



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

LARISSA DE ALMEIDA PEIXOTO FERREIRA

**EXPLORAÇÃO DA DIVERSIDADE MOLECULAR DE DERIVADOS
CUMARÍNICOS PLANEJADOS COMO MODULADORES MULTIALVO DE
RECEPTORES DE HISTAMINA H_3 , COLINESTERASES E MONOAMINA
OXIDASE-B PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

SEROPÉDICA
2026





LARISSA DE ALMEIDA PEIXOTO FERREIRA

EXPLORAÇÃO DA DIVERSIDADE MOLECULAR DE DERIVADOS CUMARÍNICOS
PLANEJADOS COMO MODULADORES MULTIALVO DE RECEPTORES DE
HISTAMINA H₃, COLINESTERASES E MONOAMINA OXIDASE-B PARA O
TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química. Área de Concentração em Química.

Orientador(a): Dr. Arthur Eugen Kümmerle

Coorientador(a): Dr. Holger Stark

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

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

F383e Ferreira, Larissa de Almeida Peixoto, 1994-
 Exploração da diversidade molecular de derivados
 cumárinicos planejados como moduladores multialvo de
 receptores de histamina H3, colinesterases e
 monoamina oxidase- B para tratamento da doença de
 alzheimer / Larissa de Almeida Peixoto Ferreira. -
 Rio de Janeiro, 2026.
 268 f.

 Orientador: Arthur Eugen Kümmerle.
 Coorientador: Holger Stark.
 Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
 Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química,
 2026.

 1. Doença de Alzheimer. 2. Receptores de histamina
 H3. 3. Colinesterase. 4. Monoamina oxidase-B. I.
 Kümmerle, Arthur Eugen, 1979-, orient. II. Stark,
 Holger, 1962-, coorient. III Universidade Federal
 Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em
 Química. IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta TFC/Dissertação/Tese, desde que seja citada a fonte

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

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

LARISSA DE ALMEIDA PEIXOTO FERREIRA

Exploração da diversidade molecular de derivados cumárinicos planejados como moduladores multialvo de receptores de histamina H3, colinesterases e monoamina oxidase-B para tratamento da doença de alzheimer

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 17/04/2026

Arthur Eugen Kummerle Dr. UFRRJ
(Orientador)

Marco Edilson Freire de Lima Dr. UFRRJ

Lídia Moreira Lima Dra. UFRJ

Luis Octávio Regasini Dr. UNESP

João Paulo dos Santos Fernandes Dr. UNIFESP



TERMO Nº 249/2026 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 04/05/2026 09:24)

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

(Assinado digitalmente em 29/04/2026 12:19)

MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ###587#8

(Assinado digitalmente em 29/04/2026 13:00)

LIDIA MOREIRA LIMA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.037-##

(Assinado digitalmente em 29/04/2026 16:56)

JOÃO PAULO DOS SANTOS FERNANDES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.238-##

(Assinado digitalmente em 18/05/2026 20:34)

LUIS OCTAVIO REGASINI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.328-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: 249, ano: 2026, tipo: **TERMO**, data de emissão: 29/04/2026 e o código de verificação: **0425814abb**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter me dado força para concluir mais uma etapa muito importante da minha vida.

Aos meus pais, Alessandra e Alessandro, que sempre lutaram para que eu pudesse me dedicar aos estudos e por sempre investirem na minha formação. Por serem meu porto seguro, sempre me apoiando nas minhas escolhas. Gostaria de agradecer também ao meu padrasto Paulo por todo o apoio nesses anos, por sempre estar presente atuando como um segundo pai.

Às minhas irmãs Lizandra e Letícia, que antes eram tão pequeninhas e hoje se tornaram mulheres inspiradoras que me apoiam, me aconselham e estão comigo em tudo.

Ao meu namorado Fábio, pelo companheirismo, por sempre estar presente, acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos dessa trajetória.

Ao meu orientador, Dr. Arthur Eugen Kümmerle, por toda a dedicação, paciência e orientação exemplar ao longo da minha vida acadêmica. Agradeço também por ser sempre acolhedor e incentivador nos momentos mais difíceis, que foram fundamentais para superar os desafios nesse processo. E, principalmente, por ter acreditado em mim quando eu mesma não acreditava, por me ajudar a realizar sonhos profissionais e pessoais. Serei eternamente grata e nunca esquecerei disso.

Ao meu coorientador, Holger Stark, por ter me aceitado na Heinrich Heine Universität Düsseldorf, por todo o apoio e pela excelente contribuição ao meu trabalho. Agradeço também ao grupo AK-Stark pela realização das atividades biológicas e pelas amizades construídas nesse processo desafiador.

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

Aos meus amigos do LaDMOL-QM, que acompanharam de perto o desenvolvimento deste trabalho e sempre me auxiliaram quando necessário. Em especial, a Lucas, Nathalia, Marina, Átila, Thiago, Luanny, Manuelle, Thais e Clara, pelos momentos compartilhados, permeados por alegrias, ansiedade e companheirismo. E aos amigos construídos ao longo deste processo, que sempre me incentivaram e estiveram presentes.

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

FERREIRA, Larissa. Síntese e avaliação de derivados cumarínicos planejados como moduladores de receptores de histamina H_3 , inibidores de colinesterase e MAO-B para o tratamento da Doença de Alzheimer. Ano de depósito. nº de folhas. 2026- Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2026

A doença de Alzheimer (DA) é considerada um transtorno neurodegenerativo multifatorial, para o qual diversos estudos têm se concentrado no desenvolvimento de compostos multialvo, visando à obtenção de terapias mais eficazes. Nesse contexto, o presente trabalho descreve a síntese e avaliação farmacológica de derivados cumarínicos funcionalizados com substituintes aromáticos, heteroaromáticos e alifáticos, planejados como compostos multialvo com potencial para modulação do receptor de histamina H_3 (H_3R), além da inibição de colinesterases (ChEs) e da monoamina oxidase B (MAO-B), como estratégia terapêutica para a modulação da DA. A síntese dos compostos foi organizada em cinco séries distintas, baseadas em variações estruturais do núcleo cumarínico. Para a obtenção das moléculas alvo foram empregadas metodologias clássicas, como as reações de Knoevenagel, Pechmann e Perkin, além de reações de acoplamento cruzado, como Suzuki–Miyaura e Buchwald–Hartwig, permitindo a introdução dos substituintes desejados. Ao todo, foram sintetizados trinta e seis compostos finais, os quais foram submetidos à avaliação farmacológica frente ao H_3R , ChE e MAO-B, além de ensaios de citotoxicidade em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Os compostos sintetizados apresentaram resultados promissores, com afinidade pelo hH_3R variando entre 12 e 299 nM, inibição das ChEs com valores de CI_{50} entre 300 e 5000 nM para AChE e entre 647 e 7000 nM para BChE, além de inibição seletiva frente à MAO-B, com valores de CI_{50} entre 70 e 4521 nM. Adicionalmente, os compostos não apresentaram citotoxicidade significativa em células SH-SY5Y, demonstrando viabilidade celular superior a 90% na concentração de 10 μ M. Com base nesses resultados, foram realizados estudos de relação estrutura–atividade (SAR), bem como avaliações *in silico* por docking molecular e predição de propriedades farmacocinéticas. Dentre os compostos avaliados, foi identificado o composto multialvo promissor **51n** (hH_3R K_i = 163 nM; $eeAChE$ CI_{50} = 74 nM; MAO-B CI_{50} = 75,6 nM). Além disso, os compostos **61e**, **61f**, **75a** e **75b** apresentaram excelente atividade dual frente ao hH_3R e $eeAChE$, com valores na faixa de um a dois dígitos nanomolar. Destaca-se ainda o composto **61c**, que apresentou maior seletividade para o hH_3R (K_i = 12 nM), associada a uma substituição estrutural ainda não descrita na literatura. Os resultados obtidos demonstram o potencial dos derivados cumarínicos desenvolvidos como candidatos promissores para a modulação multialvo da doença de Alzheimer, contribuindo para o avanço no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Cumarinas, multialvo, colinesterase, Monoamina oxidase-B, receptores de histamina H_3

ABSTRACT

FERREIRA, Larissa. Synthesis and evaluation of coumarin derivatives designed as histamine H₃ receptor modulators, cholinesterase inhibitors, and MAO-B inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. Year of submission. Number of pages. 2026. Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2026.

Alzheimer's disease (AD) is considered a multifactorial neurodegenerative disorder, for which numerous studies have focused on the development of multitarget compounds aiming at more effective therapeutic strategies. In this context, the present work describes the synthesis and pharmacological evaluation of coumarin derivatives functionalized with aromatic, heteroaromatic, and aliphatic substituents, designed as multitarget ligands with potential to modulate the histamine H₃ receptor (H₃R), as well as to inhibit cholinesterases (ChEs) and monoamine oxidase B (MAO-B), as a therapeutic strategy for the modulation of AD. The synthesis of the compounds was organized into five distinct series, based on structural variations of the coumarin core. Classical synthetic methodologies were employed for the preparation of the target molecules, including Knoevenagel, Pechmann, and Perkin reactions, as well as cross-coupling reactions such as Suzuki–Miyaura and Buchwald–Hartwig, enabling the introduction of the desired substituents. In total, thirty-six final compounds were synthesized and subjected to pharmacological evaluation against H₃R, ChEs, and MAO-B, in addition to cytotoxicity assays in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. The synthesized compounds showed promising results, displaying affinity for *h*H₃R ranging from 12 to 299 nM, ChE inhibition with IC₅₀ values between 300 and 5000 nM for AChE and between 647 and 7000 nM for BChE, as well as selective inhibition toward MAO-B, with IC₅₀ values ranging from 70 to 4521 nM. Furthermore, the compounds did not show significant cytotoxicity in SH-SY5Y cells, maintaining cell viability above 90% at 10 μM. Based on these results, structure–activity relationship (SAR) studies were conducted, along with in silico molecular docking analyses and prediction of pharmacokinetic properties. Among the evaluated compounds, the multitarget compound 51n was identified as a promising candidate (*h*H₃R K_i = 163 nM; *ee*AChE IC₅₀ = 74 nM; MAO-B IC₅₀ = 75.6 nM). In addition, compounds **61e**, **61f**, **75a**, and **75b** exhibited excellent dual activity toward *h*H₃R and *ee*AChE, with potencies in the one- to two-digit nanomolar range. Notably, compound **61c** showed higher selectivity for *h*H₃R (K_i = 12 nM), associated with a structural substitution not previously reported in the literature. Overall, the obtained results demonstrate the potential of the developed coumarin derivatives as promising multitarget candidates for Alzheimer's disease modulation, contributing to the advancement of new therapeutic strategies for neurodegenerative disorders.

Keywords: Coumarins, multitarget ligands, cholinesterase, monoamine oxidase B, histamine H₃ receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) O sistema colinérgico devido a redução da produção de acetiltransferase (AChT), há redução na disponibilidade de acetilcolina (ACh). Os inibidores da colinesterase atuam elevando sua concentração sináptica; B) O excesso de glutamato provoca aumento do influxo de cálcio e excitotoxicidade neuronal; C) agonistas dos receptores GABA contribuem para o aumento da concentração do neurotransmissor inibitório GABA; D) inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B) elevam a concentração de monoaminas, enquanto os receptores de histamina H ₃ (H ₃ R), atuando como heterorreceptores, auxiliam no aumento da concentração dos principais neurotransmissores relacionados à cognição, como acetilcolina (ACh), dopamina e GABA (adaptado de YANG; ZOU; WANG, 2023 – imagem gerada pelo Biorender).	3
Figura 2. Representação da biossíntese e da neurotransmissão nervosa da acetilcolina (Imagem produzida no Biorender).....	5
Figura 3. A) Proposta do mecanismo de hidrólise da acetilcolina no sítio catalítico das ChEs. B) Sítio ativo da acetilcolinesterase humana (<i>hAChE</i>) (PDB: 4EY4). C) Sítio ativo da butirilcolinesterase humana (<i>hBChE</i>) (PDB: 1P0I) (adaptado de GOULART, P. N. <i>et al.</i> , 2021).	6
Figura 4. Comparação da biossíntese de glutamato em um cérebro normal e na DA (adaptado de BURKKE et al., 2020).....	7
Figura 5. Desaminação oxidativa da dopamina catalisada por MAO-B (adaptado de LV et al., 2023).....	8
Figura 6. A) Ilustração das vias de modulação do H ₃ R. A ativação do H ₃ R como autorreceptor regula a síntese de histamina que ocorre a partir da L-histidina catalisada pela histidina descarboxilase (HDC). Além disso, o H ₃ R está presente em neurônios pré-sináptico de outros neurotransmissores, atuando como heterorreceptor e modulando a liberação desses neurotransmissores; B) vias de sinalização associadas ao H ₃ R: ativação da Fosfolipase A2 (PLA2), inibição da Adenilato Ciclase (AC), Ativação da via Fosfoinositol 3-quinase/ Proteína Quinase B (PI3K/AKT) que leva a inibição Glicogênio Sintetase Quinase 3 beta (GSK-3β) (THOMAS et al., 2024).	10
Figura 7. Ilustração do processamento da proteína precursora de amiloide (PPA). Existem duas vias de processamento, a clivagem normal (não amiloidogênica) e a clivagem anormal (amiloidogênica) (Imagem criada no Biorender).	11
Figura 8. Comparação entre um neurônio saudável (A) e após os danos celulares (B) ocasionando a hiperfosforilação da pTau. (Adaptado de ASHISH et al., 2019).....	13
Figura 9. A figura ilustra os principais fatores envolvidos na progressão da doença de Alzheimer (DA). A fuga de elétrons da cadeia transportadora de elétrons durante a respiração celular, associada ao hipometabolismo da glicose, constitui uma das principais fontes de produção de EROs. O dano ao DNA mitocondrial induzido por EROs compromete ainda mais as funções mitocondriais, incluindo a produção de energia essencial para o funcionamento cerebral, resultando em aumento da neurodegeneração e declínio cognitivo (adaptado de DHAPOLA et al., 2024).	14
Figura 10. Ilustração da inflamação na doença de Alzheimer (DA) no estágio 3. A agregação de β-A e ENF promove a ativação das células da glia, incluindo astrócitos e micrógli,	

desencadeando a liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios e favorecendo a infiltração de monócitos mielóides. Processos fisiológicos, como a fagocitose de peptídeos e proteínas, mediada por proteínas do sistema complemento, anticorpos e receptores de transmembrana como CD33 e TREM2, contribuem para a disfunção sináptica e a morte neuronal. (Adaptado de CUELLO et al., 2017).....	15
Figura 11. Medicamentos aprovados pelo FDA para o tratamento da DA. A) Monoterapia com Inibidores de ChE: Tacrina (1) e Rivastigmina (3) (inibidores de AChE e BChE); Donepezila (4) e Galantamina (5) (inibidores seletivos de AChE). B) Memantina, antagonista não competitivo de receptores NMDA. C) Terapia em combinação com Inibidor de ChE e antagonista de NMDA. D) Tratamento comportamental atuando na neurotransmissão de serotonina, dopamina e norepinefrina.	17
Figura 12. (A) Abordagens terapêuticas recentes na DA. (B) Inibidores enzimáticos seletivos, antagonista H ₃ R e , recentemente, as quimeras direcionadas à fosforilação (PhosTAC) têm ganhado um grande enfoque, como o composto 13 , um PhosTAC dual com eficiência de degradação (CD ₅₀) frente a pTau e alfa-sinucleína (α -syn).....	19
Figura 13. Comparação entre o tratamento atual da DA e a estratégia de MTDLs.	20
Figura 14.	21
Figura 15. Compostos dual e multialvo derivados do farmacóforo da donepezila, atuando como inibidores de AChE, ligantes/ antagonista de H ₃ R, inibidores de MAO-B e BACE-1.	23
Figura 16. A) Estrutura das benzopironas. B) Métodos sintéticos mais utilizados na literatura para a síntese de cumarinas conhecidas como reação ou condensação de Knoevenagel, Pechmann, Perkin, Reformatsky, Houben-Hoesch e Wittig.	24
Figura 17. Derivados cumarínicos multialvo promissores para DA	26
Figura 18. Resumo dos processos de síntese aplicados à obtenção dos derivados cumarínicos aplicados a cada série.	29
Figura 19. A) Representação esquemática dos deslocamentos químicos (δ , ppm) dos prótons nos compostos finais 51a-w em RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 500MHz). (B) Espectro expandido do composto 51f , destacando a atribuição detalhada dos principais sinais aromáticos e da cadeia alquílica para exemplificação.	40
Figura 20. Representação esquemática dos deslocamentos químicos (δ , ppm) dos prótons do derivado 7-aminoalcoxi-cumarínico 54c em RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 500MHz).	43
Figura 21. Análise por espectrometria de massas em solução no TLC/CMS (ionização por eletrospray), evidenciando os íons principais do reagente metoxilado (57a-c) e dos produtos fenólicos demetilados (58a-c). Os principais sinais de confirmação por RMN ¹ H, com deslocamentos característicos para -OMe e -OH aromático, bem como os sinais de confirmação da ciclização do núcleo cumarínico também são indicados.	48
Figura 22. Isômeros de imidazopiridinas	54
Figura 23. A) principais deslocamento químico de confirmação dos intermediários 70 , 71 e 73 das etapas 1, 2 e 3, respectivamente. B) Espectro de RMN de ¹ H para confirmação do produto 75c em DMSO-d ₆ (500 MHz)	57
Figura 24. Ensaio de ligação com radioligante. 1) incubação, 2) separação do radioligante livre e o radioligante-receptor, 3) detecção no contador de cintilância com auxílio do líquido cintilador gera os gráficos A, B e C (4). A) A ligação do radioligante-receptor ao atingir o equilíbrio (B ₀) e com concentrações cresce.....	62

Figura 25. (A) Análise 3D do receptor H ₃ R (PDB 7F61). O sítio ortostérico está destacado em azul, o colesterol (CLR) em verde ocupa o sítio alostérico, e a tríade conservada de interação com colesterol (Trp399, Trp402 e Tyr91) aparece em dourado. (B) Principais interações entre os compostos avaliados com o sítio ortoestérico do H ₃ R. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	68
Figura 26. A) Análise das principais interações moleculares entre o composto 75b (rosa) no sítio ortoestérico do hH ₃ R. B) Análise da sobreposição do composto 75b (rosa) e Pitolisant (laranja) e a cavidade do hH ₃ R. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	70
Figura 27. A) Análise das principais interações moleculares entre o composto 61e (marsala) Cno sítio ortoestérico do hH ₃ R. B)Análise da sobreposição do composto 61a (amarelo) e o composto 61e (marsala) na cavidade do hH ₃ R. C) Análise da sobreposição do composto 61b (roxo) e o composto 61e (marsala) na cavidade do hH ₃ R. D) Análise da sobreposição do composto 61f (salmão) e o composto 61e (marsala) na cavidade do hH ₃ R. E: Análise da sobreposição de todos os compostos cavidade do hH ₃ R. F: Estruturas e atividades dos compostos avaliados frente ao hH ₃ R. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).....	71
Figura 28. Método adaptado de Ellman para avaliação da atividade enzimática dos compostos finais frente a colinesterases	73
Figura 29. Representação dos tipos de inibidores enzimáticos.	76
Figura 30. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em EeAChE e EqBChE dos compostos 61e , 75a e 64b	78
Figura 31. Análise das principais interações moleculares entre o composto 51n (laranja) na cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	81
Figura 32. A) Sobreposição de encaixe dos compostos 51n (laranja), 61c (verde), 61d (marrom rosê) e 64 (cinza) na cavidade enzimática da AChE; B) interações moleculares entre o composto 61c (verde) na cavidade enzimática da AChE; C) interações moleculares entre o composto 61d (marrom rosê) na cavidade enzimática da AChE; D) interações moleculares entre o composto 64 (cinza) na cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).....	81
Figura 33.	83
Figura 34. A) Análise da sobreposição dos compostos 61e (verde) e 61f (verde claro) na cavidade da eqBChE; B) Principais interações do composto 61e (verde) na cavidade da eqBChE. Figura gerada com PyMOL 3.1.3.1 (Schrödinger, LLC).....	84
Figura 35. Análise da sobreposição dos compostos 51n (laranja) e 75a (verde) na cavidade da eqBChE. Figura gerada com PyMOL 3.1.3.1 (Schrödinger, LLC).....	84
Figura 36. Reação de oxidação da Tiramina catalisada pelas isoformas MAO-A e MAO-B produzindo H ₂ O ₂ . O H ₂ O ₂ ao reagir com corante Ampliflu red é transformado no composto fluorescente, resorufina (86).....	85
Figura 37.	88
Figura 38. Análise das principais interações moleculares e sobreposição do composto 51m (lilás) e o composto 51n (verde) no sítio ativo da hMAO-B. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).	89

Figura 39. Fluxograma do ensaio experimental de neurotoxicidade em células de neuroblastoma dopaminérgico (SH-SY5Y).....	90
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físicas e analíticas dos compostos dos intermediários 50a-w da Série 1	36
Tabela 2. Propriedades físicas e analíticas dos produtos 51a-w da Série 1	38
Tabela 3. Propriedades físicas e analíticas dos compostos 52 e 54a-e da Série 2	41
Tabela 4. Resultados de afinidade frente ao receptor humano de histamina H₃ (hH₃R) da série 1 e 2	65
Tabela 5. Resultados de afinidade frente ao receptor humano de histamina H₃ (hH₃R) da série 3, 4 e 5	66
Tabela 6. Score e valores de RMSD para a validação por redocking do hH₃R	67
Tabela 7. Resultados de inibição enzimática frente as colinesterases	74
Tabela 8. Parâmetros cinéticos dos compostos 61e, 75a e 64 em AChE e BChE	79
Tabela 9. Score e valores de RMSD para a validação por redocking eqBChE por similaridade	82
Tabela 10. Resultados de inibição enzimática frente as isoformas MAO-A e MAO-B	86
Tabela 11. Score e valores de RMSD para a validação por redocking da MAO-B	87
Tabela 12. Resultados de viabilidade celular de todos os compostos sintetizados frente as células de neuroblastoma SH-SY5Y a 10µM	91
Tabela 13.	93
Tabela 14. Principais dados obtidos no docking molecular no programa GOLD (versão 5.6, CCDC)	124

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Planejamento estrutural dos derivados cumarínicos atuando como ligantes de H ₃ R e com atividades adicionais como inibidores de ChE e MAO-B.	28
Esquema 2. Análise retrossintética para obtenção dos derivados cumarínicos das séries 1 e 2	30
Esquema 3. Análise retrossintética para obtenção dos derivados cumarínicos da série 3 e 4	31
Esquema 4. Análise retrossintética para obtenção dos derivados cumarínicos da série 5 separados pela rota 1 e 2.	32
Esquema 5. A- Síntese e B- esquema de intermediários proposto para os derivados 3-bromocumarínicos 48a-c	33
Esquema 6. Procedimentos experimentais dos derivados 51a-z e mecanismo proposto para os intermediários 50a-z via reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura.	35
Esquema 7. Procedimentos experimentais e esquema de intermediários proposto via reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig para os produtos 54a-e	41
Esquema 8. Etapas reacionais proposta para a síntese dos derivados 58a-f	44
Esquema 9. A- Avaliação de procedimentos para a síntese das 3-fenilcumarinas da série 3, B- monitoramento por TLC-CMS (Expression® da Advion Interchim Scientific), C- Avaliação do escopo reacional na obtenção dos derivados 57a-h desejados (espectros Figuras S114-S121 do anexo 7.2).	45
Esquema 10. Esquema de intermediários proposto para os derivados 57a-c via condensação de Perkin modificada.	47
Esquema 11. Procedimento experimental da síntese dos compostos 58a-c , cromatograma em CDD (Hexano:Acetato de etila 70:30) e esquema de intermediários proposto. Os espectros dos intermediários 58a-c são encontrados nas Figuras S125-S127 do anexo 7.2.	49
Esquema 12. Procedimento experimental, rendimento e ponto de fusão dos compostos 61a-f	50
Esquema 13. A) mecanismo proposto para síntese dos compostos 61a-f via O-alkilação catalizada por KI. B) diferença entre os deslocamentos químicos da posição H4 da cromenona quando altera as substituições em seu núcleo. C) RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do composto 61b	51
Esquema 14. Procedimento experimental da síntese dos compostos 64 e esquema de intermediários proposto para o intermediário 63 via reação clássica de Pechmann (Espectros nas Figuras S140-S143 do anexo 7.2).	53
Esquema 15. Síntese dos derivados 75a-c , dividida em cinco etapas reacionais para obtenção das cumarinas imidazo[1,2-a]piridínicas.	54
Esquema 16. Mecanismo proposto para síntese do intermediário 3-ceto-7-hidroxycumarina (69) via reação de Knoevenagel.	56
Esquema 17. Síntese do derivado 75d , dividida em quatro etapas reacionais.	58
Esquema 18. Proposta de esquema de intermediários para a síntese do intermediário 78 , seguido da formação do produto 75d	59
Esquema 19. Validação do planejamento racional dos compostos a partir da comparação das atividades farmacológicas dos compostos 80 e 81 com o produto 61n	60

Esquema 20. Interferência do tamanho do anel aromático da região arbitrária na atividade frente hH ₃ R.	63
Esquema 21. Fatores que interferem no aumento da potência na atividade frente ao H ₃ R. A homologação de 3 metilenos e a substituição por substituintes mais rígidos são cruciais para melhor atividade.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

[S] – Concentração de substrato
5HT – serotonina
 β -A – beta-amiloide
AC – Adenilato Ciclase
Acetil-CoA - acetilcoenzima A
ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
AChT – acetiltransferase
ACTI – Iodeto de acetiltiocolina
AKT – Proteína Quinase B
ALDH – aldeído desidrogenase
AMPA – receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
APP – Proteína precursora do amiloide (do inglês *amyloid precursor protein*)
ATP – trifosfato de adenosina
BACE-1
BBB – Barreira hematoencefálica (do inglês *blood-brain barrier*)
BChE – Butirilcolinesterase
BCTI – Iodeto de butiriltiocolina
Beta-secretase
cAMP – Adenosina monofosfato cíclico (do inglês *cyclic adenosine monophosphate*)
cAMP – monofosfato de adenosina cíclico
CAS – Sítio catalítico aniônico (*catalytic anionic site*)
CCDA – Cromatografia em camada delgada analítica
CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
cGMP – Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (do inglês *cyclic guanosine monophosphate*)
ChAT – enzima colina acetiltransferase
ChE – Colinesterases
CHT1 - transportador de colina de alta afinidade
CHT1 - transportador de colina de alta afinidade
DA – Doença de Alzheimer
DABCO - 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido deuterado
DO – dopamina
DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EeAChE – Acetilcolinesterase de enguia elétrica
ENFs – Emaranhados neurofibrilares
EqBChE – Butirilcolinesterase de soro equino
ERN – espécies reativas de nitrogênio
ERO – espécies reativas de oxigênio
EAATs – Transportadores de Aminoácidos Excitatórios (do inglês *Excitatory Amino Acid Transporters*).
FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês *Food and Drug Administration*)
GPCRs – Receptores acoplados à proteína G (do inglês *G protein-coupled receptors*)
GSK-3 β – Glicogênio Sintetase Quinase 3 beta
CI₅₀ – Concentração inibitória média
IgG1 - anticorpos monoclonais de imunoglobulinas G1 recombinantes
IM - Imidazo[1,2-a]piridina

IS – Índice de Seletividade
J – Constante de acoplamento
K_i – Constante de afinidade para inibição do tipo competitiva
K_i' – Constante de afinidade para inibição do tipo não-competitiva
K_m – Constante de Michaelis-Menten
MAO -Monoamina oxidase
MTDLs – Ligantes direcionados a múltiplos alvos (do inglês *Multi-Target Directed Ligands*)
NA – noradrenalina
NMDA – receptor *N*-metil-*D*-aspartato
NTM – Núcleo tuberomamilar
PAS –Sítio aniônico periférico (do inglês *peripheral anionic site*)
PDB – Protein Data Bank
Ph – Fenila
pH – Potencial Hidrogeniônico
PKA – Proteína Quinase A
ppm – partes por milhão
pTau – proteína Tau
PI3K – Fosfoinositol 3-quinase
RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SEAr – Substituição Eletrofílica Aromática
S_N2 – Substituição Nucleofílica Bimolecular
SNC – Sistema nervoso central
SNC – Sistema nervoso central
TLC-CMS - leitor de TLC acoplado ao espectrômetro de massas compacto
TMD - terapia modificadora da doença
VACHT - transportador vesicular de acetilcolina
V_{max} – Velocidade máxima
WHO – Organização Mundial de Saúde (do inglês *World Health Organization*)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Demências e a Doença de Alzheimer	1
1.2.	Neuropatologia da Doença de Alzheimer.....	2
1.2.1.	Desregulação da Neurotransmissão	2
1.2.1.1.	Neurotransmissão colinérgica	3
1.2.1.2.	Neurotransmissão glutamatérgica	6
1.2.1.3.	Neurotransmissão dopaminérgica	8
1.2.1.4.	Neurotransmissão histaminérgica.....	9
1.2.2.	Formação de oligômeros de β-amilóide	10
1.2.3.	Hiperfosforilação da proteína tau	12
1.2.4.	Estresse Oxidativo e a disfunção mitocondrial	13
1.2.5.	Neuroinflamação.....	14
1.3.	Tratamento da DA	15
1.3.1.	Tratamento sintomático e comportamental.....	16
1.3.2.	Terapias modificadoras da doença	17
1.3.3.	Abordagens terapêuticas recentes.....	18
1.4.	Cumarinas.....	23
2.	OBJETIVOS E PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	26
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1.	Planejamento sintético das séries dos derivados cumarínicos	29
3.1.1.	Análise retrossintética das séries 1 e 2	29
3.1.2.	Análise retrossintética das séries 3 e 4	30
3.1.3.	Análise retrossintética da série 5.....	31
3.2.	Síntese dos intermediários chave 3-Br-cumarinas (48a-c)	32
3.3.	Síntese dos derivados 51a-w - série 1	34
3.4.	Síntese dos derivados 3-(N-anilino) 7-aminoalcoxi-cumarínicos (54a-e) – série 2 40	
3.5.3.	O-Alquilação dos derivados 58a-c (Etapa 3)	49
3.6.	Síntese do derivado 4-fenil-7-piridinilpropoxi-cumarina (64) – série 4	52
3.7.	Síntese das 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-cumarinas.....	53
3.7.1.	Síntese das 3-(imidazo[1,2-a]piridinas)-7-aminoalcoxi-cumarinas (71a-c)54	
3.7.2.	Síntese da 3-(etilcarboxilato)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)-2H-cromen-2-ona (75d) 57	
3.8.	Ensaio <i>in vitro</i>	59
3.8.1.	Avaliação <i>in vitro</i> da afinidade frente ao receptor de Histamina H₃	60
3.8.2.	Avaliação <i>in vitro</i> de inibição enzimática frente as colinesterases	72
3.8.4.	Ensaio de neurotoxicidade em células de neuroblastomas SH-SY5Y.....	89

3.9.	Avaliação <i>in silico</i> das propriedades farmacocinéticas	91
4.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	94
5.	PARTE EXPERIMENTAL.....	97
5.1.	Síntese.....	97
5.1.1.	Síntese dos intermediários chave 48a-c	98
5.1.2.	Síntese dos derivados 51a-z (série 1).....	99
5.1.3.	Síntese dos derivados 3-(<i>N</i> -anilino) 7-aminoalcoxi-cumarínicos (54a-e) – série 2.....	109
5.1.4.	Síntese dos derivados 3-fenilcumarinas substituídas com piperidinilpropoxila em diferentes posições (58a-f) – série 3	111
5.1.5.	Síntese do derivado 4-fenil-7-piridinilpropoxi-cumarina (64) – série 4	115
5.1.6.	Síntese das 3-(imidazo[1,2- <i>a</i>]piridinas)-cumarinas (75a-c) – série 5	116
5.1.7.	Síntese das 3-(etilcarboxilato)imidazo[1,2- <i>a</i>]piridin-2-il)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (75d) – Série 5	119
5.2.	Atividade biológica.....	121
5.2.1.	Avaliação dos Derivados Quanto à Atividade Anticolinesterásica realizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (DE SOUZA et al., 2019).....	121
5.2.2.	Afinidade nos receptores de histamina H ₃ realizado na Universidade Heinrich Heine, Düsseldorf, Alemanha (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2017).....	122
5.2.3.	Avaliação dos Derivados Quanto à Atividade inibitória MAO A/B realizado na Universidade Heinrich Heine, Düsseldorf, Alemanha (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2017).....	122
5.2.3.	Avaliação de neurotoxicidade frente as células de neuroblastoma SH-SY5 realizado na Universidade Heinrich Heine, Düsseldorf, Alemanha (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2017).....	123
5.2.4.	Ensaio de MTT e viabilidade celular realizado na Universidade Heinrich Heine, Düsseldorf, Alemanha (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2017).....	123
5.3.	Modelagem Molecular	124
6.	REFERÊNCIAS	125
7.1.	ANEXO 2 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H e ¹³ C.....	133
7.32.	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa (CL-EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	214
7.3.	GRÁFICOS “ <i>BOILED-EGG</i> ” E DE RADAR	247

1. INTRODUÇÃO

1.1. Demências e a Doença de Alzheimer

A demência, também conhecida como transtorno neurocognitivo, é um conjunto de síndromes de origem crônica e progressiva, que se agrava com o envelhecimento. A demência está presente na história muito antes de receber essa denominação. Por volta de 2000 a.C., os egípcios já percebiam a perda de memória associada ao envelhecimento. Posteriormente, o tema foi abordado por diversos pensadores e médicos, como o filósofo Pitágoras (570–495 a.C.), o médico grego Hipócrates (460–370 a.C.), que identificou que lesões cerebrais causavam transtornos cognitivos, e o filósofo Marcus Tullius Cicero (106–43 a.C.). Ao longo do tempo, a demência foi debatida sempre associada ao envelhecimento, caracterizando-se por sintomas como perda de memória, desorientação, alucinações e delírios. Na Idade Moderna, o diagnóstico de demência foi aceito em 1797 pelo médico Philippe Pinel (1745–1826) e, posteriormente, a demência senil e pré-senil foram classificadas por Emil Kraepelin (1856–1926) (YANG; LEE; YOUNG, 2016).

Existem mais de 140 tipos de demência, que podem estar relacionadas a fatores de risco como problemas auditivos, hipertensão, diabetes, depressão, tabagismo, sedentarismo e também a fatores genéticos. Entre as mais incidentes estão a doença de Alzheimer (DA), responsável por cerca de 70% dos casos, a demência vascular, a demência com corpos de Lewy e a demência frontotemporal (WHO, 2025; JONES *et al.*, 2025). Os casos menos comuns incluem a doença de Parkinson, a doença de Huntington e a demência por traumatismo craniano repetitivo (HOBSON, 2025; LAMPTEY *et al.*, 2025).

A doença DA foi assim denominada por Emil Kraepelin em 1915, em homenagem ao psiquiatra alemão Alois Alzheimer, que descreveu a doença pela primeira vez em 4 de novembro de 1906 (Kraepelin, 1915). A descrição baseou-se em sua paciente Auguste Deter, de 51 anos, que desde 1901 apresentava comprometimento cognitivo, incluindo perda de memória, alucinações e delírios (MÖLLER; GRAEBER, 1998). Após seu falecimento em 8 de abril de 1906, Alzheimer identificou em seu cérebro o acúmulo de placas amiloides, emaranhados neurofibrilares e alterações arterioscleróticas, características que são consideradas os principais sinais patológicos da doença (FERRI *et al.*, 2005).

A DA é clinicamente caracterizada como um transtorno neurodegenerativo progressivo irreversível, associado à perda profunda de memória e disfunção cognitiva. Observa-se o comprometimento progressivo das atividades da vida diária, com uma variedade

de sintomas neuropsiquiátricos e alterações comportamentais, que geralmente se manifestam a partir dos 60 anos (VATANABE; MANZINE; COMINETTI, 2020). Do ponto de vista neuropatológico, a doença é caracterizada pelo acúmulo de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares, que levam à morte neuronal e, com a progressão da doença, à atrofia cerebral (DE SÁ CAVALCANTI; ENGELHARDT, 2012; RAWAT *et al.*, 2022).

A DA afeta cerca de 10% dos indivíduos com mais de 65 anos e cerca de 40% das pessoas com mais de 80 anos. Devido às mudanças significativas na expectativa de vida, estima-se que 25% da população terá mais de 65 anos até 2050, aumentando consideravelmente a prevalência da doença em razão do envelhecimento da população global (WHO, 2024; ALZ, 2025). Segundo a Associação Internacional de Alzheimer (ADI, 2019), 55 milhões de pessoas em todo o mundo estão vivendo com demência e estima-se que haverá 139 milhões em 2050 com um custo para a sociedade de 1 trilhão de dólares por ano.

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, cerca de 8,5% da população com 60 anos ou mais convive com a doença, o que representa aproximadamente 1,8 milhão de casos. A projeção indica que até 2050 esse número poderá aumentar para 5,7 milhões de pessoas diagnosticadas no país. Contudo, esses dados ainda são subestimados e apresentam dificuldades para precisão, devido ao fato de que muitas pessoas não recebem diagnóstico correto ou sequer procuram atendimento médico em função de dificuldades financeiras e sociais (SBGG, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

1.2. Neuropatologia da Doença de Alzheimer

Assim como muitos distúrbios do sistema nervoso central, a DA é uma condição multifatorial, na qual diversos processos biológicos contribuem para a neurodegeneração. Entre esses processos encontram-se a desregulação da neurotransmissão, especialmente a colinérgica; a formação de oligômeros de β -amilóide (β -A); a hiperfosforilação da proteína tau (pTau); o estresse oxidativo difuso no cérebro; a neuroinflamação; a desregulação do cálcio; a deficiência e a distribuição alterada das mitocôndrias; a toxicidade sináptica; e problemas na homeostase metálica, os quais serão discutidos adiante (PATHAK; KABRA, *et al.*, 2024, KAMILA, *et al.*, 2025).

1.2.1. Desregulação da Neurotransmissão

A DA possui três principais características já mencionadas anteriormente: a agregação de peptídeos beta-amiloides (β -A), a agregação da proteína tau (pTau) e a perda neuronal. A perda neuronal provoca desregulação da neurotransmissão, mesmo antes da morte neuronal propriamente dita (FRANCIS *et al.*, 2005). Isso ocorre porque os neurotransmissores são

sintetizados nos neurônios pré-sinápticos e transmitem mensagens através das sinapses para o neurônio pós-sináptico. Com a perda neuronal, a produção e liberação dos neurotransmissores podem diminuir ou aumentar. A Figura 1 ilustra os principais neurotransmissores alterados na DA, bem como os alvos para modulação da atividade neuronal (YANG; ZOU; WANG, 2023).

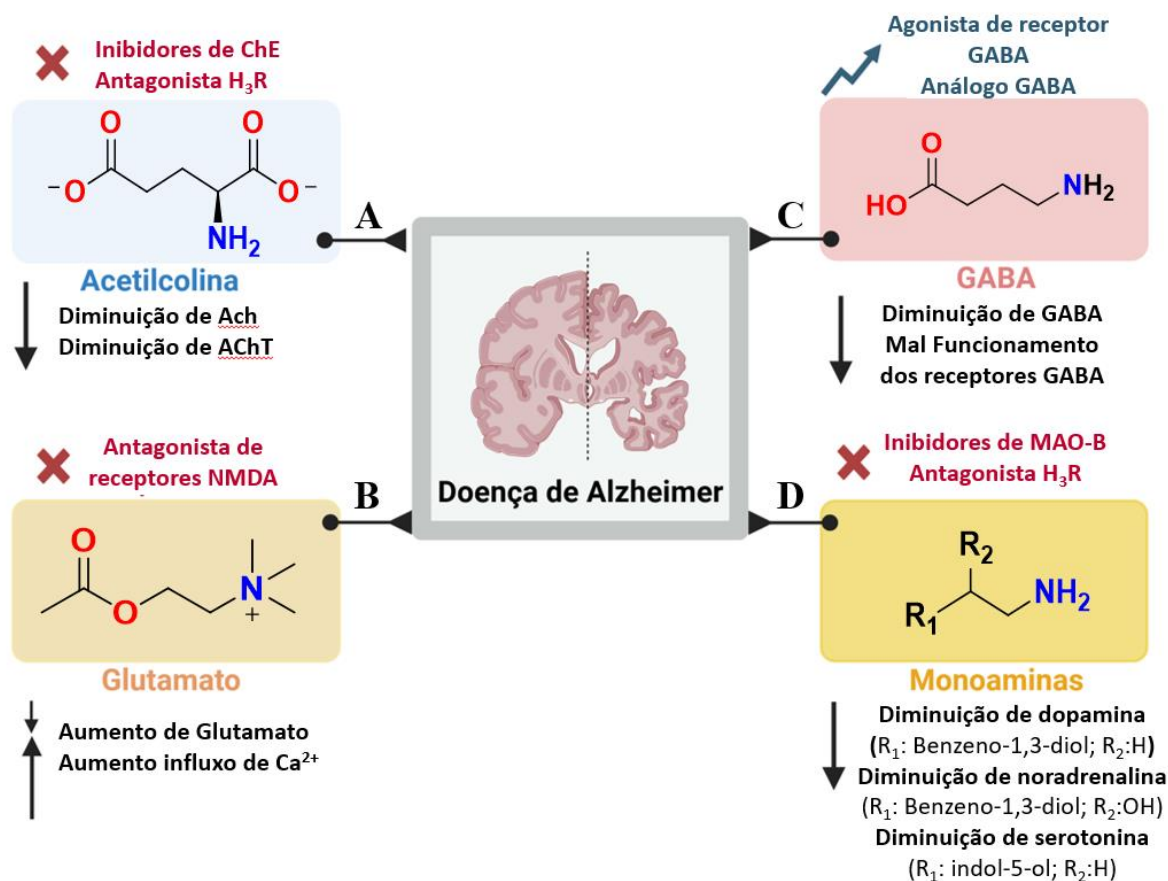


Figura 1. A) O sistema colinérgico devido a redução da produção de acetiltransferase (AChT), há redução na disponibilidade de acetilcolina (ACh). Os inibidores da colinesterase atuam elevando sua concentração sináptica; B) O excesso de glutamato provoca aumento do influxo de cálcio e excitotoxicidade neuronal; C) agonistas dos receptores GABA contribuem para o aumento da concentração do neurotransmissor inibitório GABA; D) inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B) elevam a concentração de monoaminas, enquanto os receptores de histamina H₃ (H₃R), atuando como heterorreceptores, auxiliam no aumento da concentração dos principais neurotransmissores relacionados à cognição, como acetilcolina (ACh), dopamina e GABA (adaptado de YANG; ZOU; WANG, 2023 – imagem gerada pelo Biorender).

1.2.1.1. Neurotransmissão colinérgica

O sistema colinérgico está envolvido em processos fisiológicos importantes relacionados à consciência, atenção, aprendizagem, memória e resposta ao estresse (WANG et al., 2016; CASTRO et al., 2017). Muitos estudos mostram que lesões neuronais, como, por exemplo, a degeneração e perda de transmissão no hipocampo, córtex frontal, amígdala e outras regiões, levam a problemas cognitivos e falhas nesses processos fisiológicos. Por outro lado,

fatores que aumentam a facilidade da transmissão da ação colinérgica com auxílio de inibidores de colinesterase podem melhorar esses processos (FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2016).

A acetilcolina (ACh) foi o primeiro neurotransmissor a ser identificado por Henry Hallett Dale em 1914 (TODMAN, 2008), é considerado um mediador químico de sinapses no sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico (SNP) e na junção neuromuscular. A sua liberação ativa receptores promovendo a estimulação ou inibição dependendo do tipo de receptor e sua localização, constituindo assim, a neurotransmissão colinérgica (FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2016; HAAKE *et al.*, 2024).

A ACh é sintetizada no citosol dos neurônios pré-sinápticos a partir de dois precursores: a colina, proveniente de fontes alimentares e intraneuronais, e a acetilcoenzima A (Acetil-CoA), formada a partir da glicose nas mitocôndrias dos neurônios (STAHL, 2014). Esses dois substratos interagem através da ação da enzima acetiltransferase (ChAT) localizada principalmente no citoplasma das terminações nervosas colinérgicas. Após a sua síntese, a ACh é transportada para as vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). A despolarização, processo causado pela abertura de canais iônicos, promove a liberação da ACh para a fenda sináptica, onde é rapidamente é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), em acetato e colina, que é retomada no neurônio colinérgico pré-sináptico pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1). A ACh pode também se ligar a receptores muscarínicos e nicotínicos, levando a uma resposta estimulatória ou inibitória dependendo do tipo e função dos receptores (Figura 2) (STANCIU *et al.*, 2019; HAAKE *et al.*, 2024)

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

Em um cérebro saudável, a AChE responde por 80% da atividade neuronal, enquanto a BChE responde pelos 20% restantes. Já no caso da DA avançada, a atividade da AChE pode ser reduzida à 55-67% dos níveis normais em regiões cerebrais específicas, enquanto a atividade da BChE aumenta em cerca de 165%. Essas alterações na proporção de AChE para BChE em relação à progressão da doença mudam o papel de apoio da BChE na regulação dos níveis da

ACh, tornando-se uma enzima de crescente importância funcional. Também há evidências de que a BChE pode facilitar a formação de placas senis, estando associada ao acúmulo de placas amiloides (MARUCCI et al., 2021; PATHAK; KABRA, 2024). Devido a isso, a regulação dos níveis de ACh a partir dessas enzimas também é de extrema importância no desenvolvimento e na progressão da DA (VENTURA *et al.*, 2010).

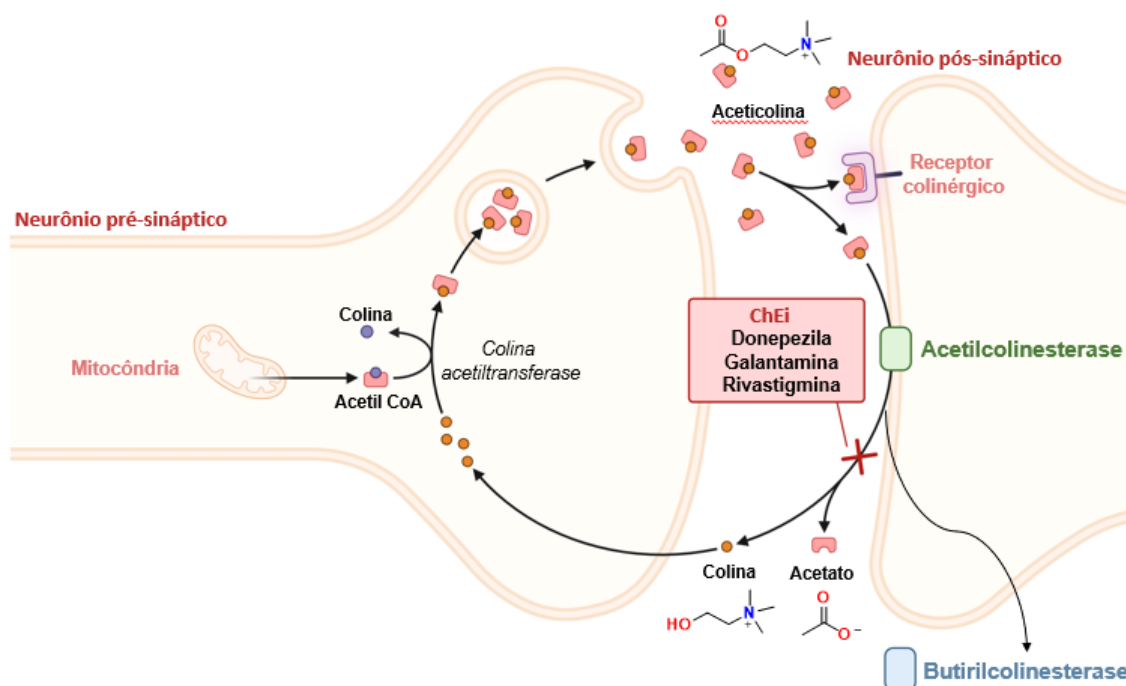


Figura 2. Representação da biossíntese e da neurotransmissão nervosa da acetilcolina (Imagem produzida no Biorender)

A estrutura tridimensional das enzimas apresenta dois principais sítios de interação: o sítio catalítico (CAS), situado em uma cavidade estreita no interior da enzima, e o sítio aniônico periférico (PAS), localizado na entrada dessa cavidade. As duas colinesterases compartilham uma homologia estrutural de aproximadamente 65%. O sítio catalítico da AChE é constituído pela tríade catalítica formada pelos resíduos Ser203, His447 e Glu334, responsáveis pela hidrólise da acetilcolina. Na BChE, a tríade catalítica é composta pelos resíduos Ser198, His438 e Glu325, que desempenham função análoga na hidrólise de seus respectivos substratos (Figura 3A) (NICOLET *et al.*, 2003; GOULART, P. N. *et al.*, 2021; SRIDHAR; GUMPENY, 2024)

Os sítios CAS e PAS da AChE (Figura 3B) são mais estreitos e predominantemente constituídos por resíduos aromáticos, cerca de 40% a mais, enquanto, na BChE (Figura 3C), predominam resíduos alifáticos e polares, o que permite a interação com substratos e inibidores de maior volume. Uma diferença fundamental entre as enzimas é que a AChE possui um resíduo de Trp86 importante para a ligação da colina, enquanto a BChE apresenta um resíduo equivalente (Trp82) em um ambiente ligeiramente diferente. Esses fatores são cruciais para a

ligação e especificidade dos substratos em relação às enzimas (DVIR, Hay *et al.*, 2010 SRIDHAR; GUMPENY, 2024).

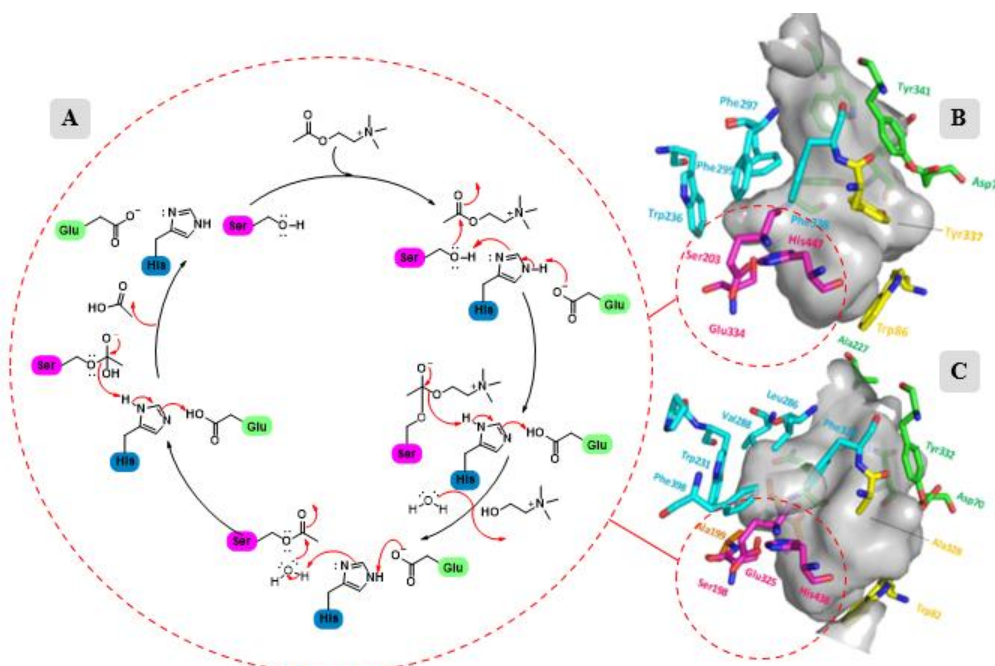


Figura 3. A) Proposta do mecanismo de hidrólise da acetilcolina no sítio catalítico das ChEs. B) Sítio ativo da acetilcolinesterase humana (*hAChE*) (PDB: 4EY4). C) Sítio ativo da butirilcolinesterase humana (*hBChE*) (PDB: 1P0I) (adaptado de GOULART, P. N. *et al.*, 2021).

Outro fator importante associado às ChEs é possibilidade de aceleração da agregação dos peptídeos β -A que a AChE pode exercer. O sítio periférico desta enzima liga-se aos peptídeos β -A por meio de interações hidrofóbicas e aromáticas, devido à alta similaridade entre os resíduos, estabilizando os oligômeros e acelerando sua agregação. Dessa forma, inibidores que têm como alvo o PAS podem bloquear a facilitação da agregação de A β pela enzima (INESTROSA *et al.*, 2005; CARVAJAZ *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2018)

1.2.1.2. Neurotransmissão glutamatérgica

O glutamato é um aminoácido de maior abundância no SNC, atuando como um neurotransmissor excitatório. Os impulsos nervosos provocam sua liberação, auxiliando no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica, no aprendizado, na memória e possui papel fundamental no mecanismo de algumas doenças neurodegenerativas como a DA (BUKKE *et al.*, 2020; PURANIK; SONG, 2024).

A Figura 4 ilustra a comparação entre a biossíntese do Glutamato em neurônios normais e na DA. Na via normal, o glutamato é produzido no neurônio-sináptico a partir da glicose, sua liberação ativa seus receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), do tipo cainato, metabotrópicos (acoplados a proteína G) e, principalmente, os receptores de *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), promovendo a abertura de canais iônicos de forma

intensiva, principalmente de cálcio. Os astrócitos presentes nas células da glia desempenham um papel importante no controle dos níveis de glutamato na fenda sináptica via absorção por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs). Os EAATs, carregam o excesso de glutamato que por sua vez é transformado em glutamina (SZYDLOWSKA, *et al.*, 2010; PAULA-LIMA *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2014; PURANIK; SONG, 2024)

Na DA, é comum que os pacientes sofram de outras comorbidades, como problemas renais, depressão e diabetes, que intensificam a complexidade da doença. A diabetes, por exemplo, é um dos fatores de riscos mais importantes para a doença. Há relatos na literatura que indicam que alterações na síntese de glicose, que é reduzida em mais de 20%, ocorre antes da manifestação da agregação proteica, podendo estar relacionada com a causa da doença. A desregulação do metabolismo da glicose afeta a síntese e a disponibilidade do glutamato. O acúmulo de glutamato na fenda sináptica dificulta a modulação pelos EAATs e ocorre uma ativação intensa de cálcio, que ativa diversas vias bioquímicas dentro da célula e pode gerar seu acúmulo na mitocôndria. Isso pode desencadear um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e a exocitose de mais neurotransmissores, que, por sua vez, amplificam o fenômeno de excitotoxicidade, levando à morte celular por apoptose. (BURKKE *et al.*, 2020; PURANIK; SONG, 2024).

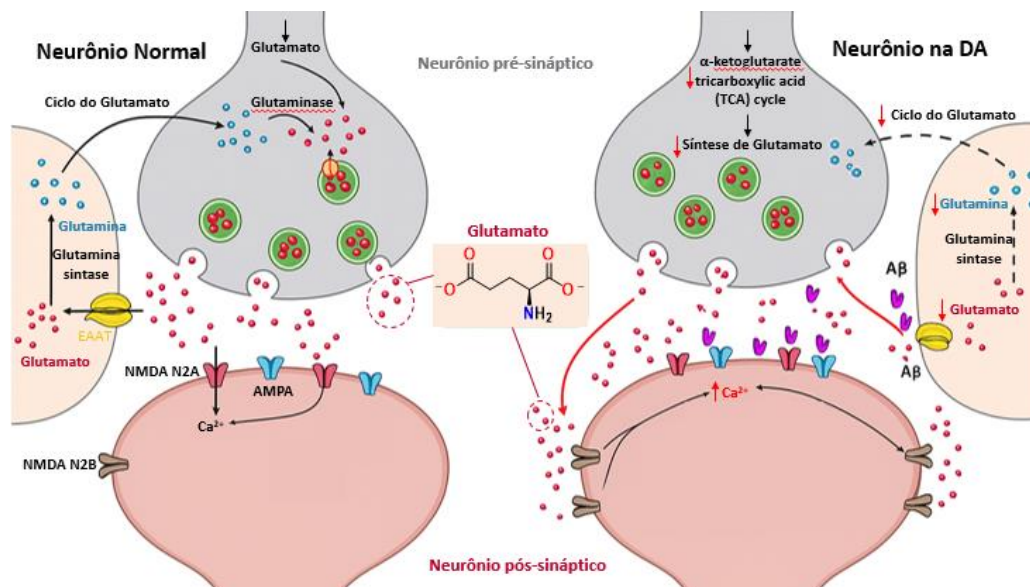


Figura 4. Comparação da biossíntese de glutamato em um cérebro normal e na DA (adaptado de BURKKE *et al.*, 2020)

1.2.1.3. Neurotransmissão dopaminérgica

Dopamina (DA) é um neurotransmissor monoaminérgico distribuído em várias regiões do cérebro apresentando diferentes funções como função motora, aprendizagem, memória emoção e outras. Diversos estudos indicam que há redução da concentração de dopamina, e que a desregulação dopaminérgica intensifica a progressão da DA, pois a dopamina é importante para processo de degradação e estabilização de oligômeros β -A, também pode inibir a agregação de pTau, apresentando efeitos neuroprotetor, apresenta equilíbrio ao sistema colinérgico e participa da modulação de outros neurotransmissores como GABA. A desregulação dopaminérgica está relacionada as suas características metabólicas, a dopamina pode ser oxidada gerando metabólitos tóxicos e espécies reativas de oxigênio (ERO) através da ação da monoamina oxidase B (YANG; ZOU; WANG, 2023, ZHANG; LIANG; GU, 2025).

A monoamina oxidase A (MAO-A) e a MAO-B são enzimas responsáveis pela oxidação de monoaminas como dopamina e serotonina. A MAO-A está relacionada aos distúrbios mentais como ansiedade e depressão enquanto a MAO-B está relacionada aos processos neurodegenerativos. A Figura 5 mostra que, ao catalisarem a oxidação de amins, como a dopamina, ocorre a formação de aldeídos tóxicos e espécies tóxicas como H_2O_2 e NH_3 que podem ser liberadas no processo. Além disso, o H_2O_2 liberado pode produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio das reações Fenton e Haber-Weiss, que fomentam o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial. Por isso, os inibidores de MAO-B desempenham um papel fundamental na DA, reduzindo o nível de ERO e diminuindo a disfunção cognitiva (LV *et al.*, 2023; YANG; ZOU; WANG, 2023)

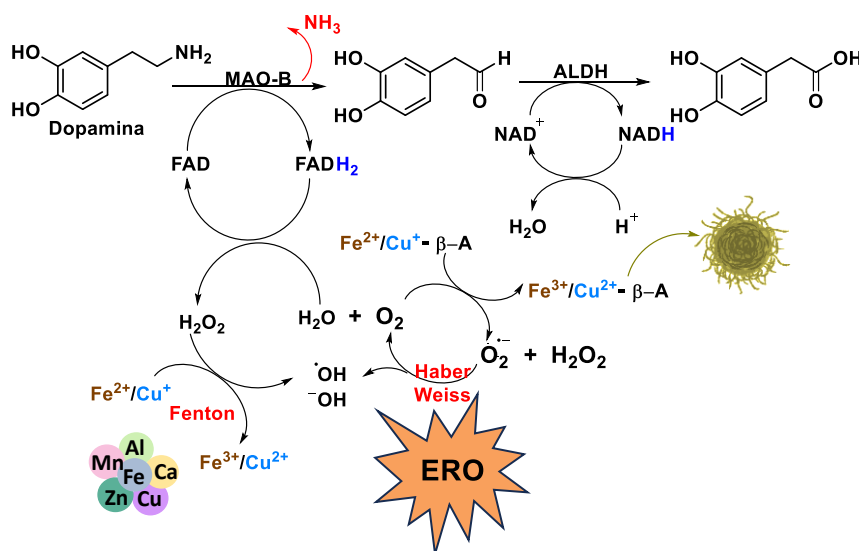


Figura 5. Desaminação oxidativa da dopamina catalisada por MAO-B (adaptado de LV *et al.*, 2023).

1.2.1.4. Neurotransmissão histaminérgica

A histamina é um neurotransmissor multifuncional no SNC, com papel duplo na modulação da neurotransmissão e do sistema imunológico, influenciando processos cognitivos e inflamatórios nesses sistemas (THOMAS et al., 2024). Suas ações fisiológicas ocorrem por meio da ativação de seus receptores específicos (WALTER *et al.*, 2011; GHAMARI *et al.*, 2019). Estudos recentes associam deterioração dos neurônios histaminérgicos à neurodegeneração, embora os mecanismos subjacentes a essa relação permaneçam desconhecidos (WALTER *et al.*, 2011; BANDARU *et al.*, 2025).

Quatro receptores de histamina acoplados a proteína G (H₁R, H₂R, H₃R e H₄R) foram relatados com diferentes funções fisiológicas (BAUTISTA-AGUILERA *et al.*, 2018). O H₁R está relacionado a respostas alérgicas, o H₂R atua na regulação do ácido gástrico, o H₃R é o principal receptor de histamina referente regulação neuronal de histamina e funções cognitivas no SNC, e o H₄R está relacionado as respostas inflamatórias, alergias, doenças autoimunes e câncer (ŁAŻEWSKA *et al.*, 2014).

O H₃R é um autorreceptor/heterorreceptor pré-sináptico amplamente expresso em diversas regiões cerebrais, incluindo o córtex cerebral, os gânglios da base e o hipotálamo, áreas que desempenham papéis cruciais na cognição (EISSA et al., 2019; THOMAS et al., 2024). Como ilustrado na Figura 6A, a atuação do H₃R como autorreceptor está relacionada à regulação negativa da síntese e liberação de histamina. Já como heterorreceptor, inibe a liberação de outros neurotransmissores, como ACh, dopamina (DA), serotonina (5HT) e noradrenalina (NA) (TALEVI et al., 2017; GAO et al., 2021).

Como ilustrado na Figura 6B, a ativação do receptor pela histamina ou por agonistas de H₃R leva à inibição da adenilil ciclase (AC) por meio da ativação das proteínas G, resultando na supressão da cascata do monofosfato de adenosina cíclico/Proteína Quinase A (cAMP/PKA). Essa supressão reduz a fosforilação do fator de transcrição CREB, que está associado à memória e à aprendizagem. Além disso, a ativação do H₃R também reduz o influxo de Ca²⁺, responsável pela liberação de neurotransmissores. Consequentemente, o bloqueio desse receptor está associado principalmente à ativação da via AC/cAMP/PKA/CREB, ao aumento do influxo de Ca²⁺ e à maior liberação de neurotransmissores. Esses efeitos contribuem para a melhora da aprendizagem e memória, sobrevivência neuronal, neuroproteção, plasticidade sináptica e redução dos processos inflamatórios (TALEVI *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2021; THOMAS et al., 2024).

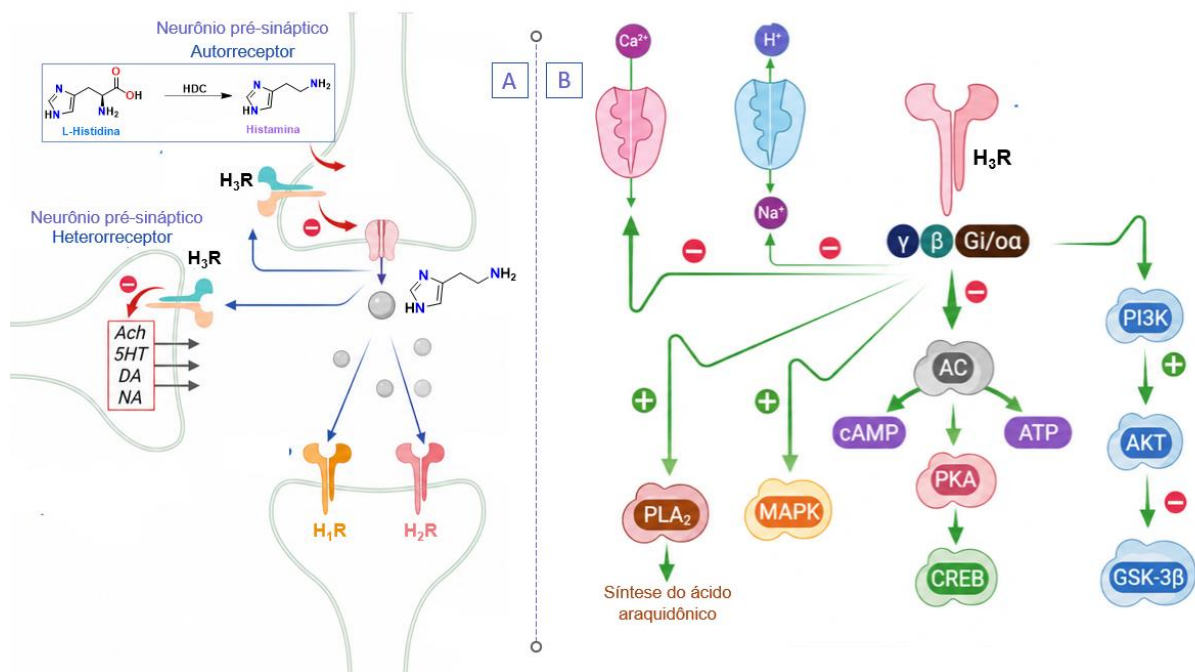


Figura 6. A) Ilustração das vias de modulação do H₃R. A ativação do H₃R como autorreceptor regula a síntese de histamina que ocorre a partir da L-histidina catalisada pela histidina descarboxilase (HDC). Além disso, o H₃R está presente em neurônios pré-sinápticos de outros neurotransmissores, atuando como heterorreceptor e modulando a liberação desses neurotransmissores; B) vias de sinalização associadas ao H₃R: ativação da Fosfolipase A2 (PLA₂), inibição da Adenilato Ciclase (AC), Ativação da via Fosfoinositol 3-quinase/ Proteína Quinase B (PI3K/AKT) que leva à inibição da Glicogênio Sintetase Quinase 3 beta (GSK-3β) (THOMAS *et al.*, 2024).

Diante desse mecanismo, antagonistas/agonistas inversos do H₃R bloqueiam sua função inibitória e inflamatória, resultando no aumento da liberação de histamina e outros neurotransmissores, além de reduzir os processos inflamatórios (GHAMARI *et al.*, 2019; THOMAS *et al.*, 2024). Nas últimas décadas, e devido à recente aprovação no mercado do pitolisant (Wakix®) (2016 – EMA; 2019 – FDA; 2023 – uso pediátrico), os antagonistas ou agonistas inversos de H₃R vêm sendo considerados alvos terapêuticos promissores para o tratamento de uma série de distúrbios neurológicos como o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), DA, esquizofrenia, distúrbios de aprendizagem e memória, Parkinson, distúrbios do sono e epilepsia (BANDARU *et al.*, 2025).

1.2.2. Formação de oligômeros de β-amiloide

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

FRANCO *et al.*, 2016).

A PPA produz peptídeos “não amiloidogênicos” (não tóxicos) e “amiloidogênicos” com auxílio de enzimas secretases. A via não tóxica ocorre através da clivagem da PPA pela enzima α -secretase, formando um peptídeo solúvel α -PPA e um segundo peptídeo que permanece da membrana até ser clivado pela enzima γ -secretase. Na via tóxica, a enzima β -secretase (BACE 1) efetua a clivagem da PPA um pouco mais distante da área onde ela sai da membrana, formando dois peptídeos: um fragmento solúvel β -PPA, e um fragmento terminal C (β -CTF), peptídeo menor que permanece inserido na membrana até ser clivado pela γ -secretase (Figura 7). Ocorre então a liberação de peptídeos tóxicos (β -A) de 40, 42 ou 43 aminoácidos, que são “amiloidogênicos”, sendo a forma β -A de 42 a mais abundante (SELKOE, 2001; DELANOGARE *et al.*, 2019; GADHAVE *et al.*, 2020; SEHAR *et al.*, 2023).

Quando produzidos na via não tóxica, esses peptídeos possuem diversas propriedades, como antioxidantes, regulação no transporte de colesterol e reparação dos vasos sanguíneos, protegendo contra lesões cerebrais. A formação de peptídeos β -A geram oligômeros que se ligam a outras moléculas e formam placas de amiloides, pequenos agrupamentos que podem bloquear a sinalização entre as células nas sinapses. Em seguida, ocorre uma série de eventos bioquímicos indesejáveis (inflamações, liberação de substâncias químicas tóxicas, entre outros), causando a hiperfosforilação de pTau e a conversão dos microtúbulos neuronais em emaranhados neurofibrilares (ENF) que destroem o sistema de transporte das células, levando à morte difusa do neurônio (ALZ, 2020; LAZAREV *et al.*, 2022).

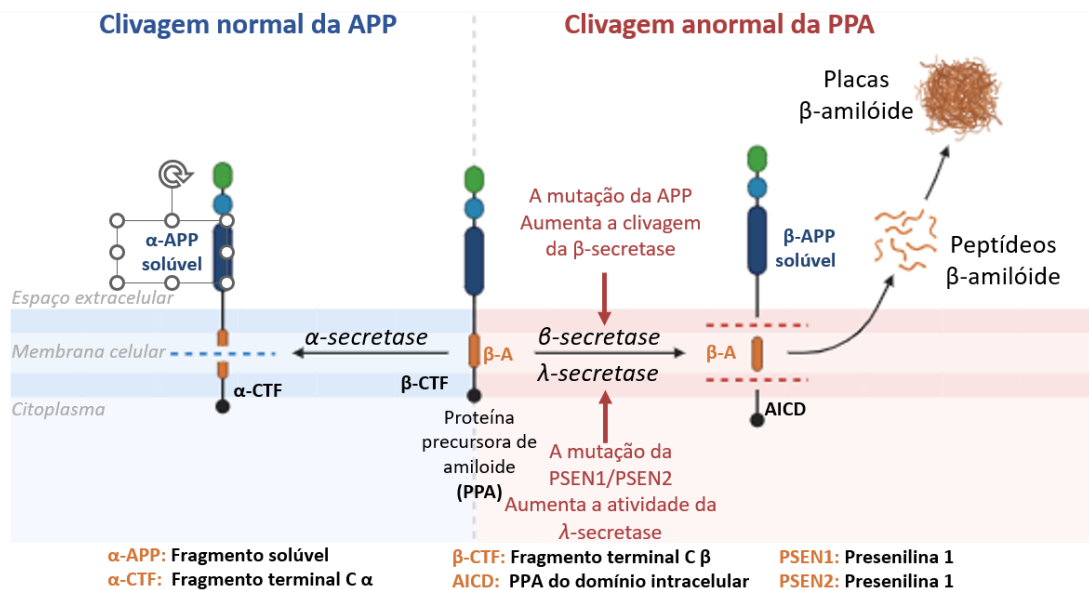


Figura 7. Ilustração do processamento da proteína precursora de amiloide (PPA). Existem duas vias de processamento, a clivagem normal (não amiloidogênica) e a clivagem anormal (amiloidogênica) (Imagem criada no Biorender).

1.2.3. Hiperfosforilação da proteína tau

A pTau é uma proteína estabilizadora cuja função é facilitar a polimerização da tubulina na célula, permitindo a formação de microtúbulos presentes nos axônios, por esse motivo é frequentemente usado como um marcador axonal (KITURA; ISHIGURO; HISANAGA, 2014). Em situações neurotóxicas, como a formação de placas de amiloides, liberação de citocinas inflamatórias, desregulação do cálcio neuronal, ocorre um aumento intenso dos níveis de fosforilação da pTau no citosol neuronal. Quando isso ocorre, a pTau se dissocia dos microtúbulos e se agrega sob a forma de filamentos helicoidais pareados insolúveis que dão origem aos ENF (Figura 8) (MORRIS *et al.*, 2011; DE SÁ CAVALCANTI; ENGELHARDT, 2012; BARAGE; SONAWANE, 2015).

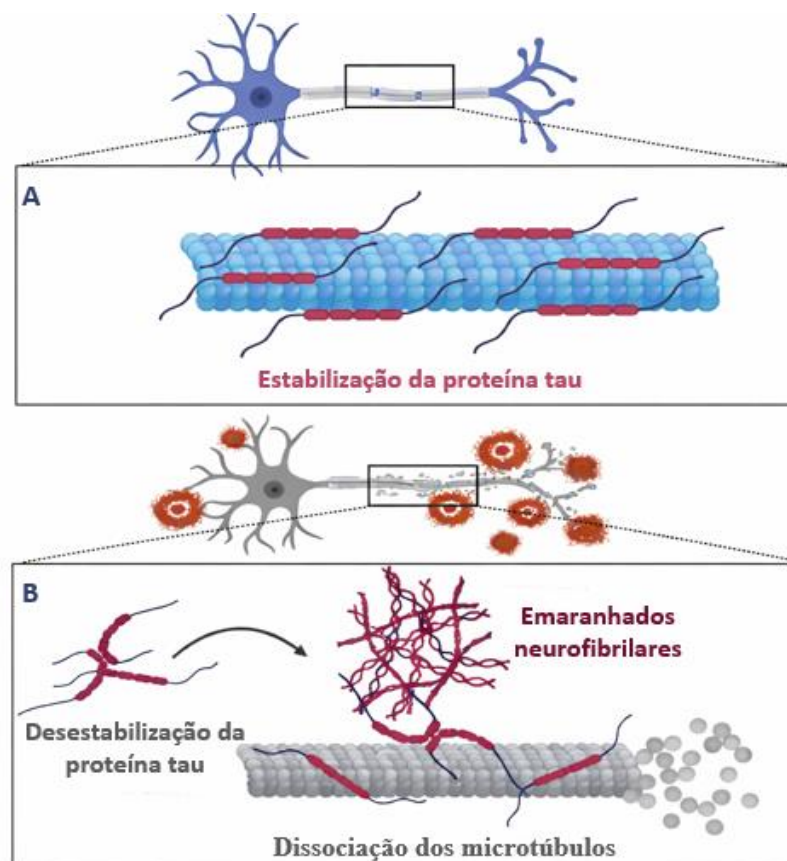


Figura 8. Comparação entre um neurônio saudável (A) e após os danos celulares (B) ocasionando a hiperfosforilação da pTau. (Adaptado de ASHISH *et al.*, 2019)

Esses filamentos acumulados podem ser transmitidos de um neurônio para outro, comparável a uma infecção, causando alterações estruturais e funcionais que provocam a perda da morfologia neuronal, iniciando o processo de neurodegeneração. Nos estágios finais da DA, os ENF atingem o neocórtex, onde memórias de longo prazo são armazenadas. Resumidamente, o acúmulo de PS formadas pelos agregados de amiloides causa uma série de neurotoxicidades

que levam a formação dos ENF provocando a perda neuronal e a perda sináptica, sendo responsáveis pela progressão do declínio cognitivo (DE SÁ CAVALCANTI; ENGELHARDT, 2012; BARAGE; SONAWANE, 2015; POHLKAMP, 2020).

1.2.4. Estresse Oxidativo e a disfunção mitocondrial

O cérebro humano consome aproximadamente 20% da glicose total do organismo, a maior parte destinada à produção de energia por meio da glicólise e da fosforilação oxidativa mitocondrial (WEINSTOCK, 2025). Devido à limitada capacidade de armazenamento energético, associada à elevada demanda metabólica, alterações na fisiopatologia cerebral podem favorecer o desenvolvimento de estresse oxidativo. Nesse contexto, diversos estudos demonstram que o estresse oxidativo constitui um dos eventos iniciais na patogênese da DA e contribui significativamente para a progressão da doença (CHEN; ZHONG, 2014; BUCCELLATO *et al.*, 2021).

O estresse oxidativo manifesta-se como resultado do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e sua eliminação pelos mecanismos antioxidantes do organismo (KOWALCZYK *et al.*, 2021). As mitocôndrias constituem a principal fonte de estresse oxidativo neuronal (Figura 9), uma vez que processos como oxidação proteica, peroxidação lipídica e modificações oxidativas no DNA nuclear (nDNA) e mitocondrial (mtDNA) levam à geração EROs e de espécies reativas de nitrogênio (ERN), bem como à formação de espécies tóxicas, tais como peróxidos, álcoois, aldeídos, carbonilas e cetonas (BUCCELLATO *et al.*, 2021; TAMAGNO *et al.*, 2021).

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

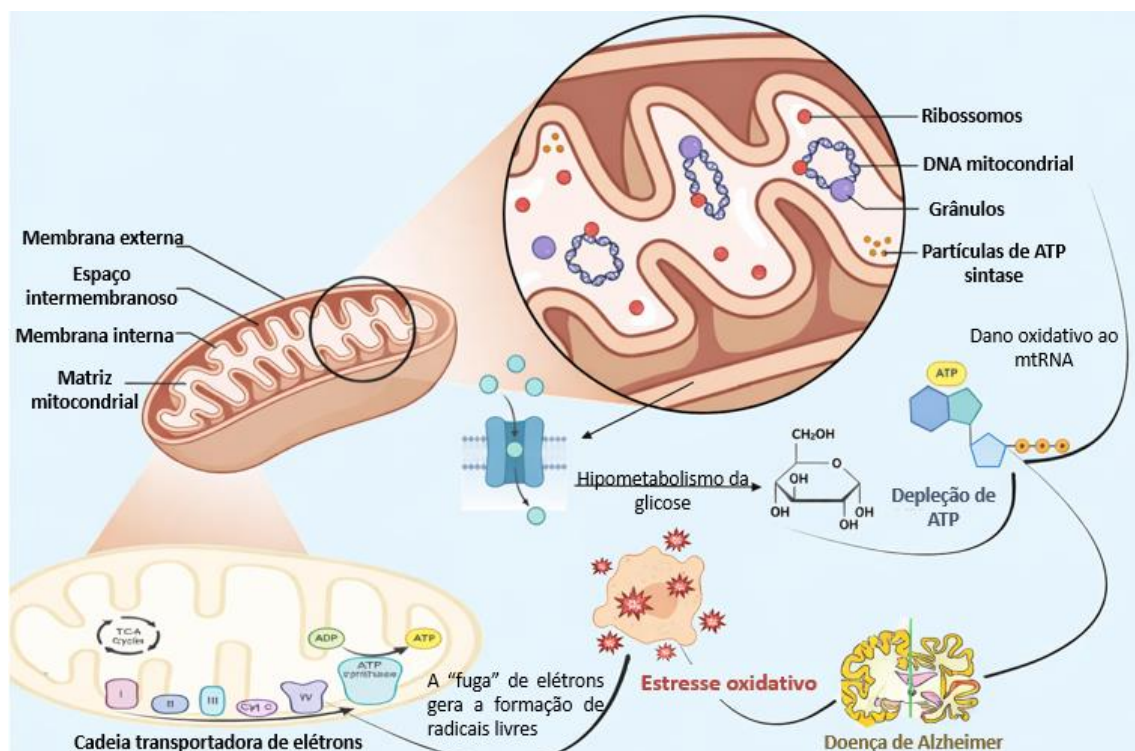


Figura 9. A figura ilustra os principais fatores envolvidos na progressão da doença de Alzheimer (DA). A fuga de elétrons da cadeia transportadora de elétrons durante a respiração celular, associada ao hipometabolismo da glicose, constitui uma das principais fontes de produção de EROs. O dano ao DNA mitocondrial induzido por EROs compromete ainda mais as funções mitocondriais, incluindo a produção de energia essencial para o funcionamento cerebral, resultando em aumento da neurodegeneração e declínio cognitivo (adaptado de DHAPOLA *et al.*, 2024).

1.2.5. Neuroinflamação

O envelhecimento ocasiona uma série de desregulações metabólicas e imunes que ativam os processos inflamatórios. (ONYANGO *et al.*, 2021; UDDIN; YU; LIM, 2021). Como mostra a Figura 10, nos processos inflamatórios há acúmulo de células da glia, que é gerada devido a respostas imunológicas a partir de astrócitos e micróglia (MORALES *et al.*, 2014; CUELLO *et al.*, 2017). Níveis elevados de β -A, formação de PS e ENF desencadeiam processos inflamatórios, havendo a ativação dessas células da glia e a geração de moléculas neurotóxicas, incluindo espécies ERO, ERN, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1b (IL-1b), IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF), levando à morte neuronal (WANG *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2024; FAKOREDE *et al.*, 2025).

As células da glia são fagócitos do SNC, ou seja, protegem o cérebro através da fagocitose de corpos estranhos, sendo responsável pela imunidade e construindo a primeira linha de defesa contra vários agentes patogênicos. Estas células estão presentes no cérebro, medula espinhal, retina e nervo ótico, sendo importante para a manutenção e elasticidade dos circuitos neuronais, contribuindo para a proteção e remodelação de sinapses. Essa ação

protetora e remodeladora é mediada por liberação de fatores tróficos, que contribui para a formação da memória. Na DA, esses processos inflamatórios ocorrem de forma crônica e intensificam os processos neurodegenerativos da doença (MORALES *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2022).

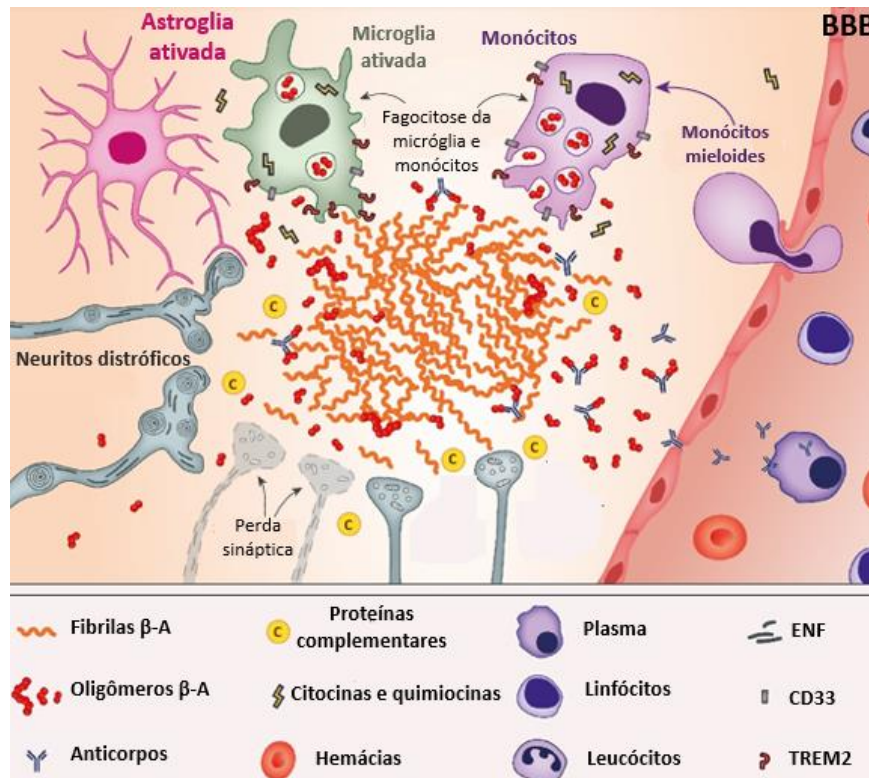


Figura 10. Ilustração da inflamação na doença de Alzheimer (DA) no estágio 3. A agregação de β -A e ENF promove a ativação das células da glia, incluindo astrócitos e micróglia, desencadeando a liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios e favorecendo a infiltração de monócitos mielóides. Processos fisiológicos, como a fagocitose de peptídeos e proteínas, mediada por proteínas do sistema complemento, anticorpos e receptores de transmembrana como CD33 e TREM2, contribuem para a disfunção sináptica e a morte neuronal. (Adaptado de CUELLO *et al.*, 2017).

1.3. Tratamento da DA

Existem diversas possíveis abordagens terapêuticas para o tratamento da DA, porém as abordagens existentes atualmente estão, em sua maioria, relacionadas ao tratamento sintomático (em terapia única ou em combinação) e ao tratamento comportamental. Recentemente, foi aprovada pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA - do inglês *Food and Drug Administration*) uma nova abordagem terapêutica, por meio das terapias modificadoras da doença que, apesar de parecerem promissoras, ainda apresentam muitas controvérsias e ceticismo sobre a efetividade na comunidade científica (ZHONG; CUMMINGS *et al.*, 2025).

Apesar de inúmeras tentativas para compreensão e tratamento da DA, as vias

terapêuticas existentes estão longe de serem satisfatórias. A maior dificuldade de desenvolver um tratamento da doença está relacionado a sua origem indeterminada e patologia multifatorial (KIM *et al.*, 2024). Por isso, novos estudos são necessários para maior compreensão da doença.

1.3.1. Tratamento sintomático e comportamental

Tratamento sintomático da DA está dividido entre os inibidores de ChEs (I-ChEs) e o antagonistas do receptor de NMDA. O primeiro medicamento aprovado para a DA foi a tacrina **(1)**, em 1993, atuando como inibidor de AChE e BChE para sintomas leves a moderados da doença. Contudo, devido à sua hepatotoxicidade, eficácia incerta e ao advento de novos I-AChEs, este medicamento foi descontinuado nos EUA em 2013 (YASHAEVA *et al.* 2025) (Figura 11).

Em seguida surgiu a segunda geração de I-AChEs, representada pela donepezila **(2)**, rivastigmina **(3)** e galantamina **(4)**, com propriedades farmacológicas semelhantes, embora algumas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas os diferenciassem entre si (FORLENZA *et al.*, 2005). A rivastigmina **(3)** e a galantamina **(4)** demonstraram efeito benéfico no tratamento de demência leve a moderada da DA, sendo que a rivastigmina **(3)** inibe tanto a AChE quanto a BChE. A donepezila **(2)** é seletiva para AChE, sendo utilizada no tratamento de demência leve, moderada e é a única opção atual para estágios graves avançados da DA (DO VALE *et al.*, 2011; FORLENZA, *et al.*, 2005; DE FALCO *et al.*, 2015) (Figura 11A). O uso desses medicamentos é geralmente acompanhado de efeitos adversos comuns, como náusea, vômito, diarreia, dores de cabeça e tontura (DONG *et al.*, 2019)

Outro fármaco utilizado clinicamente é a memantina **(5)** (Figura 11B), um antagonista não competitivo do receptor NMDA para a modulação da excitotoxicidade. A memantina **(5)** trata os sintomas de DA moderada a grave regulando a atividade do glutamato através do bloqueio de um dos seus receptores apresentando efeitos colaterais mais comuns cefaleia, constipação, diarreia, tontura e sonolência (KIM *et al.*, 2024; YASHAEVA *ET AL.* 2025).

Também existem alguns estudos relacionados à terapia combinada, utilizando inibidores de ChE juntamente com a memantina, com o objetivo de atingir múltiplos alvos da doença (ALI *et al.*, 2022). Com base nos estudos promissores, em 2014, foi aprovado pelo FDA o Namzaric® **(6)** (Figura 11C), uma combinação da donepezila com a memantina para tratamento sintomático da DA moderada a severa. A administração em altas doses estar associado a alguns efeitos colaterais como perda de peso, vômito, síncope e eventualmente, alterações cardiovasculares decorrentes tanto do aumento excessivo dos níveis de acetilcolina quanto o uso da memantina, visto que ambos possuem esses efeitos adversos

(ZHANG *et al.*, 2024; YASHAEVA *et al.*, 2025).

Por fim, o brexpiprazol (7) (Figura 11D), originalmente utilizado para tratamento de depressão e esquizofrenia por atuar nos receptores de serotonina, dopamina e norepinefrina, foi aprovado pelo FDA em 2023 para o tratamento comportamental de agitação, sintoma frequente na DA (ZHANG *et al.*, 2024; TENCHOV *et al.*, 2024).

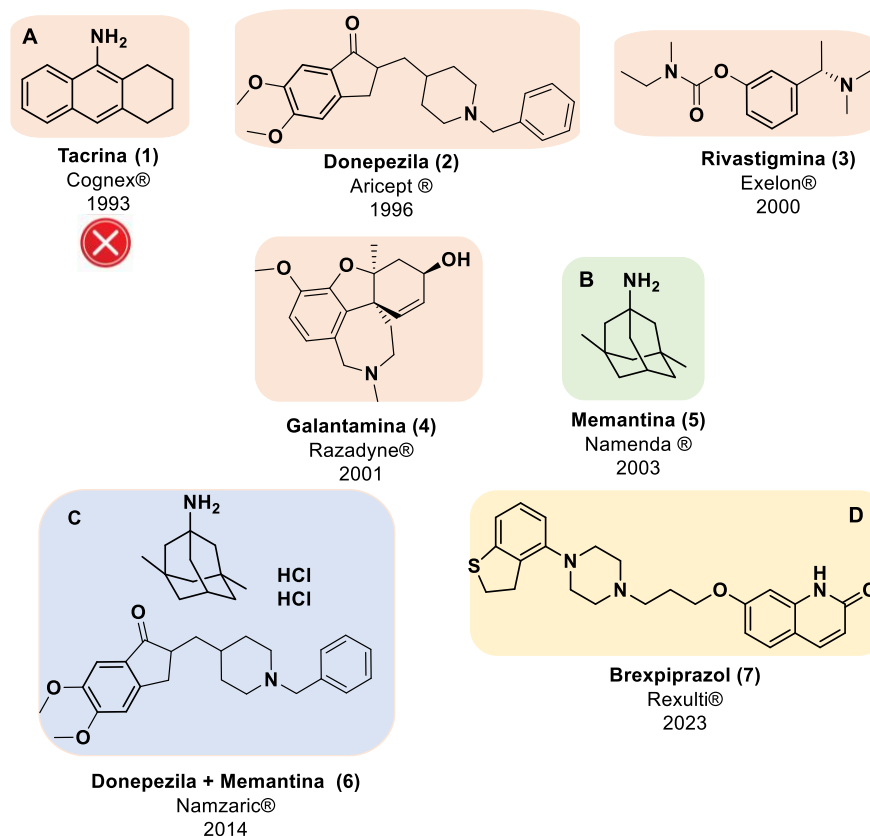


Figura 11. Medicamentos aprovados pelo FDA para o tratamento da DA. **A)** Monoterapia com Inibidores de ChE: Tacrina (1) e Rivastigmina (3) (inibidores de AChE e BChE); Donepezila (4) e Galantamina (5) (inibidores seletivos de AChE). **B)** Memantina, antagonista não competitivo de receptores NMDA. **C)** Terapia em combinação com Inibidor de ChE e antagonista de NMDA. **D)** Tratamento comportamental atuando na neurotransmissão de serotonina, dopamina e norepinefrina.

1.3.2. Terapias modificadoras da doença

Recentemente uma nova estratégia vem sendo estudada para o tratamento da DA, os anticorpos monoclonais de imunoglobulinas G1 recombinantes (IgG1), classificados como terapia modificadora da doença (TMD), pois foram projetados para atuar na patologia da doença, relacionado à redução ou eliminação de placas de β -A solúveis e insolúveis (CUMMINGS *et al.*, 2023). O aducanumab foi o primeiro anticorpo aprovado em 2021 pelo FDA, atuando ao se ligar a certos resíduos de aminoácidos de peptídeos β -A insolúveis, promovendo a remoção (*clearance*) das placas de amilóides a partir de sua degradação. Em seguida, foi aprovado o lecanemab em 2023, relacionado à redução de agregados β -A através

da interação com resíduos de aminoácidos de placas β -A solúveis e insolúveis, e recentemente, em 2024 foi aprovado o donanemab que interage com um tipo específico de placa β -A chamada β -amiloide piroglutamato (pGlu3-A β) estimulando a remoção dessas placas (ALI *et al.*, 2022; CUMMINGS *et al.*, 2023).

Apesar da terapia parecer promissora, essa abordagem gerou e ainda gera muitos conflitos na comunidade científica quanto à efetividade e segurança dos medicamentos aprovados, além das aprovações aceleradas. O Comitê Consultivo de Medicamentos do Sistema Nervoso Periférico e Central (SNPC) do FDA, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e Agência de Produtos Farmacêuticos e Dispositivos Médicos (PMDA) no Japão, por exemplo, não votaram a favor da aprovação do aducanumab pois acreditavam que os resultados clínicos eram controversos e não apresentavam evidências suficientes de eficácia. Entretanto, em meio aos debates contrários, o FDA contrariou o SNPC e aprovou o medicamento com a justificativa de que ele trazia os benefícios patológicos por meio da redução de placas β -A, mecanismo inovador no momento (VAZ *et al.*, 2022).

1.3.3. Abordagens terapêuticas recentes

A limitada eficácia e os efeitos colaterais dos medicamentos tradicionais aprovados, combinados com as falhas recentes dos medicamentos em ensaio clínico, demandam novas abordagens e alvos terapêuticos para o desenvolvimento novas gerações de medicamentos para a DA (ZHANG *et al.*, 2024). Baseando-se em dados de ensaios clínicos recentes do *clinicaltrials.gov* e através da sumarização desses dados no *ALZpipeline.com* existem 138 fármacos testados e 182 em ensaios clínicos ativos (AlzPipeline, 2025; ClinicalTrials, 2025).

Dentre as propostas terapêuticas, terapias voltadas principalmente para a melhora da cognição continuam em evidência, dada a centralidade do comprometimento cognitivo na DA, além do tratamento de sintomas neuropsiquiátricos. Porém, dentre os principais alvo de estudos destacam-se as TMDs envolvendo agentes biológicos e moléculas de baixo peso molecular, provavelmente devido aos recentes medicamentos aprovados (AlzPipeline, 2025; ClinicalTrials, 2025) (Figura 12A). Já em relação à abordagem de alvos nos estudos recentes (Figura 12B), a maioria dos compostos está relacionada aos inibidores de colinesterases, inibidores e moduladores de γ -secretase, inibidores de β -Secretase (BACE-1), inibidores de GSK-3 β , PROTACs e, principalmente, relacionado aos anticorpos monoclonais (ZHANG *et al.*, 2024; SHARMA *et al.*, 2025).

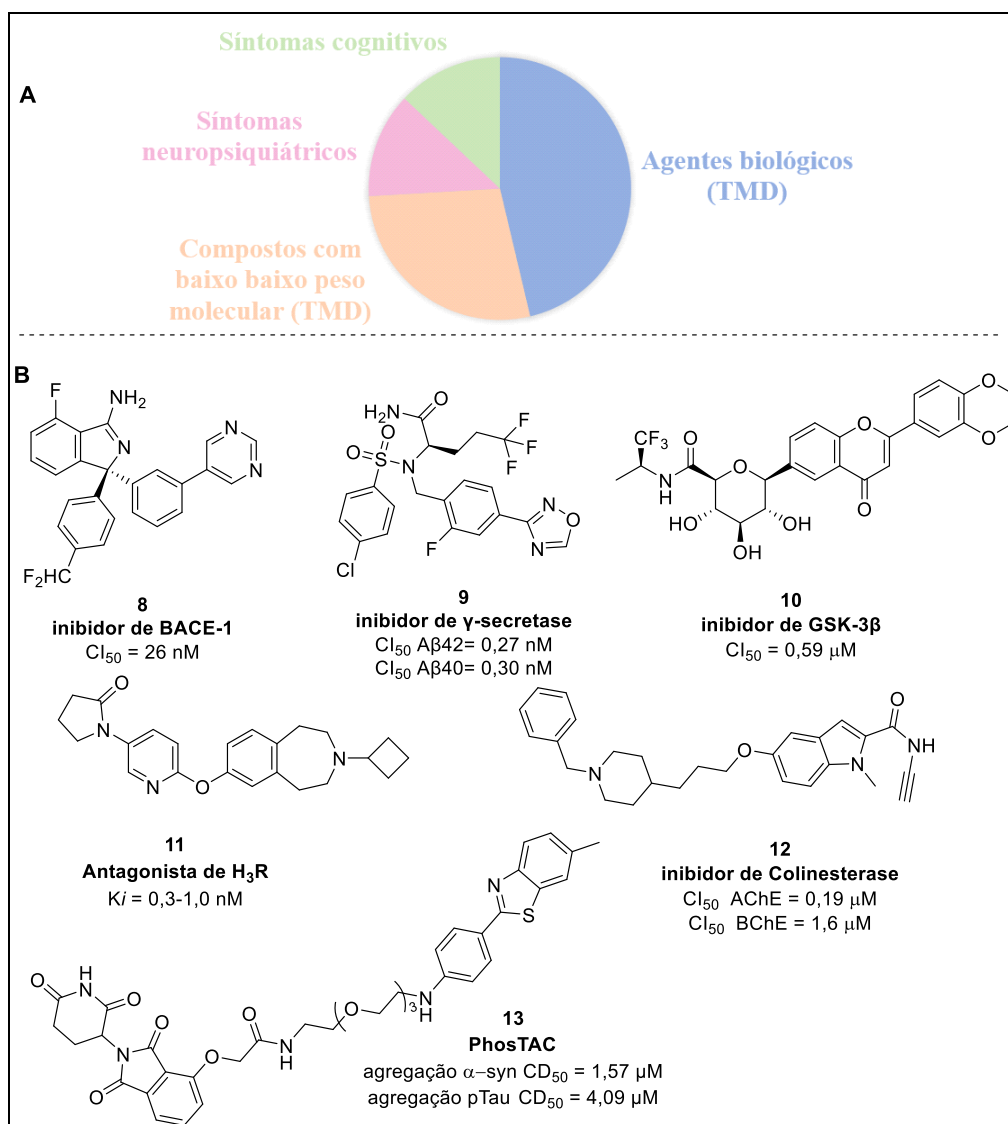


Figura 12. (A) Abordagens terapêuticas recentes na DA. (B) Inibidores enzimáticos seletivos, antagonista H₃R e, recentemente, as quimeras direcionadas à fosforilação (PhosTAC) têm ganhado um grande enfoque, como o composto **13**, um PhosTAC dual com eficiência de degradação (CD_{50}) frente a pTau e alfa-sinucleína (α -syn).

A estratégia de compostos multialvo (MTDLs, do inglês *Multi-Target Directed Ligands*) tem sido amplamente aplicada ao longo dos anos no tratamento de doenças com patologias multifatoriais, como câncer, doenças cardiovasculares, infecções e doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (PRATI;CAVALLI;BOLOGNESI, 2016). No contexto da DA, os pacientes frequentemente apresentam comorbidades concomitantes, como hipertensão, doenças cardiovasculares ou diabetes, o que os expõe a uma série de medicações. Além disso, a própria doença gera sintomas cognitivos e comportamentais que demandam intervenções medicamentosas adicionais, elevando substancialmente o risco de interações medicamentosas e toxicidade (ZOU *et al.*, 2019).

Diante disso, muitos estudos recentes priorizam estratégias de duplo e múltiplos alvos

(Figura 13) para aumentar a eficácia, evitar os efeitos colaterais associados à seletividade excessiva, diminuir a resistência medicamentosa e fornecer perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos mais previsíveis (VAZ *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2024; SHARMA *et al.*, 2025; ALMAGHRABI *et al.*, 2025)

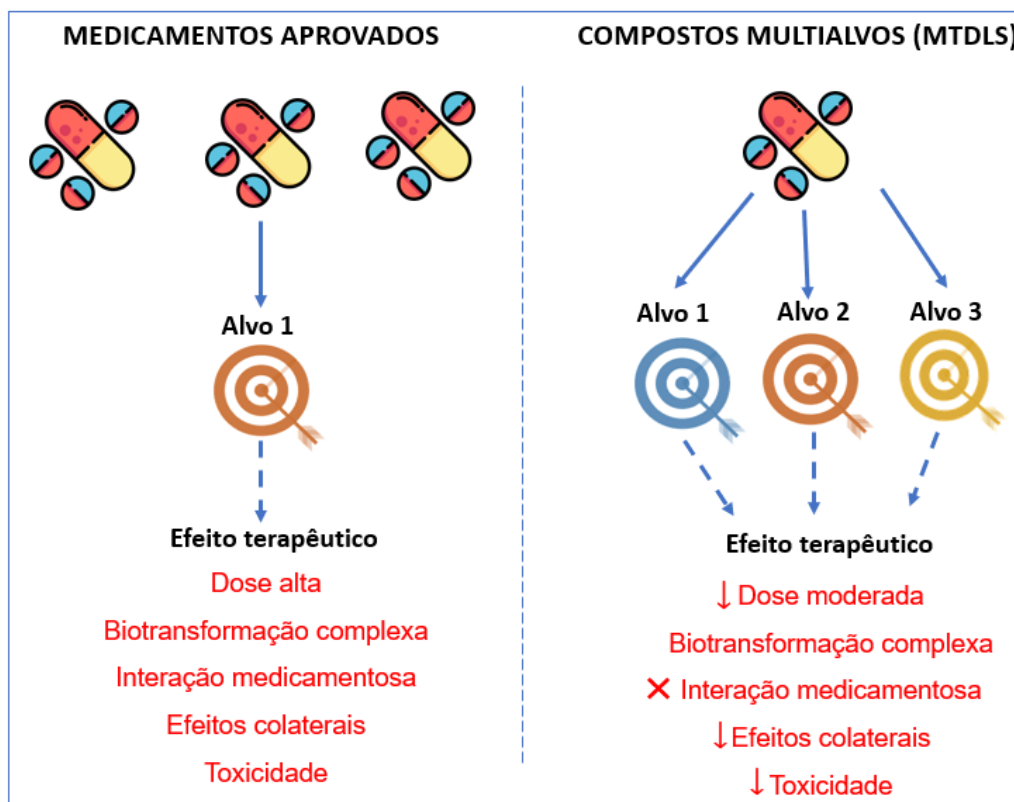


Figura 13. Comparação entre o tratamento atual da DA e a estratégia de MTDLs.

Uma das principais desvantagens desta estratégia reside na dificuldade de se atingir tanto o equilíbrio de potência entre os alvos quanto o equilíbrio das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Na ausência de um planejamento bem estruturado, podem ocorrer efeitos off-target (ZHOU *et al.*, 2019).

A estratégia de MTDL é baseada na combinação de dois ou mais farmacóforos de diferentes alvos patológicos da doença em uma única molécula, com ou sem modificações estruturais como substituições isostéricas ou otimizações conformacionais (Figura 14). A literatura classifica essa abordagem em três categorias principais, a ligação, a fusão e a incorporação. Na ligação, os farmacóforos são conectados através de uma homologação flexível ou rígida, na fusão a ligação entre os farmacóforos é direta e na incorporação ocorre a mesclagem dos alvos com sobreposição de átomos ou grupos funcionais, preservando as características essenciais para a atividade biológica de ambos os alvos (TALEVI, 2015; PRATI; CAVALLI; BOLOGNESI, 2016).

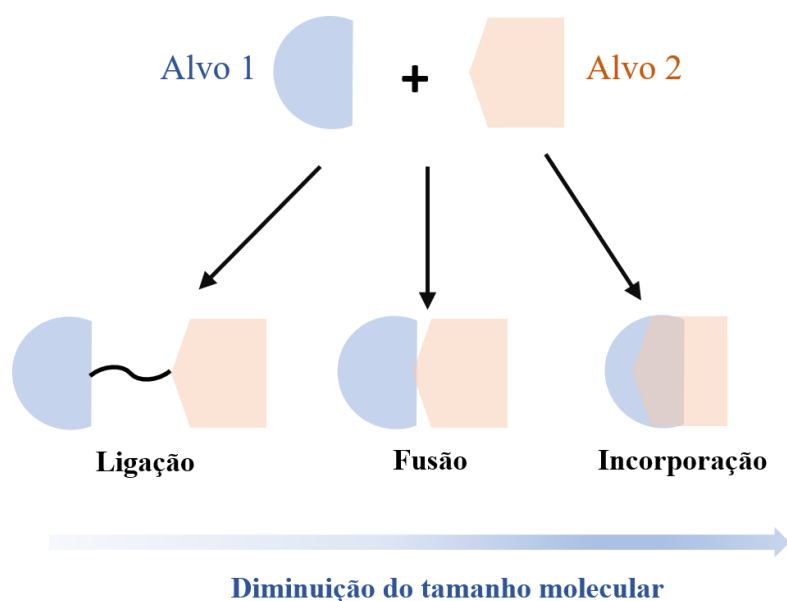


Figura 14. Principais estratégias para o planejamento de MTDL (Adaptado de PRATI; CAVALLI; BOLOGNESI, 2016).

O planejamento de MTDL para DA geralmente parte da combinação de inibidores de colinesterase com outros alvos como inibidores de BACE-1, inibidores de GSK-3 β , inibidores de MAO-B, antagonistas de receptores de NMDA, agonistas de receptor 5-HT₄, antagonistas/agonista inverso de H₃R e entre outros alvos. Atualmente os antagonistas/agonistas inversos de H₃R tornaram-se mais uma via complementar de estudo para o tratamento da DA, por causa da sua relação com a neurotransmissão e por estar envolvido na redução dos processos inflamatórios. Portanto, muitos estudos têm buscado o desenvolvendo de compostos multialvos utilizando farmacóforos de antagonistas/agonistas inversos de H₃R hibridados a farmacóforos de outros alvos importantes na modulação da DA (GHAMARI *et al.*, 2019; SZUKIEWICZ *et al.*, 2024).

A Figura 15 ilustra exemplos de compostos duais e multialvos que integram inibidores de colinesterase (AChE), antagonistas do H₃R e outros alvos relevantes, como MAO-B e BACE-1. Grande parte dos compostos planejados na Figura 15 partem do reconhecimento do grupo benzilpiperidina, associado a um núcleo planar, como farmacóforo do I-AChE donepezila (**2**). O composto multialvo **15** (AChE CI₅₀ = 0,35 μ M, BChE CI₅₀ = 0,46 μ M, MAO-A CI₅₀ = 5,2 nM, MAO-B CI₅₀ = 43 nM) foi projetado justamente a partir do farmacóforo da donepezila (**2**) e o farmacóro inibidor de MAO-B representado pelo composto **14**, utilizando a estratégia de ligação, com conexão por cadeia flexível entre os *scaffolds*. Apesar de atuar nos alvos planejados ChEs e MAO, não houve uma seletividade comparando as inibições de AChE x BChE (CI₅₀ = 0,35 μ M e 0,46 μ M, respectivamente, IS = 1,3) e MAO-A x MAO-B (CI₅₀ =

5,2 nM e $CI_{50} = 43$ nM, respectivamente, $IS = 8,2$). Posteriormente, o composto **17** foi desenvolvido pela fusão dos farmacóforos do composto **15** e do pitolisant (**16**), estabelecendo ligação covalente direta sem espaçador adicional (BAUTISTA-AGUILERA *et al.*, 2018). Apesar da semelhança entre os compostos **16** e **17**, a fusão do farmacóforo alcóxipiperidina em **17** levou a um composto que manteve as atividades observadas em **15** (AChE $CI_{50} = 0,53$ μ M; BChE $CI_{50} = 1,69$ μ M; MAO-A $CI_{50} = 0,145$ μ M; MAO-B $CI_{50} = 0,078$ μ M), mas agora apresentando também a capacidade de ser um ligante H_3R , assim como σ_1 e σ_2 (K_i hH_3R $K_i = 46,3$ nM K_i $\sigma_1 = 65,2$ nM, K_i $\sigma_2 = 326$ nM), atividades relacionadas ao pitolisant (**16**). Por fim, o composto **18** resulta da estratégia de incorporação, pela mesclagem de farmacóforos com atividades duais H_3R /AChE (DARRAS *et al.*, 2014).

Os compostos **20** e **21** foram planejados seguindo raciocínio similar, o composto **20** foi planejado a partir da ligação do farmacóforo para I-BACE-1 do composto **19** e do farmacóforo I-AChE da donepezila, levando a atividades inibitórias da AChE ($CI_{50} = 483$ nM) e BACE-1 (46,64% a 20 μ M), assim como uma ação não esperada inicialmente pela hibridação, como antagonista- H_3R ($CI_{50} = 280$ nM). De forma semelhante o composto **21** que foi planejado a partir da fusão do mesmo farmacóforo da donepezila (benzilpiperidina), levando a um dímero, apresentou atividade dual H_3R /AChE (DARRAS *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2019). O que pode ser observado a partir destes exemplos, é que mesmo que os compostos (**20** e **21**) não tenham sido originalmente planejados a partir da junção de farmacóforos I-AChE e antagonistas- H_3R , a similaridade inerente entre os modelos farmacofóricos de ambas as proteínas (aminas cíclicas com um espaçador acoxiamina) muitas vezes levam a compostos que podem ser duais com potências bastante interessantes para ambos os alvos (ŁAZEWSKA *et al.*, 2023; AÑASCO *et al.*, 2023).

Diversos anéis heteroaromáticos são utilizados como núcleos centrais na construção de MTDL para alvos envolvidos com a DA. Nos exemplos da Figura 15 é possível observar os núcleos 1-metil-1*H*-indol, 1,2,3,9-tetraidropirrol[2,1-*b*]quinazolina e 3,4-diidroquinazolin-2-amina. Além do 1-metil-1*H*-indol, diversos outros produtos naturais e núcleos originados destes produtos têm sido fonte de inspiração na obtenção de compostos com atividades frente a alvos envolvidos com a DA (ANDRADE *et al.*, 2019). Dentre estes, as cumarinas (2*H*-1-benzopiran-2-ona) e seus derivados aparecem com razoável frequência, tanto como moduladores seletiva destes alvos, quanto como um MTDL (RULLO *et al.*, 2025). Dado a sua importância e interesse do nosso grupo, este núcleo será melhor abordado no próximo tópico.

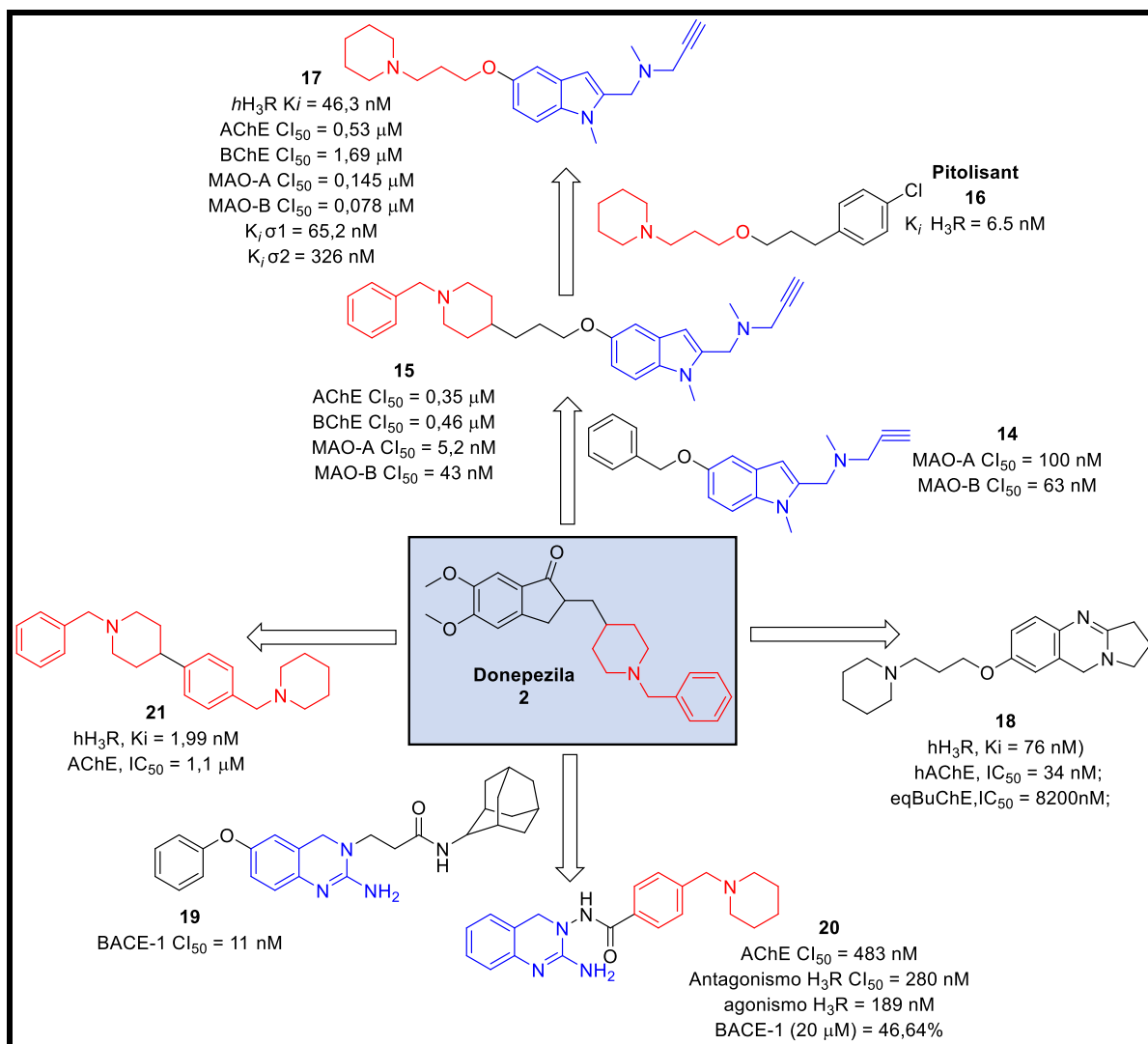


Figura 15. Compostos dual e multialvo derivados do farmacóforo da donepezila, atuando como inibidores de AChE, ligantes/ antagonista de H_3R , inibidores de MAO-B e BACE-1.

1.4. Cumarinas

O nome "cumarina" origina-se do tupi “kumarú”, nome dado à árvore *Dipteryx odorata*, popular no norte do Brasil, de onde foram isoladas, a partir de suas sementes, as primeiras cumarinas por Vogel, em 1820 (MURRAY, 1978). Também conhecidas como cromenonas, as cumarinas são lactonas do ácido *orto*-hidroxicinâmico presentes em uma ampla variedade de metabólitos secundários de plantas. Elas também podem ser produzidas por alguns fungos e bactérias específicos (PEREIRA *et al.*, 2018; FRANCO *et al.*, 2020). As cumarinas são classificadas como benzopironas, família de compostos heterocíclicos caracterizada por um anel benzeno fundido a um anel pirona, sendo subdivididas em benzo- α -pironas **22** (cumarinas) e benzo- γ -pironas **23** (flavonoides) (Figura 16A) (LACY; O’KENNEDY, 2004).

Mais de 1.300 cumarinas foram isoladas de plantas, bactérias e fungos, obtidas via rota

biossintética a partir do ácido chicórico ou pela via policetídica (Hussain *et al.*, 2018). Além disso, diversas rotas sintéticas são amplamente descritas na literatura devido a fácil disponibilidade e o baixo custo dos reagentes. As reações de Knoevenagel, Pechmann, Perkin, Reformatsky, Houben-Hoesch e Wittig (Figura 16B) representam os métodos mais utilizados para a síntese de cumarinas (SAIRAM *et al.*, 2015; SZWACZKO *et al.*, 2022). No entanto, outras abordagens sintéticas também estão disponíveis (LONČARIĆ *et al.*, 2022).

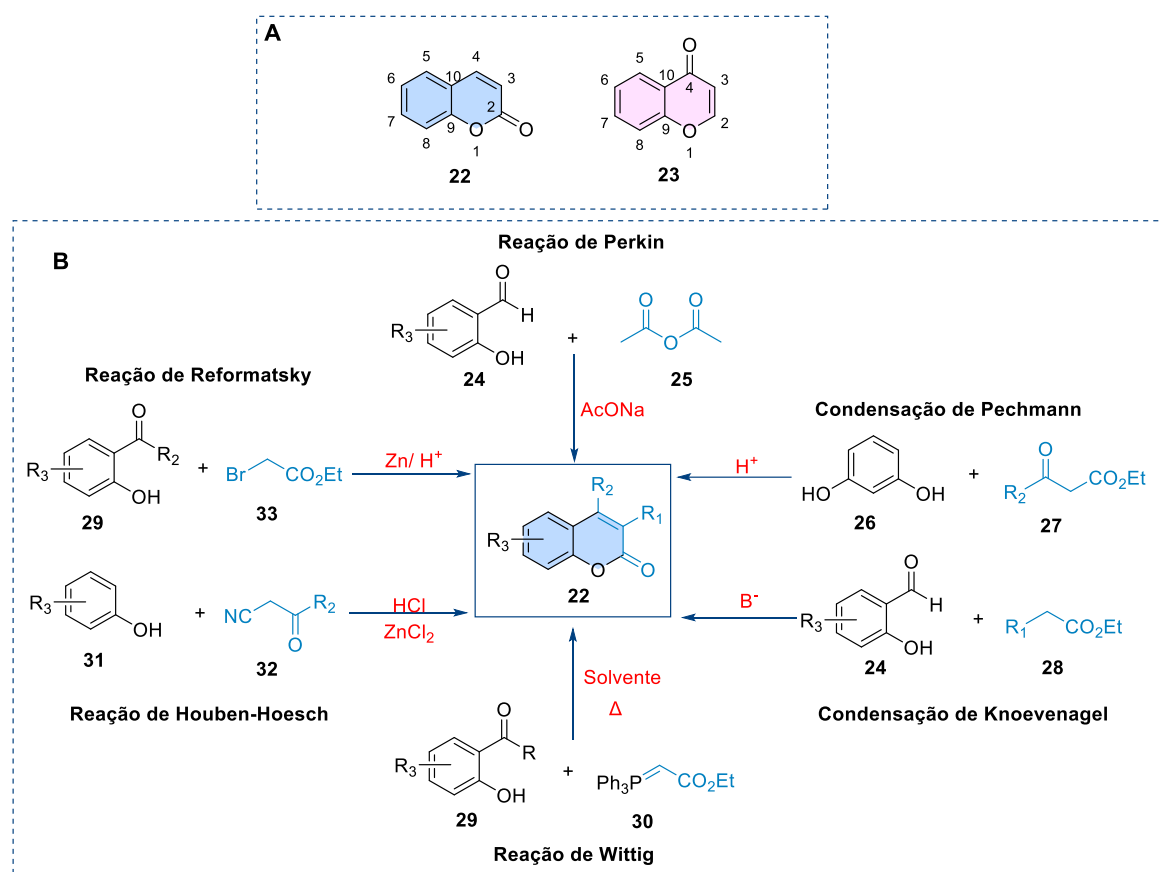


Figura 16.A) Estrutura das benzopironas. **B)** Métodos sintéticos mais utilizados na literatura para a síntese de cumarinas conhecidas como reação ou condensação de Knoevenagel, Pechmann, Perkin, Reformatsky, Houben-Hoesch e Wittig.

A reação de Perkin foi a primeira condensação descrita envolvendo o núcleo cumarínico, em 1868 (RABBANI, 2018). Conforme ilustrado na Figura 15, a reação de Perkin consiste na formação do núcleo cumarínico (**22**) por uma condensação do tipo aldólica seguida de ciclização intramolecular, entre um *orto*-hidroxibenzaldeído aromático (**24**) e um anidrido acético (**25**), na presença de um sal alcalino como catalisador (BORGES *et al.*, 2005). A condensação de Pechmann, por sua vez, foi descrita pela primeira vez em 1883 e envolve a condensação de um fenol (**26**) com um β -cetoéster (**27**), na presença de um catalisador ácido (MANHAS *et al.*, 2006). Essa rota sintética foi posteriormente otimizada em condições livres de solvente e assistidas por micro-ondas, proporcionando altos rendimentos. Por esse motivo,

tem sido amplamente empregada para a obtenção de cumarinas e outras benzopironas com propriedades biológicas, bem como para aplicações industriais (BORGES *et al.*, 2005; MANHAS *et al.*, 2006).

A reação de Knoevenagel, primeiramente publicada em 1894, consiste na condensação de um aldeído, como o *orto*-hidroxibenzaldeído (**24**), com dietilmalonato (**28**), na presença de amônia ou aminas como catalisadores (TROST, 1992). Essa reação pode ser catalisada por bases fracas ou pela combinação de aminas com ácidos carboxílicos ou ácidos de Lewis. Já a reação de Wittig envolve a interação de um aldeído ou cetona (**29**) com um ílideo de trifenilfosfônio (reagente de Wittig), gerando o núcleo cumarínico (**22**) com bons rendimentos e óxido de trifenilfosfina como subproduto (SHARMA *et al.*, 2022).

A reação de Houben-Hoesch constitui um tipo de acilação de Friedel-Crafts que sintetiza cetonas aromáticas a partir de nitrilas e arenos, na presença de ácido clorídrico e um ácido de Lewis (ZnCl_2 ou AlCl_3). Para formação do núcleo cumarínico (**22**), o fenol (**26**) reage com nitrilas, gerando intermediários β -cetonitrilas, seguidos de ciclização (FEDOROV *et al.*, 2012; SZWACZKO, 2022). Por fim, na reação de Reformatsky, a condensação de um aldeído ou cetona (**29**) com α -haloésteres (**32**), na presença de zinco metálico, forma β -hidroxiésteres, que após ciclização intramolecular forma o núcleo cumarínico (SHARMA *et al.*, 2022).

Além de sua versatilidade sintética, as cumarinas são reconhecidas por suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e terapêuticas. Elas têm recebido grande enfoque na Química Medicinal devido à atividade como antibióticos, antiparasitários, antifúngicos, anticoagulantes, anti-inflamatórios, antibacterianos, entre outros (PEREIRA *et al.*, 2018; SAMANTH; BHAT, 2024). Destacam-se também suas propriedades relacionadas ao SNC, sendo alvos promissores de pesquisa para o tratamento da DA, com ampla diversidade de compostos exibindo variadas atividades como multialvos (SAMANTH *et al.*, 2024).

A Figura 17 ilustra estudos recentes sobre derivados de cumarina como MTDLs contra frente a alvos da DA. Esses compostos tipicamente combinam a inibição da ChE, fundamental para a preservação da função cognitiva, com atividades adicionais direcionadas a vias relevantes para a doença, como a inibição da MAO-B, a agregação β -A, inibição da enzima BACE-1, GSK-3 β , H₃R outras e outras. Desta forma, a estratégia de usar o núcleo cumarínico visando a modulação de alvos envolvidos com a DA parece interessante e, de fato, vem sendo utilizada em nosso grupo (DE SOUZA *et al.*, 2019; FRANCO *et al.*, 2020; FERREIRA, 2021; NADUR *et al.*, 2025).

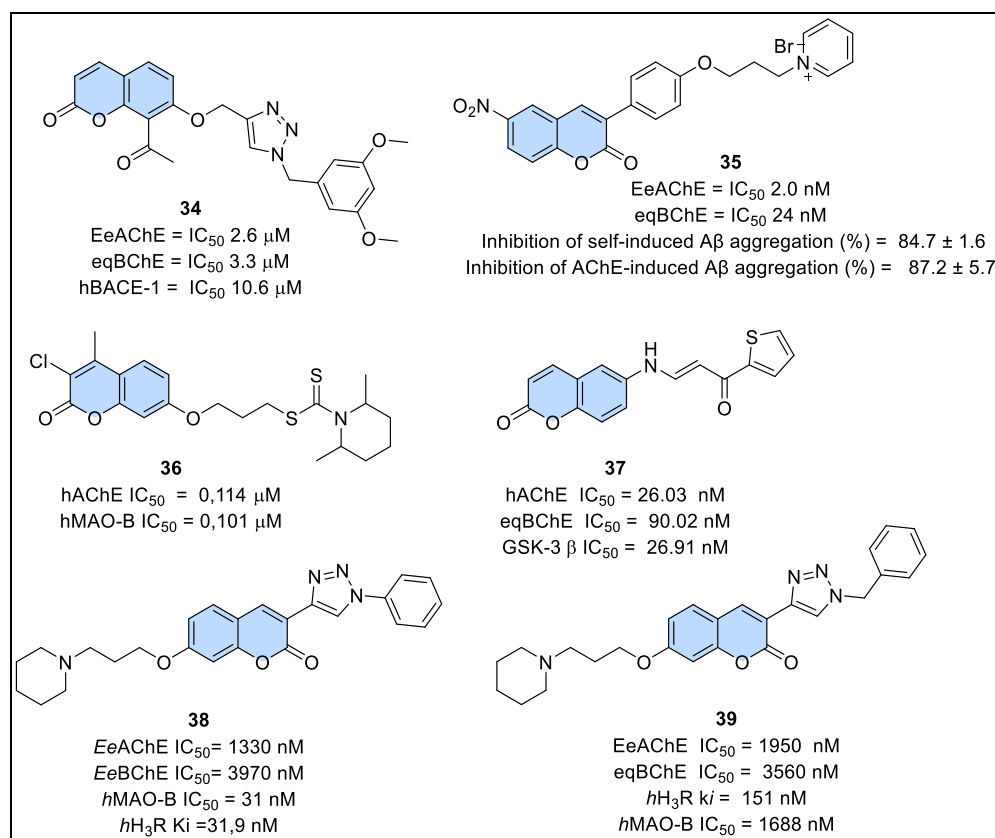


Figura 17. Derivados cumarínicos multialvo promissores para DA.

2. OBJETIVOS E PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

Tendo em vista a necessidade de novos candidatos a fármacos para o tratamento da DA, este trabalho teve como objetivo a síntese e avaliação farmacológica *in vitro* de novos ligantes multialvos cumarínicos, capazes de interagir simultaneamente com o H₃R e com outros alvos envolvidos na patologia da DA, AChE, BChE e as monoamina oxidases MAO-A/B, visando identificar candidatos a fármacos com potencial neuroprotetor e capacidade de modular vias neurotransmissoras relevantes para a doença.

A partir de dados de compostos cumarínicos do LaDMol-QM que apresentaram excelente atividade frente às colinesterases, foi identificado um perfil farmacofórico de inibidores cumarínicos de ChE descrito pelo nosso grupo de pesquisa (DE SOUZA et al., 2019; FERREIRA et al., 2021; NADUR et al., 2025). Com base na similaridade estrutural entre as subunidades farmacofóricas desses inibidores cumarínicos de ChE e as subunidades farmacofóricas dos antagonistas de H₃R descritas na literatura, foram planejadas a síntese de uma quimioteca de compostos cumarínicos na busca por identificar novos candidatos e compreender o perfil de atividade para exploração de futuras otimizações.

