Universidade Estadual de Goiás

Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas (UnUCET)

Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciências Moleculares

Jefferson Luiz Fonseca da Silva

SÍNTESE DE ANÁLOGOS DE DIIDROCUMARINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Anápolis, 2011.

Universidade Estadual de Goiás

Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas (UnUCET)

Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciências Moleculares

Jefferson Luiz Fonseca da Silva

SÍNTESE DE ANÁLOGOS DE DIIDROCUMARINAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás (UEG) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Físico-Química Molecular.

Orientador: Profº Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino.

Anápolis, 2011.

Ficha Catalográfica

Silva, Jefferson Luiz Fonseca da.

Síntese de Análogos de Diidrocumarinas e Avaliação da Atividade Anticolinesterásica. – 2011.

123 folhas; fig; tbs.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto L. B. Aquino

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2011.

1. Síntese de Diidrocumarinas. 2. Atividade Anticolinesterasica. 3. Mal de alzheimer. I. Título.

SÍNTESE DE ANÁLOGOS DE DIIDROCUMARINAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

JEFFERSON LUIZ FONSECA DA SILVA

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:

Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino

Prof. Dr. William Pires de Macedo

Prof. Dr. Guilherme Roberto de Oliveira

ANÁPOLIS, GO - BRASIL
AGOSTO 2011

Dedico este trabalho a minha amada esposa que nestes longos dois anos e, em inúmeras outras vezes, foi obrigada a me dividir com os livros e o laboratório. Obrigado por tudo!

“O livro da natureza está escrito em caracteres matemáticos, sem o conhecimento dos mesmos o homem não poderá compreendê-la. Eu creio na razão!” (Galileu Galilei).

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que participaram diretamente ou indiretamente deste trabalho; os Funcionários, Professores e Técnicos da UnUCET (UEG).

Se fosse agradecer todos aqueles que eu gostaria, não me venceriam as páginas, porém, cabe a mim colocar apenas as pessoas diretamente envolvidas no processo devido a essa limitação.

- Ao Orientador e amigo, Profº Dr. Gilberto Aquino, por ter me recebido, me orientado e motivado no decorrer deste trabalho por mais atarefado que estivesse.

- Não poderia deixar de agradecer também o incansável e corajoso, Jamerson F. Silva pela ajuda que se tornou fundamental para meu triunfo.

- Agradeço aos amigos que estiveram comigo no laboratório como os amigos: Júlio César, Amanda, Tiago (Lambança),William Fernandes, Francisco Neto (Xicão), Paulo, Tarcísio, o Wanderson dentre outros.

- Agradeço a todos os professores do programa (PMCM), que me fizeram compreender a ciência além das fronteiras que nossos olhos conseguem enxergar.

Enfim, a todos vocês meu muito obrigado!

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica

Mestrado: Ciências Moleculares-UEG, (2009-2011).

Graduação: Licenciatura em Química-UEG, (2004-2008).

Segundo grau: Colégio Estadual "Profº Heli Alves Ferreira".

Experiência em Pesquisa

Mestrado: Ciências Moleculares-UEG, (2009-2011)

Título: Síntese de Análogos da Diidrocumarina e Avaliação da Ação Anticolinesterasica

Orientador: Prof.º PhD. Gilberto Lúcio B. de Aquino

Trabalhos Científicos

Dissertação de Mestrado*:* Síntese de Análogos da Diidrocumarina e Avaliação da Ação Anticolinesterasica. (2011).

Orientador: Prof.º PhD. Gilberto Lúcio B. de Aquino.

TCC: Max Planck, o Ato de Desespero e o Surgimento da Mecânica Quântica.

Orientador: Heibbe Christian Benedito de Oliveira.

Congressos

- Apresentação de Resumo: International School on Fundamental crystallography. *Synthesys and Structural Analysis of Ethyl (2E) - 3 - (4 - Hydroxy - 3,5 - Dimethoxyphenyl) prop - 2 - enoate. (Montevideo, 2010).*

- Seminario Nacional de Síntese e produção de Fármacos, (Anápolis, 2009).

Experiência Profissional

- Analista de Controle de Qualidade Físico-Químico. Laboratório Neo Química (08/2011 - Atual).

- Analista de Equivalência Farmacêutica e Validação de Métodos Analíticos. Laboratório Teuto Brasileiro/Pfizer (2010-2011).

- Professor de Química. Colégio Estadual “Dr. Genserico Gonzaga Jaime”. Ensino Médio. (2010).

- Professor de Química. Ensino Técnico. INESUL (2008-2009).

- Analista de Controle de Qualidade Físico-Químico. Laboratório Teuto Brasileiro (2007-2010).

- Analista de Controle de Qualidade Físico-Químico. Laboratório Genoma (2006-2007).

Resumo

Título: SÍNTESE DE DIIDROCUMARINAS E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTICOLINESTERÁSICA

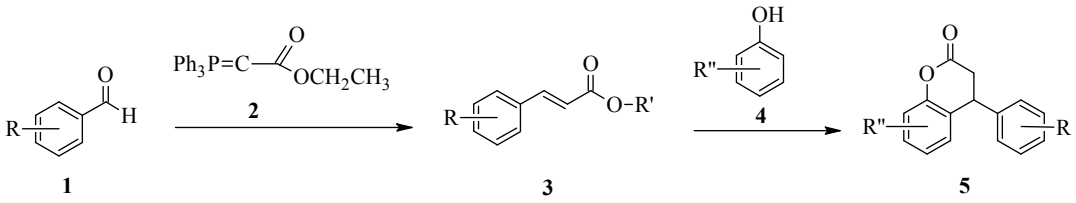


***Figura 1**: Síntese das Diidrocumarinas*

Diidrocumarinas são neoflavonóides que possuem um diversificado potencial farmacológico comprovado. Neste trabalho, foi realizada a síntese de análogos estruturais de diidrocumarinas com o objetivo de obter compostos biologicamente ativos frente a enzima acetilcolinesterase (relacionada ao Mal de Alzheimer). Li e colaboradores descreveram em seu relatório a possibilidade de sintetizar diidrocumarinas com ótimos rendimentos, através da hidroarilação de olefinas catalisada por ácido trifluoracético (TFA). Neste trabalho, as olefinas utilizadas são ésteres cinâmicos obtidos a partir da reação entre ilídeo de fósforo e benzaldeídos e também ácidos cinâmicos obtidos comercialmente. Estes compostos reagem por condensação com fenóis e posterior ciclização levando a obtençãp das diidrocumarinas. Após a síntese, a purificação por Cromatografia Flash e a caracterização por métodos espectrométricos como Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), foram realizados os testes de atividade biológica, obtendo resposta anticolinesterásica significativa para todos os compostos.

Palavras Chave: Síntese de Diidrocumarina, Atividade Biológica, Anticolinesterase, Mal de Alzheimer.

Abstract

Title: DIHYDROCOUMARIN SYNTHESES AND EVALUATION OF ANTICHOLINESTERASE ACTION

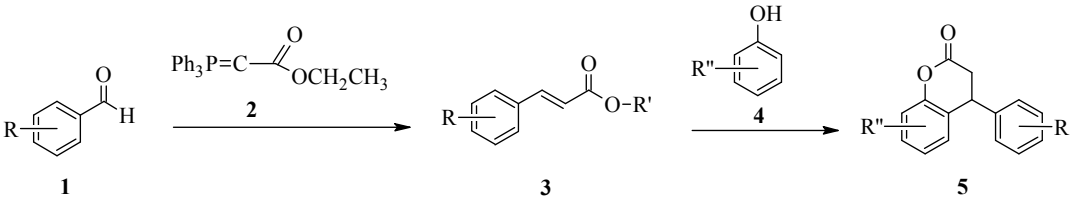


***Figura 1**: Síntese das diidrocumarinas*

Diidrocumarinas are neoflavonoides that have a diverse pharmacological potential. In this work, we performed the synthesis of structural analogues diidrocumarinas in order to obtain biologically active compounds against the enzyme acetylcholinesterase (related to Alzheimer's disease). Li and employees described in their report the possibility to synthesize diidrocumarinas with excellent yields by hidroarilação of olefins catalyzed by trifluoroacetic acid (TFA). In this work, the olefins used are cinnamic esters obtained from the reaction between phosphorus Ilides and benzaldehydes as well as cinnamic acids obtained commercially. These compounds react with phenols by condensation obtained the diidrocumarinas. After the synthesis, purification by flash chromatography and characterization by spectrometric methods such as infrared (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR) tests were performed for biological activity anticholinesterase, obtaining a positive response for all compounds.

Keywords: Diidrocumarina Synthesis, Biological Activity, Anticolinesterase, Alzheimer's disease.

Índice

RESUMO IX
ABSTRACT X
ÍNDICE XI
LISTA DE FIGURAS XIII
LISTA DE TABELAS XVI
LISTA DE ABREVIATURAS XVIII

1 – INTRODUÇÃO 1

1.1 – Desenvolvimento de Fármacos 1
1.2 – Estratégias sintéticas utilizadas na obtenção de compostos bioativos 3
1.3 – Interação Fármaco-Receptor 5
1.3.1 – Físico-Química da Interação Competitiva Reversível 6
1.4 – Doença de Alzheimer e a Hipótese Colinérgica 8
1.5 - Sítios Ativos da Acetilcolinesterase 12
1.6 – Diidrocumarinas 13
1.61 – Atividade Biológica 13
1.62 – Obtenção 14

2 – OBJETIVOS 20

Objetivo Geral 20
Objetivos Específicos 20

3 – METODOLOGIA 21

3.1- Estratégia de Síntese 21
3.1.1 – Formação dos Ésteres Cinâmicos 21
3.1.2 – Hidroarilação de Olefinas por catálise ácida 22

4 – MATERIAIS E MÉTODOS 23

4.1 – Considerações gerais 23
4.2 - Procedimento experimental 24
4.2.1 - Preparação do Brometo de Etoxicarbonilmetileno (trifenil) fosforano 24
4.2.2 – Preparação dos Ésteres Cinâmicos 25
4.3.3 - Preparação das Diidrocumarinas 26
4.3.4 – Atividade Biológica 28

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 31

5.1 – Síntese do Etoxicarbonilmetileno(trifenil)fosforano (EcTF) 31
5.2 – Síntese dos Ésteres Cinâmicos 32
5.3 – Síntese das Diidrocumarinas 47
5.4 – Atividade Biológica das Diidrocumarinas 65
5.5 – Relação entre estrutura molecular e atividade biológica (SAR) 69

6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 72

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73

8 – ANEXOS 77

8.1 – Anexo 1 77
8.2 - Anexo 2 104

Lista de Figuras

Figura 1: *Síntese das diidrocumarinas* IX

Figura 2: *Elaboração de um fármaco em etapas* 2

Figura 3: *Reação multicomponente aplicada a síntese de isocianato* 3

Figura 4: *Estrutura molecular do captopril e do saquinavir* 4

Figura 5: *Ilustração esquemática da inibição competitiva reversível* 7

Figura 6: *Estrutura molecular da acetilcolina* 9

Figura 7: *Ilustração esquemática do ciclo envolvendo a síntese, transmissão e hidrólise da acetilcolina. depois observa-se a molécula de colina retornando ao neurônio para a síntese de outra molécula de acetilcolina e a continuação do ciclo.*[11] 11

Figura 8: *Fármacos mais utilizados para o tratamento da doença de alzheimer* 12

Figura 9: *Interações no subsítio esteárico da acce.*[13] 13

Figura 10: *Interações no subsítio aniônico da acce.*[13] 13

Figura 11: *Estrutura básica de diidrocumarinas e flavonóides* 14

Figura 12: *Esquema reacional para obtenção de diidrocumarinas via ácido polifosfórico utilizando floroglucinol*[18] 15

Figura 13: *Esquema reacional para obtenção de diidrocumarinas via ácido polifosfórico utilizando o resorcinol*[18] 15

Figura 14: *Ciclização intramolecular utilizando rutênio como catalizador obtendo cromonas (**26**), terpenóides (**28** e **29**) e 4-aril-3,4-diidrocumarinas (**32**).*[19] 16

Figura 15: *Possível mecanismo para a hidroarilação intramolecular de ligações triplas c-c.*[20] 17

Figura 16: *Hidroarilação de alcenos para formação de diidrocumarinas.*[20] 17

Figura 17: *Hidroarilação de olefinas na ausência de catalisadores metálicos.*[21] 18

Figura 18: *Obtenção de diidrocumarinas e cumarinas através do ácido 5-alquil-meldrun's.*[22] 19

Figura 19: *Obtenção das moléculas alvo* 21

Figura 20: *Formação dos ésteres cinâmicos* 22

Figura 21: *Formação das diidrocumarinas* 22

Figura 22: *Esquema reacional para síntese do ilídeo de fósforo* 24

Figura 23: *Preparação dos ésteres cinâmicos* 26

Figura 24: *Obtenção das diidrocumarinas a partir dos ésteres cinâmicos (1) e a partir dos ácidos cinâmicos (2)* 27

Figura 25: *Mecanismo de formação do Etoxicarbonil(trifenil)fosforolideno* 31

Figura 26: *Mecanismo de reação do éster cinâmico* 32

Figura 27: *Estrutura molecular dos ésteres cinâmicos* 34

Figura 28: *Ésteres e ácidos cinâmicos utilizados na síntese da diidrocumarina* 47

Figura 29*: Mecanismo de reação das diidrocumarinas* 48

Figura 30: *Estrutura molecular das diidrocumarinas* 49

Figura 31: *Formação de um carbocátion estável* 58

Figura 32: *Formação de produto cíclico* 59

Figura 33: *Duas possibilidades de reação: controle cinético e controle termodinâmico* *60*

Figura 34: *Espectro de* RMN - ^{1}H *do composto* ***85*** 62

Figura 35: *Espectro de HMBC - correlações entre o dubleto* $\delta_H = 2,97$ *e os sinais de carbonos* $\delta_C = 136,3$, $\delta_C = 46,3$ *e* $\delta_C = 171,5$ 62

Figura 36: *Espectro de HMBC - correlações entre os dubletos* $\delta_H = 6,75$ 63

e $\delta_H = 7,10$ *com os sinais de carbono em* $\delta_C = 136,3$, $\delta_C = 114,6$, $\delta_C = 134,3$ *e* $\delta_C = 153,4$ *e em* $\delta_C = 45,8$, $\delta_C = 128,0$ *e* $\delta_C = 153,9$, *respectivamente*

Figura 37: *Espectro de HMBC - correlações entre o singleto* $\delta_H = 6,44$ *com os sinais de carbono em* $\delta_C = 133,7$ *e* $\delta_C = 146,1$*(aromáticos) e em* $\delta_C = 134,3$ *e* $\delta_C = 153,4$ *e em* $\delta_C = 45,8$, $\delta_C = 104,2$. 64

Figura 38: *Espectro de HMBC - correlações entre o tripleto* $\delta_H = 4,42$ *com os sinais de carbono em* $\delta_C = 129,1$ *e* $\delta_C = 135,8$, $\delta_C = 41,2$ *e* $\delta_C = 103,7$ *e com o carbono carbonílico em* $\delta_C = 172,0$. 65

Figura 39: *Reação de Ellman* 66

Figura 40: *Porcentagem de inibição apresentado pelas diidrocumarinas analisadas em ensaio de microplacas pelo método de ellman* 68

Figura 41: *Possíveis interações intermoleculares das diidrocumarinas com os sítios ativos da acetilcolinesterase.* 70

Lista de Tabelas

Tabela 1: *Correlação entre as bandas de absorção em infravermelho e os grupos funcionais para os ésteres cinâmicos obtidos* 33

Tabela 2: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***58*** 35

Tabela 3: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***58*** 35

Tabela 4: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***59*** 36

Tabela 5: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***59*** 36

Tabela 6: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***60*** 37

Tabela 7: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***60*** 37

Tabela 8: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***61*** 38

Tabela 9: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***62*** 39

Tabela 10: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***63*** 40

Tabela 11: *Dados espectrais de RMN - 1H para o composto* ***64*** 41

Tabela 12: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***64*** 41

Tabela 13: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***65*** 42

Tabela 14: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***66*** 43

Tabela 15: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***67*** 44

Tabela 16: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***67*** 44

Tabela 17: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***68*** 45

Tabela 18: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***68*** 45

Tabela 19: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***69*** 46

Tabela 20: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***69*** 46

Tabela 21*: Correlação entre as bandas de absorção em infravermelho e os grupos funcionais para as diidrocumarinas obtidas* 49

Tabela 22: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***72*** 50

Tabela 23: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***73*** *51*

Tabela 24: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***74*** *52*

Tabela 25: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***75*** *53*

Tabela 26: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***76*** *54*

Tabela 27: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto 77* *55*

Tabela 28: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***78*** *56*

Tabela 29: *Relação dos compostos esperados que não se formaram nas sínteses* *57*

Tabela 30: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***85*** *61*

Tabela 31: *Relação dos compostos obtidos e analisados pelo Método de Ellman* *67*

Lista de Abreviaturas

AcC – Acetilcolina

AcCE – Acetilcolinesterase

CATf – Colina Acetiltransferase

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

DHC – Diidrocumarina

DA – Doença de Alzheimer

EcTF – Etoxicarbonil Trifenil Fosforano

FDA – Food's and Drugs Administration

IV – Infravermelho

$\mathbf{K_A = K_D^{-1} = K_i^{-1}}$ – Constante de afinidade

PPA – Ácido Polifosfórico

Pd – Chumbo

$\mathbf{Pd(OAc)_2}$ – Acetato de Chumbo

QSAR – Quantitative and Qualitative structure-activity relationship (relações quantitativas e qualitativas entre estrutura molecular e atividade biológica)

RMC – Reações Multi-Componente

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SAfC – Sistema de Alta afinidade por Colina

TFA – Ácido Trifluoracético

DM – Diclorometano

Rf – Fator de Retenção

AcOEt – Acetato de Etila

Hex - Hexano

1 – Introdução

1.1 – Desenvolvimento de Fármacos

A busca por produtos com a finalidade de curar enfermidades é uma atividade conhecida desde a antiguidade. Estes produtos eram provenientes de recursos animais, vegetais e minerais disponíveis na época. Apesar de parecerem, a primeira vista, atraentes pela sua eficiência a maioria apresentava elevada toxicidade.[1]

Ao longo do século XVIII, verificou-se um aumento expressivo da quantidade de literatura disponível e do entendimento a respeito das propriedades dos compostos de origem natural através da invenção da imprensa, da criação de herbários, farmacopéias e compêndios, além da comunicação entre médicos de várias regiões do mundo. A partir do início do século XIX, o aperfeiçoamento das técnicas de extração possibilitou a obtenção de compostos com potencial terapêutico cada vez maior.[1-2]

No final do século XIX, a criação e a melhoria das metodologias sintéticas, permitiram o desenvolvimento compostos menos tóxicos quando comparados aos extraídos de fontes naturais. O resultado foi um aumento significativo no número de moléculas utilizadas como agentes terapêuticos ao longo do século XX.[1-2]

Atualmente, o desenvolvimento de um novo fármaco pode levar até 15 anos e consumir bilhões de dólares. É um processo realizado geralmente em 5 etapas (figura 2), onde inicialmente é necessário o conhecimento do alvo biológico e a partir deste, a eleição de uma molécula que tenha uma estrutura molecular complementar.[2-3]

Esta molécula é chamada de protótipo. A próxima etapa inclui os esforços para o aperfeiçoamento do protótipo através de pequenas alterações estruturais e funcionais procurando aumentar sua afinidade e seletividade pelo alvo biológico.[2-3]

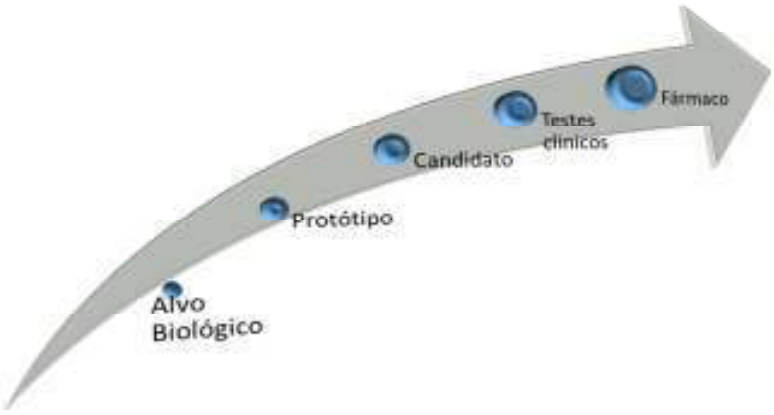


Figura 2: *Elaboração de um fármaco em etapas*

Para tanto, é preciso conhecer suas propriedades farmacocinéticas: absorção, distribuição e metabolismo, além da excreção e toxicidade. Feitos estes testes, tem-se um candidato a fármaco, que ainda precisa passar por testes clínicos (ensaios *in vivo*) para avaliar a possibilidade de comercialização. Portanto, o que se busca num fármaco é que tenha alta afinidade pelo ligante e que seja potente o bastante para provocar o efeito farmacológico esperado, uma vez que existe uma grande numero de receptores.[2-3]

O grande desafio na elaboração de novas moléculas é garantir que as reações químicas sejam capazes de formar moléculas com o máximo de complexidade e diversidade possíveis, levando ao mínimo possível de etapas. Nesse sentido, as reações de multicomponentes (RMC's) surgiram como uma ferramenta interessante. Nessa metodologia, reações antes realizadas em várias etapas, agora podem ser realizadas em um único

processo (em um único recipiente). A variabilidade e a complexidade dos compostos formados se deve a modificação dos grupos ligados as moléculas dos reagentes, possibilitando ao final, a confecção de uma larga biblioteca de compostos.[4-5]

As vantagens deste método são economia de átomos, simplicidade do processo, variações estruturais, complexidade das moléculas acessíveis, focando a preservação do meio ambiente, de energia no processo, uma vez que a utilização de reagentes e solventes é diminuída.[4-5]

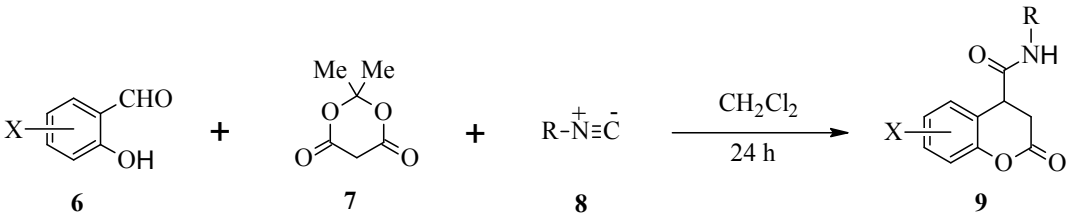


Figura 3: *Reação multicomponente aplicada a síntese de Isocianato*

Recentemente, Shaabani e colaboradores relataram em seu artigo, uma nova rota de síntese para os derivados da 3,4-diidrocumarinas fazendo uso de reações multicomponente. Como observado na figura 3, foram utilizados precursores facilmente disponíveis como derivados do 2-hidroxibenzaldeídos (**6**) com o ácido de Meldrum's (**7**) e derivados do aril ou alquil isociamidas (**8**).[6]

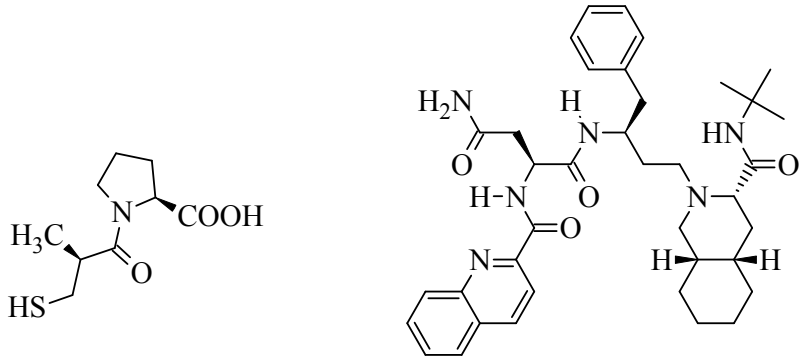
1.2 – Estratégias sintéticas utilizadas na obtenção de compostos bioativos

Nas últimas décadas, as metodologias de desenvolvimento de compostos bioativos vêm consolidando-se como abordagens imprescindíveis para a elaboração de novos fármacos. Existem duas estratégias, complementares entre si, que se destacam: a "triagem experimental" que envolve a pesquisa em bibliotecas de compostos,

buscando estruturas com estudo de atividade biológica conhecida (estudos *in vitro*); e a "triagem virtual" que é baseada na busca de alvos biológicos (ou de ligantes) elucidados e através destes propor a confecção de novas moléculas, utilizando-se de metodologias computacionais.[3-7]

Para as duas abordagens, é importante conhecer o mecanismo de ação farmacológica do processo fisiopatológico e a eleição do alvo terapêutico.[2-3]

Posteriormente, faz-se a analogia com o substrato natural ou com um protótipo a fármaco já existente no mercado para desenvolver novas estruturas. É importante também mimetizar a quantidade de compostos obtidos, mantendo aquelas estruturas que contém os grupos responsáveis pela atividade biológica através do conceito de bioisosterismo.[3-7]



Captopril **10** Saquinavir **11**

Figura 4: *Estrutura Molecular do Captopril e do Saquinavir*

Essas metodologias permitiram que se desenvolvesse o Captopril, um inibidor da enzima conversora de Angiotensina e do Saquinavir, o inibidor do HIV - protease (Figura 4).[3]

O sucesso destas estratégias também se deve ao conhecimento das relações qualitativas (SAR) e quantitativas entre estrutura-atividade (QSAR) que é uma ferramenta valiosa para avaliar as interações do fármaco frente ao receptor, principalmente quando seu sítio ativo não é conhecido. Além disso, seus resultados fornecem informações sobre a estrutura do receptor, quando o mesmo interage com o candidato a fármaco. Este método é importante não somente para explicar as afinidades encontradas experimentalmente, mas também para prever a afinidade entre moléculas desconhecidas.[2-3-7]

Um procedimento alternativo para realizar o estudo de QSAR seria o modelo farmacofórico. Essa técnica caracteriza-se pelo estudo de uma série de moléculas bioativas, de modo que suas propriedades moleculares sejam representadas geometricamente. Posteriormente, potenciais candidatos a fármaco são recuperados de uma biblioteca de compostos que obedecem a hipótese farmacofórica para comparação.[7-8]

Além de todas essas metodologias, tem-se a técnica de cristalografia de raios-x que desde as últimas duas décadas contribui com a elucidação de um grande número de alvos biológicos, possibilitando o conhecimento da estrutura tridimensional dos sítios ativos e conseqüentemente o desenho de moléculas com mais alta afinidade e seletividade.[7-8]

1.3 – Interação Fármaco-Receptor

A mais de 100 anos foi descoberto que o reconhecimento molecular mútuo é o ponto de partida para a maioria dos processos biológicos. Foi proposto por Emil Fisher que a Enzima e o Glicosídeo devem se encaixar como uma chave e uma fechadura para iniciar uma ação química entre eles,

ou seja, eles devem ser complementares entre si. A idéia de complementaridade foi inicialmente aplicada a reações antígeno-anticorpo e posteriormente a interação fármaco-receptor.[3-7]

Paul Ehrlich, também contribuiu enormemente para o entendimento do mecanismo de ação de um fármaco através do trabalho entitulado de "*Corpora non agunt nisi fixata"*. A conseqüência destes relatórios foi o entendimento da complementaridade química e geométrica das pequenas moléculas chamadas de ligantes e dos respectivos receptores e a partir disso, o efeito biológico.[3]

A idéia de complementaridade tem seus méritos didáticos pela facilidade de entendimento, no entanto não é adequada porque representa o ligante e o receptor como estruturas rígidas, o que não é verdade. Na realidade, o que se observa são estruturas flexíveis. Essa flexibilidade é o que permite explicar porque algumas moléculas estruturalmente semelhantes possuem conformações e orientações distintas no sítio ativo do receptor, resultando em atividades e afinidades diferentes.[7-8]

Sabe-se hoje que os receptores biológicos afetam as rotas metabólicas, desencadeando um efeito fisiológico. Se estas proteínas receptoras não estão funcionando corretamente, ou seja, existe falha na sua regulação, então há o surgimento de alguma doença relacionada a essa proteína.[7-8]

1.3.1 – Físico-Química da Interação Competitiva Reversível

As interações fármaco-receptor são reversíveis e quantitativamente verificadas por análise da constante de afinidade $(1/K_d)$. Entretanto, uma

caracterização completa incluiria o rearranjo entre as forças intra e intermoleculares que acompanham essas interações.[9]

A energia envolvida nesse processo é determinada pelo tipo e o número das forças presentes na transição dos reagentes, através de um complexo ativo para os produtos, que podem ser do tipo hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio, Van Der Waals e interações entre nuvens π.[8-9]

Portanto, através do conhecimento do receptor, é possível modificar a estrutura do ligante de modo que se tenha a maior afinidade possível entre eles e assim obter o efeito farmacológico esperado.[8-9]

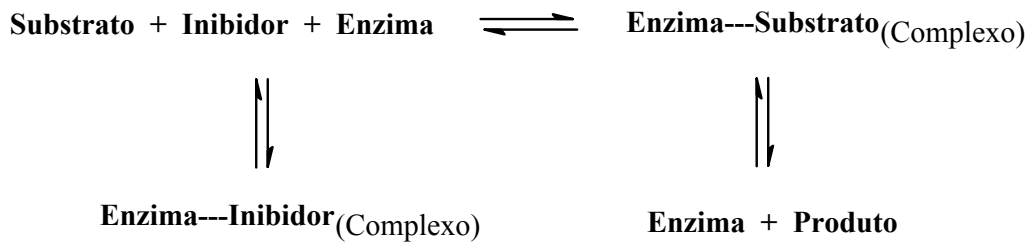


Figura 5: *Ilustração esquemática da inibição competitiva reversível*

Um tipo de inibição enzimática que se pode destacar é a inibição competitiva reversível (Figura 5). Nesse caso, o inibidor (fármaco) compete com o substrato pelo a ocupação do sítio ativo da enzima. Como conseqüência há uma diminuição da taxa de conversão desse substrato.[3]

A interação seletiva varia em função da estrutura do sítio ativo da proteína e do grupo farmacofórico do ligante através do reconhecimento energético. Os ligantes podem interagir covalentemente ou não covalentemente com o receptor.[3-9]

Em condições de equilíbrio, a interação é dominada pela energia livre de Gibbs (ΔG^0) de acordo com a equação 1. O valor dessa variável está relacionada com uma constante obtida experimentalmente; a constante de dissociação recíproca ou constante de inibição (K_d ou K_i). Esse valor descreve a tendência de formação de um complexo.[3-9]

$$K_A = K_D^{-1} = K_i^{-1} = \frac{[R'L']}{[R][L]} \;\; ; \;\; \Delta G^0 = -RT \ln K_A = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \qquad \textbf{Eq. (1)}$$

Onde $\frac{[R'L']}{[R][L]}$ = A relação entre Ligante e o Receptor ($[R'L']$) no estado ligado e no estado livre $[R][L]$ (sem interação).

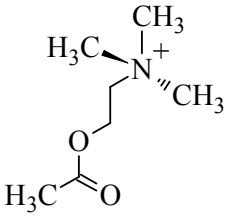
Pode-se também entender a estabilidade do complexo no estado ligado ($\mu^0_{R'L'aq.'}$) ou livre ($\mu^0_{Raq.} + \mu^0_{Laq.}$) através do potencial químico, descrito pela equação 2.[3]

$$\Delta G^0 = \mu^0_{R'L'aq.'} - (\mu^0_{Raq} + \mu^0_{Laq})^{[2]} \qquad \textbf{Eq. (2)}$$

1.4 – Doença de Alzheimer e a Hipótese Colinérgica

Até o final do século XIX, os cientistas acreditavam que a comunicação entre neurônios se dava de maneira direta, porém a partir do começo do século XX, descobriu-se que existem moléculas que funcionam como mediadores químicos entre os neurônios e o resto do corpo. Em 1907, foi proposto por Hunt, que a acetilcolina (AcC) seria responsável por essa mediação celular. Sua ação seria estimular os nervos parassimpáticos.[9]

A neurotransmissão de impulsos nervosos via AcC (**12**) é considerada vital. A perda dessa capacidade é utilizada para diagnosticar a doença de Alzheimer, uma vez que sua escassez é responsável pela deterioração de funções neurais em vários processos cognitivos como a memória, a atenção, o aprendizado entre outros.[10-11]



12

Figura 6: *Estrutura molecular da acetilcolina*

A hipótese colinérgica se baseia na idéia de que a perda da capacidade de síntese e transmissão da AcC, que ocorre no interior dos neurônios, seja a responsável pela Doença de Alzheimer (DA).[10-11]

A AcC é produzida no interior dos neurônios pela ação da Colina acetiltransferase (CATf), concentrada em vesículas e liberada na célula pré-sináptica após despolarização, na presença da Colina. Após a síntese, é transportada em vesículas no interior dos neurônios e liberada na fenda sináptica onde se encontra com os receptores muscarínicos e colinérgicos nicotínicos nas células pré e pós-sinápticos. Esse contato leva a ativação de vias bioquímicas dentro da célula. [10-11]

No momento em que atravessa a fenda sináptica, a AcC é rapidamente hidrolisada devido a presença de acetilcolinesterase (AcCE) em altas concentrações, formando colina e um grupo acetato. Posteriormente, a colina formada é novamente transportada para a membrana pré-sináptica para a síntese de mais moléculas de AcC. [10-11]

No entanto, em pessoas portadoras de doenças degenerativas do sistema nervoso central, a quantidade de (CATf) é reduzida, por isso quanto mais colina estiver disponível para a reação, maiores são as chances de síntese da AcC e de sua transmissão para a fenda sináptica. A AcCE limita excessos de AcC na fenda sináptica e sua inibição (a diminuição de sua concentração), promove um aumento na neurotransmissão pelo prolongamento da permanência da AcC na fenda sináptica, o que é fundamental no tratamento da doença de Alzheimer.[10-11]

Para manter uma quantidade razoável de colina nas vesículas sinápticas, recorre-se a um sistema de transporte de colina chamado sistema de alta afinidade (SafC), que transporta colina em baixas concentrações recém formadas pela reação de AcC com seus receptores. Este sistema de transporte é considerado a etapa limitante da reação.[11-12]

A síntese de AcC é feita em uma única etapa na proporção de uma molécula de colina para cada molécula do grupo acetato. O grupo acetato é originário de uma molécula de Acetil-CoA, que tem seus níveis mantidos devido ao metabolismo da glicose.[11-12]

A concentração de colina é mantida por sua vez pela dieta devido à incapacidade dos neurônios em sintetizar essa molécula. A enzima CATf é encontrada como uma proteína solúvel no citoplasma. O envelhecimento pode alterar os sistemas de neurotransmissores como o sistema serotoninérgico, Glutamatérgico, Aminérgico e Colinérgico. Destes, o sistema colinérgico foi o mais estudado e apesar da não unanimidade entre os pesquisadores, é considerado o que desempenha o papel mais importante nas funções cognitivas.[12-13]

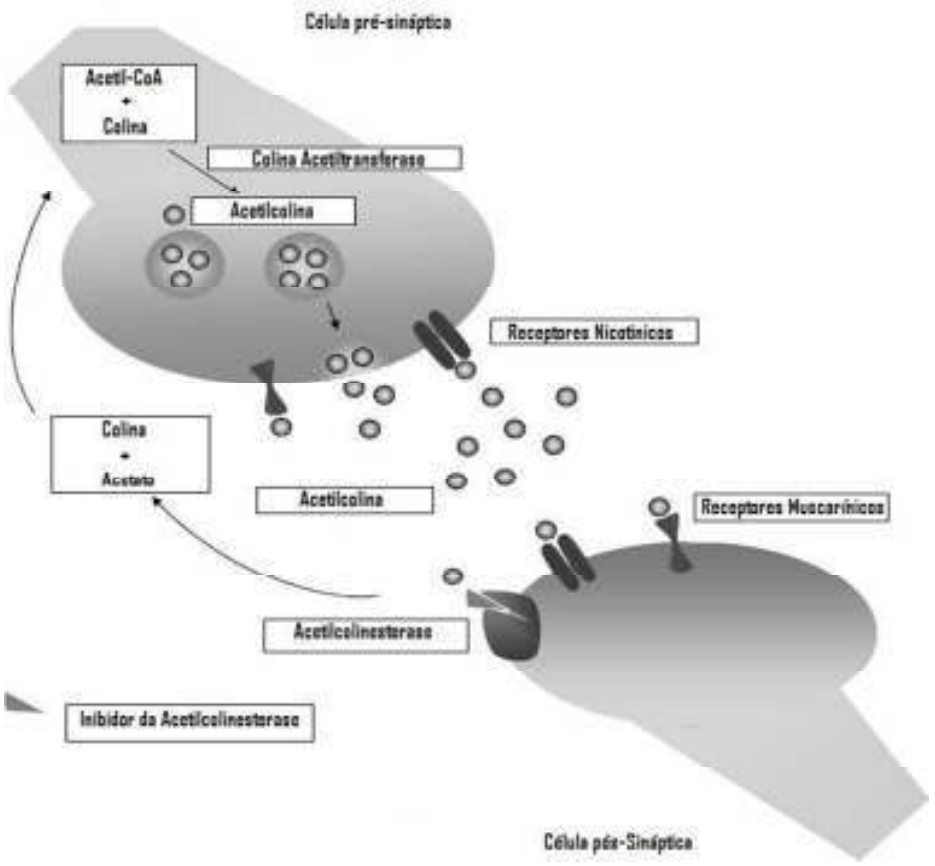


Figura 7: *Ilustração esquemática do ciclo envolvendo a síntese, transmissão e hidrólise da acetilcolina. Depois observa-se a molécula de colina retornando ao neurônio para a síntese de outra molécula de acetilcolina e a continuação do ciclo.*[11]

A hipótese colinérgica para a Doença de Alzheimer (DA) baseia-se no fato de que pessoas que apresentam deterioração das funções cognitivas apresentam também redução de transmissão colinérgica (isso é observado nas autópsias de pacientes portadoras da doença). Alguns pesquisadores contestam a hipótese colinérgica argumentando que ela seria valida apenas quando o paciente passa a ser sintomático. Apesar de contribuir para a discussão, essas pesquisas ainda são imaturas e a hipótese colinérgica é a mais aceita atualmente.[13]

O comportamento dinâmico do sistema nervoso sugere a elaboração de novos fármacos capazes de interferir no processo enzimático. Quatro

drogas foram aprovadas pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) para o tratamento a DA (Figura 8): Tacrina (**13**), Rivastignina (**14**), Galantamina (**15**) e o Donepezil (**16**). A Tacrina foi a primeira molécula a ser comercializada e hoje não é utilizada devido a sua hepatotoxicidade observada em 50% dos pacientes.[10-14]

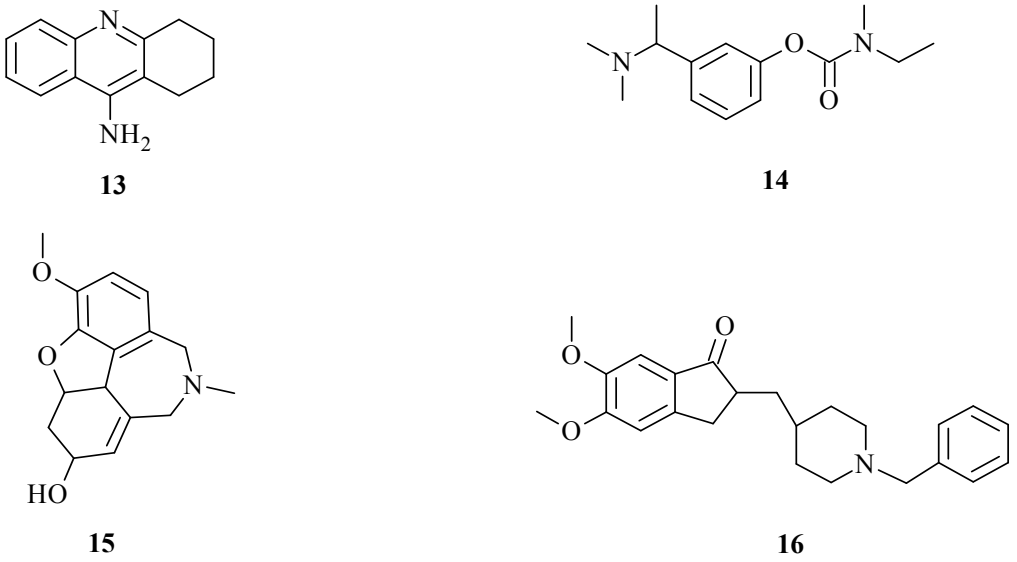


Figura 8: *Fármacos mais utilizados para o tratamento da Doença de Alzheimer*

1.5 - Sítios Ativos da Acetilcolinesterase

A AcCE, é uma enzima do tipo serino-hidrolase, altamente eficiente que atua no sistema nervoso central responsável pela hidrólise da AcC, após sua transmissão para a sinapse neuromuscular.[11-12]

Seu sítio ativo está localizado em uma faixa estreita e longa de 20Å, formado por dois subsítios: Um esteárico composto pelo sítio de serina que contêm a parte catalítica e outro aniônico responsável pela ligação com o grupo trietilamônio da AcC. A unidade catalítica funcional essencial é formada pela tríade Ser203, His447, Glu334. O "buraco" oxiônico formado

pelos grupos NH peptídicos Gly121, Gly122 a ALA204 também são unidades funcionais importantes do subsítio esteárico.[13]

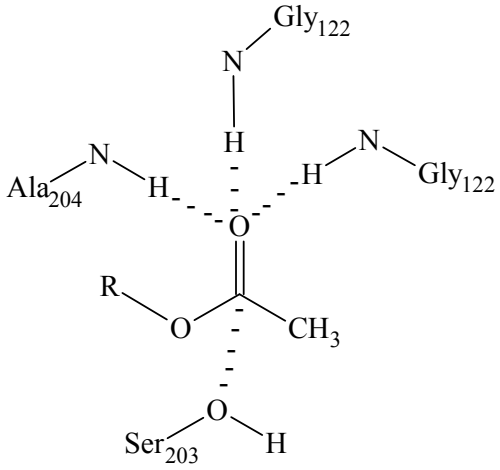


Figura 9: *Interações no subsítio esteárico da AcCE.[13]*

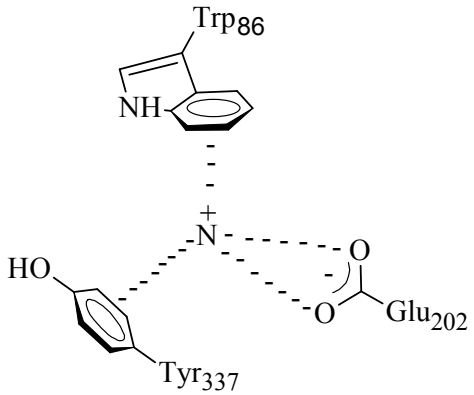


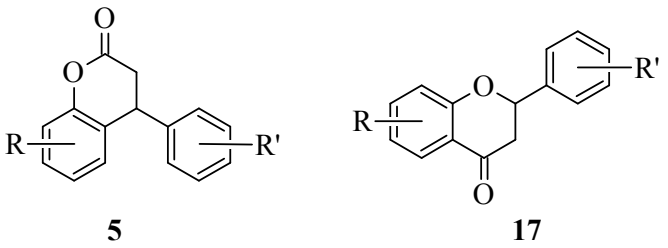
Figura 10: *Interações no subsítio aniônico da AcCE.[13]*

1.6 – Diidrocumarinas

1.61 – Atividade Biológica

Diidrocumarinas (DHC's) são sistemas de anéis constituintes fundamentais de uma série de compostos biologicamente ativos. Apesar de pouco estudadas, pesquisas recentes demonstraram que seu potencial farmacológico é muito diversificado. As 4-aril-3,4-diidrocoumarinas, por

exemplo, estão presentes em compostos naturais e apresentam similaridade estrutural com flavonóides, como observado na figura 11.[14-15]



5 **17**

Figura 11: *Estrutura básica de Diidrocumarinas e Flavonóides*

Kumar e colaboradores, relataram que as diacetoxy-diidrocumarinas e seus análogos possuem atividade frente a proteína-transacetilase (TAase) em microssomas de fígado de rato. [15]

Além disso, há relatos sobre a atividade biológica desses compostos em aldose redutase e proteína quinase, bem como atividade anti-herpética, e ainda, constituem importantes precursores sintéticos de compostos bioativos como o tartarato de tolterodina, um antagonista do receptor muscarínico utilizado no tratamento de distúrbios da bexiga. DHC's naturais também são muito utilizadas em indústrias de aromatizantes e sabores.[16-17]

1.62 – Obtenção

A síntese de diidrocumarinas foi realizada pela primeira vez nos anos 80 por Talapatra e colaboradores[18] (1986), utilizando floroglucinol e ácido cinâmico na presença de ácido polifosfórico (PPA), obtendo como produto as diidrocumarinas com baixos rendimentos e um subproduto (figura 12). Entretanto, ao utilizar ácidos cinâmicos substituídos como o ácido ρ-metoxicinâmico, a reação não ocorria. Talapatra refez a reação desta vez

utilizando resorcinol e obteve apenas a diidrocumarina como produto (figura 13).[18]

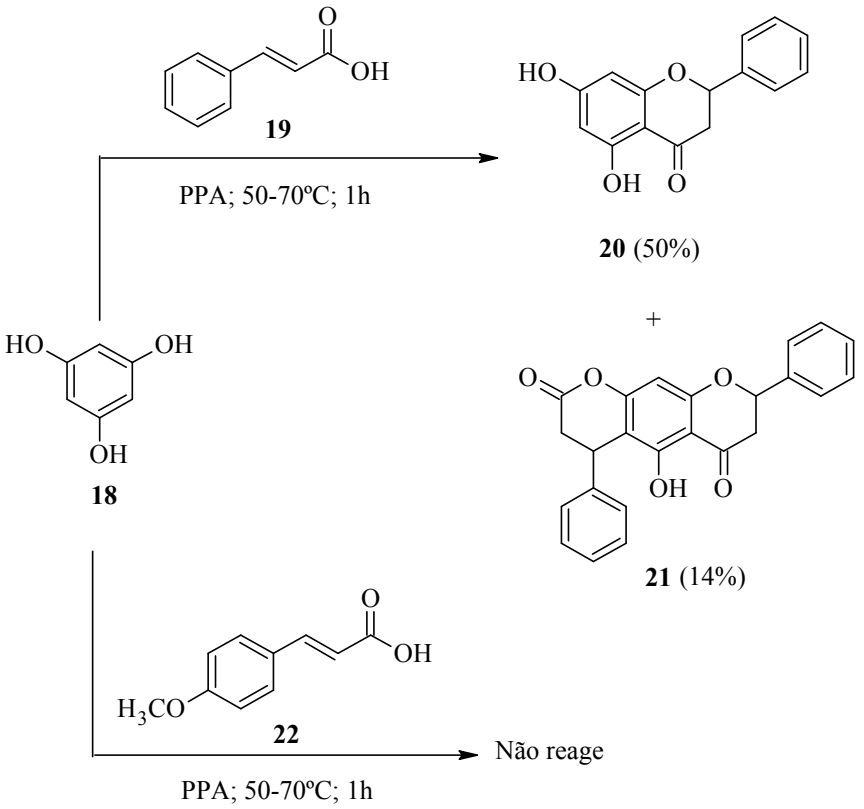


Figura 12: *Esquema reacional para obtenção de diidrocumarinas via ácido polifosfórico utilizando floroglucinol*[18]

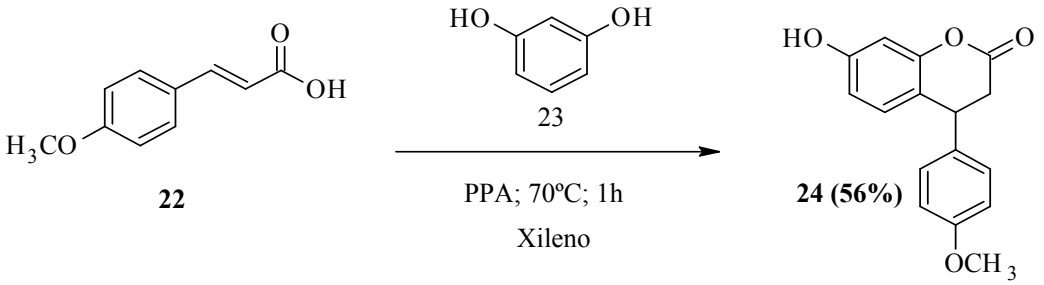


Figura 13: *Esquema reacional para obtenção de diidrocumarinas via ácido polifosfórico utilizando o resorcinol*[18]

Esse resultado mostrou que os produtos da reação são formados via mecanismos diferentes de acordo com o substituinte e que grupos doadores de elétrons facilitariam a ocorrência da reação.[18]

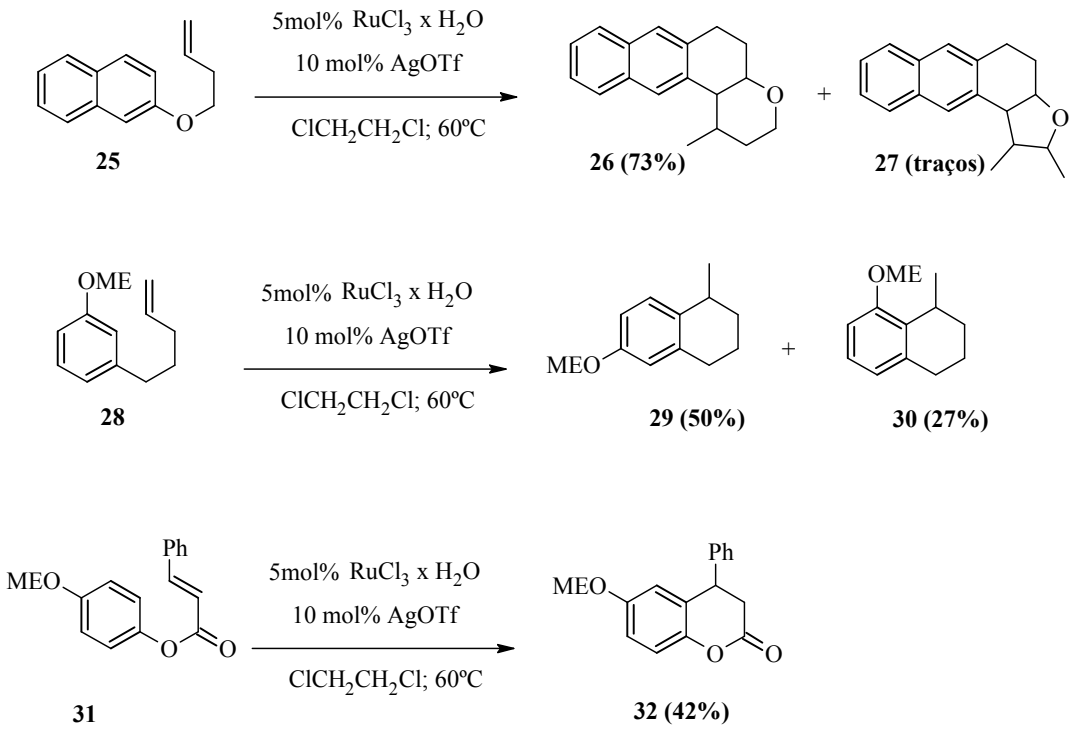


Figura 14: *Ciclização intramolecular utilizando rutênio como catalizador obtendo Cromonas (**26**), Terpenóides (**28** e **29**) e 4-aril-3,4-diidrocumarinas (**32**).*[19]

Youn e colaboradores, utilizaram Rutênio como catalizador ($Rucl_3$/AgOTf) em reações intramoleculares para ciclização de alcenos e alcinos obtendo cromonas, terpenóides e as 4-aril-3,4-diidrocumarinas (figura 14). Seus resultados indicaram que o Ru é um catalizador eficiente.[19]

Jia e colaboradores, propuseram uma nova metodologia para hidroarilação de alcenos e alcinos através da metalação eletrofílica de ligações C-H de anéis aromáticos utilizando compostos de coordenação baseados em Pd II para formar complexos do tipo $\sigma - aril - Pd$.[20]

A figura 15 mostra o mecanismo proposto por Jia para as suas reações. Na primeira etapa, espécies catiônicas de Pd altamente eletrofílicas são formadas quando um excesso de ácido trifluoracético (TFA) é usado na

presença de Pd, formando $Pd(O_2CCF_3)^+$. Em consequência, ocorre a ativação da ligação tripla carbono-carbono com o complexo de coordenação, ao mesmo tempo em que gera aceptores C-H de aril-nucleofilicos, ou seja, há um aumento da metalação. [20]

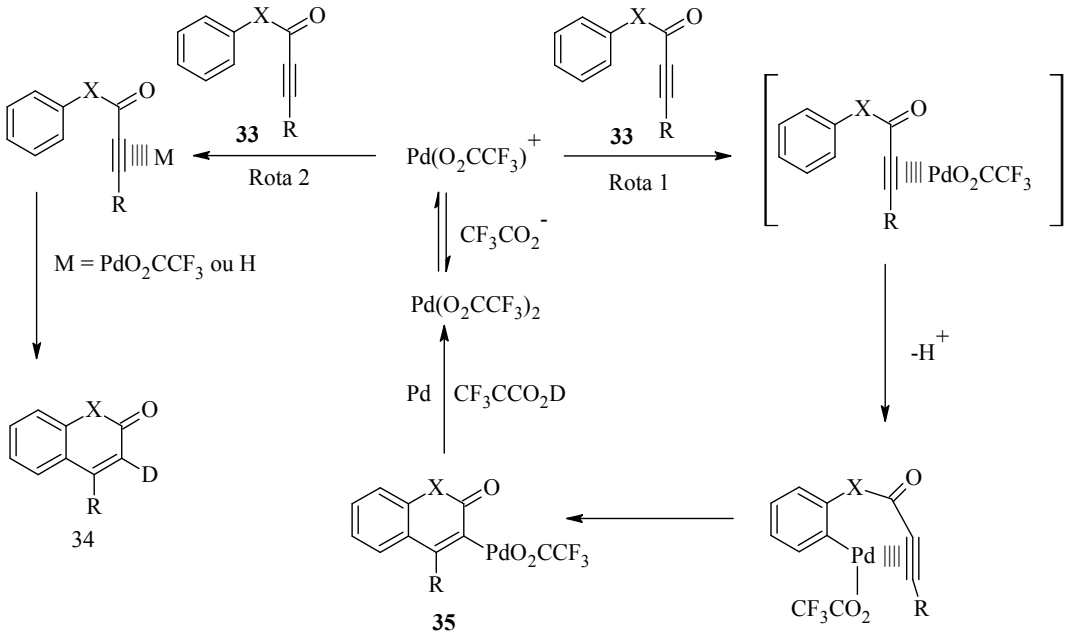


Figura 15: *Possível mecanismo para a Hidroarilação Intramolecular de ligações triplas C-C.*[20]

Jia justificou o excesso de TFA, sugerindo a necessidade de grande quantidade de espécies catiônicas de Pd^{2+} para formar complexos estáveis de $\sigma - aril - Pd$. Além disso, o TFA facilitaria a hidrólise dos compostos vinil-metalicos.[20]

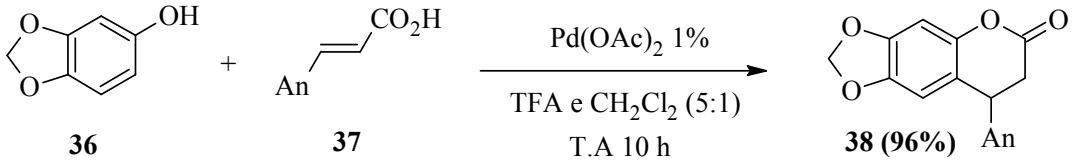


Figura 16: *Hidroarilação de alcenos para formação de diidrocumarinas.*[20]

Para a obtenção de 4-aril-diidrocumarinas, Jia utilizou um sistema reacional contendo TFA e CH_2Cl_2 (5:1), $Pd(OAc)_2$, conforme figura 16. Entretanto, em 2005 Li e colaboradores colocaram em cheque a tese de Jia. Segundo seu relatório, a hidroarilação não seria catalisada por compostos de Pd II (Figura 17). Na verdade, a catalise ocorreria fazendo uso apenas do TFA.[21]

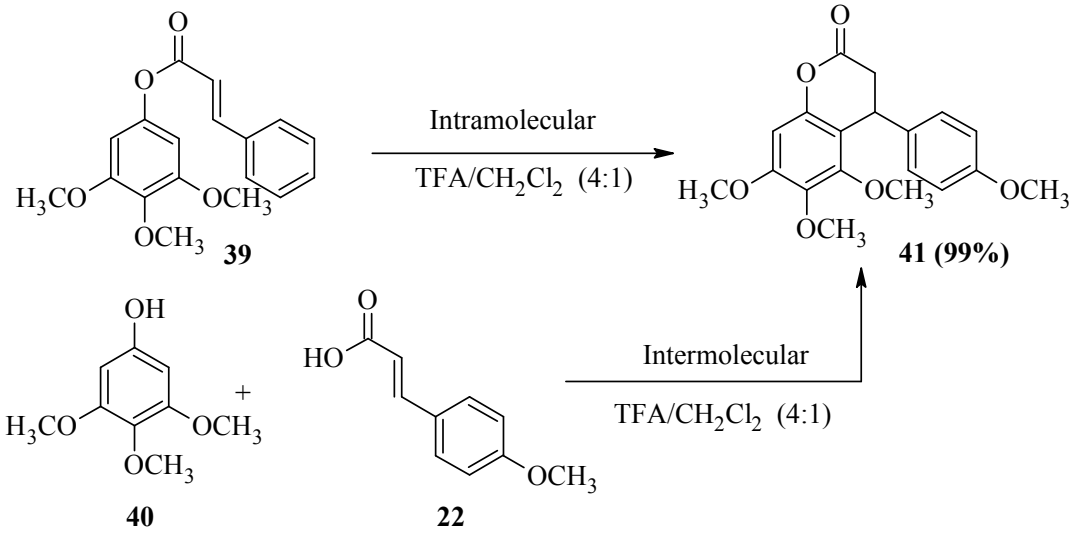


Figura 17: *Hidroarilação de Olefinas na ausência de catalisadores metálicos.*[21]

Li afirma que ao realizar a síntese de acordo com o descrito na literatura, ou seja, utilizando $Pd(OAc)_2$, obtem-se rendimentos de 96% e na ausência do catalizador metálico, o rendimento aumenta para 99%.[21]

Além disso, Li verificou que as reações intermoleculares seriam mais fáceis de acontecer que as intramoleculares e que os grupos doadores de elétrons ligados ao fenol facilitariam as reações de hidroarilação.[21]

Foi relatado também que a reação é particularmente simples onde obtem-se o produto com bons rendimentos. Outro benefício dessa abordagem é a utilização de reagentes simples, com certa complexidade

estrutural e a economia de átomos em relação a metodologias anteriores que utilizavam metais pesados como Pt e Pd para catalizar as reações.[21]

Existem outras rotas de síntese alternativas capazes de obter diidrocumarinas, como a reação dos ácidos 5-alquil Meldrun's com fenol (Figura 18).[22]

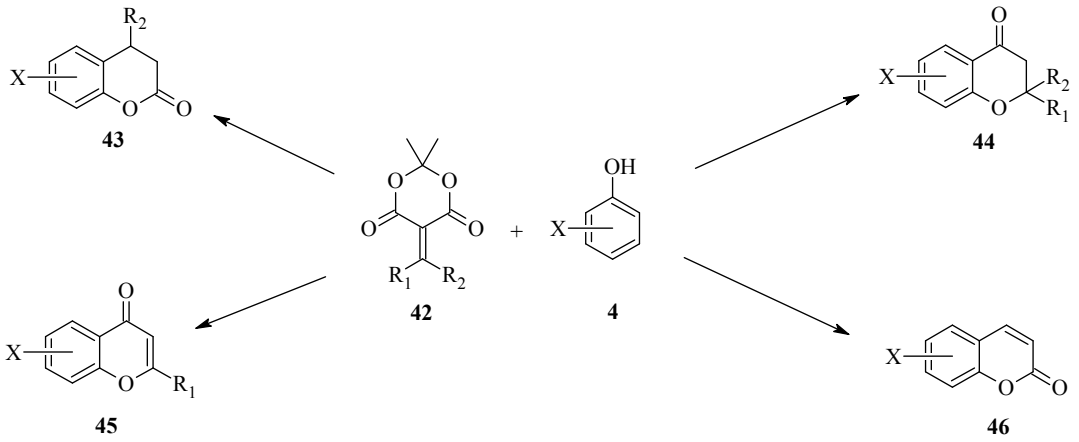


Figura 18: *Obtenção de diidrocumarinas e cumarinas através do ácido 5-alquil-meldrun's.[22]*

2 – Objetivos

Objetivo Geral

- Realizar a síntese de várias diidrocumarinas buscando obter um conjunto de moléculas que contribuam para a construção de um modelo qualitativo que relacione estrutura molecular e a atividade biológica.

Objetivos Específicos

- Obter ésteres cinâmicos através da reação entre benzaldeídos e Ilída de fósforo.

- Obter diidrocumarinas através da reação de Hidroarilação entre ésteres cinâmicos obtidos e ácidos cinâmicos comerciais com fenóis.

- Determinar a atividade biológica das diidrocumarinas obtidas e compará-las com as respectivas estruturas moleculares.

3 – Metodologia

3.1- Estratégia de Síntese

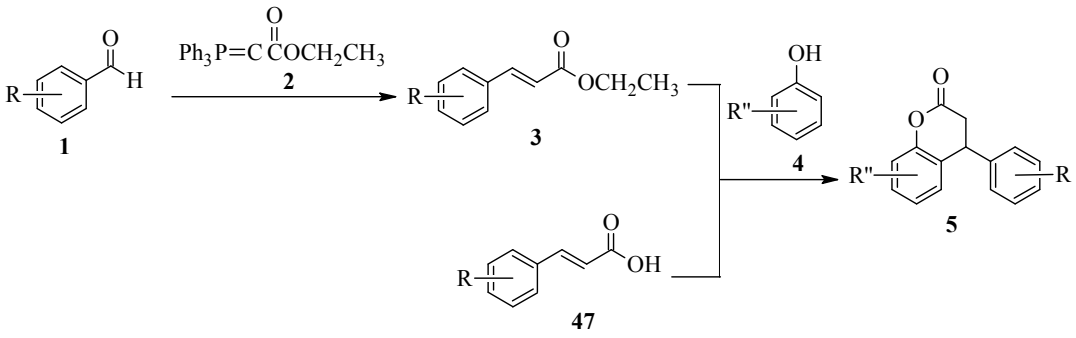


***Figura 19**:Obtenção das moléculas alvo*

A obtenção das moléculas alvo (as diidrocumarinas) será realizada a partir da reação entre o sal de fosfônio e uma série de benzaldeídos (reação de Wittig) com o objetivo de produzir os ésteres cinâmicos. O composto α,β-insaturado obtido será, por sua vez, colocado na presença de fenol e de um excesso do catalisador ácido trifluoracético (TFA) para obter-se as diidrocumarinas (reação de Hidroarilação). Ácidos cinâmicos comerciais também foram utilizados na sintetizar de diidrocumarinas.[21-23]

3.1.1 – Formação dos Ésteres Cinâmicos

Os ésteres cinâmicos foram obtidos através da reação entre o etoxicarbonil-trifenil-fosforolideno e os benzaldeídos, de acordo com a figura 20. A utilização do método de Wittig para esse fim é bastante razoável, uma vez que o sal de fosfônio utilizado é de fácil obtenção e sua reação com compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas) em si é estereoespecífica, ou seja, dependendo do ilídeo de fósforo utilizado, é possível favorecer a formação de um dos isômeros geométricos sobre a ligação dupla (*E* ou *Z*) do composto α,β-insaturado obtido. Neste trabalho

será utilizado um ilídeo de fósforo estabilizado com o objetivo de obter o isômero E.[23-24]

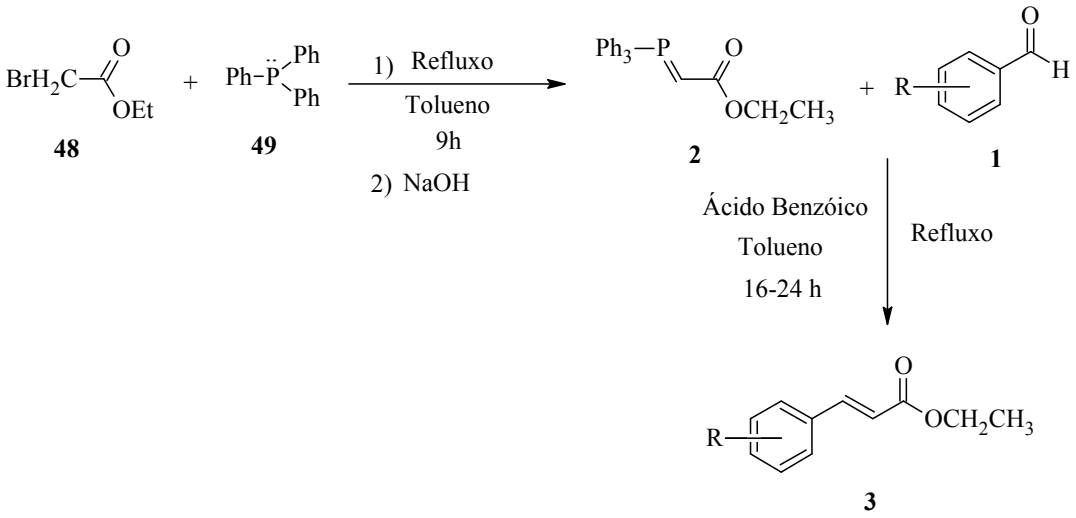


Figura 20: *Formação dos ésteres cinâmicos*

3.1.2 – Hidroarilação de Olefinas por catálise ácida

O esquema reacional geral da hidroarilação a ser utilizada na preparação de diidrocumarinas pode ser observado na figura 21. A utilização dessa metodologia se justifica pela simplicidade do processo e obtenção de bons rendimentos além da facilidade de se eliminar o catalisador.

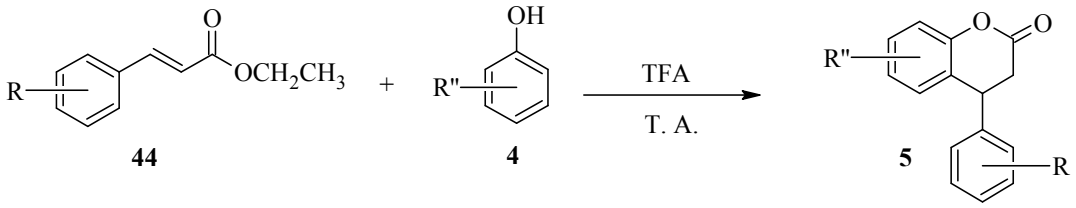


Figura 21: *Formação das diidrocumarinas*

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Considerações gerais

As considerações abaixo são válidas para todas as reações realizadas neste trabalho.

Os reagentes utilizados neste trabalho foram obtidos comercialmente através das empresas fornecedoras: Sigma-Aldrich, Acrõs, Cromoline, Synth, dentre outras.

Os reagentes foram devidamente tratados antes de sua utilização a partir de técnicas de purificação[25], de acordo com a necessidade.

Todas as reações foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada. Foi utilizada placa de CCD Silica-Gel F_{254}, com espessura 60 mm da Merck. Para revelação, foram utilizados: luz ultravioleta (254 nm - 354nm), câmara de Iodo, e solução de vanilina sulfúrica.

Após o término, as impurezas solúveis em água foram retiradas por extração com solvente, o qual foi posteriormente eliminado através de um sistema de alto-vácuo. Todos os compostos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna com o uso de coluna de vidro de diâmetro adequado e sílica-gel flash como fase estacionária (230-400 mesh, 60 Å).

As técnicas utilizadas para caracterizar os produtos das sínteses foram: Espectroscopia no Infravermelho (IV) Perkin-Elmer Spectrum BX, Modelo FT-IR System, Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^{1}H e ^{13}C) Bruker Modelo 300MHz.

4.2 - Procedimento experimental

4.2.1 - Preparação do Brometo de Etoxicarbonilmetileno (trifenil) fosforano (EcTF)

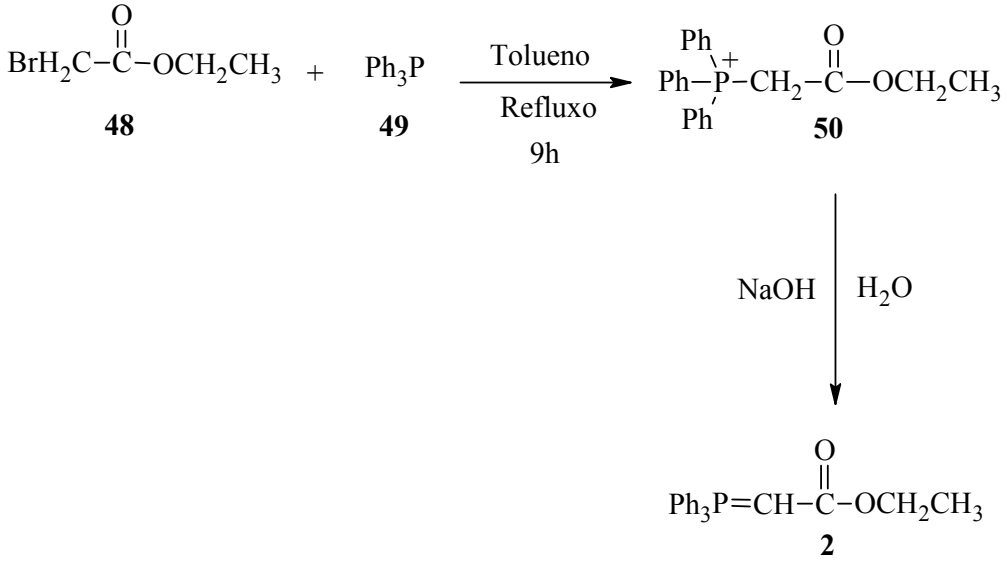


Figura 22: *Esquema reacional para Síntese do Ilídeo de Fósforo*

A um balão de fundo redondo de 500 mL, acoplado a um condensador de refluxo, com tubo de cloreto de cálcio anidro sob agitação magnética, foram adicionados 14,00 g (83,83 mmol) de bromoacetato de etila (**48**), 200 mL de tolueno purificado e 23,20g (88,45 mmol) de trifenilfosfina (**49**). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 9 horas.

Observou-se a formação de um precipitado branco em poucas horas e mais intensamente ao final da reação. O precipitado obtido (**50**) foi separado da mistura reacional por filtração a vácuo, lavado com éter dietílico (3 vezes o volume de 30 mL) e posteriormente levado ao dessecador por uma hora e depois pesado.

Após secagem, o produto foi dissolvido em 300 mL de água destilada e, sob constante agitação, adicionou-se lentamente o mesmo volume de uma solução de NaOH mol.L^{-1}. Observou-se o aparecimento de um precipitado castanho claro, que foi separado da fase aquosa por filtração à vácuo e lavado com solução de NaOH 0,1 mol/L (3 vezes o volume de 50 mL).

O sólido foi dissolvido com diclorometano, secado com sulfato de magnésio anidro e depois filtrada. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e a amostra obtida imediatamente resfriada em dessecador.

4.2.2 – Preparação dos Ésteres Cinâmicos

Os ésteres cinâmicos foram preparados através da reação entre os benzaldeídos (figura 23) e a Ilida de fósforo recém preparada. O procedimento abaixo foi realizado para todas as 12 reações.

A um balão bitubulado de 50 mL, foram adicionados 7,55 mmol do composto **51**, uma quantidade equivalente de EcTF com excesso (aproximadamente 7,70 mmol) e uma quantidade suficiente do catalizador ácido benzóico em 50 mL de Tolueno. A mistura foi mantida sob aquecimento e agitação magnética constante entre 16 a 24 horas através de um sistema de refluxo. A solução resultante foi resfriada a temperatura ambiente e transferida para um funil de separação, onde foram adicionados uma solução saturada de $NaHCO_3$ (30 mL) e éter etílico (50,0 mL). A fase orgânica foi separada e lavada com solução saturada de $NaHCO_3$ (3 vezes o volume de 30 mL) e secada com $CaCl_2$ anidro e filtrada. O solvente foi evaporado sob vácuo, e o produto resultante purificado por cromatografia em sílica gel flash, utilizando-se uma mistura de hexano e acetato de etila como fase móvel.

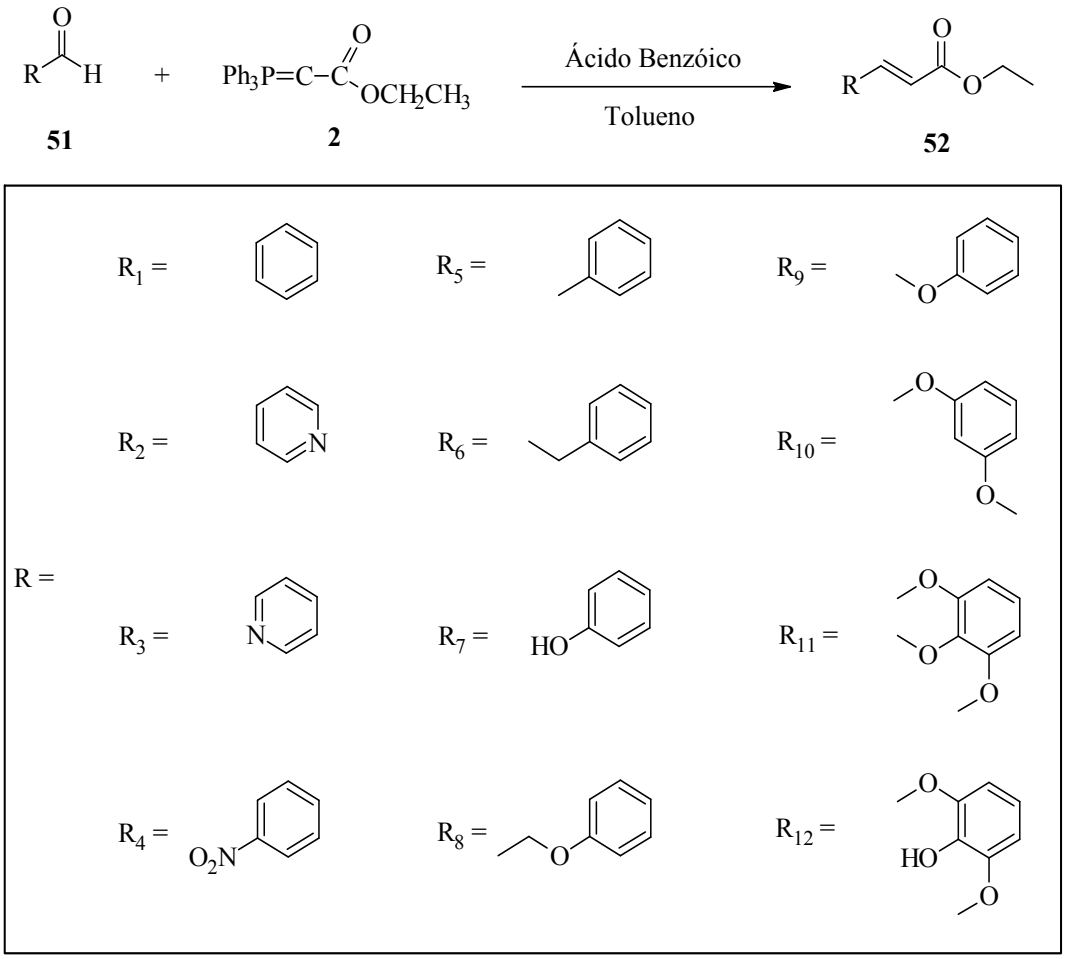


Figura 23: *Preparação dos Ésteres Cinâmicos*

4.2.3 - Preparação das Diidrocumarinas

As diidrocumarinas foram preparadas a partir da reação entre os ésteres cinâmicos recentemente obtidos e fenóis. Ácidos cinâmicos obtidos comercialmente e fenóis, também foram utilizados para esse fim (Figura 24).

Foram pesados, 0,5340 mmol do composto **4** e colocados num balão bitubulado de 50 mL, contendo 30 mL de uma solução de ácido trifluoracético e diclorometano (TFA: CH_2Cl_2) na proporção de 4:1. Adicionou-se ainda, 53,50 mmol do composto **53** (ou **55**).

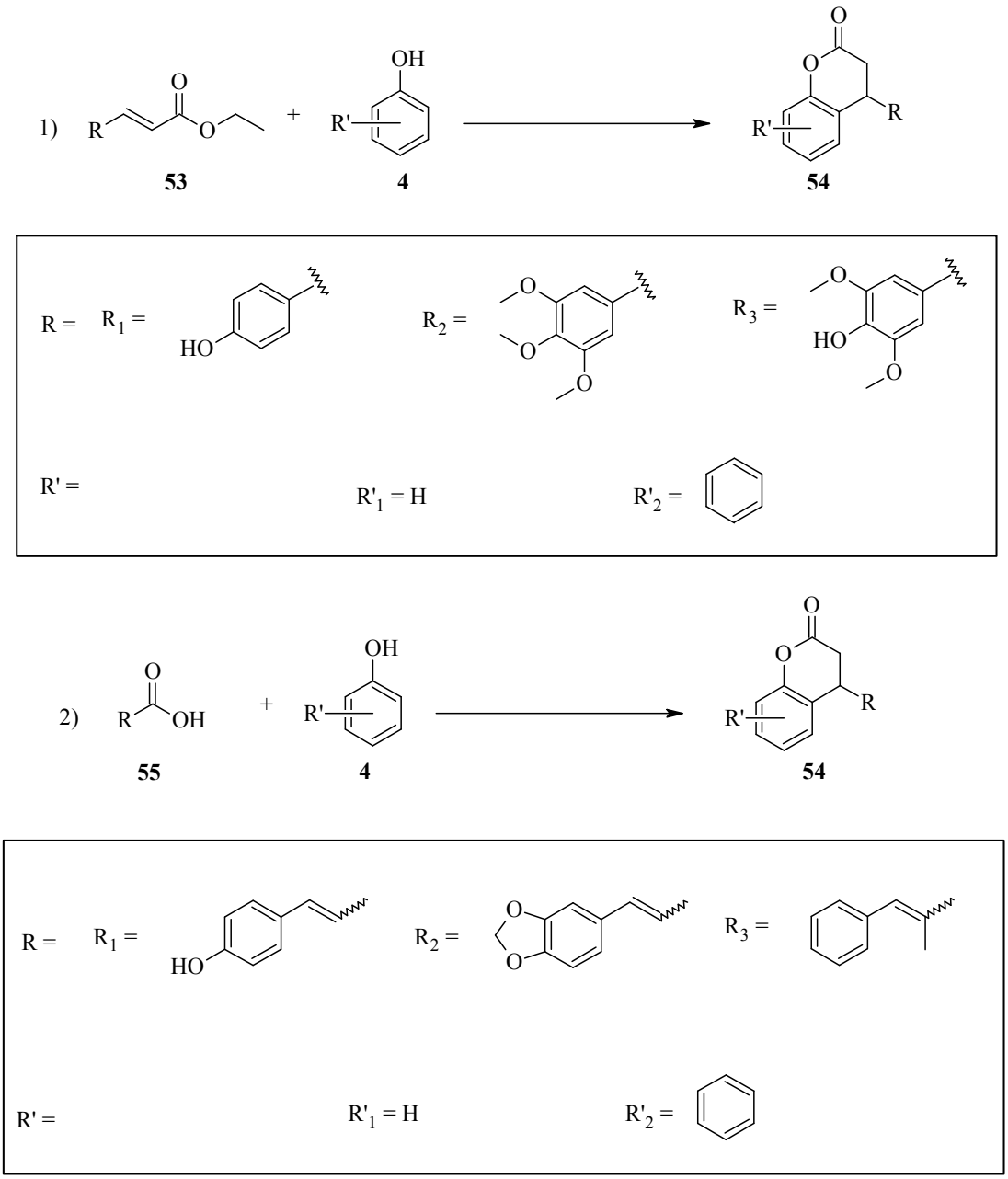


Figura 24: *Obtenção das diidrocumarinas a partir dos ésteres cinâmicos (1) e a partir dos ácidos cinâmicos (2)*

A mistura foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente por (24-36) horas. A reação foi acompanhada por CCD utilizando hexano e acetato de etila como fase móvel. O sistema foi aberto e deixado em repouso por 2 horas (para evaporar o excesso de TFA). Transferiu-se para um funil de separação, onde foram adicionados diclorometano (20 mL),

água (5 vezes o volume de 20 mL), solução de NaOH 0,001 M (3 vezes o volume de 20 mL) e água novamente (2 vezes o volume de 20 mL). A fase orgânica foi retirada do funil, secada com $MgSO_4$ anidro e concentrada à vácuo.

A amostra resultante foi purificada por cromatografia em sílica gel flash, com hexano e acetato de etila.

4.2.4 – Atividade Biológica

- Reagentes e equipamentos:

- Tampões utilizados

Tampão A: Tris 50 mM, pH 8,0

Tampão B: Tris 50 mM, pH 8,0 contendo 0,1 % de soro albumina bovia (BSA).

Tampão C: Tris 50 mM, pH 8, contendo 0,1 M NaCl e 0,02 M de $MgCl_2.6H_2O$

Tampão D: 50 mM NaH_2PO_4, pH 7,6.

- Enzimas

Acetilcolinesterase de peixe elétrico (Tipo VI-S, pó liofilizado, 292 U/mg sólido, 394 U/mg proteína, Sigma, lote: 046K7675) foi utilizada em todos os ensaios em CCD e microplaca utilizando o reagente colorimétrico de Ellmam. A enzima liofilizada foi dissolvida em tampão A para preparar uma solução estoque 1000 U/mL e, posteriormente diluida em tampão B

para obter uma solução de enzima 0,226 U/mL utilizada no ensaio em microplaca ou em tampão A para obter uma solução de enzima 3 U/mL para ser utilizada no ensaio em CCD.

- Substrato

Iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (Sigma-Aldrich®) foi o substrato utilizado nos ensaios em microplaca 15 mM em água Millipore.

- Reagentes colorimétricos

Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich®) ou reagente de Ellman foi utilizado nos ensaio em microplaca 3 mM em tampão C.

- Leitor de microplacas

Placas de poliestireno com 96 poços (300 µL/TPP®) e equipamento leitor de microplacas Thermo Scientific modelo Multiskan FC foi utilizado para medir a absorbância em 412 nm para a reação enzimática no ensaio em microplaca.

- Procedimento:

Em leitor de microplaca de 96 poços, foram adicionados em sequência os reagentes a seguir: 25 µl da solução aquosa do substrato, 125 µL de uma solução do reagente de Ellman, 50 µL de tampão B e 25 µl da solução de amostra e a absorbância monitorada a cada 10 s durante 230 s em 412 nm. Após esse período 25 µL de uma solução aquosa de enzima AChE foram adicionados e a absorbância novamente monitorada a cada 10 s durante 230s em 412 nm.

- Cálculo:

As porcentagens de inibição foram calculadas comparando-se as taxas das reações das amostras com a taxa de reação do controle (solvente utilizado para solubilizar cada amostra) através da equação:

$$\%\,inibição \;= 100 - \frac{T_{ra}}{T_{rc}} x100 \qquad \textbf{Eq. (3)}$$

Onde:

$T_{ra} =$ Taxa da reação da amostra

$T_{rc} =$ Taxa da reação de controle

A concentração de cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados avaliados através dos valores médios, considerando apenas aqueles com desvio padrão menores do que 6%.

As taxas das reações foram calculadas utilizando software apropriado (GraphPad Prism versão 5.0). Qualquer aumento da absorbância antes da adição da enzima devido à hidrólise espontânea do substrato foi corretamente corrigido subtraindo-se a taxa da reação antes da adição da enzima da taxa obtida após a adição da enzima.

5 – Resultados e Discussão

A seguir serão discutidas todas as etapas sintéticas realizadas, assim como os aspectos mais relevantes da análise estrutural e também a análise da relação entre estrutura molecular e atividade biológica.

5.1 – Síntese do Etoxicarbonilmetileno(trifenil)fosforano (EcTF)

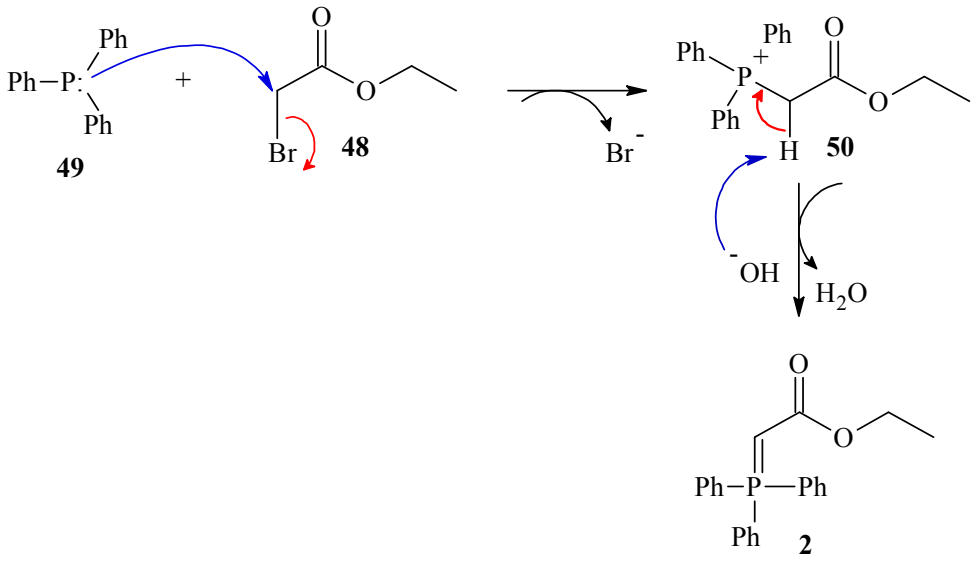
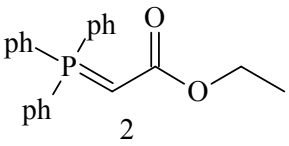


Figura 25: *Mecanismo de formação do EcTF*

O (EcTF) foi sintetizado de acordo com o protocolo descrito no procedimento experimental. A primeira etapa consiste na formação do sal de fosfônio após substituição nucleofílica da trifenilfosfina com o bromoacetato de etila, que ficou evidenciado pela formação de um precipitado branco no sistema de refluxo após poucas horas de reação. Na segunda etapa, o produto de interesse foi formado após a eliminação de água em meio básico com rendimento de 92%.

- Dados:



Name: Etoxicarbonilmetileno(trifenil)fosforanc

Ponto de Fusão: (139 - 140,2) ºC

5.2 – Síntese dos Ésteres Cinâmicos

Iniciou-se a síntese dos ésteres cinâmicos através da reação de Wittig.

