



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Erlon Ferreira Martin

**Síntese de derivados 4H-cromenos e pirano-pirazóis utilizando a estratégia multicomponente e avaliação da atividade anticolinesterase de diferentes derivados piranos**

Florianópolis  
2022

Erlon Ferreira Martin

**Síntese de derivados 4H-cromenos e pirano-pirazóis utilizando a estratégia multicomponente e avaliação da atividade anticolinesterase de diferentes derivados piranos**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Maique Weber Biavatti

Coorientador: Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martin, Erlon Ferreira

Síntese de derivados 4H-cromenos e pirano-pirazóis utilizando a estratégia multicomponente e avaliação da atividade anticolinesterase de diferentes derivados piranos / Erlon Ferreira Martin ; orientadora, Dra Maique Weber Biavatti, coorientador, Dr. Louis Pergaud Sandjo, 2022.

160 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Piranocumarinas. 3. Acetilcolinesterase. 4. Doença de Alzheimer. 5. Reação Multicomponente. I. Biavatti, Dra Maique Weber. II. Sandjo, Dr. Louis Pergaud. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Erlon Ferreira Martin

**Síntese de derivados 4H-cromenos e pirano-pirazóis utilizando a estratégia multicomponente e avaliação da atividade anticolinesterase de diferentes derivados piranos**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. (a) Beatriz Garcia Mendes Borba, Dr. (a)  
Instituição – UFSC

Prof. Marcus Tullius Scotti, Dr.  
Instituição – UFPB

Prof. Ricardo Ferreira Affeldt, Dr.  
Instituição – UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para a obtenção do título de doutor em Farmácia.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.(a) Maique Weber Biavatti, Dr.(a)  
Orientador(a)

Florianópolis  
2022

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Ivan e Inês,  
a minha namorada Suzane,  
aos meus mestres e tutores  
e a todos os amigos, pessoas e “forças” do universo  
que me guiaram e auxiliaram  
até concluir esta etapa da minha caminhada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Queria começar este agradecimento, agradecendo os meus “pais” na pesquisa, que apesar do termo masculino utilizado como adjetivo, foram grandes mães em muitos momentos. A elaboração desta tese, foi o meu maior desafio intelectual até presente momento, desafios esses que cada vez aumentam o grau de dificuldade. Sozinho, eu jamais concluiria todas as etapas, e começo então agradecendo a minha orientadora, a Professora Doutora Maique Weber Biavatti por ter me acolhido e por proporcionar a oportunidade de aprender e de me aperfeiçoar profissionalmente e como ser humano.

Não menos importante, gostaria de agradecer o meu coorientador Professor Doutor Louis Pergaud Sandjo, pela confiança depositada, e por ter aceitado o desafio de desenvolver o presente trabalho com um orientando até então desconhecido, quando fui orientado pelo professor no mestrado.

Não poderia deixar de citar à UFSC e o Programa de Pós-graduação em Farmácia por toda a infraestrutura oferecida e disponibilizada, e todos os professores pelos ensinamentos durante esses anos de pós-graduação.

Agradecer também a CAPES pela bolsa de estudos e o constante apoio a pesquisa e pela colaboração financeira que possibilitou a realização deste estudo, apesar de todo desmonte que aconteceram nas universidades e institutos federais.

Um agradecimento especial aos meus pais, Ivan e Inês, que jamais deixaram de me apoiar e me dar suporte para fazer o que eu sempre quis, e realmente tenho muita sorte de ter os pais que tenho, que são os melhores pais que eu poderia ter. Agradecer a minha namorada Suzane, que aceitou o desafio de estar ao meu lado nessa vida e me apoia nas minhas loucuras, mas também me deu forças sempre que eu precisei. A minha mensagem aos três é breve “Amo muito vocês, e hoje, vocês são minha vida todinha”.

Aos meus amigos pessoais, por estarem presentes, pelo carinho, amizade, e por sempre me apoiar e escutar as longas “palestras” e até monólogos. E aos amigos de laboratório, alguns se tornaram grandes amigos pessoais, Layzon, Larissa F., Luiz, Larissa G., Amanda, entre outros colegas dos laboratórios vizinhos e parceiros, em especial também ao Professor Doutor Flávio Reginatto por toda a ajuda, educação e

amizade que sempre demonstraram. Aos parceiros que de alguma forma estiveram ou estão presentes no desenvolvimento dos estudos, contribuindo assim para meu crescimento. A todas as pessoas citadas, e as não citadas, mas que fizeram parte desses anos, a frase que se repete é: -Desculpem-me pelos meus erros! Muito obrigado, e eu amo muito todos vocês!

E neste agradecimento quero agradecer por último a uma frase que muito me ensinou e me ensina todos os dias: “Sempre que você for culpar um desgraçado pela sua própria desgraça, lembre-se que você vive em sociedade e que o primeiro culpado por ele estar assim é você mesmo!”

## RESUMO

O Alzheimer é uma doença degenerativa do hipocampo que permanece sem cura. A OMS estima que aproximadamente 35 milhões de pessoas são acometidas pela doença. No Brasil, o segundo país no mundo em prevalência do Alzheimer, cerca de 12% da população idosa é acometida pelo mesmo. A doença de Alzheimer (DA) é correlacionada com a degeneração de neurônios colinérgicos, células nervosas que atuam nas funções cognitivas, de aprendizagem e de memória. Devido a esta desregulação, principalmente das funções cognitivas, ocorre uma diminuição da atividade sináptica, e um marcador da doença é a diminuição da concentração do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Com a intenção de aumentar a concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica, uma das vias para a terapia da DA é inibir a metabolização da ACh após ela ser liberada na fenda sináptica. A principal enzima envolvida nesse processo é a acetilcolinesterase, que hidrolisa a ACh e em poucos milissegundos já está ativa novamente para realizar uma nova reação catalítica. Compostos com ação inibitória da AChE representam alternativas para o tratamento da DA. A rivastigmina, galantamina e donepezila fazem parte desta classe de fármacos, mas apenas a donepezila é indicada nas fases severas da doença. O grande número de efeitos adversos é outra dificuldade no tratamento da DA. Cromenos substituídos e cromonas apresentaram bons resultados na inibição da AChE *in vitro*, algumas moléculas atingindo valores de IC<sub>50</sub> iguais ou até melhores que o controle positivo. Sempre pensando nos impactos dos testes no meio ambiente e na geração de resíduos, o estudo aplicou com sucesso a estratégia de reação multicomponente utilizando como reagentes benzaldeídos, β-cetoésteres, malononitrila e hidrazina e solventes como metanol, água, etanol, para a obtenção de 10 compostos pirano-pirazóis e 03 novos cromenos. A reação multicomponente foi também a via utilizada para a obtenção dos demais 16 compostos que tiveram sua atividade inibitória testada frente a AChE. 09 derivados piranocumarinas apresentaram atividade moderada a forte, e 04 deles foram selecionados para o estudo de ancoragem molecular. Os derivados possuindo o grupo ciano, p-bromofenil substituído ou 3,5-dimetóxfenil substituído apresentaram os menores valores de IC<sub>50</sub>, 9.01 μM e 9.67 μM respectivamente. Enquanto a fisiostigmina, composto referência,

apresentou valor de IC50 de 1.35  $\mu\text{M}$ . A porção aril substituída p-bromofenil e dimetóxfenil juntamente com as porções do esqueleto cumarina amina, ciano, hidróxi e carbonila realizam interações  $\pi$ - $\pi$  e ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos na porção final do desfiladeiro, no sítio catalítico da enzima AChE.

**Palavras-chave:** Piranocumarinas. Acetilcolinesterase. Doença de Alzheimer. Reação Multicomponente.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease is a hippocampus degenerative disease that remains incurable. WHO estimates that approximately 35 million people are affected by the disease. Brazil is the second country in the world, where 12% of the elderly population are affected by Alzheimer's disease. (AD) is correlated with the degeneration of cholinergic neurons, in which nerve cells play a role in cognitive, learning and memory functions. Due to this dysregulation of cognitive functions a decrease in synaptic activity occurs, and a marker of the disease is the decrease concentration of the neurotransmitter acetylcholine (ACh). With the intention of increasing the concentration of this neurotransmitter in the synaptic cleft, one of the ways for AD therapy is to inhibit the metabolism of ACh after it is released to synaptic vesicles. The main enzyme involved in this process is acetylcholinesterase, which ACh hydrolyzes and in a few milliseconds, it is already active again to carry out a new catalytic reaction. Compounds with AChE inhibitory action represent alternatives for the treatment of AD. Rivastigmine, galantamine and donepezil are part of this drug class, but only donepezil is indicated in the severe stages of the disease. The large number of adverse effects is another difficulty in the treatment of AD. Substituted chromenes and chromones showed promising results in the inhibition of AChE in vitro, some molecules reaching IC<sub>50</sub> values equal to or even better than the positive control. Concerned about the testis's impacts on the environment and the waste generation, the study successfully applied the multicomponent reaction strategy using as reagents benzaldehydes,  $\beta$ -ketoesters, malononitrile and hydrazine and solvents such as methanol, water and ethanol, to obtain ten compounds pyran-pyrazole and three new chromenes. The multicomponent reaction was also the route used to obtain the remaining 16 compounds that had their inhibitory activity against AChE assay. Nine pyranocoumarin derivatives showed moderate to strong activity, and 04 of them were selected for the molecular docking study. The coumarin derivatives having the cyan group, with substituted p-bromophenyl or substituted 3,5-dimethoxyphenyl in aryl group, showed the most promising IC<sub>50</sub> values, 9.01  $\mu$ M and 9.67  $\mu$ M respectively. As for physostigmine, the reference compound, show it a value IC<sub>50</sub> of 1.35  $\mu$ M. The aryl substituted p-bromophenyl and dimethoxyphenyl moiety together with the coumarin

amine, cyan, hydroxy and carbonyl backbone moieties perform  $\pi$ - $\pi$  interactions and hydrogen bonds with amino acid residues in the final portion of the canyon, at the catalytic site of the AChE enzyme.

**Keywords:** Pyranpyrazole. Acetylcholinesterase. Alzheimer's Disease. Multicomponent Reaction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Derivados de interesse com atividade anticolinesterase relatada em literatura. ....	27
Figura 2 – Compostos potenciais ligantes reversíveis das enzimas acetilcolinesterase e butircolinesterase. ....	27
Figura 3 – Compostos análogos da tacrina com atividade anti-acetilcolinesterase...28	
Figura 4 – Estrutura da enzima AChE adaptada de Patrik (A) e a estrutura tridimensional cristalográfica do sítio ativo da AChE humana ( <i>hAChE</i> ) de Rosenberry e colaboradores (B).....	32
Figura 5 – Esquema reacional da hidrólise da acetilcolina.....	33
Figura 6 – Esquema da hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE e liberação da colina. Adaptado de Araújo e colaboradores. ....	35
Figura 7 – Esquema do mecanismo de regeneração da serina catalítica Ser203 da enzima AChE. Adaptado de Araújo e colaboradores. ....	36
Figura 8 – Compostos análogos da tacrina com atividade anti-acetilcolinesterase...41	
Figura 9 – Esquema da hidrólise da Rivastigmina no sítio ativo da AChE e liberação do ácido metil etil carbâmico, adaptado de Polinsky. ....	43
Figura 10 – Derivados cumarínicos de <i>Angelica gigas</i> com atividade anti-acetilcolinesterase isolados por Kang e colaboradores.....	45
Figura 11 – Derivados análogos a tacrina com atividade anti-acetilcolinesterase e antibutirilcolinesterase sintetizados por Marco e colaboradores, e análogo 22 sintetizado por Maalej e colaboradores.....	46
Figura 12 – Derivados análogos a cumarina com atividade anti-acetilcolinesterase e anti-butirilcolinesterase: composto sintetizados por Amin e colaboradores; composto líder para o estudo de Rullo e colaboradores; Pterixina isolada por Orhan e colaboradores e cumarinas isoladas por Heo e colaboradores.....	48
Figura 13 – Esqueletos de interesse no estudo com potencial atividade anti-acetilcolinesterase e precursor da dihidrocumarina. ....	52
Figura 14 – Estratégia de obtenção dos derivados pirano-pirazóis.....	55
Figura 15 – Compostos pirano-pirazóis sintetizados empregando a estratégia planejada.....	56

Figura 16 – Estratégia de obtenção dos derivados 4 <i>H</i> -cromenos.....	59
Figura 17 – Compostos pirano-pirazóis sintetizados empregando a estratégia planejada.....	60
Figura 18 – Proposta de mecanismo simplificado de formação para a obtenção dos derivados de pirano-pirazóis. ....	66
Figura 19 – Proposta 2 de mecanismo de formação para a obtenção dos derivados de pirano-pirazóis.....	67
Figura 20 – Derivado piranopirazol <b>31a</b> .....	68
Figura 21 – Cromatograma do derivado <b>31a</b> por CLUE-PDA.....	68
Figura 22 – Espectro de <sup>1</sup> H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d <sub>6</sub> ) para o derivado <b>31a</b> .....	69
Figura 23 – Espectro de <sup>13</sup> C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d <sub>6</sub> ) para o derivado <b>31a</b> .....	70
Figura 24 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz <sup>1</sup> H e 75 MHz <sup>13</sup> C, TMS, DMSO-d <sub>6</sub> ) para o derivado <b>31a</b> . ....	71
Figura 25 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz <sup>1</sup> H e 75 MHz <sup>13</sup> C, TMS, DMSO-d <sub>6</sub> ) para o derivado <b>31a</b> e correlações do H4. ....	72
Figura 26 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado <b>31a</b> .....	75
Figura 27 – Derivado piranopirazol <b>31b</b> .....	75
Figura 28 – Derivado piranopirazol <b>31c</b> .....	78
Figura 29 – Derivado piranopirazol <b>31d</b> .....	80
Figura 30 – Derivado piranopirazol <b>31e</b> .....	82
Figura 31 – Derivado piranopirazol <b>31f</b> .....	84
Figura 32 – Derivado piranopirazol <b>31g</b> .....	85
Figura 33 – Derivado piranopirazol <b>31h</b> .....	87
Figura 34 – Derivado piranopirazol <b>31i</b> .....	89
Figura 35 – Derivado piranopirazol <b>31j</b> .....	91
Figura 36 – Proposta de mecanismo simplificado de formação para obtenção dos derivados 4- <i>aril</i> -4 <i>H</i> -cromenos. ....	93
Figura 37 – Derivado piranopirazol <b>34a</b> .....	94
Figura 38 – Espectro de <sup>1</sup> H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d <sub>6</sub> ) para o derivado <b>34a</b> .....	95
Figura 39 – Espectro de <sup>13</sup> C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d <sub>6</sub> ) para o derivado <b>34a</b> .....	96

Figura 40 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz <sup>1</sup> H e 75 MHz <sup>13</sup> C, TMS, DMSO-d <sub>6</sub> ) para o derivado <b>34a</b> e correlações do H4. ....	97
Figura 41 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz <sup>1</sup> H e 75 MHz <sup>13</sup> C, TMS, DMSO-d <sub>6</sub> ) para o derivado <b>34a</b> . ....	98
Figura 42 – Derivado piranopirazol <b>34b</b> .....	99
Figura 43 – Derivado piranopirazol <b>34c</b> .....	101
Figura 44 – Compostos derivados 4 <i>H</i> -cromenos avaliados quanto à atividade inibitória da enzima <i>AChE</i> . ....	104
Figura 45 – Compostos análogos a cumarina avaliados quanto a atividade inibitória da enzima <i>EeAChE</i> . ....	106
Figura 46 – Posições representativas da superposição de ligantes de (A) validação da ancoragem (B) interações com a cavidade do sítio de ligação <i>AChE</i> (4EY7). ....	110
Figura 47 – Ilustração das interações entre o sítio de ligação da enzima <i>AChE</i> e os dois enantiômeros do derivado <b>36b</b> . ....	111
Figura 48 – Interações importantes entre o sítio de ligação da enzima <i>AChE</i> e o enantiômero (R)- do derivado <b>36b</b> e o composto de referência donepezila. ....	112
Figura 49 – A) Superfície da <i>AChE</i> (4EY7) mostrando parte da molécula de donepezila fora do sítio de ligação. (B) Disposição interna de donepezila no sítio de ligação. .	113
Figura 50 – Derivados pirazolpiridonas que demonstraram atividade antiinflamatória atuando na via JAK/STAT. ....	115
Figura 51 – Derivados piranos que demonstraram atividade antiagregante plaquetária. ....	116

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados compilados de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>31a</b> e sua estrutura.....	74
Tabela 2 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz $^1\text{H}$ e 75 MHz $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>31b</b> e sua estrutura. ....	76
Tabela 3 – Dados de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>31c</b> e comparação com literatura e sua estrutura. ....	79
Tabela 4 – Dados de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>31d</b> e comparação com literatura e sua estrutura. ....	81
Tabela 5 – Dados de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>31e</b> e comparação com o <b>31c</b> e sua estrutura. ....	83
Tabela 6 – Dados de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>31f</b> e comparação com literatura e sua estrutura. ....	84
Tabela 7 – Dados de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>31g</b> e comparação com derivado <b>31a</b> e sua estrutura.....	86
Tabela 8 – Dados de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>31h</b> e comparação com literatura e sua estrutura. ....	88
Tabela 9 – Dados de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>31i</b> , <b>31h</b> e comparação com literatura e sua estrutura. ....	90
Tabela 10 – Dados de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>31j</b> e comparação com literatura e sua estrutura. ....	92
Tabela 11 – Dados de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>34a</b> e comparação com literatura e sua estrutura. ....	98
Tabela 12 – Dados de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>34b</b> e comparação com literatura e sua estrutura. ....	100
Tabela 13 – Dados de $^1\text{H}$ RMN e $^{13}\text{C}$ RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado <b>34c</b> e comparação com literatura e sua estrutura. ....	102
Tabela 14 – Atividade inibitória in vitro de inibição da Acetilcolinesterase dos pirano-pirazóis sintetizados. ....	103
Tabela 15 – Atividade inibitória in vitro de inibição da Acetilcolinesterase dos 4H-cromenos.....	104

Tabela 16 – Atividade inibitória in vitro de inibição da Acetilcolinesterase dos análogos da cumarina.....	106
Tabela 17 – Valores da função de pontuação ChemPLP para ambos enantiômeros ativos anti-AChE dos derivados <b>36b</b> , <b>36d</b> , <b>36g</b> e <b>36i</b> . ....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Ppm – Parte por milhão

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

OMS – Organização Mundial de Saúde

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

DA – Doença de Alzheimer

CoA – Coenzima A

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

µseg – Milissegundo

Ser – Serina

His – Histidina

Glu - Glutamato

Hex – Hexano

Tyr – Tirosina

Trp – Triptofano

Gly – Glicina

Ala – Alanina

kDa - Kilodaltons

*h*AChE – Acetilcolinesterase humana

*Ee*AChE – Acetilcolinesterase *Electrophorus electricus*

*Eq*BChE – Butirilcolinesterase de Soro de Equinos

Aβ – β-amilóide

PPA – Proteína Precursora Amilóide

Ca<sup>+</sup> - Ión Cálcio

MeOH – Metanol

EtOH – Etanol

AcOEt – Acetato de Etila

mg – Miligrama

ng – Nanograma  
μg – Micrograma  
Rf – Fator de retenção  
mL – Mililitro  
GHz – Gigahertz  
W – Watts  
min – Minutos  
KV – Kilovolts  
DMSO-d<sub>6</sub> – Dimetilsilano Deuterado  
D<sub>2</sub>O – Água Deuterada  
CDCl<sub>3</sub> – Clorofórmio Deuterado  
TMS – Tetrametilsilano  
UV – Ultravioleta  
MAO – Monoaminoxidase  
ACh – Acetilcolina  
AChE – Acetilcolinesterase  
BChE - Butirilcolinesterase  
HCl – Ácido Clorídrico  
NaCl – Cloreto de Sódio  
Mmol – Milimolar  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
μL – Microlitro  
μg – Micrograma  
U – Unidades  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio  
H<sub>2</sub>O – Água  
CLUE – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência  
PDA – Detector de Arranjo de Diodos  
DA – Doença de Alzheimer  
NaOAc – Acetato de Sódio  
ESG – Meio Ambiente, Social e Governança

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\delta$  – valor de deslocamento

$\int$  – valor de integração

® – marca registrada

$\lambda$  – comprimento de onda

°C – graus Celsius

% – porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1	Objetivo Geral.....	30
2.2	Objetivos Específicos .....	30
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>31</b>
3.1	CONHECENDO A PROTAGONISTA DO ESTUDO: A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE NA FENDA SINÁPTICA.....	31
<b>3.1.1</b>	<b>Função da acetilcolinesterase na fisiologia da transmissão colinérgica</b>	<b>33</b>
3.2	A DOENÇA DE ALZHEIMER: A DOENÇA QUE PREDOMINA ENTRE OS CASOS DE DEMÊNCIA.....	37
<b>3.2.1</b>	<b>Fisiopatologia da doença de Alzheimer .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Hipótese colinérgica da doença de Alzheimer.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Fármacos inibidores da acetilcolinesterase .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.4</b>	<b>A inspiração molecular: novos derivados de interesse com a capacidade de inibir a acetilcolinesterase.....</b>	<b>44</b>
3.3	OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE.....	49
<b>3.3.1</b>	<b>Delineando uma reação amiga do meio ambiente: As Leis da Química Verde</b>	<b>49</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Delineando uma reação amiga do meio ambiente: Planejando reações multicomponentes para a obtenção dos derivados piranos.....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>53</b>
4.1	SEÇÃO EXPERIMENTAL QUÍMICA.....	53
<b>4.1.1</b>	<b>Materiais e Equipamentos .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Caracterização estrutural dos compostos .....</b>	<b>54</b>

4.1.2.1	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i> .....	54
4.1.2.2	<i>Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EM)</i> .....	54
<b>4.1.3</b>	<b>Procedimentos experimentais para produção dos derivados pirano-pirazóis e cromenos</b> .....	<b>55</b>
4.1.3.1	<i>Procedimento Geral para a Síntese dos Derivados pirano-pirazóis (31a-31j)</i> 55	
4.1.3.2	<i>Caracterização, Rendimentos e Atribuições de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C dos Derivados pirano-pirazóis</i> .....	56
4.1.3.3	<i>Procedimento Geral para a Síntese dos Derivados Cromenos (34a-34c)</i>	59
<b>4.1.4</b>	<b>Análises cromatográficas</b> .....	<b>61</b>
4.1.4.1	<i>Monitoramento Cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada</i>	61
4.1.4.2	<i>Análise de Pureza por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE)</i> 61	
<b>4.1.5</b>	<b>Avaliação da atividade biológica</b> .....	<b>62</b>
4.1.5.1	<i>Avaliação da Atividade Inibitória da Acetilcolinesterase</i> .....	62
4.1.5.2	<i>Estudo de anconragem molecular</i> .....	63
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
5.1	OBTENÇÃO DOS DERIVADOS PIRANOS, GRAU DE PUREZA E CARACTERIZAÇÃO .....	65
<b>5.1.1</b>	<b>Síntese dos derivados pirano-pirazóis (31a-31j)</b> .....	<b>65</b>
5.1.1.1	<i>6-amino-4-fenil-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31a)</i> 67	
5.1.1.1.1	<i>Caracterização Estrutural por RMN do derivado 31a</i> .....	68
5.1.1.1.2	<i>Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução</i> .....	74
5.1.1.2	<i>6-amino-4-(4-clorofenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31b)</i> .....	75
5.1.1.2.1	<i>Caracterização Estrutural por RMN do derivado 31b</i> .....	76

5.1.1.2.2	Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução .....	77
5.1.1.3	<i>6-amino-4-(3-clorofenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31c)</i> .....	77
5.1.1.3.1	Caracterização Estrutural por RMN do derivado <b>31c</b> .....	78
5.1.1.3.2	Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução .....	79
5.1.1.4	<i>6-amino-4-(4-nitrofenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31d)</i> .....	80
5.1.1.4.1	Caracterização Estrutural por RMN do derivado <b>31d</b> .....	80
5.1.1.4.2	Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução .....	81
5.1.1.5	<i>6-amino-4-(3-fluorfenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31e)</i> .....	81
5.1.1.5.1	Caracterização Estrutural por RMN do derivado <b>31e</b> .....	82
5.1.1.5.2	Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução .....	83
5.1.1.6	<i>6-amino-4-(4-bromofenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31f)</i> .....	83
5.1.1.6.1	Caracterização Estrutural por RMN do derivado <b>31f</b> .....	84
5.1.1.6.2	Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução .....	85
5.1.1.7	<i>6-amino-4-(4-hidróxi-3-metoxifenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31g)</i> .....	85
5.1.1.7.1	Caracterização Estrutural por RMN do derivado <b>31g</b> .....	85
5.1.1.7.2	Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução .....	87
5.1.1.8	<i>6-amino-4-(4-hidróxi-3,5-dimetoxifenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31h)</i> .....	87
5.1.1.8.1	Caracterização Estrutural por RMN do derivado <b>31h</b> .....	88
5.1.1.8.2	Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução .....	89
5.1.1.9	<i>6-amino-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31i)</i> .....	89

5.1.1.9.1	Caracterização Estrutural por RMN do derivado <b>31i</b> .....	89
5.1.1.9.2	Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução .....	90
5.1.1.10	<i>6-amino-4-(furan-2-il)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31j)</i>	91
5.1.1.10.1	Caracterização Estrutural por RMN do derivado <b>31j</b> .....	91
5.1.1.10.2	Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução .....	92
<b>5.1.2</b>	<b>Síntese dos derivados cromenos (34a-34c)</b> .....	<b>92</b>
5.1.2.1	<i>Metil 2-amino-5,7-dihidróxi-4-(4-fluorfenil)-4H-cromeno-3-carboxilato (34a)</i>	94
5.1.2.1.1	Caracterização Estrutural por RMN do derivado <b>34a</b> .....	94
5.1.2.1.2	Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução .....	99
5.1.2.2	<i>Metil 2-amino-5,7-dihidróxi-4-(3-clorofenil)-4H-cromeno-3-carboxilato (34b)</i>	99
5.1.2.2.1	Caracterização Estrutural por RMN do derivado <b>34b</b> .....	100
5.1.2.2.2	Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução .....	100
5.1.2.3	<i>Metil 2-amino-5,7-dihidróxi-4-fenil-4H-cromeno-3-carboxilato (34c)</i> .....	101
5.1.2.3.1	Caracterização Estrutural por RMN do derivado <b>34c</b> .....	101
5.1.2.3.2	Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução .....	102
5.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE .....	103
<b>5.2.1</b>	<b>Avaliação <i>in vitro</i> de inibição da enzima acetilcolinesterase dos derivados pirano-pirazóis</b> .....	<b>103</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Avaliação <i>in vitro</i> de inibição da enzima acetilcolinesterase dos derivados benzopiranos</b> .....	<b>104</b>
5.2.2.1	<i>Derivados 4H-cromenos</i> .....	104
5.2.2.2	<i>Derivados análogos a cumarina</i> .....	105
<b>5.2.3</b>	<b>Aprofundando a avaliação estrutura atividade</b> .....	<b>107</b>

5.2.4	Estudos de ancoragem molecular .....	109
6	CONCLUSÃO .....	114
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	115
8	REFERÊNCIAS.....	117
9	ANEXOS .....	126

## 1 INTRODUÇÃO

O Alzheimer é uma doença degenerativa do hipocampo (TURNBULL; BOSKOVIC; COULSON, 2018) que afeta próximo de 0,47% da população brasileira, o que significa quase 1 milhão de brasileiros, e esse índice sobe para 12% quando consideramos apenas a população acima dos 65 anos (AMADO; BRUCKI, 2018), o que indica que 1 a cada 10 pessoas com mais de 65 anos são acometidas pela DA. De acordo com a Organização Mundial de Saúde OMS, aproximadamente 55 milhões de pessoas vivem com demência, e o Alzheimer contribui para 60% - 70% dos casos (ORGANIZATION, 2021), em números absolutos são aproximadamente 33 a 38 milhões de pessoas acometidas pela doença. A DA é uma doença, hoje, sem cura e para exemplificar esse impacto, a cidade de São Paulo possui mais de 11 milhões de habitantes (ESTATÍSTICA, 2021), então, atualmente, o número de pessoas aguardando uma cura para a doença, permitiria encher o município de São Paulo mais de 3 vezes.

A degeneração de neurônios colinérgicos é considerada um dos principais fatores pelo desenvolvimento de demência, e como foi ressaltado, uma das maiores causas de demência é a doença de Alzheimer (DA) (ASSOCIATION, 2021). Isto se dá devido a estes neurônios estarem presentes nas regiões do cérebro que desempenham um papel na memória, funções cognitivas e aprendizagem (BEKDASH, 2021). Pode-se afirmar então, que o sistema colinérgico desempenha papel fundamental na regulação das funções cognitivas.

No processo de transmissão colinérgica, o mediador químico acetilcolina é liberado em sinapses do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (HALL, 2021). Esse neurotransmissor é biossintetizado no neurônio colinérgico pré-sináptico, através da reação entre acetil coenzima-A (acetil-CoA) e a colina. Após a promoção do estímulo sináptico, a ACh é hidrolisada sob a ação da acetilcolinesterase (BOURNE; RADIC; SULZENBACHER; KIM *et al.*), enzima esta que catalisa a hidrólise através da tríade catalítica presente em sua estrutura (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016; CHEUNG; RUDOLPH; BURSHTYEN; CASSIDY *et al.*, 2012; FIFER, 2008).

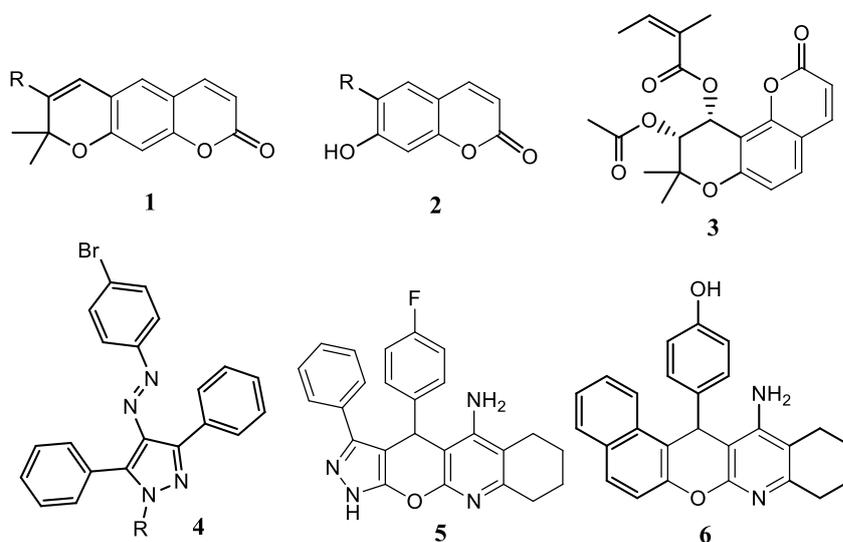
Em resumo, a AChE é uma enzima catalítica envolvida especificamente na hidrólise do neurotransmissor ACh (SIEK; KATZ; FISHMAN; KOROSI *et al.*, 1990). A

inibição dessa enzima, por consequência, resulta em um aumento da concentração da acetilcolina na fenda sináptica. Com o intuito de aumentar a atividade colinérgica central, é essencial se contrapor à perda de neurônios colinérgicos e uma destas maneiras é através de inibidores da enzima AChE (BERTRAND; WALLACE, 2020).

Compostos com ação inibitória dessa enzima são promissores na busca de novos medicamentos no tratamento da doença do Alzheimer (DA). E apesar da busca constante de novas moléculas, o protocolo de tratamento prevê apenas a donepezila, a rivastigmina e a galantamina, inibidores da AChE, como medicamentos utilizados no tratamento da DA (FIGUEIREDO; FIREMAN). Porém, relatos de efeitos adversos severos, principalmente náuseas e desconfortos gástricos, são relacionados a estes fármacos (NORDSTRÖM; RELIGA; WIMO; WINBLAD *et al.*, 2013) (TAN; JOHNELL; GARCIA-PTACEK; HAAKSMA *et al.*, 2018). A alta toxicidade destes compostos são tão comuns, que devido à alta hepatotoxicidade e a difícil posologia, a tacrina não é mais utilizada na prática clínica.

Devido à alta toxicidade e a baixa quantidade de medicamentos existentes, a demanda de novas terapias para o tratamento da DA se faz necessário. É possível obtermos novos compostos através de isolamentos de metabólitos secundários de plantas, biossíntese, síntese orgânica e ou semissíntese. Estudos anteriores que abordaram o planejamento e o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento do DA através das estratégias de síntese e isolamento, trouxeram a luz compostos (Figura 1) derivados de cromenos (**1** e **2**) e cromonas (**3**) (KANG; LEE; SUNG; PARK *et al.*, 2001; MAALEJ; CHABCHOUB; SAMADI; DE LOS RÍOS *et al.*, 2011; ORHAN; SENOL; SHEKFEH; SKALICKA-WOZNIAK *et al.*, 2017), pirano-pirazóis (**4** e **5**) (LI; YU; TU, 2021; POURABDI; KHOOBI; NADRI; MORADI *et al.*, 2016) e pirimidinas (**6**) (BABU; ELUMALAI; SRINIVASAN; ELURI *et al.*, 2019), com significativa atividade de inibição da enzima AChE *in vitro*.

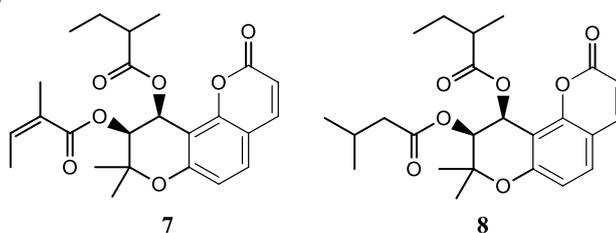
Figura 1 – Derivados de interesse com atividade anticolinesterase relatada em literatura.



Fonte: o autor

Em 2017, Orhan e colaboradores isolaram, a partir das sementes de *Mutellina purpúrea*, uma cromona, o composto pterixina (**3**) (ORHAN; SENOL; SHEKFEH; SKALICKA-WOZNIAK *et al.*, 2017) que se mostrou um promissor composto líder no tratamento da AD devido à sua atividade *in vitro* na enzima butirilcolinesterase (BChE). A pterixina (**3**), uma piranocumarina angular, também pôde ser encontrada em abundância nas raízes da *Peucedanum japonicum* (CHEN; CHANG; SHEEN; TENG *et al.*, 1996). No ano de 2020, Heo e colaboradores isolaram 15 derivados cumarínicos da *Peucedanum japonicum* e avaliaram a ação da inibição da AChE, BChE e monoamino oxidase (MAO) *in vitro* (HEO; EOM; RYU; KANG *et al.*, 2020) e identificaram 2 compostos (Figura 2) potenciais como ligantes reversíveis da AChE e da BChE, enzima colinesterase com o substituinte na posição 3 do anel pirano, fusionado no sistema de anéis da cumarina, menos polar que na AChE.

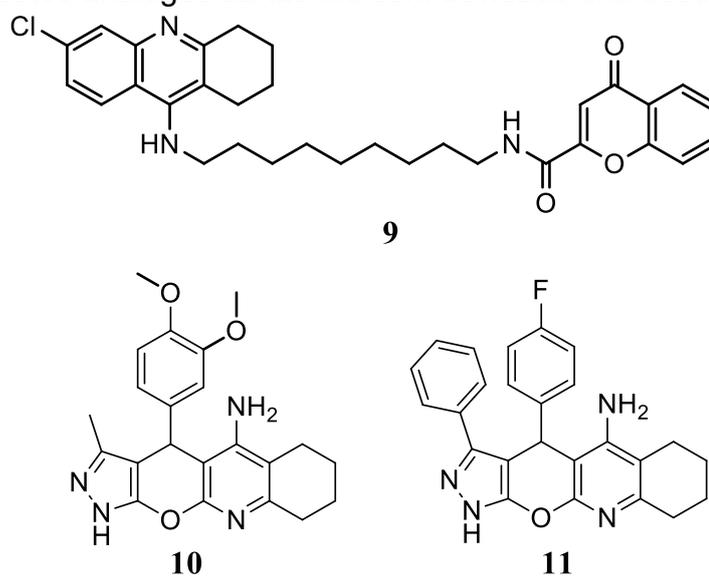
Figura 2 – Compostos potenciais ligantes reversíveis das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.



Fonte: o autor

A tacrina, apesar de descontinuada da prática clínica (FIGUEIREDO; FIREMAN), os estudos com análogos hibridizados (Figura 3) a cromenos (**9**) (MANOUCHEHRIZADEH; MOSTOUFI; TAHANPESAR; FEREDOONNEZHAD, 2019) ou a anéis pirazólicos (**10** e **11**) (KHOABI; GHANONI; NADRI; MORADI *et al.*, 2015; POURABDI; KHOABI; NADRI; MORADI *et al.*, 2016) têm apresentado boas atividades de inibição da enzima *in vitro* e *in silico*. Tendo como fonte de inspiração os derivados cromenos, cromonas e pirazólicos, o presente trabalho se propôs a avaliar o potencial de inibição da AChE de vinte e nove compostos. Todos os compostos testados são produtos de síntese, e a estratégia utilizada para a síntese foi a de multicomponentes.

Figura 3 – Compostos análogos da tacrina com atividade anti-acetilcolinesterase.



Fonte: o autor

É inegável que a questão ambiental e a gestão de resíduos são assuntos de destaques na mídia internacional, mesmo que as políticas públicas nacionais para a preservação do meio ambiente, nos últimos 3 anos, vêm sendo deixada de lado (ARAÚJO, 2020; MENEZES; BARBOSA JR, 2021). A estratégia de reação de multicomponentes é citada como uma estratégia com princípios da química verde, química limpa e/ou química autossustentável (ANASTAS; EGHBALI, 2010). É uma estratégia de obter compostos inéditos que vem sendo amplamente aplicada na área de descoberta de novos tratamentos as mais variadas doenças (LAM; TIMMERMAN, 2018). Hoje, o termo mais utilizado é o “*green chemistry*”, adotado pela União

Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), e neste trabalho será citado como química verde, a tradução literal da palavra em questão.

Então, preocupando-se com os resíduos gerados nas estratégias de reação, e seguindo as diretrizes da química verde, a estratégia reacional planejada para este estudo foi a de multicomponentes, utilizando como reagentes acetoacetato de etila, malononitrila e  $\alpha$ -ciano acetato com aldeídos aromáticos em meio básico (NAGARAJAN; REDDY, 2009). Essa técnica reacional de multicomponentes já foi aplicada anteriormente, com sucesso, para a produção de cumarinas angulares e 4*H*-cromenos (MARTIN; MBAVENG; DE MORAES; KUETE *et al.*, 2018). Estes compostos previamente sintetizados, foram utilizados no estudo e através do domínio da técnica reacional e da expertise adquirida pelo autor, foram então planejados os compostos pirano-pirazóis e os novos derivados 4*H*-cromenos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar compostos pirano-pirazóis e compostos 4*H*-cromenos novos utilizando a estratégia de reação multicomponente e avaliar a atividade inibitória da acetilcolinesterase de cromenos, cromonas e dos pirano-pirazóis.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sintetizar compostos pirano-pirazóis através da estratégia de reação de multicomponentes.

Sintetizar novos derivados 4*H*-cromenos através da estratégia de reação de multicomponentes.

Caracterizar todos os compostos sintetizados por métodos espectrométricos e espectroscópicos.

Avaliar a atividade anti-acetilcolinesterase *in vitro* dos compostos sintetizados e caracterizados.

Avaliar a atividade anti-acetilcolinesterase *in vitro* dos derivados cromonas e 4*H*-cromenos.

Estabelecer a relação estrutura atividade.

Realizar estudos de ancoragem molecular com os derivados que possuem maior potencial de inibição da enzima AChE.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

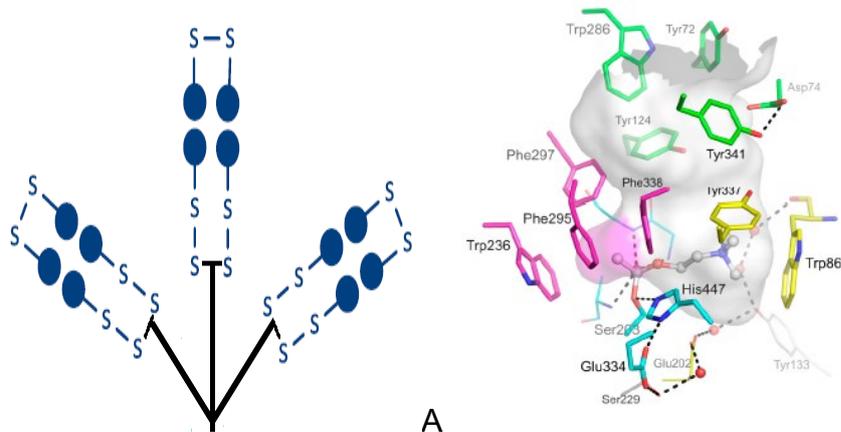
#### 3.1 CONHECENDO A PROTAGONISTA DO ESTUDO: A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE NA FENDA SINÁPTICA

A AChE e a BChE são os dois tipos de colinesterases presentes nos animais vertebrados (MASSOULIÉ; SUSSMAN; BON; SILMAN, 1993), elas apresentam semelhanças estruturais, 50% de homologia entre os seus aminoácidos (PEZZEMENTI; NACHON; CHATONNET, 2011), a heterogenia faz a AChE ser muito mais eficiente e seletiva a acetilcolina (ROSENBERRY; BRAZZOLOTTO; MACDONALD; WANDHAMMER *et al.*, 2017). A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor, e a acetilcolinesterase (Figura 4) é uma enzima serina-hidrolase que tem como função catalisar a hidrólise do neurotransmissor ACh depois de liberado no espaço sináptico (HALL, 2021).

Quanto a estrutura molecular a AChE possui duas formas diferentes, oligômeros de subunidades catalíticas (monômeros, dímeros e tetrâmeros) e associações heteroméricas de estruturas de subunidades catalíticas (BOURNE; TAYLOR; BOUGIS; MARCHOT, 1999). Os oligômeros são geralmente encontrados intracelulares na forma solúvel e as AChEs heteroméricas (geralmente tetrâmeros) ligados a subunidade estrutural, são encontradas ligadas a membrana celular nas sinapses neuronais (MASSOULIÉ; SUSSMAN; BON; SILMAN, 1993).

A arquitetura da AChE de vertebrados e do seu centro ativo foi publicada ao longo dos anos 90, através da metodologia de cristalografia por Raio-X (BOURNE; TAYLOR; BOUGIS; MARCHOT, 1999; SUSSMAN; HAREL; FROLOW; OEFNER *et al.*, 1991). Colocando o foco sobre a AChE presentes nas fendas sinápticas colinérgicas, ela possui os tetrâmeros de subunidades catalíticas ligadas entre si por pontes dissulfeto e a uma subunidade estrutural de colágeno de 20 kDa (LEGAY, 2000). A AChE apresenta três ramificações destas associadas, formando assim uma estrutura de árvore ancorada na superfície externa da membrana celular (MASSOULIÉ; SUSSMAN; BON; SILMAN, 1993). A estrutura possui quatro subunidades protéicas capazes de hidrolisar a ACh em cada uma das ramificações (PATRICK, 2013), totaliza assim, doze sítios catalíticos.

Figura 4 – Estrutura da enzima AChE adaptada de Patrik (A) e a estrutura tridimensional cristalográfica do sítio ativo da AChE humana (*hAChE*) de Rosenberry e colaboradores (B).



Fonte: o autor/ Rosenberry e colaboradores (2017)

A AChE está presente nas proximidades dos receptores colinérgicos o que contribui ainda mais a sua eficiência, assim, o tempo de meia vida da ACh na fenda é de 10 milissegundos ( $\mu\text{seg}$ ) (HALL, 2021; MASSOULIÉ; SUSSMAN; BON; SILMAN, 1993). Além da sua localização e estrutura, a natureza do sítio ativo é de suma importância para ação desta enzima (PATRICK, 2013), os aminoácidos presentes são fundamentais para a atividade catalítica. Dividindo em partes, são 3 porções de destaque, uma denominada sítio de reconhecimento, outra é o desfiladeiro ou a garganta e o sítio ativo (MASSOULIÉ; SUSSMAN; BON; SILMAN, 1993; SUSSMAN; HAREL; FROLOW; OEFNER *et al.*, 1991).

Iniciando a descrição da estrutura pela parte mais exposta da enzima, temos o sítio de reconhecimento, sítio periférico ou, simplesmente, sítio P, revestido por grupamentos aromáticos. O sítio P desempenha papel crucial no reconhecimento da ACh como substrato (ROSENBERRY; BRAZZOLOTTO; MACDONALD; WANDHAMMER *et al.*, 2017). O sítio ativo está localizado no fundo de um desfiladeiro estreito de 20 Å de profundidade, um dos mais profundos já estudados, onde 40% da sua superfície é formada por anéis de catorze resíduos de aminoácidos aromáticos (MASSOULIÉ; SUSSMAN; BON; SILMAN, 1993).

Já no sítio de acilação, sítio ativo ou, simplesmente, sítio A há a presença de um bolso de ligação de colina formado por um triptofano e uma tirosina. Resíduos de triptofano e fenilalanina formam um bolso de ligação de acila (ROSENBERRY;

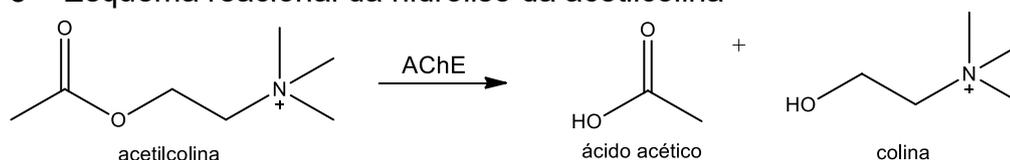
BRAZZOLOTTO; MACDONALD; WANDHAMMER *et al.*, 2017). Três aminoácidos em particular são responsáveis pela atividade catalítica, a tríade catalítica. Formada pela Ser203, His 447, Glu 334 (MASSOULIÉ; SUSSMAN; BON; SILMAN, 1993; ROSENBERRY; BRAZZOLOTTO; MACDONALD; WANDHAMMER *et al.*, 2017; SUSSMAN; HAREL; FROLOW; OEFNER *et al.*, 1991) a tríade catalítica está localizada ao fundo do sítio A. A serina é responsável pelo ataque nucleofílico a ACh com o auxílio da histidina e do glutamato (ROSENBERRY; BRAZZOLOTTO; MACDONALD; WANDHAMMER *et al.*, 2017). Grupos amida da cadeia principal de resíduos de AA da enzima formam uma região denominada cavidade oxianion (ORDENTLICH; BARAK; KRONMAN; ARIEL *et al.*, 1998).

### 3.1.1 Função da acetilcolinesterase na fisiologia da transmissão colinérgica

Como mencionado no início desta seção, A AChE é um serina-hidrolase, e esse grupo de enzimas utiliza um nucleófilo, a hidroxila presente na serina, para hidrolisar as ligações amida, éster e tio éster (SIMON; CRAVATT, 2010). No caso da AChE, a enzima hidrolisa seletivamente uma ligação éster fisiologicamente e o resultado dessa hidrólise são substratos de proteínas e pequenas moléculas (metabólitos) (SILMAN; SUSSMAN, 2008).

A AChE está presente nas sinapses colinérgicas, sinapses que tem como característica a presença do neurotransmissor, a acetilcolina. Após a ativação do neurônio colinérgico as colinesterases (AChE e BChE) hidrolisam a acetilcolina presente na fenda sináptica (FIFER, 2008) (Figura 5) permitindo que esse neurônio retorne ao estado de repouso (HALL, 2021).

Figura 5 – Esquema reacional da hidrólise da acetilcolina



Fonte: o autor

A ACh sintetizada no neurônio pré-sináptico, através da acetilação da colina com a acetil coenzima A, é então transportada para o interior das vesículas. Lá, permanece armazenada em alta concentração até ser liberada no espaço sináptico.

Quando um potencial de ação chega, ocorre a despolarização da terminação nervosa, abrindo muitos canais de cálcio (Ca) na membrana do terminal nervoso. Esse movimento permite o influxo de íons cálcio facilitando a fusão da membrana vesicular com a membrana plasmática. A fusão faz com que grande quantidade de vesículas se rompa, acontecendo assim a exocitose da ACh na fenda sináptica (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016; HALL, 2021; VENTURA; ABREU; FREITAS; SATHLER *et al.*, 2010).

Após essa etapa, o neurotransmissor chegando no espaço sináptico ou ele propaga a informação se ligando no receptor pós-sináptico e após a mensagem ser transmitida, se desliga do receptor e volta a estar disponível na fenda sináptica, ou é diretamente reconhecido pela AChE e sofre a hidrólise (BERTRAND; WALLACE, 2020; HALL, 2021; PATRICK, 2013).

Então é nesse momento que entra em ação a enzima AChE, em 10 milissegundos ela hidrolisa a ACh em ácido acético e colina. O primeiro movimento é o de reconhecimento, onde a enzima reconhece o neurotransmissor. O sítio periférico, sítio P, desempenha papel crucial na identificação da ACh. A presença de resíduos aromáticos de Trp286, Tyr124, Tyr341 e Tyr 72 no sítio P da AChE no *homo sapiens sapiens* (*hAChE*) (ROSENBERRY; BRAZZOLOTTO; MACDONALD; WANDHAMMER *et al.*, 2017) facilita e orienta a entrada da ACh no desfiladeiro até o sítio A. O grupo amônio quaternário da ACh pode estabelecer algumas interações cátion- $\pi$  com o Trp286, e interações de Van Der Waals Tyr124, Tyr341 ao mesmo tempo que a hidroxila da Tyr72 pode fazer uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio da ACh (COLLETIER; FOURNIER; GREENBLATT; STOJAN *et al.*, 2006).

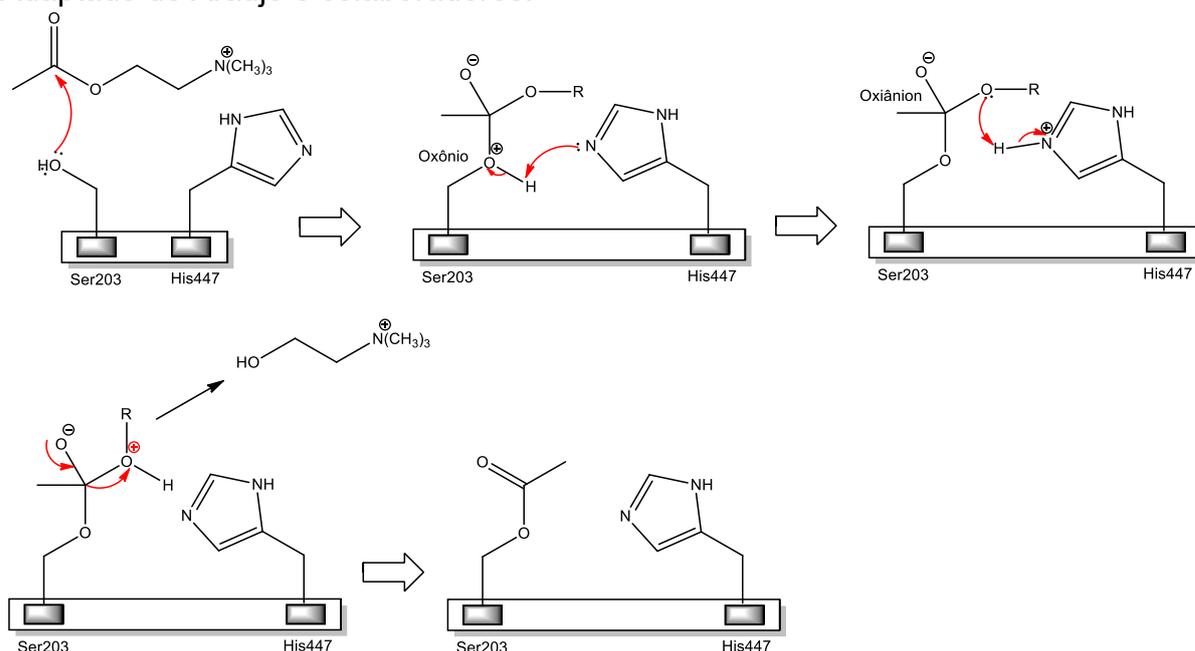
Depois de orientada para dentro do desfiladeiro, a ACh vai em direção ao sítio A. O desfiladeiro é revestido por 14 resíduos de aminoácidos aromáticos que podem formar interações cátion- $\pi$  com a acetilcolina guiando a molécula para o final do desfiladeiro (MASSOULIÉ; SUSSMAN; BON; SILMAN, 1993; ROSENBERRY; BRAZZOLOTTO; MACDONALD; WANDHAMMER *et al.*, 2017). Completando a travessia, a ACh chega ao sítio ativo ou apenas sítio A.

Chegando no sítio A, existe um bolso de ligação de colina formado pelos aminoácidos Trp86 e Tyr337, que realizam importantes interações cátion- $\pi$  ou ligações de hidrogênio com a porção colina carregada positivamente (BOURNE; RADIC; SULZENBACHER; KIM *et al.*, 2006; SUSSMAN; HAREL; FROLOW; OEFNER *et al.*, 1991). Esse movimento auxilia a alinhar o substrato, a ACh, para a catálise. Os

resíduos de Phe295, Phe 237 e Trp236 formam o bolso de ligação acila (BOURNE; RADIC; SULZENBACHER; KIM *et al.*, 2006), onde a parte acetil do substrato fica firmemente acomodada, alinhando a molécula para sofrer o ataque nucleofílico da Ser203, presente na tríade catalítica (ROSENBERRY; BRAZZOLOTTO; MACDONALD; WANDHAMMER *et al.*, 2017).

A tríade catalítica é responsável pelo processo de hidrólise, propriamente dito, formada pelos aminoácidos Ser203, His447 e Glu334 (ROSENBERRY; BRAZZOLOTTO; MACDONALD; WANDHAMMER *et al.*, 2017). O processo de hidrólise inicia-se após a ACh estar devidamente posicionada no sítio A. O mecanismo catalítico (Figura 6) então se inicia pelo ataque nucleofílico da carbonila da ACh pelo par de elétrons da hidroxila do resíduo de Ser203, gerando um intermediário tetraédrico. O intermediário apresenta um íon oxônio e a His447 atua como base retirando o próton e formando assim o oxíânion (FIFER, 2008).

Figura 6 – Esquema da hidrólise da ACh no sítio ativo da AChE e liberação da colina. Adaptado de Araújo e colaboradores.



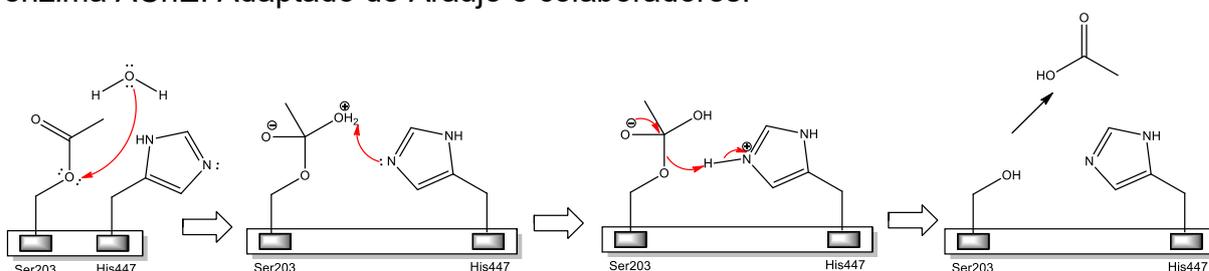
Fonte: o autor, adaptado de Araújo *et al* (2016)

Os resíduos dos aminoácidos Gly121, Gly122 e Ala204 possuem grupos amida e formam uma região de carga positiva chamada cavidade oxíânion, que ativa o grupo carbonila da ligação acila que foi clivada estabilizando o íon oxíânion carregado negativamente (ORDENTLICH; BARAK; KRONMAN; ARIEL *et al.*, 1998). A His447

que foi protonada, atua como ácido e doa um próton para a porção colina da ACh transformando-a em um melhor grupo de saída. Logo após a regeneração da carbonila, ocorre então o processo de liberação da colina (BOURNE; RADIC; SULZENBACHER; KIM *et al.*, 2006; FIFER, 2008) e a saída deixa a enzima AChE acetilada.

A regeneração da serina catalítica da AChE se dá também por hidrólise (Figura 7), eliminando uma molécula de ácido acético com as moléculas de água presentes no meio agindo como nucleófilos (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016; FIFER, 2008).

Figura 7 – Esquema do mecanismo de regeneração da serina catalítica Ser203 da enzima AChE. Adaptado de Araújo e colaboradores.



Fonte: o autor, adaptado de Araújo *et al* (2016)

A tríade catalítica é formada também pelo aminoácido Glu334, onde suas interações aumentam a performance da *hAChE*. Este por sua vez, devido ao seu grupo carboxilato, forma uma ligação de hidrogênio com a His447. Por conseguinte, a histidina forma uma ligação de hidrogênio entre a Ser203, aumentando ainda mais a nucleofilicidade da serina catalítica (CHEUNG; RUDOLPH; BURSHTEYN; CASSIDY *et al.*, 2012; SHAFFERMAN; BARAK; KAPLAN; ORDENTLICH *et al.*, 2005).