Essas subunidades farmacofóricas incluem uma região básica, considerada essencial para a interação com ambos os alvos, um espaçador de dois a três grupos metileno e um átomo

de oxigênio responsável pela conexão com um núcleo central ou ligado diretamente a uma região arbitrária, representada pelo núcleo cumarínico em nossos compostos (Esquema 1A). Nesse contexto, alguns compostos inibidores de ChE do LaDMol-QM foram selecionados para avaliação no modelo de afinidade frente ao H₃R. Com base nos resultados, o composto LaDMol-138 (**38**) foi identificado como promissor, apresentando excelente afinidade pelo H₃R ($K_i = 31,9$ nM).

A partir deste protótipo, que apresentava um perfil de substituição 3,7 (3-(1,2,3-triazol) e 7-alcoxiamina), foram planejados novos derivados com modificações estruturais em diversas posições do núcleo cumarínico, visando compreender os requisitos importantes para a atividade como ligantes de H₃R, além de buscar a adição de atividades adicionais como inibidores de colinesterases e MAO-B, conforme ilustrado no Esquema 2B.

Desta forma, nas posições 3 e 4 do núcleo cumarínico, que se encontram voltadas para a região arbitrária do modelo farmacofórico do H₃R e para as interações hidrofóbicas no sítio periférico (PS) das ChE, foi planejada a construção de compostos com substituintes aromáticos e heteroaromáticos (trocas bioisostéricas clássicas do núcleo 1,2,3-triazol) com diferentes padrões de substituição e volume, bem como anilinas substituídas (simplificação molecular do LaDMol-138 (**38**), com o objetivo de analisar qual das duas séries regioisoméricas (3-substituída e/ou 4-substituída) poderia promover as melhores interações adicionais no H₃R e no PS das ChE. Adicionalmente, com base nos resultados promissores relatados na literatura para 3-fenil-cumarinas (**40** e **41**), a análise das atividades dos compostos como inibidores de MAO (I-MAO), bem como da influência da posição de substituição, também são objetivos dessa exploração estrutural.

O perfil regioisomérico de substituição da subunidade básica alcoxiamina também foi objeto do planejamento, sendo exploradas as posições **6**, **7** e **8** do núcleo cumarínico. Para essas regiões, até o momento, não há relatos na literatura que discutam relações estrutura-atividade relacionadas a diferentes substituições com as atividades pretendidas, mas que continuam atendendo a todos os requisitos farmacofóricos dos alvos planejados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Planejamento sintético das séries dos derivados cumarínicos

A síntese para obtenção dos derivados cumarínicos está resumida na Figura 18. A síntese das séries foram planejadas com base em metodologias clássicas, partindo do núcleo cumarínico central, complementadas por abordagens avançadas como reações de acoplamento cruzado, amplamente empregadas em nosso grupo. Esses compostos foram organizados ao longo do texto em cinco séries distintas, cuja classificação considerou as variações estruturais dos substituintes, incluindo sua posição de inserção e natureza eletrônica.

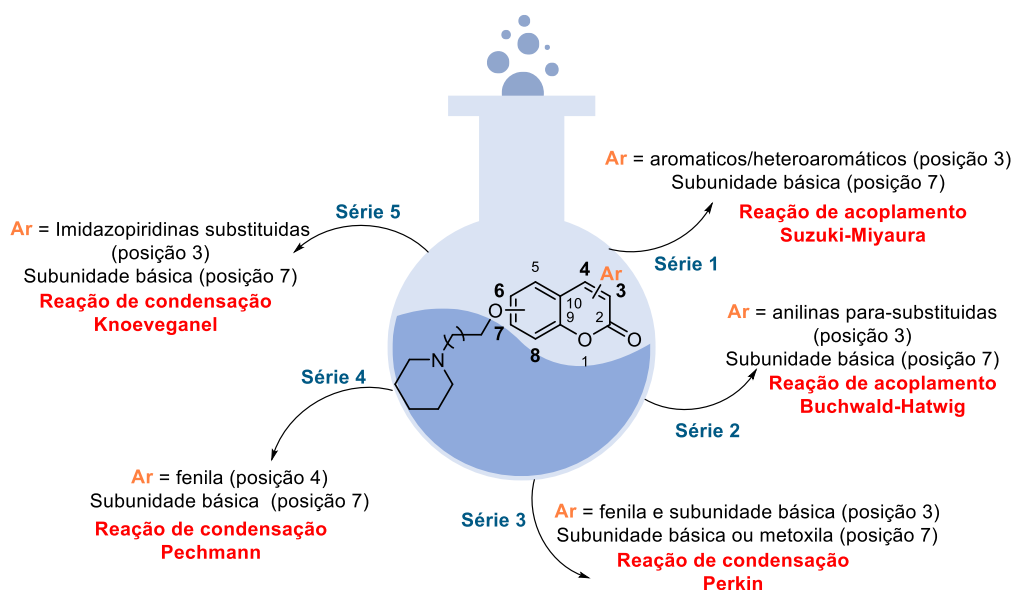


Figura 18. Resumo dos processos de síntese aplicados à obtenção dos derivados cumarínicos aplicados a cada série.

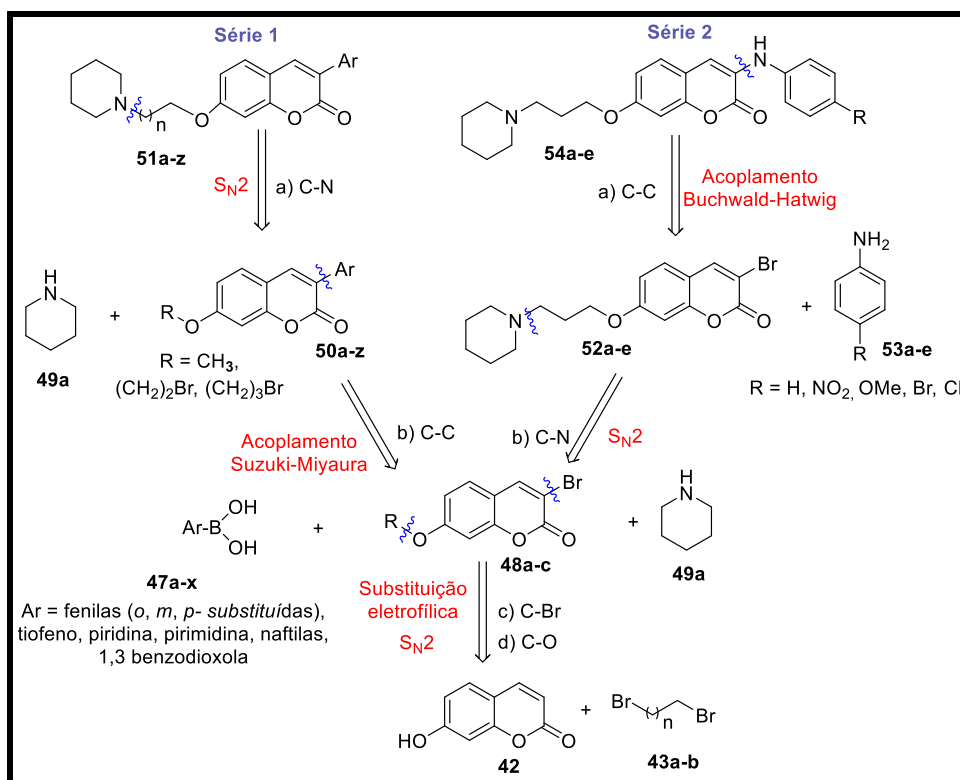
3.1.1. Análise retrossintética das séries 1 e 2

O esquema 2 representa a retrossíntese das **séries 1 (51a-z)** e **2 (54a-e)**, provenientes do mesmo intermediário chave. Na **série 1**, por meio de uma desconexão C-N (**etapa a**), foram identificados como precursores a piperidina (**49a**) e o derivados 7-(3-bromopropoxi)-2*H*-cromen-2-one (**50a**) substituídos obtidos por substituição nucleofílica bimolecular (S_N2). Na **série 2**, também por uma desconexão C-N (**etapa a**) foi identificado o intermediário 3-bromo-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2*H*-cromen-2-ona (**52a-e**) e anilinas *para*-substituídas (**53a-e**), explorando a reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig.

As desconexões da **etapa b** das **séries 1 e 2** levam ao mesmo composto chave (**48a-c**). Na **série 1**, esse intermediário é obtido por uma desconexão C-C (**etapa b**) a partir da reação de acoplamento cruzado Suzuki-Miyaura, identificando que **48** pode ser acoplado a ácidos borônicos (**47a-x**). Já na série 2, uma desconexão C-N (**etapa b**) permite detectar a piperidina

(49a) e o composto-chave (48a-c) através de uma S_N2.

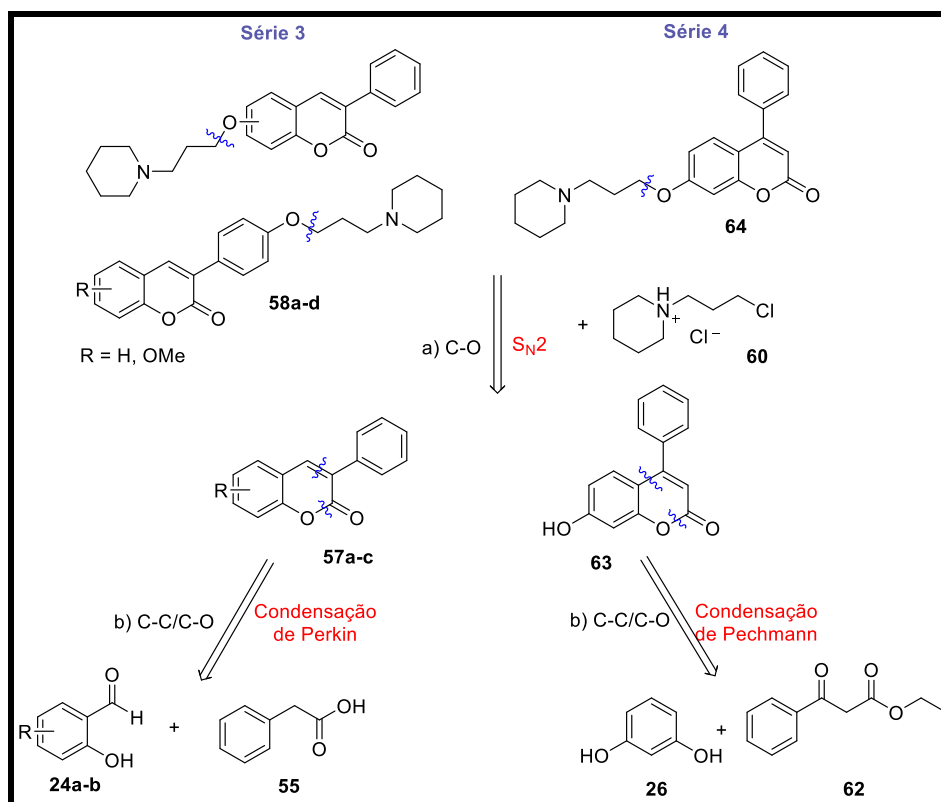
Nas etapas c e d, a partir de duas desconexões C-Br e C-O do composto chave 48, foi possível identificar os reagentes de partida umbeliferona (42) e dibromoalcanos (43a-b) obtidos comercialmente. A partir de 42 e 43a-b, duas reações subsequentes de S_N2 substituição eletrofilica à região α,β-insaturada do anel da lactona pode levar aos intermediários chaves 48.



Esquema 2. Análise retrossintética para obtenção dos derivados cumarínicos das séries 1 e 2.

3.1.2. Análise retrossintética das séries 3 e 4

Os derivados cumarínicos das séries 3 e 4 referem-se às substituições nas posições 4, 6 e 8 do núcleo cumarínico com grupos fenila (posição 4) (64, série 4) e piperidinopropoxila (posições 6 e 8) (58a-d, série 3). A análise retrossintética, ilustrada no Esquema 3, inicia-se com desconexão C-O (etapa a) comum às duas séries, identificando fenilcumarinas hidroxiladas (56a-c) e cloridrato de 3-cloropropoxi-piperidina (60) como reagentes oriundos dos síntons nucleofílicos e eletrofilicos, respectivamente. Duas novas desconexões C-C e C-O (etapa b) retrotraem aos salicilaldeídos substituídos (24a-c) e ácido fenilacético (55) na série 3, via condensação de Perkin, e ao resorcinol (26) e β-cetoéster (62) na série 4, por condensação de Pechmann clássica.



Esquema 3. Análise retróssintética para obtenção dos derivados cumarínicos da **série 3 e 4**.

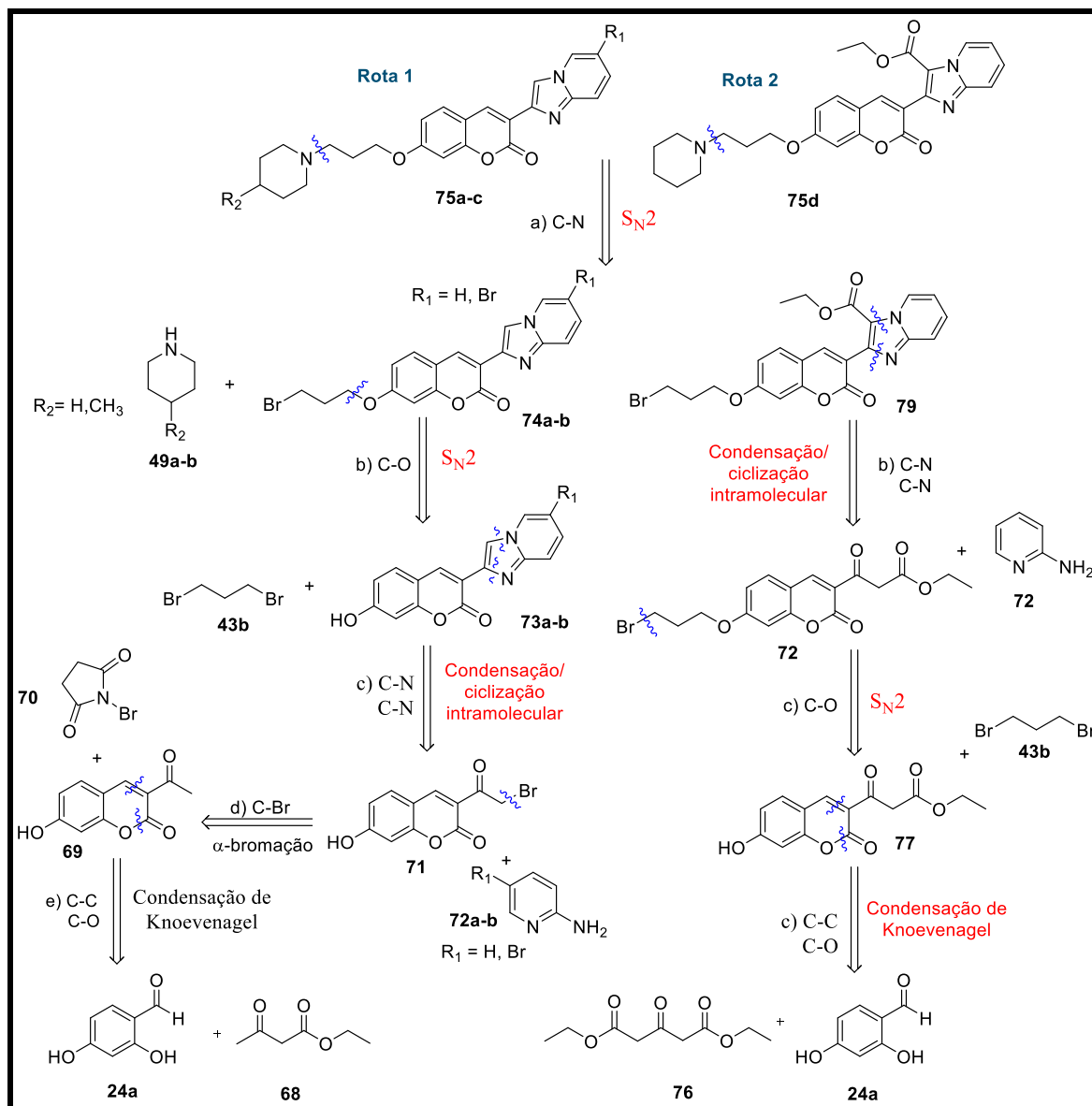
3.1.3. Análise retróssintética da série 5

A **série 5** refere-se à síntese das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridina)-cumarinas (**75a-d**) que foram divididas em duas rotas sintéticas conforme a variação de substituição no anel imidazopiridina. A análise retróssintética, ilustrada no esquema 4, inicia-se com a desconexão C-N (**etapa a**), comum às duas rotas, identificando os intermediários **68a-c**, **79** e piperidina (**49a-c**).

Na rota 1, a **etapa b** inicia-se com uma desconexão C-O via S_N2, revelando o intermediário **67a-b** e 1,3-dibromopropano **43b**. Posteriormente, duas conexões C-N (**etapa c**) retrotraem o intermediário bromado (**71**) e 2-aminopiridina (**72a-b**), via reação de condensação seguida de ciclização intramolecular. Em seguida, a partir uma desconexão C-Br (**etapa d**) via α -bromação, foram identificados a 3-ceto-7-OH-cumarina (**69**) e *N*-bromosuccinamida (**70**). Por fim, duas desconexões C-C e C-O (etapa e) via condensação de Knoevenagel, levam 2,4-dihidroxibenzaldeído (**24a**) e etilacetoacetato (**68**).

A rota 2 segue o mesmo procedimento reacional da rota 1, com adaptações devido ao éster na posição 3 do núcleo da imidazopiridina. Nesse caso, as duas desconexões C-N (**etapa b**) foram realizadas via *one-pot* por bromação seguida de condensação/ciclização, revelando o intermediário β -cetoéster **78** e o reagente 2-aminopiridina (**72**). Em seguida, a partir de uma

desconexão C-O (**etapa c**), via S_N2 obtém-se o β -cetoéster hidroxilado (**77**). Por fim, com duas desconexões C-C e C-O (**etapa d**) são identificados os reagentes dietilacetoadicarbóxido (**76**) e 2,4-di-hidroxi-benzaldeído (**24a**).



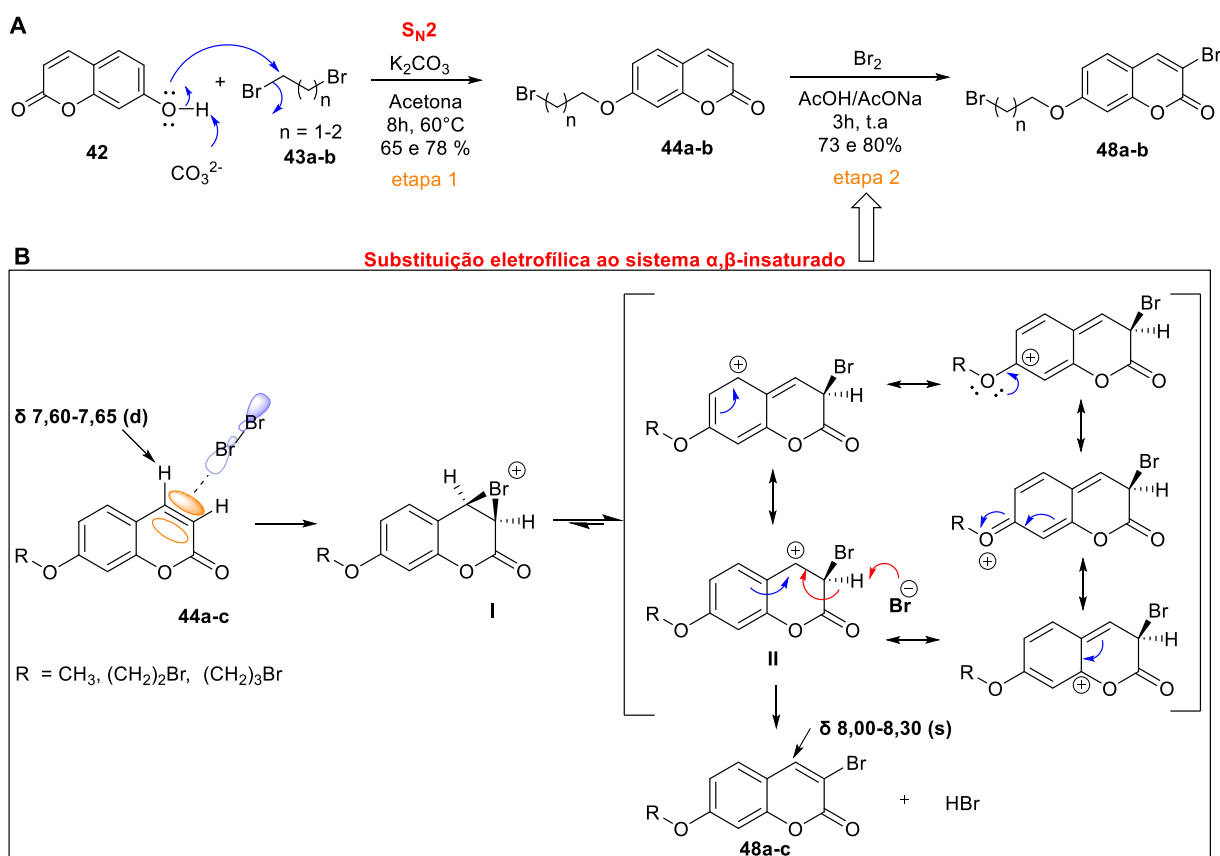
Esquema 4. Análise retrossintética para obtenção dos derivados cumarínicos da **série 5** separados pela rota 1 e 2.

3.2. Síntese dos intermediários chave 3-Br-cumarinas (48a-c)

A síntese dos intermediários-chave **48a-c** ocorre em duas etapas, exceto para **48c** (metoxila na posição 7), que requer apenas a etapa 2. O Esquema 5 ilustra ambas as etapas reacionais e o mecanismo da etapa final. Na primeira etapa, obtêm-se as 7-bromoalcocumarininas (**44a-b**), com rendimentos de 65 e 78%, a partir da umbeliferona (**42**), via reação de Williamson em meio básico (K_2CO_3), utilizando dibromoalcanos (**43a-b**) com 2 e 3 metilenos, em acetona a 60°C em tubo reacional selado. Em seguida, os intermediários-

chave **48a-c** foram obtidos com rendimentos de 70-80%, pela bromação seletiva com Br₂ a temperatura ambiente, em meio tamponado com acetato de sódio/ácido acético (CH₃COONa/CH₃COOH) (Esquema 5A).

As reações de ambas as etapas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando sílica como fase estacionária e hexano/acetato de etila (30%) como eluente, tanto na etapa 1 quanto na etapa 2. Na etapa 1, foi necessária a purificação por cromatografia em coluna flash automatizada de fase normal, com gradiente de hexano/acetato de etila (10–30%). Na etapa 2, a reação foi resfriada em banho de gelo e o produto foi filtrado a vácuo, lavando-se com água destilada. Após o isolamento e purificação, os compostos finais foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C (RMN ¹H e ¹³C), cujos espectros são ilustrados nas Figuras S1–S8 do Anexo 7.2.



Esquema 5. A- Síntese e B- esquema de intermediários proposto para os derivados 3-bromocumarínicos **48a-c**.

As cumarinas apresentam características "pseudoaromática" devido à fusão do sistema π do benzeno (6 π elétrons) com o sistema α,β -insaturado da pirona, no qual o oxigênio do éter doa um par de elétrons, completando o sexteto aromático (6 elétrons π) no anel heterocíclico (CITARELLA *et al.*, 2024). Devido a essa característica, a bromação seletiva em C3 não deve ser classificada como substituição eletrofílica aromática clássica, mas sim como uma

substituição eletrofílica ao sistema α,β -insaturado da pirona.

O esquema de intermediários proposto inicia-se com a coordenação do bromo ao alceno da pirona formando o íon bromônio (**I**), resultante da interação entre o orbital σ^* vazio do bromo (LUMO) ao orbital π ocupado do alceno da pirona (HOMO). Em seguida, ocorre a abertura desse complexo, gerando um intermediário iônico estabilizado por ressonância (**II**), com possível equilíbrio entre o íon bromônio (**I**) e um β -bromocarbocátion (**II**), dependendo da estabilidade do carbocátion formado. O β -bromocarbocátion (**II**) é favorecido nesse sistema por 2 fatores principais, a estabilização por ressonância causada pela fusão da pirona com benzeno, a estabilização da carga positiva nas estruturas de ressonância exercida pelo grupo alcoxila e solvatação promovida pelo meio ácido acético.

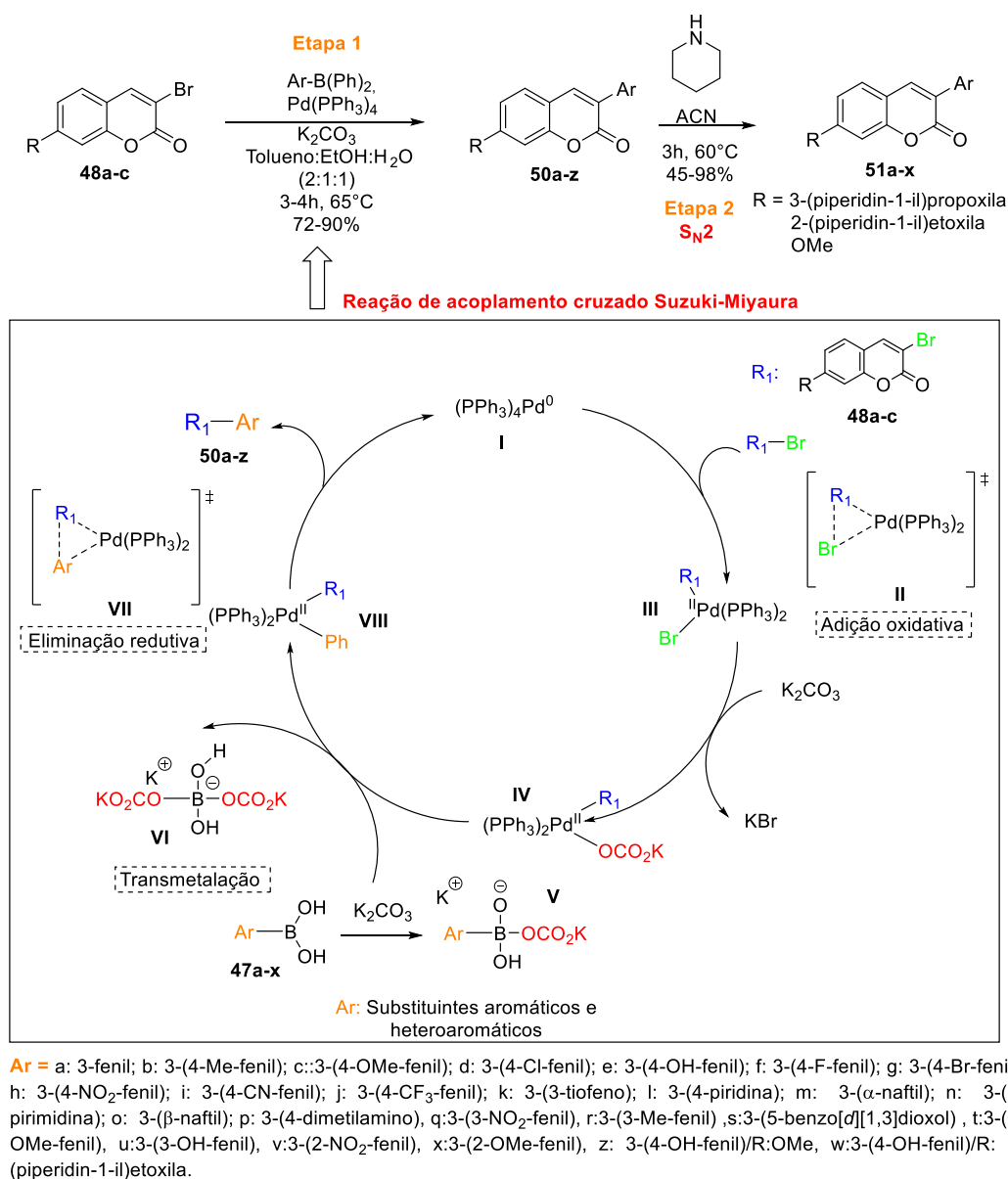
Por fim, o brometo presente no meio abstrai o hidrogênio ácido do intermediário **II**, restaurando a ligação dupla C3=C4 e formando os intermediários-chave **48a-c**. Observa-se a formação de ácido bromídrico (HBr), potencialmente problemático, pois a cumarina pode sofrer degradação em meio ácido ou alta temperatura, com abertura do anel lactônico. Assim, o meio reacional foi tamponado com CH₃COONa/CH₃COOH para neutralizar o HBr e evitar a possível degradação do núcleo cumarínico (NADUR, 2025).

3.3. Síntese dos derivados 51a-w - série 1

A síntese dos produtos **51a-z** ocorre em duas etapas a partir do intermediário chave **48a-c**. A etapa principal (etapa 1) consiste na obtenção dos intermediários **50a-z** por reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura, em rendimentos variando de 72-90% (Esquema 6). Essa reação utilizou diversos ácidos borônicos aromáticos e heteroaromáticos, tetrakis(trifenilfosfina)paládio(0) (**I**), carbonato de potássio e uma mistura de solventes, resultando na formação dos intermediários **50a-z** (Tabela 1). Na etapa 2, através de uma S_N2 na presença de piperidina em acetonitrila (ACN), foram obtidos os produtos finais **51a-z** com rendimentos variando de 45-98% (Esquema 6). As propriedades físicas e químicas e informações gerais desses compostos estão apresentadas na Tabela 2.

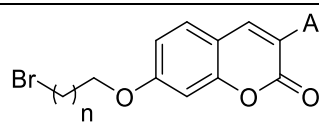
O mecanismo proposto para a síntese dos intermediários **50a-z**, é representado através do ciclo catalítico do catalizador Pd(PPh₃)₄ (**I**) baseando-se em três etapas principais, a adição oxidativa, transmetalção e eliminação redutiva (Esquema 5). Na adição oxidativa, ocorre a inserção da ligação C3-Br do intermediário **48a-z**, representado pelo estado de transição (**II**), formando o complexo com Pd⁺² (**III**). Após a formação do complexo de organopaládio (**III**), ocorre a substituição do nucleofílica do carbonato de potássio e eliminação do Br formando um complexo oxidado estável (**IV**).

Na transmetalização, ocorre troca da unidade orgânica das espécies organoboro (**47a-x**) com a base. Primeiramente, forma-se o complexo boronato (**V**), no qual a base se liga ao orbital vazio do boro. Em seguida, a unidade orgânica do boronato se coordena ao paládio, representada pelo estado de transição (**VII**), formando o intermediário (**VIII**) e do ácido fenilborônico. A última etapa, eliminação redutiva, completa o ciclo catalítico do paládio, regenerando a forma reduzida (**I**). Nesta etapa, clivam-se as duas ligações C-Pd das unidades orgânicas, formando a ligação C-C dos intermediários **50a-b** (PENTSAK et al., 2019).



Esquema 6. Procedimentos experimentais dos derivados **51a-z** e mecanismo proposto para os intermediários **50a-z** via reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura.

Tabela 1. Propriedades físicas e analíticas dos compostos dos intermediários 50a-w da Série 1



50a-w

Código	n	Ar	Rendimento	P.F. (°C) ^b
50a	2	Fenil	76%	97-109 ^b
50b	2	4-Me-fenil	74%	145-153 ^b
50c	2	4-OMe-fenil	72%	120-127 ^b
50d	2	4-Cl-fenil	73%	115-119 ^b
50e	2	4-OH-fenil	60%	153-157 ^b
50f	2	4-F-fenil	73%	135-140 ^b
50g	2	4-Br-fenil	80%	160-165 ^b
50h	2	4-NO ₂ -fenil	86%	155-159 ^b
50i	2	4-CN-fenil	89%	182-191 ^b
50j	2	4-CF ₃ -fenil	61%	148-156 ^b
50k	2	3-tiofeno	71%	112-120 ^b
50l	2	4-piridina	50%	210-217 ^c
50m	2	α-naftil	82%	175-193 ^b
50n	2	5-pirimidina	66%	220-226 ^c
50o	2	β-naftil	72%	195-207 ^c
50p	2	4-dimetilamino	90%	147-154 ^b
50q	2	3-NO ₂ -fenil	63%	122-129 ^b
50r	2	3-Me-fenil	53%	100-113 ^b
50s	2	5-benzo[d][1,3]dioxol	81%	165-170 ^b
50t	2	3-OMe-fenil	56%	115-120 ^b
50u	2	3-OH-fenil	53%	140-147 ^b
50v	2	2-NO ₂ -fenil	36%	- ^d
50x	2	2-OMe-fenil	54%	- ^d
50z	1	4-OH-fenil	71%	188-195 ^b
50w	OMe	4-OH-fenil	78%	122-137 ^b

^bfusiômetro automático Buchi M-565, ^cfusiômetro manual Gehaka PF-1500 Farma, ^dóleo

Diversos fatores interferem na reação de Suzuki-Miyaura, incluindo efeitos eletrônicos, estéricos, reatividade do substrato e natureza da base. Ligantes deficientes em elétrons e volumosos dificultam a adição oxidativa, mas facilitam a eliminação reductiva (D'Alterio et al., 2021). Conforme os rendimentos dos intermediários Tabela 1, observa-se

pouca diferença entre os derivados fenílicos *para*-substituídos com grupos doadores (60-90%) e retiradores de elétrons (61-89%). Contudo, quando esses grupos ocupam posições *orto* ou *meta*, os rendimentos diminuem (36-63%), provavelmente devido aos efeitos eletrônicos e estéricos que afetam a transmetalização, etapa limitante quando os substituintes estão nos ácidos borônicos. Importante destacar que a reação de acoplamento ocorre na posição C3 da cumarina, enquanto a posição C2 apresenta uma carbonila que pode exercer um pseudo efeito *orto* sob essas reações de acoplamento realizadas, o que também corroboraria para a redução dos rendimentos relatados acima com ácidos borônicos *orto* e *meta*-substituídos.

Substratos contendo nitrogênio, como piperidina, piridina e pirimidina, podem ocasionar o envenenamento do catalisador Pd(PPh₃)₄ devido à coordenação dos pares de elétrons livres dos nitrogênios ao Pd⁰, provavelmente devido a facilidade de acesso ao Pd⁰ com o ligante de PPh₃, formando complexos inativos que inibem a adição oxidativa (HEGEDUS; MÁTHÉ, 2001; HAIBACH *et al.*, 2022). Isso explica os rendimentos com os derivados piridina (**50l**) e pirimidina (**50n**), que apesar de não possuírem efeitos estéricos *orto* ou *meta*, apresentaram rendimentos reduzidos (50% e 66%, respectivamente), suficiente, entretanto para seguir para etapa seguinte sem a necessidade de troca do catalisador.

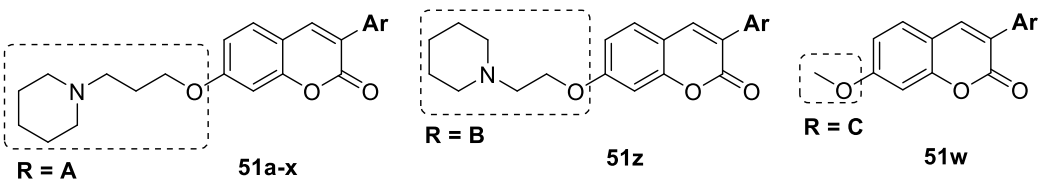
Como descrito anteriormente, os compostos finais **51a-w** foram obtidos na etapa final por meio de uma reação de aminação via S_N2, na qual a piperidina atua como nucleófilo. Sob a perspectiva de derivatização em última etapa, desejável para a construção de uma série congênere, a realização da aminação antes da reação de acoplamento cruzado de Suzuki–Miyaura poderia, a princípio, ser mais vantajosa. Entretanto, ensaios conduzidos com esse objetivo demonstraram que a presença da piperidina, nas condições empregadas para o acoplamento de Suzuki–Miyaura, resultava na formação de múltiplas impurezas. Esses resultados justificam a rota escolhida, na qual a introdução desse substituinte (piperidina) ocorre apenas na etapa final.

As reações de ambas as etapas foram monitoradas CCD, utilizando sílica como fase estacionária e hexano/acetato de etila (30%) como eluente na etapa 1, e diclorometano/metanol (10%) como eluente na etapa 2. Ambas as etapas geraram poucas impurezas, que exigiram purificação por cromatografia em coluna flash automatizada de fase normal, com gradiente de hexano/acetato de etila (10–30%) para a etapa 1 e diclorometano/metanol (0–15%) para a etapa 2. Em alguns casos da etapa 2, não foi necessária purificação, bastando o isolamento por partição entre acetato de etila e água.

Após o isolamento e purificação, os intermediários **50a-w** (Figuras S9–S55 do Anexo 7.2) e os compostos finais **51a-w** (Figuras S56–S103 do Anexo 7.2) foram caracterizados por

RMN ^1H e ^{13}C . Os produtos **51a-w** também foram identificados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Figuras S160–S180 do Anexo 7.3), e suas purezas estão indicadas na Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades físicas e analíticas dos produtos 51a-w da Série 1

					
Código	R	Ar	Rendimento	P.F. (°C) ^{a/b}	Pureza
51a	A	Fenil	98%	163,8 ^a	99,11%
51b	A	4-Me-fenil	72%	145,9 ^a	99,14%
51c	A	4-OMe-fenil	60%	134,3°C ^a	98,55
51d	A	4-Cl-fenil	46%	150 ^a	95,04%
51e	A	4-OH-fenil	52%	210 ^a	95,03%
51f	A	4-F-fenil	96%	147 ^a	96,39%
51g	A	4-Br-fenil	74%	-	93,02%
51h	A	4-NO ₂ -fenil	45%	147 ^a	97,02%
51i	A	4-CN-fenil	56%	288 ^a	100%
51j	A	4-CF ₃ -fenil	61%	146,5 ^a	100%
51k	A	3-tiofeno	65%	164,9 ^a	95,18%
51l	A	4-piridina	20%	181°C ^a	96,69%
51m	A	α-naftil	83%	141°C ^a	100%
51n	A	5-pirimidina	59%	162°C ^a	100%
51o	A	β-naftil	50%	155,6 ^a	100%
51p	A	4-dimetilamino	48%	155°C ^a	97,44%
51q	A	3-NO ₂ -fenil	31%	95-105 ^b	98,91%
51r	A	3-Me-fenil	33%	105-112 ^b	96,10%
51s	A	5-benzo[d][1,3]dioxol	20%	95-110 ^b	96,40%
51t	A	3-OMe-fenil	32%	100-115 ^b	97,65%
51u	A	3-OH-fenil	31%	190-197 ^b	99,36%
51v	A	2-NO ₂ -fenil	54%	145-155 ^b	98,29%
51x	A	2-OMe-fenil	28%	178-187 ^b	- ^c
51z	B	4-OH-fenil	49%	178-189 ^b	- ^c
51w	C	4-OH-fenil	75%	154-168 ^b	- ^c

^afusiômetro automático Buchi M-565, ^bfusiômetro manual Gehaka PF-1500 Farma, ^cintermediários

Nas análises de RMN ¹H e ¹³C, sinais característicos confirmaram as estruturas dos produtos **51a-w**, conforme ilustrado na Figura 19. Como representado na Figura 19A, alguns sinais característicos apresentaram perfis similares em todos os compostos e confirmaram a estrutura base da cadeia da amino alcoila e do núcleo cumarínico. Os prótons dos grupos metilenos ligados ao nitrogênio (CH₂-N, posições 3', 4' e 8') foram atribuídos aos multipletos ou singletos largos na região de δ 2,25–2,50 ppm em RMN de ¹H, cujos carbonos correspondentes foram observados na faixa de δ 54–56 ppm em RMN de ¹³C. Em contraste, o sinal do metileno adjacente ao oxigênio (CH₂-O, posição 1') apresentou-se como um quarteto mais desprotegido entre δ 4,0–4,3 ppm (¹H) e δ 65–68 ppm (¹³C), confirmando a ligação éter na posição 7 da cumarina.

O sinal diagnóstico mais relevante da formação do sistema heterocíclico foi o do hidrogênio na posição 4 (H-4), o mais desprotegido da estrutura devido à desblindagem causada pela ressonância da carbonila adjacente e pelos efeitos de anisotropia do sistema aromático fundido, sendo observado entre δ 7,10–9,00 ppm (¹H) e δ 135–140 ppm (¹³C). Adicionalmente, para o composto fluorado **51f**, a presença do anel *p*-fluorfenila na posição 3 foi ratificada pela observação de desdobramentos característicos nos sinais aromáticos devido ao acoplamento heteronuclear com o núcleo de ¹⁹F. Em RMN de ¹³C, o carbono diretamente ligado ao flúor (C-3") manifestou-se um deslocamento de aproximadamente δ 163,8 ppm, enquanto os carbonos em posição *orto* e *meta* exibiram constantes de acoplamento de menor intensidade, confirmando o padrão de substituição no sistema aromático lateral.

O flúor exerce dois efeitos opostos no anel aromático: um efeito indutivo (–I), retirando densidade eletrônica, e um efeito de ressonância (+R), no qual os pares de elétrons livres do flúor podem ser doados ao anel. Na posição *orto* ao flúor, os prótons apresentam deslocamento químico menor, entre 7,12 e 7,16 ppm, e na posição *meta* apresentam sinais com maior deslocamento químico, entre 7,68 e 7,70 ppm. Isso ocorre porque, nas posições *orto* e *para* o efeito +R prevalece sobre o efeito indutivo, uma vez que a doação de pares de elétrons pelo flúor aumenta a densidade eletrônica nessas posições específicas. Portanto, quanto maior a densidade eletrônica, maior é a blindagem contra o campo magnético externo, o que resulta em um deslocamento químico menor.

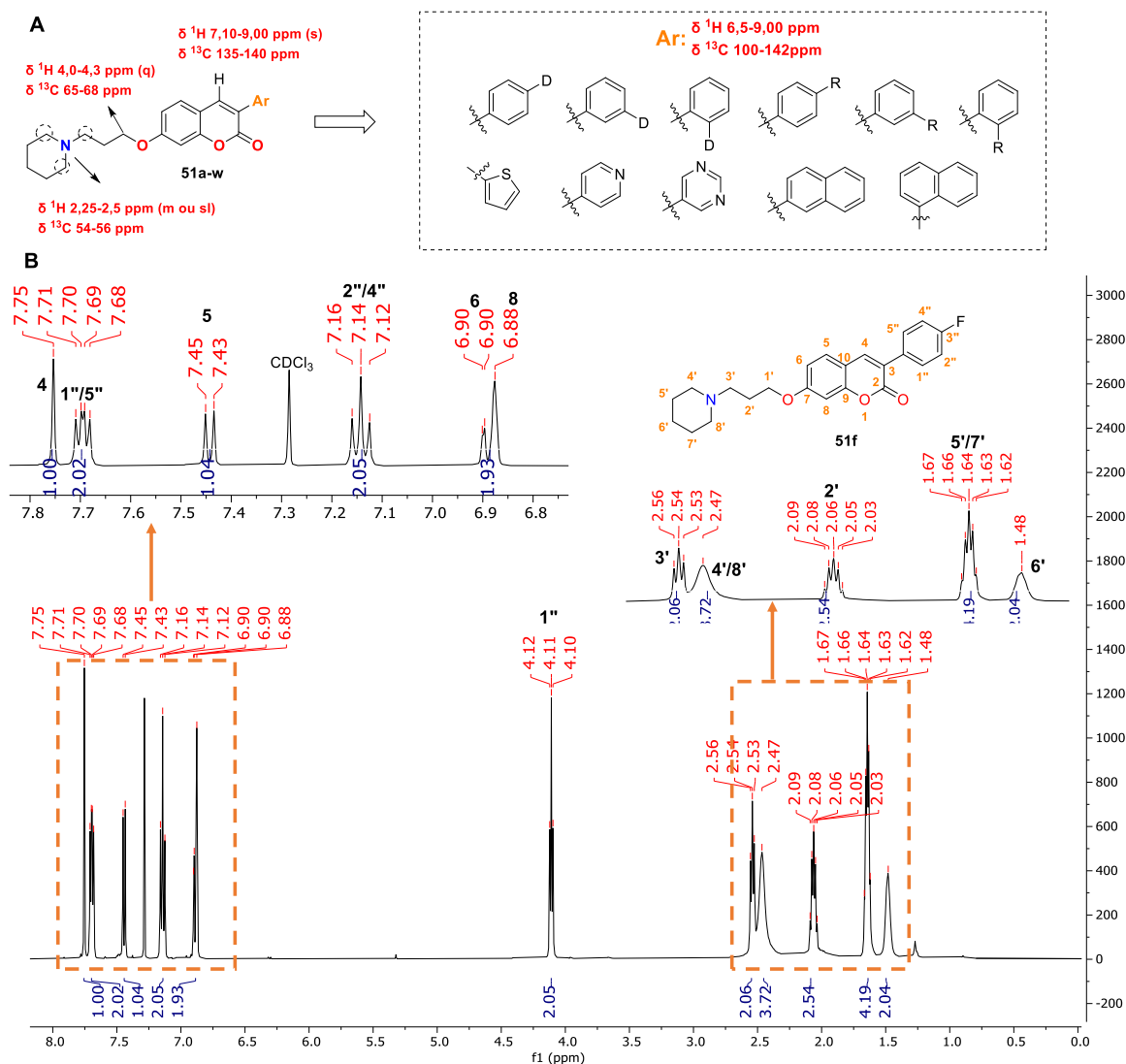
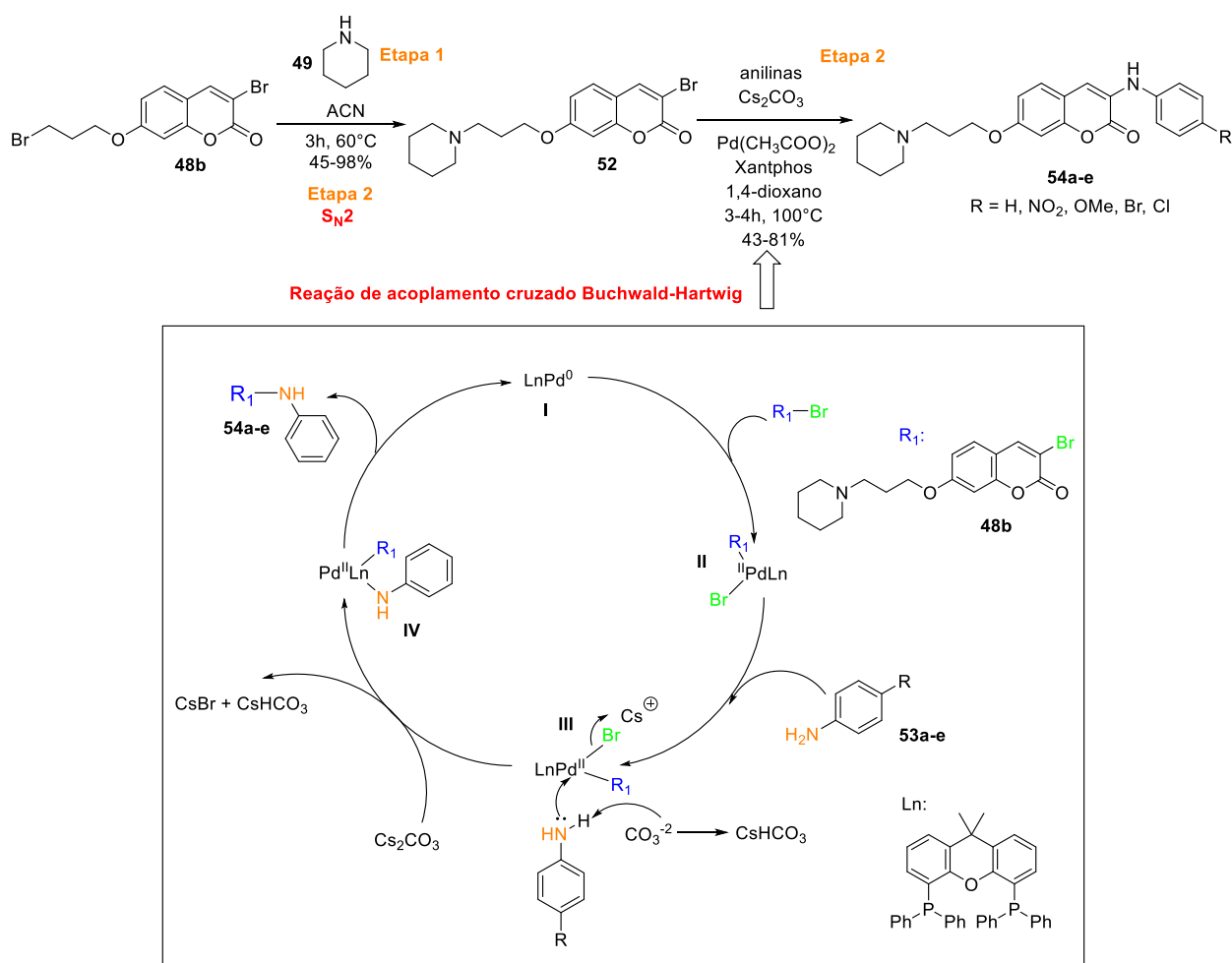


Figura 19.A) Representação esquemática dos deslocamentos químicos (δ , ppm) dos prótons nos compostos finais **51a-w** em RMN de ^1H (CDCl_3 , 500MHz). (B) Espectro expandido do composto **51f**, destacando a atribuição detalhada dos principais sinais aromáticos e da cadeia alquílica para exemplificação.

3.4.Síntese dos derivados 3-(*N*-anilino) 7-aminoalcoxi-cumarínicos (**54a-e**) – série 2

A síntese dos produtos **54a-e** ocorre em duas etapas a partir do intermediário **48b**, conforme representado no Esquema 7. O intermediário chave, composto **52**, é obtido na etapa principal por aminação similar à etapa 1 da série 1, com rendimento de 63%. Na etapa final, realiza-se a reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig na presença de anilinas substituídas (**53a-e**), carbonato de cério como base, acetato de paládio e Xantphos como ligante, em 1,4-dioxano como solvente, em rendimentos de 43-81%. As propriedades físicas, químicas e informações gerais desses compostos estão listadas na Tabela 3. Esses compostos foram sintetizados com objetivo de avaliar não só de avaliar modificações para melhora de atividade (farmacodinâmica), mas também nas propriedades farmacocinéticas como a modulação

solubilidade, permeabilidade e outros, que podem ser moduladas com a introdução do átomo de nitrogênio (BUSKES; BLANCO; et al., 2020).



Esquema 7. Procedimentos experimentais e esquema de intermediários proposto via reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig para os produtos **54a-e**.

Tabela 3. Propriedades físicas e analíticas dos compostos **52** e **54a-e** da Série 2

Código	R	Rendimento	P.F. (°C)	Pureza
52	-	63%	97-110	97%
54a	H	77%	110-117	98,59%
54b	NO ₂	75%	120-125	98,62%
54c	OMe	69%	134-138	100%
54d	Br	35%	147-150	93%
54e	Cl	73%	143-149	90,28%

Assim como na reação de Suzuki-Miyaura, o mecanismo do acoplamento Buchwald-Hartwig é melhor visualizado a partir da perspectiva do catalisador de paládio (I), apresentando algumas similaridades. A reação inicia-se com a adição oxidativa do haleto de arila (intermediário **52**) ao Pd(0), formando o complexo de organopáladio (II) **II**. Em seguida, ocorre

a coordenação da anilina substituída (**53a-e**) ao Pd(II), assistida pela base carbonato de cério (Cs_2CO_3), que desprotona a anilina e facilita a transmetalização, gerando o intermediário **III**. Por fim, a eliminação redutiva (**IV**) forma os produtos desejados (**54a-e**), regenerando o catalisador Pd(0) e completando o ciclo catalítico (Esquema 18) (PAUL; PATT; HARTWIG, 1994; GURAM; BUCHWALD, 1994).

Apesar de algumas similaridades, existem diferenças importantes entre as reações de Buchwald-Hartwig e Suzuki-Miyaura que vão além das mais claras relacionadas aos reagentes e à formação de ligações C-N versus C-C. Por exemplo, a Buchwald-Hartwig funciona melhor com ligantes volumosos de paládio como Xantphos, que facilitam a coordenação da anilina e evitam subprodutos como dimerização do Pd ou homoacoplamentos. Já na Suzuki-Miyaura, catalisadores menos volumosos como $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ou $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, sem ligantes auxiliares, são mais utilizados, pois complexos volumosos dificultariam a transmetalização com ácidos borônicos e os ligantes hidrofóbicos seriam insolúveis no meio aquoso (ALFANO *et al.*, 2025).

Outro fator importante é o tipo de solvente, a reação de Buchwald-Hartwig requer solventes orgânicos anidros como 1,4-dioxano, pois a protonação das aminas em meio aquoso reduz sua nucleofilicidade, prejudicando a transmetalização. Já na Suzuki-Miyaura, muitas metodologias empregam água como solvente, que auxilia na ativação dos ácidos borônicos e na hidrólise da base, facilitando a transmetalização (SHERWOOD *et al.*, 2019; AHMED; MUSHTA; CHINNAM, 2023).

As reações de ambas as etapas foram monitoradas por CCD, utilizando sílica como fase estacionária e diclorometano/metanol (0-15%) como eluente. Ambas geraram poucas impurezas, purificadas por cromatografia em coluna flash automatizada de fase normal com gradiente de diclorometano/metanol (0-15%). Em alguns casos da etapa 2, lavagem com acetona removeu impureza próxima ao produto.

Após isolamento e purificação, os compostos finais foram caracterizados por RMN ^1H e ^{13}C (Figura S104-S113 do anexo 7.2), LC-MS e HPLC (Figura S181-S183 do anexo 7.2) e tiveram suas purezas avaliadas (Tabela 3). Nas análises de RMN ^1H e ^{13}C , sinais característicos confirmaram as estruturas dos produtos **54a-e**, conforme ilustrado na Figura 20. De modo geral, núcleo cumarínico e da cadeia aminoalcoxila foi evidenciada pela similaridade dos deslocamentos químicos observados em todos os derivados da série. A confirmação da monoarilação é comprovada com sinal de -NH próximo ao deslocamento de aromáticos (87,09-9 ppm), claramente identificável em DMSO-*d*6 devido à menor taxa de troca protônica e ao efeito de desblindagem por ressonância com os sistemas aromáticos adjacentes.

No espectro de RMN de ^{13}C , a formação da ligação C-N foi corroborada pelo

deslocamento dos carbonos quaternários nas posições 3 (do núcleo cumarínico) e 1''-6'' (do anel arílico lateral), situados na faixa de δ 134–139 ppm. Adicionalmente, o hidrogênio H-4 do núcleo cumarínico permanece como o sinal mais desprotegido do espectro ^1H , enquanto as variações nos deslocamentos químicos e multiplicidades na região aromática (δ 6,5–8,5 ppm) correlacionam-se diretamente com o efeito indutivo e mesomérico dos diferentes substituintes (H, NO_2 , OMe, Br, Cl) presentes no anel arílico.

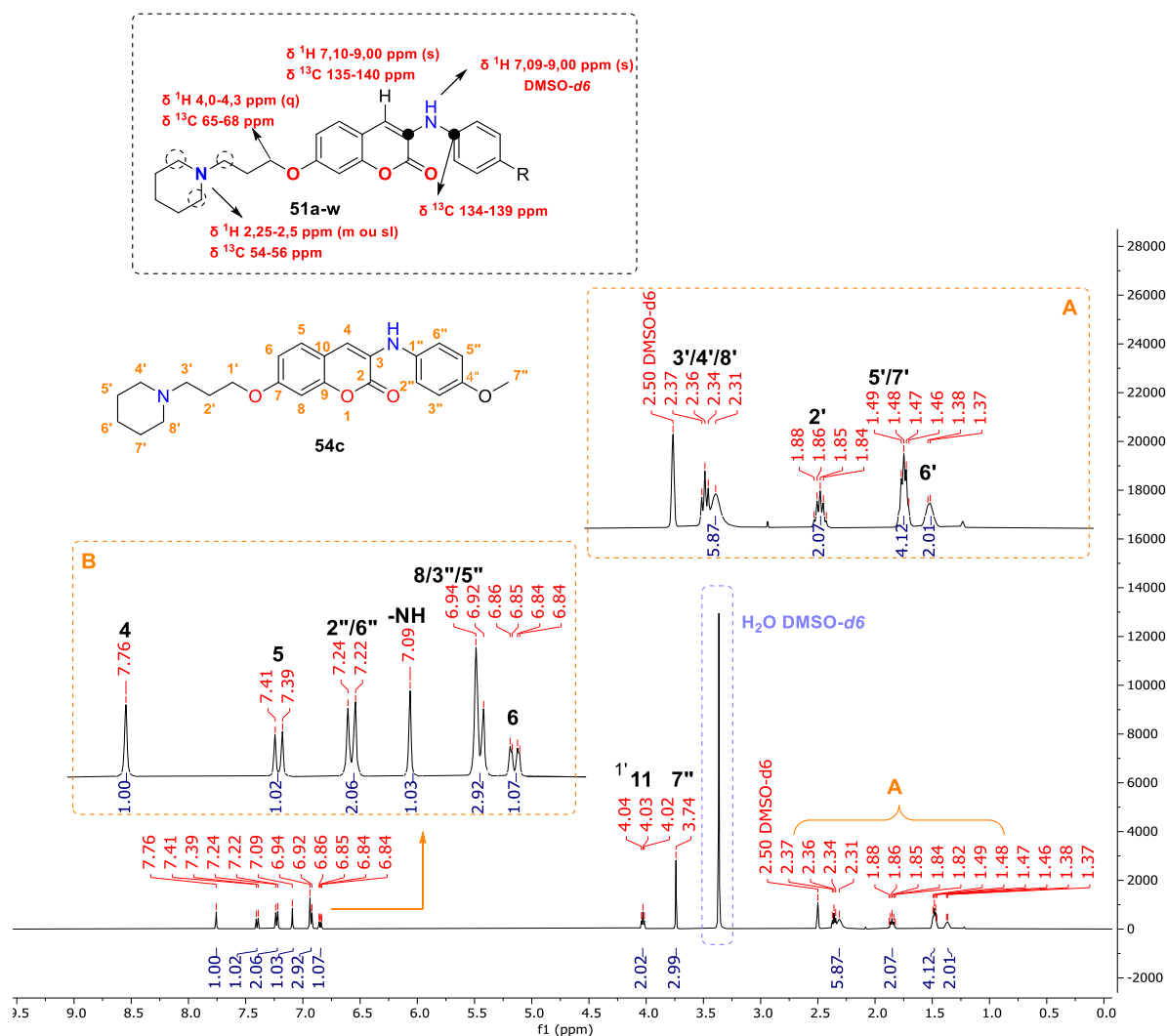
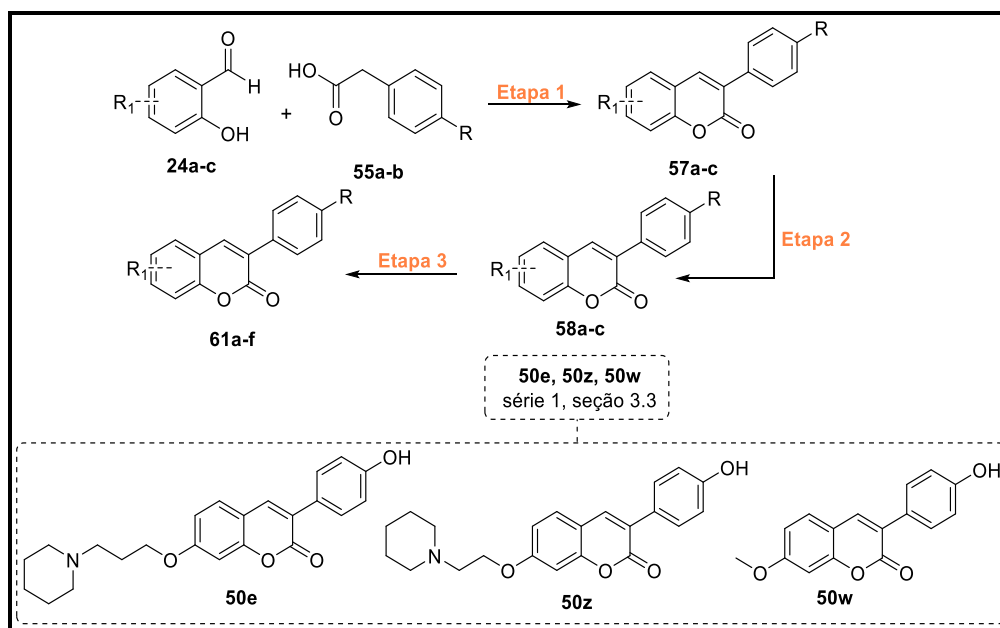


Figura 20. Representação esquemática dos deslocamentos químicos (δ , ppm) dos prótons do derivado 7-aminoalcoxi-cumarínico **54c** em RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 500MHz).

3.5. Síntese dos derivados regiosioméricos de 3-fenilcumarinas substituídas com piperidinilpropoxila (**58a-f**) – série 3

A série das 3-fenilcumarinas substituídas com grupos piperidinilpropoxila em diferentes posições foi planejada para permitir a síntese rápida e eficiente dos derivados, avaliando o impacto das substituições em posições adjacentes, uma vez que há poucos relatos na literatura. A síntese dos derivados **58a-c** ocorreu em três etapas sequenciais (Esquema 8).

Inicialmente, os núcleos cumarínicos substituídos com o grupo 3-fenila (**57a-c**) foram sintetizados via reação de Perkin modificada, a partir dos salicilaldeídos **24a-c**. Em seguida, a desmetilação foi realizada com tribrometo de boro (BBr_3) em diclorometano (DCM), resultando nos intermediários hidroxilados **56a-c**. Finalmente, a alquilação do grupo hidroxila dos intermediários **56a-c** e dos intermediários **50e**, **50z** e **50w** (obtidos na série 1, seção 3.3) foi realizada com cloridrato de 3-cloropropilpiperidina, introduzindo uma cadeia alquílica básica e gerando os análogos finais (**58a-f**).



Esquema 8. Etapas reacionais proposta para a síntese dos derivados **58a-f**.

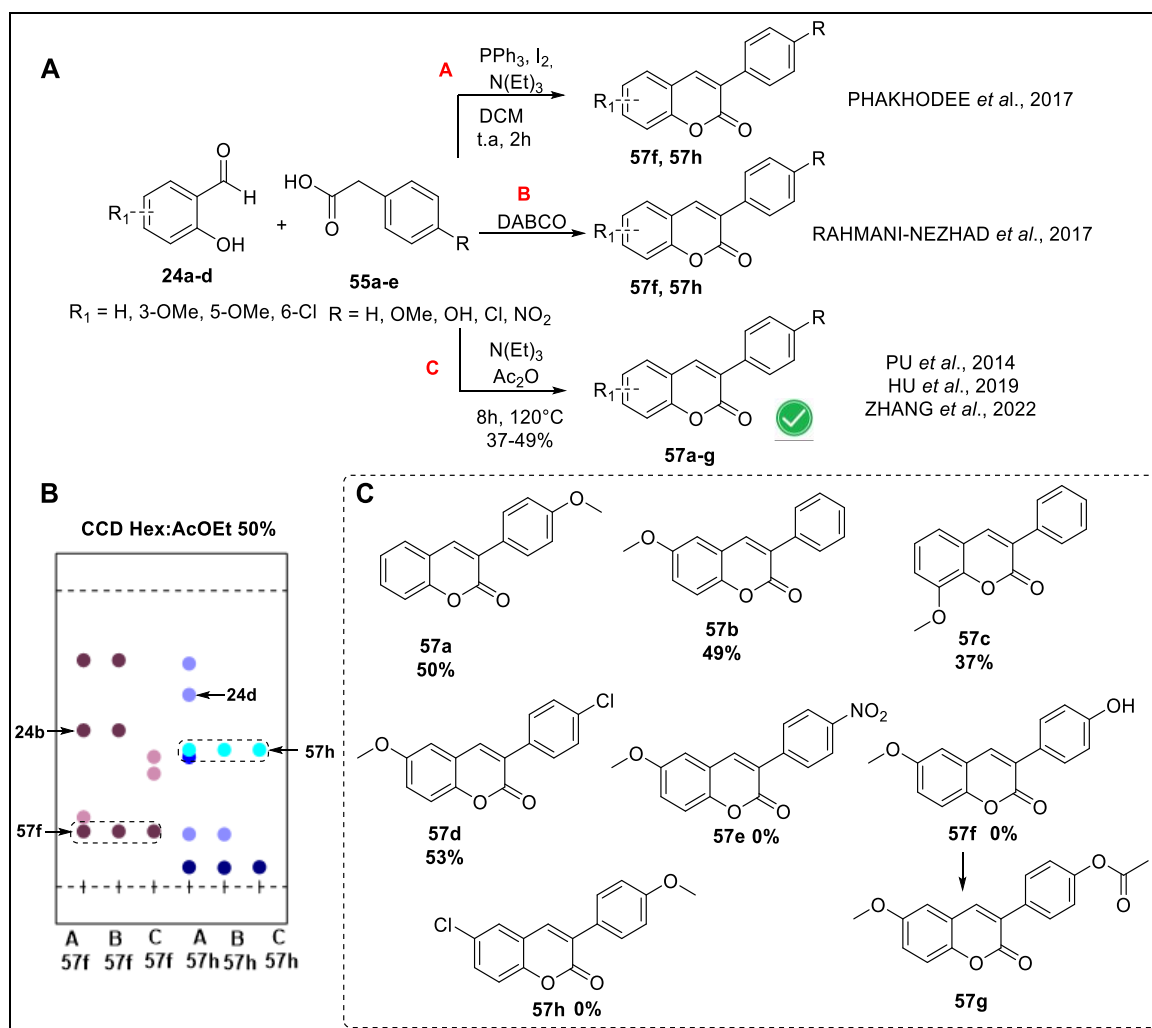
3.5.1. Síntese no núcleo cumarínico via reação adaptada de Perkin (Etapa 1)

A primeira etapa consiste na síntese de 3-fenilcumarinas substituídas com metoxila, na qual três metodologias foram avaliadas (Esquema 9A) visando a obtenção eficiente dos intermediários com baixo custo e facilidade para explorar diferentes posições de substituição a partir de salicilaldeídos e ácidos fenilacético substituídos. A metodologia **A** corresponde a uma reação *one-pot* baseada em adaptação da reação de Wittig, empregando trifenilfosfina, iodo molecular e trietilamina em diclorometano. Já a metodologia **B** foi realizada na presença da base 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) em condições livres de solvente. Por fim, a metodologia **C**, categorizada como reação adaptada de Perkin, foi conduzida em anidrido acético com trietilamina como base.

As metodologias **A** e **B** foram inicialmente avaliadas com o objetivo de obter os compostos **57f** e **57h**, em função da maior disponibilidade dos reagentes correspondentes. O progresso das reações foi monitorado pelo leitor de TLC acoplado ao espectrômetro de massas compacto (TLC-CMS). Essa abordagem mostrou-se eficiente para o acompanhamento

simultâneo de múltiplas reações, permitindo a rápida identificação dos produtos formados, além de reduzir custos com análises subsequentes e minimizar desperdícios de material (Esquema 9B).

As metodologias **B** e **C** apresentaram melhores resultados, com a maior concentração do produto e com menor formação de impurezas. No entanto, observou-se que as reações conduzidas na presença de **DABCO** levaram à formação de aglomerados sólidos, o que dificultou significativamente as etapas de purificação dos produtos obtidos.



Esquema 9. A- Avaliação de procedimentos para a síntese das 3-fenilcumarinas da série 3, B- monitoramento por TLC-CMS (*Expression® da Advion Interchim Scientific*), C- Avaliação do escopo reacional na obtenção dos derivados **57a-h** desejados (espectros Figuras S114-S121 do anexo 7.2).

Diante desses resultados, a metodologia **C** foi selecionada para avaliação, uma vez que apresentou menor formação de impurezas e maior concentração do produto desejado. A partir desta metodologia, os compostos **57a-d** foram obtidos com rendimentos satisfatórios de 37 a 53%. Entretanto, a mesma síntese aplicada aos compostos **57e** e **57f** levou à formação significativa de impurezas. Especificamente para a reação visando à obtenção do composto **57f**,

foi detectada a formação do subproduto **57g**, atribuída à presença de uma hidroxila exposta às condições reacionais como identificado no leitor de placas TLC-CMS.

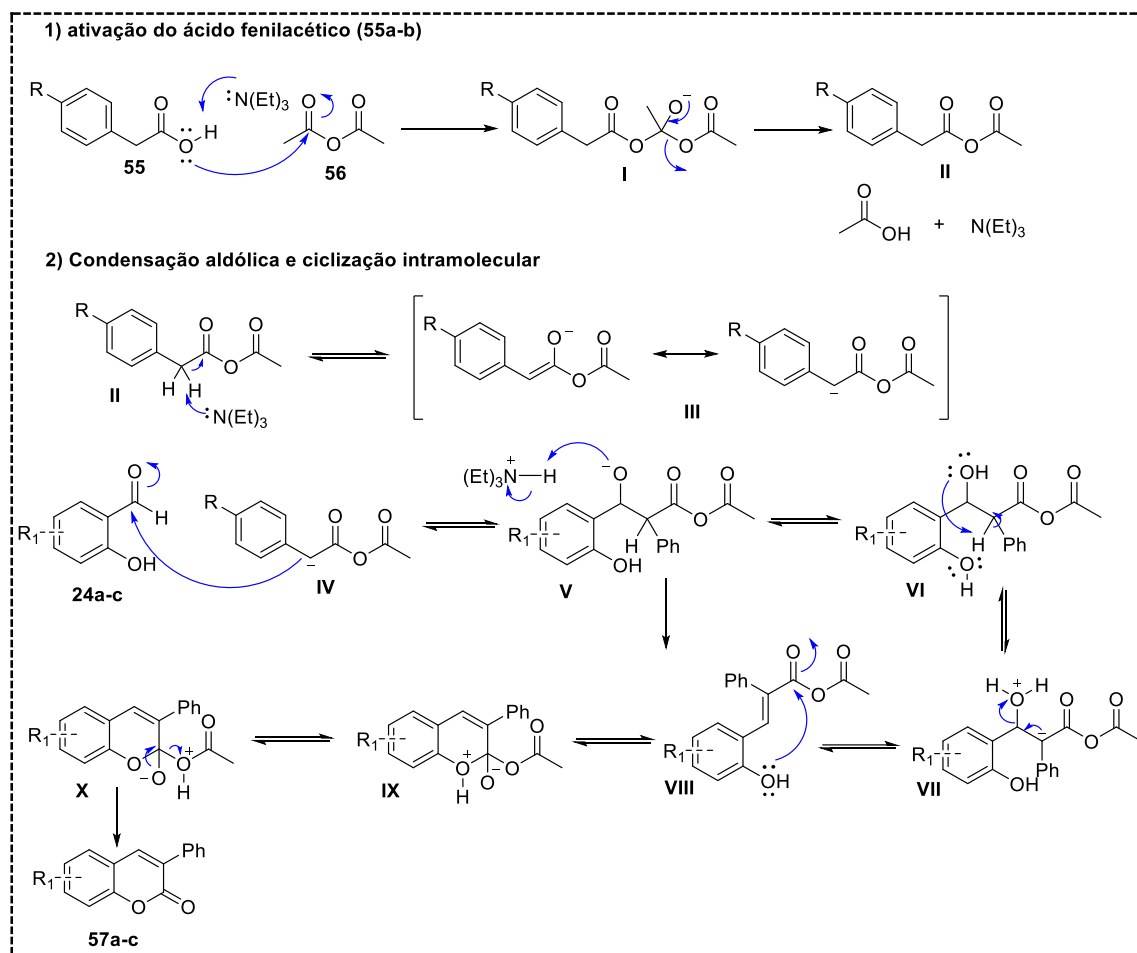
Em função do elevado nível de impurezas observadas, os produtos dessas reações não foram submetidos às etapas de purificação. Diante disso, optou-se por prosseguir nesta etapa com os compostos **57a–c**, os quais se mostraram suficientes para a avaliação da influência das diferentes posições de substituição no núcleo cumarínico.

A reação de Perkin é tradicionalmente empregada na síntese de ácidos α , β -insaturados aromáticos, sendo baseada na condensação aldólica entre um anidrido carboxílico e um aldeído aromático na presença de uma base fraca, geralmente acetato de sódio ou potássio, ou trietilamina. Para a síntese de cumarinas, além da condensação, ocorre uma ciclização intramolecular favorecida por condições de aquecimento, conduzindo à formação do anel lactônico (MAJUMDER; MAJUMDER, 1993).

O mecanismo proposto para a obtenção dos derivados **57a–c** baseia-se em uma reação de Perkin modificada, na qual a ativação do ácido fenilacético (**55**) ocorre inicialmente pela formação de um intermediário acilado na presença de trietilamina (**II**). Essa etapa gera um intermediário reativo que, após desprotonação, leva à formação de uma espécie enolato estabilizada, capaz de atuar como nucleófilo (**III**).

Na etapa seguinte, o enolato ataca o carbono eletrofílico da carbonila do aldeído, resultando na formação do intermediário β -hidroxicarbonílico (**V**). Após a transferência de próton e desidratação conduz à formação do sistema α,β -insaturado, característico de uma condensação aldólica (**VIII**) (CLAYDEN, 2012).

Por fim, hidroxila em *orto* realiza um ataque nucleofílico intramolecular a carbonila do anidrido, e após transferência de próton e eliminação do grupo acetato leva à formação dos compostos **57a–c**, conforme ilustrado no Esquema 10.



Esquema 10. Esquema de intermediários proposto para os derivados **57a-c** via condensação de Perkin modificada.

3.5.2. Desmetilação dos derivados **57a-c** (Etapa 2)

A segunda etapa, representada no Esquema 11, consiste na desmetilação dos intermediários metoxilados 3-fenilcumarinas (**57a-c**) com tribromoborano (BBr_3) em diclorometano. A reação inicia com resfriamento a 0°C , seguido de aquecimento a 45°C após a adição do BBr_3 , resultando em rendimentos de 56 a 70%. No mecanismo proposto, o BBr_3 atua como ácido de Lewis, coordenando-se ao oxigênio da metoxila por meio de seu orbital p vazio, com formação do íon oxônio (**I**) promovendo uma polarização e enfraquecimento da ligação C-O. Em seguida, ocorre ataque nucleofílico via $\text{S}_{\text{N}}2$ pelo Br^- , levando a clivagem da ligação O-Me, gerando o intermediário borânico (**II**), que após hidrólise, origina os compostos hidroxilados **58a-c** (Clayden et al., 2012; Nadur, 2025).

O tempo da reação foi monitorado até 7h e deixada em *overnight*. Até 5h, observa-se a formação do produto sem degradação conforme ilustrado na CCD do esquema 11, após 5h, começa a formação da degradação representada pelo spot em preto na CCD, embora o reagente inicial não seja consumido completamente em nenhum caso. A degradação decorre

provavelmente do aumento da concentração de HBr gerado *in situ*, capaz de clivar o anel lactona da cumarina em meio ácido forte. Além da TLC, a reação foi analisada no leitor TLC-CMS, confirmando a formação do produto, com m/z correspondente aos compostos, e sua proporção relativa ao reagente metoxilado (Figura 21).

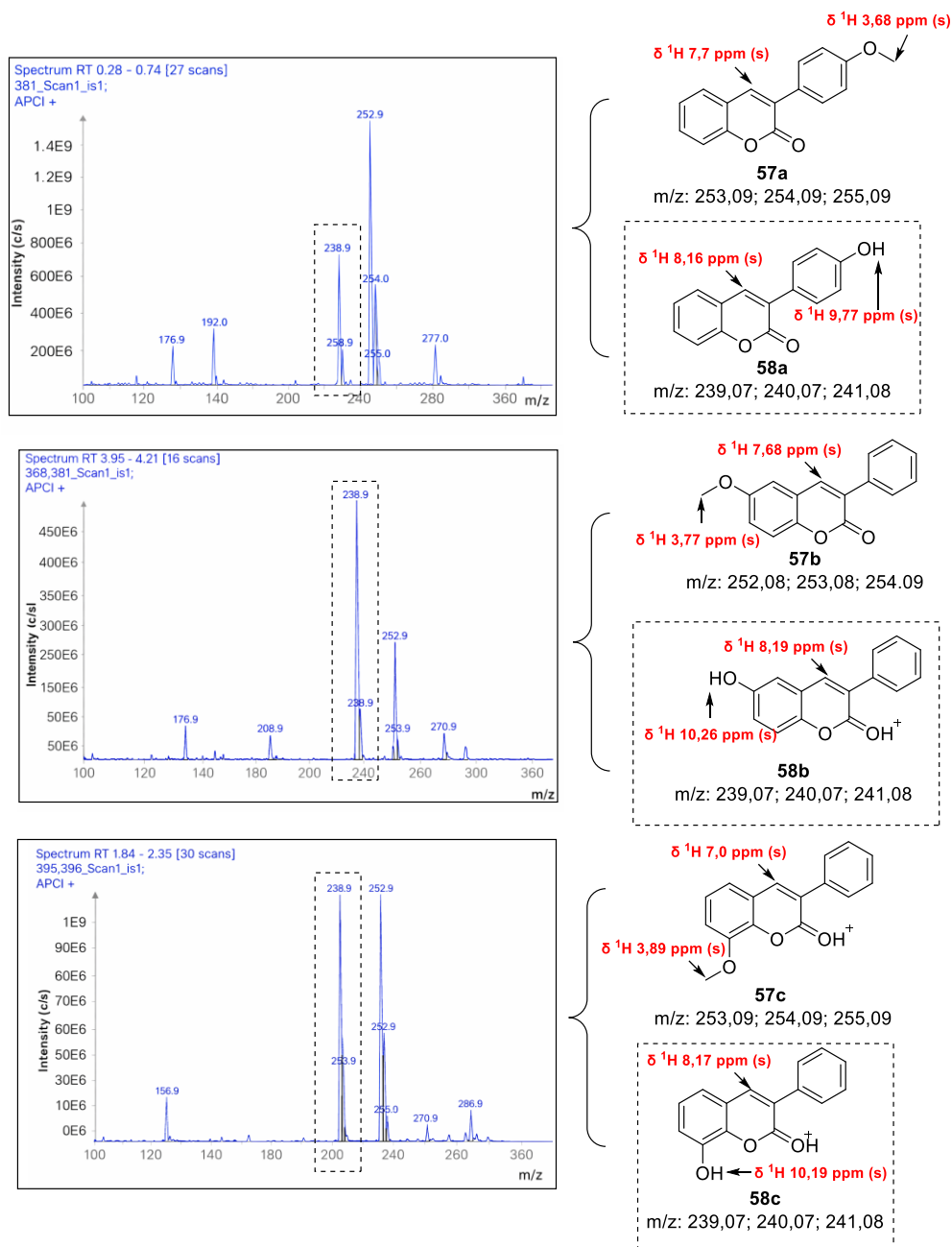
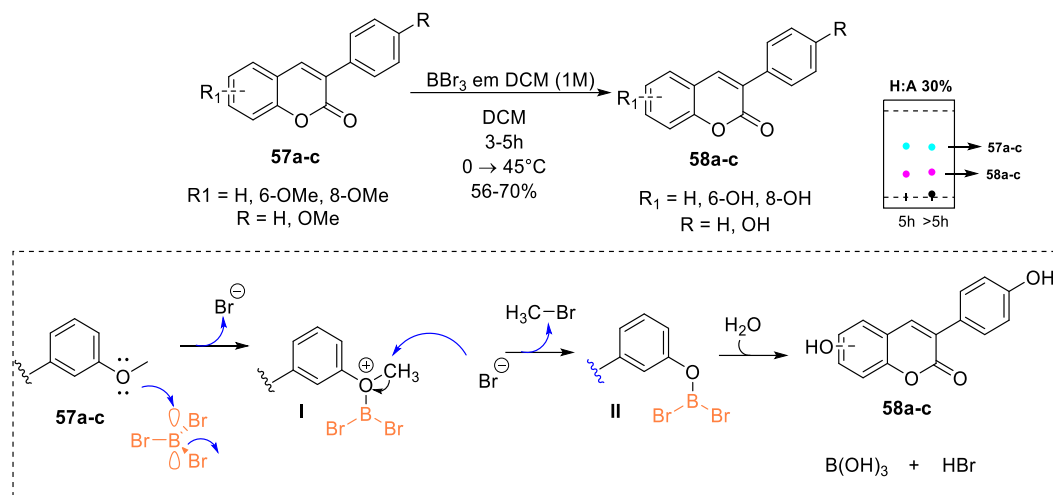


Figura 21. Análise por espectrometria de massas em solução no TLC/CMS (ionização por eletrospray), evidenciando os íons principais do reagente metoxilado (**57a-c**) e dos produtos fenólicos demetilados (**58a-c**). Os principais sinais de confirmação por RMN ^1H , com deslocamentos característicos para -OMe e -OH aromático, bem como os sinais de confirmação da ciclização do núcleo cumarínico também são indicados.

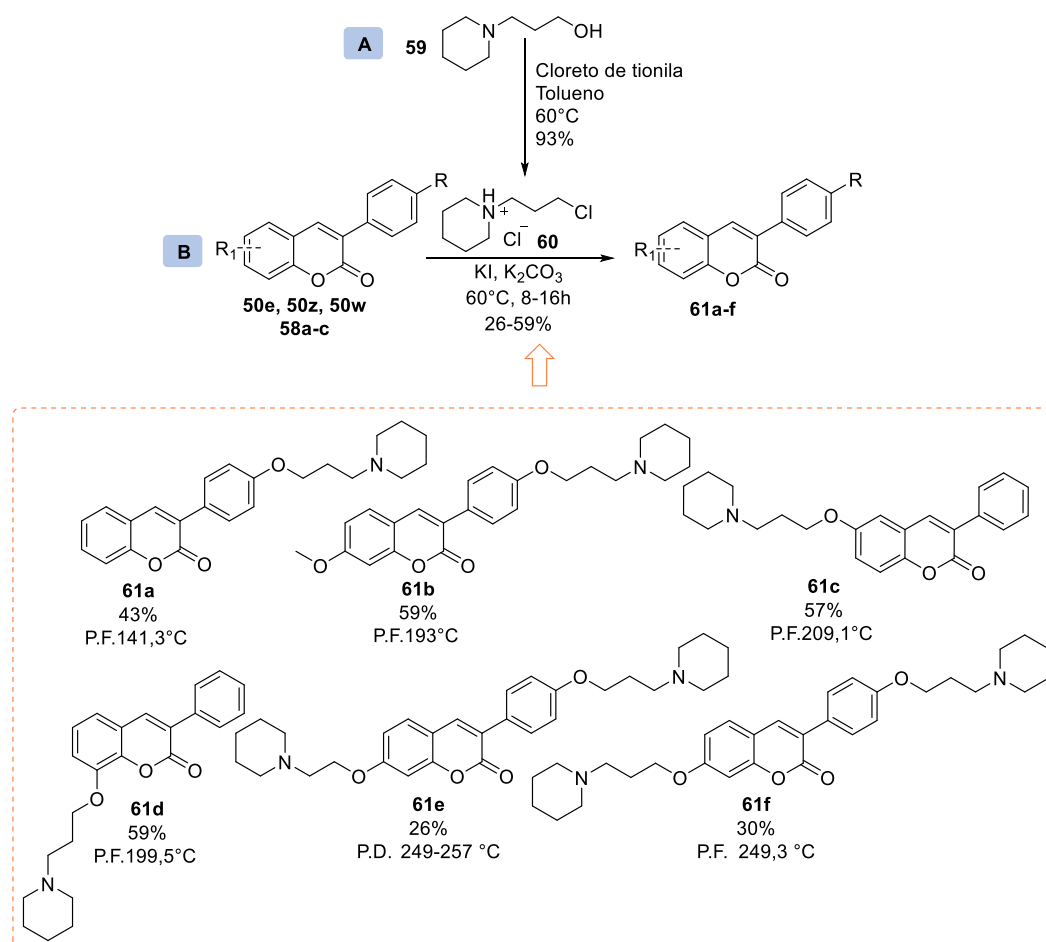


Esquema 11. Procedimento experimental da síntese dos compostos **58a-c**, cromatograma em CDD (Hexano:Acetato de etila 70:30) e esquema de intermediários proposto. Os espectros dos intermediários **58a-c** são encontrados nas Figuras S125-S127 do anexo 7.2.

3.5.3. *O*-Alquilação dos derivados **58a-c** (Etapa 3)

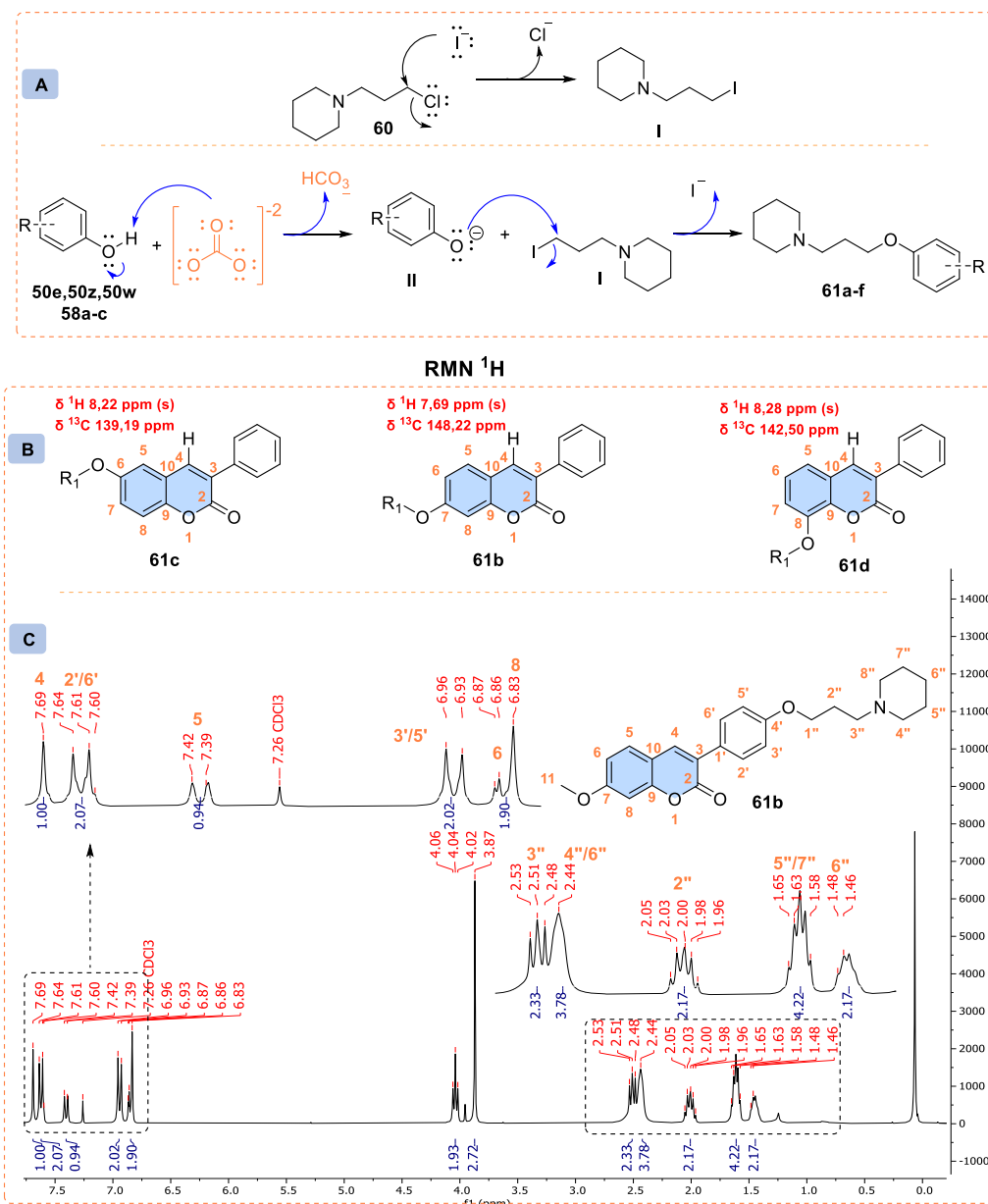
A etapa final da síntese das 3-fenil-cumarinas substituídas foi realizada mediante reação de *O*-alquilação dos derivados hidroxilados da etapa anterior (**58a-c**) e na série 1 (**50e**, **50z** e **50w**) com cloridrato de 1-(cloropropil)piperidina (**60**), na presença de iodeto de potássio (KI) e carbonato de potássio (K_2CO_3), originando os compostos alquilados **61a-f** com rendimento na faixa de 26-59%, conforme ilustrado no Esquema 12B. O cloridrato de 1-(cloropropil)piperidina foi preparado por meio da reação de S_N2 entre 1-(hidroxipropil)piperidina (**59**) com cloreto de tionila em tolueno, obtendo rendimento de 93% (Esquema 12A).

O mecanismo proposto, de forma simplificada e esquematizado no Esquema 12, inicia-se com a reação S_N2 entre o iodeto (proveniente do KI, catalisador da reação) e o cloridrato de 1-(cloropropil)piperidina (**60**), na qual o iodeto realiza ataque nucleofílico ao carbono ligado ao cloro, gerando o intermediário **I**. Paralelamente, a base presente no meio (K_2CO_3) abstrai o próton da hidroxila, formando o fenolato (**II**). O fenolato (**II**) atua como nucleófilo, atacando o carbono ligado ao iodo no intermediário **I**. De modo concertado, forma-se a ligação C-O e rompe-se a ligação C-I, liberando iodeto e originando os derivados **61a-f**.



Esquema 12. Procedimento experimental, rendimento e ponto de fusão dos compostos **61a-f**.

As reações foram monitoradas por CCD e pelo sistema automatizado de leitura de CCD (*Plate Express, Advion*), tanto em solução quanto em placas de CDD. Os derivados **61a-f** foram confirmados por LC-MS (Figuras S183-S188 do anexo 7.3) e por RMN de ¹H e ¹³C (Figuras S128-S138 do anexo 7.2). A caracterização por RMN de ¹H e ¹³C apresenta similaridade com os compostos previamente descritos, nos quais a subunidade aminoalcoxila exibe deslocamentos químicos na faixa de 1,40-2,60 ppm, variando conforme o ambiente químico, e a unidade aromática na faixa de 6,30-9,00 ppm, como ilustrado no espectro do composto **61b** representado no Esquema 13C.



Esquema 13. A) mecanismo proposto para síntese dos compostos **61a-f** via *O*-alquilação catalizada por KI. B) diferença entre os deslocamentos químicos da posição H4 da cromenona quando altera as substituições em seu núcleo. C) RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **61b**.

Uma diferença observada entre os sinais dos compostos **61a-f** refere-se ao fato de que as características dos substituintes aromáticos e heteroaromáticos na posição 3 afetam o deslocamento químico do H4 da cromenona. Da mesma forma, a variação na posição da metoxila ou da cadeia piridinilpropoxila interfere nesse deslocamento químico. Na posição 7, a metoxila exerce efeito protetor sobre o H4 em relação ao campo magnético externo, doando densidade eletrônica por ressonância que se estende até a posição 4 via sistema conjugado, o que eleva a densidade eletrônica local e reduz o deslocamento químico (δ menor).

Em contraste, nas posições 6 e 8, a doação eletrônica é menos eficiente para alcançar o

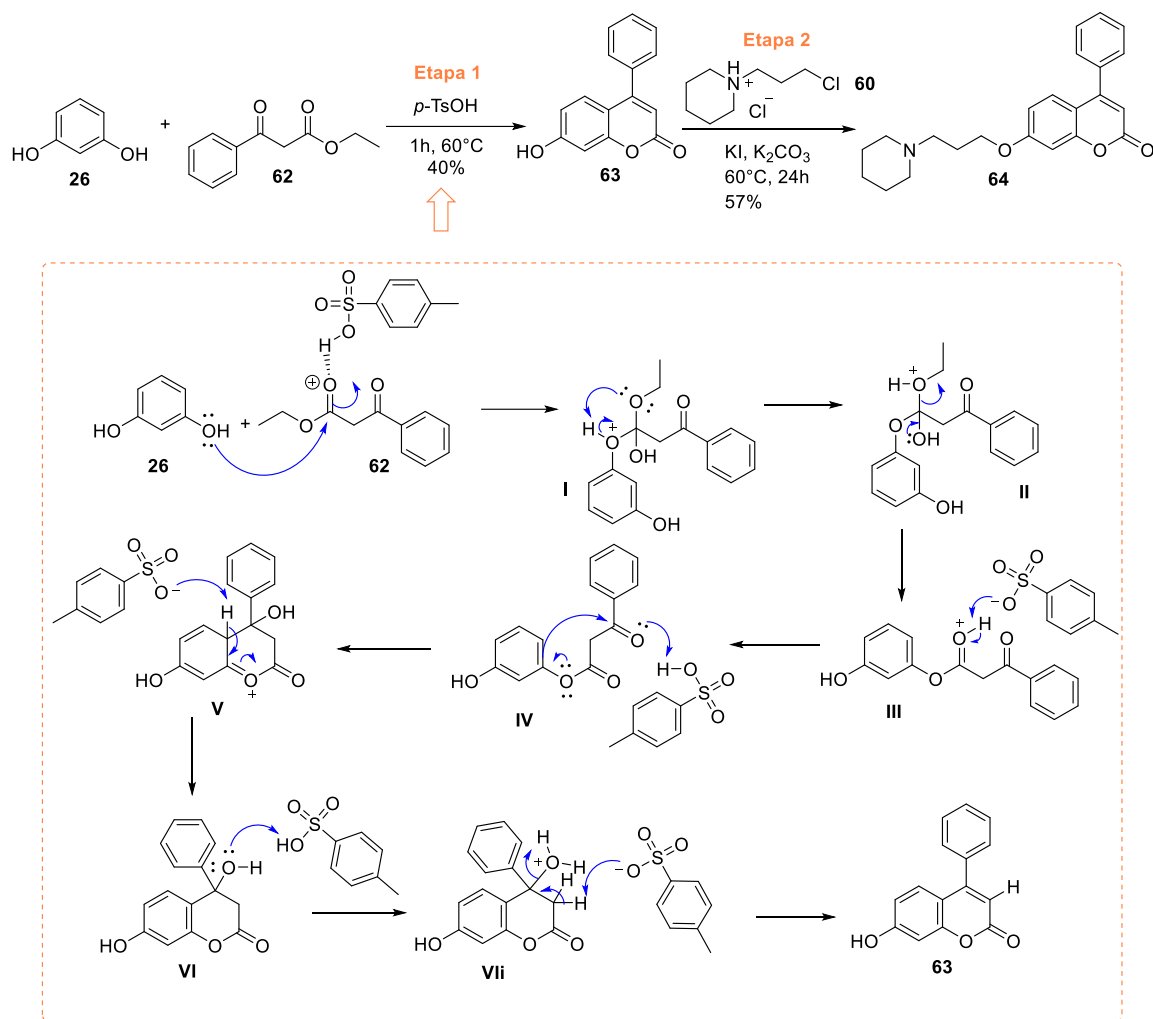
H4, resultando em maior exposição ao campo magnético externo e consequente aumento do δ do H4. Adicionalmente, a proximidade da posição 8 ao anel pirona intensifica esse efeito, a doação de elétrons eleva a densidade eletrônica ao redor da C9, tornando o H4 mais eletropositivo e amplificando seu deslocamento químico para valores mais altos (Esquema 13B).

Essas características eletrônicas nas substituições 6-8 do núcleo cumarínico também interferem na reatividade e nos rendimentos de reações que envolvem o núcleo. Por esse motivo, muitas das vezes reações na posição 7 são mais reativas e geralmente com maiores rendimentos comparando com as posições 6 e 8.

3.6. Síntese do derivado 4-fenil-7-piridinilpropoxi-cumarina (64) – série 4

O derivado da 4-fenil-7-(piridinilpropoxi)cumarina (**64**) foi sintetizado em duas etapas. A primeira etapa consiste na formação do núcleo cumarínico por condensação clássica de Pechmann, por meio da reação do resorcinol (**26**) com o β -cetoéster benzoilacetato de etila (**62**), em meio de ácido *p*-toluenossulfônico (PTSA), livre de solvente, com rendimento de 40%, gerando o intermediário 4-fenil-7-hidroxi-cumarina (**63**) (SUGINO; TANAKA, 2001). A segunda etapa corresponde à reação de O-alkilação do intermediário 4-fenil-7-hidroxi-cumarina (**63**), descrita na série anterior (Esquema 14).

O mecanismo do intermediário **63**, ilustrado no Esquema 14, segue o mecanismo clássico da reação de Pechmann. Inicialmente, o ácido (no caso, o PTSA) protona a carbonila do β -cetoéster benzoilacetato de etila (**62**), tornando-a um eletrófilo mais reativo. Em seguida, o resorcinol (**26**) ataca nucleofilicamente a carbonila protonada, formando um intermediário tetraédrico (**I**), que, após transferência de próton, elimina etanol e gera o composto 1,3-dicarbonílico (**III**). Numa etapa subsequente, o PTSA ativa a carbonila do grupo cetona (**III**), que sofre substituição eletrofílica aromática intramolecular pelo anel do resorcinol. O ataque nucleofílico do anel aromático ao carbono carbonílico leva à formação do intermediário cíclico (**IV**). Após a desprotonação (**V**), que restabelece a aromaticidade, ocorre a desidratação (**VI**), formando o anel lactônico e origina o composto 4-fenil-7-hidroxi-cumarina (**63**) (REZAEI *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2022).



Esquema 14. Procedimento experimental da síntese dos compostos **64** e esquema de intermediários proposto para o intermediário **63** via reação clássica de Pechmann (Espectros nas Figuras S140-S143 do anexo 7.2).

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

Assim como as cumarinas, as imidazopiridinas (**IM**) constituem um núcleo bastante explorado, devido à combinação do heterociclo nitrogenado com diversidade sintética, além de apresentarem uma ampla variedade de aplicações farmacológicas, principalmente em doenças relacionadas ao SNC. O núcleo possui diferentes isômeros como ilustrado na Figura 22, variando a posição do nitrogênio, o que resulta em compostos com diferentes características e propriedades físico-químicas (FERREIRA et al., 2026). A 3-(imidazo[1,2-*a*]piridina)-cumarina (**65**) é uma das isoformas mais exploradas na Química Medicinal e, diante disso, os compostos **75a-c** planejados foram sintetizados por duas rotas sintéticas diferentes, em razão da diferença de substituição entre suas estruturas.

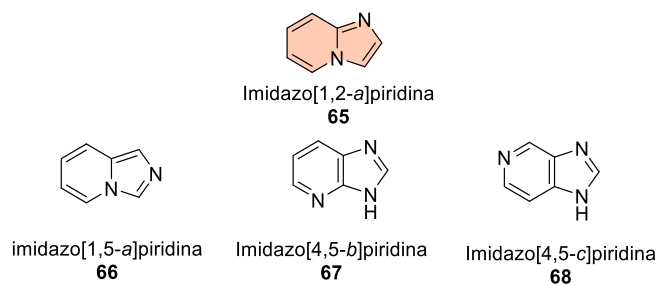


Figura 22. Isômeros de imidazopiridinas

A síntese dos derivados 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-7-aminoalcoxi-cumarinas (**71a-c**) foi realizada em 5 etapas, conforme representado pelo **Esquema 15** (FERREIRA, 2021). A primeira etapa corresponde à formação do núcleo cumarínico via reação de Knoevenagel, cujo mecanismo é ilustrado no esquema 16. Nesta etapa, o 2,4-diidroxi-benzaldeído (**24a**) reage com acetoacetato de etila (**69**) em meio básico de piperidina utilizando etanol como solvente a uma temperatura de 80°C, resultando o intermediário **70** com rendimento de 70%. A segunda etapa envolve a α -bromação do grupo carbonílico do intermediário **70** com *N*-bromosuccinimida (NBS) em diclorometano, a 80°C, obtendo o intermediário **71** com rendimento de 75%.

Esquema 15. Síntese dos derivados **75a–c**, dividida em cinco etapas reacionais para obtenção das cumarinas imidazo[1,2-*a*]piridínicas.

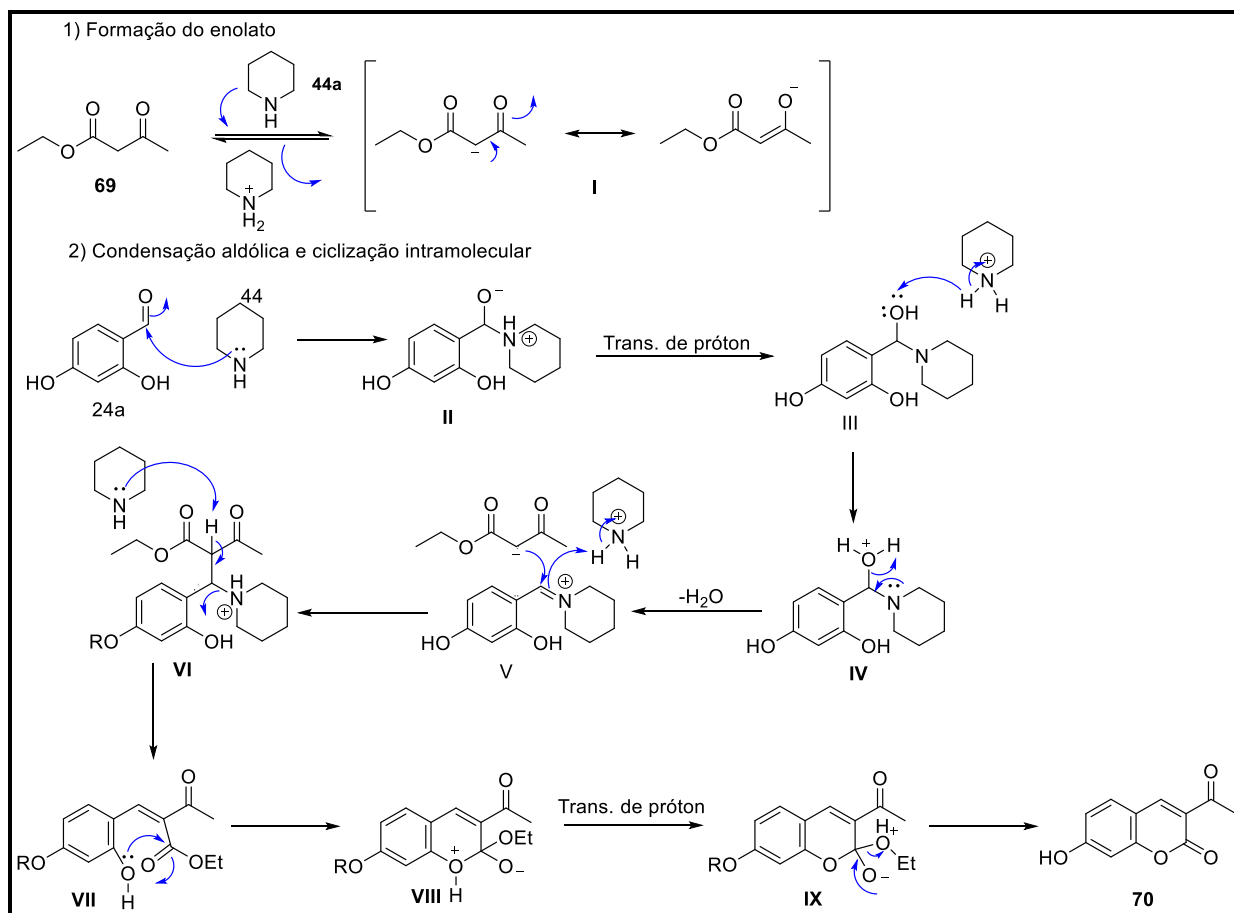
A terceira etapa corresponde à formação do núcleo da imidazo[1,2-*a*]piridina (IM) na posição 3 por meio de uma reação de S_N2 seguida de ciclização intramolecular. Essa etapa foi realizada a partir do intermediário bromado **71** e da 2-aminopiridina substituída, em etanol, a 80 °C, conforme ilustrado no **Esquema 16** (adaptado de KUMMERLE, 2009; FERREIRA, 2021). Os intermediários **73a–b** foram obtidos com rendimento de 88 %.

A etapa 4 envolve uma reação de alquilação do intermediário **73a–b** com 1,3-dibromopropano, entretanto, nas tentativas de purificação, o reagente que não havia sido totalmente consumido, acabava co-eluindo com o produto. Por esse motivo, o rendimento relativo dessa etapa foi calculado considerando-se duas etapas sucessivas (etapas 4 e 5). Por fim, a etapa 5 corresponde à reação de aminação com piperidina substituída, via S_N2, resultando nos derivados finais **75a–c**. As etapas 4 e 5 já haviam sido descritas previamente na série 1.

O mecanismo proposto para a reação de Knoevenagel (etapa 1) é análogo ao da reação de Perkin descrita para a série 3. O mecanismo inicia-se com a formação do enolato (**I**) a partir do acetoacetato de etila (**69**), catalisada pela piperidina (**44a**). Em seguida, a piperidina (**44a**) ataca a carbonila do aldeído (**24a**). Após transferência de próton e desidratação, forma-se o íon imínio (**V**). Na próxima etapa, ocorre o ataque nucleofílico do enolato (**I**) ao íon imínio (**V**), formando o intermediário (**VI**).

A formação deste intermediário é crucial para a geração do núcleo cumarínico, pois a partir desse ponto ocorre uma substituição nucleofílica acíclica intramolecular no éster. Nesse processo, primeiro ocorre o ataque do nucleófilo ao carbono eletrofílico da carbonila do éster (**VII**), formando um intermediário tetraédrico instável (**VIII**), seguido por transferência de próton (**IX**) e formação do intermediário **70**.

Todas as etapas foram monitoradas por CCD, purificadas por cromatografia em coluna flash (sistema Isolera™) e caracterizadas por RMN de ¹H e ¹³C (Figuras S144-S153 do anexo 7.2). Na etapa 5, devido à reação ter ocorrido a partir de um reagente impuro, ainda com intermediário (**73a–b**), ambos foram identificados e resgatados na purificação para o cálculo do rendimento relativo da etapa 4. Na figura 23A estão representados os principais sinais de confirmação dos intermediários formados na etapa 1, 2 e 3. A confirmação do núcleo cumarínico, por meio do intermediário **70** (etapa 1), como já mencionado anteriormente, é evidenciada pelo singlete mais desprotegido dos sinais aromáticos, com deslocamento químico de 8,57 ppm no RMN de ¹H e 148,32 ppm no RMN de ¹³C.



Esquema 16. Mecanismo proposto para síntese do intermediário 3-ceto-7-hidroxycumarina (69) via reação de Knoevenagel

O intermediário **71** pode ser identificado pelo singlete com integração para 2 hidrogênios na metila da cetona, devido à formação da ligação C-Br, que apresenta deslocamento químico para campo mais alto em 4,84 ppm no RMN de ^1H e 37,80 ppm no RMN de ^{13}C . Com o aumento da densidade eletrônica na posição 3, observa-se um aumento no deslocamento químico do H4 da cromenona, em 8,76 ppm no RMN de ^1H . Para o intermediário **73**, o produto é confirmado pela formação dos sinais mais desprotegidos em relação à cromenona, referentes aos hidrogênios do núcleo da IM, com deslocamentos químicos de 8,79 e 8,99 ppm (singlete ou dubleto) e outro sinal em 8,81 e 8,76 ppm na forma de singlete, comprovando a ciclização do núcleo.

A Figura 23B ilustra a formação de um dos produtos, na qual podem ser identificados os três sinais mais desprotegido, 8,99 ppm (H-8'') e 8,82 ppm (H-6'') de confirmação do núcleo da IM, e 8,56 ppm, referente à confirmação do núcleo coumarínico. Além disso, estão presentes os demais sinais aromáticos dos núcleos, bem como os sinais de 1,41–4,14 ppm, referentes aos

prótons mais protegidos da cadeia da subunidade básica.

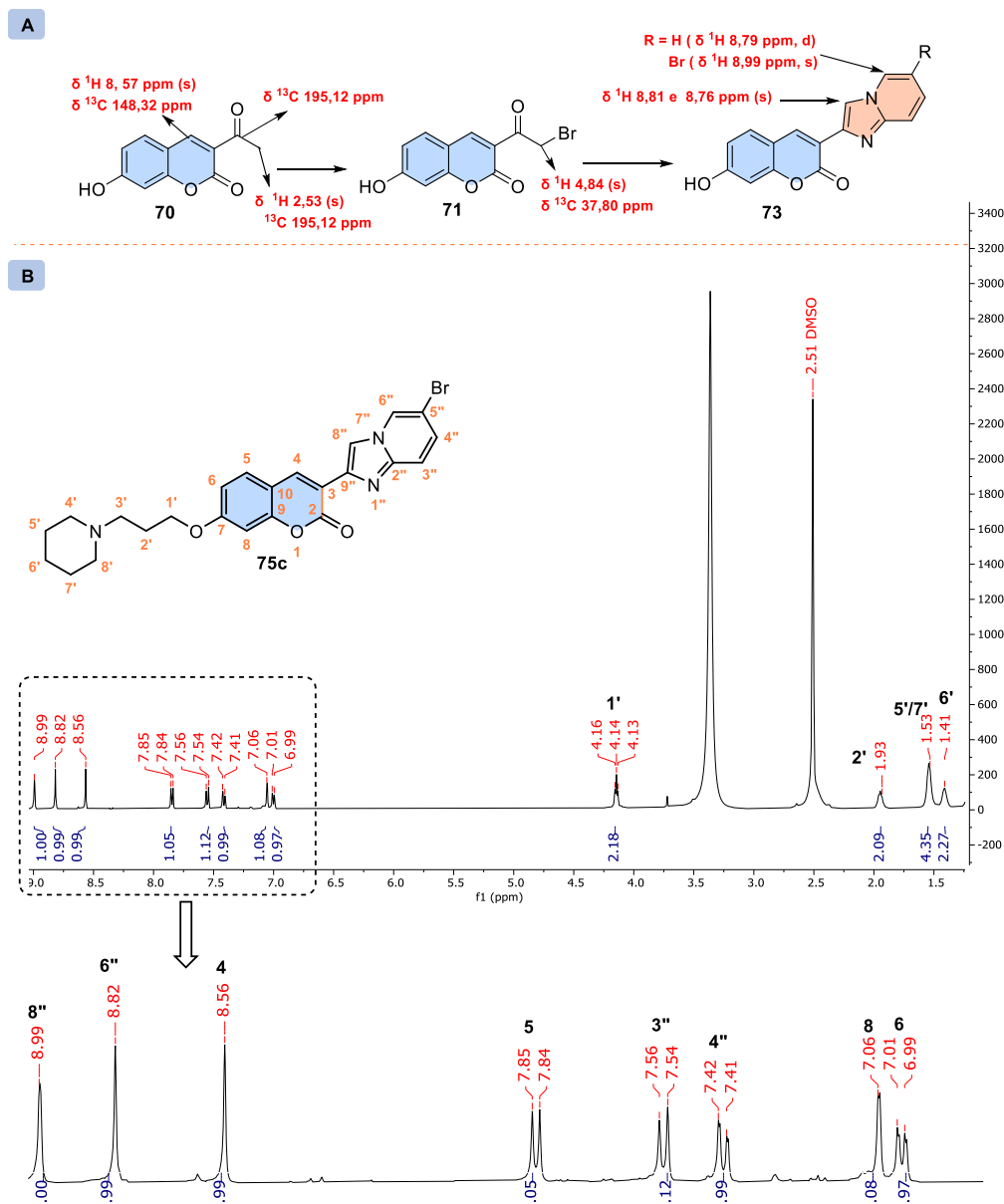


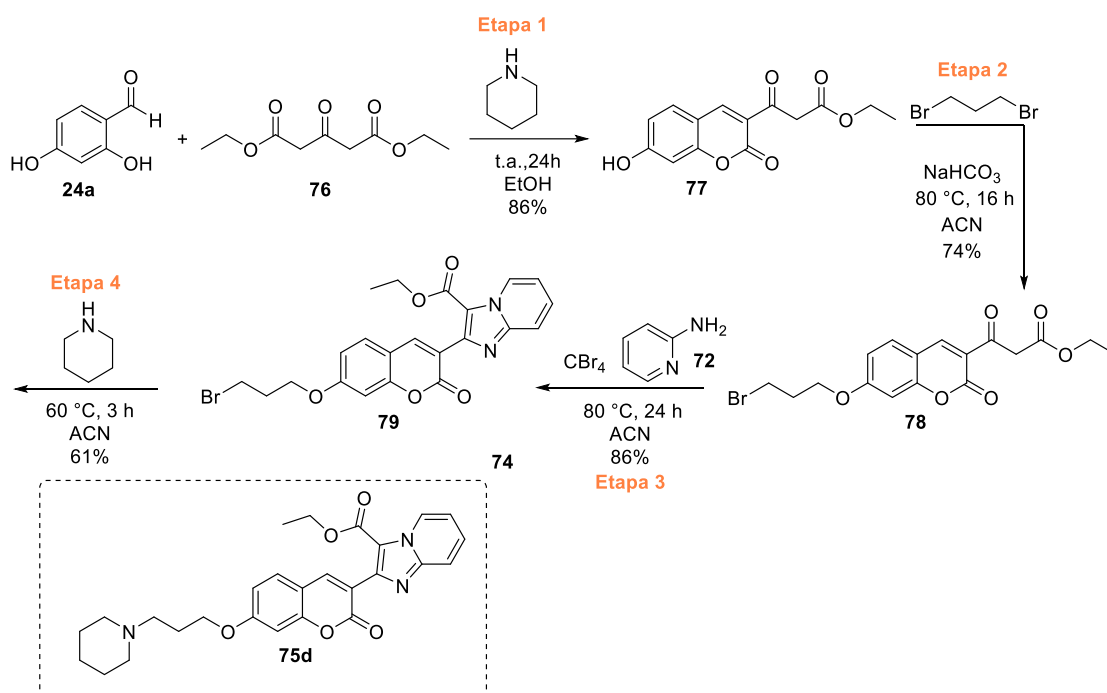
Figura 23. A) principais deslocamento químico de confirmação dos intermediários **70**, **71** e **73** das etapas 1, 2 e 3, respectivamente. **B)** Espectro de RMN de ^1H para confirmação do produto **75c** em $\text{DMSO}-d_6$ (500 MHz)

3.7.2. Síntese da 3-(etilcarboxilato)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)-2H-cromen-2-ona (**75d**)

O esquema 17 representa a síntese do último derivado imidazopiridínico (**75d**). O composto foi sintetizado por uma rota adicional, uma vez que o produto deriva de outro intermediário coumarínico (**77**). A rota 2 foi dividida em 4 etapas similares às da rota 1, a diferença está na formação do núcleo da **IM**, que ocorre em uma reação *one-pot*, na qual a bromação e a ciclização do núcleo da **IM** são realizadas em uma única etapa.

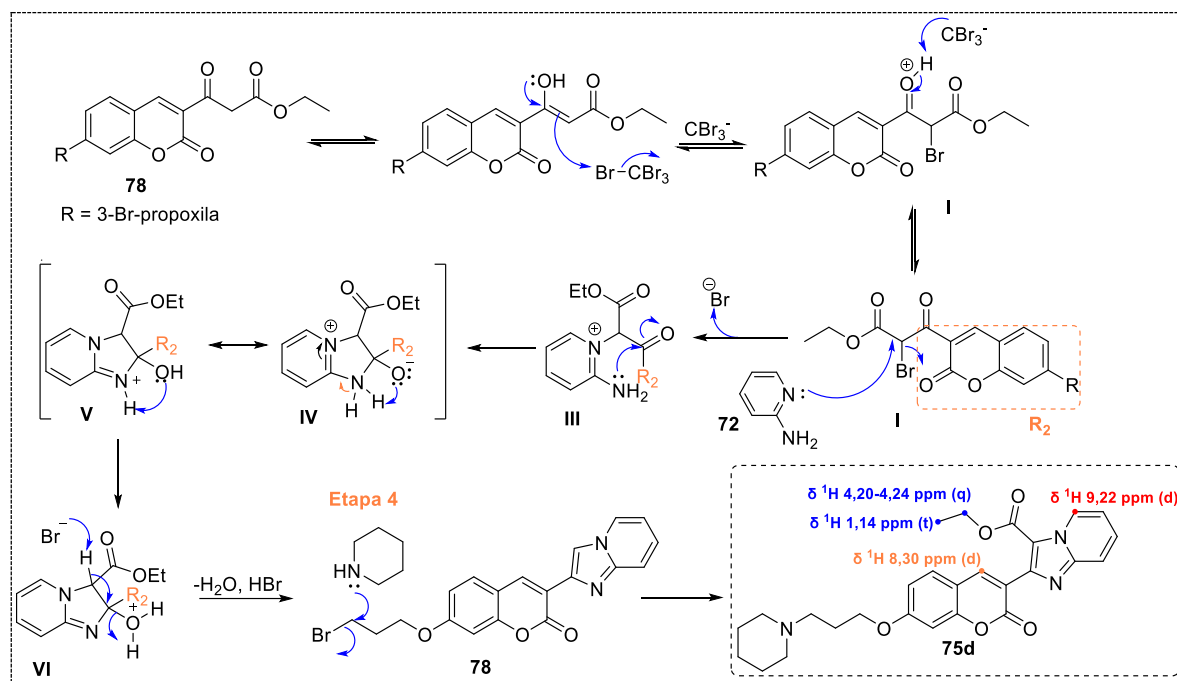
Na etapa 1, por meio de uma reação de Knoevenagel similar à etapa correspondente

da rota anterior, é sintetizado o intermediário **77** a partir do salicilaldeído **24e** e do dietil oxoetilmalonato (**76**) em meio básico, com rendimento de 86%. Diferentemente da rota 1, na rota 2 a alquilação ocorre na segunda etapa, com o intermediário **77** e o dibromopropano em rendimento de 74%. A formação do núcleo imidazopiridínico ocorre na etapa 3, por meio de uma reação *one-pot* com CBr₄ e 2-aminopiridina em acetonitrila a 80 °C, obtendo o intermediário **79** com rendimento de 86%. Por fim, a última etapa consiste na formação do produto final **75d**, por reação de aminação com piperidina, em rendimento de 61% (Espectros nas Figuras S152-S158 do anexo 7).



Esquema 17. Síntese do derivado **75d**, dividida em quatro etapas reacionais.

Na proposta de mecanismo representada pelo Esquema 18, a síntese do intermediário chave **79** inicia-se com uma bromação. O bromo eletrofílico adiciona-se ao carbono oleofínico, favorecido pelo equilíbrio ceto-enólico do derivado 7-bromoalcoxi-β-cetoéster (**78**), em seguida ocorre a desprotonação da carbonila pelo íon tribromometano, formando o intermediário (**II**). Este intermediário reage com a 2-aminopiridina (**72**) via S_N2 formando o intermediário (**III**). Em seguida, ocorre uma adição nucleofílica intramolecular da amina primária ligada ao anel piridínico, através de um ataque nucleofílico ao carbono da cumarina gerando o intermediário tetraédrico **IV**. Após transferência de próton, forma-se o íon imínio, seguido de desidratação, que leva ao produto **78**. Após a purificação por cromatografia em coluna flash (sistema Isolera™) e caracterizadas por RMN de ¹H e ¹³C ocorre a etapa 4, na qual ocorre a aminação via S_N2 formando o produto **75d**.



Esquema 18. Proposta de esquema de intermediários para a síntese do intermediário **78**, seguido da formação do produto **75d**.

3.8. Ensaios *in vitro*

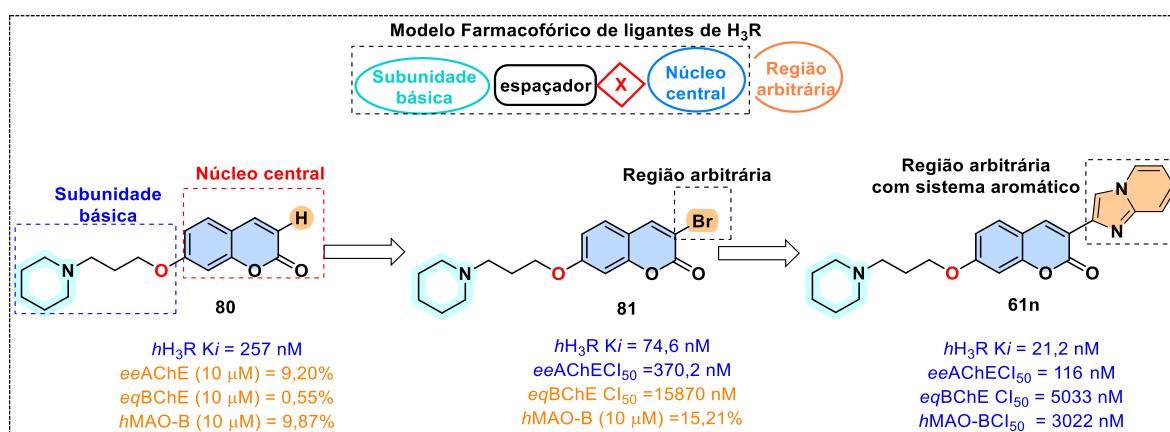
Após a obtenção, caracterização e análise de pureza dos compostos finais, foram realizados ensaios de afinidade pelo receptor de histamina H_3 humana (hH_3R), de inibição enzimática da AChE de enguia elétrica ($eeAChE$) e BChE de soro equino ($eqBChE$) e das monoaminas oxidases humana ($hMAO-A$ e $hMAO-B$), além da avaliação da ausência de citotoxicidade e neurotoxicidade em células de neuroblastoma SH-SY5Y. Adicionalmente, foram conduzidas avaliações *in silico* por meio de modelagem molecular e de predição de propriedades farmacocinéticas, com o objetivo de compreender a potência e as características farmacocinéticas dos compostos.

Inicialmente, como o núcleo cumarina nunca havia sido descrito em ligantes do H_3R , buscou-se avaliar o perfil de bioatividade desse núcleo atuando como núcleo central no modelo de antagonistas H_3R . Desta forma, a avaliação do composto **80** frente aos alvos pretendidos confirmou o padrão 3-propoxipiperidina-cumarina como um bom ligante de H_3R ($K_i = 257$ nM), sem, entretanto, apresentar inibição significativa das ChE e MAO-B à 10 μ M (Esquema 19). Esse comportamento pode ser explicado com base no modelo farmacofórico de antagonistas do H_3R , no qual uma subunidade básica ligada a um núcleo central pode ser responsável pela atividade biológica.

Apesar da boa complementaridade de **80** com este modelo farmacofórico, nitidamente a região arbitrária não estava sendo explorada por este hit e modificações em C3 da cumarina foram realizadas buscando uma otimização estrutural. Reconhecendo que a introdução de

grupos lipofílicos nessa região já havia sido explorada por nosso grupo visando inibição de ChEs (SOUZA, 2018; FERREIRA 2021), os compostos **81** e **61n** foram avaliados.

A introdução de um bromo na posição C3 da cumarina (derivado **81**) promoveu um aumento da atividade frente ao H_3R (hH_3R K_i = 74,6 nM), corroborando que substituintes nessa posição poderiam gerar interações adicionais na região arbitrária do modelo farmacofórico de H_3R ; além de levar ao surgimento de atividade frente a ChEs ($eeAChE$ CI_{50} = 370,2 nM, $eqBChE$ CI_{50} = 15870 nM), mas ainda sem apresentar atividade frente à MAO-B à 10 μ M. Por fim, a troca do bromo por um grupo aromático (imidazopiridina), capaz de fazer interações de empilhamento- π com o Trp presente no PAS das ChEs (FERREIRA, 2021) e que também apresenta relatos de interação com o sítio ativo da MAO-B (RAUHAMÄKI *et al.*, 2018; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ *et al.*, 2020), levou ao composto **61n** que apresentou boas atividades em todos os alvos avaliados (hH_3R K_i = 21,2 nM, $eeAChE$ CI_{50} = 116 nM, $eqBChE$ CI_{50} = 5033 nM, $hMAO-B$ CI_{50} = 3022 nM). Esses resultados corroboraram o planejamento racional dos compostos desenvolvidos.



Esquema 19. Validação do planejamento racional dos compostos a partir da comparação das atividades farmacológicas dos compostos **80** e **81** com o produto **61n**.

3.8.1. Avaliação *in vitro* da afinidade frente ao receptor de Histamina H_3

O ensaio de afinidade *in vitro* dos compostos sintetizados com o receptor histaminérgico H_3 humano (hH_3R) foi realizado por meio de um ensaio de ligação competitiva com radioligante. Esse radioligante é tipicamente histamina marcada com 3H ou ^{125}I , embora isótopos como ^{14}C , ^{35}S e ^{32}P também possam ser utilizados em alguns casos. Esse ensaio é muito utilizado para caracterização de receptores, principalmente os acoplados à proteína G, e identificar os ligantes endógenos e exógenos (MAGUIRE *et al.*, 2012). É importante ressaltar que, nos ensaios de ligação, não é possível distinguir o agonista e o antagonista, pois ambos são tratados como ligantes.

