

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Igor Vivan Roberto

**Análise *in silico* e síntese de análogos cumarínicos com potencial de inibição  
da enzima Monoamina Oxidase do tipo B**

Florianópolis

2023

Igor Vivan Roberto

**Análise *in silico* e síntese de análogos cumarínicos com potencial de inibição da enzima Monoamina Oxidase do tipo B**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Maique Weber Biavatti, Dr.<sup>a</sup>

Coorientador: Prof. Luiz Antonio Escorteganha Pollo, Dr.

Florianópolis

2023

Roberto, Igor Vivian

Análise in silico e síntese de análogos cumarínicos com potencial de inibição da enzima Monoamina Oxidase do tipo B / Igor Vivian Roberto ; orientadora, Maique Weber Biavatti, coorientador, Luiz Antonio Escorteganha Pollo, 2023.

65 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Ancoramento molecular. 3. Síntese orgânica. 4. Monoamina Oxidase do tipo B. 5. Cumarinas. I. Biavatti, Maique Weber. II. Pollo, Luiz Antonio Escorteganha. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Igor Vivian Roberto

**Planejamento e síntese de inibidores cumarínicos da enzima Monoamina Oxidase do tipo B**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia

Florianópolis, 30 de junho de 2023.



Coordenação do Curso

**Banca examinadora**



Prof.<sup>a</sup> Maique Weber Biavatti, Dr.<sup>a</sup>

Orientadora



Prof.<sup>a</sup> Lílian Sibelle Campos Bernardes, Dr.<sup>a</sup>

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.<sup>a</sup> Cristiane Meyre da Silva Bittencourt, Dr.<sup>a</sup>

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023.

A todos que possuem uma primavera dentro de si.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, com carinho especial aos meus avós Salete e Nilton, que desde sempre moldaram meu caráter e permitiram que somente coisas boas acontecessem na minha vida. Essa vitória também é de vocês e sou honrado em fazer parte das suas histórias. Agradeço com todo o amor que emana de mim.

Aos meus amigos, os quais considero minha segunda família, que tiveram paciência ao longo de todo esse período e que continuam andando ao meu lado, expressei meu mais profundo obrigado. Vocês foram o alicerce para que eu me mantivesse em pé nesses cinco anos e meio, sendo luz quando o caminho estava repleto de escuridão.

Ao curso de Farmácia, por proporcionar um aprendizado único na formação de profissionais farmacêuticos, mostrando a beleza da profissão e o quão importante somos em todas as áreas em que a farmácia está presente.

À professora Maique e ao professor Luiz, os quais me aceitaram e me abraçaram com todo seu carinho desde o primeiro minuto que nos conhecemos. Este trabalho é também reflexo dos seus esforços em tentar sempre melhorar, mesmo que de pouquinho em pouquinho, o aprendizado dos seus alunos, como ótimos mestres que são. Fico extremamente feliz pela oportunidade de estar convosco nesta última etapa da minha vida.

Algumas outras pessoas também passam pela nossa vida, mesmo que repentinamente, permitindo que entremos em suas vidas e que entrem na nossa. Meus agradecimentos também vão ao Laboratório de Estudos do Sistema Cardiovascular (LESC), à equipe da indústria Citromax, ao grupo de pesquisa da Central Analítica, aos extensionistas e ex-extensionistas do projeto Ações Preventivas Interdisciplinares em Doenças do Coração (APRINDCor) e aos profissionais do Ilha Hospital e Maternidade.

Espero que o presente trabalho seja de utilidade para quem vier a encontrá-lo na literatura, portanto, dedico aos leitores, cuja busca insaciável por conhecimento os trouxeram a um pedacinho da minha vida! Obrigado!

Não posso deixar de agradecer às minhas plantas, que me fazem companhia diariamente e compartilham dos bons e maus momentos. Que, mesmo mudas, dizem muito; e que, mesmo enraizadas, dançam na sua mais esplendorosa forma.

Meus mais sinceros agradecimentos!

*“Quand on a vu une seule fois le resplendissement du bonheur sur le visage d'un être qu'on aime, on sait qu'il ne peut pas y avoir d'autre vocation pour un homme que de susciter cette lumière sur les visages qui l'entourent” (CAMUS, 1964, p. 81)*

## RESUMO

A enzima monoamina oxidase (MAO) pertence à família das flavoenzimas, ou seja, utiliza o cofator Dinucleotídeo de Flavina e Adenina (FAD) na catálise oxidativa de arilalquilaminas endógenas, como dopamina e serotonina. A isoforma B (MAO B) tem participação na Doença de Parkinson (DP), a qual tem sua expressão aumentada no tecido cerebral, levando à degradação da dopamina, já escassa no local, além da produção de metabólitos tóxicos. Inibidores da MAO B vêm como estratégia para a redução dos danos da DP, sendo os disponíveis para o tratamento da DP a selegilina, a rasagilina e a safinamida, sendo a primeira usada principalmente na fase inicial e as outras na fase avançada da doença. A MAO B exibe um sítio ativo composto por três estruturas: o loop 99-112 que controla a entrada de substrato; a cavidade de entrada; e a cavidade catalítica, formada pelos aminoácidos da “cela aromática” e o FAD, entre outros resíduos. O sítio ativo apresenta grande quantidade de resíduos hidrofóbicos, tendo relevância na seletividade de substratos. Atualmente, o mecanismo de catálise chamado “transferência de hidreto de 2 etapas” é o mais aceito, levando à formação de um aduto covalente com o substrato, sendo parte do mecanismo de formação de ligação covalente de inibidores irreversíveis da MAO B. O desenvolvimento de novos inibidores que possam complementar ou até mesmo substituir os fármacos atuais é de grande interesse, sendo testados diferentes grupos químicos para isso, incluindo os análogos cumarínicos, os quais apresentam potencial para inibição da MAO B. Nesse contexto, o trabalho busca avaliar por meio de ancoramento molecular as interações de quatro análogos que possuem núcleo cumarínico com a MAO B, chamados DCPM (Derivado Cumarínico-Propargílico Metoxilado), DCPE (Derivado Cumarínico-Propargílico Etoxilado), DCAM (Derivado Cumarínico-Alquílico Metoxilado) e DCAE (Derivado Cumarínico-Propargílico Metoxilado), além de propor uma via sintética para sua obtenção. As análises *in silico* foram realizadas utilizando principalmente o *software* GOLD para o ancoramento e o *software* PyMOL para análise de interações e confecção de imagens. Já a síntese foi acompanhada por meio de cromatografia em camada delgada e as caracterizações realizadas por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e de carbono (RMN <sup>13</sup>C) e espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). As interações predominantes para os análogos DCPE e DCAM foram as hidrofóbicas, enquanto para o análogo DCPM foram as do tipo dipolo-dipolo induzido, e, no caso do DCAE, ambos os tipos estavam na mesma quantidade. Entre os principais achados, estão a ocorrência de ligações de hidrogênio com a lactona do anel cumarínico, bem como a possibilidade de formação de ligação covalente com o resíduo Cys 172 pelos análogos propargílicos. Ainda, o anel benzênico aparenta ser estabilizado por interações do tipo  $\pi$ -stacking com a “cela aromática” e *T*-stacking com o anel 1,2-diidropiridina do FAD. Já em relação à síntese, a via dos análogos etoxilados foi primeiramente seguida, porém não finalizada, sendo sintetizado 5 dos intermediários, sendo que 2 são inéditos na literatura. O principal fator limitante da rota é a perda por formação de subprodutos.

**Palavras-chave:** cumarina; propargilamina; ancoramento molecular; cela aromática.

## ABSTRACT

The enzyme monoamine oxidase (MAO) belongs to the flavoenzymes family, meaning it utilizes the cofactor Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) in the oxidative catalysis of endogenous arylalkylamines, such as dopamine and serotonin. Isoform B (MAO B) plays a role in Parkinson's Disease (PD), where its expression is increased in brain tissue, leading to dopamine degradation, which is already scarce in the affected area, as well as the production of toxic metabolites. MAO B inhibitors come as a strategy for reducing the damage caused by PD. The available options for PD treatment are selegiline, rasagiline and safinamide. Selegiline is primarily used in the early stages of the disease, while the others are utilized in the advanced phase. MAO B displays an active site composed by three structures: the 99-112 loop that controls substrate entry; the entrance cavity; and the catalytic cavity, formed by the aminoacids from the "aromatic cage" and FAD, among other residues. The active site contains a significant number of hydrophobic residues, which are of utmost importance for substrate selectivity. Currently, the accepted catalytic mechanism, known as "two-step hydride transfer", leads to the formation of a covalent adduct with the substrate, being part of the process by which irreversible MAO B inhibitors form covalent bonds. The development of new inhibitors that can complement or even replace current drugs is of great interest, and different chemical groups are being tested for this purpose, including coumarin analogs, which show significant potential for MAO B inhibition. In this context, the study aims to evaluate the interaction of four coumarin analogs, namely DCPM (Methoxylated Propargylic-Coumarin Derivative), DCPE (Ethoxylated Propargylic-Coumarin Derivative), DCAM (Methoxylated Alkyl-Coumarin Derivative) and DCAE (Ethoxylated Alkyl-Coumarin Derivative), with MAO B through molecular docking. Additionally, a synthetic route for their preparation is proposed. *In silico* analyses were mainly conducted using the GOLD software for docking and the PyMOL software for interaction analysis and image rendering. The synthesis was monitored using thin-layer chromatography and the characterizations were performed using hydrogen nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR) and carbon nuclear magnetic resonance ( $^{13}\text{C}$  NMR), as well as high resolution mass spectroscopy (HRMS). The predominant interactions for the DCPE and DCAM analogs were hydrophobic interactions, while for the DCPM analog, induced dipole-dipole interactions were prominent. In the case of DCAE, both types of interactions were present equally. Among the main findings, it was observed that hydrogen bonds occur with the lactone moiety of the coumarin ring, as well as the potential for covalent bonding with the Cys 172 residue by the propargylic analogs. Furthermore, the benzene ring appears to be stabilized by  $\pi$ -stacking interactions with the "aromatic cage" and T-stacking interactions with the 1,2-dihydropyridine ring of the FAD. Regarding the synthesis, the pathway for the ethoxylated analogs was initially pursued but not completed. Five intermediates were synthesized, with two of them being previously unreported in the literature. The main limiting factor of the route is the loss due to the formation of byproducts.

**Keywords:** coumarin; propargylamine; molecular docking; aromatic cage.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Desaminação oxidativa de monoaminas pelas MAOs.....	15
Figura 2 — Estrutura em 3D das monoamina oxidases do tipo A e B.....	16
Figura 3 — Participação da MAO no metabolismo da dopamina.....	17
Figura 4 — Vias de lesão celular na Doença de Parkinson.....	18
Figura 5 — Estrutura em 3D da MAO B e estrutura química do anel isoaloxazina do Dinucleotídeo de Flavina Adenina (FAD).....	19
Figura 6 — Características estruturais do sítio ativo da enzima MAO B.....	20
Figura 7 — Mecanismo de transferência de hidreto de 2 etapas.....	21
Figura 8 — Mecanismo de inibição irreversível proposto para derivados de propargilamina.....	25
Figura 9 — Grupos químicos de potenciais inibidores de monoamina oxidase.....	26
Figura 10 — Classificação das cumarinas naturais.....	27
Figura 11 — Ligantes avaliados nas análises <i>in silico</i> .....	32
Figura 12 — Poses preferenciais dos análogos propargílicos DCPM e DCPE.....	42
Figura 13 — Poses preferenciais dos análogos n-propílicos DCAM e DCAE.....	42
Figura 14 — Resíduos e ligações de hidrogênio dos análogos testados com a MAO B.....	44

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 — Via sintética dos derivados cumarínicos.....	35
Esquema 2 — Síntese do intermediário cumarínico 1.....	47
Esquema 3 — Síntese do intermediário cumarínico 2a.....	48
Esquema 4 — Síntese do intermediário cumarínico 3a.....	48
Esquema 5 — Síntese do intermediário cumarínico 4a.....	49
Esquema 6 — Síntese do intermediário tosilato de propargila 6x.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASP	<i>Astex Statistical Potential</i>
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CCDC	<i>Cambridge Crystallographic Data Centre</i>
COMT	Catecol-o-Metil Transferase
DCAE	Derivado Cumarínico-Alquílico Etoxilado
DCAM	Derivado Cumarínico-Alquílico Metoxilado
DCPE	Derivado Cumarínico-Propargílico Etoxilado
DCPM	Derivado Cumarínico-Propargílico Metoxilado
DMF	Dimetilformamida
DP	Doença de Parkinson
FAD	Dinucleotídeo de Flavina e Adenina
HAMD	<i>Hamilton Depression Rating Scale</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectroscopy</i>
IMAO	Inibidor de Monoamina Oxidase
MAO	Monoamina Oxidase
MAO A	Monoamina Oxidase do tipo A
MAO B	Monoamina Oxidase do tipo B
NBS	N-Bromosuccinimida
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
UPDRS	<i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>
WRS	<i>Webster Rating Scale</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior que
Å	Angstrom
eq.	Equivalente
g	Gramma
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% da atividade enzimática
kDa	Quilodalton
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
ml	Mililitro
mmol	Milimol
nm	Nanômetro
v/v	Volume/volume
°C	Graus Celsius

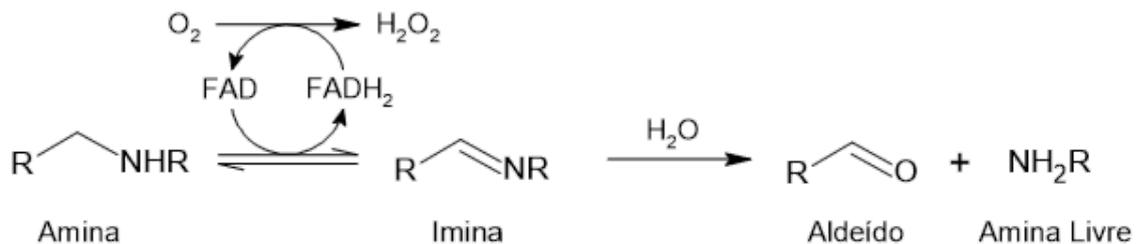
## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 ANÁLISES IN SILICO.....	30
3.1.1 Tratamento dos ligantes.....	30
3.1.2 Tratamento da enzima monoamina oxidase do tipo B.....	31
3.1.3 Ancoramento molecular.....	31
3.1.4 Análise dos tipos e distância das interações dos ligantes com a enzima.....	32
3.2 SÍNTESE ORGÂNICA.....	33
3.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....	34
3.4 REAÇÕES E IDENTIFICAÇÃO.....	35
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
4.1 ESTUDOS IN SILICO.....	39
4.2 SÍNTESE ORGÂNICA.....	46
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
APÊNDICE A — Interações dos análogos com o sítio ativo da MAO B.....	56
APÊNDICE B — Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono dos produtos e intermediários.....	61

## 1 INTRODUÇÃO

O grupo das enzimas Monoamina Oxidases (MAOs) é composto por duas isoenzimas ditas do tipo A (MAO A) e do tipo B (MAO B), as quais utilizam o Dinucleotídeo de Flavina e Adenina (FAD) como cofator para a catálise dos seus substratos, sendo, portanto, pertencentes à família das flavoproteínas. Essencialmente, as duas enzimas realizam a desaminação oxidativa de arilalquilaminas endógenas, como norepinefrina, serotonina, dopamina, tiramina, feniletilamina, entre outras, sendo uma etapa importante na degradação dessas substâncias (EDMONDSON; BINDA, 2018). A reação catalisada pelas MAOs está descrita na Figura 1.

Figura 1: Desaminação oxidativa de monoaminas pelas MAOs.

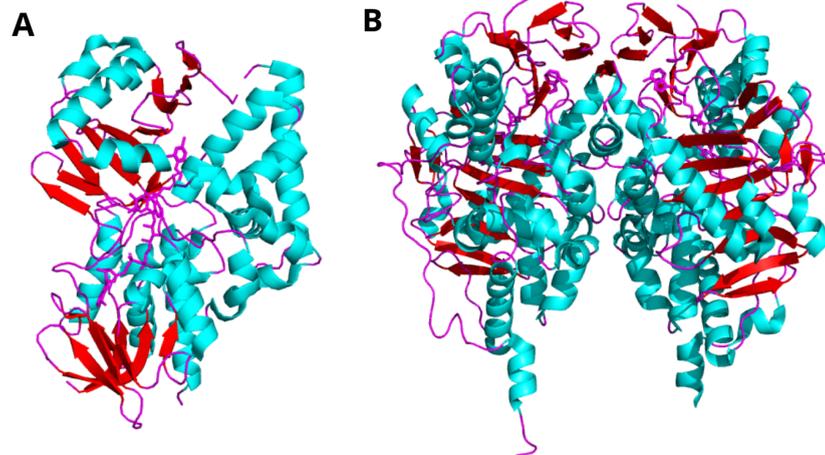


Legenda: A degradação do grupamento amina ocorre inicialmente por meio de uma reação de oxirredução enzimática, formando um grupo imina. O FAD participa como cofator dessa reação, havendo o consumo de oxigênio molecular para a regeneração eletrônica da molécula, com consequente geração de peróxido de hidrogênio. Em seguida, ocorre a hidrólise não-enzimática da imina em ambiente aquoso, formando os respectivos aldeído e amina livre.

Fonte: Adaptado de Carradori, Secci e Petzer, 2018.

As MAOs foram descritas primeiramente como tiramina oxidases por Hare, em 1928, em estudos realizados em material hepático (HARE, 1928). Com a ampla quantidade de enzimas do tipo amina oxidases até então descobertas, Zeller em 1956 sugeriu distingui-las de acordo com a capacidade de metabolizar monoaminas, como tiramina, ou diaminas, como putrescina e cadaverina, chamando as de monoamina oxidases ou diamina oxidases, respectivamente (ZELLER, 1956). Já em 1968, Johnston cogitou a possibilidade de existirem duas enzimas do tipo monoamina oxidase, havendo diferenças de sensibilidade ao mesmo inibidor (JOHNSTON, 1968). Após mais de 30 anos, Binda *et al* conseguiram caracterizar estruturalmente ambas as enzimas por cristalografia, permitindo que estudos do seu sítio catalítico pudessem ser realizados com maior clareza (Figura 2) (BINDA *et al.*, 2002; DE COLIBUS *et al.*, 2005).

Figura 2: Estrutura em 3D das monoamina oxidases do tipo A e B.



Legenda: A: Monômero A da monoamina oxidase do tipo A. B: Monoamina oxidase do tipo B em dímero. Em ciano, sequências de  $\alpha$ -hélice; em vermelho, sequências de folhas  $\beta$ ; e em rosa, sequências de loop. Códigos de identificação no *Protein Data Bank*: 2BXR (MAO A) e 1GOS (MAO B). Imagens geradas por meio do *software* PyMOL.