A enzima AChE é estudada com o intuito de estabelecer seu envolvimento com diversas doenças e desenvolver novos tratamentos (CHEUNG; RUDOLPH; BURSHTEYN; CASSIDY *et al.*, 2012; HALL, 2021; VENTURA; ABREU; FREITAS; SATHLER *et al.*, 2010). Faz parte deste processo compreender a estrutura da AChE e sua função dentro do sistema colinérgico. Ampliar a compreensão do mecanismo catalítico envolvido na hidrólise do neurotransmissor ACh e da arquitetura funcional da enzima, são fatores preponderantes para orientar os novos projetos na área da química medicinal, que visam agentes em potencial para a terapia da doença de Alzheimer através da inibição da AChE.

### 3.2 A DOENÇA DE ALZHEIMER: A DOENÇA QUE PREDOMINA ENTRE OS CASOS DE DEMÊNCIA

Partindo do conceito de demência pela OMS, é uma síndrome que leva à deterioração da função cognitiva, ou seja, perda da capacidade de processar o pensamento, além do que espera das consequências usuais do envelhecimento biológico. Demência é então, um conjunto particular de sintomas, possuindo três estágios, o inicial ou leve, o moderado e o tardio ou grave (ASSOCIATION, 2021; ORGANIZATION, 2021).

Demência é uma síndrome, geralmente de natureza crônica ou progressiva, que afeta além do pensamento, a comunicação, a memória, a orientação, a compreensão, o cálculo, a aprendizagem e o julgamento (ARANDA; KREMER; HINTON; ZISSIMOPOULOS *et al.*, 2021; HUGO; GANGULI, 2014). Com a função cognitiva comprometida o indivíduo afetado sofre também com mudanças no humor, no comportamento, controle emocional ou motivação para fazer as atividades físicas e diárias onde a consciência não é afetada (ARANDA; KREMER; HINTON; ZISSIMOPOULOS *et al.*, 2021; LAMB; SHEEHAN; ATHERTON; NICHOLS *et al.*, 2018).

No ano de 2010, era estimado um número de 35,6 milhões de pessoas acometidas pela síndrome (PRINCE; BRYCE; ALBANESE; WIMO *et al.*, 2013), hoje, a OMS estima que esse número já chega a 55 milhões. Com uma prevalência estimada de dez milhões de pessoas a cada ano, a OMS reconheceu a demência como prioridade na saúde pública (ORGANIZATION, 2021). A demência é a quinta principal causa de mortes, sendo no ano de 2016, pouco mais de 4% dos óbitos foram relacionados a demência (NICHOLS; SZOEKE; VOLLSET; ABBASI *et al.*, 2019).

O impacto social e econômico da demência é expressivo, a OMS estima um custo total global da sociedade de um a três trilhões de dólares nos últimos anos (ORGANIZATION, 2021). No ano de 2020 um estudo realizado nos Estado Unidos da América, os custos médicos combinados com todos os custos com os cuidados e excepcionalidades de um paciente com demência, foram estimados entre 500 bilhões de dólares (ARANDA; KREMER; HINTON; ZISSIMOPOULOS *et al.*, 2021).

Existem uma série de fatores de risco que podem ser relacionados com demência, como traumas cranianos, genética, estilo de vida, fatores médicos e

psiquiátricos, mas, fatores de risco não causam obrigatoriamente a doença, assim como fatores de prevenção não diminuem suas chances de adquirir a doença à zero (ARANDA; KREMER; HINTON; ZISSIMOPOULOS *et al.*, 2021; ORGANIZATION, 2021).

As causas de demência podem ser especificamente uma ou mais causas associadas. Podem causar demência: doença de Alzheimer (DA), doença de Huntington, doença de Parkinson, doenças de príon, doenças vasculares cerebral, degeneração do lobo frontotemporal, algum trauma cerebral, uso irracional ou uso contínuo de medicamentos controlados (HUGO; GANGULI, 2014).

A doença de Alzheimer é uma patologia sem cura que contribui para 60% - 80% dos casos de demência OMS (ASSOCIATION, 2021), em números absolutos a estimativa fica entre 33 e 44 milhões de pessoas acometidas. A prevalência da DA aumenta de acordo com o envelhecimento e após os 65 anos a incidência pode dobrar a cada cinco anos (GARRE-OLMO, 2018; LOPEZ; KULLER, 2019). No ano de 2016, a Turquia teve a maior prevalência do mundo da DA tardia, o Brasil foi o segundo com o número de casos entre 882 e 1220 a cada cem mil pessoas (GARRE-OLMO, 2018). Em estudo realizado no ano de 2018, foi reportado que a doença afetava naquele ano cerca de 0,47% da população brasileira e 12% da população acima dos 65 anos (AMADO; BRUCKI, 2018).

O impacto da doença não se dá somente na pessoa acometida, mas como também afeta todo seu entorno socioeconômico e de familiares. É estimado um custo de mais de 300 bilhões somando todos os gastos com os cuidados relativos à doença, onde mais de 200 bilhões representam gastos com cuidados médicos e medicamentos (WONG, 2020). Além de todos os envolvidos, a DA ainda gera um impacto nos sistemas de saúde. De acordo com o Ministério da Saúde brasileiro, o número de hospitalizações relacionadas a DA e os custos econômicos aumentaram 88% em 2010 e 44% em 2019 (FETER; LEITE; CAPUTO; CARDOSO *et al.*, 2021). Por ser uma doença que demanda muitos custos, é de se esperar que a doença traga mais prejuízos aos pacientes, e a família de baixa renda (ARANDA; KREMER; HINTON; ZISSIMOPOULOS *et al.*, 2021).

### 3.2.1 Fisiopatologia da doença de Alzheimer

Uma característica histopatológica da DA é a observação da massiva perda sináptica e morte neuronal nas regiões cerebrais, incluindo o córtex cerebral e o hipocampo (SELKOE, 2001). A doença possui marcadores histopatológicos característicos como diferentes tipos de placas senis e novos neurofibrilares, formados através do depósito de peptídeos amilóides e hiperfosforilação da proteína Tau e ativação da célula da glia (HANSEN; HANSON; SHENG, 2018; LASHLEY; SCHOTT; WESTON; MURRAY *et al.*, 2018).

As duas principais hipóteses para explicar a etiologia da doença são baseadas nesses marcadores neuropatológicos, são elas, a hipótese da cascata amiloidal e a hipótese colinérgica. Na primeira hipótese, a neurodegeneração inicia a partir da produção, agregação e deposição da substância  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) e placas senis resultado da clivagem proteolítica anormal da proteína precursora amilóide (PPA) (HARDY; HIGGINS, 1992).

A PPA pode ser clivada por duas vias metabólicas, a via não amiloigênica, considerada a via natural e a via amiloidogênica. No processo natural, não gera beta amilóide, sendo feito pela enzima  $\alpha$ -secretase. O produto é clivado pela  $\gamma$ -secretase, dando origem a um peptídeo solúvel que desempenha função biológica. Já na via amiloidogênica a PPA é clivada pela  $\beta$ -secretase e após a clivagem do produto pela  $\gamma$ -secretase, o peptídeo originado possui uma sequência de 40 ou 42 aminoácidos, e apresenta uma predisposição para formar agregados entre si (GOLDE; RAN; FELSENSTEIN, 2012; HARDY, 2006).

### 3.2.2 Hipótese colinérgica da doença de Alzheimer

A hipótese colinérgica é a hipótese mais antiga para explicar a etiologia da DA do idoso (BARTUS; DEAN III; BEER; LIPPA, 1982) e o presente trabalho se baseia nessa hipótese. Muitas regiões do cérebro que desempenham as funções de memória e aprendizagem, além das respostas ao estresse, e outras funções cognitivas são regiões ricas em neurônios colinérgicos (WOOLF; BUTCHER, 2011). Por consequência, a via colinérgica desempenha importante função nos processos de memória e aprendizagem (DEUTSCH, 1971) e a perda de neurônios colinérgicos acarreta na perda dessas funções.

Algumas características são encontradas no sistema colinérgico do indivíduo acometido pela DA, como redução variável dos neurônios colinérgicos localizados no núcleo basal de Meynert e diminuição da concentração, no córtex e no hipocampo, da colina acetiltransferase, enzima que sintetiza a ACh (HAMPEL; MESULAM; CUELLO; KHACHATURIAN *et al.*, 2019; KÁSA; RAKONCZAY; GULYA, 1997). Os neurônios que expressam a enzima colina acetiltransferase tem origem no núcleo basal de Meynert, logo a perda desses neurônios do cérebro acometido pela DA, reforça a correlação entre o sistema colinérgico, a ACh, o núcleo basal de Meynert e a patogênese da DA (WHITEHOUSE; PRICE; CLARK; COYLE *et al.*, 1981). Apesar de outras hipóteses terem surgido e algumas até desafiarem essa hipótese, ela ainda é bem aceita pela comunidade científica.

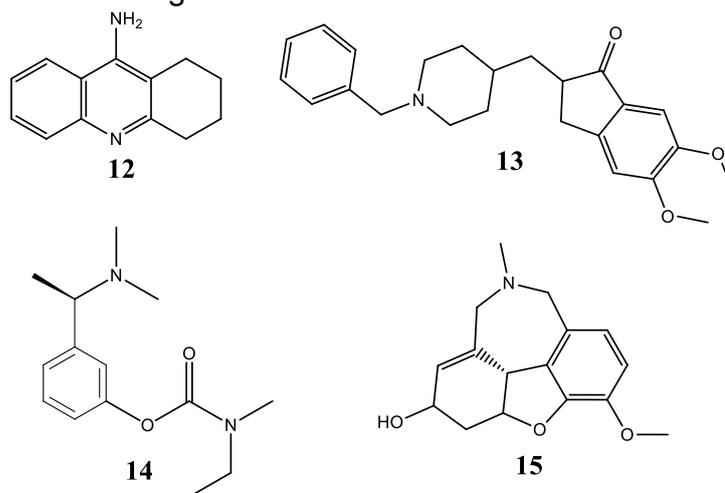
Com o intuito de observar os efeitos da interferência do sistema colinérgico na aprendizagem e memorização nos mamíferos, publicações avaliaram inibidores irreversíveis da enzima AChE. As pesquisas apontaram que a ativação do sistema colinérgico foi responsável por melhorar a aprendizagem (MUTHURAJU; MAITI; SOLANKI; SHARMA *et al.*, 2009) e também relatam uma relação entre o desempenho de ratos em testes de reconhecimento espacial e os níveis cerebrais de AChE (BENNETT; REYNOLDS; PRUSKY; DOUGLAS *et al.*, 2007).

Por definição, como apresentado na hipótese colinérgica, os pacientes acometidos pela DA apresentam baixos níveis de acetilcolina. Visando o retardo da disfunção cognitiva nas fases iniciais da doença, estratégias para aumentar a disponibilidade de ACh foram traçadas, e uma delas foi inibir a AChE retardando a degradação metabólica (ANAND; SINGH, 2013).

### **3.2.3 Fármacos inibidores da acetilcolinesterase**

Esta classe de medicamentos possui hoje, quatro representantes aprovados pela Administração Federal de Alimentos e Medicamentos americana (FDA), são eles a tacrina (**12**), a donepezila (**13**), a rivastigmina (**14**) e a galantamina (**15**) (Figura 8). O único medicamento aprovado para o tratamento de sintomas severos é a donepezila, os outros medicamentos são indicados para sintomas leves a moderados (ELLUL; ARCHER; FOY; POPPE *et al.*, 2007).

Figura 8 – Compostos análogos da tacrina com atividade anti-acetilcolinesterase.



Fonte: o autor

Começando a abordagem pelo Cognex<sup>®</sup>, nome comercial da tacrina **12**, foi aprovado pelo FDA no ano de 1993 (ANAND; SINGH, 2013). O estudo de meta-análise de Qizilbash e colaboradores, avaliou doze estudos que incluíram mais de 1980 pacientes com DA. Como conclusão o estudo apontou uma visível redução da deterioração da função cognitiva nos primeiros três meses e um aumento de chance de melhora no estado clínico dos pacientes, quando comparado com placebo (QIZILBASH; WHITEHEAD; HIGGINS; WILCOCK *et al.*, 1998).

A tacrina **12**, possui muitos efeitos colaterais relatados como: prisão de ventre, gases, náuseas, êmese, riscos de infarto e hepatotoxicidade (NORDSTRÖM; RELIGA; WIMO; WINBLAD *et al.*, 2013; SUMMERS; KOEHLER; MARSH; TACHIKI *et al.*, 1989). Por consequência dos efeitos secundários, a tacrina não é mais prescrita (FIGUEIREDO; FIREMAN) e nem comercializada (ASSOCIATION, 2021; ELLUL; ARCHER; FOY; POPPE *et al.*, 2007).

Seguindo a ordem cronológica o Aricept<sup>®</sup>, nome comercial da donepezila **15**, foi aprovado em 1996. Um projeto que buscou derivados da tacrina no início dos anos 80, e inspirou mais de 700 derivados, permitiu a descoberta de que a troca do anel piperazina por piperidina ocasionou o aumento expressivo da atividade de inibição da enzima AChE. Após alguns poucos protótipos, chegou-se ao composto **15** com eficácia comprovada e sem sinais de hepatotoxicidade (SIMOES; VIEGAS; MOREIRA; SILVA *et al.*, 2014; VIEGAS; SIMÕES; DA ROCHA; CASTELLI *et al.*, 2011).

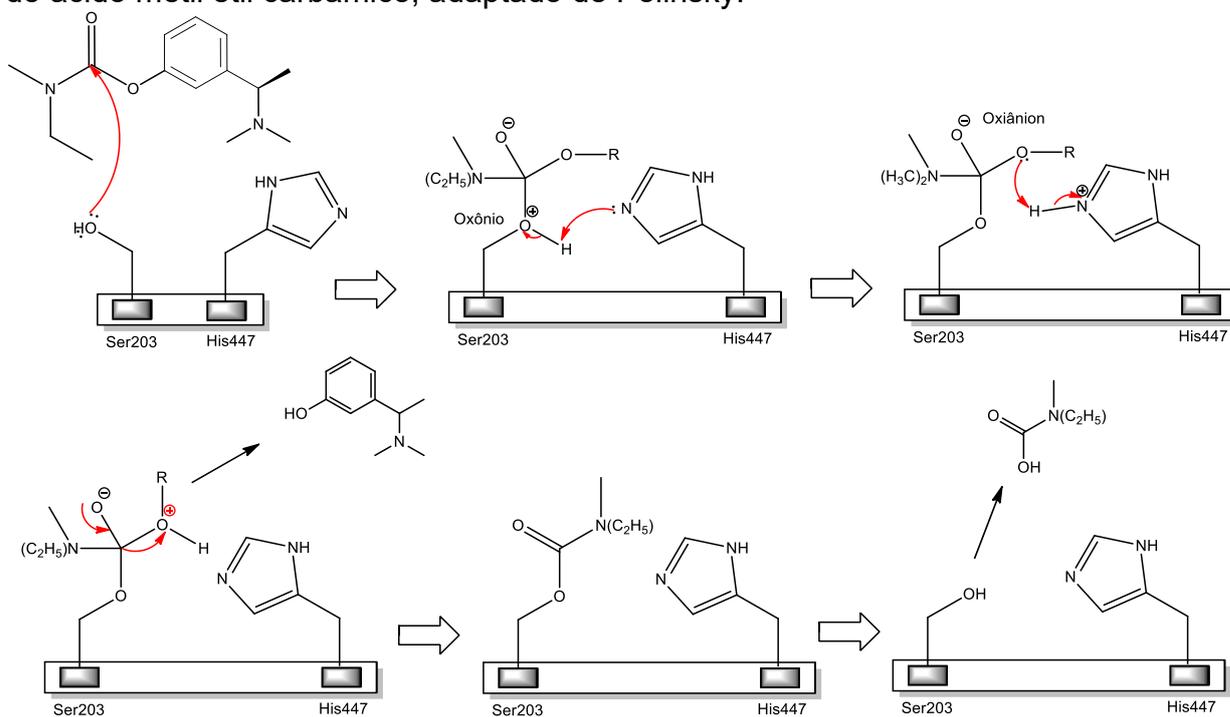
A estrutura da donepezila **15**, realiza importantes interações com o sítio ativo da enzima AChE. As interações no desfiladeiro da enzima são realizadas principalmente por três porções, o átomo de nitrogênio no anel piperidina com a Phe330 e a Tyr121, e o sistema de anéis indanona e a porção benzila, que realizam interações  $\pi$ - $\pi$  com resíduos aromáticos principalmente do Trp84 e o Trp279 (SIMOES; VIEGAS; MOREIRA; SILVA *et al.*, 2014). A substituição da porção benzila ligada ao átomo do nitrogênio por outros grupos funcionais, comprovou que essa porção é essencial para atividade inibitória (BELLUTI; PIAZZI; BISI; GOBBI *et al.*, 2009).

A donepezila **15** demonstrou em estudos que tem a capacidade de retardar levemente a progressão do comprometimento leve da cognição e podem inibir a progressão da doença em pacientes que apresentam a apolipoproteína E4 (BARNES; YAFFE, 2005), fator genético comum de risco para a DA. Os efeitos colaterais mais relatados são náuseas, tonturas, êmese, cansaço, dores musculares e perda de apetite e peso (STANCIU; LUCA; RUSU; BILD *et al.*, 2019). E é o único fármaco inibidor de acetilcolinesterase aprovado para o tratamento dos sintomas severos da DA tardia associada (ELLUL; ARCHER; FOY; POPPE *et al.*, 2007).

No início dos anos 2000 foram aprovadas a rivastigmina **14**, e a galantamina **13** no ano de 2001 (ANAND; SINGH, 2013). O Exelon<sup>®</sup>, nome comercial da rivastigmina **14**, é um inibidor não seletivo da AChE, isso porque esse medicamento também tem ação inibitória em BChE (NGUYEN; HOFFMAN; CHAKKAMPARAMBIL; GROSSBERG, 2020). E os efeitos colaterais mais relatados são náuseas, êmese, fraqueza muscular, tontura, sonolência, diarréia (ELLUL; ARCHER; FOY; POPPE *et al.*, 2007; HANSEN; GARTLEHNER; WEBB; MORGAN *et al.*, 2008). A atividade inibitória da rivastigmina **14** *in vitro*, apresentou resultados de cem a mil vezes menos potentes que a fisioestigmina ou tacrina **12**, porém, *in vivo* o resultado foi de apenas dez vezes menos potente (ENZ; BODDEKE; GRAY; SPIEGÉL, 1991).

Esse fármaco é descrito como um ligante pseudo-irreversível das colinesterases, e realiza ligações similares a ACh sendo hidrolisado no sítio ativo liberando um substrato fenólico resultando na carbamilação do sítio A da enzima (Figura 9). A característica irreversível se dá devido ao fato da porção carbamila manter a enzima inativa por quase dez horas, diferente do substrato natural que a regeneração da ação da enzima se dá em alguns milissegundos (ENZ; BODDEKE; GRAY; SPIEGÉL, 1991; POLINSKY, 1998).

Figura 9 – Esquema da hidrólise da Rivastigmina no sítio ativo da AChE e liberação do ácido metil etil carbâmico, adaptado de Polinsky.



Fonte: o autor, adaptado de Polinsky (1998)

O FDA, em 2007, aprovou uma alternativa à cápsula oral do Exelon<sup>®</sup>, o sistema de liberação transdérmica da rivastigmina **14**, o adesivo Exelon<sup>®</sup>Patch (NGUYEN; HOFFMAN; CHAKKAMPARAMBIL; GROSSBERG, 2020). Seis anos antes, o Razadyne<sup>®</sup>, nome comercial da galantamina **13**, foi aprovado. Além de inibidor seletivo, se ligando apenas na AChE; competitivo que compete o ligante com a acetilcolina; e reversível da AChE, pois após alguns milissegundos a enzima está ativa novamente. impedindo a hidrólise da ACh, também modula os receptores nicotínicos  $\alpha 4\beta 2$  e  $\alpha 4\beta 7$  permitindo uma melhora na ação de outros neurotransmissores além da ACh (NAGUY; HUSAIN; ALAMIRI, 2022; RAZAY; WILCOCK, 2008). Os efeitos colaterais mais comuns da galantamina **13** são náuseas, diarreia, cansaço, dor de cabeça, tontura e perda de peso (ELLUL; ARCHER; FOY; POPPE *et al.*, 2007; HANSEN; GARTLEHNER; WEBB; MORGAN *et al.*, 2008).

Conclui-se que os inibidores da AChE têm sido aplicados na terapia da DA tardia, promovendo o aumento dos níveis de ACh e melhora da função colinérgica. Porém, a quantidade de efeitos adversos relatada pelos pacientes somada a dificuldade de tratamento dos sintomas mais severos da DA, dificultam o tratamento da doença (ELLUL; ARCHER; FOY; POPPE *et al.*, 2007).

A segurança é um dos pilares do tratamento medicamentoso, e no tratamento da DA não é diferente. Os inibidores da AChE, apesar de apresentarem boa tolerância, apresentam muitos relatos de efeitos adversos. Um estudo de revisão sistemática utilizando a meta-análise, relatou que 76% de todos os pacientes em tratamento com algum inibidor de acetilcolinesterase relataram a ocorrência de pelo menos um efeito adverso, onde os mais citados foram náusea, êmese, diarreia e perda de peso (HANSEN; GARTLEHNER; WEBB; MORGAN *et al.*, 2008).

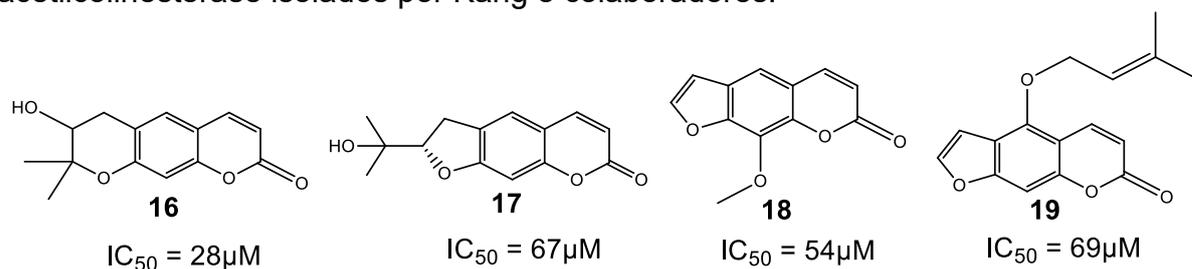
Outro pilar é a eficácia, e os inibidores colinesterásicos são indicados nas fases iniciais da DA, sendo os sintomas mais severos de difícil tratamento. E nessa linha, inúmeros estudos vêm sendo realizados a fim de desenvolver um composto inédito e com baixa toxicidade (VECCHIO; SORRENTINO; PAOLETTI; MARRA *et al.*, 2021).

#### **3.2.4 A inspiração molecular: novos derivados de interesse com a capacidade de inibir a acetilcolinesterase.**

Novas terapias medicamentosas surgem de novas moléculas oriundas de síntese orgânica ou semissíntese ou isoladas de seres vivos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Com os inibidores da enzima AChE não seria diferente, no período entre o fim dos anos 90 e início dos anos 2000, ocorreu um aumento significativo no número de pesquisas que buscaram moléculas com atividade de inibição das colinesterases. Não por coincidência, os medicamentos terem sido autorizados nesse intervalo de tempo (ANAND; SINGH, 2013; VECCHIO; SORRENTINO; PAOLETTI; MARRA *et al.*, 2021).

No início dos anos 2000, estudos na Coreia do Sul descreveram o isolamento, identificaram compostos cumarínicos da planta *Angelica gigas* e posteriormente avaliaram a atividade inibitória frente a enzima AChE (KANG; LEE; SUNG; PARK *et al.*, 2001). A partir do extrato metanólico da planta, os autores isolaram doze cumarinas e avaliaram a atividade anti-AChE *in vitro* através do método colorimétrico de Ellman (ELLMAN; COURTNEY; ANDRES JR; FEATHERSTONE, 1961) com valores de IC<sub>50</sub> variando entre 29mM e 28µM. Os compostos mais potentes inibidores da AChE foram o decursinol (**16**), uma dihidropiranocumarina e três furanocumarinas (**17**, **18**, **19**) mencionados na Figura 10.

Figura 10 – Derivados cumarínicos de *Angelica gigas* com atividade anti-acetilcolinesterase isolados por Kang e colaboradores.

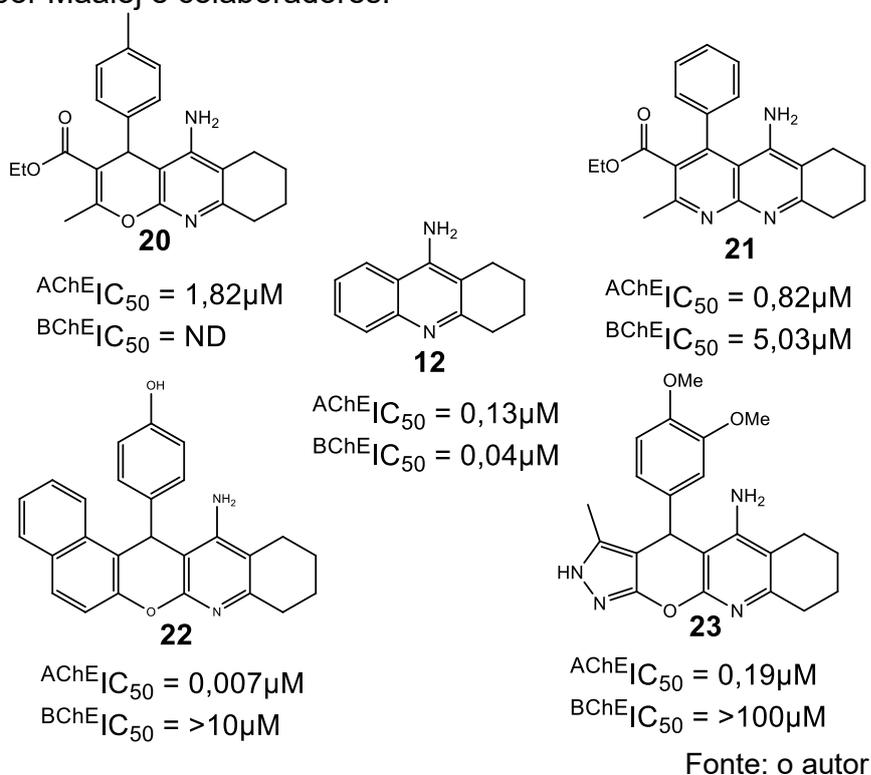


Fonte: o autor

O estudo permitiu observar que o anel furano diminuiu a atividade inibitória comparado ao anel di-idropirano. O composto 16 possui uma hidroxila livre na posição 3', e o estudo concluiu que a presença dessa hidroxila desempenha papel importante na atividade de inibição da piranocumarina. Por fim, as cumarinas simples, possuindo apenas um sistema de dois anéis na molécula inteira, apresentaram uma diminuição na atividade em questão, mais de mil vezes menor (KANG; LEE; SUNG; PARK *et al.*, 2001).

O estudo de Marco e colaboradores, abordou uma estratégia de síntese para obter derivados análogos a tacrina e avaliou a capacidade de inibição da AChE e BChE *in vitro* utilizando também o método colorimétrico de Ellman (MARCO; DE LOS RÍOS; CARREIRAS; BAÑOS *et al.*, 2001). Os dois análogos da tacrina mais ativos foram o derivado 20 e 21, dois inibidores antagonistas não competitivos. O mais ativo foi de seis à sete vezes menos potente que a tacrina ( $^{AChE}IC_{50} = 0,13\mu M$  e  $^{BChE}IC_{50} = 0,04\mu M$ ) e o estudo observou também que o composto **20** foi altamente seletivo para AChE, diferente da tacrina e do derivado **21**. Estes derivados demonstraram a capacidade de serem mais eficientes em bloquear os canais de  $Ca^{+}$  (voltage-dependente com 50% de inibição) em células bovinas (MARCO; DE LOS RÍOS; CARREIRAS; BAÑOS *et al.*, 2002).

Figura 11 – Derivados análogos a tacrina com atividade anti-acetilcolinesterase e antibutirilcolinesterase sintetizados por Marco e colaboradores, e análogo 22 sintetizado por Maalej e colaboradores.



Uma década depois, Maalej e colaboradores se inspirando no composto 20 sintetizaram vinte e oito derivados e avaliaram a atividade inibitória das enzimas *EeAChE* de *Electrophorus electricus* e *EqBChE* do soro de equinos, seguindo o protocolo de Ellman. O composto 22, presente na Figura 11, foi o mais ativo e seletivo com valor de  $\text{IC}_{50}$  de 7nm (MAALEJ; CHABCHOUB; SAMADI; DE LOS RÍOS *et al.*, 2011).

O estudo de estrutura atividade descreveu que a presença de um eletrodoador no grupo aril substituído, apresentou os mais potentes inibidores da AChE. Quando os substituintes foram metoxilados independentemente da posição e do número presente no anel, não houve aumento ou diminuição da atividade. E a substituição por um anel de 5 membros ligado ao anel piridina diminuir em quatro vezes a atividade quando comparado a uma molécula com um hexano na mesma posição (MAALEJ; CHABCHOUB; SAMADI; DE LOS RÍOS *et al.*, 2011).

O estudo de ancoragem molecular sugeriu que o derivado **22**, ambos os enantiômeros (R)- e (S)- possuem interações idênticas, apesar de apresentar uma leve preferência pela conformação (R)-. Foram avaliadas também o perfil neuroprotetor através do ensaio de viabilidade celular utilizando MTT (3-(4,5-

dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina) em células SH-SY5Y, reportando um valor abaixo dos 17%. E demonstrou que não é um agonista de canais de  $Ca^{2+}$  aplicando o teste com populações celulares bovinas (MAALEJ; CHABCHOUB; SAMADI; DE LOS RÍOS *et al.*, 2011).

Ao longo dos anos modificações foram sugeridas a partir dos análogos da tacrina, então, no ano de 2015, Khoobi e colaboradores avaliaram *in vitro* o potencial de inibição de derivados pirano-pirazóis análogos da tacrina frente enzimas colinesterases *EeAChE* e *EqBCh* (KHOOBI; GHANONI; NADRI; MORADI *et al.*, 2015). O estudo apresentou o composto **23** como uma molécula antagonista seletiva da AChE em potencial, esse composto apresentou, no ensaio *in vitro*, uma atividade inibitória maior que a tacrina. O estudo de relação estrutura-atividade demonstrou que substituições metoxi na posição 2 e 6 do grupo aromático substituído, diminui a atividade drasticamente.

Corroborando com os estudos de ancoragem molecular de Maalej e colaboradores (MAALEJ; CHABCHOUB; SAMADI; DE LOS RÍOS *et al.*, 2011), ambas as conformações promoveram boas interações com o sitio de reconhecimento através de interações  $\pi$ - $\pi$  Tyr334. Durante a conformação da molécula, o grupo dimetoxifenil realiza interações  $\pi$ - $\pi$  Phe330 e ligações de hidrogênio His440 se acomodando assim na porção catalítica aniônica, do sitio A da enzima (KHOOBI; GHANONI; NADRI; MORADI *et al.*, 2015).

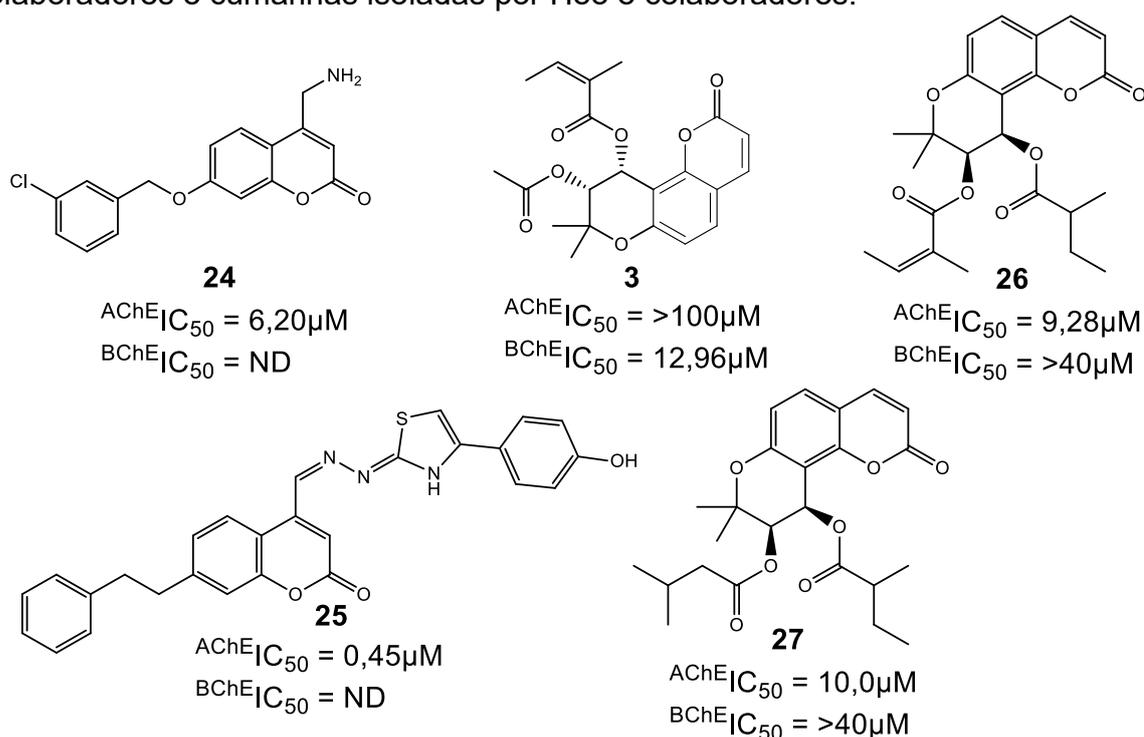
Assim como continuaram, ao longo destes anos, os estudos com os análogos da tacrina, com as cromonas não foi diferente. Ao decorrer dos últimos anos foram realizadas modificações sintéticas (RULLO; CATTO; CARRIERI; DE CANDIA *et al.*, 2019) e isolamento (ORHAN; SENOL; SHEKFEH; SKALICKA-WOZNIAK *et al.*, 2017) de novas moléculas que apresentaram resultados promissores inibindo as colinesterases.

Rullo e colaboradores propuseram modificações na molécula **24** (Figura 12), uma dihidrocurarina, na posição 7 e na posição 4, com o intuito de melhorar as atividades inibitórias das colinesterases e da monoamina oxidase B (MAO B) (RULLO; CATTO; CARRIERI; DE CANDIA *et al.*, 2019). O estudo anterior citado sugeriu vinte e sete diferentes modificações do composto líder, a molécula **24**, e posterior avaliação da atividade de inibição da *EeAChE* e *EqBChE*.

Os autores descreveram sobre a modificação na porção cauda, identificando que a substituição meta quando halogenada, a atividade inibitória *in vitro* foi maior. Os

mesmos citaram ainda, que a adição do grupamento propargila na “cabeça” da dihidrocumarina aumentou a atividade e a seletividade da molécula quanto a AChE (RULLO; CATTO; CARRIERI; DE CANDIA *et al.*, 2019). Os estudos com as modificações seguem e no anos de 2021, Amin e colaboradores obtiveram bons resultados, chegando ao composto **25** (Figura 12) (AMIN; RAHMAN; ALLAM; EL-ZOHEIRY, 2021). Além da estratégia de modificações através da síntese orgânica, o isolamento de compostos naturais também continua a trazer compostos com atividade de inibição da AChE e BChE (ORHAN; SENOL; SHEKFEH; SKALICKA-WOZNIAK *et al.*, 2017).

Figura 12 – Derivados análogos a cumarina com atividade anti-acetilcolinesterase e anti-butirilcolinesterase: composto sintetizados por Amin e colaboradores; composto líder para o estudo de Rullo e colaboradores; Pterixina isolada por Orhan e colaboradores e cumarinas isoladas por Heo e colaboradores.



Fonte: o autor

A pterixina **3** é um derivado da dihidropiranocumarina que Orhan e colaboradores isolaram da *Mutellina purpurea*, e avaliaram o potencial de inibição da *EeAChE* e da *EqBChE* in vitro seguindo o protocolo de Ellman (ORHAN; SENOL; SHEKFEH; SKALICKA-WOZNIAK *et al.*, 2017). O composto **3** inibiu a BChE com valores de  $\text{IC}_{50}$  de  $12,96\mu\text{M}$ , a referência utilizada foi a galantamina que alcançou valores  $\text{IC}_{50}$  de inibição da BChE  $22,16\mu\text{M}$ .

Na Ásia encontramos a *Peucedanum japonicum* Thunberg, e Heo e os demais autores, em 2020, isolaram a pterixina do estrato etanólico das raízes da planta. Além da pterixina, foram isolados mais catorze cumarinas e todos os quinze compostos foram avaliados *in vitro* quanto a capacidade de inibição das colinesterases (*EeAChE* e *EqBChE*) e da enzima MAO (HEO; EOM; RYU; KANG *et al.*, 2020).

Os compostos **26** e **27** (Figura 12) foram os que obtiveram os melhores valores de inibição da enzima AChE, com valores de IC<sub>50</sub> iguais a 9,28 µM e 10,0 µM respectivamente. Por meio do método de diálise, o estudo indicou que são inibidores reversíveis da AChE. A cumarina, composto **26**, mostrou interações entre o grupamento da hidroxila fenólica com a Tyr 121 com ligações de hidrogênio, interação ausente no composto **27** (HEO; EOM; RYU; KANG *et al.*, 2020). O estudo então, classificou o composto **26** como uma molécula promissora, não tóxica, capaz de inibir reversivelmente a enzima AChE.

Estes estudos serviram de inspiração para o presente trabalho, e a estratégia de escolha para a obtenção de novos compostos e de compostos que não possuem dados em literatura quanto a seu potencial de inibição da enzima AChE foi realizada através da síntese orgânica.

### 3.3 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

#### 3.3.1 Delineando uma reação amiga do meio ambiente: As Leis da Química Verde

Nos dias de hoje, nas empresas e instituições, a política ESG (do inglês- Environmental, Social e Governance), que nada mais é que meio ambiente, social e governança está instaurada. A preocupação com o meio ambiente se dá no momento em que a humanidade começa a sofrer com mudanças antropométricas influenciando na natureza. Pensando em um laboratório de síntese orgânica e isolamento de compostos de interesse, a gestão dos resíduos tóxicos e biológicos envolvidos nos processos, é parte essencial do processo e um grande desafio (ABDUSSALAM-MOHAMMED; ALI; ERRAYES, 2020).

Apesar da realidade brasileira ser diferente, pois as políticas públicas nacionais para a preservação do meio ambiente, nos últimos 3 anos, vêm sendo

deixadas de lado (ARAÚJO, 2020; MENEZES; BARBOSA JR, 2021) no mundo um dos assuntos que mais preocupam os governantes ao redor do planeta é a questão ambiental.

Em 1998, Dr. Paul Anastas e Dr. John Warner, introduziram ao mundo da química um guia para o delineamento de novos compostos e de novos processos químicos, levando em consideração todos os aspectos do ciclo do processo em questão desde a toxicidade dos produtos, segurança, biodegradabilidade e reagentes utilizados. Os Doze Princípios da Química Verde foram então descritos (ANASTAS; EGHBALI, 2010) e em 2005 foi estabelecido um acrônimo, mais fácil de memorizar, o PRODUCTIVELY foi publicado (TANG; SMITH; POLIAKOFF, 2005).

O primeiro princípio fala sobre a geração de resíduos “é melhor prevenir a formação de resíduo do que os neutralizar após a formação”. O segundo é se refere ao aproveitamento dos reagentes utilizados, partindo do princípio de reação perfeita é aquela que incorpora todos os átomos dos reagentes. O terceiro se refere mais diretamente a síntese, as estratégias de cicloadições, rearranjos ou reações multicomponentes são classificadas como reações eficientes (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

O quarto trata sobre desenhar e planejar as moléculas, sobre a importância de compreender os impactos que causam as moléculas envolvidas no desenvolvimento de novas substâncias. O fato de se ter esse conhecimento permite projetar moléculas mais seguras para o meio ambiente. O quinto fala sobre os solventes, essa categoria é uma das maiores geradoras de resíduos na química em geral. A água, acetona, metano, dióxido de carbono, metanol ou etanol são os solventes que menos contribuem para a poluição. O sexto leva em consideração a energia reacional, uma vez que toda a energia desperdiçada é geração de resíduo (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

O sétimo aborda os materiais, se são reutilizáveis ou recicláveis, e a oitava fala da derivatização, técnica muito aplicada no setor industrial. O nono é a parte da catálise, este processo melhora a eficiência da reação diminuindo a aplicação de energia necessária para a reação acontecer. Por fim vem a biodegradação em décimo, as análises e os testes realizados, que devem obedecer às regras de solventes, materiais e outros aspectos que se enquadrem dentro da química verde, o décimo primeiro. E o último princípio, trata sobre a prevenção de acidentes (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

### 3.3.2 Delineando uma reação amiga do meio ambiente: Planejando reações multicomponentes para a obtenção dos derivados piranos.

A reação de multicomponentes é uma estratégia de obter compostos inéditos que vem sendo amplamente aplicada na área de descoberta de novos tratamentos as mais variadas doenças (LAM; TIMMERMAN, 2018). É uma estratégia citada nos princípios da química verde (ANASTAS; EGHBALI, 2010) e foi utilizada desde os primeiros planejamentos da rotas de síntese do autor para obtenção das substâncias de interesse.

Por definição, a reação multicomponente são reações de um passo envolvendo três ou mais reagentes, onde a maioria dos átomos de partida são incorporados na molécula final (UGI; DÖMLING; HÖRL, 1994). Logicamente, são reações que se enquadram também na segunda lei da química verde, uma vez que a grande maioria dos átomos são incorporados no produto reacional. A eficiência da reação é outro ponto importante, uma vez que o produto é formado em uma etapa apenas diminuindo o número de processos de tratamento da síntese de compostos (DOMLING; WANG; WANG, 2012).

As primeiras moléculas formadas na reação multicomponente comumente tem a função de “peças” ou “encaixes” para a posterior formação do esqueleto cíclico ou acíclico, e o esqueleto sofre então transformações secundárias com o objetivo de formar o produto reacional (DOMLING; WANG; WANG, 2012). Embasados na estratégia de reação em dominó que deu origem a uma variedade de esqueletos ativos biologicamente, as reações multicomponentes são, hoje, utilizadas na química medicinal para a descoberta de novas drogas (TIETZE; RACKELMANN, 2004; UGI; DÖMLING; HÖRL, 1994).

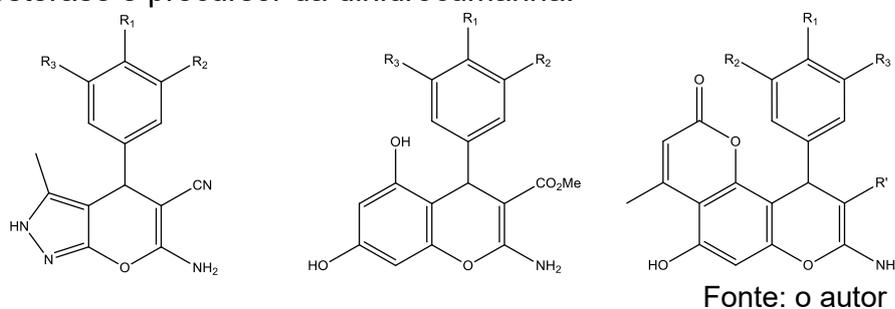
Como relatado anteriormente, entre as etapas na estratégia multicomponente ocorre a formação de um produto intermediário para reagir com outro componente da reação. Buscou-se aplicar também a utilização racional dos reagentes, mirando uma reação que aproveite o maior número de átomos para a formação do produto reacional. É de se esperar que se avalie muito criteriosamente os solventes utilizados nas reações e diminuir ao máximo a necessidade de processos de separação e filtração, com a intenção de diminuir o volume de solventes produzidos.

No planejamento de uma reação que respeite Leis da Química Verde, a estratégia reacional planejada para este estudo foi a de multicomponentes utilizando

reagentes aceto acetato de etila, malononitrila e  $\alpha$ -ciano acetato com aldeídos aromáticos; em meio básico formado por uma mistura dos solventes água e metanol (NAGARAJAN; REDDY, 2009). Essa técnica prevê a formação de produtos intermediários, um condensado de Knoevenagel como um dos passos, assim como a estratégia reacional de multicomponentes aplicada anteriormente, com sucesso, para a produção de cumarinas angulares e 4*H*-cromenos (MARTIN; MBAVENG; DE MORAES; KUETE *et al.*, 2018) utilizados nesse estudo.

Buscou-se na literatura referências que proporcionaram a capacidade de obter-se novas moléculas, relativamente pouco complexas, de forma ágil e que atenuem a produção de resíduos. Inspirado nos estudos apresentados no item 3.2.4, buscou-se além da síntese de moléculas potencialmente ativas, avaliar o potencial de inibição da enzima AChE de compostos da biblioteca de compostos sintetizados anteriormente pelo autor. Estes compostos previamente sintetizados foram relatados pela primeira vez pelo autor, e o estudo avaliou a citotoxicidade *in vitro*, em células de leucemia resistentes e não (MARTIN; MBAVENG; DE MORAES; KUETE *et al.*, 2018).

Figura 13 – Esqueletos de interesse no estudo com potencial atividade anti-acetilcolinesterase e precursor da dihidrocumarina.



Através do domínio da técnica reacional e da expertise adquirida pelo autor foram então planejados e/ou sintetizados os compostos pirano-pirazóis e novos derivados 4*H*-cromenos (Figura 13).

## 4 METODOLOGIA

Nesta seção estão descritas as metodologias aplicadas para a obtenção de análogos pirano-pirazóis com substituintes aromáticos e um substituinte furano, e os novos derivados cromenos. Além disso, estão descritos os métodos e equipamentos utilizados para caracterização dos compostos, e ensaios biológicos, assim como os reagentes e solventes utilizados em todos os procedimentos descritos.

### 4.1 SEÇÃO EXPERIMENTAL QUÍMICA

#### 4.1.1 Materiais e Equipamentos

Os equipamentos e vidrarias utilizadas estão vinculados aos laboratórios da Central Analítica, Central Cromatográfica, de Química Farmacêutica e de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Ciências Farmacêuticas, dispostos no Centro de Ciências da Saúde da UFSC.

Para a realização das sínteses irradiadas por micro-ondas foi utilizado o sintetizador micro-ondas da marca Biotage<sup>®</sup> modelo Initiator+ 2,45GHz (0-400W). O equipamento tem faixa de temperatura variável entre 40-300 °C e os tubos de reação utilizados foram os de 10mL.

Os reagentes utilizados neste estudo foram todos adquiridos da Sigma Aldrich<sup>®</sup>, bem como os aldeídos, os cetoésteres, o cianoacetato de metila, a malononitrila, o floroglucinol. Assim como a hidrazina, a guanidina, a uréia e a tiouréia. O carbonato de potássio ( $K_2CO_3$ ), outro catalisador reacional, foi adquirido da empresa Spectrum<sup>®</sup>. Os solventes utilizados foram adquiridos das empresas Vetec<sup>®</sup>, Química Moderna<sup>®</sup> e NEON<sup>®</sup>.

O leitor de microplacas Synergy 2 Multi-Mode Reader (Biotek) foi utilizado para a realização do ensaio de inibição da acetilcolinesterase. Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich<sup>®</sup>. As soluções tampões preparadas foram: tampão A – solução de Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> pH = 8.0; Tampão B – solução de Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> pH = 8.0 acrescido de 0,1 % de soro albumina bovina; Tampão C – solução de Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> pH = 8.0 acrescido de NaCl 0.1 mol L<sup>-1</sup> e MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.02 mol L<sup>-1</sup>. Foram utilizados também, soluções de iodeto de acetiltiocolina, reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico-DTNB) e a

enzima acetilcolinesterase liofilizada (*EeAChE*) (Tipo VI-S obtida de *Electroparus electricus*).

#### 4.1.2 Caracterização estrutural dos compostos

Os produtos reacionais, que ao serem avaliados por CCD apresentaram uma mancha distinta às manchas dos produtos de partida, foram posteriormente purificados por meio de filtração com solvente orgânicos e água. Em seguida, foram submetidas a análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR), para a elucidação estrutural e caracterização das substâncias.

##### 4.1.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e os bidimensionais (HSQC e HMBC) foram adquiridos no espectrômetro Bruker® modelo Fourier® 300 (300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Os solventes utilizados para solubilizar as amostras para análises foram a acetona deuterada (acetona- $\text{d}_6$ ), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $\text{d}_6$ ) e água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), todos com tetrametilsilano (TMS) para calibração, utilizado como referência interna.

Os dados adquiridos (FID) foram processados em software TopSpin 4.0.9 (Bruker®). Os deslocamentos químicos foram reportados em partes por milhão (ppm), em relação ao TMS, da frequência aplicada e as constantes de acoplamento (J) medidas em Hertz (Hz), e todos resultados foram comparados com dados disponíveis na literatura.

##### 4.1.2.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EM)

Para a caracterização utilizando a espectrometria de massa, dos dados de LC/MS-MS, foram obtidos utilizando um sistema cromatográfico com espectrômetro de massa de alta resolução acoplado, Xevo® G2-XS QTOF (Quadrupolo - Time Of Fly) (Waters®).

A fonte de ionização utilizada foi o eletrospray (YEUNG; AZIZ; GUERRERO-CASTILLA; ARGUELLES), no modo positivo com força de colisão de 3.0kV, e

posteriormente os dados foram salvos e processados utilizando o software MassLynx v4.1(Waters®).

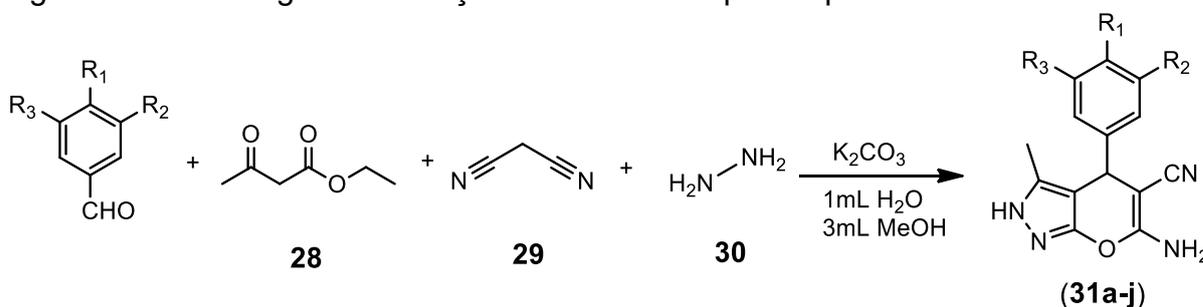
Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC, e antes de sua utilização, filtrados por membrana (0,22 µm) e degaseificados em banho de ultrassom durante 15 minutos, sob pressão reduzida. As amostras dos produtos de reação foram preparadas utilizando acetonitrila ou metanol, ambos grau HPLC e filtradas por membrana Millipore® (poro de 0,22 µm).

#### 4.1.3 Procedimentos experimentais para produção dos derivados pirano-pirazóis e cromenos

##### 4.1.3.1 Procedimento Geral para a Síntese dos Derivados pirano-pirazóis (**31a-31j**)

O procedimento experimental adotado para a série de derivados análogos pirano-pirazóis está exemplificado na Figura 14.

Figura 14 – Estratégia de obtenção dos derivados pirano-pirazóis.

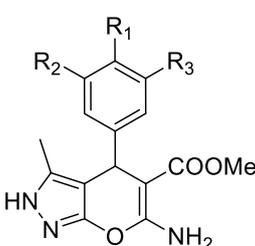
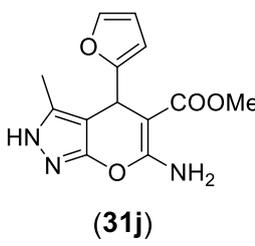


Fonte: o autor, baseado na reação de Nagarajan & Reddy de 2009

Para a síntese dos compostos derivados pirano-pirazóis (**31a-31j**), foi utilizado um sistema adaptado da estratégia de reação de multicomponentes dos autores Nagarajan & Reddy de 2009 (NAGARAJAN; REDDY, 2009). Em um balão de fundo redondo, foram adicionados quatro componentes na mesma mistura reacional: um aldeído aromático (1.0 mmol), acetoacetato de etila (**28**) (1.0 mmol), malononitrila (**29**) (1.0 mmol), e hidrazina (**30**) (1.0 mmol) solubilizados em 1 mL etanol e 4 mL de água. Os reagentes foram adicionados sequencialmente sob agitação vigorosa com a presença de um catalisador básico o  $K_2CO_3$  e a reação foi mantida sob constante agitação durante 8-12 horas, obtendo rendimentos entre 9,7%-47,2%.

A reação foi controlada pelo consumo do produto intermediário, um condensado de Knoevenagel, através de CCD. A fase móvel utilizada no sistema foi uma solução acetato de etila (AcOEt): hexano (Hex): metanol (MeOH) (1:1:0,1, v/v). Após o consumo total do reagente e a confirmação da formação do produto reacional, o precipitado sólido foi filtrado e lavado com água e uma mistura de acetato de etila e hexano (EtOAc:Hex, 1:4, v/v). Após a filtração, os produtos das reações (Figura 15) foram recristalizados com uma mistura etanol/água.

Figura 15 – Compostos pirano-pirazóis sintetizados empregando a estratégia planejada.

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
	(31a)	H	H	H
	(31b)	Cl	H	H
	(31c)	H	Cl	H
	(31d)	NO <sub>2</sub>	H	H
	(31e)	H	F	H
	(31f)	Br	H	H
	(31g)	OH	OMe	H
	(31h)	OH	OMe	OMe
	(31i)	OMe	OMe	OMe
				(31j)

Fonte: o autor

#### 4.1.3.2 Caracterização, Rendimentos e Atribuições de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C dos Derivados pirano-pirazóis

##### 6-amino-4-fenil-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila

**(31a):** P.M.: 252,1011 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó, branco opaco com pureza de 100% e rendimento de 41,5% (0,1046 g). <sup>1</sup>H RMN (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.11 (s, 1H), 7.24 (m, 5H), 6.58 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.58 (s, 1H), 1.77 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 161.3, 155.2, 144.8, 136.1, 128.9 (2C), 127.9 (2C), 127.2, 121.2, 98.1, 57.6, 36.6, 10.1. O valor teórico calculado para C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O (M+H) foi de 253.1089 m/z, e o HRMS apresentou um pico de valor de m/z de 253.1095.

##### 6-amino-4-(4-clorofenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31b):

P.M.: 286,0621 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó branco levemente amarelado com pureza de 100% e rendimento de 12,3% (0,0353 g). <sup>1</sup>H RMN

(300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.13 (s, 1H), 6.91 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.37 (d, J=8,1Hz, 2H), 7.19 (d, J=8.1Hz, 2H), 4.63 (s, 1H), 1.79 (s, 3H) <sup>13</sup>C RMN (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 161.3, 155.1, 143.9, 136.1, 131.6, 129.8 (2), 128.9 (2), 121.1, 97.6, 57.2, 36.0, 10.2. O valor teórico calculado para C<sub>14</sub>H<sub>12</sub><sup>35</sup>CIN<sub>4</sub>O (M+H) foi de m/z 287.0700 e o HRMS apresentou dois picos, com o primeiro pico com valor de relação massa carga (m/z) de 287.0703.

**6-amino-4-(3-clorofenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-**

**carbonitrila (31c):** P.M.: 286,0621 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó, branco com pureza de 100% e rendimento de 14,0% (0,0401 g). <sup>1</sup>H RMN (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.17 (s, 1H), 7.38-7.29 (m, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.14 (d, J = 7.3Hz, 1H), 6.96 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.66 (s, 1H), 1.81 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 161.5, 155.1, 147.5, 136.2, 133.5, 130.9, 127.6, 127.3, 126.7, 121.08, 97.4, 57.0, 36.2, 10.2. O valor teórico calculado para C<sub>14</sub>H<sub>12</sub><sup>35</sup>CIN<sub>4</sub>O (M+H) foi de m/z 287.0700, e o HRMS apresentou um pico de valor de 287.0699 m/z.

**6-amino-4-(4-nitrofenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-**

**carbonitrila (31d):** P.M.: 297,0862 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó, branco opaco com pureza de 100% e rendimento de 18,8% (0,0561 g). <sup>1</sup>H RMN (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.21 (s, 1H), 8.21 (d, J=7,8Hz, 2H), 7.47 (d, J=7,8Hz, 2H), 7.05 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.84 (s, 1H), 1.81 (s, 3H) <sup>13</sup>C RMN (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 161.6, 155.1, 146.9, 136.3, 129.3 (2), 124.4 (2), 97.0, 56.3, 36.4, 10.2. O valor teórico calculado para C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (M+H) foi de m/z 298.0940, e o espectro HRMS apresentou um pico com uma relação massa carga (m/z) 298.0942.

**6-amino-4-(3-fluorfenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-**

**carbonitrila (31e):** P.M.: 270,0917 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó branco com pureza de 100% e rendimento de 12,5% (0,0338 g). <sup>1</sup>H RMN (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.14 (s, 1H), 7.37 (q, J=7,2Hz J=14,3, 1H), 7.03 (m, 3H), 6.93 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.66 (s, 1H), 1.81 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 161.4, 155.1, 147.9 (d), 136.1, 130.9, 124.0, 121.1, 114.7, 114.3 (d), 113.9, 97.5, 57.0, 36.3, 10.1. O valor teórico calculado para C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>FN<sub>4</sub>O (M+H) foi de m/z 271.0995, e o HRMS apresentou um pico de valor 271.0998 m/z.

