

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“SÍNTESE DE UMA COLEÇÃO DE CUMARINAS, POSSÍVEIS  
INIBIDORES DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE”**

**Lucas Campos Curcino Vieira\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

**Orientadora: Arlene Gonçalves Corrêa**

**\* bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP  
2010**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

V658sc

Vieira, Lucas Campos Curcino.

Síntese de uma coleção de cumarinas, possíveis  
inibidores da enzima acetilcolinesterase / Lucas Campos  
Curcino Vieira. -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
141 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2010.

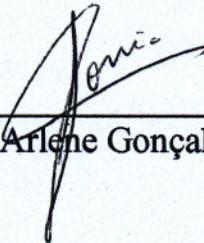
1. Síntese orgânica. 2. Cumarinas. 3. Acetilcolinesterase.  
4. Química orgânica. I. Título.

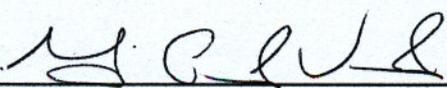
CDD: 547.2 (20<sup>a</sup>)

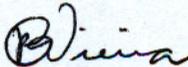
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Mestrado Acadêmico**

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico do candidato Lucas Campos Curcino Vieira, realizada em 13 de agosto de 2010:*

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Arlene Gonçalves Corrêa

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Marcia Paranho Veloso

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

Tornamos nosso mundo significativo  
pela coragem de nossas perguntas e  
pela profundidade de nossas respostas.

[ Carl Sagan ]

## **AGRADECIMENTOS**

- À minha família, em especial a minha mãe, pela educação, carinho, amor e incentivo que me ajudaram na conclusão deste projeto;
- A Profa. Dra. Arlene Gonçalves Corrêa pela orientação e confiança;
- A Vanessa, minha namorada, pelo apoio e amor oferecidos neste período;
- Aos amigos da república;
- Aos colegas do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais e do Departamento de Química;
- Aos técnicos do departamento pelos serviços prestados e pela amizade;
- A Profa. Dra. Carmem L. Cardoso (FFCL-RP, USP) pela colaboração nos bioensaios com acetilcolinesterase.
- A FAPESP pela bolsa concedida.

# **Lista de Abreviaturas**

AChE: enzima acetilcolinesterase

APTS: ácido *p*-toluenossulfônico

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CG: cromatógrafo à gás

$\delta$ : deslocamento químico

*d*: duplete

*dd*: duplo duplete

*df*: duplete largo

DMSO: dimetilsulfóxido

g: grama

IMER: Immobilized Enzyme Reactor

IV: infravermelho

*J*: constante de acoplamento

*m*: multiplete

*q*: quadruplete

RMN <sup>13</sup>C: ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN <sup>1</sup>H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

*s*: singleto

*sf*: singleto largo

*t*: tripleto

# **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Inibidores da AChE indicados para o tratamento da Doença de Alzheimer. ...	5
Tabela 2. Ésteres obtidos através irradiação de micro-ondas.....	23
Tabela 3. Rendimentos obtidos para os compostos ácidos <b>18</b> , <b>19</b> e <b>20</b> .....	26
Tabela 4. Síntese dos compostos <b>16</b> , <b>22</b> , <b>23</b> , <b>24</b> , <b>25</b> .....	29
Tabela 5. Síntese dos compostos <b>30</b> , <b>31</b> , <b>32</b> , <b>33</b> .....	42
Tabela 6. Resultado do Ensaio de Ellman.....	45
Tabela 7. Resultado do Ensaio de Marston.....	47
Tabela 8. Porcentagem de inibição da enzima AChE. ....	50
Tabela 9. Valores de IC <sub>50</sub> de inibição da enzima AChE. ....	53
Tabela 10. Condições reacionais para a obtenção das cumarinas ácidas. ....	60
Tabela 11. Condições reacionais para a obtenção das cumarinas ácidas. ....	62
Tabela 12. Condições reacionais para a obtenção das amidas. ....	64
Tabela 13. Condições reacionais utilizadas no Acoplamento de Suzuki (1).....	70
Tabela 14. Condições reacionais utilizadas no Acoplamento de Suzuki (2).....	71

# Lista de Figuras

Figura 1. Enzima Acetilcolinesterase.....	3
Figura 2. Medicamentos usados no tratamento da Doença de Alzheimer. ....	4
Figura 3. Alcalóides e cumarina com atividade inibitória da AChE.....	6
Figura 4. Cumarina.....	7
Figura 5. <b>a)</b> Warfarin (cumarina sintética); <b>b)</b> 8-metoxipsoraleno (Furanocumarina). ....	7
Figura 6. Exemplos de cumarinas. ....	8
Figura 7. Posições propostas para a inserção dos fragmentos piperidínicos.....	18
Figura 8. Proposta de síntese das cumarinas piperidínicas. ....	18
Figura 9. <b>a)</b> Intermediário <b>I</b> ; <b>b)</b> Ligação de hidrogênio intramolecular. ....	31
Figura 10. Substâncias padrões utilizadas nos ensaios com a AChE. ....	43
Figura 11. Compostos que não foi possível o ensaio no IMER. ....	48
Figura 12. Cromatograma produzido pelo IMER-AChE referente ao composto <b>17</b> . ....	48
Figura 13. Cromatograma produzido pelo IMER-AChE referente ao composto <b>16</b> . ....	49
Figura 14. Compostos que mostraram inibição da AChE.....	52
Figura 15. Gráfico de IC <sub>50</sub> do composto <b>27</b> . ....	53
Figura 16. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>9</b> . ....	81
Figura 17. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>9</b> . ....	82
Figura 18. Espectro de Infravermelho do composto <b>9</b> . ....	83
Figura 19. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>10</b> . ....	84
Figura 20. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>10</b> . ....	85
Figura 21. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>11</b> . ....	86
Figura 22. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>11</b> . ....	87
Figura 23. Espectro de Infravermelho do composto <b>11</b> . ....	88
Figura 24. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>12</b> . ....	89
Figura 25. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>12</b> . ....	90
Figura 26. Espectro de Infravermelho do composto <b>12</b> . ....	91
Figura 27. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>13</b> . ....	92
Figura 28. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>13</b> . ....	93
Figura 29. Espectro de Infravermelho do composto <b>13</b> . ....	94
Figura 30. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>14</b> . ....	95
Figura 31. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>14</b> . ....	96
Figura 32. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>15</b> . ....	97
Figura 33. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>15</b> . ....	98
Figura 34. Espectro de Infravermelho do composto <b>15</b> . ....	99
Figura 35. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>15</b> . ....	100
Figura 36. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>16</b> . ....	101
Figura 37. Espectro de Infravermelho do composto <b>16</b> . ....	102
Figura 38. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>17</b> . ....	103
Figura 39. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>17</b> . ....	104
Figura 40. Espectro de Infravermelho do composto <b>17</b> . ....	105
Figura 41. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>18</b> . ....	106
Figura 42. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>18</b> . ....	107
Figura 43. Espectro de Infravermelho do composto <b>18</b> . ....	108
Figura 44. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>19</b> . ....	109
Figura 45. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>19</b> . ....	110
Figura 46. Espectro de Infravermelho do composto <b>19</b> . ....	111
Figura 47. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>20</b> . ....	112

Figura 48. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>20</b> .....	113
Figura 49. Espectro de Infravermelho do composto <b>20</b> .....	114
Figura 50. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>22</b> .....	115
Figura 51. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>22</b> .....	116
Figura 52. Espectro de Infravermelho do composto <b>22</b> .....	117
Figura 53. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>23</b> .....	118
Figura 54. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>23</b> .....	119
Figura 55. Espectro de Infravermelho do composto <b>23</b> .....	120
Figura 56. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>24</b> .....	121
Figura 57. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>24</b> .....	122
Figura 58. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>25</b> .....	123
Figura 59. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>25</b> .....	124
Figura 60. Espectro de Infravermelho do composto <b>25</b> .....	126
Figura 61. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>26</b> .....	127
Figura 62. Espectro de Infravermelho do composto <b>26</b> .....	127
Figura 63. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>27</b> .....	128
Figura 64. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>27</b> .....	129
Figura 65. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>28</b> .....	130
Figura 66. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>28</b> .....	131
Figura 67. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>29</b> .....	132
Figura 68. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>29</b> .....	133
Figura 69. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>30</b> .....	134
Figura 70. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>30</b> .....	135
Figura 71. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>31</b> .....	136
Figura 72. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>31</b> .....	137
Figura 73. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>32</b> .....	138
Figura 74. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>32</b> .....	139
Figura 75. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>33</b> .....	140
Figura 76. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>33</b> .....	141

# **Lista de Esquemas**

Esquema 1. Proposta da rota biossintética de cumarinas em vegetais superiores. ....	9
Esquema 2. Reação de Pechmann. ....	10
Esquema 3. Reação de Perkin. ....	10
Esquema 4. Reação de Knoevenagel. ....	11
Esquema 5. Metodologia descrita por Kadnikov. ....	11
Esquema 6. Metodologia descrita por Li. ....	11
Esquema 7. Metodologia descrita por Liu. ....	12
Esquema 8. Metodologia empregada para a síntese das cumarinas. ....	19
Esquema 9. Obtenção do composto <b>9</b> . ....	19
Esquema 10. Obtenção do composto <b>10</b> . ....	21
Esquema 11. Benzaldeídos utilizados para a obtenção dos ésteres cumarínicos. ....	22
Esquema 12. Metodologia para a síntese de cumarinas utilizando micro-ondas. ....	22
Esquema 13. Mecanismo da reação de Knoevenagel. ....	24
Esquema 14. Tentativa de obtenção das amidas via reação de amidação. ....	24
Esquema 15. Obtenção do composto <b>17</b> . ....	25
Esquema 16. Obtenção do composto <b>15</b> . ....	27
Esquema 17. Síntese de amidas catalisada por ácido fenilborônico. ....	30
Esquema 18. Síntese de amidas cumarínicas catalisada por ácido fenilborônico. ....	31
Esquema 19. Síntese de 2-amido-cromonas. ....	31
Esquema 20. Metodologia para a síntese do composto <b>26</b> . ....	32
Esquema 21. Tentativa de redução das amidas piperidínicas. ....	34
Esquema 22. Síntese do composto <b>27</b> . ....	35
Esquema 23. Síntese do composto <b>28</b> . ....	36
Esquema 24. Mecanismo da reação multicomponente. ....	37
Esquema 25. Acoplamento de Suzuki. ....	38
Esquema 26. Retrossíntese dos compostos via acoplamento de Suzuki. ....	39
Esquema 27. Síntese do composto <b>29</b> . ....	39
Esquema 28. Acoplamento de Suzuki (Prediger <i>et al.</i> (2006)). ....	40
Esquema 29. Ácidos borônicos testados no acoplamento de Suzuki. ....	41
Esquema 30. Acoplamento de Suzuki (Moteki e col (2008)). ....	41
Esquema 31. Mecanismo do Acoplamento de Suzuki. ....	43
Esquema 32. Catálise da hidrólise da acetiltiocolina e reação de Ellman. ....	44
Esquema 33. Hidrólise do acetato de $\alpha$ -naftila e a reação com Fast Blue B. ....	46

# Resumo

## **Síntese de uma coleção de cumarinas, possíveis inibidores da enzima acetilcolinesterase**

A Doença de Alzheimer está associada à redução das taxas de acetilcolina (ACh) no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical, além de outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P em menor extensão. Alguns medicamentos empregados para o tratamento da Doença de Alzheimer disponíveis no mercado são inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). Este trabalho teve como objetivos: sintetizar uma coleção de cumarinas, avaliar os compostos sintetizados com relação à atividade inibitória da enzima AChE em IMERs (*Immobilized Enzyme Reactor*), a fim de fornecer subsídios para o estudo da relação estrutura-atividade destes compostos e o desenho racional de possíveis fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer.

Durante o desenvolvimento do projeto empregou-se a condensação de Knoevenagel entre salicilaldeídos e malonato de dietila para a obtenção da estrutura padrão da cumarina. As derivações na estrutura das cumarinas foram realizadas através de reações de amidação, substituição nucleofílica, reação multicomponente e acoplamento cruzado.

A reação de Suzuki se mostrou uma ferramenta interessante para a obtenção de cumarinas substituídas na posição 8, visto que não se tem relatos na literatura sobre o emprego de reações acoplamento cruzado para a síntese de cumarinas substituídas nesta posição. No total foram sintetizados 23 compostos.

A atividade inibitória dos compostos sintetizados foi avaliada utilizando o método de Ellman adaptado a um IMER, que oferece a vantagem da fase estacionária produzida manter a atividade da enzima com superior estabilidade e assim poder ser utilizada múltiplas vezes e em fluxo. Dentre a coleção de cumarinas sintetizada, o 2-oxo-7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)-2H-cromeno-3-carboxilato de etila mostrou-se como o melhor inibidor para a AChE, apresentando um IC<sub>50</sub> de 6,3 µM.

# **Abstract**

## Synthesis of a coumarin collection, possible inhibitors of acetylcholinesterase enzyme

Alzheimer's disease is associated with decreased rates of acetylcholine (ACh) in synaptic process, decreasing the cortical cholinergic transmission, and other neurotransmitters such as norepinephrine, dopamine, serotonin, glutamate and substance P in lesser extension. Some drugs used to treat Alzheimer's disease available in the market are inhibitors of acetylcholinesterase enzyme (AChE). The aim of this work was synthesize and evaluate a library of coumarins with respect to inhibitory activity against AChE in IMERs (*Immobilized Enzyme Reactor*). This study could contribute to establish the structure-activity relationships and the rational design of possible drugs to treat the Alzheimer's disease.

During the development of the project it was used the Knoevenagel condensation between salicylaldehydes and diethyl malonate to obtain coumarins. The functionalization of the coumarins had been carried by amidation, nucleophilic substitution, multicomponent and cross coupling reactions. The Suzuki reaction has proved to be an interesting tool to obtain 8-substituted coumarins, a method that has not yet been described in the literature. In total 23 compounds were synthesized.

The inhibitory activity of the synthesized compounds was evaluated using Ellman's method adapted to a IMER, which offers the advantage of the stationary phase retains the activity of the enzyme with superior stability and thus it can be used multiple times and in flow. Among the synthesized coumarins, ethyl 2-oxo-7-(2-(piperidin-1-yl)ethoxy)-2*H*-chromene-3-carboxylate proved to be the best inhibitor for AChE, with an  $IC_{50}$  of 6.3  $\mu$ M.

## Sumário

1. Introdução .....	2
1.1. Doença de Alzheimer .....	2
1.2. Acetilcolinesterase .....	3
1.3. Inibidores da Acetilcolinesterase .....	4
1.4 - Cumarinas.....	7
1.5 – Síntese de Cumarinas .....	9
1.6. Cromatografia por Afinidade .....	12
2 - Objetivos .....	16
3 – Resultados e Discussões .....	18
3.1 – Obtenção dos análogos piperidínicos substituídos na posição 3 .....	19
3.1.1 – Obtenção dos análogos 2oxo-2 <i>H</i> -3-cromenocarboxilato de etila .....	19
3.1.2 – Tentativa de obtenção das amidas piperidínicas via Rota A.....	24
3.1.3 – Obtenção dos análogos 2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxílico .....	25
3.1.4 – Obtenção das amidas piperidínicas via Rota B .....	27
3.1.5 - Outras metodologias testadas para a obtenção das amidas.....	29
3.1.6 – Tentativa de redução das amidas piperidínicas .....	33
3.2 – Obtenção do análogo piperidínico substituído na posição 7.....	34
3.3 – Obtenção dos análogos piperidínicos substituídos na posição 8 .....	36
3.3.1 – Reação Multicomponente .....	36
3.3.2 – Acoplamento de Suzuki .....	38
3.4 – Ensaio Biológicos.....	43
3.4.1 – Ensaio de Ellman .....	44
3.4.2 – Ensaio de Marston.....	45
3.4.2 – Ensaio no IMER.....	47
4. Conclusões.....	56
5. Procedimento Experimental .....	58
5.1. Aspectos Gerais .....	58
5.2. Obtenção do 7-hidroxi-2oxo-2 <i>H</i> -3-cromenocarboxilato de etila (9).....	59
5.3. Obtenção do 7-metoxi-2oxo-2 <i>H</i> -3-cromenocarboxilato de etila (10).....	59
5.4. Obtenção dos compostos 11 - 14.....	60
5.5. Tentativa de obtenção dos compostos 15 e 16. ....	62
5.6. Obtenção das cumarinas ácidas 17 - 20.....	62

5.7. Obtenção das amidas cumarínicas 15, 16, 22 - 25.....	64
5.8. Tentativa de obtenção das amidas via reação de amidação catalisada por ácido borônico. .....	66
5.9. Obtenção do <i>N</i> -butil-7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxamida (26). ....	67
5.10. Tentativa de redução das amidas piperidínicas. ....	67
5.11. Obtenção do 2-oxo-7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxilato de etila (27)..	68
5.12. Obtenção do 7-hidroxi-2-oxo-8-(piperidin-1-ilmetil)-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxilato de etila (28). ....	68
5.13. Obtenção do 7-hidroxi-8-iodo-2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carboxilato de etila (29).....	69
5.14. Obtenção dos compostos 30, 31 (sem PPh <sub>3</sub> ). ....	69
5.15. Obtenção dos compostos 30 - 33 (com PPh <sub>3</sub> ). ....	70
6. Refêrências Bibliográficas .....	74

# Introdução

# 1. Introdução

## 1.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa, de impacto socioeconômico, responsável por cerca de 50 a 60% do número total de casos de demência dentre pessoas acima dos 65 anos (VIEGAS JR *et al.*, 2004a). Esta patologia afeta cerca de 1,5% da população em idade entre 65-69 anos, 21% entre 85-86 e 39% acima dos 90 anos, acometendo aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo.

O processo degenerativo progressivo das funções psicomotoras e cognitivas, descrito inicialmente pelo patologista alemão Alois Alzheimer em 1907, dura de 8,5 a 10 anos, desde o aparecimento dos primeiros sintomas clínicos até a morte do paciente. As regiões cerebrais associadas às funções mentais superiores, particularmente o córtex frontal e o hipocampo, são aquelas mais comprometidas pelas alterações bioquímicas decorrentes da doença.

Embora sua etiologia não seja totalmente conhecida, fatores genéticos são extremamente relevantes para o desenvolvimento desta doença, pois, além da idade, a existência de membro da família com demência é o único fator sistematicamente associado, presente em 32,9% dos casos diagnosticados. A Doença de Alzheimer é transmitida de forma autossômica dominante e as características de idade de início e evolução identificam subtipos diferentes com correlatos genéticos. Por ser autossômica dominante, a penetração é completa, entretanto a manifestação observada na prole não é de 50%, mas de aproximadamente 25%. A redução da manifestação sugere que outros fatores devam fazer parte do processo da doença, caracterizando sua multifatorialidade (HEYMAN, 1996).

Dentre as causas mais evidentes da gênese da doença estão a ocorrência de deposição extracelular do peptídeo  $\beta$ -amilóide em plaquetas senis e a formação errática de neurofibrilas intracelulares. Todo esse processo resulta em perda da função neuronal e dano sináptico, com subsequente comprometimento da memória, da

coordenação motora e do raciocínio, além da perda da capacidade cognitiva e demência (VIEGAS JR *et al.*, 2004a).

Em nível celular, a Doença de Alzheimer está associada à redução das taxas de acetilcolina (ACh) no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical, além de outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P em menor extensão.

## 1.2. Acetilcolinesterase

A enzima acetilcolinesterase (AChE) (FIGURA 1), também chamada *Colinesterase de glóbulo vermelho (CGV)*, *colinesterase verdadeira (eritrocitária)*, ou (mais formalmente) acetilcolina acetil-hidrolase, está presente principalmente nas hemácias, sinapses (terminações nervosas) e músculos estriados.

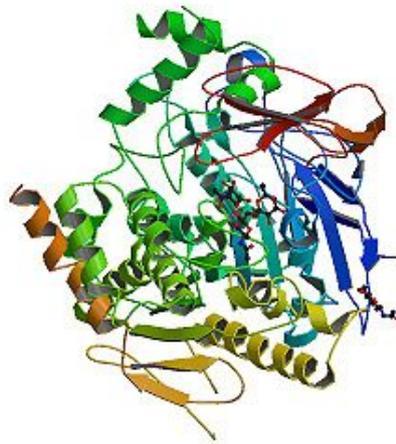


Figura 1. Enzima Acetilcolinesterase.

A pseudocolinesterase, também conhecida como *colinesterase sérica*, *butirilcolinesterase*, ou (mais formalmente) *acilcolina acil-hidrolase*, é encontrada principalmente no fígado, no plasma, no pâncreas e no intestino delgado.

Ambas as enzimas catalizam a hidrólise (destruição) do neurotransmissor acetilcolina restante no espaço sináptico em colina e ácido acético, reação necessária para permitir que o neurônio colinérgico retorne a seu estado de repouso após a ativação, evitando assim uma transmissão excessiva de acetilcolina, que produziria uma sobre estimulação do músculo e, como consequência, debilidade e cansaço

(METZLER, 2001). A diferença entre os dois tipos de colinesterase está na seletividade por substratos: enquanto a AChE hidrolisa acetilcolina, a outra hidrolisa butirilcolina preferencialmente.

Um anticolinesterásico é um inibidor da colinesterase. Devido à sua função essencial, os elementos químicos que interferem com a ação da colinesterase são potentes neurotoxinas, causando excessiva salivação e olhos lacrimejantes em baixas doses, seguido por espasmos musculares e finalmente a morte. Mas além de armas bioquímicas e agrotóxicos, os anticolinesterásicos são também utilizados em anestésias ou no tratamento da miastenia gravis, glaucoma e doença de Alzheimer (MUSIAL *et al.*, 2007).

### 1.3. Inibidores da Acetilcolinesterase

Alguns medicamentos empregados para o tratamento da Doença de Alzheimer disponíveis no mercado são inibidores da AChE (Figura 2).

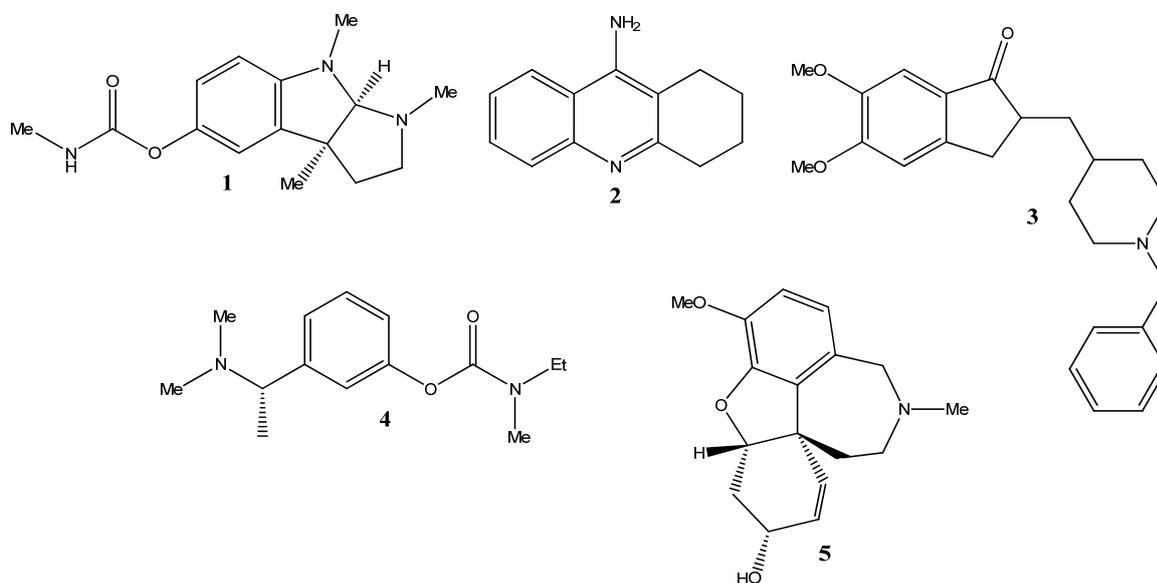


Figura 2. Medicamentos usados no tratamento da Doença de Alzheimer.

A flostigmina (1) (Synapton®), um alcalóide isolado em 1864 de *Physostigma venenosum* (Fabraceae), foi o primeiro inibidor da AChE usado em terapia (ORHAN *et al.*, 2006). A tacrina (2) (Cognex®) foi o primeiro medicamento aprovado pelo *US Food and Drug Administration* (FDA). O donepezil hidrocloreto (Aricept®) (3) foi

aprovado pelo FDA em 1996. A rivastigmina (Exelon®) (4) é um inibidor pseudo-irreversível da AchE. A galantamina (Reminyl®) (5) foi isolada de *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae), e é indicada para o tratamento da doença de Alzheimer de intensidade leve e moderada, atualmente aprovada em 69 países, inclusive o Brasil, desde 2000. Vários derivados ou análogos destes fármacos estão hoje em testes pré-clínicos ou clínicos. Na Tabela 1 são descritos alguns efeitos colaterais destes medicamentos.

Tabela 1. Inibidores da AChE indicados para o tratamento da Doença de Alzheimer.

<b>Fármaco</b>	<b>Janela Terapêutica (mg/dia)</b>	<b>Posologia Diária</b>	<b>Efeitos Colaterais</b>
Tacrina	40-160	4 doses	hepatotoxicidade em 30-50% monitorização das transaminases
Donepezil	5-10	Dose única	interações medicamentosas: varfarina, quinidina, digitálicos, cetoconazol, itraconazol, corticóides, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, fenitoína, carbamazepina
Rivastigmina	3-12	2 doses	inibição da butiril-colinesterase efeitos colaterais periféricos; interação com fluoxetina, haloperidol e tioridazina

Devido aos graves efeitos colaterais apresentados pelos medicamentos empregados atualmente, a busca por novos inibidores da AChE continua sendo bastante importante. Vários trabalhos estão descritos na literatura, tanto empregando produtos naturais quanto sintéticos (LOIZZO et al., 2008; MUSIAL et al., 2007; ORHAN et al., 2006).

Dentre os compostos que apresentam maior atividade inibitória da AChE estão a classe dos alcalóides piperidínicos e as cumarinas. Bolzani e col. relataram a

atividade inibitória do alcalóide natural (-)-espectralina (**6**), isolada de flores de *Senna spectabilis* (Fabaceae) (VIEGAS JR *et al.*, 2004b; VIEGAS JR *et al.*, 2005). Derivados piperidínicos sintéticos análogos à espectralina, também mostraram atividades bastante interessantes frente a AChE (CASTRO *et al.*, 2008).

Além dos derivados de produtos naturais, também são encontrados compostos piperidínicos sintéticos que apresentam interessante atividade inibitória frente a AChE; Ghiron *et al.* (2010) reportaram a síntese de uma coleção de derivados piperidínicos frente a inibição da AChE, dentre os quais o composto **7** apresentou um  $EC_{50}$  de 70nM. Além dos alcalóides, outra classe de compostos com atividade inibitória da AChE é a das cumarinas (DOS SANTOS *et al.*, 2008). Por exemplo, Piazzini *et al.* (2008) descreveram a síntese de derivados cumarínicos sendo que o composto **8** apresentou um  $IC_{50}$  de 18,3 nM (Figura 3).

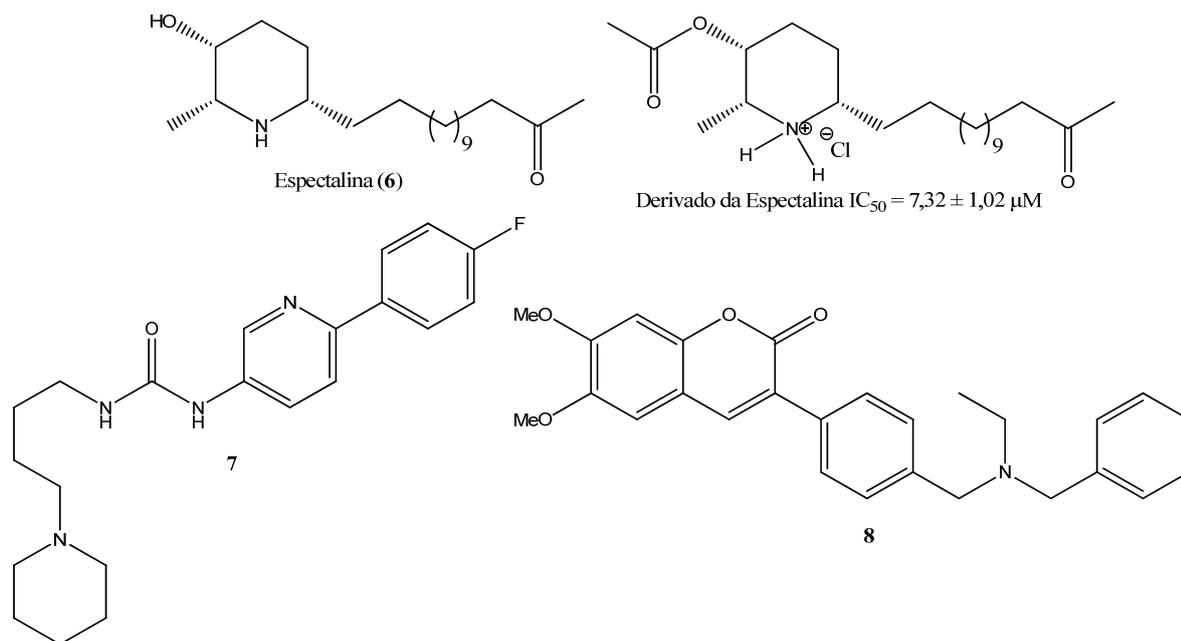


Figura 3. Alcalóides e cumarina com atividade inibitória da AChE.

## 1.4 - Cumarinas

As cumarinas (Figura 4) pertencem a uma família ampla de metabólitos de plantas chamada benzopiranonas, com mais de 1500 representantes em mais de 800 espécies. Nas plantas, esses compostos podem ocorrer no tegumento, frutas, flores, raízes, folhas e caules, embora, em geral, maiores concentrações são encontradas em frutas e flores (CROTEAU *et al.*, 2000).

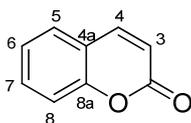


Figura 4. Cumarina

Suas funções nas plantas parecem estar principalmente relacionadas com a defesa, dada a sua atividade antimicrobiana, anti-alimentar e propriedades inibitórias de germinação. As propriedades mais bem conhecidas das cumarinas indiretamente destacam seu papel na defesa da planta. Ingerir cumarinas de tais plantas, como o trevo, pode causar hemorragia interna em mamíferos. Esta descoberta, em última instância levou ao desenvolvimento do rodenticida Warfarin (Figura 5a) e ao uso de relacionados compostos para tratar e prevenir acidente vascular cerebral. Da mesma forma, o composto fotossensibilizante 8-metoxipsoraleno, presente no tecido foliar de *Heracleum mantegazzianum*, pode causar fotofitodermatites quando em contato com a pele e posterior exposição à radiação UV-A (Figura 5b) (CROTEAU *et al.*, 2000).

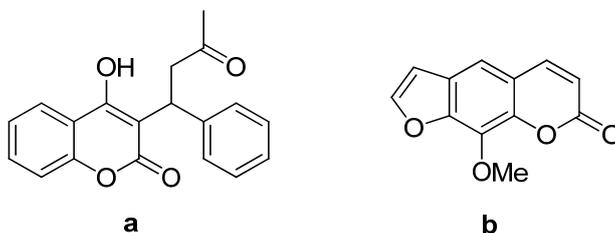


Figura 5. **a**) Warfarin (cumarina sintética); **b**) 8-metoxipsoraleno (Furanocumarina).

A comparável forma de dermatite induzida pela cumarina pode também ocorrer durante o manuseio do aipo. Psoraleno (Figura 6), no entanto, é agora usado com sucesso para tratar várias desordens da pele (eczema, psoríase), por meio de uma combinação de ingestão oral e tratamento UV-A. Outras famílias de cumarias incluem:

furanocumarinas lineares (por exemplo, psoraleno), furanocumarinas angulares (por exemplo, angelicina), piranocumarinas (por exemplo, seselina), e cumarinas substituídas (por exemplo, 4-hidroxicumarina) (CROTEAU *et al.*, 2000).

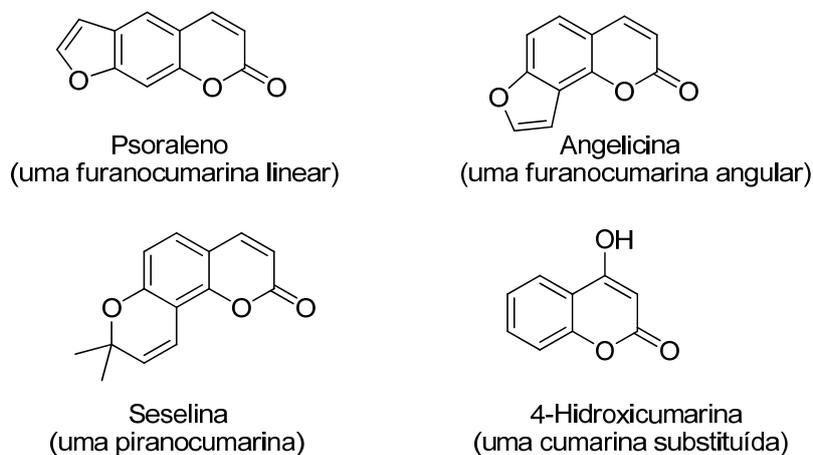
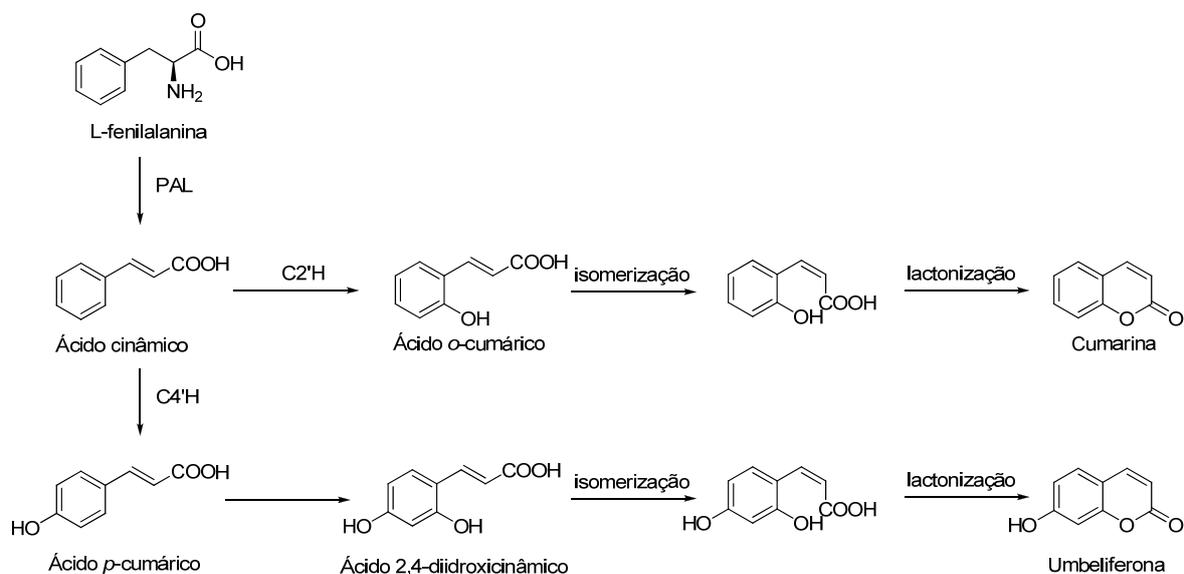


Figura 6. Exemplos de cumarinas.

As cumarinas são biossintetizadas através da rota do ácido chiquímico, derivadas do metabolismo da fenilalanina. A enzima fenilalanina amonialiase (PAL) é a responsável entre o metabolismo primário e o secundário por catalisar a desaminação da L-fenilalanina (metabólito primário) produzindo o ácido *trans*-cinâmico. O ácido *trans*-cinâmico é *p*-hidroxilado através da ação da enzima cinamato 4'-hidroxilase resultando no ácido *p*-cumárico (DOUGLAS, 1996). Ao contrário do que geralmente ocorre, a hidroxilação do ácido cinâmico ou do ácido *p*-cumárico pode ocorrer *orto* a cadeia lateral originando o ácido *o*-cumárico e o ácido 2,4-diidroxicumárico respectivamente (DEWICK, 1997). Após a hidroxilação, os ácidos hidroxicinâmicos sofrem isomerização da forma *trans* para *cis* (WATERMAN *et al.*, 1994). Na natureza, as isomerizações *trans/cis* e a lactonização são mediadas por enzimas. O ácido *o*-cumárico e o ácido *p*-cumárico dão origem a cumarina e umbeliferona, respectivamente (DEWICK, 1997). As etapas seguintes são dependentes das características gênicas da planta, podendo estar envolvidas duas ou mais rotas específicas na biogênese das cumarinas (Esquema 1).



abreviações: PAL (fenilalanina amonilase); C2'H (cinamato 2'-hidroxilase); C4'H (cinamato 4'-hidroxilase)

Esquema 1. Proposta da rota biossintética de cumarinas em vegetais superiores.

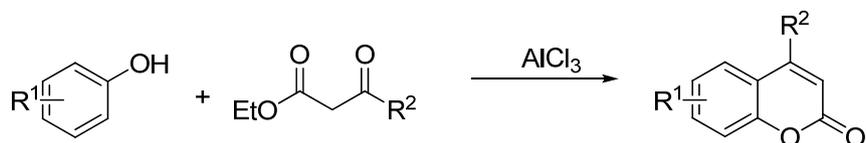
Vários fungos e leveduras também biossintetizam cumarinas, por exemplo, as aflatoxinas. No entanto, estes metabólitos são derivados policetídeos e, portanto, são análogos bioquimicamente distintos (CROTEAU *et al.*, 2000).

## 1.5 – Síntese de Cumarinas

Vários são os métodos empregados para a síntese de cumarinas. Dentre as metodologias mais utilizadas podemos destacar as reações de Pechmann (PECHMANN *et al.*, 1984; DE *et al.*, 2005; POTDAR *et al.*, 2001), Perkin (QUEZADA *et al.*, 2010; MATOS *et al.*, 2009), Knoevenagel (YU *et al.*, 2009; ALVIM JR. *et al.*, 2003), Reformatsky e Wittig (YAVARI *et al.*, 1998). Essas reações conduzem à obtenção de cumarinas com substituições no C-4 e C-3. A obtenção de diidro-cumarinas (ausência da dupla entre o C-3 e C-4) pode ser realizada através da reação de hidroarilação entre fenóis e derivados do ácido cinâmico em meio ácido (AOKI *et al.*, 2005).

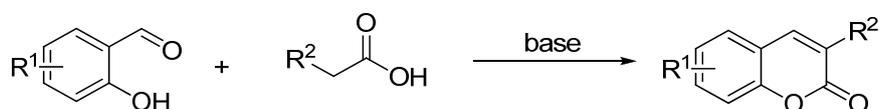
A reação de Pechmann (Esquema 2) é o método mais amplamente aplicado para a síntese de cumarinas já que envolve a condensação de fenóis com  $\beta$ -ceto ésteres na presença de um agente ácido de condensação, levando a cumarinas

substituídas na posição 4 em bons rendimentos. Entre os catalisadores ácidos que têm sido utilizados na reação de Pechmann, estão o ácido sulfúrico, pentóxido de fósforo, cloreto de alumínio, ácido trifluoroacético e muitos outros (JOHN *et al.*, 1961; HOEFNAGEL *et al.*, 1995).



Esquema 2. Reação de Pechmann.

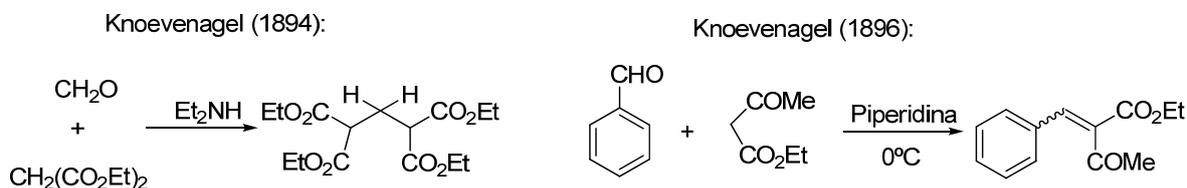
Em 1868, W. H. Perkin descreveu a síntese *one-pot* de uma cumarina pelo aquecimento do sal de sódio de salicilaldeído em anidrido acético (PERKIN, 1868). Após este primeiro relato, Perkin investigou o alcance e a limitação do processo e descobriu que ele poderia ser bem adaptado para a eficiente síntese de ácido cinâmicos e cumarinas (PERKIN, 1877). A condensação de salicilaldeídos com ácidos carboxílicos alifáticos, na presença de uma base fraca, permite a síntese de cumarinas substituídas na posição 3 (Esquema 3).



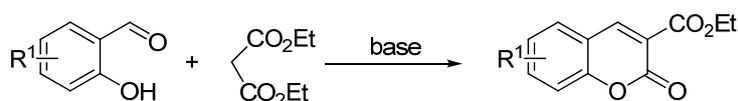
Esquema 3. Reação de Perkin.

Em 1894, E. Knoevenagel relatou a condensação de malonato de dietila com formaldeído catalisada por dietilamina, formando como produto o aduto *bis*-dicarboxilato. Ele encontrou o mesmo tipo de aduto *bis*, quando o formaldeído e outros aldeídos foram condensados com benzoilacetato de etila ou acetilacetona na presença de aminas primárias e secundárias. Dois anos depois, em 1896, Knoevenagel realizou a reação entre benzaldeído e acetoacetato de etila a 0°C usando piperidina como catalisador e obteve benzilideno acetoacetato de etila como único produto. A reação de aldeídos e cetonas com compostos metilênicos ativos na presença de uma base fraca permite a síntese de compostos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados. A reação de Knoevenagel realizada utilizando salicilaldeídos e compostos dicarboxílicos leva a formação de

compostos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados e posteriormente ocorre uma reação de esterificação intra-molecular fornecendo assim a estrutura da cumarina (Esquema 4).



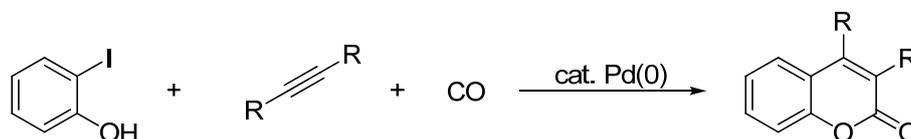
Condensação de Knoevenagel (Síntese de Cumarinas):



Esquema 4. Reação de Knoevenagel.

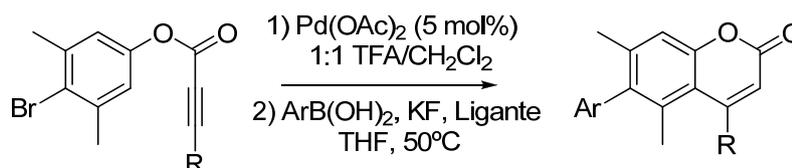
As cumarinas também podem ser sintetizadas através de reações catalisadas por metais de transição e reações em fase sólida.

Kadnikov e col. (2000) reportaram a síntese de cumarinas através do acoplamento catalisado por paládio de iodofenóis com alquinos internos e monóxido de carbono (Esquema 5). A síntese emprega condições reacionais brandas e pode ser utilizada uma ampla variedade de grupos funcionais tanto no alquino quanto no fenol.



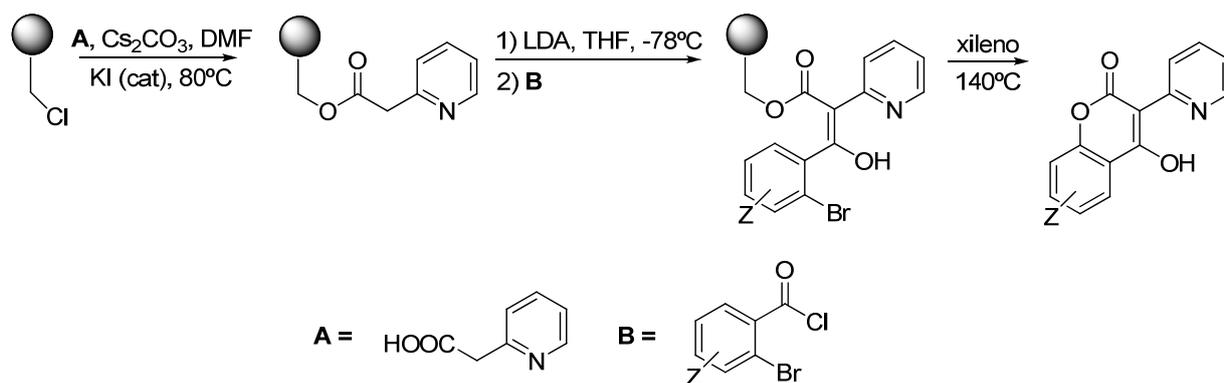
Esquema 5. Metodologia descrita por Kadnikov.

Li e col. (2005) descreveram a síntese de uma coleção de cumarinas bromadas por meio da cicloisomerização eletrofílica de bromo arilpropiolatos, catalisada por paládio. As cumarinas bromadas sintetizadas podem ser diversificadas estruturalmente pela redução do catalisador Pd(II) para Pd(0) seguida pelos acoplamentos de Suzuki, Sonogashira, Heck, ou Hartwig-Buchwald (Esquema 6).



Esquema 6. Metodologia descrita por Li.

Liu e col. (2006) produziram uma coleção de 4-hidroxicumarinas utilizando síntese em fase sólida. A reação chave desta metodologia foi a substituição intramolecular *ipso* para a formação do anel lactônico da cumarina com simultânea clivagem do produto (Esquema 7).



Esquema 7. Metodologia descrita por Liu.

## 1.6. Cromatografia por Afinidade

A necessidade de novos fármacos tem estimulado a pesquisa pela busca de compostos que atuem como inibidores enzimáticos (COPELAND, 2005), e a triagem de substratos e/ou inibidores que se liguem seletivamente à enzima em estudo torna-se interessante para a indústria farmacêutica. No entanto, há a necessidade do desenvolvimento de técnicas que reduzam o número de possíveis candidatos. Uma alternativa promissora é a utilização de técnicas cromatográficas para estudos de afinidade de fármacos (CARDOSO, 2009).

Os processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos de ação de fármacos, como absorção, distribuição, metabolismo, modulação e ativação do receptor, são dinâmicos na natureza e têm muito em comum com os mecanismos básicos envolvidos em cromatografia líquida. As principais interações intermoleculares, como as eletrostáticas, hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio são determinantes tanto nos processos biológicos quanto nos cromatográficos. Como a atividade e o metabolismo dos fármacos são mediados por diferentes tipos de interações com os alvos biológicos, a

avaliação dessas interações pode ser utilizada nos estudos de afinidade e na elucidação do mecanismo de ação de um fármaco (EMNÉUS, 1995).

A utilização de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tendo como fase estacionária biorreatores ou IMER (*Immobilized enzyme reactors*) pode ser chamada de cromatografia de afinidade analítica ou cromatografia de afinidade quantitativa ou biocromatografia (KALISZAN, 1997). Esse processo cromatográfico fornece seletividade, rapidez e possibilidade de reutilização da enzima, além da reprodutibilidade obtida através da combinação da especificidade e da sensibilidade de uma reação enzimática. Assim, com a sensibilidade de detecção aumentada, o IMER pode ser usado para isolar e/ou identificar compostos biologicamente ativos em misturas complexas (CARDOSO, 2009).

A imobilização de enzimas tem se mostrado, nos últimos tempos, uma poderosa ferramenta para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade (MATEO, 2007). Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. A imobilização de enzimas a suportes cromatográficos apresenta diversas vantagens, sobre a utilização de enzimas livres em solução, entre as quais destacamos: a utilização de pequenos volumes de amostra; aumento do tempo de vida e da estabilidade da enzima em relação à temperatura, aos solventes orgânicos e à variação de pH sem perda considerável da atividade catalítica; reutilização; pequeno manuseio da amostra, evitando contaminações; e fácil separação da enzima dos produtos da reação (ZHANG, 1998; GIRELLI, 2007). Essas vantagens são úteis nos estudos enzimáticos *on-line*, onde os produtos da reação enzimática e os inibidores são detectados diretamente por UV-Vis, fluorescência ou espectrometria de massas.

Os IMERs têm sido amplamente utilizados para separação e identificação de metabólitos, nos estudos de metabolismo dos fármacos, para análise e síntese enantiosseletiva, na digestão proteolítica de proteínas *on-line*, no controle biotecnológico de fármacos, e para a identificação de substratos e/ou inibidores, na busca por novos ligantes. Também merece destaque o uso de enzimas imobilizadas como biossensores em aplicações biomédicas ou como órgãos artificiais (CARDOSO, 2009).

Bartolini e col. (2004) vêm desenvolvendo biorreatores contendo AChE para estudos *on-line* utilizando como suporte, principalmente, os monolitos. A enzima AChE foi covalentemente imobilizada sobre discos de monolito etilenodiamina (EDA) usando o glutaraldeído com reagente na derivação. Esse monolito é composto de um material polimérico macroporoso conhecido como CIM (da sigla em inglês para meio de interação conectivo). O micro-biorreator resultante AChE-EDA-CIM foi acoplado a um sistema cromatográfico *on-line* e utilizado como a própria coluna cromatográfica. A eficácia do método para o estudo de inibição foi comprovada utilizando inibidores conhecidos da AChE e os biorreatores foram aplicados aos estudos de determinação da capacidade inibitória  $IC_{50}$  (concentração do inibidor capaz de reduzir pela metade a banda do produto obtida em condições de saturação) dos inibidores selecionados e na determinação do mecanismo de ação e das constantes de inibição.

Quando os IMERs são usados como pós-coluna, os analitos são inicialmente separados, de maneira convencional, em uma coluna analítica. Apenas os analitos de interesse passam através do IMER e são convertidos nos produtos, usualmente com aumento da absorção, fluorescência ou detecção eletroquímica. Os benefícios dessa técnica são: a possibilidade de evitar a interferência de artefatos, usualmente observados em reações comuns de derivação; a alta reprodutibilidade, mesmo no caso da incompleta conversão pela enzima ou da instabilidade do produto de reação. As desvantagens são geralmente devidas ao alargamento da banda cromatográfica e aos efeitos de diluição de reagentes eventualmente adicionados; à necessidade de, algumas vezes, aumentar a sensibilidade do método analítico pela derivação do produto; à necessidade de modificar as condições experimentais utilizadas na etapa de separação, que são diferentes daquelas necessárias para que ocorra a reação enzimática como, por exemplo, mudança no valor de pH, troca dos solventes orgânicos ou alteração na temperatura (DALGAARD, 1986).

Quando possível, o uso do IMER, como pós-coluna analítica, se torna uma boa escolha uma vez que pode ser conectado diretamente a detectores específicos e não há necessidade de sucessivas etapas de separação.

# Objetivos

## 2 - Objetivos

Os objetivos do trabalho foram:

- Sintetizar uma coleção de cumarinas piperidínicas e análogos;
- Avaliar os compostos sintetizados com relação à atividade inibitória da enzima AChE em IMERs;
- Fornecer subsídios para o estudo da relação estrutura-atividade destes compostos e o desenho racional de possíveis fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer.

# **Resultados e Discussões**

### 3 – Resultados e Discussões

Considerando a atividade inibitória frente a AChE apresentada pelos alcalóides piperidínicos **6** e **7** assim como pela cumarina **8** (Figura 3), foi proposta a síntese de uma coleção de compostos cumarínicos contendo em sua estrutura o anel piperidínico (Figura 7).

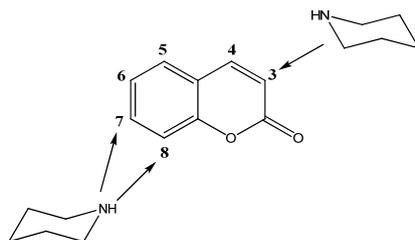


Figura 7. Posições propostas para a inserção dos fragmentos piperidínicos.

Para a síntese de uma maior variedade de compostos possuindo fragmentos contendo o anel piperidínico em diferentes posições da estrutura da cumarina, foram traçadas algumas estratégias sintéticas empregando reações de amidação, substituição nucleofílica, reações de acoplamento cruzado e reação multicomponente. As posições escolhidas para o acoplamento dos fragmentos piperidínicos foram 3, 7 e 8, pois assim os derivados poderiam ser obtidos a partir de um mesmo material de partida (Figura 8).