Existem três tipos de ensaios de avaliação de ligantes de hH_3R : ensaio de saturação,

de competição e de cinética. O Ensaio de saturação utiliza uma concentração fixa do receptor e varia a concentração do radioligante, com objetivo de determinar a constante de dissociação (K_d) e a densidade máxima do sítio de ligação ($B_{máx}$) (**Figura 24-4A**). O ensaio de cinética avalia o tempo de incubação, com o objetivo de determinar as constantes de associação e dissociação (**Figura 24- 4C**). Já o ensaio por ligação competitiva utiliza uma concentração fixa do receptor e do radioligante, variando a concentração do ligante competidor (não marcado radioativamente), com o objetivo de avaliar a afinidade e identificar a seletividade entre radioligante e ligante competidor pelo receptor (**Figura 24 4B**).

A Figura 24 (1-3) ilustra, de forma geral, o ensaio de ligação com radioligante. O receptor é incubado com o radioligante e o composto competidor, cujas concentrações e ordem adição dependem do tipo de ensaio realizado (FLANAGAN, 2016; GODYŃ *et al.*, 2021). No caso do ensaio por competição, primeiro é incubado uma concentração fixa do receptor, expressado através de células HEK293, e do radioligante ($[^3H]N^{\alpha}$ -metil-histamina), e em seguida é adicionado uma concentração variada do composto competidor (1). Depois, o radioligante livre é separado (2) e o complexo radioligante-receptor é detectado no contador de cintilação (3) por meio da radiação emitida do radioligante na presença do líquido cintilador (FLANAGAN, 2016; SOAVE *et al.*, 2020).

A curva de competição é obtida, na maioria dos casos, por um gráfico semilogarítmico, representando a diferença entre o percentual total de ligação do complexo radioligante-receptor e a concentração $\log_{10}$ do ligante competidor, produzindo curva sigmoideal inversa com um máximo igual ao B_0 e um mínimo que corresponde à ligação não específica. A concentração do ligante que inibe 50% da ligação (IC_{50}) pode ser usada para estimar a afinidade do ligante não marcado, a partir da equação de Cheng-Prusoff (4B), em que K_D é a constante de dissociação, $[L]$ é a concentração do radioligante (COPELAND, 2013; FLANAGAN, 2016).

$$K_i = \frac{IC_{50} \cdot K_D}{(K_D + [L])}$$

Uma observação importante é que existem ligantes que modulam a interação radioligante–receptor de forma alostérica e, muitas vezes, até aumentam a ligação do radioligante–receptor. Portanto, neste ensaio, o ligante não marcado deve inibir a interação radioligante–receptor de forma competitiva, e não alostérica, para garantir que, ao ocupar a mesma superfície de ligação do radioligante, ou seja, o sítio de ligação ortostérico, iniba completamente a ligação específica.

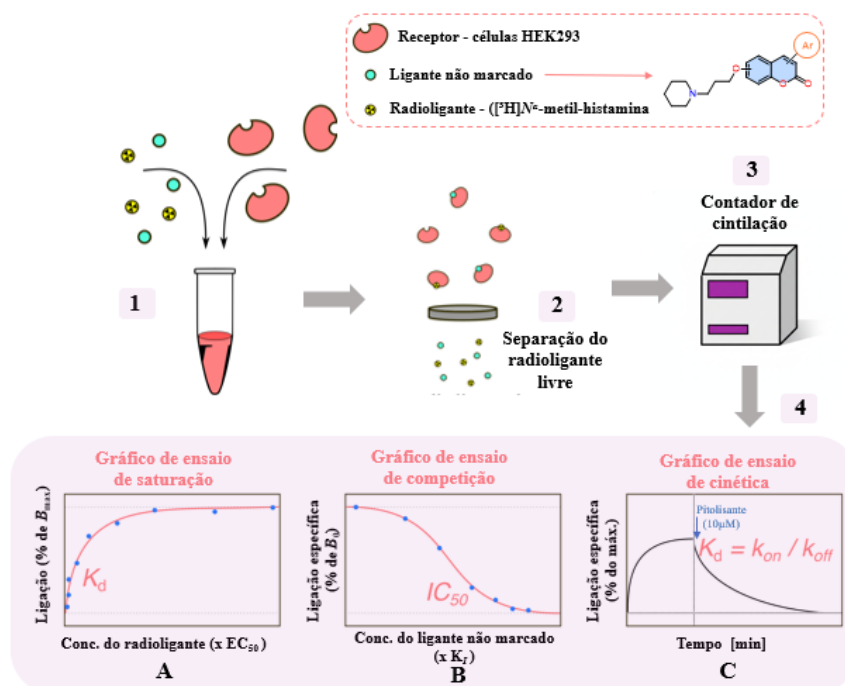


Figura 24. Ensaio de ligação com radioligante. **1)** incubação, **2)** separação do radioligante livre e o radioligante-receptor, **3)** detecção no contador de cintilância com auxílio do líquido cintilador gera os gráficos A, B e C **(4)**. **A)** A ligação do radioligante-receptor ao atingir o equilíbrio (B_0) e com concentrações cresce

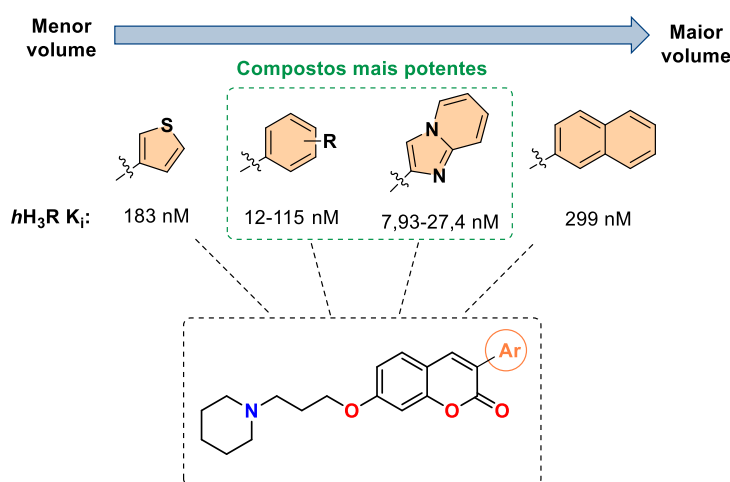
Trinta e sete compostos das **séries 1, 2, 3, 4 e 5** foram testados no ensaio de afinidade competitiva pelo hH_3R , apresentando valores de constante de inibição (K_i) inferiores a 1200 nM. Os resultados de afinidade pelo receptor hH_3R , representados pelas tabelas 4 e 5, demonstraram excelentes valores de K_i , variando entre 2 nM e 299 nM, sendo que a única exceção a essa faixa foi o composto **61d** (hH_3R K_i = 1131 nM). A tabela 4 contém os resultados de afinidade das **séries 1 e 2**, enquanto a tabela 5 apresenta os resultados das **séries 3, 4 e 5**.

De modo geral, nas 3-fenilcumarinas *para*-substituídas (**51a-j**), os grupos doadores de elétrons originaram compostos com melhor afinidade (K_i = 18,1-55,5 nM) do que os retiradores de elétrons (K_i = 91,8-104 nM), sendo a única exceção o substituinte $-NO_2$ (**51h**, K_i = 33,4 nM) que apresentou afinidade similar aos compostos com grupos doadores de elétrons. Os compostos com substituintes em *meta* não apresentaram uma correlação direta quando comparados com seus pares *para*-substituídos. Enquanto os compostos **51q** (*m*- NO_2 , K_i = 24,4 nM) e **51r** (*m*-Me; K_i = 28,7 nM) mostraram maior afinidade do que seus análogos correlatos *para*-substituídos **51h** (*p*- NO_2 , K_i = 33,4 nM) e **51b** (*p*-Me, K_i = 54,8 nM), os demais compostos *meta*-substituídos apresentaram afinidade reduzida (K_i = 132,9 - 139,4 nM).

Com relação aos compostos *orto*-substituídos, todos resultaram em menor afinidade (K_i = 68,5 - 260,0 nM) comparados a seus análogos substituídos nas posições *meta* e *para*,

indicando que a possível quebra de planaridade introduzida entre o núcleo central (cumarina) e os grupos aromáticos da região arbitrária, causada pelo efeito *orto*, pode ser deletéria para a afinidade.

Anéis aromáticos/heteroaromáticos de 6 membros na região arbitrária parecem possuir o volume ideal para interação com o hH_3R , uma vez que anéis menores, como tiofeno e maiores, como naftaleno, nesta região, mesmo os bioisósteros clássicos, apresentaram menores afinidades ($K_i = 183\text{--}299\text{ nM}$). Porém, os compostos **75a–d** (série 5; $K_i = 7,93\text{--}27,4\text{ nM}$), com substituinte imidazopiridina, apesar de possuírem com volume maior, estão entre os mais potentes, indicando a importância de anéis heteroaromáticos nitrogenados (Esquema 20).



Esquema 20. Interferência do tamanho do anel aromático da região arbitrária na atividade frente hH_3R .

A aza homologação em C3 entre o núcleo central e o sistema π da região arbitrária na **série 2** (**54a–c**), em comparação aos análogos fenil-substituídos, resultou em menores afinidades ($K_i = 41,5 - 93\text{ nM}$), apesar de ainda serem compostos bastante promissores, indicando que a ligação direta do sistema π dos grupos da região arbitrária ao núcleo central cumarina parece ser importante. A última exploração do perfil de substituição da região arbitrária foi acessada pela avaliação da 4-fenilcumarina (**64**) ($K_i = 56,4\text{ nM}$) (Tabela 2) que, apesar de apresentar menor afinidade que seu regioisômero 3-fenilcumarina (**51a**, $K_i = 28,7\text{ nM}$), ainda assim demonstra potencial para estudos futuros.

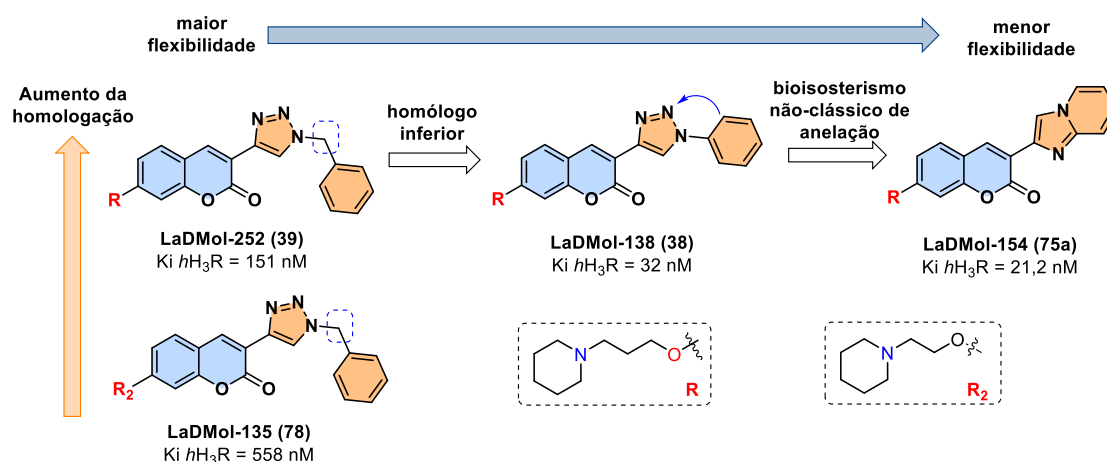
Os resultados descritos acima indicaram que o perfil de substituição com grupos aromáticos em C3 da cumarina se mostrou melhor que em C4. Desta forma, as **séries 3 e 4** foram planejadas para avaliar a influência de diferentes perfis de substituições da subunidade básica propoxiamina no núcleo cumarínico.

Tendo a 3-fenilcumarina **51a** ($K_i = 28,7\text{ nM}$) como referência, a avaliação dos compostos **61a** ($K_i = 220,0\text{ nM}$) (transposição da propoxipiperidina para o anel fenila em C3),

61b ($K_i = 58,5$ nM) (transposição da propoxipiperidina para o anel fenila em C3, mas mantendo um grupo alcóxila em C7), e **61c** ($K_i = 12,0$ nM) e **61d** ($K_i = 1131$ nM) (transposições da propoxipiperidina para C6 e C7, respectivamente) demonstrou resultados interessantes do ponto de vista de correlações estrutura atividade. Primeiramente, a substituição da cumarina com a propoxipiperidina em C6 (composto **61c**) levou a melhor afinidade (**51a** $K_i = 28,7$ nM; **61c** $K_i = 12$ nM) entre todos os compostos possuindo a fenila em C3 ou C4, demonstrando que este perfil de substituição pode ser o melhor para a afinidade H_3R e que substituições na fenila em C3 nesse sistema podem representar uma rota promissora para o desenvolvimento de compostos de alta afinidade. Como esperado, as substituições na posição C8 (composto **61d**) foram desfavoráveis em comparação com seus análogos (**51a** e **61c**), provavelmente devido a interferências estereo-eletrônicas.

Os resultados dos compostos **61a-b** corroboram o planejamento racional. A menor afinidade do composto **61a** ($K_i = 220$ nM) reforça a importância da cumarina como núcleo central, que neste caso acaba atuando na região arbitrária, enquanto **61b** ($K_i = 58,8$ nM) destaca o benefício de substituintes alcóxilas no núcleo cumarínico.

Os compostos **61e** (série 3; $K_i = 2,30$ nM) e **75b** (série 5; $K_i = 7,93$ nM) foram os mais potentes entre todos os derivados avaliados, demonstrando que a presença de subunidades básicas nas duas regiões promove aumento significativo da atividade, como também observado em **61f**. De modo geral, a presença do espaçador de 3C é crucial para a maior potência, pois, com base nos resultados da quimioteca do análogo 2C (**LaDMol-135**) do composto **LaDMol-252**, foi identificado que a homologação de 3C aumenta a atividade entre 15 e 30 vezes. Além disso, a menor flexibilidade conformacional é responsável pela atividade adicional como observado no Esquema 21.



Esquema 21. Fatores que interferem no aumento da potência na atividade frente ao H_3R . A homologação de 3 metilenos e a substituição por substituintes mais rígidos são cruciais para melhor atividade.

Tabela 4. Resultados de afinidade frente ao receptor humano de histamina H₃ (*h*H₃R) da série 1 e 2

Cod.	Ar	<i>K_i</i> <i>h</i> H ₃ R [nM] [IC 95%] ^a	Cod.	Ar	<i>K_i</i> <i>h</i> H ₃ R [nM] [IC 95%] ^a
51a	3-fenil	28,7 [8,79;84,0]	51o	3-(β-naftil)	299 [250; 358]
51b	3-fenil-4-Me	54,8 [13,8; 218]	51p	3-fenil-4-dimetilamino	18,1 [11,5; 28,5]
51c	3-fenil-4-OMe	46,5 [17,6; 123]	51q	3-NO ₂ -fenil	24,42 [8,88; 67,15]
51d	3-fenil-4-Cl	91,8 [72,0; 117]	51r	3-Me-fenil	28,71 [11,08;74,40]
51e	3-fenil-4-OH	55,5 [19,8; 155]	51s	5-benzo[<i>d</i>][1,3]dioxol	36,72 [16,28;82,83]
51f	3-fenil-4-F	90,6 [36,3; 226]	51t	3-OMe-fenil	139,43 [59,14;328,3]
51h	3-fenil-4-NO ₂	33,4 [10,0; 112]	51u	3-OH-fenil	132,9 [49,68;355,5]
51i	3-fenil-4-CN	104 [31,7; 340]	51v	2-NO ₂ -fenil	68,49 [33,17;141,4]
51j	3-fenil-4-CF ₃	115 [33,5; 396]	51x	2-OMe-fenil	259,99 [73,26;922,9]
51k	3-(3-tiofeno)	183 [54,5; 612]	54a	3-anilina	52,8 [31,00; 165]
51l	3-(4-piridina)	64,0 [20,3; 202]	54b	3-(4-NO ₂ -anilina)	41,5 [18,4; 93,7]
51m	3-(α-naftil)	211 [50,9; 872]	54c	3-(<i>p</i> -anisidina)	93 [41,3; 209]
51n	3-(5-pirimidina)	163 [109; 245]	Pitolisant		6,5 [2,3; 18]

^aConstante de inibição *K_i* frente ao receptor de histamina H₃ humana (*h*H₃R), cujos valores foram calculados no intervalo de confiança (IC) de 95% (n = 3-5)

Tabela 5. Resultados de afinidade frente ao receptor humano de histamina H₃ (hH₃R) da série 3, 4 e 5

CÓDIGO	ESTRUTURA	K _i hH ₃ R [nM] [IC 95%]
61a		220 [100; 486]
61b		58,5 [33,5; 103]
61c		12,0 [4,38; 32,8]
61d		1131 [527; 2426]
61e		2,30 [1,04; 5,1]
61f		20,9 [8,52; 51,2]
64		56,4 [20,4; 156]
75a		21,2 [8,94; 50,1]
75b		7.93 [3.14; 20.03]
75d		27,4 [11,1; 67,5]

O modelo farmacofórico dos receptores de histamina, mencionado anteriormente, foi observado por meio de análises de *docking* molecular no sítio ortostérico do H₃R com diversos ligantes, utilizando o programa GOLD 2024.3.0. Para a avaliação, utilizou-se a proteína disponível no *Protein Data Bank* (PDB) com código 7F61 e resolução de 2,6 Å (Peng et al., 2022). A determinação da melhor função pelo programa GOLD 2024.3.0 foi feita através de *redocking* com o ligante co-cristalizado da enzima (PF03654746) (GHAMARI et al., 2019). A função ChemPLP apresentou maior precisão na reprodução das interações moleculares do ligante, com valores de RMSD inferiores a 0,85 Å, considerando uma região de 15 Å no mesmo local de interação no sítio ativo do ligante co-cristalizado como referência (Tabela 6). Além disso, o pitolisant serviu como referência experimental para validar o modelo de *docking*.

Tabela 6. Score e valores de RMSD para a validação por redocking do hH₃R

Score Function	DockScore	RMSD (Å)
GoldScore	57.0359	0.7418
CHEMPLP	84.3787	0.4437
ChemScore	36.6913	0.8027
ASP	57.3723	0.5991

A partir dessas análises, foram destacadas interações cruciais para a inibição do receptor: a subunidade básica do ligante interage por ponte salina com o resíduo Asp114; o heteroátomo da cadeia de homologação estabelece ligação de hidrogênio com Tyr115; e a região arbitrária do ligante que promove interações com diversos resíduos aromáticos, como Phe398, Tyr94 e Tyr189. Outro fator importante é que, devido ao uso do mapa farmacofórico de antagonistas H₃R e à semelhança de interação com pitolisant, nossos compostos devem atuar como antagonistas/agonistas inversos dos H₃R.

Adicionalmente, próximo a essa cavidade encontra-se o colesterol (CLR), que desempenha papel fundamental na estabilização do receptor por meio de interações π - π stacking envolvendo os resíduos Trp399, Trp402 e Tyr91 (Figura 25), bem como por ligações de hidrogênio com Glu395. Estudos indicam que o colesterol atua como modulador alostérico em relação aos antagonistas do H₃R, sendo que a interação dos antagonistas com esses resíduos pode contribuir para a desestabilização do receptor (PENG et al., 2022).

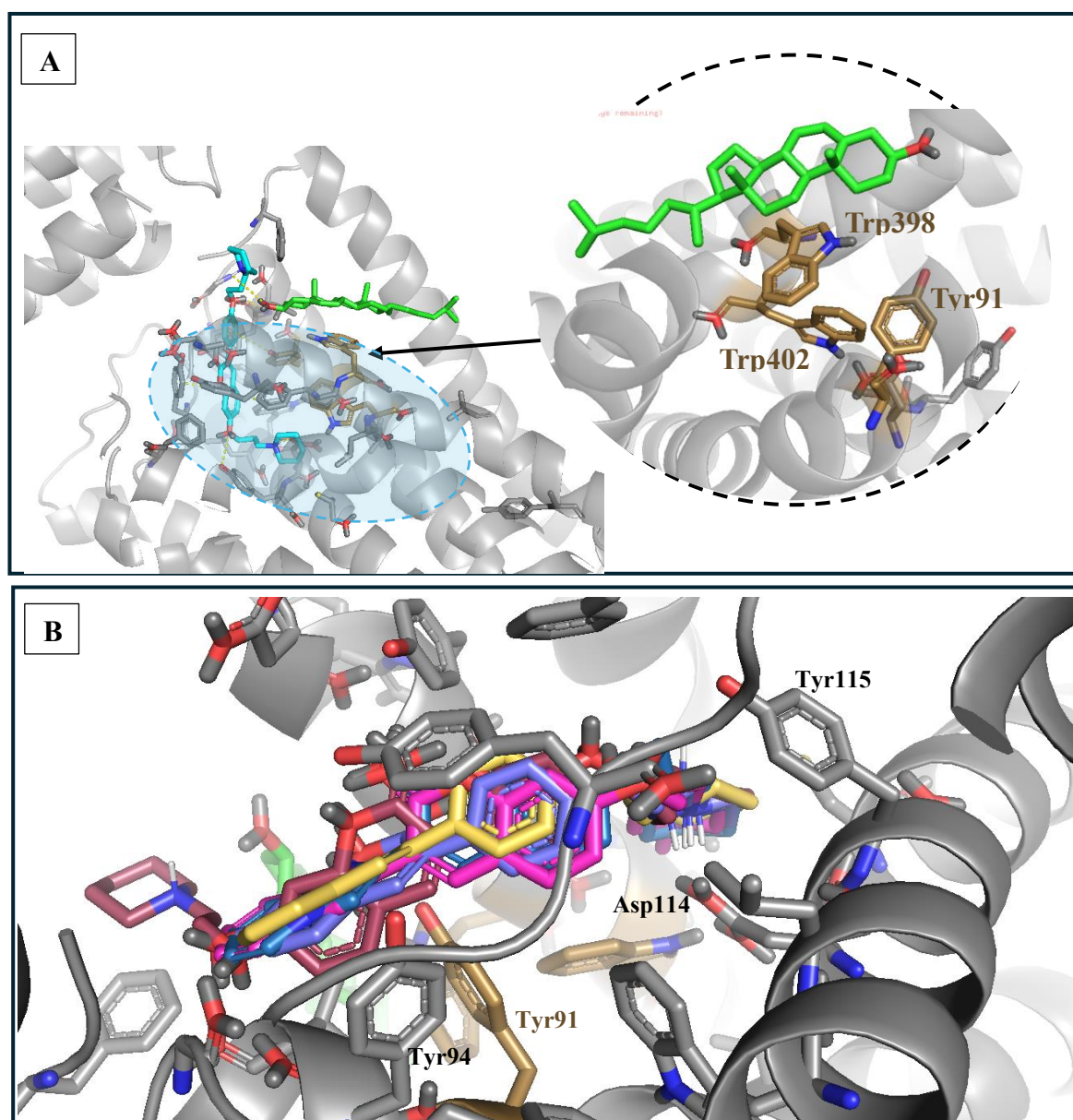


Figura 25. (A) Análise 3D do receptor H₃R (PDB 7F61). O sítio ortostérico está destacado em azul, o colesterol (CLR) em verde ocupa o sítio alostérico, e a tríade conservada de interação com colesterol (Trp399, Trp402 e Tyr91) aparece em dourado. (B) Principais interações entre os compostos avaliados com o sítio ortoestérico do H₃R. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

O resultado de afinidade dos compostos revela bons resultados, pois eles interagem, de modo geral, com os principais resíduos responsáveis pela atividade no sítio ortostérico. As diferenças decorrem de variações na angulação, distância de interação e características adicionais dos substituintes. Os *para*-substituintes doadores de elétrons e o grupo nitro, diferentemente da maioria dos retiradores de elétrons, formam ligação de hidrogênio com Arg27, além de alterarem a angulação da interação π - π com Tyr94. Da mesma forma, o grupo fenila apresenta emparelhamento π - π ideal com a Tyr94, o que pode explicar a maior afinidade

desses compostos observada na avaliação *in vitro*.

Nesse sistema, anéis aromáticos menores que seis membros, como o tiofeno do composto **51k**, não alcançam proximidade suficiente para formar interações π - π na região devido à distância entre os núcleos. Os compostos com substituintes α -naftil (**51m**) e β -naftil (**51o**) apresentam maior volume, direcionando o anel para regiões de resíduos alifáticos e polares em sua conformação estável, o que justificaria a perda da potência. Ainda assim, o α -naftil mantém interação π - π com Tyr94, justificando sua maior atividade em relação ao β -naftil.

Os compostos **61c** e **61d**, com a subunidade básica propoxipiperidina nas posições **6** e **8**, respectivamente, exibem interações similares ao análogo **51a**. No entanto, o **61d** (posição **8**) não forma ligação de hidrogênio entre o oxigênio da cadeia propoxipiperidina e a Tyr115, que é importante no modelo farmacofórico. No **61c** (posição **6**), mais ativo, a angulação de interação é similar à do **51a**, mas o oxigênio da homologação está mais direcionado para resíduos que interagem com CLR.

Já o composto **64** (**4-fenilcumarina**) apresenta pose mais externa no sítio ortostérico, próxima à região do colesterol, onde o oxigênio da lactona forma ligações de hidrogênio com Tyr94 e Tyr189. Devido à posição externa, o composto **64** não estabelece ponte salina com Asp114, mas realiza interação cátion- π com Phe398. Como a interação com a ponte salina é de extrema importância para atividade, talvez sejam necessário estudos adicionais, como simulações de dinâmica molecular, para tentar identificar as possíveis interações induzidas no sítio ortoestérico.

Dentre os compostos mais potentes destacam-se o **61e** (hH_3R K_i = 2,30 nM; série 3) e o **75b** (hH_3R K_i = 7,93 nM; série 4). O **75b**, cuja pose é ilustrada na Figura **26A**, segue o padrão majoritário de interação dos compostos avaliados e do pitolisant (Figura **26B**): na subunidade básica, o nitrogênio da piperidina forma ponte salina com Asp114 (2,6 Å), o oxigênio da homologação estabelece ligação de hidrogênio com Tyr115 (3,6 Å), a cumarina realiza interação π - π com Tyr189 (4,3 Å) e tipo T com Phe398 (5,0 Å), a carbonila da lactona forma ligação de hidrogênio com Tyr394. A diferença reside no anel imidazopiridina, cujo encaixe permite ligação de hidrogênio com resíduos polares próximos ao CLR e diretamente com Tyr91 (2,9 Å).

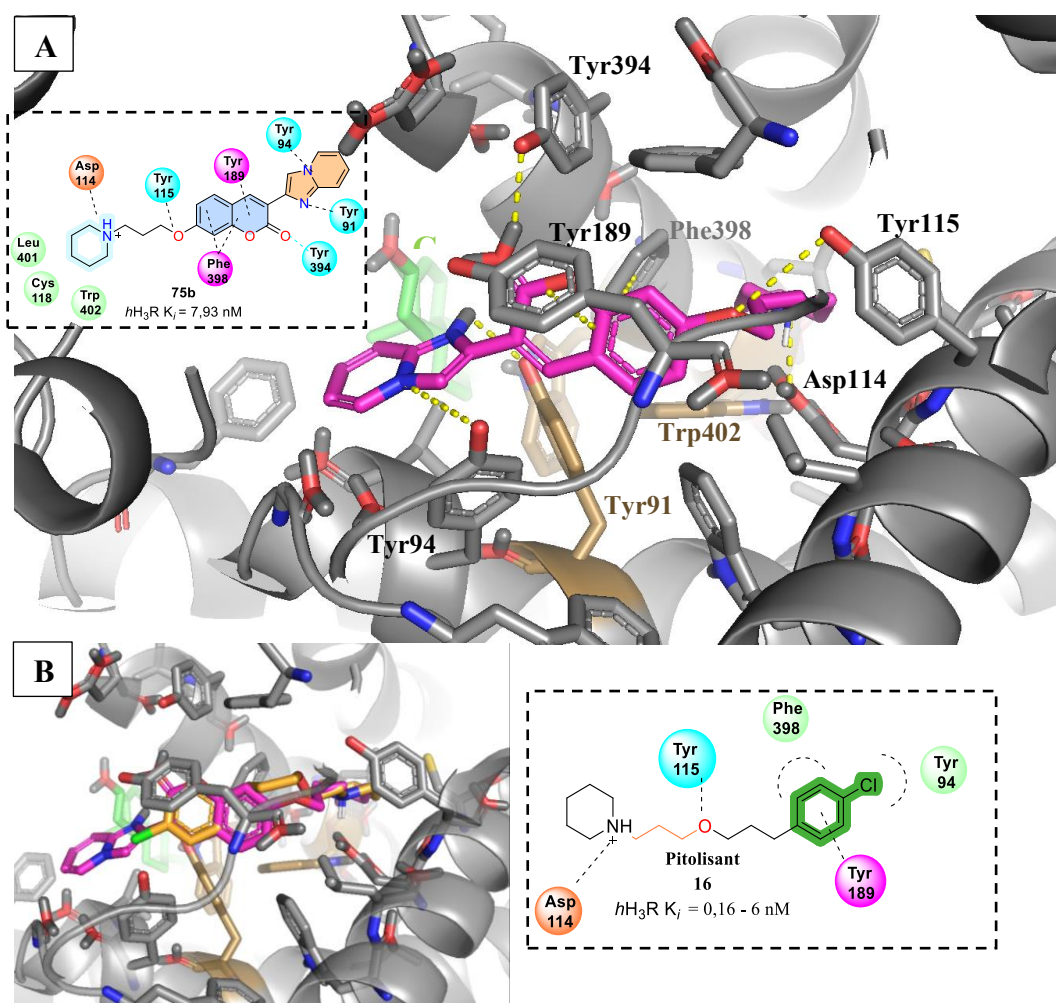


Figura 26. A) Análise das principais interações moleculares entre o composto **75b** (rosa) no sítio ortoestérico do *hH₃R*. B) Análise da sobreposição do composto **75b** (rosa) e Pitolisant (laranja) e a cavidade do *hH₃R*. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Além disso, a metila ligada à piperidina em **75b** estabelece interações hidrofóbicas na região interna da cavidade com Trp402, Phe398 e Leu401. A presença da metila e sua maior proximidade ao colesterol (4,7 Å), em contraste com os 5,5 Å do análogo **75a** (série 4), representam as únicas diferenças estruturais de interação e que podem explicar a maior afinidade de **75b** (*hH₃R* K_i = 7,93 nM) frente a **75a** (*hH₃R* K_i = 21,2 nM). Isso evidencia a importância dessas interações com CLR e resíduos responsáveis pela sua estabilização, como Trp402, para o aumento da potência.

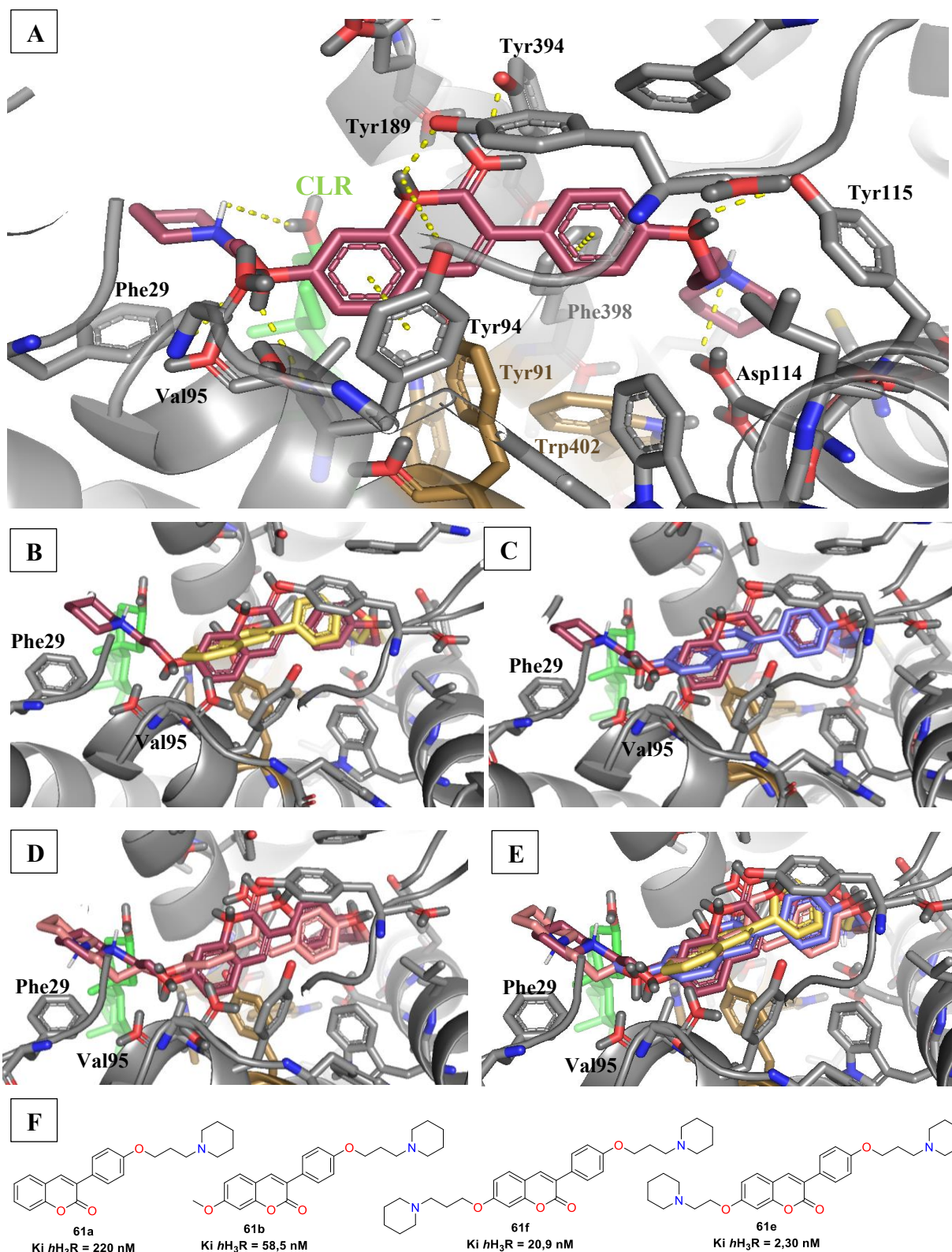


Figura 27. A) Análise das principais interações moleculares entre o composto **61e** (marsala) Cno sítio ortoestérico do hH_3R . B) Análise da sobreposição do composto **61a** (amarelo) e o composto **61e** (marsala) na cavidade do hH_3R . C) Análise da sobreposição do composto **61b** (roxo) e o composto **61e** (marsala) na cavidade do hH_3R . D) Análise da sobreposição do composto **61f** (salmão) e o composto **61e** (marsala) na cavidade do hH_3R . E: Análise da sobreposição de todos os compostos cavidade do hH_3R . F: Estruturas e atividades dos

compostos avaliados frente ao *hH₃R*. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

No composto **61e**, um dímero, a conformação mais estável direciona a homologação com três metilenos para dentro da cavidade, realizando as principais interações já citadas, e a homologação com dois metilenos direcionada para parte externa da cavidade (Figura 27A). Nesse sistema, a distância de homologação ideal para atividade está na faixa de 4,5-5 Å, medida em que o heteroátomo (oxigênio) interage com Tyr115 e o Asp114 interage com a piperidina dentro da cavidade.

A partir da comparação de atividade e interações do composto **61e** com o dímero **61f** e os compostos **61a** e **61b** (Figura 27E e 27F), podem-se notar algumas observações importantes que justificam as diferenças de atividade. Primeiramente, ambos os dímeros, devido ao alongamento da cadeia estão voltados para o sítio alostérico, as diferenças residem na angulação da conformação mais estável, que faz com que o dímero **61f** perca interações importantes com os resíduos aromáticos Tyr94 e Phe398, além da ligação direta com o colesterol, interação ausente no composto **61f**, ao contrário do observado no dímero **61e** (2,9 Å).

Comparando o composto **61e** com os compostos **61a** (Figura 27B) e **61b** (Figura 27C), observa-se que o grupo metoxi na cumarina é crucial para a atividade, pois forma uma ligação de hidrogênio com a Val95 na entrada da cavidade do sítio ortostérico. Essa interação também direciona o composto **61b** para melhores interações com os resíduos aromáticos no sítio. Diante disso, o **61e** é o mais ativo entre os avaliados, reforçando a importância do antagonista na desestabilização por interação com CLR e seus resíduos associados.

3.8.2. Avaliação *in vitro* de inibição enzimática frente as colinesterases

Foram realizados ensaios de atividade inibitória frente às colinesterases, AChE e BChE, para todos os produtos finais sintetizados e alguns intermediários. Os ensaios foram conduzidos pelo método espectrofotométrico adaptado de Ellman *et al.* (1961), utilizando o fármaco donepezila como referência.

O método baseia-se na hidrólise enzimática da acetiltiocolina (ATC, **82a**) ou butiriltiocolina (BTC, **83b**) pelas enzimas AChE ou BChE, respectivamente, gerando ácido acético/butírico (**84a-b**) e tiocolina (**85**). Esta última reage com o 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB, **86**), produzindo o ácido 2-nitro-5-mercaptotio benzóico (amarelo) (**87**), cuja formação é quantificada por espectrofotometria em leitor de placas equipado com filtro de luz a $\lambda = 415$ nm. Assim, a atividade enzimática é monitorada indiretamente pela reação da tiocolina com o corante cromogênico DTNB (Figura 28).

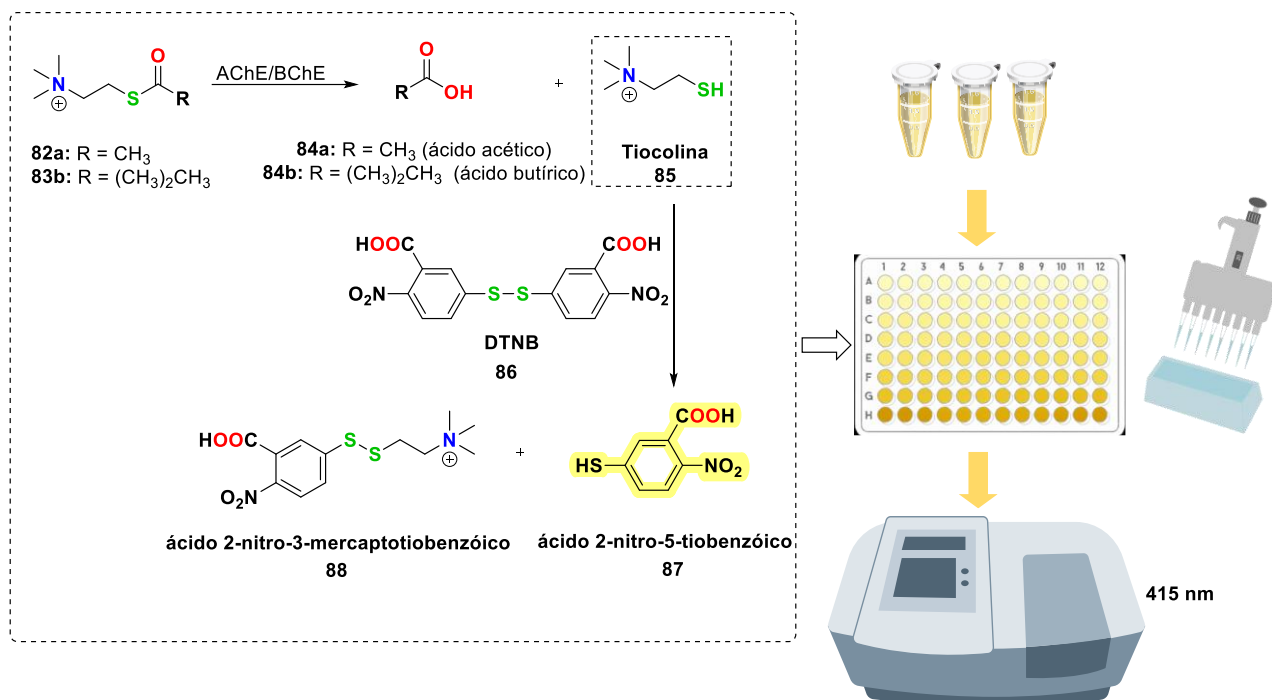


Figura 28. Método adaptado de Ellman para avaliação da atividade enzimática dos compostos finais frente a colinesterases

Inicialmente, realizou-se um *screening* a uma concentração fixa 10 μM , selecionando-se os compostos com inibição maior que 50% para determinação do CI_{50} . Todos os compostos, exceto o **51b**, exibiram percentual de inibição maior que 50% frente à AChE. Em relação a BChE, os compostos **51b**, **51h-i**, **51m**, **51n-o**, **54b-c** apresentaram o percentual de inibição menor que 50%. Os resultados de inibição enzimática frente as colinesterases, representados na Tabela 6, demonstram inibições de excelente a moderada, com CI_{50} variando entre 74 nM e 4493 nM para AChE, e entre 330 nM e 8649 nM para BChE.

De maneira geral, os compostos apresentaram um perfil predominantemente de maior potência e seletividade para AChE, conforme demonstrado na tabela 6, com destaque para os compostos **51h-i**, **51m-o**, **54b-c**, que exibiram o maior perfil de seletividade para AChE, demonstrando menos de 50% de inibição da BChE à 10 μM . Por outro lado, os compostos **61b** e **61c** foram os únicos a apresentarem maior seletividade para BChE, sendo 4 vezes mais potentes na inibição desta enzima comparativamente à AChE.

Tabela 7. Resultados de inibição enzimática frente as colinesterases

Comp.	CI ₅₀ [nM] ± DP ^a ou % inibição a 10 µM		IS ^d	Comp.	CI ₅₀ [nM] ± DP ^a ou % inibição a 10 µM		IS ^d
	AChE ^b	BChE ^c			AChE ^b	BChE ^c	
51a	1031 ± 0,029	1860 ± 24	1,8	51t	676 ± 47	984 ± 19	1,5
51b	18% ± 1,33	13% ± 1,24	-	51u	2090 ± 100	5478 ± 192	2,6
51c	1139 ± 83	1033 ± 71	0,9	51v	1247 ± 63	2493 ± 152	2
51d	1480 ± 80	4469 ± 141	3	51x	1538 ± 116	3079 ± 162	2
51e	729 ± 30	6948 ± 256	4,7	54a	1552 ± 6	2819 ± 192	2
51f	858 ± 27	2788 ± 56	3,3	54b	434 ± 21	18,3 % ± 1,24	434
51h	463 ± 28	40% ± 7,1	463	54c	806 ± 43	38% ± 2,36	806
51i	228 ± 70	38% ± 10,5	228	61a	1938 ± 134	1219 ± 6	0,63
51j	613 ± 51	6364 ± 464	10	61b	4250 ± 124	1085 ± 82	0,25
51k	869 ± 57	1673 ± 46	2	61c	2540 ± 126	647 ± 59	0,25
51l	138 ± 4	8649 ± 243	62	61d	4493 ± 275	6777 ± 42	1,5
51m	4153 ± 275	-84% ± 324	>1000	61e	311 ± 15	330 ± 24	1
51n	74 ± 20	43% ± 3,35	74	61f	260 ± 10	433 ± 14	1,7
51o	2148 ± 127	-35% ± 386	>1000	64	2207 ± 73	3270 ± 73	5,5
51p	2085 ± 151	7270 ± 273	3,5	75a	116 ± 6	5033 ± 141	43
51q	539 ± 14	2460 ± 120	4,6	75b	563 ± 116	6007 ± 420	11
51r	519 ± 34	3290 ± 120	6	75c	121 ± 8	4042 ± 162	33
51s	754 ± 7	7357 ± 108	10	75d	1307 ± 79	5067 ± 335	4
Donepezila <i>ee</i> AChE CI ₅₀ = 7.02 ± 0.24				eq BChE CI ₅₀ = 2390 ± 110			

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

Na **série 1 (51a-x)**, as 3-fenilcumarinas substituídas foram geralmente mais potentes do que a 3-fenilcumarina não substituída (**51a**). Diferentemente do observado para *h*H₃R, as atividades não seguem uma tendência clara entre o perfil de substituições por grupos doadores/retiradores de elétrons, observando-se, contudo, que substituintes fortemente retiradores de elétrons -NO₂ (**51h**; $\sigma_{\text{para}} = 0,78$; CI₅₀ = 463 ± 28 nM) e -CN (**51i**; $\sigma_{\text{para}} = 0,66$; CI₅₀ = 228 ± 70 nM) levaram a incremento da potência de inibição em AChE, um padrão frequentemente observado em nossa quimioteca de I-AChE. Recentemente esse fenômeno foi estudado por dinâmica molecular em nosso grupo (FRANCO et al., 2026), demonstrando que as fenilas substituídas com esses grupos podem realizar melhores interações de empilhamento π - π com a Trp286 no PAS, gerando um mecanismo colaborativo que culmina

com o favorecimento das interações no CAS. Na posição *meta*, os substituintes -Me (**51r**; $CI_{50} = 519 \pm 34$) e -OMe (**51t**; $CI_{50} = 676 \pm 47$) superaram seus análogos em *para*, **51b** (inibição à $10 \mu M = 18 \pm 1,33 \%$) e **51c** ($CI_{50} = 1139 \pm 83$ nM), respectivamente. A inatividade do derivado **51b** (*p*-Me-Ph) em AChE, o único de toda a série, é intrigante, pois não há razões farmacodinâmicas para tal. Esse resultado já foi observado em nosso grupo em outras séries correlatas e precisa ser mais bem estudado para sua compreensão. Por fim, de maneira geral os compostos com substituintes na posição *orto* foram menos potentes que *meta* e *para*, indicando, como nas avaliações em *hH₃R*, que a quebra de planaridade/volume adicional nessa região não é benéfica.

Assim como observado para o *hH₃R*, os compostos com anéis de seis membros na posição 3 das cumarinas foram mais potentes em AChE que aqueles com anéis menores, como o tiofeno (**51k**; $CI_{50} = 869 \pm 57$), ou maiores, como as naftilas (**51n**; inibição à $10 \mu M = 74 \pm 20 \%$ e **51o**; $CI_{50} = 2148 \pm 127$), com exceção dos compostos **75a** e **75c**, que apresentam um anel nitrogenado fundido (imidazopiridina) na posição 3. De modo geral, os compostos heteroaromáticos nitrogenados (**51l**, **51n**, **75a** e **75c**) exibiram os melhores resultados entre todos os compostos avaliados frente a AChE (CI_{50} entre 74 e 138 nM). Esses resultados corroboram com àqueles observados os derivados **51h** e **51i**, os quais apresentam grupos eletrôn retiradores, uma vez que derivados azaheterociclos frequentemente proporcionam interações de empilhamento π e T entre sistemas aromáticos superiores em comparação com anéis de benzeno simples devido à sua densidade eletrônica reduzida e interações eletrostáticas específicas (dipolo-quadrupolo ou quadrupolo-quadrupolo), que geralmente são favorecidas em conformações paralelas deslocadas ou escalonadas (BOOTSMA *et al.*, 2019; DO *et al.*, 2025).

Em relação aos compostos apresentando diferentes substituições no núcleo cumarínico, seja pelas cadeias de propoxipiperidinas nas posições 6 e 8 ou pela fenila na posição 4, todos apresentaram menor atividade do que os compostos com as substituições nas posições 3 (propoxipiperidinas) e 7 (aromáticos). Esse perfil indica uma maior restrição estérica e/ou eletrônica com relação ao perfil de substituição das cumarinas, no que tange a habilidade de inibir as ChE, em comparação com o perfil de atividade observado para o *hH₃R*.

A cinética enzimática estuda o mecanismo no pelo qual as enzimas se ligam aos substratos, transformando em produtos sob auxílio de catalisados. Os inibidores enzimáticos correspondem a moléculas capazes de reduzir ou interromper a catálise de reações mediadas por enzimas podendo ocorrer de forma reversível e irreversível. Na inibição irreversível os inibidores ligam-se a enzima ou grupos funcionais da enzima por ligação covalentes estáveis que modifica permanentemente o sítio da enzima.

Os inibidores reversíveis ligam-se à enzima por interações não covalentes, como interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou forças de van der Waals. Estes inibidores subdividem-se de modo geral 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) (Figura 29).

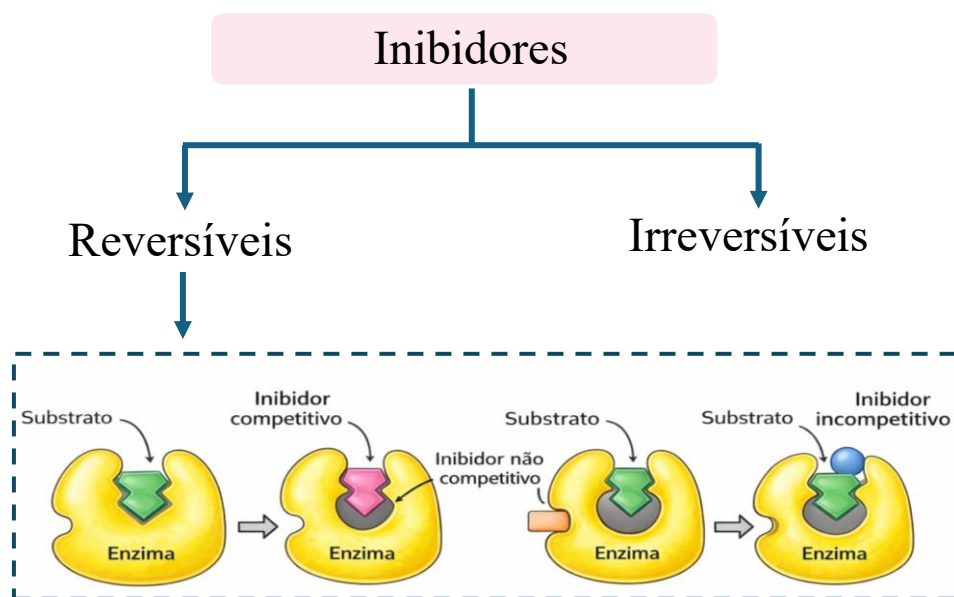


Figura 29. Representação dos tipos de inibidores enzimáticos.

Na inibição competitiva, o inibidor compete diretamente com o substrato pelo sítio ativo da enzima, devido à similaridade no 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.

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 (SEGEL, 1975; Copeland, 2013; L; M, 2022).

Existem também os inibidores mistos, que podem ser considerados uma generalização dos inibidores não competitivos, pois são capazes de se ligar tanto ao sítio catalítico da enzima (caracterizando um componente de inibição competitiva) quanto a um sítio alostérico (componente de inibição não competitiva), atuando por dois modos distintos. Esse mecanismo geralmente resulta na redução de V_{max} , enquanto o K_m pode aumentar ou diminuir, dependendo da afinidade do inibidor pela enzima livre ou pelo complexo enzima–substrato. Para esse tipo de inibição, devem ser calculadas duas constantes, **K_i** , relacionada à inibição competitiva, e **K_i'** , associada à inibição não competitiva (Copeland, 2013; L; M, 2022).

Para determinar o mecanismo de inibição dos compostos avaliados, foram realizados ensaios de cinética enzimática com os compostos **61e**, **64** e **75a** em ambas as enzimas, escolhidos baseando-se na melhor atividade e diferença estrutural. Esses compostos foram selecionados com base em sua potência inibitória frente à AChE e em suas diferenças estruturais, visando a um melhor entendimento do perfil de interação com as enzimas. Foram avaliados os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} (Tabela 9), bem como a construção do gráfico de Lineweaver–Burk (Figura 30), que corresponde à forma linearizada da equação de Michaelis–Menten, permitindo a determinação dos parâmetros cinéticos e a identificação do mecanismo de inibição.

A partir da obtenção dos parâmetros cinéticos e da plotagem do gráfico de Lineweaver–Burk, foi identificado que os compostos **61e** e **75a** apresentam inibições do tipo mista para ambas as enzimas. Diante disso, esses inibidores são capazes de se ligar tanto ao sítio catalítico da enzima, quanto ao sítio alostérico. Esse comportamento já era esperado, considerando a similaridade estrutural dos compostos e a proximidade entre o sítio catalítico e o sítio alostérico (sítio periférico) das ChEs.

Para a AChE, o composto **64** apresentou inibição do tipo mista, enquanto para a BChE apresentou inibição do tipo não competitiva, indicando interação preferencial com um sítio alostérico da enzima. No caso das ChEs, como os sítios catalítico e periférico encontram-se próximos, há grande probabilidade de que esse composto esteja atuando por meio da formação de um complexo ternário entre a enzima, o substrato e o inibidor. Esse comportamento pode estar relacionado também ao maior volume do sítio ativo da BChE, o que favorece a acomodação simultânea dessas espécies.

Com base nas constantes de afinidade, observa-se que, embora os compostos apresentem afinidade por ambas as enzimas, os menores valores de K_i obtidos para a AChE indicam maior afinidade por essa enzima. Esse comportamento pode estar relacionado às características estruturais do sítio ativo, que podem favorecer interações mais eficientes entre

os compostos e a AChE. Em relação ao mecanismo de inibição, o menor valor de K_i em comparação ao K_i' indica que os compostos apresentam maior afinidade pelo sítio catalítico do que pelo sítio periférico, o que corrobora os resultados obtidos nos estudos de docking molecular.

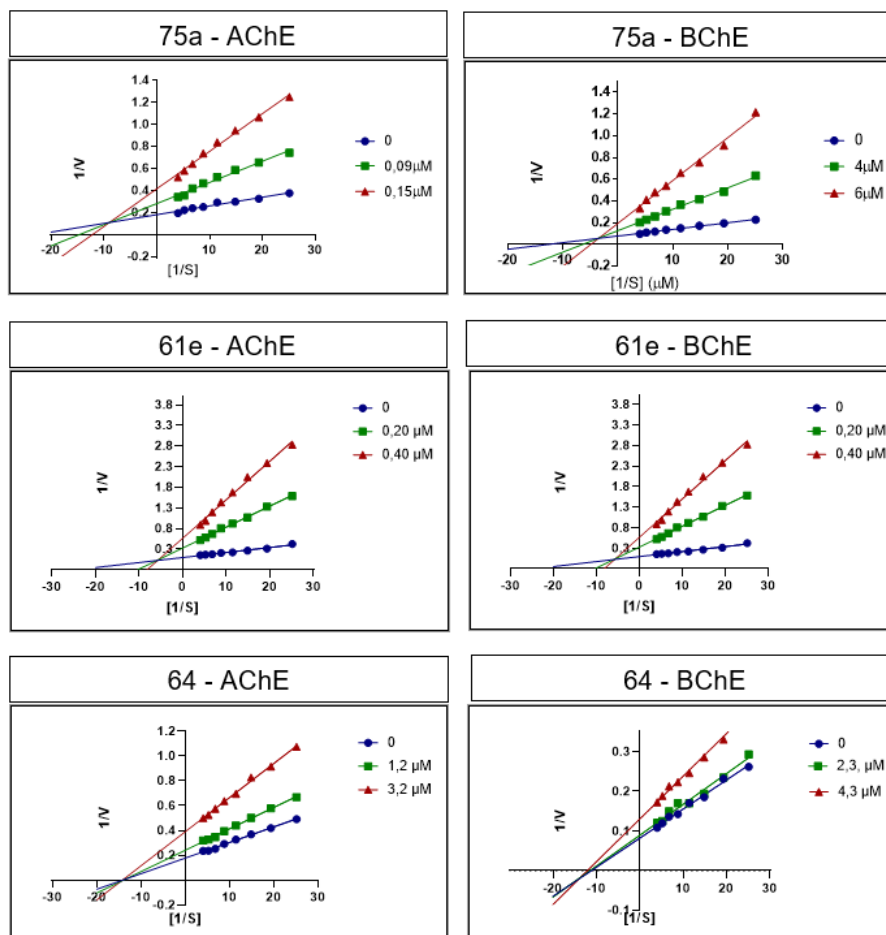


Figura 30. Gráficos de Lineweaver-Burk da cinética de inibição em *Ee*AChE e *Eq*BChE dos compostos **61e**, **75a** e **64b**.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos dos compostos 61e, 75a e 64 em AChE e BChE

Concentração (μM)	$V_{\max} \pm \text{DP}^a$ ($1 \times 10^3 \mu\text{M} / \text{min}$)	$K_m \pm \text{DP}^a$ ($1 \times 10^3 \mu\text{M}$)	$K_i (\mu\text{M}) \pm \text{DP}^b$	$K_i' (\mu\text{M}) \pm \text{DP}^c$
75a em BChE				
0	$10,65 \pm 0,289$	$73,29 \pm 1,015$		
4	$8,02 \pm 0,687$	$176,77 \pm 6,328$	$0,97 \pm 0,036$	$2,66 \pm 0,095$
6	$4,36 \pm 0,138$	$211,5 \pm 10,606$		
75a em AChE				
0	$5,73 \pm 0,297$	$45,61 \pm 0,368$		
0,09	$4,01 \pm 0,184$	$83,49 \pm 3,274$	$0,024 \pm 0,0005$	$0,099 \pm 0,0023$
0,15	$2,66 \pm 0,093$	$107,20 \pm 7,495$		
61e em BChE				
0	$10,65 \pm 0,288$	$73,29 \pm 1,015$		
0,20	$8,02 \pm 0,68$	$176,77 \pm 6,328$	$0,05 \pm 0,002$	$0,16 \pm 0,00096$
0,40	$4,36 \pm 0,137$	$211,5 \pm 10,606$		
61e em AChE				
0	$8,94 \pm 0,400$	$98,47 \pm 1,205$		
0,20	$3,45 \pm 0,005$	$172 \pm 13,010$	$0,03 \pm 0,0000$	$0,08 \pm 0,0020$
0,40	$2,75 \pm 0,181$	$351,75 \pm 3,040$		
64 em BChE				
0	$12,31 \pm 0,142$	$95,15 \pm 1,795$		
2,3	$10,45 \pm 0,360$	$91,78 \pm 7,865$	-	$12,06 \pm 0,227$
4,3	$8,77 \pm 0,084$	$96,55 \pm 2,245$		
64 em AChE				
0	$5,27 \pm 0,346$	$68,60 \pm 1,905$		
1,2	$3,81 \pm 0,166$	$74,74 \pm 6,75$	$0,99 \pm 0,032$	$3,17 \pm 0,104$
3,2	$2,89 \pm 0,091$	$88,33 \pm 3,670$		

^aMédia $\pm$ desvio padrão (DP) de seis experimentos independentes realizados em triplicata; ^b K_i , constante de inibição competitiva; ^c K_i' , constante de inibição não competitiva.

Procurando compreender as bases moleculares que explicariam as atividades observadas sobre as ChEs, foi realizado um estudo de ancoramento molecular dos compostos avaliados. O método foi conduzido utilizando a estrutura cristalográfica da AChE de *Electrophorus electricus* (EeAChE), disponível no Protein Data Bank (PDB ID: 1C2O), utilizando a donepezila como referência. As análises foram realizadas com a função de escore Goldscore, considerando um raio de 15 Å em torno do resíduo Ser203, localizado no CAS,

como referência para a definição da região de *docking* (DE SOUZA et al., 2019).

De modo geral, a análise de *docking* revelou que os inibidores ocupam simultaneamente o CAS e o PAS, estabelecendo interações chave em ambos, em concordância com os dados de cinética enzimática. As diferenças de potência decorrem da angulação e distância dos compostos e os principais resíduos. Como ilustrado na Figura 31, no complexo *eeAChE*-composto **51n** ($CI_{50} = 74$ nM), o nitrogênio da piperidina forma interação cátion- π com Trp86 (4,0 Å) e ligação de hidrogênio com Tyr337 (2,1 Å), o núcleo cumarínico estabelece ligação de hidrogênio adicional com Tyr337 (2,0 Å) e o grupo peptídico de Phe295, enquanto o anel piperidínico realiza contatos hidrofóbicos com Ser203 e His447. No sítio periférico, a pirimidina na posição 3 interage via empilhamento π - π (3,3 Å) com Trp286. Essas interações explicam a alta potência inibitória dessa classe de composto, como já descrito na literatura (DE SOUZA et al., 2019; NADUR et al., 2025).

Os compostos **51l** ($CI_{50} = 138$ nM) e **75a** ($CI_{50} = 116$ nM), também classificados entre os mais potentes, exibem interações similares às observadas para **51n**. Em resumo, os compostos com substituintes azaheterocíclios em C3 apresentam maior potência inibitória ($CI_{50} < 140$ nM) devido à capacidade de formar ligações de hidrogênio com resíduos polares da região PAS, além de interações π - π com resíduos aromáticos da região como Trp286.

A modificação regioisomérica da subunidade básica propoxipiperidina da posição 7 para as posições 6 (**61c**) e 8 (**61d**), bem como do sistema aromático da posição 3 para a posição 4 (**64**), originou poses de ancoramento apresentando mudanças conformacionais, com relação a **51a**, em busca da melhor estabilidade de encaixe, alterando as principais interações (Figura 32). Exemplos incluem a perda da interação cátion- π com Trp86, ligação de hidrogênio com Tyr337 e interação π - π com Trp286, que são consideradas de grande importância para a inibição da AChE. A Figura 32A compara essas interações com o composto mais ativo **51n** na cavidade da AChE. Na Figura 32B, o composto **61c** (verde) direciona-se à região superior da cavidade, sem interação com Trp86, o nitrogênio da piperidina forma ligação de hidrogênio com His447, enquanto o núcleo cumarínico interage via ligação de hidrogênio com o grupo peptídico de Phe295. Já os compostos **61d** (Figura 32C) e **64** (Figura 32D) exibem poses invertidas, com a fenila em posição 3 e 4 interagindo com Trp86 e a subunidade básica voltada para o sítio periférico.

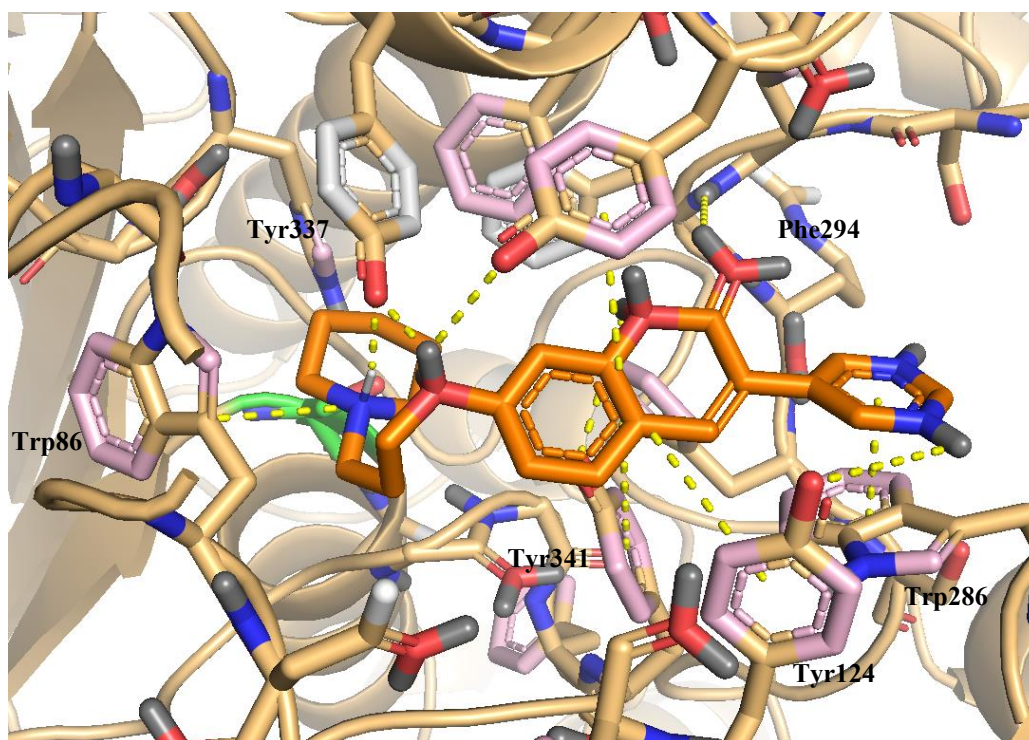


Figura 31. Análise das principais interações moleculares entre o composto **51n** (laranja) na cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

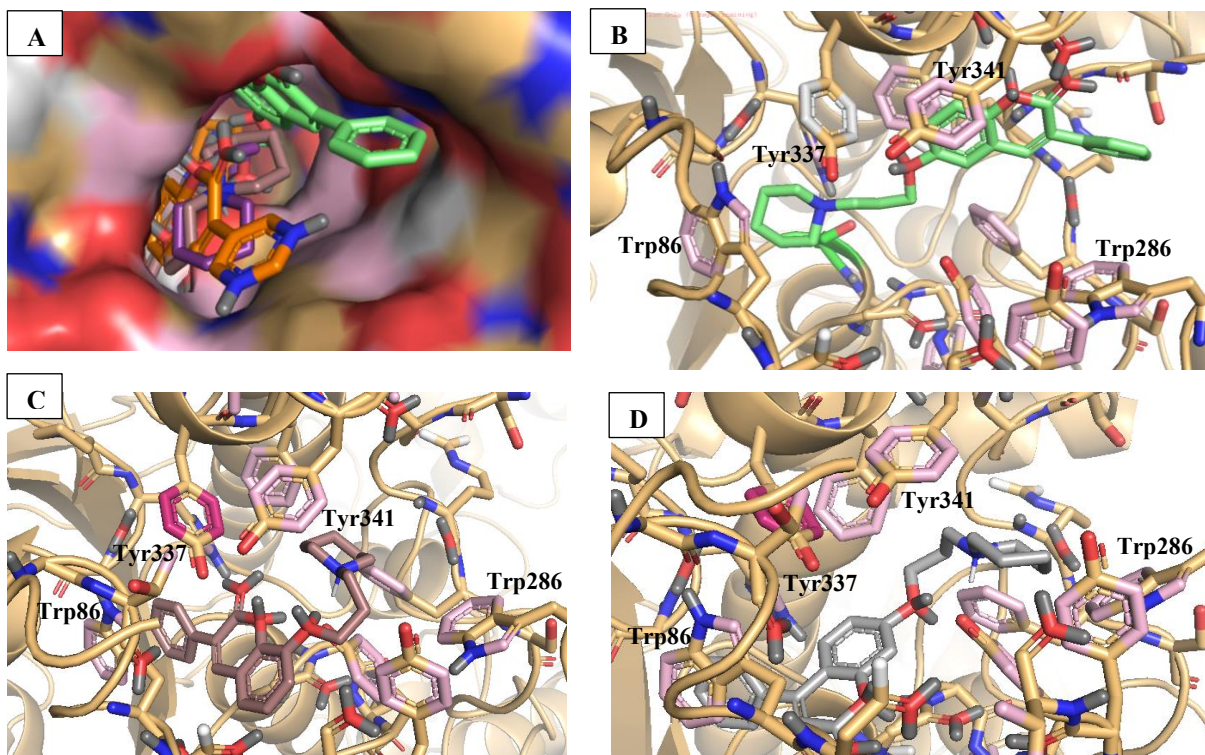


Figura 32. A) Sobreposição de encaixe dos compostos **51n** (laranja), **61c** (verde), **61d** (marrom rosê) e **64** (cinza) na cavidade enzimática da AChE; B) interações moleculares entre o composto **61c** (verde) na cavidade enzimática da AChE; C) interações moleculares entre o composto **61d** (marrom rosê) na cavidade enzimática da AChE; D) interações moleculares entre o composto **64** (cinza) na cavidade enzimática da AChE. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

Em relação ao ancoramento molecular frente a enzima *EqBChE*, foram selecionados os compostos mais ativos, **61c** ($CI_{50} = 647$ nM), **61e** ($CI_{50} = 330$ nM) e **61f** ($CI_{50} = 433$ nM) e o composto **51n** cuja inibição a *EqBChE* foi abaixo de 50% a 10 μ M e **75a** ($CI_{50} = 5033$ nM) para melhor entendimento das interações dos compostos mais ativos e da baixa atividade. Foi necessário a construção modelo por similaridade a partir de uma estrutura tridimensional (3D) cuja sequência está 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 e cobertura de 0,87. Para validar a função de escore 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 3,20 Å.

Tabela 9. Score e valores de RMSD para a validação por redocking *eqBChE* por similaridade

Score Function	DockScore	RMSD (Å)
GoldScore	33.8079	2.6434
CHEMPLP	51.0350	2.6173
ChemScore	40.2990	3.1314
ASP	35.0566	0.6127

Em resumo, a diferença estrutural entre as cavidades da AChE (Figura 33A) e da BChE (Figura 33B) explica, em parte, a maior seletividade dos compostos avaliados para a AChE em relação à BChE. Isso ocorre porque as estruturas menores e com subunidades aromáticas dos ligantes interagem majoritariamente no sítio da AChE, enquanto na BChE a maioria dos compostos interage com poucos resíduos, deixando grande parte da cavidade livre (Figura 33C). Já os compostos mais ativos, como **61c**, **61e** e **61f**, se acomodam melhor na cavidade da BChE, possibilitando interações com os principais resíduos (Figura 33D).

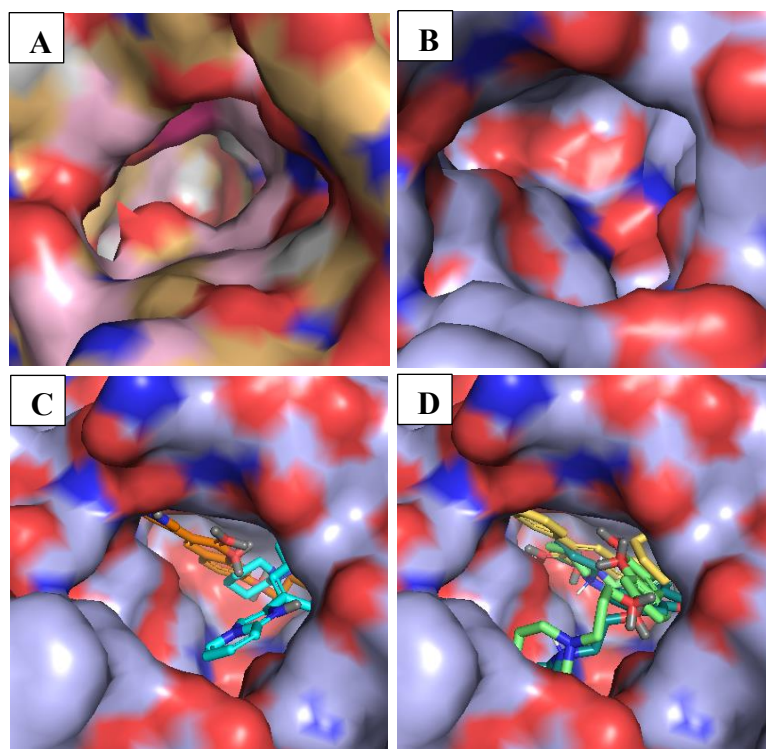


Figura 33. Volume de acesso das cavidades de ligação e encaixe dos compostos. **A)** Cavidade da eeAChE; **B)** Cavidade da eqBChE; **C)** Encaixe dos compostos **51n** e **75a** na eqBChE; **D)** Encaixe dos compostos **61c**, **61e** e **61f** na eqBChE. Figura gerada com PyMOL 3.1.3.1 (Schrödinger, LLC).

A Figura 34A ilustra as poses de ligação obtidas dos inibidores em forma de dímeros **61e** (verde) e **6f** (verde limão) no sítio da eqBChE, enquanto a Figura 30B ilustra de forma mais detalhada interações do composto **61e** no sítio. Pode ser observado que ambos compostos ocupam simultaneamente o CAS e o PAS da enzima em que a subunidade básica e a fenila estão voltadas para dentro da cavidade e a cumarina com a outra subunidade básica está voltada para o sítio periférico, estando em concordância com os dados cinéticos observados experimentalmente.

Em relação ao composto **61e** (Figura 34B), o grupamento amino-cíclico protonado dos inibidores estabelece interações do tipo cátion- π com o resíduo Trp110 (4,6 Å) e ligação de hidrogênio com Gly144 (2,8 Å), enquanto o núcleo cumarínico posiciona-se na entrada do sítio catalítico, formando uma interação de empilhamento π - π com o resíduo Tyr365 (4,1 Å) e Phe357 (5,3 Å). No sítio periférico, predominaram interações hidrofóbicas com Gly144, Val305, Ser315, Leu 153, Thr148.

Em relação às interações do composto **51n** (laranja), o complexo posiciona-se em uma região com poucas interações hidrofóbicas em todas as poses, sem a principal interação cátion- π com o resíduo Trp110, o que justifica sua baixa atividade. Já o composto **75a** (azul), que apresenta

atividade significativa, estabelece interação cátion- π com Trp110, a cumarina realiza empilhamento π - π com Tyr365 e His366, enquanto a substituição IM promove interações hidrofóbicas no sítio periférico (Figura 35).

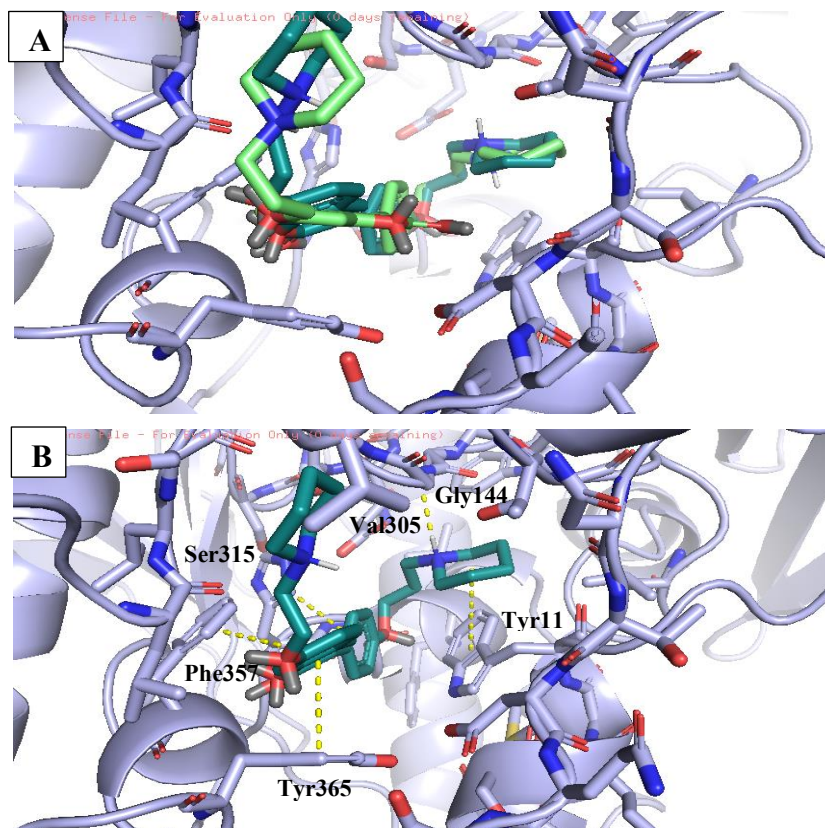


Figura 34. A) Análise da sobreposição dos compostos **61e** (verde) e **61f** (verde claro) na cavidade da eqBChE; B) Principais interações do composto **61e** (verde) na cavidade da eqBChE. Figura gerada com PyMOL 3.1.3.1 (Schrödinger, LLC).

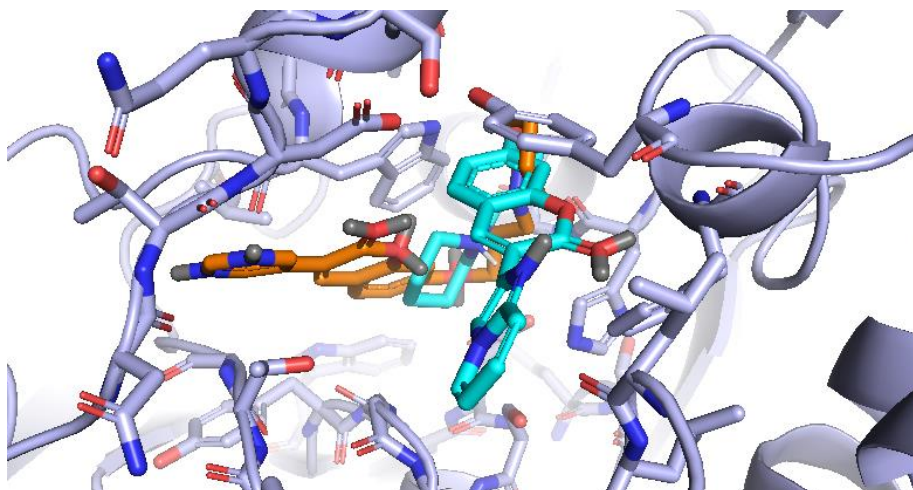


Figura 35. Análise da sobreposição dos compostos **51n** (laranja) e **75a** (verde) na cavidade da eqBChE. Figura gerada com PyMOL 3.1.3.1 (Schrödinger, LLC).

3.8.3. Ensaio *in vitro* de inibição enzimática frente as isoformas MAO-A e MAO-B

Este ensaio avalia a inibição das isoformas da monoamina oxidase (MAO A e MAO B) por meio de um método fluorimétrico baseado na detecção do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) gerado pela oxidação da tiramina (**82**), que é substrato da MAO A e B. A quantificação da atividade enzimática foi realizada por meio de ensaio fluorimétrico, baseado na conversão do corante *Ampliflu Red* (**85**) em resorufina (**86**), um produto fluorescente, na presença do H₂O₂ gerado na oxidação da tiramina (Figura 36).

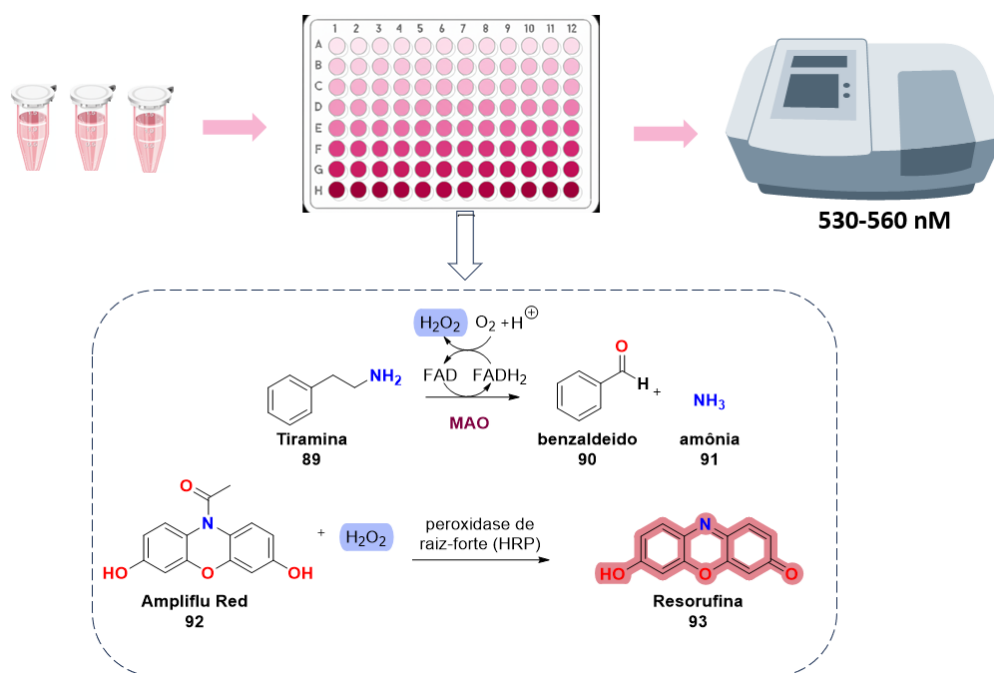


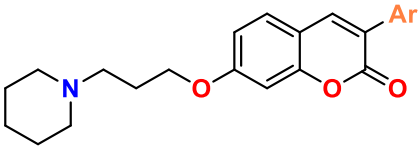
Figura 36. Reação de oxidação da Tiramina catalisada pelas isoformas MAO-A e MAO-B produzindo H₂O₂. O H₂O₂ ao reagir com corante *Ampliflu red* é transformado no composto fluorescente, resorufina (**86**).

Dentre os compostos testados, alguns demonstraram potentes atividades inibitórias contra a MAO-B, com valores de CI₅₀ variando entre 70 e 4521 nM. Notavelmente, os compostos não exibiram atividade significativa contra a MAO-A, indicando um perfil seletivo para MAO-B (Tabela 7). Essa seletividade é de grande relevância, uma vez que a isoforma MAO-B está diretamente envolvida nos processos neurodegenerativos da DA, tornando-a um alvo terapêutico promissor para o desenvolvimento de novos fármacos.

A partir dos resultados obtidos para a enzima MAO-B, observou-se que, de modo geral, substituições mais rígidas e hidrofóbicas proporcionaram melhores resultados, em sua maioria encontrados na série 1. As 3-fenilcumarinas *para*-substituídas com grupos retiradores de elétrons (**51d**, CI₅₀ = 132 nM; **51f**, CI₅₀ = 359 nM; **51h**, CI₅₀ = 100 nM; **51i**, CI₅₀ = 138 nM) apresentaram potência de inibição superior em comparação à 3-fenilcumarina (**51a**; CI₅₀ = 561

nM). Ademais, a cumarina substituída com o grupo pirimidina (**51n**, $CI_{50} = 75,6$ nM) demonstrou ainda maior potência em relação à fenila, posicionando-se entre os mais ativos contra MAO-B. Destaca-se também o composto **51m** (α -naftila na posição 3, $CI_{50} = 70,3$ nM), com atividade comparável ao **51n**. A elevada potência desses derivados associa-se a interações favoráveis no bolsão hidrofóbico da MAO-B, potencializando suas afinidades.

Tabela 10. Resultados de inibição enzimática frente as isoformas MAO-A e MAO-B

			
Código	Ar	% de inibição ($1 \mu M \pm SEM$) ou CI_{50} [nM] [95% CI]	
		MAO A	MAO B
51a	3-fenil	$11,63 \pm 4,10$	561 [388; 810]
51b	3-fenil-4-Me	$15,96 \pm 5,93$	290 [102; 765]
51c	3-fenil-4-OMe	$7,39 \pm 2,96$	515 [219; 1212]
51d	3-fenil-4-Cl	$14,51 \pm 5,71$	132 [80,3; 216]
51f	3-fenil-4-F	$0,09 \pm 0,09$	359 [204; 632]
51h	3-fenil-4-NO ₂	$17,09 \pm 4,25$	100 [45,7; 220]
51i	3-fenil-4-CN	$18,0 \pm 2,85$	138 [117; 163]
51k	3-(3-tiofeno)	$9,87 \pm 4,12$	1721 [1042; 2841]
51m	3-(α -naftil)	$3,49 \pm 1,23$	70,3 [33,3; 148]
51n	3-(5-pirimidina)	$15,38 \pm 2,12$	75,6 [42,9; 133]
51o	3-(β -naftil)	$5,37 \pm 2,00$	176 [69,9; 441]
51p	3-fenil-4-dimetilamino	$16,34 \pm 5,40$	1396 [1110; 1755]
54a	3-anilina	17136 [7833; 37487]	871 [605; 1255]
64	4-fenil	$8,06 \pm 3,50$	1797 [677; 4770]
75a	Imidazopiridina	7.38 ± 1.57	3022 [1849; 4940]
Rasagiline		-	25 ± 7

Os sítios de interação das enzimas MAO-A e MAO-B são predominantemente hidrofóbicos, compostos majoritariamente por resíduos de aminoácidos alifáticos e, principalmente, aromáticos. Embora ambas apresentem características semelhantes, existem diferenças estruturais importantes que influenciam a seletividade por seus ligantes. De modo geral, o sítio ativo da MAO-A é menor e mais flexível, favorecendo a interação com ligantes

que possuem maior flexibilidade conformacional. Já o sítio ativo da MAO-B e apresenta uma estrutura mais rígida, o que favorece a interação com ligantes mais rígidos e aromáticos. Essa diferença estrutural pode explicar a maior seletividade dos compostos avaliados para a MAO-B, especialmente devido à sua aromaticidade e capacidade de se acomodar melhor nas cavidades hidrofóbicas da MAO-B (HUBÁLEK *et al.*, 2003).

O perfil teórico de interação dos compostos da Tabela 11 com a enzima MAO-B foi avaliado por ancoramento molecular, utilizando o complexo cristalográfico de *h*MAO-B com ligante cumarínico (PDB 2V60). A função ChemScore apresentou maior precisão na reprodução das interações moleculares do ligante, com valores de RMSD inferiores a 3,00 Å (Tabela 10). O *redocking* foi executado com o ligante co-cristalizado 7-(3-clorobenzyloxy)-4-carboxaldeído-cumarina, confirmando a confiabilidade da avaliação.

Tabela 11. Score e valores de RMSD para a validação por redocking da MAO-B

Score Function	DockScore	RMSD (Å)
GoldScore	57.2204	3.2857
CHEMPLP	70.5828	0.7364
ChemScore	33.1857	0.6918
ASP	47.6336	0.8831

O sítio ativo da MAO-B é constituído por duas regiões principais: a cavidade interna onde se encontra o cofator FAD e resíduos alifáticos e aromáticos, e cavidade externa, denominada região de entrada, composta majoritariamente por resíduos alifáticos. Na cavidade interna, as interações com Tyr435, Tyr398, Gln206 e cofator FAD e ligação de hidrogênio com a Cys172 são cruciais para a inibição da enzima (Figura 37). A Tyr435, em particular, desempenha um papel fundamental na polarização do ligante e na redução de FAD, tornando sua interação essencial para a atividade inibitória BAUTISTA-AQUILERA *et al.*, 2018; MELLADO *et al.*, 2020; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ *et al.*, 2020).

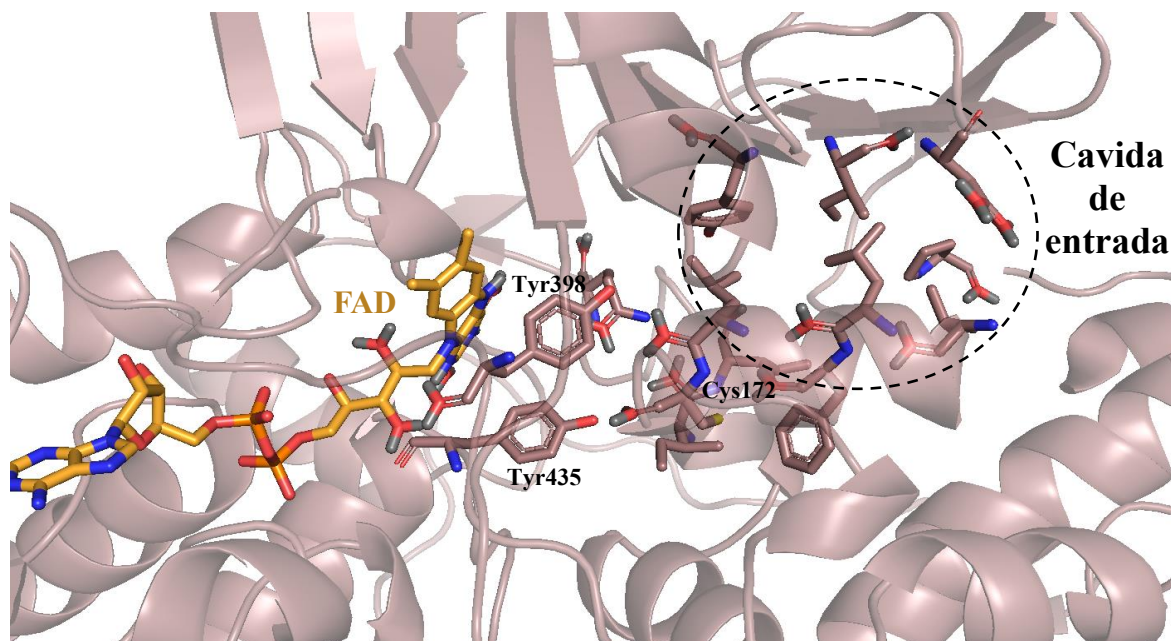


Figura 37. Sítio ativo da MAO-B (PDB 2V60). Compõe-se de uma cavidade de entrada formada por resíduos alifáticos e uma cavidade interna com os principais aminoácidos responsáveis pelas interações enzima-ligante, além do FAD, que confere estabilidade estrutural. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

As variações nas atividades observadas entre os compostos podem ser atribuídas à angulação e à qualidade dessas interações e a interação com o FAD, uma vez que os compostos que apresentaram melhores atividade possuem maior interação com o cofator. Como exemplo pode-se citar os compostos 3-fenilcumarinas *para*-substituídas com grupos retiradores de elétrons (**51d**, **51f**, **51h**, **51i**), os quais apresentaram maior interação com resíduos aromáticos da Tyr435 e Tyr398, além de estarem mais direcionado ao FAD, comparando-os com o composto **51a**.

Dentre os compostos mais ativos contra *h*MAO-B destacam-se **51h** ($CI_{50} = 100$ nM), **51n** ($CI_{50} = 70,3$ nM) e **51m** ($CI_{50} = 75,6$ nM). Os compostos **51m** e **51n** apresentam perfil de interação similar (Figura 38): a subunidade básica estabelece interações hidrofóbicas com resíduos alifáticos na cavidade de entrada (Leu171, Leu167, Leu164, Ile316), a cumarina forma ligações de hidrogênio com Gln206, Tyr326 e Ile199 (3,0-4,5 Å), e a α -naftila (**51m**) ou pirimidina (**51n**) interagem com Tyr435, Tyr398 e FAD a 3,0-4,0 Å. O composto **51h** também exibe interações similares, porém com o grupo nitro está mais próximo ao FAD. Por esse motivo, pode ser considerado o menos ativo dentre os mais potentes, devido à provável repulsão eletrônica nessa região.

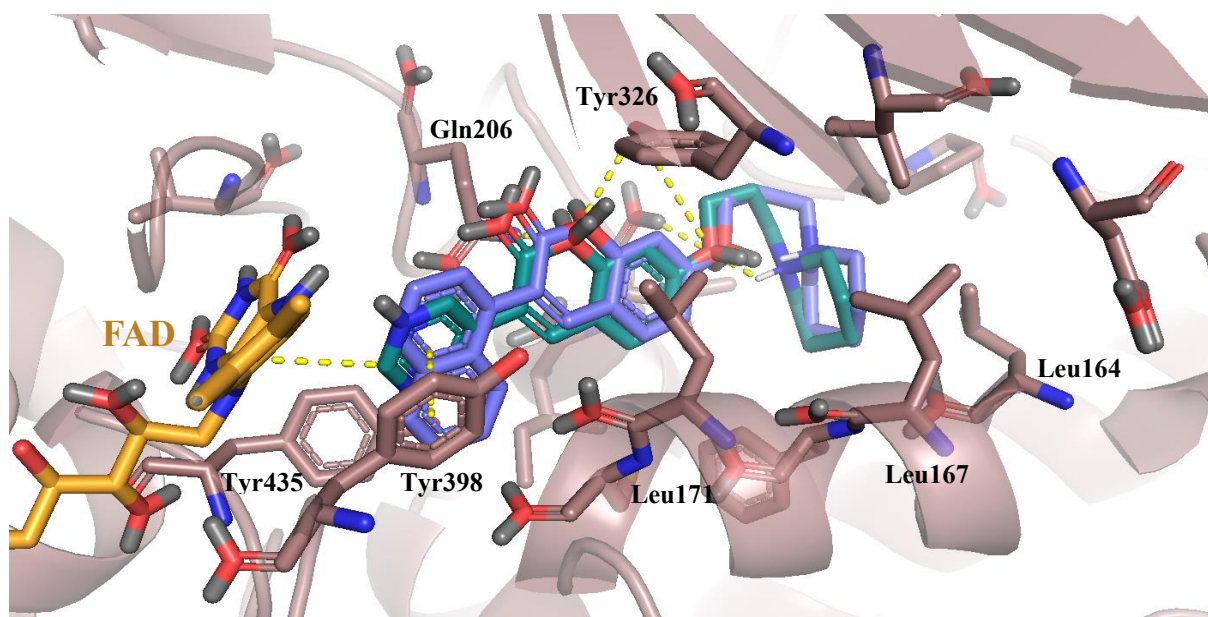


Figura 38. Análise das principais interações moleculares e sobreposição do composto **51m** (lilás) e o composto **51n** (verde) no sítio ativo da *h*MAO-B. Figura gerada com PyMol 3.1.3.1 (Copyright © Schrödinger LLC).

3.8.4. Ensaio de neurotoxicidade em células de neuroblastomas SH-SY5Y

O ensaio de neurotoxicidade ilustrado na Figura 39 foi avaliado pela combinação do cultivo celular de células de neuroblastoma humano dopaminérgico (SH-SY5Y) com um ensaio colorimétrico de viabilidade celular via brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (BAUTISTA-AGUILERA *et al.*, 2017).

A linhagem **SH-SY5Y** é amplamente utilizada como modelo de neurônio para estudos de neurotoxicidade, doença de Parkinson e DA (MEDEIROS, 2015). Inicialmente, é realizada a cultura das células, cujo meio e suplementos estão descritos na parte experimental, seguida da incubação (1). Em seguida, são realizados os tratamentos com os compostos controles e os compostos-teste em diferentes concentrações (2). Após o tratamento, é realizado o ensaio MTT (3) com adição do reagente MTT (**87**) de coloração amarela.

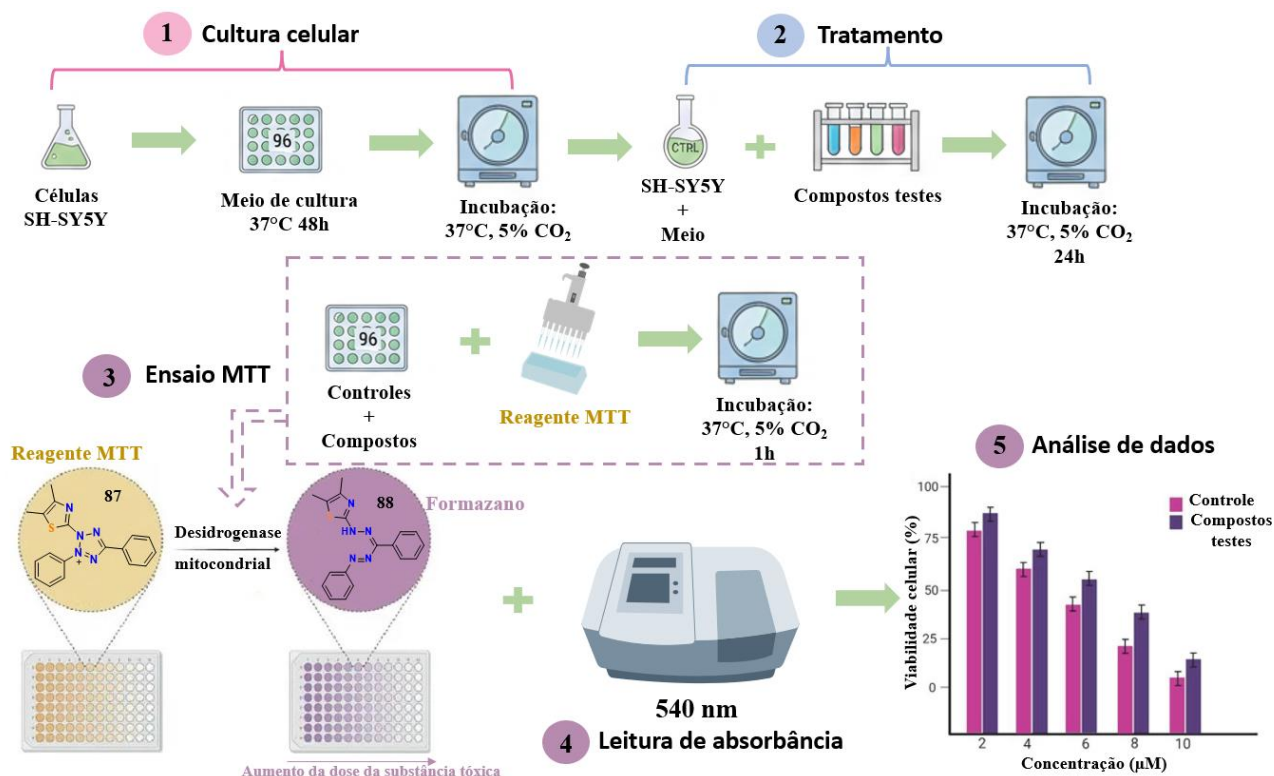


Figura 39. Fluxograma do ensaio experimental de neurotoxicidade em células de neuroblastoma dopaminérgico (SH-SY5Y)

O MTT é um sal de tetrazólio hidrossolúvel que penetra nas mitocôndrias e em vesículas intracelulares. Em mitocôndrias funcionais, as desidrogenases transferem elétrons para o anel de tetrazólio do MTT, e essa redução quebra o anel, convertendo o MTT amarelo em formazano (88), um composto roxo e insolúvel. A quantidade de formazano produzido é proporcional à atividade mitocondrial e ao número de células metabolicamente ativas (GHASEMI *et al.*, 2021).

Após a adição do reagente MTT e a incubação, é realizada a leitura de absorbância (4) e, em seguida, a análise de dados a partir da curva dose-resposta (5). Se o composto-teste reduzir a viabilidade celular (geralmente abaixo de 80% em relação ao controle) após 24 h de tratamento, interpreta-se que o composto possui potencial neurotóxico. A Tabela 12 mostra que todos os compostos sintetizados apresentam viabilidade celular acima de 90% a uma concentração de 10 μM, indicando, portanto, ausência de potencial neurotóxico nessas condições.

Tabela 12. Resultados de viabilidade celular de todos os compostos sintetizados frente as células de neuroblastoma SH-SY5Y a 10µM

Cód.	Viabilidade celular (SH-SY5Y) 10 µM [%] ± DP	Cód.	Viabilidade celular (SH-SY5Y) 10 µM [%] ± DP	Cód.	Viabilidade celular (SH-SY5Y) 10 µM [%] ± DP
51a	104,9 ± 2,2	51n	101,6 ± 2,2	54c	105,8 ± 4,1
51b	110,9 ± 2,8	51o	106,1 ± 3,5	61a	107,5 ± 4,2
51c	113,7 ± 2,2	51p	95,8 ± 7,0	61b	99,6 ± 5,5
51d	110,6 ± 1,7	51q	112 ± 1,9	61c	112,1 ± 2,4
51e	100,3 ± 0,7	51r	114,3 ± 1,3	61d	94,7 ± 2,2
51f	110,5 ± 2,5	51s	114,6 ± 1,3	61e	102,2 ± 1,0
51h	101,8 ± 1,8	51t	106,9 ± 1,3	61f	92,7 ± 7,9
51i	105,4 ± 0,9	51u	110,2 ± 1,7	64	102,7 ± 4,1
51j	109,3 ± 1,6	51v	114,3 ± 1,3	75a	96,8 ± 8,2
51k	110,9 ± 1,1	51x	116,4 ± 1,7	75b	82,8 ± 1,7
51l	112,1 ± 2,4	54a	105,2 ± 3,0	75d	90,6 ± 6,6
51m	105,8 ± 4,5	54b	98,3 ± 3,1		

3.9. Avaliação *in silico* das propriedades farmacocinéticas

As propriedades físicas-químicas e farmacocinéticas relacionadas à absorção, biodisponibilidade e permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) foram previstas utilizando a plataforma online SwissADME. O método se baseia em cálculos teóricos para estimar fatores como lipofilicidade, solubilidade em água, parâmetros farmacocinéticos (absorção gastrointestinal (AGI), permeabilidade da BHE e metabolismo), além das principais regras de druglikeness e indicadores gerais de adequação à química medicinal.

A Tabela 13 apresenta os principais fatores teóricos que indicam se os compostos testados possuem ou não semelhança estrutural com um fármaco. A regra dos cinco de Lipinski, por exemplo, fornece uma diretriz para a biodisponibilidade oral de fármacos de pequenas moléculas, estipulando os seguintes critérios, massa molecular (MW) < 500 g/mol, coeficiente de partição octanol-água (log P) < 5, número de doadores de ligações de hidrogênio (HBD) ≤ 5 e número de aceptores de ligações de hidrogênio (HBA) ≤ 10 (Lipinski et al., 1996). Já a regra de Veber refina ainda mais as previsões de biodisponibilidade oral, introduzindo parâmetros adicionais como área de superfície polar topológica (ASPT, ou TPSA) ≤ 140 Å² e número de ligações rotatórias ≤ 10 (Veber et al., 2002).

A maioria dos compostos atende às principais regras de *druglikeness*, com exceção dos compostos **51j**, **51m** e **51o**, que apresentam log P um pouco acima de 5, em razão de substituições mais lipofílicas em comparação aos demais.

Grande parte dos compostos também exibe boa previsão de permeabilidade gastrointestinal e hematoencefálica, exceto os compostos **51j**, **51q** e **54b**, conforme indicado pela representação visual do gráfico de “*boiled-egg*” (ou “gráfico do ovo cozido”), ilustrados nas Figuras S194-S198 do anexo 7.4. Este gráfico prevê a absorção gastrointestinal e a permeabilidade da barreira hematoencefálica com base em duas propriedades físico-químicas principais: log P e área de superfície polar total (ASPT).

A ASPT é definida como a soma das superfícies dos átomos polares de uma molécula, geralmente relacionados a oxigênio, nitrogênio, fósforo e hidrogênios ligados a esses átomos, embora outros heteroátomos também possam influenciar o transporte entre membranas (ERTL; ROHDE; SELZER, 2000). O composto **51j**, apesar de apresentar uma ASPT aceitável para a passagem pela membrana hematoencefálica, possui elevada lipofilicidade, o que faz com que, em parâmetros experimentais, ele se posicione acima da região amarela do gráfico “*boiled-egg*”. Apesar de parecer um contrassenso, já que um maior logP nos leva, inicialmente, a pensar em maior facilidade de transposição de membranas, um alto valor de logP pode causar um aumento da ligação não específica às proteínas plasmáticas e aos tecidos, reduzindo a concentração do composto livre e, conseqüentemente, de sua passagem ao SNC.

Já os compostos **51q** e **54b**, embora apresentem lipofilicidade aceitável ($\log P > 4$), possuem valores elevados de ASPT, 88,50 Å² e 100,53 Å², respectivamente. Geralmente, valores de ASPT superiores a 70 Å² estão associados à redução da permeabilidade hematoencefálica (Lipinski et al., 1996).

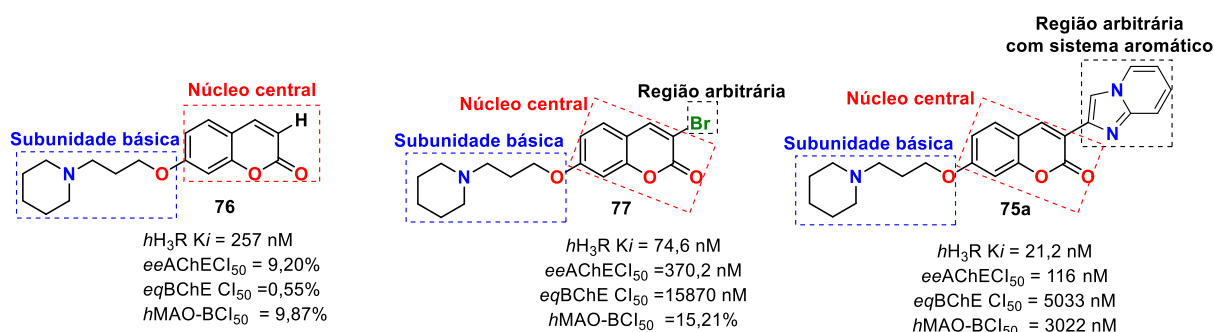
Tabela 13. Propriedades físico-químicas e parâmetros de druglikeness dos compostos avaliados, calculados in silico pela plataforma SwissADME.

Código	MM (g/mol)	ASPT (Å²)	CLogP	Código	MW (g/mol)	ASPT (Å²)	CLogP
51a	363,46	42,68	4,37	51t	393,48	51,91	4,37
51b	377,48	42,68	4,69	51u	379,46	62,91	3,96
51c	393,48	51,91	4,33	51v	408,45	88,50	3,80
51d	397,9	42,68	4,90	51x	393,48	51,91	4,37
51e	379,46	62,91	3,95	54a	378,47	54,71	4,20
51f	381,45	42,68	4,68	54b	423,47	100,53	3,61
51h	408,45	88,50	3,77	54c	408,5	63,94	4,23
51i	388,47	66,47	4,14	61a	363,46	42,68	4,36
51j	431,48	42,68	5,40	61b	393,48	51,91	4,37
51k	369,48	70,92	4,35	61c	363,46	42,68	4,38
51l	364,44	55,57	3,62	61d	363,46	42,68	4,34
51m	413,52	42,68	5,25	61e	490,64	55,15	5,08
51n	365,43	68,46	3,12	61f	504,67	55,15	5,40
51o	413,52	42,68	5,27	64	363,46	4,68	3,76
51p	406,53	45,92	4,41	75a	419,52	59,98	3,35
51q	408,45	88,50	3,76	75b	433,54	59,98	3,55
51r	377,48	42,68	4,70	75d	475,55	59,98	3,55
51s	407,47	61,14	4,20				

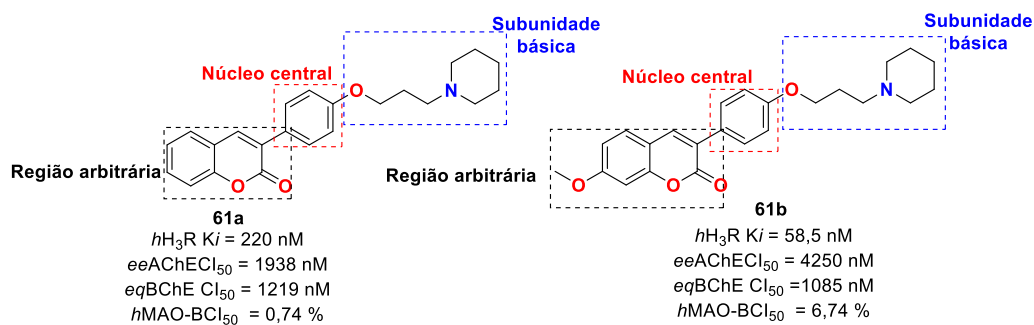
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Ao todo, foram sintetizados 36 compostos, dos quais 33 são inéditos, divididos em cinco séries, obtidos com rendimentos satisfatórios e em processos sintéticos reprodutíveis.

O planejamento estrutural racional, baseado nos modelos farmacofóricos dos alvos pretendidos, mostrou-se bem-sucedido, levando à identificação de compostos com elevada afinidade e capacidade de inibição dos alvos propostos contendo o perfil 3-aryl-7-propoxypiperidina-cumarinas, presente por exemplo em **75a** onde a cumarina age como núcleo central para a atividade antagonista de H_3R , que comparativamente a **76** e **77** demonstrou a importância dessas substituições.

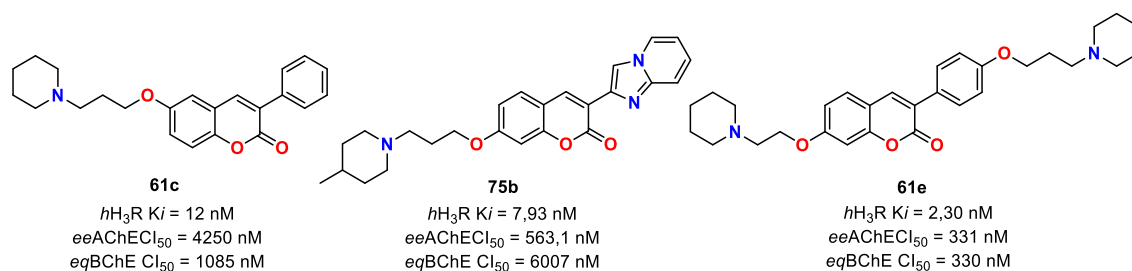


A avaliação da influência de cumarinas regioisoméricas, *i.e.* substituídas em diferentes posições, também se mostrou acertada levando a compostos com grande afinidade frente ao H_3R , nos quais as cumarinas não atuam mais como núcleo central, mas sim como região arbitrária na qual pequenas modificações podem levar a grande modulação na atividade: *e.g.* composto **61a** (hH_3R K_i = 220 nM; $AChE$ CI_{50} = 1938 nM; $BChE$ CI_{50} = 1219 nM) → **61b** (hH_3R K_i = 58,5 nM; $AChE$ CI_{50} = 4250 nM; $BChE$ CI_{50} = 1085 nM). Adicionalmente, estes isômeros se mostraram mais seletivos por $BChE$, o que pode ser explorado como uma nova série de compostos duais antagonistas de hH_3R e inibidores de $BChE$.

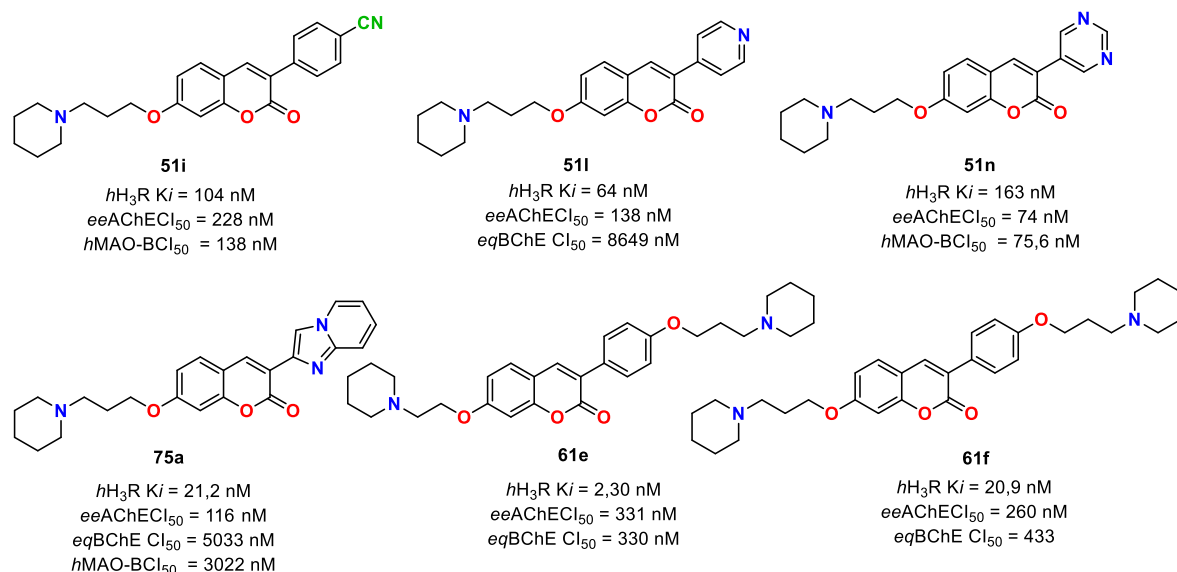


Do ponto de vista da obtenção de ligantes de hH_3R , a **série 1** (substituições aromáticas e heteroaromáticas na posição 3 do núcleo cumarínico) se mostrou promissora com K_i variando

de 18,1 a 299 nM. Nesta série, fenilas substituídas foram bem aceitas (exceção de metoxilas em *orto* e *meta*), enquanto heteroaromáticos de 5 e 6 membros (com exceção da 4 pirinina) levaram a redução da afinidade, assim como as naftilas. A substituição aromática na posição 3 da cumarina parece benéfica, uma vez que o composto **64** (transposição da fenila de C3 para C4, **série 4**) se mostrou com menor afinidade (**64**, K_i hH_3R = 56,4 nM; **51a**, K_i hH_3R = 28,7 nM). A quebra de conjugação entre a cumarina e substituintes em C3 leva a alguma perda de afinidade, pois a **série 2** (*N*-arilações na posição 3 do núcleo cumarínico), apesar de poucos exemplares, apresentou menor afinidade comparativa a **série 1**, mas ainda assim interessantes (K_i hH_3R de 56,4 a 93 nM). Já as **séries 3 e 5** apresentaram os compostos com maior afinidade (**61c**, K_i hH_3R = 12,0 nM **61e**, K_i hH_3R = 2,30 nM; **75b**, K_i hH_3R = 7,93 nM), demonstrando que a transposição do farmacóforo propoxipiperidina para C6 e C3, em **61c** e **61e**, respectivamente, gera um novo perfil a ser estudado em trabalhos futuros, assim como **75b** demonstrou que compostos azaheterociclos bicíclicos parecem ser interessantes, principalmente com a exploração do efeito metila na piperidina. Cabe ressaltar que o composto **61c** apresentou maior seletividade para H_3R frente aos outros alvos, configurando-se como um resultado especialmente promissor para o desenvolvimento de novos derivados seletivos para esse receptor, a partir de um padrão de substituição (subunidade básica na posição 6) ainda não explorado na literatura. Pode-se observar também que substituições na subunidade básica bem como subunidade básica adicional na região arbitrária foram cruciais para o aumento de potência.



Os compostos **51i**, **51l**, **51n**, **61e**, **61f** e **75a** destacaram-se entre os mais potentes e seletivos para AChE, com exceção dos dímeros **61e** e **61f**, que apresentaram menor seletividade. Além disso, os compostos **51i**, **51n** e **75a** apresentaram perfil de compostos multialvo, destacando-se especialmente os compostos **51i** e **51n**, que além de demonstraram ótimas afinidade e inibições enzimáticas em todos os alvos avaliados, essas atividades foram equipotentes, resultado particularmente relevante considerando os desafios associados ao desenvolvimento de ligantes multialvos.



No que diz respeito às avaliações *in silico*, os compostos apresentaram perfis de interação compatíveis com os resultados biológicos obtidos, evidenciando as principais interações moleculares descritas na literatura como responsáveis pela atividade frente às enzimas e ao receptor estudados, podendo ser utilizados em estudos de otimização estrutural futuros. Além disso, as predições teóricas de propriedades farmacocinéticas indicaram resultados favoráveis, incluindo bom potencial de permeabilidade pela barreira hematoencefálica e conformidade com regras clássicas de *drug-likeness* e biodisponibilidade.

Os resultados obtidos foram excelentes e importantes para a busca do tratamento da DA. A análise de relação estrutura-atividade (SAR) abriu caminho para uma série de novas modificações estruturais. Como perspectiva, serão realizados ensaios de dinâmica molecular de alguns compostos para identificar de forma mais eficiente as diferenças nas interações, como no caso do composto **64**. Além disso, os compostos mais promissores serão explorados em modelos celulares e *in vivo* relacionados à DA.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Síntese

O acompanhamento das reações foi feito através da técnica de CCD, 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). Além disso, a reação foi monitorada por TLC-CMS (*Expression® da Advion Interchim Scientific*) dispositivo que oferece um meio simples e automatizado de obter espectros de massa diretamente de placas CCD, combinado com o espectrômetro de massa compacto.

Os solventes utilizados nas reações descritas acima foram comprados pela empresa *sigma-aldrich* e *Neon*. A fase orgânica das reações foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi evaporado à pressão reduzida em evaporador rotatório IKA (modelo RV 10 digital) com banho IKA (modelo HB 10 digital). A determinação dos pontos de fusão foi realizada em aparelho automático M-560/M-565 Buchi.

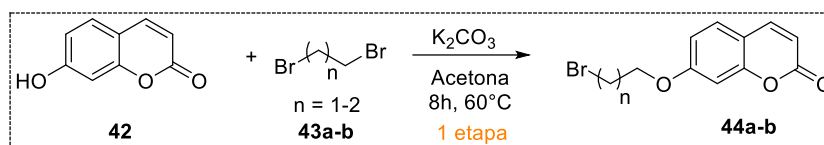
A purificação dos compostos foi realizada a partir da técnica de cromatografias líquida de adsorção em coluna flash, Isolera Biotage, modelo ISO-4SV (IQ-UFRRJ). Para a confecção da pastilha, utilizou-se sílica gel 70-230 mesh (Merck). E como fase móvel, foram utilizadas as misturas solventes de acordo 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 (DEPTQ) foram obtidos operando a 75 MHz e à 125 MHz, em aparelho Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (IQ -UFRRJ e HHU-Alemanha), respectivamente, e as amostras foram dissolvidas em CDCl₃ e DMSO-d₆, contendo TMS como referência interna. As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e sua multiplicidade descrita com: s-simpleto / sl-simpleto largo / d-dubleto / t-triplete / q-quarteto / m-multipleto / dd-duplo dubleto.

Os pontos de fusão foram determinados pelos fusiômetros da GEHAKA modelo PF-1500 FARMA (UFRRJ) e M-560 da Buchi (HHU-Alemanha).

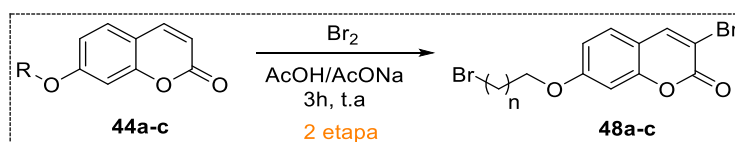
5.1.1. Síntese dos intermediários chave 48a-c



Uma solução de 7-hidroxycumarina (**42**) (1,0 mmol, 1 equiv) e carbonato de potássio (4,0 mmol, 4 equiv) em acetona (7 mL) foi agitada e adicionada gota a gota em um tubo de reação de borossilicato de 25 mL contendo 1,3-dibromopropano (**43a-b**) (7,0 mmol, 7 equiv) dissolvido em acetona (3 mL). O recipiente de reação foi selado e a mistura foi aquecida a 60 °C por 24 horas. Após a conclusão, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e os sais inorgânicos foram removidos por filtração. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e solubilizado em acetato de etila. A fase orgânica foi lavada três vezes com água, seca sobre sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e concentrada sob pressão reduzida. Os produtos (**44a-b**) foram purificados por cromatografia flash automatizada em coluna de sílica gel utilizando o sistema Isolera, com eluição em gradiente de hexano/acetato de etila (70:30, v/v).

7-(2-bromoetoxi)-2H-cromen-2-ona (44a): Sólido branco, rendimento 65%, p.f. 135 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,65 (d, J = 9,5 Hz, 1H); 7,40 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 6,93-6,86 (m, 1H); 6,82 (s, 1H); 6,28 (d, J = 9,5 Hz, 1H); 4,35 (t, 2H), 3,68 (t, 2H). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,18; 157,08; 143,33; 128,98; 127,12; 113,60; 112,87; 110,68; 101,67; 68,18; 66,71; 28,46.

7-(2-bromopropoxi)-2H-cromen-2-ona (44b): Sólido branco, rendimento 78%, p.f. 145°C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,64 (d, J = 9,5 Hz, 1H); 7,38 (d, J = 8,5 Hz, 1H); 6,84 (dd, J = 11,5, 3,2 Hz, 2H); 6,26 (d, J = 9,6 Hz, 1H); 4,17 (t, 2H); 3,61 (t, 2H); 2,36 (q, 2H). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,86; 161,22; 155,85; 143,32; 128,85; 113,29; 112,78; 112,74; 101,54; 65,85; 31,96; 29,63.



As coumarinas substituídas (**44a-c**) (300 mg, 1,06 mmol, 1,0 equiv) e acetato de sódio (274,4 mg, 3,35 mmol, 3,0 equiv) foram solubilizados em um tubo de reação com 10 mL de ácido acético. Em seguida, bromo (0,0735 mL, 1,43 mmol, 1,29 equiv) foi então adicionado à mistura reacional. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. Os intermediários chave **48a-c** foram precipitados pela adição de gelo e subsequentemente filtração.

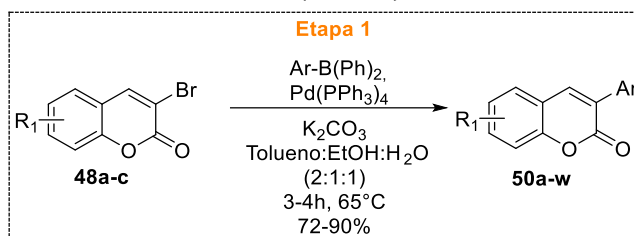
3-bromo-7-(2-bromoetoxi)-2H-cromen-2-ona (48a): Sólido avermelhado, rendimento 75%, p.f. 183 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,03 (s, 1H); 7,37 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 6,90 (dd, J = 8,7, 2,5 Hz, 1H); 6,82 (d, J = 2,8 Hz, 1H); 4,36 (s, 2H); 3,68 (t, 2H). RMN ¹³C (126 MHz,

CDCl₃) δ 157,39; 144,34; 138,91; 128,99; 128,32; 113,59; 108,32; 101,57; 68,29; 28,36.

3-bromo-7-(3-bromopropoxi)-2H-cromen-2-ona (48b): Sólido avermelhado, rendimento 80%, p.f. 195 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,02 (s, 1H); 7,36 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 6,87 (dd, J = 8,6, 2,4 Hz, 1H); 6,83 (s, 1H); 4,17 (t, 2H); 3,61 (t, 2H); 2,36 (q, 2H). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 162,07; 157,49; 155,03; 144,43; 128,19; 113,42; 113,28; 107,96; 101,44; 65,99, 31,90; 29,54.

3-bromo-7-metoxi-2H-cromen-2-ona (48c): Sólido avermelhado, rendimento 70%, p.f. 160 °C. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 8,00 (s, 1H); 7,34 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 6,86 (dd, J = 8,7, 2,5 Hz, 1H); 6,80 (d, J = 2,7 Hz, 1H); 3,87 (s, 3H).

5.1.2. Síntese dos derivados 51a-z (série 1)



Em um tubo de reação, foram adicionados 0,14 mmol do intermediário chave **48a-c**, 0,20 mmol de ácido borônico aromático ou heteroaromático substituído e 0,41 mmol de carbonato de potássio (K₂CO₃), solubilizados em 4 mL de uma mistura de solventes água:etanol:tolueno (2:1:1, v/v). O tubo foi então vedado e submetido à troca de atmosfera com nitrogênio. Posteriormente, adicionou-se 0,01 mmol (1 mol%) do catalisador Pd(PPh₃)₄ solubilizado em tolueno, o tubo foi selado e a mistura reagida sob agitação magnética a 65 °C por 1-3 h. Após este período, o sistema foi resfriado e o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida no rotavapor. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna flash (sistema Isolera™), utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano/acetato como fase móvel. A eluição foi realizada em gradiente, com a concentração de 5-20% do solvente mais polar

7-(3-bromopropoxi)-3-fenil-2H-cromen-2-ona (50a): sólido amarelo; rendimento 76%; ponto de fusão 97-109°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,80 (s, 1H); 7,72 (d, J = 7,9 Hz, 2H); 7,47 (t, J = 7,5 Hz, 3H); 7,44 – 7,38 (m, 1H); 6,90 (d, J = 7,3 Hz, 2H); 4,22 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 3,65 (t, J = 6,4 Hz, 2H); 2,40 (t, J = 6,3 Hz, 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,64; 160,90; 155,26; 135,00; 125,01; 65,90; 31,99; 29,61.

7-(3-bromopropoxi)-3-(p-tolil)-2H-cromen-2-ona (50b): sólido amarelo; rendimento 74%; ponto de fusão 145-153°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,76 (s, 1H); 7,61 (d, J = 8,0 Hz, 2H); 7,45 (d, J = 9,1 Hz, 1H); 7,28 (d, J = 3,4 Hz, 1H); 6,89 (d, J = 7,3 Hz, 2H); 4,20 (t, J = 6,0

Hz; 2H); 3,64 (t; J = 6,4 Hz; 2H); 2,47-2,34 (m; 5H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,48; 160,99; 155,14; 138,51; 132,08; 124,99; 65,88; 32,01; 29,62.

7-(3-bromopropoxi)-3-(4-metoxifenil)-2H-cromen-2-ona (50c): sólido amarelo; rendimento 72%; ponto de fusão 120-127°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,71 (s; 1H); 7,65 (d; J = 8,8 Hz; 2H); 7,43 (d; J = 9,1 Hz; 1H); 6,97 (d; J = 8,8 Hz; 2H); 6,86 (d; J = 7,4 Hz; 2H); 4,18 (t; 2H); 3,85 (s; 3H); 3,62 (t; 2H); 2,36 (d; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,35; 161,11; 159,86; 154,99; 138,71; 129,69; 128,71; 127,37; 124,61; 113,59; 112,88; 101,10; 65,87; 55,40; 32,01; 29,63.

7-(3-bromopropoxi)-3-(4-hidroxifenil)-2H-cromen-2-ona (50d): sólido alaranjado; rendimento 60%; ponto de fusão 115-119°C; RMN ¹H (500 MHz, DMSO) δ 9,70 (s; 1H); 8,08 (s; 1H); 7,66 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 7,56 (d; J = 8,4 Hz; 2H); 7,03 (s; 1H); 6,98 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 6,82 (d; J = 8,4 Hz; 2H); 4,19 (t; J = 6,2 Hz; 2H); 3,68 (t; J = 6,5 Hz; 2H); 2,31-2,23 (m; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) δ 161,42; 160,62; 158,10; 154,83; 125,95; 113,88; 66,55; 32,09; 31,53.

7-(3-bromopropoxi)-3-(4-clorofenil)-2H-cromen-2-ona (50e): sólido bege; rendimento 73%; ponto de fusão 153-157°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,76 (s; 1H); 7,64 (d; J = 8,5 Hz; 2H); 7,44 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 7,40 (d; J = 8,4 Hz; 2H); 6,88 (dd; J = 11,3, 2,8 Hz; 2H); 4,19 (t; 2H); 3,62 (t; 2H); 2,37 (t; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,87; 160,72; 155,30; 140,11; 134,49; 133,37; 129,37; 129,04; 128,71; 123,71; 113,35; 113,16; 101,13; 65,93; 31,96; 29,61.

7-(3-bromopropoxi)-3-(4-fluorofenil)-2H-cromen-2-ona (50f): sólido bege; rendimento 73%; ponto de fusão 135-147°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,29 (d; J = 8,8 Hz; 2H); 7,92-7,88 (m; 3H); 7,50 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 6,92 (dd; J = 8,6, 2,4 Hz; 1H); 6,89 (d; J = 2,5 Hz; 1H); 4,21 (t; 2H); 3,63 (t; 2H); 2,38 (t; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 162,60; 160,14; 155,75; 141,75; 141,45; 132,13; 129,51; 129,27; 123,67; 122,47; 113,52; 113,04; 101,21; 66,06; 31,91; 29,50.