Fonte: Adaptado de Binda *et al*, 2002 e De Colibus *et al*, 2005.

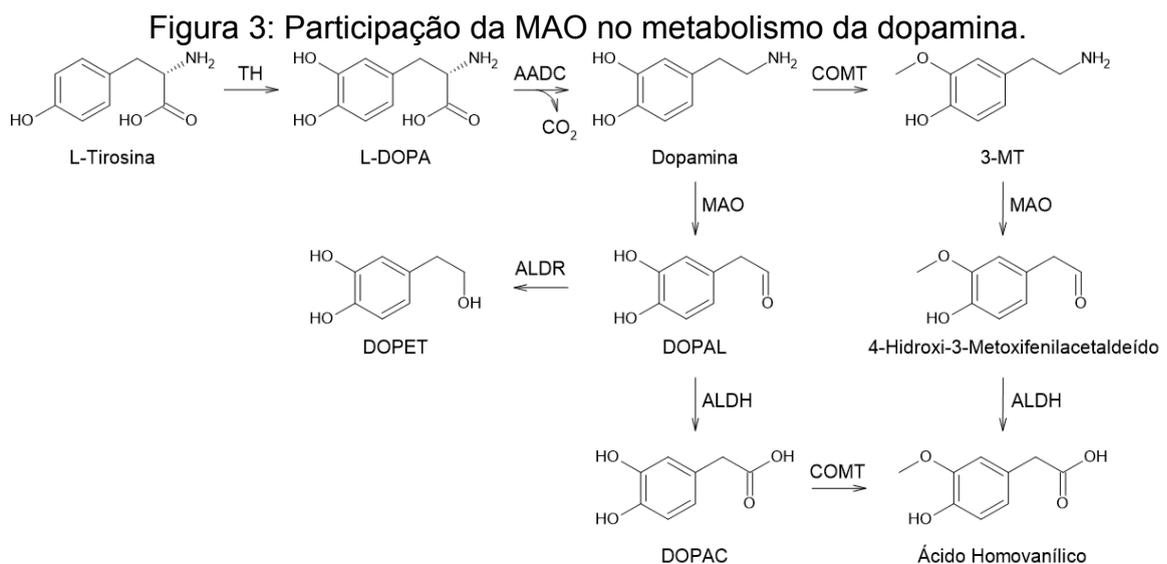
Apesar de serem inicialmente descritas no fígado, as monoamina oxidases são encontradas em diferentes tecidos, os quais são apresentados no Quadro 1. Cabe ressaltar que as isoformas da MAO são expressas normalmente nos mesmos tecidos, porém com predominâncias diferentes de acordo com o papel desempenhado no local. Além disso, a expressão das isoformas também pode ser alterada de acordo com algumas condições fisiológicas ou patológicas, como o aumento da expressão cerebral de MAO B em indivíduos com mais de 60 anos (FOWLER *et al.*, 1980; KORNHUBER *et al.*, 1989), aumento de MAO A no cérebro de pessoas com depressão (MEYER *et al.*, 2006) e aumento em tecidos tumorais de uma ou outra isoforma dependendo do tecido afetado (ALJANABI *et al.*, 2021).

Quadro 1: Expressão predominante das isoformas da MAO nos tecidos humanos.

MAO A	MAO B
Neurônios adrenérgicos	Neurônios serotoninérgicos
Neurônios dopaminérgicos	Astrócitos
Neurônios catecolaminérgicos	Plaquetas
Trato gastrointestinal	
Placenta	
Pulmão	
Fígado	
Coração	

Fonte: Adaptado de Aljanabi *et al.*, 2021; Carradori, Secci e Petzer, 2018; Levitt, Pintar e Breakefield, 1982.

A monoamina oxidase é um importante alvo em estudos neuropsicofarmacológicos, devido às monoaminas endógenas serem os neurotransmissores majoritários no Sistema Nervoso Central. No caso do metabolismo da dopamina, que é sintetizada a partir da *L*-tirosina dentro do citoplasma neuronal e armazenada em vesículas até a sua liberação na fenda sináptica, quando em contato com a MAO ou a COMT, é degradada em vários subprodutos (Figura 3) (LATIF *et al.*, 2021; MASATO *et al.*, 2019). O bloqueio da atividade da MAO tem como consequência o aumento da concentração das aminas metabolizadas por ela, intensificando seus efeitos sobre a célula alvo. Isso tem particular importância em doenças que causam a diminuição dos níveis de neurotransmissores, como depressão e doenças neurodegenerativas, incluindo a Doença de Parkinson (JONES; RAGHANTI, 2021; TAN; JENNER; CHEN, 2021).



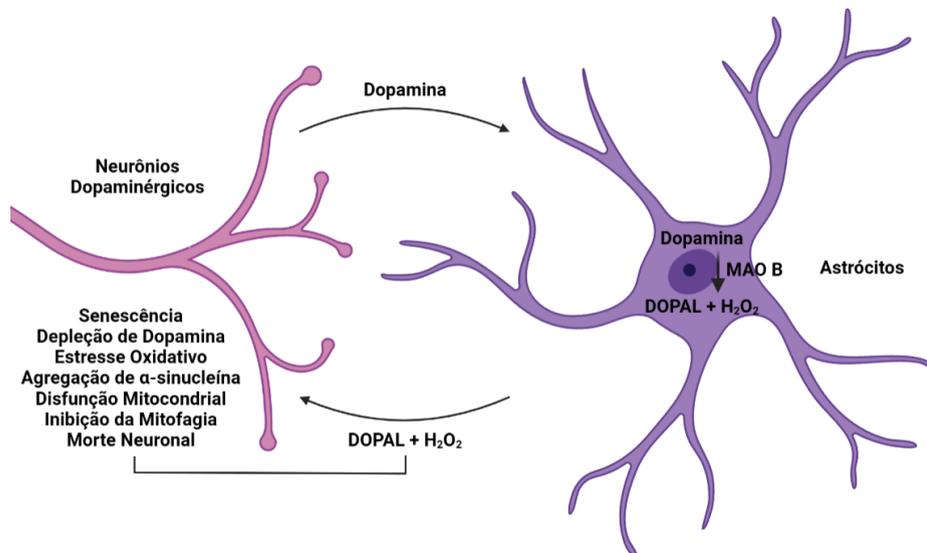
Legenda: TH: Tirosina Hidroxilase; AADC: Descarboxilase de Aminoácidos Aromáticos; COMT: Catecol-o-Metiltransferase; MAO: Monoamina Oxidase; 3-MT: 3-Metoxitiramina; DOPAL: 3,4-dihidroxiifenilacetaldeído; ALDR: Aldeído Redutase; DOPET: 3,4-dihidroxiifeniletanol; ALDH: Aldeído Desidrogenase; DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxiifenilacético.

Fonte: Adaptado de Latif *et al.*, 2021 e Masato *et al.*, 2019.

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que leva à depleção dos neurônios dopaminérgicos que partem da substância negra pars compacta em direção ao núcleo estriado. A ausência de inervação dopaminérgica leva aos sintomas motores e cognitivos decorrentes da doença, como rigidez, tremores e bradicinesia, sendo eles os parâmetros diagnósticos da DP. Molecularmente, a doença é caracterizada pela formação de Corpos de Lewy, decorrente do acúmulo e agregação intracelular de  $\alpha$ -sinucleína, juntamente com a

ocorrência de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, que, quando somados, resultam na morte dos neurônios. Atualmente, relaciona-se a enzima MAO B à esses eventos, não sendo a depleção de dopamina o único mecanismo pelo qual ela participa da doença. Sabe-se que com a desaminação da dopamina os subprodutos da catálise desempenham um papel neurotóxico importante, sendo eles o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a amônia ( $NH_3$ ) e um metabólito desaminado chamado DOPAL (3,4-dihidroxiacetilaldeído). Apesar de não ser expressa em quantidade significativa nos neurônios dopaminérgicos, a MAO B envolvida na doença é derivada dos astrócitos que cercam os neurônios locais (Figura 4) (JONES; RAGHANTI, 2021; SANTIN *et al.*, 2021; TAN; JENNER; CHEN, 2021).

Figura 4: Vias de lesão celular na Doença de Parkinson.



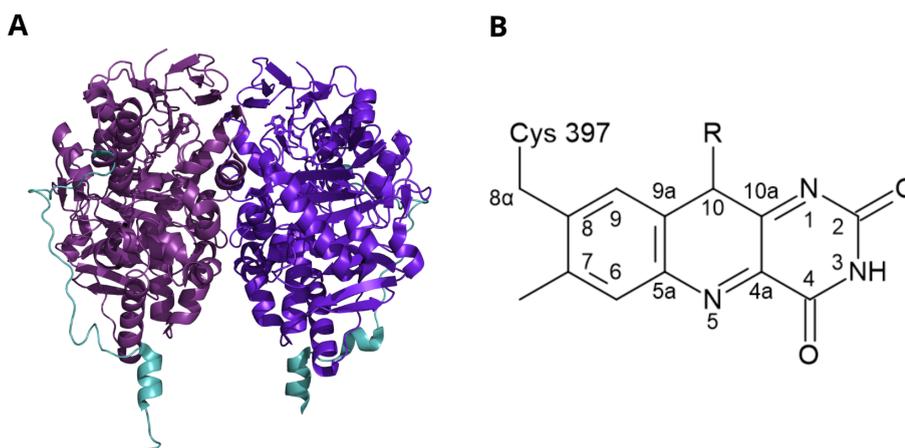
Legenda: Na Doença de Parkinson há o aumento da expressão de MAO B cerebral, especialmente em astrócitos, culminando na produção de DOPAL e  $H_2O_2$ , os quais levam à danos celulares que intensificam os efeitos da doença. DOPAL: 3,4-dihidroxiacetilaldeído.

Fonte: Adaptado de Santin *et al.*, 2021.

A monoamina oxidase do tipo B, escopo deste trabalho, é uma proteína de 520 aminoácidos e massa molecular de 58,8 kDa, compartilhando 70% de sua estrutura com a isoforma A (BACH *et al.*, 1988). Estruturalmente, a enzima se apresenta como um dímero, onde a porção C-terminal é responsável pelo ancoramento na membrana externa mitocondrial, sendo uma região composta por 59 aminoácidos (461-520) com uma  $\alpha$ -hélice transmembrana entre os resíduos Val 489 e Thr 500 para o monômero A (11 aminoácidos) e Val 489 e Ile 496 para o monômero B (7 aminoácidos) (Figura 5 A) (PDB ID: 1GOS). O cofator FAD, por sua

vez, é conectado à enzima por meio do resíduo Cys 397, o qual se liga covalentemente na posição 8 $\alpha$ -metila do anel isoaloxazina (Figura 5 B) (BINDA *et al.*, 2002; SCHNAITMAN; ERWIN; GREENAWALT, 1967).

Figura 5: Estrutura em 3D da MAO B e estrutura química do anel isoaloxazina do Dinucleotídeo de Flavina Adenina (FAD).



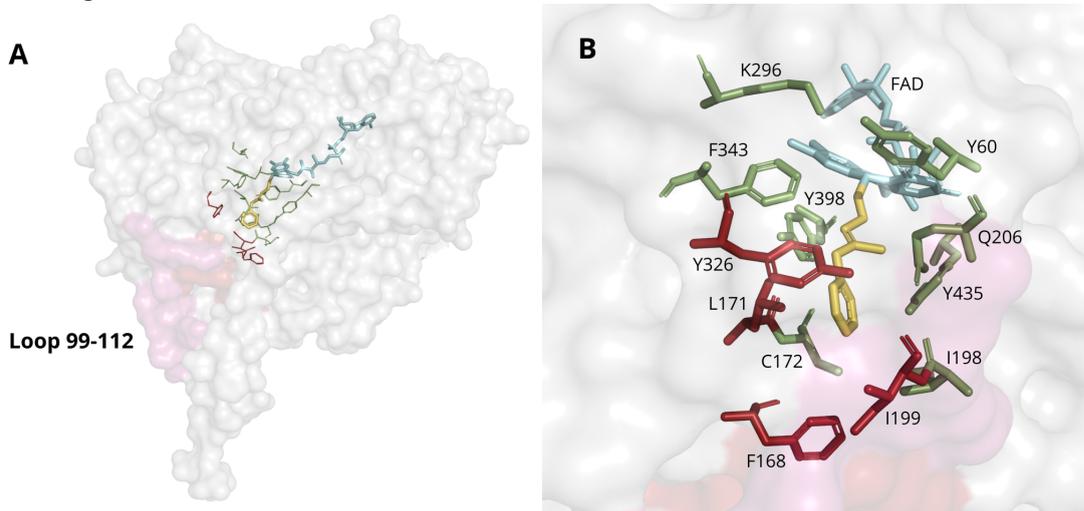
Legenda: A: Cada tom de roxo representa um monômero da enzima; em ciano, a porção C-terminal em cada monômero. B: Anel isoaloxazina do FAD; notar a ligação Cys 397-8 $\alpha$ -metila. Código de identificação no *Protein Data Bank*: 1GOS.  
Fonte: Adaptado de Binda *et al.*, 2002.

O sítio catalítico da MAO B, por sua vez, é formado por duas cavidades de diferentes tamanhos, uma menor com 290 Å<sup>3</sup>, chamada “cavidade de entrada”, e uma maior de 420 Å<sup>3</sup>, chamada “cavidade catalítica”, as quais são separadas entre si por quatro resíduos de aminoácidos (Tyr 326, Ile 199, Leu 171 e Phe 168). Ainda, foi identificada a existência de uma sequência em loop entre os aminoácidos 99 e 112 (loop 99-112) que separa a “cavidade de entrada” da superfície proteica. A admissão de moléculas para dentro do sítio ativo aparenta envolver uma alteração estrutural no loop 99-112, permitindo a entrada do substrato na “cavidade de entrada” e então, por movimento dos quatro resíduos que dividem as cavidades, há a passagem da molécula para a “cavidade catalítica” (BINDA *et al.*, 2002).

A “cavidade de entrada” possui caráter hidrofóbico, marcada pelos aminoácidos Phe 103, Pro 104, Trp 119, Leu 164, Leu 167, Phe 168, Leu 171, Ile 199, Ile 316, Tyr 326 (BINDA *et al.*, 2002), enquanto a “cavidade catalítica” é composta pela porção proteica, onde se destacam os aminoácidos Tyr 398 e Tyr 435 (que formam a chamada “cela aromática”; AKYÜZ; ERDEM; EDMONDSON, 2007), e o anel isoaloxazina do FAD. Uma característica de destaque reside na formação de

um complexo entre o átomo de nitrogênio 5 do anel do FAD, uma molécula de água e o resíduo Lys 296. Tal complexo tem função de estabilização do cofator durante o período de inatividade da enzima (EDMONDSON *et al.*, 2009) (Figura 6).

Figura 6: Características estruturais do sítio ativo da enzima MAO B.



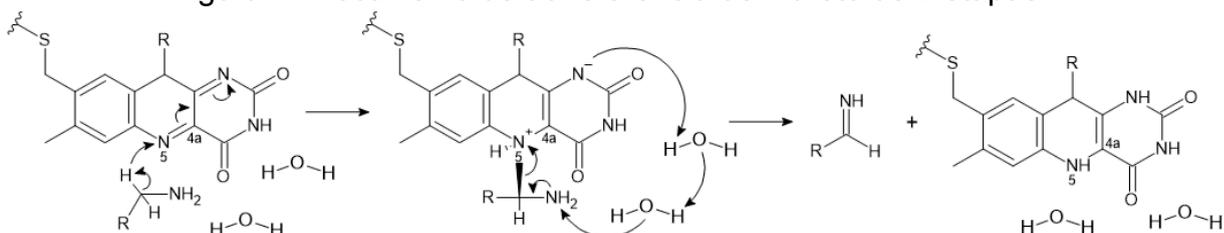
Legenda: MAO B em complexo com pargilina (Código de identificação no *Protein Data Bank*: 1GOS; Binda *et al.*, 2002). A: Visão lateral (90°) do monômero A, onde é possível observar em rosa o loop 99-112 e em vermelho os resíduos da cavidade de entrada. B: Visão posterior ampliada do monômero A; detalhe para os resíduos envolvidos na cavidade de entrada e cavidade catalítica. O inibidor pargilina está representado em amarelo, ligado covalentemente à molécula de FAD (ciano).

Os resíduos explicitados em vermelho correspondem aos aminoácidos que separam as duas cavidades da enzima. Em verde são apresentados os resíduos que envolvem o sítio catalítico e que estabilizam a molécula de pargilina.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O mecanismo de catálise da MAO B é baseado em uma reação de oxirredução entre o substrato, o FAD e o oxigênio molecular. Atualmente, o mecanismo mais aceito para a catálise realizada pela MAO B é a transferência de hidreto de 2 etapas (ORRU; ALDECO; EDMONDSON, 2013) (Figura 7), sendo demonstrado por estudos computacionais que a viabilidade energética dele prevalece em relação às demais hipóteses de mecanismos já descritas (VIANELLO; REPIČ; MAVRI, 2012). A transferência de hidreto de 2 etapas consiste na abstração de um hidreto do carbono  $\alpha$  do substrato pelo nitrogênio 5 do anel isoaloxazina, com conseqüente formação de um aduto entre o carbono  $\alpha$  e o nitrogênio 5. Em seguida, duas moléculas de água presentes no sítio catalítico da enzima auxiliam na transferência de prótons entre o nitrogênio 1 do anel isoaloxazina e o substrato, desfazendo o aduto e gerando uma imina neutra e um FAD completamente reduzido (Figura 7) (VIANELLO; REPIČ; MAVRI, 2012).

Figura 7: Mecanismo de transferência de hidreto de 2 etapas.

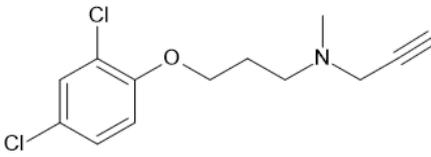
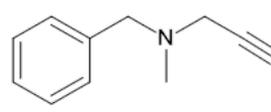
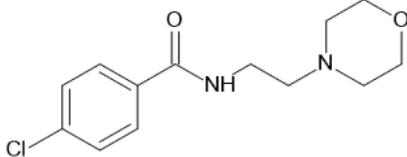
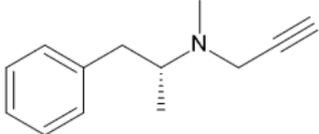
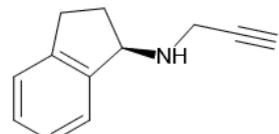
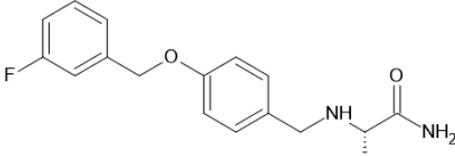
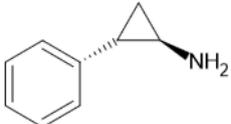
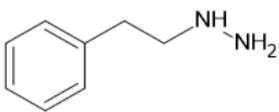
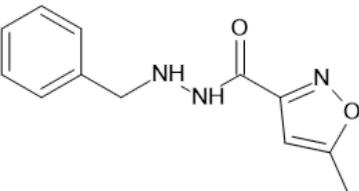


Fonte: Adaptado de Vianello, Repič e Mavri, 2012.