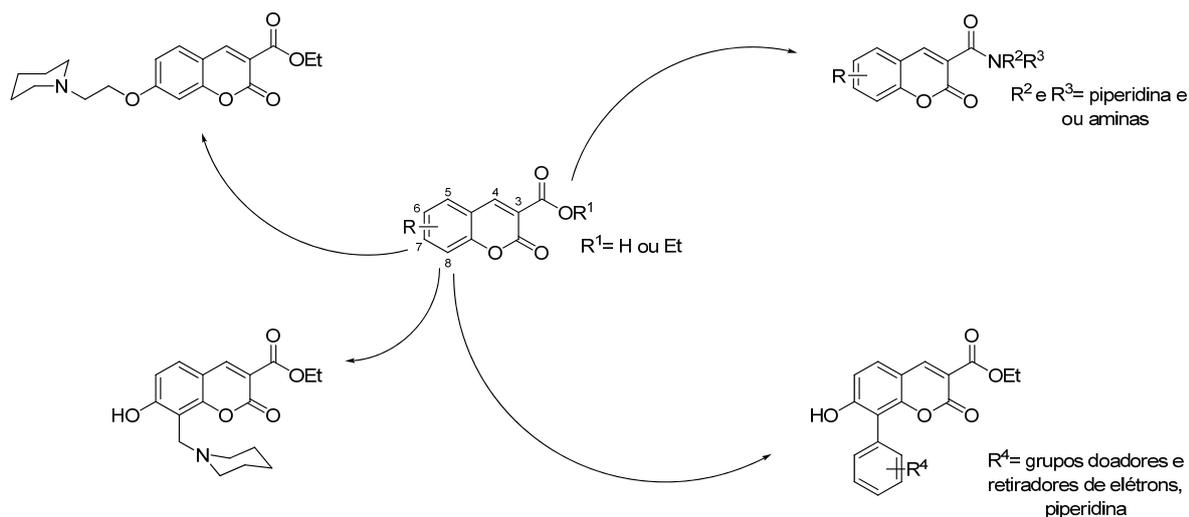
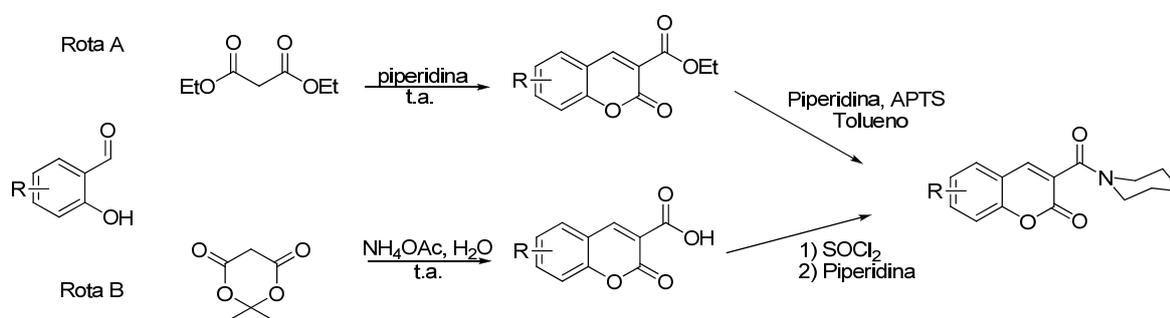


Figura 8. Proposta de síntese das cumarinas piperidínicas.

### 3.1 – Obtenção dos análogos piperidínicos substituídos na posição 3

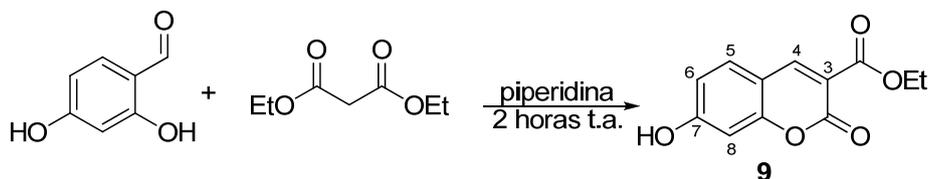
Várias são as metodologias de síntese de cumarinas descritas na literatura. Neste trabalho foi empregada a condensação de Knoevenagel (ALVIM JR *et al.*, 2005), uma reação de condensação aldólica entre um composto dicarboxílico e um derivado de salicilaldeído, fornecendo assim a cumarina substituída na posição 3 com um grupo éster (COOEt) ou ácido (COOH), os quais posteriormente poderiam ser transformados em amidas piperidínicas através de reações de amidação Rota A e Rota B, respectivamente (Esquema 8).



Esquema 8. Metodologia empregada para a síntese das cumarinas.

#### 3.1.1 – Obtenção dos análogos 2oxo-2H-3-cromenocarboxilato de etila

Para a obtenção das amidas piperidínicas, os trabalhos foram iniciados pela síntese do 7-hidroxi-2oxo-2H-3-cromenocarboxilato de etila (**9**) (Rota A), através da reação entre 2,4-diidroxi-6-R-benzaldeído, malonato de dietila e piperidina, a temperatura ambiente por um tempo reacional de 2 horas (Esquema 9). Após o término da reação obteve-se o composto desejado **9**, na forma de um sólido amarelo em 97% de rendimento.



Esquema 9. Obtenção do composto **9**.

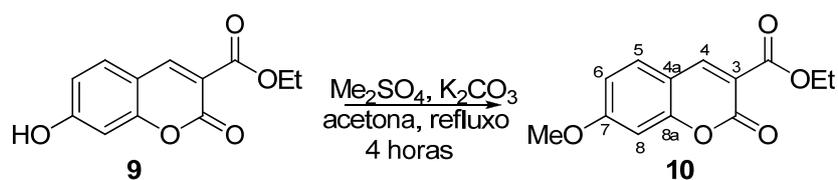
O composto **9** foi caracterizado por ressonância magnética nuclear e infravermelho. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO, 400MHz) mostrou um singlete em  $\delta$  8,66 (s) correspondendo ao hidrogênio da posição 4. Um duplo duplete em  $\delta$  6,83 (*dd*,  $J=2$  e 8Hz) indicando acoplamento em *meta* e *orto* referente ao hidrogênio na posição 6, e dois dupletos em  $\delta$  7,74 (*d*,  $J=8$ Hz) e  $\delta$  6,71 (*d*,  $J=2$ Hz) correspondendo aos hidrogênios das posições 5 e 8 respectivamente. O grupo éster na posição 3 apresentou um quadrupletos em  $\delta$  4,24 (*q*) correspondente aos hidrogênios metilênicos e um triplete em  $\delta$  1,28 (*t*) correspondendo aos hidrogênios metílicos.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou 12 sinais, sendo eles correspondentes a estrutura proposta:  $\delta$  14,1 correspondendo ao carbono metílico,  $\delta$  60,8 correspondendo ao carbono metilênico,  $\delta$  149,4 corresponde ao carbono metínico na posição 4 e  $\delta$  113,9 ao carbono da posição 3. Um sinal em  $\delta$  164,0 correspondendo ao carbono quaternário da carboxila do éster e  $\delta$  156,3 ao carbono quaternário da carboxila da lactona. Os sinais em  $\delta$  132,1; 112,0 e 101,7 correspondem aos carbonos C-H nas posições 5, 6 e 8 da estrutura da cumarina, os sinais em  $\delta$  110,4 e 157,0 aos carbonos quaternários da junção dos anéis e o sinal em  $\delta$  162,9 corresponde ao carbono quaternário na posição 7. Os valores foram coincidentes com os dados encontrados na literatura (ALVIM JR *et al.*, 2005).

O espectro no IV mostrou bandas de deformação axial assimétrica C-H em  $2835\text{ cm}^{-1}$ , deformação axial simétrica em  $2767\text{ cm}^{-1}$  correspondendo a carbonos  $\text{sp}^3$  do grupamento  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ . A banda de absorção da deformação axial de C=O da lactona apareceu em  $1749\text{ cm}^{-1}$  e no éster esta banda apareceu em  $1620\text{ cm}^{-1}$ . A banda de deformação axial em  $1681\text{ cm}^{-1}$  corresponde a ligação dupla trissubstituída na posição 4. A deformação angular fora do plano de C-H de anel aromático apareceu em  $970\text{ cm}^{-1}$  e a deformação axial de C-C anel aromático apareceu em  $1037\text{ cm}^{-1}$ .

Em seguida, foram sintetizados outros compostos possuindo tanto grupos doadores quanto retiradores de elétrons na subunidade aromática da cumarina, a fim de avaliar a influência destes substituintes em relação à atividade inibitória da AChE.

Para a obtenção do composto **10** (Esquema 10), foi realizada uma reação de *O*-alquilação da cumarina **9** com sulfato de dimetila e carbonato de potássio sob refluxo em acetona anidra. Após 4 horas de reação, foi obtido um sólido branco como produto com rendimento de 60%.



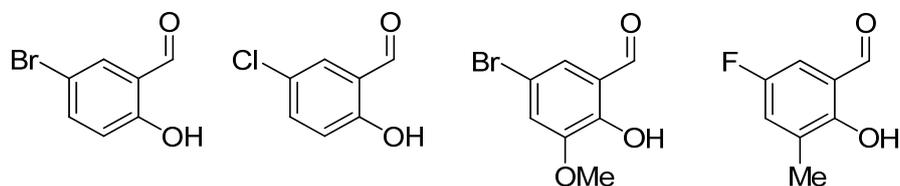
Esquema 10. Obtenção do composto **10**.

O composto **10** foi caracterizado por ressonância magnética nuclear e infravermelho. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) mostrou um singlete em  $\delta$  8,52 (s) correspondendo ao hidrogênio da posição 4. Um duplo duplete em  $\delta$  6,91 (*dd*,  $J=2$  e 8Hz) indicando acoplamento em *meta* e *orto* referente ao hidrogênio na posição 6, e dois dupletos em  $\delta$  7,52 (*d*,  $J=8$ Hz) e  $\delta$  6,83 (*d*,  $J=2$ Hz) correspondendo aos hidrogênios das posições 5 e 8 respectivamente. O grupo éster na posição 3 apresentou um quadruplo em  $\delta$  4,41 (*q*) correspondente aos hidrogênios metilênicos e um triplete em  $\delta$  1,42 (*t*) correspondendo aos hidrogênios metílicos. Foi observado um singlete em  $\delta$  3,92 (s) integrando para três hidrogênios, o qual corresponde ao sinal do deslocamento químico do grupo  $\text{CH}_3$  pertencente à metoxila da posição 7.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou 13 sinais, sendo eles correspondentes a estrutura proposta: o grupo éster apresentou dois sinais em  $\delta$  14,2 e  $\delta$  61,6 correspondendo ao carbono metílico e metilênico, respectivamente;  $\delta$  148,8 corresponde ao carbono metínico na posição 4 e  $\delta$  114,2 ao carbono da posição 3. Um sinal em  $\delta$  165,1 correspondendo ao carbono quaternário da carboxila do éster e  $\delta$  157,5 ao carbono quaternário da carboxila da lactona. Os sinais em  $\delta$  130,7; 113,6 e 100,4 correspondem aos carbonos C-H nas posições 5, 6 e 8, os sinais em  $\delta$  111,6 e 157,0 aos carbonos quaternários da junção dos anéis e o sinal em  $\delta$  163,4 corresponde ao carbono quaternário na posição 7 da metoxila. O carbono do grupo metoxi ( $-\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ) apresentou um sinal com deslocamento químico de 56 ppm. Os valores obtidos foram coincidentes com os dados encontrados na literatura (ALVIM JR *et al.*, 2005).

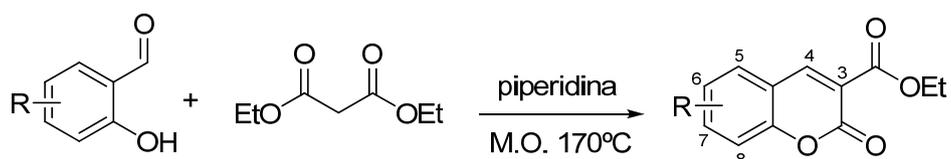
A síntese de outros ésteres cumarínicos partindo de 2-hidroxibenzaldeídos mostrados no Esquema 11, não foi possível utilizando a metodologia empregada para a obtenção do composto **9**. Este procedimento não se mostrou eficiente para a síntese de cumarinas cujo componente 2-hidroxibenzaldeído não possui outro grupo hidroxila

ligada ao anel aromático, devido a pouca solubilidade dos mesmos no malonato de dietila (Esquema 11).



Esquema 11. Benzaldeídos utilizados para a obtenção dos ésteres cumarínicos.

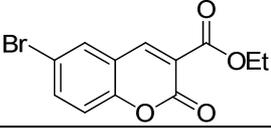
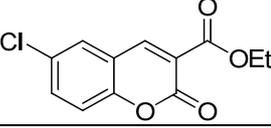
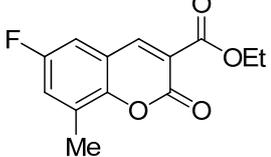
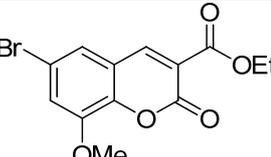
Assim, a busca de outras metodologias se tornou necessária e, depois de realizada uma revisão na literatura, foi adotado o procedimento empregado por Robert e col. (2008), o qual descreve a síntese de derivados cumarínicos via irradiação de micro-ondas (Esquema 12).



Esquema 12. Metodologia para a síntese de cumarinas utilizando micro-ondas.

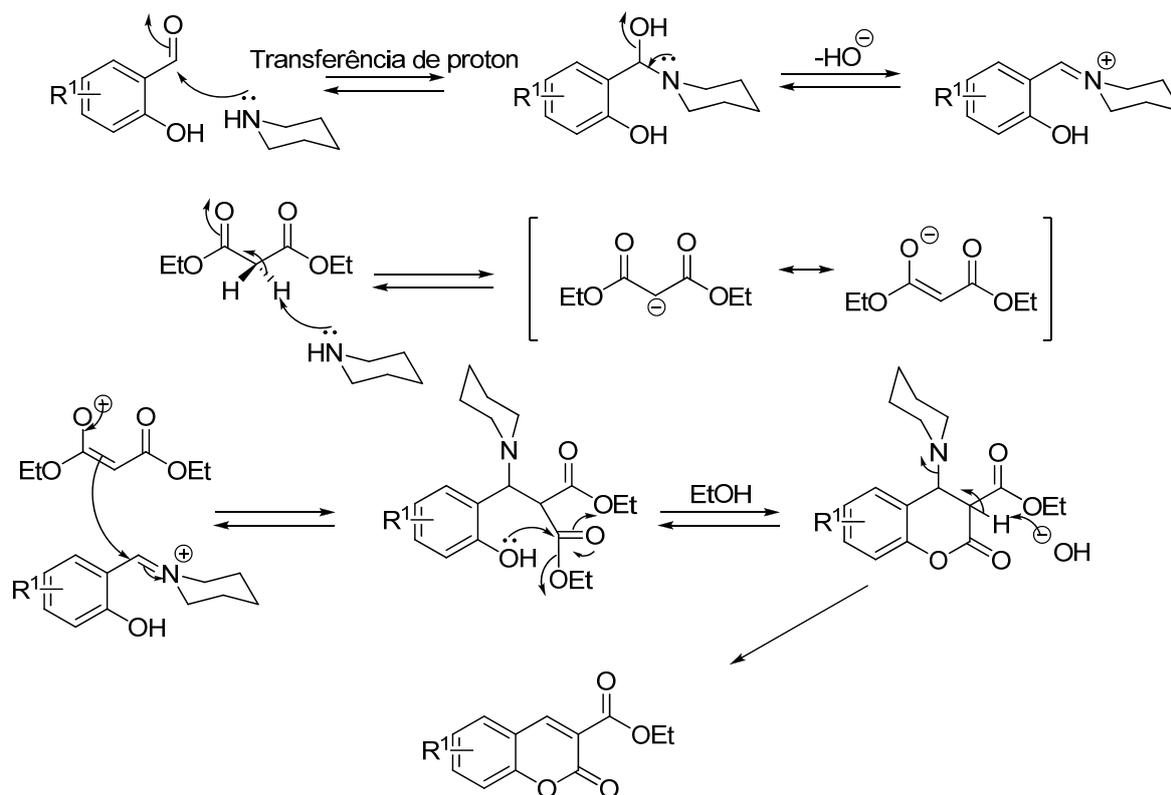
A síntese dos ésteres cumarínicos foi realizada partindo dos benzaldeídos (Esquema 11) com malonato de dietila sob irradiação de micro-ondas, utilizando como catalisador a piperidina. Após trinta minutos de irradiação a 170°C, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente e os produtos foram purificados por recristalização em etanol. Os rendimentos obtidos para cada composto estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Ésteres obtidos através irradiação de micro-ondas.

Composto	Estrutura	Rendimento%
11		46
12		44
13		49
14		52

O aquecimento por micro-ondas é uma forma atraente de conduzir reações orgânicas pela grande redução nos tempos de reação e bons rendimentos. A utilização de aquecimento por micro-ondas em reações com ausência de solvente tem sido apontada como uma técnica de Química Verde, já que não é utilizado um solvente na reação, o que eliminaria a necessidade de reciclar, descartar e manipular um solvente orgânico (que muitas vezes é tóxico, inflamável e/ou ataca a camada de ozônio) (SANSEVERINO, 2002).

O mecanismo da reação de condensação de Knoevenagel envolve primeiro a formação do íon imínio entre o salicilaldeído e a amina secundária (piperidina), em seguida ocorre captura de um hidrogênio  $\alpha$ -carbonílico do malonato de etila pela piperidina, originando um nucleófilo, o qual posteriormente ataca o carbono eletrofílico do íon imínio. Em seguida os pares de elétrons da hidroxila na posição 2 (*orto*) adicionam na carboxila do éster levando a formação do anel lactônico. Posteriormente o grupo etóxido que foi eliminado remove o hidrogênio  $\alpha$ -carbonílico levando à eliminação da piperidina e formação da estrutura da cumarina (Esquema 13).

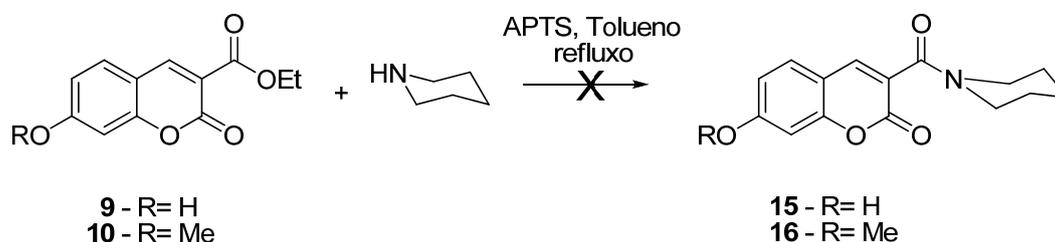


Esquema 13. Mecanismo da reação de Knoevenagel.

### 3.1.2 – Tentativa de obtenção das amidas piperidínicas via Rota A

Após a síntese dos ésteres cumarínicos, a próxima etapa seria a obtenção das amidas piperidínicas via reação de transaminação.

A reação foi realizada a partir do refluxo dos compostos **9** e **10**, piperidina e APTS em tolueno, e após 24 horas de reação, não foi observada a formação de produtos e o material de partida foi recuperado (Esquema 14).



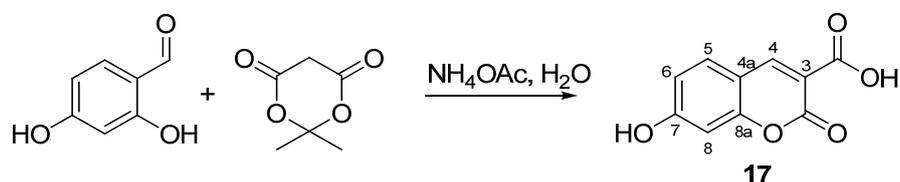
Esquema 14. Tentativa de obtenção das amidas via reação de amidificação.

Como não foi possível a obtenção das amidas piperidínicas via Rota A, optou-se por adotar a Rota B e sintetizar as amidas a partir dos ácidos carboxílicos correspondentes.

### 3.1.3 – Obtenção dos análogos 2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico

A estratégia adotada para obtenção das cumarinas piperidínicas via Rota B baseia-se na síntese de um intermediário ácido, que pode ser transformado no cloreto de acila, uma espécie mais reativa, que reagido com a amina adequada fornecerá a amida correspondente.

Para a obtenção das cumarinas ácidas, utilizou-se a metodologia descrita por Scott & Raston (2000), que consiste na reação de salicilaldeídos substituídos com ácido de Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona), na presença de acetato de amônio sob agitação à temperatura ambiente por um tempo reacional de 1 hora. A cumarina **17** foi obtida a partir do 2,4-dihidroxi-benzaldeído com rendimento de 98% (Esquema 15).



Esquema 15. Obtenção do composto **17**.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) mostrou um singlete em  $\delta$  8,54 (s) correspondendo ao hidrogênio na posição 4, dois dupletos em  $\delta$  7,68 (*d*,  $J=8\text{Hz}$ ) e outro em  $\delta$  6,69 (*d*,  $J=2\text{Hz}$ ) correspondendo respectivamente aos hidrogênios na posição 5 e 8, um duplo duplete em  $\delta$  6,80 (*dd*,  $J=2$  e  $10\text{Hz}$ ) correspondendo ao hidrogênio na posição 6. Estes dados foram comparados com os descritos na literatura (ALVIM JR *et al.*, 2005) o que sugere a estrutura do composto **17**.

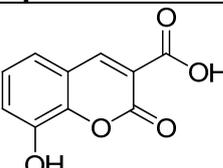
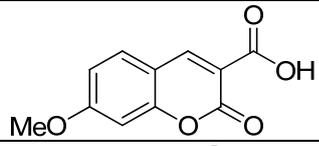
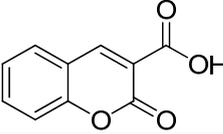
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou 10 sinais, sendo eles correspondentes a estrutura proposta:  $\delta$  131,0; 110,2 e 101,2 ppm correspondendo aos carbonos C-H aromáticos nas posições 5, 6 e 8, o deslocamento em  $\delta$  146,1 ppm corresponde ao carbono metínico na posição 4 e  $\delta$  114,6 ao carbono da posição 3. Um sinal em  $\delta$  165,2

correspondendo ao carbono quaternário da carboxila do ácido e  $\delta$  156,7 ao carbono quaternário da carboxila da lactona. Os sinais em  $\delta$  99,4 e 158,8 são referentes aos carbonos quaternários da junção dos anéis e o deslocamento em  $\delta$  165,1 corresponde ao carbono quaternário na posição 7, o qual está ligado a hidroxila.

O espectro no IV (KBr) mostrou bandas de deformação das principais funções existentes na estrutura da cumarina, em  $3166\text{ cm}^{-1}$  largo, correspondendo a deformação axial de O-H da hidroxila ligada ao anel na posição 7 e  $3467\text{ cm}^{-1}$  largo correspondendo a hidroxila do ácido,  $1236\text{ cm}^{-1}$  correspondendo a deformação angular fora do plano em de C-O-H do ácido,  $1620\text{ cm}^{-1}$  correspondendo a deformação axial de C=O carboxílico, e  $1710\text{ C=O}$  da lactona.

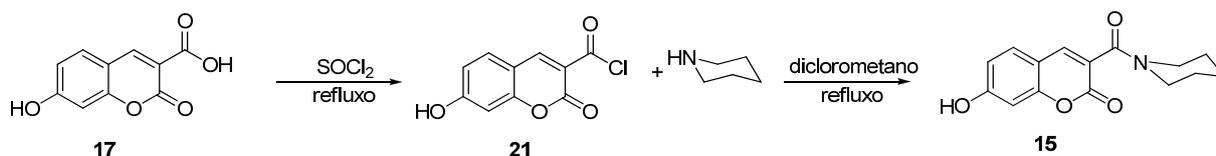
Foram sintetizadas outras cumarinas ácidas (**18**, **19** e **20**) seguindo a mesma metodologia empregada para a obtenção do composto **17**, utilizando como material de partida o 2,3-diidroxibenzaldeído, 2-hidroxi-3-metoxibenzaldeído e 2-hidroxibenzaldeído, respectivamente. Os rendimentos obtidos para estes compostos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimentos obtidos para os compostos ácidos **18**, **19** e **20**.

Composto	Rendimento (%)
<b>18</b> 	93
<b>19</b> 	93
<b>20</b> 	93

### 3.1.4 – Obtenção das amidas piperidínicas via Rota B

Para a obtenção das amidas foi necessário preparar inicialmente o cloreto de ácido. Esta reação foi realizada dissolvendo os compostos ácidos em cloreto de tionila e colocando a solução em refluxo, sob atmosfera de nitrogênio, por um tempo reacional de 7 horas. O primeiro cloreto de acila sintetizado foi o composto **21** (Esquema 16).



Esquema 16. Obtenção do composto **15**.

A síntese do composto **15** foi realizada utilizando a metodologia descrita por Castral (2006) para a obtenção de uma coleção de amidas. Para isso, o composto **21** foi dissolvido em diclorometano e sob atmosfera de nitrogênio, banho de gelo e agitação, a piperidina foi adicionada aos poucos. A mistura reacional foi agitada e mantida sob refluxo por 15 horas. O produto foi purificado por coluna cromatográfica, obtendo assim um sólido branco com rendimento de 42%.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200MHz, MeOD) mostrou um singleto em  $\delta$  7,95 (s) correspondendo ao hidrogênio na posição 4, dois dupletos em  $\delta$  7,53 (*d*,  $J = 8\text{Hz}$ ) e outro em  $\delta$  6,75 (*d*,  $J = 2\text{Hz}$ ) correspondendo respectivamente aos hidrogênios na posição 5 e 8, um duplo duplete em  $\delta$  6,83 (*dd*,  $J = 2$  e  $10\text{ Hz}$ ) referente ao hidrogênio na posição 6. Estes sinais caracterizam a cumarina substituída com hidroxila na posição 7. A amida substituinte na posição 3 apresenta os seguintes sinais: dois multipletos em  $\delta$  3,71 - 3,68 (*m*) e  $\delta$  3,41 - 3,36 (*m*) correspondendo aos hidrogênios dos grupos metilênicos ligados diretamente ao átomo de nitrogênio e um singleto largo em  $\delta$  1,67 (*s*) correspondendo aos outros hidrogênios do anel piperidínico. Esses dados sugerem a estrutura do composto **15**.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou 15 sinais, sendo eles correspondentes a estrutura proposta: os deslocamentos em  $\delta$  23,8; 25,1; 25,8; 41,9 e 47,4 ppm correspondem aos carbonos  $\text{CH}_2$  pertencentes ao anel piperidínico,  $\delta$  142,1

corresponde ao carbono metínico na posição 4 e  $\delta$  120,3 ao carbono da posição 3. Um sinal em  $\delta$  163,0 corresponde ao carbono quaternário da carboxila da amida e  $\delta$  161,8 ao carbono quaternário da carboxila da lactona. Os sinais em  $\delta$  130,1; 113,5 e 101,9 ppm correspondem aos carbonos C-H nas posições 5, 6 e 8 da estrutura da cumarina, os sinais em  $\delta$  110,7 e 155,4 aos carbonos quaternários da junção dos anéis e o sinal em  $\delta$  157,8 corresponde ao carbono quaternário na posição 7 da hidroxila.

O espectro no IV (KBr) mostra bandas em 2937 e 2849  $\text{cm}^{-1}$  característicos de deformação axial de C-H de carbonos  $\text{sp}^3$  correspondendo as deformações do anel piperidínico e as tensões do anel move as bandas de deformação axial C-H para frequências mais altas. Bandas em 3053  $\text{cm}^{-1}$  correspondendo a deformação axial de C-H aromático, 3429  $\text{cm}^{-1}$  referente deformação axial de O-H da hidroxila fenólica, 1623  $\text{cm}^{-1}$  correspondendo a deformação axial de C=O carboxílico, e 1719  $\text{cm}^{-1}$  C=O da lactona. No espectro não foi observado a presença da banda de absorção da deformação axial de O-H do ácido carboxílico, e a frequência da banda de absorção da carboxila localizada na posição 3 possui um valor menor ao observado para o composto **17**, indicando assim a formação da ligação C-N do grupo amida.

Os compostos **23**, **24**, **25** e **26** foram obtidos utilizando a mesma metodologia aplicada para a síntese do composto **15**. Os reagentes empregados na obtenção destas amidas e os rendimentos estão colocados na Tabela 4.

Tabela 4. Síntese dos compostos 16, 22, 23, 24, 25.

Composto	Estrutura	Rendimento (%)
16		52
22		56
23		58
24		65
25		40

Os valores de deslocamento químico de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e as bandas de absorção de I.V. indicaram a formação dos compostos desejados.

Os sinais de deslocamento químico de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos para o composto 25, mostraram ser de carbonos metilênicos, carbonos com hibridização  $\text{sp}^2$  e quaternários, caracterizando possivelmente a estrutura, mas carece de outros sinais para determinar exatamente qual sinal corresponde a cada carbono da estrutura.

### 3.1.5 - Outras metodologias testadas para a obtenção das amidas

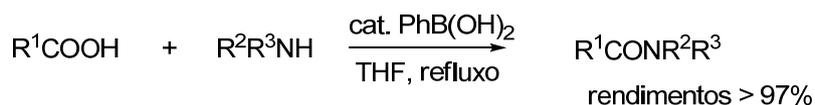
#### 3.1.5.1 – Reação de amidação catalisada por ácido borônico

São vários os procedimentos descritos na literatura para a obtenção de amidas (DALE, 2000). O método mais explorado é a preparação de cloretos de ácido, os

quais reagem com aminas para a formação das amidas. Apesar de sua versatilidade, este método tem suas limitações, porque existem muitos cloretos de ácido instáveis e também eles requerem reagentes perigosos para a sua preparação (cloreto de tionila (SOCl<sub>2</sub>), cloreto oxalila (ClOCCOCl), fosgênio (COCl<sub>2</sub>), etc.

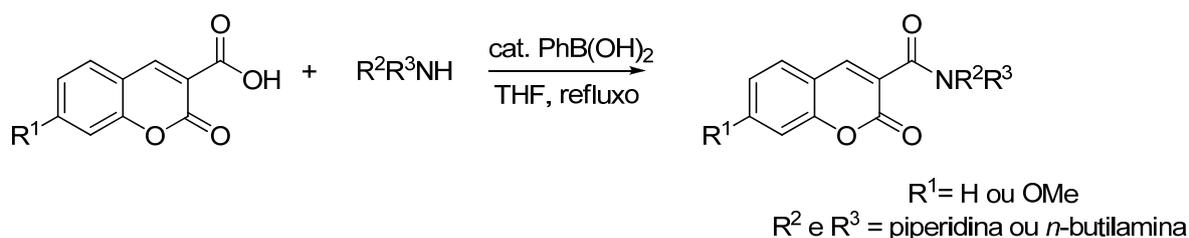
Existem outras rotas comuns para a síntese de amidas, por exemplo: a) ativação de ácidos carboxílicos usando 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), (b) tratamento de ácidos carboxílicos com cloretos de amônio, aminas terciárias e agentes de acoplamento tipicamente utilizados em síntese de peptídeos, e (c) utilização de cloretos de azolida e *N*-acilimidazol como eficientes reagentes acilantes para reagir com aminas. Estes métodos são considerados incompatíveis com a prática em escala industrial, devido sua natureza exotérmica, uso de catálise básica, alta pressão e baixa seletividade (DALE, 2000).

Ishihara *et al.* (1996) reportou o primeiro método baseado em reagentes de boro como catalisadores que permitiam a formação direta de amidas a partir de ácidos carboxílicos e aminas. Em um trabalho recente, Mylavarapu e col. (2007) descreveram a síntese de amidas a partir de ácidos carboxílicos e aminas, utilizando como catalisador o ácido fenilborônico (Esquema 17).



Esquema 17. Síntese de amidas catalisada por ácido fenilborônico.

A metodologia descrita por Mylavarapu foi testada utilizando como ácidos os compostos **19** e **20**, e como aminas, a *n*-butilamina e piperidina (Esquema 18). A mistura reacional contendo o ácido carboxílico, amina, catalisador e o solvente (THF), foi mantida sob refluxo acoplado a um Dean Stark, para remoção de água formada no meio reacional. A reação foi acompanhada por CCD, onde após 24 horas não foi observado a formação do produto e os materiais de partida foram recuperados.



Esquema 18. Síntese de amidas cumarínicas catalisada por ácido fenilborônico.

O ácido fenilborônico ativa a molécula do ácido carboxílico por reduzir a densidade eletrônica no carbono carboxílico, o que torna o intermediário **I** (Figura 9a) mais propenso a adição nucleofílica da amina. Entretanto, a ligação de hidrogênio intramolecular presente nos compostos **19** e **20** (Figura 9b) deve concorrer com a formação do intermediário **I**, o que pode dificultar a catálise por parte do ácido borônico e assim impedir a reação de formação da amida.

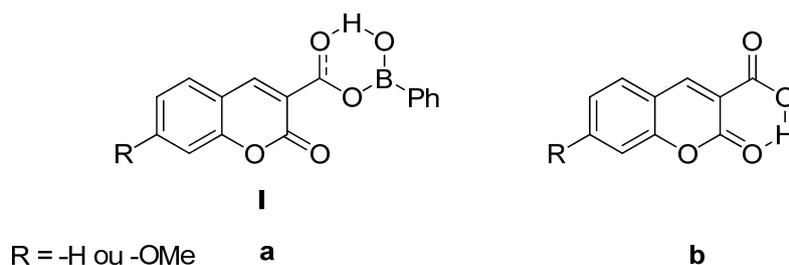
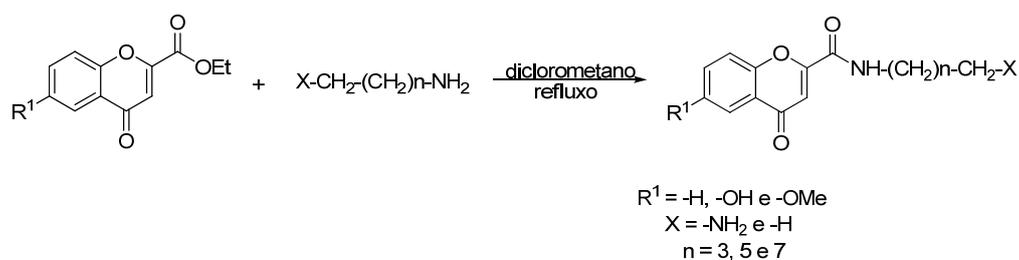


Figura 9. **a)** Intermediário **I**; **b)** Ligação de hidrogênio intramolecular.

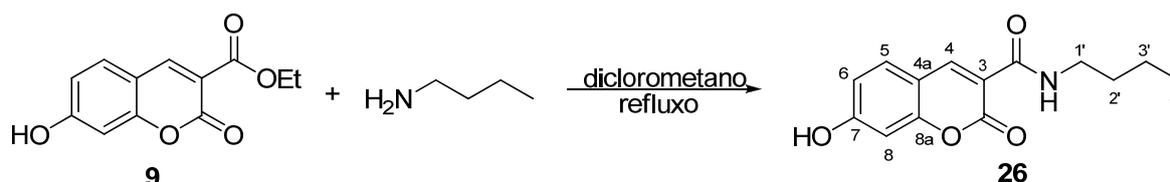
### 3.1.5.2 – Reação de amidação de cromonas

As cromonas representam uma classe de compostos com estrutura bastante semelhantes à estrutura das cumarinas. Walenzyk *et. al.* (2005) sintetizaram uma coleção de 2-amido-cromonas, a partir do refluxo de ésteres 2-etil-cromonas e aminas em dicloroetano (Esquema 19).



Esquema 19. Síntese de 2-amido-cromonas.

Devido a essa similaridade estrutural existente entre as cromonas e cumarinas, a metodologia descrita por Walenzyk foi testada para a síntese das 3-amido-cumarinas, utilizando como éster o composto **9** e *n*-butilamina como amina (Esquema 20). O solvente utilizado na reação foi diclorometano e após 24 horas de refluxo foi obtido um sólido como produto com rendimento de 38%.



Esquema 20. Metodologia para a síntese do composto **26**.

O composto **26** foi caracterizado por RMN  $^1\text{H}$  e infravermelho. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200MHz, DMSO- $d_6$ ) mostrou um singleto em  $\delta$  8,31 (s) correspondendo ao hidrogênio na posição 4, um duplete em  $\delta$  7,14 (*d*,  $J = 8,4\text{Hz}$ ) e um singleto largo em  $\delta$  6,13 (*s*) correspondendo respectivamente aos hidrogênios na posição 5 e 8, um duplo duplete em  $\delta$  6,22 (*dd*,  $J = 2$  e  $8\text{ Hz}$ ) referente ao hidrogênio na posição 6. Estes sinais caracterizam a cumarina substituída com hidroxila na posição 7. A amida substituinte na posição 3 apresenta os seguintes sinais: dois multipletos em  $\delta$  1,88 – 1,74 (*m*) e  $\delta$  1,66 – 1,48 (*m*) correspondendo aos hidrogênios dos grupos metilênicos nas posições 2' e 3', respectivamente. O grupo  $\text{CH}_2$  (1') ligado diretamente ao átomo de nitrogênio apresentou um tripleto  $\delta$  3,48 (*t*) e o grupo  $\text{CH}_3$  (4') um tripleto em  $\delta$  0,89 (*t*).

O espectro no IV (KBr) mostra bandas em 2850 e 2783  $\text{cm}^{-1}$  característicos de deformação axial de C-H de carbonos  $\text{sp}^3$  correspondendo às deformações da cadeia carbônica alifática da amida. Bandas em 3467  $\text{cm}^{-1}$  correspondendo a deformação axial de O-H da hidroxila fenólica, em 1620  $\text{cm}^{-1}$  correspondendo a deformação axial de C=O carboxílico, e 1710  $\text{cm}^{-1}$  C=O da lactona também foram observadas. No espectro foi observado que a frequência da banda de absorção da carboxila localizada na posição 3 possui um valor menor ao observado para o composto **9**, indicando assim a formação da ligação C-N do grupo amida. Esses dados, juntamente com os dados de RMN  $^1\text{H}$ , sugerem a estrutura do composto **26**.

O emprego desta metodologia foi descartado visto que o tempo reacional é extenso e o rendimento obtido é baixo, o que inviabiliza o emprego desta estratégia sintética para o preparo das amidas.

### 3.1.6 – Tentativa de redução das amidas piperidínicas

Os compostos **6** e **7** inibidores da acetilcolinesterase encontrados na literatura apresentam em sua estrutura o fragmento piperidínico na forma de amina, então a fim de se avaliar a relação estrutura atividade tornou-se necessário a redução das amidas sintetizadas para as aminas correspondentes.

Os procedimentos utilizados para reduções de amidas podem ser agrupados em quatro tipos: reações eletroquímicas; reações com metais; reduções nucleofílicas e reduções eletrofílicas.

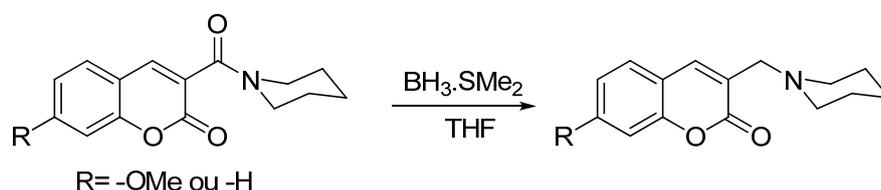
As reações eletroquímicas e aquelas envolvendo metais são dependentes das condições de reação (CASADEI *et. al.*, 1992) podendo levar à formação competitiva entre aminas, aldeídos ou alcoóis (SHONO *et. al.*, 1992; NISHIYAMA *et. al.*, 1988; DEPREZ, 1987). As reduções nucleofílicas, empregando principalmente boro-hidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), hidreto de lítio e alumínio ( $\text{LiAlH}_4$ ) e seus derivados (MANDAL *et. al.*, 1988; KRISHNAMURTHY *et. al.*, 1980), proporcionam, além de aminas, a formação de outros produtos de reação. Por exemplo, tris-(dialquilamino)-alumínio-hidreto de lítio reduz seletivamente amidas primárias e terciárias aos aldeídos correspondentes (CHA *et. al.*, 1991). Apesar de reduzirem as amidas quantitativamente, os redutores nucleofílicos apresentam, em muitos casos, aplicações limitadas em sínteses, pois são redutores muito fortes, reagindo não especificamente com substâncias polifuncionais.

A redução de amidas envolvendo redutores eletrofílicos, principalmente borana ( $\text{BH}_3$ ) e diborana ( $\text{B}_2\text{H}_6$ ), alana ( $\text{AlH}_3$ ) e seus derivados (WOLF *et. al.*, 1999; BROWN *et. al.*, 1970) levam normalmente à formação seletiva de aminas em condições brandas de reação.

Para diferentes grupos funcionais, a reatividade de redutores eletrofílicos é influenciada significativamente pela estrutura dos substituintes nos reagentes e apresenta-se relacionada com o poder de complexação entre os heteroátomos e o boro

(BROWN *et. al.*, 1982). De um modo geral, para a redução com borano em THF, tem-se a seguinte ordem de reatividade: ácidos carboxílicos > olefinas > cetonas > nitrilas > epóxidos > amidas > ésteres > haletos de acila. Além disso, para nitro-compostos, sulfonas, sulfetos, sulfóxidos, dissulfetos, tosilatos, haletos de alquila e vários outros grupos funcionais, o borano é essencialmente inerte (PAWELKE *et. al.*, 1996; KRISHNAMURTHY *et. al.*, 1977).

Para a redução das amidas piperidínicas foi testada a metodologia descrita por Brown e col. (1982) (Esquema 21).

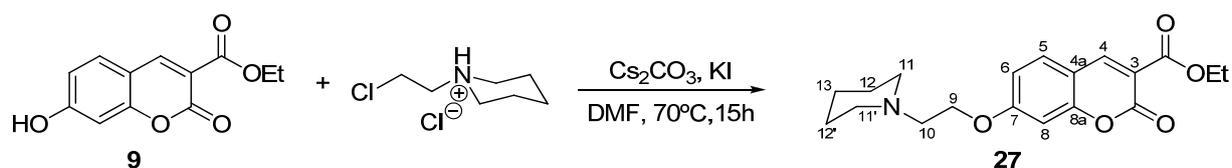


Esquema 21. Tentativa de redução das amidas piperidínicas.

A reação de redução foi realizada para as amidas **16** e **22**, utilizando como agente redutor o complexo de borana com dimetilsulfeto ( $BH_3.SMe_2$ ), solvente THF, e a reação foi realizada a temperatura ambiente e monitorada através de CCD. Após um tempo reacional de 24 horas, não foi observada a formação de produtos, assim a reação foi terminada e as amidas utilizadas foram recuperadas.

### 3.2 – Obtenção do análogo piperidínico substituído na posição 7

Para a síntese do análogo piperidínico substituído na posição 7 (composto **27**), foi realizada uma reação de substituição nucleofílica entre o composto **9** e o cloridrato de 3-cloroetilpiperidina. Foi utilizado carbonato de céσιο como base para desprotonar a hidroxila fenólica, DMF como solvente e uma quantidade catalítica de iodeto de potássio. Após um tempo reacional de 15 horas foi obtido um sólido amarelo como produto com rendimento de 62% (Esquema 22).



Esquema 22. Síntese do composto **27**.

O composto **27** foi caracterizado por ressonância magnética nuclear. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) mostrou um singlete em  $\delta$  8,50 (s) correspondendo ao hidrogênio da posição 4. Um duplo duplete em  $\delta$  6,90 (*dd*,  $J= 2$  e 8 Hz) indicando acoplamento em *meta* e *orto* do hidrogênio na posição 6 e dois dupletos em  $\delta$  7,49 (*d*,  $J= 8\text{Hz}$ ) e  $\delta$  6,81 (*d*,  $J=2\text{Hz}$ ) correspondendo aos hidrogênios das posições 5 e 8 respectivamente. O grupo éster na posição 3 apresentou um quadrupeto em  $\delta$  4,40 (*q*) correspondente aos hidrogênios metilênicos e um tripeto em  $\delta$  1,40 (*t*) correspondendo aos hidrogênios metílicos. O fragmento acoplado na posição 7 foi caracterizado pelos dois tripletos em 4,18 e 2,80 ppm referentes aos grupos  $\text{CH}_2$  das posições 9 e 10, respectivamente. O anel piperidínico apresentou um multipeto em 2,50-2,52 ppm referente aos hidrogênios das posições 11 e 11', um multipeto em 1,58-1,64 ppm referente aos hidrogênio 12 e 12' e um multipeto em 1,44-1,48 ppm correspondendo aos hidrogênios do grupo  $\text{CH}_2$  na posição 13.

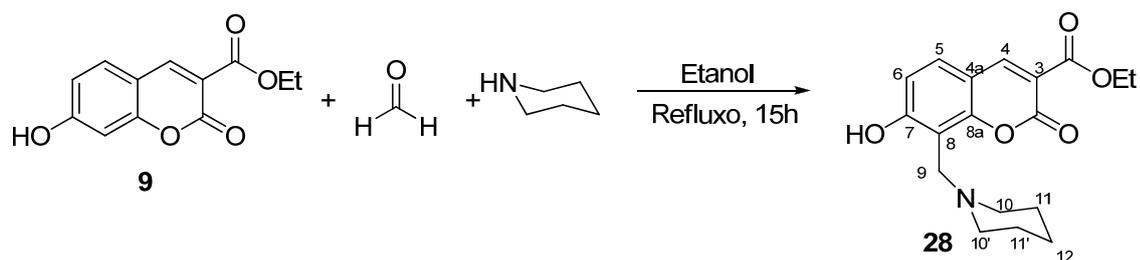
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou 17 sinais, sendo eles correspondentes a estrutura proposta:  $\delta$  14,2 correspondendo ao carbono metílico,  $\delta$  61,6 correspondendo ao carbono metilênico,  $\delta$  148,9 corresponde ao carbono metínico na posição 4 e  $\delta$  114,0 ao carbono da posição 3. Um sinal em  $\delta$  164,4 correspondendo ao carbono quaternário da carboxila do éster e  $\delta$  157,5 ao carbono quaternário da carboxila da lactona. Os sinais em  $\delta$  130,6; 111,6 e 101,0 correspondem aos carbonos C-H nas posições 5, 6 e 8 da estrutura da cumarina, os sinais em  $\delta$  114,1 e 157,1 aos carbonos quaternários da junção dos anéis e o sinal em  $\delta$  163,4 corresponde ao carbono quaternário na posição 7. Os carbonos metilênicos das posições 9 e 10 apresentaram sinais em  $\delta$  66,9 e 57,4, respectivamente. Devido à simetria existente no anel piperidínico, o mesmo foi caracterizado por três sinais  $\delta$  55,0; 25,9 e 24,1, referentes aos carbonos 11 e 11', 12 e 12', e 13; respectivamente.

### 3.3 – Obtenção dos análogos piperidínicos substituídos na posição 8

#### 3.3.1 – Reação Multicomponente

Uma das formas de se obter análogos cumarínicos substituídos na posição 8 seria através de uma reação multicomponente. Reações multicomponentes (MCRs) são reações convergentes, em que três ou mais matérias-primas reagem para formar um produto, em que basicamente todos ou a maioria dos átomos constituem o produto recém-formado (DÖMLING *et. al.*, 2000). Em uma MCR, o produto é formado de acordo com uma cascata de reações químicas elementares. Portanto, existe uma rede de reações em equilíbrio, que, finalmente, todos os fluxos levam a uma etapa irreversível, fornecendo assim o produto. O desafio é realizar uma MCR de tal forma que a rede de pré-reações equilibradas leve para a formação do principal produto e não a produtos secundários. O resultado é claramente dependente das condições de reação como solvente, temperatura, catalisador, concentração, o tipo de reagentes utilizados e os grupos funcionais presentes (ZHU *et al.*, 2005).

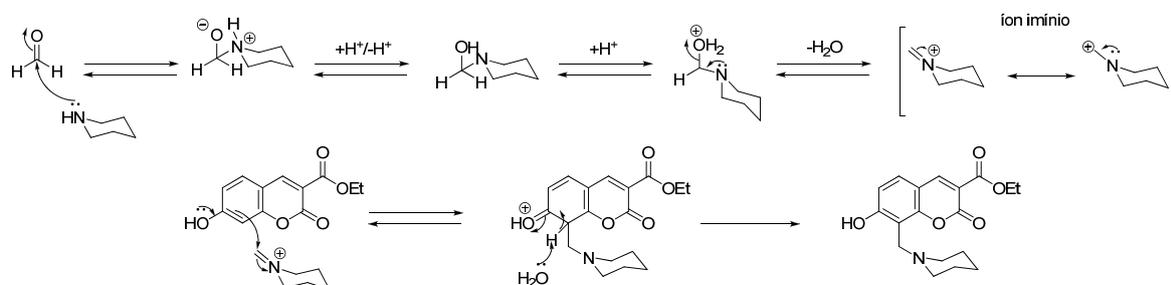
O composto **28** foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito por Kontogiorgis e col. (2005) a partir da reação multicomponente entre o composto **9**, formaldeído e a piperidina, utilizando como solvente etanol. Após um tempo de reacional de 15 horas, foi obtido um sólido amarelo como produto com rendimento de 40% (Esquema 23).



Esquema 23. Síntese do composto **28**.

O mecanismo da reação multicomponente segue duas etapas, onde primeiramente ocorre a reação entre o formaldeído e a piperidina para a formação do íon imínio. Em uma segunda etapa, a hidroxila na posição 7 do composto **9** orienta o

ataque nucleofílico da cumarina ao íon imínio para a formação da nova ligação C-C na posição 8. Em seguida um próton é abstraído a fim de se restabelecer a aromaticidade do sistema e então o composto **28** é formado em uma etapa irreversível. (Esquema 24).



Esquema 24. Mecanismo da reação multicomponente.

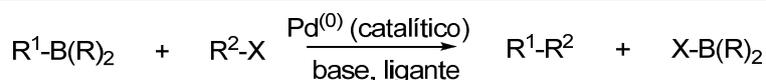
O composto **28** foi caracterizado por ressonância magnética nuclear. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400MHz) mostrou um singlete em  $\delta$  8,53 (s) correspondendo ao hidrogênio da posição 4, dois dupletos em  $\delta$  7,56 ( $d$ ,  $J= 8\text{Hz}$ ) e  $\delta$  6,55 ( $d$ ,  $J= 8\text{Hz}$ ) correspondendo aos hidrogênios das posições 5 e 6 respectivamente. A ausência do sinal referente ao hidrogênio da posição 8, indica que ocorreu a formação da ligação C-C naquela posição. O grupo éster substituinte na posição 3 apresentou um quadrupeto em  $\delta$  4,23 ( $q$ ) correspondente aos hidrogênios metilênicos e um tripleto em  $\delta$  1,28 ( $t$ ) correspondendo aos hidrogênios metílicos. O fragmento acoplado na posição 8 foi caracterizado pelo singlete em 4,05 ppm referentes ao grupo  $\text{CH}_2$  na posição 9. Os hidrogênios do anel piperidínico apresentaram multipletos em 2,80-2,82; 1,60-1,66 e 1,46-1,51 ppm correspondendo aos hidrogênios metilênicos nas posições 10,10'; 11,11' e 12,12', respectivamente.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou 16 sinais, sendo eles correspondentes a estrutura proposta:  $\delta$  14,2 correspondendo ao carbono metílico,  $\delta$  60,2 correspondendo ao carbono metilênico do grupo éster,  $\delta$  149,3 corresponde ao carbono metínico na posição 4 e  $\delta$  116,4 ao carbono da posição 3. Um sinal em  $\delta$  170,9 correspondendo ao carbono quaternário da carboxila do éster e  $\delta$  156,6 ao carbono quaternário da carboxila da lactona. Os sinais em  $\delta$  131,2; 107,6 e 105,2 correspondem aos carbonos nas posições 5, 6 e 8, os sinais em  $\delta$  106,7 e 155,8 aos carbonos quaternários da junção dos anéis e o sinal em  $\delta$  163,3 corresponde ao carbono quaternário na posição

7. O carbono metilênico da posição 9 mostrou um sinal em  $\delta$  52,3. Devido à simetria existente no anel piperidínico, o mesmo foi caracterizado por três sinais  $\delta$  52,4; 24,2 e 22,4, referentes aos carbonos 10 e 10', 11 e 11', e 12; respectivamente.

### 3.3.2 – Acoplamento de Suzuki

Outra estratégia sintética aplicada para a obtenção das cumarinas substituídas na posição 8 é a reação de Suzuki (MYAURA *et. al.*, 1995), a qual baseia-se no acoplamento entre compostos organoborados e haletos ou triflatos orgânicos, catalisado por paládio (Esquema 25). Esta metodologia possui inúmeras vantagens por apresentar condições reacionais brandas, grande número de ácidos borônicos comerciais, os subprodutos inorgânicos são facilmente removidos da mistura reacional, os materiais de partida toleram uma variedade de grupos funcionais e o acoplamento é estereo- e regioseletivo.

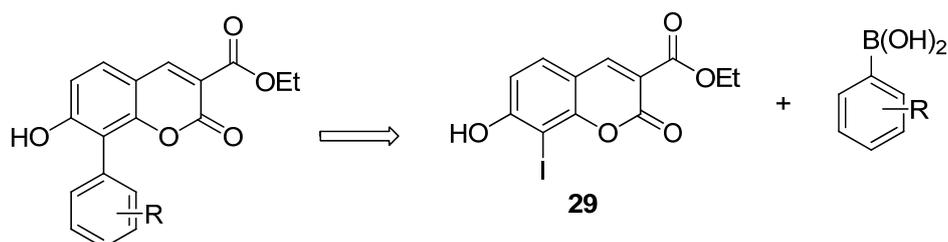


**R**<sup>1</sup>= alquil, alil, alquenil, alquinil, aril; **R**= alquil, OH, O-alquil; **R**<sup>2</sup>= alquenil, aril, alquil; **X**= Cl, Br, OTf, OPO(OR)<sub>2</sub>; **base**= Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Ba(OH)<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, TIOH, KF, CsF, Bu<sub>4</sub>F, NaOH, M<sup>+</sup>(O-alquil).

Esquema 25. Acoplamento de Suzuki.

Encontram-se na literatura relatos do emprego de reações de acoplamento catalisadas por paládio para a introdução de substituintes somente nas posições 4 (GAO *et. al.*, 2010; LUO *et. al.*, 2009a; LUO *et. al.*, 2009b) e 7 (LI *et. al.*, 2005) da estrutura da cumarina. Portanto, é interessante e importante um estudo da reação de acoplamento catalisada por paládio para a inserção de substituintes na posição 8.

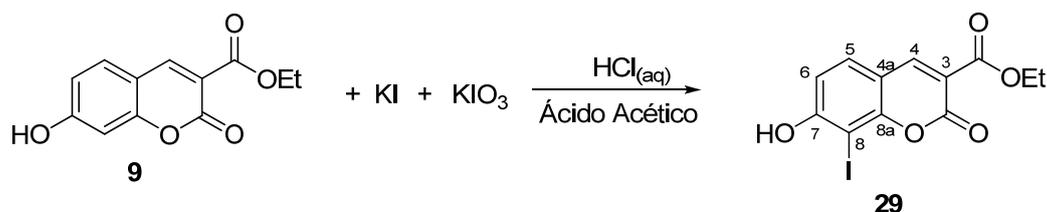
A rota sintética adotada para a obtenção destes compostos (Esquema 26) consiste primeiramente na síntese do haleto orgânico (iodo cumarina **29**) para que em seguida possa ser realizado o acoplamento de Suzuki com diferentes ácidos borônicos na presença de uma base.