7-(3-bromopropoxi)-3-(4-clorofenil)-2H-cromen-2-ona (50g): sólido bege; rendimento 81%; ponto de fusão 160-178°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,76 (s; 1H); 7,64 (d; J = 8,5 Hz; 2H); 7,45 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 7,40 (d; J = 6,8 Hz; 2H); 6,88 (d; J = 10,4 Hz; 2H); 4,19 (t; 2H); 3,62 (t; 2H); 2,37 (p; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,86; 140,59; 134,50; 133,39; 129,72; 129,04; 128,67; 113,36; 113,15; 101,14; 65,92; 31,96; 29,62.

7-(3-bromopropoxi)-3-(4-nitrofenil)-2H-cromen-2-ona (50h): sólido alaranjado; rendimento 86%; ponto de fusão 155-159°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,29 (d; J = 8,7 Hz; 2H); 7,91 (d; J = 5,5 Hz; 3H); 7,50 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 6,91 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 6,89 (s;

1H); 4,21 (t; 2H); 3,63 (t; 2H); 2,43-2,33 (p; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 162,60; 160,17; 155,74; 147,47; 141,78; 129,53; 129,22; 123,68; 122,45; 113,53; 113,03; 101,19; 66,05; 31,90; 29,55.

4-(7-(3-bromopropoxi)-2-oxo-2H-cromen-3-il)benzonitrila (50i): sólido bege; rendimento 89%; ponto de fusão 182-191°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,85 (d; J = 3,2 Hz; 2H); 7,83 (s; 1H); 7,72 (d; J = 8,5 Hz; 2H); 7,48 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 6,91 (dd; J = 8,6, 2,4 Hz; 1H); 6,88 (d; J = 2,5 Hz; 1H); 4,21 (t; 2H); 3,63 (t; 2H); 2,38 (p; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 162,46; 160,22; 155,65; 141,55; 139,55; 132,22; 129,42; 129,01; 122,85; 118,72; 113,45; 113,07; 111,92; 101,18; 66,01; 31,90; 29,56.

7-(3-bromopropoxi)-3-[4-(trifluorometil)fenil]-2H-cromen-2-ona (50j): sólido branco; rendimento 61%; ponto de fusão 148-156°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,84 (d; J = 8,4 Hz; 3H); 7,71 (d; J = 8,2 Hz; 2H); 7,50 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 6,94-6,83 (m; 2H); 4,22 (t; J = 5,8 Hz; 2H); 3,65 (t; J = 6,4 Hz; 2H); 2,43-2,37 (m; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 162,69; 162,18; 160,49; 155,53; 138,52; 65,98; 31,94; 29,55.

7-(3-bromopropoxi)-3-(tiofen-3-il)-2H-cromen-2-ona (50k): sólido branco; rendimento 71%; ponto de fusão 112-123°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,12 (d; J = 3,3 Hz; 1H); 7,89 (s; 1H); 7,50 (d; J = 5,0 Hz; 1H); 7,44 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 7,41-7,36 (m; 1H); 6,87 (d; J = 11,5 Hz; 2H); 4,18 (t; 2H); 3,62 (t; 2H); 2,36 (m; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,50; 154,65; 137,47; 128,79; 126,16; 125,62; 125,17; 134,67; 119,61; 113,31; 113,09; 101,07; 65,90; 32,00; 29,61.

7-(3-bromopropoxi)-3-(piridin-4-il)-2H-cromen-2-ona (50l): sólido branco; rendimento 50%; decomposição 210-217°C; RMN ¹H (500 MHz, DMSO) δ 8,65 (d; J = 4,4 Hz; 2H); 8,47 (s; 1H); 7,76 (d; J = 6,3 Hz; 2H); 7,74 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 7,10 (d; J = 2,5 Hz; 1H); 7,04 (dd; J = 8,7, 2,4 Hz; 1H); 4,22 (t; J = 6,0 Hz; 2H); 3,69 (t; J = 6,5 Hz; 2H); 2,29 (p; J = 6,3 Hz; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) δ 162,64; 159,80; 155,73; 150,14; 143,21; 131,99; 131,91; 129,29; 129,19; 123,01; 120,80; 113,73; 113,32; 101,32; 66,71; 32,03; 31,50.

7-(3-bromopropoxi)-3-(naftalen-2-il)-2H-cromen-2-ona (50m): sólido bege; rendimento 82%; decomposição 195-207°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,93-7,88 (m; 2H); 7,79 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 7,76 (s; 1H); 7,55-7,47 (m; 4H); 7,45 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 6,94 (s; 1H); 6,91 (dd; J = 8,5, 2,2 Hz; 1H); 4,22 (t; 2H); 3,64 (t; 2H); 2,39 (p; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,85; 161,13; 155,76; 142,87; 133,72; 132,96; 131,68; 129,21; 128,98; 128,57; 127,75; 126,44; 126,06; 125,32; 125,23; 124,88; 113,22; 112,99; 101,38; 65,96; 32,00; 29,61.

7-(3-bromopropoxi)-3-(pirimidin-5-il)-2H-cromen-2-ona (50n): sólido branco; rendimento 76%; decomposição 220-242°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 9,22 (s; 1H); 9,10 (s; 2H); 7,89

(s; 1H); 7,51 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 6,93 (dd; J = 8,6, 2,4 Hz; 1H); 6,90 (d; J = 2,4 Hz; 1H); 4,22 (t; J = 5,8 Hz; 2H); 3,63 (t; J = 6,4 Hz; 2H); 2,38 (q; J = 6,1 Hz; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 158,07; 155,99; 141,25; 113,62; 101,32; 66,06; 31,89; 29,52.

7-(3-bromopropoxi)-3-[4-(dimetilamino)fenil]-2H-cromen-2-ona (50p): sólido amarelo fluorescente; rendimento 90%; ponto de fusão 147-154°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (s; 1H); 7,63 (d; J = 8,8 Hz; 2H); 7,40 (s; 1H); 6,85 (dt; J = 4,3, 2,2 Hz; 2H); 6,77 (d; J = 9,0 Hz; 2H); 4,17 (t; J = 5,8 Hz; 2H); 3,63 (d; J = 6,3 Hz; 2H); 3,00 (s; 6H); 2,36 (q; J = 6,1 Hz; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 160,90; 154,64; 150,57; 137,08; 129,27; 128,43; 122,65; 114,04; 112,71; 112,06; 105,29; 101,05; 65,81; 40,44; 32,04; 29,69.

7-(3-bromopropoxi)-3-(3-nitrofenil)-2H-cromen-2-ona (50q): sólido amarelo; rendimento 63%; ponto de fusão 122-129°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,57 (t; J = 2,0 Hz; 1H); 8,27 (dd; J = 9,2, 2,3 Hz; 1H); 8,15 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 7,93 (s; 1H); 7,66 (d; J = 8,0 Hz; 1H); 7,53 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 6,95 (dd; J = 8,6, 2,4 Hz; 1H); 6,92 (d; J = 2,4 Hz; 1H); 4,24 (t; J = 5,8 Hz; 2H); 3,66 (t; 2H); 2,40 (h; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 162,42; 160,36; 155,64; 141,33; 136,60; 134,61; 129,44; 123,20; 122,39; 113,46; 101,21; 66,01; 31,92; 29,57.

7-(3-bromopropoxi)-3-(m-tolil)-2H-cromen-2-ona (50r): sólido bege; rendimento 61%; ponto de fusão 100-117°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,75 (s; 1H); 7,50 (s; 1H); 7,48 (d; J = 7,9 Hz; 1H); 7,44 (d; J = 9,3 Hz; 1H); 7,33 (t; J = 7,6 Hz; 1H); 7,20 (d; J = 7,6 Hz; 1H); 6,87 (d; J = 6,9 Hz; 2H); 4,19 (t; 2H); 3,62 (t; 2H); 2,41 (s; 3H); 2,37 (q; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,57; 160,95; 155,21; 139,93; 138,08; 134,94; 129,32; 129,08; 128,90; 128,38; 125,55; 113,59; 112,93; 101,11; 65,88; 32,00; 29,65; 21,55.

3-(benzo[d]dioxol-5-il)-7-(3-bromopropoxi)-2H-cromen-2-ona (50s): sólido branco; rendimento 81%; ponto de fusão 165-172°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,69 (s; 1H); 7,42 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 7,21 (s; 1H); 7,16 (d; J = 10,1 Hz; 1H); 6,91-6,82 (m; 3H); 6,00 (s; 2H); 4,18 (t; 2H); 3,62 (t; 2H); 2,36 (p; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,49; 160,99; 155,03; 147,93; 147,69; 139,19; 128,90; 128,80; 124,60; 122,33; 113,56; 112,96; 109,04; 108,34; 101,33; 101,09; 65,87; 31,99; 29,65.

7-(3-bromopropoxi)-3-(3-metoxifenil)-2H-cromen-2-ona (50t): sólido bege; rendimento 56%; ponto de fusão 115-125°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,77 (s; 1H); 7,44 (d; J = 8,8 Hz; 1H); 7,35 (t; J = 8,2 Hz; 1H); 7,25 (s; 2H); 6,93 (dd; J = 7,1, 2,5 Hz; 1H); 6,88 (d; J = 2,5 Hz; 2H); 4,19 (t; 2H); 3,85 (s; 3H); 3,62 (t; 2H); 2,37 (p; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,69; 160,16; 159,53; 144,20; 140,15; 136,32; 129,47; 128,98; 124,78; 120,82; 114,19; 114,07; 113,49; 112,98; 101,10; 65,89; 55,38; 31,98; 29,63.

7-(3-bromopropoxi)-3-(3-hidroxifenil)-2H-cromen-2-ona (50u): sólido bege; rendimento

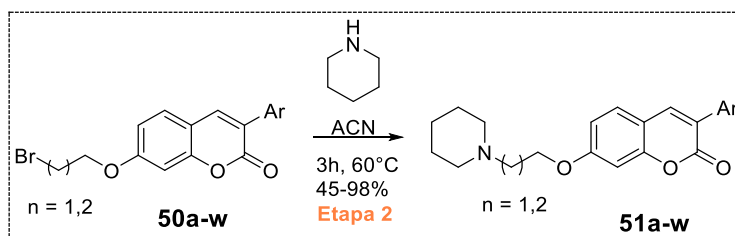
63%; ponto de fusão 141,2°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,79 (s; 1H); 7,44 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 7,33-7,28 (m; 2H); 7,20 (d; J = 8,0 Hz; 1H); 6,91-6,85 (m; 3H); 5,70 (s; 1H); 4,19 (t; 2H); 3,62 (t; 2H); 2,37 (p; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,69; 155,18; 151,62; 140,35; 130,76; 129,77; 129,03; 120,52; 115,66; 113,19; 101,07; 65,92; 31,97; 29,62.

7-(3-bromopropoxi)-3-(2-nitrofenil)-2H-cromen-2-ona (10v): óleo marrom; rendimento 36%; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,10 (d; J = 9,5 Hz; 1H); 7,72 (s; 1H); 7,68 (td; J = 7,6, 1,3 Hz; 1H); 7,60-7,54 (m; 1H); 7,50-7,42 (m; 2H); 6,89 (dd; J = 8,4, 2,4 Hz; 1H); 6,87 (d; J = 2,5 Hz; 1H); 4,19 (t; 2H); 3,62 (t; 2H); 2,37 (p; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 162,07; 159,98; 155,51; 148,75; 139,92; 133,55; 132,00; 130,45; 129,68; 129,14; 124,86; 124,06; 113,24; 112,95; 101,41; 65,98; 31,94; 29,65.

7-(3-bromopropoxi)-3-(2-metoxifenil)-2H-cromen-2-ona (50x): óleo marrom; rendimento 56%; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,68 (s; 1H); 7,40 (d; J = 8,0 Hz; 1H); 7,36 (d; J = 7,9 Hz; 2H); 7,02 (t; J = 7,5 Hz; 1H); 6,99 (d; J = 8,2 Hz; 1H); 6,86 (d; J = 7,6 Hz; 2H); 4,18 (t; 2H); 3,83 (s; 3H); 3,61 (t; 2H); 2,37 (p; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,45; 160,63; 157,26; 155,42; 141,84; 130,88; 130,32; 128,82; 124,31; 123,15; 120,63; 113,40; 112,68; 111,32; 101,22; 65,85; 55,79; 32,01; 29,68.

7-(2-bromopropoxi)-3-(4-hidroxifenil)-2H-cromen-2-ona (50z): sólido bege; rendimento 71%; ponto de fusão 188-195°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,71 (s; 2H); 7,59 (d; J = 8,7 Hz; 2H); 7,44 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 6,92 (s; 2H); 6,84 (d; J = 2,4 Hz; 1H); 6,72 (s; 1H); 4,36 (t; 2H); 3,69 (t; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 162,70; 156,27; 138,64; 131,01; 129,91; 128,84; 127,24; 115,44; 113,01; 101,21; 68,20; 28,52.

3-(4-hidroxifenil)-7-metoxi-2H-cromen-2-ona (50z): sólido amarelado; rendimento 78%; ponto de fusão 122-137°C; RMN ¹H (300 MHz, DMSO) δ 8,06 (s; 1H); 7,63 (s; 1H); 7,57 (s; 2H); 7,00 (d; J = 2,5 Hz; 1H); 6,95 (dd; J = 8,6, 2,5 Hz; 1H); 6,83 (d; J = 8,8 Hz; 3H); 3,85 (s; 3H).



Em um tubo de reação foram adicionados 1 mmol dos intermediários **50a-w** e solubilizados em 15 mL de acetonitrila. Em seguida foram adicionados 3 mmol de piperidina. O tubo foi então selado e a mistura foi submetida a agitação magnética e aquecimento a 60°C por aproximadamente 3h. Após este período, o sistema foi resfriado e o solvente foi removido

por evaporação sob pressão reduzida no rotavapor. Em alta concentração de produto, a fase orgânica foi solubilizada em acetonitrila com 5% isopropanol e lavada três vezes com água, seca sobre sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna flash (sistema Isolera™), utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano/acetato como fase móvel. A eluição foi realizada em gradiente, com a concentração de 5-10% do solvente mais polar

3-fenil-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51a): sólido branco; rendimento 98%; ponto de fusão 163,8°C; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,75 (s; 1H); 7,61 (d; J = 8,7 Hz; 2H); 7,43 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 7,39 (s; 2H); 7,34 (d; J = 8,8 Hz; 1H); 6,85 – 6,78 (m; 2H); 4,11 (s; 2H); 3,42 (s; 1H); 3,31 (s; 1H); 3,19 (s; 2H); 3,08 (d; J = 7,4 Hz; 5H); 2,72 (t; J = 11,9 Hz; 2H); 2,39 (s; 2H); 2,11 (d; J = 13,4 Hz; 2H); RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,95; 161,05; 155,20; 139,45; 138,40; 132,17; 129,13; 128,69; 128,27; 124,69; 113,35; 113,04; 101,00; 65,43; 54,88; 53,45; 23,62; 22,58; 21,83.

7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-3-(p-tolila)-2H-cromen-2-ona (51b): sólido branco; rendimento 72%; ponto de fusão 145,9°C; RMN ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ 7,65 (s; 1H); 7,51 (d; J = 8,3 Hz; 2H); 7,36 – 7,30 (m; 1H); 7,17 (d; J = 7,9 Hz; 2H); 6,81 – 6,75 (m; 2H); 4,01 (t; J = 6,4 Hz; 2H); 2,47 – 2,41 (m; 2H); 2,36 (s; 4H); 2,32 (s; 3H); 2,03 – 1,89 (m; 2H); 1,54 (p; J = 5,6 Hz; 4H); 1,39 (q; J = 6,6 Hz; 2H); RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ 161,95; 161,05; 155,20; 139,45; 138,40; 132,17; 129,13; 128,69; 128,27; 124,69; 113,35; 113,04; 101,00; 67,11; 55,74; 54,66; 26,53; 25,90; 24,35; 21,30.

3-(4-metoxifenil)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51c): sólido branco; rendimento 80%; ponto de fusão 134,3°C; RMN ¹H (300 MHz; DMSO-d₆) δ 8,11 (s; 1H); 7,68 (d; J = 2,2 Hz; 1H); 7,65 (d; J = 3,2 Hz; 1H); 7,63 (s; 1H); 7,01 (d; J = 2,2 Hz; 1H); 6,98 (d; J = 1,4 Hz; 2H); 6,95 (dd; J = 8,5, 2,4 Hz; 1H); 4,10 (t; J = 6,4 Hz; 2H); 3,79 (s; 3H); 2,44 – 2,30 (m; 6H); 1,88 (p; J = 6,5 Hz; 2H); 1,50 (p; J = 5,8 Hz; 4H); 1,38 (q; J = 6,4 Hz; 2H); RMN ¹³C (75 MHz; DMSO-d₆) δ 161,93; 160,61; 159,73; 154,99; 139,93; 130,92; 130,03; 129,94; 127,60; 123,22; 114,11; 113,37; 101,09; 67,21; 55,67; 55,40; 54,50; 26,44; 25,94; 24,49.

3-(4-clorofenil)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51d): sólido branco; rendimento 46%; ponto de fusão 150°C; RMN ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ 7,74 (s; 1H); 7,64 (d; J = 2,1 Hz; 1H); 7,62 (d; J = 2,2 Hz; 1H); 7,43 – 7,38 (m; 2H); 7,37 (d; J = 2,1 Hz; 1H); 6,88 – 6,80 (m; 2H); 4,08 (t; J = 6,3 Hz; 2H); 2,68 – 2,36 (m; 6H); 2,12 – 2,00 (m; 2H); 1,65 (p; J =

5,1 Hz; 4H); 1,47 (q; J = 7,4 Hz; 2H); RMN ^{13}C (126 MHz; CDCl_3) δ 162,24; 160,75; 155,32; 134,37; 133,46; 123,41; 67,03; 55,63; 54,51; 26,22; 25,57; 24,14.

3-(4-hidroxifenil)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51e): sólido branco; rendimento 52%; ponto de fusão 205°C; RMN ^1H (500 MHz; DMSO-d_6) δ 9,72 (s; 1H); 8,09 (s; 1H); 7,66 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 7,56 (d; J = 8,0 Hz; 2H); 7,00 (s; 1H); 6,96 (d; J = 9,0 Hz; 1H); 6,83 (d; J = 8,2 Hz; 2H); 4,12 (t; J = 6,4 Hz; 2H); 2,51 – 2,35 (m; 6H); 1,97 – 1,85 (m; 2H); 1,57 – 1,49 (m; 4H); 1,41 (s; 2H); RMN ^{13}C (126 MHz; DMSO-d_6) δ 161,73; 160,65; 158,08; 154,86; 125,97; 123,60; 67,08; 55,27; 54,34; 39,44; 25,69.

3-(4-fluorofenil)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51f): sólido branco; rendimento 95%; ponto de fusão 147°C; RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ 7,75 (s; 1H); 7,69 (dd; J = 8,9, 5,3 Hz; 2H); 7,44 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 7,14 (t; J = 8,7 Hz; 2H); 6,91 – 6,86 (m; 2H); 4,11 (t; J = 6,3 Hz; 2H); 2,54 (t; J = 7,5 Hz; 2H); 2,47 (s; 4H); 2,06 (p; J = 6,5 Hz; 2H); 1,64 (p; J = 5,6 Hz; 4H); 1,48 (s; 2H); RMN ^{13}C (126 MHz; CDCl_3) δ 163,81; 162,18; 161,83; 160,96; 155,29; 139,93; 131,09; 130,27; 128,81; 123,68; 115,50; 155,33; 113,24; 113,14; 101,04; 67,13; 55,72; 54,64; 26,49; 25,85; 24,33.

3-(4-nitrofenil)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51h): sólido laranja; rendimento 44%; ponto de fusão 147,1°C; RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ 8,29 (d; J = 8,8 Hz; 2H); 7,90 (d; J = 8,5 Hz; 3H); 6,90 (dd; J = 8,6, 2,4 Hz; 1H); 6,87 (s; 1H); 4,12 (t; 2H); 2,69 – 2,42 (m; 6H); 2,11 (t; 2H); 1,68 (d; 4H); 1,49 (s; 2H); RMN ^{13}C (126 MHz; CDCl_3) δ 163,00; 160,22; 155,79; 147,43; 141,84; 141,54; 129,19; 123,66; 122,19; 113,63; 112,79; 101,13; 67,15; 55,59; 54,54; 26,21; 25,57; 24,14.

3-(4-(2-oxo-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-3-il)benzonitrilo (51i): sólido laranja; rendimento 44%; ponto de fusão 147,1°C; RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ 7,84 (d; J = 2,8 Hz; 2H); 7,82 (d; J = 2,1 Hz; 1H); 7,72 (d; J = 2,1 Hz; 1H); 7,69 (d; J = 2,1 Hz; 1H); 7,45 (d; J = 8,6 Hz; 1H); 6,92 – 6,85 (m; 2H); 4,10 (t; J = 6,3 Hz; 2H); 2,54 – 2,48 (m; 2H); 2,43 (t; J = 5,4 Hz; 4H); 2,09 – 1,97 (m; 3H); 1,66 – 1,56 (m; 4H); 1,46 (q; J = 5,9 Hz; 2H); RMN ^{13}C (75 MHz; CDCl_3) δ 200,29; 167,84; 162,96; 160,27; 155,72; 141,48; 139,64; 132,18; 129,29; 128,98; 122,51; 118,70; 113,61; 112,78; 111,84; 101,08; 67,27; 55,66; 54,66; 26,49; 25,89; 24,35.

7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-3-(4-(trifluorometil)fenil)-2H-cromen-2-ona (51j): sólido bege; rendimento 56%; ponto de fusão 188,4°C; RMN ^1H (500 MHz; CDCl_3) δ 7,84 (d; J = 5,0

Hz; 3H); 7,71 (d; J = 8,4 Hz; 2H); 7,48 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 6,94 – 6,86 (m; 2H); 4,13 (t; J = 6,3 Hz; 2H); 2,64 – 2,38 (m; 6H); 2,13 – 2,04 (m; 2H); 1,72 – 1,61 (m; 4H); 1,49 (s; 2H); RMN ¹³C (126 MHz; CDCl₃) δ 162,61; 160,57; 155,59; 141,10; 138,60; 129,14; 128,73; 125,40; 123,21; 113,41; 112,94; 101,04; 67,14; 55,67; 54,61; 26,36; 25,72; 24,25.

3-(7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-3-(tiophen-3-il)-2H-cromen-2-ona (51k): sólido bege; rendimento 65%; ponto de fusão 164,9°C; RMN ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ 7,93 (s; 1H); 7,72 (dd; J = 3,8, 1,2 Hz; 1H); 7,42 (d; J = 8,2 Hz; 1H); 7,37 (dd; J = 5,1, 1,2 Hz; 1H); 7,10 (dd; J = 5,1, 3,7 Hz; 1H); 6,89 – 6,82 (m; 2H); 4,07 (t; J = 6,4 Hz; 2H); 2,50 (d; J = 7,2 Hz; 2H); 2,42 (t; J = 5,4 Hz; 4H); 2,07 – 1,94 (m; 2H); 1,60 (p; J = 5,7 Hz; 4H); 1,45 (q; J = 6,4 Hz; 2H); RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ 162,08; 159,81; 154,54; 136,50; 136,03; 128,66; 127,44; 126,80; 126,19; 118,41; 113,47; 112,90; 101,03; 67,18; 55,71; 54,67; 26,54; 25,94; 24,38.

7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-3-(piridin-4-il)-2H-cromen-2-ona (51l): sólido amarelo claro; rendimento 20%; ponto de fusão 181,2°C; RMN ¹H (500 MHz; DMSO-d₆) δ 7,77 (d; J = 5,7 Hz; 2H); 7,73 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 7,07 (s; 1H); 7,02 (d; J = 8,8 Hz; 1H); 4,15 (t; J = 6,4 Hz; 2H); 2,50 – 2,32 (m; 6H); 1,97 – 1,86 (m; 2H); 1,57 – 1,46 (m; 4H); 1,39 (s; 2H); RMN ¹³C (126 MHz; DMSO-d₆) δ 159,84; 150,15; 143,25; 130,78; 123,02; 113,79; 113,12; 101,22; 55,28; 54,42; 25,85.

3-(naftalen-1-il)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51m): sólido rosa claro; rendimento 93%; ponto de fusão 141,5°C; RMN ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ 7,90 (dt; J = 7,3, 2,4 Hz; 2H); 7,82 – 7,77 (m; 1H); 7,74 (s; 1H); 7,56 – 7,45 (m; 4H); 7,41 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 6,94 – 6,86 (m; 2H); 4,11 (t; 2H); 2,58 – 2,49 (m; 2H); 2,46 (t; 4H); 2,17 (d; 2H); 2,12 – 1,98 (m; 2H); 1,59 (s; 4H); 1,45 (d; J = 6,1 Hz; 2H); RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ 162,30; 161,19; 158,37; 155,81; 142,99; 133,73; 133,06; 131,72; 129,13; 128,86; 128,54; 127,74; 126,40; 126,03; 125,31; 124,57; 113,14; 112,93; 101,27; 67,16; 55,70; 54,62; 26,46; 25,82; 24,31.

7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-3-(pirimidin-5-il)-2H-cromen-2-ona (51n): sólido bege; rendimento 59%; ponto de fusão 162,3°C; RMN ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ 9,16 (s; 1H); 9,06 (s; 2H); 7,86 (s; 1H); 7,46 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 6,91 – 6,83 (m; 2H); 4,08 (t; J = 6,4 Hz; 2H); 2,46 (t; J = 7,4 Hz; 2H); 2,43 – 2,32 (m; 4H); 2,25 (s; 2H); 1,99 (p; J = 6,4 Hz; 2H); 1,57 (p; J = 5,6 Hz; 4H); 1,42 (q; J = 6,0 Hz; 2H); RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ 163,19; 160,12; 157,93; 155,92; 141,34; 129,38; 126,63; 118,11; 113,76; 112,56; 109,25; 104,91; 101,21; 67,33; 55,61; 54,64; 26,50; 25,91; 24,37.

3-(naftalen-2-il)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51o): sólido branco; rendimento 50%; ponto de fusão 155,6°C; RMN ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ 8,22 (s; 1H); 7,92 – 7,81 (m; 4H); 7,78 (dd; J = 8,6, 1,8 Hz; 1H); 7,53 – 7,42 (m; 3H); 6,92 – 6,83 (m; 2H); 4,09 (t; J = 6,4 Hz; 2H); 2,56 – 2,47 (m; 2H); 2,47 – 2,36 (m; 4H); 2,05 (t; 2H); 1,62 (p; 4H); 1,46 (q; 2H); RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ 162,18; 161,03; 155,34; 140,34; 133,25; 133,12; 132,50; 128,86; 128,41; 127,95; 127,60; 126,49; 126,30; 125,97; 124,54; 113,34; 113,20; 101,03; 67,16; 55,74; 54,67; 26,55; 25,92; 24,38.

3-(4-(dimetilamino)fenil)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51p): sólido amarelo fluorescente; rendimento 48%; ponto de fusão 155,1°C; RMN ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ 7,64 (d; J = 3,5 Hz; 2H); 7,61 (d; J = 2,2 Hz; 1H); 7,37 (d; J = 9,3 Hz; 1H); 6,83 (dd; J = 5,8, 2,3 Hz; 2H); 6,78 – 6,72 (m; 2H); 4,06 (t; J = 6,3 Hz; 2H); 2,99 (s; 6H); 2,54 – 2,46 (m; 2H); 2,43 (t; J = 5,4 Hz; 4H); 2,08 – 1,96 (m; 2H); 1,61 (p; J = 5,5 Hz; 4H); 1,45 (q; J = 6,7 Hz; 2H); RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃) δ 161,37; 161,34; 154,71; 150,53; 137,15; 129,18; 128,31; 124,72; 122,74; 113,74; 112,82; 112,04; 100,95; 67,04; 55,76; 54,65; 40,40; 26,55; 25,89; 24,36.

3-(3-nitrofenil)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51q): sólido amarelo, rendimento 31%, ponto de fusão 99 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,63 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,28 – 8,17 (m, 2H), 7,75 (dt, J = 14,0; 8,3 Hz, 2H), 7,08 (s, 1H), 7,02 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 4,15 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,45 (s, 6H), 1,95 (s, 2H), 1,53 (s, 3H), 1,40 (s, 2H), 1,23 (s, 1H). RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ 162,73; 160,27; 155,61; 148,15; 136,98; 135,19; 130,63; 130,28; 123,24; 121,17; 113,74; 113,26; 101,22; 67,24; 55,23; 54,34; 26,18; 25,71.

7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-3-(m-tolil)-2H-cromen-2-ona (51r): sólido bege, rendimento 33%, ponto de fusão 111 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,74 (s, 1H), 7,51 – 7,45 (m, 2H), 7,41 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,32 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,19 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,85 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 4,08 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,55 – 2,40 (m, 8H), 2,04 (p, J = 6,5 Hz, 2H), 1,68 – 1,57 (m, 4H), 1,46 (s, 2H). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 162,01; 161,04; 155,26; 140,04; 135,02; 129,25; 129,07; 128,77; 128,36; 113,09; 101,00; 67,08; 55,75; 54,64; 26,46; 25,80; 24,32.

3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51s): sólido amarelo, rendimento 20%, ponto de fusão 100 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,14 (s, 1H), 7,64 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,32 – 7,19 (m, 2H), 7,04 – 6,93 (m, 2H), 6,07 (s, 2H), 4,10 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 2,47 – 2,26 (m, 6H), 1,89 (s, 2H), 1,50 (s, 4H), 1,37 (s, 2H). RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ 162,03; 160,49; 155,03; 147,71; 129,22; 123,16; 113,48; 109,13; 108,57;

101,70; 101,07; 67,19; 55,36; 54,46; 26,38; 25,88; 24,44.

3-(3-metoxifenil)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51t): sólido amarelo, rendimento 32%, ponto de fusão 100 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,76 (s, 1H), 7,42 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,34 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,24 (s, 2H), 6,93 (dd, J = 8,1, 3,1 Hz, 1H), 6,89 – 6,80 (m, 2H), 4,08 (t, J = 6,3 Hz, 2H), 3,85 (s, 3H), 2,55 (t; J = 7,6 Hz; 2H), 2,48 (s; 4H), 2,05 (p; J = 6,3 Hz; 2H), 1,63 (p; J = 5,6 Hz; 4H), 1,48 (s, 2H). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 162,09; 160,86; 159,52; 155,29; 136,40; 129,45; 128,88; 124,51; 120,81; 114,14; 114,04; 113,23; 113,10; 101,00; 67,03; 55,63; 54,49; 26,28; 25,62; 24,20.

3-(2-nitrofenil)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51v): sólido amarelo, rendimento 54%, ponto de fusão 155,5 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,10 (d; J = 8,2 Hz; 1H), 7,71 (s; 1H), 7,68 (d; J = 7,6 Hz; 1H), 7,56 (t; J = 7,7 Hz; 1H), 7,47 (d; J = 7,4 Hz; 1H), 7,43 (d; J = 8,5 Hz; 1H), 6,90 – 6,85 (m; 2H), 4,09 (t; J = 6,3 Hz; 2H), 2,56 – 2,38 (m; 6H), 2,04 (p; J = 6,5 Hz; 2H), 1,62 (p; J = 5,7 Hz; 4H), 1,47 (s; 2H), 1,25 (s; 2H), 0,85 (t; J = 10,9 Hz; 2H). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 162,63; 160,16; 155,69; 148,90; 140,10; 133,56; 132,09; 129,71; 129,09; 124,96; 113,51; 101,43; 67,27; 55,78; 54,71; 26,51; 25,89; 24,40.

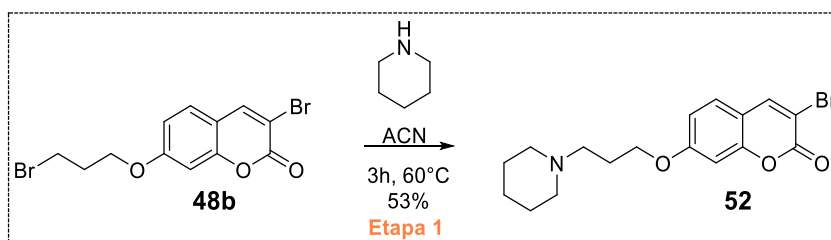
3-(2-metoxifenil)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (51x): sólido bege, rendimento 33%, ponto de fusão 111,00 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (s; 1H), 7,40 – 7,33 (m; 3H), 7,04 – 6,96 (m; 2H), 6,84 (d; J = 6,5 Hz; 2H), 4,07 (t; J = 6,3 Hz; 2H), 3,83 (s; 3H), 2,51 (d; J = 7,3 Hz; 2H), 2,48 – 2,30 (m; 4H), 2,02 (p; J = 6,5 Hz; 2H), 1,81 (s; 4H), 1,60 (p; J = 5,7 Hz; 4H), 1,45 (s; 2H). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161,92; 160,75; 157,26; 155,47; 124,38; 122,83; 67,10; 55,79; 54,65; 26,54; 25,91; 24,39

7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-3-(4-(3-(piperidin-1-il)propoxi)fenil)-2H-cromen-2-ona (51z): sólido branco, rendimento 26%, ponto de fusão 249,3 °C. RMN ¹H (300 MHz; CDCl₃) δ 7,68 (s; 1H); 7,61 (d; J = 8,9 Hz; 2H); 7,40 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 6,91 (d; J = 8,9 Hz; 2H); 6,82 (d; J = 9,8 Hz; 2H); 4,88 (s; 6H); 4,08 (q; J = 6,0 Hz; 4H); 3,02 – 2,68 (m; 12H); 2,23 (dq; J = 11,4, 5,9 Hz; 4H); 1,99 (s; 3H); 1,83 (hept; J = 5,9 Hz; 8H); 1,60 – 1,50 (m; 5H); RMN ¹³C (151 MHz; DMSO-d₆) δ 161,45; 160,55; 158,72; 154,97; 139,94; 130,11; 127,88; 123,38; 114,72; 113,86; 113,40; 101,26; 66,16; 65,43; 53,91; 52,76; 24,00; 23,18; 21,74.

7-methoxy-3-(4-(3-(piperidin-1-yl)propoxy)phenyl)-2H-chromen-2-one (51w): white solid, yields 43%, ponto de fusão 141,3. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.22 (s, 1H), 7.71 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 2H), 7.53 – 7.33 (m, 6H), 7.22 (dd, J = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 4.11 (t, J = 5.9 Hz, 2H),

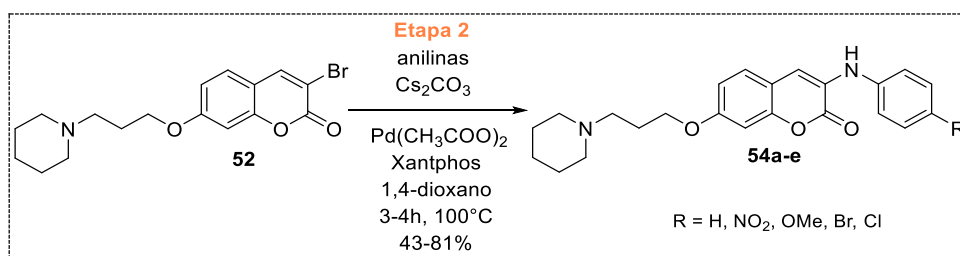
3.36 (s, 3H), 3.20 (t, $J = 8.0$ Hz, 4H), 2.25 – 2.10 (m, 2H), 1.73 (s, 5H), 1.55 (s, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 159.76, 154.55, 147.48, 140.34, 134.63, 128.64, 128.49, 128.25, 127.20, 119.93, 119.54, 117.00, 111.65, 105.93, 53.44, 52.31, 23.57, 22.77, 21.35.

5.1.3. Síntese dos derivados 3-(*N*-anilino) 7-aminoalcoxi-cumarínicos (54a-e) – série 2



Em um tubo de reação foram adicionados 1 mmol dos intermediários 50a-z e solubilizados em 15 mL de acetonitrila. Em seguida foram adicionados 3 mmol de piperidina. O tubo foi então selado e a mistura foi submetida a agitação magnética e aquecimento a 60°C por aproximadamente 3h. Após este período, o sistema foi resfriado e o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida no rotavapor. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna flash (sistema Isolera™), utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano/acetato como fase móvel. A eluição foi realizada em gradiente, com a concentração de 5-10% do solvente mais polar

3-Fenil-7-[3-(piperidin-1-il)propoxi]-2H-cromen-2-ona (52): sólido amarelo, rendimento de 75%, ponto de fusão 97-110°C. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (s, 1H); 7.69-7.70 (m, 2H); 7.39-7.46 (m, 4H); 6.86-6.87 (m, 2H); 4.09 (m, 2H); 2.47-2.55 (m, 6H); 2.05-2.06 (m, 2H); 1.64 (q, 4H); 1.47 (m, 2H). ^{13}C RMN (125 MHz; CDCl_3) δ 162.04; 160.92; 155.27; 140.05; 135.03; 128.78; 128.39; 128.37; 124.67; 113.23; 113.07; 100.99; 67.04; 55.63; 54.53; 26.37; 25.73; 24.25.



Em um tubo de reação foi adicionado 0,14 mmol do intermediário chave **52**, 0,21 mmol de Cs_2CO_3 , 0,003 mmol de Xantphos e 0,003 mmol de $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Em paralelo, em outro tubo de reação, foram adicionados 0,17 mmol de anilinas substituídas e 4 mL de 1,4-Dioxano. Em seguida, os tubos foram fechados e as misturas foram degasadas com gás nitrogênio por 10 minutos. Após a degasagem, a mistura de anilina e dioxano foi retirada do

tubo com uma seringa e adicionada ao tubo de reação contendo os demais reagentes. Por fim o tubo foi selado e a mistura foi submetida a aquecimento a 100°C e agitação magnética por 3h. Após este período, o sistema foi resfriado e o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida no rotavapor. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna flash (sistema Isolera™), utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de diclorometano/metanol como fase móvel. A eluição foi realizada em gradiente, com a concentração de 5-10% do solvente mais polar.

3-(fenilamino)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (54a): sólido amarelo, rendimento 77%, ponto de fusão 110-117°C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7,38 (t; J = 7,9 Hz; 2H); 7,19-7,23 (m; 4H); 7,08 (t; J = 7,4 Hz; 1H); 6,84-6,86 (m; 2H); 6,63 (sl; 1H); 4,14 (t; J = 6,0 Hz; 2H); 2,81 (t; J = 6,0 Hz; 2H); 2,53 (sl; 4H); 1,63 (q; J = 5,5 Hz; 4H); 1,46-1,47 (m; 2H). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 160,11; 158,45; 149,67; 140,24; 129,57; 127,00; 126,31; 122,92; 120,01; 114,11; 113,23; 109,93; 101,48; 66,46; 57,72; 55,07; 25,87; 24,11.

3-((4-nitrofenil)amino)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (54b): sólido laranja, rendimento 75%, ponto de fusão 120-132°C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9,03 (s; 1H); 8,12 (d; J = 9,3 Hz; 2H); 7,89 (s; 1H); 7,59 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 7,27 (d; J = 9,3 Hz; 2H); 7,02 (s; 1H); 6,96 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 2,44 (s; 6H); 1,95 – 1,82 (m; 2H); 1,51 (s; 4H); 1,40 (s; 2H). RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ 160,48; 159,09; 152,11; 150,04; 139,36; 128,82; 126,14; 124,79; 123,88; 115,93; 113,95; 113,26; 101,44; 67,06; 55,34; 54,42; 25,78.

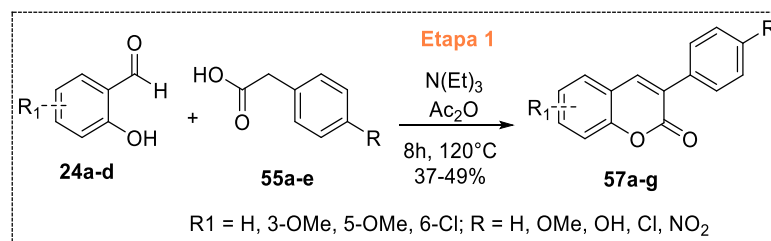
3-((4-metoxifenil)amino)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (54c): sólido amarelo, rendimento 69%, ponto de fusão 134-138°C. RMN ¹H(500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,76 (s; 1H); 7,40 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 7,23 (d; J = 9,0 Hz; 2H); 7,09 (s; 1H); 6,93 (d; J = 9,1 Hz; 3H); 6,85 (dd; J = 8,7, 2,5 Hz; 1H); 4,03 (t; J = 6,4 Hz; 2H); 3,74 (s; 3H); 2,40 – 2,22 (m; 6H); 1,85 (p; J = 6,5 Hz; 2H); 1,48 (q; J = 5,6 Hz; 4H); 1,37 (d; J = 5,2 Hz; 2H). RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ 159,37; 158,21; 155,34; 149,59; 134,18; 128,61; 114,56; 66,94; 55,55; 54,59; 26,66; 26,07; 24,62.

3-((4-bromofenil)amino)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (54d): sólido amarelo, rendimento 35%, ponto de fusão 147-153°C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,08 (s; 1H); 7,48 – 7,39 (m; 4H); 7,24 (s; 1H); 7,21 (s; 1H); 6,93 (d; J = 2,5 Hz; 1H); 6,87 (dd; J = 8,6, 2,5 Hz; 1H); 4,07 (t; J = 6,2 Hz; 2H); 2,71 (d; J = 7,8 Hz; 7H); 2,01 (dd; J = 14,6, 6,1

Hz; 2H); 1,61 (p; J = 5,5 Hz; 5H); 1,45 (q; J = 6,2 Hz; 2H). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 160,00; 158,94; 149,88; 139,43; 132,56; 126,49; 121,37; 115,09; 113,71; 113,26; 110,86; 101,44; 66,92; 55,77; 54,56; 26,41; 25,67; 24,23.

3-((4-clorofenil)amino)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (54e): sólido amarelo, rendimento 73%, ponto de fusão 143-151°C. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,25 (d; J = 7,0 Hz; 2H); 7,17 (d; J = 7,6 Hz; 1H); 7,09 (d; J = 8,5 Hz; 3H); 6,77 (d; J = 5,6 Hz; 3H); 3,99 (t; J = 6,3 Hz; 2H); 2,62 – 2,37 (m; 6H); 2,01 (p; J = 6,4 Hz; 2H); 1,73 – 1,52 (m; 4H); 1,43 (d; J = 5,3 Hz; 2H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 159,82; 158,71; 149,77; 139,05; 129,45; 127,35; 126,64; 126,46; 121,06; 113,74; 113,02; 110,75; 66,68; 55,59; 54,37; 40,61; 40,34; 40,05; 39,78; 39,50; 26,12; 25,34; 23,93.

5.1.4. Síntese dos derivados 3-fenilcumarinas substituídas com piperidinilpropoxila em diferentes posições (58a-f) – série 3



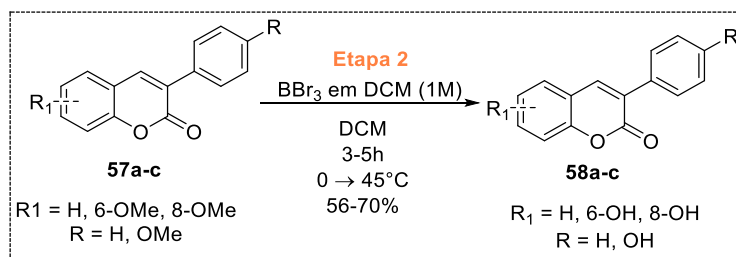
Em um tubo de reação foram adicionados 8 mmol do salicilaldeído substituído (**24a-d**) e 16 mmol do ácido fenilacético substituído (**55a-e**), seguidos de 20 mL de anidrido acético e 5 mL de trietilamina. A mistura foi aquecida a 120 °C por 8 h. Ao final da reação, os produtos que se apresentaram na forma sólida foram filtrados, enquanto aqueles que permaneceram em solução tiveram o solvente evaporado em rota-evaporador. Em ambos os casos, foi necessária purificação adicional por cromatografia em coluna flash (sistema Isolera™), utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano/acetato como fase móvel. A eluição foi realizada em gradiente, com a concentração de 10-20% do solvente mais polar.

3-(4-metoxifenil)-2H-cromen-2-ona (57a): sólido branco, rendimento 57%. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,77 (s, 1H); 7,70 (d, J = 6,9 Hz, 2H); 7,48 – 7,38 (m, 3H); 7,30 (d, J = 9,0 Hz, 1H); 7,11 (dd, J = 9,1, 2,9 Hz, 1H); 6,97 (d, J = 3,0 Hz, 1H); 3,86 (s, 3H). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 160,81; 156,14; 148,00; 139,79; 134,79; 128,58; 128,50; 120,02; 119,20; 117,52; 109,90; 55,87.

6-metoxi-3-fenil-2H-cromen-2-ona (57b): sólido branco, rendimento 49%. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,68 (s, 1H); 7,65 – 7,59 (m, 2H); 7,41 – 7,30 (m, 3H); 7,21 (d, J = 9,0 Hz, 1H); 7,02 (dd, J = 9,1, 2,9 Hz, 1H); 6,89 (d, J = 2,8 Hz, 1H); 3,77 (s, 3H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 160,73; 156,15; 148,01; 139,74; 134,79; 128,47; 120,02; 119,17; 117,47; 109,93; 55,89.

8-metoxi-3-fenil-2H-cromen-2-ona (57c): sólido branco, rendimento 37%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,70 (s, 1H), 7,62 (dd, J = 8,0, 1,6 Hz, 2H), 7,40 – 7,29 (m, 3H), 7,12 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,02 (dd, J = 7,9, 1,5 Hz, 1H), 6,98 (dd, J = 7,9, 1,5 Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 160,73, 156,15, 148,01, 139,74, 134,79, 128,47, 120,02, 119,17, 117,47, 109,93, 55,89.

6-metoxi-3-(4-clorofenil)-2H-cromen-2-ona (57d): sólido branco, rendimento 53%. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,77 (s, 1H); 7,65 (d, J = 8,5 Hz, 2H); 7,41 (d, J = 8,7 Hz, 2H); 7,30 (d, J = 9,1 Hz, 1H); 7,12 (dd, J = 9,1, 2,9 Hz, 1H); 6,97 (d, J = 3,0 Hz, 1H); 3,86 (s, 3H). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 160,56; 156,22; 148,03; 139,85; 134,94; 133,17; 129,89; 128,71; 127,45; 119,50; 117,58; 109,91; 55,88.



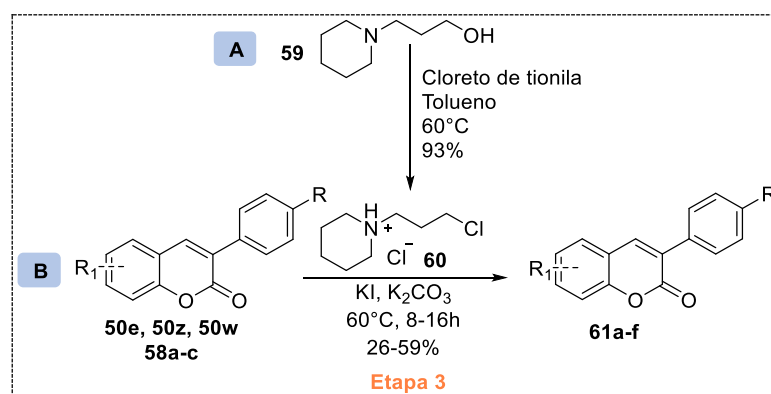
Em um tubo de reação, 4 mmol do intermediário 57a–c foram solubilizados em 20 mL de diclorometano. A mistura foi submetida a agitação magnética até atingir a temperatura de 0 °C. Em seguida, adicionou-se, gota a gota, 13 mmol de uma solução de BBr_3 (1 M em diclorometano). Após a adição de BBr_3 , o banho de gelo foi removido e a reação foi mantida em refluxo por 3 h. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna flash (sistema IsoleraTM), utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de diclorometano/metanol como fase móvel. A eluição foi realizada em gradiente, com a concentração de 5-15% do solvente mais polar.

3-(4-hidroxifenil)-2H-cromen-2-ona (58a): sólido amarelado, rendimento 57%. RMN ^1H (600 MHz, DMSO) δ 10,19 (s, 1H); 8,17 (s, 1H); 7,72 (d, J = 7,7 Hz, 2H); 7,49 – 7,38 (m, 3H); 7,17 (dt, J = 15,4, 7,6 Hz, 2H); 7,09 (d, J = 7,7 Hz, 1H).

6-hidroxi-3-fenil-2H-cromen-2-ona (58b): sólido branco, rendimento 70%. RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ 8,17 (s, 1H); 7,75 (dd, $J = 7,6, 1,6$ Hz, 1H); 7,69 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H); 7,62 – 7,55 (m, 1H); 7,40 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 7,35 (td, $J = 7,4, 1,2$ Hz, 1H); 7,04 – 6,98 (m, 2H).

8-hidroxi-3-fenil-2H-cromen-2-ona (58c): sólido marrom, rendimento 67%. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9,77 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,71 (dd, $J = 8,1, 1,5$ Hz, 2H), 7,51 – 7,40 (m, 3H), 7,29 (s, 1H), 7,10 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 7,04 (dd, $J = 8,8, 2,9$ Hz, 1H).

8-hidroxi-3-fenil-2H-cromen-2-ona (58c): sólido marrom, rendimento 67%. RMN ^1H (300 MHz, DMSO) δ 9,77 (s, 1H); 8,16 (s, 1H); 7,71 (dd, $J = 8,1, 1,5$ Hz, 2H); 7,51 – 7,40 (m, 3H); 7,29 (s, 1H); 7,10 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H); 7,04 (dd, $J = 8,8, 2,9$ Hz, 1H).



A: O composto **60** 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): $\delta = 10,72$ 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). ^{13}C RMN (126 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 53,67; 52,06; 42,59; 26,23; 22,33; 21,41$.

B: Em um tubo de borossilicato, foram adicionados 1 mmol de 3-fenil-cumarinas substituídas (**50e**, **50z**, **50w**, **58a-c**), 0,92 mmol do cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (**60**), 3 mmol de carbonato de potássio (K₂CO₃) e 1 mmol de iodeto de potássio (KI) e 5,8 mL de acetona. A mistura reacional foi submetida a refluxo por 24 horas. Após este período, o sistema foi resfriado e o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida no rotavapor. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna flash (sistema Isolera™), utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de diclorometano/metanol como fase móvel. A eluição foi realizada em gradiente, com a concentração de 0-10% do solvente mais polar.

3-(4-(3-(piperidin-1-il)propoxi)fenil)-2H-cromen-2-ona (61a): sólido marrom, rendimento 59 %, ponto de fusão 193,0 °C. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,22 (s, 1H); 7,74 – 7,68 (m,

2H); 7,51 – 7,34 (m, 5H); 7,22 (dd, J = 9,1, 3,0 Hz, 1H); 4,11 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 3,43 – 3,03 (m, 6H); 2,16 (dt, J = 10,7, 5,7 Hz, 2H); 1,74 (s, 4H); 1,57 (s, 2H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 159,76; 154,55; 147,48; 140,34; 134,63; 128,64; 128,49; 128,25; 127,20; 119,93; 119,54; 117,00; 111,65; 105,93; 53,44; 52,31; 23,57; 22,77; 21,35.

3-fenil-6-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (61b): sólido branco, rendimento 57 %, ponto de fusão 209,1 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,22 (s, 1H); 7,83 – 7,67 (m, 3H); 7,65 – 7,54 (m, 1H); 7,46 – 7,30 (m, 2H); 7,04 (d, J = 8,9 Hz, 2H); 4,13 (d, J = 6,1 Hz, 2H); 3,47 – 3,09 (m, 6H); 2,14 (dq, J = 11,1, 5,8 Hz, 2H); 1,87 – 1,39 (m, 6H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 159,83; 158,51; 152,70; 139,19; 131,38; 129,85; 128,44; 127,11; 126,27; 124,57; 119,58; 115,77; 114,22; 53,45; 52,32; 23,56; 22,81; 21,35.

3-fenil-8-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (61c): sólido branco, rendimento 57 %, ponto de fusão 199,5 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,93 (s, 1H); 8,28 (s, 1H); 7,74 (dd, J = 8,1, 1,6 Hz, 2H); 7,53 – 7,28 (m, 6H); 4,24 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 3,54 (d, J = 12,2 Hz, 2H); 3,31 (d, J = 11,9 Hz, 3H); 2,96 (d, J = 10,3 Hz, 2H); 2,29 – 2,15 (m, 2H); 1,96 – 1,54 (m, 5H); 1,41 (d, J = 11,5 Hz, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 160,72; 159,43; 145,12; 142,50; 140,78; 134,49; 128,66; 128,47; 128,24; 126,96; 124,57; 120,44; 120,20; 115,40; 110,93; 53,59; 52,29; 23,48; 22,67; 21,22.

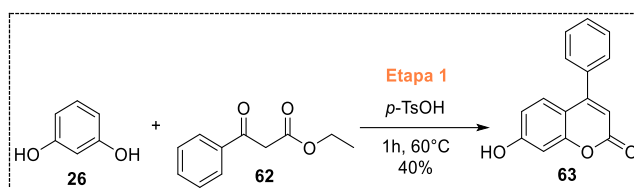
7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-3-(4-(3-(piperidin-1-il)propoxi)fenil)-2H-cromen-2-ona (61d): sólido branco, rendimento 26 %, ponto de fusão 249,3 °C. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,68 (s, 1H); 7,61 (d, J = 8,9 Hz, 2H); 7,40 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 6,91 (d, J = 8,9 Hz, 2H); 6,82 (d, J = 9,8 Hz, 2H); 4,88 (s, 6H); 4,08 (q, J = 6,0 Hz, 4H); 3,02 – 2,68 (m, 12H); 2,23 (dq, J = 11,4, 5,9 Hz, 4H); 1,99 (s, 3H); 1,83 (hept, J = 5,9 Hz, 8H); 1,60 – 1,50 (m, 5H). RMN ¹³C (151 MHz, DMSO-d₆) δ 161,45; 160,55; 158,72; 154,97; 139,94; 130,11; 127,88; 123,38; 114,72; 113,86; 113,40; 101,26; 66,16; 65,43; 53,91; 52,76; 24,00; 23,18; 21,74.

7-metoxi-3-(4-(3-(piperidin-1-il)propoxi)fenil)-2H-cromen-2-ona (61e): sólido branco, rendimento 43 %, ponto de fusão 141,3 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,22 (s, 1H); 7,71 (dd, J = 8,0, 1,6 Hz, 2H); 7,53 – 7,33 (m, 6H); 7,22 (dd, J = 9,0, 3,0 Hz, 1H); 4,11 (t, J = 5,9 Hz, 2H); 3,36 (s, 3H); 3,20 (t, J = 8,0 Hz, 4H); 2,25 – 2,10 (m, 2H); 1,73 (s, 5H); 1,55 (s, 2H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 159,76; 154,55; 147,48; 140,34; 134,63; 128,64; 128,49; 128,25; 127,20; 119,93; 119,54; 117,00; 111,65; 105,93; 53,44; 52,31; 23,57; 22,77; 21,35

7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)-3-(4-(3-(piperidin-1-il)propoxi)fenil)-2H-cromen-2-ona (61f):

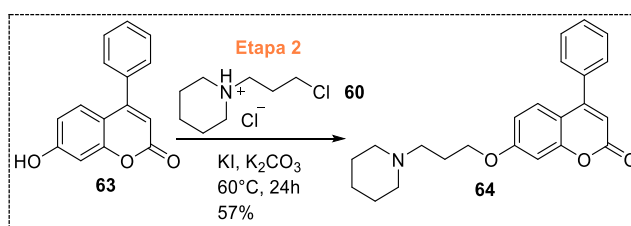
sólido bege, rendimento 45 %, ponto de fusão 255 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,18 (s, 1H); 7,70 (t, J = 9,8 Hz, 3H); 7,09 (s, 1H); 7,03 (d, J = 8,8 Hz, 3H); 4,35 (s, 2H); 4,14 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 4,10 (t, J = 6,9 Hz, 2H); 3,26 – 2,64 (m, 12H); 2,12 (t, J = 7,8 Hz, 2H); 1,74 – 1,61 (m, 8H); 1,55 – 1,40 (m, 4H). RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ 160,55; 158,74; 154,91; 139,92; 130,12; 127,81; 114,68; 113,51; 101,42; 65,47; 59,85; 54,03; 20,76; 13,76.

5.1.5. Síntese do derivado 4-fenil-7-piridinilpropoxi-cumarina (64) – série 4



Em um tubo de reação foram adicionados 10 mmol de resorcinol (**26**), 10 mmol de do β-cetoéster aromático (**62**) e 0,5 mmol de ácido *p*-toluenosulfônico. A mistura foi aquecida a 60°C por 1h. Ao final da reação, foi adicionado água a mistura, e o sólido formado foi filtrado. O intermediário obtido (**63**) foi recristalizado com etanol, com rendimento de 40%.

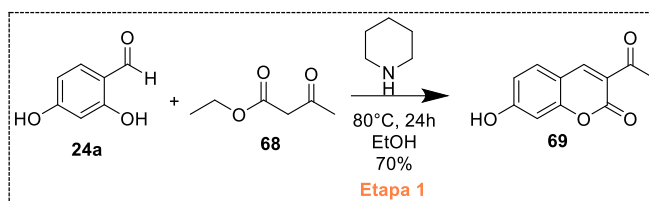
7-hidroxi-4-fenil-2H-cromen-2-ona (63): sólido bege, rendimento 45 %. RMN ¹H (300 MHz, DMSO) δ 10,67 (s, 1H); 7,60 – 7,47 (m, 5H); 7,27 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 6,82 – 6,75 (m, 2H); 6,15 (s, 1H). RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) δ 161,87; 160,63; 155,91; 139,31; 135,64; 128,89; 128,62; 113,70; 110,85; 106,64; 103,17.



Em um tubo de borossilicato, adicionaram-se 1 mmol de 7-hidroxi-4-fenilcumarina (**63**), 0,92 mmol de cloridrato de 1-(cloroalquil)piperidina (**60**), 3 mmol de carbonato de potássio (K₂CO₃), 1 mmol de iodeto de potássio (KI) e 5,8 mL de acetona. A mistura reacional foi submetida a refluxo por 24 horas. Após este período, o sistema foi resfriado e o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida no rotavapor. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna flash (sistema Isolera™), utilizando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de diclorometano/metanol como fase móvel. A eluição foi realizada em gradiente, com a concentração do solvente mais polar (metanol) variando de 0% a 10%.

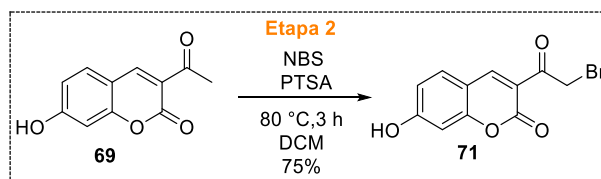
4-fenil-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-2-ona (64): óleo marrom; rendimento 98%; RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3) δ 7,55 – 7,48 (m; 3H); 7,46 – 7,40 (m; 2H); 7,36 (d; J = 8,9 Hz; 1H); 6,89 (d; J = 2,5 Hz; 1H); 6,78 (dd; J = 8,9, 2,5 Hz; 1H); 6,20 (s; 1H); 4,08 (t; J = 6,4 Hz; 2H); 2,52 – 2,44 (m; 2H); 2,44 – 2,34 (m; 4H); 2,17 (s; 1H); 2,07 – 1,92 (m; 2H); 1,59 (p; J = 5,7 Hz; 4H); 1,46 (d; J = 5,7 Hz; 3H); RMN ^{13}C (151 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) δ 162,39; 160,48; 155,97; 155,64; 135,48; 130,14; 129,34; 128,90; 128,31; 113,25; 112,17; 111,73; 102,13; 67,28; 55,36; 54,51; 31,16; 26,45; 25,97; 24,51.

5.1.6. Síntese das 3-(imidazo[1,2-*a*]piridinas)-cumarinas (75a-c) – série 5



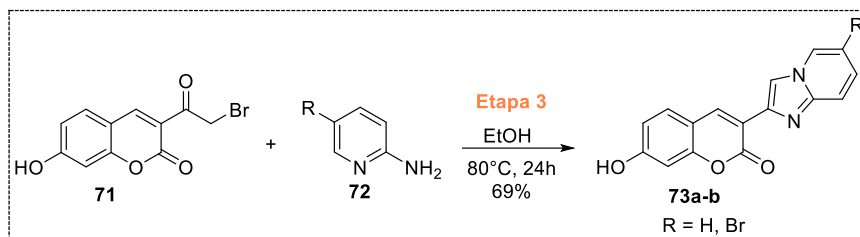
Em um tubo de reação de borossilicato (25 mL), solubilizou-se 14,48 mmol de salicilaldeído (**24a**) em 40 mL de etanol. Em seguida, adicionaram-se 14,48 mmol de acetoacetato de etila (**68**) e 2,17 mmol de piperidina. A solução foi mantida sob aquecimento a 80 °C por 24 horas. Após o término da reação, o sólido formado foi filtrado com etanol gelado, obtendo-se o intermediário **69**.

7-hidroxi-4-fenil-2H-cromen-2-ona (63): sólido bege, rendimento 70 %, ponto de fusão 238 °C. RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) / TMS (δ , ppm): 11,30 (1H, s); 8,58 (s, 1H); 7,75 (d, J = 8,51 Hz, 1H); 6,83 (dd, J = 8,51 Hz, J_4 = 2,2 Hz, 1H); 6,79 (1H, s); 2,51 (2H, s). RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) / TMS (δ , ppm): 195,15; 165,28; 159,60; 148,32; 113,16; 119,27; 114,93; 111,05; 102,25; 30,56.



Em um tubo de reação de borossilicato (25 mL), adicionaram-se 0,2 mmol de 3-acetilcumarina (**63**), N-bromossuccinimida (NBS, 0,2 mmol, 1 equivalente) e ácido p-toluenossulfônico (PTSA, 0,02 mmol, 10% mol). A mistura foi solubilizada em 2 mL de diclorometano. O tubo foi então vedado e a reação foi conduzida sob agitação e aquecimento a 80 °C por 1 a 3 horas (o tempo variou em função da escala do experimento). Ao final, o produto foi isolado na forma de sólido por filtração a vácuo.

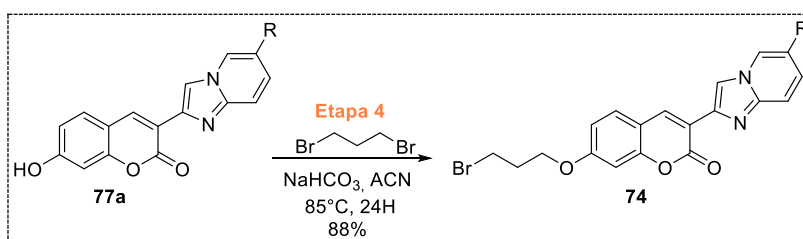
3-(2-bromoacetil)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (71): sólido amarelo, rendimento 60 %, ponto de fusão 140 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) / TMS (δ, ppm): 11,30 (1H, s); 8,76 (s, 1H); 7,84 (d, J = 8,51 Hz, 1H); 6,89 (dd, J = 8,51 Hz, J₄ = 2,2 Hz, 1H); 6,79 (1H, d, J₄ = 2,2 Hz); 4,84 (2H, s). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) / TMS (δ, ppm): 188,59; 165,87; 159,13; 149,13; 132,96; 118,50; 114,32; 112,53; 100,84; 79,13.



Em um tubo de reação de borosilicato (25 mL) foram adicionados 0,5 mmol de 3-(2-bromoacetil)-cumarina (**71**) e 0.5 mmol de 2-aminopiridina (**72**) em 2 mL de etanol, em seguida, o frasco foi selado e a mistura foi agitada e aquecida a 80°C em 3h. Os produtos (**73a-b**) foram obtidos na forma de sólidos sob filtração a vácuo com diclorometano.

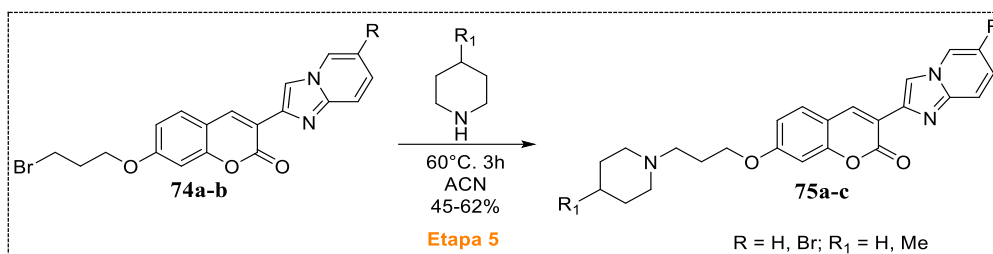
7-hidroxi-3-(imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)-2H-cromen-2-ona (73a): sólido amarelo, rendimento 69 %, ponto de fusão 219 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) / TMS (δ, ppm): 8,91 (1H, d, J = 6,7 Hz); 8,82 (1H, s); 8,73 (1H, s); 7,87 (1H, d, J = 9,0 Hz); 7,82 (1H, t); 7,71 (1H, d, J = 8,6 Hz); 7,39 (1H, t); 6,92 (2H, dd, J = 8,6 Hz, J₄ = 2,0 Hz); 6,84 (1H, d, J = 2,0 Hz). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) / TMS (δ, ppm): 163,16; 158,88; 155,52; 141,33; 131,23; 129,26; 114,72; 114,00; 113,00; 111,53; 102,56.

3-(6-bromoimidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (73b): sólido amarelo, rendimento 53 %, ponto de fusão 254 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO) δ 10,71 (s, 1H); 8,99 (s, 1H); 8,76 (s, 1H); 8,55 (s, 1H); 7,76 (s, 1H); 7,55 (s, 1H); 7,41 (s, 1H); 6,91 – 6,71 (m, 2H). RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) δ 162,02; 155,12; 140,15; 130,83; 129,73; 128,41; 117,56; 112,23; 102,29.



Em um tubo de reação de borossilicato (25 mL), solubilizaram-se 2 mmol de 7-hidroxi-3-(imidazo[1,2-*a*]piridin-3-il)cumarina (**77a**) em 10 mL de acetonitrila (ACN). Em seguida, adicionaram-se 4 mmol de 1,3-dibromopropano e 18 mmol de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Após a adição, o tubo foi vedado e a mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento a 85 °C por 6 horas. Ao final, a mistura reacional foi concentrada à

pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (sistema Isolera™), utilizando como fase móvel uma mistura de diclorometano e metanol em gradiente de 0-5% do solvente mais polar (metanol).



Em um tubo de reação de borossilicato (25 mL), adicionaram-se 1,3 mmol de 3-(imidazo[1,2-*a*]piridin-3-il)-7-(bromoalcoxi)cumarinas (**74a-b**), 2,6 mmol de piperidina e 8 mL de acetonitrila (ACN). Após a adição, o tubo foi vedado e a mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e aquecimento a 60 °C por 3 horas. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (sistema Isolera™), utilizando como fase móvel uma mistura de diclorometano e metanol em gradiente de 0- 20% do solvente mais polar (metanol).

3-(imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2*H*-cromen-2-ona (**75a**):

sólido marrom, rendimento 61 %, ponto de decomposição 245–259 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,86 (s, 1H); 8,64 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H); 8,58 (s, 1H); 7,78 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 7,56 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H); 7,32 (t, 1H); 7,29 (t, 1H); 7,02 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); 6,92 (t, 1H); 4,21 (s, 4H); 3,21 (s, 2H); 3,49 (s, 4H); 2,91 (s, 2H); 2,20 (m, 2H); 1,61 – 1,85 (m, 6H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆, TMS) δ 161,72; 159,65; 154,82; 144,77; 138,73; 138,28; 130,51; 126,28; 117,65; 116,63; 113,75; 113,65; 113,35; 101,67; 66,24; 53,75; 52,69; 23,74; 23,05; 21,76.

3-(imidazo[1,2-*a*]piridin-2-il)-7-(3-(4-metilpiperidin-1-il)propóxi)-2*H*-cromen-2-ona

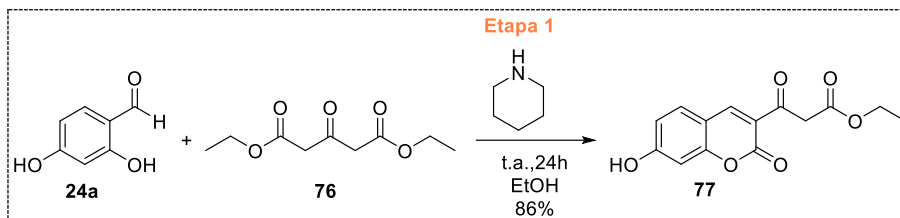
(**75b**): sólido alaranjado, rendimento 44%, ponto de fusão 250-257 °C; ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,84 (s; 1H), 8,65 (d; *J* = 6,8 Hz; 1H), 8,58 (s; 1H), 7,88 (d; *J* = 8,7 Hz; 1H), 7,56 (d; *J* = 9,0 Hz; 1H), 7,35 – 7,25 (m; 1H), 7,08 (s; 1H), 7,01 (d; *J* = 8,7 Hz; 1H), 6,92 (t; *J* = 6,8 Hz; 1H), 4,19 (t; *J* = 6,1 Hz; 2H), 3,13 (s; 4H), 2,84 (s; 2H), 2,15 (s; 2H), 1,79 (d; *J* = 13,6 Hz; 2H), 1,39 – 1,21 (m; 4H), 0,92 (t; *J* = 8,4 Hz; 4H). ¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,78; 159,66; 154,81; 144,75; 138,73; 138,28; 130,50; 127,84; 126,38; 116,66; 113,34; 101,30

3-(6-bromoimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)-7-(3-(piperidin-1-yl)propoxy)-2*H*-chromen-2-one

(**76c**): sólido alaranjado, rendimento 37%, ponto de fusão 257-261 °C; ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.99 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.14 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H),

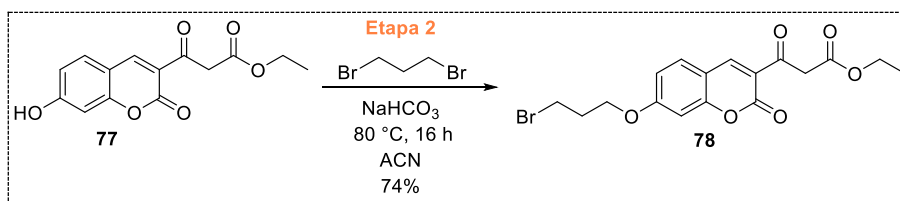
1.93 (s, 2H), 1.53 (s, 4H), 1.41 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 162.35, 159.63, 154.96, 130.55, 129.16, 127.79, 117.73, 113.72, 113.65, 106.26, 101.24, 67.16, 54.26, 25.59, 21.72.

5.1.7. Síntese das 3-(etilcarboxilato)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)-2H-cromen-2-ona (75d) – Série 5



Em um tubo de reação de 10 mL, foram adicionados 3,10 mmol de 2,4-dihidroxibenzaldeído (**24a**) que foram solubilizados em 10 mL de Etanol. Em seguida adicionou-se 3,10 mmol de dietilacetoadicarboxilato de etila (**76**) e 0,77 mmol de piperidina como catalisador. A mistura ficou sob agitação em temperatura ambiente por 24 h, o precipitado formado foi filtrado a vácuo com etanol gelado, sem necessidade de purificação, formando o intermediário (**77**).

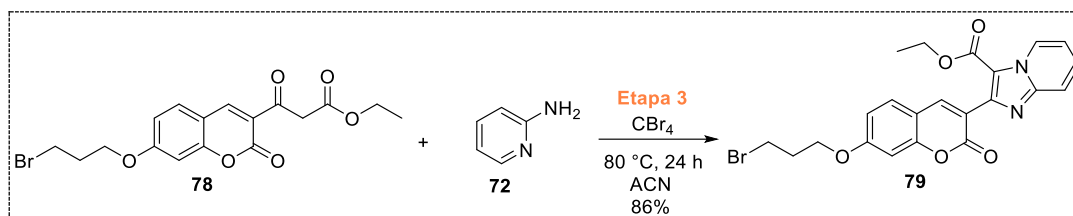
ethyl 3-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-oxopropanoato (89): sólido amarelo, rendimento 86 %, ponto de fusão 143 °C. RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) / TMS (δ , ppm): 12,57 (0,15H, s, enol); 8,71 (1H, s, ceto); 8,63 (0,15H, s, ceto); 7,84 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, ceto); 7,79 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, enol); 6,87–6,89 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 2,2$ Hz, ceto); 6,86–6,77 (0,15H, d, $J = 2,2$ Hz, ceto); 6,76 (1H, d, enol); 6,43 (0,14H, s, enol); 4,20–4,24 (0,32H, q, enol); 4,07–4,12 (2H, q, ceto); 3,99 (2H, s, ceto); 1,26 (0,45H, t); 1,16 (3H, t). RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) / TMS (δ , ppm): 190,35; 168,15; 165,16; 159,72; 157,89; 149,66; 133,67; 118,44; 114,38; 111,31; 102,31; 60,89; 48,73; 14,46.



Em um tubo de reação de borosilicato (25 mL) foram solubilizados 2 mmol de 7-hidroxi- β -cetoéster (**77**) em 10 mL de acetonitrile (ACN). Em seguida foram adicionados 4 mmol de 1,3-dibromopropano e 18 mmol de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Ao fim da adição, o tubo de reação foi selado e a mistura foi submetida a aquecimento sob agitação magnética a 85 °C por 6h. A mistura reacional foi pastilhada e cromatografada em coluna de sílica gel (Isolera) e gradiente hexano:acetato de etila como eluente. A evaporação do solvente sob pressão reduzida

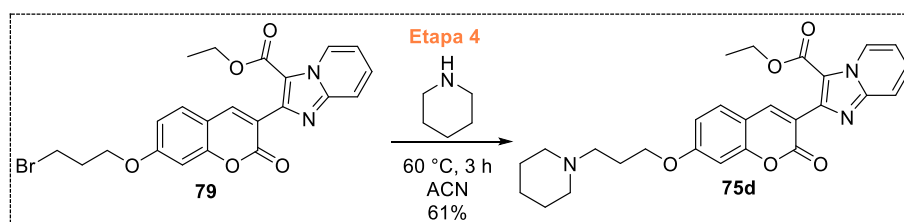
levou ao intermediário (78).

ethyl 3-(7-(3-bromopropoxi)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-oxopropanoato (78): sólido amarelo claro, rendimento 74 %, ponto de fusão 135–140 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) /TMS (δ, ppm): 12,64 (1H, s, enol); 8,59 (1H, s, ceto); 8,57 (1H, s, enol); 7,58 (1H, d, J = 8,8 Hz, J = 1,5 Hz, ceto); 7,52 (1H, d, J = 8,8 Hz, J = 1,5 Hz, enol); 6,89–6,94 (1H, m, ceto/enol); 6,85 (1H, d, ceto/enol); 6,62 (1H, d, enol); 4,18–4,30 (4H, m, ceto/enol); 4,10 (2H, s, ceto); 3,60–3,63 (2H, t, ceto/enol); 3,38 (2H, m, ceto/enol); 1,26–1,36 (3H, m, ceto/enol). RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) / TMS (δ, ppm): 190,17; 173,65; 167,95; 164,58; 159,76; 157,81; 148,63; 131,81; 130,44; 115,53; 114,18; 113,64; 112,22; 100,96; 92,77; 66,24; 66,04; 48,77; 31,74; 29,29; 14,20; 14,08.



Em um tubo de reação de borosilicato (25 mL), foram adicionados 1,5 mmol de β-cetoéster alquilado (78) que foram solubilizados em 2 mL de acetonitrila, em seguida adicionou-se 1 mmol de tetrabromometano e 0,5 mmol de 2-aminopiridina (72). A mistura reagiu em refluxo por 24h. A purificação dos compostos foi realizada a partir da técnica de cromatografias líquida de adsorção em coluna flash, Isolera Biotage. Como fase móvel, foram utilizadas mistura solventes hexano/acetato de etila 30%.

ethyl2-(7-(3-bromopropoxi)-2-oxo-2H-cromen-3-il)imidazo[1,2-a]piridina-3-carboxilato (79): sólido marrom, rendimento 86 %, ponto de fusão 187 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 9,35 (d, J = 6,9 Hz, 1H); 8,02 (s, 1H); 7,75 (d, J = 9,0 Hz, 1H); 7,48 (t, J = 9,3 Hz, 2H); 7,09 (t, J = 6,8 Hz, 1H); 6,91 (d, J = 7,4 Hz, 2H); 4,35 (q, J = 7,1 Hz, 2H); 4,23 (t, J = 5,7 Hz, 2H); 3,65 (t, J = 6,3 Hz, 2H); 2,40 (p, J = 6,0 Hz, 2H); 1,28 (t, J = 7,1 Hz, 3H). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 162,27; 160,72; 160,05; 155,95; 147,07; 146,39; 142,52; 129,52; 128,07; 120,54; 117,56; 114,47; 112,99; 112,92; 101,34; 65,92; 60,84; 32,00; 29,56; 14,08.



Em um tubo de reação de borosilicato (25 mL), foram adicionados 1,3 mmol da imidazo[1,2-a]piridinas-6-etilcarboxilato (79), 2,6 mmol de piperidina e 8 mL de acetonitrila (ACN). Após

a adição dos reagentes, o tubo foi selado e a mistura foi submetida a agitação magnética e aquecimento a 60°C por 3h. Por fim, a mistura reacional foi purificada no equipamento Isolera com fase estacionária sílica e fase móvel mistura de diclorometano:metanol em gradiente de concentração de 0-25% do solvente mais polar.

Ethyl-2-(2-oxo-7-(3-(piperidin-1-il)propoxi)-2H-cromen-3-il)imidazo[1,2-a]piridina-

3-carboxilato (75d): sólido marrom, rendimento 61 %, ponto de decomposição 110–120 °C (36). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm) δ 9,21 (d, J = 6,9 Hz); 8,29 (s); 7,89 (d, J= 8,8 Hz); 7,75 (d, J= 8,8 Hz); 7,63 (dt, J= 8,8 Hz, J₃ = 6,9 Hz, J = 1,3 Hz); 7,28 (dt, J= 6,9 Hz, J= 1,3 Hz); 7,11 (d, J= 2,2 Hz); 7,02 (dd, J= 8,8 Hz, J = 2,2 Hz); 4,21 (m, 4H); 2,73 (s, 2H); 3,03 (m, 6H); 2,13 (m, 2H); 1,71 (s, 4H); 1,51 (s, 2H); 1,13 (t, 3H). RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆, TMS, δ, ppm) δ 162,07; 160,09; 159,36; 155,46; 146,17; 143,13; 130,28; 128,81; 127,61; 119,64; 117,40; 115,31; 113,33; 113,34; 112,58; 101,22; 66,19; 60,52; 13,93.

5.2. Atividade biológica

5.2.1. Avaliação dos Derivados Quanto à Atividade Anticolinesterásica realizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (DE SOUZA et al., 2019)

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 de todos os compostos finais DMSO (30mM). Inicialmente, foram adicionados 150 µL de solução do composto inibidor (**51a-z**, **57a-c**, **64**, **75a-d**) 146 em uma placa de 96 poços. Como controle negativo soluções de DMSO em triplicata. 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). Um leitor de placas iMark (Bio-Rad) equipado com um filtro de luz de = 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 µL de solução do substrato iodeto de acetiltiocolina (ACTI) ou iodeto de S-butiltiocolina (BCTI) em concentrações diluídas em série (fator = 1,3) foram adicionados aos respectivos poços e a absorbância registrada após incubação durante 10 minutos a 25°C a λ = 415 nm. Os respectivos gráficos de Lineweaver-Burk foram obtidos por plotagem de um gráfico de 1 / velocidade versus 1 / [substrato] para o controle negativo e duas concentrações diferentes de inibidor. A regressão linear de cada conjunto de dados mostra um comportamento convergente, de forma que a região na qual as

curvas convergem determina o tipo de inibição observada. Os valores de K_i , K_i' (constantes de inibição competitiva e não-competitiva respectivamente), K_m (constante de Michaelis-Menten) e $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima) foram calculados com auxílio do programa Graphpad Prism 8.0.1 usando modelos de regressão não linear para cinética enzimática - inibição e cinética enzimática - substrato versus velocidade.

5.2.2. Afinidade nos receptores de histamina H_3 realizado na Universidade Heinrich Heine, Düsseldorf, Alemanha (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2017)

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, $4^\circ C$) e homogeneizadas com um homogeneizador Ultra-Turrax® em tampão de ligação H_3R resfriado no gelo (12,5 mM de 147 $MgCl_2$, 100 mM de NaCl e 75 mM de Tris/HCl, pH 7,4). O homogenato de membrana celular foi centrifugado ($20.000 \times g$, 20 min, $4^\circ C$), e o sedimento (pellet) obtido foi ressuspensão no tampão de ligação e armazenado a $-80^\circ C$ até o uso (Kottke et al., 2011).

Antes dos experimentos, as membranas celulares foram descongeladas, homogeneizadas por sonicação a $4^\circ C$ 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 $25^\circ C$), 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).

5.2.3. Avaliação dos Derivados Quanto à Atividade inibitória MAO A/B realizado na Universidade Heinrich Heine, Düsseldorf, Alemanha (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2017)

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 CI_{50} 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 CI_{50} foram calculados a partir das taxas de reação com variação da concentração do inibidor, na presença de concentração de substrato $2 \times K_m$, 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 148 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.

5.2.3. Avaliação de neurotoxicidade frente as células de neuroblastoma SH-SY5Y realizado na Universidade Heinrich Heine, Düsseldorf, Alemanha (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2017)

A linhagem celular neuroblastoma dopaminérgico humano SH-SY5Y (Sigma-Aldrich) foram mantidas em uma mistura 1:1 do *Nutrient Mixture F-12* e *Eagle's minimum essential medium* (EMEM), suplementados com 15 aminoácidos não essenciais, 1 mM de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Os cultivos foram semeados em frascos contendo meio suplementado e mantidos a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ e 95% de ar. Para os ensaios, as células SH-SY5Y foram subcultivadas em placas de 96 poços, com densidade de semeadura de 5×10^4 células por poço, na presença ou ausência dos compostos em diferentes concentrações, por 24 h.

5.2.4. Ensaio de MTT e viabilidade celular realizado na Universidade Heinrich Heine, Düsseldorf, Alemanha (BAUTISTA-AGUILERA et al., 2017)

A viabilidade celular foi medida por ensaio colorimétrico quantitativo utilizando 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio brometo (MTT) (Sigma-Aldrich). Resumidamente, ao final do período de incubação, adicionaram-se 10 µL do reagente de marcação MTT a cada poço, obtendo-se uma concentração final de 0,5 mg/mL. Em seguida, a placa foi incubada por 1 h em estufa úmida a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar (v/v). Após esse período, o meio de cultura foi removido e o formazano insolúvel foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO). A redução do MTT foi determinada

colorimetricamente pela leitura da absorbância em 540 nm. As células-controle tratadas apenas com MEM/F12 foram consideradas como 100% de viabilidade.

5.3. Modelagem Molecular

Inicialmente, todos os compostos finais foram submetidos à minimização energética realizada com o método semi-empírico PM6, empregando o software Spartan Pro (versão 14.0). As estruturas minimizadas foram então preparadas para o estudo de ancoramento molecular (*docking*) contra as proteínas alvo cujos códigos no Protein Data Bank (PDB) estão listados na Tabela 14. Os estudos de docking foram conduzidos com o programa GOLD (versão 5.6, CCDC). Para cada complexo enzima/receptor–ligante definiu-se a região de ligação com base no sítio ativo ou no ligante co-cristalizado (conforme indicado na Tabela 14) e foram geradas múltiplas conformações de ligação por ligante. As melhores soluções foram selecionadas considerando o valor da função de pontuação fornecida pelo GOLD, a reprodutibilidade entre múltiplas execuções e a concordância com interações de referência (por exemplo, ligações de hidrogênio, interações π – π e contatos hidrofóbicos) observadas para ligantes conhecidos. As análises detalhadas das interações para os ensaios de atividade colinesterásica, MAO-B e interação com o receptor H₃ são sumarizadas na tabela abaixo. As soluções selecionadas com maiores scores foram analisadas visualmente e submetidas a análises complementares, como estabilidade conformacional e interações importantes nos sítios.

Tabela 14. Principais dados obtidos no docking molecular no programa GOLD (versão 5.6, CCDC)

INTERAÇÃO	PDB ID	FUNÇÃO	Ligante	Referência
Receptor Histamina H ₃	7F61	ChemPLP	PF0365474	No sítio do ligante PF0365474
Acetilcolinesterase	1C2O	GoldScore	Dímero Bis-tacrina	638 (Tyr 86)
MAO-B	2V60	Chemscore	Derivado cumarínico	No sítio do ligante

6. REFERÊNCIAS

- ADENIJI, A. O.; ADAMS, P. W.; MODY, V. V. Amyloid β hypothesis in the development of therapeutic agents for Alzheimer's disease. In: **Drug discovery approaches for the treatment of neurodegenerative disorders**. Academic Press, 2017. p. 109-143.
- AHMED, Adnan; MUSHTAQ, Irfan; CHINNAM, Sampath. Suzuki–Miyaura cross-couplings for alkyl boron reagent: recent developments—a review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 67, 2023.
- ALFANO, Antonella Ilenia; BARONE, Simona; BRINDISI, Margherita. Flow Chemistry for Flowing Cross-Couplings: A Concise Overview. **Organic Process Research & Development**, v. 29, n. 2, p. 281-298, 2025.
- ALI, Rouchan; GUPTA, Ghanshyam Das; CHAWLA, Pooja A. Aducanumab: A new hope in Alzheimer's Disease. **Health Sciences Review**, v. 4, p. 100039, 2022.
- ALMAGHRABI, Mohammed. Multitarget-directed ligands for Alzheimer's disease: Recent novel MTDLs and mechanistic insights. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 11, p. 1685, 2025.
- ALZ. ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2025 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 15, n. 3, p. 321-387, 2019. Acesso em 26/09/2025
- ASHISH, Anchal Singh; YADAV, Ajay Kumar; SINGH, Royana. Influence of crucial risk factor to developing Alzheimer disease.
- BAUTISTA-AGUILERA, Oscar M. et al. Contilisant, a tetratarget small molecule for Alzheimer's disease therapy combining cholinesterase, monoamine oxidase inhibition, and H3R antagonism with S1R agonism profile. **Journal of medicinal chemistry**, v. 61, n. 15, p. 6937-6943, 2018.
- BAUTISTA-AGUILERA, Oscar M. et al. Contilisant, a tetratarget small molecule for Alzheimer's disease therapy combining cholinesterase, monoamine oxidase inhibition, and H3R antagonism with S1R agonism profile. **Journal of medicinal chemistry**, v. 61, n. 15, p. 6937-6943, 2018.
- BOOTSMA, Andrea N.; DONEY, Analise C.; WHEELER, Steven E. Predicting the strength of stacking interactions between heterocycles and aromatic amino acid side chains. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 28, p. 11027-11035, 2019.
- BUCCELLATO, Francesca Romana et al. Role of oxidative damage in Alzheimer's disease and neurodegeneration: From pathogenic mechanisms to biomarker discovery. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, p. 1353, 2021.
- 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, 2020.

BUSKES, Melissa J.; BLANCO, Maria-Jesus. Impact of cross-coupling reactions in drug discovery and development. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3493, 2020.

CHEN, Zhichun; ZHONG, Chunjiu. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neuroscience bulletin**, v. 30, n. 2, p. 271-281, 2014.

CLAYDEN, Jonathan; GREEVES, Nick; WARREN, Stuart. **Organic chemistry**. Oxford university press, 2012.

COPELAND, Robert A. **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists**. John Wiley & Sons, 2013.

CUMMINGS, Jeffrey et al. Anti-amyloid monoclonal antibodies for the treatment of Alzheimer's disease. **BioDrugs**, v. 38, n. 1, p. 5, 2023

DARRAS, Fouad H. et al. Synthesis, biological evaluation, and computational studies of Tri- and tetracyclic nitrogen-bridgehead compounds as potent dual-acting AChE inhibitors and h H3 receptor antagonists. **ACS chemical neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 225-242, 2014.

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

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

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

DHAPOLA, Rishika et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease: current knowledge of signaling pathways and therapeutics. **Molecular biology reports**, v. 51, n. 1, p. 48, 2024.

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

DO, Khue U.; CONNER, Audrey V.; WHEELER, Steven E. Making Sense of Heteroatom Effects in π - π Interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 147, n. 35, p. 32273-32286, 2025.

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

ERTL, Peter; ROHDE, Bernhard; SELZER, Paul. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3714-3717, 2000.

FERREIRA, Larissa AP et al. Imidazo [1, 2-a] pyridines in Medicinal Chemistry: Recent Advances in Synthesis and Biological Activities. **ACS Omega**, 2026.

FERREIRA, Larissa de Almeida Peixoto et al. Síntese e avaliação farmacológica de novas 3-(imidazo [1, 2- α] piridinas)-cumarinas planejadas para o tratamento da Doença de Alzheimer. 2021.

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

FLANAGAN, Colleen A. GPCR-radioligand binding assays. In: **Methods in cell biology**. Academic Press, 2016. p. 191-215.

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

FRANCIS, Paul T. The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease. **CNS spectrums**, v. 10, n. S18, p. 6-9, 2005.

FRANCIS, Paul T. The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease. **CNS spectrums**, v. 10, n. S18, p. 6-9, 2005.

FRANCO, et al. A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. *Química Nova JCR*, V. 44, P. 180-197, 2020

GAO, Jie et al. Design and synthesis of ranitidine analogs as multi-target directed ligands for the treatment of alzheimer's disease. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 6, p. 3120, 2021.

GHAMARI, Nakisa et al. Histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists: Where do they go?. **Pharmacology & therapeutics**, v. 200, p. 69-84, 2019.

GHAMARI, Nakisa et al. Histamine H3 receptor ligands by hybrid virtual screening, docking, molecular dynamics simulations, and investigation of their biological effects. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 93, n. 5, p. 832-843, 2019.

Ghasemi, M.; *et al.* The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci.* 2021, 22(23): 12827.

GURAM, Anil S.; BUCHWALD, Stephen L. Palladium-catalyzed aromatic aminations with in situ generated aminostannanes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 17, p. 7901-7902, 1994.

HENEKA, Michael T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388-405, 2015.

HOBSON, Pat. Different stages and types of dementia. In: **Enabling people with dementia:**

Understanding and implementing person-centred care. Cham: Springer Nature Switzerland, 2025. p. 63-70.

HU, Yu-Heng et al. Synthesis and biological evaluation of 3-(4-aminophenyl)-coumarin derivatives as potential anti-Alzheimer's disease agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 1083-1092, 2019.

JONES, Aaron et al. Environmental risk factors for all-cause dementia, Alzheimer's disease dementia, vascular dementia, and mild cognitive impairment: An umbrella review and meta-analysis. **Environmental research**, v. 270, p. 121007, 2025.

KAMILA, Pritam et al. Effect of neuroinflammation on the progression of Alzheimer's disease and its significant ramifications for novel anti-inflammatory treatments. **IBRO Neuroscience Reports**, v. 18, p. 771-782, 2025.

KENNEDY, Matthew E. et al. The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS β -amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients. **Science translational medicine**, v. 8, n. 363, p. 363ra150-363ra150, 2016.

KIM, Aaron Y. et al. Alzheimer's disease and its treatment—yesterday, today, and tomorrow. **Frontiers in pharmacology**, v. 15, p. 1399121, 2024.

KOWALCZYK, Paweł et al. Mitochondrial oxidative stress—a causative factor and therapeutic target in many diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 24, p. 13384, 2021.

KRAEPELIN, Emil. **Psychiatrie : ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte.** [S.l.]: Leipzig : Barth, 1915.

LAMPTEY, Richard NL et al. A review of the common neurodegenerative disorders: current therapeutic approaches and the potential role of nanotherapeutics. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 3, p. 1851, 2022.

LAN, Yu et al. Synthesis and biological evaluation of novel sigma-1 receptor antagonists based on pyrimidine scaffold as agents for treating neuropathic pain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 24, p. 10404-10423, 2014.

LAZAREV, Vladimir F. et al. Protein interactome of amyloid- β as a therapeutic target. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 2, p. 312, 2023.

ŁAŻEWSKA, Dorota et al. Multitargeting histamine H3 receptor ligands among acetyl- and propionyl-phenoxyalkyl derivatives. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2349, 2023.

ŁAŻEWSKA, Dorota; KIEĆ-KONONOWICZ, Katarzyna. New developments around histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists: a patent review (2010–present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 1, p. 89-111, 2014.

LV, Yangjing et al. Monoamine oxidase B inhibitors based on natural privileged scaffolds: A review of systematically structural modification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 251, p. 126158, 2023.

MAGUIRE, Janet J.; KUC, Rhoda E.; DAVENPORT, Anthony P. Radioligand binding assays and their analysis. In: **Receptor binding techniques**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. p. 31-77.

MAH, Dylan et al. The sulfation code of tauopathies: heparan sulfate proteoglycans in the prion like spread of tau pathology. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 671458, 2021.

MAJUMDER, P. L.; MAJUMDER, Suman. Further Evidence for the Mechanism of Formation of Coumarin by Perkin Reaction from salicylaldehyde and a Novel Synthesis of 1, 1-diphenyl-2 (2'-hydroxyphenyl) ethene from O- α , α -diphenylacetylsalicylaldehyde with Et₃N. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 28, p. 572-578, 1993.

MEDEIROS, Liana Marengo de. Diferenciação colinérgica da linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y e seu uso como modelo in vitro da Doença de Alzheimer. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024. <<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 26/09/2025

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

MORALES, Inelia et al. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. Santiago, Chile: **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2014.

HENEKA, Michael T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388-405, 2015.

NADUR, Nathalia F. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Multitarget 7-Alcoxyamino-3-(1, 2, 3-triazole)-coumarins as Potent Acetylcholinesterase Inhibitors. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 9, p. 1398, 2025.

ONYANGO, Isaac G. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Biomedicines**, v. 9, n. 5, p. 524, 2021.

PATHAK, Chandni; KABRA, Uma D. A comprehensive review of multi-target directed ligands in the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic Chemistry**, v. 144, p. 107152, 2024.

PAUL, Frederic; PATT, Joe; HARTWIG, John F. Palladium-catalyzed formation of carbon-nitrogen bonds. Reaction intermediates and catalyst improvements in the hetero cross-coupling

of aryl halides and tin amides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 13, p. 5969-5970, 1994.

PHAKHODEE, Wong et al. Ph₃P/I₂-mediated synthesis of 3-aryl-substituted and 3, 4-disubstituted coumarins. **Synlett**, v. 28, n. 07, p. 825-830, 2017.

PRATI, Federica; CAVALLI, Andrea; BOLOGNESI, Maria Laura. Navigating the chemical space of multitarget-directed ligands: from hybrids to fragments in Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 466, 2016.

PU, Wenchen et al. 3-Arylcoumarins: synthesis and potent anti-inflammatory activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 23, p. 5432-5434, 2014.

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, 2024.

RAHMANI-NEZHAD, Samira et al. Synthesis and evaluation of coumarin–resveratrol hybrids as 15-lipoxygenase inhibitors. **Synthetic Communications**, v. 45, n. 6, p. 741-749, 2015.

RAWAT, Priyanka et al. Phosphorylated tau in Alzheimer's disease and other tauopathies. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 21, p. 12841, 2022.

REZAEI, Ramin; FARJAM, Mohammad Hossein; FARASAT, Maryam. Coumarin synthesis via Pechmann condensation utilizing starch sulfuric acid as a green and efficient catalyst under solvent-free conditions. **Org. Chem. Indian J**, v. 10, p. 73-78, 2014.

SALLOWAY, S. et al. A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease. **Neurology**, v. 77, n. 13, p. 1253-1262, 2011.

SANDOVAL, Pedro Jimenez; SANTIAGO, Julia. In vitro analytical approaches to study plant ligand-receptor interactions. **Plant physiology**, v. 182, n. 4, p. 1697-1712, 2020.

SBGG. Sociedade brasileira de geriatria e gerontologia. Disponível em: <<https://sbgg.org.br/em-dia-mundial-do-alzheimer-dados-ainda-sao-subestimados-apesar-de-avancos-no-diagnostico-e-tratamento-da-doenca/>>. Acesso em 26/09/2025

Segel, I. H. Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. **Wiley**, 1975.

SEHAR, Ujala et al. Amyloid beta in aging and Alzheimer's disease. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 21, p. 12924, 2022.

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

SHARMA, Amit et al. Recent advancements in the therapeutic approaches for Alzheimer's disease treatment: current and future perspective. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 652-693, 2025.

SHERWOOD, James et al. Solvent effects in palladium catalysed cross-coupling reactions. **Green Chemistry**, v. 21, n. 9, p. 2164-2213, 2019.

SOAVE, Mark et al. Fluorescent ligands: Bringing light to emerging GPCR paradigms. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 5, p. 978-991, 2020.

SOUZA, Gabriela Alves de. Síntese de compostos alquilamino-cumarínicos planejados como inibidores da acetilcolinesterase e agregação de placas β amiloides para o tratamento da doença de Alzheimer. 2018.

SUGINO, Teizo; TANAKA, Koichi. Solvent-free coumarin synthesis. **Chemistry Letters**, v. 30, n. 2, p. 110-111, 2001.

SZCZEPAŃSKA, Katarzyna et al. Structural and molecular insight into piperazine and piperidine derivatives as histamine H3 and sigma-1 receptor antagonists with promising antinociceptive properties. **ACS chemical neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2021.

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, 2024.

TALEVI, A. Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the “skeleton key approach” from a medicinal chemist. **Computational and Experimental Approaches in Multi-target Pharmacology**, p. 90, 2017.

TALEVI, Alan. Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the “skeleton key approach” from a medicinal chemist perspective. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 205, 2015.

TAMAGNO, Elena et al. Oxidative stress and beta amyloid in Alzheimer’s disease. Which comes first: the chicken or the egg?. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, p. 1479, 2021.

TENCHOV, Rumiana; SASSO, Janet M.; ZHOU, Qiongqiong Angela. Alzheimer’s disease: exploring the landscape of cognitive decline. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 15, n. 21, p. 3800-3827, 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, 2024.

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

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

VAZ, Miguel et al. Role of aducanumab in the treatment of Alzheimer's disease: Challenges and opportunities. **Clinical interventions in aging**, p. 797-810, 2022.

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

WEINSTOCK, Marta. Role of Oxidative Stress and Neuroinflammation in the Etiology of Alzheimer's Disease: Therapeutic Options. **Antioxidants**, v. 14, n. 7, p. 769, 2025.

WHO,2025 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> acessado em 04/04/2026

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021. <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>>. Acesso em 26/09/2025

YANG, Hyun Duk et al. History of Alzheimer's disease. **Dementia and neurocognitive disorders**, v. 15, n. 4, p. 115-121, 2016.

YANG, Zhenqi; ZOU, Yong; WANG, Lifeng. Neurotransmitters in prevention and treatment of Alzheimer's disease. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 4, p. 3841, 2023.

YANG, Zhenqi; ZOU, Yong; WANG, Lifeng. Neurotransmitters in prevention and treatment of Alzheimer's disease. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 4, p. 3841, 2023.

YASHAEVA, Leyla et al. Advancing Care in Alzheimer's Disease: Current Treatments and Their Impact on Quality of Life. **Cureus**, v. 17, n. 8, 2025.

ZHANG, Jifa et al. Recent advances in Alzheimer's disease: Mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 9, n. 1, p. 211, 2024.

ZHANG, Pengfei et al. Multi-target design strategies for the improved treatment of Alzheimer's disease. **European journal of medicinal chemistry**, v. 176, p. 228-247, 2019.

ZHANG, Qiang et al. Natural source, bioactivity and synthesis of 3-Arylcoumarin derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 1023-1042, 2022.

ZHANG, Yuhan; LIANG, Yuan; GU, Yixue. The dopaminergic system and Alzheimer's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 20, n. 9, p. 2495-2512, 2025.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO 2 - ESPECTROS DE RMN DE ^1H e ^{13}C

Figura S1. Espectro de RMN ^1H do composto (**44a**) em CDCl_3 a 500 MHz

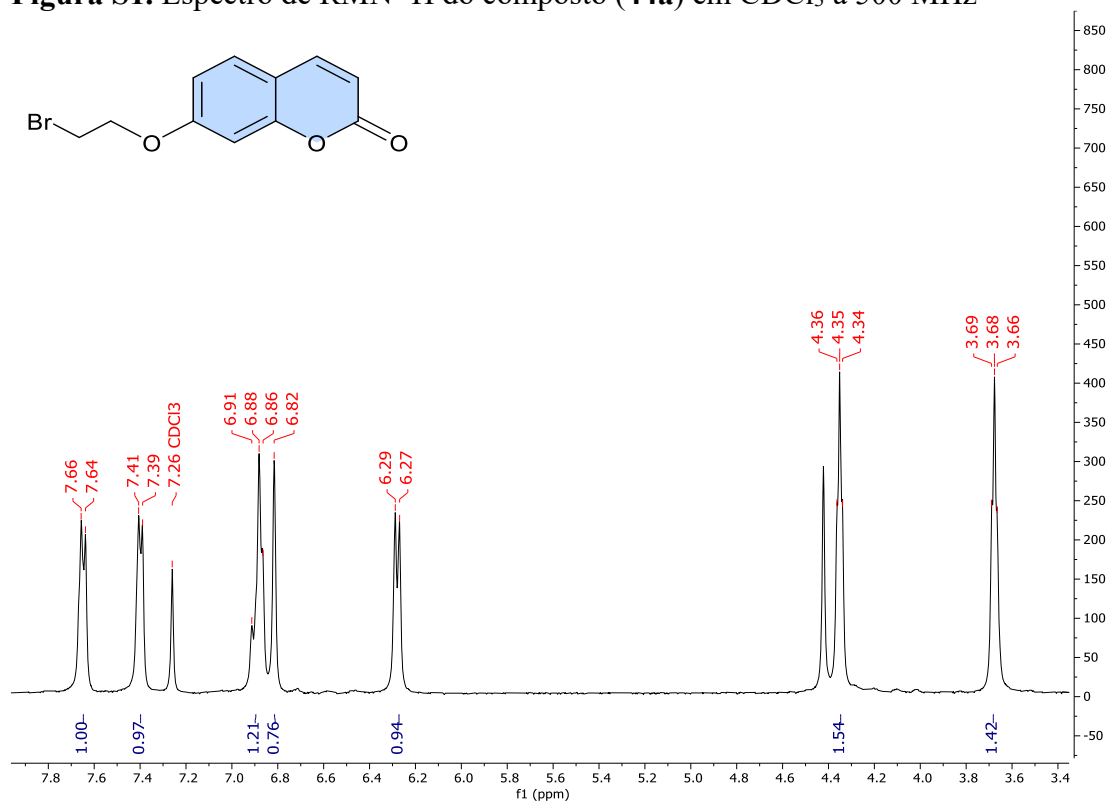


Figura S2. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**44a**) em CDCl_3 a 125 MHz

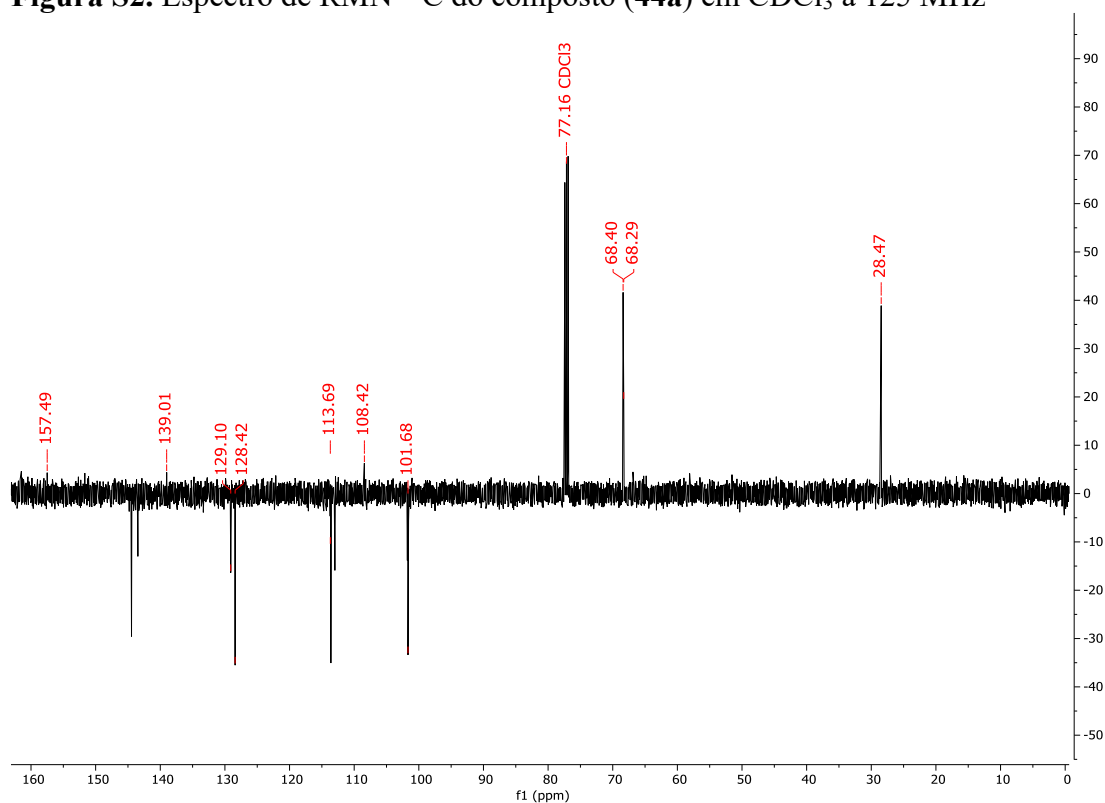


Figura S3. Espectro de RMN ^1H do composto (**44b**) em CDCl_3 a 500 MHz

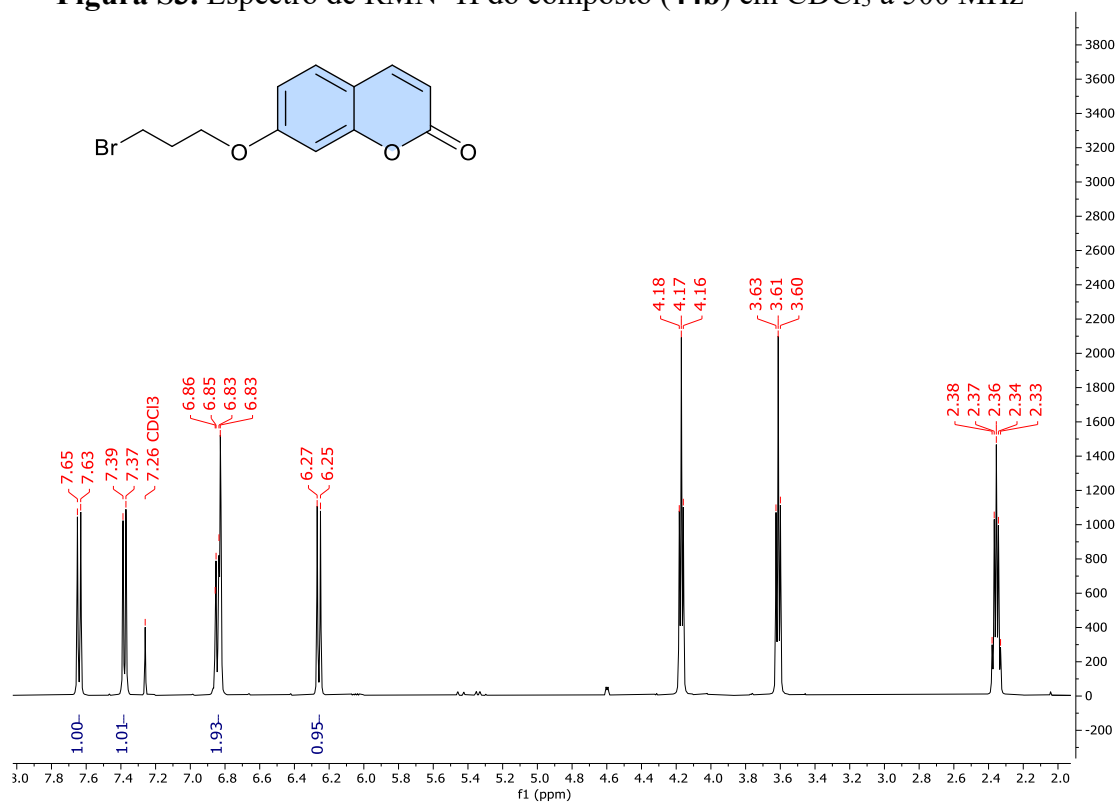


Figura S4. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**44b**) em CDCl_3 a 125 MHz

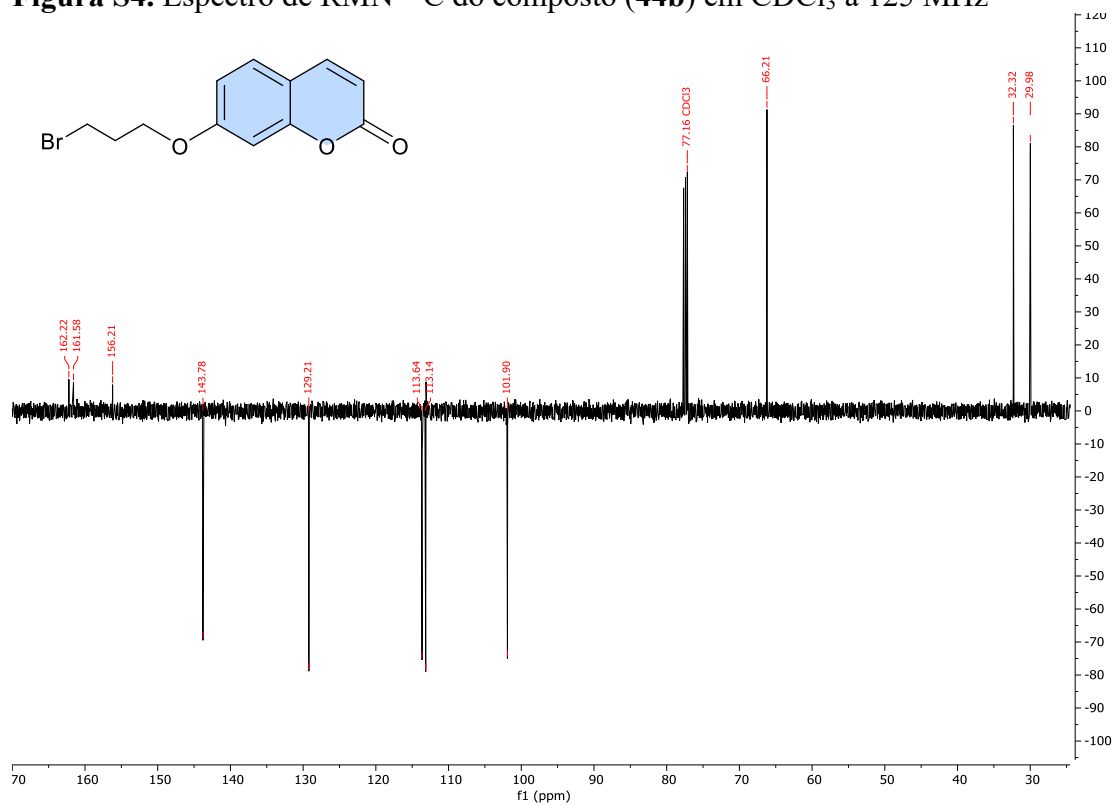


Figura S5. Espectro de RMN ^1H do composto (**48a**) em CDCl_3 a 500 MHz

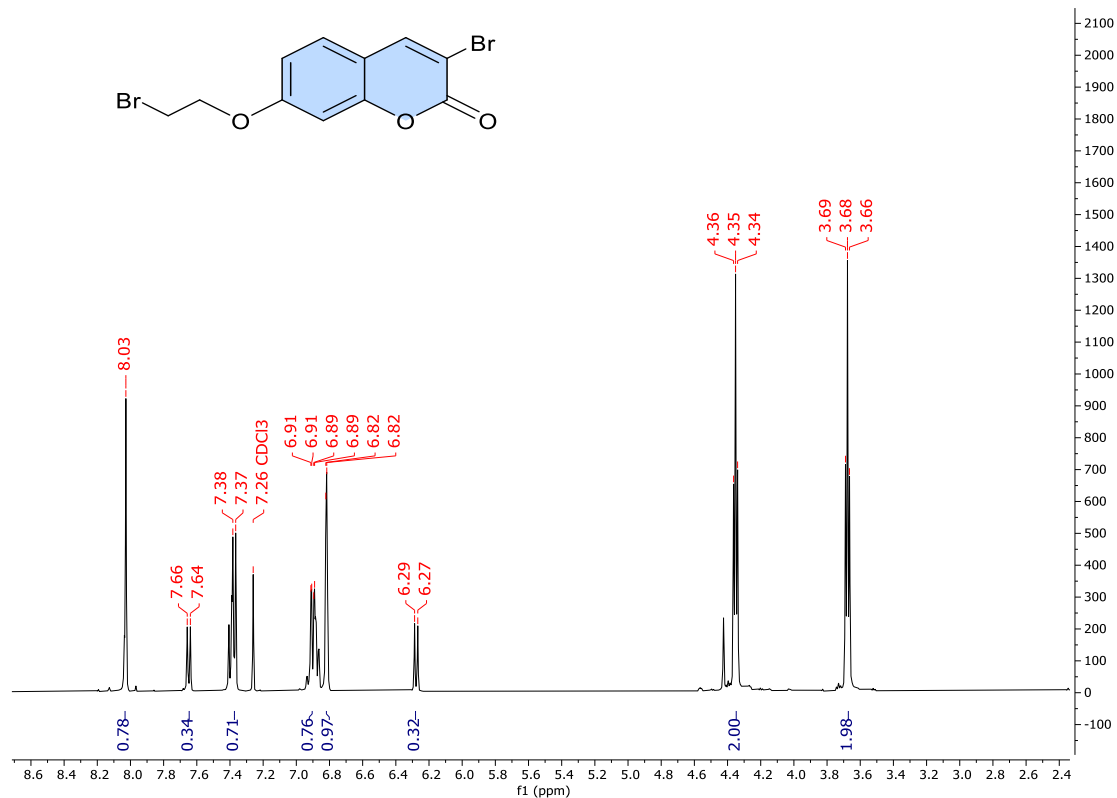


Figura S6. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**48a**) em CDCl_3 a 125 MHz

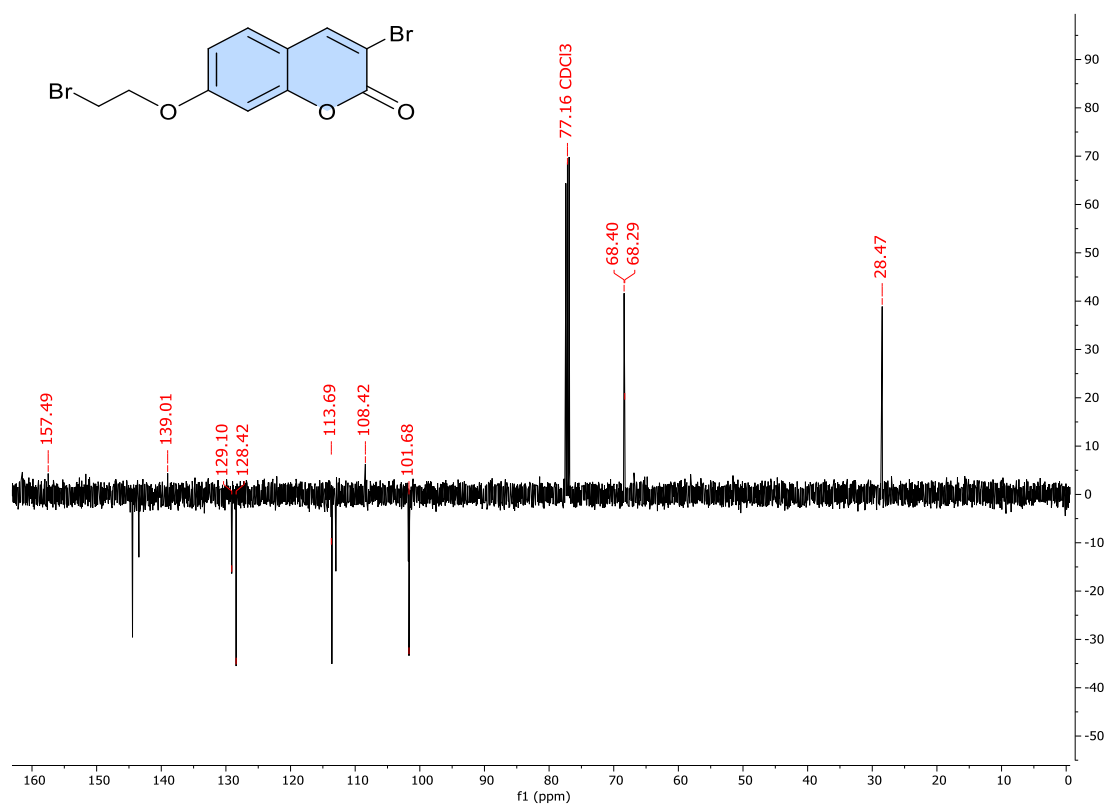


Figura S7. Espectro de RMN ^1H do composto (**48b**) em CDCl_3 a 500 MHz

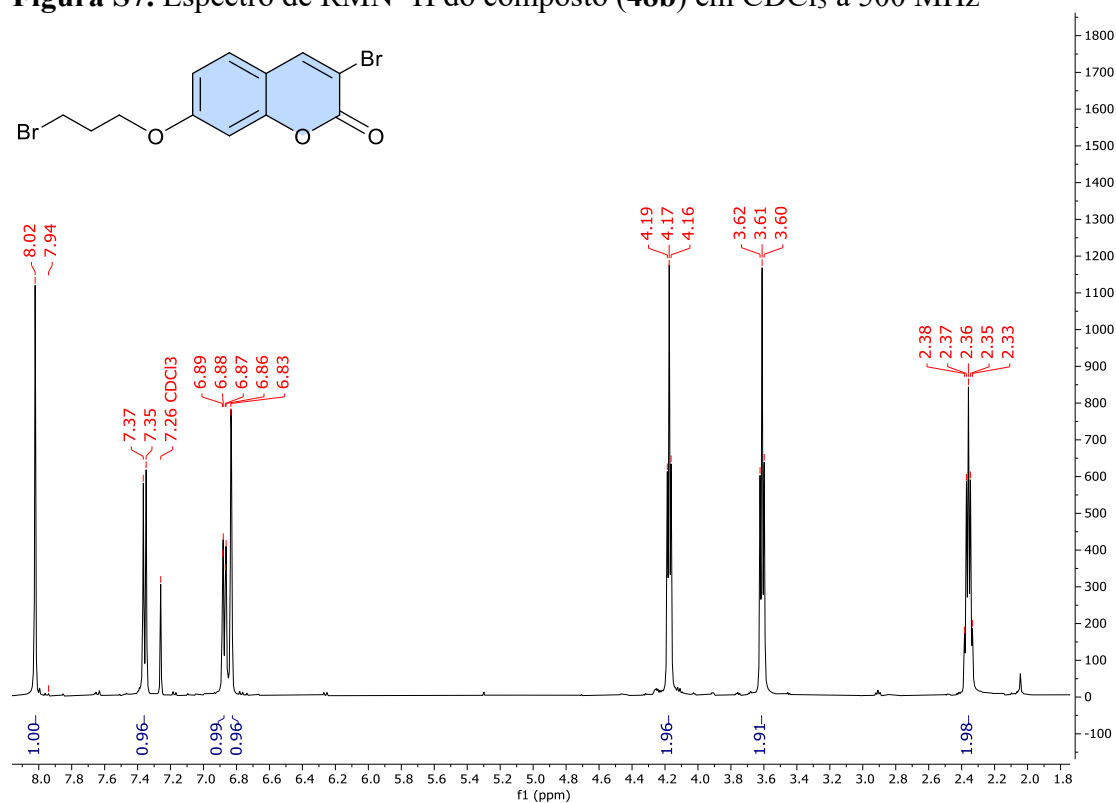


Figura S8. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**48b**) em a 125 MHz

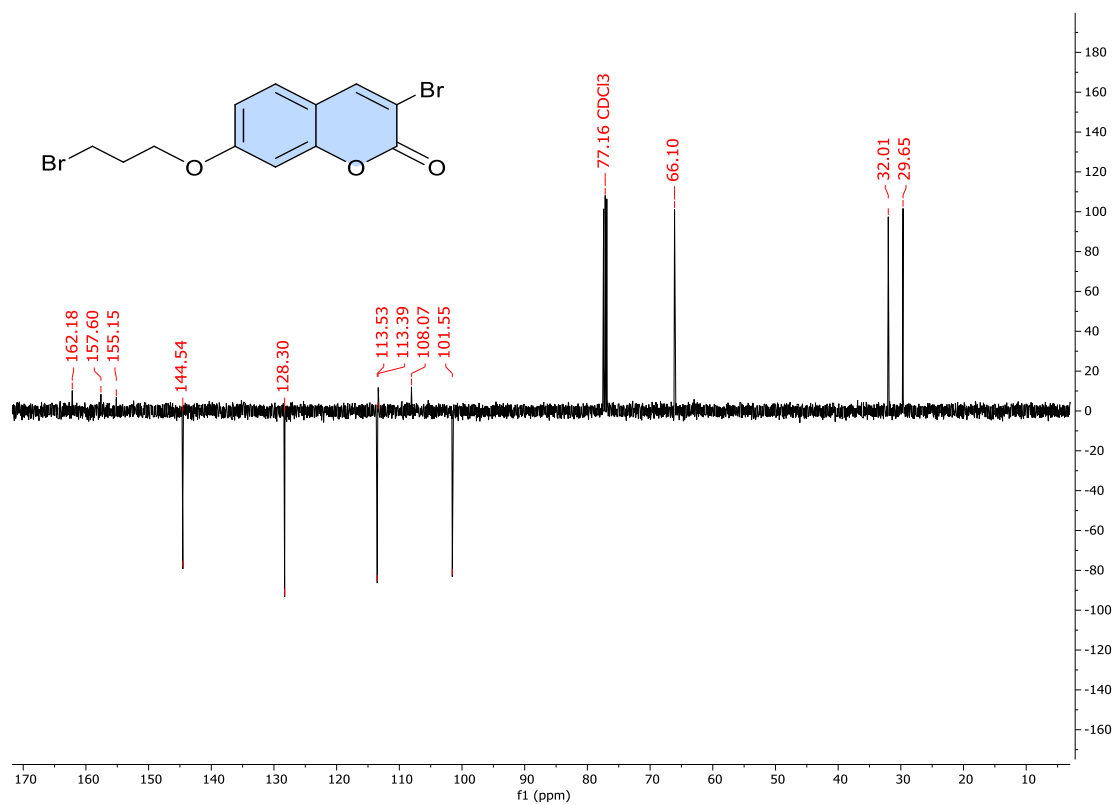


Figura S9. Espectro de RMN ^1H do composto (**50a**) em CDCl_3 a 500 MHz

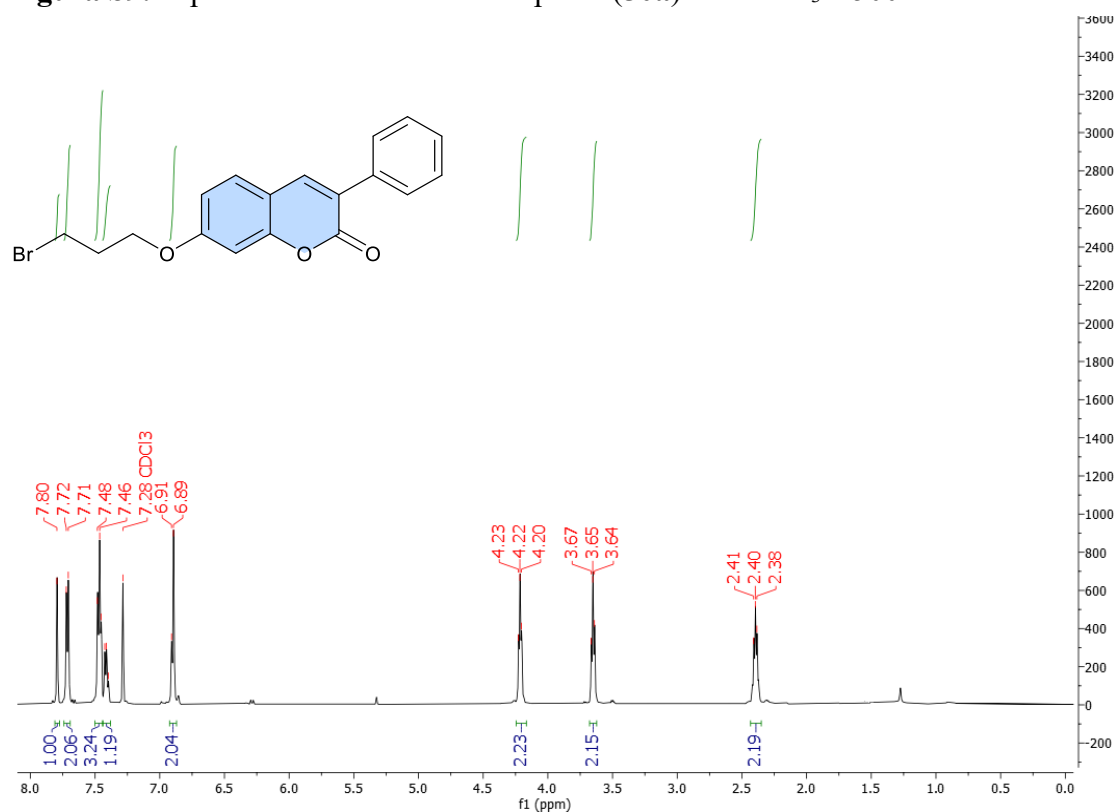


Figura S10. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**509**) em CDCl_3 a 125 MHz



