



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
NÚCLEO DE QUÍMICA DE HETEROCICLOS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE 7-AMINO-  
ESPIRO[CROMENO[4,3-*b*]QUINOLINA-6,1'-CICLOALCANOS] E  
DERIVADOS**

TESE DE DOUTORADO

LETÍCIA BARROS DA SILVA

Santa Maria, RS

2017

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE 7-AMINO-  
ESPIRO[CROMENO[4,3-*b*]QUINOLINA-6,1'-CICLOALCANOS] E  
DERIVADOS**

*ELABORADA POR*

**LETÍCIA BARROS DA SILVA**

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do Grau de **Doutora em Química**  
ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-  
Graduação em Química da Universidade  
Federal de Santa Maria – RS.

Orientador: Prof. Dr. Helio Gauze Bonacorso

Santa Maria, RS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, APROVA a Tese de Doutorado

SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE 7-AMINO-  
ESPIRO[CROMENO[4,3-b]QUINOLINA-6,1'-CICLOALCANOS] E  
DERIVADOS

ELABORADA POR:  
LETÍCIA BARROS DA SILVA

Como requisito parcial para obtenção do Grau de DOUTORA em QUÍMICA.

COMISSÃO EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Hélio Guize Bonacorso – Orientador – UFSM

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Chitolina Schetinger – UFSM

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Nilo Zanatta – UFSM

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wilson João Curico Filho – UFPel

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Walmar Alípio Severo Filho – UNISC

Santa Maria, 2017

Dedico este trabalho a minha filha, Luísa, pelo constante apoio, amor e carinho.  
Obrigada! Te amarei por toda minha existência!

Ao meu pai, Délcio, e minha madraستا, Gianete, por todo suporte que me deram durante o meu doutorado. O apoio de vocês foi fundamental para o desenvolvimento dessa tese!

Ao Prof. Helio G. Bonacorso, pela orientação e pela oportunidade que me concedeu,  
meu sincero agradecimento.

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Ester, e aos meus irmãos, Filipe e Leandro, pela convivência e apoio.

Aos meus amigos, em especial ao tio José Pedro e a tia Núbia, que muitas vezes “madrugaram” para cuidar da minha filha e também a Prof.<sup>a</sup> Alice J. Kozakevicius e sua filha Olívia pelos inúmeros momentos de descontração e trocas de experiências.

Aos colegas do Lab. 2113 e 2114 pela colaboração na realização desse trabalho, em especial, ao Pablo A. Nogara pelo auxílio nos assuntos referentes a avaliação biológica e também pelos *docking* molecular, a minha ex-IC Sarah C. Feitosa pela colaboração nos trabalhos de laboratório e ao colega Alex Ketzer pela ajuda nos espectros.

Ao Prof. João B. T. Rocha e seus alunos, em especial ao Diones C. Bueno, pela acolhida em seu laboratório e pelo empenho na realização das avaliações biológicas.

A Prof.<sup>a</sup> Tânia Beatriz C. Pasa e sua aluna Fernanda Nunes pela realização das atividades antitumorais.

Ao Prof. Patrick T. Campos pela parceria no desenvolvimento do artigo sobre a investigação estrutural e supramolecular dos novos análogos estruturais da tacrina desenvolvidos nesse trabalho.

Aos colegas do RMN pelo desempenho no desenvolvimento dos espectros.

Aos demais professores e colegas dos outros laboratórios integrantes do Grupo NUQUIMHE, principalmente pelo empréstimo de solventes e reagentes.

Aos funcionários do NAPO pelo auxílio, em especial a Geovana Pinheiro, a Lisiane S. Soares e o Sérgio Brondani.

Aos funcionários do PPGQ e do Departamento de Química pela disponibilidade e ajuda quando necessário.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FATEC, pelo auxílio financeiro na compra de materiais e reagentes para a pesquisa e a concessão da bolsa de doutorado.

**ÍNDICE**

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xviii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>8</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>63</b>
<b>5. SUGESTÕES DE CONTINUIDADE DESSE TRABALHO.....</b>	<b>66</b>
<b>6. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>124</b>
<b>ANEXO IV.....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXO V.....</b>	<b>175</b>
<b>ANEXO VI.....</b>	<b>182</b>
<b>ANEXO VII.....</b>	<b>184</b>
<b>ANEXO VIII.....</b>	<b>190</b>
<b>ANEXO IX.....</b>	<b>195</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Condições reacionais testadas para otimização do solvente e catalisador.....	28
<b>Tabela 2.</b> Condições reacionais testadas para otimização do tempo reacional.....	28
<b>Tabela 3.</b> Otimização do meio reacional.....	29
<b>Tabela 4.</b> Propriedades físicas e rendimentos dos compostos <b>9a-g</b> .....	30
<b>Tabela 5.</b> Propriedades físicas e rendimentos dos compostos <b>10-12</b> .....	32
<b>Tabela 6.</b> Atividade inibitória dos compostos <b>9-12</b> sobre as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.....	44
<b>Tabela 7.</b> Comparação da distância (em Å) entre os carbonos inferiores do anel espiro e os hidrogênios polares dos resíduos Tyr130 e Gly118.....	45
<b>Tabela 8.</b> Efeito dos compostos <b>9a-g</b> na viabilidade de leucócitos humanos <i>in vitro</i> .....	47
<b>Tabela 9.</b> Condições reacionais testadas para síntese do composto <b>13a</b> .....	49
<b>Tabela 10.</b> Otimização de condições reacionais para a síntese de 7-(1 <i>H</i> -pirrol-1-il)espiro[cromeno [4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclopentano].....	50
<b>Tabela 11.</b> Propriedades físicas e rendimentos dos compostos <b>14-16</b> .....	51
<b>Tabela 12.</b> Citotoxicidade dos compostos <b>14-16</b> na linhagem tumoral (SF295) e não tumoral (HUVEC).....	59

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura da tacrina e da co-droga tacrina-silibinina.....	1
<b>Figura 2.</b> Estrutura dos derivados de 6 <i>H</i> -1-benzopirano[4,3- <i>b</i> ]quinolinas bioativos.....	3
<b>Figura 3.</b> Pirróis substituídos presentes na estrutura-base de alguns fármacos.....	4
<b>Figura 4.</b> Objetivo geral sintético resumido desta Tese.....	4
<b>Figura 5.</b> Espiro-heterociclos formados a partir de espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas.....	10
<b>Figura 6.</b> Estrutura de compostos azo-espiro e de espiro-heterociclos derivados de benzopiranos.....	12
<b>Figura 7.</b> Estrutura química de derivados de Cromeno-quinolinas.....	14
<b>Figura 8.</b> Estrutura química da tacrina e da (2 <i>R</i> )-9-amino-2-metil-2,3-diidro-1 <i>H</i> -ciclopenta[ <i>b</i> ]quinolina.....	15
<b>Figura 9.</b> Sítios ativos da enzima acetilcolinesterase.....	15
<b>Figura 10.</b> Estrutura do dímero e heterodímeros híbridos da tacrina.....	17
<b>Figura 11.</b> Estrutura do núcleo quinolínic.....	18
<b>Figura 12.</b> Estrutura química do pirrol.....	22
<b>Figura 13.</b> Espectro de Massas (GC-EI) de 2'-metil-espiro[croman-2,1'-ciclohexan]-4-onas ( <b>2d</b> ).....	26
<b>Figura 14.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400,13 MHz, 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] ( <b>9d</b> ), em CDCl <sub>3</sub> .....	34
<b>Figura 15.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100,61 MHz, 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] ( <b>9d</b> ), em CDCl <sub>3</sub> .....	34
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN bidimensional HMQC a 600 MHz de 7-amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] ( <b>9d</b> ), em CDCl <sub>3</sub> com ampliação na região dos carbonos aromáticos.....	35
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN bidimensional HMBC a 600 MHz de 7-amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] ( <b>9d</b> ), em CDCl <sub>3</sub> com ampliação na região dos carbonos aromáticos.....	36
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN bidimensional COSY a 400 MHz de 7-amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] ( <b>9d</b> ), em CDCl <sub>3</sub> com ampliação na região dos carbonos aromáticos.....	37
<b>Figura 19.</b> Espectro no Infravermelho de 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] ( <b>9d</b> ).....	38

<b>Figura 20.</b> ORTEP de 7-Amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] ( <b>9f</b> ) (CCDC995079).....	39
<b>Figura 21.</b> Representação das possíveis estruturas dos isômeros do composto 7-Amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] ( <b>9f</b> ).....	40
<b>Figura 22.</b> Sobreposição dos compostos <b>9a</b> , <b>9b</b> e <b>9c</b> . As esferas verdes são os centróides de cada anel espiro e as linhas verdes suas respectivamente distâncias. Os valores das distâncias podem ser vistos na <b>Tabela 7</b> .....	45
<b>Figura 23.</b> Resultado do <i>docking</i> para o composto <b>9a</b> (em amarelo) que interage nas mesmas regiões da enzima AChE que a tacrina.....	45
<b>Figura 24.</b> Estrutura química dos compostos 7-amino-6 <i>H</i> -cromano[4,3- <i>b</i> ]quinolina e <b>9a</b> .....	46
<b>Figura 25.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz de 7-(1 <i>H</i> -pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3- <i>b</i> ] quinolina-6,1'-ciclohexano] ( <b>14b</b> ), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	53
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-(1 <i>H</i> -pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3- <i>b</i> ] quinolina-6,1'-ciclohexano] ( <b>14b</b> ), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	53
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN bidimensional HMQC a 400 MHz de 7-(1 <i>H</i> -pirrol-1-il)espiro[cromeno [4,3- <i>b</i> ] quinolina-6,1'-ciclohexano] ( <b>14b</b> ), em CDCl <sub>3</sub> com ampliação na região dos carbonos aromáticos.....	54
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN bidimensional HMBC a 400 MHz de 7-(1 <i>H</i> -pirrol-1-il)espiro[cromeno [4,3- <i>b</i> ] quinolina-6,1'-ciclohexano] ( <b>14b</b> ), em CDCl <sub>3</sub> com ampliação na região dos carbonos aromáticos.....	55
<b>Figura 29.</b> ORTEP de 7-(1 <i>H</i> -pirrol-1-il)-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-cicloheptano] ( <b>14c</b> ) (CCDC 1487058).....	56
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz de 7-Amino-9-feniletinil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclopentano] ( <b>17b</b> ), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	61
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-9-feniletinil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclopentano] ( <b>17b</b> ), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	61
<b>Figura 32.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz de 7-Amino-9-morfolino-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclopentano] ( <b>18b</b> ), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	62
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-9-morfolino-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclopentano] ( <b>18b</b> ), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	62
<b>Figura 34.</b> Espectro de Massas (GC-EI) de espiro[croman-2,1'-ciclopentan]-4-ona ( <b>4a</b> ).....	92
<b>Figura 35.</b> Espectro de Massas (GC-EI) de espiro[croman-2,1'-ciclohexan]-4-ona ( <b>4b</b> ).....	93

<b>Figura 36.</b> Espectro de Massas (GC-EI) de espiro[croman-2,1'-cicloheptan]-4-ona (4c).....	94
<b>Figura 37.</b> Espectro de Massas (GC-EI) de 2'-metil-espiro[croman-2,1'-ciclohexan]-4-ona (4d).....	95
<b>Figura 38.</b> Espectro de Massas (GC-EI) de 3'-metil-espiro[croman-2,1'-ciclohexan]-4-ona (4e).....	96
<b>Figura 39.</b> Espectro de Massas (GC-EI) de 4'-metil-espiro[croman-2,1'-ciclohexan]-4-ona (4f).....	97
<b>Figura 40.</b> Espectro de Massas (GC-EI) de 4'-(tert-butil)-espiro[croman-2,1'-ciclohexan]-4-ona (4g).....	98
<b>Figura 41.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz e <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] (9a), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	100
<b>Figura 42.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz e <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] (9b), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	101
<b>Figura 43.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz e <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-cicloheptano] (9c), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	102
<b>Figura 44.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz e <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] (9d), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	103
<b>Figura 45.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz e <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-3'-metil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] (9e), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	104
<b>Figura 46.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz e <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] (9f), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	105
<b>Figura 47.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz e <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-4'- <i>t</i> -butil-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] (9g), registrados em CDCl <sub>3</sub> .....	106
<b>Figura 48.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz e <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-9-cloro-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] (10a), registrados em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	107
<b>Figura 49.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz e <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-9-cloro-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-ciclohexano] (10b), registrados em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	108
<b>Figura 50.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H a 400 MHz e <sup>13</sup> C { <sup>1</sup> H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-9-cloro-espiro[cromeno[4,3- <i>b</i> ]quinolina-6,1'-cicloheptano] (10c), registrados em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	109

- Figura 51.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-10-cloro-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (**11a**), registrados em  $\text{DMSO-}d_6$ .....110
- Figura 52.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-10-cloro-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**11b**), registrados em  $\text{DMSO-}d_6$ .....111
- Figura 53.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-10-cloro-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloheptano] (**11c**), registrados em  $\text{DMSO-}d_6$ .....112
- Figura 54.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-9-bromo-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**12b**), registrados em  $\text{DMSO-}d_6$ .....113
- Figura 55.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclopentano] (**14a**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....114
- Figura 56.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclohexano] (**14b**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....115
- Figura 57.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-cicloheptano] (**14c**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....116
- Figura 58.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-(1*H*-pirrol-1-il)-4'-metil-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclohexano] (**14f**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....117
- Figura 59.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 9-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclopentano] (**15a**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....118
- Figura 60.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 9-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclohexano] (**15b**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....119
- Figura 61.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 9-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-cicloheptano] (**15c**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....120
- Figura 62.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 10-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclopentano] (**16a**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....121

- Figura 63.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 10-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclohexano] (**16b**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....122
- Figura 64.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 10-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-cicloheptano] (**16c**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....123
- Figura 65.** Espectro de HMQC a 600 MHz de 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....125
- Figura 66.** Espectro de HMBC a 600 MHz de 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....126
- Figura 67.** Espectro de HMQC a 600 MHz de 7-Amino-3'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9e**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....127
- Figura 68.** Espectro de HMBC a 600 MHz de 7-Amino-3'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9e**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....128
- Figura 69.** Espectro de HMQC a 600 MHz de 7-Amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9f**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....129
- Figura 70.** Espectro de HMBC a 600 MHz de 7-Amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9f**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .....130
- Figura 71.** ORTEP de 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (**9a**) (CCDC 994958).....132
- Figura 72.** ORTEP de 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9b**) (CCDC 1500741).....134
- Figura 73.** ORTEP de 7-Amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9f**) (CCDC995079).....136
- Figura 74.** ORTEP de 7-Amino-9-cloro-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (**10a**) (CCDC 997278).....138
- Figura 75.** ORTEP de 7-Amino-9-bromo-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**11b**) (CCDC 995080).....140
- Figura 76.** ORTEP de 7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloheptano] (**14c**) (CCDC 1487058).....142

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

$\delta$  = Deslocamento químico

AL = Ácido de Lewis

ACh = Acetilcolina

AChE = enzima acetilcolinesterase

ATCC = American Type Culture Collection

BChE = enzima butirilcolinesterase

calc. = Calculado

CC<sub>50</sub> = Concentração citotóxica para 50% das células

CCD = Cromatografia em Camada Delgada

CIM = Concentração Inibitória Mínima

Col. = Colaboradores

Comp. = composto

DA = Doença de Alzheimer

DMF = Dimetilformamida

EI = Impacto de elétrons

Et = Etila

d = Duplete

dd = Duplo duplete

ddd = Duplo duplo duplete

DMSO-*d*<sub>6</sub> = Dimetil sulfóxido deuterado

exp. = Experimental

eq. = Equivalentes

FDA = *Food and Drug Administration*

g = Gramas

h = Horas

Hz = Hertz

IC<sub>50</sub> = Concentração do inibidor que inibe 50% da enzima

IV = Infravermelho

m = Multipleto

Me = Metila

min = Minutos

NAPO = Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas

NUQUIMHE = Núcleo de Química de Heterociclos

P.f. = Ponto de fusão

Ph = Fenila

ppm = parte por milhão

*p*-TSA = Ácido *p*-toluenossulfônico

*p*-TSOH = Ácido *p*-toluenossulfônico

q = Quarteto

Rend. = Rendimento

RMN de  $^1\text{H}$  = Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de  $^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } = Ressonância magnética nuclear de carbonos

s = Simpleto

t = Tripleto

td = Triplo duplete

t.a. = Temperatura ambiente

*t*-Bu = *terc*-butila

TMS = Tetrametil silano



**RESUMO****SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE 7-AMINO-  
ESPIRO[CROMENO[4,3-*b*]QUINOLINA-6,1'-CICLOALCANOS] E  
DERIVADOS**

Autora: Letícia Barros da Silva

Orientador: Prof. Dr. Helio Gauze Bonacorso

A presente tese descreve a síntese e avaliação farmacológica de novos análogos estruturais da tacrina, assim como as reações de *N*-derivatização e de acoplamento C-C e C-N desses compostos. Assim, uma série de 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos], onde [cicloalcanos = ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, 2-metil-, 3-metil-, 4-metil-, e 4-*t*-butil-ciclohexano] foi sintetizada com rendimentos de 30 – 65 % através de uma reação de ciclocondensação entre 2-amino-benzonitrilas e sete exemplos de espiro[cromano-2,1'-cicloalcan]-4-onas, utilizando AlCl<sub>3</sub> como catalisador, na ausência de solvente e sob aquecimento térmico convencional. Posteriormente, visando o estudo da influência dos substituintes cloro e bromo na atividade biológica desse sistema, além da possibilidade de inserção de novos grupos a partir de um composto bromo substituído em reações de acoplamento, estendeu-se essa metodologia para a obtenção dos 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] halo substituídos. Subsequentemente, essas espirocromeno-quinolinas (tacrinás híbridas) foram avaliadas quanto a atividade de AChE e BChE *in vitro* e foram realizados estudos complementares de *docking* molecular. Ambos os resultados para esses novos análogos da tacrina foram correlacionados com as características estruturais desses compostos. Ainda, essas espirocromeno-quinolinas foram submetidos a testes de citotoxicidade em células saudáveis de leucócitos humanos. Em sequência, foram realizadas inicialmente reações de *N*-derivatização em 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos], possibilitando a inserção do heterociclo pirrol via reação de Clauson-Kass, com rendimentos de 52 – 78 %. Esses novos compostos foram avaliados quanto a atividade antitumoral e antimicrobiana. Por fim, reações de acoplamento C-C e C-N tipo Sonogashira, Suzuki-Miyaura e Buchwald-Hartwig para o exemplar 7-amino-9-bromo-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] conduziram a produtos de futuro interesse sob o ponto de vista sintético e biológico.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA  
SANTA MARIA, FEVEREIRO DE 2017**

**ABSTRACT****SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF 7-AMINO-SPIRO[CHROMENO[4,3-*b*]QUINOLIN-6,1'-CYCLOALKANES] AND DERIVATIVES**

Author: Letícia Barros da Silva

Advisor: Prof. Dr. Helio Gauze Bonacorso

The present thesis describes the synthesis and pharmacological evaluation of new tacrine structural analogues, as well as *N*-derivation reactions and C-C and C-N coupling on these compounds. By this way, a series of 7-amino-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinolone-6,1'-cycloalkanes], where [cycloalkanes = cyclopentane, cyclohexane, cycloheptane, 2-methyl-, 3-methyl-, 4-methyl-, and 4-*t*-butyl-cyclohexane] were synthesized with yields of 30 – 65 % through a cyclocondensation between 2-amino-benzonitriles and seven examples of spiro[chromano-2,1'-cycloalkan]-4-ones, using AlCl<sub>3</sub> as catalyst, in a solventless conventional thermal heating. Later, aiming at the study of the influence of chlorine and bromine as substituents in the biologic activity of these systems, and the possibility of insertion of new groups using one bromine substituted compound in coupling reactions, this methodology was extended to obtain halo substituted 7-amino-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinolone-6,1'-cycloalkanes]. Subsequently, these spirochromeno-quinolines (tacrine hybrids) were evaluated for their AChE and BChE *in vitro* activities as well as complementary molecular docking studies. Both results for these new tacrine analogues were correlated with their structural characteristics for these compounds. The spirochromeno-quinolines were also evaluated for their cytotoxicity using healthy human leukocytes. In the sequence, *N*-derivation reactions in 7-amino-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinolone-6,1'-cycloalkanes] were made, allowing the insertion of a pyrrole heterocycles by Clauson-Kass reaction, with yields of 52-78 %. These new compounds were evaluated for their antitumor and antimicrobial activities. Lastly, the C-C and C-N coupling reactions employing sonogashira, Suzuki-Myaura and Buchwald-Hartwig techniques for the 7-amino-9-bromo-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinolone-6,1'-cyclohexane] furnished products of future interest in a synthetic and biologic points of view.

**FEDERAL UNIVERSITY OF SANTA MARIA  
POST-GRADUATE COURSE IN CHEMISTRY  
DOCTORAL THESIS IN CHEMISTRY  
SANTA MARIA, FEBRUARY, 2017**

## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

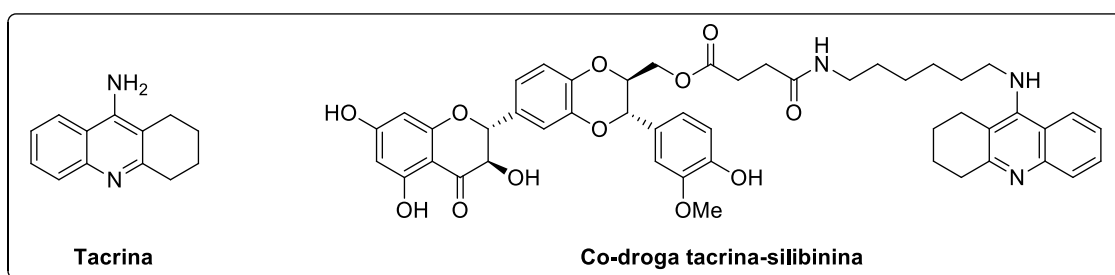
---

## 1. INTRODUÇÃO

A 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina ou tacrina (**Figura 1**) é um fármaco reconhecido pelo seu elevado potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), sendo indicada para o tratamento da doença de Alzheimer (DA).<sup>1</sup> Nos EUA, a tacrina foi o primeiro fármaco aprovado pela agência *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento dessa doença, entretanto o uso contínuo dessa droga é limitado devido aos seus efeitos colaterais, tais como distúrbios gastrointestinais e hepatotoxicidade.<sup>1</sup>

Testes clínicos com a tacrina demonstraram que 8 dos 41 pacientes tratados com esse fármaco apresentaram danos no fígado, porém das drogas avaliadas contra a doença de Alzheimer a tacrina mostrou ser uma das mais eficientes na inibição da enzima acetilcolinesterase, além de apresentar outras atividades farmacológicas como: bloqueio do canal de potássio, inibição do processo de recaptação de monoamina neuronal e inibição da monoamina oxidase.<sup>2,3</sup>

Assim, vários híbridos da tacrina e derivados têm sido sintetizados com o objetivo de aumentar a eficiência desse fármaco e diminuir seus efeitos colaterais. Por exemplo, em 2012, Chen e col. sintetizaram a co-droga tacrina-silibinina (**Figura 1**) que não apresentou hepatotoxicidade em testes *in vivo* e *in vitro* e apresentou maior eficácia na inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (BChE) que a tacrina.<sup>4</sup>



**Figura 1.** Estrutura da tacrina e da co-droga tacrina-silibinina.

<sup>1</sup> Romero A.; Cacabelos, R.; Oset-Gasque, J. M.; Samadi, A.; Marco-Contelles, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1916.

<sup>2</sup> Pisoni, S. D.; Costa, S. J.; Gamba, D.; Petzhold, L. C.; Borges, A. C. A.; Ceschi, A. M.; Lunardi, P.; Gonçalves, S. A. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 526.

<sup>3</sup> Shutske, G. M.; Pierrat, F. A.; Kapples, K. J.; Cornfeldt, M. L.; Szewczak, M. R.; Huger, F. P.; Bores, G. M.; Haroutunian, V.; Davis, K. L. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1805

<sup>4</sup> Chen, X.; Zenger, K.; Lupp, A.; Kling, B.; Heilmann, J.; Fleck, C.; Kraus, B.; Decker, M. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5231.

A doença de Alzheimer é um dos maiores problemas de demência que se tem conhecimento.<sup>1</sup> A DA é uma afecção neurodegenerativa, progressiva e irreversível que afeta 35 milhões de pessoas no mundo e estima-se que esse número irá triplicar até 2050, caso não se desenvolvam tratamentos eficazes para essa doença.<sup>5</sup>

Estudos recentes demonstram que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na iniciação da DA, tornando-se assim um importante alvo para o tratamento dessa doença.<sup>5</sup> Neste contexto, vários antioxidantes foram testados em ensaios clínicos, porém existe a necessidade do desenvolvimento de um medicamento multifuncional que além de inibir a AChE tenha também uma ação antioxidante.<sup>5</sup> Deste modo, a associação de blocos construtores com função antioxidante em moléculas com potencial de inibição da AChE seria uma importante estratégia para o tratamento da DA.

Por outro lado, espiro-heterociclos pertencem a uma importante classe de compostos naturais e sintéticos que possuem propriedades únicas como a espiroconjugação, efeito anomérico e quiralidade axial, por isso são importantes blocos construtores de diversos compostos de relevância biológica e farmacêutica.<sup>6</sup> Além disso, apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas, como atividade antitumoral, antibiótica, anti-inflamatória, anti-diabetes e antidepressiva.<sup>7</sup> Assim, a incidência de espiro-heterociclos na literatura vem crescendo exponencialmente ao longo da última década.<sup>8</sup>

Tendo em vista a importância do desenvolvimento de drogas multifuncionais, é descrito na literatura que heterociclos derivados de 6*H*-1-benzopirano[4,3-*b*]quinolinas apresentam uma grande variedade de atividades biológicas (**Figura 2**). Mulakayala e col. sintetizaram 6*H*-1-benzopirano[4,3-*b*]quinolin-6-onas como potenciais agentes anti-câncer.<sup>9</sup> Esses compostos foram avaliados *in vitro* contra quatro linhas celulares de câncer e foram considerados ativos.<sup>9</sup> Também, 6*H*-1-benzopirano[4,3-*b*]quinolonas são reportadas na literatura como agentes estrogênicos.<sup>10</sup>

---

<sup>1</sup> Romero A.; Cacabelos, R.; Oset-Gasque, J. M.; Samadi, A.; Marco-Contelles, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1916.

<sup>5</sup> Thiratmatrakul, S.; Yenjai, C.; Waiwut, P.; Vajragupta, O.; Reubroycharoen, P.; Tohda, M.; Boonyarat, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 21

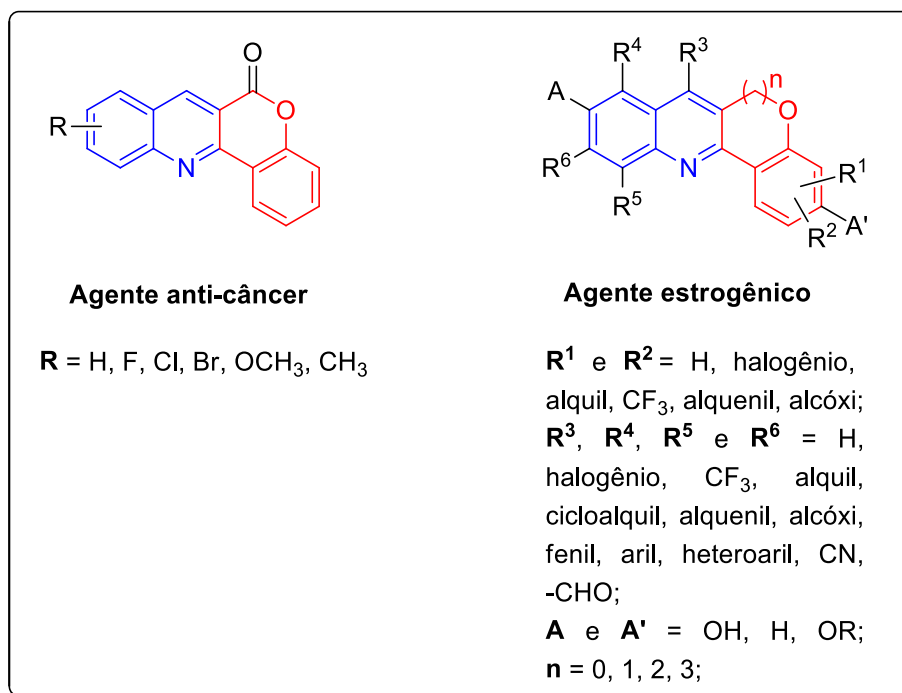
<sup>6</sup> Chen, N. Y.; Ren, P. L.; Zou, M. M.; Xu, P. Z.; Shao, S. X.; Xu, Y. X.; Li, Z. *Chin. Chem. Lett.* **2014**, *25*, 197.

<sup>7</sup> Pradhan, R.; Patra, M.; Behera, A. K.; Mishra, B. K.; Behera, R. K. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 779.

<sup>8</sup> Carreira, M. E.; Fessard, C. T. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 8257.

<sup>9</sup> Mulakayala, N.; Rambabu, D.; Raja, M. R.; Chaitanya, M.; Kumar, C. S.; Kalle, A. M.; Krishna, G. R.; Reddy, C. M.; Basaveswara Rao, M. V.; Pal, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 759.

<sup>10</sup> Vu, A. T. US Patent deposited on United States Patent - US 7354927 B2 in agreement to Pottstown, PA **2008**.



**Figura 2.** Estrutura dos derivados de 6H-1-benzopirano[4,3-b]quinolinas bioativos.

Dentre as diversas classes de heterociclos multifuncionais, destacam-se os pirróis, anéis contendo quatro átomos de carbono e um átomo de nitrogênio. Os pirróis são encontrados como constituintes básicos em produtos naturais e moléculas biologicamente ativas, com vasta gama de aplicações biológicas, tais como atividade antitumoral, antibacteriana e antiviral, sendo ainda muito utilizados como precursores em síntese orgânica.<sup>11-17</sup> Sistemas pirrólicos compõem a estrutura de diversas moléculas com aplicações farmacológicas de suma importância, desde controladores de secreção gástrica (Vonoprazan), redutores de colesterol (Atorvastatina), anti-inflamatórios (Tolmetina e Zomepirac), entre outras (**Figura 3**).

<sup>11</sup> Yates, F. S.; Boulton A. J.; McKillop A. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Pergamon, Oxford. **1984**, vol. 2.

<sup>12</sup> Walsh, C. T.; Tsodikova, G.; Howard-Jones, A. R. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 517;

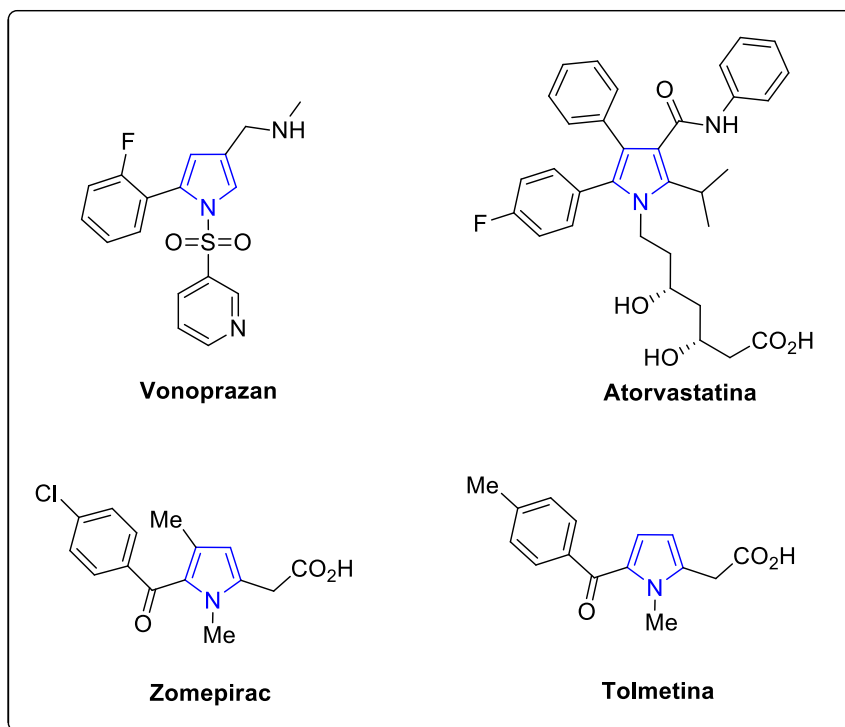
<sup>13</sup> Bellina, F., Rossi, R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 7213.

<sup>14</sup> Su, T.L.; Lee, T.C.; Kakadiya, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 609.

<sup>15</sup> Biava, M. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1859.

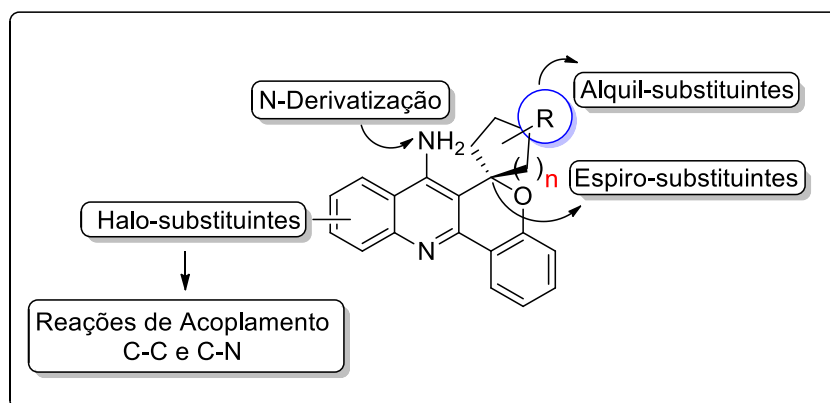
<sup>16</sup> Almerico, A. M.; Diana, P.; Barraja, P.; Dattolo, G.; Mingoia, F.; Loi, A. G.; Scintu, F.; Milia, C.; Puddu, I.; La Colla, P. *Farmaco* **1998**, *53*, 33.

<sup>17</sup> Pelkey, E. T. *Prog. Heterocycl. Chem.* **2005**, *17*, 109;



**Figura 3.** Pirróis substituídos presentes na estrutura-base de alguns fármacos.

Considerando os aspectos relatados anteriormente, a presente tese tem por objetivo geral realizar um estudo sobre a síntese, a derivatização e a avaliação farmacológica de novos derivados sintéticos, tendo por base a estrutura da tacrina (**Figura 4**). Estes novos heterociclos apresentam uma porção espirocarbocíclica contemplando anéis de 5-7 membros, substituídos ou não, halo-substituintes na fração quinolínica, propiciando reações de acoplamento C-C e C-N, como também, o grupo amino, que será utilizado em reações de *N*-derivatização heterocíclica na obtenção de pirróis.

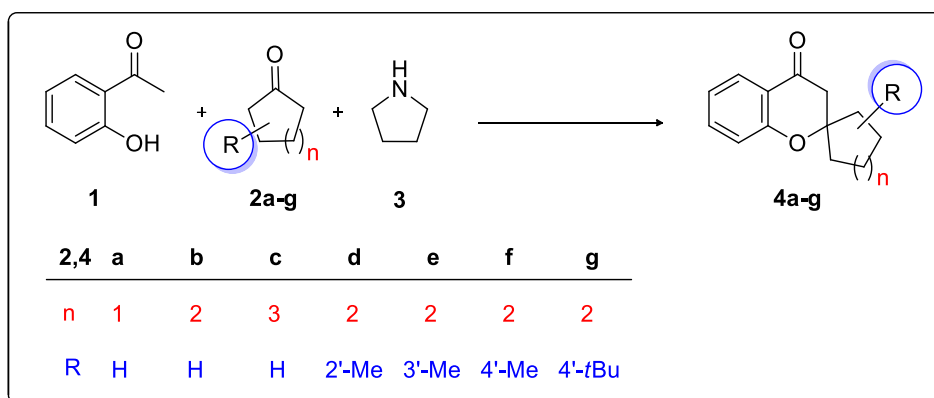


**Figura 4.** Objetivo geral sintético resumido desta Tese.

Visando alcançar as etapas previstas no objetivo geral, está previsto o desenvolvimento dos seguintes objetivos específicos:

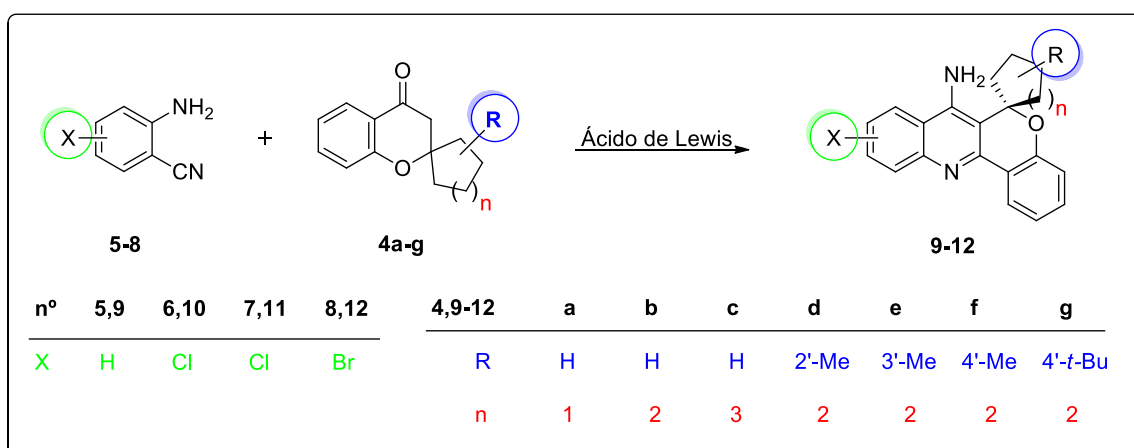
1. Sintetizar espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas precursoras (**4**) a partir da metodologia descrita por Kabbe (**Esquema 1**),<sup>18,19</sup> a qual utiliza reações envolvendo 2-hidróxi-acetofenona (**1**), cicloalcanonas substituídas (**2**) e pirrolidina (**3**) sob aquecimento.

**Esquema 1:**



2. Sintetizar 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] (**9-12**) a partir de espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas (**4a-g**) em reações com 2-amino-benzonitrilas (**5-8**) na presença de catálise ácida (**Esquema 2**).

**Esquema 2:**



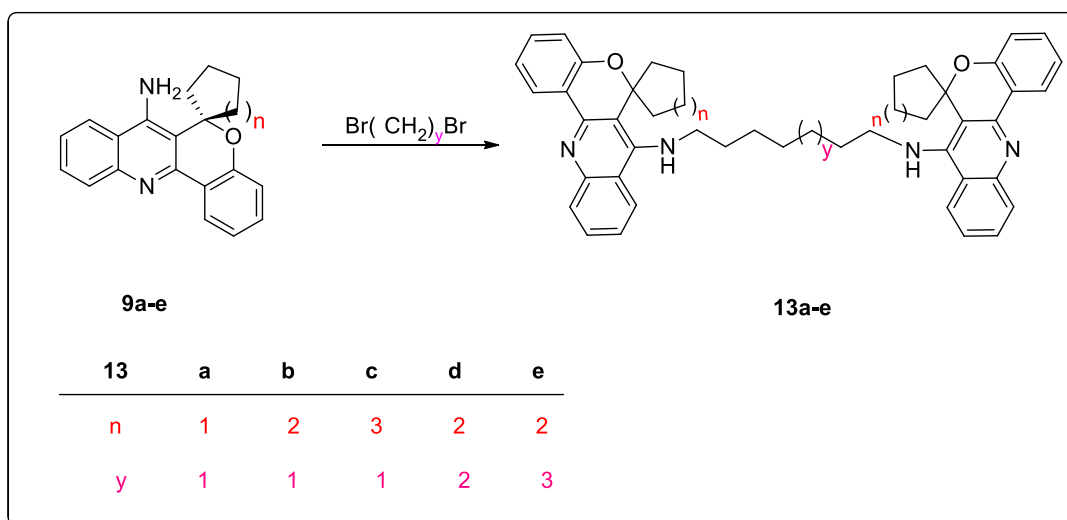
<sup>18</sup> Kabbe, H. J. *Angew. Chem. Int.* **1982**, *21*, 241.

<sup>19</sup> Kabbe, H. J. *Synthesis*, **1978**, 886.



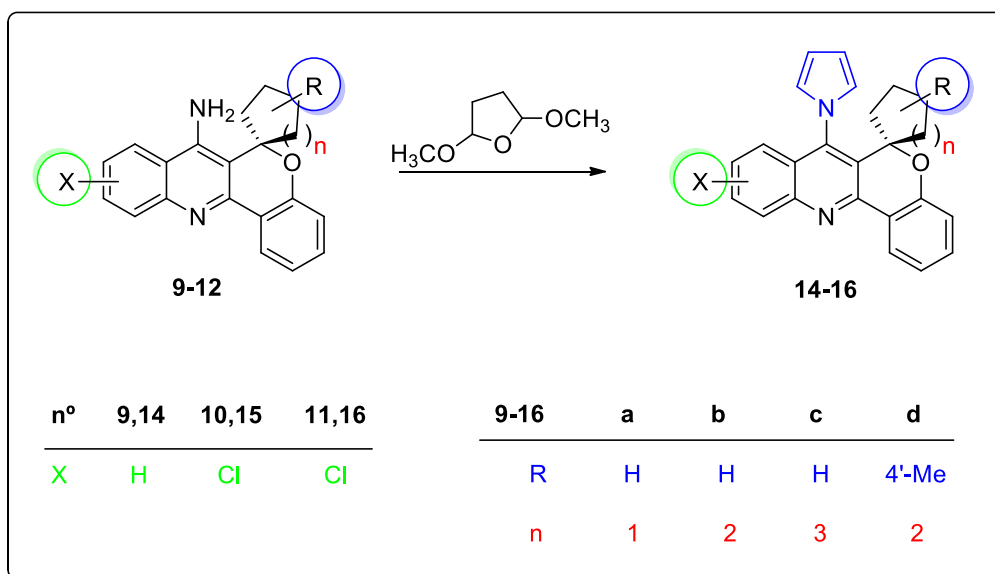
3. Uma vez que a literatura descreve uma elevada atividade farmacológica para tacrina-dímeros derivados, este objetivo específico pretende sintetizar os dímeros **13a-e** a partir dos compostos **9a-e** em reações com di-brometos de alquila (**Esquema 3**).

**Esquema 3.**



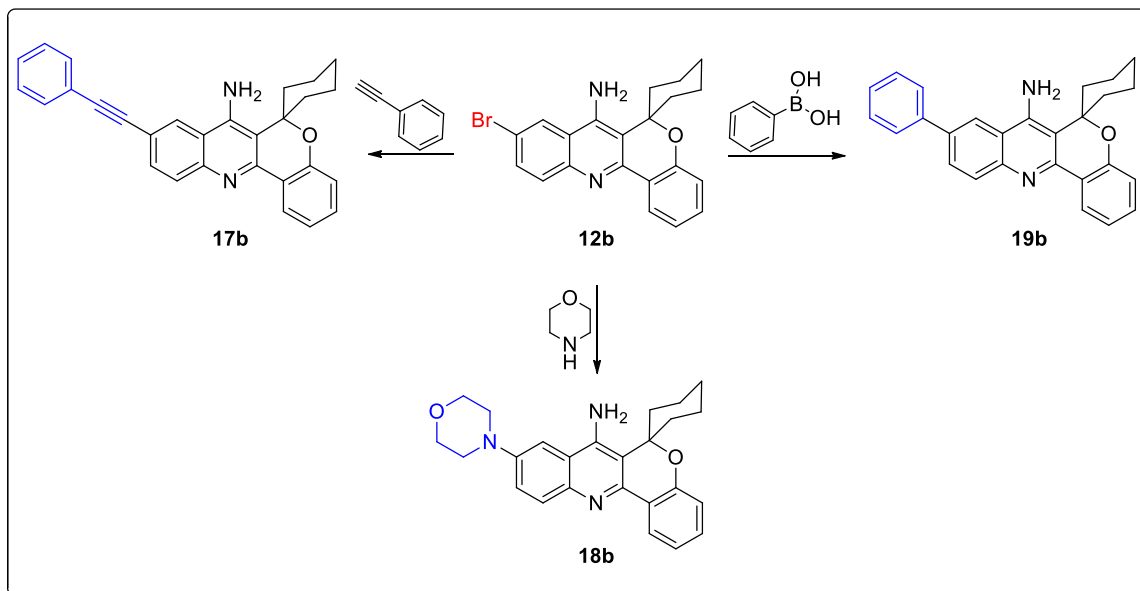
4. Explorar reações de *N*-derivatização nos compostos **9-12** pretendendo isolar exemplos de estruturas pirrolil derivadas **14-16** (**Esquema 4**).

**Esquema 4.**



5. Realizar reações de acoplamento C-C (tipo Sonogashira e Suzuki-Miyaura) e C-N (tipo Buchwald-Hartwig) no composto **12b**, a fim de verificar a aplicabilidade desse composto na síntese de novas moléculas mais complexas (**Esquema 5**).

**Esquema 5.**



6. Realizar as seguintes avaliações biológicas dos compostos (**9-16**):

- Inibição das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase;
- Atividade antitumoral;
- Citotoxicidade em leucócitos humanos;
- Atividade antimicrobiana;

7. Realizar estudos complementares de *Docking* molecular.

---

**REVISÃO DA LITERATURA**

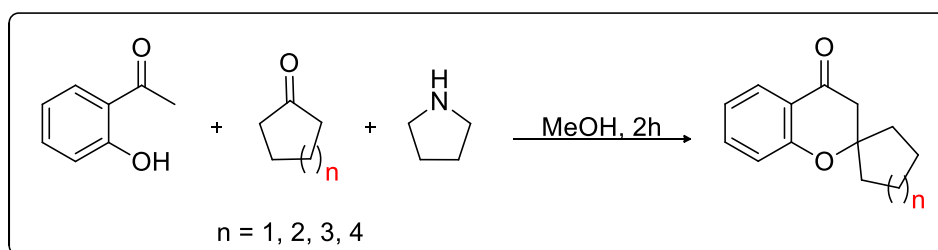
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura abordará referências específicas relacionadas com a pesquisa desenvolvida. Assim, inicialmente será descrito trabalhos relacionados com a síntese de espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas (**4a-g**), espiro-heterociclos e de derivados bioativos de 6*H*-1-benzopirano[4,3-*b*]quinolinas. Posteriormente, serão abordadas referências sobre a tacrina e os seus análogos bioativos e também sobre as principais metodologias para obtenção da tacrina (**Figura 1**). Após, serão apresentadas referências relativas à classe dos pirróis.

### 2.1 Espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas

A síntese de espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas foi descrita inicialmente por Kabbe como uma reação multicomponente envolvendo a 2-hidroxi-acetofenona e as respectivas 1-cicloalquenil-pirrolidinas produzidas *in situ* a partir de cetonas cíclicas e pirrolidina (**Esquema 6**).<sup>18, 19</sup>

**Esquema 6.**

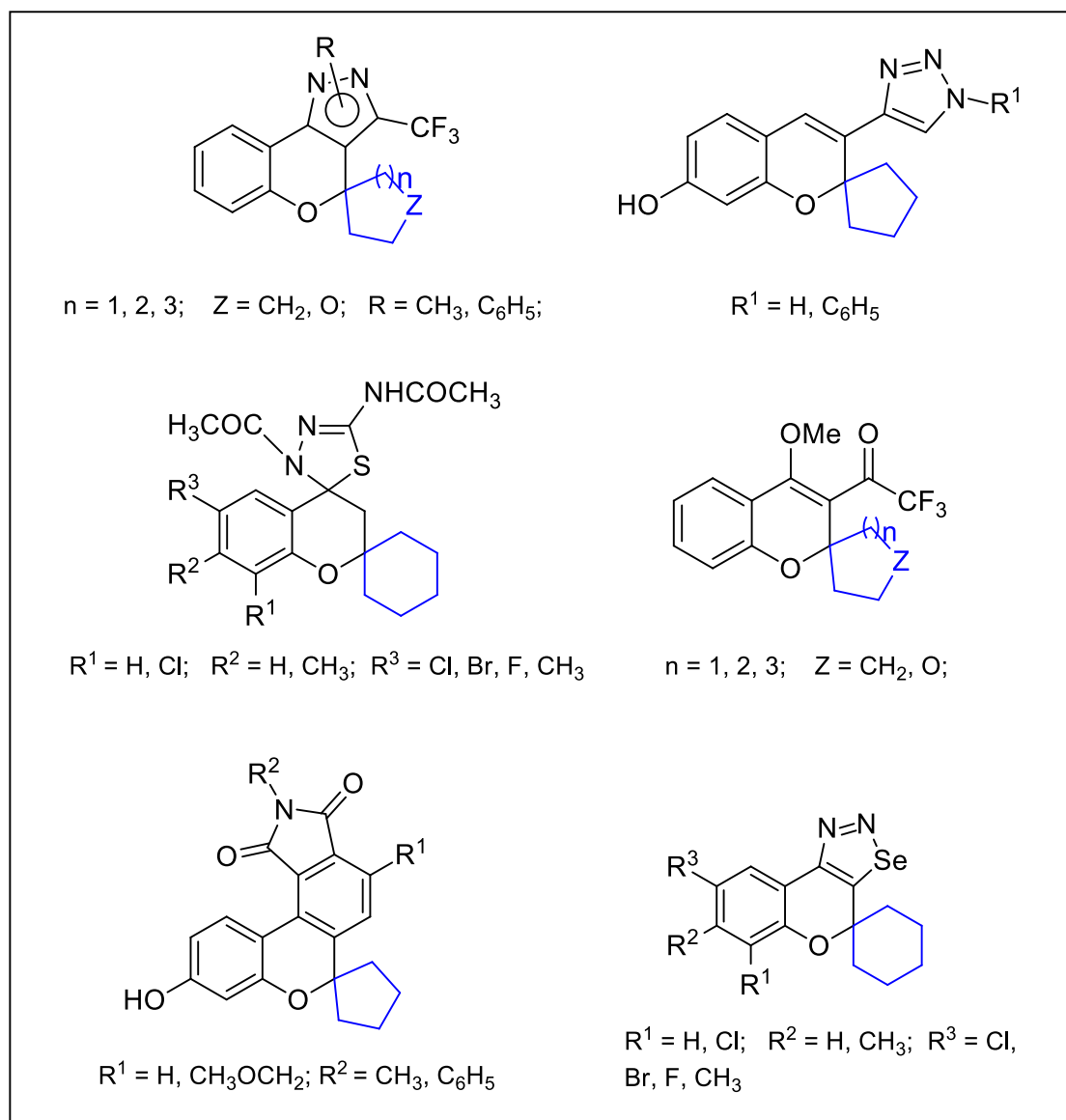


Tendo em vista que os espiro-heterociclos estão presentes em diversos compostos naturais bioativos, a síntese de espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas é amplamente descrita na literatura e esses compostos são importantes precursores de diversos espiro-heterociclos reportados na literatura, assim as espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas pertencem a uma importante classe de compostos largamente utilizados na síntese de novos espiro compostos.<sup>20</sup> A **Figura 5** mostra alguns espiro-heterociclos formados a partir de espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas.

<sup>18</sup> Kabbe, H. J. *Angew. Chem. Int.* **1982**, *21*, 241.

<sup>19</sup> Kabbe, H. J. *Synthesis*, **1978**, 886.

<sup>20</sup> Ko, K. S.; Jang, J. H.; Kim, E.; Park, B. S. *Chem. Commu.* **2006**, 2962.



**Figura 5.** Espiro-heterociclos formados a partir de espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas.

Assim, a utilização das espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas como precursores permite a inserção de uma porção espirocarbocíclica em novas moléculas, visto que espiro-heterociclos apresentam propriedades únicas ainda pouco estudadas e ampla atividade biológica, as quais serão apresentadas a seguir.<sup>6, 21</sup>

<sup>6</sup> Chen, N. Y.; Ren, P. L.; Zou, M. M.; Xu, P. Z.; Shao, S. X.; Xu, Y. X.; Li, Z. *Chin. Chem. Lett.* **2014**, *25*, 197.

<sup>21</sup> Bonacorso, H. G.; Garcia, F. D.; Belo, C. R.; Tier, A. Z.; Frizzo, C. P.; Martins, M. A. P.; Zanatta, N. *J. Fluorine Chem.* **2014**, *166*, 44.

## 2.2 Espiro-heterociclos

Compostos espiro-cíclicos são compostos que possuem um carbono comum a dois anéis. Em 1900, Bayer sintetizou o primeiro composto espiro, descrito como um hidrocarboneto bicíclico. A partir de então, o termo espirociclano foi usado para descrever a família de tais hidrocarbonetos que possuem em sua estrutura pelo menos dois ciclos ligados por um carbono em comum. Devido à natureza tetraédrica deste carbono, os planos do anel são praticamente perpendiculares um ao outro.<sup>22</sup> O carbono central dos compostos espiro sendo quaternário é um desafio a mais na investigação estereo-seletiva destas estruturas.

A presença da estrutura espiro-cíclica é comum em vários produtos naturais como alcaloides, terpenos e terpenóides. Espiro-compostos representam uma importante classe de ocorrência em substâncias naturais caracterizadas por pronunciadas propriedades biológicas, o que aumenta o interesse nas investigações de síntese, caracterização estrutural e ensaios de bioatividade de espiro-compostos.<sup>23</sup> Assim, a síntese e avaliação biológica de espiro-heterociclos vem crescendo exponencialmente nos últimos 50 anos.<sup>8</sup>

Em 2014, Carreira e col. realizou uma pesquisa sobre o número de literaturas que citava ou utilizava espiro-heterociclos nos últimos 50 anos (1964 – 2013).<sup>8</sup> Além de observarem um crescimento exponencial de espiro-heterociclos na literatura, também foi observado uma ligação direta desses compostos com agentes bioativos.<sup>8</sup> Ainda, a análise dos dados mostrou que a maioria das patentes sobre espiro-heterociclos dos últimos 10 anos são da indústria farmacêutica, agroquímica ou de áreas relacionadas a doenças, como oncologia, distúrbios metabólicos e anti-infecciosos.<sup>8</sup>

Os espiro-heterociclos apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas, como os derivados de espiro-oxindol que possuem atividade antitumoral, antibiótica e antimicrobiana, tais como anti-HIV e antimalárica.<sup>7, 24</sup>

---

<sup>7</sup> Pradhan, R.; Patra, M.; Behera, A. K.; Mishra, B. K.; Behera, R. K. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 779.

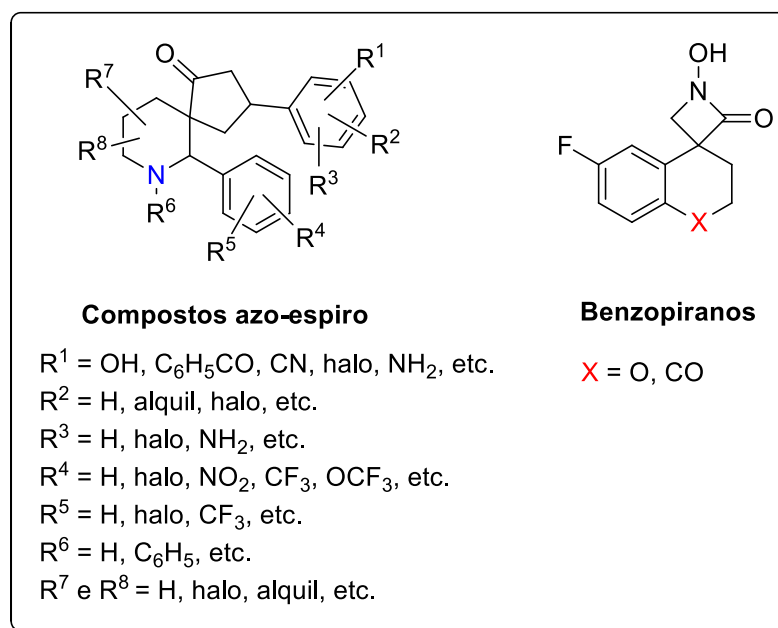
<sup>8</sup> Carreira, M. E.; Fessard, C. T. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 8257.

<sup>22</sup> Bayer, A. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1900**, *33*, 3771.

<sup>23</sup> (a) Longeon, A.; Guyot, M.; Vacelet, J. *Experientia* **1990**, *46*, 548. (b) Kobayashi, J.; Tsuda, M.; Agemi, K.; Shigemiri, H.; Ishibashi, M.; Sasaki, T.; Mikami, Y. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6617. (c) James, D. M.; Kunze, H. B.; Faulkner, D. J. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1137.

<sup>24</sup> Singh, S. G.; Desta, Y. Z. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 6104

Os compostos azo-espiros por serem antagonistas da taquicinina são utilizados no tratamento da depressão, ansiedade, dor e enxaqueca (**Figura 6**).<sup>7</sup> Ainda, espiro-heterociclos derivados de benzopiranos possuem atividade anti-diabetes, pois são inibidores da aldose redutase (**Figura 6**).<sup>7</sup> Portanto, espiro compostos são importantes blocos construtores para diversas moléculas bioativas.<sup>6</sup>



**Figura 6.** Estrutura de compostos azo-espiro e de espiro-heterociclos derivados de benzopiranos.

### 2.3 Derivados Bioativos de 6H-1-Benzopirano[4,3-b]quinolinas

A síntese dos derivados de cromeno-quinolinas tem se destacado devido a vasta gama de atividades biológicas e farmacológica desses compostos como, moduladores seletivos do receptor de progesterona,<sup>25</sup> atividade transcricional,<sup>26</sup> e moduladores de glicocorticoides (**Figura 7**).<sup>27</sup>

Além disso, Miri e col. sintetizaram derivados de cromeno-[4,3-b]quinolina e avaliaram a citotoxicidade desses compostos, os quais apresentaram atividade antitumoral

<sup>6</sup> Chen, N. Y.; Ren, P. L.; Zou, M. M.; Xu, P. Z.; Shao, S. X.; Xu, Y. X.; Li, Z. *Chin. Chem. Lett.* **2014**, *25*, 197.

<sup>7</sup> Pradhan, R.; Patra, M.; Behera, A. K.; Mishra, B. K.; Behera, R. K. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 779.

<sup>25</sup> Zhi, L.; Tegley, C. M.; Pio, B.; Edward, J. P.; Motamedi, M.; Jones, T. D.; Marschke, K. B.; Mais, D. E.; Risek, B.; Schrader, W. T. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4104.

<sup>26</sup> Coghlan, M. J.; Kym, P. R.; Elmore, S. W.; Wang, A. X.; Luly, J. R.; Wilcox, D.; Stashko, M.; Lin, C. W.; Miner, J.; Tyree, C.; Nakane, M.; Jacobson, P.; Lane, B. C. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2879.

<sup>27</sup> Ku, Y. Y.; Grieme, T.; Raje, P.; Sharma, P.; Morton, H. E.; Rozema, M.; King, A. S. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3238.

promissora para as seguintes linhagens de células de câncer: HeLa, K562, LS180 e MCF-7 (**Figura 7**).<sup>28</sup> Ainda, esses compostos apresentaram baixa atividade de bloqueio do canal de cálcio, que é um efeito indesejado quando esses compostos são utilizados como agentes antitumorais.

Dentre os derivados de cromeno-quinolinas destacam-se os 6*H*-1-benzopirano[4,3-*b*]quinolinas, os quais são eficientes ligantes β-seletivos receptores de estrogênio,<sup>29</sup> além de apresentarem pronunciada atividade antitumoral contra diversas linhagens de células de câncer.<sup>9,30</sup>

Mulakayala e col. sintetizaram 10 compostos derivados de 6*H*-1-benzopirano[4,3-*b*]quinolin-6-onas como potencial agentes anticâncer (**Figura 2**).<sup>9</sup> Esses compostos foram avaliados *in vitro* contra quatro linhas celulares de câncer: leucemia (K562), câncer de colo do útero (Colo-205), de mama (MDA-MB 231) e contra o neuroblastoma (IMR32). Os derivados de 6*H*-1-benzopirano[4,3-*b*]quinolin-6-onas foram considerados ativos para todas as linhas testadas, sendo que o valor de IC<sub>50</sub> variou de 8 a 46 μM.<sup>9</sup> Ainda, os menores valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos para a linhagem de célula do câncer de mama (MDA-MB 231).<sup>9</sup>

Posteriormente, Li e col. também avaliaram os derivados de 6*H*-1-benzopirano[4,3-*b*]quinolin-6-onas contra diversas linhas de células de câncer, sendo de colo do útero (HCT-15, HCT-116, HT-29, LS-180, LS-174, S1 e Lovo), de próstata (PC3 e DU-145) e de mama (MCF-7).<sup>30</sup> Esses compostos também foram ativos para todas as linhas celulares testadas.<sup>30</sup>

Contudo, derivados de 6*H*-1-benzopirano[4,3-*b*]quinolinas parecem apresentar pronunciada bioatividade, principalmente como promissores agentes antitumorais

---

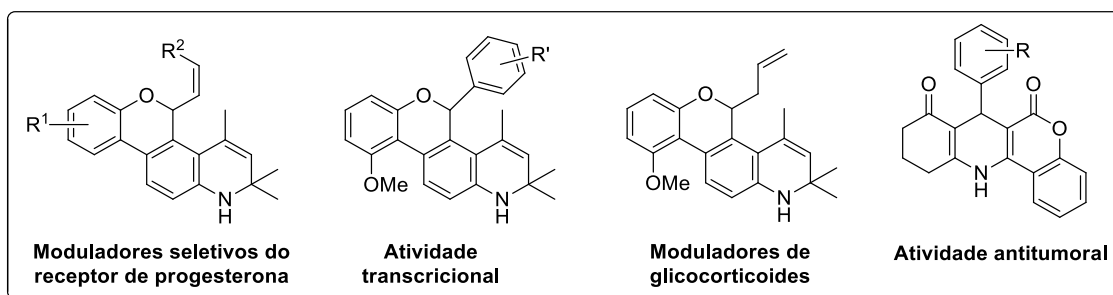
<sup>9</sup> Mulakayala, N.; Rambabu, D.; Raja, M. R.; Chaitanya, M.; Kumar, C. S.; Kalle, A. M.; Krishna, G. R.; Reddy, C. M.; Basaveswara Rao, M. V.; Pal, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 759.

<sup>28</sup> Miri, R.; Motamedi, R.; Rezaei, M. R.; Firuzi, O.; Javidnia, A.; Shafiee, A. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2011**, *2*, 111.

<sup>29</sup> Vu, A. T.; Campbell, A. N.; Harris, H. A.; Unwalla, R. J.; Manas, E. S.; Mewshaw, R. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4053.

<sup>30</sup> Li, T-L.; Guo, H-F.; Li, F-J.; Sun, Z-G.; Zhang, H-C. *Bangladesh. J. Pharmacol.* **2015**, *10*, 660.