Esquema 26. Retrossíntese dos compostos via acoplamento de Suzuki.

Para a obtenção do composto **29** foi empregado o procedimento descrito por Adimurthy e col. (2003). Esta metodologia é interessante para a iodação de compostos aromáticos ricos em elétrons, pois a oxidação do iodeto resulta na formação *in situ* de espécies eletrofílicas que são responsáveis pela iodação do composto aromático em questão, permitindo assim a inserção do átomo de iodo em apenas uma posição da estrutura aromática, visto que a hidroxila pode orientar a iodação tanto na posição 8 quanto na posição 6.

A iodação do composto **9** foi feita com 0,66 mol equiv. de iodeto de potássio e 0,33 mol equiv. de iodato de potássio e um mol equiv. de ácido mineral (HCl), que resulta na geração *in situ* de um cátion iodo (ADIMURTHY, 2003). A mistura reacional foi mantida sob agitação por um tempo de 4 horas e após este período o composto **29** foi obtido em 88% de rendimento (Esquema 27).



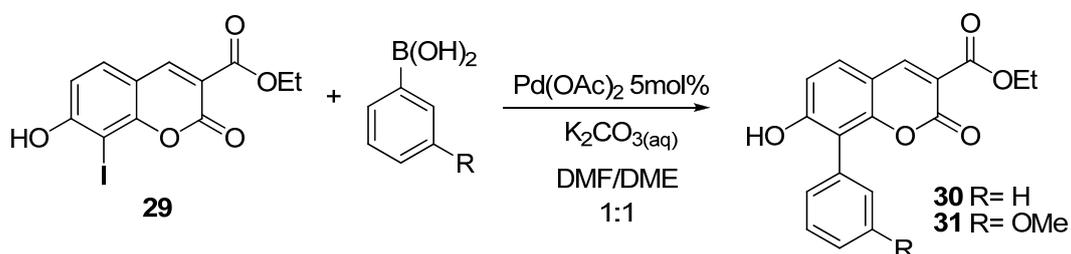
Esquema 27. Síntese do composto **29**.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400MHz) mostrou um singlete em  $\delta$  8,66 (s) correspondendo ao hidrogênio da posição 4. Dois dupletos em  $\delta$  7,77 (d,  $J=8,5\text{Hz}$ ) e  $\delta$  6,96 (d,  $J=8,5\text{Hz}$ ) correspondendo aos hidrogênios das posições 5 e 6 respectivamente. O grupo éster substituinte na posição 3 apresentou um quadrupeto em  $\delta$  4,28 (q) correspondente aos hidrogênios metilênicos e um tripeto em  $\delta$  1,31 (t) correspondendo aos hidrogênios metílicos. Não foi observado o sinal do deslocamento químico do hidrogênio da posição 8 e os dupletos referentes aos hidrogênios

aromáticos possuem uma constante de acoplamento de 8,55 Hz, indicando que estão localizados em *orto*.

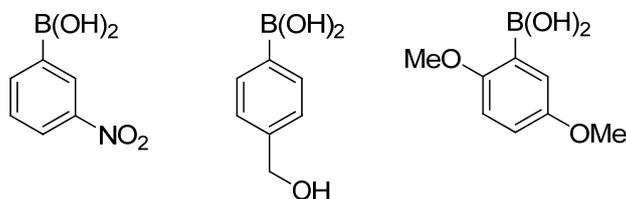
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou 12 sinais, sendo eles correspondentes a estrutura proposta:  $\delta$  14,0 correspondendo ao carbono metílico,  $\delta$  60,8 correspondendo ao carbono metilênico,  $\delta$  149,2 corresponde ao carbono metínico na posição 4 e  $\delta$  112,4 ao carbono da posição 3. Um sinal em  $\delta$  163,5 correspondendo ao carbono quaternário da carboxila do éster e  $\delta$  156,1 ao carbono quaternário da carboxila da lactona. Os sinais em  $\delta$  131,6 e 111,0 correspondem aos carbonos C-H nas posições 5 e 6 da estrutura da cumarina, os sinais em  $\delta$  109,6 e 156,6 aos carbonos quaternários da junção dos anéis e o sinal em  $\delta$  162,5 corresponde ao carbono quaternário na posição 7 da hidroxila. O sinal de deslocamento químico do carbono aromático ligado ao átomo de iodo aparece em 74,2 ppm.

Sintetizado o composto **29**, a próxima etapa foi a realização da reação de acoplamento cruzado (Esquema 28) com diferentes ácidos borônicos possuindo tanto grupos doadores quanto retiradores de elétrons.



Para a obtenção dos compostos de acoplamento, utilizou-se a metodologia descrita por Prediger *et al.* (2006), na qual uma solução de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  em água é adicionada à mistura reacional contendo a iodo cumarina (**29**), o ácido fenilborônico, o catalisador  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  em DMF e DME após 30 min de reação. No momento da adição observa-se claramente o desprendimento de gás,  $\text{CO}_2$ , resultante da formação de ácido carbônico no meio reacional. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 12 horas e ao término da reação o composto **30** foi obtido com rendimento de 50%. O mesmo procedimento foi realizado utilizando o ácido 3-metoxifenilborônico como organoborano e foi obtido o composto **31** com rendimento de 48%.

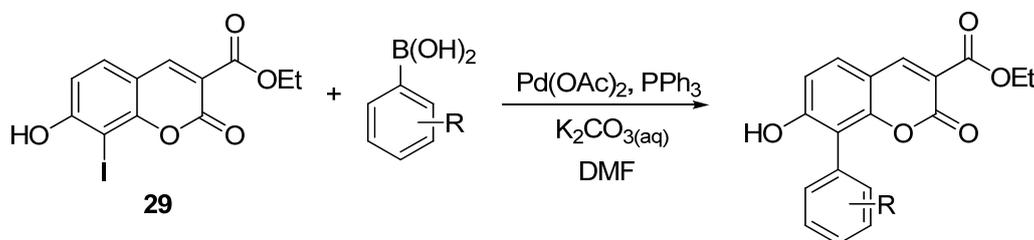
Entretanto, o emprego desta metodologia não foi eficaz quando se utilizou outros ácidos borônicos para a reação de acoplamento (Esquema 29).



Esquema 29. Ácidos borônicos testados no acoplamento de Suzuki.

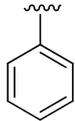
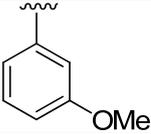
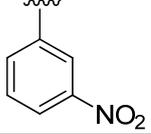
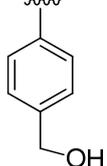
Considerando os rendimentos obtidos quando empregado o procedimento adaptado de Prediger *et al.* (2006) e visando a síntese de um número maior de cumarinas substituídas na posição 8, foi realizada uma busca na literatura e assim adotada uma versão adaptada da metodologia descrita por Moteki e col. (2008), utilizando como ligante a trifenilfosfina.

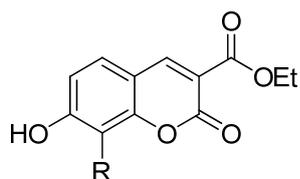
Nesta metodologia, uma solução de  $K_2CO_3$  em água foi adicionada à mistura reacional contendo o composto **29**, o ácido borônico, o catalisador  $Pd(OAc)_2$ , o ligante  $PPh_3$  em DMF. A mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por 4 horas (Esquema 30). Os compostos obtidos através da reação de Suzuki, e os respectivos rendimentos estão sumarizados na Tabela 5.



Esquema 30. Acoplamento de Suzuki (Moteki e col (2008)).

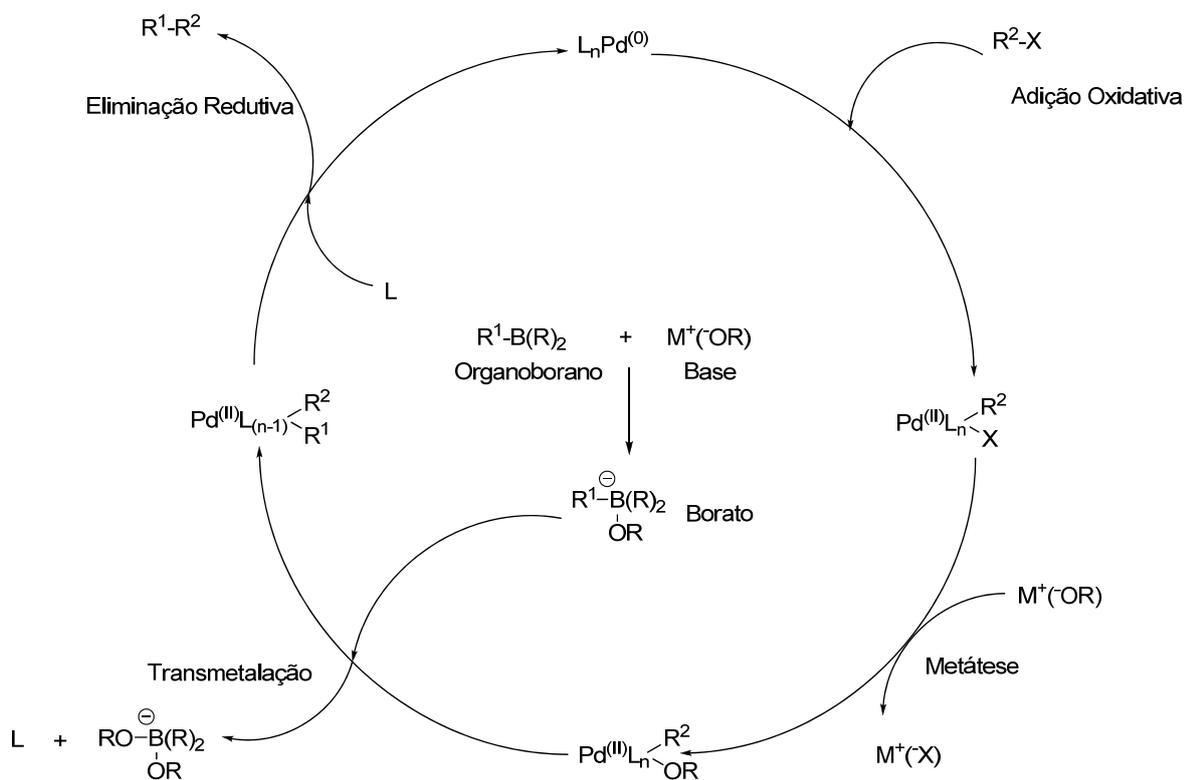
Tabela 5. Síntese dos compostos **30**, **31**, **32**, **33**.

Composto	R	Rendimento (%)
<b>30</b>		50
<b>31</b>		66
<b>32</b>		57
<b>33</b>		70



A adição de trifenilfosfina possibilitou que a reação fosse bem sucedida para a obtenção dos compostos **32** e **33**, e embora tenha sido aumentada a quantidade de reagentes utilizados na reação, o tempo reacional diminuiu consideravelmente e não foi preciso o uso de fontes de aquecimento.

O mecanismo do acoplamento de Suzuki é análogo aos ciclos catalíticos de outros acoplamentos e tem quatro etapas distintas: 1) adição oxidativa do haleto orgânico ao Pd<sup>0</sup> para formar Pd<sup>II</sup>; 2) troca de um ânion ligado ao paládio por um ânion da base (metátese); 3) transmetalização entre Pd<sup>II</sup> e o complexo de arilborato; e 4) eliminação redutiva para a formação da ligação sigma carbono-carbono e a regeneração de Pd<sup>0</sup>. Embora ácidos organoborônicos não sofram transmetalização com complexos de Pd<sup>II</sup>, os correspondentes *ate-complexos* rapidamente reagem. A quaternização do átomo de boro com um ânion aumenta com a nucleofilicidade do grupo aril e isto acelera sua transferência para o paládio na etapa de transmetalização. Ligantes muito volumosos e ricos em elétrons aumentam a reatividade de cloretos de arila não reativos pela aceleração da velocidade da etapa de adição oxidativa (Esquema 31) (MYAURA *et. al.*, 1995).



Esquema 31. Mecanismo do Acoplamento de Suzuki.

### 3.4 – Ensaios Biológicos

Os compostos sintetizados foram submetidos a dois ensaios preliminares para determinação da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase: Ellman (1961) e Marston (2002), utilizando como padrão as substâncias comercializadas para o tratamento da doença de Alzheimer: Galantamina, Tacrina e Fisostigmina (Figura 10).

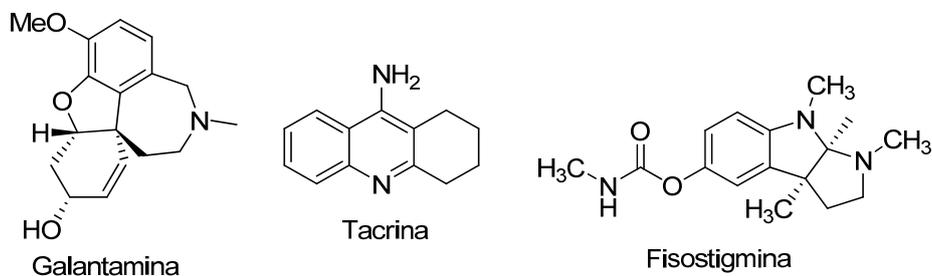


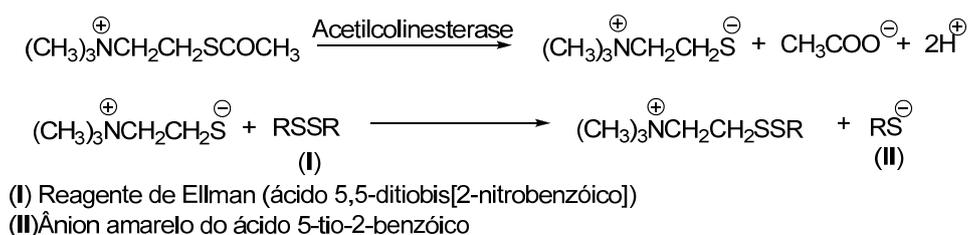
Figura 10. Substâncias padrões utilizadas nos ensaios com a AChE.

Os ensaios foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Carmem L. Cardoso (FFCL-RP, USP).

### 3.4.1 – Ensaio de Ellman

A atividade enzimática da AChE é avaliada por métodos colorimétricos utilizando o reagente de Ellman, o qual baseia-se na medida da velocidade de produção de tiocolina através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina.

Neste método, a tiocolina reage com o chamado reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis[ 2-nitrobenzóico] (DTNB) (I) formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo (II) com intensa absorção em 412 nm (Esquema 32).



Esquema 32. Catálise da hidrólise da acetiltiocolina e reação de Ellman.

Relatos na literatura indicam que compostos como aldeídos e aminas podem provocar resultados falso-positivo no ensaio de Ellman (RHEE, 2003). Estes compostos impedem a reação entre a tiocolina (produto da reação enzimática) e o reagente de Ellman, o que impediria a formação do ânion amarelo e resultaria na formação do halo branco. Portanto, nesse caso não há inibição da atividade enzimática, e sim da reação química entre o produto da reação e o corante. Assim, a fim de distinguir entre os compostos que atuam realmente na inibição da atividade enzimática e aqueles que atuam na reação química entre a tiocolina e o reagente de Ellman, as amostras foram submetidas ao teste de falso positivo. Os resultados estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultado do Ensaio de Ellman

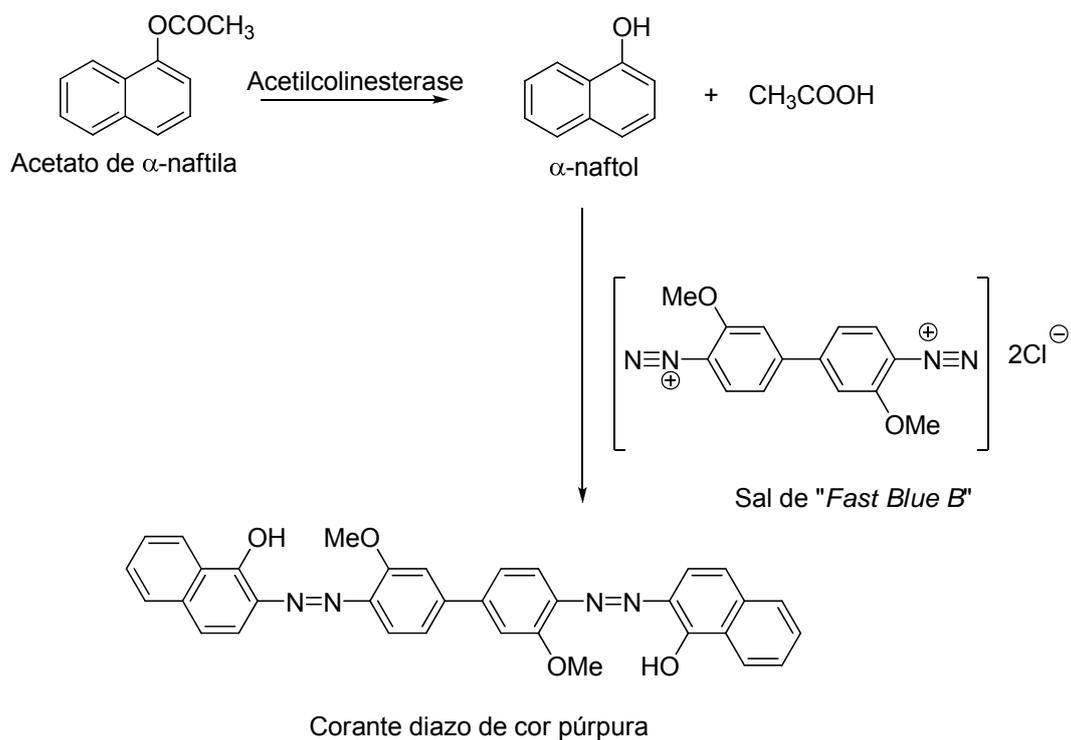
Composto	TLC-Ellman <sup>a</sup>	TLC-Ellman-falso positivo <sup>b</sup>
Tacrina	+	-
<b>17</b>	+	+
<b>19</b>	+	+
<b>20</b>	+	+
<b>18</b>	+	+
<b>15</b>	+	+
<b>16</b>	+	+
<b>22</b>	+	+
<b>23</b>	+	+
<b>14</b>	+	+
<b>11</b>	+	+
<b>12</b>	+	+
<b>13</b>	+	+
<b>10</b>	+	+
<b>30</b>	+	+
<b>31</b>	+	+
<b>32</b>	+	+
<b>33</b>	+	+

a = Ensaio de Ellman (+) inibição e b= falso positivo de Ellman (+) falso inibidor da AChE e (-) inibidor da AChE.

Devido aos resultados obtidos no teste de falso positivo e também à difícil visualização dos resultados, foi então realizado outro ensaio para melhor compreensão dos resultados.

### 3.4.2 – Ensaio de Marston

No ensaio de Marston (2002) a atividade enzimática é detectada pela conversão do acetato de  $\alpha$ -naftila a  $\alpha$ -naftol que reage com o sal de *Fast Blue B* formando um corante diazo de cor púrpura (Esquema 33). O resultado positivo é observado com a formação de halos brancos na placa cromatográfica, o que significa que o composto presente na amostra inibiu a reação enzimática, portanto não ocorrendo a formação do  $\alpha$ -naftol e a consequente formação do corante.



Esquema 33. Hidrólise do acetato de  $\alpha$ -naftila e a reação com Fast Blue B.

O ensaio foi realizado com as amostras numa concentração de  $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e solubilizadas em DMSO, Metanol e  $\text{CHCl}_3$  de acordo com a solubilidade de cada composto. Volumes de  $2,5\ \mu\text{L}$  de cada amostra foram aplicados nas placas cromatográficas e eluídas em  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  95:5 (v/v).

Depois de eluídas e secas, foram borrifadas sobre as placas uma solução tampão (pH=7,8) e uma solução contendo AChE e albumina bovina (utilizada para estabilizar), e então mantidas em um "cuba úmida" a  $37^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Após esse período, as soluções do "fast blue" em água e acetato de  $\alpha$ -naftila em etanol foram misturadas e borrifadas sobre as placas. Resultado positivo é observado quando a amostra inibe a enzima, a qual não reage com o acetato de  $\alpha$ -naftila, ocorrendo a formação de um halo branco (Tabela 7).

Portanto, foi possível concluir que a coleção de cumarinas enviadas para os ensaios são inibidoras da enzima acetilcolinesterase.

Tabela 7. Resultado do Ensaio de Marston.

Composto	TLC – Marston <sup>a</sup>
Tacrina	+
<b>17</b>	+
<b>19</b>	+
<b>20</b>	+
<b>18</b>	+
<b>15</b>	+
<b>16</b>	+
<b>22</b>	+
<b>23</b>	+
<b>14</b>	+
<b>11</b>	+
<b>12</b>	+
<b>13</b>	+
<b>10</b>	+
<b>30</b>	+
<b>31</b>	+
<b>32</b>	+
<b>33</b>	+

a = Ensaio de Marston (+) inibição

### 3.4.2 – Ensaio no IMER

Através dos ensaios preliminares de Ellman e Marston foi possível verificar que os compostos sintetizados são inibidores da AChE, contudo estes ensaios são apenas qualitativos, não possibilitando quantificar a concentração nem a porcentagem com que os compostos inibem a enzima.

Para a quantificação, foi realizado o experimento com a enzima acetilcolinesterase imobilizada em uma coluna capilar de sílica fundida. Neste ensaio, a coluna com a enzima imobilizada foi utilizada como coluna cromatográfica num sistema em fluxo, CLAE. O sistema de detecção utilizado foi um detector de arranjo de diodos - D.A.D e o comprimento de onda selecionado foi 412 nm, pois o ensaio é um método modificado de Ellman (1961).

As amostras foram injetadas em uma concentração de 1mg/mL na presença de uma concentração fixa do substrato enzimático acetiltiocolina. Foi

realizado um branco de cada amostra para analisar a interferência na banda de absorção do produto formado em 412 nm.

Para algumas amostras injetadas não foi possível o cálculo de inibição da atividade enzimática, pois os compostos analisados absorvem no mesmo comprimento de onda utilizado do ensaio (Figura 11). Por exemplo, no ensaio realizado com composto **17**, as injeções contendo o branco do inibidor (amostra sem substrato que leva a conversão de tiocolina) e amostra contendo o composto **17** + substrato (a fim de se calcular a inibição do produto formado) obtiveram banda cromatográfica mais intensa do que a banda referente à injeção do substrato que forma o produto tiocolina, dessa forma foi inviabilizado qualquer interpretação (Figura 12).

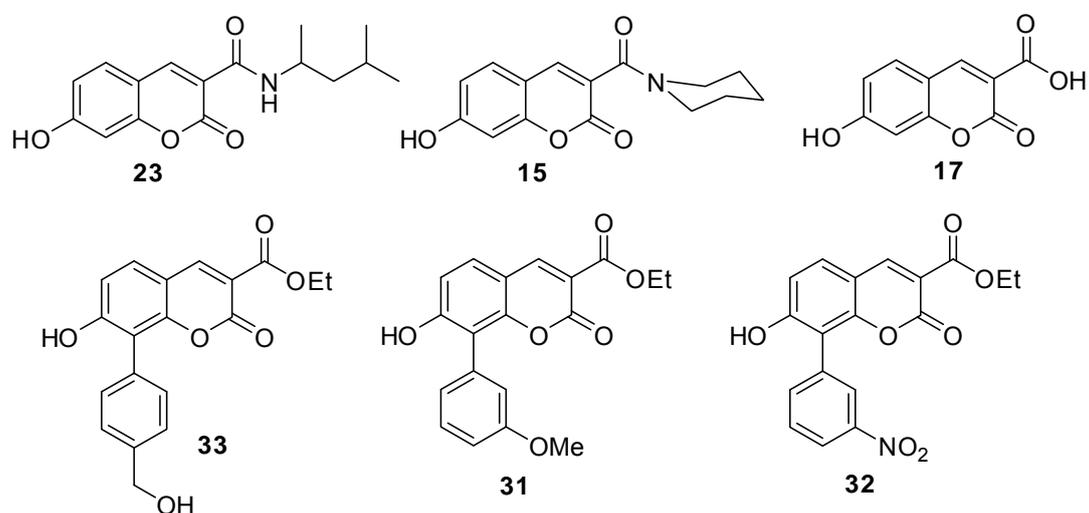


Figura 11. Compostos que não foi possível realizar o ensaio no IMER.

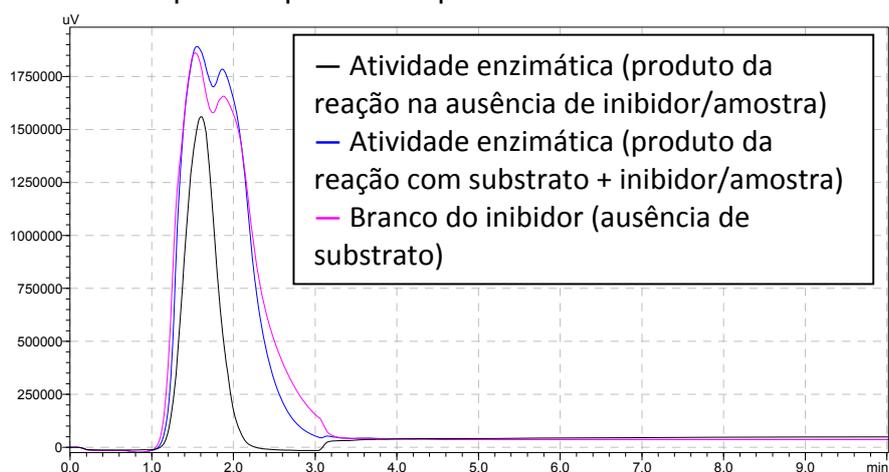


Figura 12. Cromatograma produzido pelo IMER-AChE referente ao composto **17**.

Para o composto **16** (Figura 13), assim como para os demais casos onde o composto não absorve no mesmo comprimento de onda empregado no experimento, foi possível calcular a porcentagem de inibição da atividade enzimática inicial da AChE, pois as bandas cromatográficas referente ao branco da amostra e a injeção da amostra propriamente dita não interferem de forma que inviabilize uma interpretação do ocorrido.

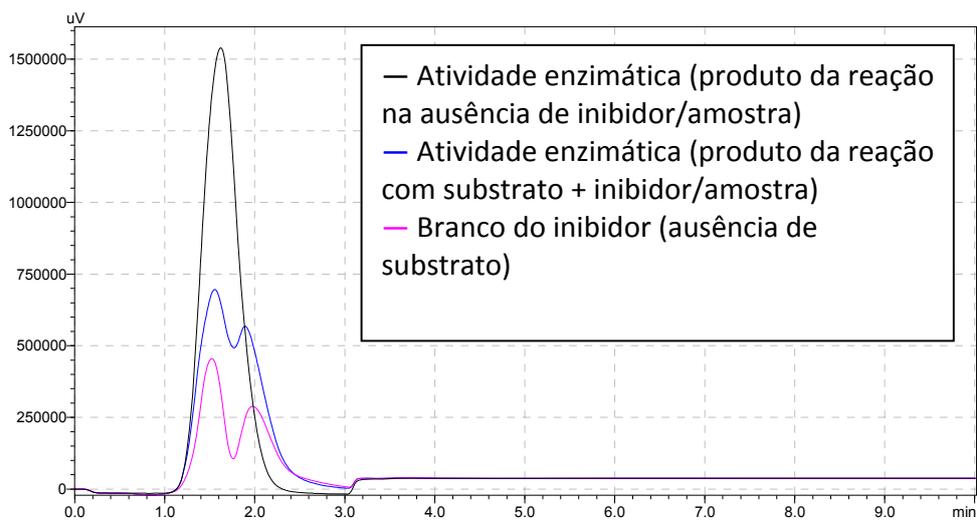
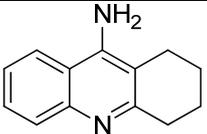
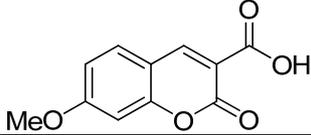
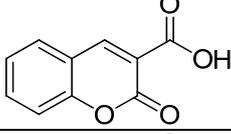
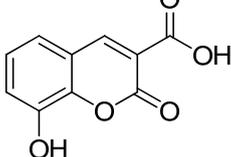
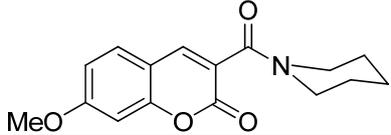
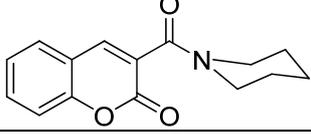
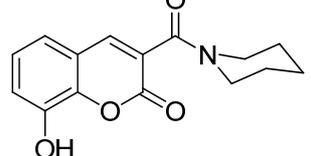
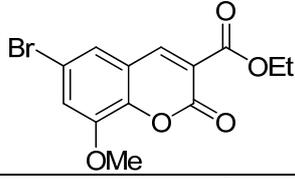
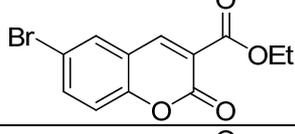
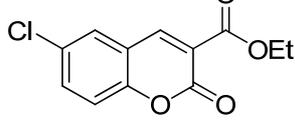
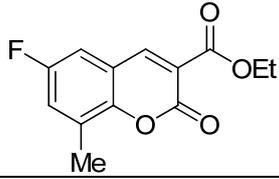
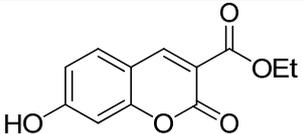
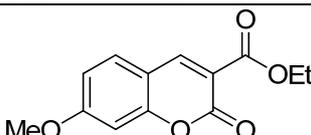
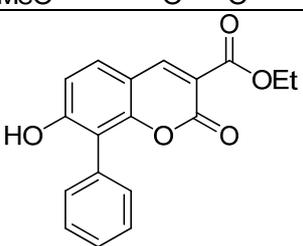
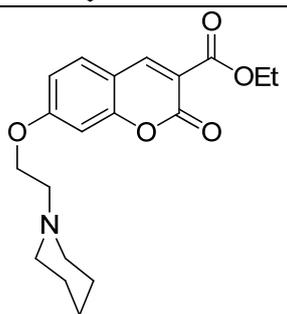
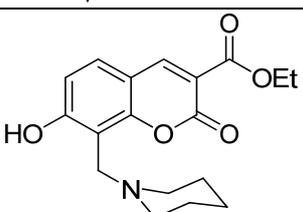


Figura 13. Cromatograma produzido pelo IMER-AChE referente ao composto **16**.

As porcentagens de inibição obtidas para os compostos analisados estão sumarizadas na Tabela 8.

Tabela 8. Porcentagem de inibição da enzima AChE.

Composto	Estrutura	Porcentagem de inibição (%)
Tacrina		97,9
19		82,7
20		86,5
18		13,7
16		80,7
22		45,2
24		2,3
14		73,2
11		45,6
12		43,2

13		83,6
9		39,8
10		46,6
30		41,6
27		85,9
28		69,3

Dentre o grupo de amidas analisado, o composto que apresentou maior atividade inibitória da AChE foi a amida piperidínica **16** (80,7%). A presença do grupo metoxila na posição 7 da estrutura da cumarina foi importante para este valor de inibição visto que a amida piperidínica **22**, a qual não possui substituintes na subunidade aromática da cumarina, apresentou um fator de inibição de apenas 45,2%.

Os ácidos precursores para a síntese das amidas também foram avaliados e o composto **20** foi o que apresentou maior inibição (86,5%). Entre os ácidos, a

presença de substituintes na subunidade aromática da estrutura diminui a atividade do composto frente a AChE, os ácidos **19** (grupo metoxila na posição 7) e **18** (grupo hidroxila na posição 8) demonstram porcentagens de inibição de 82,7% 13,7%, respectivamente.

Outro fato observado foi que os ácidos carboxílicos foram mais ativos que as correspondentes amidas piperidínicas na inibição da enzima. A relação de decréscimo na porcentagem de inibição entre os compostos **19** e **16** foi de apenas 2,0%, entretanto, para os compostos **20** e **22**, a diferença foi de 41,3%.

Dentre o grupo dos ésteres mono substituídos, o composto **10** apresentou o maior valor de inibição 46,6%, entre os substituídos com halogênios, o composto **11** (bromo na posição 6) foi melhor inibidor que o o composto **12** (cloro na posição 6).O composto **14** apresentou uma porcentagem de inibição de 73,2%, mostrando que a inserção de um grupo metoxila na posição 8 do composto **11**, aumentasse a inibição em 27,6%. A cumarina **13** foi o composto que apresentou a maior porcentagem de inibição, 83,6% (Figura 14).

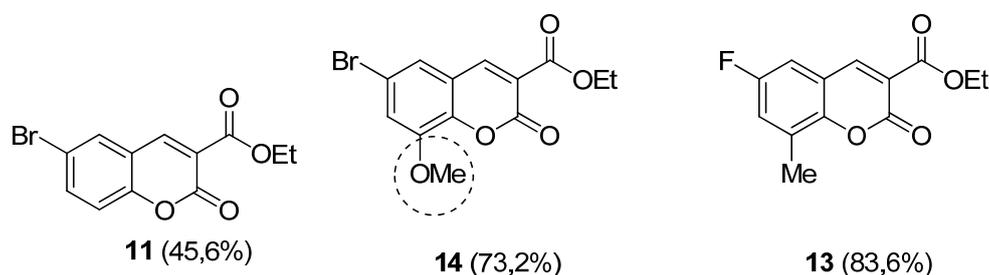


Figura 14. Compostos que mostraram inibição da AChE.

Os compostos que mostraram a maior porcentagem de inibição foram escolhidos para o cálculo de  $IC_{50}$ . A cumarina **27** foi o composto que apresentou o menor  $IC_{50}$  (6,3  $\mu$ M) (Figura 15). Os valores obtidos estão dispostos na Tabela 9.

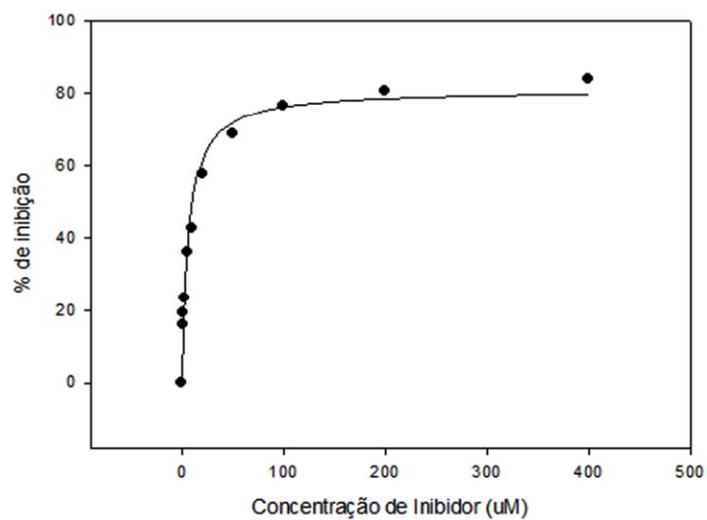


Figura 15. Gráfico de IC<sub>50</sub> do composto **27**.

Tabela 9. Valores de IC<sub>50</sub> de inibição da enzima AChE.

Composto	Estrutura	IC <sub>50</sub> (μM)
Tacrina		0,087
<b>19</b>		483
<b>20</b>		657
<b>16</b>		790
<b>14</b>		573

13		156
27		6,3
28		17,1

Comparando estes resultados com os da literatura, podemos concluir que o composto **27** apresentou um  $IC_{50}$  menor do que o derivado da espectralina (**34**). O composto **34** é obtido através de duas transformações químicas partindo do alcalóide natural espectralina. Entretanto, a obtenção deste composto em escala industrial é desfavorável devido à complexidade de sua estrutura, pois existem três centros estereogênicos, o que envolveria reações estereoespecíficas. O composto **27** apresenta uma estrutura simples e pode ser sintetizado através de duas reações químicas simples e que levam a formação do produto com bom rendimento (Figura 16).

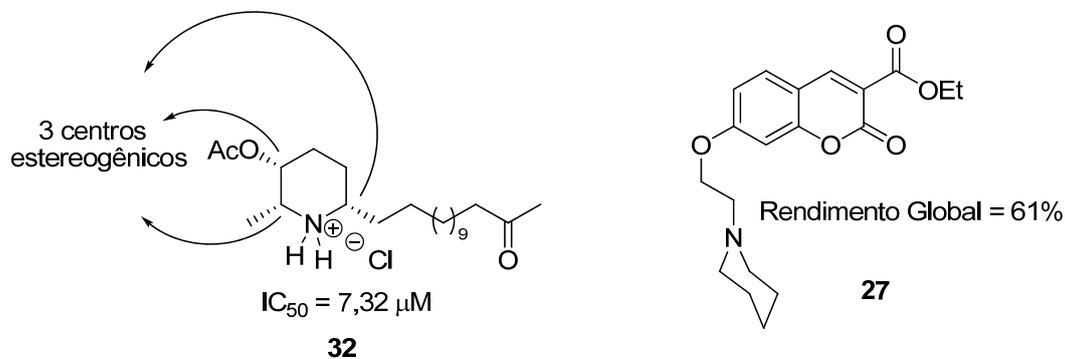


Figura 16. Comparação entre o composto **32** e **27**.

# **Conclusões e Perspectivas**

## 4. Conclusões e Perspectivas

As reações empregadas neste trabalho permitiram a síntese de 23 compostos, dentre eles cumarinas piperidínicas contendo o fragmento piperidínico tanto na função amida quanto amina.

A utilização de microondas mostrou ser uma metodologia interessante para a síntese dos análogos 3-carboxilato de etila, os quais não foram possíveis de obter através do método convencional aplicado para a síntese do composto **9**.

A reação de Suzuki mostrou-se uma ferramenta interessante e importante para a síntese de cumarinas substituídas na posição 8. Este tipo de acoplamento cruzado catalisado por paládio é inédito para a construção de ligação C-C nesta posição da estrutura da cumarina. Embora o uso de trifenilfosfina como ligante aumentasse a quantidade de subprodutos gerados na reação, o mesmo permitiu que os compostos fossem obtidos com melhor rendimento e com menor tempo reacional.

Embora os ensaios preliminares tenham mostrado que os compostos sintetizados são inibidores da acetilcolinesterase, ao se calcular a porcentagem de inibição, foi observado que os mesmos são fracos inibidores da enzima. O composto 2-oxo-7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)-2*H*-cromeno-3-carboxilato de etila **27** mostrou-se como o melhor inibidor para a AChE, apresentando um IC<sub>50</sub> de 6,3 µM.

O composto **27** apresentou um IC<sub>50</sub> menor do que o derivado da espectralina (**34**), o que é vantajoso para o desenvolvimento de um fármaco a ser utilizado no tratamento da doença de Alzheimer, devido à simplicidade de sua estrutura se comparado com a do alcalóide natural.

Como perspectivas, serão realizados ensaios para avaliar o mecanismo de inibição dos compostos frente a AChE e também ensaios com a enzima butirilcolinesterase, enzima análoga a AChE, a fim de avaliar a seletividade dos compostos sintetizados frente a inibição destas enzimas.

# **Procedimento Experimental**

## 5. Procedimento Experimental

### 5.1. Aspectos Gerais

Os espectros no infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Bomem modelo M102 com transformada de Fourier e calibração interna. As amostras foram masseradas em KBr e prensadas de forma a gerar as pastilhas utilizadas na obtenção dos espectros de absorção. As absorções foram expressas em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) foram registrados em um espectrômetro Bruker AC-200 e 400 MHz. Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

Os solventes utilizados foram todos de grau técnico e foram destilados antes de serem utilizados. Os solventes anidros foram obtidos por tratamento convencional (PERRIN, 1988). Os demais reagentes foram obtidos da Aldrich Co. e utilizados sem purificação prévia.

As reações feitas sob irradiação de micro-ondas foram realizadas em um forno da CEM Discover®.

Nas separações feitas por cromatografia em coluna utilizou-se sílica gel 60, 230 - 400 mesh ASTM Merck e sílica gel 60 A, 70-230 mesh Aldrich Co. As análises cromatográficas em camada delgada foram efetuadas empregando-se as placas comerciais da Riedel-de Haën (60 F 254), as quais foram reveladas em luz ultravioleta (254 nm) e solução de vanilina em ácido sulfúrico e etanol (vanilina 6% m/v, 4% de ácido sulfúrico e 10% de água, v/v em etanol).

## 5.2. Obtenção do 7-hidroxi-2oxo-2H-3-cromenocarboxilato de etila (9).

Em um balão de fundo redondo foi adicionado o 2,4-diidroxibenzaldeído (0,512 g; 3,70 mmol), malonato de dietila (1,27 g; 7,90 mmol) e em seguida piperidina (10 gotas). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 2 horas. Adicionou-se então uma solução de HCl 1mol/L (5mL) e o precipitado formado foi filtrado e lavado com água fria (10mL). O sólido obtido foi purificado em uma coluna cromatográfica flash utilizando como eluente uma mistura de diclorometano e acetato de etila (7:3). Obteve-se o produto desejado (0,735g) com 97% de rendimento.

IV ( $\nu_{\text{máx}}$ ,KBr): 970, 1037, 1606, 1623, 1681, 1719, 1749, 2767, 2835, 3467  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$ : 11,07 (s, OH), 8,66 (s, 1H), 7,74 (d,  $J= 8\text{Hz}$ , 1H), 6,83 (dd,  $J= 2$  e  $8\text{Hz}$ , 1H), 6,71 (d,  $J= 2\text{Hz}$ , 1H), 4,24 (q, 2H), 1,28 (t, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO)  $\delta$ : 14,1; 60,8; 101,7; 110,4; 112,0; 113,9; 132,1; 149,4; 156,3; 157,0; 162,9; 164,0.

## 5.3. Obtenção do 7-metoxi-2oxo-2H-3-cromenocarboxilato de etila (10).

Em um balão de duas vias de fundo redondo equipado com condensador de refluxo, contendo uma solução da cumarina **9** (60 mg, 0,257 mmol) em acetona anidra (4 mL) foi adicionado  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (43 mg, 0,308 mmol) e em seguida sulfato de dimetila (39 mg, 0,308 mmol). A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 4 horas, em seguida deixou-se a mistura em repouso até atingir a temperatura ambiente. Adicionou-se uma solução saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mL) e extraiu-se a reação com acetato de etila (4 x 10 mL). Secou-se a fase orgânica com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e evaporou-se o solvente em um rotaevaporador. O sólido obtido foi purificado em coluna *flash* utilizando-se uma mistura de diclorometano e acetato de etila (95:5) como eluente. Obteve-se o produto desejado (38,3 mg) com 60% de rendimento.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,52 (s, 1H); 7,52 (d,  $J= 8\text{Hz}$ , 1H); 6,91 (dd,  $J= 2$  e  $8\text{Hz}$ , 1H); 6,83 (d,  $J= 2\text{Hz}$ , 1H); 3,92 (s, 3H); 4,41 (q, 2H); 1,42 (t, 3H).

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14,2; 56,0; 61,6; 100,4; 111,6; 113,6; 114,2; 130,7; 148,8; 157,0; 157,5; 163,4; 165,1.

#### 5.4. Obtenção dos compostos 11 - 14.

Em um tubo de microondas (10 mL) equipado com barra magnética foram adicionados o apropriado 2-hidroxi-benzaldeído (1 mmol), malonato de dietila (320,3 mg; 2 mmol) e piperidina (3,4 mg; 0,04 mmol). O tubo foi selado e irradiado por microondas a uma temperatura de 170°C por 30 minutos. Depois de terminado o tempo reacional, a mistura foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente, transferida para um balão de fundo redondo e evaporado o excesso de reagente (malonato de dietila). O sólido residual foi purificado por recristalização em etanol, fornecendo o produto desejado com rendimentos especificados na Tabela 10.

Tabela 10. Condições reacionais para a obtenção das cumarinas ácidas.

Composto	2-hidroxi-benzaldeído	Rendimento (%), m (mg)
	m (mg)	
11	5-bromo	46; 136,7
	201,02	
12	5-cloro	44; 110, 7
	156,5	
13	5-fluor-3-metil	49; 122,6
	154,1	
14	5-bromo-3-metoxi	52; 170,1
	231	

**6-bromo-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxilato de etila (11).**

IV ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr): 1704; 1753; 2972; 2898; 3089; 3070  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,44 (s, 1H), 7,75 (d,  $J=2$  Hz, 1H); 7,72 (dd,  $J=2$  e 8 Hz, 1H); 7,26 (d,  $J=8$  Hz, 1H); 4,42 (q, 2H); 1,41 (t, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 14,1; 62,1; 117,3; 118,5; 119,3; 119,4; 131,4; 136,8; 146,9; 153,9; 155,9 e 162,6.

**6-cloro-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxilato de etila (12).**

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,44 (s, 1H), 7,60 (d,  $J=2$  Hz, 1H); 7,58 (d,  $J=2$  Hz, 1H); 7,30-7,33 (m, 1H); 4,42 (q, 2H); 1,41 (t, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 14,2; 62,2; 118,3; 118,8; 119,5; 128,4; 130,1; 134,1; 153,5; 156,0 e 162,7.

**5-fluor-3-metil-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxilato de etila (13).**

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,43 (s, 1H), 7,22-7,25 (m, 1H); 7,12 (dd,  $J=2$  e 7 Hz, 1H); 4,42 (q, 2H); 2,47 (s, 3H); 1,41 (t, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 14,2; 15,6; 62,1; 111,6; 111,9; 118,1; 119,2; 122,7; 122,9; 128,9; 129,0; 147,8; 149,8; 156,4; 157,1; 159,5 e 162,9.

**5-bromo-3-metoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxilato de etila (14).**

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,39 (s, 1H), 7,32 (d,  $J=2$  Hz, 1H); 7,25 (d,  $J=2$  Hz, 1H); 4,42 (q, 2H); 3,97 (s, 3H); 1,41 (t, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 14,1; 56,5; 62,1; 116,9; 118,7; 119,3; 119,6; 122,4; 143,9; 147,2; 147,7; 155,4 e 158,0.

## 5.5. Tentativa de obtenção dos compostos 15 e 16.

Em um balão de fundo redondo de 10 mL adicionou-se o composto **9** (50 mg, 0,2 mmol) em tolueno (1mL), APTS (10 mg, 0,06 mmol) e piperidina (170 mg, 2,0 mmol). A mistura reacional foi refluxada por um período de 24 horas. A reação foi acompanhada por CCD e não foi observada a formação de produtos. Este mesmo procedimento para a obtenção de amidas a partir do composto **9** foi realizado para o composto **10**, e sob as mesmas condições reacionais não foi verificada a formação dos produtos.

## 5.6. Obtenção das cumarinas ácidas 17 - 20.

A uma suspensão do correspondente benzaldeído em água (10 mL) foram adicionados o ácido de Meldrum e acetato de amônio. A suspensão foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água fria (2 x 6,0 mL) e seco à vácuo, fornecendo o produto desejado com os rendimentos especificados na Tabela 11.

Tabela 11. Condições reacionais para a obtenção das cumarinas ácidas.

Cumarina Ácida	Benzaldeído m (g)/ mmol	Ácido de Meldrum m (g)/ mmol	NH <sub>4</sub> OAc m (mg)/ mmol	Rendimento (%), m(g)
<b>17</b>	2,4-dihidroxi 1,003 / 7,24	1,268 / 8,69	289 / 3,7	98, 1,466
<b>18</b>	2,3-dihidroxi 1,003 / 7,24	1,251 / 8,6	138 / 1,8	93, 1,390
<b>19</b>	2-hidroxi-4-metoxi 0,515 / 3,28	0,562 / 3,9	142 / 1,9	93, 0,687
<b>20</b>	2-hidroxi 1,030 / 8,43	1,456 / 10,12	162 / 2,1	93, 1,503

**Ácido 7-hidroxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (17).**

IV ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr): 1458; 1620; 1714; 1775; 3118; 3523  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8,54 (s, 1H), 7,68 (d,  $J$ = 8 Hz, 1H); 6,80 (dd,  $J$ = 2 e 10 Hz, 1H); 6,69 (d,  $J$ = 2Hz, 1H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 99,4; 101,2; 110,2; 114,6; 131,0; 146,1; 156,7; 158,8; 165,1; 165,2.

**Ácido 8-hidroxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (18).**

IV ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr): 1458, 1620, 1693, 1775, 3039 , 3475  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8,68 (s, 1H), 7,32-7,27 (m, 1H), 7,21 (sl, 1H), 7,19 (sl, 1H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 118,1; 118,8; 119,9; 120,3; 127,7; 143,0; 144,3; 148,6; 156,7; 163,9.

**Ácido 7-metoxi-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (19).**

IV ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr): 802, 1203, 1022, 1688, 1733, 2759, 2879, 3114  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 8,99 (s, 1H), 7,75 (d,  $J$ =10 Hz, 1H), 7,12 (dd,  $J$ = 2 e 10 Hz, 1H), 6,99 (d,  $J$ =2 Hz, 1H), 4,01 (s, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ): 56,1; 100,2; 111,7; 113,0; 115,8; 131,1; 147,4; 156,5; 157,3; 164,1; 164,4.

**Ácido 2-oxo-2H-cromeno-3-carboxílico (20).**

IV ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr): 1423, 1684, 1745, 2927, 3423  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8,96 (s, 1H); 7,74-7,69 (m, 2H); 7,43-7,37 (m, 2H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 116,0; 117,9; 118,3; 124,7; 130,1; 134,1; 148,2; 154,4; 156,8; 163,8.

## 5.7. Obtenção das amidas cumarínicas 15, 16, 22 - 25.

Em um balão de fundo redondo, sob atmosfera de nitrogênio, provido de agitação magnética e condensador de refluxo, a cumarina ácida foi dissolvida em  $\text{SOCl}_2$  (6 mL, 82 mmol) e em seguida o sistema foi aquecido (refluxo) até aproximadamente  $70^\circ\text{C}$ . Após 7 horas de reação, foi adicionado hexano anidro (10 mL) e o sistema de refluxo foi trocado por um sistema de destilação a fim de retirar o excesso de cloreto de tionila. Este procedimento foi repetido duas vezes. O cloreto do ácido obtido foi diluído em diclorometano (5 mL) e sob atmosfera de nitrogênio e banho de gelo, a amina correspondente foi adicionada aos poucos. A mistura reacional foi aquecida a  $50^\circ\text{C}$  e após 15 horas de reação, adicionou-se uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (15mL) e a fase orgânica foi extraída com diclorometano (4 x 15mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado em um rota-evaporador. O produto obtido foi purificado em uma coluna cromatográfica flash utilizando como eluente uma mistura de acetato de etila e hexano (7:3). As quantidades dos reagentes utilizados assim como os rendimentos obtidos nas reações estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Condições reacionais para a obtenção das amidas.

Amida cumarínica	Cumarina Ácida m (mg)/ mmol	Amina m (mg)/ mmol	Rendimento (%), m (mg)
<b>15</b>	<b>17</b> 214 / 1,03	106 / 1,248	40, 112
<b>16</b>	<b>19</b> 207 / 0,9	172 / 2,02	52, 140
<b>22</b>	<b>20</b> 203 / 1,06	172 / 2,02	56, 152
<b>23</b>	<b>17</b> 103 / 0,5	72 / 0,7	62, 90
<b>24</b>	<b>18</b> 100 / 0,48	172 / 2,02	54, 71
<b>25</b>	<b>18</b> 100 / 0,48	96 / 0,96	31, 43

**7-hidroxi-3-(piperidin-1-ilcarbonil)-2H-cromeno-2-ona (15).**

IV ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr): 1623, 1719, 2849, 2937, 3053  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, MeOD)  $\delta$ : 7,95 (s,1H), 7,53 (d,  $J=8\text{Hz}$ ,1H), 6,83 (dd,  $J=2$  e 10 Hz,1H) 6,75 (d,  $J=2\text{Hz}$ ,1H), 3,71-3,68 (m,2H), 3,41 – 3,36 (m,2H),  $\delta$  1,67 (sl,6H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 23,8; 25,1; 25,8; 41,9; 47,4; 101,9; 110,7; 113,5; 120,3; 130,1; 142,1; 155,4; 157,8; 161,8; 163,0.

**7-metoxi-3-(piperidin-1-ilcarbonil)-2H-cromeno-2-ona (16).**

IV ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr): 1027, 1224, 1615, 1717, 2854, 2944  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :  $\delta$  7,84 (s,1H);  $\delta$  7,42 (d,  $J=8\text{Hz}$ , 1H); 6,83 (d,  $J=2\text{Hz}$ ,1H); 6,88 (dd,  $J=2$  e 8 Hz,1H); 3,89 (s,3H); 3,71 (sl,2H); 3,34 (sl,2H); 1,66 (sl,6H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 24,3; 25,6; 26,3; 42,4; 47,9; 56,5; 101,1; 112,3; 113,3; 121,9; 130,4; 142,4; 155,8; 158,3; 163,3; 163,5.

**3-(piperidin-1-ilcarbonil)-2H-cromeno-2-ona (22).**

IV ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr): 1252, 1625, 1717, 2853, 2935 $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,87 (s,1H); 7,63 – 7,51 (m,2H); 7,37 – 7,28 (m,2H); 3,72 (sl,2H); 3,34 (sl,2H); 1,67 (sl,6H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 24,3; 25,6; 26,3; 42,4; 47,8; 114,1; 118,8; 125,2; 125,7; 129,3; 133,0; 141,9; 153,8; 163,0.

**7-hidroxi-N-(4-metilpentan-2-il)-2-oxo-2H-cromeno-3- carboxamida (23).**

IV ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr): 1645, 1714, 2921, 2958, 3209, 3288  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,78 (s,1H), 7,53 (d,  $J=8\text{Hz}$ ,1H), 6,96 (dl,  $J=2\text{Hz}$ ,1H), 6,93 (dd,  $J=2$  e 8 Hz,1H), 0,89 (s, 3H), 0,93 (s,3H), 1,23 (d,  $J=6\text{Hz}$ ,3H), 1,77 (sl,2H), 4,31 – 4,10 (m,1H), 1,52-1,34 (m,1H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO)  $\delta$ : 21,2;  $\delta$  22,1;  $\delta$  22,8; 24,6; 42,9; 45,4; 101,7; 111,1; 113,7; 114,3; 131,9; 147,9; 156,2; 160,7; 161,2; 163,5.