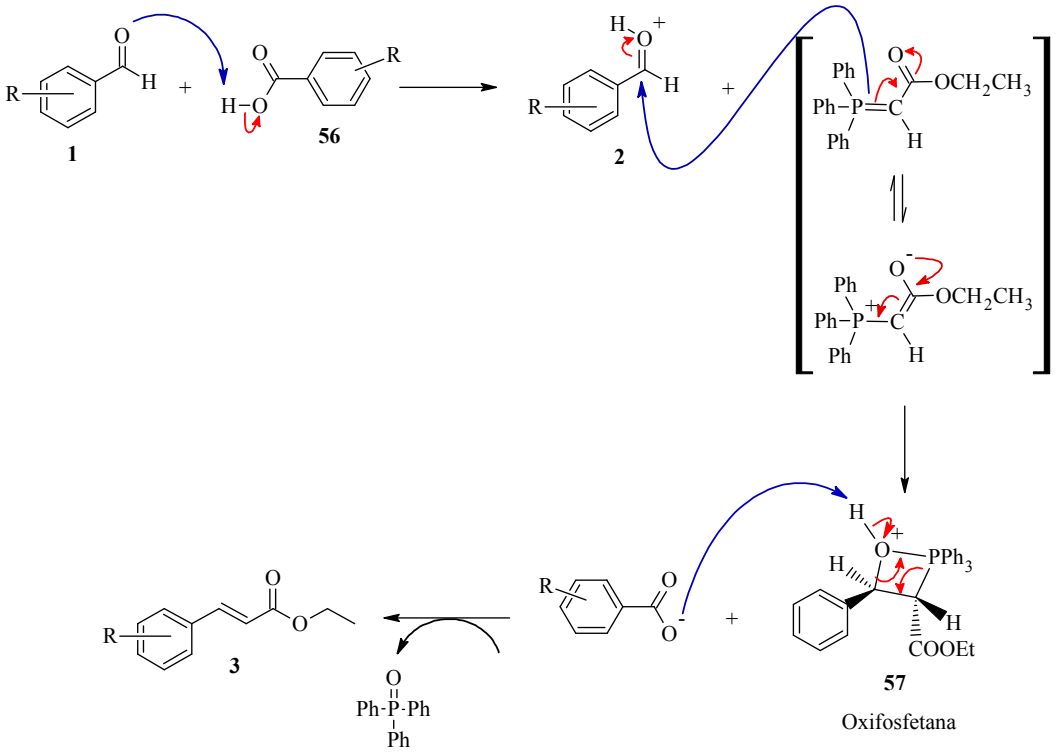


Figura 26: *Mecanismo de reação do Éster Cinâmico*

O EcTF tem a carga do carbânion estabilizada devido a ressonância desses elétrons com a carbonila ao seu lado (figura 26). Portanto, tem-se uma Ilida menos reativa, o que justifica o uso de ácido benzóico como catalizador.

Outra consequência da utilização desse tipo de Ilida é a formação induzida do isômero *E*, que é o mais estável (observado através da análise dos

espectros de RMN). De fato, em todas as reações foi verificada apenas a formação desse isômero com rendimentos apreciáveis, entre 47% e 70%.

Foi possível verificar, através dos espectros de infravermelho (em anexo), o aparecimento de bandas de absorção características dos compostos sintetizados. Observou-se uma banda larga no intervalo de 1690 à 1740 cm^{-1} referente ao estiramento da carbonila (C=O) e duas bandas médias entre 1625 e 1640 cm^{-1}, característica do estiramento da ligação carbono-carbono (C=C). Tem-se também um sinal duplo entre 1000 e 1300 cm^{-1} referente ao estiramento simétrico da ligação C — O.

Tabela 1: *Correlação entre as bandas de absorção em infravermelho e os grupos funcionais para os ésteres cinâmicos obtidos.*

Composto	C=O	C=C	C — O
58	1709	1637	1181
59	1706	1639	1125
60	1707	1643	1119
61	1710	1645	1175
62	1702	1631	1199
63	1709	1636	1120
64	1711	1641	1118
65	1706	1636	1041
66	1705	1604	1030
67	1708	1639	1064
68	1692	1634	1006
69	1703	1633	1036

Através dos espectros de ^{1}H RMN foram analisados os diferentes deslocamentos químicos (δ) entre os sinais de multipletos. Desse modo, foi

possível confirmar as estruturas propostas para os ésteres cinâmicos analisados. Atribuiu-se o sinal do tripleto que aparece próximo de 1,3 ppm aos hidrogênios ligados ao carbono 12 (figura 26) vizinhos a dois hidrogênios acoplados com $(J \cong 7{,}1Hz)$.

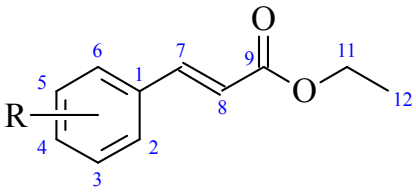
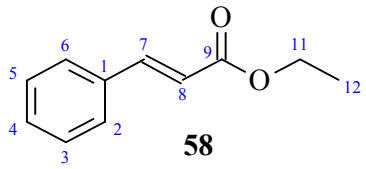


Figura 27: *Estrutura molecular dos ésteres cinâmicos*

Um quarteto foi identificado próximo a 4,2 ppm e atribuído aos hidrogênios do carbono 11, porque existem três hidrogênios adjacentes acoplados $(J \cong 7{,}2Hz)$.

Observou-se também a presença de dupletos na região entre 6,5 e 7,0 ppm que caracterizam os dois hidrogênios da ligação dupla. E ainda, sinais na região entre 7,0 e 9,0 ppm, características de prótons de anel aromatico.

- Dados dos produtos obtidos:



58

Descrição: Sólido cristalino e transparente

Name: 3-Fenil-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (137,9 - 138,8) ºC

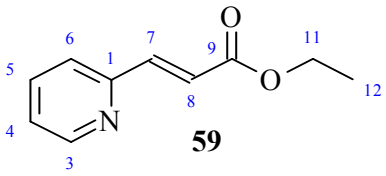
Rendimento: 50 %

Tabela 2: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***58***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,34	H-12	t	7,14
4,27	H-11	q	7,18
6,45	H-7 e H-8	d	15,91
7,38	H-3, H-4, H-5	m	-
7,48 - 7,56	H-2	m	-
7,70	H-6	d	15,91

Tabela 3: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***58***

δ (ppm)	Atribuição
14,21	C-12 (CH_3)
60,40	C-11 (CH_2)
118,12 e 127,93	C-7 e C-8 (C=C)
128,76	C-1 (C)
130,11	C-2 e C-3 (CH)
134,32	C-5 e C-6 (CH)
144,49	C-4 (CH)
166,89	C-9 (C=O)



59

Descrição: Sólido amarelo claro

Name: 3-(2-piridin)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (65,5 - 66,7) ºC

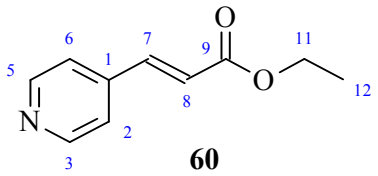
Rendimento: 48 %

Tabela 4: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***59***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,26	H-12	t	7,10
4,20	H-11	q	7,18
6,85	H-8	d	15,85
7,36	H-7	d	7,80
7,15 – 7,23	H-3	m	-
7,55 – 7,69	H-4 e H-5	m	-
8,40 – 8,70	H-6	m	-

Tabela 5: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***59***

δ (ppm)	Atribuição
14,04	C-12 (CH_3)
60,43	C-11 (CH_2)
122,31 e 124,03	C-7 e C-8 (C=C)
136,66	C-1 (C)
142,96	C-6 (CH)
149,80	C-3 e C-5 (CH)
152,65	C-4 (CH)
166,46	C-9 (C=O)



60

Descrição: Sólido branco a amarelo claro

Name: 3-(4-piridin)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (57,5 - 59,1) ºC

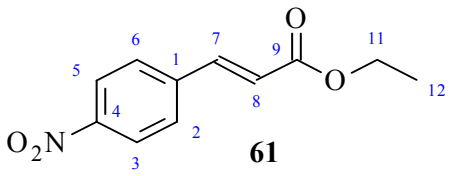
Rendimento: 54 %

Tabela 6: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***60***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,28	H-12	t	7,18
4,22	H-11	q	7,07
6,56	H-8	d	15,85
7,18 – 7,22	H-7	m	-
7,32 – 7,54	H-2 e H-6	m	-
7,55 – 7,67	H-3 e H-5	m	-

Tabela 7: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***60***

δ (ppm)	Atribuição
14,18	C-12 (CH_3)
61,04	C-11 (CH_2)
123,63 e 128,38	C-7 e C-8 (C=C)
131,96	C-1 (C)
141,11	C-2 e C-6 (CH)
149,42	C-3 e C-5 (CH)
165,80	C-9 (C=O)



61

Descrição: Sólido amarelo cristalino

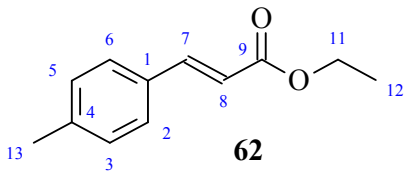
Name: 3-(4-nitrofenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (128,9 - 131,0) ºC

Rendimento: 68 %

Tabela 8: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***61***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,34	H-12	t	7,14
4,26	H-11	q	7,01
6,30	H-8	d	16,09
6,85	H-2 e H-6	d	8,56
7,43	H-3 e H-5	d	8,56
7,63	H-7	d	16,09



62

Descrição: Sólido branco

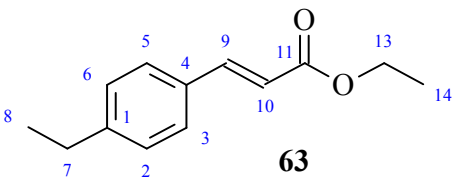
Name: 3-(4-metilenofenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (71,2 - 72,0) ºC

Rendimento: 49 %

Tabela 9: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***62***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,36	H-12	t	7,14
1,57	H-13	s	-
4,31	H-11	q	7,27
6,57	H-6	d	16,09
7,68	H-7 e H-8	d	8,56
7,71 – 7,79	H-2	m	-
8,26	H-3 e H-5	d	8,82



63

Descrição: Sólido branco

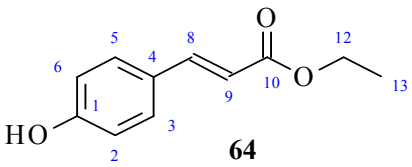
Name: 3-(4-etilenofenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (65,5 - 66,7) ºC

Rendimento: 49 %

Tabela 10: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***63***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,47	H-8 e H-14	t	7,01
4,03 - 4,18	H-7 e H-13	m	-
7,02	H-3 e H-5	s	-
7,43 - 7,53	H-2	m	-
7,61 - 7,73	H-6	m	-
7,79 - 7,91	H-9 e H-10	m	-



64

Descrição: Óleo branco a transparente

Name: 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoato de etila

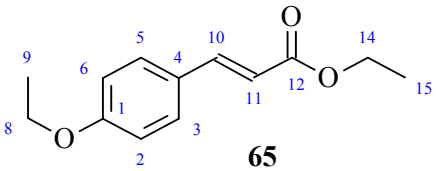
Rendimento: 61 %

Tabela 11: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***64***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,34	H-13	t	7,10
4,26	H-12	q	7,12
6,29	H-3	d	16,07
6,86	H-8 e H-9	d	8,74
7,41	H-2 e H-6	d	8,89
7,63	H-5	d	15,91

Tabela 12: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***64***

δ (ppm)	Atribuição
14,28	C-13 (CH_3)
60,53	C-12 (CH_2)
115,15 e 115,89	C-8 e C-9 (C=C)
126,73	C-4 (C)
129,94	C-3 e C-5 (CH)
144,73	C-2 e C-6 (CH)
158,33	C-1 (C)
167,88	C-10 (C=O)



65

Descrição: Sólido branco cristalino

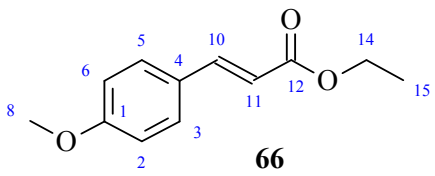
Name: 3-(4-etoxifenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (153,4 - 155,0) ºC

Rendimento: 49 %

Tabela 13: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***65***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,33	H-15	t	7,14
1,43	H-9	t	7,14
4,06	H-8	q	7,01
4,25	H-14	q	7,01
6,30	H-11	d	15,83
6,89	H-3 e H-5	d	8,82
7,46	H-2 e H-6	d	8,82
7,64	H-10	d	16,09



66

Descrição: Sólido branco

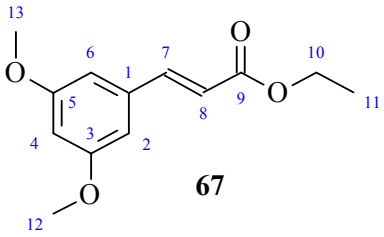
Name: 3-(4-metoxifenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (156,5 - 156,9) ºC

Rendimento: 59 %

Tabela 14: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***66***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,26	H-15	t	7,14
3,77	H-8	s	-
4,18	H-14	q	7,27
6,24	H-11	d	16,09
6,83	H-3 e H-5	d	8,82
7,41	H-2 e H-6	d	8,56
7,57	H-10	d	15,83



67

Descrição: Óleo amarelo

Name: 3-(3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila

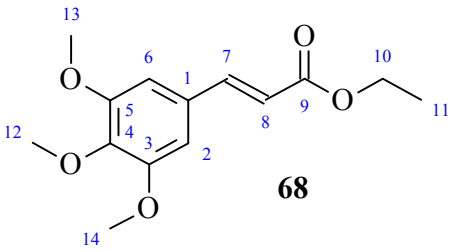
Rendimento: 60 %

Tabela 15: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***67***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,34	H-11	t	7,10
3,80	H-12 e H-13	s	-
4,26	H-10	q	7,07
6,41	H-8	d	16,07
6,47 - 6,51	H-4	m	-
6,66	H-2 e H-6	d	2,18
7,60	H-7	d	15,91

Tabela 16: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***67***

δ (ppm)	Atribuição
14,25	C-11 (CH_3)
55,33	C-12 e C-13 (CH_3)
60,49	C-10 (CH_2)
102,42 e 105,82	C-7 e C-8 (C=C)
118,67	C-1 (C)
136,23	C-2 e C-6 (CH)
144,52	C-3 e C-5 (C)
160,90	C-4 (CH)
166,92	C-9 (C=O)



68

Descrição: Sólido branco

Name: 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (66,0 - 68,6) ºC

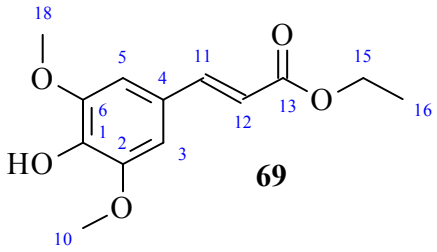
Rendimento: 60 %

Tabela 17: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***68***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,34	H-11	t	7,10
3,89	H-12, H-13 e H-14	s	-
4,26	H-10	q	7,07
6,35	H-8	d	15,91
6,75	H-2 e H-6	s	-
7,60	H-7	d	15,83

Tabela 18: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***68***

δ (ppm)	Atribuição
14,28	C-11 (CH_3)
56,08	C-12, C-13 e C14 (CH_3)
60,92	C-10 (CH_2)
105,10 e 117,46	C-7 e C-8 (C=C)
129,92	C-1 (C)
139,97	C-2 e C-6 (CH)
144,52	C-3 e C-5 (C)
153,37	C-4 (C)
166,91	C-9 (C=O)



69

Descrição: Sólido amarelo cristalino

Name: 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (69,7 - 70,0) ºC

Rendimento: 70 %

Tabela 19: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***69***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,33	H-16	t	7,18
3,91	H-10, H-18	s	-
4,25	H-15	q	7,20
6,29	H-12	d	15,91
6,76	H-3 e H-5	s	-
7,59	H-11	d	15,91

Tabela 20: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***69***

δ (ppm)	Atribuição
14,28	C-16 (CH_3)
56,24	C-10, C-18 (CH_3)
60,35	C-15 (CH_2)
104,93 e 115,90	C-11 e C-12 (C=C)
125,84	C-4 (C)
137,00	C-3 e C-5 (CH)
144,83	C-2 e C-6 (C)
147,13	C-1 (C)
167,14	C-13 (C=O)

5.3 – Síntese das Diidrocumarinas

As diidrocumarinas foram preparadas á partir de três ésteres cinâmicos obtidos por via sintética e três ácidos cinâmicos comerciais.

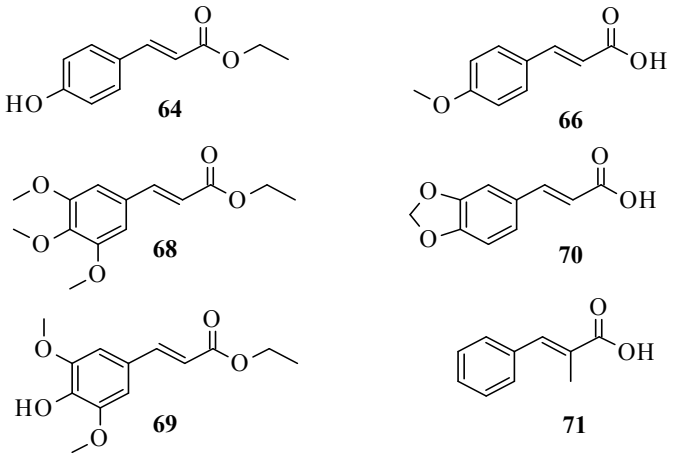


Figura 28: *Ésteres e Ácidos Cinâmicos utilizados na síntese da Diidrocumarina*

Dentre os compostos, escolheram-se aqueles cuja molécula apresentava maior variabilidade e complexidade estrutural para a análise comparativa entre atividade biológica e estrutura molecular. Os demais compostos sintetizados serço utilizados em outros trabalhos.

A reação de hidroarilação observada no mecanismo na figura 29 abaixo tem uma característica importantíssima, a formação de um centro quiral no produto, podendo formar esterioisômeros.

Durante as primeiras horas de síntese, percebeu-se uma evidente alteração na cor da mistura em todas as reações. Verificou-se também o surgimento de cristais nas paredes do balão após 12 horas de reação. Os rendimentos das reações variaram entre 39% a 97%.

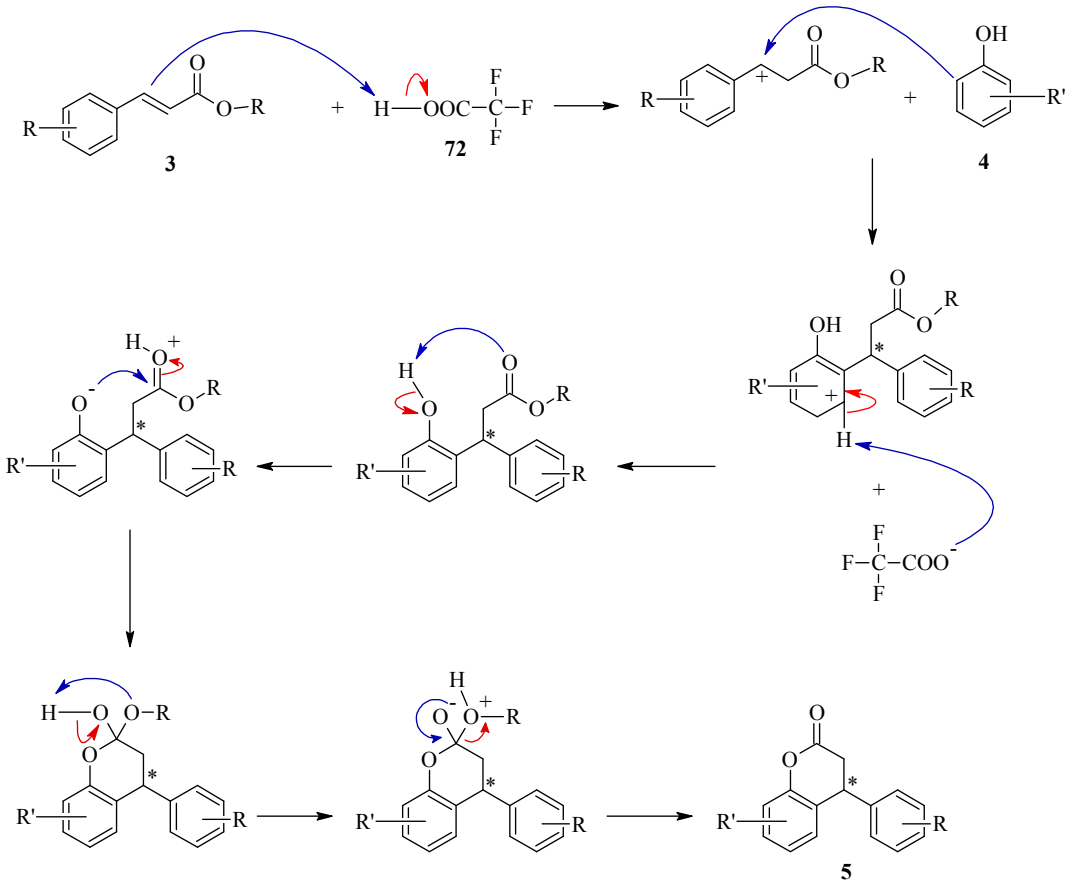


Figura 29: *Mecanismo de reação das Diidrocumarinas*

A evidência mais relevante da formação do produto, após análise do espectro de infravermelho foi o deslocamento do sinal para estiramento da carbonila. Nos ésters cinâmicos os elétrons da carbonila estão conjugados com os da ligação dupla, em consequência, a posicão do sinal é deslocado para o intervalo de 1690 e 1740 cm^{-1}. A ligação dupla é consumida na reacão, formando as diidrocumarinas (lactonas cíclicas). A perda da conjugação provoca o deslocamento do sinal para o intervalo de 1735 e 1770 cm^{-1}.

Foi verificado também o desaparecimento da banda correspondente ao estiramento da ligação C=C no intervalo entre 1625 e 1640 cm^{-1} e o aparecimento de uma banda de absorção para o estiramento simétrico da ligação C—O caracterizado por um sinal forte entre 1000 e 1300 cm^{-1}.

Tabela 21: *Correlação entre as bandas de absorção em infravermelho e os grupos funcionais para as diidrocumarinas obtidas.*

Composto	C=O
73	1758
74	1762
75	1766
76	1773
77	1764
78	1742
79	1740

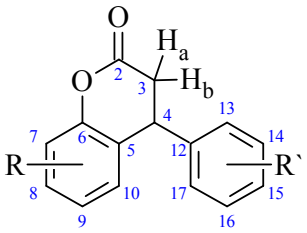
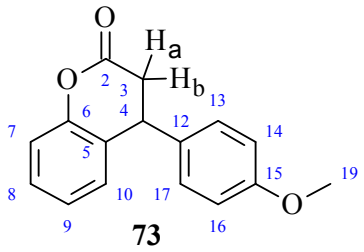


Figura 30: *Estrutura molecular das Diidrocumarinas*

Foi possível confirmar as estruturas da maioria dos compostos esperados através dos espectros de RMN de ^{1}H. É característico de todas as diidrocumarinas um par de duplos dubletos (Figura 30), cada um integrado para um átomo de hidrogênio, na região entre 3,0 e 3,3 ppm (J=15,5 Hz e 8,3 Hz aproximadamente), devido ao acoplamento dos hidrogenios H_a-3 e H_b-3 (não equivalentes) com o hidrogênio H-4, respectivamente. Outro duplo dubleto é verificado na região entre 4,0 e 4,6 ppm (J = 7,8 Hz e 6,2 Hz, aproximadamente), representando o hidrogênio H-4. Os demais sinais são de hidrogênios dos anéis aromáticos, que tem seus sinais no intervalo de 6,5 a 9,0 ppm.

-Dados dos produtos obtidos:



73

Descrição: Sólido branco a amarelo

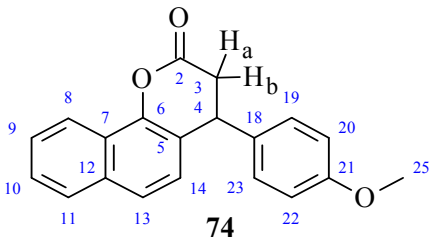
Name: 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona

Ponto de Fusão: (120,1 - 121,9) ºC

Rendimento: 44 %

Tabela 22: *Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto* ***72***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3,00	H_a-3	dd	15,57 e 8,30
3,07	H_b-3	dd	15,83 e 5,97
3,81	H-19	s	-
4,31	H-4	dd	7,8 e 6,2
6,89	H-14 e H-17	d	8,82
6,99	H-13	d	7,01
7,09	H-8, H-9, H-10	d	8,56
7,14	H17	d	6,75
7,31	H-7	s	-



74

Descrição: Sólido branco a castanho

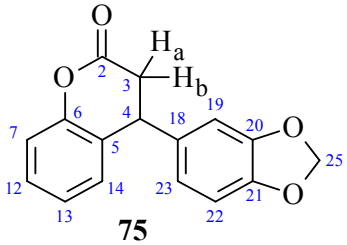
Name: 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona

Ponto de Fusão: (123,5 - 125,0) ºC

Rendimento: 57 %

Tabela 23: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***73***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3,09	H_a-3	dd	15,83 e 6,75
3,19	H_b-3	dd	15,83 e 6,23
3,79	H-25	s	-
4,45	H-4	dd	7,93 e 6,21
6,87	H-20 e H-22	d	8,82
7,10	H-8, H-9, H-10	m	-
7,57	H-11, H-13, H-14	d	8,56
7,83	H19	d	6,75
8,31	H-23	s	-



75

Descrição: Sólido branco

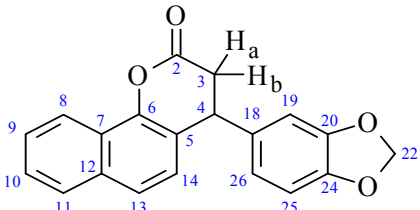
Name: 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona

Ponto de Fusão: (125,9 - 128,1) ºC

Rendimento: 39 %

Tabela 24: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***74***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
2,97	H_a-3	dd	15,83 e 7,79
3,06	H_b-3	dd	15,83 e 5,97
4,28	H-4	dd	7,50 e 6,50
5,97	H-25	s	-
6,62	H-12 e H-13	s	-
6,78	H-22	d	8,30
7,02	H-23	d	8,30
7,12	H-7 e H-14	m	-
7,31	H-19	m	-



76

Descrição: Sólido branco

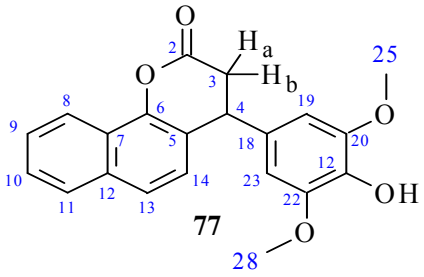
Name: 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona

Ponto de Fusão: (126,0 - 128,9) ºC

Rendimento: 45 %

Tabela 25: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***75***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3,08	H_a-3	dd	15,83 e 6,49
3,19	H_b-3	dd	15,83 e 6,23
4,42	H-4	dd	7,22 e 6,44
5,95	H-22	s	-
6,63	H-14 e H-15	m	-
6,77	H-9	d	8,56
7,14	H-10	d	8,56
7,58	H-19, H-25 e H-26	m	-
7,84	H-8	d	7,79
8,32	H-11	d	8,30



Descrição: Sólido Marron

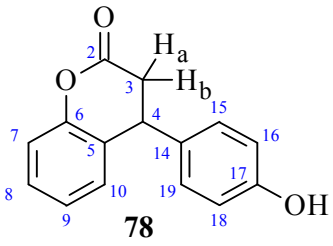
Name: 4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona

Ponto de Fusão: (109,1 - 111,2) ºC

Rendimento: 39 %

Tabela 26: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***76***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3,11	H_a-3	dd	15,83 e 7,53
3,20	H_b-3	dd	15,83 e 6,23
3,82	H-25 e H-28	s	-
4,42	H-4	dd	7,53 e 6,23
6,41	H-19 e H-23	s	-
7,12	H-8	d	8,30
7,58	H-9, H-10 e H-11	m	-
7,85	H-13	d	7,78
8,32	H-14	d	8,30



78

Descrição: Sólido branco a amarelo

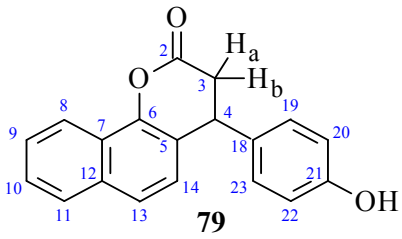
Name: 4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona

Ponto de Fusão: (61,1 - 62,0) ºC

Rendimento: 86 %

Tabela 27: *Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto 77*

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3,09	H_a-3	dd	15,57 e 6,49
3,19	H_b-3	dd	15,83 e 6,49
4,44	H-4	dd	7,83 e 6,56
6,80	H-16 e H-18	d	8,56
7,04	H-15 e H-19	d	8,56
7,12	H-7	d	8,30
7,57	H-8	m	-
7,84	H-9	d	8,04
8,32	H-10	d	7,53



79

Descrição: Sólido branco a amarelo

Name: 4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona

Ponto de Fusão: (63,3 - 64,1) ºC

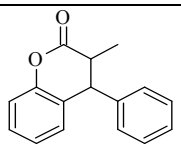
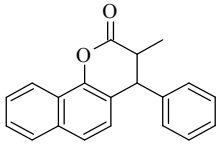
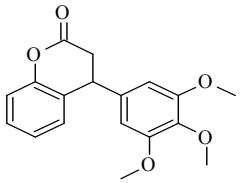
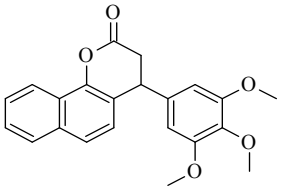
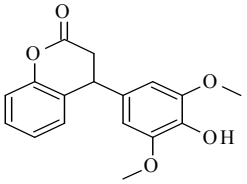
Rendimento: 97 %

Tabela 28: *Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto* ***78***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3,09	H_a-3	dd	15,83 e 6,49
3,19	H_b-3	dd	15,83 e 6,23
4,45	H-4	dd	7,83 e 6,56
6,80	H-20 e H-22	d	8,82
7,05	H-19 e H-23	d	8,56
7,13	H-8	d	8,56
7,57	H-9, H-10 e H-11	m	-
7,84	H-13	d	8,56
8,32	H-14	d	8,82

Entretanto, em algumas reações não foi verificado a formação do produto de interesse. Estes estão disponíveis na tabela 29.

Tabela 29: *Relação dos compostos esperados que não se formaram nas sínteses*

Nome	Estrutura Molecular
3-metil-4-fenil-3,4-diidro-2-cromenona	 **80**
3-metil-4-fenil-3,4-diidro-2-benzocromenona	 **81**
4-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona	 **82**
4-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona	 **83**
4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona	 **84**

Esperava-se que todos os compostos acima fossem formados após reação com o fenol e o naftol com os ésteres e ácidos cinâmicos respectivamente, o que não foi observado.

O insucesso na formação dos compostos **80** e **81** da tabela 29 acima pode ser atribuído a estabilidade do carbocátion formado após o ataque nucleofílico da dupla ligação ao TFA. Esse carbocátion é vizinho ao grupo fenil a esquerda e a um carbono α-carbonila metilado a direita (figura 31).

O impedimento estérico, também promovido pela metila, pode impossibilitar a aproximação do fenol para a substituição eletrofílica aromática com o carbocátion.[24-26]

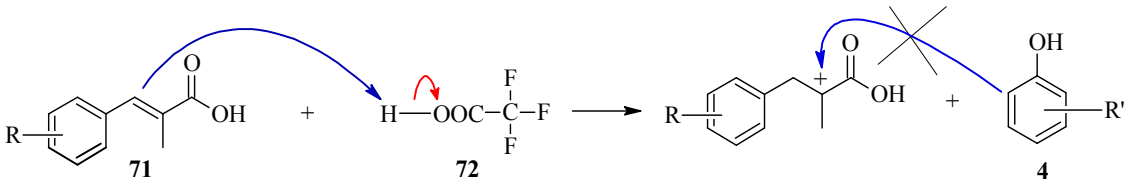


Figura 31: *Formação de um carbocátion estável, impossibilitando a substituição eletrofílica aromática.*

A presença de um grupo metoxi (OCH_3) nas posições 3 e 5 do anel aromático no composto **68** pode influenciar a sua reatividade. O metoxi é um grupo desativante do anel para a posição *meta* por efeito indutivo. O carbono meta desativado nesse caso é vizinho ao carbocátion, tornando-o extremamente instável, com tempo de vida pequeno e insuficiente para sofrer o ataque nucleofílico do fenol na próxima etapa da reação. Em consequência, o produto não se forma ou é obtido em pequeno rendimento. No caso dos compostos **82** e **83**, não houve formação do produto.[24-26]

Além disso, as reações de hidroarilação de ésteres e ácidos cinâmicos na presença do fenol são mais eficientes quanto maior o número de grupos doadores de elétrons ligados ao fenol. Isso significa que a reação é favorecida quando acontece na presença de fenóis com maior força nucleofílica.[21]

Na reação entre o composto **69** com o fenol, deveria ser formado o produto **84**. Porém, de forma surpreendente, os espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C em 2D (HMBC) em anexo, mostraram que houve a formação de um produto inesperado (figura 32).

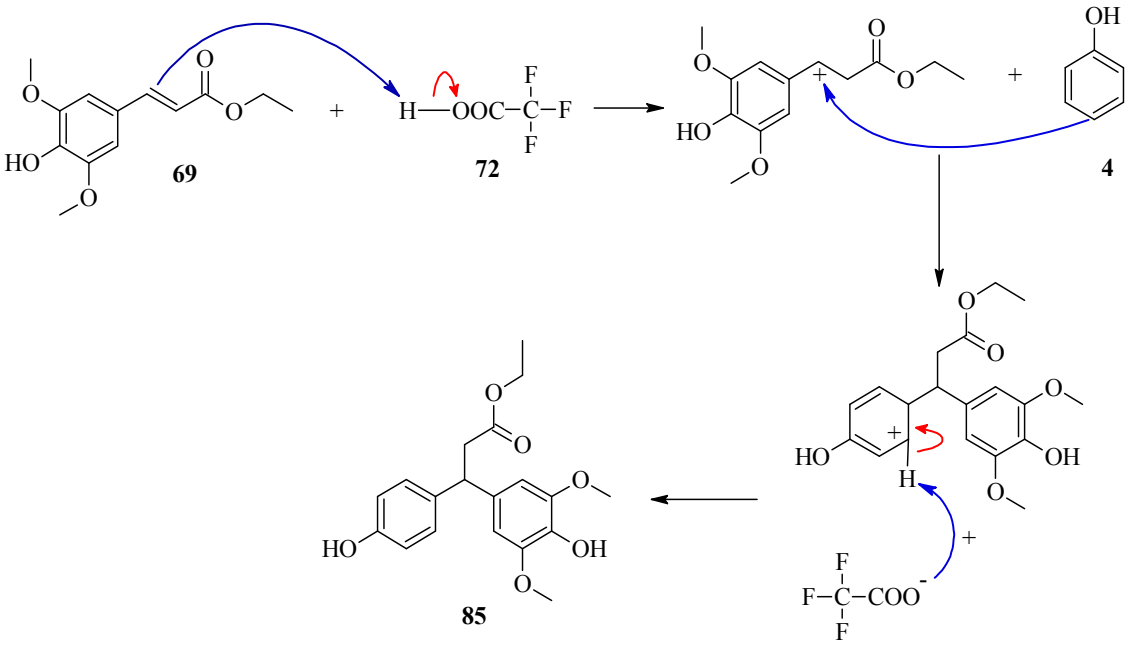


Figura 32: *Formação de um produto Cíclico*

O carbocátion formado na primeira etapa é instável, por motivos já explicados anteriormente, no entanto houve formação do produto em rendimento baixo (40,7%).

A explicação mais plausível seria o equilíbrio no estado de transição. Sabe-se que nesse momento, existem duas possibilidades de ataque nucleofílico pelo fenol: um a posição *orto e* outro a posição *para*.[26]

Inicialmente, observa-se que o ataque nucleofílico através da posição *orto* é desfavorecido por impedimento estérico, entretanto, forma um produto final mais estável. Portanto, no primeiro momento o ataque nesta posição não é favorável (mais lento), mas na medida em que a reação se processa o

equilíbrio é deslocado no sentido da formação do produto cíclico, muito estável (controle termodinâmico).[26]

Por outro lado, como o carbocátion formado tem um tempo de vida muito pequeno no estado de transição, acaba favorecendo a reação que ocorre mais rapidamente, característica do controle cinético. Neste caso o ataque nucleofílico ocorre na posição *para*, deslocando o equilíbrio no sentido da formação do produto não cíclico.[26]

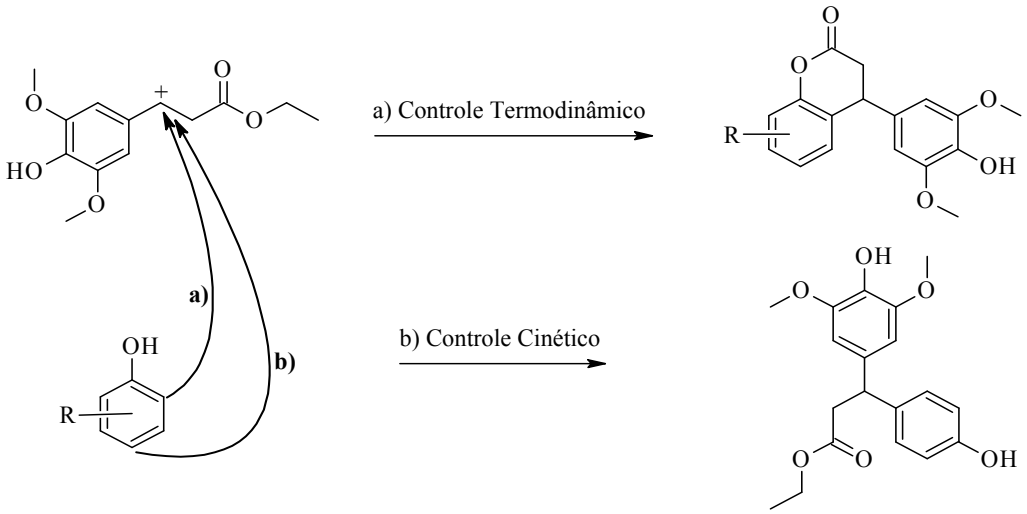
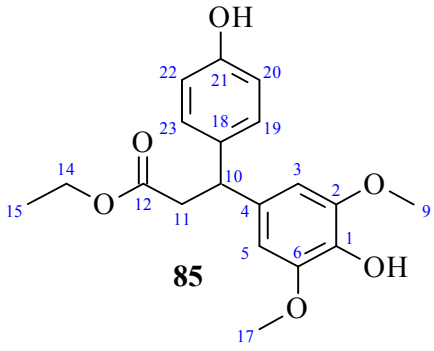


Figura 33: *Duas possibilidades de reação: controle cinético e controle termodinâmico.*

O produto cíclico pode ser favorecido pela utilização de nucleófilos mais fortes e o produto não cíclico pelo aquecimento, o que foi observado. A reação realizada a partir do naftol (nucleófilo mais forte) foi capaz de produzir o composto ciclico esperado.[26]



85

Descrição: Sólido branco a amarelo

Name: 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-(4-hidroxifenil)-propanoato de etila

Ponto de Fusão: (64,2 - 65,5) ºC

Rendimento: 41 %

Tabela 30: *Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto* ***85***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,15	H-15	t	7,14
2,97	H-11	d	8,04
3,84	H-9 e H-17	s	-
4,05	H-14	q	7,01
4,42	H-10	t	8,04
6,44	H-3 e H-5	s	-
6,75	H-19 e H-23	d	8,56
7,10	H-20 e H-22	d	8,30

No espectro de RMN de ^1H (Figura 34 e em anexo), observa-se o aparecimento de dois dubletos típicos de acoplamento spin de um sistema AA'BB' para anel aromático 1-4 substituído. Estes hidrogênios estão presentes em δ_H = 6,75 ppm e δ_H = 7,10 integrados com dois hidrogênios cada e constante de acoplamento de 8,56 Hz e 8,30Hz respectivamente.

Neste mesmo espectro, verificou-se a presença de um tripleto em δ_H = 1,15 integrado para três hidrogênios, um dubleto em δ_H = 2,97 integrado para 2 hidrogênios, um singleto em δ_H = 3,87 integrados para os 6 hidrogênios metílicos, um quarteto em δ_H 4,05 integrado para 2 hidrogênios e um tripleto em δ_H = 4,42 integrado para 1 hidrogênio e por fim um singleto na região dos aromáticos δ_H = 6,44 integrado para dois hidrogênios. Essas informações confirmaram a formação do composto em questão.

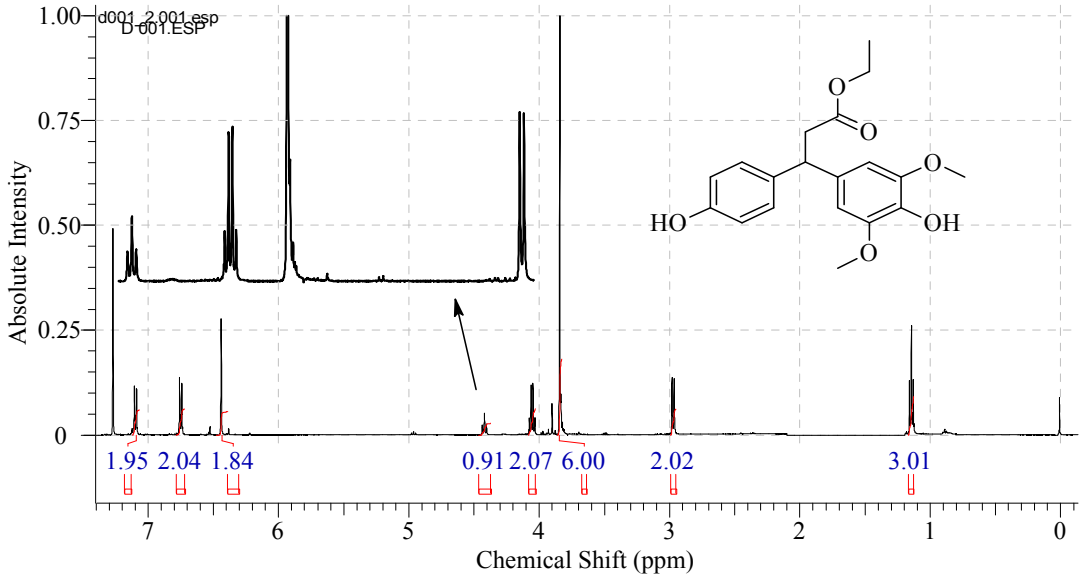


Figura 34: *Espectro de RMN-* ^{1}H *do composto* ***85***

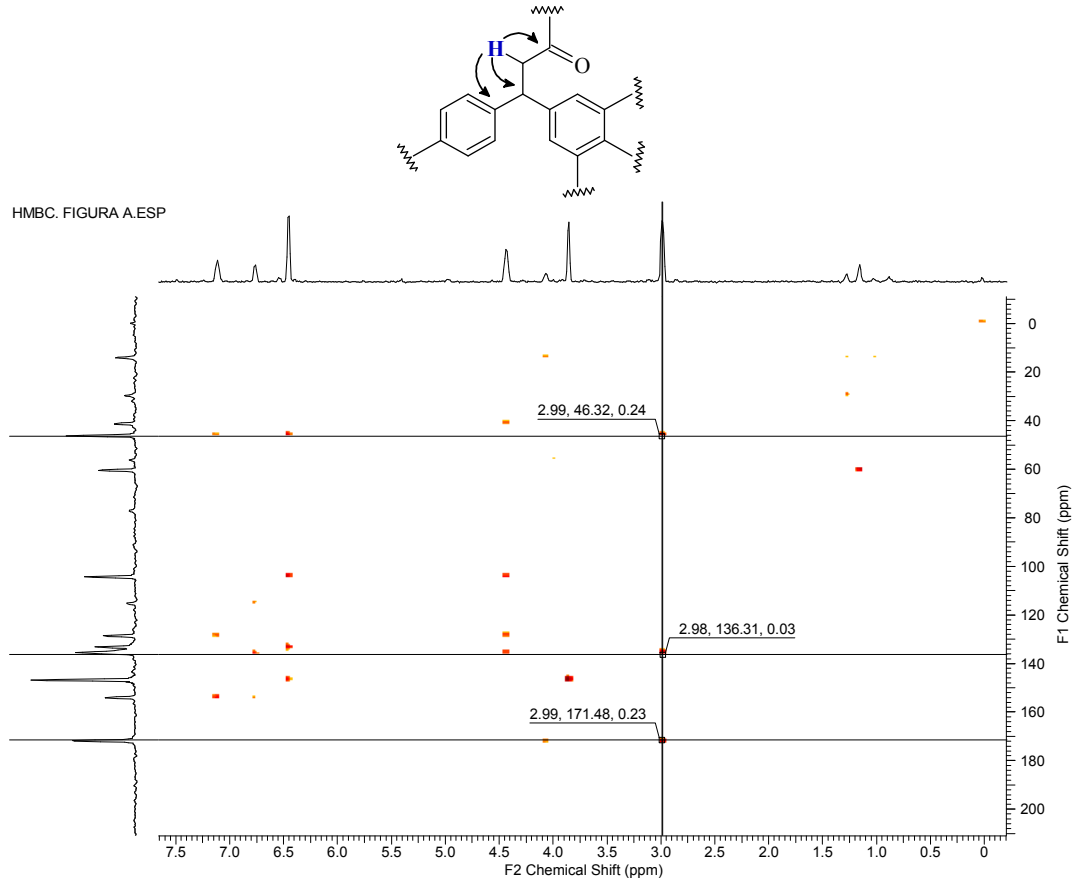


Figura 35: *Espectro de HMBC - Correlações entre o dubleto* $\delta_H = 2,97$ *e os sinais de carbonos* $\delta_C = 136,3$, $\delta_C = 46,3$ *e* $\delta_C = 171,5$.

A fim de eliminar qualquer tipo de dúvida, fez-se necessária a técnica de RMN em 2D via HMBC. A utilização dessa ferramenta é interessante porque possibilita analisar o acoplamento de hidrogênios e carbonos a longa distância.

Observou-se no espectro de HMBC a correlação entre o dubleto em δ_H = 2,97 com o sinal em δ_C = 136,3 referente ao carbono no anel aromático 1-4 substituído; em δ_C = 46,3 correspondente ao carbono assimétrico e ainda em δ_C = 171,5 referente ao carbono carbonílico (Figura 35)

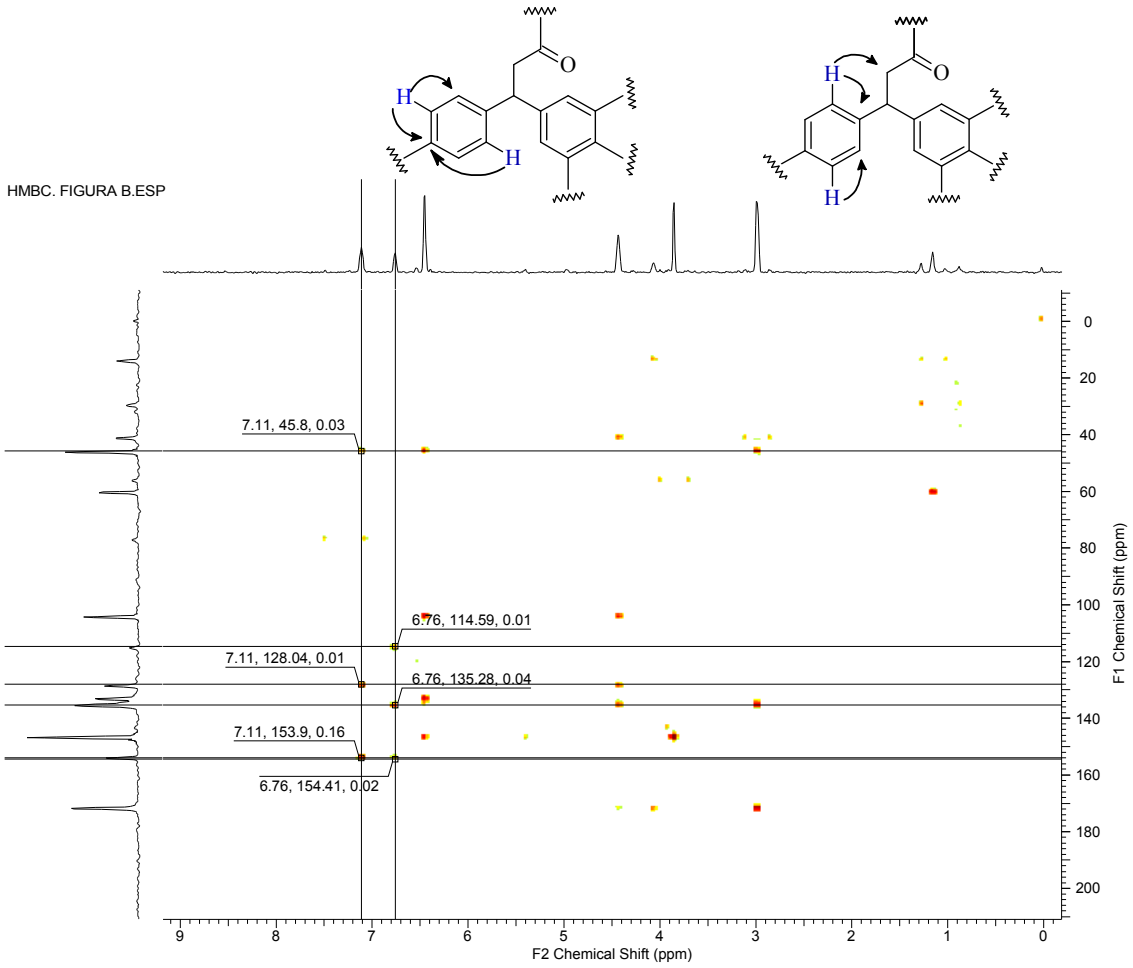


Figura 36: *Espectro de HMBC - Correlações entre os dubletos δ_H = 6,75 e δ_H = 7,10 com os sinais de carbono em δ_C = 136,3, δ_C = 114,6, δ_C = 134,3 e δ_C = 153,4 e em δ_C = 45,8, δ_C = 128,0 e δ_C = 153,9, respectivamente*

A figura 36 mostra dois dubletos do sistema AA'BB' δ_H = 6,75 e δ_H = 7,10 acoplam-se com os sinais de carbono em δ_C = 114,6, δ_C = 134,3 e δ_C = 153,4 e em δ_C = 45,8, δ_C = 128,0 e δ_C = 153,9, respectivamente.

Pode se verificar na figura 37 que os hidrogênios do singleto observado em δ_H = 6,44, acoplam-se com os carbonos aromáticos em δ_C = 133,7 e δ_C = 146,1 e também com os carbonos fora do anel em δ_C = 45,8 e δ_C = 104,2.

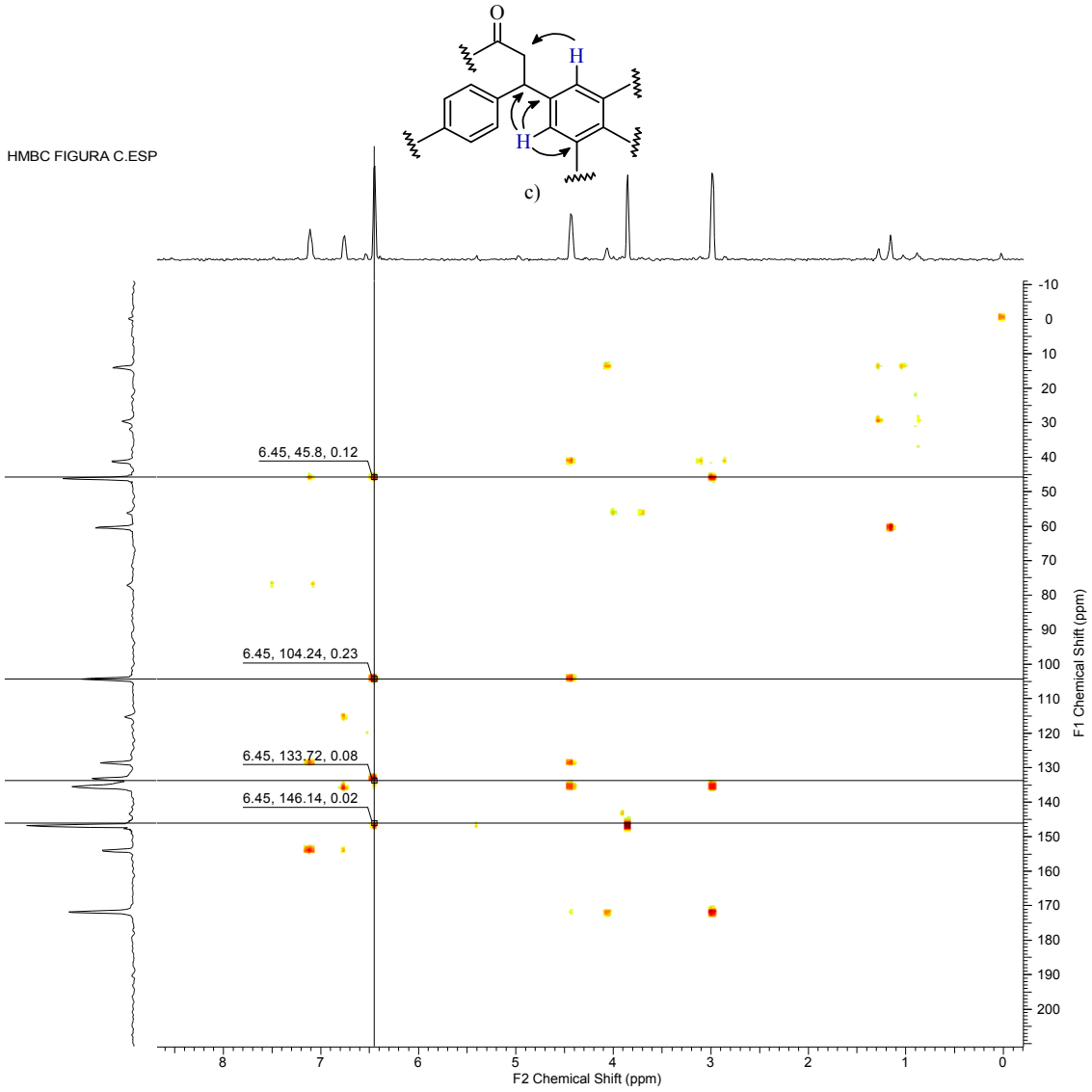


Figura 37: *Espectro de HMBC - Correlações entre o singleto δ_H = 6,44 com os sinais de carbono em δ_C = 133,7 e δ_C = 146,1(aromáticos) e em δ_C = 134,3 e δ_C = 153,4 e em δ_C = 45,8, δ_C = 104,2*

Os hidrogênios do tripleto observado em δ_H = 4,42, acoplam-se com os carbonos aromáticos em δ_C = 129,1, δ_C = 135,8 e também com os carbonos em δ_C = 41,2 e δ_C = 103,7 e com o carbono carbonílico em δ_C = 172,0 como observado na figura 38.

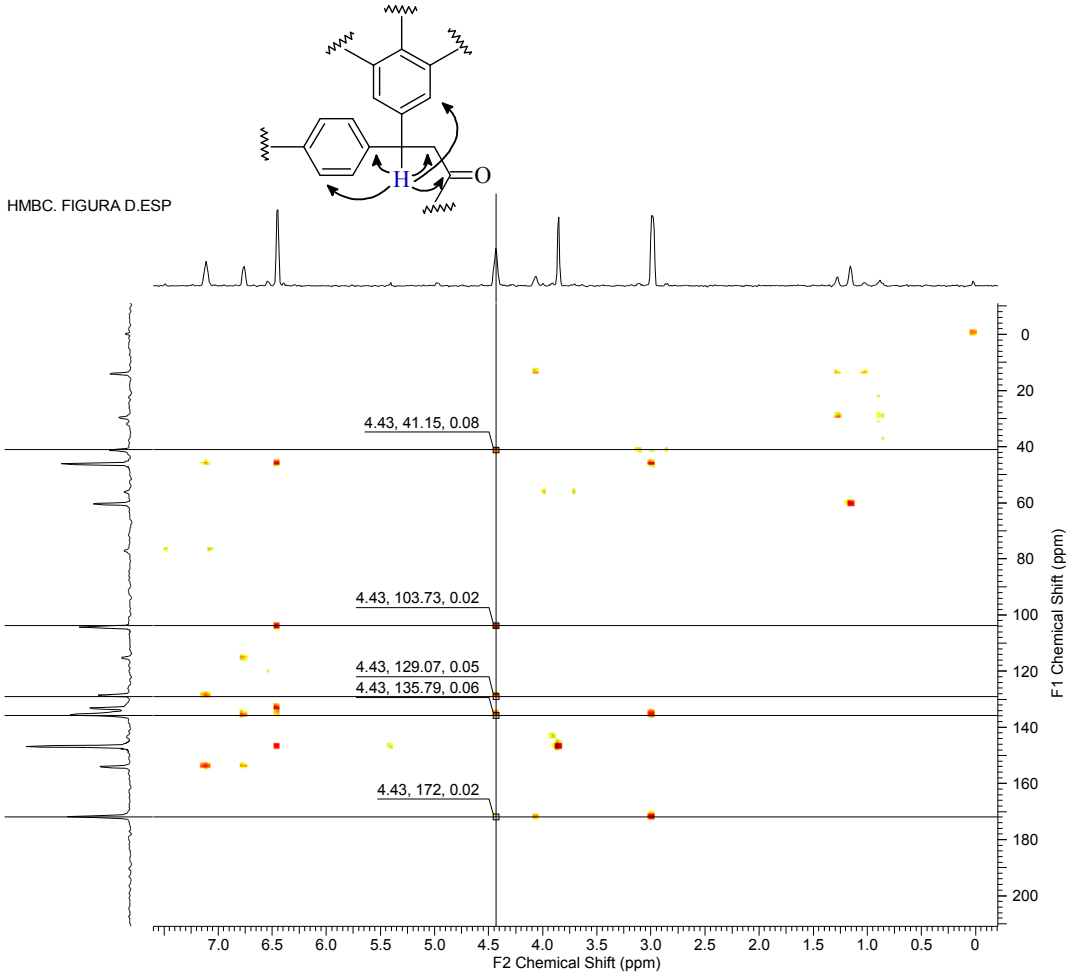


Figura 38: *Espectro de HMBC - Correlações entre o tripleto δ_H = 4,42 com os sinais de carbono em δ_C = 129,1 e δ_C = 135,8, δ_C = 41,2 e δ_C = 103,7 e com o carbono carbonílico em δ_C = 172,0.*

5.4 – Atividade Biológica das Diidrocumarinas

Todas as diidrocumarinas sintetizadas e que apresentaram confirmação estrutural mostraram alguma atividade biológica anticolinesterasica.

Para este trabalho, foi utilizado o método de Ellman (figura 39) para a determinação da atividade biológica anticolinesterásica. Este método consiste na determinação da taxa de produção da tiocolina após a hidrólise da acetiltiocolina na presença da enzima acetilcolinesterase (AcCE).

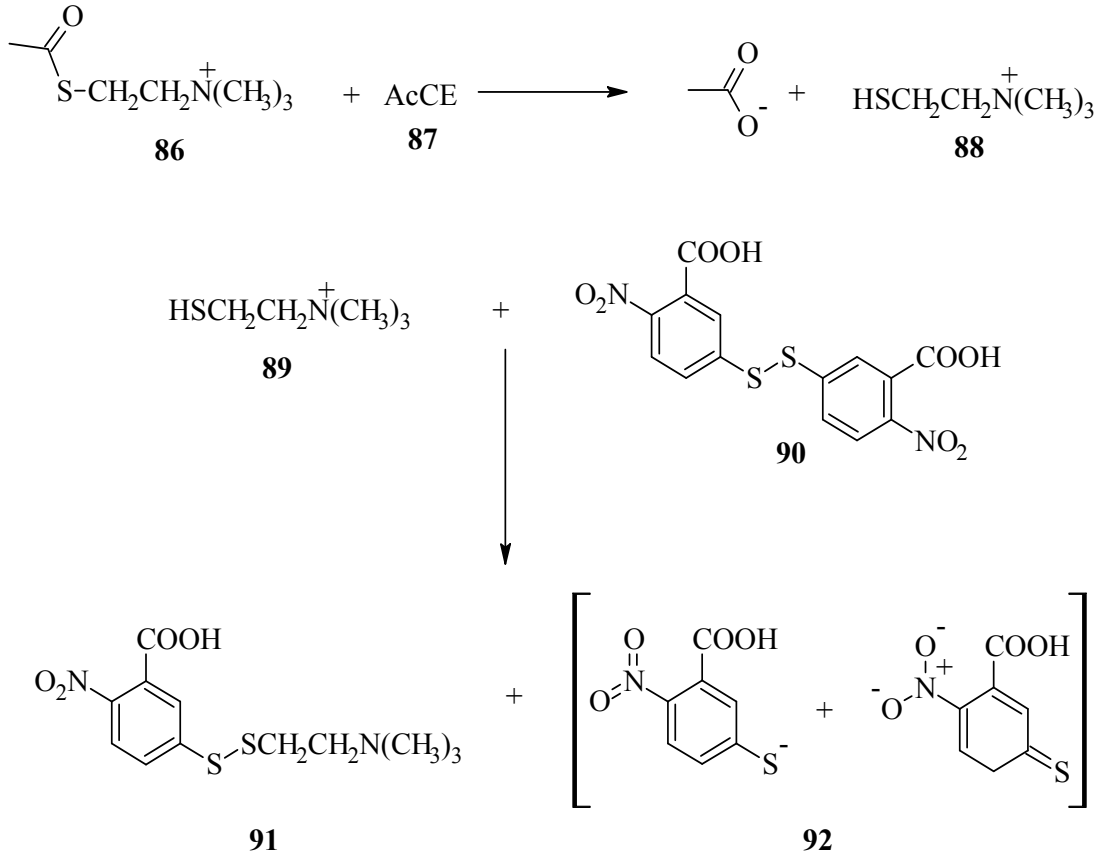
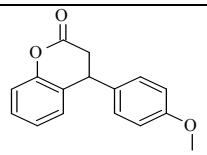
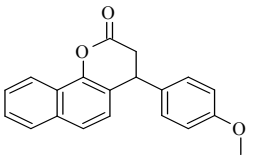
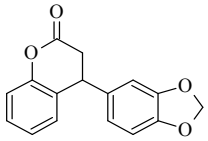
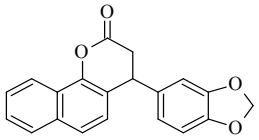
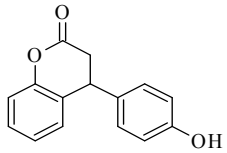
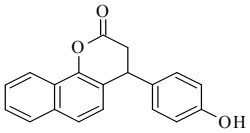
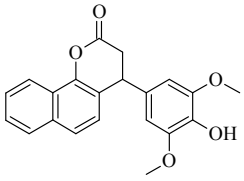
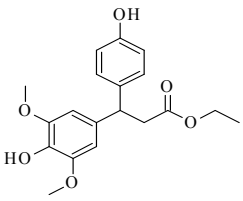


Figura 39: *Reação de Ellman*

Foram misturados o reagente de Ellman (DTNB) e acetiltiocolina nos poços do espectrofotômetro de microplacas e medida a absorbância como descrito no procedimento. Depois da adicão de AcCE observou-se a formação de uma coloração amarela na solução devido a catálise enzimática. Desse modo, é medida a continuação da reação da tiocolina com o reagente de Ellman, cujo produto é o ânion amarelo (**92**). Com a adição das amostras (tabela 31) antes da acetilcolinesterase, a absorbância é diminuída, indicando a inibição da enzima.

Tabela 31: *Relação dos compostos obtidos e analisados pelo método de Ellman*

Número	*Nome*	*Estrutura Molecular*
1	4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona	 **73**
2	4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona	 **74**
3	4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona	 **75**
4	4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona	 **76**
5	4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona	 **78**
6	4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona	 **79**
7	4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona	 **77**
8	3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-(4-hidroxifenil) propanoato de etila	 **85**

O método de Ellman se mostrou muito robusto, mas tem uma limitação importante; a exigência de alta solubilidade em água das amostras, uma vez que todas as soluções utilizadas são aquosas. As diidrocumarinas são pouco solúveis em água. Para superar esse problema as amostras foram solubilizadas numa solução de DMSO (Dimetilsulfóxido) a 10% e depois diluídas várias vezes com água até alcançar a concentração adequada para as análises. Apesar disso, obteve-se uma ótima reprodutibilidade nos resultados obtidos para todas as diidrocumarinas analisadas.

A partir do método descrito acima, foram feitos três medidas de cada diidrocumarina e analisadas as porcentagens de inibição em triplicata, de acordo com a equação 3 descrita no procedimento experimental (pág. 30). Consideraram-se apenas os valores que reproduziram nos três experimentos e descartados os valores discrepantes.

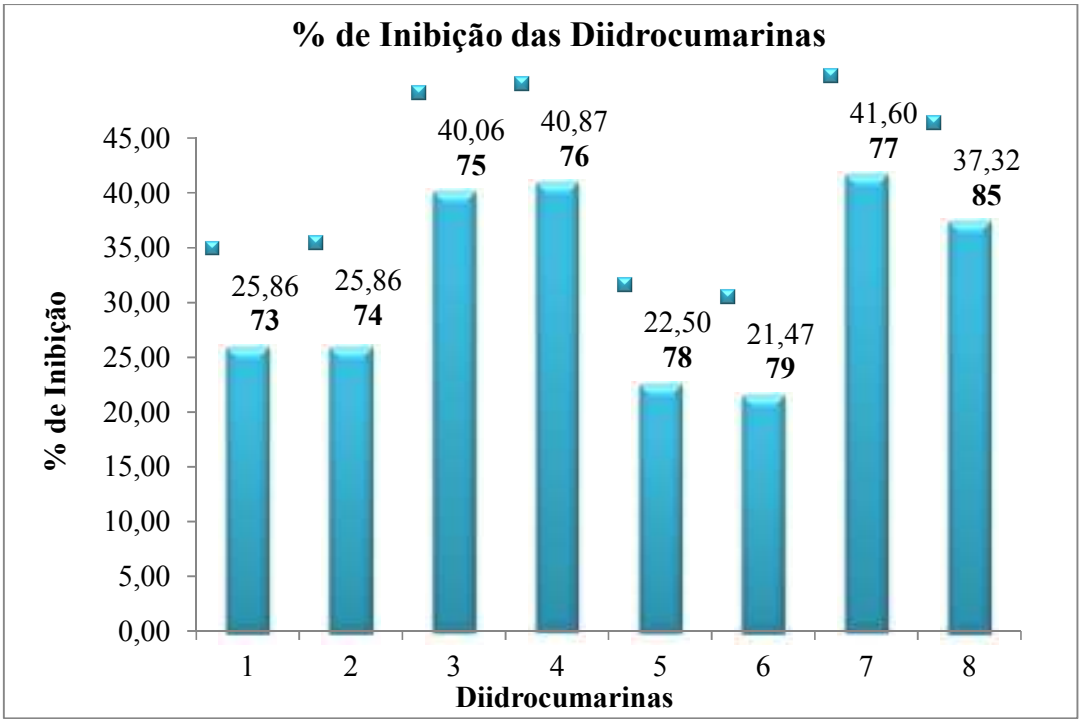


Figura 40: *Porcentagem de inibição apresentado pelas diidrocumarinas analisadas em ensaio de microplacas pelo método de Ellman*

O cálculo utilizado para determinar as porcentagens apresentadas na figura 40, avaliam o quociente entre a absorbância verificada para uma solução contendo a acetiltiocolina (72) + o reagente de Ellman (75) + AcCE (73) + a solução amostra e outra solução igual sem a adição da amostra. Através do valor obtido, é possível calcular a taxa de inibição, ou seja, a quantidade de acetilcolinesterase inibida quando adicionada as diidrocumarinas de acordo com a equação 3.

Os resultados verificados na figura 40, para os três experimentos, foram realizados utilizando-se a espectroscopia no UV-Vis com comprimento de onda de 412 nm. Estes valores de atividade biológica estão relacionados com as estruturas numeradas da tabela 31.

5.5 – Relação entre estrutura molecular e atividade biológica (SAR)

Como demonstrado na introdução, a acetilcolinesterase possui dois subsítios de interação, um esteárico e um aniônico. O subsítio aniônico interage com a porção trietilamônio (catiônico) da acetilcolina e o esteárico é responsável pela catálise e interage com a porção esteárica da acetilcolina. Interações secundárias observadas podem contribuir com a maximização das interações.[3,12]

O subsítio esteárico caracteriza-se pela afinidade a grupos hidrofílicos. O grupo serina, localizado no subsítio esteárico, contém uma hidroxila livre capaz de efetuar um ataque nucleofílico a carbonila da acetilcolina, levando-a a hidrólise. Por analogia, é possível aceitar que todos os compostos sintetizados reagem com a serina da mesma forma. Além disso, estes compostos podem interagir como doadores de elétrons nas ligações de hidrogênio do lactona com o "buraco oxiônico" de aminoácidos formado pela

Alamina e a Glicina. Portanto, quanto maior a quantidade de grupos hidrofílicos presentes maior será a quantidade de interações (figura 41).[10,12]

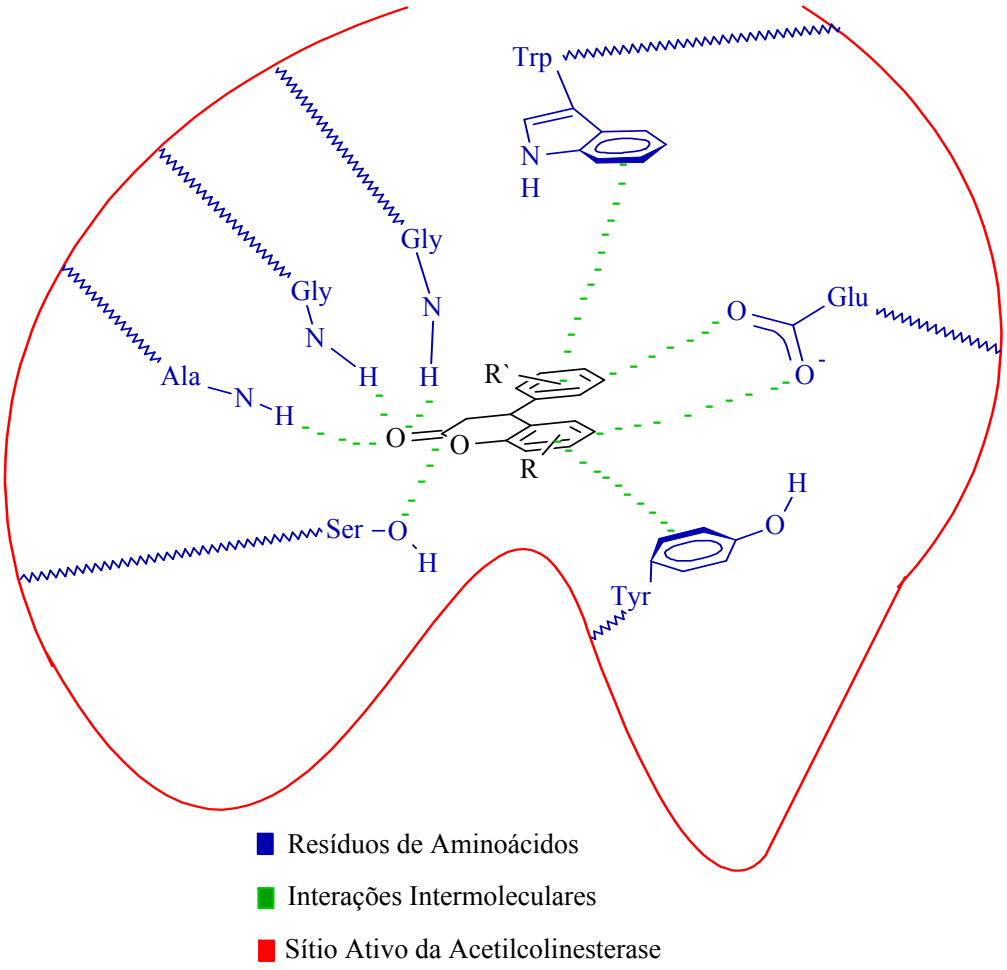


Figura 41: *Possíveis interações intermoleculares das diidrocumarinas com os sítios ativos da acetilcolinesterase.*

O resultado das análises de atividade biológica mostrou que a resposta anticolinesterásica proveniente de moléculas contendo um ou dois anéis na sua estrutura é praticamente a mesma. O aumento na quantidade de anéis aromáticos não causou acréscimo significativo na inibição da enzima.

O aumento da porcentagem de inibição na medida em que se aumenta a quantidade de grupos contendo aceptores de ligações de hidrogênio nas

diidrocumarinas, também é um fato. Esses grupos podem interagir com os aminoácidos do sítio periférico aniônico e os grupos que possuem anel aromático interagem com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico aniônico.[28]

É o que ocorre com os compostos da tabela 31, que se diferenciam apenas pelas quantidades diferentes dos grupos ligados ao anel aromático.

Os compostos **73** e **74** possuem apenas um grupo aceptor de ligações de hidrogênio (o grupo metoxi) na posição 4 e apresentam o valor de aproximadamente 25% de inibição. Os compostos **78** e **79**, também possuem um grupo aceptor de ligações de hidrogênio na mesma posição com um valor de inibição próximo (de 22%).

O acréscimo de um oxigênio ligado a posição 3 do anel aromático contribuiu de forma significativa com a porcentagem de inibição observado para os compostos **74** e **75** através do grupo dioximetil (OCH2O). Obteve-se o valor aproximado de 40% de inibição.

Entretanto a presença de três grupos aceptores de ligações de hidrogênio não apresentou aumento na porcentagem de inibição, mantendo valores próximos de 40% de inibição. Com esse resultado, é razoável pensar que as posições 3 e 4 são privilegiadas e contribuem para o aumento da porcentagem de inibição.

6 – Conclusões e Perspectivas

Os objetivos deste trabalho foram integralmente alcançados.

A síntese dos ésteres cinâmicos através de uma Ilida de fósforo mostrou-se um procedimento extremamente simples e altamente eficaz, resultando na formação do produto com rendimentos apreciáveis. Os espectros de infravermelho e de RMN confirmaram a formação dos produtos.

Através da Hidroarilação, ao contrário, não foi possível obter todos os produtos. No entanto, para todas as diidrocumarinas que se formaram, obteve-se resposta anticolinesterásica.

O método de Ellman, para a determinação da atividade biológica anticolinesterásica mostrou-se muito eficiente, pois é extremamente seletivo e muito simples de se realizar.

A obtenção do produto não cíclico (**85**) não esperado foi surpreendente e interessante, não só por formar um produto novo, como por apresentar atividade anticolinesterásica.

Pretende-se, em trabalhos futuros, sintetizar mais diidrocumarinas e derivados, procurando obter moléculas cada vez mais seletivas, eficazes e capazes de ter aplicabilidade terapêutica no futuro.

7 - Referências Bibliográficas

1. Gareth, T.; *Medicinal Chemistry: An Introduction*. 1ª Ed.; John Wileu & Sons, V. 1 p. 539, 2000.

2. Barreto, R. L.; *Design e Síntese de Novos Análogos Estruturais da Acetilcolina Conformacionalmente Restringidos*. Campinas, SP; 2003. [Dissertação].

3. Gohlke H.; Klebe, G.; *Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors*. Angew. Chem. Int. No. 41, p. 2644 – 2676, 2002.

4. Wang, S. L.; Wu, F. Y.; Cheng, C.; Zhang, g.; Liu, Y. P., Jiang, B., Shi, F.; Tu, S. J.; *Multicomponent Synthesis of Poly-Substituted Benzo[a]pyrano-[2,3-c]phenazine Derivatives under Microwave Heating*. ACS Comb. Sci., No. 13, p. 135–139, 2011.

5. Dömling, A,; *Recent Developments in Isocyanide Based Multicomponent Reactions in Applied Chemistry*. Chem. Rev., No. 106, p. 17−89; 2006.

6. Shaabani A.; Sarvary, A.; Soleimani, E.; Rezayan, A. H.; Heidary, M**.;** *A novel method for the synthesis of substituted 3,4-dihydrocoumarin derivatives via isocyanide-based three-component reaction*; Mol Divers 12:197–202; 2008.

7. Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Miranda, A. L. P.; Rodrigues C. R.; *A Química Medicinal de N-Acilidrazonas: Novos Compostos-Protótipos de Fármacos nalgésicos, Antiinflamatórios e Anti-Trombóticos*. Quim. Nova*,* Vol. 25, No. 1, p. 129-148, 2002.

8. Velikorodov, A. V.; Imasheva, N. M.; *Synthesis of Carbamate Derivatives of Coumarin and Chromene*. Russian Journal of Organic Chemistry Vol. 44 No. 9; 2008.

9. Raffa, R. B.; *Thermodynamics of the Drug-Receptor Interation;* Life Sciences, Vol. 65, No. 10, p. 967-980; 1999.

10. Castro, B. M.; *Funções Motoras em Camundongos Deficientes do Transportador Vesicular de Acetilcolina*. Belo Horizonte - MG, 2006. [Dissertação].

11. Lleó, A.; Greenberg, S. M.; Growdon, J. H.; *Current Pharmacotherapy for Alzheimer's Disease,* Annu. Rev. Med. No.57, p. 513–33; 2006.

12. Silva, I. F. O; *Aspectos do envelhecimento cerebral e função cognitiva em modelo experimental animal e estudo de mecanismos de neurodegeneração em cultura celular*; Belo Horizonte-MG, UFMG, 2007 [Dissertação].

13. Terry Jr., A. V., Buccafusco, J. J.; *The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development*; The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics, Vol. 306, No. 3, 2003.

14. Prakash, G. K. S.; Paknia, F.; Vaghoo, H.; Rasul, G.; Mathew, T.; Olah, G. A.; *Preparation of Trifluoromethylated Dihydrocoumarins, Indanones, and Arylpropanoic Acids by Tandem Superacidic Activation of 2-(Trifluoromethyl)acrylic Acid with Arenes*. J. Org. Chem., 75, 2219–2226; 2010.

15. Kumar, A. et al.; *Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylcoumarins. Part 11: Comparison of the specificities of acetoxy derivatives of 4-methylcoumarin and 4-phenylcoumarin to acetoxycoumarins: protein transacetilase.* Bioorg. Med. Chem. No. 13, p. 4300–4305, 2005.

16. Santos, C. E. R.; *Síntese, Caracterização e Atividade Anti-Leishmania de Derivados das Classes 4-Aril-3,4-Diidrocumarinas, Pirrazolo[3,4-b]Piridin-6-Onas e N,N'-Difenil-Benzamidinas*; Seropédica-RJ; 2008. [Dissertação].

17. Santos, C. E., R.; Echevarria, A.; An *efficient and fast synthesis of 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins by (CF3SO3)3Y catalysis under microwave irradiation*. Tetrahedron Letters, nº 48, p. 4505–4508, 2007.

18. Talapatra, D.; Deb, T.; Talapatra, S.; *Condensation of phenol & cinnamic acid in presence of polyphosphoric acid: A novel biogenetic-type oxidative self-cyclisation*. Indian journal of chemistry, V. 25B, p. 1122-1125; 1986.

19. Young, S. W.; Pastine, S. J.; Sames, D.; *Ru(III)-Catalyzed Cyclization of Arene-Alkene Substrates via Intramolecular Electrophilic Hydroarylation*. Organic Letters, V. 6, nº 4, p. 581-584, 2004.

20. Jia, C.; Piao, D.; Kitamura, T.; Fujiwara, T.; *New Method for Preparation of Coumarin and Quinolinones via Pd-Catalyzed Intramolecular Hydroarilation of C-C Triple bonds*; J. Org. Chem., Vol. 65, No. 22; 2000.

21. Li, K.; Foresee, L. N.; Tunge, J. A.; *Trifluoroacetic Acid-Mediated Hydroarylation: Synthesis of Dihydrocoumarins and Dihydroquinolones*, J. Org. Chem., *70*, 2881-2883; 2005.

22. Fillion, E.; et al. *Yb(OTf)3-Catalyzed Reactions of 5-Alkylidene Meldrum's Acids with Phenols: One-Pot Assembly of 3,4-Dihydrocoumarins, 4-Chromanones, Coumarins, and Chromones*; J. Org. Chem., *71*, 409-412; 2006.

23. Kolodiazhnyi, O. I.; *Phosphorus ylides: chemistry and application in organic synthesis*; WILEY-VCH; Kiev, 1999.

24. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. "*Organic Chemistry*", Oxford University Press, 1st Ed., 2001.

25. Armarego, W.L.F.; Perrin, D. D.; *Purification of laboratory Chemicals*; Butterworth Heinemann, 4th edition; 2000.

26. Carey, F. A., Sundberg, R. J.; Advanced Organic chemistry; 4ª Ed.; Kluwer academy/ Plenum publisher New York-2000; pág. 215-220.

27. H. Dvir, Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T., Sussman, J.L.; Acetylcholinesterase: From 3D structure to function, Chem. Biol. Interact; 2010.

28. Almeida, J. R.*Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer*; Ribeirão Preto; 2011. [Dissertação].

29. Kua, J.; Zhang, Y.; McCammon, J. A.; *Studying Enzyme Binding Specificity in Acetylcholinesterase Using a Combined Molecular Dynamics and Multiple Docking Approach*; J. Am. Chem. Soc., 124, 8260-8267; 2002.

30. Oxgaard, J.; Periana, R. A.; Goddard, W. A.; *Mechanistic Analysis of Hydroarylation Catalysts*, J. Am. Chem. Soc., 126, 11658-11665; 2004.

31. Jagdale, A. R.; Sudalai, A.; *p-Toluenesulfonic acid mediated hydroarylation of cinnamic acids with anisoles and phenols under metal and solvent-free conditions*, Tetrahedron Letters, No. 48 4895–4898; 2005.

32. Aoki et al, S.; *A convenient synthesis of dihydrocoumarins from phenols and cinnamic acid derivatives*, Tetrahedron No. 61, 9291–9297, 2005.

33. Barreiro, E. J.; Ferreira, V. F.; Costa, P. R. R.; *Substâncias Enantiomericamente Puras (SEP): A Questão dos Fármacos Quirais*; Quím. Nova, 20(6); 1997.

34. Bezerra, M. Z. B.; Machado, M. I. L.; Morais, S. M,; Filho, R. B.; *Synthesis of Neoflavonoids: 4-(4-methoxyphenil)-3,4-Diidrocoumarin*. J. Braz. Chem Soc., vol. 8, No. 3, 229-234, 1997.

35. Duan, S.; Jana, R.; Tunge, J. A.; *Lewis Acid-Catalyzed Diastereoselective Hydroarylation of Benzylidene Malonic Esters*, J. Org. Chem., *74*, 4612–4614; 2009.

36. Imasheva, N. M.; Velikorodov, A. V.; Krivosheev, O. O.; *Synthesis of Dihydrocoumarin Carbamate Derivatives*; Russian Journal of Organic Chemistry Vol. 44 No. 11; 2008.

37. Kalaiselvan, A.; Venuvanalingam, P.; *Oxaphosphetane versus betaine formation in epoxide ring opening by PPh3: a mechanistic probe by ab initio and DFT modeling;* Tetrahedron Letters No. 46, 4087–4090; 2005.

38. Lee, J. H. et al.; *Acetylcholinesterase Inhibitors from the Twigs of Vaccinium oldhami Miquel*; Arch Pharm Res Vol 27, No 1, 53-56; 2004.

39. Li, K.; Tunge, J. A.; *Chemical Libraries via Sequential C-H Functionalization of Phenols*; J. Comb. Chem., 10*,* 170–174, 2005.

40. Mahajan, J. R.; Araújo. J. C.; *Attempted novel preparation of dihydrocoumarin and coumarin; obtention of aryl acrylates and 3-chloropropionates*; J. Chem. No. 65**,** 224; 1987.

41. Malany, S. et al.; *Transition State Structure and Rate Determination for the Acylation Stage of Acetylcholinesterase Catalyzed Hydrolysis of (Acetylthio)choline*; J. Am. Chem. Soc.**,** No. *122,* 2981-2987; 2000.

42. Oyamada, J.; Kitamura, J.; *Synthesis of coumarins by Pt-catalyzed hydroarylation of propiolic acids with phenols*; Tetrahedron No. 62, 6918–6925; 2006.

43. Piao, C.; Zhao, Y.; Han, X.; Liu, Q.; *AlCl3-Mediated Direct Carbon-Carbon Bond-Forming Reaction of r-Hydroxyketene-S,S-acetals with Arenes and Synthesis of 3,4-Disubstituted Dihydrocoumarin Derivatives*; J. Org. Chem. No. *73*, 2264-2269; 2008.

44. Quinn, D. M.; *Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States;* Chem.Rev.. 955-979; 1987.

45. Rhee, I. K. et al.; *Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining*; *J. Chromatogr*. *A, No* 915, 217 –223; 2001.

46. Saha, N. N.; Desai, V. N.; Dhavale, D. D.; A *Synthesis of New Coumarin C-Glycosyl Derivatives*; J. Org. Chem*.,* Vol. 64, No. 5, 1999.

47. Silman, I.; Sussman, J. L.; *Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology,* Current Opinion in Pharmacology, No.5:293–302; 2005.

48. Still, C. W., Kahn, M.; *Miltra, A.; Rapidchromatographic technic for preparative separations with moderate resolution*. J. Org. Chem. No. 43, 2923-2925; 1978.

49. Velikorodov, A. V.; Imasheva, N. M.; *Synthesis of Carbamate Derivatives of 2,3-Dihydro-4H-1,4-benzoxazine*; Russian Journal of Organic Chemistry Vol. 44 No. 3 2008.

50. Verli, H.; Barreiro, E. J.; *Um paradigma da Química Medicinal: A Flexibilidade dos Ligantes e Receptores*; Quim. Nova*,* Vol. 28, No. 1, 95-102, 2005.

51. Zhao, Y.; Ku, Y.; Haoa, X. J.; Le, S.; *Preparation of Analogues of Territrem B, a Potent AChE Inhibitor*; Tetrahedron, No. 56, 8901-8913; 2000.

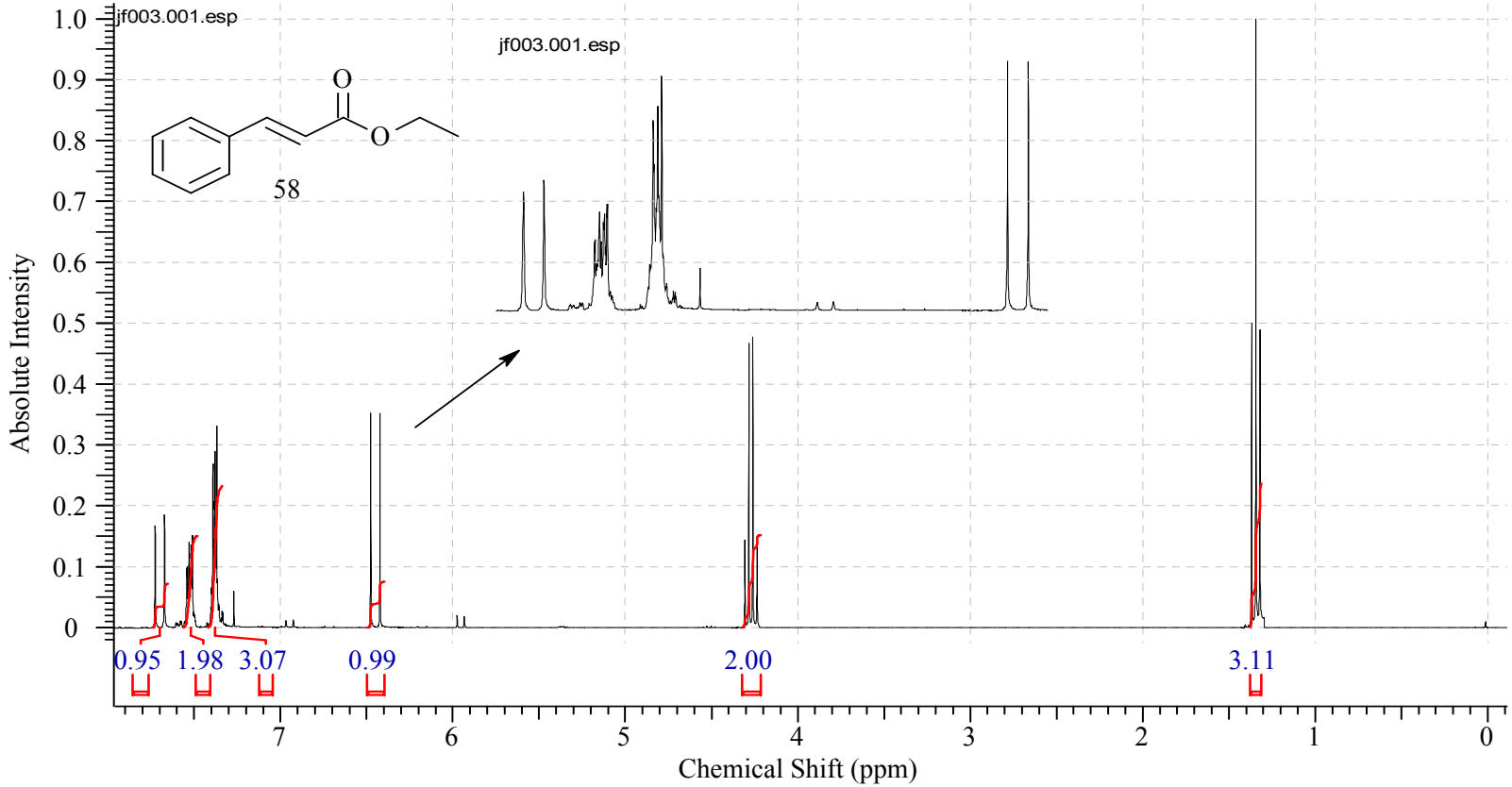
52. Zeitler, Z,; Rose, C. A.; *An Efficient Carbene-Catalyzed Access to 3,4-Dihydrocoumarins*, J. Org. Chem. No. *74*, 1759–1762; 2009.