Figura S11. Espectro de RMN ^1H do composto (**50b**) em CDCl_3 a 500 MHz

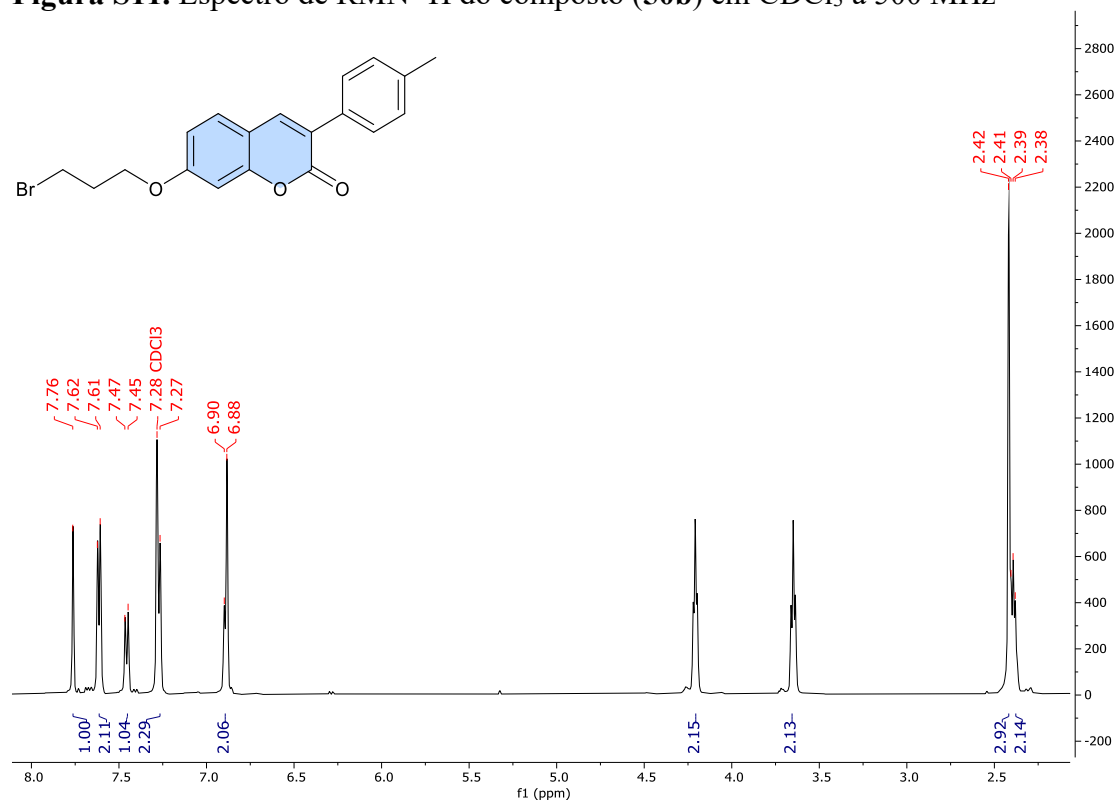


Figura S12. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50b**) em CDCl_3 a 125 MHz

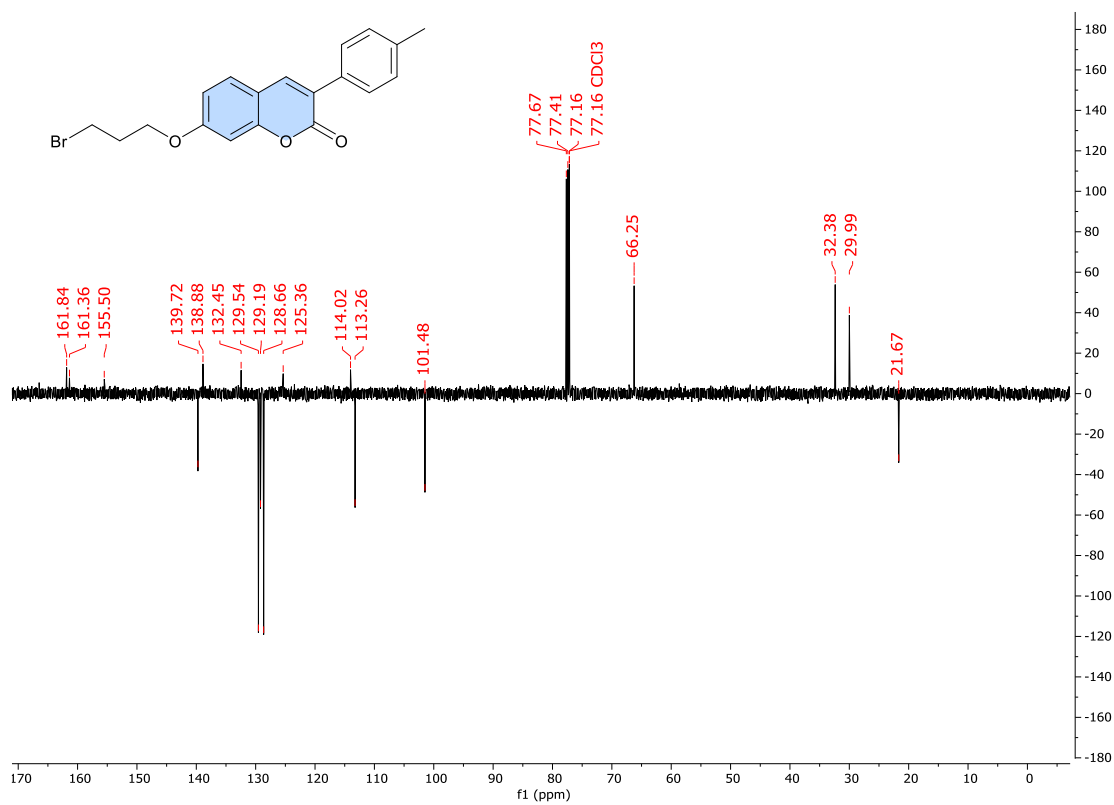


Figura S13. Espectro de RMN ^1H do composto (**50c**) em CDCl_3 a 500 MHz

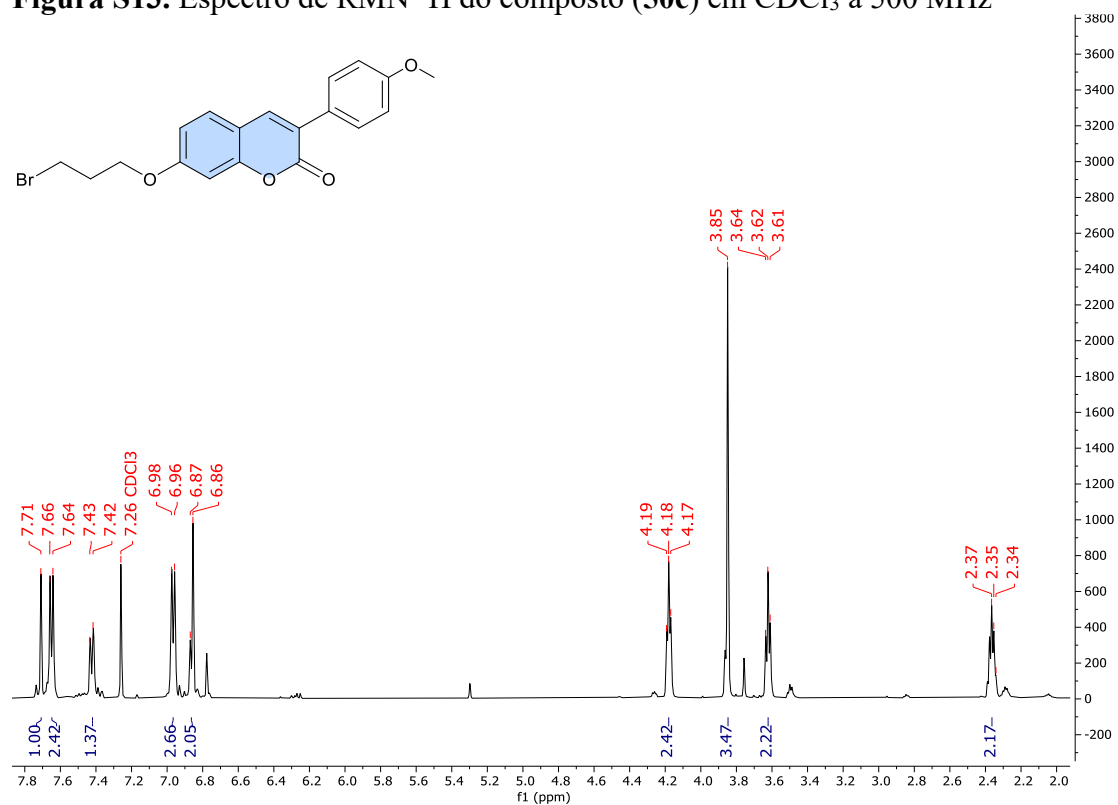


Figura S14. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50c**) em CDCl_3 a 125 MHz

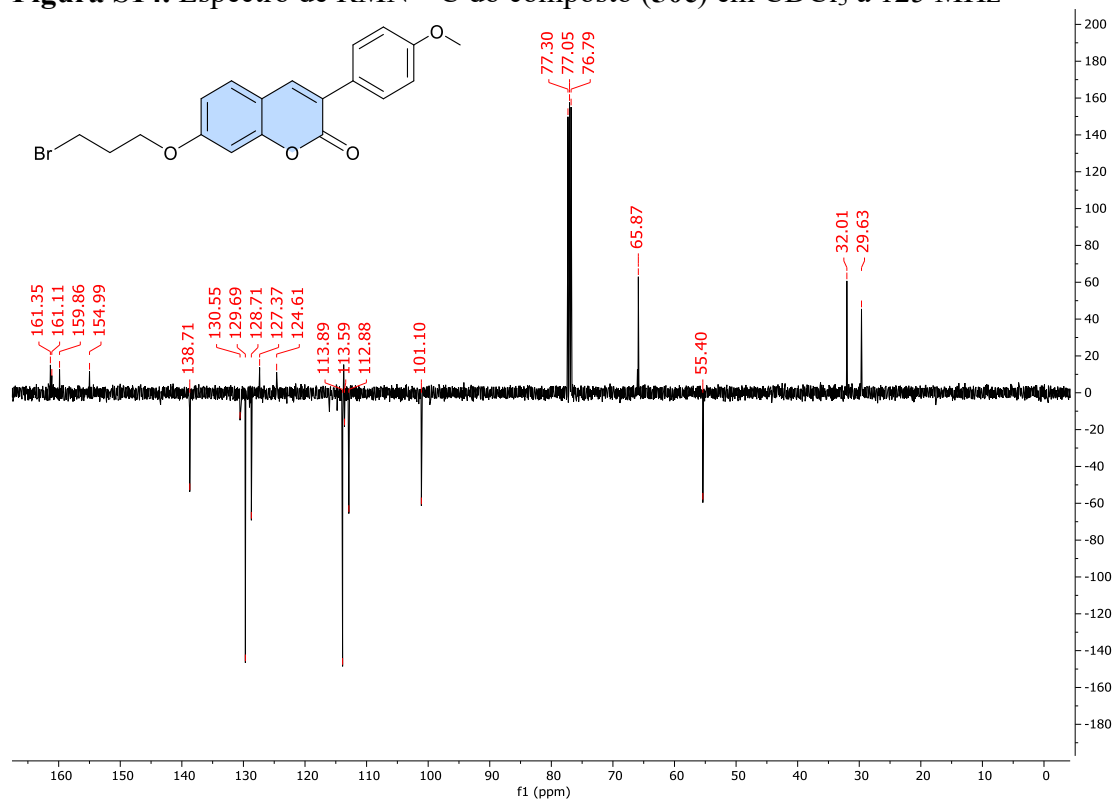


Figura S15. Espectro de RMN ^1H do composto (**50d**) em CDCl_3 a 500 MHz

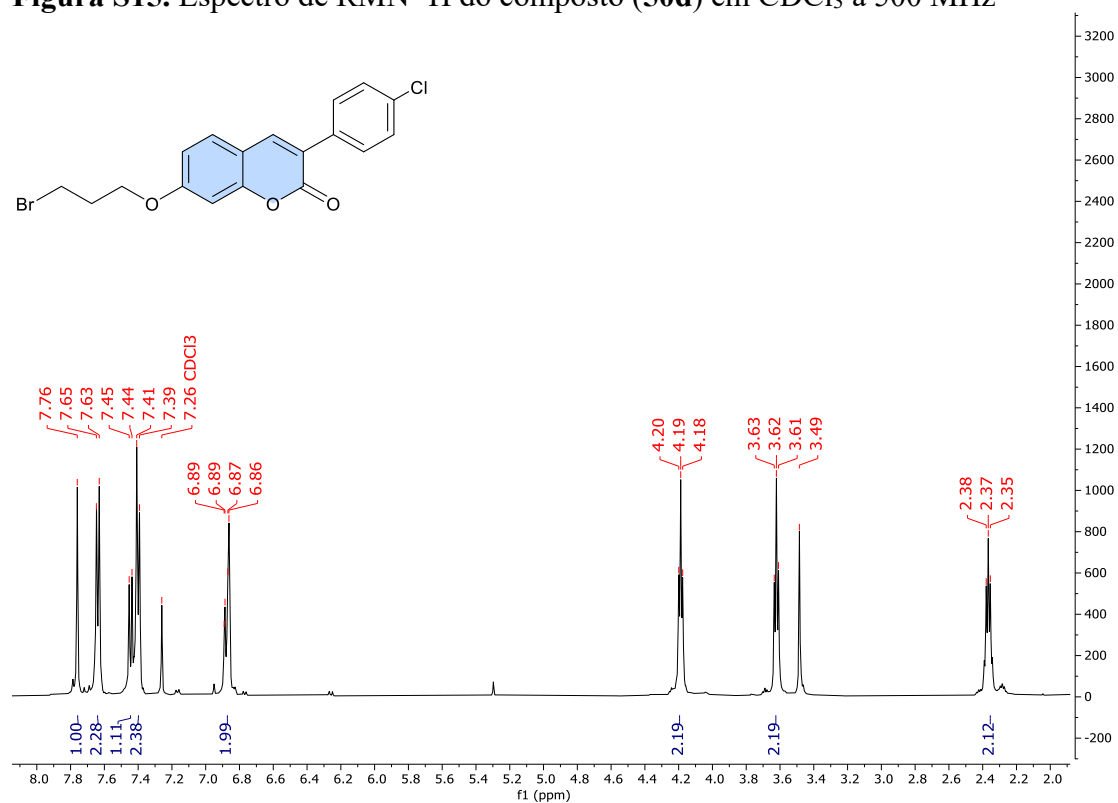


Figura S16. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50d**) em CDCl_3 a 125 MHz

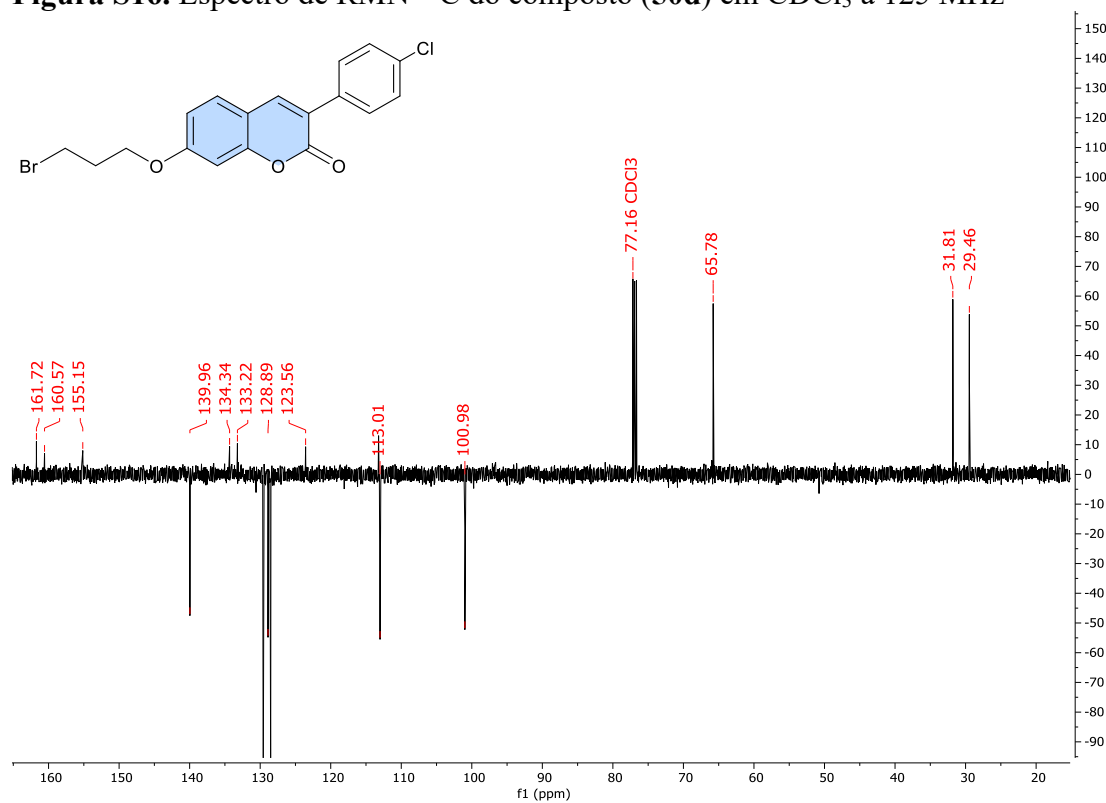


Figura S17. Espectro de RMN ^1H do composto (**50e**) em DMSO- d_6 a 500 MHz

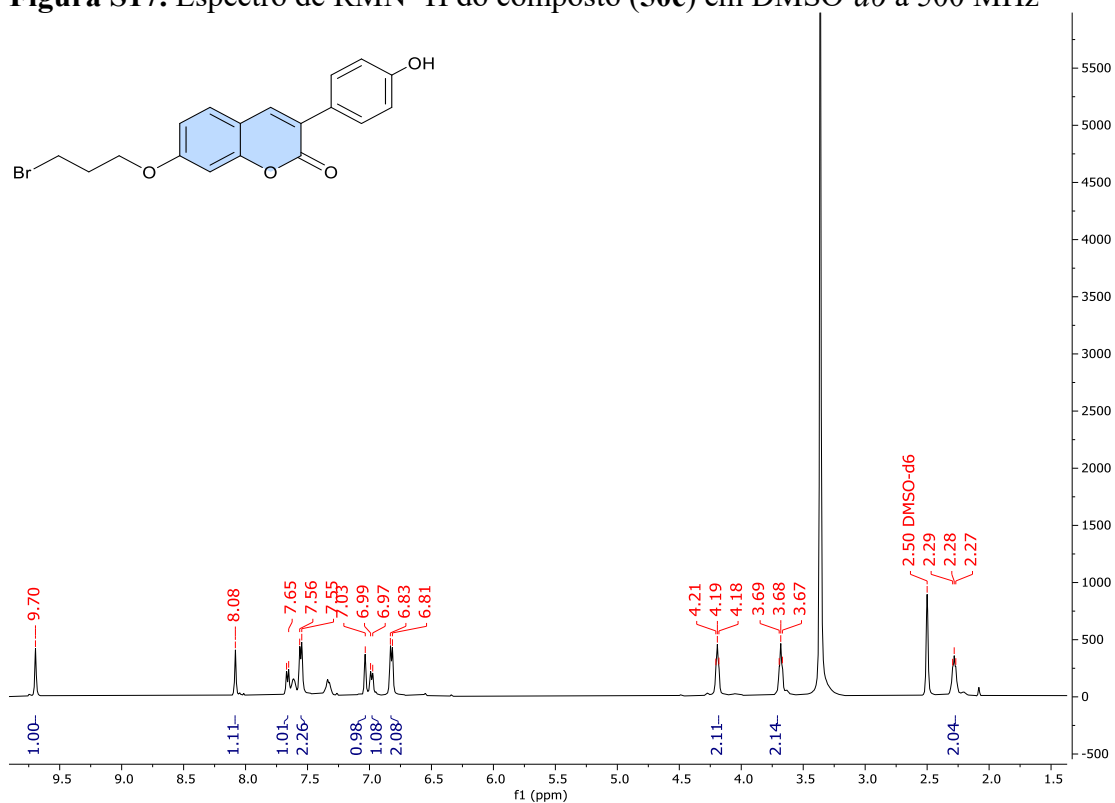


Figura S18. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50e**) em DMSO- d_6 a 125 MHz

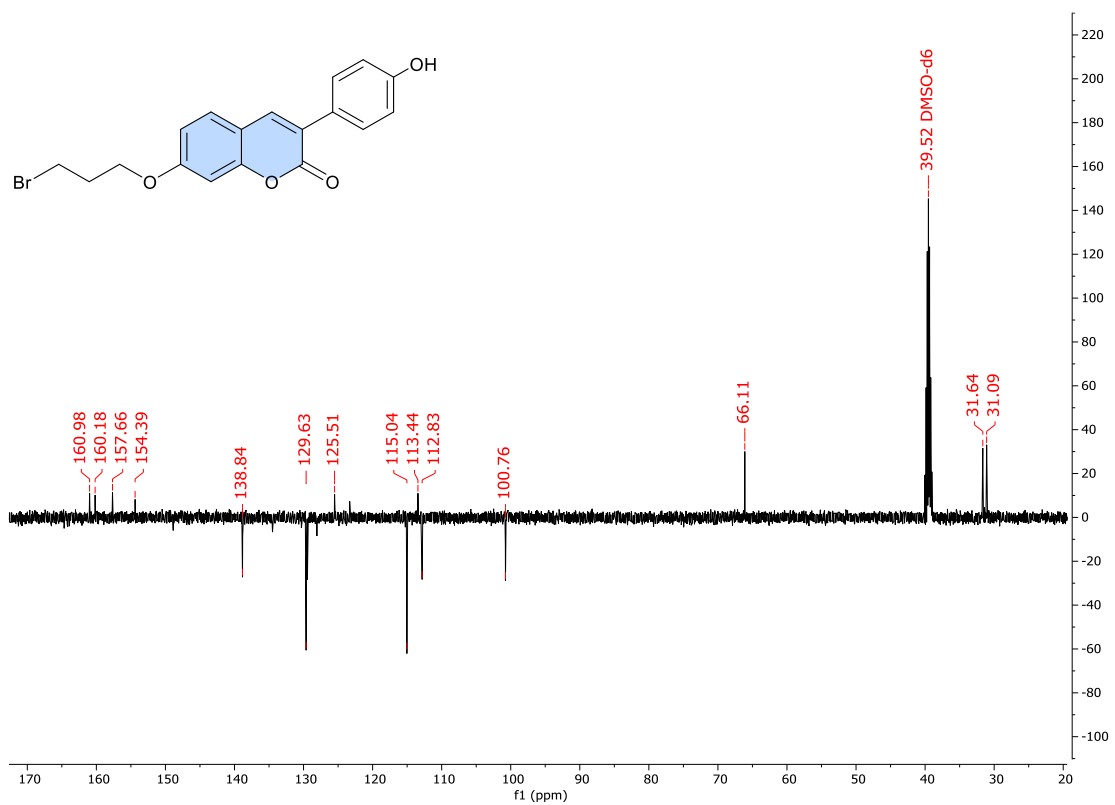


Figura S19. Espectro de RMN ^1H do composto (**50f**) em CDCl_3 a 500 MHz

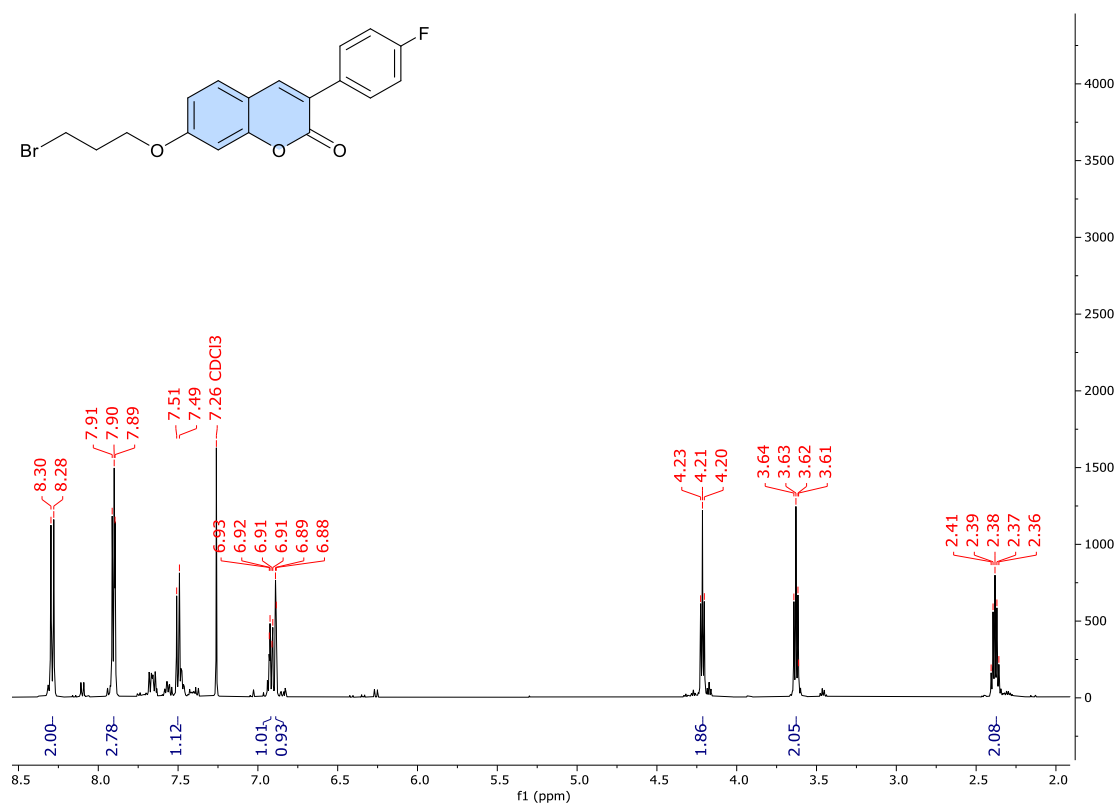


Figura S20. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50f**) em CDCl_3 a 125 MHz

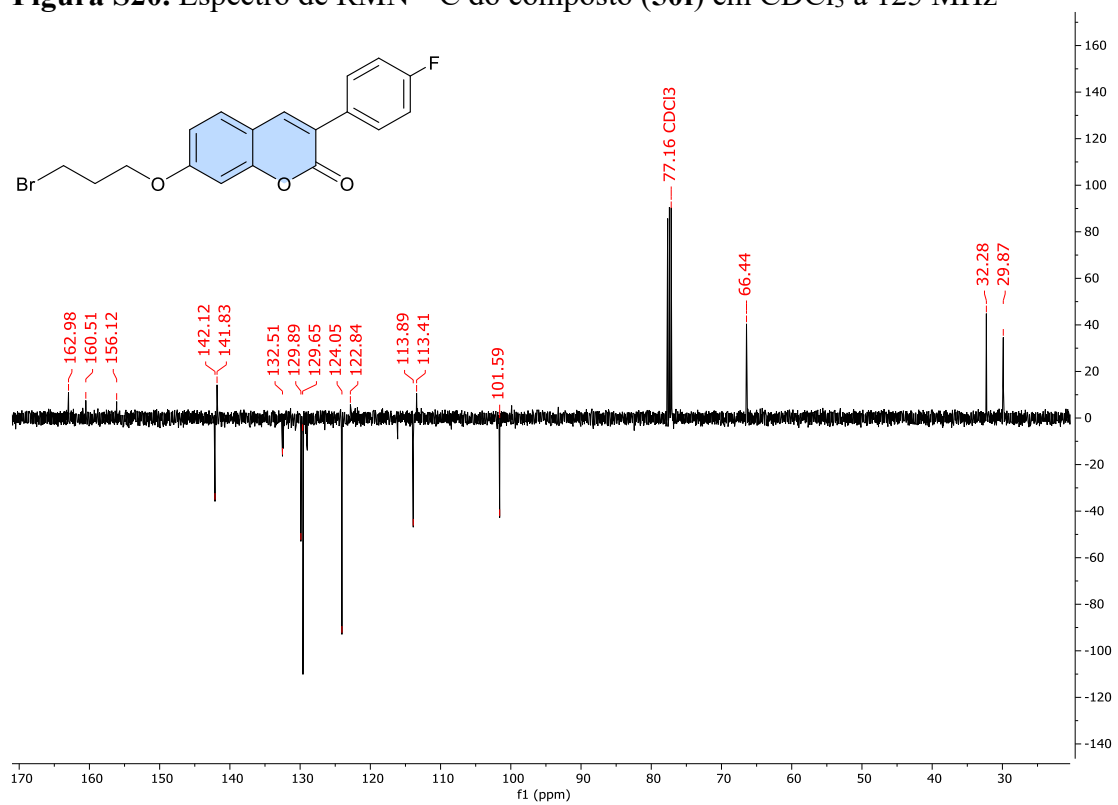


Figura S21. Espectro de RMN ^1H do composto (**50g**) em CDCl_3 a 500 MHz

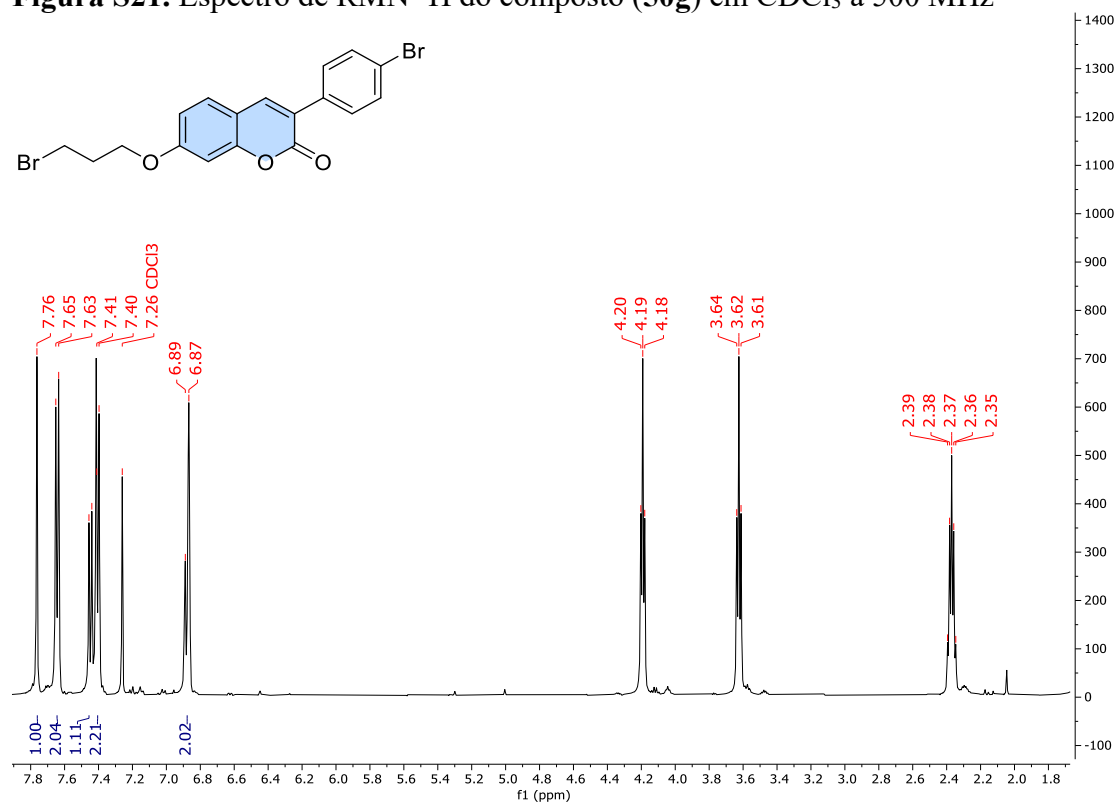


Figura S22. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50g**) em CDCl_3 a 125 MHz

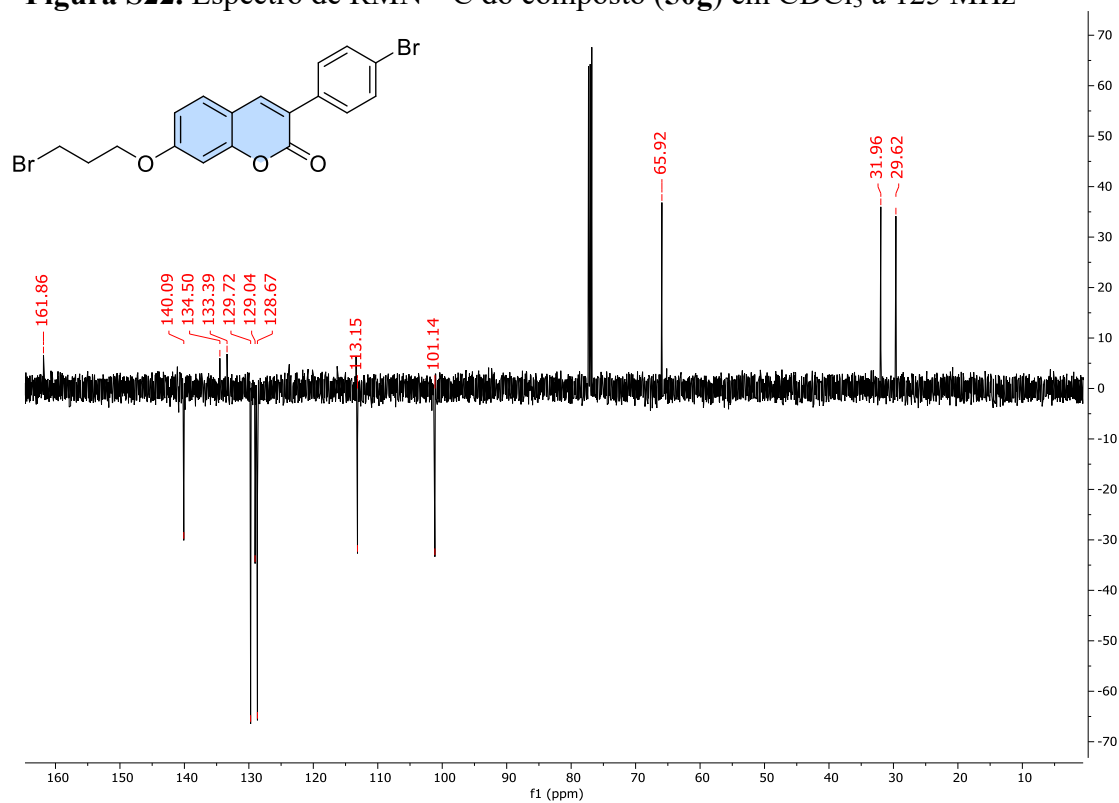


Figura S23. Espectro de RMN ^1H do composto (**50h**) em CDCl_3 a 500 MHz

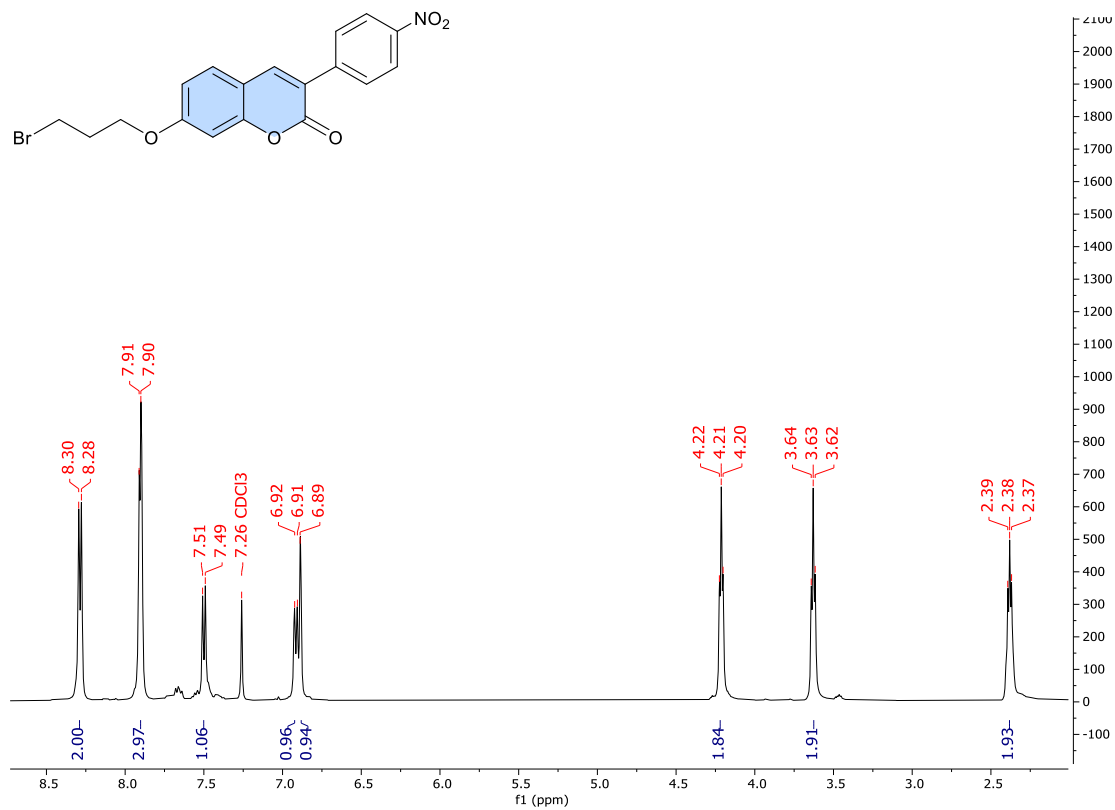


Figura S24. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50h**) em CDCl_3 a 125 MHz

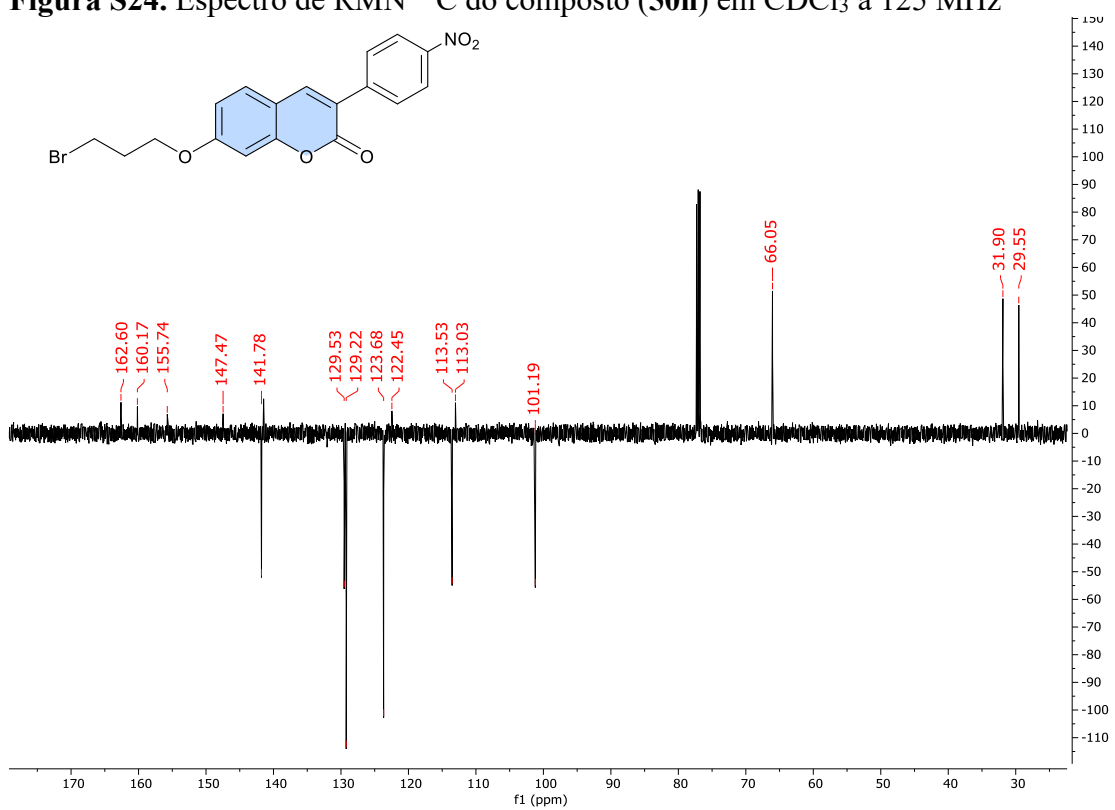


Figura S25. Espectro de RMN ^1H do composto (**50i**) em CDCl_3 a 500 MHz

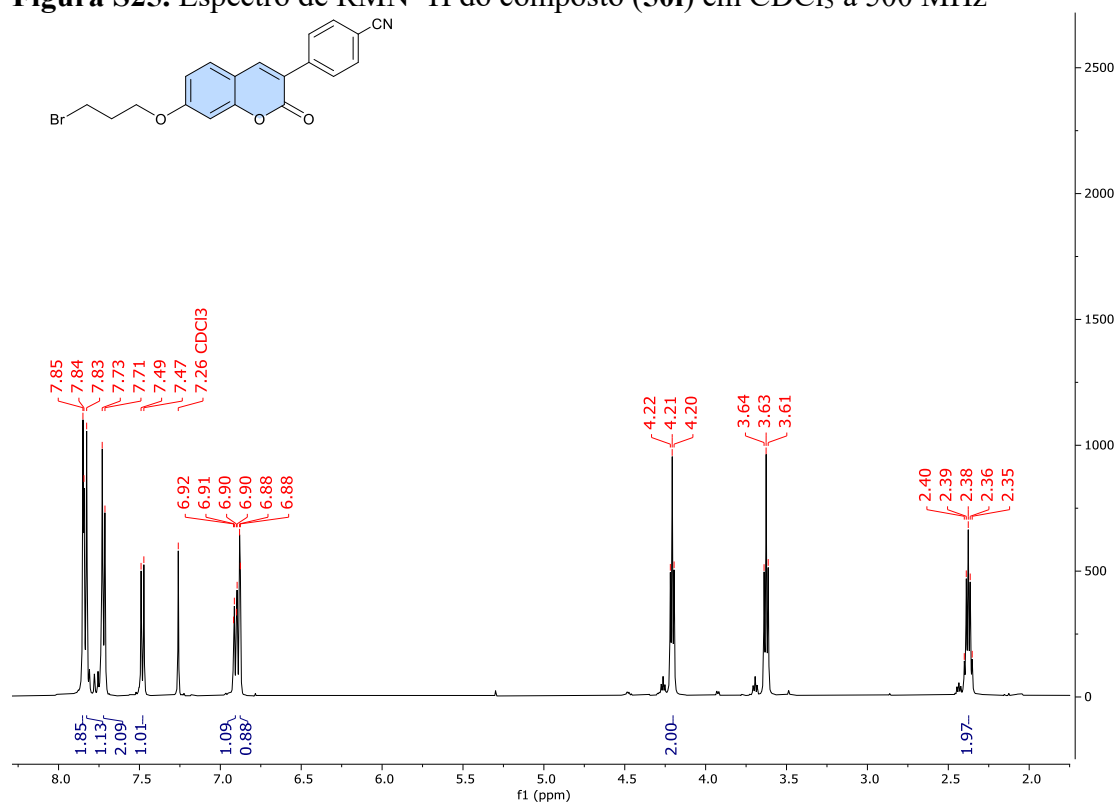


Figura S26. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50i**) em CDCl_3 a 125 MHz

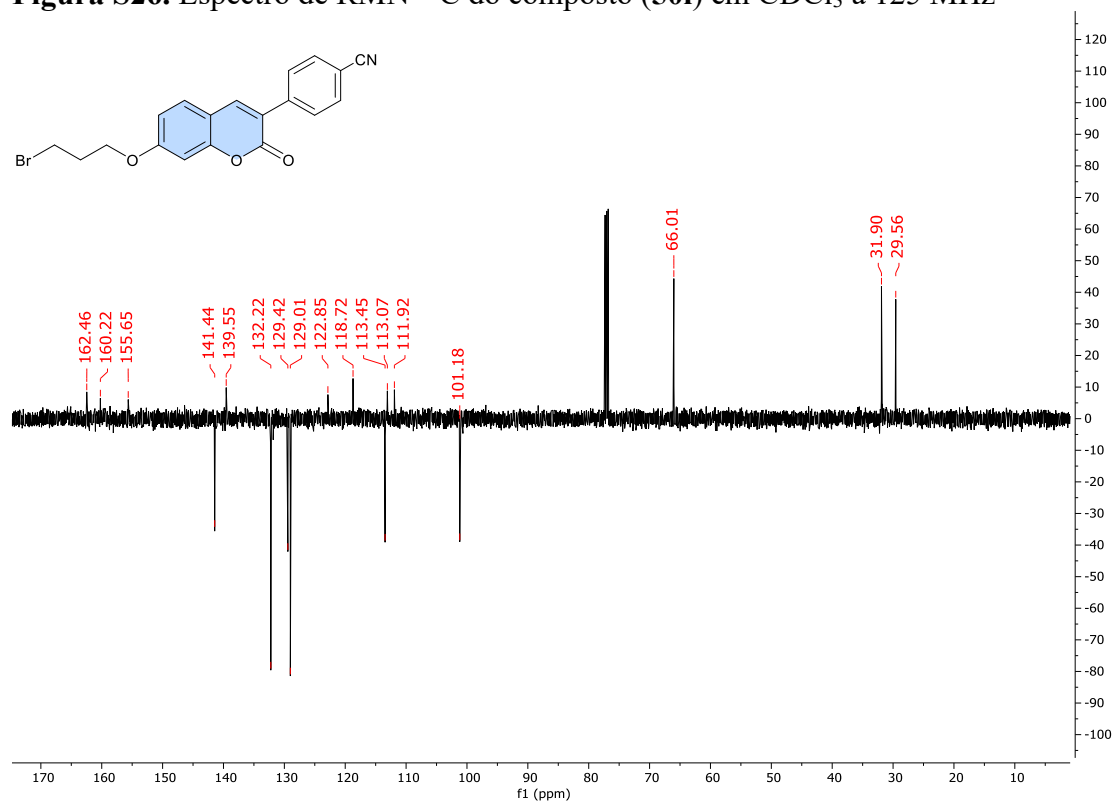


Figura S27. Espectro de RMN ^1H do composto (**50j**) em CDCl_3 a 500 MHz

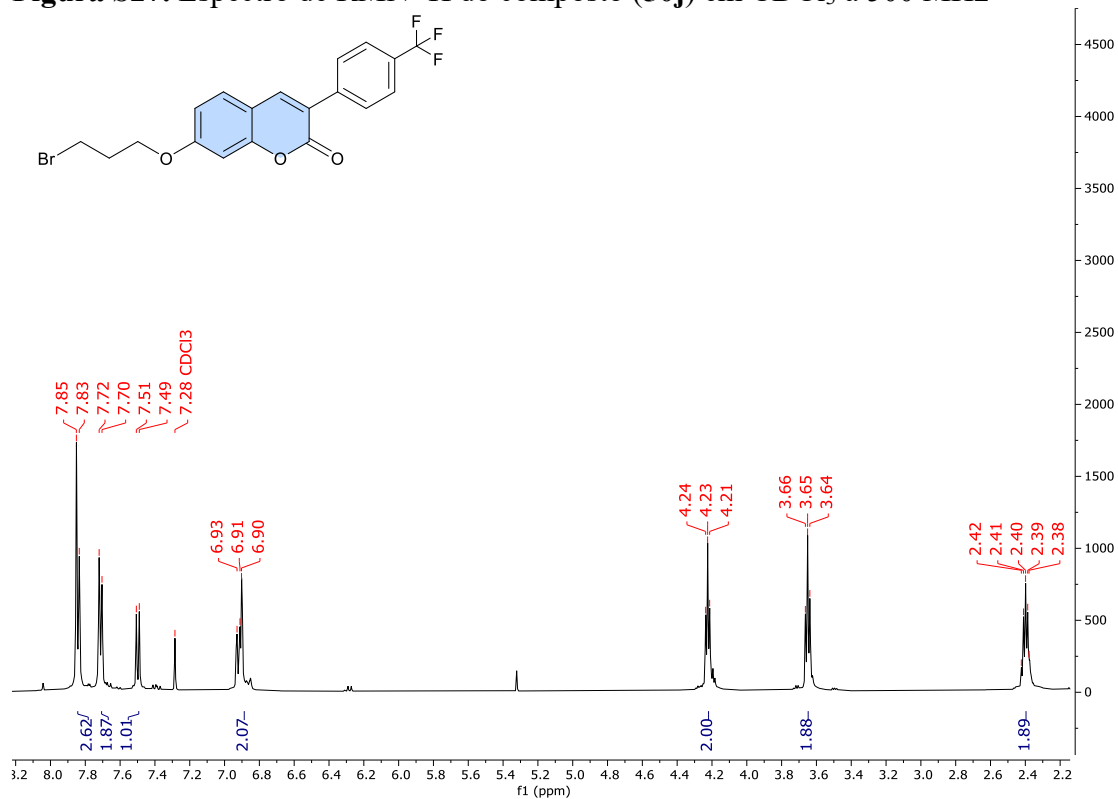


Figura S28. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50j**) em CDCl_3 a 125 MHz

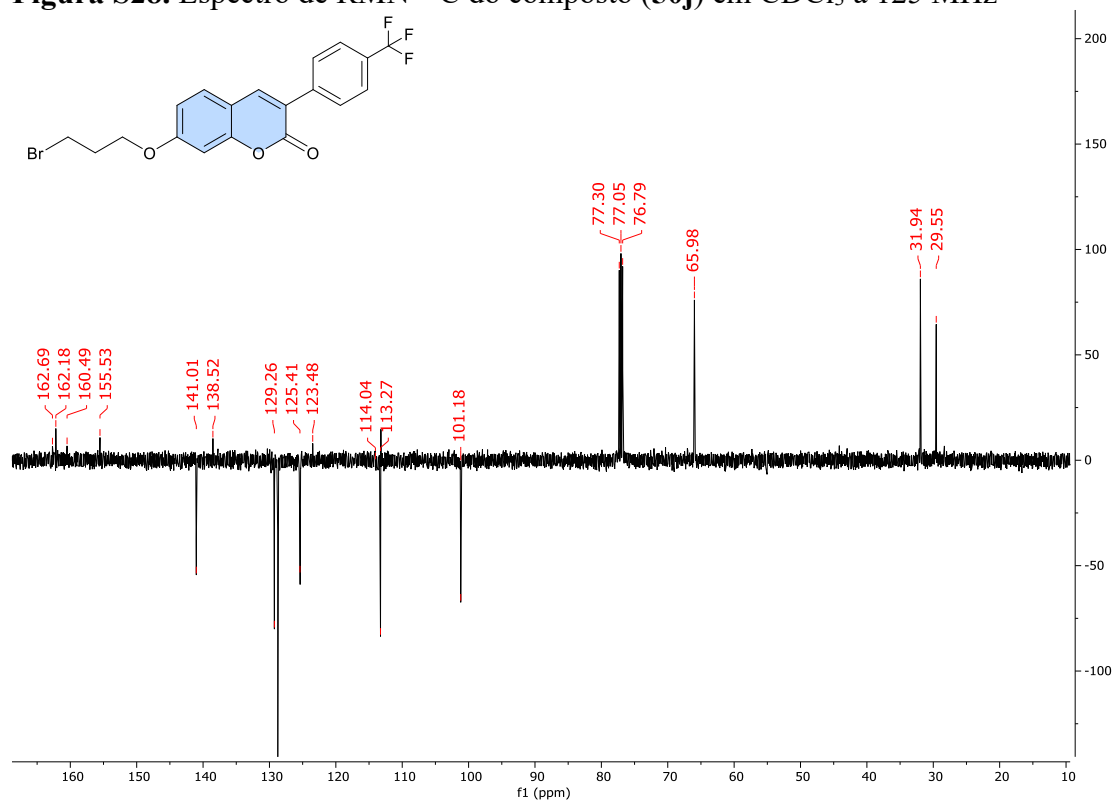


Figura S29. Espectro de RMN ^1H do composto (**50k**) em CDCl_3 a 500 MHz

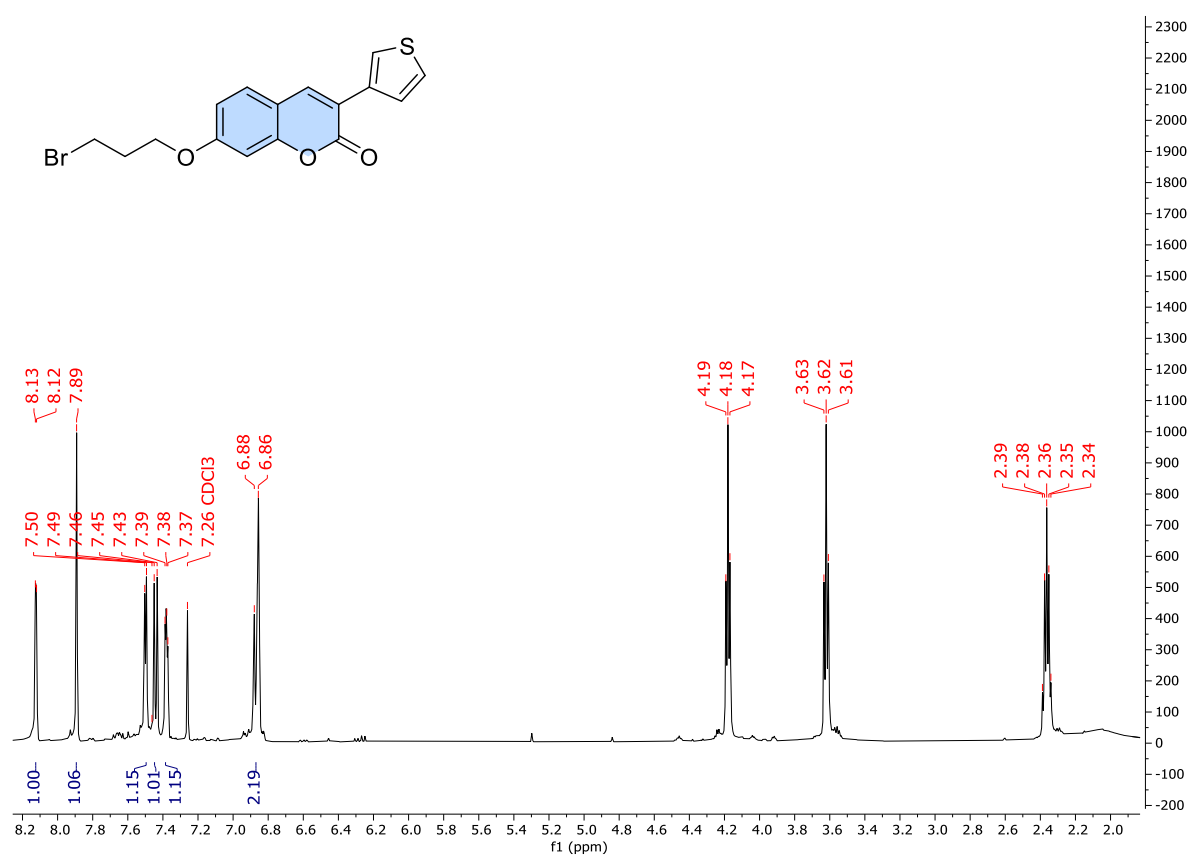


Figura S30. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50k**) em CDCl_3 a 125 MHz

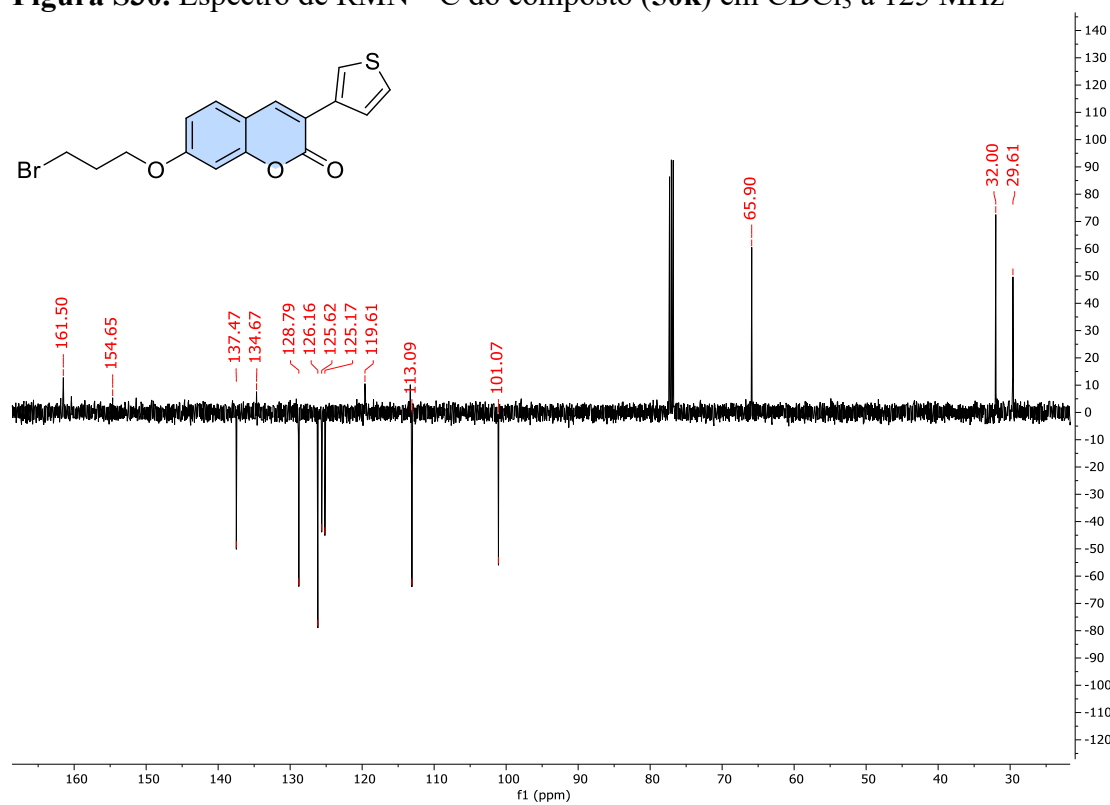


Figura S31. Espectro de RMN ^1H do composto (**50l**) em DMSO- d_6 a 500 MHz

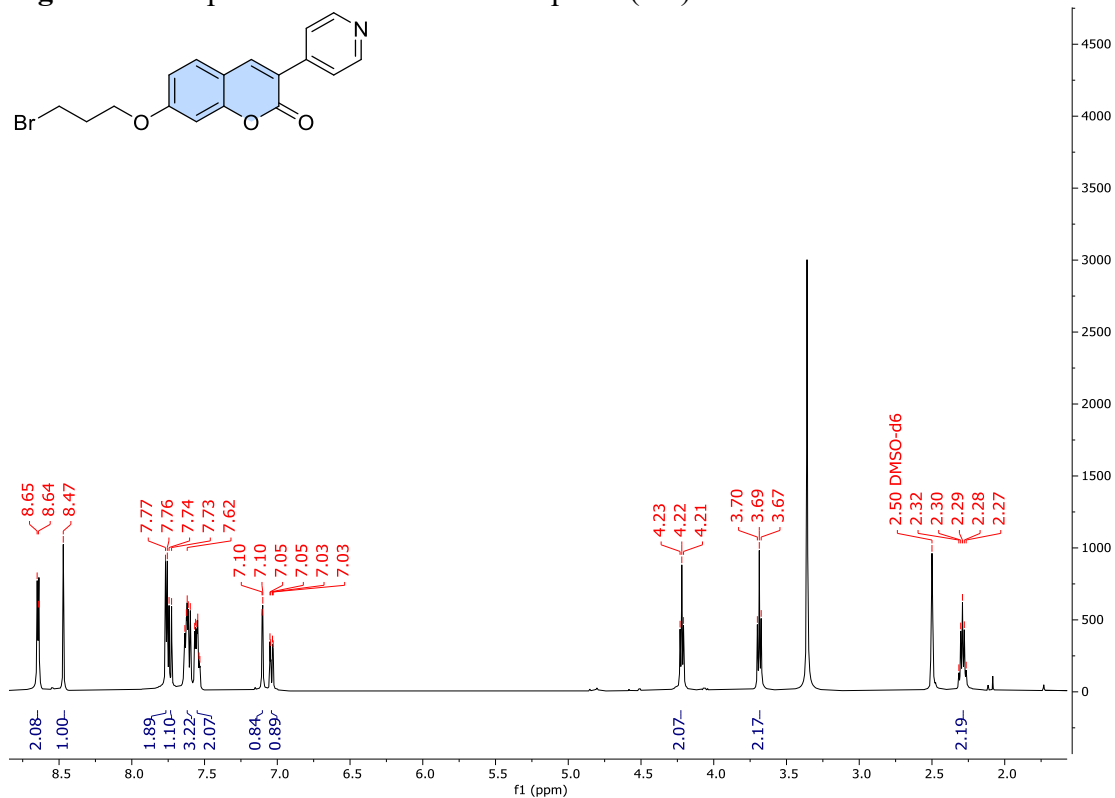


Figura S32. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50l**) em DMSO- d_6 a 125 MHz

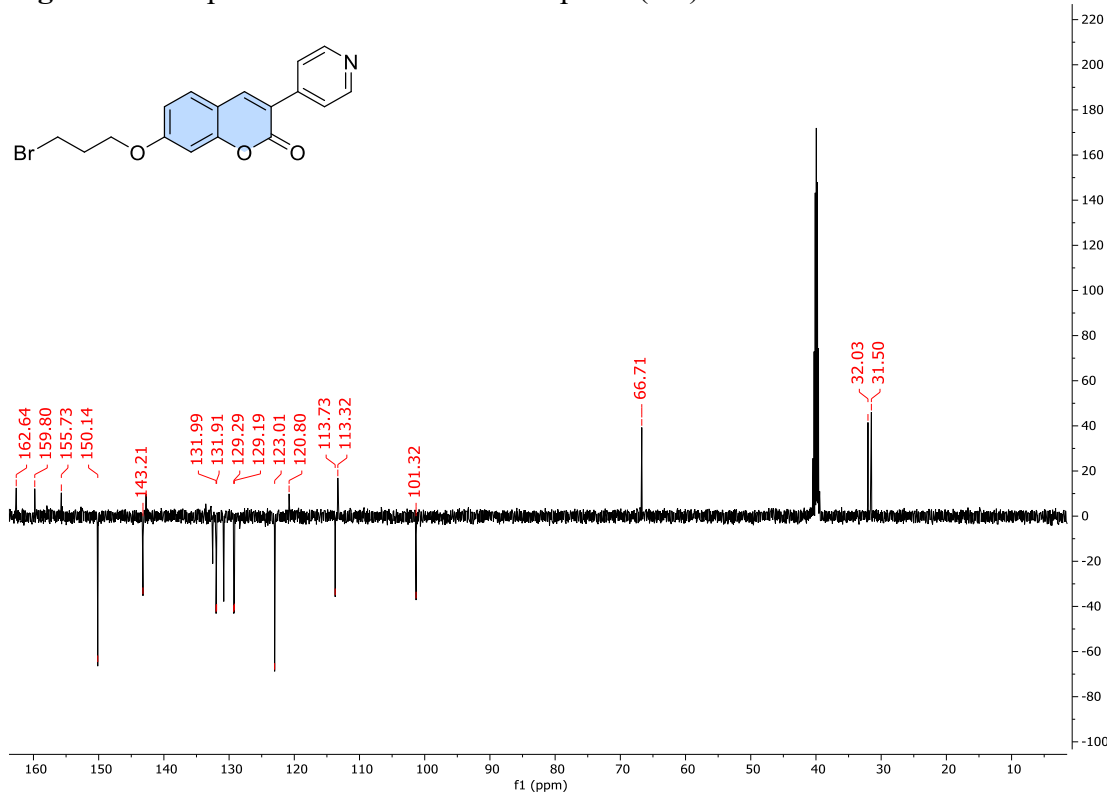


Figura S33. Espectro de RMN ^1H do composto (**50m**) em CDCl_3 a 500 MHz

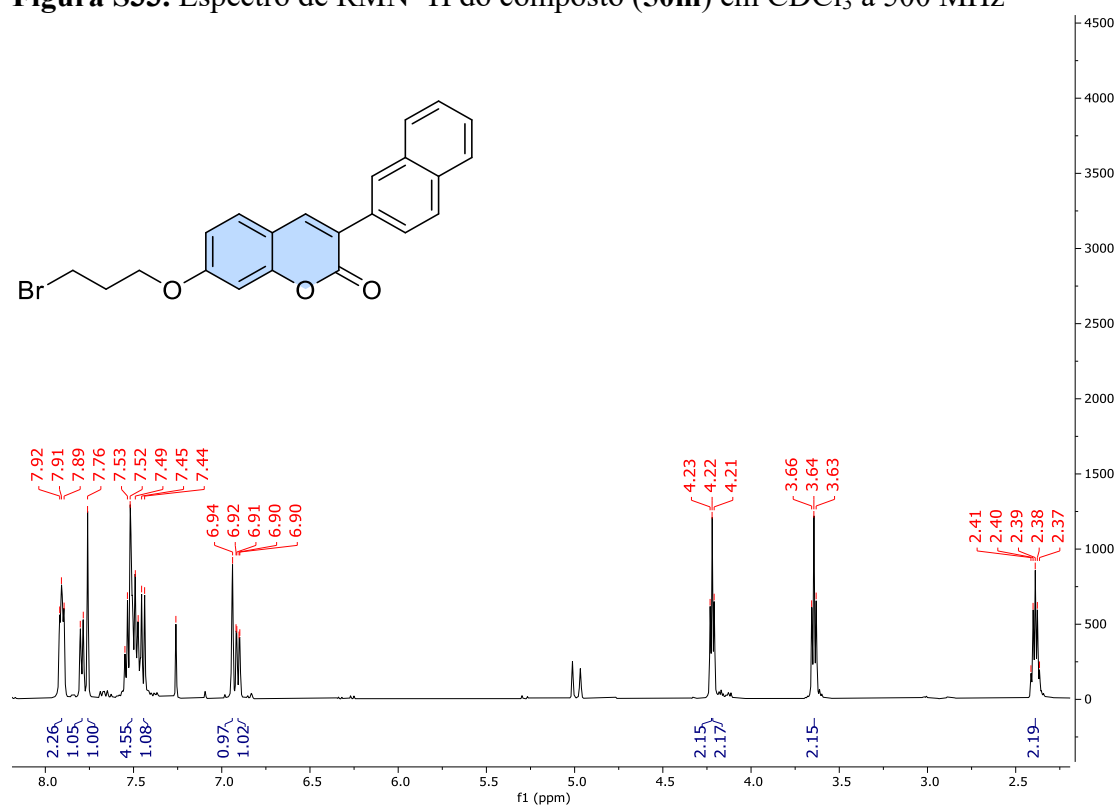


Figura S34. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50m**) em CDCl_3 a 125 MHz

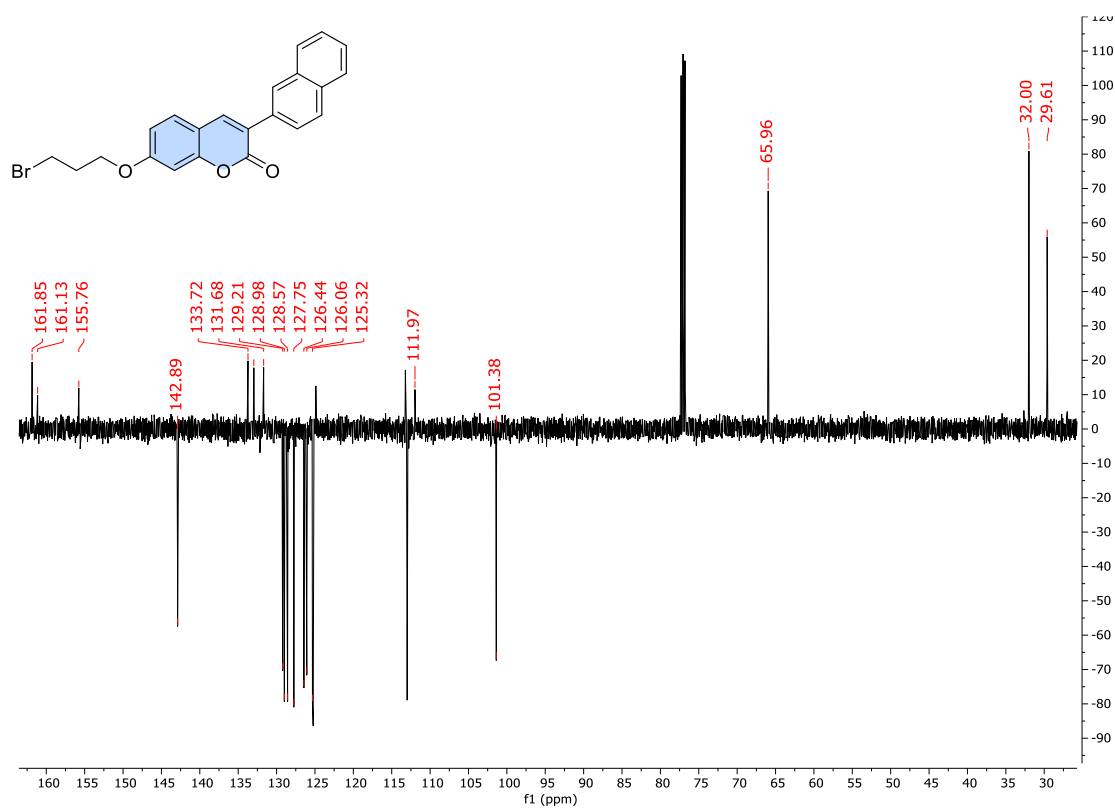


Figura S35. Espectro de RMN ^1H do composto (**50n**) em CDCl_3 a 500 MHz

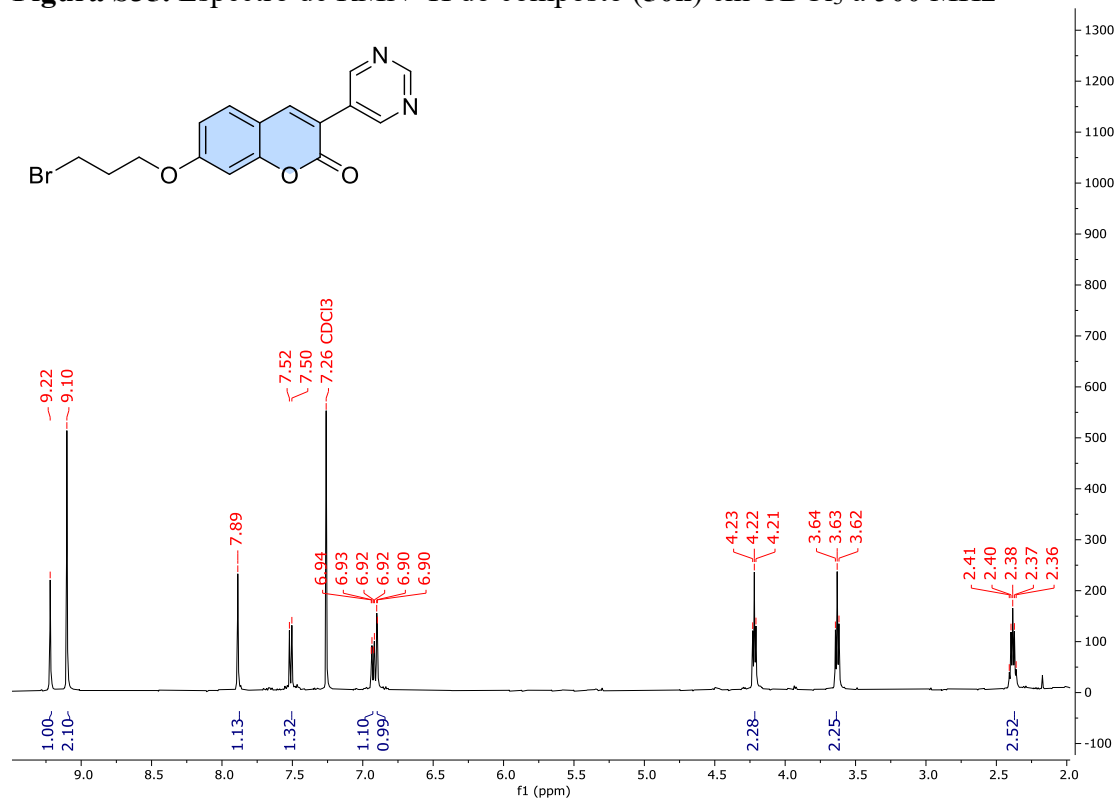


Figura S36. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50n**) em CDCl_3 a 125 MHz

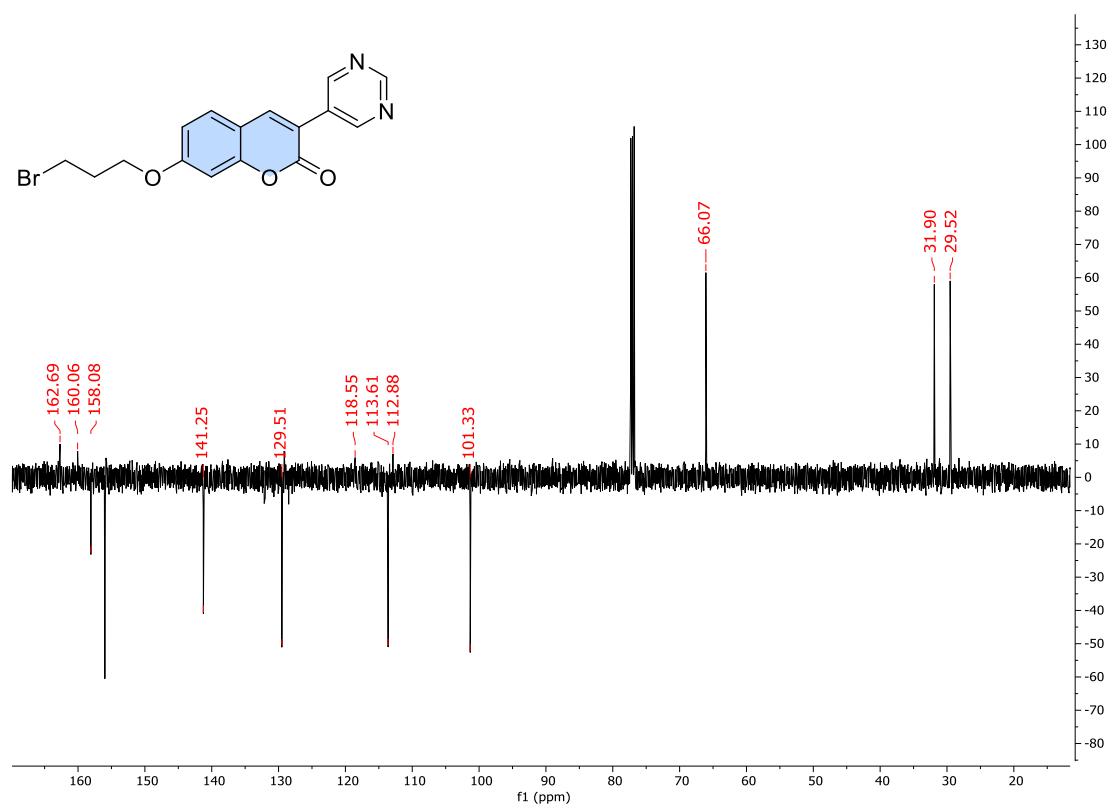


Figura S37. Espectro de RMN ^1H do composto (**50p**) em CDCl_3 a 500 MHz

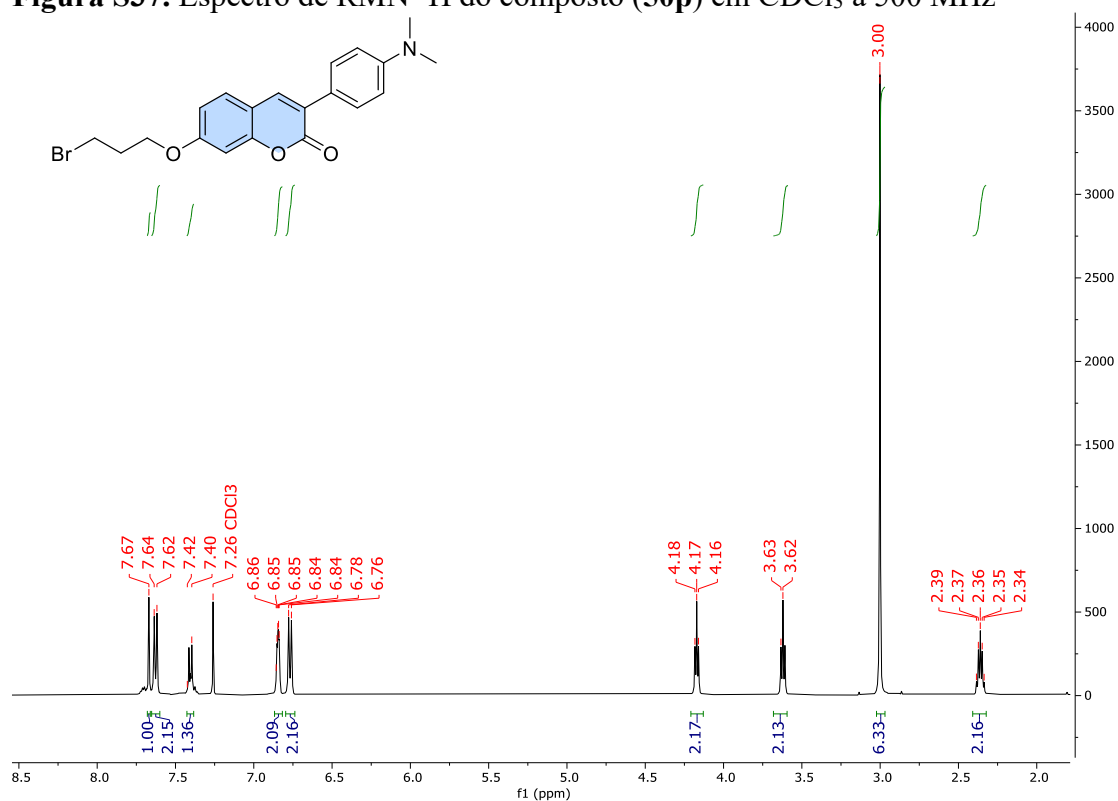


Figura S38. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50p**) em CDCl_3 a 125 MHz

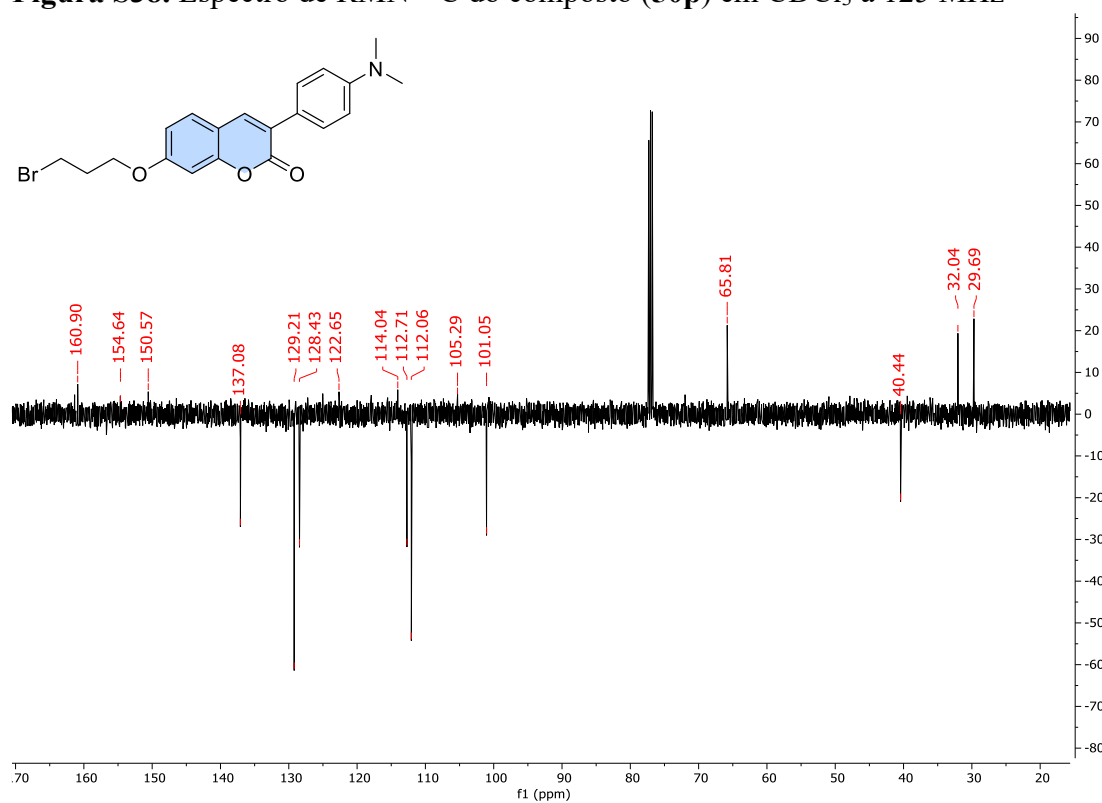


Figura S39 Espectro de RMN ^1H do composto (**50q**) em CDCl_3 a 500 MHz

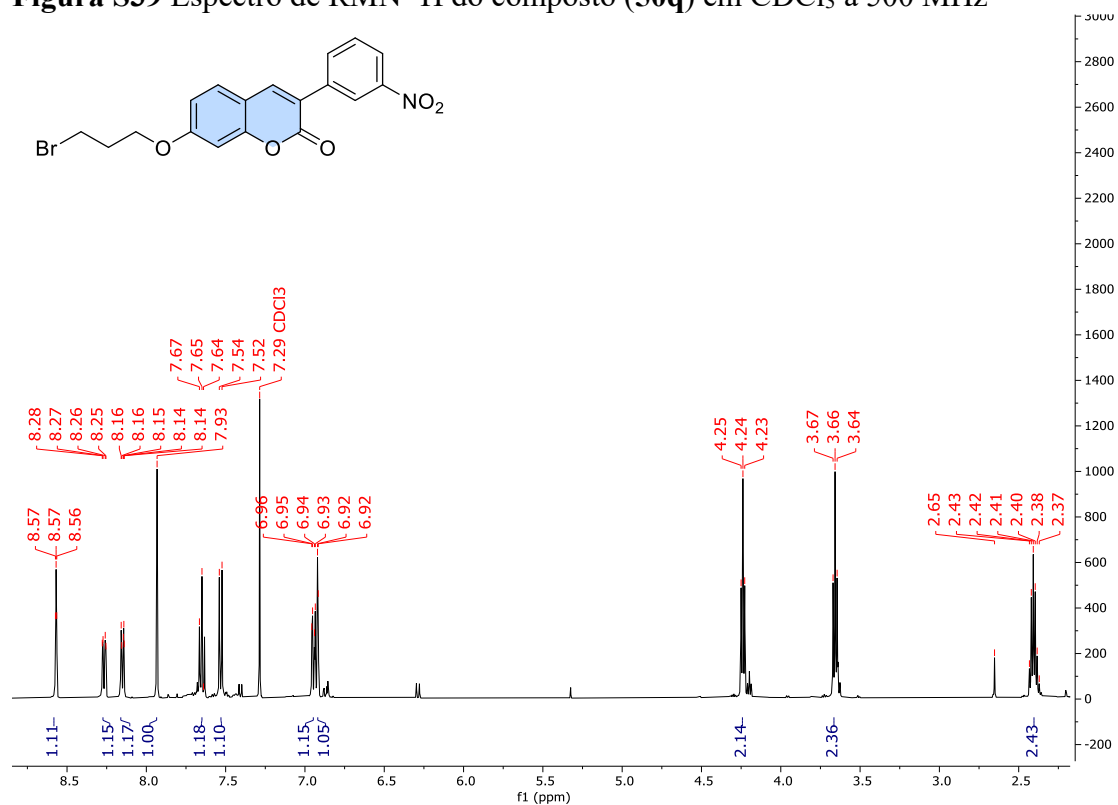


Figura S40. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50q**) em CDCl_3 a 125 MHz

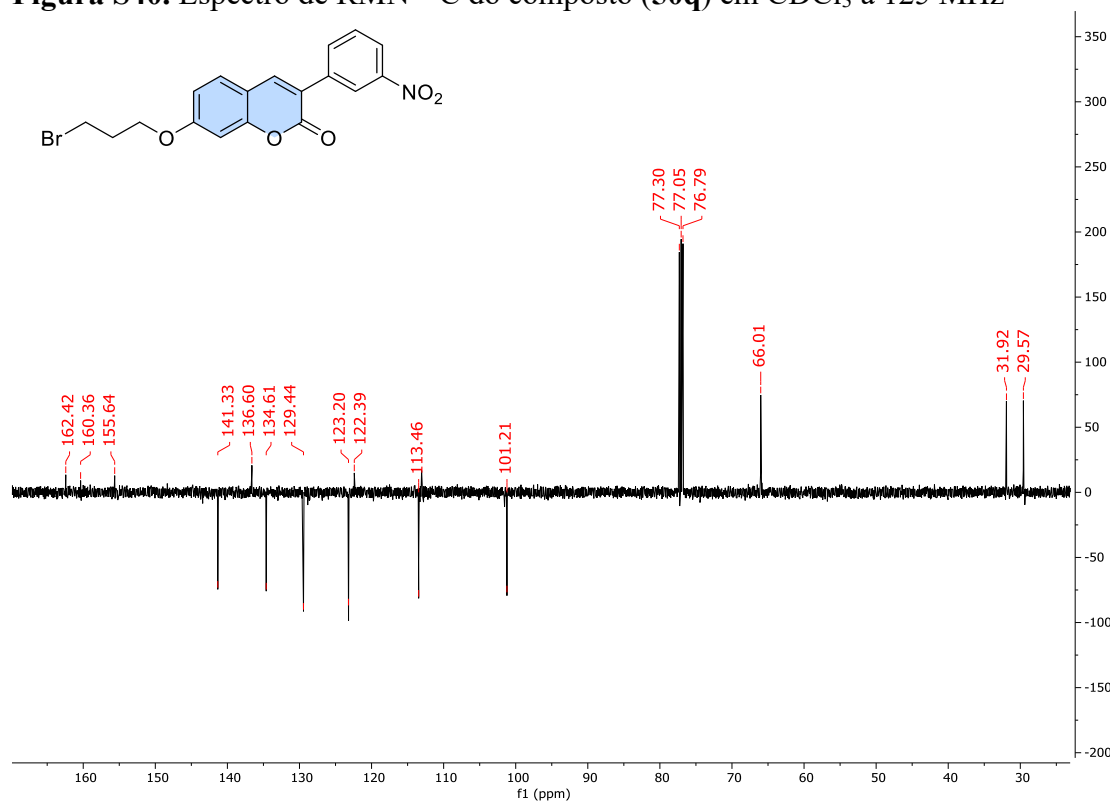


Figura S41 Espectro de RMN ^1H do composto (**50r**) em CDCl_3 a 500 MHz

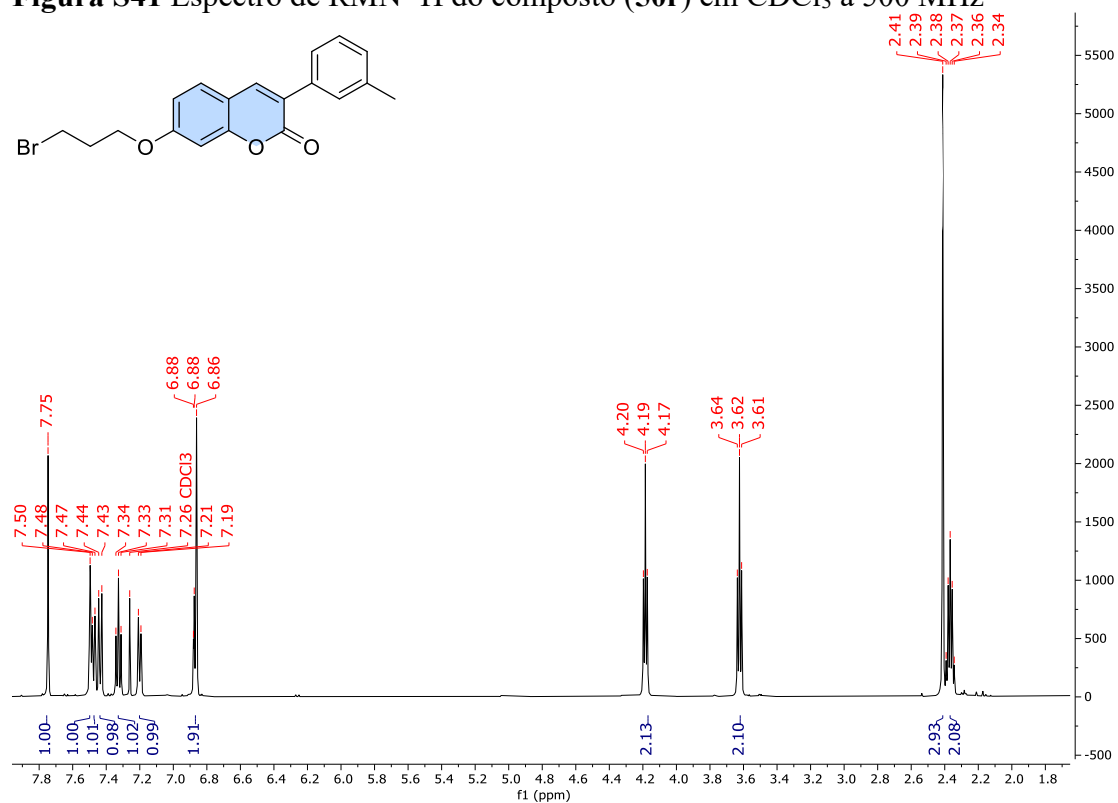


Figura S42. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50r**) em CDCl_3 a 125 MHz

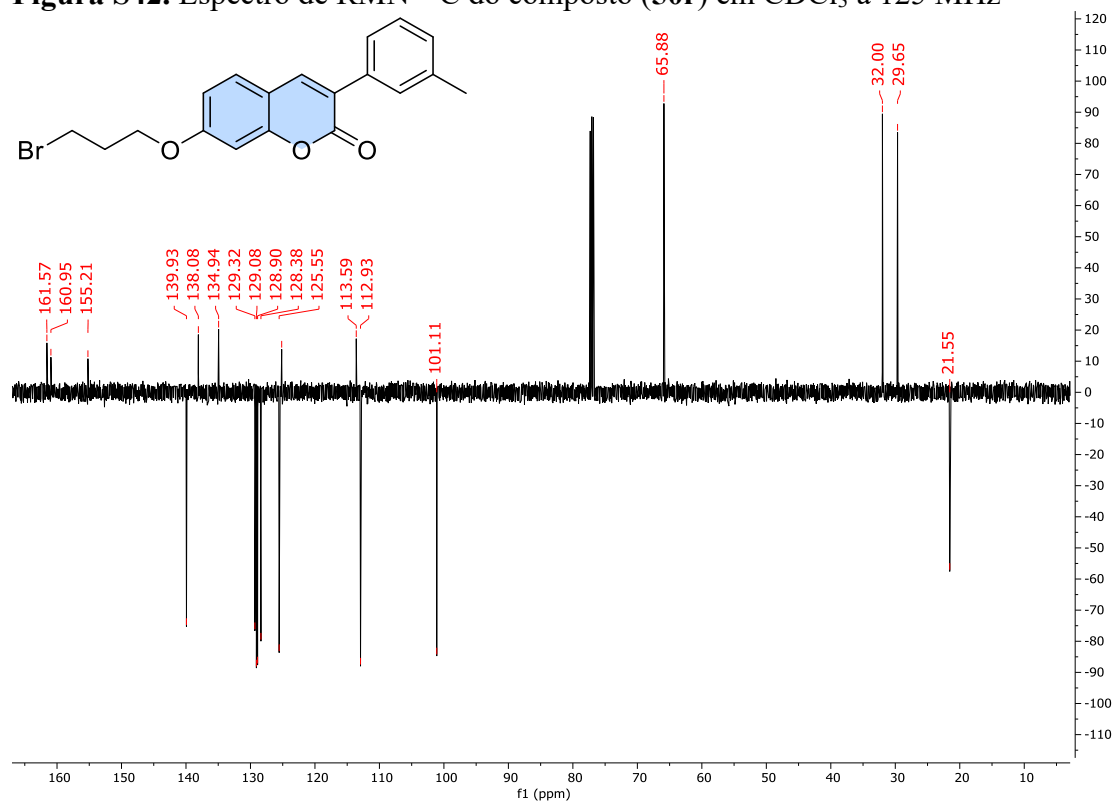


Figura S43 Espectro de RMN ^1H do composto (**50s**) em CDCl_3 a 500 MHz

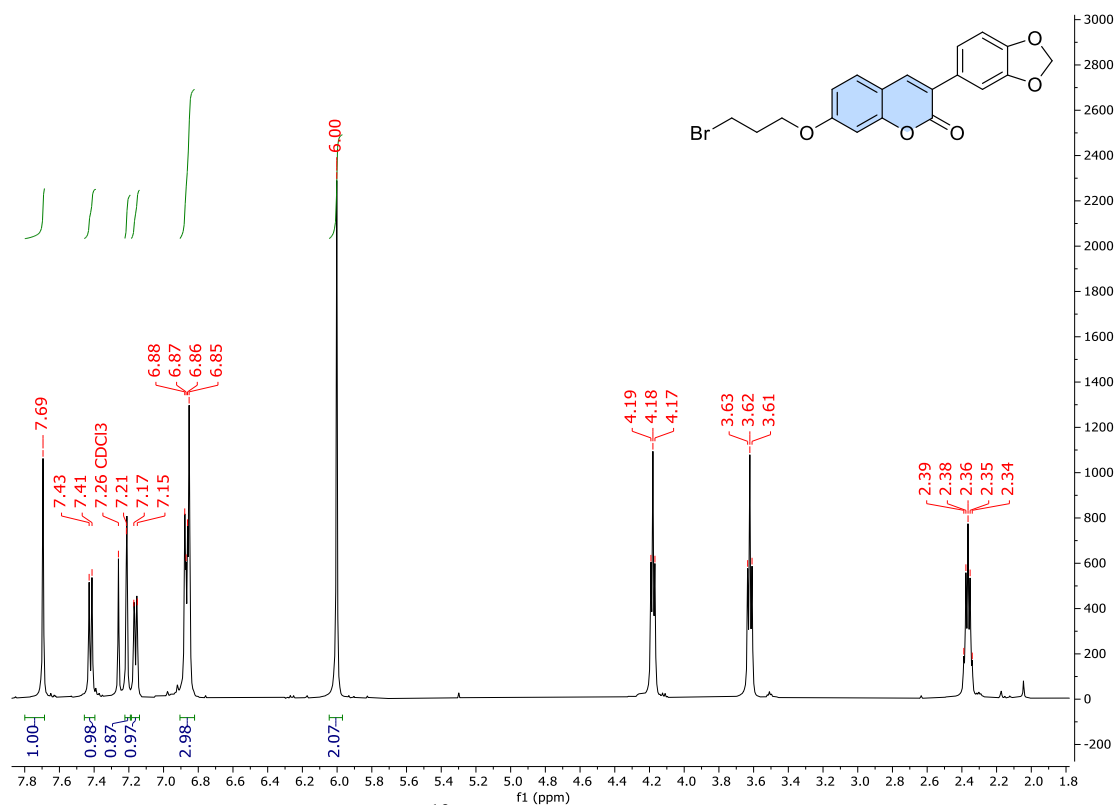


Figura S44. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50s**) em CDCl_3 a 125 MHz

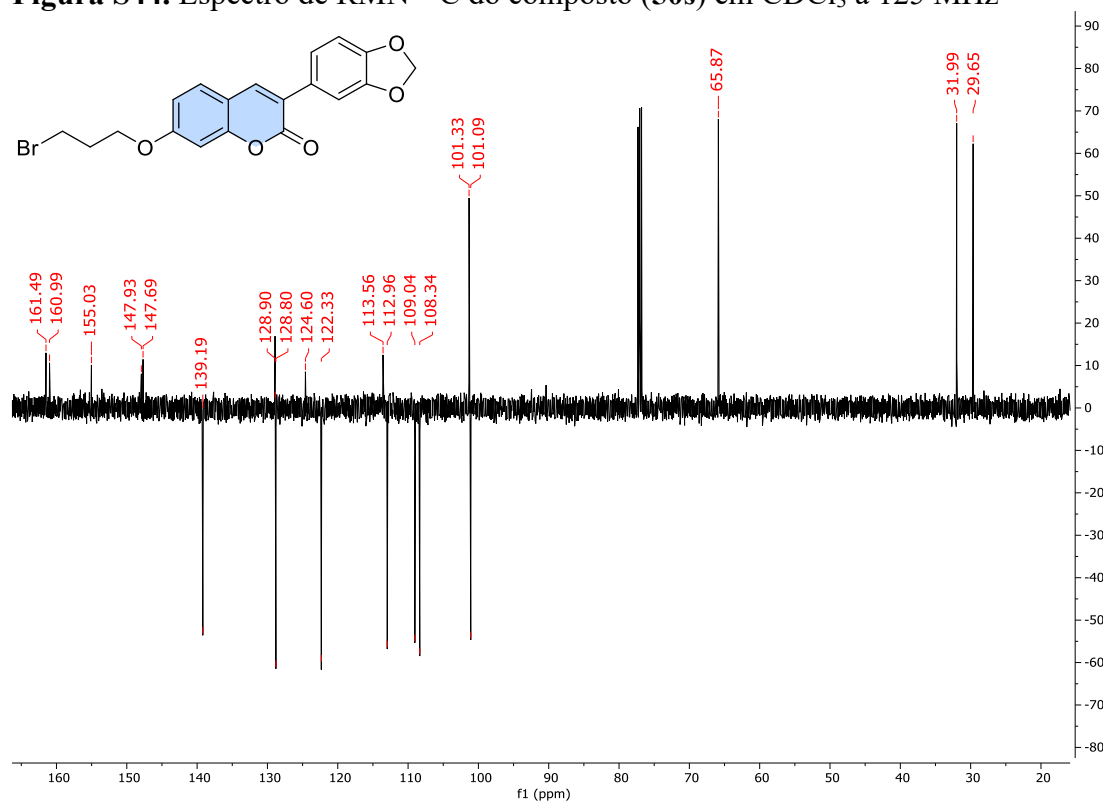


Figura S45 Espectro de RMN ^1H do composto (**50t**) em CDCl_3 a 500 MHz

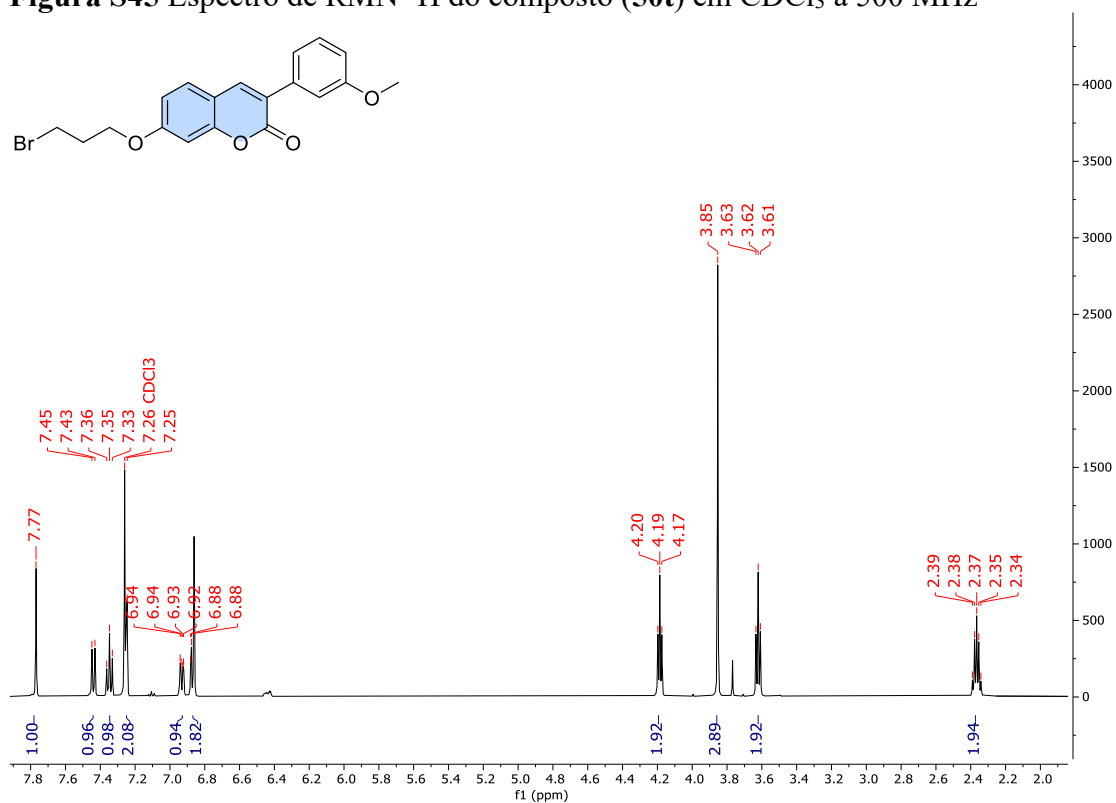


Figura S46. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50t**) em CDCl_3 a 125 MHz

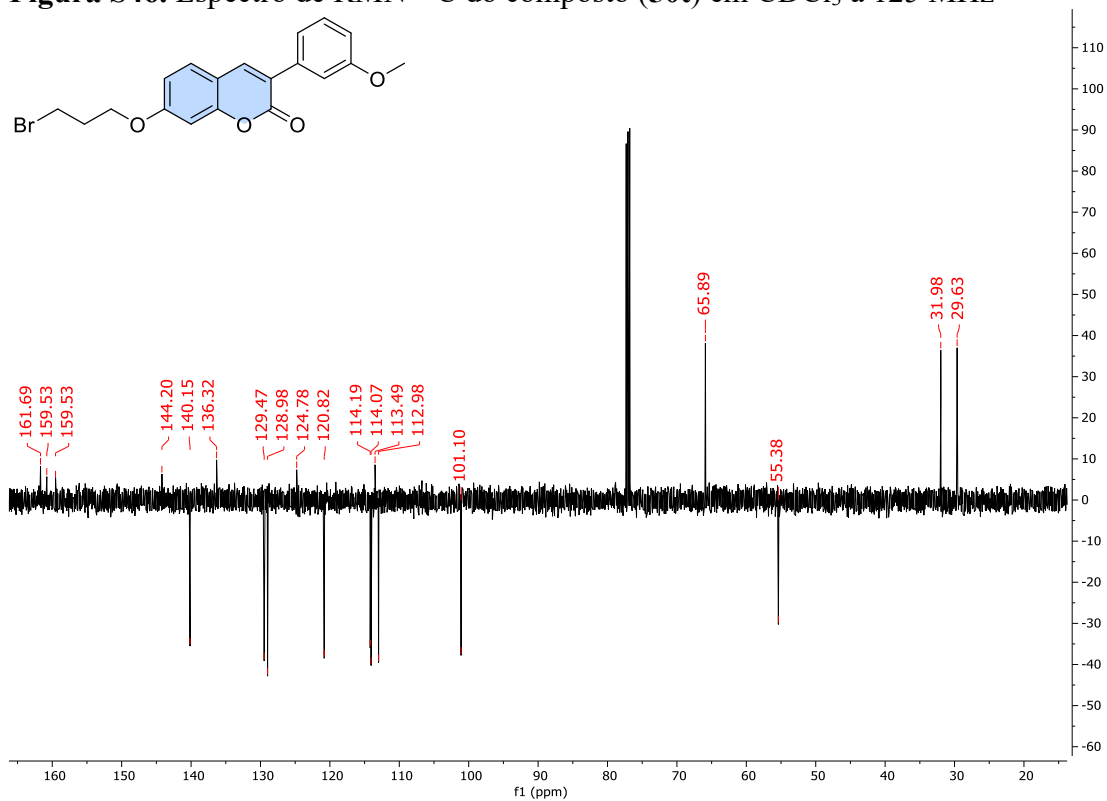


Figura S47 Espectro de RMN ^1H do composto (**50u**) em CDCl_3 a 500 MHz

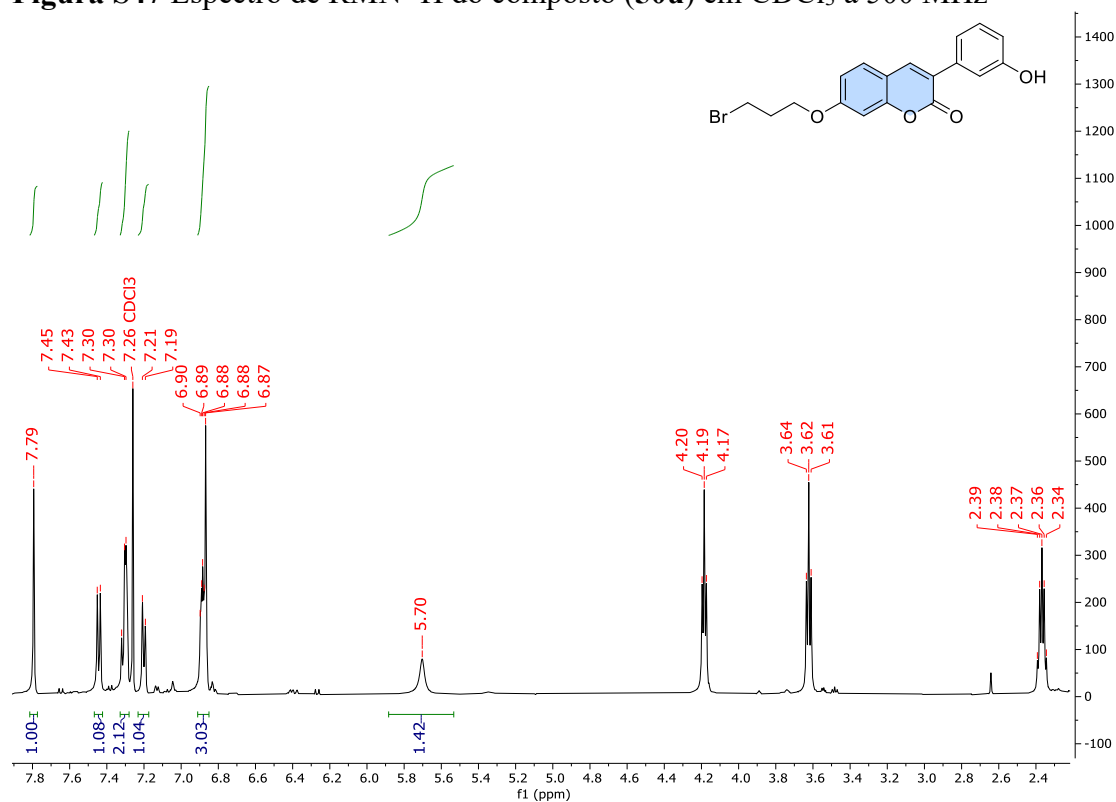


Figura S48. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50u**) em CDCl_3 a 125 MHz

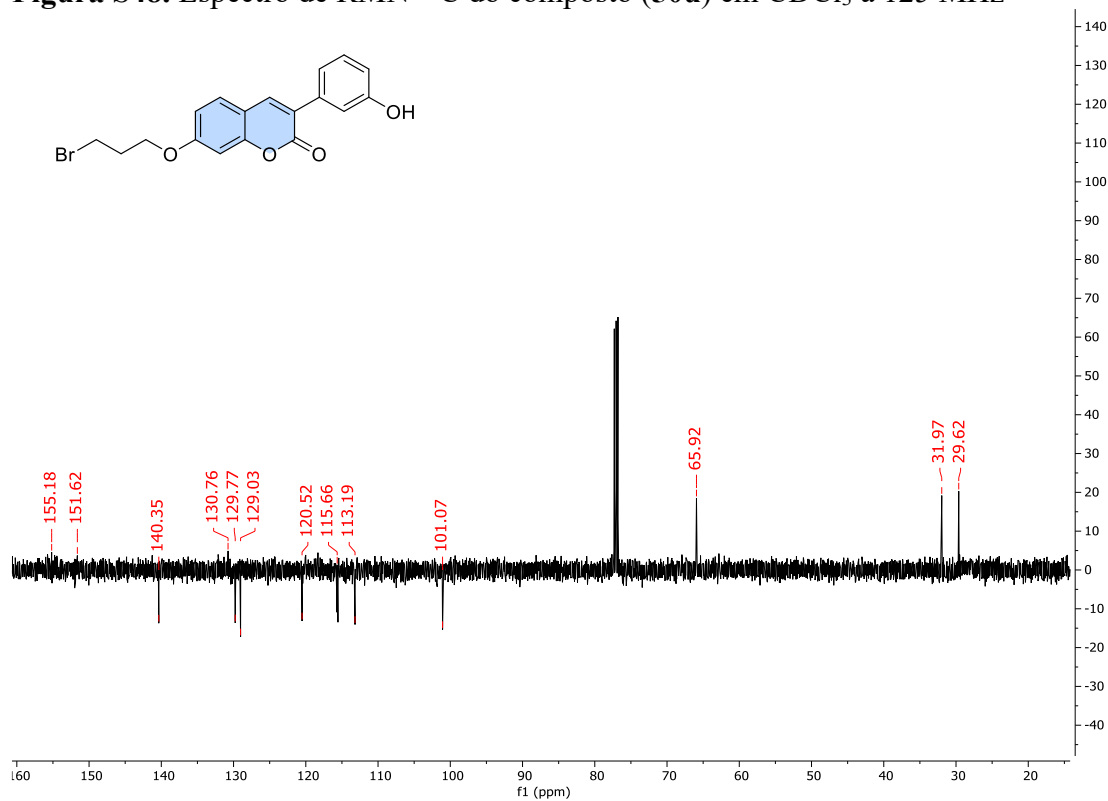


Figura S49. Espectro de RMN ^1H do composto (**50v**) em CDCl_3 a 500 MHz

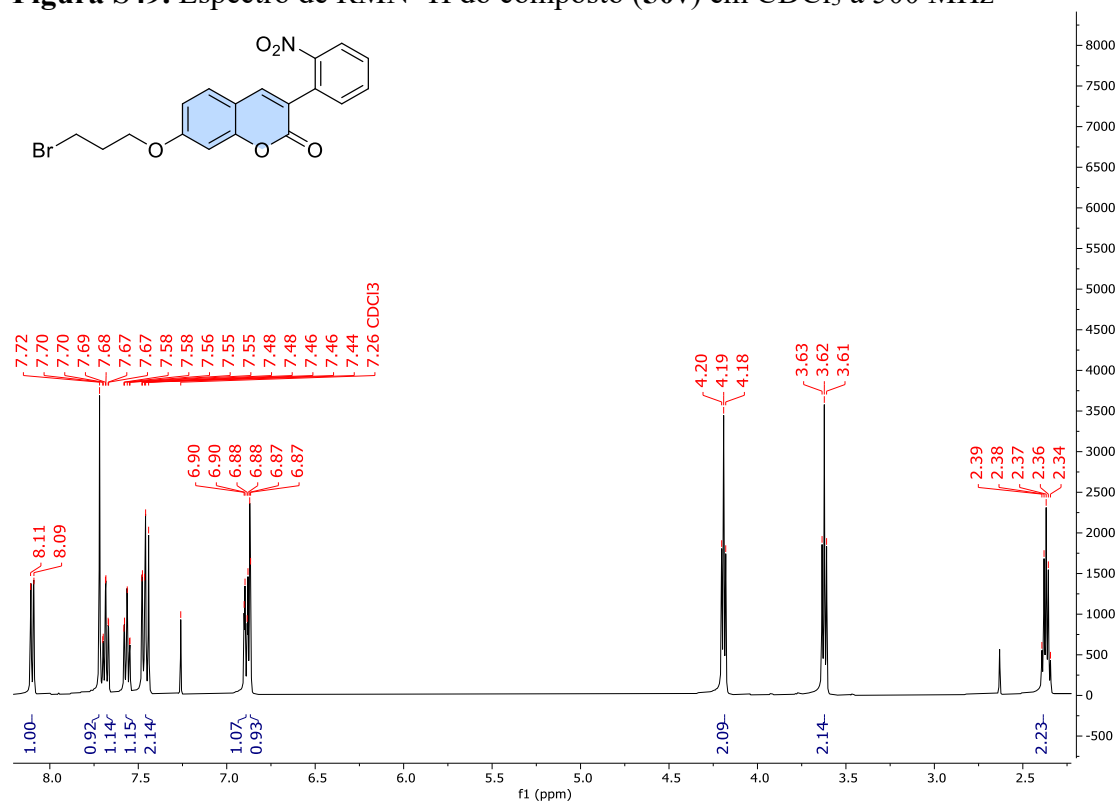


Figura S50. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50v**) em CDCl_3 a 125 MHz

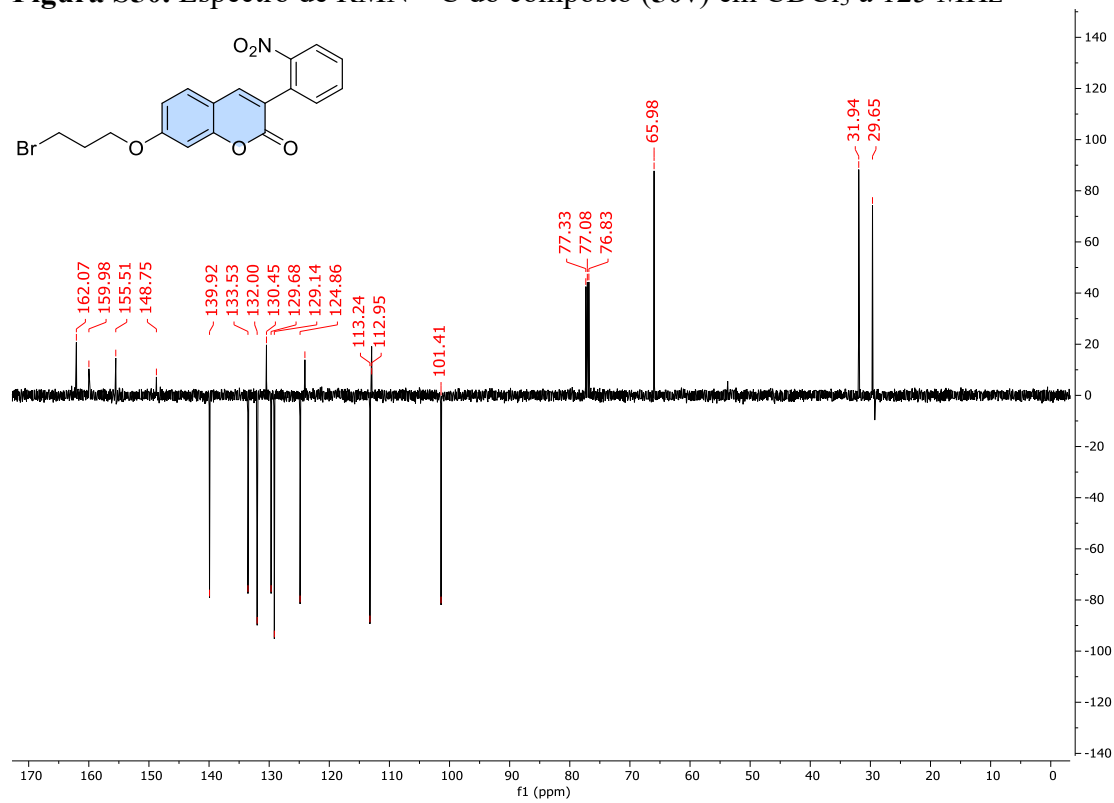


Figura S51. Espectro de RMN ^1H do composto (**50x**) em CDCl_3 a 500 MHz

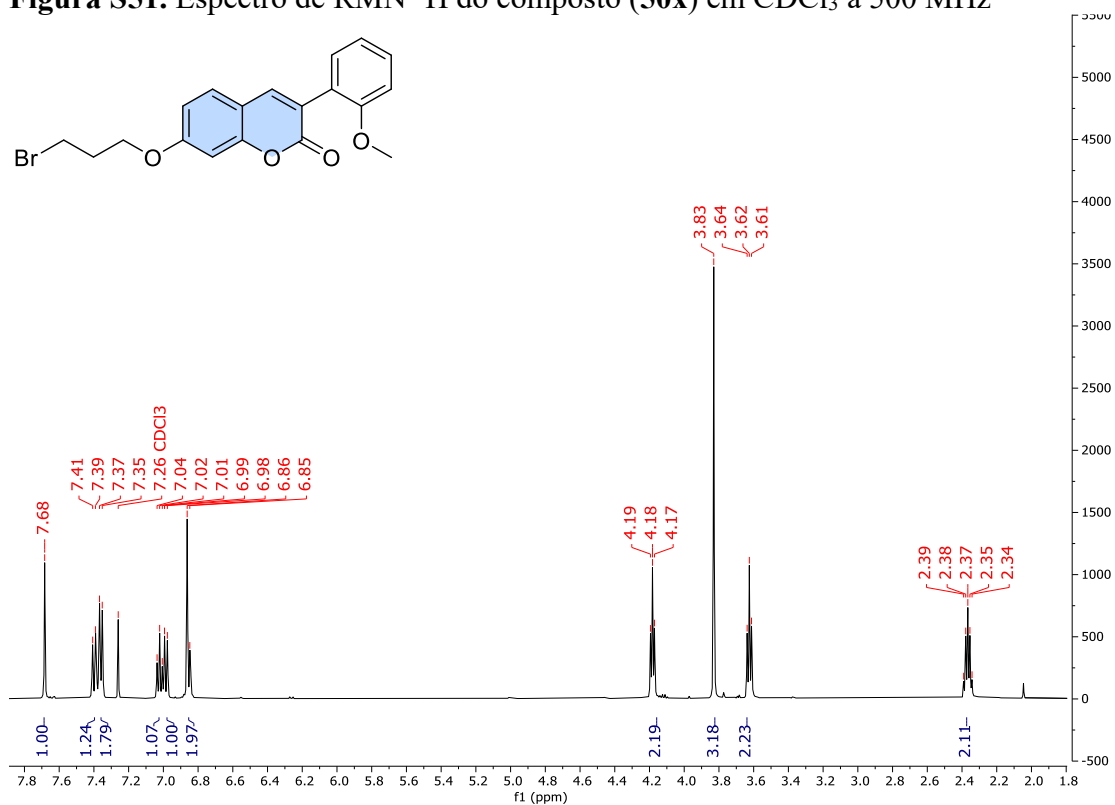


Figura S52. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50x**) em CDCl_3 a 125 MHz

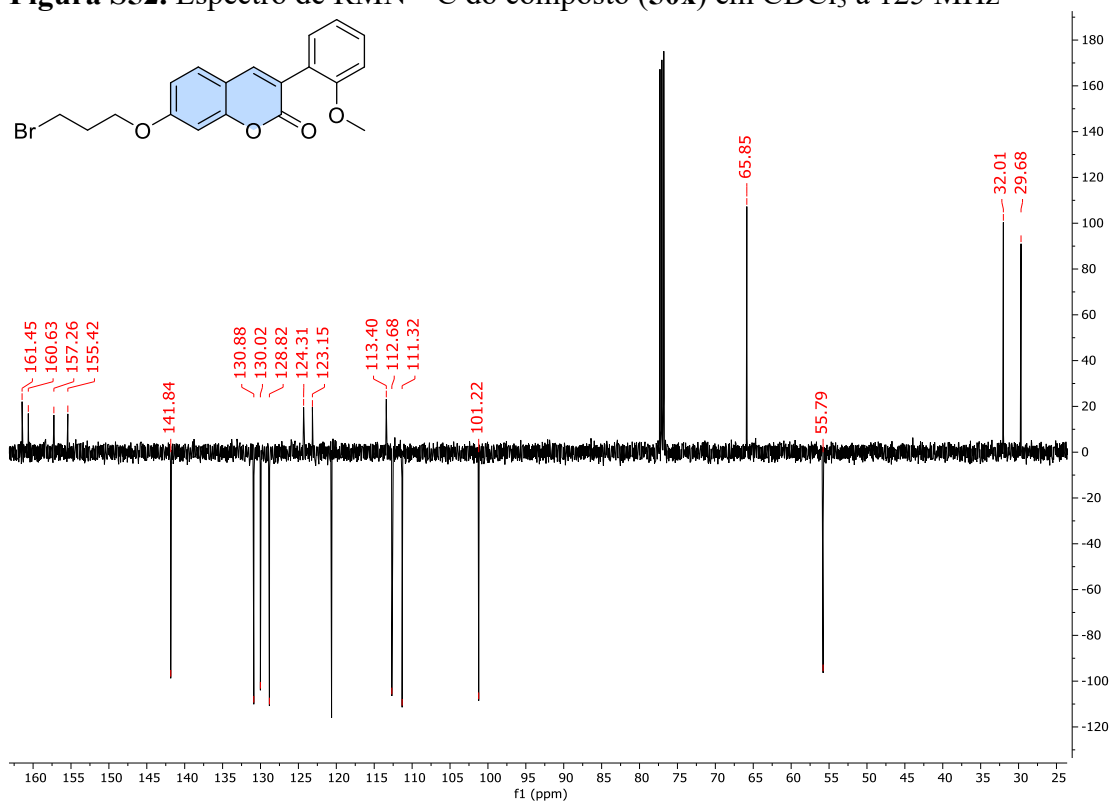


Figura S53. Espectro de RMN ^1H do composto (**50z**) em CDCl_3 a 500 MHz

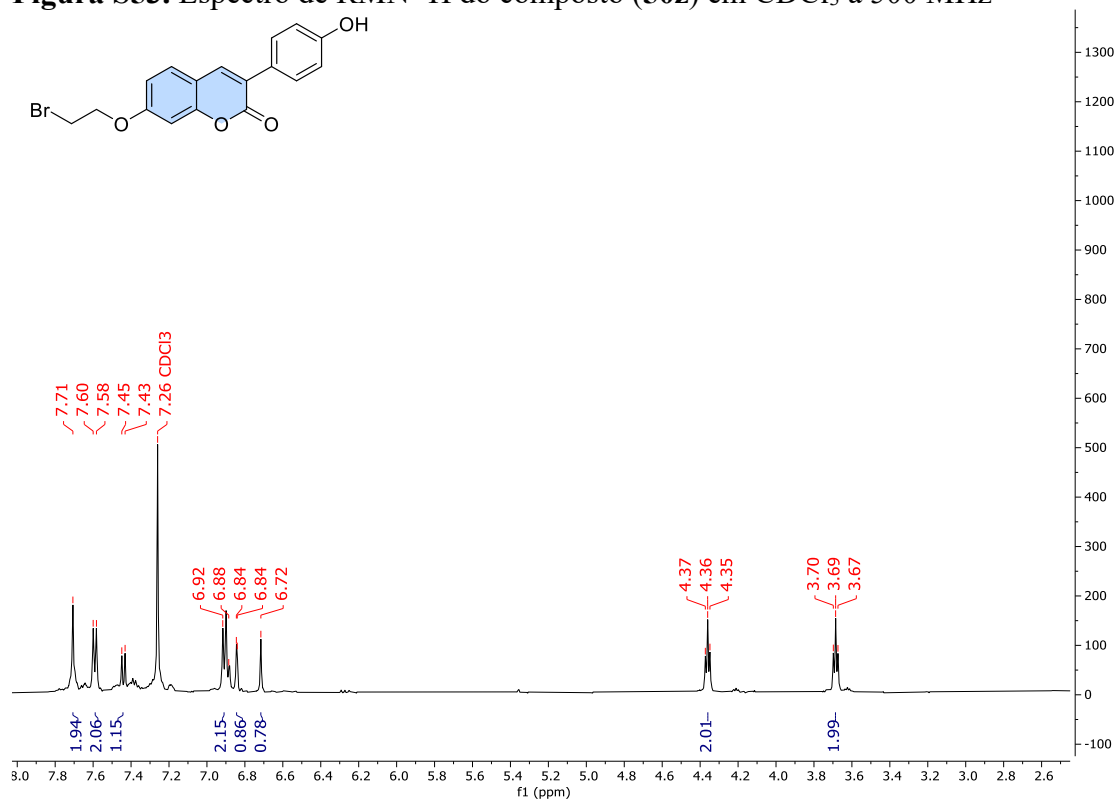


Figura S54. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**50z**) em CDCl_3 a 125 MHz