**8-hidroxi-3-(piperidin-1-ilcarbonil)-2H-cromeno-2-ona (24).**

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 10,32 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,72-7,13 (m, 3H), 3,58-3,55 (m, 2H), 3,32-3,29 (m, 2H), 1,64 – 1,57 (m, 2H), 1,54 – 1,48 (m, 4H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 23,8; 25,2; 25,8; 42,0; 47,4; 118,7; 118,8; 119,2; 124,7; 125,0; 141,8; 142,0; 144,5; 157,5 e 162,6.

**8-hidroxi-N-cicloexil-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida (25).**

IV ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr): 1643, 2852, 2931, 3205, 3317  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,12 (s, 1H), 6,69 (dd,  $J = 2$  e 8 Hz, 1H), 6,51 (dd,  $J = 8$  e 9 Hz, 1H), 6,90 (dd,  $J = 2$  e 8 Hz, 1H), 3,47 – 3,33 (m, 1H), 1,98 – 1,27 (m, 10H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO)  $\delta$ : 167,9; 163,8; 152,9; 146,2; 121,7; 117,5; 116,9; 102,9; 64,1; 33,5; 25,0; 23,6.

**5.8. Tentativa de obtenção das amidas via reação de amidação catalisada por ácido borônico.**

Em um balão de duas vias de fundo redondo equipado com um Dean-Stark, foi adicionado o ácido fenilborônico (2,6 mg; 0,022 mmol) a uma solução do composto **19** (50 mg; 0,22 mmol) em tolueno anidro. À mistura reacional foi adicionado a piperidina (18,7 mg; 0,22 mmol) e refluxada por um tempo de 12 horas. A reação foi acompanhada por CCD e não foi observada a formação de produtos. O mesmo procedimento foi testado utilizando como ácido carboxílico o composto **20**, e também foi avaliada a reação para outras aminas, como exemplo a n-butilamina, no entanto, sob as mesmas condições reacionais não foi verificada a formação dos produtos.

### 5.9. Obtenção do *N*-butil-7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (26).

Em um balão de fundo redondo equipado com condensador de refluxo, contendo uma solução da cumarina **9** (50 mg, 0,214 mmol) em diclorometano (5 mL) foi adicionado a *n*-butilamina (44 mg, 0,599 mmol) e em seguida a mistura reacional foi mantida sob refluxo por 24 horas. Após o tempo reacional deixou-se a mistura em repouso até atingir a temperatura ambiente. Adicionou-se uma solução aquosa de HCl 1M (10 mL) e extraiu-se a reação com diclorometano (4 x 10 mL). Secou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporou-se o solvente em um rotaevaporador. O produto obtido foi purificado em coluna *flash* utilizando uma mistura de diclorometano e acetato de etila (7:3) como eluente. Obteve-se o produto desejado (20,9 mg) com 38% de rendimento.

IV ( $\nu_{\text{máx}}$ , KBr): 1620, 1710, 2783, 2850, 3166, 3467 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$ : 8,31 (s, 1H), 7,14 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6,22 (dd, *J* = 2 e 8 Hz, 1H), 6,13 (sl, 1H), 3,48 (t, 2H), 1,88 – 1,74 (m, 2H), 1,66 – 1,48 (m, 2H), 0,89 (t, 3H).

### 5.10. Tentativa de redução das amidas piperidínicas.

Para uma solução do composto **22** (50 mg, 0,194 mmol) em THF (5 mL) sob atmosfera de nitrogênio foi adicionada gota a gota uma solução de Me<sub>2</sub>.BH<sub>3</sub> (20  $\mu$ L, 0,194 mmol) em THF (1mL) a temperatura ambiente por 30 minutos e então a mistura foi agitada por 2 horas. Adicionou-se NaBH<sub>4</sub> (1 mg, 0,026 mmol) e agitou-se a solução por 24 horas. A reação foi acompanhada por CCD e não foi observada a formação de produtos. Adicionou-se metanol seco (5 mL) e agitou-se por mais 30 minutos à temperatura ambiente. O solvente foi evaporado e o material de partida foi recuperado.

O mesmo procedimento foi testado utilizando a amida **16**, e sob as mesmas condições reacionais não foi verificada a formação do produto de redução.

### 5.11. Obtenção do 2-oxo-7-(2-(piperidin-1-il)etoxi)-2H-cromeno-3-carboxilato de etila (27).

Em um balão de fundo redondo contendo a solução da cumarina **9** (61,2 mg; 0,261 mmol) em DMF (4 mL) foi adicionado K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (80 mg; 0,574 mmol) e a mistura foi mantida sob agitação por 10 minutos. Foi adicionado o cloridrato de 3-cloro-etil-piperidina (58 mg; 0,313 mmol), KI (2 mg; 0,012 mmol) e a mistura reacional foi agitada a temperatura de 70°C por um período de 15 horas. O solvente foi evaporado e o produto foi purificado em uma coluna cromatográfica flash utilizando como eluente uma mistura de diclorometano e metanol (95:5). O composto **27** foi obtido como um sólido amarelo com rendimento de 62%.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8,50 (s, 1H), 7,49 (d, *J* = 8Hz, 1H), 6,90 (dd, *J* = 2 e 8Hz, 1H), 6,82 (d, *J* = 2Hz, 1H), 4,40 (q, 2H), 4,18 (t, 2H), 2,80 (t, 2H), 2,52-2,50 (m, 4H), 1,64-1,58 (m, 4H), 1,48-1,44 (m, 2H), 1,40 (t, 3H).

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 14,2; 24,1; 25,9; 55,0; 57,4; 61,6; 66,9; 101,1; 111,6; 114,0; 114,1; 130,6; 148,9; 157,1; 157,5; 163,4 e 164,4.

### 5.12. Obtenção do 7-hidroxi-2-oxo-8-(piperidin-1-ilmetil)-2H-cromeno-3-carboxilato de etila (28).

A uma solução de piperidina (22,8 mg; 0,268 mmol) em etanol (2 mL) foi adicionado uma solução aquosa de formaldeído 37% (40 µL; 0,536 mmol) e a mistura reacional foi mantida sob refluxo. Após 30 minutos, foi adicionada uma solução do composto **9** (62,8 mg; 0,268 mmol) em etanol (7 mL). A mistura reacional foi então mantida sob agitação e refluxo por um tempo de 15 horas. Ao término do tempo reacional, o solvente foi evaporado e o produto foi purificado em coluna cromatográfica flash utilizando como eluente uma mistura de diclorometano e metanol (95:5). O composto **28** foi obtido como um sólido amarelo com rendimento de 40%.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8,53 (s, 1H), 7,56 (d,  $J$ = 8Hz, 1H), 6,55 (d,  $J$ = 8Hz, 1H), 4,23 (q, 2H), 4,05 (s, 2H), 2,82-2,80 (m, 4H), 1,66-1,60 (m, 4H), 1,51-1,46 (m, 2H), 1,28 (t, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 14,2; 22,4; 24,2; 52,3; 52,4; 60,2; 105,2; 106,7; 107,6; 116,4; 131,2; 149,3; 155,8; 156,6; 163,3 e 170,9.

### 5.13. Obtenção do 7-hidroxi-8-iodo-2-oxo-2H-cromeno-3-carboxilato de etila (29)

A solução da cumarina **9** (232 mg, 0,991 mmol) em ácido acético (6 mL) foi adicionada em um balão de fundo redondo de 50 mL e em seguida adicionou-se KI (109,6 mg; 0,660 mmol),  $\text{KIO}_3$  (70,6 mg, 0,330 mmol). A mistura foi tratada com HCl (0,991 mmol) em água (10 mL) por 45 min com auxílio de um funil de adição. Após a adição do ácido manteve-se a mistura reacional sob agitação por 3 horas à temperatura ambiente. O precipitado formado foi filtrado, lavado com uma solução saturada de bissulfito de sódio (10 mL) e com água fria (10 mL). O composto **29** foi obtido como um sólido amarelo com 88% (310 mg) de rendimento.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8,66 (s, 1H); 7,77 (d,  $J$ = 8,5Hz, 1H); 6,96 (d,  $J$ = 8,5Hz, 1H); 4,28 (q, 2H); 1,31 (t, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 14,0; 60,8; 74,2; 109,6; 111,0; 112,4; 131,6; 149,2; 156,1; 156,6; 162,5; 163,5.

### 5.14. Obtenção dos compostos **30**, **31** (sem $\text{PPh}_3$ ).

A solução do composto **29** (0,138 mmol, 50 mg) em DMF (2 mL) e DME (2 mL) foi adicionada em um Schlenk (50 mL) contendo  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (0,9 mg; 0,004 mmol) e o ácido borônico (0,165 mmol) sob atmosfera de argônio. A mistura resultante foi agitada por 30 minutos na temperatura ambiente, depois foi adicionada uma solução de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (91,4 mg; 0,662 mmol) em  $\text{H}_2\text{O}$  (2 mL) previamente desairada. Após a adição da solução básica, a mistura reacional foi deixada em refluxo por 12 horas. Ao término do

tempo reacional, a solução foi resfriada e filtrada com acetato de etila (20,0 mL) em um funil de placa sinterizada contendo sílica e celite. Evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O produto foi purificado em coluna cromatográfica usando sílica flash e como eluente diclorometano/acetato de etila 7:3. As quantidades de reagentes e os rendimentos estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13. Condições reacionais utilizadas no Acoplamento de Suzuki (1).

<b>Composto</b>	<b>Ácido Borônico m (mg) / mmol</b>	<b>Rendimento (%), m (mg)</b>
<b>30</b>	fenil 20,8 / 0,165	50, 21,4
<b>31</b>	3-metoxifenil 27,1 / 0,165	48, 22,4

### 5.15. Obtenção dos compostos 30 - 33 (com PPh<sub>3</sub>).

Em um balão monotubular de 10 mL contendo o composto **29** (0,143 mmol, 51,5 mg), Pd(OAc)<sub>2</sub> (1,6 mg; 0,005 mmol), PPh<sub>3</sub> (3,7 mg; 0,01 mmol) e o ácido borônico (0,165 mmol) sob atmosfera de argônio foi adicionado DMF (2 mL). A mistura resultante foi agitada por 15 minutos a temperatura ambiente, depois foi adicionada uma solução de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (59,2 mg; 0,429 mmol) em H<sub>2</sub>O (2 mL) previamente desairada. Após a adição da solução básica, a mistura reacional foi mantida sob agitação por 4 horas. Ao término do tempo reacional, a solução foi filtrada em um funil de placa sinterizada contendo sílica e celite com acetato de etila (20 mL). Evaporou-se o solvente a pressão reduzida e o produto de acoplamento cruzado foi purificado em coluna cromatográfica usando sílica flash e como eluente diclorometano/acetato de etila 7:3. As quantidades de reagentes e os rendimentos estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14. Condições reacionais utilizadas no Acoplamento de Suzuki (2).

Composto	Ácido Borônico m (mg)	Rendimento (%); m (mg)
<b>30</b>	fenil	50; 22,7
	20,1	
<b>31</b>	3-metoxi-fenil	66; 32,0
	25,0	
<b>32</b>	3-nitro-fenil	57; 28,8
	27,5	
<b>33</b>	4-hidroximetil-fenil	70; 34,0
	25,0	

**7-hidroxi-2-oxo-8-fenil-2H-cromeno-3- carboxilato de etila (30)**

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ: 8,83 (s, 1H); 7,89 (*d*, *J* = 8,5Hz, 1H); 7,15 (*d*, *J* = 8,5Hz, 1H); 7,46 - 7,37 (*m*, 5H); 4,37 (*q*, 2H); 1,41 (*t*, 3H).

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6) δ: 14,2; 60,9; 149,7; 110,7; 111,9; 113,8; 115,7; 127,5; 128,01; 130,7; 130,8; 131,5; 154,0; 156,5; 161,4; 163,0.

**7-hidroxi-2-oxo-8-(3-metoxifenil)-2H-cromeno-3-carboxilato de etila (31)**

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ: 8,70 (s, 1H); 7,76 (*d*, *J* = 8,4Hz, 1H); 7,02 (*d*, *J* = 8,4Hz, 1H); 7,38-7,35 (*m*, 1H); 6,97-6,94 (*m*, 3H); 4,26 (*q*, 2H); 3,77 (s, 3H); 1,29 (*t*, 3H).

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6) δ: 14,0; 55,0; 60,7; 110,6; 112,0; 112,8; 113,5; 115,5; 116,4; 122,9; 128,8; 130,7; 132,6; 149,5; 153,9; 156,0; 158,8; 161,0; 163,8.

**7-hidroxi-2-oxo-8-(3-nitrofenil)-2H-cromeno-3-carboxilato de etila (32)**

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ: 11,33 (s, 1H), 8,73 (s, 1H); 8,30-8,25 (*m*, 2H); 7,92 (*d*, *J* = 8Hz, 1H); 7,85-7,76 (*m*, 2H); 7,07 (*d*, *J* = 8Hz, 1H); 4,27 (*q*, 2H); 1,29 (*t*, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 13,7; 60,4; 110,3; 111,9; 112,7; 113,2; 122,1; 125,0; 129,1; 131,2; 132,7; 137,2; 147,2; 149,1; 153,5; 155,6; 160,5 e 162,4.

**7-hidroxi-2-oxo-8-(4-(hidroximetil)fenil)-2H-cromeno-3-carboxilato de etila (33)**

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8,69 (s, 1H); 7,75 (d,  $J = 8,55\text{Hz}$ , 1H); 7,38 (d,  $J = 7,23\text{Hz}$ , 2H); 7,32 (d,  $J = 7,46\text{Hz}$ , 2H); 7,02 (d,  $J = 8,55\text{Hz}$ , 1H); 4,54 (sl, 2H); 4,24 (q, 2H); 1,27 (t, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 14,0; 60,7; 62,8; 110,6; 111,9; 113,5; 115,6; 126,0; 129,6; 130,3; 130,6; 141,7; 149,6; 154,0; 156,3; 161,1 e 162,8.

# **Referências Bibliográficas**

## 6. Refências Bibliográficas

ADIMURTHY, S.; RAMARCHADRAIAH, G.; "A new, environment friendly protocol for iodination of electron-rich aromatic compounds", *Tetrahedron Lett.*, **44**: 5099, 2003.

ALVIM JR., J., DIAS, R. L. A., CASTILHO, M. S., OLIVA, G., CORRÊA, A. G., "Preparation and Evaluation of a Coumarin Library towards the Inhibitory Activity of the Enzyme gGAPDH from *Trypanosoma cruzi*", *J. Braz. Chem. Soc.* **16**: 763, 2005.

AOKI, S., CHIE, A., OYAMADA, J., KITAMURA, T., "A convenient synthesis of dihydrocoumarins from phenol and cinnamic acid derivatives", *Tetrahedron*, **61**: 9291, 2005.

BARTOLINI, M.; CAVRINI, V.; ANDRISANO, V.; "Monolithic micro-immobilized-enzyme reactor with human recombinant acetylcholinesterase for on-line inhibition studies", *J. Chromatogr., A*, **1031**: 27, 2004.

BROWN, H.C.; BIGLEY, D.B.; ARORA, S.K.; YOON, N.M.; "Selective reductions. XVI. Reaction of disiamylborane in tetrahydrofuran with selected organic compounds containing representative functional groups", *J. Am. Chem. Soc.*, **92**: 7161, 1970.

BROWN, H.C.; CHOI, Y.M.; NARASIMHAN, S.; "Selective reductions. 29. A simple technique to achieve an enhanced rate of reduction of representative organic compounds by borane-dimethyl sulfide", *J. Org. Chem.*, **47**: 3153, 1982.

CARDOSO, C.; L.; MORAES, M.; C.; CASS, Q.; B.; "Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas", *Quím. Nova*; **32**: 175, 2009.

CASADEI, M.A.; RIENZO, B.D.; INESI, A.; MORACCI, F.M.; "Electrochemical studies on haloamides. Part 3. Haloacetamides and halo-acetohydroxamates", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 375, 1992.

CASTRAL, T. C.; *Síntese e Avaliação Biológica de uma Coleção de Amidas*, São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2006. Dissertação de Mestrado, 136 f.

CASTRO, N. G.; COSTA, R. S.; PIMENTELA, L. S.B.; DANUELLO, A.; ROMEIRO, N. C.; VIEGAS JR. C.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A.M.; BOLZANI, V. S.; ROCHA, M. S. "CNS-selective noncompetitive cholinesterase inhibitors derived from the natural piperidine alkaloid (-)-spectaline", *Eur. J. Pharmacol.* **580**: 339, 2008.

CHA, J.S.; LEE, J.C.; LEE, H.S.; LEE, S.E.; KIM, J.M.; KWON, O.O.; MIN, S.J.; "Selective reduction with lithium bis- or tris(dialkylamino)aluminum hydrides. III. Reduction of

primary carboxamides to aldehydes by lithium tris(diethylamino)aluminum hydride”, *Tetrahedron Lett.*, **32**: 6903, 1991.

COPELAND, R.; A.; Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal Chemists and Pharmacologists, Wiley: New Jersey, 2005.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G.; “Natural products (secondary metabolites) IN *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*”, Buchanan, B.; Grissem, W.; Jones, R.; (Eds.), American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1306-1310.

DALE, D. J.; DUNN, P. J.; GOLIGHTLY, C.; HUGHES, M. L.; LEVETT, P. C.; PEARCE, A. K.; Searle, P. M.; WARD, G.; WOOD, A. S. “The Chemical Development of the Commercial Route to Sildenafil: A Case History”, *Org. Process Res. Dev.*, **4**: 17, 2000.

DALGAARD, L.; “Immobilized enzymes as post-column reactors in high-performance liquid chromatography”, *Trends Anal. Chem.*, **5**: 185, 1986.

DE, S. K.; GIBBS, R. A.; “An Efficient and Practical Procedure for the Synthesis of 4-Substituted Coumarins”, *Synthesis*, **8**: 1231, 2005.

DEPREZ, S.; “Reduction electrochimique de la fonction amide d'un compose antitumoral, l'echinosporine”, *Tetrahedron Lett.*, **28**: 4679, 1987.

DEWICK, P.M. “Medicinal natural products: a biosynthetic approach”, West Sussex: Ed. John Wiley & Sons, 1997.

DÖMLING, A., UGI, I., “Multicomponent Reactions with Isocyanides”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**: 3168, 2000.

DOS SANTOS, R. P.; TREVISAN, M. T. S.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; MELO, V. M. M.; “Composição química e atividade biológica de *Triphasia trifolia*”, *Quim. Nova* **31**: 53, 2008.

DOUGLAS, C.J., “Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weedsto trees”, *Trends Plant Sci.*, **6**: 171, 1996.

ELLMAN, G. L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*; **7**: 88, 1961.

EMNÉUS, J.; MARKO-VARGA, G.; “Biospecific detection in liquid chromatography”; *J. Chromatogr. A*; **703**: 191, 1995.

GAO, W., LUO, Y., DING, Q., PENG, Y., WU, J., “An efficient route to 4-substituted coumarins, 2(5H)-furanones, and pyrones via palladium-catalyzed couplings of alkenyl tosylates with organoindium reagents”, *Tetrahedron Lett.*, **51**: 136, 2010.

GHIRON, C.; HAYDAR, S.; N.; ASCHMIES, S.; BOTHMANN, H.; CASTALDO, C.; COCCONCELLI, G.; COMERY, T.; A.; DI, L.; DUNLOP, J.; LOCK, T.; KRAMER, A.; KOWAL, D.; JOW, F.; GRAUER, S.; HARRISON, B.; LA ROSA, S.; MACCARI, L.; MARQUIS, K.; L.; MICCO, I.; NENCINI, A.; QUINN, J.; ROBICHAUD, A.; J.; RONCARATI, R.; SCALI, C.; TERSTAPPEN, G.; C.; TURLIZZI, E.; VALACCHI, M.; VARRONE, M.; ZANALETTI, R.; ZANELLI, U.; "Novel Alpha-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists Containing a Urea Moiety: Identification and Characterization of the Potent, Selective, and Orally Efficacious Agonist 1-[6-(4-Fluorophenyl)pyridin-3-yl]-3-(4-piperidin-1-ylbutyl) Urea (SEN34625/WYE-103914)." *J. Med. Chem.*, **53**: 4379, 2010.

GIRELLI, A.; M.; MATTEI, E.; MESSINA, A.; "Immobilized tyrosinase reactor for on-line HPLC application Development and characterization", *Sens. Actuators B*, **121**: 515, 2007.

HEYMAN, A.; PETERSON, B.; FILLENBAUM, G.; PIEPER, C.; "The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD) Part XIV: demographic and clinical predictors of survival in patients with Alzheimer's disease", *Neurology*, **46**: 656, 1996.

HOEFNAGEL, A. J.; GUNNEWEGH, E. A.; DOWNING, R. S.; VAN BEKKUM, H.; "Synthesis of 7-hydroxycoumarins catalysed by solid acid catalysts", *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 225, 1995.

ISHIHARA, K.; OHARA, S.; YAMAMOTO, H., "3,4,5-Trifluorobenzeneboronic Acid as an Extremely Active Amidation Catalyst", *J. Org. Chem.*, **61**: 4196, 1996.

JOHN, E. V. O.; ISRAELSTAM, S., S.; "Use of Cation Exchange Resins in Organic Reactions. I. The Von Pechmann Reaction", *J. Org. Chem.*, **26**: 240, 1961.

KADNIKOV, D. V., LAROCK, R. C., "Synthesis of Coumarins via Palladium-Catalyzed Carbonylative Annulation of Internal Alkynes by *o*-Iodophenols", *Org. Lett.*, **2**: 3643, 2000.

KALISZAN, R.; WAINER, I. W.; *Chromatographic Separations Based on Molecular Recognition*; Jinno, K., Wiley: New York, 1997.

KONTOGIORGIS, C. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; "Synthesis and Antiinflammatory Activity of Coumarin Derivatives", *J. Med. Chem.*; **48**: 6400, 2005.

KRISHNAMURTHY, S.; THOMPSON, K.L.; "Selective reduction of functionalized carboxylic acids with borane-methyl sulfide: A convenient undergraduate organic experiment", *J. Chem. Educ.*, **54**: 778, 1977.

KRISHNAMURTHY, S.; BROWN, H.C.; "Selective reductions. 27. Reaction of alkyl halides with representative complex metal hydrides and metal hydrides. Comparison of various hydride reducing agents", *J. Org. Chem.*, **45**: 849, 1980.

LI, K., ZENG, Y., NEUENSWANDER, B., TUNGE, J. A., "Sequential Pd(II)-Pd(0) Catalysis for the Rapid Synthesis of Coumarins" *J. Org. Chem.*, **70**: 6515, 2005.

LIU, Y., MILLS, A. D., KURTH, M. J., "Solid phase synthesis of 3-(5-arylpyridin-2-yl)-4-hydroxycoumarins", *Tetrahedron Lett.*, **47**: 1985, 2006.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; MENICHINI, F. "Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: An update", *Curr. Med. Chem.* **15**: 1209, 2008.

LUO, Y., WU, J., "Copper-free Sonogashira reactions of 4-hydroxycoumarins with alkynes", *Tetrahedron*, **65**: 6810, 2009a.

LUO, Y., WU, J., "Palladium-catalyzed direct arylation of 4-hydroxycoumarins with arylboronic acids via C–OH bond activation", *Tetrahedron Lett.*, **50**: 2103, 2009b.

MANDAL, S.B.; GIRI, V.S.; SABEENA, M.S.; PAKRASHI, S.C.; "Reduction of lactams and thiolactams by sodium borohydride. Application in the synthesis of some alkaloids", *J. Org. Chem.*, **53**: 4236, 1988.

MARSTON, A.; KISSLING, J. HOSTETTMANN, K.; "A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants", *Phytochem. Anal.* **13**: 51, 2002.

MATEO, C.; PALOMO, J.; M.; FERNANDEZ-LORETE, G.; GUIZA, J.; M.; FERNANDEZ-LORETE, R.; "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques", *Enzyme Microb. Technol.*; **40**: 1451, 2007.

MATOS, M. J.; VIÑA, D.; PICCIAU, C.; ORALLO, F.; SANTANA, L.; URIARTE, E.; "Synthesis and evaluation of 6-methyl-3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**: 5053, 2009.

METZLER, D. E.; "Biochemistry: *The Chemical Reactions of Living Cells*" volume 1, 2<sup>nd</sup>ed, Academic Press, 2001.

MOTEKI, S. A.; TAKACS, J. M.; "Exploiting self-assembly for ligand scaffold optimization: "Substrate-tailored" ligands for catalytic asymmetric hydroboration", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**(5): 894, 2008.

MUSIAL, A.; BAJDA, M.; MALAWSKA, B.; "Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment", *Curr. Med. Chem.* **14**: 2654, 2007.

MYAURA, N.; SUZUKI, A.; "Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds", *Chem. Rev.*, **95**: 2457, 1995.

MYLAVARAPU, R. K.; KONDAIAH, G. C. M; KOLLA, N., VEERAMALLA, R., KOILKONDA, P.;BHATTACHARYA, A.; BANDICHHOR, R.; "Boric Acid Catalyzed Amidation in the Synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients", *Org. Proc. Res. Develop.* **11**: 1065, 2007.

NISHIYAMA, Y.; HAMANAKA, S.; "Carbonyl-to-methylene conversion: selenium-assisted reduction of aromatic ketones with carbon monoxide and water", *J. Org. Chem.*, **53**: 1326, 1988.

ORHAN, G.; ORHAN, I.; SENER, B. "Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease", *Let. Drug Design Discov.* **3**: 268, 2006.

PAWELKE, G.; BUERGER, H.; "Trifluoromethyl-substituted Aminoboranes and Amine Boranes Revealing Alkene and Alkane Chemistry", *Appl. Organomet. Chem.*, **10**: 147, 1996.

PECHMANN, H. V.; DUISBERG, C.; "Neue Bildungsweise der Coumarine. Synthese des Daphnetins. I", *Chem. Ber.*, **17**: 929, 1884.

PERKIN, W. H.; "On the hydride of aceto-salicyl", *J. Chem. Soc.*, **21**: 181, 1868.

PERKIN, W. H.; "On the formation of coumarin and of cinnamic and of other analogous acids from the aromatic aldehydes", *J. Chem. Soc.* **31**: 388, 1877.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F.; *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, 3<sup>rd</sup> edition, 1988.

PIAZZI, L.; CAVALLI, A.; COLIZZI, F.; BELLUTI, F.; BARTOLINI, M.; MANCINI, F.; RECANATINI, M.; ANDRISANO, V.; RAMPA, A. "Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**: 423, 2008.

POTDAR, M. K.; MOHILE, S. S.; SALUNKHE, M. M.; "Coumarin syntheses via Pechmann condensation in Lewis acidic chloroaluminate ionic liquid", *Tetrahedron Lett.*, **42**: 9285, 2001.

PREDIGER, P.; MORO, A. V.; NOGUEIRA, C. W.; SAVEGNAGO, L.; MENEZES, P. H. M.; ROCHA, J. B. T.; ZENI, G.; "Palladium-Catalyzed Suzuki Cross-Coupling of 2-Haloselenophenes: Synthesis of 2-Arylselenophenes, 2,5-Diarylselenophenes, and 2-Arylselenophenyl Ketones", *J. Org. Chem.*, **71** : 3786, 2006.

QUEZADA, E.; DELOGU, G.; PICCIAU, C.; SANTANA, L.; PODDA, G.; BORGES, F.; GARCÍA-MORALES, V.; VIÑA, D.; ORALLO, F.; "Synthesis and Vasorelaxant and Platelet Antiaggregatory Activities of a New Series of 6-Halo-3-phenylcoumarins", *Molecules*, **15**: 270, 2010.

RHEE, K.; VAN RIJN, R. M.; VERPOORTE, R., "Qualitative Determination of False-positive Effects in the Acetylcholinesterase Assay using Thin Layer Chromatography", *Phytochem. Anal.* **14**:127, 2003.

ROBERT, S.; BERTOLLA, C.; MASEREEL, B.; DOGNE', J.; POCHE, L.; "Novel 3-Carboxamide-coumarins as Potent and Selective FXIIa Inhibitors"; *J. Med. Chem.*, **51**: 3077, 2008.

SANSEVERINO, A. M.; "Microondas em síntese orgânica"; *Quim. Nova*, **25**: 660, 2002.

SCOTT, J. L., RASTON, C. L.; "Solvent-free synthesis of 3-carboxycoumarins", *Green Chem.*, **2**: 245, 2000.

SHONO, T.; MASUDA, H.; MURASE, H.; SHIMOMURA, M.; KASHIMURA, S.; "Electroorganic chemistry. 134. Facile electroreduction of methyl esters and N,N-dimethylamides of aliphatic carboxylic acids to primary alcohols", *J. Org. Chem.*, **57**: 1061, 1992.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. "Produtos Naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer", *Quím. Nova*, **27**: 655, 2004a.

VIEGAS JR., C., BOLZANI, V.S., BARREIRO, E.J., YOUNG, M.C., FURLAN, M., TOMAZELA, D., EBERLIN, M.N. "Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*." *J. Nat. Prod.* **67**: 908, 2004b.

VIEGAS JR., C., BOLZANI, V.S., PIMENTEL, L.S., CASTRO, N.G., CABRAL, R.F., COSTA, R.S., FLOYD, C., ROCHA, M.S., YOUNG, M.C., BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A., "New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids." *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 4184, 2005.

WALENZYK, T.; CAROLA, C.; BUCHHOLZB, H.; KONIG, B.; Chromone derivatives which bind to human hair; *Tetrahedron*, **61**: 7366, 2005.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S., *Methods in Ecology- Analysis of phenolic plant metabolites*. London: Ed. Blackwell Scientific Publication, 1994. p.238.

WOLF, N.J.; GEORGIEV, E.M.; YORDANOV, A.T.; WHITTLESEY, B.R.; KOCH, H.F.; ROUNDHILL, D.M.; "Synthesis and crystal structures of lower rim amine and carbamoyl substituted calixarenes as transfer agents for oxyanions between an aqueous and a chloroform phase", *Polyhedron* **18**: 885, 1999.

YAVARI, I.; HEKMAT-SHOAR, R.; ZONOUI, A.; "A new and efficient route to 4-carboxymethylcoumarins mediated by vinyltriphenylphosphonium salt", *Tetrahedron Lett.*, **39**: 2391, 1998.

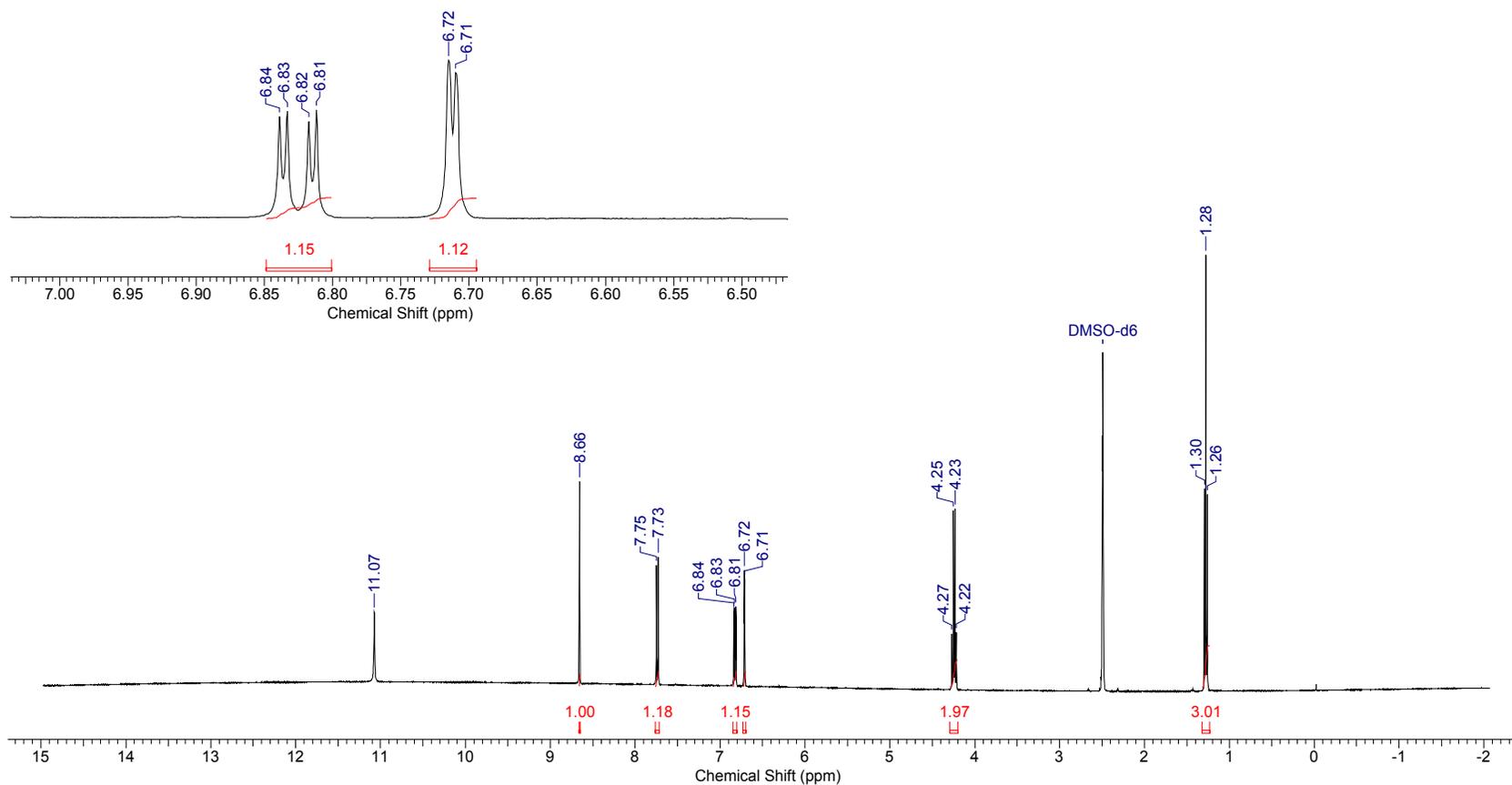
YU, T.; ZHANG, P.; ZHAO, Y.; ZHANG, H.; MENG, J.; FAN, D.; "Synthesis, characterization and high-efficiency blue electroluminescence based on coumarin derivatives of 7-diethylamino-coumarin-3-carboxamide", *Org. Electr.*, **10**: 653, 2009.

ZHANG, Y.; XIAO, Y.; KELLAR, K.; J.; WAINER, I.; W.; "Immobilized Nicotinic Receptor Stationary Phase for On-Line Liquid Chromatographic Determination of Drug-Receptor Affinities", *Anal. Biochem.*, **22**: 264, 1998.

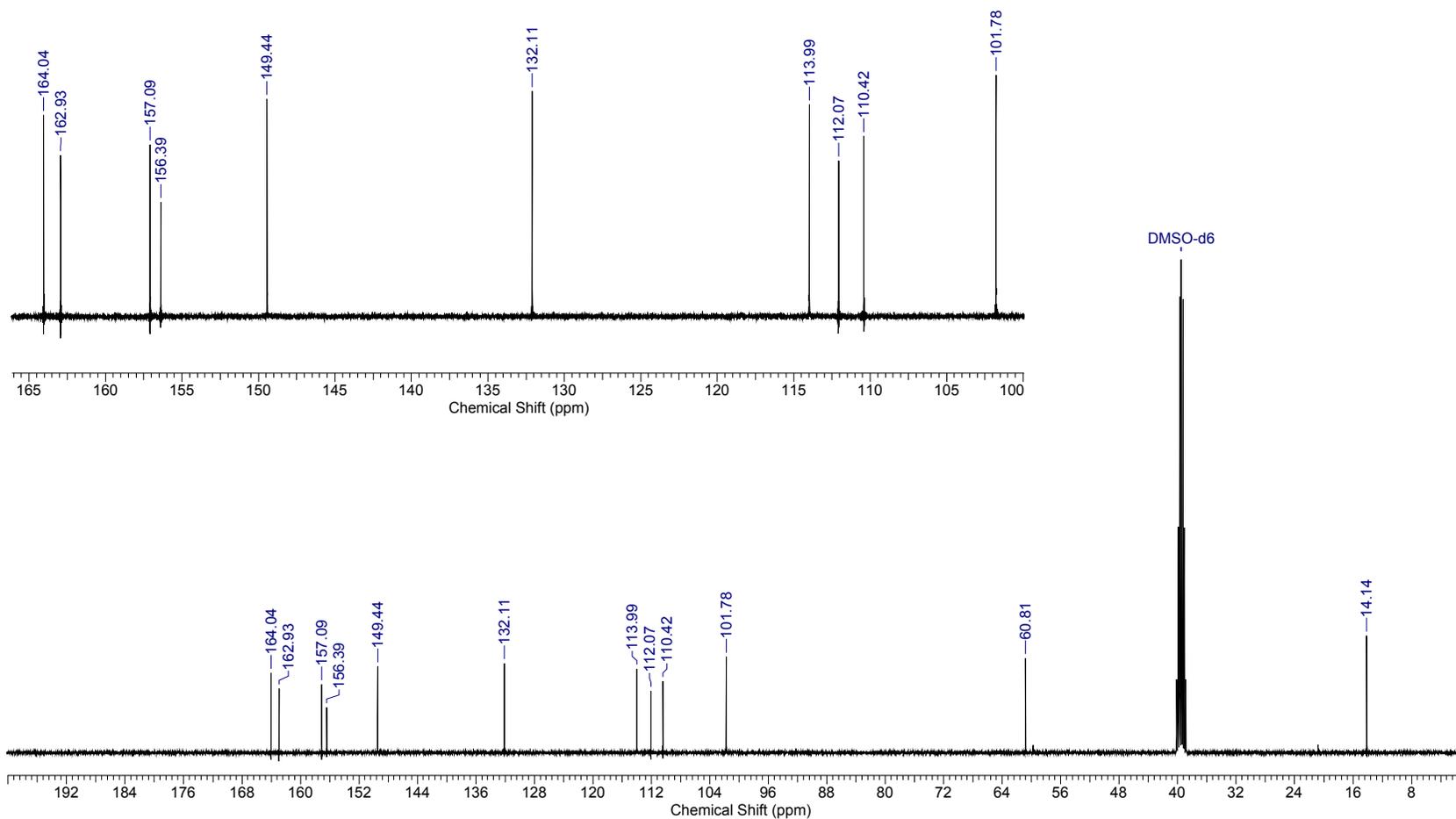
ZHU, J., BIENAYME, H.; *Reações multicomponentes*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.

# Espectros

<b>Acquisition Time (sec)</b>	4.8060	<b>Comment</b>	PROTON DMSO C:\NMRData nmrsu	<b>Date</b>	19 Nov 2010 02:20:48
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Desktop\Lucas\AV3472A2L4\AV3472A2L4_001000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	400.15
<b>Nucleus</b>	<sup>1</sup> H	<b>Number of Transients</b>	16	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	6818.18
				<b>Points Count</b>	32768
				<b>Temperature (degree C)</b>	22.000

Figura 17. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 9.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6816	<b>Comment</b>	C13CPD32 DMSO C:\NMRData nmrsu		<b>Date</b>	19 Nov 2010 05:20:00	
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Desktop\Lucas\AV3472A2L4\AV3472A2L4_002000fid				<b>Frequency (MHz)</b>	100.63	
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	3072	<b>Original Points Count</b>	16384	<b>Points Count</b>	65536
<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24038.46	<b>Temperature (degree C)</b>	22.400

Figura 18. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 9.

<b>File Name</b>	C:\USERS\LUCAS\DOWNLOADS\C4.JDX		<b>Date Stamp</b>	20/08/2010 14:11:00	<b>Date</b>	20 Aug 2010 14:58:34		
<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	MB	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	
<b>Y Axis</b>	%Transmittance	<b>Spectrum Range</b>		298.9446 - 4000.0706	<b>Points Count</b>	1920	<b>Data Spacing</b>	1.9287

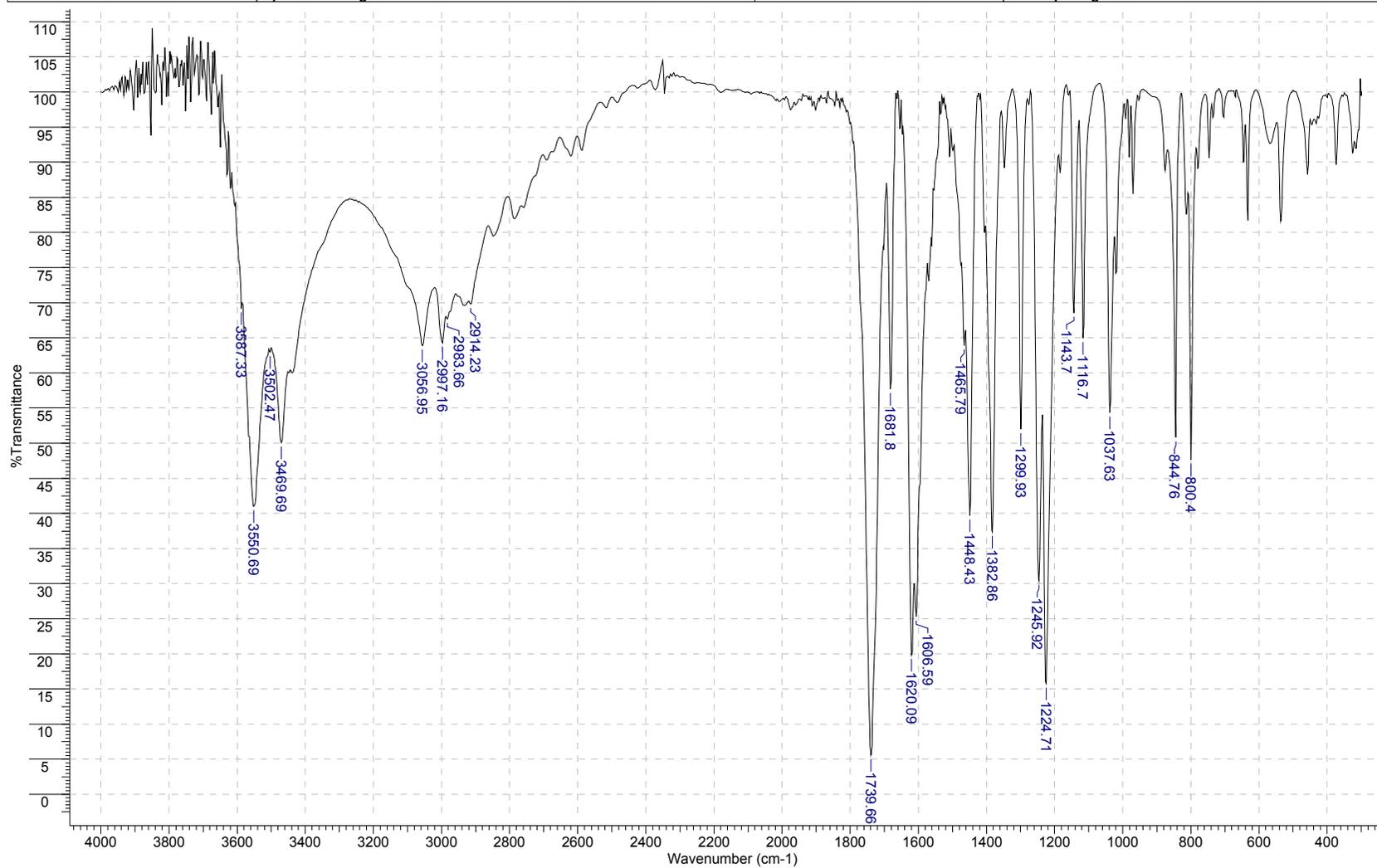


Figura 19. Espectro de Infravermelho do composto **9**.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	4.5613	<b>Comment</b>	Imported from UXNMR.		<b>Date</b>	00/00/1980 00:00:00	<b>Frequency (MHz)</b>	400.21	
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Solvent</b>	CDCI3
<b>Temperature (grad C)</b>	27.000							<b>Sweep Width (Hz)</b>	7183.91

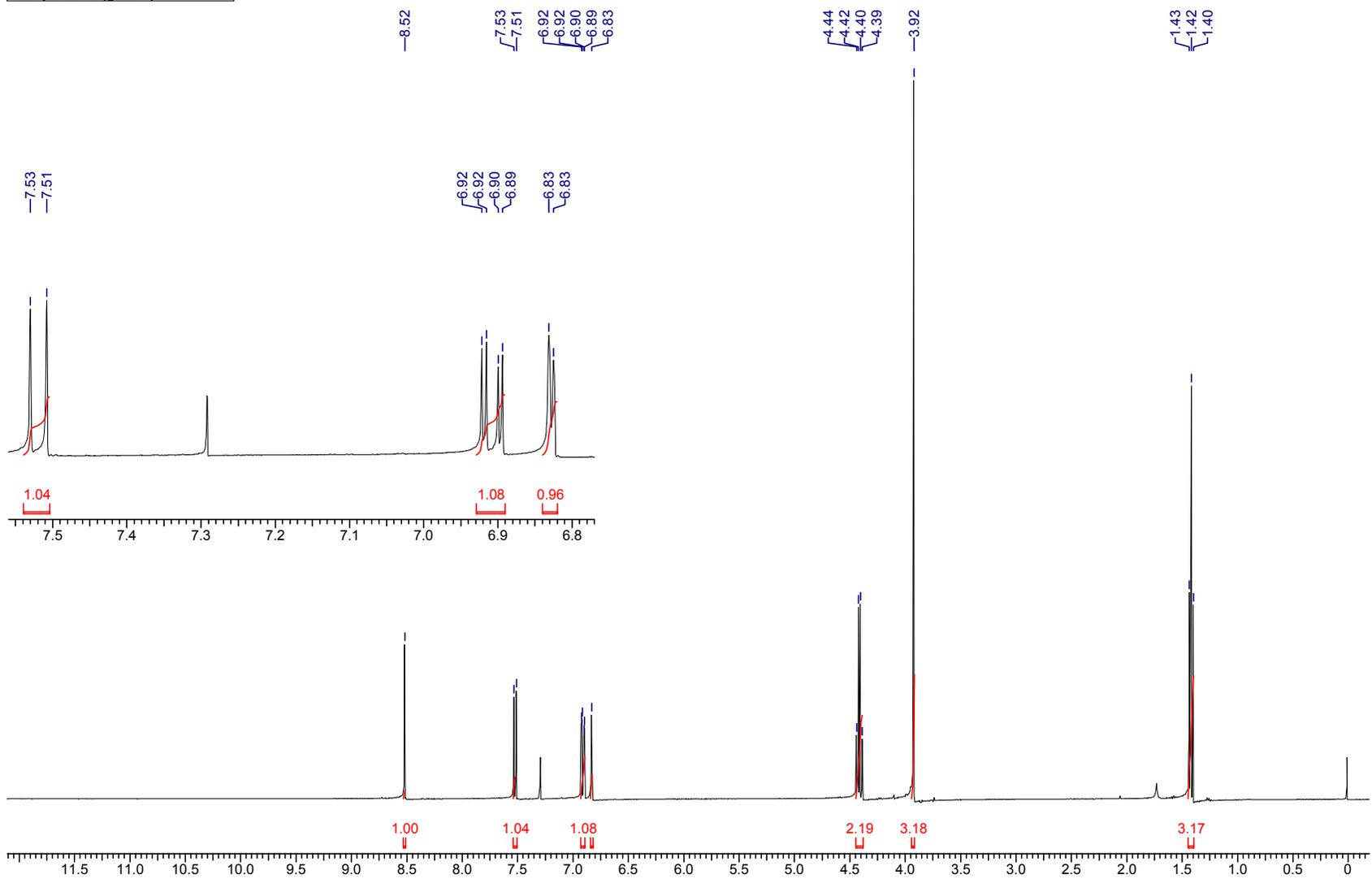


Figura 20. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 10.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	CEM	<b>Date</b>	24 Jul 2009 13:00:48
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Documents\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (5)\D302A2CE\D302A2CE_002000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	100.64
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	1026	<b>Original Points Count</b>	16384
<b>Pulse Sequence</b>	zpgg30	<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36
				<b>Points Count</b>	16384
				<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

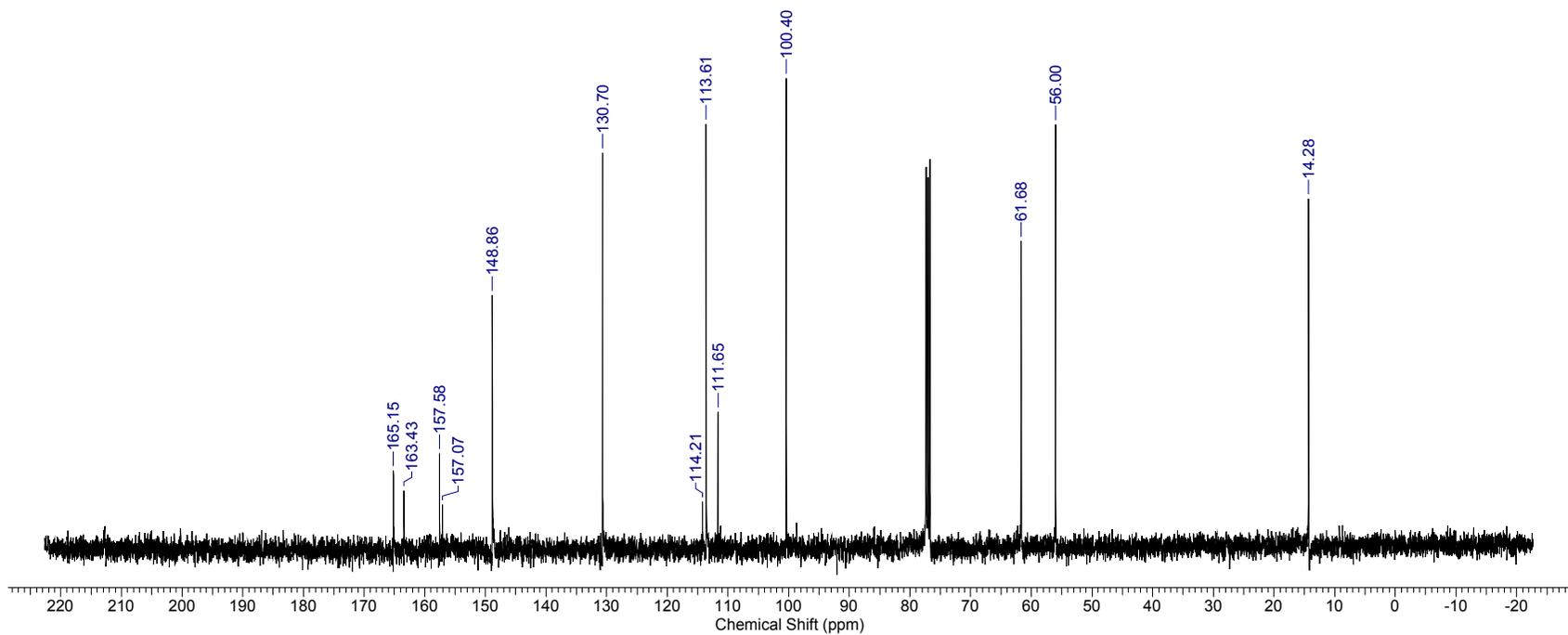


Figura 21. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 10.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	5.4657	<b>Comment</b>	Imported from UXMNR.	<b>Date</b>	00/00/1980 00:00:00
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Documents\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (6)\HCUM(6)-400MHz.ESP			<b>Frequency (MHz)</b>	400.21
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Sweep Width (Hz)</b>	5995.20	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

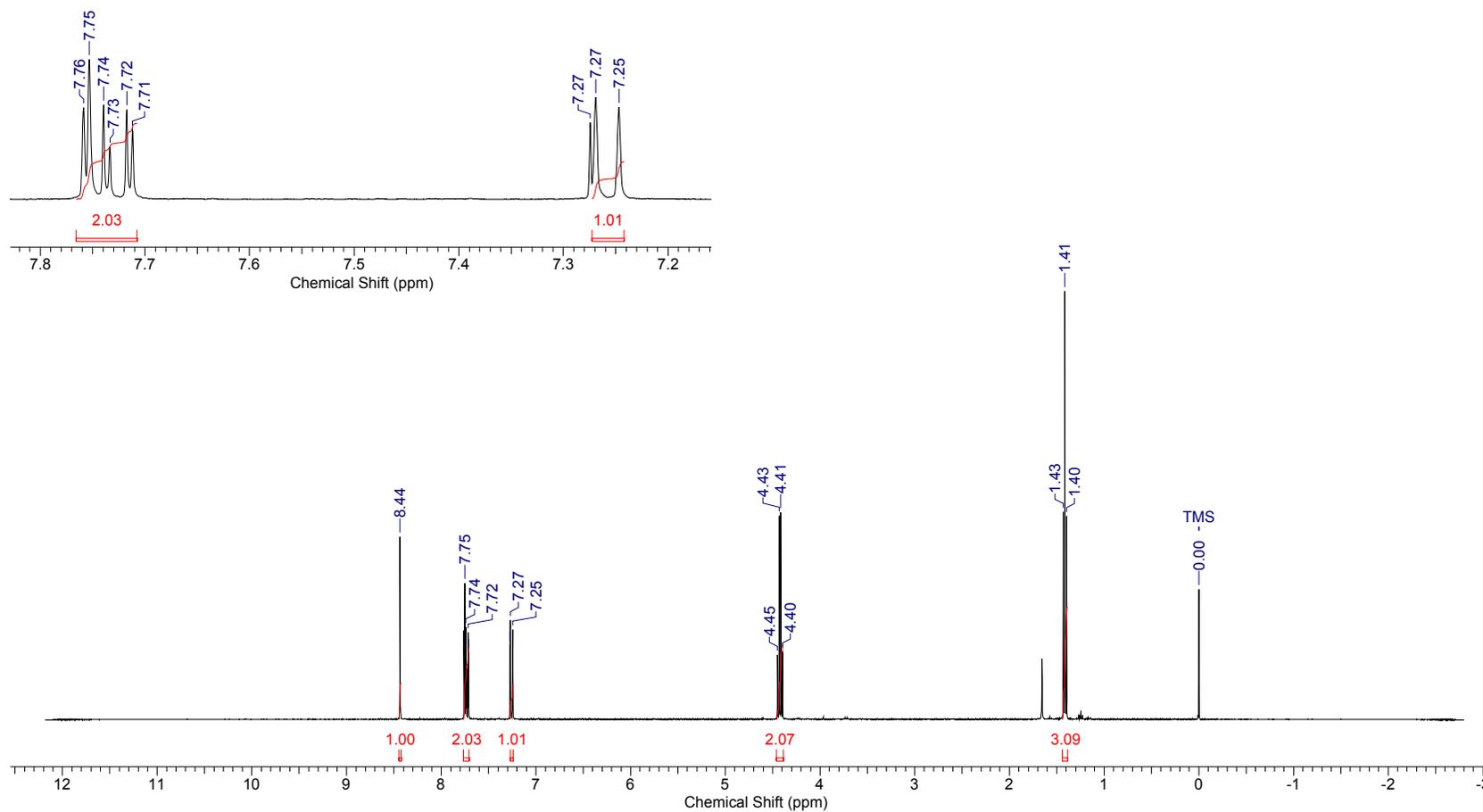


Figura 22. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 11.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	Amostra: Br	<b>Date</b>	11 Jan 2010 12:18:08
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Documents\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (6)\D022A2Br\D022A2Br_002000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	100.64
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	1024	<b>Original Points Count</b>	16384
<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30	<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36
				<b>Points Count</b>	16384
				<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

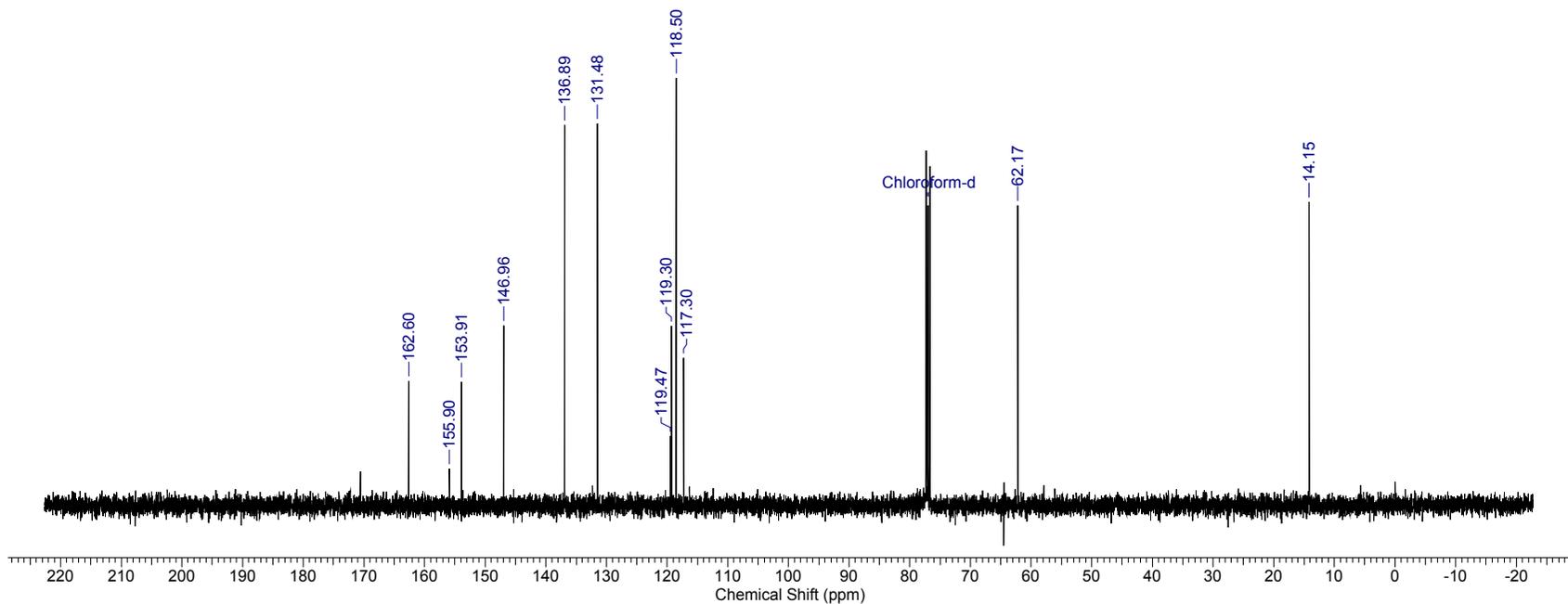
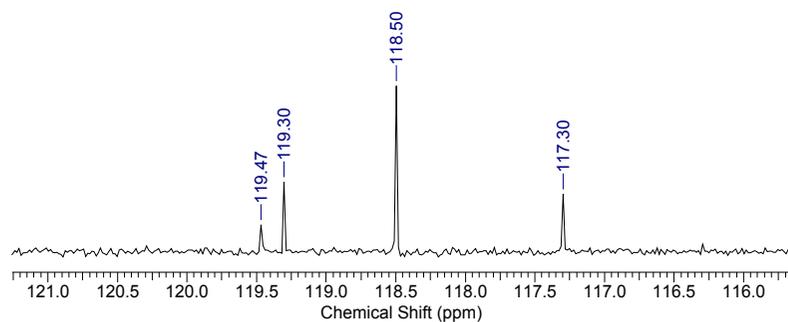


Figura 23. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 11.