**6-amino-4-(4-bromofenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31f):** P.M.: 330,0116 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó, branco opaco amarelado-esverdeado claríssimo com pureza de 100% e rendimento de 18,6% (0.0614 g). <sup>1</sup>H RMN (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.14 (s, 1H), 7.51 (d, J=8,1Hz, 2H), 7.14 (d, J=8,1Hz, 2H), 6.93 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.62 (s, 1H), 1.80 (s, 3H) <sup>13</sup>C RMN (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 161.3, 155.1, 144.3, 136.1, 133.2, 132.6, 132.5, 131.8(2), 130.6(2), 121.1, 120.2, 97.5, 57.1, 36.0, 10.2. O valor teórico calculado para C<sub>14</sub>H<sub>11</sub><sup>79</sup>BrN<sub>4</sub>O (M+H) foi de 331.0194 m/z, o HRMS apresentou um pico de valor de relação massa carga (m/z) de 331.0197.

**6-amino-4-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31g):** P.M.: 298,1066 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó, branco opaco com pureza de 100% e rendimento de 32,8% (0.0980 g). <sup>1</sup>H RMN (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.06 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 6.78 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.71 (s, 1H), 6.69 (d, J = 8.1Hz, 1H), 6.54 (d, J = 8.1Hz, 1H), 4.49 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 1.81 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 161.1, 155.1, 147.7, 145.6, 136.1, 135.8, 121.3, 120.2, 115.8, 112.0, 98.3, 58.0, 56.0, 36.2, 10.2. O valor teórico calculado para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (M+H) foi de 299.1144 m/z, e o HRMS apresentou um pico de valor de m/z de 299.1149.

**6-amino-4-(4-hidróxi-3,5-dimetóxfenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31h):** P.M.: 328,1172 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó, branco opaco claro com pureza de 99,99% e rendimento de 47,2% (0.1548 g). <sup>1</sup>H RMN (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.07 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 6.80 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.41 (s, 2H), 4.51 (s, 1H), 3.69 (s, 6H), 1.84 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 161.2, 155.1, 148.3 (2C), 136.2, 134.9, 134.7, 121.3, 105.3 (2C), 98.1, 57.8, 56.4 (2C), 36.7, 10.3. O valor teórico calculado para C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M+H) foi de 329.1250 m/z, e o HRMS apresentou um pico de valor de m/z de 329.1251.

**6-amino-4-(3,4,5-trimetóxfenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31i):** P.M.: 342,1328 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó, branco opaco com pureza de 100% e rendimento de 36,8% (0.1262 g). <sup>1</sup>H RMN (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.11 (s, 1H), 6.86 (s, 2H), 6.48 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.58 (s, 1H), 3.71 (s, 6H), 3.64 (s, 3H), 1.87 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 161.4, 155.1, 153.2 (2C),

140.5, 136.6, 136.2, 121.3, 105.0 (2C), 97.7, 60.4, 57.3, 56.2 (2C), 36.9, 10.3. O valor teórico calculado para  $C_{17}H_{19}N_4O_4$  (M+H) foi de m/z 343.1406, e o HRMS apresentou um pico de valor de 343.1406 m/z.

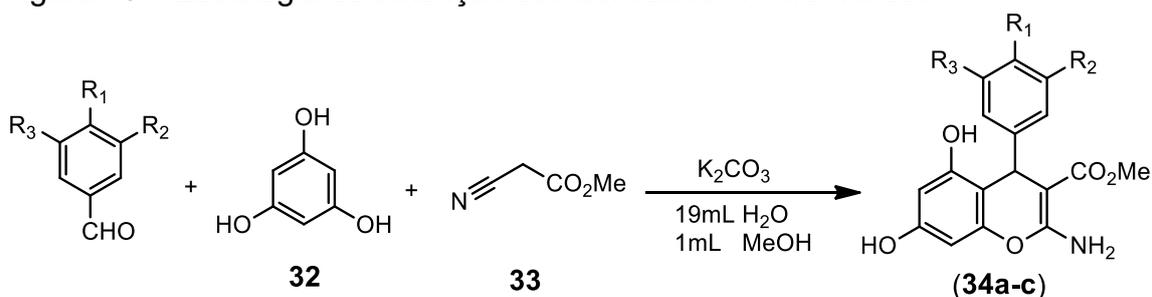
**6-amino-4-(furan-2-il)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31j):** P.M.: 242,0804 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó, branco salmão claríssimo opaco com pureza de 100% e rendimento de 44,2% (0.1070 g). <sup>1</sup>H RMN (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.16 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 6.95 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.37 (s, 1H), 6.18 (s, 1H), 4.78 (s, 1H), 1.98 (s, 3H) <sup>13</sup>C RMN (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 161.9, 156.1, 155.2, 142.7, 136.3, 121.0, 110.7, 106.1, 95.5, 54.4, 30.2, 10.0. O valor teórico calculado para  $C_{14}H_{11}N_4O_2$  (M+H) foi de m/z 243.0877, HRMS apresentou um pico de relação massa carga (m/z) 243.0883.

#### 4.1.3.3 Procedimento Geral para a Síntese dos Derivados Cromenos (34a-34c)

Para a obtenção dos novos derivados 4H-cromenos, o autor recorreu a uma estratégia já aplicada com sucesso em trabalhos anteriores (MARTIN; MBAVENG; DE MORAES; KUETE *et al.*, 2018): em um balão de fundo redondo foram adicionados 1,0mL de MeOH, onde o floroglucinol (1,0 mmol), 1,0 equivalente do alfa-cianoacetato de metila e 1,0 equivalente dos diferentes benzaldeídos foram solubilizados. Em sequência, foram adicionados 19 mL da solução básica de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A reação foi monitorada por CCD, como descrito no item 4.2.2.1. O produto reacional foi filtrado e lavado com água purificada (MASESANE; MIHIGO, 2015).

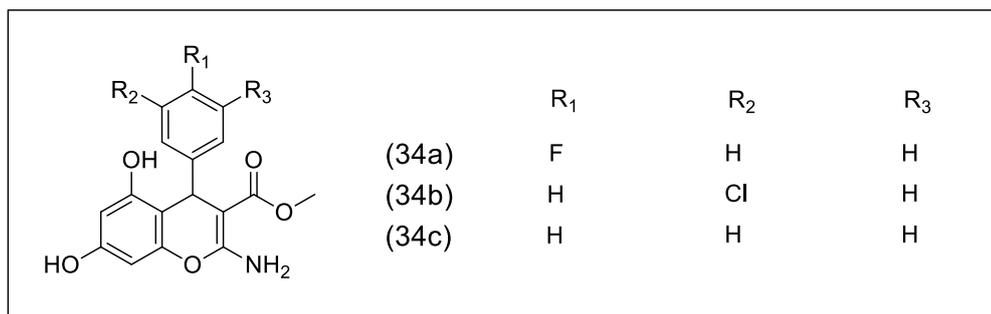
O procedimento experimental adotado para a série de derivados análogos cromenos está exemplificado na Figura 16 e Figura 17.

Figura 16 – Estratégia de obtenção dos derivados 4H-cromenos.



Fonte: o autor

Figura 17 – Compostos pirano-pirazóis sintetizados empregando a estratégia planejada.



Fonte: o autor

**Metil 2-amino-5,7-dihidróxi-4-(4-fluorfenil)-4H-cromeno-3-carboxilato**

**(34a):** P.M.: 331,0856 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó, branco opaco com pureza de 100% e rendimento de 13% (0.0433 g). <sup>1</sup>H RMN (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 9.67 (s, 1H, OH), 9.43 (s, 1H, OH), 7.55 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.25-7.19 (m, 1H), 6.96-6.85 (m, 3H) 6.05 (s, 1H), 5.97 (s, 1H), 4.88 (sl, 1H), 3.53 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 168.9, 162.1, 157.6, 155.5, 151.1 (d), 151.0, 130.1, 130.0, 123.6, 114.4 (d), 112.8 (d), 105.3, 99.1, 94.1, 77.4, 50.9, 34.1. O valor teórico calculado para C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>FNO<sub>5</sub> (M+H) foi de m/z 332.0934, HRMS apresentou um pico de relação massa carga (m/z) 332.0937.

**Metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(3-clorofenil)-4H-cromeno-3-carboxilato**

**(34b):** P.M.: 347,0561 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó, branco amarelado claríssimo opaco com pureza de 100% e rendimento de 17% (0.0599 g). <sup>1</sup>H RMN (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 9.68 (s, 1H, OH), 9.46 (s, 1H, OH), 7.56 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.22-7.10 (m, 4H), 6.05 (s, 1H), 5.97 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 3.54 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 168.9, 162.0, 157.7, 155.5, 150.9, 150.7, 132.7, 130.2, 127.5, 126.4, 125.9, 105.1, 99.1, 94.1, 77.3, 50.9, 34.2. O valor teórico calculado para C<sub>17</sub>H<sub>14</sub><sup>35</sup>ClNO<sub>5</sub> (M+H) foi de m/z 348.0639, HRMS apresentou um pico de relação massa carga (m/z) 348.0642. O valor teórico calculado para C<sub>17</sub>H<sub>14</sub><sup>37</sup>ClNO<sub>5</sub> (M+H) foi de m/z 350.0604, HRMS apresentou um pico de relação massa carga (m/z) 350.0618

**Metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-fenil-4H-cromeno-3-carboxilato (34c):** P.M.:

313,0950 g.mol<sup>-1</sup>. Sólido, em forma de pó, branco opaco com pureza de 100% e rendimento de 15% (0.0472 g). <sup>1</sup>H RMN (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 9.56 (s, 1H, OH), 9.37 (s, 1H, OH), 7.49 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.13 (m, 5H), 6.03 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 4.85

(s, 1H), 3.52 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 169.0, 162.0, 157.3, 155.4, 151.1, 148.2, 128.1 (2C), 127.7 (2C), 125.8, 106.0, 99.0, 94.0, 78.1, 50.8, 34.2. O valor teórico calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5$  (M+H) foi de m/z 314.1028, HRMS apresentou um pico de relação massa carga (m/z) 314.1034.

#### 4.1.4 Análises cromatográficas

##### 4.1.4.1 Monitoramento Cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada

A CCD foi utilizada para acompanhar e monitorar a evolução das reações e determinar o final da mesma. Foram utilizadas folhas cromatográficas de sílica gel 60 G da Merk® com indicador de fluorescência (F<sub>254</sub>) em suporte de alumínio (SiliCycle®). Após aplicação das manchas dos produtos de partida e do produto da reação, as manchas foram observadas sob luz visível e luz UV, nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 254nm (extinção) e 365nm (fluorescência), e posteriormente foram revelados com anisaldeído sulfúrico.

A fase móvel (NGUYEN; HOFFMAN; CHAKKAMPARAMBIL; GROSSBERG), composta por HEX:AcEtO:MeOH 1:1:0,1 (v/v), favoreceu a obtenção de um sistema cromatográfico que proporcionasse o melhor perfil para observação de mancha de diferente fator de retenção (Rf) que os produtos de partida utilizados.

Para o preparo da solução reveladora, foram utilizados o anisaldeído e o etanol (EtOH), o ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) e o ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). O revelador seguiu a seguinte ordem de reação: adicionar 85mL de EtOH, 10mL de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 5mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e mais 0,5mL de anisaldeído.

##### 4.1.4.2 Análise de Pureza por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE)

Para realizar os ensaios de pureza foi utilizado um sistema cromatógrafo líquido de ultra performance (CLUE) da Waters®, modelo Acquity® UPLC, com injetor automático e forno. O equipamento possui o detector de arranjo de fotodiodos (PDA) acoplado e hifenado ao detector de espalhamento de luz evaporativo.

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC, e antes de sua utilização, filtrados por membrana (0,22  $\mu\text{m}$ ) e desgaseificados em banho de ultrassom durante 15 minutos, sob pressão reduzida. As amostras dos produtos das reações foram

preparadas utilizando em acetonitrila grau HPLC e filtradas por membrana Millipore® (poro de 0,22 µm).

Para as análises empregou-se uma coluna Acquity® UPLC BEH C18 (2.1 x 50 mm i.d., 1,7 µm) (Waters®) com temperatura de forno de coluna à 40 °C (± 2 °C). A FM utilizada constituiu de gradiente combinando a solução aquosa acidificada com ácido fórmico (HCOOH) (99.9:0.1, v/v) (A) e acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN) (B). As condições do gradiente aplicadas foram as seguintes: 0-3 min, gradiente da proporção de A:B (90:10, v/v), 3.1-4.0 min, gradiente até proporção A:B (50:50, v/v); 4.1-4.5 min, gradiente até proporção A:B (2:98, v/v) permanece assim até 5min; 5.1-5.5 min, retorno do gradiente até proporção inicial de A:B (90:10, v/v) permanecendo assim até o minuto 8.0, totalizando assim 8 minutos de análise a um fluxo constante de 0,30 mL.min<sup>-1</sup>. O volume de injeção utilizado foi de 0.5 µL.

Todos cromatogramas foram adquiridos no comprimento de onda de 240 nm, e por fim os dados foram analisados e as áreas dos picos no cromatograma foram integradas em software MassLynx V4.1ks (Waters®). As áreas dos picos foram salvas e calculadas a porcentagem respectiva de cada pico, em relação à somatória total, obtendo-se assim o grau de pureza da substância (expressa em porcentagem). O primeiro pico do cromatograma foi desconsiderado por ser considerado impureza presente em todo ensaio, estando presente em todas as corridas.

#### **4.1.5 Avaliação da atividade biológica**

##### *4.1.5.1 Avaliação da Atividade Inibitória da Acetilcolinesterase*

A inibição da AChE dos derivados sintetizados foi mensurada baseando-se no método descrito por Ellman's (ELLMAN; COURTNEY; ANDRES JR; FEATHERSTONE, 1961). Sendo assim, este bioensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase foi realizado conforme método descrito a seguir.

Foram pipetados 35 µL de tampão B, 125 µL do reagente de Ellman em tampão C, 40 µL de AChE (0.226 U/mL) em tampão B seguido de 25 µL de cada amostra diluída em MeOH; adicionados todos em poços de placas de 96 poços.

Em seguida, foram realizadas as seguidas leituras a cada 30 segundos em 412 nm em leitor BioTek® Synergy™ 2 na temperatura de 28 °C. O próximo passo foi adicionar 25 µL iodeto de acetiltiocolina diluído em água ultra purificada em filtro Milli-

Q, iniciando assim a reação. Imediatamente o prato de 96 poços foi posto sob agitação e aquecimento a 28 °C e submetido a novas leituras, a 412 nm, a cada 60 minutos.

O controle positivo selecionado foi a fisiostigmina e o MeOH como controle negativo. Todas as amostras foram testadas em triplicata e a porcentagem de atividade inibitória contra a enzima AChE (%) foi estabelecida utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 1 - \left( \frac{V_{\text{amostra}}}{V_{\text{controle}}} \right) \times 100$$

Para as amostras que apresentaram valores superiores a 50% de inibição enzimática na concentração de 100 µM, determinou-se o IC<sub>50</sub>, a concentração efetiva para diminuir em 50% a inibição da enzima. Os valores foram apresentados em média ± desvio padrão das replicatas.

#### 4.1.5.2 *Estudo de ancoragem molecular*

Os compostos que exibiram uma forte inibição da AchE in vitro foram selecionados para o estudo computacional para obter uma proposta de orientação da ligação da proteína com o composto. Um complexo da AchE humana com a donepezila (PDB:4EY7) foi selecionado e o software Gold 2020.2.0 foi utilizado para preparar e executar os cálculos de ancoragem. A preparação constituiu em adicionar os átomos de H expostos, remover as moléculas de água e separar o ligante cristalográfico para validação e reacoplamento. O local de ligação foi definido pela posição do ligante cristalográfico e foi aplicado um raio aumentado de 8 Å. O ChemPLP foi utilizado como função de pontuação com a eficiência de busca do algoritmo genético (G.A.) a 200%. Durante a validação do reencaixe, a função de busca foi capaz de alcançar o valor RMSD = 0,2300 Å quando o ligante, a donepezila, foi extraído e RMSD = 0,6186 Å para a donepezila realocada com a otimização geométrica. Cada ligante foi projetado, desenhado, usando Avogadro (versão 1.2.0) para gerar as respectivas coordenadas cartesianas de ambos os enantiômeros (R) e (S) e as geometrias foram otimizadas ao mínimo, usando o método semi-empírico AM1 em Orca (versão 4.2.0) usando as palavras-chave: ! AM1 def2-SVP OPT FREQ. Os cálculos de frequência foram feitos a fim de garantir os mínimos calculados sem frequências imaginárias, que se correlacionariam com inconsistências na geometria

final calculada. As medidas e figuras apresentadas foram renderizadas utilizando PyMol open-source (versão 2.6.0a0) de utilização livre.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS PIRANOS, GRAU DE PUREZA E CARACTERIZAÇÃO

#### 5.1.1 Síntese dos derivados pirano-pirazóis (31a-31j)

A primeira proposta de mecanismo de formação desta série de derivados (Figura 18) é baseada em uma estratégia que envolve inicialmente a formação do intermediário pela condensação de Knoevenagel. O arilideno malononitrila (Figura 18 – II) se forma através do resultado da condensação entre a malononitrila com os benzaldeídos. Na condensação de Knoevenagel os aldeídos reagem com compostos que possuem ligação C-H ácida e se condensam, neste estudo foi utilizado a malononitrila, reagente onde o metileno é vizinho a um ou mais grupos, CN (KURTI; CZAKÓ, 2005).

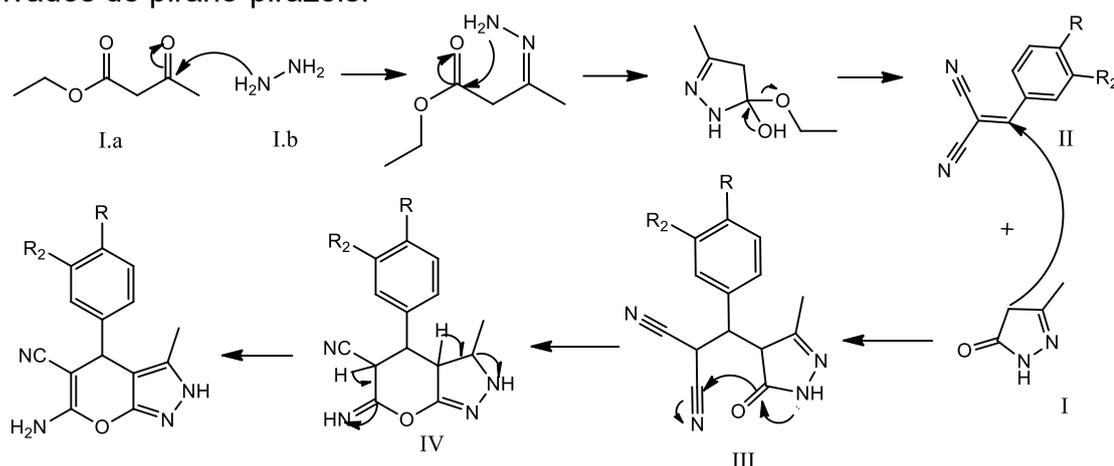
Logo, compostos  $\beta$ -cetoéster e  $\alpha$ -cianoésteres têm grupo  $\text{CH}_2$  cujo átomos de hidrogênio são ácidos (pKa 10-14). O  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , confere ao meio um caráter básico, isto favorece a desprotonação do metileno ativo; seguido da adição do ânion ao composto carbonílico, com uma eliminação de água a partir do intermediário aldólico. Por esta razão, essa é uma reação pertencente à classe geral das condensações aldólicas catalisadas por bases (KURTI; CZAKÓ, 2005; SMITH, 2020).

Posteriormente a formação da pirazolona, resultando da reação inicial da hidrazina com o acetoacetato de atila. Essa reação se dá através de um ataque do nucleófilo hidrazina. O subproduto em questão é um acceptor de Michael, devido a sua nitrila  $\alpha,\beta$ -insaturada anexa ao anel aromático, por consequência o próximo passo proposto é a ocorrência de uma adição de Michael. Após a formação do produto de reação da condensação, ocorre uma adição desse nucleófilo com a pirazolona (Figura 18 – I), mais especificamente na posição  $\beta$  da carbonila insaturada (KEERTHY; GARG; MOHAN; MADAN *et al.*, 2014; KURTI; CZAKÓ, 2005; MASESANE; MIHIGO, 2015).

Por final há uma ciclização através do ataque do carbonila do anel na imina (Figura 18 – I). Após o tautomerismo da forma enol menos estável para a forma ceto, mais estável, ocorre a ciclização através da captura do H no ponto da adição, favorecendo a formação do enol menos estável novamente e este elétron livre do (O)

interage com (C=N) ocorrendo assim a ciclização (KURTI; CZAKÓ, 2005). Sendo assim, essa é uma proposta de como os derivados dihidropirano[2,3-c]pirazóis foram obtidos para este estudo.

Figura 18 – Proposta de mecanismo simplificado de formação para a obtenção dos derivados de pirano-pirazóis.



Fonte: o autor

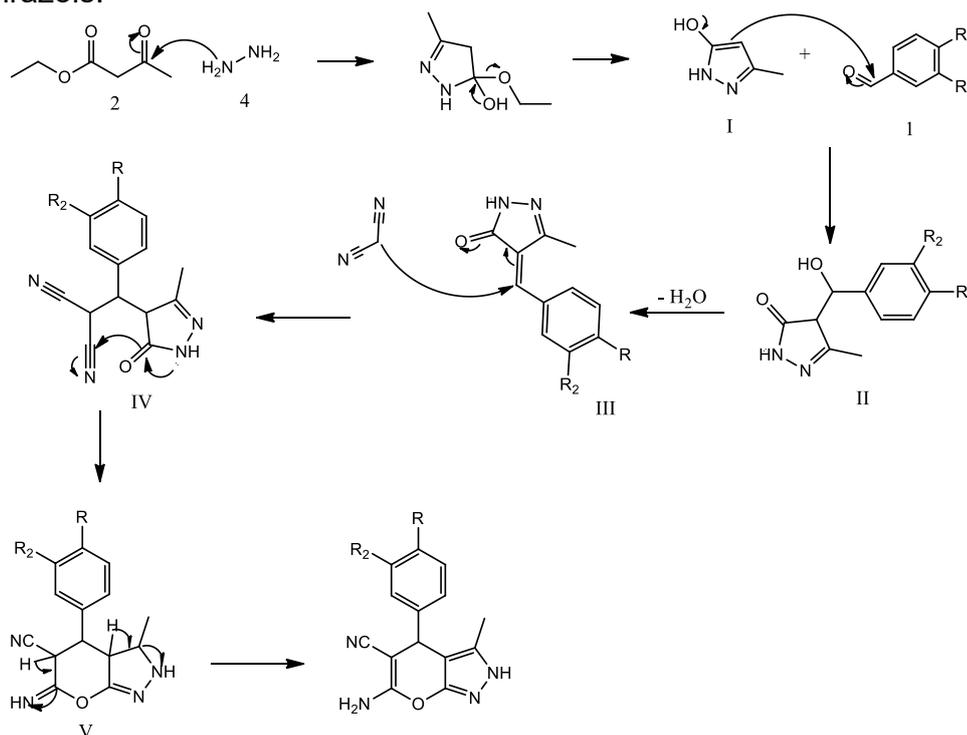
A segunda proposta de formação (Figura 19) dos di-hidropirano [2,3-c]pirazóis, baseia-se na formação da pirazolona resultando da reação inicial da hidrazina com o acetoacetato de etila, provavelmente o mais plausível. Seguido por uma condensação do benzaldeído com a posição beta da carbonila da pirazolona. Só então acontece a adição de Michael no carbânion da malononitrila, seguido por uma condensação intramolecular. Apoiado na proposta 1, ocorre por final o deslocamento do próton tautomérico, permitindo assim a obtenção do produto desejado (ZOU; WU; HU; LIU *et al.*, 2011).

O solvente utilizado, H<sub>2</sub>O:MeOH (1:3, v/v), favoreceu esta reação de multicomponentes em uma via, pois, o solvente selecionado, favorece a condensação. Estudos reportaram que a utilização de solventes próticos como etanol, metanol, e principalmente água, aceleraram a velocidade da reação do que quando se utilizou solventes como tolueno ou tetracloreto de carbono (SHAMROUKH; ZAKI; MORSY; ABDEL-MOTTI *et al.*, 2007), e este efeito pode ser explicado pela solvatação alta dos reagentes e catalisador (KURTI; CZAKÓ, 2005).

Em um estudo realizado para estudar o efeito do solvente na condensação de Knoevenagel em sistema heterogêneo, os autores afirmam que o emprego de água como solvente traz benefícios. A água é um solvente, prótico, que tem efeito direto

sobre a reação, como alterações no tempo de reação (ISOBE; HOSHI; SUZUKI; HAGIWARA, 2005), e foi selecionada justamente por também ser um solvente economicamente viável, não tóxico e ambientalmente correto (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

Figura 19 – Proposta 2 de mecanismo de formação para a obtenção dos derivados de pirano-pirazóis.



Fonte: o autor

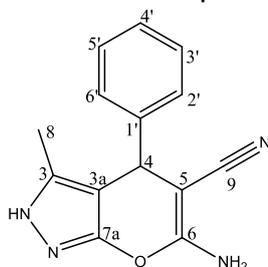
O solvente selecionado, também favorece a condensação, estudos reportaram que a utilização de solventes próticos como etanol, metanol, e principalmente água, aceleraram a velocidade da reação do que quando se utilizou solventes como tolueno ou tetracloreto de carbono, este efeito pode ser explicado pela solvatação alta dos reagentes e catalisador (KURTI; CZAKÓ).

#### 5.1.1.1 6-amino-4-fenil-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31a)

Para o derivado **31a** (Figura 20), foi utilizado o benzaldeído, o tempo de reação foi de 10 horas e o grau de pureza do composto foi de 100% via LC-MS (Figura 21). O LC apresentou dois picos antes dos 2 minutos, que foram considerados resíduos, pois estão presentes também na corrida apenas com solvente. Para facilitar

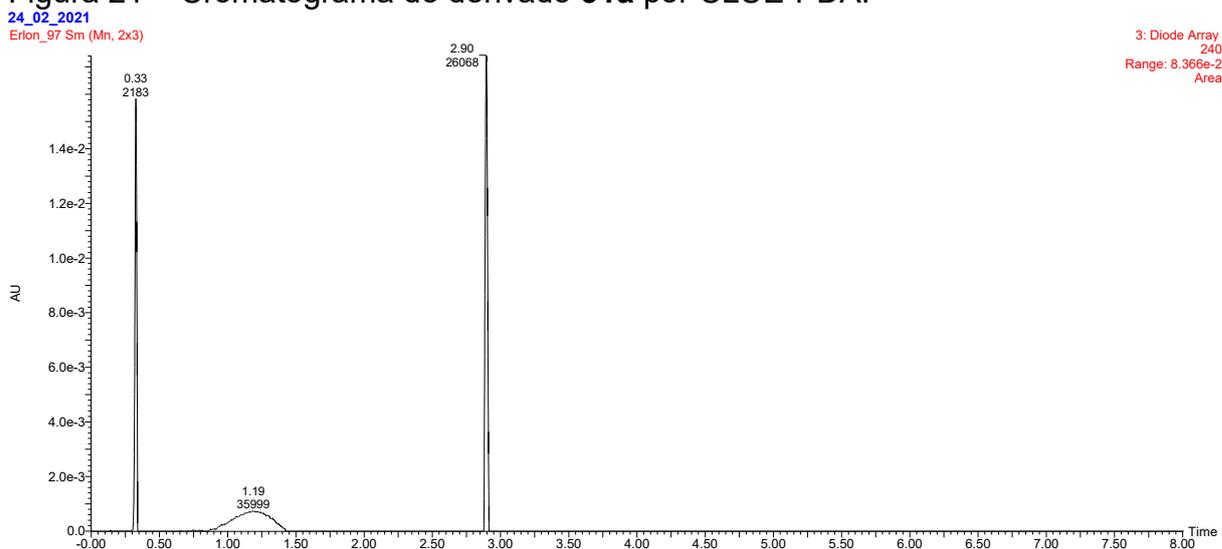
a leitura e a apresentação dos dados de caracterização dessa série de compostos, os próximos cromatogramas estarão presentes na seção anexo, sempre indicado pelo seu respectivo título.

Figura 20 – Derivado piranopirazol **31a**



Fonte: o autor

Figura 21 – Cromatograma do derivado **31a** por CLUE-PDA.



Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

Fonte: o autor

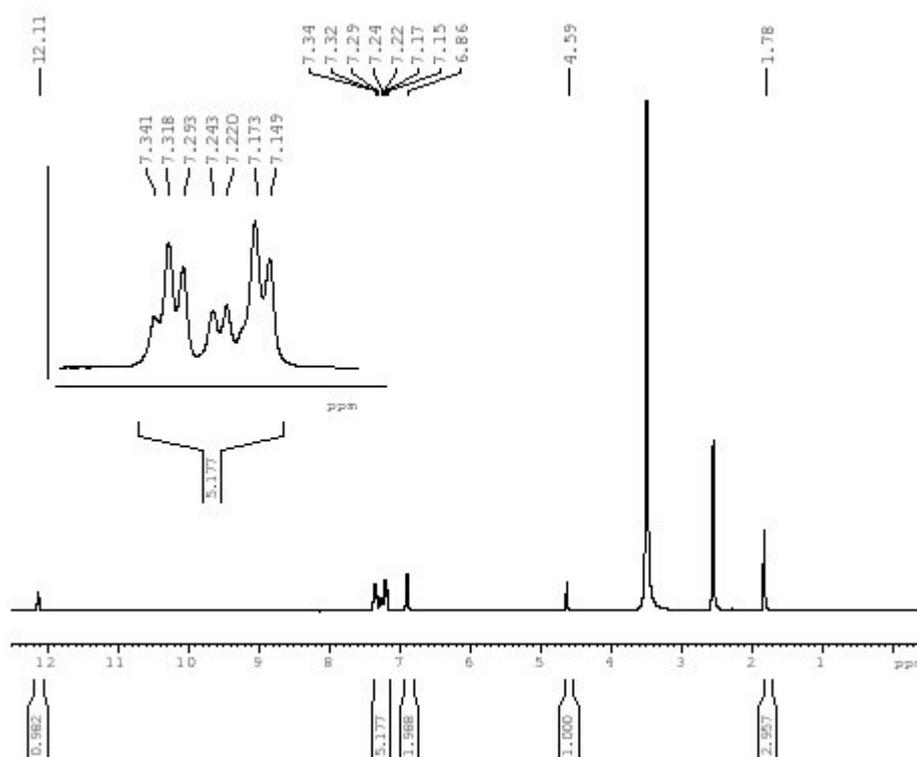
#### 5.1.1.1.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **31a**

A análise de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 22) do derivado **31a**, serve como referência de apresentação dos dados de como foram realizadas as análises para a caracterização do esqueleto piranopirazol utilizando os sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figura 23) somados aos mapas de correlação 2D. Todos os dados apresentados servirão de apoio para toda a série.

Primeiramente, trouxemos à luz a caracterização do esqueleto piranopirazol, o sinal mais desblindado no espectro de hidrogênio é um simpleto integrando para 1

com valor de  $\delta$  12,11. O mapa de correlação HSQC (Figura 24) nos proporciona identificar ligações  $J^1$  entre os hidrogênios e os carbonos da molécula, ou seja, permite identificação do valor de deslocamento do C ao qual o átomo de H está ligado. Assim, o espectro permitiu correlacionar que este simpleto não possui nenhum sinal de correlação  $J^1$  com carbono algum da molécula, indicando que o átomo de H está ligado a um dos heteroátomos da molécula. Então, esse sinal é característico do sinal do H2 ligado ao nitrogênio no anel pirazol.

Figura 22 – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31a**.



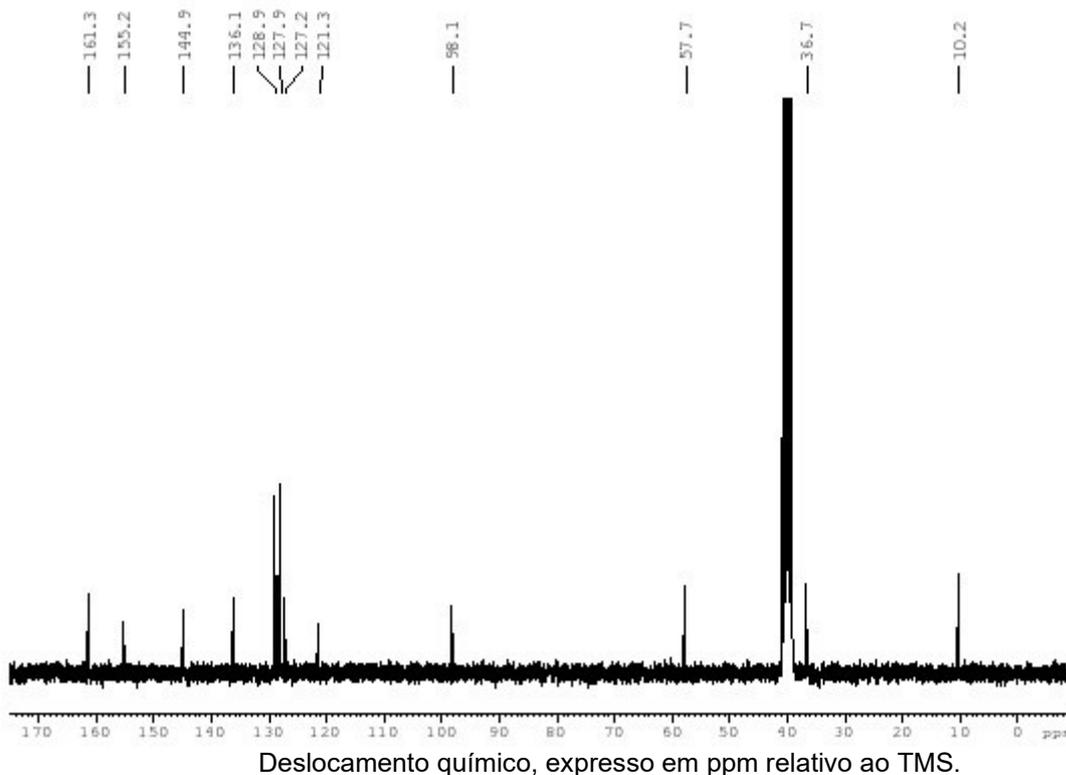
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Fonte: o autor

Para confirmar a posição, recorreu-se ao mapa de correlações HMBC (Figura 25), que correlaciona os sinais de  $^1\text{H}$  com suas correlações com carbonos em  $J^{2-4}$ . O referido sinal  $\delta$  12,11 ppm apresenta 3 correlações com os sinais 98,1 ppm, 136,1 ppm e 155,2 ppm. O sinal de  $^{13}\text{C}$  ressonando em  $\delta$  155,2, é indicativo de carbono de anel ligado a 1 ou mais heteroátomos, como o carbono de amida, corroborando com o sinal do C7a. Os sinais com valor de deslocamento em  $\delta$  136,1 e  $\delta$  98,1 serão posteriormente confirmados, mas estes sinais possuem correlação com o H2, o

primeiro é indicado como sendo o C3 e o  $\delta$  98,1 sendo o C3a, carbono esse que liga o anel pirazol ao anel pirano.

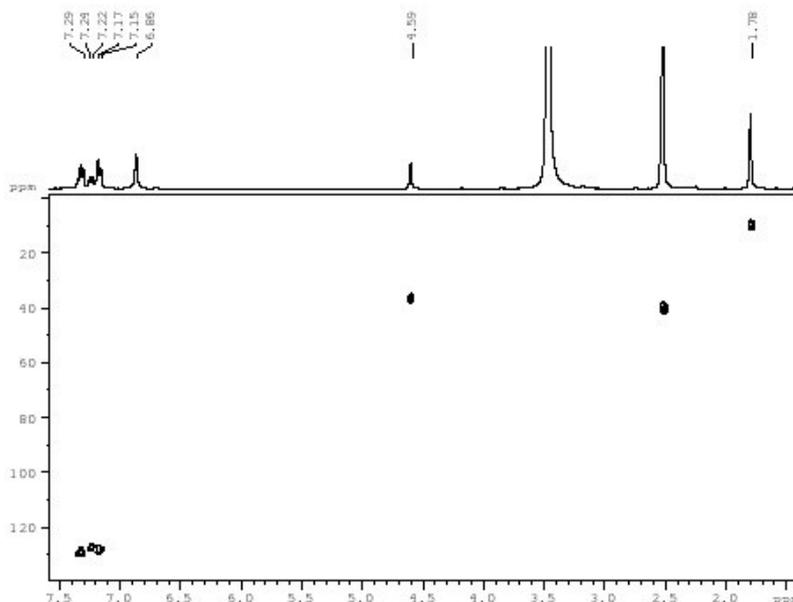
Figura 23 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31a**.



Fonte: o autor

O simpleto integrando para 2 hidrogênios ressonando em 6,58 ppm, não há correlação  $J^1$  dele com nenhum  $^{13}\text{C}$  através do espectro de HSQC (Figura 24), caracterizando os hidrogênios ligados a heteroátomo ligado ao carbono C6. Seguindo, verificou-se no mapa HMBC (Figura 25) duas correlações fracas com os carbonos  $\delta$  161,3 e  $\delta$  57,7. O sinal mais desblindado do mapa de  $^{13}\text{C}$  é o de valor  $\delta$ 161,3 e foi caracterizado como sendo o C6, carbono esse ligado a dois heteroátomos. O outro sinal foi caracterizado como sendo o C5 ligado à nitrila. Esses sinais confirmam a posição dos hidrogênios em questão.

Figura 24 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31a**.

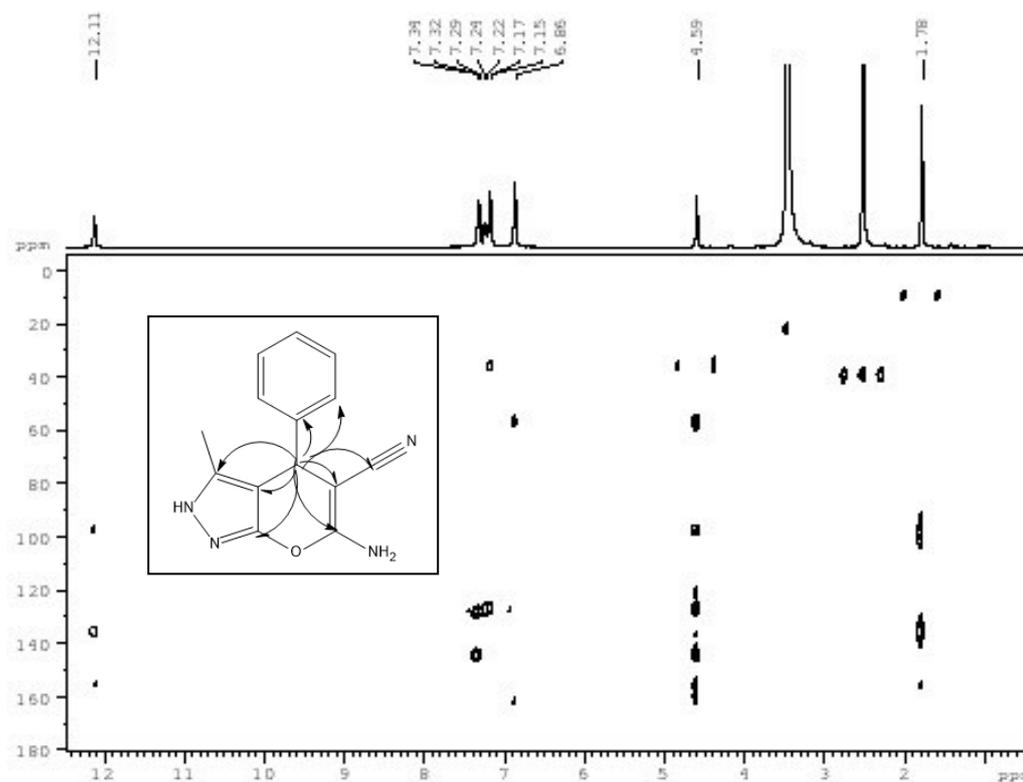


Fonte: o autor

Ainda analisando o espectro de  $^1\text{H}$  RMN, apresentou mais um simpleto ressonando em 4,59 ppm, integrando para 1. Sinal esse que é indicativo de carbono vicinal olefínico e/ou C ligados a  $-\text{C}=\text{O}$  com ligações  $\text{sp}^3$ . O espectro de HSQC proporcionou observar que o sinal em  $\delta$  4,59 tem uma correlação  $J^1$  com o sinal de carbono com valor  $\delta$  36,7, sinal esse que é característico do hidrogênio ligado ao carbono metino quiral na posição C4, posição no anel pirano onde se posiciona o substituinte arila, sendo assim esse sendo um sinal característico da ciclização e da posição do substituinte aril.

Sendo de conhecimento que as correlações visualizadas no mapa HMBC (Figura 25) são da interação spin-spin a longa distância de átomos de carbono e hidrogênio, sendo representadas como  $J^{2-4}$ . Então, é esperado que o sinal em C4 tenha correlação com quase todos os sinais de  $^{13}\text{C}$  da molécula. Analisando o sinal de  $^1\text{H}$  com valor  $\delta$  4,59, o mapa mostra uma correlação  $J^3$  com o sinal  $\delta$  161,3, este sinal caracteriza sendo o do C6, confirmado pela correlação com os H do  $\text{NH}_2$ . Uma correlação  $J^3$  com o sinal 155,2 ppm, indicativo de carbono de carboxila aromática, confirmando a posição C7a. O mapa permite ainda ver as seguintes correlações:  $\delta$  57,7 (C5),  $\delta$  98,1 (C3a) e por fim uma correlação  $J^3$  com o sinal ressonando em  $\delta$  136,1 (C3); corroborando com todos os sinais de  $^{13}\text{C}$ , do anel pirano e do anel pirazol, tendo correlações com o H4.

Figura 25 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31a** e correlações do H4.



Fonte: o autor

Por fim, no espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 22) um último sinal apresentado, o sinal mais protegido foi um simpleto com valor de  $\delta$  1,78, integrando para 3 hidrogênios. A área que este sinal está ressonando é característica de hidrogênios ligados a carbono  $\text{sp}^3$ . Corroborando com essa afirmação, o mapa HSQC apresentou uma correlação  $J^1$  do sinal de  $^{13}\text{C}$  com valor de 10,2 ppm. Correspondendo ao grupo metil ligado na posição C3 do anel pirazol do sistema de anéis fusionados piranopirazol. Confirmando a posição do sinal, o mapa HMBC reportou correlações  $J^3$  com os sinais  $\delta$  98,1 (C3a) e  $\delta$  136,1 (C3) e uma correlação fraca com o sinal  $\delta$  155,2 (C7a); sinais estes todos presentes no anel pirazol, confirmando a posição do metil e a caracterização das posições dos hidrogênios e dos carbonos do sistema piranopirazol.

Como foi mencionado no início desta seção, a caracterização do sistema de anéis conjugados ocorreu da mesma forma nos próximos derivados desta série de compostos. Logo, os dados dos próximos derivados estarão presentes na seção

anexos identificados pelos seus respectivos títulos, sendo descritos apenas seus substituintes na posição 4.

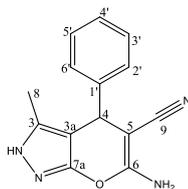
O espectro ainda apresentou sinais multipletos integrando para 5H, indicativo de hidrogênios ligados a anel aromático. Os sinais foram visíveis na região entre  $\delta$  7,00-7,50 ppm, região dos H aromáticos. Observando o mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 24) pode-se, ainda, correlacionar os sinais de hidrogênio do anel aromático substituinte em C-4, os sinais ressonando entre  $\delta$  7,15-7,34 correlacionando com os sinais de  $^{13}\text{C}$   $\delta$  127,2,  $\delta$  127,9 (2C),  $\delta$  128,9 (2C), correspondendo a 5 carbonos de anel aromático. Expandindo a região no mapa de correlação HMBC (Figura 25) foi possível observar que os H ressonando mais próximas a região de 7,16 ppm correlacionando com  $\delta$  127,9 (2C); um único H ressonando na região de 7,22 ppm correlacionando com o C ressonando em  $\delta$  127,2; e por fim, hidrogênios na região  $\delta$  7,31 ppm correlacionando com sinal de  $\delta$  128,9 (2C).

Uma correlação  $J^3$  é observada entre o sinal ressonando em  $\delta$  7,16, integrando para  $^2\text{H}$ , com o C4 e o sinal de  $^{13}\text{C}$  com valor de  $\delta$  127,2. Esse é um sinal importante que confirma a posição onde está o sistema aril, e o carbono foi caracterizado como sendo da posição para o C4'. Também é possível visualizar uma correlação  $J^3$  do sinal de  $^1\text{H}$  na região de  $\delta$  7,22 com o sinal de  $^{13}\text{C}$  de valor  $\delta$  127,9 (2C), sendo os C2' e C6'. Por fim o sinal de  $^1\text{H}$  ressonando na região de  $\delta$  7,31 com dois sinais de  $^{13}\text{C}$ , um de valor  $\delta$  128,9 (2C), os carbonos C3' e C5', e com o  $\delta$  144,9, o C1'. O sistema substituído aril foi então caracterizado como:  $\delta$  144,9 na posição C1',  $\delta$  127,9 (C2'),  $\delta$  128,9 (C3'),  $\delta$  127,2 (C4'),  $\delta$  128,9 (C5') e por fim  $\delta$  127,9 (C2').

Para confirmar assim o sistema aromático na posição do C4, uma última confirmação utilizando o sinal de  $^1\text{H}$   $\delta$  4,59. No mapa HMBC (Figura 25) é possível confirmar as correlações desse sinal com os sinais de  $^{13}\text{C}$  ressonando em  $\delta$  127,9 e um correlação mais fraca com o sinal em  $\delta$  144,9. Confirmando assim a posição do substituinte na posição C4.

Os dados obtidos na análise de RMN relacionados cada um em sua posição estão compilados e apresentados na Tabela 1, e a caracterização do derivado por RMN foi considerada adequada.

Tabela 1 – Dados compilados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN (300MHz, 75MHz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31a** e sua estrutura.

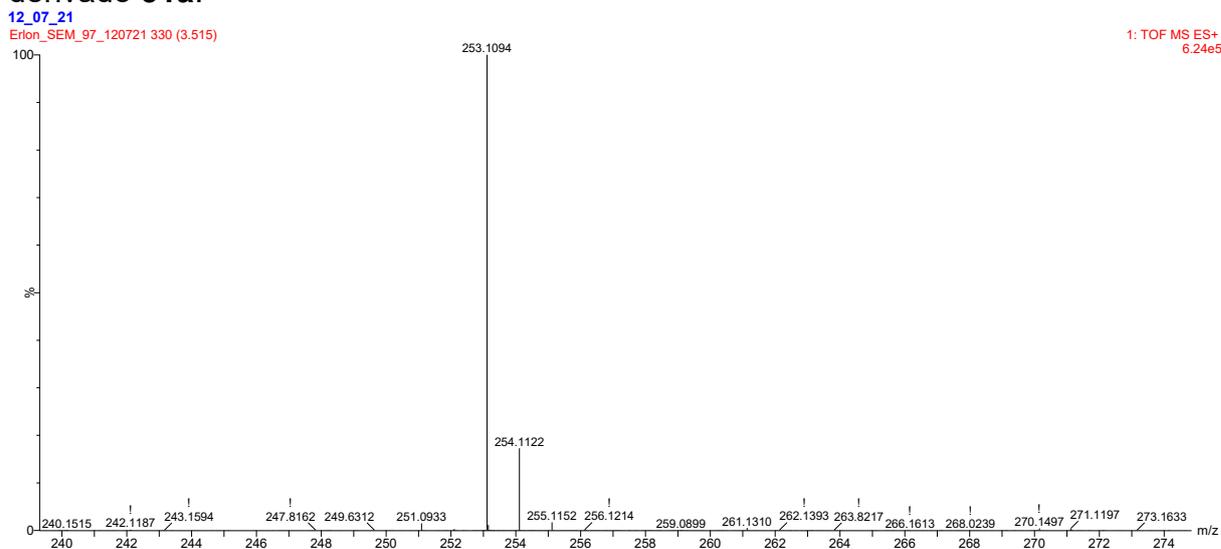


Posição	DERIVADO 31a			(KANAGARAJ; PITCHUMANI, 2010)			(AL-MATAR; KHALIL; ADAM; ELNAGDI, 2010)		
	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (JHz)	$\int$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (JHz)	$\int$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (JHz)	$\int$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	-	N-	-	-	N-	-	-	N-
2	12.11 <i>s</i>	1	NH	-	-	NH	12.11 <i>s</i>	1	NH
3	-	-	136.1	-	-	140.2	-	-	135.6
4	4.58 <i>s</i>	1	36.7	4.44 <i>s</i>	1	24.8	5.18 <i>s</i>	1	36.2
5	-	-	57.7	-	-	70.4	-	-	57.2
6	-	-	161.3	-	-	160.0	-	-	-
7	-	-	O-	-	-	O-	-	-	O-
8	1.77 <i>s</i>	3	10.1	-	-	11.4	-	-	9.8
9	-	-	121.3	-	-	126.3	-	-	120.8
3a	-	-	98.1	-	-	112.2	-	-	-
7a	-	-	155.2	-	-	152.3	-	-	-
1'	-	-	144.9	-	-	143.9	-	-	144.5
2'	7.15-7.34 <i>m</i>	5	127.9	7.17-7.44 <i>m</i>	5	129.3	7.16-7.33 <i>m</i>	5	127.5
3'	7.15-7.34 <i>m</i>	5	128.9	7.17-7.44 <i>m</i>	5	130.9	7.16-7.33 <i>m</i>	5	128.4
4'	7.15-7.34 <i>m</i>	5	127.2	7.17-7.44 <i>m</i>	5	127.2	7.16-7.33 <i>m</i>	5	126.8
5'	7.15-7.34 <i>m</i>	5	128.9	7.17-7.44 <i>m</i>	5	130.9	7.16-7.33 <i>m</i>	5	128.4
6'	7.15-7.34 <i>m</i>	5	127.9	7.17-7.44 <i>m</i>	5	129.3	7.16-7.33 <i>m</i>	5	127.5
NH <sub>2</sub>	6.86 <i>s</i>	2	-	6.94 <i>s l</i>	2	-	6.89 <i>s l</i>	2	-
	(300 MHz $^1\text{H}$ , 75 MHz $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ )			(300 MHz $^1\text{H}$ , 75 MHz $^{13}\text{C}$ , CDCl <sub>3</sub> & DMSO- $d_6$ )					

#### 5.1.1.1.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Para confirmação da massa molecular, o composto foi submetido a análise por espectrometria de massas em sistema LC-MS/Q-TOF. A análise do espectro (Figura 26) permitiu observar um pico de maior intensidade apresentando um valor de relação massa carga ( $m/z$ ) de 253.1094 [ $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> e teve massa teórica calculada em  $m/z$  253.1089.

Figura 26 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **31a**.



Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).

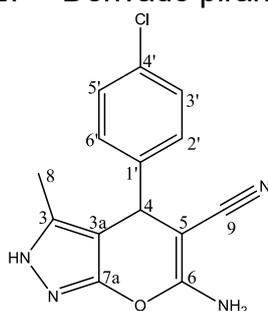
Fonte: o autor

Este composto já foi sintetizado e reportado por outros autores anteriormente (AL-MATAR; KHALIL; ADAM; ELNAGDI, 2010; KANAGARAJ; PITCHUMANI, 2010), e os dados confirmam o sucesso da reação em sintetizar o composto em questão. Os próximos espectros de massa de alta resolução estarão apresentados na seção anexos.

#### 5.1.1.2 6-amino-4-(4-clorofenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31b)

Para a obtenção deste derivado (Figura 27) o aldeído utilizado foi o 4-clorobenzaldeído, e o tempo de reação foi de 8 horas. O produto reacional apresentou uma pureza de 100% através de análise LC-MS (Anexo A).

Figura 27 – Derivado piranopirazol **31b**



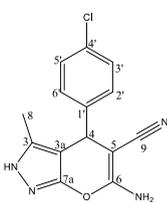
Fonte: o autor

5.1.1.2.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **31b**

A análise do sistema de anéis conjugados, ocorreu da mesma forma como o apresentado no derivado **31a** e os dados estão apresentados na Tabela 2. O aldeído selecionado como substituinte, na posição 4 do anel piranopirazólico, foi um anel aromático para substituído com um halogenado. O substituinte foi então confirmado com a observação de dois sinais de dupletos, com valor de deslocamento de  $\delta$  7,37 e  $\delta$  7,19 no espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Anexo B). Os dois sinais integram para dois H e possuem constantes de acoplamento de valor 8.1 Hz, são sinais correlacionando-se entre si em um sistema aromático. Tal valor de constante de acoplamento é característico em orto de H de anel aromático para-substituído ligado ao sistema piranopirazólico.

O mapa de correlação heteronuclear HSQC (Anexo D), correlacionou os carbonos (Anexo C) ligados a esses hidrogênios da molécula. Assim, pode-se correlacionar os sinais de hidrogênio nas suas posições: o sinal  $\delta$  7,38 correlacionando com o sinal de C  $\delta$  128,9; o  $\delta$  7,19 correlacionando com o sinal de C em  $\delta$  129,8. O mapa de correlação HMBC (Anexo E), confirmou as posições através das correlações observadas. O sinal  $\delta$  7,38 faz correlação no eixo y com os sinais  $\delta$  131,6 e o  $\delta$  143,9. Já o sinal  $\delta$  7,19 apresentou correlações com os sinais:  $\delta$  36,0,  $\delta$  131,6. Assim, foi possível caracterizar o substituinte como sendo um anel aromático para substituído.

Tabela 2 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31b** e sua estrutura.



Posição o	DERIVADO <b>31b</b>			(KANAGARAJ; PITCHUMANI, 2010)			(MOHAMED; KHAIRELDIN; FAHMYB; EL-SAYEDA, 2010)		
	$\delta$ $^1\text{H}$ mult. (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ mult. (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ mult. (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	-	N-	-	-	N-	-	-	N-
2	12.13 s	1	NH	-	-	NH	12.04 s	1	NH-
3	-	-	136.1	-	-	134.2	-	-	134.9
4	4.63 s	1	36.0	4.58 s	1	24.4	4.59 s	1	33.9
5	-	-	57.2	-	-	70.4	-	-	55.9
6	-	-	161.3	-	-	159.3	-	-	160.2
7	-	-	O-	-	-	O-	-	-	O-
8	1.79 s	3	10.2	1.82 s	3	11.7	1.75 s	3	9.4
9	-	-	121.1	-	-	130.1	-	-	120.5

<b>3a</b>	-	-	97.6	-	-	112.1	-	-	96.8
<b>7a</b>	-	-	155.1	-	-	153.6	-	-	153.7
<b>1'</b>	-	-	143.9	-	-	142.1	-	-	145.42
<b>2'</b>	7.19 <i>d</i> (8.1)	2	129.8	7.18 <i>d</i> (8.1)	2	127.6	7.16-7.34 <i>m</i>	4	-
<b>3'</b>	7.37 <i>d</i> (8.1)	2	128.9	7.31 <i>d</i> (8.1)	2	126.7	7.16-7.34 <i>m</i>	4	-
<b>4'</b>	-	-	131.6	-	-	141.4	-	-	-
<b>5'</b>	7.37 <i>d</i> (8.1)	2	128.9	7.31 <i>d</i> (8.1)	2	126.7	7.16-7.34 <i>m</i>	4	-
<b>6'</b>	7.19 <i>d</i> (8.1)	2	129.8	7.18 <i>d</i> (8.1)	2	127.6	7.16-7.34 <i>m</i>	4	-
<b>NH<sub>2</sub></b>	6.91 <i>s</i>	2	-	6.69 <i>s/l</i>	2	-	6.89 <i>s</i>	2	--
	(300 MHz <sup>1</sup> H, 75 MHz <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> )			(300 MHz <sup>1</sup> H, 75 MHz <sup>13</sup> C, CDCl <sub>3</sub> & DMSO-d <sub>6</sub> )			(270 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )		

#### 5.1.1.2.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

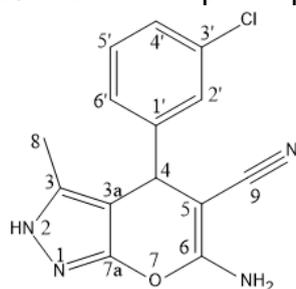
O espectrograma (Anexo F), reportou dois picos com uma relação isotrópica 3:1 característico do átomo de Cl. No espectrograma observou-se dois picos, de padrão isotópico 3:1, característicos de átomo de Cloro. O pico de maior intensidade, apresentou um valor de relação massa carga ( $m/z$ ) de 287.0706,  $[C_{14}H_{11}^{35}ClN_4O+H]^+$  e teve massa teórica calculada em  $m/z$  287.0700. O segundo pico, apresentou valor de  $m/z$  289.0672 o qual corresponde a massa da fórmula  $[C_{14}H_{11}^{37}ClN_4O+H]^+$  com valor teórico calculado em  $m/z$  289.0674.

O espectrograma é característico do isótopo do elemento <sup>35</sup>Cl e <sup>37</sup>Cl, a diferença da intensidade dos picos é explicada pela abundância destes isótopos na natureza, que é de 75,77% e 24,23% respectivamente.

Este composto já foi sintetizado e reportado por outros autores anteriormente, e os dados confirmam o sucesso da reação em sintetizar o composto em questão.

#### 5.1.1.3 6-amino-4-(3-clorofenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-*c*]pirazol-5-carbonitrila (31c)

O derivado de benzaldeído utilizado para este composto (Figura 28) foi o 3-clorobenzaldeído, e a primeira avaliação foi o tempo de reação que foi de 12 horas. A reação resultou em um precipitado em forma de pó com uma pureza de 100% (Anexo G).