A formação de aldeído a partir da hidrólise da imina ocorre fora do sítio ativo, de forma não-enzimática, liberando amônia ou aminas livres (EDMONDSON; BHATTACHARYYA; WALKER, 1993; WOO; SILVERMAN, 1995). Já em relação à etapa de regeneração da enzima, caracterizada pela oxidação da flavina reduzida após a catálise, sugere-se que o oxigênio molecular atravessa as cavidades de entrada e de catálise se aproximando do carbono 4a do anel isoaloxazina de forma a gerar um par radicalar entre si, com a flavina na sua forma de semiquinona e o oxigênio como ânion superóxido. Acredita-se que esses intermediários passem por uma recombinação radicalar ou por uma transferência de elétrons acoplada a transferência de prótons, gerando o FAD completamente oxidado e peróxido de hidrogênio. As suposições do mecanismo de regeneração da enzima se baseiam em estudos com outras flavoenzimas, mas que aparentam ser aplicáveis para a MAO B (EDMONDSON *et al.*, 2009).

A inibição das monoamina oxidases é reconhecida como uma estratégia farmacológica para elevar a concentração de neurotransmissores no tecido alvo, e isso é realizado pela classe de fármacos chamada inibidores de monoamina oxidase (IMAOs). Os IMAOs podem ser classificados como seletivos para MAO A (IMAO A), seletivos para MAO B (IMAO B) ou não seletivos (inibem tanto MAO A quanto MAO B). Entre os IMAO A, os principais representantes são os inibidores irreversíveis clorgilina e pargilina e o inibidor reversível moclobemida. Em relação aos IMAO B, estão disponíveis os inibidores irreversíveis selegilina e rasagilina e o inibidor reversível safinamida. Por fim, alguns exemplos de inibidores não seletivos são a tranilcipromina, fenelzina e isocarboxazida, todos irreversíveis (BHAWNA *et al.*, 2022). Suas estruturas estão representadas no Quadro 2.

Quadro 2: Classificação e estrutura dos inibidores de monoamina oxidase.

Seletividade	Reversibilidade	Nome	Estrutura
IMAO A	Irreversíveis	Clorgilina	
		Pargilina	
	Reversíveis	Moclobemida	
IMAO B	Irreversíveis	Selegilina	
		Rasagilina	
	Reversíveis	Safinamida	
Não seletivos	Irreversíveis	Tranilcipromina	
		Fenelzina	
		Isocarboxazida	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma das aplicações dos IMAOs é para a Doença de Parkinson. A farmacoterapia da Doença de Parkinson (DP) se baseia inicialmente em diminuir a progressão dos sintomas e, quando em estágios sintomáticos, controlar esses eventos (BRASIL, 2017). Atualmente as classes de medicamentos disponíveis para a DP são os precursores de dopamina (levodopa), Inibidores da DOPA- Descarboxilase (benserazida e carbidopa), agonistas dopaminérgicos (pramipexol, bromocriptina e rotigotina), inibidores da catecol-o-metil transferase (entacapona), inibidores da monoamina oxidase do tipo B (selegilina, rasagilina e safinamida), anticolinérgicos (triexifenidil e biperideno), antiglutamatérgicos (amantadina) e antipsicóticos (clozapina) (BRASIL, 2017; SABA *et al.*, 2022). No Brasil, todas essas opções estão disponíveis no mercado, entretanto, no Sistema Único de Saúde somente não estão presentes a rotigotina, o pramipexol de liberação prolongada e a safinamida (BRASIL, 2022).

O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Parkinson (2017) preconiza como tratamento na fase inicial da doença os inibidores da MAO B, amantadina ou anticolinérgicos (se refratário à outros antiparkinsonianos), em indivíduos sem prejuízo funcional. Já para os indivíduos com algum prejuízo funcional, é recomendado o uso de levodopa em baixas doses, visto que altas doses levam rapidamente à flutuações motoras (*wearing-off*, *delayed-on* e *no-on*), as quais também acontecem em baixas doses, mas somente após anos de tratamento. O uso de agentes dopaminérgicos para essa população deve ser mais cauteloso, visto que apresentam diversos efeitos adversos que podem limitar seu uso, sendo indicados como primeira linha em monoterapia para pacientes jovens, principalmente os agonistas que não são derivados do ergot (pramipexol e rotigotina) (NICE, 2017; SABA *et al.*, 2022).

Na fase avançada da doença, o uso de associações se torna comum, visto as complicações geradas pela doença. O uso de levodopa em baixas doses, associado ao pramipexol, à entacapona, à rasagilina ou à amantadina apresenta benefícios motores, especialmente em relação ao primeiro, que possibilita a redução da dose de levodopa (BRASIL, 2017). Agonistas dopaminérgicos, inibidores da COMT e inibidores da MAO B permitem a redução das flutuações, mas não das discinesias dessa fase (SABA *et al.*, 2022). Em relação aos sintomas não-motores, o uso de clozapina é o mais adequado para o controle de alucinações e delírios (BRASIL, 2017; NICE, 2017), seguido da quetiapina (NICE, 2017), devendo os demais

medicamentos antiparkinsonianos serem retirados ou terem sua dose reduzida (BRASIL, 2017). Indivíduos que apresentam demência parkinsoniana, podem ser manejados com o uso de inibidores de acetilcolinesterase (NICE, 2017).

A classe dos inibidores de monoamina oxidase do tipo B, representada pela selegilina, rasagilina e safinamida, é utilizada para o controle dos sintomas motores da DP. Entre os principais benefícios da selegilina, se destacam a redução da progressão da doença e a diminuição da necessidade do uso de levodopa ao longo do tempo quando administrado na fase inicial da doença (TETRUD; LANGSTON, 1989). Uma revisão sistemática de WANG *et al.* (2023) identificou uma melhora no escore UPDRS total (Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson), com o uso da selegilina em monoterapia ou terapia combinada, havendo ainda uma tendência ao longo do tempo dessa melhora no escore. Para as subescalas UPDRS I, UPDRS II e UPDRS III também houve uma tendência parecida de melhora ao longo do tempo, assim como para os escores HAMD (Escala de Avaliação de Depressão de Hamilton), que avalia depressão em pacientes com DP, e WRS (Escala de Avaliação de Webster), o qual avalia o prejuízo clínico dos pacientes com DP. Entre os efeitos adversos, a selegilina apresentou maiores prejuízos neuropsiquiátricos, com os distúrbios de sono sendo os mais prevalentes, quando comparada com o placebo. Em relação aos fármacos entacapona, pramipexol e triexifenidil essa diferença não foi significativa (WANG *et al.*, 2023).

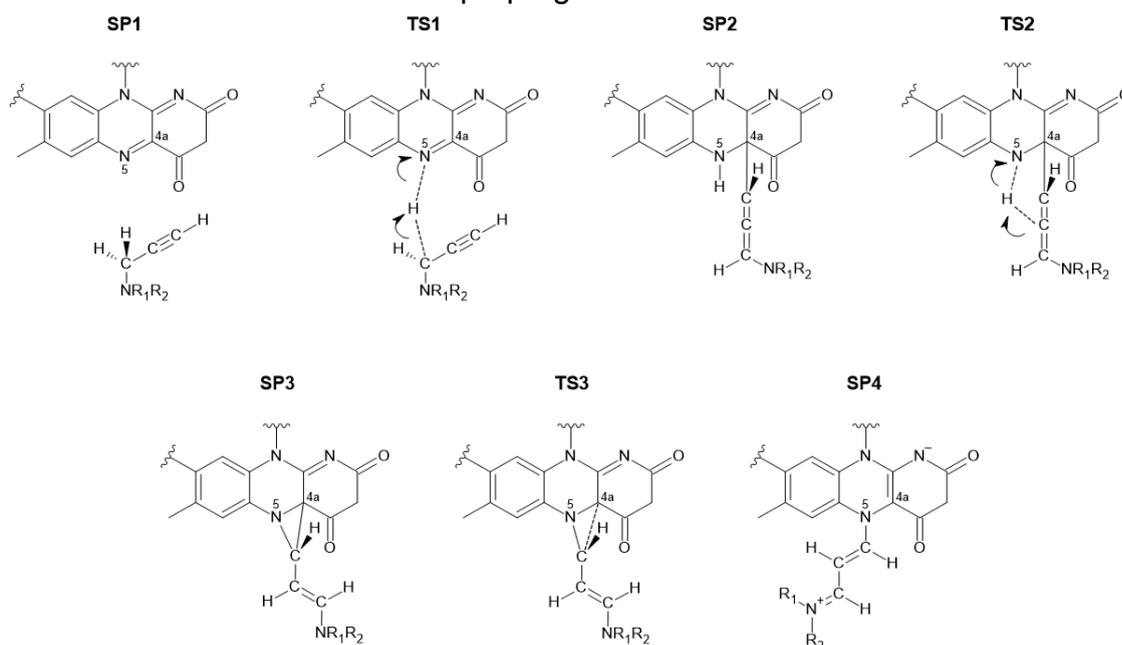
Por sua vez, a rasagilina apresenta efeitos de curto prazo, relacionados à inibição da MAO B e aumento da dopamina local, e efeitos de longo prazo, envolvendo neuroproteção por mecanismo anti-apoptótico (YOUDIM *et al.*, 2005). Em monoterapia, o fármaco consegue melhorar o UPDRS I, II e III com uma dose de 1 mg, porém com 2 mg somente é capaz de melhorar as subescalas II e III, além de ambos reduzirem a escala total. Os eventos adversos são os mesmos para as duas doses e na mesma frequência (CHANG *et al.*, 2022). Em terapia adjunta à levodopa, a rasagilina é capaz de reduzir a dose necessária de levodopa, melhorar os escores UPDRS II e III e não apresenta diferença significativa entre a frequência de efeitos adversos quando comparada à monoterapia de levodopa (KANO *et al.*, 2022).

A safinamida é indicada nas fases moderada a avançada da DP como terapia adjunta ao levodopa. Um diferencial é o fato de sua atividade ser multimodal, levando à inibição reversível da MAO B e bloqueio de canais de sódio voltagem dependente e modulação de canais de cálcio, com consequente inibição da

liberação de glutamato (GARDONI *et al.*, 2018). Em uma metanálise de 2021, a mais recente até então, o fármaco apresentou importância no tratamento de pacientes com DP com flutuações motoras na dose de 100 mg associado à levodopa, melhorando o UPDRS III, ampliando o tempo de ON (tempo em que há a presença de efeitos terapêuticos) e diminuindo o tempo de OFF (tem em que há a ausência de efeitos terapêuticos). Os efeitos adversos encontrados foram poucos ou nulos nas três doses observadas (50 mg, 100 mg e 200 mg), para pacientes com ou sem flutuações motoras (GIOSSI *et al.*, 2021). Entretanto, a qualidade dos estudos utilizados na revisão sistemática citada são em geral de moderada ou baixa qualidade, dificultando a sua confiabilidade para a prática clínica.

Especificamente, os inibidores da monoamina oxidase do tipo B irreversíveis, selegilina e rasagilina, aumentam a atividade da dopamina na região estriatal do encéfalo e reduzem a formação de espécies radiculares derivadas da atividade da enzima (CHEN; SWOPE, 2005). A inibição gerada por essas moléculas ainda não está totalmente clara, porém é observada a formação de um aduto covalente entre o grupo propargilamina e o nitrogênio 5 do anel isoaloxazina (CHAJKOWSKI-SCARRY; RIMOLDI, 2014). Uma proposta de mecanismo de inibição irreversível para os análogos de propargilamina foi apresentada por Tandarić e Vianello, em 2019, a partir de estudos computacionais, descrita na Figura 8.

Figura 8: Mecanismo de inibição irreversível proposto para derivados de propargilamina.

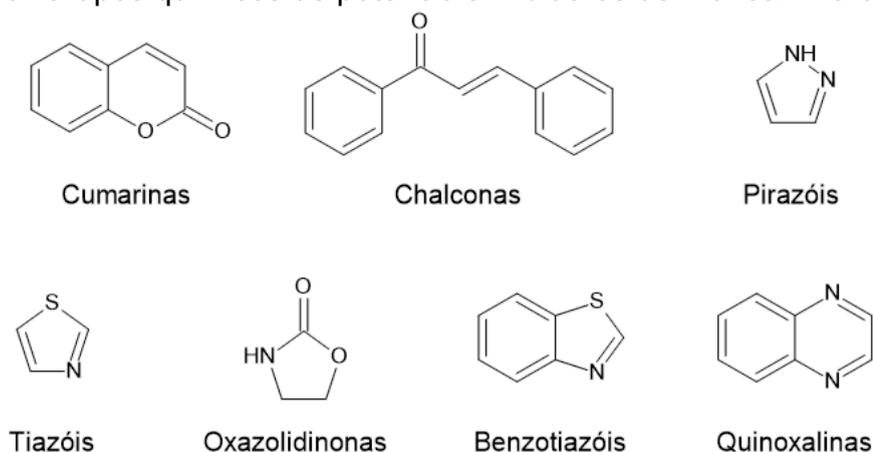


Legenda: A primeira etapa se refere à abstração de um hidreto, representado por SP1 e TS1, com consequente rearranjo das ligações  $\pi$  em forma de aleno. Em seguida, há um ataque eletrofílico ao carbono 4a, com formação de um aduto entre as espécies (SP2). O aduto favorece a transferência do próton abstraído pelo nitrogênio 5 para o carbono  $\beta$  do inibidor (TS2) e a criação de um anel de três membros entre o carbono  $\gamma$ , o nitrogênio 5 e o carbono 4a (SP3). Devido à tensão do anel gerado e a conformação do anel isaloxazina, ele se quebra entre o carbono  $\gamma$  e o carbono 4a (TS3), havendo rearranjo eletrônico com formação de SP4. SP: Ponto Estacionário; TS: Estado de Transição.

Fonte: Adaptado de Tandarić e Vianello, 2019.

Com o avanço dos estudos de relação estrutura atividade para os inibidores da monoamina oxidase, novas classes químicas de moléculas foram testadas visando a inibição das enzimas, avaliando a sua reversibilidade e seletividade em relação às duas isoenzimas. Entre algumas dessas classes, podemos citar os derivados de cumarinas, chalconas, pirazóis, tiazóis, oxazolidinonas, benzotiazóis e quinoxalinas (Figura 9) (BHAWNA *et al.*, 2022).

Figura 9: Grupos químicos de potenciais inibidores de monoamina oxidase.

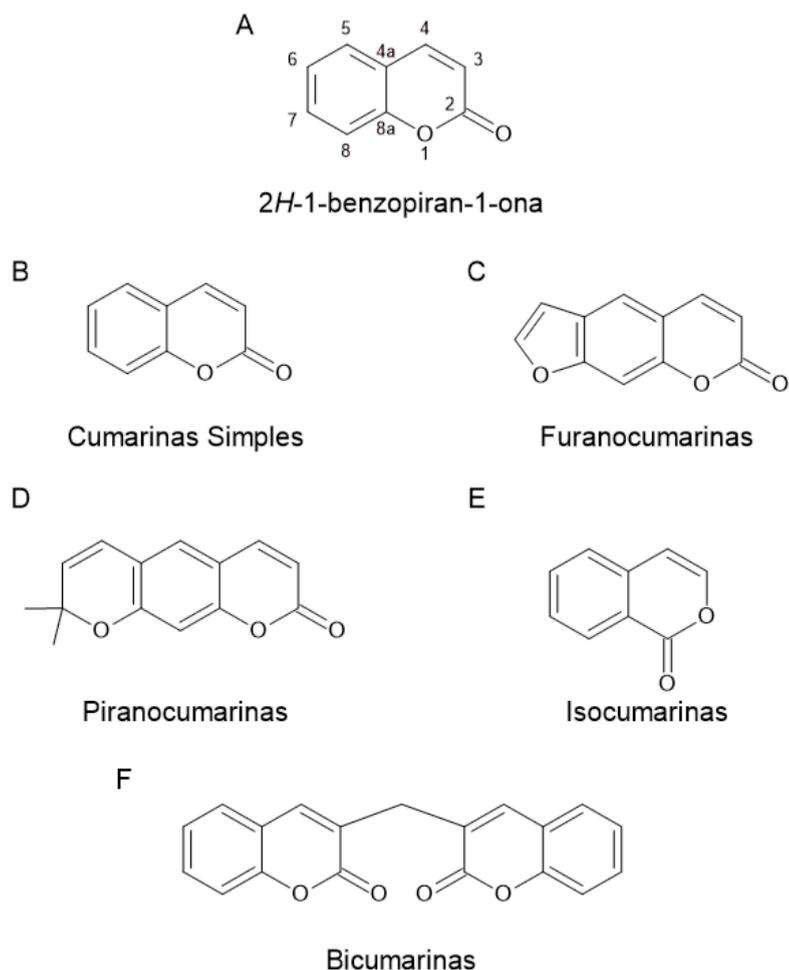


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os análogos de cumarinas representam um importante grupo de moléculas com atividade biológica, sendo um exemplo a varfarina, a qual é utilizada como fármaco anticoagulante em pacientes com fibrilação atrial pelo risco de infarto cardioembólico e no tratamento de trombose venosa profunda e embolismo pulmonar (ABDELNABI *et al.*, 2022). O núcleo cumarínico é formado por uma estrutura de dois anéis chamada 2H-1-benzopiran-1-ona (Figura 10 A). As cumarinas naturais podem ser classificadas como cumarinas simples (Figura 10 B), furanocumarinas (com um anel furano conjugado ao anel benzênico; Figura 10 C), piranocumarinas (com pelo menos um anel pirano dissustituído conjugado ao anel benzênico; Figura 10 D), isocumarinas (isômero da cumarina; Figura 10 E) e

bicumarinas (com dois núcleos cumarínicos covalentemente ligados; Figura 10 F) (KOYIPARAMBATH *et al.*, 2021).

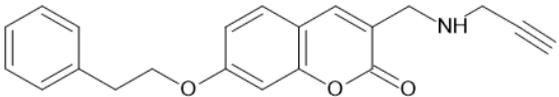
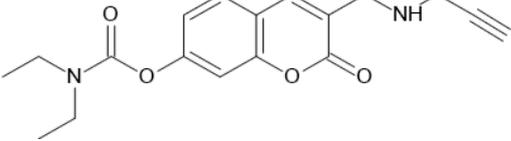
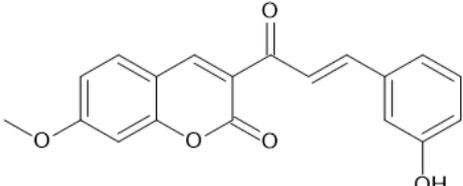
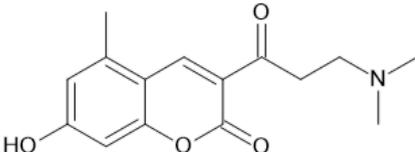
Figura 10: Classificação das cumarinas naturais.