<b>Comment</b>	bromo	<b>File Name</b>	H:\INFRAVERMELHO\BROMO.JDX	<b>Date Stamp</b>	21/11/2009 17:04:00
<b>Date</b>	21 Nov 2009 17:21:22	<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	MB
<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)	<b>Y Axis</b>	% Transmittance	<b>Spectrum Range</b> 318.2312 - 4000.0706	
<b>Points Count</b>	1910	<b>Data Spacing</b>	1.9287		

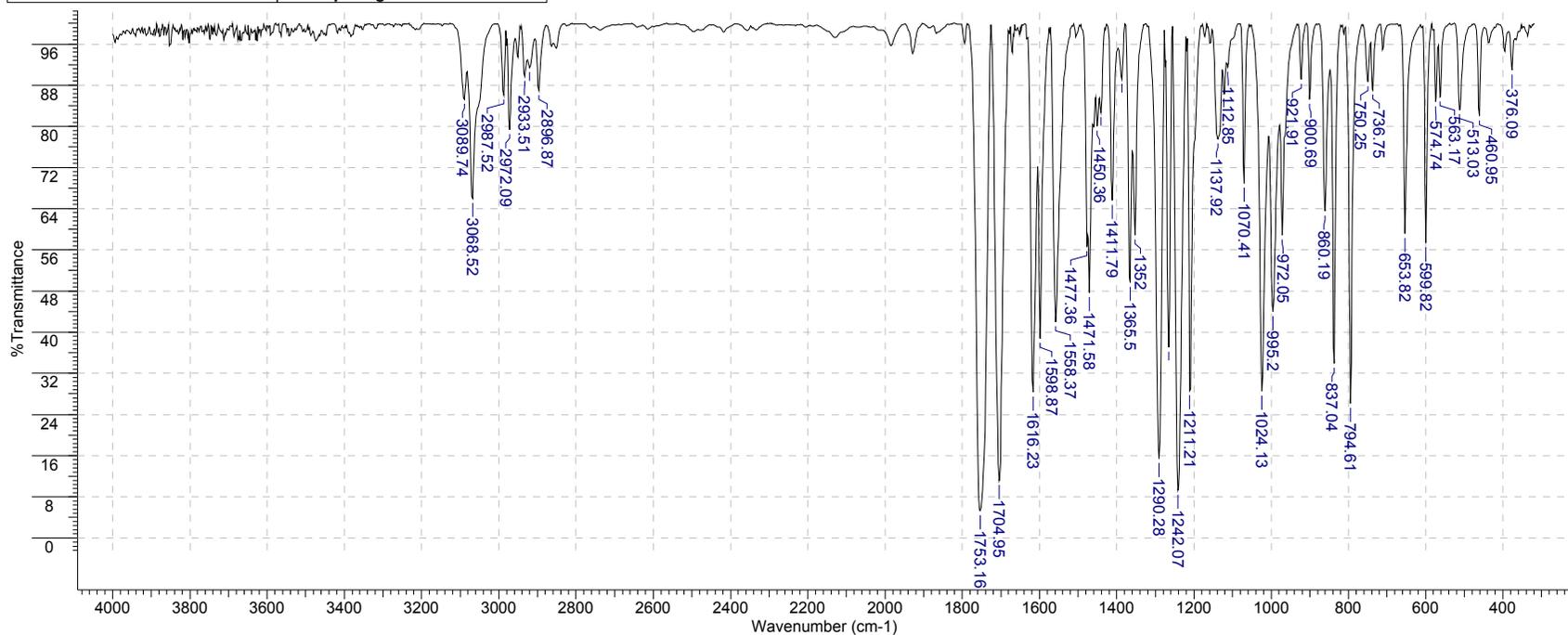


Figura 24. Espectro de Infravermelho do composto 11.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	5.4657	<b>Comment</b>	Imported from UXMNR.	<b>Date</b>	00/00/1980 00:00:00
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Documents\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (7)\HCUM(7)-400MHz.ESP			<b>Frequency (MHz)</b>	400.21
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Sweep Width (Hz)</b>	5995.20	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

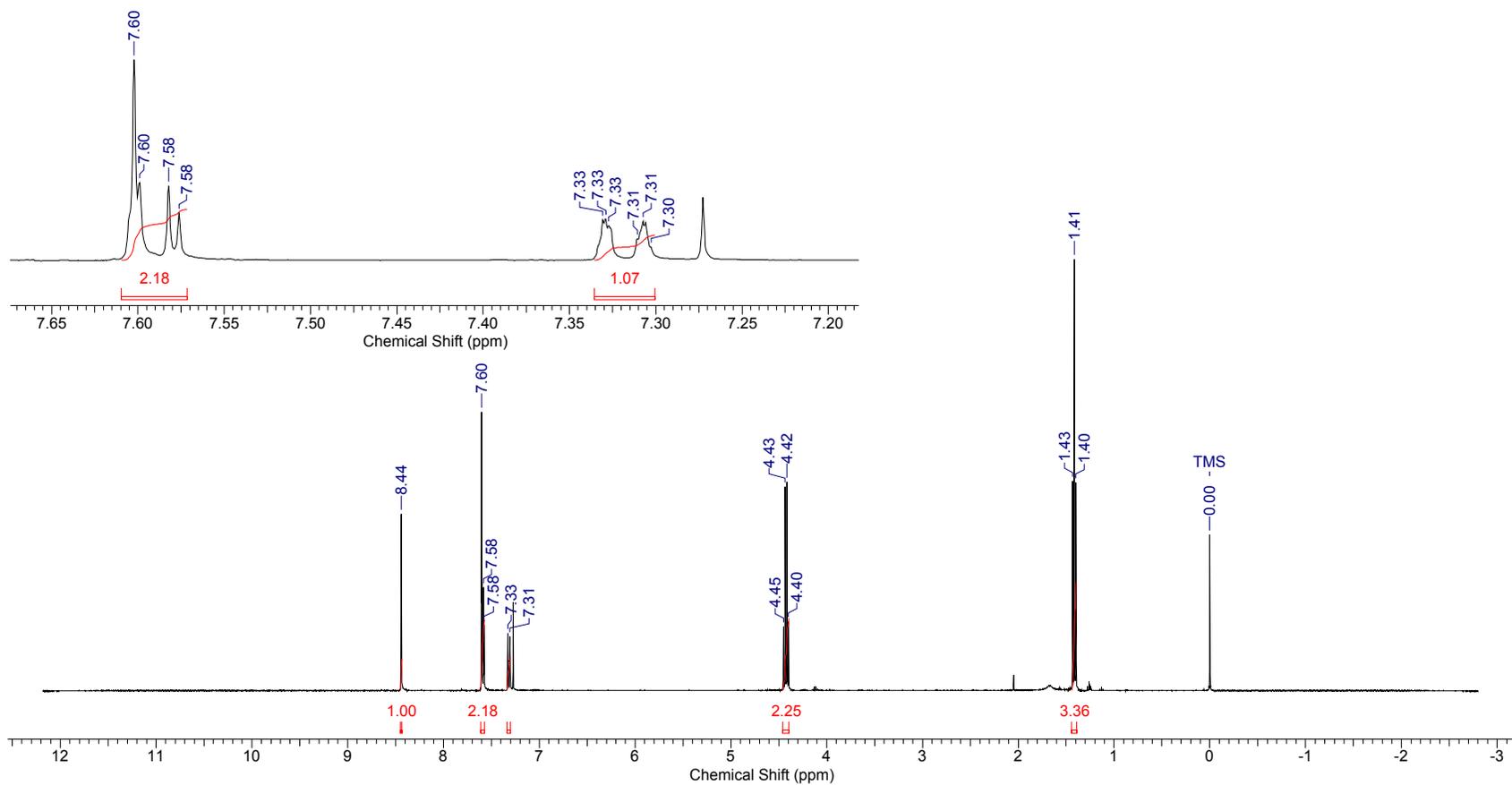


Figura 25. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 12.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	Amostra: Cl	<b>Date</b>	11 Jan 2010 12:50:08
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Documents\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (7)\D022A2C\D022A2C\ 002000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	100.64
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	1024	<b>Original Points Count</b>	16384
<b>Pulse Sequence</b>	zpgg30	<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36
				<b>Points Count</b>	16384
				<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

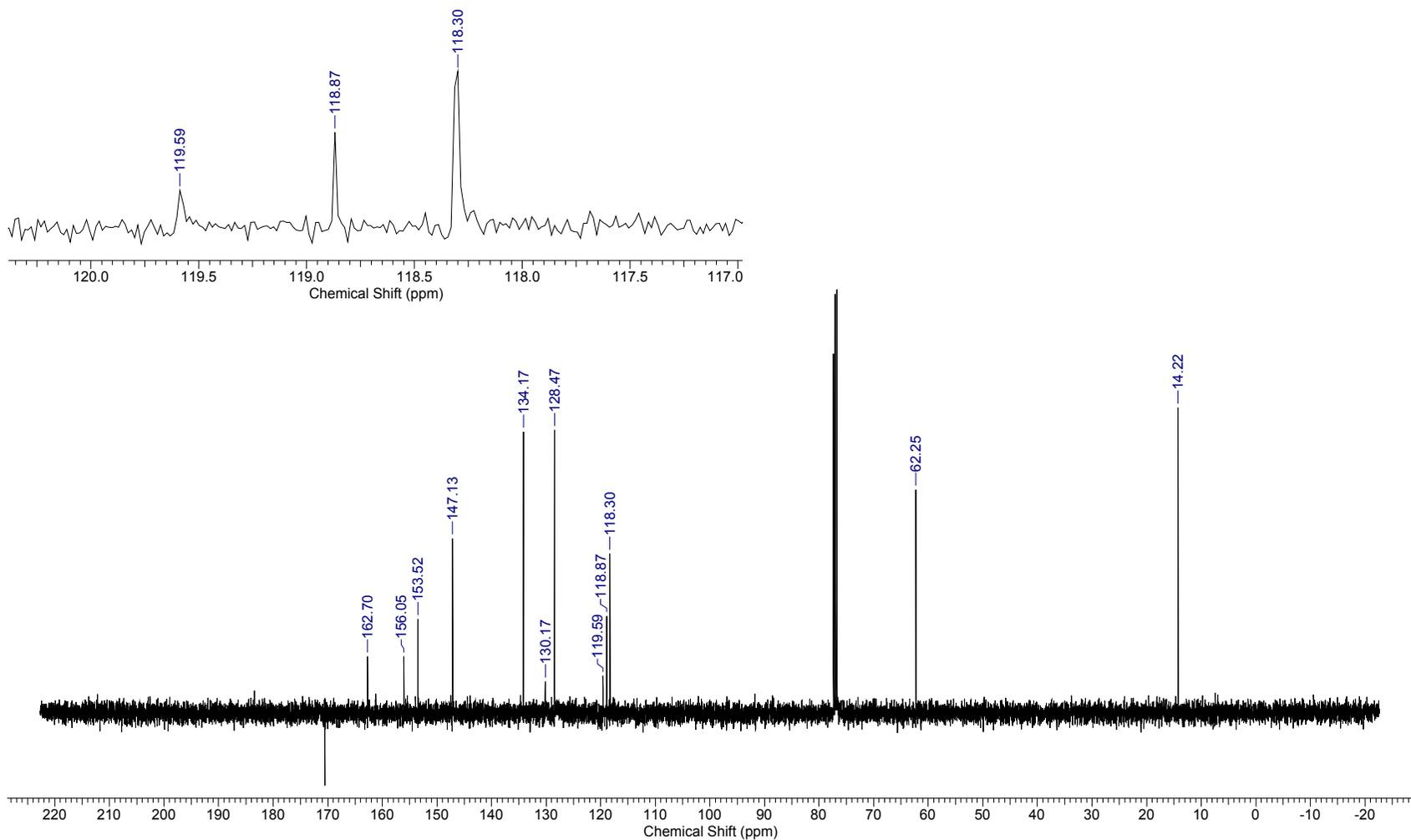


Figura 26. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 12.

<b>Comment</b>	cloro	<b>File Name</b>	H:\INFRAVERMELHO\CLORO.JDX	<b>Date Stamp</b>	21/11/2009 16:51:00	
<b>Date</b>	21 Nov 2009 17:22:08	<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	MB	<b>Spectral Region</b> IR
<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)		<b>Y Axis</b>	%Transmittance	<b>Spectrum Range</b> 318.2312 - 4000.0706	
<b>Points Count</b>	1910	<b>Data Spacing</b>	1.9287			

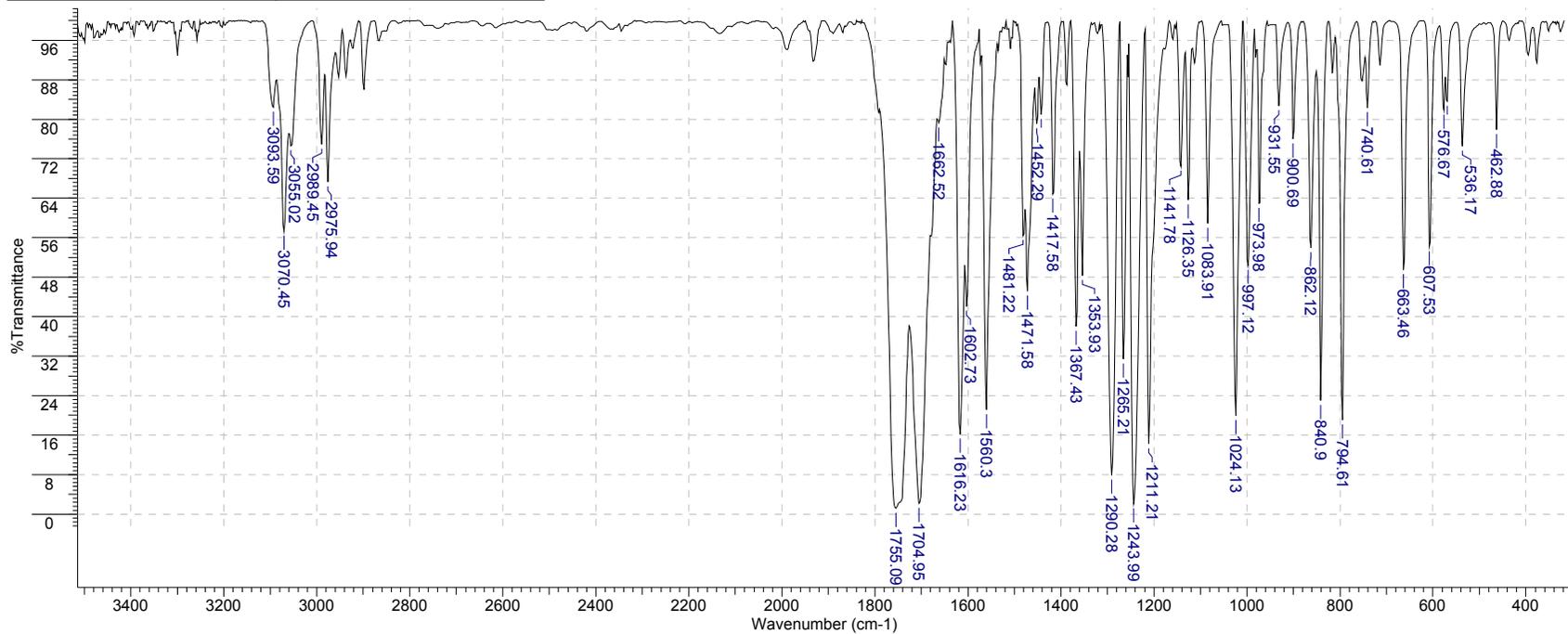


Figura 27. Espectro de Infravermelho do composto 12.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	5.4657	<b>Comment</b>	Imported from UXMNR.	<b>Date</b>	00/00/1980 00:00:00
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Documents\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (8)\HCUM(8)-400MHz.ESP			<b>Frequency (MHz)</b>	400.21
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Sweep Width (Hz)</b>	5995.20	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

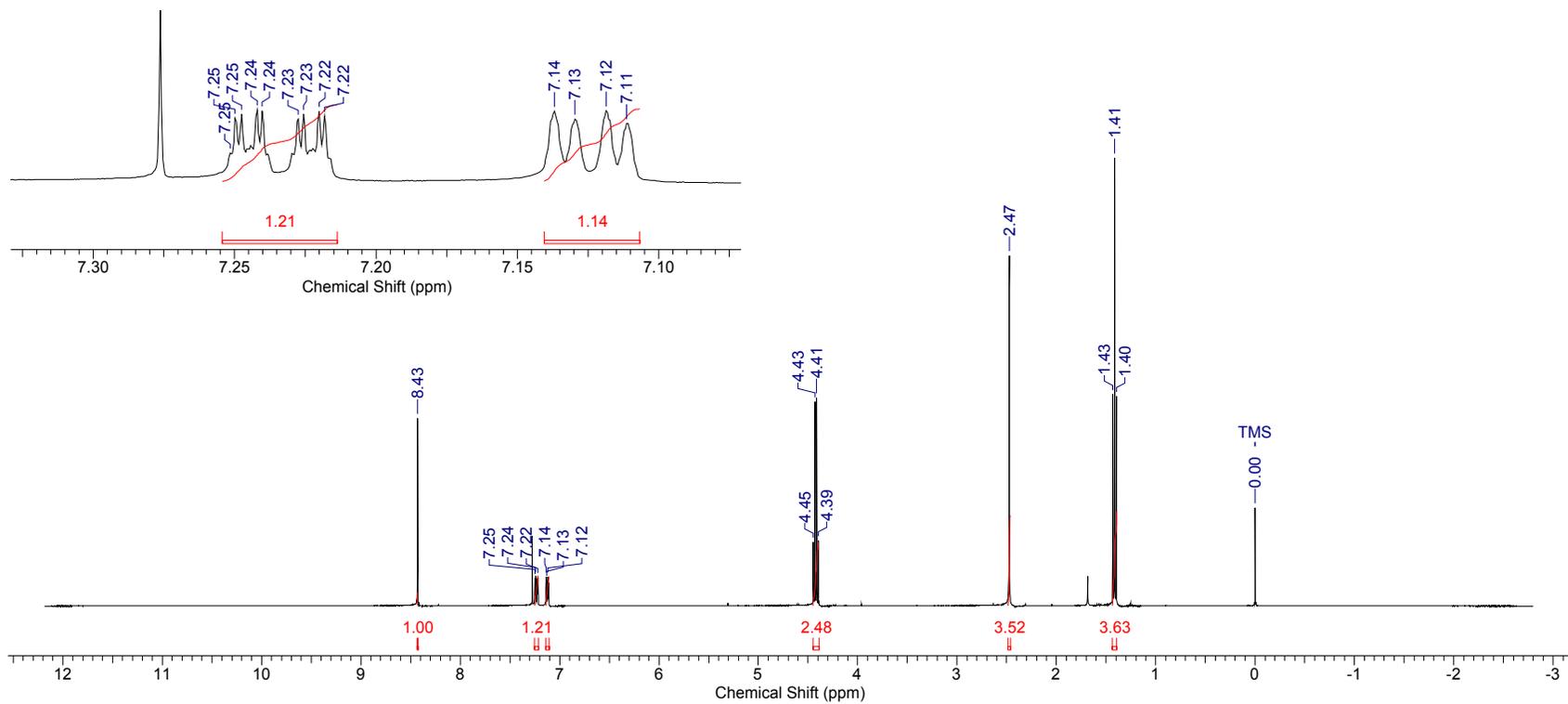


Figura 28. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 13.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	Amostra: F	<b>Date</b>	11 Jan 2010 13:32:48
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Documents\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (8)\D022A2aF\D022A2aF_002000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	100.64
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	12912	<b>Original Points Count</b>	16384
<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30	<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36
				<b>Points Count</b>	16384
				<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

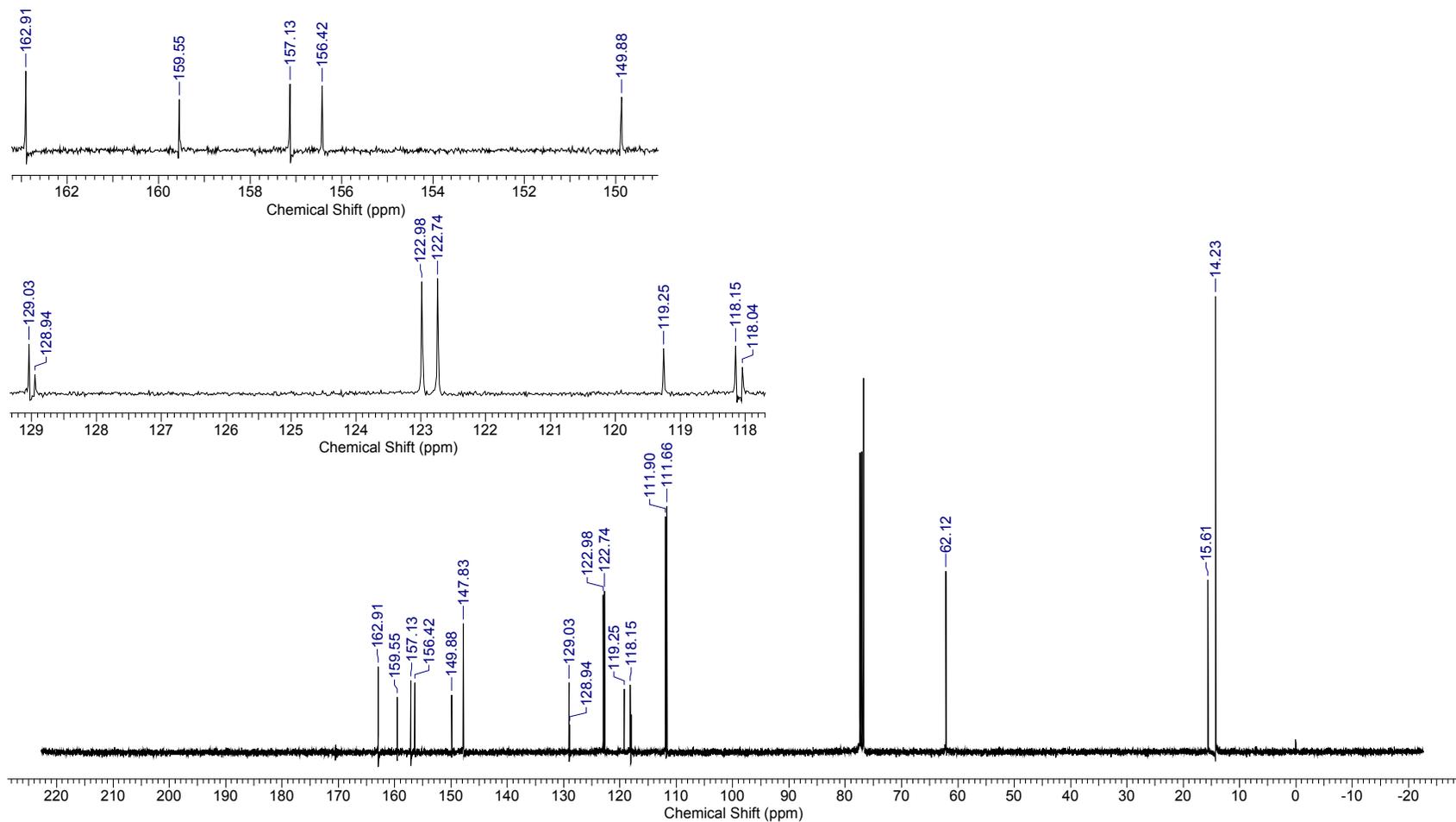


Figura 29. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 13.

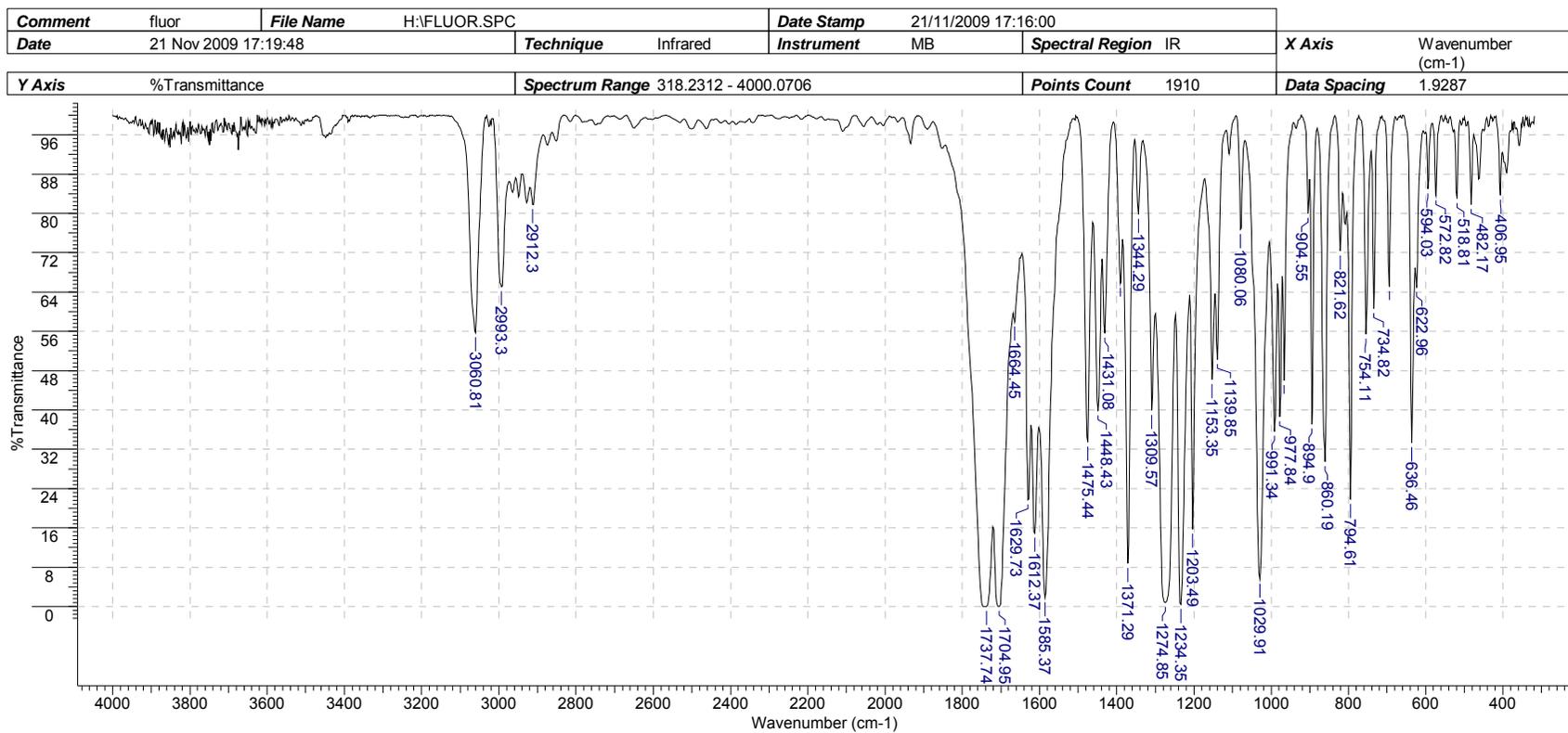


Figura 30. Espectro de Infravermelho do composto 13.

Acquisition Time (sec)	5.3477	Comment	BME	Date	11 Dec 2009 11:16:16				
File Name	H:\D502A3BMD502A3BM_001000fid			Frequency (MHz)	400.21	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D		
Sweep Width (Hz)	6127.45	Temperature (degree C)	27.000						

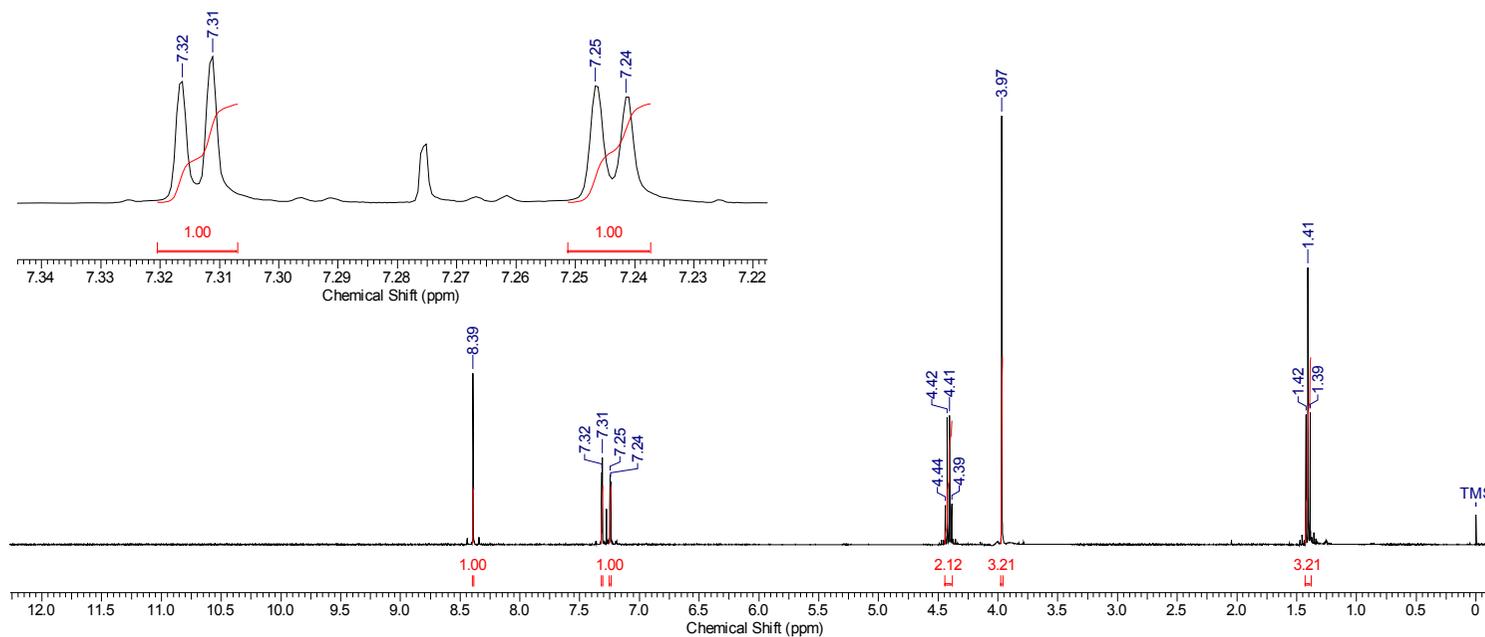


Figura 31. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 14.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	BME	<b>Date</b>	11 Dec 2009 11:26:56
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Documents\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (9)\D502A3BM\D502A3BM_002000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	100.64
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	1024	<b>Original Points Count</b>	16384
<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30	<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36
				<b>Points Count</b>	16384
				<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

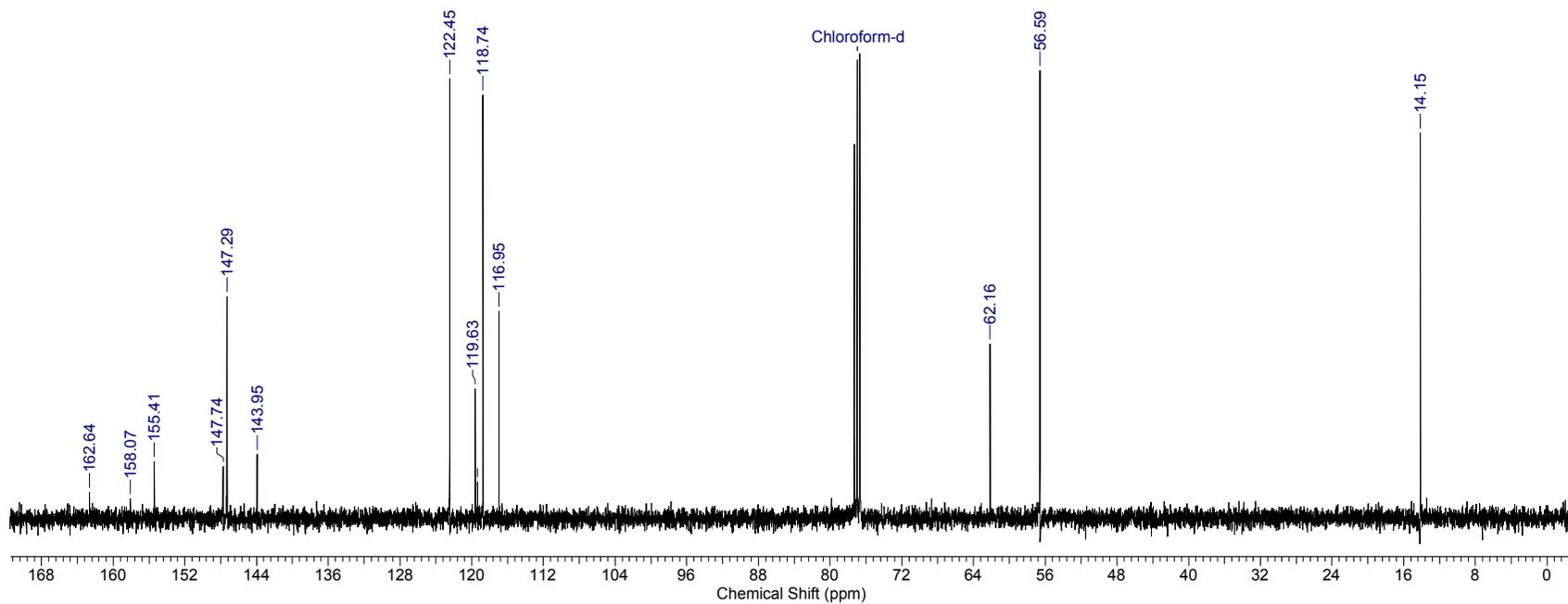


Figura 32. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 14.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	4.5613	<b>Comment</b>	AM1	<b>Date</b>	19 Oct 2009 12:26:40
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\mestrado\Espectros - Cumarinas\AMD(3)\AMD(3)-400MHz\AMD(3)-400MHz_001000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	400.21
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Pulse Sequence</b>	zg	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	7183.91
				<b>Points Count</b>	32768
				<b>Temperature (degree C)</b>	30.000

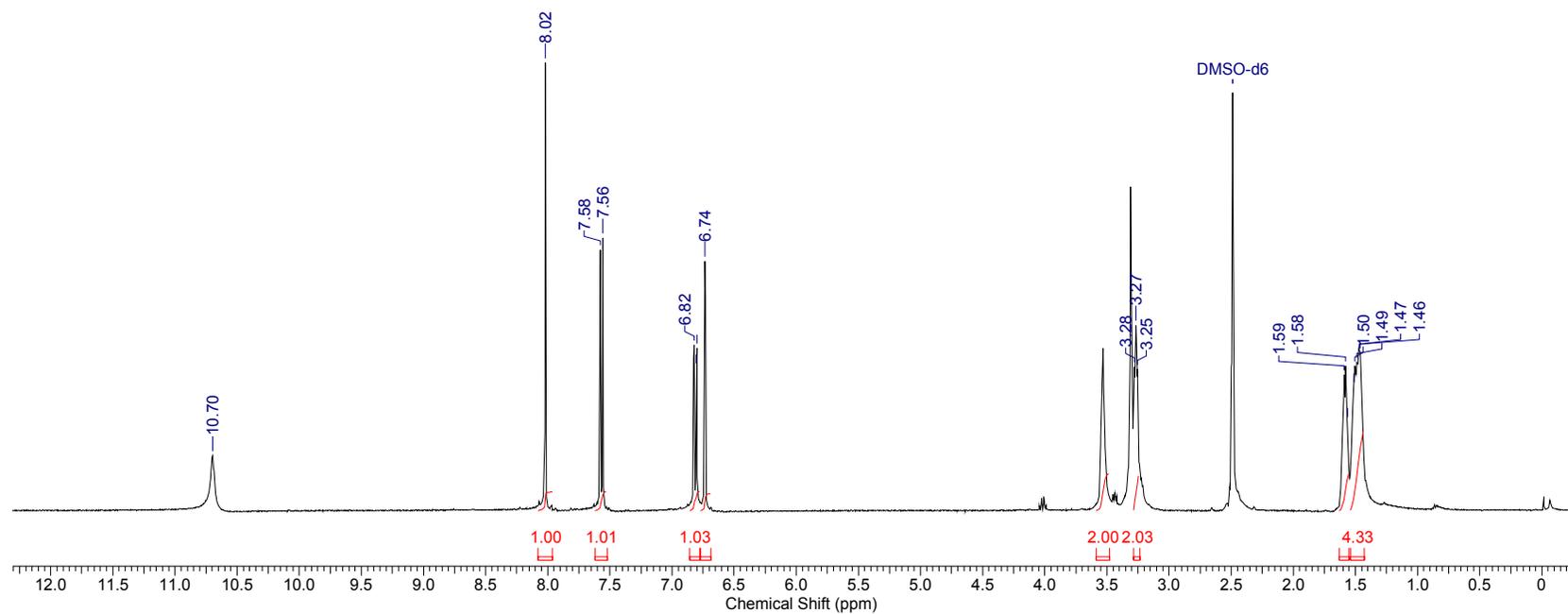
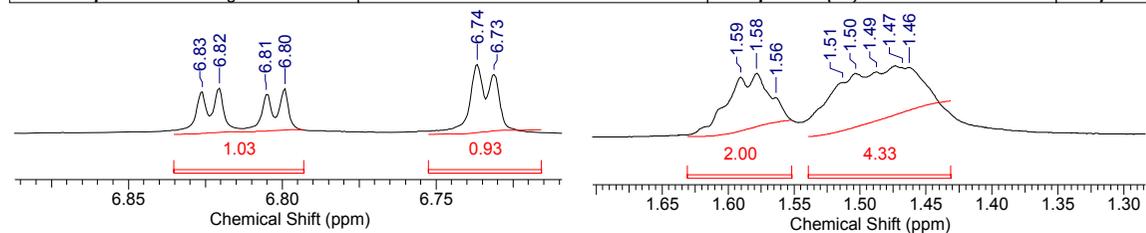


Figura 33. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 15.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	AM1	<b>Date</b>	19 Oct 2009 12:35:12		
<b>File Name</b>	H:\D432A2A1\1D432A2A1_002000fid	<b>Frequency (MHz)</b>	100.64	<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	1024
<b>Original Points Count</b>	16384	<b>Points Count</b>	16384	<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6
<b>Temperature (degree C)</b>	22.000					<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36

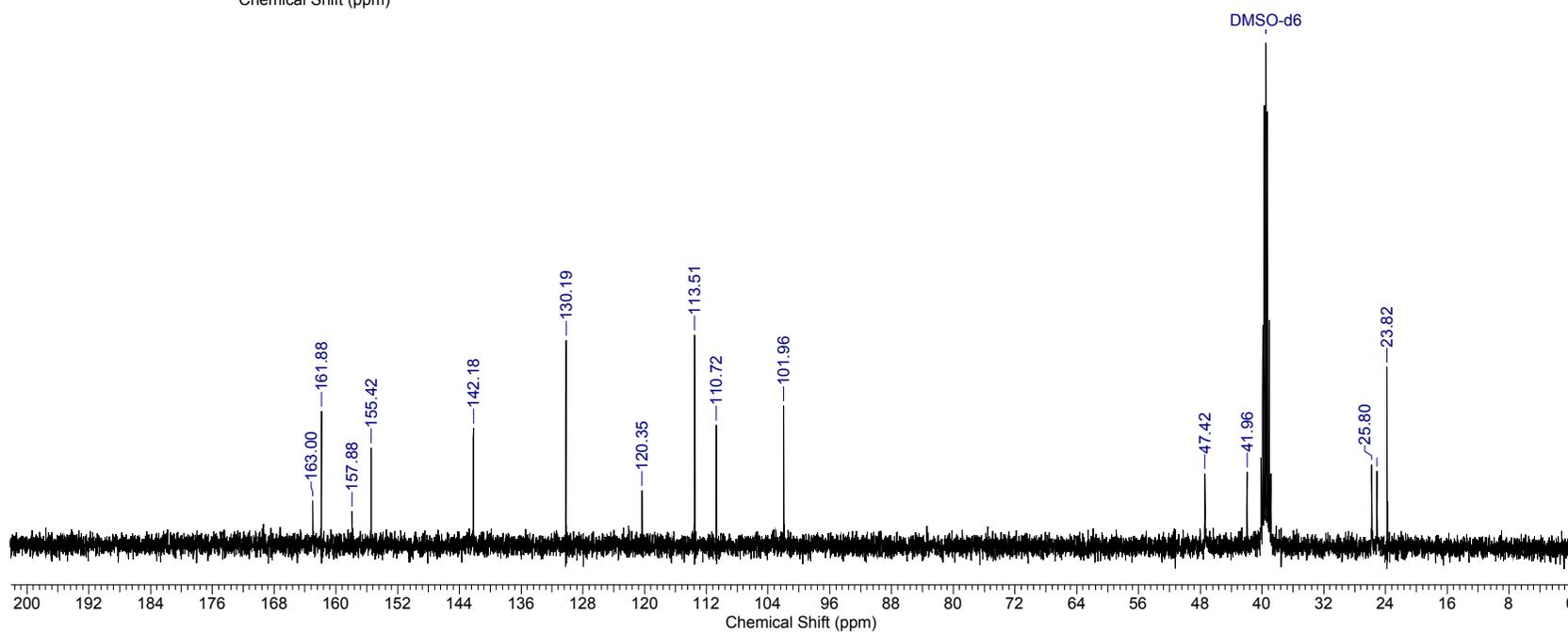
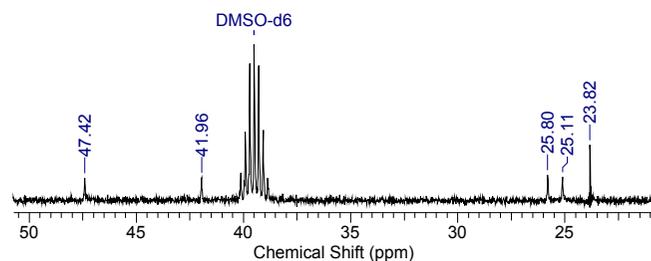


Figura 34. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 15.

<b>File Name</b>	C:\USERS\LUCAS\DOWNLOADS\IC5.JDX		<b>Date Stamp</b>	20/08/2010 14:22:00	<b>Date</b>	20 Aug 2010 14:58:42		
<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	MB	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	
<b>Y Axis</b>	%Transmittance	<b>Spectrum Range</b>		298.9446 - 4000.0706	<b>Points Count</b>	1920	<b>Data Spacing</b>	1.9287



Figura 35. Espectro de Infravermelho do composto 15.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	10.1581	<b>Comment</b>	A162A2HAMD4		<b>Date</b>	<b>Frequency (MHz)</b>	200.13
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	72	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Sweep Width (Hz)</b>	3225.81	<b>Temperature (grad C)</b>	27.000		<b>Solvent</b>	CDCl3	

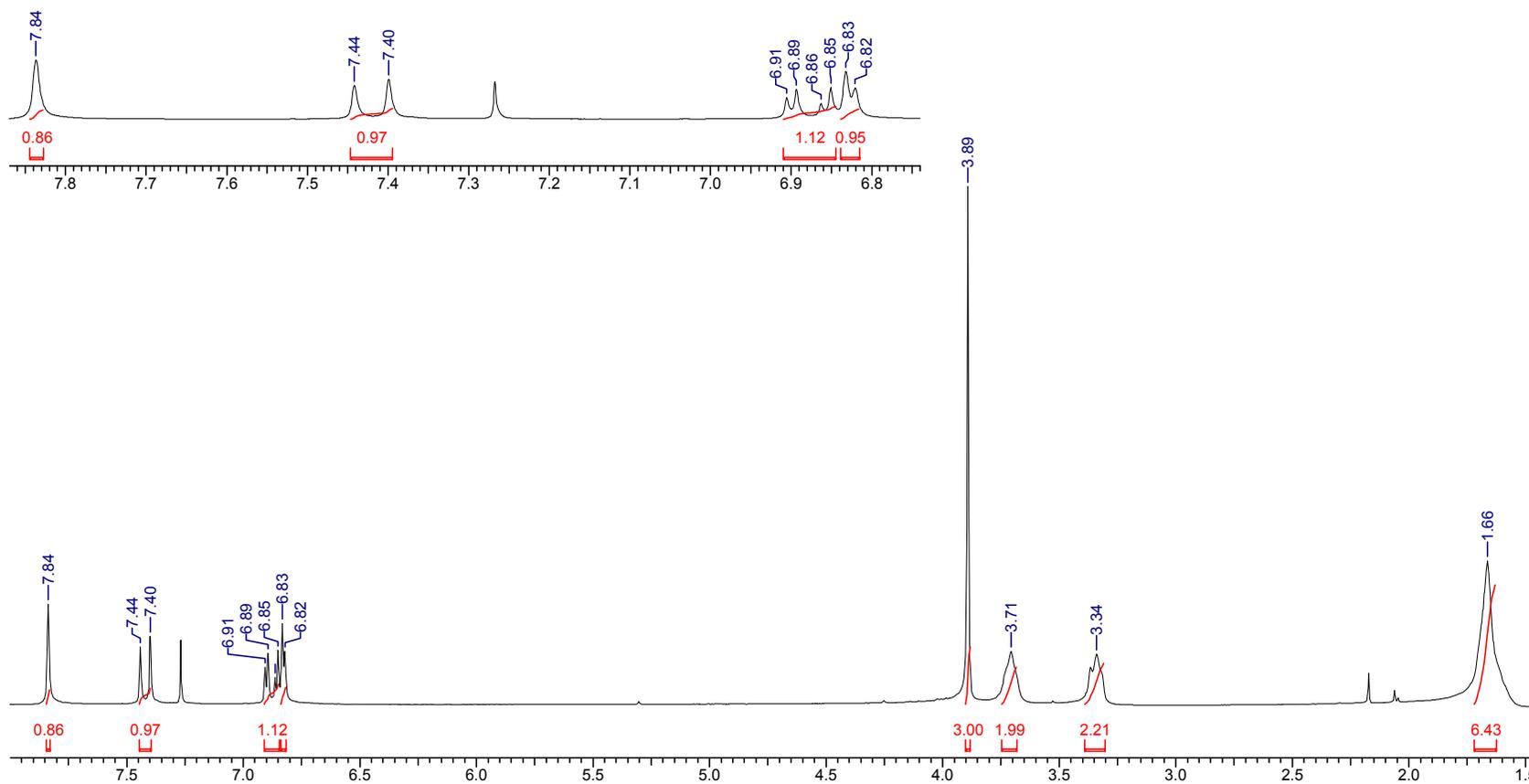


Figura 36. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 16.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6783	<b>Comment</b>	Imported from UXNMR.		<b>Date</b>	00/00/1980 00:00:00			
<b>Frequency (MHz)</b>	100.64	<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	12075	<b>Original Points Count</b>	16384	<b>Points Count</b>	16384
<b>Solvent</b>	CDCl3	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24154.59	<b>Temperature (grad C)</b>	22.000				

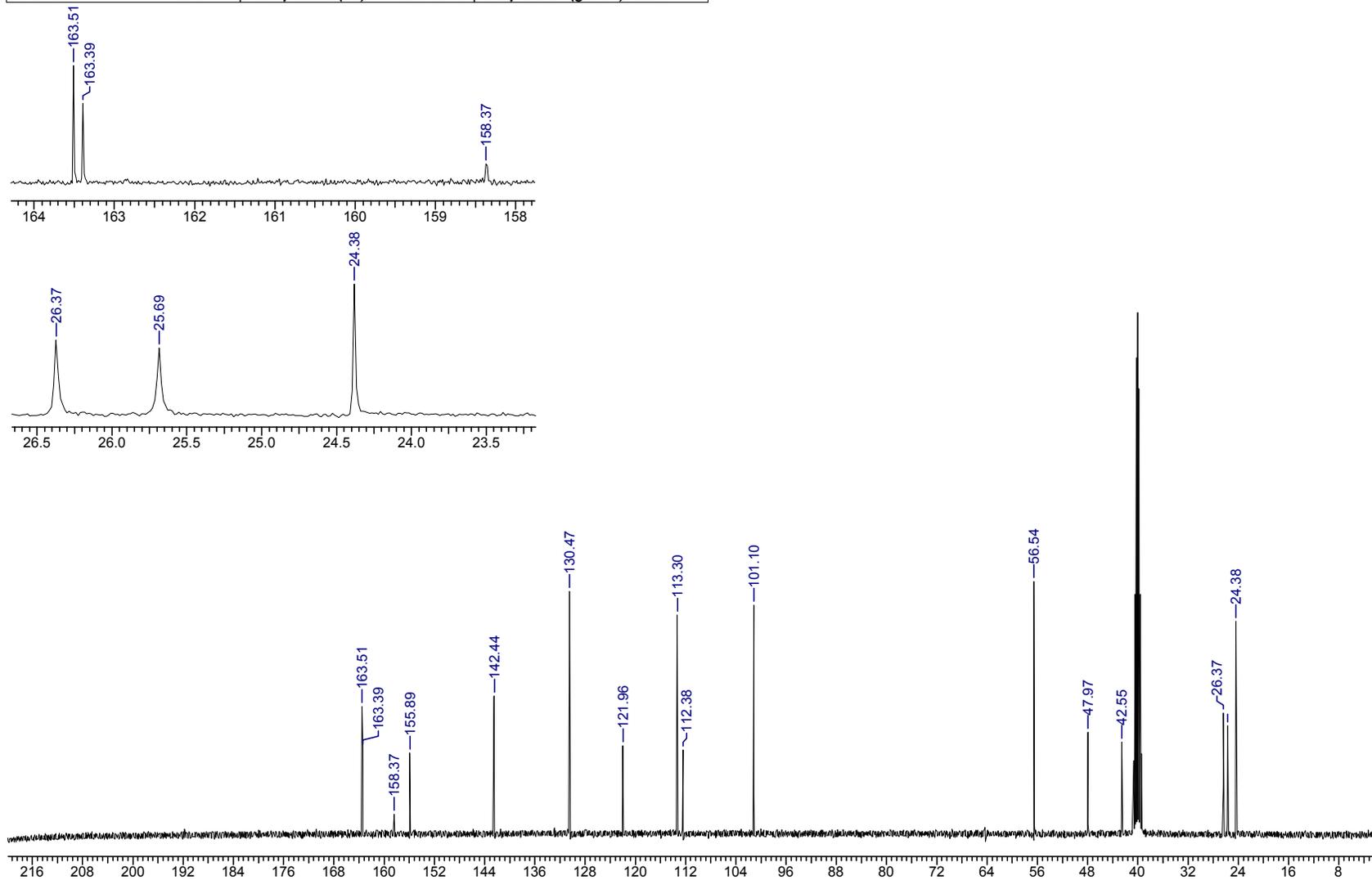


Figura 37. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 16.