**Figura 7.** Estrutura química de derivados de Cromeno-quinolinas.

## 2.4 Tacrina e Análogos Bioativos

A doença de Alzheimer é uma afecção neurodegenerativa progressiva clinicamente caracterizada pelo déficit cognitivo e de memória, a qual está relacionada com a degradação do sistema colinérgico e alterações nos sistemas glutamatérgica e serotoninérgica.<sup>1</sup> Essa perda cognitiva e de memória pode estar associada a diminuição dos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh), o qual pode ser degradado por dois tipos de enzimas, a acetilcolinesterase que é responsável pela finalização dos impulsos nervosos e a butirilcolinesterase que ainda não tem seu papel bem definido na neurotransmissão.<sup>1, 31</sup>

Em 1993, a tacrina foi o primeiro fármaco inibidor da AChE e BChE aprovado nos EUA pela agência *Food and Drug Administration (FDA)* para o tratamento da DA. Entretanto, esse fármaco apresentou elevada hepatotoxicidade via elevação dos níveis séricos de alanina aminotransferase, o que limitou o seu uso clínico.<sup>1, 31</sup>

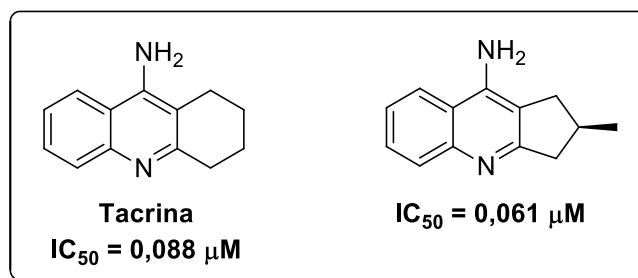
Tendo em vista que, a tacrina é considerada um fármaco “ouro” no tratamento da doença de Alzheimer, vários análogos ou derivados da tacrina tem sido sintetizados com o objetivo de aumentar a eficiência desse fármaco na inibição da enzima acetilcolinesterase e minimizar seus efeitos colaterais.<sup>1</sup>

Pisoni e col. sintetizaram novas tetrahydroacridinas quirais a partir de cetonas terpênicas e avaliaram o potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase desses compostos.<sup>2</sup> Dos novos análogos testados, apenas um apresentou maior eficiência que a tacrina na inibição da AChE, enquanto que os demais análogos apresentaram valores bem superiores de IC<sub>50</sub> (**Figura 8**).<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Romero A.; Cacabelos, R.; Oset-Gasque, J. M.; Samadi, A.; Marco-Contelles, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 1916.

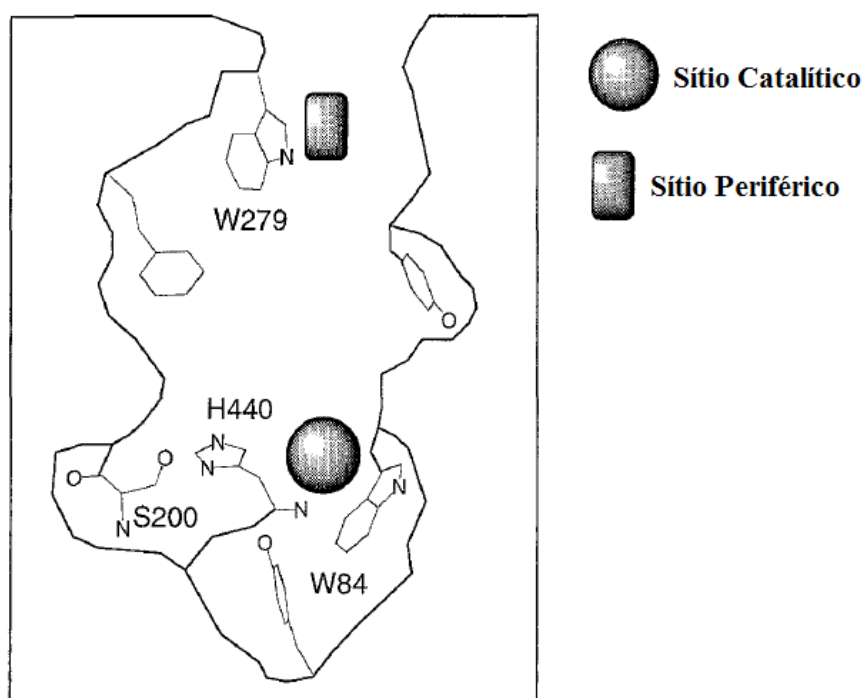
<sup>2</sup> Pisoni, S. D.; Costa, S. J.; Gamba, D.; Petzhold, L. C.; Borges, A. C. A.; Ceschi, A. M.; Lunardi, P.; Gonçalves, S. A. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 526.

<sup>31</sup> Anand, P.; Singh, B. *Arch. Pharm. Res.* **2013**, 36, 375.



**Figura 8.** Estrutura química da tacrina e da (2R)-9-amino-2-metil-2,3-diidro-1H-ciclopenta[b]quinolina.

Pang e col. identificaram através de estudos computacionais as diferentes regiões de interação da AChE (centro periférico e catalítico) e observaram uma baixa afinidade da tacrina pelo centro periférico dessa enzima (**Figura 9**).<sup>32</sup> Assim, os autores sintetizaram dímeros e heterodímeros de tacrina como estratégia para aumentar a eficiência e seletividade do inibidor em relação à AChE.<sup>33</sup> Segundo os autores, duas moléculas de tacrina ligadas por uma cadeia alquílica permitiria a interação simultânea entre o dímero de tacrina e os centros periférico e catalítico da enzima.<sup>33</sup>



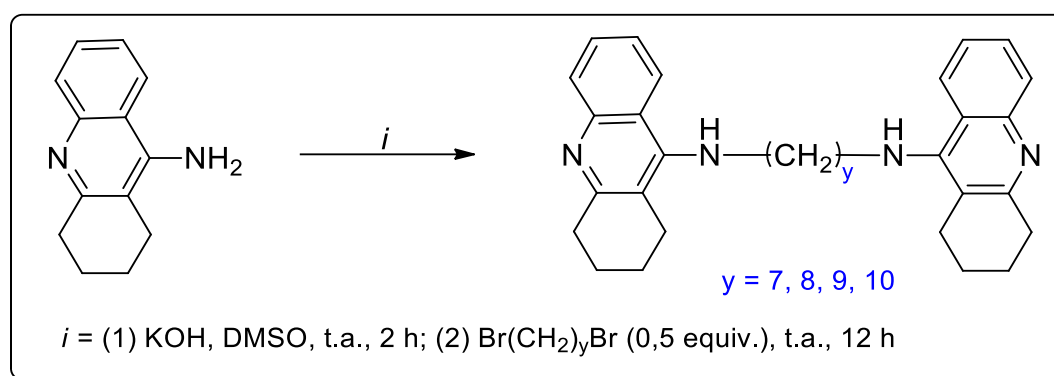
**Figura 9.** Sítios ativos da enzima acetilcolinesterase.<sup>32</sup>

<sup>32</sup> Pang, Y. -P.; Kozikowski, A. P. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, 8, 669

<sup>33</sup> Pang, Y. -P.; Hong, F.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Brimijoin, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 171.

Os dímeros de tacrina foram sintetizados através de uma reação de substituição nucleofílica entre a tacrina e dibrometos de cadeia longa (7 a 10 carbonos metilênicos) na presença de KOH (**Esquema 7**).<sup>33</sup> A avaliação biológica desses dímeros mostrou um significativo aumento no potencial de inibição da AChE, sendo que o dímero com  $y = 7$  foi o que mais inibiu a AChE e mostrou ser 149 vezes mais potente que a tacrina.<sup>33</sup>

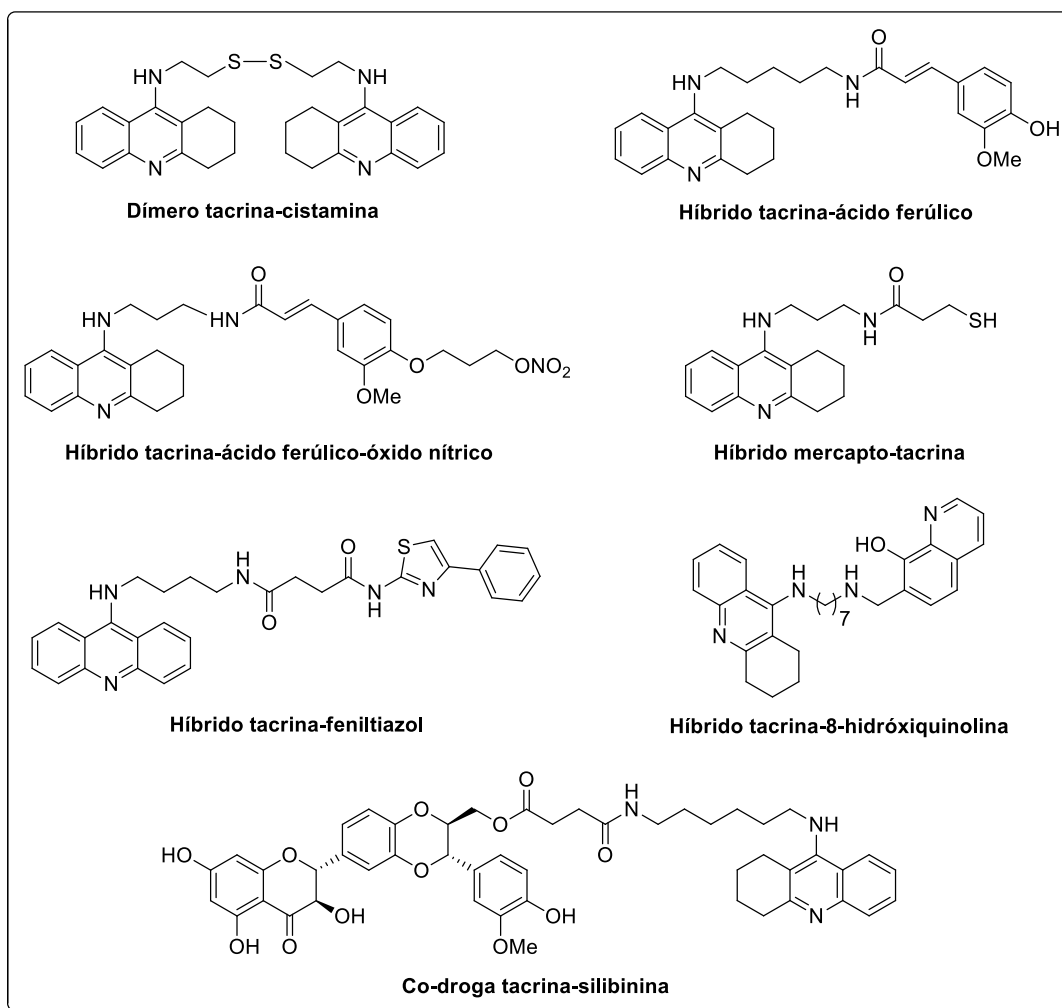
**Esquema 7.**



Neste contexto, vários heterodímeros e híbridos da tacrina tem sido sintetizados e avaliados biologicamente na tentativa de obter um potente fármaco para o tratamento da doença de Alzheimer (**Figura 10**).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Romero A.; Cacabelos, R.; Oset-Gasque, J. M.; Samadi, A.; Marco-Contelles, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 1916.

<sup>33</sup> Pang, Y. -P.; Hong, F.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Brimijoin, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 171.



**Figura 10.** Estrutura do dímero e heterodímeros híbridos da tacrina.

Estudos recentes demonstram a importância do desenvolvimento de uma droga multifuncional para o tratamento da doença de Alzheimer. A formação de radicais livres e o dano oxidativo celular provocado pela formação dessas espécies, por exemplo, parece desempenhar um papel importante na iniciação da DA. Assim a associação de uma droga anti-colinérgica e antioxidante tornou-se um importante alvo para o tratamento da DA.<sup>5</sup>

Em 2012, Chen e col. sintetizaram e avaliaram biologicamente novos híbridos tacrina-ácido ferúlico-óxido nítrico como tentativa de obter uma droga multifuncional (**Figura 10**).<sup>34</sup> Esses novos híbridos apresentaram maior potencial de inibição da AChE e BChE que a tacrina. O ácido ferúlico é um potente agente antioxidante que age como

<sup>5</sup> Thiratmatrakul, S.; Yenjai, C.; Waiwut, P.; Vajragupta, O.; Reubroycharoen, P.; Tohda, M.; Boonyarat, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 75, 21.

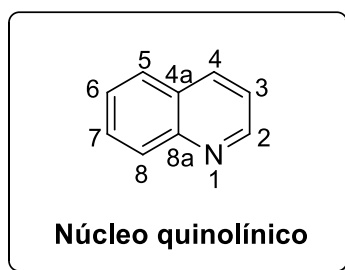
<sup>34</sup> Chen, Y.; Sun, J.; Frang, L.; Liu, M.; Peng, S.; Liao, H.; Lehmann, J.; Zhang, Y. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4309.

uma barreira de membrana celular impedindo a atividade de radicais livres, assim esperava-se que esses novos híbridos apresentassem atividade antioxidante, porém isso não ocorreu. Alguns dos novos híbridos tacrina-ácido ferúlico-óxido nítrico apresentaram atividade vasorelaxante.<sup>34</sup>

Ainda, outros híbridos da tacrina tem sido sintetizados com o objetivo de obter uma droga multifuncional, como a co-droga tacrina-silibinina que além de inibir a AChE e BChE também apresenta atividade hepatoprotetora.<sup>4</sup> Também, uma nova série de heterodímeros tacrina-huprine foram sintetizados com o objetivo de inibir simultaneamente os sítios catalítico e periférico da AChE. Esses compostos apresentaram atividade anti-colinérgica e anti-amiloidegênicas.<sup>35</sup>

## 2.5 Principais Metodologias para Obtenção de Híbridos da Tacrina

A tacrina e análogos estruturais possuem um núcleo quinolínico que é um sistema heterocíclico baseado na fusão de um anel benzênico com anel piridínico através da ligação C2-C3 (**Figura 11**).<sup>36</sup>



**Figura 11.** Estrutura do núcleo quinolínico.

<sup>4</sup> Chen, X.; Zenger, K.; Lupp, A.; Kling, B.; Heilmann, J.; Fleck, C.; Kraus, B.; Decker, M. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5231.

<sup>34</sup> Chen, Y.; Sun, J.; Frang, L.; Liu, M.; Peng, S.; Liao, H.; Lehmann, J.; Zhang, Y. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4309.

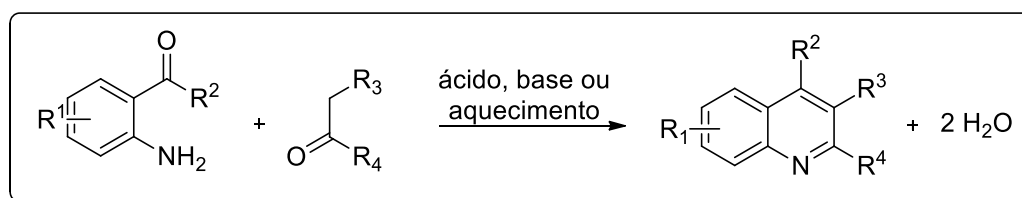
<sup>35</sup> Galdeano, C.; Viayna E.; Sola, I.; Formosa, X.; Camps, P.; Badia, A.; Victòria Clos, M.; Relat, J.; Ratia, M.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Salmona, M.; Minguillón, C.; González-Muñoz, G. C.; Rodríguez-Franco, M. I.; Bidon-Chanal, A.; Javier Luque, F.; Muñoz-Torrero, D.; *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 661.

<sup>36</sup> Marco-Contelles, j.; Pérez-Mayoral, E.; Samadi, A.; Carreiras, M. C.; Soriano, E. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2652.

Existem várias rotas sintéticas bem descritas na literatura para obtenção de sistemas quinolínicos, tais quais: síntese de Skraup,<sup>37, 38</sup> Doebner-von Miller,<sup>39</sup> Friedländer,<sup>40</sup> Pftzinger,<sup>41</sup> Conrad-Limpach,<sup>42</sup> Combes<sup>43</sup> e Knorr.<sup>44</sup> Essas rotas sintéticas são bem conhecidas e ainda frequentemente utilizadas para a preparação de compostos de uso farmacêutico, ligantes e materiais funcionais tendo o núcleo quinolina como parte estrutural fundamental.

A reação de Friedländer é o método mais simples para a obtenção de sistemas quinolínicos, a qual consiste em uma reação entre 2-aminoaldeído ou 2-aminocetona aromática com um aldeído ou cetona contendo grupo metileno (**Esquema 8**).<sup>36</sup> Essa reação pode ocorrer na presença ou na ausência de catalisador, porém a reação sem catalisador exige temperaturas drásticas (150 – 220 °C).<sup>36</sup>

### Esquema 8.



Embora as características gerais desse tipo de reação sejam bem conhecidas, os detalhes mecanísticos ainda não estão totalmente elucidados.<sup>36</sup> Existem duas propostas mecanísticas para a obtenção de quinolinas a partir da reação de Friedländer, a primeira entre 2-aminoaldeído ou 2-aminocetona aromática e um aldeído ou cetona contendo grupo metileno, envolve a formação inicial de um base de Schiff em equilíbrio tautomérico com a enamina, seguida pela reação aldólica intramolecular formando a hidróxi imina que após sofrer desidratação forma a quinolina (**Esquema 9**).<sup>36</sup>

<sup>36</sup> Marco-Contelles, J.; Pérez-Mayoral, E.; Samadi, A.; Carreiras, M. C.; Soriano, E. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2652.

<sup>37</sup> Manske, R. H. F.; Kulka, M. *Org. React.* **1953**, *7*, 59.

<sup>38</sup> Tokuyama, H.; Sato, M.; Ueda, T.; Fukuyama, T. *Heterocycles* **2001**, *54*, 105.

<sup>39</sup> Masato, M.; Fujio, T.; Jun-ichi, M. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8523.

<sup>40</sup> Cheng, C.-C.; Yan, S.-J. In: *The Friedländer Synthesis of Quinolines*, Dauben, W. C. (ed), Organic Reactions, vol. 28, John Wiley & Sons, New York, **1982**, 37.

<sup>41</sup> Jones, G. In: *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Weissberger, A.; Taylor, E. C. (eds), vol. 32, John Wiley & Sons, Chichester, **1977**, 181.

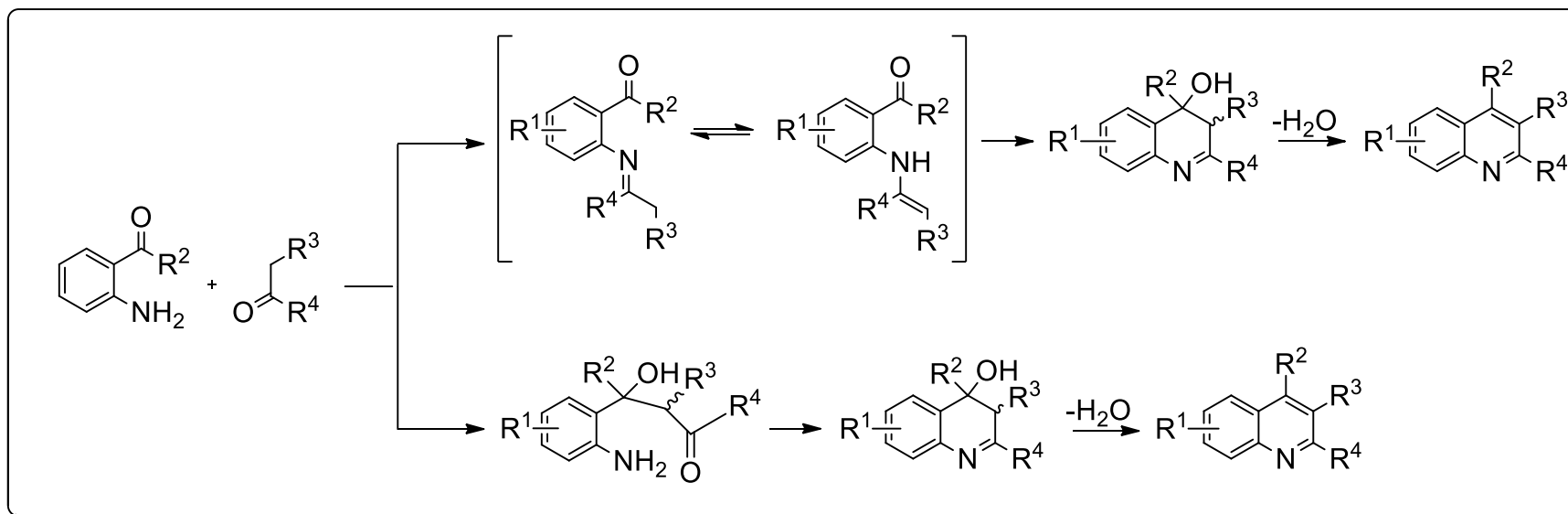
<sup>42</sup> Reitsema, R. H. *Chem. Rev.* **1948**, *43*, 47.

<sup>43</sup> Bergstrom, F. W. *Chem. Rev.* **1944**, *35*, 156.

<sup>44</sup> Hauser, C. R.; Reynolds, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 2402.

A segunda proposta sugere que ocorre, primeiramente, uma reação aldólica intramolecular formando o intermediário hidróxi imina que após sofrer desidratação forma a quinolina (**Esquema 9**).<sup>36</sup> Embora, há suporte mecanístico para a segunda proposta, a maioria das evidências favorece a primeira via mecanística, onde a síntese de Friedländer envolve a formação de uma base intermediária de Schiff.<sup>36</sup> No entanto, estudos indicam que em meio ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $p\text{-TsOH}$ ) ou básico ( $\text{NaOH}$ ) a reação aldólica intramolecular é o primeiro passo na reação de Friedländer entre 2-amino-benzaldeídos e aldeídos.<sup>36</sup>

**Esquema 9.**

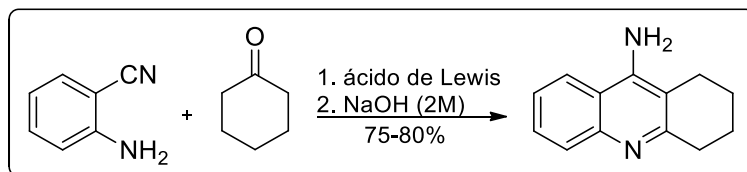


<sup>36</sup>Marco-Contelles, j.; Pérez-Mayoral, E.; Samadi, A.; Carreiras, M. C.; Soriano, E. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2652.

### 2.5.1 Reações de Ciclocondensação entre Aminonitrilas e Ciclocetonas

A reação de ciclocondensação entre aminonitrilas e cicloalcanonas é um método direto, sem o isolamento de intermediários, de obtenção da tacrina e análogos. Essa reação também é classificada como de Friedländer e ocorre na presença de um ácido de Lewis (**Esquema 10**).<sup>36</sup>

**Esquema 10**



Em 2009, Costa e col. avaliaram, através do rendimento, a eficiência de 11 ácidos de Lewis na reação de condensação entre a antranilonitrila e a ciclohexanona (**Esquema 10**).<sup>45</sup> Entre os catalisadores que proporcionaram maior rendimento (85 - 100 %) para essa reação, em tolueno, estão o cloreto de índio ( $\text{InCl}_3$ ) e cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ).<sup>45</sup> Os autores também observaram que essa reação ocorre com bons rendimentos (75 - 80 %) na ausência de solvente, porém na presença de solventes polares ocorre a formação de uma mistura complexa.<sup>45</sup>

Assim, essa metodologia é eficiente na síntese da tacrina e análogos, pois é uma reação direta, os reagentes são de baixo custo, os rendimentos são considerados bons (80 - 100 %) e a reação também ocorre sem solvente. Uma das limitações dessa metodologia seria a utilização de temperaturas elevadas (110 °C).

As reações de ciclocondensação entre aminonitrilas e cicloalcanonas também podem ocorrer com bons rendimentos empregando radiação de micro-ondas.<sup>46, 47</sup> Khalilzadeh e col. realizaram a síntese de diversos derivados da tacrina empregando radiação de micro-ondas (**Esquema 11**).<sup>46</sup> Essa reação ocorre sem solvente entre 2-amino-benzonitrilas e ciclocetonas na presença de *p*-TSA em diferentes suportes sólidos, sendo a sílica gel o suporte mais eficiente para essa reação (**Esquema 11**).<sup>46</sup>

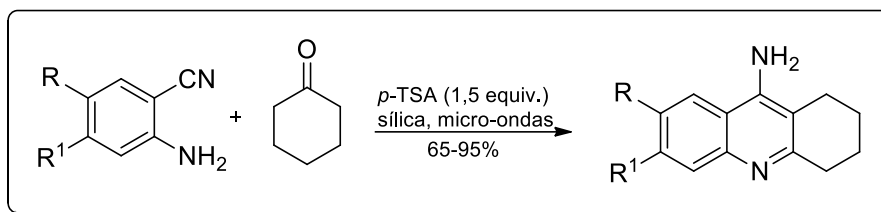
<sup>45</sup> Costa, J. S.; Pisoni S. D.; Silva, B. C.; Petzhold, L. C.; Russowsky, D; Ceschi, M. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1448.

<sup>46</sup> Khalilzadeh, M. A.; Hosseini, A.; Tajbakhsh, M. *J. Heterocycl. Chem.* **2007**, *44*, 535.

<sup>47</sup> Hasaninejad, A.; Zare, A.; Shekouhy, M.; Ameri-Rad, J. *Green Chem.* **2011**, *13*, 958.

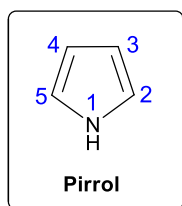


## Esquema 11



## 2.6 Pirróis

O pirrol é um sistema aza-heterocíclico aromático de fórmula  $C_4H_5N$  encontrado como estrutura básica de produtos naturais e moléculas biologicamente ativas (**Figura 12**), com uma grande variedade de aplicações biológicas, tais como atividade antitumoral contra várias linhagens de células de câncer, como linhagens de leucemia e câncer de mama,<sup>14</sup> além de apresentarem atividade antibacteriana<sup>15</sup> e antiviral.<sup>16</sup>



**Figura 12.** Estrutura química do pirrol.

Existem várias rotas sintéticas para obtenção de pirróis, como a reação de Hantzsch, de Knorr, de Paal-Knorr e de Clauson-Kass, entre outras.<sup>48</sup> A reação de **Paal-Knorr** procede através da adição de aminas primárias à 1,4-dicetonas em meio ácido,<sup>48</sup> enquanto no procedimento adotado por **Hantzsch**, a transformação ocorre através da mistura de  $\beta$ -cetoésteres com  $\alpha$ -halocetonas em presença de aminas primárias ou amônia (**Esquema 12**).<sup>48</sup> Já a reação de **Knorr** ocorre entre  $\alpha$ -aminocetonas e  $\beta$ -cetoésteres ou  $\beta$ -dicetonas (**Esquema 12**).<sup>48</sup>

<sup>14</sup> Su, T.L.; Lee, T.C.; Kakadiya, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 609.

<sup>15</sup> Biava, M. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1859.

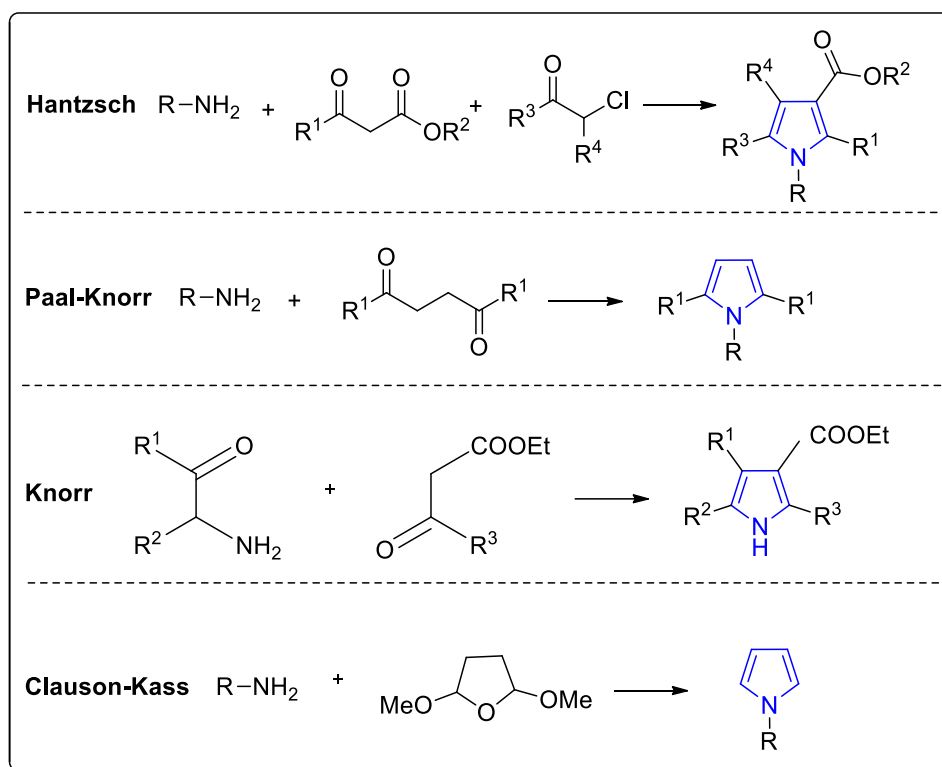
<sup>16</sup> Almerico, A. M.; Diana, P.; Barraja, P.; Dattolo, G.; Mingoia, F.; Loi, A. G.; Scintu, F.; Mília, C.; Puddu, I.; La Colla, P. *Farmacologia* **1998**, *53*, 33.

<sup>48</sup> Eicher, T.; Hauptmann, S. *The Chemistry of Heterocycles*. Wiley, 2<sup>a</sup> ed. Londres. **2003**.

A síntese de pirróis via **Clauson-Kass** envolve a reação de condensação entre uma amina e o 2,5-dimetóxitetrahidrofurano para formar um pirrol *N*-substituído e sem substituintes nas posições 2 e 3 do anel (**Esquema 12**).

Diversos métodos para a síntese Clauson-Kass de pirróis foram desenvolvidas na presença de vários agentes promotores, como ácido acético glacial,<sup>49</sup> pentóxido de fósforo,<sup>50</sup> ácido trifluorometanosulfônico,<sup>51</sup> montmorilonite K-10,<sup>52</sup> cloreto de ferro (III)<sup>53</sup> e eterato de MgI<sub>2</sub>.<sup>54</sup> Ainda, a reação de Clauson-Kass pode ser catalisada por cobre em meio aquoso.<sup>55</sup> Portanto, diversas modificações na reação de Clauson-Kass tem sido realizadas na tentativa de melhorar a eficiência dessa reação, tendo em vista que esses compostos possuem ampla bioatividade.

### Esquema 12.



<sup>49</sup> Artico, M.; Silvestri, R.; Massa, S.; Loi, A. G.; Corrias, S.; Piras, G.; Colla, P. L. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 522.

<sup>50</sup> Fang, Y.; Leysen, D.; Ottenheijm, H. C. J.; *Synth. Commun.* **1995**, 25.

<sup>51</sup> Abid, M.; Teixeira, L.; Török, B. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 4047.

<sup>52</sup> Abid, M.; Landge, S. M.; Török, B. *Org. Prep. Proced. Int.* **2006**, 38, 495.

<sup>53</sup> Azizi, N.; Khajeh-Amiri, A.; Ghafari, H.; Bolourtchian, M.; Saidi, M. R. *Synlett.* **2009**, 2245.

<sup>54</sup> Zhang, X.; Shi, J. *Tetrahedron.* **2011**, 67, 898.

<sup>55</sup> Deng, H.-J.; Fang, Y.-J.; Chen, G.-W.; Liu, M.-C.; Wu, H.-Y.; Chen, J.-X. *Appl. Organometal. Chem.* **2012**, 26, 164.

---

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

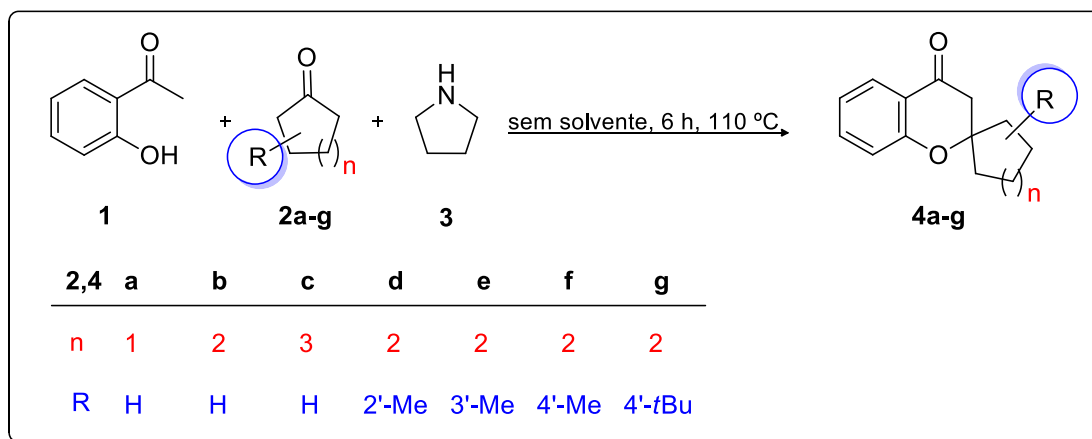
Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos após 48 meses de desenvolvimento do presente estudo. Inicialmente, será descrita a síntese dos precursores espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas (**4a-g**).

Em sequência, será demonstrada a síntese, purificação, identificação e avaliação biológica de 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] (**9-12**); as reações de *N*-derivatização dos compostos **9-12**, assim como a purificação, identificação e avaliação biológica e finalmente, as reações de acoplamento C-C e C-N partindo de um exemplar de 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] bromo substituído.

#### 3.1 Síntese de Espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas

A síntese de espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas (**4a-g**) foi descrita inicialmente por Kabbe, porém essa metodologia foi adaptada para a eliminação do uso de solvente (**Esquema 13**).<sup>18,19</sup>

**Esquema 13**



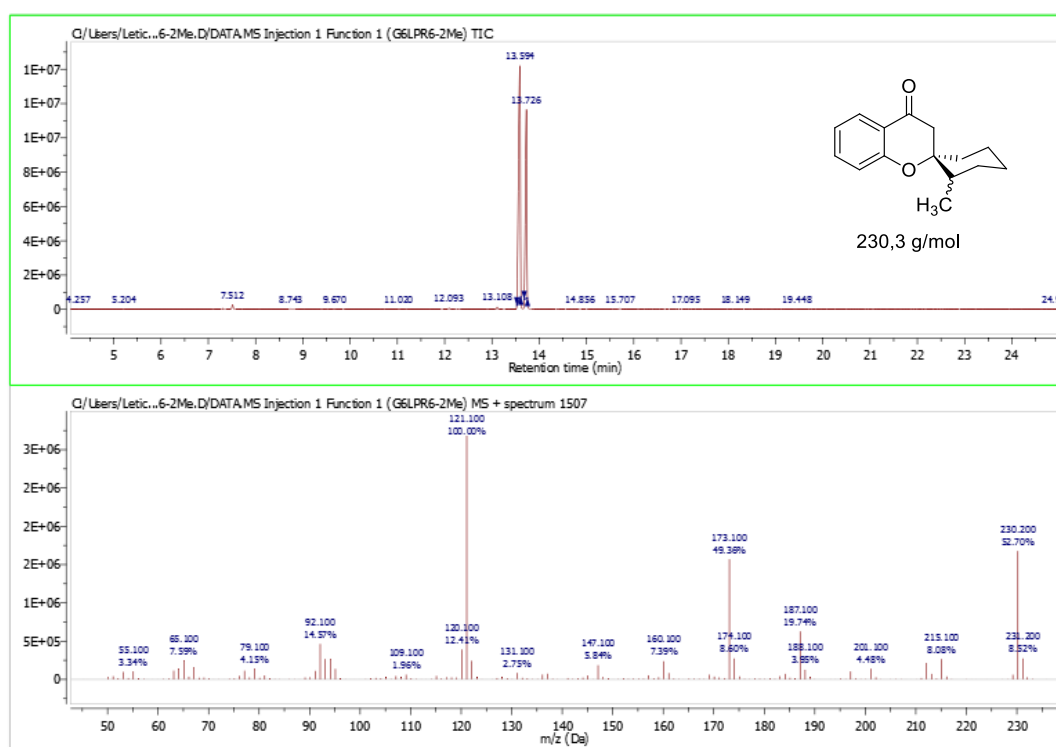
As espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas foram sintetizadas a partir da reação entre 2-hidróxi-acetofenona (**1**), cicloalcanonas (**2a-g**) e pirrolidina (**3**), através de aquecimento sob refluxo por 6 horas a 110 °C na ausência de solvente.<sup>18</sup>

<sup>18</sup> Kabbe, H. J. *Angew. Chem. Int.* **1982**, *21*, 241.

<sup>19</sup> Kabbe, H. J. *Synthesis*, **1978**, 886.

Os óleos formados (**4a-g**) foram destilados sob pressão reduzida (1-5 mbar) com rendimentos de 75 a 85 % (**Esquema 13**). As espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas (**4a-g**) foram identificadas por CG-MS e os dados encontrados estão de acordo com a literatura (**Anexo I**).<sup>19,19</sup>

Ainda, é importante ressaltar que os compostos **4d-g** formam diastereoisômeros, os quais as estruturas se diferenciam na configuração da porção espirocarbocíclica. A formação de diastereoisômeros dos compostos **4d-g** pode ser constatada através de dados previamente descritos na literatura,<sup>56</sup> como também, através do espectro de massas (GC-EI) desses compostos, onde observa-se a presença 2(dois) sinais com o mesmo peso molecular, porém em tempos de retenção diferentes (**Figura 13** e **Anexo I**).



**Figura 13.** Espectro de Massas (GC-EI) de 2'-metil-espiro[croman-2,1'-ciclohexan]-4-onas (**2d**).

<sup>18</sup> Kabbe, H. J. *Angew. Chem. Int.* **1982**, *21*, 241.

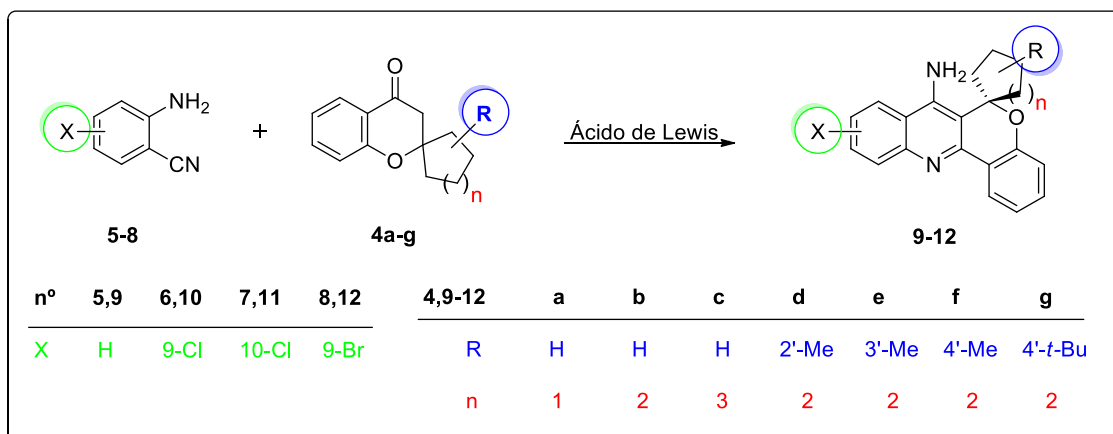
<sup>19</sup> Kabbe, H. J. *Synthesis*, **1978**, 886.

<sup>56</sup> Carpenter, R. D.; Fettinger, J. C.; Lam, K. S.; Kurth, M. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6407.

### 3.2 Síntese de 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos]

Os 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] foram obtidas através de uma reação de ciclocondensação entre espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas (**4a-g**) e aminonitrilas (**5-8**) na presença de um ácido de Lewis (**Esquema 14**).

**Esquema 14**

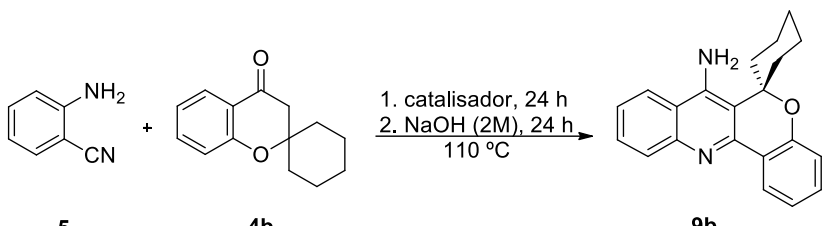


Visando determinar as condições reacionais ideais para obtenção dos compostos **9-12**, optou-se por estudar a síntese do composto **9b**. Com base em procedimentos experimentais descritos na literatura, foram realizados testes para escolha do solvente mais adequado para essa reação (**Tabela 1**).<sup>2,45</sup> Conforme mostrado na **Tabela 1**, a reação para obtenção do produto **9b** utilizando AlCl<sub>3</sub> como catalisador ocorre tanto em tolueno como na ausência de solvente. Entretanto, a reação sem solvente parece ser mais eficiente na formação do produto **9b** (65 %) quando comparada com a reação em tolueno (30 %).

Além do solvente, foram testados 4 tipos de catalisadores (AlCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, InCl<sub>3</sub>, BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub>) na síntese do composto **9b** (**Tabela 1**). Dos catalisadores testados na ausência de solvente, o AlCl<sub>3</sub> é o mais eficiente na síntese do composto **9b**, enquanto que o FeCl<sub>3</sub> mostrou ser o menos eficiente (**reações 3 – 6, Tabela 1**). A reação que utiliza o FeCl<sub>3</sub> como catalisador levou a formação de uma mistura complexa sem o isolamento do composto **9b**, tanto em tolueno como na ausência de solvente (**Tabela 1**).

<sup>2</sup> Pisoni, S. D.; Costa, S. J.; Gamba, D.; Petzhold, L. C.; Borges, A. C. A.; Ceschi, A. M.; Lunardi, P.; Gonçalves, S. A. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 526.

<sup>45</sup> Costa, J. S.; Pisoni, S. D.; Silva, B. C.; Petzhold, L. C.; Russowsky, D.; Ceschi, M. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1448.

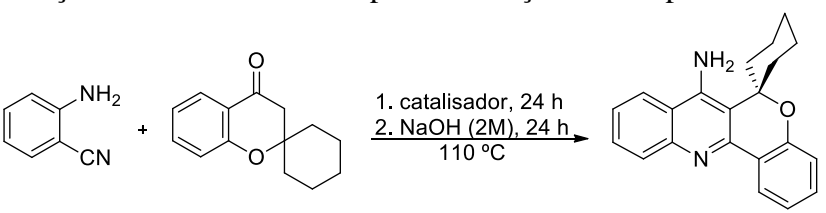
**Tabela 1.** Condições reacionais testadas para otimização do solvente e catalisador.


Reação <sup>[a]</sup>	Solvente <sup>[b]</sup>	Catalisador	Rendimento <sup>[c]</sup> (%)
1	Tolueno	AlCl <sub>3</sub>	30
2	Tolueno	FeCl <sub>3</sub>	0
3	[c]	[d]	0
4	[c]	AlCl <sub>3</sub>	65
5	[c]	FeCl <sub>3</sub>	0
6	[c]	InCl <sub>3</sub>	60
7	[c]	BF <sub>3</sub> .OEt <sub>2</sub>	05

[a] Reagentes foram utilizados na relação molar **4b:5:catalisador** = 1:1:1. [b] Quantidade de solvente = 8 mL. [c] Reação na ausência de solvente. [d] sem catalisador. [e] Rendimento do produto isolado.

Considerando a importância da eliminação do uso de solvente como um dos princípios da química verde e a eficiência do AlCl<sub>3</sub> como catalisador, além do baixo custo do AlCl<sub>3</sub> comparado ao InCl<sub>3</sub> optou-se pela síntese de 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] na ausência de solvente e catálise de AlCl<sub>3</sub>.

Posteriormente, estudou-se a variação do tempo reacional para as condições estabelecidas anteriormente (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Condições reacionais testadas para otimização do tempo reacional.


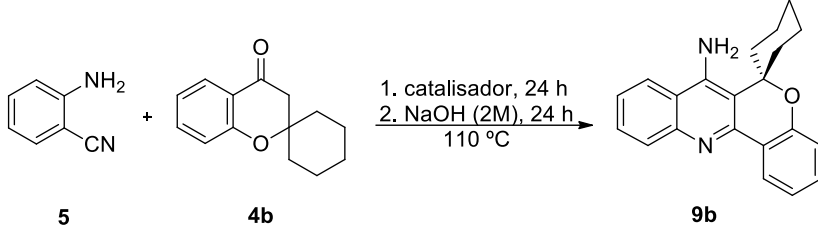
Reação <sup>[a]</sup>	Tempo reacional (h)	Rendimento <sup>[c]</sup> (%)
1	4	[b]
2	8	30
3	32	55
4	48	65

[a] Reagentes foram utilizados na relação molar **4b:5:catalisador** = 1:1:1. [b] isolamento do intermediário da reação. [c] Rendimento do produto isolado.

Tendo em vista a redução do tempo reacional para formação do composto **9b**, foram testados os tempos de 4, 8 e 32 horas para essa reação (**Tabela 2**). No tempo reacional de 4 horas não foi observada a formação do composto **9b**, enquanto que em 8 horas reacionais ocorreu a formação do composto **9b** com baixo rendimento (30 %). No tempo reacional de 32 horas obteve-se o composto **9b** com 55 % de rendimento. Assim, o tempo reacional de 48 horas é a melhor condição para síntese de 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] (**Tabela 2**).

Considerando que o  $\text{AlCl}_3$  reage com a umidade do ar formando  $\text{HCl}$  e  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , estudou-se a síntese do composto **9b** em atmosfera de argônio, porém não foi observado um aumento no rendimento da reação (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Otimização do meio reacional.



Reação <sup>[a]</sup>	Meio reacional	Rendimento <sup>[d]</sup> (%)
1	[b]	60
2	[c]	65

[a] Reagentes foram utilizados na relação molar **4b:5:catalisador** = 1:1:1. [b] atmosfera inerte (Argônio). [c] na ausência de atmosfera inerte [d] Rendimento do produto isolado.

Ainda, foram realizados testes empregando radiação de micro-ondas para obtenção do composto **9b** nas mesmas condições que o sob aquecimento térmico convencional, porém nos tempos de 1, 1,5 e 2 minutos, os resultados obtidos não foram satisfatórios (15 – 30 %).

Assim, após a otimização das condições reacionais para obtenção de 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexanos] (**9b**), estas foram utilizadas para a síntese da série de compostos **9a-g** (**Esquema 14**). Posteriormente, visando o estudo da influência dos substituintes cloro nas posições 9 ou 10, e do bromo na atividade biológica deste sistema, além da possibilidade de inserção de novos grupos na posição 9 do composto bromo substituído (**12b**) em reações de acoplamento, estendeu-se a metodologia usada na obtenção de **9a-g** para a síntese dos compostos **10-12** (**Esquema 14**). A seguir, será apresentado e discutido a purificação dos compostos **9-12**.

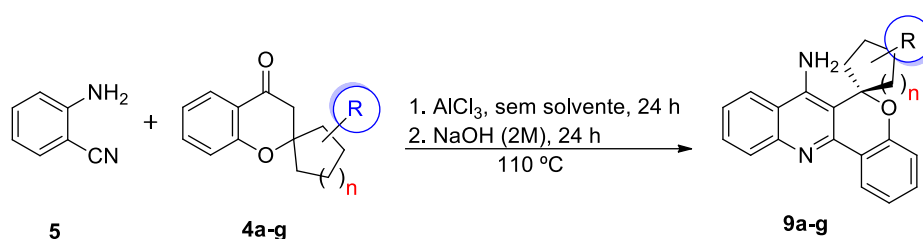


### 3.3 Purificação das 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos]

Os compostos **9-12**, depois de serem isolados do meio reacional com clorofórmio foram purificados por recristalização em álcool etílico e apresentaram-se como compostos sólidos e estáveis ao ar.

Após, foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ , HMQC, HMBC, COSY espectrometria no infravermelho, difração de raios-X, ponto de fusão, massa de alta resolução e análise elementar. As **Tabelas 4 e 5** mostram o rendimento, ponto de fusão, massa de alta resolução e análise elementar dos compostos **9-12**.

**Tabela 4.** Propriedades físicas e rendimentos dos compostos **9a-g**.



Comp.	n	R	Rend. (%) <sup>[a]</sup>	Fórmula/ Massa Molecular (g/mol)	Ponto de Fusão (°C)	HRMS (g/mol) Calc. Exp. <sup>[b]</sup>	Análise Elementar (%)		
							Cal./Experim. C	H	N
<b>9a</b>	1	H	60	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O 302,37	118-119	—	79,44	6,00	9,26
							79,39	5,78	9,13
<b>9b</b>	2	H	65	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O 316,40	156-157	317,1654 317,1672	—		
<b>9c</b>	3	H	55	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O 330,42	153-154	—	79,97	6,71	8,48
							79,90	6,64	8,42
<b>9d</b>	2	2'-Me	30	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O 330,42	195-197	—	79,97	6,71	8,48
<b>9e</b>	2	3'-Me	35	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O 330,42	161-163	—	79,97	6,71	8,48
							79,89	6,83	8,33
<b>9f</b>	2	4'-Me	60	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O 330,42	176-177	—	79,97	6,71	8,48
							79,68	6,73	8,32
<b>9g</b>	2	4'- <i>t</i> -Bu	60	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O 372,50	229-231	—	80,61	7,58	7,52
							80,19	7,82	7,09

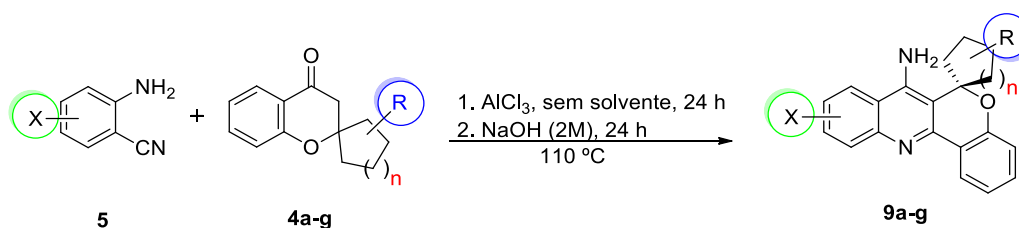
[a] Rendimento do produto recristalizado. [b] análise de massas de alta resolução realizada considerando  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

Dos compostos **9a-g** mostrados na **Tabela 4**, o não substituído **9b** (X = H) com n = 2, foi o que apresentou maior rendimento (65%), provavelmente devido a estabilidade da composição do carbono espiro [6,6], o qual é formado por dois ciclos de seis membros.

Ainda, os compostos **9d** e **9e** tiveram os menores rendimentos (30 e 35 %, respectivamente). Uma provável explicação para esses baixos rendimentos seria que a 2-amino-benzonitrila reage somente com um dos diastereoisômeros dos compostos **4d** e **4e**, os quais se formam quase que na mesma proporção. A síntese dos compostos **9d** e **9e** é diastereosseletiva.

A síntese diastereosseletiva dos compostos **9d-g** foi comprovada pelas análises de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ }, HMQC, HMBC e COSY onde não foi observada duplicação de sinais e, portanto confirmada a obtenção de um único diastereoisômero para cada caso. A identificação espectroscópica dos compostos **9-12** será discutida a seguir.

Dos análogos da tacrina **10-12** substituídos com bromo na posição 9 e cloro nas posições 9 ou 10, o composto cloro substituído **11b** (X = Cl) foi o que apresentou maior rendimento (56 %, **Tabelas 5**). De modo geral, esses rendimentos foram semelhantes aos do compostos **9a-g**.

**Tabela 5.** Propriedades físicas e rendimentos dos compostos **10-12**.

Comp.	X	n	Rend. (%) <sup>[a]</sup>	Fórmula/Massa Molecular (g/mol)	Ponto de Fusão (°C)	HRMS (g/mol) Calc. Exp. <sup>[b]</sup>	Análise Elementar (%)		
							Cal./Experim.	C	H
<b>10a</b>	9-Cl	1	45	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O 336,81	114-116	—	67,70 67,76	5,4 5,47	7,89 7,78
<b>10b</b>	9-Cl	2	55	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O 350,84	214-215	—	71,89 71,73	5,46 5,48	7,98 7,84
<b>10c</b>	9-Cl	3	42	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O 364,87	212-214	—	72,42 72,10	5,80 5,52	7,68 7,59
<b>11a</b>	10-Cl	1	50	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub> O 336,81	141-142	337,1102 337,1095	—	—	—
<b>11b</b>	10-Cl	2	56	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O 350,84	201-204	—	71,89 72,16	5,46 5,61	7,98 7,70
<b>11c</b>	10-Cl	3	45	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O 364,87	176-177	365,1415 365,1404	—	—	—
<b>12b</b>	9-Br	2	52	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> BrN <sub>2</sub> O 395,29	204-205	—	63,81 63,74	4,84 4,76	7,09 7,05

[a] Rendimento do produto recristalizado. [b] análise de massas de alta resolução realizada considerando [M + H]<sup>+</sup>. [c] C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O.H<sub>2</sub>O

### 3.4 Identificação Espectroscópica dos Compostos 9-12

#### 3.4.1 Identificação por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C

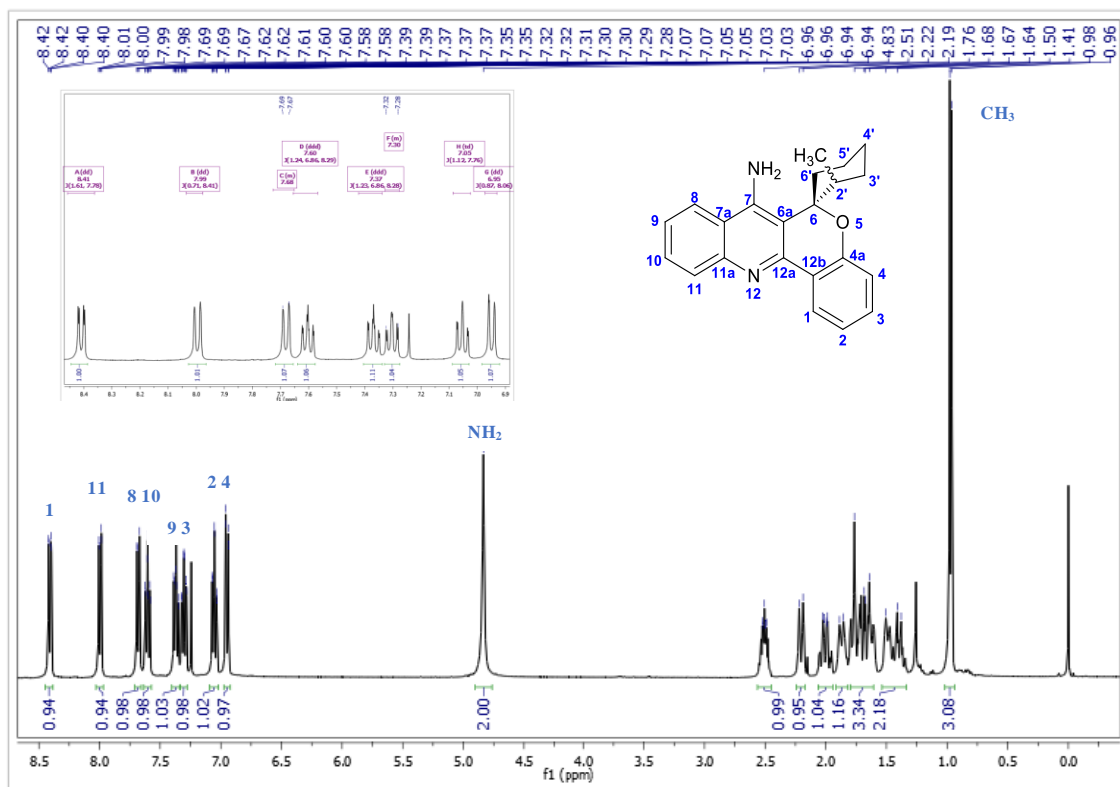
Os compostos **9-12** foram identificados por <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}, sendo os espectros registrados em CDCl<sub>3</sub> (**9a-g**) e em DMSO-*d*<sub>6</sub> (**10-12**), utilizando TMS como referência interna.

A atribuição dos sinais dos compostos **9-12** foi realizada com base na literatura e através da análise dos espectros de RMN bidimensional HSQC, HMBC e COSY.

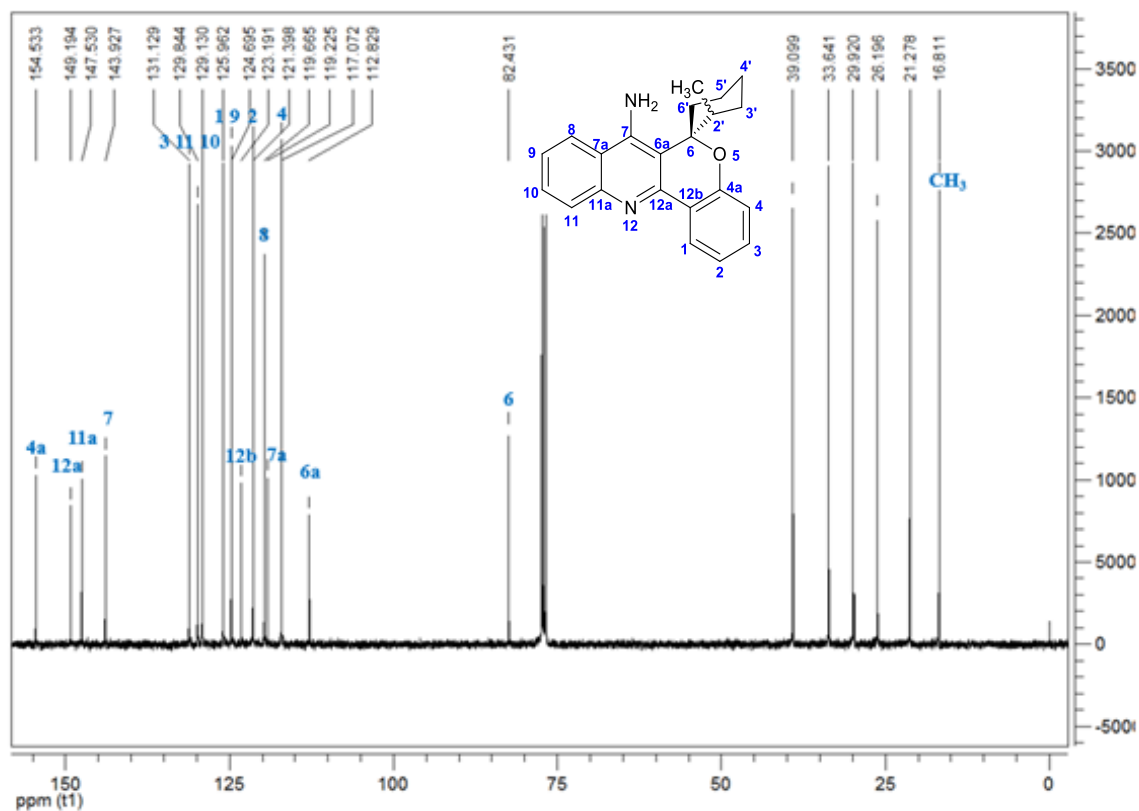
Os dados espectroscópicos, assim como a atribuição dos sinais de RMN de hidrogênio e carbono para os compostos **9-12** utilizará o composto **9d** como modelo, o qual teve seus espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  registrados em  $\text{CDCl}_3$  utilizando TMS como referência interna (**Figura 14 e 15**).

Assim, a partir do espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz para o 7-amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**), apresentado na **Figura 14**, observa-se: um duplo duplete em 8,41 ppm com constantes de acoplamento de 8 e 2 Hz correspondente ao hidrogênio 1 (H-1); um duplo duplete em 7,99 ppm com constantes de acoplamento de 8 e 0,7 Hz referente ao H-11; um duplete em 7,68 ppm com constante de acoplamento de 8 Hz correspondente ao H-8; um duplo duplo duplete em 7,66 ppm com constantes de acoplamento de 8, 7 e 1 Hz ao H-10; um multiplete em 7,35 – 7,39 ppm correspondente ao H-9; um multiplete em 7,28 -7,32 ppm referente ao H-3; um triplo duplete em 7,05 ppm com constantes de acoplamento de 8 e 1 Hz correspondente ao H-2; um duplo duplete em 6,95 ppm com constantes de acoplamento de 8 e 1 Hz referente ao H-4; um simpleto em 4,83 ppm referente aos hidrogênios do grupo amino; multipletos na região de 2,51 a 1,45 ppm correspondentes aos hidrogênios da porção espirocarbocíclica (H-6'2 a H-6'6) e um duplete em 1,02 com constante de acoplamento de 7 Hz referente aos hidrogênios da metila ligada ao C-6'4 (**Figura 14**).

Além dos sinais de RMN  $^1\text{H}$ , o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100,61 MHz para o 7-amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**), em  $\text{CDCl}_3$ , apresentado na **Figura 15**, mostra os seguintes sinais: 154,5 (C-4a); 149,2 (C-12a); 147,5 (C-11a); 143,9 (C-7); 131,1 (C-3); 129,8 (C-11); 129,1 (C-10); 125,9 (C-1); 124,7 (C-9); 123,2 (C-12b); 121,4 (C-2); 119,7 (C-8); 119,2 (C-7a); 117,1 (C-4); 112,8 (C-6a); 82,4 (C-6) (**Figura 15**). Os sinais em 39,1; 33,6; 29,9; 26,2; 21,3 ppm referem-se aos carbonos da porção espirocarbocíclica e o sinal em 16,8 ppm refere-se ao carbono da metila ligado ao carbono metílico C-6'4 (**Figura 15**).



**Figura 14.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz, 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**), em  $\text{CDCl}_3$ .