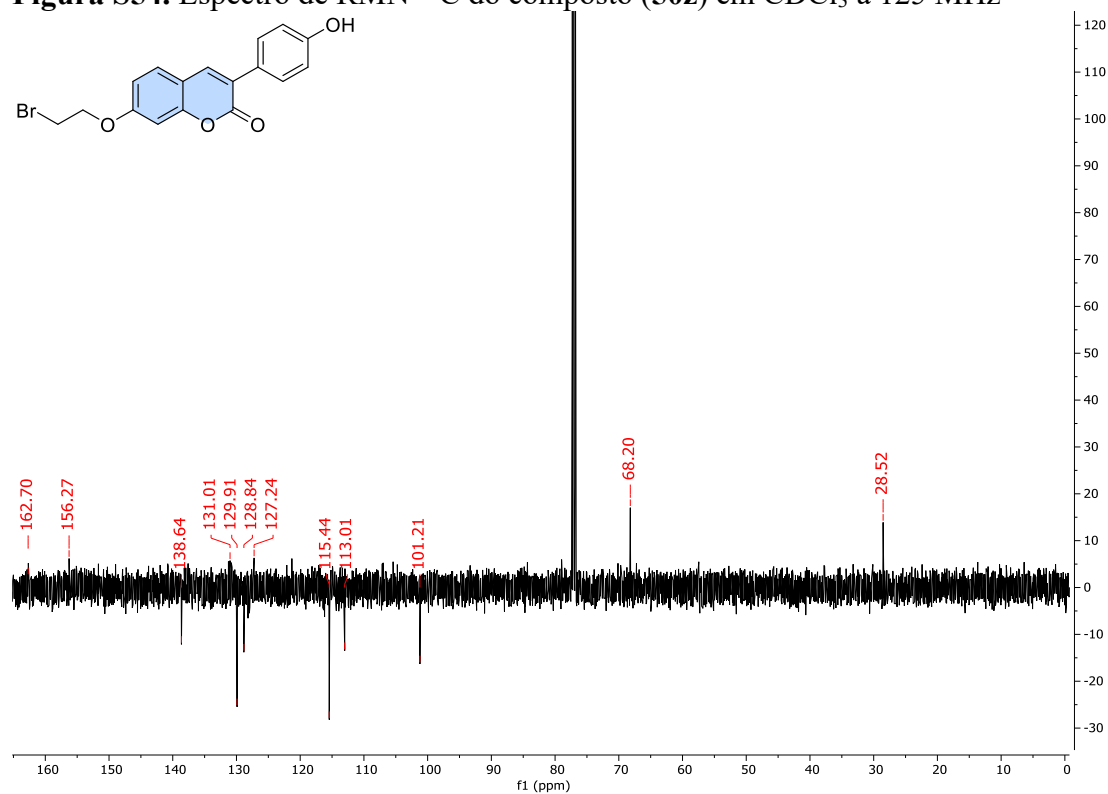


Figura S55. Espectro de RMN ^1H do composto (**51w**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 300 MHz

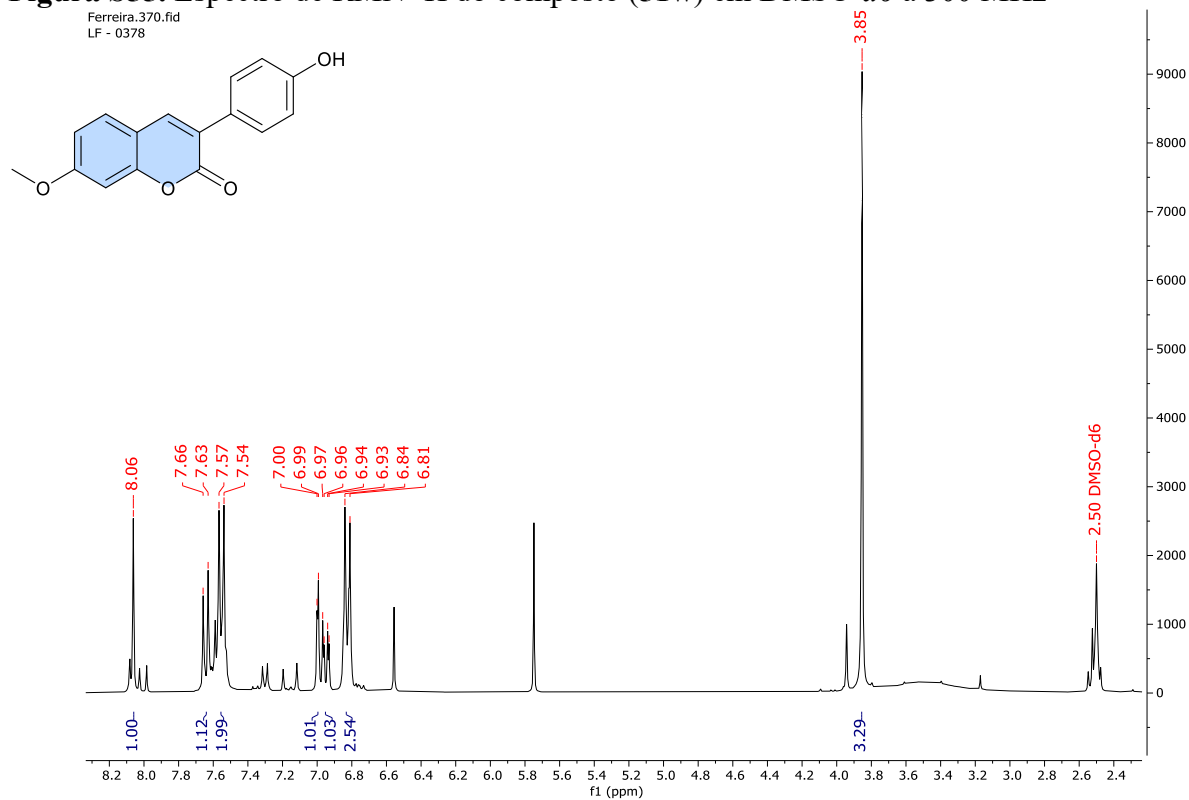


Figura S56. Espectro de RMN ^1H do composto (**51a**) em CDCl_3 a 500 MHz

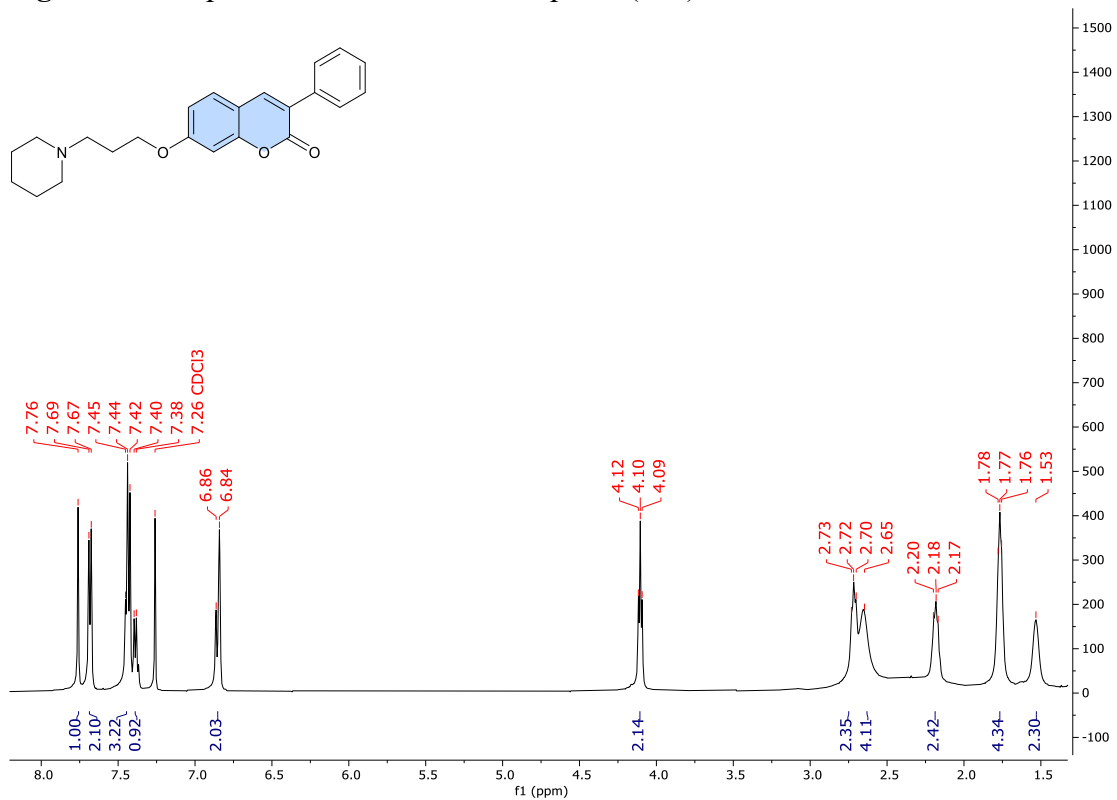


Figura S57. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51a**) em CDCl_3 a 125 MHz

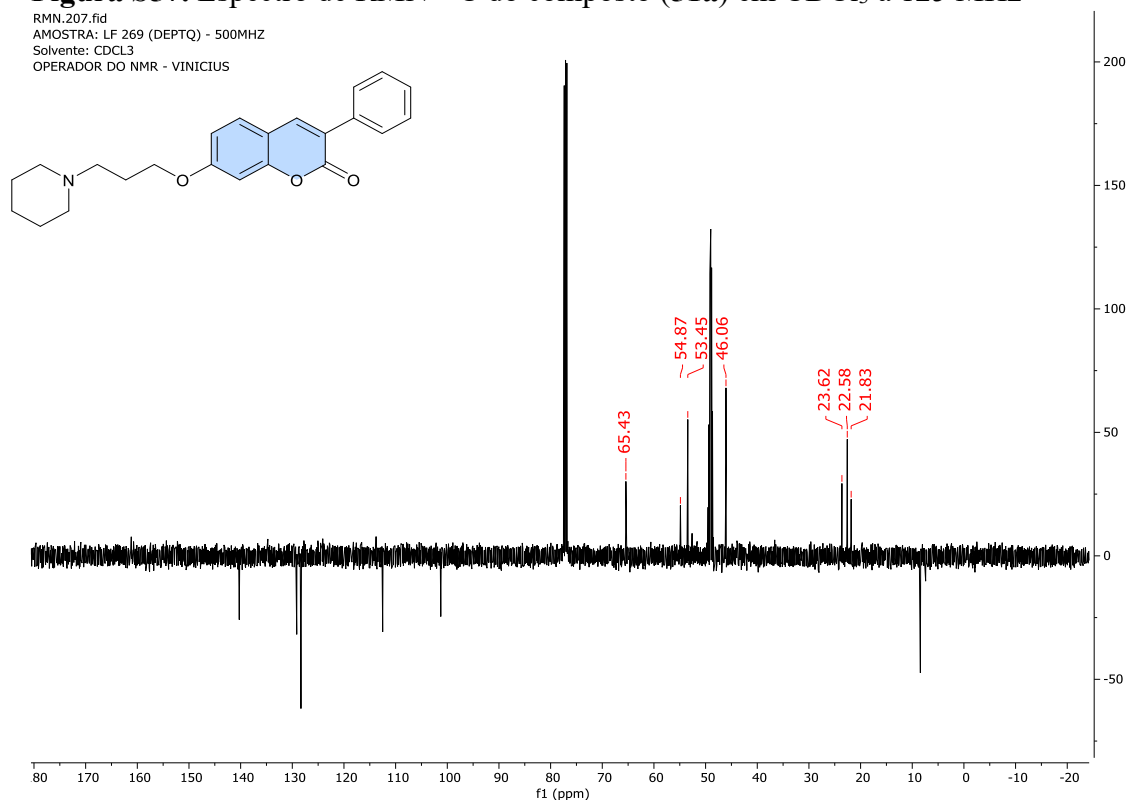


Figura S58. Espectro de RMN ^1H do composto (**51b**) em CDCl_3 a 300 MHz

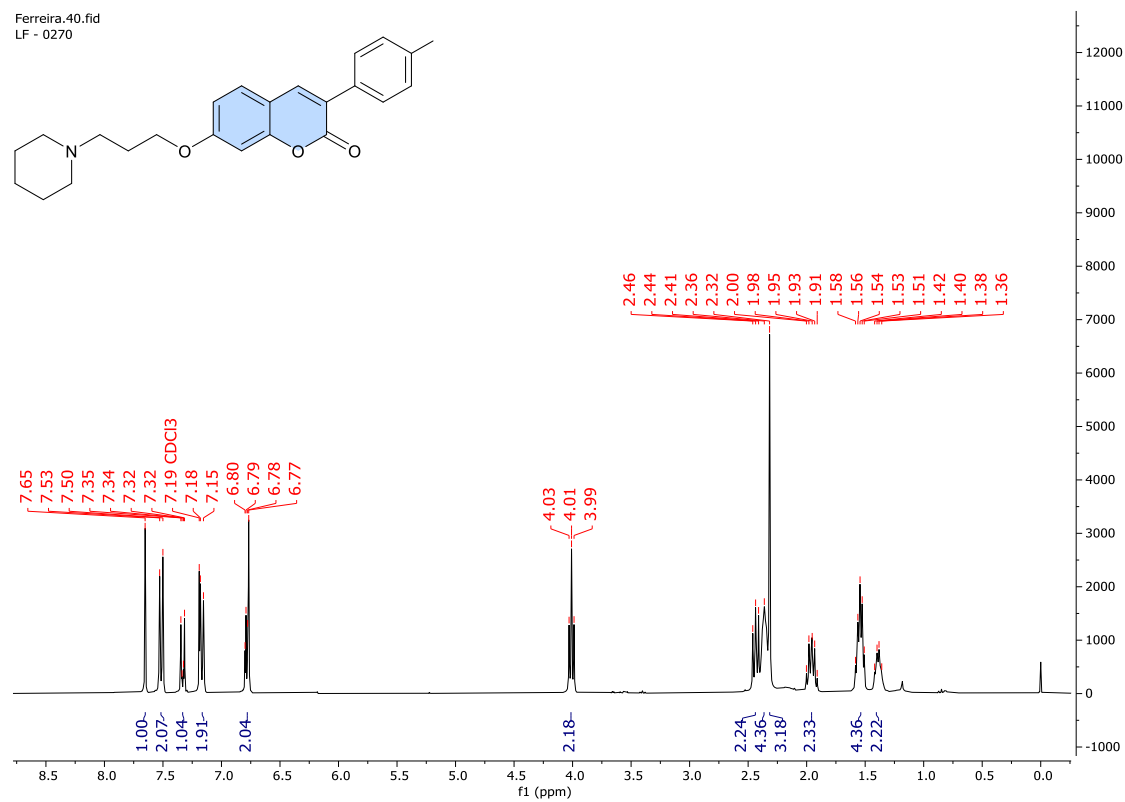


Figura S59. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51b**) em CDCl_3 a 75 MHz

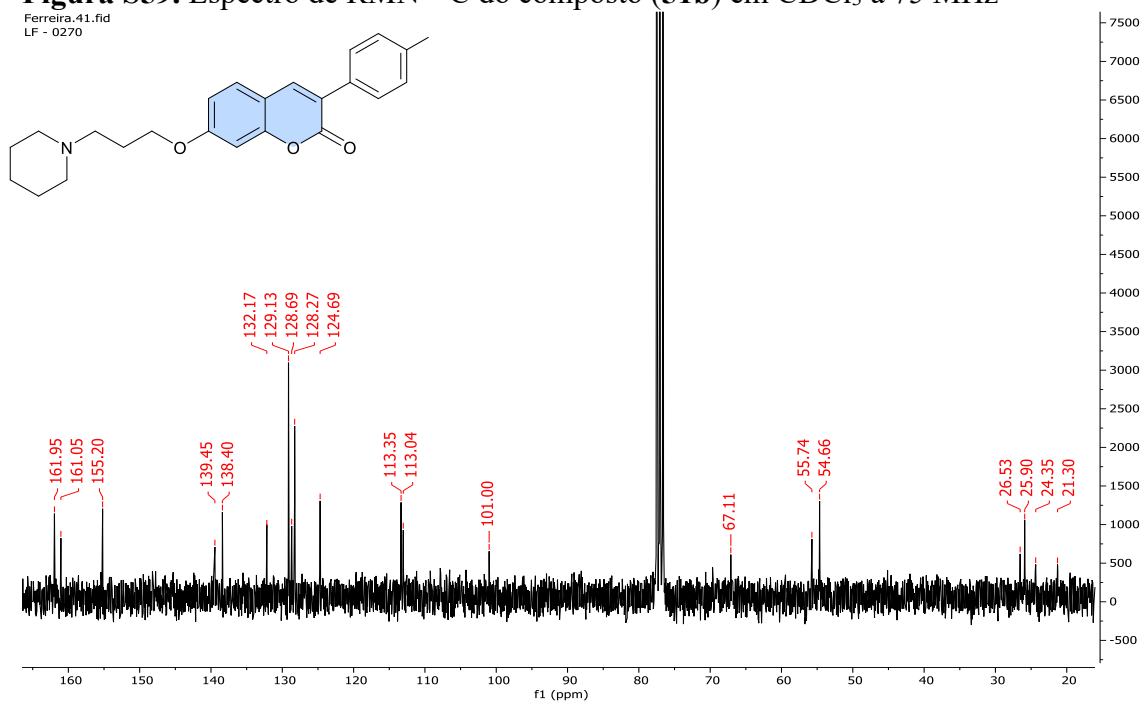


Figura S60. Espectro de RMN ^1H do composto (**51c**) em $\text{DMSO}-d_6$ a 500 MHz

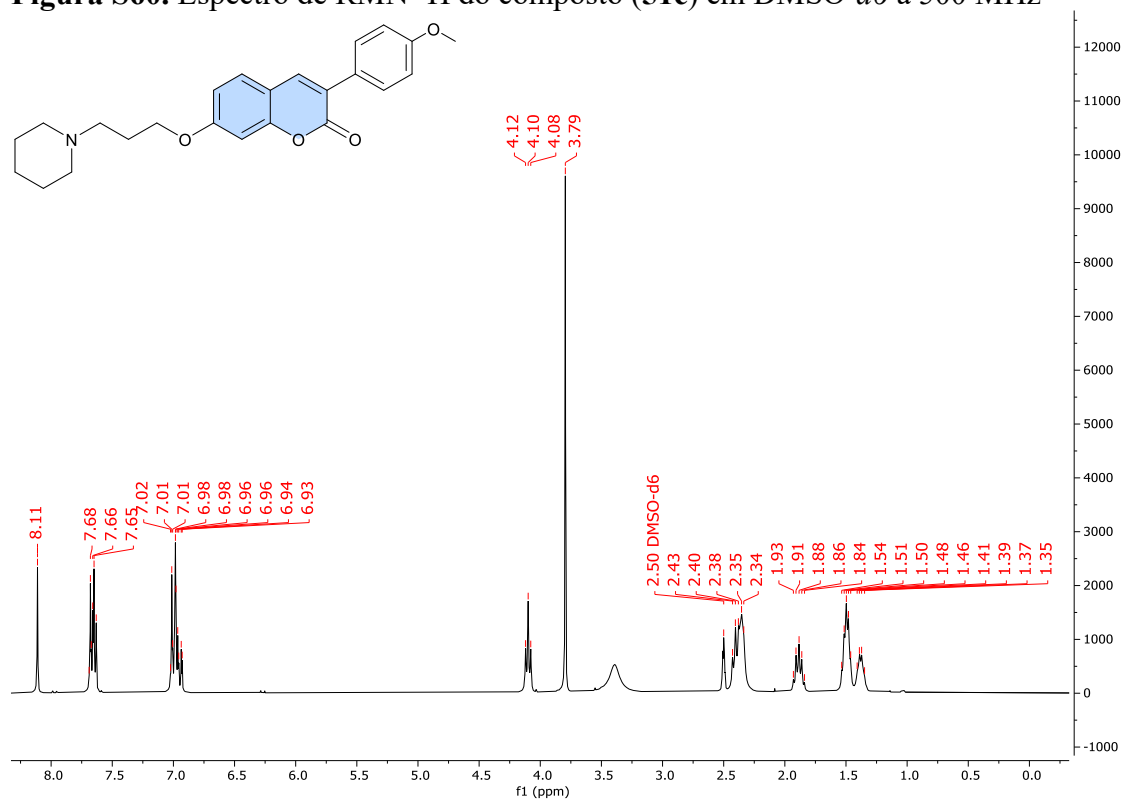


Figura S61. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51c**) em DMSO- d_6 a 125 MHz

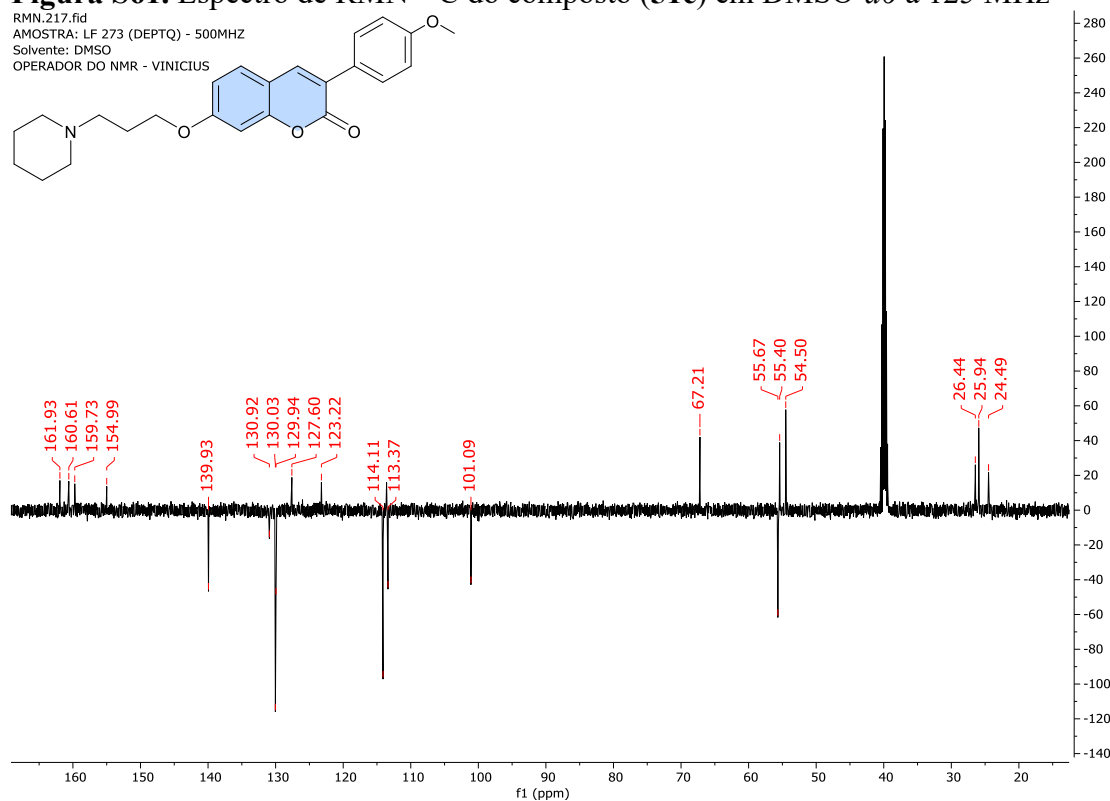


Figura S62. Espectro de RMN ^1H do composto (**51d**) em CDCl_3 a 300 MHz

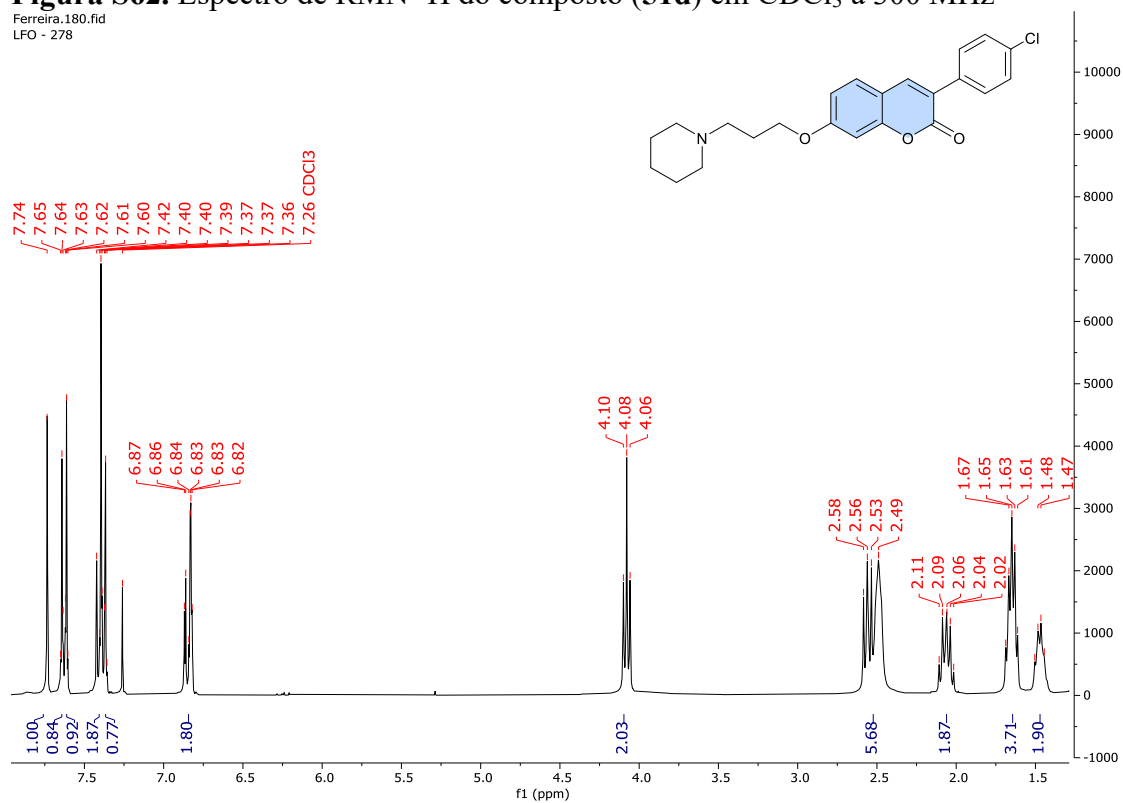


Figura S63. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51d**) em CDCl_3 a 125 MHz

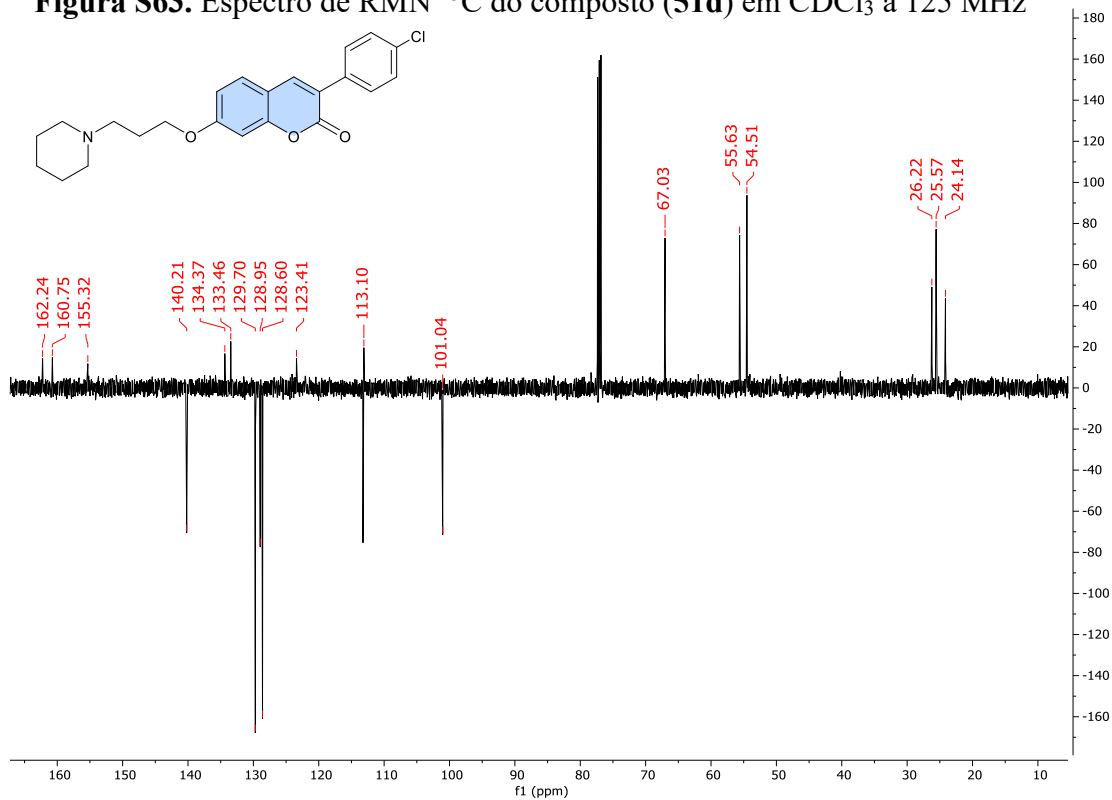


Figura S64. Espectro de RMN ^1H do composto (**51e**) em $\text{DMSO}-d_6$ a 500 MHz

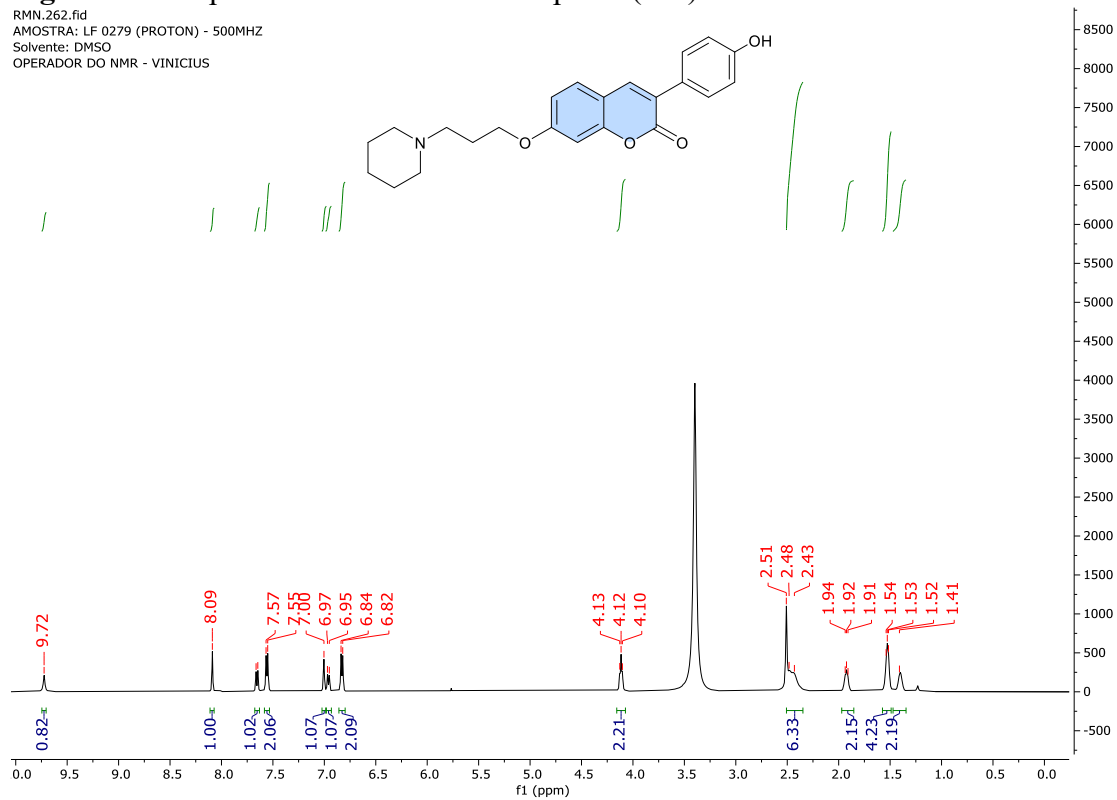


Figura S65. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51e**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 125 MHz

RMN/263 LF0279
AMOSTRA: LF 0279 (DEPTQ) - 500MHZ
Solvente: DMSO
OPERADOR DO NMR - VINICIUS

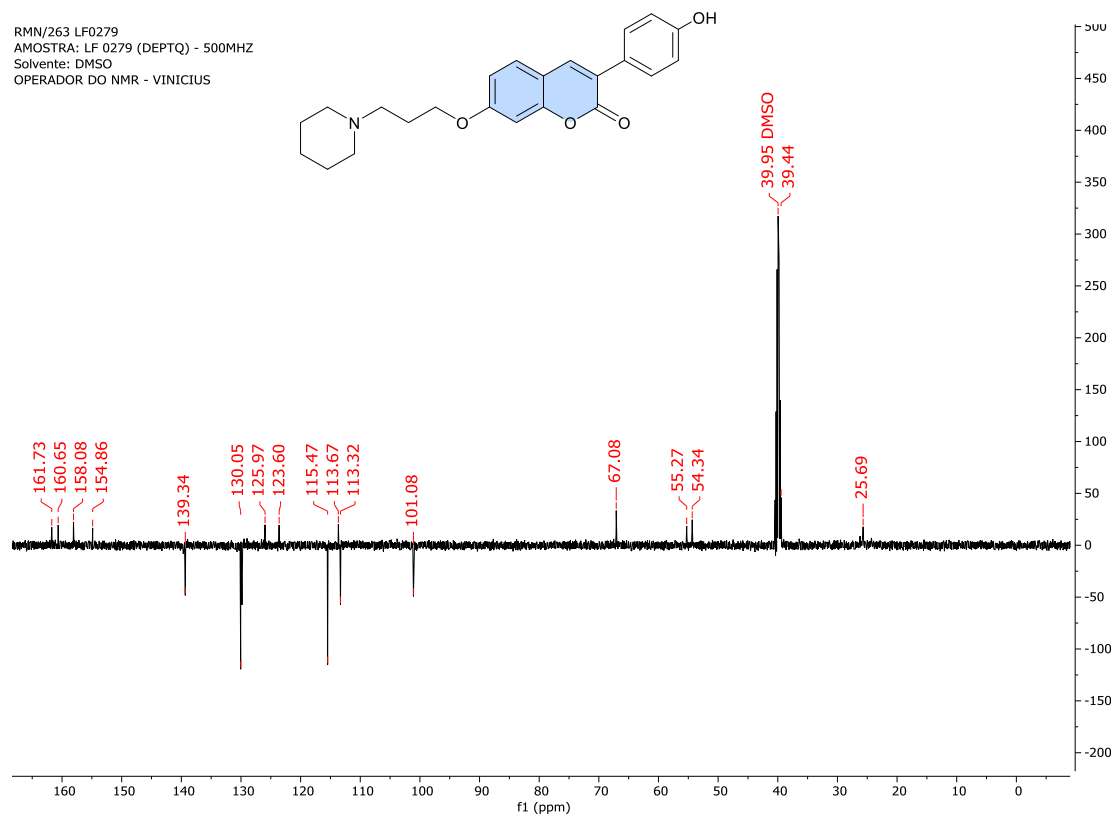


Figura S66. Espectro de RMN ^1H do composto (**51f**) em CDCl_3 a 500 MHz

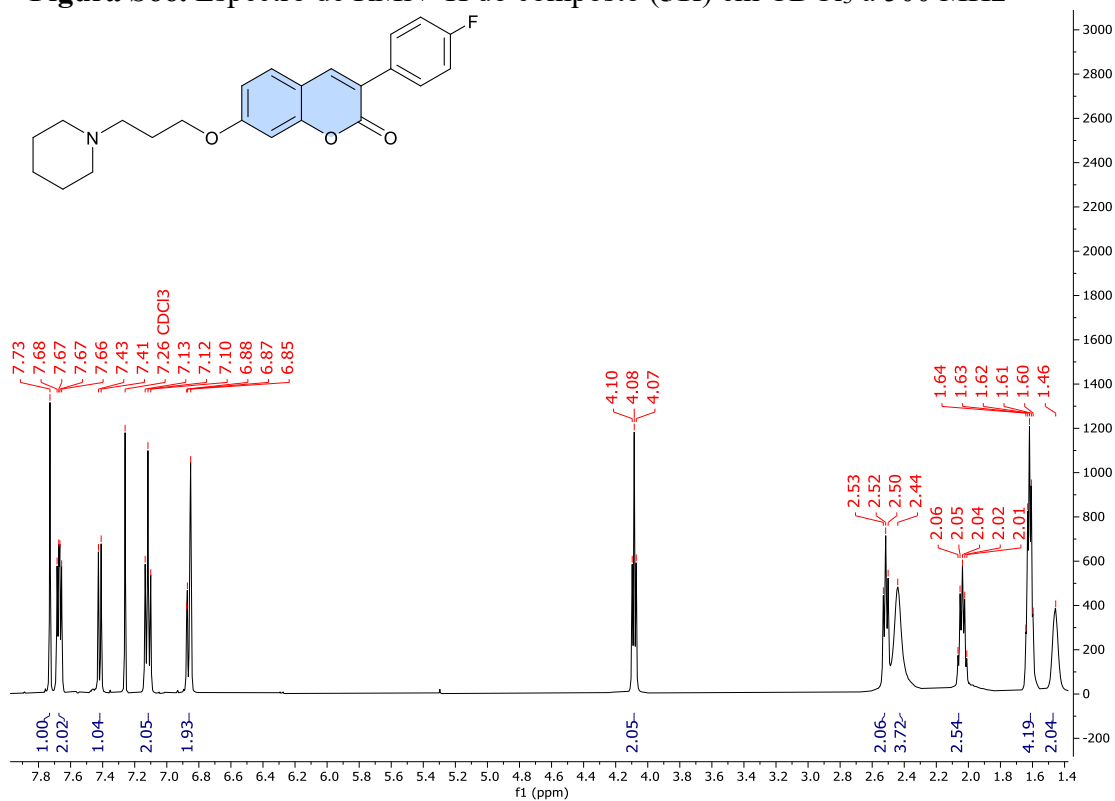


Figura S67. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51f**) em CDCl_3 a 125 MHz

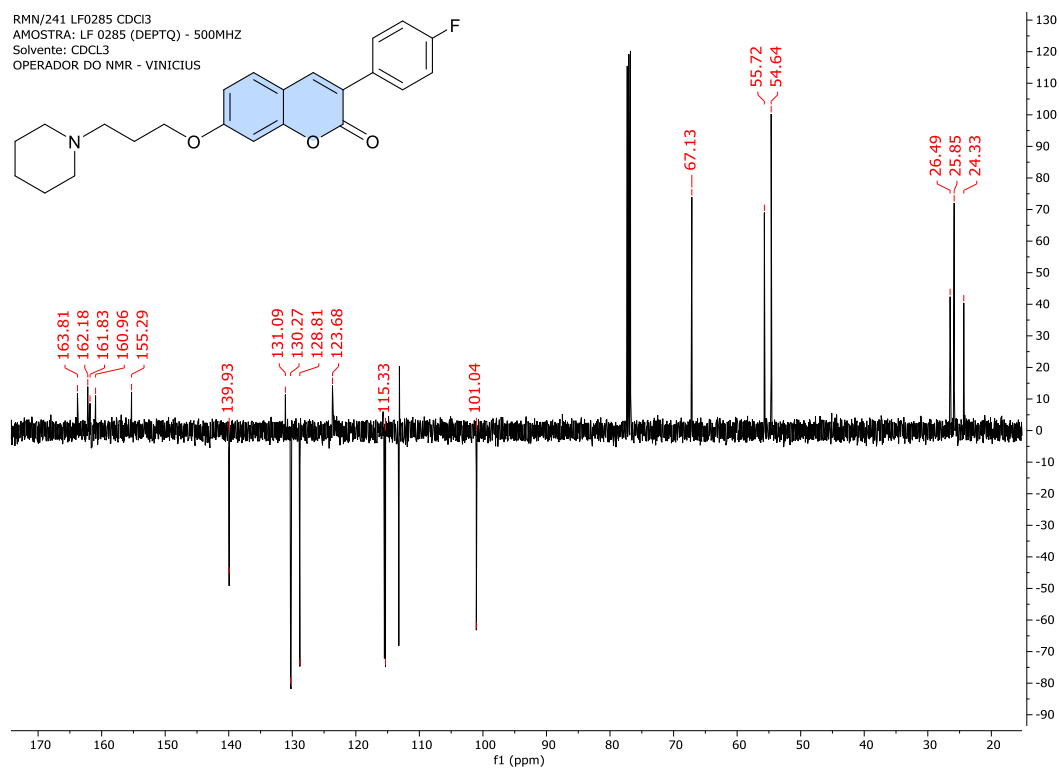
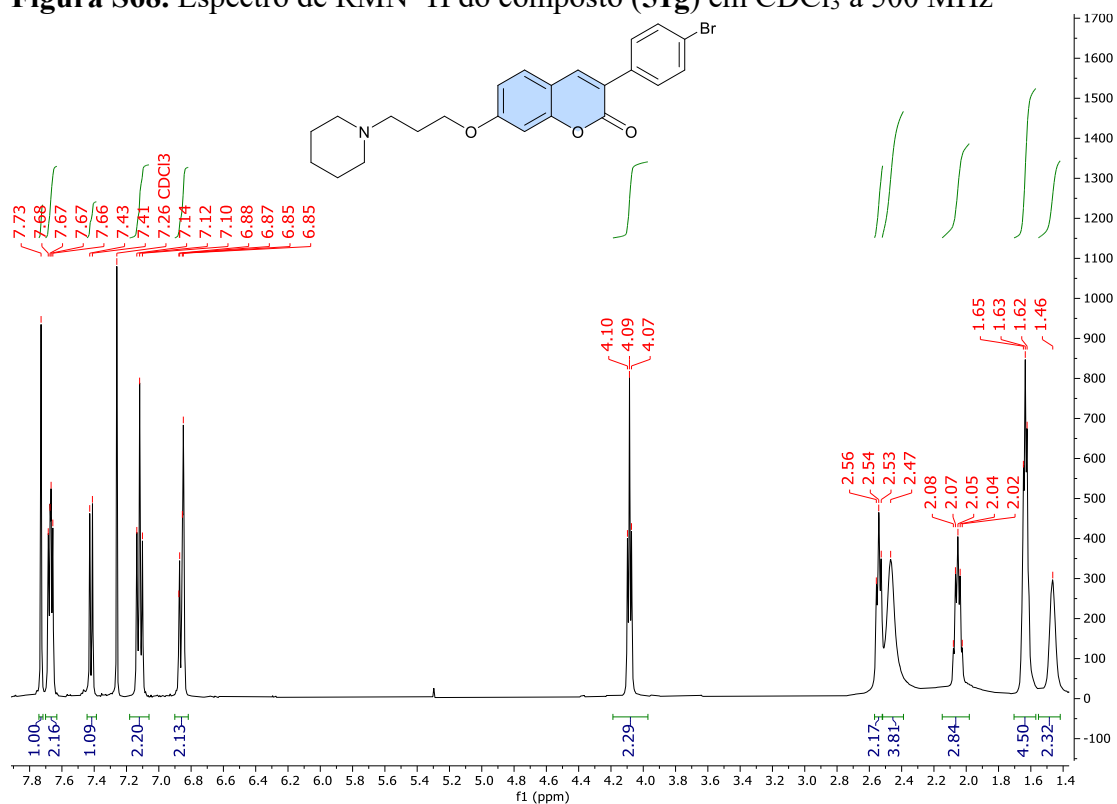


Figura S68. Espectro de RMN ^1H do composto (**51g**) em CDCl_3 a 500 MHz



g) ¹³C NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10g. The chemical structure of 10g is shown above the spectrum. The spectrum displays peaks corresponding to the carbons in the molecule, with the following chemical shifts (ppm) labeled: 163.81, 162.18, 161.83, 160.96, 155.29, 139.93, 131.09, 130.27, 128.81, 123.68, 115.50, 115.33, 113.24, 101.04, 67.13, 55.72, 54.64, 26.49, 25.85, and 24.33.

Figura S76. Espectro de RMN ¹H do composto (511) em CDCl₃ a 300 MHz

Chemical structure: O=[N+]([O-])c1ccc(cc1)-c2cc3c(cc2)c(=O)oc4ccc(OCCCN5CCCCC5)cc34

¹³C NMR spectrum (CDCl₃) showing peaks (ppm):

Peak (ppm)
163.00
160.22
155.79
147.43
141.84
141.54
129.19
123.66
122.19
113.63
112.79
101.13
77.15 (CDCl ₃)
55.59
54.54
26.21
25.57
24.14

N#Cc1ccc(cc1)c2cc3c(cc2)oc(=O)c3c4ccc(OCCCN5CCCCC5)cc4

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of 4-(4-cyanophenyl)-2-(4-(4-(piperidin-4-ylbutoxy)phenyl)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-2H-chromen-3-one. The spectrum displays peaks from 1.45 to 7.85 ppm. Integration values are provided below the peaks.

Chemical Shift (ppm)	Integration
7.85, 7.84, 7.83, 7.82, 7.81, 7.81, 7.73, 7.72, 7.71, 7.70, 7.69, 7.47, 7.44, 7.26 (CDCl ₃)	1.80, 1.10, 1.13, 0.72, 1.00, 1.94
6.91, 6.90, 6.88, 6.87, 6.86, 6.85	1.94
4.12, 4.10, 4.08	2.05, 2.00
2.53, 2.50, 2.48, 2.45, 2.43, 2.41	2.02, 3.90
2.06, 2.03, 2.01	3.11
1.59, 1.45	4.04, 2.07

Figura S73. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51i**) em CDCl_3 a 75 MHz

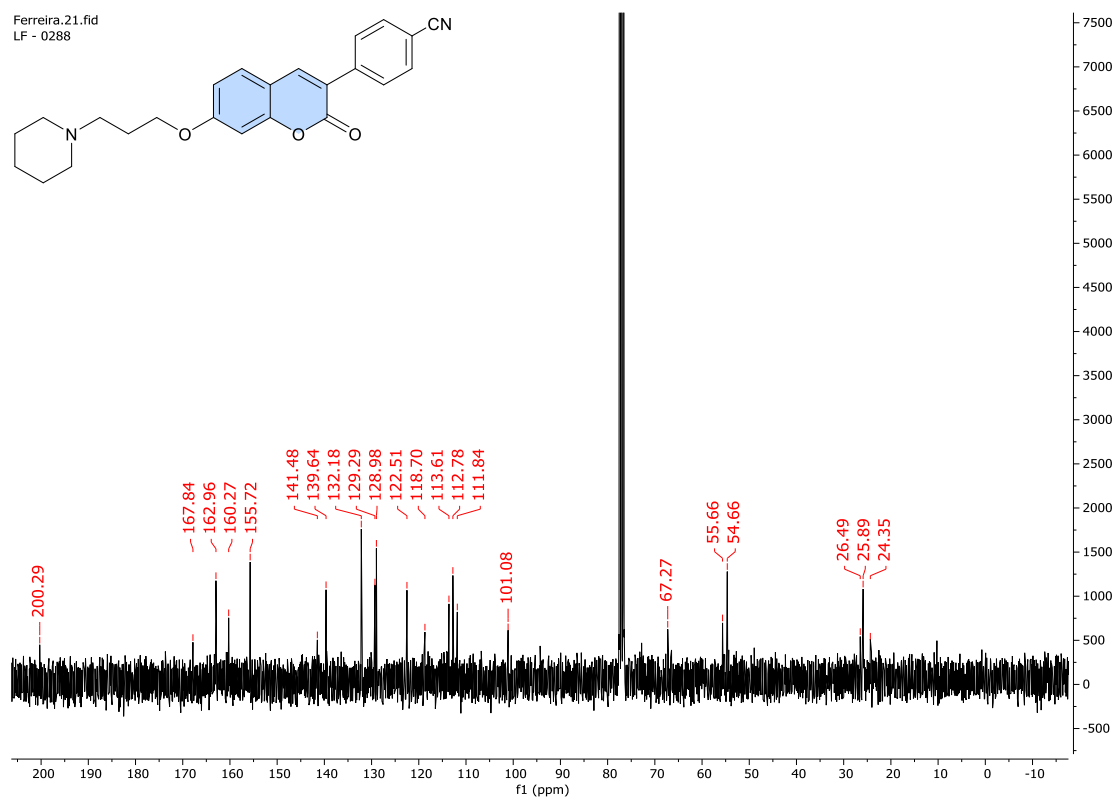


Figura S74. Espectro de RMN ^1H do composto (**51j**) em CDCl_3 a 500 MHz

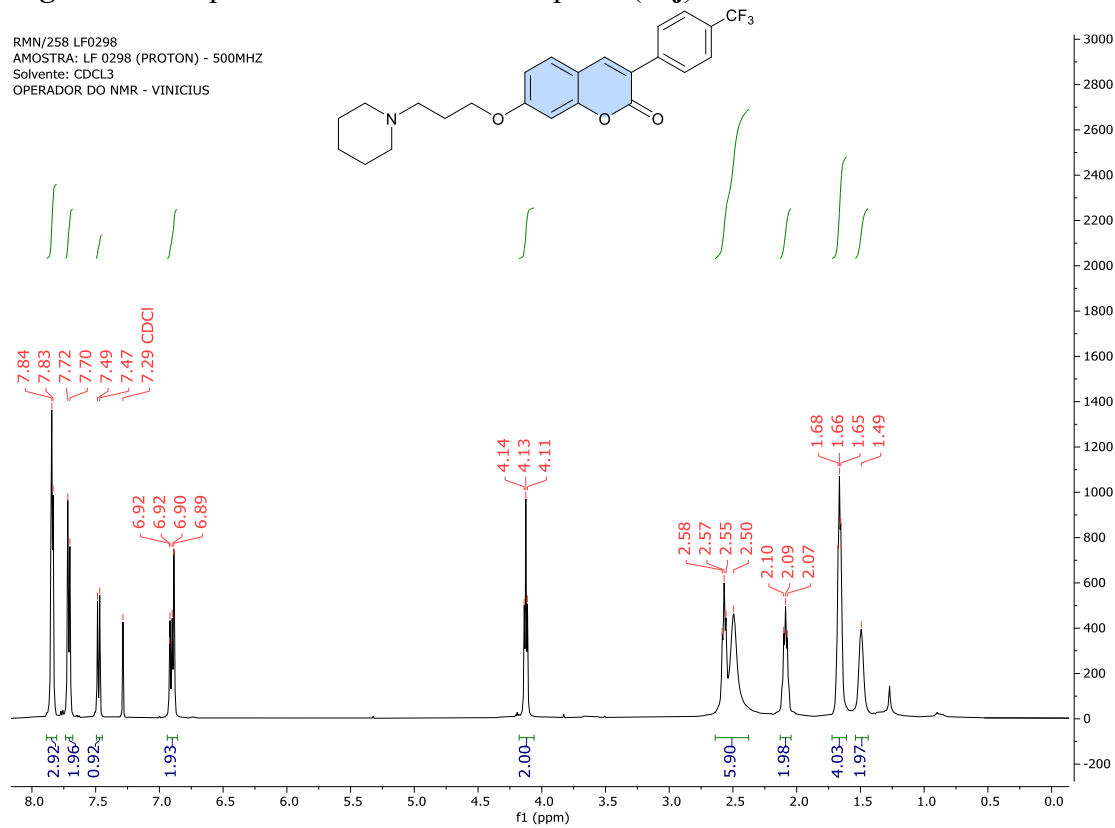


Figura S75. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51j**) em CDCl_3 a 125 MHz

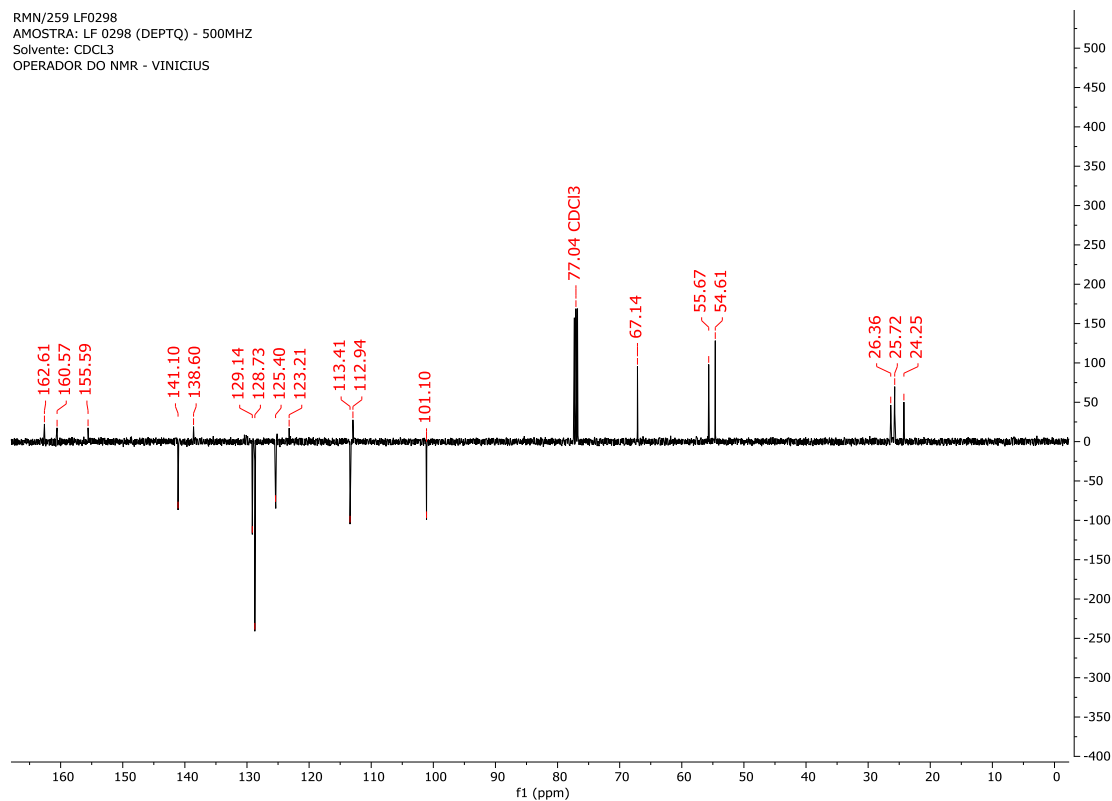


Figura S76. Espectro de RMN ^1H do composto (**51k**) em CDCl_3 a 300 MHz

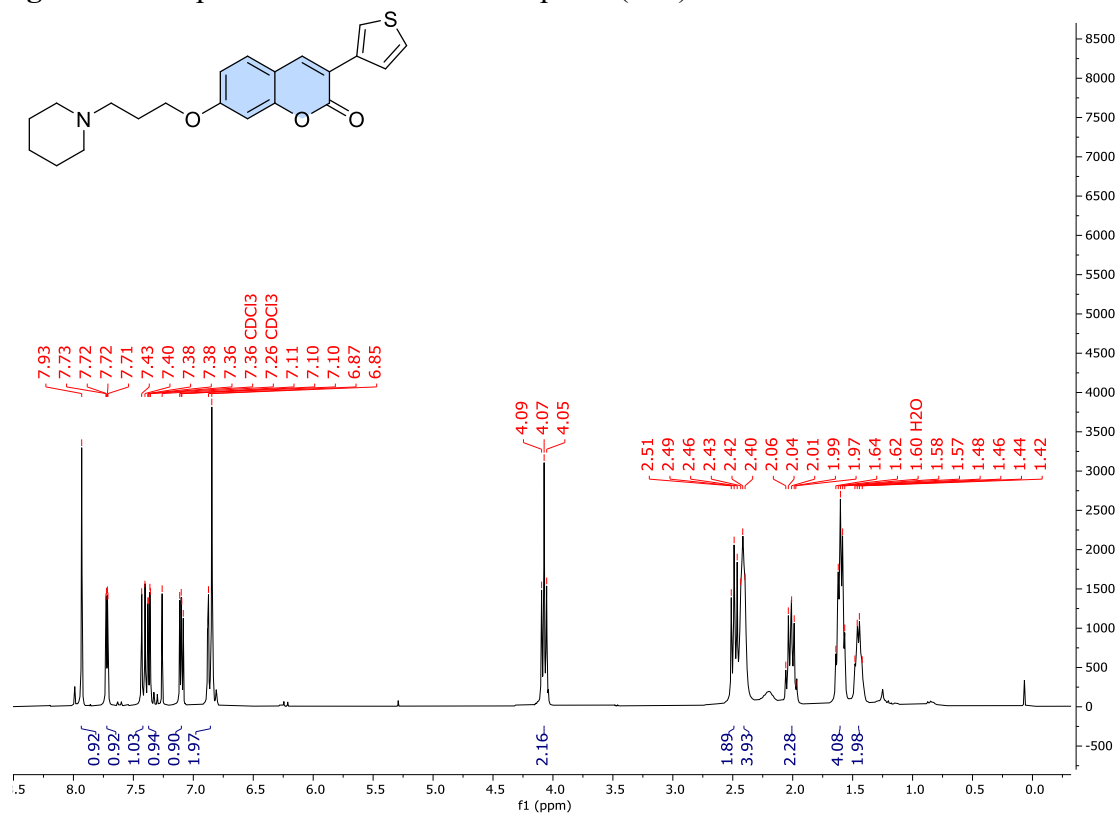


Figura S77. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51k**) em CDCl_3 a 75 MHz

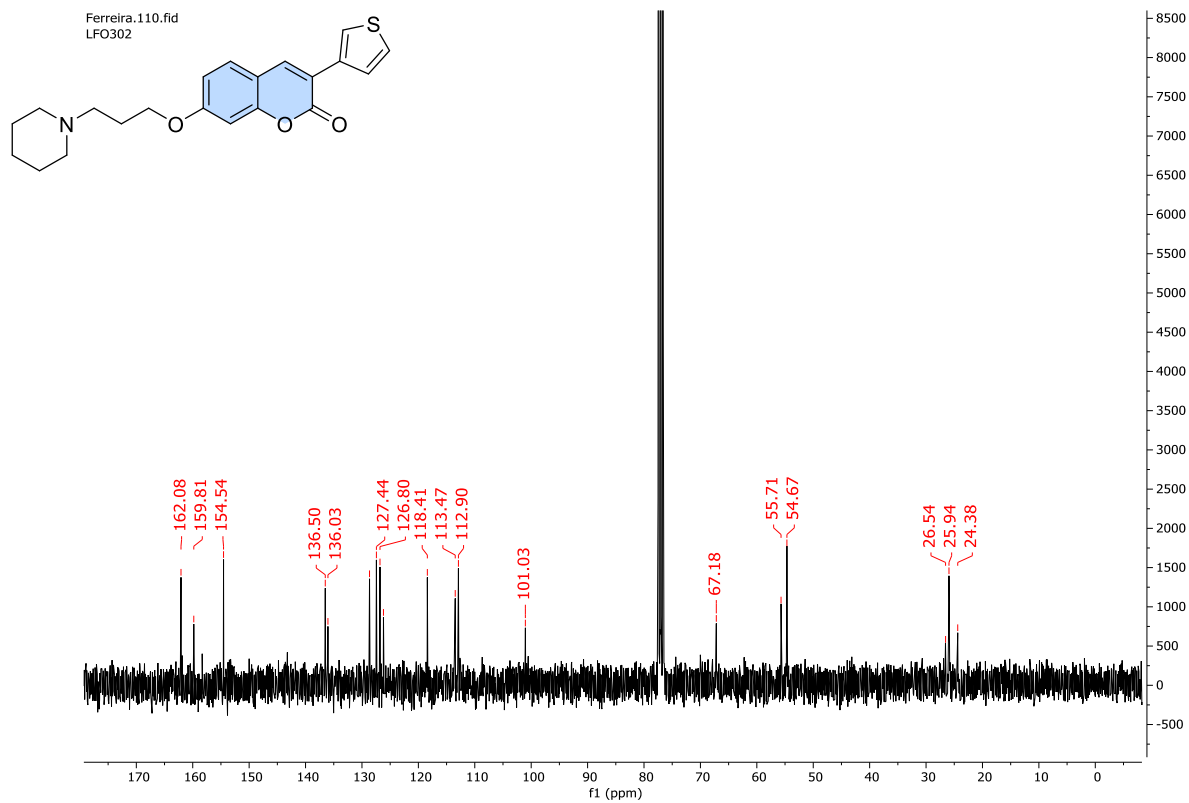


Figura S78. Espectro de RMN ^1H do composto (**51l**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz

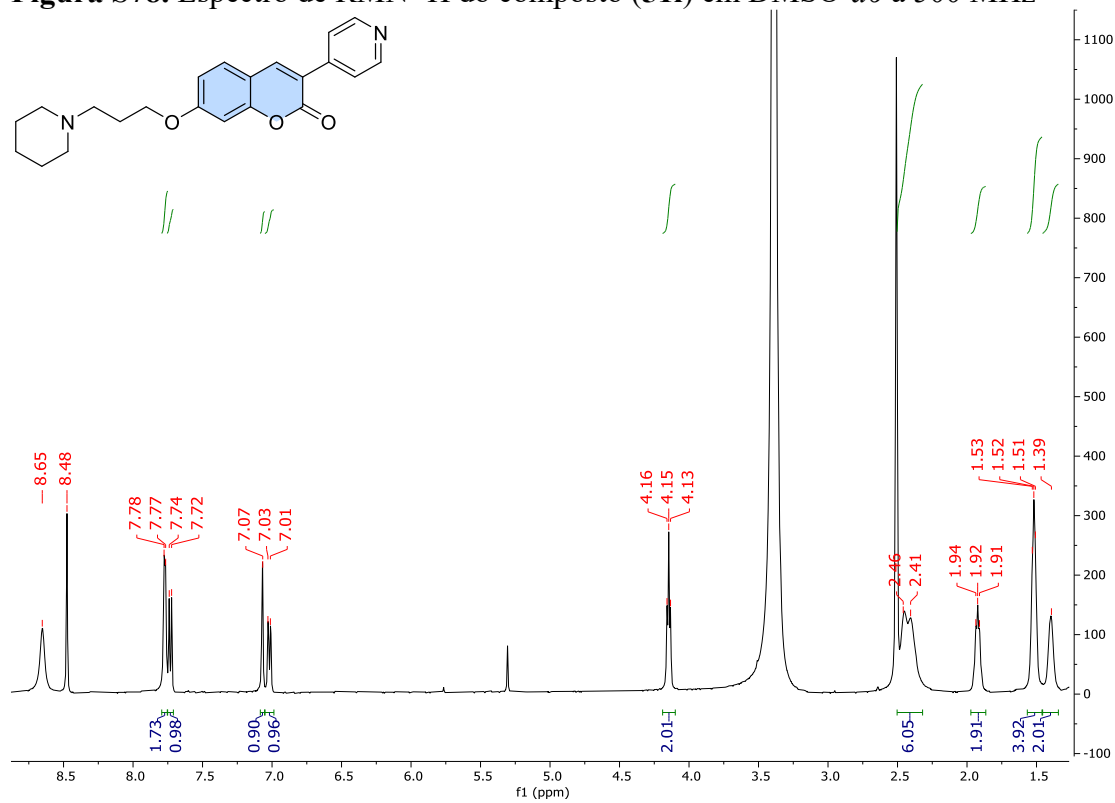


Figura S79. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51l**) em DMSO- d_6 a 125 MHz

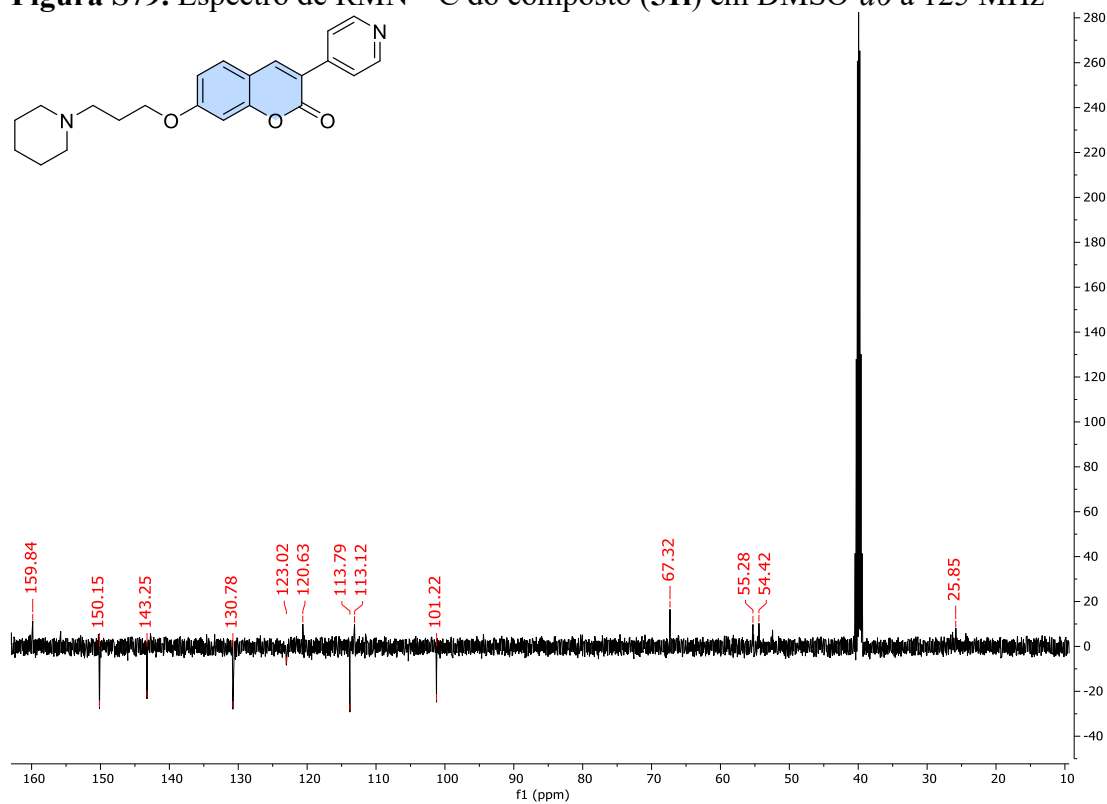


Figura S80. Espectro de RMN ^1H do composto (**51m**) em CDCl_3 a 300 MHz

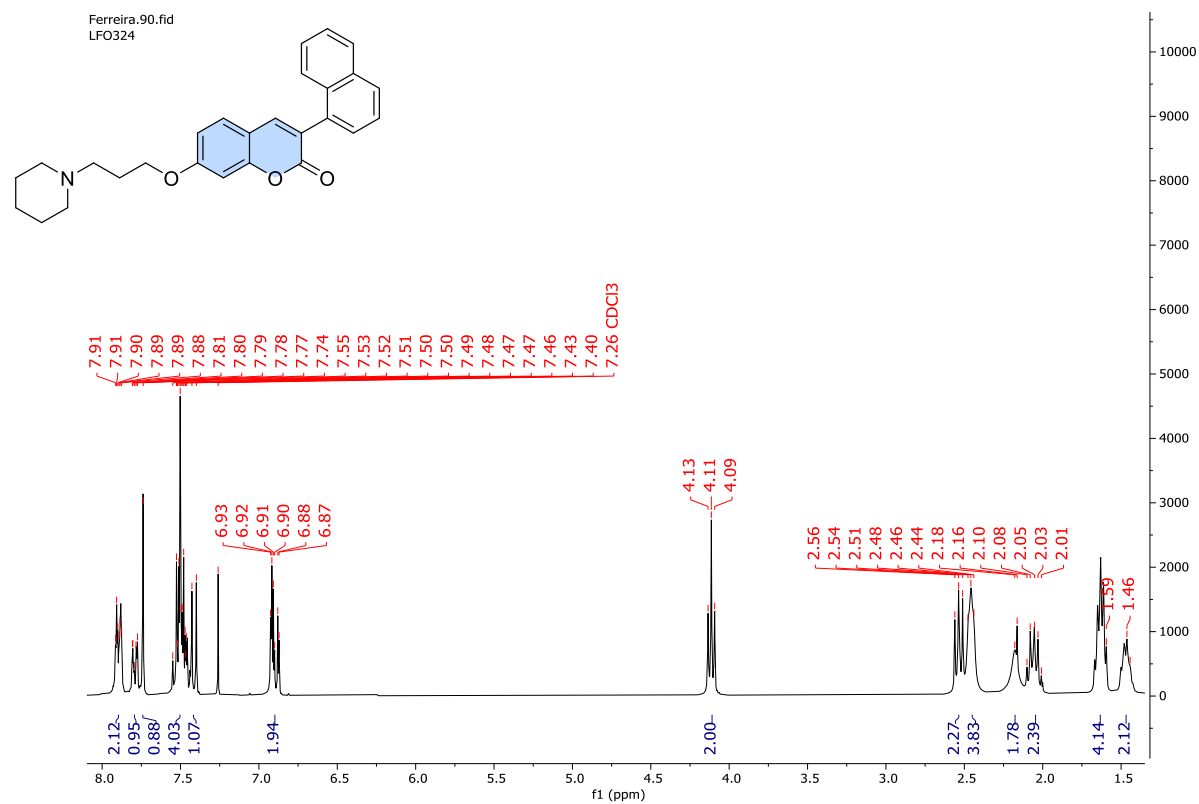


Figura S81. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51m**) em CDCl_3 a 75 MHz

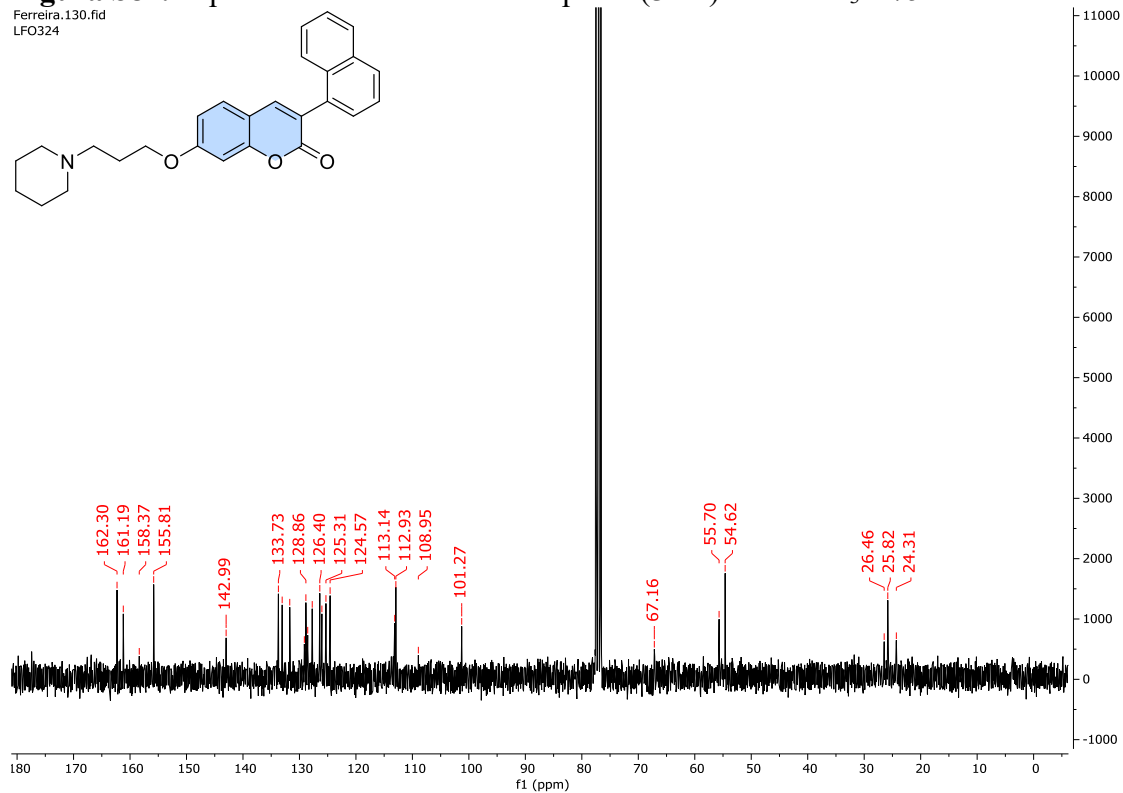


Figura S82. Espectro de RMN ^1H do composto (**51n**) em CDCl_3 a 300 MHz

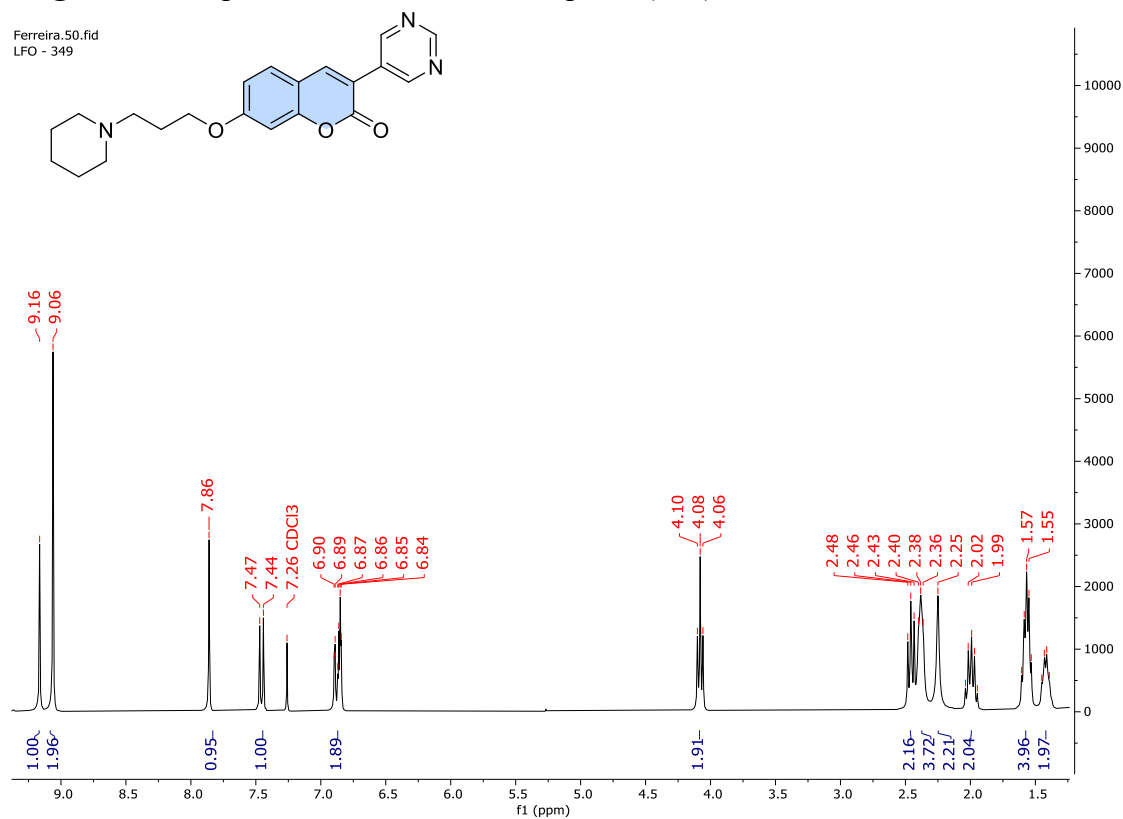


Figura S83. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51n**) em CDCl_3 a 75 MHz

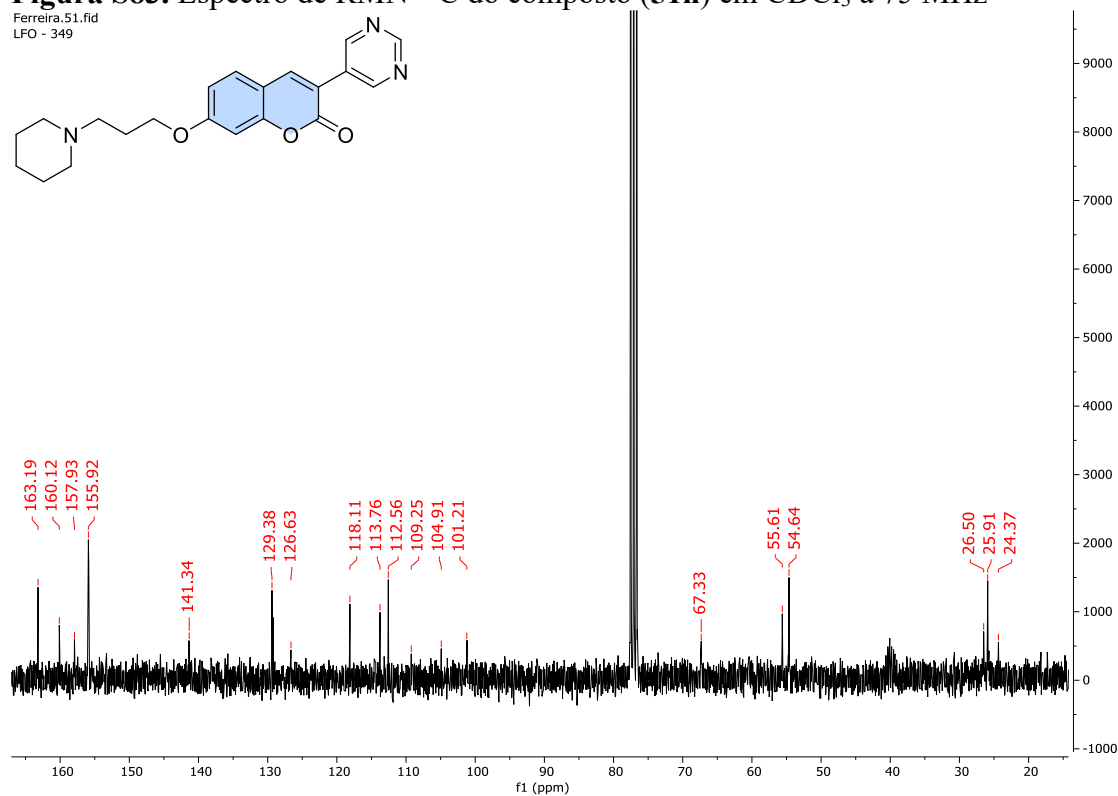


Figura S84. Espectro de RMN ^1H do composto (**51o**) em CDCl_3 a 300 MHz

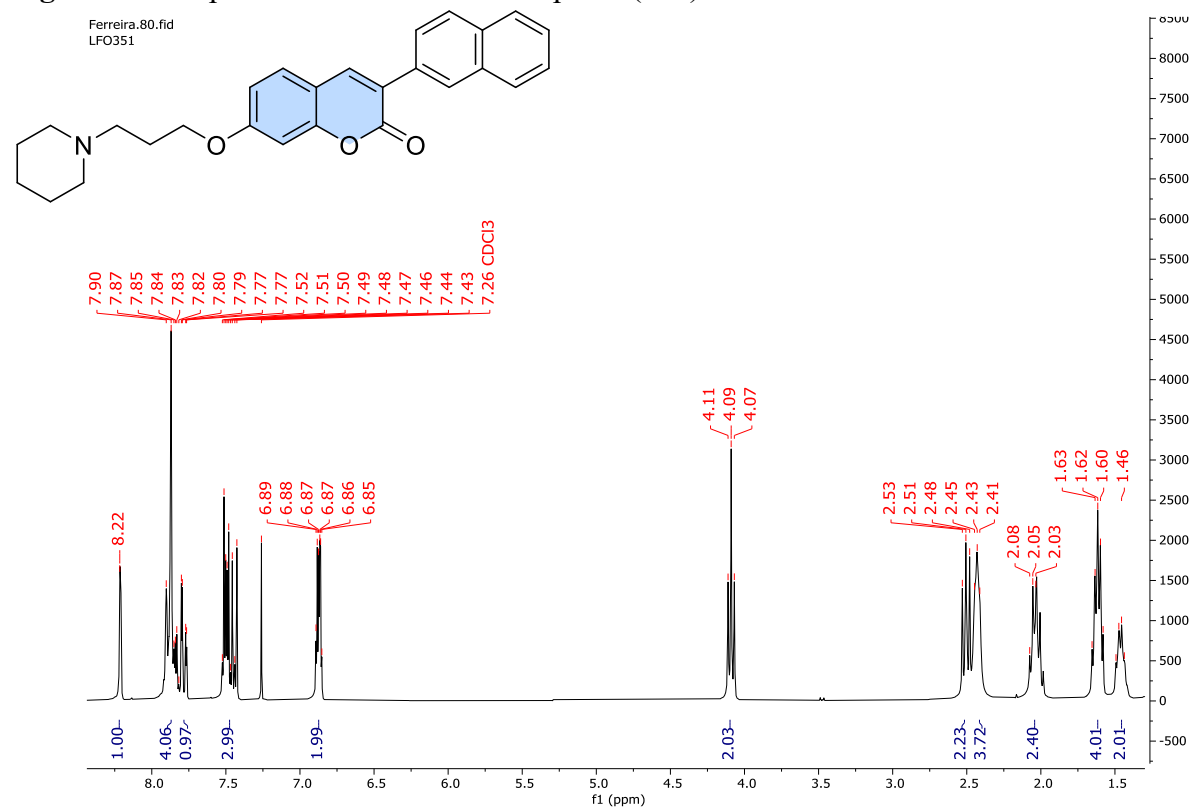


Figura S85. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51o**) em CDCl_3 a 75 MHz

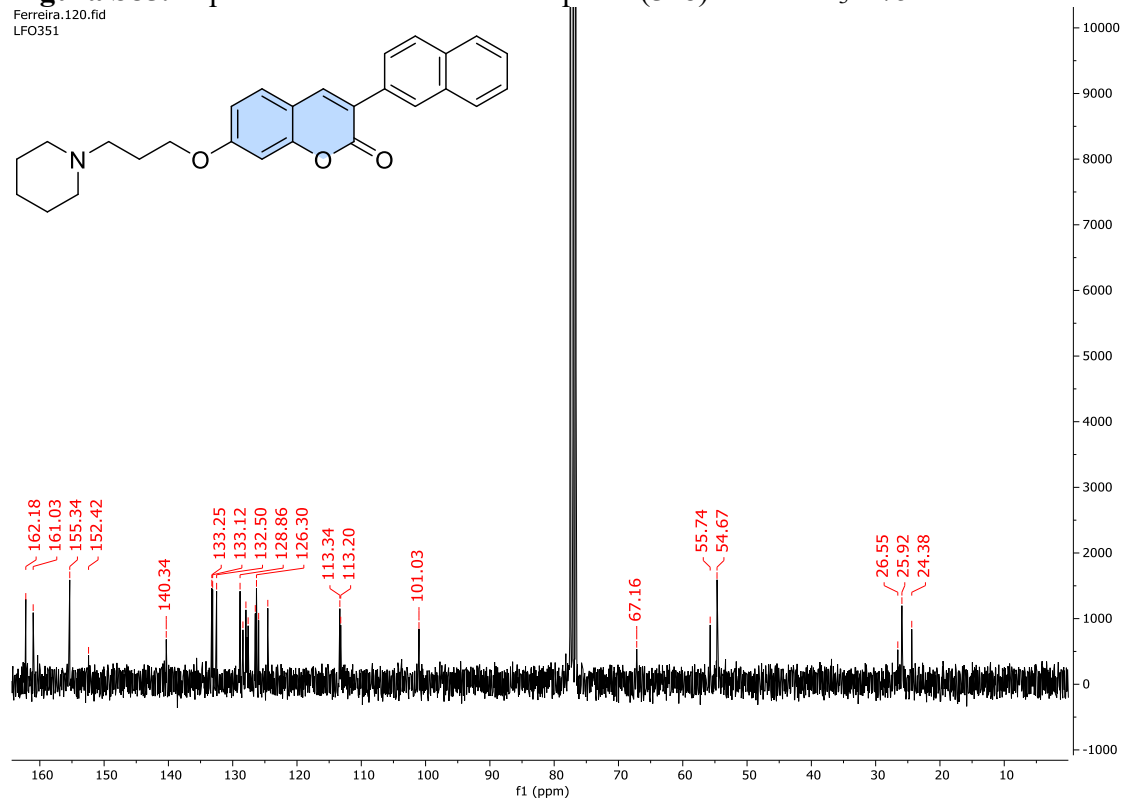


Figura S86. Espectro de RMN ^1H do composto (**51p**) em CDCl_3 a 300 MHz

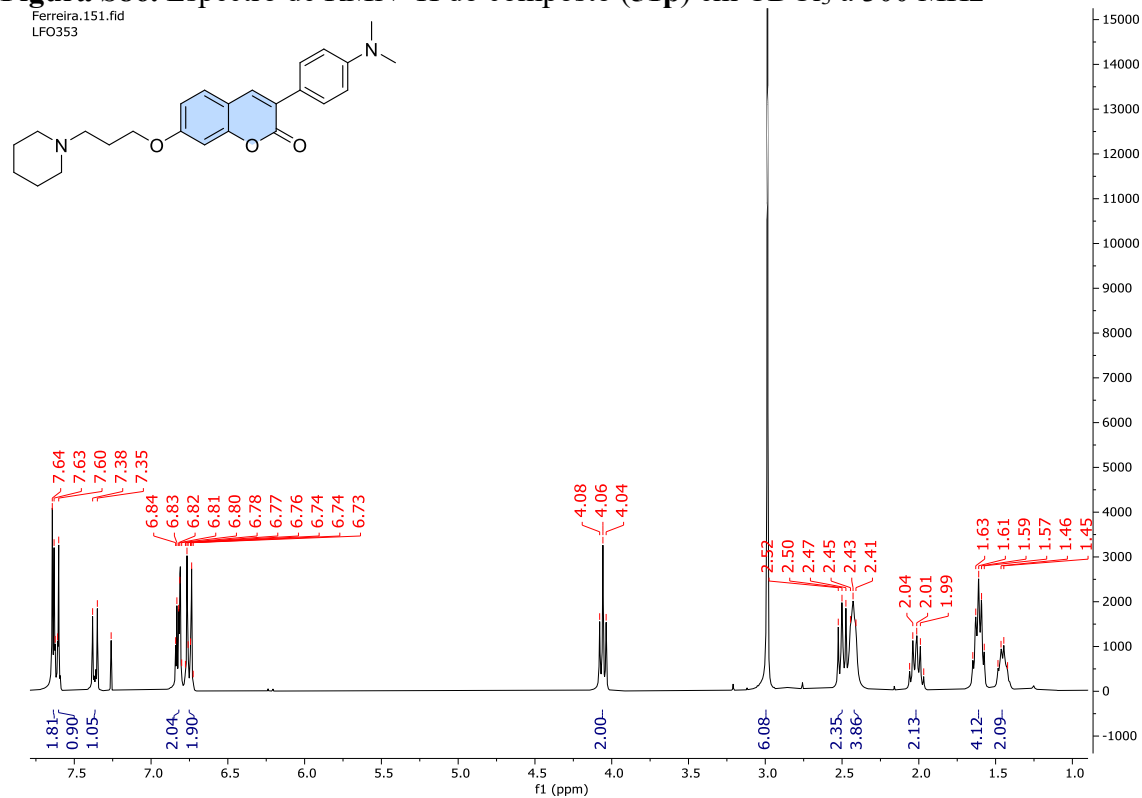


Figura S87. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51p**) em CDCl_3 a 75 MHz

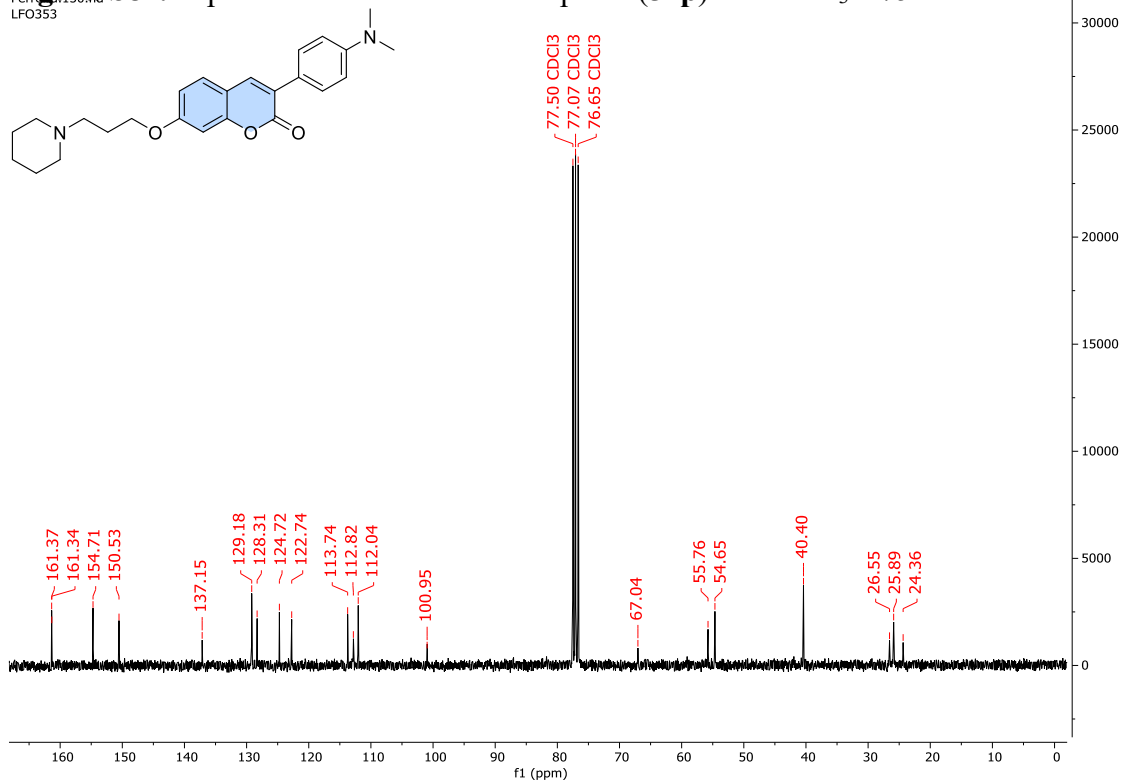


Figura S88 Espectro de RMN ^1H do composto (**51q**) em CDCl_3 a 500 MHz

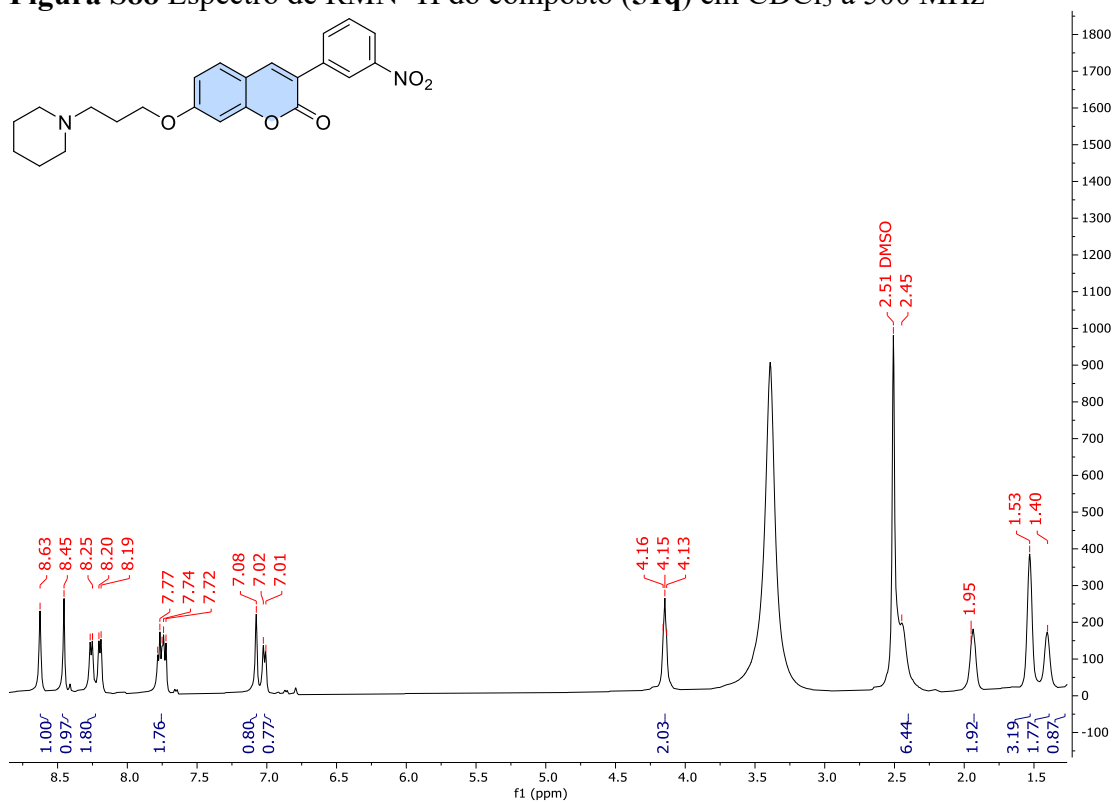


Figura S89. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51q**) em CDCl_3 a 125 MHz

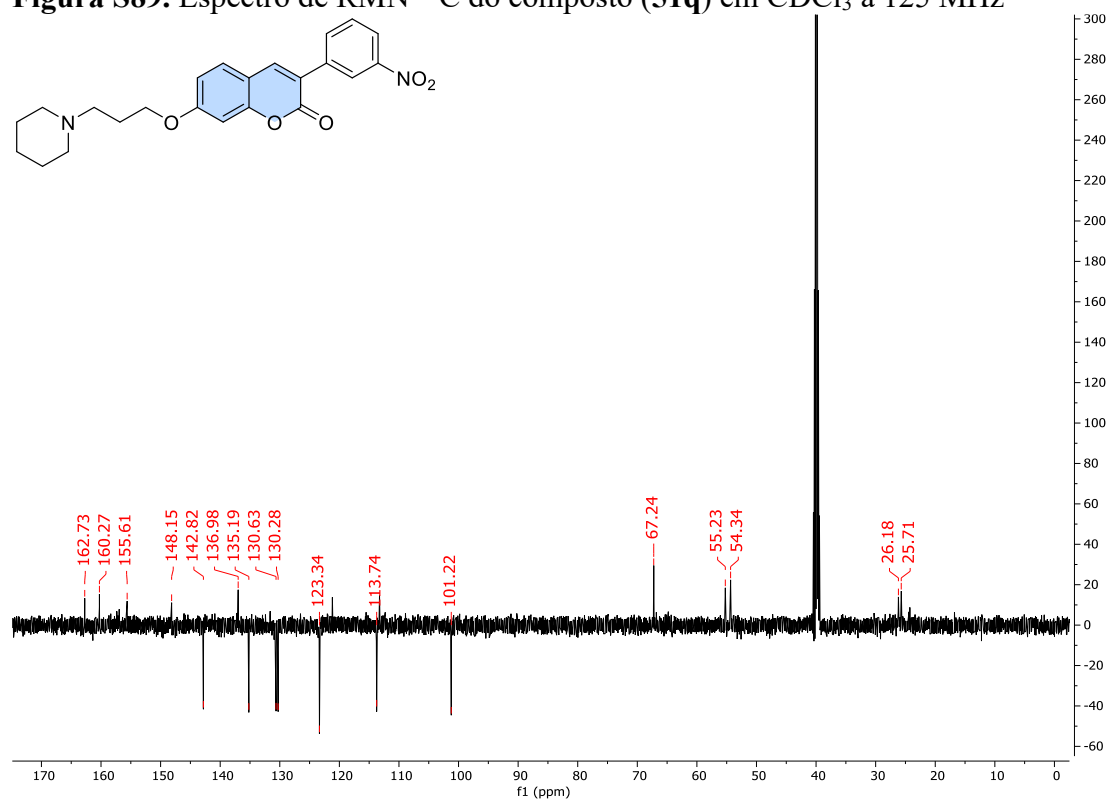
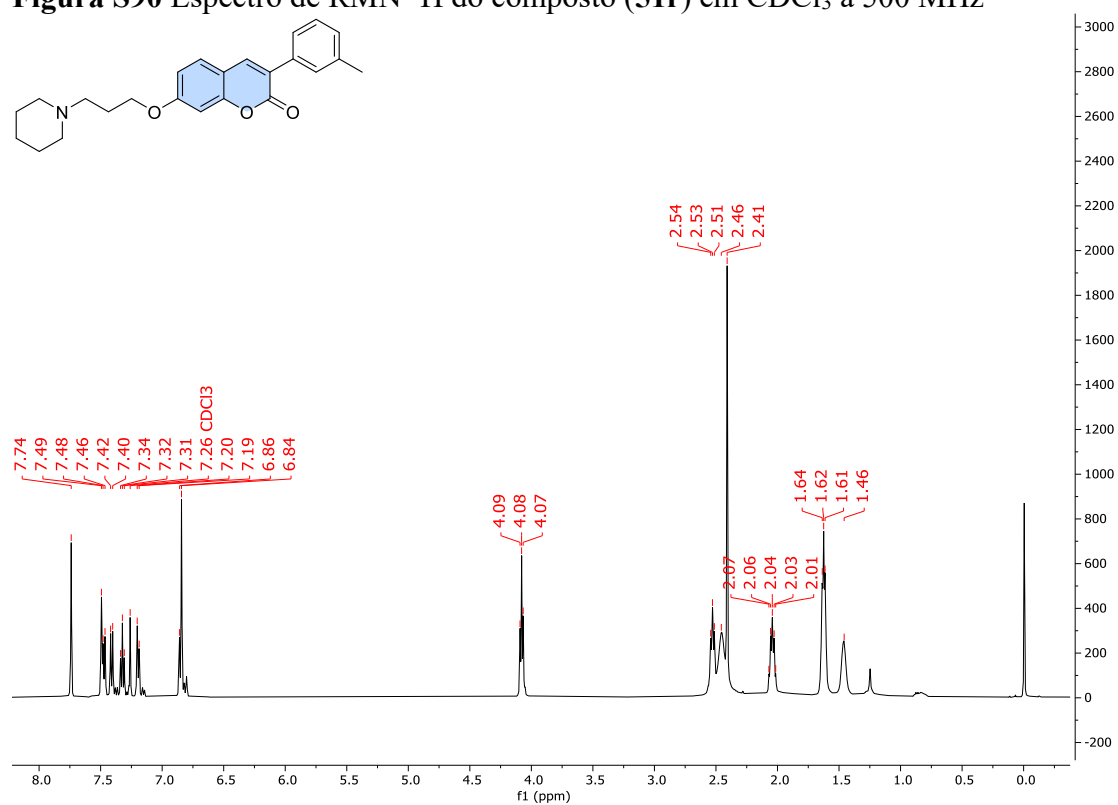


Figura S90 Espectro de RMN ^1H do composto (**51r**) em CDCl_3 a 500 MHz



Chemical structure: CC1=CC=C(C=C1)c2cc3c(cc2)oc(=O)c3OCCCN4CCCCC4

¹³C NMR spectrum (CDCl₃) showing peaks (ppm):

- 162.01, 161.04, 155.26
- 140.04, 138.06, 135.02, 129.25, 129.07, 128.77, 128.36
- 113.09, 101.00
- 77.00 (CDCl₃)
- 67.08, 55.75, 54.64
- 26.46, 25.80, 24.32, 21.55

Figura S93. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51s**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 125 MHz

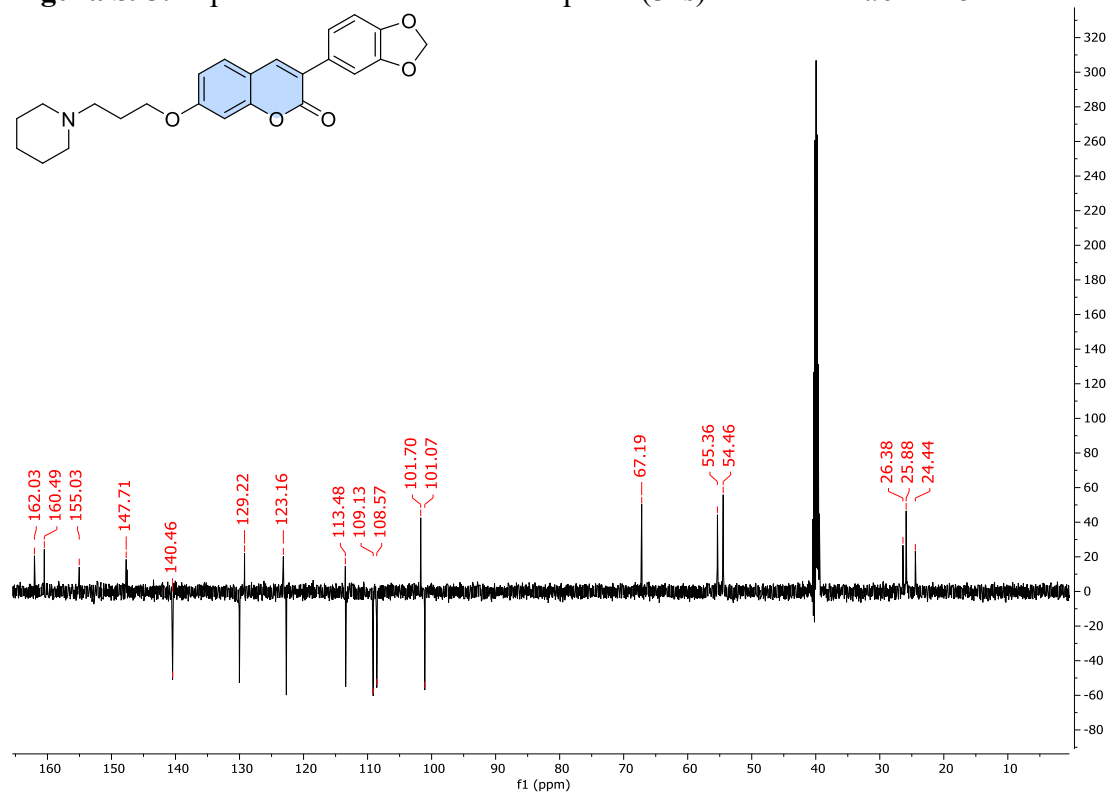


Figura S94. Espectro de RMN ^1H do composto (**51t**) em CDCl_3 a 500 MHz

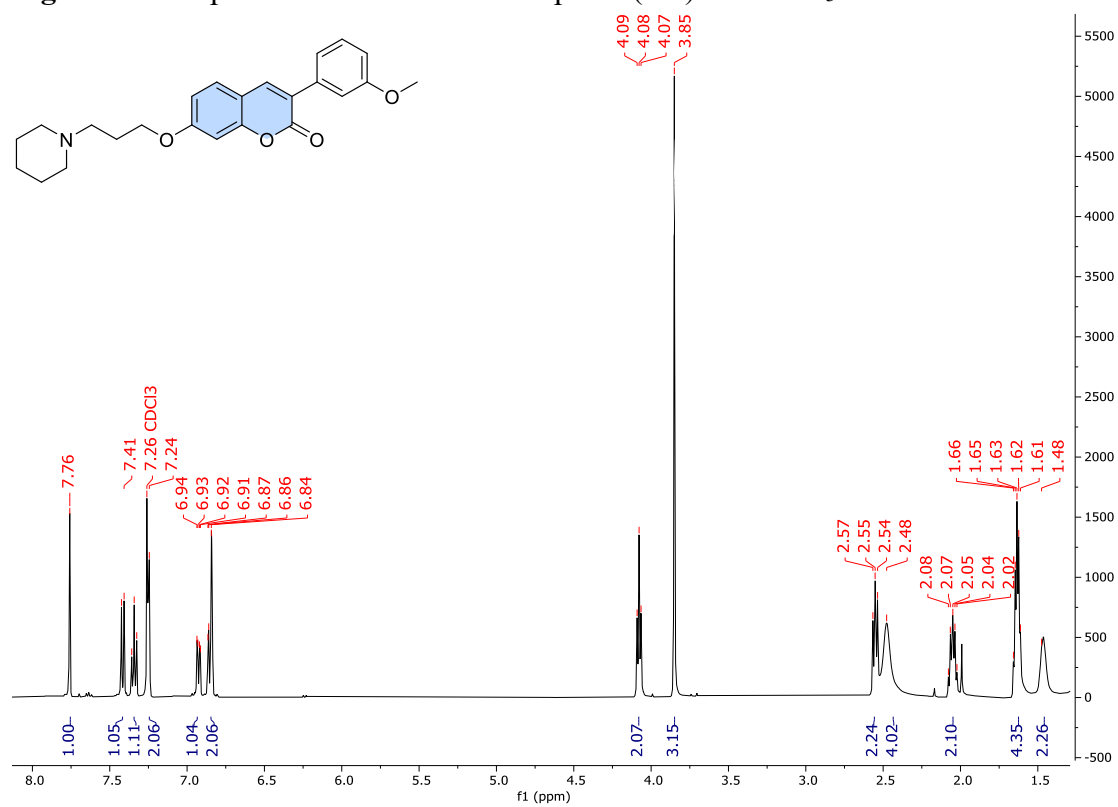


Figura S95. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51t**) em CDCl_3 a 125 MHz

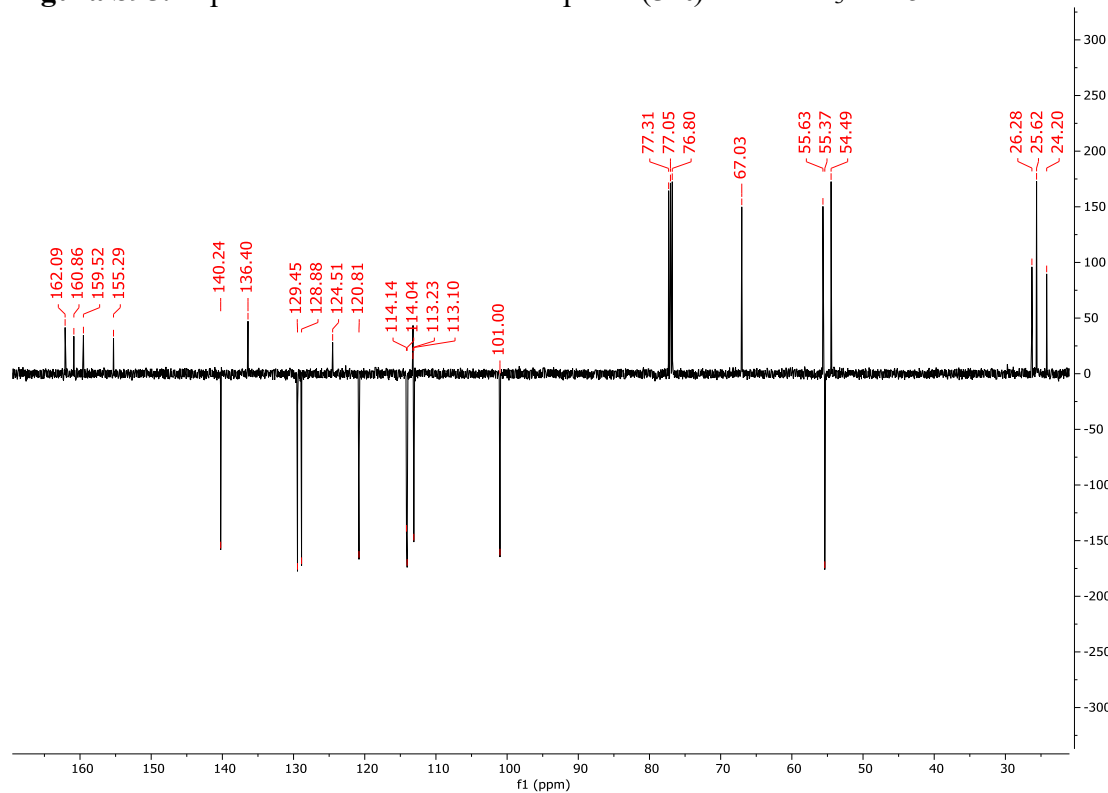
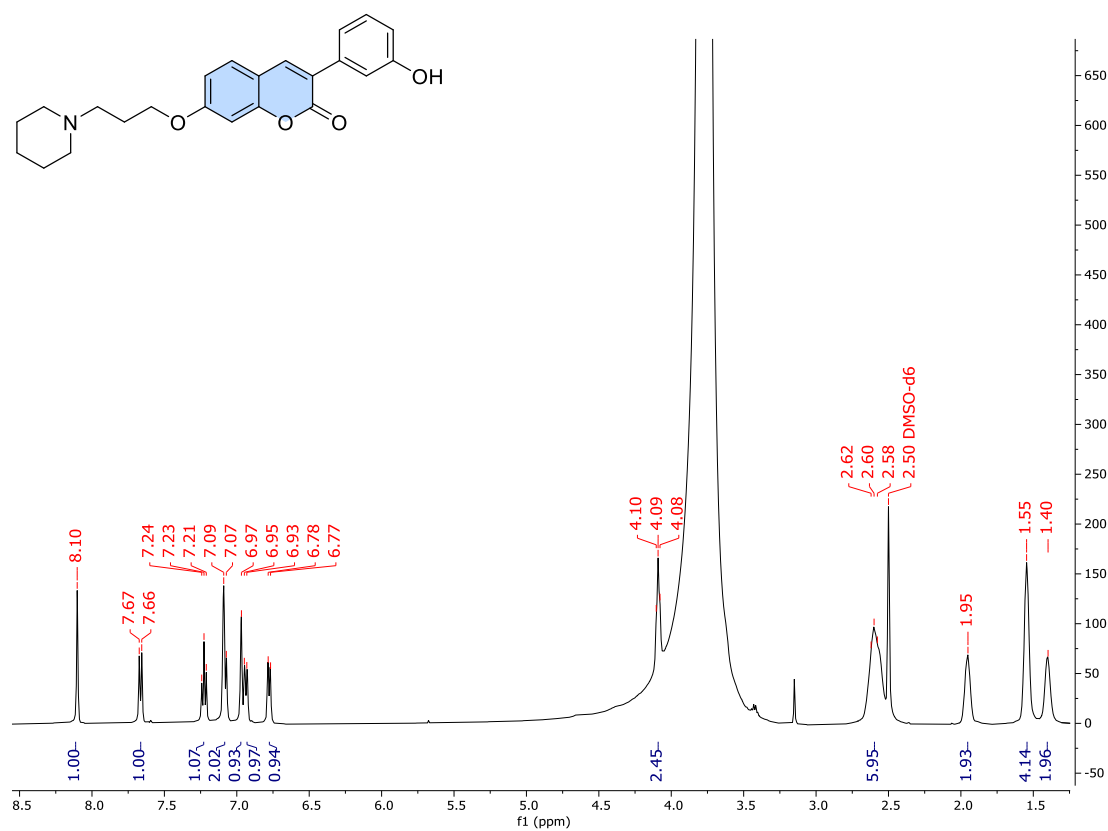


Figura S96. Espectro de RMN ^1H do composto (**51u**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz



g

Oc1ccc(cc1)c2cc3c(cc2O=C3OC(=O)N4CCCCC4)ccc5ccc(OCCOCCN5CCCCC5)cc5

162.02
160.49
157.37
155.10
141.17
136.50
130.25
129.81
123.61
119.57
113.47
101.00
66.95
54.98
53.94
25.46
24.92
23.56

f1 (ppm)

Chemical structure: O=[N+]([O-])c1ccc(cc1)-c2cc3c(cc2)oc(=O)c3OCCN4CCCCC4

¹H NMR spectrum (CDCl₃) showing peaks and integration values:

Chemical Shift (ppm)	Integration
8.11, 8.10	0.98
7.71, 7.68, 7.67, 7.56, 7.48, 7.46, 7.44, 7.42	1.14
6.89, 6.87, 6.86	0.84
4.10, 4.09, 4.08	1.04
2.54, 2.53, 2.51, 2.46	0.99
2.07, 2.06, 2.04, 2.03, 2.02	0.97
1.65, 1.63, 1.61, 1.60, 1.47	1.98

O=[N+]([O-])c1ccc(cc1)-c2cc3c(cc2)c(=O)oc4ccccc34

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of 4-(2-(4-nitrophenyl)-2-oxo-1,3-benzoxazin-5-yl)pyrrolidine. The spectrum shows peaks from 1.47 to 8.11 ppm. Aromatic protons are between 7.42-7.77 ppm, the pyrrolidine ring is at 4.08-4.11 ppm, and aliphatic protons are between 1.47-2.54 ppm. Integration values are shown below the peaks.

Chemical Shift (ppm)	Integration
8.11, 8.10	0.98
7.68, 7.67, 7.56, 7.48	1.14
7.46, 7.44, 7.42	0.84
6.89, 6.87, 6.86	1.04
4.11, 4.09, 4.08	0.99
2.54, 2.53, 2.51, 2.46	0.97
2.07, 2.06, 2.04, 2.03, 2.02	1.98
1.65, 1.63, 1.62, 1.61, 1.60, 1.47	2.17

Chemical structure of compound 10: COc1ccc(cc1)Oc2c(=O)oc3cc(OCCNCC3)ccc23

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10. The x-axis represents the chemical shift in ppm (f1), ranging from 8.0 to 1.5. The y-axis represents intensity, ranging from -200 to 3200. The spectrum shows several peaks corresponding to the structure, with integration values provided for each major peak group.