<b>File Name</b>	C:\USERS\LUCAS\MESTRADO\ESPECTROS - CUMARINAS\AMD (4)\IVAMD4.SPC			<b>Date Stamp</b>	26/03/2009 10:49:00
<b>Date</b>	26 Mar 2009 14:44:44	<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	MB
<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)	<b>Y Axis</b>	%Transmittance	<b>Spectrum Range</b>	349.5721 - 4000.0704
<b>Data Spacing</b>	0.4822			<b>Points Count</b>	7572

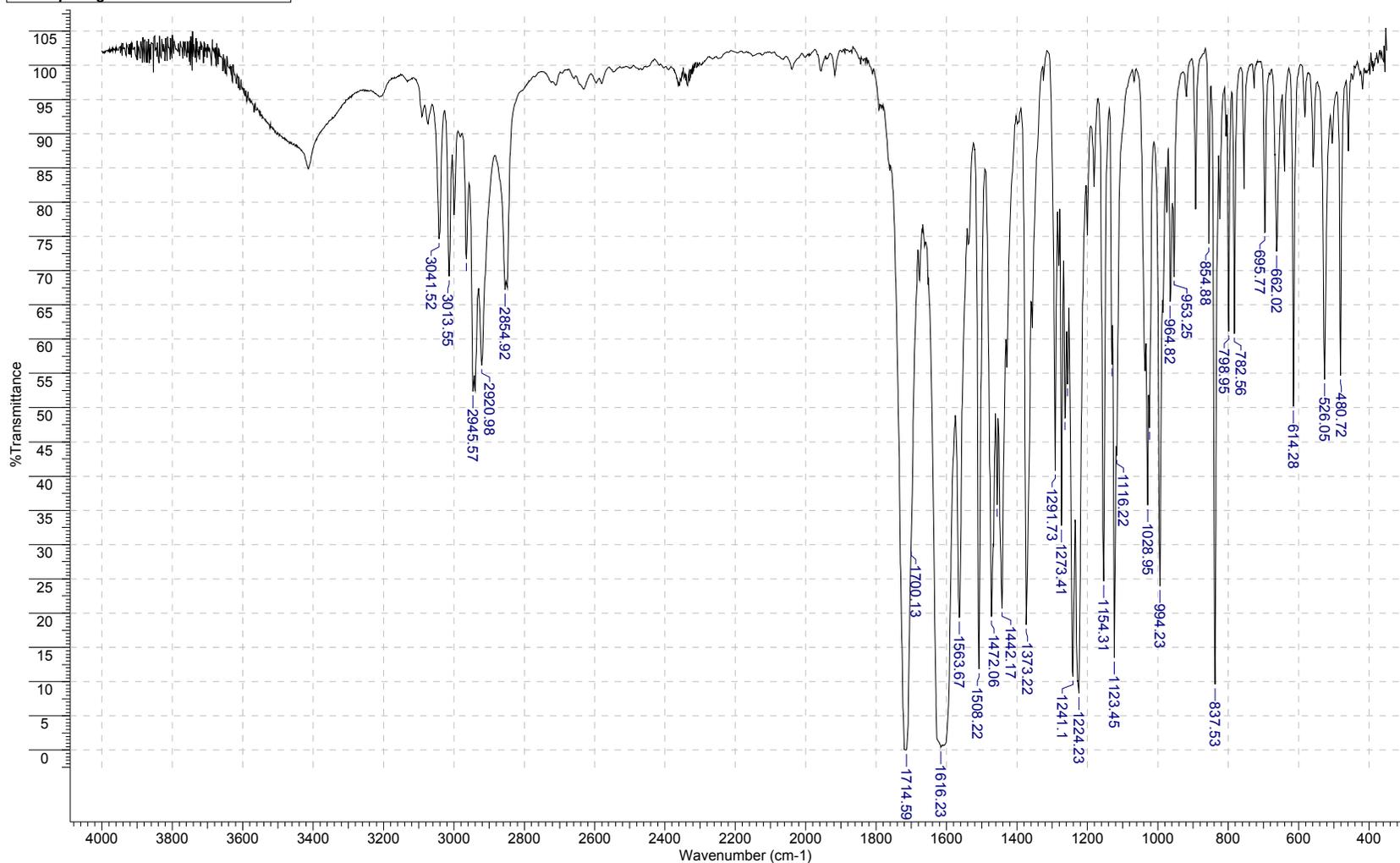


Figura 38. Espectro de Infravermelho do composto 16.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	4.5613	<b>Comment</b>	CM1	<b>Date</b>	19 Oct 2009 16:55:28		
<b>File Name</b>	H:\D432A2C1\D432A2C1_001000fid	<b>Frequency (MHz)</b>	400.21	<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8
<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg	<b>Solvent</b>	DMSO-D6
<b>Temperature (degree C)</b>	30.000					<b>Sweep Width (Hz)</b>	7183.91

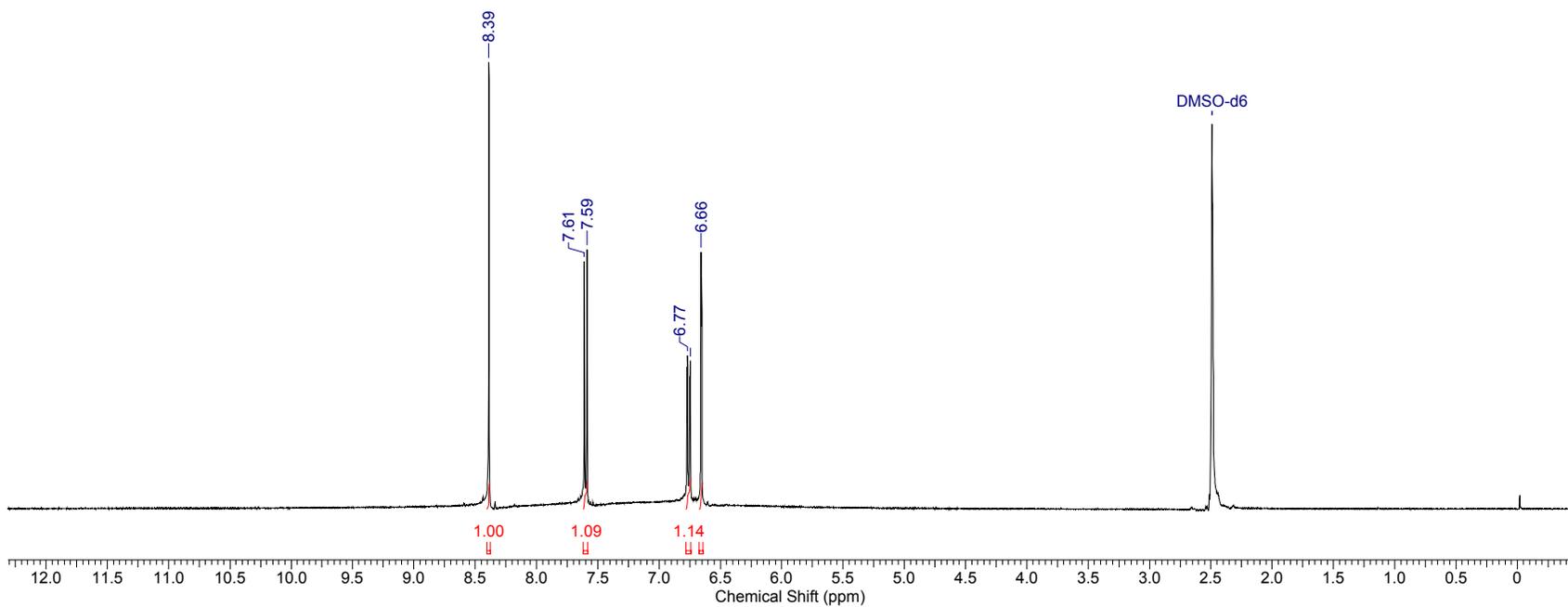
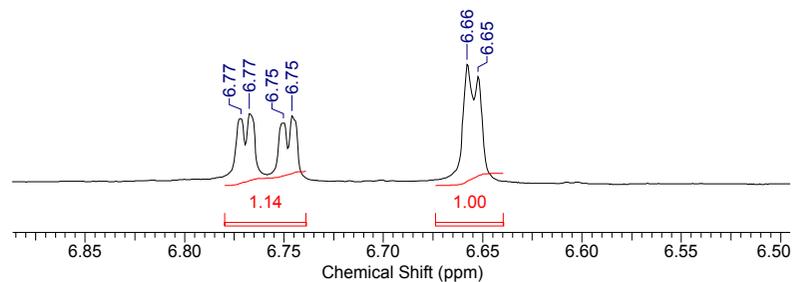
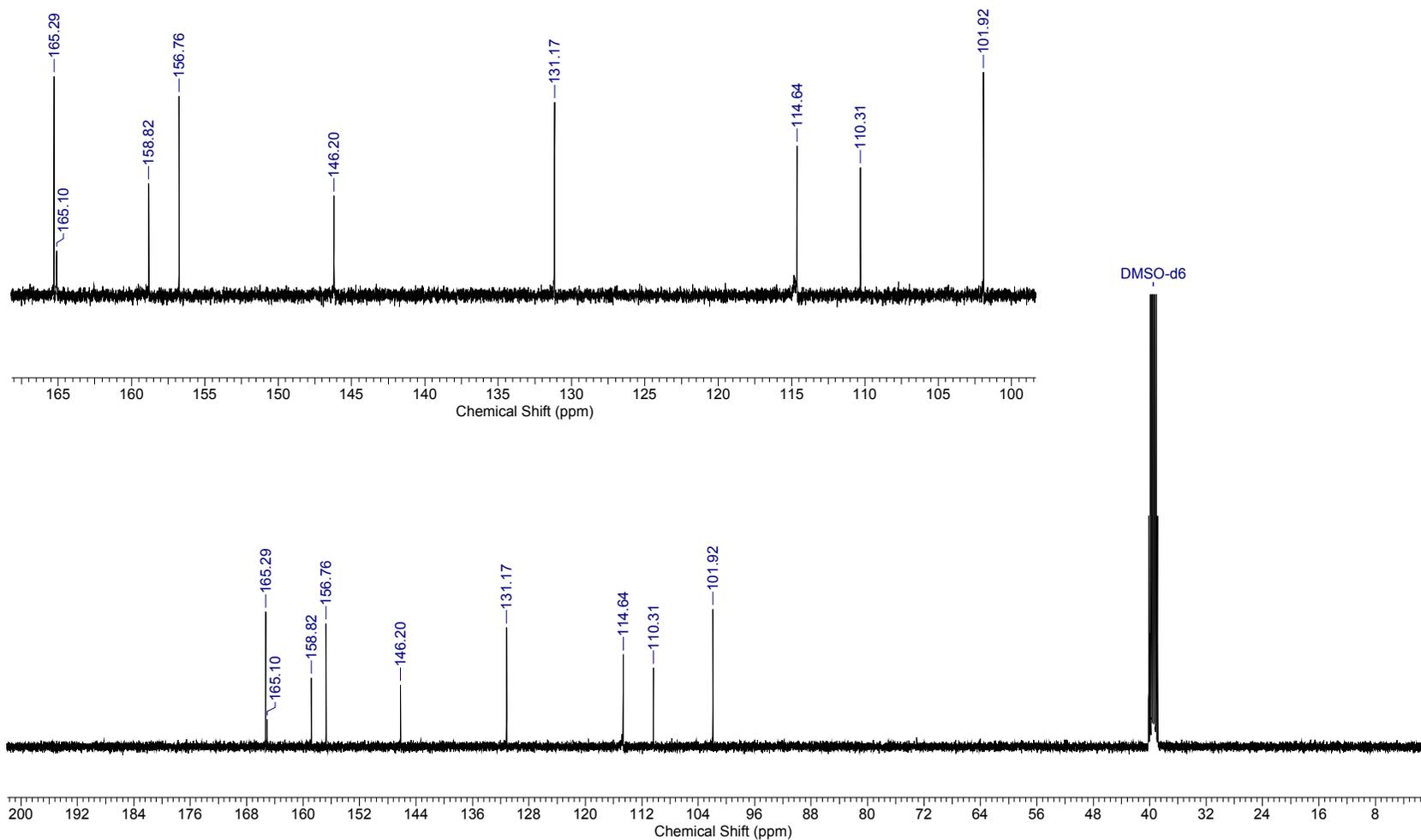


Figura 39. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 17.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.3631	<b>Comment</b>	C13CPD32 DMSO C:\NMRData nmrsu		<b>Date</b>	19 Nov 2010 08:21:20	
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Desktop\Lucas\AV3472A2L1\AV3472A2L1_002000fid				<b>Frequency (MHz)</b>	100.63	
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	3072	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24038.46	<b>Temperature (degree C)</b>	22.400

Figura 40. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 17.

<b>File Name</b>	H:\1.JDX	<b>Date Stamp</b>	29/09/2009 15:00:00	<b>Date</b>	29 Sep 2009 15:31:24	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Instrument</b>	MB	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)	<b>Y Axis</b>	%Transmittance
<b>Spectrum Range</b>	349.0901 - 4000.0706		<b>Points Count</b>	1894	<b>Data Spacing</b>	1.9287	

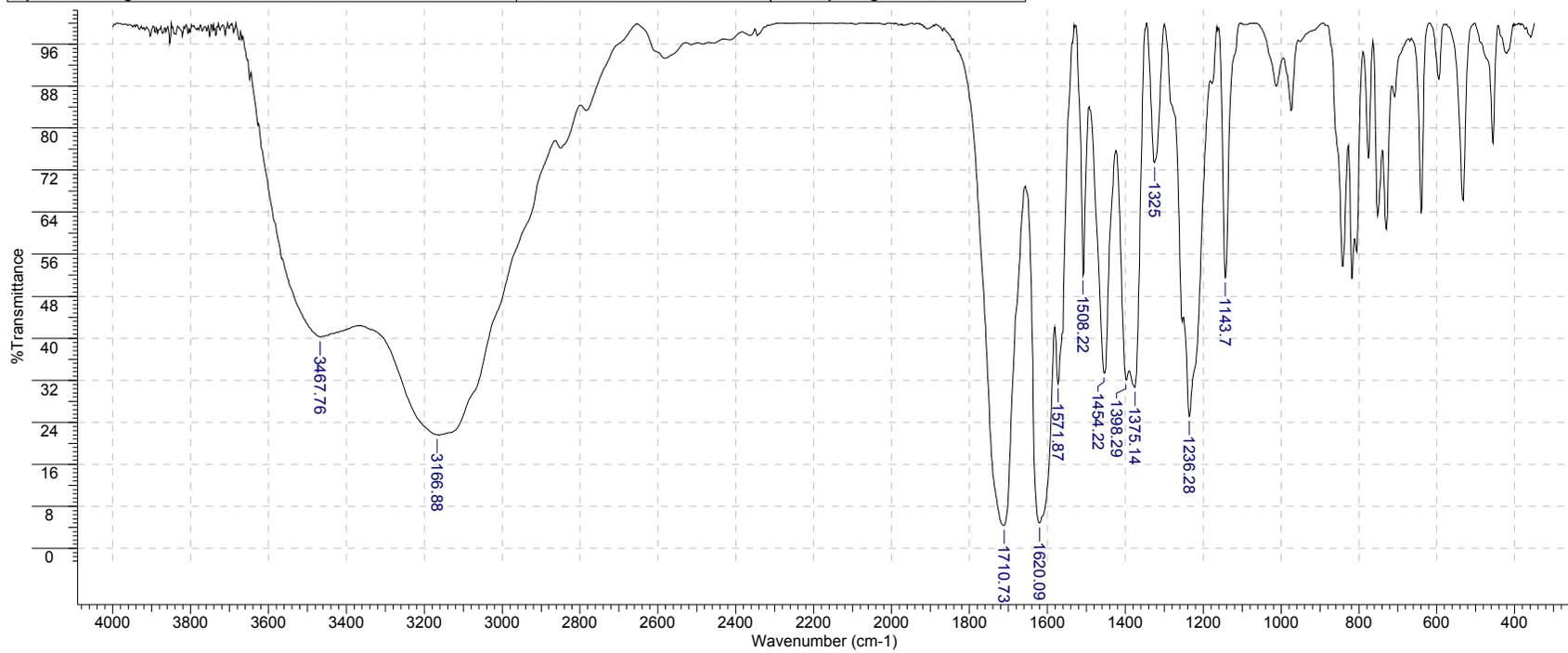


Figura 41. Espectro de Infravermelho do composto 17.

Acquisition Time (sec)	4.0894	Comment	CM2	Date	19 Oct 2009 16:57:36		
File Name	H:\D432A2C2\D432A2C2_001000fid	Frequency (MHz)	400.21	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg	Solvent	DMSO-D6
Temperature (degree C)	30.000					Sweep Width (Hz)	8012.82

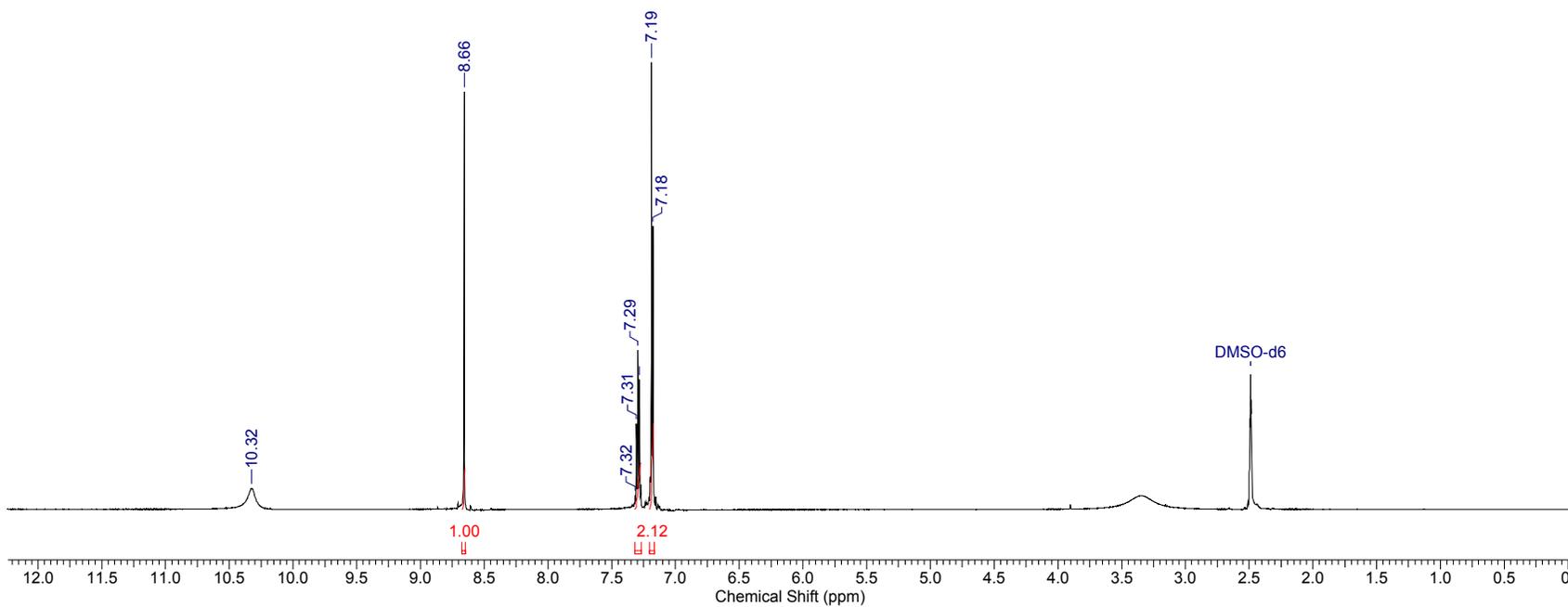
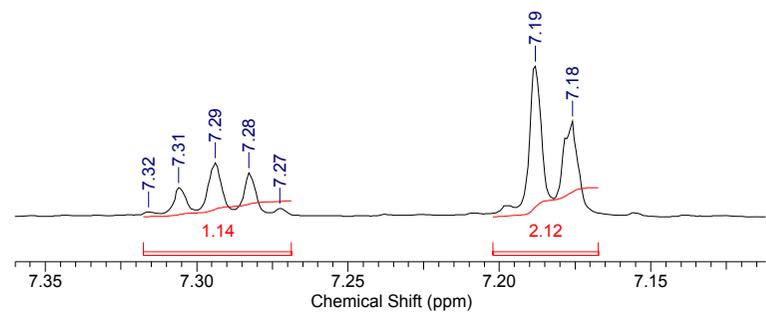


Figura 42. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto **18**.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	CM2	<b>Date</b>	19 Oct 2009 17:08:16		
<b>File Name</b>	H:\D432A2C2\D432A2C2_002000fid		<b>Frequency (MHz)</b>	100.64	<b>Nucleus</b>	<sup>13</sup> C	
<b>Original Points Count</b>	16384	<b>Points Count</b>	16384	<b>Pulse Sequence</b>	zpgg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6
<b>Temperature (degree C)</b>	22.000					<b>Number of Transients</b>	1024
						<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36

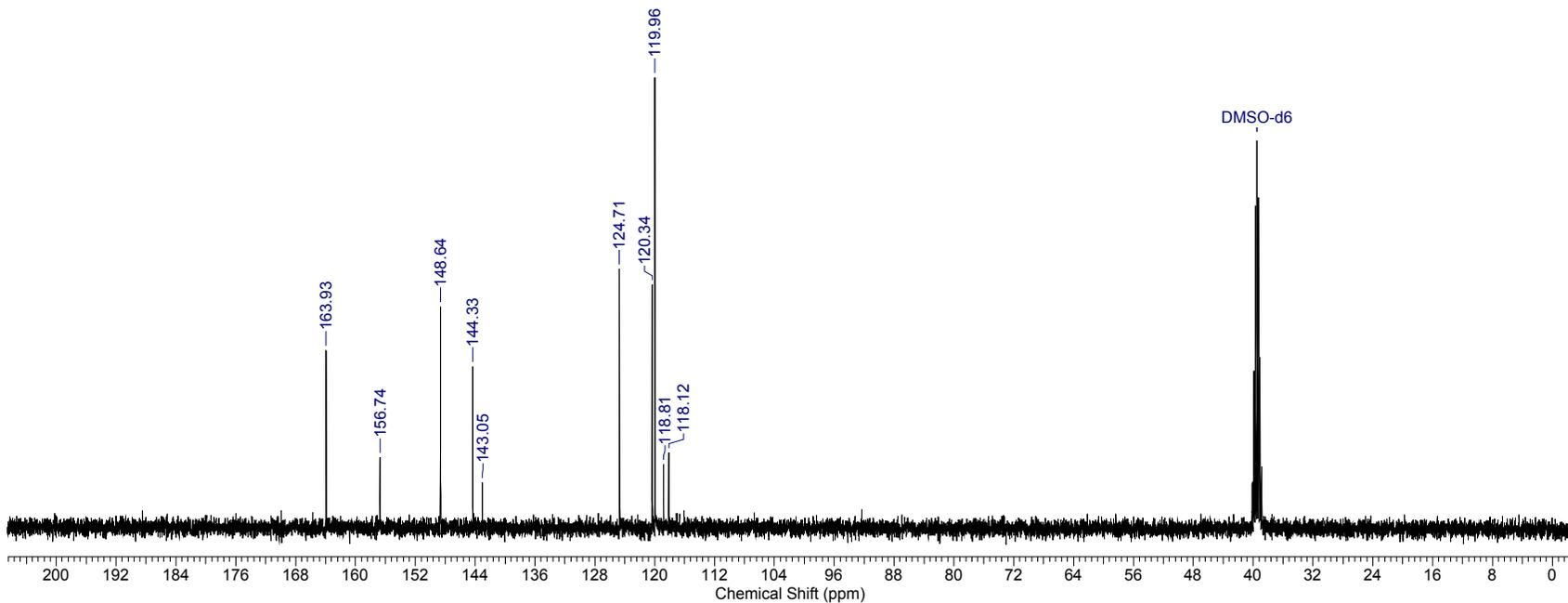
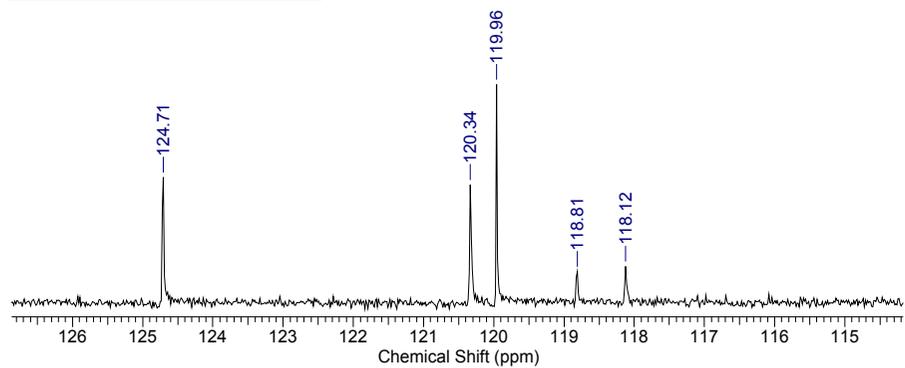


Figura 43. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 18.

<b>File Name</b>	C:\USERS\LUCAS\DOWNLOADS\C1.JDX		<b>Date Stamp</b>	20/08/2010 10:49:00	<b>Date</b>	20 Aug 2010 12:22:46		
<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	MB	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)	
<b>Y Axis</b>	%Transmittance	<b>Spectrum Range</b>		298.9446 - 4000.0706	<b>Points Count</b>	1920	<b>Data Spacing</b>	1.9287

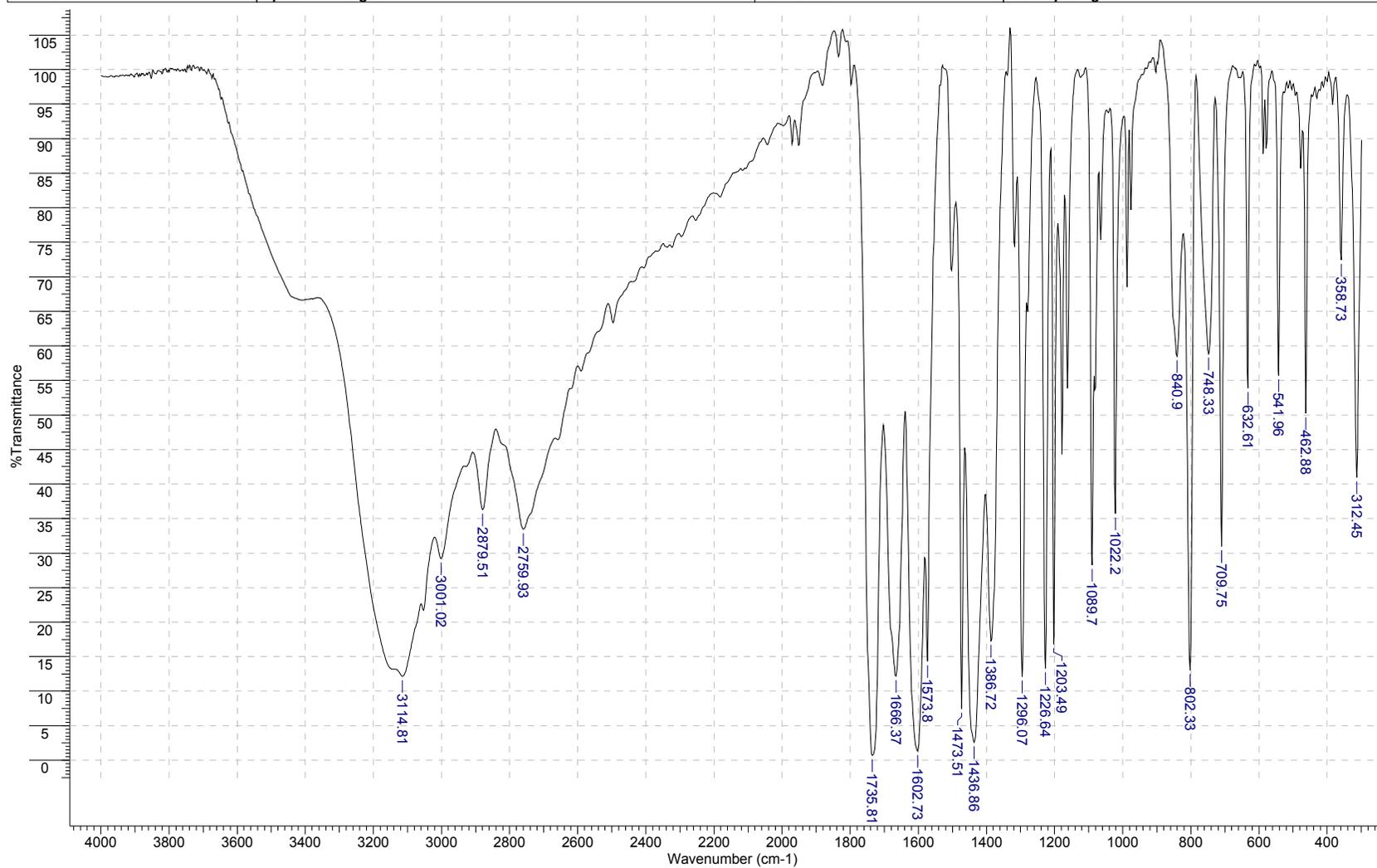


Figura 44. Espectro de Infravermelho do composto 18.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.9584	<b>Comment</b>	CAM	<b>Date</b>	24 Aug 2009 18:22:56
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Documents\Imestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (3)\CUM3\CUM3_001000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	400.21
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	8278.15
				<b>Points Count</b>	32768
				<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

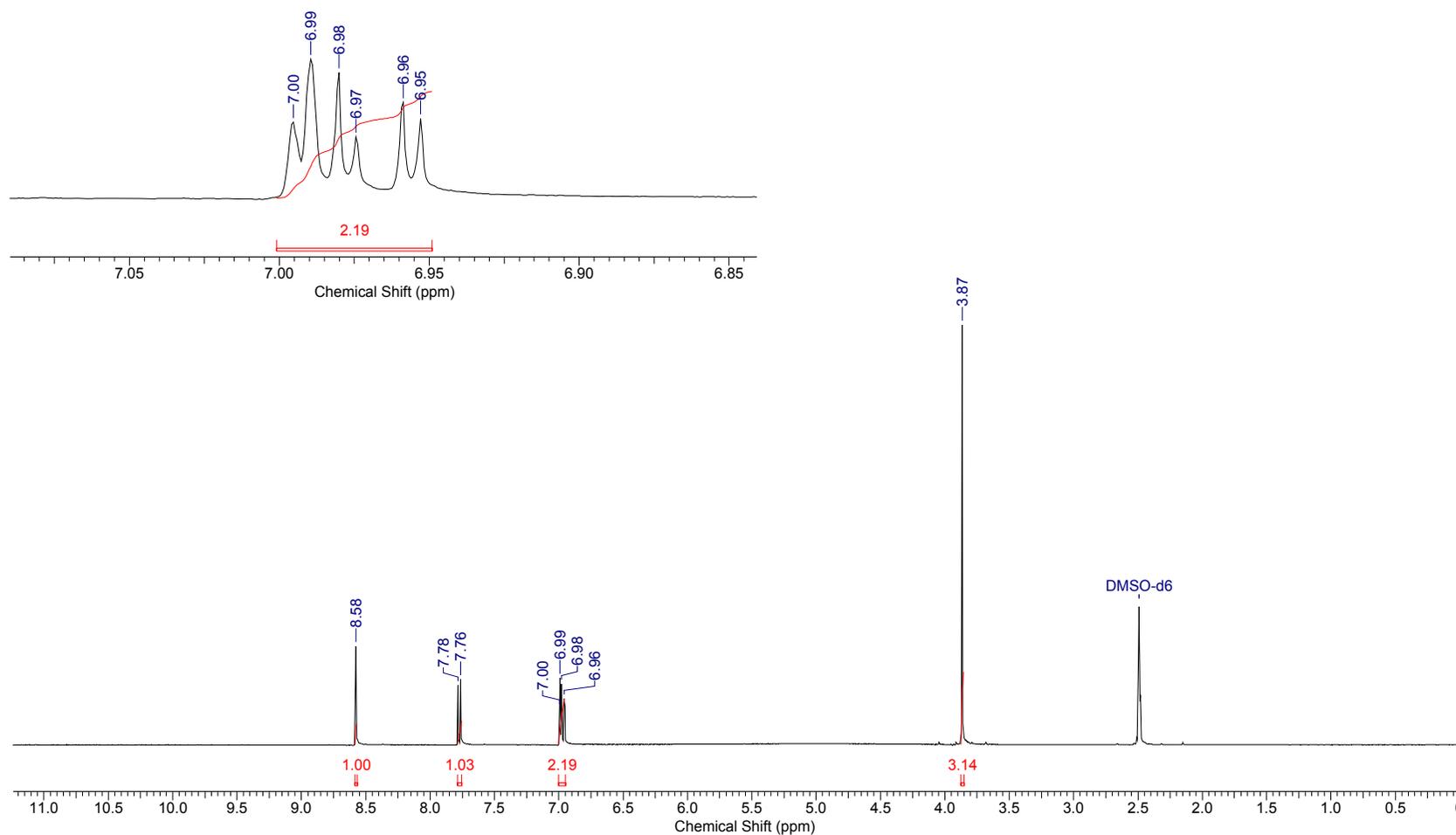


Figura 45. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 19.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6783	<b>Comment</b>	CAM	<b>Date</b>	24 Aug 2009 18:29:20
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Documents\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (3)\CUM3\CUM3_002000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	100.64
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	4096	<b>Original Points Count</b>	16384
<b>Pulse Sequence</b>	zpgg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24154.59
				<b>Points Count</b>	16384
				<b>Temperature (degree C)</b>	22.000

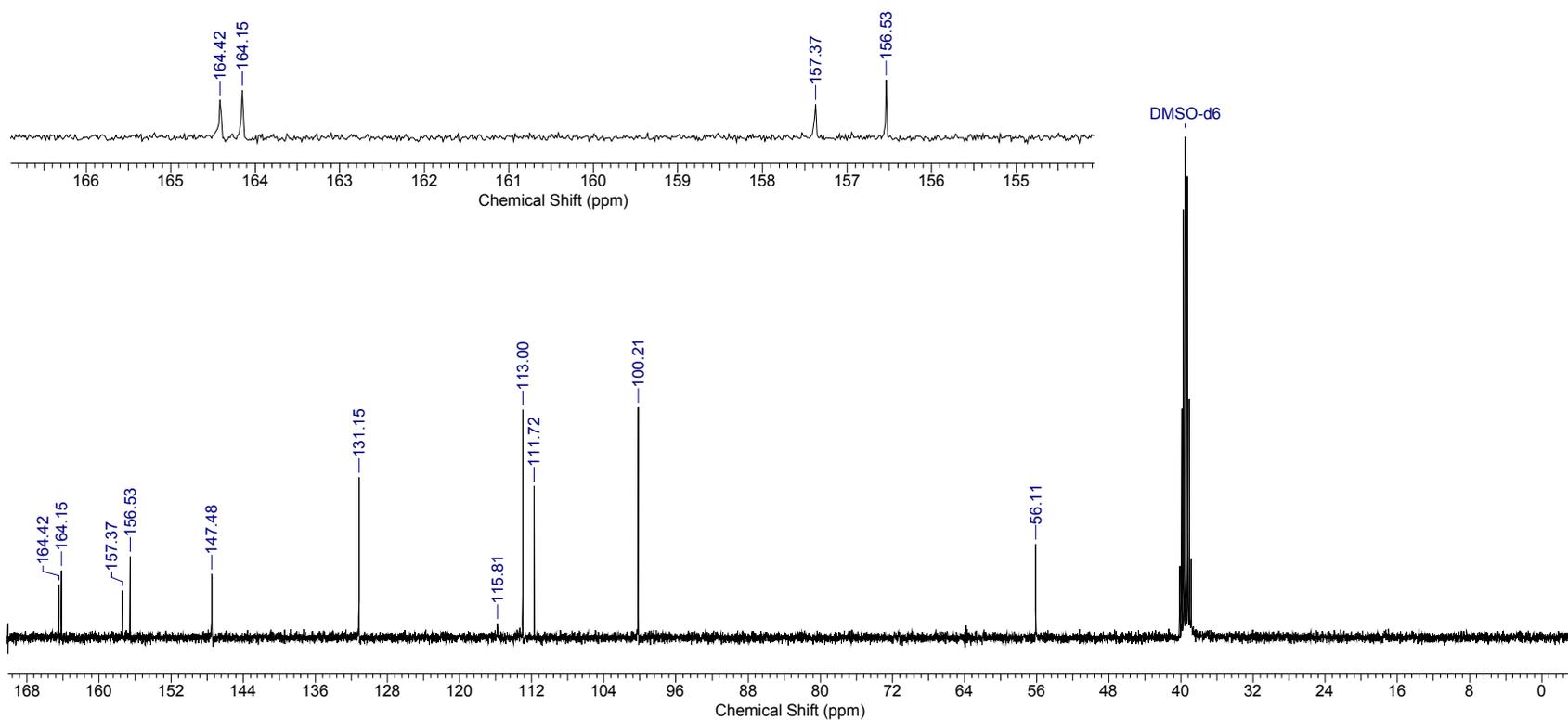


Figura 46. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 19.

<b>Comment</b>	branco	<b>File Name</b>	C:\USERS\LUCAS\DOWNLOADS\IC3.JDX	<b>Date Stamp</b>	20/08/2010 11:16:00		
<b>Date</b>	20 Aug 2010 12:23:04	<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	MB	<b>Spectral Region</b>	IR
<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)	<b>Y Axis</b>	% Transmittance	<b>Spectrum Range</b> 298.9446 - 4000.0706			
<b>Points Count</b>	1920	<b>Data Spacing</b>	1.9287				

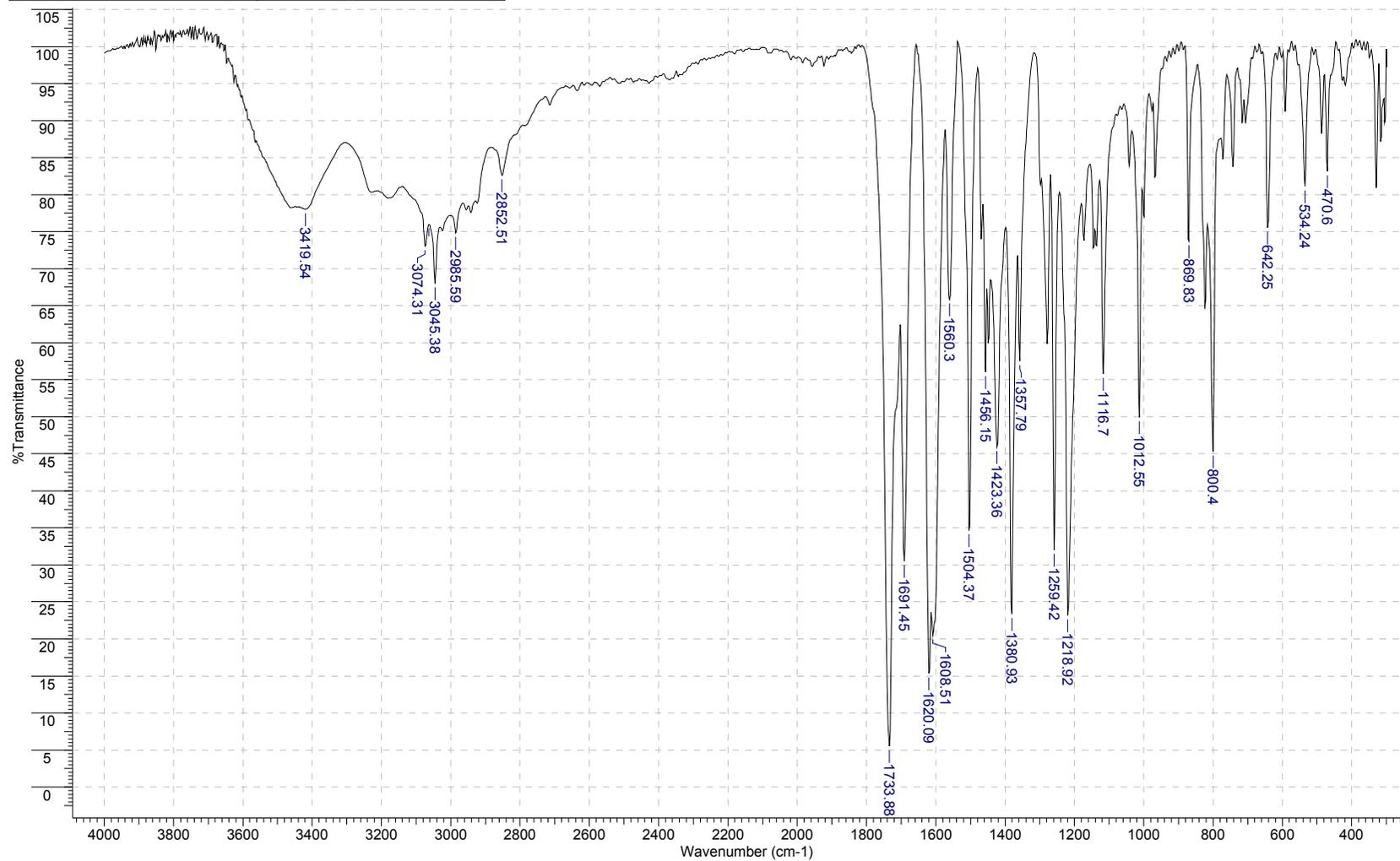


Figura 47. Espectro de Infravermelho do composto 19.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.9584	<b>Comment</b>	CAN	<b>Date</b>	24 Aug 2009 19:33:20
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Documents\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (4)\CUM4\CUM4_001000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	400.21
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	8278.15
				<b>Points Count</b>	32768
				<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

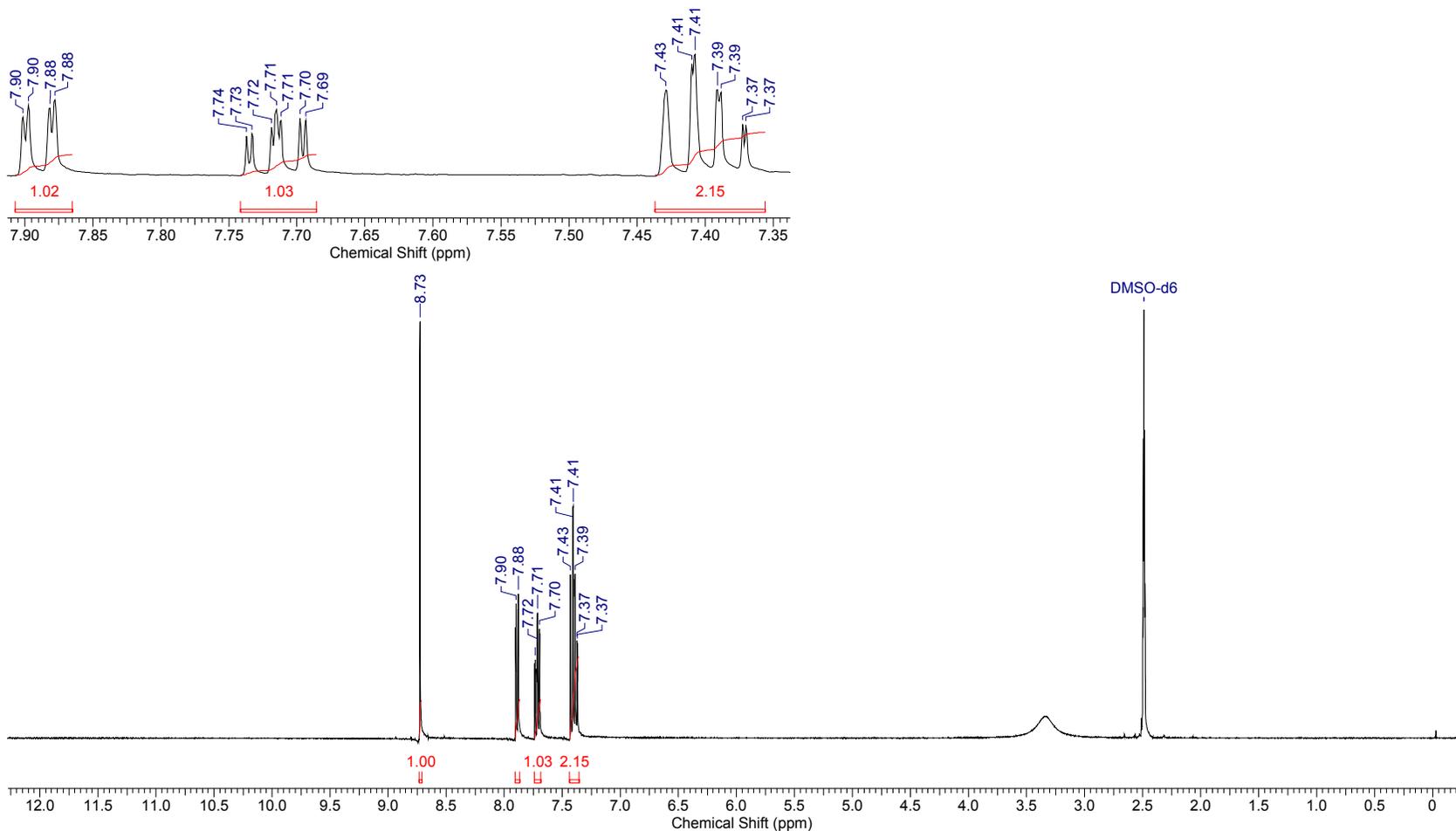
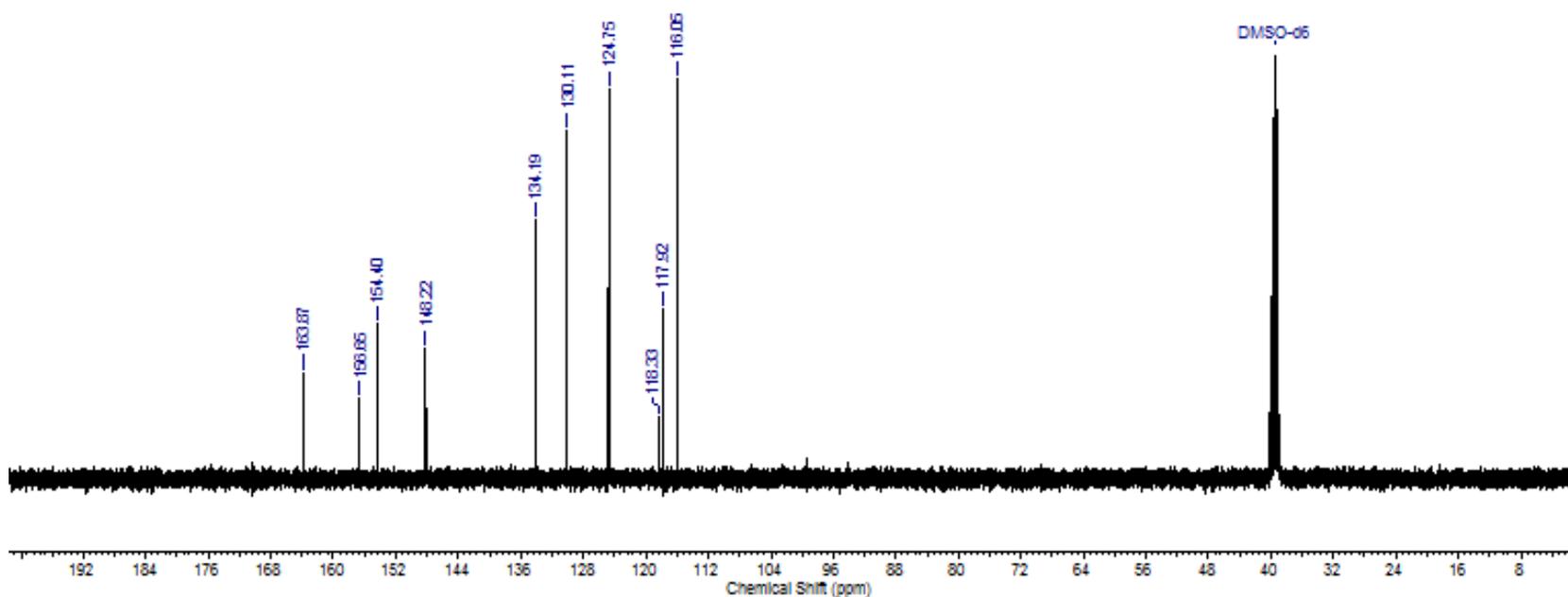


Figura 48. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 20.

Acquisition Time (sec)	0.6783	Comment	CAN	Date	24 Aug 2009 19:33:20
File Name	C:\Users\Lucas\Documents\metad\Espectros - Cumarinas\Cumarina 4\ICUM4\ICUM4_002000fid			Frequency (MHz)	100.64
Nucleus	<sup>13</sup> C	Number of Transients	1162	Original Points Count	16384
Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Points Count	65536
Temperature (degree C)	22.000			Sweep Width (Hz)	24154.59

Figura 49. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto **20**.