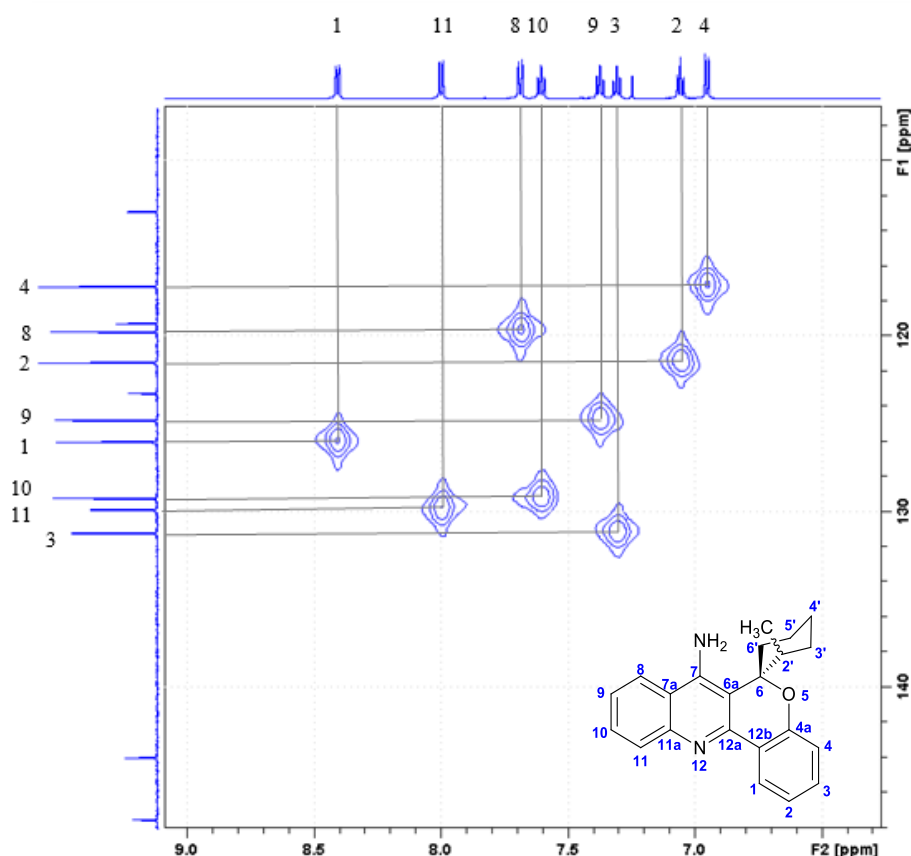


**Figura 15.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100,61 MHz, 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**), em  $\text{CDCl}_3$ .

É importante ressaltar que tanto no espectro de RMN  $^1\text{H}$  quanto no de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  dos compostos **9d-g** não há qualquer indício da presença de uma mistura de 2(dois) diastereoisômeros.

A atribuição dos deslocamentos químicos para o composto **9d** foi realizada com auxílio de RMN bidimensional HMQC, HMBC e COSY (Figuras 16-18, respectivamente). Os sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  referentes a porção espirocarbocíclica não foram atribuídos, pois os hidrogênios ligados aos carbonos 6'2 a 6'6 do anel espiro são diastereotópicos. Assim, esses hidrogênios formam multipletos na região de alta frequência do espectro de RMN  $^1\text{H}$  dificultando a atribuição precisa dos seus sinais.

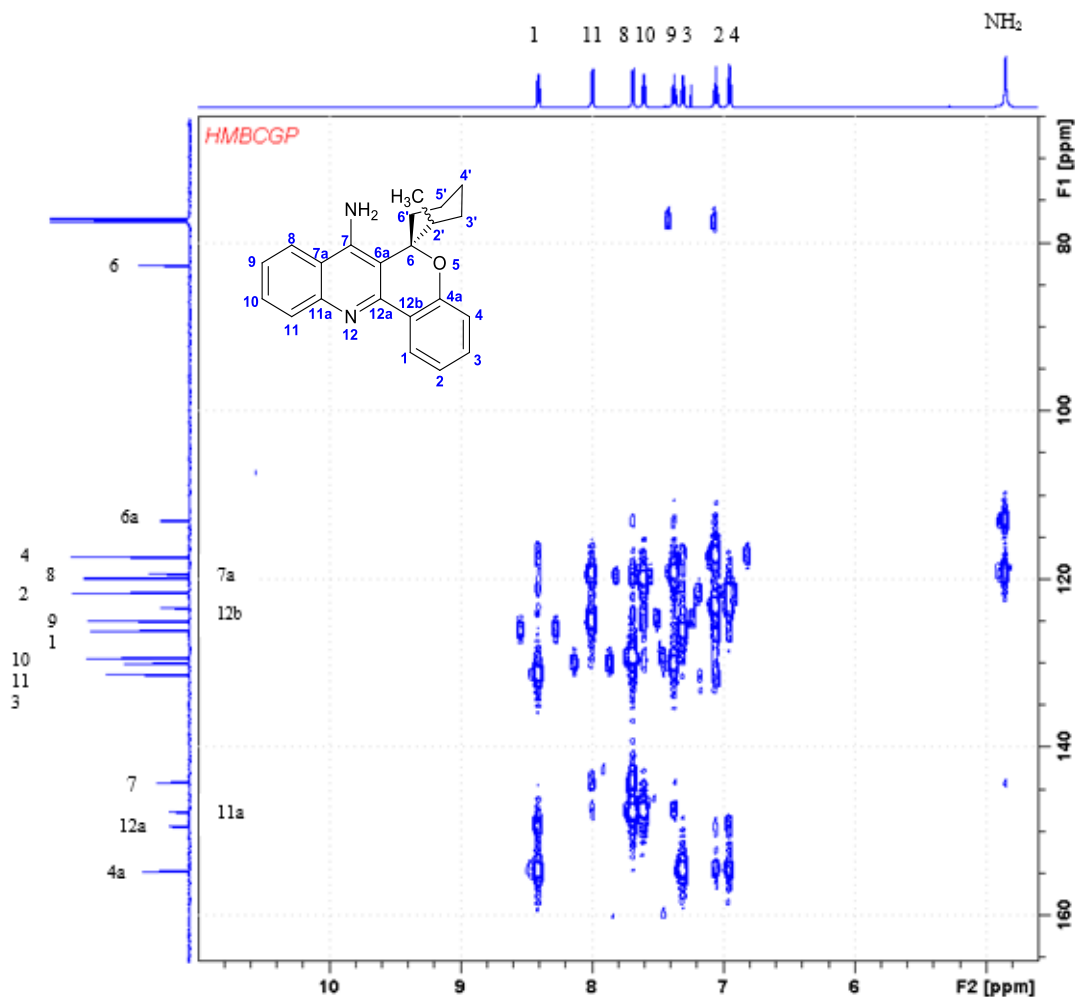
Na Figura 16 está representado o espectro de RMN bidimensional HMQC do composto **9d**. Os sinais de  $^1\text{H}$  foram atribuídos conforme a descrição da literatura e os carbonos hidrogenados foram atribuídos a partir do espectro de HMQC.<sup>45</sup>



**Figura 16.** Espectro de RMN bidimensional HMQC a 600 MHz de 7-amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**), em  $\text{CDCl}_3$  com ampliação na região dos carbonos aromáticos.

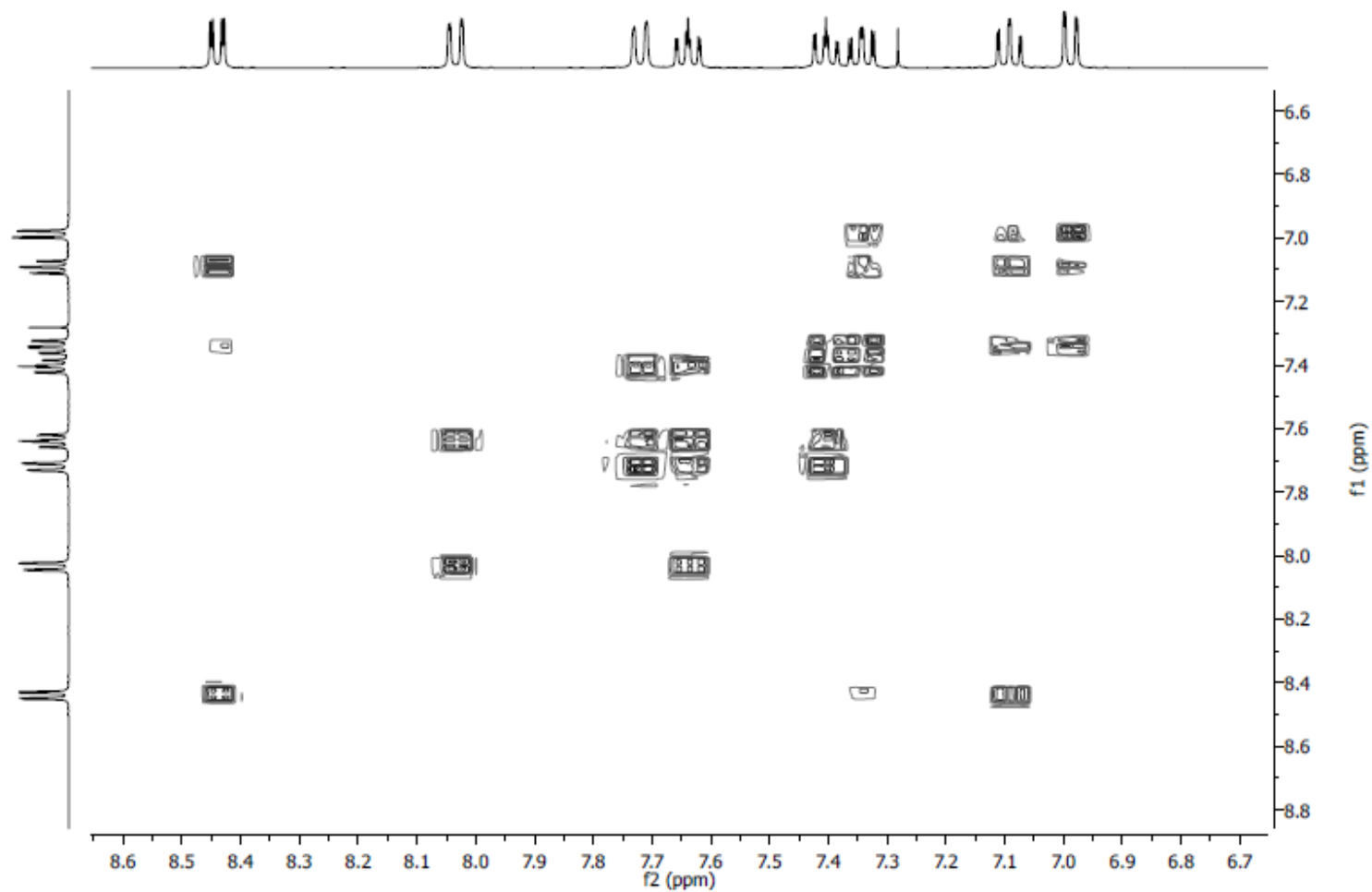
<sup>45</sup> Costa, J. S.; Pisoni, S. D.; Silva, B. C.; Petzhold, L. C.; Russowsky, D.; Ceschi, M. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1448.

Os carbonos não hidrogenados foram atribuídos a partir do espectro de RMN HMBC do composto **9d** (Figura 17). Os acoplamentos entre os hidrogênios do grupo amino e os carbonos C-6a e C-7a foram determinantes para a atribuição desses carbonos e dos demais carbonos não hidrogenados (Figura 17).



**Figura 17.** Espectro de RMN bidimensional HMBC a 600 MHz de 7-amino-2'-metil-espino[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**), em  $\text{CDCl}_3$  com ampliação na região dos carbonos aromáticos.

A fim de confirmar a correta atribuição dos sinais de RMN  $^1\text{H}$  foi realizado um espectro RMN COSY (Figura 18).



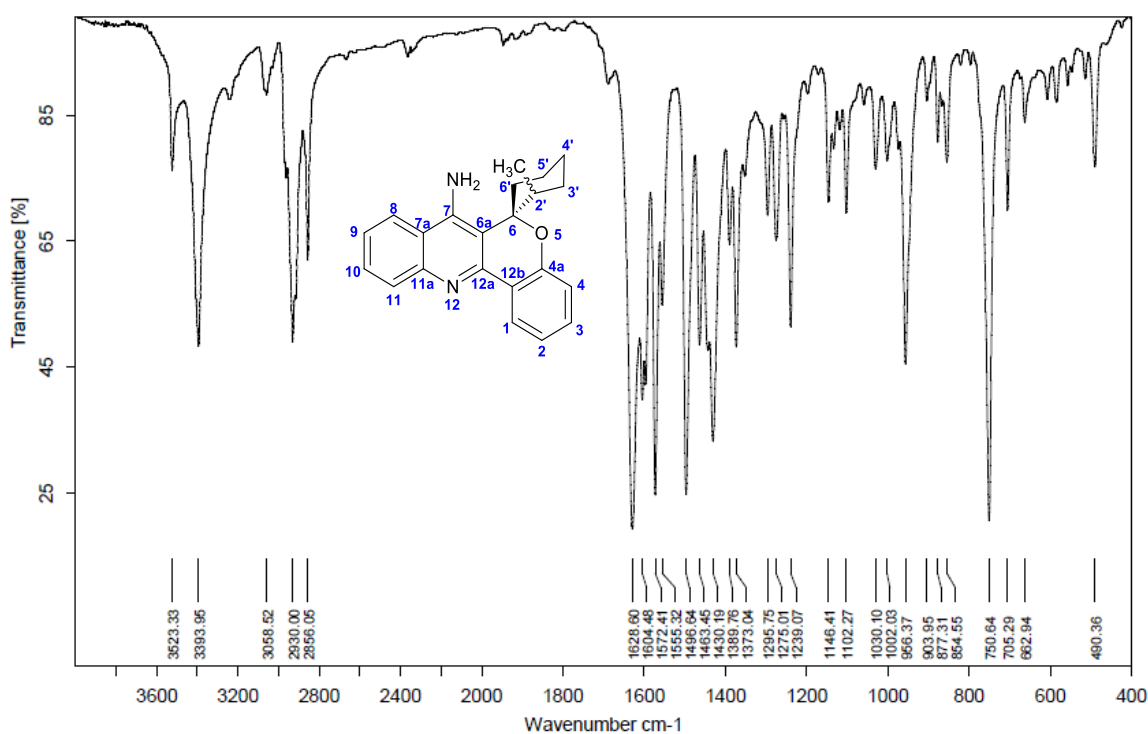
**Figura 18.** Espectro de RMN bidimensional COSY a 400 MHz de 7-amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**), em  $\text{CDCl}_3$  com ampliação na região dos carbonos aromáticos.



### 3.4.2 Identificação por espectroscopia no infravermelho (IR)

O composto **9d** também foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho (**Figura 19**).

No espectro IR do composto **9d**, o qual foi feito na forma sólida em pastilhas de KBr, observou-se as seguintes bandas: em 3523 e 3393  $\text{cm}^{-1}$  bandas referentes a deformação axial do grupo  $\text{NH}_2$ ; em 2930 e 2856  $\text{cm}^{-1}$  bandas referentes a deformação axial do C-H da porção espirocarbocíclica; em 1628  $\text{cm}^{-1}$  banda atribuída a deformação angular simétrica no plano do NH (**Figura 19**). A região entre 1628-400  $\text{cm}^{-1}$  apresentou várias bandas próximas dificultando a sua atribuição.



**Figura 19.** Espectro no Infravermelho na forma sólida em pastilhas de KBr de 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**).

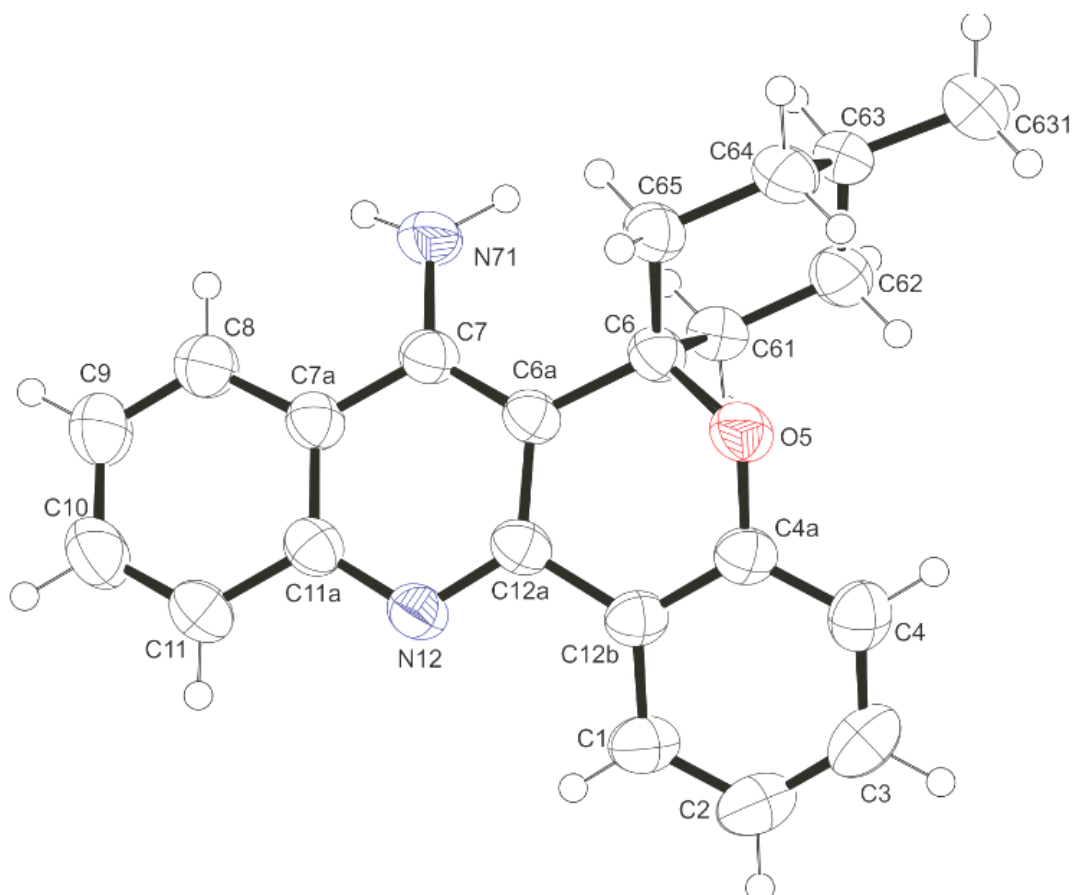
### 3.4.3 Difração de raios-X

Considerando que os compostos **9-12** são sólidos, a difração de raios-X em monocristal foi outra técnica utilizada na caracterização estrutural dessa série. A **Figura 20** mostra, como exemplo, o ORTEP para o composto **9f**. No **Anexo IV** estão os ORTEPs

e os dados cristalográficos para os compostos **9a**, **9b**, **9f**, **10a**, **12b**, além da investigação estrutural e supramolecular desses compostos.

A investigação estrutural dos compostos **9a**, **9f**, **10a**, **12b** mostra que o anel benzênico da quinolina é plano, o qual apresentou desvio do plano do r.m.s. de 0,0039; 0,0065; 0,0046 e 0,0157 Å nos compostos **9a**, **9f**, **10a** e **12b**, respectivamente. Ainda, o anel da piridina é menos plano que o benzênico, com desvios do plano do r.m.s. de 0,0364, 0,0433, 0,0320 e 0,0457 Å (**9a**, **9f**, **10a** e **12b**, respectivamente). O ângulo de torção C (8) -C (7A) -C (11A) -N (12) para os compostos **9a**, **9f**, **10a** e **12b**, é -179,0 (2), 176,4 (3), -179,6 (4) e -173,9 (2) ° mostrando que os anéis benzeno e piridina estão no mesmo plano.

Além disso, a investigação estrutural mostra que a porção espirocarbocíclica é formada por um cicloalcano, sendo um ciclopentano na conformação tipo envelope nos compostos **9a** e **10a**, e um ciclohexano em forma de cadeira nos compostos **9f** e **12b**. O composto **9f** apresenta uma metila na posição equatorial do ciclohexano da porção espirocarbocíclica (**Figura 20**).



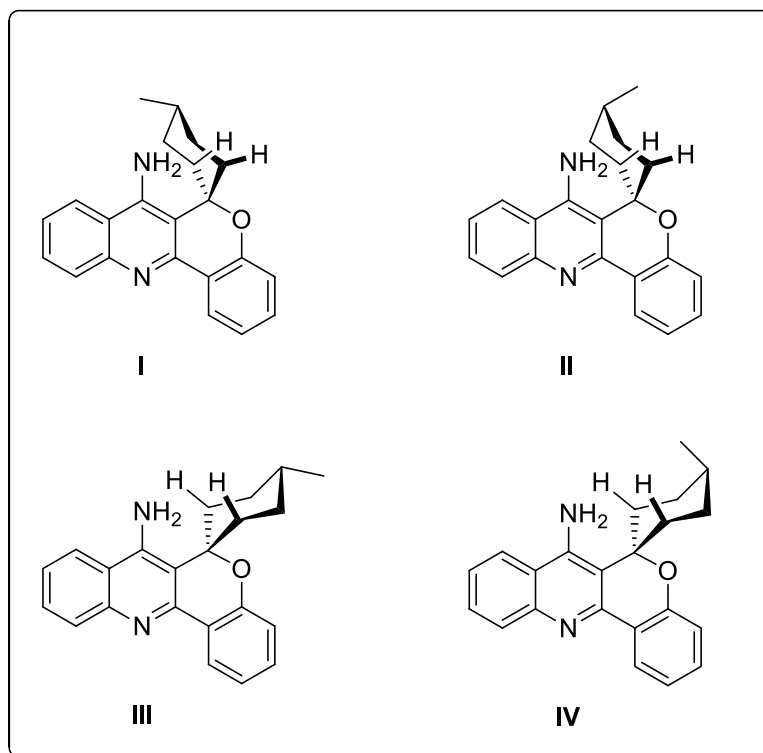
**Figura 20.** ORTEP de 7-Amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9f**) (CCDC995079).

### 3.5 Elucidação da estereoquímica dos compostos 9d-g

Conforme mostrado anteriormente, os compostos **4d-g** se apresentaram como um par de diastereoisômeros para cada caso, os quais se diferenciam pela configuração da porção espirocarbocíclica.

Entretanto, ao contrário dos precursores espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas (**4d-g**), os 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] (**9d-g**) derivados das reações de **4d-g** com a 2-amino-benzonitrila, não formaram misturas de diastereoisômeros como esperado. Isso pode ser evidenciado através das análises de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ( $\{^1\text{H}\}$ ), HMQC e HMBC mostradas anteriormente (**Figuras 14-18**). Portanto, sugere-se que a síntese dos compostos **9d-g** foi diastereosseletiva.

A **Figura 21** mostra uma análise mais detalhada para as 4(quatro) possíveis estruturas dos isômeros esperados nos compostos **9d-g**, as quais serão representados usando como modelo o composto **9f**.



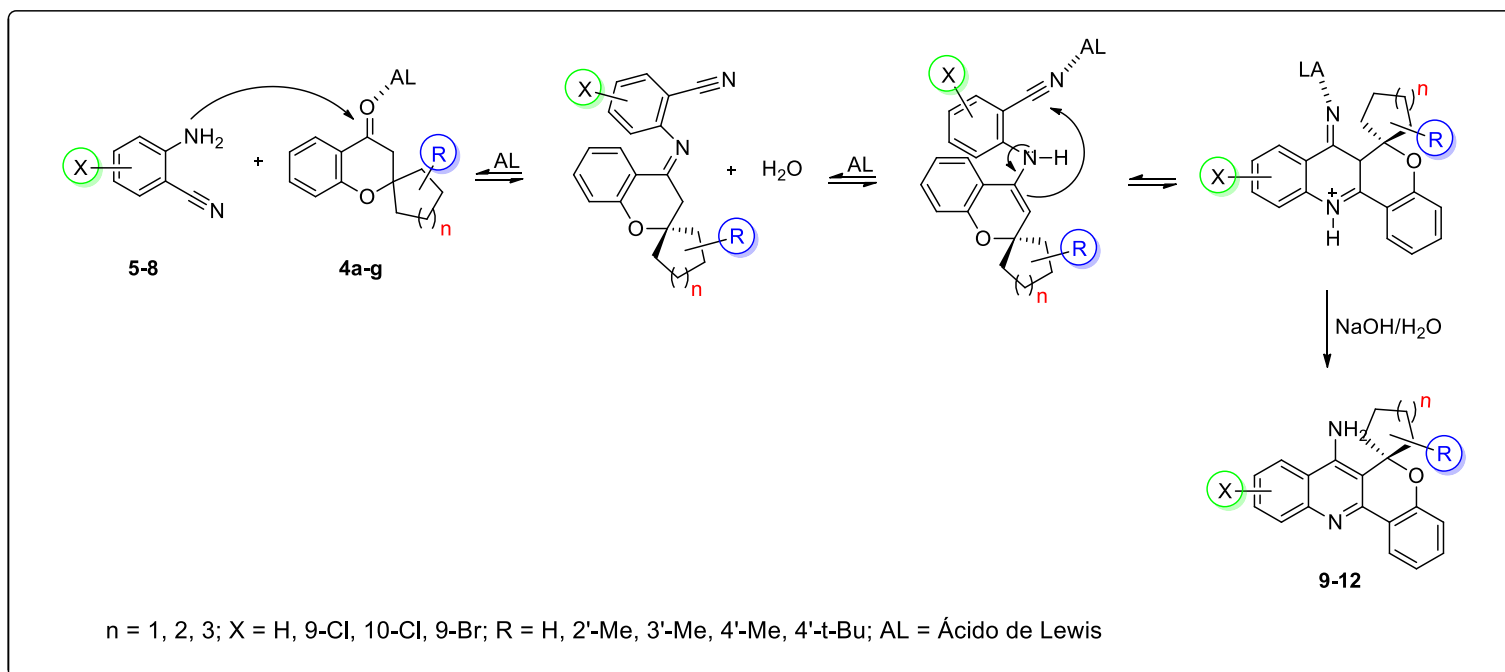
**Figura 21.** Representação das possíveis estruturas dos isômeros do composto 7-Amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9f**).

Das estruturas indicadas na **Figura 21**, as que possuem a porção espirocarbocíclica na configuração representada por **I** e **II** parecem ser menos estáveis, devido ao efeito estérico entre a porção espirocarbocíclica e o grupo amina, o que dificultaria sua formação. Além disso, estudos mostram que as conformações que tem substituintes na posição axial são menos estáveis dos que as que possuem substituintes na posição equatorial. Assim, a estrutura **III** parece ser a provável estrutura do único diastereoisômero formado para 7-amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9f**), a qual foi confirmada pela análise do ORTEP gerado pela difração de raios-X (**Figura 20**).

### 3.6 Mecanismo Geral para a Síntese dos Compostos 9-12

O mecanismo proposto, com base na literatura,<sup>45</sup> para a síntese dos compostos **9-12** sugere inicialmente, uma adição nucleofílica do grupo amina de **5-8** sobre o grupo carbonílico de **4a-g** formando uma imina que por sua vez, está em equilíbrio com uma enamina. Em seguida, a nitrila ativada sofre uma adição intramolecular da enamina e essa após hidrólise alcalina da origem aos compostos **9-12**.

#### Esquema 15



<sup>45</sup>Costa, J. S.; Pisoni S. D.; Silva, B. C.; Petzhold, L. C.; Russowsky, D; Ceschi, M. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1448.

### 3.7 Avaliação Biológica dos Compostos 9-12

Os compostos **9-12** foram avaliados quanto a atividade anti-colinérgica, citotóxica e foram realizados estudos complementares de *docking* molecular.

#### 3.7.1 Avaliação da atividade inibitória das enzimas AChE, BChE e estudo de *docking* molecular dos compostos 9-12

Visando a avaliação biológica dos compostos **9-12** foram realizados ensaios *in vitro* para determinação da atividade inibitória desses compostos sobre as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase purificadas e isoladas de *Electrophorus electricus* e *Equus ferus*, respectivamente (**Tabela 6**).

A avaliação da atividade inibitória dos compostos **9-12** seguiram o método de Ellman e foram descritos através dos valores de IC<sub>50</sub>. Esses ensaios foram realizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFSM com a colaboração do Prof. Dr. João B. T. da Rocha.

De acordo com os valores de IC<sub>50</sub> descritos na **Tabela 6**, os compostos **9-12** apresentaram atividade inibitória da enzima AChE inferior a tacrina, porém semelhante a galantamina, sendo que os compostos **9a** e **11a** foram os que apresentaram maior potencial de inibição entre os novos híbridos da tacrina.

De modo geral, os compostos com X = H (**9a-g**) apresentaram maior atividade inibitória da enzima AChE do que os compostos substituídos com X = 9-Cl, 10-Cl e 9-Br (**10-12**) e dentre os substituídos os que possuem o substituinte cloro na posição 10 são os que mais inibem a enzima AChE *in vitro*. Diversos estudos sobre o efeito da inserção de um halogênio no anel benzênico da tacrina e análogos demonstram que a presença de um átomo de cloro na posição que equivale a 10 dos compostos **9-12** deveria aumentar consideravelmente o potencial de inibição da AChE, o que não foi observado para os 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos].<sup>3,58</sup>

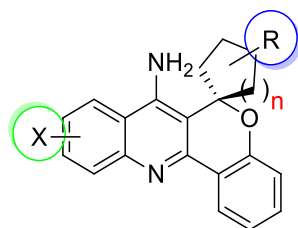
Porém, quando comparamos o potencial inibitório dos compostos **10a-c** (X = 9-Cl) e **11a-c** (X = 10-Cl), observamos que os compostos **11a-c**, em geral, apresentam maior atividade anti-AChE que os **10a-c**. Esse dado está em conformidade com a literatura.<sup>3,58</sup>

---

<sup>3</sup> Shutske, G. M.; Pierrat, F. A.; Kapples, K. J.; Cornfeldt, M. L.; Szwczak, M. R.; Huger, F. P.; Bores, G. M.; Haroutunian, V.; Davis, K. L. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1805.

<sup>58</sup> Proctor, R. G.; Harvey, L. A. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 295.

**Tabela 6.** Atividade inibitória dos compostos **9-12** sobre as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.

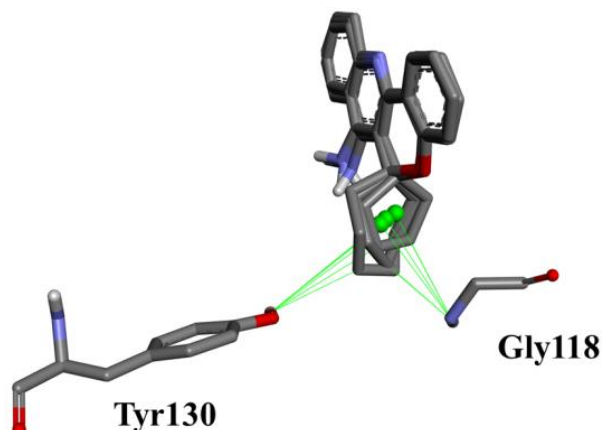


Composto	n	R	X	IC <sub>50</sub> <sup>[a]</sup> para AChE (μM)	IC <sub>50</sub> <sup>[b]</sup> para BChE (μM)
<b>9a</b>	1	H	H	3,60 ± 1,20	2,15 ± 1,4
<b>9b</b>	2	H	H	4,31 ± 1,32	5,55 ± 1,2
<b>9c</b>	3	H	H	8,28 ± 3,32	6,32 ± 1,2
<b>9d</b>	2	2'-Me	H	>25,0	>25,0
<b>9e</b>	2	3'-Me	H	5,38 ± 1,53	3,33 ± 1,2
<b>9f</b>	2	4'-Me	H	8,01 ± 1,26	16,04 ± 1,2
<b>9g</b>	2	4'- <i>t</i> -Bu	H	>25,0	>25,0
<b>10a</b>	1	H	9-Cl	23,7 ± 4,30	>25,0
<b>10b</b>	2	H	9-Cl	23,1 ± 3,41	>25,0
<b>10c</b>	3	H	9-Cl	>25	>25,0
<b>11a</b>	1	H	10-Cl	3,69 ± 0,51	9,93 ± 1,54
<b>11b</b>	2	H	10-Cl	14,3 ± 3,65	>25,0
<b>11c</b>	3	H	10-Cl	27,4 ± 2,84	>25,0
<b>12b</b>	2	H	9-Br	>25,0	7,90 ± 1,3
Tacrina	-	-	-	0,254 ± 0,008	0,0547 ± 0,022
Galantamina	-	-	-	3,12 ± 0,16	15,8 ± 3,60

<sup>[a]</sup>AChE de *Electrophorus electricus*; IC<sub>50</sub>, a concentração do inibidor que inibe 50% da AChE (média ± DP). <sup>[b]</sup>BChE de *Equus ferus*; IC<sub>50</sub>, concentração do inibidor que inibe 50% de BChE (média ± DP).

Além disso, observou-se que a atividade inibitória desses compostos diminui com o aumento da porção espirocarbocíclica. Esses resultados estão de acordo com o estudo de *docking* molecular, o qual descreve que quanto maior a porção espirocarbocíclica desses compostos maior o efeito estérico entre essa porção e os resíduos de Tyr130 e Gly118 dos subsítio aniônico e *oxyanion hole*, respectivamente da AChE (**Figura 22**). Uma possível explicação para esse resultado, seria que o aumento do efeito estérico diminui a capacidade de interação desses compostos com a enzima, diminuindo também a capacidade inibitória. Ainda, o estudo de *docking* molecular mostra que o composto **9a** interage com a enzima acetilcolinesterase nas mesmas regiões que a tacrina (**Figura 23**).

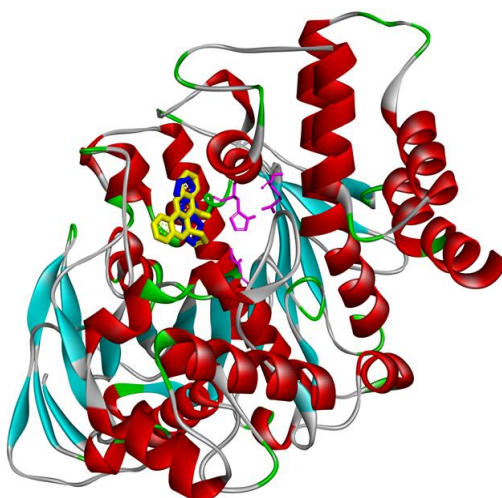
O estudo completo de *docking* molecular com os tipos de interações com a enzima e valores de energia livre de ligação ( $\Delta G$ ) dos compostos **9a-c** está no **Anexo V**.



**Figura 22.** Sobreposição dos compostos **9a**, **9b** e **9c**. As esferas verdes são os centroides de cada anel espiro e as linhas verdes suas respectivas distâncias. Os valores das distâncias podem ser vistos na **Tabela 7**.

**Tabela 7.** Comparação da distância (em Å) entre os carbonos inferiores do anel espiro e os hidrogênios polares dos resíduos Tyr130 e Gly118. \*A partir do centroide de anel.

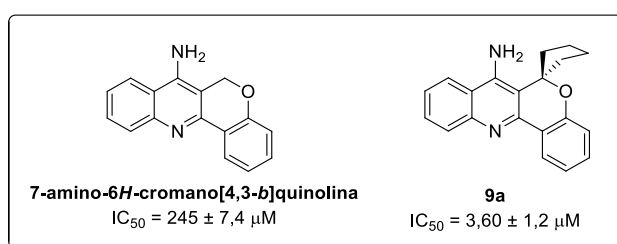
Resíduos	Composto		
	<b>9a</b>	<b>9b</b>	<b>9c</b>
Tyr130	4,29	3,89	3,30
Gly118	3,32	2,91	2,67
Tyr130*	5,44	5,10	4,80
Gly118*	4,04	4,04	3,99



**Figura 23.** Resultado do *docking* para o composto **9a** (em amarelo) que interage nas mesmas regiões da enzima AChE que a tacrina (em azul). A tríade catalítica (Ser200, Glu327 e His440) estão mostradas em rosa.



Por outro lado, Valenti e col.<sup>59</sup> sintetizaram uma série de análogos da tacrina e avaliaram o potencial de inibição da AChE e BChE. Dentre os compostos avaliados, a 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina foi a que apresentou maior valor de IC<sub>50</sub> para AChE (245 ± 7,4 μM). Como o potencial de inibição da AChE, em geral, diminui com o tamanho da molécula foi realizado um novo estudo de *docking* molecular comparativo entre os compostos **3a** e 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina (**Figura 24**), o qual sugere que esses compostos apesar de interagirem na mesma região da enzima, apresentam conformações distintas, sendo assim, apresentam diferentes afinidades para com a AChE. O estudo completo de *docking* molecular encontra-se no **Anexo V**.



**Figura 24.** Estrutura química dos compostos 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina e **9a**.

A avaliação biológica dos compostos **9a-g** sobre a inibição da enzima BChE seguiu o mesmo padrão da AChE (**Tabela 6**). O composto **9a** foi o que apresentou maior potencial de inibição da enzima BChE e também, a atividade anti-BChE dos compostos **9a-g** parece ser inversamente proporcional ao tamanho da porção espirocarbocíclica (**Tabela 6**).

### 3.7.2 Avaliação da citotoxicidade em células de leucócitos humanos

Tendo em vista, que a tacrina apresenta uma severa hepatotoxicidade via elevação dos níveis séricos de alanina aminotransferase, o que limitou o seu uso clínico, os compostos **9a-g** foram avaliados quanto a citotoxicidade em células de leucócitos humanos. Esses ensaios foram realizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFSM com a colaboração do Prof. Dr. João B. T. da Rocha.

As avaliações *in vitro* da citotoxicidade de 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] em leucócitos humanos foram realizadas em

<sup>59</sup> Valenti, P.; Rampa, A.; Bisi, A.; Andrisano, V.; Cavrini, V.; Fin, L.; Buriani, A.; Giusti, P. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2599

conformidade com os métodos descritos anteriormente na literatura.<sup>60,61</sup> O sangue venoso heparinizado foi obtido a partir de doadores voluntários saudáveis do Hospital da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil (idade 25-52 anos). O protocolo utilizado nesse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFSM (n. 089.0.243.000-07).

De acordo com os resultados obtidos para esses ensaios, a incubação dos leucócitos humanos com  $\text{NaN}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$  causou uma diminuição significativa da viabilidade celular ( $p < 0,01$ ), enquanto que a incubação com os compostos 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$  não modificaram a viabilidade celular (**Tabela 8**). A percentagem de células intactas após incubação com os compostos **9a-g** variou de  $89,60 \pm 2,67$  a  $96,81 \pm 0,29$  % indicando que 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] não apresentam citotoxicidade para esse tipo de célula. Entretanto, quando incubadas com o controle positivo ( $\text{NaN}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ ), a percentagem de células intactas diminuiu para  $69,30 \pm 1,26$  %. Portanto, esses novos híbridos sintéticos da tacrina não apresentam citotoxicidade em leucócitos humanos nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 8.** Efeito dos compostos **9a-g** na viabilidade de leucócitos humanos *in vitro*.

Concentração	Compostos / viabilidade celular (% de células intactas) <sup>[a]</sup>						
	<b>9a</b>	<b>9b</b>	<b>9c</b>	<b>9d</b>	<b>9e</b>	<b>9f</b>	<b>9g</b>
100 $\mu\text{M}$	94,87 $\pm 0,69$	95,57 $\pm 0,23$	96,81 $\pm 0,29$	96,69 $\pm 1,02$	96,40 $\pm 0,04$	95,06 $\pm$ 0,21	95,21 $\pm$ 0,29
200 $\mu\text{M}$	95,22 $\pm 1,03$	95,79 $\pm 0,57$	96,81 $\pm 0,29$	96,18 $\pm 0,59$	95,57 $\pm 0,48$	94,93 $\pm$ 0,15	89,60 $\pm$ 2,67
DMSO (0,5%)	96,52 $\pm$ 0,18	—	—	—	—	—	—
$\text{NaN}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$	69,30 $\pm$ 1,26 <sup>[b]</sup>	—	—	—	—	—	—

<sup>[a]</sup>Os resultados foram expressos como média + SEM (n = 3) realizados em duplicata.

<sup>[b]</sup>Utilizou-se  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,6 mM) +  $\text{NaN}_3$  como controle positivo.

<sup>60</sup> Bueno, D. C.; Meinerz, D. F.; Allebrandt, J.; Waczuk, E. P.; Santos, D. B.; Mariano, D. O. C.; Rocha, J. B. T.; *Bio Med Research International* **2013**, 1.

<sup>61</sup> Waczuk, E. P.; Kamdem, J. P.; Abolaji, A. O.; Meinerz, D. F.; Bueno, D. C.; Gonzaga, T. K. S. N.; Dorow, T. S. C.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Rocha, J. B. T.; Avila, D. S. *Toxicol. Res.*, **2015**, 4, 739.

### 3.7.3 Avaliação da atividade antitumoral contra o Glioblastoma dos compostos 9a-g

Considerando que diversos dados da literatura<sup>9, 30</sup> indicam que os heterociclos derivados de 6H-1-benzopirano[4,3-b]quinolinas apresentam atividade antitumoral, foram realizadas avaliações antitumorais dos compostos **9a-g** contra linhagens de células resistentes ao glioblastoma (SF295-R) e não resistente (SF295). Conforme os resultados obtidos, os compostos avaliados induziram a citotoxicidade em células de SF295 e SF295-R com CC<sub>50</sub> de aproximadamente 25 e 40 µM, respectivamente. Esses valores de CC<sub>50</sub> foram inferiores ao do fármaco temozolomida indicando que esses compostos apresentam maior atividade e seletividade que a temozolomida para esse tipo de célula.

Esse estudo faz parte da dissertação de mestrado da aluna Fernanda Nunes orientada pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Beatriz Creczynski Pasa – Universidade Federal de Santa Catarina, o qual foi um importante resultado para a continuidade desse trabalho. O resumo desse estudo encontra-se no **Anexo VI** e até o presente momento foi publicado no XVIII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology - São Paulo, Brazil, July 13th to 16th, 2016.

### 3.8 Reações de derivatização dos compostos 9-12

A fim de estudar a reatividade e potencializar a bioatividade dos compostos **9-12** foram realizadas diversas reações de derivatização desses compostos.

#### 3.8.1 Síntese de dímeros dos compostos 9a-e

Tendo em vista que a formação de dímeros da tacrina aumentam consideravelmente a atividade anti-AChE,<sup>32, 33</sup> tentou-se sintetizar dímeros dos compostos **9a-e** (**Esquema 3**). A metodologia utilizada para síntese desses novos dímeros foi baseada na literatura<sup>33</sup> e as reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD). Os resultados obtidos estão na **Tabela 9**, os quais mostram que a reação não ocorre sob várias condições reacionais. Assim, não foi possível obter uma metodologia para a síntese de dímeros dos compostos **9a-e**.

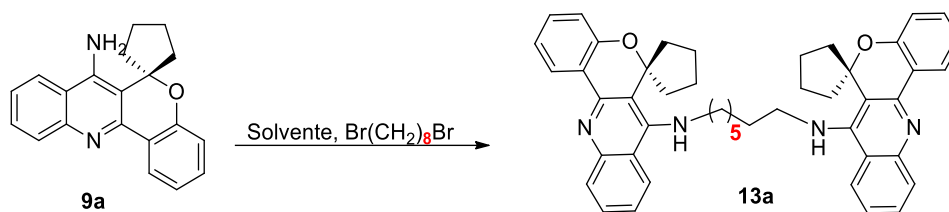
---

<sup>9</sup> Mulakayala, N.; Rambabu, D.; Raja, M. R.; Chaitanya, M.; Kumar, C. S.; Kalle, A. M.; Krishna, G. R.; Reddy, C. M.; Basaveswara Rao, M. V.; Pal, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 759.

<sup>30</sup> Li, T-L.; Guo, H-F.; Li, F-J.; Sun, Z-G.; Zhang, H-C. *Bangladesh. J. Pharmacol.* **2015**, *10*, 660.

<sup>32</sup> Pang, Y. -P.; Kozikowski, A. P. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 669

<sup>33</sup> Pang, Y. -P.; Hong, F.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Brimjoiijn, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 171.

**Tabela 9.** Condições reacionais testadas para síntese do composto **13a**.

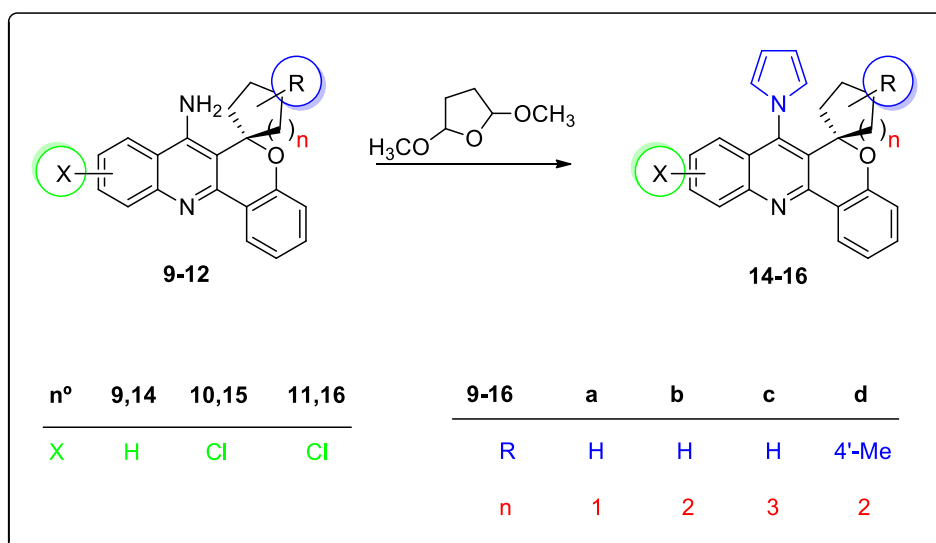
Reação <sup>[a]</sup>	Base	Solvente	T (°C)	Tempo (h)	Rendimento <sup>[b]</sup> (%)
1	KOH	DMSO	25	14	0
2	KOH	Acetona	60	14	0
3	NaOH	DMSO	25	14	0
4	NaOH	DMSO	25	24	0
5	NaOH	THF	66	14	0
6	NaOH	Acetona	60	24	0

<sup>[a]</sup>Testes utilizando 0,25 mmol de 1,8-dibromooctano, 0,5 mmol de **9a**, 1 mmol de base e 5 mL de solvente, conversão acompanhada por CCD. <sup>[b]</sup>Rendimento do produto isolado.

### 3.8.2 Síntese de 7-(1*H*-pirrol-1-il)espiro[chromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-cicloalcanos] (**14-16**)

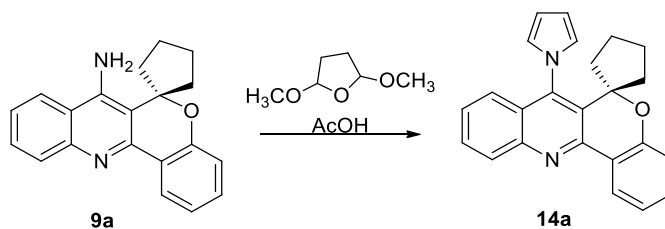
Tendo em vista, potencializar a atividade antitumoral dos compostos **9-11** optou-se por fazer a inserção de um pirrol nessas moléculas.

As 7-(1*H*-pirrol-1-il)espiro[chromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-cicloalcanos] foram obtidas através de uma reação de Clauson-kass em ácido acético glacial (**Esquema 16**).

**Esquema 16.**

Visando determinar as condições reacionais ideais para obtenção dos compostos **14-16**, optou-se por estudar a síntese do composto **14a**. Com base em procedimentos experimentais descritos na literatura, foram realizados testes onde foram variados o volume de ácido acético e o tempo reacional (**Tabela 10**)

**Tabela 10.** Otimização de condições reacionais para a síntese de 7-(1*H*-pirrol-1-il)espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclopentano].



Entrada <sup>[a]</sup>	Volume <sup>[b]</sup> (mL)	Tempo	Rendimento <sup>[c]</sup> (%)
1	5	6	40-50
2	5	24	52
3	2,5	24	50-60
4	3,5	24	70
5	3,5	48	78

<sup>[a]</sup>Testes utilizando 0,5 mmol de **9a** e 1 mmol de 2,5-dimetoxitetrahydrofurano; Conversão acompanhada por CCD. <sup>[b]</sup>Volume de CH<sub>3</sub>COOH (mL). <sup>[c]</sup>Rendimento do produto isolado.

Conforme mostra a **Tabela 10**, a variação do volume de ácido acético glacial altera o rendimento da reação, sendo o volume de 3,5 mL o ideal para a reação de formação do composto **14a**.

Além do volume de solvente, modificou-se o tempo reacional onde obteve-se um rendimento de 78 %, considerado satisfatório para esse sistema impedido, em 48 horas.

Assim, após otimização das condições reacionais para obtenção do composto 7-(1*H*-pirrol-1-il)espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclopentano] (**14a**) foram sintetizados os compostos **14a-d**. Posteriormente, visando aumentar o escopo reacional e potencializar a possível atividade antitumoral desses compostos com a inserção do átomo de cloro nas posições 9 e 10, sintetizou-se os compostos **15-16**.

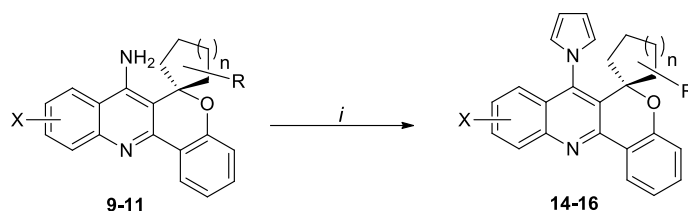
A seguir, será apresentado e discutido a purificação dos compostos **9-12**.

### 3.8.3 Purificação das 7-(1*H*-pirrol-1-il)espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-cicloalcanos]

Os compostos **14-16**, depois de serem isolados do meio reacional com acetato de etila foram purificados por cromatográfica em coluna de sílica gel e eluídos em hexano/acetato de etila (99:1). Esses compostos apresentaram-se como sólidos estáveis ao ar.

Após, foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ }, difração de raios-X, ponto de fusão, massa de alta resolução e análise elementar. A **Tabelas 11** mostra o rendimento, ponto de fusão, massa de alta resolução e análise elementar dos compostos **14-16**.

**Tabela 11.** Propriedades físicas e rendimentos dos compostos **14-16**.<sup>[a]</sup>



Comp.	n	R	X	Rend. (%) <sup>[b]</sup>	Fórmula/Massa Molecular (g/mol)	Ponto de fusão (°C)	Análise Elementar (%)		
							Cal./Experim.	C	H
<b>14a</b>	1	H	H	78	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O (352,42)	146-147	81,69 81,16	5,72 5,92	7,95 7,71
<b>14b</b>	2	H	H	56	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O (366,45)	180-182	81,94 81,79	6,05 6,13	7,64 7,53
<b>14c</b>	3	H	H	53	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O (380,48)	149-150	82,07 81,96	6,36 6,49	7,36 7,13
<b>14d</b>	2	4'-Me	H	56	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O (380,48)	176-177	82,07 81,80	6,36 6,60	7,36 7,15
<b>15a</b>	1	H	9-Cl	62	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O (386,87)	150-152	74,51 74,27	4,95 5,49	7,24 6,64
<b>15b</b>	2	H	9-Cl	52	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O (400,90)	165-167	74,90 74,68	5,28 5,51	6,99 6,74
<b>15c</b>	3	H	9-Cl	73	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O (414,93)	171-173	75,25 75,25	5,88 5,59	6,49 6,75
<b>16a</b>	1	H	10-Cl	65	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O (386,87)	171-173	74,51 74,71	4,95 5,53	7,24 6,71
<b>16b</b>	2	H	10-Cl	62	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O (400,90)	223-225	74,90 74,88	5,28 5,46	6,99 6,77
<b>16c</b>	3	H	10-Cl	60	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O (414,93)	189-190	75,25 75,21	5,88 5,75	6,49 6,59

<sup>[a]</sup>*i* = 2,5-dimetoxitetrahydrofurano, CH<sub>3</sub>COOH, 90 °C, 48 h. <sup>[b]</sup>Rendimento do produto isolado.

O rendimento dos compostos **14-16** variaram de 52 – 78%, sendo dentre esses, o composto **14a** foi o que apresentou maior rendimento (**Tabela 11**). De modo geral, os rendimentos diminuem com o aumento da porção espirocarbocíclica, isso sugere que essa porção dificulta a formação do pirrol através do efeito estérico.

### 3.8.3 Identificação espectroscópica dos compostos 14-16

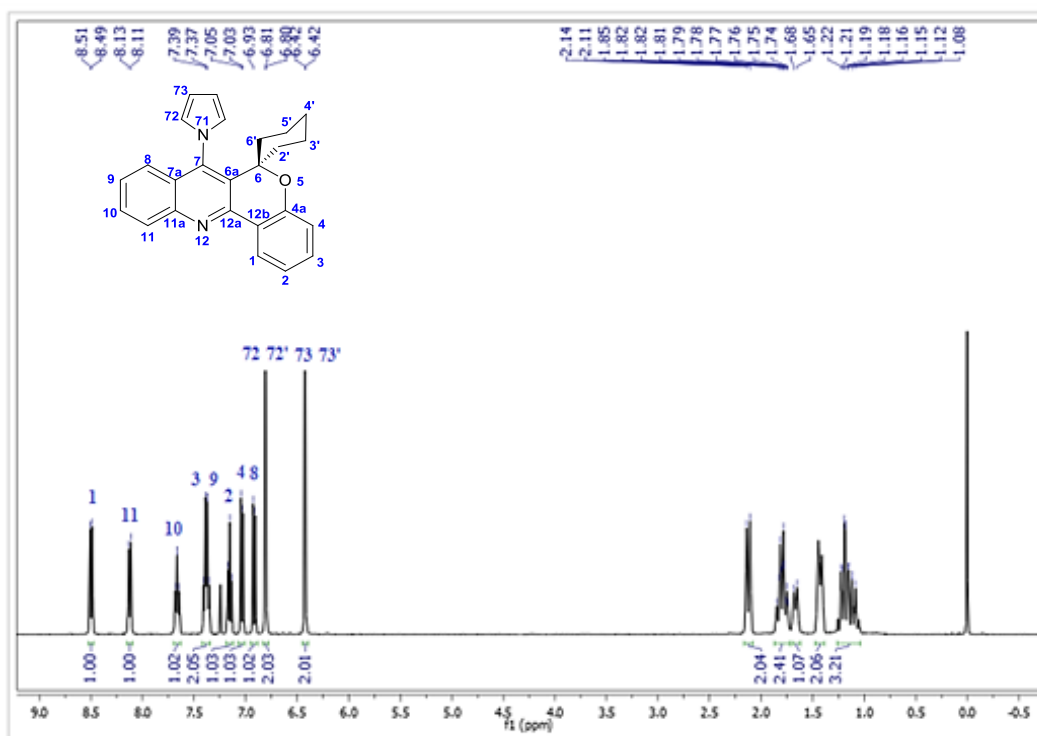
Os 7-(1*H*-pirrol-1-il)espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-cicloalcanos] (**14-16**) foram identificadas por  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ }, os espectros foram registrados em  $\text{CDCl}_3$  utilizando TMS como referência interna.

A atribuição dos sinais dos compostos **14-16** foi realizada com base na literatura e através da análise dos dados espectroscópicos dos precursores **9-11**.

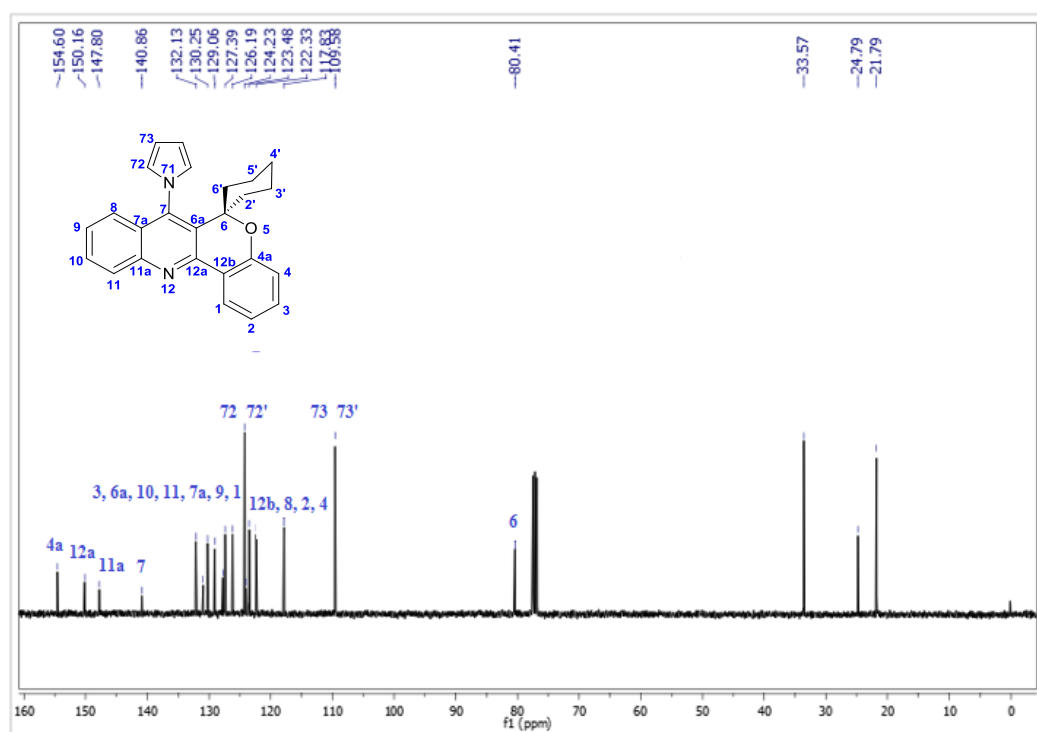
Os dados espectroscópicos, assim como a atribuição dos sinais de RMN de hidrogênio e carbono dos compostos **14-16** será representada pelo composto **14b**, sendo que os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram registrados em  $\text{CDCl}_3$  utilizando TMS como referência interna (**Figuras 25 e 26**, respectivamente).

Assim, de acordo com o espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz de 7-(1*H*-pirrol-1-il)espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclohexano] (**14b**) observa-se: um duplete em 8,50 ppm com constante de acoplamento de 8 Hz referente ao hidrogênio 1; um duplete em 8,12 Hz com constante de acoplamento de 8 Hz correspondente ao H-11; um tripleto em 7,66 com constante de acoplamento de 7 Hz referente ao H-10; um multipletto entre 7,35 e 7,41 correspondente ao H-3 e H-9, respectivamente; um tripleto em 7,15 com constante de acoplamento de 7 Hz referente ao H-2; um duplete em 7,04 com constante de acoplamento de 8 Hz correspondente ao H-4; um duplete em 6,92 com constante de acoplamento de 8 Hz referente ao H-8; um multipletto em 6,79 - 6,81 correspondente aos hidrogênios 72 e 72' do pirrol; um multipletto em 6,41 - 6,44 referente aos hidrogênios 73 e 73' do pirrol; multiplettos na região de 1,05 a 2,12 correspondentes aos hidrogênios da porção espirocarbocíclica (H-6'2 a H-6'6) (**Figura 25**).

Além dos sinais de RMN  $^1\text{H}$ , o composto **14b** apresenta os seguintes sinais de RMN  $^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } a  $\delta$ : 154,6 (C-4a); 150,2 (C-12a); 147,8 (C-11a); 140,9 (C-7); 132,1 (C-3); 131,0 (C-6a); 130,2 (C-10); 129,1 (C-11); 127,8 (C-7a); 127,4 (C-9); 126,2 (C-1); 124,2 (C-72 e C-72'); 124,0 (C-12b); 123,5 (C-8); 122,3 (C-2); 117,8 (C-4); 109,6 (C-73 e C-73'); 80,4 (C-6). Os sinais em 33,6; 24,8; 21,8 ppm correspondem aos carbonos da porção espirocarbocíclica (**Figura 26**).



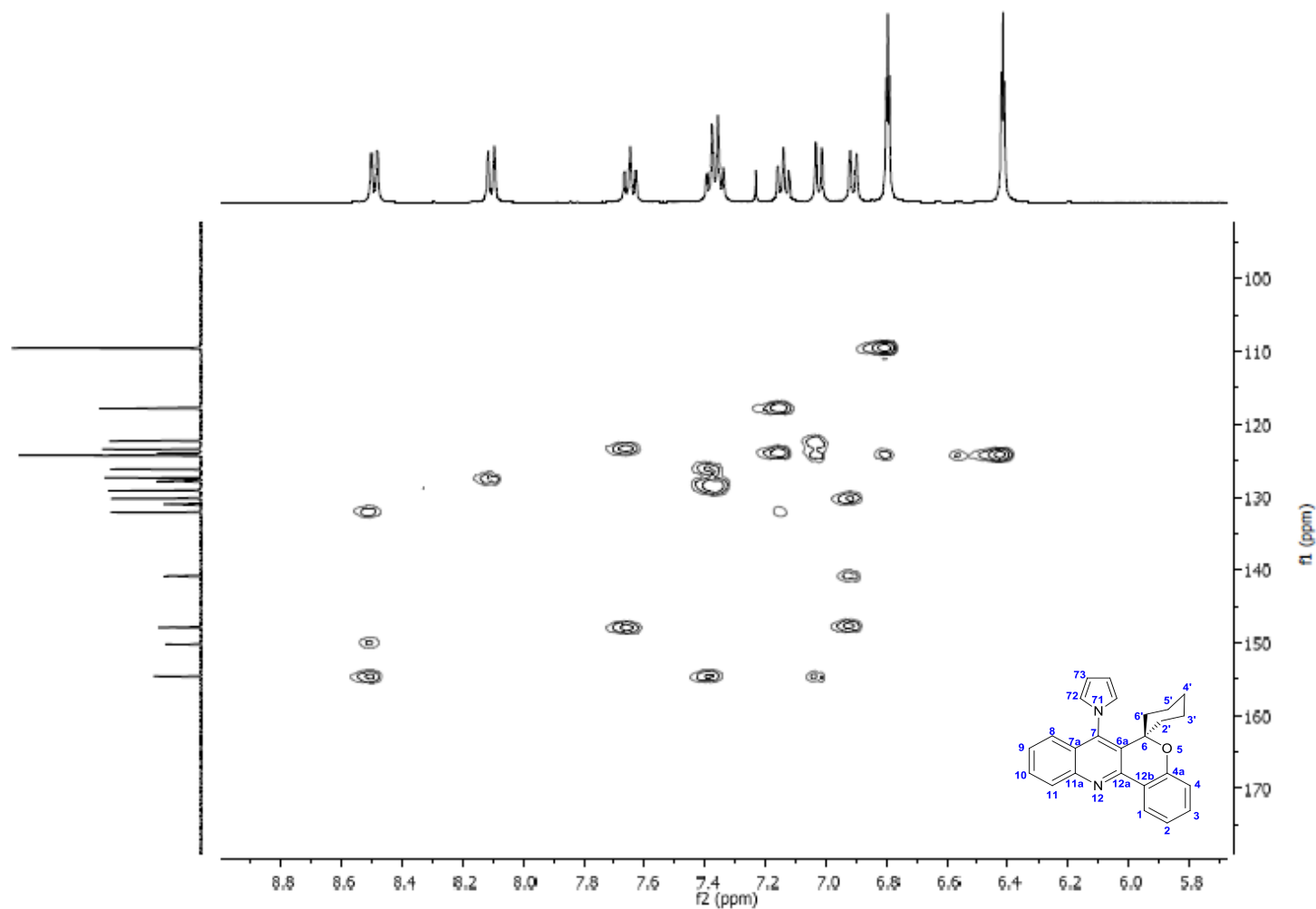
**Figura 25.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H a 400 MHz de 7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**14b**), registrados em CDCl<sub>3</sub>.