53. Seidl, C.; *Pesquisa de Substâncias Naturais Inibidoras da Acetilcolinesterase* Curitiba-Pr; 2010. [Dissertação].

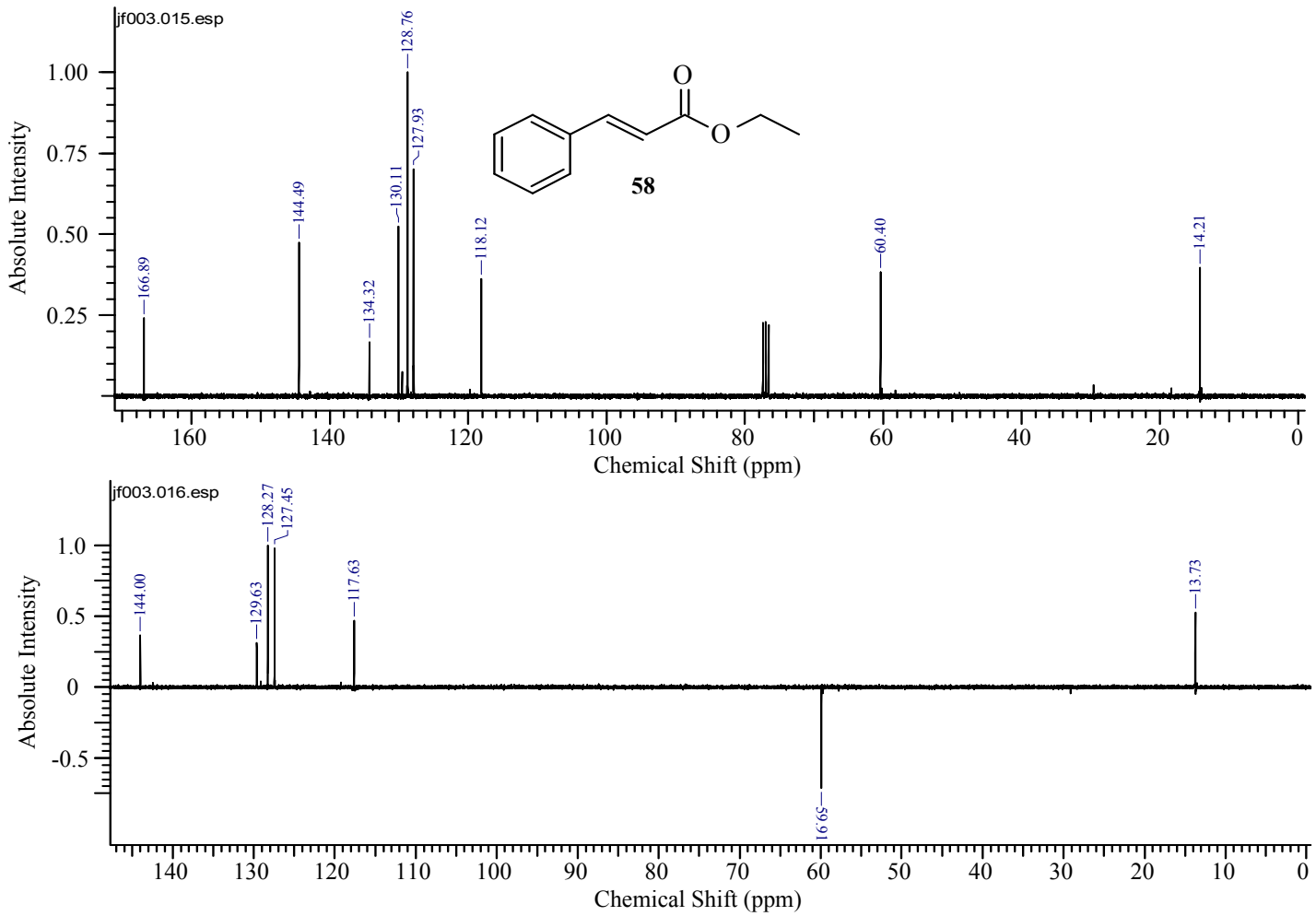
8 – Anexos

8.1 – Anexo I

8.1.1 - Espectros de RMN- ^{1}H do 3-(Fenil)-2-propenoato de etila

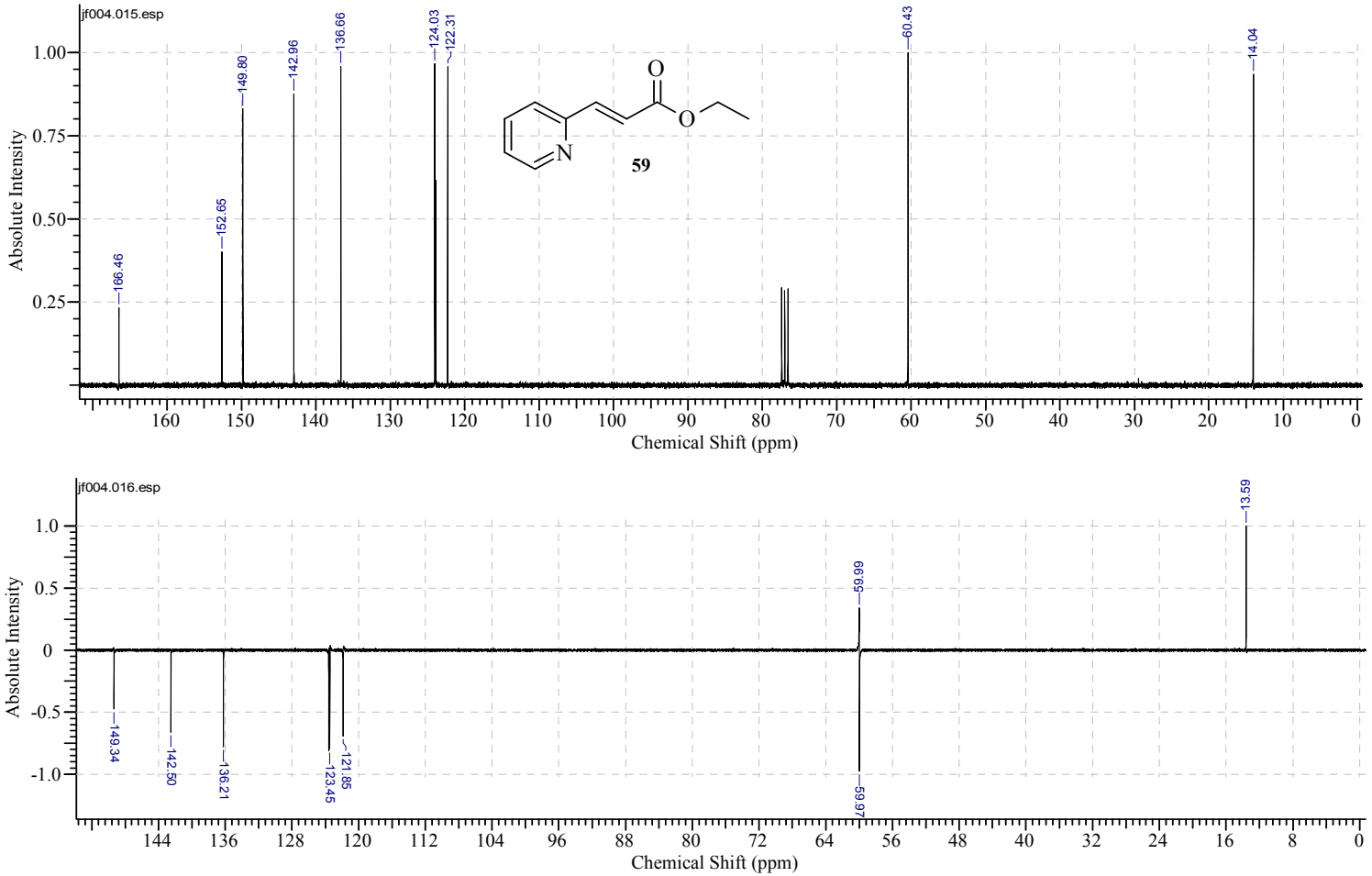


8.1.2 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(Fenil)-2-propenoato de etila

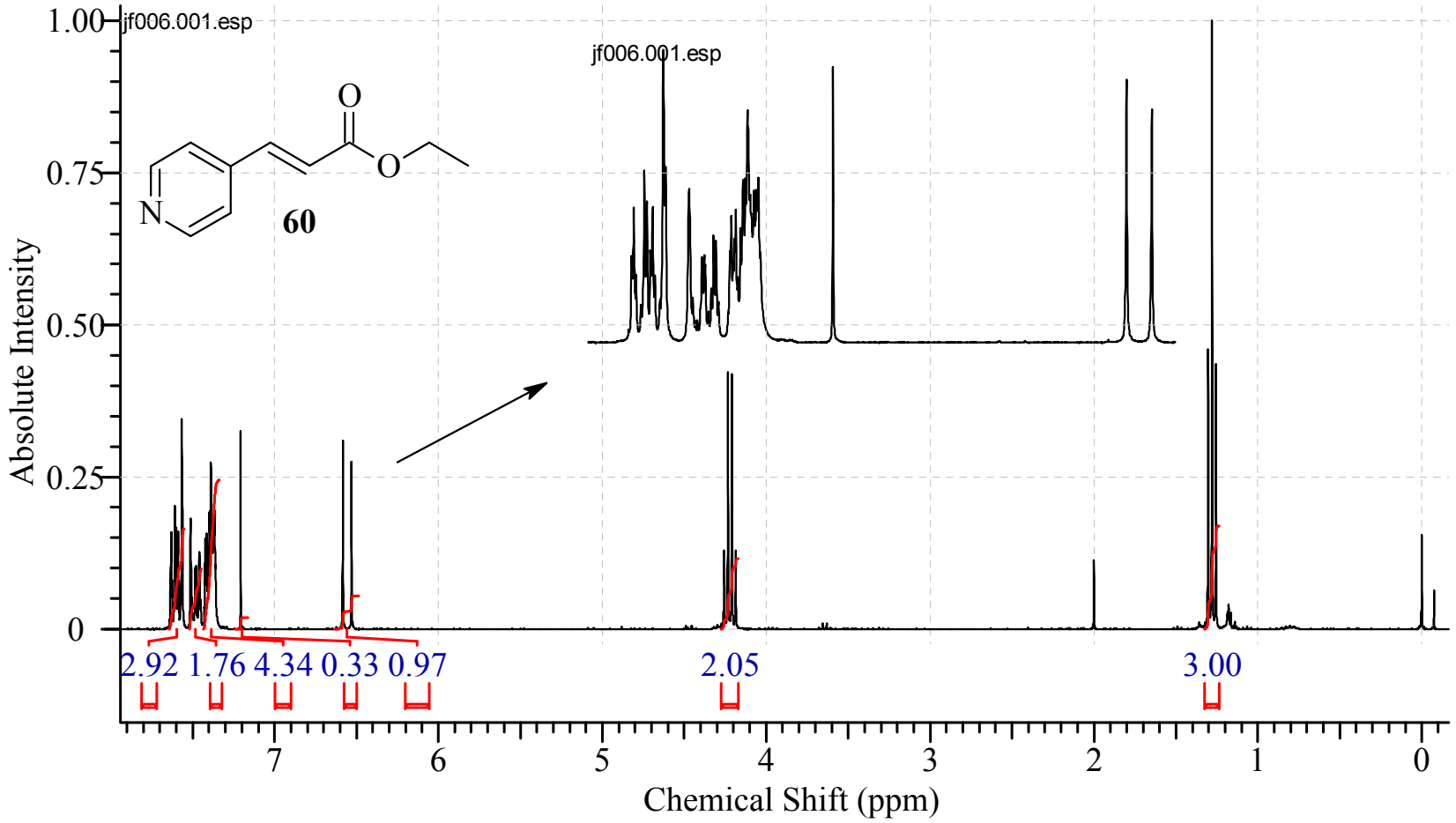


8.1.3 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(2-piridin)-2-propenoato de etila

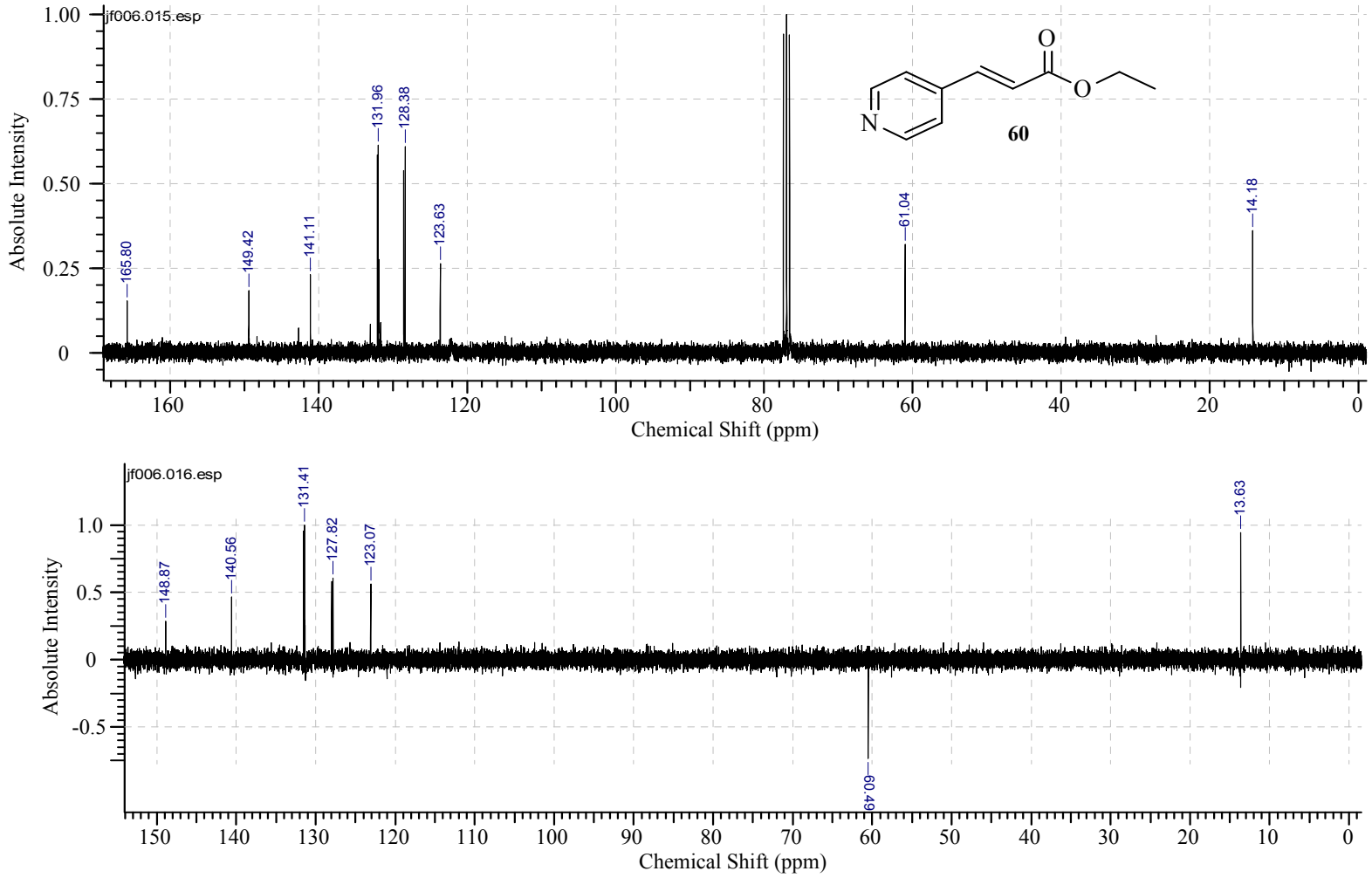
8.1.4 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(2-piridin)-2-propenoato de etila



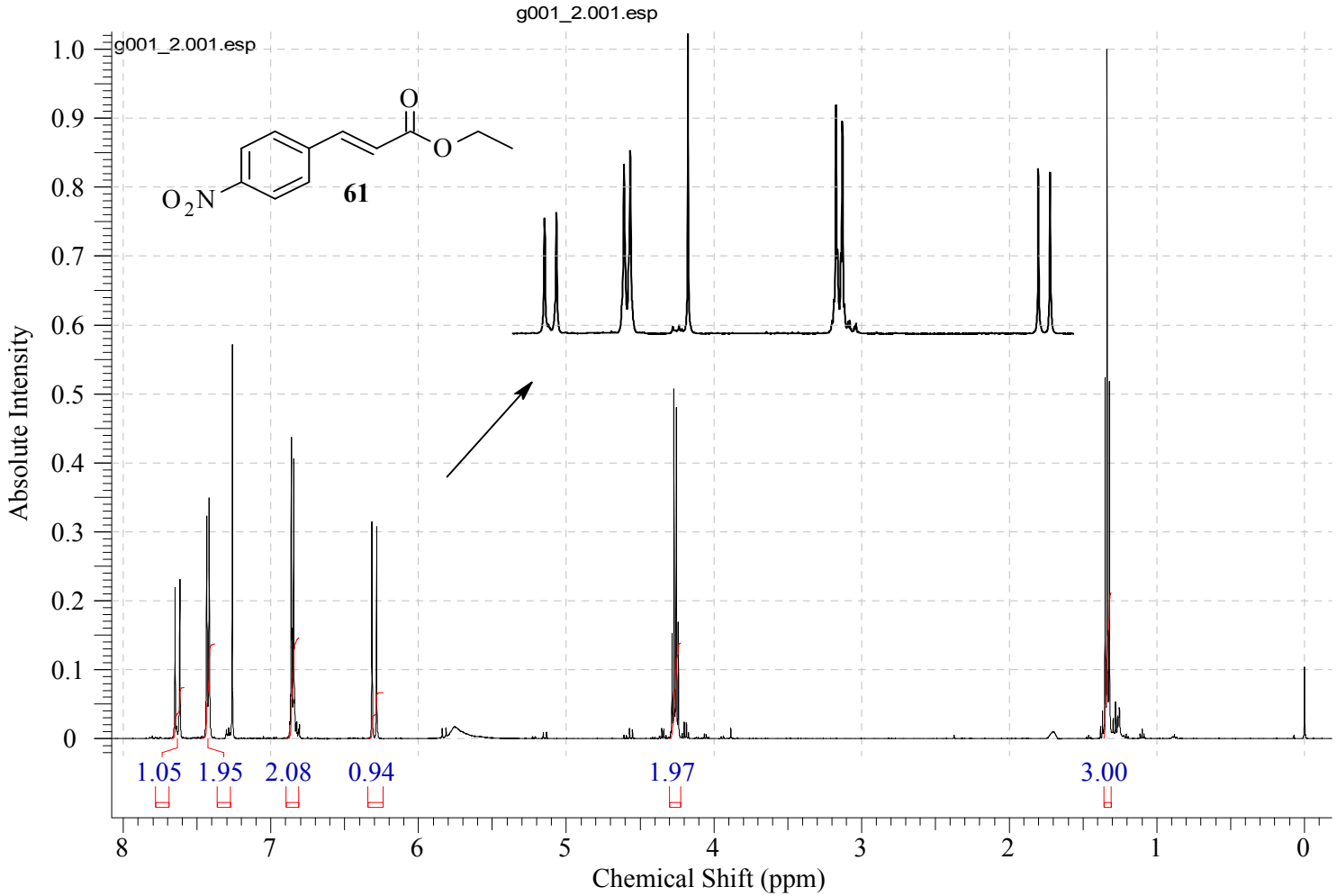
8.1.5 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-piridin)-2-propenoato de etila



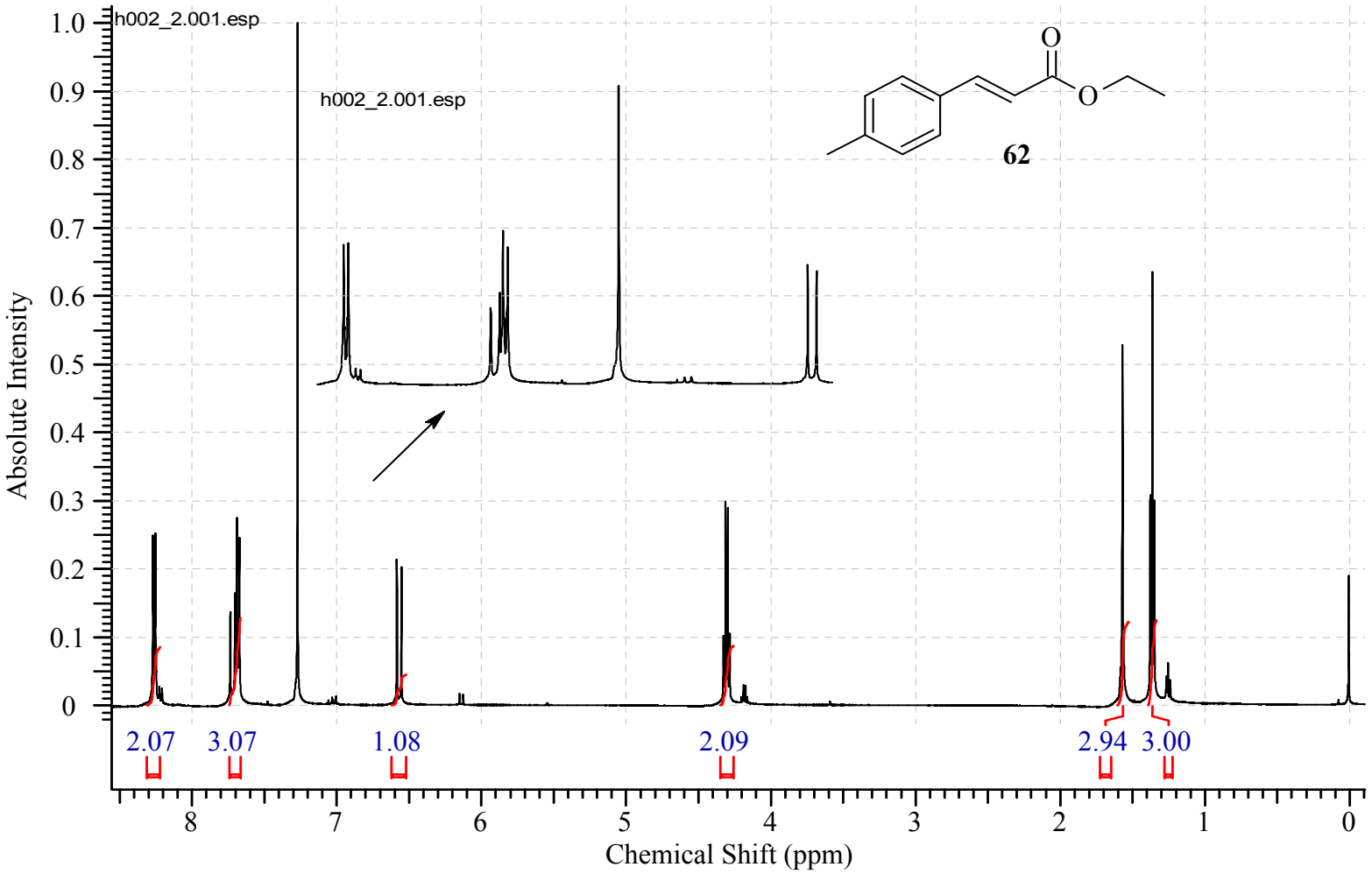
8.1.6 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(4-piridin)-2-propenoato de etila



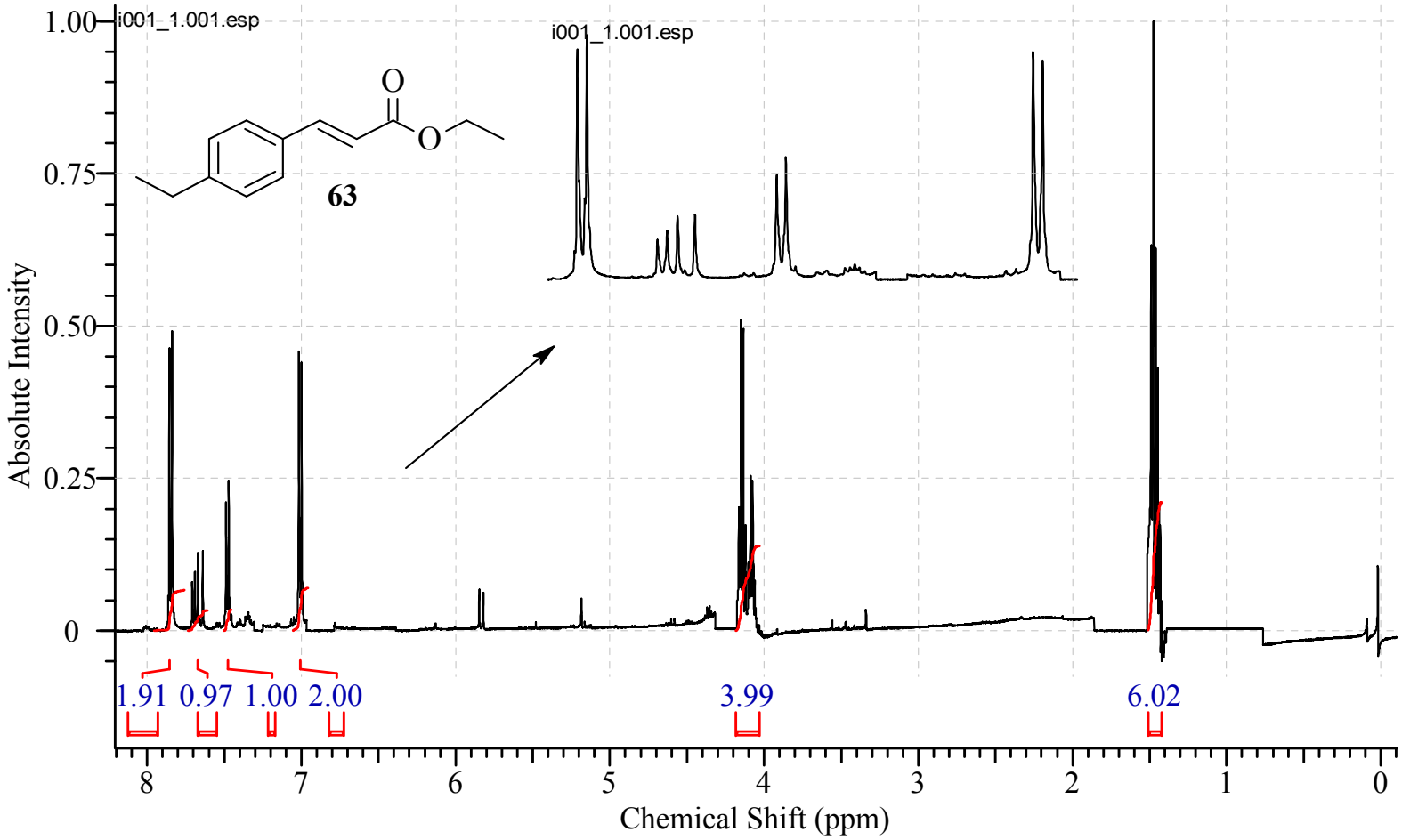
8.1.7 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-Nitrofenil)-2-propenoato de etila



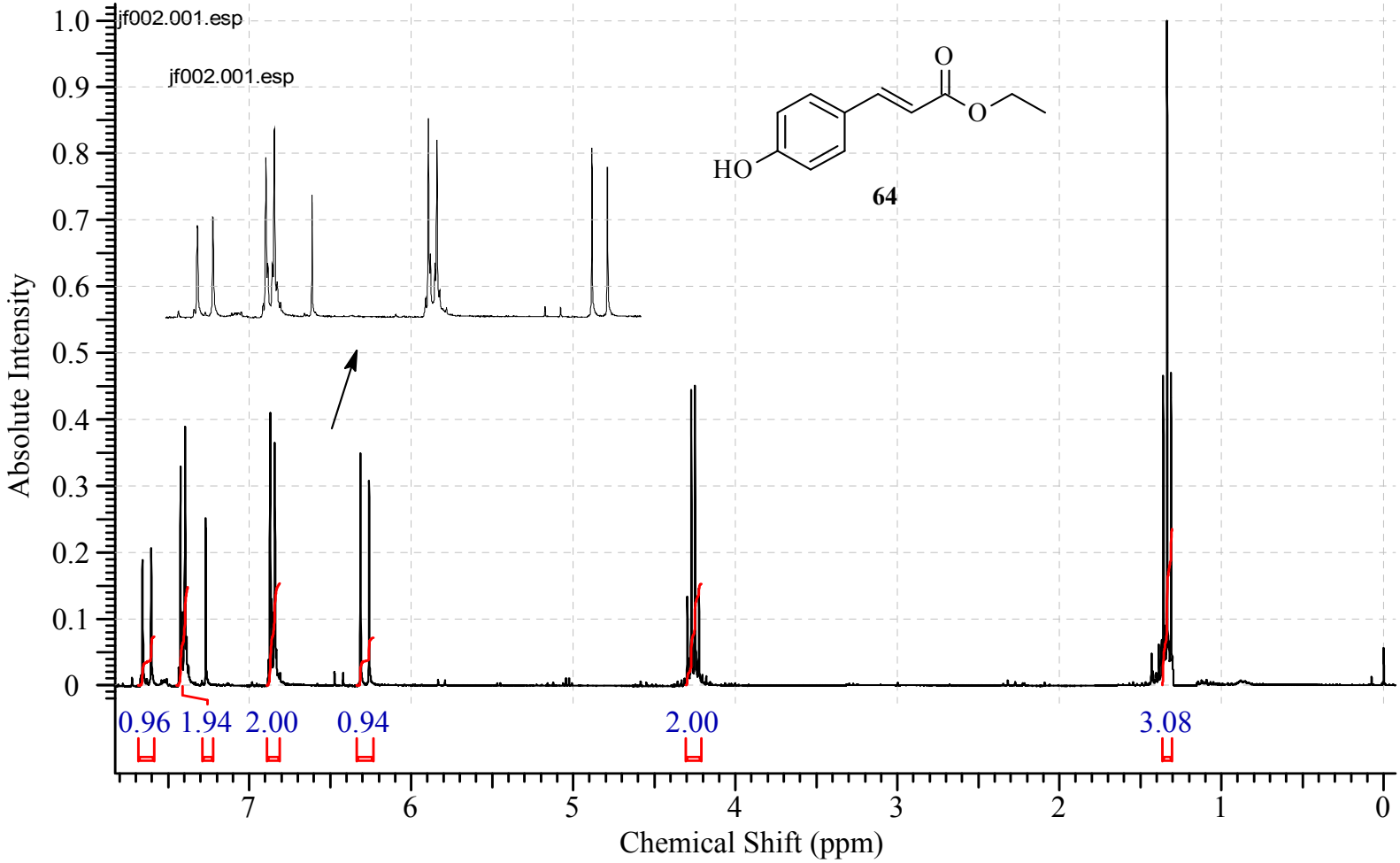
8.1.8 - Espectro de RMN- ^{1}H do 3-(4-metilenofenil)-2-propenoato de etila



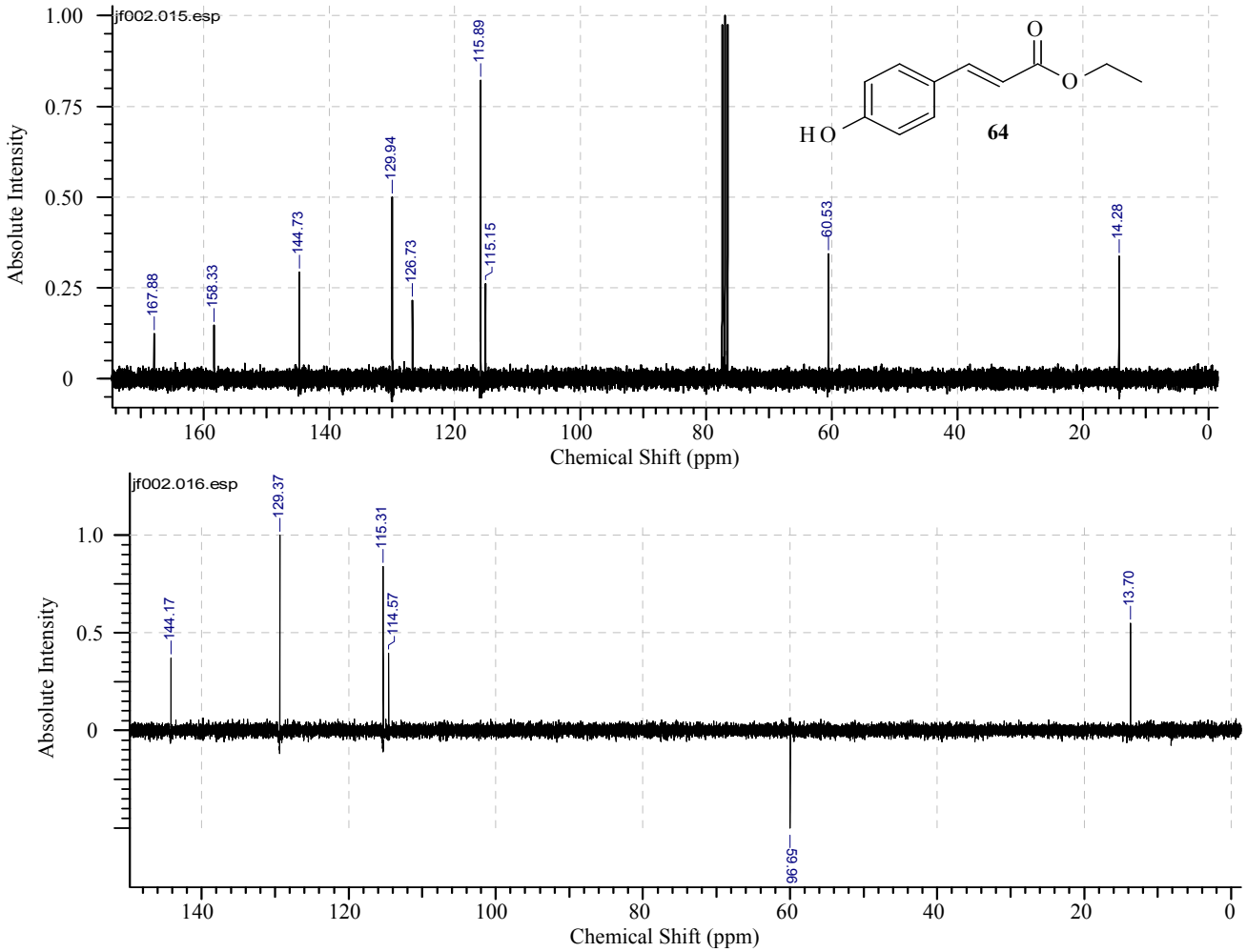
8.1.9 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-etilenofenil)-2-propenoato de etila



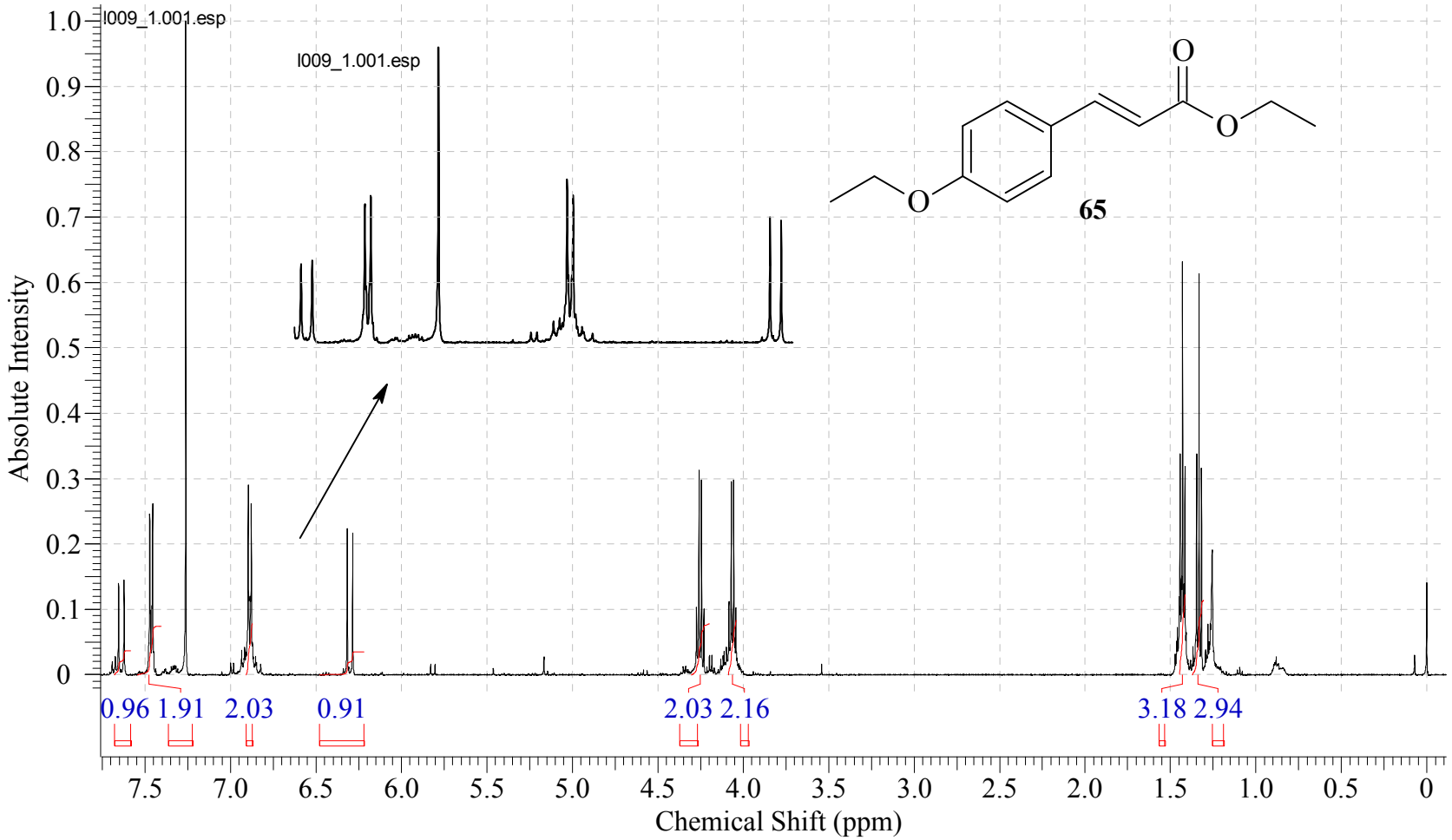
8.1.10 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-Hidroxifenil)-2-propenoato de etila



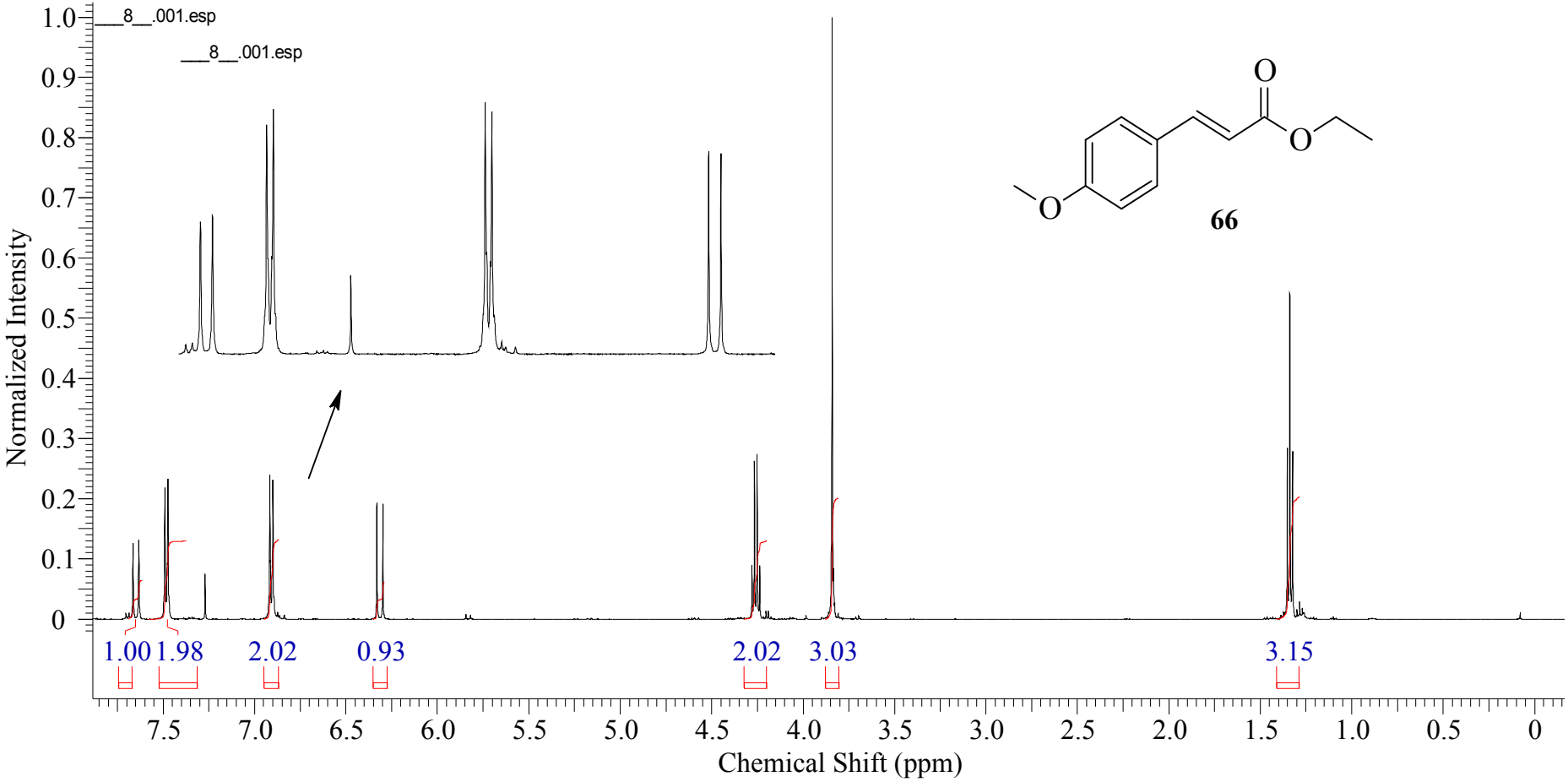
8.1.11 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(4-Hidroxifenil)-2-propenoato de etila



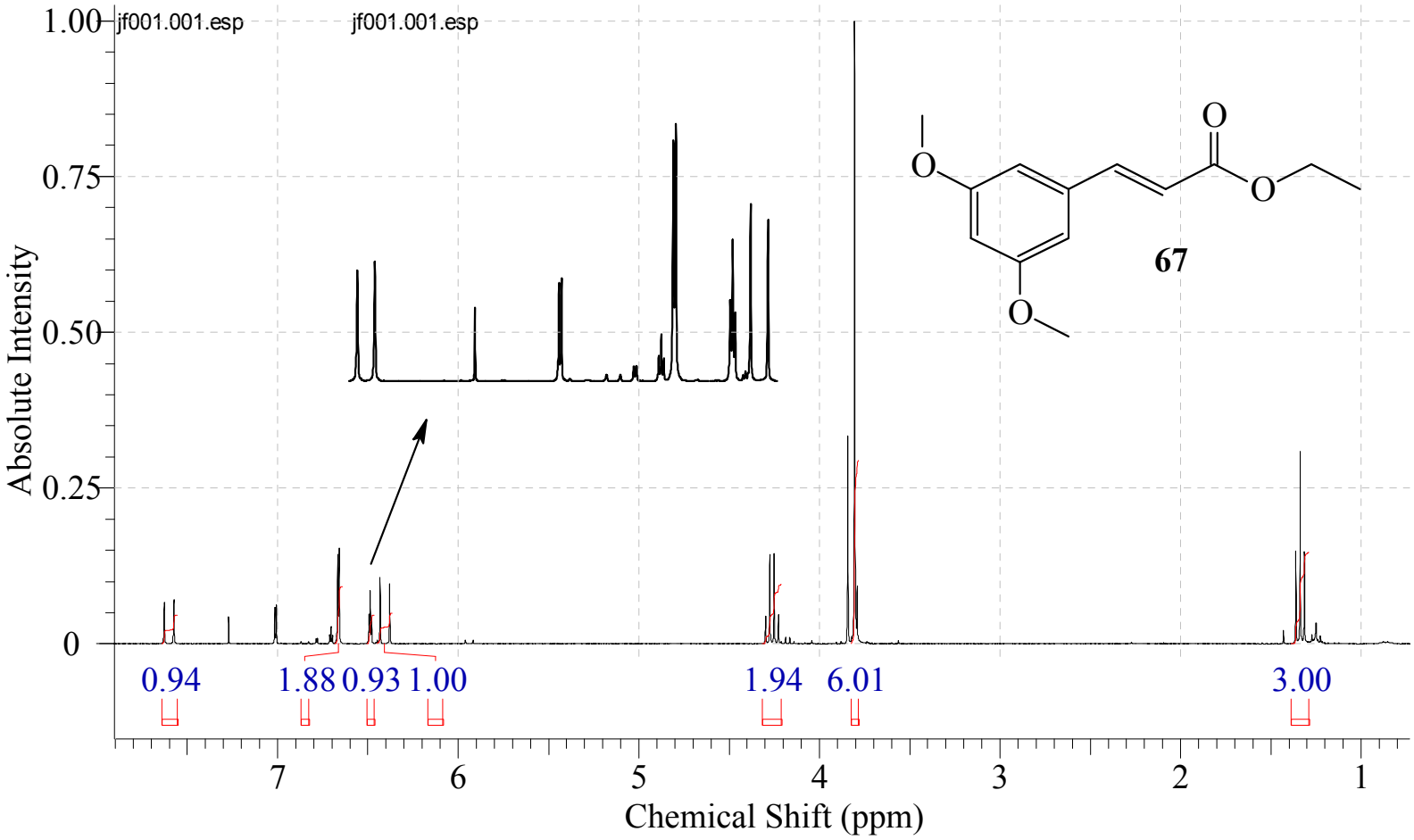
8.1.12 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-Etoxifenil)-2-propenoato de etila



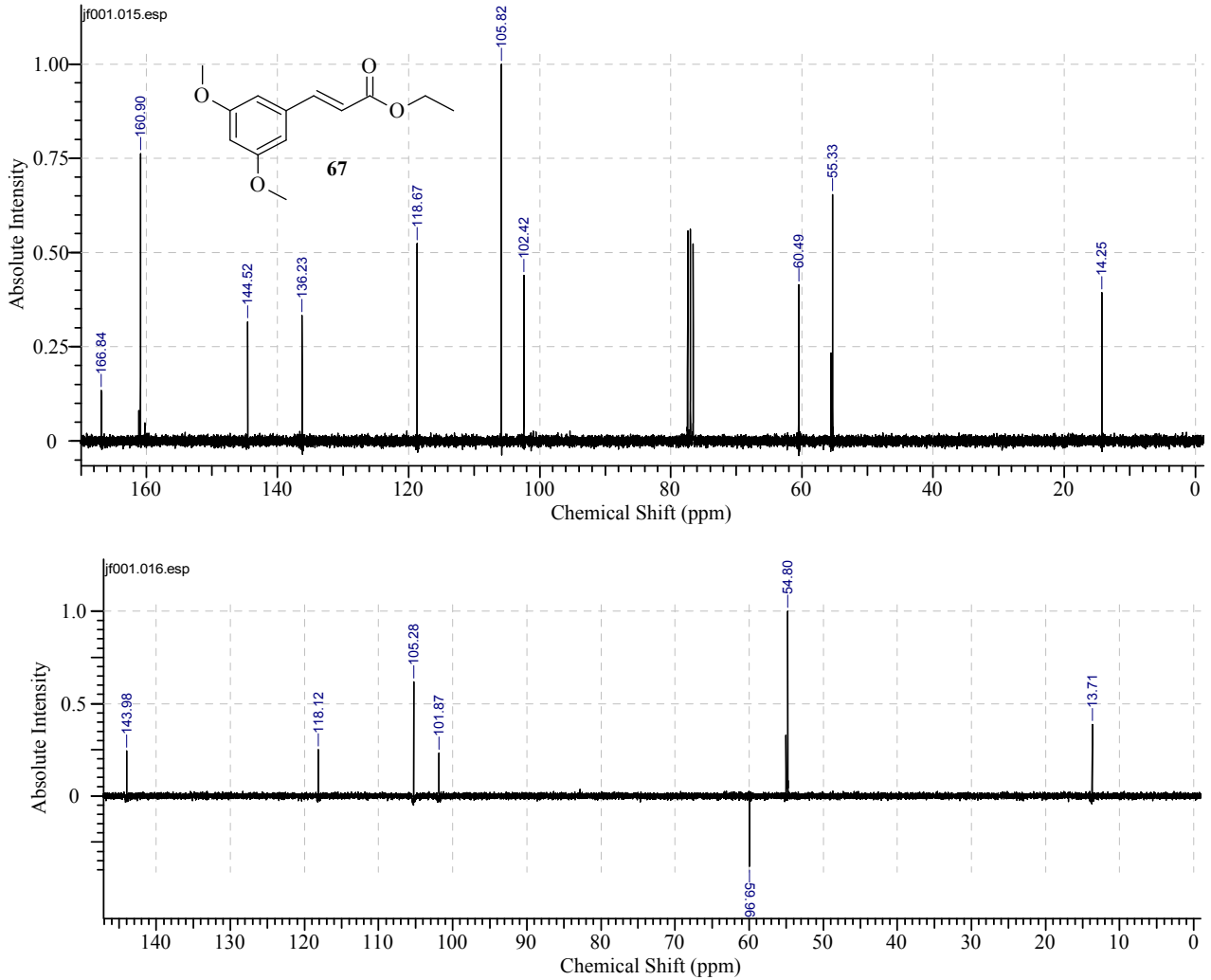
8.1.13 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-metoxifenil)-2-propenoato de etila



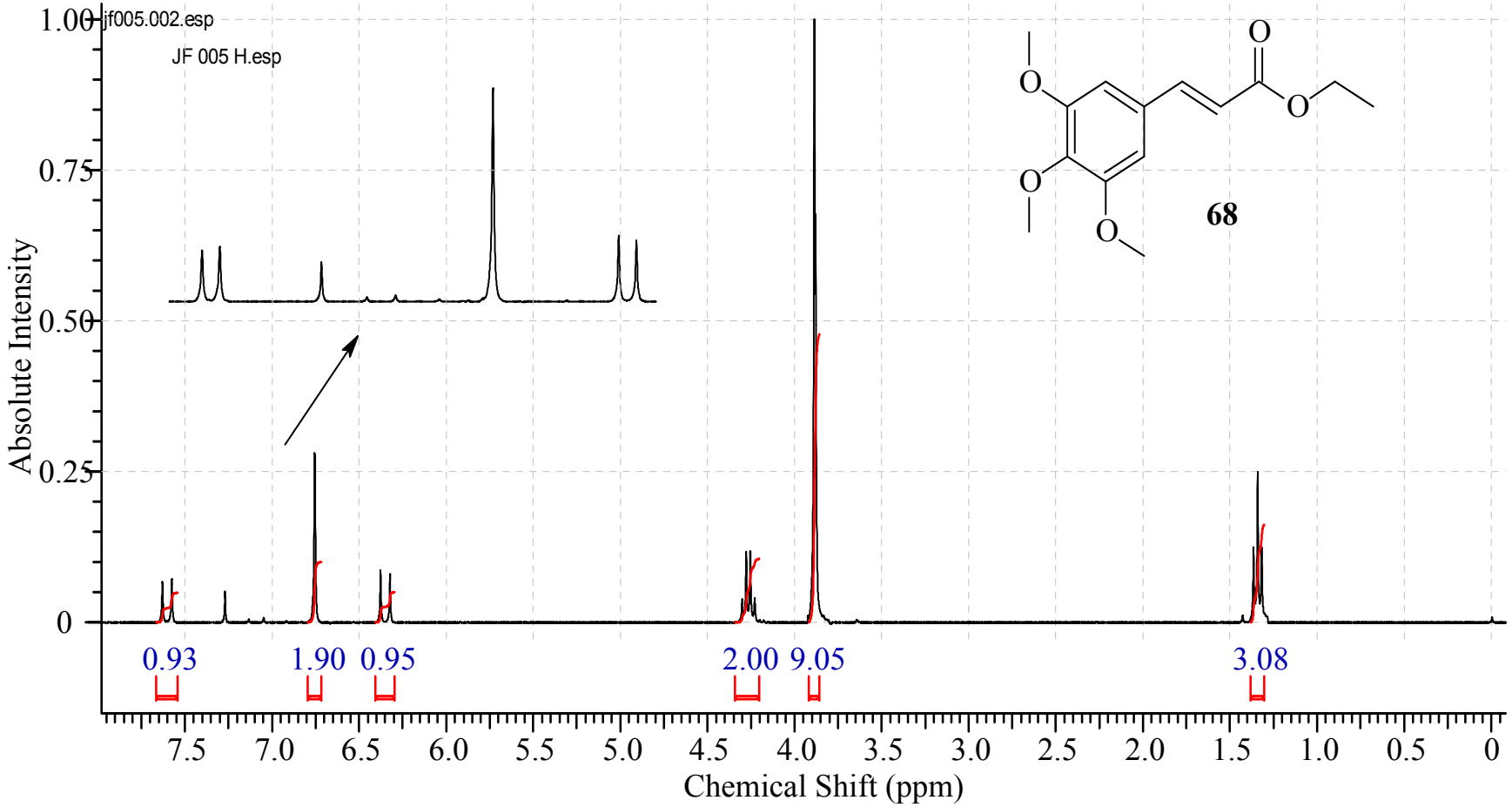
8.1.14 - Espectro de RMN-^1H do 3-(3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila



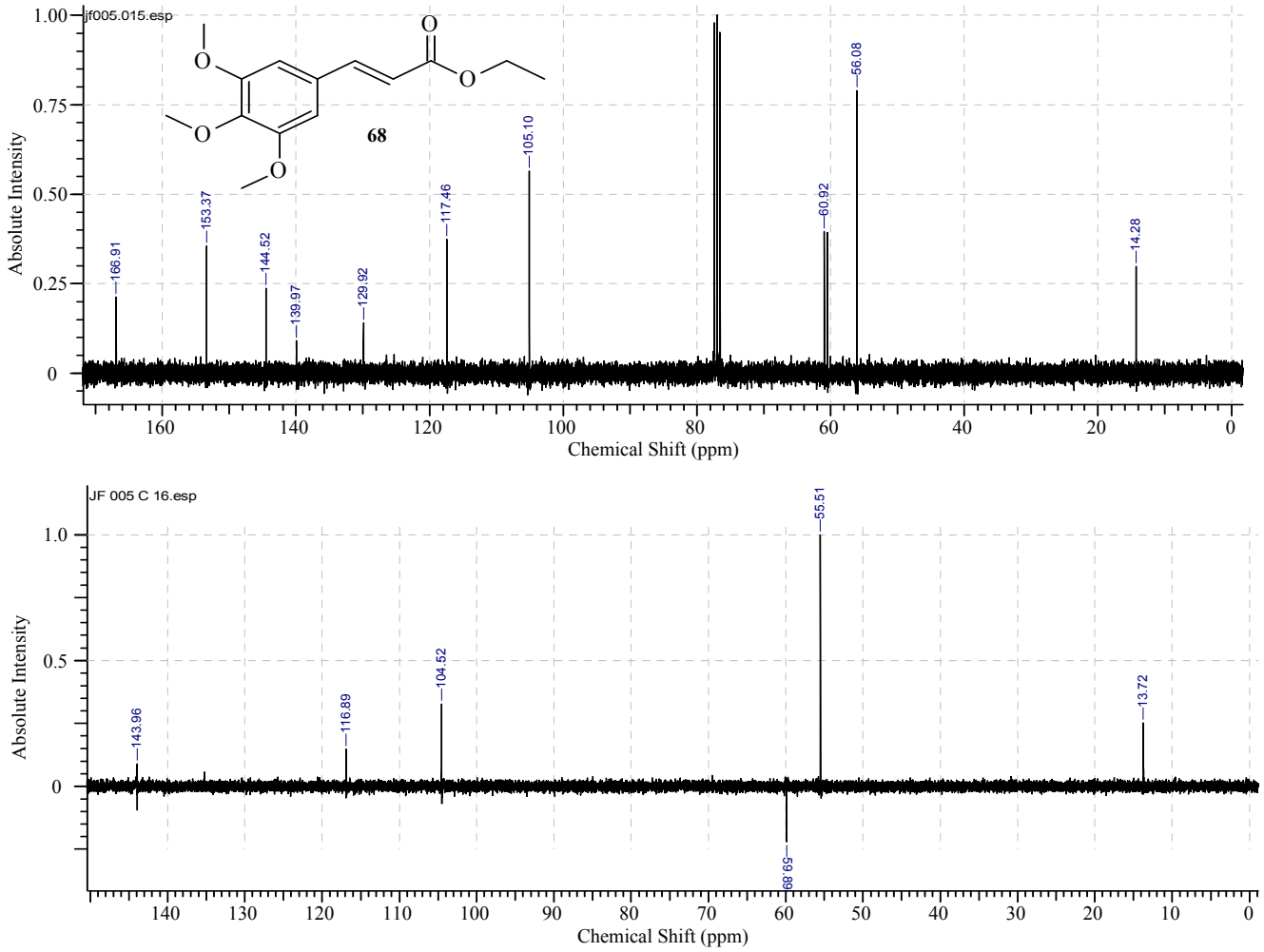
8.1.15 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila



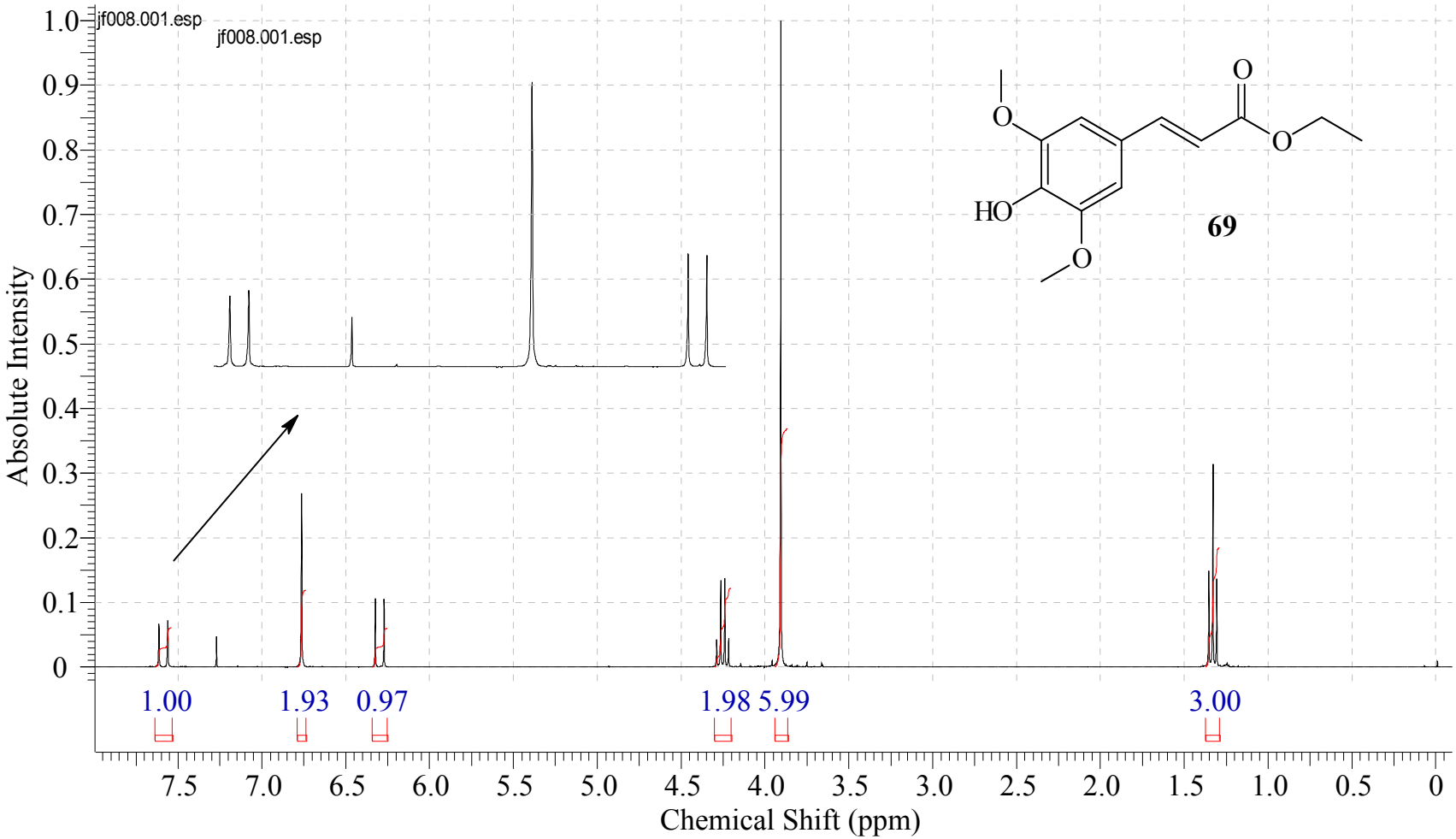
8.1.16 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenoato de etila



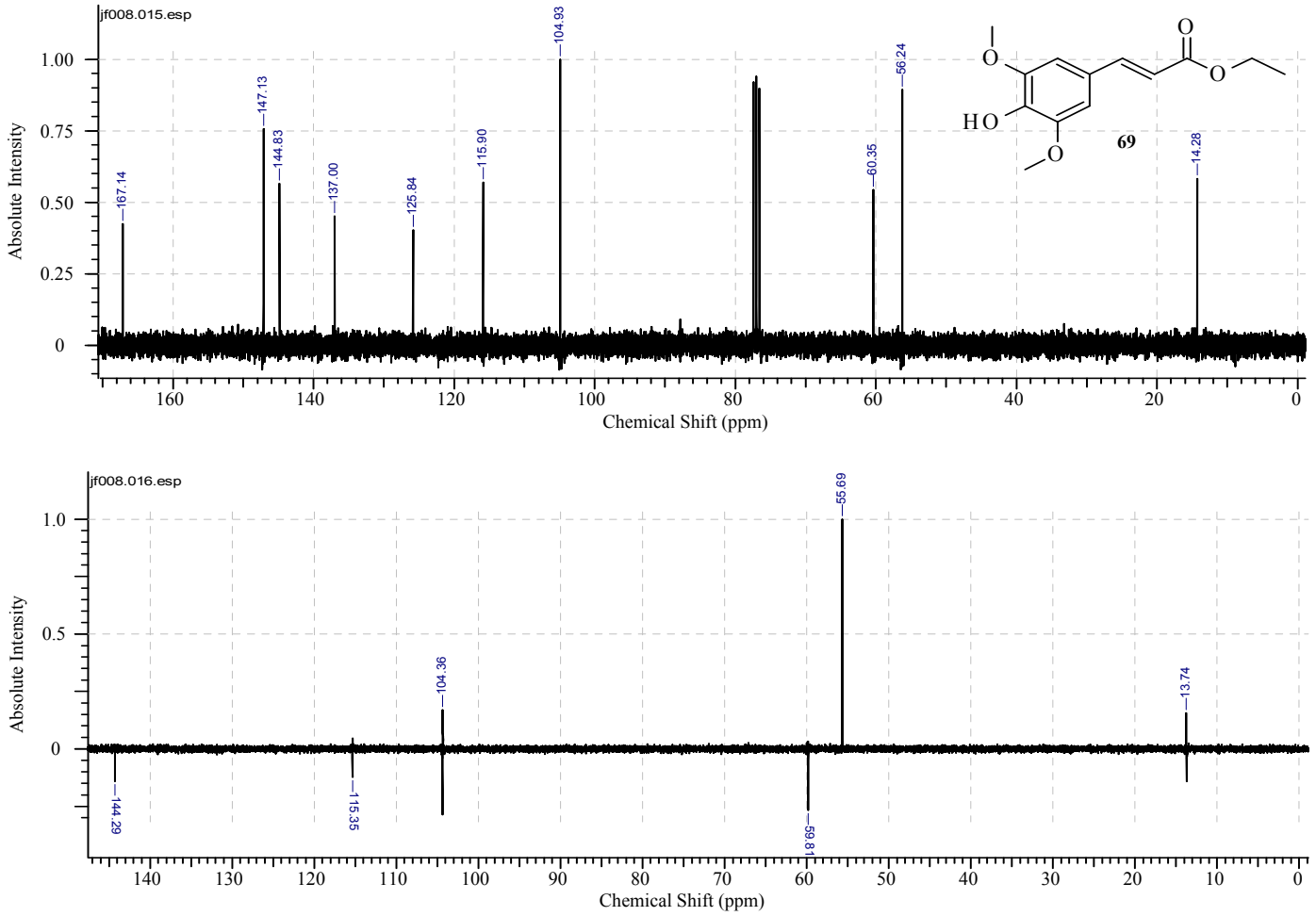
8.1.17 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenoato de etila



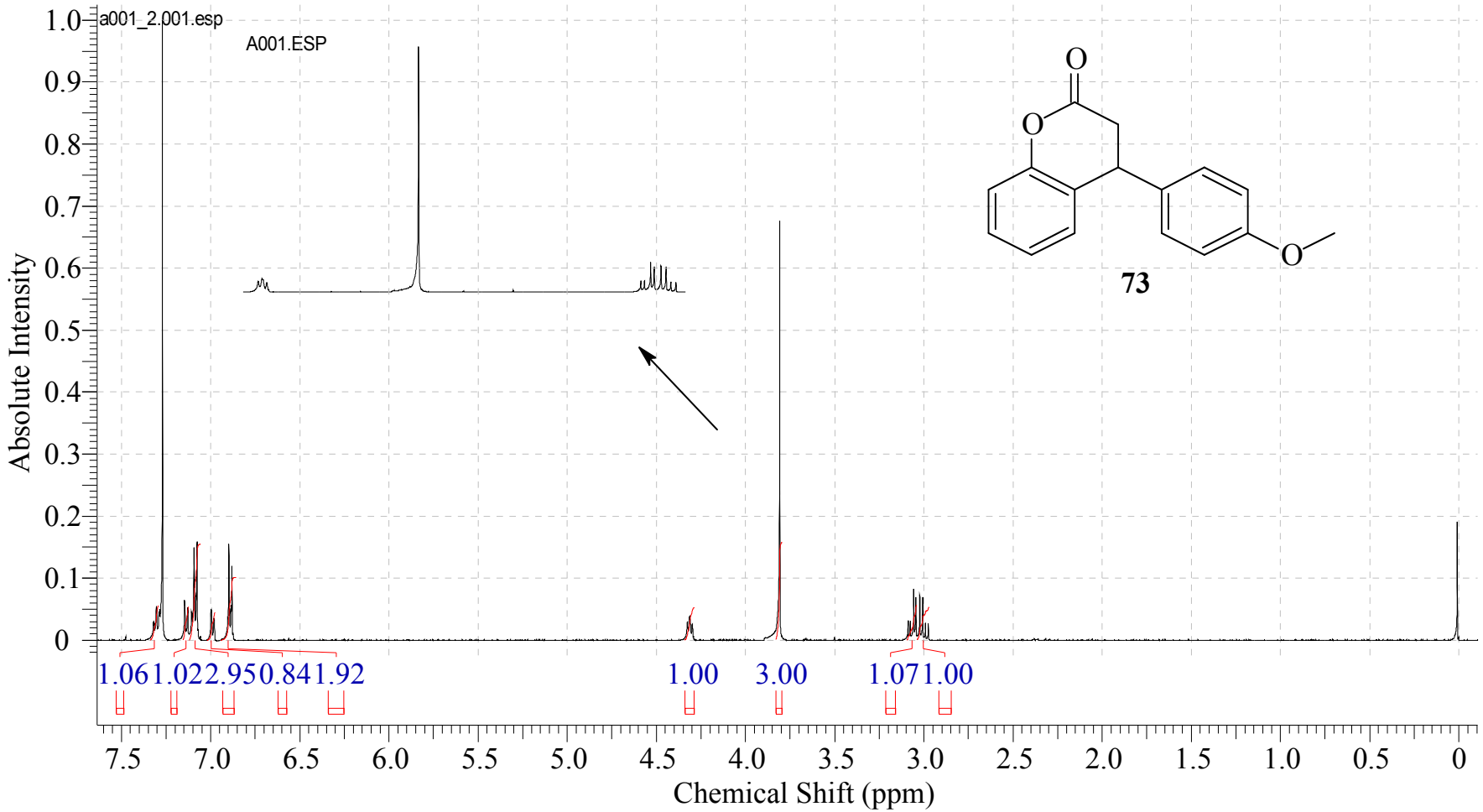
8.1.18 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila



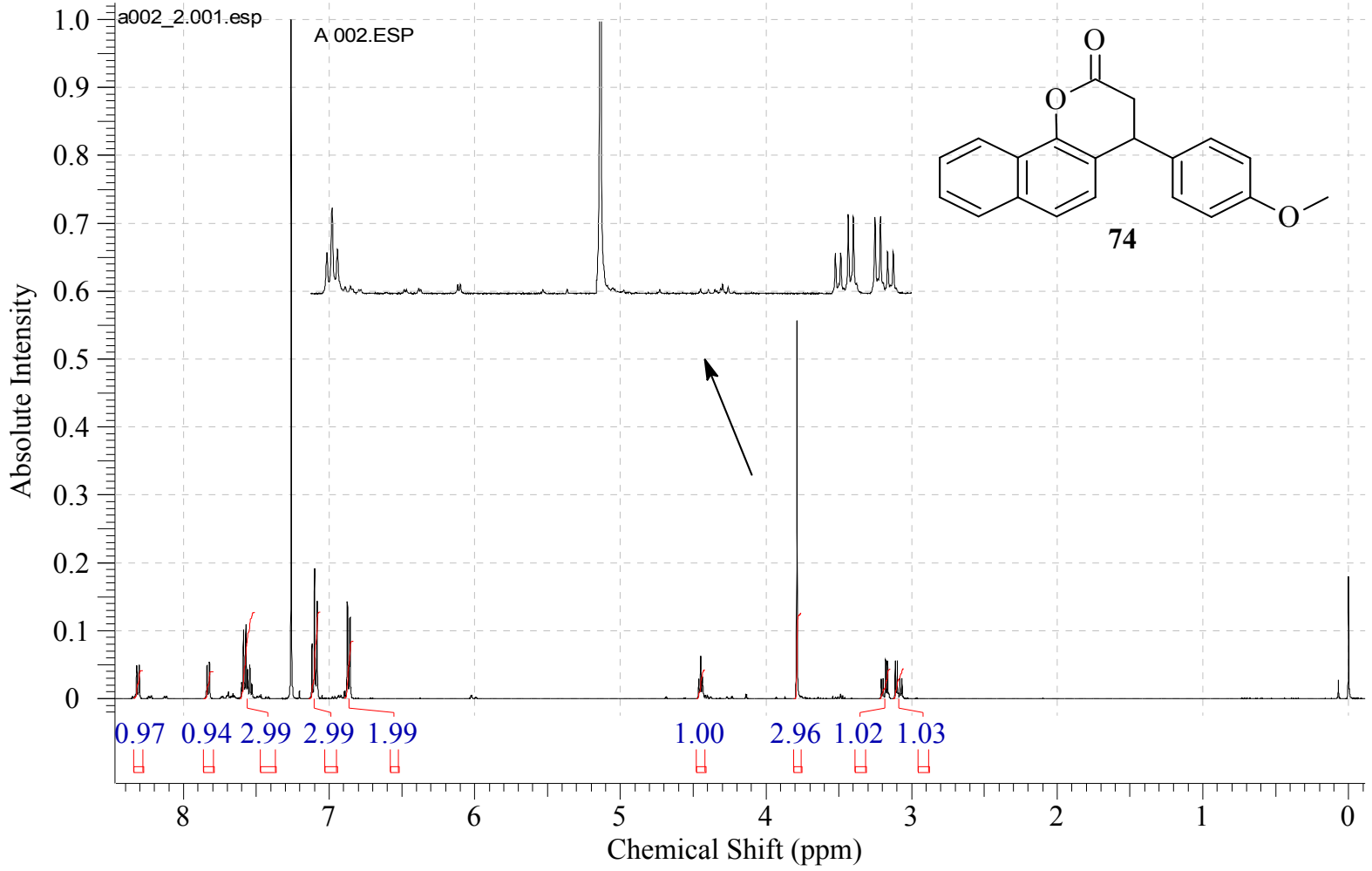
8.1.19 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila



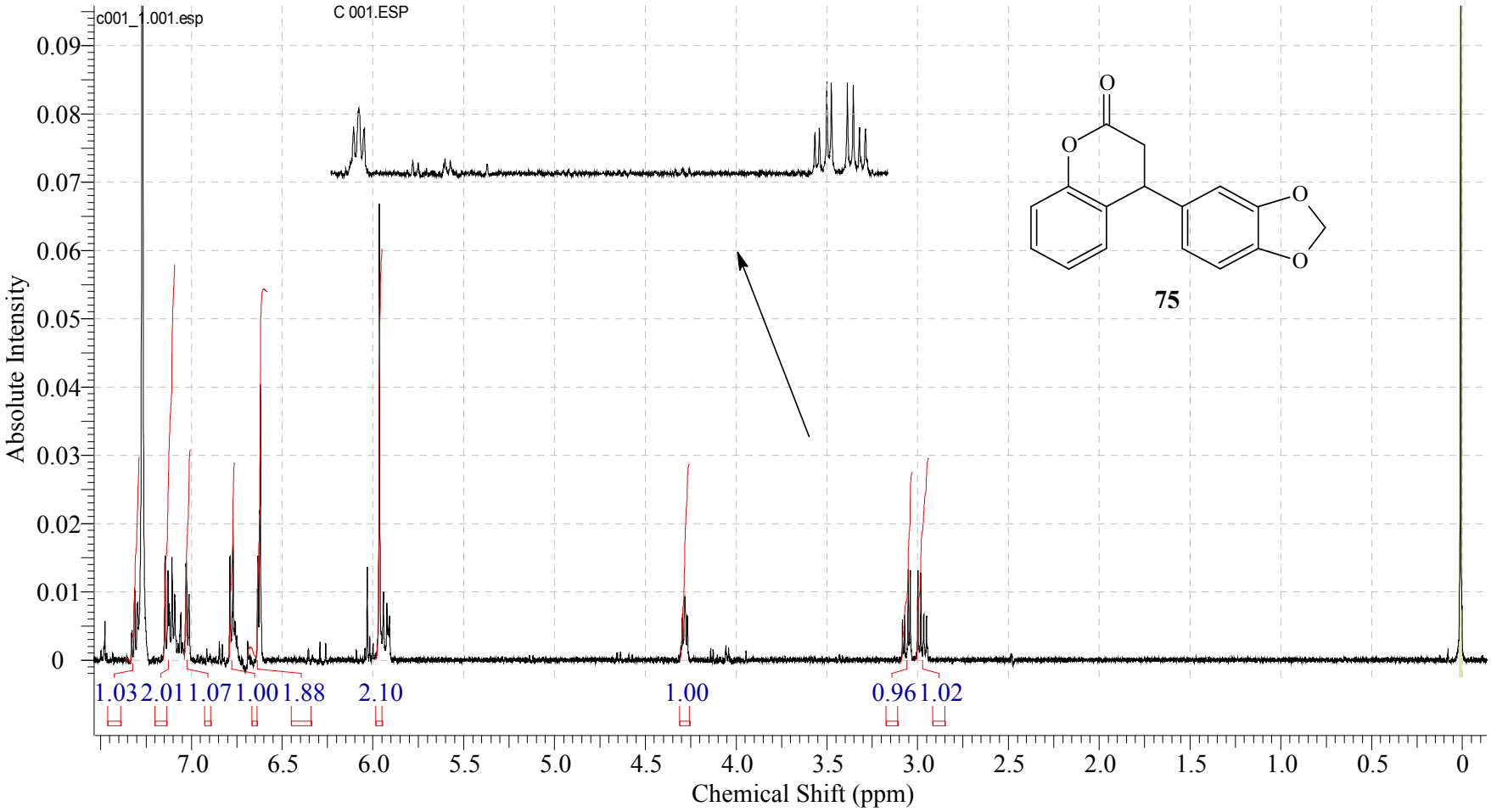
8.1.20 - Espectro de RMN-^{1}H do 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona



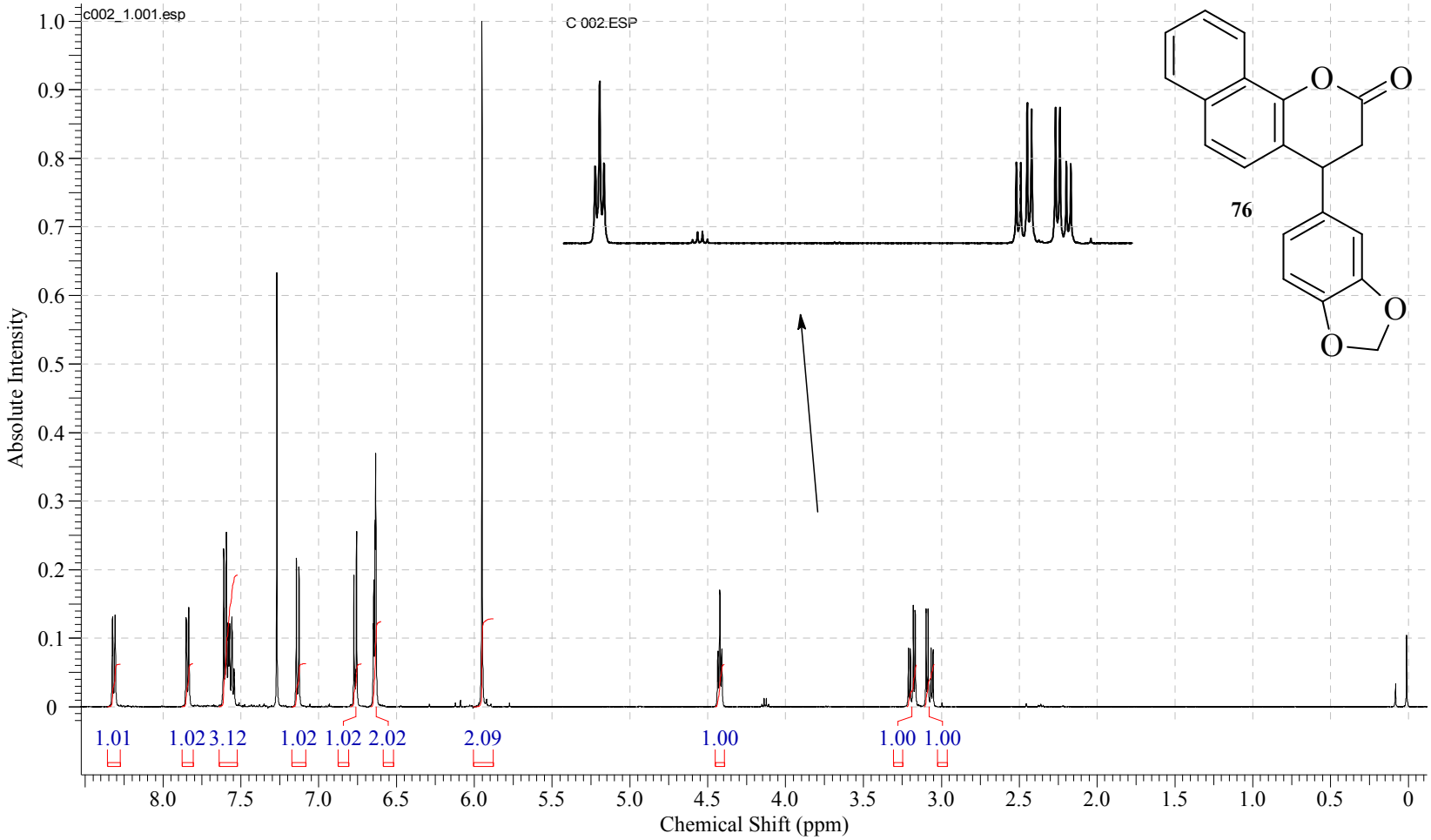
8.1.21 - Espectro de RMN- ^{1}H do 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



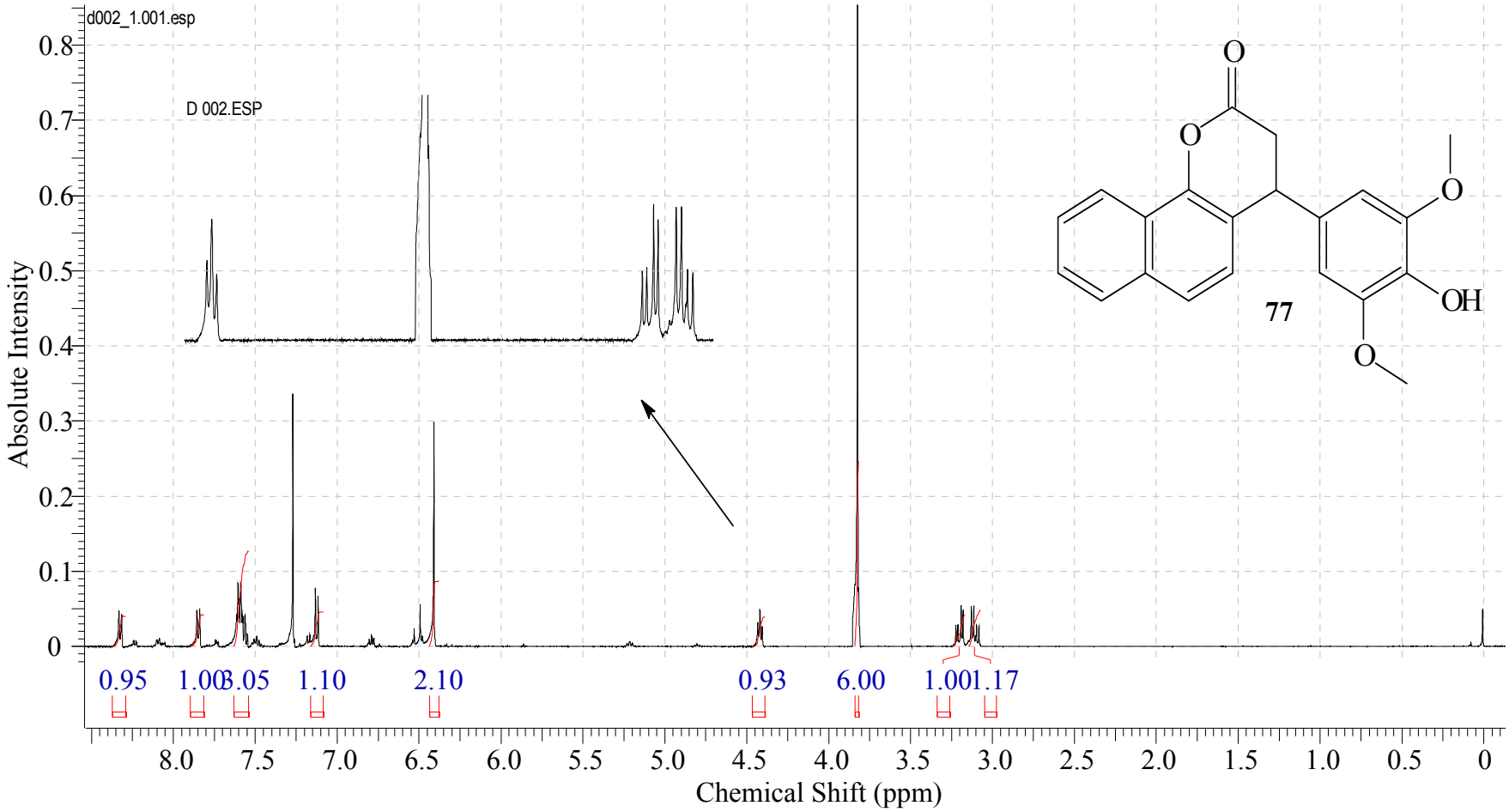
8.1.22 - Espectro de RMN-^{1}H do 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona



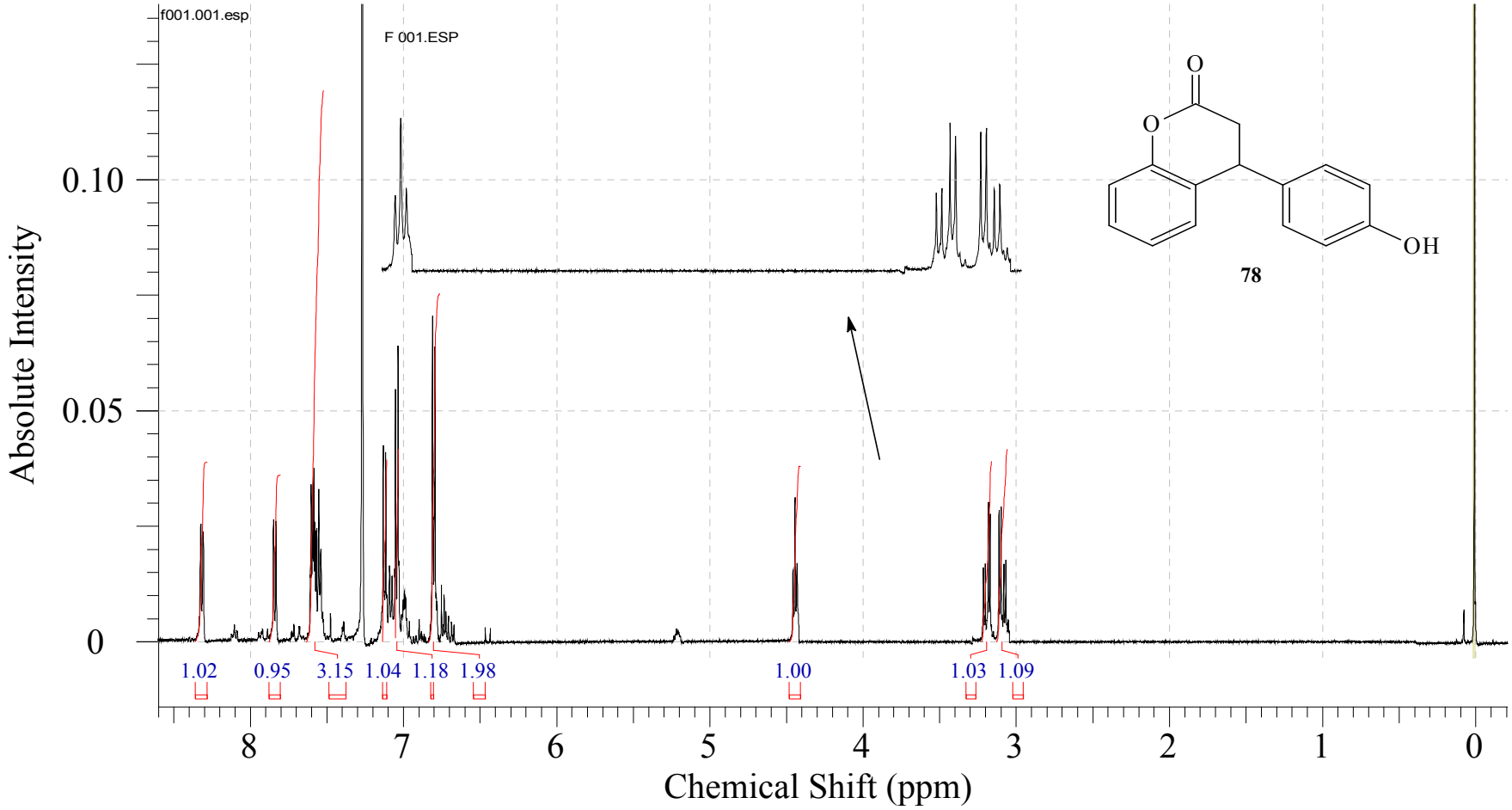
8.1.23 - Espectro de RMN-^{1}H do 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