<b>Comment</b>	branco	<b>File Name</b>	C:\USERS\LUCAS\DOWNLOADS\C2.JDX	<b>Date Stamp</b>	20/08/2010 11:02:00	
<b>Date</b>	20 Aug 2010 12:22:56	<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	MB	<b>Spectral Region</b> IR
<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)		<b>Y Axis</b>	%Transmittance		
<b>Points Count</b>	1920	<b>Data Spacing</b>	1.9287	<b>Spectrum Range</b> 298.9446 - 4000.0706		

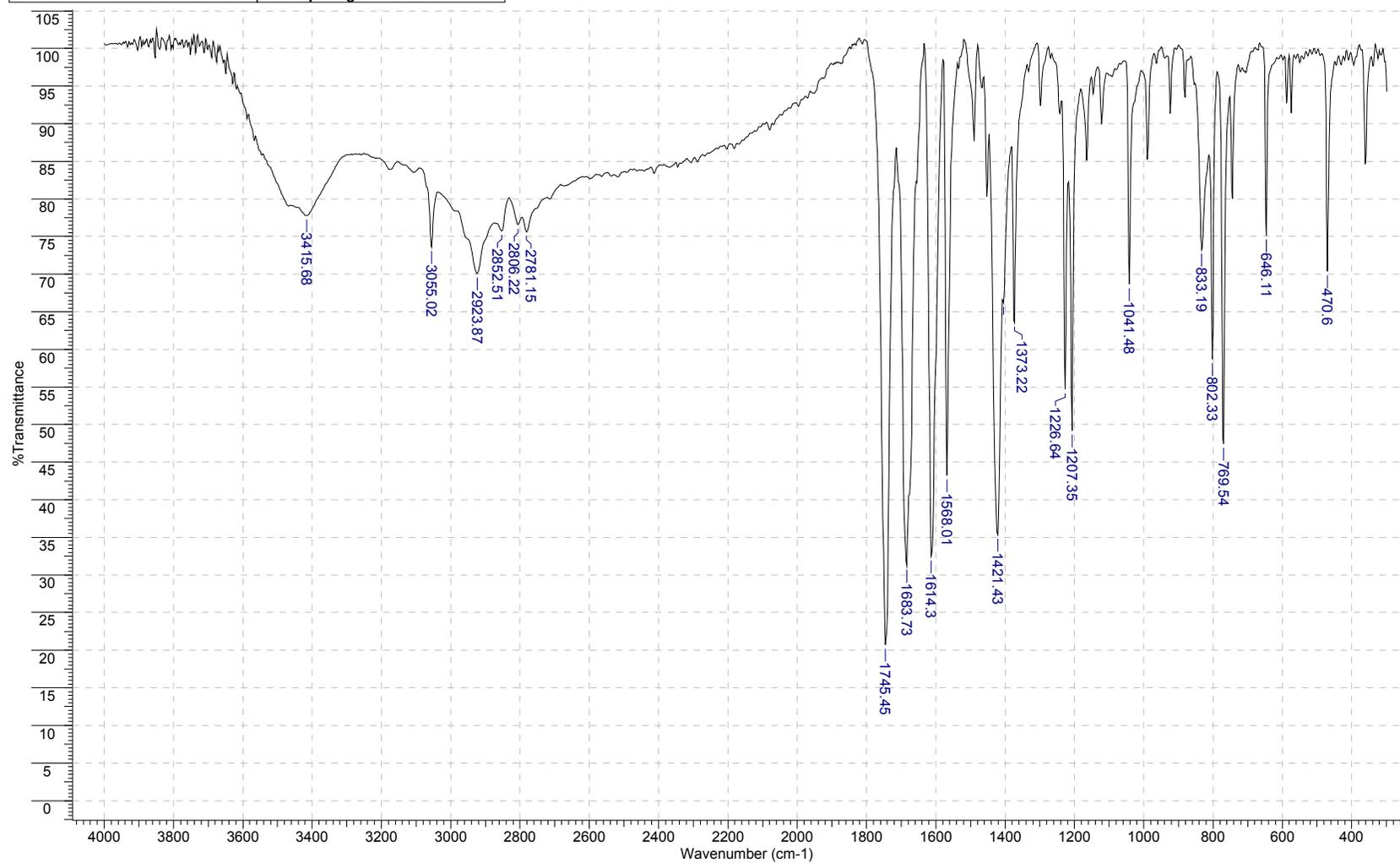


Figura 50. Espectro de Infravermelho do composto 20.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.9584	<b>Comment</b>	Imported from UXNMR.		<b>Date</b>	00/00/1980 00:00:00		<b>Frequency (MHz)</b>	400.21		
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Solvent</b>	DMSO	<b>Sweep Width (Hz)</b>	8278.15
<b>Temperature (grad C)</b>	27.000										

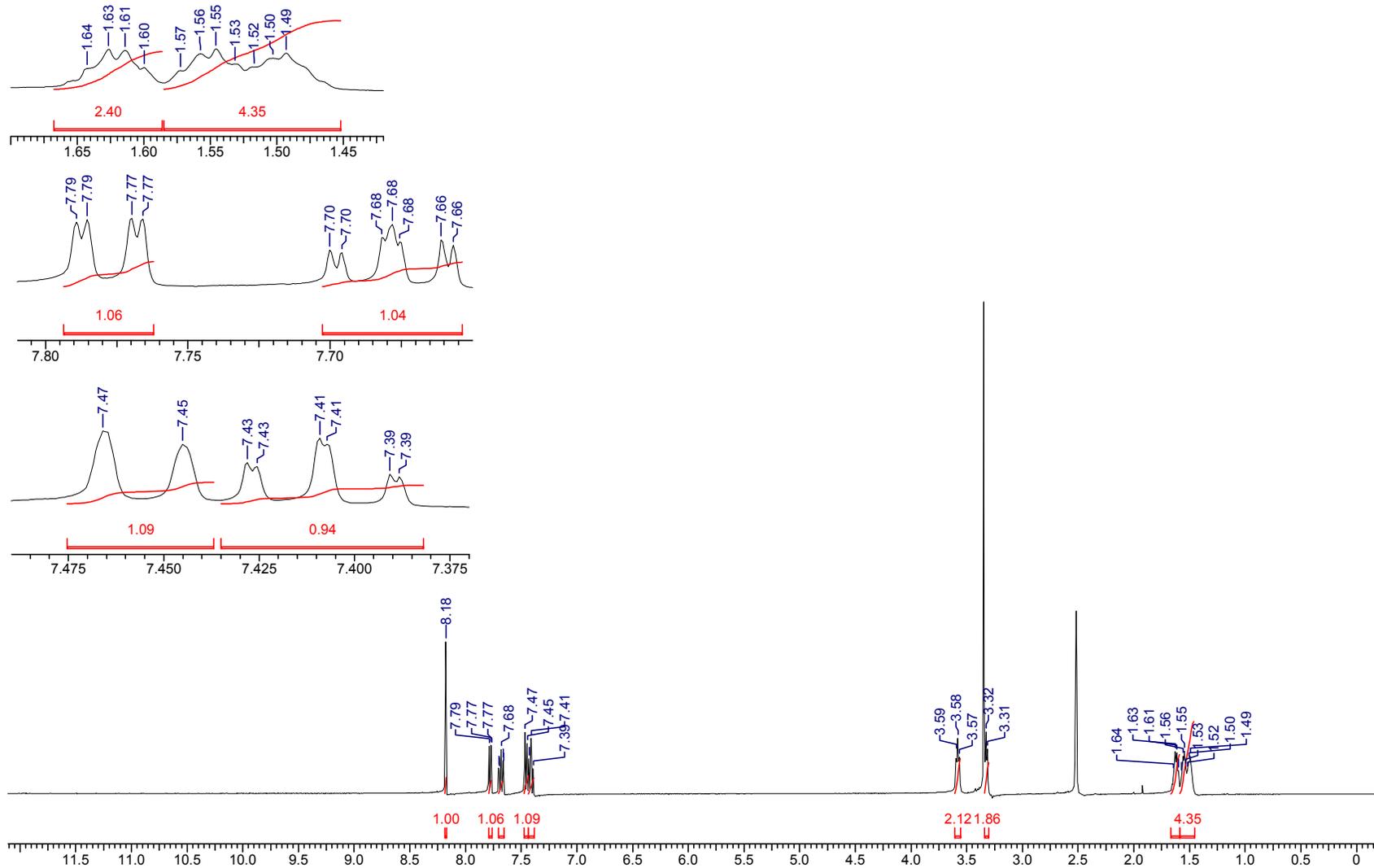


Figura 51. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 22.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6783	<b>Comment</b>	Imported from UXNMR.		<b>Date</b>	00/00/1980 00:00:00			
<b>Frequency (MHz)</b>	100.64	<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	4096	<b>Original Points Count</b>	16384	<b>Points Count</b>	16384
<b>Solvent</b>	DMSO	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24154.59	<b>Temperature (grad C)</b>	22.000				

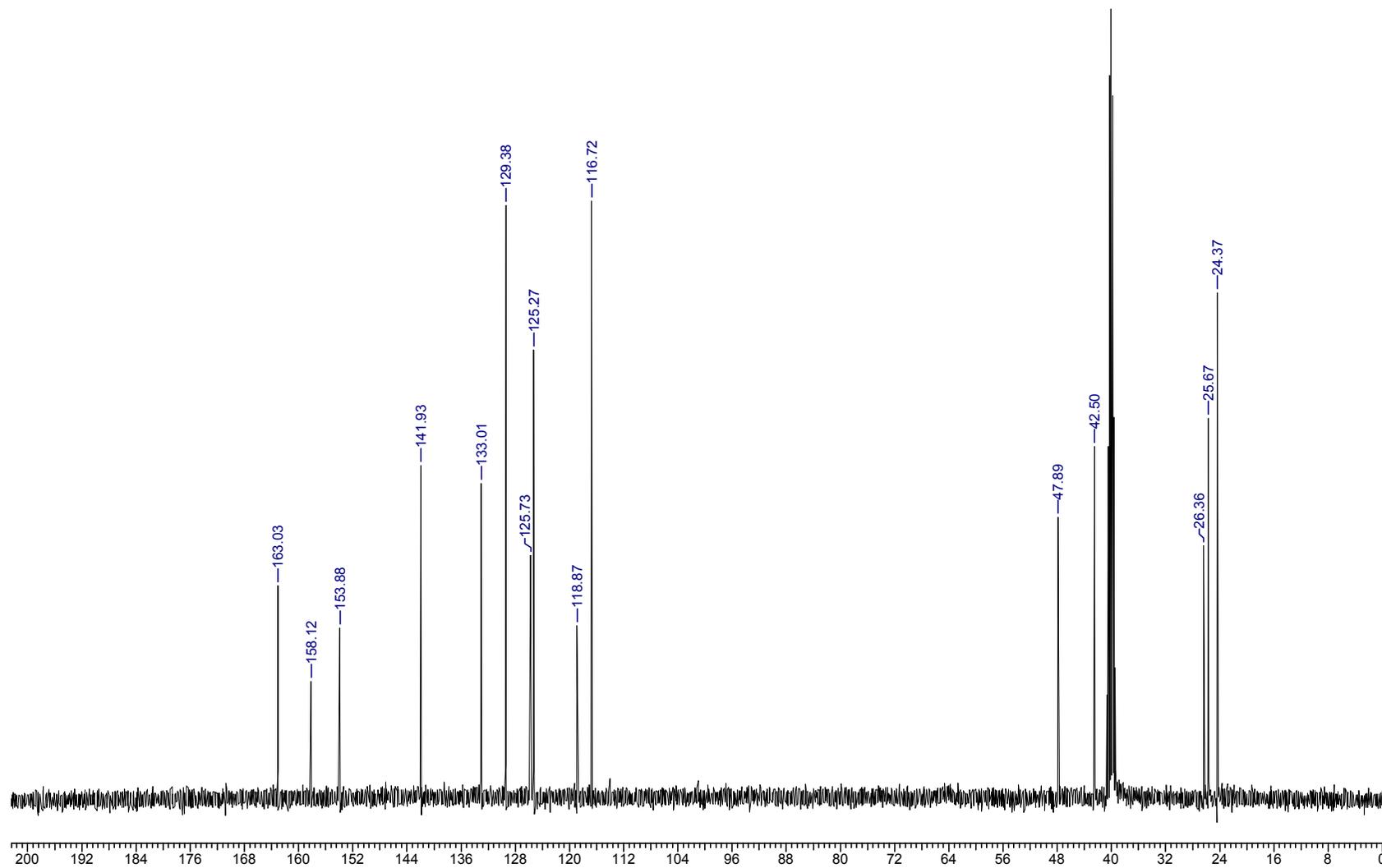


Figura 52. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 22.

<b>File Name</b>	C:\USERS\LUCAS\DOWNLOADS\IC7.JDX		<b>Date Stamp</b>	20/08/2010 14:44:00	<b>Date</b>	20 Aug 2010 14:58:58	
<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	MB	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Y Axis</b>	%Transmittance	<b>Spectrum Range</b> 298.9446 - 4000.0706		<b>Points Count</b>	1920	<b>Data Spacing</b>	1.9287



Figura 53. Espectro de Infravermelho do composto 22.

<b>Acquisition Time (sec)</b> 5.0790	<b>Comment</b> Imported from UXNMR.	<b>Date</b> 00/00/1980 00:00:00	<b>Frequency (MHz)</b> 200.13
<b>Nucleus</b> 1H	<b>Number of Transients</b> 1	<b>Original Points Count</b> 16384	<b>Points Count</b> 16384
<b>Temperature (grad C)</b> 27.000		<b>Solvent</b> CDCl3	<b>Sweep Width (Hz)</b> 3225.81

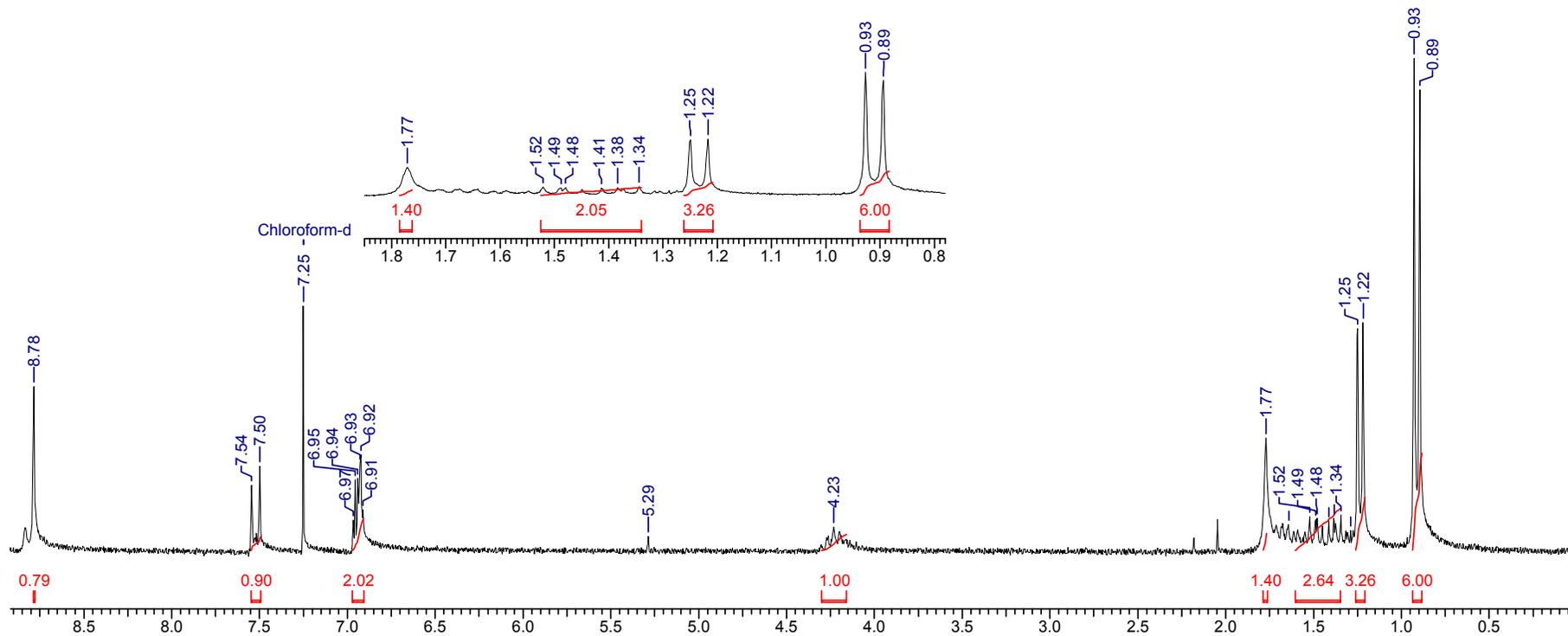
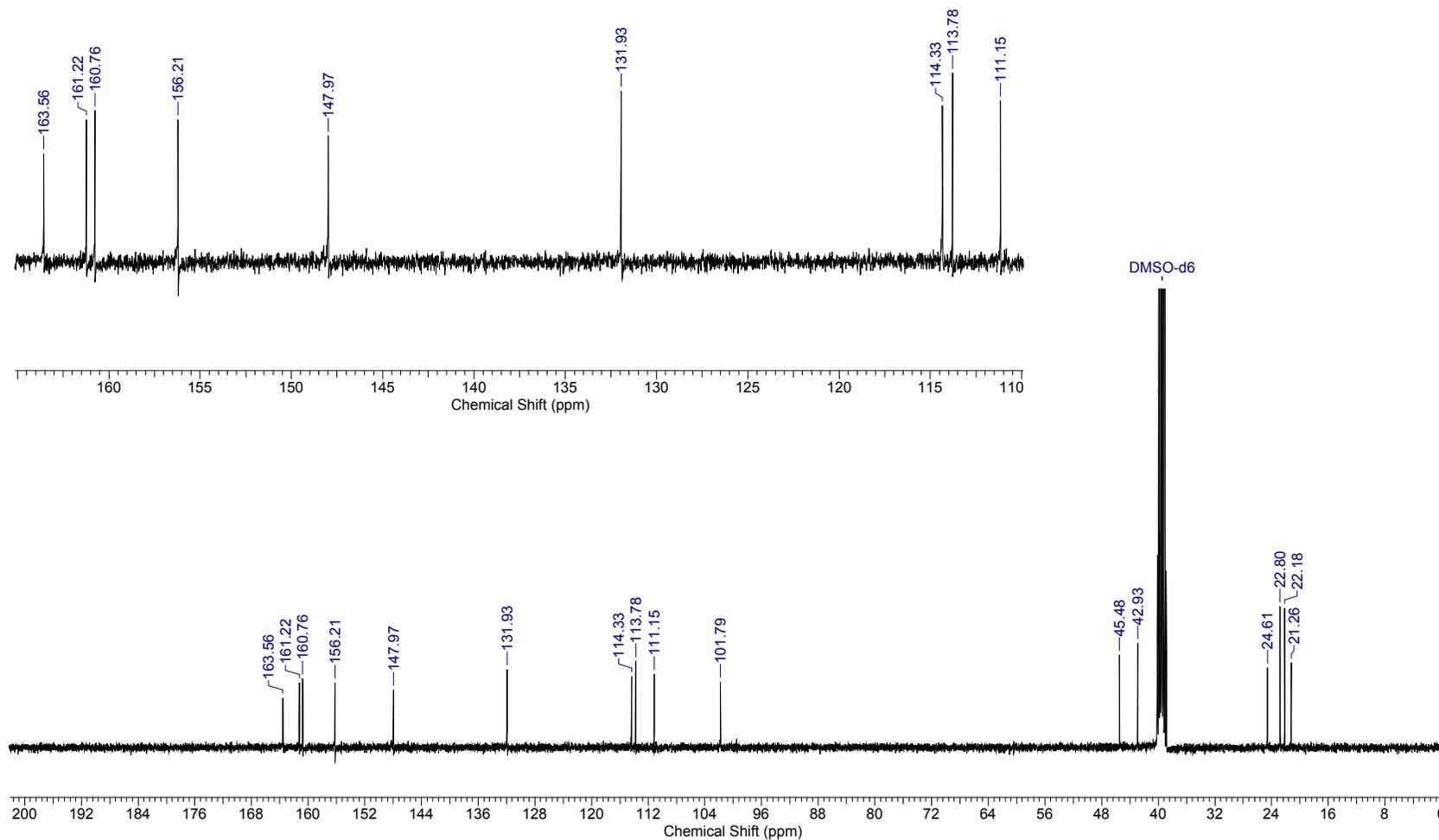


Figura 54. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 23.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6816	<b>Comment</b>	C13CPD32 DMSO C:\NMRData nmrsu		<b>Date</b>	19 Nov 2010 10:05:52	
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Desktop\Lucas\AV3472A2L2\AV3472A2L2_002000fid				<b>Frequency (MHz)</b>	100.63	
<b>Nucleus</b>	<sup>13</sup> C	<b>Number of Transients</b>	1749	<b>Original Points Count</b>	16384	<b>Points Count</b>	16384
<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24038.46	<b>Temperature (degree C)</b>	22.300

Figura 55. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 23.

<b>File Name</b>	C:\USERS\LUCAS\DOWNLOADS\C6.JDX	<b>Date Stamp</b>	20/08/2010 14:33:00	<b>Date</b>	20 Aug 2010 14:58:52
<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	MB	<b>Spectral Region</b>	IR
<b>Y Axis</b>	%Transmittance	<b>Spectrum Range</b>	298.9446 - 4000.0706	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )
				<b>Points Count</b>	1920
				<b>Data Spacing</b>	1.9287

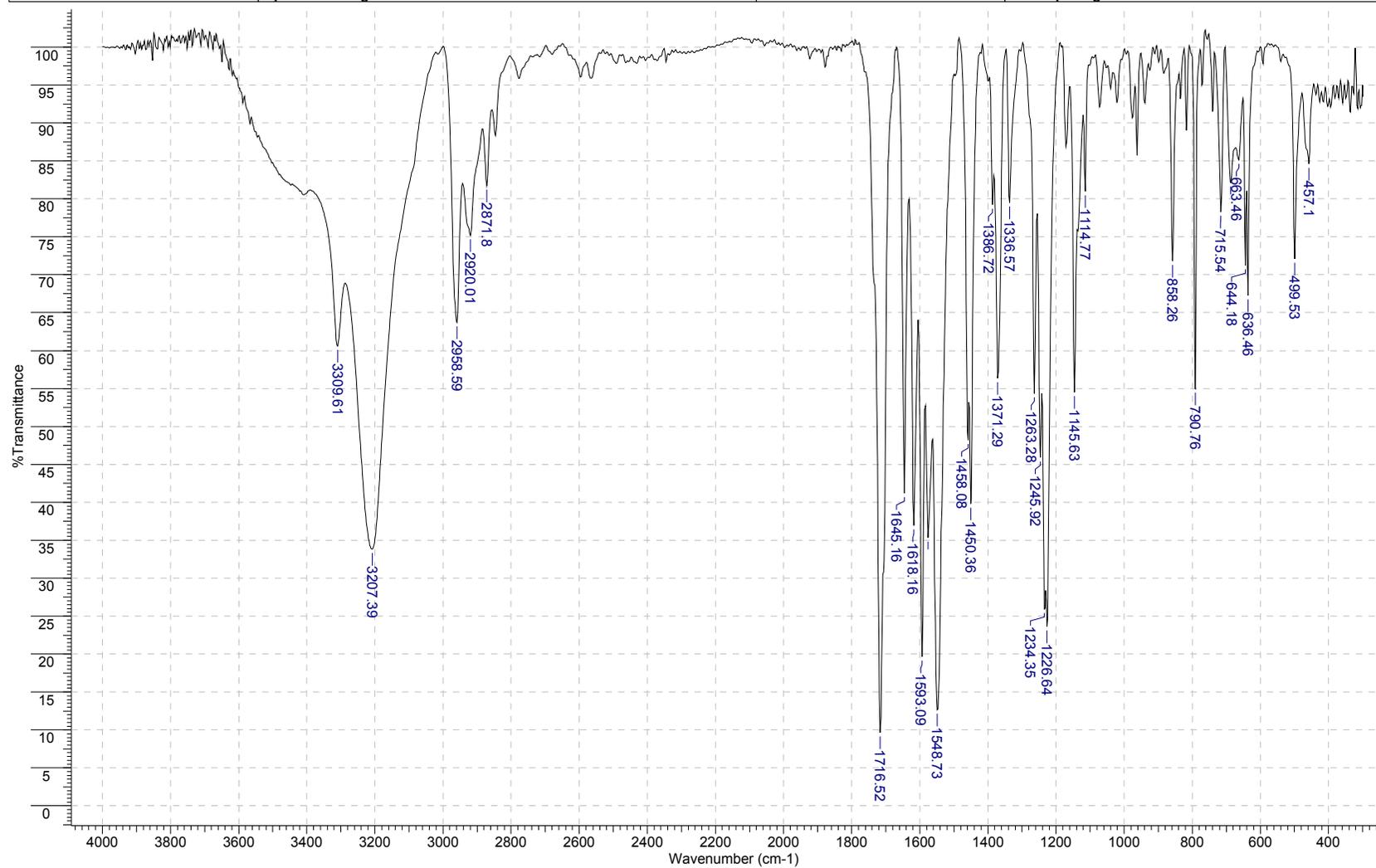


Figura 56. Espectro de Infravermelho do composto 23.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.9584	<b>Date</b>	06 Jul 2010 11:29:04	<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Desktop\D272A2C1\D272A2C1_001000fid				
<b>Frequency (MHz)</b>	400.21	<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	8278.15	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000		

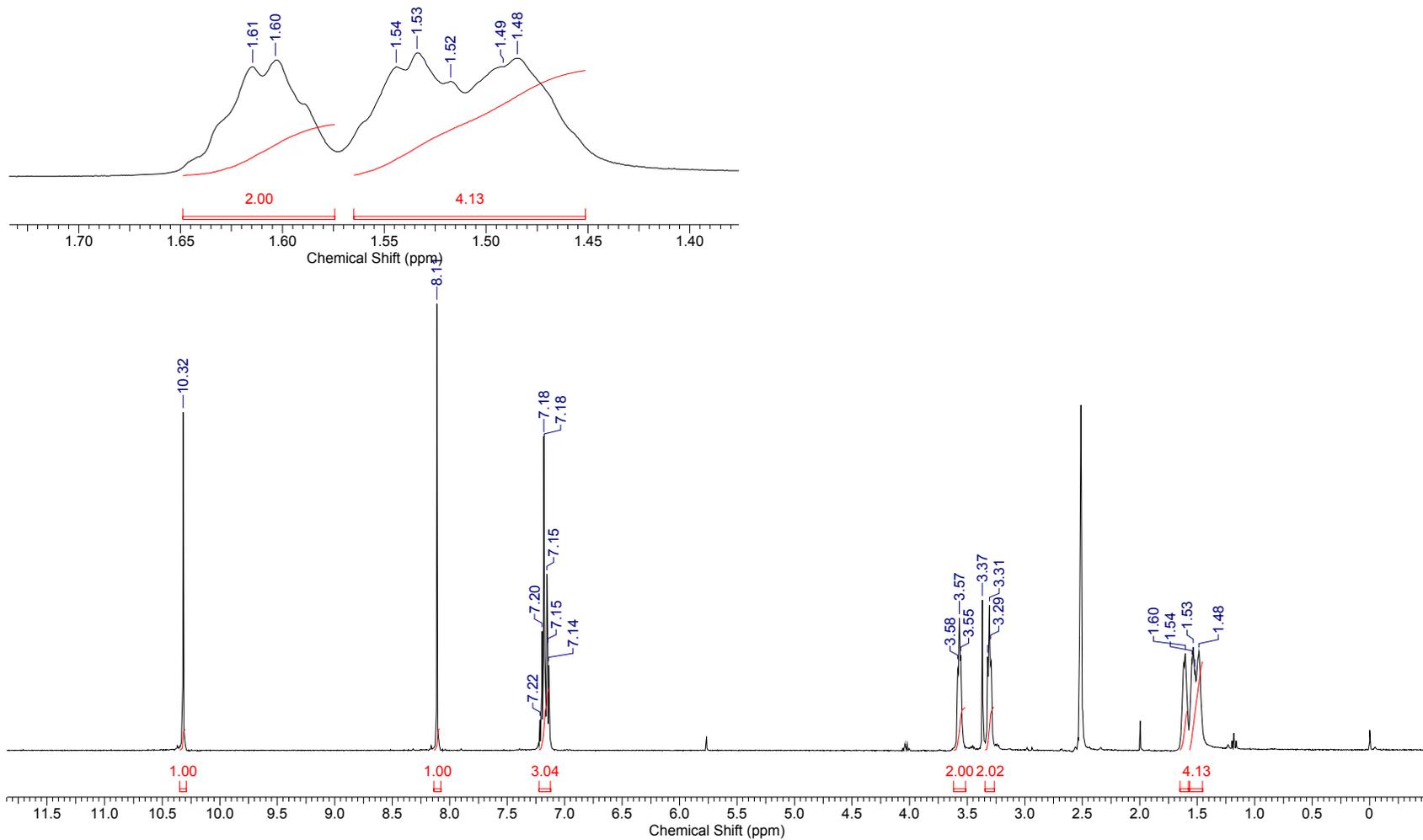


Figura 57. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 24.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6128	<b>Date</b>	06 Jul 2010 11:33:20	<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Desktop\D272A2C1\D272A2C1_002000fid				
<b>Frequency (MHz)</b>	100.64	<b>Nucleus</b>	<sup>13</sup> C	<b>Number of Transients</b>	1024	<b>Original Points Count</b>	16384	<b>Points Count</b>	32768
<b>Pulse Sequence</b>	zpgg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	26737.97	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000		

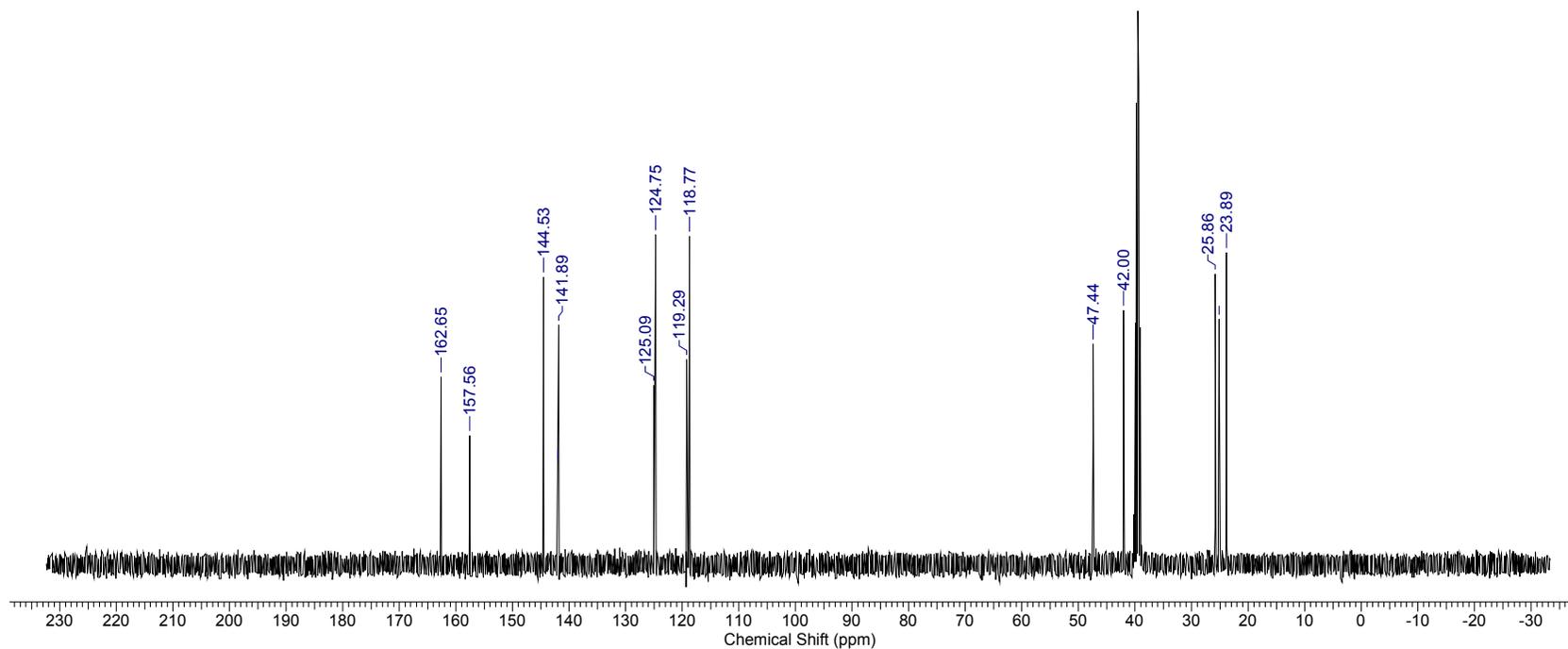
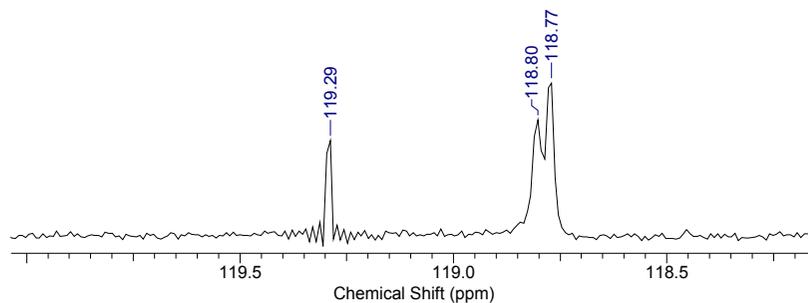


Figura 58. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 24.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	10.1581	<b>Comment</b>	A03sinteseLU	<b>Date</b>	27 Jul 1993 03:09:57
<b>File Name</b>	C:\USERS\LUCAS\MESTRADO\ESPECTROS - CUMARINAS\AMD (1)\HAMD1.DX			<b>Frequency (MHz)</b>	200.13
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8	<b>Origin</b>	pn
<b>Owner</b>	pn	<b>Points Count</b>	32768	<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D
<b>Sweep Width (Hz)</b>	3225.81	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000		

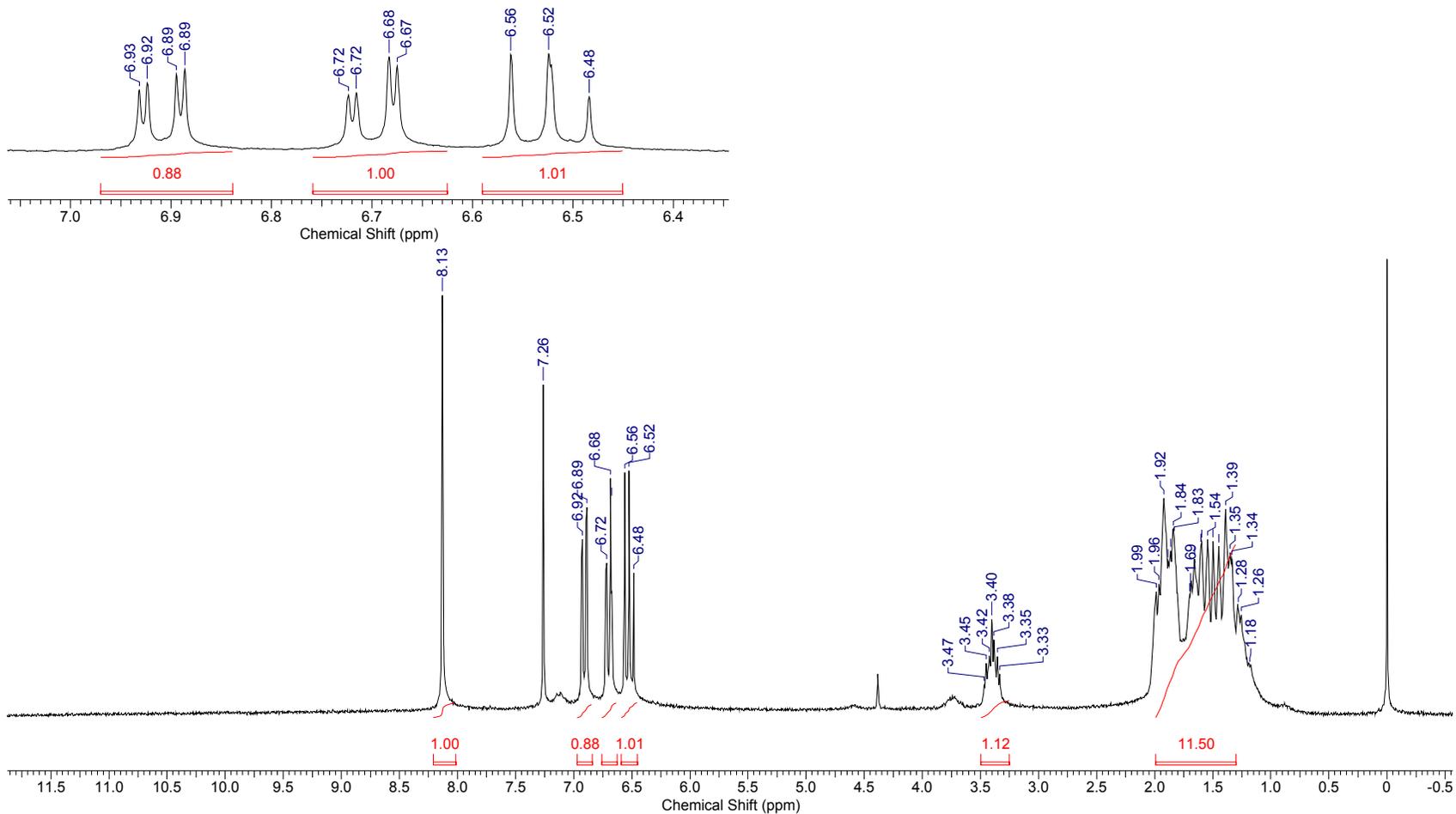
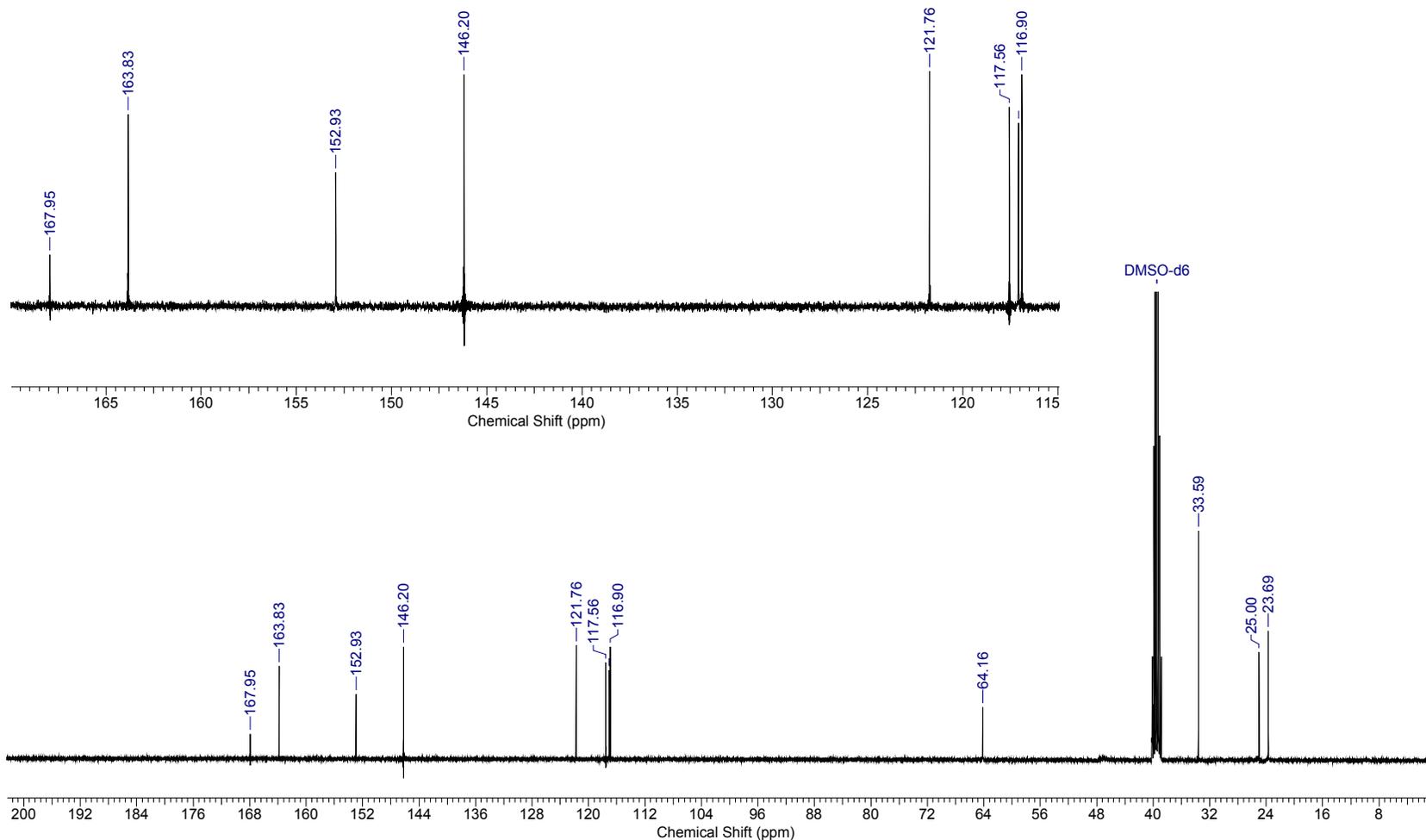


Figura 59. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 25.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.3631	<b>Comment</b>	C13CPD32 DMSO C:\NMRData nmrsu		<b>Date</b>	19 Nov 2010 02:18:40	
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Desktop\Lucas\AV3472A2L3\AV3472A2L3_002000fid				<b>Frequency (MHz)</b>	100.63	
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	3072	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24038.46	<b>Temperature (degree C)</b>	22.600

Figura 60. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 25.

<b>File Name</b>	C:\USERS\LUCAS\DOWNLOADS\C8.JDX	<b>Date Stamp</b>	20/08/2010 14:55:00	<b>Date</b>	20 Aug 2010 14:59:04
<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	MB	<b>Spectral Region</b>	IR
<b>Y Axis</b>	% Transmittance	<b>Spectrum Range</b>	298.9446 - 4000.0706	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
				<b>Points Count</b>	1920
				<b>Data Spacing</b>	1.9287

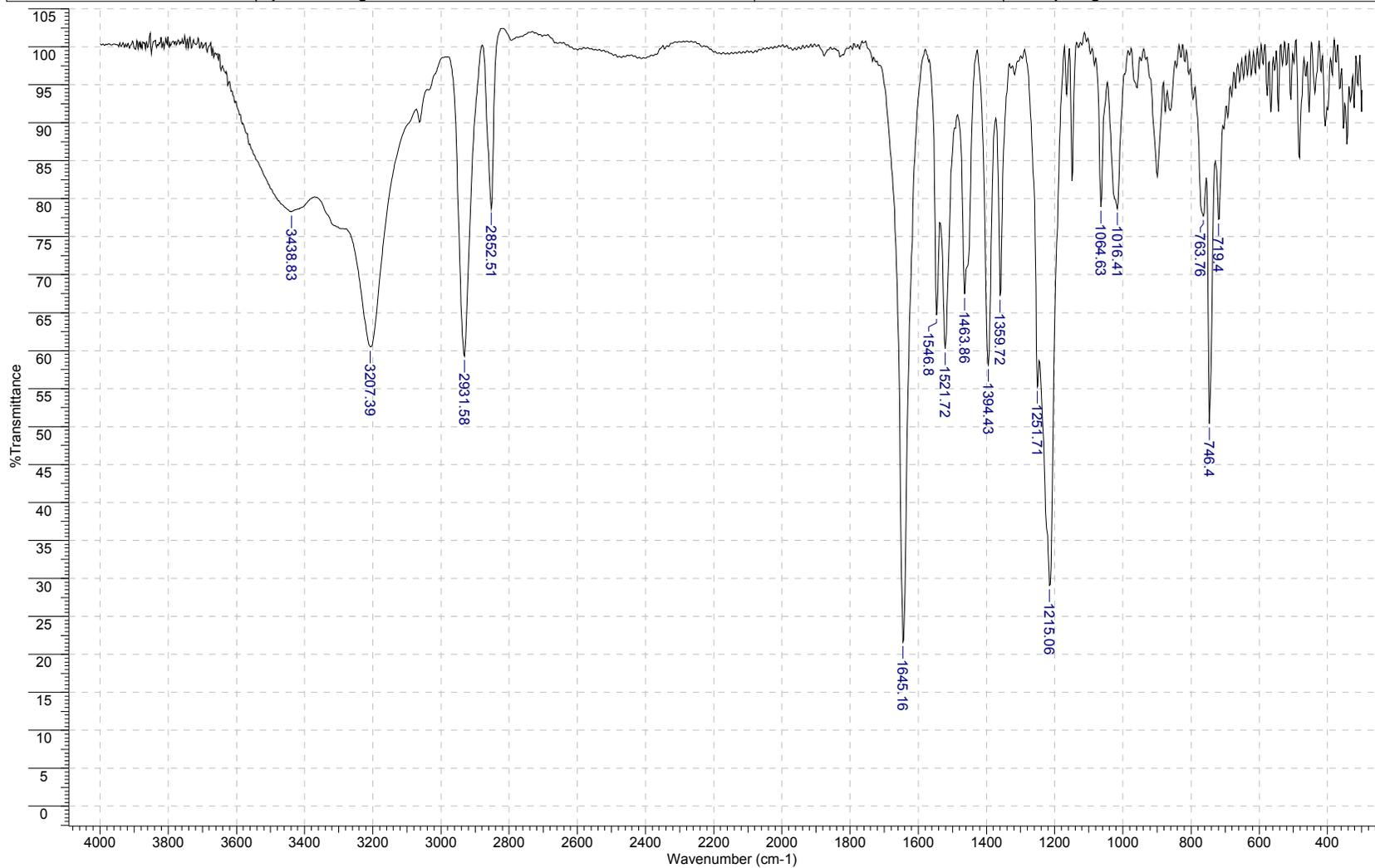


Figura 61. Espectro de Infravermelho do composto **25**.

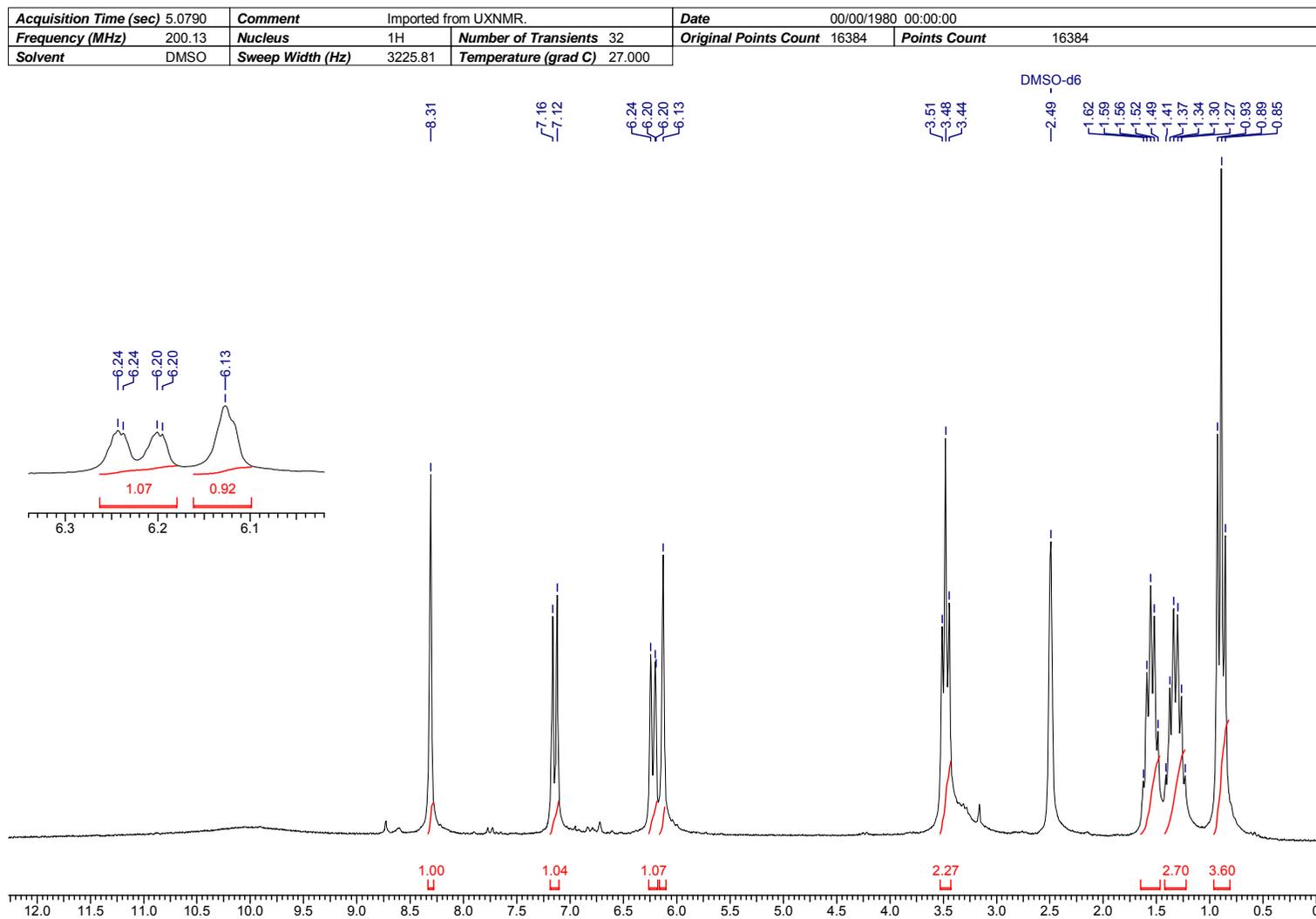


Figura 62. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **26**.