**Figura 26.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} a 100, 61 MHz de 7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**14b**), registrados em CDCl<sub>3</sub>.



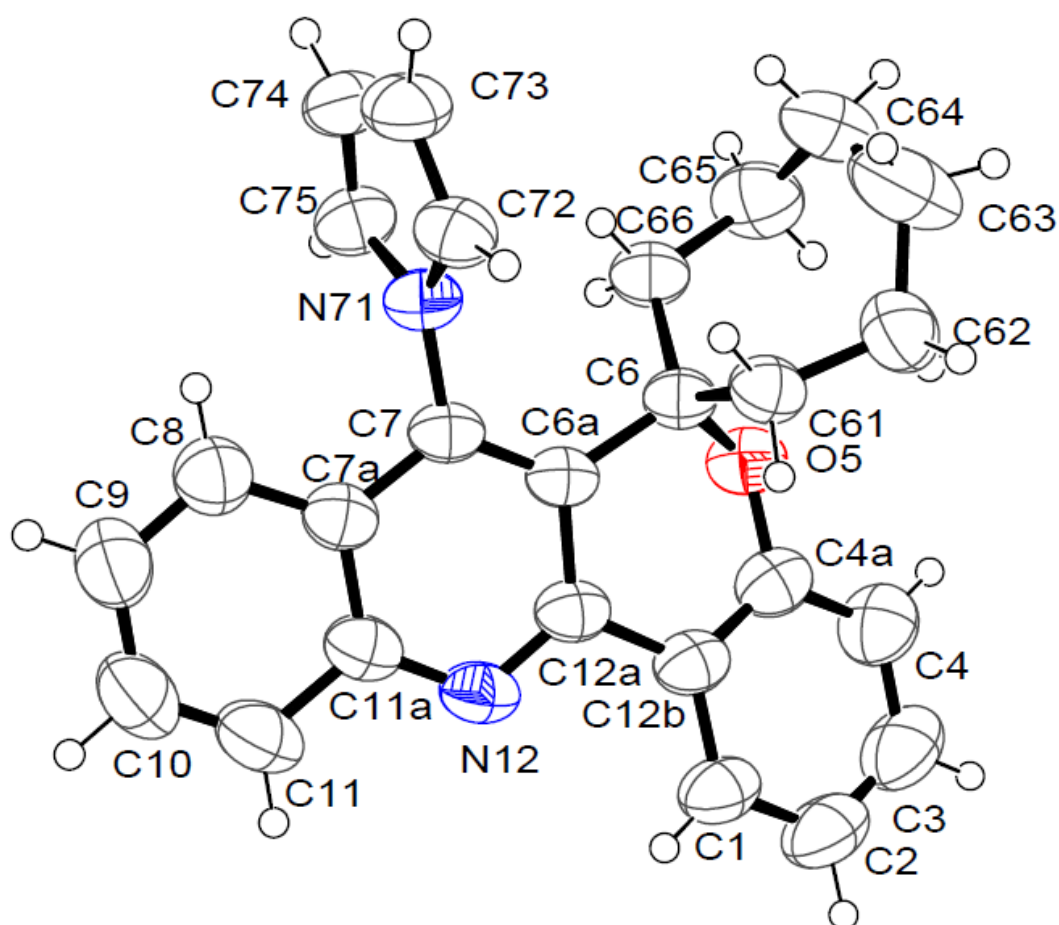




**Figura 28.** Espectro de RMN bidimensional HMBC a 400 MHz de 7-(1*H*-pirrol-1-il)espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclohexano] (**14b**), em  $\text{CDCl}_3$  com ampliação na região dos carbonos aromáticos.

### 3.8.4 Difração de raios-X

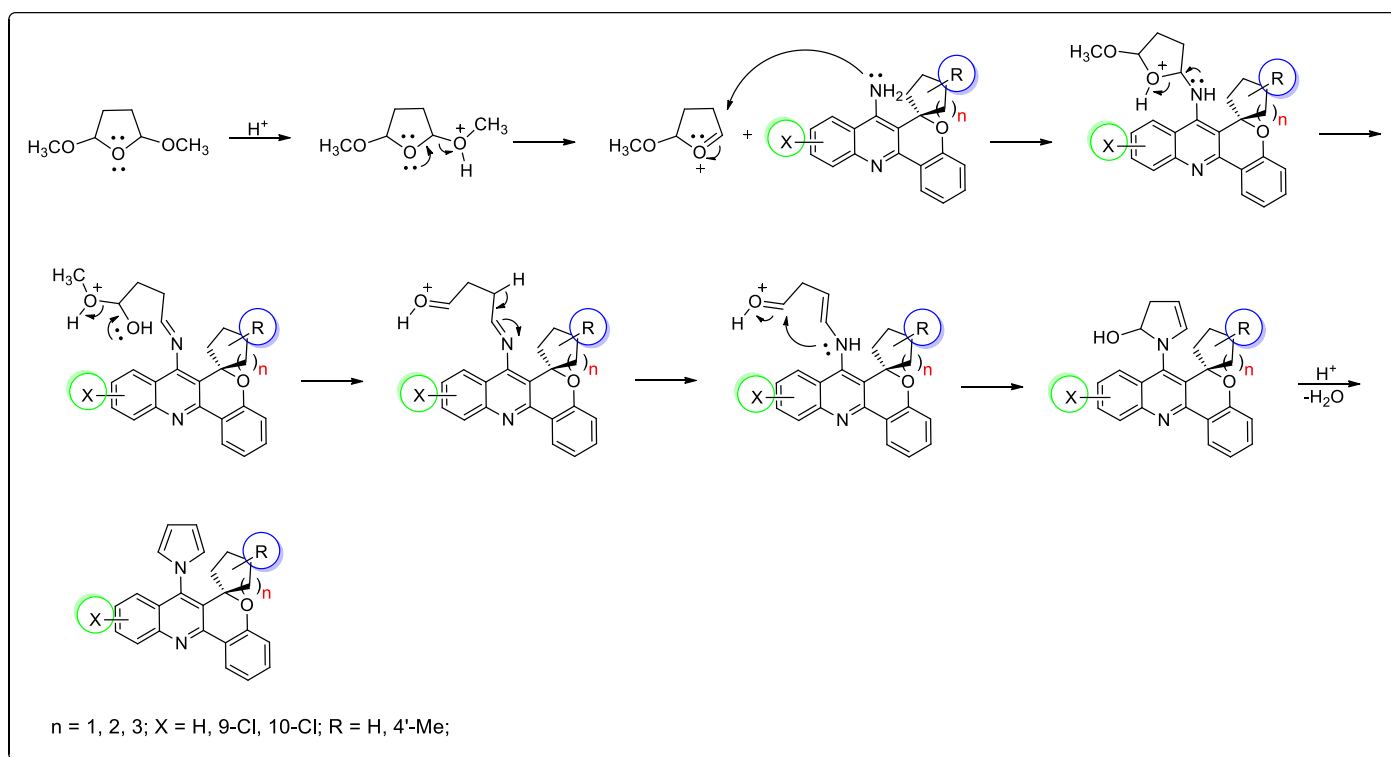
Complementando a caracterização dos compostos **14-16**, realizou-se a determinação estrutural por difração de raios-X em monocristal da 7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloheptano] (**14c**). O ORTEP desse composto está na **Figura 29** e os dados cristalográficos estão no **Anexo IV** dessa tese.



### 3.8.5 Mecanismo geral para síntese dos compostos 14-16

O **esquema 17** mostra o mecanismo proposto com base na literatura<sup>54</sup> para formação das 7-(1*H*-pirrol-1-il)espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-cicloalcanos].

**Esquema 17.**



<sup>54</sup> Zhang, X.; Shi, J. *Tetrahedron*. **2011**, *67*, 898.

### 3.8.6 Avaliação biológica dos compostos 14-16

Os compostos **14-16** foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana e antitumoral. Os testes antimicrobianos foram realizados no Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFSM com a colaboração do Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, enquanto que os ensaios antitumorais foram realizados no Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFSC em parceria com a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tania Beatriz C. Pasa.

#### 3.8.6.1 Atividade antimicrobiana *in vitro*

A atividade antimicrobiana do composto **14b** foi avaliada contra bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), fungos (*Candida albicans* ATCC 24433, *Candida dubliniensis* ATCC 646, *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *Aspergillus flavus*) e alga (*Prototheca zopfii*).

O composto **14b** não apresentou atividade antibacteriana nas concentrações de 1600; 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 µg/mL, sendo que a concentração inibitória mínima (CIM) desse composto para todos os tipos de bactérias testadas foi maior que 1600 µg/mL.

Ainda, o mesmo composto também não apresentou atividade antifúngica nas concentrações de 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56 µg/mL, apresentando CIM > 800 µg/mL para todos os tipos de fungos testados e também para a alga.

O estudo completo da atividade antimicrobiana do composto **14b** está no **Anexo VII**.

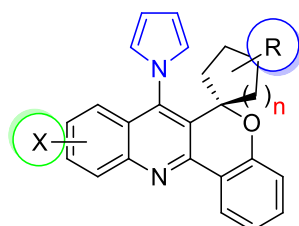
#### 3.8.6.2 Atividade antitumoral dos compostos 14-16

Os compostos **14-16** foram submetidos a avaliação citotóxica na linhagem tumoral (SF295, glioblastoma) e não tumoral (HUVEC, endotélio de veias do cordão umbilical). Conforme mostra a **tabela 12**, onde estão representados os valores de CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica para 50% das células) dos compostos testados, somente o composto **14a** apresentou atividade antitumoral contra o glioblastoma, entretanto esse composto

também apresentou citotoxicidade para a linhagem não tumoral (HUVEC). Contudo, outras linhagens celulares tumorais deveriam ser testadas para uma avaliação completa, visto que essas moléculas podem ser seletiva para alguma linhagem específica.

O estudo completo sobre a avaliação antitumoral desses compostos está no **Anexo VIII**.

**Tabela 12.** Citotoxicidade dos compostos **14-16** na linhagem tumoral (SF295) e não tumoral (HUVEC).



Compostos	CC <sub>50</sub> (μM) <sup>[a]</sup>	
	SF295	HUVEC
Controle	>100	>100
<b>14a</b>	39	28
<b>14b</b>	>100	>100
<b>14c</b>	>100	>100
<b>14d</b>	>100	>100
<b>15a</b>	>100	>100
<b>15b</b>	>100	>100
<b>15c</b>	>100	>100
<b>16a</b>	>100	>100
<b>16b</b>	>100	>100
<b>16c</b>	>100	>100

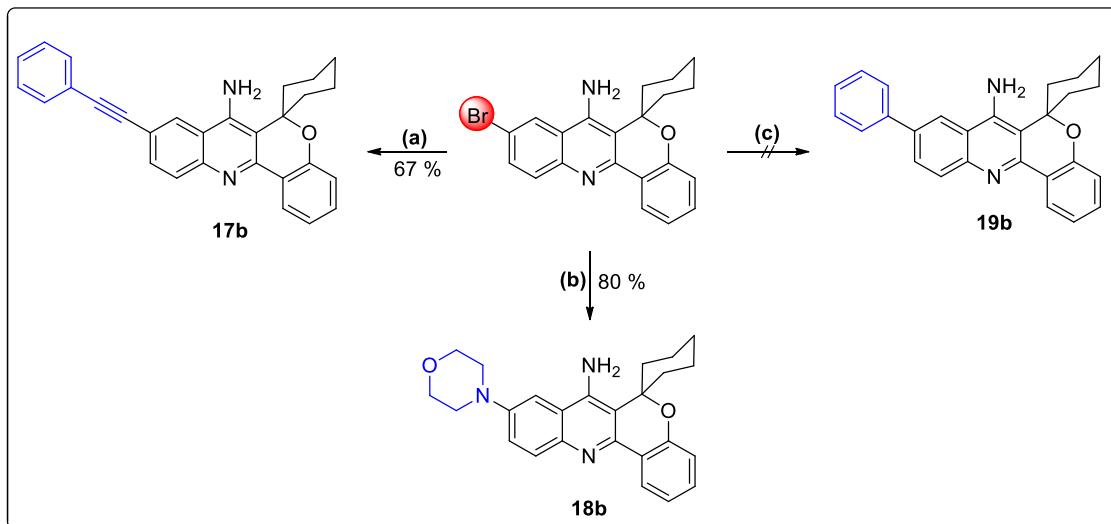
<sup>[a]</sup>O valor de CC<sub>50</sub> foi calculado através do programa GraphPad Prism (n = 3).

### 3.9 Reações de acoplamento C-C e C-N

A fim de mostrar as possíveis aplicabilidades para a síntese de moléculas mais complexas a partir de exemplar, foram realizadas reações de acoplamento C-C e C-N dos tipos Sonogashira, Suzuki-Myaura e Buchwald-Hartwig para o composto 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinoxalina-6,1'-ciclohexano] bromo substituído (**12b**).

As reações representadas no **Esquema 18** mostram que foi possível realizar reações de acoplamento C-C e C-N do tipo Sonogashira e Buchwald-Hartwig envolvendo o composto **12b** e reagentes apropriados. Os compostos **17b** e **18b** foram obtidos com rendimentos de 67 e 80 %, respectivamente. Ainda, não foi possível obter o composto **19b** pela metodologia mostrada no **Esquema 18**.

**Esquema 18.** Reagentes e condições: **(a)** Etililbenzeno (0,64 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (2 mol%), PPh<sub>3</sub> (6 mol%), CuI (2 mol%), TEA (0,6 mL), DMF, 60 °C, 16 h; **(b)** morfolina (0,75mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (2 mol%), XPhos (4 mol%), NaOtBu (0,5 mmol), tolueno, 100 °C, 24h; **(c)** Ácido fenilborônico (0,75 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (2 mol%), XPhos (4 mol%), TEA (0,75 mL), tolueno, 100 °C, 16 h.

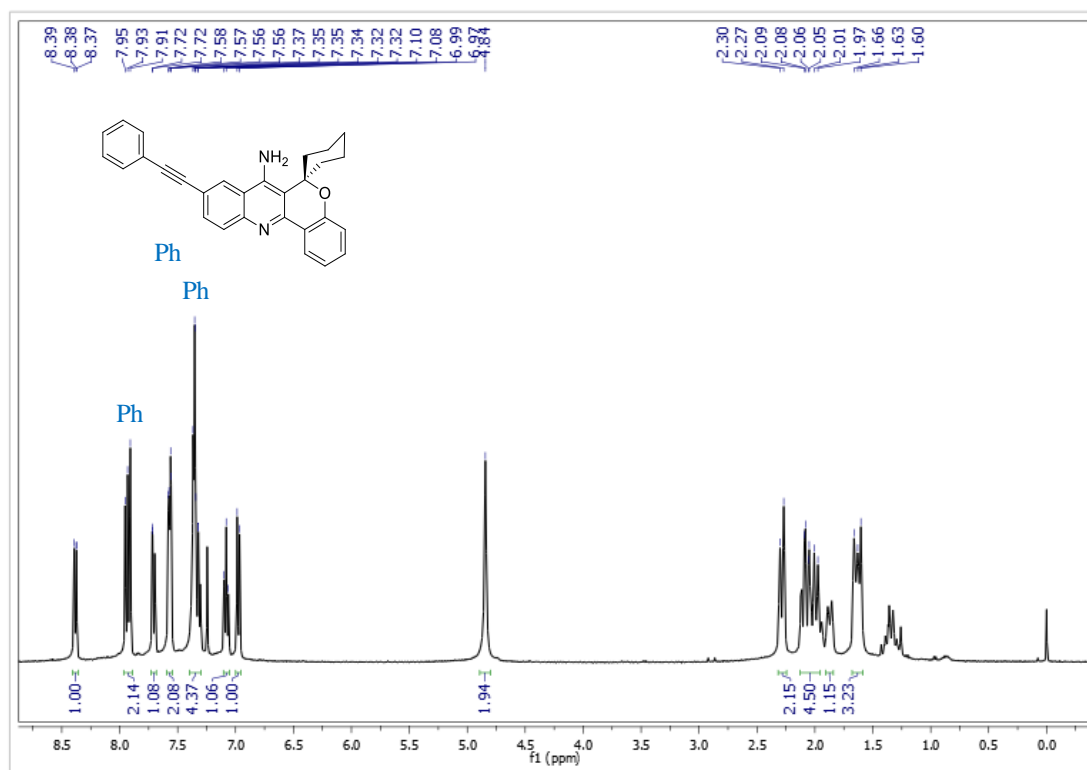


Os compostos **17b** e **18b** foram identificadas por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}, os espectros foram registrados em CDCl<sub>3</sub> utilizando TMS como referência interna (**Figuras 30-33**).

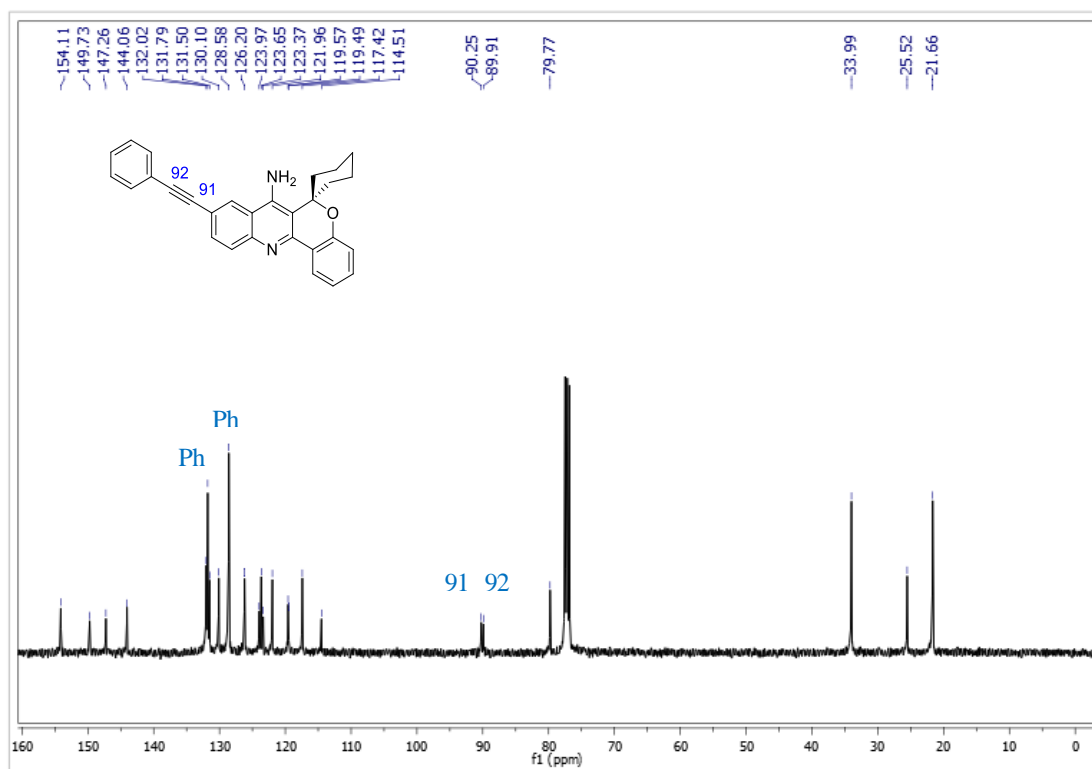
O composto **17b** obteve o mesmo padrão de sinais de RMN <sup>1</sup>H que o composto **9b** (X = H, n = 2), porém com o surgimento de 3(três) multipletos, o primeiro em 7,89 - 7,95 ppm (2H) referente ao H-11 e a um dos hidrogênios da fenila, o segundo em 7,56 - 7,59 (2H) correspondente ao H-10 e a outro hidrogênio da fenila. Por fim, um multiplete em 7,30 - 7,38 (4H) referente ao H-3 e a três hidrogênios da fenila (**Figura 30**). O mesmo ocorreu com os sinais de RMN <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}, entretanto com o surgimento de 2(dois) sinais na região dos aromáticos referentes a fenila (δ 131,8; 128,6 ppm) e dois sinais em 90,2 e 89,9 ppm correspondentes aos carbonos na tripla ligação (**Figura 31**).

O composto **18b** também obteve o mesmo padrão de sinais de RMN <sup>1</sup>H que o composto **9b** (X = H, n = 2), onde foi observado o surgimento de dois multipletos em 3,89 - 3,91 ppm (4H) referentes aos hidrogênios 93 e 93' e em 3,23 - 3,26 ppm correspondente aos hidrogênios 92 e 92' (**Figura 32**). No espectro de RMN <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} observou-se o surgimento de dois picos, um em 67,0 ppm (C-93 e C-93') e o outro em 50,1 ppm (C-92 e C-92') referentes ao substituinte morfolino (**Figura 33**).

Contudo, o composto 7-amino-9-bromo-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**12b**) pode ser utilizado como precursor em reações de acoplamento C-C e C-N.

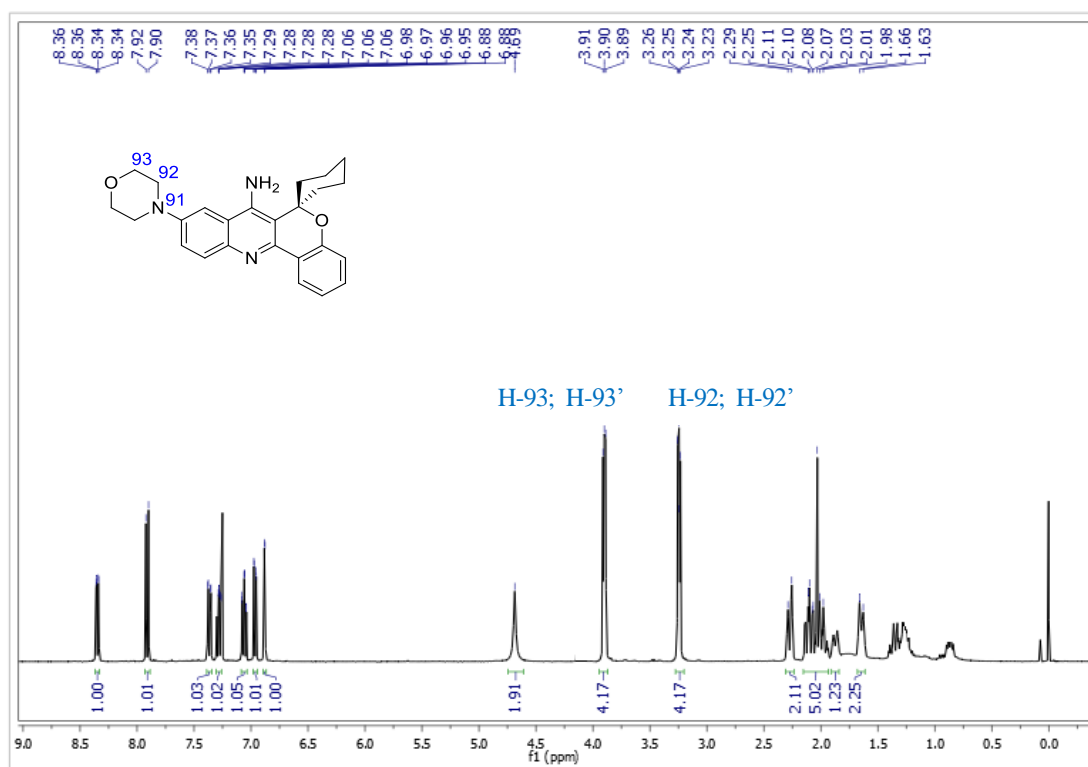


**Figura 30.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz de 7-Amino-9-feniletinil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinoлина-6,1'-ciclopentano] (17b), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .

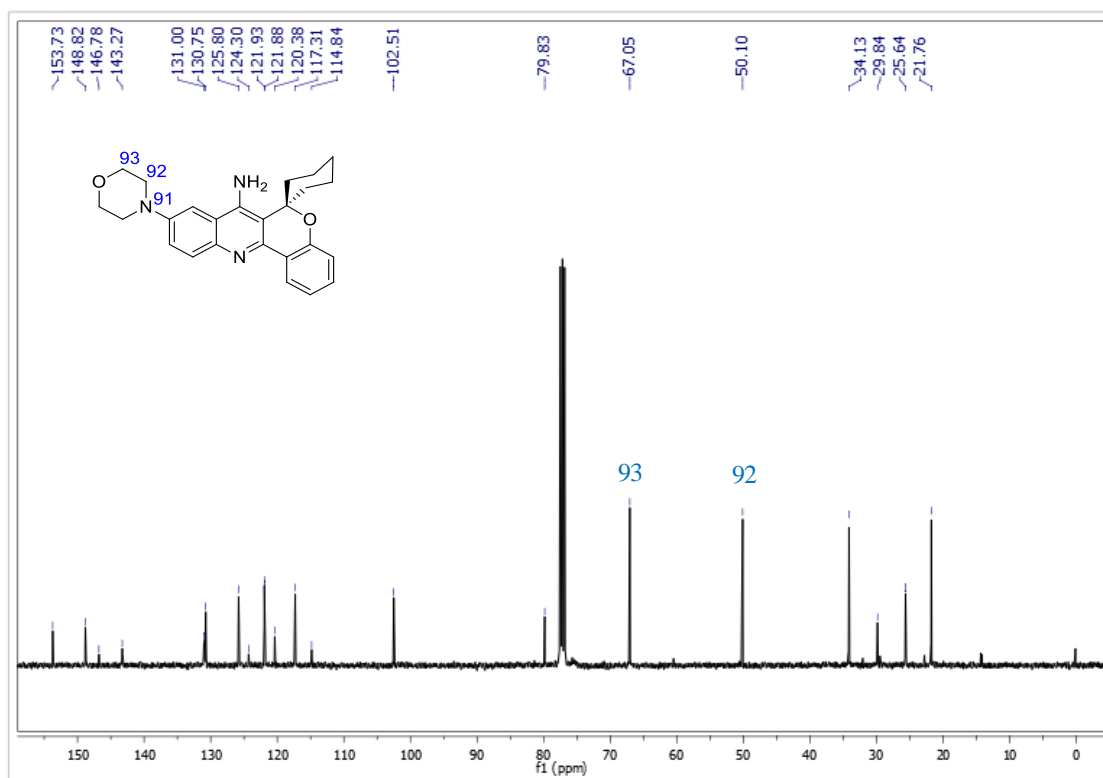


**Figura 31.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-9-feniletinil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinoлина-6,1'-ciclopentano] (17b), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .





**Figura 32.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz de 7-Amino-9-morfolino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (**18b**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 33.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-9-morfolino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (**18b**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .

---

**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos propostos para a realização desse trabalho, pode-se concluir que:

- i) Desenvolveu-se uma rota sintética simples, eficiente e de baixo custo para a obtenção de uma série de 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos], com rendimentos de 30 – 65 %; moléculas baseadas na Tacrina, porém com estruturas químicas mais complexas;
- ii) Comprovou-se uma diastereosseletividade nas reações para obtenção de 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] quando a porção espirocarbocíclica é alquil substituída (**9d-g**);
- iii) Com base no estudo de *docking* molecular (**Anexo V**) para os compostos **9a**, **9b**, **9c** e nos ensaios *in vitro* de inibição da AChE para os compostos **9a-g**, verificou-se que o potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase diminui com o aumento do tamanho do ciclo da porção espirocarbocíclica, provavelmente devido ao efeito estérico do anel carbocíclico nas interações com os resíduos de Tyr130 e Gly118 da enzima;
- iv) Considerando-se os compostos das séries **9-12**, o 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (**9a**) apresentou o menor valor de IC<sub>50</sub> para inibição das enzimas AChE e BChE;
- v) A presença de um átomo de cloro ou bromo nas posições 9 e 10 dos compostos **10-12**, não aumentou o potencial anti-AChE desses compostos;
- vi) Não foi possível desenvolver uma metodologia para a síntese de dímeros derivados dos compostos 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] (**9a-e**);
- vii) Rendimentos satisfatórios (52 – 78 %) foram obtidos para a reação de inserção de um pirrol nos compostos **9-11** via reação de Clauson-Kass, porém esses novos compostos apresentaram atividade antitumoral contra o glioblastoma inferior aos seus precursores **9-11**;
- viii) O composto 7-amino-9-bromo-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**12b**) pode ser utilizado como precursor em reações de

acoplamento C-C e C-N dos tipos Sonogashira e Buchwald-Hartwig, demonstrando uma futura aplicabilidade sintética para a construção de estruturas químicas mais complexas e de possível interesse na área farmacológica.

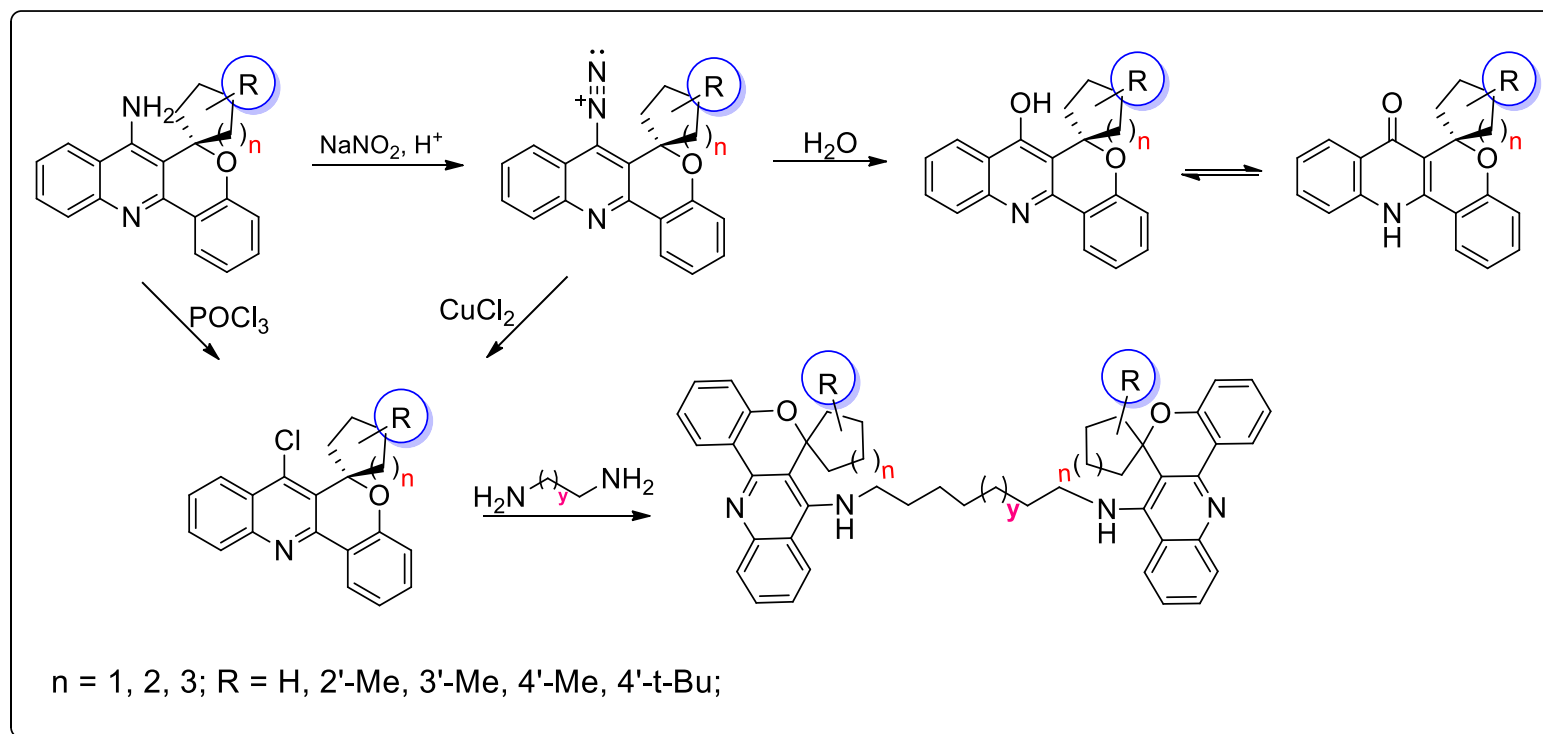
---

**SUGESTÕES DE CONTINUIDADE DESSE TRABALHO**

## 5. SUGESTÕES DE CONTINUIDADE DESSE TRABALHO

Ampliar o escopo das aplicações dos compostos **9-12**, através de reações de diazotação e halogenação.

Esquema 17



---

**MATERIAL E MÉTODOS**

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Reagentes e Solventes Utilizados

Os reagentes e solventes utilizados para a síntese dos compostos em estudo apresentam qualidade técnica ou p.a., e/ou foram purificados segundo procedimentos usuais de laboratório.<sup>62</sup> Os reagentes e solventes utilizados estão descritos a seguir:

#### 6.1.1 Reagentes

- Cicloetonas (Sigma-Aldrich);
- Pirrolidina (Sigma-Aldrich);
- 2-hidroxi-acetofenona (Sigma-Aldrich);
- 2-amino-benzonitrila (Sigma-Aldrich);
- 5-cloro-2-amino-benzonitrila (Sigma-Aldrich);
- 4-cloro-2-amino-benzonitrila (Acros);
- 5-bromo-2-amino-benzonitrila (Sigma-Aldrich);
- 5-nitro-2-amino-benzonitrila (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de índio (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de alumínio (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de ferro (III) (Sigma-Aldrich);
- Éter dietílico de trifluoreto de boro (Sigma-Aldrich);
- Sulfato de sódio anidro P.A (Vetec);
- Carbonato de sódio anidro P.A (Vetec);
- Hidróxido de sódio P.A (Vetec);
- Acetilcolina (Sigma-Aldrich);
- Enzima AChE purificada (isolada de *Electrophorus electricus*, Sigma-Aldrich);
- Enzima BChE purificada (isolada de *Equus ferus*, Sigma-Aldrich);
- 2,5-dimetóxitetrahidrofurano (Sigma-Aldrich);
- 1,8-dibromooctano (Sigma-Aldrich);

---

<sup>62</sup> Perrin, D. D.; Armarego, L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3<sup>rd</sup> Ed., Pergamon Press: New York, 1996.



- Azida de sódio (Sigma-Aldrich);
- Acetato de paládio (Sigma-Aldrich);
- Trifenilfosfina (Sigma-Aldrich);
- Iodeto de cobre (I) (Sigma-Aldrich);
- Fenilacetileno (Sigma-Aldrich);
- Trietilamina (Sigma-Aldrich);
- Morfolina (Sigma-Aldrich);
- XPhos (Sigma-Aldrich);
- Peróxido de hidrogênio;

### 6.1.2 Solventes

- Ácido acético glacial (Vetec);
- Acetato de etila (Vetec, Synth);
- Acetona (Vetec, Synth);
- Água destilada;
- Álcool etílico (Vetec, Synth);
- Clorofórmio (Vetec, Synth);
- Dimetilsulfóxido (Vetec, Synth);
- Hexano (Vetec);
- Tetrahidrofurano (Vetec, Synth);
- Tolueno (Vetec, Synth);
- Dimetilformamida (Vetec);

## 6.2 Equipamentos Utilizados

### 6.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram registrados no Espectrômetro BRUKER DPX-400 e AVANCE 3 HD (400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 100,62 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) do Departamento de Química – UFSM, Santa Maria. Os dados de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , verificados no aparelho BRUKER DPX - 400 e AVANCE III, foram obtidos em tubos de 5 mm, temperatura de 300 K, em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) ou dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO}-d_6$ ) como solvente, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As condições usadas no espectrômetro foram: SF 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 100,61 MHz para  $^{13}\text{C}$ ; *lock* interno pelo  $^2\text{D}$  do solvente; largura de pulso 8,0  $\mu\text{s}$  para  $^1\text{H}$  e 13,7  $\mu\text{s}$  para  $^{13}\text{C}$ ; tempo de aquisição 13,7 s para  $^1\text{H}$  e 2,7 s para  $^{13}\text{C}$ ; janela espectral 4800 Hz para  $^1\text{H}$  e 24000 Hz para  $^{13}\text{C}$ ; número de varreduras de 8 a 32 para  $^1\text{H}$  e 2000 a 20000 para  $^{13}\text{C}$ ; dependendo do composto, número de pontos 65536 com resolução digital Hz/ponto igual a 0,146 para  $^1\text{H}$  e 0,74 para  $^{13}\text{C}$ . A reprodutibilidade dos dados de deslocamento químico é estimada ser de  $\pm 0,01$  ppm.

Os espectros de 2D (HMQC e HMBC) foram registrados no aparelho Bruker Avance III 600 MHz do Departamento de Química da UFSM, obtidos em tubos de 5 mm, na temperatura de 298 K, resolução digital  $\pm 0,01$  ppm, em  $\text{CDCl}_3$  como solvente e TMS ( $\delta = 0,0$  ppm) como referência interna.

### 6.2.2 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho MQAPF-302- aparelho digital de ponto de fusão e em um Electrothermal Mel-Temp 3.0 no Departamento de Química da UFSM.

### 6.2.3 Análise Elementar

As análises elementares foram realizadas em um analisador Perkin Elmer 2400 CHN, no Instituto de Química, Central Analítica, USP, São Paulo.

#### 6.2.4 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HMRS)

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific). Os experimentos foram realizados através da infusão direta da amostra (fluxo: 10 mL / min) na forma de íon positivo que utiliza ionização por eletropulverização. Os cálculos de composição elementar para comparação foram feitos utilizando a ferramenta específica incluída no módulo navegador Qual de Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, solte 2.0.7) do software.

#### 6.2.5 Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram feitos na forma sólida em pastilhas de KBr (2,0 a 3,0 mg do composto para cada 100 mg de KBr). Utilizou-se o aparelho Espectrofotômetro Bruker Tensor – 27, localizado no Departamento de Química da UFSM, com uma janela espectral entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 6.2.6 Difração de raios-X

A análise de difração de raios-X dos compostos foi realizada em monocristal em um difratômetro automático de quatro círculos com detector de área Bruker Kappa APEX-II CCD 3 kW Sealed Tube System, dotado de um monocromador de grafite e fonte de radiação Mo-K $\alpha$  ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ )<sup>63</sup> instalado no Departamento de Química da UFSM. Solução e refinamento das estruturas foram feitos utilizando o pacote de programas SHELX97.<sup>64</sup> Os parâmetros estruturais foram obtidos através do refinamento baseando-se nos quadrados dos fatores estruturais e na técnica da matriz completa/mínimos quadrados. Os átomos não hidrogenóides restantes foram localizados através de sucessivas diferenças de Fourier e refinados com parâmetros térmicos anisotrópicos.<sup>65</sup> As coordenadas dos átomos de hidrogênio foram, então, localizadas a partir das densidades encontradas no mapa de Fourier. As projeções gráficas foram construídas utilizando-se o programa *Ortep3 for Windows*.<sup>66</sup>

---

<sup>63</sup> Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA. 2006. APEX2 (Versão 2.1), COSMO (Versão 1.56), BIS (Versão 2.0.1.9), SAINT (Versão 7.3A), SADABS (Versão 2004/1), XPREP (Versão 2005/4).

<sup>64</sup> Sheldrick, G. M. SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Germany, 1997.

<sup>65</sup> Padwa, A. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 1274.

<sup>66</sup> Farrugia J. L. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565.

### 6.2.7 Micro-ondas

Os experimentos foram realizados em um micro-ondas Discover CEM com modo de operação contendo arrefecimento simultâneo. A temperatura foi ajustada e a irradiação foi cessada automaticamente quando a temperatura predeterminada foi atingida.

### 6.3 Ensaio *in vitro*

Os ensaios de atividade das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase seguiram o protocolo de Ellman.<sup>67</sup> Os compostos foram dissolvidos em DMSO, sendo as concentrações finais de 0,5, 1,0 e 10  $\mu\text{M}$ , onde foram feitos 3 experimentos (n) em triplicata para cada amostra. Os compostos foram pré-incubados a 30°C durante 10 minutos com 0,01 U das enzimas purificadas acetilcolinesterase (isolada de *Electrophorus electricus*) e butirilcolinesterase (isolada de *Equus ferus*), sendo que a reação foi iniciada com a adição de acetiltiocolina (0,8 mM).

### 6.4 Ensaio *in silico*

O programa Vina 1.1.1 foi usado para o estudo *in silico* de *docking* molecular (ancoragem), usando um exhaustiveness de 200, e como coordenadas do grid box, x= 5.286, y=65.457, z=58.647 (dimensões do grid box: 66Å x 64 Å x 62 Å).

Previamente, a estrutura de raios-x da AChE com a tacrina foi obtida do Protein Data Bank (PDB: 1ACJ), onde a tacrina, moléculas de água, íons e outros ligantes foram removidos. Foram adicionados hidrogênios a estrutura da proteína e a mesma foi minimizada com o campo de força AMBERff99SB (100 passos) usando o programa CHIMERA 1.8rc.<sup>68</sup> Os híbridos da tacrina (**9a-c**) foram criados no software Avogadro 1.1.1, seguido de uma otimização geométrica semi-empírica (PM6) usando o programa MOPAC2012.<sup>69, 70, 71</sup>

<sup>67</sup> Ellman, G. L.; Coutney, K. D.; Andres, V.J.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.

<sup>68</sup> Lindorff-Larsen, K.; Piana, S.; Palmo, K.; Maragakis, P.; Klepeis, J.L.; Dror, R.O.; Shaw, D.E. *Proteins* **2010**, *78*, 1950.

<sup>69</sup> Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. *Journal Cheminformatics* **2012**, *4*, 1.

<sup>70</sup> Stewart, J. J. P. *J. Mol. Mod.* **2007**, *13*, 1173.

<sup>71</sup> Stewart J.J.P., MOPAC2012, 2012. Stewart Computational Chemistry. Colorado Springs, CO, USA. <http://OpenMOPAC.net>.

A AChE e os híbridos da tacrina (**9a-c**) foram preparados para *docking* usando o programa AutoDock Tools 4.2, onde os ligantes foram considerados flexíveis e a enzima rígida. Os hidrogênios apolares foram omitidos.

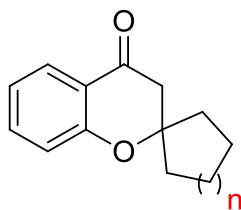
As estruturas com as energias livre de ligação mais favoráveis (baixo valor) foram selecionadas e analisadas usando o Accelrys Discovery Studio 3.5.

## 6.5 Viabilidade dos leucócitos humanos:

As avaliações *in vitro* da citotoxicidade dos compostos **9a-g** em leucócitos humanos foram realizadas em conformidade com os métodos descritos anteriormente na literatura.<sup>60, 61</sup> O sangue venoso heparinizado foi obtido a partir de doadores voluntários saudáveis do Hospital da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil (idade 25-52 anos). O protocolo utilizado nesse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFSM (n. 089.0.243.000-07). Os leucócitos isolados ( $2 \times 10^6/\text{mL}^{-1}$ ) foram incubados durante 5 h com DMSO (0,5 %), 0,3 mM NaN<sub>3</sub> + 0,6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controle positivo) e com os compostos indicados em uma solução tampão de Hank contendo 10 % plasma humano.

## 6.6 Procedimentos Experimentais Sintéticos

### 6.6.1 Procedimento Geral para Síntese de Espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas (**4a-g**)



$$n = 1, 2, 3, 2-(2'\text{Me}), 2-(3'\text{Me}), 2-(4'\text{Me}), 2-(4'\text{t-Bu})$$

A síntese de espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas foi descrita inicialmente por Kabbe, porém essa metodologia foi adaptada para a eliminação do uso de solvente.<sup>18, 19</sup>

<sup>60</sup> Bueno, D. C.; Meinerz, D. F.; Allebrandt, J.; Waczuk, E. P.; Santos, D. B.; Mariano, D. O. C.; Rocha, J. B. T.; *Bio Med Research International* **2013**, 1.

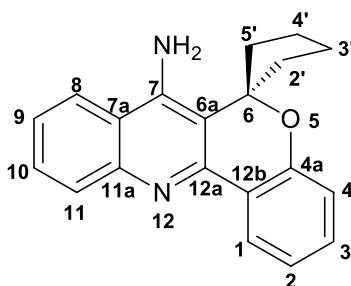
<sup>61</sup> Waczuk, E. P.; Kamdem, J. P.; Abolaji, A. O.; Meinerz, D. F.; Bueno, D. C.; Gonzaga, T. K. S. N.; Dorow, T. S. C.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Rocha, J. B. T.; Avila, D. S. *Toxicol. Res.*, **2015**, 4, 739.

Em um balão de 50 ml adicionou-se 50 mmol de 2-hidroxiacetofenona (**1**), 50 mmol da cetona cíclica (**2a-g**) e 50 mmol de pirrolidina (**3**). A mistura resultante foi mantida sob agitação por 6h a 110 °C. O óleo resultante foi destilado a pressão reduzida e o as espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas apresentaram-se na forma de óleos amarelos (**4a-g**).

### 6.6.2 Procedimento Geral para Síntese de 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] (**9 – 12**)

A uma mistura de aminonitrilas (3mmol) **1** e espiro[croman-2,1'-cicloalcan]-4-onas (3 mmol) **4a-g** foi adicionado o ácido de Lewis (3 mmol), cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) ou cloreto de índio (InCl<sub>3</sub>). A mistura reacional foi aquecida a 110 °C sob agitação magnética por 24 horas. Em seguida, foi adicionado uma solução de NaOH (2M, 20 mL) e a mistura reacional permaneceu sob agitação magnética na mesma temperatura por mais 24 horas. Após o resfriamento do sistema a temperatura ambiente, os compostos **9-12** foram extraídos em clorofórmio (30 mL) e a fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada e o solvente foi retirado em rotaevaporador. O produto foi purificado por recristalização em álcool etílico (5 mL).

#### 6.6.2.1 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (**9a**)



Sólido amarelo, rendimento 60 %, p.f. 118 – 119 °C.

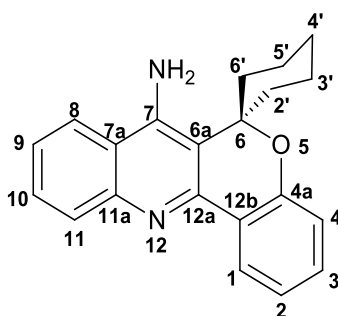
RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,39 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-1); 8,00 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 0,7 Hz, 1H, H-11); 7,67 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-8); 7,60 (ddd, *J* = 8 Hz, *J* = 7 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-10); 7,37 (ddd, *J* = 8 Hz, *J* = 7 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-9); 7,25-7,31 (m, 1H, H-3); 7,07 (td, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-2); 6,88 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 0,8 Hz, 1H, H-4); 4,62 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 2,30-2,36 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 1,80-2,10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,76-1,86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,5 (C-4a); 148,5 (C-12a); 147,7 (C-11a); 143,9

<sup>18</sup> Kabbe, H. J. *Angew. Chem. Int.* **1982**, *21*, 241.

<sup>19</sup> Kabbe, H. J. *Synthesis*, **1978**, 886.

(C-7); 131,1 (C-3); 129,8 (C-11); 129,2 (C-10); 125,9 (C-1); 124,7 (C-9); 123,5 (C-12b); 121,8 (C-2); 119,7 (C-8); 119,1 (C-7a); 117,6 (C-4); 112,5 (C-6a); 89,3 (C-6); 37,7 (CH<sub>2</sub>); 25,6 (CH<sub>2</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O: C 79,44; H 6,00; N 9,26. Encontrado (%): C 79,39; H 5,78; N 9,13.

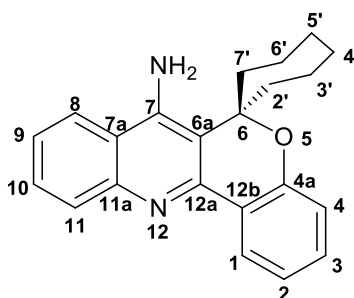
### 6.6.2.2 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (9b)



Sólido branco, rendimento 65 %, p.f. 156 – 157 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,40 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-1); 7,99 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-11); 7,67 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-8); 7,57-7,62 (m, 1H, H-10); 7,29-7,39 (m, 2H, H-9, H-3); 7,06-7,09 (m, 1H, H-2); 6,97 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 0,7 Hz, 1H, H-4); 4,79 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 2,28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,08 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 1,7 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,3 (m, 1H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,0 (C-4a); 149,0 (C-12a); 147,6 (C-11a); 144,4 (C-7); 131,2 (C-3); 129,9 (C-11); 129,3 (C-10); 126,1 (C-1); 124,8 (C-9); 124,1 (C-12b); 121,9 (C-2); 119,8 (C-8); 119,6 (C-7a); 117,4 (C-4); 114,0 (C-6a); 79,7 (C-6); 33,9 (CH<sub>2</sub>); 25,5 (CH<sub>2</sub>); 21,6 (CH<sub>2</sub>); HRMS Cal. para C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O: 317,1654. Encontrado: 317,1672.

### 6.6.2.3 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloheptano] (9c)

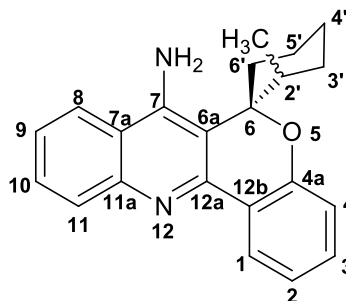


Sólido amarelo, rendimento 55 %, p.f. 153 – 154 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,39 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-1); 8,00 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-11); 7,68 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-8); 7,60 (ddd, *J* = 8 Hz, *J* = 7 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-10); 7,30-7,40 (m, 2H, H-9, H-3); 7,08 (td, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-2); 6,96 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 0,8 Hz, 1H, H-4); 4,77 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 2,35 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 2,03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,7 (m, 6H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,1 (C-4a); 148,3 (C-12a); 147,6 (C-11a); 143,9 (C-7); 131,3 (C-3); 129,9 (C-11); 129,2 (C-10); 126,0 (C-1); 124,7 (C-9); 123,7 (C-12b); 121,8 (C-2); 119,8 (C-8); 119,4 (C-7a); 117,6 (C-4); 116,5 (C-6a);

83,8 (C-6); 38,1 (CH<sub>2</sub>); 29,9 (CH<sub>2</sub>); 24,3 (CH<sub>2</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O: C 79,97; H 6,71; N 8,48. Encontrado (%): C 79,90; H 6,64; N 8,42.

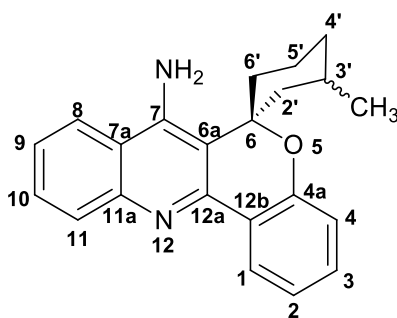
#### 6.6.2.4 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-b]quinolina-6,1'-ciclohexano] (9d)



Sólido branco, rendimento 30 %, p.f. 195 – 196 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,41 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-1); 7,99 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-11); 7,68 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-8); 7,60 (ddd, *J* = 8 Hz, *J* = 7 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-10); 7,28-7,39 (m, 1H, H-9, H-3); 7,05 (td, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-2); 6,95 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-4); 4,83 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 2,54 – 1,45 (m, 9H, CH<sub>2</sub>); 0,97 (d, *J* = 7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,5 (C-4a); 149,1 (C-12a); 147,5 (C-11a); 143,9 (C-7); 131,1 (C-3); 129,8 (C-11); 129,1 (C-10); 126,0 (C-1); 124,7 (C-9); 123,2 (C-12b); 121,4 (C-2); 119,7 (C-8); 119,2 (C-7a); 117,0 (C-4); 112,8 (C-6a); 82,4 (C-6); 39,1 (CH<sub>2</sub>); 33,6 (CH<sub>2</sub>); 29,9 (CH<sub>2</sub>); 26,2 (CH<sub>2</sub>); 21,3 (CH<sub>2</sub>); 16,8 (CH<sub>3</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O: C 79,97; H 6,71; N 8,48. Encontrado (%): C 79,39; H 6,37; N 8,29.

#### 6.6.2.5 7-Amino-3'-metil-espiro[cromeno[4,3-b]quinolina-6,1'-ciclohexano] (9e)



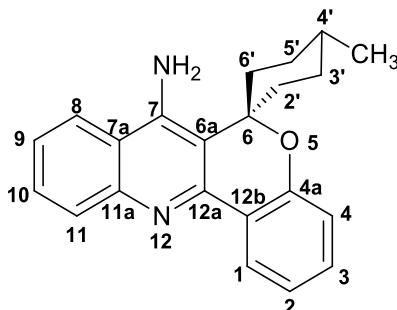
Sólido branco, rendimento 35 %, p.f. 161 – 163 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,38-8,41 (m, 1H, H-1); 7,99 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 0,7, 1H, H-11); 7,56-7,64 (m, 2H, H-8, H-10); 7,28-7,35 (m, 2H, H-9, H-3); 7,05-7,09 (m, 1H, H-2); 6,94 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 0,8 Hz, 1H, H-4); 4,77 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 2,22 – 1,59 (m, 9H, CH<sub>2</sub>); 0,90 (d, *J* = 7, 3H, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,0 (C4a); 148,9 (C-12a); 147,6 (C11a); 144,4 (C-7); 131,2 (C-3); 129,8 (C-11); 129,3 (C-10); 126,0 (C-1); 124,8 (C-9); 124,0 (C-12b); 121,9 (C-2); 119,8 (C-8); 119,5 (C-7a); 117,3 (C-4); 113,7 (C-6a); 80,4 (C-6); 42,5 (CH<sub>2</sub>); 34,4 (CH<sub>2</sub>); 33,2 (CH<sub>2</sub>); 27,7 (CH<sub>2</sub>); 22,6 (CH<sub>3</sub>); 21,5 (CH<sub>2</sub>).



Anal. (%) Calculado para  $C_{22}H_{22}N_2O$ : C 79,97; H 6,71; N 8,48. Encontrado (%): C 79,89; H 6,83; N 8,33.

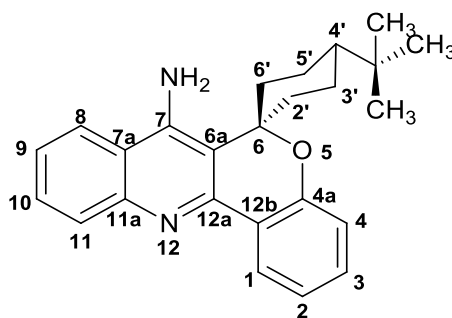
#### 6.6.2.6 7-Amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3-b]quinolina-6,1'-ciclohexano] (9f)



Sólido branco, rendimento 60 %, p.f. 176 – 177 °C.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8,39 (d,  $J = 8$ , 1H, H-1); 7,99 (d,  $J = 8$ , 1H, H-11); 7,64 (t,  $J = 8$ , 1H, H-8); 7,59 (d,  $J = 8$ , 1H, H-10); 7,36 (t,  $J = 8$ , 1H, H-9); 7,27 (d,  $J = 8$ , 1H, H-3); 7,08 (t,  $J = 7$ , 1H, H-2); 6,97 (d,  $J = 8$ , 1H, H-4); 4,78 (s, 2H,  $NH_2$ ); 2,22 – 1,59 (m, 9H,  $CH_2$ ); 1,02 (d,  $J = 7$ , 3H,  $CH_3$ ). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  153,9 (C-4a); 149,1 (C-12a); 147,6 (C-11a); 144,3 (C-7); 131,2 (C-3); 129,9 (C-11); 129,3 (C-10); 126,0 (C-1); 124,8 (C-9); 124,1 (C-12b); 121,9 (C-2); 119,8 (C-8); 119,5 (C-7a); 117,4 (C-4); 113,7 (C-6a); 79,3 (C-6); 33,8 ( $CH_2$ ); 32,1 ( $CH_2$ ); 30,2 ( $CH_2$ ); 22,6 ( $CH_3$ ); Anal. (%) Calculado para  $C_{22}H_{22}N_2O$ : C 79,97; H 6,71; N 8,48. Encontrado (%): C 79,68; H 6,73; N 8,32.

#### 6.6.2.7 7-Amino-4'-*t*-butil-espiro[cromeno[4,3-b]quinolina-6,1'-ciclohexano] (9g)

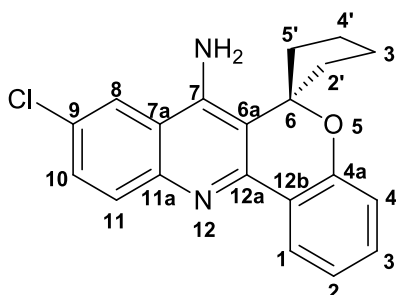


Sólido branco, rendimento 60 %, p.f. 229 – 231 °C.

RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8,39 (ddd,  $J = 6$  Hz,  $J = 4$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H, H-1); 7,99 (dd,  $J = 9$  Hz,  $J = 1$  Hz, 1H, H-11); 7,65 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, H-8); 7,59 (ddd,  $J = 8$  Hz,  $J = 7$  Hz,  $J = 1$  Hz, 1H, H-10); 7,29-7,37 (m, 2H, H-9, H-3); 7,06-7,10 (m, 1H, H-2); 6,95 (dd,  $J = 8$  Hz,  $J = 1$  Hz, 1H, H-4); 4,78 (s, 2H,  $NH_2$ ); 2,34 – 1,10 (m, 9H,  $CH_2$ ); 0,99 (s, 9H,  $CH_3$ ). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  154,0 (C-4a); 149,3 (C-12a); 147,7 (C-11a); 144,4 (C-7); 131,2 (C-3); 130,0 (C-11); 129,2 (C-10); 126,1 (C-1); 124,9 (C-9); 124,3 (C-12b); 121,9 (C-2); 119,8 (C-8); 117,4 (C-7a); 113,8 (C-4); 79,4 (C-6a); 47,4 (CH);

34,4 (CH<sub>2</sub>); 32,8 (C); 27,7 (CH<sub>3</sub>); 22,6 (CH<sub>2</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O: C 80,61; H 7,58; N 7,52. Encontrado (%): C 80,19; H 7,82; N 7,09.

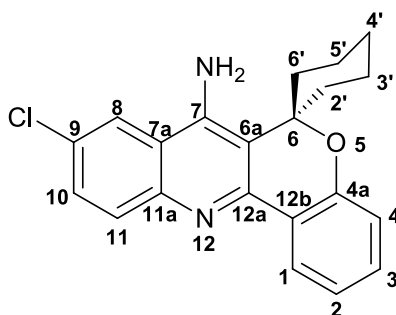
#### 6.6.2.8 7-Amino-9-cloro-espiro[cromeno[4,3-b]quinolina-6,1'-ciclopentano] (10a)



Sólido amarelo, rendimento 45 %, p.f. 114 – 116 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,46 (d, *J* = 2, 1H); 8,23 (dd, *J* = 8, *J* = 1, 1H); 7,84 (d, *J* = 9, 1H); 7,61 (dd, *J* = 9, *J* = 2, 1H); 7,31-7,35 (m, 1H); 7,07 (t, *J* = 8, 1H); 6,90 (d, *J* = 8, 1H); 6,20 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 2,44-2,48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,95-2,07 (m, 6H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 153,8; 148,0; 145,7; 145,0; 131,1; 130,7; 129,5; 128,5; 125,4; 123,3; 121,5; 121,4; 119,8; 117,3; 110,4; 89,7 (C-6); 35,4 (CH<sub>2</sub>); 23,8 (CH<sub>2</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O.H<sub>2</sub>O: C 67,70; H 5,40; N 7,89. Encontrado (%): C 67,76; H 5,47; N 7,78.

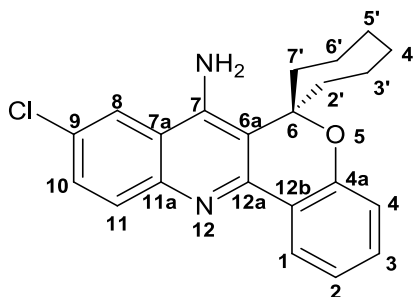
#### 6.6.2.9 7-Amino-9-cloro-espiro[cromeno[4,3-b]quinolina-6,1'-ciclohexano] (10b)



Sólido amarelo, rendimento 55 %, p.f. 214 – 215 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,43 (d, *J* = 2, 1H); 8,19 (dd, *J* = 8, *J* = 2, 1H); 7,79 (d, *J* = 9, 1H); 7,59 (dd, *J* = 9, *J* = 2, 1H); 7,34 (td, *J* = 8, *J* = 2, 1H); 7,06 (td, *J* = 8, *J* = 1, 1H); 6,99 (dd, *J* = 8, *J* = 1, 1H); 6,45 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 2,37-2,44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,86-1,95 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 1,56-1,67 (m, 4H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 153,4; 148,1; 145,6; 145,5; 131,0; 130,6; 129,4; 128,3; 125,5; 123,8; 121,5; 121,4; 120,1; 117,0; 113,0; 79,9 (C-6); 31,4 (CH<sub>2</sub>); 23,2 (CH<sub>2</sub>); 21,1 (CH<sub>2</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O: C 71,89; H 5,46; N 7,98. Encontrado (%): C 71,73; H 5,48; N 7,84.

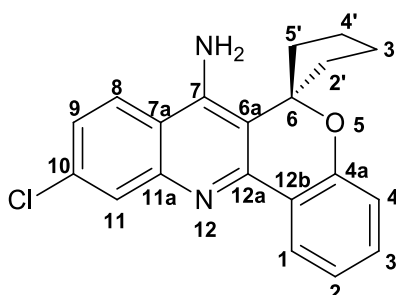
### 6.6.2.10 7-Amino-9-cloro-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloheptano] (10c)



Sólido amarelo, rendimento 42 %, p.f. 212 – 214 °C.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8,43 (d,  $J = 2$ , 1H); 8,20 (dd,  $J = 8$ ,  $J = 2$ , 1H); 7,80 (d,  $J = 9$ , 1H); 7,59 (dd,  $J = 9$ ,  $J = 2$ , 1H); 7,35 (td,  $J = 8$ ,  $J = 2$ , 1H); 7,06 (t,  $J = 8$ , 1H); 6,98 (dd,  $J = 8$ ,  $J = 1$ , 1H); 6,25 (s, 2H, NH $_2$ ); 2,45 – 1,62 (m, 12H, CH $_2$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  153,5; 147,3; 145,5; 145,0; 131,1; 130,6; 129,4; 128,3; 125,4; 123,4; 121,5; 121,4; 120,0; 117,2; 115,4; 83,1 (C-6); 36,1 (CH $_2$ ); 27,5 (CH $_2$ ); 23,2 (CH $_2$ ). Anal. (%) Calculado para C $_{22}$ H $_{21}$ ClN $_2$ O: C 72,42; H 5,80; N 7,68. Encontrado (%): C 72,10; H 5,52; N 7,59.