Figura 28 – Derivado piranopirazol **31c**

Fonte: o autor

#### 5.1.1.3.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **31c**

A análise do sistema de anéis conjugados, se deu da mesma forma como o apresentado no derivado **31a** e os dados estão apresentados na Tabela 3. Para determinar com clareza o substituinte aril na posição C4 (Figura 28), o espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Anexo H) apresentou sinais característicos de hidrogênios de anéis aromáticos. O sinal mais desblindado deles foi o multiplete  $\delta$  7,38-7,29 ppm integrando para 2 H. O próximo sinal foi um multiplete integrando para 1 H, com valor de deslocamento 7,20 ppm. Por fim, foi possível identificar um duplete com valor de acoplamento 7.3Hz, integrando para 1 H, ressonando em  $\delta$  7,14 ppm.

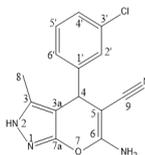
O mapa de correlações heteronuclear HSQC (Anexo J) permitiu correlacionar os sinais de  $^{13}\text{C}$  (Anexo I) aos sinais de  $^1\text{H}$  RMN. Os sinais supracitados apresentaram correlações no eixo y, e o sinal próximo ao valor  $\delta$  7,36 ppm correlaciona com o C com valor de deslocamento de 130,9 ppm; o sinal próximo a  $\delta$  7,31 ppm correlacionando com o sinal  $\delta$  127,3 ppm. O multiplete em  $\delta$  7,20 ppm tem uma correlação com o sinal de  $^{13}\text{C}$  de valor  $\delta$  127,6 ppm. E o duplete ressonando em  $\delta$  7,14 ppm tem uma correlação  $J^1$  com o carbono  $\delta$  126,7ppm.

Os sinais são característicos do anel aromático e como anteriormente foram observadas as correlações spin-spin carbono hidrogênio para podermos caracterizar o substituinte 3-clorofenil na posição C4 do anel pirano-pirazólico. O mapa HMBC (Anexo K) permitiu observar as correlações heteronucleares com o sinal principal, mais tarde classificado como sinal diagnóstico, o H4, pois este hidrogênio deve correlacionar tanto com o esqueleto piranopirazol quanto ao anexo aril.

O hidrogênio em questão tem o deslocamento de  $\delta$  4,66 e sua correlação  $J^1$  com o sinal  $\delta$  36,2. Foram confirmadas, através do mapa HMBC (Anexo K), a

correlação com o C1' ( $\delta$  147,5), C3' ( $\delta$  136,9), C2' ( $\delta$  127,6) e  $\delta$  127,3. Tanto o sinal ressonando em  $\delta$  7,14 e  $\delta$  7,20 possuem uma correlação no eixo y de valor  $\delta$  36,2.

Tabela 3 – Dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31c** e comparação com literatura e sua estrutura.



Posição	DERIVADO 31c			(KANAGARAJ; PITCHUMANI, 2010)		
	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	<i>f</i>	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	<i>f</i>	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	-	N-	-	-	N-
2	12.17 <i>s</i>	1	NH	-	-	NH
3	-	-	136.2	-	-	134.2
4	4,66 <i>s</i>	1	36.2	4,46 <i>s</i>	1	24.4
5	-	-	57.0	-	-	70.4
6	-	-	161.5	-	-	159.1
7	-	-	O-	-	-	O-
8	1.81 <i>s</i>	3	10.2	2.05 <i>s</i>	3	11.5
9	-	-	121.1	-	-	142.2
3 <sup>a</sup>	-	-	97.5	-	-	101.4
7 <sup>a</sup>	-	-	155.1	-	-	153.4
1'	-	-	147.5	-	-	148.8
2'	7.31 <i>m</i>	1	127.3	8.52 <i>s</i>	1	129.7
3'	-	-	133.5	-	-	133.0
4'	7.36 <i>m</i>	1	130.9	8.59-8.61 <i>m</i>	1	130.6
5'	7.20 <i>m</i>	1	127.6	7.04-7.14 <i>m</i>	2	127.9
6'	7.14 <i>m</i>	1	126.7	7.04-7.14 <i>m</i>	2	126.9
NH <sub>2</sub>	6.96 <i>s</i>	2	NH <sub>2</sub>	6.56 <i>s l</i>	2	NH <sub>2</sub>

(300 MHz  $^1\text{H}$ , 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ )      (300 MHz  $^1\text{H}$ , 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , CDCl<sub>3</sub> & DMSO- $d_6$ )

#### 5.1.1.3.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

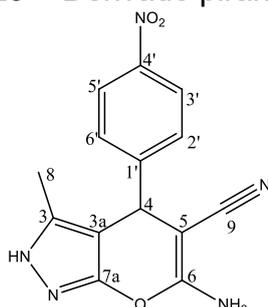
O espectro de massas (Anexo L) reportou dois picos com uma relação isotópica 3:1 característico do átomo de Cl (75,77% e 24,23%). O pico de maior intensidade apresentou um valor de relação massa carga ( $m/z$ ) de 287.0701,  $[\text{C}_{14}\text{H}_{11}^{35}\text{ClN}_4\text{O}+\text{H}]^+$  e teve massa teórica calculada em  $m/z$  287.0700. O segundo pico apresentou valor de  $m/z$  289.0673 o qual corresponde a massa da fórmula  $[\text{C}_{14}\text{H}_{11}^{37}\text{ClN}_4\text{O}+\text{H}]^+$  com valor teórico calculado em  $m/z$  289.0674.

Este composto já foi sintetizado e reportado por outros autores anteriormente, (KANAGARAJ; PITCHUMANI, 2010) e os dados confirmam o sucesso da reação em sintetizar o composto em questão.

#### 5.1.1.4 6-amino-4-(4-nitrofenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31d)

O derivado de benzaldeído utilizado para este composto (Figura 29) foi o 4-nitrobenzaldeído, e o tempo de reação foi de 9 horas. A reação resultou em um precipitado em forma de pó com uma pureza de 100% (Anexo M).

Figura 29 – Derivado piranopirazol **31d**



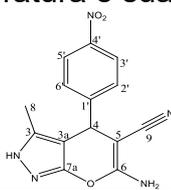
Fonte: o autor

##### 5.1.1.4.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **31d**

A análise do sistema de anéis conjugados, se deu da mesma forma como o apresentado no derivado **31a** e os dados estão apresentados na Tabela 4. A porção aril substituída (C-4) é mais uma vez um sistema para substituído, logo, a única diferença observada, entre o derivado **31b** e este derivado está na posição C-4', que por sua vez o substituinte é o grupo nitro ao invés do halogenado.

O espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Anexo N) apresentou dois dupletos com constantes de acoplamento de valor igual a 7.8Hz, correlacionando entre si. Como já descrito, é característico aos hidrogênios do anel arila para-substituído. O mapa de correlações HSQC (Anexo P) permitiu correlacionar os sinais:  $\delta$  8,21 ppm, integrando para 2H, ao sinal  $\delta$  124,4 ppm (C3'/C5'); e  $\delta$  7,47 ppm, integrando para 2H,  $\delta$  129,3 ppm (C2'/C6'). O mapa HMBC (Anexo Q) apresentou correlações no eixo y, os sinais  $^{13}\text{C}$  (Anexo O), para os dois sinais. O sinal em  $\delta$  8,21 ppm apresentou correlação com o sinal  $\delta$  146,9 ppm; e o sinal  $\delta$  7,47 ppm apresentou as seguintes:  $\delta$  146,9 ppm,  $\delta$  36,4 ppm. Confirmando o sistema de anel aromático *p*-substituído ligado ao C4.

Tabela 4 – Dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN (300MHz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31d** e comparação com literatura e sua estrutura.



Posição	DERIVADO <b>31d</b>			(KANAGARAJ; PITCHUMANI, 2010)			(MOHAMED; KHAIRELDIN; FAHMYB; EL-SAYEDA, 2010)		
	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	<i>f</i>	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	<i>f</i>	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	<i>f</i>	$\delta$ $^{13}\text{C}$
<b>1</b>	-	-	N-	-	-	N-	-	-	N-
<b>2</b>	12.21 <i>s</i>	1	NH	-	-	NH	11.41 <i>s</i>	1	NH
<b>3</b>	-	-	136.3	-	-	135.5	-	-	-
<b>4</b>	4.88 <i>s</i>	1	36.4	4.73 <i>s</i>	1	23.3	4.98 <i>s</i>	1	33.4
<b>5</b>	-	-	56.4	-	-	70.7	-	-	55.5
<b>6</b>	-	-	161.6	-	-	160.4	-	-	160.1
<b>7</b>	-	-	O-	-	-	O-	-	-	O-
<b>8</b>	1.81 <i>s</i>	3	10.2	2.04 <i>s</i>	3	11.4	2.10 <i>s</i>	3	9.7
<b>9</b>	-	-	-	-	-	126.0	-	-	121.5
<b>3<sup>a</sup></b>	-	-	97.0	-	-	112.8	-	-	96.4
<b>7<sup>a</sup></b>	-	-	155.1	-	-	154.2	-	-	155.7
<b>1<sup>o</sup></b>	-	-	-	-	-	150.4	-	-	147.4
<b>2<sup>o</sup></b>	7.47 <i>d</i> (7.8)	2	129.3	7.48 <i>d</i> (8.1)	2	127.9	7.37-7.40 <i>m</i>	2	-
<b>3<sup>o</sup></b>	8.21 <i>d</i> (7.8)	2	124.4	8.17 <i>d</i> (8.1)	2	130.0	8.10-8.11 <i>m</i>	2*	-
<b>4<sup>o</sup></b>	-	-	146.9	-	-	141.9	-	-	-
<b>5<sup>o</sup></b>	8.21 <i>d</i> (7.8)	2	124.4	8.17 <i>d</i> (8.1)	2	130.0	8.10-8.11 <i>m</i>	2*	-
<b>6<sup>o</sup></b>	7.47 <i>d</i> (7.8)	2	129.3	7.48 <i>d</i> (8.1)	2	127.9	7.37-7.40 <i>m</i>	2	-
<b>NH<sub>2</sub></b>	7.05 <i>s</i>	2	NH <sub>2</sub>	6.22 <i>s l</i>	2	NH <sub>2</sub>	7.10 <i>s</i>	2	NH <sub>2</sub>
	(300 MHz $^1\text{H}$ , 75 MHz $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ )			(300 MHz $^1\text{H}$ , 75 MHz $^{13}\text{C}$ , CDCl <sub>3</sub> & DMSO- $d_6$ )			(270 MHz, DMSO- $d_6$ )		

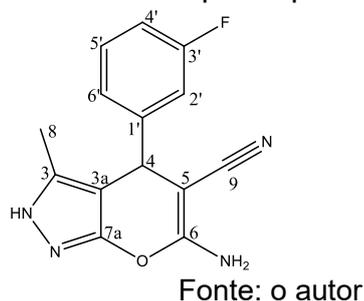
#### 5.1.1.4.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Para confirmar o composto, o espectro (Anexo R) apresentou um pico com relação massa carga ( $m/z$ ) de 298.0942 que corresponde a massa do produto de reação mais uma molécula de hidrogênio  $[\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3+\text{H}]^+$ , com valor teórico de massa calculada 298.0940.

Este composto já foi sintetizado e reportado por outros autores anteriormente, (KANAGARAJ; PITCHUMANI, 2010; MOHAMED; KHAIRELDIN; FAHMYB; EL-SAYEDA, 2010) e os dados confirmam o sucesso da reação em sintetizar o composto em questão.

#### 5.1.1.5 6-amino-4-(3-fluorfenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31e)

O benzaldeído utilizado para este composto (Figura 30) foi o 3-fluorbenzaldeído, e o tempo de reação foi de 8 horas. A reação resultou em um precipitado em forma de pó branco com uma pureza de 100% (Anexo S).

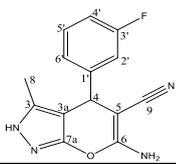
Figura 30 – Derivado piranopirazol **31e**

#### 5.1.1.5.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **31e**

A análise do sistema de anéis conjugados, se deu da mesma forma como o apresentado no derivado **31a** e os dados estão apresentados na Tabela 5. A única diferença entre o derivado **31c** e este derivado é o halogenado do anel aromático meta-substituído. O espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Anexo T) apresentou então um sinal duplete de dupletos e um multipletos estão ressonando na região de hidrogênios de anel aromático. Os sinais são de difícil resolução, devido a molécula conter o flúor, e os sinais estarem com suas multiplicidades pouco resolvidas. O duplete de dupletos tem uma constante de acoplamento de valor igual a 7.2Hz, indicando acoplamentos na posição orto, e uma constante de valor 14.3Hz.

O mapa HSQC (Anexo V) permitiu correlacionar os sinais  $^1\text{H}$  aos  $^{13}\text{C}$  (Anexo U) com valor de deslocamento de:  $\delta$  7,37 ao sinal  $\delta$  130,9;  $\delta$  7,06, ao sinal  $\delta$  113,9;  $\delta$  7,01 ao sinal  $\delta$  124,1; e o sinal  $\delta$  6,97 ao sinal  $\delta$  114,4. O que permitiu identificar os carbonos presentes no grupo aril na posição C4. O mapa HMBC (Anexo X) apresentou correlações no eixo y para todos os sinais, o dd  $\delta$  7,37 apresentou as seguintes correlações:  $\delta$  114,4,  $\delta$  147,8; o sinal  $\delta$  7,06 apresentou as correlações com os sinais:  $\delta$  114,4,  $\delta$  124,1; o sinal  $\delta$  7,01 apresentou correlações com os sinais  $\delta$  36,3 e 114,4; e o sinal  $\delta$  6,97 apresentou correlações com os sinais:  $\delta$  36,3,  $\delta$  124,1. Confirmando o sistema de anel aromático *m*-substituído ligado ao C4 ( $\delta$  36,3).

Tabela 5 – Dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN (300MHz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31e** e comparação com o **31c** e sua estrutura.



Posição	DERIVADO 31e			DERIVADO 31c		
	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	-	N-	-	-	N-
2	12.12 s	1	NH	12.17 s	1	NH
3	-	-	136.2	-	-	136.2
4	4,63 s	1	36.3	4,66 s	1	36.2
5	-	-	57.1	-	-	57.0
6	-	-	161.5	-	-	161.5
7	-	-	O-	-	-	O-
8	1.78 s	3	10.2	1.81 s	3	10.2
9	-	-	121.1	-	-	121.1
3a	-	-	97.5	-	-	97.5
7a	-	-	155.2	-	-	155.1
1'	-	-	114.7	-	-	147.5
2'	6.97 m	1	114.4	7.31 m	1	127.3
3'	-	-	147.9	-	-	133.5
4'	7.06 m	1	113.9	7.36 m	1	130.9
5'	7.37 dd (7.2, 14.3)	1	130.9	7.20 m	1	127.6
6'	7.01 m	1	124.1	7.14 m	1	126.7
NH <sub>2</sub>	6.94 s	2	-	6.96 s	2	NH <sub>2</sub>

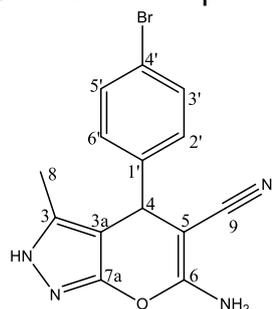
(300 MHz  $^1\text{H}$ , 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ )

#### 5.1.1.5.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

A análise de confirmação de massa molecular apresentou um pico com relação massa carga (m/z) de 271.0998 (Anexo Z) que corresponde a massa do produto de reação mais uma molécula de hidrogênio  $[\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{FN}_4\text{O}+\text{H}]^+$ , com valor teórico de massa calculada 271.0995. A comparação com os resultados do composto **31c** apresentados na Tabela 5, auxiliam na confirmação do sucesso da reação em sintetizar o composto em questão.

#### 5.1.1.6 6-amino-4-(4-bromofenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31f)

O benzaldeído utilizado para este composto (Figura 31) foi o 4-bromobenzaldeído, e o tempo de reação foi de 8 horas. A reação resultou em um precipitado em forma de pó com uma pureza de 100% (Anexo AA).

Figura 31 – Derivado piranopirazol **31f**

Fonte: o autor

5.1.1.6.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **31f**

A análise do sistema de anéis conjugados, se deu da mesma forma como o apresentado no derivado **31a** e os dados estão apresentados na Tabela 6. A única diferença observada entre o derivado **31b**, **31d** e este derivado, está na posição C4', substituinte aqui é um outro halogenado, o cloro. Todos os espectros estão presentes na seção Anexos, apresentados na seguinte ordem: espectro 1H RMN (Anexo AB), espectro 13C RMN (Anexo AC), mapas de correlação heteronuclear HSQC (Anexo AD) e HMBC (Anexo AE).

Tabela 6 – Dados de <sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C RMN (300MHz, 75Hz, TMS, DMSO-d<sub>6</sub>) para o derivado **31f** e comparação com literatura e sua estrutura.

Posição	DERIVADO 31f			DERIVADO 31b			(KANAGARAJ; PITCHUMANI, 2010)		
	$\delta$ <sup>1</sup> H <i>mult.</i> (J Hz)	<i>J</i>	$\delta$ <sup>13</sup> C	$\delta$ <sup>1</sup> H <i>mult.</i> (J Hz)	<i>J</i>	$\delta$ <sup>13</sup> C	$\delta$ <sup>1</sup> H <i>mult.</i> (J Hz)	<i>J</i>	$\delta$ <sup>13</sup> C
1	-	-	N-	-	-	N-	-	-	N-
2	12.12 s	1	NH	12.13 s	1	NH	-	-	NH
3	-	-	136.2	-	-	136.1	-	-	135.0
4	4.62 s	1	36.1	4.63 s	1	36.0	4.55 s	1	24.1
5	-	-	57.1	-	-	57.2	-	-	70.7
6	-	-	161.4	-	-	161.3	-	-	159.1
7	-	-	O-	-	-	O-	-	-	-
8	1.78 s	3	10.2	1.79 s	3	10.2	1.91 s	3	11.1
9	-	-	121.1	-	-	121.1	-	-	119.1
3a	-	-	97.6	-	-	97.6	-	-	112.1
7a	-	-	155.2	-	-	155.1	-	-	153.7
1'	-	-	144.4	-	-	143.9	-	-	-
2'	7.14 d (8.0)	2	130.2	7.19 d (8.1)	2	129.8	7.06 d (8.4)	2	-
3'	7.51 d (8.0)	2	131.8	7.37 d (8.1)	2	128.9	7.43 d (8.4)	2	-
4'	-	-	120.2	-	-	131.6	-	-	-
5'	7.51 d (8.0)	2	131.8	7.37 d (8.1)	2	128.9	7.43 d (8.4)	2	-
6'	7.14 d (8.0)	2	130.2	7.19 d (8.1)	2	129.8	7.06 d (8.4)	2	-
NH <sub>2</sub>	6.94 s	2	-	6.91 s	2	-	6.45 s	2	-

(300 MHz <sup>1</sup>H, 75 MHz <sup>13</sup>C, DMSO-d<sub>6</sub>)

(300 MHz <sup>1</sup>H, 75 MHz <sup>13</sup>C, CDCl<sub>3</sub> & DMSO-d<sub>6</sub>)

#### 5.1.1.6.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

O espectro da análise de confirmação de massa molecular (Anexo AF), reportou dois picos com uma relação isotrópica 1:1 característico do átomo de Br. O primeiro pico apresentou um valor de relação massa carga ( $m/z$ ) de 331.0198 e teve massa teórica calculada para  $[C_{14}H_{11}^{79}BrN_4O+H]^+$  em  $m/z$  331.0194. O segundo pico apresentou valor de  $m/z$  333.0179 o qual corresponde a massa da fórmula  $[C_{14}H_{11}^{81}BrN_4O+H]^+$  com valor teórico calculado em  $m/z$  331.0179.

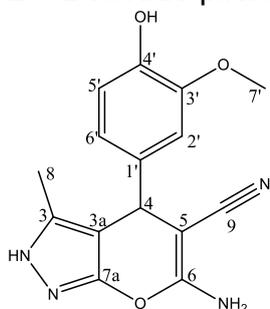
O espectro é característico do isótopo do elemento Bromo-79 e Bromo-81, a intensidade dos picos é explicada pela abundância destes isótopos na natureza, que é de 50,69% e 49,31% respectivamente.

Este composto já foi sintetizado e reportado por outros autores anteriormente (KANAGARAJ; PITCHUMANI, 2010) e os dados confirmam o sucesso da reação em sintetizar o composto em questão.

#### 5.1.1.7 6-amino-4-(4-hidróxi-3-metoxifenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31g)

O benzaldeído utilizado para este composto (Figura 32) foi a vanilina, o tempo de reação foi de 10 horas. A reação resultou em um precipitado em forma de pó com uma pureza de 99.8% (Anexo AG).

Figura 32 – Derivado piranopirazol **31g**



Fonte: o autor

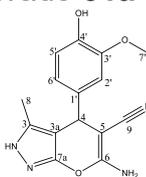
#### 5.1.1.7.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **31g**

A análise do sistema de anéis conjugados, se deu da mesma forma como o apresentado no derivado **31a** e os dados estão apresentados na Tabela 7. O composto possui uma hidroxila na posição C4' e um grupo metoxila na posição C3' no grupo aril substituído. Para confirmar a hidroxila presente no anel aromático e sua posição, analisamos os dois mapas de correlação.

No mapa de correlação heteronuclear HSQC (Anexo AJ) o sinal  $^1\text{H}$  RMN (Anexo AH) ressonando em  $\delta$  8,89 ppm não possui correlação  $J^1$ , confirmando não estar ligado a um átomo de  $^{13}\text{C}$  RMN (Anexo AI). Já o mapa HMBC (Anexo AK) apresentou as seguintes correlações com o mesmo sinal:  $\delta$  115,8 ppm,  $\delta$  145,7 ppm e  $\delta$  147,8 ppm.

A metoxila, caracterizada pelo simpleto  $^1\text{H}$  RMN com valor de deslocamento  $\delta$  3,71 ppm, integrando para 3 H, apresentou correlação no eixo y do mapa HSQC (Anexo AJ) na altura do sinal  $\delta$  56,1 ppm. Já o mapa HMBC (Anexo AK) relatou apenas 1 correlação com o sinal  $\delta$  147,8 ppm, caracterizado como o C3'. O sinal  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  6,71 ppm apresentou as seguintes correlações:  $\delta$  36,3 ppm,  $\delta$  120,2 ppm,  $\delta$  135,8 ppm,  $\delta$  147,8 ppm; e o sinal  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  6,54 ppm reportou as seguintes correlações:  $\delta$  36,3 ppm,  $\delta$  112,0 ppm,  $\delta$  145,7 ppm. Confirmando o sistema de anel aromático *p*-substituído ligado ao C4.

Tabela 7 – Dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31g** e comparação com derivado **31a** e sua estrutura.



Posição	DERIVADO 31g			DERIVADO 31a			(UPADHYAY; SHARMA; SINGH; DUBEY <i>et al.</i> , 2017)		
	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	-	N-	-	-	N-	-	-	N-
2	12.07 s	1	NH	12.11 s	1	NH	12.06 s	1	NH
3	-	-	136.1	-	-	136.1	-	-	135.5
4	4.49 s	1	36.3	4.58 s	1	36.7	4.51 s	1	35.7
5	-	-	58.1	-	-	57.7	-	-	57.6
6	-	-	161.1	-	-	161.3	-	-	160.6
7	-	-	O-	-	-	O-	-	-	O-
8	1.82 s	3	10.3	1.77 s	3	10.1	1.80 s	3	9.8
9	-	-	120.2	-	-	121.3	-	-	119.7
3 <sup>a</sup>	-	-	98.4	-	-	98.1	-	-	97.8
7 <sup>a</sup>	-	-	155.2	-	-	155.2	-	-	154.6
1'	-	-	135.8	-	-	144.9	-	-	135.3
2'	6.71 <i>d</i> (8.0)	2	115.9	7.15-7.34 <i>m</i>	5	127.9	6.71 <i>m</i>	2	111.3
3'	-	-	147.8	7.15-7.34 <i>m</i>	5	128.9	-	-	147.3
4'	-	-	145.7	7.15-7.34 <i>m</i>	5	127.2	-	-	145.2
5'	6.71 <i>d</i> (8.0)	2	112.0	7.15-7.34 <i>m</i>	5	128.9	6.71 <i>m</i>	2	111.5
6'	6.54 <i>d</i> (8.0)	1	120.2	7.15-7.34 <i>m</i>	5	127.9	6.52 <i>m</i>	1	120.8
7'	3.71 s	-	56.1	-	-	-	3.72 s	3	55.6
OH	8.89 s	-	-	-	-	-	8.83 s	1	-

NH <sub>2</sub>	6.78 s	2	NH <sub>2</sub>	6.86 s	2	NH <sub>2</sub>	6.77 s	2	NH <sub>2</sub>
	(300 MHz <sup>1</sup> H, 75 MHz <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> )			(300 MHz <sup>1</sup> H, 75 MHz <sup>13</sup> C, CDCl <sub>3</sub> & DMSO-d <sub>6</sub> )			(400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )		

#### 5.1.1.7.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

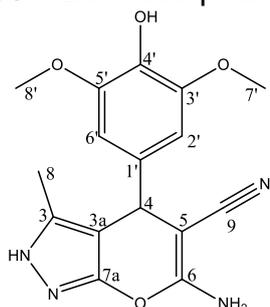
A análise de confirmação de massa molecular de alta precisão foi realizada. O espectro (Anexo AL) apresentou um pico com relação massa carga ( $m/z$ ) de 299.1149, que corresponde a massa do produto de reação mais uma molécula de hidrogênio  $[C_{16}H_{16}N_4O_4+H]^+$ , com valor teórico calculada  $m/z$  299.1144.

O derivado em questão já foi sintetizado e reportado, inclusive até a data presente, publicações estão sendo publicadas, sobre novas estratégias de reação (UPADHYAY; SHARMA; SINGH; DUBEY *et al.*, 2017; VERMA; CHAUHAN; SINGH; SINGH *et al.*, 2022). Porém existe uma grande dificuldade de encontrar dados de RMN caracterizando o referido derivado, há uma percepção em publicações com compostos que são “consensos” populares acadêmicos já bem estabelecidos, de que perde-se informações básicas, como essa de caracterização dos compostos. Geralmente apresenta-se a citação dos dados de <sup>1</sup>H RMN. Ainda fez-se a comparação com o derivado **31a** para auxiliar ainda mais na confirmação do sistema pirazólico e as correlações com o grupamento aril substituído.

#### 5.1.1.8 6-amino-4-(4-hidróxi-3,5-dimetoxifenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31h)

O benzaldeído utilizado para este composto (Figura 33) foi o seringaldeído, e o tempo de reação que foi de 12 horas. A reação resultou em um precipitado em forma de pó com uma pureza de 99,9% (Anexo AM).

Figura 33 – Derivado piranopirazol **31h**



Fonte: o autor

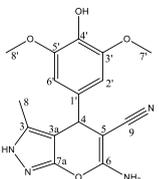
5.1.1.8.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **31h**

A análise do sistema de anéis conjugados, se deu da mesma forma como o apresentado no derivado **31a** e os dados estão apresentados na Tabela 8. A diferença observada entre o derivado **31g** e este está na posição C5', que era a posição de um H e agora possui uma metoxila na posição em questão do anel aromático.

O mapa de correlação heteronuclear HSQC (Anexos AP) permitiu a correlação do sinal de  $^1\text{H}$  RMN (Anexo AN)  $\delta$  6,41 ppm, que integra para 2H, correlacionando com o sinal  $^{13}\text{C}$  RMN (Anexo AO)  $\delta$  105,4 ppm, que também representa 2 carbonos, caracterizando os hidrogênios H-2' e H-6'. O sinal de  $^1\text{H}$  RMN (Anexo AN)  $\delta$  3,69 ppm, integra para 6 H, correlacionando com o sinal  $^{13}\text{C}$  (Anexo AO)  $\delta$  56,4 ppm, caracterizados como os hidrogênios das metoxilas nas posições 7' e 8'.

O sinal  $^1\text{H}$  RMN (Anexo AN)  $\delta$  8,28 ppm é indicativo do H da hidroxila na posição C4', posição essa confirmada pelo mapa HMBC (Anexo AQ)  $^{13}\text{C}$   $\delta$  105,4 ppm.

Tabela 8 – Dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN (300MHz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31h** e comparação com literatura e sua estrutura.



Posição	DERIVADO 31h			(UPADHYAY; SHARMA; SINGH; DUBEY <i>et al.</i> , 2017)		
	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	$\int$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	$\int$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	-	N-	-	-	N-
2	12.07 s	1	NH	12.08 s	-	NH
3	-	-	136.2	-	-	135.6
4	4.51 s	1	36.7	4.53 s	1	36.2
5	-	-	57.8	-	-	57.3
6	-	-	161.2	-	-	160.7
7	-	-	O-	-	-	O-
8	1.84 s	3	10.3	1.86 s	3	9.8
9	-	-	121.4	-	-	120.9
3a	-	-	98.1	-	-	97.6
7a	-	-	155.1	-	-	154.6
1'	-	-	134.9	-	-	134.4
2'	6.41 s	2	105.3	6.43 s	2	104.8
3'	-	-	148.3	-	-	147.8
4'	-	-	134.7	-	-	134.2
5'	-	-	148.3	-	-	147.8
6'	6.41 s	2	105.3	6.43 s	2	104.8
7'	3.69 s	6	56.4	3.71 s	6	55.9
8'	3.69 s	6	56.4	3.71 s	6	55.9
OH	8.28 s	1	-	8.28 s	1	-
NH <sub>2</sub>	6.80 s	2	-	6.85 s	2	-

(300 MHz  $^1\text{H}$ , 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ )

(400 MHz, DMSO- $d_6$ )

#### 5.1.1.8.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

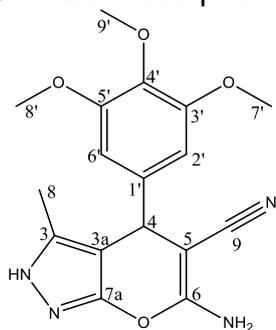
A análise de confirmação de massa molecular de alta precisão foi realizada. O espectro (Anexo AR) apresentou um pico com relação massa carga ( $m/z$ ) de 329.1249 que corresponde a massa do produto de reação mais uma molécula de hidrogênio  $[C_{16}H_{16}N_4O_4+H]^+$ , com valor teórico de massa calculada  $m/z$  329.1250.

Este composto já foi sintetizado e reportado por outros autores anteriormente (UPADHYAY; SHARMA; SINGH; DUBEY *et al.*, 2017) e os dados confirmam o sucesso da reação em sintetizar o composto em questão.

#### 5.1.1.9 6-amino-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31i)

O benzaldeído utilizado para este composto (Figura 34) foi o 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, e o tempo de reação foi de 12 horas. A reação resultou em um precipitado em forma de pó com uma pureza de 99,9% (Anexo AS).

Figura 34 – Derivado piranopirazol **31i**



Fonte: o autor

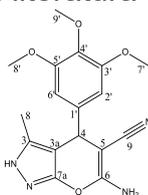
#### 5.1.1.9.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **31i**

A análise do sistema de anéis conjugados, se deu da mesma forma como o apresentado no derivado **31a** e os dados estão apresentados na Tabela 9. A diferença entre o seringaldeído e o trimetoxibenzaldeído está na metoxila na posição *p*-substituída, posição que era ocupada por uma hidroxila. Essa posição pôde ser confirmada observando a correlação, no mapa HSQC (Anexo AV), do sinal de  $^1H$  RMN

(Anexo AT)  $\delta$  6,46 ppm, que integra para 2 hidrogênios, com o sinal  $^{13}\text{C}$  RMN (Anexo AU)  $\delta$  105,0 ppm (2C) identificando os H sendo o H-2' e o H-6'.

O mapa HSQC (Anexo AV) confirmou ainda os hidrogênios das metoxilas 7' e 8' ( $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  3,71 ppm, integrando para 6 H) correlacionando-os com o sinal  $^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  56,3 ppm. Os hidrogênios da metoxila 9' foram reportados com valor de deslocamento de 3,64 ppm correlacionando com o sinal  $^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  60,4 ppm. Para confirmar a posição das metoxilas, foi observada uma correlação, no mapa heteronuclear HMBC (Anexo AX), do sinal  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  3,71 ppm com o sinal  $^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  153,2 ppm. Por fim também foi reportada uma correlação do sinal  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  3,64 ppm com o sinal  $^{13}\text{C}$  RMN  $\delta$  136,6 ppm.

Tabela 9 – Dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31i**, **31h** e comparação com literatura e sua estrutura.



Posição	DERIVADO 31i			DERIVADO 31h			(UPADHYAY; SHARMA; SINGH; DUBEY <i>et al.</i> , 2017)			
	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$	
1	-	-	N-	-	-	N-	-	-	N-	
2	12.11 s	1	NH	12.07 s	1	NH	12.08 s	1	NH	
3	-	-	136.3	-	-	136.2	-	-	136.0	
4	4.58 s	1	36.9	4.51 s	1	36.7	4.57 s	1	36.5	
5	-	-	57.4	-	-	57.8	-	-	56.9	
6	-	-	161.4	-	-	161.2	-	-	160.9	
7	-	-	O-	-	-	O-	-	-	O-	
8	1.87 s	3	10.4	1.84 s	3	10.3	1.88 s	3	9.91	
9	-	-	121.3	-	-	121.4	-	-	120.8	
3a	-	-	97.8	-	-	98.1	-	-	97.2	
7a	-	-	155.2	-	-	155.1	-	-	154.6	
1'	-	-	140.5	-	-	134.9	-	-	139.9	
2'	6.46 s	2	105.0	6.41 s	2	105.3	6.46 s	2	104.4	
3'	-	-	153.2	-	-	148.3	-	-	152.7	
4'	-	-	136.6	-	-	134.7	-	-	135.6	
5'	-	-	153.2	-	-	148.3	-	-	152.7	
6'	6.46 s	2	105.0	6.41 s	2	105.3	6.46 s	2	104.4	
7'	3.71 s	6	56.3	3.69 s	6	56.4	3.73 s	6	55.7	
8'	3.71 s	6	56.3	3.69 s	6	56.4	3.73 s	6	55.7	
9'	3.64 s	3	60.4	-	-	-	3.66 s	3	59.8	
OH	-	-	-	8.28 s	1	-	-	-	-	
NH <sub>2</sub>	6.86 s	2	NH <sub>2</sub>	6.80 s	2	-	6.84 s	2	NH <sub>2</sub>	
	(300 MHz $^1\text{H}$ , 75 MHz $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ )						(300 MHz $^1\text{H}$ , 75 MHz $^{13}\text{C}$ , CDCl <sub>3</sub> & DMSO- $d_6$ )			

#### 5.1.1.9.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

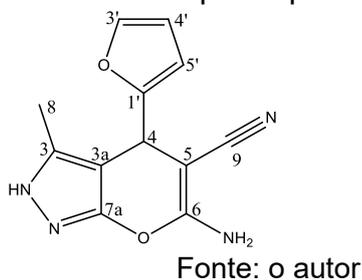
A análise de confirmação de massa molecular, o espectro (Anexo AZ) apresentou um pico com relação massa carga ( $m/z$ ) de 343.1407 que corresponde a massa do produto de reação mais uma molécula de hidrogênio  $[C_{17}H_{18}N_4O_4+H]^+$ , com valor teórico de massa calculada  $m/z$  343.1406.

Este composto já foi sintetizado e reportado por outros autores anteriormente (UPADHYAY; SHARMA; SINGH; DUBEY *et al.*, 2017) e os dados confirmam o sucesso da reação em sintetizar o composto em questão.

#### 5.1.1.10 6-amino-4-(furan-2-il)-3-metil-2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-5-carbonitrila (31j)

O benzaldeído utilizado para este composto (Figura 35) foi o furfuraldeído, e a primeira avaliação foi o tempo de reação que foi de 8 horas. A reação resultou em um precipitado em forma de pó avermelhado com uma pureza de 100% (Anexo AAA).

Figura 35 – Derivado piranopirazol **31j**



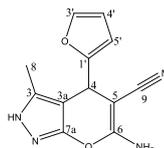
##### 5.1.1.10.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **31j**

A análise do sistema de anéis conjugados, se deu da mesma forma como o apresentado no derivado **31a** e os dados estão apresentados na Tabela 10. O anel furano foi caracterizado a partir dos mapas de correlação heteronucleares HSQC (Anexo AAD) e HMBC (Anexo AAE). Os mapas permitiram observar o sinal  $^1H$  RMN (Anexo AAB)  $\delta$  7,54 ppm correlacionando com o sinal  $^{13}C$  RMN (Anexo AAC)  $\delta$  142,7 ppm, no mapa HSQC, caracterizado como o hidrogênio ligado ao C-3', os valores mais desblindados corroboram com o carbono ligado a heteroatomo.

O mapa HSQC permitiu a identificação dos hidrogênios H-4' e H-5' com valor de deslocamento igual a 6,37 ppm e 6,18ppm, respectivamente. Onde o hidrogênio 4'

correlaciona com o sinal  $^{13}\text{C}$   $\delta$  106,1 ppm e o H-5' correlaciona com o sinal  $\delta$  106,1 ppm. Para finalizar a caracterização foram observadas, no mapa HMBC (Anexo AAE), as correlações  $J^{2-4}$  no eixo y para estes sinais descritos acima concluindo a caracterização do sistema furfural substituído na posição C4.

Tabela 10 – Dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN (300MHz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31j** e comparação com literatura e sua estrutura.



Posição	DERIVADO 31j			(MOHAMED; KHAIRELDIN; FAHMYB; EL-SAYEDA, 2010)		
	$\delta$ $^1\text{H}$ mult. (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ mult. (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	-	N-	-	-	N-
2	12.16 s	1	NH	12.19 s	-	NH
3	-	-	136.3	-	-	-
4	4.78 s	1	30.2	4.80 s	1	33.3
5	-	-	54.5	-	-	59.9
6	-	-	161.9	-	-	160.1
7	-	-	O-	-	-	O-
8	1.98 s	3	10.0	2.00 s	3	9.35
9	-	-	121.1	-	-	120.2
3a	-	-	95.6	-	-	99.3
7a	-	-	155.3	-	-	155.1
1'	-	-	156.2	-	-	152.9
2'	-	-	O-	-	-	O-
3'	7.54 s	1	142.7	6.39-7.56 m	1	141.9
4'	6.37 s	1	110.7	6.39-7.56 m	1	122.3
5'	6.18 s	1	106.1	6.39-7.56 m	1	105.9
NH <sub>2</sub>	6.96 s	2	NH <sub>2</sub>	6.21 s	2	NH <sub>2</sub>
	(300 MHz $^1\text{H}$ , 75 MHz $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ )			(300 MHz $^1\text{H}$ , 75 MHz $^{13}\text{C}$ , CDCl <sub>3</sub> & DMSO- $d_6$ )		

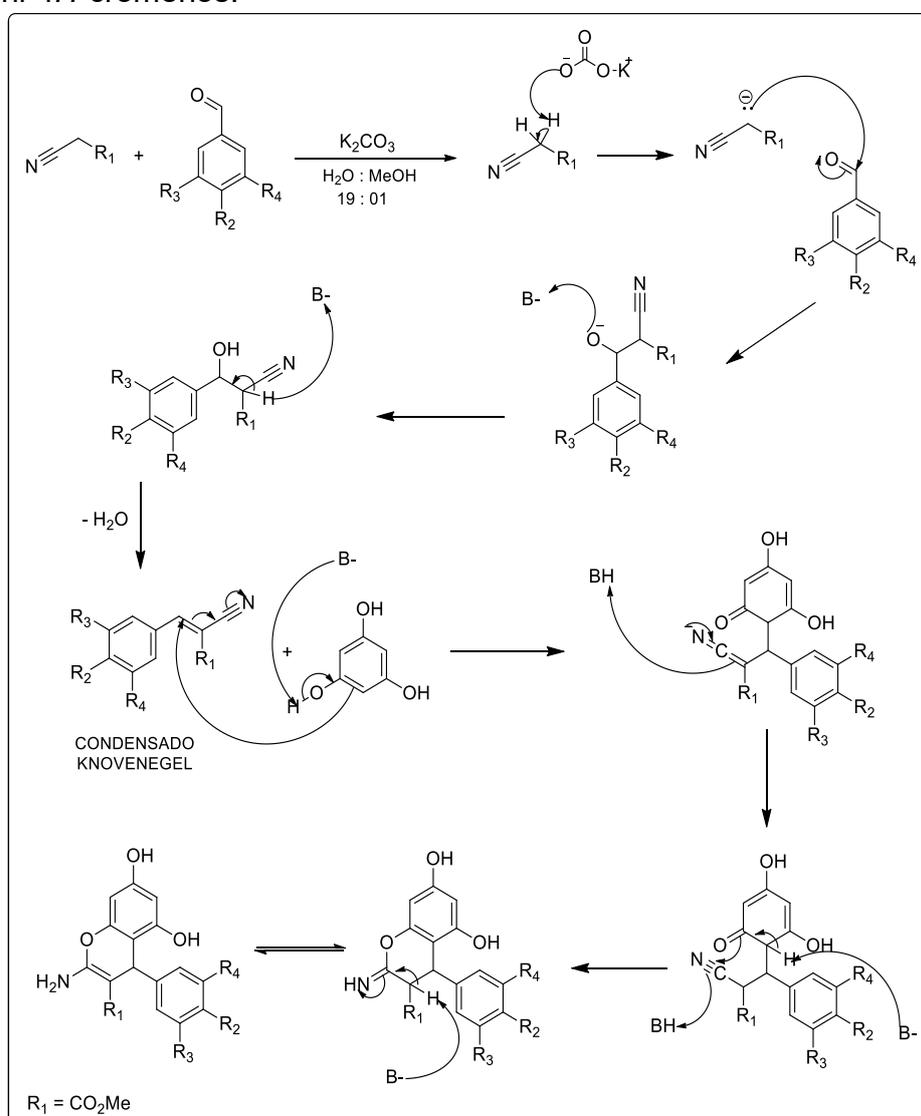
#### 5.1.1.10.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Para confirmar o composto, foi realizada a análise de confirmação de massa molecular, onde o espectro (Anexo AAF) apresentou um pico com relação massa carga (m/z) de 243.0883 que corresponde a massa do produto de reação mais uma molécula de hidrogênio  $[\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2+\text{H}]^+$ , com valor teórico de massa calculada 243.0877. Os dados apresentados condizem com as publicações prévias dessa substância (MOHAMED; KHAIRELDIN; FAHMYB; EL-SAYEDA, 2010) e os dados confirmam o sucesso da reação em sintetizar o composto em questão.

#### 5.1.2 Síntese dos derivados cromenos (34a-34c)

A obtenção dos novos derivados cromenos, foi baseada em uma estratégia multicomponentes já aplicada anteriormente com sucesso pelo autor. Essa metodologia foi adaptada pelo autor (MARTIN; MBAVENG; DE MORAES; KUETE *et al.*, 2018), inspirada pelo trabalho dos autores Masesane & Mihigo (MASESANE; MIHIGO, 2015). A proposta de mecanismo de formação desta série de cromenos parte também da formação do produto intermediário de condensação através da condensação de Knoevenagel, e está ilustrada na figura 36.

Figura 36 – Proposta de mecanismo simplificado de formação para obtenção dos derivados 4-aryl-4H-cromenos.



Fonte: o autor

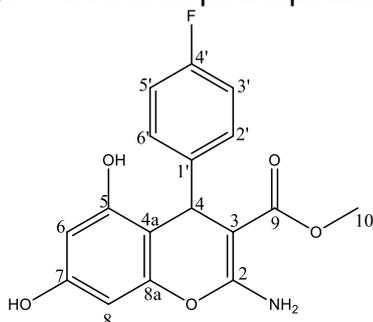
A próxima etapa, após a formação do produto de condensação, é proposto que seja uma adição de Michael com o floroglucinol. Essa adição ocorre na posição  $\beta$  de uma das hidroxilas do floroglucinol. A ciclização final para obtenção da imina, onde

o tauterismo iminia-enamina ocorre até a molécula atingir a conformação mais estável. E a aplicação dessa estratégia reacional permitiu a obtenção de 3 novos derivados 4*H*-cromenos.

#### 5.1.2.1 Metil 2-amino-5,7-dihidróxi-4-(4-fluorfenil)-4*H*-cromeno-3-carboxilato (34a)

Como em cada derivado 4*H*-cromeno, o único reagente que altera a cada reação são os benzaldeídos. O benzaldeído utilizado para este composto (Figura 37) foi o 4-fluorfenilbenzaldeído, o tempo de reação que foi de 16 horas. A reação resultou em um precipitado em forma de pó com uma pureza de 100% (Anexo AAG).

Figura 37 – Derivado piranopirazol **34a**

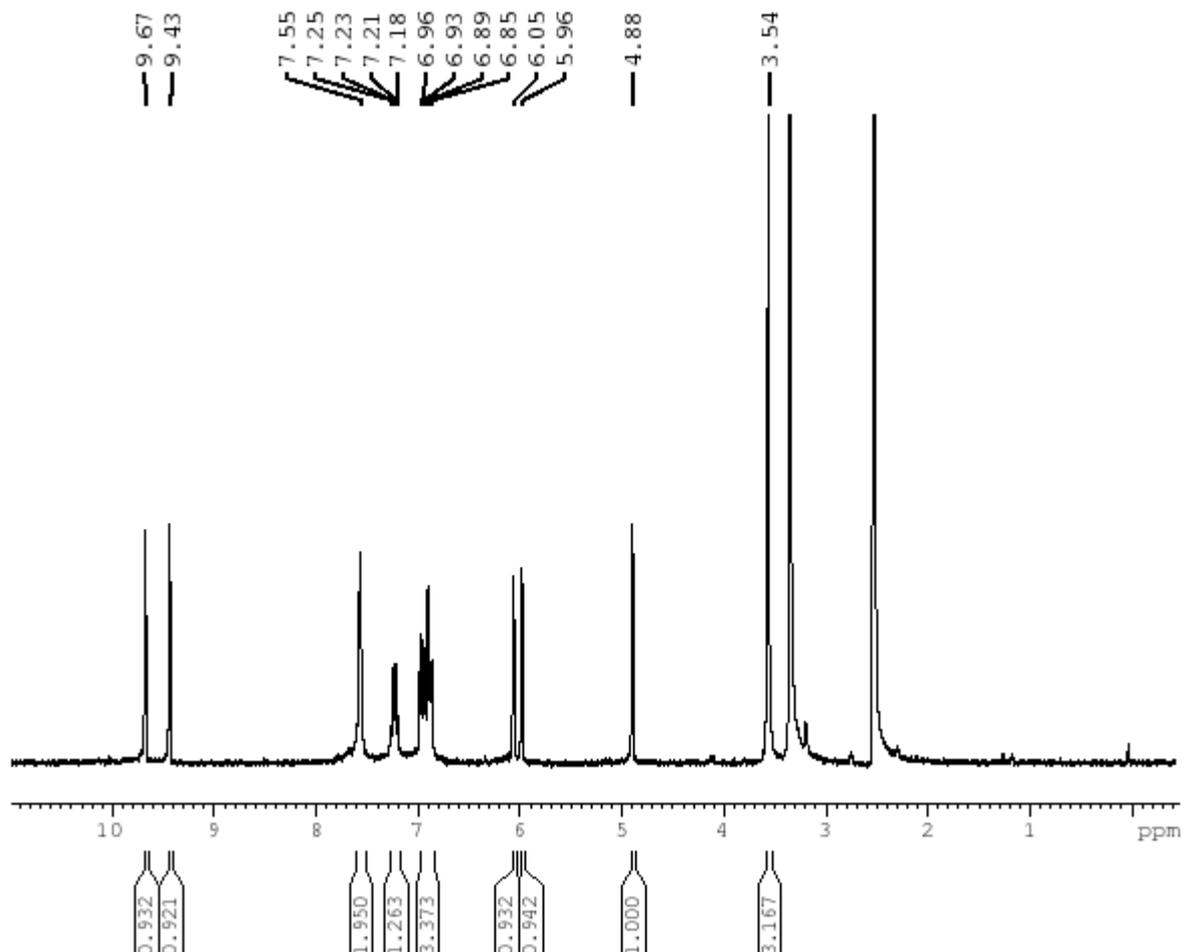


Fonte: o autor

##### 5.1.2.1.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **34a**

Seguindo a mesma lógica de apresentação dos resultados de síntese já apresentados, a análise de RMN foi realizada caracterizando primeiramente o sistema de anéis conjugados, dihidróxi-benzopirano. Posteriormente foi caracterizado o grupo aril substituído na posição 4 (Figura 37) e os dados estão apresentados na Tabela 11.

Figura 38 – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300Hz, TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **34a**.

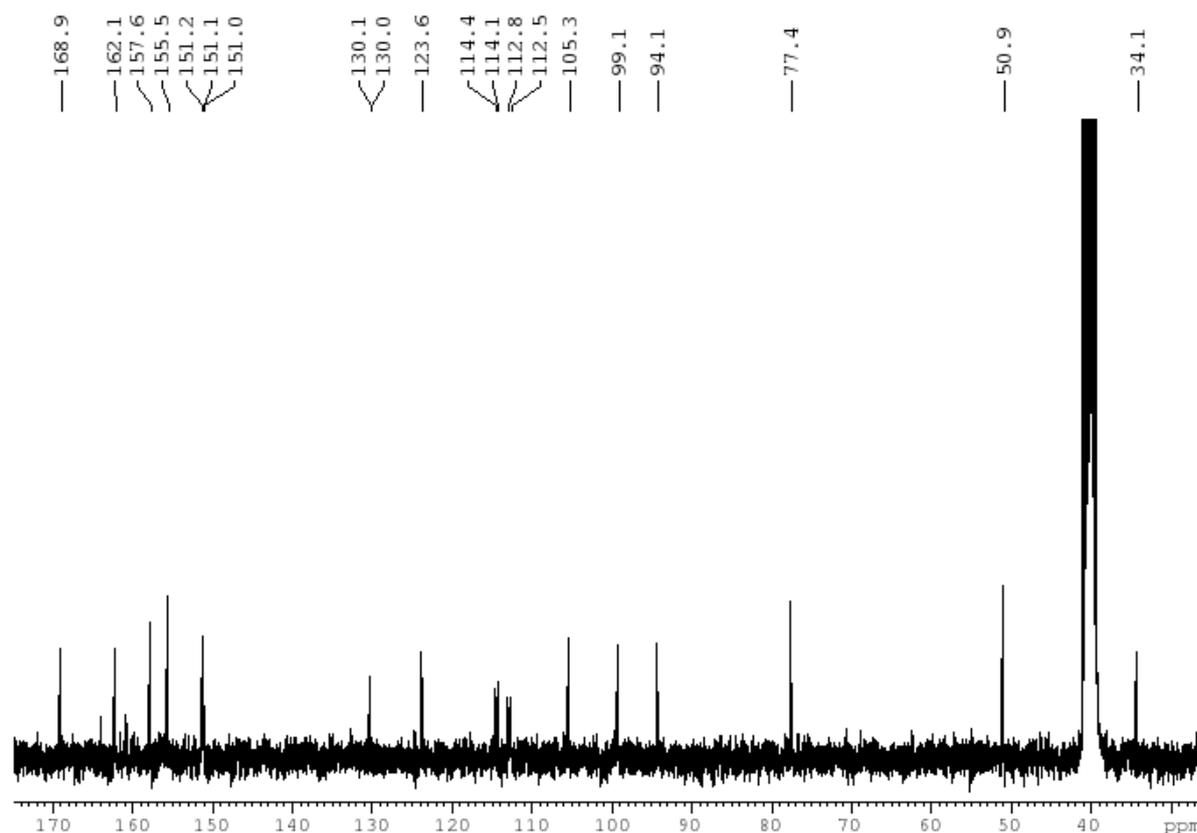


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Fonte: o autor

O espectro de  $^1\text{H}$  NMR (Figura 38) apresentou dados na região de hidrogênios de aldeídos com valores de deslocamento menores de 10 ppm. Os sinais  $\delta$  9,67 ppm e  $\delta$  9,43 ppm foram identificados como sendo as hidroxilas da porção benzeno do sistema de anéis.

Figura 39 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **34a**.

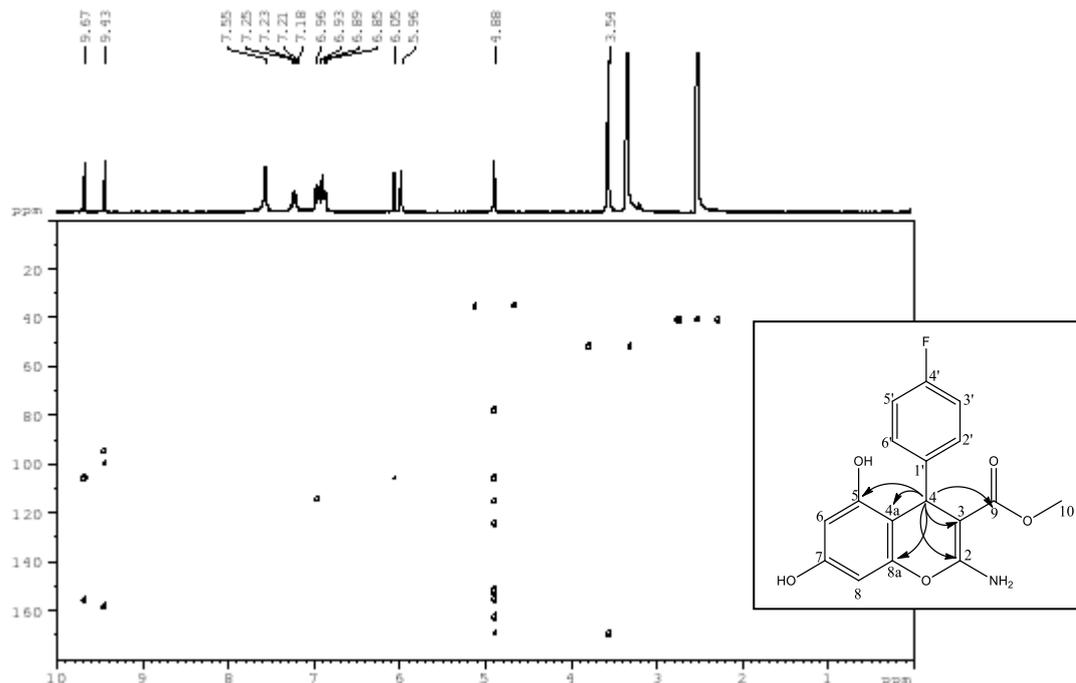


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Fonte: o autor

Na região de hidrogênios aromáticos outros dois simpletos ressonando em  $\delta$  6,05 ppm e  $\delta$  5,97 ppm, todos os dois sinais integrando para 1 H, sendo identificados como os dois hidrogênios da porção benzeno do anel pirano. O mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 40) mostrou uma correlação forte entre o sinal  $\delta$  6,05 ppm e o sinal  $^{13}\text{C}$  RMN (Figura 39)  $\delta$  94.1 ppm, confirmando a posição H-6 e o sinal menos desblindado o H-8. O simpleto largo em  $\delta$  4,88 ppm integrando para 1H, região indicativa de hidrogênio de carbono metino ou de dupla ligação, sinal este identificado como o hidrogênio ligado ao carbono quiral na posição H-4. Essa ligação pôde ser confirmada pelo mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 41) que apresentou uma correlação no eixo y com o sinal em  $\delta$  34,1 ppm.

Figura 40 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **34a** e correlações do H4.

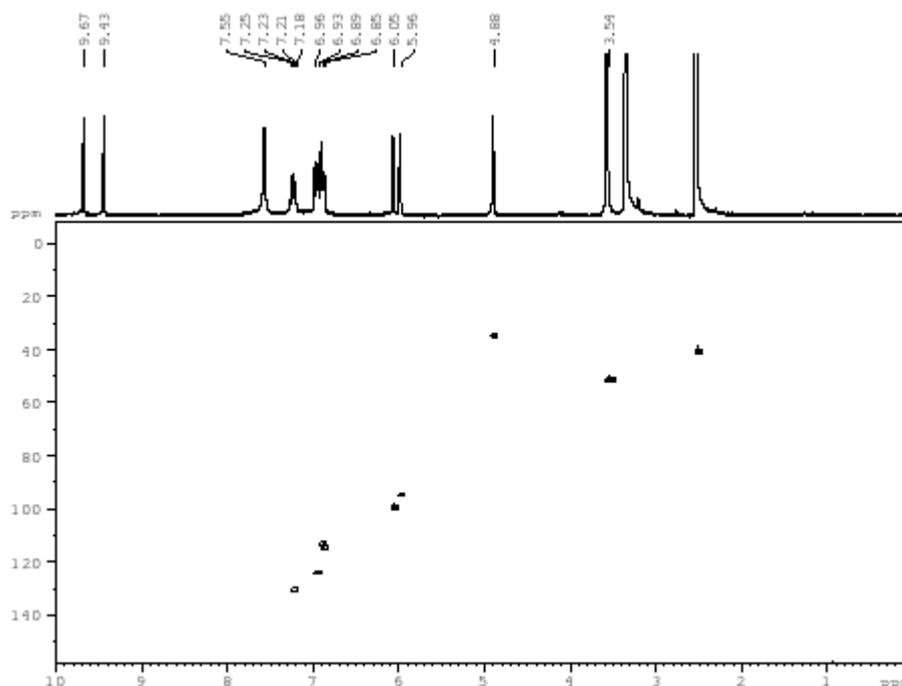


Fonte: o autor

O sinal dos 2 hidrogênios ligados ao heteroátomo na posição C-2 ( $\delta$  162,1 ppm) foi observado no espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 38) na forma de um simpleto em  $\delta$  7,55 ppm integrando para 2H. E por fim o simpleto em  $\delta$  3,52 ppm, ligado ao C-10 ( $\delta$  50,9 ppm), integrando para 3H característico hidrogênios de C  $\text{sp}^3$  ligado a um heteroátomo eletronegativo. O mapa HMBC mostrou ainda uma correlação no eixo y, deste sinal com o C-9 ( $\delta$  168,9 ppm), região de carbonos de éster, confirmação a posição e a função éster presente na molécula. Este sinal de  $^{13}\text{C}$  também faz uma correlação com o H-4, o que confirma a sua posição na molécula.