Peak list (ppm) and integration values:

Chemical Shift (ppm)	Integration
7.67	1.00
7.38	2.73
7.37	
7.36	
7.35	1.87
7.26	1.80
7.03	
7.02	
7.00	
6.99	
6.97	
6.85	
6.83	
4.08	1.88
4.07	
4.06	
3.83	2.75
2.51	2.07
2.50	3.88
2.48	
2.42	
2.05	2.02
2.04	
2.02	
2.01	
1.99	
1.81	
1.63	
1.61	
1.60	
1.59	
1.58	2.02
1.45	3.96
1.44	1.89

Chemical structure: COc1ccc(cc1)-c2cc3c(cc2O3)ccc(OCCN4CCCCC4)c5ccccc5

¹³C NMR spectrum (ppm):

- 161.92
- 160.75
- 157.26
- 155.47
- 141.97
- 130.90
- 129.96
- 128.71
- 124.38
- 122.83
- 120.62
- 112.87
- 111.31
- 101.08
- 67.10
- 55.79
- 54.65
- 26.54
- 25.91
- 24.39

[illegible]

Figura S103. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**51z**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 125 MHz

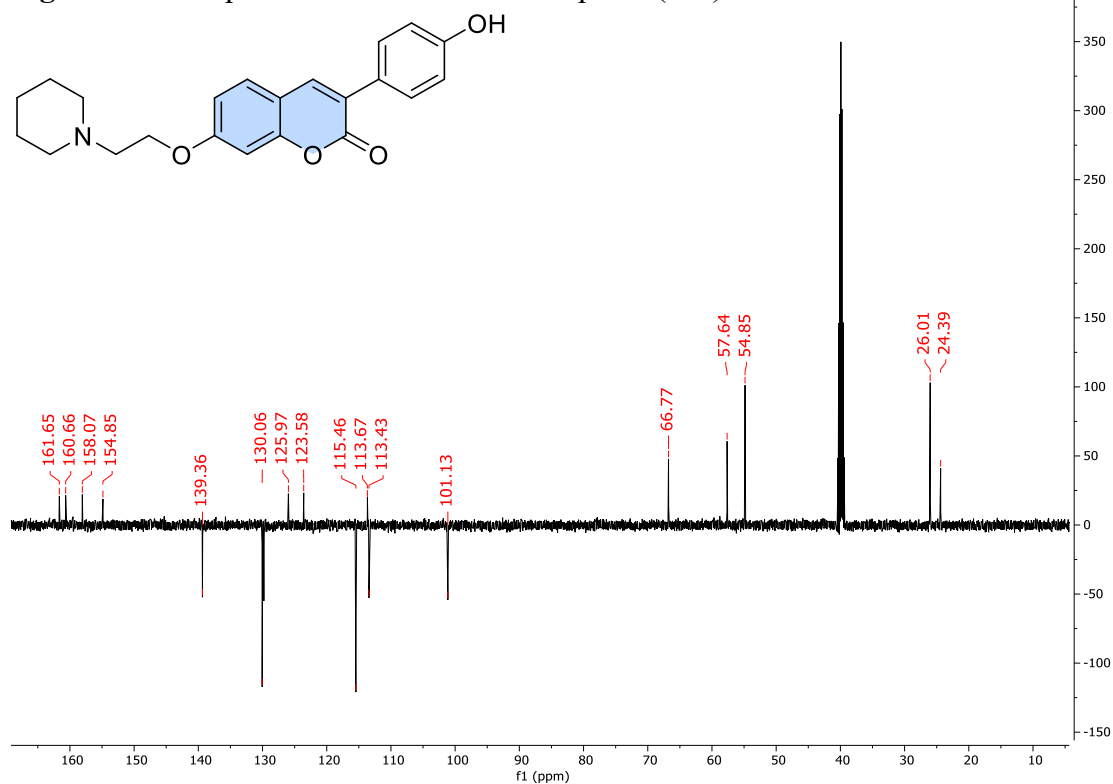


Figura S104. Espectro de RMN ^1H do composto (**54a**) em CDCl_3 a 500 MHz

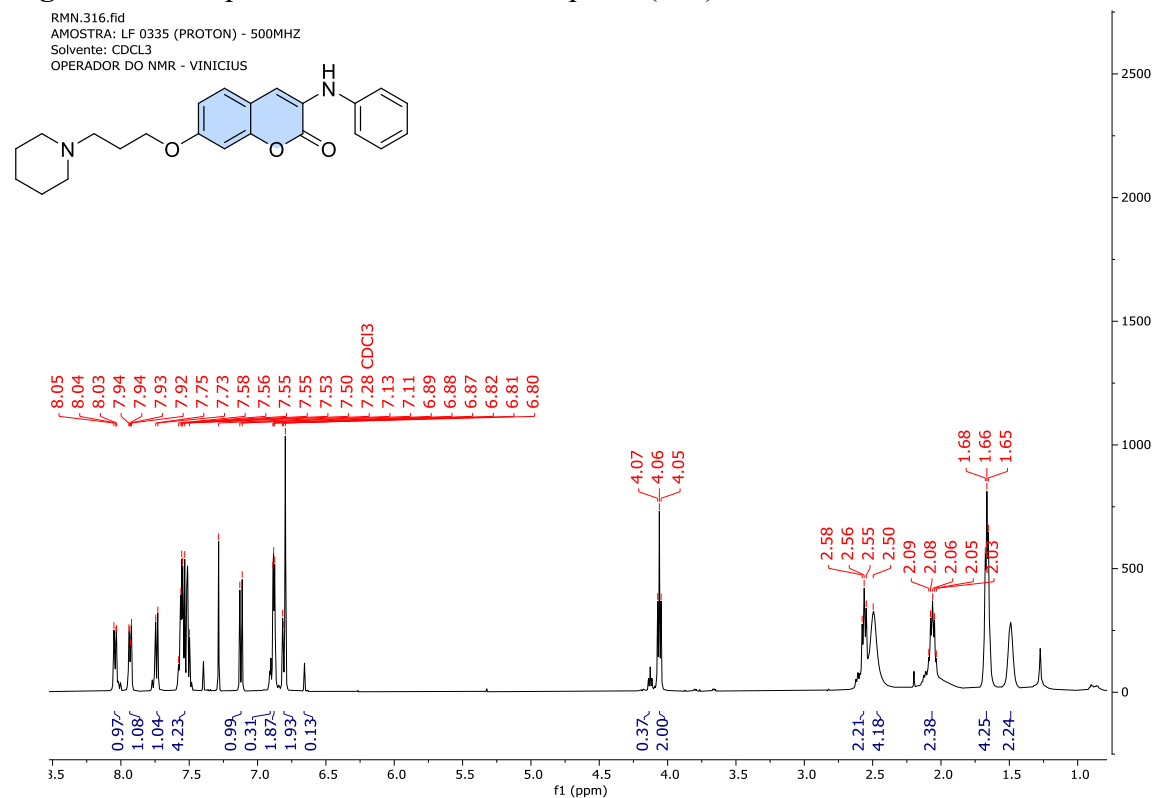


Figura S105. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**54a**) em CDCl_3 a 125 MHz

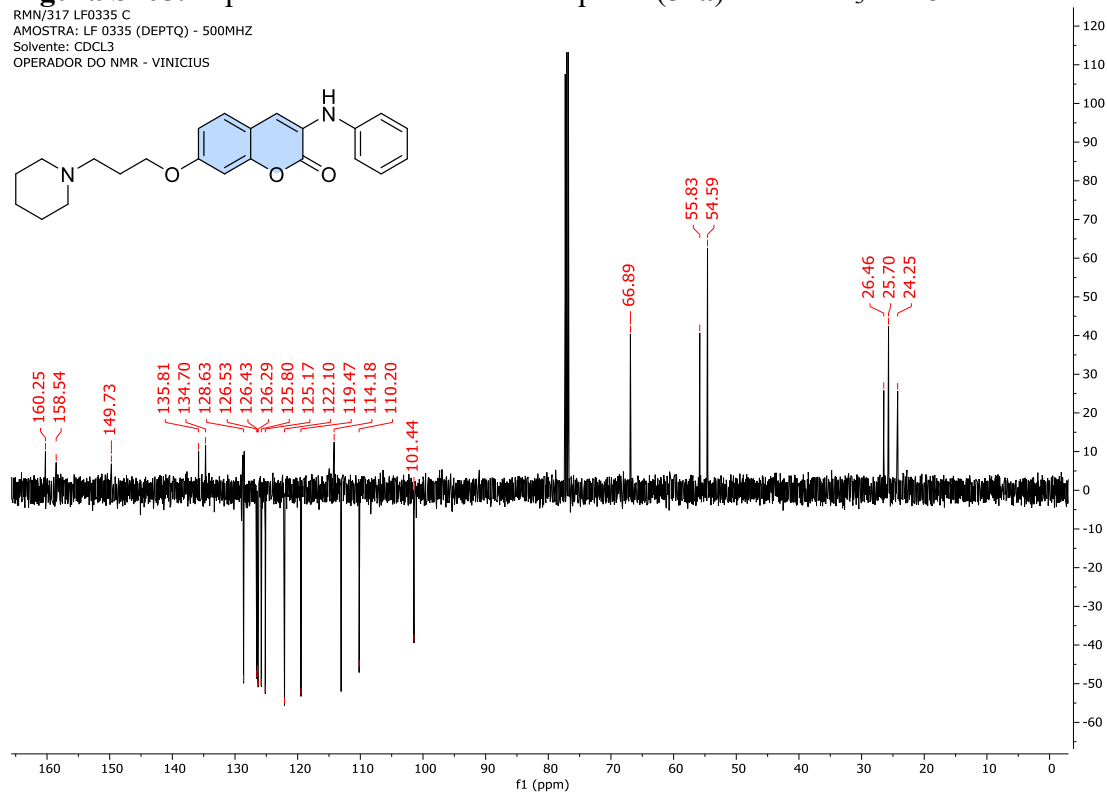


Figura S106. Espectro de RMN ^1H do composto (**54b**) em $\text{DMSO}-d_6$ a 500 MHz

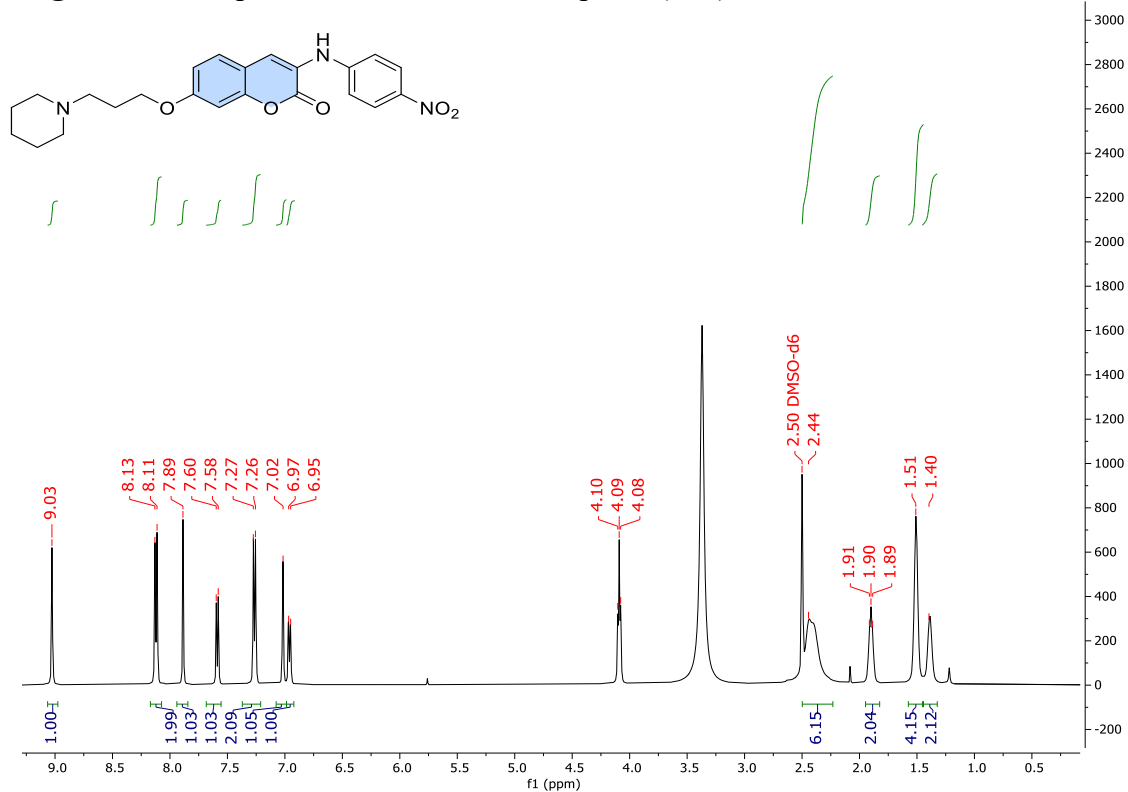


Figura S107. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**54b**) em DMSO- d_6 a 125 MHz

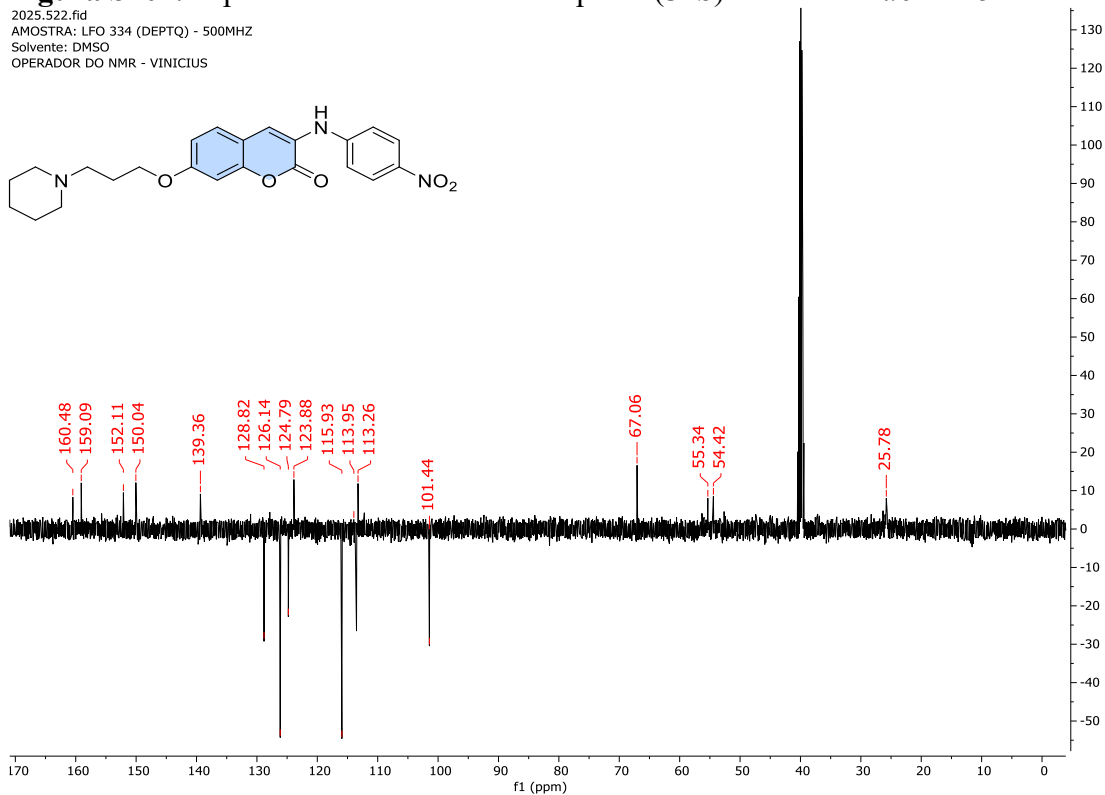


Figura S108. Espectro de RMN ^1H do composto (**54c**) em DMSO- d_6 a 500 MHz

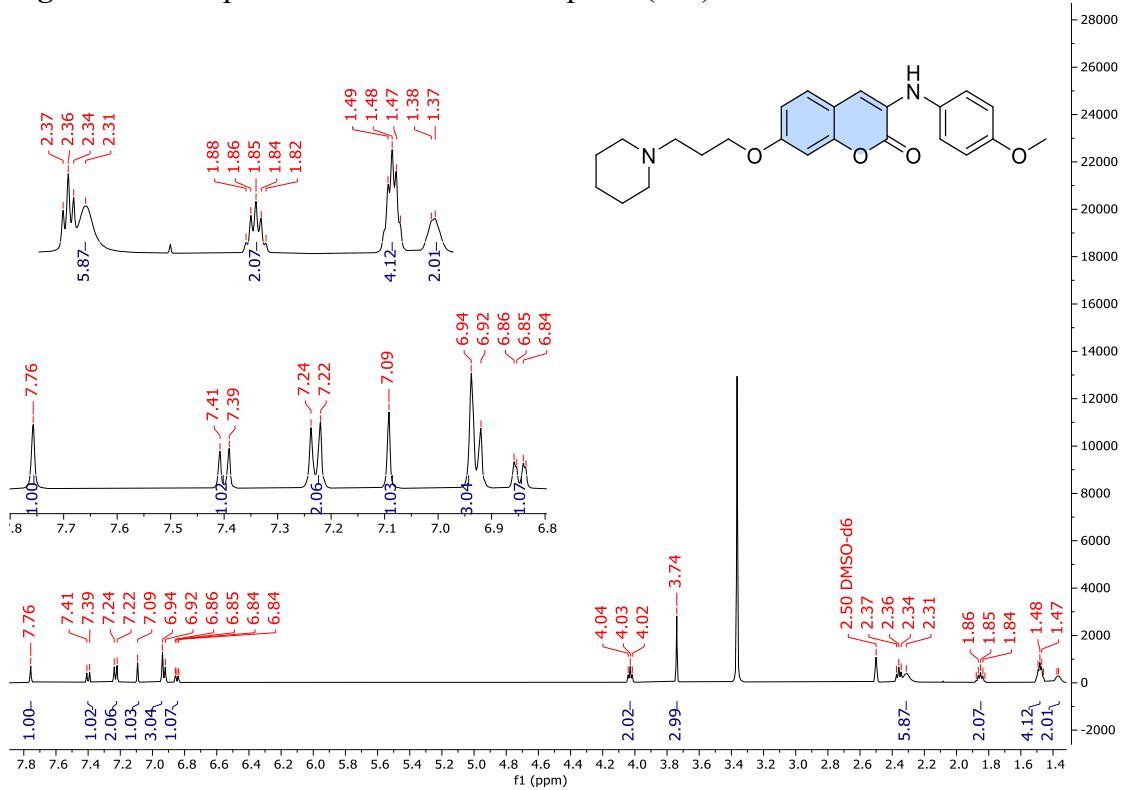


Figura S109. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**54c**) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz

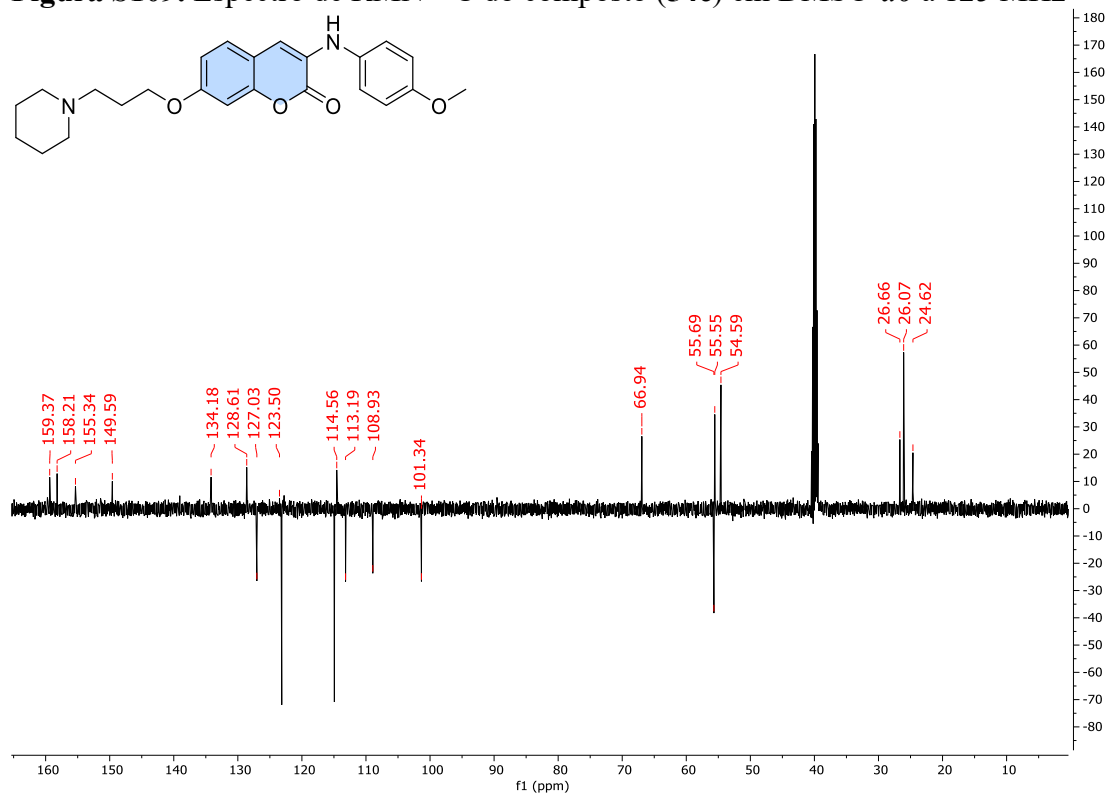


Figura S110. Espectro de RMN ^1H do composto (**54d**) em DMSO-*d*₆ a 300 MHz

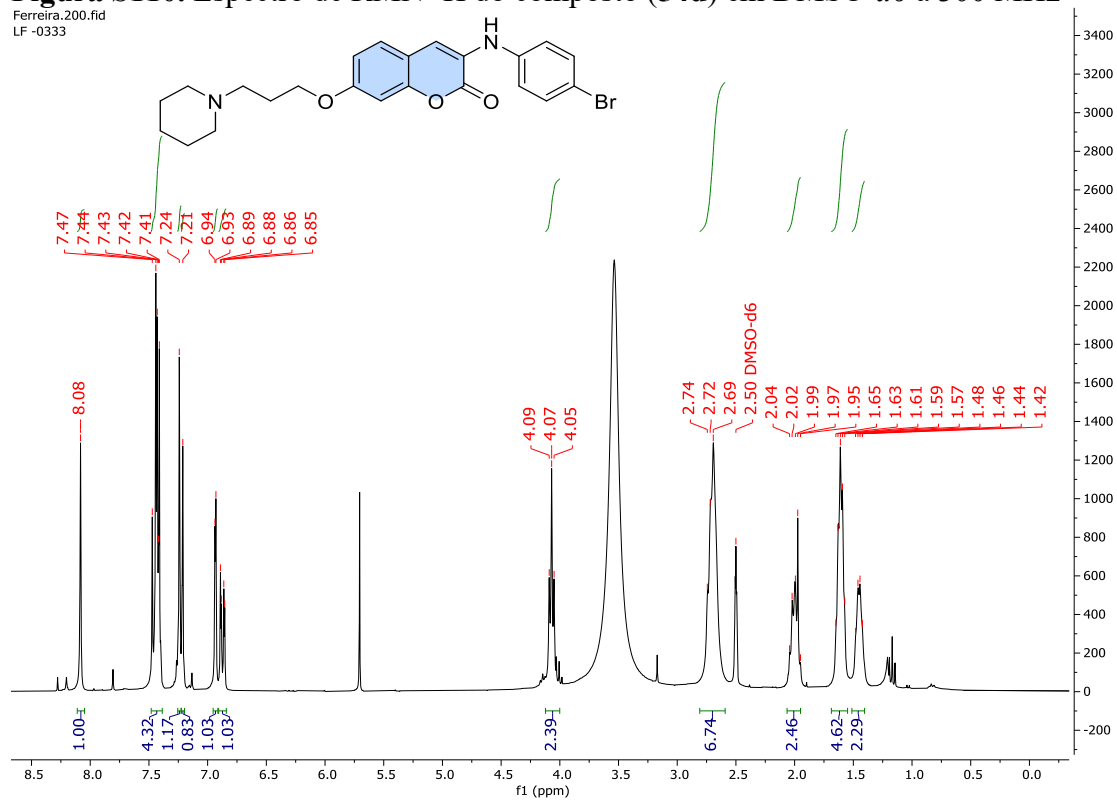


Figura S111. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**54d**) em CDCl_3 a 125 MHz

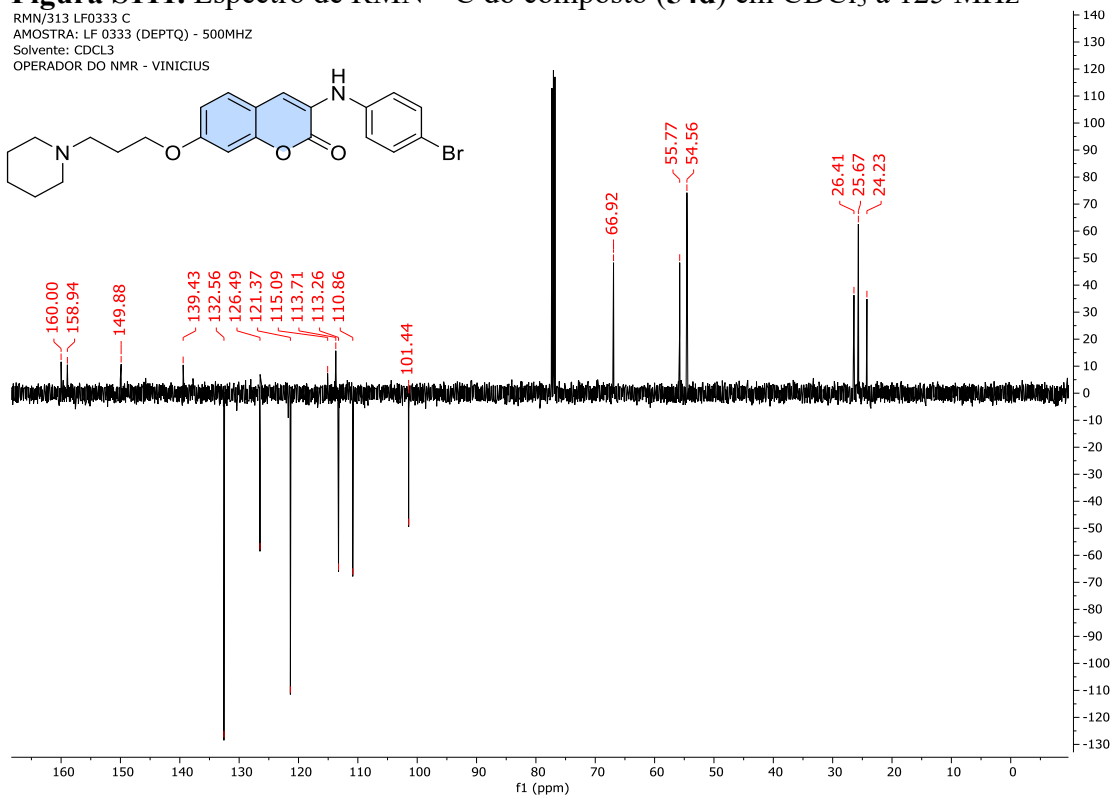


Figura S112. Espectro de RMN ^1H do composto (**54e**) em CDCl_3 a 300 MHz

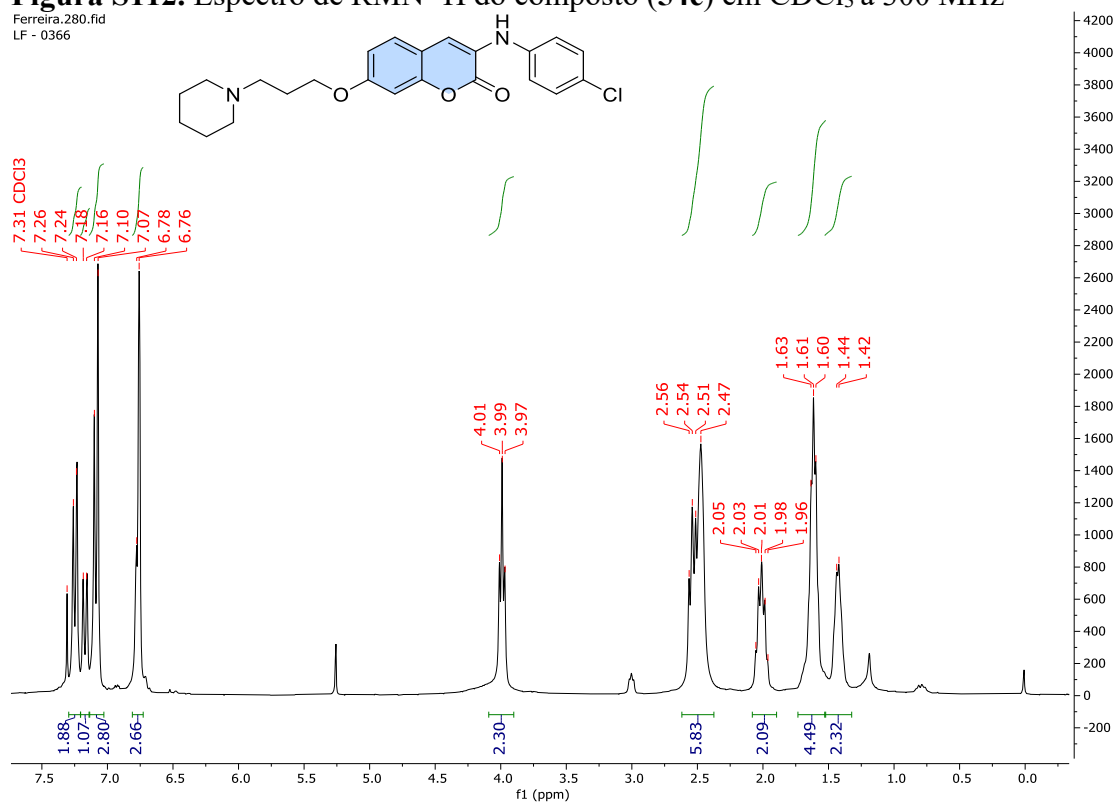


Figura S113. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**54e**) em CDCl_3 a 75 MHz

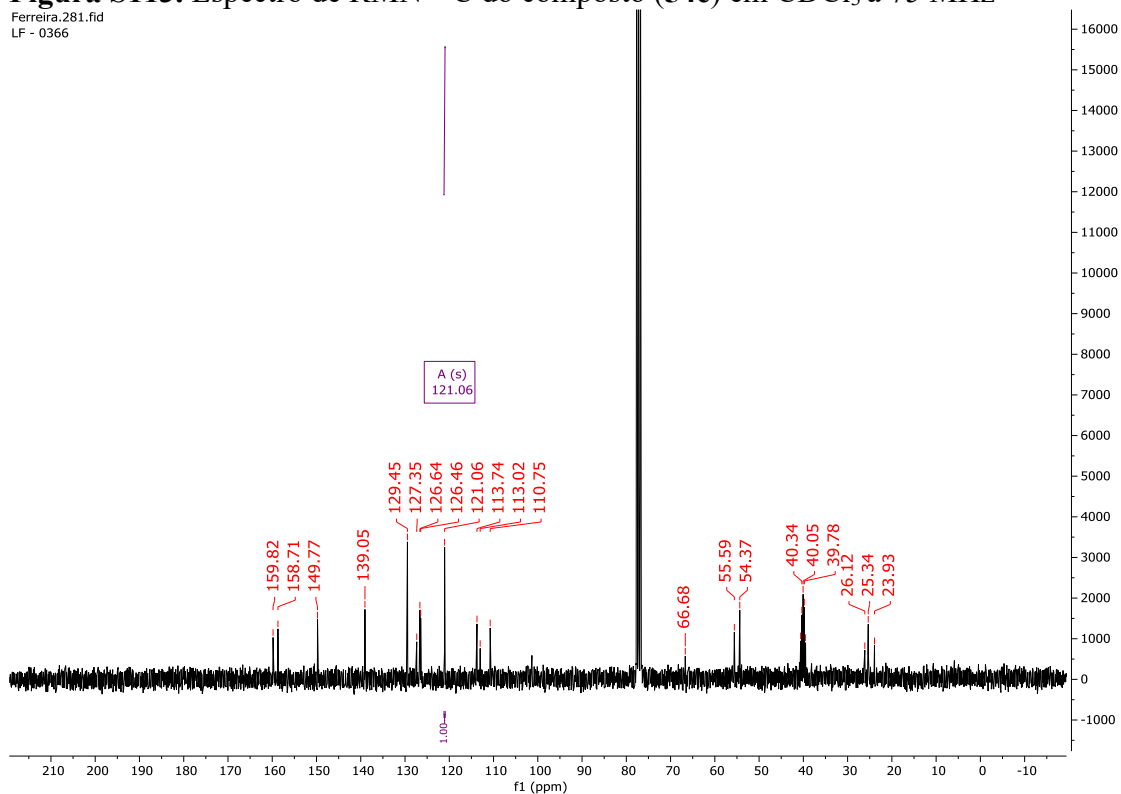


Figura S114. Espectro de RMN ^1H do composto (**56a**) em CDCl_3 a 500 MHz

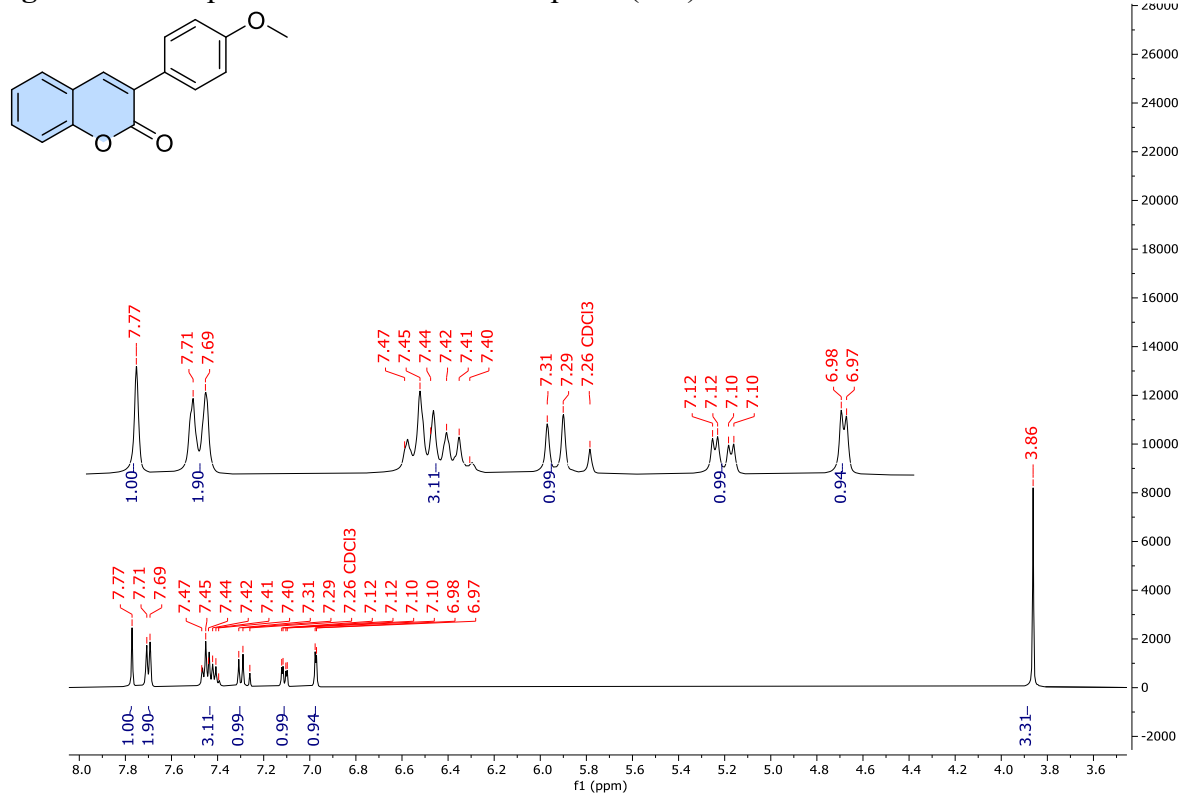


Figura S115. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**56a**) em CDCl_3 a 125 MHz

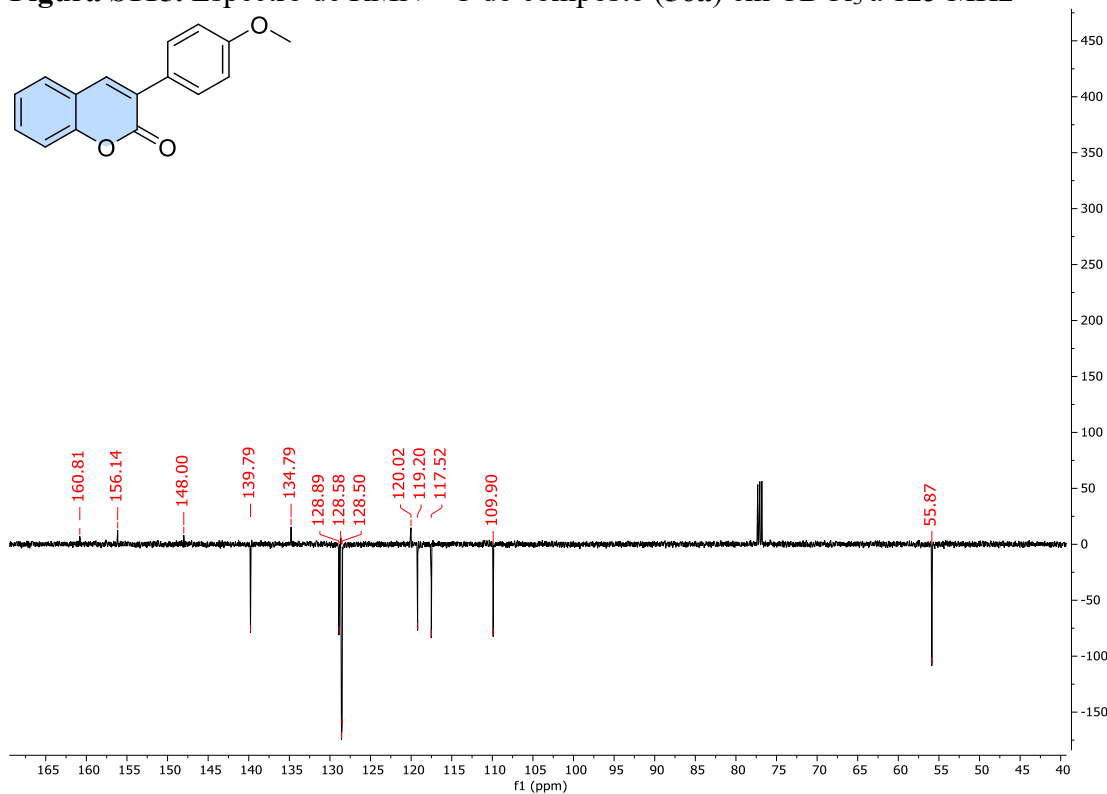


Figura S116. Espectro de RMN ^1H do composto (**56b**) em CDCl_3 a 300 MHz

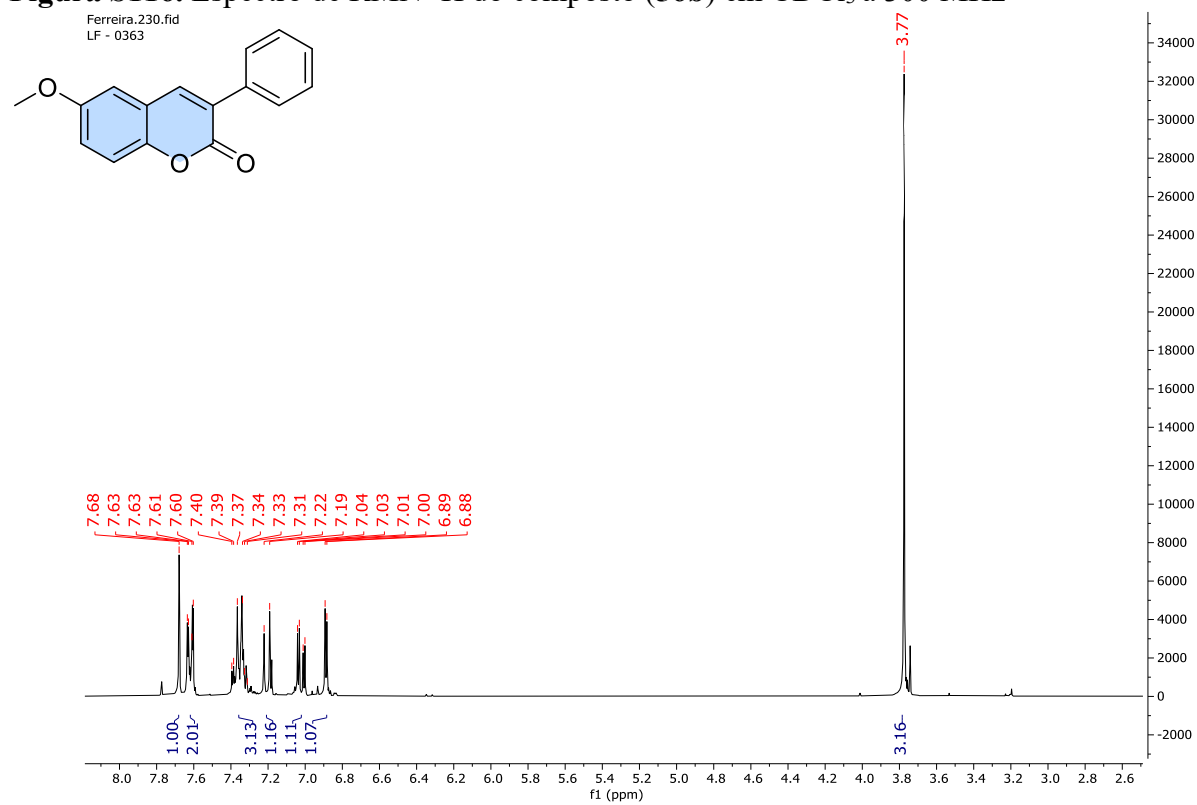


Figura S117. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**56b**) em CDCl_3 a 75 MHz

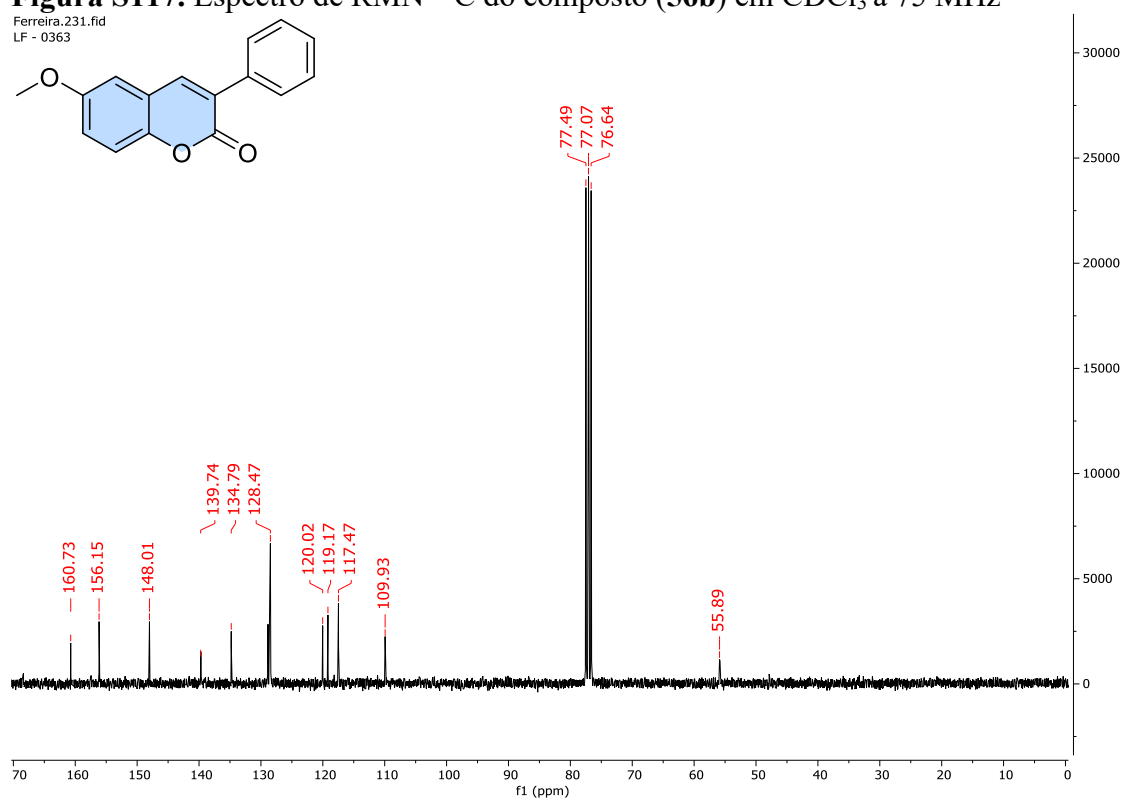


Figura S118. Espectro de RMN ^1H do composto (**56c**) em CDCl_3 a 300 MHz

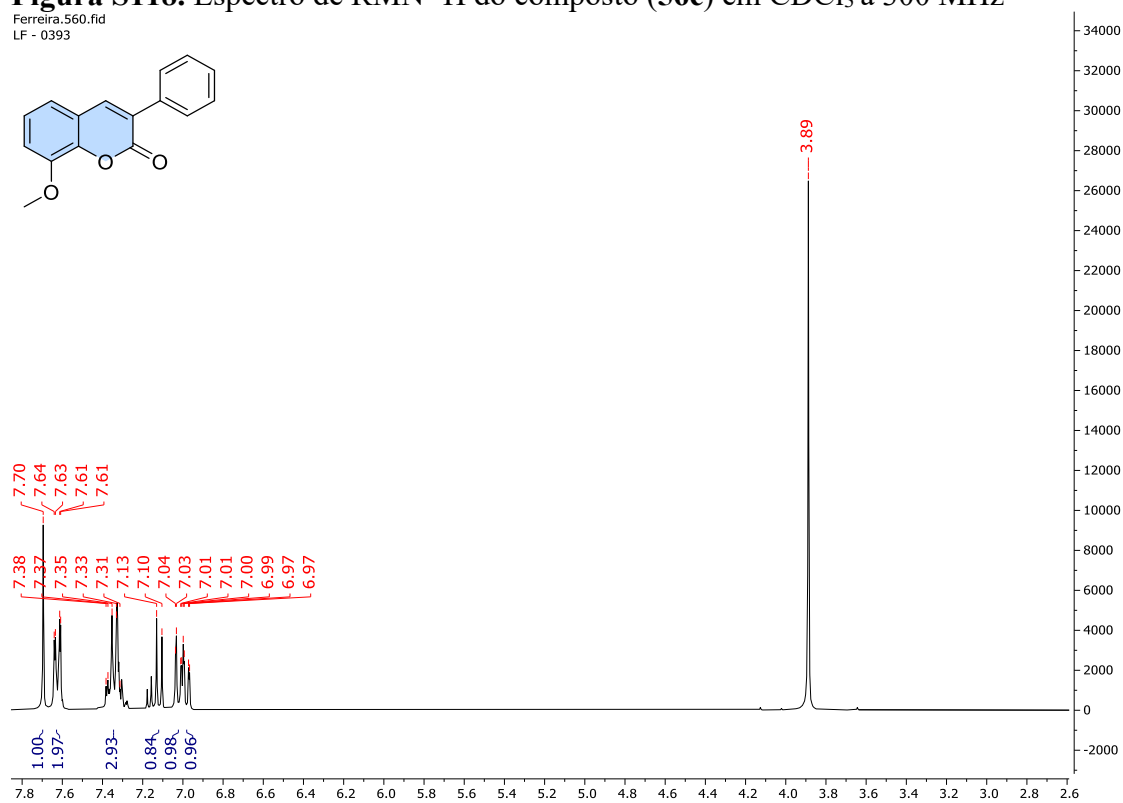


Figura S119. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**56c**) em CDCl_3 a 75 MHz

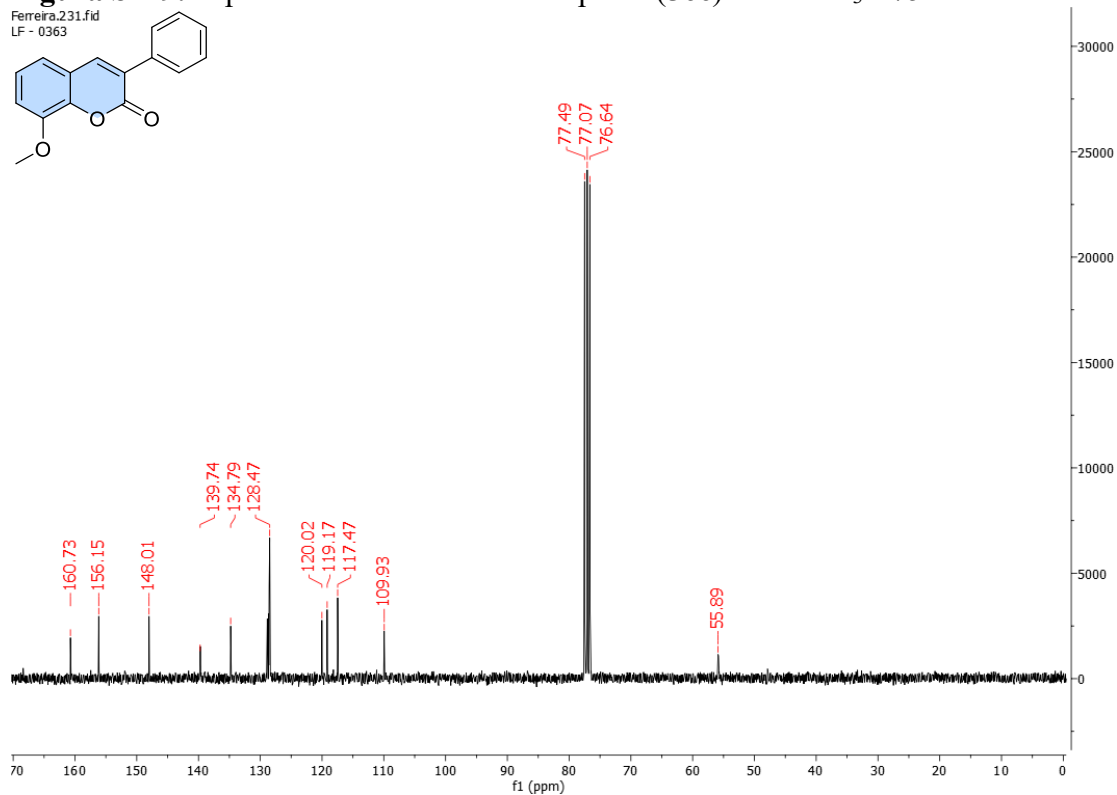


Figura S120. Espectro de RMN ^1H do composto (**56d**) em CDCl_3 a 500 MHz

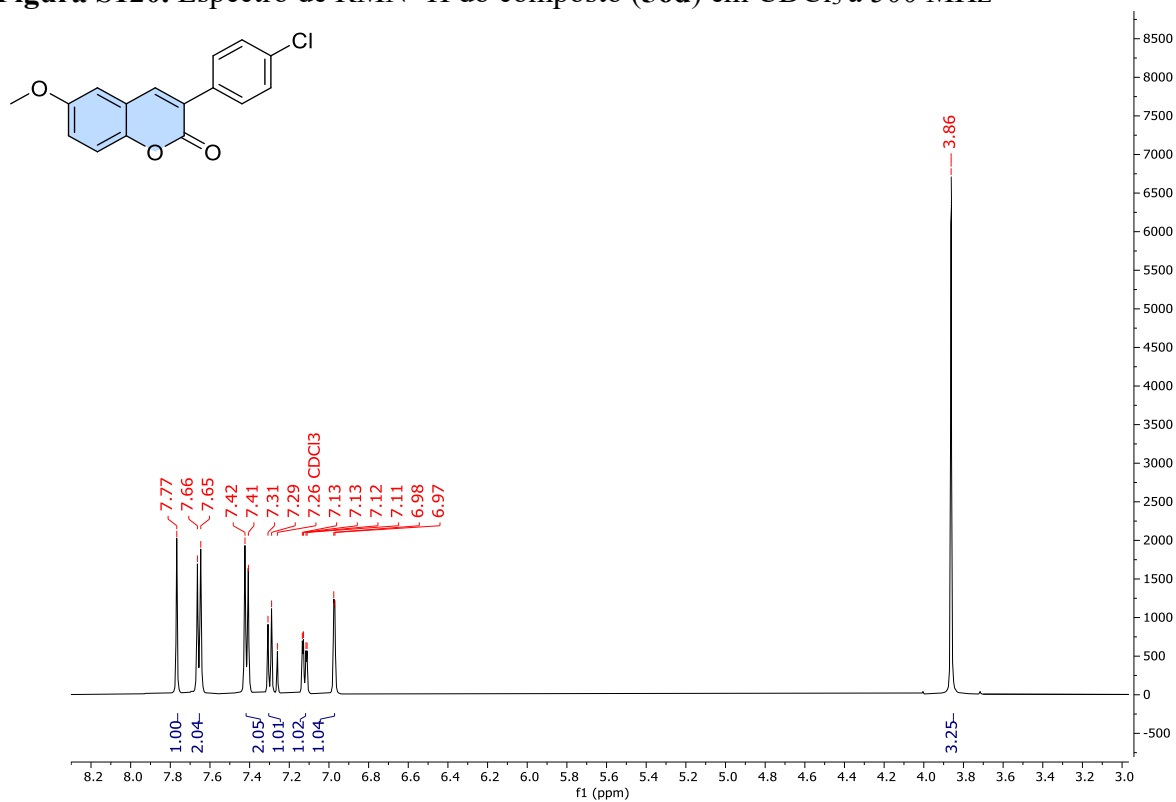


Figura S121. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**56d**) em CDCl_3 a 125 MHz

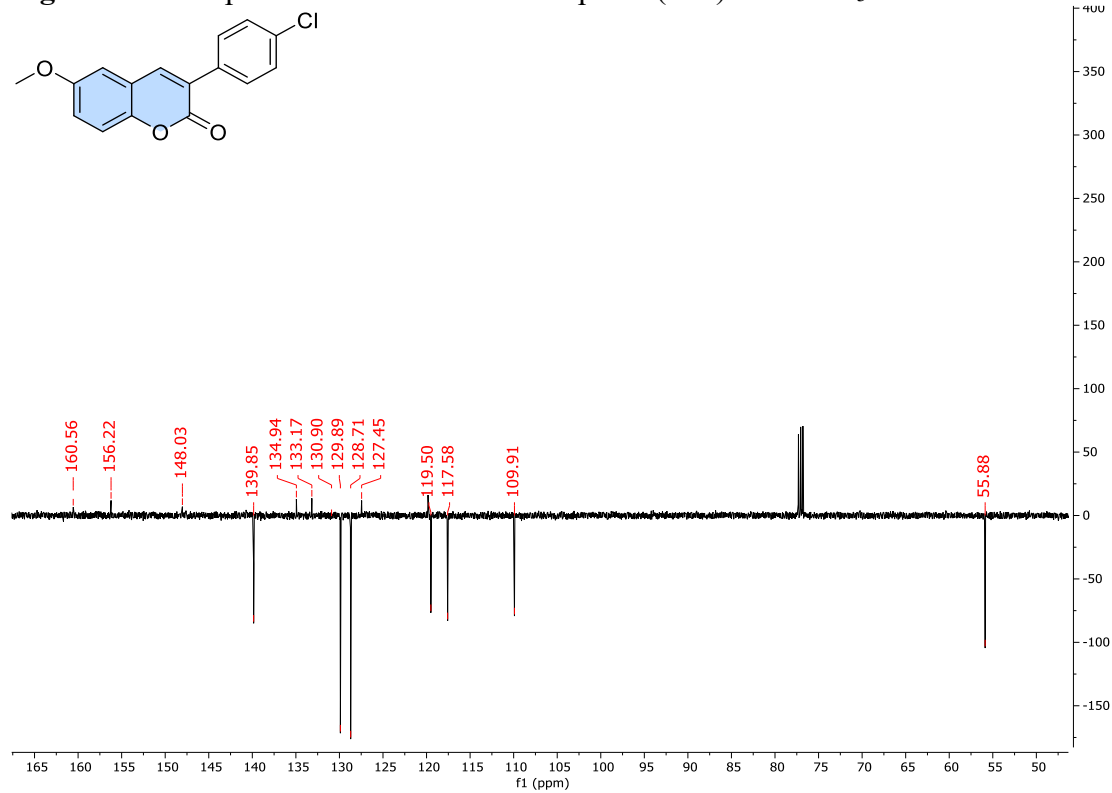


Figura S125. Espectro de RMN ^1H do composto (**58a**) em $\text{DMSO}-d_6$ a 300 MHz

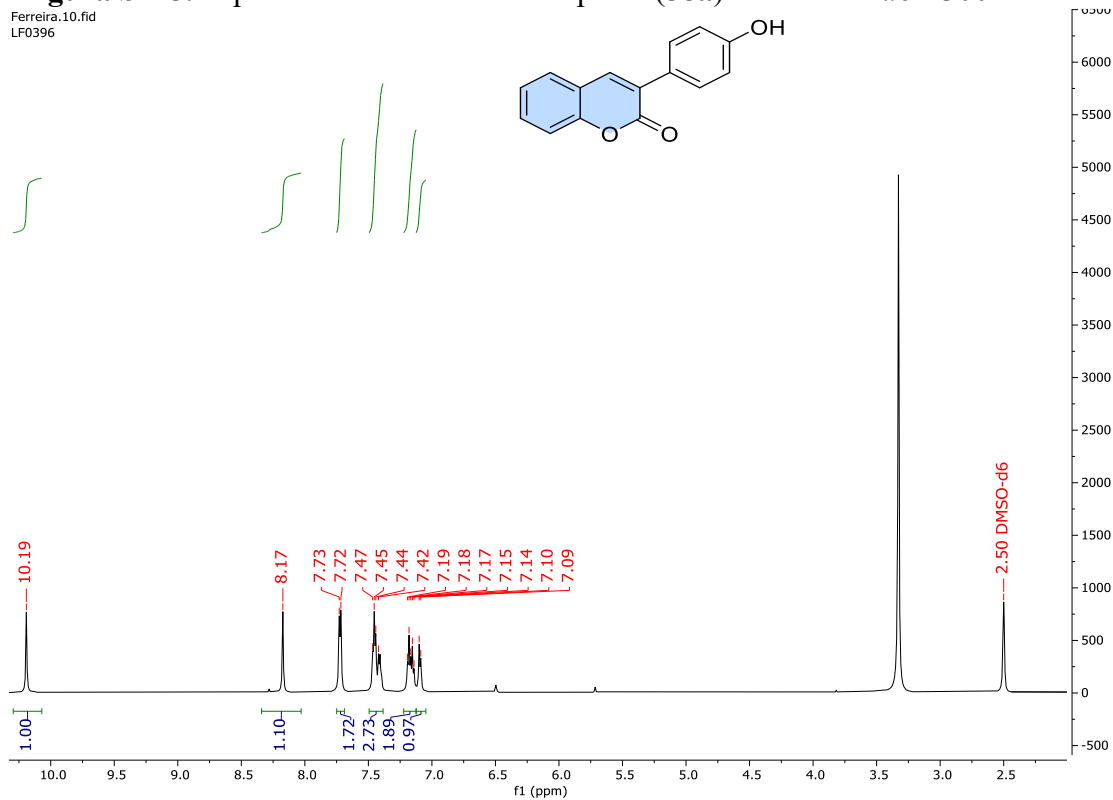


Figura S126. Espectro de RMN ^1H do composto (**58b**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 300 MHz

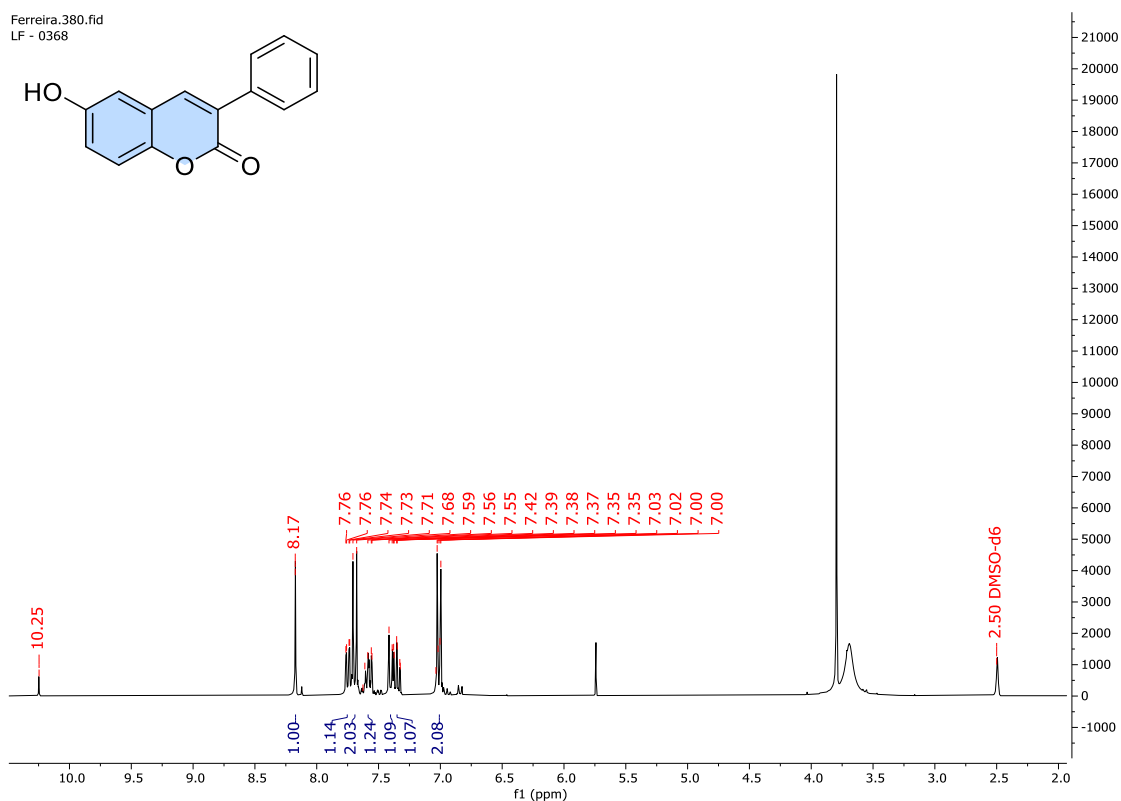


Figura S127. Espectro de RMN ^1H do composto (**58c**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 300 MHz

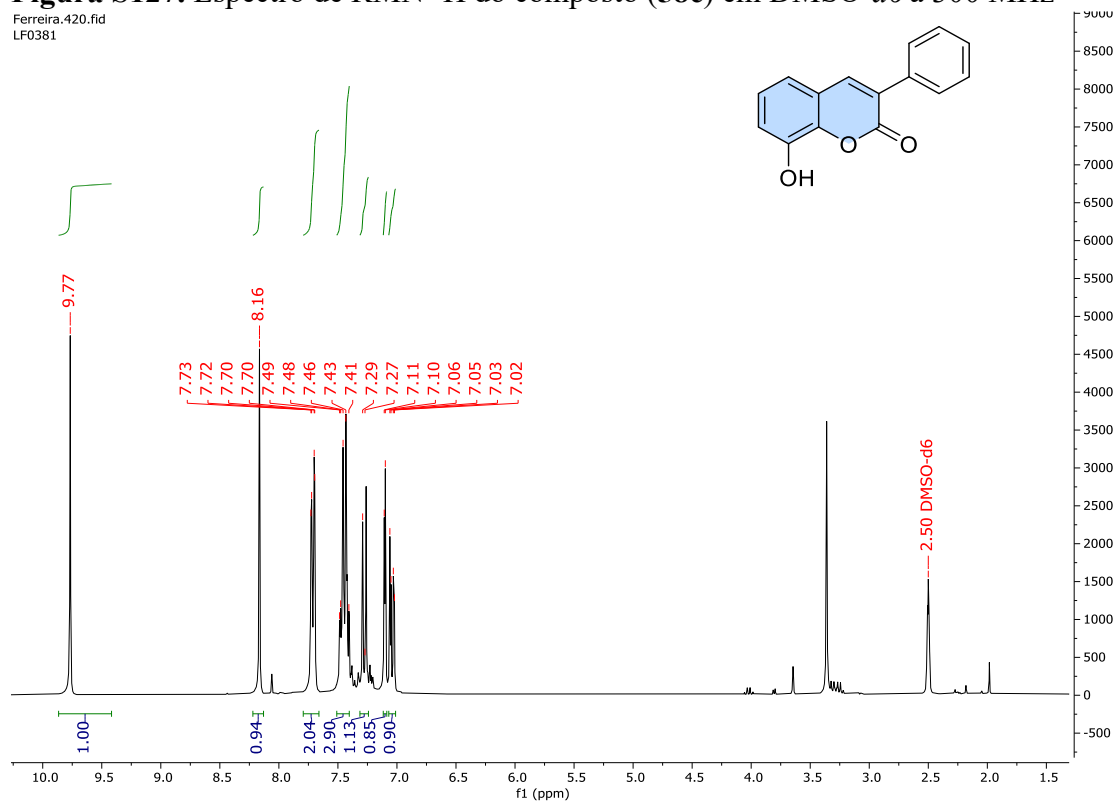


Figura S128. Espectro de RMN ^1H do composto (**61a**) em DMSO- d_6 a 300 MHz

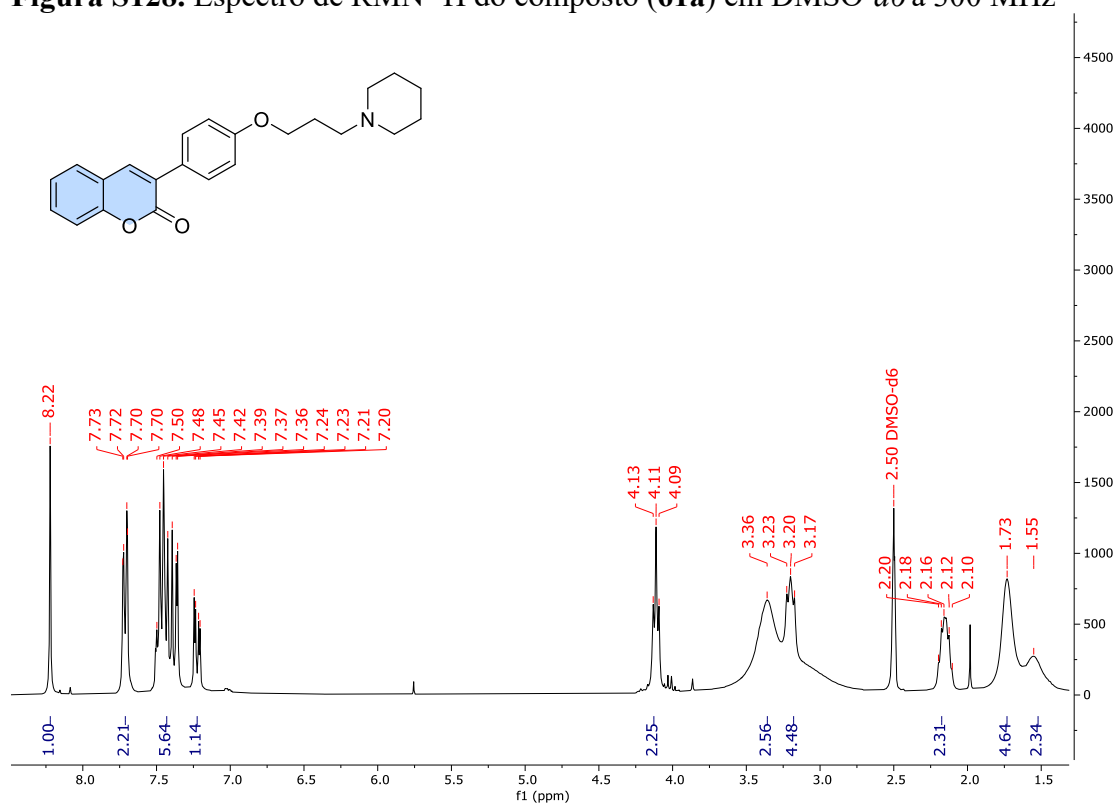


Figura S129. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**61a**) em DMSO- d_6 a 75 MHz

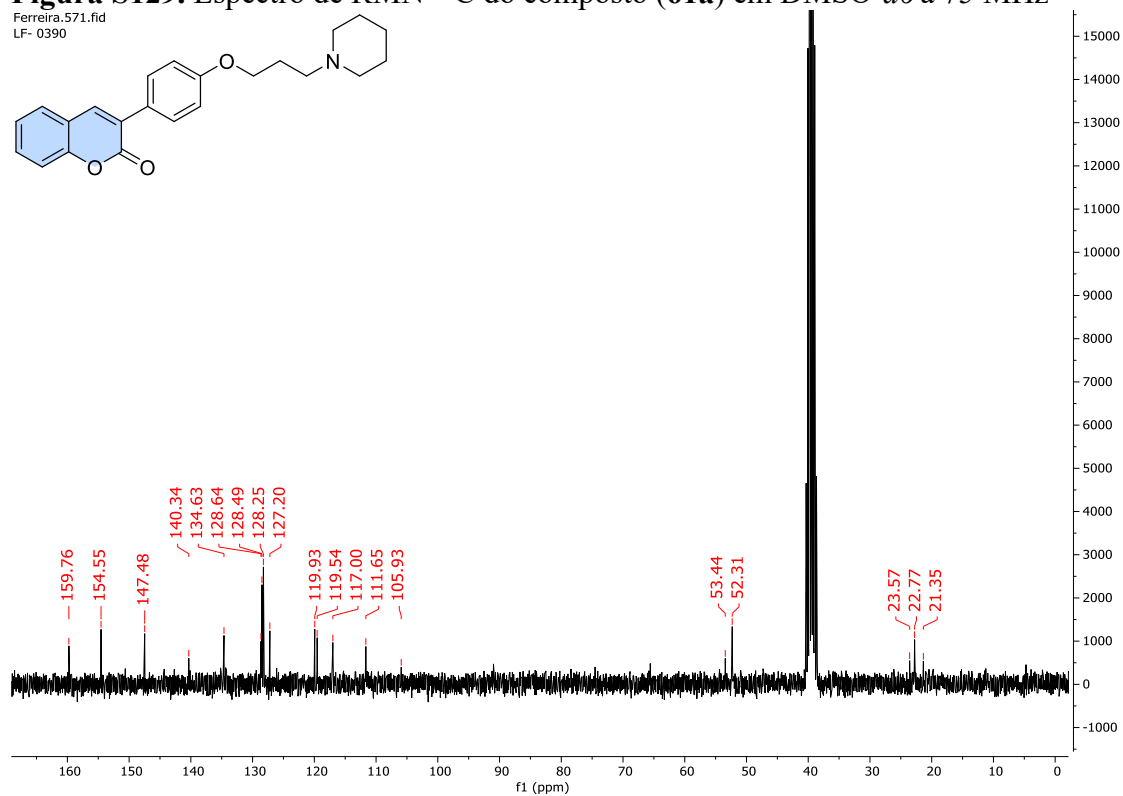


Figura S130. Espectro de RMN ^1H do composto (**61b**) em CDCl_3 a 300 MHz

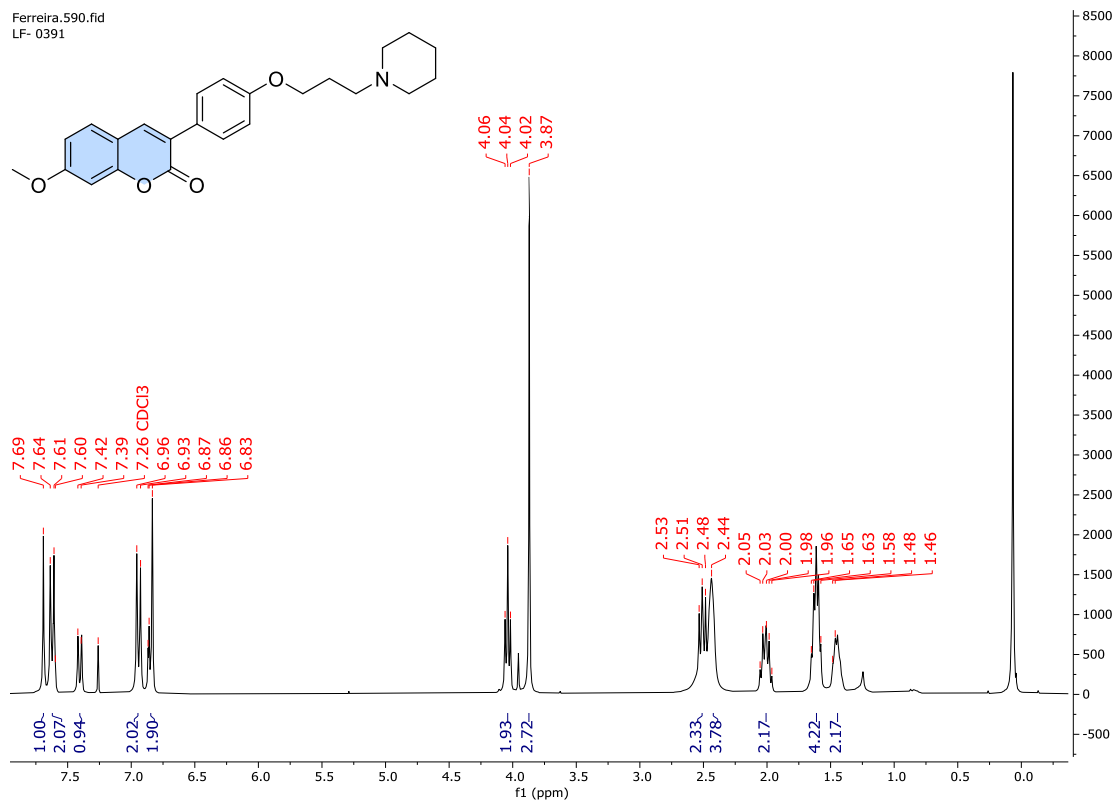


Figura S131. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**61b**) em CDCl_3 a 75 MHz

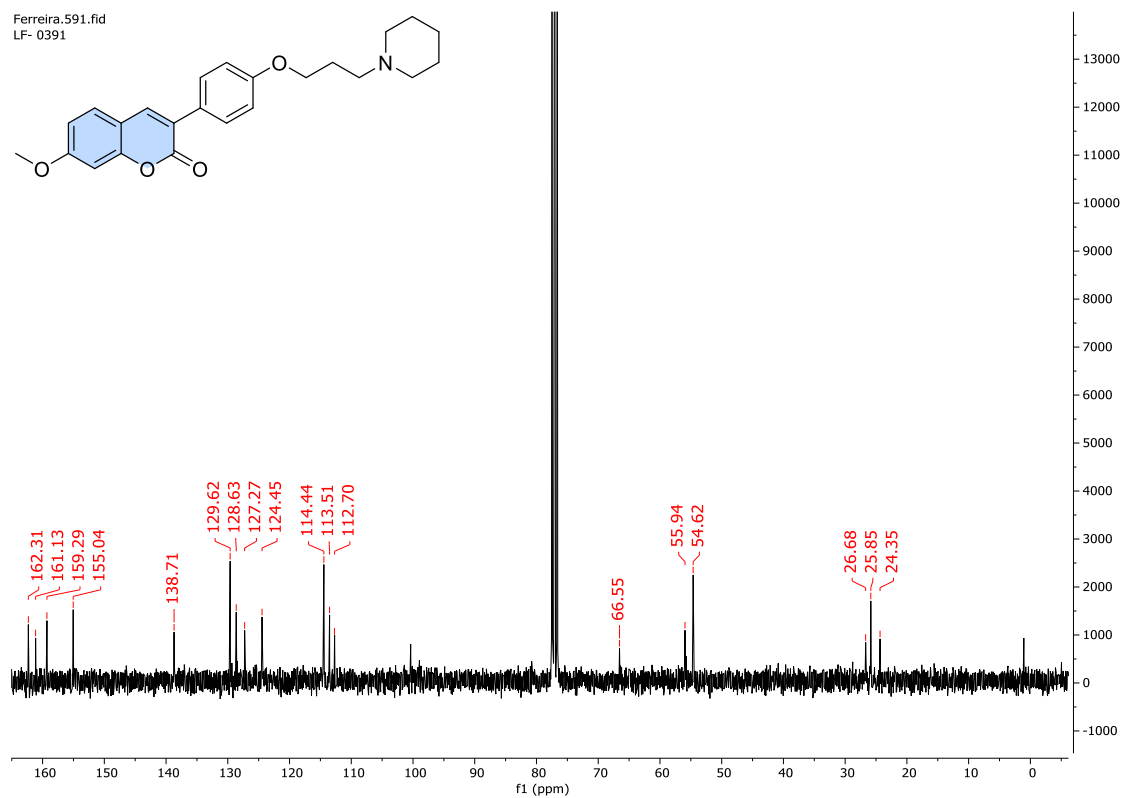


Figura S132. Espectro de RMN ^1H do composto (**61c**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 300 MHz

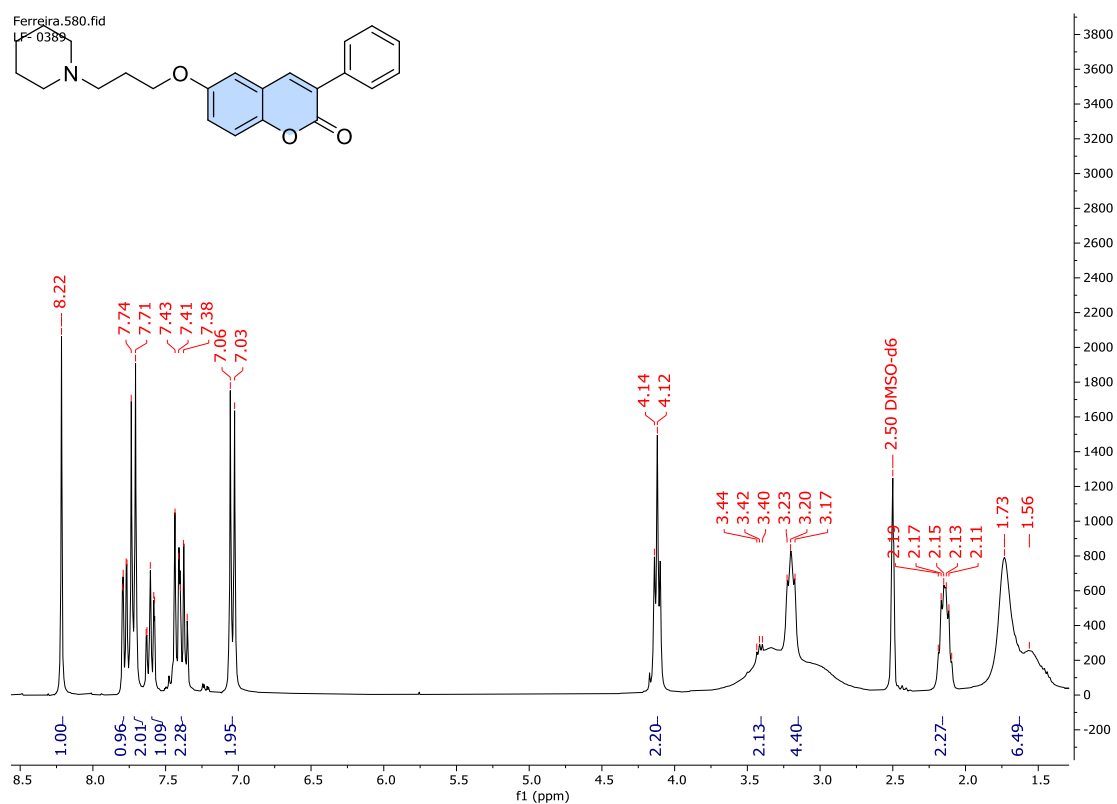


Figura S133. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**61c**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 75 MHz

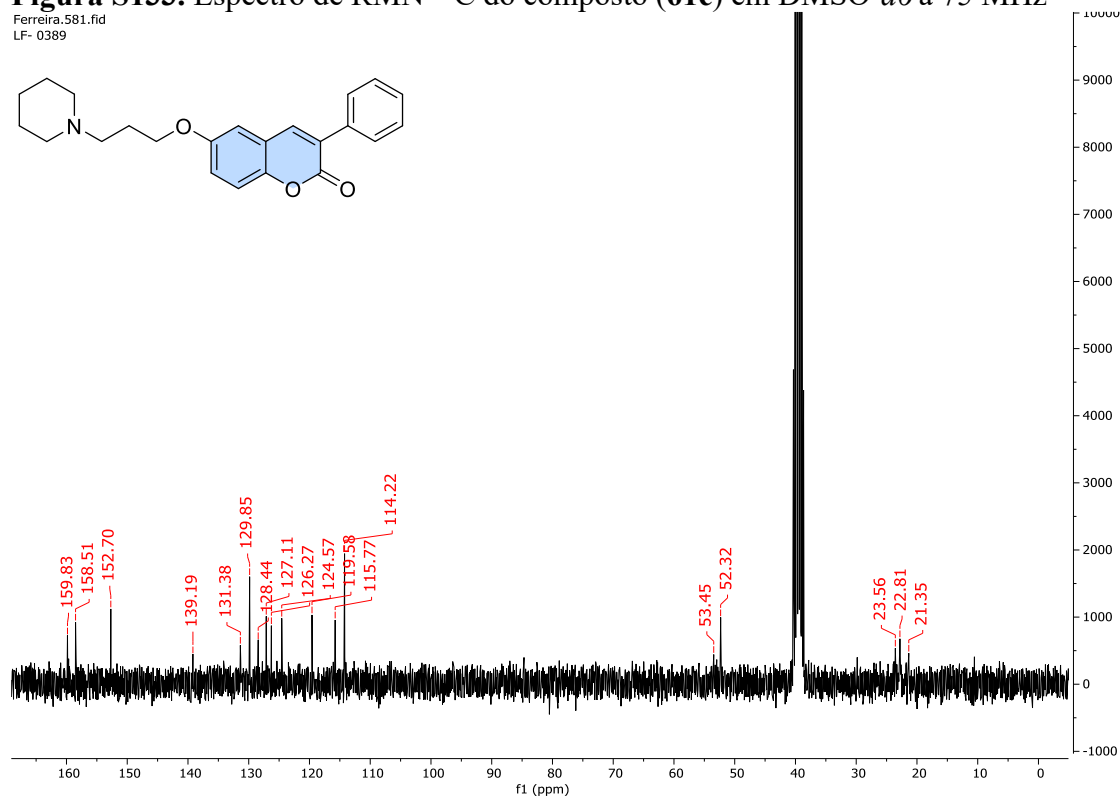


Figura S134. Espectro de RMN ^1H do composto (**61d**) em CDCl_3 a 300 MHz

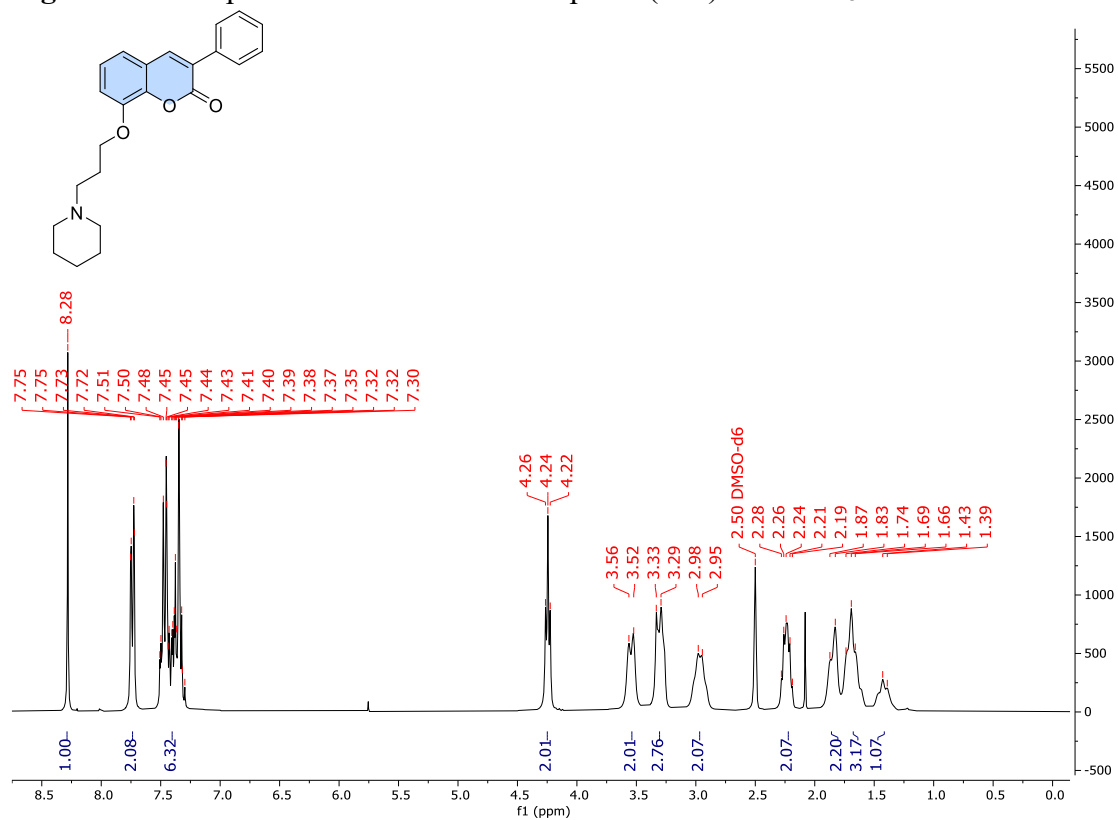


Figura S135. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**61d**) em CDCl_3 a 125 MHz

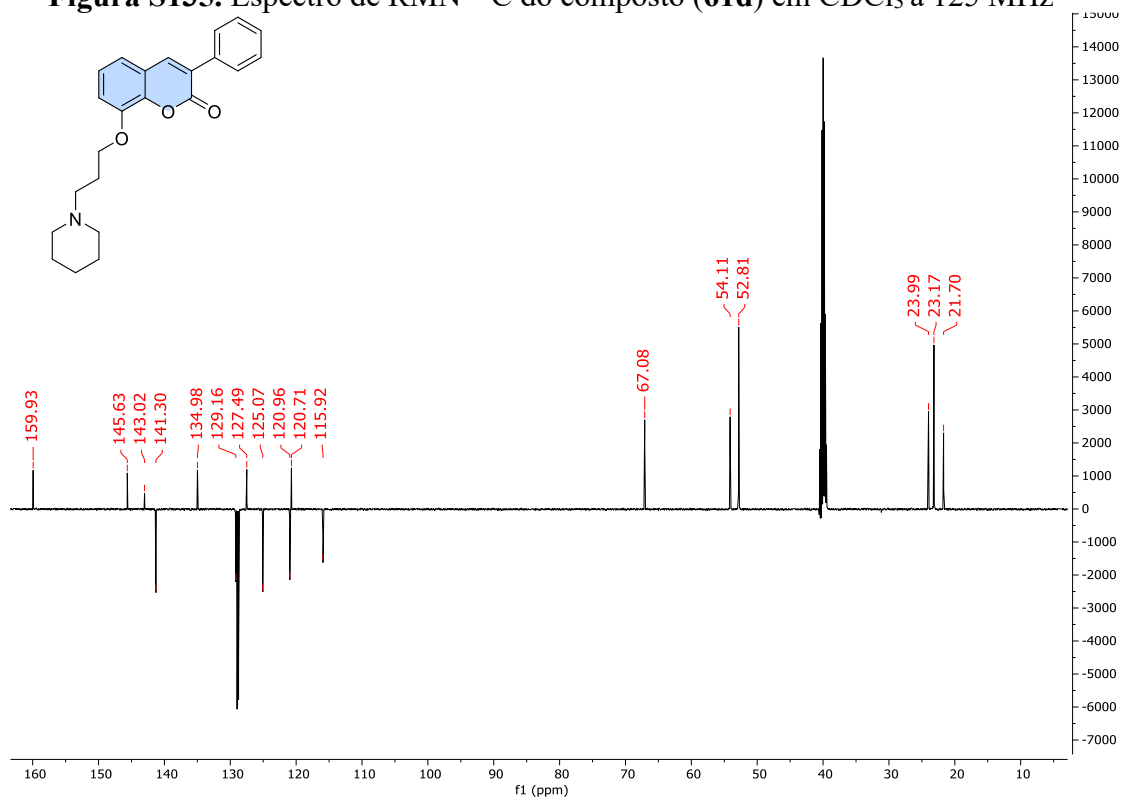


Figura S136. Espectro de RMN ^1H do composto (**61e**) em DMSO- d_6 a 500 MHz

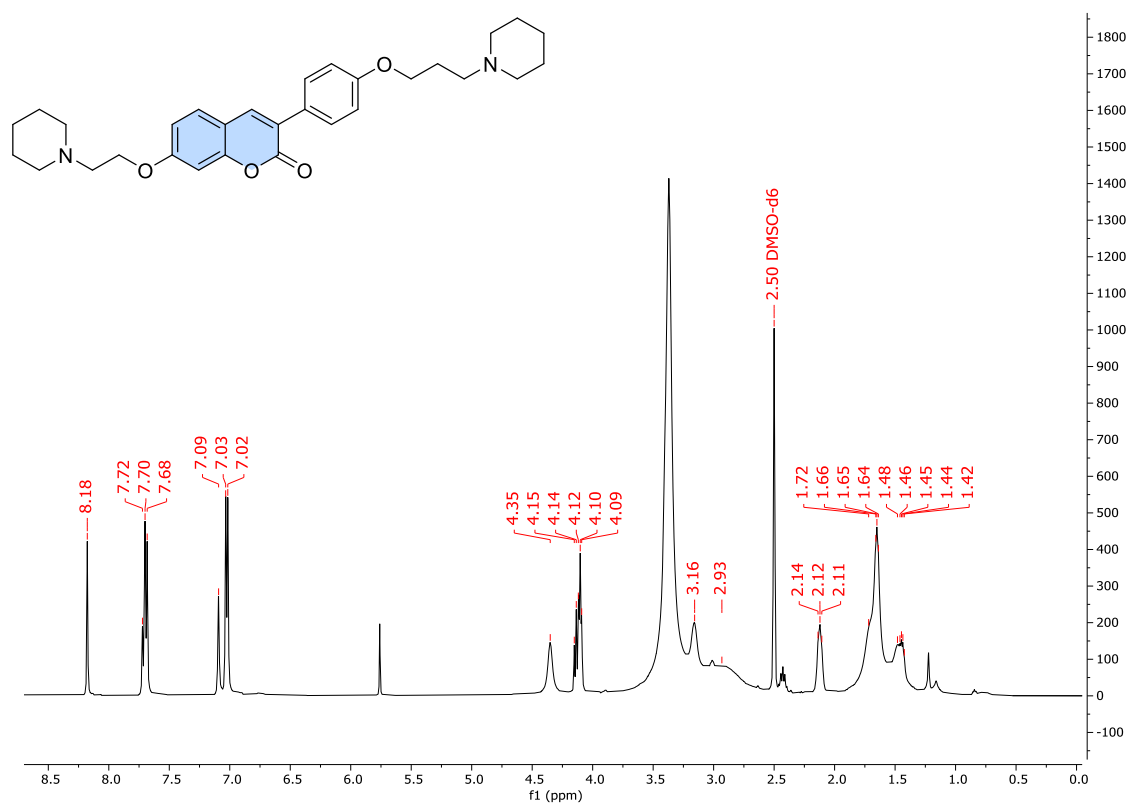


Figura S137. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**61e**) em DMSO- d_6 a 125 MHz

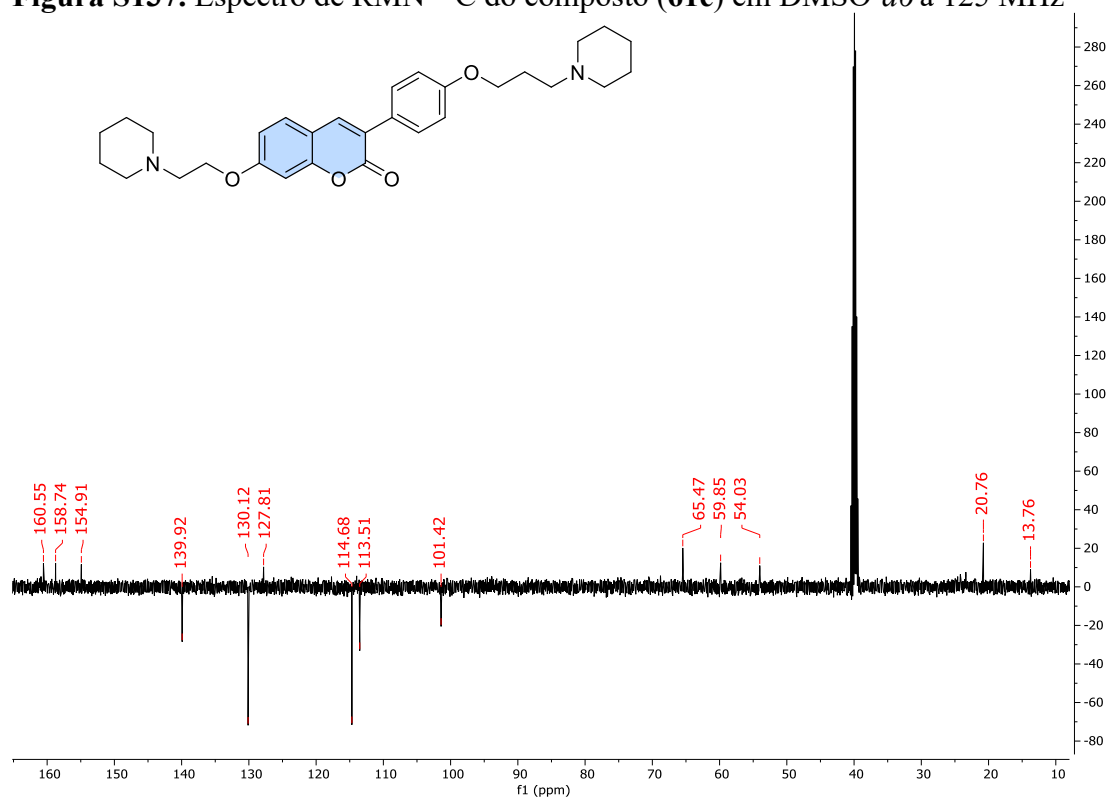


Figura S138. Espectro de RMN ^1H do composto (**61f**) em CDCl_3 a 300 MHz

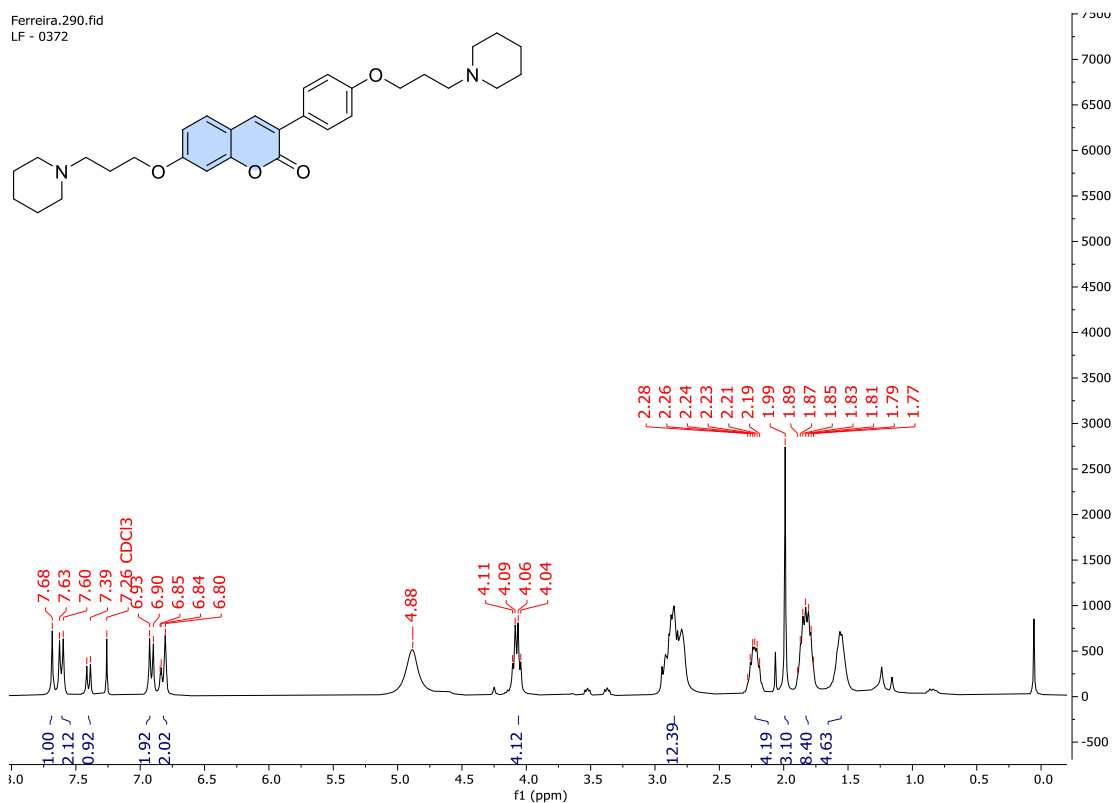


Figura S139. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**61f**) em CDCl_3 a 75 MHz

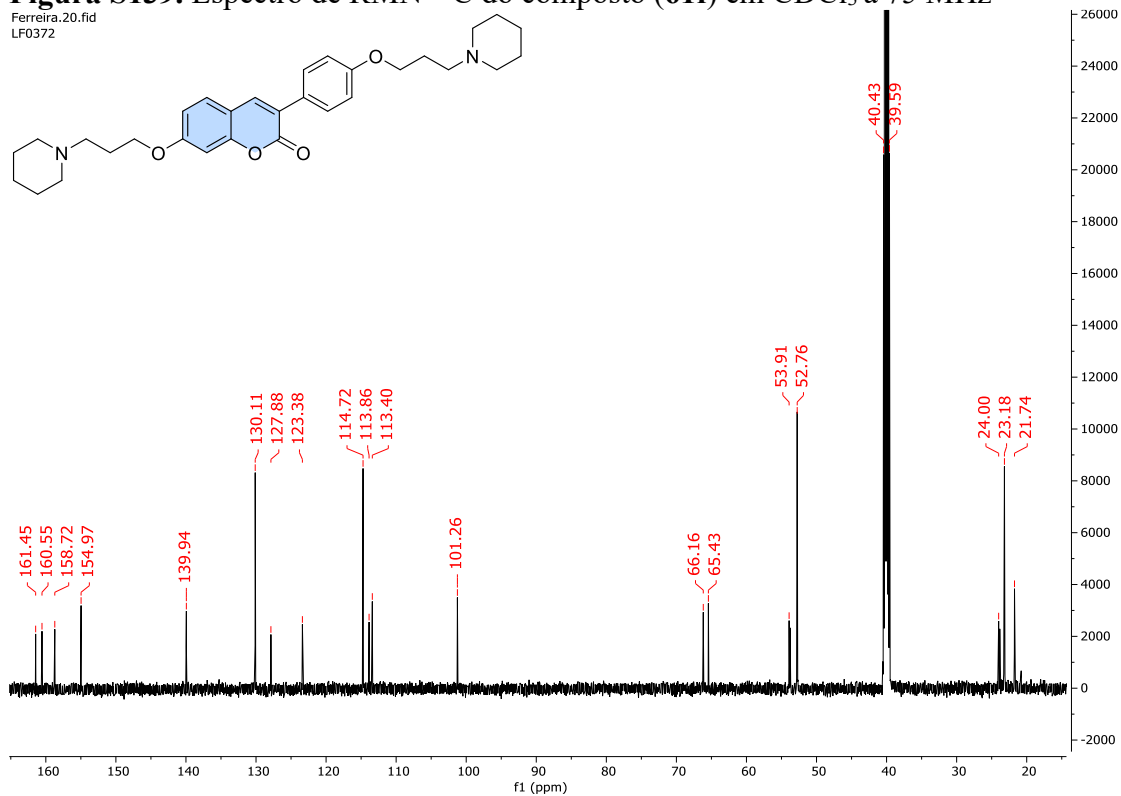


Figura S140. Espectro de RMN ^1H do composto (**63**) em DMSO- d_6 a 300 MHz

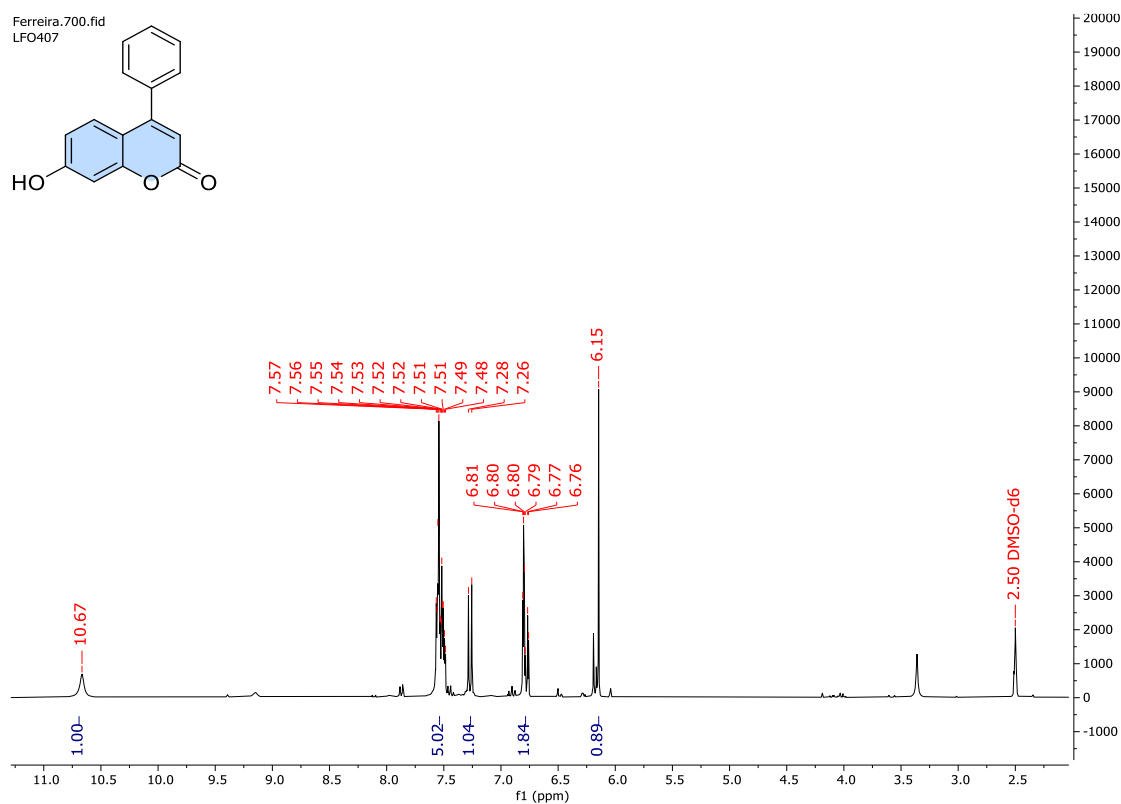


Figura S141. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**63**) em DMSO- d_6 a 75 MHz

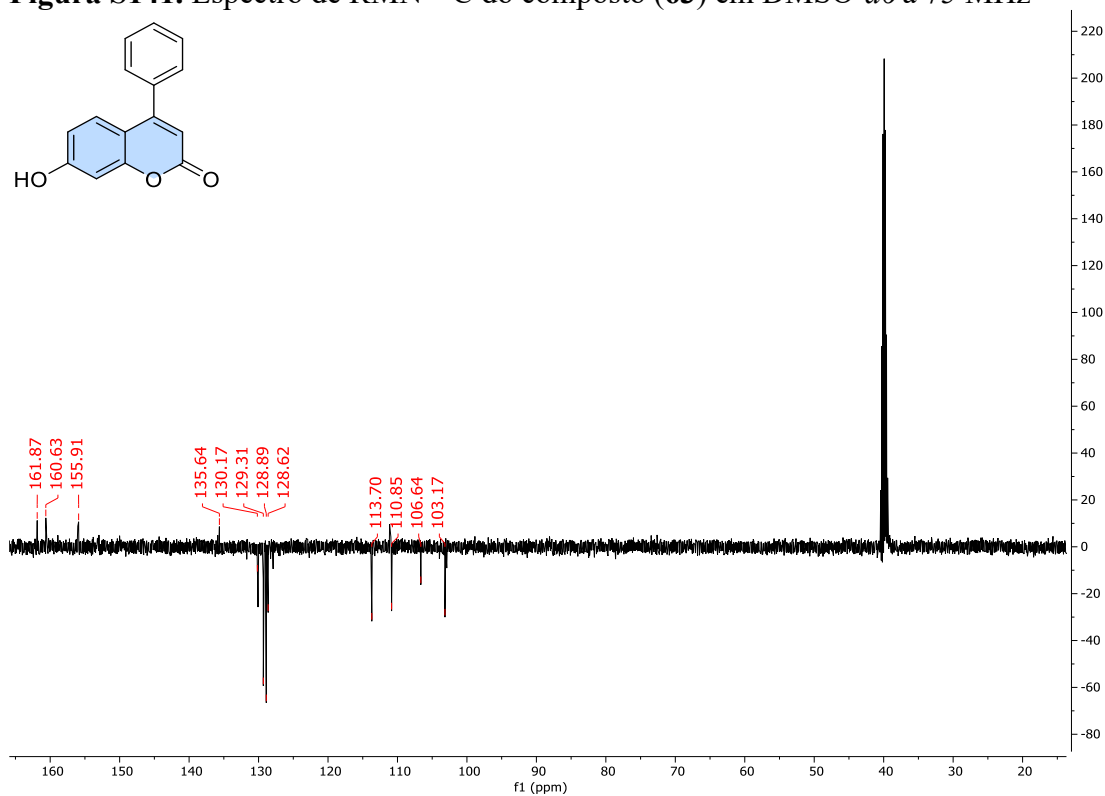


Figura S143. Espectro de RMN ^1H do composto (**64**) em DMSO- d_6 a 300 MHz

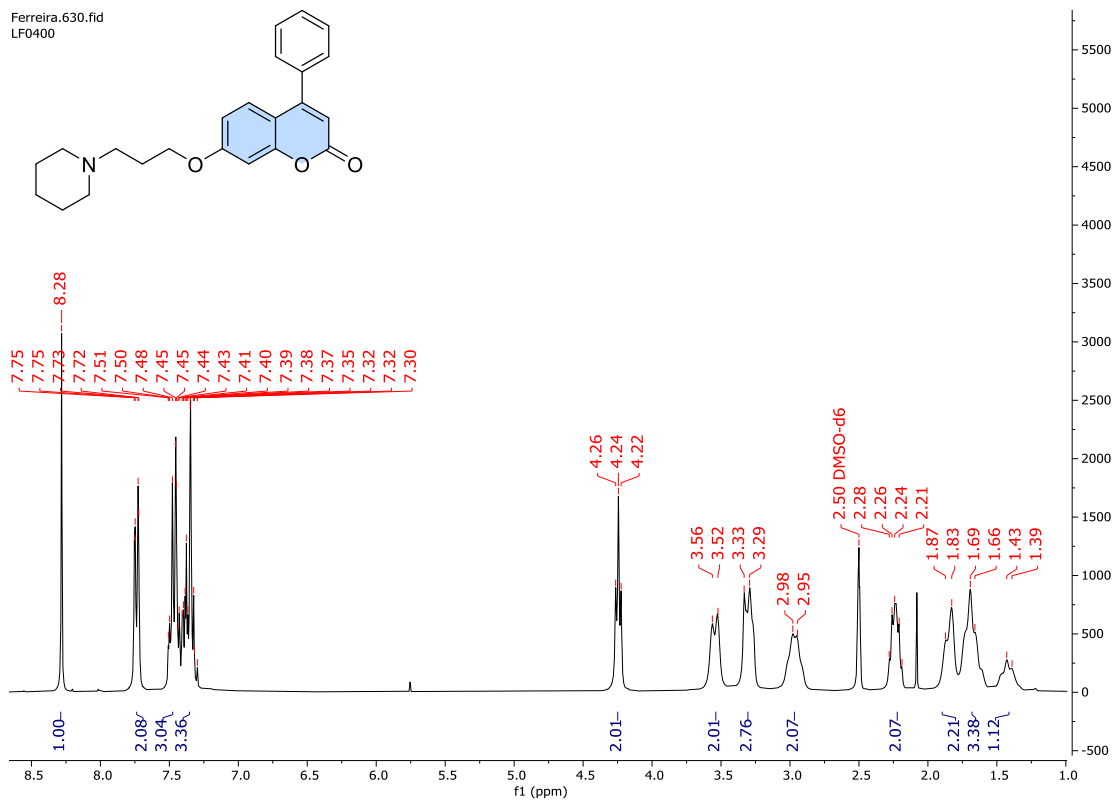


Figura S143. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**64**) em DMSO- d_6 a 75 MHz

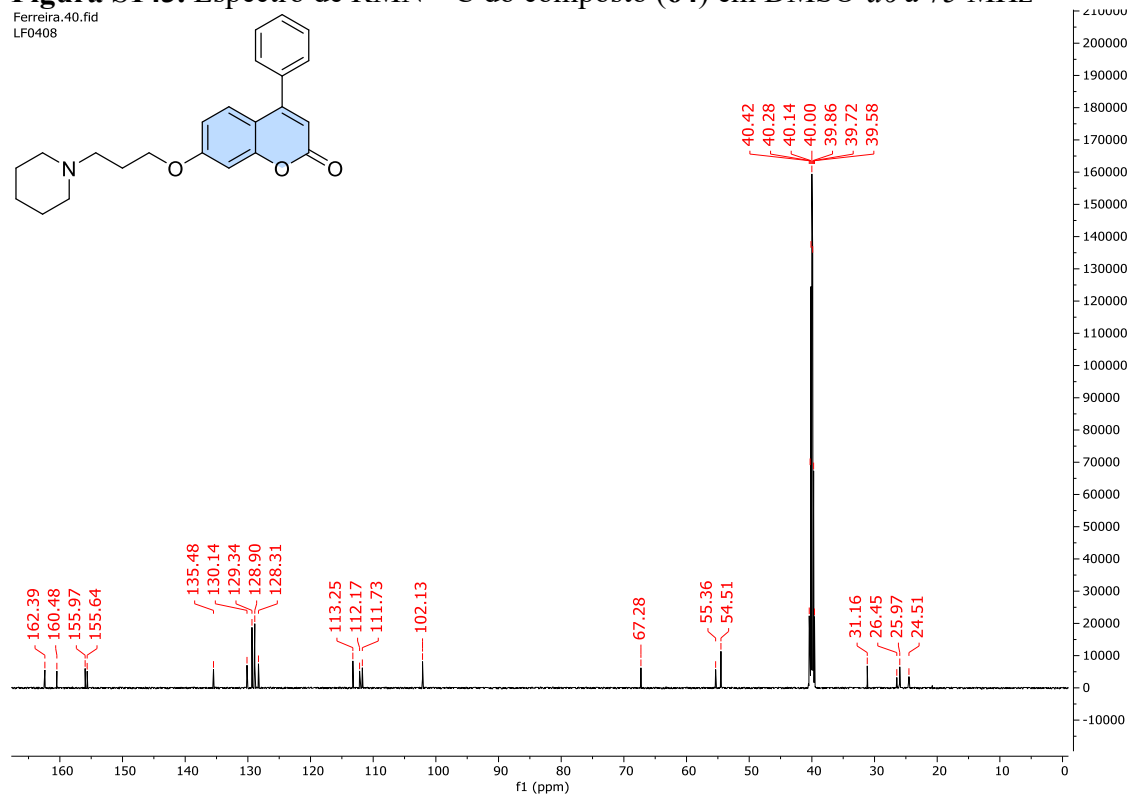


Figura S144. Espectro de RMN ^1H do composto (**69**) em DMSO- d_6 a 500 MHz

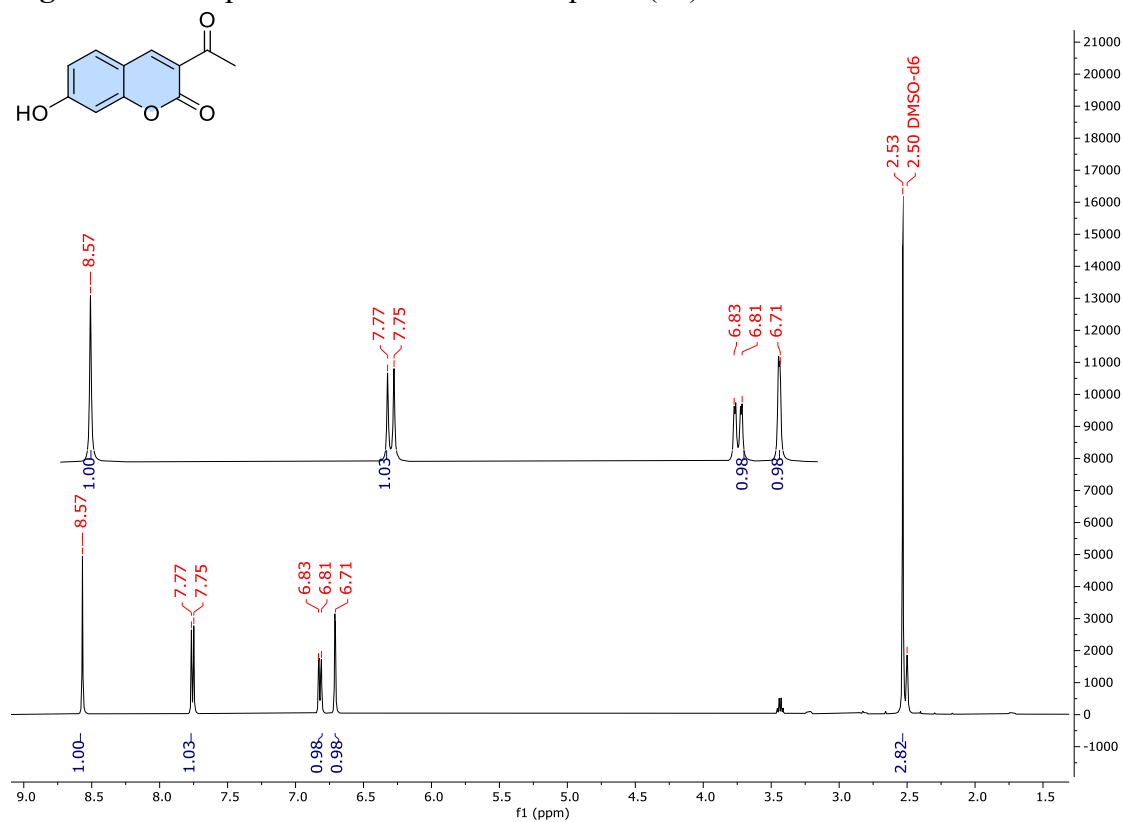


Figura S145. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**69**) em DMSO- d_6 a 1255 MHz

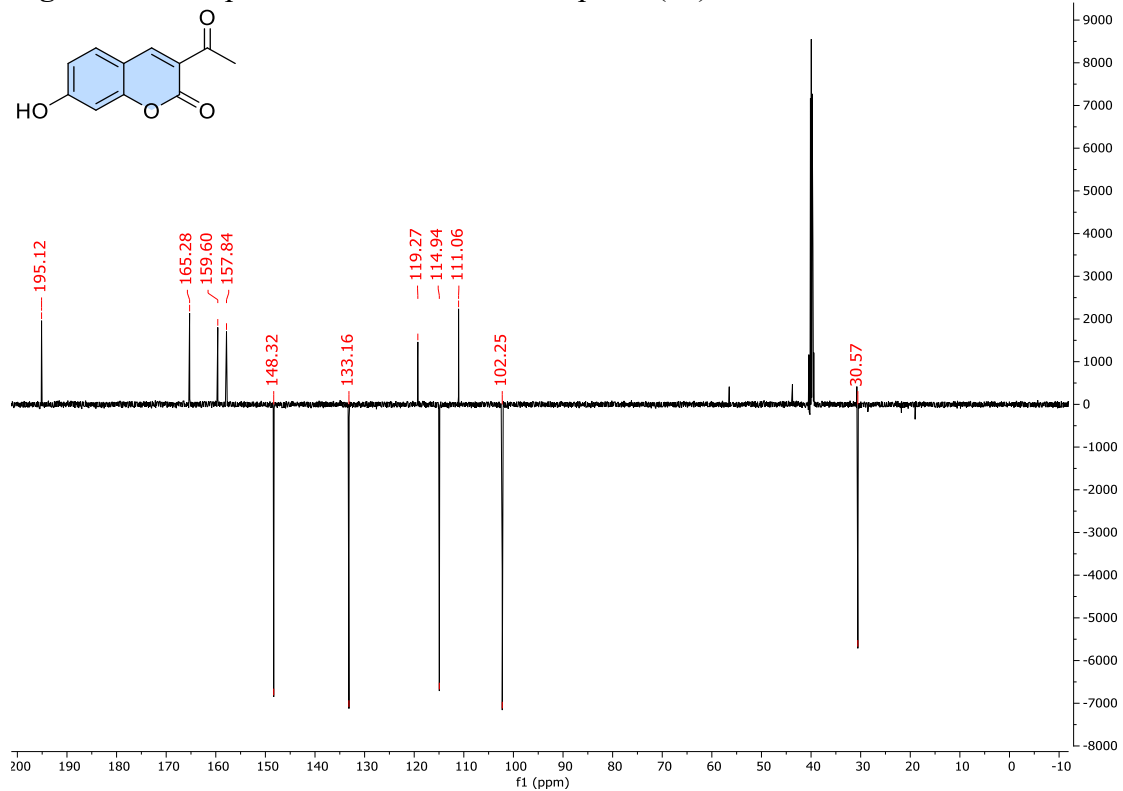


Figura S144. Espectro de RMN ^1H do composto (71) em CDCl_3 a 5500 MHz

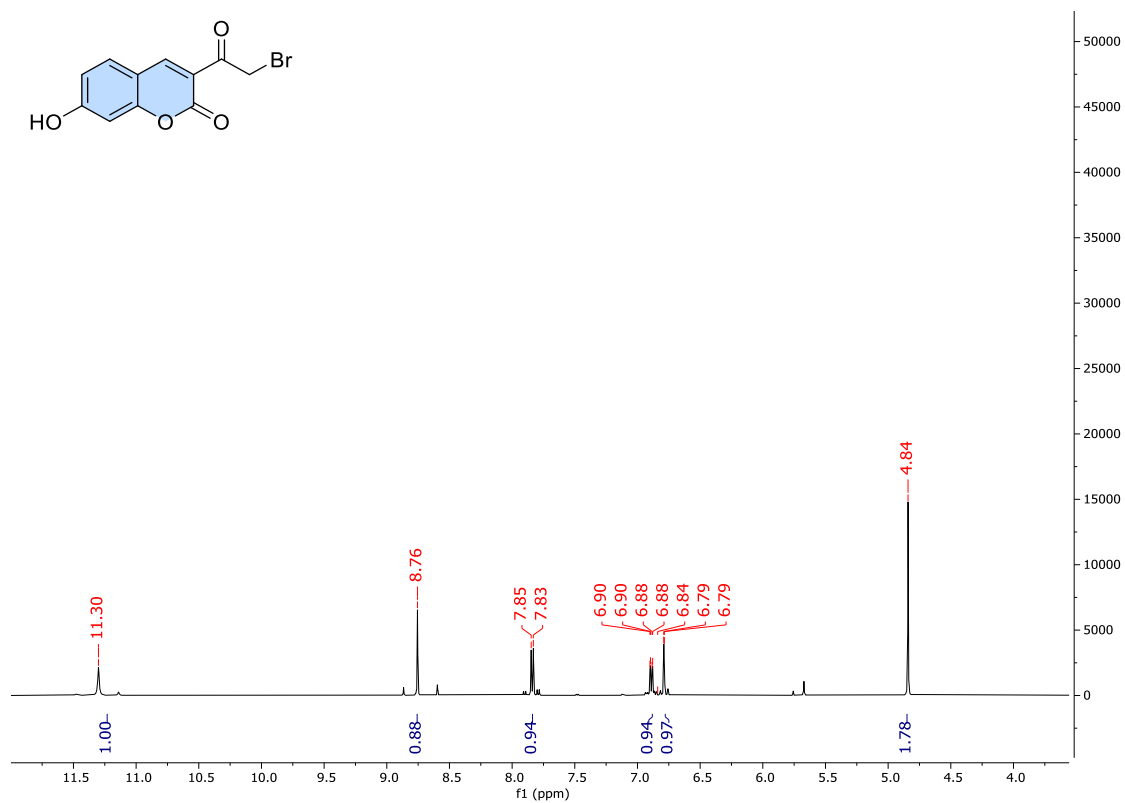
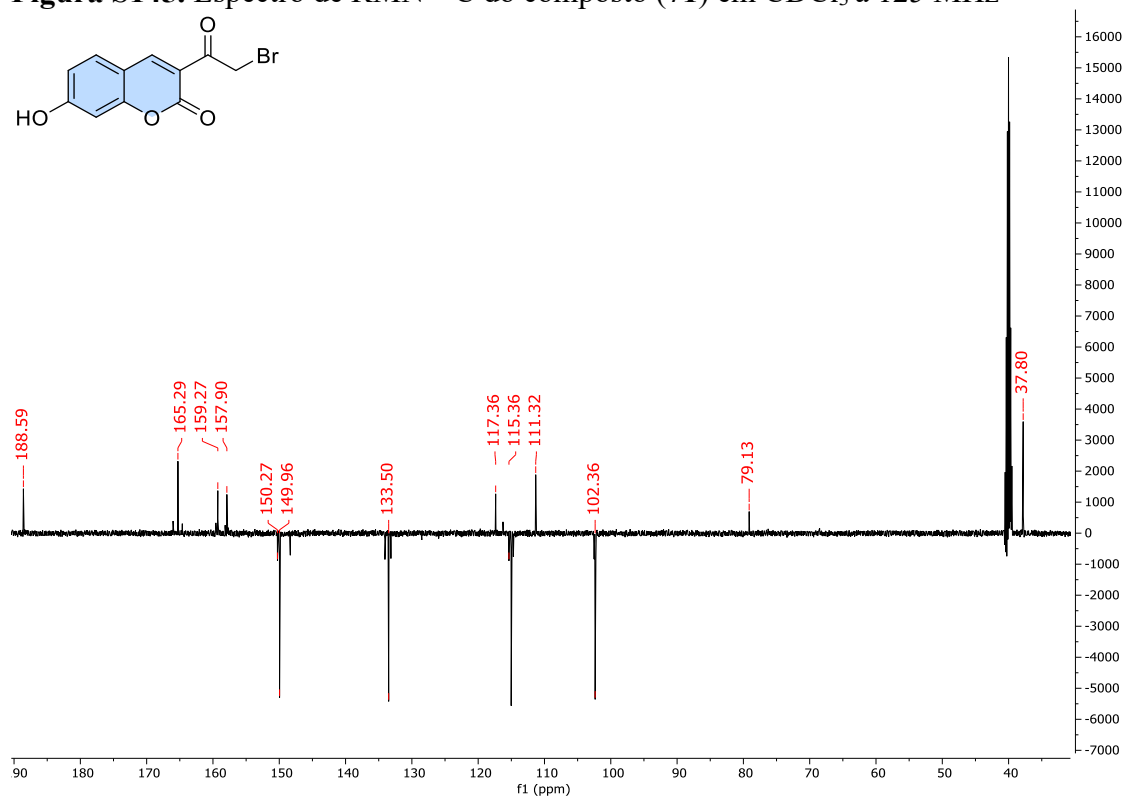


Figura S145. Espectro de RMN ^{13}C do composto (71) em CDCl_3 a 125 MHz



2025/383 CIM OH
 AMOSTRA: CIM OH (DEPTQ) - 500MHZ
 Solvente: DMSO
 OPERADOR DO NMR - VINICIUS

O=C1C(=C2C(=C1)C(=C(C=C2)O)C=C3C(=C(C=C3)N=C4C=CC=CC=C4N5C=CC=CC=C54))C=C6C=CC=CC=C6N=C7C=CC=CC=C7N5C=CC=CC=C54

163.08
 158.89
 155.46
 141.19
 131.18
 129.18
 116.37
 114.68
 113.93
 113.39
 111.52
 102.52

f1 (ppm)

Figura S148. Espectro de RMN ^1H do composto (**73b**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz

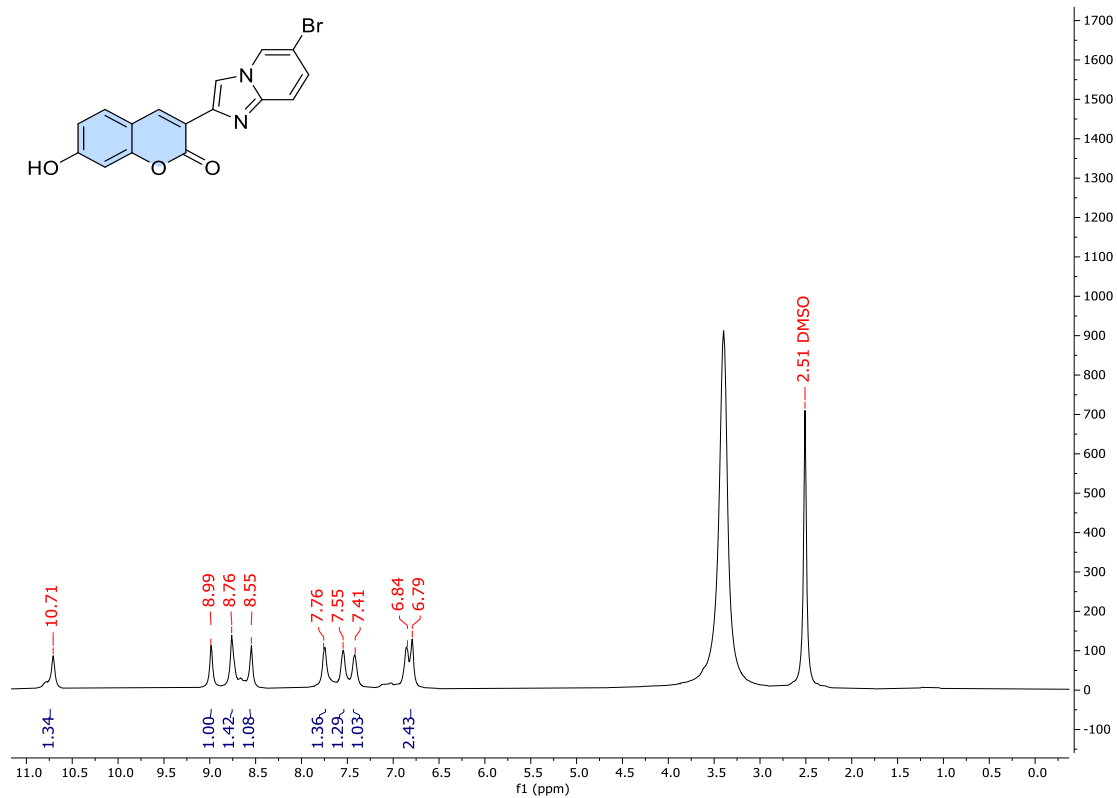


Figura S149. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**73b**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 125 MHz

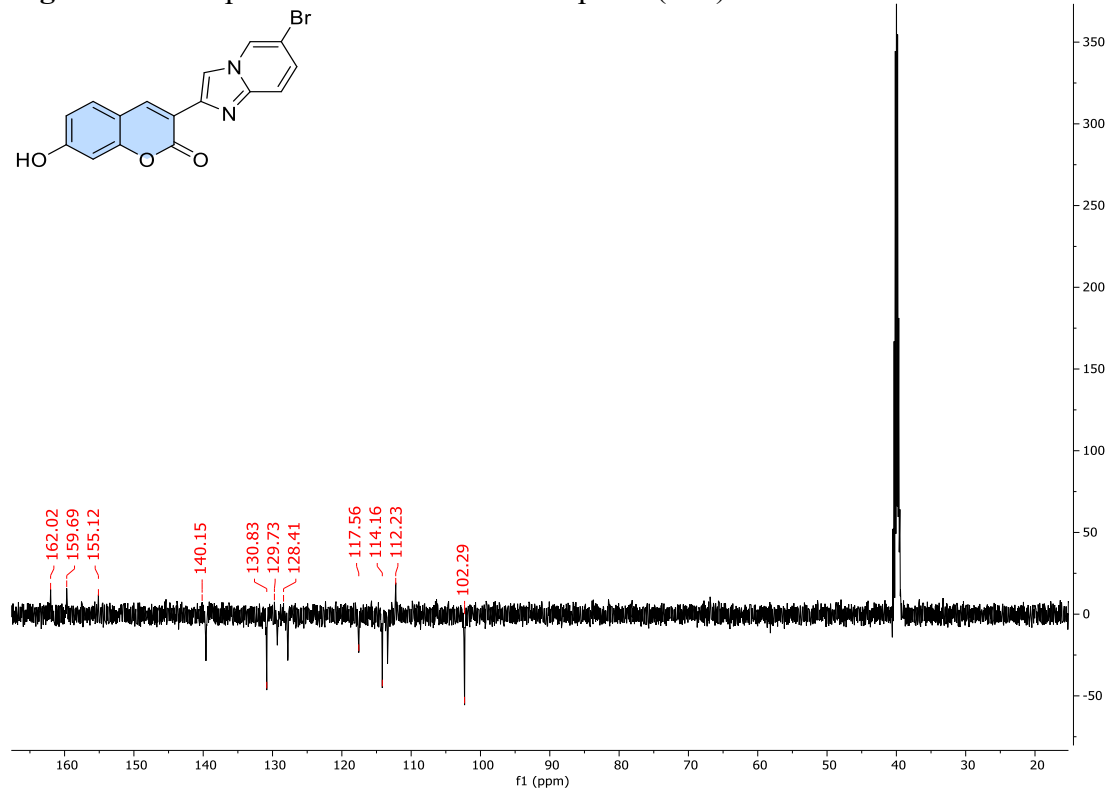


Figura S150. Espectro de RMN ^1H do composto (**75a**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz

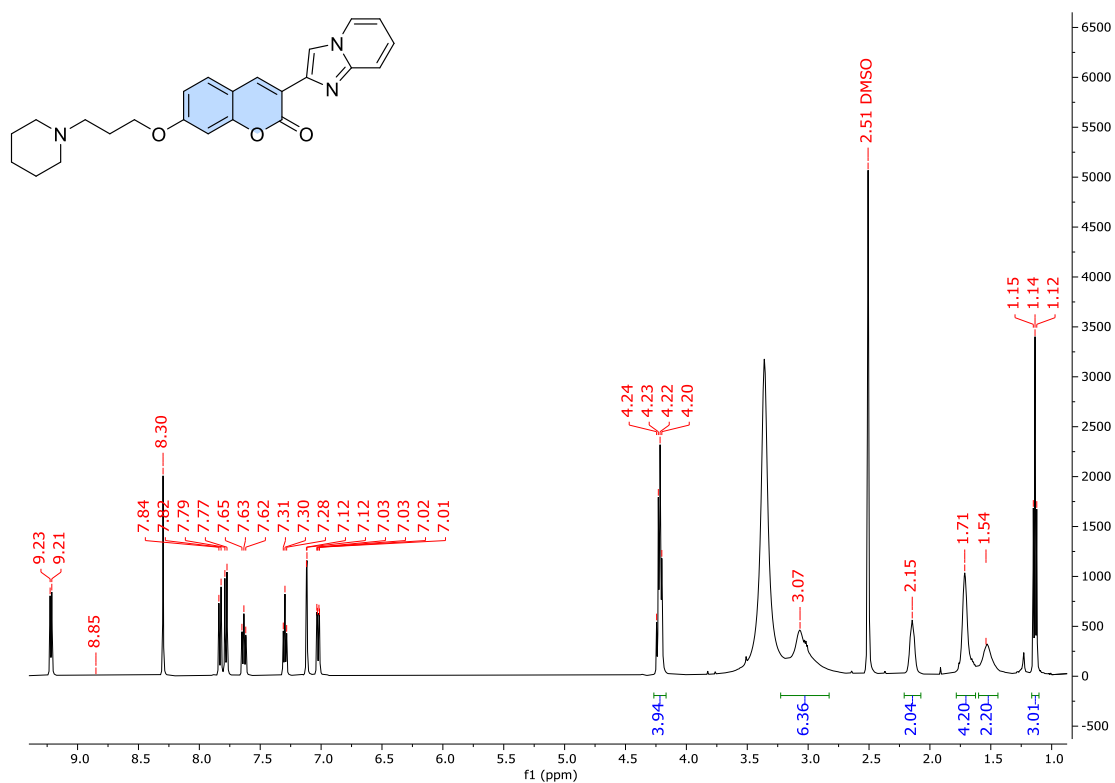


Figura S151. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**75a**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 125 MHz

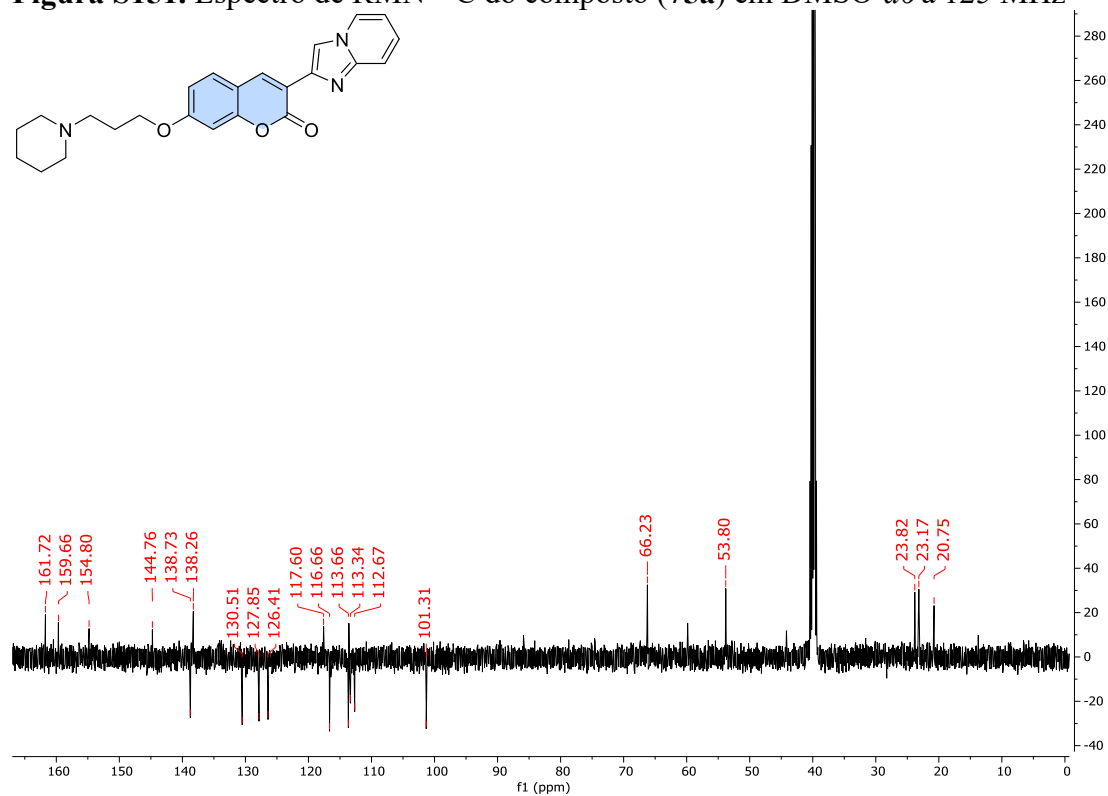


Figura S150. Espectro de RMN ^1H do composto (**75b**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 500 MHz

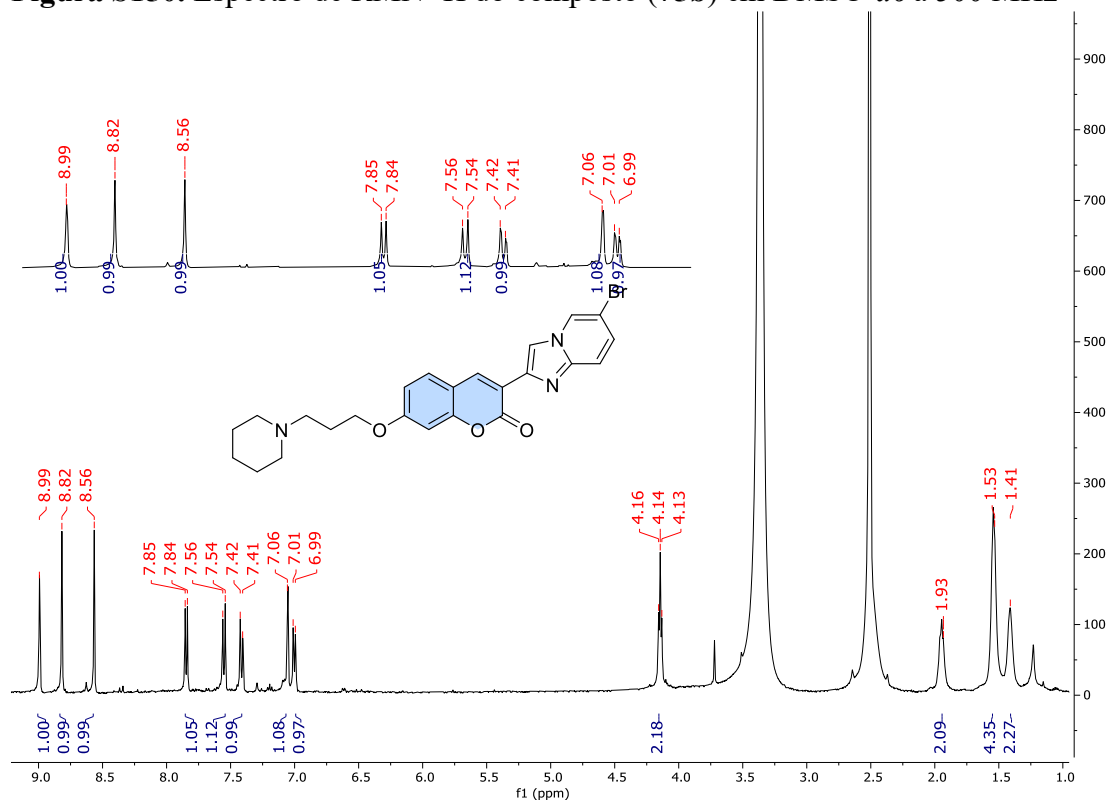


Figura S151. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**75b**) em $\text{DMSO-}d_6$ a 125 MHz