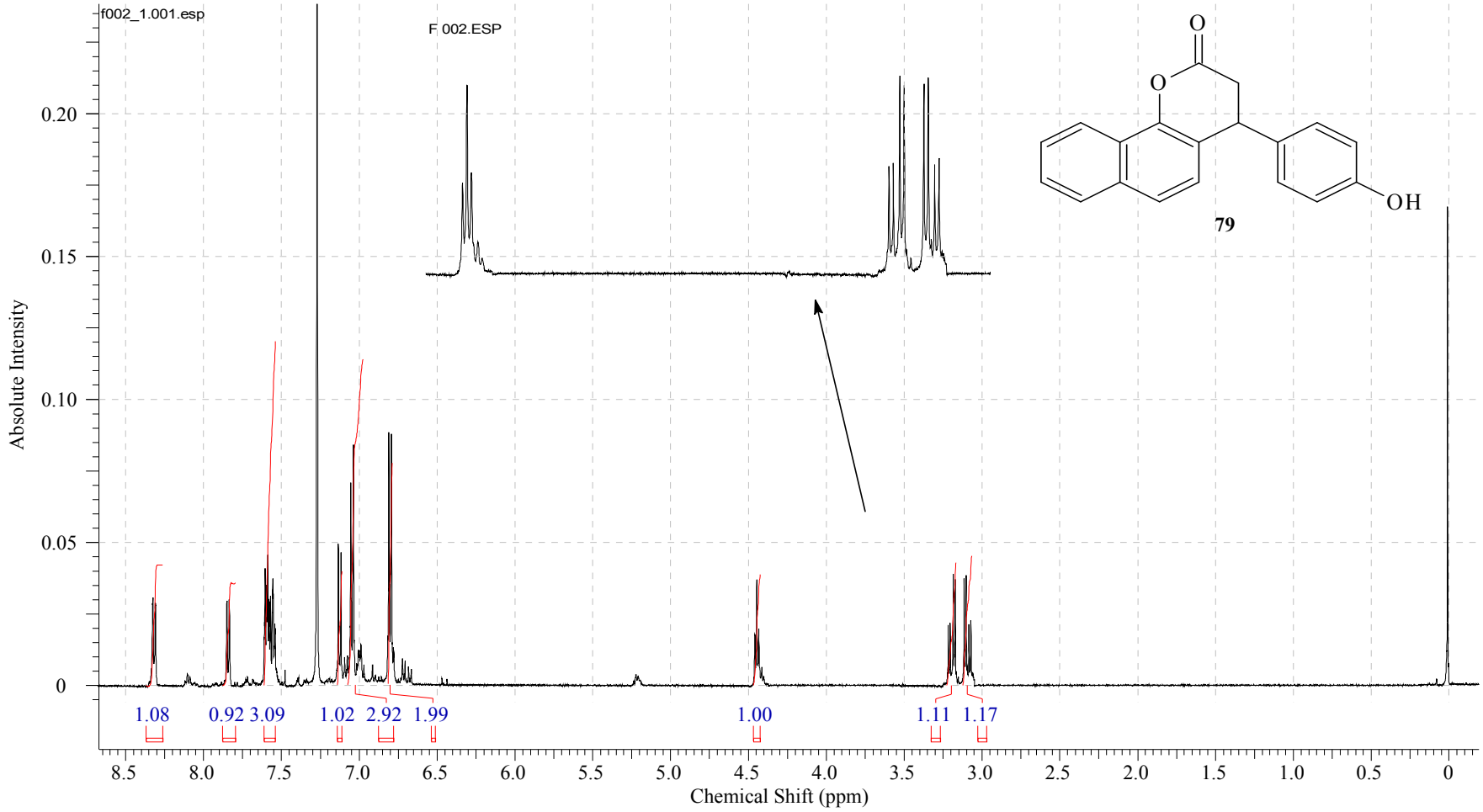
8.1.24 - Espectro de RMN-^{1}H do 4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



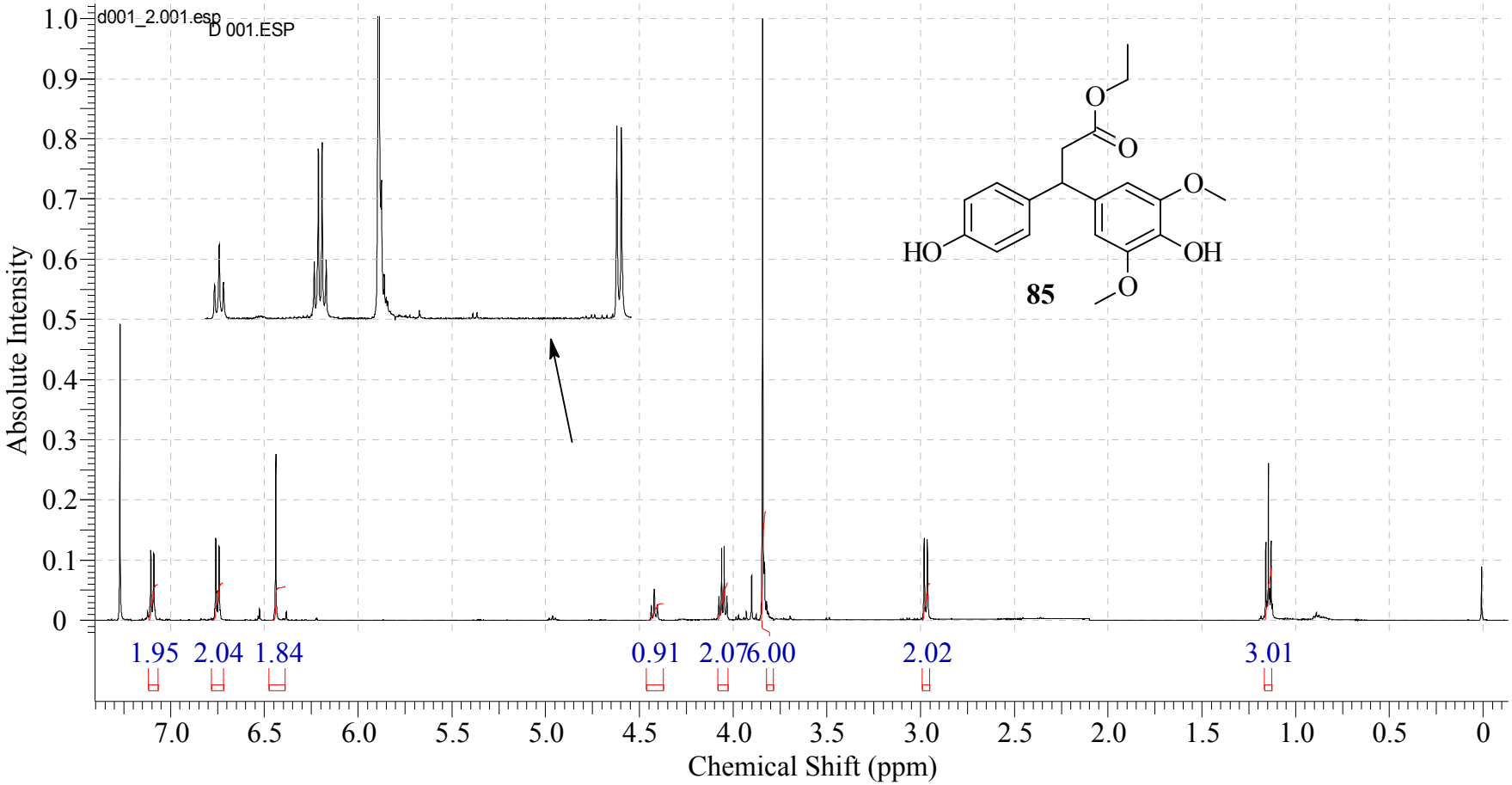
8.1.25 - Espectro de RMN-^{1}H do 4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona



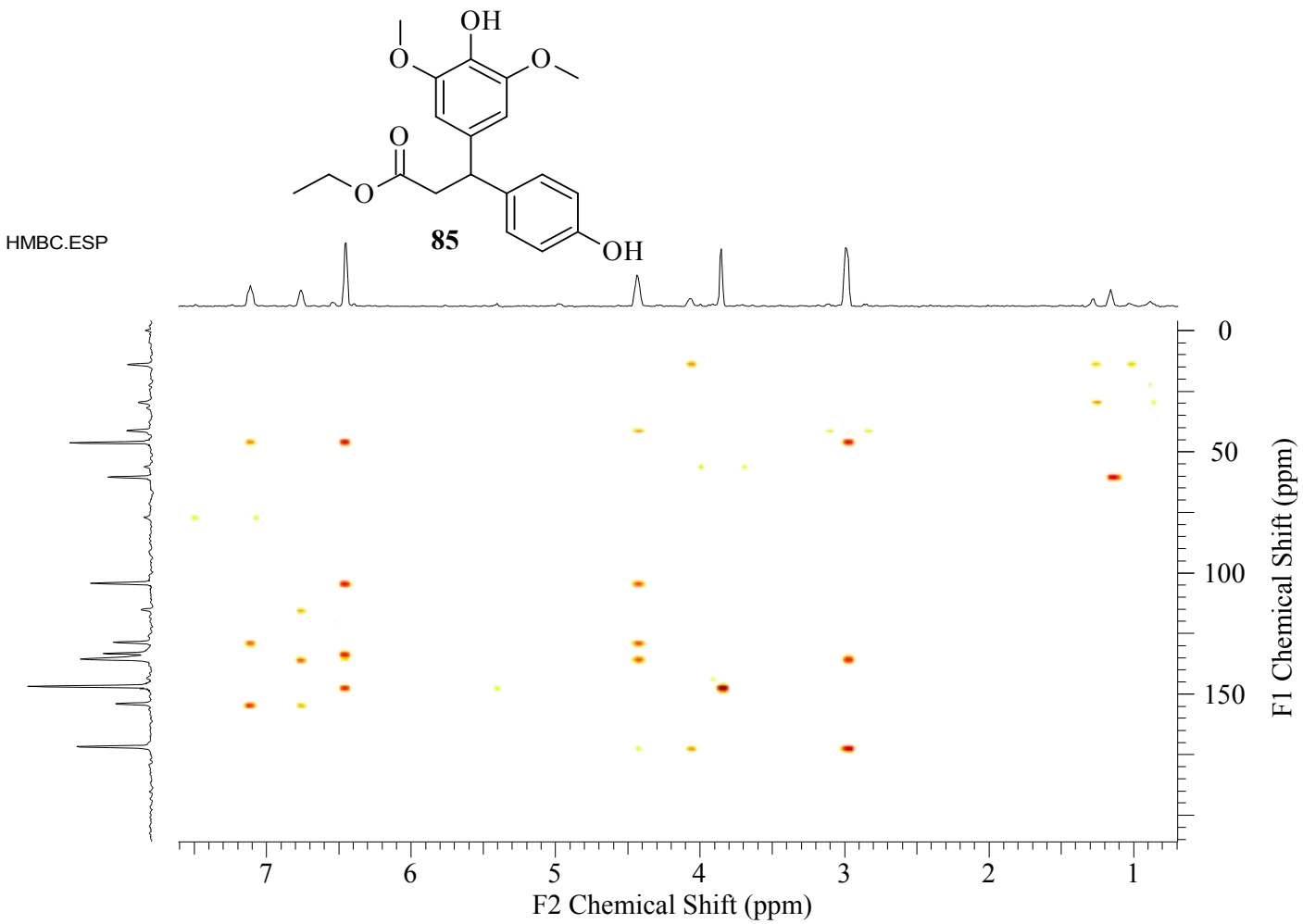
8.1.26 - Espectro de RMN-^{1}H do 4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



8.1.27- Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-(4-hidroxifenil) propanoato de etila

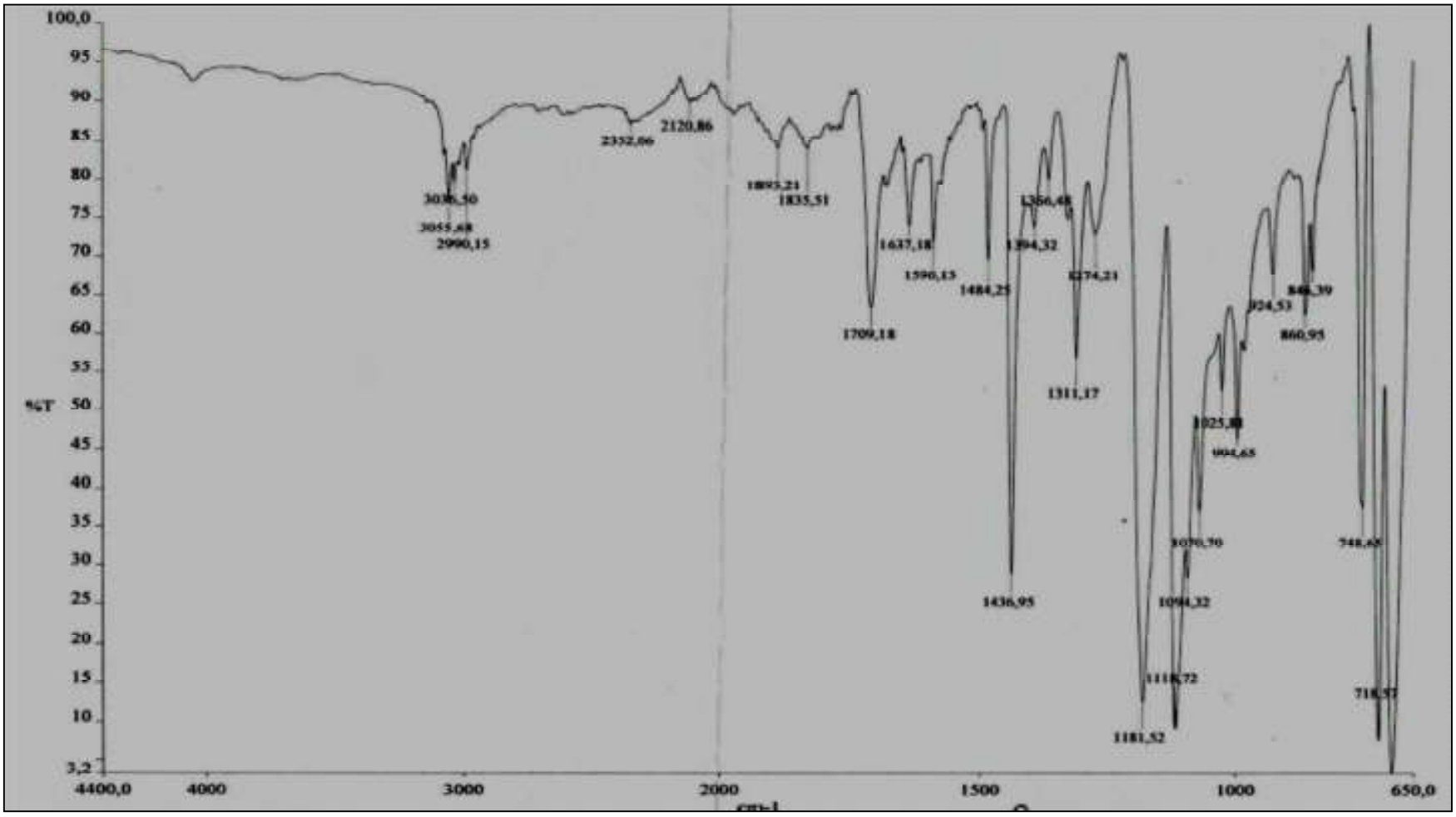


8.1.28 - Espectro de HMBC do 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-(4-hidroxifenil) propanoato de etila

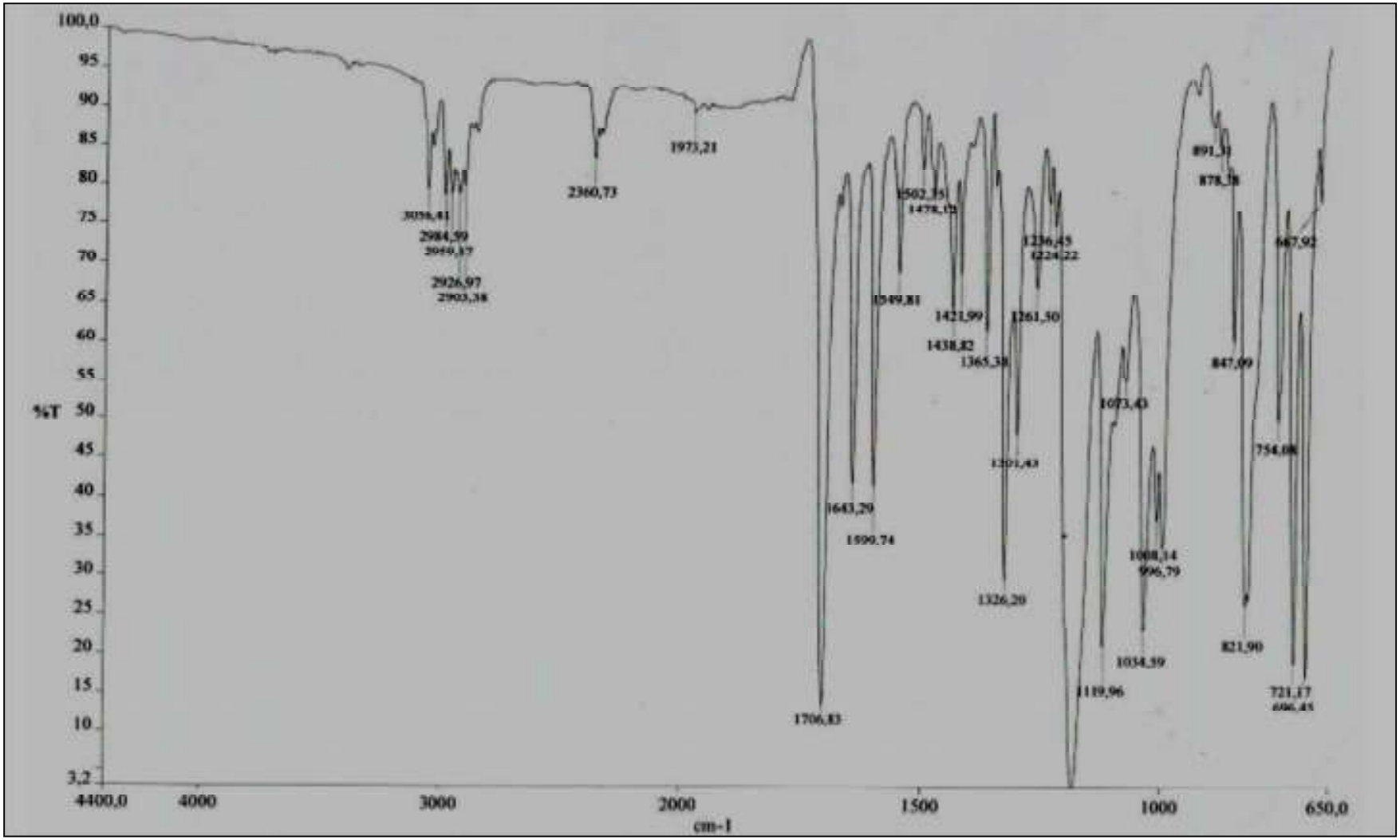


8.2 - Anexo 2

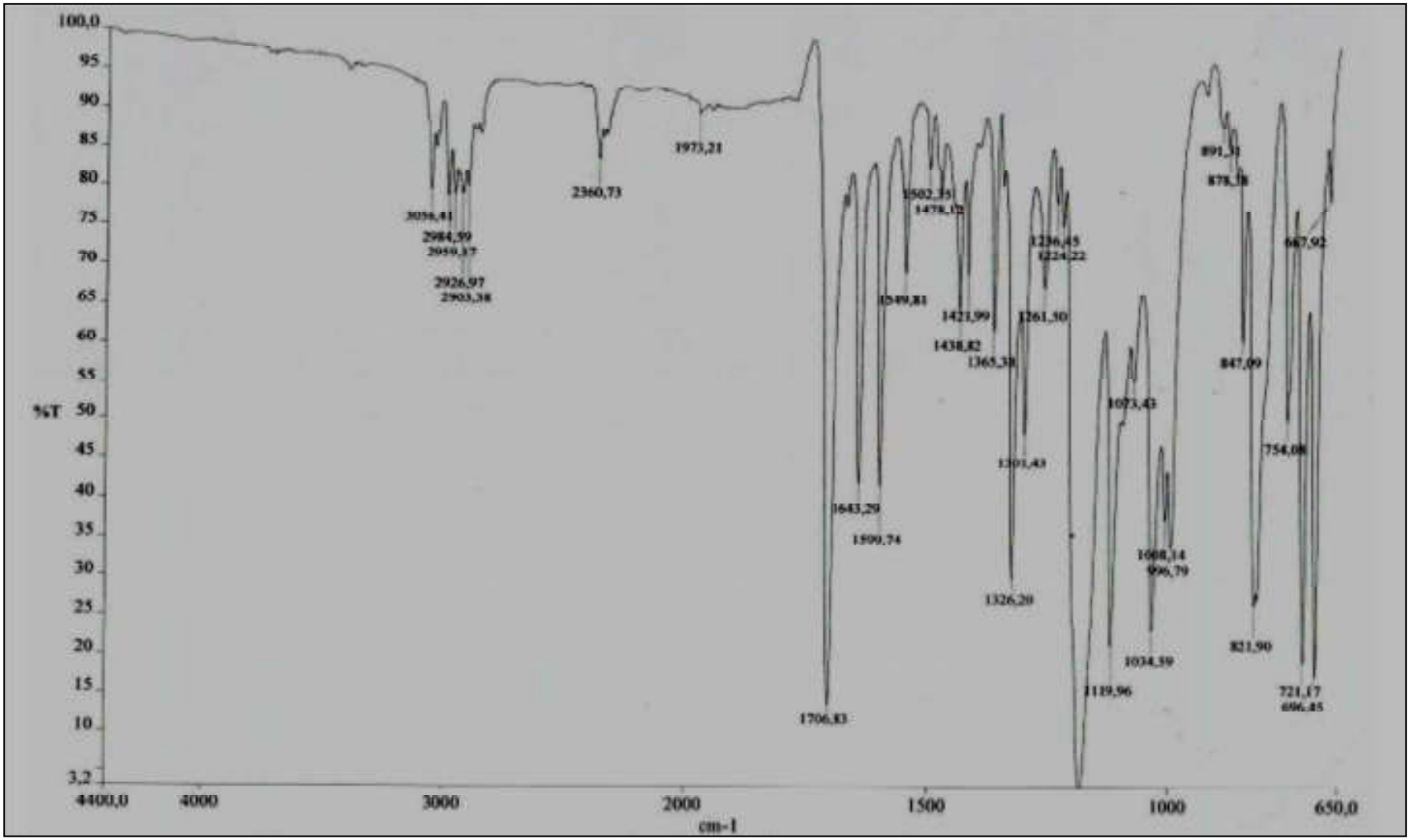
8.2.1 – Espectro de IV do 3-(Fenil)-2-propenoato de etila



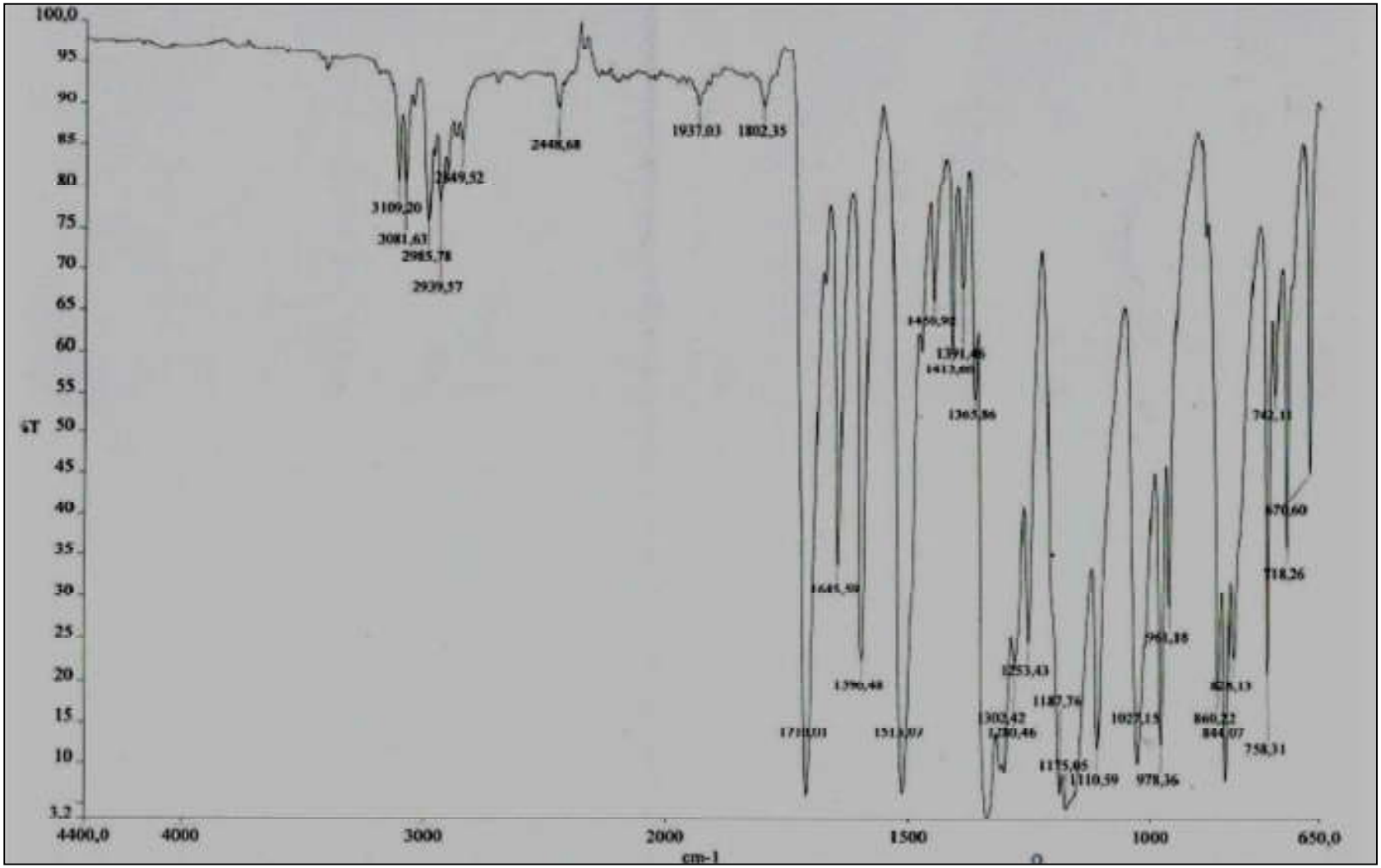
8.2.2 – Espectro de IV do 3-(2-piridin)-2-propenoato de etila



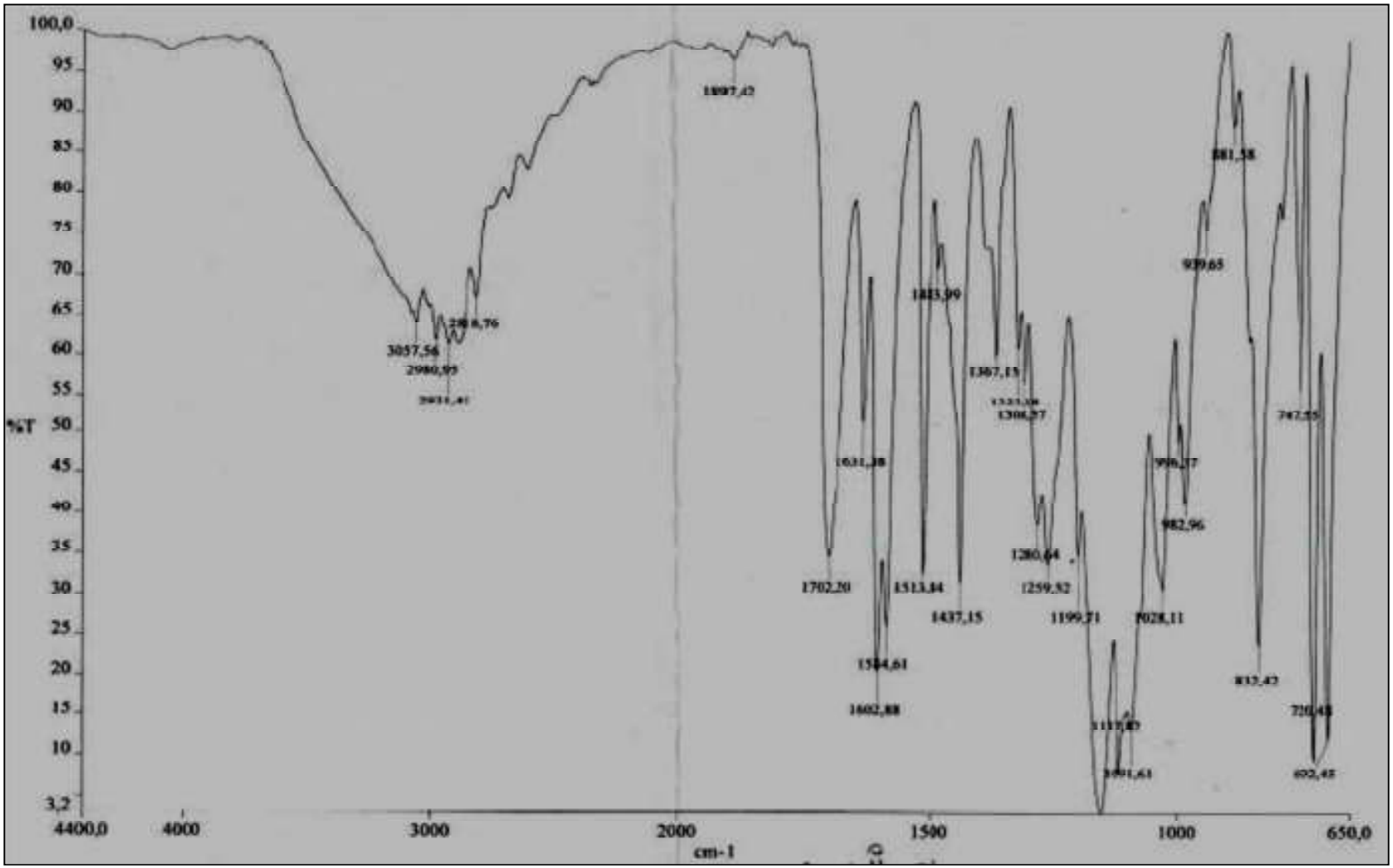
8.2.3 – Espectro de IV do 3-(4-piridin)-2-propenoato de etila



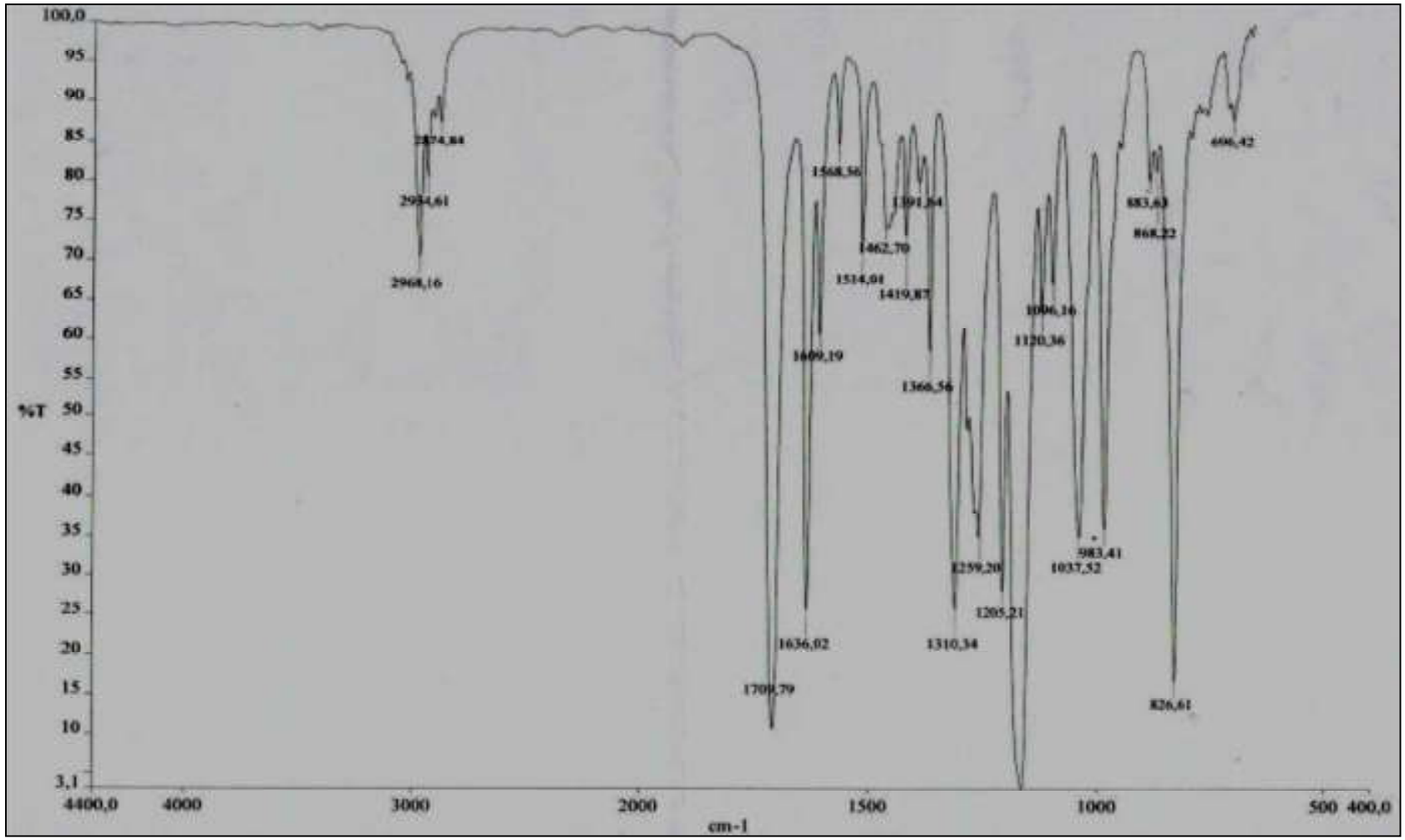
8.2.4 – Espectro de IV do 3-(4-Nitrofenil)-2-propenoato de etila



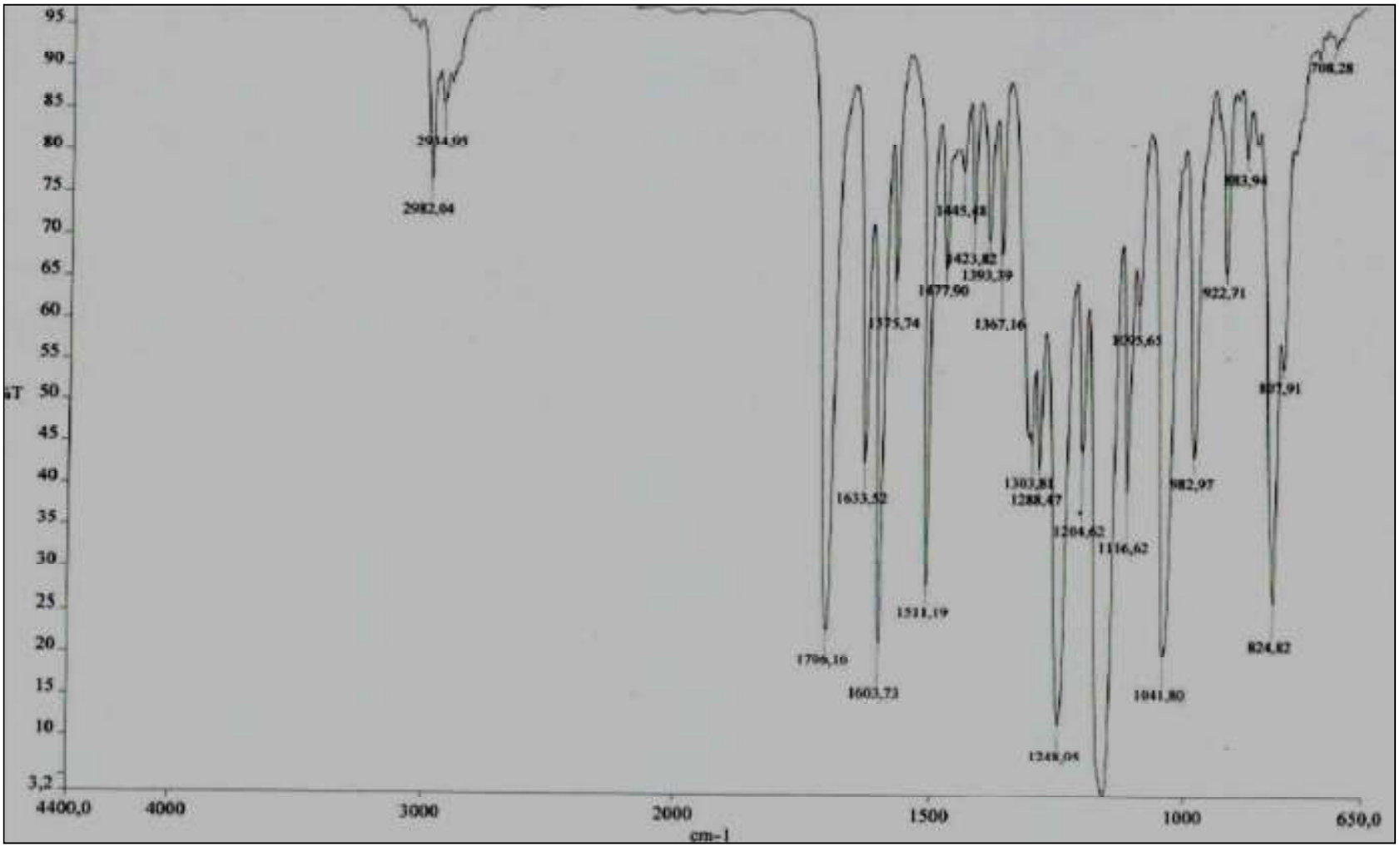
8.2.5 – Espectro de IV do 3-(4-metilenofenil)-2-propenoato de etila



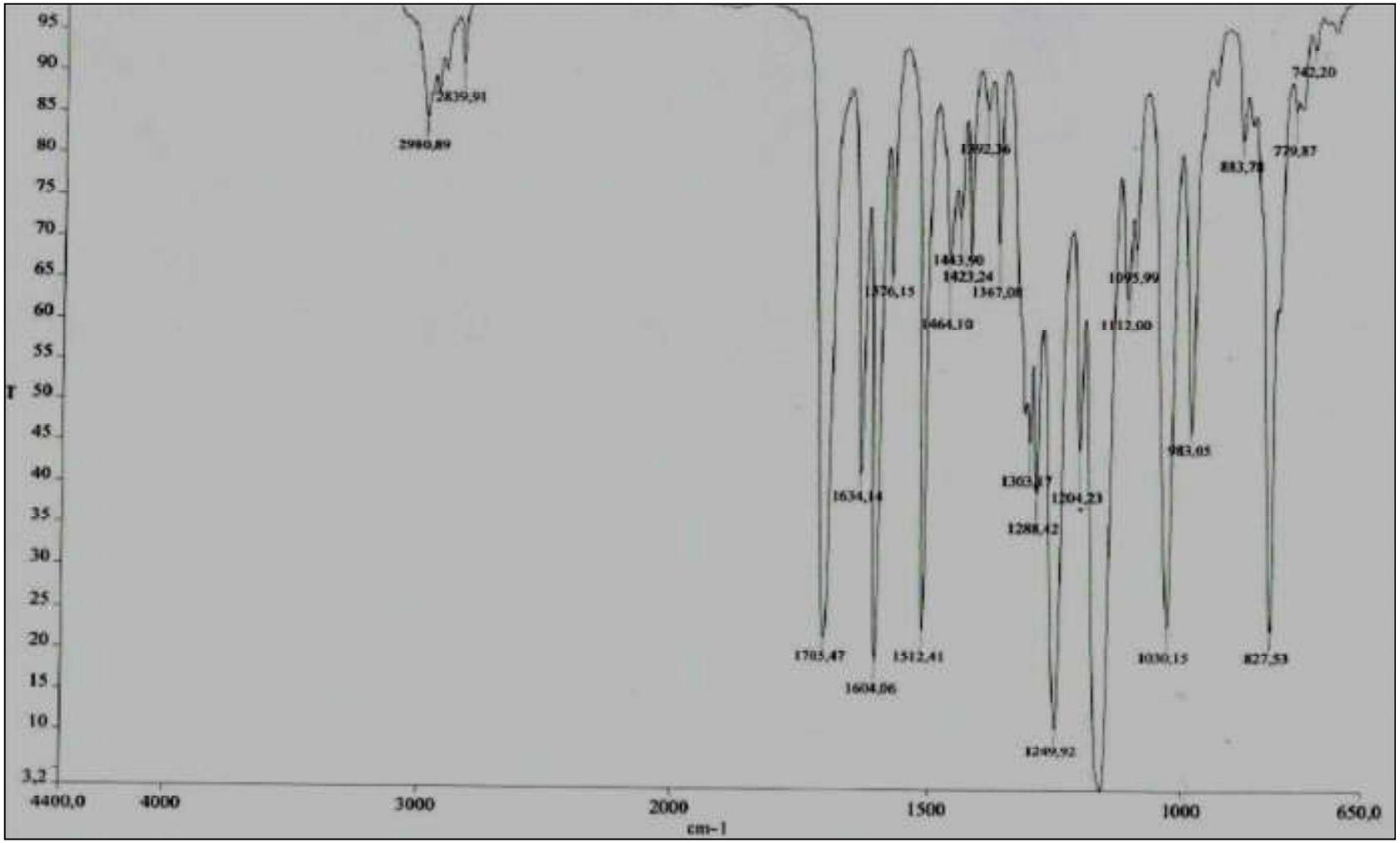
8.2.6 – Espectro de IV do 3-(4-etilenofenil)-2-propenoato de etila



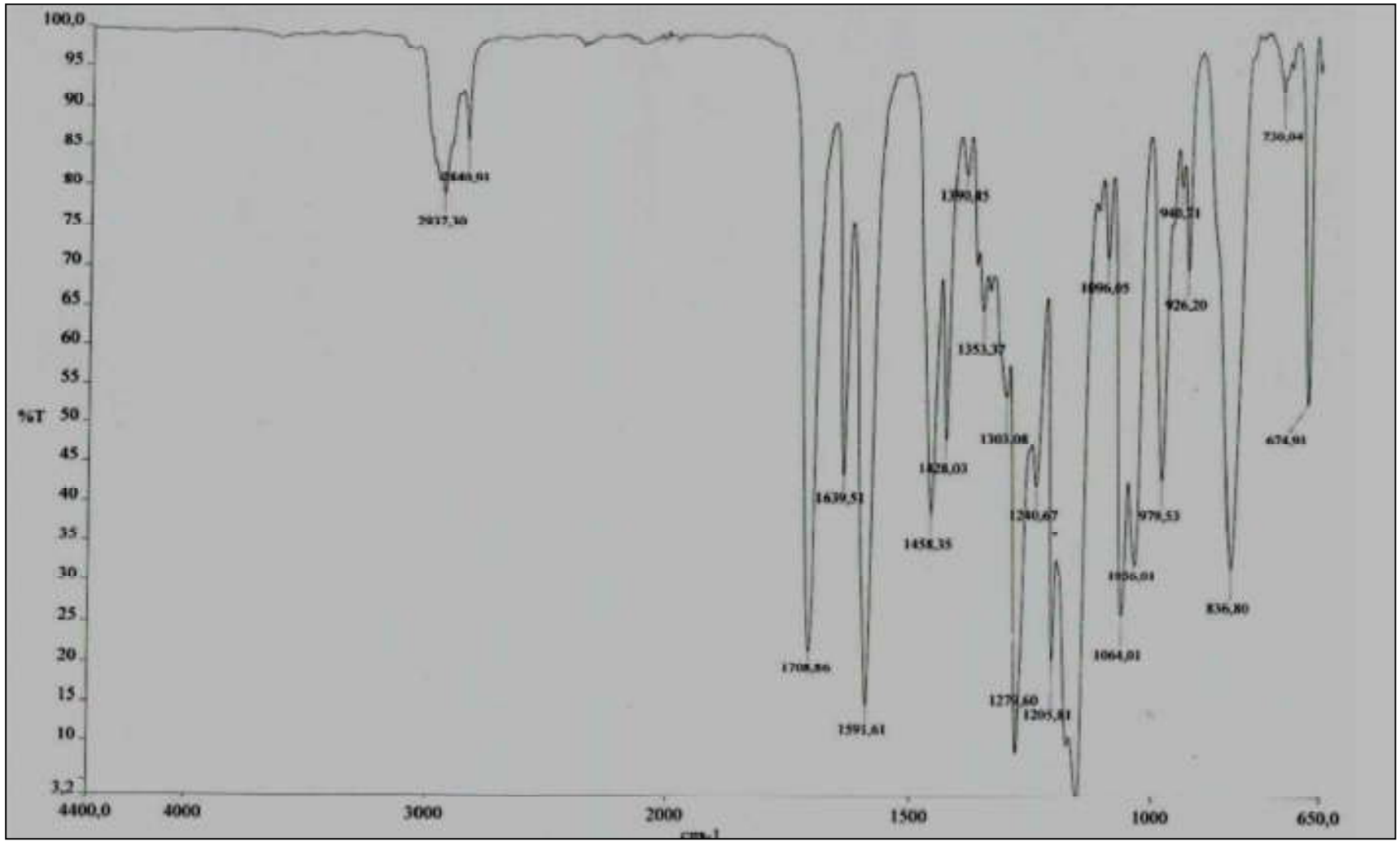
8.2.7 – Espectro de IV do 3-(4-Etoxifenil)-2-propenoato de etila



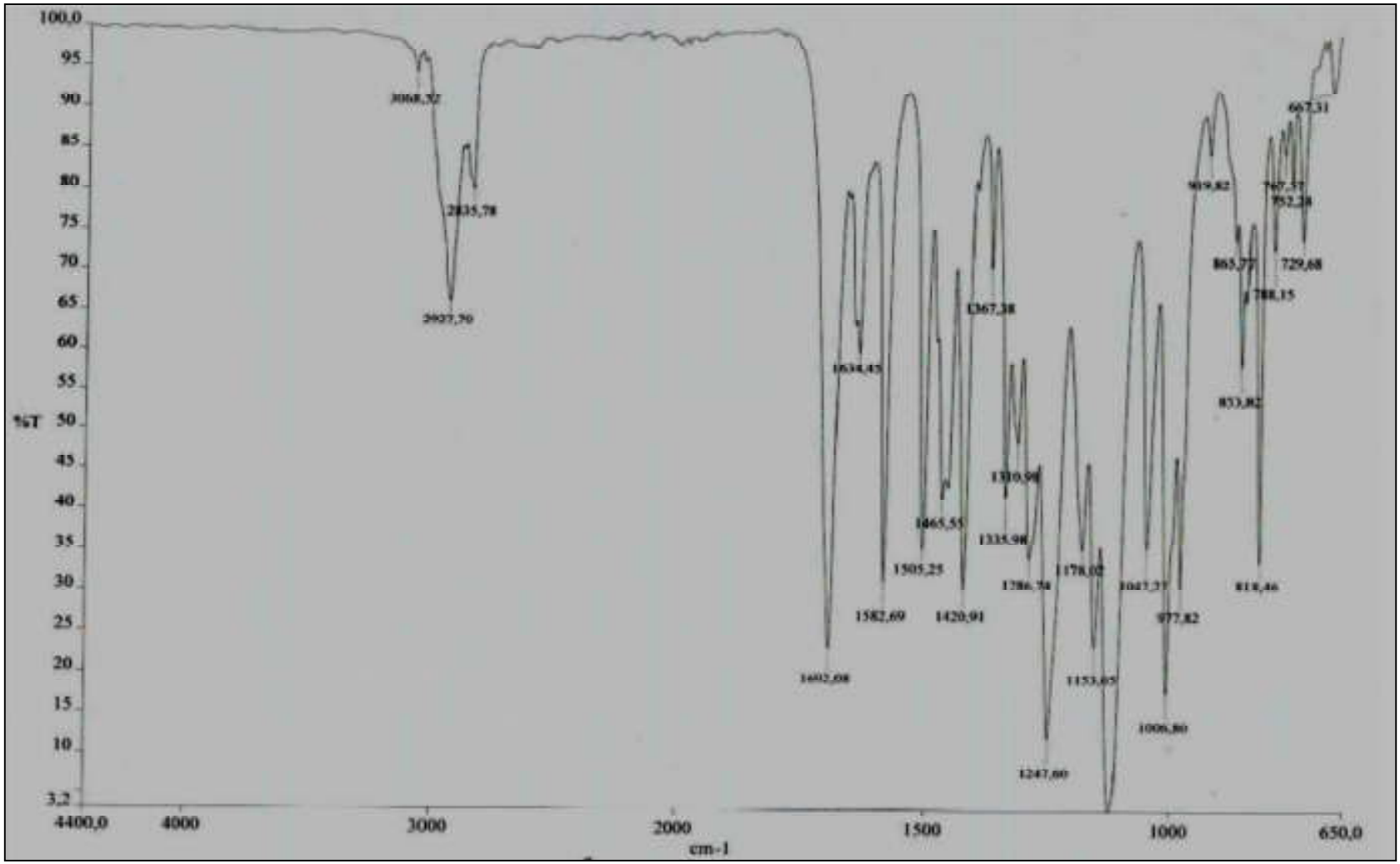
8.2.8 – Espectro de IV do 3-(4-metoxifenil)-2-propenoato de etila



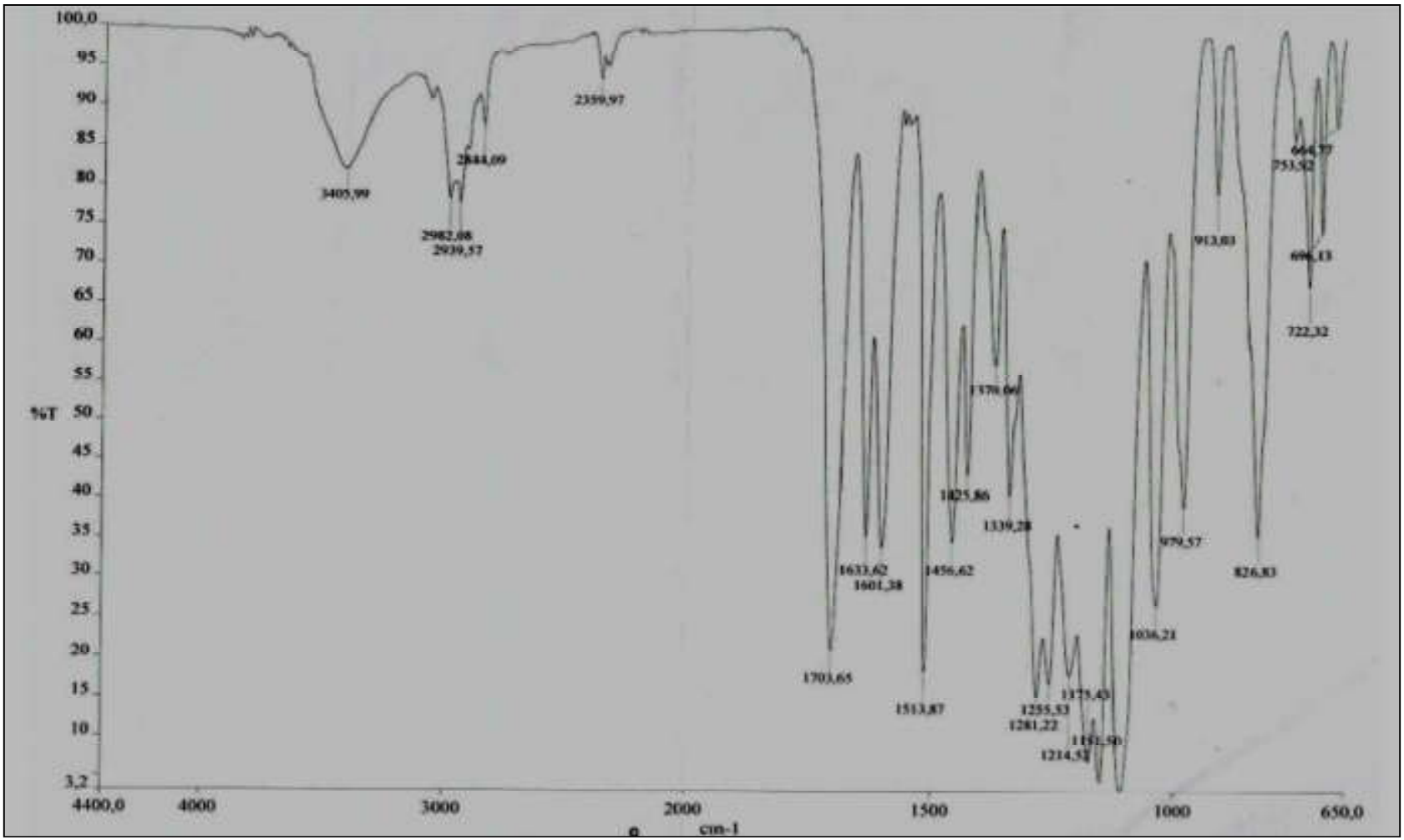
8.2.9 – Espectro de IV do 3-(3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila



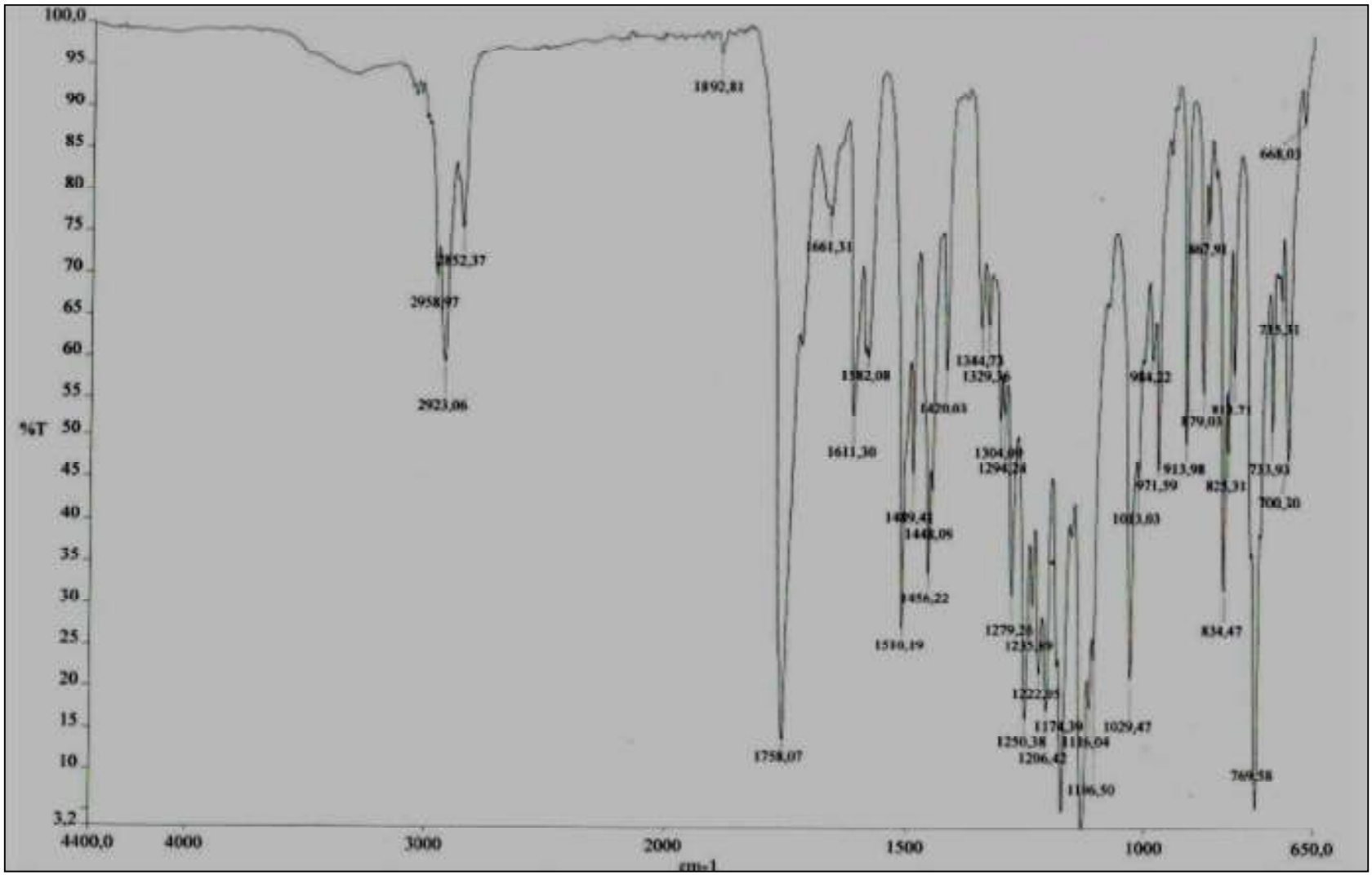
8.2.10 – Espectro de IV do 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenoato de etila



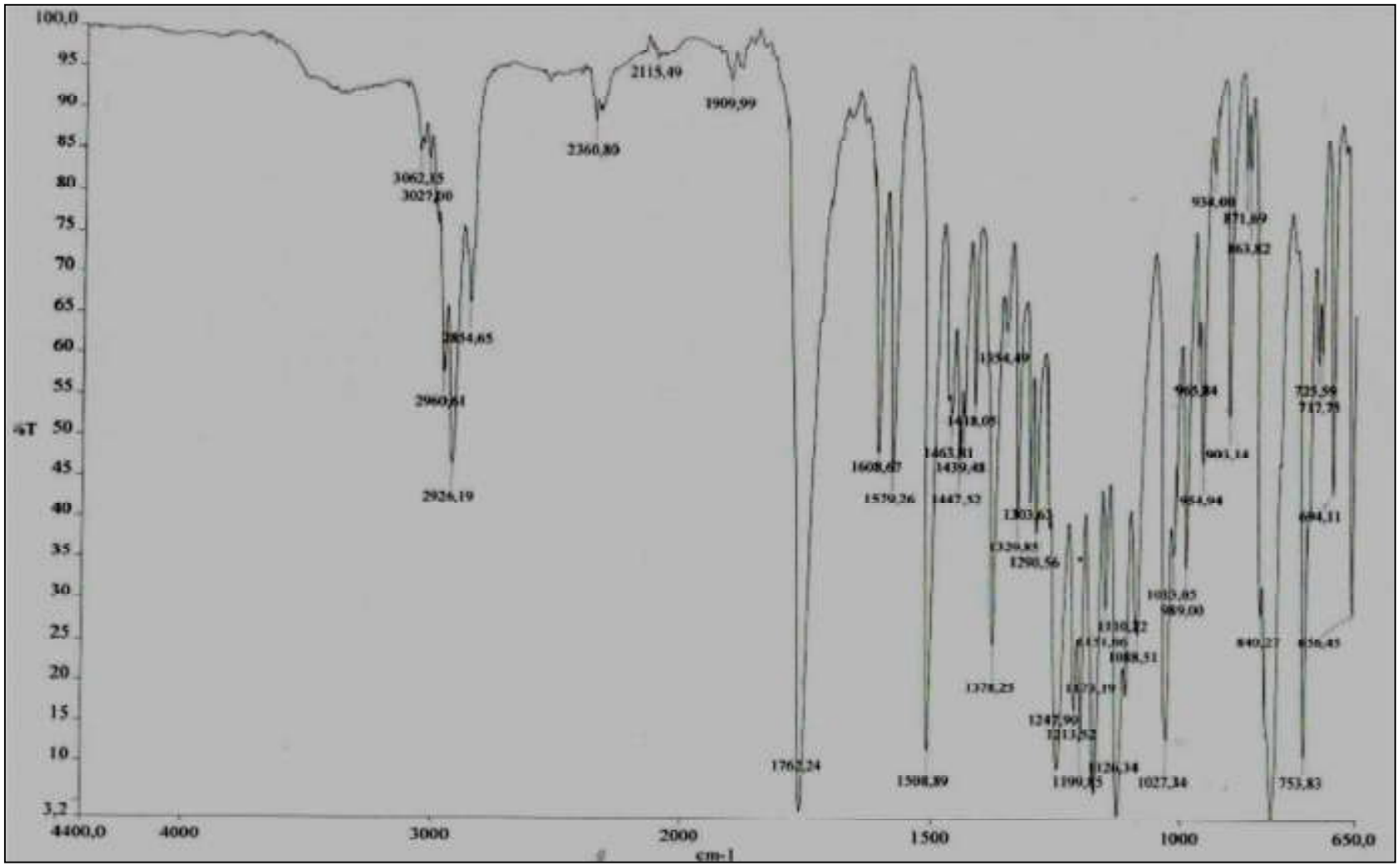
8.2.11 – Espectro de IV do 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila



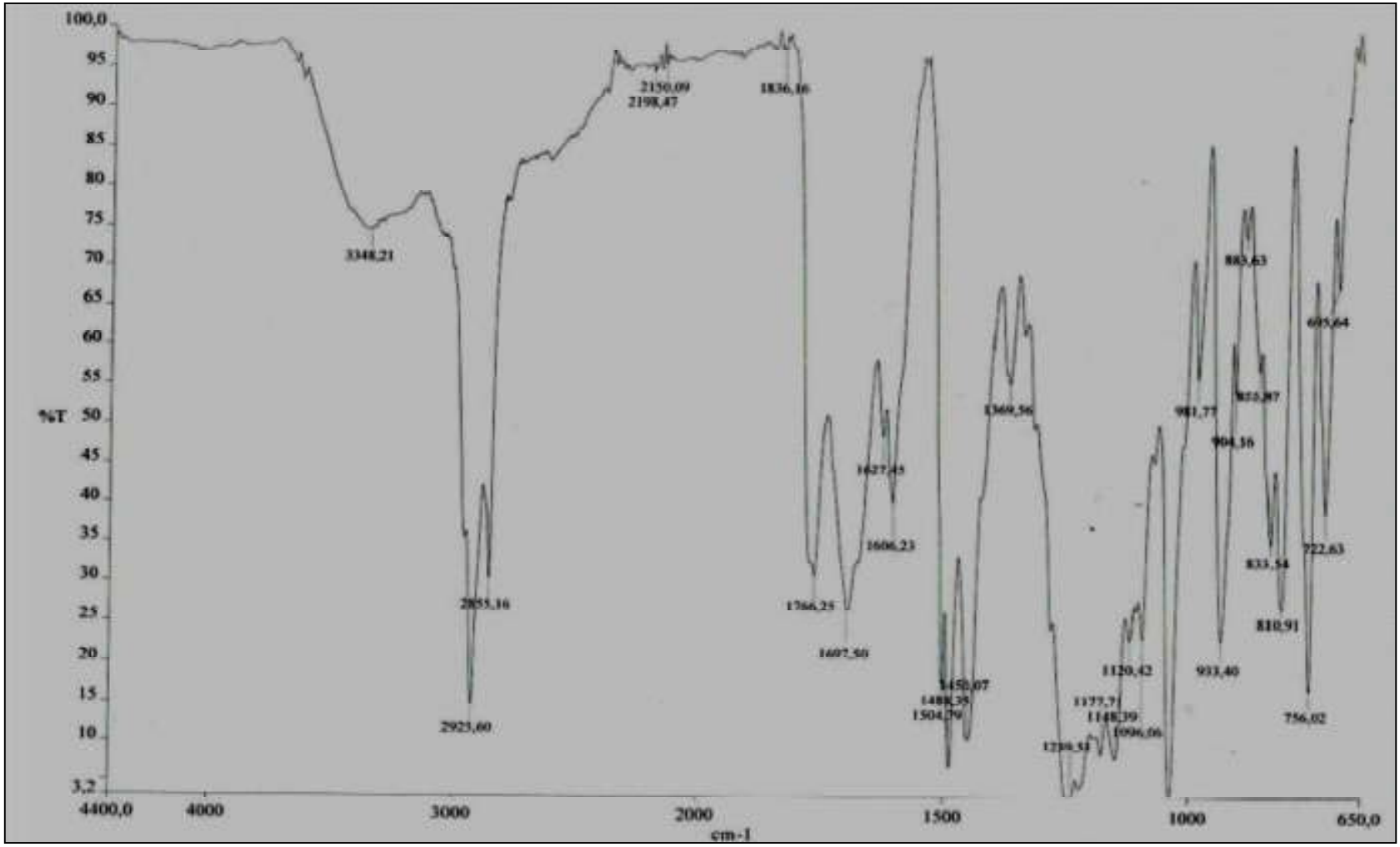
8.2.12 – Espectro de IV da 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona



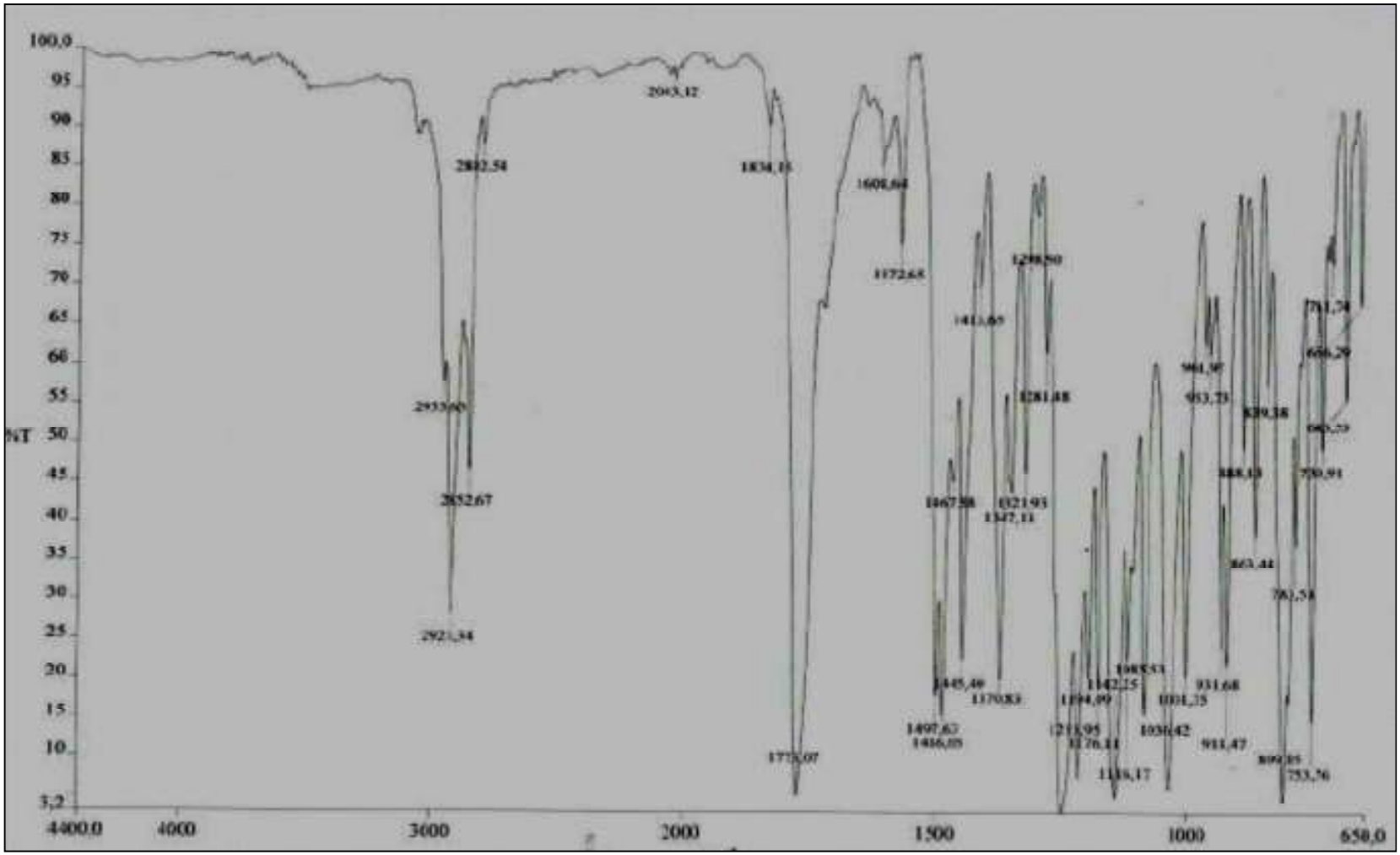
8.2.13 – Espectro de IV da 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



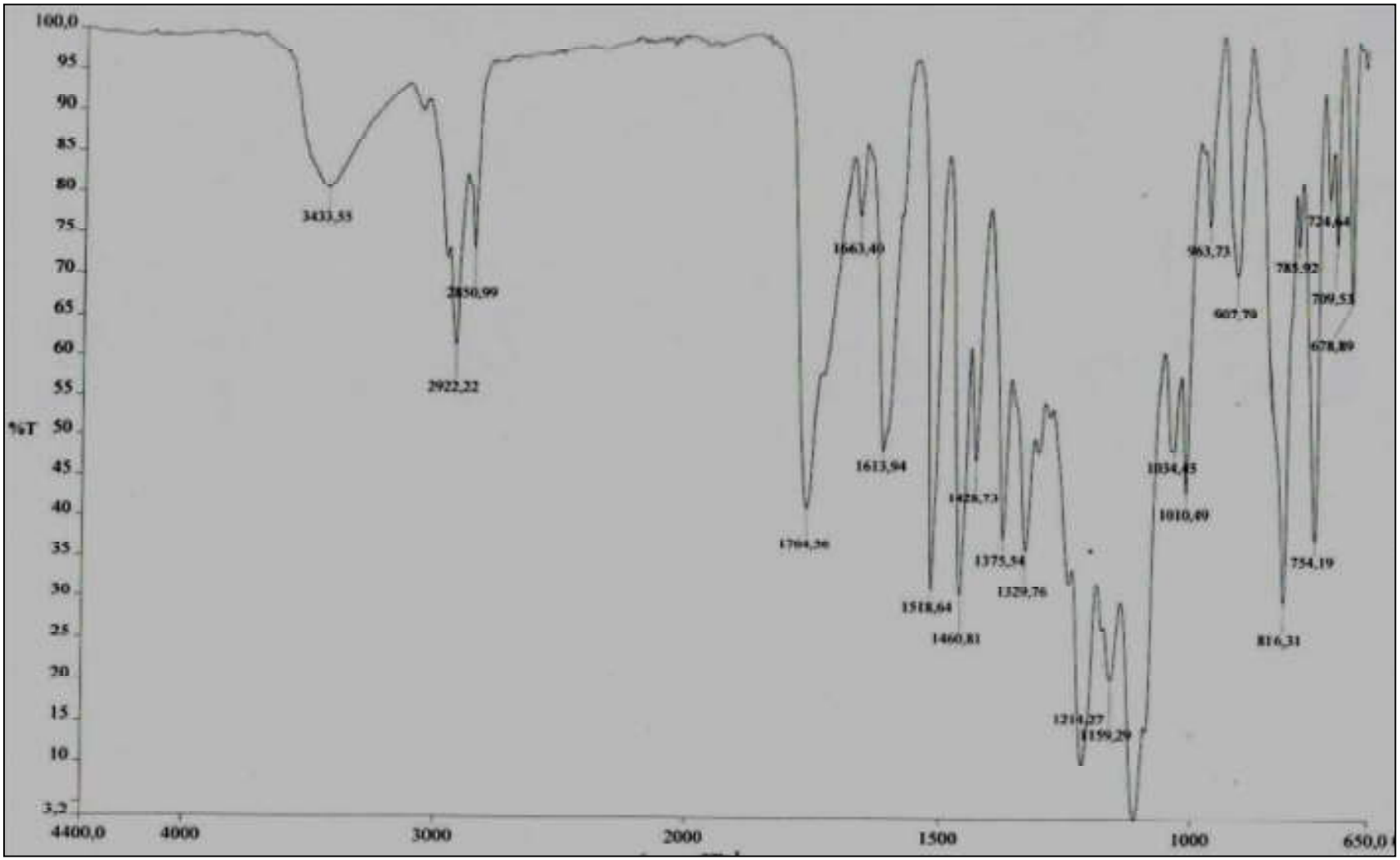
8.2.14 – Espectro de IV da 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona



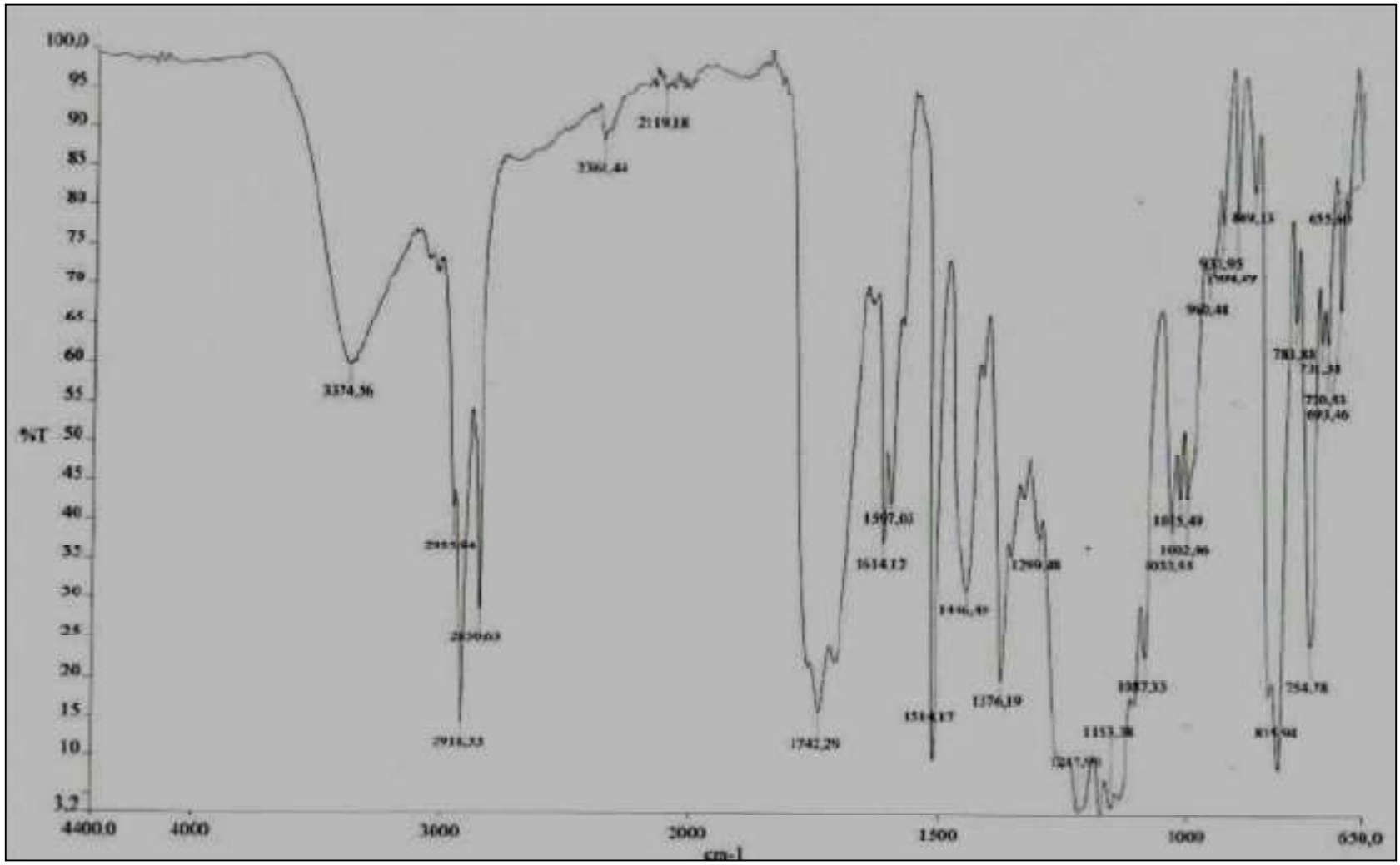
8.2.15 – Espectro de IV da 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



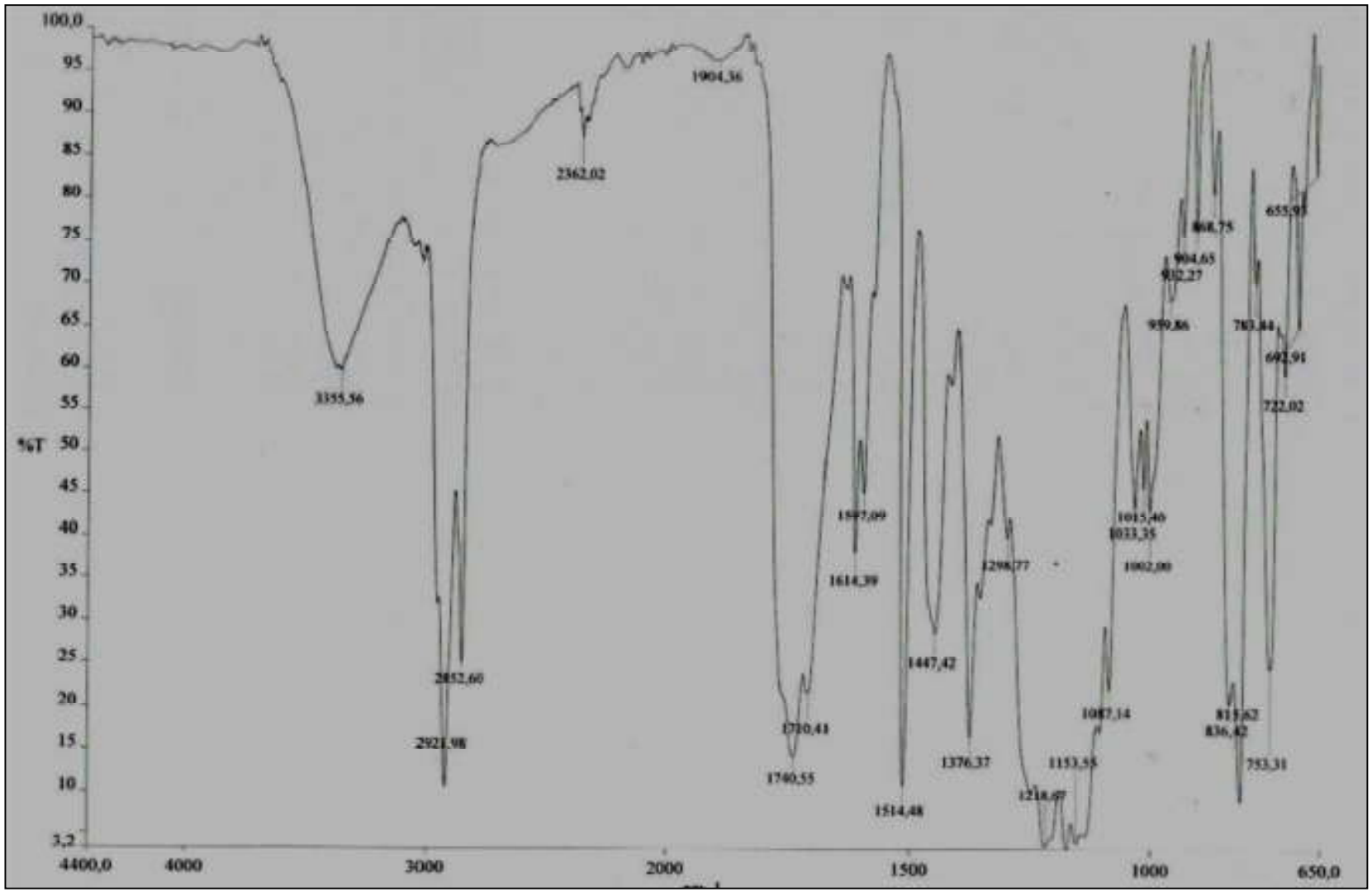
8.2.16 – Espectro de IV da 4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



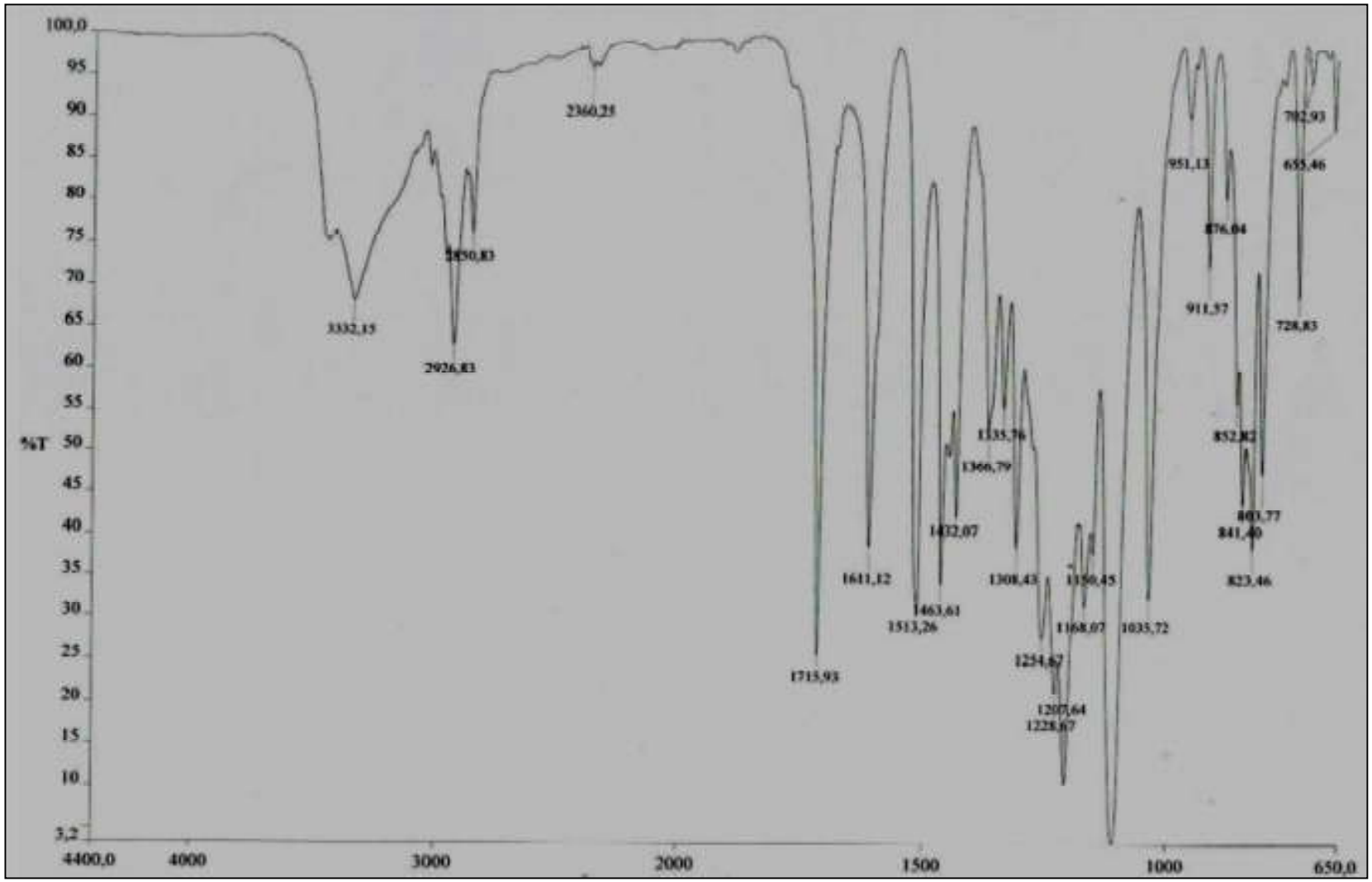
8.2.17 – Espectro de IV da 4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona



8.2.18 – Espectro de IV da 4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



8.2.19 – Espectro de IV da 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-(4-hidroxifenil) propanoato de etila



Universidade Estadual de Goiás
Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas (UnUCET)
Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciências Moleculares

Jefferson Luiz Fonseca da Silva

SÍNTESE DE ANÁLOGOS DE DIIDROCUMARINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Anápolis, 2011.

Universidade Estadual de Goiás
Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas (UnUCET)
Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciências Moleculares

Jefferson Luiz Fonseca da Silva

SÍNTESE DE ANÁLOGOS DE DIIDROCUMARINAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás (UEG) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Físico-Química Molecular.

Orientador: Profº Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino.

Anápolis, 2011.

Ficha Catalográfica

Silva, Jefferson Luiz Fonseca da.

Síntese de Análogos de Diidrocumarinas e Avaliação da Atividade Anticolinesterásica. – 2011.

123 folhas; fig; tbs.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto L. B. Aquino

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2011.

1. Síntese de Diidrocumarinas. 2. Atividade Anticolinesterasica. 3. Mal de alzheimer. I. Título.

SÍNTESE DE ANÁLOGOS DE DIIDROCUMARINAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

JEFFERSON LUIZ FONSECA DA SILVA

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:

Prof. Dr. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino

Prof. Dr. William Pires de Macedo

Prof. Dr. Guilherme Roberto de Oliveira

ANÁPOLIS, GO - BRASIL
AGOSTO 2011

Dedico este trabalho a minha amada esposa que nestes longos dois anos e, em inúmeras outras vezes, foi obrigada a me dividir com os livros e o laboratório. Obrigado por tudo!

“O livro da natureza está escrito em caracteres matemáticos, sem o conhecimento dos mesmos o homem não poderá compreendê-la. Eu creio na razão!” (Galileu Galilei).

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que participaram diretamente ou indiretamente deste trabalho; os Funcionários, Professores e Técnicos da UnUCET (UEG).

Se fosse agradecer todos aqueles que eu gostaria, não me venceriam as páginas, porém, cabe a mim colocar apenas as pessoas diretamente envolvidas no processo devido a essa limitação.

- Ao Orientador e amigo, Profº Dr. Gilberto Aquino, por ter me recebido, me orientado e motivado no decorrer deste trabalho por mais atarefado que estivesse.

- Não poderia deixar de agradecer também o incansável e corajoso, Jamerson F. Silva pela ajuda que se tornou fundamental para meu triunfo.