É possível observar que a posição 4, muito similar à série de derivados anterior, é um sinal que as correlações observadas nos mapas heteronucleares confirmam as posições do anel pirano. No mapa HMBC (Figura 40) foi possível observar as correlações com o C-3 ( $\delta$  77,4 ppm), C-4a ( $\delta$  105,3 ppm), C-5 ( $\delta$  155,5), C-8a ( $\delta$  151,0 ppm).

Figura 41 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **34a**.



Fonte: o autor

Na região dos H aromáticos o espectro (Figura 38) apresentou dois multipletos com valores de deslocamento de 7.25-7.19 ppm e 6.96-6.85ppm, o primeiro integrando para um H e o segundo sinal integrando para três hidrogênios. O mapa de correlação heteronuclear HSQC permitiu identificar a correlação com os sinais de carbono na região de carbonos aromáticos. O mapa HMBC ainda reportou uma correlação entre os sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos hidrogênios do sistema aril substituído, caracterizando um sistema aromático.

Tabela 11 – Dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **34a** e comparação com literatura e sua estrutura.

Posição	DERIVADO 34a			COMPOSTO 16 (MARTIN; MBAVENG; DE MORAES; KUETE <i>et al.</i> , 2018)		
	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	162.1	-	-	161.9
3	-	-	77.4	-	-	77.5
4	4.88 <i>s/l</i>	1	34.1	4,83 <i>s</i>	1	33.9
5	-	-	155.5	-	-	155.4
6	6.05 <i>s</i>	1	99.1	6,04 <i>s/l</i>	1	99.0

7	-	-	157.6	-	-	157.5
8	5.97 s	1	94.1	5,96 sl	1	94.1
9	-	-	168.9	-	-	168.9
10	3.53 s	3	50.9	3,52 s	3	50.8
4a	-	-	105.3	-	-	105.3
8a	-	-	151.0	-	-	150.9
1'	-	-	130.1	-	-	147.2
2'	6.96-6.85 m	3	123.6	7,12 d (8.3)	2	129,6
3'	6.96-6.85 m	3	114.4 d	7,23 d (8.3)	2	128,1
4'	-	-	151.1 d	-	-	130,3
5'	6.96-6.85 m	1	112.8 d	7,23 d (8.3)	2	128,1
6'	7.19-7.25 m	3	130.0	7,12 d (8.3)	2	129,6
NH <sub>2</sub>	7.55 s	2	NH <sub>2</sub>	7,55 s	2	NH <sub>2</sub>
OH-5	9.67 s	1	OH	9,43 s	1	OH
OH-7	9.43 s	1	OH	9,64 s	1	OH
	(300 MHz <sup>1</sup> H, 75 MHz <sup>13</sup> C, DMSO-d <sub>6</sub> )			(300 MHz <sup>1</sup> H, 75 MHz <sup>13</sup> C, CDCl <sub>3</sub> & DMSO-d <sub>6</sub> )		

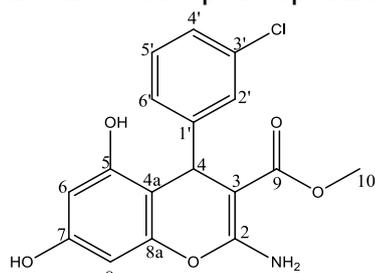
#### 5.1.2.1.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

O espectro (Anexo AAH) para a análise de confirmação de massa molecular apresentou um pico com relação massa carga ( $m/z$ ) de 332.0937 que corresponde a massa do produto de reação mais uma molécula de hidrogênio  $[C_{17}H_{14}FNO_5+H]^+$ , com valor teórico de massa calculada 332.0934. Os dados apresentados do sistema de anéis condizem com os dados apresentados na publicação prévia (MARTIN; MBAVENG; DE MORAES; KUETE *et al.*, 2018) que abordou a citotoxicidade desta série de 4H-cromenos. Esse derivado é novo e está descrito pela primeira vez em trabalho publicado (MARTIN; POLLO; DA SILVA; BIAVATTI *et al.*, 2022), originado da presente Tese.

#### 5.1.2.2 Metil 2-amino-5,7-dihidróxi-4-(3-clorofenil)-4H-cromeno-3-carboxilato (34b)

O benzaldeído utilizado para este composto (Figura 42) foi o 3-clorofenilbenzaldeído, o tempo de reação que foi de 16 horas. A reação resultou em um precipitado em forma de pó com uma pureza de 100% (Anexo AAI).

Figura 42 – Derivado piranopirazol **34b**



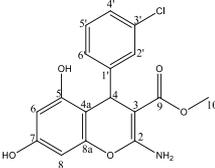
Fonte: o autor

### 5.1.2.2.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **34b**

A análise do sistema de anéis conjugados, se deu da mesma forma como o apresentado no derivado **34a** e os dados estão apresentados na Tabela 12. O espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Anexo AAJ) reportou um sinal multipletto na região de hidrogênios de anel aromático. O sinal em  $\delta$  7,22-7,10 ppm integra para 4 hidrogênios, indicados como os H ligados ao anel do grupamento aril.

O mapa de correlação heteronuclear HSQC (Anexo AAL) possibilitou identificar os valores dos sinais de  $^{13}\text{C}$  RMN (Anexo AAK) presentes nesse anel aromático. O mapa HMBC (Anexo AAM) deu suporte a caracterização do derivado em questão. Como este derivado é novo, foi feita uma comparação dos valores, a fim de confirmar a molécula, com um composto já publicado desta série de 4H-cromenos carboxilados.

Tabela 12 – Dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **34b** e comparação com literatura e sua estrutura.



Posição	DERIVADO <b>34b</b>			COMPOSTO <b>16</b> (MARTIN; MBAVENG; DE MORAES; KUETE <i>et al.</i> , 2018)		
	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	$\int$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	$\int$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	162.0	-	-	161.9
3	-	-	77.3	-	-	77.5
4	4.85 <i>sl</i>	1	34.2	4,83 <i>s</i>	1	33.9
5	-	-	155.5	-	-	155.4
6	6.05 <i>s</i>	1	99.1	6,04 <i>sl</i>	1	99.0
7	-	-	157.7	-	-	157.5
8	5.97 <i>s</i>	1	94.1	5,96 <i>sl</i>	1	94.1
9	-	-	168.9	-	-	168.9
10	3.54 <i>s</i>	3	50.9	3,52 <i>s</i>	3	50.8
4a	-	-	105.1	-	-	105.3
8a	-	-	150.9	-	-	150.9
1'	-	-	150.7	-	-	147.2
2'	7.22-7.10 <i>m</i>	4	125.9	7,12 <i>d</i> (8.3)	2	129,6
3'	-	-	132.7	7,23 <i>d</i> (8.3)	2	128,1
4'	7.22-7.10 <i>m</i>	4	126.4	-	-	130,3
5'	7.22-7.10 <i>m</i>	4	130.2	7,23 <i>d</i> (8.3)	2	128,1
6'	7.22-7.10 <i>m</i>	4	127.5	7,12 <i>d</i> (8.3)	2	129,6
NH <sub>2</sub>	7.56 <i>s</i>	2	NH <sub>2</sub>	7,55 <i>s</i>	2	NH <sub>2</sub>
OH-5	9.68 <i>s</i>	1	OH	9,43 <i>s</i>	1	OH
OH-7	9.46 <i>s</i>	1	OH	9,64 <i>s</i>	1	OH

(300 MHz  $^1\text{H}$ , 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ )

### 5.1.2.2.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

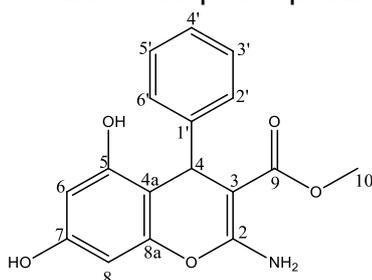
O espectro (Anexo AAN) para a análise de confirmação de massa molecular apresentou dois picos com padrão isotópico 3:1. O pico de maior intensidade tem relação massa carga ( $m/z$ ) de 348.0642 que corresponde a massa do produto de reação mais uma molécula de hidrogênio  $[C_{17}H_{14}^{35}ClNO_5+H]^+$ , com valor teórico de massa calculada 348.0639. O pico de menor intensidade tem relação massa carga ( $m/z$ ) de 350.0618 que corresponde a massa do produto de reação mais uma molécula de hidrogênio  $[C_{17}H_{14}^{37}ClNO_5+H]^+$ , com valor teórico de massa calculada 350.0604.

Os dados apresentados do sistema de anéis condizem com os dados apresentados na publicação prévia (MARTIN; MBAVENG; DE MORAES; KUETE *et al.*, 2018), assim como o derivado anterior. Esse derivado é novo e está descrito pela primeira vez em trabalho publicado pelo autor e colaboradores (MARTIN; POLLO; DA SILVA; BIAVATTI *et al.*, 2022).

#### 5.1.2.3 Metil 2-amino-5,7-dihidróxi-4-fenil-4H-cromeno-3-carboxilato (34c)

O benzaldeído foi utilizado para este composto (Figura 43) e o tempo de reação que foi de 16 horas. A reação resultou em um precipitado em forma de pó com uma pureza de 100% (Anexo AAO).

Figura 43 – Derivado piranopirazol **34c**



Fonte: o autor

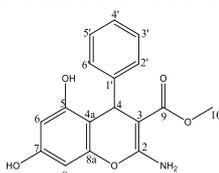
##### 5.1.2.3.1 Caracterização Estrutural por RMN do derivado **34c**

A análise do sistema de anéis conjugados, se deu da mesma forma como o apresentado no derivado **34a** e os dados estão apresentados na Tabela 13. Foi possível observar, na região dos hidrogênios aromáticos do espectro de  $^1H$  RMN

(Anexo AAP) um multipeto integrando para 5H. O sinal em  $\delta$  7,13 ppm foi então caracterizado como sendo os hidrogênios do anel aromático na posição 4.

O mapa HSQC (Anexo AAR) permitiu identificar os sinais de  $^{13}\text{C}$  RMN (Anexo AAQ) presentes no anel aromático. O mapa HMBC (Anexo AAS) permitiu observar algumas correlações com o H-4 que definiu algumas posições dos carbonos, como por exemplo, o sinal em questão possui uma correlação no eixo y em  $\delta$  127.7ppm, auxiliando na caracterização das posições 2' e 6'.

Tabela 13 – Dados de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN (300MHz, 75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **34c** e comparação com literatura e sua estrutura.



Posição	DERIVADO 34c			COMPOSTO 16 (MARTIN; MBAVENG; DE MORAES; KUETE <i>et al.</i> , 2018)		
	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ <i>mult.</i> (J Hz)	J	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	162.0	-	-	161.9
3	-	-	78.1	-	-	77.5
4	4.88 <i>sl</i>	1	34.2	4,83 <i>s</i>	1	33.9
5	-	-	155.4	-	-	155.4
6	6.05 <i>s</i>	1	99.0	6,04 <i>sl</i>	1	99.0
7	-	-	157.3	-	-	157.5
8	5.97 <i>s</i>	1	94.0	5,96 <i>sl</i>	1	94.1
9	-	-	169.0	-	-	168.9
10	3.53 <i>s</i>	3	50.8	3,52 <i>s</i>	3	50.8
4a	-	-	106.0	-	-	105.3
8a	-	-	151.1	-	-	150.9
1'	-	-	148.2	-	-	147.2
2'	7.13 <i>m</i>	5	127.7	7,12 <i>d</i> (8.3)	2	129,6
3'	7.13 <i>m</i>	5	128.1	7,23 <i>d</i> (8.3)	2	128,1
4'	7.13 <i>m</i>	5	125.8	-	-	130,3
5'	7.13 <i>m</i>	5	128.1	7,23 <i>d</i> (8.3)	2	128,1
6'	7.13 <i>m</i>	5	127.7	7,12 <i>d</i> (8.3)	2	129,6
NH <sub>2</sub>	7.49 <i>s</i>	2	NH <sub>2</sub>	7,55 <i>s</i>	2	NH <sub>2</sub>
OH-5	9.56 <i>s</i>	1	OH	9,43 <i>s</i>	1	OH
OH-7	9.37 <i>s</i>	1	OH	9,64 <i>s</i>	1	OH

(300 MHz  $^1\text{H}$ , 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , DMSO- $d_6$ )

(300 MHz  $^1\text{H}$ , 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , CDCl<sub>3</sub> & DMSO- $d_6$ )

#### 5.1.2.3.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

O espectro (Anexo AAT) para a análise de confirmação de massa molecular apresentou um pico com relação massa carga (m/z) de 314.1028 que corresponde a massa do produto de reação mais uma molécula de hidrogênio [ $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5 + \text{H}$ ]<sup>+</sup>, com valor teórico de massa calculada 314.1028.

Os dados apresentados do sistema de anéis condizem com os dados apresentados na publicação prévia (MARTIN; MBAVENG; DE MORAES; KUETE *et*

*al.*, 2018), assim como o derivado anterior. Esse derivado é novo e está descrito pela primeira vez em trabalho publicado pelo autor e colaboradores (MARTIN; POLLO; DA SILVA; BIAVATTI *et al.*, 2022).

## 5.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

### 5.2.1 Avaliação *in vitro* de inibição da enzima acetilcolinesterase dos derivados pirano-pirazóis

Os derivados pirano-pirazóis **31a-31j** foram avaliados *in vitro* frente a AChE usando o método adaptado, baseando-se no método de Ellman (ELLMAN; COURTNEY; ANDRES JR; FEATHERSTONE, 1961) com a fisostigmina como controle positivo. A atividade foi expressa em porcentagem de inibição, e apresentado em forma de tabela (Tabela 14). A triagem foi realizada na concentração de 100  $\mu\text{M}$ .

Tabela 14 – Atividade inibitória *in vitro* de inibição da Acetilcolinesterase dos pirano-pirazóis sintetizados.

DERIVADOS	% DE INIBIÇÃO (100 $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
<b>31a</b>	4.65 $\pm$ 3.68	n.d.
<b>31b</b>	1.22 $\pm$ 1.31	n.d.
<b>31c</b>	5.09 $\pm$ 7.76	n.d.
<b>31d</b>	1.04 $\pm$ 2.26	n.d.
<b>31e</b>	1.53 $\pm$ 0.94	n.d.
<b>31f</b>	-1.34 $\pm$ 1.09	n.d.
<b>31g</b>	3.30 $\pm$ 4.65	n.d.
<b>31h</b>	4.06 $\pm$ 5.77	n.d.
<b>31i</b>	-0.24 $\pm$ 7.64	n.d.
<b>31j</b>	-4.10 $\pm$ 2.98	n.d.
<b>Fisostigmina</b>	79.20 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	1.35 $\pm$ 0.07

Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 3); <sup>a</sup> controle positivo testado em 10  $\mu\text{M}$ ; n.d. não determinado.

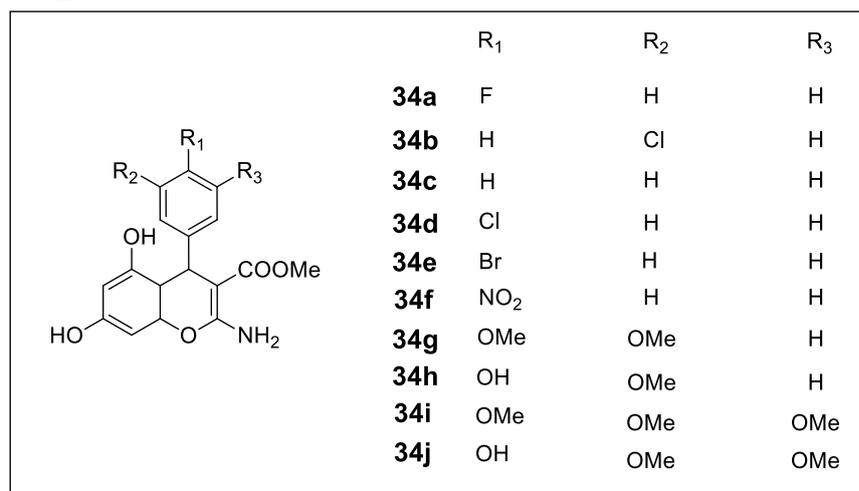
Os 10 compostos pirano-pirazóis apresentaram uma atividade inibitória de AChE muito fraca ou não apresentaram atividade inibitória com valor máximo de inibição de 5,09% apresentado pelo derivado **31c** na concentração de 100  $\mu\text{M}$ .

## 5.2.2 Avaliação *in vitro* de inibição da enzima acetilcolinesterase dos derivados benzopiranos

### 5.2.2.1 Derivados 4H-cromenos

Os derivados cromenos **34a-34j** (Figura 44) foram avaliados *in vitro* frente a AChE usando o método adaptado, baseando-se no método de Ellman (ELLMAN; COURTNEY; ANDRES JR; FEATHERSTONE, 1961) com a fisostigmina como controle positivo. A atividade foi expressa em porcentagem de inibição, e apresentado em forma de tabela (Tabela 15) com a triagem sendo realizada na mesma concentração que a série anterior.

Figura 44 – Compostos derivados 4H-cromenos avaliados quanto à atividade inibitória da enzima AChE.



Fonte: o autor

Três destes compostos foram sintetizados dentro do presente trabalho, os demais compostos apresentados na Figura 44 foram sintetizados e publicados (MARTIN; MBAVENG; DE MORAES; KUETE *et al.*, 2018).

Tabela 15 – Atividade inibitória *in vitro* de inibição da Acetilcolinesterase dos 4H-cromenos.

DERIVADOS	% DE INIBIÇÃO (100 µM)	IC <sub>50</sub> (µM)
<b>34a</b>	2.90 ± 5.59	n.d.
<b>34b</b>	7.30 ± 3.65	n.d.
<b>34c</b>	-0.65 ± 2.05	n.d.
<b>34d</b>	3.45 ± 0.65	n.d.
<b>34e</b>	6.18 ± 4.20	n.d.

<b>34f</b>	2.34 ± 3.55	n.d.
<b>34g</b>	1.52 ± 3.91	n.d.
<b>34h</b>	-2.77 ± 1.45	n.d.
<b>34i</b>	7.90 ± 5.86	n.d.
<b>34j</b>	-3.64 ± 3.69	n.d.
<b>Fisostigmina</b>	79.20 ± 0.29 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.07

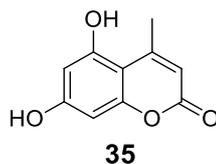
Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3); <sup>a</sup> controle positivo testado em 10 µM; **n.d.** não determinado.

Entre os 10 compostos cromenos quatro não apresentaram atividade, os derivados **34(c, g, h, j)** os outros seis derivados apresentaram uma atividade inibitória da *EeAChE* fraca ou muito fraca. Os valores máximos de porcentagem de inibição da enzima *AChE* foram 7,90% e 7,30% apresentado pelos derivados **34i** e **34b**, respectivamente.

#### 5.2.2.2 Derivados análogos a cumarina

Os derivados piranocumarinas angulares **36a-36i** e o esqueleto cumarínico **35** (Figura 45) foram avaliados conforme o *in vitro* frente a *AChE* usando o mesmo método adaptado, baseando-se no método de Ellman (ELLMAN; COURTNEY; ANDRES JR; FEATHERSTONE, 1961) com a fisostigmina como controle positivo, como as séries de compostos anteriores. A atividade foi expressa em porcentagem de inibição, e apresentado em forma de tabela (Tabela 16).

Figura 45 – Compostos análogos a cumarina avaliados quanto a atividade inibitória da enzima *EeAChE*.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R'
<b>36a</b>	Cl	H	H	CN
<b>36b</b>	Br	H	H	CN
<b>36c</b>	NO <sub>2</sub>	H	H	CN
<b>36d</b>	OMe	OMe	H	CN
<b>36e</b>	Cl	H	H	COOMe
<b>36f</b>	Br	H	H	COOMe
<b>36g</b>	NO <sub>2</sub>	H	H	COOMe
<b>36h</b>	OMe	OMe	OMe	COOMe
<b>36i</b>	OMe	OMe	H	COOMe

Fonte: o autor

A triagem foi realizada na concentração de 100 µM e o valor da metade da máxima concentração inibitória, o valor de IC<sub>50</sub> também foi avaliado nos compostos que apresentaram atividade.

Tabela 16 – Atividade inibitória in vitro de inibição da Acetilcolinesterase dos análogos da cumarina.

DERIVADOS	% DE INIBIÇÃO (100 µM)	IC <sub>50</sub> (µM)
<b>36a</b>	66.59 ± 1.57	32.39 ± 1.04
<b>36b</b>	80.73 ± 0.33	9.01 ± 0.71
<b>36c</b>	52.10 ± 1.40	n.d.
<b>36d</b>	79.80 ± 0.62	9.67 ± 0.68
<b>36e</b>	75.37 ± 1.01	11.49 ± 1.18
<b>36f</b>	73.21 ± 0.67	11.73 ± 0.67
<b>36g</b>	63.63 ± 0.51	20.03 ± 1.90
<b>36h</b>	33.29 ± 2.02	n.d.
<b>36i</b>	70.14 ± 1.02	26.21 ± 0.75
<b>35</b>	03.56 ± 1.32	n.d.
<b>Fisostigmina</b>	79.20 ± 0.29 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.07

Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3); <sup>a</sup> controle positivo testado em 10 µM;  
n.d. não determinado.

O núcleo dihidrocumarina **35** apresentou um efeito inibitório de 3,56% da enzima *AChE* na concentração a 100 µM, contudo todos os derivados (**36a-36i**)

apresentaram um efeito inibitório significativo. O composto **36h** obteve porcentagem de inibição de 33,3% na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , em todos os outros compostos o efeito inibitório frente a enzima *AChE* variaram entre 52,10% e 80,73% de inibição.

Foram selecionados para a avaliação do  $\text{IC}_{50}$  os derivados que demonstraram um valor de inibição maior que 50% na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Os considerados mais ativos foram os derivados **36b** e **36d** com valores de  $\text{IC}_{50}$ , respectivamente, de 9,01  $\mu\text{M}$  e 9,67  $\mu\text{M}$ . Quando comparado a referência, a fisostigmina, os compostos mais ativos ainda foram sete vezes menos ativos.

### 5.2.3 Aprofundando a avaliação estrutura atividade

Os resultados de atividade de todos os compostos foram compilados e estão presentes em uma única tabela na seção de anexos (Anexo AAU). O estudo teve como um dos objetivos a avaliação da atividade inibitória da *AChE* dos derivados pirano-pirazóis quando não estão fusionados a um sistema tricíclico nitrogenado. E mostrou que esse sistema de anéis fissionados apresenta atividade inibitória frente a *AChE* muito fraca quando não estão fusionados a um sistema tricíclico nitrogenado (Tabela 14). Derivados da tacrina pirano-pirazóis apresentaram atividade inibitória da *EeAChE* maiores que a tacrina (KHOOBI; GHANONI; NADRI; MORADI *et al.*, 2015)

Observando as séries de derivados que não apresentaram atividade inibitória significativa, os compostos que performaram melhores resultados de inibição entre eles foram os derivados **31c**, **34b** e **34i** com capacidade de porcentagem de inibição de enzima de  $5.09\% \pm 7.76$ ,  $7.30\% \pm 3.65$  e  $7.90\% \pm 5.86$ ; respectivamente. Esses resultados sugerem que a presença de um heteroátomo na posição 3 do grupamento arila, ou grupos doadores de elétrons, como os grupos metoxila do composto **34i** melhoram ou favorecem o potencial de inibição da enzima. A falta de algumas funcionalidades somada a forma das moléculas inativas pode justificar o porquê dessas moléculas não caberem no desfiladeiro da *AChE* e, conseqüentemente, não têm a capacidade de inativar a enzima.

Os derivados sintéticos piranocumarínicos angulares avaliados mostraram forte inibição da *AChE* (Tabela 16) corroborando com os estudos Orhan e colaboradores de 2017, e o de Heo e colaboradores de 2020 que descreveram derivados piranocumarinas angulares com forte atividade anti-*AChE* (ORHAN; SENOL; SHEKFEH; SKALICKA-WOZNIAK *et al.*, 2017). Pterixina e outros derivados

quelactona são piranocumarinas naturais identificados da *Mutellina purpurea* e *Peucedanum japonicum* foram descritas com atividade anti-AChE (HEO; EOM; RYU; KANG *et al.*, 2020; ORHAN; SENOL; SHEKFEH; SKALICKA-WOZNIAK *et al.*, 2017).

O núcleo cumarina com uma amida funcionalizada, ligada a outros grupos farmacofóricos, na posição C-3 (YAO; WANG; WANG; JIANG *et al.*, 2016) ou C-6 (MAHMOUD; NISSAN; ELSAWAH; REFAEY *et al.*, 2019) apresentaram forte atividade inibitória até maiores que a donepezila e a tacrina. O anel pirano dos piranocromenos fusionados em C-3 e C-4 do núcleo cumarínico também apresentaram atividade inibitória da AChE e BChE (KHOABI; ALIPOUR; SAKHTEMAN; NADRI *et al.*, 2013). Já no presente estudo estão fusionados em C-7 e C-8, assim como as piranocumarinas isoladas do estudo de Heo e colaboradores (HEO; EOM; RYU; KANG *et al.*, 2020).

No entanto, o núcleo dihidrocumarina **35** não apresentou atividade, resultado que corrobora com anteriores que afirmam que este núcleo é um precursor com uma ótima versatilidade que permite modificações para produzir potenciais moléculas inibidoras da *AchE*. A modificação química da dihidrocumarina **35** neste trabalho é representado pelos derivados piranocumarinas angulares sintéticas, **36a-36i**, sintetizadas anteriormente pelo autor. Essa modificação no núcleo aumentou significativamente a atividade de inibição da enzima *AChE* (Tabela 16). Quando comparamos os análogos da cumarina com as outras duas séries, mas principalmente com os derivados *4H*-cromenos, o sistema de três anéis fusionados foi preponderante para a molécula exibir atividade. Os grupos ciano e éster também tiveram uma importante participação na inibição da *AchE*.

Dividindo a série em dois grupos, os derivados que possuem o grupo ciano e os derivados que possuem o grupo éster, a análise comparativa entre os grupos mostrou que o derivado mais ativo foi o composto *p*-bromofenil com o grupo ciano (**36b**). Quando o grupo ciano foi trocado por um grupo éster, a atividade diminuiu 1.3 vezes (**36f**). O mesmo efeito foi observado com os derivados **36d** e **36i** mas a correlação não foi confirmada, pois o mesmo não foi observado entre os derivados **36a** e **36e**, e os derivados **36c** e **36g**.

Fisostigmina é um alcalóide carbamato inibidor reversível da AChE, o mecanismo de inibição se dá por carbamilação da serina inutilizando-a impedindo a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (HALL, 2021). Os derivados mais ativos foram o **36b** e o **36d**, a diferença entre eles estruturalmente está apenas no

grupamento 4-aryl substituído, o primeiro é o substituinte bromo e o segundo é dimetóxi em orto e para. Em comparação com a fisostigmina, os derivados contêm um grupo ciano  $\alpha,\beta$ -insaturado atuando como sítio eletrofílico. Presumiu-se que esse grupo funcional por estar ligado a dois grupos doadores de elétrons que reduziram sua reatividade e, conseqüentemente, diminuíram a potência quando comparados ao padrão positivo.

#### 5.2.4 Estudos de ancoragem molecular

O estudo de ancoragem molecular foi desenvolvido e realizado em parceria, sob a responsabilidade do prof. Dr. Luiz Antonio Escorteganha Pollo, do Centro de Ciências da Saúde da UFSC (CCS-UFSC). O experimento de ancoragem utilizando a estrutura cristalográfica da acetilcolinesterase recombinante humana complexada com donepezila (PDB: 4EY7) (CHEUNG; RUDOLPH; BURSHTEYN; CASSIDY *et al.*, 2012) foi validado pela primeira vez através da extração e re-ancoragem da donepezila, o ligante cristalográfico, e a mesma estrutura com a geometria otimizada pelo método AM1. A Figura 46A ilustra a superposição do ligante original (laranja) re-ancorado ou re-encaixado (rosa, RMSD = 0.2300 Å) e o ligante com a geometria otimizada (verde, RMSD = 0.6186 Å) no sítio de ligação.

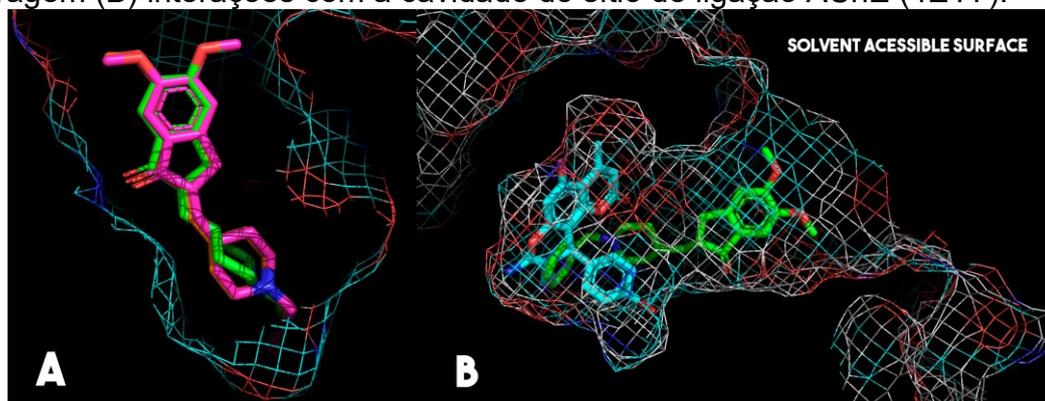
Os derivados que demonstraram atividade anti-AchE *in vitro*, **36b**, **36d**, **36g**, **36i** foram então submetidos a esse experimento de ancoragem molecular. O mais ativo deles, o derivado **36b**, foi comparado com a donepezila quanto a capacidade de ligação com o sítio ativo da enzima. A Figura 46B mostra a cavidade do sítio de ligação da AchE onde, a donepezila (COLLETIER; FOURNIER; GREENBLATT; STOJAN *et al.*, 2006) é posicionada longitudinalmente, permitindo a observação do derivado **36b** interagindo com a porção mais profunda do sítio de ligação.

As principais interações observadas entre a donepezila e o sítio de ligação estão ilustradas na Figura 48. Interação entre o grupo carbonila na posição 1 e F295 (ligação H 1,6 Å), entre o nitrogênio na posição 1 no anel de piperidina e Y337 (ligação H 3,7 Å) e Y341 (ligação H 4,6 Å), entre o substituinte benzil e W86 (empilhamento  $\pi$ - $\pi$ , 3,8 Å) e entre a posição 2 e F297 (interação  $\sigma$ - $\pi$  4,1 Å). Por fim, foi possível observar uma série de interações  $\sigma$ - $\pi$ , entre a posição 3 no anel piperidina com Y341 ( $\sigma$ -interações  $\pi$  3,7 e 3,9 Å, respectivamente), entre a posição 4 no anel de piperidina

com Y337 (interação  $\sigma$ - $\pi$  4,1 Å) e o metileno entre os dois sistemas de anel e Y338 (interação  $\sigma$ - $\pi$  3,6 Å).

Devido a estereoquímica do C-4 nos derivados, ambos os enantiômeros foram levados em consideração no presente estudo e os valores da função de pontuação ChemPLP para cada enantiômero estão apresentados em forma de tabela (Tabela 17).

Figura 46 – Posições representativas da superposição de ligantes de (A) validação da ancoragem (B) interações com a cavidade do sítio de ligação AChE (4EY7).



Fonte: Dr. Luiz A.E. Pollo (MARTIN; POLLO; DA SILVA; BIAVATTI *et al.*, 2022)

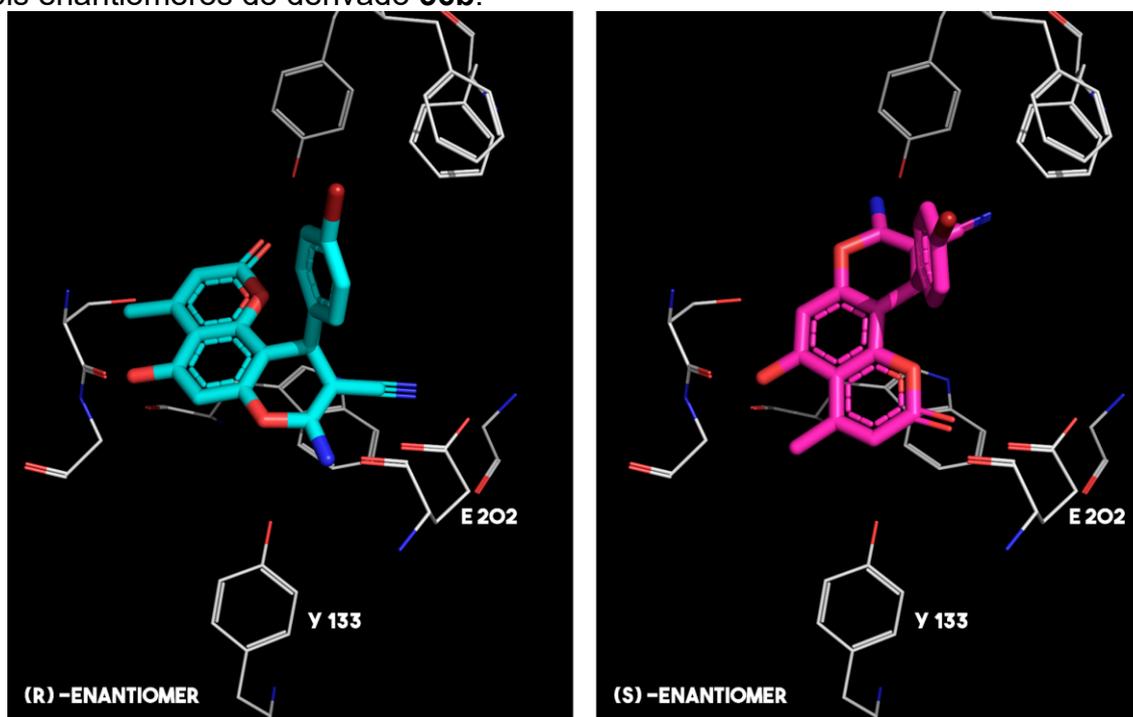
Apesar das interações formadas por cada um dos enantiômeros (R)- e (S)- acontecerem de formas muito diferentes, não houve essa grande diferença nos valores da função de pontuação ChemPLP. Na Figura 47 os dois enantiômeros do derivado **36b** estão representados e foram capazes de interagir com F295, F338, e W86.

Tabela 17 – Valores da função de pontuação ChemPLP para ambos enantiômeros ativos anti-AChE dos derivados **36b**, **36d**, **36g** e **36i**.

Compound	Valor de ChemPLP	
	Enantiomer (R)	Enantiomer (S)
<b>25</b>	74.1625	69.1396
<b>27</b>	79.0017	68.3360
<b>28</b>	64.8555	73.7413
<b>29</b>	45.2029	72.9224
<b>30</b>	50.7852	62.7127

As principais interações entre o grupo amina na posição 8 e o grupo nitrila na posição 9 do enantiômero (R)- com E202, no enantiômero (S)- essas interações foram trocadas por uma interação fraquíssima entre o grupo carbonila na posição 2. Essas observações indicam interações mais fracas entre o enantiômero (S)- e o sítio de ligação proposto no estudo. Sugerindo que o enantiômero (R)- teve melhor afinidade com o sítio de ligação, e a perda das principais interações fortes da *AChE* com o enantiômero **36b**(S)- também pode ser observada em todos os outros derivados ancorados. A disposição do grupo aril volumoso é de grande importância para diminuir a distância do grupo amino na posição 8 com o resíduo carboxi E202. Por consequência, o derivado **36b**(R)- foi aplicado no estudo para exemplificar a melhor interação possível com a parte mais profunda do sítio de ligação (Figura 47).

Figura 47 – Ilustração das interações entre o sítio de ligação da enzima *AChE* e os dois enantiômeros do derivado **36b**.

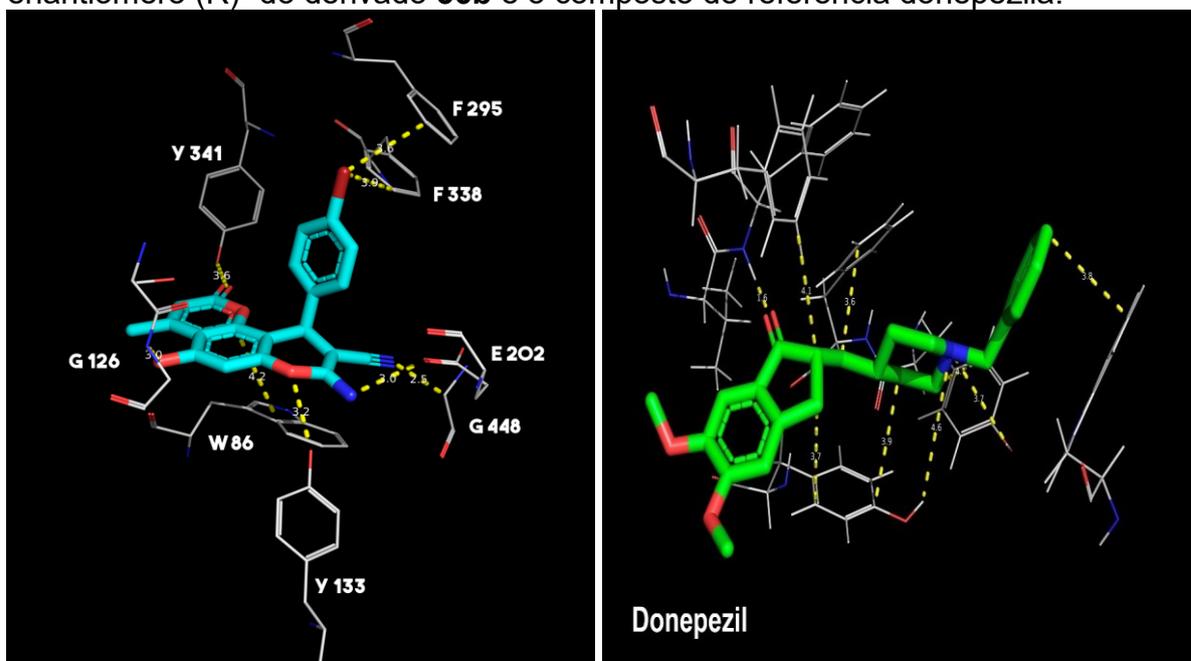


Fonte: Dr. Luiz A.E. Pollo (MARTIN; POLLO; DA SILVA; BIAVATTI *et al.*, 2022)

Na Figura 48 estão ilustradas as principais interações, e três principais foram observadas: entre o grupo amino na posição 8 e E202 (ligação H 3,0 Å), a interação entre o grupo hidroxila fenólico na posição 5 e W86 (ligação H 2,6 Å), e entre o sistema

bicíclico aromático e W86 (interação  $\pi$ - $\pi$ , 4,2 Å). O resíduo de Y133 realiza interações tanto com o oxigênio na posição 7 (ligação H 3,2 Å) quanto com o grupo amino na posição 8 (ligação H 2,7 Å).

Figura 48 – Interações importantes entre o sítio de ligação da enzima AchE e o enantiômero (R)- do derivado **36b** e o composto de referência donepezila.

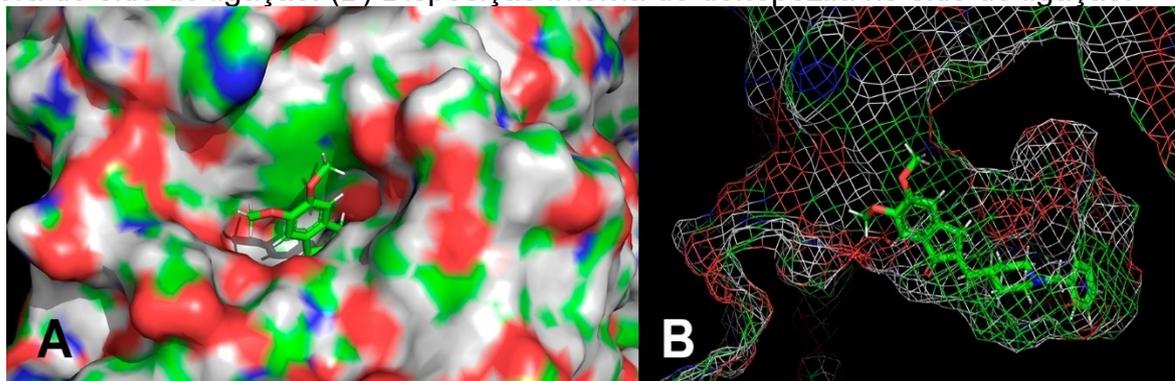


Fonte: Dr. Luiz A.E. Pollo (MARTIN; POLLO; DA SILVA; BIAVATTI *et al.*, 2022)

A Figura 48 permitiu ainda observar ainda outras interações significativas entre o resíduo de Y341 com o grupo carbonila na posição 2 (ligação H, 3,6 Å) e a porção substituída *p*-bromofenil com os resíduos F295 e F338 (interações  $\sigma$ - $\pi$  3,6 e 3,9 Å, respectivamente).

Como observado, o derivado 36b estabelece fortes interações com a porção mais ao fundo do desfiladeiro da enzima, já a donepezila foi capaz de estabelecer somente interações médias a fracas ao longo do desfiladeiro. Foi possível observar ainda, na Figura 49, que o medicamento tem parte de sua estrutura exposta. Por ambos os derivados se ligarem a porções diferentes do sítio de ligação, é esperado que as interações encontradas sejam diferentes.

Figura 49 – A) Superfície da AChE (4EY7) mostrando parte da molécula de donepezila fora do sítio de ligação. (B) Disposição interna de donepezila no sítio de ligação.



Fonte: Dr. Luiz A.E. Pollo (MARTIN; POLLO; DA SILVA; BIAVATTI *et al.*, 2022)

Os resultados aqui apresentados somados aos resultados de atividade inibitória da enzima de outras quarenta e duas moléculas foram revisados por pares e publicados na revista “Journal of Molecules Structure” e publicados em julho de 2022 (MARTIN; POLLO; DA SILVA; BIAVATTI *et al.*, 2022).

## 6 CONCLUSÃO

O estudo permitiu serem produzidos dez derivados 2,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol (**31a-j**), com baixo rendimento e 03 derivados 4H-cromenos novos na literatura (**34a-c**). A vantagem das reações multicomponentes aplicadas neste estudo foram a baixa geração de resíduos, a utilização dos solventes denominados amigos da natureza como EtOH e água que tem baixo grau de poluição do meio ambiente, o aproveitamento do número total de moléculas dos reagentes iniciais e a facilidade de reprodução da reação com baixos riscos de acidentes laboratoriais.

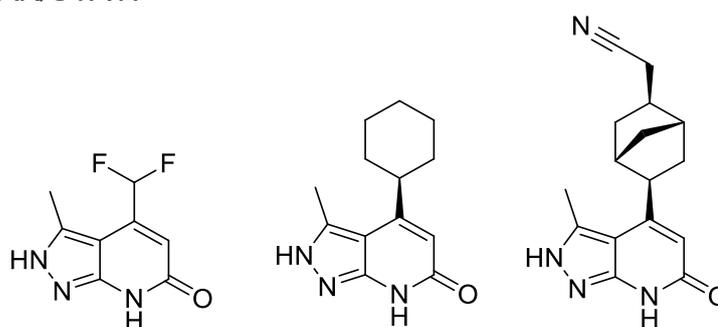
O presente trabalho descreveu a atividade inibitória da acetilcolinesterase de trinta derivados, atividade essa que foi descrita em literatura pela primeira vez (MARTIN; POLLO; DA SILVA; BIAVATTI *et al.*, 2022), juntamente com a atividade de outras substâncias. Os derivados de piranocumarinas apresentaram uma boa atividade, com valores de IC<sub>50</sub> variando entre 9 e 33 µM. Os resultados mostraram que as piranocumarinas com a presença do grupo amino foram as mais ativas, **36b** e **36d** foram as mais ativas. O **36b** possui a porção p-bromofenil e o **36d** apresenta a porção 3,4-dimetóxi. O estudo da ancoragem molecular revelou a relação estrutura-afinidade do átomo de bromo e grupos químicos como NH<sub>2</sub>, ciano, hidróxi e carbonila mostraram proximidade com os resíduos F295, F338, E202, G448, Y341, W86 e G126 no sítio A de ligação da enzima *AChE*.

Assim, as estratégias de síntese aplicadas para obtenção dos derivados cumarínicos também foi baseada na reação multicomponente, tornando a obtenção destes compostos simplificada. Por consequência, esses derivados se apresentaram como ótimos protótipos no desenvolvimento de terapias que tem como base a inibição da enzima *AChE*.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo permitiu aumentar o leque de derivados sintéticos, com potencial atividade biológica, ainda não exploradas. A fim de explorar ainda mais a atividade biológica dos derivados sintetizados. Em uma revisão bibliográfica derivados pirazolpiridonas (Figura 50) demonstraram possível atividade *in silico* nas vias de sinalização inflamatória atuando na via JAK/STAT. (HANSEN; JEPSEN; LARSEN; SINDET *et al.*, 2020). Para aumentar ainda mais o leque, avaliar a hipótese dos derivados pirano-pirazóis possuírem atividade com potencial de ação interferindo na cascata da inflamação.

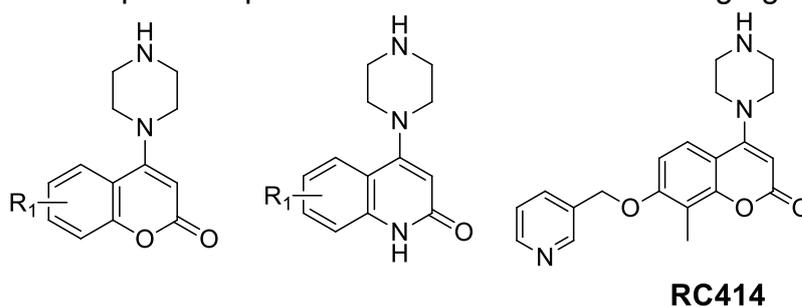
Figura 50 – Derivados pirazolpiridonas que demonstraram atividade antiinflamatória atuando na via JAK/STAT.



Fonte: o autor

Outra cascata fisiológica importante no ser humano com potencial terapêutico explorado dos cromenos e cromonas é a da coagulação. Em publicações anteriores, o composto RC414(11) e dois derivados 4-(1-piperazinil)-2H-cumarinas (Figura 51) foram alvos de estudos como novos potenciais antiagregantes plaquetários, através do bloqueio da enzima fosfodiesterase que previne a degradação dos mensageiros celulares AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) e GMPc (monofosfato cíclico de guanosina). A molécula RC-414 apresentou atividade inibitória específica da AMPc com alta afinidade pela fosfodiesterase com valores de IC<sub>50</sub> de 1,73 ± 0.35 μM (COSTA; DIAS; BRITO; PROENCA, 2016; LEONCINI; SIGNORELLO; BRUZZESE; DI BRACCIO *et al.*, 2004). Com o objetivo de explorar os 4H-cromenos como esqueletos bioativos com possível ação na cascata da coagulação, estes derivados foram enviados para o Departamento de Análises Clínicas da UFSC, sob a responsabilidade da prof. Dra. Ana Carolina Rabello de Moraes.

Figura 51 – Derivados piranos que demonstraram atividade antiagregante plaquetária.



Fonte: o autor

Os compostos sintetizados neste trabalho foram enviados também para o “Department of Global Health and Infection, Brighton and Sussex Medical School, na Universidade de Sussex, Brighton, Reino Unido, aos cuidados do professor Dr. Simon Waddell para avaliar a atividade anti-mycobacterium. As substâncias foram também encaminhadas para a Universidade Johannes Gutenberg de Mainz, na Alemanha, para avaliação do potencial de inibição da enzima Mpro do SARS-CoV-2.

E como a quiralidade desempenha um papel de suma importância na ação farmacológica e na determinação da ligação específica (LIN; YOU; CHENG, 2011), como o enantiômero (S)-(-)-propranolol é 100 vezes mais potente como  $\beta$ -bloqueador ou o enantiômero (S)-(+)-ibuprofeno é mais ativo (ALKADI; JBEILY, 2018). Uma lacuna na síntese é a avaliação do centro estereoquímico já que assumiu-se que a reação possa resultar em uma mistura racêmica dos enantiômeros, avaliar a estereoquímica dos compostos sintetizados.

## 8 REFERÊNCIAS

ABDUSSALAM-MOHAMMED, W.; ALI, A.; ERRAYES, A. Green chemistry: principles, applications, and disadvantages. **Chem. Methodol**, 4, p. 408-423, 2020.

AL-MATAR, H. M.; KHALIL, K. D.; ADAM, A. Y.; ELNAGDI, M. H. Green one pot solvent-free synthesis of pyrano [2, 3-c]-pyrazoles and pyrazolo [1, 5-a] pyrimidines. **Molecules**, 15, n. 9, p. 6619-6629, 2010.

ALKADI, H.; JBEILY, R. Role of Chirality in Drugs: An Overview. **Infectious disorders drug targets**, 18, n. 2, p. 88-95, 2018.

AMADO, D. K.; BRUCKI, S. M. D. Knowledge about Alzheimer's disease in the Brazilian population. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, 76, p. 775-782, 2018.

AMIN, K. M.; RAHMAN, D. E. A.; ALLAM, H. A.; EL-ZOHEIRY, H. H. Design and synthesis of novel coumarin derivatives as potential acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Bioorganic Chemistry**, 110, p. 104792, 2021.

ANAND, P.; SINGH, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Archives of Pharmacal Research**, 36, n. 4, p. 375-399, 2013.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. **Chemical Society Reviews**, 39, n. 1, p. 301-312, 2010.

ARANDA, M. P.; KREMER, I. N.; HINTON, L.; ZISSIMOPOULOS, J. *et al.* Impact of dementia: Health disparities, population trends, care interventions, and economic costs. **Journal of the American Geriatrics Society**, 69, n. 7, p. 1774-1783, 2021.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. d. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.

ARAÚJO, S. M. V. G. d. Environmental policy in the Bolsonaro government: the response of environmentalists in the Legislative Arena. **Brazilian Political Science Review**, 14, 2020.

ASSOCIATION, A. s. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's Dementia**, 16, n. 3, p. 327-406, 2021.

BABU, M. N.; ELUMALAI, K.; SRINIVASAN, S.; ELURI, K. *et al.* Synthesis and anticholinesterase activity of a novel series of acetazolamide condensed 1, 4-dihydropyridines. **Carbon Resources Conversion**, 2, n. 3, p. 191-197, 2019.

BARNES, D. E.; YAFFE, K. Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. **The New England Journal of Medicine**, 353, p. 951-952, 2005.

BARTUS, R. T.; DEAN III, R. L.; BEER, B.; LIPPA, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, 217, n. 4558, p. 408-414, 1982.

BEKDASH, R. A. The cholinergic system, the adrenergic system and the neuropathology of alzheimer's disease. **Int Journal of Molecular Sciences**, 22, n. 3, p. 1273, 2021.

BELLUTI, F.; PIAZZI, L.; BISI, A.; GOBBI, S. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of benzophenone derivatives as novel acetylcholinesterase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44, n. 3, p. 1341-1348, 2009.

BENNETT, B. M.; REYNOLDS, J. N.; PRUSKY, G. T.; DOUGLAS, R. M. *et al.* Cognitive deficits in rats after forebrain cholinergic depletion are reversed by a novel NO mimetic nitrate ester. **Neuropsychopharmacology**, 32, n. 3, p. 505-513, 2007.

BERTRAND, D.; WALLACE, T. L. A review of the cholinergic system and therapeutic approaches to treat brain disorders. **Behavioral Pharmacology of the Cholinergic System**, 45, p. 1-28, 2020.

BOURNE, Y.; RADIC, Z.; SULZENBACHER, G.; KIM, E. *et al.* Substrate and product trafficking through the active center gorge of acetylcholinesterase analyzed by crystallography and equilibrium binding. **Journal of Biological Chemistry**, 281, n. 39, p. 29256-29267, 2006.

BOURNE, Y.; TAYLOR, P.; BOUGIS, P. E.; MARCHOT, P. Crystal structure of mouse acetylcholinesterase: a peripheral site-occluding loop in a tetrameric assembly. **Journal of Biological Chemistry**, 274, n. 5, p. 2963-2970, 1999.

CHEN, I.-S.; CHANG, C.-T.; SHEEN, W.-S.; TENG, C.-M. *et al.* Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from Formosan *Peucedanum japonicum*. **Phytochemistry**, 41, n. 2, p. 525-530, 1996.

CHEUNG, J.; RUDOLPH, M. J.; BURSHTEYN, F.; CASSIDY, M. S. *et al.* Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, 55, n. 22, p. 10282-10286, 2012.

COLLETIER, J. P.; FOURNIER, D.; GREENBLATT, H. M.; STOJAN, J. *et al.* Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. **The EMBO journal**, 25, n. 12, p. 2746-2756, 2006.

COSTA, M.; DIAS, T. A.; BRITO, A.; PROENCA, F. Biological importance of structurally diversified chromenes. **European J Med Chem**, 123, p. 487-507, 2016.

DEUTSCH, J. A. The cholinergic synapse and the site of memory. **Science**, 174, n. 4011, p. 788-794, 1971.

DOMLING, A.; WANG, W.; WANG, K. Chemistry and biology of multicomponent reactions. **Chemical Reviews**, 112, n. 6, p. 3083-3135, 2012.

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

ELLUL, J.; ARCHER, N.; FOY, C.; POPPE, M. *et al.* The effects of commonly prescribed drugs in patients with Alzheimer's disease on the rate of deterioration. **Journal of Neurology, Neurosurgery Psychiatry**, 78, n. 3, p. 233-239, 2007.

ENZ, A.; BODDEKE, H.; GRAY, J.; SPIEGÉL, R. Pharmacologic and clinicopharmacologic properties of SDZ ENA 713, a centrally selective acetylcholinesterase inhibitor. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 640, n. 1, p. 272-275, 1991.

ESTATÍSTICA, I. B. d. G. e. **Panorama Cidade de São Paulo**. 2021. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/sao-paulo/panorama>. Acesso em: 04/04/2022.

FETER, N.; LEITE, J. S.; CAPUTO, E. L.; CARDOSO, R. K. *et al.* Who are the people with Alzheimer's disease in Brazil? Findings from the Brazilian Longitudinal Study of Aging. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 24, p. 1-13, 2021.

FIFER, E. K. Foye's principles of medicinal chemistry. *In.* 6th ed.: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. cap. 361-391.

FIGUEIREDO, F. d. A.; FIREMAN, M. A. d. A. PORTARIA CONJUNTA Nº 13, DE 28 DE NOVEMBRO DE 2017. DOU. SAÚDE, M. D. S. S. D. A. À.

GARRE-OLMO, J. Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias. **Revista de Neurologia**, 66, n. 11, p. 377-386, 2018.

GOLDE, T. E.; RAN, Y.; FELSENSTEIN, K. M. Shifting a complex debate on  $\gamma$ -secretase cleavage and Alzheimer's disease. **The EMBO Journal**, 31, n. 10, p. 2237-2239, 2012.

HALL, J. E. **Guyton & Hall. Tratado de fisiología médica**. 13 ed. Elsevier Health Sciences, 2017 2021. 8413820731.

HAMPEL, H.; MESULAM, M.-M.; CUELLO, A. C.; KHACHATURIAN, A. S. *et al.* Revisiting the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease: emerging evidence from translational and clinical research. **The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease**, 6, n. 1, p. 2-15, 2019.

HANSEN, B. B.; JEPSEN, T. H.; LARSEN, M.; SINDET, R. *et al.* Fragment-based discovery of pyrazolopyridones as JAK1 inhibitors with excellent subtype selectivity. 2020.

HANSEN, D. V.; HANSON, J. E.; SHENG, M. Microglia in Alzheimer's disease. **Journal of Cell Biology**, 217, n. 2, p. 459-472, 2018.

HANSEN, R. A.; GARTLEHNER, G.; WEBB, A. P.; MORGAN, L. C. *et al.* Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Interventions in Aging**, 3, n. 2, p. 211, 2008.

HARDY, J. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal. **Journal of Alzheimer's Disease**, 9, n. s3, p. 151-153, 2006.

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

HEO, J. H.; EOM, B. H.; RYU, H. W.; KANG, M.-G. *et al.* Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities of khellactone coumarin derivatives isolated from *Peucedanum japonicum* Thurnberg. **Scientific reports**, 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

HUGO, J.; GANGULI, M. Dementia and cognitive impairment: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Clinics in geriatric medicine**, 30, n. 3, p. 421-442, 2014.

ISOBE, K.; HOSHI, T.; SUZUKI, T.; HAGIWARA, H. Knoevenagel reaction in water catalyzed by amine supported on silica gel. **Molecular diversity**, 9, n. 4, p. 317-320, 2005.

KANAGARAJ, K.; PITCHUMANI, K. Solvent-free multicomponent synthesis of pyranopyrazoles: per-6-amino- $\beta$ -cyclodextrin as a remarkable catalyst and host. **Tetrahedron Letters**, 51, n. 25, p. 3312-3316, 2010.

KANG, S. Y.; LEE, K. Y.; SUNG, S. H.; PARK, M. J. *et al.* Coumarins Isolated from *Angelica gigas* Inhibit Acetylcholinesterase: Structure– Activity Relationships. **Journal of Natural Products**, 64, n. 5, p. 683-685, 2001.