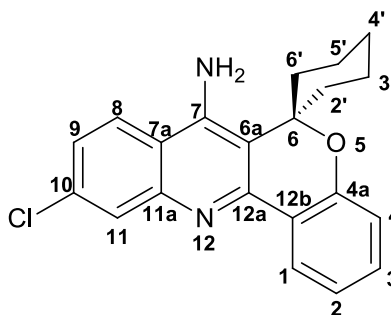
### 6.6.2.11 7-Amino-10-cloro-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (11a)



Sólido amarelo, rendimento 50 %, p.f. 141 – 142 °C.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8,31 (d,  $J = 9$ , 1H); 8,20 (dd,  $J = 8$ ,  $J = 2$ , 1H); 7,82 (d,  $J = 2$ , 1H); 7,40 (dd,  $J = 9$ ,  $J = 2$ , 1H); 7,31-7,35 (m, 1H); 7,06 (td,  $J = 8$ ,  $J = 1$ , 1H); 6,89 (dd,  $J = 8$ ,  $J = 1$ , 1H); 6,18 (s, 2H, NH $_2$ ); 2,40-2,47 (m, 2H, CH $_2$ ); 1,95-2,09 (m, 6H, CH $_2$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  153,8; 148,7; 147,9; 145,8; 133,7; 131,2; 127,0; 125,4; 124,4; 123,9; 123,1; 117,6; 110,0; 89,7 (C-6); 35,4 (CH $_2$ ); 23,8 (CH $_2$ ). HRMS Calc. para C $_{20}$ H $_{17}$ ClN $_2$ O: 337,1102. Encontrado: 337,1095.

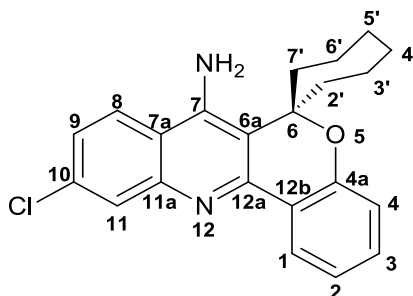
### 6.6.2.12 7-Amino-10-cloro-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (11b)



Sólido amarelo, rendimento 56 %, p.f. 201 – 204 °C.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8,32 (d,  $J = 9$ , 1H); 8,19 (dd,  $J = 8$ ,  $J = 2$ , 1H); 7,80 (d,  $J = 2$ , 1H); 7,33-7,41 (m, 2H); 7,05-7,08 (m, 1H); 6,99 (d,  $J = 8$ , 1H), 6,48 (s, 2H, NH $_2$ ); 2,36-2,43 (m, 2H, CH $_2$ ); 1,83-1,99 (m, 4H, CH $_2$ ); 1,56-1,74 (m, 4H, CH $_2$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  153,4; 148,8; 147,7; 146,4; 133,7; 131,2; 126,9; 125,6; 124,6; 123,8; 123,7; 121,4; 117,9; 117,0; 112,7; 79,9 (C-6); 31,5 (CH $_2$ ); 23,2 (CH $_2$ ); 21,0 (CH $_2$ ); Anal. (%) Calculado para C $_{21}$ H $_{19}$ ClN $_2$ O: C 71,89; H 5,46; N 7,98. Encontrado (%): C 72,16; H 5,61; N 7,70.

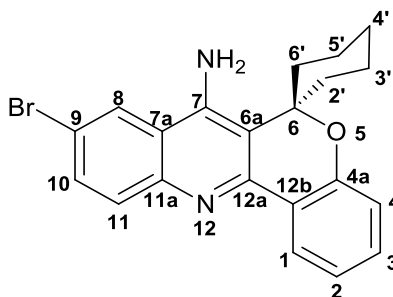
### 6.6.2.13 7-Amino-10-cloro-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloheptano] (11c)



Sólido amarelo, rendimento 45 %, p.f. 176 – 177 °C.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8,31 (d,  $J = 9$ , 1H); 8,21 (dd,  $J = 8$ ,  $J = 1$ , 1H); 7,81 (d,  $J = 2$ , 1H); 7,33-7,41 (m, 2H); 7,06 (t,  $J = 7$ , 1H); 6,98 (d,  $J = 8$ , 1H); 6,25 (s, 2H, NH $_2$ ); 2,42 – 2,46 (m, 2H, CH $_2$ ); 2,11-2,16 (m, 2H, CH $_2$ ); 1,65-1,89 (m, 8H, CH $_2$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  153,5; 148,0; 147,7; 145,8; 133,6; 131,2; 126,9; 125,4; 124,5; 123,8; 123,3; 121,3; 117,8; 117,2; 115,1; 83,0; 40,1; 39,9; 39,7; 39,5; 39,3; 39,1; 38,9; 36,1; 27,5; 23,1. HRMS Calc. para C $_{22}$ H $_{21}$ ClN $_2$ O: 365,1415. Encontrado: 365,1404.

### 6.6.2.14 7-Amino-9-bromo-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (12b)



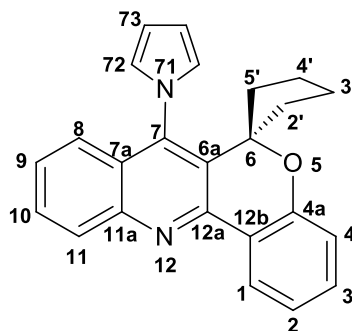
Sólido amarelo, rendimento 52 %, p.f. 204 – 205 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8,56 (d, *J* = 1, 1H); 8,18 (dd, *J* = 8, *J* = 2, 1H); 7,70-7,72 (m, 2H); 7,35 (td, *J* = 8, *J* = 2, 1H); 7,06 (t, *J* = 8, 1H); 6,98 (d, *J* = 8, 1H); 6,47 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 2,44 - 1,55 (m, 10H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 153,3; 148,1; 145,7; 145,4; 131,9; 131,0; 130,7; 125,5; 124,6; 123,7; 121,3; 120,6; 117,0; 116,6; 112,9; 79,9 (C-6); 31,4 (CH<sub>2</sub>); 23,2 (CH<sub>2</sub>); 21,0 (CH<sub>2</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>2</sub>O: C 63,81; H 4,84; N 7,09. Encontrado (%): C 63,74; H 4,76; N 7,05.

### 6.6.3 Procedimento geral para síntese de 7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] (14-16)

A uma mistura de 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] (0,5 mmol) (**9-11**) e 2,5-dimetóxitetrahidrofurano (1 mmol) foi adicionado 3,5 mL de ácido acético glacial. A mistura reacional foi aquecida a 90 °C sob agitação magnética por 48 horas. Em seguida, o ácido acético glacial foi rotaevaporado. Após, adicionou-se 20 mL de acetato de etila e os compostos **14-16** foram lavados com água destilada (3 x 15 mL). A fase orgânica foi seca com CaCO<sub>3</sub>, filtrada e o solvente foi retirado em rotaevaporador. Os compostos **14-16** foram purificados por cromatográfica em coluna de sílica gel e eluídos em hexano/acetato de etila (99:1).

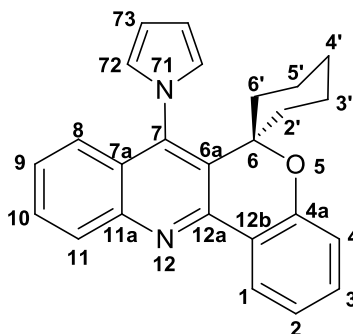
### 6.6.3.1 7-(1*H*-Pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclopentano] (14a)



Sólido branco, rendimento 78 %, p.f. 146 – 147 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,50 (d, *J* = 8, 1H, H-1); 8,12 (d, *J* = 8, 1H, H-11); 7,66 (t, *J* = 8, 1H, H-10); 7,34-7,39 (m, 2H, H-3, H-9); 7,15 (t, *J* = 7, 1H, H-2); 6,94 (d, *J* = 8, 2H, H-4, H-8); 6,77 - 6,78 (m, 2H, H-72, H-72'); 6,42 - 6,43 (m, 2H, H-73, H-73'); 2,15 - 2,21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,86 - 1,88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,58 - 1,60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,37 - 1,42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 155,2 (C-4a); 150,6 (C-12a); 147,9 (C-11a); 140,3 (C-7); 132,1; 130,2; 129,2; 128,6; 127,4; 126,2; 124,2; 124,0 (C-72, C-72'); 123,9; 123,4; 122,4; 118,0; 109,8 (C-73, C-73'); 89,8 (C-6); 36,7 (CH<sub>2</sub>); 23,3 (CH<sub>2</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O: C 81,69; H 5,72; N 7,95. Encontrado (%): C 81,16; H 5,92; N 7,71.

### 6.6.3.2 7-(1*H*-Pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclohexano] (14b)

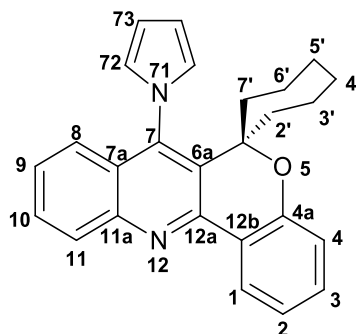


Sólido branco, rendimento 56 %, p.f. 180 – 182 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,50 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-1); 8,12 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-11); 7,66 (t, *J* = 7 Hz, 1H, H-10); 7,35-7,41 (m, 2H, H-3, H-9); 7,15 (t, *J* = 7 Hz, 1H, H-2); 7,04 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-4); 6,92 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-8); 6,81 (m, 2H, H-72, H-72'); 6,42 (m, 2H, H-73, H-73'); 2,12 (d, *J* = 13 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,74-1,85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,67 (d, *J* = 13 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>); 1,43 (d, *J* = 13 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,05-1,26 (m, 3H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,6 (C-4a); 150,2 (C-12a); 147,8 (C-11a); 140,9 (C-7); 132,1 (C-3); 131,0 (C-6a); 130,2 (C-10); 129,1 (C-11); 127,8 (C-7a); 127,4 (C-9); 126,2 (C-1); 124,2 (C-72, C-72'); 124,0 (C-12b); 123,5 (C-8); 122,3 (C-2); 117,8 (C-4); 109,6 (C-73, C-73');

80,4 (C-6); 33,6 (CH<sub>2</sub>); 24,8 (CH<sub>2</sub>); 21,8 (CH<sub>2</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O: C 81,94; H 6,05; N 7,64. Encontrado (%): C 81,79; H 6,13; N 7,53.

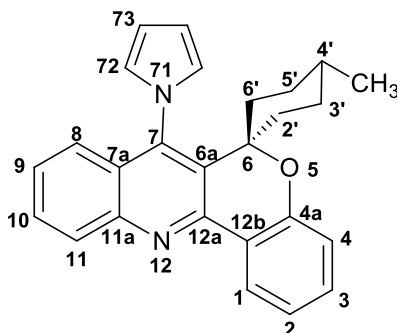
### 6.6.3.3 7-(1*H*-Pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-cicloheptano] (14c)



Sólido branco, rendimento 53 %, p.f. 149 – 150 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,49 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-1); 8,15 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-11), 7,63 – 7,72 (m, 1H, H-10); 7,33 – 7,45 (m, 2H, H-3, H-9); 7,12 – 7,21 (m, 1H, H-2); 7,03 (td, *J* = 8, *J* = 1 Hz, 1H, H-4); 6,84 (dd, *J* = 8, *J* = 1 Hz, 1H, H-8); 6,82 (t, *J* = 2 Hz, 2H, H-72, H-72'); 6,43 (t, *J* = 2 Hz, 2H, H-73, H-73'); 2,26 – 2,32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,77 – 1,86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,65 – 1,83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,53 – 1,60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,33 – 1,45 (m, 4H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,8 (C-4a); 150,8 (C-12a); 149,7 (C-11a); 141,9 (C-7); 133,0; 132,3; 131,8; 130,3; 129,7; 129,0; 128,6; 128,0; 127,9; 127,5; 126,7; 126,2; 125,4 (C-72, C72'); 124,5; 123,5; 122,3; 118,0; 109,7 (C-73, C73'); 83,6 (C-6); 38,1 (CH<sub>2</sub>); 27,6 (CH<sub>2</sub>); 22,1 (CH<sub>2</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O: C 82,07; H 6,36; N 7,36. Encontrado (%): C 81,96; H 6,49; N 7,13.

### 6.6.3.4 4'-Metil-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (14d)

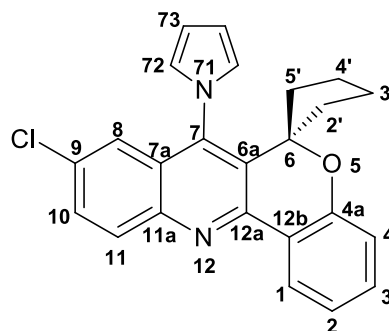


Sólido branco, rendimento 56 %, p.f. 176 – 177 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,49 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-1); 8,11 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-11); 7,65 (ddd, *J* = 8 Hz, *J* = 7 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-10); 7,34-7,40 (m, 2H, H-3, H-9); 7,14 (td, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-2); 7,01 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-4); 6,91 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-8); 6,79 (t, *J* = 2 Hz, 2H, H-72, H-72'); 6,41 (t, *J* = 2 Hz,

2H, H-73, H-73'); 2,10-2,15 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,21-1,57 (m, 7H, CH<sub>2</sub>); 0,90 (d, *J* = 6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,6 (C-4a); 150,3 (C-12a); 147,9 (C-11a); 140,8 (C-7); 132,8 (C-3); 130,8 (C-6a); 130,2 (C-10); 129,1 (C-11); 127,8 (C-7a); 127,4 (C-9); 126,2 (C-1); 124,2 (C-72, C-72'); 124,1 (C-12b); 123,5 (C-8); 122,3 (C-2); 117,8 (C-4); 109,6 (C-73, C-73'); 80,1 (C-6); 33,6 (CH<sub>2</sub>); 31,3 (CH<sub>2</sub>); 30,4 (CH<sub>2</sub>); 22,4 (CH<sub>3</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O: C 82,07; H 6,36; N 7,36. Encontrado (%): C 81,80; H 6,60; N 7,15.

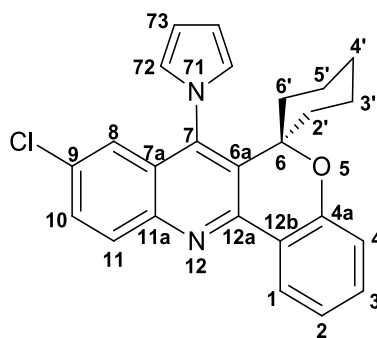
### 6.6.3.5 9-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclopentano] (15a)



Sólido branco, rendimento 62 %, p.f. 150 – 152 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,43 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-1); 8,00 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-11); 7,55 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-10); 7,33 (t, *J* = 7 Hz, 1H, H-3); 7,11 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-2); 6,86-6,91 (m, 2H, H-4, H-8); 6,73 (t, *J* = 2 Hz, 2H, H-72, H-72'); 6,41 (t, *J* = 2 Hz, 2H, H-73, H-73'); 1,32-2,17 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 155,2 (C-4a); 150,9 (C-12a); 146,3 (C-11a); 139,5 (C-7); 133,5 (C-3); 132,3 (C-6a); 131,1 (C-10); 130,8 (C-11); 129,5 (C-7a); 128,4 (C-9); 126,2 (C-1); 123,8 (C-72, C-72'); 123,7 (C-12b); 122,4 (C-8); 122,3 (C-2); 118,0 (C-4); 110,2 (C-73, C-73'); 89,7 (C-6); 36,8 (CH<sub>2</sub>); 23,4 (CH<sub>3</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O: C 74,51; H 4,95; N 7,24. Encontrado (%): C 74,27; H 5,49; N 6,64.

### 6.6.3.6 9-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclohexano] (15b)

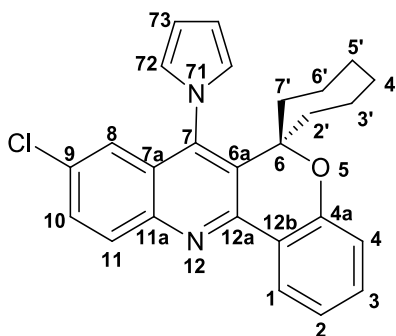




Sólido amarelo, rendimento 56 %, p.f. 180 – 182 °C.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,45 (d,  $J = 7$  Hz, 1H, H-1); 8,02-8,10 (m, 1H, H-11); 7,58 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, H-10) 7,38 (t,  $J = 6$  Hz, 1H, H-3); 7,14 (t,  $J = 7$  Hz, 1H, H-2); 7,02 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, H-4); 6,78-6,86 (m, H-8, H-72, H-72'); 6,42 (t,  $J = 2$  Hz, 2H, H-73, H-73'); 1,41 – 2,14 (m, 10H,  $\text{CH}_2$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  154,6 (C-4a); 150,5 (C-12a); 146,3 (C-11a); 140,1 (C-7); 136,4; 133,5; 132,4; 131,9; 131,2; 130,8; 128,2; 126,2; 124,2; 123,7; 122,4; 117,9; 110,0; 80,4 (C-6); 33,6 ( $\text{CH}_2$ ); 24,8 ( $\text{CH}_2$ ); 21,8 ( $\text{CH}_2$ ). Anal. (%) Calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}$ : C 74,90; H 5,28; N 6,99. Encontrado (%): C 74,68; H 5,51; N 6,74.

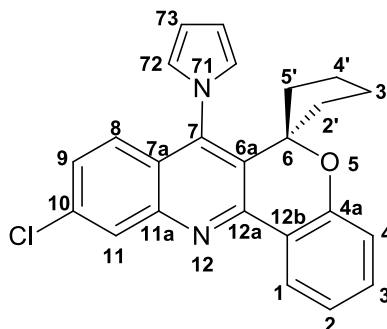
**6.6.3.7 9-Cloro-7-(1H-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-b] quinolina-6,1'-cicloheptano] (15c)**



Sólido branco, rendimento 73 %, p.f. 171 – 173 °C.

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,42 (dd,  $J = 8$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H, H-1); 8,02 (d,  $J = 9$  Hz, 1H, H-11), 7,57 (dd,  $J = 9$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H, H-10); 7,36 – 7,40 (m, 1H, H-3); 7,11 – 7,15 (m, 1H, H-2); 7,00 (d,  $J = 8$ , 1H, H-4); 6,78 (t,  $J = 2$  Hz, 3H, H-8, H-72, H-72'); 6,44 (t,  $J = 2$  Hz, 2H, H-73, H-73'); 2,24 – 2,29 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,76 – 1,85 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,63 – 1,71 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,49 – 1,56 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,33 – 1,44 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  154,8 (C-4a); 150,0 (C-12a); 146,2 (C-11a); 140,1 (C-7); 133,8; 133,5; 132,4; 131,2; 130,7; 128,8; 126,1; 124,4; 123,4; 122,4; 122,3; 118,0; 110,1; 83,6 (C-6); 38,1 ( $\text{CH}_2$ ); 27,5 ( $\text{CH}_2$ ); 22,1 ( $\text{CH}_2$ ). Anal. (%) Calculado para  $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}$ : C 75,25; H 5,88; N 6,49. Encontrado (%): C 75,25; H 5,59; N 6,75.

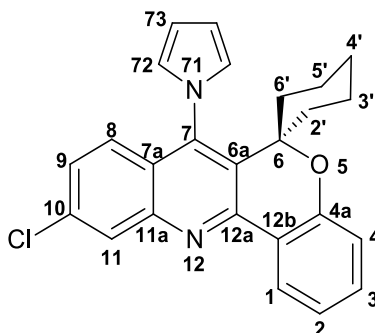
**6.6.3.8 10-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclopentano] (16a)**



Sólido amarelo, rendimento 65 %, p.f. 171 – 173 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,44 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-1); 8,10 (d, *J* = 2 Hz, 1H, H-11); 7,28-7,38 (m, 2H, H-3, H-9); 7,13 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-2); 6,92 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-4); 6,84 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-8) 6,75 (t, *J* = 2 Hz, 2H, H-72, H-72'); 6,41 (t, *J* = 2 Hz, 2H, H-73, H-73'); 1,32-2,19 (m, 8H, CH<sub>2</sub>); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 155,3 (C-4a); 151,8 (C-12a); 148,2 (C-11a); 140,3 (C-7); 136,2 (C-3); 132,4 (C-6a); 128,8 (C-10); 128,2; 128,0; 126,3; 126,1; 124,9; 123,8 (C-72, C-72'); 123,7; 122,4; 118,0 (C-4); 110,1 (C-73, C-73'); 89,7 (C-6); 36,8 (CH<sub>2</sub>); 23,3 (CH<sub>2</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O: C 74,51; H 4,95; N 7,24. Encontrado (%): C 74,71; H 5,53; N 6,71.

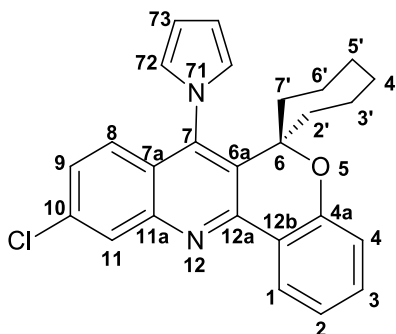
**6.6.3.9 10-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclohexano] (16b)**



Sólido amarelo, rendimento 62 %, p.f. 223 – 225 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,45 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-1); 8,11 (d, *J* = 2 Hz, 1H, H-11); 7,40 (td, *J* = 8 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-3); 7,30 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-9); 7,14 (td, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-2); 7,02 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-4); 6,78-6,83 (m, H-8, H-72, H-72'); 6,42 (t, *J* = 2 Hz, 2H, H-73, H-73'); 1,41 – 2,13 (m, 10H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,8 (C-4a); 151,4 (C-12a); 148,2 (C-11a); 140,9 (C-7); 136,3; 132,5; 131,2; 128,2; 128,0; 126,3; 125,0; 124,2; 123,7; 122,4; 117,9; 109,9; 80,4 (C-6); 33,6 (CH<sub>2</sub>); 24,8 (CH<sub>2</sub>); 21,8 (CH<sub>2</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O: C 74,90; H 5,28; N 6,99. Encontrado (%): C 74,88; H 5,46; N 6,77.

**6.6.3.10 10-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-cicloheptano] (16c)**



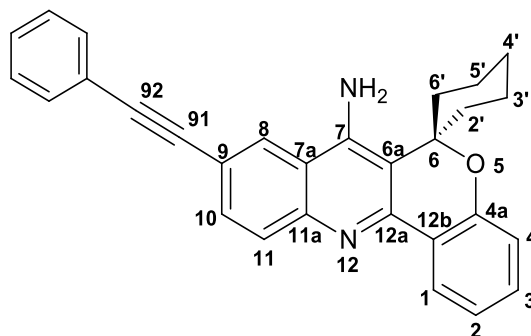
Sólido branco, rendimento 60 %, p.f. 189 – 190 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,42 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-1); 8,09 (d, *J* = 2 Hz, 1H, H-11); 7,39 (td, *J* = 8 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-3); 7,28 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H-9); 7,13 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-2); 7,00 (d, *J* = 8, 1H, H-4); 6,73-6,79 (m, 3H, H-8, H-72, H-72'); 6,42 (t, *J* = 2 Hz, 2H, H-73, H-73'); 2,24 – 2,29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,76 – 1,85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,63 – 1,71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,51 – 1,59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,33 – 1,44 (m, 4H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,9 (C-4a); 150,9 (C-12a); 148,2 (C-11a); 140,9 (C-7); 136,2; 133,1; 132,6; 128,2; 128,0; 126,5; 126,3; 125,0; 124,5; 123,4; 122,3; 118,0; 109,9; 83,6 (C-6); 38,2 (CH<sub>2</sub>); 27,6 (CH<sub>2</sub>); 22,1 (CH<sub>2</sub>). Anal. (%) Calculado para C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>2</sub>O: C 75,25; H 5,88; N 6,49. Encontrado (%): C 75,21; H 5,75; N 6,59.

**6.6.4 Procedimento Geral para Síntese de 7-Amino-9-feniletinil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (17b)**

A um tubo de ensaio foram adicionados o Pd(OAc)<sub>2</sub> (2 mol%), PPh<sub>3</sub> (6 mol%), CuI (2 mol%) e o composto **12b** (0,2 mmol). O sistema foi submetido a uma atmosfera inerte e após foram adicionados 2 mL de DMF, fenilacetileno (0,64 mmol) e 0,6 mL de trietilamina. A solução resultante permaneceu por 16 h à 60 °C e após, foi extraída com acetato de etila e água (3 x 15 mL) e o óleo resultante foi purificado através de coluna cromatográfica utilizando acetato de etila em hexano (3%).

**6.6.4.1 7-Amino-9-feniletinil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (17b)**



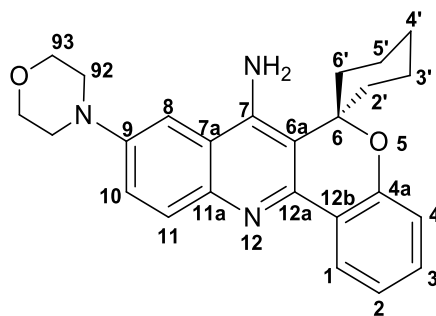
Sólido branco, rendimento 67 %, p.f. 235 – 237 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,38 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-1); 7,89-7,95 (m, 2H, H-11, Ph); 7,71 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, H-8); 7,56-7,59 (m, 2H, H-10, Ph); 7,30-7,38 (m, 4H, H-3, Ph); 7,08 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-2); 6,98 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-4); 4,84 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 1,60-2,30 (m, 10H, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 154,1 (C-4a); 149,7 (C-12a); 147,3 (C-11a); 144,1 (C-7); 132,0; 131,8 (Ph); 131,5; 130,1; 128,6 (Ph); 126,2; 124,0; 123,6; 123,4; 122,0; 119,6; 119,5; 117,4; 114,5; 90,2 (C-91); 89,9 (C-92); 79,8 (C-6); 34,0 (CH<sub>2</sub>); 25,5 (CH<sub>2</sub>); 21,7 (CH<sub>2</sub>).

**6.6.5 Procedimento Geral para a Síntese de 7-Amino-9-morfolino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (18b)**

A um tubo de ensaio foram adicionados o Pd(OAc)<sub>2</sub> (2 mol%), XPhos (4 mol%), NaOtBu (0,5 mmol) e o composto **12b** (0,2 mmol). O sistema foi submetido a uma atmosfera inerte e após foram adicionados 2 mL de tolueno e morfolina (0,65 mmol). A solução resultante permaneceu por 24 h à 100 °C e após, foi extraída com acetato de etila e água (3 x 15 mL) e o óleo resultante foi purificado através de coluna cromatográfica utilizando acetato de etila em hexano (50%).

**6.6.5.1 7-Amino-9-morfolino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (18b)**



Sólido verde, rendimento 80 %, p.f. 247 – 249 °C.

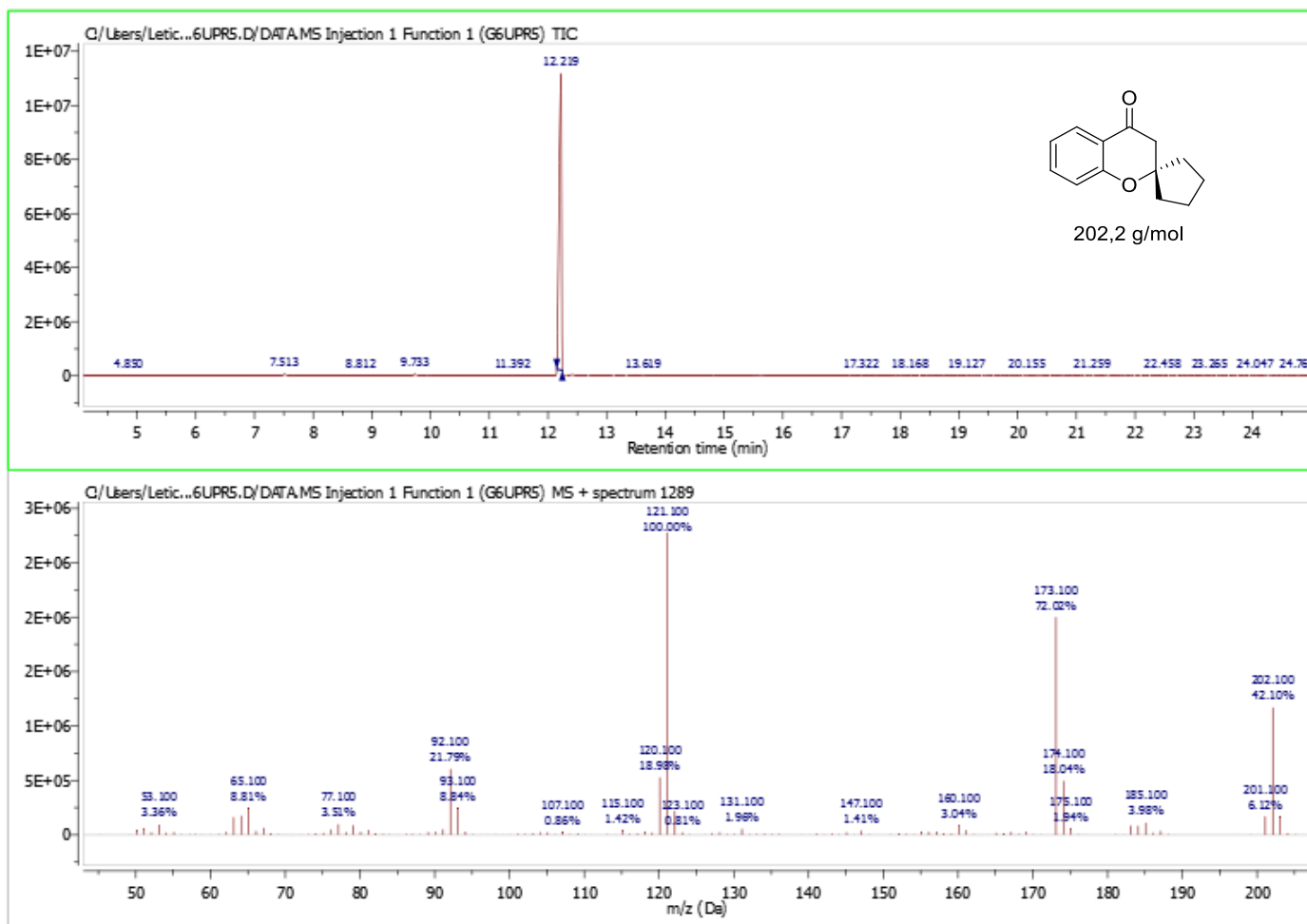
RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,35 (dd,  $J = 8$  Hz,  $J = 1$  Hz, 1H, H-1); 7,91 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, H-11); 7,37 (dd,  $J = 9$  Hz,  $J = 3$  Hz, 1H, H-8); 7,26-7,30 (m, 1H, H-10); 7,06 (t,  $J = 8$  Hz, 1H, H-3); 6,96 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, H-2); 6,88 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, H-4); 4,69 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 3,89-3,91 (m, 4H, H-93, H-93'); 3,23-3,26 (m, 4H, H-92, H-92'); 1,63-2,29 (m, 10H,  $\text{CH}_2$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  153,7 (C-4a); 148,8 (C-12a); 146,8 (C-11a); 143,3 (C-7); 131,0; 130,7; 125,8; 124,3; 121,9; 121,9; 120,4; 117,3; 114,8; 102,5; 79,8 (C-6); 67,0 (C-93, C-93'); 50,1 (C-92, C-92'); 34,1 ( $\text{CH}_2$ ); 25,6 ( $\text{CH}_2$ ); 21,8 ( $\text{CH}_2$ ).

---

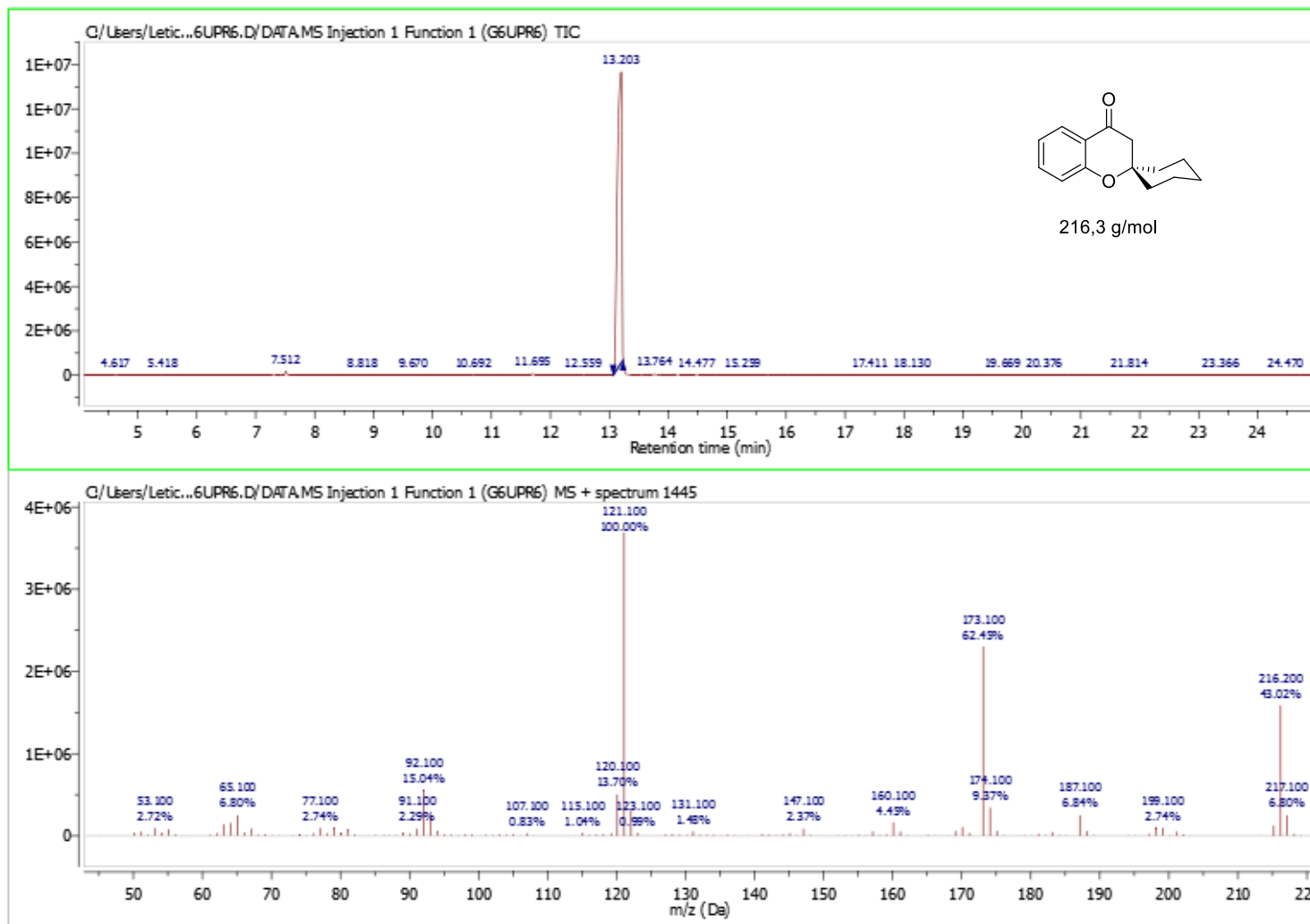
**ANEXO I**

*Espectros de GC-MS-EI*

## 7. ESPECTROS DE GC-MS-EI DOS COMPOSTOS 4a-g



**Figura 34.** Espectro de Massas (GC-EI) de espiro[croman-2,1'-ciclopentan]-4-ona (4a).



**Figura 35.** Espectro de Massas (GC-El) de espiro[croman-2,1'-ciclohexan]-4-ona (**4b**).



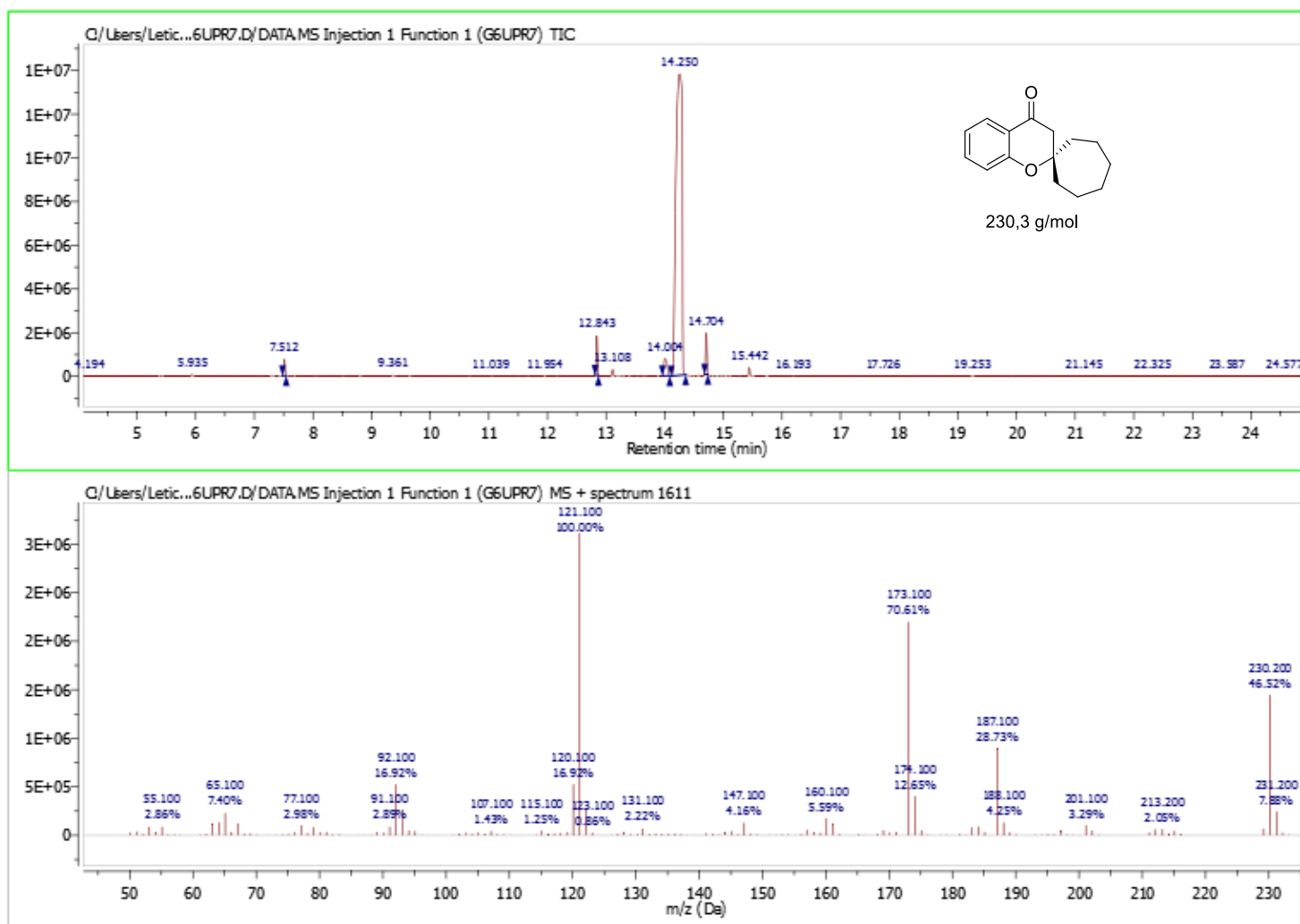
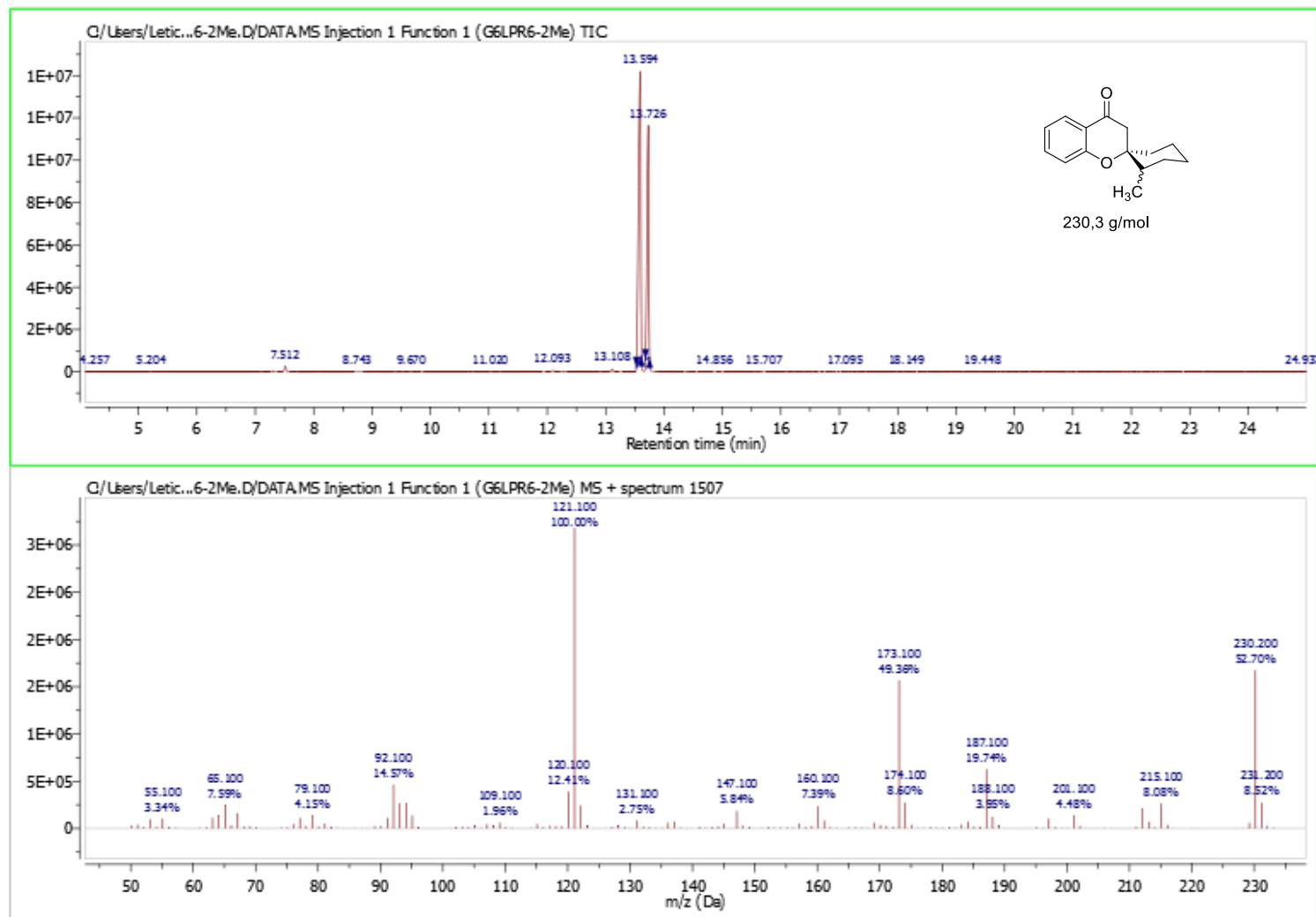
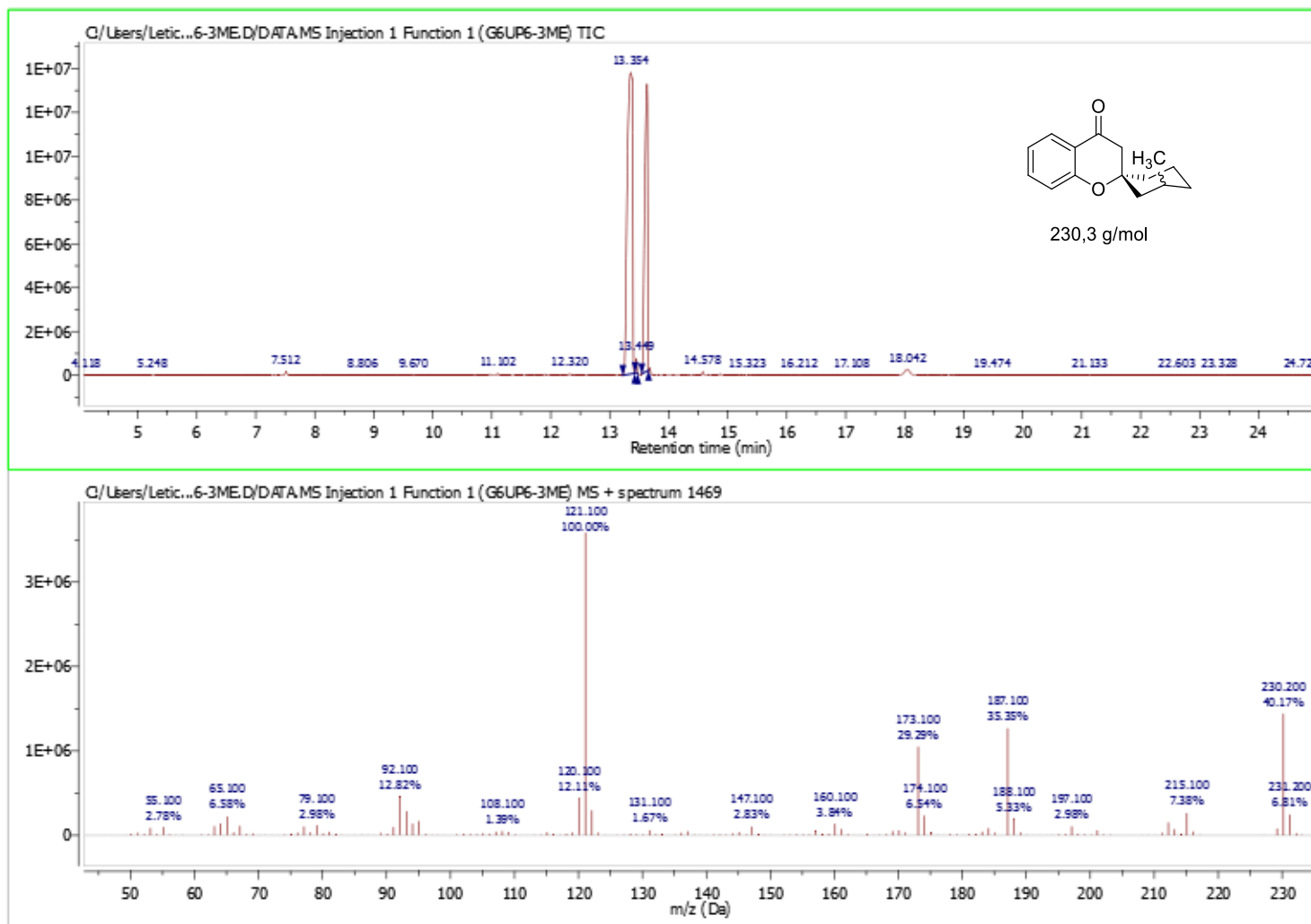


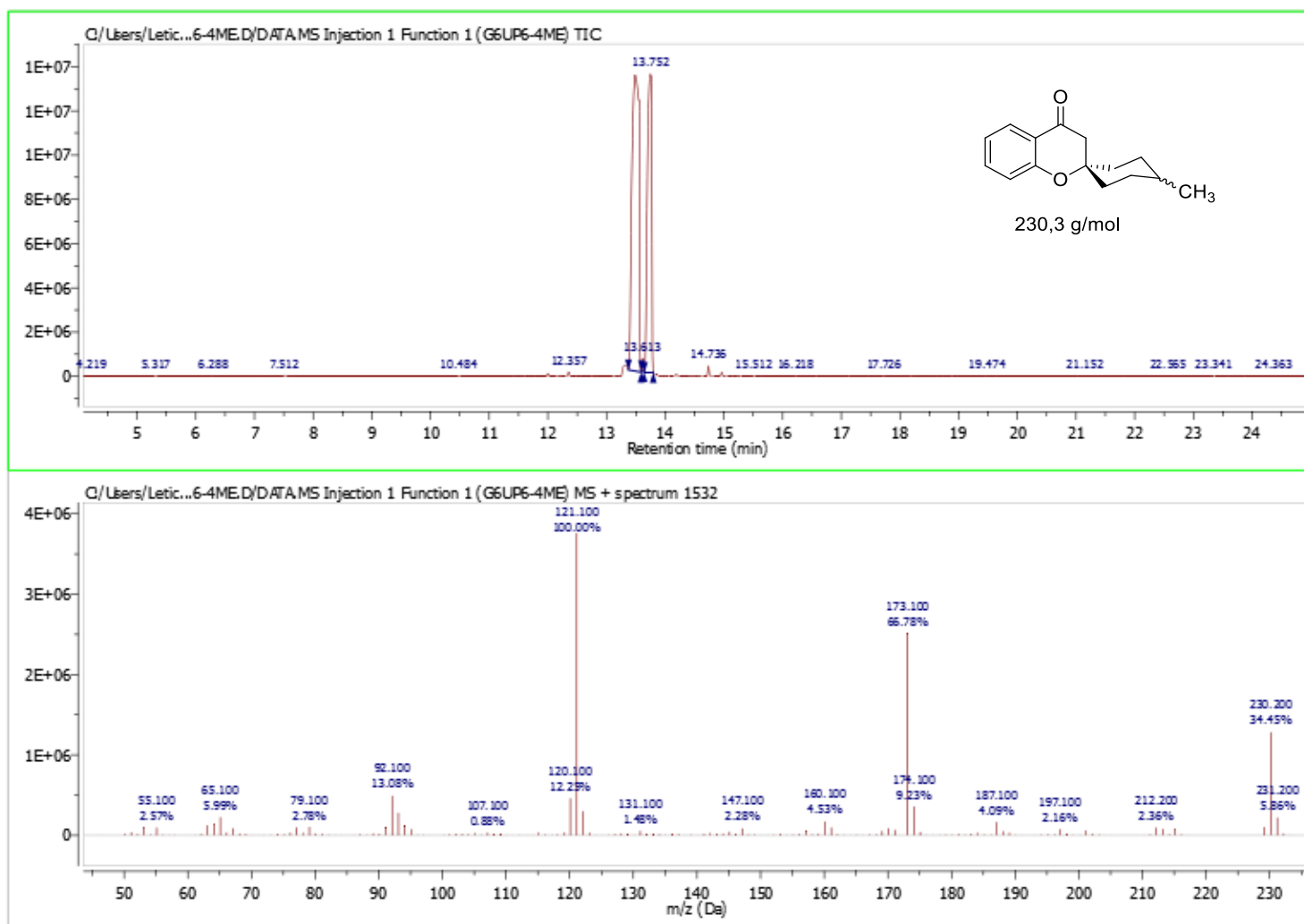
Figura 36. Espectro de Massas (GC-EL) de espiro[croman-2,1'-cicloheptan]-4-ona (4c).



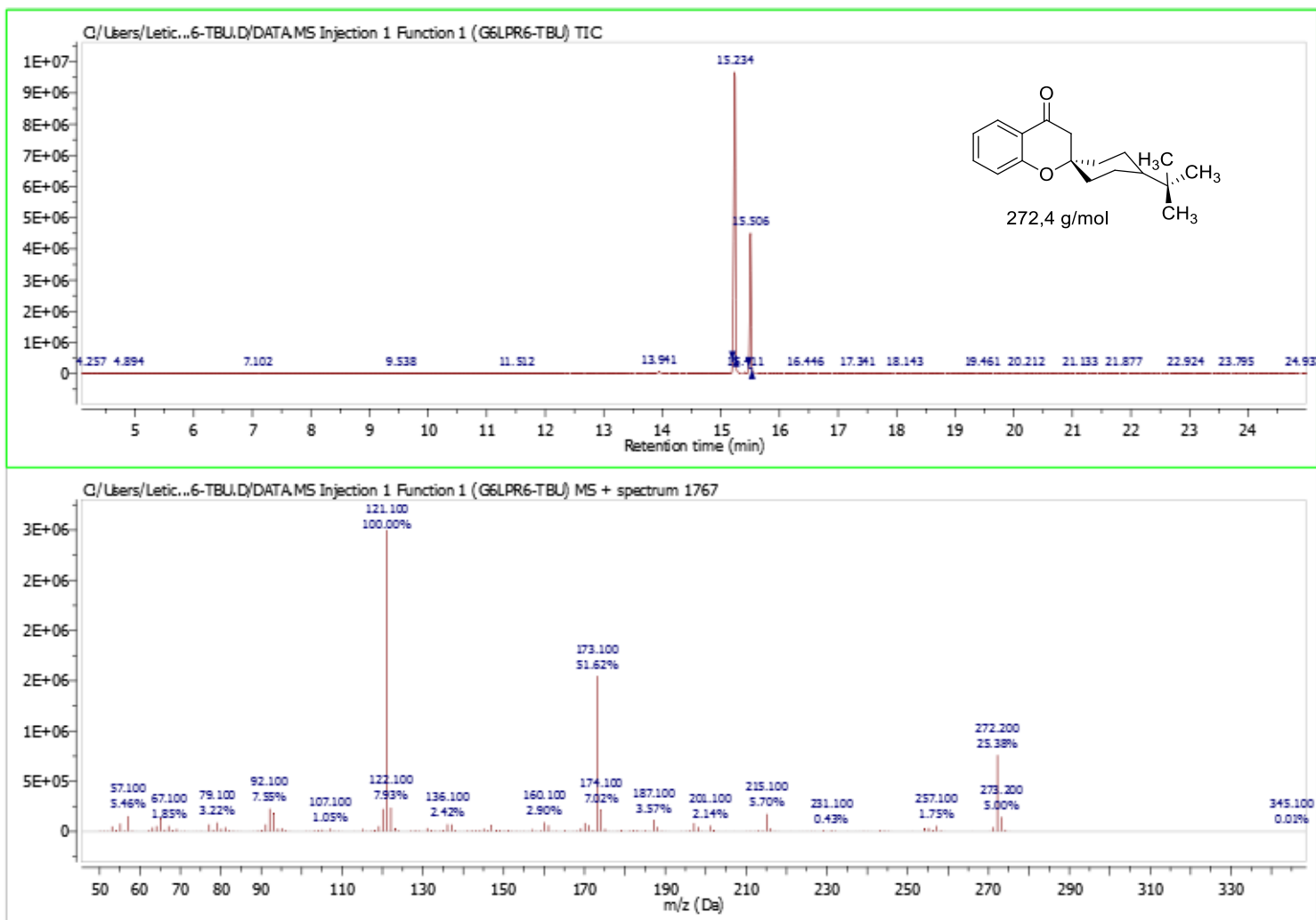
**Figura 37.** Espectro de Massas (GC-MS) de 2'-metil-espiro[croman-2,1'-ciclohexan]-4-ona (**4d**).



**Figura 38.** Espectro de Massas (GC-El) de 3'-metil-espiro[croman-2,1'-ciclohexan]-4-ona (**4e**).



**Figura 39.** Espectro de Massas (GC-El) de 4'-metil-espiro[croman-2,1'-ciclohexan]-4-ona (**4f**).



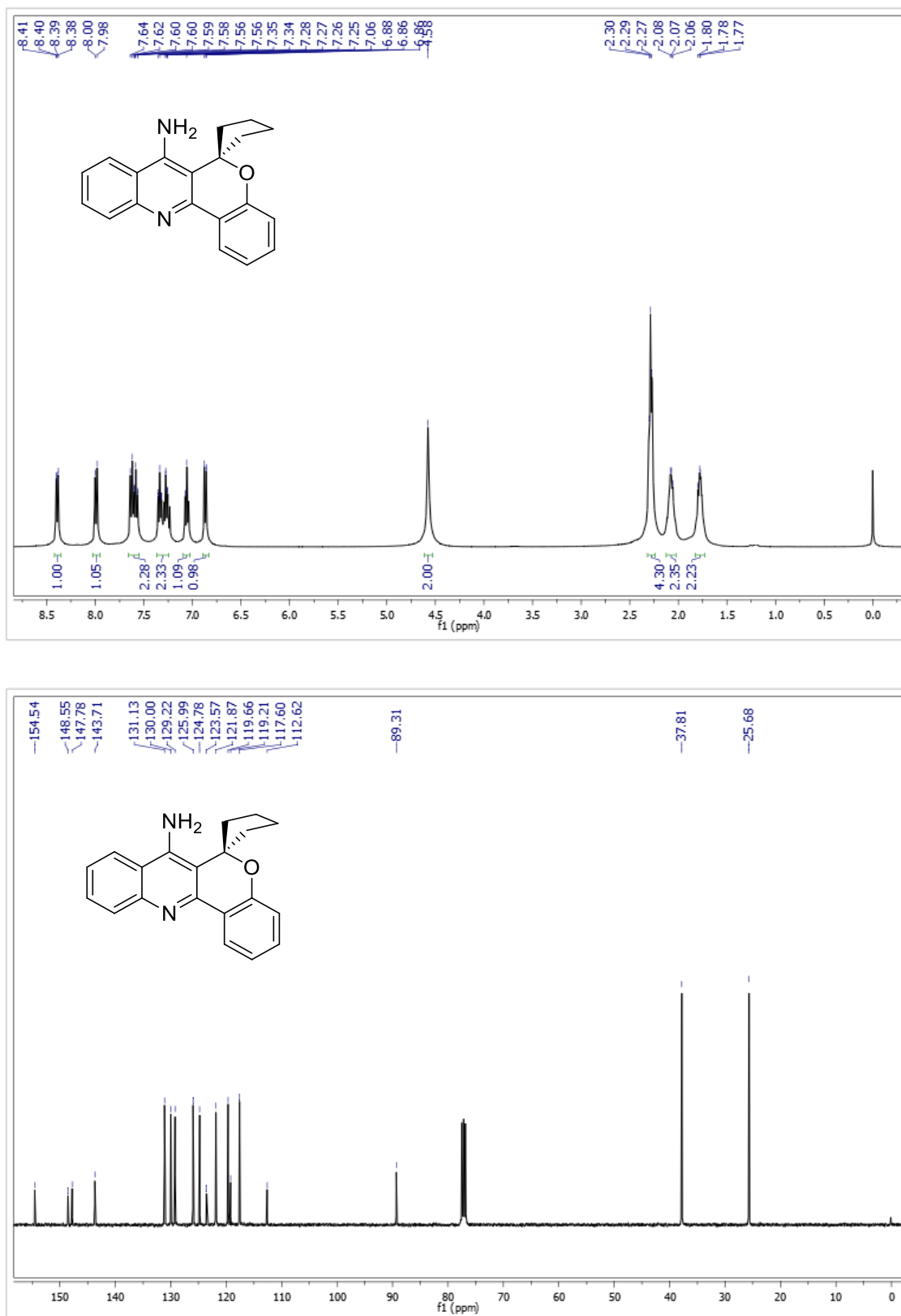
**Figura 40.** Espectro de Massas (GC-EL) de 4'-(tert-butil)-espiro[croman-2,1'-ciclohexan]-4-ona (**4g**).