Fonte: Adaptado de (KOYIPARAMBATH *et al.*, 2021).

Atualmente, sabe-se que as cumarinas naturais e sintéticas têm atividade também no Sistema Nervoso Central, podendo ser importantes adjuvantes nos tratamentos de doenças que afetem esse sistema (SKALICKA-WOŹNIAK *et al.*, 2016). Diversos análogos já foram sintetizados e avaliados quanto à sua atividade biológica frente à doenças neurodegenerativas, como na Doença de Alzheimer (MZEZEWA *et al.*, 2021) e na Doença de Parkinson (MOYA-ALVARADO *et al.*, 2021), encontrando moléculas com grande potencial de se tornarem agentes terapêuticos (Tabela 1).

Tabela 1: Exemplos de moléculas contendo núcleo cumarínico e sua atividade sobre a MAO B.

Estrutura	IC <sub>50</sub> MAO B (µM)	SI MAO B (µM)	Referência
	0,029	133,2	MZEZEWA <i>et al.</i> , 2021.
	0,101	205,9	MZEZEWA <i>et al.</i> , 2021.
	0,76 ± 0,08	-	MOYA-ALVA RADO <i>et al.</i> , 2021.
	3,66 ± 1,64	> 100	(TAO <i>et al.</i> , 2019).

Legenda: SI MAO B: Índice de Seletividade para MAO B, calculada a partir da equação:  
 $SI = IC_{50}(MAO A) / IC_{50}(MAO B)$ .

Fonte: Adaptado de Moya-Alvarado *et al.*, 2021; Mzezewa *et al.*, 2021 e Tao *et al.*, 2019.

De forma geral, inibidores irreversíveis levam à maior duração e intensidade da ação desejada, com menor flutuação dos parâmetros farmacocinéticos, entretanto a síntese *de novo* de enzima e o risco de imunogenicidade da ligação entre o inibidor e a enzima tornam seu uso mais cauteloso. Já em relação aos inibidores reversíveis, o principal fator que influencia sua atividade é a seletividade frente às isoenzimas, possuindo normalmente melhores perfis de segurança (CARRADORI; SILVESTRI, 2015; DUARTE; CUADRADO; LEÓN, 2021). Análogos cumarínicos, no geral, possuem um ótimo perfil de reversibilidade e seletividade para MAO B (MATOS *et al.*, 2020).

Dessa forma, o presente trabalho busca ampliar a gama de moléculas na literatura contendo o núcleo cumarínico e que têm potencial de inibir a enzima MAO B, aumentando a chance de alguma delas ser eleita para estudos posteriores.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação teórica das propriedades de ligação dos derivados cumarínicos propostos com o sítio ativo da enzima monoamina oxidase do tipo B (MAO B) e síntese de tais derivados.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Análise *in silico* das interações entre a enzima MAO B e os análogos cumarínicos propostos, por meio de ancoramento molecular;

Obter os análogos avaliados a partir da síntese sequencial e purificação de cada intermediário e produto da rota sintética proposta;

Caracterizar estruturalmente os intermediários e produtos finais por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), bem como espectrometria de massas de alta resolução.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 ANÁLISES *IN SILICO*

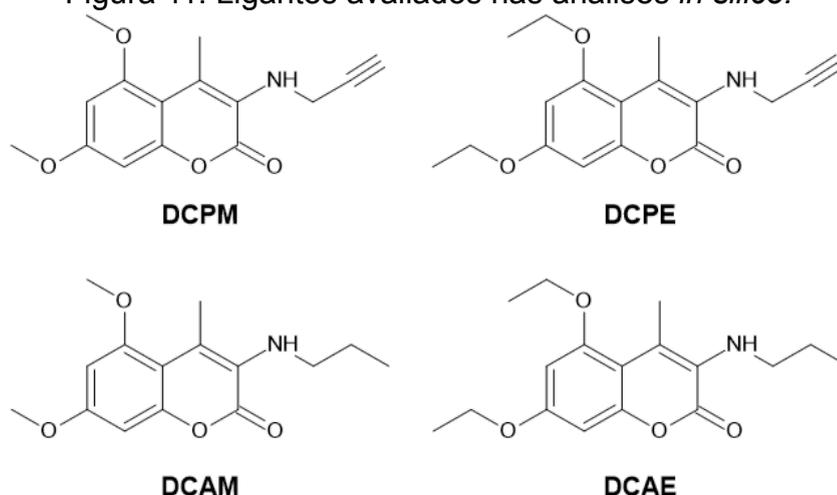
#### 3.1.1 Tratamento dos ligantes

Os ligantes avaliados nas análises *in silico* foram o Derivado Cumarínico-Propargílico Metoxilado (DCPM), o Derivado Cumarínico-Propargílico Etoxilado (DCPE), o Derivado Cumarínico-Alquílico Metoxilado (DCAM) e o Derivado Cumarínico-Alquílico Etoxilado (DCAE), cujas estruturas químicas estão representadas na Figura 11. Os Derivados Cumarínicos-Propargílicos, em especial, contém um grupamento propargilamina ligado ao carbono 3 do anel cumarínico, enquanto os Derivados Cumarínicos-Alquílicos apresentam um grupo n-propilamina no mesmo carbono.

As estruturas foram desenhadas no *software* gratuito Avogadro (HANWELL *et al.*, 2012) e pré-otimizadas no próprio programa, até a variação de energia em relação ao campo aplicado ser nulo. Posteriormente, as estruturas foram otimizadas com o aplicativo gratuito ORCA (NEESE, 2012), além de serem realizados cálculos de frequência para identificação de possíveis anormalidades nas frequências calculadas para as ligações. A otimização molecular se deu por meio do método semi-empírico *Hartree-Fock* de 3 parâmetros corrigidos (HF-3c), se mostrando o melhor método semi-empírico para as moléculas em questão, visto que não apresentou frequências negativas nos cálculos realizados.

Ainda, de forma a verificar e garantir a fidedignidade da estrutura molecular dos ligantes otimizados, foi utilizado o *software* Mercury do suite de *softwares* da CCDC (GROOM *et al.*, 2016), com a correção de átomos e ligações da molécula, se necessário. Essa etapa adicional também foi aplicada para o ligante cristalográfico (selegilina), o qual foi extraído do complexo com a enzima e desfeita sua ligação covalente com o cofator FAD por meio do *software* *Discovery Studio Visualizer*.

Figura 11: Ligantes avaliados nas análises *in silico*.



Legenda: DCPM: Derivados Cumarínico-Propargílico Metoxilado; DCPE: Derivados Cumarínico-Propargílico Etoxilado; DCAM: Derivados Cumarínico-Alquílico Metoxilado; DCAE: Derivados Cumarínico-Alquílico Etoxilado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.1.2 Tratamento da enzima monoamina oxidase do tipo B

A enzima utilizada no trabalho foi a monoamina oxidase do tipo B em complexo com a selegilina descrita por De Colibus *et al.*, 2005, catalogada sob o código 2BYB no *Protein Data Bank* (Resolução de 2,20 Å). A proteína foi mantida completamente rígida durante os estudos *in silico*, somente sendo adicionado os hidrogênios não explícitos na molécula, sem alteração no tautomerismo dos resíduos de histidina. Uma vez que moléculas de água estão presentes na proteína cristalográfica, houve necessidade de retirar essas estruturas para o ancoramento.

### 3.1.3 Ancoramento molecular

A ancoragem molecular se deu por meio do *software* GOLD, do suite de *softwares* da CCDC (GROOM *et al.*, 2016). Duas etapas foram feitas para a obtenção dos resultados: a validação do método e o ancoramento com os parâmetros da validação.

A validação das corridas de ancoramento molecular ocorreu através da variação do raio do sítio de ligação, nas distâncias de 6,0 Å, 7,0 Å e 8,0 Å, *versus* as quatro funções de escore presentes no software, ditos CHEMPLP, GoldScore, ChemScore e ASP. O ligante cristalográfico da enzima, selegilina, e o controle positivo, também sendo a selegilina, foram analisados frente à observação do erro

quadrático médio (RMSD) em relação às coordenadas do ligante cristalográfico. O ancoramento estaria validado caso o RMSD estivesse menor ou igual a 2,0, na maioria dos resultados para determinado raio no grid e função de escore, sendo essa distância e método de cálculo utilizados para obter os resultados. Como resultado, foi encontrado que a função de escore ASP no raio de 7,0 Å e de 8,0 Å apresentaram os melhores valores de RMSD, com os dois raios exibindo a mesma eficiência.

Para a obtenção dos resultados, os 4 ligantes foram testados, tendo o ligante cristalográfico como controle da corrida por meio do seu RMSD. O ancoramento foi realizado segundo as configurações da validação, utilizando a função de escore ASP no raio de 8,0 Å, com obtenção do *fitness* para cada pose. As posições preferenciais para cada ligante foram definidas de acordo com a pose de maior prevalência e, dentre elas, as que se apresentavam mais centralizadas quando comparadas às demais e com o mínimo possível de choques entre os raios de Van der Waals dos átomos do ligante e do cofator FAD.

Tanto para a validação, quanto para os testes, foi permitido flexibilidade total às ligações dos ligantes testados, além da eficiência de busca ser de 200%, onde foram selecionadas as 10 primeiras poses encontradas após a corrida.

#### 3.1.4 Análise dos tipos e distância das interações dos ligantes com a enzima

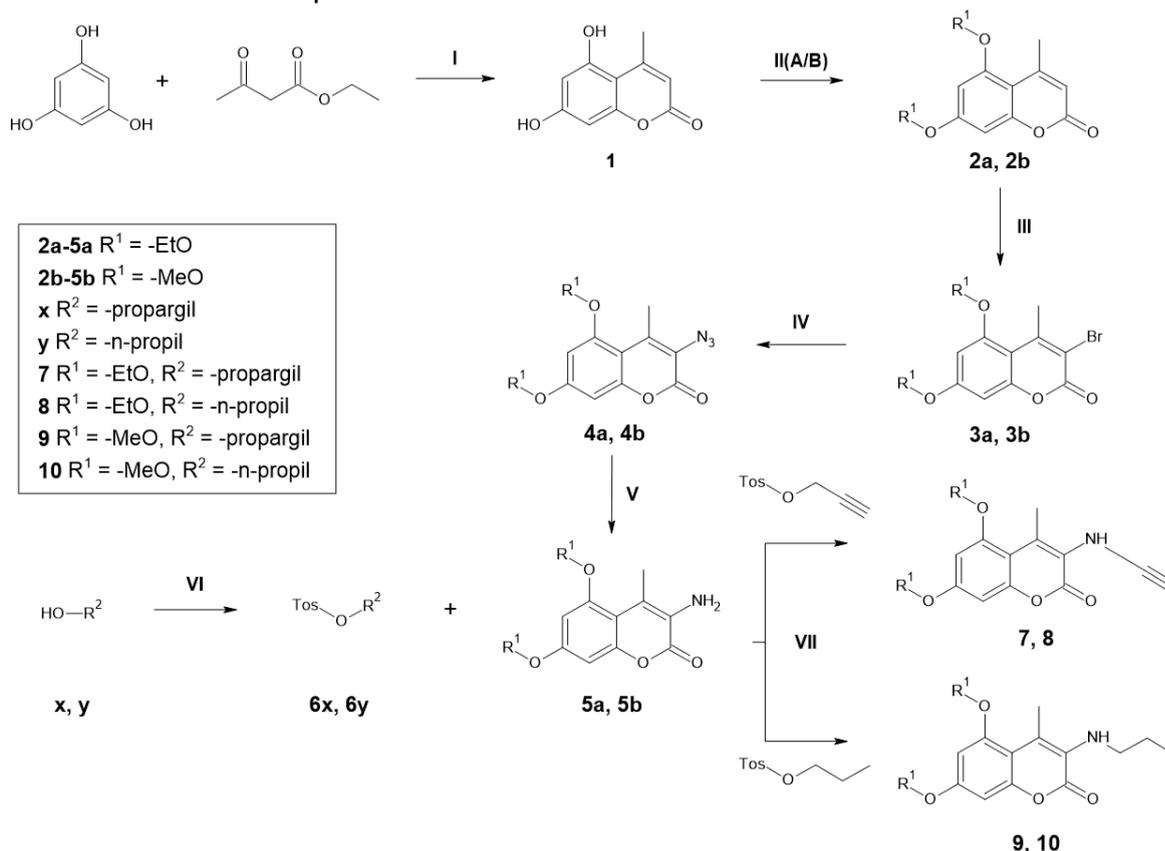
As posições preferenciais encontradas foram avaliadas quanto aos tipos de interações e a distância em relação aos resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da enzima. Ligações covalentes entre os ligantes e a enzima não foram alvo de busca para o presente estudo. As interações de maior relevância foram as que apresentaram distância entre os átomos envolvidos menor ou igual a 3,0 Å, sendo classificadas visualmente. Algumas interações chave em uma distância maior de 3,0 Å também foram avaliadas.

As poses foram convertidas em arquivos de visualização para o *software* PyMOL *Open Source* versão 2.6.0a0, para que fossem feitas as análises de distância de ligação e tipos de ligação, respectivamente, bem como na produção das imagens apresentadas no trabalho.

### 3.2 SÍNTESE ORGÂNICA

Após a avaliação *in silico*, a rota sintética para obtenção dos quatro derivados, apresentada no Esquema 1, foi testada.

Esquema 1: Via sintética dos derivados cumarínicos.



Legenda: Condições reacionais. **Condição I:** Ácido Polifosfórico, 60° C. **Condição II:** Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, t-BuONa, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>Br (A) ou CH<sub>3</sub>I (B), DMF, 0 °C. **Condição III:** CCl<sub>4</sub>, NBS, 50 °C. **Condição IV:** NaN<sub>3</sub>, DMF, 70 °C. **Condição V:** PPh<sub>3</sub>, DMF, 70 °C. **Condição VI:** TosCl, KOH, Éter Dietílico, 0 °C. **Condição VII:** 6x ou 6y, DBU, THF, 0 °C. Análogos. **7:** DCPM. **8:** DCPE. **9:** DCAM. **10:** DCAE.  
 Fonte: Elaborado pelo autor

A etapa inicial da rota sintética é composta por uma condensação de Pechmann na ausência de solvente (MARTIN *et al.*, 2018). Em seguida, há a alquilação dos grupos hidroxila por meio de uma substituição nucleofílica com brometo de etila ou iodeto de metila, produzindo os análogos etoxilado (via “A”) e metoxilado (via “B”), respectivamente (PADURARU *et al.*, 2008). A terceira etapa consiste na brominação do carbono 3 do anel cumarínico, como descrito por Schieferdecker *et al.*, 2019, sofrendo, posteriormente, uma substituição nucleofílica por um grupo azida (MATTA *et al.*, 2018). O intermediário azida gerado foi

posteriormente reduzido com  $\text{NaBH}_4$  e  $\text{NiCl}_2$  (GIAMPIERO *et al.*, 2021), para que seja possível a substituição nucleofílica entre a amina primária formada e o tosilato de propargila ou de n-propila (GORE *et al.*, 2009), os quais foram previamente obtidos pela tosilção do álcool propargílico ou n-propílico, respectivamente (ÇOBAN; AYRANCI; AK, 2022).

O acompanhamento das reações foi realizado por cromatografia de camada delgada (CCD) em placa de sílica gel, com leitura nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm.

### 3.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

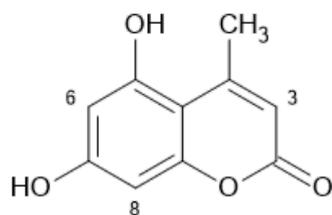
A elucidação estrutural foi feita por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), monodimensional e bidimensional, em aparelho Bruker Fourier 300 com frequência de operação de 300 MHz para RMN  $^1\text{H}$  e 75 MHz para RMN  $^{13}\text{C}$ . O padrão utilizado para a RMN foi o Trimetilsilano, com os deslocamentos químicos expressos em partes por milhão (ppm). A espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) também foi realizada para os intermediários, sendo feita em equipamento Xevo G2-S QTof.

Quando pertinente, a etapa de elucidação estrutural foi complementada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em aparelho IR Prestige-21.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono estão presentes no Apêndice B.

### 3.4 REAÇÕES E IDENTIFICAÇÃO

#### 3.4.1 Preparo da 5,7-dihidroxi-4-metil-2H-cromen-2-ona (1)



Em um béquer, foram adicionados 5,0 g de floroglucinol (1 eq., 39,6 mmol), 5,0 ml de acetoacetato de etila (1 eq., 39,6 mmol) e 0,5 ml de ácido polifosfórico (0,26 eq., 10,29 mmol). A mistura foi agitada sob temperatura de 60 °C, sem utilização de solvente. A reação foi finalizada após 2 horas, sendo adicionado água em temperatura ambiente e filtrado sob baixa pressão. Posteriormente, o material retido no filtro foi lavado 2 vezes com etanol, restando um sólido de cor branca.

**Fórmula Molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>

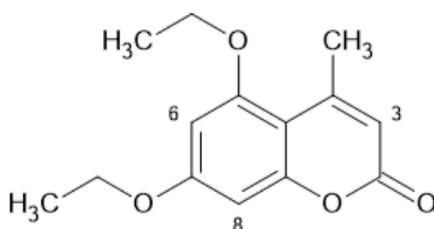
**Massa Molar:** 192,17 g mol<sup>-1</sup>

**Rendimento:** 67,19% (5,11 g; 26,59 mmol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 6,29 (d, *J* 2,3 Hz, 1H, H-8), 6,21 (d, *J* 2,3 Hz, 1H, H-6), 5,85 (s, 1H, H-3), 2,59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**HRMS** calculado para C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 215,0315, encontrado *m/z* 215,0327.

#### 3.4.2 Preparo da 5,7-dietoxi-4-metil-2H-cromen-2-ona (2a)



Em um balão, foi adicionado 1,5 g de (1) (1 eq., 7,81 mmol), o qual foi solubilizado com DMF (20 ml) sob atmosfera de argônio. Posteriormente, a temperatura foi reduzida em banho de gelo (0 °C) e então foram adicionados o Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 eq., 2,545 g, 7,81 mmol), o t-BuONa (1 eq., 0,751 g, 7,81 mmol) e o EtBr (3 eq., 1,74 ml, 7,81 mmol) sob agitação, sendo a reação monitorada por meio de

CCD (hexano:acetato de etila 7:3 v/v) durante 4 horas. Quando finalizada a reação, foi realizada uma partição líquido-líquido extraído com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e água 2 vezes. A fase orgânica foi desidratada utilizando  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, esperando secar o solvente a temperatura ambiente e em seguida mantido sob vácuo, com formação de um sólido verde.