KÁSA, P.; RAKONCZAY, Z.; GULYA, K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, 52, n. 6, p. 511-535, 1997.

KEERTHY, H. K.; GARG, M.; MOHAN, C. D.; MADAN, V. *et al.* Synthesis and characterization of novel 2-amino-chromene-nitriles that target Bcl-2 in acute myeloid leukemia cell lines. **PloS one**, 9, p. 107-118, 2014.

KHOABI, M.; ALIPOUR, M.; SAKHTEMAN, A.; NADRI, H. *et al.* Design, synthesis, biological evaluation and docking study of 5-oxo-4, 5-dihydropyrano [3, 2-c] chromene derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 68, p. 260-269, 2013.

KHOABI, M.; GHANONI, F.; NADRI, H.; MORADI, A. *et al.* New tetracyclic tacrine analogs containing pyrano [2, 3-c] pyrazole: Efficient synthesis, biological assessment and docking simulation study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 89, p. 296-303, 2015.

KURTI, L.; CZAKÓ, B. **Strategic applications of named reactions in organic synthesis**. Elsevier, 2005. 0080575412.

LAM, K.; TIMMERMAN, H. Multicomponent reactions in drug discovery and medicinal chemistry. **Drug Discovery Today: Technologies**, 29, 2018.

LAMB, S. E.; SHEEHAN, B.; ATHERTON, N.; NICHOLS, V. *et al.* Dementia And Physical Activity (DAPA) trial of moderate to high intensity exercise training for people with dementia: randomised controlled trial. **BMJ**, 361, 2018.

LASHLEY, T.; SCHOTT, J. M.; WESTON, P.; MURRAY, C. E. *et al.* Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects. **Disease Models Mechanisms**, 11, n. 5, p. dmm031781, 2018.

LEGAY, C. Why so many forms of acetylcholinesterase? **Microscopy Research Technique**, 49, n. 1, p. 56-72, 2000.

LEONCINI, G.; SIGNORELLO, M. G.; BRUZZESE, D.; DI BRACCIO, M. *et al.* Mechanisms involved in the antiplatelet activity of 8-methyl-4-(1-piperazinyl)-7-(3-pyridinylmethoxy)-2H-1-benzopyran-2-one (RC414). **Biochemical pharmacology**, 67, n. 5, p. 911-918, 2004.

LI, X.; YU, Y.; TU, Z. Pyrazole scaffold synthesis, functionalization, and applications in Alzheimer's disease and Parkinson's disease treatment (2011–2020). **Molecules**, 26, n. 5, p. 1202, 2021.

LIN, G.-Q.; YOU, Q.-D.; CHENG, J.-F. **Chiral drugs: Chemistry and biological action**. John Wiley & Sons, 2011. 1118075633.

LOPEZ, O. L.; KULLER, L. H. Epidemiology of aging and associated cognitive disorders: Prevalence and incidence of Alzheimer's disease and other dementias. **Handbook of clinical neurology**, 167, p. 139-148, 2019.

MAALEJ, E.; CHABCHOUB, F.; SAMADI, A.; DE LOS RÍOS, C. *et al.* Synthesis, biological assessment and molecular modeling of 14-aryl-10, 11, 12, 14-tetrahydro-9H-benzo [5, 6] chromeno [2, 3-b] quinolin-13-amines. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, 21, n. 8, p. 2384-2388, 2011.

MAHMOUD, W. R.; NISSAN, Y. M.; ELSAWAH, M. M.; REFAEY, R. H. *et al.* Neurobehavioral investigation and acetylcholinesterase inhibitory activity study for some new coumarin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 182, p. 111651, 2019.

MANOUCHEHRIZADEH, E.; MOSTOUFI, A.; TAHANPESAR, E.; FERREIDONNEZHAD, M. Alignment-independent 3D-QSAR and molecular docking studies of tacrine– 4-oxo-4H-Chromene hybrids as anti-Alzheimer's agents. **Computational Biology**, 80, p. 463-471, 2019.

MARCO, J. L.; DE LOS RÍOS, C.; CARREIRAS, M. a. C.; BAÑOS, J. E. *et al.* Synthesis and acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase inhibition activity of new tacrine-like analogues. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, 9, n. 3, p. 727-732, 2001.

MARCO, J. L.; DE LOS RÍOS, C.; CARREIRAS, M. C.; BAÑOS, J. E. *et al.* Synthesis and Acetylcholinesterase/Butyrylcholinesterase Inhibition Activity of 4-Amino-2, 3-diaryl-5, 6, 7, 8-tetrahydrofuro (and thieno)[2, 3-b]-quinolines, and 4-Amino-5, 6, 7, 8, 9-pentahydro-2, 3-diphenylcyclohepta [e] furo (and thieno)-[2, 3-b] pyridines. **Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical Medicinal Chemistry**, 335, n. 7, p. 347-353, 2002.

MARTIN, E. F.; MBAVENG, A. T.; DE MORAES, M. H.; KUETE, V. *et al.* Prospecting for cytotoxic and antiprotozoal 4-aryl-4H-chromenes and 10-aryldihydropyrano [2, 3-f] chromenes. 351, n. 10, p. 1800100, 2018.

MARTIN, E. F.; POLLO, L. A. E.; DA SILVA, L. A. L.; BIAVATTI, M. W. *et al.* In vitro studies of a series of synthetic compounds for their anti-acetylcholinesterase activities identified arylpyrano [2, 3-f] coumarins as hit compounds. **Journal of Molecular Structure**, 1260, p. 132799, 2022.

MASESANE, I. B.; MIHIGO, S. O. Efficient and green preparation of 2-amino-4H-chromenes by a room-temperature, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-catalyzed, three-component reaction of malononitrile, benzaldehydes, and phloroglucinol or resorcinol in aqueous medium. **Synthetic Communications**

45, n. 13, p. 1546-1551, 2015.

MASSOULIÉ, J.; SUSSMAN, J.; BON, S.; SILMAN, I. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Progress in Brain Research**, 98, p. 139-146, 1993.

MENEZES, R. G.; BARBOSA JR, R. Environmental governance under Bolsonaro: dismantling institutions, curtailing participation, delegitimising opposition. **Zeitschrift für vergleichende politikwissenschaft**, 15, n. 2, p. 229-247, 2021.

MOHAMED, N. R.; KHAIRELDIN, N. Y.; FAHMYB, A.; EL-SAYEDA, A. Facile synthesis of fused nitrogen containing heterocycles as anticancer agents. **Der Pharm Chem**, 2, p. 400-417, 2010.

MUTHURAJU, S.; MAITI, P.; SOLANKI, P.; SHARMA, A. K. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors enhance cognitive functions in rats following hypobaric hypoxia. **Behavioural Brain Research**, 203, n. 1, p. 1-14, 2009.

NAGARAJAN, A. S.; REDDY, B. S. Synthesis of substituted pyranopyrazoles under neat conditions via a multicomponent reaction. **Synlett**, 2009, n. 12, p. 2002-2004, 2009.

NAGUY, A.; HUSAIN, K.; ALAMIRI, B. Galantamine beyond Alzheimer's disease—a fact or artefact? **CNS Spectrums**, 27, n. 3, p. 268-271, 2022.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NGUYEN, K.; HOFFMAN, H.; CHAKKAMPARAMBIL, B.; GROSSBERG, G. T. Evaluation of rivastigmine in Alzheimer's disease. **Neurodegenerative disease management**, 11, n. 1, p. 35-48, 2020.

NICHOLS, E.; SZOEKE, C. E.; VOLLSET, S. E.; ABBASI, N. *et al.* Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, 18, n. 1, p. 88-106, 2019.

NORDSTRÖM, P.; RELIGA, D.; WIMO, A.; WINBLAD, B. *et al.* The use of cholinesterase inhibitors and the risk of myocardial infarction and death: a nationwide cohort study in subjects with Alzheimer's disease. **European Heart Journal**, 34, n. 33, p. 2585-2591, 2013.

ORDENTLICH, A.; BARAK, D.; KRONMAN, C.; ARIEL, N. *et al.* Functional characteristics of the oxyanion hole in human acetylcholinesterase. **Journal of Biological Chemistry**, 273, n. 31, p. 19509-19517, 1998.

ORGANIZATION, W. H. **Dementia**. 02/09/2022 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. Acesso em: 30/04/2022.

ORHAN, I. E.; SENOL, F. S.; SHEKFEH, S.; SKALICKA-WOZNIAK, K. *et al.* Pteryxin-a promising butyrylcholinesterase-inhibiting coumarin derivative from *Mutellina purpurea*. **Food Chemical Toxicology** 109, p. 970-974, 2017.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 5 ed. Oxford university press, 2013. 0199697396.

PEZZEMENTI, L.; NACHON, F.; CHATONNET, A. Evolution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the vertebrates: an atypical butyrylcholinesterase from the Medaka *Oryzias latipes*. **PLoS One**, 6, n. 2, p. e17396, 2011.

POLINSKY, R. J. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. **Clinical Therapeutics**, 20, n. 4, p. 634-647, 1998.

POURABDI, L.; KHOOBI, M.; NADRI, H.; MORADI, A. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship study of tacrine-based pyrano [2, 3-c] pyrazoles targeting AChE/BuChE and 15-LOX. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 123, p. 298-308, 2016.

PRINCE, M.; BRYCE, R.; ALBANESE, E.; WIMO, A. *et al.* The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. **Alzheimer's Dementia**, 9, n. 1, p. 63-75, 2013.

QIZILBASH, N.; WHITEHEAD, A.; HIGGINS, J.; WILCOCK, G. *et al.* Cholinesterase inhibition for Alzheimer disease: a meta-analysis of the tacrine trials. **Jama**, 280, n. 20, p. 1777-1782, 1998.

RAZAY, G.; WILCOCK, G. K. Galantamine in Alzheimer's disease. **Expert Review of Neurotherapeutics**, 8, n. 1, p. 9-17, 2008.

ROSENBERRY, T. L.; BRAZZOLOTTO, X.; MACDONALD, I. R.; WANDHAMMER, M. *et al.* Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: A crystallographic, kinetic and calorimetric study. **Molecules**, 22, n. 12, p. 2098, 2017.

RULLO, M.; CATTO, M.; CARRIERI, A.; DE CANDIA, M. *et al.* Chasing ChEs-MAO B Multi-Targeting 4-Aminomethyl-7-Benzoyloxy-2 H-Chromen-2-ones. **Molecules**, 24, n. 24, p. 4507, 2019.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiological Reviews**, 2001.

SHAFFERMAN, A.; BARAK, D.; KAPLAN, D.; ORDENTLICH, A. *et al.* Functional requirements for the optimal catalytic configuration of the AChE active center. **Chemico-biological Interactions**, 157, p. 123-131, 2005.

SHAMROUKH, A. H.; ZAKI, M. E.; MORSY, E. M.; ABDEL-MOTTI, F. M. *et al.* Synthesis of Pyrazolo [4', 3': 5, 6] pyrano [2, 3-d] pyrimidine Derivatives for Antiviral Evaluation. **Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical Medicinal Chemistry**, 340, n. 5, p. 236-243, 2007.

SIEK, G. C.; KATZ, L. S.; FISHMAN, E. B.; KOROSI, T. S. *et al.* Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain. **Biological psychiatry**, 27, n. 6, p. 573-580, 1990.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: how is structure related to function? **Chemico-biological interactions**, 175, n. 1-3, p. 3-10, 2008.

SIMOES, M. C. R.; VIEGAS, F. P. D.; MOREIRA, M. S.; SILVA, M. d. F. *et al.* Donepezil: an important prototype to the design of new drug candidates for Alzheimer's disease. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, 14, n. 1, p. 2-19, 2014.

SIMON, G. M.; CRAVATT, B. F. Activity-based proteomics of enzyme superfamilies: serine hydrolases as a case study. **Journal of Biological Chemistry**, 285, n. 15, p. 11051-11055, 2010.

SMITH, M. B. **March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure**. John Wiley & Sons, 2020. 1119371805.

STANCIU, G. D.; LUCA, A.; RUSU, R. N.; BILD, V. *et al.* Alzheimer's disease pharmacotherapy in relation to cholinergic system involvement. **Biomolecules**, 10, n. 1, p. 40, 2019.

SUMMERS, W.; KOEHLER, A.; MARSH, G.; TACHIKI, K. *et al.* Long-term hepatotoxicity of tacrine. **The Lancet**, 333, n. 8640, p. 729, 1989.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C. *et al.* Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**, 253, n. 5022, p. 872-879, 1991.

TAN, E. C.; JOHNNELL, K.; GARCIA-PTACEK, S.; HAAKSMA, M. L. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors and risk of stroke and death in people with dementia. **Alzheimer's Dementia**, 14, n. 7, p. 944-951, 2018.

TANG, S. L.; SMITH, R. L.; POLIAKOFF, M. Principles of green chemistry: PRODUCTIVELY. **Green Chemistry**, 7, n. 11, p. 761-762, 2005.

TIETZE, L. F.; RACKELMANN, N. Domino reactions in the synthesis of heterocyclic natural products and analogs. **Pure Applied Chemistry**, 76, n. 11, p. 1967-1983, 2004.

TURNBULL, M. T.; BOSKOVIC, Z.; COULSON, E. J. Acute down-regulation of BDNF signaling does not replicate exacerbated amyloid- $\beta$  levels and cognitive impairment induced by cholinergic basal forebrain lesion. **Frontiers In Molecular Neuroscience**, 11, 2018.

UGI, I.; DÖMLING, A.; HÖRL, W. Multicomponent reactions in organic chemistry. **Endeavour**, 18, n. 3, p. 115-122, 1994.

UPADHYAY, A.; SHARMA, L. K.; SINGH, V. K.; DUBEY, R. *et al.* Electrochemically induced one pot synthesis of 1, 4-dihydropyrano [2, 3-c]-pyrazole-5-carbonitrile derivatives via a four component-tandem strategy. **Tetrahedron Letters**, 58, n. 13, p. 1245-1249, 2017.

VECCHIO, I.; SORRENTINO, L.; PAOLETTI, A.; MARRA, R. *et al.* The state of the art on acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Central Nervous System Disease**, 13, p. 11795735211029113, 2021.

VENTURA, A. L.; ABREU, P. A.; FREITAS, R. C.; SATHLER, P. C. *et al.* Colinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Revista de Psiquiatria Clinica**, 37, n. 2, p. 74-81, 2010.

VERMA, P.; CHAUHAN, S.; SINGH, V.; SINGH, S. *et al.* Urea hydrogen peroxide-initiated synthesis of pyranopyrazoles through oxidative coupling under base-and metal-free conditions by physical grinding method. **Molecular Diversity**, 26, n. 3, p. 1769-1777, 2022.

VIEGAS, F. P.; SIMÕES, M. C. R.; DA ROCHA, M. D.; CASTELLI, M. R. *et al.* Doença de Alzheimer: Caracterização, evolução e implicações do processo neuroinflamatório. **Revista Virtual de Química**, 3, n. 4, p. 286-306, 2011.

WHITEHOUSE, P. J.; PRICE, D. L.; CLARK, A. W.; COYLE, J. T. *et al.* Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. **Annals of Neurology**, 10, n. 2, p. 122-126, 1981.

WONG, W. Economic burden of Alzheimer disease and managed care considerations. **The American Journal of Managed Care**, 26, n. 8 Suppl, p. S177-S183, 2020.

WOOLF, N. J.; BUTCHER, L. L. Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. **Behavioural Brain Research**, 221, n. 2, p. 488-498, 2011.

YAO, D.; WANG, J.; WANG, G.; JIANG, Y. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives as novel acetylcholinesterase inhibitors that attenuate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. **Bioorganic Chemistry**, 68, p. 112-123, 2016.

YEUNG, Y. T.; AZIZ, F.; GUERRERO-CASTILLA, A.; ARGUELLES, S. J. C. P. D. Signaling pathways in inflammation and anti-inflammatory therapies. 24, n. 14, p. 1449-1484, 2018.

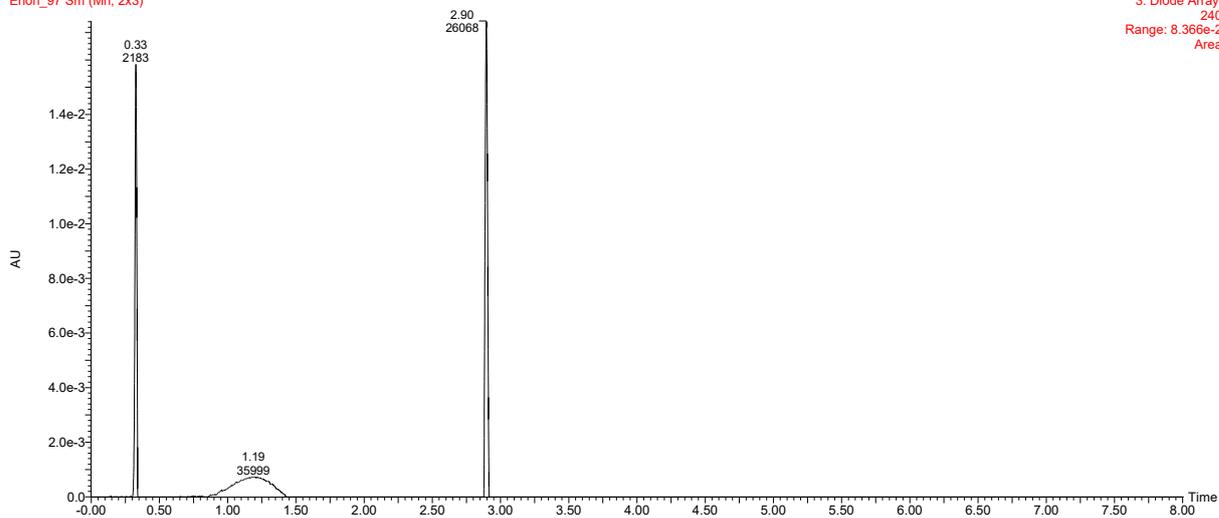
ZOU, Y.; WU, H.; HU, Y.; LIU, H. *et al.* A novel and environment-friendly method for preparing dihydropyrano [2, 3-c] pyrazoles in water under ultrasound irradiation. **Ultrasonics sonochemistry**, 18, n. 3, p. 708-712, 2011.

## 9 ANEXOS

### Anexo A – Cromatograma do derivado **31b** por CLUE-PDA.

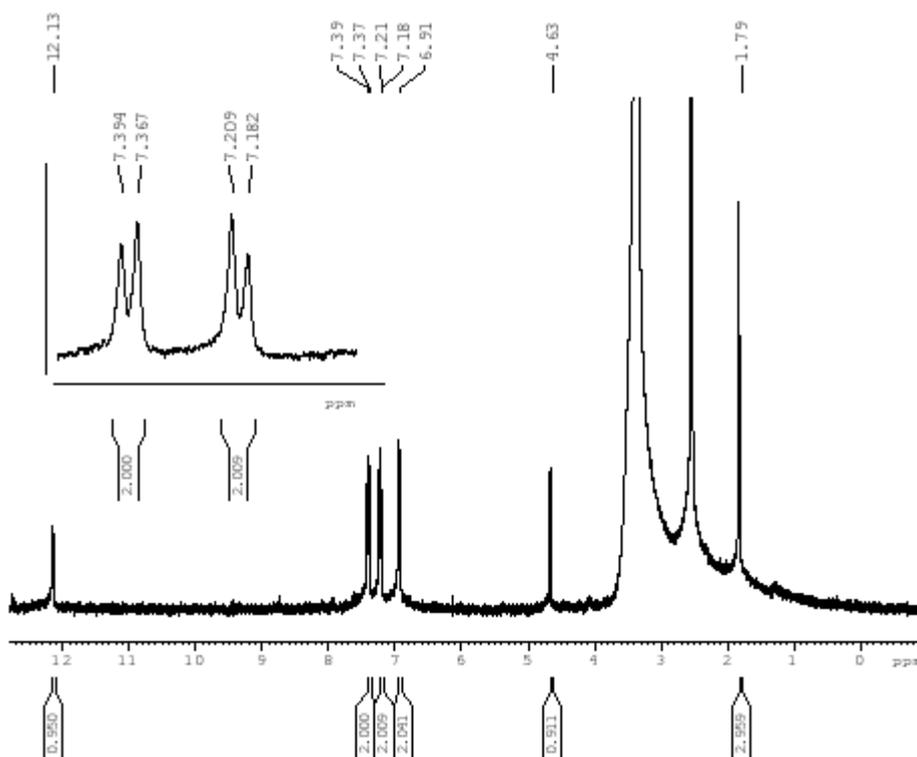
24\_02\_2021

Erlon\_97 Sm (Mn, 2x3)

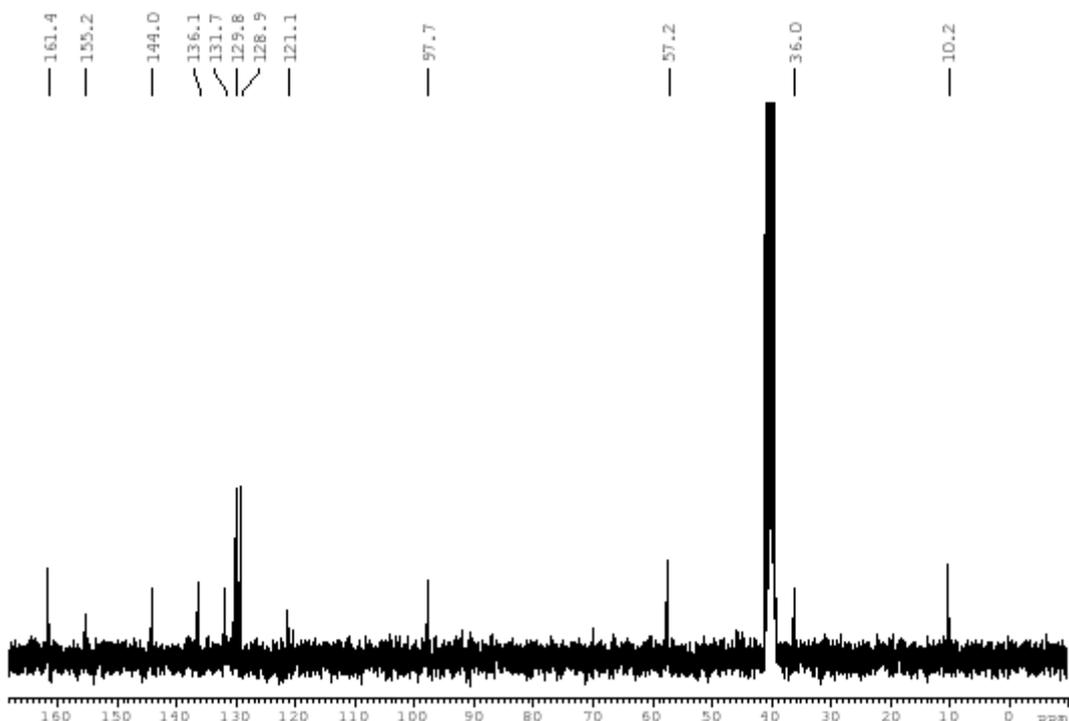
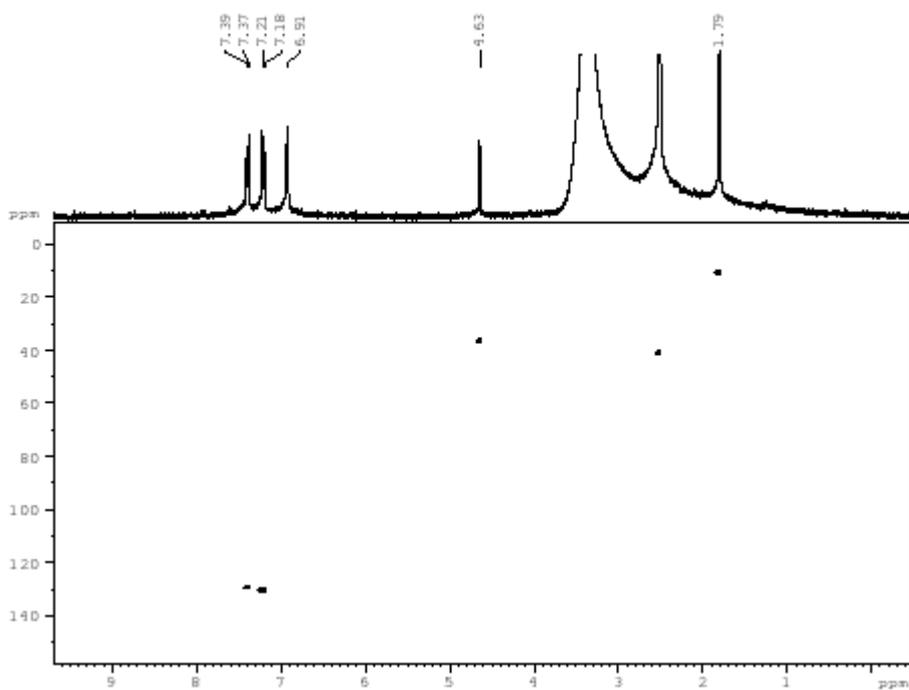


Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

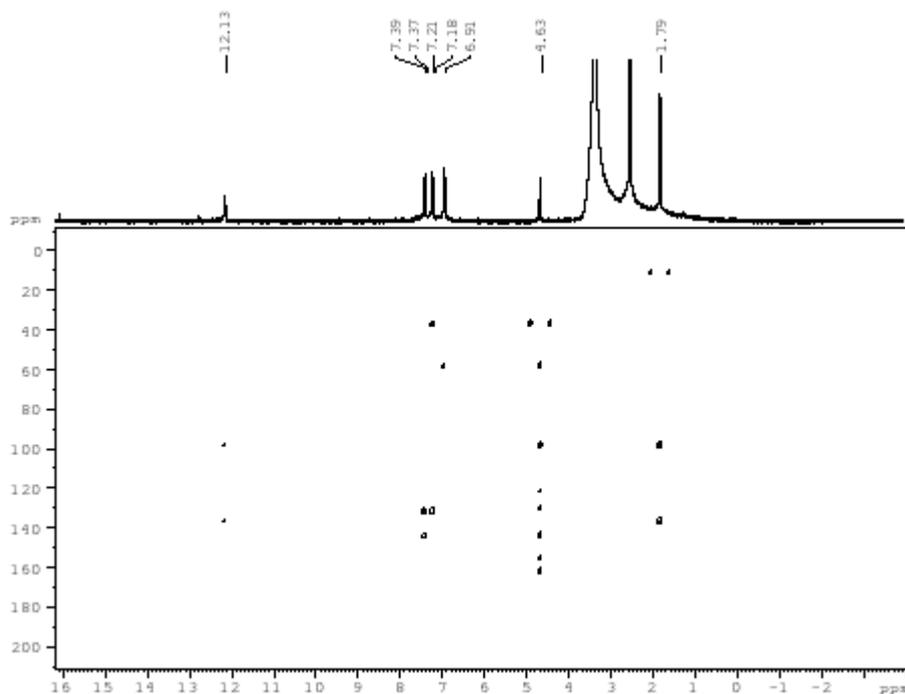
### Anexo B – Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300Hz, TMS, $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31b**.



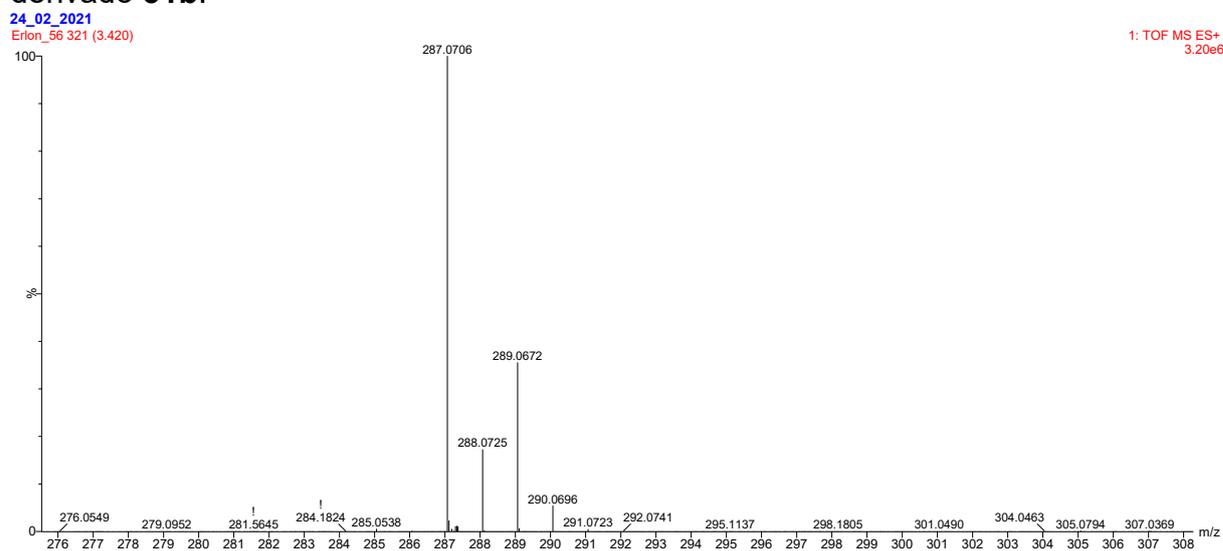
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo C – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31b**.Anexo D – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31b**.

Anexo E – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31b**.



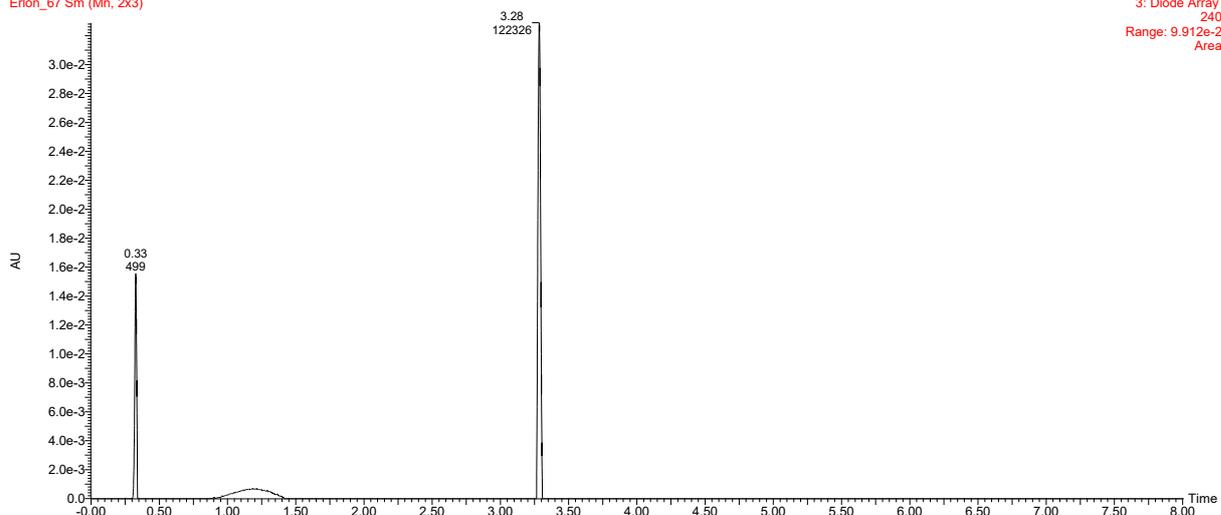
Anexo F – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **31b**.



### Anexo G – Cromatograma do derivado **31c** por CLUE-PDA.

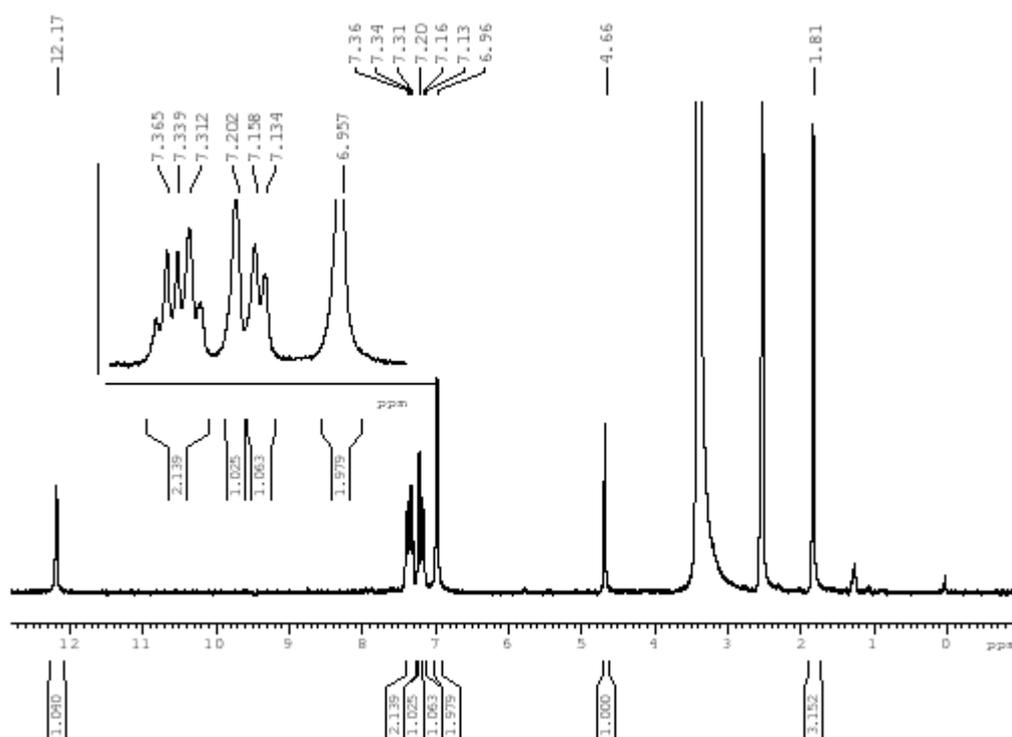
24\_02\_2021

Erion\_67 5m (Mn, 2x3)



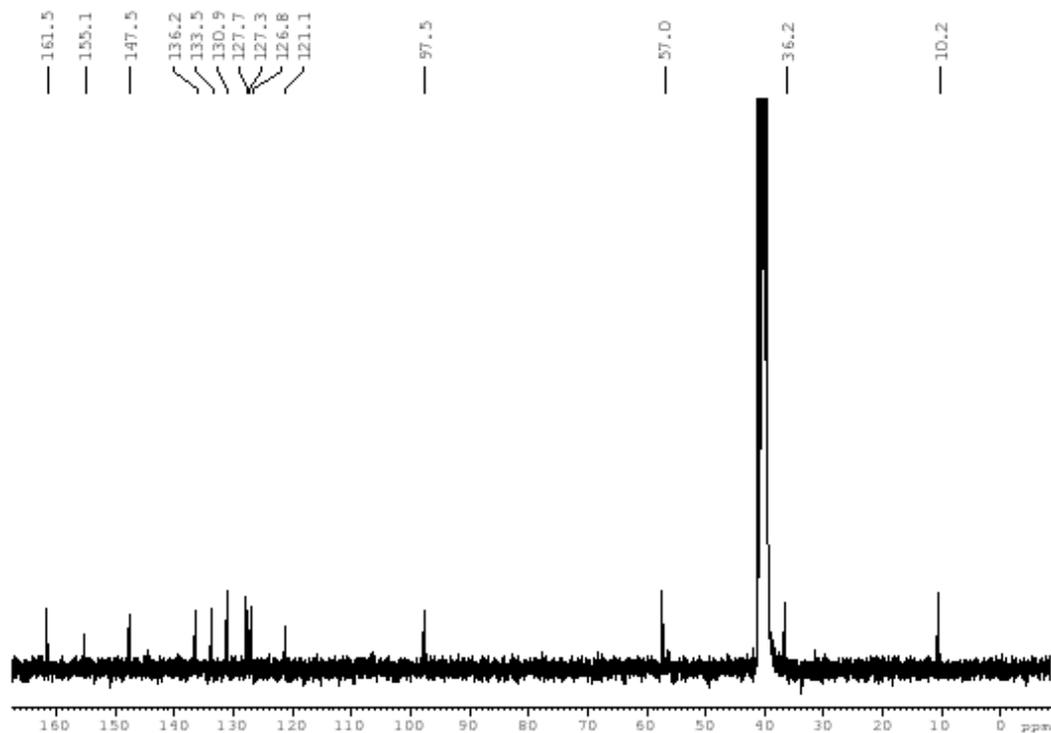
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

### Anexo H – Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300Hz, TMS, $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31c**.



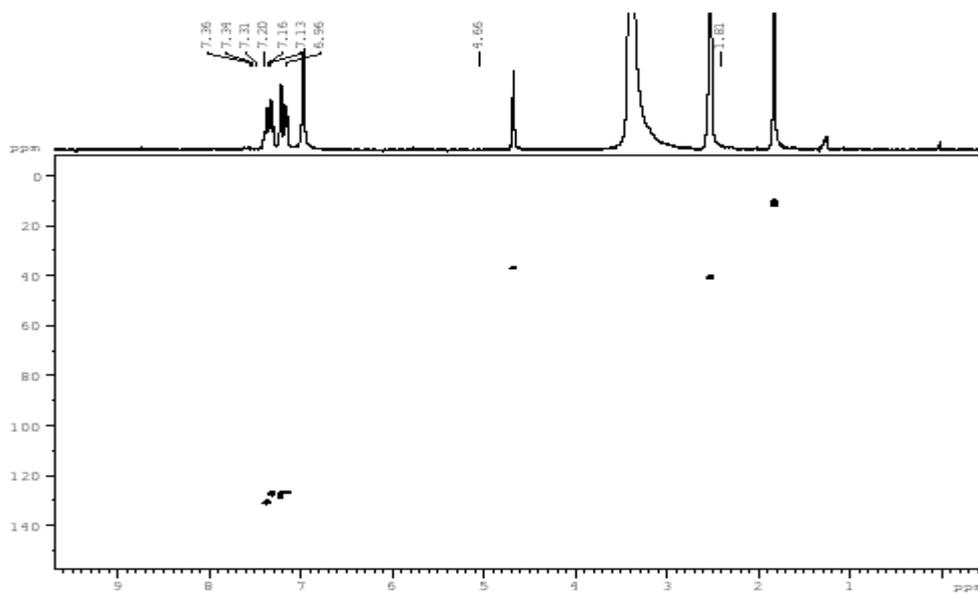
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo I – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31c**.

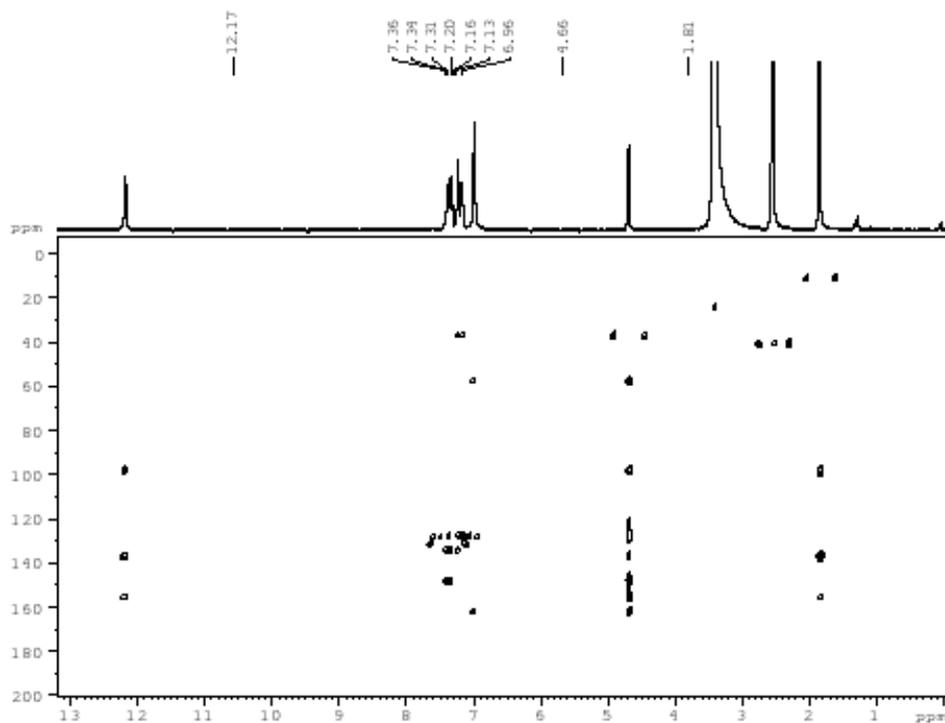


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo J – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31c**.

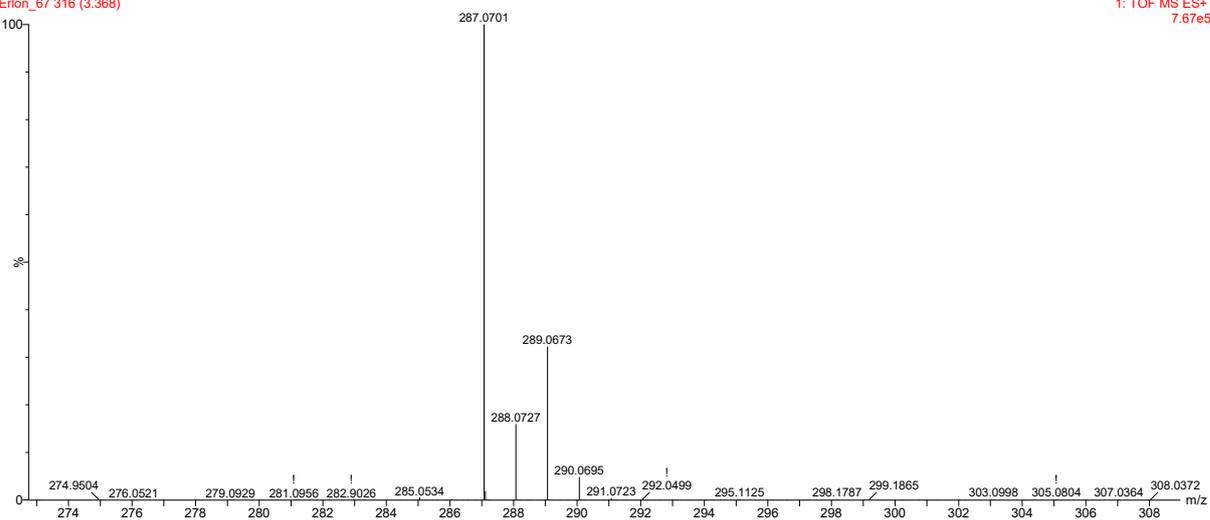


Anexo K – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31c**.



Anexo L – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **31c**.

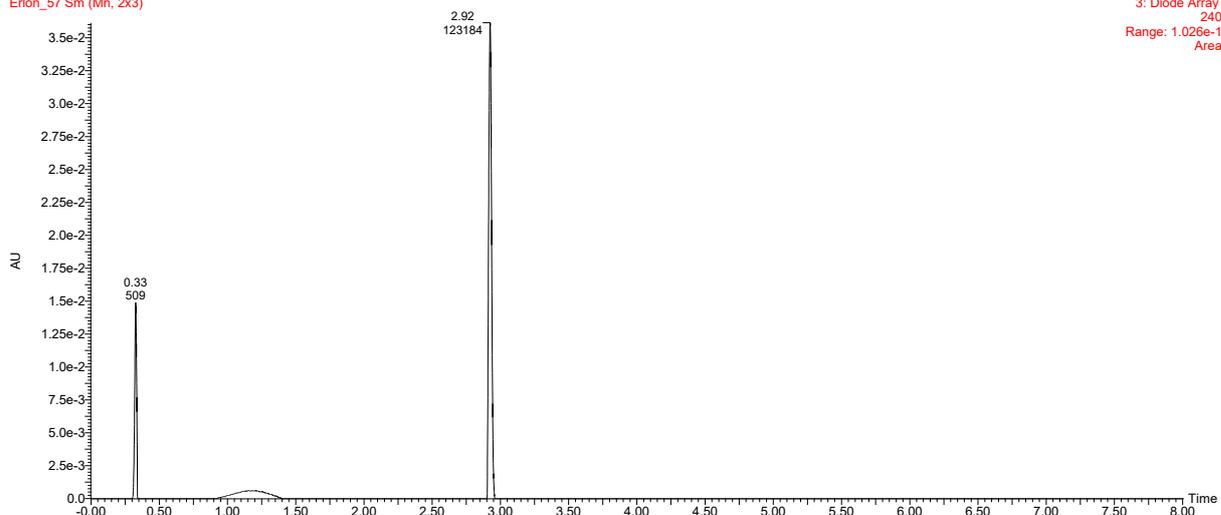
24\_02\_2021  
Erion\_67 316 (3.368)



### Anexo M – Cromatograma do derivado **31d** por CLUE-PDA.

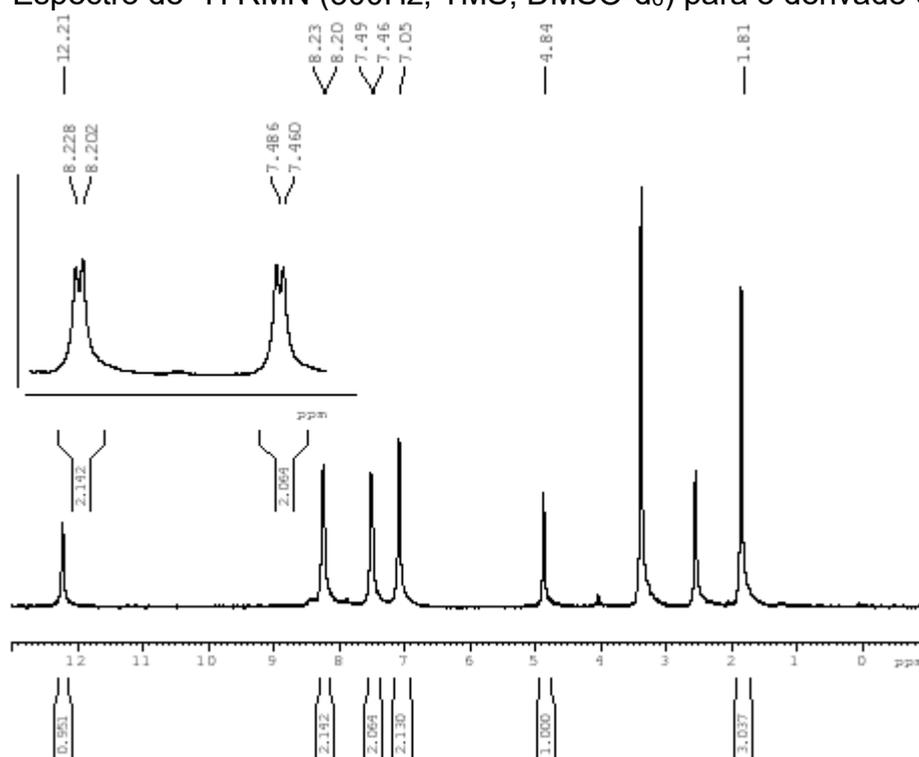
24\_02\_2021

Erion\_57 Sm (Mn, 2x3)



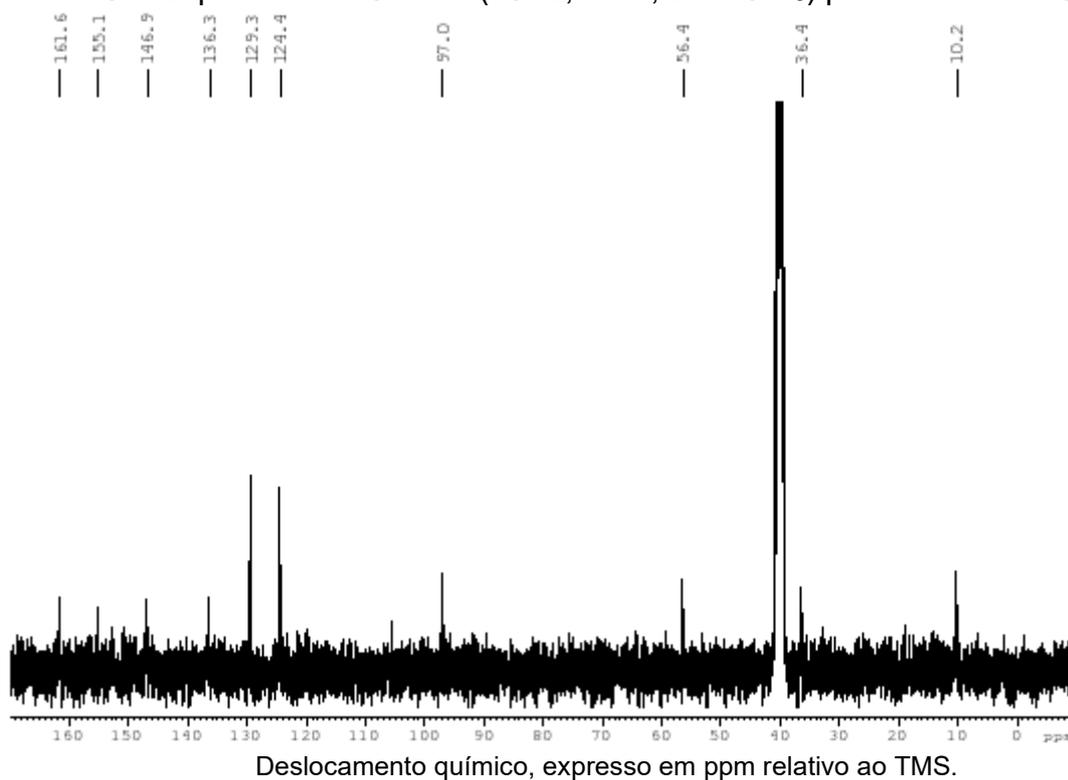
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

### Anexo N – Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300Hz, TMS, $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31d**.

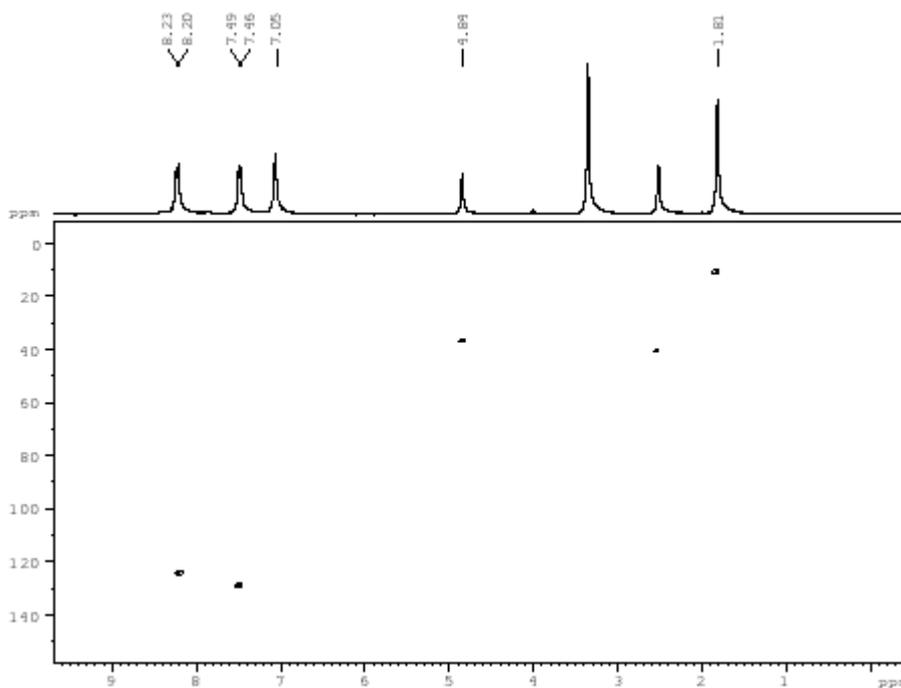


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

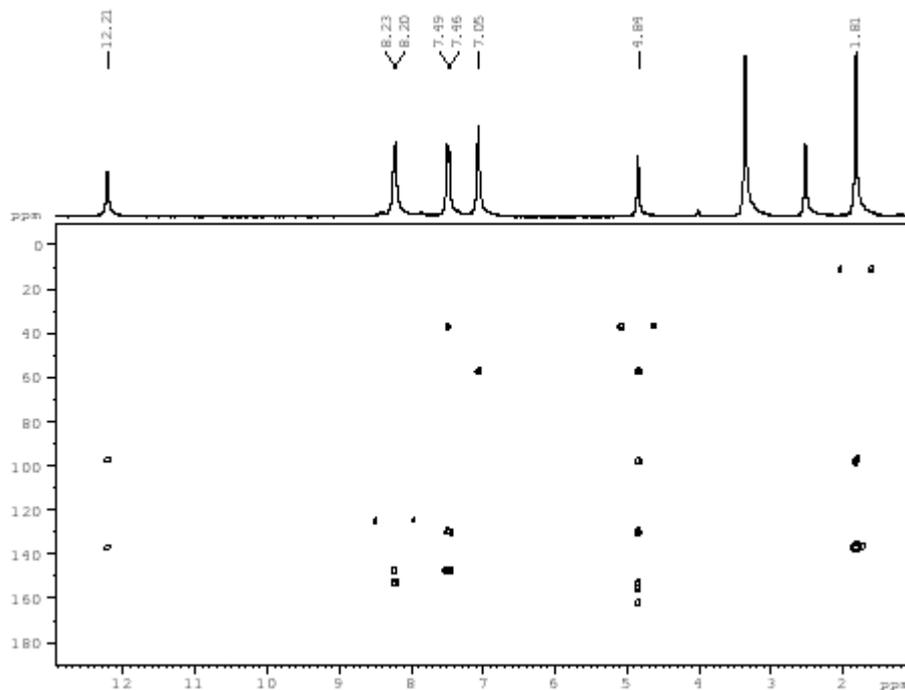
Anexo O – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS, DMSO- $\text{d}_6$ ) para o derivado **31d**.



Anexo P – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $\text{d}_6$ ) para o derivado **31d**.

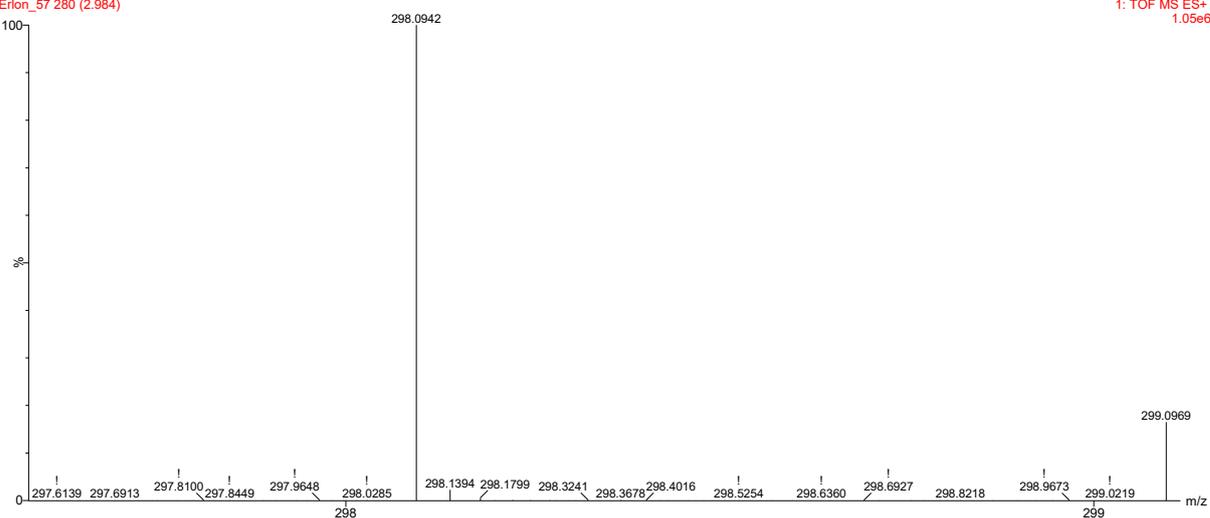


Anexo Q – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31d**.



Anexo R – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **31d**.