---

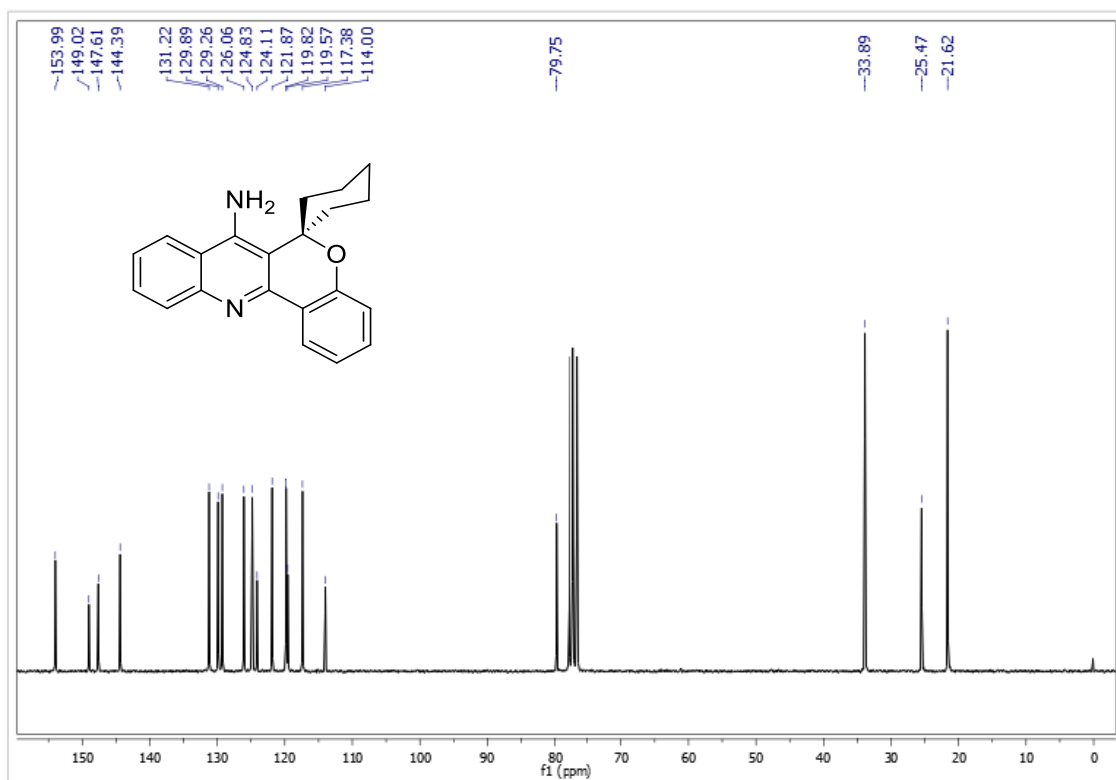
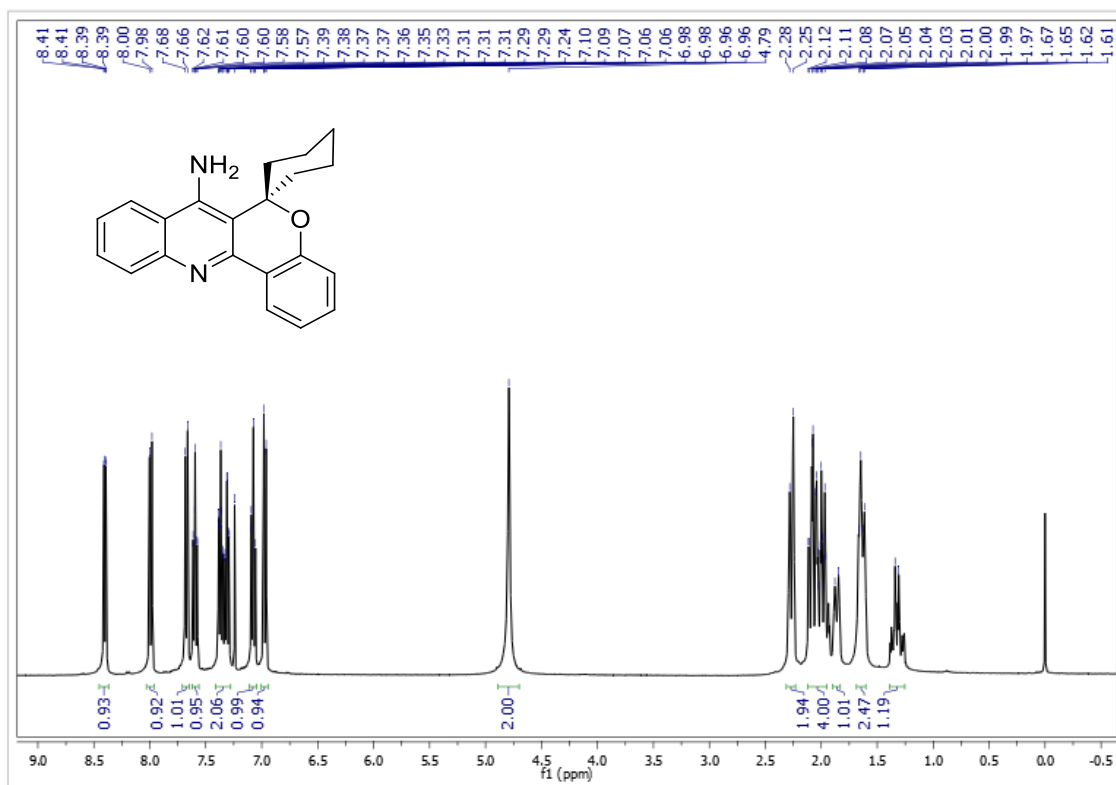
**ANEXO II**

*Espectros de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$*

## 8. ESPECTROS DE RMN DOS COMPOSTOS 9-16

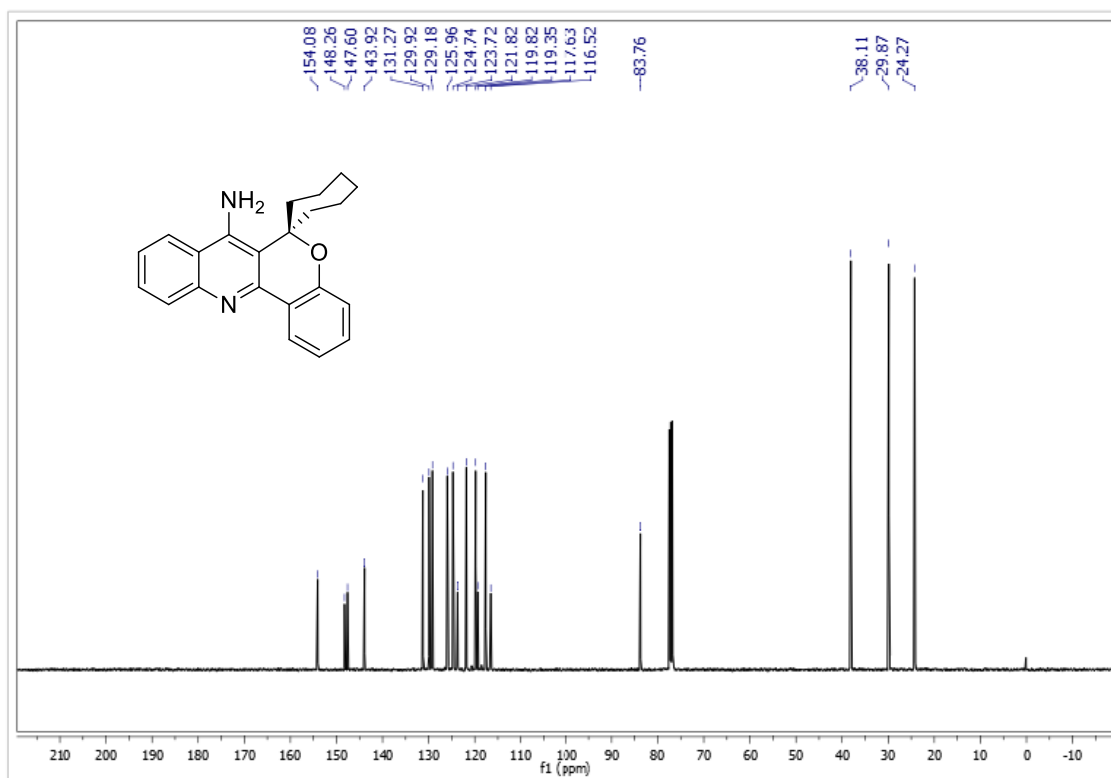
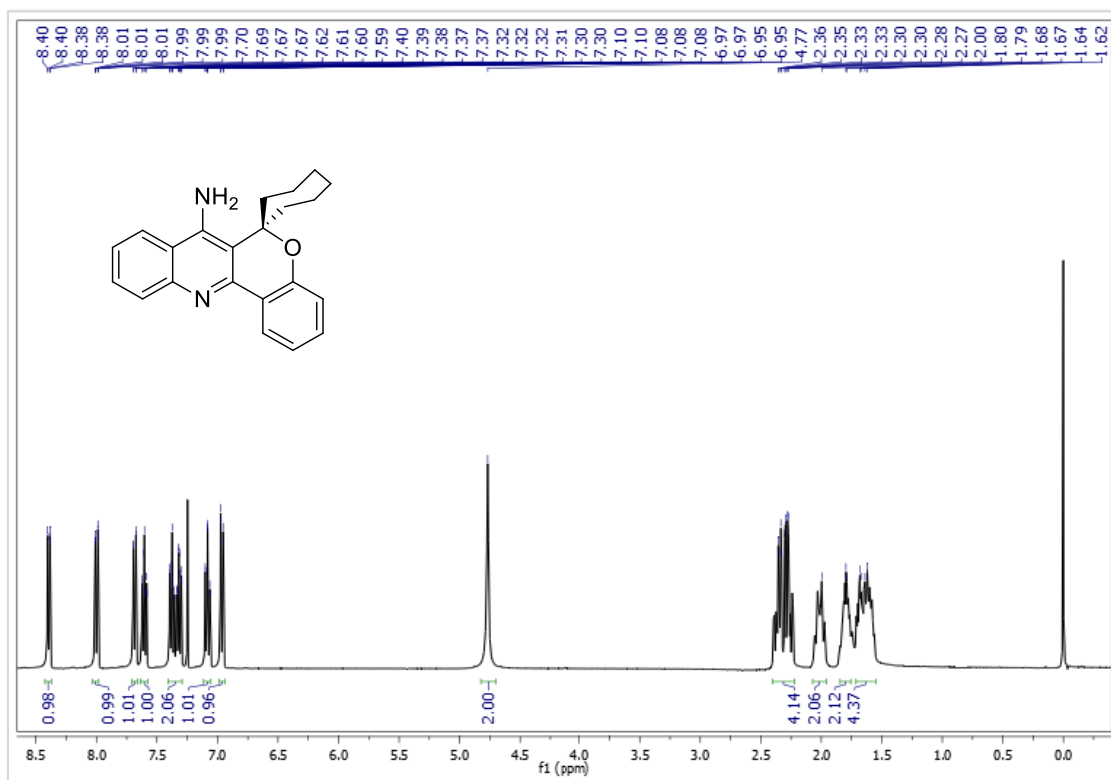


**Figura 41.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinoлина-6,1'-ciclopentano] (**9a**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .

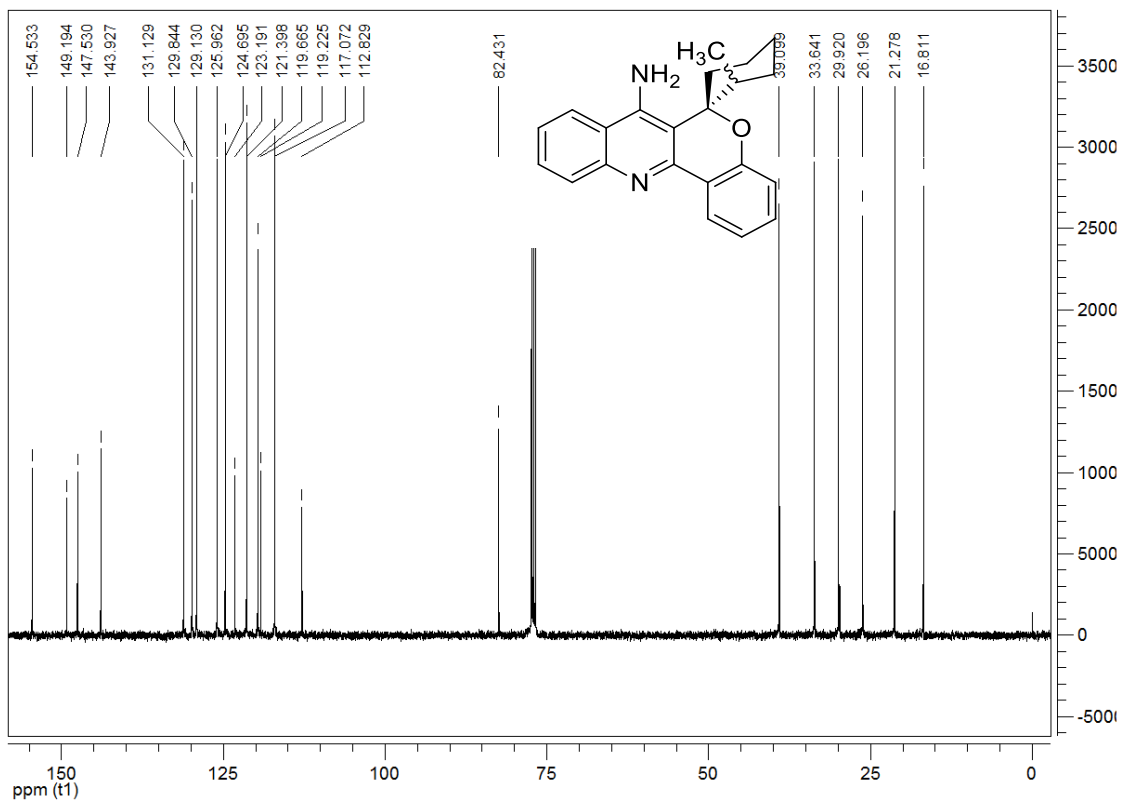
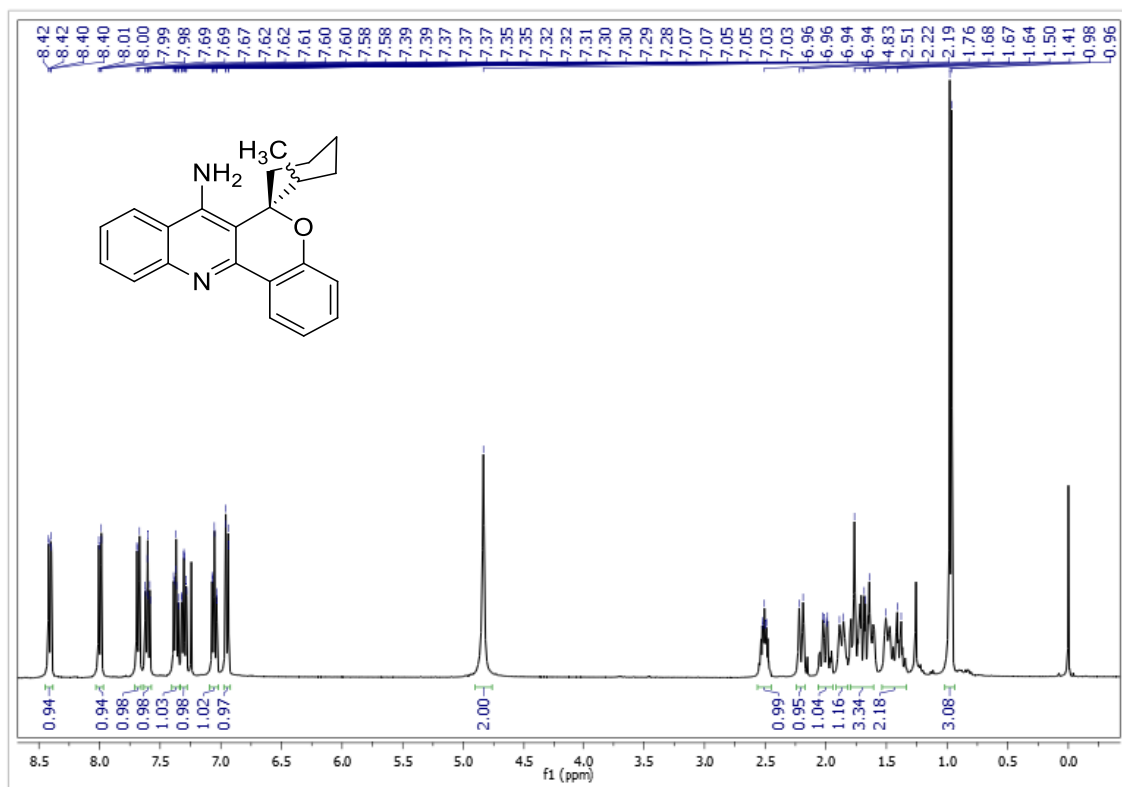


**Figura 42.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H a 400 MHz e <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9b**), registrados em CDCl<sub>3</sub>.

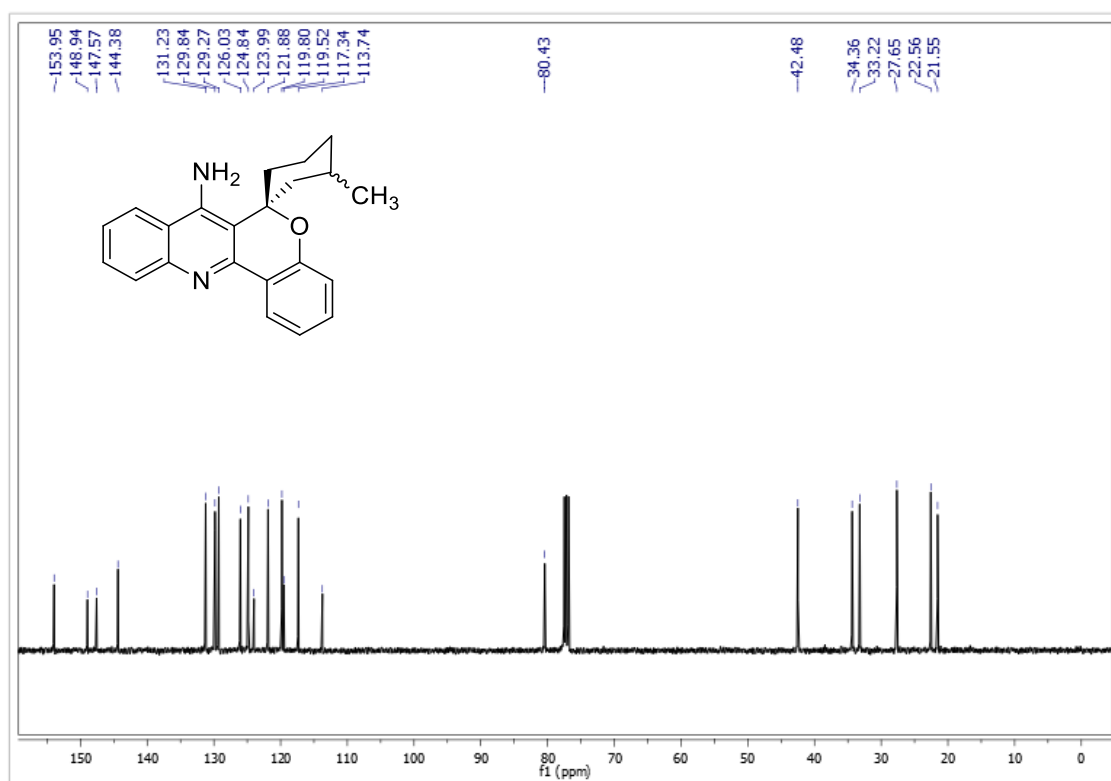
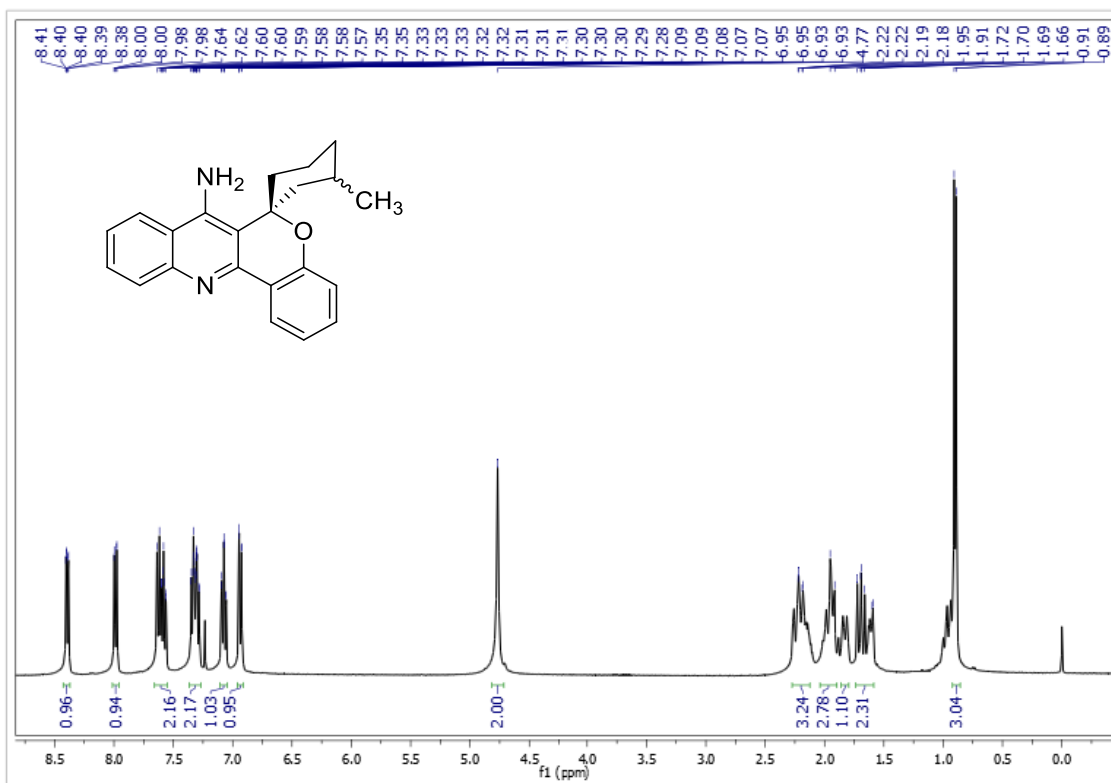




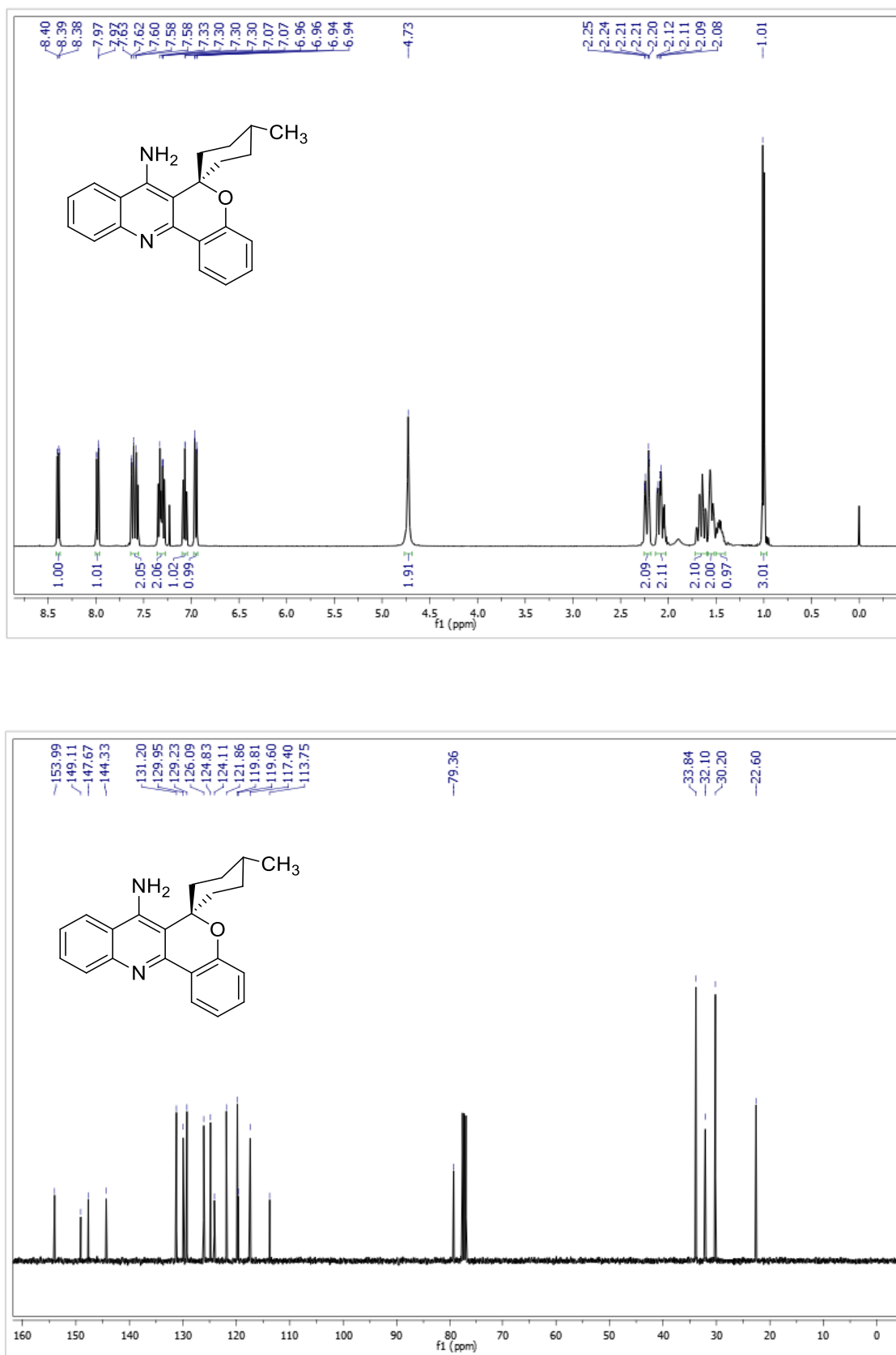
**Figura 43.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloheptano] (**9c**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



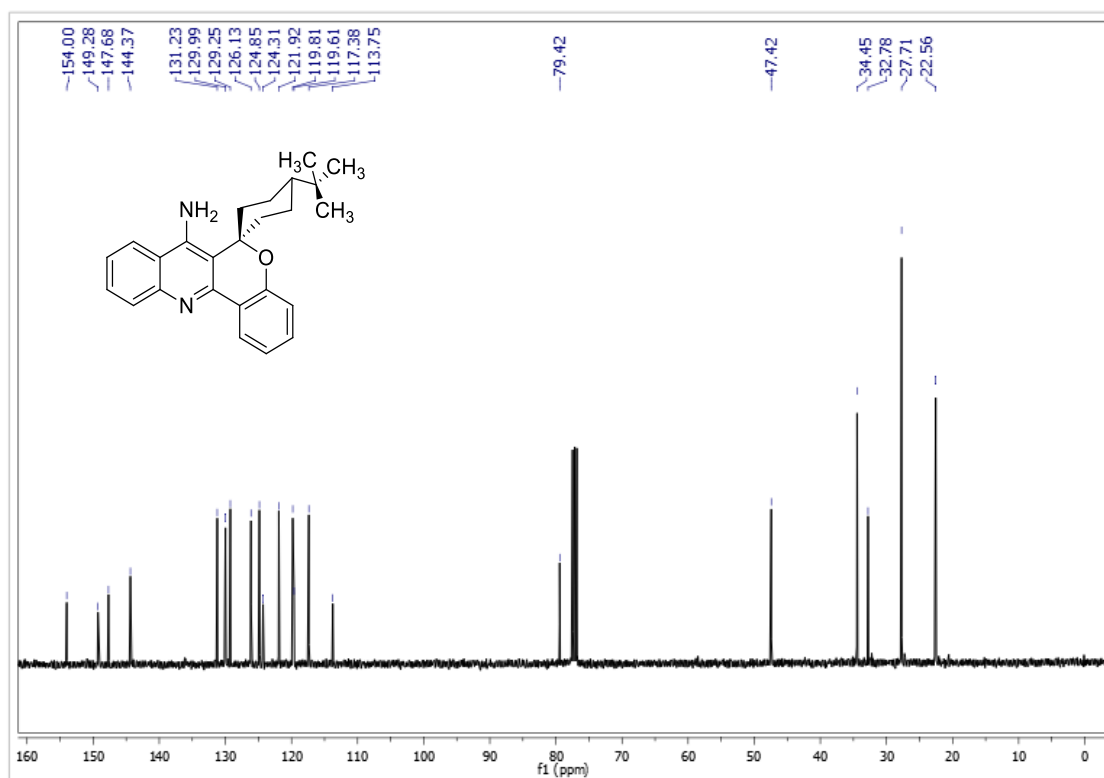
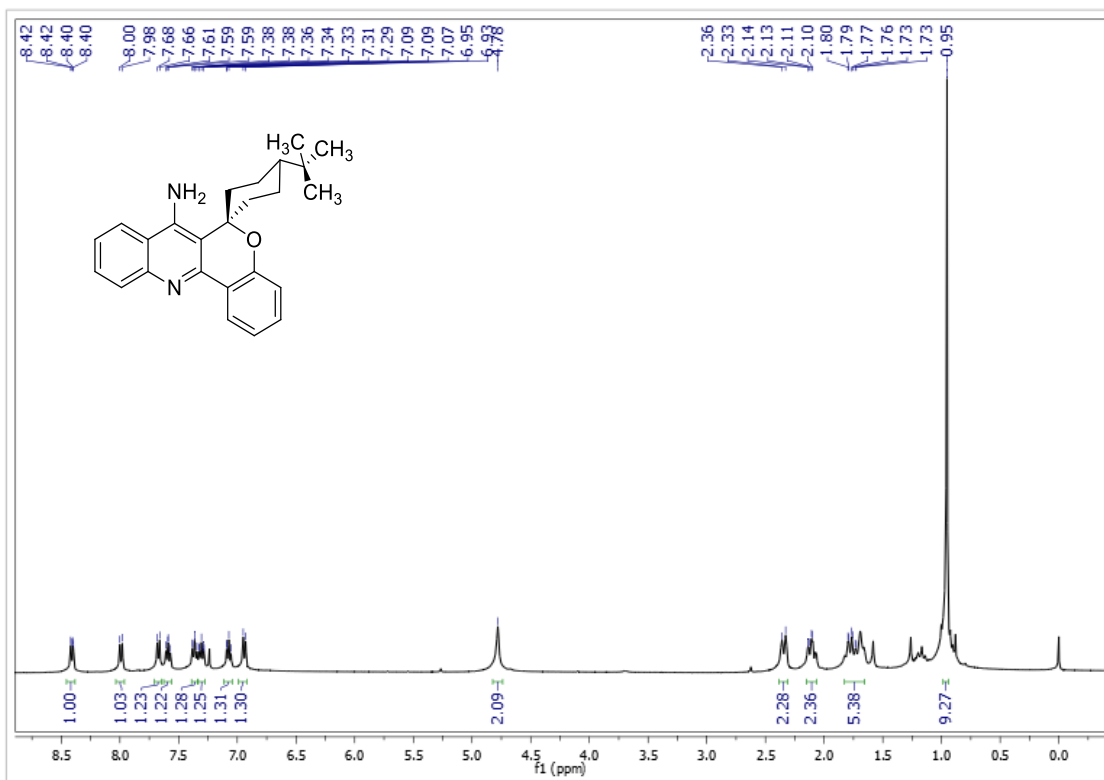
**Figura 44.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



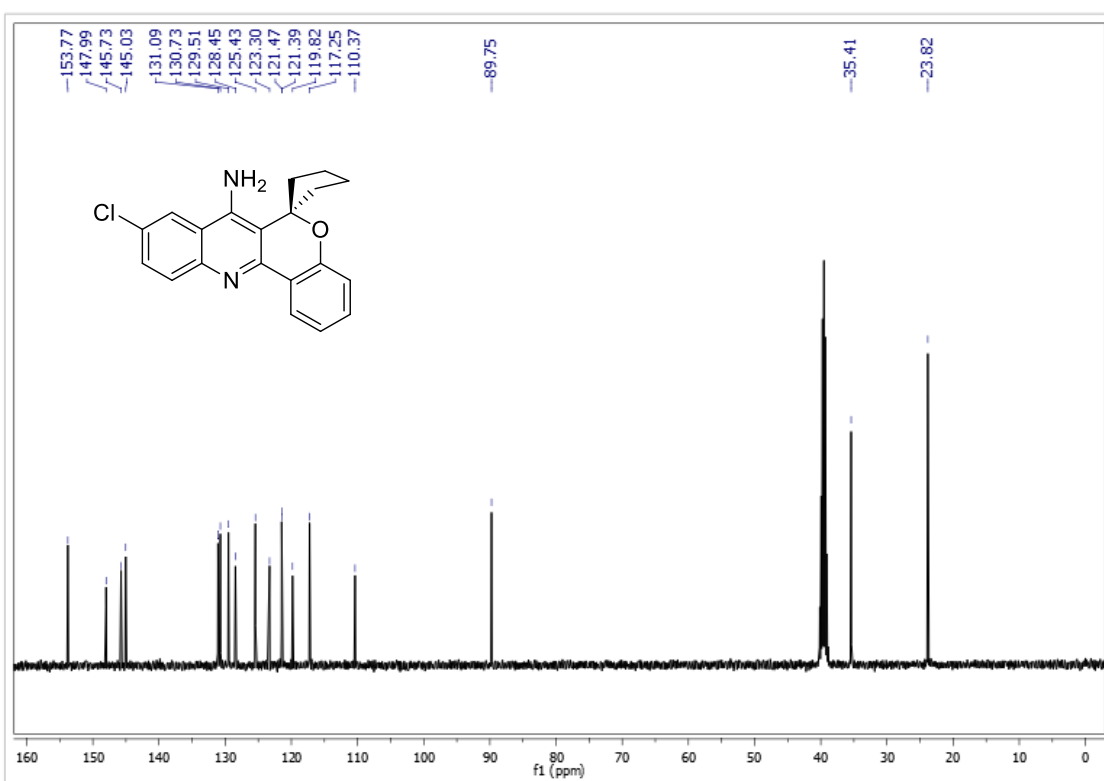
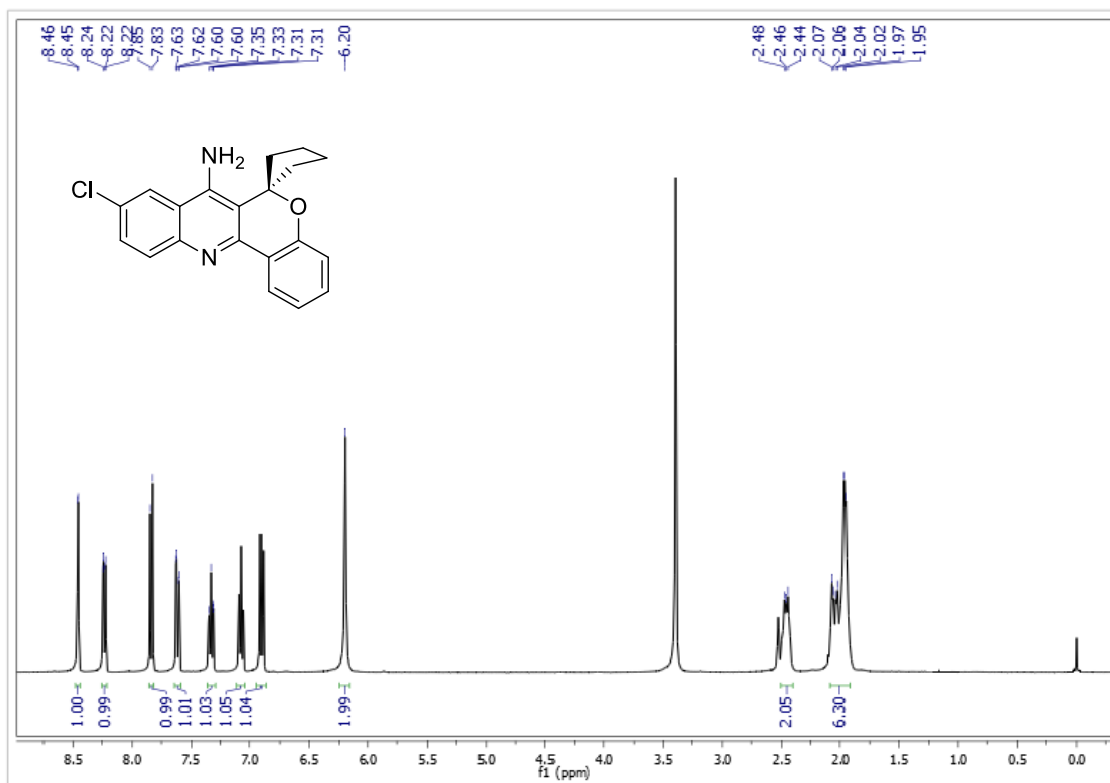
**Figura 45.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-3'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9e**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



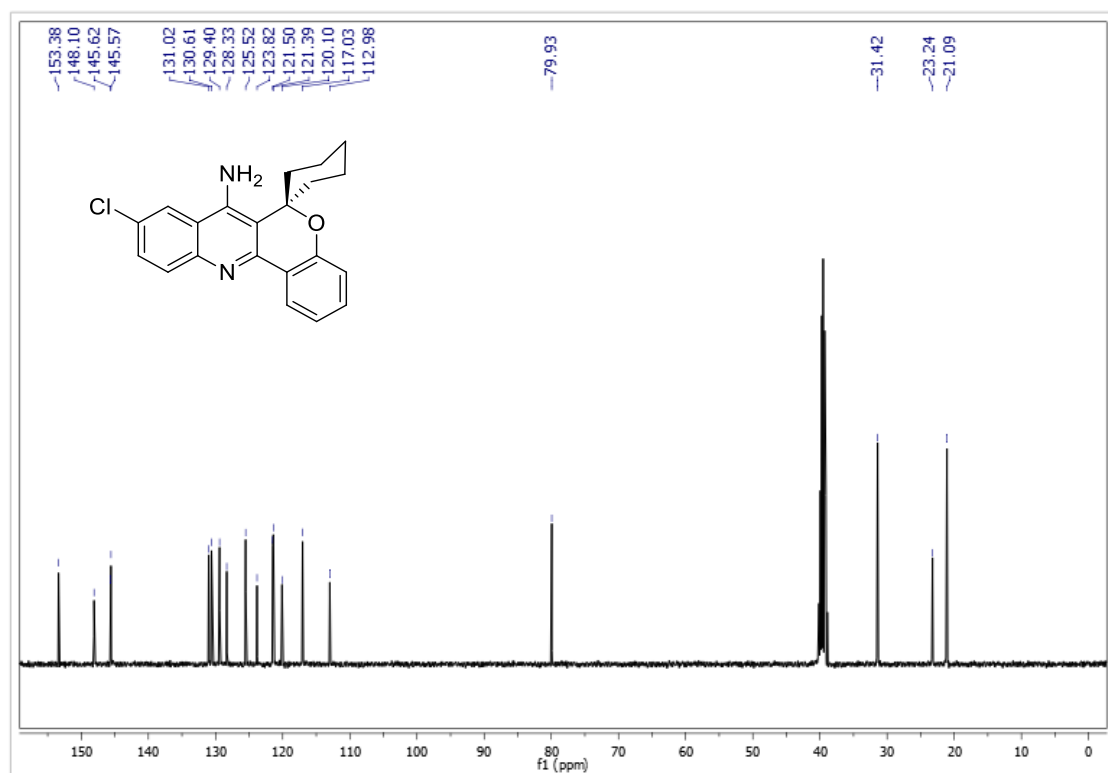
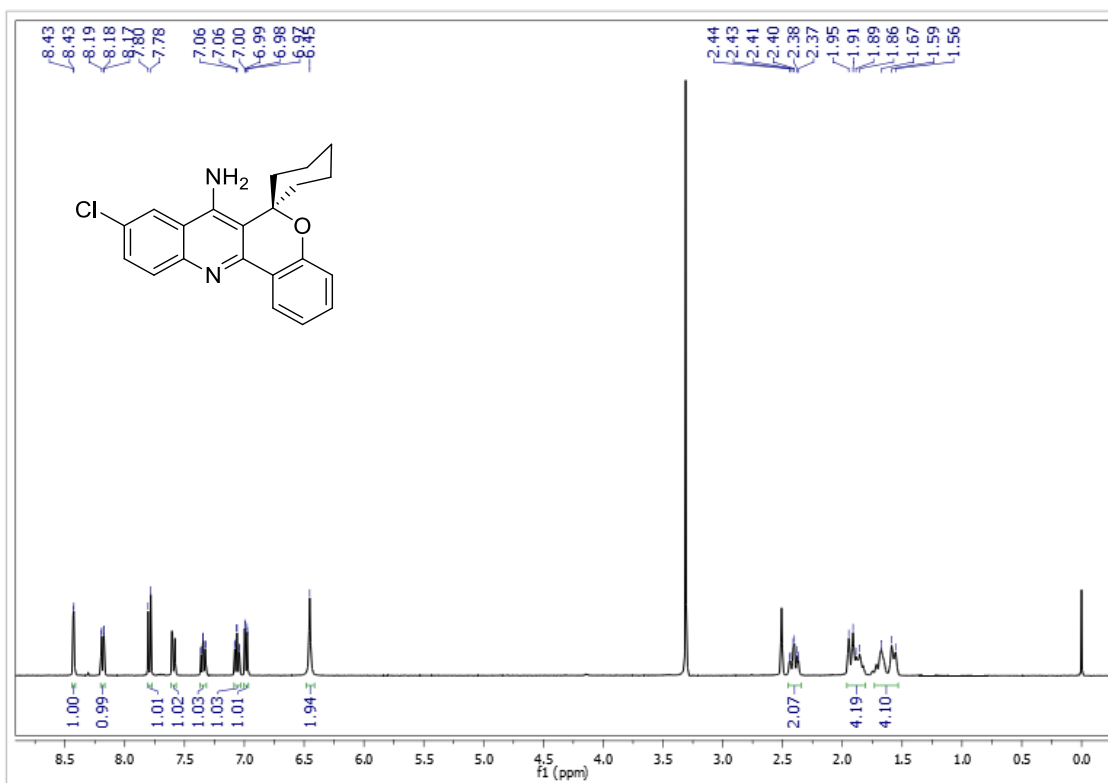
**Figura 46.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-4'-metil-espino[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9f**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



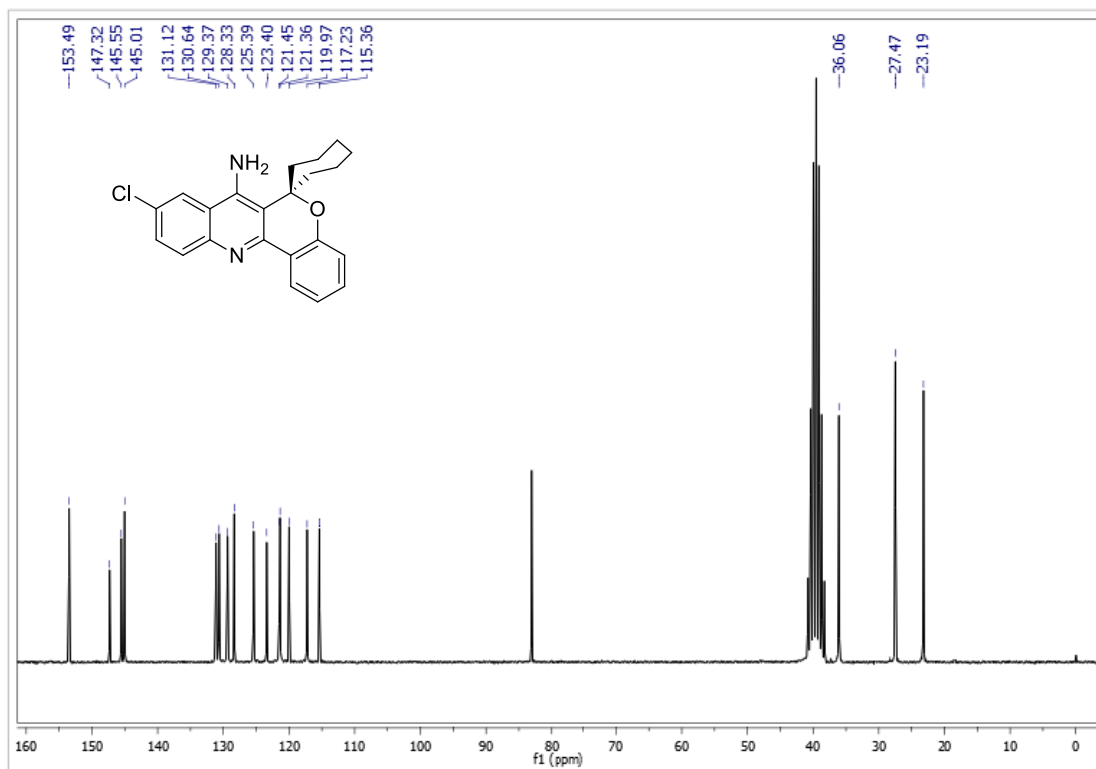
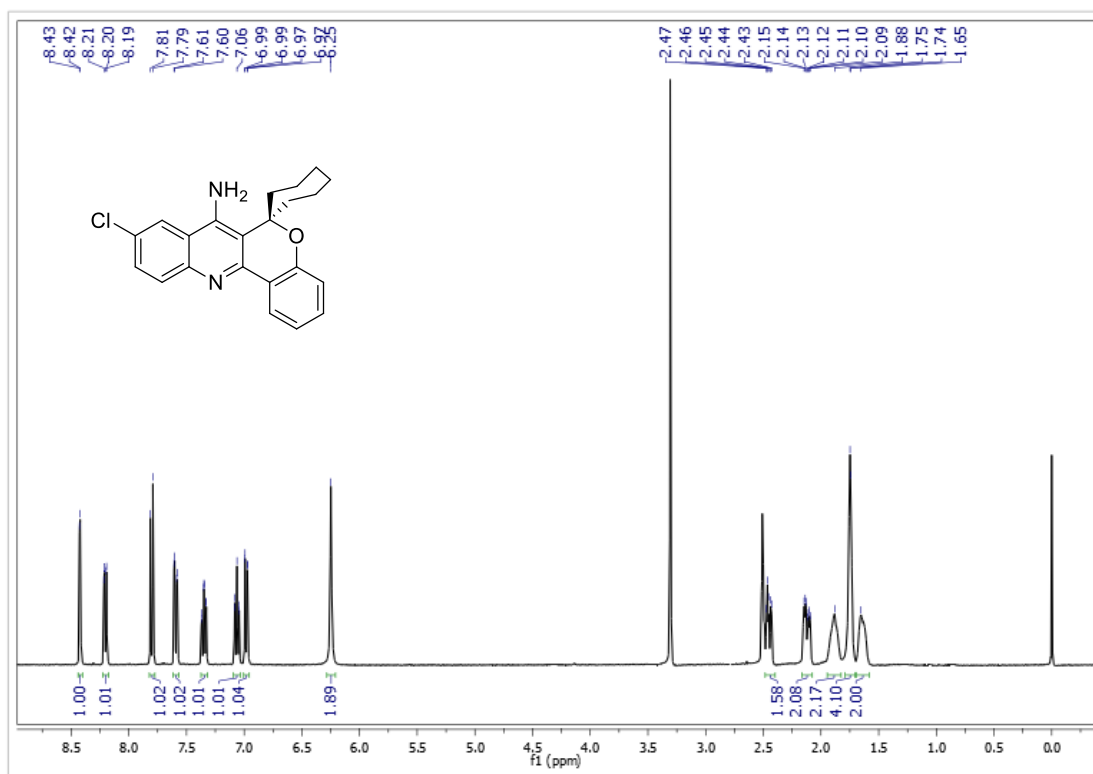
**Figura 47.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H a 400 MHz e <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} a 100, 61 MHz de 7-Amino-4'-*t*-butil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9g**), registrados em CDCl<sub>3</sub>.



**Figura 48.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-9-cloro-espino[chromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (**10a**), registrados em  $\text{DMSO-}d_6$ .

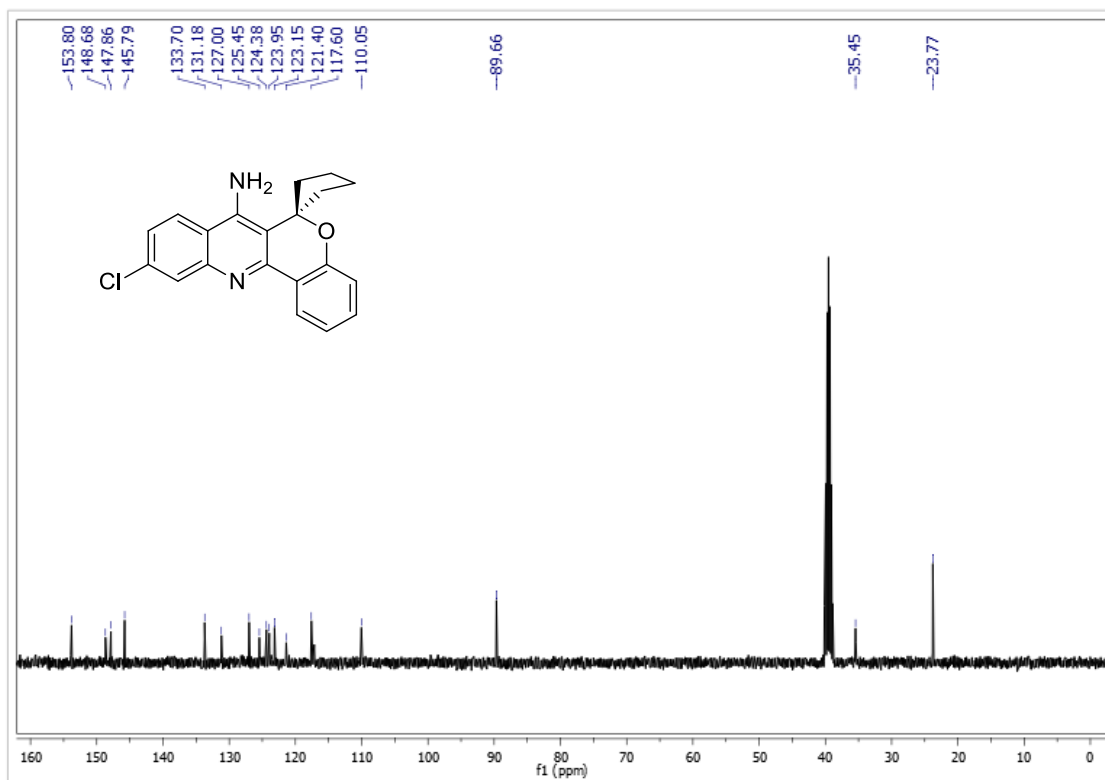
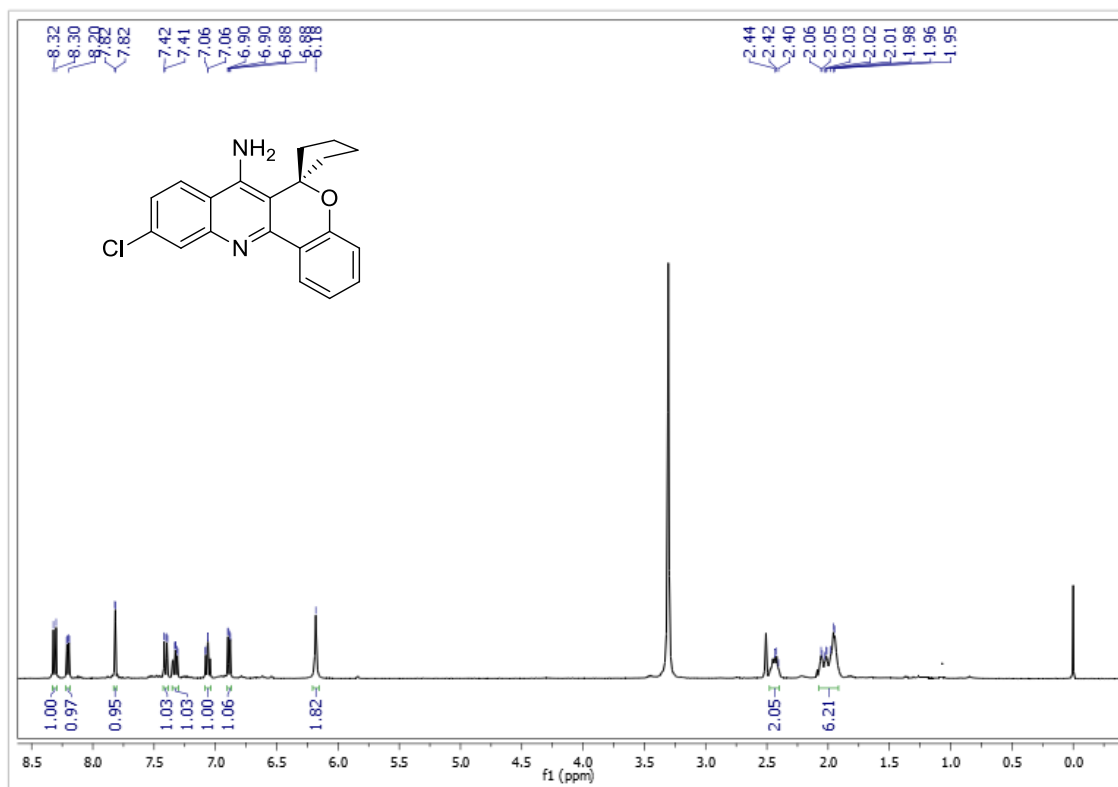


**Figura 49.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-9-cloro-esp[ro]cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano (10b), registrados em  $\text{DMSO-}d_6$ .

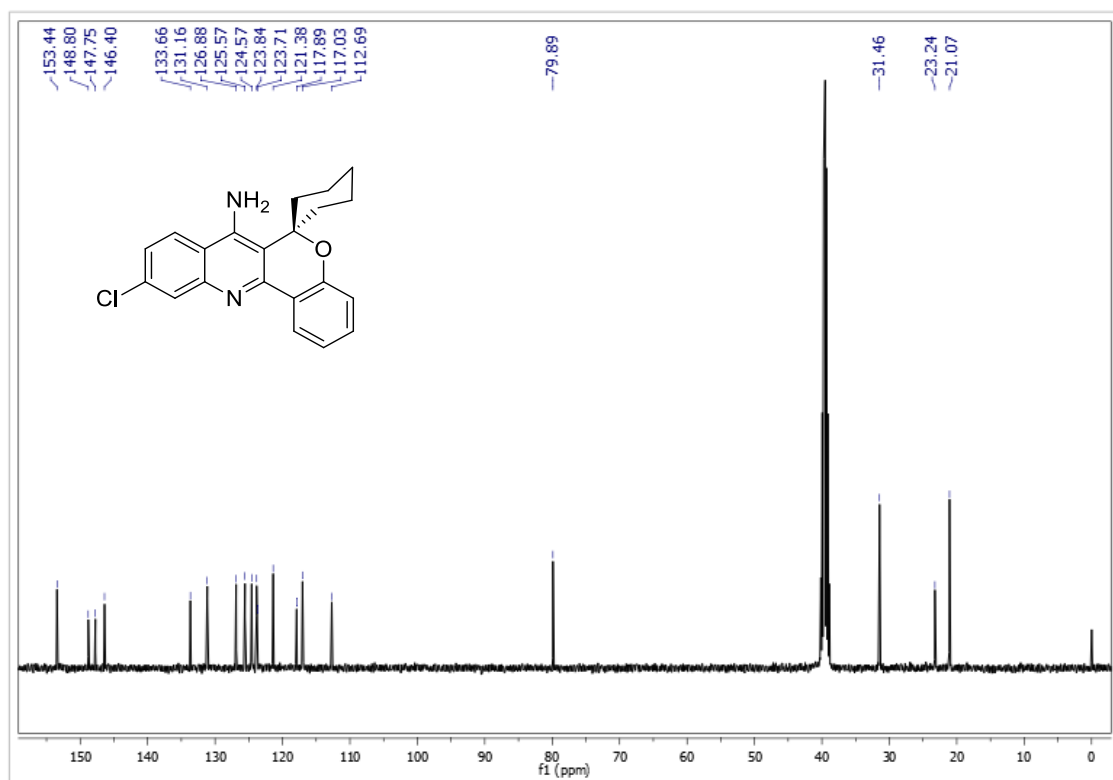
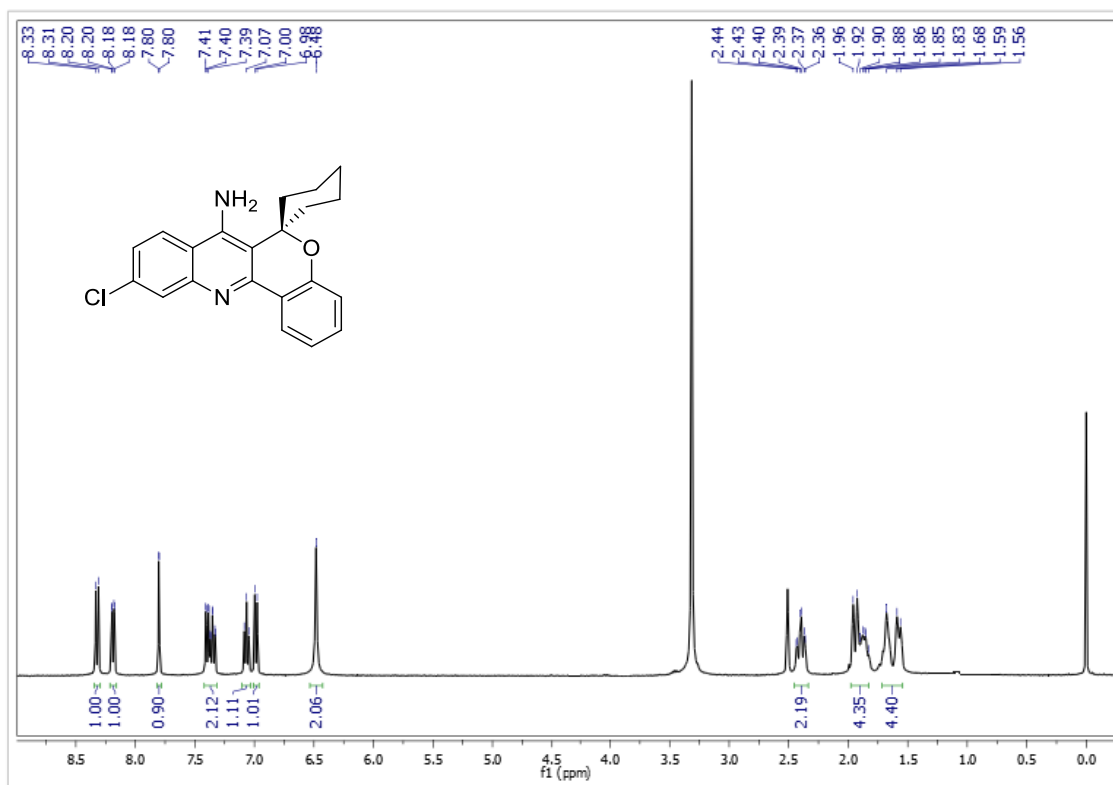


**Figura 50.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-9-cloro-espino[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloheptano] (**10c**), registrados em  $\text{DMSO-}d_6$ .

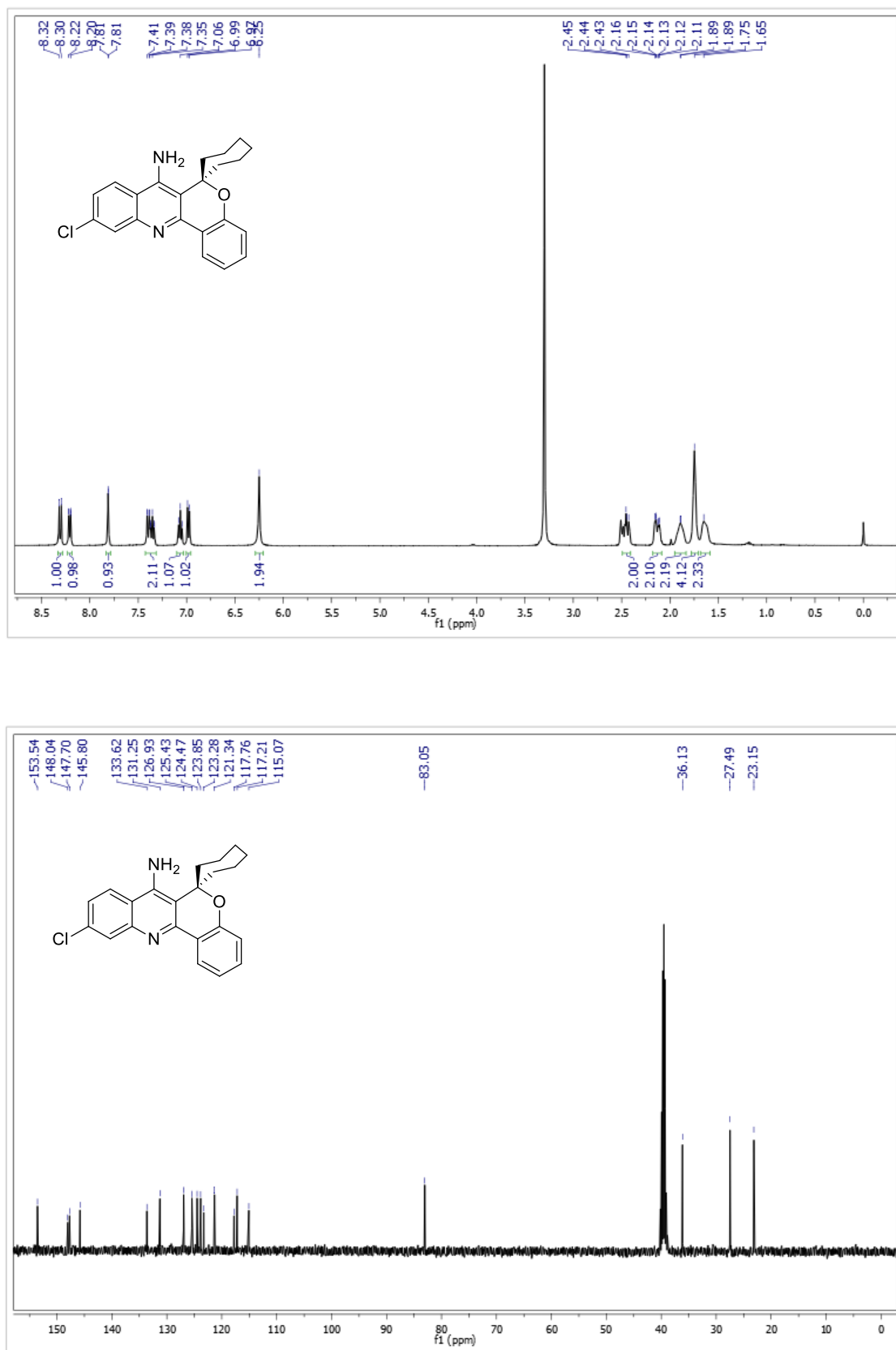




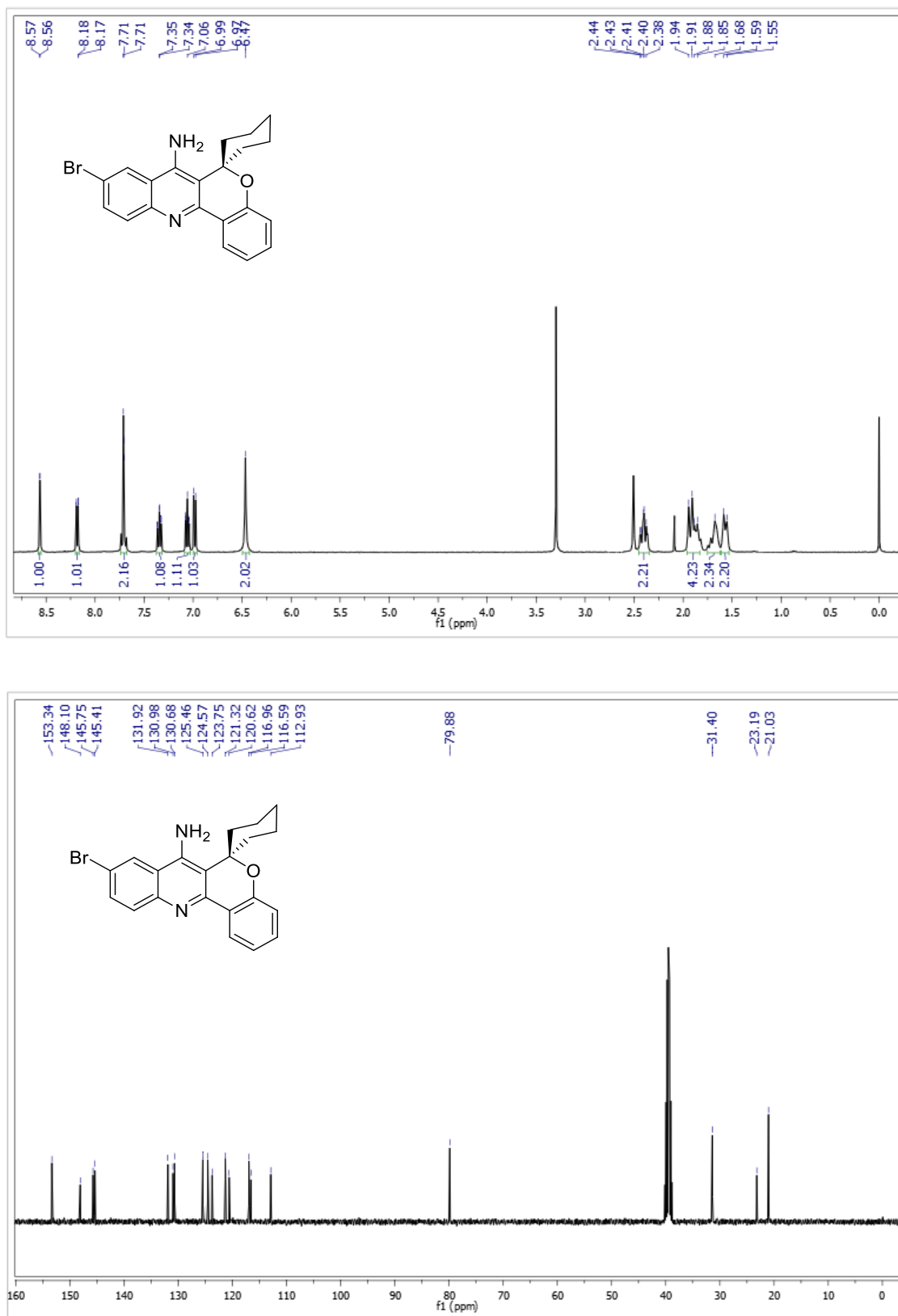
**Figura 51.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-10-cloro-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (**11a**), registrados em  $\text{DMSO-}d_6$ .