- Agradeço aos amigos que estiveram comigo no laboratório como os amigos: Júlio César, Amanda, Tiago (Lambança),William Fernandes, Francisco Neto (Xicão), Paulo, Tarcísio, o Wanderson dentre outros.

- Agradeço a todos os professores do programa (PMCM), que me fizeram compreender a ciência além das fronteiras que nossos olhos conseguem enxergar.

Enfim, a todos vocês meu muito obrigado!

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica

Mestrado: Ciências Moleculares-UEG, (2009-2011).

Graduação: Licenciatura em Química-UEG, (2004-2008).

Segundo grau: Colégio Estadual "Profº Heli Alves Ferreira".

Experiência em Pesquisa

Mestrado: Ciências Moleculares-UEG, (2009-2011)

Título: Síntese de Análogos da Diidrocumarina e Avaliação da Ação Anticolinesterasica

Orientador: Prof.º PhD. Gilberto Lúcio B. de Aquino

Trabalhos Científicos

Dissertação de Mestrado*:* Síntese de Análogos da Diidrocumarina e Avaliação da Ação Anticolinesterasica. (2011).

Orientador: Prof.º PhD. Gilberto Lúcio B. de Aquino.

TCC: Max Planck, o Ato de Desespero e o Surgimento da Mecânica Quântica.

Orientador: Heibbe Christian Benedito de Oliveira.

Congressos

- Apresentação de Resumo: International School on Fundamental crystallography. *Synthesys and Structural Analysis of Ethyl (2E) - 3 - (4 - Hydroxy - 3,5 - Dimethoxyphenyl) prop - 2 - enoate. (Montevideo, 2010).*

- Seminario Nacional de Síntese e produção de Fármacos, (Anápolis, 2009).

Experiência Profissional

- Analista de Controle de Qualidade Físico-Químico. Laboratório Neo Química (08/2011 - Atual).

- Analista de Equivalência Farmacêutica e Validação de Métodos Analíticos. Laboratório Teuto Brasileiro/Pfizer (2010-2011).

- Professor de Química. Colégio Estadual “Dr. Genserico Gonzaga Jaime”. Ensino Médio. (2010).

- Professor de Química. Ensino Técnico. INESUL (2008-2009).

- Analista de Controle de Qualidade Físico-Químico. Laboratório Teuto Brasileiro (2007-2010).

- Analista de Controle de Qualidade Físico-Químico. Laboratório Genoma (2006-2007).

Resumo

Título: SÍNTESE DE DIIDROCUMARINAS E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTICOLINESTERÁSICA

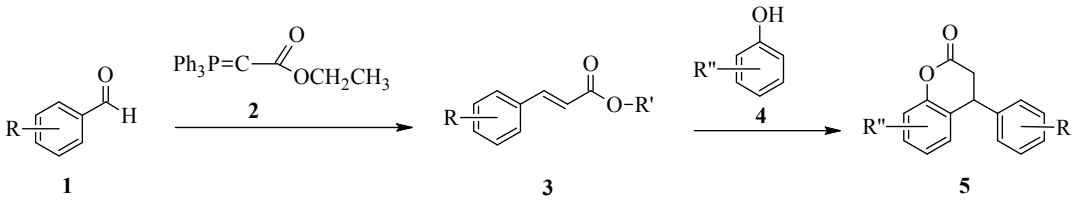


***Figura 1**: Síntese das Diidrocumarinas*

Diidrocumarinas são neoflavonóides que possuem um diversificado potencial farmacológico comprovado. Neste trabalho, foi realizada a síntese de análogos estruturais de diidrocumarinas com o objetivo de obter compostos biologicamente ativos frente a enzima acetilcolinesterase (relacionada ao Mal de Alzheimer). Li e colaboradores descreveram em seu relatório a possibilidade de sintetizar diidrocumarinas com ótimos rendimentos, através da hidroarilação de olefinas catalisada por ácido trifluoracético (TFA). Neste trabalho, as olefinas utilizadas são ésteres cinâmicos obtidos a partir da reação entre ilídeo de fósforo e benzaldeídos e também ácidos cinâmicos obtidos comercialmente. Estes compostos reagem por condensação com fenóis e posterior ciclização levando a obtençãp das diidrocumarinas. Após a síntese, a purificação por Cromatografia Flash e a caracterização por métodos espectrométricos como Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), foram realizados os testes de atividade biológica, obtendo resposta anticolinesterásica significativa para todos os compostos.

Palavras Chave: Síntese de Diidrocumarina, Atividade Biológica, Anticolinesterase, Mal de Alzheimer.

Abstract

Title: DIHYDROCOUMARIN SYNTHESES AND EVALUATION OF ANTICHOLINESTERASE ACTION

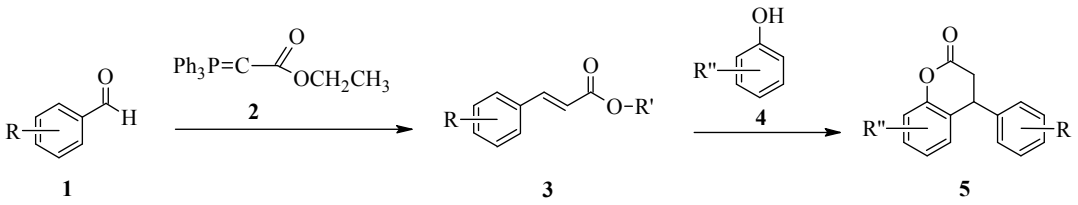


***Figura 1**: Síntese das diidrocumarinas*

Diidrocumarinas are neoflavonoides that have a diverse pharmacological potential. In this work, we performed the synthesis of structural analogues diidrocumarinas in order to obtain biologically active compounds against the enzyme acetylcholinesterase (related to Alzheimer's disease). Li and employees described in their report the possibility to synthesize diidrocumarinas with excellent yields by hidroarilação of olefins catalyzed by trifluoroacetic acid (TFA). In this work, the olefins used are cinnamic esters obtained from the reaction between phosphorus Ilides and benzaldehydes as well as cinnamic acids obtained commercially. These compounds react with phenols by condensation obtained the diidrocumarinas. After the synthesis, purification by flash chromatography and characterization by spectrometric methods such as infrared (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR) tests were performed for biological activity anticholinesterase, obtaining a positive response for all compounds.

Keywords: Diidrocumarina Synthesis, Biological Activity, Anticolinesterase, Alzheimer's disease.

Índice

RESUMO IX
ABSTRACT X
ÍNDICE XI
LISTA DE FIGURAS XIII
LISTA DE TABELAS XVI
LISTA DE ABREVIATURAS XVIII

1 – INTRODUÇÃO 1

1.1 – Desenvolvimento de Fármacos 1
1.2 – Estratégias sintéticas utilizadas na obtenção de compostos bioativos 3
1.3 – Interação Fármaco-Receptor 5
1.3.1 – Físico-Química da Interação Competitiva Reversível 6
1.4 – Doença de Alzheimer e a Hipótese Colinérgica 8
1.5 - Sítios Ativos da Acetilcolinesterase 12
1.6 – Diidrocumarinas 13
1.61 – Atividade Biológica 13
1.62 – Obtenção 14

2 – OBJETIVOS 20

Objetivo Geral 20
Objetivos Específicos 20

3 – METODOLOGIA 21

3.1- Estratégia de Síntese 21
3.1.1 – Formação dos Ésteres Cinâmicos 21
3.1.2 – Hidroarilação de Olefinas por catálise ácida 22

4 – MATERIAIS E MÉTODOS 23

4.1 – Considerações gerais 23
4.2 - Procedimento experimental 24
4.2.1 - Preparação do Brometo de Etoxicarbonilmetileno (trifenil) fosforano 24
4.2.2 – Preparação dos Ésteres Cinâmicos 25
4.3.3 - Preparação das Diidrocumarinas 26
4.3.4 – Atividade Biológica 28

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 31

5.1 – Síntese do Etoxicarbonilmetileno(trifenil)fosforano (EcTF) 31
5.2 – Síntese dos Ésteres Cinâmicos 32
5.3 – Síntese das Diidrocumarinas 47
5.4 – Atividade Biológica das Diidrocumarinas 65
5.5 – Relação entre estrutura molecular e atividade biológica (SAR) 69

6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 72

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73

8 – ANEXOS 77

8.1 – Anexo 1 77
8.2 - Anexo 2 104

Lista de Figuras

Figura 1: *Síntese das diidrocumarinas* IX

Figura 2: *Elaboração de um fármaco em etapas* 2

Figura 3: *Reação multicomponente aplicada a síntese de isocianato* 3

Figura 4: *Estrutura molecular do captopril e do saquinavir* 4

Figura 5: *Ilustração esquemática da inibição competitiva reversível* 7

Figura 6: *Estrutura molecular da acetilcolina* 9

Figura 7: *Ilustração esquemática do ciclo envolvendo a síntese, transmissão e hidrólise da acetilcolina. depois observa-se a molécula de colina retornando ao neurônio para a síntese de outra molécula de acetilcolina e a continuação do ciclo.*[11] 11

Figura 8: *Fármacos mais utilizados para o tratamento da doença de alzheimer* 12

Figura 9: *Interações no subsítio esteárico da acce.*[13] 13

Figura 10: *Interações no subsítio aniônico da acce.*[13] 13

Figura 11: *Estrutura básica de diidrocumarinas e flavonóides* 14

Figura 12: *Esquema reacional para obtenção de diidrocumarinas via ácido polifosfórico utilizando floroglucinol*[18] 15

Figura 13: *Esquema reacional para obtenção de diidrocumarinas via ácido polifosfórico utilizando o resorcinol*[18] 15

Figura 14: *Ciclização intramolecular utilizando rutênio como catalizador obtendo cromonas (**26**), terpenóides (**28** e **29**) e 4-aril-3,4-diidrocumarinas (**32**).*[19] 16

Figura 15: *Possível mecanismo para a hidroarilação intramolecular de ligações triplas c-c.*[20] 17

Figura 16: *Hidroarilação de alcenos para formação de diidrocumarinas.*[20] 17

Figura 17: *Hidroarilação de olefinas na ausência de catalisadores metálicos.*[21] 18

Figura 18: *Obtenção de diidrocumarinas e cumarinas através do ácido 5-alquil-meldrun's.*[22] 19

Figura 19: *Obtenção das moléculas alvo* 21

Figura 20: *Formação dos ésteres cinâmicos* 22

Figura 21: *Formação das diidrocumarinas* 22

Figura 22: *Esquema reacional para síntese do ilídeo de fósforo* 24

Figura 23: *Preparação dos ésteres cinâmicos* 26

Figura 24: *Obtenção das diidrocumarinas a partir dos ésteres cinâmicos (1) e a partir dos ácidos cinâmicos (2)* 27

Figura 25: *Mecanismo de formação do Etoxicarbonil(trifenil)fosforolideno* 31

Figura 26: *Mecanismo de reação do éster cinâmico* 32

Figura 27: *Estrutura molecular dos ésteres cinâmicos* 34

Figura 28: *Ésteres e ácidos cinâmicos utilizados na síntese da diidrocumarina* 47

Figura 29*: Mecanismo de reação das diidrocumarinas* 48

Figura 30: *Estrutura molecular das diidrocumarinas* 49

Figura 31: *Formação de um carbocátion estável* 58

Figura 32: *Formação de produto cíclico* 59

Figura 33: *Duas possibilidades de reação: controle cinético e controle termodinâmico* 60

Figura 34: *Espectro de* RMN - ^{1}H *do composto* ***85*** 62

Figura 35: *Espectro de HMBC - correlações entre o dubleto* $\delta_H = 2,97$ *e os sinais de carbonos* $\delta_C = 136,3$, $\delta_C = 46,3$ *e* $\delta_C = 171,5$ 62

Figura 36: *Espectro de HMBC - correlações entre os dubletos* $\delta_H = 6,75$ 63

e $\delta_H = 7,10$ *com os sinais de carbono em* $\delta_C = 136,3$, $\delta_C = 114,6$, $\delta_C = 134,3$ *e* $\delta_C = 153,4$ *e em* $\delta_C = 45,8$, $\delta_C = 128,0$ *e* $\delta_C = 153,9$, *respectivamente*

Figura 37: *Espectro de HMBC - correlações entre o singleto* $\delta_H = 6,44$ *com os sinais de carbono em* $\delta_C = 133,7$ *e* $\delta_C = 146,1$*(aromáticos) e em* $\delta_C = 134,3$ *e* $\delta_C = 153,4$ *e em* $\delta_C = 45,8$, $\delta_C = 104,2$ *.* 64

Figura 38: *Espectro de HMBC - correlações entre o tripleto* $\delta_H = 4,42$ *com os sinais de carbono em* $\delta_C = 129,1$ *e* $\delta_C = 135,8$, $\delta_C = 41,2$ *e* $\delta_C = 103,7$ *e com o carbono carbonílico em* $\delta_C = 172,0$*.* 65

Figura 39: *Reação de Ellman* 66

Figura 40: *Porcentagem de inibição apresentado pelas diidrocumarinas analisadas em ensaio de microplacas pelo método de ellman* 68

Figura 41: *Possíveis interações intermoleculares das diidrocumarinas com os sítios ativos da acetilcolinesterase.* 70

Lista de Tabelas

Tabela 1: *Correlação entre as bandas de absorção em infravermelho e os grupos funcionais para os ésteres cinâmicos obtidos* 33

Tabela 2: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***58*** 35

Tabela 3: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***58*** 35

Tabela 4: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***59*** 36

Tabela 5: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***59*** 36

Tabela 6: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***60*** 37

Tabela 7: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***60*** 37

Tabela 8: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***61*** 38

Tabela 9: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***62*** 39

Tabela 10: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***63*** 40

Tabela 11: *Dados espectrais de RMN - 1H para o composto* ***64*** 41

Tabela 12: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***64*** 41

Tabela 13: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***65*** 42

Tabela 14: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***66*** 43

Tabela 15: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***67*** 44

Tabela 16: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***67*** 44

Tabela 17: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***68*** 45

Tabela 18: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***68*** 45

Tabela 19: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***69*** 46

Tabela 20: *Dados espectrais de RMN - ^{13}C para o composto* ***69*** 46

Tabela 21*: Correlação entre as bandas de absorção em infravermelho e os grupos funcionais para as diidrocumarinas obtidas* 49

Tabela 22: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***72*** 50

Tabela 23: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***73*** *51*

Tabela 24: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***74*** *52*

Tabela 25: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***75*** *53*

Tabela 26: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***76*** *54*

Tabela 27: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto 77* *55*

Tabela 28: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***78*** *56*

Tabela 29: *Relação dos compostos esperados que não se formaram nas sínteses* *57*

Tabela 30: *Dados espectrais de RMN - ^{1}H para o composto* ***85*** *61*

Tabela 31: *Relação dos compostos obtidos e analisados pelo Método de Ellman* *67*

Lista de Abreviaturas

AcC – Acetilcolina

AcCE – Acetilcolinesterase

CATf – Colina Acetiltransferase

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

DHC – Diidrocumarina

DA – Doença de Alzheimer

EcTF – Etoxicarbonil Trifenil Fosforano

FDA – Food's and Drugs Administration

IV – Infravermelho

$\mathbf{K_A = K_D^{-1} = K_i^{-1}}$ – Constante de afinidade

PPA – Ácido Polifosfórico

Pd – Chumbo

$\mathbf{Pd(OAc)_2}$ – Acetato de Chumbo

QSAR – Quantitative and Qualitative structure-activity relationship (relações quantitativas e qualitativas entre estrutura molecular e atividade biológica)

RMC – Reações Multi-Componente

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SAfC – Sistema de Alta afinidade por Colina

TFA – Ácido Trifluoracético

DM – Diclorometano

Rf – Fator de Retenção

AcOEt – Acetato de Etila

Hex - Hexano

1 – Introdução

1.1 – Desenvolvimento de Fármacos

A busca por produtos com a finalidade de curar enfermidades é uma atividade conhecida desde a antiguidade. Estes produtos eram provenientes de recursos animais, vegetais e minerais disponíveis na época. Apesar de parecerem, a primeira vista, atraentes pela sua eficiência a maioria apresentava elevada toxicidade.[1]

Ao longo do século XVIII, verificou-se um aumento expressivo da quantidade de literatura disponível e do entendimento a respeito das propriedades dos compostos de origem natural através da invenção da imprensa, da criação de herbários, farmacopéias e compêndios, além da comunicação entre médicos de várias regiões do mundo. A partir do início do século XIX, o aperfeiçoamento das técnicas de extração possibilitou a obtenção de compostos com potencial terapêutico cada vez maior.[1-2]

No final do século XIX, a criação e a melhoria das metodologias sintéticas, permitiram o desenvolvimento compostos menos tóxicos quando comparados aos extraídos de fontes naturais. O resultado foi um aumento significativo no número de moléculas utilizadas como agentes terapêuticos ao longo do século XX.[1-2]

Atualmente, o desenvolvimento de um novo fármaco pode levar até 15 anos e consumir bilhões de dólares. É um processo realizado geralmente em 5 etapas (figura 2), onde inicialmente é necessário o conhecimento do alvo biológico e a partir deste, a eleição de uma molécula que tenha uma estrutura molecular complementar.[2-3]

Esta molécula é chamada de protótipo. A próxima etapa inclui os esforços para o aperfeiçoamento do protótipo através de pequenas alterações estruturais e funcionais procurando aumentar sua afinidade e seletividade pelo alvo biológico.[2-3]

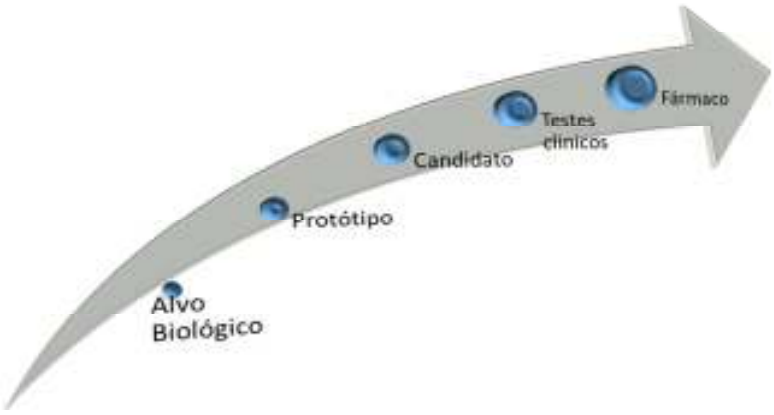


Figura 2: *Elaboração de um fármaco em etapas*

Para tanto, é preciso conhecer suas propriedades farmacocinéticas: absorção, distribuição e metabolismo, além da excreção e toxicidade. Feitos estes testes, tem-se um candidato a fármaco, que ainda precisa passar por testes clínicos (ensaios *in vivo*) para avaliar a possibilidade de comercialização. Portanto, o que se busca num fármaco é que tenha alta afinidade pelo ligante e que seja potente o bastante para provocar o efeito farmacológico esperado, uma vez que existe uma grande numero de receptores.[2-3]

O grande desafio na elaboração de novas moléculas é garantir que as reações químicas sejam capazes de formar moléculas com o máximo de complexidade e diversidade possíveis, levando ao mínimo possível de etapas. Nesse sentido, as reações de multicomponentes (RMC's) surgiram como uma ferramenta interessante. Nessa metodologia, reações antes realizadas em várias etapas, agora podem ser realizadas em um único

processo (em um único recipiente). A variabilidade e a complexidade dos compostos formados se deve a modificação dos grupos ligados as moléculas dos reagentes, possibilitando ao final, a confecção de uma larga biblioteca de compostos.[4-5]

As vantagens deste método são economia de átomos, simplicidade do processo, variações estruturais, complexidade das moléculas acessíveis, focando a preservação do meio ambiente, de energia no processo, uma vez que a utilização de reagentes e solventes é diminuída.[4-5]

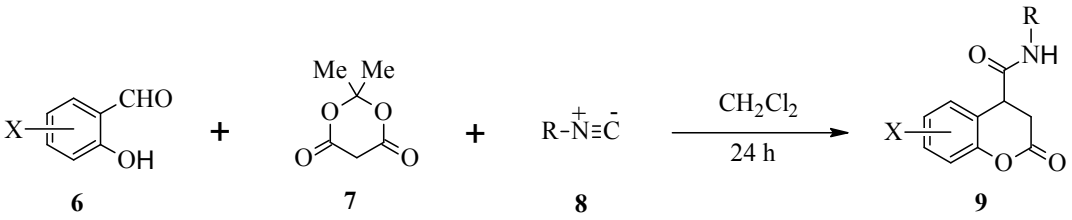


Figura 3: *Reação multicomponente aplicada a síntese de Isocianato*

Recentemente, Shaabani e colaboradores relataram em seu artigo, uma nova rota de síntese para os derivados da 3,4-diidrocumarinas fazendo uso de reações multicomponente. Como observado na figura 3, foram utilizados precursores facilmente disponíveis como derivados do 2-hidroxibenzaldeídos (**6**) com o ácido de Meldrum's (**7**) e derivados do aril ou alquil isociamidas (**8**).[6]

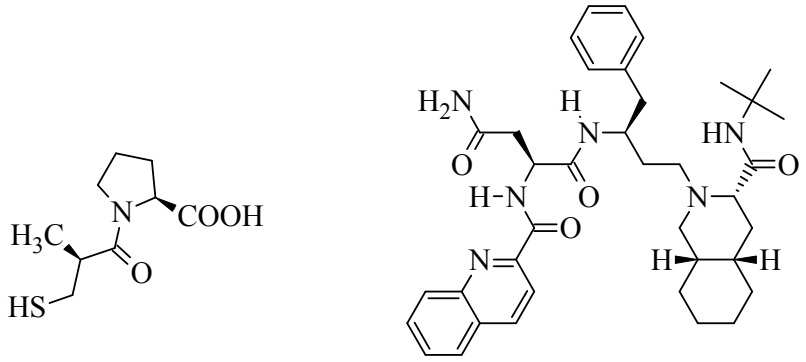
1.2 – Estratégias sintéticas utilizadas na obtenção de compostos bioativos

Nas últimas décadas, as metodologias de desenvolvimento de compostos bioativos vêm consolidando-se como abordagens imprescindíveis para a elaboração de novos fármacos. Existem duas estratégias, complementares entre si, que se destacam: a "triagem experimental" que envolve a pesquisa em bibliotecas de compostos,

buscando estruturas com estudo de atividade biológica conhecida (estudos *in vitro*); e a "triagem virtual" que é baseada na busca de alvos biológicos (ou de ligantes) elucidados e através destes propor a confecção de novas moléculas, utilizando-se de metodologias computacionais.[3-7]

Para as duas abordagens, é importante conhecer o mecanismo de ação farmacológica do processo fisiopatológico e a eleição do alvo terapêutico.[2-3]

Posteriormente, faz-se a analogia com o substrato natural ou com um protótipo a fármaco já existente no mercado para desenvolver novas estruturas. É importante também mimetizar a quantidade de compostos obtidos, mantendo aquelas estruturas que contém os grupos responsáveis pela atividade biológica através do conceito de bioisosterismo.[3-7]



Captopril **10** Saquinavir **11**

Figura 4: *Estrutura Molecular do Captopril e do Saquinavir*

Essas metodologias permitiram que se desenvolvesse o Captopril, um inibidor da enzima conversora de Angiotensina e do Saquinavir, o inibidor do HIV - protease (Figura 4).[3]

O sucesso destas estratégias também se deve ao conhecimento das relações qualitativas (SAR) e quantitativas entre estrutura-atividade (QSAR) que é uma ferramenta valiosa para avaliar as interações do fármaco frente ao receptor, principalmente quando seu sítio ativo não é conhecido. Além disso, seus resultados fornecem informações sobre a estrutura do receptor, quando o mesmo interage com o candidato a fármaco. Este método é importante não somente para explicar as afinidades encontradas experimentalmente, mas também para prever a afinidade entre moléculas desconhecidas.[2-3-7]

Um procedimento alternativo para realizar o estudo de QSAR seria o modelo farmacofórico. Essa técnica caracteriza-se pelo estudo de uma série de moléculas bioativas, de modo que suas propriedades moleculares sejam representadas geometricamente. Posteriormente, potenciais candidatos a fármaco são recuperados de uma biblioteca de compostos que obedecem a hipótese farmacofórica para comparação.[7-8]

Além de todas essas metodologias, tem-se a técnica de cristalografia de raios-x que desde as últimas duas décadas contribui com a elucidação de um grande número de alvos biológicos, possibilitando o conhecimento da estrutura tridimensional dos sítios ativos e conseqüentemente o desenho de moléculas com mais alta afinidade e seletividade.[7-8]

1.3 – Interação Fármaco-Receptor

A mais de 100 anos foi descoberto que o reconhecimento molecular mútuo é o ponto de partida para a maioria dos processos biológicos. Foi proposto por Emil Fisher que a Enzima e o Glicosídeo devem se encaixar como uma chave e uma fechadura para iniciar uma ação química entre eles,

ou seja, eles devem ser complementares entre si. A idéia de complementaridade foi inicialmente aplicada a reações antígeno-anticorpo e posteriormente a interação fármaco-receptor.[3-7]

Paul Ehrlich, também contribuiu enormemente para o entendimento do mecanismo de ação de um fármaco através do trabalho entitulado de "*Corpora non agunt nisi fixata"*. A conseqüência destes relatórios foi o entendimento da complementaridade química e geométrica das pequenas moléculas chamadas de ligantes e dos respectivos receptores e a partir disso, o efeito biológico.[3]

A idéia de complementaridade tem seus méritos didáticos pela facilidade de entendimento, no entanto não é adequada porque representa o ligante e o receptor como estruturas rígidas, o que não é verdade. Na realidade, o que se observa são estruturas flexíveis. Essa flexibilidade é o que permite explicar porque algumas moléculas estruturalmente semelhantes possuem conformações e orientações distintas no sítio ativo do receptor, resultando em atividades e afinidades diferentes.[7-8]

Sabe-se hoje que os receptores biológicos afetam as rotas metabólicas, desencadeando um efeito fisiológico. Se estas proteínas receptoras não estão funcionando corretamente, ou seja, existe falha na sua regulação, então há o surgimento de alguma doença relacionada a essa proteína.[7-8]

1.3.1 – Físico-Química da Interação Competitiva Reversível

As interações fármaco-receptor são reversíveis e quantitativamente verificadas por análise da constante de afinidade $(1/K_d)$. Entretanto, uma

caracterização completa incluiria o rearranjo entre as forças intra e intermoleculares que acompanham essas interações.[9]

A energia envolvida nesse processo é determinada pelo tipo e o número das forças presentes na transição dos reagentes, através de um complexo ativo para os produtos, que podem ser do tipo hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio, Van Der Waals e interações entre nuvens π.[8-9]

Portanto, através do conhecimento do receptor, é possível modificar a estrutura do ligante de modo que se tenha a maior afinidade possível entre eles e assim obter o efeito farmacológico esperado.[8-9]

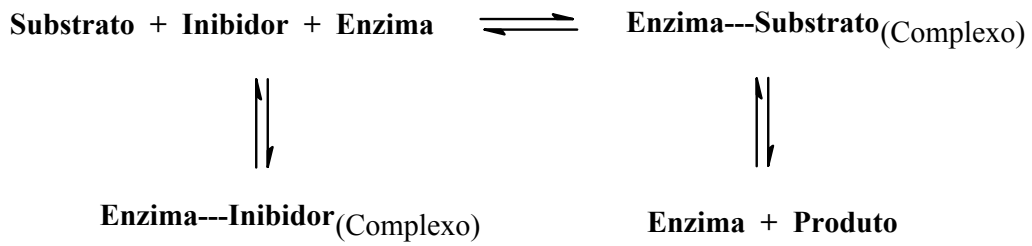


Figura 5: *Ilustração esquemática da inibição competitiva reversível*

Um tipo de inibição enzimática que se pode destacar é a inibição competitiva reversível (Figura 5). Nesse caso, o inibidor (fármaco) compete com o substrato pelo a ocupação do sítio ativo da enzima. Como conseqüência há uma diminuição da taxa de conversão desse substrato.[3]

A interação seletiva varia em função da estrutura do sítio ativo da proteína e do grupo farmacofórico do ligante através do reconhecimento energético. Os ligantes podem interagir covalentemente ou não covalentemente com o receptor.[3-9]

Em condições de equilíbrio, a interação é dominada pela energia livre de Gibbs (ΔG^0) de acordo com a equação 1. O valor dessa variável está relacionada com uma constante obtida experimentalmente; a constante de dissociação recíproca ou constante de inibição (K_d ou K_i). Esse valor descreve a tendência de formação de um complexo.[3-9]

$$K_A = K_D^{-1} = K_i^{-1} = \frac{[R'L']}{[R][L]} \;\; ; \;\; \Delta G^0 = -RT \ln K_A = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \qquad \textbf{Eq. (1)}$$

Onde $\frac{[R'L']}{[R][L]}$ = A relação entre Ligante e o Receptor ($[R'L']$) no estado ligado e no estado livre $[R][L]$ (sem interação).

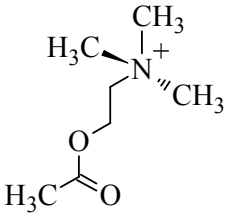
Pode-se também entender a estabilidade do complexo no estado ligado ($\mu^0_{R'L'aq.'}$) ou livre ($\mu^0_{Raq.} + \mu^0_{Laq.}$) através do potencial químico, descrito pela equação 2.[3]

$$\Delta G^0 = \mu^0_{R'L'aq.'} - (\mu^0_{Raq} + \mu^0_{Laq})^{[2]} \qquad \textbf{Eq. (2)}$$

1.4 – Doença de Alzheimer e a Hipótese Colinérgica

Até o final do século XIX, os cientistas acreditavam que a comunicação entre neurônios se dava de maneira direta, porém a partir do começo do século XX, descobriu-se que existem moléculas que funcionam como mediadores químicos entre os neurônios e o resto do corpo. Em 1907, foi proposto por Hunt, que a acetilcolina (AcC) seria responsável por essa mediação celular. Sua ação seria estimular os nervos parassimpáticos.[9]

A neurotransmissão de impulsos nervosos via AcC (**12**) é considerada vital. A perda dessa capacidade é utilizada para diagnosticar a doença de Alzheimer, uma vez que sua escassez é responsável pela deterioração de funções neurais em vários processos cognitivos como a memória, a atenção, o aprendizado entre outros.[10-11]



12

Figura 6: *Estrutura molecular da acetilcolina*

A hipótese colinérgica se baseia na idéia de que a perda da capacidade de síntese e transmissão da AcC, que ocorre no interior dos neurônios, seja a responsável pela Doença de Alzheimer (DA).[10-11]

A AcC é produzida no interior dos neurônios pela ação da Colina acetiltransferase (CATf), concentrada em vesículas e liberada na célula pré-sináptica após despolarização, na presença da Colina. Após a síntese, é transportada em vesículas no interior dos neurônios e liberada na fenda sináptica onde se encontra com os receptores muscarínicos e colinérgicos nicotínicos nas células pré e pós-sinápticos. Esse contato leva a ativação de vias bioquímicas dentro da célula. [10-11]

No momento em que atravessa a fenda sináptica, a AcC é rapidamente hidrolisada devido a presença de acetilcolinesterase (AcCE) em altas concentrações, formando colina e um grupo acetato. Posteriormente, a colina formada é novamente transportada para a membrana pré-sináptica para a síntese de mais moléculas de AcC. [10-11]

No entanto, em pessoas portadoras de doenças degenerativas do sistema nervoso central, a quantidade de (CATf) é reduzida, por isso quanto mais colina estiver disponível para a reação, maiores são as chances de síntese da AcC e de sua transmissão para a fenda sináptica. A AcCE limita excessos de AcC na fenda sináptica e sua inibição (a diminuição de sua concentração), promove um aumento na neurotransmissão pelo prolongamento da permanência da AcC na fenda sináptica, o que é fundamental no tratamento da doença de Alzheimer.[10-11]

Para manter uma quantidade razoável de colina nas vesículas sinápticas, recorre-se a um sistema de transporte de colina chamado sistema de alta afinidade (SafC), que transporta colina em baixas concentrações recém formadas pela reação de AcC com seus receptores. Este sistema de transporte é considerado a etapa limitante da reação.[11-12]

A síntese de AcC é feita em uma única etapa na proporção de uma molécula de colina para cada molécula do grupo acetato. O grupo acetato é originário de uma molécula de Acetil-CoA, que tem seus níveis mantidos devido ao metabolismo da glicose.[11-12]

A concentração de colina é mantida por sua vez pela dieta devido à incapacidade dos neurônios em sintetizar essa molécula. A enzima CATf é encontrada como uma proteína solúvel no citoplasma. O envelhecimento pode alterar os sistemas de neurotransmissores como o sistema serotoninérgico, Glutamatérgico, Aminérgico e Colinérgico. Destes, o sistema colinérgico foi o mais estudado e apesar da não unanimidade entre os pesquisadores, é considerado o que desempenha o papel mais importante nas funções cognitivas.[12-13]

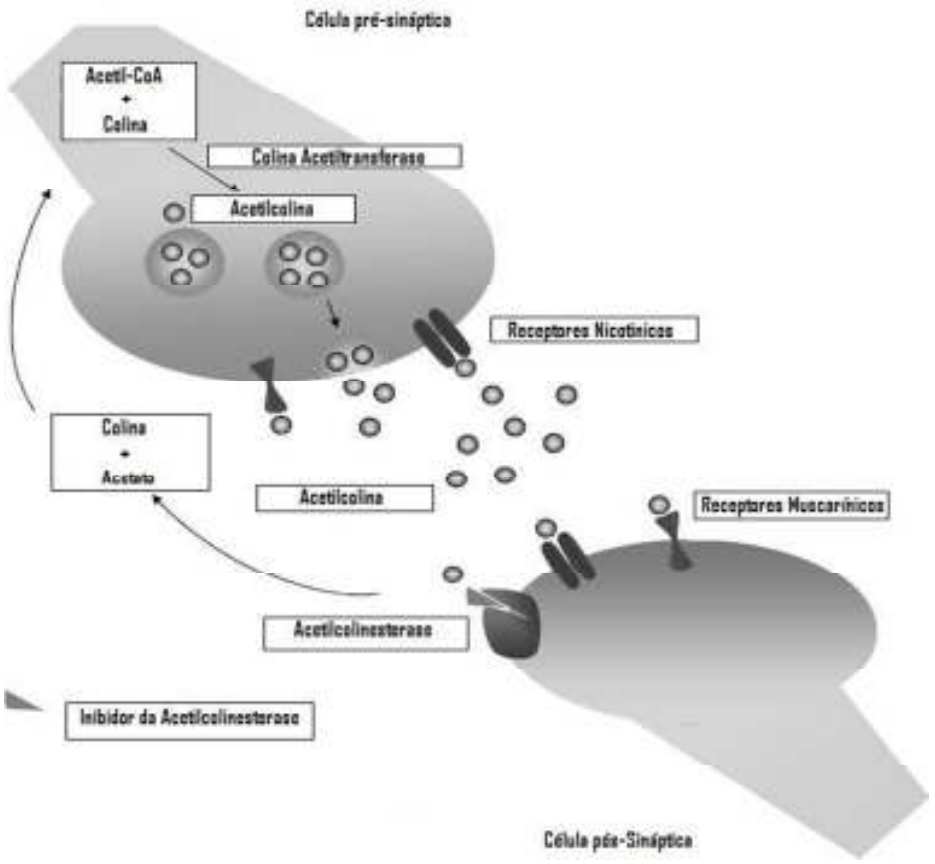


Figura 7: *Ilustração esquemática do ciclo envolvendo a síntese, transmissão e hidrólise da acetilcolina. Depois observa-se a molécula de colina retornando ao neurônio para a síntese de outra molécula de acetilcolina e a continuação do ciclo.*[11]

A hipótese colinérgica para a Doença de Alzheimer (DA) baseia-se no fato de que pessoas que apresentam deterioração das funções cognitivas apresentam também redução de transmissão colinérgica (isso é observado nas autópsias de pacientes portadoras da doença). Alguns pesquisadores contestam a hipótese colinérgica argumentando que ela seria valida apenas quando o paciente passa a ser sintomático. Apesar de contribuir para a discussão, essas pesquisas ainda são imaturas e a hipótese colinérgica é a mais aceita atualmente.[13]

O comportamento dinâmico do sistema nervoso sugere a elaboração de novos fármacos capazes de interferir no processo enzimático. Quatro

drogas foram aprovadas pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) para o tratamento a DA (Figura 8): Tacrina (**13**), Rivastignina (**14**), Galantamina (**15**) e o Donepezil (**16**). A Tacrina foi a primeira molécula a ser comercializada e hoje não é utilizada devido a sua hepatotoxicidade observada em 50% dos pacientes.[10-14]

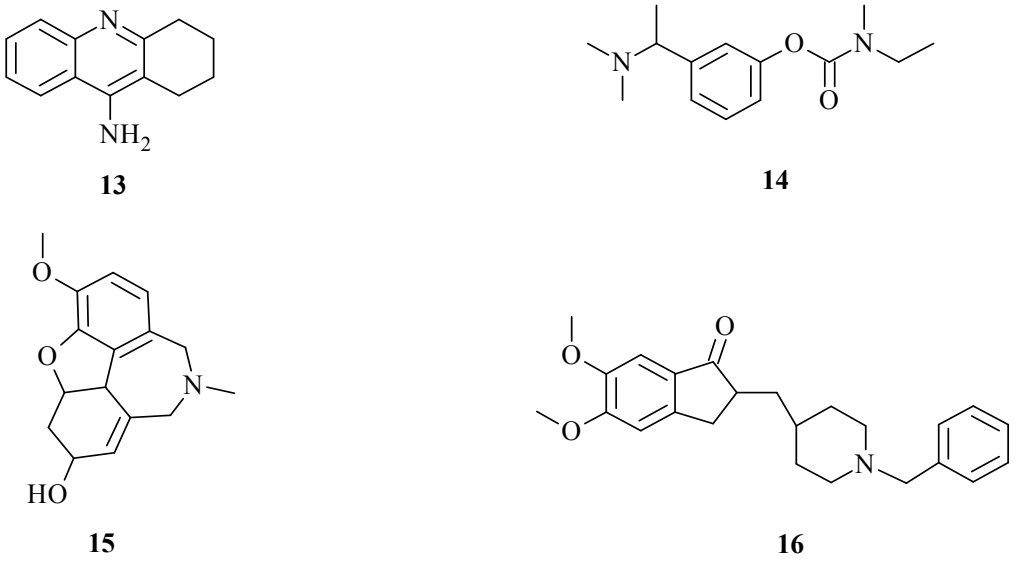


Figura 8: *Fármacos mais utilizados para o tratamento da Doença de Alzheimer*

1.5 - Sítios Ativos da Acetilcolinesterase

A AcCE, é uma enzima do tipo serino-hidrolase, altamente eficiente que atua no sistema nervoso central responsável pela hidrólise da AcC, após sua transmissão para a sinapse neuromuscular.[11-12]

Seu sítio ativo está localizado em uma faixa estreita e longa de 20A, formado por dois subsítios: Um esteárico composto pelo sítio de serina que contêm a parte catalítica e outro aniônico responsável pela ligação com o grupo trietilamônio da AcC. A unidade catalítica funcional essencial é formada pela tríade Ser203, His447, Glu334. O "buraco" oxiônico formado

pelos grupos NH peptídicos Gly121, Gly122 a ALA204 também são unidades funcionais importantes do subsítio esteárico.[13]

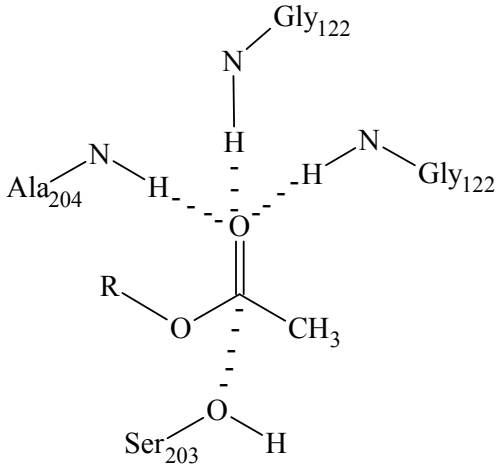


Figura 9: *Interações no subsítio esteárico da AcCE.[13]*

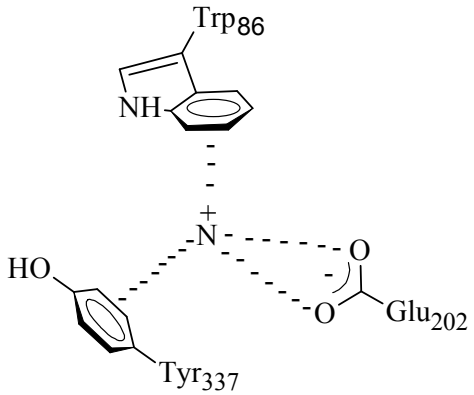


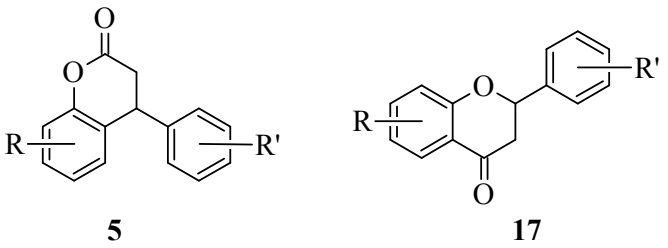
Figura 10: *Interações no subsítio aniônico da AcCE.[13]*

1.6 – Diidrocumarinas

1.61 – Atividade Biológica

Diidrocumarinas (DHC's) são sistemas de anéis constituintes fundamentais de uma série de compostos biologicamente ativos. Apesar de pouco estudadas, pesquisas recentes demonstraram que seu potencial farmacológico é muito diversificado. As 4-aril-3,4-diidrocoumarinas, por

exemplo, estão presentes em compostos naturais e apresentam similaridade estrutural com flavonóides, como observado na figura 11.[14-15]



5 **17**

Figura 11: *Estrutura básica de Diidrocumarinas e Flavonóides*

Kumar e colaboradores, relataram que as diacetoxy-diidrocumarinas e seus análogos possuem atividade frente a proteína-transacetilase (TAase) em microssomas de fígado de rato. [15]

Além disso, há relatos sobre a atividade biológica desses compostos em aldose redutase e proteína quinase, bem como atividade anti-herpética, e ainda, constituem importantes precursores sintéticos de compostos bioativos como o tartarato de tolterodina, um antagonista do receptor muscarínico utilizado no tratamento de distúrbios da bexiga. DHC's naturais também são muito utilizadas em indústrias de aromatizantes e sabores.[16-17]

1.62 – Obtenção

A síntese de diidrocumarinas foi realizada pela primeira vez nos anos 80 por Talapatra e colaboradores[18] (1986), utilizando floroglucinol e ácido cinâmico na presença de ácido polifosfórico (PPA), obtendo como produto as diidrocumarinas com baixos rendimentos e um subproduto (figura 12). Entretanto, ao utilizar ácidos cinâmicos substituídos como o ácido ρ-metoxicinâmico, a reação não ocorria. Talapatra refez a reação desta vez

utilizando resorcinol e obteve apenas a diidrocumarina como produto (figura 13).[18]

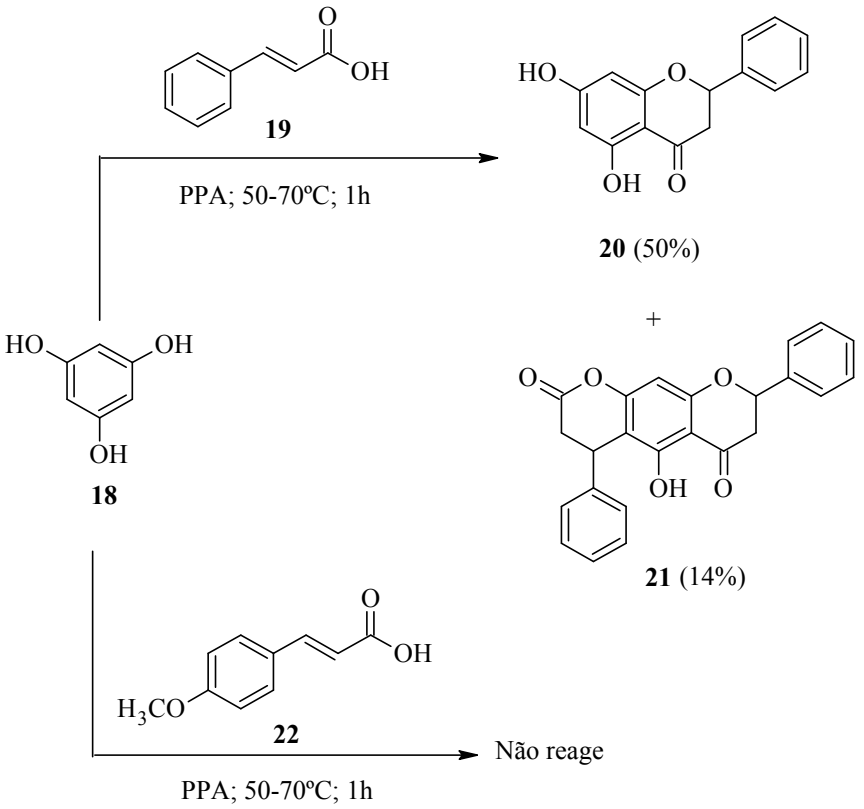


Figura 12: *Esquema reacional para obtenção de diidrocumarinas via ácido polifosfórico utilizando floroglucinol*[18]

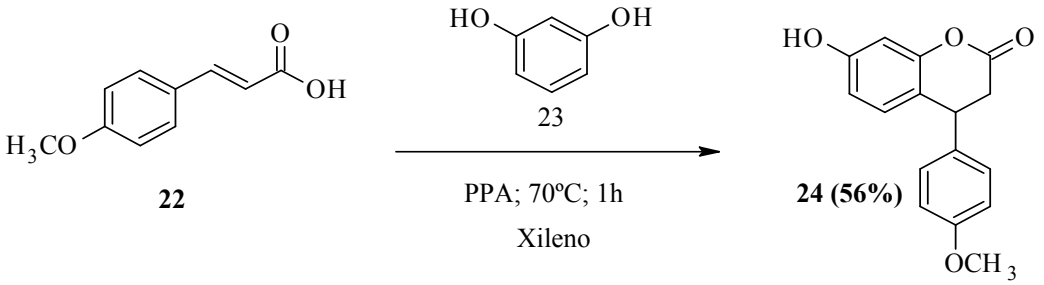


Figura 13: *Esquema reacional para obtenção de diidrocumarinas via ácido polifosfórico utilizando o resorcinol*[18]

Esse resultado mostrou que os produtos da reação são formados via mecanismos diferentes de acordo com o substituinte e que grupos doadores de elétrons facilitariam a ocorrência da reação.[18]

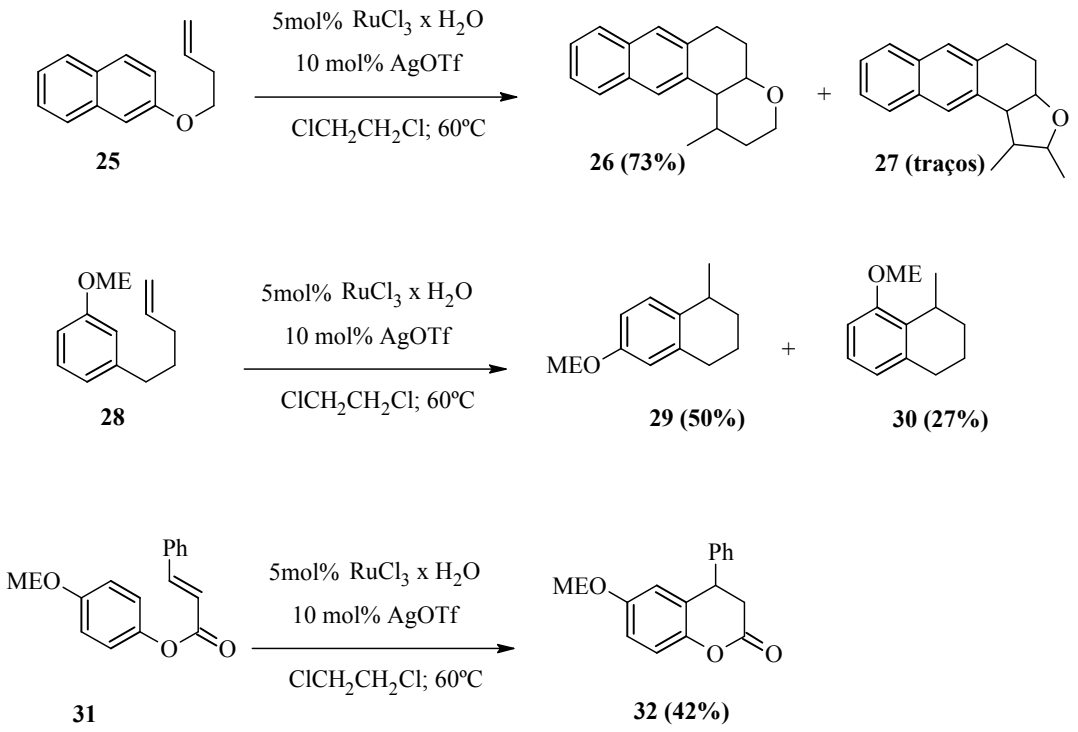


Figura 14: *Ciclização intramolecular utilizando rutênio como catalizador obtendo Cromonas (**26**), Terpenóides (**28** e **29**) e 4-aril-3,4-diidrocumarinas (**32**).*[19]

Youn e colaboradores, utilizaram Rutênio como catalizador ($Rucl_3$/AgOTf) em reações intramoleculares para ciclização de alcenos e alcinos obtendo cromonas, terpenóides e as 4-aril-3,4-diidrocumarinas (figura 14). Seus resultados indicaram que o Ru é um catalizador eficiente.[19]

Jia e colaboradores, propuseram uma nova metodologia para hidroarilação de alcenos e alcinos através da metalação eletrofílica de ligações C-H de anéis aromáticos utilizando compostos de coordenação baseados em Pd II para formar complexos do tipo $\sigma - aril - Pd$.[20]

A figura 15 mostra o mecanismo proposto por Jia para as suas reações. Na primeira etapa, espécies catiônicas de Pd altamente eletrofílicas são formadas quando um excesso de ácido trifluoracético (TFA) é usado na

presença de Pd, formando $Pd(O_2CCF_3)^+$. Em consequência, ocorre a ativação da ligação tripla carbono-carbono com o complexo de coordenação, ao mesmo tempo em que gera aceptores C-H de aril-nucleofilicos, ou seja, há um aumento da metalação. [20]

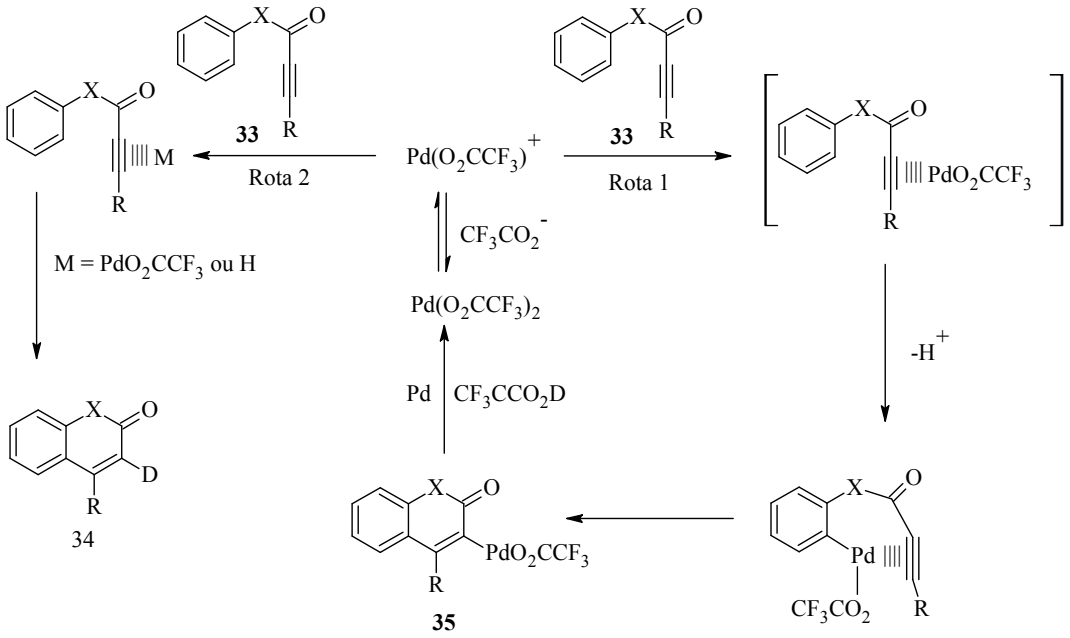


Figura 15: *Possível mecanismo para a Hidroarilação Intramolecular de ligações triplas C-C.*[20]

Jia justificou o excesso de TFA, sugerindo a necessidade de grande quantidade de espécies catiônicas de Pd^{2+} para formar complexos estáveis de $\sigma - aril - Pd$. Além disso, o TFA facilitaria a hidrólise dos compostos vinil-metalicos.[20]

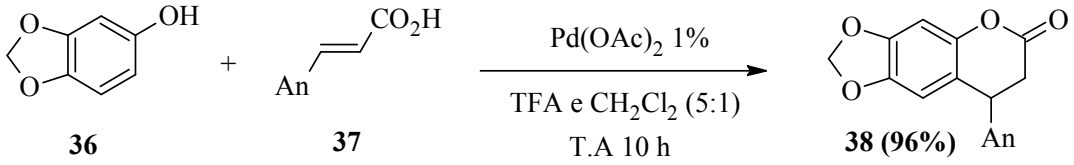


Figura 16: *Hidroarilação de alcenos para formação de diidrocumarinas.*[20]

Para a obtenção de 4-aril-diidrocumarinas, Jia utilizou um sistema reacional contendo TFA e CH_2Cl_2 (5:1), $Pd(OAc)_2$, conforme figura 16. Entretanto, em 2005 Li e colaboradores colocaram em cheque a tese de Jia. Segundo seu relatório, a hidroarilação não seria catalisada por compostos de Pd II (Figura 17). Na verdade, a catalise ocorreria fazendo uso apenas do TFA.[21]

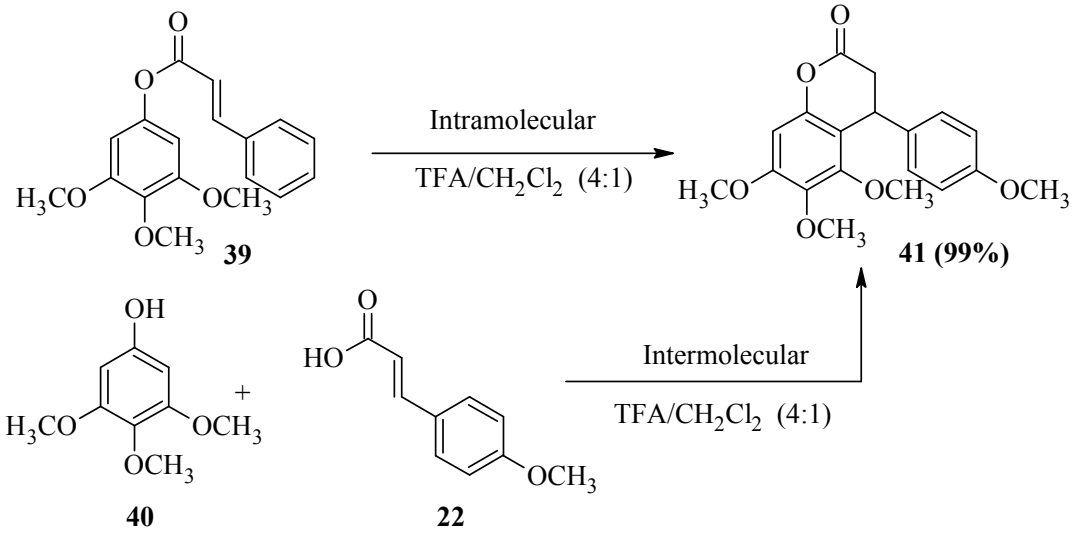


Figura 17: *Hidroarilação de Olefinas na ausência de catalisadores metálicos.*[21]

Li afirma que ao realizar a síntese de acordo com o descrito na literatura, ou seja, utilizando $Pd(OAc)_2$, obtem-se rendimentos de 96% e na ausência do catalizador metálico, o rendimento aumenta para 99%.[21]

Além disso, Li verificou que as reações intermoleculares seriam mais fáceis de acontecer que as intramoleculares e que os grupos doadores de elétrons ligados ao fenol facilitariam as reações de hidroarilação.[21]

Foi relatado também que a reação é particularmente simples onde obtem-se o produto com bons rendimentos. Outro benefício dessa abordagem é a utilização de reagentes simples, com certa complexidade

estrutural e a economia de átomos em relação a metodologias anteriores que utilizavam metais pesados como Pt e Pd para catalizar as reações.[21]

Existem outras rotas de síntese alternativas capazes de obter diidrocumarinas, como a reação dos ácidos 5-alquil Meldrun's com fenol (Figura 18).[22]

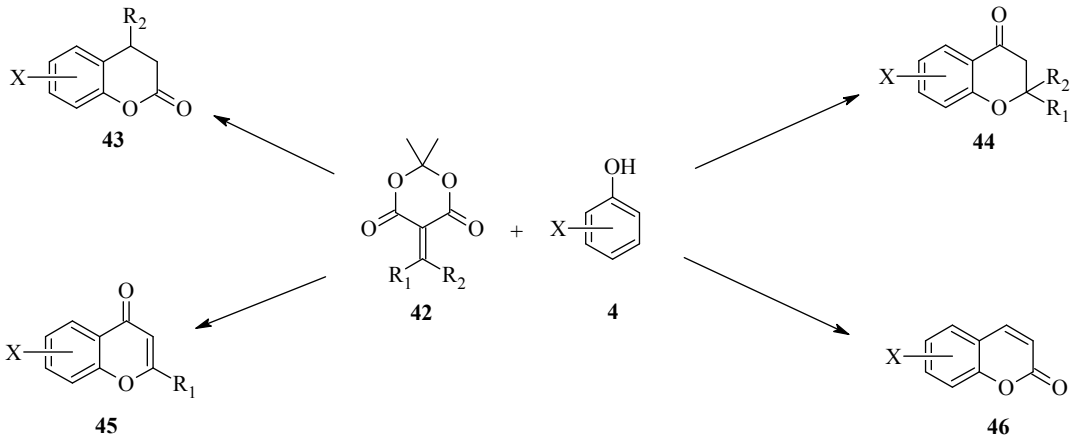


Figura 18: *Obtenção de diidrocumarinas e cumarinas através do ácido 5-alquil-meldrun's.[22]*

2 – Objetivos

Objetivo Geral

- Realizar a síntese de várias diidrocumarinas buscando obter um conjunto de moléculas que contribuam para a construção de um modelo qualitativo que relacione estrutura molecular e a atividade biológica.

Objetivos Específicos

- Obter ésteres cinâmicos através da reação entre benzaldeídos e Ilída de fósforo.

- Obter diidrocumarinas através da reação de Hidroarilação entre ésteres cinâmicos obtidos e ácidos cinâmicos comerciais com fenóis.

- Determinar a atividade biológica das diidrocumarinas obtidas e compará-las com as respectivas estruturas moleculares.

3 – Metodologia

3.1- Estratégia de Síntese

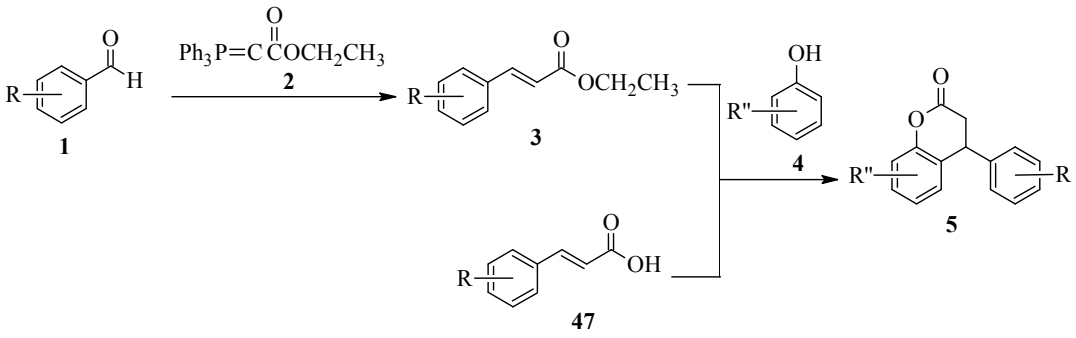


***Figura 19**:Obtenção das moléculas alvo*

A obtenção das moléculas alvo (as diidrocumarinas) será realizada a partir da reação entre o sal de fosfônio e uma série de benzaldeídos (reação de Wittig) com o objetivo de produzir os ésteres cinâmicos. O composto α,β-insaturado obtido será, por sua vez, colocado na presença de fenol e de um excesso do catalisador ácido trifluoracético (TFA) para obter-se as diidrocumarinas (reação de Hidroarilação). Ácidos cinâmicos comerciais também foram utilizados na sintetizar de diidrocumarinas.[21-23]

3.1.1 – Formação dos Ésteres Cinâmicos

Os ésteres cinâmicos foram obtidos através da reação entre o etoxicarbonil-trifenil-fosforolideno e os benzaldeídos, de acordo com a figura 20. A utilização do método de Wittig para esse fim é bastante razoável, uma vez que o sal de fosfônio utilizado é de fácil obtenção e sua reação com compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas) em si é estereoespecífica, ou seja, dependendo do ilídeo de fósforo utilizado, é possível favorecer a formação de um dos isômeros geométricos sobre a ligação dupla (*E* ou *Z*) do composto α,β-insaturado obtido. Neste trabalho

será utilizado um ilídeo de fósforo estabilizado com o objetivo de obter o isômero E.[23-24]

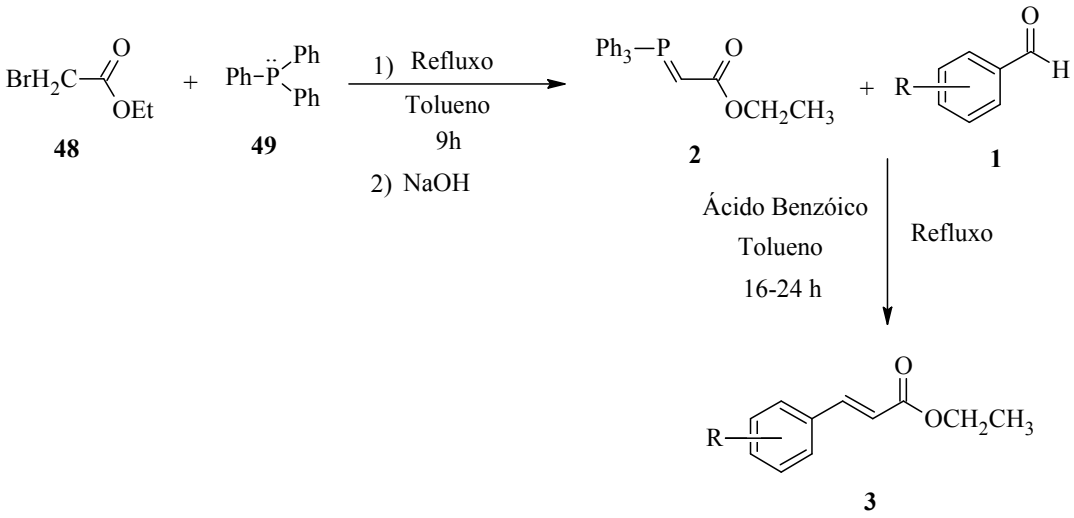


Figura 20: *Formação dos ésteres cinâmicos*

3.1.2 – Hidroarilação de Olefinas por catálise ácida

O esquema reacional geral da hidroarilação a ser utilizada na preparação de diidrocumarinas pode ser observado na figura 21. A utilização dessa metodologia se justifica pela simplicidade do processo e obtenção de bons rendimentos além da facilidade de se eliminar o catalisador.

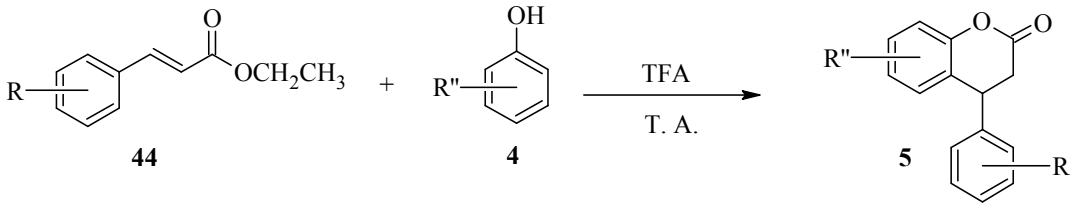


Figura 21: *Formação das diidrocumarinas*

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Considerações gerais

As considerações abaixo são válidas para todas as reações realizadas neste trabalho.

Os reagentes utilizados neste trabalho foram obtidos comercialmente através das empresas fornecedoras: Sigma-Aldrich, Acrõs, Cromoline, Synth, dentre outras.

Os reagentes foram devidamente tratados antes de sua utilização a partir de técnicas de purificação[25], de acordo com a necessidade.

Todas as reações foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada. Foi utilizada placa de CCD Silica-Gel F_{254}, com espessura 60 mm da Merck. Para revelação, foram utilizados: luz ultravioleta (254 nm - 354nm), câmara de Iodo, e solução de vanilina sulfúrica.

Após o término, as impurezas solúveis em água foram retiradas por extração com solvente, o qual foi posteriormente eliminado através de um sistema de alto-vácuo. Todos os compostos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna com o uso de coluna de vidro de diâmetro adequado e sílica-gel flash como fase estacionária (230-400 mesh, 60 Å).

As técnicas utilizadas para caracterizar os produtos das sínteses foram: Espectroscopia no Infravermelho (IV) Perkin-Elmer Spectrum BX, Modelo FT-IR System, Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN de ^{1}H e ^{13}C) Bruker Modelo 300MHz.

4.2 - Procedimento experimental

4.2.1 - Preparação do Brometo de Etoxicarbonilmetileno (trifenil) fosforano (EcTF)

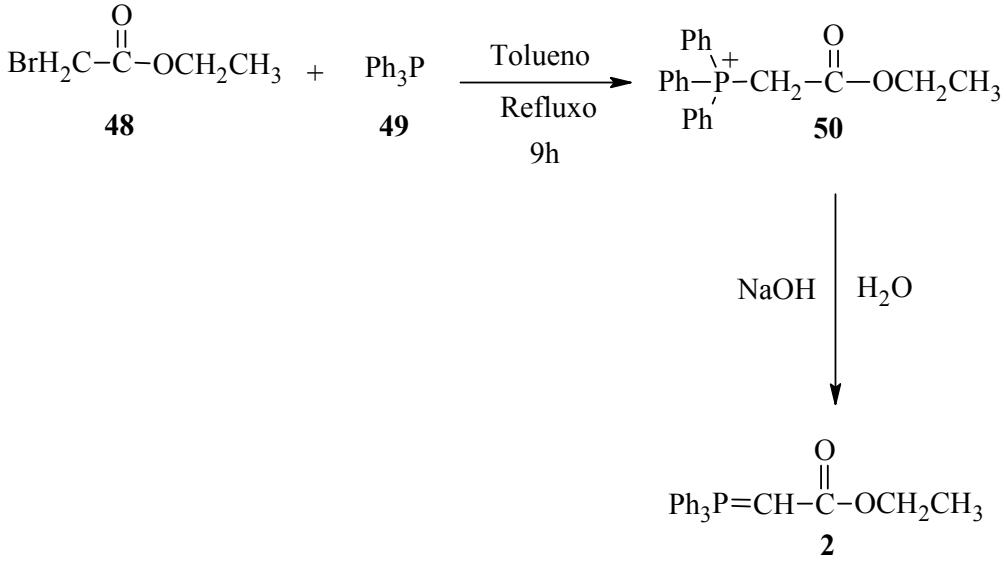


Figura 22: *Esquema reacional para Síntese do Ilídeo de Fósforo*

A um balão de fundo redondo de 500 mL, acoplado a um condensador de refluxo, com tubo de cloreto de cálcio anidro sob agitação magnética, foram adicionados 14,00 g (83,83 mmol) de bromoacetato de etila (**48**), 200 mL de tolueno purificado e 23,20g (88,45 mmol) de trifenilfosfina (**49**). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 9 horas.

Observou-se a formação de um precipitado branco em poucas horas e mais intensamente ao final da reação. O precipitado obtido (**50**) foi separado da mistura reacional por filtração a vácuo, lavado com éter dietílico (3 vezes o volume de 30 mL) e posteriormente levado ao dessecador por uma hora e depois pesado.

Após secagem, o produto foi dissolvido em 300 mL de água destilada e, sob constante agitação, adicionou-se lentamente o mesmo volume de uma solução de NaOH mol.L^{-1}. Observou-se o aparecimento de um precipitado castanho claro, que foi separado da fase aquosa por filtração à vácuo e lavado com solução de NaOH 0,1 mol/L (3 vezes o volume de 50 mL).

O sólido foi dissolvido com diclorometano, secado com sulfato de magnésio anidro e depois filtrada. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e a amostra obtida imediatamente resfriada em dessecador.

4.2.2 – Preparação dos Ésteres Cinâmicos

Os ésteres cinâmicos foram preparados através da reação entre os benzaldeídos (figura 23) e a Ilida de fósforo recém preparada. O procedimento abaixo foi realizado para todas as 12 reações.

A um balão bitubulado de 50 mL, foram adicionados 7,55 mmol do composto **51**, uma quantidade equivalente de EcTF com excesso (aproximadamente 7,70 mmol) e uma quantidade suficiente do catalizador ácido benzóico em 50 mL de Tolueno. A mistura foi mantida sob aquecimento e agitação magnética constante entre 16 a 24 horas através de um sistema de refluxo. A solução resultante foi resfriada a temperatura ambiente e transferida para um funil de separação, onde foram adicionados uma solução saturada de $NaHCO_3$ (30 mL) e éter etílico (50,0 mL). A fase orgânica foi separada e lavada com solução saturada de $NaHCO_3$ (3 vezes o volume de 30 mL) e secada com $CaCl_2$ anidro e filtrada. O solvente foi evaporado sob vácuo, e o produto resultante purificado por cromatografia em sílica gel flash, utilizando-se uma mistura de hexano e acetato de etila como fase móvel.

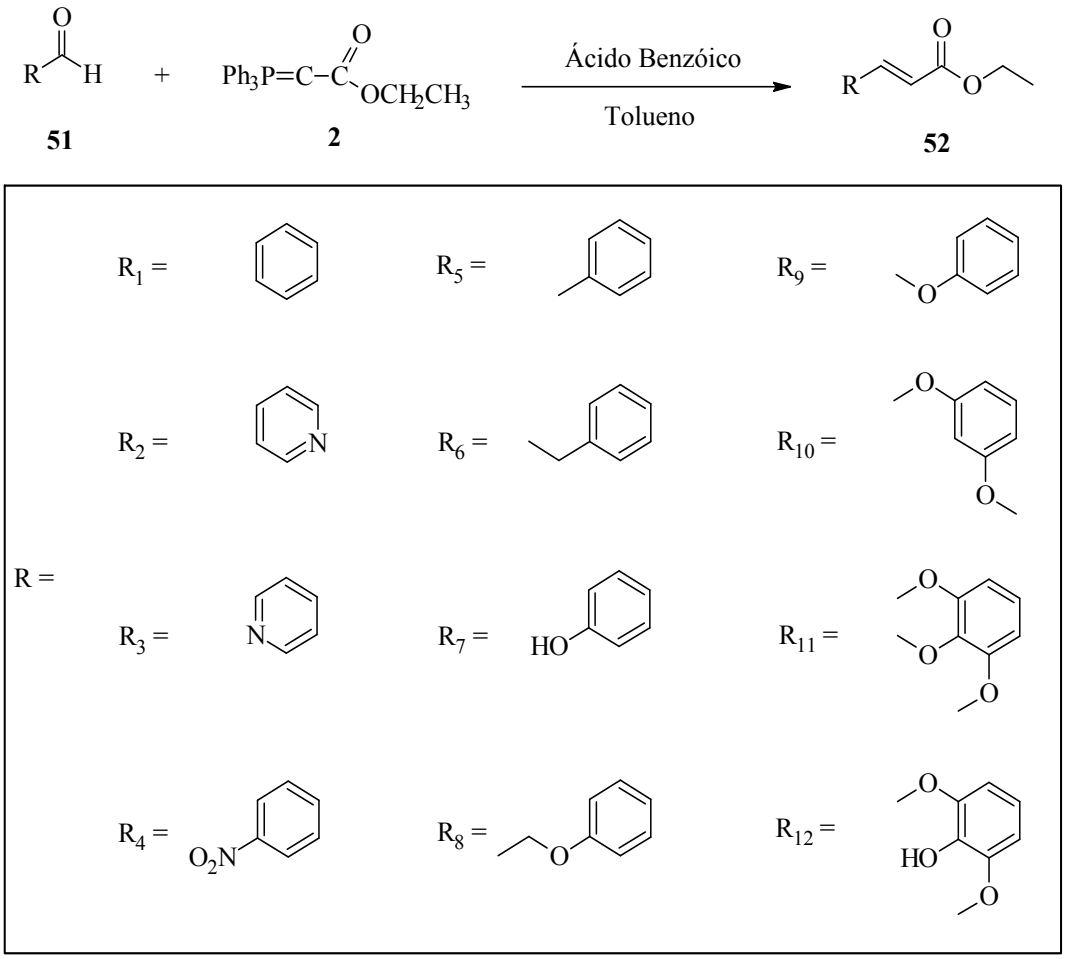


Figura 23: *Preparação dos Ésteres Cinâmicos*

4.2.3 - Preparação das Diidrocumarinas

As diidrocumarinas foram preparadas a partir da reação entre os ésteres cinâmicos recentemente obtidos e fenóis. Ácidos cinâmicos obtidos comercialmente e fenóis, também foram utilizados para esse fim (Figura 24).

Foram pesados, 0,5340 mmol do composto **4** e colocados num balão bitubulado de 50 mL, contendo 30 mL de uma solução de ácido trifluoracético e diclorometano (TFA: CH_2Cl_2) na proporção de 4:1. Adicionou-se ainda, 53,50 mmol do composto **53** (ou **55**).

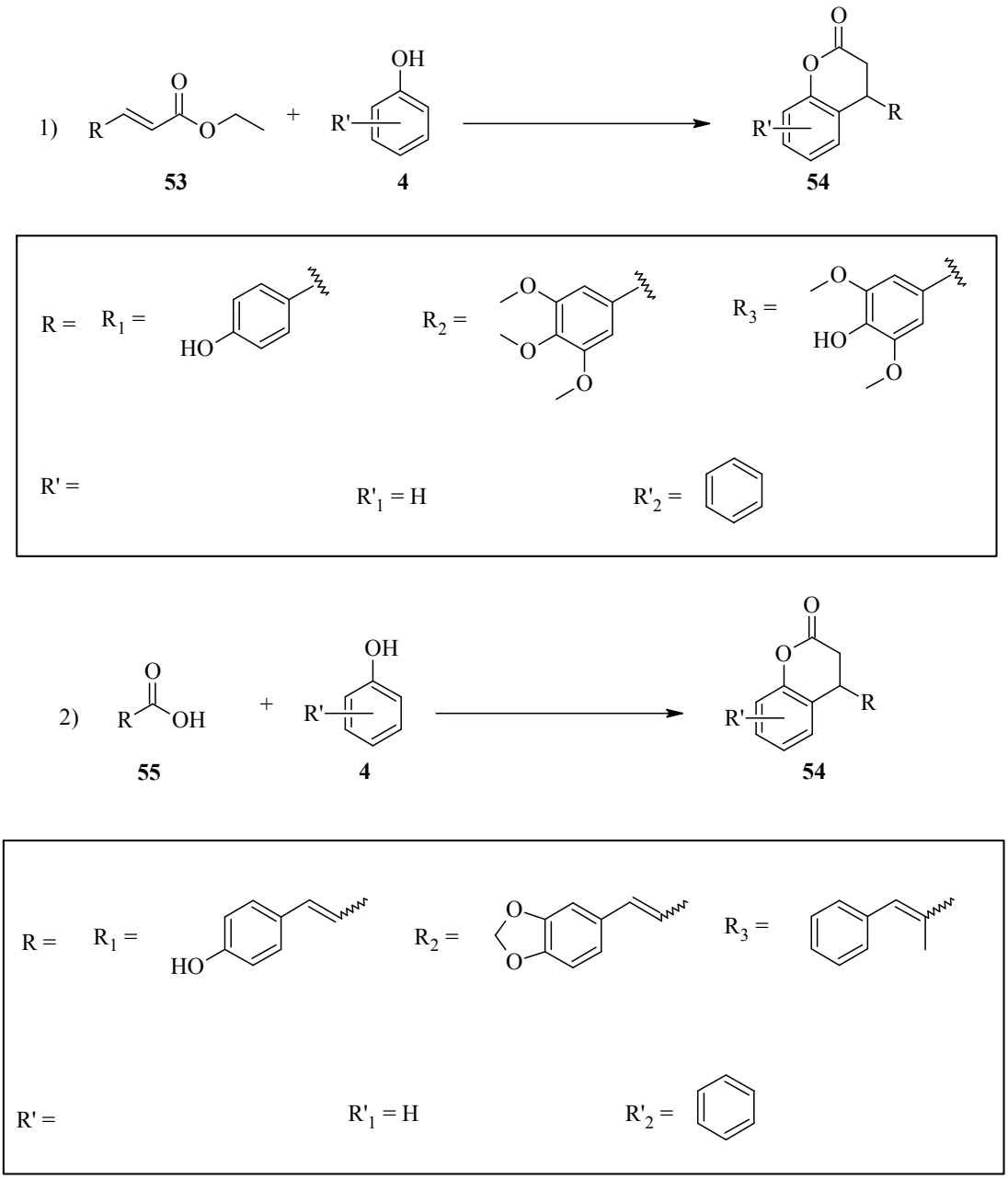


Figura 24: *Obtenção das diidrocumarinas a partir dos ésteres cinâmicos (1) e a partir dos ácidos cinâmicos (2)*

A mistura foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente por (24-36) horas. A reação foi acompanhada por CCD utilizando hexano e acetato de etila como fase móvel. O sistema foi aberto e deixado em repouso por 2 horas (para evaporar o excesso de TFA). Transferiu-se para um funil de separação, onde foram adicionados diclorometano (20 mL),

água (5 vezes o volume de 20 mL), solução de NaOH 0,001 M (3 vezes o volume de 20 mL) e água novamente (2 vezes o volume de 20 mL). A fase orgânica foi retirada do funil, secada com $MgSO_4$ anidro e concentrada à vácuo.

A amostra resultante foi purificada por cromatografia em sílica gel flash, com hexano e acetato de etila.

4.2.4 – Atividade Biológica

- Reagentes e equipamentos:

- Tampões utilizados

Tampão A: Tris 50 mM, pH 8,0

Tampão B: Tris 50 mM, pH 8,0 contendo 0,1 % de soro albumina bovia (BSA).

Tampão C: Tris 50 mM, pH 8, contendo 0,1 M NaCl e 0,02 M de $MgCl_2.6H_2O$

Tampão D: 50 mM NaH_2PO_4, pH 7,6.

- Enzimas

Acetilcolinesterase de peixe elétrico (Tipo VI-S, pó liofilizado, 292 U/mg sólido, 394 U/mg proteína, Sigma, lote: 046K7675) foi utilizada em todos os ensaios em CCD e microplaca utilizando o reagente colorimétrico de Ellmam. A enzima liofilizada foi dissolvida em tampão A para preparar uma solução estoque 1000 U/mL e, posteriormente diluida em tampão B

para obter uma solução de enzima 0,226 U/mL utilizada no ensaio em microplaca ou em tampão A para obter uma solução de enzima 3 U/mL para ser utilizada no ensaio em CCD.

- Substrato

Iodeto de acetiltiocolina (ACTI) (Sigma-Aldrich®) foi o substrato utilizado nos ensaios em microplaca 15 mM em água Millipore.

- Reagentes colorimétricos

Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (Sigma-Aldrich®) ou reagente de Ellman foi utilizado nos ensaio em microplaca 3 mM em tampão C.

- Leitor de microplacas

Placas de poliestireno com 96 poços (300 µL/TPP®) e equipamento leitor de microplacas Thermo Scientific modelo Multiskan FC foi utilizado para medir a absorbância em 412 nm para a reação enzimática no ensaio em microplaca.

- Procedimento:

Em leitor de microplaca de 96 poços, foram adicionados em sequência os reagentes a seguir: 25 µl da solução aquosa do substrato, 125 µL de uma solução do reagente de Ellman, 50 µL de tampão B e 25 µl da solução de amostra e a absorbância monitorada a cada 10 s durante 230 s em 412 nm. Após esse período 25 µL de uma solução aquosa de enzima AChE foram adicionados e a absorbância novamente monitorada a cada 10 s durante 230s em 412 nm.

- Cálculo:

As porcentagens de inibição foram calculadas comparando-se as taxas das reações das amostras com a taxa de reação do controle (solvente utilizado para solubilizar cada amostra) através da equação:

$$\%\,inibição \;= 100 - \frac{T_{ra}}{T_{rc}} x100 \qquad \textbf{Eq. (3)}$$

Onde:

T_{ra} = Taxa da reação da amostra

T_{rc} = Taxa da reação de controle

A concentração de cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados avaliados através dos valores médios, considerando apenas aqueles com desvio padrão menores do que 6%.

As taxas das reações foram calculadas utilizando software apropriado (GraphPad Prism versão 5.0). Qualquer aumento da absorbância antes da adição da enzima devido à hidrólise espontânea do substrato foi corretamente corrigido subtraindo-se a taxa da reação antes da adição da enzima da taxa obtida após a adição da enzima.

5 – Resultados e Discussão

A seguir serão discutidas todas as etapas sintéticas realizadas, assim como os aspectos mais relevantes da análise estrutural e também a análise da relação entre estrutura molecular e atividade biológica.

5.1 – Síntese do Etoxicarbonilmetileno(trifenil)fosforano (EcTF)

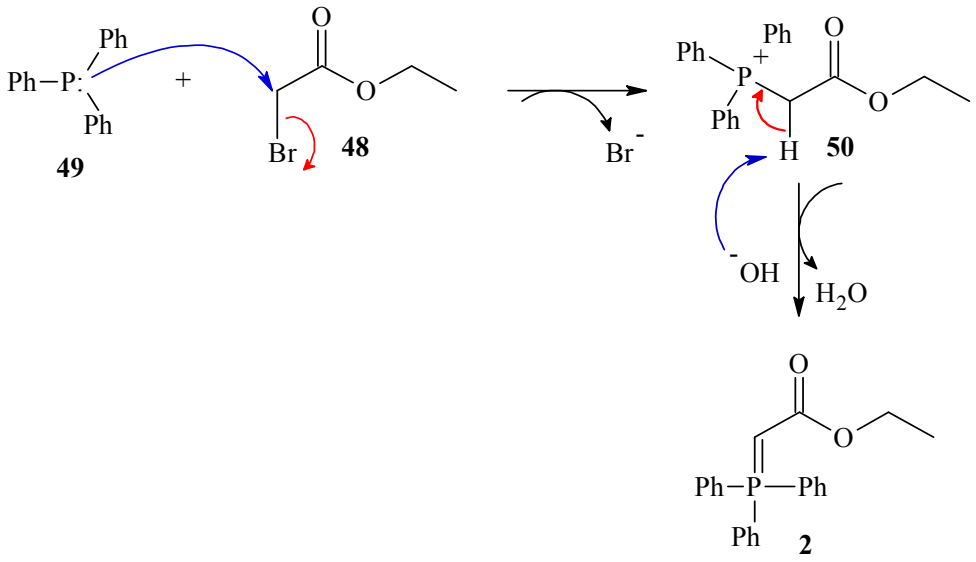
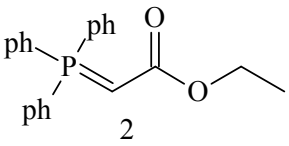


Figura 25: *Mecanismo de formação do EcTF*

O (EcTF) foi sintetizado de acordo com o protocolo descrito no procedimento experimental. A primeira etapa consiste na formação do sal de fosfônio após substituição nucleofílica da trifenilfosfina com o bromoacetato de etila, que ficou evidenciado pela formação de um precipitado branco no sistema de refluxo após poucas horas de reação. Na segunda etapa, o produto de interesse foi formado após a eliminação de água em meio básico com rendimento de 92%.

- Dados:



Name: Etoxicarbonilmetileno(trifenil)fosforanc

Ponto de Fusão: (139 - 140,2) ºC

5.2 – Síntese dos Ésteres Cinâmicos

Iniciou-se a síntese dos ésteres cinâmicos através da reação de Wittig.

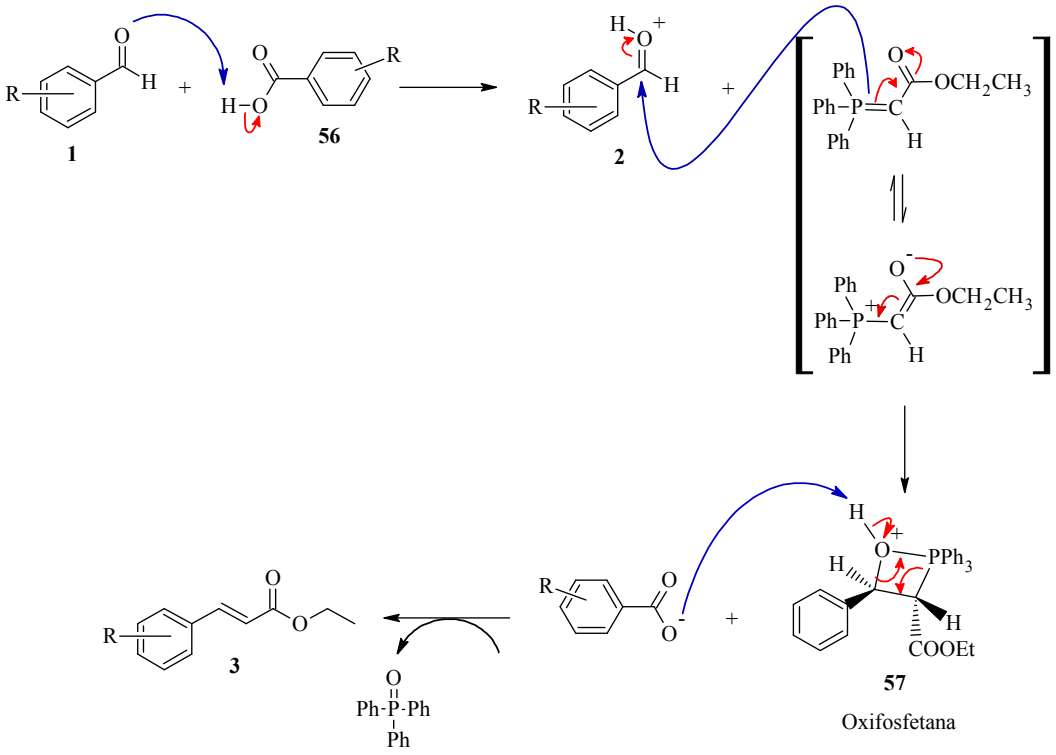


Figura 26: *Mecanismo de reação do Éster Cinâmico*

O EcTF tem a carga do carbânion estabilizada devido a ressonância desses elétrons com a carbonila ao seu lado (figura 26). Portanto, tem-se uma Ilida menos reativa, o que justifica o uso de ácido benzóico como catalizador.

Outra consequência da utilização desse tipo de Ilida é a formação induzida do isômero *E*, que é o mais estável (observado através da análise dos

espectros de RMN). De fato, em todas as reações foi verificada apenas a formação desse isômero com rendimentos apreciáveis, entre 47% e 70%.