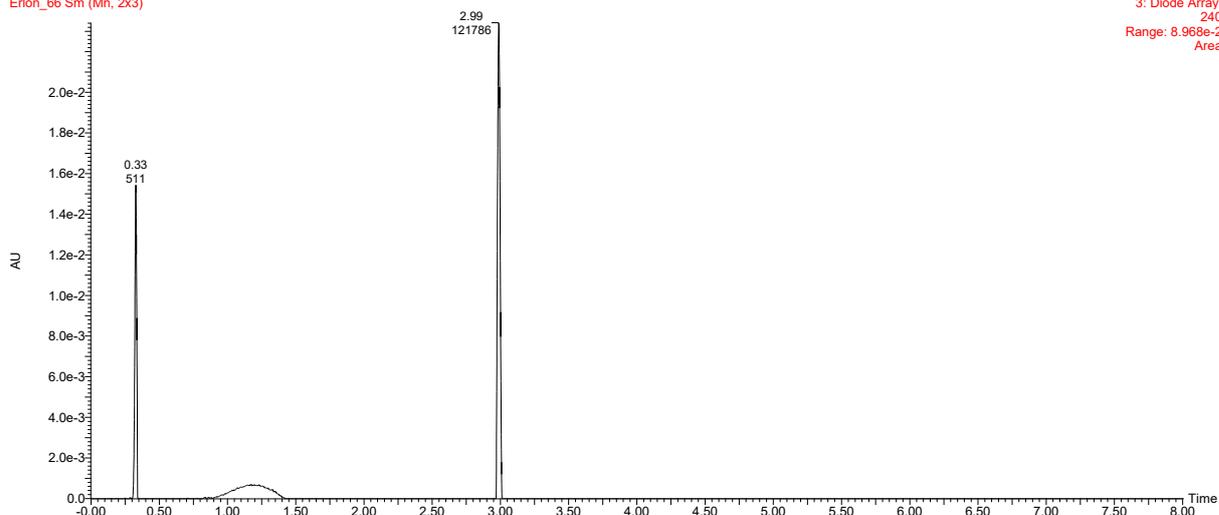
24\_02\_2021  
Erion\_57 280 (2.984)



### Anexo S – Cromatograma do derivado **31e** por CLUE-PDA.

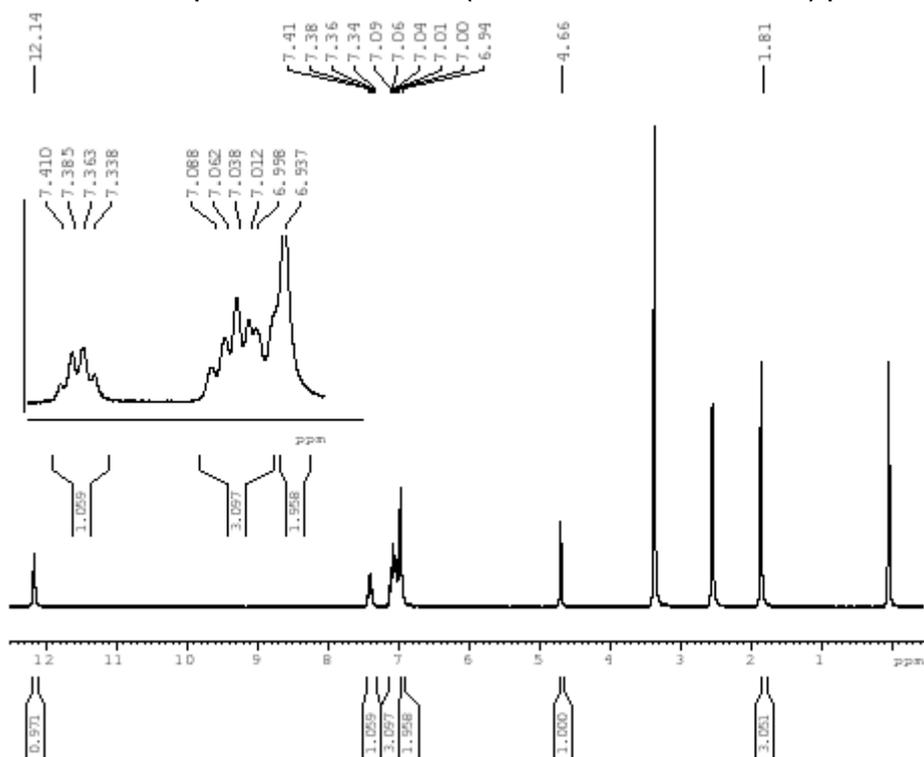
24\_02\_2021

Erion\_06 Sm (Mn, 2x3)

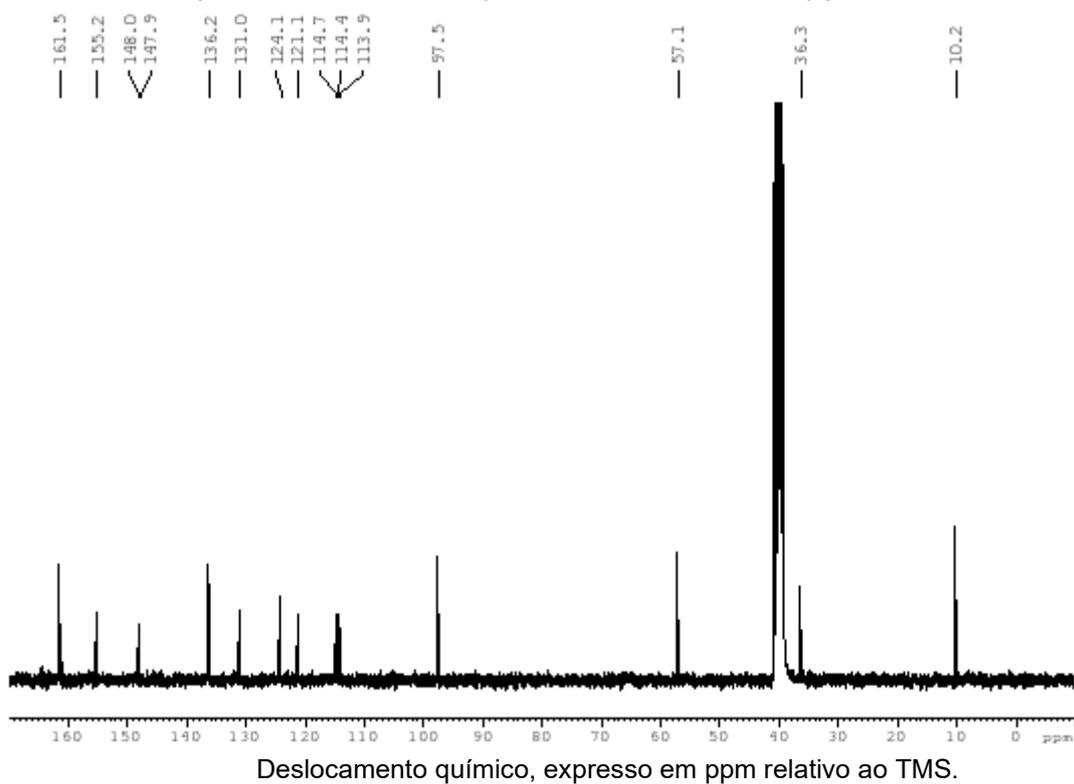


Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

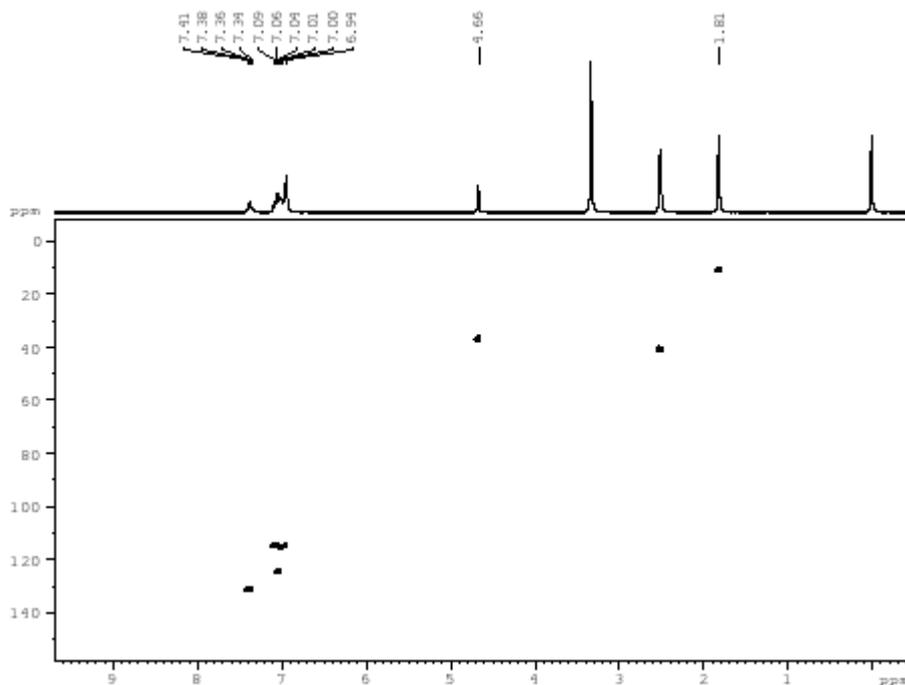
### Anexo T – Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31e**.



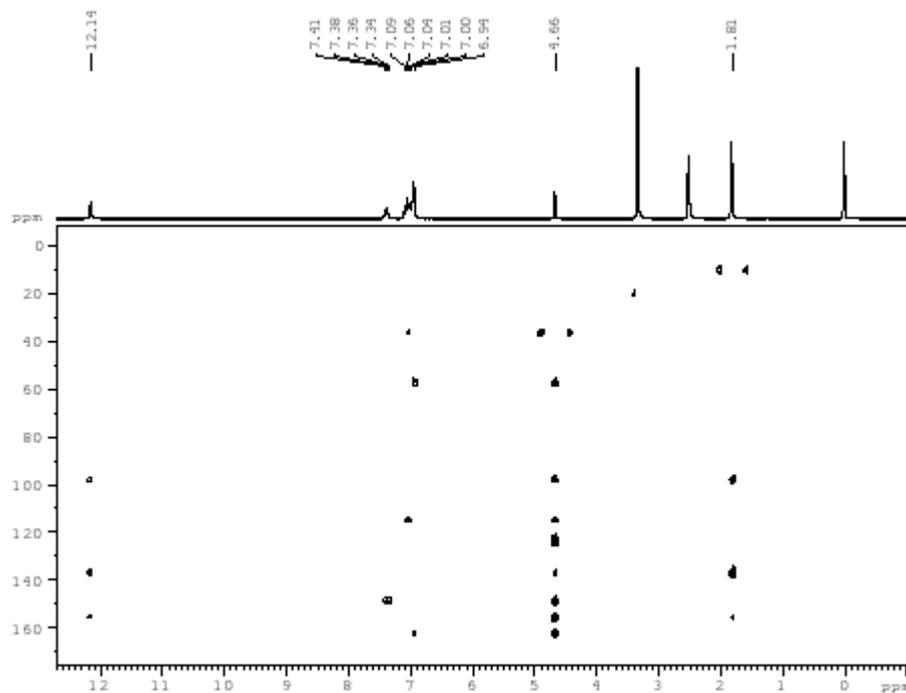
Anexo U – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31e**.



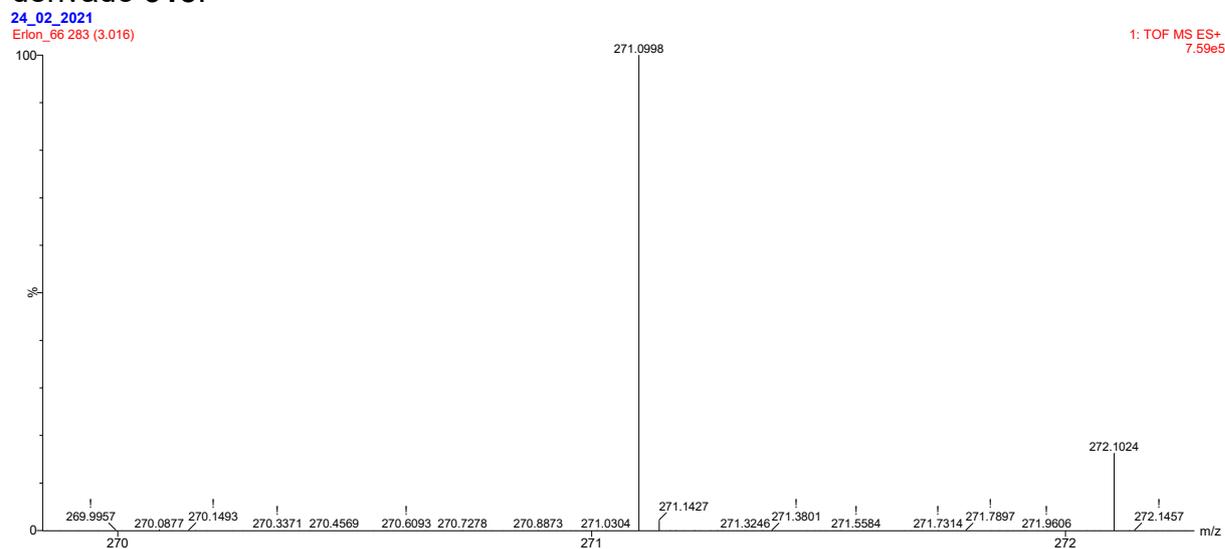
Anexo V – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31e**.



Anexo X – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31e**.



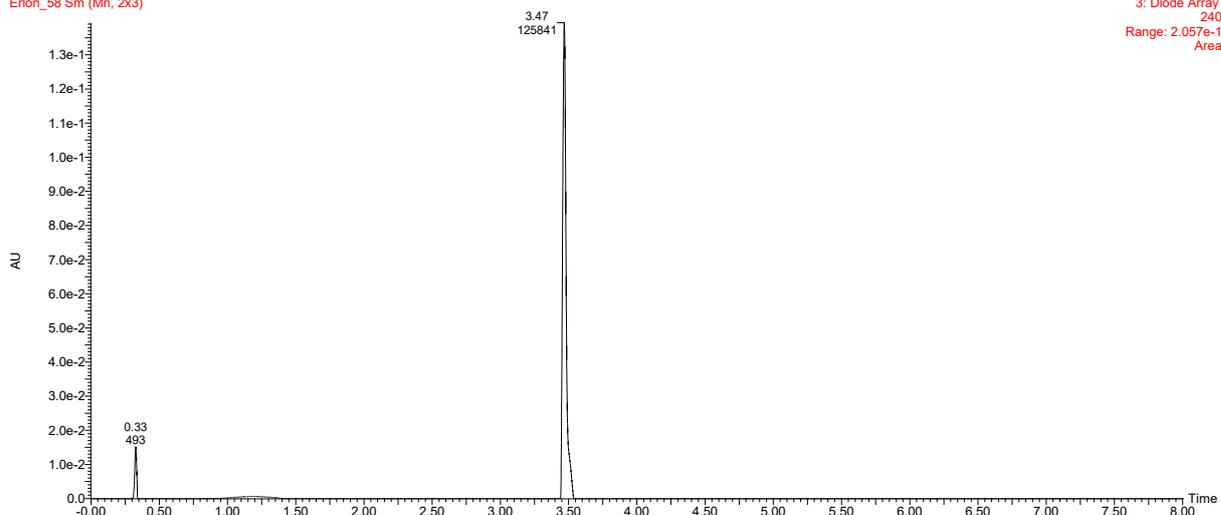
Anexo Z – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **31e**.



### Anexo AA – Cromatograma do derivado **31f** por CLUE-PDA.

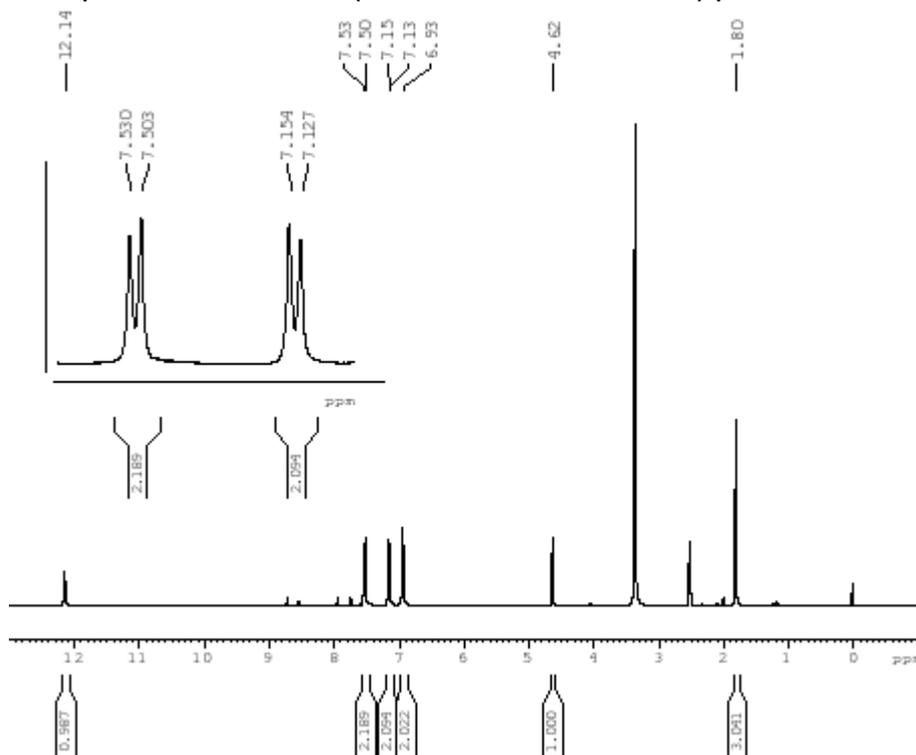
24\_02\_2021

Erion\_58 Sm (Mn, 2x3)



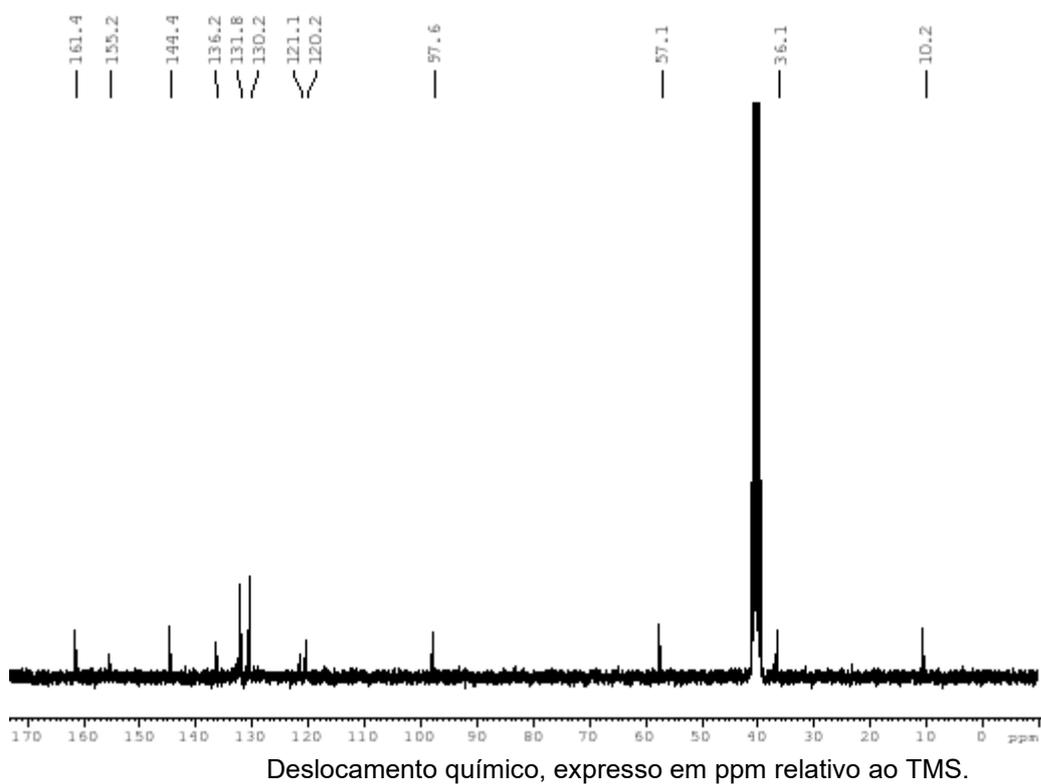
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

### Anexo AB – Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31f**.

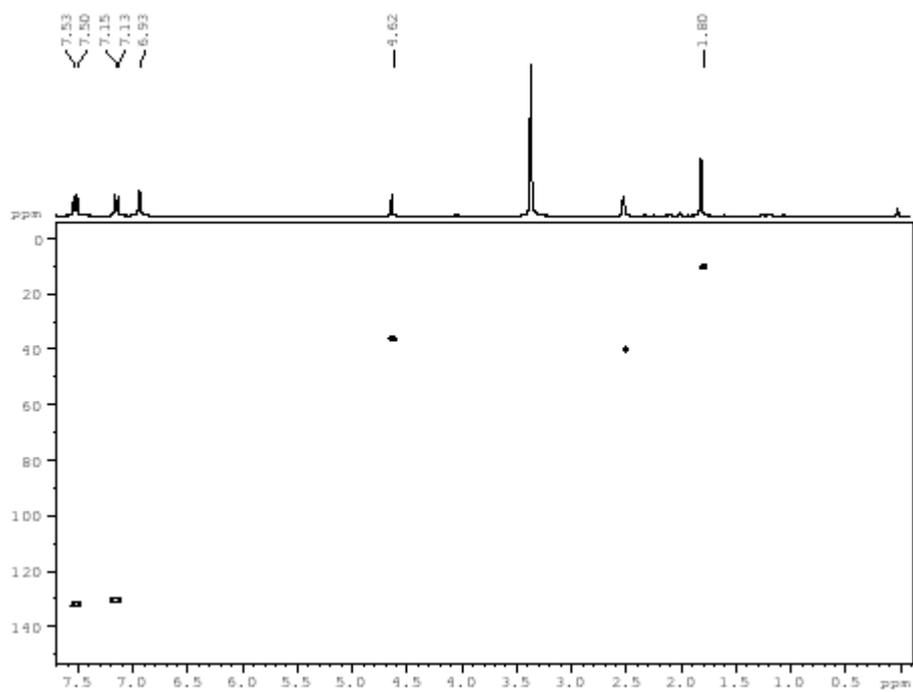


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

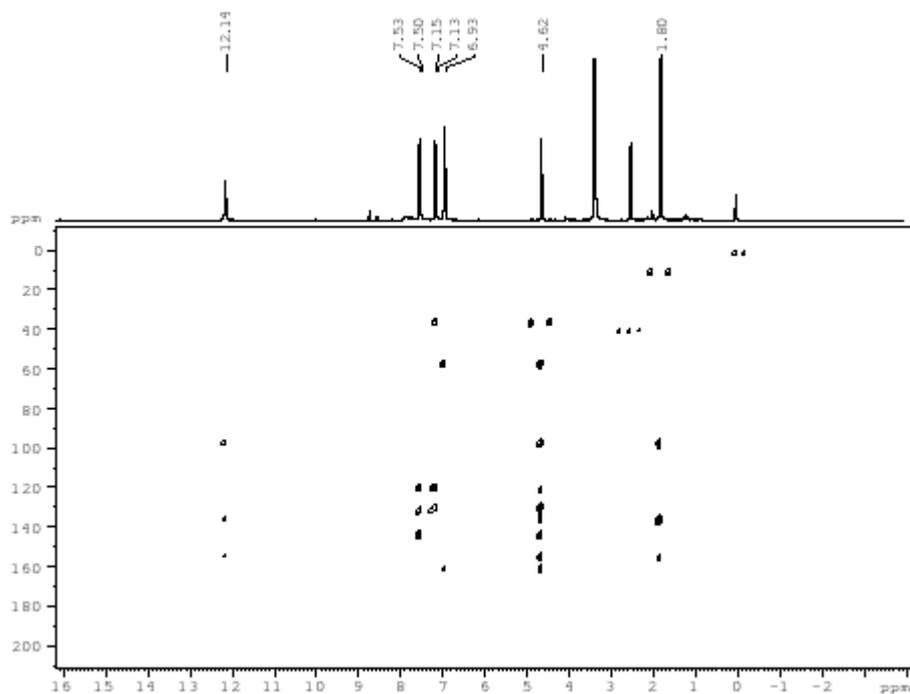
Anexo AC – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31f**.



Anexo AD – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31f**.



Anexo AE – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31f**.



Anexo AF – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **31f**.

24\_02\_2021  
Erion\_58 331 (3.525)

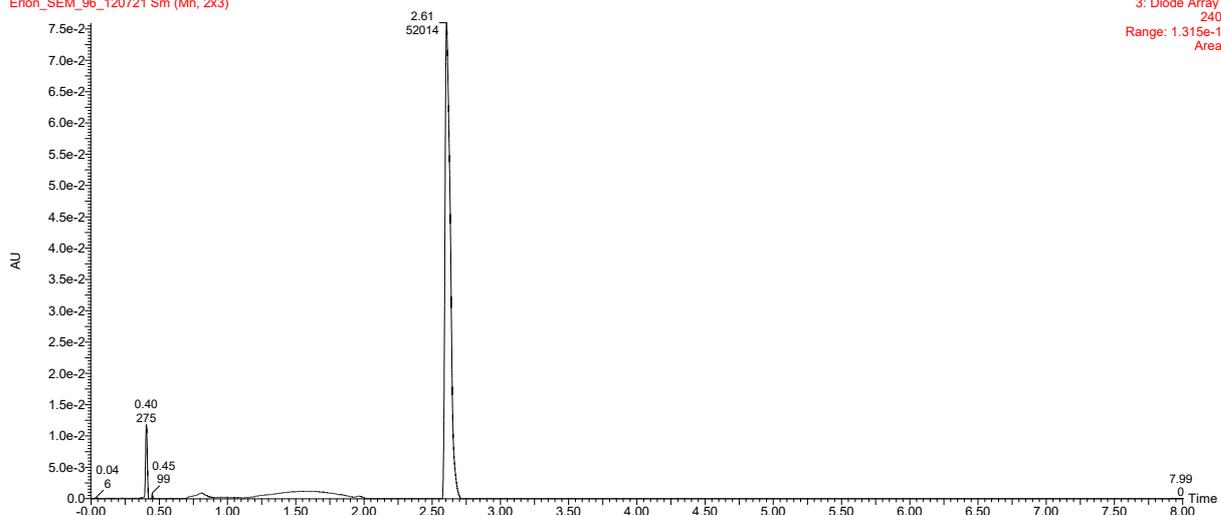


1: TOF MS ES+  
2.73e6

### Anexo AG – Cromatograma do derivado **31g** por CLUE-PDA.

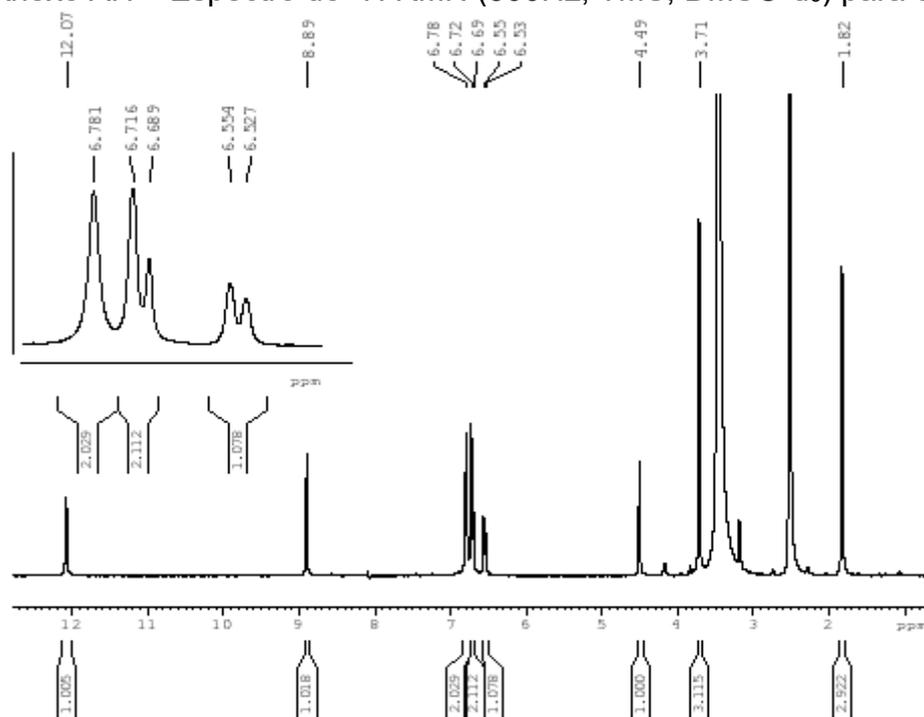
12\_07\_21

Erion\_SEM\_96\_120721 Sm (Mn, 2x3)



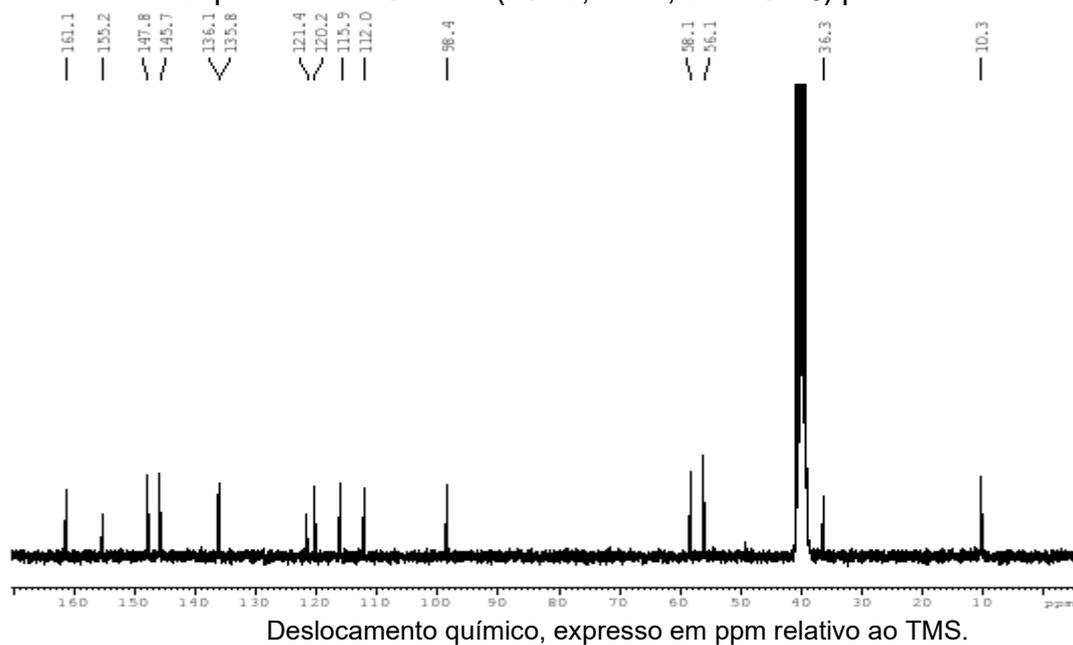
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

### Anexo AH – Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300Hz, TMS, $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31g**.

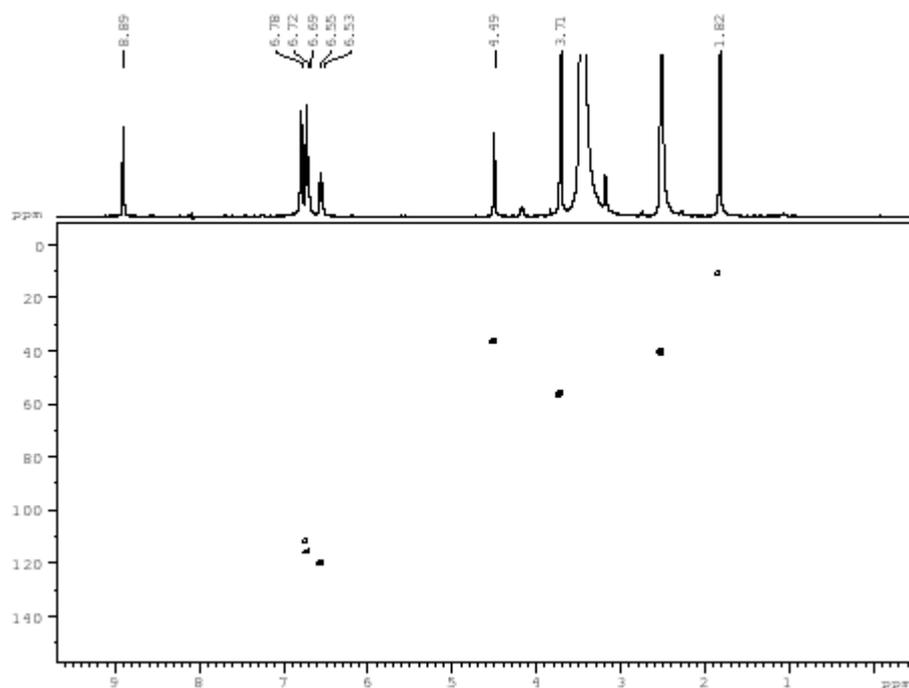


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

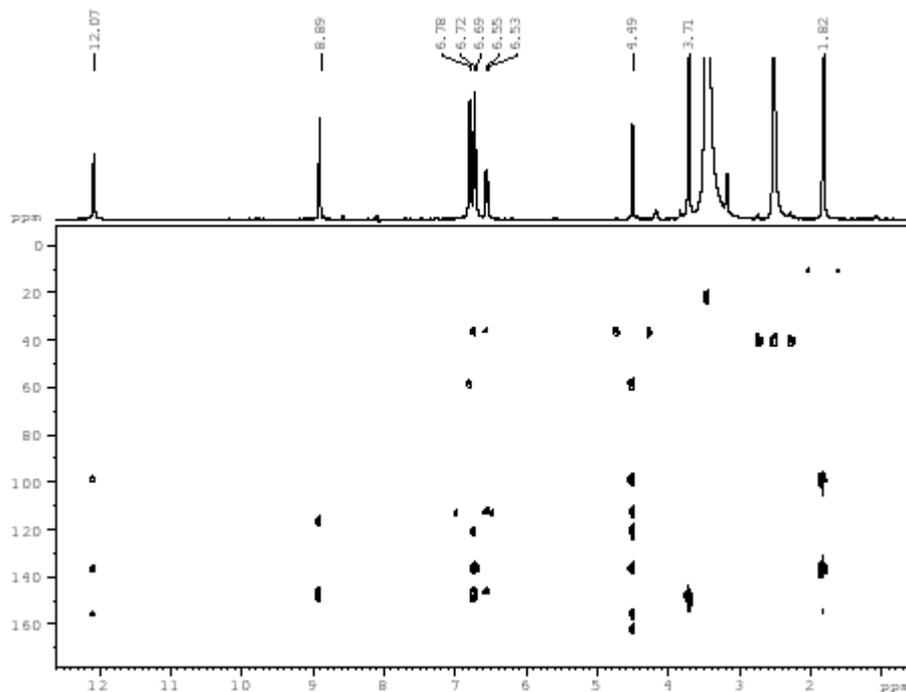
Anexo AI – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31g**.



Anexo AJ – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31g**.



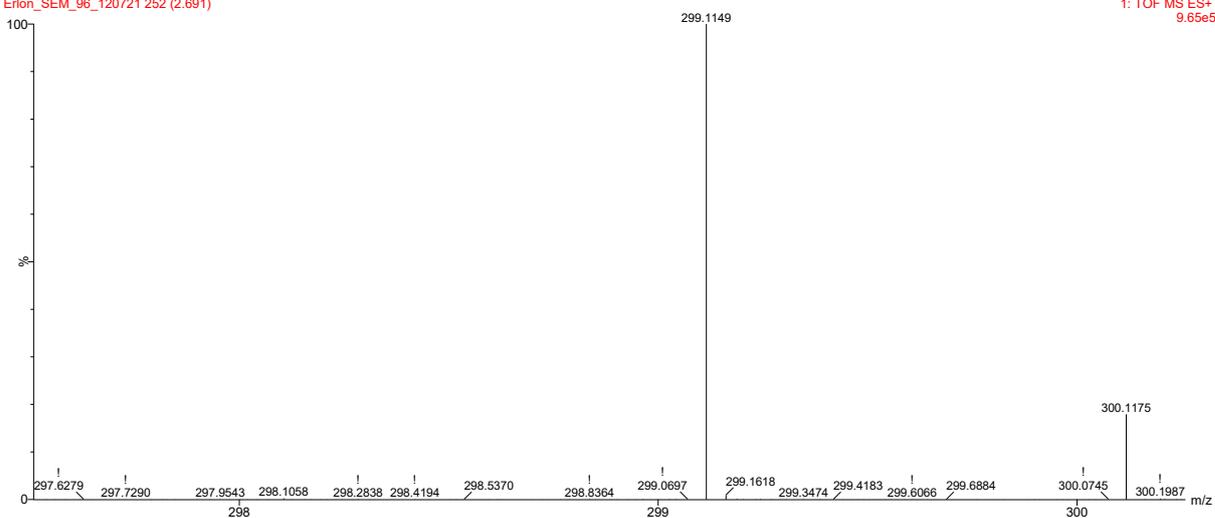
Anexo AK – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31g**.



Anexo AL – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **31g**.

12\_07\_21

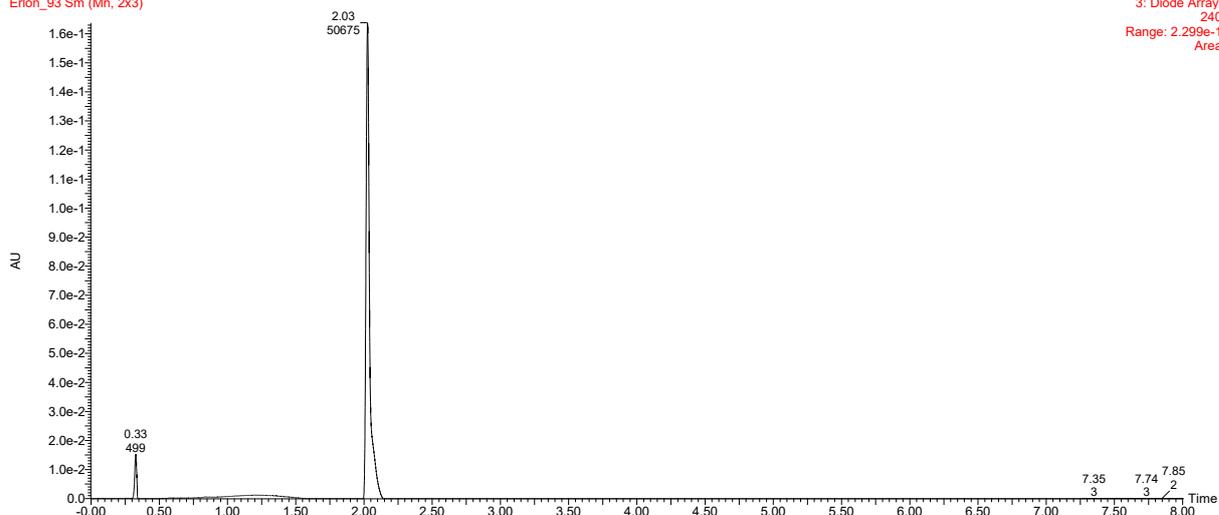
Erlon\_SEM\_96\_120721\_252 (2.691)



### Anexo AM – Cromatograma do derivado **31h** por CLUE-PDA.

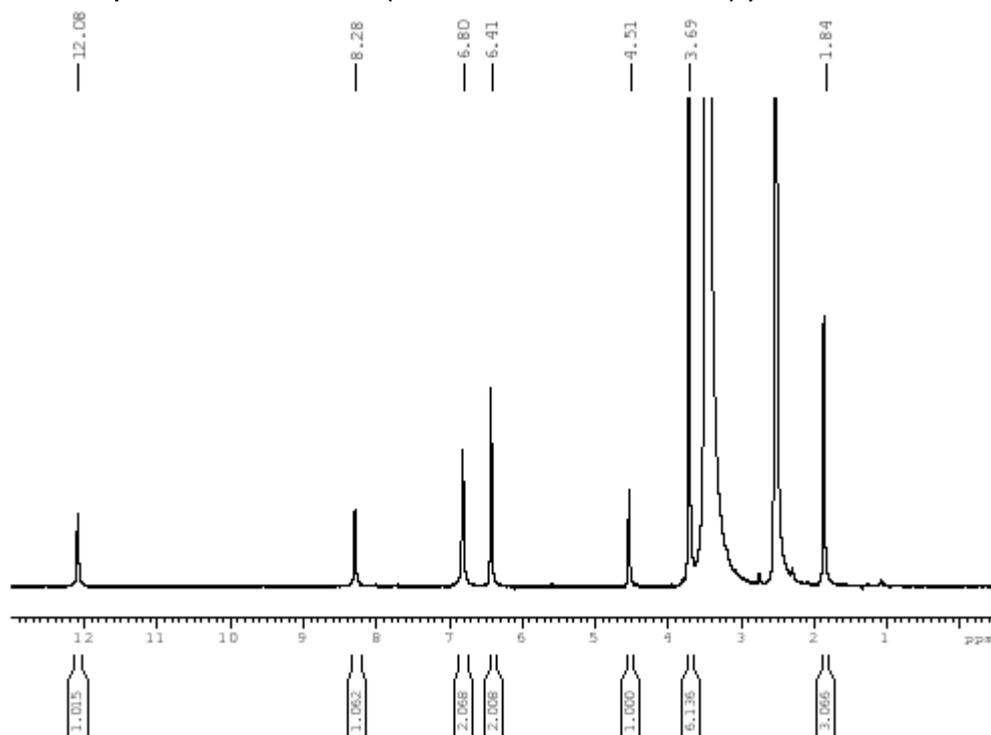
24\_02\_2021

Erion\_93 Sm (Mn, 2x3)



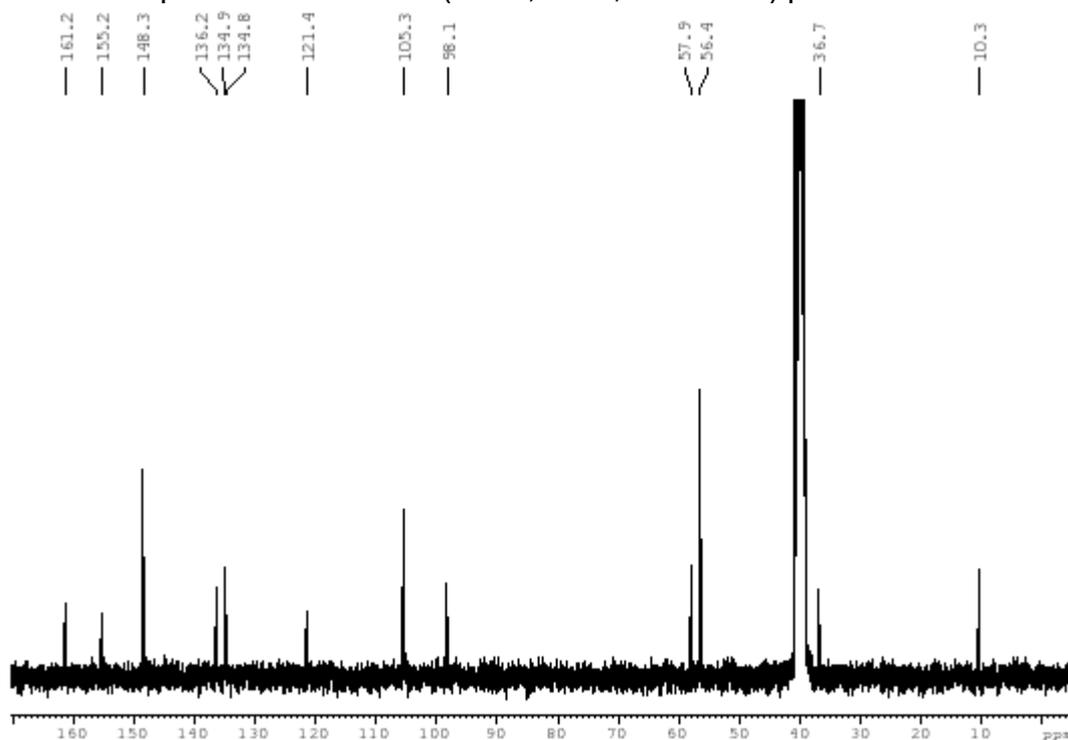
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

### Anexo AN – Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300Hz, TMS, $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31h**.



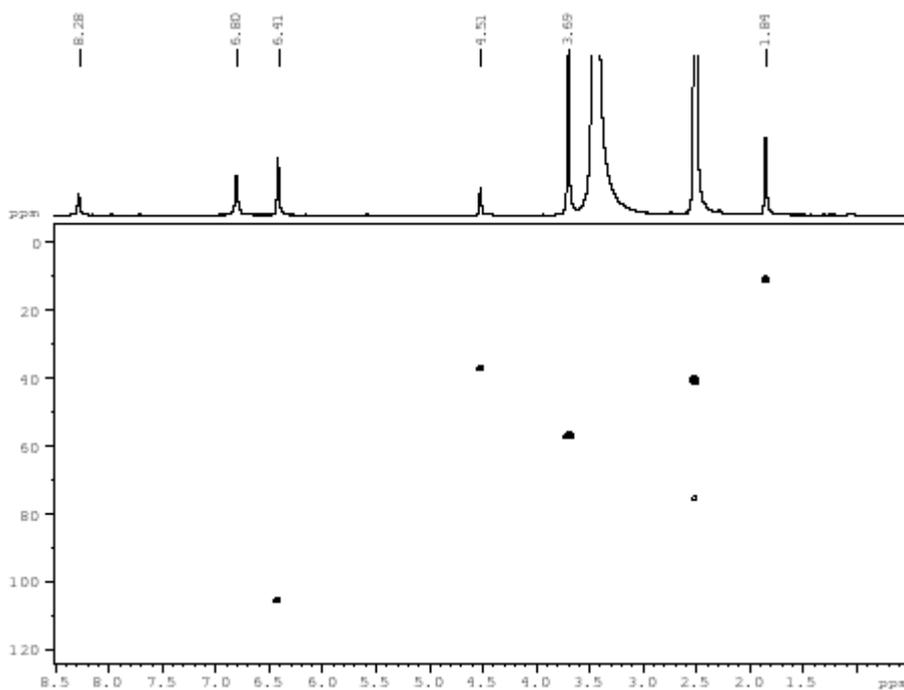
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo AO – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31h**.

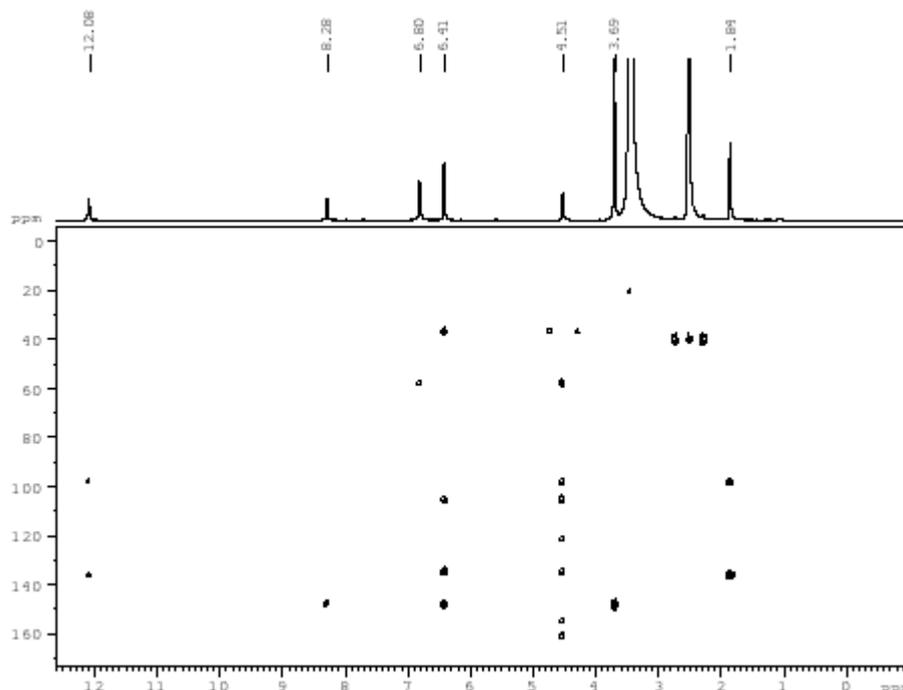


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo AP – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31h**.



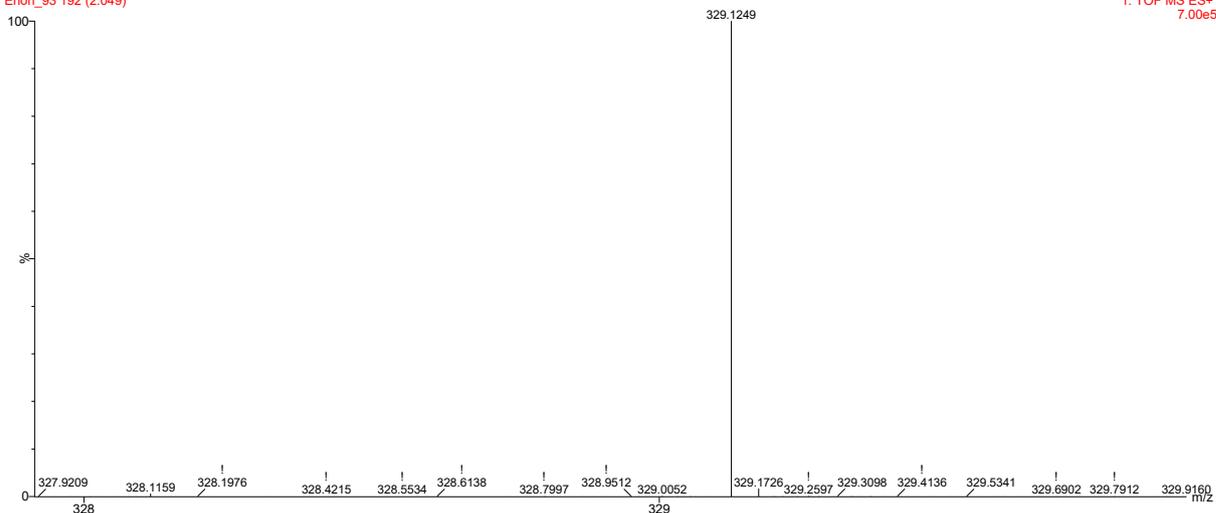
Anexo AQ – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31h**.



Anexo AR – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **31h**.

24\_02\_2021

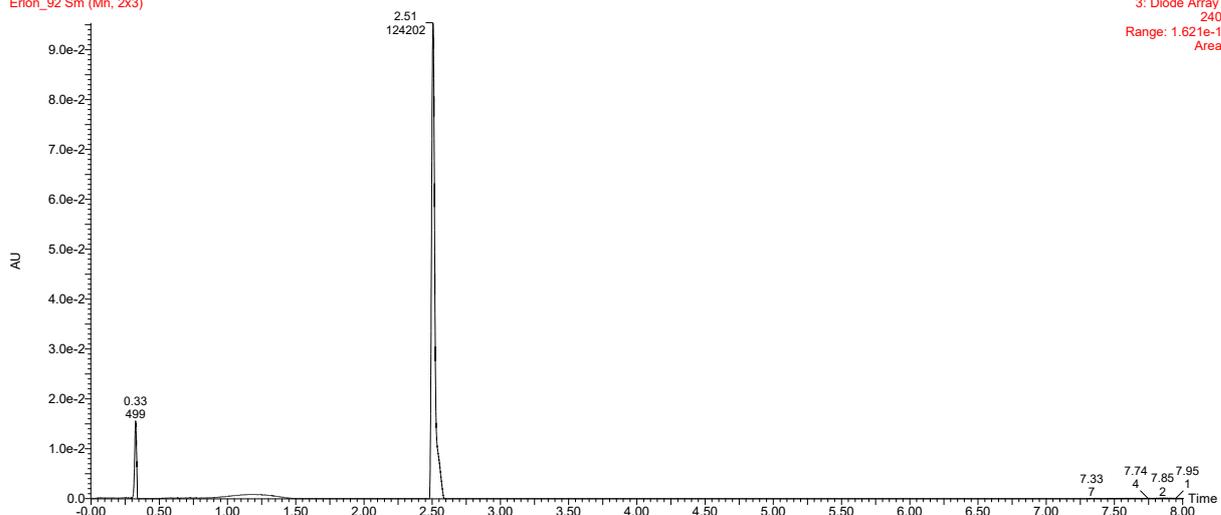
Erlon\_93 192 (2.049)



### Anexo AS – Cromatograma do derivado **31i** por CLUE-PDA.

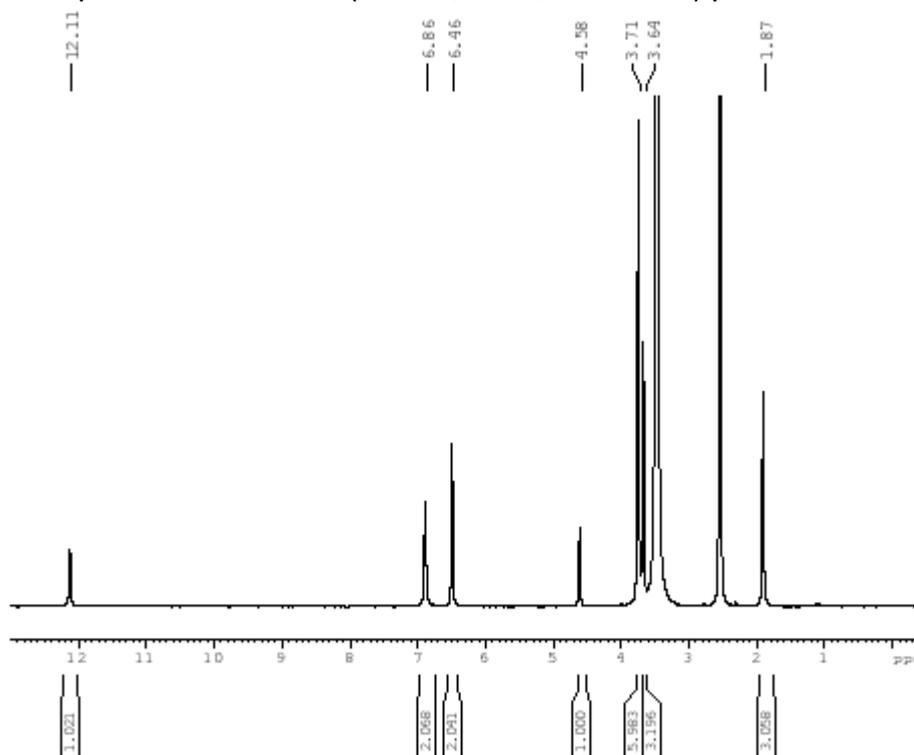
24\_02\_2021

Erion\_92 Sm (Mn, 2x3)



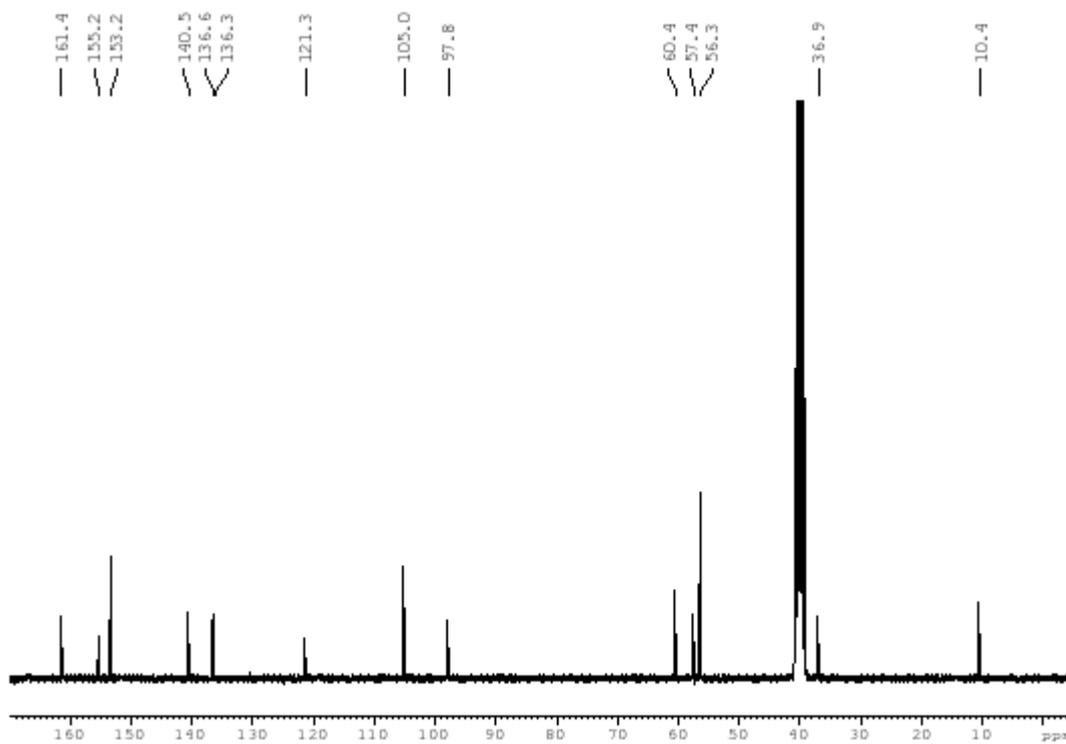
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

### Anexo AT – Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300Hz, TMS, $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31i**.



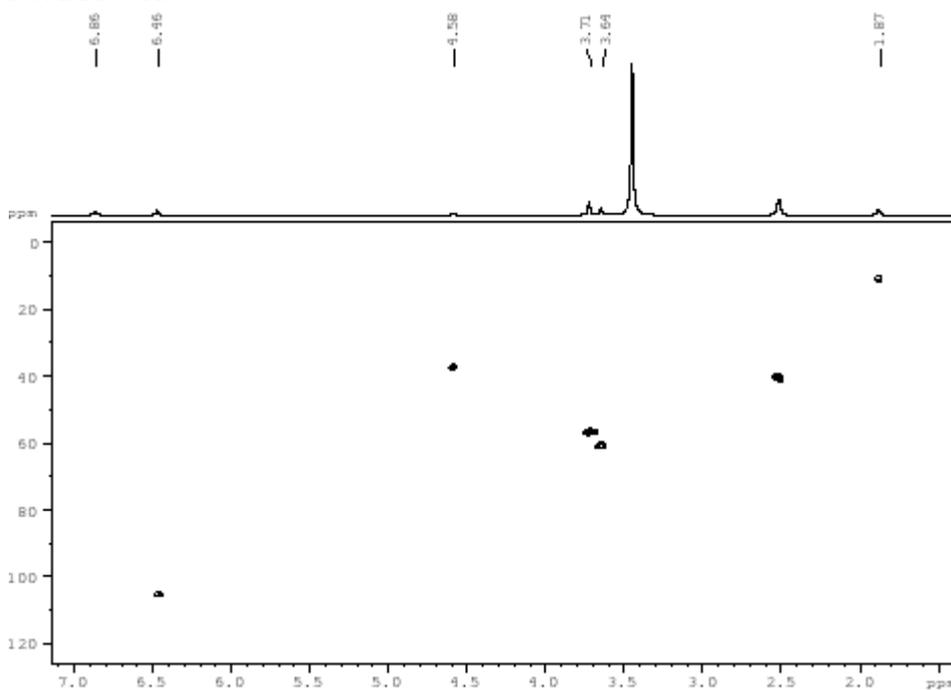
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo AU – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31i**.