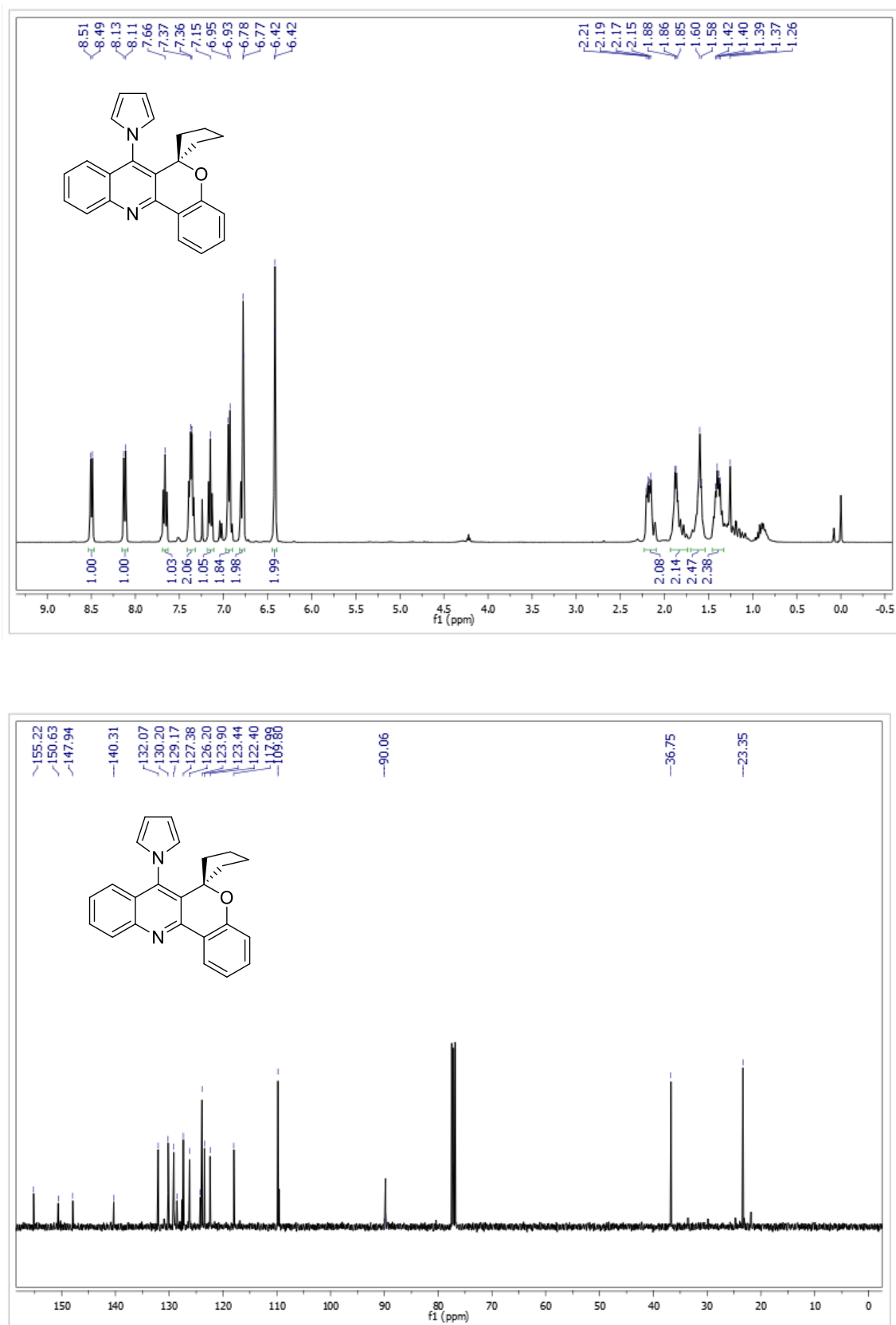
**Figura 52.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-10-cloro-espino[chromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**11b**), registrados em  $\text{DMSO-}d_6$ .



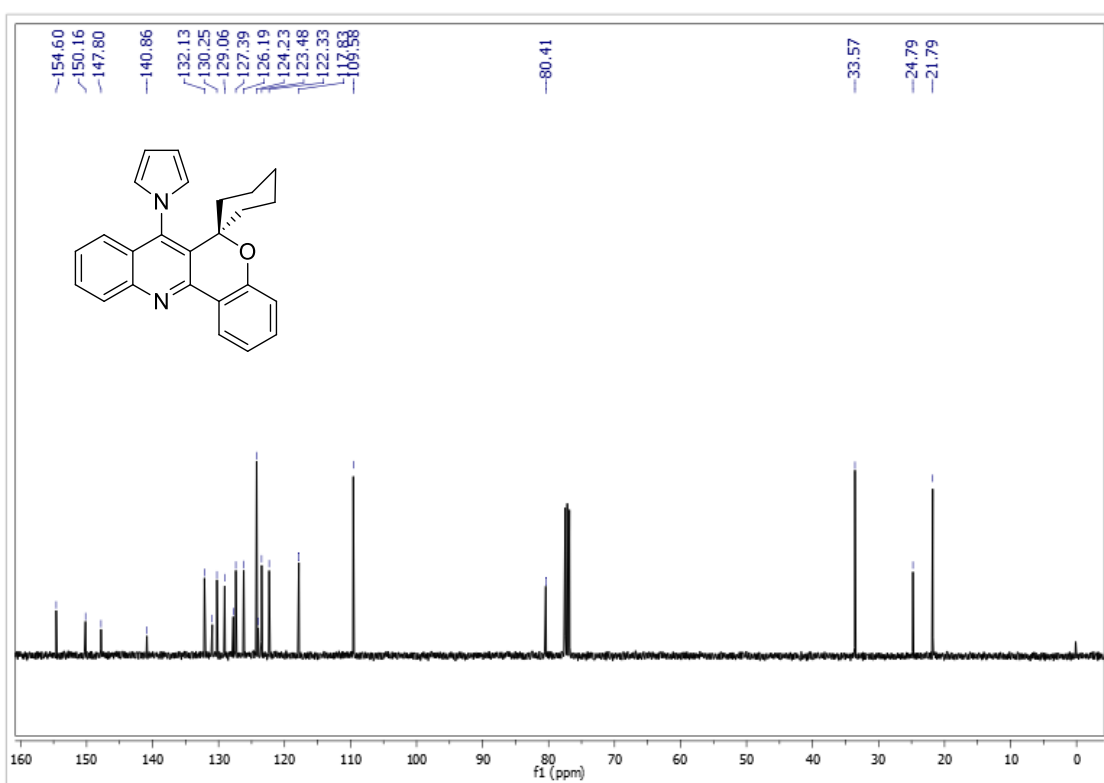
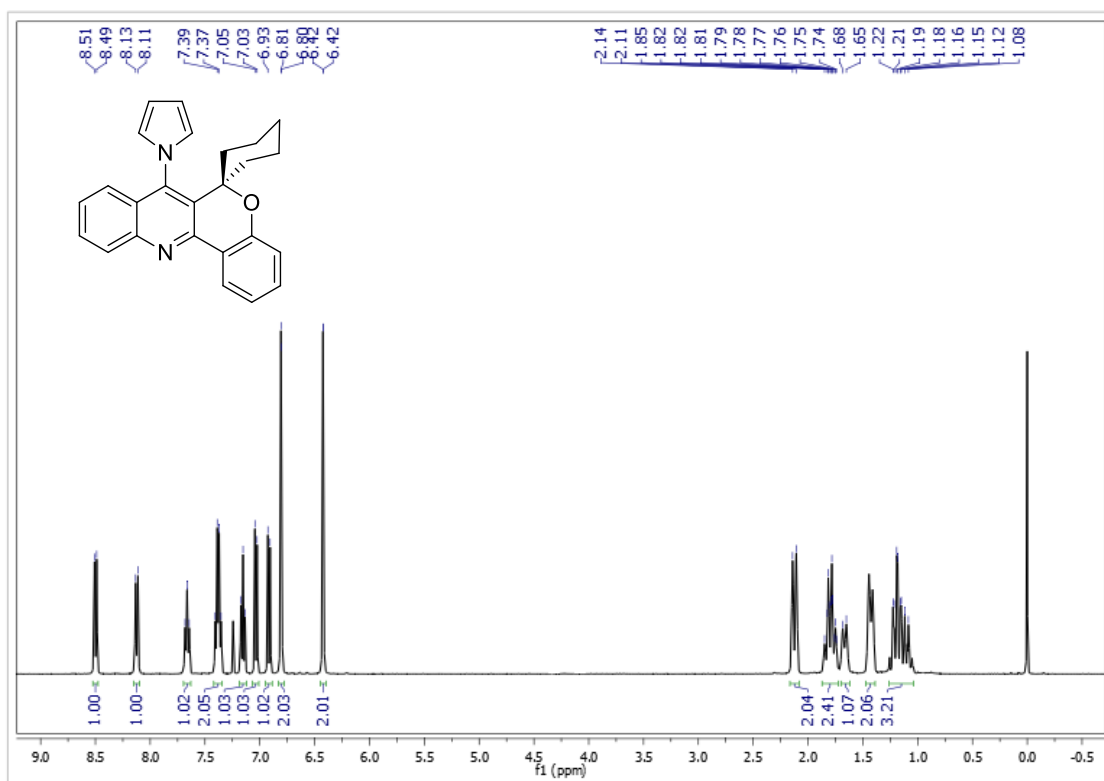
**Figura 53.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-10-cloro-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloheptano] (**11c**), registrados em DMSO-*d*<sub>6</sub>.



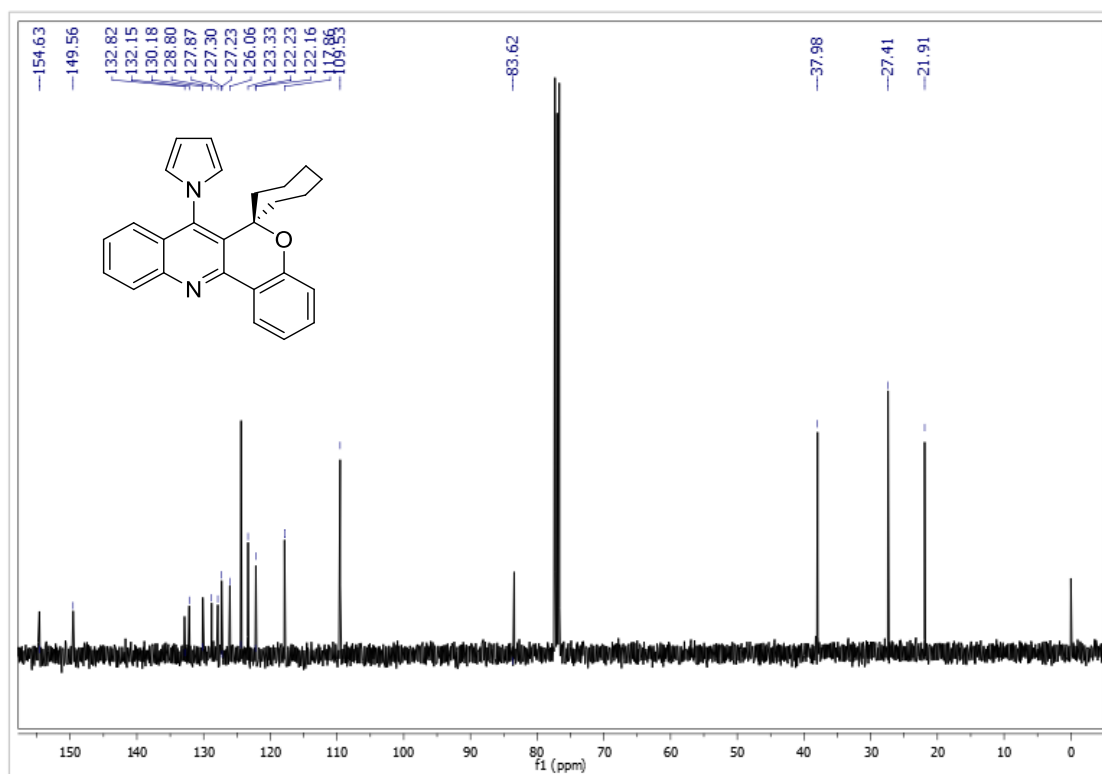
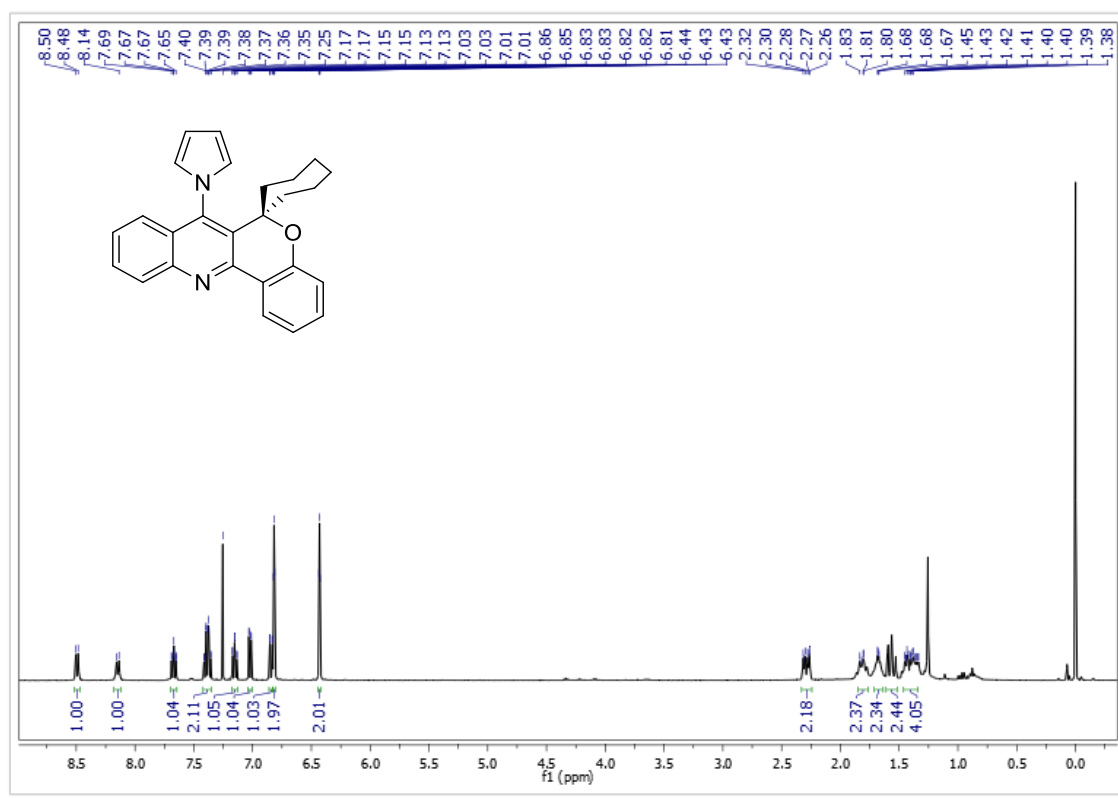
**Figura 54.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-Amino-9-bromo-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**12b**), registrados em  $\text{DMSO-}d_6$ .



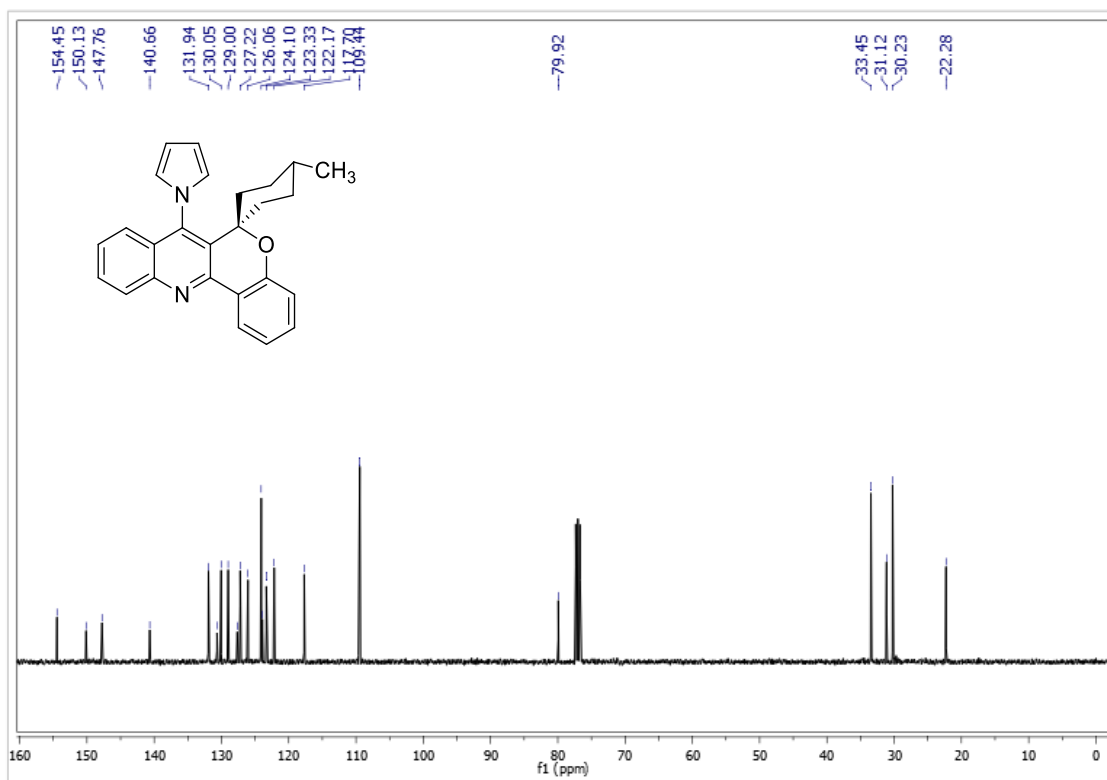
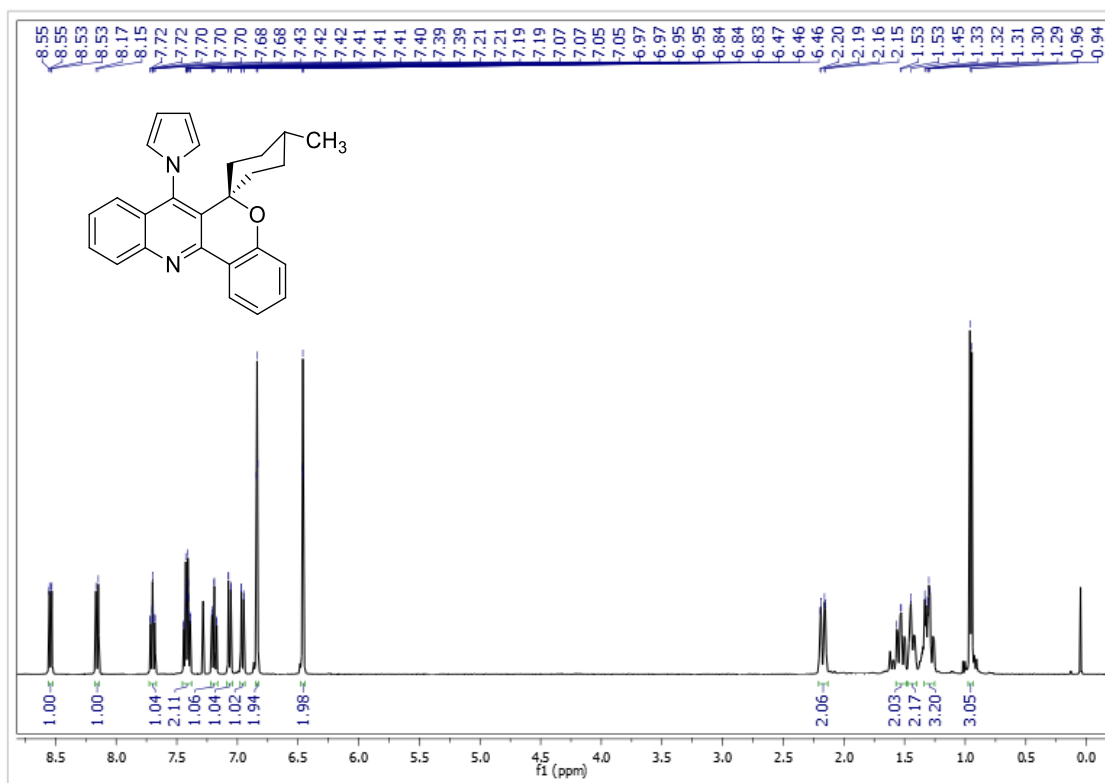
**Figura 55.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclopentano] (**14a**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 56.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H a 400 MHz e <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} a 100, 61 MHz de 7-(1*H*-pirol-1-*il*)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclohexano] (**14b**), registrados em CDCl<sub>3</sub>.

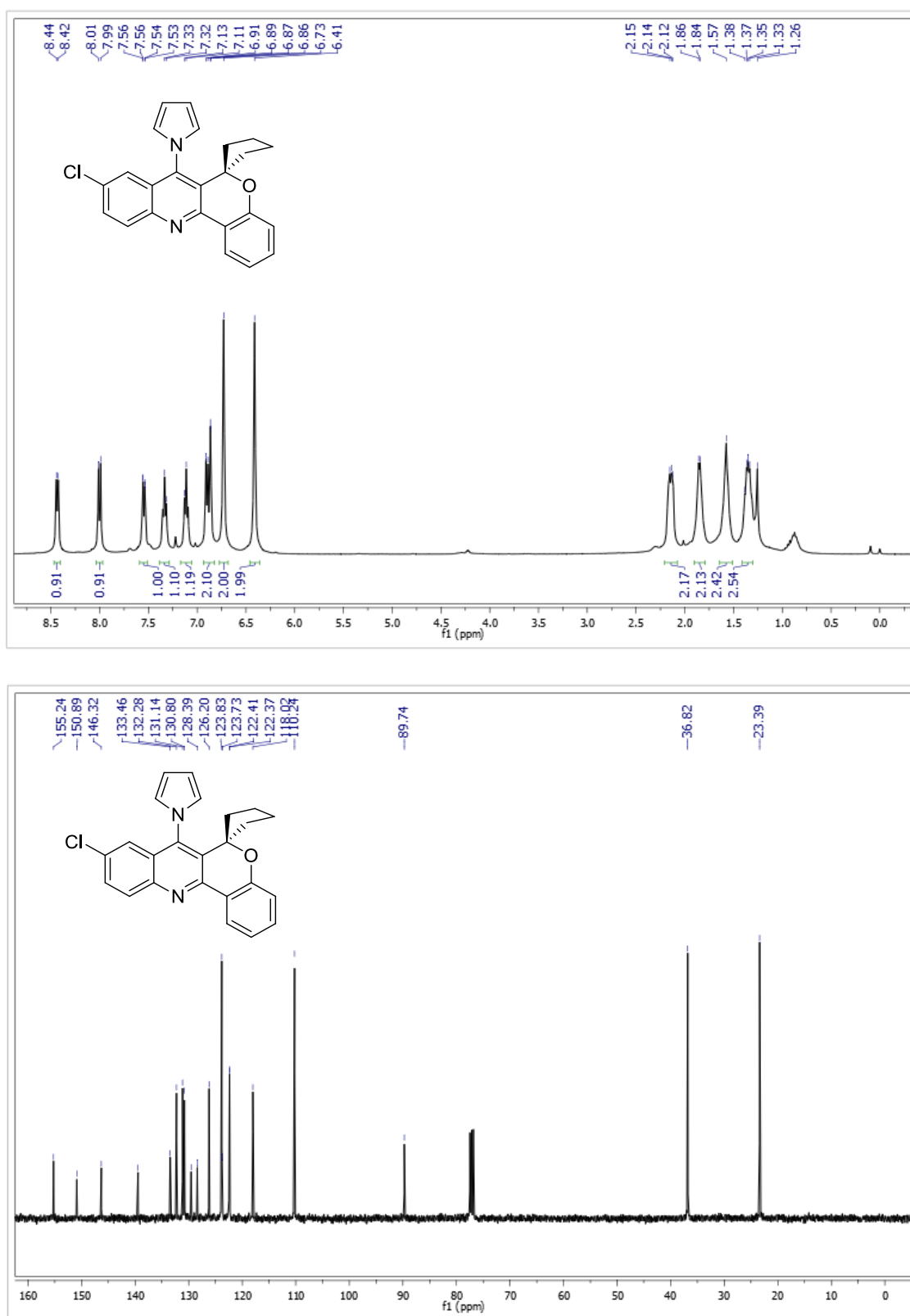


**Figura 57.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H a 400 MHz e <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} a 100, 61 MHz de 7-(1*H*-pirrol-1-*il*)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-cicloheptano] (**14c**), registrados em CDCl<sub>3</sub>.

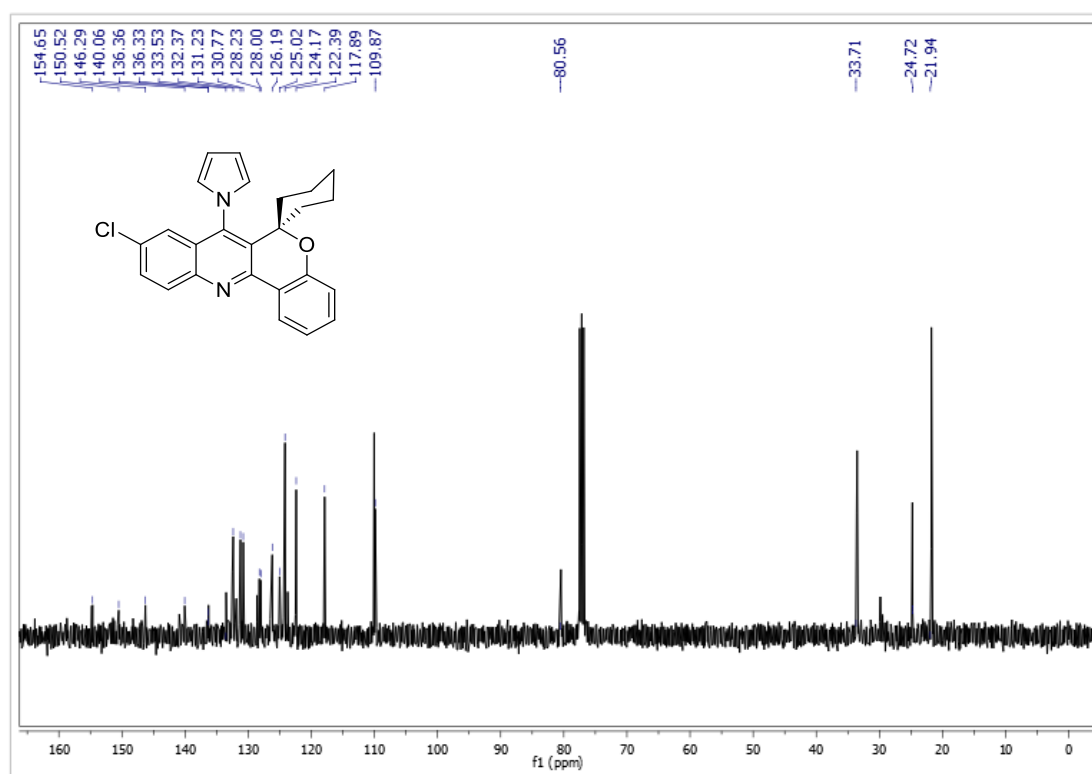
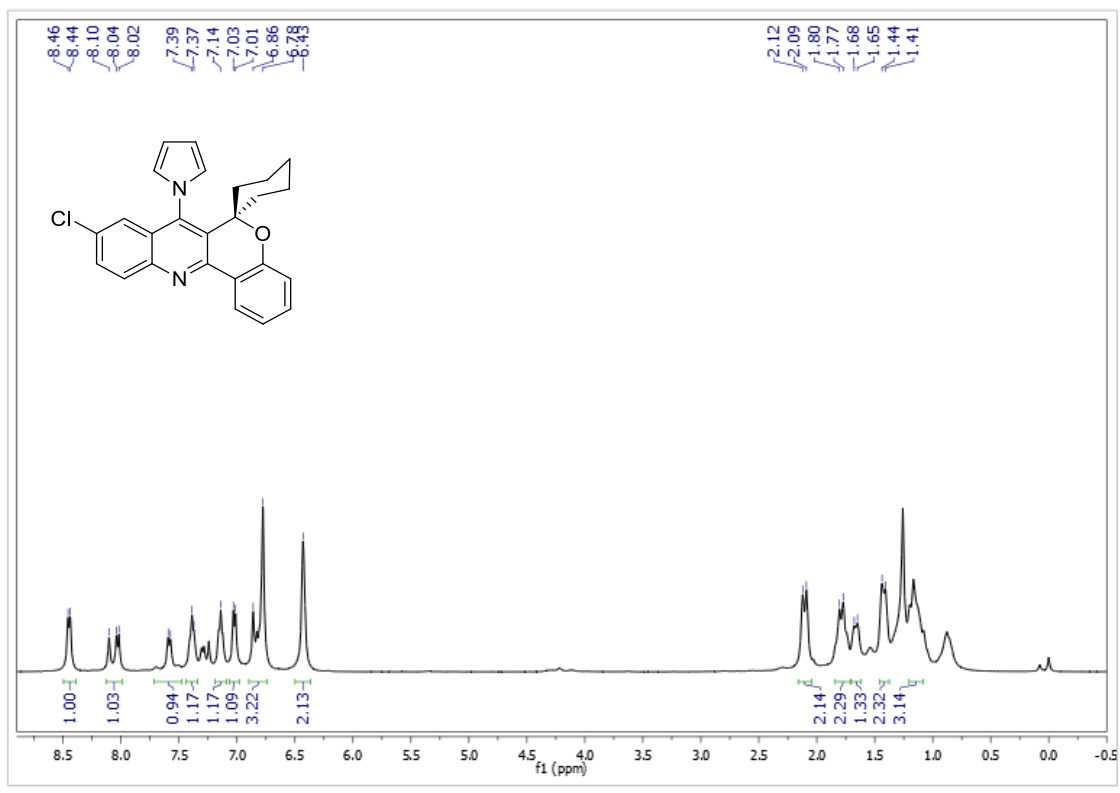


**Figura 58.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 7-(1*H*-pirrol-1-il)-4'-metil-espino[chromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclohexano] (**14d**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .

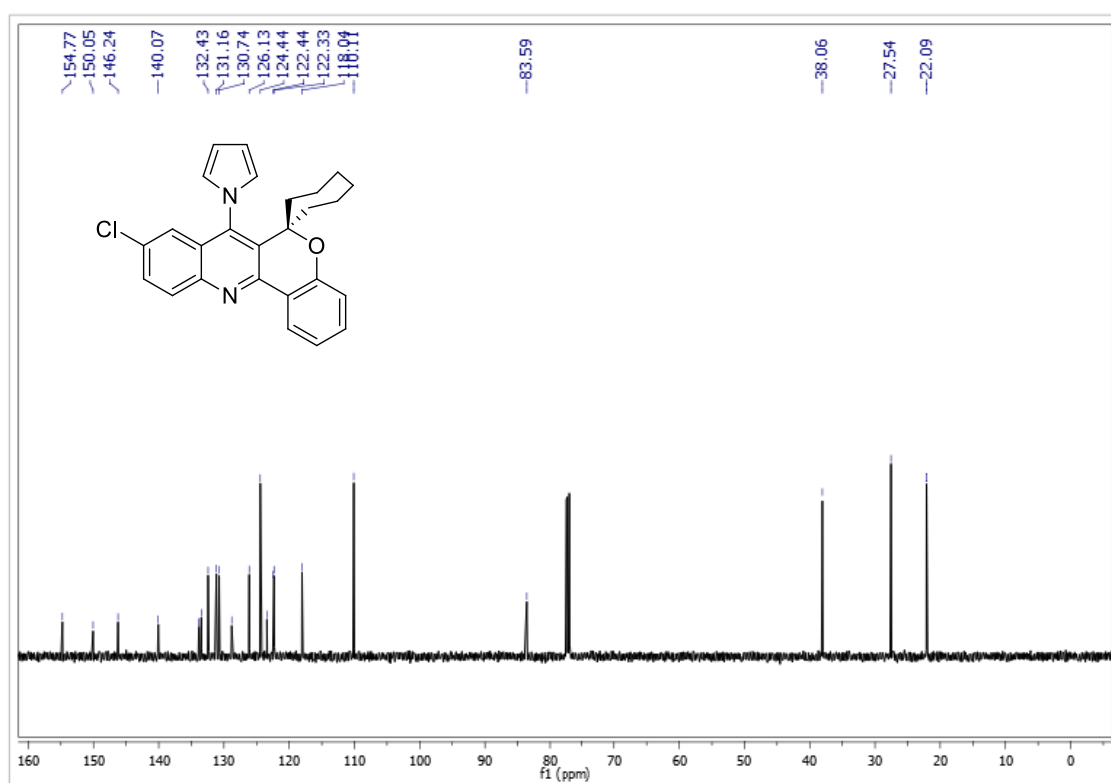
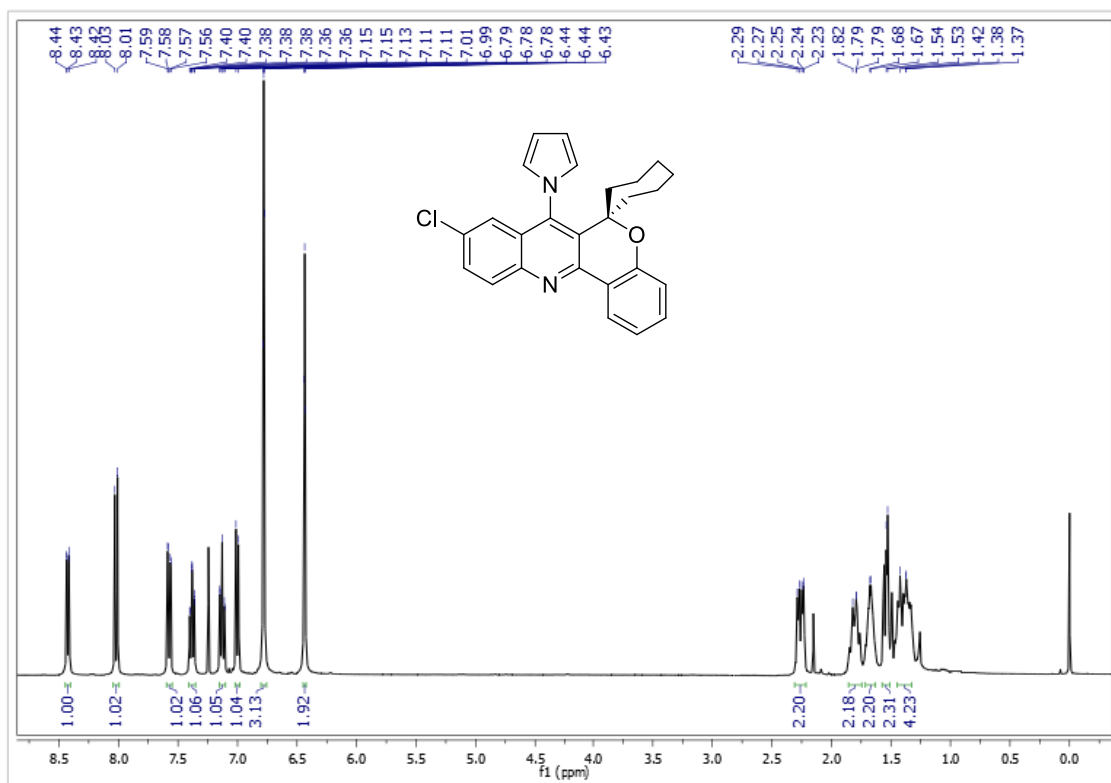




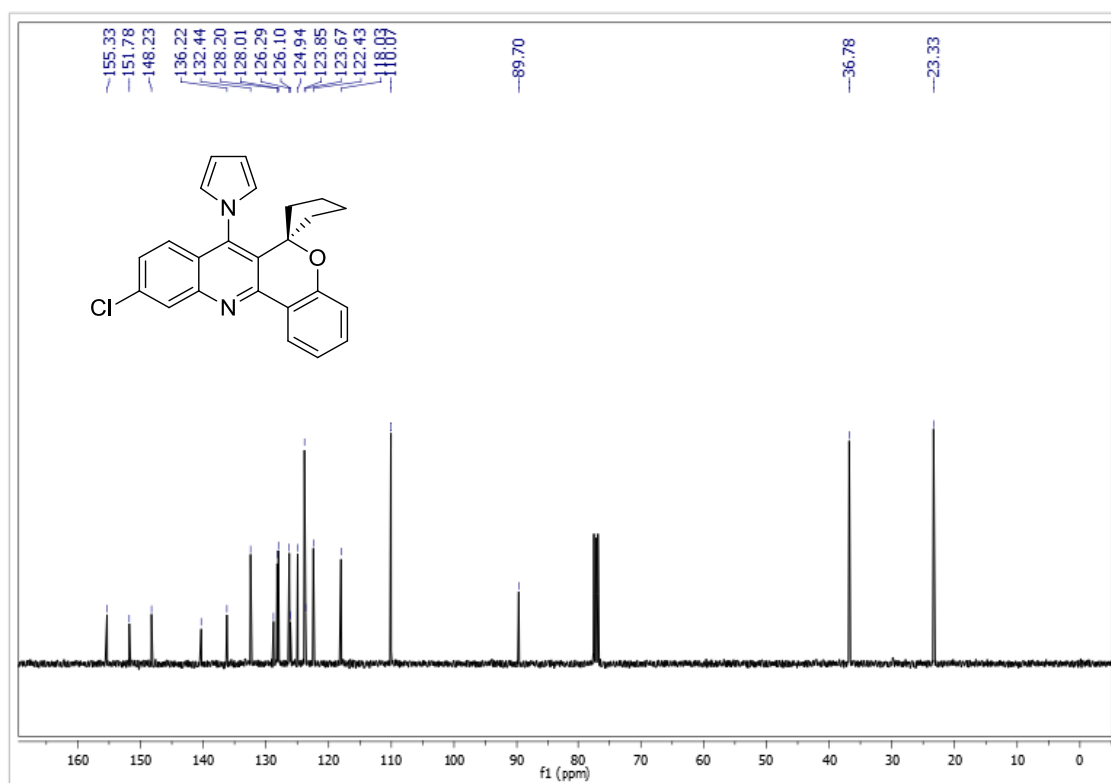
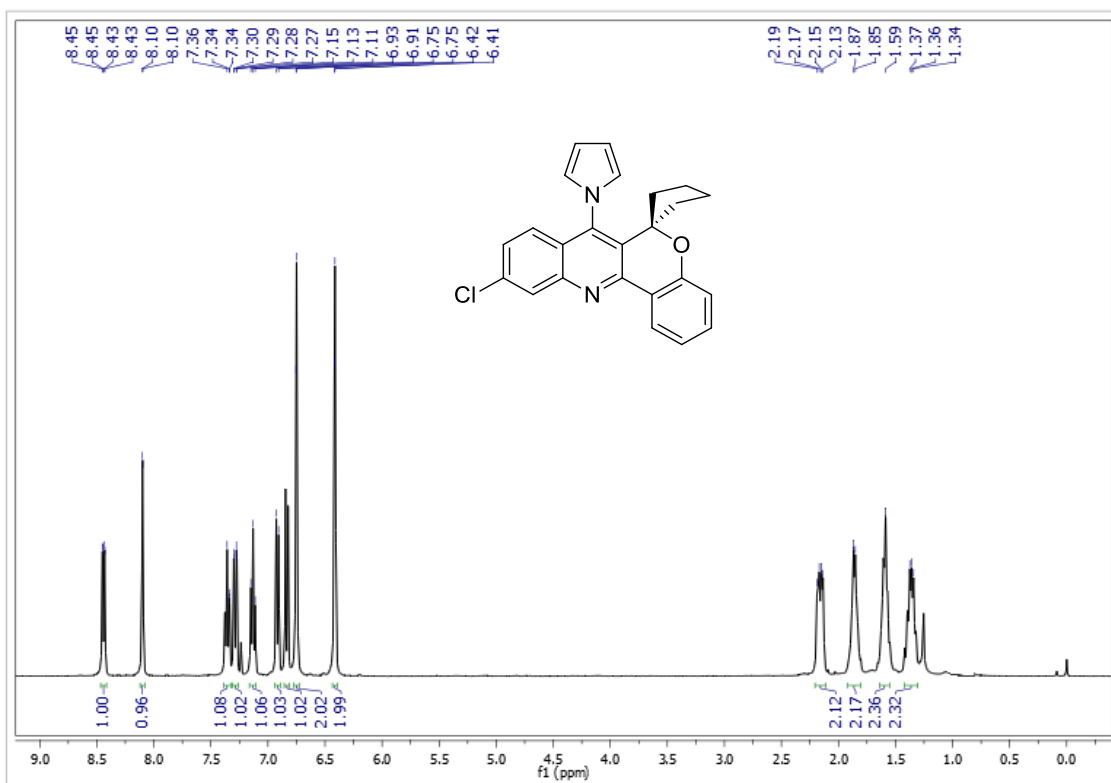
**Figura 59.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 9-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclopentano] (**15a**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



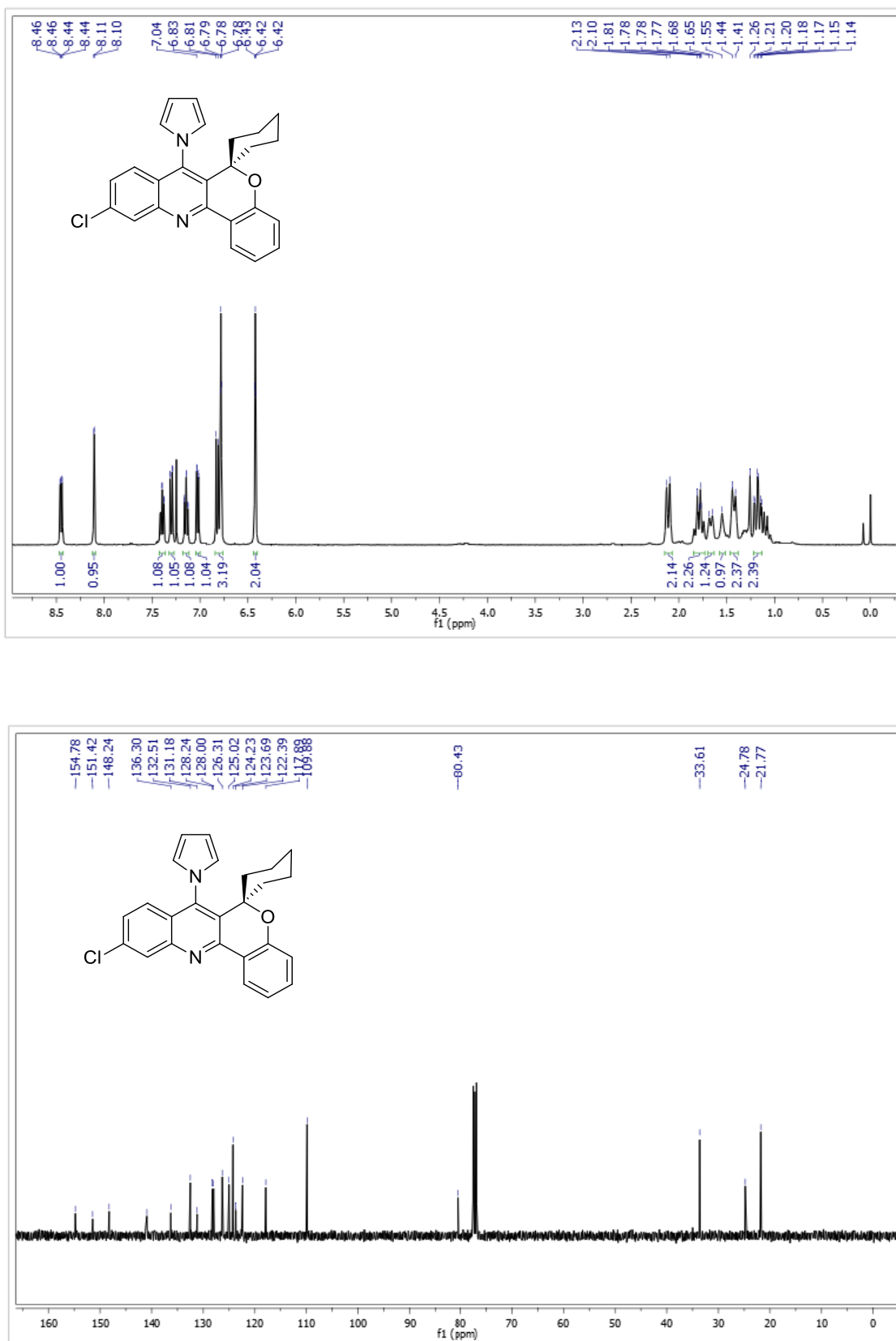
**Figura 60.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 9-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**15b**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



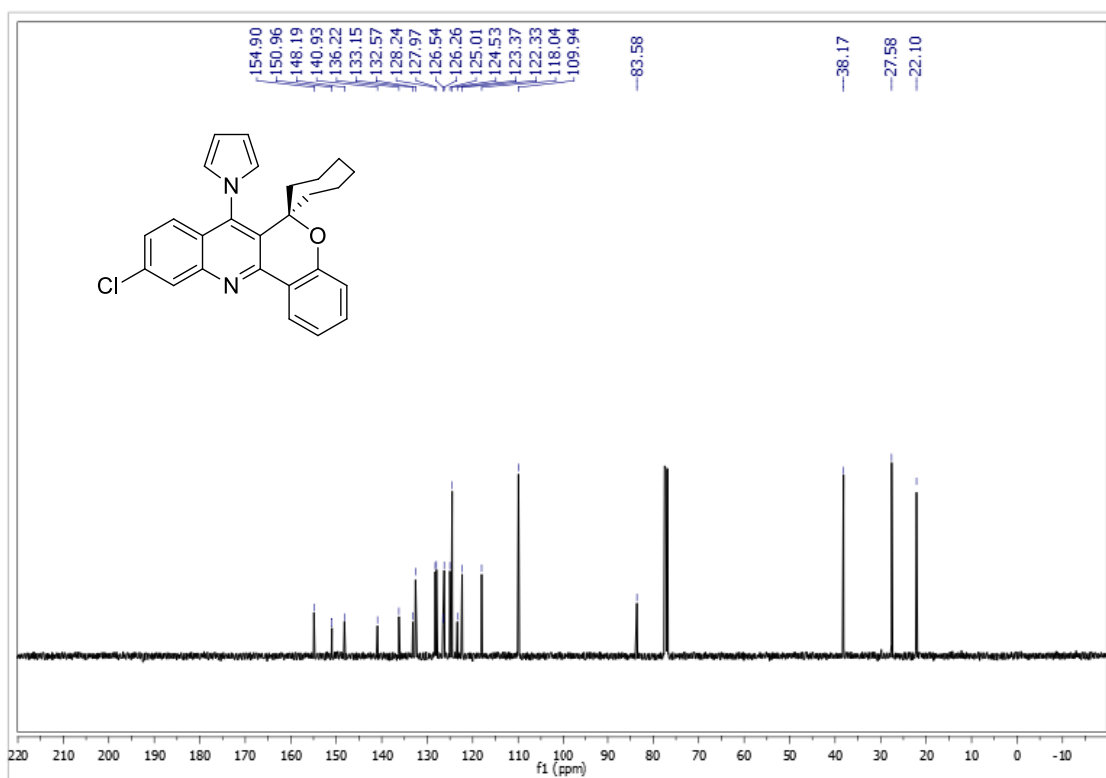
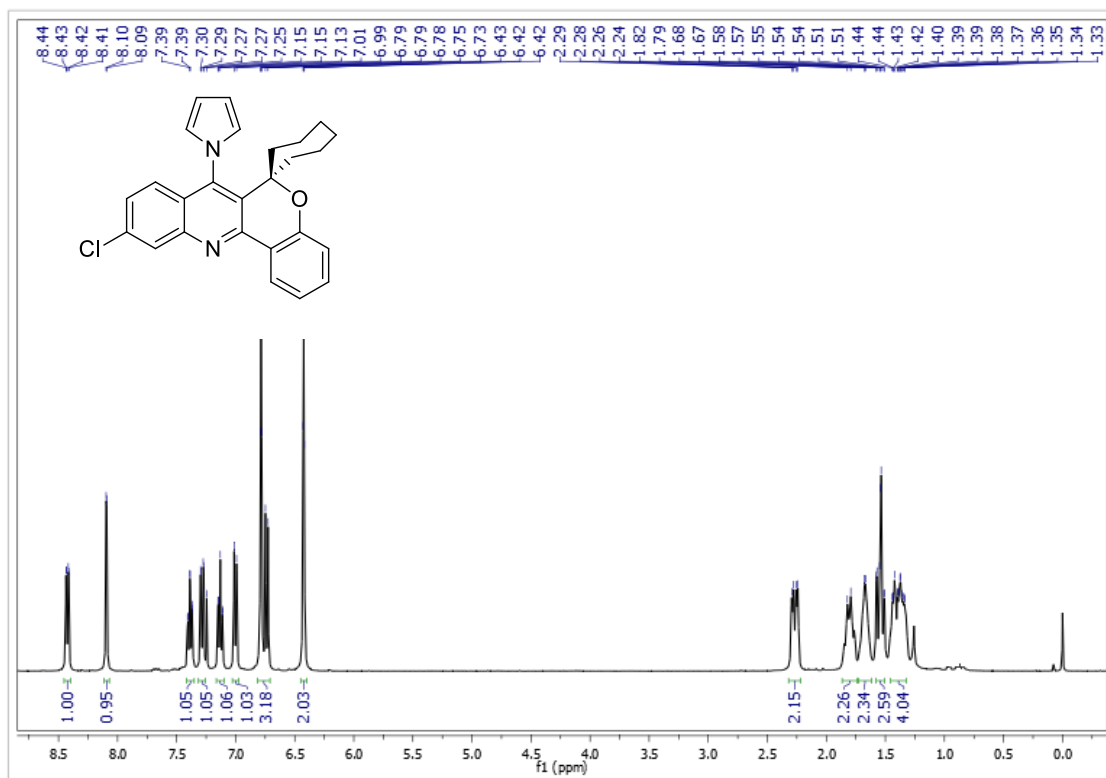
**Figura 61.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 9-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloheptano] (**15c**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 62.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 10-Cloro-7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1'-ciclopentano] (**16a**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 63.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 10-Cloro-7-(1H-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**16b**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 64.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  a 100, 61 MHz de 10-Cloro-7-(1H-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-b]quinolina-6,1'-cicloheptano] (**16c**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .

---

**ANEXO III**

*Espectros de HMQC e HMBC*

## 9. ESPECTROS DE HMQC E HMBC DOS COMPOSTOS 9d-f

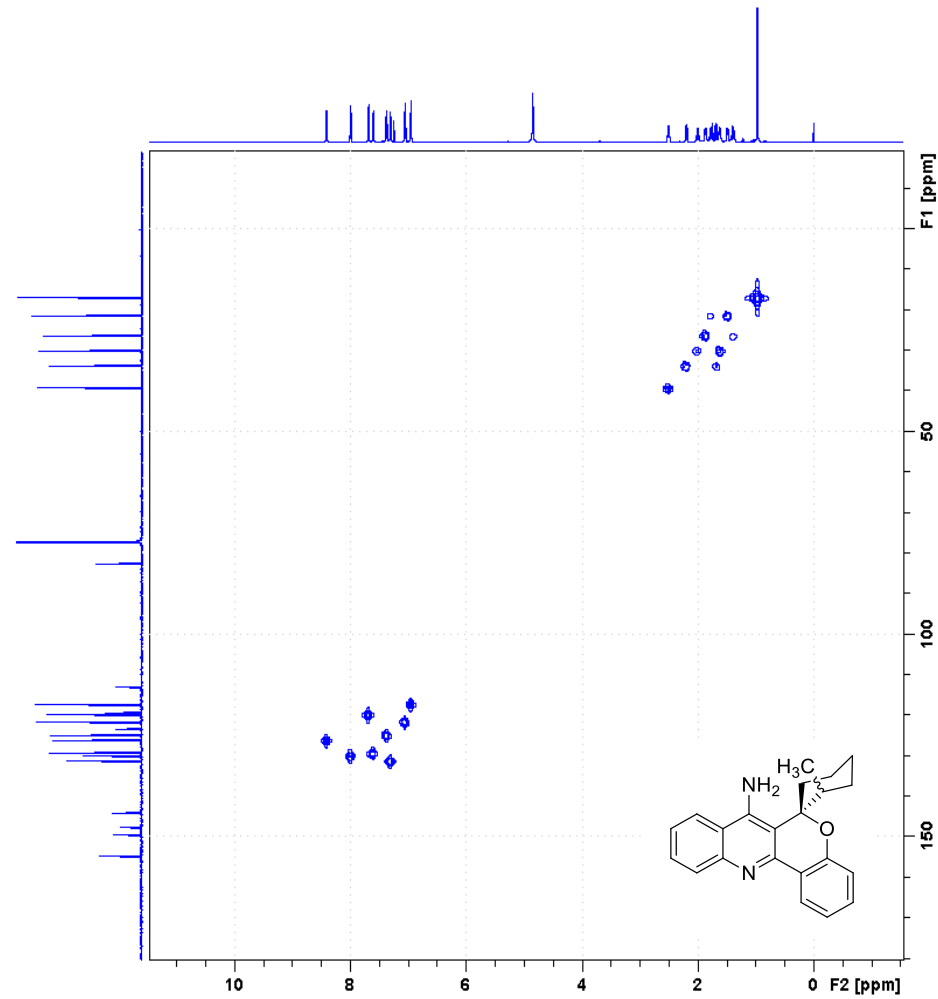
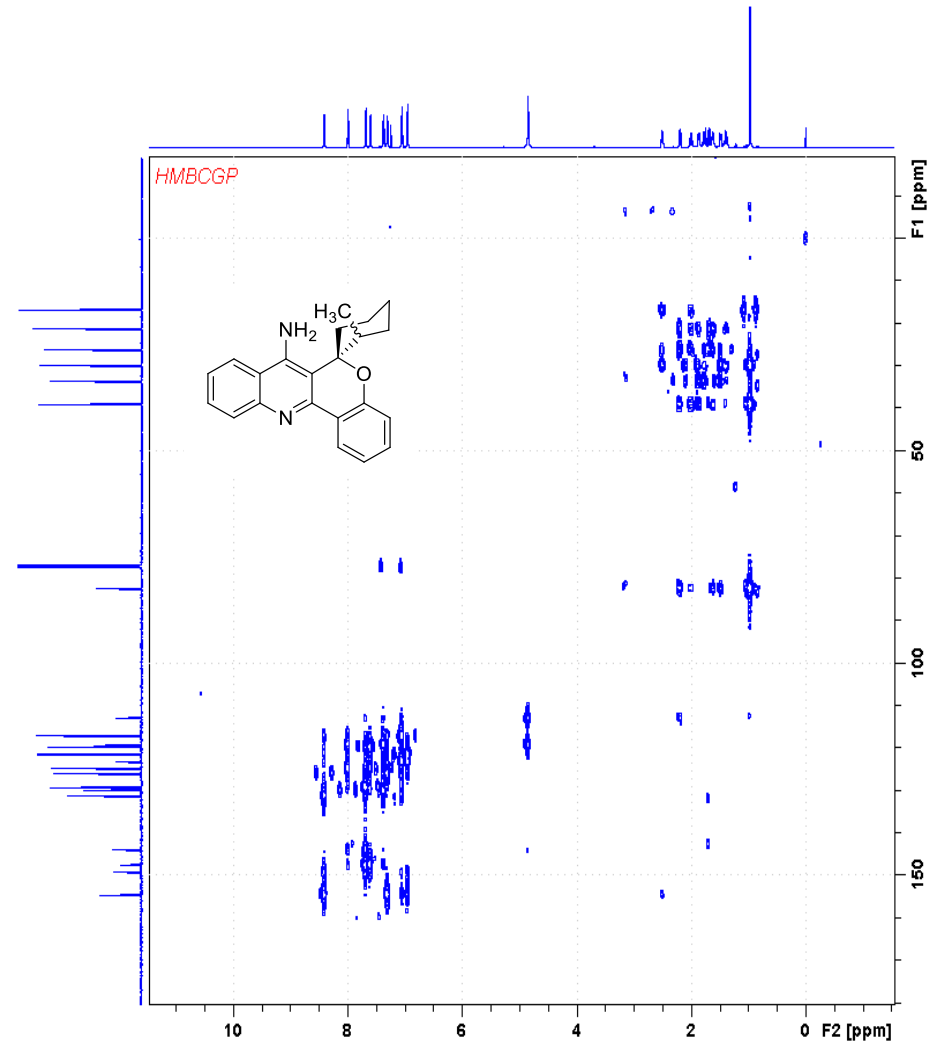
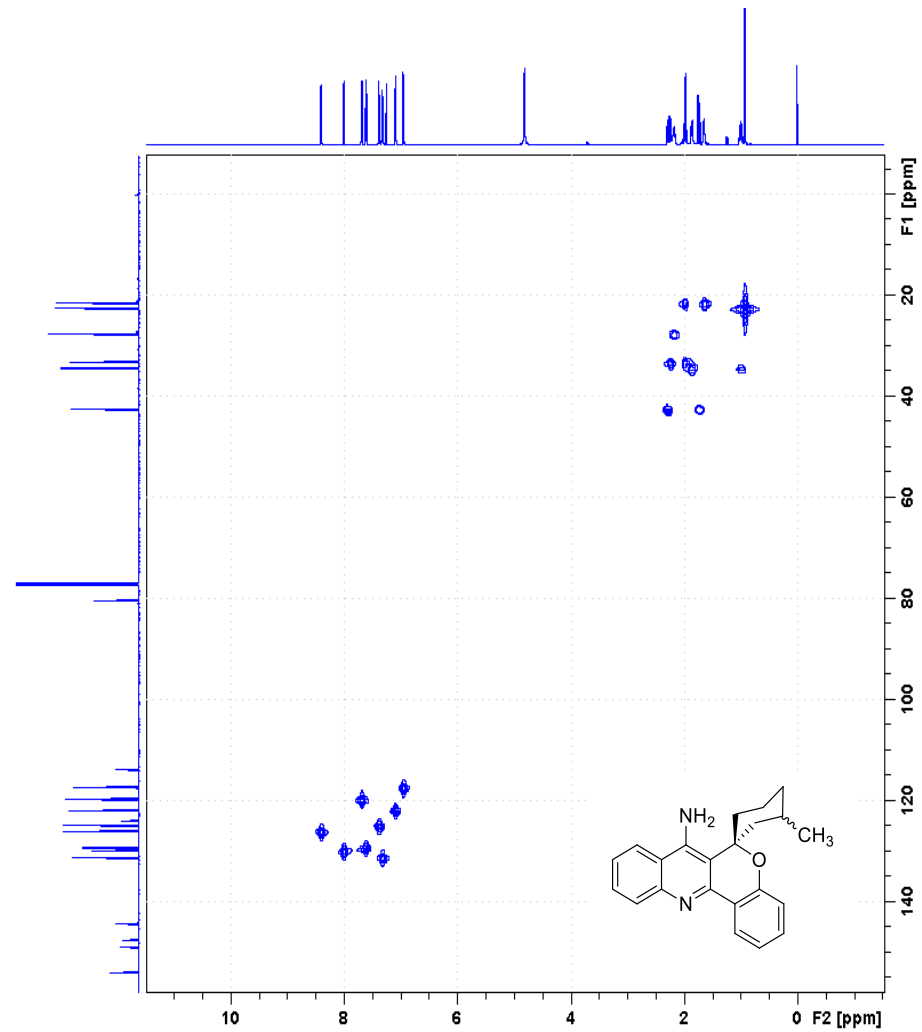


Figura 65. Espectro de HMQC a 600 MHz de 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .