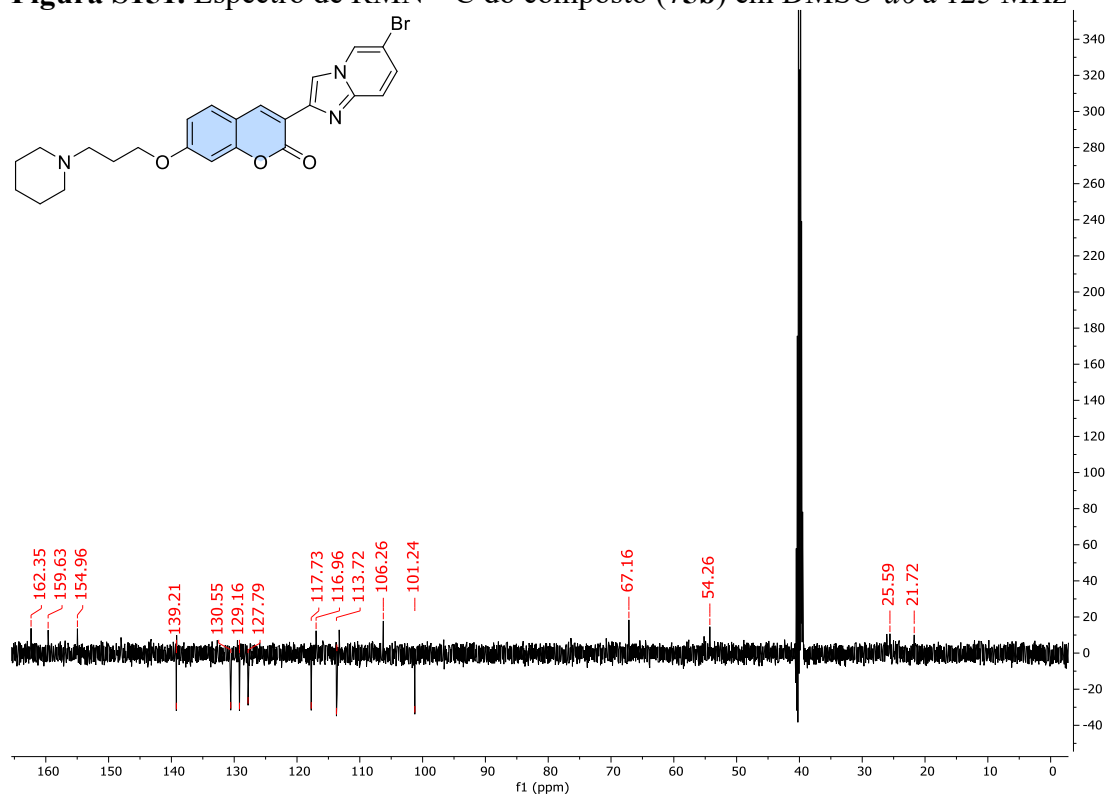


Figura S152. Espectro de RMN ^1H do composto (75c) em DMSO-*d*₆ a 500 MHz

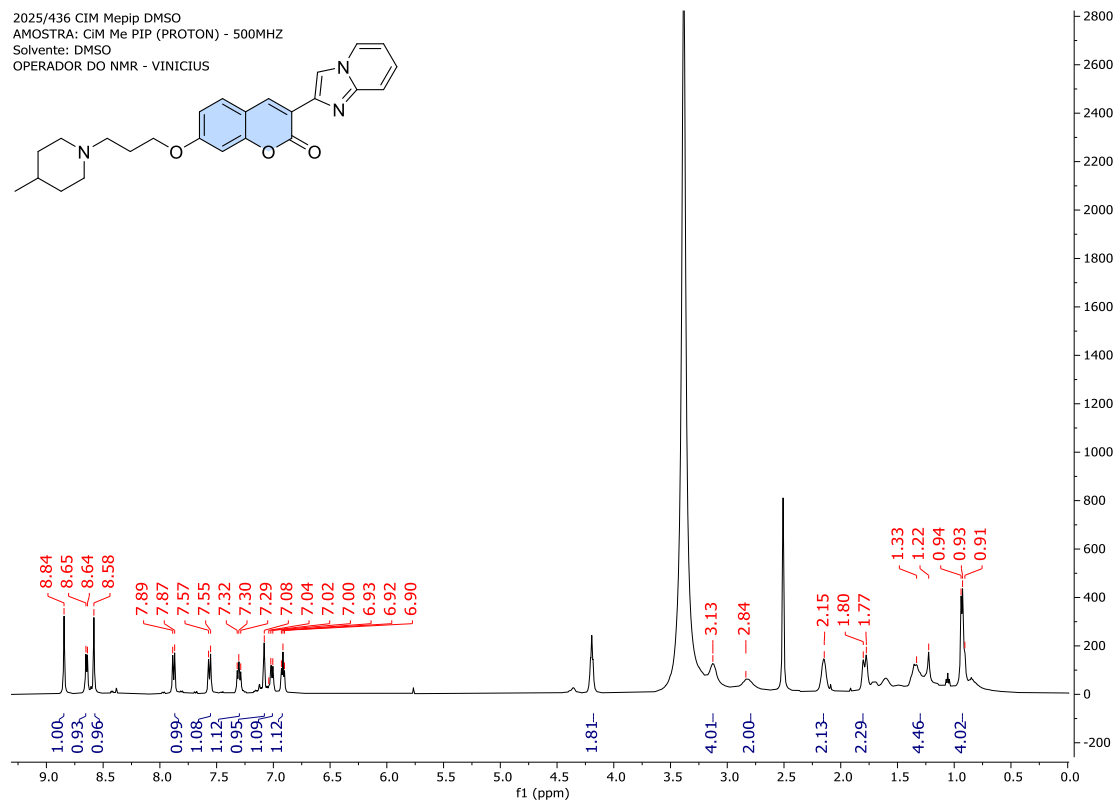


Figura S153. Espectro de RMN ^{13}C do composto (75c) em DMSO-*d*₆ a 125 MHz

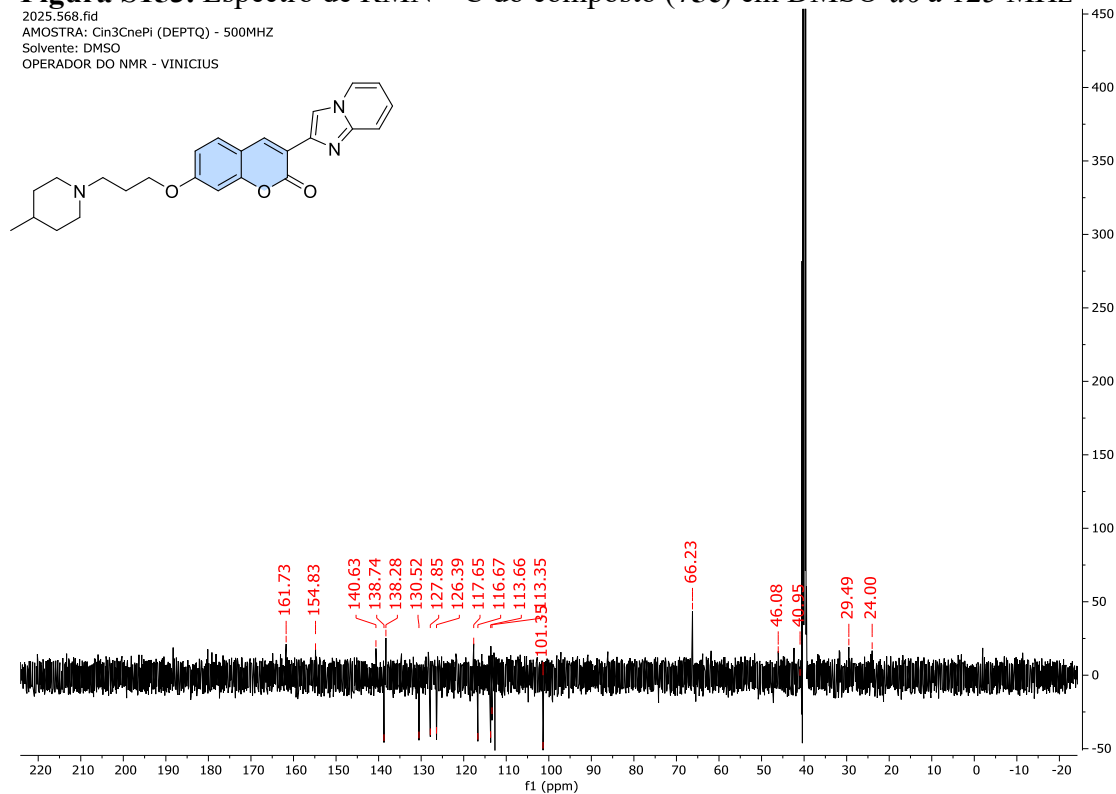


Figura S152. Espectro de RMN ^1H do composto (77) em DMSO- d_6 a 500 MHz

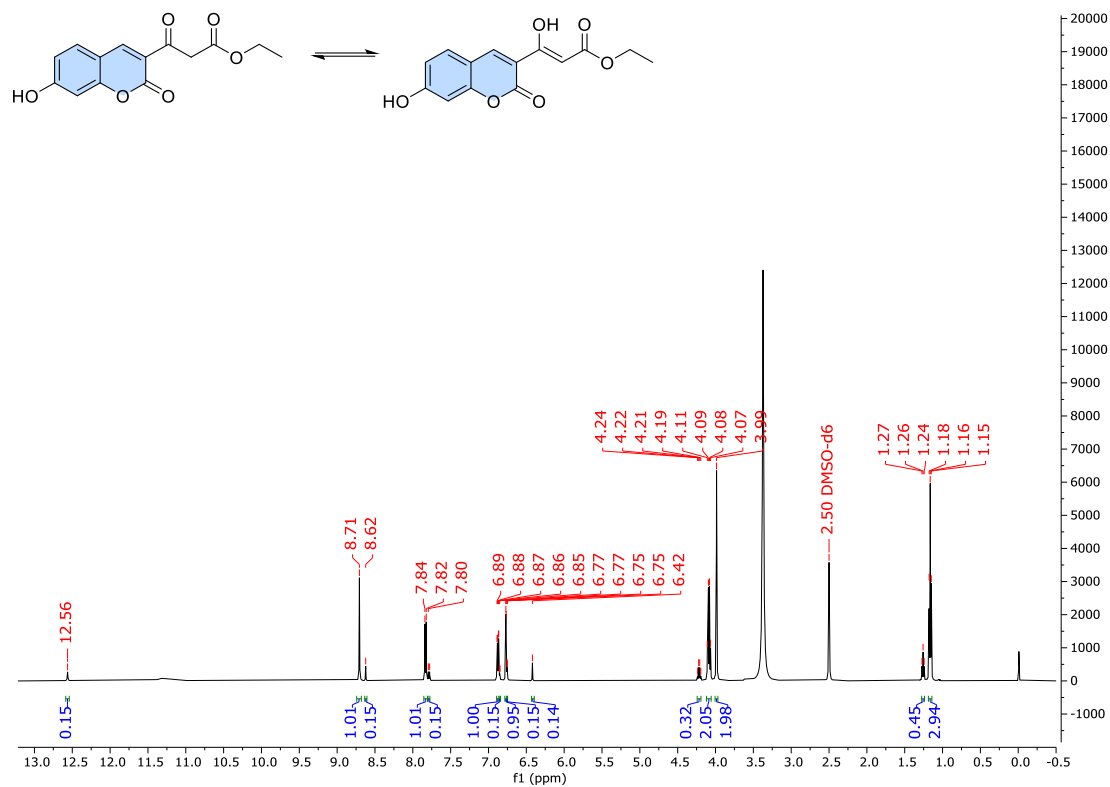


Figura S153. Espectro de RMN ^{13}C do composto (77) em DMSO- d_6 a 125 MHz

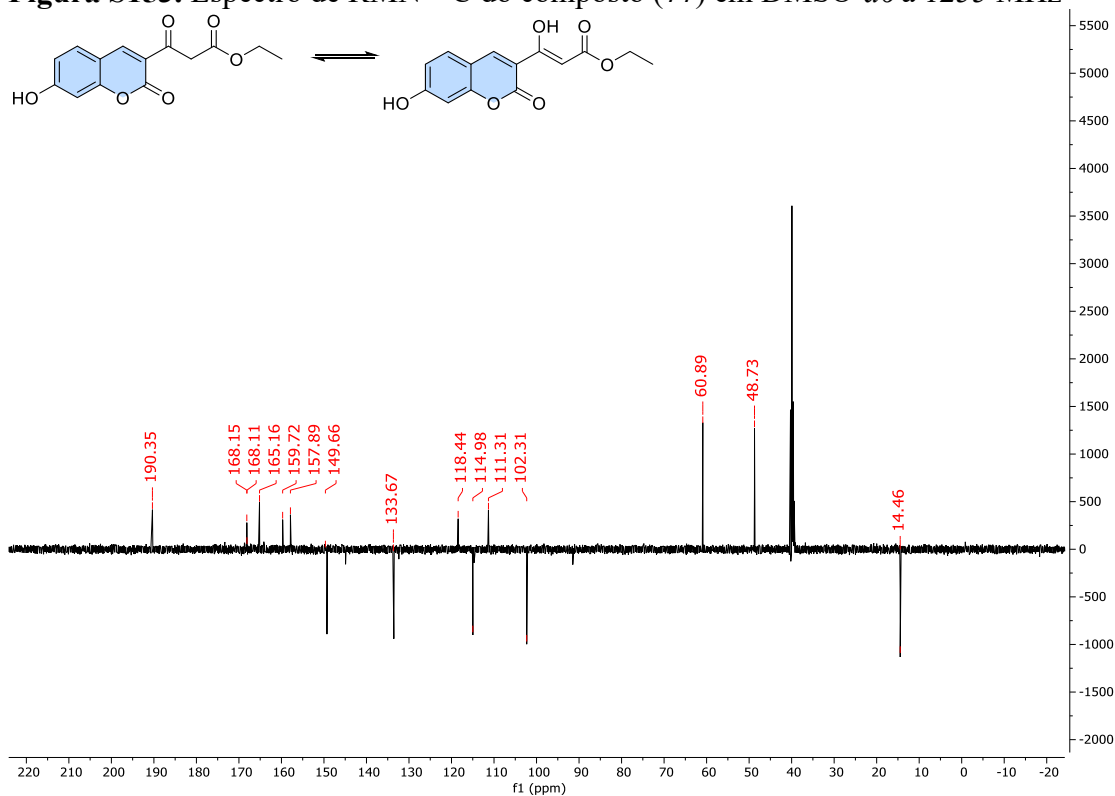


Figura S154. Espectro de RMN ^1H do composto (**78**) em CDCl_3 a 500 MHz

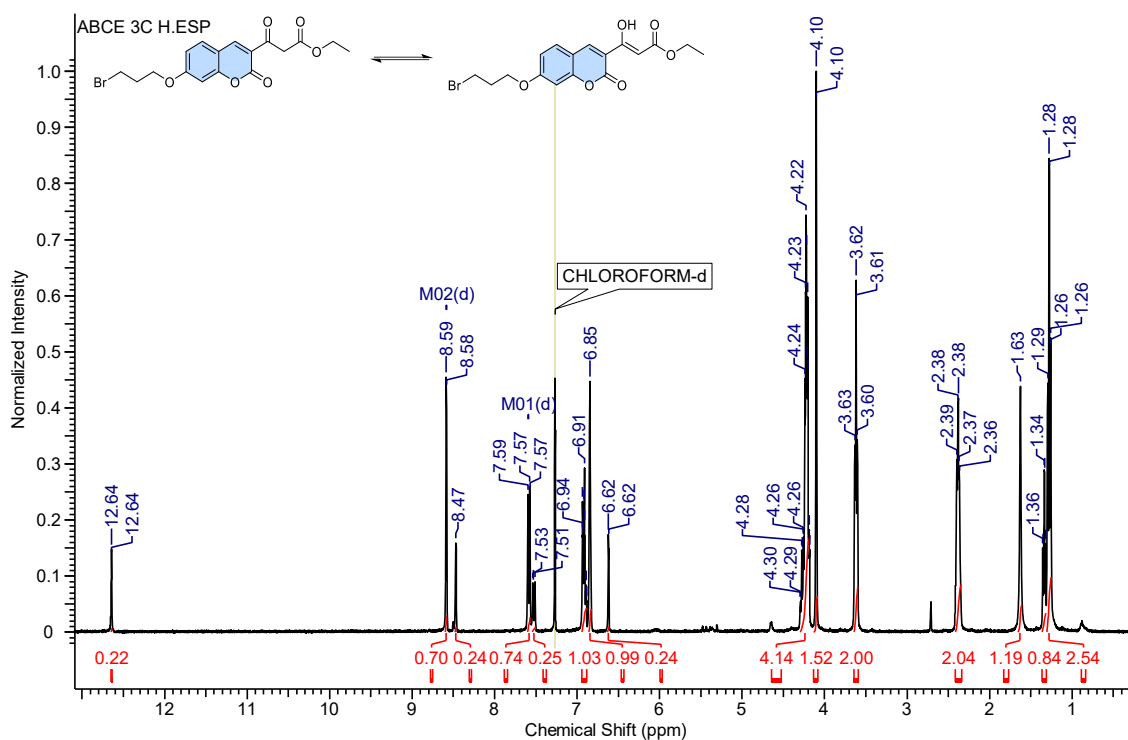


Figura S155. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**78**) em CDCl_3 a 125 MHz

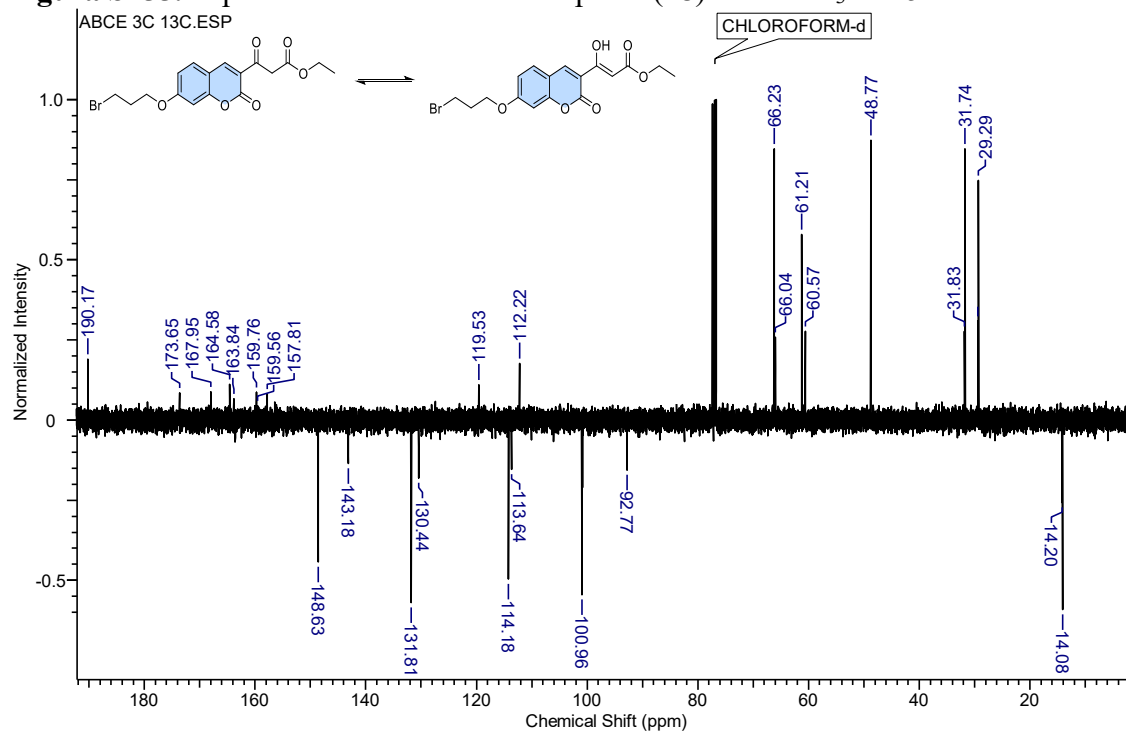


Figura S156. Espectro de RMN ^1H do composto (**79**) em CDCl_3 a 500 MHz

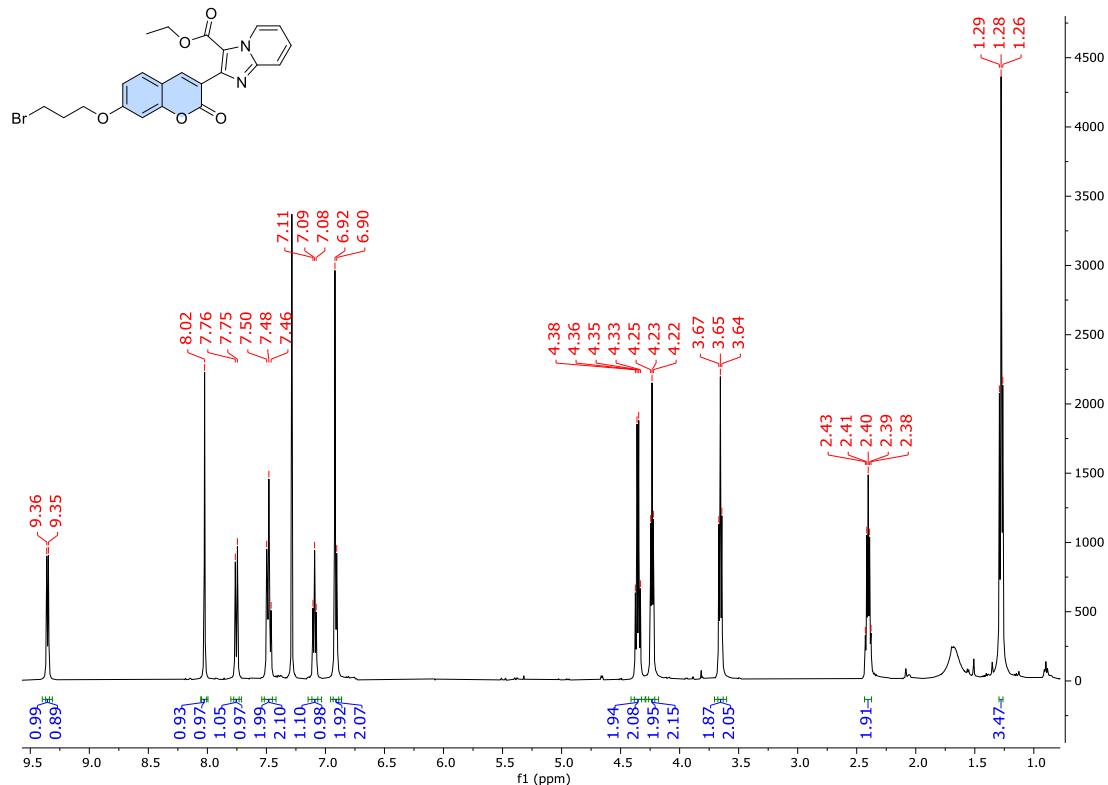
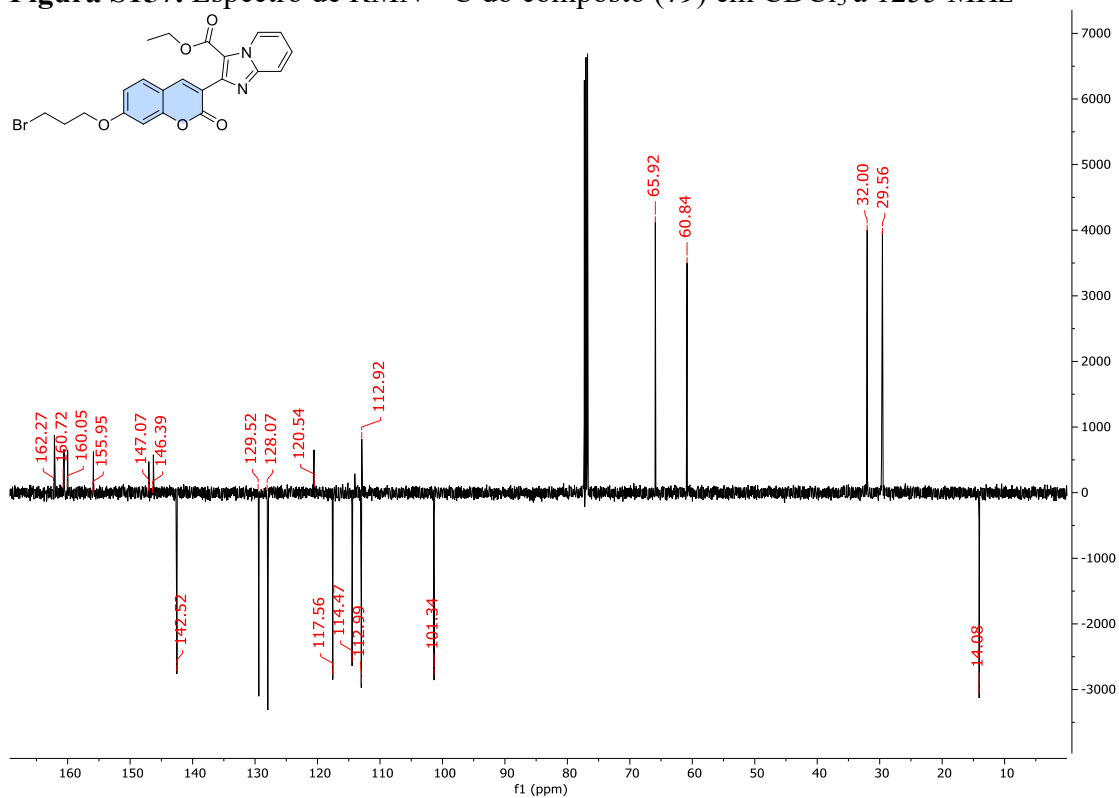


Figura S157. Espectro de RMN ^{13}C do composto (**79**) em CDCl_3 a 1255 MHz



Chemical structure of compound 10: CCOC(=O)c1nc2ccccc2n1-c3cc4c(cc3)oc(=O)c4cc5ccc(OCCCN6CCCCC6)cc5

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10. The x-axis represents the chemical shift in ppm (f1), ranging from 0 to 10. The y-axis represents the intensity, ranging from -500 to 6500. The spectrum shows several peaks, with the following chemical shifts (ppm) labeled in red: 9.23, 9.21, 8.85, 8.30, 7.84, 7.82, 7.79, 7.77, 7.65, 7.63, 7.62, 7.31, 7.30, 7.28, 7.12, 7.11, 7.03, 7.03, 7.02, 7.01, 4.24, 4.23, 4.22, 4.20, 3.90, 3.07, 2.15, 1.71, 1.54, 1.15, 1.14, and 1.12. Integration values are shown in blue below the baseline: 3.90, 6.30, 2.04, 4.19, 2.20, and 3.00.

Chemical structure of compound 10 is shown above the spectrum. The spectrum displays the following labeled peaks (ppm):

Peak Label (ppm)
160.39
159.66
155.76
146.76
146.47
143.44
130.58
129.12
127.92
119.95
117.70
115.62
113.63
112.88
101.52
66.49
60.82
54.09
52.98
24.18
23.60
22.67
14.18

7.32. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa (CL-EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Figura S160. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **51^a**

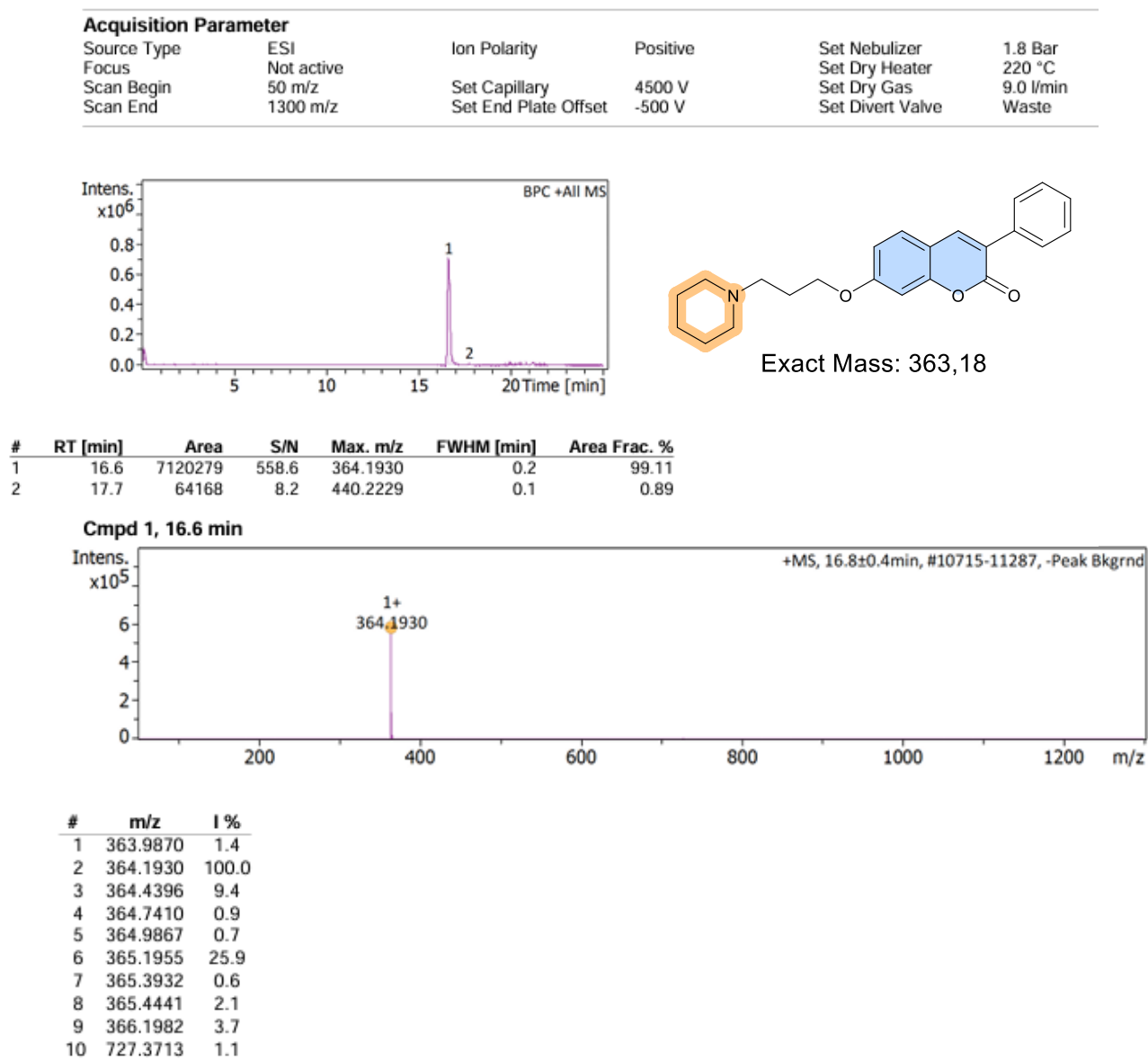
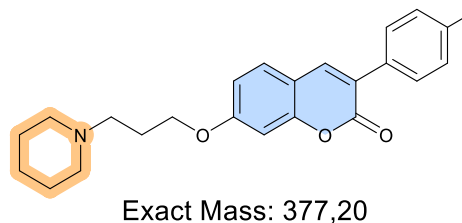
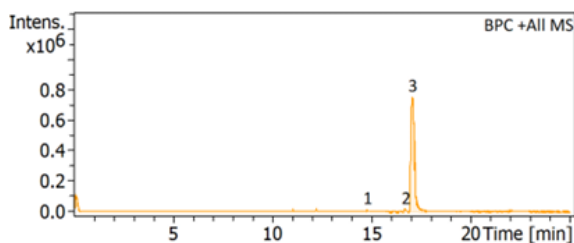


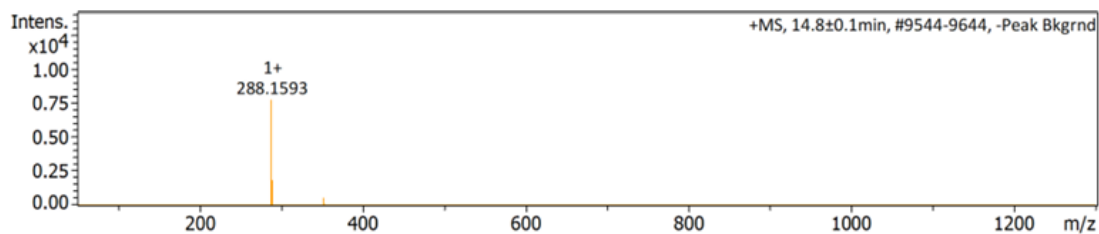
Figura S161. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **51b**

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



1
2
3



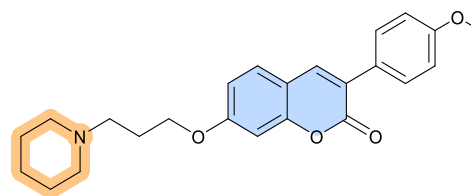
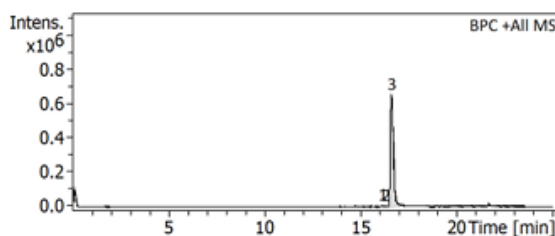
#	m/z	I %
1	288.1593	100.0
2	288.3164	12.1
3	288.3576	11.2
4	289.1634	24.1
5	289.1912	1.4
6	352.3410	7.1
7	352.4703	2.6
8	352.5195	3.4
9	352.5845	2.0
10	353.3497	2.0

Cmpd 2, 16.7 min

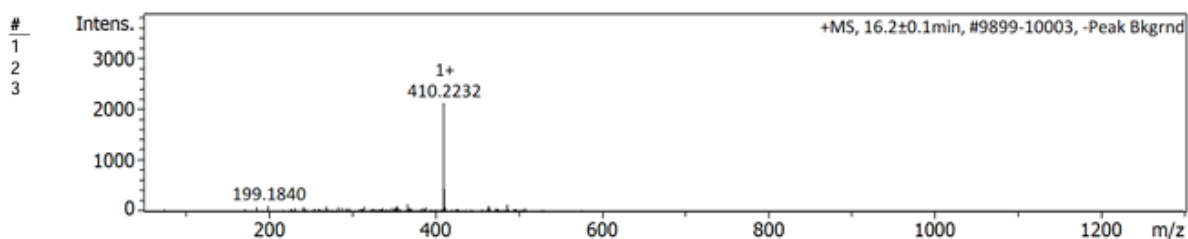
Figura S162. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **51c**

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Exact Mass: 393,19

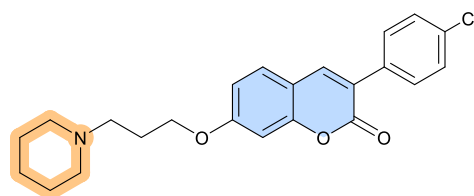
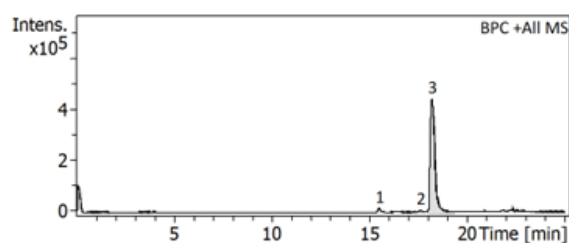


#	m/z	I %
1	367.2757	6.9
2	410.2232	100.0
3	410.2666	7.8
4	410.4801	7.9
5	410.7296	92.8
6	410.7984	16.5
7	410.8669	16.3
8	410.9938	7.3
9	411.2247	21.3
10	411.3027	7.1

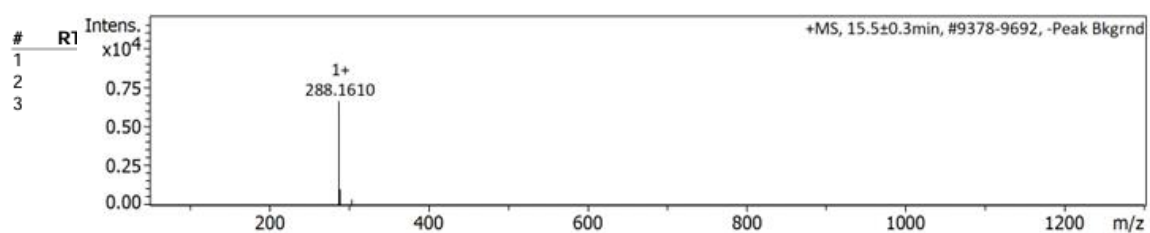
Cmpd 2, 16.3 min

Figura S163. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Exact Mass: 397,14

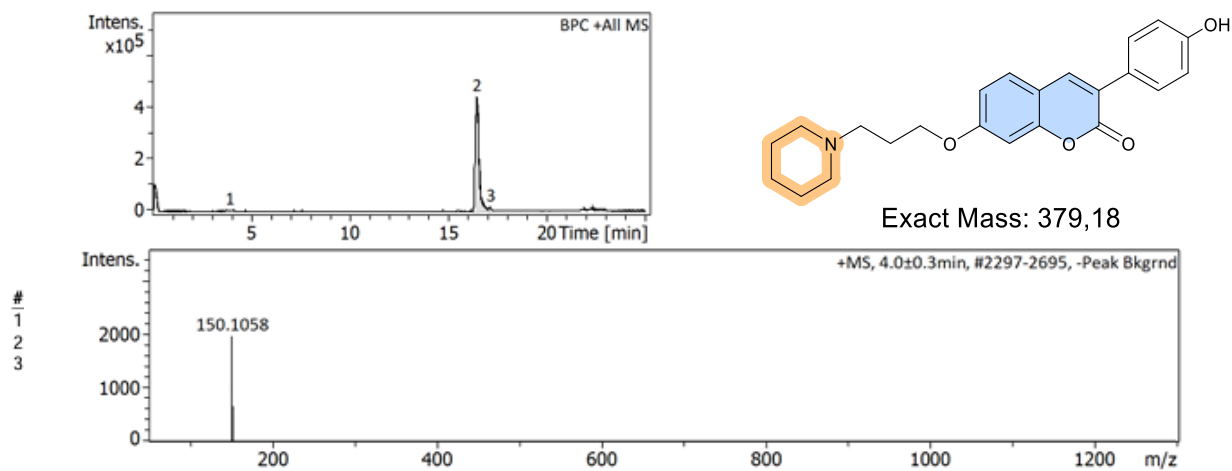


#	m/z	I %
1	288.1610	100.0
2	288.2454	1.4
3	288.2750	1.4
4	288.3010	2.9
5	288.3253	3.7
6	288.3578	10.0
7	289.1645	15.8
8	289.2054	1.1
9	304.1578	5.5
10	304.1904	1.0

Cmpd 2, 17.6 min

Figura S164. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **51e**

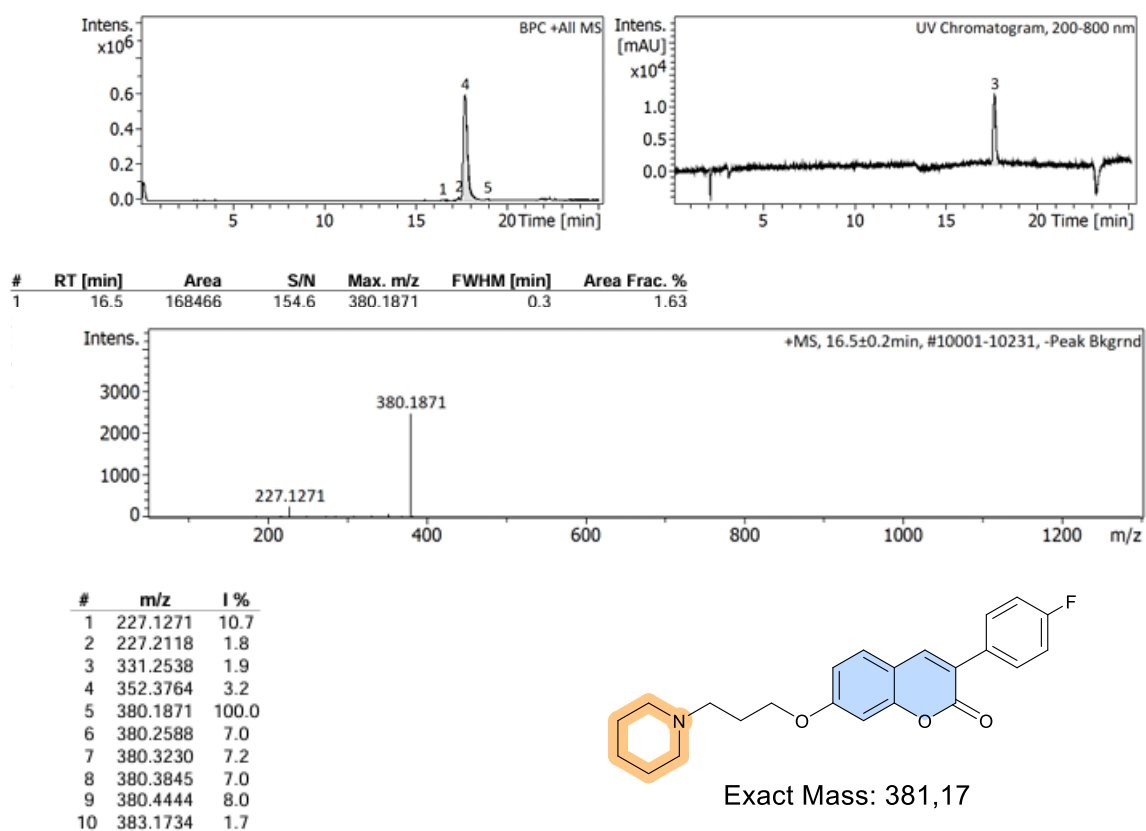
Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



#	m/z	I %
1	150.1058	100.0
2	150.1228	4.0
3	150.1544	5.3
4	150.1771	7.1
5	150.1959	3.1
6	150.2116	5.3
7	152.1038	33.9
8	152.1277	6.0
9	152.1565	4.9
10	152.2129	1.2

Cmpd 2, 16.5 min

Figura S165. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **51f**

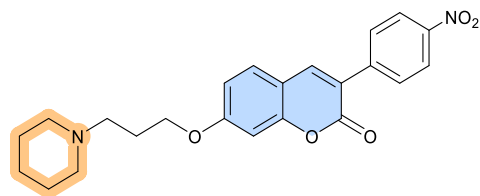
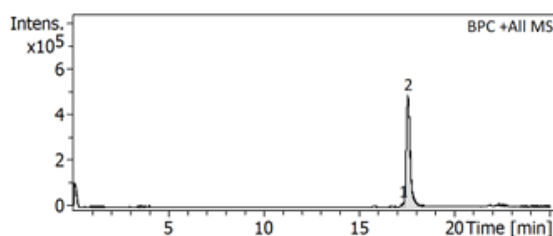


Cmpd 2, 17.4 min

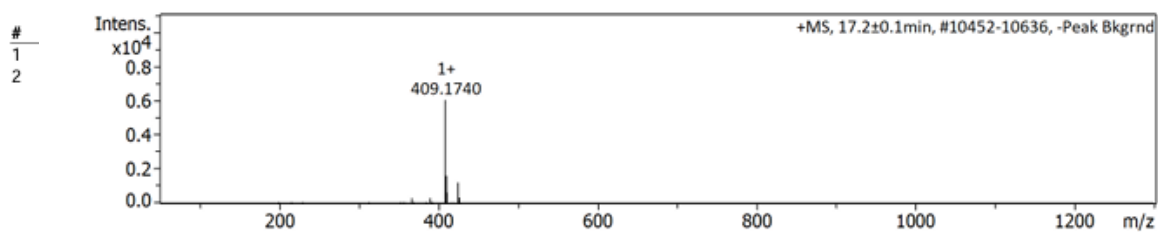
Figura S166. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **51h**

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Exact Mass: 408,17



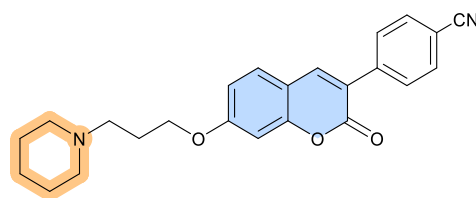
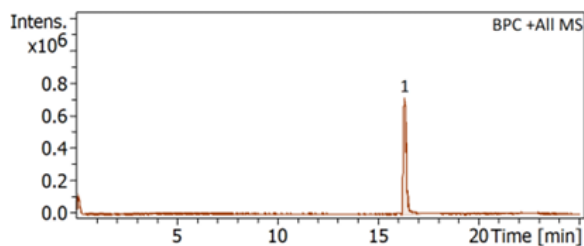
#	m/z	I %
1	367.2768	4.9
2	390.1708	5.3
3	409.1740	100.0
4	409.3164	3.3
5	409.3699	5.1
6	409.4561	4.3
7	410.1774	26.9
8	411.1852	10.3
9	425.1754	20.6
10	426.1780	5.5

Cmpd 2, 17.6 min

Figura S167. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **51i**

Acquisition Parameter

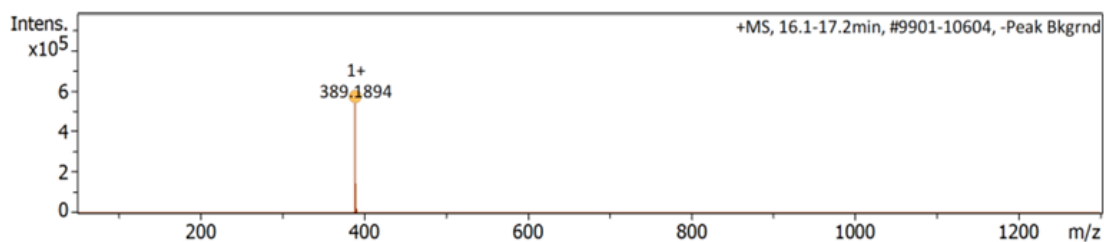
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Exact Mass: 388,18

#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	16.3	7994237	764.0	389.1894	0.2	100.00

Cmpd 1, 16.3 min



#	m/z	I %
1	388.9643	1.4
2	389.1894	100.0
3	389.4542	9.5
4	389.7532	0.8
5	389.9699	0.7
6	390.1913	27.2
7	390.4590	2.2
8	391.1937	4.2
9	391.4549	0.5
10	392.1983	0.4

Figura S168. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **51j**

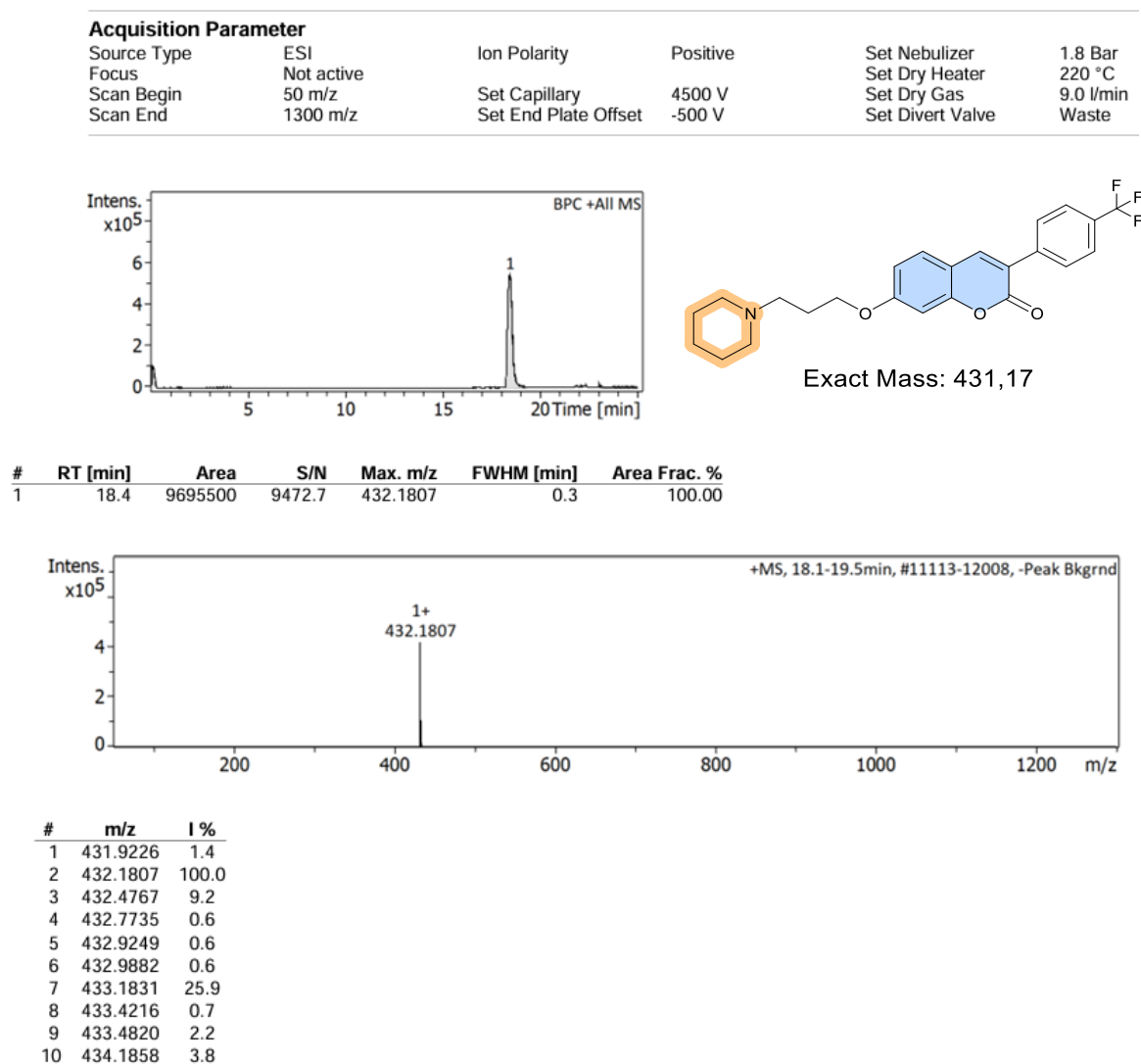
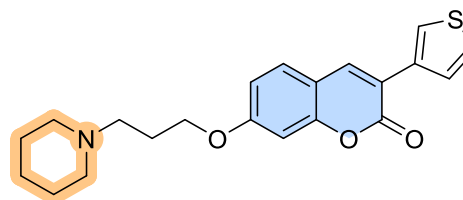
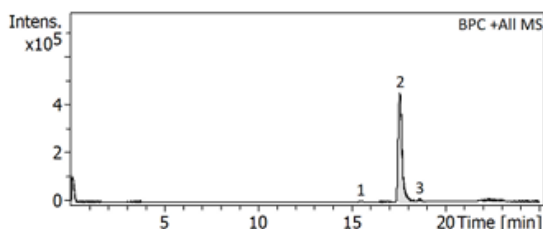


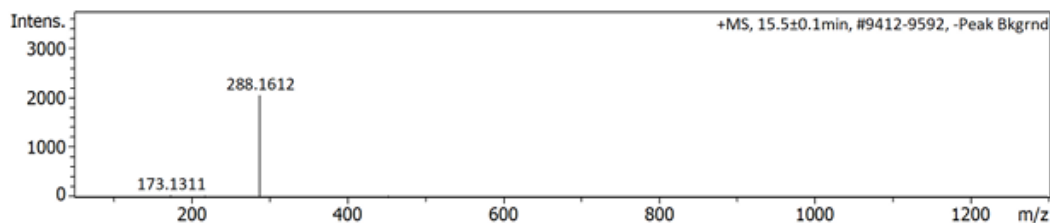
Figura S169. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **51k**

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Exact Mass: 369,14

#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	15.5	83890	141.6	288.1612	0.2	1.16
2	17.6	6898182	8277.1	370.1495	0.2	95.18
3	18.6	265355	309.7	452.1377	0.2	3.66

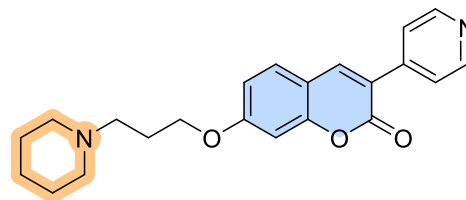
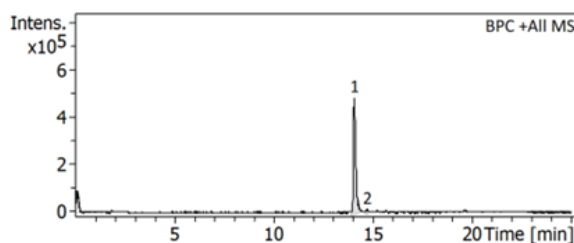


#	m/z	I %
1	173.1311	1.9
2	217.0966	1.2
3	288.1612	100.0
4	288.2048	5.5
5	288.2422	8.3
6	288.2727	5.5
7	288.2988	4.1
8	288.3238	2.4
9	288.3576	8.8
10	453.3579	1.3

Cmpd 2, 17.6 min

Figura S170. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **511**

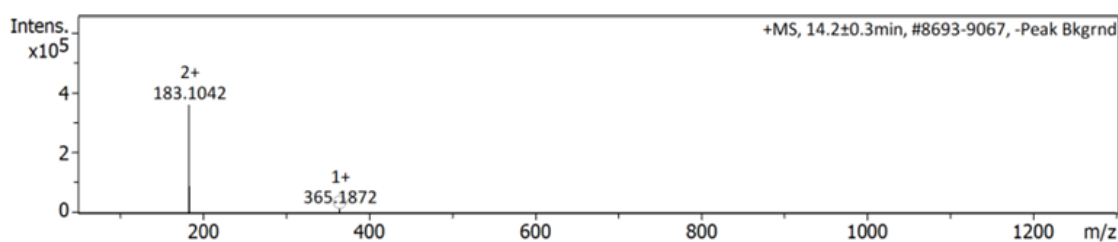
Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Exact Mass: 364,18

#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	14.1	4278495	1314.2	183.1042	0.1	96.69
2	14.7	146453	58.2	223.0596	0.1	3.31

Cmpd 1, 14.1 min



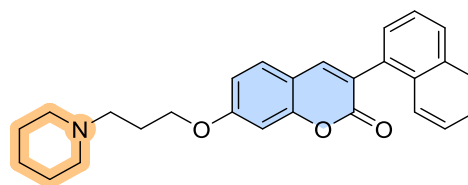
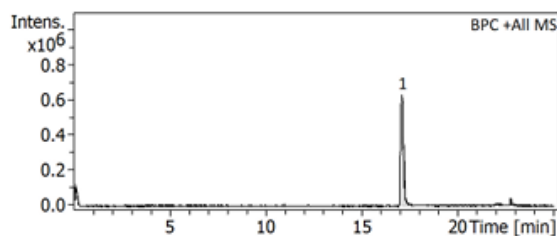
#	m/z	I %
1	183.0291	0.9
2	183.1042	100.0
3	183.2232	4.0
4	183.4859	0.5
5	183.6055	25.1
6	183.7255	1.2
7	184.1069	3.8
8	184.6072	0.4
9	365.1872	4.2
10	366.1916	1.0

#	z	Sum Formula	Adduct	Meas. m/z	err [mDa]	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma
1	1+	C22H24N2O3	M+H	365.1872	-1.2	C22H25N2O3	365.1860	-3.2	10.8	1

Cmpd 2, 14.7 min

Figura S171. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **51m**

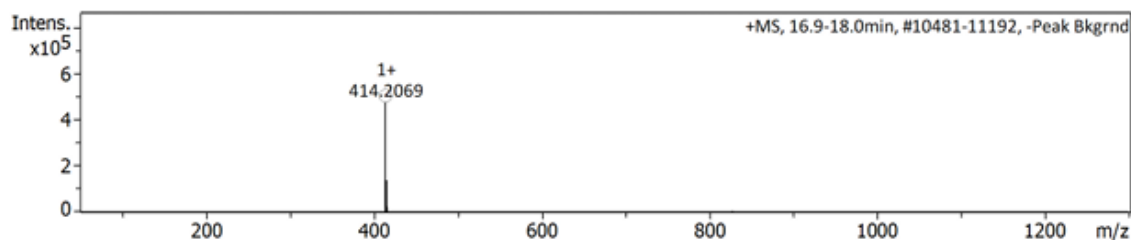
Acquisition Parameter		Ion Polarity		Positive	
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Exact Mass: 413,20

#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	17.1	6728750	1024.7	414.2069	0.2	100.00

Cmpd 1, 17.1 min



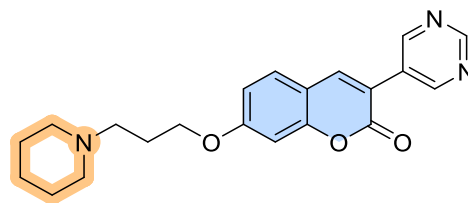
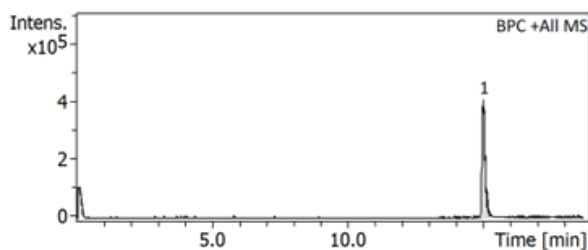
#	m/z	I %
1	413.9636	1.4
2	414.2069	100.0
3	414.4902	9.5
4	414.7921	0.8
5	414.9711	0.6
6	415.2095	29.7
7	415.4958	2.6
8	416.2123	5.0
9	827.4011	1.5
10	828.4042	0.9

#	z	Sum Formula	Adduct	Meas. m/z	err [mDa]	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma
1	1+	C27H27NO3	M+H	414.2069	-0.5	C27H28NO3	414.2064	-1.2	1.7	1

Figura S172. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **51n**

Acquisition Parameter

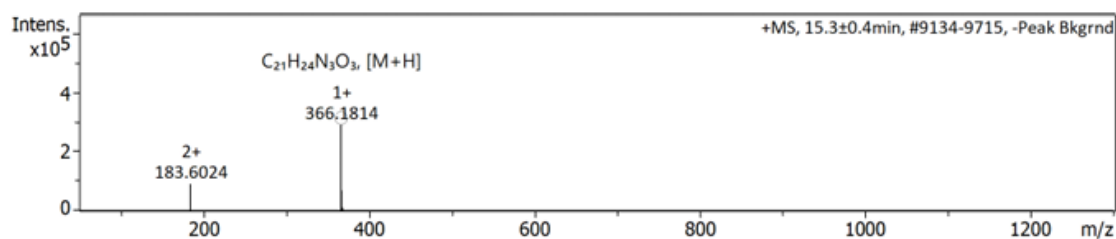
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Exact Mass: 365,17

#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	15.0	3238616	814.2	366.1814	0.1	100.00

Cmpd 1, 15.0 min

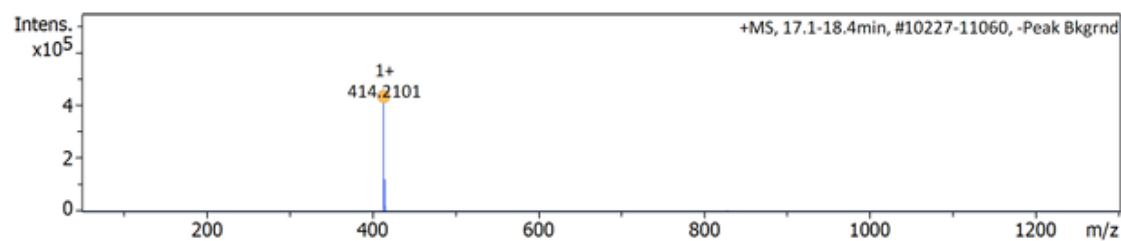


#	m/z	I %
1	183.6024	31.9
2	183.7219	1.4
3	184.1036	8.0
4	184.6053	1.2
5	365.9731	1.2
6	366.1814	100.0
7	366.4304	8.1
8	367.1844	24.2
9	367.4346	1.9
10	368.1872	3.4

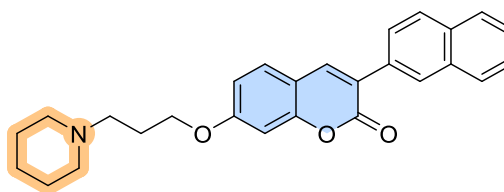
#	z	Sum Formula	Adduct	Meas. m/z	err [mDa]	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma
1	1+	C21H23N3O3	M+H	366.1814	-0.2	C21H24N3O3	366.1812	-0.4	0.2	1

Figura S173. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **51o**

Cmpd 1, 17.4 min

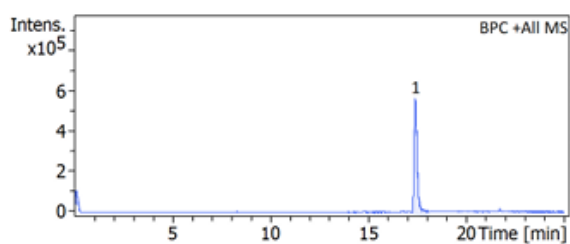


#	m/z	I %
1	413.9635	1.3
2	414.2101	100.0
3	414.4927	8.8
4	414.9730	0.7
5	415.2128	30.0
6	415.4390	0.9
7	415.4976	2.5
8	416.2153	5.0
9	827.4076	1.3
10	828.4114	0.8



Exact Mass: 413,20

#	z	Sum Formula	Adduct	Meas. m/z	err [mDa]	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma
1	1+	C27H27NO3	M+H	414.2101	-3.7	C27H28NO3	414.2064	-8.9	0.4	1



#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	17.4	6887099	809.0	414.2101	0.2	100.00

Cmpd 1, 17.4 min

Figura S174. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) do composto **51q**

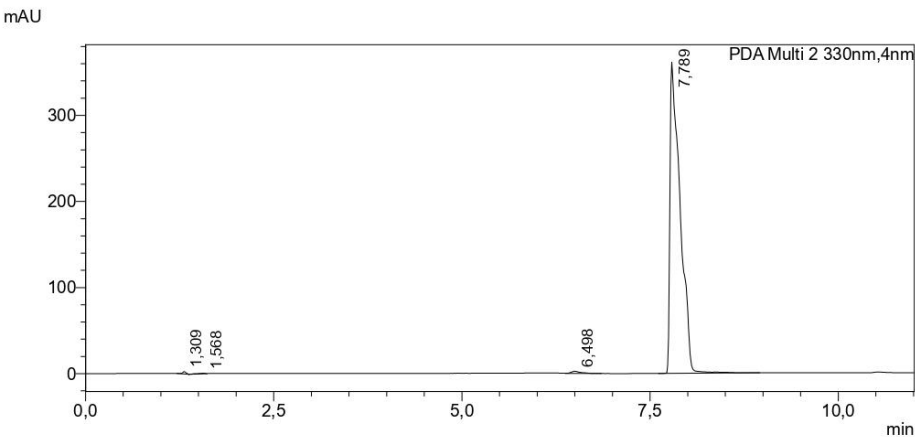
21/10/2025 15:44:11 Page 1 / 1

 Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : LF0419
Data Filename : LF0419.lcd
Method Filename : Método1-Finais MeOH-HAc 20-80%.lcm
Vial # : 1-1
Injection Volume : 10 uL
Date Acquired : 15/10/2025 11:59:49
Date Processed : 15/10/2025 12:12:04
Sample Type : Unknown
Acquired by : HPLC
Processed by :

<Chromatogram>

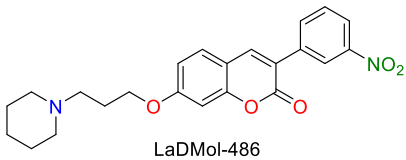
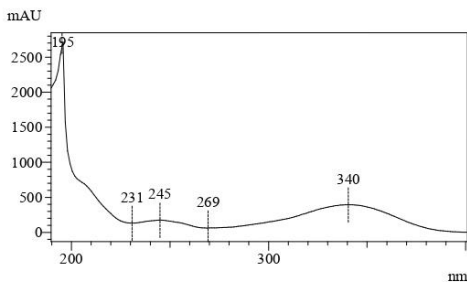


<Peak Table>

PDA Ch2 330nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Area%
1	1,309	8198	2726		0,238
2	1,568	6206	747		0,180
3	6,498	23068	2550		0,669
4	7,789	3413198	361517		98,914
Total		3450670	367541		100,000

Peak: 4
RT: 7,789



C:\LabSolutions\Data\LaDMol\Larissa\Nova pasta\Nova pasta\LF0419.lcd

Figura S175. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) do composto **51r**

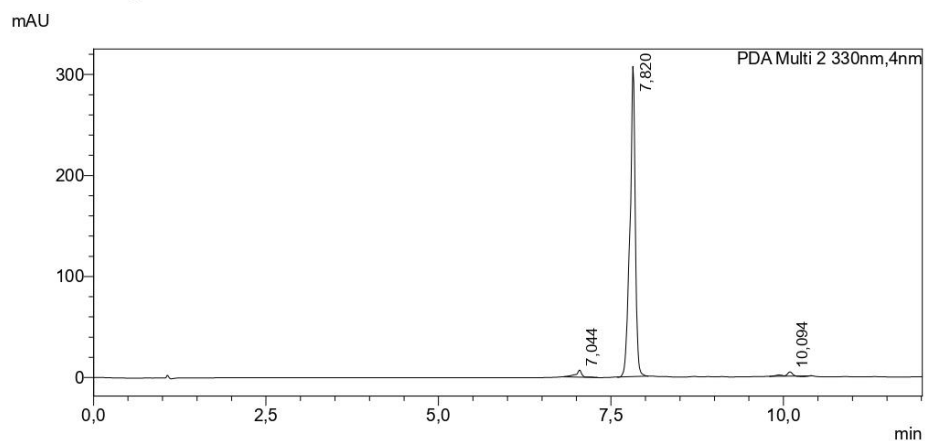
21/10/2025 15:51:12 Page 1 / 1

SHIMADZU
LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : LF0431.4
Data Filename : LF0431.4.lcd
Method Filename : NAH Finais Novo MeOH-Acido 30-80%.lcm
Vial # : 1-1
Injection Volume : 10 uL
Date Acquired : 09/10/2025 14:56:36
Date Processed : 09/10/2025 15:08:37
Sample Type : Unknown
Acquired by : HPLC
Processed by :

<Chromatogram>

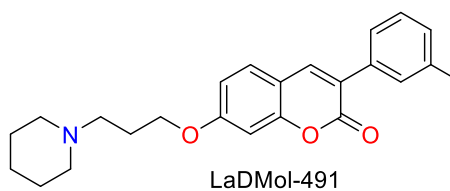
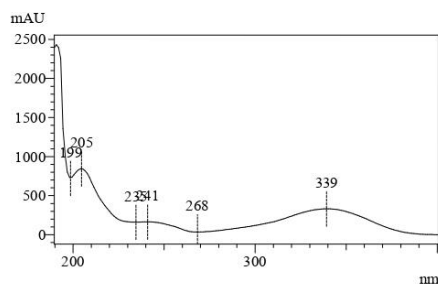


<Peak Table>

PDA Ch2 330nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Area%
1	7.044	43958	7007		2.571
2	7.820	1643044	306986		96.096
3	10.094	22795	4050		1.333
Total		1709797	318042		100.000

Peak: 2
RT: 7.820



C:\LabSolutions\Data\LaDMol\Larissa\Nova pasta\LF0431.4.lcd

Figura S1756. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) do composto **51s**

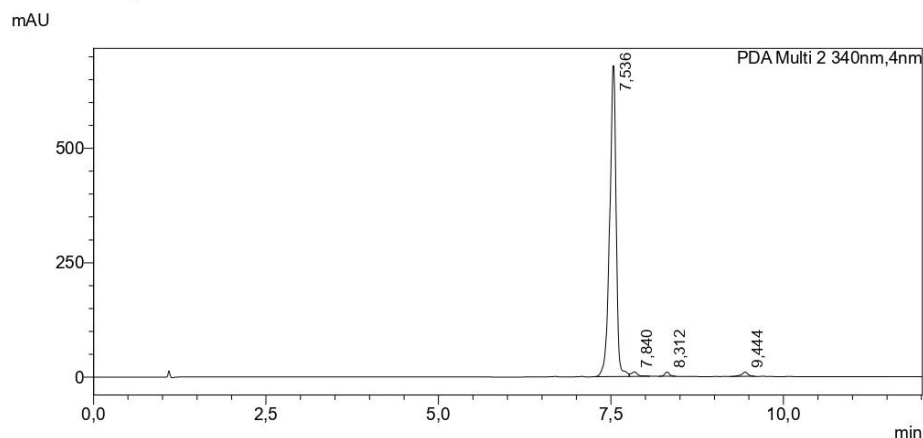
21/10/2025 15:55:51 Page 1 / 1

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : LF0420
 Data Filename : LF0420.lcd
 Method Filename : NAH Finais Novo MeOH-Acido 30-80%.lcm
 Vial # : 1-1
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 01/10/2025 14:17:35
 Date Processed : 01/10/2025 14:44:50
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : HPLC
 Processed by :

<Chromatogram>

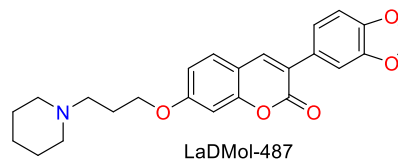
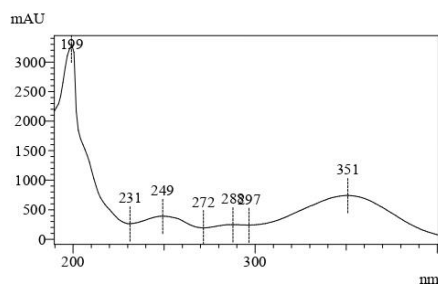


<Peak Table>

PDA Ch2 340nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Area%
1	7.536	4402862	678902		96,389
2	7.840	59220	9429		1,296
3	8.312	44143	9168		0,966
4	9.444	61580	9513		1,348
Total		4567805	707012		100,000

Peak: 1
 RT: 7.536



C:\LabSolutions\Data\LaDMol\Larissa\Nova pasta\LF0420.lcd

Figura S177. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) do composto **51t**

21/10/2025 15:53:29 Page 1 / 1



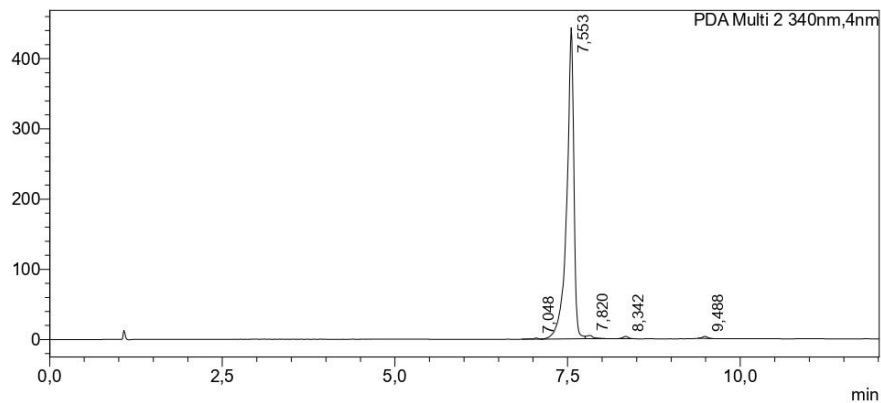
Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : LF0426
 Data Filename : LF0426.lcd
 Method Filename : NAH Finais Novo MeOH-Acido 30-80%.lcm
 Vial # : 1-1
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 01/10/2025 15:00:26
 Date Processed : 01/10/2025 15:28:46
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : HPLC
 Processed by :

<Chromatogram>

mAU



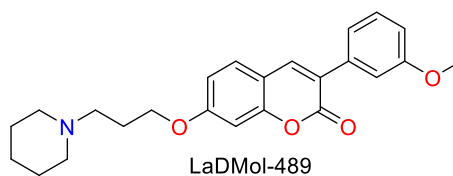
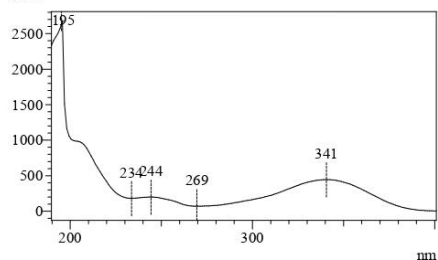
<Peak Table>

PDA Ch2 340nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Area%
1	7,048	8225	1522		0,255
2	7,553	3153224	442992		97,652
3	7,820	33781	4760		1,046
4	8,342	19060	3471		0,590
5	9,488	14738	2911		0,456
Total		3229029	455656		100,000

Peak: 2
 RT: 7,553

mAU



C:\LabSolutions\Data\LaDMol\Larissa\Nova pasta\LF0426.lcd

Figura S178. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) do composto **51u**

21/10/2025 15:56:47 Page 1 / 1



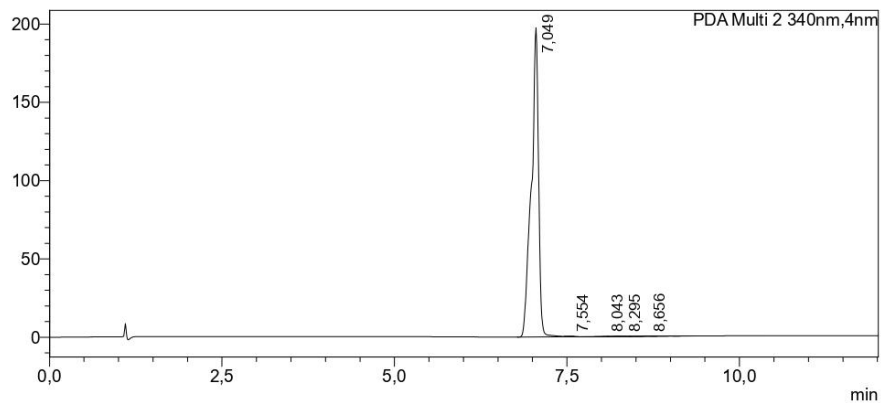
Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : LF0430
 Data Filename : LF0430.lcd
 Method Filename : NAH Finais Novo MeOH-Acido 30-80%.lcm
 Vial # : 1-1
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 01/10/2025 13:47:28
 Date Processed : 01/10/2025 14:13:54
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : HPLC
 Processed by :

<Chromatogram>

mAU



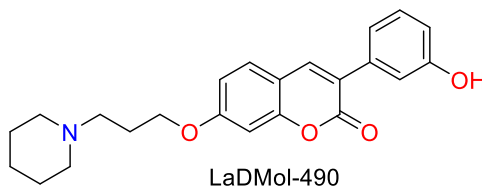
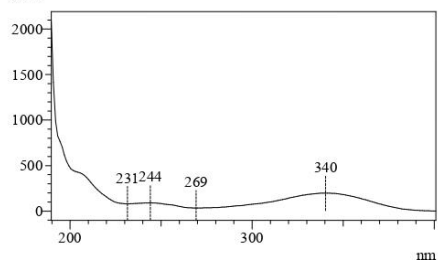
<Peak Table>

PDA Ch2 340nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Area%
1	7.049	1439876	197405		99,363
2	7.554	1699	309		0,117
3	8.043	1375	164		0,095
4	8.295	3983	309		0,275
5	8.656	2174	286		0,150
Total		1449107	198473		100,000

Peak: 1
 RT: 7.049

mAU



C:\LabSolutions\Data\LaDMol\Larissa\Nova pasta\LF0430.lcd

Figura S179. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) do composto **51v**

21/10/2025 15:55:05 Page 1 / 1



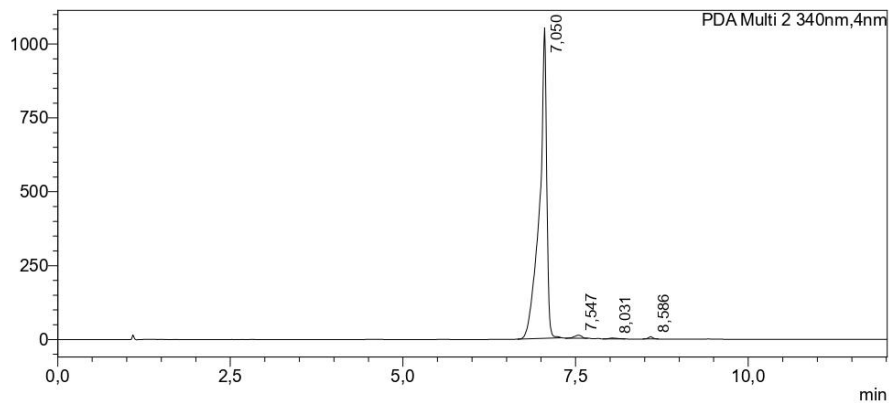
Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : LF0425
 Data Filename : LF0425.lcd
 Method Filename : NAH Finais Novo MeOH-Acido 30-80%.lcm
 Vial # : 1-1
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 01/10/2025 14:32:31
 Date Processed : 01/10/2025 14:58:19
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : HPLC
 Processed by :

<Chromatogram>

mAU



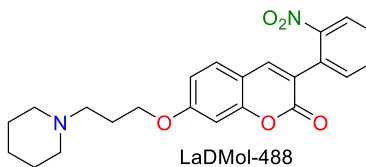
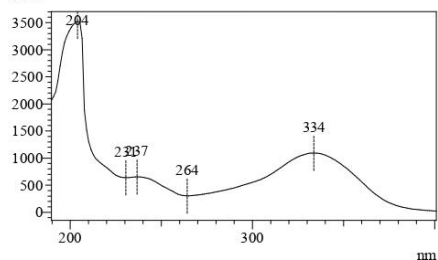
<Peak Table>

PDA Ch2 340nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Area%
1	7.050	7674202	1050254		98,293
2	7.547	72094	9802		0,923
3	8.031	24391	2980		0,312
4	8.586	36765	7724		0,471
Total		7807453	1070760		100,000

Peak: 1
 RT: 7.050

mAU



C:\LabSolutions\Data\LaDMol\Larissa\Nova pasta\LF0425.lcd

Figura S180. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) do composto **51x**

21/10/2025 15:52:15 Page 1 / 1



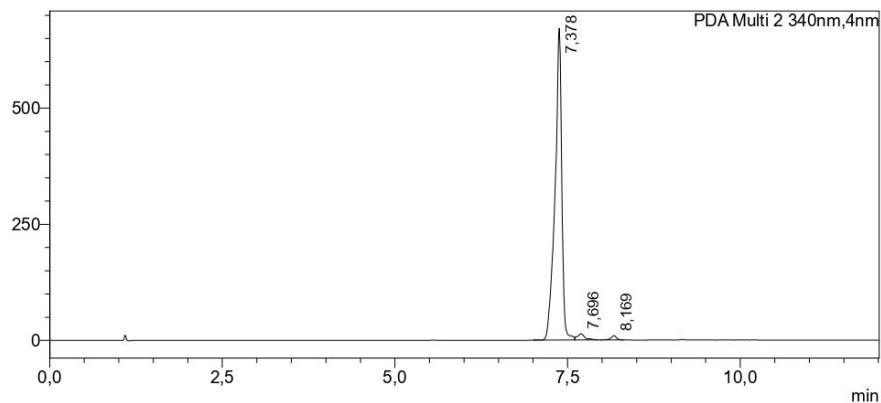
Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : LF0433
 Data Filename : LF0433.lcd
 Method Filename : NAH Finais Novo MeOH-Acido 30-80%.lcm
 Vial # : 1-1
 Injection Volume : 10 uL
 Date Acquired : 01/10/2025 15:16:23
 Date Processed : 01/10/2025 15:42:22
 Sample Type : Unknown
 Acquired by : HPLC
 Processed by :

<Chromatogram>

mAU



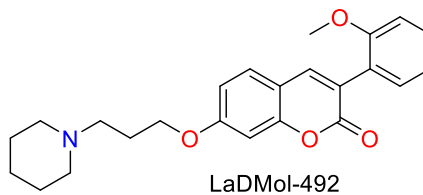
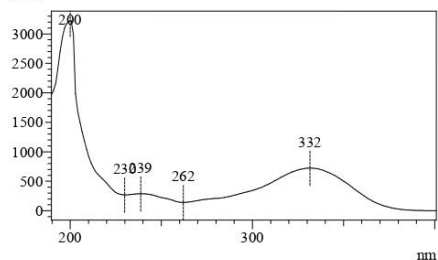
<Peak Table>

PDA Ch2 340nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Area%
1	7.378	4554332	670818		96,826
2	7.696	98448	13343		2,093
3	8.169	50849	9182		1,081
Total		4703630	693343		100,000

Peak: 1
 RT: 7.378

mAU

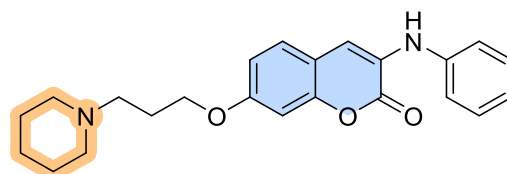
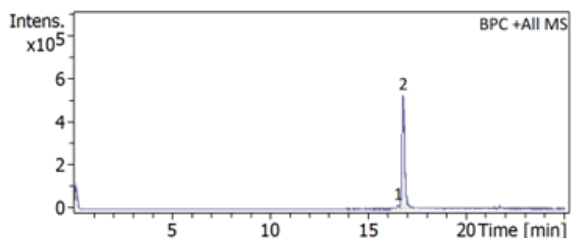


C:\LabSolutions\Data\LaDMol\Larissa\Nova pasta\LF0433.lcd

Figura S181. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **54a**

Acquisition Parameter

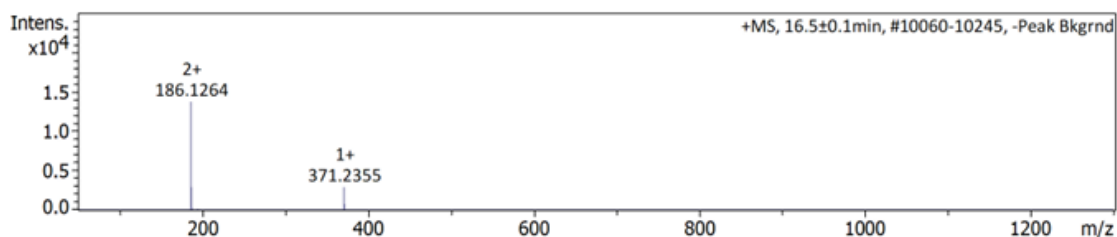
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Exact Mass: 378,19

#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	16.5	76423	20.9	186.1264	0.1	1.41
2	16.8	5334061	825.5	379.2046	0.2	98.59

Cmpd 1, 16.5 min



#	m/z	I %
1	186.1264	100.0
2	186.2167	2.9
3	186.2468	6.1
4	186.6283	21.7
5	186.7444	1.6
6	187.1281	2.1
7	194.1217	1.4
8	371.2355	21.5
9	371.3298	1.6
10	372.2402	5.4

Cmpd 2, 16.8 min

Figura S182. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **54c**

Compound Spectrum List Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Results\2024\08112024\LF0365_106_1_5136 — Blank_1_1_5132.d
 Method az 2 bis 98 Reinheit ab 90 pickup nur MS.m
 Sample Name LF0365
 Comment Original analysis: 'LF0365_106_1_5136.d',
 Subtracted analysis: 'Blank_1_1_5132.d' (Xpose, 0.5s, 5),
 Processed with: 'DataAnalysis 5.3.556',
 Date: 2024-11-08T19:21:04

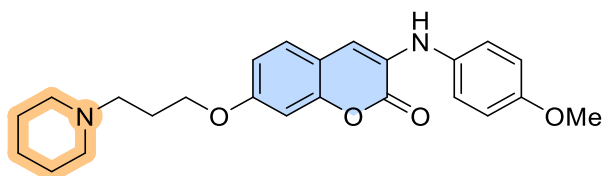
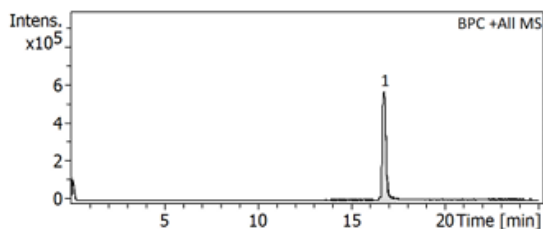
Acquisition Date 11/8/2024 4:48:42 PM

Operator Demo User

Instrument compact 8255754.00000

Acquisition Parameter

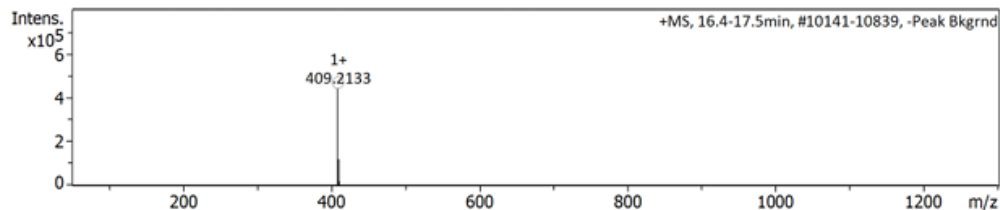
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Exact Mass: 408,20

#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	16.8	8615205	7661.4	409.2133	0.2	100.00

Cmpd 1, 16.8 min



#	m/z	I %
1	408.9746	1.2
2	409.2133	100.0
3	409.4976	8.3
4	409.7943	0.6
5	409.9905	0.6
6	410.2160	27.3
7	410.4483	0.9
8	410.5021	2.1
9	411.2187	4.5
10	412.2210	0.5

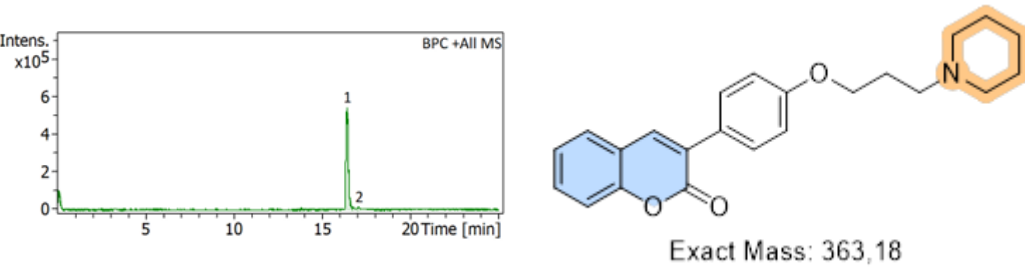
#	z	Sum Formula	Adduct	Meas. m/z	err [mDa]	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma
1	1+	C23H26N4O3	M+H	409.2133	0.3	C23H27N4O3	407.2078	0.6	814.8	2

Figura S183. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **61a**

Compound Spectrum List Report

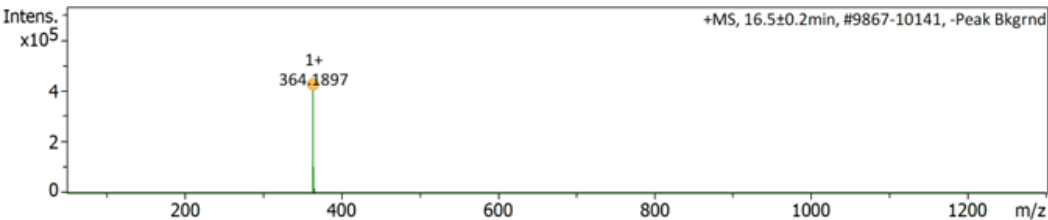
Analysis Info		Acquisition Date 10/18/2024 4:00:16 PM	
Analysis Name	D:\Data\Results\2024\18102024\LF0390_20_1_4978 — Blank_1_1_4975.d	Operator	Demo User
Method	az 2 bis 98 Reinheit ab 90 pickup nur MS.m	Instrument	compact 8255754.00000
Sample Name	LF0390		
Comment	Original analysis: 'LF0390_20_1_4978.d', Subtracted analysis: 'Blank_1_1_4975.d' (Xpose, 0.5s, 5), Processed with: 'DataAnalysis 5.3.556', Date: 2024-10-19T13:22:25		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	16.4	5305180	1205.5	364.1897	0.2	96.62
2	17.1	185686	44.6	442.0990	0.2	3.38

Cmpd 1. 16.4 min



#	m/z	I %
1	363.9859	1.2
2	364.0824	0.6
3	364.1897	100.0
4	364.4394	8.2
5	364.7375	0.7
6	364.9851	0.6
7	365.1929	25.7
8	365.3951	0.6
9	365.4416	2.1
10	366.1955	3.8

#	z	Sum Formula	Adduct	Meas. m/z	err [mDa]	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma
1	1+	C23H25NO3	M+H	364.1897	1.0	C23H26NO3	364.1907	2.7	0.2	1

Cmpd 2. 17.1 min

Figura S184. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **61b**

Compound Spectrum List Report

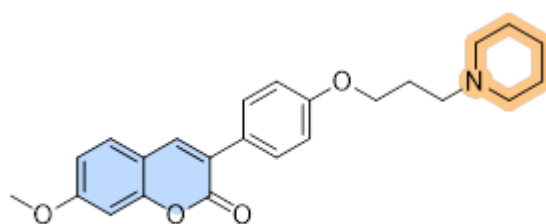
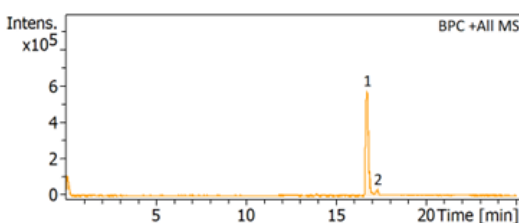
Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Results\2024\29102024\LF0391_84_1_5055 — Blank_1_1_5053.d
 Method az 2 bis 98 Reinheit ab 90 pickup nur MS.m
 Sample Name LF0391
 Comment Original analysis: 'LF0391_84_1_5055.d',
 Subtracted analysis: 'Blank_1_1_5053.d' (Xpose, 0.5s, 5),
 Processed with: 'DataAnalysis 5.3.556',
 Date: 2024-10-29T16:14:06

Acquisition Date 10/29/2024 3:45:18 PM
 Operator Demo User
 Instrument compact 8255754.00000

Acquisition Parameter

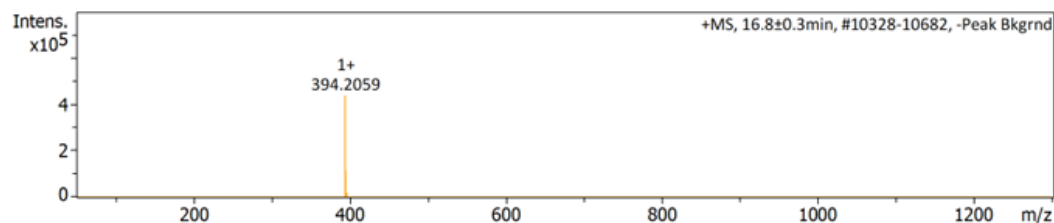
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Exact Mass: 393,19

#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	16.7	6460192	1230.4	394.2059	0.2	95.58
2	17.3	298834	70.8	474.1139	0.2	4.42

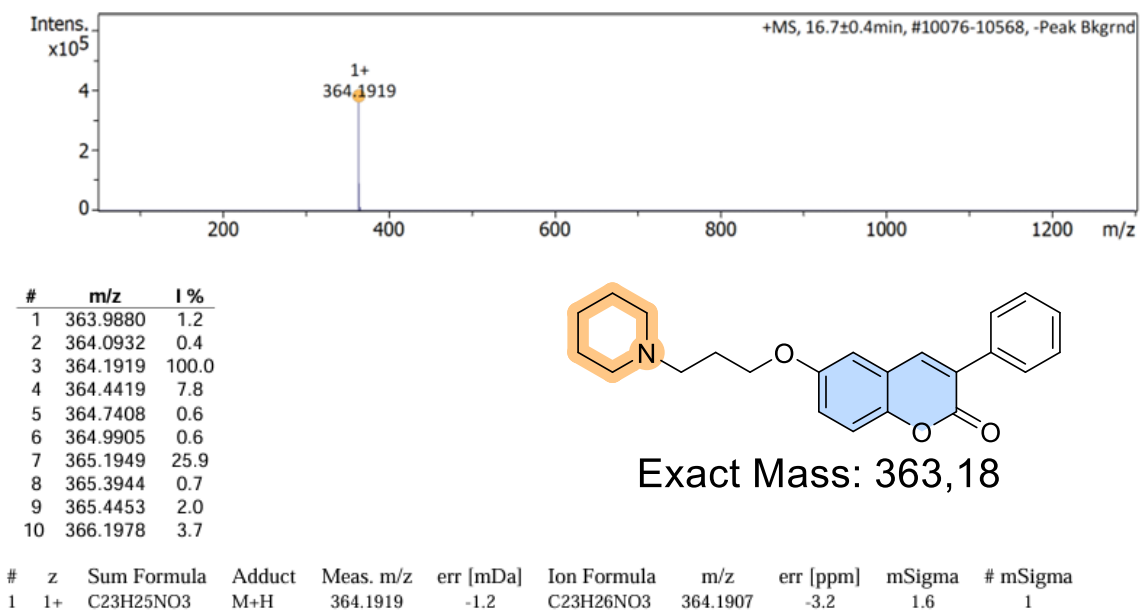
Cmpd 1, 16.7 min



#	m/z	I %
1	393.9774	1.2
2	394.2059	100.0
3	394.4415	0.5
4	394.4784	8.1
5	394.7717	0.6
6	394.9846	0.6
7	395.2085	26.6
8	395.4267	0.8
9	395.4821	2.1
10	396.2111	4.3

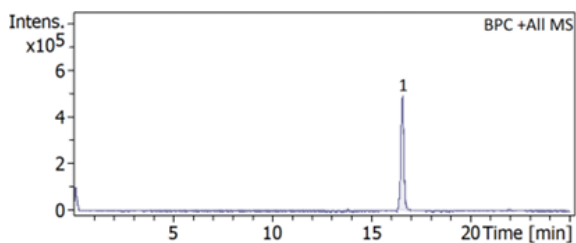
Cmpd 2, 17.3 min

Figura S185. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **61c**



Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



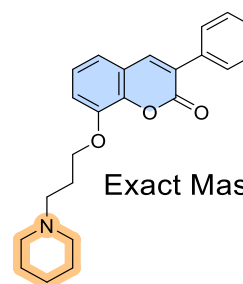
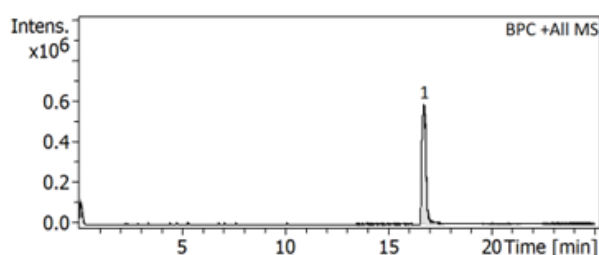
#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	16.6	5204875	406.3	364.1919	0.2	100.00

Cmpd 1, 16.6 min

Figura S186. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **61d**

Acquisition Parameter

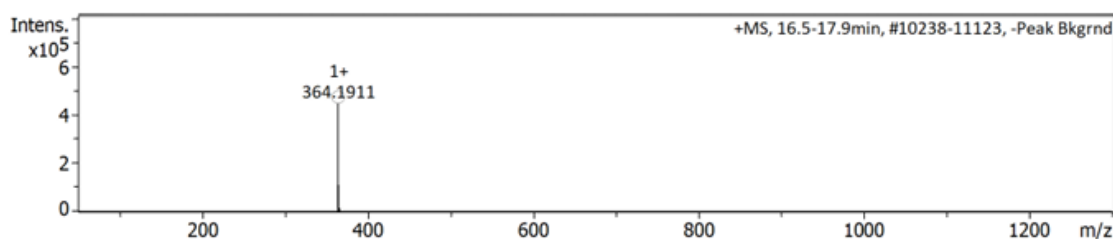
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



Exact Mass: 363,18

#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	16.7	8644005	7982.7	364.1911	0.2	100.00

Cmpd 1, 16.7 min



#	m/z	I %
1	363.9869	1.1
2	364.0749	0.4
3	364.1911	100.0
4	364.4410	7.7
5	364.7387	0.6
6	364.9859	0.5
7	365.1939	25.6
8	365.4119	0.8
9	365.4471	1.7
10	366.1966	3.7

#	z	Sum Formula	Adduct	Meas. m/z	err [mDa]	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma
1	1+	C23H25NO3	M+H	364.1911	-0.4	C23H26NO3	364.1907	-1.0	0.6	1

Figura S187. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) do composto **61e**

21/10/2025 15:36:27 Page 1 / 1

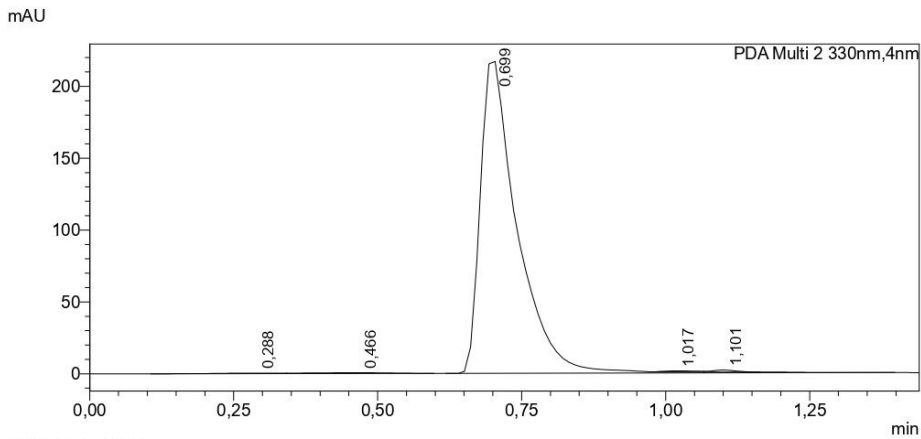


Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name : LF0439'
Data Filename : LF0439'.lcd
Method Filename : NAH Finais Novo MeOH-Acido 30-80%.lcm
Vial # : 1-1
Injection Volume : 10 uL
Date Acquired : 10/10/2025 15:12:49
Date Processed : 21/10/2025 15:34:29
Sample Type : Unknown
Acquired by : HPLC
Processed by :

<Chromatogram>

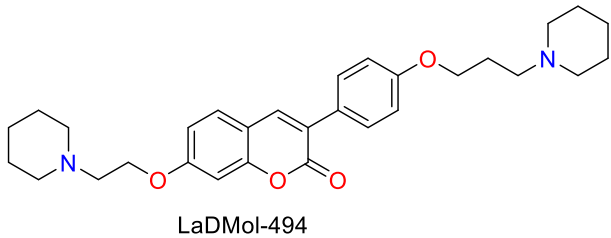
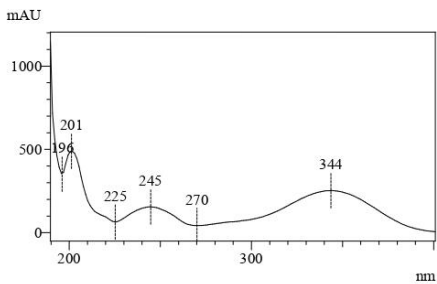


<Peak Table>

PDA Ch2 330nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Area%
1	0.288	2843	349		0.287
2	0.466	5479	527		0.553
3	0.699	976488	216984		98.518
4	1.017	2674	701		0.270
5	1.101	3692	1356		0.372
Total		991176	219918		100.000

Peak: 3
RT: 0.699



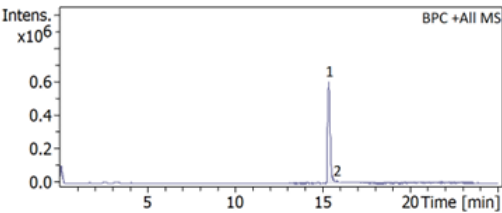
C:\LabSolutions\Data\LaDMol\Larissa\Nova pasta\LF0439'.lcd

Figura S188. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **61f**

Compound Spectrum List Report

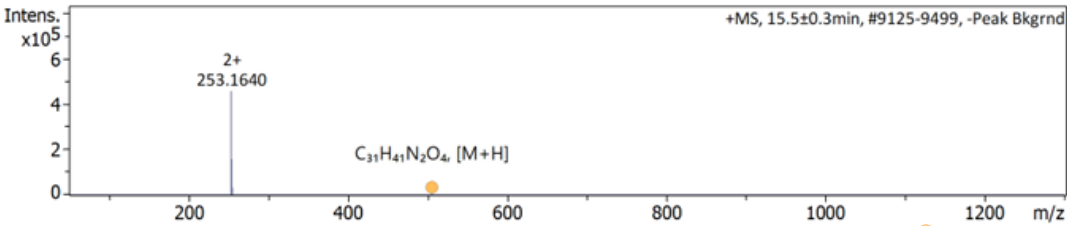
Analysis Info		Acquisition Date 11/6/2024 1:01:13 PM	
Analysis Name	D:\Data\Results\2024\06112024\LF0372_22_1_5124 — Blank_1_1_5123.d	Operator	Demo User
Method	az 2 bis 98 Reinheit ab 90 pickup nur MS.m	Instrument	compact 8255754.00000
Sample Name	LF0372		
Comment	Original analysis: 'LF0372_22_1_5124.d', Subtracted analysis: 'Blank_1_1_5123.d' (Xpose, 0.5s, 5), Processed with: 'DataAnalysis 5.3.556', Date: 2024-11-06T13:49:45		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste

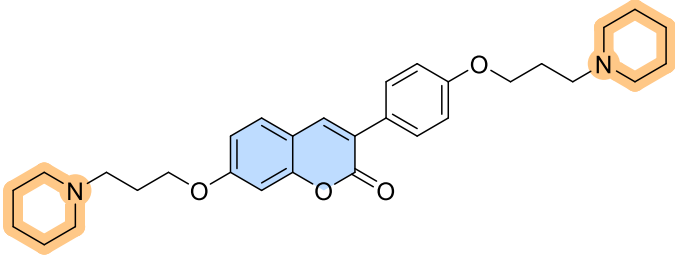


#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	15.4	6520787	8032.2	253.1640	0.2	98.81
2	15.8	78712	160.8	293.1176	0.1	1.19

Cmpd 1, 15.4 min



#	m/z	I %
1	98.0980	0.5
2	253.0381	1.0
3	253.1640	100.0
4	253.3325	5.2
5	253.6650	35.2
6	253.8345	2.0
7	254.1664	7.0
8	254.3358	0.4
9	254.6679	0.9
10	505.3059	1.2



Exact Mass: 504,30

#	z	Sum Formula	Adduct	Meas. m/z	err [mDa]	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma
1	1+	C31H40N2O4	M+H	505.3059	0.2	C31H41N2O4	505.3061	0.5	32.0	1

Figura S189. Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (CL-EM ES) do composto **64**

Compound Spectrum List Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Results\2024\26112024\LF0408_72_1_5251 — Blank_1_1_5244.d
 Method az 2 bis 98 Reinheit ab 90 pickup nur MS.m
 Sample Name LF0408
 Comment Original analysis: 'LF0408_72_1_5251.d',
 Subtracted analysis: 'Blank_1_1_5244.d' (Xpose, 0.5s, 5),
 Processed with: 'DataAnalysis 5.3.556',
 Date: 2024-11-26T20:58:29

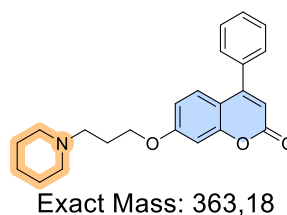
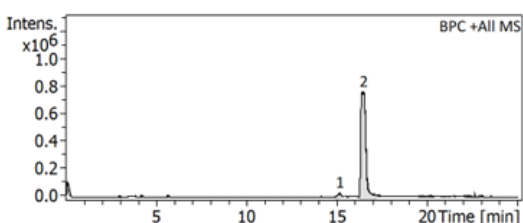
Acquisition Date 11/26/2024 6:50:45 PM

Operator Demo User

Instrument compact 8255754.00000

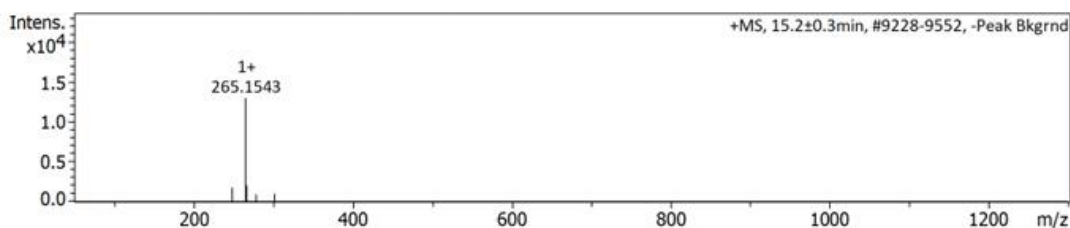
Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	1.8 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	9.0 l/min
Scan End	1300 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



#	RT [min]	Area	S/N	Max. m/z	FWHM [min]	Area Frac. %
1	15.2	518540	316.2	265.1543	0.3	2.89
2	16.5	17422932	6613.4	364.1914	0.3	97.11

Compd 1, 15.2 min



#	m/z	I %
1	248.1647	13.4
2	248.2784	1.5
3	265.1543	100.0
4	265.2701	2.0
5	265.3060	5.0
6	265.3383	7.5
7	266.1577	16.1
8	266.2416	1.7
9	278.1769	7.2
10	302.1745	7.9

Compd 2, 16.5 min

Figura S190. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) do composto **75a**



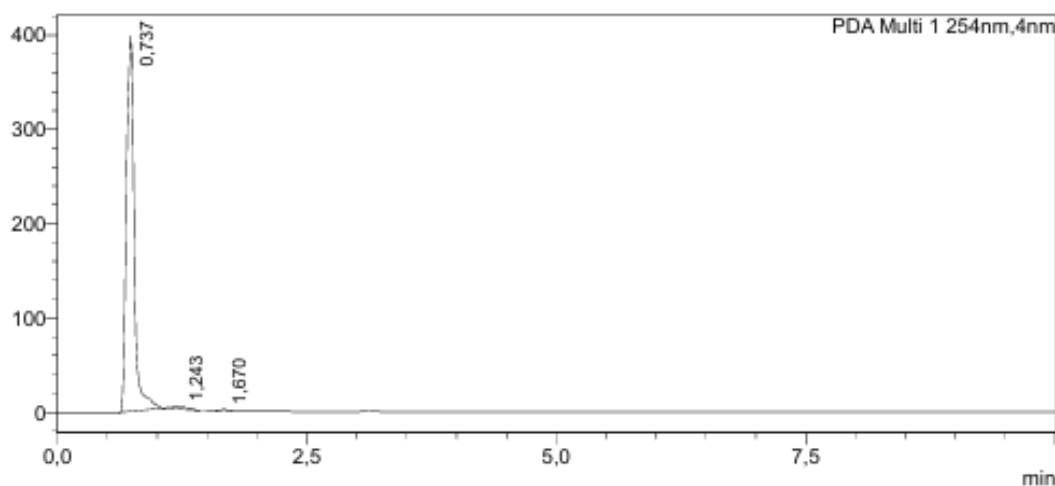
Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: AACIM3C.2	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: AACIM3C.2		
Data Filename	: AACIM3C.2.lcd		
Method Filename	: isocratico CH3CN-acido 70%.lcm		
Batch Filename	:		
Vial #	: 1-1		
Injection Volume	: 10 uL		
Date Acquired	: 09/02/2026 14:19:10	Acquired by	: HPLC
Date Processed	: 09/02/2026 14:29:12	Processed by	: HPLC

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	0.737	2157150	98.241
2	1.243	31936	1.454
3	1.670	6698	0.305
Total		2195784	100.000

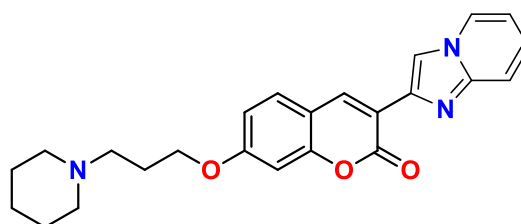


Figura S191. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) do composto **75b**



Analysis Report

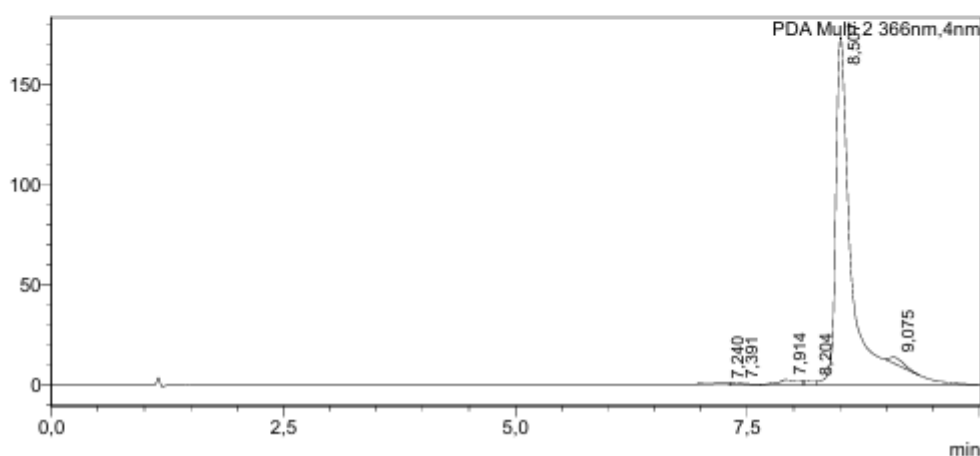
<Sample Information>

Sample Name : CIMMePIP
Data Filename : CIMMePIP.lcd
Method Filename : MeOH-H2O 20-80%.lcm
Vial # : 1-1
Injection Volume : 10 uL
Date Acquired : 15/10/2025 16:17:23
Date Processed : 15/10/2025 16:33:44

Sample Type : Unknown
Acquired by : HPLC
Processed by :

<Chromatogram>

mAU



<Peak Table>

PDA Ch2 366nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Name	Area%
1	7,240	5766	457		0,257
2	7,391	5390	528		0,240
3	7,914	35548	2356		1,582
4	8,204	15514	2005		0,690
5	8,507	2154715	174053		95,885
6	9,075	30246	2812		1,346
Total		2247480	182211		100,000

Peak: 5
RT: 8,507

mAU

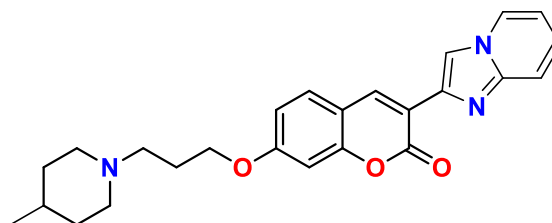
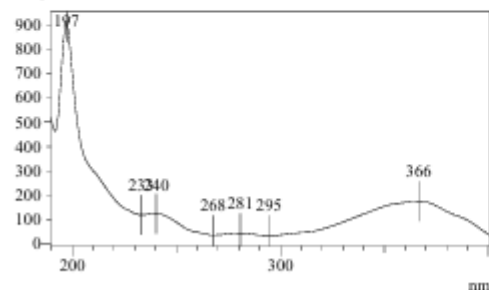


Figura S192. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD) do composto **75d**



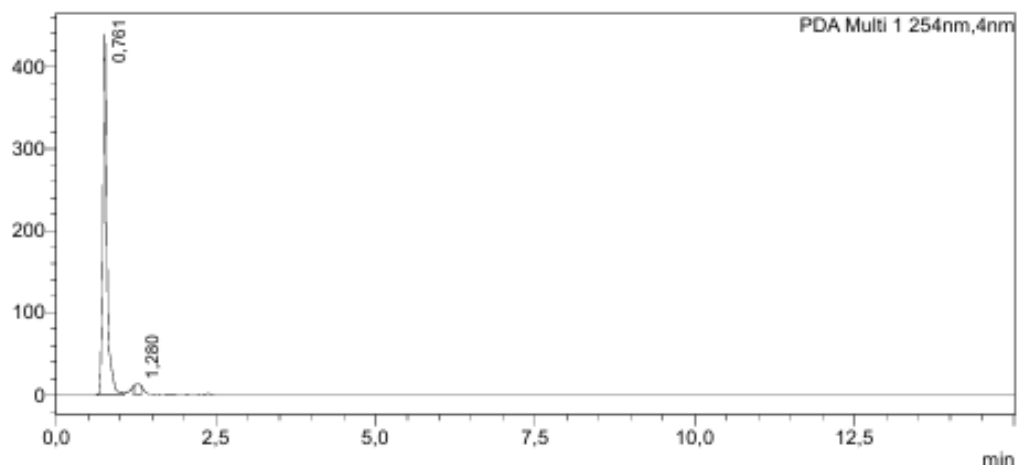
Analysis Report

<Sample Information>

Sample Name	: AAIM3C.3	Sample Type	: Unknown
Sample ID	: AAIM3C.3	Acquired by	: HPLC
Data Filename	: AAIM3C.3.lcd	Processed by	: HPLC
Method Filename	: isocratico CH3CN-acido 70%.lcm		
Batch Filename	:		
Vial #	: 1-1		
Injection Volume	: 10 µL		
Date Acquired	: 02/02/2026 14:39:21		
Date Processed	: 02/02/2026 14:54:24		

<Chromatogram>

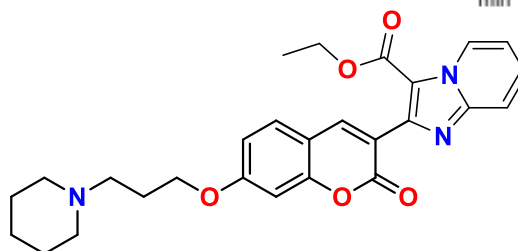
mAU



<Peak Table>

PDA Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	0,761	1931788	95,871
2	1,280	83190	4,129
Total		2014978	100,000



7.3. GRÁFICOS “BOILED-EGG” E DE RADAR

Figura S193. Gráficos “boiled-egg” para os compostos 51a-f

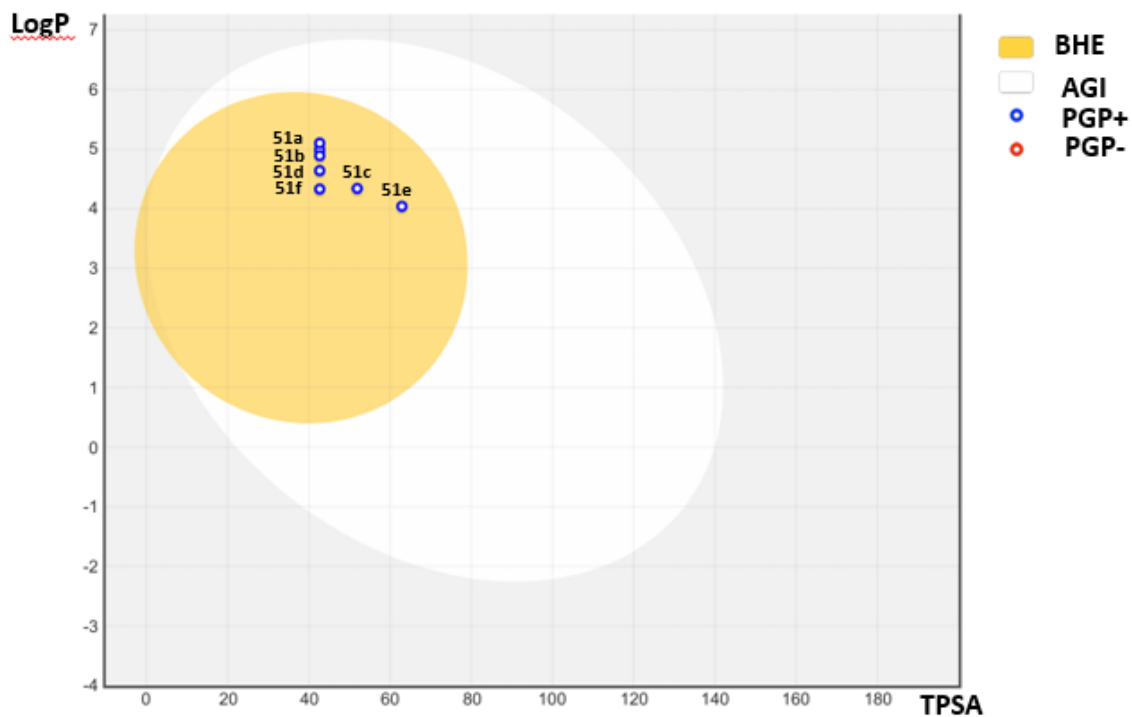


Figura S194. Gráficos “boiled-egg” para os compostos 51h-x

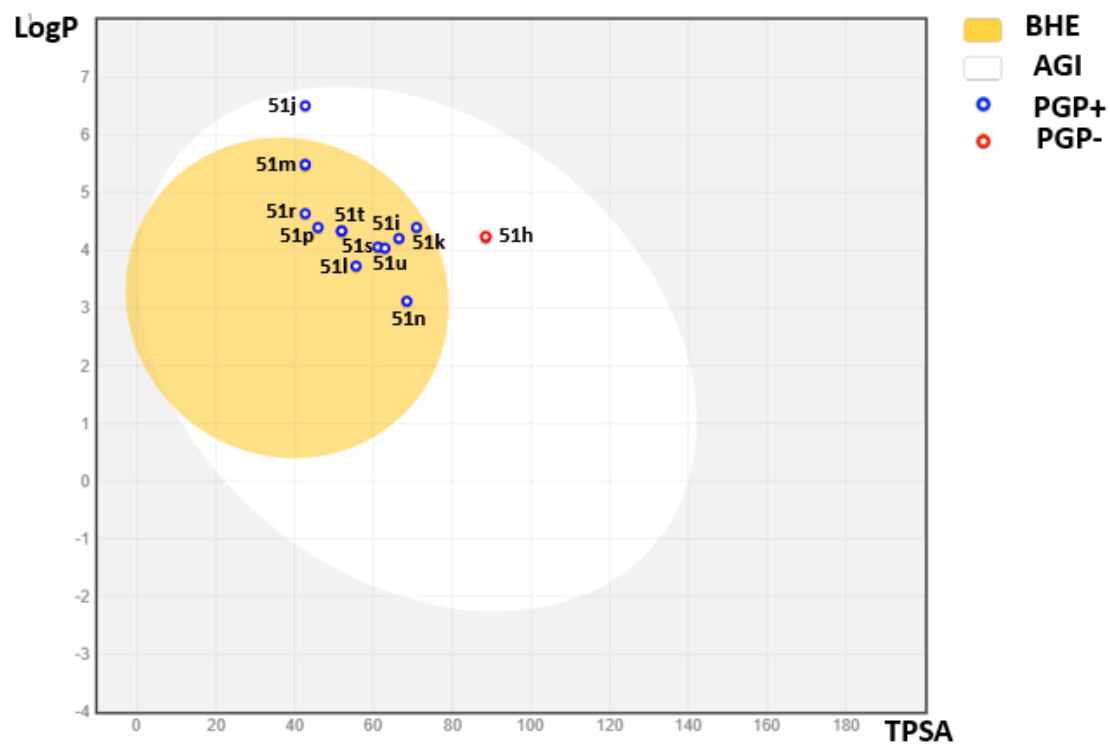


Figura S195. Gráficos “boiled-egg” para os compostos 54a-d

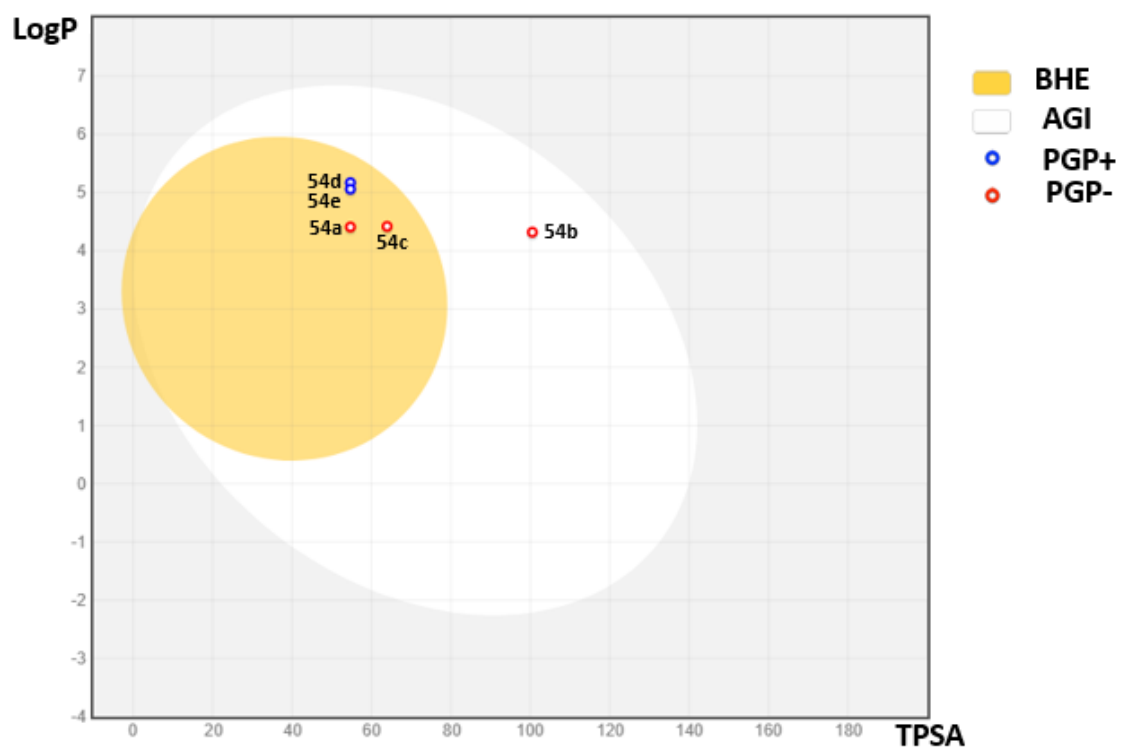


Figura S196. Gráficos “boiled-egg” para os compostos 61a-f, 64 e 75a-d

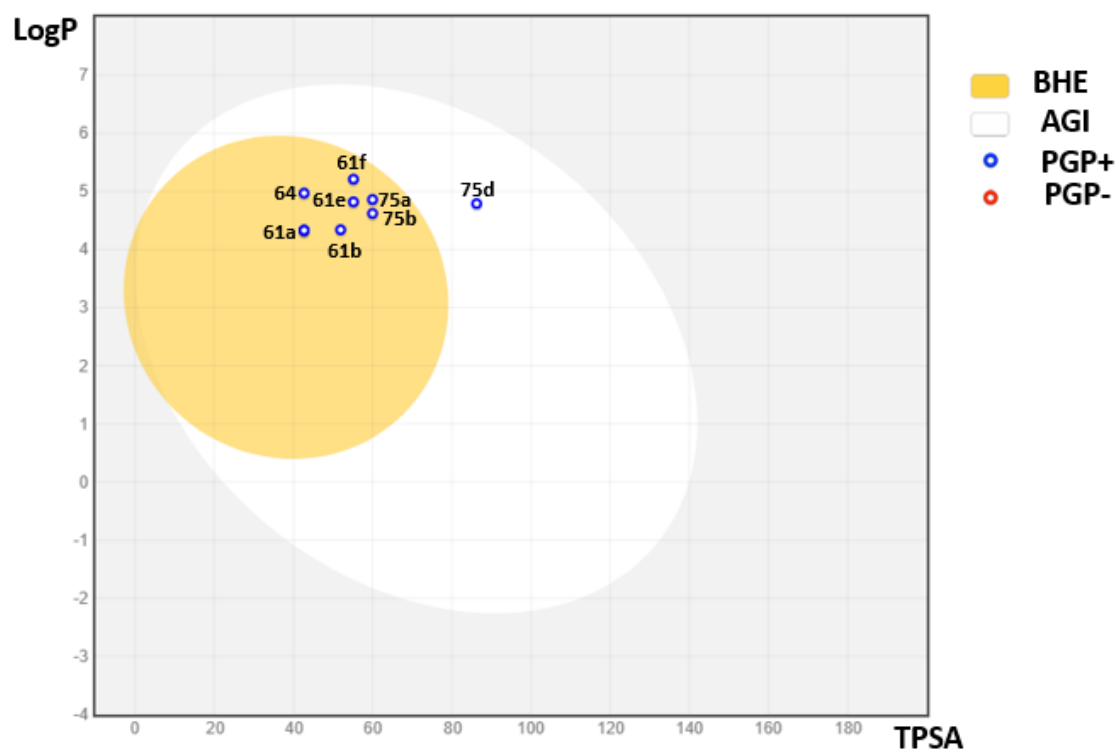


Figura S196. Gráfico de radar das propriedades físico-químicas (logP, TPSA, flexibilidade, polaridade, tamanho, saturação/insaturação) e druglikeness para a maioria dos compostos sintetizados.