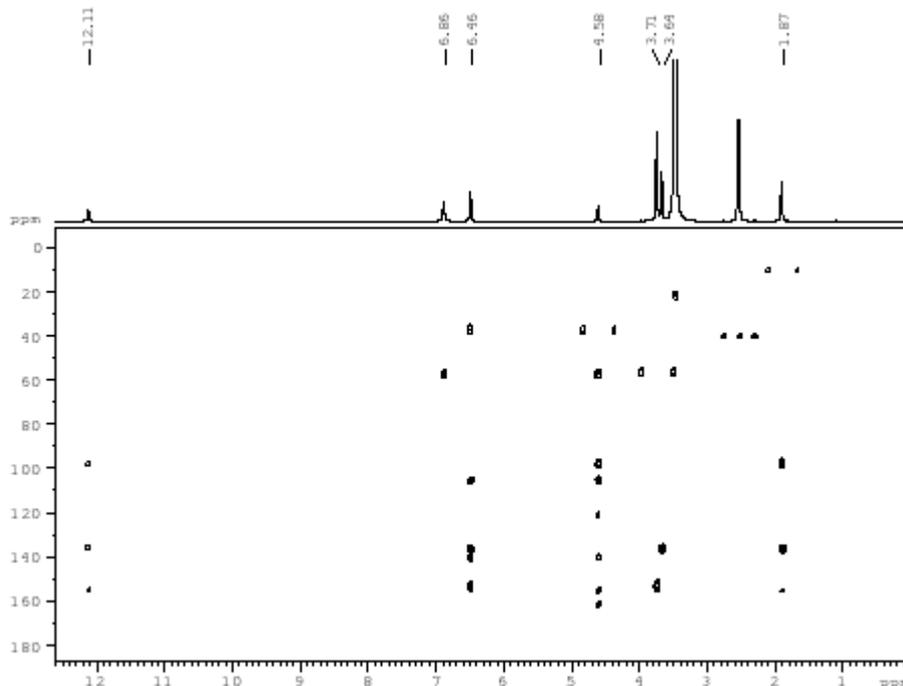


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo AV – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31i**.



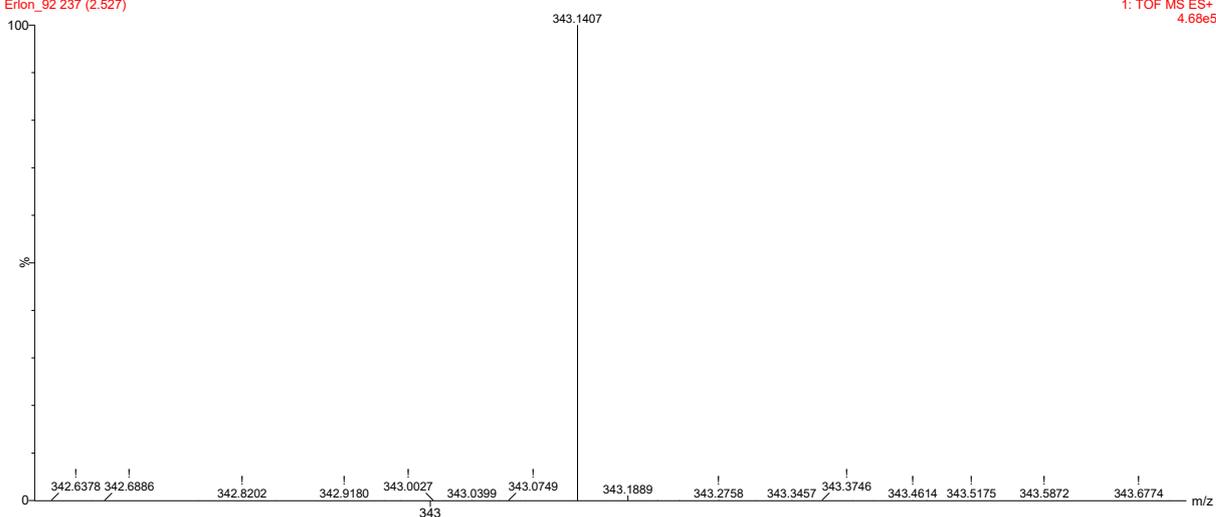
Anexo AX – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31i**.



Anexo AZ – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **31i**.

24\_02\_2021

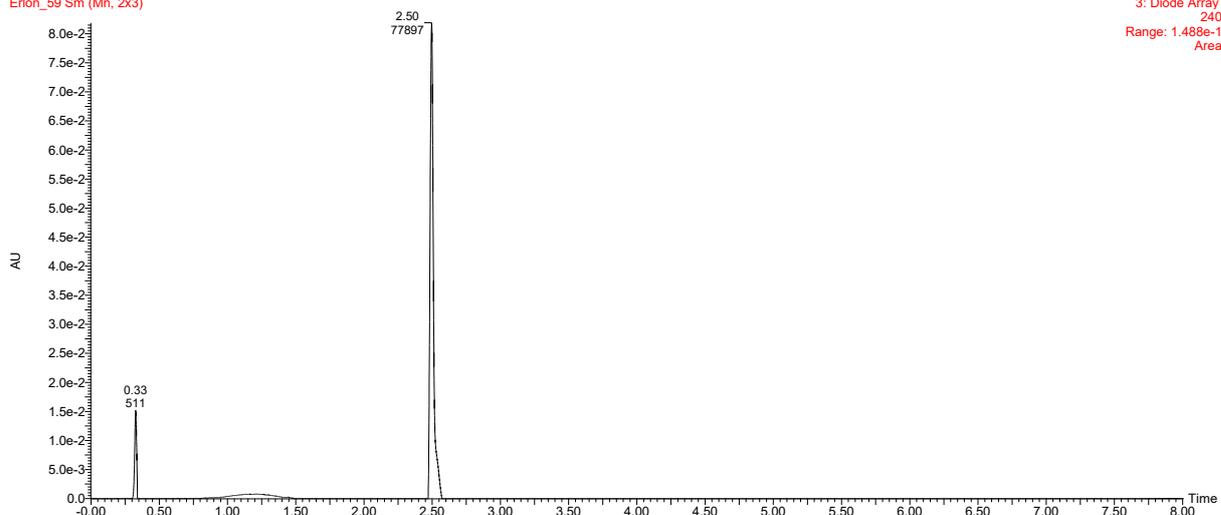
Erion\_92 237 (2.527)



### Anexo AAA – Cromatograma do derivado **31j** por CLUE-PDA.

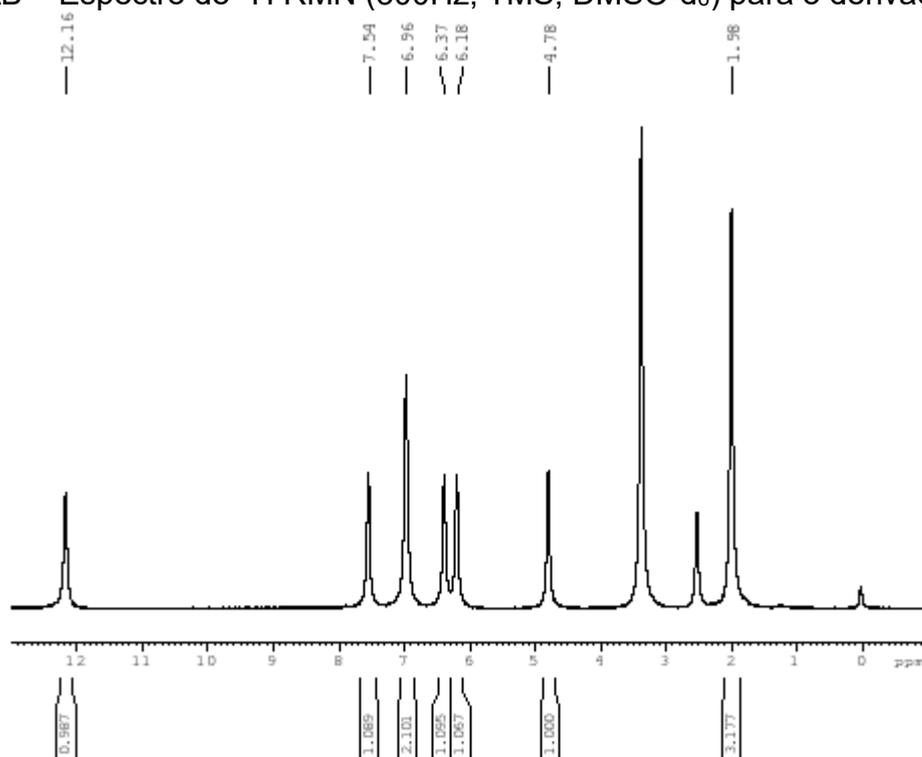
24\_02\_2021

Erion\_59 Sm (Mn, 2x3)



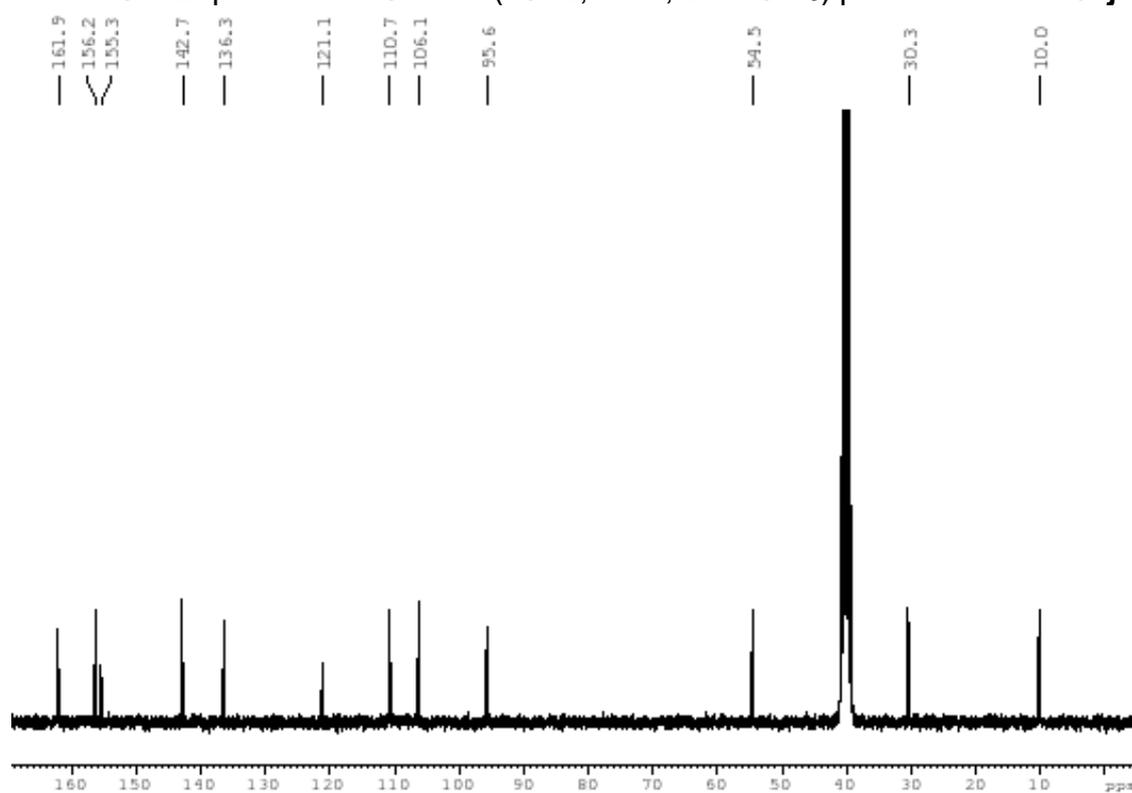
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

### Anexo AAB – Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31j**.



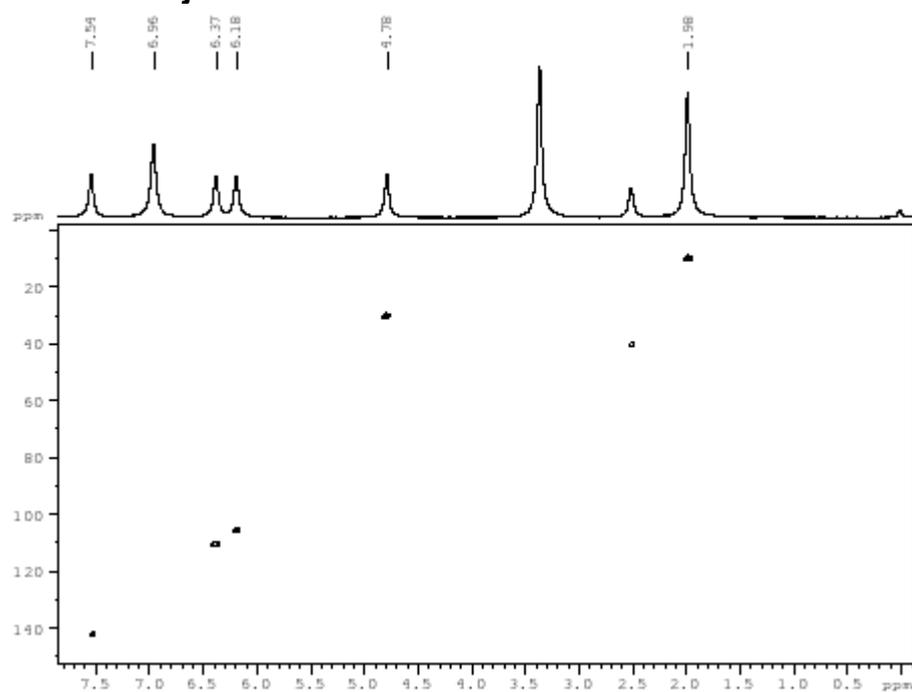
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo AAC – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31j**.

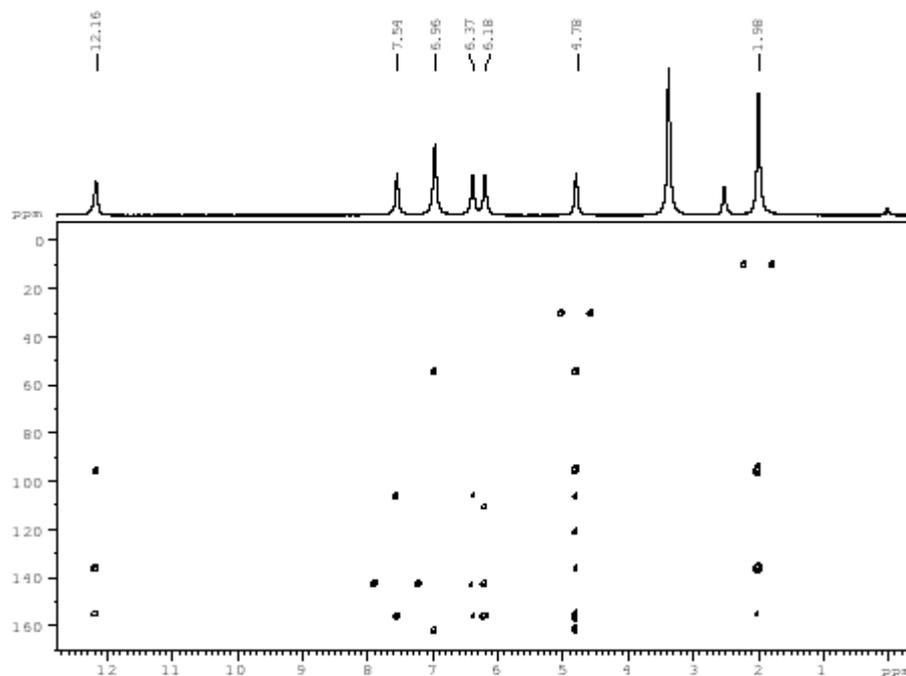


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo AAD – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS, DMSO- $d_6$ ) para o derivado **31j**.



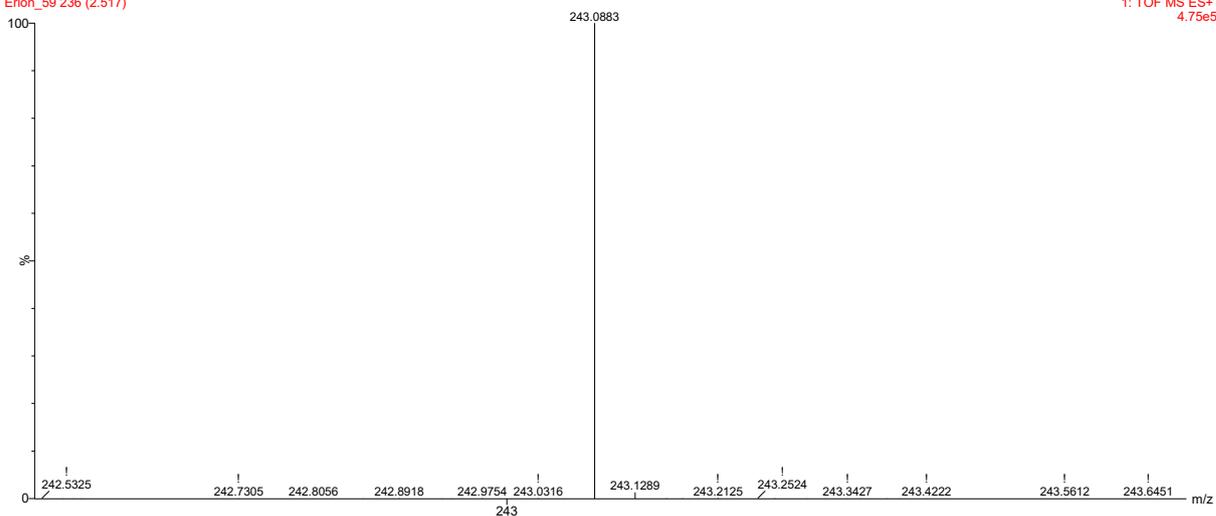
Anexo AAE – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **31j**.



Anexo AAF – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **31j**.

24\_02\_2021

Erlon\_59 236 (2.517)

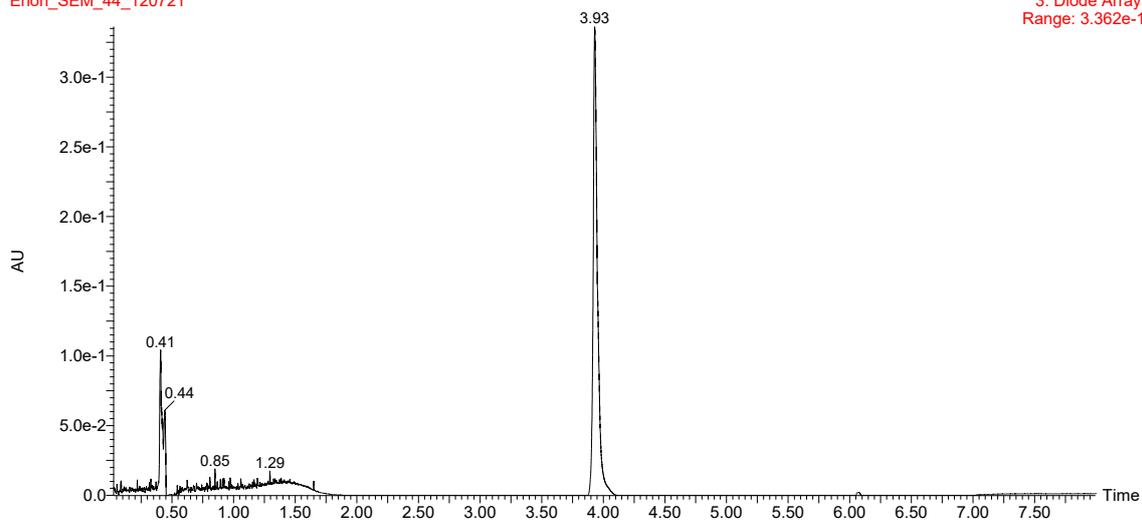


1: TOF MS ES+  
4.75e5

Anexo AAG – Cromatograma do derivado **34a** por CLUE-PDA.

12\_07\_21

Erlon\_SEM\_44\_120721

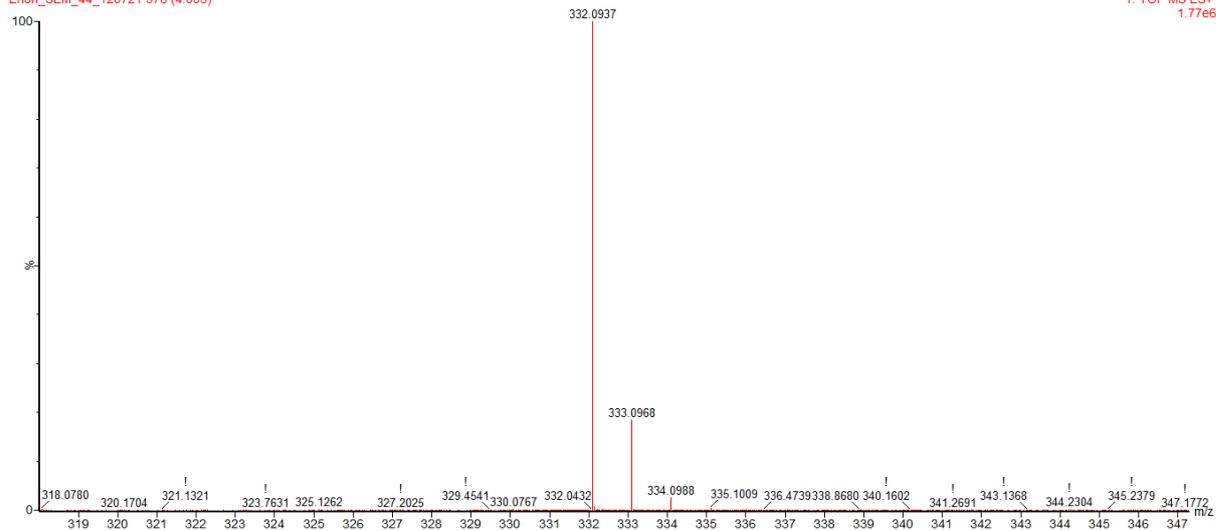


Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

Anexo AAH – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **34a**.

12\_07\_21

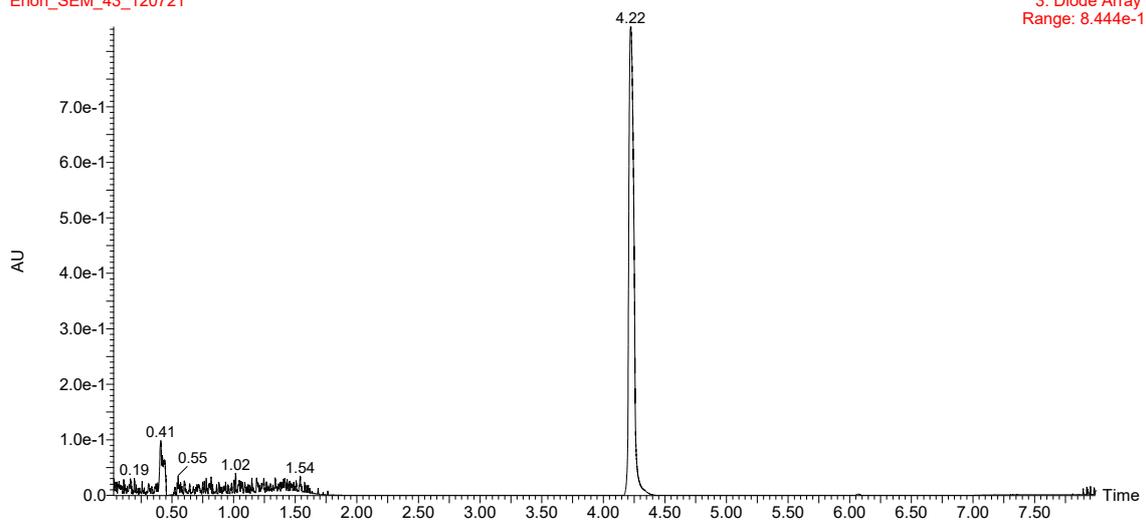
Erlon\_SEM\_44\_120721 376 (4.003)



### Anexo AAI – Cromatograma do derivado **34b** por CLUE-PDA.

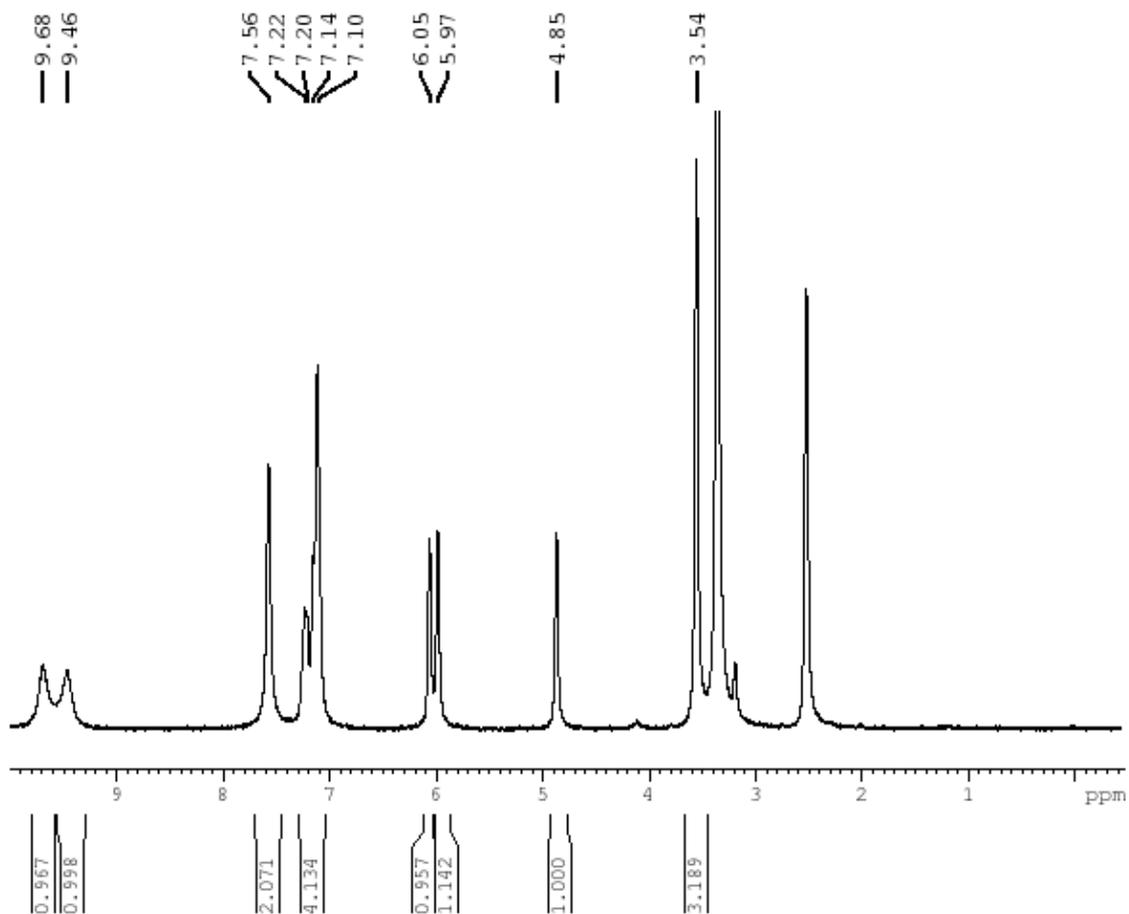
12\_07\_21

Erlon\_SEM\_43\_120721



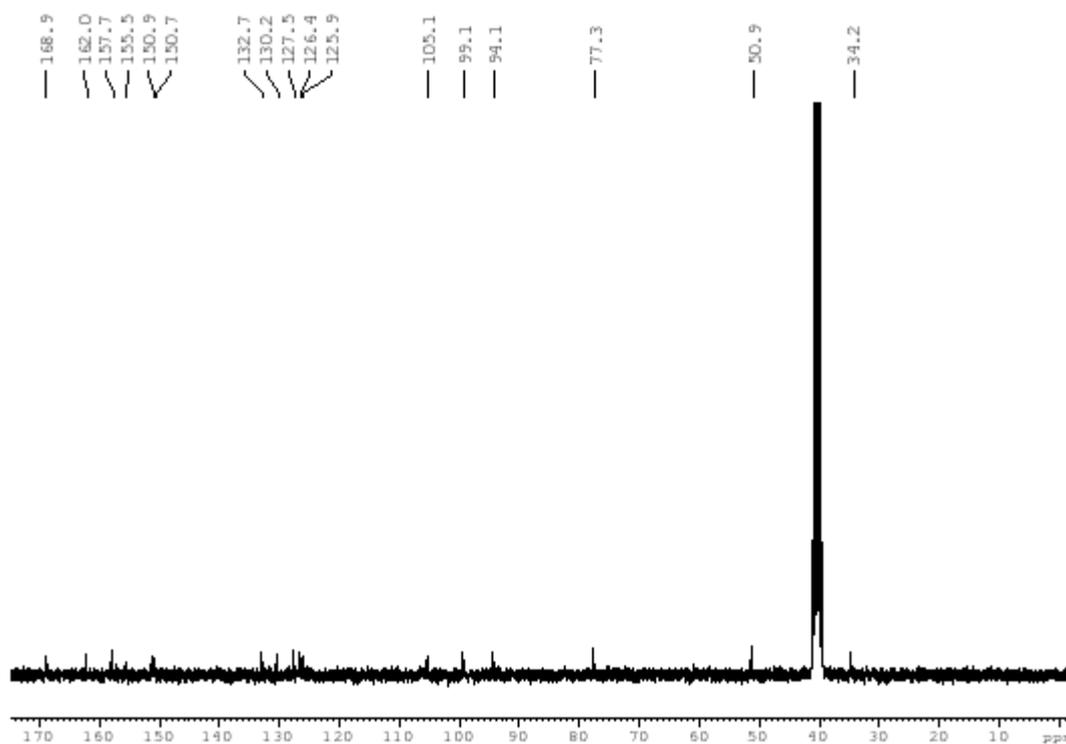
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

### Anexo AAJ – Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300Hz, TMS, $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **34b**.



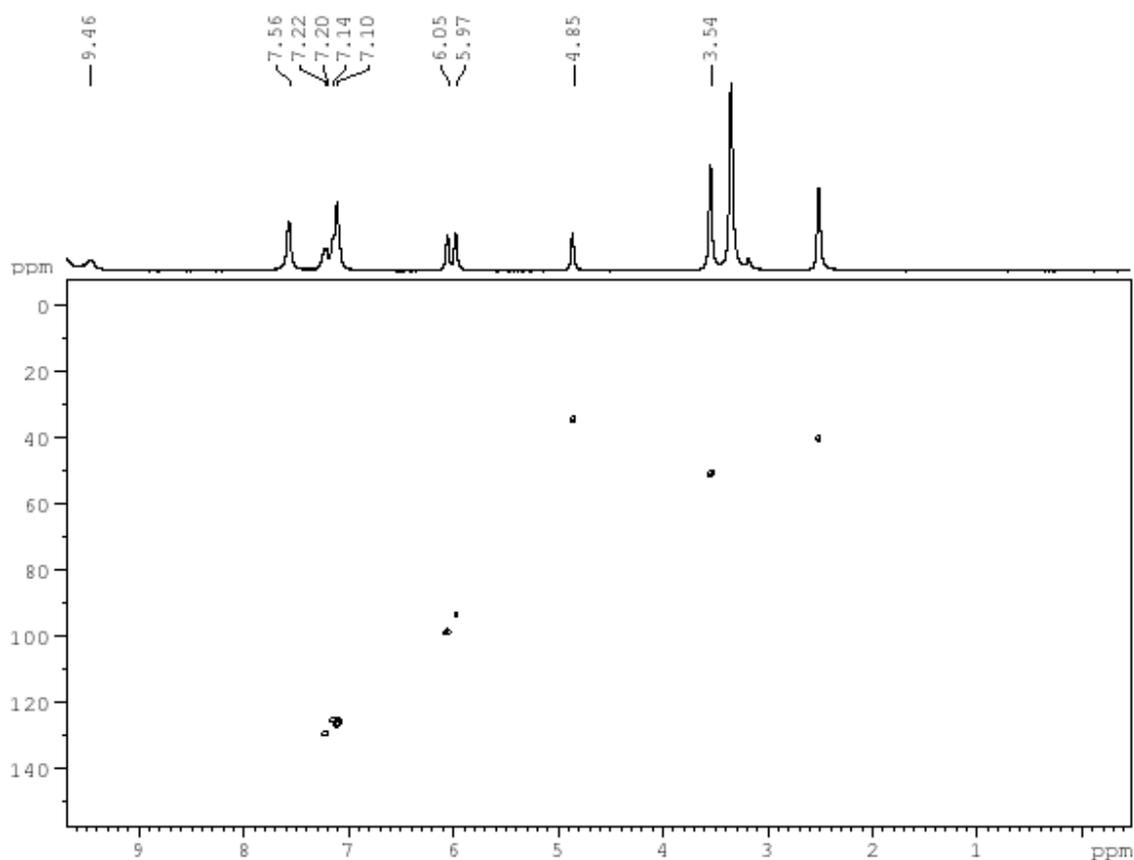
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo AAK – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **34b**.

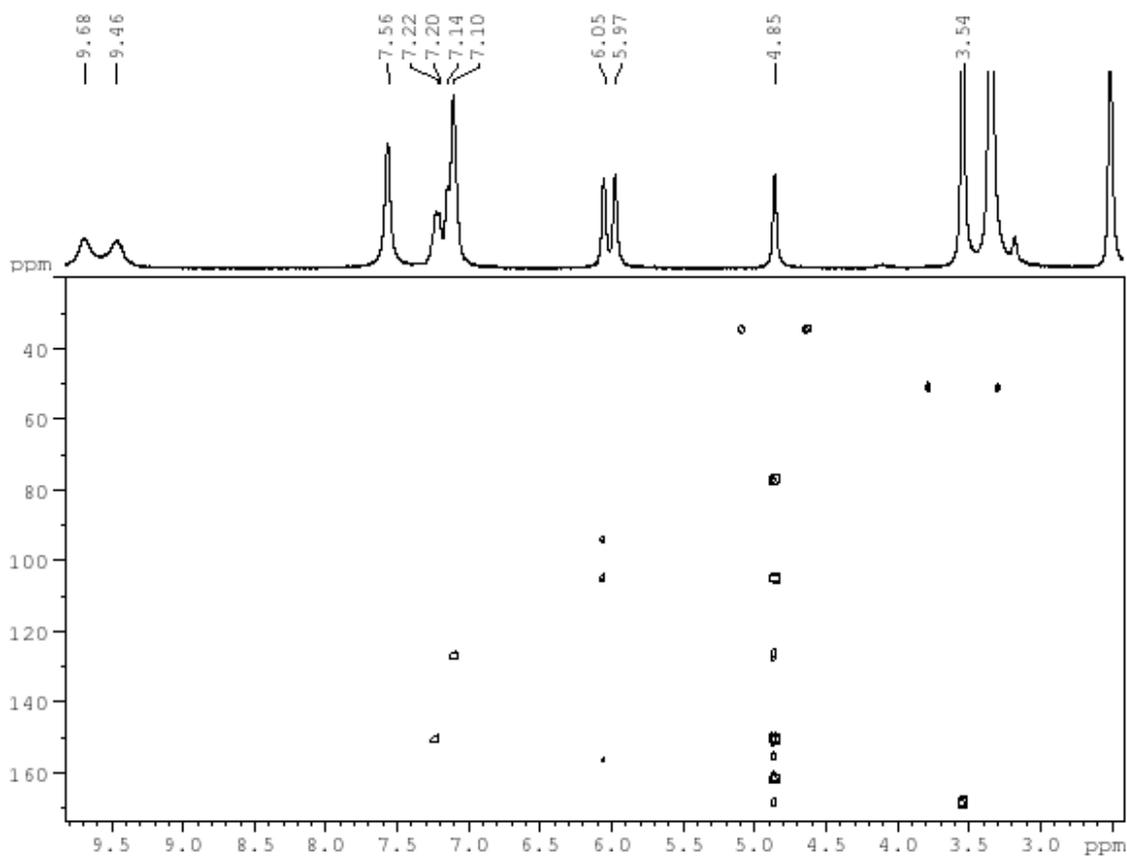


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo AAL – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **34b**.



Anexo AAM – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS,  $\text{DMSO-}d_6$ ) para o derivado **34b**.

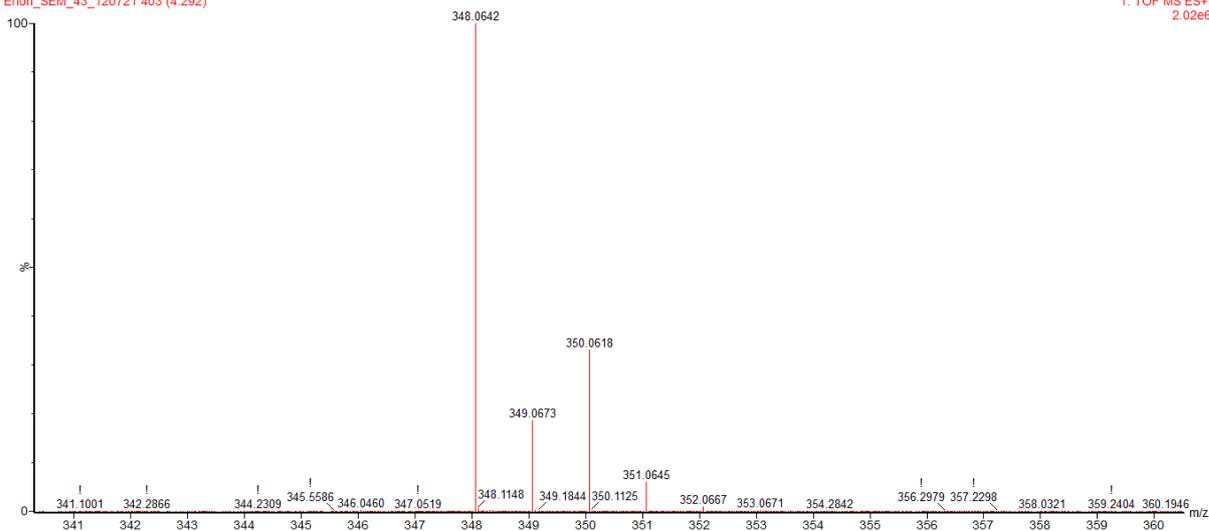


Anexo AAN – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **34b**.

12\_07\_21

Erlon\_SEM\_43\_120721\_403 (4.292)

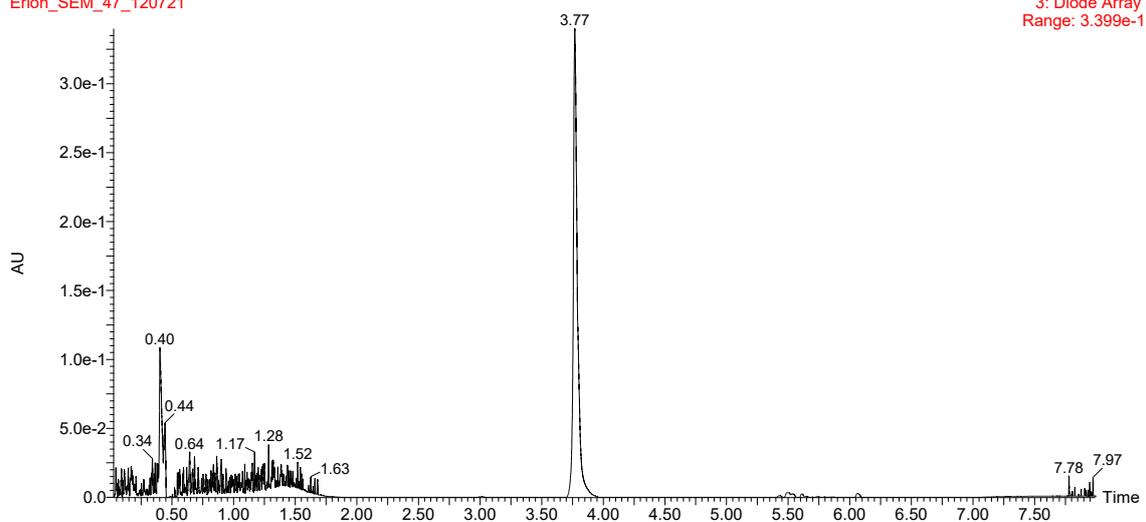
1: TOF MS ES+  
2.02e6



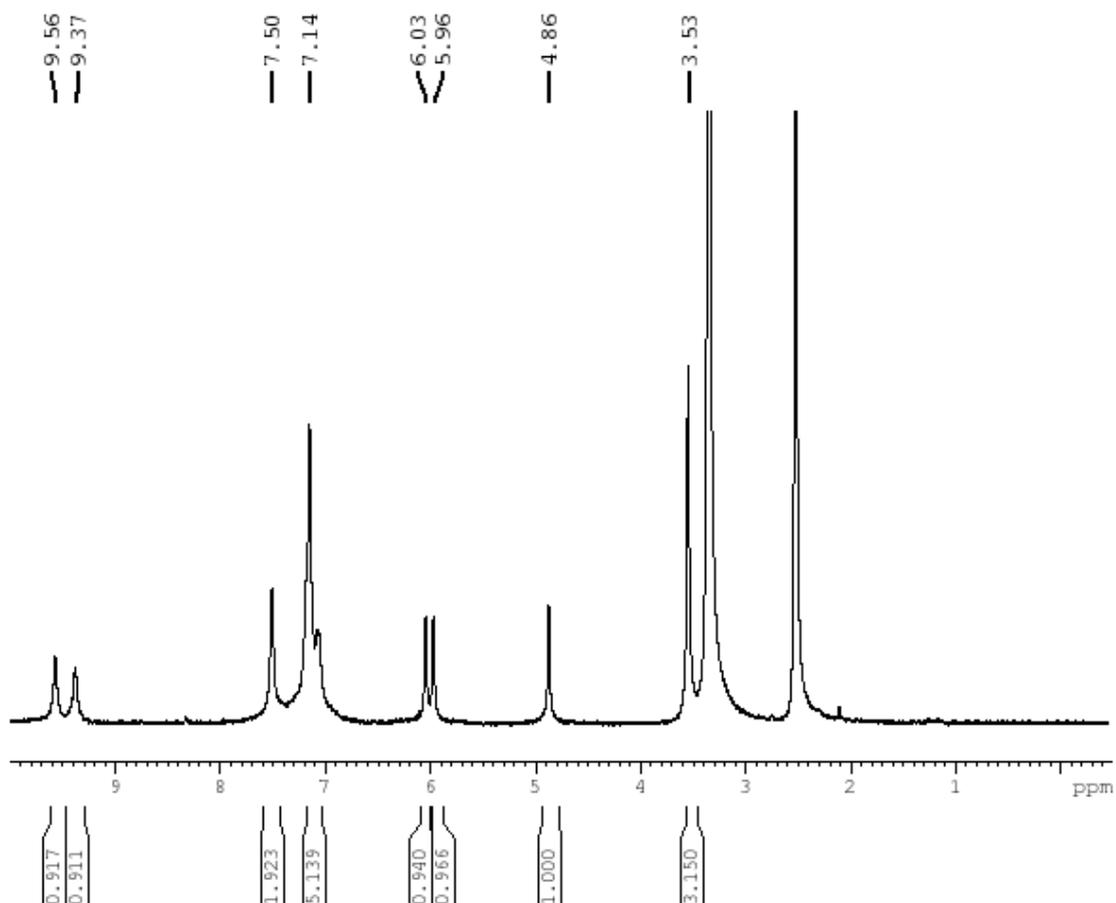
Anexo AAO – Cromatograma do derivado **34c** por CLUE-PDA.

12\_07\_21

Erlon\_SEM\_47\_120721

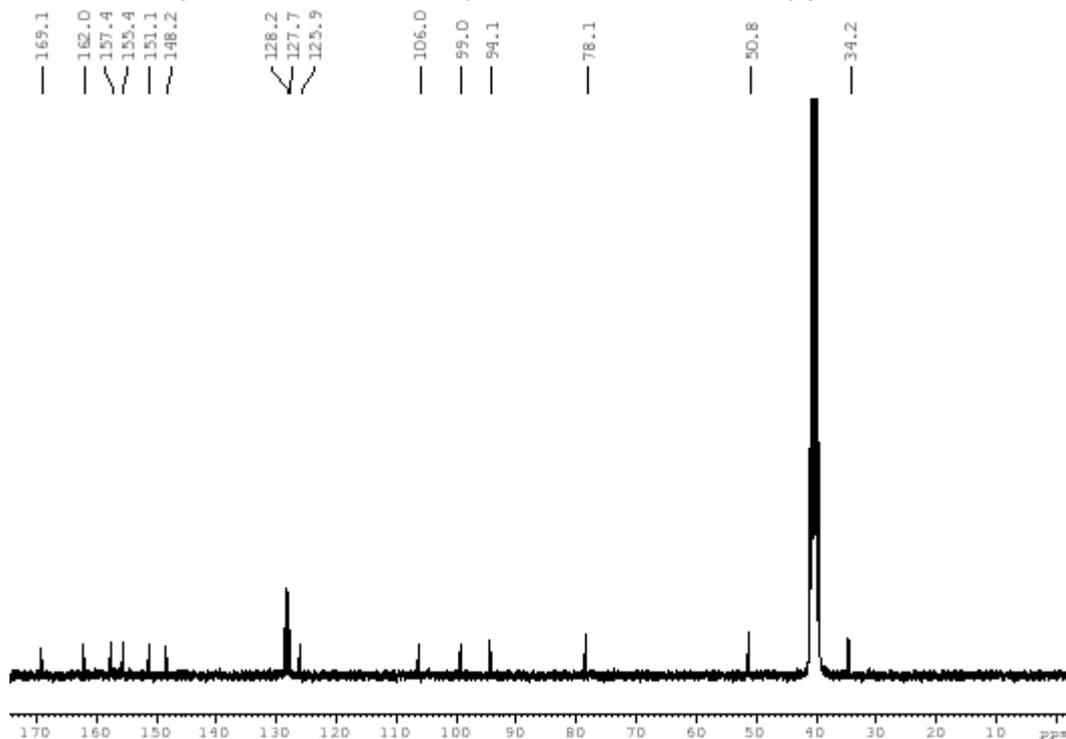


Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem foi calculada.

Anexo AAP – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300Hz, TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **34c**.

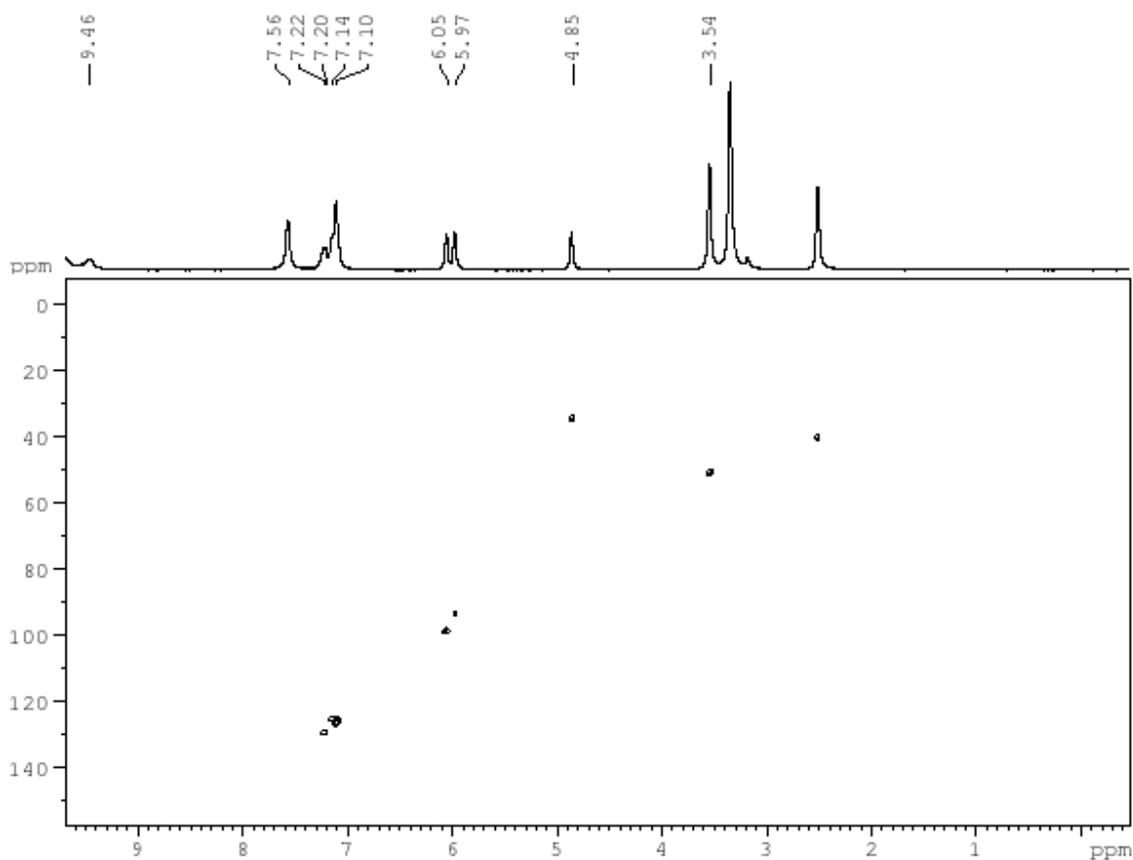
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo AAQ – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75Hz, TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **34c**.

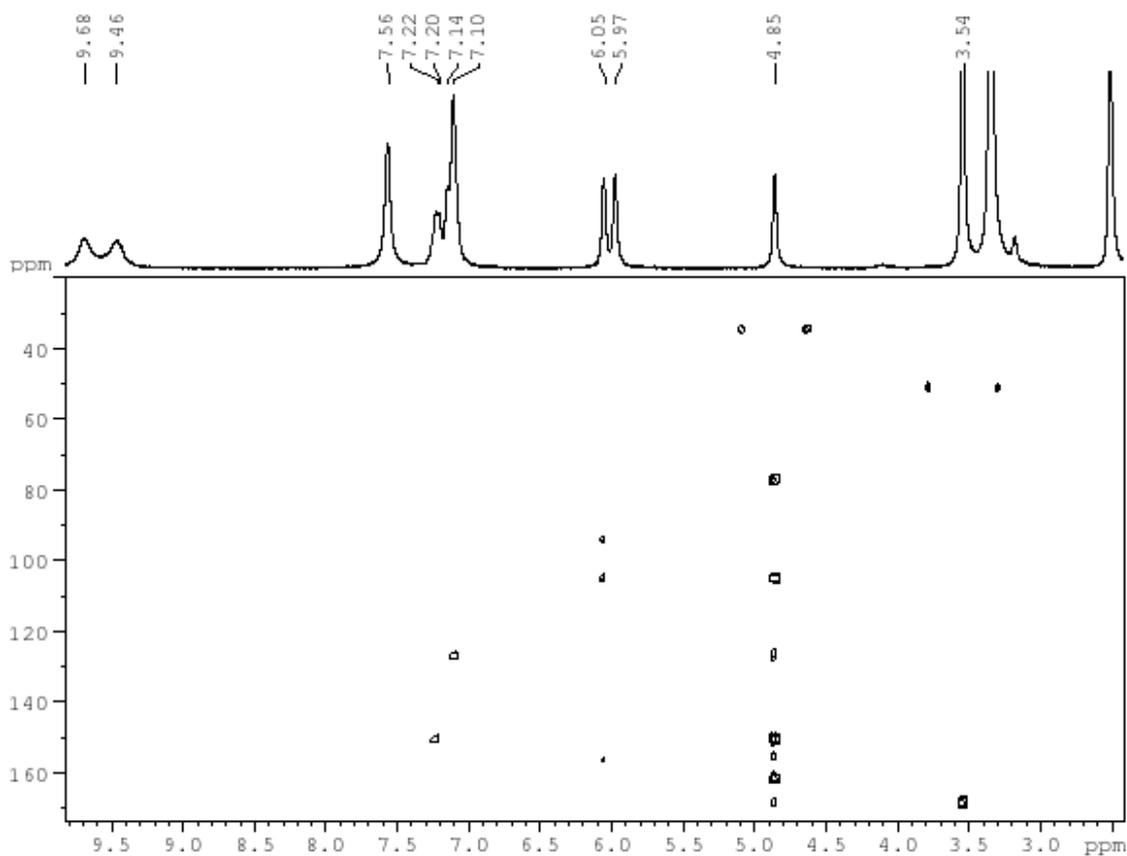


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Anexo AAR – Mapa de correlação HSQC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **34c**.



Anexo AAS – Mapa de correlação HMBC (300 MHz  $^1\text{H}$  e 75 MHz  $^{13}\text{C}$ , TMS,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para o derivado **34c**.

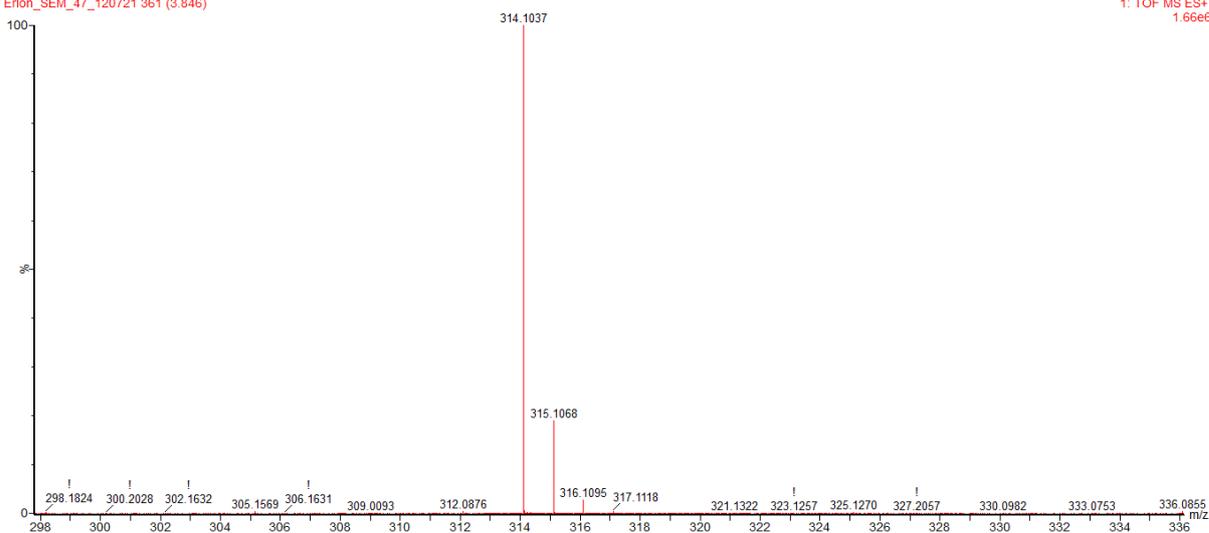


Anexo AAT – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **34c**.

12\_07\_21

Erlon\_SEM\_47\_120721\_361 (3.846)

1: TOF MS ES+  
1.66e6



Anexo AAU – Atividade inibitória *in vitro* de inibição da Acetilcolinesterase dos derivados avaliados.

DERIVADOS	% DE INIBIÇÃO (100 $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
31a	4.65 $\pm$ 3.68	n.d.
31b	1.22 $\pm$ 1.31	n.d.
31c	5.09 $\pm$ 7.76	n.d.
31d	1.04 $\pm$ 2.26	n.d.
31e	1.53 $\pm$ 0.94	n.d.
31f	-1.34 $\pm$ 1.09	n.d.
31g	3.30 $\pm$ 4.65	n.d.
31h	4.06 $\pm$ 5.77	n.d.
31i	-0.24 $\pm$ 7.64	n.d.
31j	-4.10 $\pm$ 2.98	n.d.
34a	2.90 $\pm$ 5.59	n.d.
34b	7.30 $\pm$ 3.65	n.d.
34c	-0.65 $\pm$ 2.05	n.d.
34d	3.45 $\pm$ 0.65	n.d.
34e	6.18 $\pm$ 4.20	n.d.
34f	2.34 $\pm$ 3.55	n.d.
34g	1.52 $\pm$ 3.91	n.d.
34h	-2.77 $\pm$ 1.45	n.d.
34i	7.90 $\pm$ 5.86	n.d.
34j	-3.64 $\pm$ 3.69	n.d.
36a	66.59 $\pm$ 1.57	32.39 $\pm$ 1.04
36b	80.73 $\pm$ 0.33	9.01 $\pm$ 0.71
36c	52.10 $\pm$ 1.40	n.d.
36d	79.80 $\pm$ 0.62	9.67 $\pm$ 0.68
36e	75.37 $\pm$ 1.01	11.49 $\pm$ 1.18
36f	73.21 $\pm$ 0.67	11.73 $\pm$ 0.67
36g	63.63 $\pm$ 0.51	20.03 $\pm$ 1.90
36h	33.29 $\pm$ 2.02	n.d.
36i	70.14 $\pm$ 1.02	26.21 $\pm$ 0.75
35	03.56 $\pm$ 1.32	n.d.
<b>Fisostigmina</b>	79.20 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	1.35 $\pm$ 0.07

Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 3); <sup>a</sup> controle positivo testado em 10  $\mu$ M;

n.d. não determinado.