**Fórmula Molecular:**  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4$

**Massa Molar:**  $248,27 \text{ g mol}^{-1}$

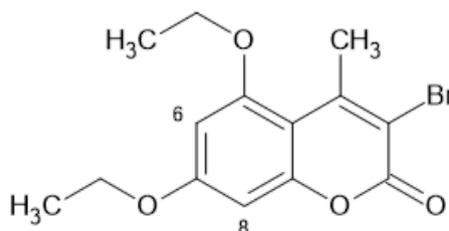
**Rendimento:** 86,12% (1,67 g; 6,72 mmol)

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  6,40 (d,  $J$  2,3 Hz, 1H, H-8), 6,26 (d,  $J$  2,3 Hz, 1H, H-6) 5,93 (dd,  $J$  1,2 / 2,3 Hz, 1H, H-3), 4,06 (q,  $J$  7,0 Hz, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2,55 (d,  $J$  1,2 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,47 (t,  $J$  7,0 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,43 (d,  $J$  7,0 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  162,1, 161,2, 158,4, 156,9, 154,7, 111,2, 96,2, 93,7, 64,6, 64,0, 24,4, 14,6, 14,5.

**HRMS** calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  271,0941, encontrado  $m/z$  271,0960.

### 3.4.3 Preparo da 5,7-dietoxi-4-metil-3-bromo-2H-cromen-2-ona (3a)



Em um balão, 500 mg de (2a) (1 eq., 2,02 mmol) foi solubilizado em 40 ml de  $\text{CCl}_4$  e em seguida 717,2 mg de NBS (2 eq., 4,04 mmol) foram adicionados na solução. A temperatura foi mantida em  $50^\circ\text{C}$ , sob agitação, por 9 horas. Durante o período, o monitoramento foi realizado por CCD (hexano:acetato de etila 7:3 v/v), até o desaparecimento do material de partida. O precipitado formado foi filtrado com  $\text{CCl}_4$  e um segundo balão onde foi recolhido o material solubilizado foi secado em rotaevaporador. Em seguida, foi realizada cromatografia em coluna com eluição em gradiente (partindo de hexano:acetato de etila 9:1 v/v e aumentando 10% de acetato de etila a cada eluição até 5:5). As frações contendo o produto foram reunidas em um balão e o solvente removido sob vácuo, sobrando um sólido amarelo.

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>BrO<sub>4</sub>

**Massa Molar:** 327,17 g mol<sup>-1</sup>

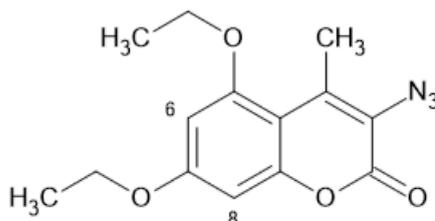
**Rendimento:** 32,40% (162 mg; 0,49 mmol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 6,43 (d, *J* 2,4 Hz, 1H, H-8), 6,32 (d, *J* 2,4 Hz, 1H, H-6), 4,09 (q, *J* 7,0 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,51 (t, *J* 7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,45 (d, *J* 7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 162,1, 161,6, 157,8, 155,6, 152,9, 109,2, 104,1, 96,9, 93,5, 64,9, 64,2, 24,4, 14,6, 14,5.

**HRMS** calculado para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>BrO<sub>4</sub> [2M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 675,0200, encontrado *m/z* 675,0212.

#### 3.4.4 Preparo da 3-azido-5,7-dietoxi-4-metil-2H-cromen-2-ona (4a)



Em um balão, 162 mg de (3a) (1 eq., 0,4951 mmol) foi solubilizado em 3 ml de DMF hidratado, sob aquecimento a uma temperatura de 70 °C e agitação. 71,44 mg de NaN<sub>3</sub> (2,22 eq., 0,9902 mmol) foi adicionado na solução, sendo a reação acompanhada por CCD (hexano:acetato de etila 7:3 v/v) até todo o material de partida ser consumido. A reação foi finalizada após 8 horas, sendo adicionado solução saturada de NaCl, filtrado, e realizado extração com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4 vezes. Na sequência, a fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e o solvente removido sob vácuo. O material foi isolado por cromatografia em coluna com eluição em gradiente (partindo de hexano:acetato de etila 8:2 v/v até 5:5 v/v, aumentando 10% de acetato de etila a cada eluição). As frações contendo o produto foram reunidas em um balão e secas em rotaevaporador, restando um sólido amarelo.

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Massa Molar:** 289,28 g mol<sup>-1</sup>

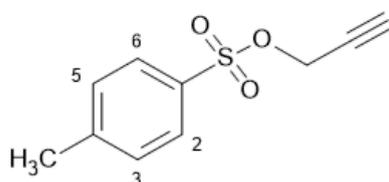
**Rendimento:** 7,75% (11,1 mg; 0,038 mmol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 6,40 (d, *J* 2,4 Hz, 1H, H-8), 6,29 (d, *J* 2,4 Hz, 1H, H-6), 4,02 (q, *J* 7,0 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,47 (t, *J* 7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,43 (t, *J* 7,0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 161,0, 158,3, 153,5, 139,4, 119,3, 118,6, 104,7, 97,0, 93,5, 64,7, 64,1, 17,7, 14,6, 14,1.

**HRMS** calculado para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [2M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 601,2017, encontrado *m/z* 601,2057.

### 3.4.5 Preparo do prop-2-in-1-il 4-metilbenzeno-1-sulfonato (6x)



Em um erlenmeyer à 0 °C, 11,4 g de TosCl (3 eq., 150 mmol) foram solubilizados em 50 ml de éter dietílico e então adicionado 2,72 ml de álcool propargílico (1 eq., 50 mmol). Em seguida, KOH (16,83 g, 6 eq., 300 mmol) foi adicionado aos poucos, observando a formação de um precipitado fino. Após 4 horas de agitação, 60 ml de água gelada foi adicionada na mistura reacional, a qual foi extraída 4 vezes com éter dietílico. A fase orgânica foi evaporada a temperatura ambiente por 48 horas, restando um composto oleoso de coloração marrom.

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Massa Molar:** 210,25 g mol<sup>-1</sup>

**Rendimento:** 39,20% (4,41 g; 20,97 mmol)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7,81 (d, *J* 8,4 Hz, 2H, H-2, H-6), 7,35 (d, *J* 8,4 Hz, 2H, H-3, H-5), 4,69 (d, *J* 2,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,49 (t, *J* 2,5 Hz, 1H, CH), 2,45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 145,2, 132,9, 129,9, 128,1, 77,3, 75,4, 57,3, 21,7.

**HRMS** calculado para C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>S [2M+Na]<sup>+</sup> *m/z* 443,0594, encontrado *m/z* 443,0585.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTUDOS *IN SILICO*

Os experimentos envolvendo ancoragem molecular demonstraram boa complementaridade entre os resíduos da MAO B e os átomos dos ligantes na função de escore e raio do sítio ativo escolhidos. Os análogos de cumarina mostraram valores de *fitness* superiores em comparação ao ligante cristalográfico selegilina. Entre esses análogos, os compostos etoxilados exibiram valores de *fitness* mais altos do que os metoxilados. Já entre os análogos etoxilados, observou-se uma tendência em que o Derivado Cumarínico-Propargílico Etoxilado (DCPE) apresentou valores mais elevados que o Derivado Cumarínico-Alquílico Etoxilado (DCAE). Os valores de *fitness* encontrados estão representados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de *fitness* encontrados para os análogos e o controle positivo selegilina.

Pose	Selegilina	DCPM	DCPE	DCAM	DCAE
1	26,6449	42,5565	43,4510	42,5565	44,6160
2	28,8197	41,0575	42,2999	41,8757	43,2053
3	28,9821	41,8757	<b>41,9244</b>	40,4975	43,7493
4	29,2044	<b>40,4975</b>	44,2933	41,3174	43,4808
5	30,0320	41,3174	44,6091	41,1123	44,1929
6	28,8383	41,1123	44,3635	<b>41,5741</b>	43,0485
7	29,3061	41,5741	44,8952	42,2874	<b>42,6225</b>
8	29,8312	42,2874	44,7458	41,2217	43,3060
9	29,6440	41,2217	43,6379	42,6123	43,3136
10	28,8558	42,6123	44,4618	41,0575	44,1491

Legenda: Em negrito e destaque, as poses de cada análogo utilizadas para avaliação de interações após triagem visual. DCPM: Derivados Cumarínico-Propargílico Metoxilado; DCPE: Derivados Cumarínico-Propargílico Etoxilado; DCAM: Derivados Cumarínico-Alquílico Metoxilado; DCAE: Derivados Cumarínico-Alquílico Etoxilado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

De forma geral, todos os ligantes se posicionaram dentro do sítio ativo ortogonalmente ao anel isoaloxazina, entretanto a inspeção visual das poses permitiu observar três fontes de variações entre as poses, sendo elas: o sentido do grupamento propargilamina/propilamina em relação ao anel isoaloxazina (oposto ou

direcionado ao anel), a direção do grupamento lactona no sítio ativo (para cima ou para baixo) e a ocorrência de choque entre os raios de Van der Waals do ligante e do anel isoaloxazina. Ainda, a prevalência de poses semelhantes foi verificada. Os resultados estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3: Características espaciais dos ligantes no sítio ativo da MAO B.

Característica	DCPM	DCPE	DCAM	DCAE
Cadeia nitrogenada	100% Oposta	80% Direcionada	100% Oposta	70% Oposta
Direção da lactona	100% Baixo	100% Baixo	50% Baixo	100% Baixo
Choques de raios de VW	50% Presente	100% Presente	60% Ausente	100% Presente
Semelhança entre poses	100% Similares	80% Similares	50% Similares	70% Similares

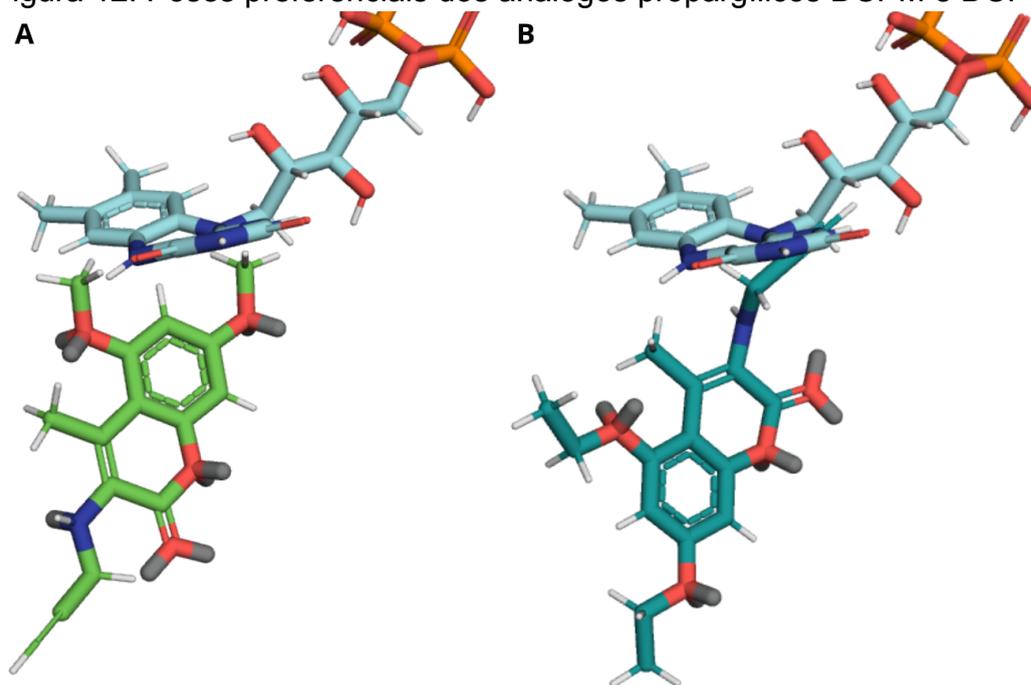
Legenda: Percentual de frequência referente a 10 poses de cada análogo. DCPM: Derivados Cumarínico-Propargílico Metoxilado; DCPE: Derivados Cumarínico-Propargílico Etoxilado; DCAM: Derivados Cumarínico-Alquílico Metoxilado; DCAE: Derivados Cumarínico-Alquílico Etoxilado. VW: Van der Waals.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A inspeção visual das poses geradas pelo ancoramento, em contrapartida, não corresponde aos maiores valores de *fitness* para cada um dos análogos. Particularmente, para os análogos DCPM, DCPE e DCAE, as poses escolhidas foram as que possuem menor *fitness* dentre as demais, conforme a Tabela 2. As posições prevalentes de cada ligante estão representadas nas Figuras 12 e 13.

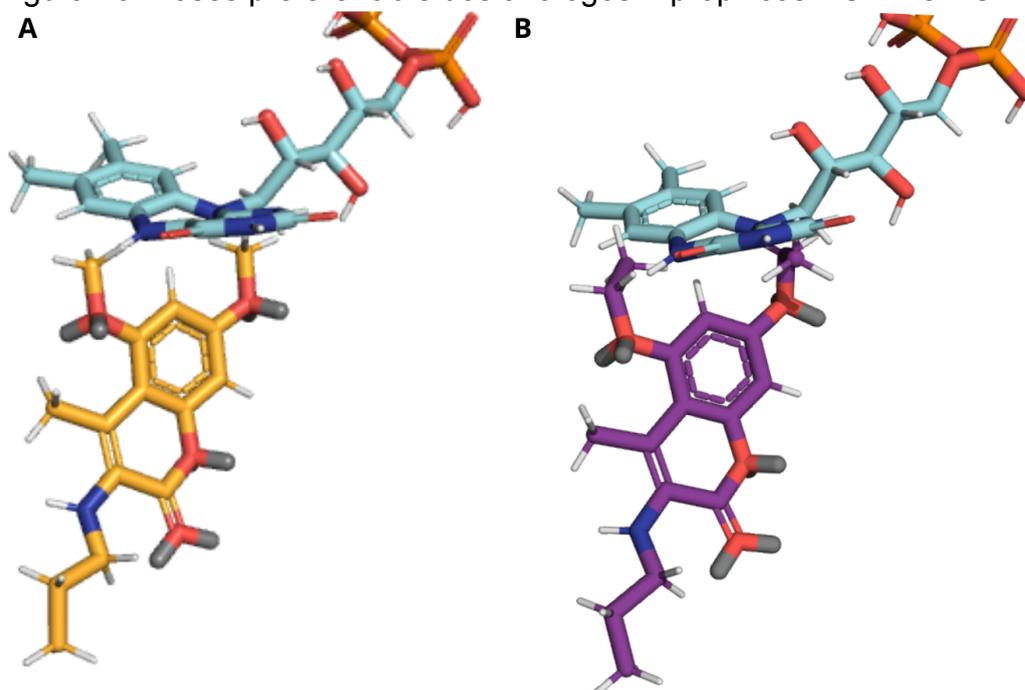
Uma vez que o *fitness* avalia a complementaridade do ligante com o sítio ativo, é possível hipotetizar que as diferenças dos valores de *fitness* entre os grupos de ligantes etoxilados e metoxilados pode ser decorrente do aumento da hidrofobicidade e tamanho das cadeias ligadas ao núcleo cumarínico, já que as cavidades da MAO B possuem grande número de resíduos hidrofóbicos, aumentando a quantidade de interações com o ligante. Por consequência, uma vez que a cadeia n-propílica do DCAE tem caráter mais apolar que a cadeia propargílica do DCPE, a chance dessa cadeia interagir com os resíduos na porção oposta ao FAD é maior, direcionando a cadeia nitrogenada para essa região.

Figura 12: Poses preferenciais dos análogos propargílicos DCPM e DCPE.



Legenda: Cadeia carbônica do FAD representada em ciano, DCPM em verde claro (A) e DCPE em azul turquesa (B). Átomos de oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, fósforo em laranja, hidrogênio em branco e nuvens eletrônicas em cinza.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13: Poses preferenciais dos análogos n-propílicos DCAM e DCAE.

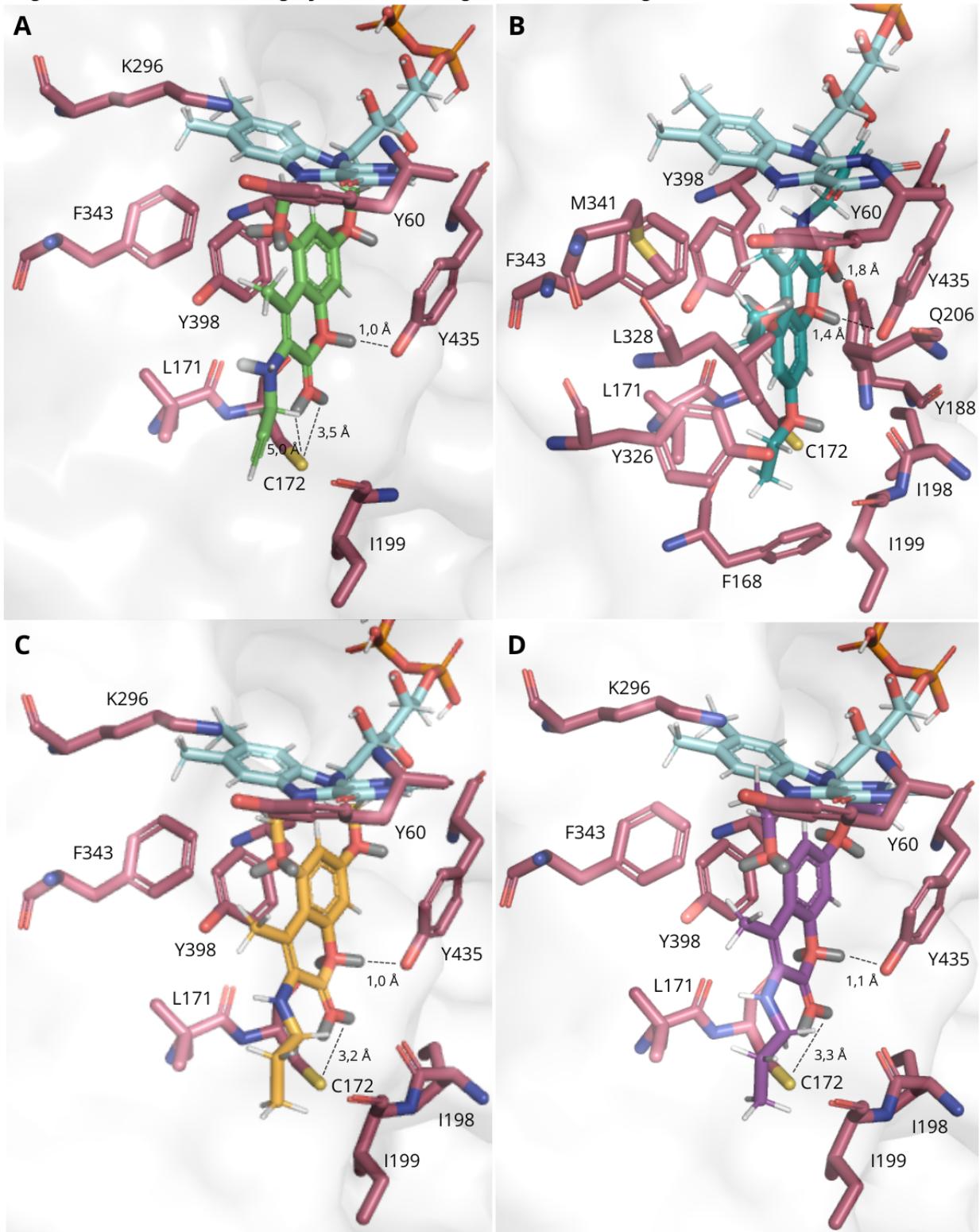


Legenda: Cadeia carbônica do DCAM em laranja (A) e do DCAE em roxo (B). O esquema de cores é o mesmo da Figura 12.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a avaliação geral das poses, foi realizada a classificação dos tipos de interações e suas distâncias frente aos resíduos do sítio ativo da enzima. As interações hidrofóbicas prevaleceram nos análogos DCPE e DCAM, sendo seguidas pelas interações do tipo dipolo-dipolo. Já para o análogo DCPM, as interações do tipo dipolo-dipolo induzido foram as mais frequentes, estando em segundo lugar as interações hidrofóbicas. Em relação ao análogo DCAE, os dois tipos de interações mencionados foram encontrados na mesma quantidade. As interações do tipo *stacking* compreendem as interações  $\pi$ -*stacking* e *T-stacking*, estando presentes somente com os ligantes DCPM, DCAM e DCAE. Ademais, as ligações de hidrogênio foram observadas na mesma quantidade em todos os análogos. O Apêndice A apresenta as descrições das interações de cada análogo com o sítio catalítico da enzima, enquanto a Figura 14 mostra os ligantes, os resíduos envolvidos em interações e as ligações de hidrogênio quando presentes.