Foi possível verificar, através dos espectros de infravermelho (em anexo), o aparecimento de bandas de absorção características dos compostos sintetizados. Observou-se uma banda larga no intervalo de 1690 à 1740 cm^{-1} referente ao estiramento da carbonila (C=O) e duas bandas médias entre 1625 e 1640 cm^{-1}, característica do estiramento da ligação carbono-carbono (C=C). Tem-se também um sinal duplo entre 1000 e 1300 cm^{-1} referente ao estiramento simétrico da ligação C — O.

Tabela 1: *Correlação entre as bandas de absorção em infravermelho e os grupos funcionais para os ésteres cinâmicos obtidos.*

Composto	C=O	C=C	C — O
58	1709	1637	1181
59	1706	1639	1125
60	1707	1643	1119
61	1710	1645	1175
62	1702	1631	1199
63	1709	1636	1120
64	1711	1641	1118
65	1706	1636	1041
66	1705	1604	1030
67	1708	1639	1064
68	1692	1634	1006
69	1703	1633	1036

Através dos espectros de ^{1}H RMN foram analisados os diferentes deslocamentos químicos (δ) entre os sinais de multipletos. Desse modo, foi

possível confirmar as estruturas propostas para os ésteres cinâmicos analisados. Atribuiu-se o sinal do tripleto que aparece próximo de 1,3 ppm aos hidrogênios ligados ao carbono 12 (figura 26) vizinhos a dois hidrogênios acoplados com $(J \cong 7{,}1Hz)$.

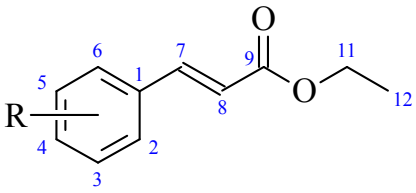
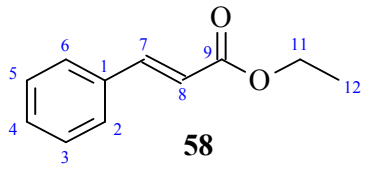


Figura 27: *Estrutura molecular dos ésteres cinâmicos*

Um quarteto foi identificado próximo a 4,2 ppm e atribuído aos hidrogênios do carbono 11, porque existem três hidrogênios adjacentes acoplados $(J \cong 7{,}2Hz)$.

Observou-se também a presença de dupletos na região entre 6,5 e 7,0 ppm que caracterizam os dois hidrogênios da ligação dupla. E ainda, sinais na região entre 7,0 e 9,0 ppm, características de prótons de anel aromatico.

- Dados dos produtos obtidos:



58

Descrição: Sólido cristalino e transparente

Name: 3-Fenil-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (137,9 - 138,8) ºC

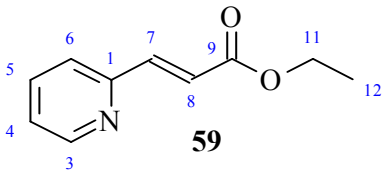
Rendimento: 50 %

Tabela 2: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***58***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,34	H-12	t	7,14
4,27	H-11	q	7,18
6,45	H-7 e H-8	d	15,91
7,38	H-3, H-4, H-5	m	-
7,48 - 7,56	H-2	m	-
7,70	H-6	d	15,91

Tabela 3: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***58***

δ (ppm)	Atribuição
14,21	C-12 (CH_3)
60,40	C-11 (CH_2)
118,12 e 127,93	C-7 e C-8 (C=C)
128,76	C-1 (C)
130,11	C-2 e C-3 (CH)
134,32	C-5 e C-6 (CH)
144,49	C-4 (CH)
166,89	C-9 (C=O)



59

Descrição: Sólido amarelo claro

Name: 3-(2-piridin)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (65,5 - 66,7) ºC

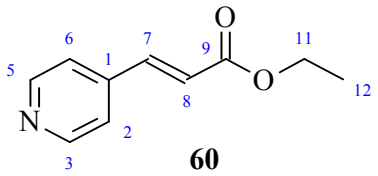
Rendimento: 48 %

Tabela 4: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***59***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,26	H-12	t	7,10
4,20	H-11	q	7,18
6,85	H-8	d	15,85
7,36	H-7	d	7,80
7,15 – 7,23	H-3	m	-
7,55 – 7,69	H-4 e H-5	m	-
8,40 – 8,70	H-6	m	-

Tabela 5: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***59***

δ (ppm)	Atribuição
14,04	C-12 (CH_3)
60,43	C-11 (CH_2)
122,31 e 124,03	C-7 e C-8 (C=C)
136,66	C-1 (C)
142,96	C-6 (CH)
149,80	C-3 e C-5 (CH)
152,65	C-4 (CH)
166,46	C-9 (C=O)



60

Descrição: Sólido branco a amarelo claro

Name: 3-(4-piridin)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (57,5 - 59,1) ºC

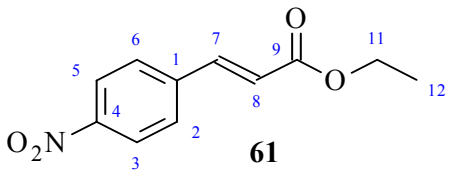
Rendimento: 54 %

Tabela 6: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***60***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,28	H-12	t	7,18
4,22	H-11	q	7,07
6,56	H-8	d	15,85
7,18 – 7,22	H-7	m	-
7,32 – 7,54	H-2 e H-6	m	-
7,55 – 7,67	H-3 e H-5	m	-

Tabela 7: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***60***

δ (ppm)	Atribuição
14,18	C-12 (CH_3)
61,04	C-11 (CH_2)
123,63 e 128,38	C-7 e C-8 (C=C)
131,96	C-1 (C)
141,11	C-2 e C-6 (CH)
149,42	C-3 e C-5 (CH)
165,80	C-9 (C=O)



61

Descrição: Sólido amarelo cristalino

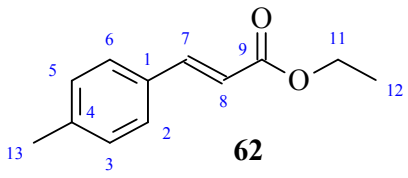
Name: 3-(4-nitrofenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (128,9 - 131,0) ºC

Rendimento: 68 %

Tabela 8: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***61***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,34	H-12	t	7,14
4,26	H-11	q	7,01
6,30	H-8	d	16,09
6,85	H-2 e H-6	d	8,56
7,43	H-3 e H-5	d	8,56
7,63	H-7	d	16,09



62

Descrição: Sólido branco

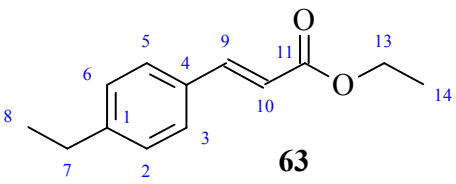
Name: 3-(4-metilenofenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (71,2 - 72,0) ºC

Rendimento: 49 %

Tabela 9: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***62***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,36	H-12	t	7,14
1,57	H-13	s	-
4,31	H-11	q	7,27
6,57	H-6	d	16,09
7,68	H-7 e H-8	d	8,56
7,71 – 7,79	H-2	m	-
8,26	H-3 e H-5	d	8,82



63

Descrição: Sólido branco

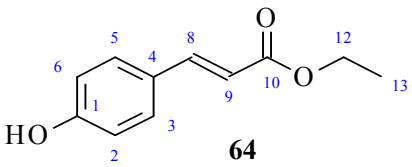
Name: 3-(4-etilenofenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (65,5 - 66,7) ºC

Rendimento: 49 %

Tabela 10: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***63***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,47	H-8 e H-14	t	7,01
4,03 - 4,18	H-7 e H-13	m	-
7,02	H-3 e H-5	s	-
7,43 - 7,53	H-2	m	-
7,61 - 7,73	H-6	m	-
7,79 - 7,91	H-9 e H-10	m	-



64

Descrição: Óleo branco a transparente

Name: 3-(4-hidroxifenil)-2-propenoato de etila

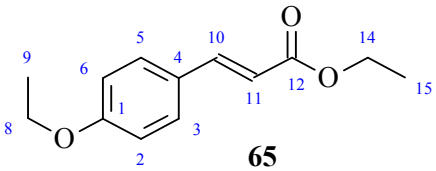
Rendimento: 61 %

Tabela 11: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***64***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,34	H-13	t	7,10
4,26	H-12	q	7,12
6,29	H-3	d	16,07
6,86	H-8 e H-9	d	8,74
7,41	H-2 e H-6	d	8,89
7,63	H-5	d	15,91

Tabela 12: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***64***

δ (ppm)	Atribuição
14,28	C-13 (CH_3)
60,53	C-12 (CH_2)
115,15 e 115,89	C-8 e C-9 (C=C)
126,73	C-4 (C)
129,94	C-3 e C-5 (CH)
144,73	C-2 e C-6 (CH)
158,33	C-1 (C)
167,88	C-10 (C=O)



65

Descrição: Sólido branco cristalino

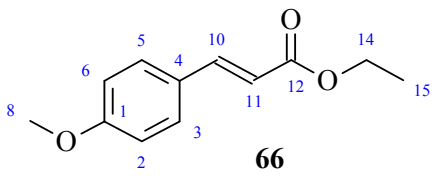
Name: 3-(4-etoxifenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (153,4 - 155,0) ºC

Rendimento: 49 %

Tabela 13: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***65***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,33	H-15	t	7,14
1,43	H-9	t	7,14
4,06	H-8	q	7,01
4,25	H-14	q	7,01
6,30	H-11	d	15,83
6,89	H-3 e H-5	d	8,82
7,46	H-2 e H-6	d	8,82
7,64	H-10	d	16,09



66

Descrição: Sólido branco

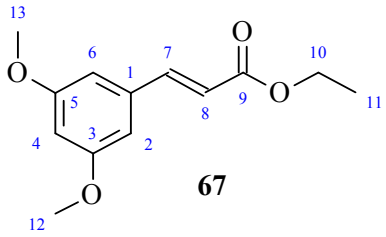
Name: 3-(4-metoxifenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (156,5 - 156,9) ºC

Rendimento: 59 %

Tabela 14: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***66***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,26	H-15	t	7,14
3,77	H-8	s	-
4,18	H-14	q	7,27
6,24	H-11	d	16,09
6,83	H-3 e H-5	d	8,82
7,41	H-2 e H-6	d	8,56
7,57	H-10	d	15,83



67

Descrição: Óleo amarelo

Name: 3-(3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila

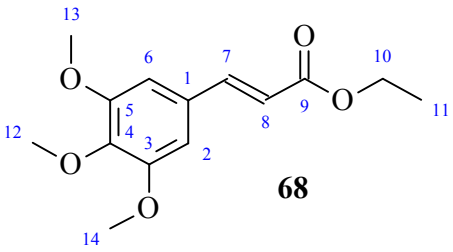
Rendimento: 60 %

Tabela 15: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***67***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,34	H-11	t	7,10
3,80	H-12 e H-13	s	-
4,26	H-10	q	7,07
6,41	H-8	d	16,07
6,47 - 6,51	H-4	m	-
6,66	H-2 e H-6	d	2,18
7,60	H-7	d	15,91

Tabela 16: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***67***

δ (ppm)	Atribuição
14,25	C-11 (CH_3)
55,33	C-12 e C-13 (CH_3)
60,49	C-10 (CH_2)
102,42 e 105,82	C-7 e C-8 (C=C)
118,67	C-1 (C)
136,23	C-2 e C-6 (CH)
144,52	C-3 e C-5 (C)
160,90	C-4 (CH)
166,92	C-9 (C=O)



68

Descrição: Sólido branco

Name: 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (66,0 - 68,6) ºC

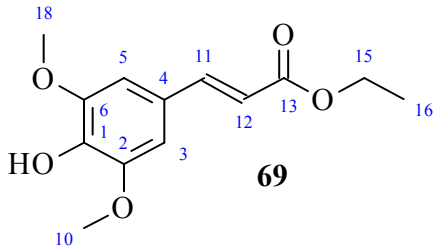
Rendimento: 60 %

Tabela 17: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***68***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,34	H-11	t	7,10
3,89	H-12, H-13 e H-14	s	-
4,26	H-10	q	7,07
6,35	H-8	d	15,91
6,75	H-2 e H-6	s	-
7,60	H-7	d	15,83

Tabela 18: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***68***

δ (ppm)	Atribuição
14,28	C-11 (CH_3)
56,08	C-12, C-13 e C14 (CH_3)
60,92	C-10 (CH_2)
105,10 e 117,46	C-7 e C-8 (C=C)
129,92	C-1 (C)
139,97	C-2 e C-6 (CH)
144,52	C-3 e C-5 (C)
153,37	C-4 (C)
166,91	C-9 (C=O)



69

Descrição: Sólido amarelo cristalino

Name: 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila

Ponto de Fusão: (69,7 - 70,0) ºC

Rendimento: 70 %

Tabela 19: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***69***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,33	H-16	t	7,18
3,91	H-10, H-18	s	-
4,25	H-15	q	7,20
6,29	H-12	d	15,91
6,76	H-3 e H-5	s	-
7,59	H-11	d	15,91

Tabela 20: *Dados espectrais de RMN de ^{13}C para o composto* ***69***

δ (ppm)	Atribuição
14,28	C-16 (CH_3)
56,24	C-10, C-18 (CH_3)
60,35	C-15 (CH_2)
104,93 e 115,90	C-11 e C-12 (C=C)
125,84	C-4 (C)
137,00	C-3 e C-5 (CH)
144,83	C-2 e C-6 (C)
147,13	C-1 (C)
167,14	C-13 (C=O)

5.3 – Síntese das Diidrocumarinas

As diidrocumarinas foram preparadas á partir de três ésteres cinâmicos obtidos por via sintética e três ácidos cinâmicos comerciais.

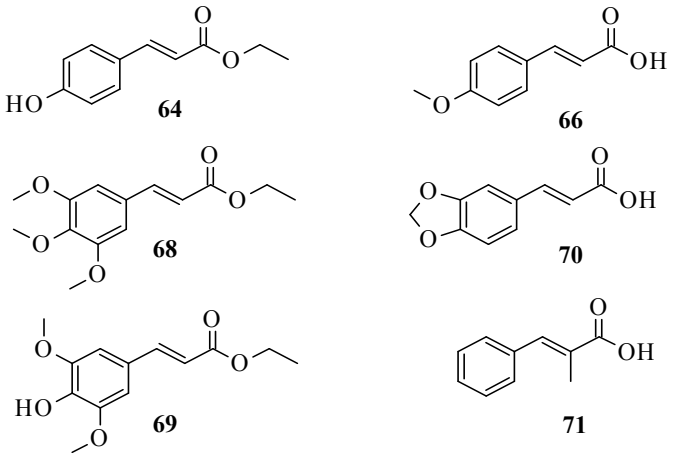


Figura 28: *Ésteres e Ácidos Cinâmicos utilizados na síntese da Diidrocumarina*

Dentre os compostos, escolheram-se aqueles cuja molécula apresentava maior variabilidade e complexidade estrutural para a análise comparativa entre atividade biológica e estrutura molecular. Os demais compostos sintetizados serço utilizados em outros trabalhos.

A reação de hidroarilação observada no mecanismo na figura 29 abaixo tem uma característica importantíssima, a formação de um centro quiral no produto, podendo formar esterioisômeros.

Durante as primeiras horas de síntese, percebeu-se uma evidente alteração na cor da mistura em todas as reações. Verificou-se também o surgimento de cristais nas paredes do balão após 12 horas de reação. Os rendimentos das reações variaram entre 39% a 97%.

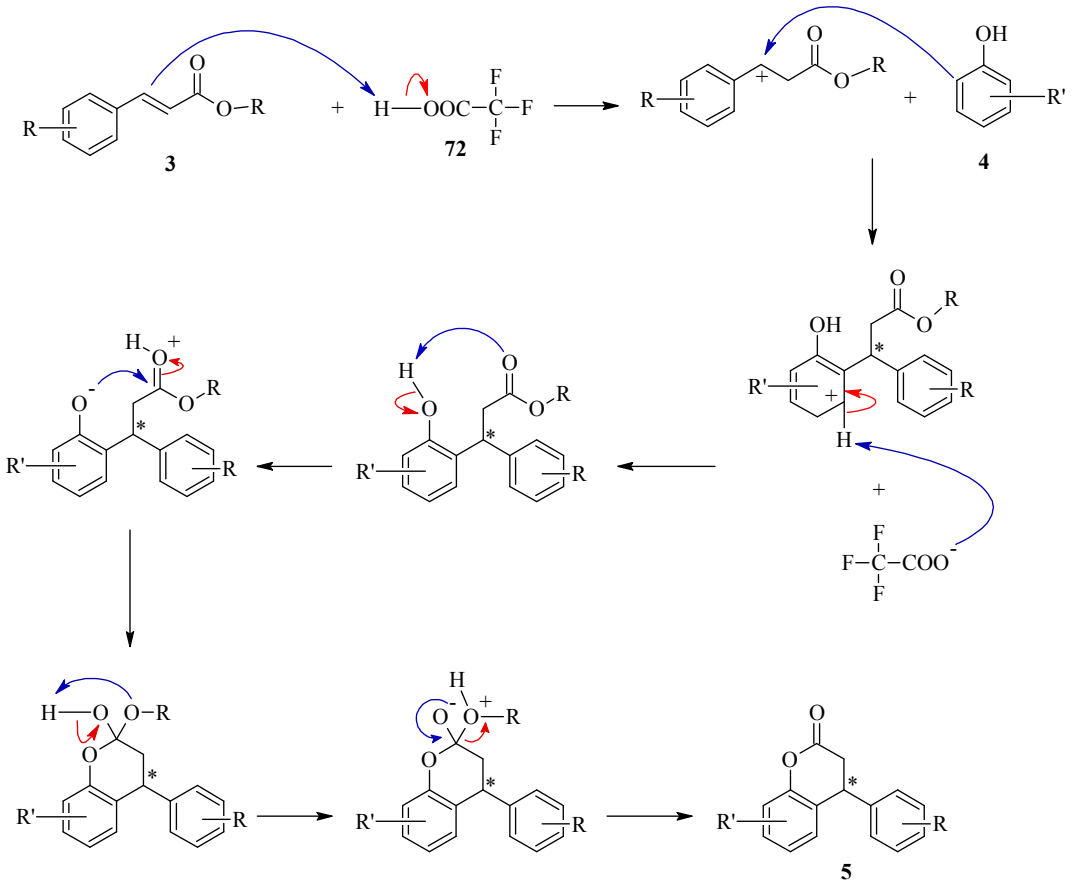


Figura 29: *Mecanismo de reação das Diidrocumarinas*

A evidência mais relevante da formação do produto, após análise do espectro de infravermelho foi o deslocamento do sinal para estiramento da carbonila. Nos ésters cinâmicos os elétrons da carbonila estão conjugados com os da ligação dupla, em consequência, a posicão do sinal é deslocado para o intervalo de 1690 e 1740 cm^{-1}. A ligação dupla é consumida na reacão, formando as diidrocumarinas (lactonas cíclicas). A perda da conjugação provoca o deslocamento do sinal para o intervalo de 1735 e 1770 cm^{-1}.

Foi verificado também o desaparecimento da banda correspondente ao estiramento da ligação C=C no intervalo entre 1625 e 1640 cm^{-1} e o aparecimento de uma banda de absorção para o estiramento simétrico da ligação C—O caracterizado por um sinal forte entre 1000 e 1300 cm^{-1}.

Tabela 21: *Correlação entre as bandas de absorção em infravermelho e os grupos funcionais para as diidrocumarinas obtidas.*

Composto	C=O
73	1758
74	1762
75	1766
76	1773
77	1764
78	1742
79	1740

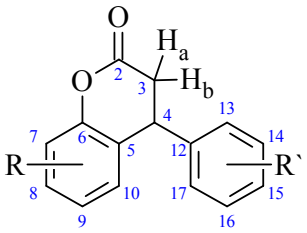
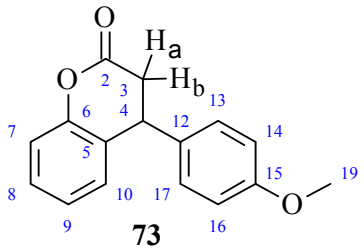


Figura 30: *Estrutura molecular das Diidrocumarinas*

Foi possível confirmar as estruturas da maioria dos compostos esperados através dos espectros de RMN de ^{1}H. É característico de todas as diidrocumarinas um par de duplos dubletos (Figura 30), cada um integrado para um átomo de hidrogênio, na região entre 3,0 e 3,3 ppm (J=15,5 Hz e 8,3 Hz aproximadamente), devido ao acoplamento dos hidrogenios H_a-3 e H_b-3 (não equivalentes) com o hidrogênio H-4, respectivamente. Outro duplo dubleto é verificado na região entre 4,0 e 4,6 ppm (J = 7,8 Hz e 6,2 Hz, aproximadamente), representando o hidrogênio H-4. Os demais sinais são de hidrogênios dos anéis aromáticos, que tem seus sinais no intervalo de 6,5 a 9,0 ppm.

-Dados dos produtos obtidos:



73

Descrição: Sólido branco a amarelo

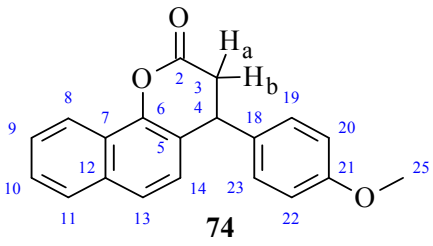
Name: 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona

Ponto de Fusão: (120,1 - 121,9) ºC

Rendimento: 44 %

Tabela 22: *Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto* ***72***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3,00	H_a-3	dd	15,57 e 8,30
3,07	H_b-3	dd	15,83 e 5,97
3,81	H-19	s	-
4,31	H-4	dd	7,8 e 6,2
6,89	H-14 e H-17	d	8,82
6,99	H-13	d	7,01
7,09	H-8, H-9, H-10	d	8,56
7,14	H17	d	6,75
7,31	H-7	s	-



74

Descrição: Sólido branco a castanho

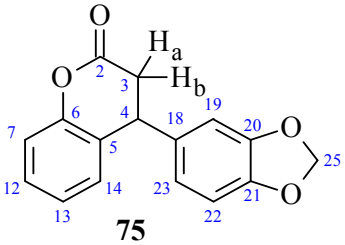
Name: 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona

Ponto de Fusão: (123,5 - 125,0) ºC

Rendimento: 57 %

Tabela 23: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***73***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3,09	H_a-3	dd	15,83 e 6,75
3,19	H_b-3	dd	15,83 e 6,23
3,79	H-25	s	-
4,45	H-4	dd	7,93 e 6,21
6,87	H-20 e H-22	d	8,82
7,10	H-8, H-9, H-10	m	-
7,57	H-11, H-13, H-14	d	8,56
7,83	H19	d	6,75
8,31	H-23	s	-



75

Descrição: Sólido branco

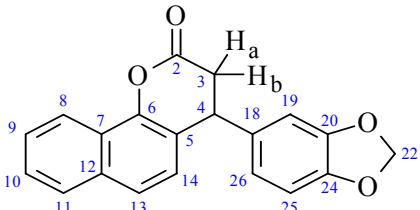
Name: 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona

Ponto de Fusão: (125,9 - 128,1) ºC

Rendimento: 39 %

Tabela 24: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***74***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
2,97	H_a-3	dd	15,83 e 7,79
3,06	H_b-3	dd	15,83 e 5,97
4,28	H-4	dd	7,50 e 6,50
5,97	H-25	s	-
6,62	H-12 e H-13	s	-
6,78	H-22	d	8,30
7,02	H-23	d	8,30
7,12	H-7 e H-14	m	-
7,31	H-19	m	-



76

Descrição: Sólido branco

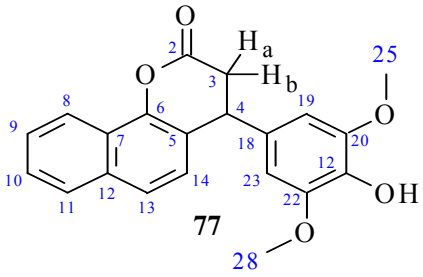
Name: 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona

Ponto de Fusão: (126,0 - 128,9) ºC

Rendimento: 45 %

Tabela 25: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***75***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3,08	H_a-3	dd	15,83 e 6,49
3,19	H_b-3	dd	15,83 e 6,23
4,42	H-4	dd	7,22 e 6,44
5,95	H-22	s	-
6,63	H-14 e H-15	m	-
6,77	H-9	d	8,56
7,14	H-10	d	8,56
7,58	H-19, H-25 e H-26	m	-
7,84	H-8	d	7,79
8,32	H-11	d	8,30



77

Descrição: Sólido Marron

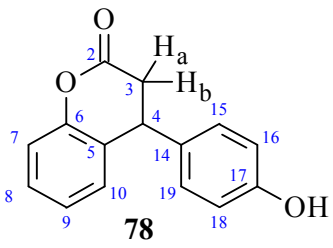
Name: 4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona

Ponto de Fusão: (109,1 - 111,2) ºC

Rendimento: 39 %

Tabela 26: *Dados espectrais de RMN de ^{1}H para o composto* ***76***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3,11	H_a-3	dd	15,83 e 7,53
3,20	H_b-3	dd	15,83 e 6,23
3,82	H-25 e H-28	s	-
4,42	H-4	dd	7,53 e 6,23
6,41	H-19 e H-23	s	-
7,12	H-8	d	8,30
7,58	H-9, H-10 e H-11	m	-
7,85	H-13	d	7,78
8,32	H-14	d	8,30



78

Descrição: Sólido branco a amarelo

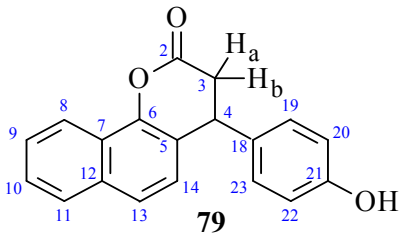
Name: 4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona

Ponto de Fusão: (61,1 - 62,0) ºC

Rendimento: 86 %

Tabela 27: *Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto 77*

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3,09	H_a-3	dd	15,57 e 6,49
3,19	H_b-3	dd	15,83 e 6,49
4,44	H-4	dd	7,83 e 6,56
6,80	H-16 e H-18	d	8,56
7,04	H-15 e H-19	d	8,56
7,12	H-7	d	8,30
7,57	H-8	m	-
7,84	H-9	d	8,04
8,32	H-10	d	7,53



79

Descrição: Sólido branco a amarelo

Name: 4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona

Ponto de Fusão: (63,3 - 64,1) ºC

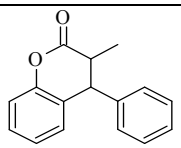
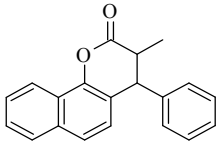
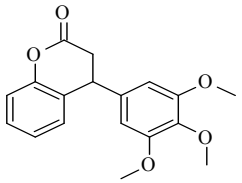
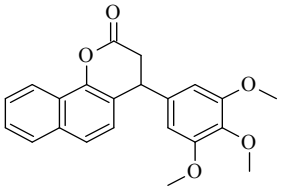
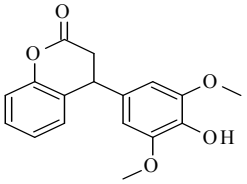
Rendimento: 97 %

Tabela 28: *Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto* ***78***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
3,09	H_a-3	dd	15,83 e 6,49
3,19	H_b-3	dd	15,83 e 6,23
4,45	H-4	dd	7,83 e 6,56
6,80	H-20 e H-22	d	8,82
7,05	H-19 e H-23	d	8,56
7,13	H-8	d	8,56
7,57	H-9, H-10 e H-11	m	-
7,84	H-13	d	8,56
8,32	H-14	d	8,82

Entretanto, em algumas reações não foi verificado a formação do produto de interesse. Estes estão disponíveis na tabela 29.

Tabela 29: *Relação dos compostos esperados que não se formaram nas sínteses*

Nome	Estrutura Molecular
3-metil-4-fenil-3,4-diidro-2-cromenona	 **80**
3-metil-4-fenil-3,4-diidro-2-benzocromenona	 **81**
4-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona	 **82**
4-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona	 **83**
4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona	 **84**

Esperava-se que todos os compostos acima fossem formados após reação com o fenol e o naftol com os ésteres e ácidos cinâmicos respectivamente, o que não foi observado.

O insucesso na formação dos compostos **80** e **81** da tabela 29 acima pode ser atribuído a estabilidade do carbocátion formado após o ataque nucleofílico da dupla ligação ao TFA. Esse carbocátion é vizinho ao grupo fenil a esquerda e a um carbono α-carbonila metilado a direita (figura 31).

O impedimento estérico, também promovido pela metila, pode impossibilitar a aproximação do fenol para a substituição eletrofílica aromática com o carbocátion.[24-26]

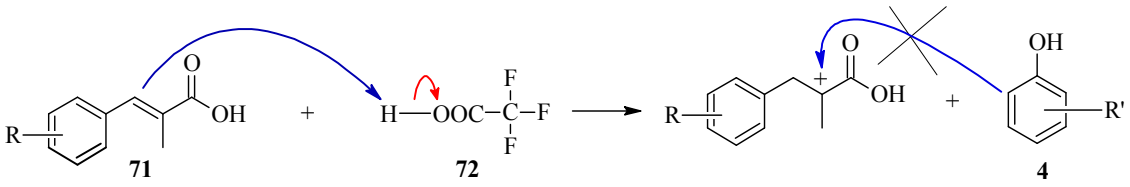


Figura 31: *Formação de um carbocátion estável, impossibilitando a substituição eletrofílica aromática.*

A presença de um grupo metoxi (OCH_3) nas posições 3 e 5 do anel aromático no composto **68** pode influenciar a sua reatividade. O metoxi é um grupo desativante do anel para a posição *meta* por efeito indutivo. O carbono meta desativado nesse caso é vizinho ao carbocátion, tornando-o extremamente instável, com tempo de vida pequeno e insuficiente para sofrer o ataque nucleofílico do fenol na próxima etapa da reação. Em consequência, o produto não se forma ou é obtido em pequeno rendimento. No caso dos compostos **82** e **83**, não houve formação do produto.[24-26]

Além disso, as reações de hidroarilação de ésteres e ácidos cinâmicos na presença do fenol são mais eficientes quanto maior o número de grupos doadores de elétrons ligados ao fenol. Isso significa que a reação é favorecida quando acontece na presença de fenóis com maior força nucleofílica.[21]

Na reação entre o composto **69** com o fenol, deveria ser formado o produto **84**. Porém, de forma surpreendente, os espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C em 2D (HMBC) em anexo, mostraram que houve a formação de um produto inesperado (figura 32).

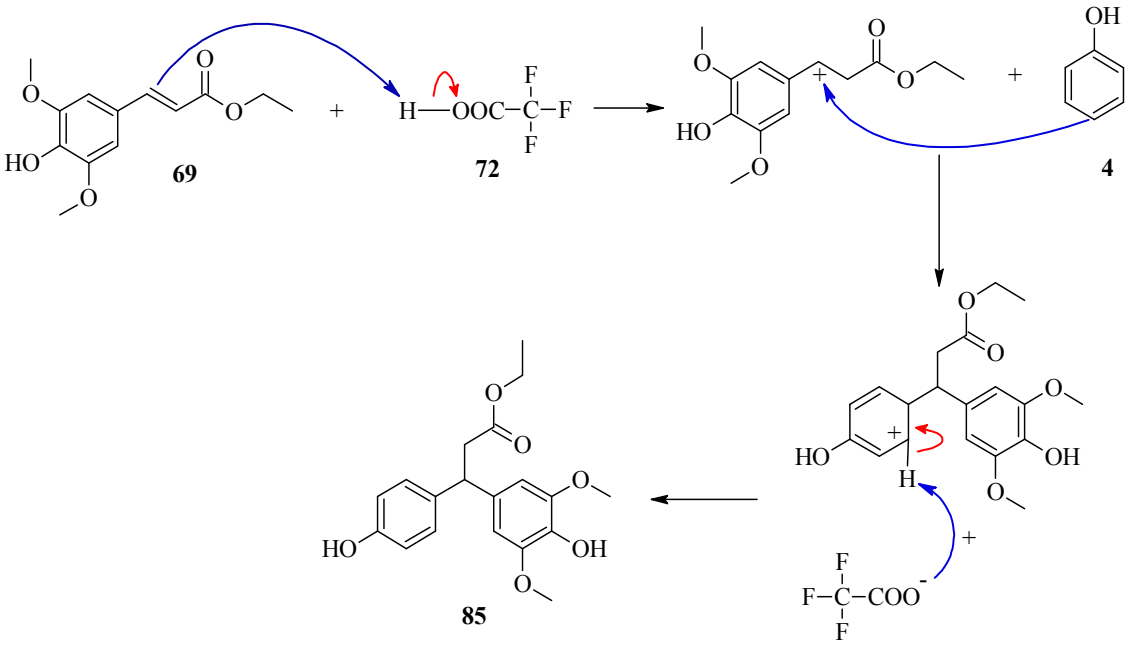


Figura 32: *Formação de um produto Cíclico*

O carbocátion formado na primeira etapa é instável, por motivos já explicados anteriormente, no entanto houve formação do produto em rendimento baixo (40,7%).

A explicação mais plausível seria o equilíbrio no estado de transição. Sabe-se que nesse momento, existem duas possibilidades de ataque nucleofílico pelo fenol: um a posição *orto e* outro a posição *para*.[26]

Inicialmente, observa-se que o ataque nucleofílico através da posição *orto* é desfavorecido por impedimento estérico, entretanto, forma um produto final mais estável. Portanto, no primeiro momento o ataque nesta posição não é favorável (mais lento), mas na medida em que a reação se processa o

equilíbrio é deslocado no sentido da formação do produto cíclico, muito estável (controle termodinâmico).[26]

Por outro lado, como o carbocátion formado tem um tempo de vida muito pequeno no estado de transição, acaba favorecendo a reação que ocorre mais rapidamente, característica do controle cinético. Neste caso o ataque nucleofílico ocorre na posição *para*, deslocando o equilíbrio no sentido da formação do produto não cíclico.[26]

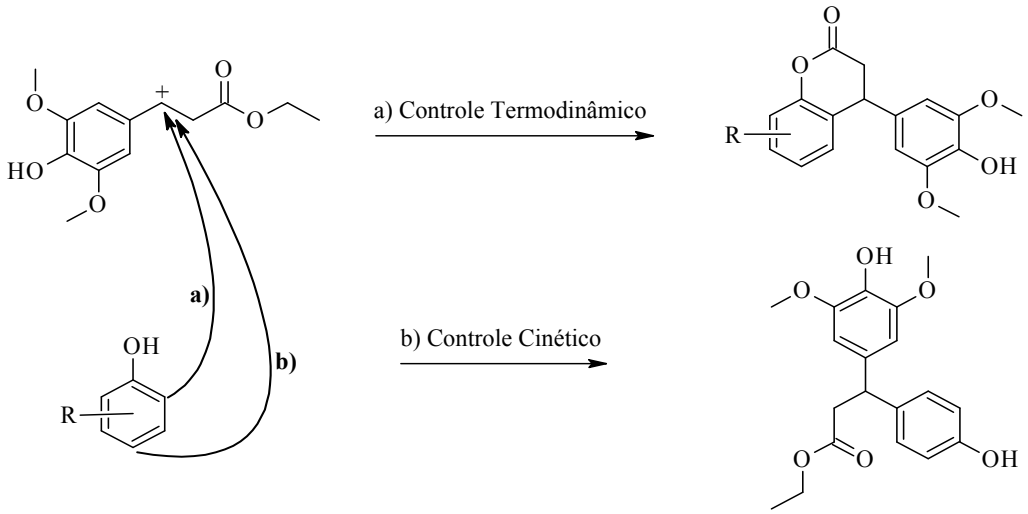
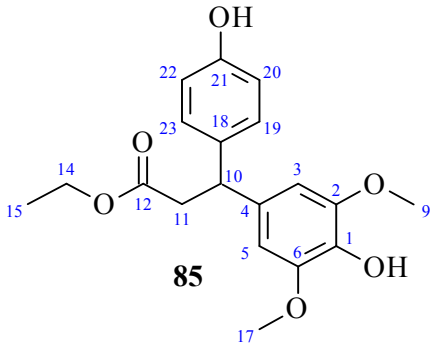


Figura 33: *Duas possibilidades de reação: controle cinético e controle termodinâmico.*

O produto cíclico pode ser favorecido pela utilização de nucleófilos mais fortes e o produto não cíclico pelo aquecimento, o que foi observado. A reação realizada a partir do naftol (nucleófilo mais forte) foi capaz de produzir o composto ciclico esperado.[26]



85

Descrição: Sólido branco a amarelo

Name: 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-
3-(4-hidroxifenil)-propanoato de etila

Ponto de Fusão: (64,2 - 65,5) ºC

Rendimento: 41 %

Tabela 30: *Dados espectrais de RMN de ^1H para o composto* ***85***

δ (ppm)	Atribuição	Tipo de Sinal	J (Hz)
1,15	H-15	t	7,14
2,97	H-11	d	8,04
3,84	H-9 e H-17	s	-
4,05	H-14	q	7,01
4,42	H-10	t	8,04
6,44	H-3 e H-5	s	-
6,75	H-19 e H-23	d	8,56
7,10	H-20 e H-22	d	8,30

No espectro de RMN de ^1H (Figura 34 e em anexo), observa-se o aparecimento de dois dubletos típicos de acoplamento spin de um sistema AA'BB' para anel aromático 1-4 substituído. Estes hidrogênios estão presentes em δ_H = 6,75 ppm e δ_H = 7,10 integrados com dois hidrogênios cada e constante de acoplamento de 8,56 Hz e 8,30Hz respectivamente.

Neste mesmo espectro, verificou-se a presença de um tripleto em δ_H = 1,15 integrado para três hidrogênios, um dubleto em δ_H = 2,97 integrado para 2 hidrogênios, um singleto em δ_H = 3,87 integrados para os 6 hidrogênios metílicos, um quarteto em δ_H 4,05 integrado para 2 hidrogênios e um tripleto em δ_H = 4,42 integrado para 1 hidrogênio e por fim um singleto na região dos aromáticos δ_H = 6,44 integrado para dois hidrogênios. Essas informações confirmaram a formação do composto em questão.

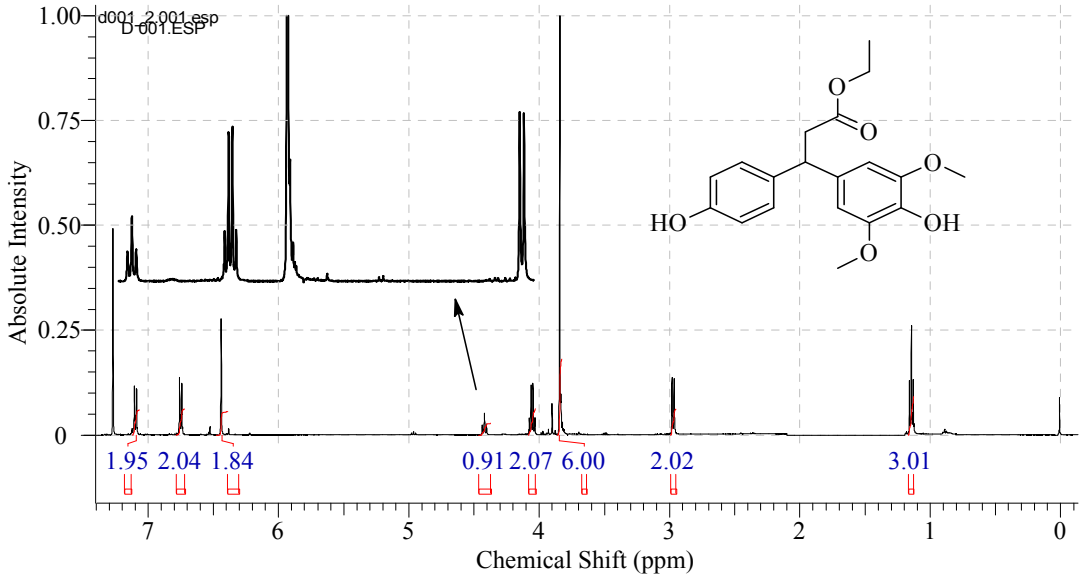


Figura 34: *Espectro de RMN-* ^{1}H *do composto* ***85***

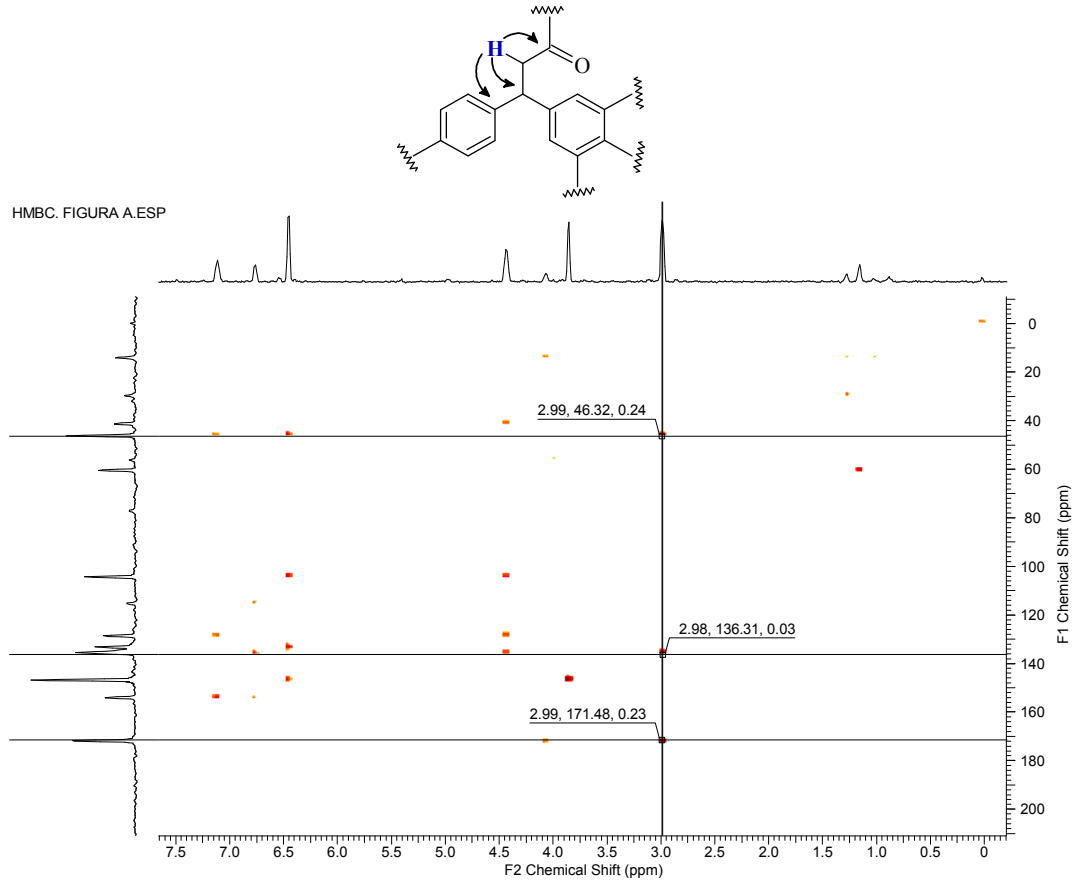


Figura 35: *Espectro de HMBC - Correlações entre o dubleto* $\delta_H = 2,97$ *e os sinais de carbonos* $\delta_C = 136,3$, $\delta_C = 46,3$ *e* $\delta_C = 171,5$.

A fim de eliminar qualquer tipo de dúvida, fez-se necessária a técnica de RMN em 2D via HMBC. A utilização dessa ferramenta é interessante porque possibilita analisar o acoplamento de hidrogênios e carbonos a longa distância.

Observou-se no espectro de HMBC a correlação entre o dubleto em δ_H = 2,97 com o sinal em δ_C = 136,3 referente ao carbono no anel aromático 1-4 substituído; em δ_C = 46,3 correspondente ao carbono assimétrico e ainda em δ_C = 171,5 referente ao carbono carbonílico (Figura 35)

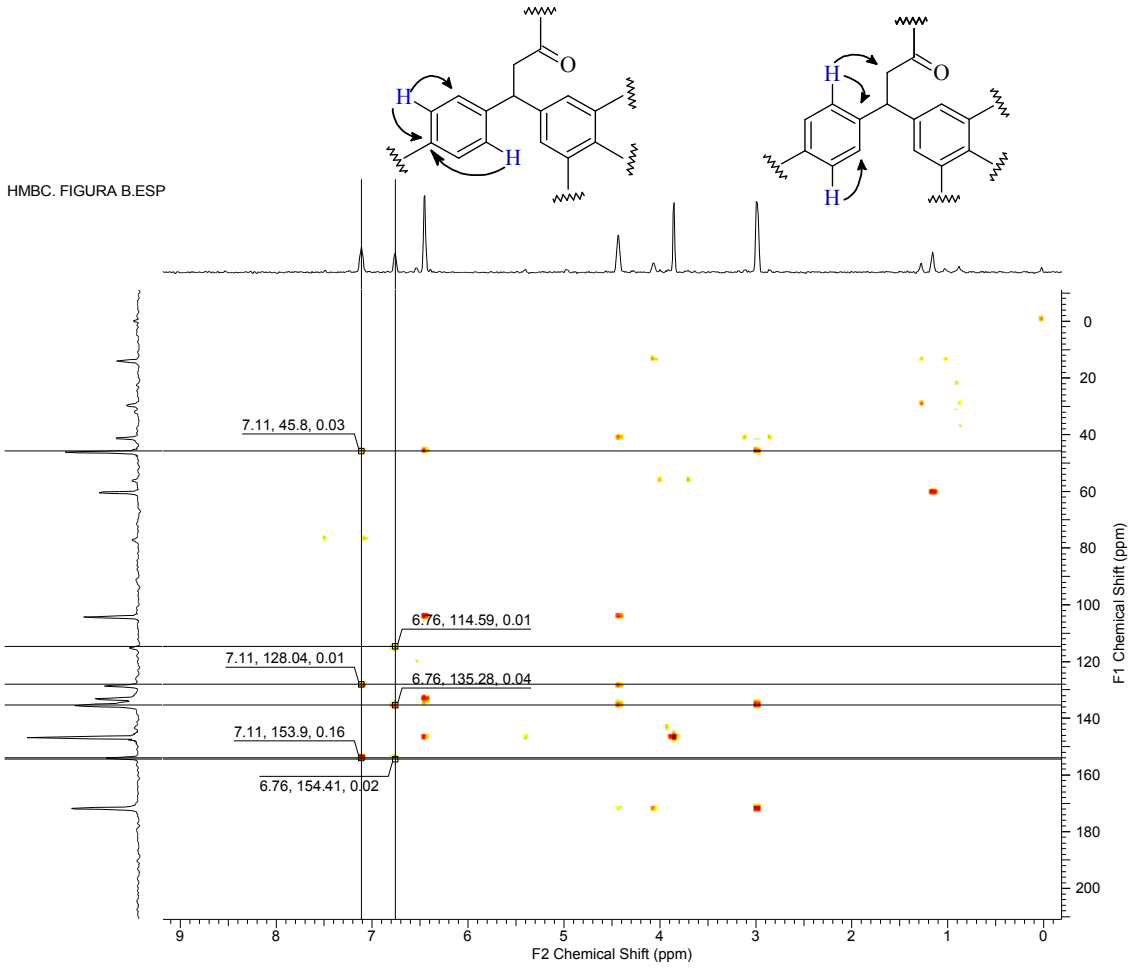


Figura 36: *Espectro de HMBC - Correlações entre os dubletos δ_H = 6,75 e δ_H = 7,10 com os sinais de carbono em δ_C = 136,3, δ_C = 114,6, δ_C = 134,3 e δ_C = 153,4 e em δ_C = 45,8, δ_C = 128,0 e δ_C = 153,9, respectivamente*

A figura 36 mostra dois dubletos do sistema AA'BB' δ_H = 6,75 e δ_H = 7,10 acoplam-se com os sinais de carbono em δ_C = 114,6, δ_C = 134,3 e δ_C = 153,4 e em δ_C = 45,8, δ_C = 128,0 e δ_C = 153,9, respectivamente.

Pode se verificar na figura 37 que os hidrogênios do singleto observado em δ_H = 6,44, acoplam-se com os carbonos aromáticos em δ_C = 133,7 e δ_C = 146,1 e também com os carbonos fora do anel em δ_C = 45,8 e δ_C = 104,2.

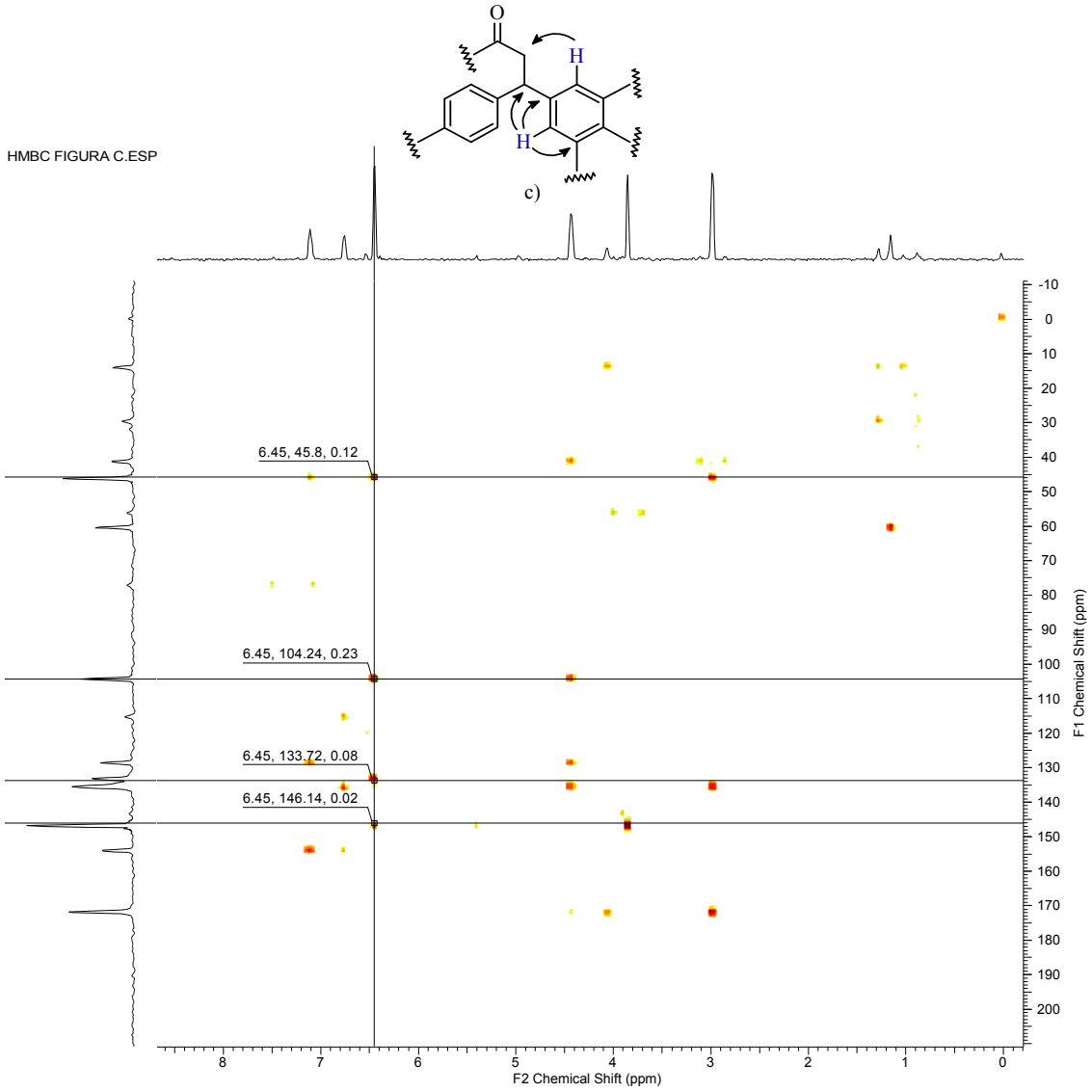


Figura 37: *Espectro de HMBC - Correlações entre o singleto δ_H = 6,44 com os sinais de carbono em δ_C = 133,7 e δ_C = 146,1(aromáticos) e em δ_C = 134,3 e δ_C = 153,4 e em δ_C = 45,8, δ_C = 104,2*

Os hidrogênios do tripleto observado em δ_H = 4,42, acoplam-se com os carbonos aromáticos em δ_C = 129,1, δ_C = 135,8 e também com os carbonos em δ_C = 41,2 e δ_C = 103,7 e com o carbono carbonílico em δ_C = 172,0 como observado na figura 38.

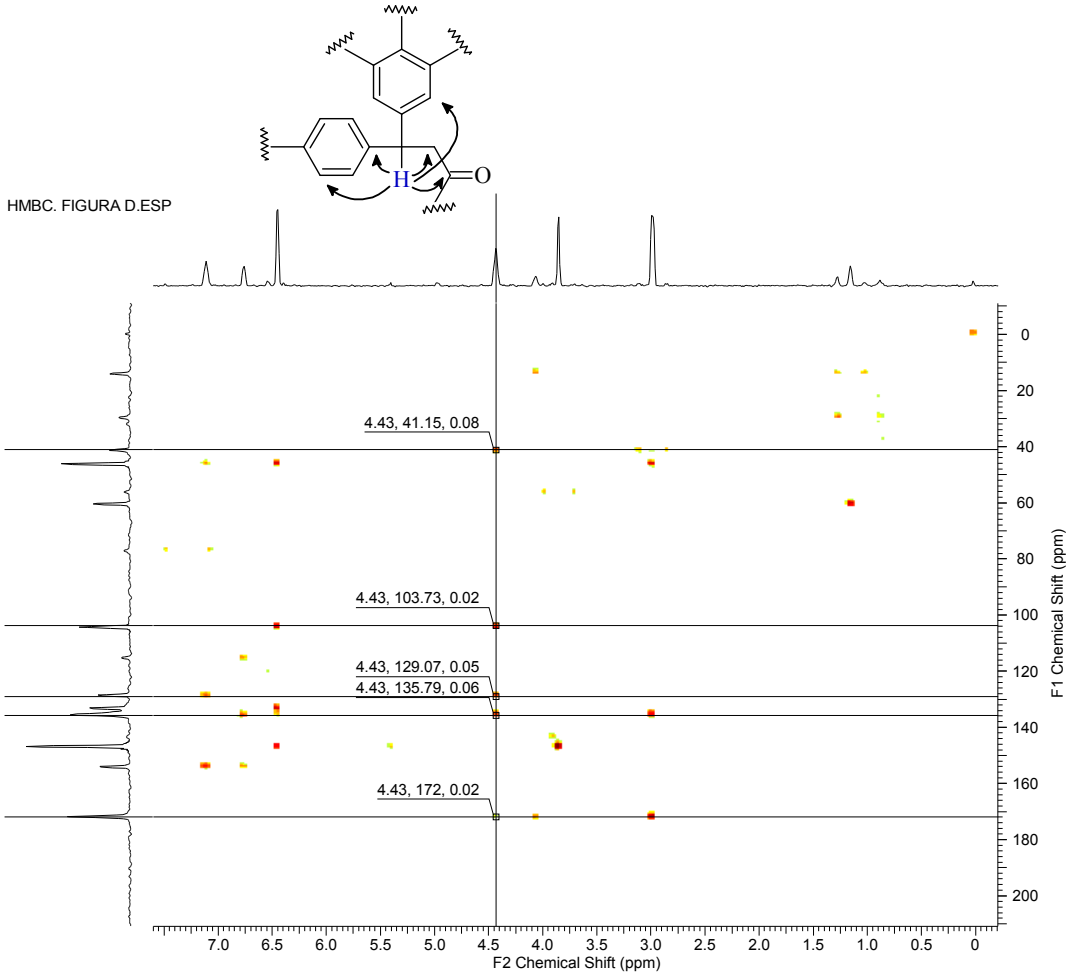


Figura 38: *Espectro de HMBC - Correlações entre o tripleto δ_H = 4,42 com os sinais de carbono em δ_C = 129,1 e δ_C = 135,8, δ_C = 41,2 e δ_C = 103,7 e com o carbono carbonílico em δ_C = 172,0.*

5.4 – Atividade Biológica das Diidrocumarinas

Todas as diidrocumarinas sintetizadas e que apresentaram confirmação estrutural mostraram alguma atividade biológica anticolinesterasica.

Para este trabalho, foi utilizado o método de Ellman (figura 39) para a determinação da atividade biológica anticolinesterásica. Este método consiste na determinação da taxa de produção da tiocolina após a hidrólise da acetiltiocolina na presença da enzima acetilcolinesterase (AcCE).

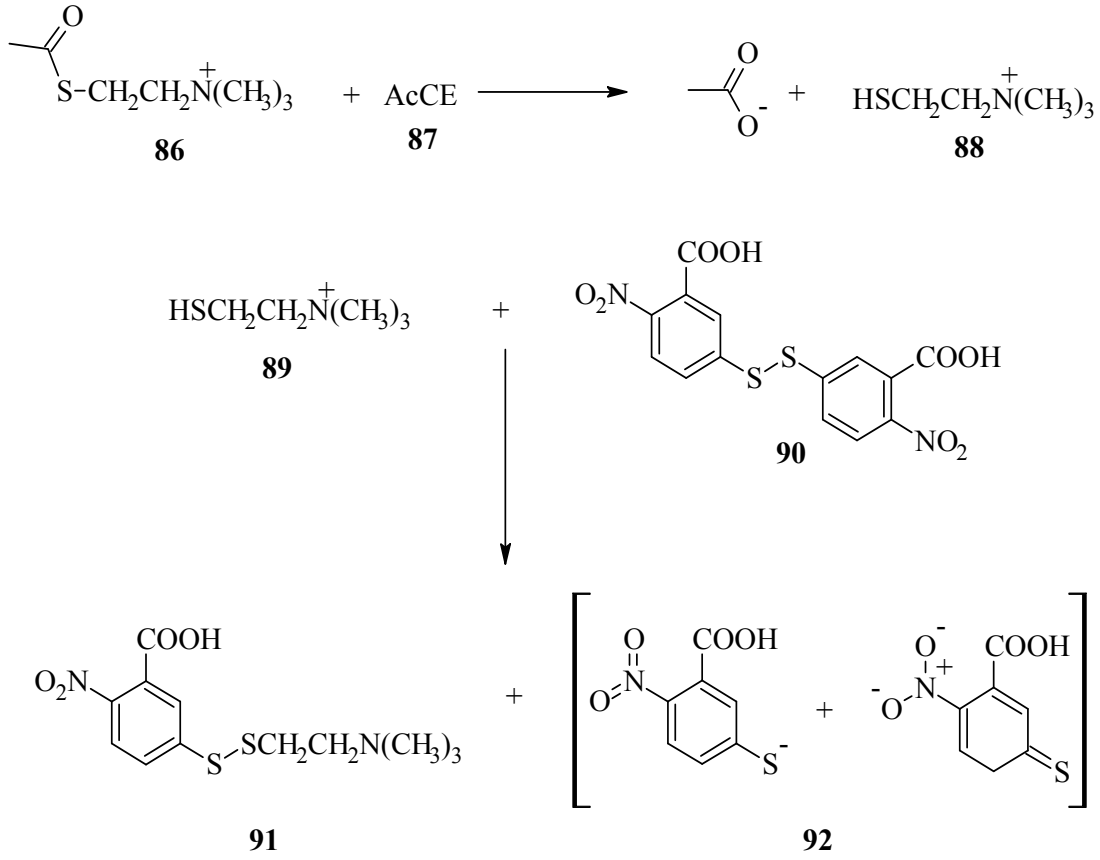
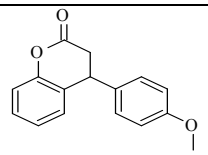
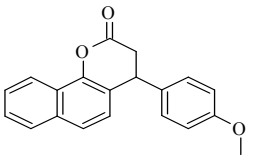
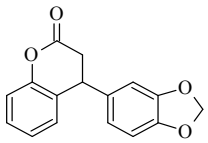
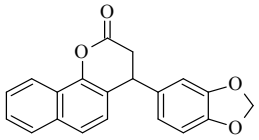
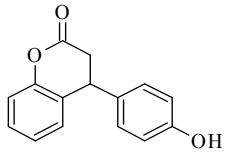
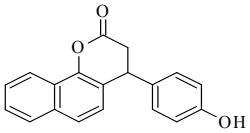
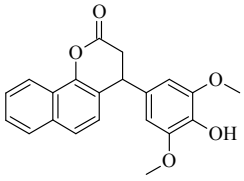
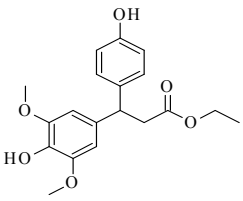


Figura 39: *Reação de Ellman*

Foram misturados o reagente de Ellman (DTNB) e acetiltiocolina nos poços do espectrofotômetro de microplacas e medida a absorbância como descrito no procedimento. Depois da adicão de AcCE observou-se a formação de uma coloração amarela na solução devido a catálise enzimática. Desse modo, é medida a continuação da reação da tiocolina com o reagente de Ellman, cujo produto é o ânion amarelo (**92**). Com a adição das amostras (tabela 31) antes da acetilcolinesterase, a absorbância é diminuída, indicando a inibição da enzima.

Tabela 31: *Relação dos compostos obtidos e analisados pelo método de Ellman*

Número	*Nome*	*Estrutura Molecular*
1	4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona	 **73**
2	4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona	 **74**
3	4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona	 **75**
4	4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona	 **76**
5	4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona	 **78**
6	4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona	 **79**
7	4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona	 **77**
8	3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-(4-hidroxifenil) propanoato de etila	 **85**

O método de Ellman se mostrou muito robusto, mas tem uma limitação importante; a exigência de alta solubilidade em água das amostras, uma vez que todas as soluções utilizadas são aquosas. As diidrocumarinas são pouco solúveis em água. Para superar esse problema as amostras foram solubilizadas numa solução de DMSO (Dimetilsulfóxido) a 10% e depois diluídas várias vezes com água até alcançar a concentração adequada para as análises. Apesar disso, obteve-se uma ótima reprodutibilidade nos resultados obtidos para todas as diidrocumarinas analisadas.

A partir do método descrito acima, foram feitos três medidas de cada diidrocumarina e analisadas as porcentagens de inibição em triplicata, de acordo com a equação 3 descrita no procedimento experimental (pág. 30). Consideraram-se apenas os valores que reproduziram nos três experimentos e descartados os valores discrepantes.

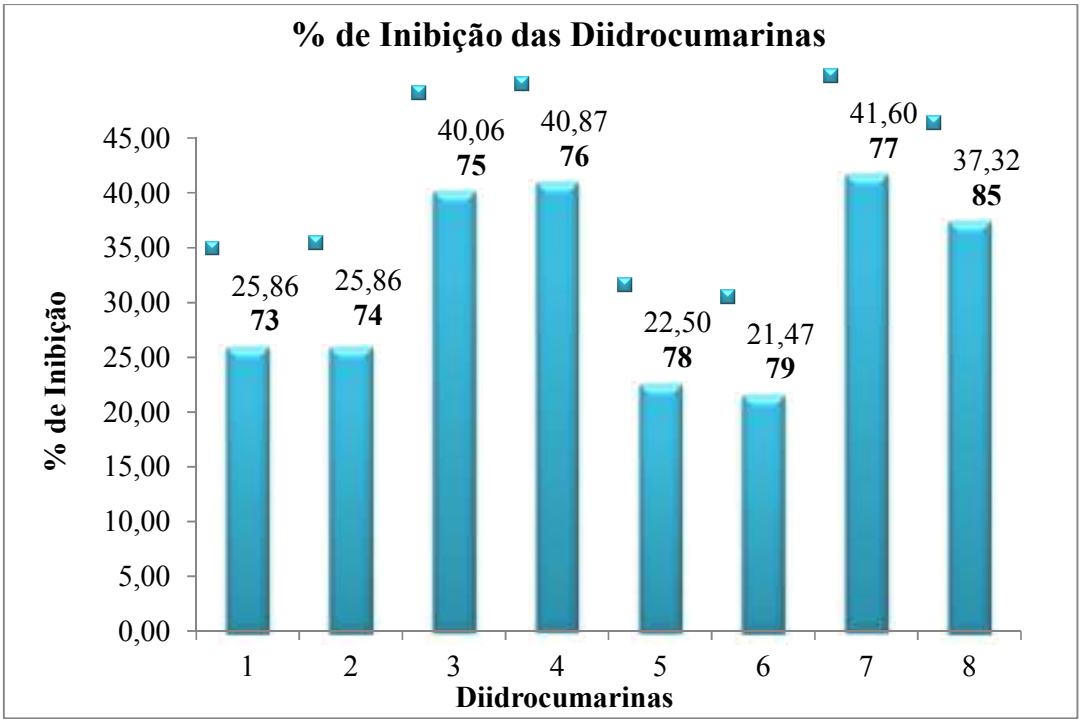


Figura 40: *Porcentagem de inibição apresentado pelas diidrocumarinas analisadas em ensaio de microplacas pelo método de Ellman*

O cálculo utilizado para determinar as porcentagens apresentadas na figura 40, avaliam o quociente entre a absorbância verificada para uma solução contendo a acetiltiocolina (72) + o reagente de Ellman (75) + AcCE (73) + a solução amostra e outra solução igual sem a adição da amostra. Através do valor obtido, é possível calcular a taxa de inibição, ou seja, a quantidade de acetilcolinesterase inibida quando adicionada as diidrocumarinas de acordo com a equação 3.

Os resultados verificados na figura 40, para os três experimentos, foram realizados utilizando-se a espectroscopia no UV-Vis com comprimento de onda de 412 nm. Estes valores de atividade biológica estão relacionados com as estruturas numeradas da tabela 31.

5.5 – Relação entre estrutura molecular e atividade biológica (SAR)

Como demonstrado na introdução, a acetilcolinesterase possui dois subsítios de interação, um esteárico e um aniônico. O subsítio aniônico interage com a porção trietilamônio (catiônico) da acetilcolina e o esteárico é responsável pela catálise e interage com a porção esteárica da acetilcolina. Interações secundárias observadas podem contribuir com a maximização das interações.[3,12]

O subsítio esteárico caracteriza-se pela afinidade a grupos hidrofílicos. O grupo serina, localizado no subsítio esteárico, contém uma hidroxila livre capaz de efetuar um ataque nucleofílico a carbonila da acetilcolina, levando-a a hidrólise. Por analogia, é possível aceitar que todos os compostos sintetizados reagem com a serina da mesma forma. Além disso, estes compostos podem interagir como doadores de elétrons nas ligações de hidrogênio do lactona com o "buraco oxiônico" de aminoácidos formado pela

Alamina e a Glicina. Portanto, quanto maior a quantidade de grupos hidrofílicos presentes maior será a quantidade de interações (figura 41).[10,12]

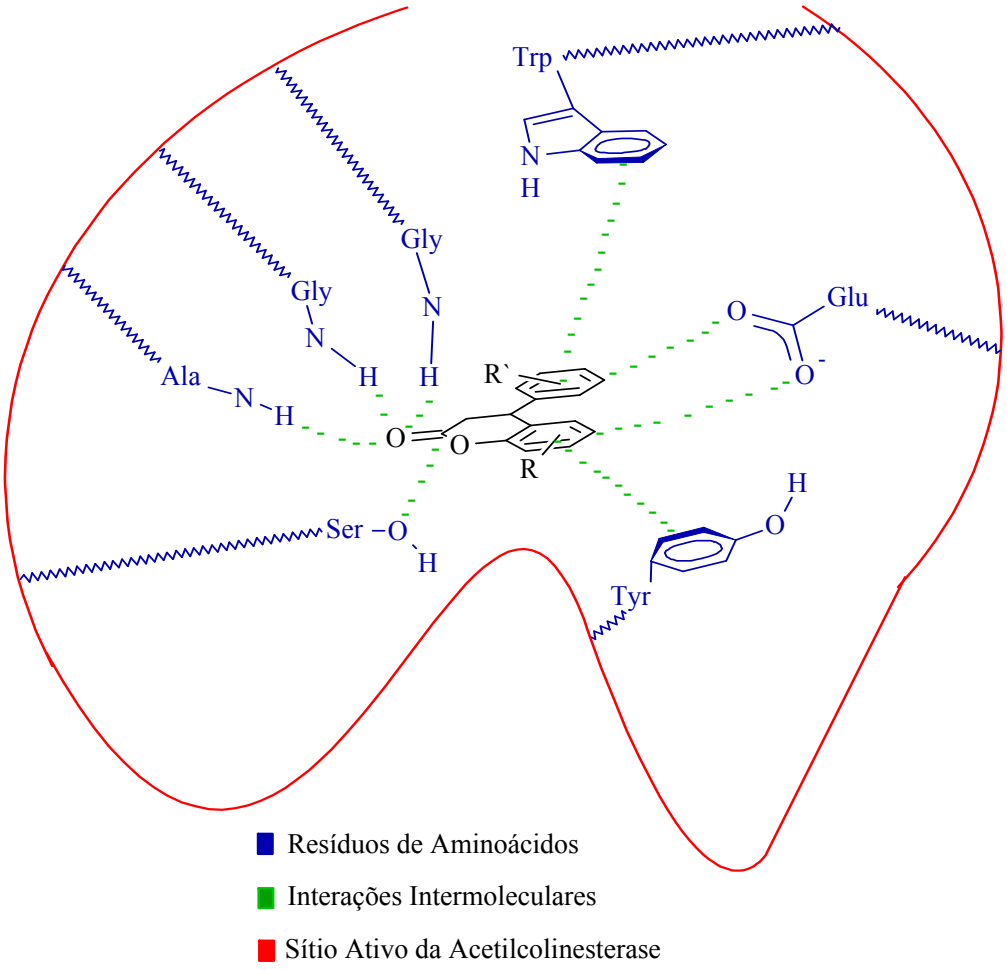


Figura 41: *Possíveis interações intermoleculares das diidrocumarinas com os sítios ativos da acetilcolinesterase.*

O resultado das análises de atividade biológica mostrou que a resposta anticolinesterásica proveniente de moléculas contendo um ou dois anéis na sua estrutura é praticamente a mesma. O aumento na quantidade de anéis aromáticos não causou acréscimo significativo na inibição da enzima.

O aumento da porcentagem de inibição na medida em que se aumenta a quantidade de grupos contendo aceptores de ligações de hidrogênio nas

diidrocumarinas, também é um fato. Esses grupos podem interagir com os aminoácidos do sítio periférico aniônico e os grupos que possuem anel aromático interagem com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico aniônico.[28]

É o que ocorre com os compostos da tabela 31, que se diferenciam apenas pelas quantidades diferentes dos grupos ligados ao anel aromático.

Os compostos **73** e **74** possuem apenas um grupo aceptor de ligações de hidrogênio (o grupo metoxi) na posição 4 e apresentam o valor de aproximadamente 25% de inibição. Os compostos **78** e **79**, também possuem um grupo aceptor de ligações de hidrogênio na mesma posição com um valor de inibição próximo (de 22%).

O acréscimo de um oxigênio ligado a posição 3 do anel aromático contribuiu de forma significativa com a porcentagem de inibição observado para os compostos **74** e **75** através do grupo dioximetil (OCH2O). Obteve-se o valor aproximado de 40% de inibição.

Entretanto a presença de três grupos aceptores de ligações de hidrogênio não apresentou aumento na porcentagem de inibição, mantendo valores próximos de 40% de inibição. Com esse resultado, é razoável pensar que as posições 3 e 4 são privilegiadas e contribuem para o aumento da porcentagem de inibição.

6 – Conclusões e Perspectivas

Os objetivos deste trabalho foram integralmente alcançados.

A síntese dos ésteres cinâmicos através de uma Ilida de fósforo mostrou-se um procedimento extremamente simples e altamente eficaz, resultando na formação do produto com rendimentos apreciáveis. Os espectros de infravermelho e de RMN confirmaram a formação dos produtos.

Através da Hidroarilação, ao contrário, não foi possível obter todos os produtos. No entanto, para todas as diidrocumarinas que se formaram, obteve-se resposta anticolinesterásica.

O método de Ellman, para a determinação da atividade biológica anticolinesterásica mostrou-se muito eficiente, pois é extremamente seletivo e muito simples de se realizar.

A obtenção do produto não cíclico (**85**) não esperado foi surpreendente e interessante, não só por formar um produto novo, como por apresentar atividade anticolinesterásica.

Pretende-se, em trabalhos futuros, sintetizar mais diidrocumarinas e derivados, procurando obter moléculas cada vez mais seletivas, eficazes e capazes de ter aplicabilidade terapêutica no futuro.

7 - Referências Bibliográficas

1. Gareth, T.; *Medicinal Chemistry: An Introduction*. 1ª Ed.; John Wileu & Sons, V. 1 p. 539, 2000.

2. Barreto, R. L.; *Design e Síntese de Novos Análogos Estruturais da Acetilcolina Conformacionalmente Restringidos*. Campinas, SP; 2003. [Dissertação].

3. Gohlke H.; Klebe, G.; *Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors*. Angew. Chem. Int. No. 41, p. 2644 – 2676, 2002.

4. Wang, S. L.; Wu, F. Y.; Cheng, C.; Zhang, g.; Liu, Y. P., Jiang, B., Shi, F.; Tu, S. J.; *Multicomponent Synthesis of Poly-Substituted Benzo[a]pyrano-[2,3-c]phenazine Derivatives under Microwave Heating*. ACS Comb. Sci., No. 13, p. 135–139, 2011.

5. Dömling, A,; *Recent Developments in Isocyanide Based Multicomponent Reactions in Applied Chemistry*. Chem. Rev., No. 106, p. 17−89; 2006.

6. Shaabani A.; Sarvary, A.; Soleimani, E.; Rezayan, A. H.; Heidary, M**.;** *A novel method for the synthesis of substituted 3,4-dihydrocoumarin derivatives via isocyanide-based three-component reaction*; Mol Divers 12:197–202; 2008.

7. Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Miranda, A. L. P.; Rodrigues C. R.; *A Química Medicinal de N-Acilidrazonas: Novos Compostos-Protótipos de Fármacos nalgésicos, Antiinflamatórios e Anti-Trombóticos*. Quim. Nova*,* Vol. 25, No. 1, p. 129-148, 2002.

8. Velikorodov, A. V.; Imasheva, N. M.; *Synthesis of Carbamate Derivatives of Coumarin and Chromene*. Russian Journal of Organic Chemistry Vol. 44 No. 9; 2008.

9. Raffa, R. B.; *Thermodynamics of the Drug-Receptor Interation;* Life Sciences, Vol. 65, No. 10, p. 967-980; 1999.

10. Castro, B. M.; *Funções Motoras em Camundongos Deficientes do Transportador Vesicular de Acetilcolina*. Belo Horizonte - MG, 2006. [Dissertação].

11. Lleó, A.; Greenberg, S. M.; Growdon, J. H.; *Current Pharmacotherapy for Alzheimer's Disease,* Annu. Rev. Med. No.57, p. 513–33; 2006.

12. Silva, I. F. O; *Aspectos do envelhecimento cerebral e função cognitiva em modelo experimental animal e estudo de mecanismos de neurodegeneração em cultura celular*; Belo Horizonte-MG, UFMG, 2007 [Dissertação].

13. Terry Jr., A. V., Buccafusco, J. J.; *The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development*; The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics, Vol. 306, No. 3, 2003.

14. Prakash, G. K. S.; Paknia, F.; Vaghoo, H.; Rasul, G.; Mathew, T.; Olah, G. A.; *Preparation of Trifluoromethylated Dihydrocoumarins, Indanones, and Arylpropanoic Acids by Tandem Superacidic Activation of 2-(Trifluoromethyl)acrylic Acid with Arenes*. J. Org. Chem., 75, 2219–2226; 2010.

15. Kumar, A. et al.; *Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylcoumarins. Part 11: Comparison of the specificities of acetoxy derivatives of 4-methylcoumarin and 4-phenylcoumarin to acetoxycoumarins: protein transacetilase.* Bioorg. Med. Chem. No. 13, p. 4300–4305, 2005.

16. Santos, C. E. R.; *Síntese, Caracterização e Atividade Anti-Leishmania de Derivados das Classes 4-Aril-3,4-Diidrocumarinas, Pirrazolo[3,4-b]Piridin-6-Onas e N,N'-Difenil-Benzamidinas*; Seropédica-RJ; 2008. [Dissertação].

17. Santos, C. E., R.; Echevarria, A.; An *efficient and fast synthesis of 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins by (CF3SO3)3Y catalysis under microwave irradiation*. Tetrahedron Letters, nº 48, p. 4505–4508, 2007.

18. Talapatra, D.; Deb, T.; Talapatra, S.; *Condensation of phenol & cinnamic acid in presence of polyphosphoric acid: A novel biogenetic-type oxidative self-cyclisation*. Indian journal of chemistry, V. 25B, p. 1122-1125; 1986.

19. Young, S. W.; Pastine, S. J.; Sames, D.; *Ru(III)-Catalyzed Cyclization of Arene-Alkene Substrates via Intramolecular Electrophilic Hydroarylation*. Organic Letters, V. 6, nº 4, p. 581-584, 2004.

20. Jia, C.; Piao, D.; Kitamura, T.; Fujiwara, T.; *New Method for Preparation of Coumarin and Quinolinones via Pd-Catalyzed Intramolecular Hydroarilation of C-C Triple bonds*; J. Org. Chem., Vol. 65, No. 22; 2000.

21. Li, K.; Foresee, L. N.; Tunge, J. A.; *Trifluoroacetic Acid-Mediated Hydroarylation: Synthesis of Dihydrocoumarins and Dihydroquinolones*, J. Org. Chem., *70*, 2881-2883; 2005.

22. Fillion, E.; et al. *Yb(OTf)3-Catalyzed Reactions of 5-Alkylidene Meldrum's Acids with Phenols: One-Pot Assembly of 3,4-Dihydrocoumarins, 4-Chromanones, Coumarins, and Chromones*; J. Org. Chem., *71*, 409-412; 2006.

23. Kolodiazhnyi, O. I.; *Phosphorus ylides: chemistry and application in organic synthesis*; WILEY-VCH; Kiev, 1999.

24. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. "*Organic Chemistry*", Oxford University Press, 1st Ed., 2001.

25. Armarego, W.L.F.; Perrin, D. D.; *Purification of laboratory Chemicals*; Butterworth Heinemann, 4th edition; 2000.

26. Carey, F. A., Sundberg, R. J.; Advanced Organic chemistry; 4ª Ed.; Kluwer academy/ Plenum publisher New York-2000; pág. 215-220.

27. H. Dvir, Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T., Sussman, J.L.; Acetylcholinesterase: From 3D structure to function, Chem. Biol. Interact; 2010.

28. Almeida, J. R.*Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer*; Ribeirão Preto; 2011. [Dissertação].

29. Kua, J.; Zhang, Y.; McCammon, J. A.; *Studying Enzyme Binding Specificity in Acetylcholinesterase Using a Combined Molecular Dynamics and Multiple Docking Approach*; J. Am. Chem. Soc., 124, 8260-8267; 2002.

30. Oxgaard, J.; Periana, R. A.; Goddard, W. A.; *Mechanistic Analysis of Hydroarylation Catalysts*, J. Am. Chem. Soc., 126, 11658-11665; 2004.

31. Jagdale, A. R.; Sudalai, A.; *p-Toluenesulfonic acid mediated hydroarylation of cinnamic acids with anisoles and phenols under metal and solvent-free conditions*, Tetrahedron Letters, No. 48 4895–4898; 2005.

32. Aoki et al, S.; *A convenient synthesis of dihydrocoumarins from phenols and cinnamic acid derivatives*, Tetrahedron No. 61, 9291–9297, 2005.

33. Barreiro, E. J.; Ferreira, V. F.; Costa, P. R. R.; *Substâncias Enantiomericamente Puras (SEP): A Questão dos Fármacos Quirais*; Quím. Nova, 20(6); 1997.

34. Bezerra, M. Z. B.; Machado, M. I. L.; Morais, S. M,; Filho, R. B.; *Synthesis of Neoflavonoids: 4-(4-methoxyphenil)-3,4-Diidrocoumarin*. J. Braz. Chem Soc., vol. 8, No. 3, 229-234, 1997.

35. Duan, S.; Jana, R.; Tunge, J. A.; *Lewis Acid-Catalyzed Diastereoselective Hydroarylation of Benzylidene Malonic Esters*, J. Org. Chem., *74*, 4612–4614; 2009.

36. Imasheva, N. M.; Velikorodov, A. V.; Krivosheev, O. O.; *Synthesis of Dihydrocoumarin Carbamate Derivatives*; Russian Journal of Organic Chemistry Vol. 44 No. 11; 2008.

37. Kalaiselvan, A.; Venuvanalingam, P.; *Oxaphosphetane versus betaine formation in epoxide ring opening by PPh3: a mechanistic probe by ab initio and DFT modeling;* Tetrahedron Letters No. 46, 4087–4090; 2005.

38. Lee, J. H. et al.; *Acetylcholinesterase Inhibitors from the Twigs of Vaccinium oldhami Miquel*; Arch Pharm Res Vol 27, No 1, 53-56; 2004.

39. Li, K.; Tunge, J. A.; *Chemical Libraries via Sequential C-H Functionalization of Phenols*; J. Comb. Chem., 10*,* 170–174, 2005.

40. Mahajan, J. R.; Araújo. J. C.; *Attempted novel preparation of dihydrocoumarin and coumarin; obtention of aryl acrylates and 3-chloropropionates*; J. Chem. No. 65**,** 224; 1987.

41. Malany, S. et al.; *Transition State Structure and Rate Determination for the Acylation Stage of Acetylcholinesterase Catalyzed Hydrolysis of (Acetylthio)choline*; J. Am. Chem. Soc.**,** No. *122,* 2981-2987; 2000.

42. Oyamada, J.; Kitamura, J.; *Synthesis of coumarins by Pt-catalyzed hydroarylation of propiolic acids with phenols*; Tetrahedron No. 62, 6918–6925; 2006.

43. Piao, C.; Zhao, Y.; Han, X.; Liu, Q.; *AlCl3-Mediated Direct Carbon-Carbon Bond-Forming Reaction of r-Hydroxyketene-S,S-acetals with Arenes and Synthesis of 3,4-Disubstituted Dihydrocoumarin Derivatives*; J. Org. Chem. No. *73*, 2264-2269; 2008.

44. Quinn, D. M.; *Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States;* Chem.Rev.. 955-979; 1987.

45. Rhee, I. K. et al.; *Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining*; *J. Chromatogr*. *A, No* 915, 217 –223; 2001.

46. Saha, N. N.; Desai, V. N.; Dhavale, D. D.; A *Synthesis of New Coumarin C-Glycosyl Derivatives*; J. Org. Chem*.,* Vol. 64, No. 5, 1999.

47. Silman, I.; Sussman, J. L.; *Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology,* Current Opinion in Pharmacology, No.5:293–302; 2005.

48. Still, C. W., Kahn, M.; *Miltra, A.; Rapidchromatographic technic for preparative separations with moderate resolution*. J. Org. Chem. No. 43, 2923-2925; 1978.

49. Velikorodov, A. V.; Imasheva, N. M.; *Synthesis of Carbamate Derivatives of 2,3-Dihydro-4H-1,4-benzoxazine*; Russian Journal of Organic Chemistry Vol. 44 No. 3 2008.

50. Verli, H.; Barreiro, E. J.; *Um paradigma da Química Medicinal: A Flexibilidade dos Ligantes e Receptores*; Quim. Nova*,* Vol. 28, No. 1, 95-102, 2005.

51. Zhao, Y.; Ku, Y.; Haoa, X. J.; Le, S.; *Preparation of Analogues of Territrem B, a Potent AChE Inhibitor*; Tetrahedron, No. 56, 8901-8913; 2000.

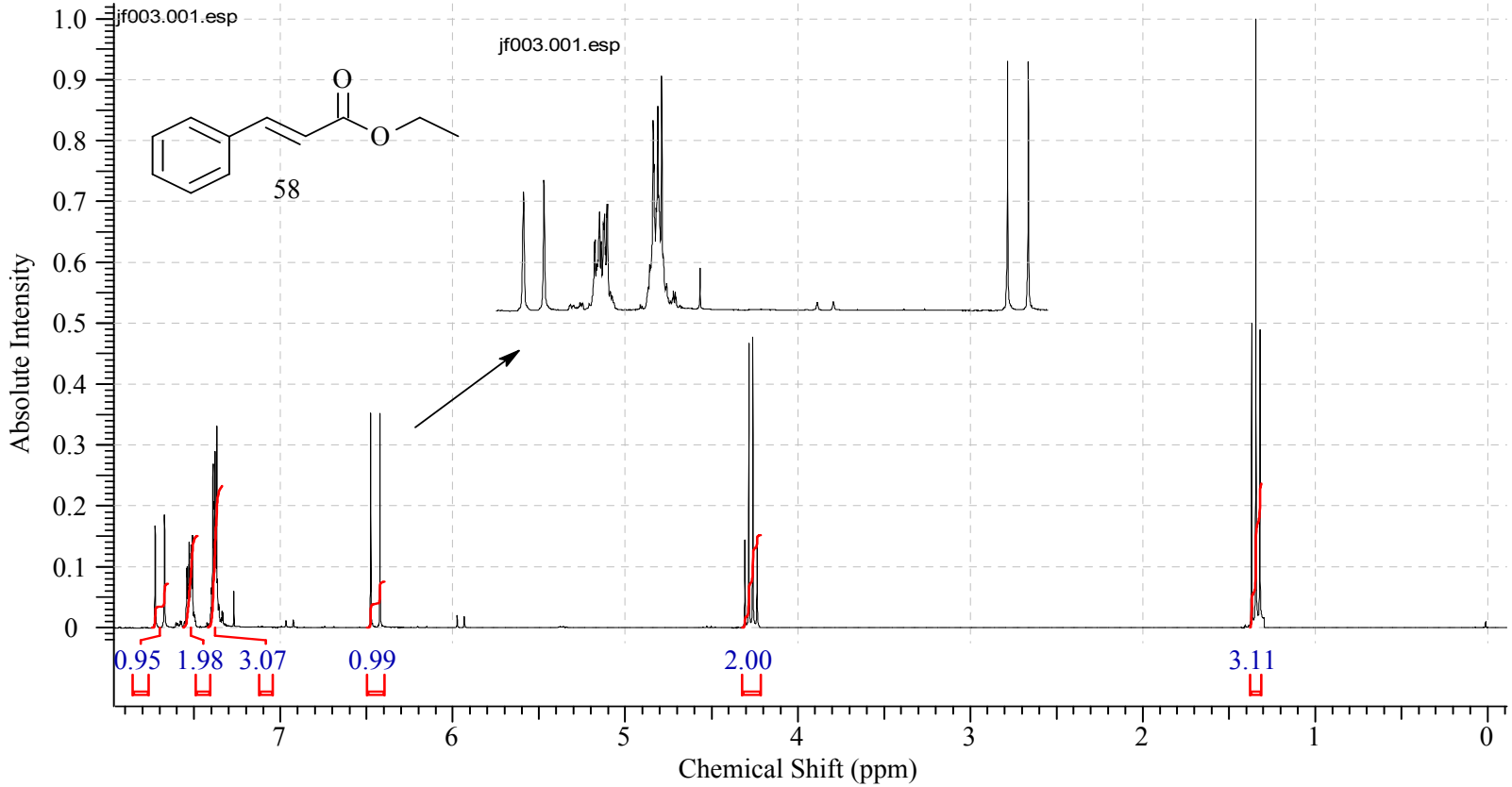
52. Zeitler, Z,; Rose, C. A.; *An Efficient Carbene-Catalyzed Access to 3,4-Dihydrocoumarins*, J. Org. Chem. No. *74*, 1759–1762; 2009.