1 Nov 2009

<b>File Name</b>	H:\1.JDX	<b>Date Stamp</b>	29/09/2009 15:00:00	<b>Date</b>	29 Sep 2009 15:31:24	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Instrument</b>	MB	<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm $^{-1}$ )	<b>Y Axis</b>	%Transmittance
<b>Spectrum Range</b>	349.0901 - 4000.0706	<b>Points Count</b>	1894	<b>Data Spacing</b>	1.9287		

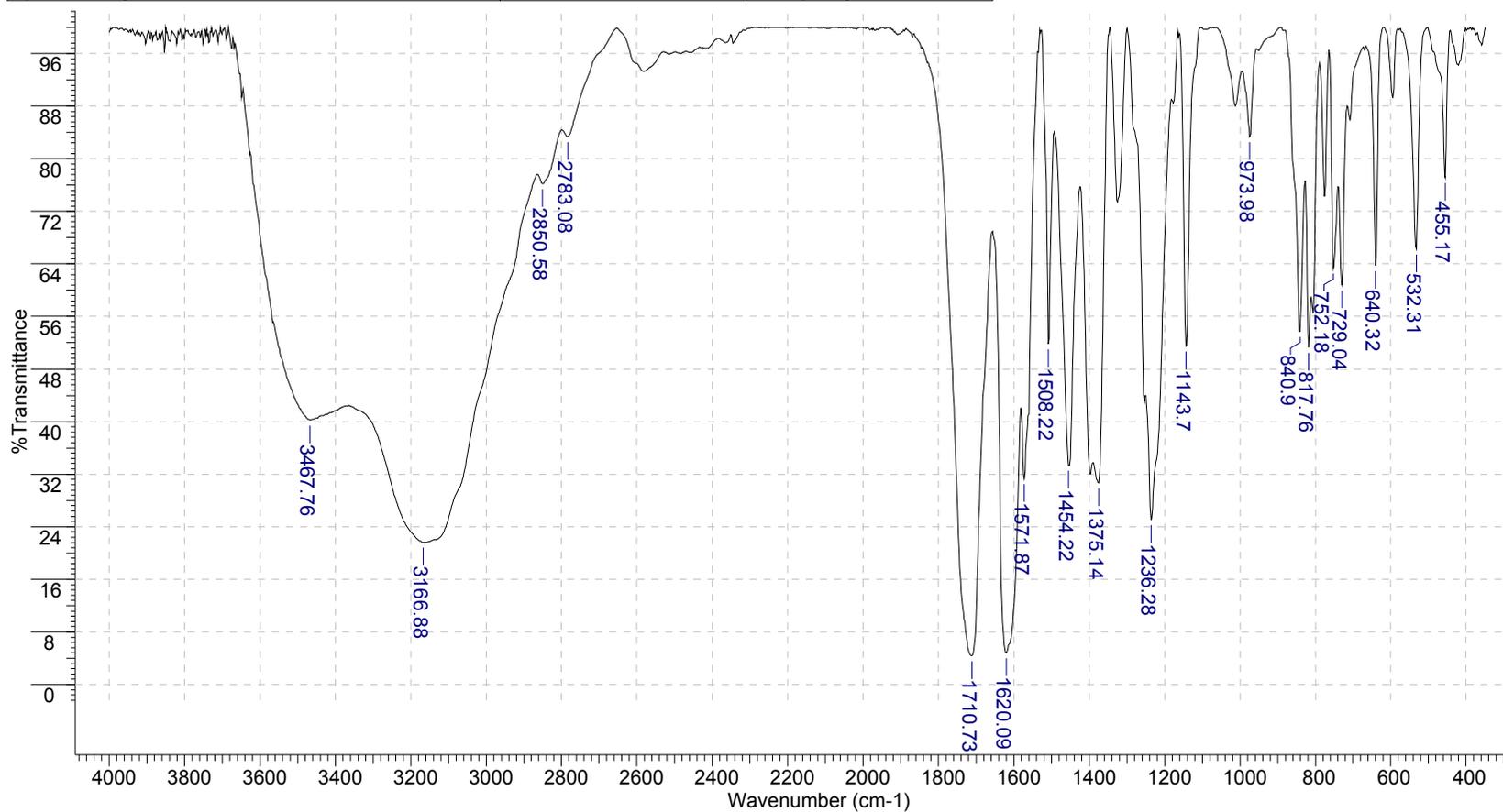


Figura 63. Espectro de Infravermelho do composto **26**.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	4.5613	<b>Comment</b>	C11	<b>Date</b>	18 May 2010 14:02:40
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (12)\D202A211\D202A211_001000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	400.21
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Points Count</b>	32768
<b>Temperature (degree C)</b>	27.000			<b>Sweep Width (Hz)</b>	7183.91

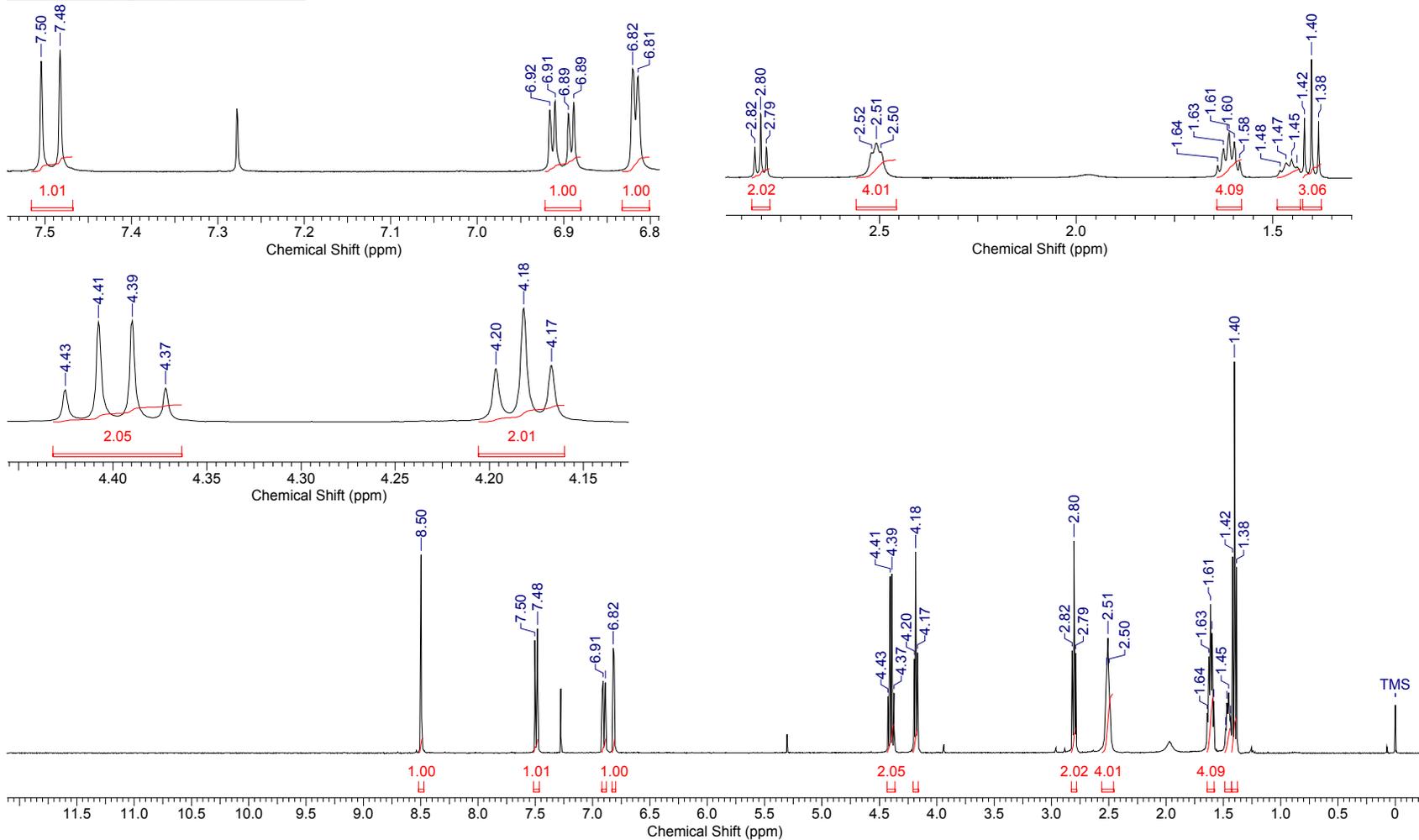


Figura 64. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 27.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	C11	<b>Date</b>	18 May 2010 13:56:16
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (12)\D202A211\D202A211_002000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	100.64
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	1024	<b>Original Points Count</b>	16384
<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30	<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Points Count</b>	65536
<b>Temperature (degree C)</b>	27.000			<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36

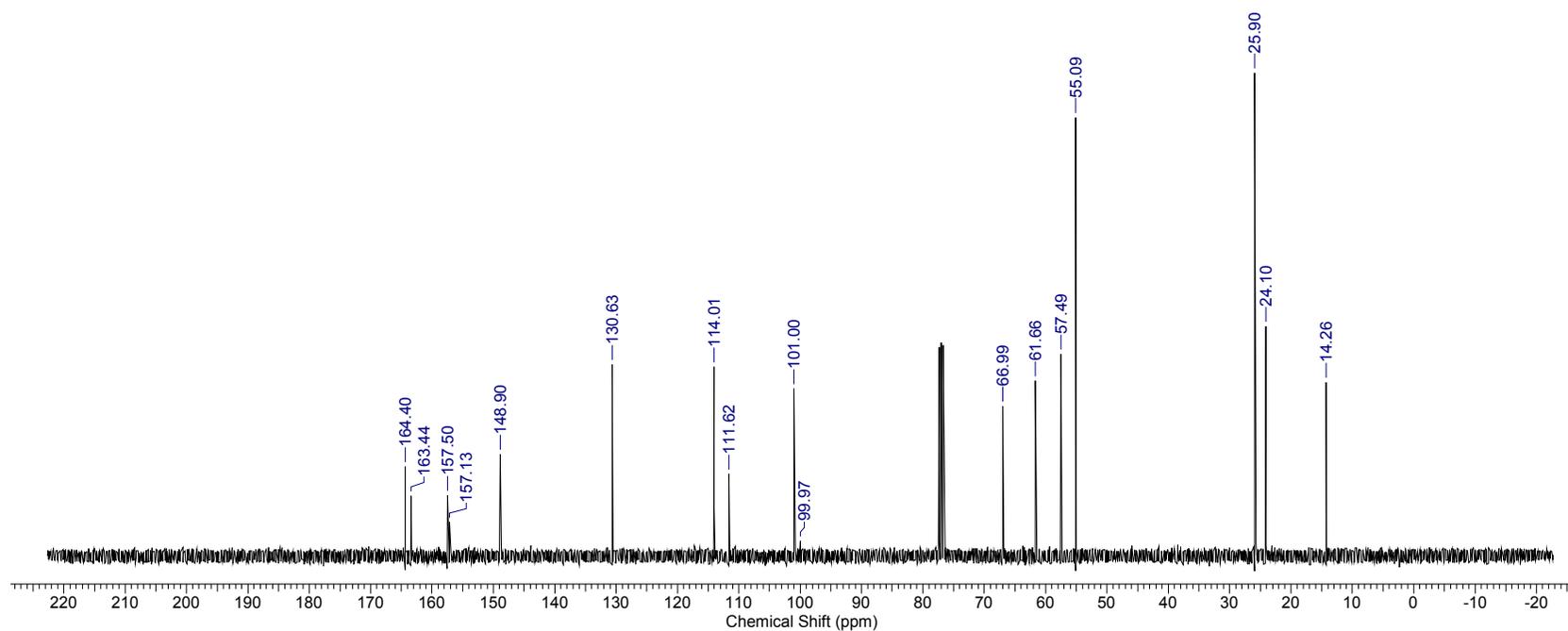
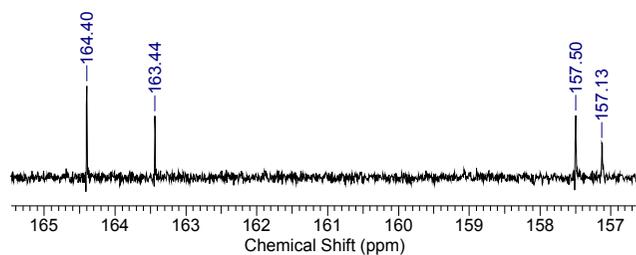


Figura 65. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 27.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	4.5613	<b>Comment</b>	C12	<b>Date</b>	18 May 2010 14:06:56
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (11)\D202A212\D202A212_001000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	400.21
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	7183.91
				<b>Points Count</b>	32768
				<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

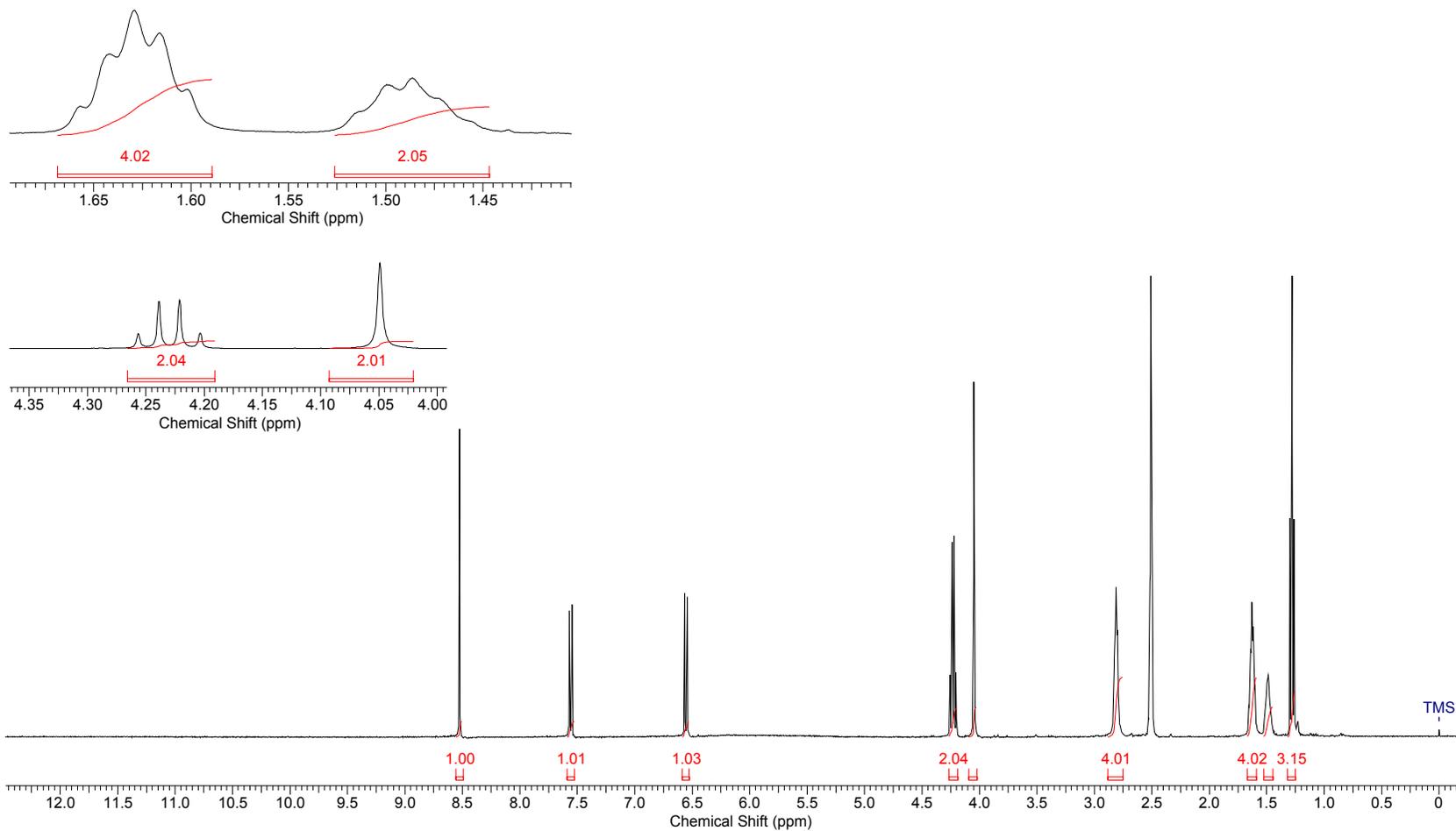
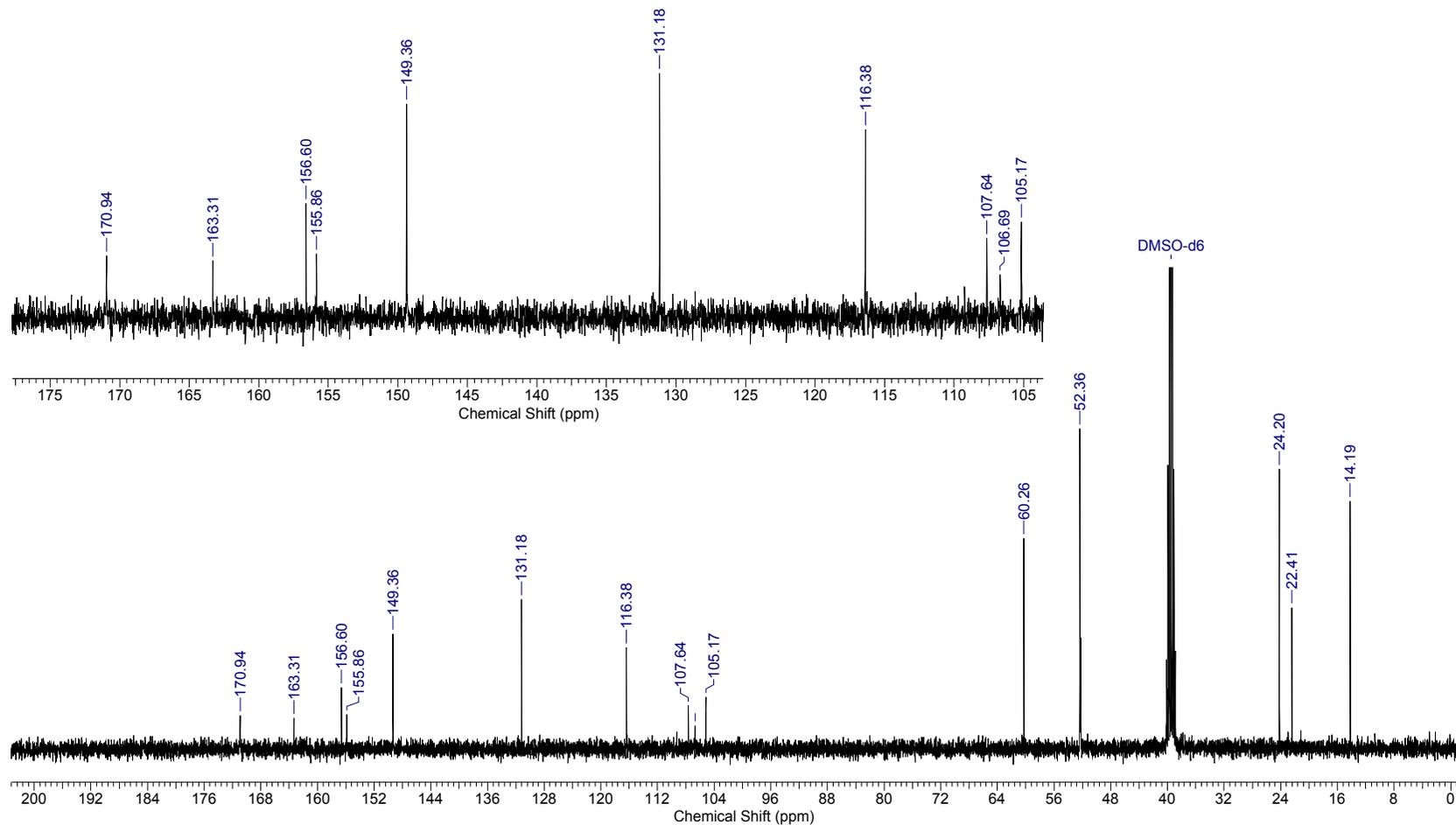


Figura 66. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 28.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	C12	<b>Date</b>	18 May 2010 14:21:52		
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\mestrado\Espectros - Cumarinas\Cumarina (11)\D202A212\D202A212_002000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	100.64		
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	1024	<b>Original Points Count</b>	16384	<b>Points Count</b>	16384
<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

Figura 67. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 28.

Acquisition Time (sec)	4.5613	Comment	Imported from UXNMR.		Date	00/00/1980 00:00:00		Frequency (MHz)	400.21		
Nucleus	1H	Number of Transients	8	Original Points Count	32768	Points Count	32768	Solvent	DMSO	Sweep Width (Hz)	7183.91
Temperature (grad C)	27.000										

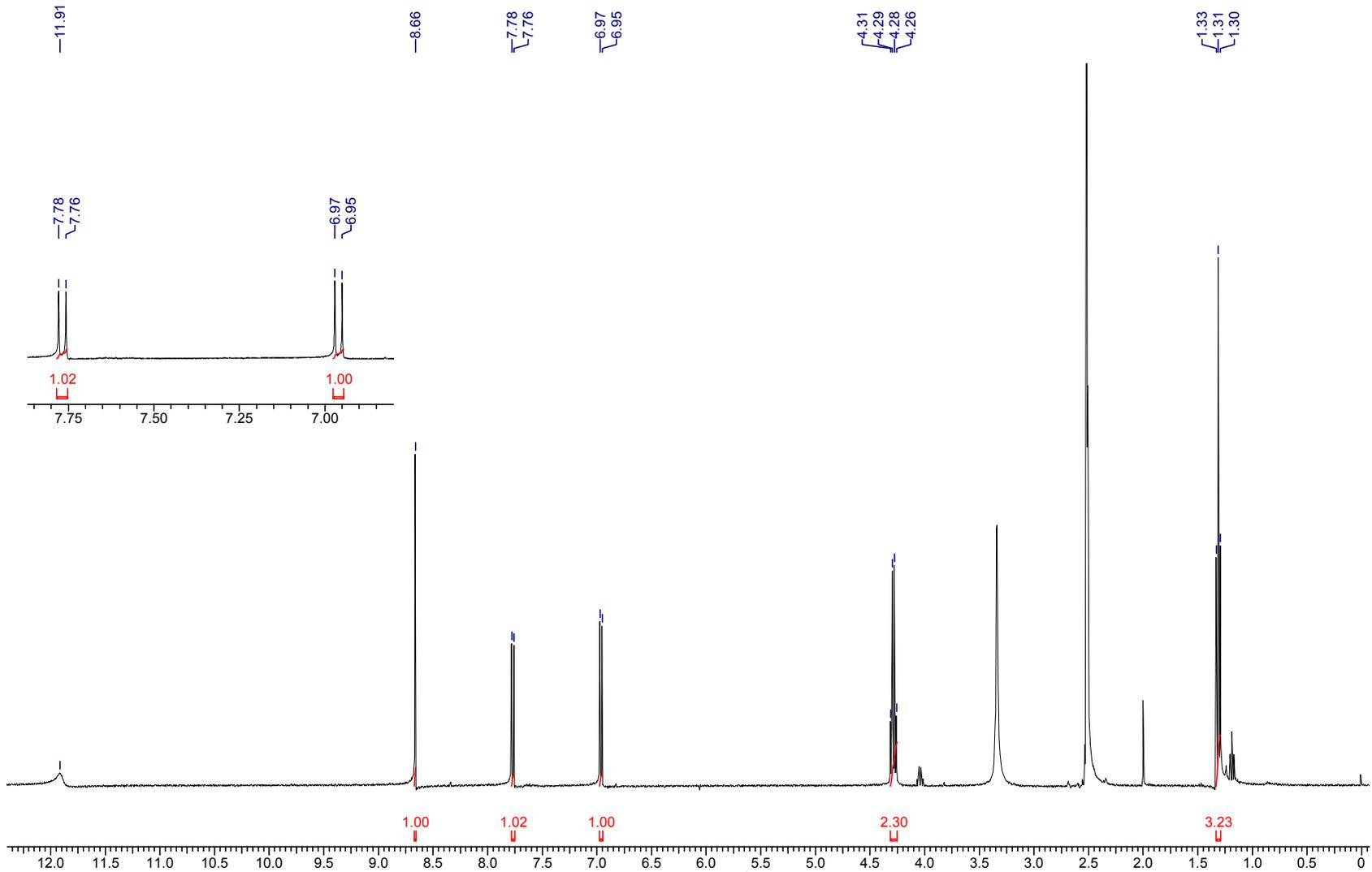
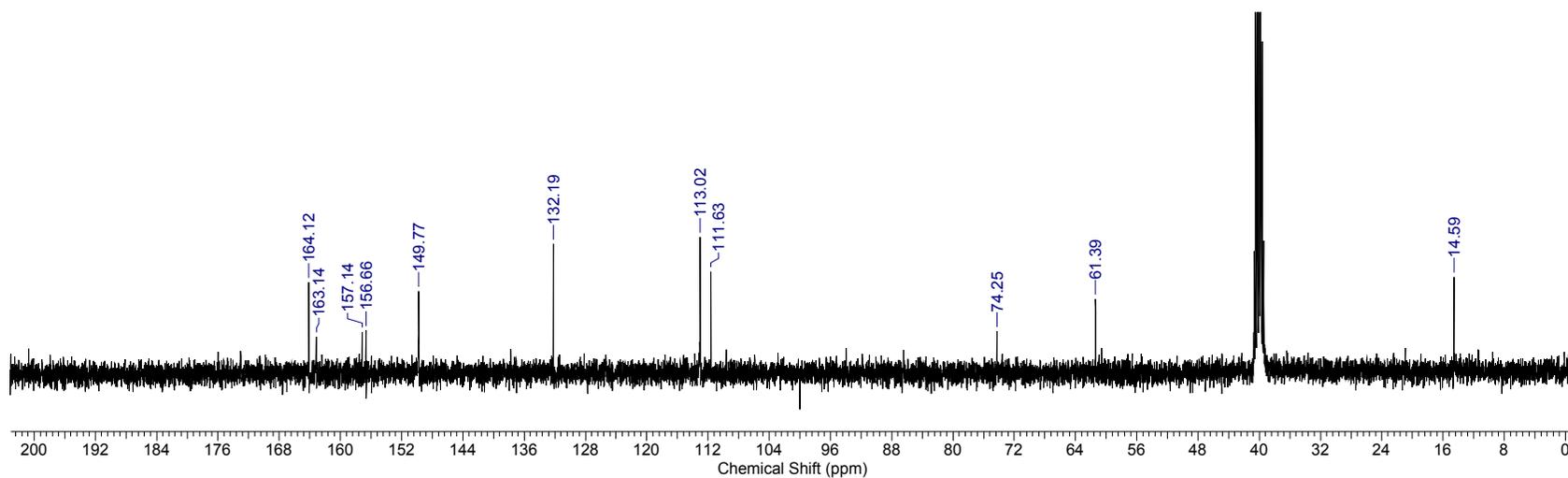
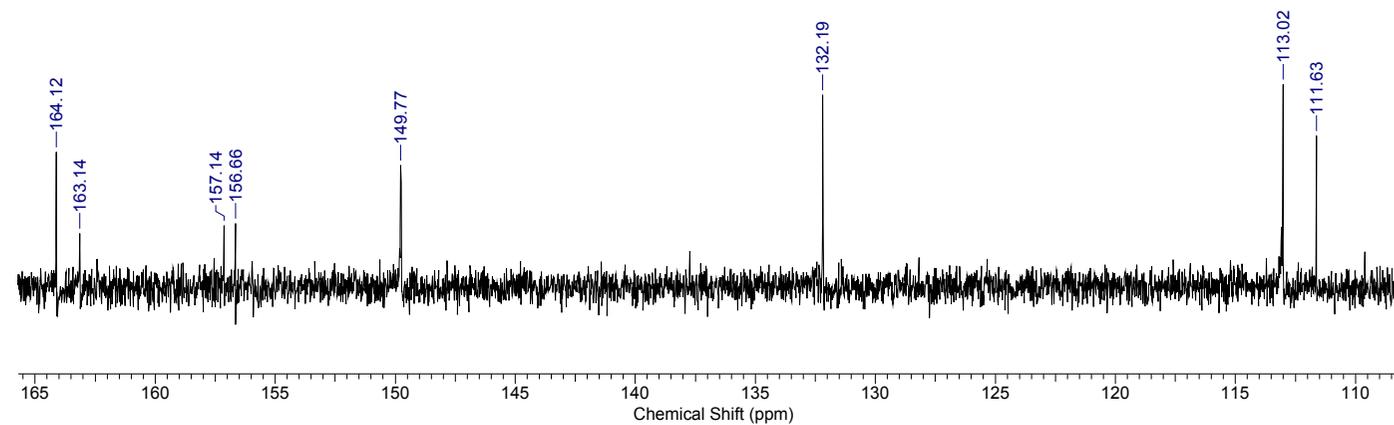


Figura 68. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 29.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	Imported from UXNMR.	<b>Date</b>	00/00/1980 00:00:00
<b>File Name</b>	C:\USERS\LUCAS\MESTRADO\ESPECTROS - CUMARINAS IODO CUMARINA\IC- IODOCUMARINA-400MHZ.ESP			<b>Frequency (MHz)</b>	100.64
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	3072	<b>Original Points Count</b>	16384
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

Figura 69. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **29**.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	5.0790	<b>Comment</b>	Imported from UXNMR.		<b>Date</b>	20 Feb 1994 12:11:44	
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Documents\mestrado\Espectros - Cumarinas\Csz1\Csz1\Csz1_001000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	200.13		
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	32	<b>Original Points Count</b>	16384	<b>Points Count</b>	16384
<b>Pulse Sequence</b>	zg	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	3225.81	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

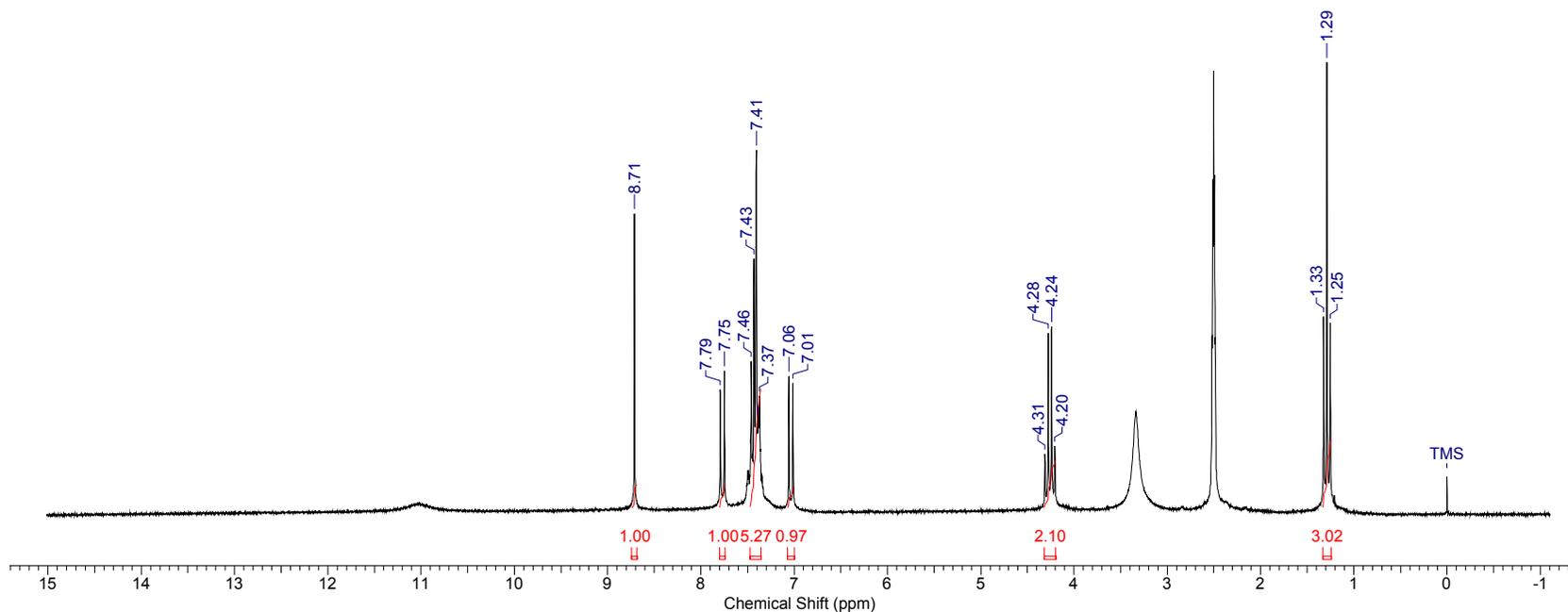


Figura 70. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **30**.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	C5Z1	<b>Date</b>	04 Sep 2009 11:05:36		
<b>File Name</b>	H:\Espectros - Cumarinas\Csz1\D362A5Z1\D362A5Z1_002000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	100.64	<b>Nucleus</b>	13C
<b>Number of Transients</b>	549	<b>Original Points Count</b>	16384	<b>Points Count</b>	16384	<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30
<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000				

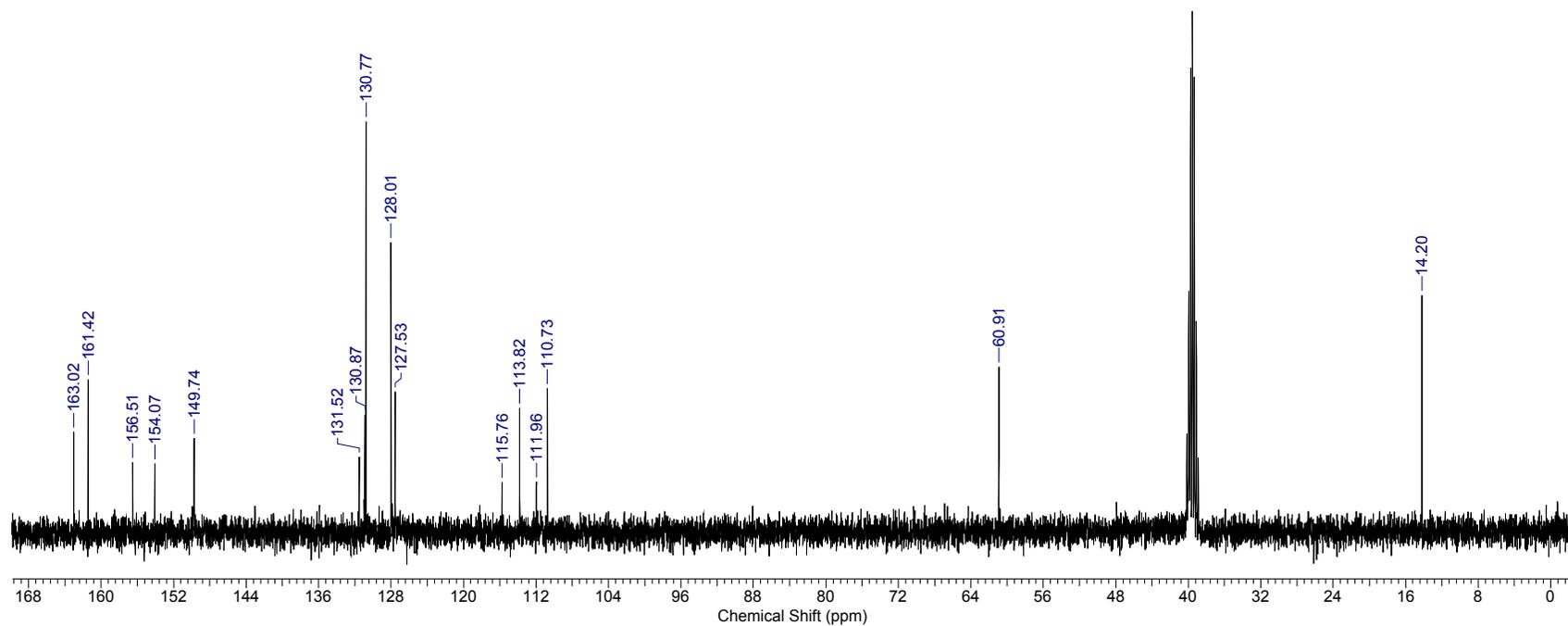


Figura 71. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto **30**.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	5.5443	<b>Comment</b>	C5Z2	<b>Date</b>	04 Sep 2009 17:31:44		
<b>File Name</b>	H:\Especros - Cumarinas\Csz2\D362A5Z2\D362A5Z2_001000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	400.21	<b>Nucleus</b>	1H
<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30
<b>Sweep Width (Hz)</b>	5910.17	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000				

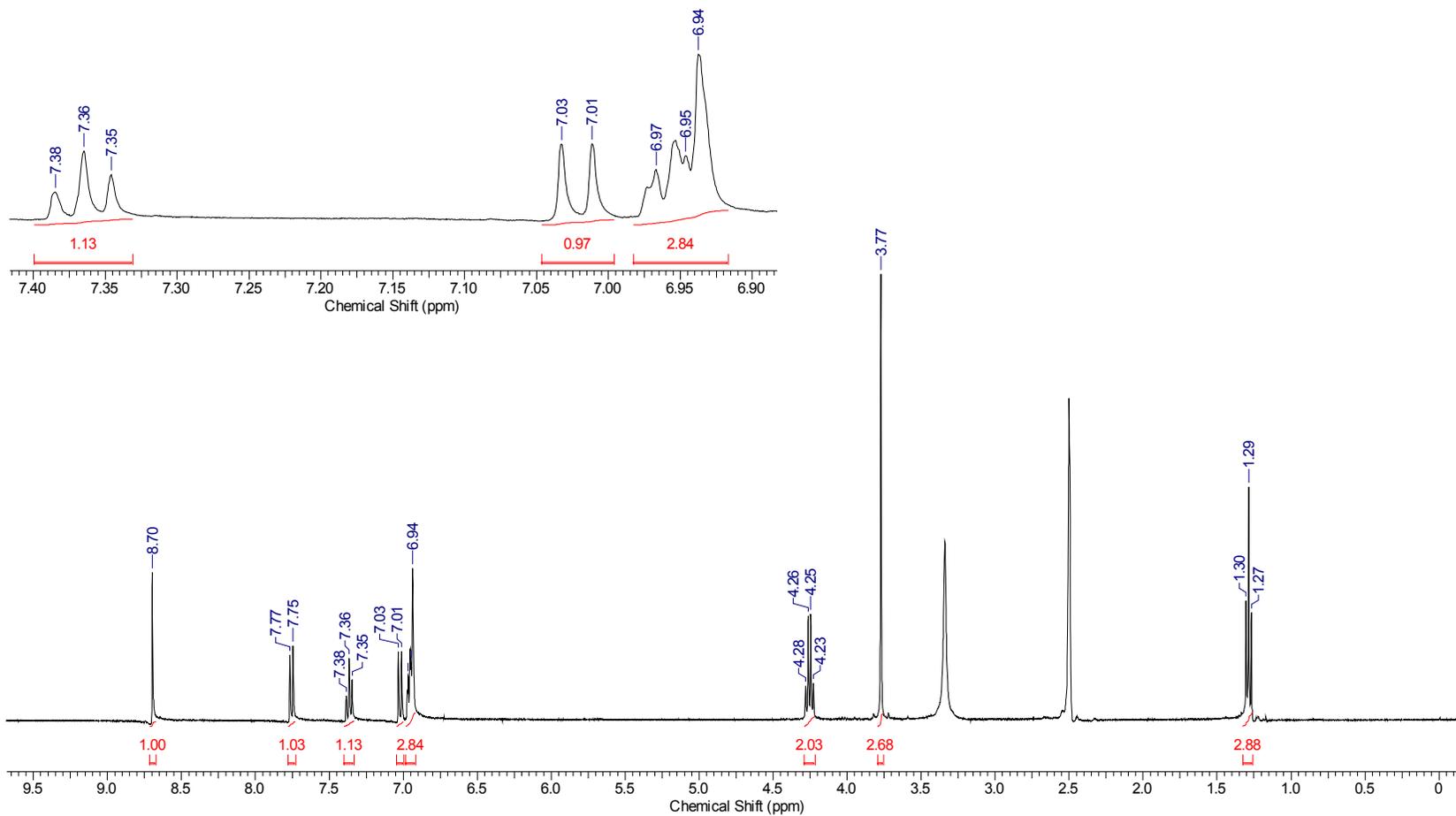


Figura 72. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 31.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	C5Z2	<b>Date</b>	04 Sep 2009 17:36:00		
<b>File Name</b>	H:\Espectros - Cumarinas\Csz2\D362A5Z2\D362A5Z2_002000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	100.64	<b>Nucleus</b>	13C
<b>Number of Transients</b>	1024	<b>Original Points Count</b>	16384	<b>Points Count</b>	16384	<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30
<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000				

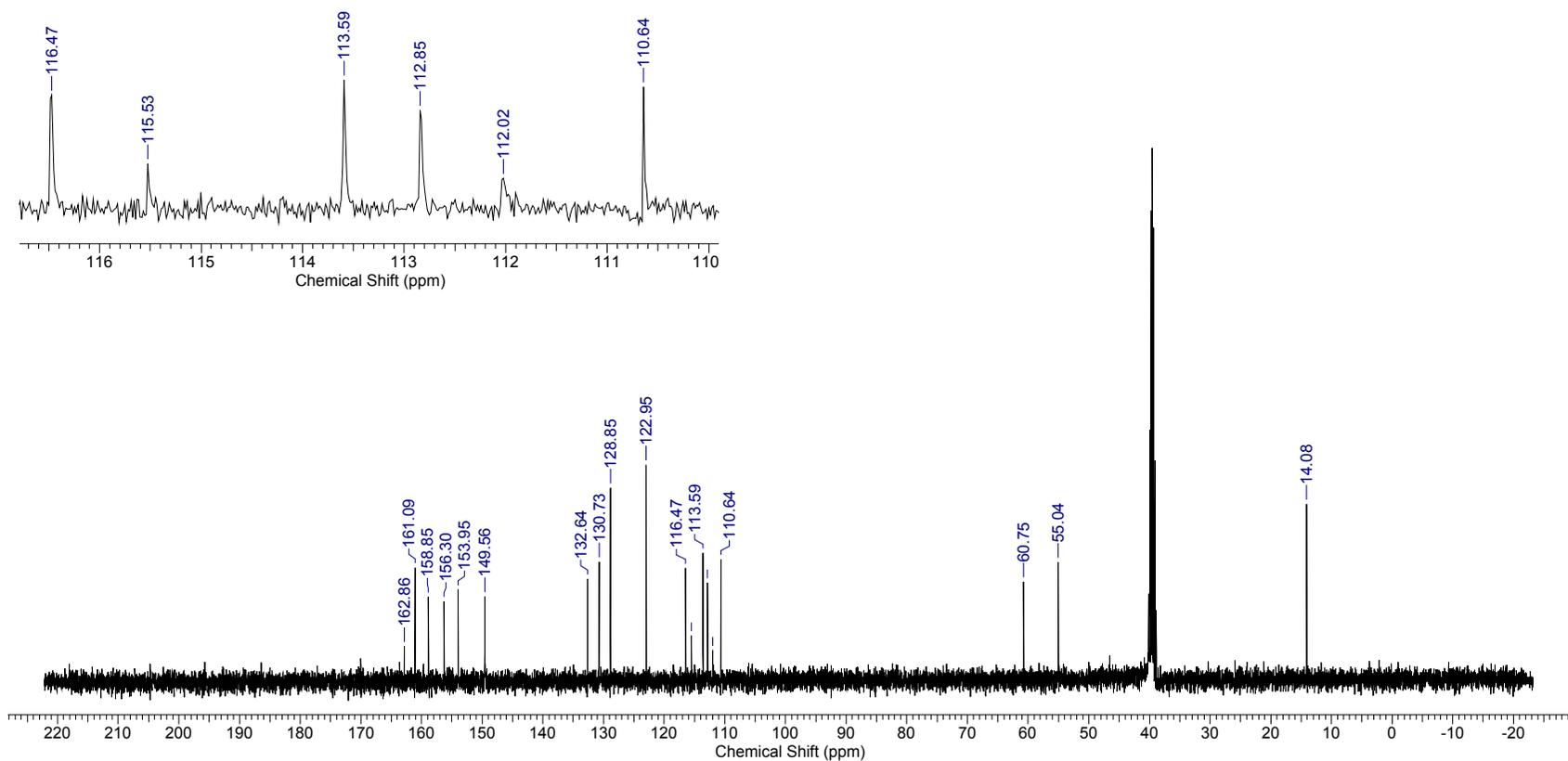


Figura 73. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 31.

Acquisition Time (sec)	4.0894	Comment	Z3	Date	15 Mar 2010 13:32:48	
File Name	H:\D112A2Z3\ID112A2Z3_001000fid		Frequency (MHz)	400.21	Nucleus	1H
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Solvent
Temperature (degree C)	27.000				DMSO-D6	Sweep Width (Hz)
						8012.82

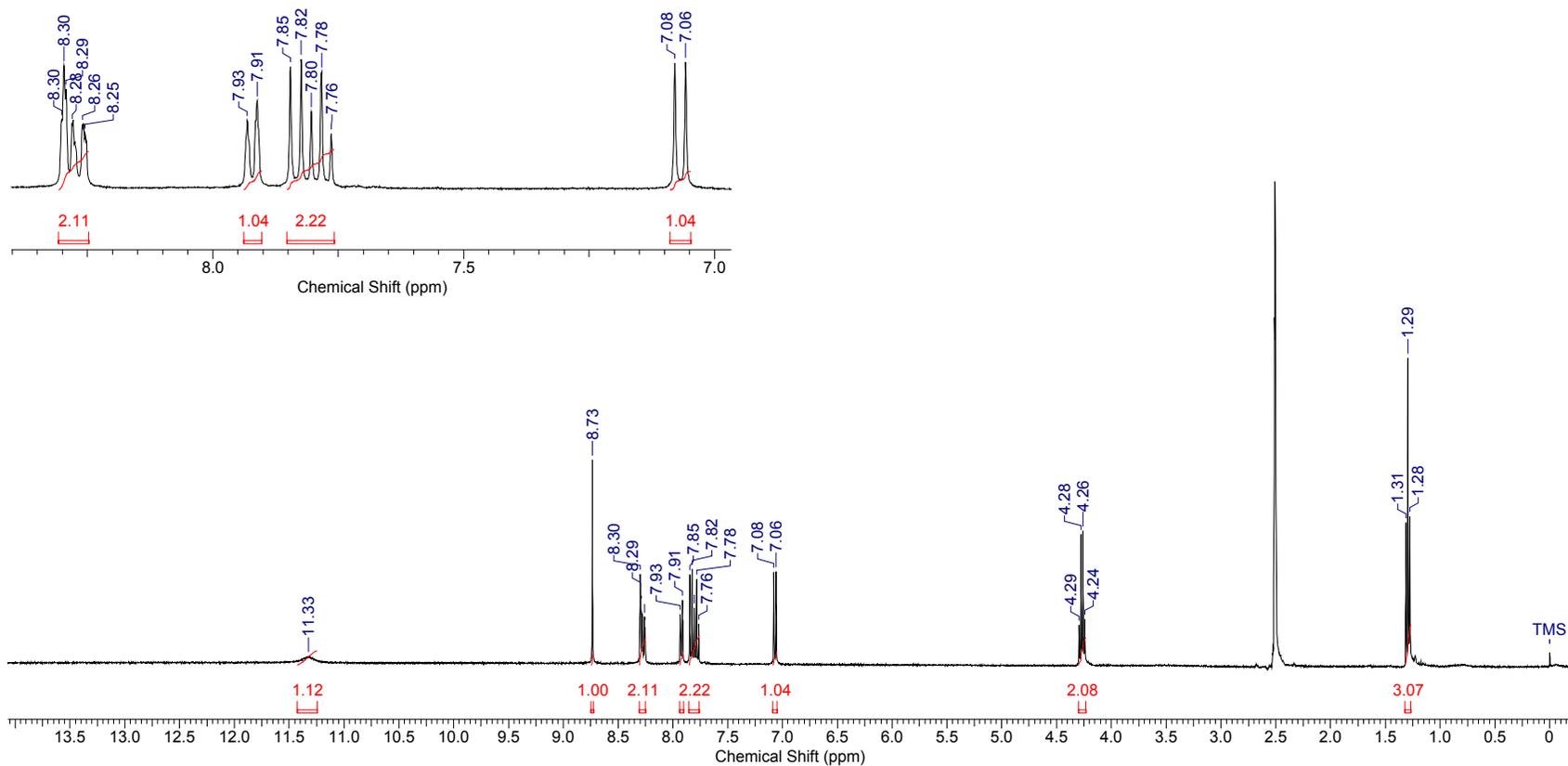


Figura 74. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 32.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6783	<b>Comment</b>	Z3	<b>Date</b>	15 Mar 2010 13:47:44				
<b>File Name</b>	H:\D112A2Z3\D112A2Z3_002000fid		<b>Frequency (MHz)</b>	100.64	<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	1024	
<b>Original Points Count</b>	16384	<b>Points Count</b>	16384	<b>Pulse Sequence</b>	zpgg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24154.59
<b>Temperature (degree C)</b>	27.000								

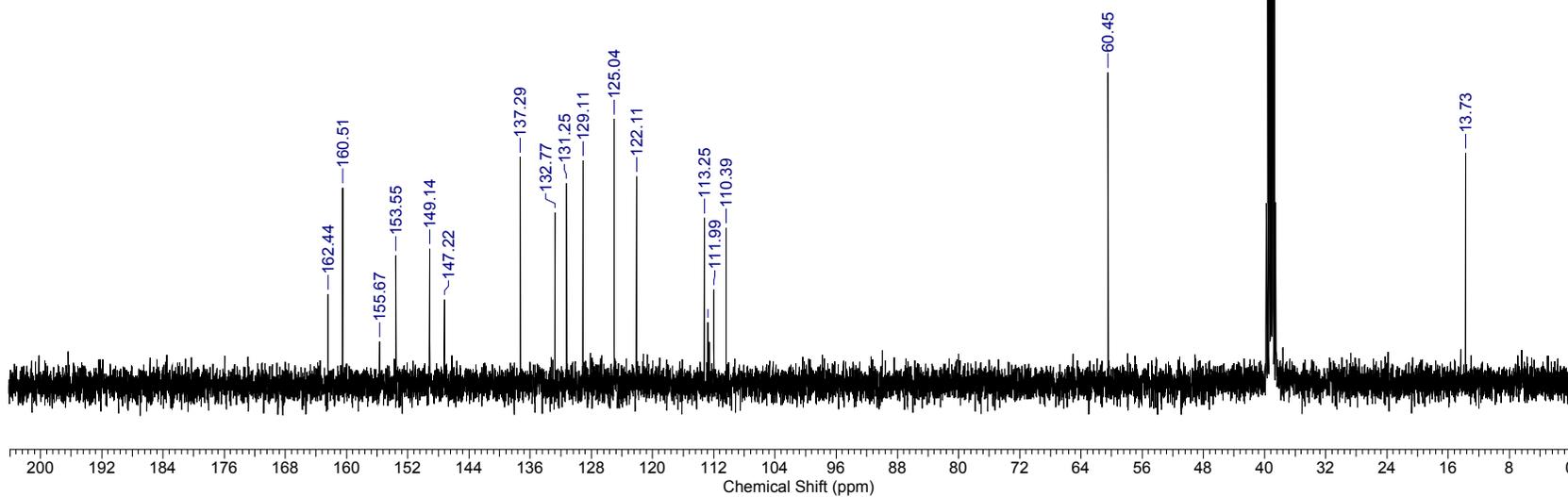
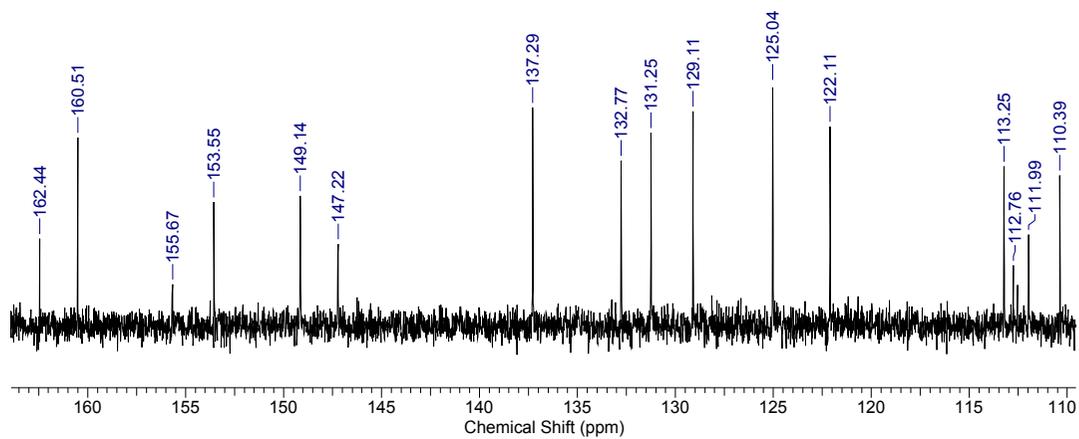


Figura 75. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **32**.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	4.5613	<b>Comment</b>	CZ4	<b>Date</b>	18 May 2010 14:38:56
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\Desktop\D202A2Z4\D202A2Z4_010000fid	<b>Frequency (MHz)</b>	400.21	<b>Nucleus</b>	<sup>1</sup> H
<b>Number of Transients</b>	8	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zgcprr
<b>Sweep Width (Hz)</b>	7183.91	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000	<b>Solvent</b>	DMSO-D6

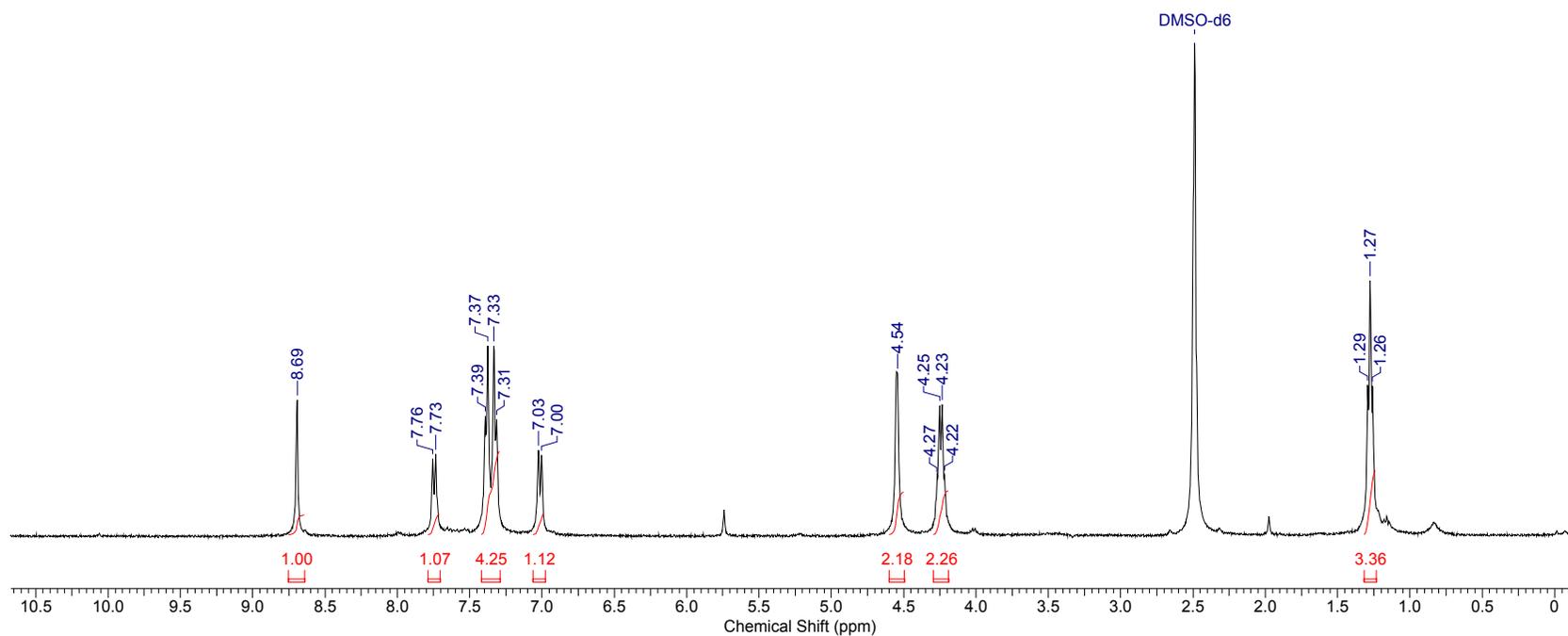
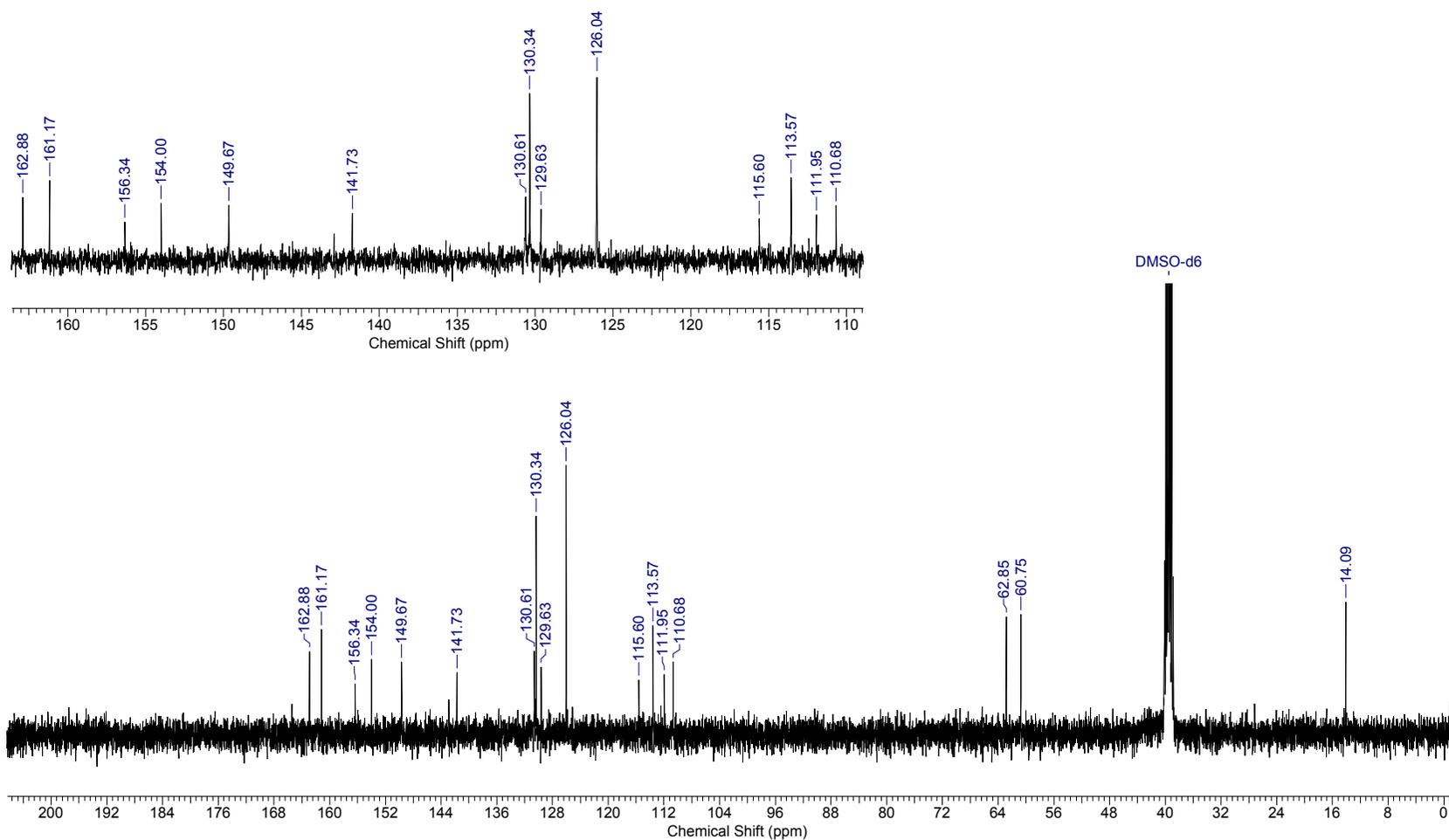


Figura 76 Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto **33**.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.6636	<b>Comment</b>	CZ4	<b>Date</b>	18 May 2010 14:53:52
<b>File Name</b>	C:\Users\Lucas\mestrado\Espectros - Cumarinas\Csz4\D202A2Z4\D202A2Z4_002000fid			<b>Frequency (MHz)</b>	100.64
<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	2048	<b>Original Points Count</b>	16384
<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	24691.36
				<b>Temperature (degree C)</b>	27.000

Figura 77. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 33.