A presença de cadeias hidrofóbicas conectadas ao anel cumarínico gerou muitas interações com a enzima, o que é esperado visto a grande hidrofobicidade do sítio ativo. Entre os aminoácidos que estabilizaram as cadeias alquílicas, estão principalmente a Phe 343 e Tyr 60 para os grupamentos nas posições 4 e 5 (metila e metoxila/etoxila) do anel cumarínico e Leu 171 e Ile 199 para os grupamentos na posição 3 (propargila e n-propila), porém outros aminoácidos também participam na formação do ambiente hidrofóbico que interage com os ligantes, sendo eles Leu 328, Ile 198 e Phe 168 como resíduos estritamente hidrofóbicos. Ademais, uma vez que a metodologia utilizada não avaliou a possibilidade de flexibilidade dos radicais dos aminoácidos, é possível que haja maior número ou intensidade de interações com os análogos, permitindo melhor perfil de complementaridade.

Figura 14: Resíduos e ligações de hidrogênio dos análogos testados com a MAO B.



Legenda: A: DCPM. B: DCPE. C: DCAM. D: DCAE. O esquema de cores é o mesmo das Figuras 12 e 13. Aminoácidos do sítio ativo em vermelho tijolo. Os pontilhados representam as ligações de hidrogênio do sítio ativo com os análogos, com suas distâncias medidas em angstrom (Å).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dado que nos análogos existem átomos de oxigênio e nitrogênio, esses conseguem interagir ou por dipolo-dipolo induzido ou por ligações de hidrogênio com o sítio ativo. Em relação aos análogos DCPM, DCAM e DCAE, cujos grupos nitrogenados apresentaram-se opostos ao FAD, interações do tipo dipolo-dipolo induzido são majoritariamente formadas entre os aminoácidos Lys 296, Phe 343, Tyr 398 e/ou Tyr 435 e os grupos metoxila e etoxila. Essas mesmas interações com os éteres do análogo DCPE foram realizadas com os resíduos Cys 172 e Phe 343. A respeito dos átomos de nitrogênio dos grupos propargila e n-propila, o aminoácido Leu 171 foi responsável por estabilizá-lo nos análogos DCPM, DCAM e DCAE, entretanto, para o análogo DCPE, a interação se deu com a Tyr 398.

Um caso específico de interação do tipo dipolo-dipolo induzido foi observado entre o nitrogênio 5 do FAD e o hidrogênio do carbono  $\alpha$  do grupo propargila presente no análogo DCPE, com uma distância de 1,3 Å. Esse tipo de interação possibilita a ocorrência de uma abstração de hidreto, uma vez que essa distância permite facilmente a extração do elétron, sendo considerada parte inicial do mecanismo de inibição irreversível proposto para os análogos de propargilamina (Figura 8). Esse resultado permite o ampliação do estudo do mecanismo de inibição dos análogos aqui propostos.

Interações do tipo ligação de hidrogênio foram observadas nos quatro análogos, ocorrendo com o grupo lactona do anel cumarínico, havendo esse tipo de interação entre o álcool do resíduo Tyr 435 e o oxigênio 1 da lactona. Ainda, para o análogo DCPE, houve interação com o álcool do resíduo Tyr 188, favorecendo a interação com o sítio ativo da MAO B. Outro tipo de interação de hidrogênio foi observada entre o grupo tiol do aminoácido Cys 172 com a carbonila da lactona dos análogos DCPM, DCAM e DCAE, onde essa interação apresenta diferentes funções de acordo com o grupo nitrogenado envolvido. Para o DCAM e DCAE, esse tipo de interação aparenta estabilizar o grupo no sítio da enzima; já para o DCPM, uma vez que apresenta um grupo propargílico, também há a possibilidade de haver formação de ligação covalente com a cisteína. A interação do enxofre da Cys 172 com o carbono  $\beta$  do ligante DCPM conta com uma distância de 5,6 Å que indica a possibilidade, mesmo que com baixa probabilidade, de formação de ligação covalente quando avaliado em sistema biológico, especialmente quando considerada a flexibilidade dos resíduos do sítio ativo da MAO B. Entretanto, a formação do aduto não é certa, visto que o aminoácido não participa da catálise da

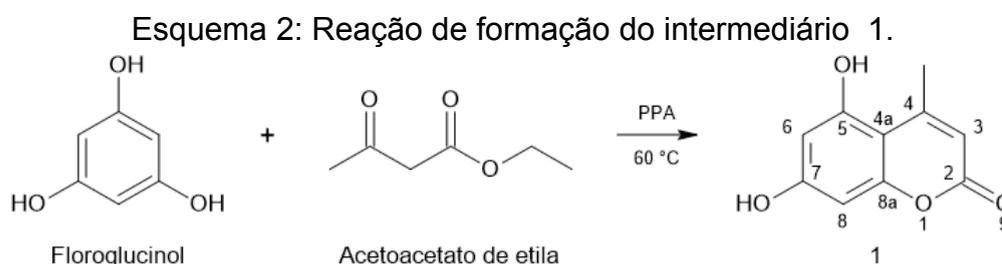
enzima e a estrutura da propargilamina influencia fortemente esse tipo de atividade (GEHRINGER; LAUFER, 2019).

Por fim, foram encontradas interações do tipo *stacking* com os análogos. Interações do tipo  $\pi$ -*stacking* com o anel benzênico do núcleo cumarínico, formado pelos resíduos Tyr 398 e Tyr 435 da “cela aromática”, foram vistas para os análogos DCPM, DCAM e DCAE, uma vez que a porção benzênica do anel cumarínico está próxima desse resíduos. Já a interação do tipo *T-stacking* foi encontrada para os análogos DCPM, DCAM e DCAE com o anel 1,2-diidropiridina do FAD em uma distância de 2,2 à 2,3 Å, o qual forma um anel aromático quando em estado oxidado.

## 4.2 SÍNTESE ORGÂNICA

Em seguida, partiu-se para a síntese dos quatro análogos avaliados seguindo a rota sintética proposta. Os análogos etoxilados, DCPE e DCAE, foram escolhidos para a primeira síntese, visto que seus escores de fitness foram os maiores da série.

A primeira etapa consistiu na formação do núcleo cumarínico via condensação de Pechmann, incorporado com os substituintes metila na posição 4 e hidroxila nas posições 5 e 7. Nela, o floroglucinol e o acetoacetato de etila reagem na presença de um ácido forte como o ácido polifosfórico (PPA), havendo transesterificação entre a hidroxila do floroglucinol e a carbonila ligada à etila do acetoacetato de etila e posterior adição de Michael. O rendimento encontrado foi de 67,2%. Os resultados de RMN <sup>1</sup>H mostraram um simpleto em 5,85 ppm do hidrogênio do carbono 3, um simpleto em 2,59 ppm dos 3 hidrogênios da metila na posição 4 e dois dupletos em 6,21 ppm e 6,29 ppm, correspondentes aos hidrogênios dos carbonos 6 e 8 (Apêndice B, página 61).



Na sequência, foi realizada uma alquilação com bromoetano nas hidroxilas fenólicas das posições 5 e 7, levando à formação de éteres de etila (2a). Essa etapa é essencial para que a próxima ocorra, pois há o risco de haver polimerização do produto pelo ataque de grupos nucleofílicos como as hidroxilas no produto halogenado, reduzindo a quantidade do intermediário brominado na posição 3. Para a alquilação, o rendimento foi de 86,1%. A confirmação da síntese pelo RMN <sup>1</sup>H se deu pela presença de sinais com quarteto em 4,06 ppm, correspondente ao hidrogênios metilênicos dos dois grupos etila, e dois tripletos com deslocamentos de 1,47 ppm e 1,43 ppm, correspondentes aos hidrogênios dos carbonos terminais das etilas (Apêndice B, página 62).

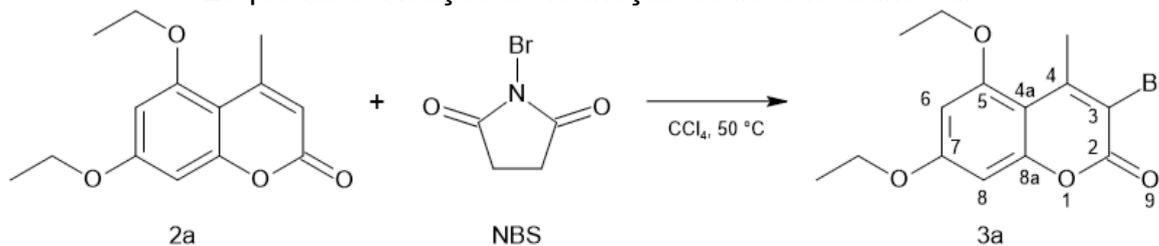
Esquema 3: Reação de formação do intermediário 2a.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Durante a etapa de adição do bromo na posição 3, houveram algumas dificuldades relacionadas à formação de subprodutos, chamados A, B e C. O produto A encontrado é o intermediário de interesse (3a). Em relação ao subproduto C, foi possível o isolamento e caracterização por RMN, sendo observado a adição do bromo nas posições 6 ou 8 do anel aromático, com formação de 23,5 mg do material (rendimento de 3,6%). Não foi possível isolar o subproduto B do subproduto A para a sua caracterização, sendo, portanto, utilizado na reação de substituição nucleofílica com a azida. Apesar das perdas por formação de subproduto, o rendimento da reação foi de 32,4%, com a ausência do sinal do hidrogênio na posição 3 (de deslocamento de 5,93 ppm) quando comparado ao intermediário 2a (Apêndice B, página 63).

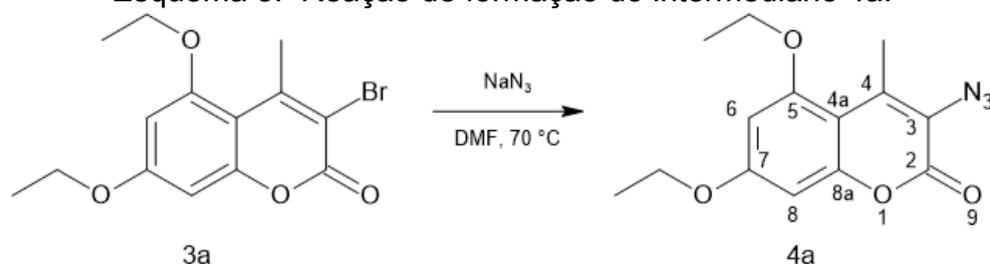
Esquema 4: Reação de formação do intermediário 3a.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A substituição nucleofílica do bromo pela azida na posição 3 foi a quarta etapa da via sintética, sendo a reação com menor rendimento da rota até então, contando com 7,8% de material isolado (Esquema 5). O principal motivo para o baixo rendimento é a formação de diversos subprodutos, sendo observados pela CCD realizada após a cromatografia em coluna pelo menos outros 8 subprodutos não caracterizados. O RMN  $\text{H}^1$  apresentou deslocamentos semelhantes aos encontrados para intermediário brominado, visto que não houve mudança na quantidade de hidrogênios na molécula (Apêndice B, página 64).

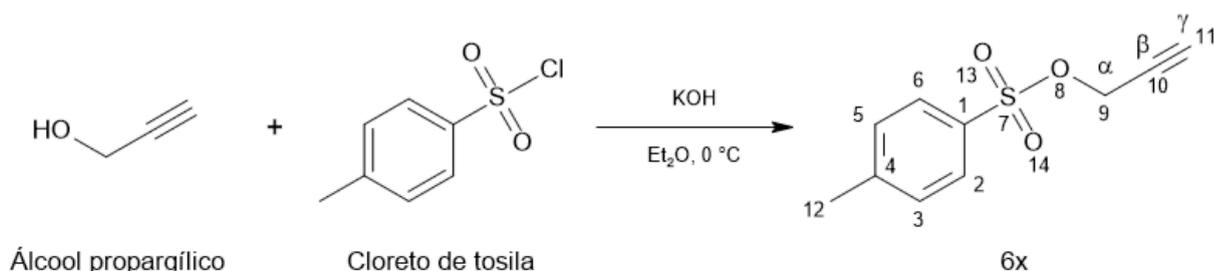
Esquema 5: Reação de formação do intermediário 4a.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A reação paralela de formação do tosilato de propargila apresentou desempenho razoável, com 39,2% de material sintetizado. O éster de tosilato sintetizado facilita a substituição nucleofílica na amina nos intermediários 5a dos análogos DCPM e DCPE, levando à formação do grupo propargilamina. O grupo propargila pôde ser observado pelos hidrogênios em 2,49 ppm (1 hidrogênio do carbono  $\gamma$ ) e 4,69 ppm (2 hidrogênios do carbono  $\alpha$ ), enquanto o grupo tosil apresentou dois dupletos em 7,35 ppm e 7,81 ppm, correspondente aos hidrogênio aromáticos, e um simpleto em 2,45 ppm dos 3 hidrogênios da metila substituída no anel (Apêndice B, página 65).

Esquema 6: Reação de formação do intermediário tosilato de propargila 6x.



Álcool propargílico

Cloreto de tosila

6x

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho buscou avaliar *in silico* as interações entre os análogos cumarínicos e a monoamina oxidase do tipo B, encontrando ligações de hidrogênio na estabilização do anel lactônico presente na cumarina, bem como uma boa complementaridade com os resíduos hidrofóbicos presentes no sítio ativo da enzima.

Ainda, foi observada a possibilidade de ocorrência de formação de ligação covalente para os análogos propargílicos DCPM e DCPE, com o resíduo Cys 172 e com o nitrogênio 5 do anel isoaloxazina, respectivamente. Outras interações relevantes são relacionadas ao anel aromático para os análogos DCPM, DCAM e DCAE, tanto do tipo  $\pi$ -stacking pela “cela aromática”, quanto do tipo T-stacking com o anel 1,2-diidropiridina do FAD.

Com relação à síntese, os intermediários etoxilados e o intermediário tosilado foram isolados e caracterizados de forma quase eficiente, sendo obtidas 2 moléculas inéditas na literatura, os intermediários 3a e 4a.

Os dados aqui presentes serão utilizados em trabalhos futuros do grupo de pesquisa, bem como as moléculas sintetizadas seguirão pela rota sintética até que os quatro análogos sejam obtidos.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como futuras atividades a serem testadas, estão incluídas, mas não limitadas, as que se seguem:

- a) Conclusão da síntese e purificação do intermediário contendo o grupamento amina (5a; 3-amino-5,7-dietoxi-4-metil-2*H*-cromen-2-ona) e do intermediário tosilato de *n*-propila (6y), para posterior obtenção dos produtos finais etoxilados DCPE (Derivado Cumarínico-Propargílico Etoxilado) e DCAE (Derivado Cumarínico Alquílico Etoxilado);
- b) Síntese e purificação dos demais análogos metoxilados — Derivado Cumarínico-Propargílico Metoxilado (DCPM) e Derivado Cumarínico-Alquílico Metoxilado (DCAM) —, de forma a fortalecer a via sintética proposta;
- c) Ampliação das análises *in silico*, com aumento da série análoga;
- d) Verificação da capacidade de formação de ligação covalente dos derivados DCPE e DCPM com o cofator FAD por meio de análise de ressonância magnética nuclear;
- e) Avaliação da inibição gerada pelos quatro análogos na enzima monoamina oxidase do tipo B expressa em fungos da espécie *Pichia pastoris*, reforçando a literatura a respeito da relação estrutura atividade dos inibidores de MAO B cumarínicos.

## REFERÊNCIAS

ABDELNABI, M. et al. Switching from warfarin to direct-acting oral anticoagulants: it is time to move forward! **The Egyptian heart journal: (EHJ): official bulletin of the Egyptian Society of Cardiology**, v. 74, n. 1, p. 18, 28 mar. 2022.

AKYÜZ, M. A.; ERDEM, S. S.; EDMONDSON, D. E. The aromatic cage in the active site of monoamine oxidase B: effect on the structural and electronic properties of bound benzylamine and p-nitrobenzylamine. **Journal of Neural Transmission**, v. 114, n. 6, p. 693, 31 mar. 2007.

ALJANABI, R. et al. Monoamine Oxidase (MAO) as a Potential Target for Anticancer Drug Design and Development. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 19, p. 6019, 4 out. 2021.

BACH, A. W. et al. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 13, p. 4934–4938, jul. 1988.

BHAWNA et al. Monoamine oxidase inhibitors: A concise review with special emphasis on structure activity relationship studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 242, p. 114655, 15 nov. 2022.