53. Seidl, C.; *Pesquisa de Substâncias Naturais Inibidoras da Acetilcolinesterase* Curitiba-Pr; 2010. [Dissertação].

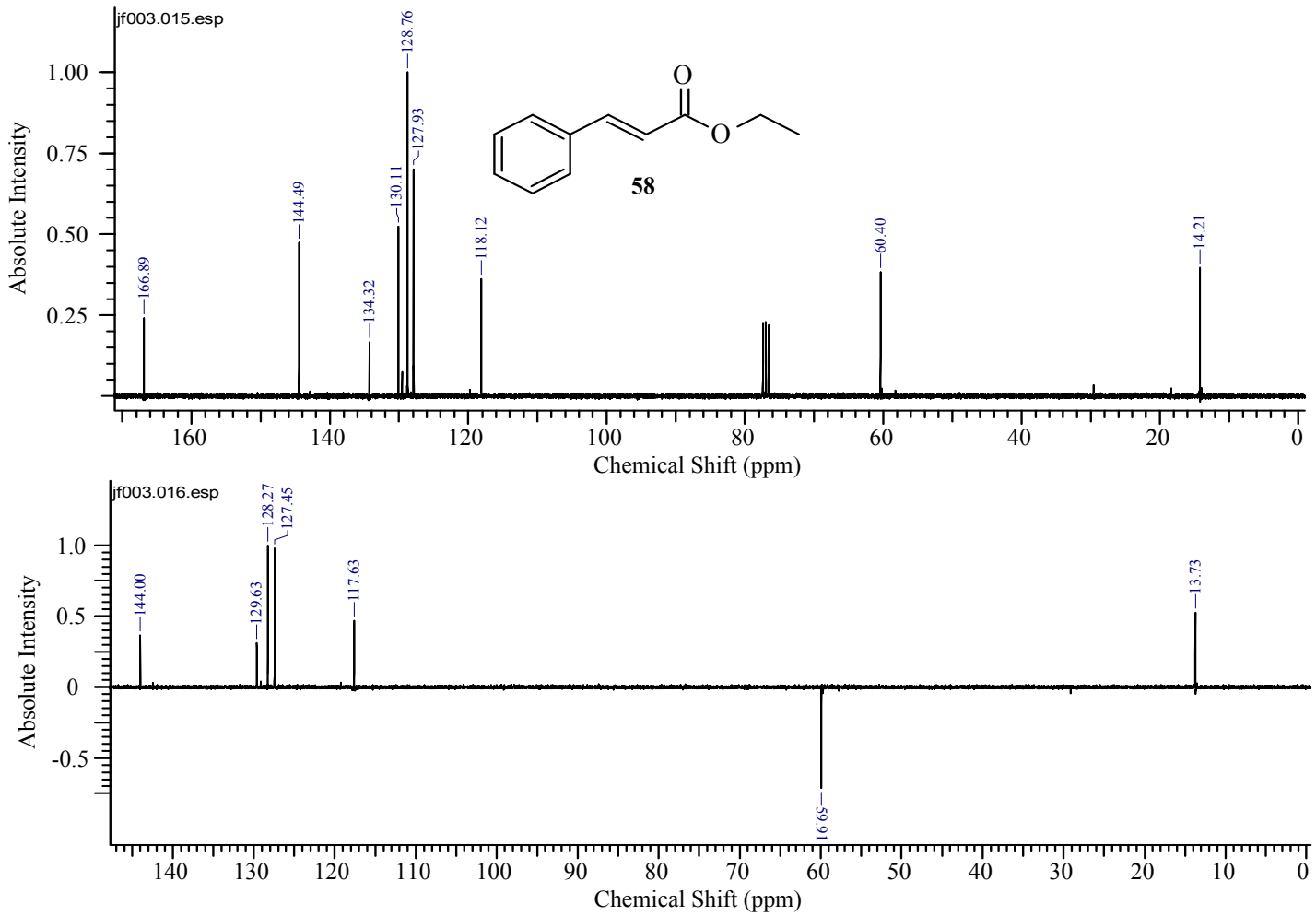
8 – Anexos

8.1 – Anexo I

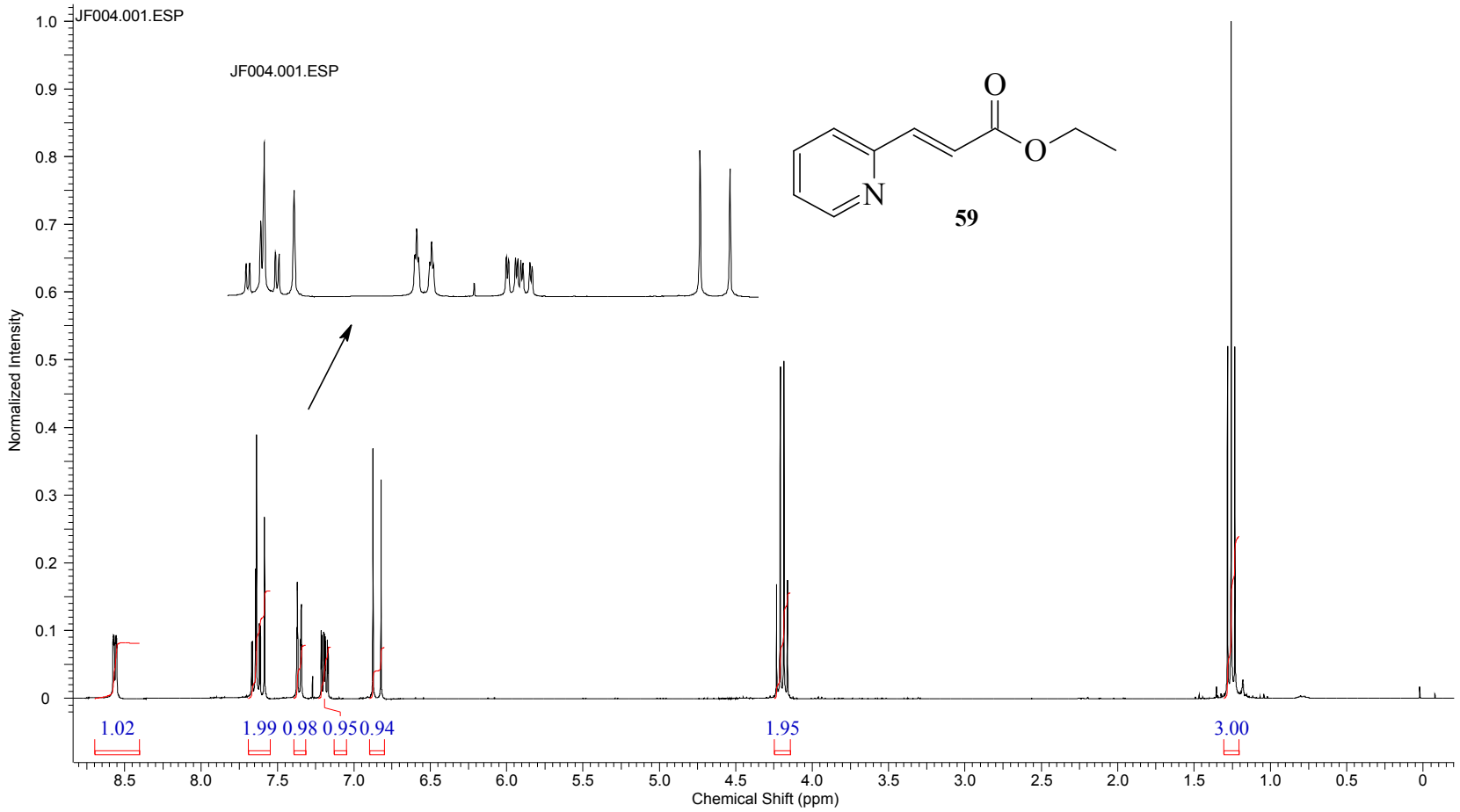
8.1.1 - Espectros de RMN- ^{1}H do 3-(Fenil)-2-propenoato de etila



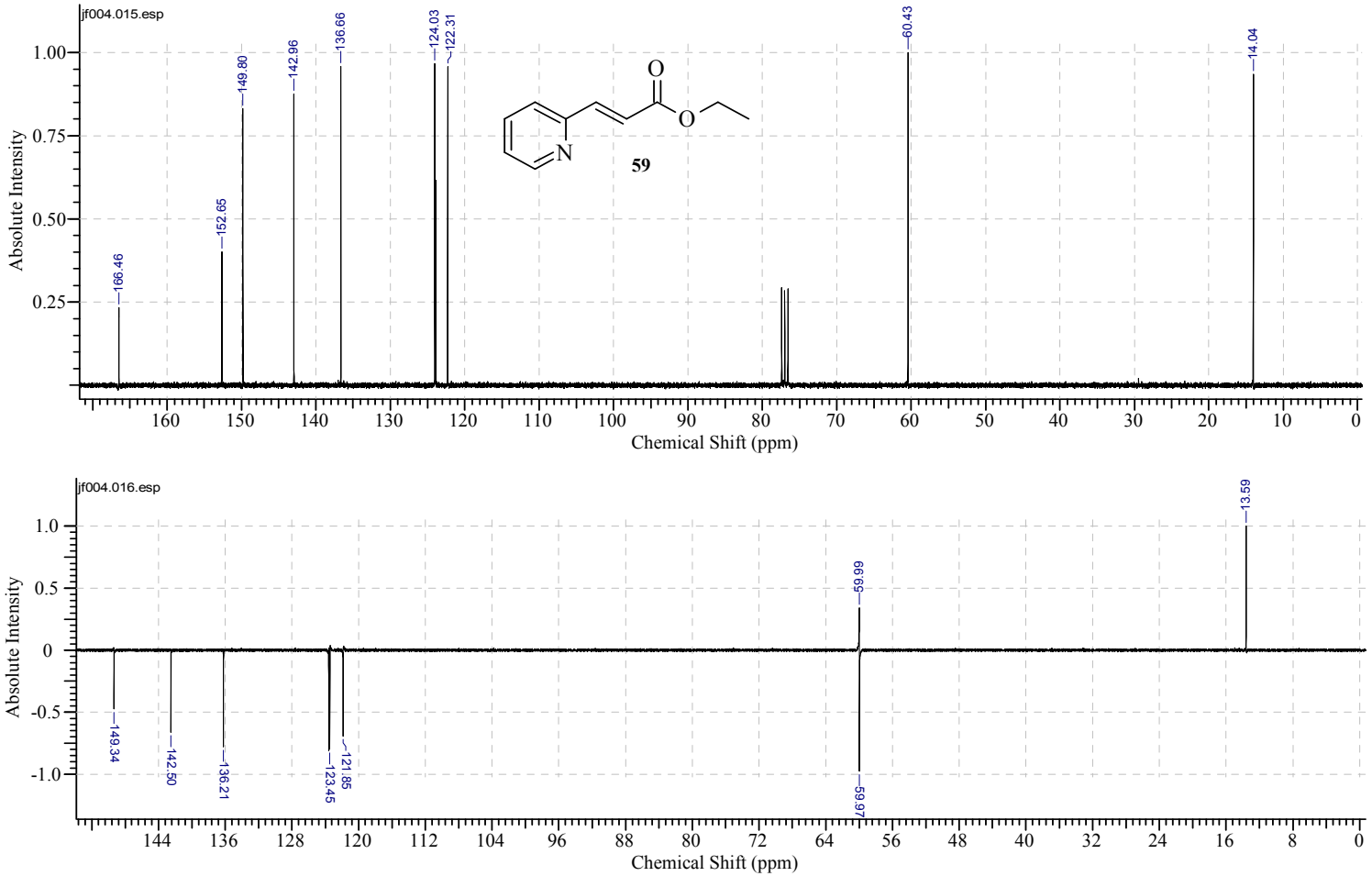
8.1.2 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(Fenil)-2-propenoato de etila



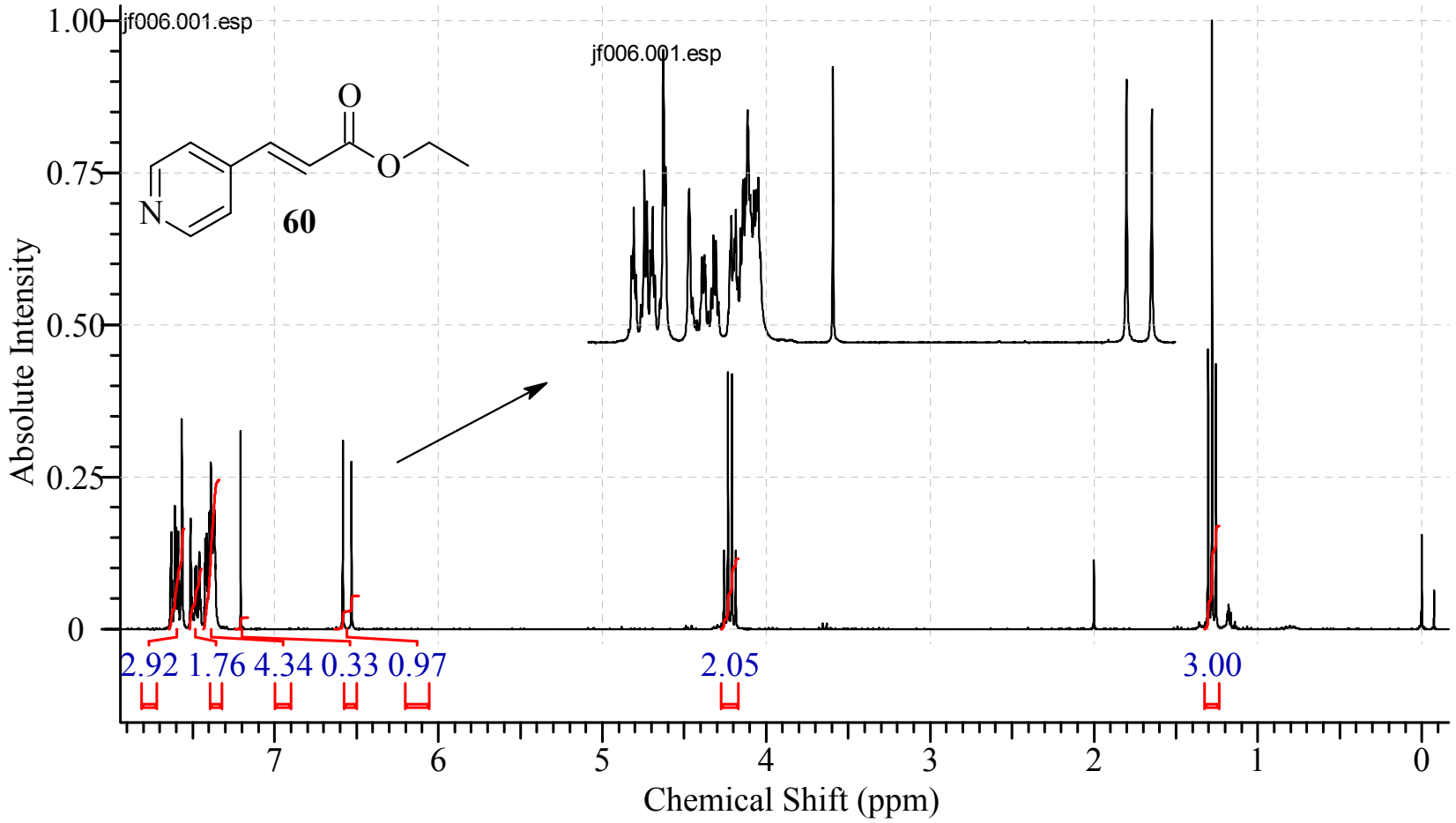
8.1.3 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(2-piridin)-2-propenoato de etila



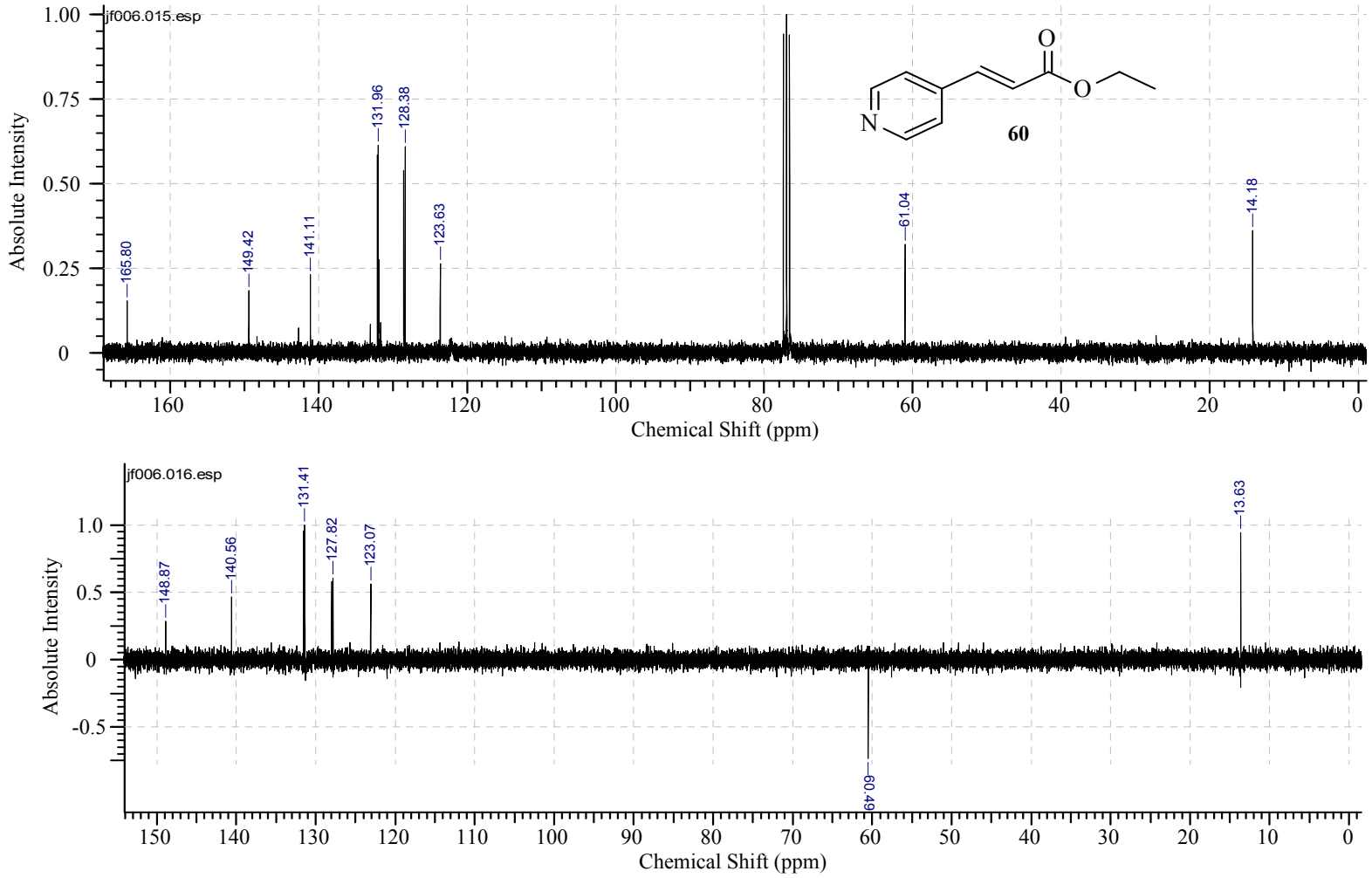
8.1.4 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(2-piridin)-2-propenoato de etila



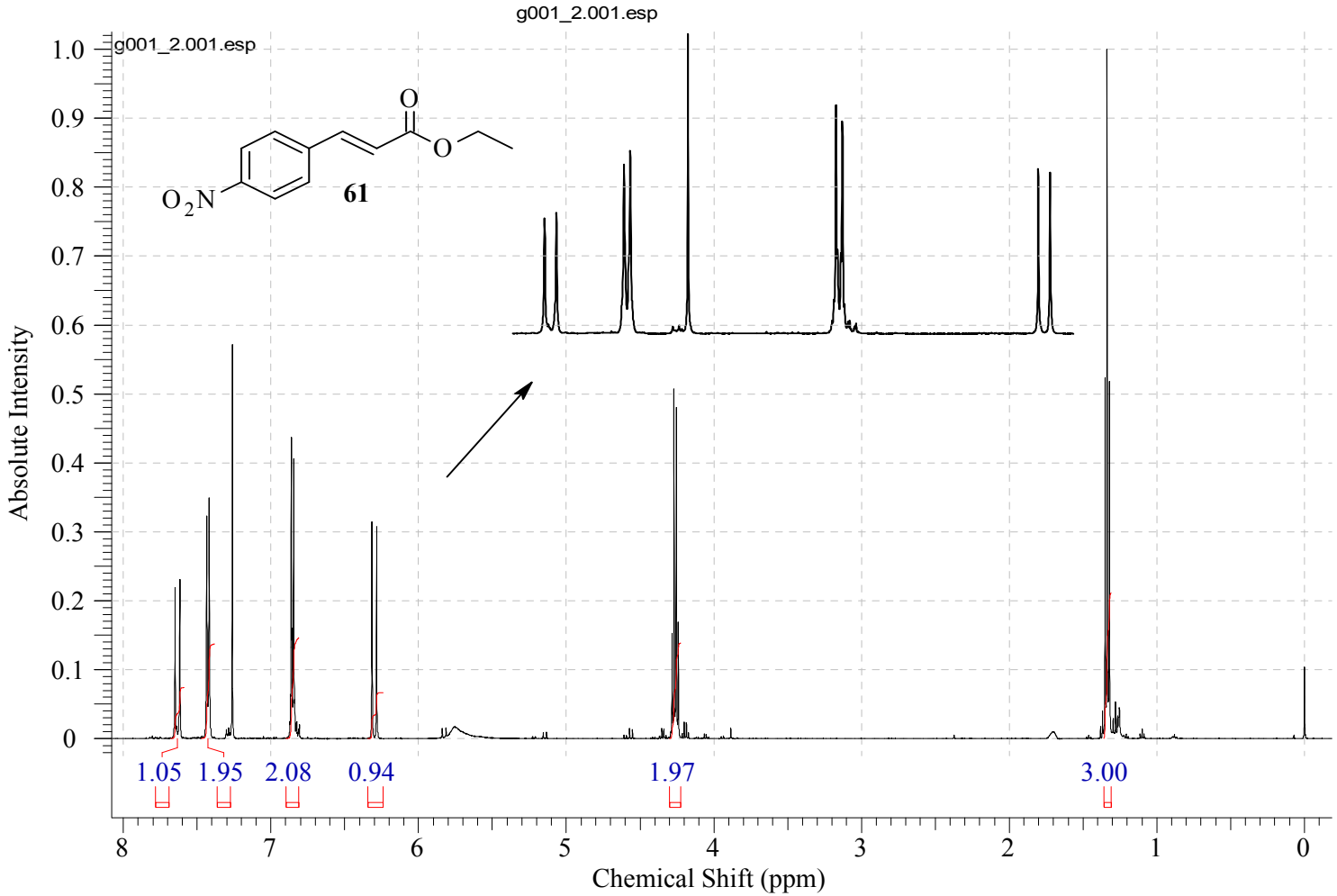
8.1.5 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-piridin)-2-propenoato de etila



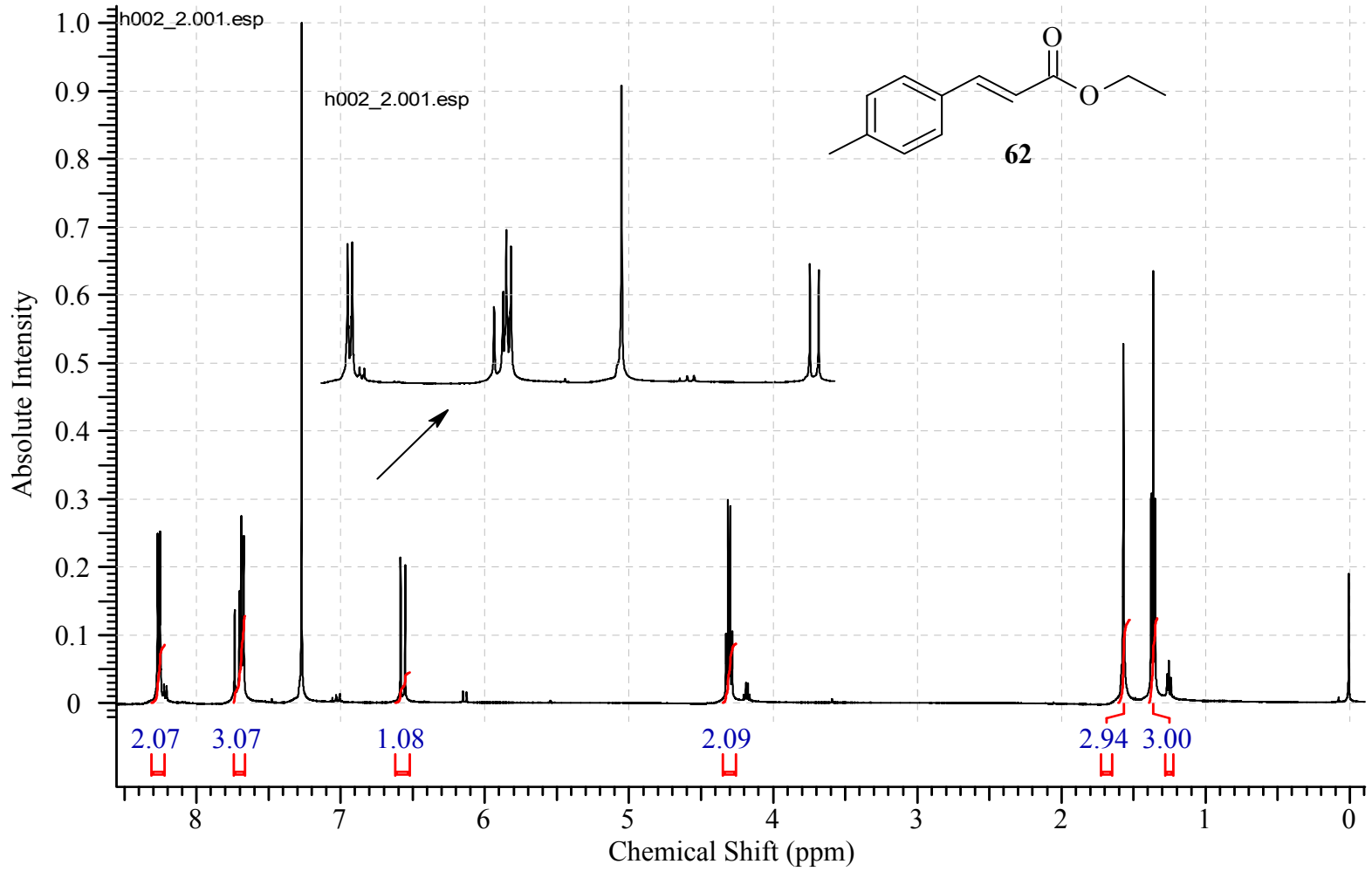
8.1.6 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(4-piridin)-2-propenoato de etila



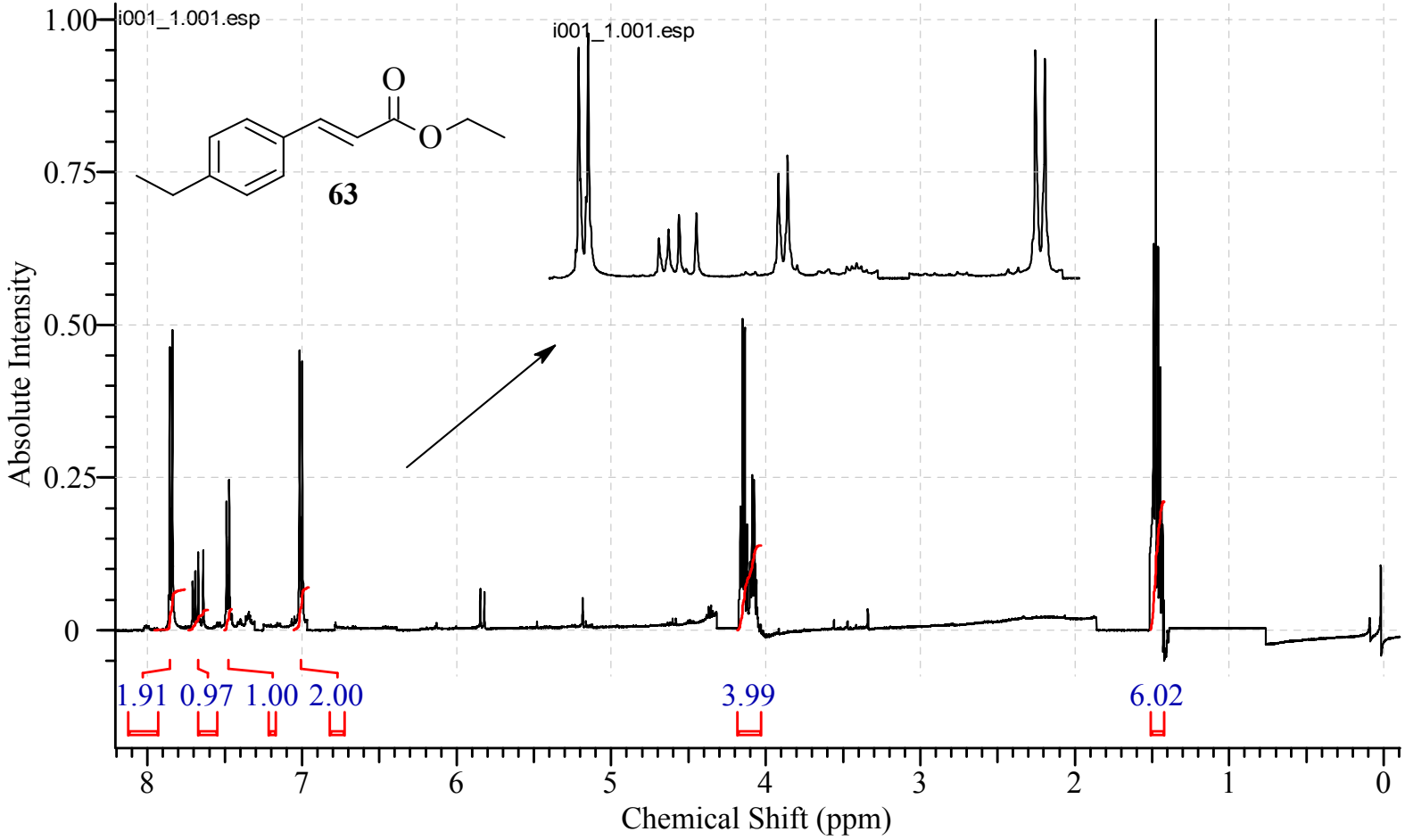
8.1.7 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-Nitrofenil)-2-propenoato de etila



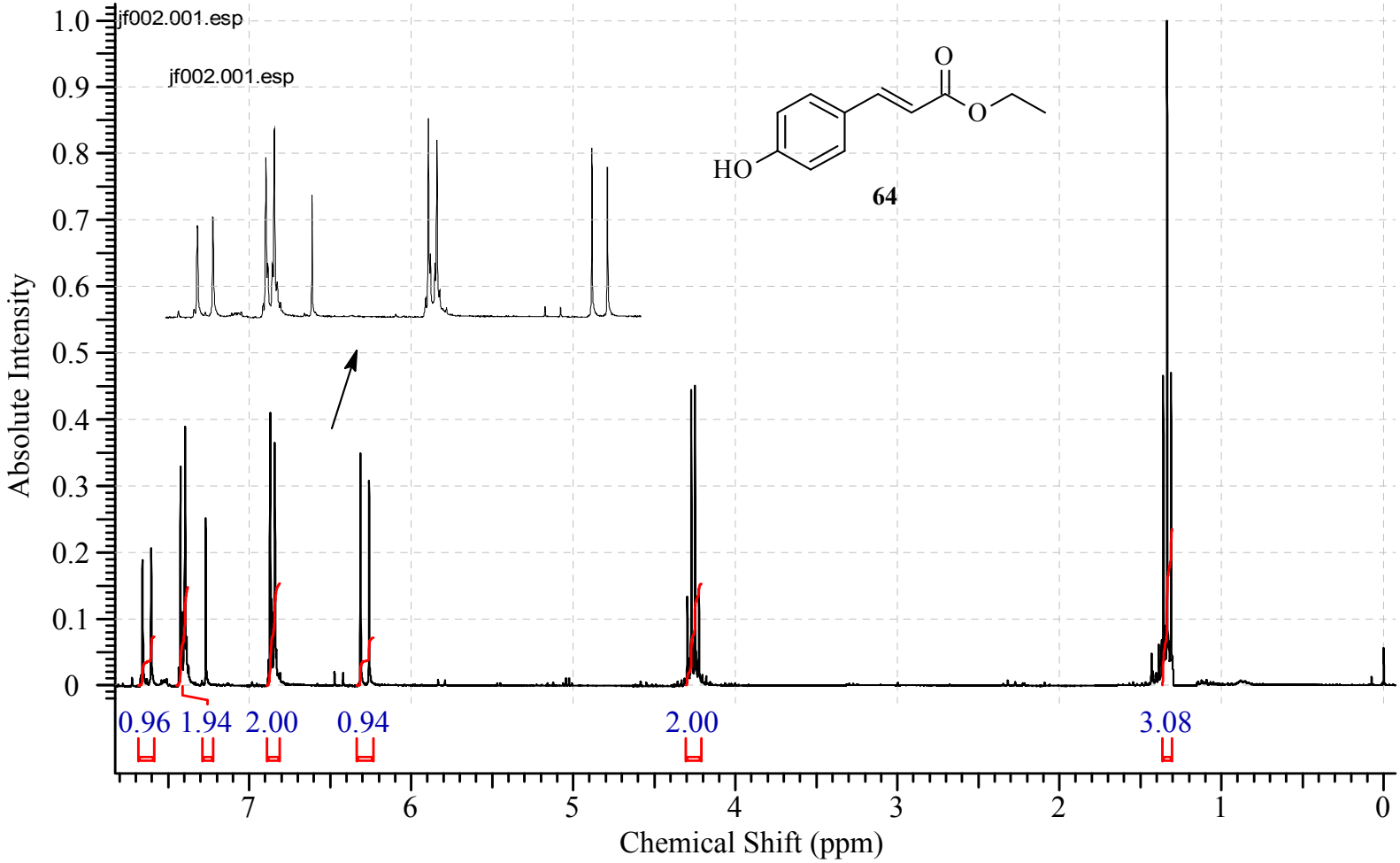
8.1.8 - Espectro de RMN- ^{1}H do 3-(4-metilenofenil)-2-propenoato de etila



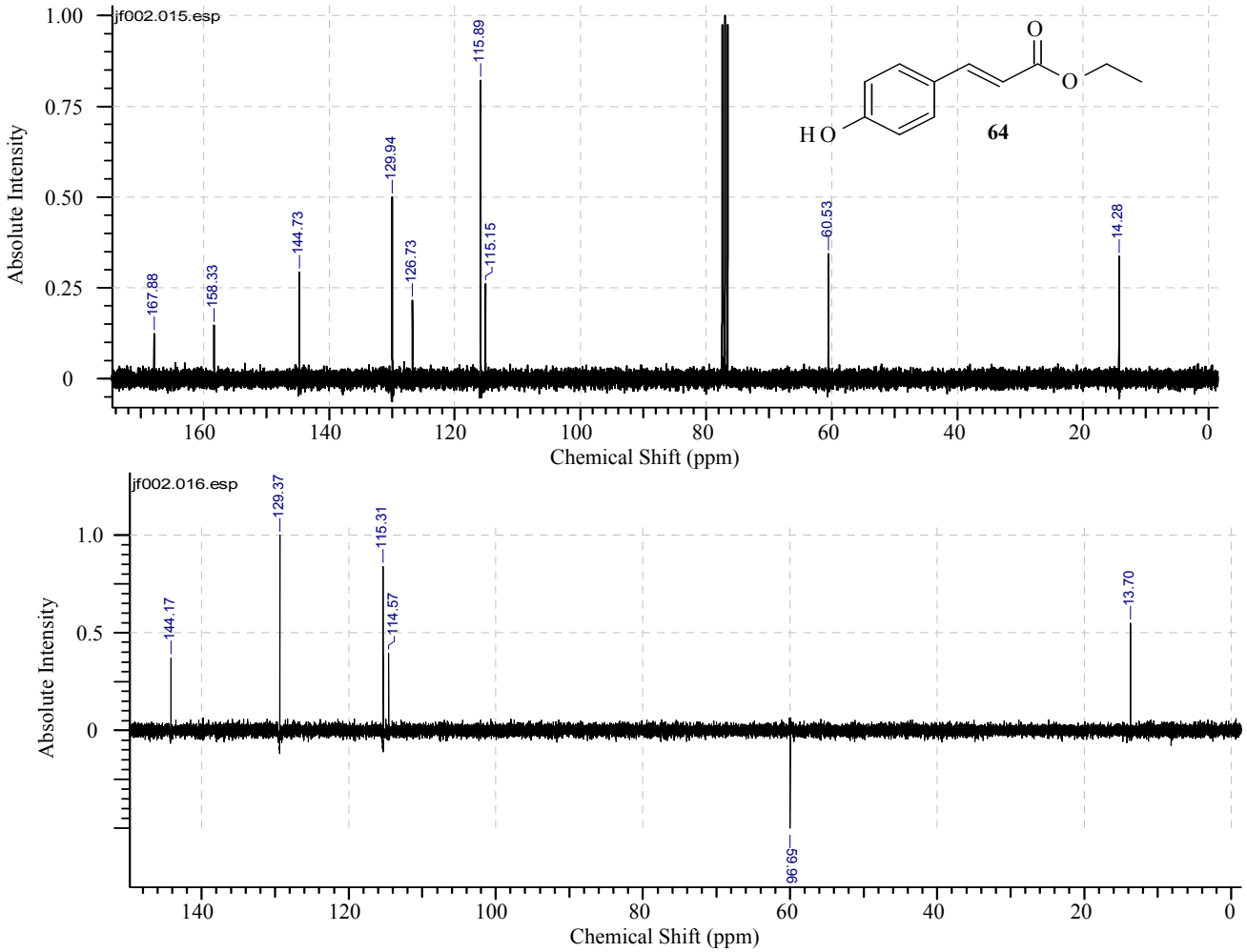
8.1.9 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-etilenofenil)-2-propenoato de etila



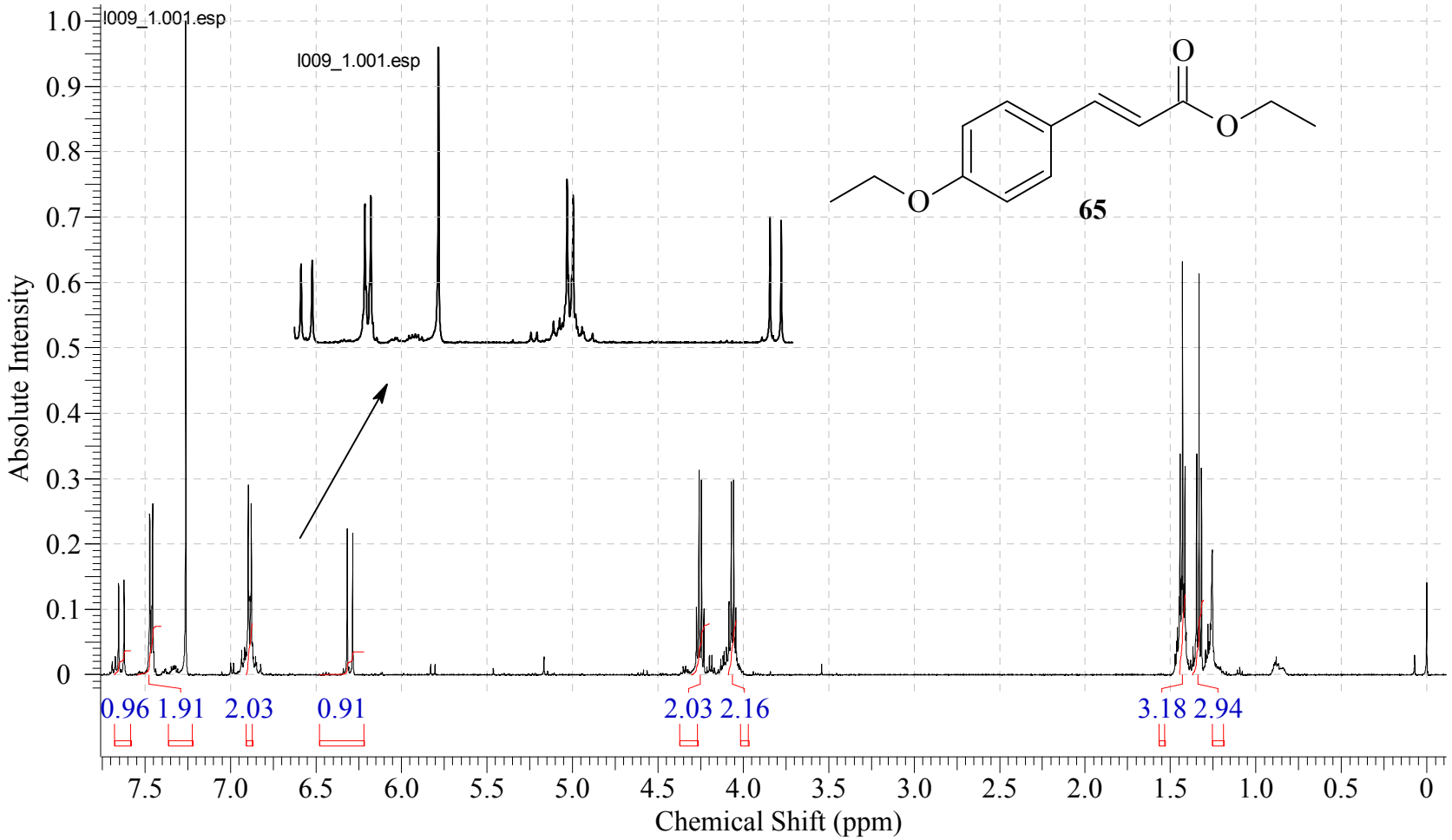
8.1.10 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-Hidroxifenil)-2-propenoato de etila



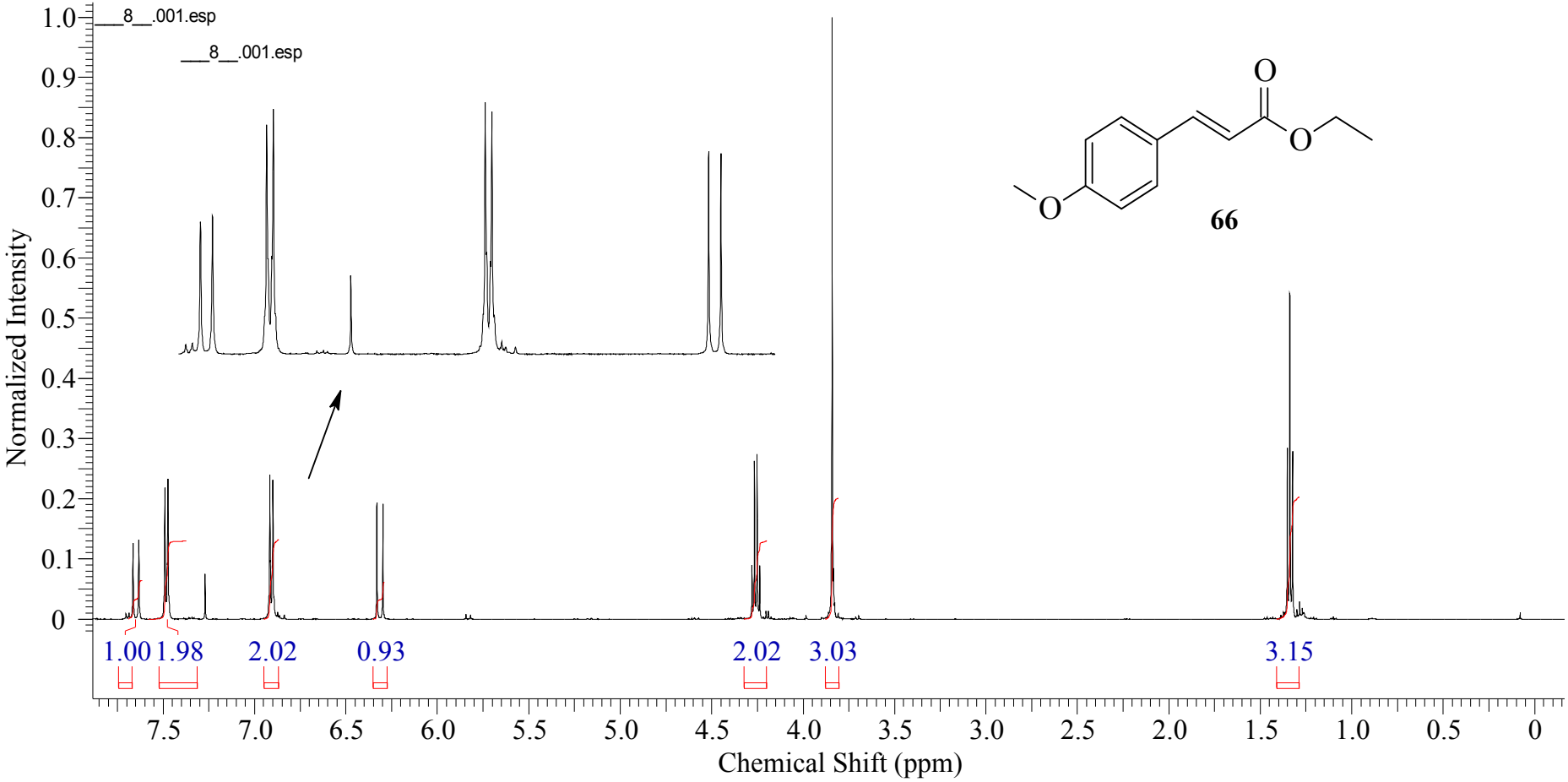
8.1.11 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(4-Hidroxifenil)-2-propenoato de etila



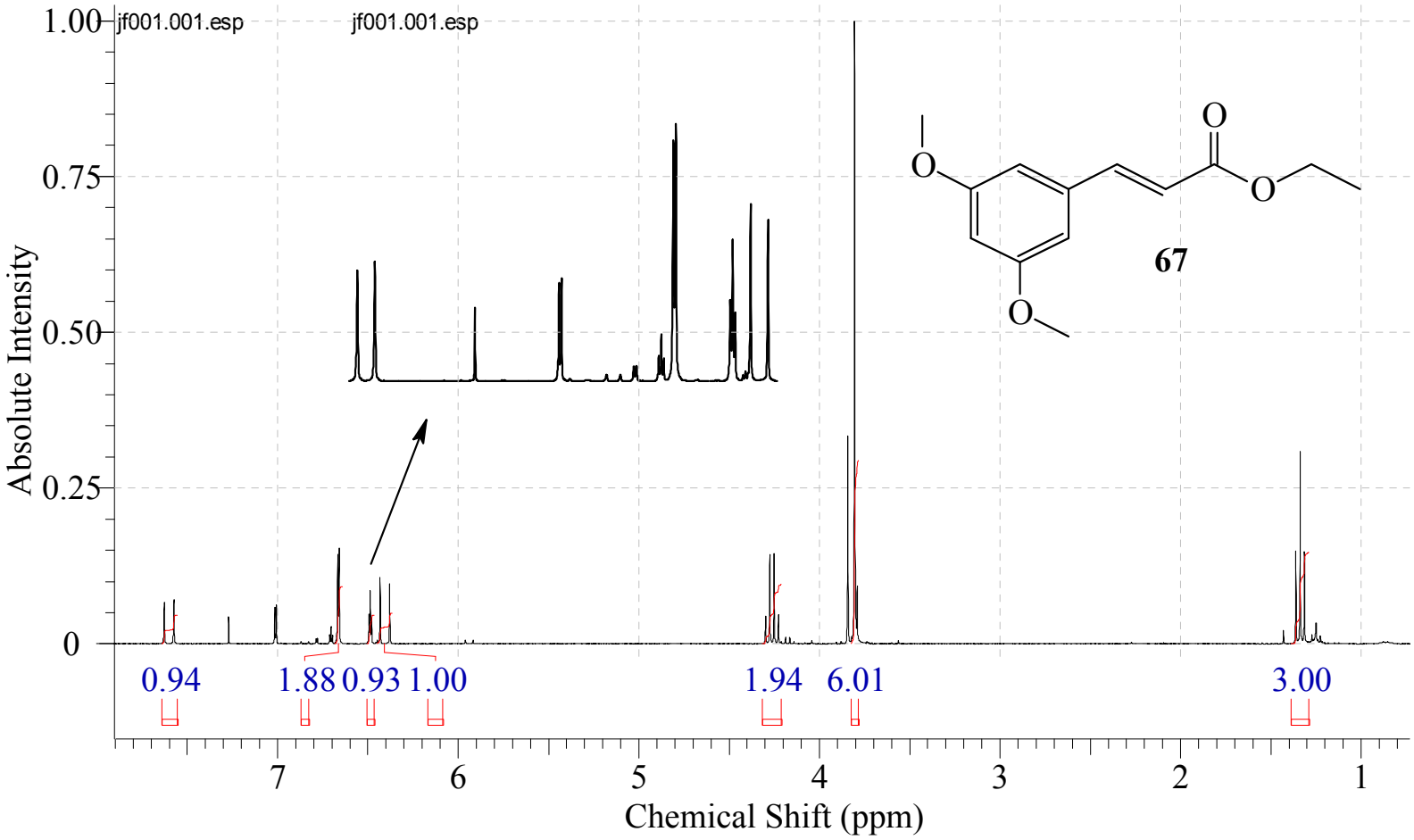
8.1.12 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-Etoxifenil)-2-propenoato de etila



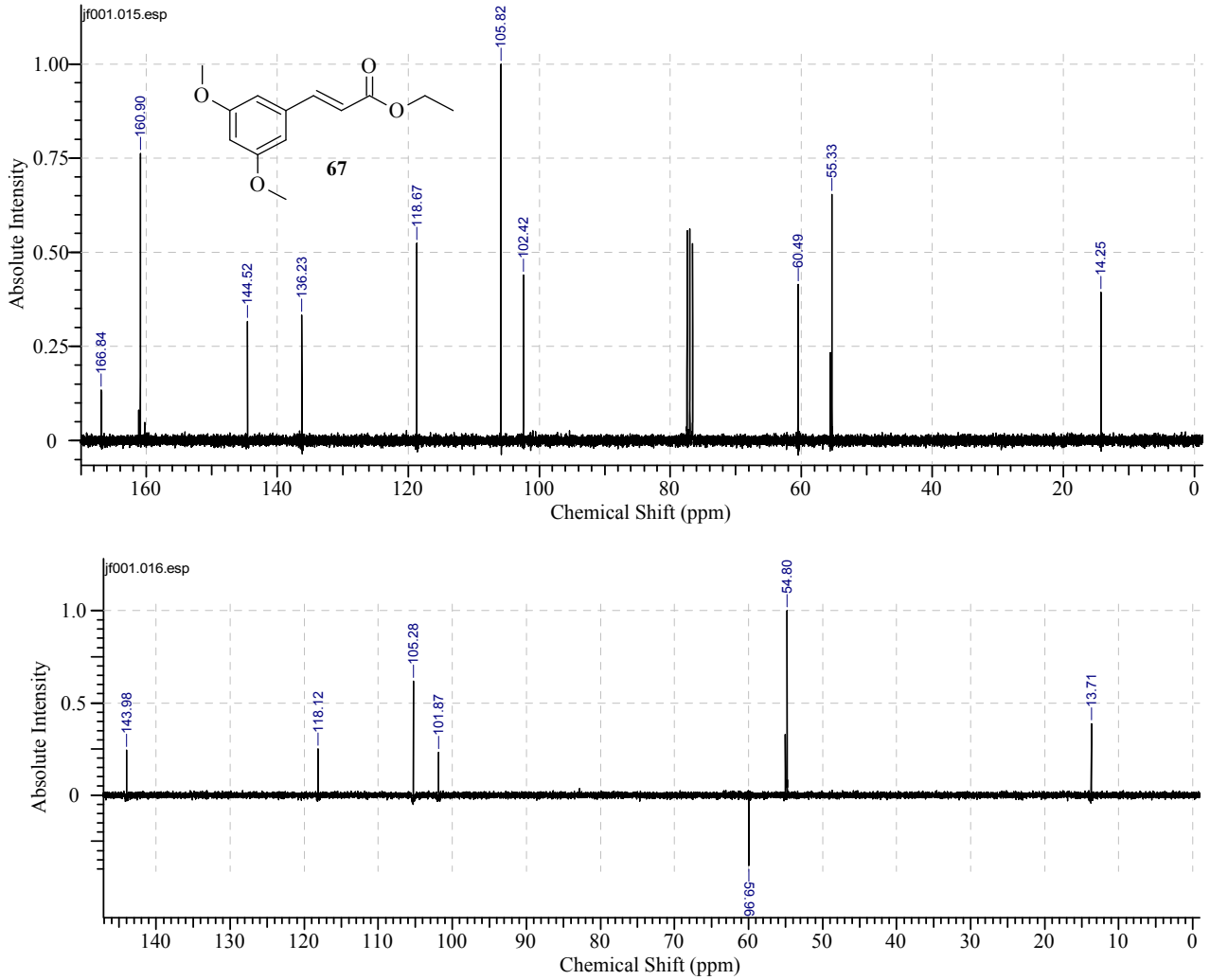
8.1.13 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-metoxifenil)-2-propenoato de etila



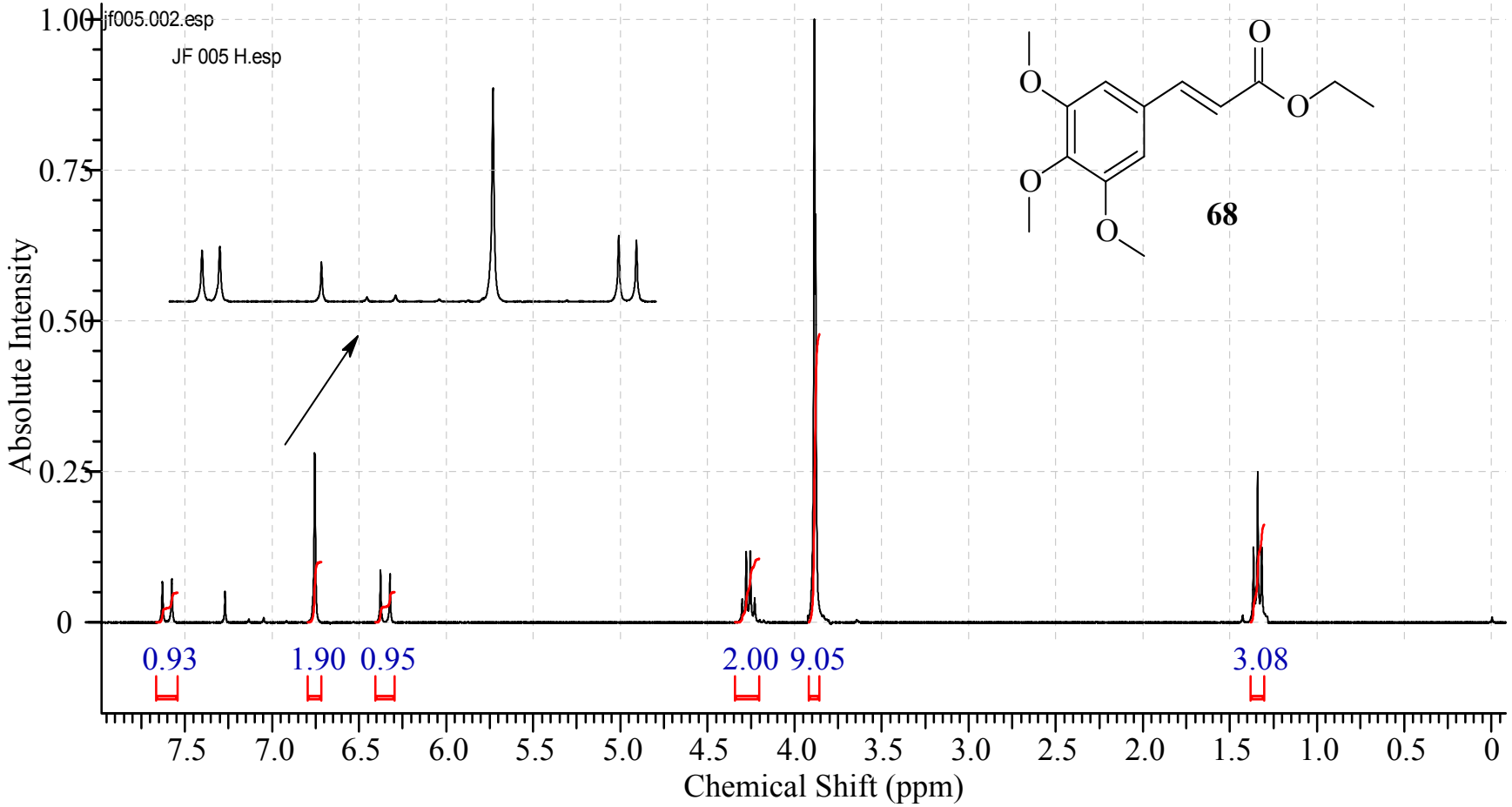
8.1.14 - Espectro de RMN-^1H do 3-(3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila



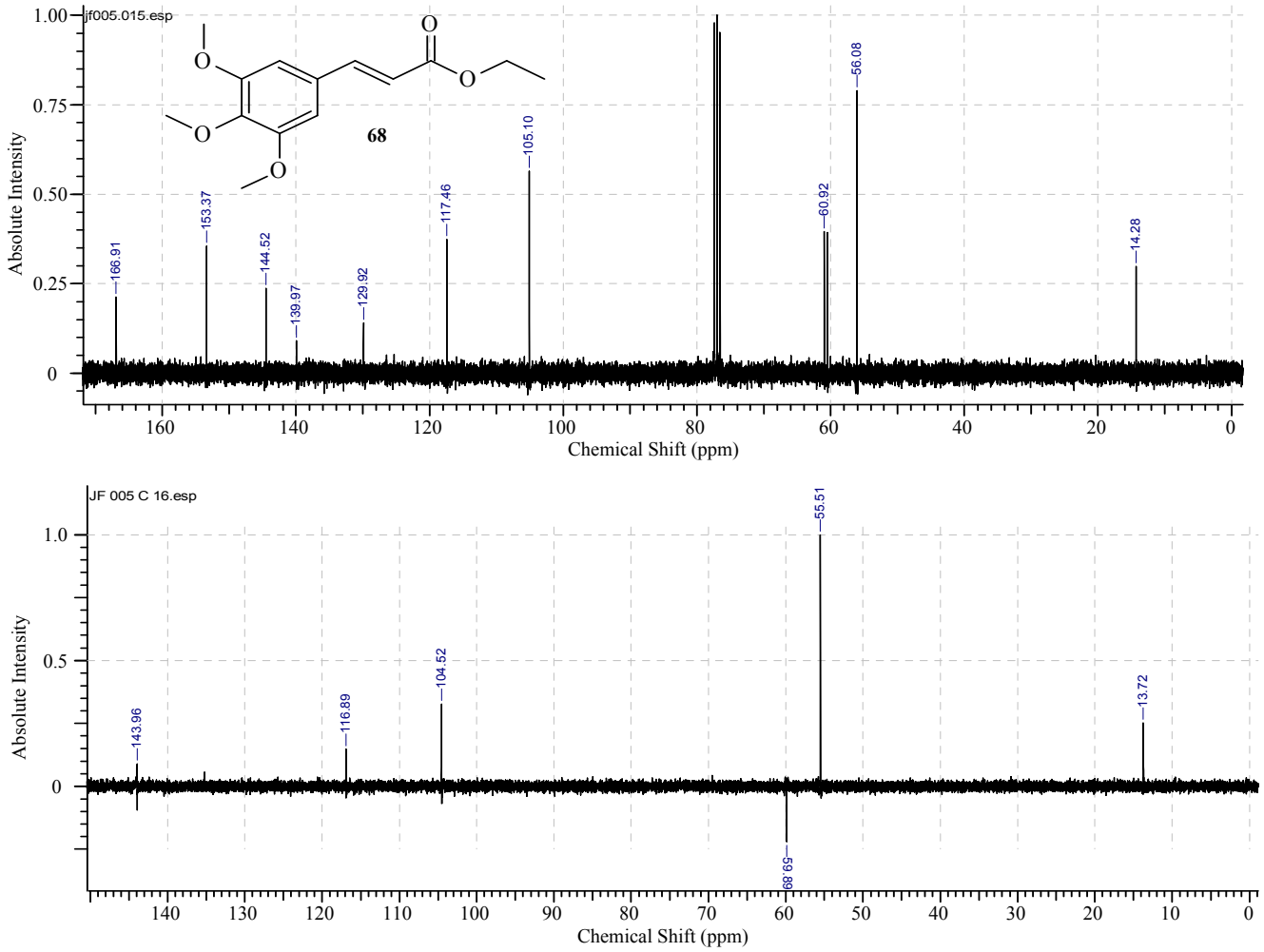
8.1.15 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila



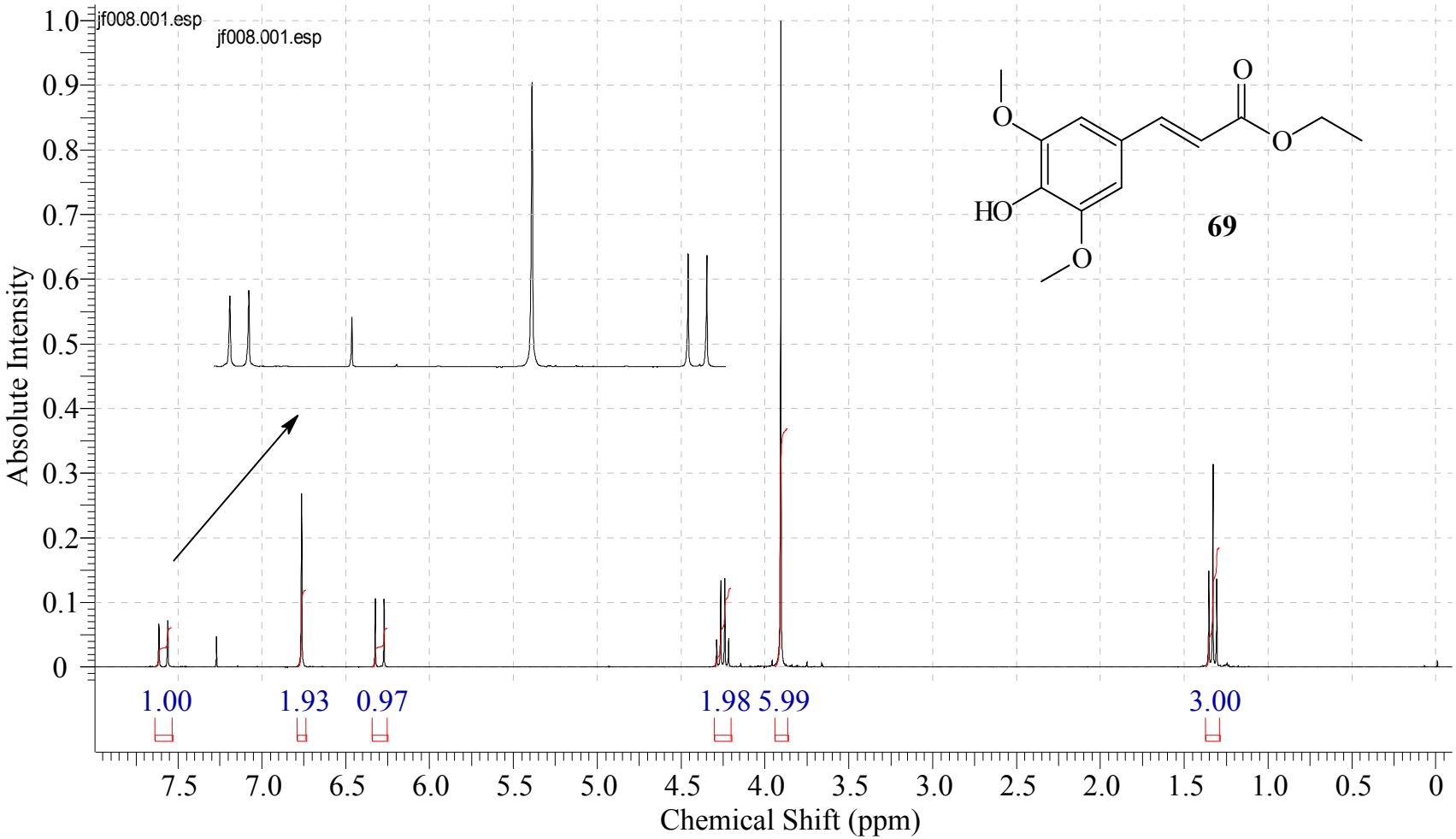
8.1.16 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenoato de etila



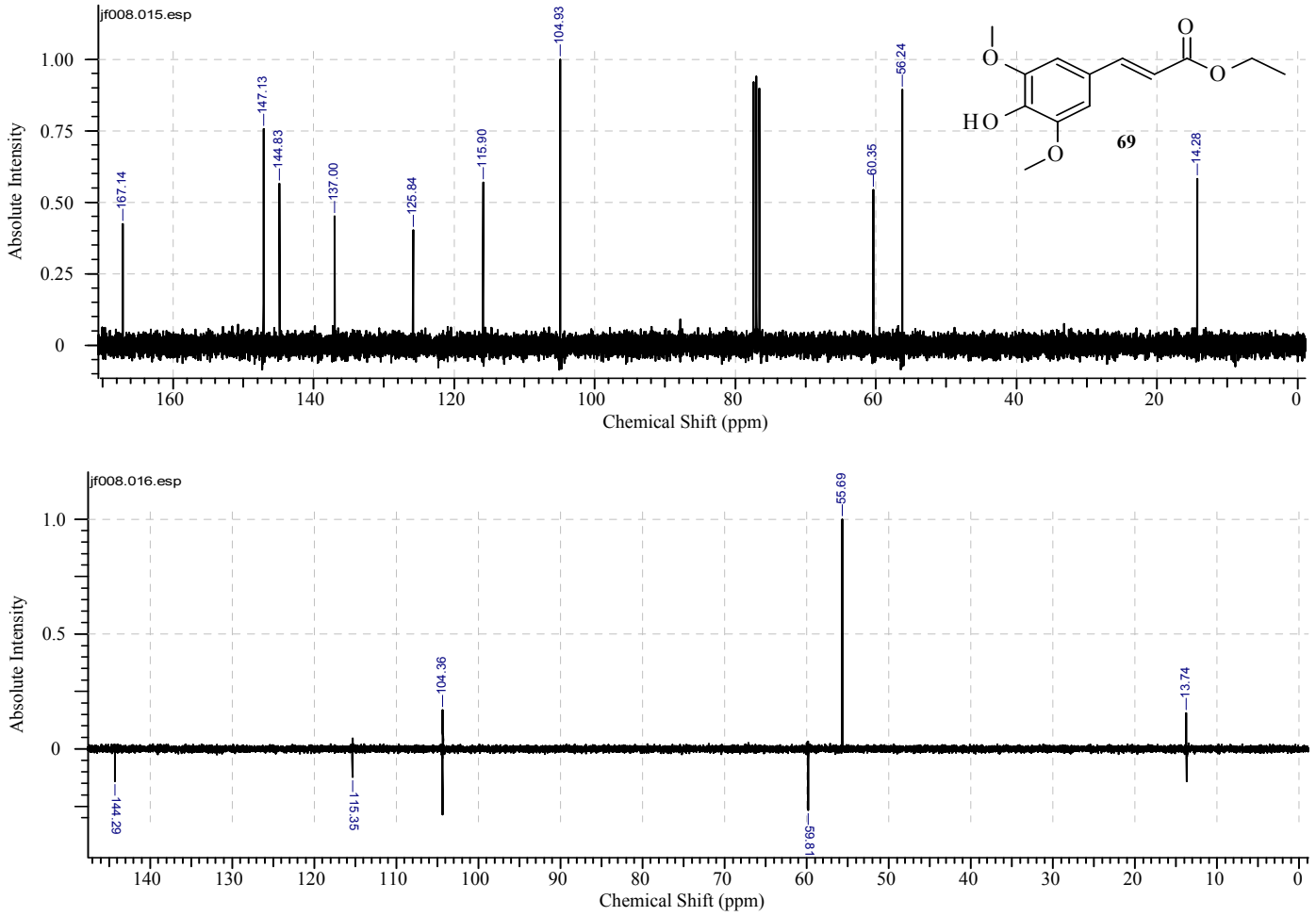
8.1.17 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenoato de etila



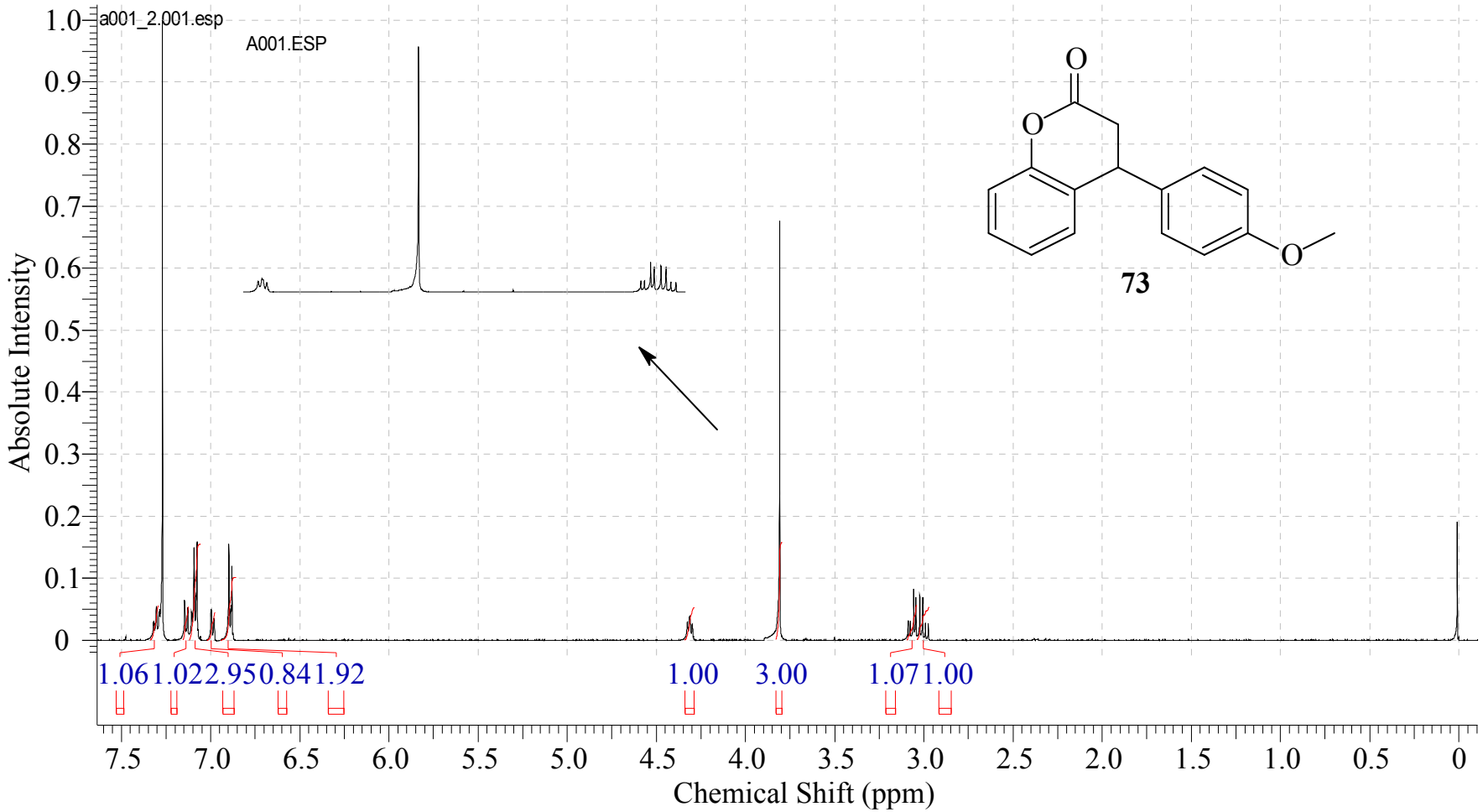
8.1.18 - Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila



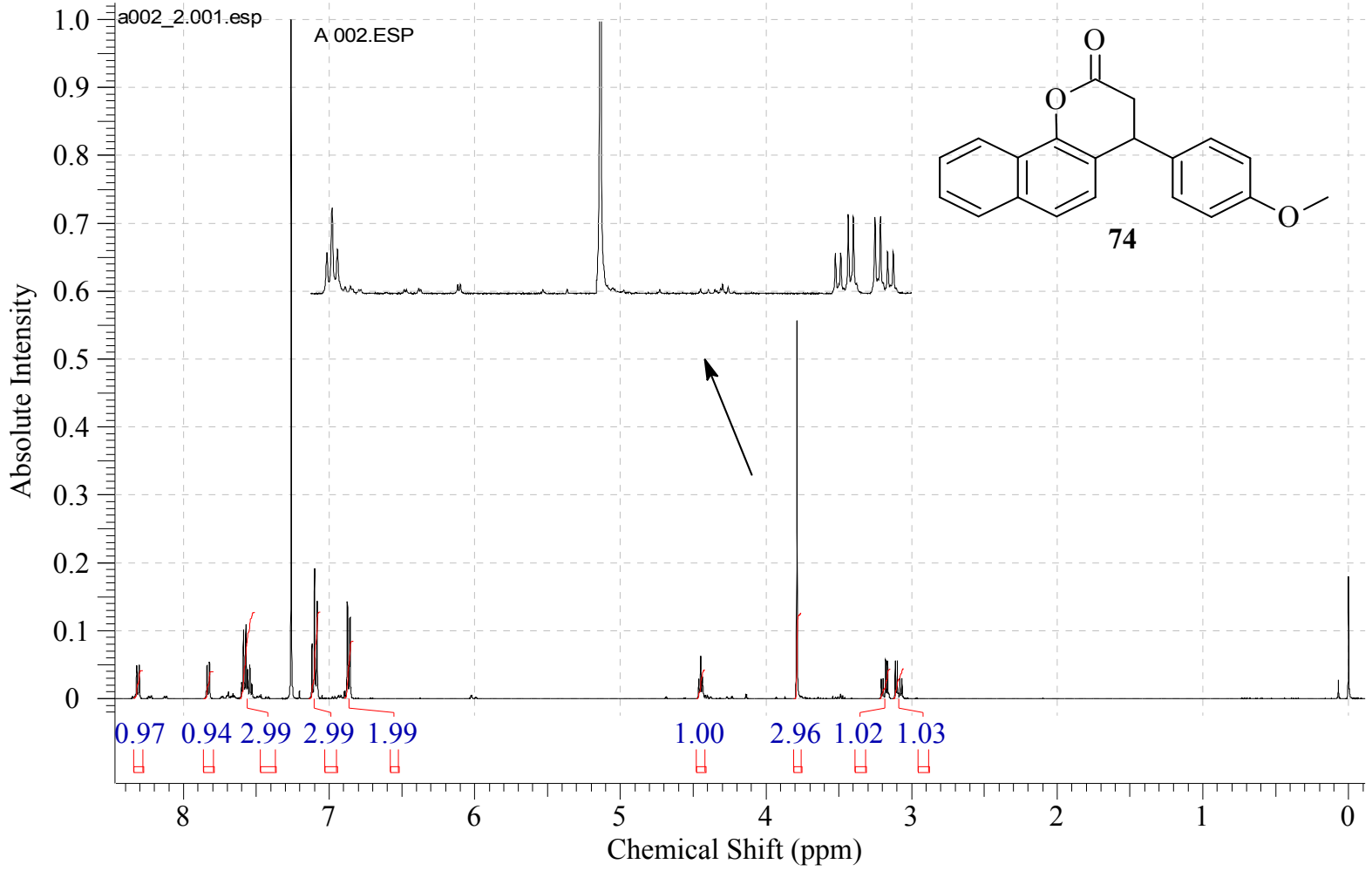
8.1.19 - Espectro de RMN- ^{13}C do 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila



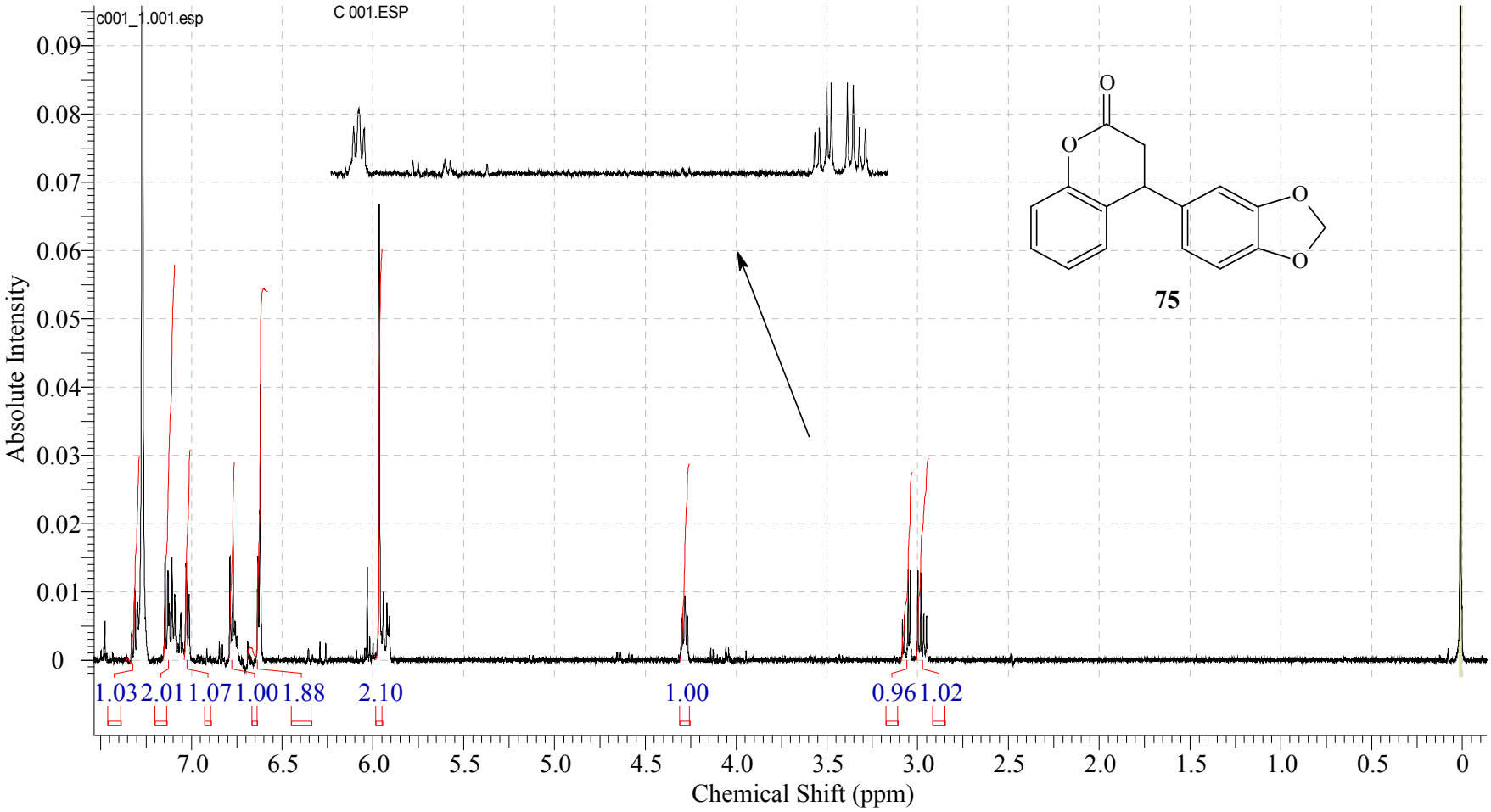
8.1.20 - Espectro de RMN-^{1}H do 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona



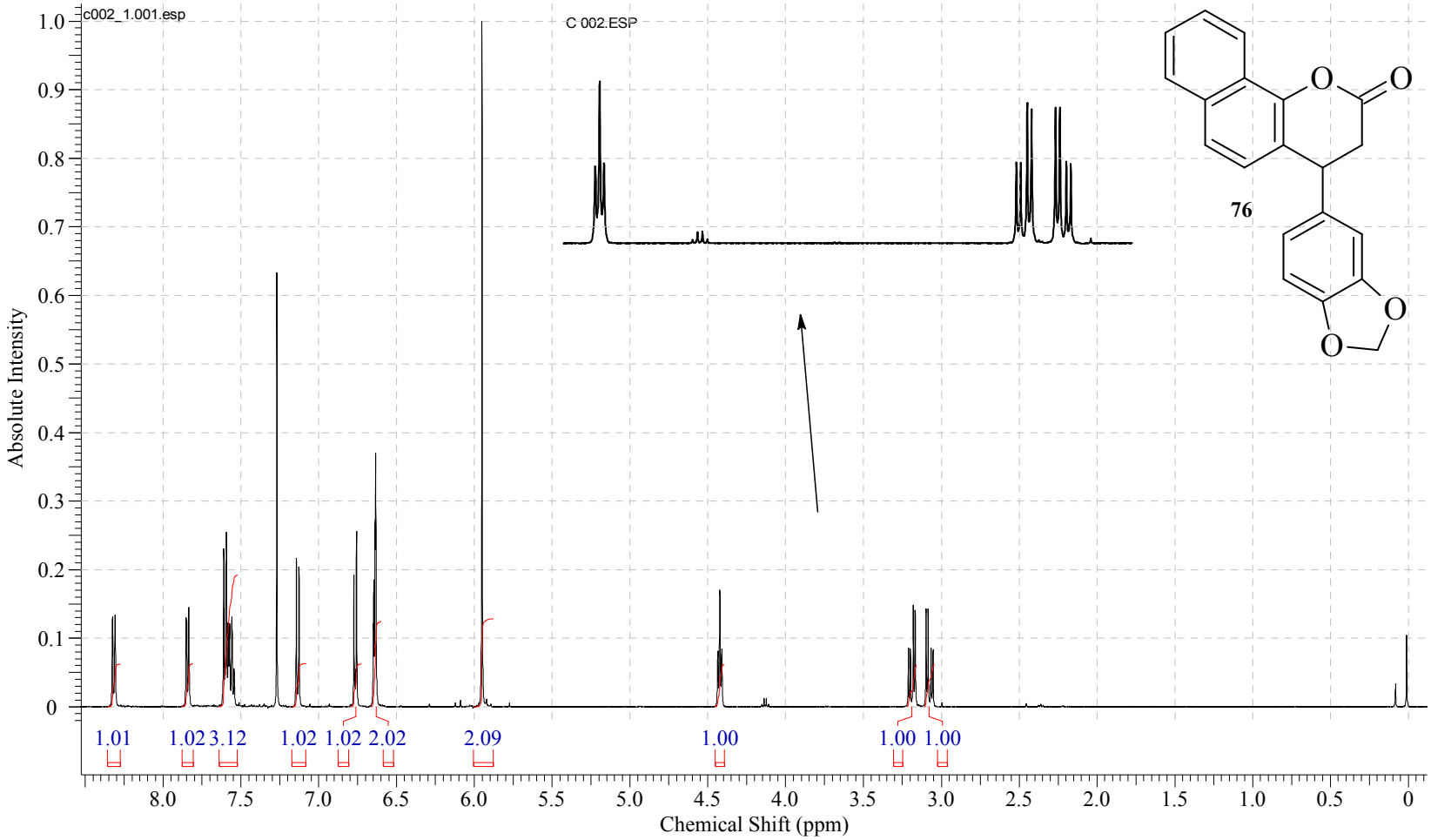
8.1.21 - Espectro de RMN- ^{1}H do 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



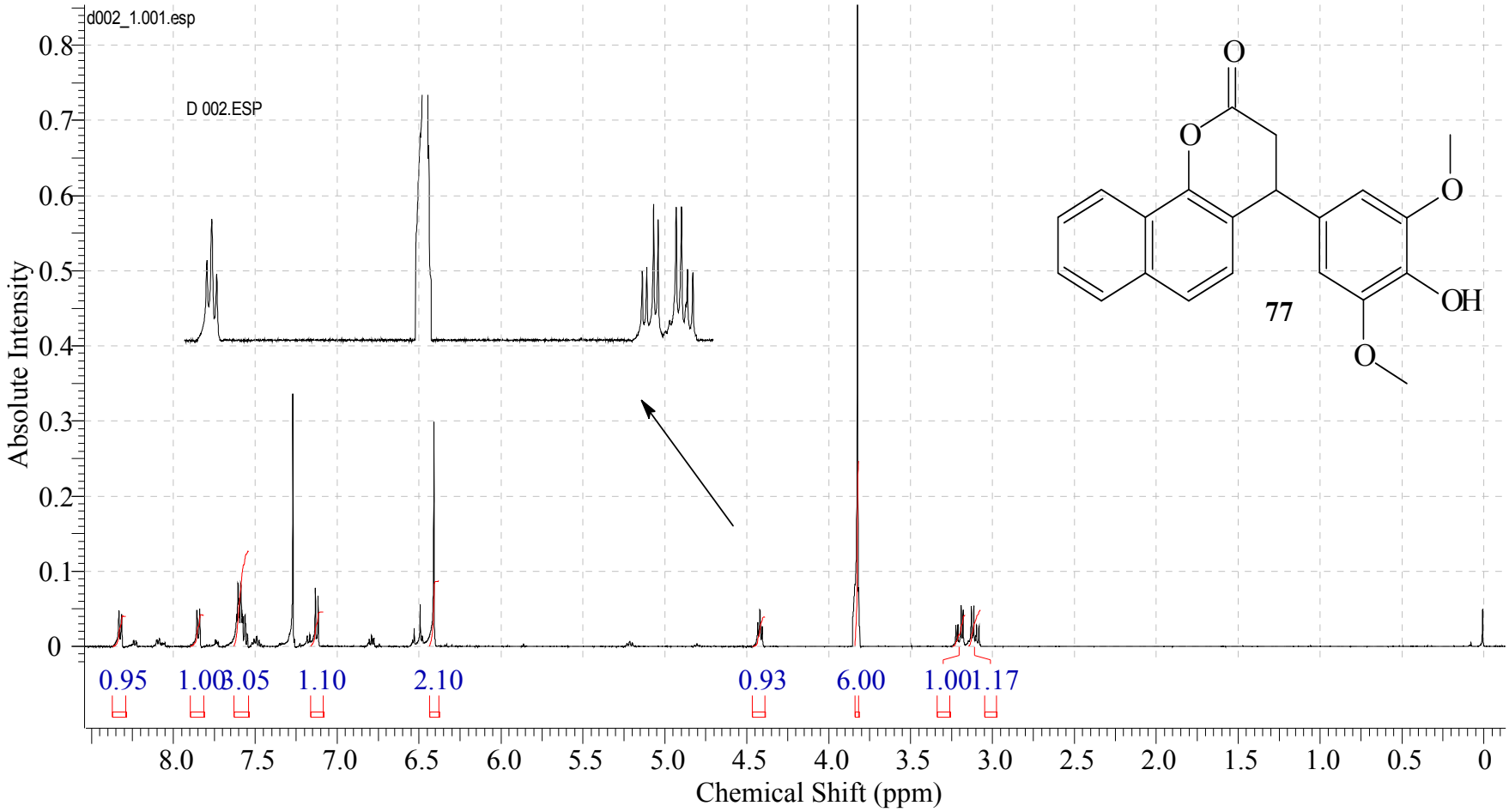
8.1.22 - Espectro de RMN-^{1}H do 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona



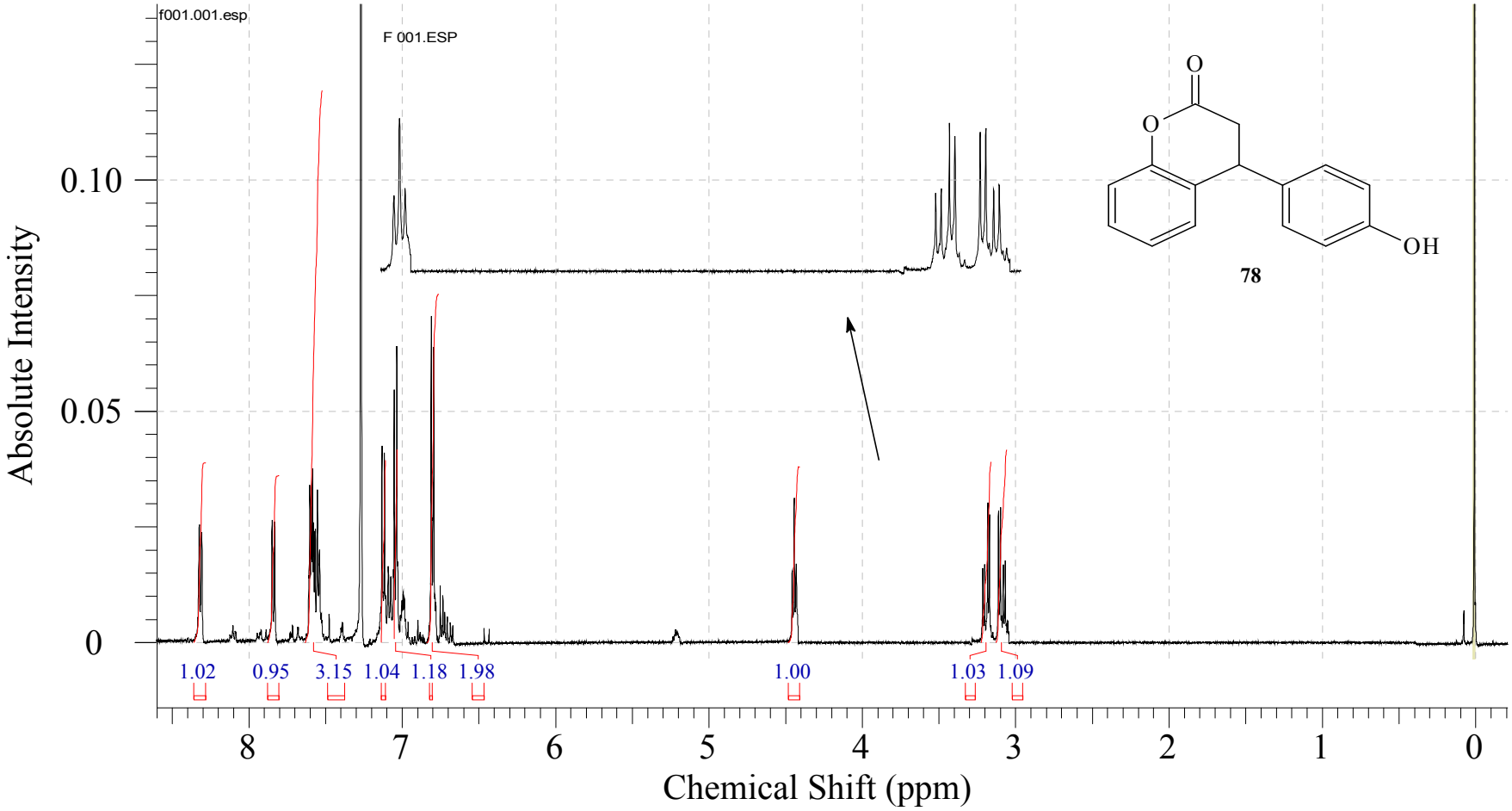
8.1.23 - Espectro de RMN-^{1}H do 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



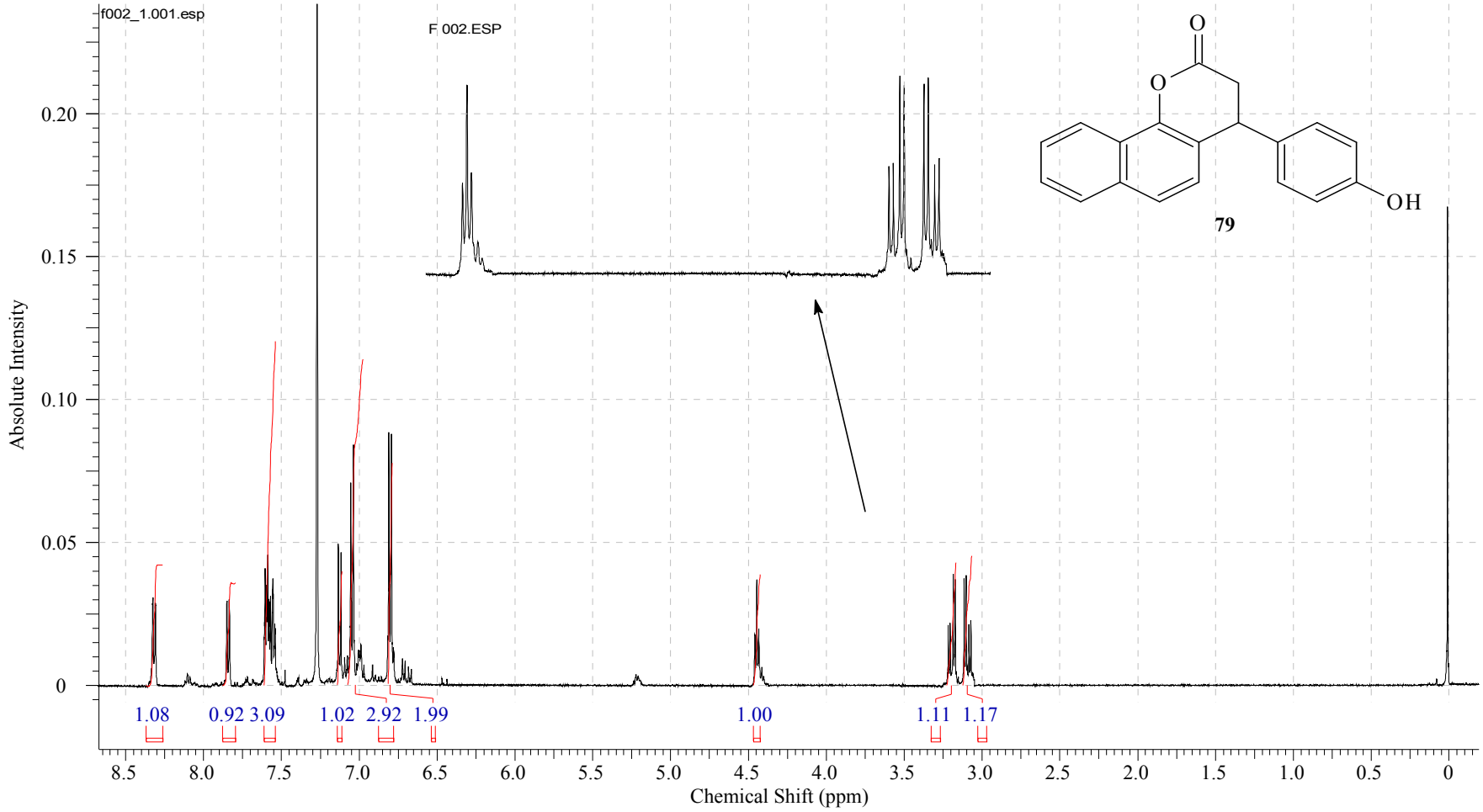
8.1.24 - Espectro de RMN-^{1}H do 4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



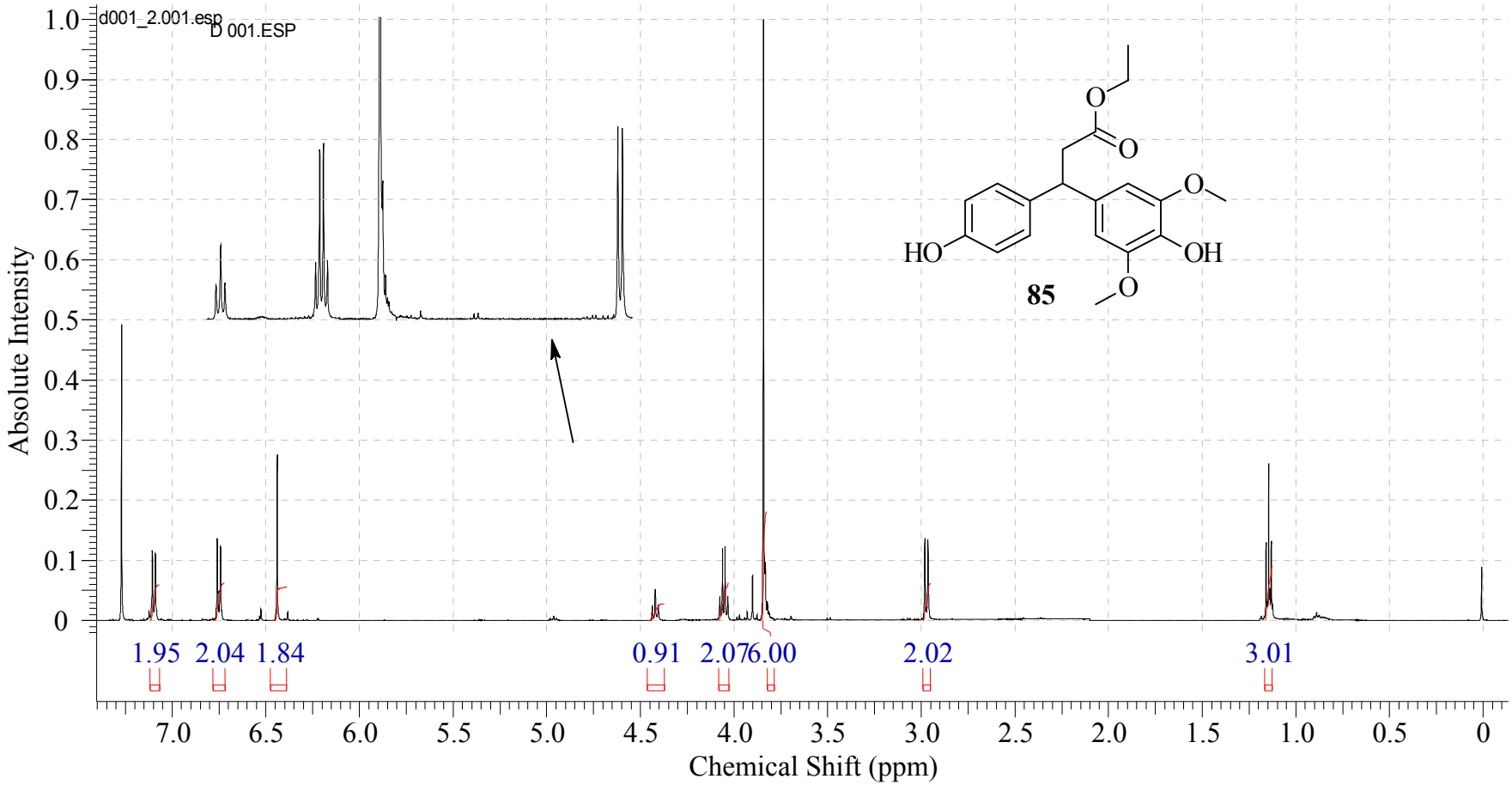
8.1.25 - Espectro de RMN-^{1}H do 4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona



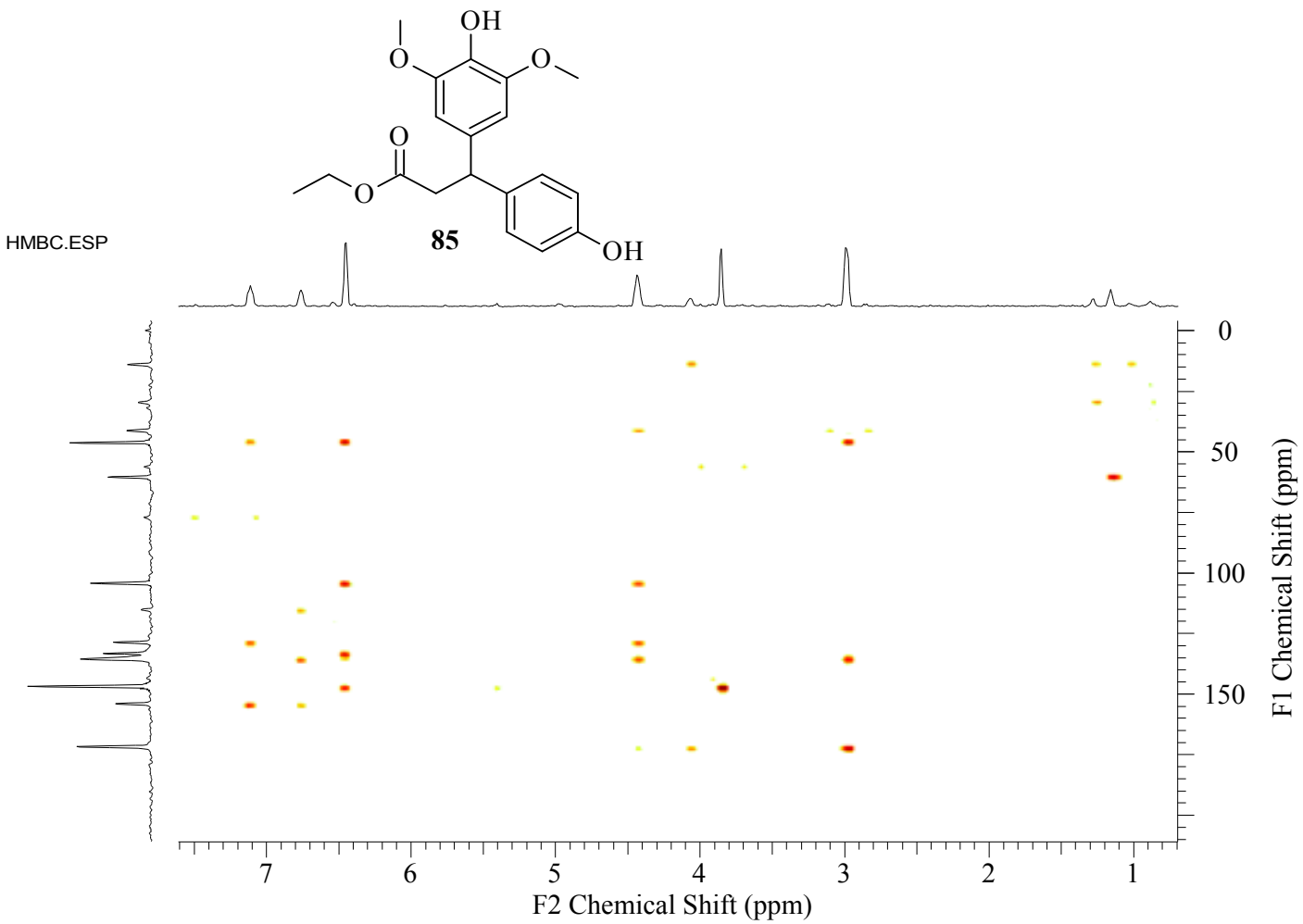
8.1.26 - Espectro de RMN-^{1}H do 4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



8.1.27- Espectro de RMN-^{1}H do 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-(4-hidroxifenil) propanoato de etila

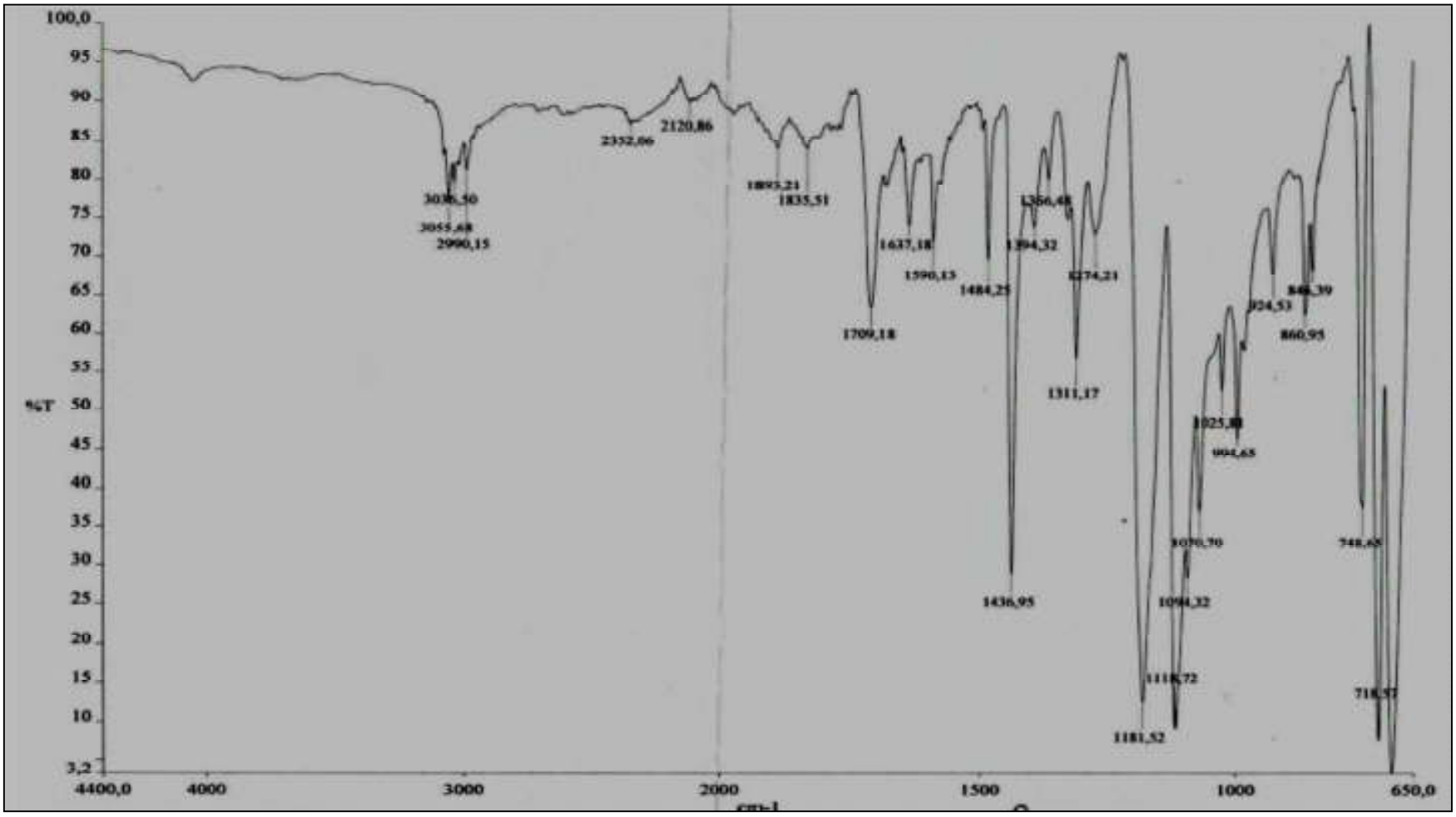


8.1.28 - Espectro de HMBC do 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-(4-hidroxifenil) propanoato de etila

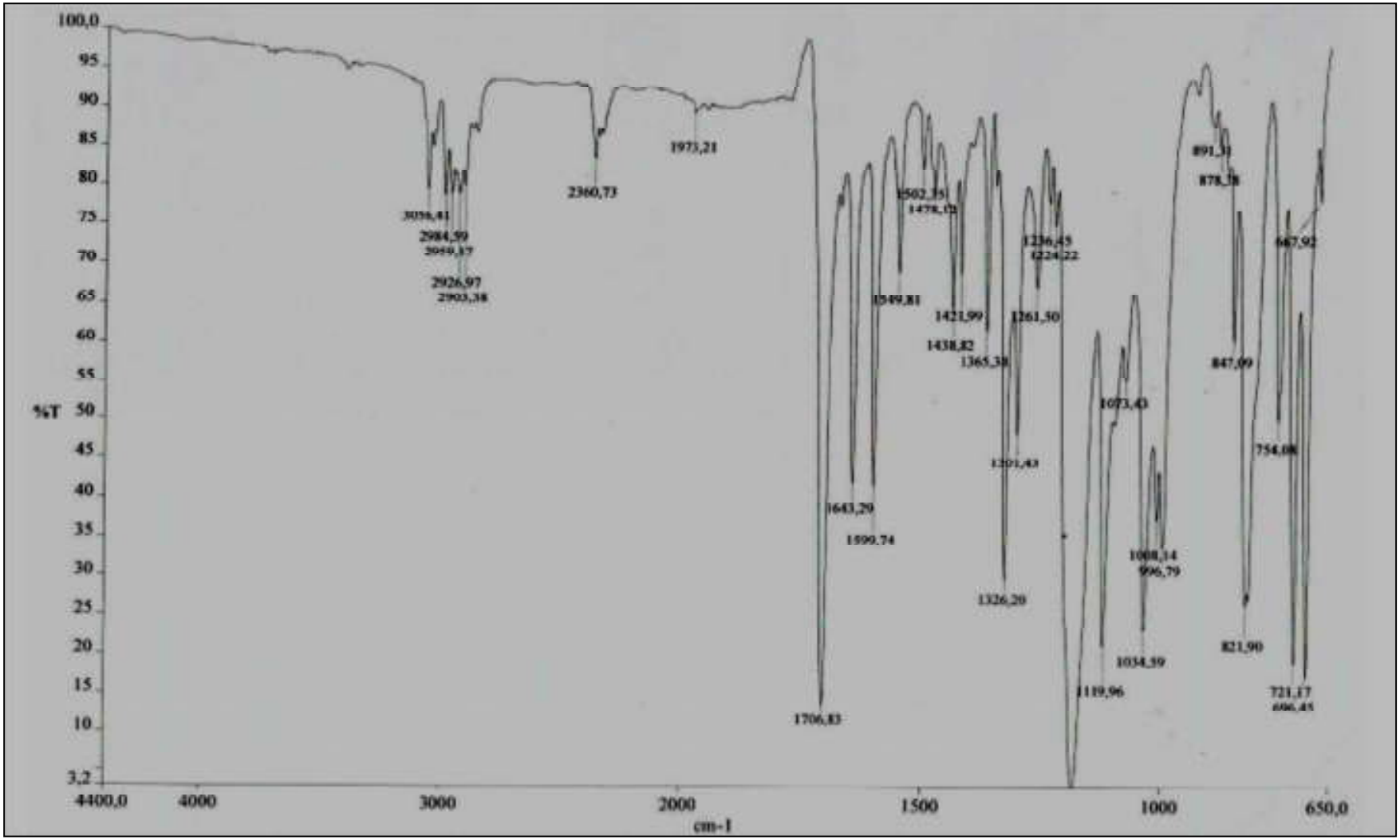


8.2 - Anexo 2

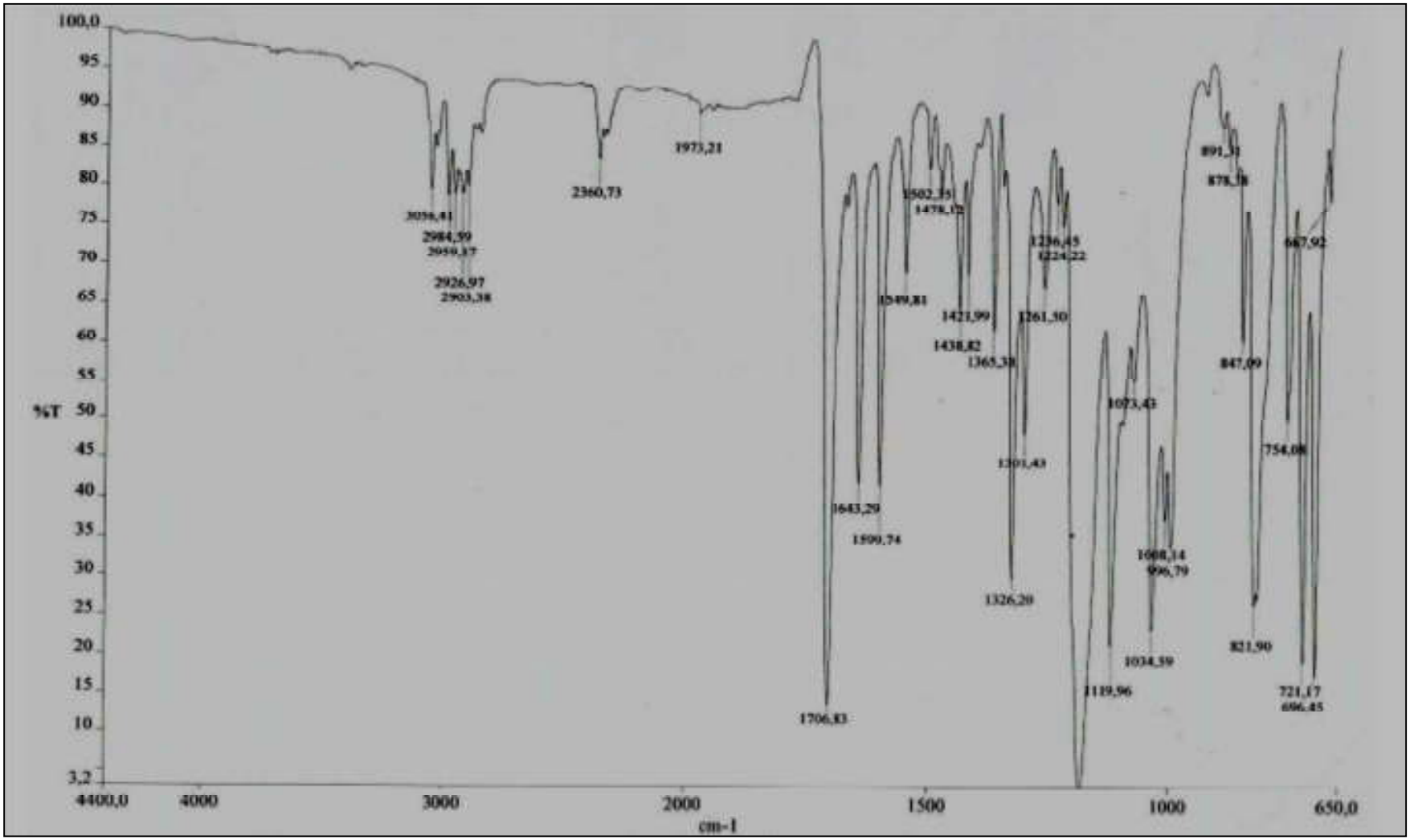
8.2.1 – Espectro de IV do 3-(Fenil)-2-propenoato de etila



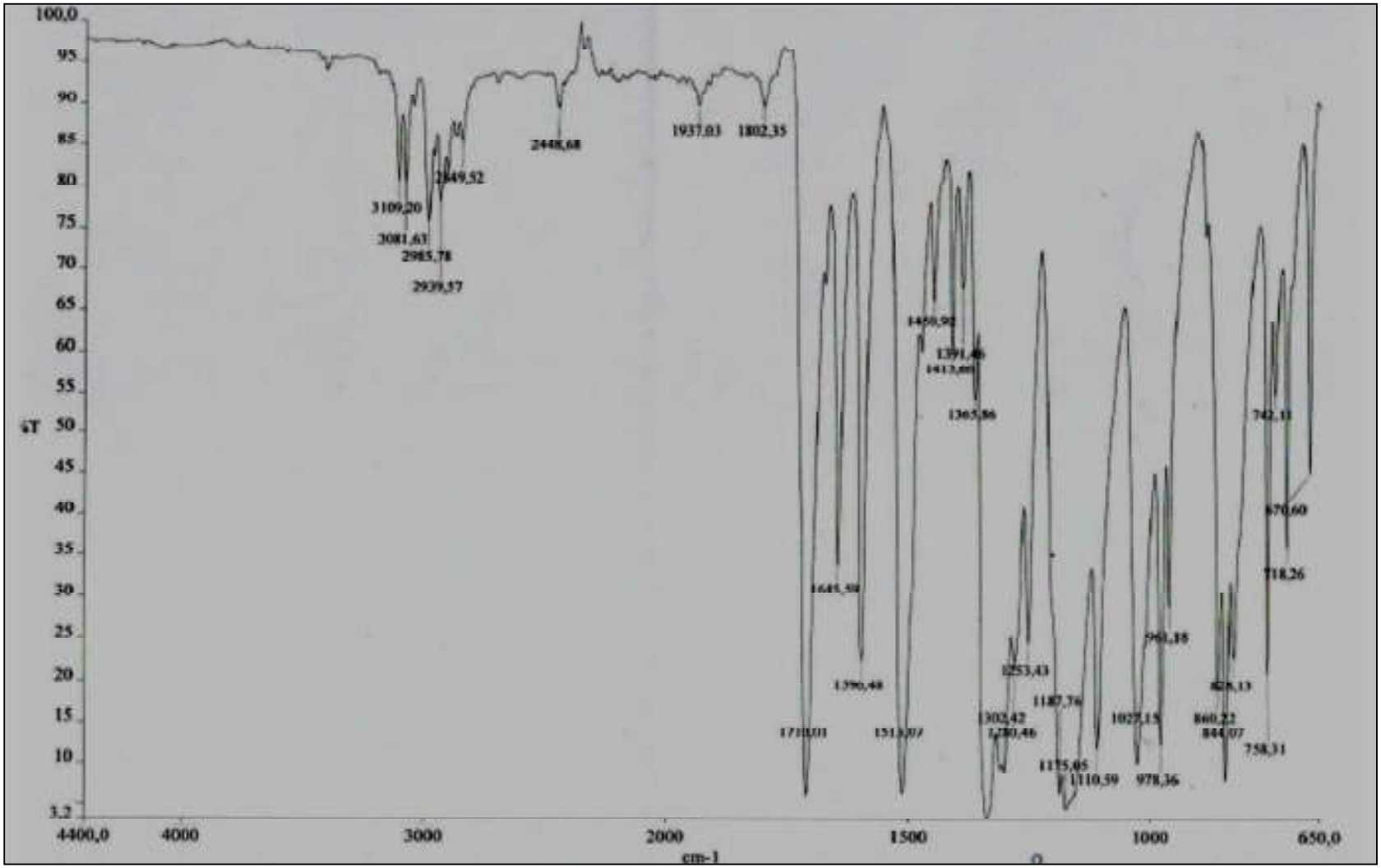
8.2.2 – Espectro de IV do 3-(2-piridin)-2-propenoato de etila



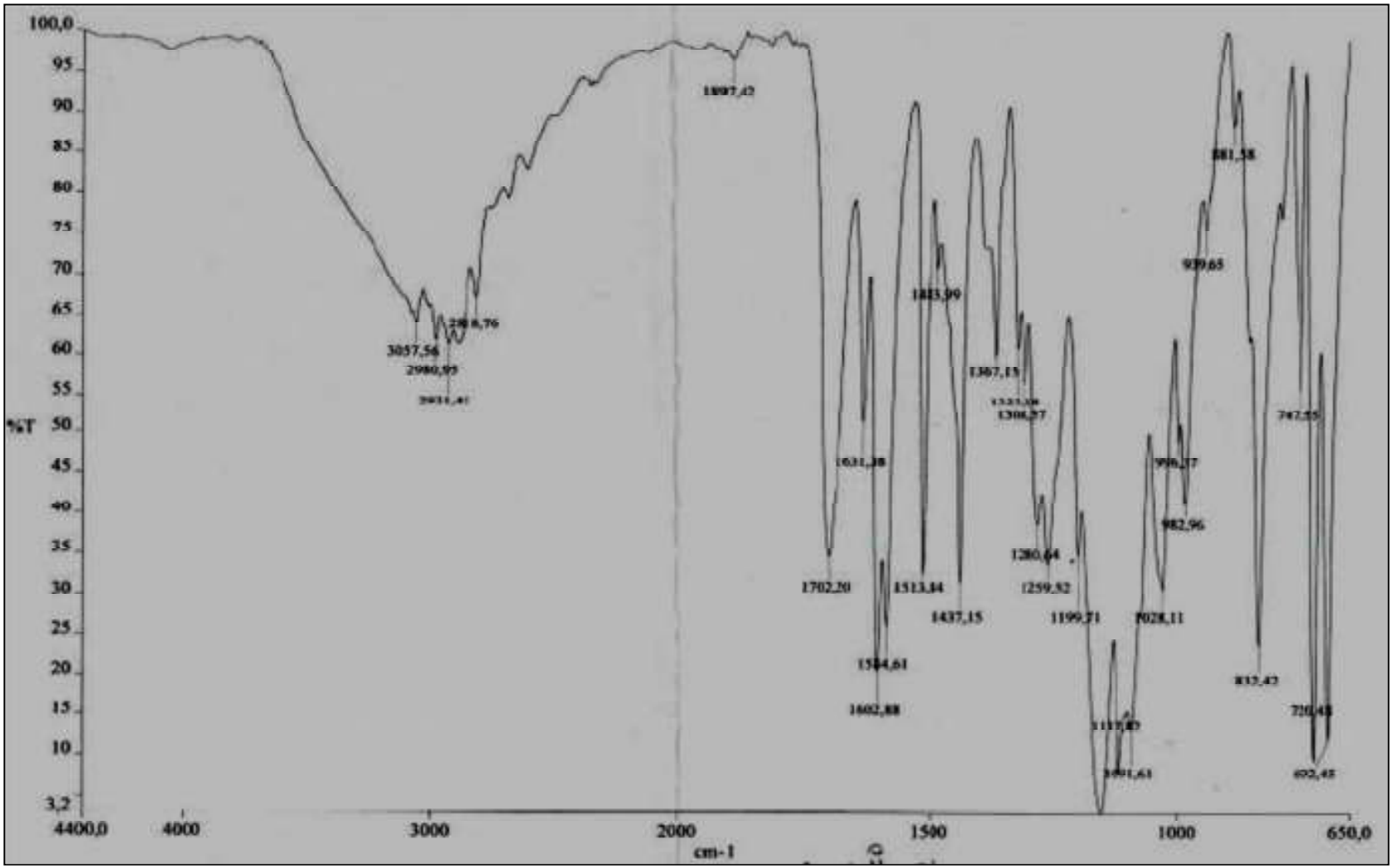
8.2.3 – Espectro de IV do 3-(4-piridin)-2-propenoato de etila



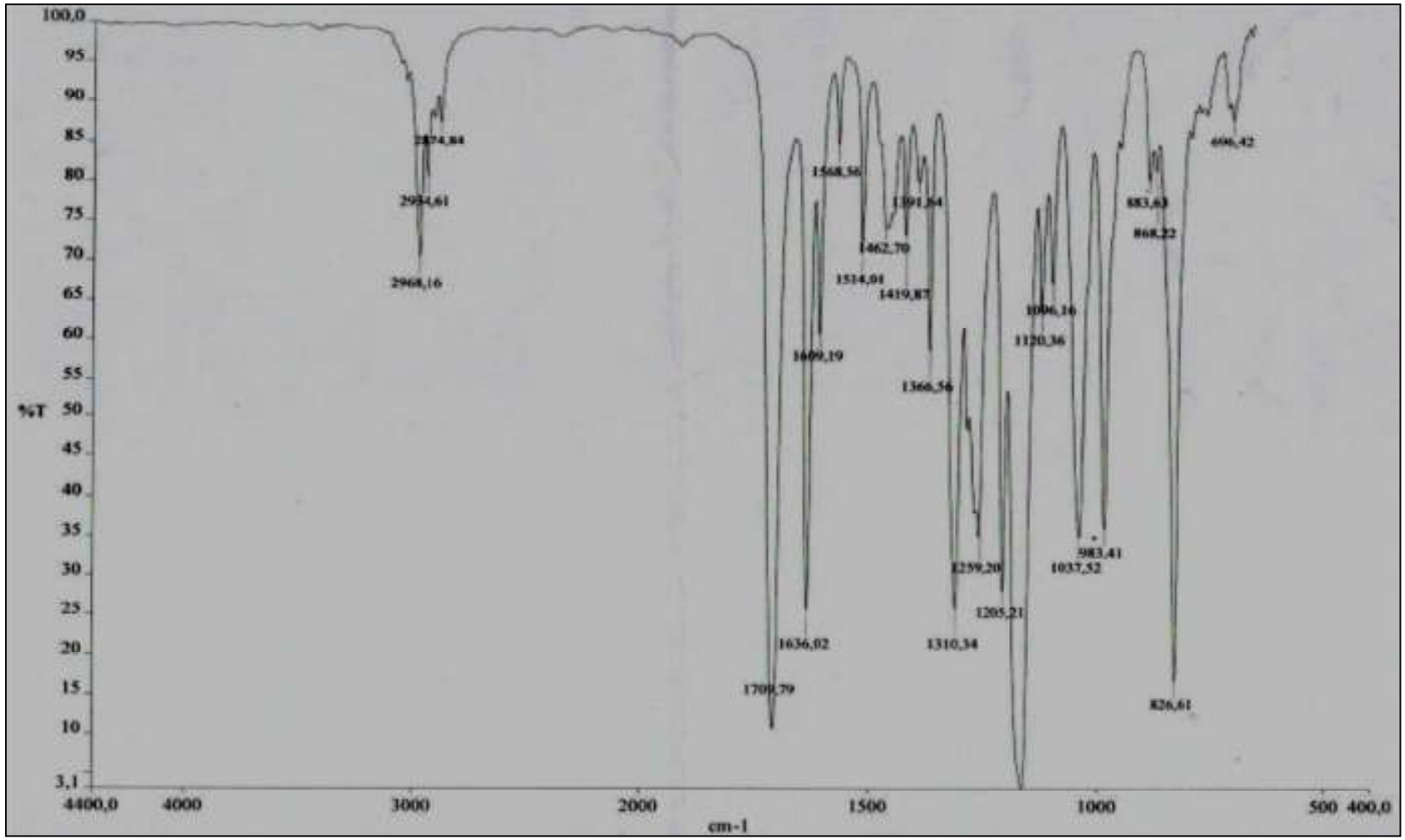
8.2.4 – Espectro de IV do 3-(4-Nitrofenil)-2-propenoato de etila



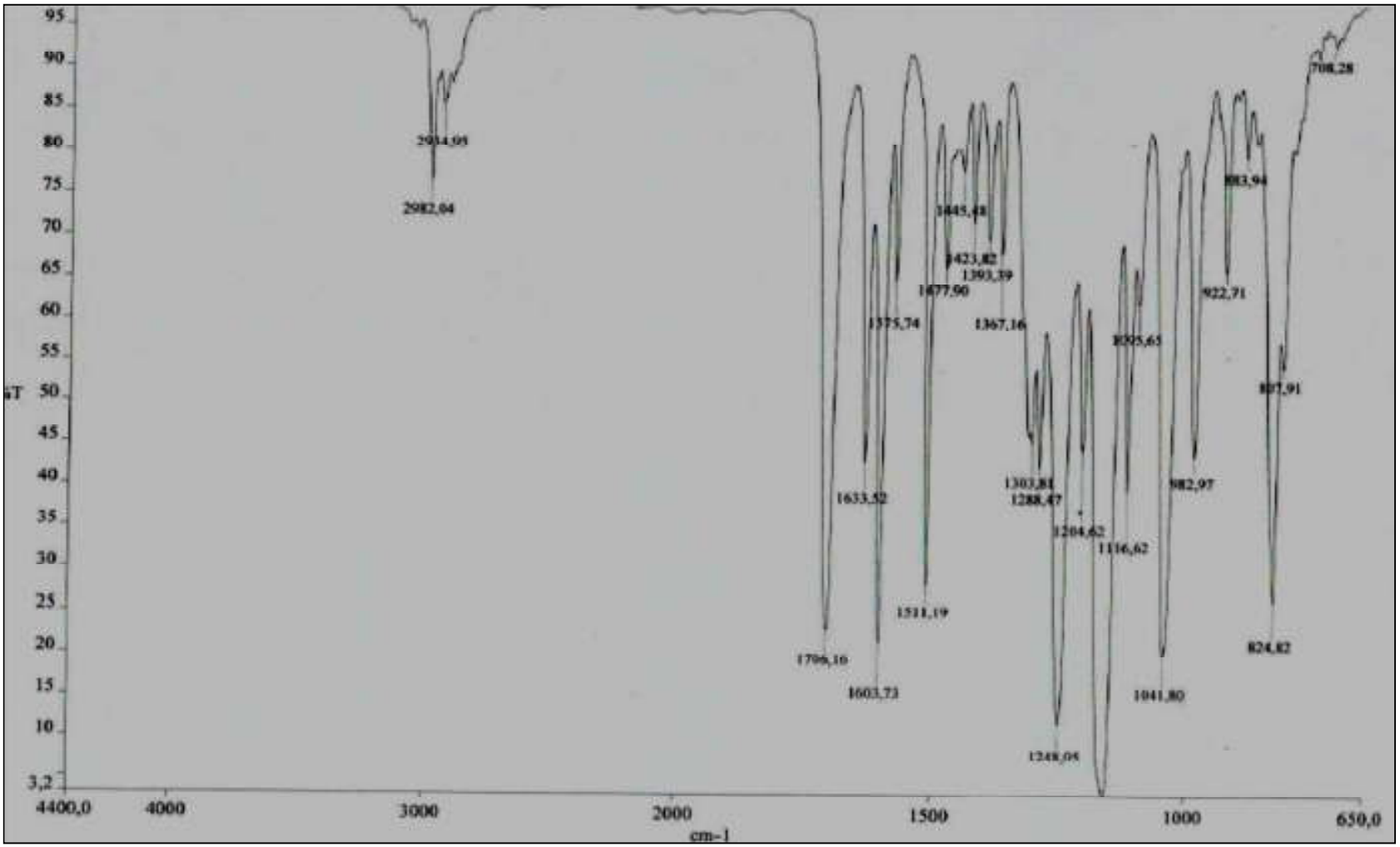
8.2.5 – Espectro de IV do 3-(4-metilenofenil)-2-propenoato de etila



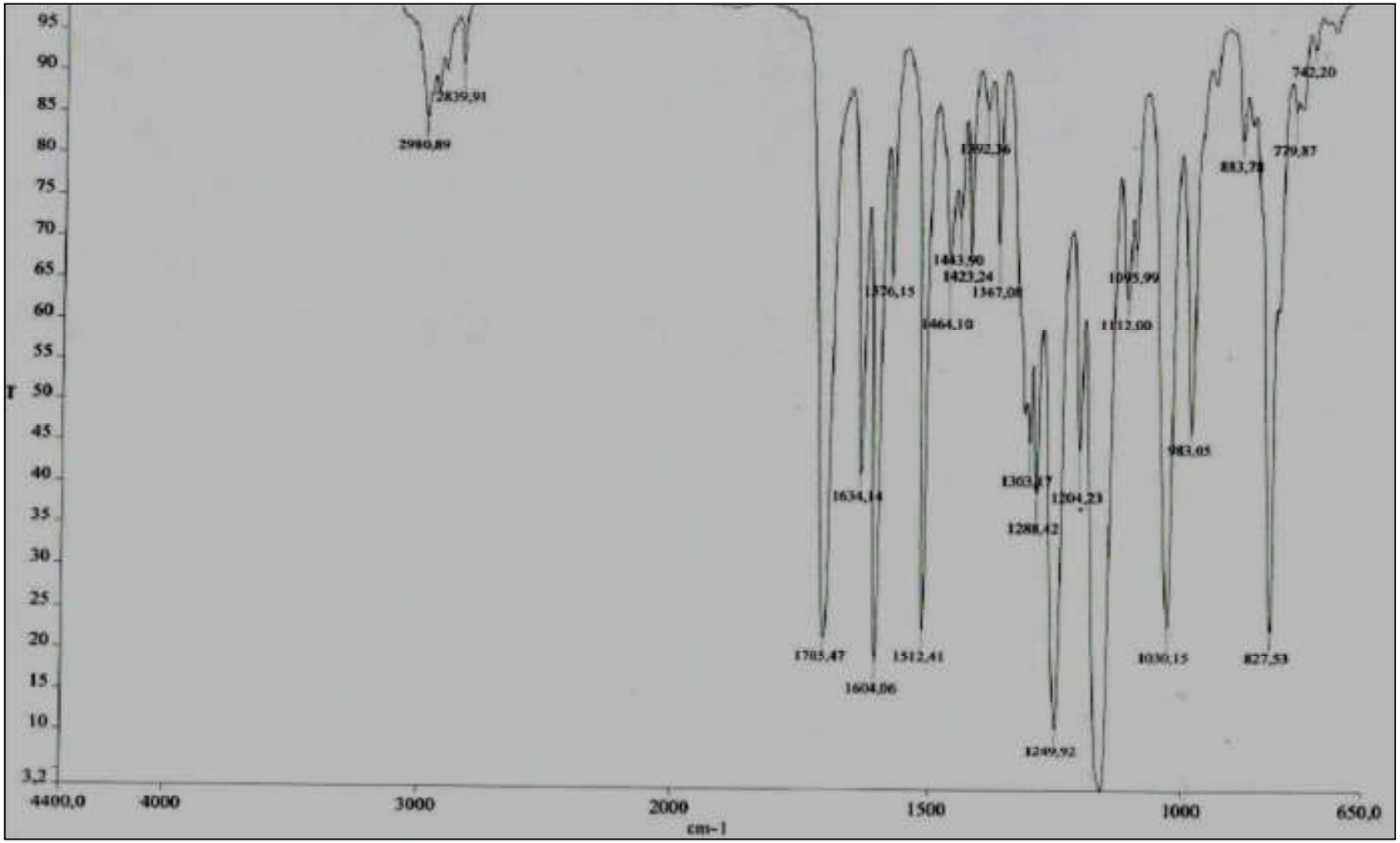
8.2.6 – Espectro de IV do 3-(4-etilenofenil)-2-propenoato de etila



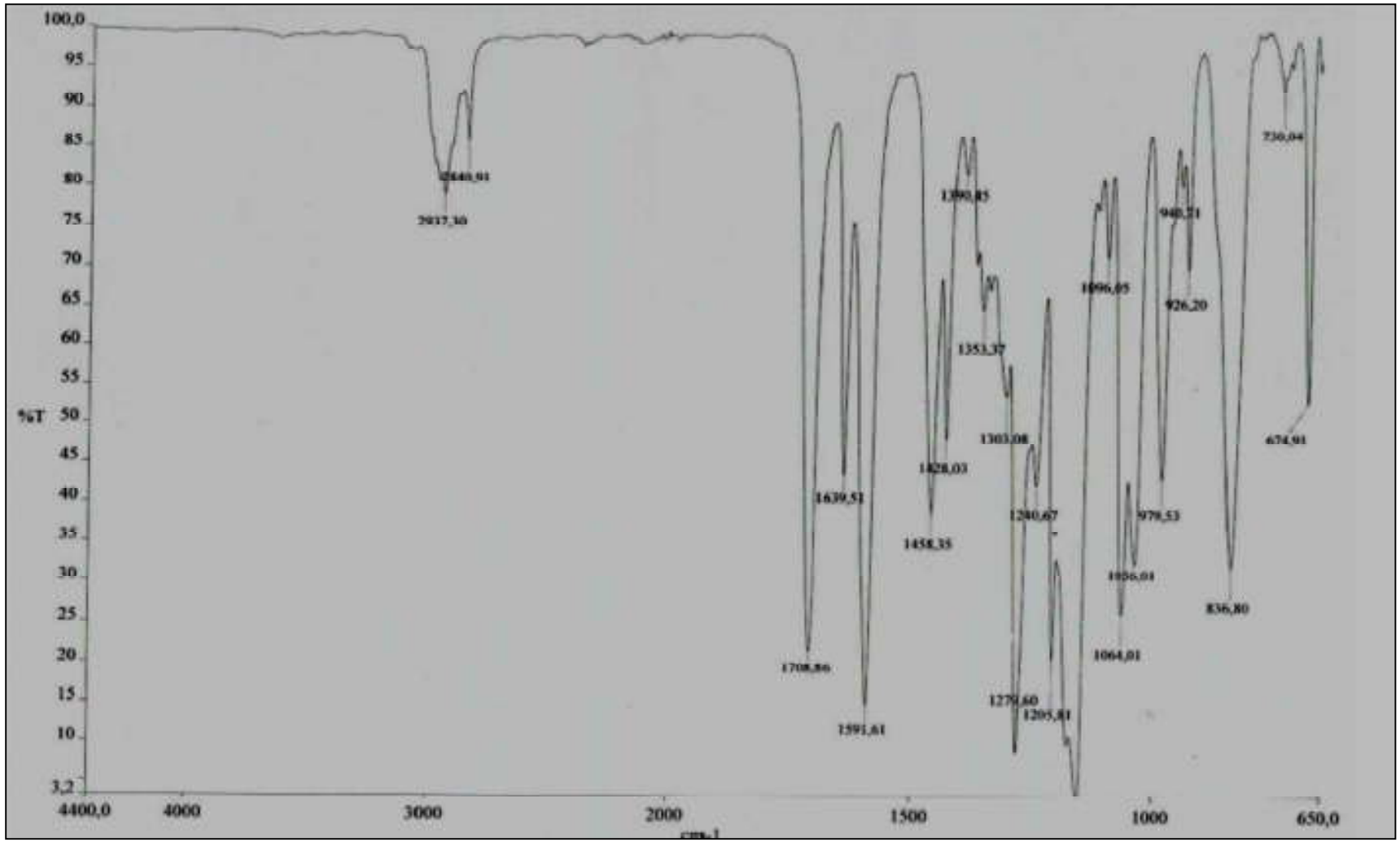
8.2.7 – Espectro de IV do 3-(4-Etoxifenil)-2-propenoato de etila



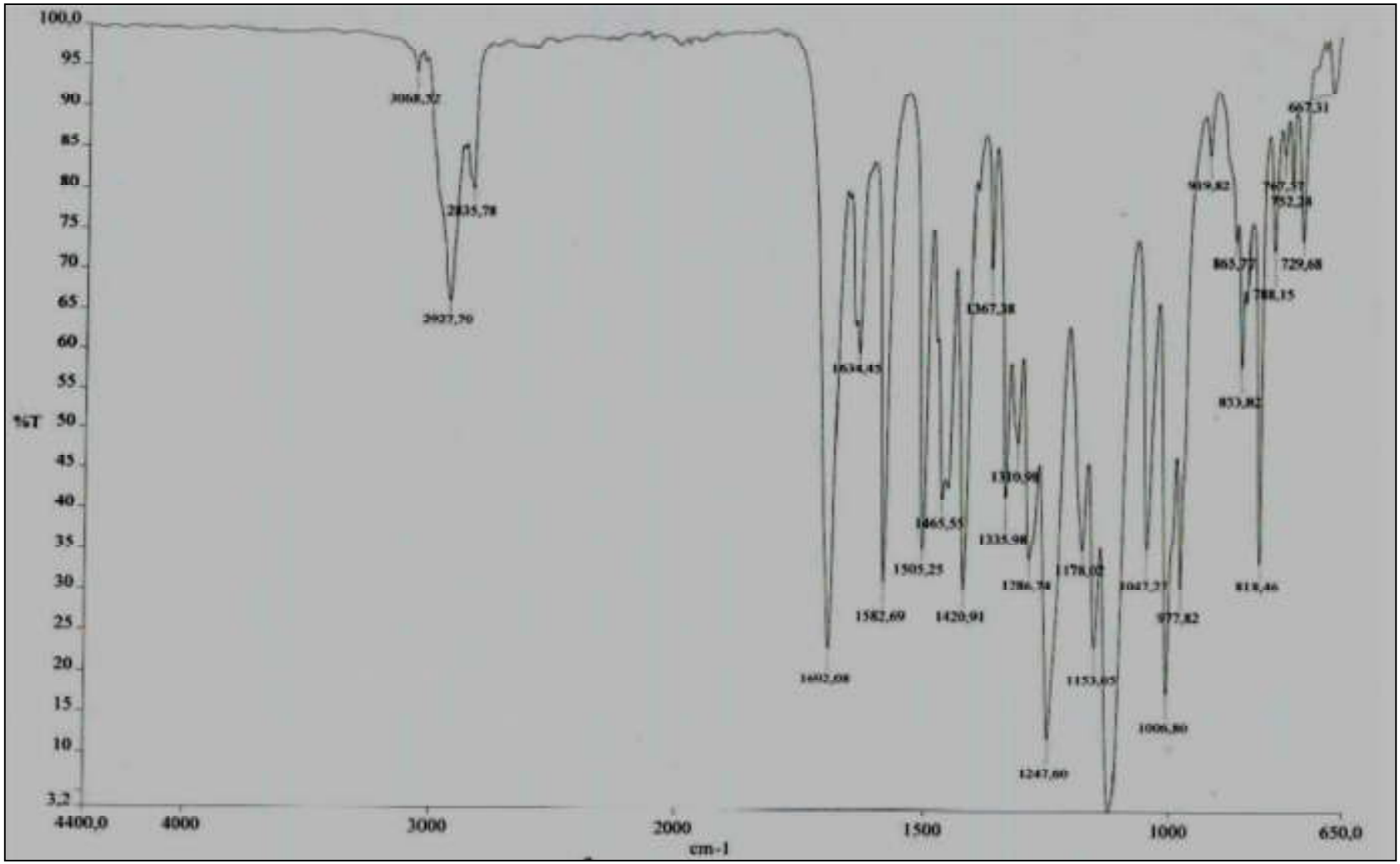
8.2.8 – Espectro de IV do 3-(4-metoxifenil)-2-propenoato de etila



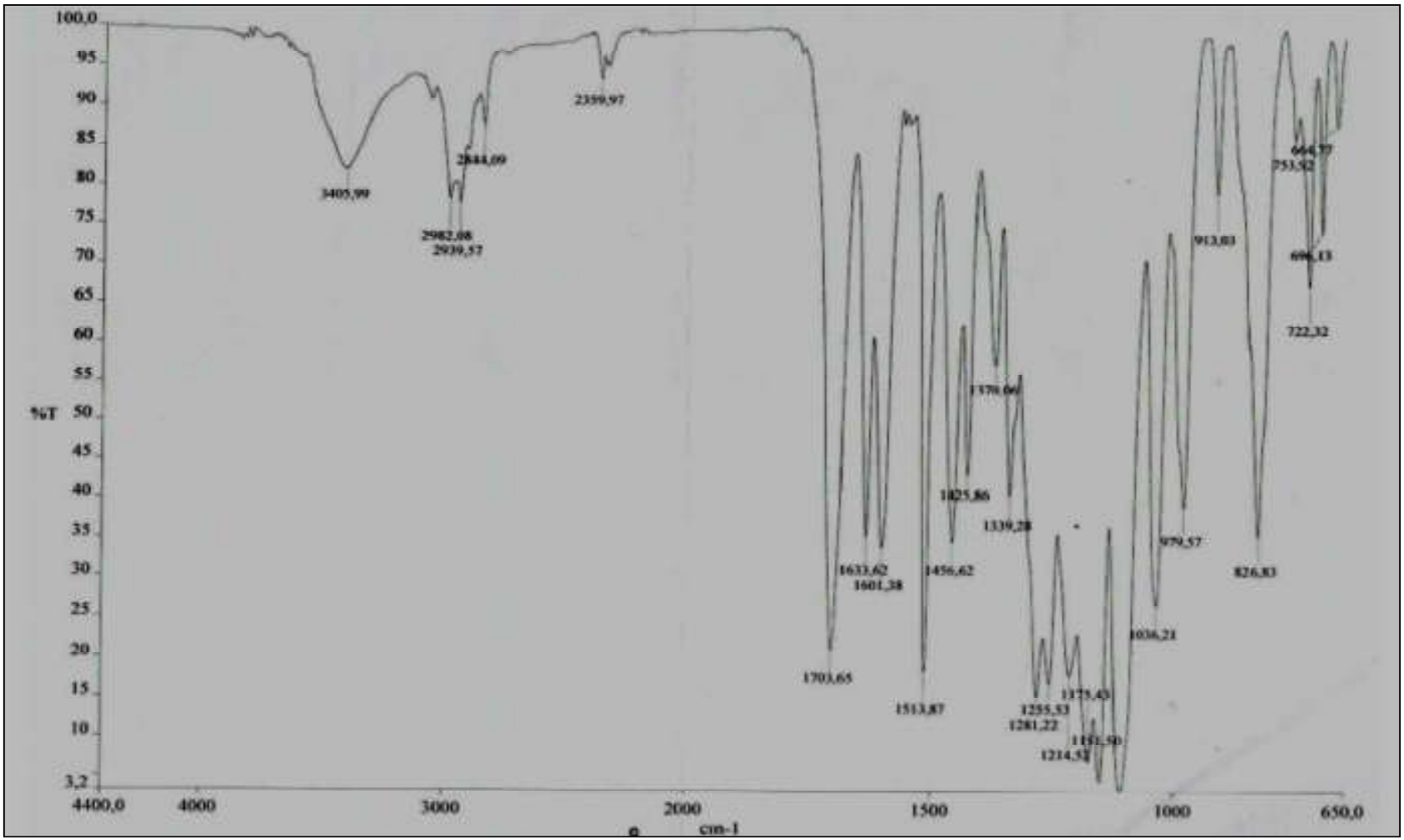
8.2.9 – Espectro de IV do 3-(3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila



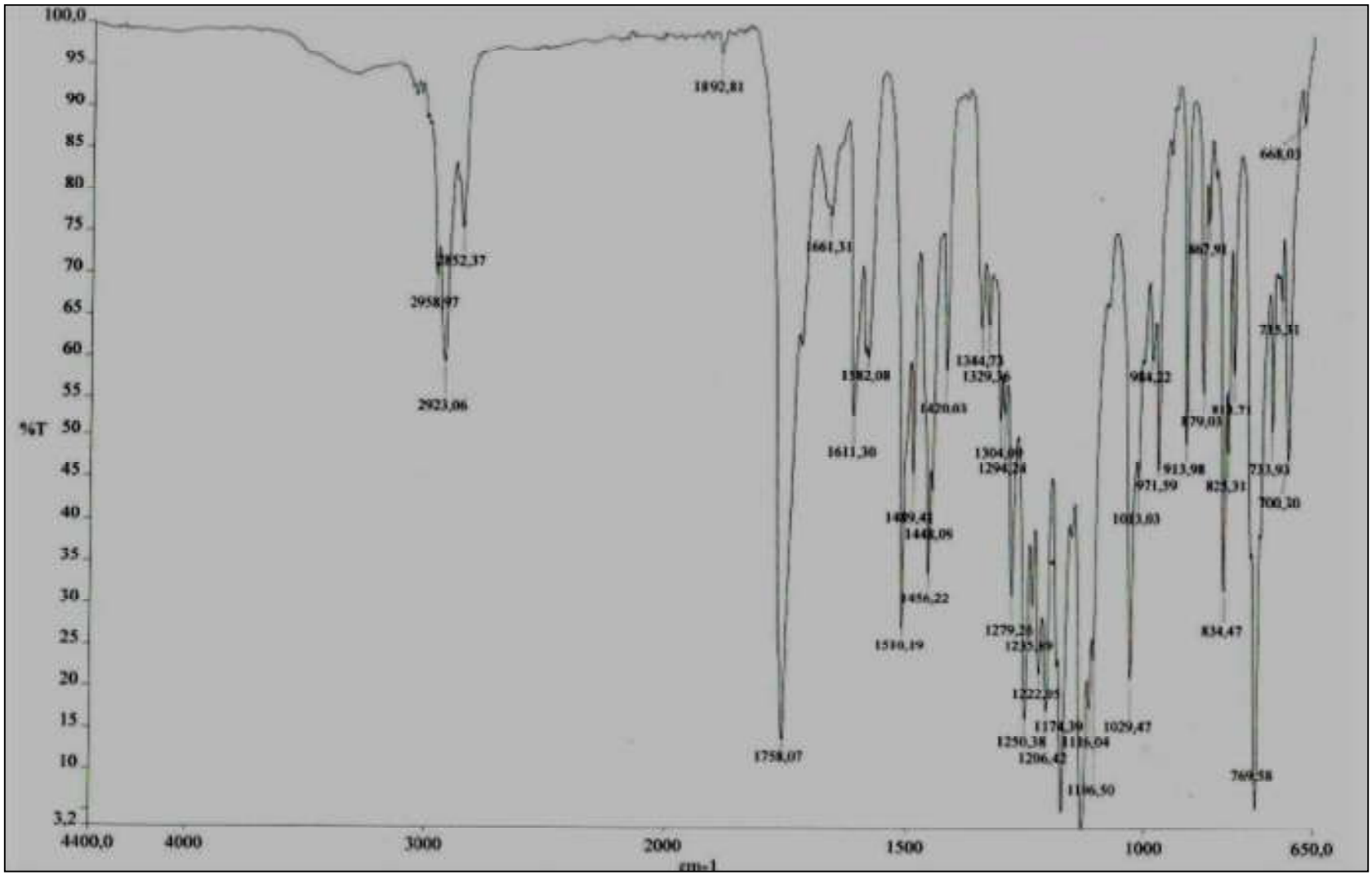
8.2.10 – Espectro de IV do 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenoato de etila



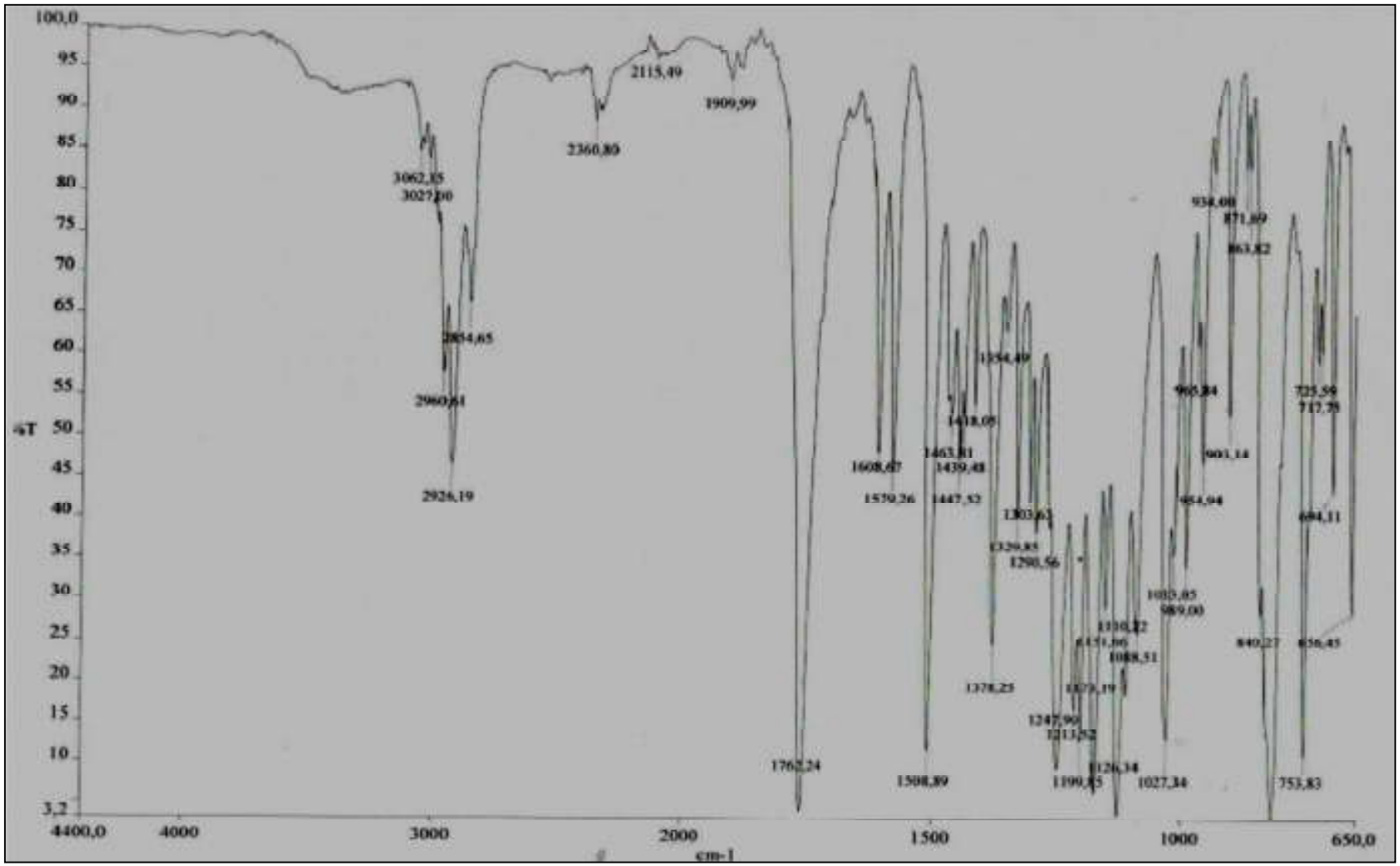
8.2.11 – Espectro de IV do 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-2-propenoato de etila



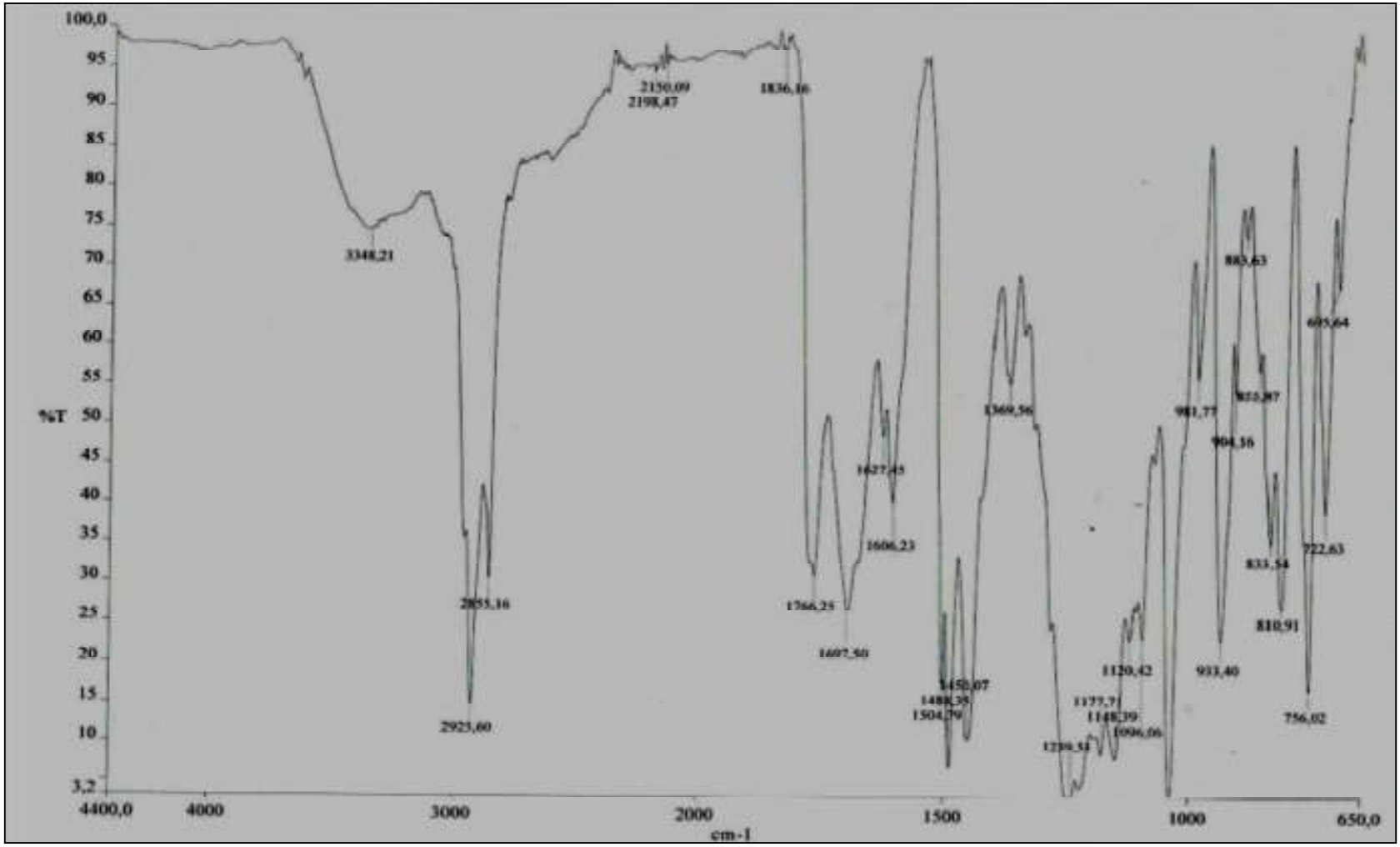
8.2.12 – Espectro de IV da 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona



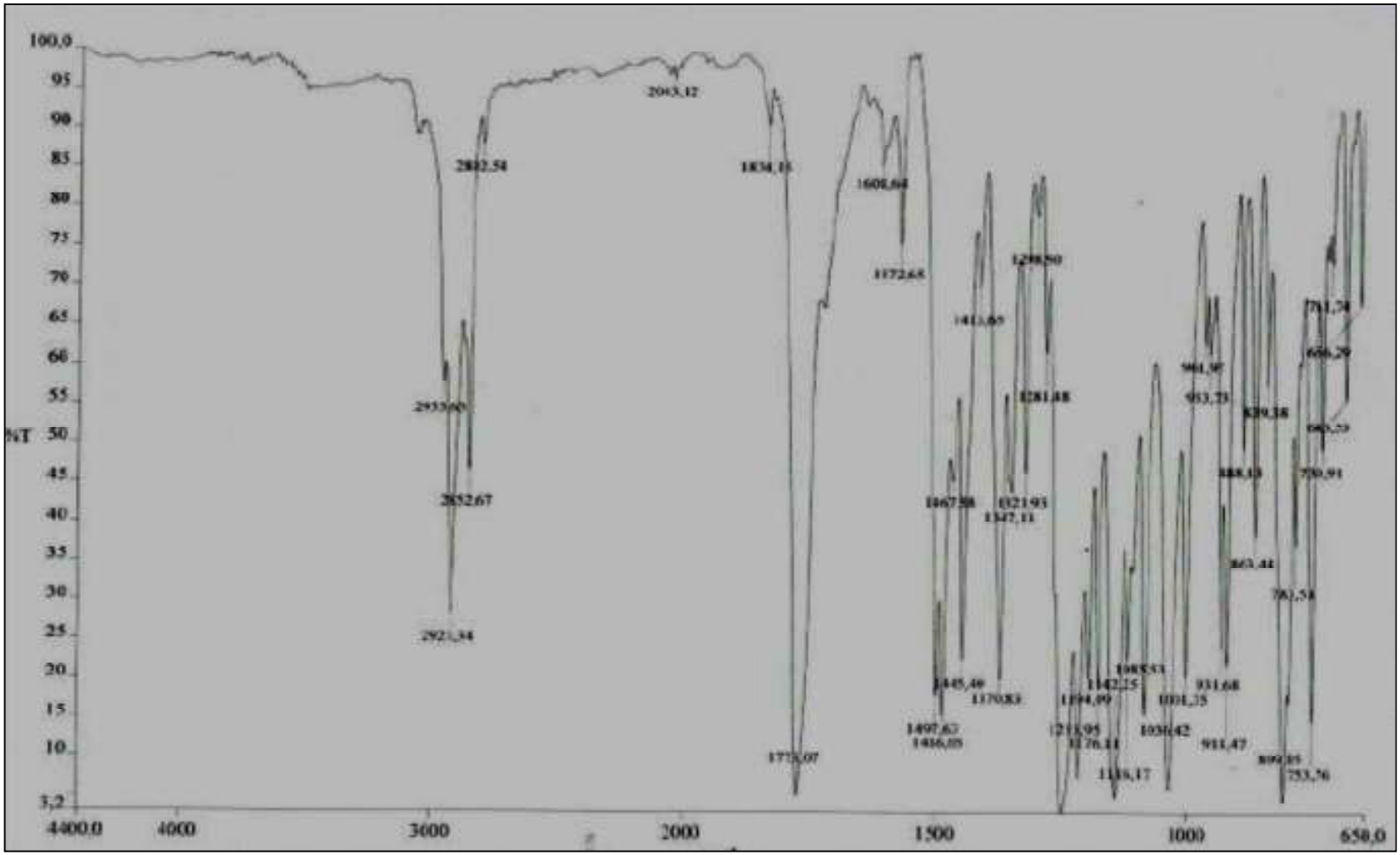
8.2.13 – Espectro de IV da 4-(4-metoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



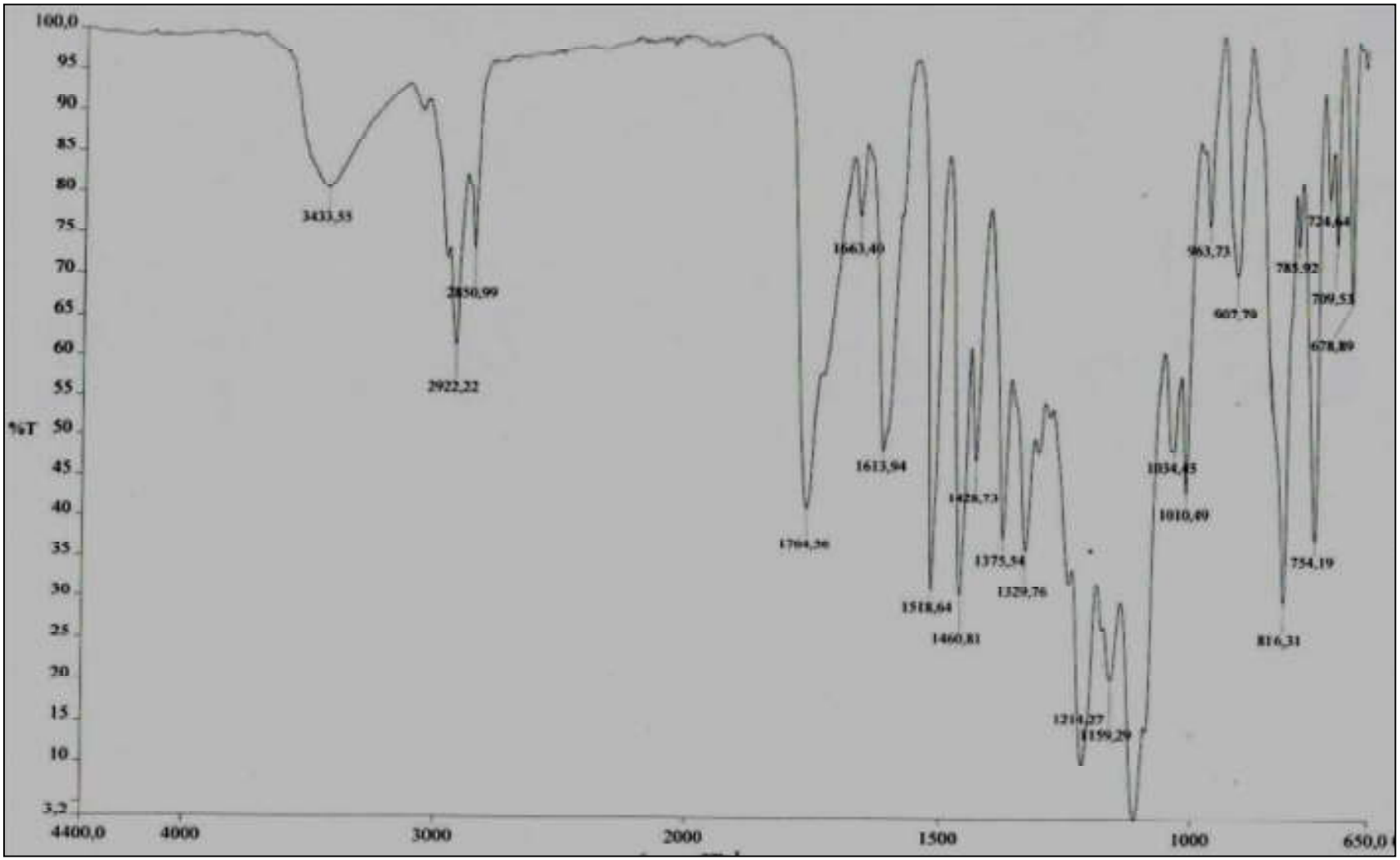
8.2.14 – Espectro de IV da 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona



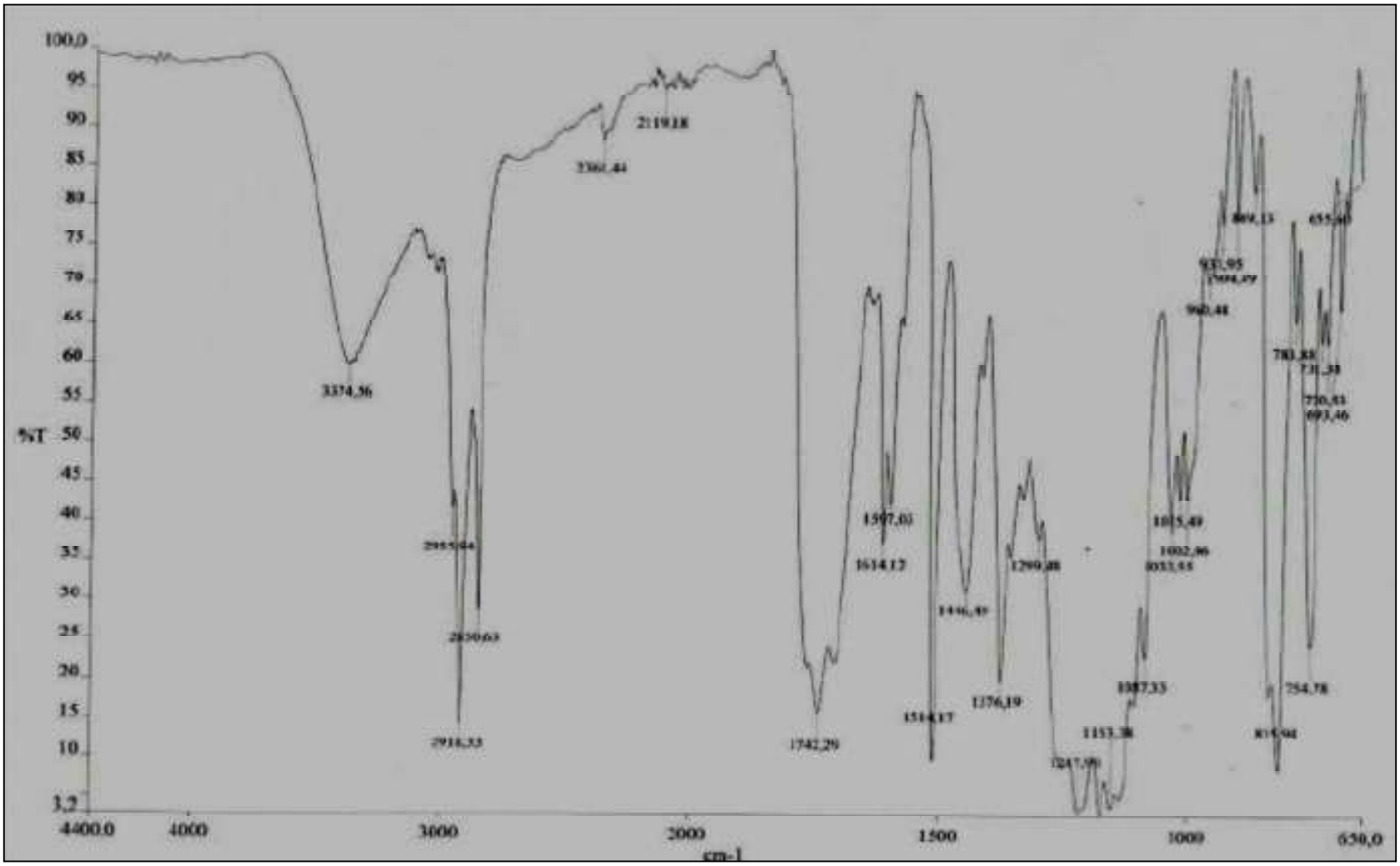
8.2.15 – Espectro de IV da 4-(1,3-dioxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



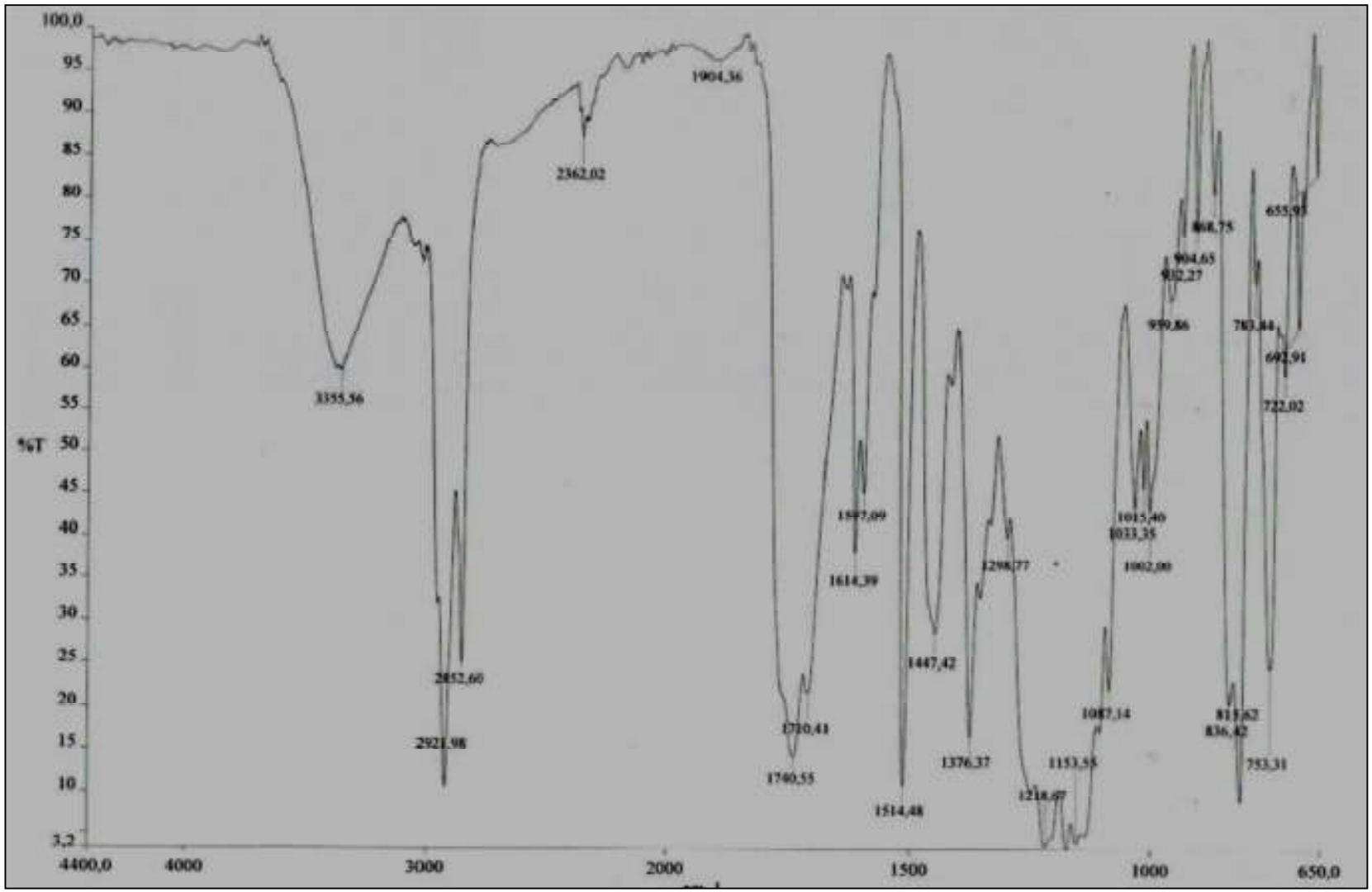
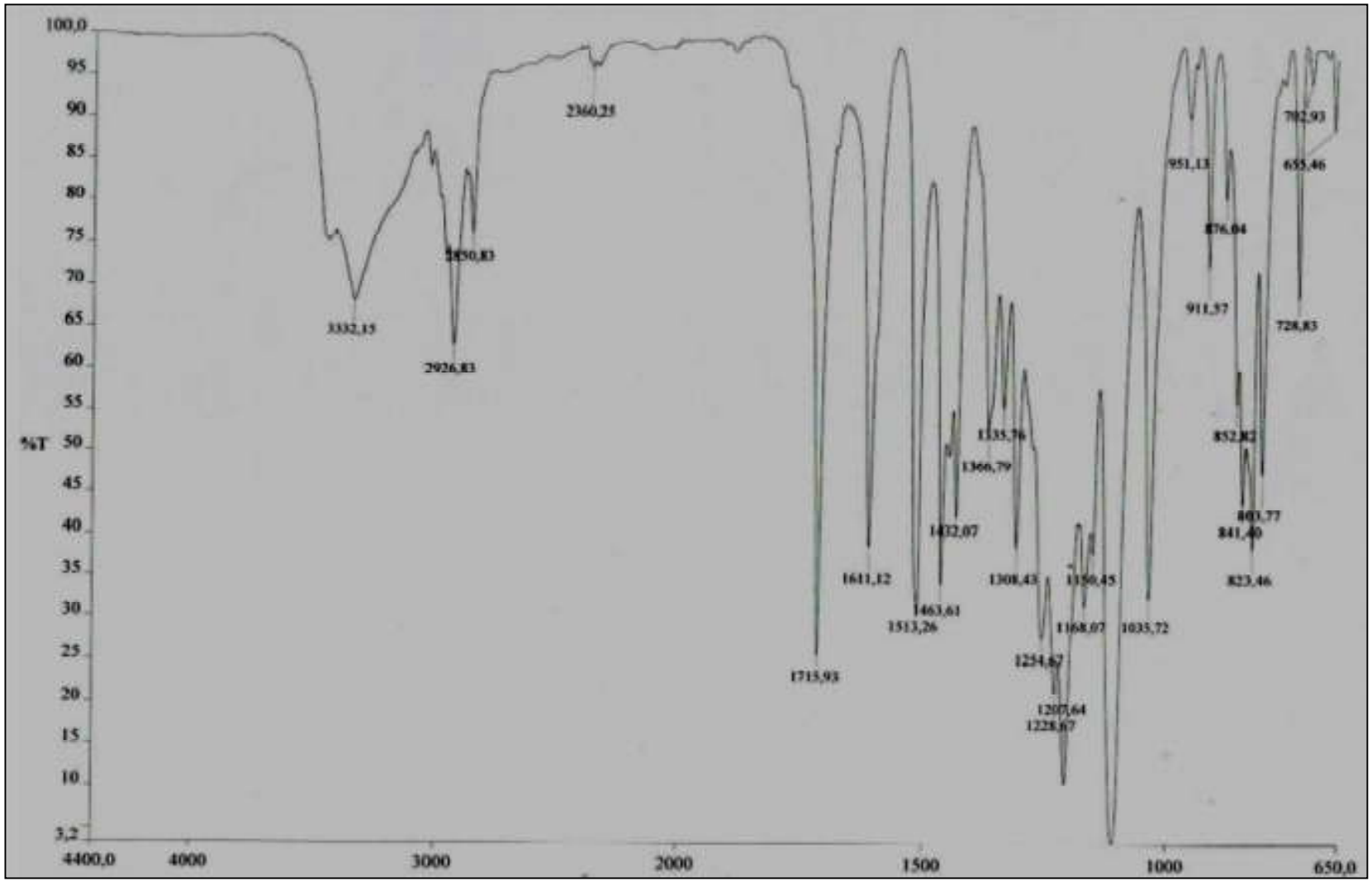
8.2.16 – Espectro de IV da 4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



8.2.17 – Espectro de IV da 4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-cromenona



8.2.18 – Espectro de IV da 4-(4-hidroxifenil)-3,4-diidro-2-benzocromenona



8.2.19 – Espectro de IV da 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3-(4-hidroxifenil) propanoato de etila