BINDA, C. et al. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 1, p. 22–26, jan. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada em Saúde. Portaria Conjunta nº 10, de 31 de outubro de 2017. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Parkinson. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2022 (RENAME 2022). Brasília, DF, 2022. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao\\_nacional\\_medicamentos\\_2022.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_2022.pdf)>

CARRADORI, S.; SECCI, D.; PETZER, J. P. MAO inhibitors and their wider applications: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 28, n. 3, p. 211–226, mar. 2018.

CARRADORI, S.; SILVESTRI, R. New Frontiers in Selective Human MAO-B Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 17, p. 6717–6732, 10 set. 2015.

CHAJKOWSKI-SCARRY, S.; RIMOLDI, J. M. Monoamine oxidase A and B substrates: probing the pathway for drug development. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 6, p. 697–717, abr. 2014.

CHANG, H.-Y. et al. Efficacy of rasagiline monotherapy for early Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Psychopharmacology**, v. 36, n. 6, p. 704–714, jun. 2022.

CHEN, J. J.; SWOPE, D. M. Clinical Pharmacology of Rasagiline: A Novel, Second-Generation Propargylamine for the Treatment of Parkinson Disease. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, n. 8, p. 878–894, 2005.

ÇOBAN, F.; AYRANCI, R.; AK, M. Naphthalimide clicked polycarbazoles: Synthesis, characterization, and investigation of their optical, electrochemical and spectroelectrochemical properties. **Synthetic Metals**, v. 285, p. 117031, 1 abr. 2022.

DE COLIBUS, L. et al. Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 36, 9 jun. 2005.

DUARTE, P.; CUADRADO, A.; LEÓN, R. Monoamine Oxidase Inhibitors: From Classic to New Clinical Approaches. Em: SCHMIDT, H. H. H. W.; GHEZZI, P.; CUADRADO, A. (Eds.). **Reactive Oxygen Species : Network Pharmacology and Therapeutic Applications**. Handbook of Experimental Pharmacology. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 229–259.

EDMONDSON, D. E. et al. Molecular and Mechanistic Properties of the Membrane-Bound Mitochondrial Monoamine Oxidases. **Biochemistry**, v. 48, n. 20, p. 4220–4230, 26 maio 2009.

EDMONDSON, D. E.; BHATTACHARYYA, A. K.; WALKER, M. C. Spectral and kinetic studies of imine product formation in the oxidation of p-(N,N-dimethylamino)benzylamine analogs by monoamine oxidase B. **Biochemistry**, v. 32, n. 19, p. 5196–5202, 18 maio 1993.

EDMONDSON, D. E.; BINDA, C. Monoamine Oxidases. Em: HARRIS, J. R.; BOEKEMA, E. J. (Eds.). **Membrane Protein Complexes: Structure and Function**. Subcellular Biochemistry. Singapore: Springer Singapore, 2018. v. 87p. 117–139.

FOWLER, C. J. et al. Titration of human brain monoamine oxidase-A and-B by clorgyline andl-deprenil. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 311, n. 3, p. 263–272, abr. 1980.

GARDONI, F. et al. Safinamide Modulates Striatal Glutamatergic Signaling in a Rat Model of Levodopa-Induced Dyskinesia. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 367, n. 3, p. 442–451, dez. 2018.

GEHRINGER, M.; LAUFER, S. A. Emerging and Re-Emerging Warheads for Targeted Covalent Inhibitors: Applications in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 5673–5724, 27 jun. 2019.

GIAMPIERO, P. et al. Nickel Boride Catalyzed Reductions of Nitro Compounds and Azides: Nanocellulose-Supported Catalysts in Tandem Reactions. **Synthesis**, 5 ago. 2021.

GIOSSI, R. et al. Overall Efficacy and Safety of Safinamide in Parkinson's Disease: A Systematic Review and a Meta-analysis. **Clinical Drug Investigation**, v. 41, n. 4, p. 321–339, 2021.

GORE, V. et al. **An Improved Process for the Preparation of Amines**. Munique, 10 dez. 2009.

GROOM, C. R. et al. The Cambridge Structural Database. **Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials**, v. 72, n. 2, p. 171–179, 1 abr. 2016.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 13 ago. 2012.

HARE, M. L. C. Tyramine oxidase. **Biochemical Journal**, v. 22, n. 4, p. 968–979, 1928.

JOHNSTON, J. P. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. **Biochemical Pharmacology**, v. 17, n. 7, p. 1285–1297, 1 jul. 1968.

JONES, D. N.; RAGHANTI, M. A. The role of monoamine oxidase enzymes in the pathophysiology of neurological disorders. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 114, p. 101957, 1 jul. 2021.

KANO, O. et al. Rasagiline as Adjunct to Levodopa for Treatment of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Parkinson's Disease**, v. 2022, p. 4216452, 30 ago. 2022.

KORNHUBER, J. et al. Ontogenesis of monoamine oxidase-A and -B in the human brain frontal cortex. **Brain Research**, v. 499, n. 1, p. 81–86, 9 out. 1989.

KOYIPARAMBATH, V. P. et al. Deciphering the detailed structure–activity relationship of coumarins as Monoamine oxidase enzyme inhibitors—An updated review. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 98, n. 4, p. 655–673, 2021.

LATIF, S. et al. Dopamine in Parkinson's disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 522, p. 114–126, 1 nov. 2021.

LEVITT, P.; PINTAR, J. E.; BREAKEFIELD, X. O. Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 20, p. 6385–6389, out. 1982.

MARTIN, E. F. et al. Prospecting for cytotoxic and antiprotozoal 4-aryl-4H-chromenes and 10-aryldihydropyrano[2,3-f]chromenes. **Archiv der Pharmazie**, v. 351, n. 10, p. 1800100, 3 ago. 2018.

MASATO, A. et al. Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. **Molecular Neurodegeneration**, v. 14, p. 35, 20 ago. 2019.

MATOS, M. J. et al. Coumarin-Rasagiline Hybrids as Potent and Selective hMAO-B Inhibitors, Antioxidants, and Neuroprotective Agents. **ChemMedChem**, v. 15, n. 6, p. 532–538, 2020.

MATTA, A. et al. One-Pot Synthesis and Photophysical Studies of Dihydropyrimidinone-Based Dyes: Novel Violet-Blue Light Emitting Fluorophores. **ChemistrySelect**, 14 set. 2018.

MEYER, J. H. et al. Elevated Monoamine Oxidase A Levels in the Brain: An Explanation for the Monoamine Imbalance of Major Depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 11, p. 1209–1216, 1 nov. 2006.

MOYA-ALVARADO, G. et al. Coumarin-Chalcone Hybrids as Inhibitors of MAO-B: Biological Activity and In Silico Studies. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2430, 22 abr. 2021.

MZEZEWA, S. C. et al. Design, synthesis, and evaluation of 3,7-substituted coumarin derivatives as multifunctional Alzheimer's disease agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 1607–1621, 19 mar. 2021.

National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Parkinson's disease in adults: diagnosis and management. Londres, 19 jul. 2017.

NEESE, F. The ORCA program system. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 73–78, 2012.

ORRU, R.; ALDECO, M.; EDMONDSON, D. E. Do MAO A and MAO B utilize the same mechanism for the C-H bond cleavage step in catalysis? Evidence suggesting differing mechanisms. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 120, n. 6, p. 847–851, jun. 2013.

PADURARU, P. M. et al. Synthesis of Substituted Alkoxy Benzene Minilibraries, for the Discovery of New Insect Olfaction or Gustation Inhibitors. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 123–134, jan. 2008.

SABA, R. A. et al. Diretrizes para o tratamento da doença de Parkinson: consenso do Departamento Científico de Transtornos do Movimento da Academia Brasileira de Neurologia - sintomas motores. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 80, p. 316–329, 18 mar. 2022.

SANTIN, Y. et al. Monoamine oxidases in age-associated diseases: New perspectives for old enzymes. **Ageing Research Reviews**, v. 66, p. 101256, 1 mar. 2021.

SCHIEFERDECKER, S. et al. Clostrindolin is an antimycobacterial pyrone alkaloid from *Clostridium beijerinckii*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 17, n. 25, p. 6119–6121, 26 jun. 2019.

SCHNAITMAN, C.; ERWIN, V. G.; GREENAWALT, J. W. The submitochondrial localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. **The Journal of Cell Biology**, v. 32, n. 3, p. 719–735, mar. 1967.

SKALICKA-WOŹNIAK, K. et al. Implication of coumarins towards central nervous system disorders. **Pharmacological Research**, v. 103, p. 188–203, 1 jan. 2016.

TAN, Y.-Y.; JENNER, P.; CHEN, S.-D. Monoamine Oxidase-B Inhibitors for the Treatment of Parkinson's Disease: Past, Present, and Future. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 12, n. 2, p. 477–493, 2021.

TANDARIĆ, T.; VIANELLO, R. Computational Insight into the Mechanism of the Irreversible Inhibition of Monoamine Oxidase Enzymes by the Antiparkinsonian Propargylamine Inhibitors Rasagiline and Selegiline. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 8, p. 3532–3542, 21 ago. 2019.

TAO, D. et al. Discovery of coumarin Mannich base derivatives as multifunctional agents against monoamine oxidase B and neuroinflammation for the treatment of Parkinson's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 173, p. 203–212, 1 jul. 2019.

TETRUD, J. W.; LANGSTON, J. W. The Effect of Deprenyl (Selegiline) on the Natural History of Parkinson's Disease. **Science**, v. 245, n. 4917, p. 519–522, 4 ago. 1989.

VIANELLO, R.; REPIČ, M.; MAVRI, J. How are Biogenic Amines Metabolized by Monoamine Oxidases? **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2012, n. 36, p. 7057–7065, 2012.

WANG, K. et al. Efficacy and safety of selegiline for the treatment of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 15, p. 1134472, 11 abr. 2023.

WOO, J. C. G.; SILVERMAN, R. B. Monoamine oxidase B catalysis in low aqueous medium. Direct evidence for an imine product. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 5, p. 1663–1664, fev. 1995.

YOUDIM, M. B. H. et al. Rasagiline: Neurodegeneration, neuroprotection, and mitochondrial permeability transition. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 1–2, p. 172–179, 2005.

ZELLER, E. A. Short Communication: On the Classification and Nomenclature of Amine Oxidases. Em: **Ciba Foundation Symposium - Histamine**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 1956. p. 258–263.

## APÊNDICE A — Interações dos análogos com o sítio ativo da MAO B

Quadro A1: Interações do análogo DCPM com o sítio ativo da MAO B.

Aminoácido	Átomo/Grupamento	Interação	Distância (Å)
Tyr 398	Metoxila 7	Dipolo-Dipolo Induzido	1,8
		Dipolo-Dipolo Induzido	2,5
	Oxigênio 1	Dipolo-Dipolo Induzido	2,9
	Anel aromático	<i><math>\pi</math>-stacking</i>	3,0
Cys 172	Carbonila	Dipolo-Dipolo Induzido	2,3
		Ligação de Hidrogênio	3,2
Phe 343	Metila	Hidrofóbica	1,4
	Metoxila 5	Hidrofóbica	1,8
		Dipolo-Dipolo Induzido	2,1
		Dipolo-Dipolo Induzido	2,6
C4a (FAD)	Anel aromático	<i>T-stacking</i>	2,2
Lys 296	Metoxila 5	Dipolo-Dipolo Induzido	2,3
Ile 199	Carbono $\gamma$	Hidrofóbica	3,0
Leu 171	Amina	Dipolo-Dipolo Induzido	2,1
	Carbono $\alpha$	Hidrofóbica	2,0
		Hidrofóbica	2,6
		Hidrofóbica	2,9
Gly 434	Metoxila 7	Dipolo-Dipolo Induzido	2,4
Tyr 60	Metoxila 5	Hidrofóbica	1,9
		Dipolo-Dipolo Induzido	2,6
Gln 206	Metila	Hidrofóbica	2,7
Tyr 435	Oxigênio 1	Ligação de Hidrogênio	1,0
	Metoxila 7	Hidrofóbica	2,7
		Hidrofóbica	2,8
	Anel aromático	<i><math>\pi</math>-stacking</i>	3,5

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro A2: Interações do análogo DCPE com o sítio ativo da MAO B.

Aminoácido	Átomo/Grupamento	Interação	Distância (Å)
Tyr 398	Amina	Dipolo-Dipolo Induzido	2,2
	Oxigênio 1	Dipolo-Dipolo Induzido	2,4
Cys 172	Etoxila 7	Dipolo-Dipolo Induzido	2,4
	Carbono 8	Hidrofóbica	2,0
Phe 343	Etoxila 5	Dipolo-Dipolo Induzido	2,0
		Hidrofóbica	2,3
		Hidrofóbica	2,4
N5 (FAD)	Carbono $\alpha$	Dipolo-Dipolo Induzido	1,3
Phe 168	Etoxila 7	Hidrofóbica	2,3
Ile 198	Etoxila 7	Hidrofóbica	2,6
Ile 199	Etoxila 7	Hidrofóbica	2,5
Leu 171	Etoxila 7	Hidrofóbica	1,9
		Hidrofóbica	2,2
		Hidrofóbica	2,4
Leu 328	Etoxila 5	Hidrofóbica	2,3
Met 341	Etoxila 5	Hidrofóbica	2,1
Gln 206	Etoxila 5	Hidrofóbica	2,3
		Hidrofóbica	2,4
Tyr 326	Etoxila 5	Hidrofóbica	2,5
		Hidrofóbica	2,5
Tyr 60	Metila	Hidrofóbica	2,6
	Etoxila 5	Hidrofóbica	2,5
Tyr 188	Carbonila	Ligação de Hidrogênio	1,8
Tyr 435	Oxigênio 1	Ligação de Hidrogênio	1,4

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro A3: Interações do análogo DCAM com o sítio ativo da MAO B.

Aminoácido	Átomo/Grupamento	Interação	Distância (Å)
Tyr 398	Metoxila 7	Dipolo-Dipolo Induzido	2,2
		Hidrofóbica	2,3
	Anel aromático	$\pi$ -stacking	3,1
Cys 172	Carbonila	Dipolo-Dipolo Induzido	2,5
		Ligação de Hidrogênio	3,2
	Oxigênio 1	Dipolo-Dipolo Induzido	2,5
Phe 343	Metila	Hidrofóbica	1,8
	Metoxila 5	Hidrofóbica	1,6
		Hidrofóbica	2,4
		Dipolo-Dipolo Induzido	2,4
C4a (FAD)	Anel aromático	$T$ -stacking	2,3
Lys 296	Metoxila 5	Dipolo-Dipolo Induzido	2,6
Ile 199	Carbono $\gamma$	Hidrofóbica	2,0
		Hidrofóbica	2,2
		Hidrofóbica	2,5
	Carbono $\alpha$	Hidrofóbica	2,6
	Carbono $\beta$	Hidrofóbica	2,8
Ile 198	Carbonila	Dipolo-Dipolo Induzido	2,6
		Dipolo-Dipolo Induzido	2,8
Leu 171	Amina	Dipolo-Dipolo Induzido	2,0
	Carbono $\beta$	Hidrofóbica	1,9
		Hidrofóbica	2,5
Tyr 60	Metoxila 5	Hidrofóbica	2,3
		Hidrofóbica	2,5
		Hidrofóbica	2,4
Tyr 435	Oxigênio 1	Ligação de Hidrogênio	1,0
	Metoxila 7	Hidrofóbica	2,5
		Dipolo-Dipolo Induzido	2,5

	Anel aromático	$\pi$ -stacking	2,7
--	----------------	-----------------	-----

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro A4: Interações do análogo DCAE com o sítio ativo da MAO B.

Aminoácido	Átomo/Grupamento	Interação	Distância (Å)
Tyr 398	Etoxila 7	Dipolo-Dipolo Induzido	1,6
	Anel aromático	$\pi$ -stacking	3,0
Cys 172	Carbonila	Dipolo-Dipolo Induzido	2,5
		Ligação de Hidrogênio	3,3
	Oxigênio 1	Dipolo-Dipolo Induzido	2,7
Phe 343	Metila	Hidrofóbica	1,8
	Etoxila 5	Hidrofóbica	1,4
		Hidrofóbica	2,3
		Dipolo-Dipolo Induzido	2,3
		Dipolo-Dipolo Induzido	2,5
C4a (FAD)	Anel aromático	$T$ -stacking	2,2
Lys 296	Etoxila 5	Dipolo-Dipolo Induzido	2,5
Ile 199	Carbono $\gamma$	Hidrofóbica	2,3
		Hidrofóbica	2,4
		Hidrofóbica	2,7
Ile 198	Carbonila	Dipolo-Dipolo Induzido	2,6
	Carbono $\alpha$	Dipolo-Dipolo Induzido	2,7
Leu 171	Amina	Dipolo-Dipolo Induzido	2,0
	Carbono $\beta$	Hidrofóbica	2,0
		Hidrofóbica	2,4
	Carbono $\gamma$	Hidrofóbica	2,7
		Hidrofóbica	2,7
Tyr 60	Etoxila 5	Hidrofóbica	1,9
		Hidrofóbica	2,7
		Dipolo-Dipolo Induzido	2,6
Tyr 435	Oxigênio 1	Ligação de Hidrogênio	1,1

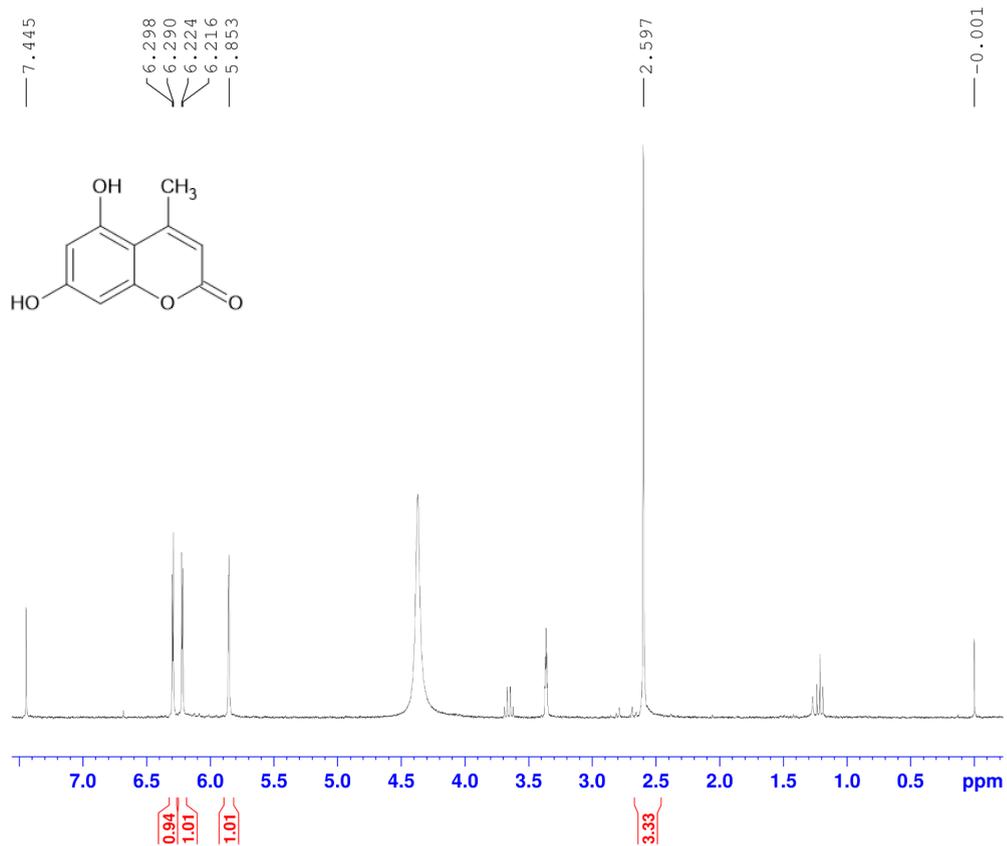
	Etoxila 7	Hidrofóbica	2,8
		Dipolo-Dipolo Induzido	1,9
		Dipolo-Dipolo Induzido	2,7
	Anel aromático	$\pi$ -stacking	3,7

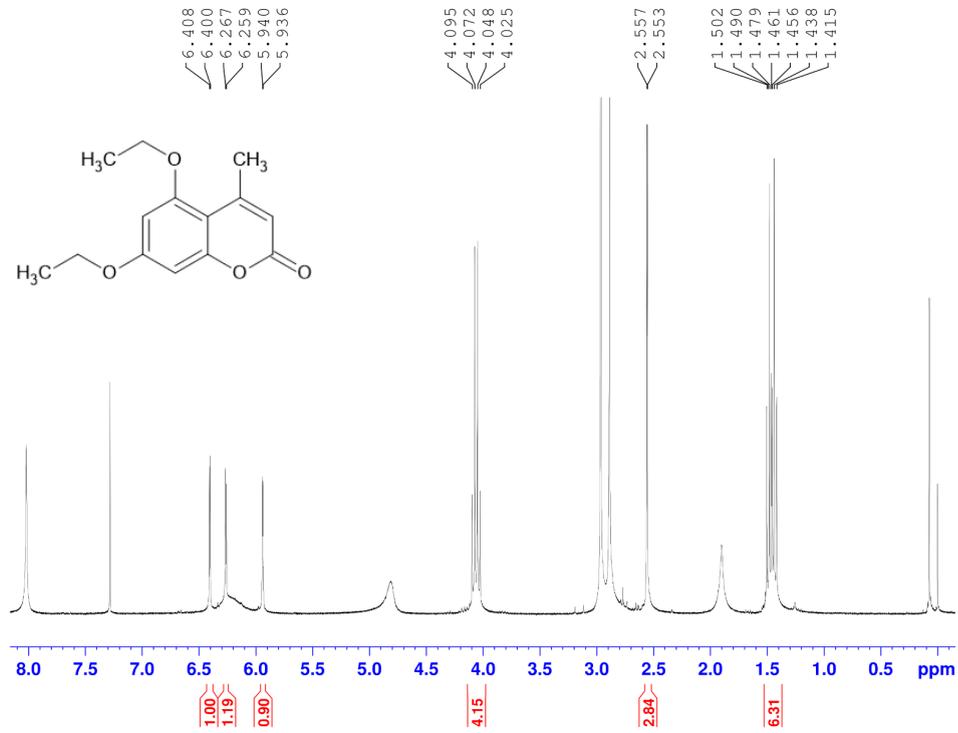
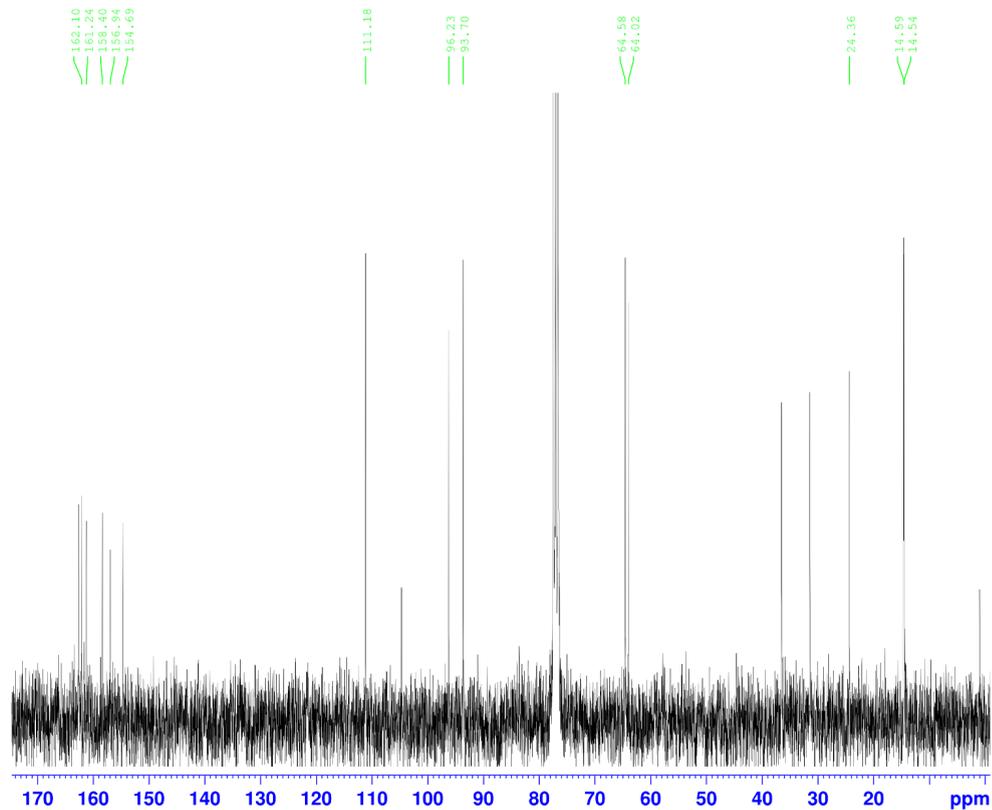
Fonte: Elaborado pelo autor.

## APÊNDICE B — Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono dos produtos e intermediários

### 5,7-dihidroxi-4-metil-2H-cromen-2-ona

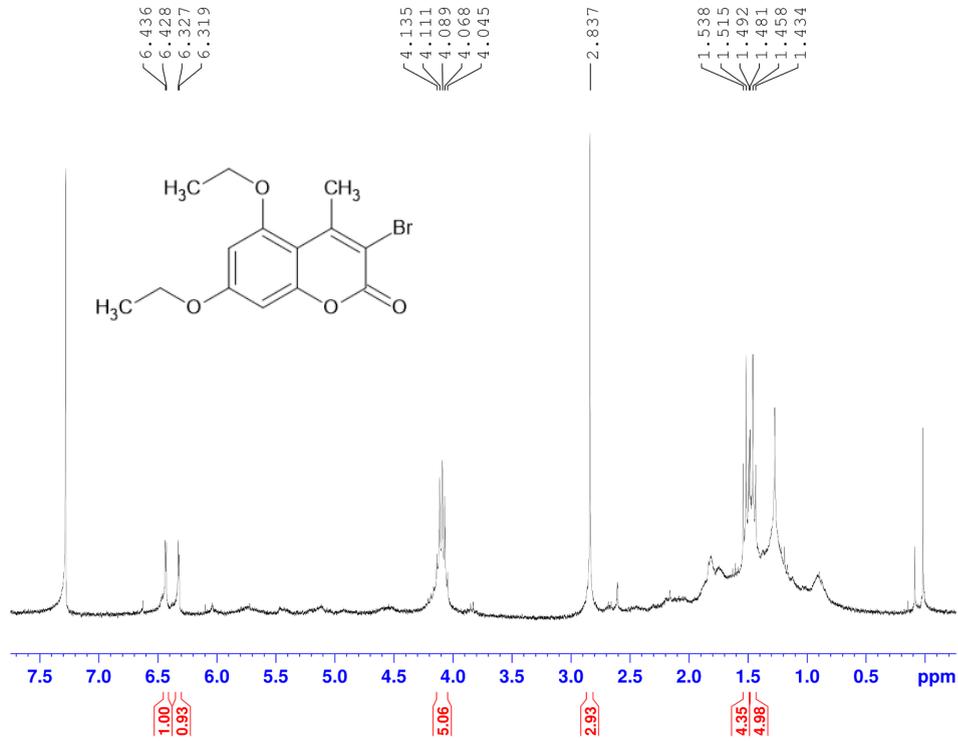
RMN  $^1\text{H}$



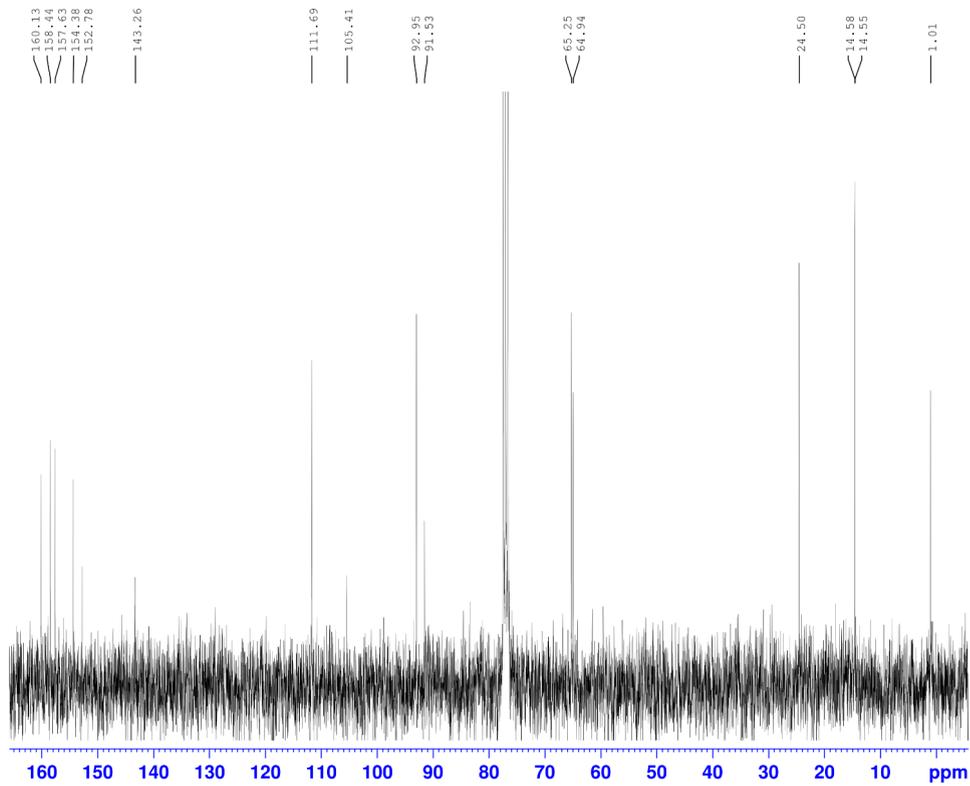
**5,7-dietoxi-4-metil-2H-cromen-2-ona**RMN  $^1\text{H}$ RMN  $^{13}\text{C}$ 

### 5,7-dietoxi-4-metil-3-bromo-2H-cromen-2-ona

RMN  $^1\text{H}$

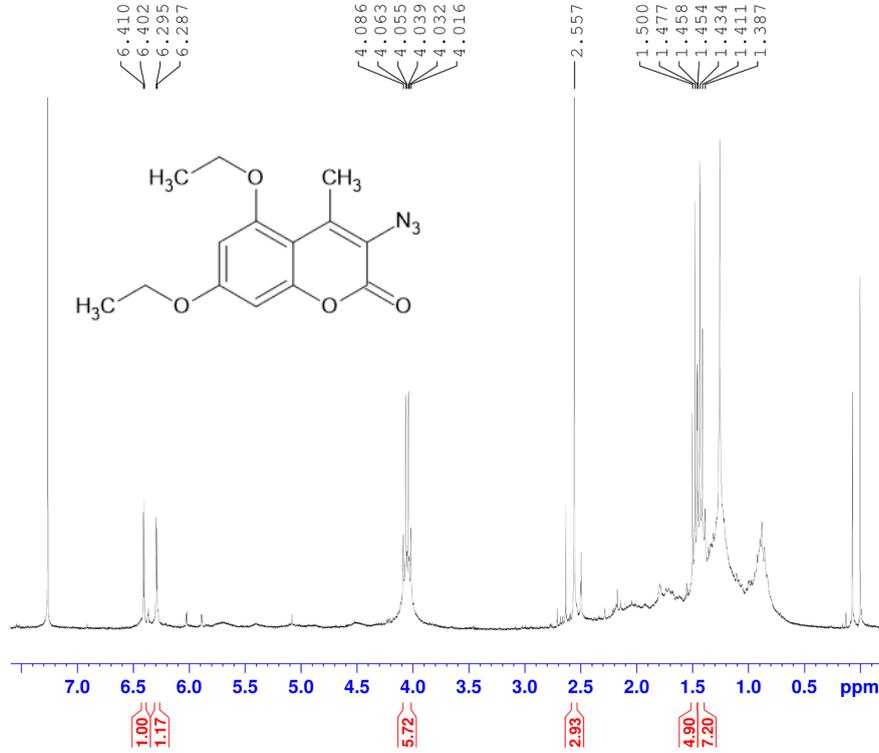


RMN  $^{13}\text{C}$

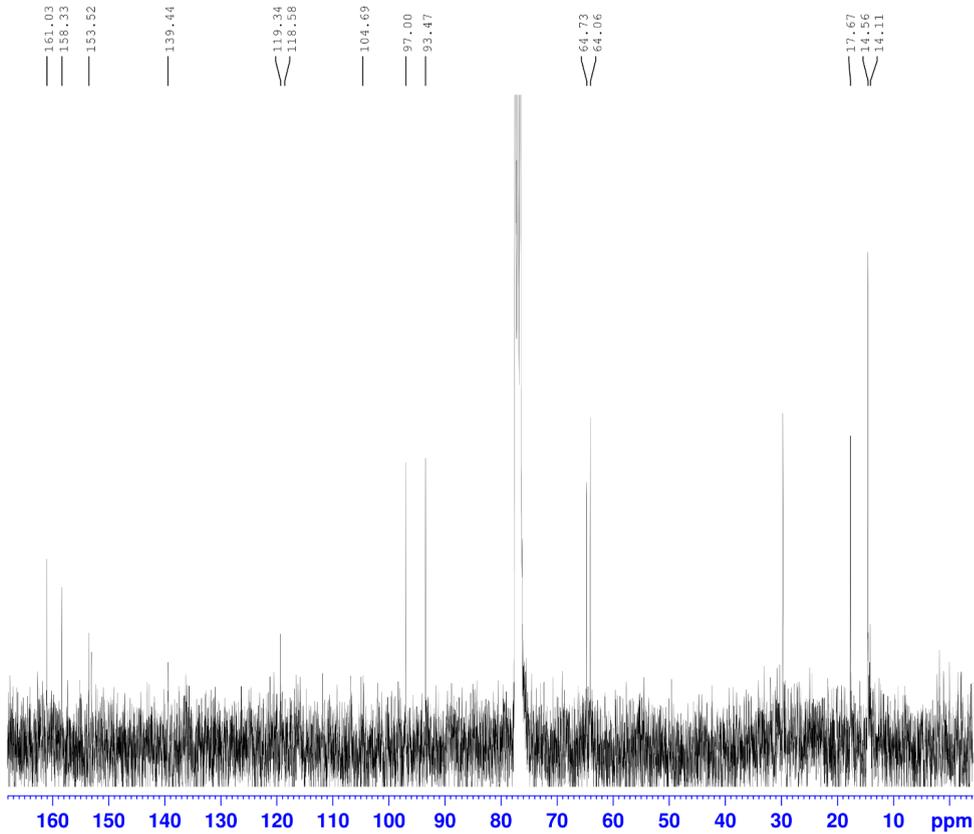


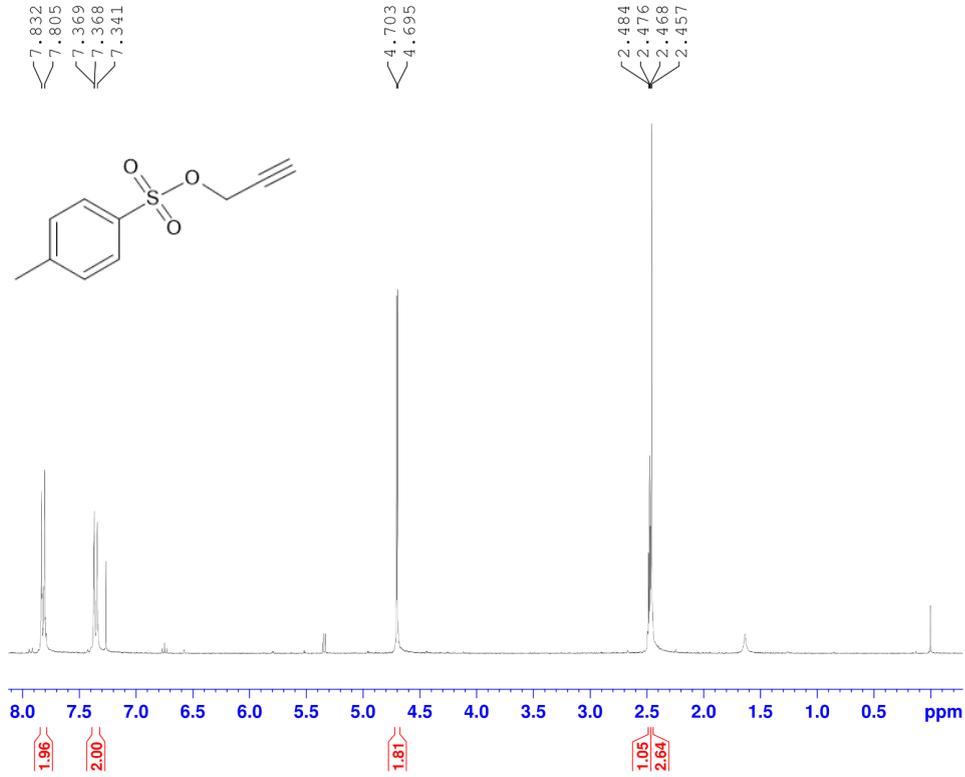
### 3-azido-5,7-dietoxi-4-metil-2H-cromen-2-ona

RMN  $^1\text{H}$



RMN  $^{13}\text{C}$



**Prop-2-in-1-il 4-metilbenzeno-1-sulfonato**RMN  $^1\text{H}$ RMN  $^{13}\text{C}$ 