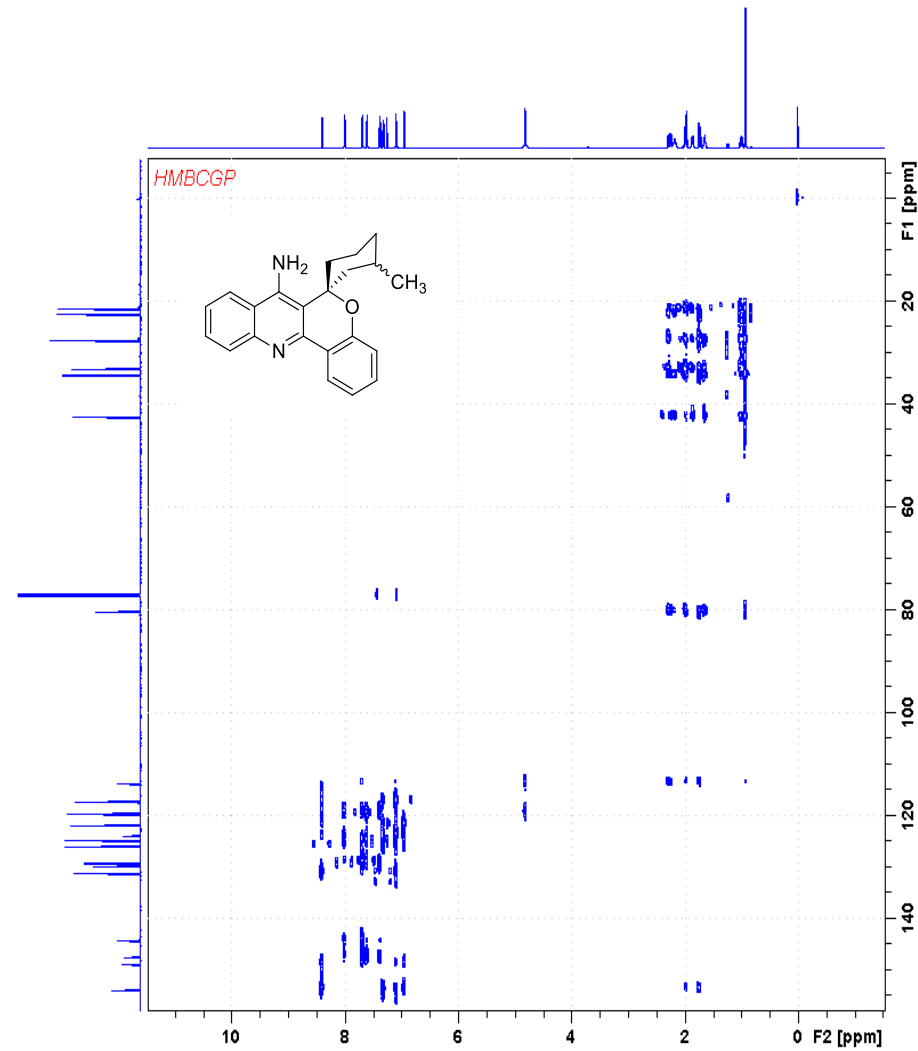




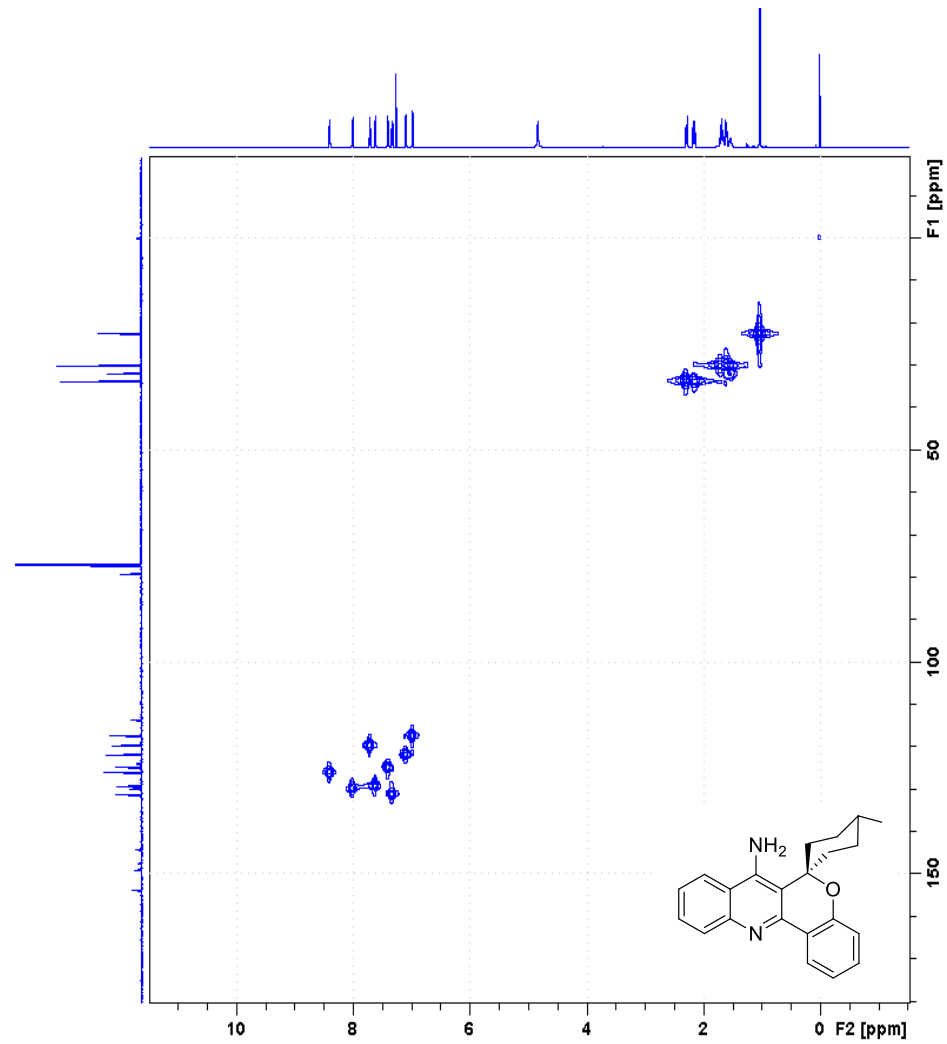
**Figura 66.** Espectro de HMBC a 600 MHz de 7-Amino-2'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9d**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



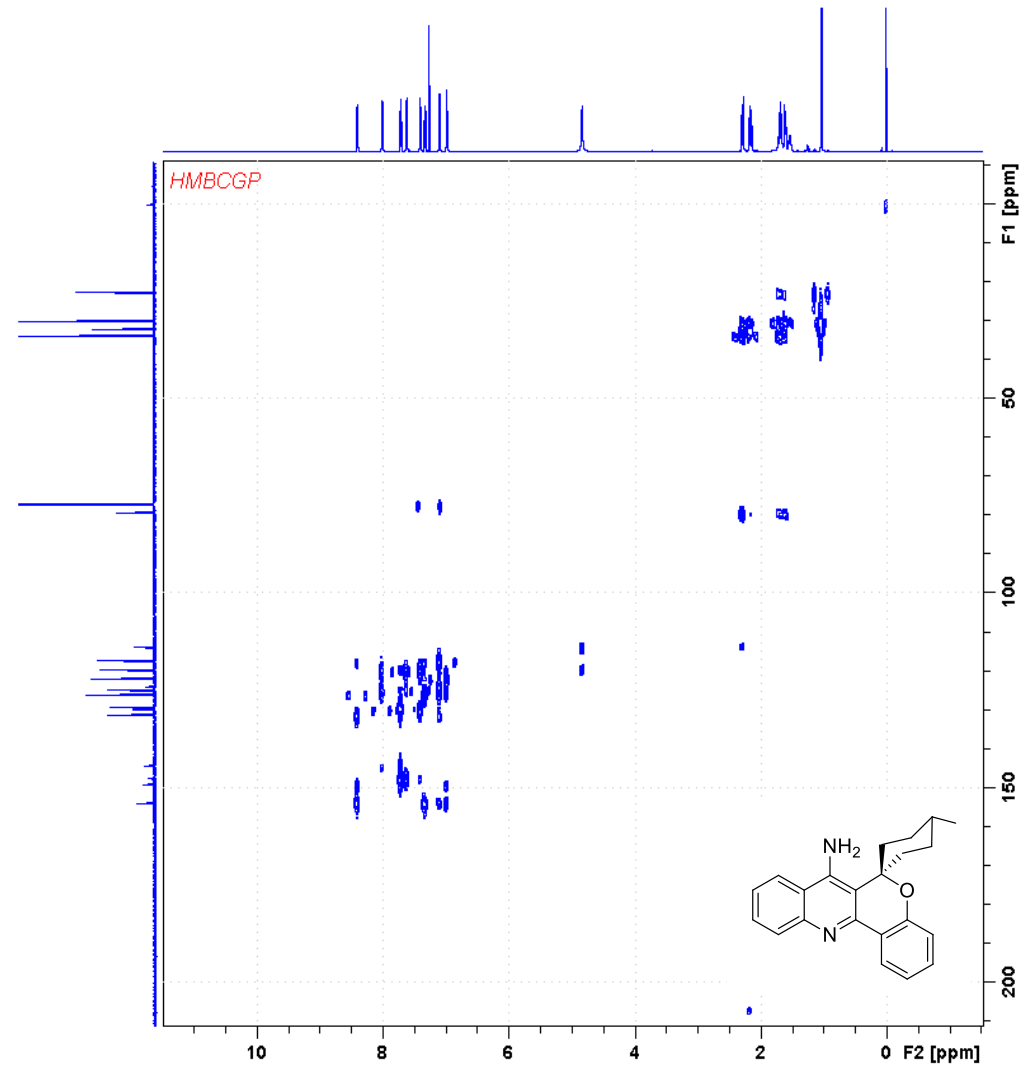
**Figura 67.** Espectro de HMQC a 600 MHz de 7-Amino-3'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9e**), registrados em CDCl<sub>3</sub>.



**Figura 68.** Espectro de HMBC a 600 MHz de 7-Amino-3'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9e**), registrados em  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 69.** Espectro de HMQC a 600 MHz de 7-Amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9f**), registrados em CDCl<sub>3</sub>.



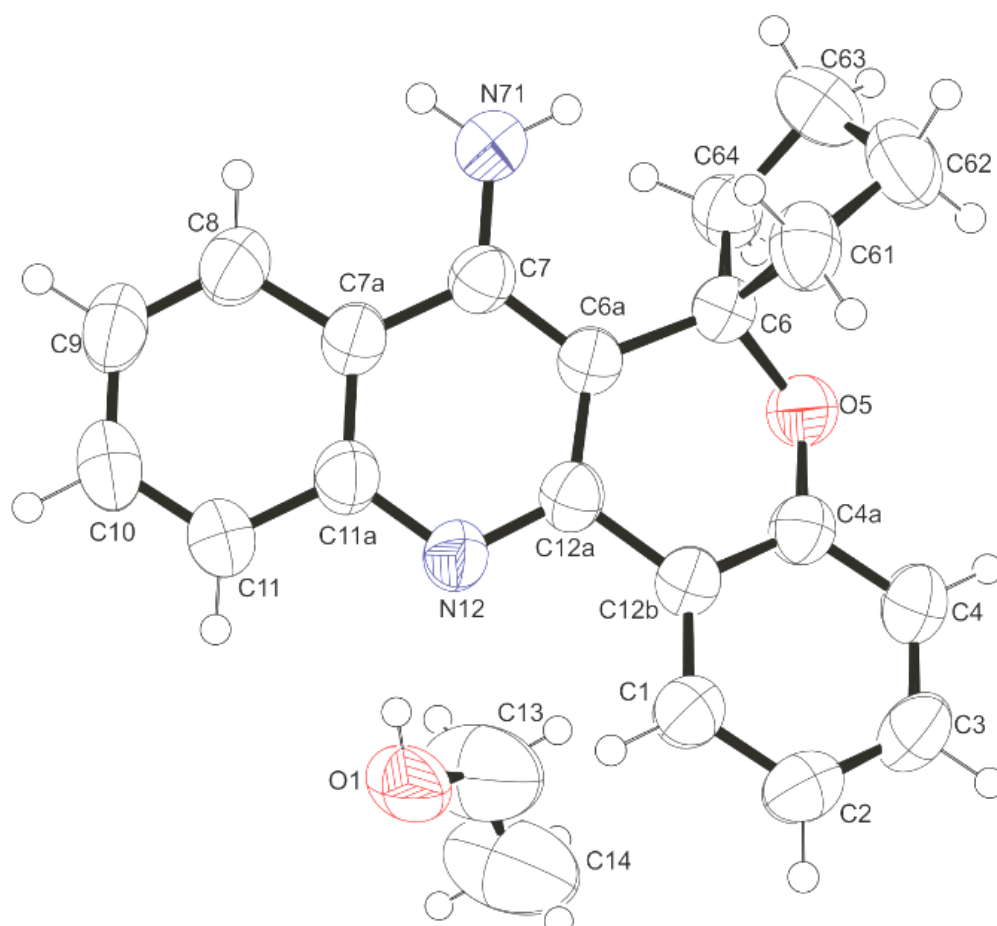
**Figura 70.** Espectro de HMBC a 600 MHz de 7-Amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9f**), registrados em CDCl<sub>3</sub>.

---

**ANEXO IV***Difração de raios-X*

## 10. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

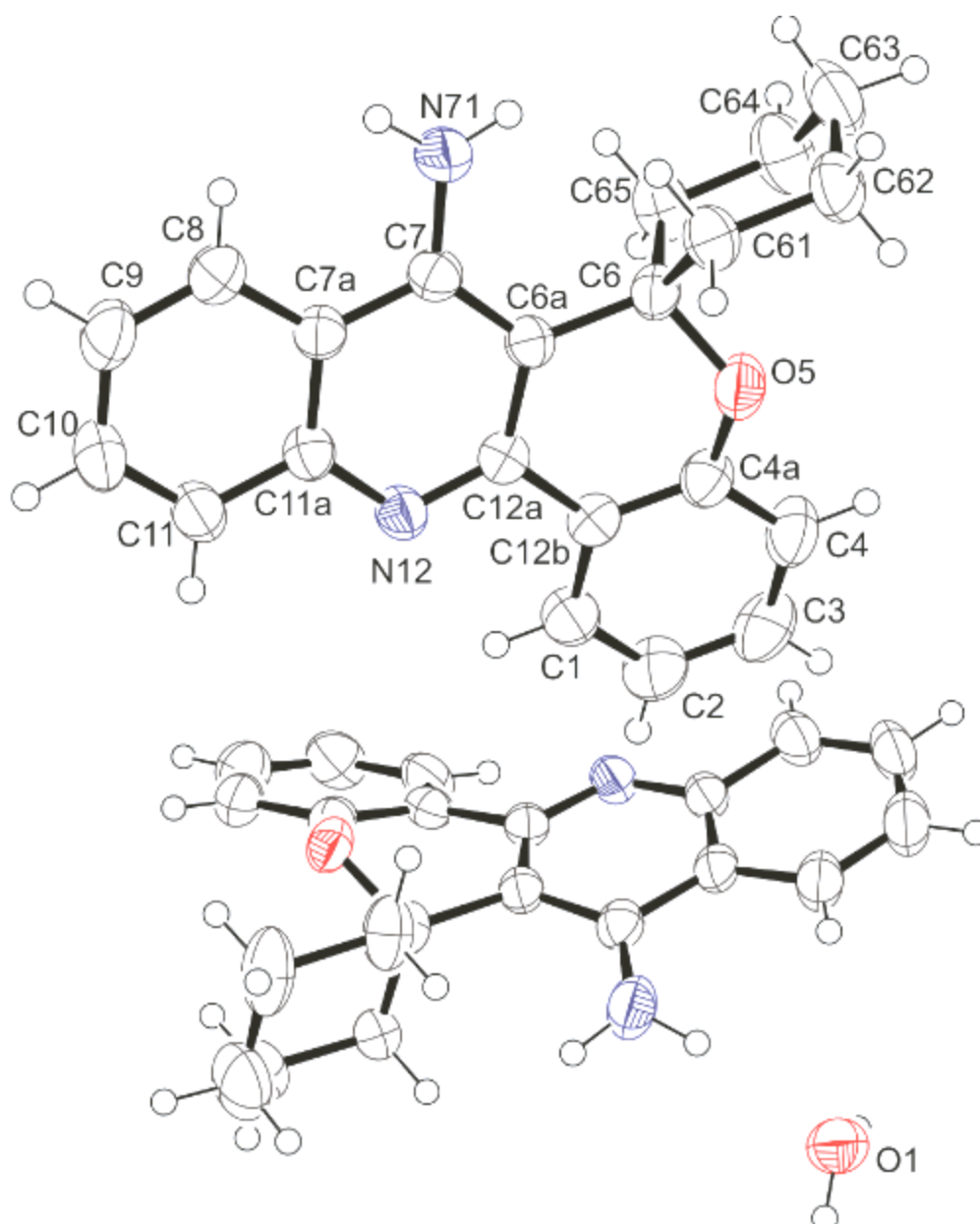
### 10.1 Difração de raios-X dos compostos 9a, 9b, 9f



**Figura 71.** ORTEP de 7-Amino-espino[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (**9a**) (CCDC 994958).

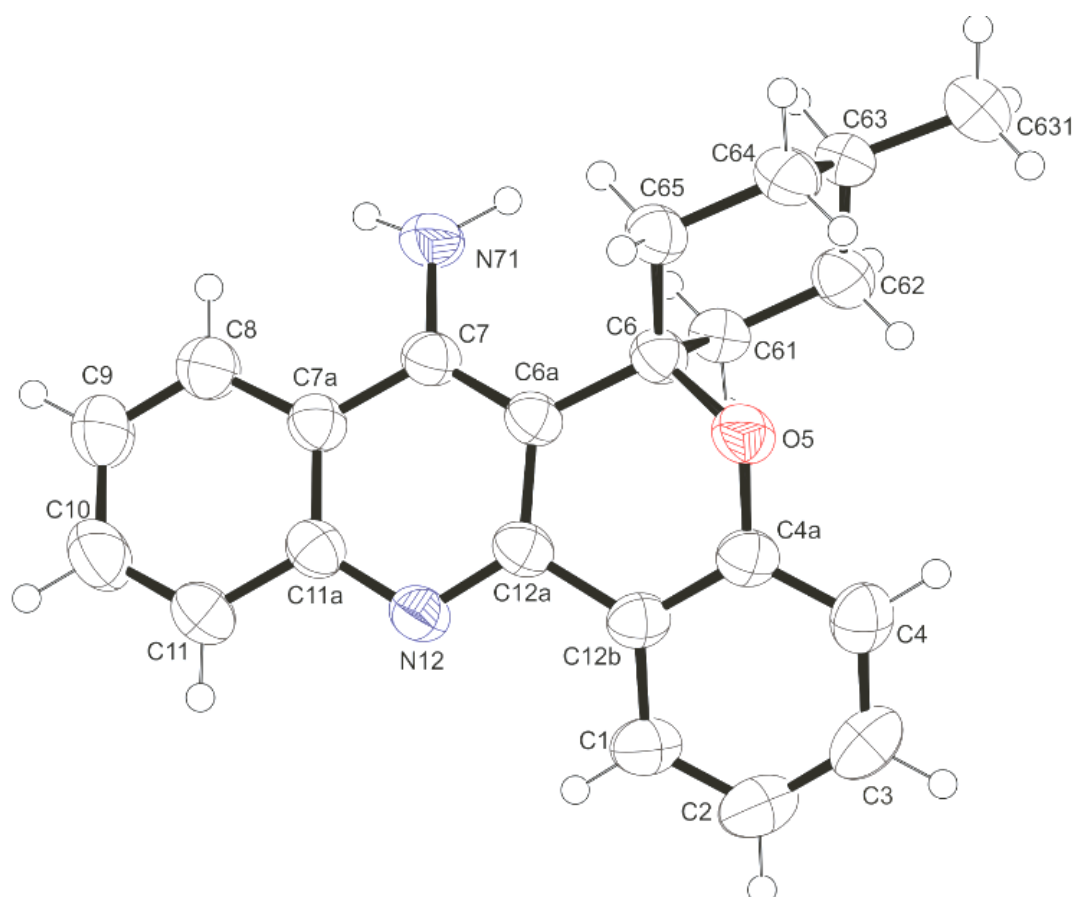






**Figura 72.** ORTEP de 7-Amino-espino[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9b**) (CCDC 1500741).

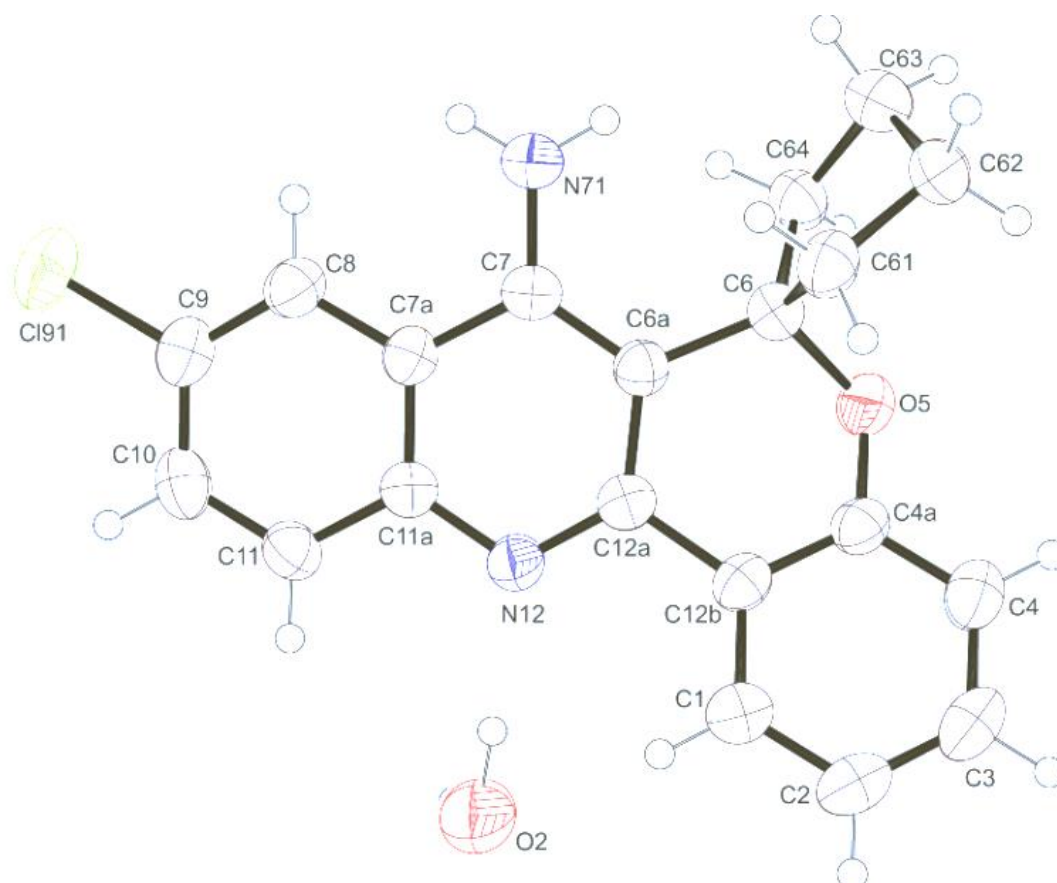




**Figura 73.** ORTEP de 7-Amino-4'-metil-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**9f**) (CCDC995079).

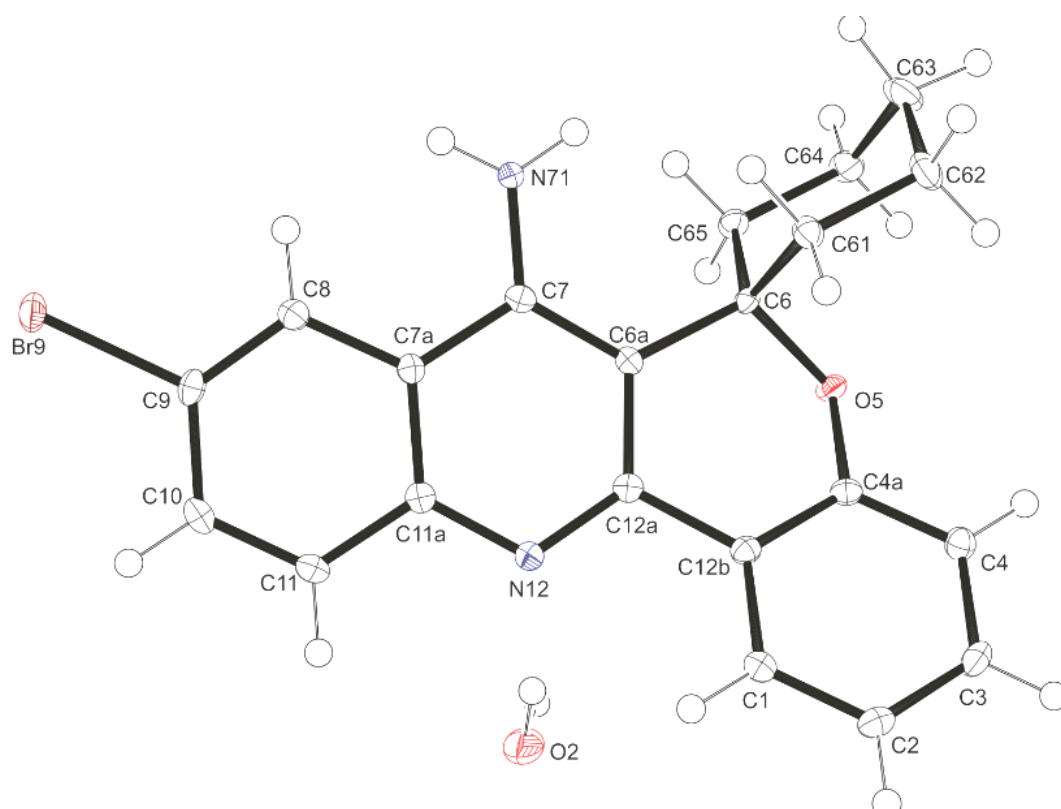


## 10.2 Difração de raios-X dos compostos 10-12



**Figura 74.** ORTEP de 7-Amino-9-cloro-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclopentano] (**10a**) (CCDC 997278).





**Figura 75.** ORTEP de 7-Amino-9-bromo-espino[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-ciclohexano] (**11b**) (CCDC 995080).

Tabela 17. Dados cristalográficos do composto 12b

**checkCIF/PLATON report**

You have not supplied any structure factors. As a result the full set of tests cannot be run.

THIS REPORT IS FOR GUIDANCE ONLY. IF USED AS PART OF A REVIEW PROCEDURE FOR PUBLICATION, IT SHOULD NOT REPLACE THE EXPERTISE OF AN EXPERIENCED CRYSTALLOGRAPHIC REFEREE.

No syntax errors found. [CIF dictionary](#) [Interpreting this report](#)

**Datablock: pa**

---

Bond precision: C-C = 0.0033 Å                      Wavelength=0.71073

Cell:                      a=8.7506(13)                      b=9.5840(16)                      c=11.4663(19)  
    alpha=107.009(9)                      beta=102.884(8)                      gamma=97.997(8)

Temperature: 293 K

	Calculated	Reported
Volume	874.6(3)	874.6(2)
Space group	P -1	P-1
Hall group	-P 1	-P1
Moiety formula	C21 H19 Br N2 O, H2 O	C21 H21 Br N2 O2
Sum formula	C21 H21 Br N2 O2	C21 H21 Br N2 O2
Mr	413.30	413.31
Dx, g cm-3	1.569	1.569
Z	2	2
Mu (mm-1)	2.369	2.369
F000	424.0	424.0
F000'	423.58	
h, k, lmax	11, 12, 14	11, 12, 14
Nref	3976	3920
Tmin, Tmax	0.422, 0.497	0.505, 0.751
Tmin'	0.201	

Correction method= GAUSSIAN

Data completeness= 0.986                      Theta(max)= 27.360

R(reflections)= 0.0221( 3603)                      wR2(reflections)= 0.0548( 3920)

S = 1.089                      Npar= Npar = 234

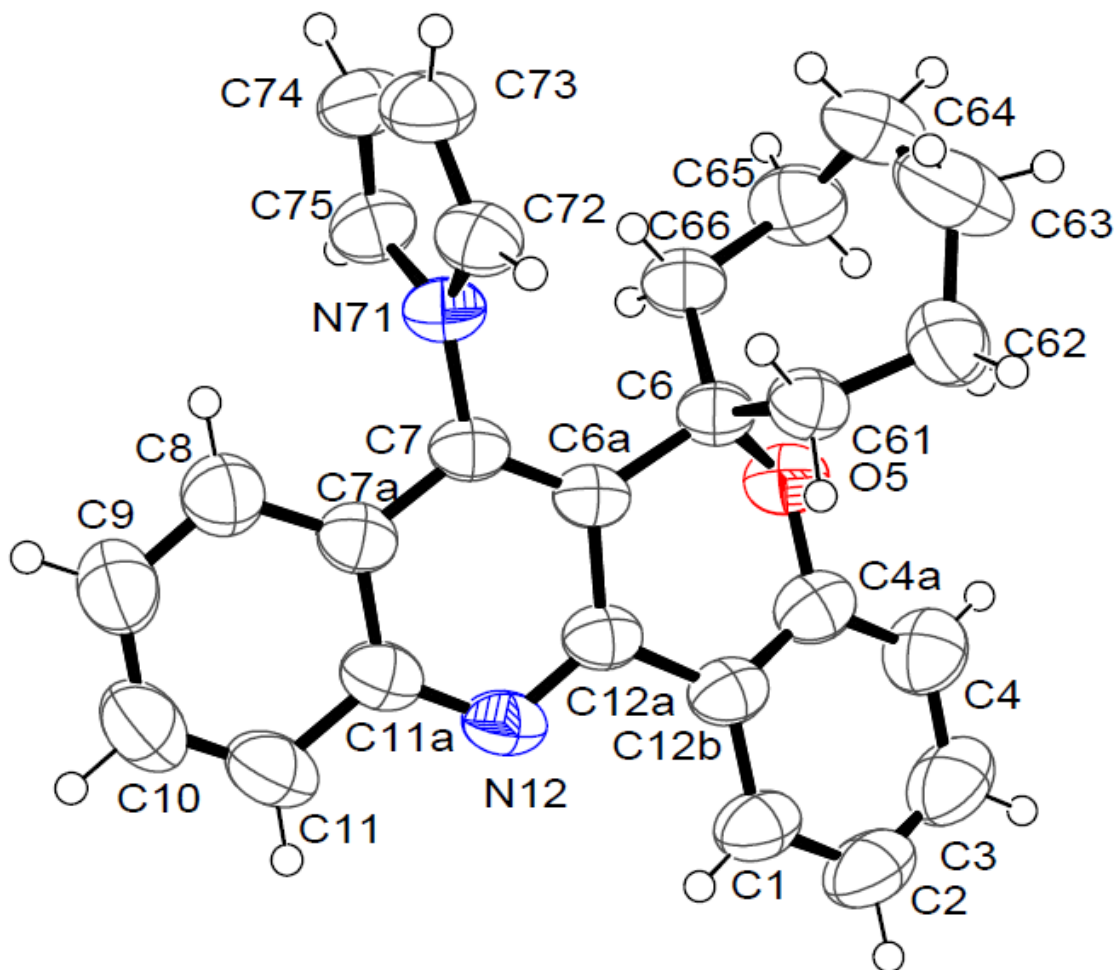
---

The following ALERTS were generated. Each ALERT has the format  
 test-name ALERT alert-type alert-level.  
 Click on the hyperlinks for more details of the test.

---



## 10.3 Difração de raios-X do composto 14c



**Figura 76.** ORTEP de 7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloheptano] (**14c**) (CCDC 1487058).

Tabela 18. Dados cristalográficos do composto 14c

**checkCIF/PLATON report**

You have not supplied any structure factors. As a result the full set of tests cannot be run.

**THIS REPORT IS FOR GUIDANCE ONLY. IF USED AS PART OF A REVIEW PROCEDURE FOR PUBLICATION, IT SHOULD NOT REPLACE THE EXPERTISE OF AN EXPERIENCED CRYSTALLOGRAPHIC REFEREE.**

No syntax errors found. [CIF dictionary](#) [Interpreting this report](#)

**Datablock: mmq0104\_0m-auto**

---

Bond precision:	C-C = 0.0030 Å	Wavelength=1.54178	
Cell:	a=15.6841(4) alpha=90	b=13.1101(3) beta=106.066(1)	c=20.4047(5) gamma=90
Temperature:	296 K		

	Calculated	Reported
Volume	4031.75(17)	4031.75(17)
Space group	C 2/c	C2/c
Hall group	-C 2yc	-C 2yc
Moiety formula	C26 H24 N2 O	C26 H24 N2 O
Sum formula	C26 H24 N2 O	C26 H24 N2 O
Mr	380.47	380.47
Dx, g cm <sup>-3</sup>	1.254	1.254
Z	8	8
Mu (mm <sup>-1</sup> )	0.596	0.596
P000	1616.0	1616.0
P000'	1620.39	
h, k, lmax	19, 16, 25	19, 16, 25
Nref	4023	3964
Tmin, Tmax	0.801, 0.856	0.645, 0.754
Tmin'	0.779	

Correction method= # Reported T Limits: Tmin=0.645 Tmax=0.754  
AbsCorr = GAUSSIAN

Data completeness= 0.985      Theta(max)= 72.660

R(reflections)= 0.0532( 3235)      wR2(reflections)= 0.1565( 3964)

S = 0.927      Npar= 262

---

The following ALERTS were generated. Each ALERT has the format  
test-name\_ALERT\_alert-type\_alert-level.  
Click on the hyperlinks for more details of the test.

**Structural investigation, UV-vis analysis and crystal packing of  
spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkan]-7-amine – novel tacrine  
hybrids by X-ray diffractometry**

Helio G. Bonacorso<sup>1\*</sup>, Patrick T. Campos<sup>2</sup>, Letícia B. Silva<sup>1</sup>, Bernardo A. Iglesias<sup>3</sup>, Nilo Zanatta<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE), Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97.105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

<sup>2</sup> *Instituto Federal Sul-Rio-Grandense, Campus Pelotas, CEP 96.015-360, Pelotas, RS, Brazil*

<sup>3</sup> *Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97.105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

\*Corresponding author. Tel.: +55 55 3220-8756; fax: +55 55 3220-8031

E-mail address: [helio.bonacorso@ufsm.br](mailto:helio.bonacorso@ufsm.br) (H.G. Bonacorso)

**Abstract**

The structure of four spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkan]-7-amine (**1–4**) was determined by x-ray diffractometry. The quinoline rings were obtained as almost planar structures, with an RMS deviation within a range of 0.0345–0.0641 Å, while the chromene rings are not planar. Moreover, the cycloalkane rings are attached to the chromene in spiro form. Three of the four compounds crystallize in solvate form — one with ethanol and the other two with water. The crystal packing for compounds **1–4** is discussed in terms of intermolecular interactions, and it is shown that the crystal packing of these heterocycles is governed by: strong O-H...N and N-H...O hydrogen bonds; weak C-H...O and C-H...N hydrogen bonds; and very weak C-H...Cl, C-H...Br, and C-H... $\pi$  interactions. Also,  $\pi$ ... $\pi$  and lone pair  $\pi$  interactions are present in the crystal packing of the heterocycles. These interactions lead to the formation of endless chains along a plane, as well as supramolecular dimers and the arrangement of molecules in layers. Complementarily, UV-vis absorption spectra properties are also discussed.

**Keywords:** X-ray, UV-vis analysis, tacrine, spirochromenes, crystal packing, hydrogen bond, lone pair- $\pi$ .

## Introduction

In 1993, tacrine (1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine) was the first inhibiting drug of the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) to be approved in the USA by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of Alzheimer's disease (AD). However, this drug had severe hepatotoxicity, due to the elevation of the serum levels of alanine aminotransferase, which limited its clinical use [1,2].

Despite the side effects shown by tacrine, this drug is a potent and clinically effective inhibitor of AChE [2]. Consequently, in recent years, various tacrine hybrids have been synthesized in order to increase the efficiency and, in particular, to reduce the side effects [2].

In recent times, various molecular modeling studies have been conducted in order to understand the structure-activity relationship of different compounds, starting from the crystal structure. These studies can help predict the effect of inhibitors (e.g., new tacrine hybrids) on specific targets [3].

In 2015, we reported the synthesis of a series of new spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkan]-7-amine, in which [cycloalkane = cyclopentane, cyclohexane, cycloheptane, 2-methyl-, 3-methyl-, 4-methyl-, and 4-*t*-butyl-cyclohexane] at yields of 30 – 65% [4]. Subsequently, these spirochromenoquinolines were subjected to AChE and cytotoxicity activity, and computational molecular docking studies. Both results were correlated with the structural features and showed the best results for the new tacrine hybrid that possessed the spirocyclopentane moiety.

Given this context and considering our interest in the structural study of heterocyclic molecules through X-ray diffraction [5-11], the objective of this work was to: present the supramolecular structures of four examples of spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkan]-7-amine and evaluate the substituent effects of these heterocycles as well as the presence of solvents in the crystal packing.

## Experimental

### Synthesis

The spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkan]-7-amine **1,2** were synthesized in accordance with procedures that have already been reported [4]. The new compounds **3,4** were synthesized by a similar methodology adopted for compounds **1,2** and described as following.

To a mixture of 2-amino-5-chlorobenzonitrile (1.0 mmol, 0.152 g) or 2-amino-5-bromobenzonitrile (1.0 mmol, 0.197 g) and spiro[chroman-2,1'-cyclohexan]-4-one (1.0 mmol, 0.216 g), Lewis acid (1.0 mmol), AlCl<sub>3</sub> (0.133 g), or InCl<sub>3</sub> (0.221 g) was added. The reaction mixture was heated at 110 °C under magnetic stirring for 24 h. Then, a NaOH 2M solution (10 mL) was added and the reaction mixture was held under magnetic stirring at the same temperature for 24 h. After cooling the system to room temperature, the compounds **3,4** were extracted with CHCl<sub>3</sub> (3 x 5 mL) and the organic phase was dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and then the solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by recrystallization from ethyl alcohol (5 mL).

9-Chloro-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cyclohexan]-7-amine (**3**): Yellow solid, yield 55 %, mp 214–215 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C) δ (ppm): 8.43 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 8.18 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 9 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 11 Hz, *J* = 2 Hz, 1H), 7.32–7.36 (m, 1H), 7.04–7.08 (m, 1H), 6.99 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6.45 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.37–2.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.57–1.67 (m, 8H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C) δ (ppm): 153.3, 148.0, 145.5, 145.5, 130.9, 130.5, 129.3, 128.2, 125.4, 123.7, 121.4, 121.3, 120.0, 116.9, 112.9, 79.8, 31.3, 23.1, 21.0. Anal. Calcd. For C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O: C, 71.89; H, 5.46; N, 7.98. Found: C, 71.73; H, 5.48; N, 7.84.

9-Bromo-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cyclohexan]-7-amine (**4**): Yellow solid, yield 52 %, mp 204–205 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C) δ (ppm): 8.56 (d, *J* = 1 Hz, 1H); 8.18 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2 Hz, 1H); 7.71 (m, 2H); 7.34 (m, 1H); 7.06 (t, *J* = 8 Hz, 1H); 6.98 (d, *J* = 8 Hz, 1H); 6.48 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 2.40–1.58 (m, 10H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C) δ (ppm): δ 153.9; 148.7; 146.3; 146.0; 132.5; 131.6; 131.3; 126.0; 125.2; 124.3; 121.9; 121.2; 117.5;

117.2; 113.5; 80.5; 32.0; 23.8; 21.6. Anal. Calcd. For C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>BrN<sub>2</sub>O: C, 63.81; H, 4.84; N, 7.09. Found: C, 63.74; H, 4.76; N, 7.05.

### X-ray

The crystals used for the data collection were obtained by recrystallization of compounds from ethyl alcohol, followed by slow evaporation at room temperature.

X-ray data were collected on a Bruker SMART CCD diffractometer [12], using graphite-monochromatized Mo K $\alpha$  radiation, with  $\lambda = 0.71073$  Å. The crystallographic structures of tacrine hybrids **1–4** were solved by direct methods (SHELXS-97) [13]. Refinements were performed with the SHELXL97 [14] package, using full-matrix least-squares on  $F^2$ , with anisotropic displacement parameters for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were included in the refinement at calculated positions, with C-H distances of 0.93 Å (aromatic CH), 0.97 Å (methylene CH<sub>2</sub>), and 0.98 Å (methine CH), using a riding model. The isotropic thermal parameters of the hydrogen atoms were kept equal to:  $U_{iso}(H) \approx 1.5 U_{eq}$  for Csp<sup>3</sup>, and 1.2 for Csp<sup>2</sup>. Molecular graphs were prepared using ORTEP3 for Windows [15]. The crystal data and details concerning data collection and structure refinement are shown in **Table 1**.

### UV-vis analysis

UV-Vis electronic absorption spectra in solution were performed on a UV-2600 spectrophotometer at a concentration of 10<sup>-4</sup> mol/L at 250-500 nm wavelength range.

## Results and discussion

### Molecular Study

The benzene ring of the quinoline heterocycle was planar, with RMS deviations, from the plane, of 0.0039, 0.0065, 0.0046, and 0.0157 Å in compounds **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively. The six-membered pyridine ring was less planar, with RMS deviations, from the plane, of 0.0364, 0.0433, 0.0320, and 0.0457 Å in compounds **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively. The C(8)-C(7A)-C(11A)-N(12) torsion angles for compounds **1**, **2**, **3**, and **4** were -179.0(2), 176.4(3), -179.6(4), and -173.9(2)°, which indicates that the benzene and pyridine rings are in the same plane. The planarity was confirmed by: the benzene ring deviations, from the least-squares plane, of 4.18 (11), 3.50 (11), 2.71(15), and 5.49 (11) Å for the pyridine rings in compounds **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively; and by the RMS deviations, from the quinoline ring, of 0.0462, 0.0474, 0.0345, and 0.0641 Å in compounds **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively (**Figure 2**). The atom that deviates the most from the plane of the quinoline ring is the C(6A), by 0.1050(17), 0.1065(24), 0.0810(34), and -0.1147(17) in **1**, **2**, **3** and **4**, respectively. The geometry of the aromatic heterocyclic quinoline system is similar to that reported in the literature [3]. The benzene ring of the chromene heterocycle is planar, with RMS deviations, from the plane, of 0.0030, 0.0073, 0.0045, and 0.0036 Å in compounds **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively.

The torsional angles observed for N(12)-C(12A)-C(12B)-C(1) were -18.0(3), 14.8(4), -17.8(6), and -20.7(3)° in compounds **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively, which indicates that the benzene ring of the chromene heterocycle is not in the same plane as the quinoline heterocycle. This means that there is no electron resonance between the two ring systems, which is confirmed by the bond lengths for C(12A)-C(12B) of 1.469(3), 1.470(4), 1.473(6), and 1.468(3) Å in compounds **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively — similar to those found for non-conjugated bonds between aromatic sp<sup>2</sup> carbon atoms [16]. These bond lengths are greater than the bond lengths between the carbons of the aromatic rings in compounds **1–4** (**Table 2**); however, they are smaller when compared with the lengths of the C(6)-



C(6a) bond — which are 1.520(3), 1.529(4), 1.525(6), and 1.531(3) Å in compounds **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively — and similar to those lengths for bonds between an aromatic carbon and a  $sp^3$  carbon [16]. The bond angles found for C(4A)-O(5)-C(6) were 118.03(16), 117.4(2), 117.3(3), and 117.42(16)° in compounds **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively, which indicates trigonal planar geometry (despite the oxygen atom having  $sp^3$  hybridization) and, therefore, enables a small conjugation of the oxygen's non-binding electron pair with the benzene ring. This can be confirmed by the decrease in the lengths of the O(5)-C(4A) bond of 1.364(2), 1.365(3), 1.355(6), and 1.363(3) Å in compounds **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively — similar to what was found for conjugated bonds between aromatic carbon and oxygen [16]. The bond angles observed for O(5)-C(6)-C(6A) were 110.55(16), 110.0(2), 110.4(4), and 110.91(16)° in compounds **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively, which clearly indicates tetrahedral geometry for the C(6) carbon spiro atom. This makes the length of the C(6)-O(5) bond greater (without conjugation) when compared with the C(4A)-O(5) bond. The bond lengths found for C(6)-O(5) were 1.460(2), 1.455(3), 1.468(5), and 1.463(2) Å in compounds **1**, **2**, **3**, and **4**, respectively — similar to those found for simple bonds with no conjugation between carbon and oxygen atoms with  $sp^3$  hybridization [16].

The spiro fragment is formed by the union of the 2*H*-pyran ring and a cycloalkane in the C(6) carbon atom — there is one cyclopentane ring in a twisted conformation in compounds **1** and **3**, and one cyclohexane in a chair conformation in compounds **2** and **4** (Figure 2).

### Supramolecular Study

The crystal packing of structures **1–4** was stabilized by intermolecular hydrogen bonds (Table 3),  $\pi \cdots \pi$  interactions, C-H $\cdots\pi$  interactions, and lone pair $\cdots\pi$  interactions. Compounds **1**, **3**, and **4** had a strong O(2)-H(2A) $\cdots$ N(12) hydrogen bond, with interatomic distances of 2.808(3), 2.905(4), and 2.8282(18) Å, respectively, for O(2) $\cdots$ N(12). This interaction was observed for the compounds that had solvent present in the crystal structure, thus demonstrating the great proton-donating power of the solvent and the great proton-accepting power of the quinoline's nitrogen atom. Another pattern observed in the crystal

packing of these compounds was the strong N(71)-H(71B)...O(2) hydrogen bond — with interatomic distances, for N(71)...O(2), of 2.903(2), 3.095(4), and 2.9885(19) Å for compounds **1**, **3**, and **4**, respectively — together with a weak C(8)-H(8)...O(2) hydrogen bond with interatomic distances, for C(8)...O(2), of 3.438(3), 3.459(5), and 3.377(2) Å in compounds **1**, **3**, and **4**, respectively. These two interactions together show that compounds **1**, **3**, and **4** act as bidentated proton donators in hydrogen bonds, as well as forming a seven-membered pseudo-ring with the oxygen atom originating from the solvent present in the crystal structure. It could also be seen that the oxygen atom of the solvent is a strong proton acceptor, and that the NH<sub>2</sub> group bonded to the quinoline is a strong proton donor in hydrogen bonding. Furthermore, it can be seen that both the ethanol molecule present in the crystalline structure **1**, and the water molecules present in the crystal structures of **3** and **4**, act as a bridge between two molecules of the heterocyclic compounds in the crystal packing of the structures. The strong proton-donating power in the hydrogen bonds of the NH<sub>2</sub> group bonded to quinoline was also observed in compound **2**. This compound displayed a strong N(71)-H(71A)...N(12) hydrogen bond, with an interatomic distance of 3.576(2) Å for N(71)...N(12) forming endless chains along one plane. Additionally, the weak C(1)-H(1)...N(71) hydrogen bond was observed with an interatomic distance of 3.597(2) Å for C(1)...N(71) in compound **2**. These two interactions together demonstrate that compound **2** acts in a bidentated manner as a proton donator and acceptor, forming a seven-membered pseudo-ring. Compound **3** also acts in a bidentated manner, similar to compound **2** — both have the carbon atom C(1) as a proton donator and the nitrogen atom N(12) as a proton acceptor. However, in the structure of **3**, the oxygen atom O(2) of the water acts as the acceptor of the H(1) proton in the hydrogen bond. The C(1)-H(1)...O(2) interaction has an interatomic distance of 3.383(5) Å for C(1)...O(2).

The presence of solvent in the structure was a determining factor in the crystal packing of compounds **1**, **3**, and **4**. In the solvent of the structure of **1**, there was only one acidic hydrogen atom; whereas in the water molecule, solvent was present in structures **3** and **4**, and there were two hydrogen atoms capable of making two hydrogen bonds. This was observed in **3** — the O(2)-H(2B)...N(71)

interaction had an interatomic distance of 3.361(4) Å for O(2)...N(71) — and in **4** — the O(2)-H(2B)...Br(91) interaction had an interatomic distance of 3.7493 (5) Å for O(2)...Br(91). Furthermore, another pattern observed in the crystal structures of **3** and **4** was the interactions between the cycloalkanes and the halogen atoms. In **3**, the C(63)-H(63B)...Cl(91) interaction was observed with an interatomic distance of 3.605(6) Å for C(63)...Cl(91); and in **4**, the C(64)-H(64A)...Br(91) interaction was observed with an interatomic distance of 3.687(2) Å for C(64)...Br(91). These interactions are considered to be the weakest, due to the proton donor (carbon) and the proton acceptor (halogen) being electronegatively weak. The strongest hydrogen bonds are those that have both the proton donors and the proton acceptors of the highly electronegative atoms (oxygen and nitrogen) already described. The criteria and the strength of the hydrogen bonds were accepted in accordance with what has been described in the literature [17–19].

Besides the hydrogen bonds, compounds **1–4** show interactions that involve the  $\pi$  electrons of the aromatic rings. Compound **1** has the  $\pi$ ... $\pi$  interaction between the benzene ring of the chromene heterocycle, and the quinoline. This interaction led to the formation of a supramolecular dimer — the shortest distance was 3.852 Å between the centroid of this benzene ring and the C7A atom, which is characteristic of a parallel displaced  $\pi$ ... $\pi$  interaction [20–23]. Furthermore, compound **1** had a C-H... $\pi$  interaction with a distance of 2.789 Å between the centroid of the quinoline system's pyridine ring and the hydrogen atom H(62); however, the smallest distance for this interaction is 2.666 Å, between the C(7) carbon and H(62) hydrogen atoms.

Compound **2** has a C-H... $\pi$  interaction involving the benzene ring of the chromene heterocycle, forming a trimer with a distance of 3.093 Å between the centroid of this ring and the H(3) hydrogen atom; however, the smallest interatomic distance for this interaction is 2.760 Å, between the H(3) hydrogen and C(3) carbon atoms. Additionally, compound **2** acts in a bidentated manner in C-H... $\pi$  interactions, with the C(8) and N(71) atoms being the proton donors. The distances found were 2.592 Å between H(71B) and C(11), and 2.841 Å between H(8) and the centroid of the quinoline's benzene ring. The other C-H... $\pi$

interaction present in this compound is between the centroid of the quinoline's pyridine ring and the H(63) hydrogen atom, with a distance of 2.575 Å.

Compound **3** had two pairs of  $\pi\cdots\pi$  interactions involving the quinoline heterocycle arranged in layers forming a supramolecular dimer. The smallest distances found for these interactions were: 3.599 Å between the C(12A) carbon atom and the centroid of the quinoline's benzene ring, and 3.634 Å between the C(11A) carbon atom and the centroid of the quinoline's pyridine ring.

Compound **4** displayed the  $\pi\cdots\pi$  interaction involving the benzene rings of the quinoline heterocycle — the smallest distance found was 3.438 Å between the centroid of this ring and the C(8) carbon atom. Additionally, in this same pair of molecules, the lone pair $\cdots\pi$  interaction was observed between the bromine atom and the centroid of the quinoline heterocycle's pyridine ring, with a distance of 3.511 Å. These interactions led to the formation of a supramolecular dimer with the molecules arranged in layers. Another interaction observed for this compound was the C-H $\cdots\pi$  type, which also formed a dimer — the smallest distance found was 2.666 Å between the H(61B) hydrogen atom of the cyclohexane and the C(11) carbon atom of the quinoline heterocycle's benzene ring.

For all of the interactions, it was found that the distances were smaller than the sum of the Van der Waals radii of the atoms involved [24]. For the C-H $\cdots\pi$  interactions, it could be seen that the smallest distances were between the hydrogen atom and one of the atoms of either the benzene ring or heterocyclic ring, but not its centroid. This is due to the fact that the highest electron density is located at the periphery of the ring and not in the center, because these six-membered rings are considered to be  $\pi$ -deficient. It is for this reason that the  $\pi\cdots\pi$  interactions were all classified as parallel displaced, due to the electrostatic attraction: from the periphery of the ring with high electron density, and from the centroid of the ring with low electron density [20–22]. Only one lone pair $\cdots\pi$  interaction was observed — it is characterized by the interaction of one neutral atom rich in electrons (bromine) and one  $\pi$  ring lacking in electrons. The six-membered aromatic or heteroaromatic  $\pi$  rings are the ones most often found in this type of interaction [25].

### UV-vis behavior of compounds 1-4

The comparative absorption spectra of the compounds **1-4**, using ethyl acetate as solvent, are shown in **Figure 11** and the absorption properties are listed in **Table 4**. The spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkan]-7-amine derivatives showed absorption maxima located around 250-350 nm range, at the UV region. The values for the molar absorptivity coefficient ( $\epsilon$ ) for these compounds indicated that spin and symmetry allowed electronic transitions, which could be related to  $n \rightarrow \pi^*$  and  $\pi \rightarrow \pi^*$  transitions (**Figure 11**). We did not observe significant changes on the absorption maxima location associated with the different stereochemistry in the spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkan]-7-amines.

### **Conclusion**

In conclusion, in two hydrogen bond patterns, the amino group and the quinoline nitrogen atom were observed as a proton donor and proton acceptor, respectively, for all of the structures. Another pattern observed involved the presence of interactions with  $\pi$  electrons, due to the high number of aromatic rings. In addition, it was observed the effect of substituent on the crystal packing with the variation of cycloalkanes attached to the chromene and halogen atoms as a substituent on the quinoline. The solvents present in the unit cell acted as a bridge between two heterocyclic molecules, via hydrogen bonding. All such variances led to differences in crystal packing; for example, the formation of supramolecular dimers and endless chains along a plane. UV-vis absorption data showed that the molar absorptivity coefficient ( $\epsilon$ ) for these new tacrine hybrids indicated a spin and symmetry suggesting  $n \rightarrow \pi^*$  and  $\pi \rightarrow \pi^*$  electronic transitions.

### **Supplementary Material**

CCDC numbers 994958, 995079, 997278, and 995080 contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained, free of charge, at [www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html](http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html), or from the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) at 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK. Fax: +44(0) 1223 336 033 and e-mail: [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk).

## Acknowledgements

The authors thank the Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the fellowships and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support (Process number 306.883/2015-5).

## References

- [1] A. Romero, R. Cacabelos, M.J. Oset-Gasque, A. Samadi, J. Marco-Contelles, Novel tacrine-related drugs as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 1916-1922.
- [2] P. Anand, B. Singh, A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *Arch. Pharm. Res.* 36 (2013) 375-399.
- [3] H. Hayour, A. Bouraiou, S. Bouacida, F. Berree, B. Carboni, T. Roisnel, A. Belfaitah, Synthesis and X-ray structures of new cycloalka[e]pyrano[2,3-*b*]pyridine derivatives: novel tacrine analogues, *Tetrahedron Lett.* 52 (2011) 4868-4871.
- [4] H.G. Bonacorso, L.B. Silva, J.B.T. Rocha, P.A. Nogara, E.P. Waczuk, F.D'A. Silva, D.C. Bueno, Y.N.A.M. Kader, M.A.P. Martins, N. Zanatta, Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of 7-amine-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkanes] as new tacrine hybrids, *Tetrahedron Lett.* 56 (2015) 7024-7027.

- [5] M.A.P. Martins, M. Hörner, J. Beck, A.Z. Tier, A.L. Belladonna, A.R. Meyer, N. Zanatta, H.G. Bonaccorso, C.P. Frizzo, Polymorphism in an 18-membered macrocycle: an energetic and topological approach to understand the supramolecular structure, *CrystEngComm*. 18 (2016) 3866-3876.
- [6] M.A.P. Martins, A.R. Meyer, A.Z. Tier, K. Longhi, L.C. Ducati, H.G. Bonaccorso, N. Zanatta, C.P. Frizzo, Proposal for crystallization of 3-amino-4-halo-5-methylisoxazoles: an energetic and topological approach, *CrystEngComm*. 17 (2015) 7381-7391.
- [7] M.A.P. Martins, C.P. Frizzo, A.C.L. Martins, A.Z. Tier, I.M. Grindi, A.R. Meyer, H.G. Bonaccorso, N. Zanatta, Energetic and topological approach for characterization of supramolecular clusters in organic crystals, *RSC Adv*. 4 (2014) 44337-44349.
- [8] C.P. Frizzo, A.R. Meyer, G.S. Caleffi, L.V. Rodrigues, M.R.B. Marzari, P.T. Campos, D.N. Moreira, H.G. Bonaccorso, N. Zanatta, M.A.P. Martins, Influence of bulky and halogen substituents on crystal packing of pyrazolo[1,5-a]pyrimidines, *J. Mol. Struct.* 1004 (2011) 45-50.
- [9] P.T. Campos, P. Machado, C.P. Frizzo, D.N. Moreira, A.R. Meyer, H.G. Bonaccorso, N. Zanatta, L. Ducati, R. Rittner, C.F. Tormena, M.A.P. Martins, Structural investigations of 5-hydroxy-4,5-dihydroisoxazoles, *J. Mol. Struct.* 1006 (2011) 462-468.
- [10] M.A.P. Martins, D.N. Moreira, C.P. Frizzo, P.T. Campos, K. Longhi, M.R.B. Marzari, N. Zanatta, H.G. Bonaccorso, X-ray, semi-empirical MO calculations and  $\pi$ -electron delocalization of 1-cyanoacetyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles, *J. Mol. Struct.* 969 (2010) 111-119.
- [11] P. Machado, P.T. Campos, G.R. Lima, F.A. Rosa, A.F.C. Flores, H.G. Bonaccorso, N. Zanatta, M.A.P. Martins, Experimental and calculated structural parameters of 5-trihalomethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole derivatives, novel analgesic agents, *J. Mol. Struct.* 917 (2009) 176-182.

- [12] Bruker (2006). APEX2 (Version 2.1), COSMO (Version 1.56), BIS (Version 2.0.1.9), SAINT (Version 7.3A) and SADABS (Version 2004/1) & XPREP (Version 2005/4). Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- [13] Sheldrick GM (1997) SHELXS-97, Program for Crystal Structure Solution, University of Göttingen, Germany.
- [14] Sheldrick GM (1997) SHELXL97, Program for Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Germany.
- [15] Farrugia LJ (1997) ORTEP-III for Windows, J. Appl. Cryst. 30:565.
- [16] F.H. Allen, O. Kennard, D.G. Watson, L. Brammer, A.G. Orpen, R. Taylor, Tables of bond lengths determined by x-ray and neutron diffraction. part 1. bond lengths in organic compounds, J. Chem. Soc. Perkin Trans. II (1987) S1.
- [17] T. Steiner, The hydrogen bond in the solid state, Angew. Chem. Int. Ed. 41 (2002) 48-76.
- [18] S.J. Grabowski, Hydrogen bonding strength-measures based on geometric and topological parameters, J. Phys. Org. Chem. 17 (2004) 18-31.
- [19] G.R. Desiraju, Hydrogen bridges in crystal engineering: interactions without borders, Acc. Chem. Res. 35 (2002) 565-573.
- [20] Y.C. Park, J.S. Lee, Accurate ab initio binding energies of the benzene dimer, J. Phys. Chem. A. 110 (2006) 5091-5095.
- [21] J.G. Hill, J.A. Platts, H.J. Werner, Calculation of intermolecular interactions in the benzene dimer using coupled-cluster and local electron correlation methods, Phys. Chem. Chem. Phys. 8 (2006) 4072-4078.
- [22] M.O. Sinnokrot, C.D. Sherrill, High-accuracy quantum mechanical studies of  $\pi$ - $\pi$  interactions in benzene dimers, J. Phys. Chem. A 110 (2006) 10656-10668.
- [23] C.A. Hunter, J.K.M. Sanders, The nature of  $\pi$ - $\pi$  interactions, J. Am. Chem. Soc. 112 (1990) 5525-5534.



[24] P. Pyykkö, Strong closed-shell interactions in inorganic chemistry, *Chem. Rev.* 97 (1997) 597-636.

[25] T.J. Mooibroek, P. Gamez, J. Reedijk, Lone pair- $\pi$  interactions: a new supramolecular bond? *CrystEngComm.* 10 (2008) 1501-1515.

Table 1

Compound	1	2	3	4
CCDC N°	994958	995079	997278	995080
Formula	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Mr	348.43	330.42	354.82	413.31
Temperature (K)	293(2)	296(2)	293(2)	293(2)
Wavelength (Å)	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073
Crystal system	Monoclinic	Trigonal	Monoclinic	Triclinic
Space Group	P21/n	R-3	P21/c	P-1
Unit cell parameters				
a (Å)	11.1829(6)	21.915(3)	7.4814(4)	8.7506(13)
b (Å)	15.3308(8)	21.915(3)	26.4133(14)	9.5840(16)
c (Å)	11.8646(6)	18.873(2)	9.1210(6)	11.4663(19)
α (°)	90	90	90	107.009(9)
β (°)	113.295(3)	90	113.322(3)	102.884(8)
γ (°)	90	120	90	97.997(8)
V (Å <sup>3</sup> )	1868.28(17)	7849.9(16)	1655.12(17)	874.6(2)
Z	4	18	4	2
Density (calculated) (g.cm <sup>-3</sup> )	1.239	1.258	1.424	1.569
Absorption coefficient (mm <sup>-1</sup> )	0.080	0.078	0.247	2.369
F (000)	744	3168	744	424
Crystal size (mm)	0.601 x 0.481 x 0.229	0.60 x 0.15 x 0.10	0.279 x 0.171 x 0.143	0.661 x 0.317 x 0.295
θ range for data collection (°)	2.12-30.02	1.52-27.47	1.54-27.16	1.93-27.36
h, k, l range	-15<=h<=15, -21<=k<=19, 15<=l<=16	-28<=h<=28, -28<=k<=28, 17<=l<=24	-7<=h<=9, -33<=k<=27, 11<=l<=11	-11<=h<=11, -12<=k<=12, 14<=l<=14
T <sub>max</sub> and T <sub>min</sub>	0.9990 and 0.9522	0.9923 and 0.9549	0.9872 and 0.9603	0.7514 and 0.5054
Reflections collected	28579	34748	24026	24068
Independent reflections	5323 [R(int) = 0.0407]	3927 [R(int) = 0.0771]	3669 [R(int) = 0.0702]	3920 [R(int) = 0.0281]
Data/ restraints/ parameters	5323 / 0 / 235	3927 / 2 / 225	3669 / 4 / 217	3920 / 2 / 234
Absorption correction	Gaussian	Gaussian	Gaussian	Gaussian
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Final R indices [I>2σ(I)]	R <sub>1</sub> = 0.0639, wR <sub>2</sub> = 0.1628	R <sub>1</sub> = 0.0515, wR <sub>2</sub> = 0.1075	R <sub>1</sub> = 0.0517, wR <sub>2</sub> = 0.1268	R <sub>1</sub> = 0.0221, wR <sub>2</sub> = 0.0538
R indices (all data)	R <sub>1</sub> = 0.1585, wR <sub>2</sub> = 0.2103	R <sub>1</sub> = 0.1264, wR <sub>2</sub> = 0.1363	R <sub>1</sub> = 0.1097, wR <sub>2</sub> = 0.1533	R <sub>1</sub> = 0.0254, wR <sub>2</sub> = 0.0548
Goodness of fit on F <sup>2</sup>	1.010	0.978	1.021	1.089
Largest diff. peak and hole (e Å <sup>-3</sup> )	0.331 and -0.356	0.153 and -0.171	0.261 and -0.398	0.371 and -0.325

Table 2

	1	2	3	4
C(1)-C(2)	1.378(3)	1.371(5)	1.379(7)	1.384(3)
C(2)-C(3)	1.368(3)	1.376(4)	1.378(7)	1.391(3)
C(3)-C(4)	1.377(4)	1.374(4)	1.372(8)	1.387(3)
C(4)-C(4a)	1.388(3)	1.374(4)	1.383(6)	1.386(3)
C(4a)-O(5)	1.364(2)	1.365(3)	1.355(6)	1.363(3)
O(5)-C(6)	1.460(2)	1.455(3)	1.468(5)	1.463(2)
C(6)-C(6a)	1.520(3)	1.529(4)	1.525(6)	1.531(3)
C(6a)-C(7)	1.392(3)	1.388(4)	1.387(6)	1.394(3)
C(7)-C(7a)	1.437(3)	1.438(4)	1.440(6)	1.443(3)
C(7a)-C(8)	1.415(3)	1.406(4)	1.411(6)	1.412(3)
C(8)-C(9)	1.362(3)	1.361(4)	1.361(6)	1.365(3)
C(9)-C(10)	1.393(4)	1.402(5)	1.394(7)	1.365(3)
C(10)-C(11)	1.351(3)	1.349(5)	1.356(7)	1.365(3)
C(11)-C(11a)	1.414(3)	1.413(4)	1.410(6)	1.418(3)
C(11a)-N(12)	1.366(3)	1.361(4)	1.360(6)	1.361(3)
N(12)-C(12a)	1.330(2)	1.325(3)	1.324(6)	1.328(3)
C(12a)-C(12b)	1.469(3)	1.470(4)	1.473(6)	1.468(3)
C(12b)-C(1)	1.390(3)	1.393(4)	1.395(7)	1.395(3)
C(4a)-C(12b)	1.386(3)	1.383(4)	1.383(6)	1.388(3)
C(6a)-C(12a)	1.409(3)	1.426(4)	1.413(6)	1.420(3)
C(7a)-C(11a)	1.408(3)	1.412(4)	1.409(7)	1.416(3)
C(7)-N(71)	1.357(3)	1.383(3)	1.370(6)	1.363(3)

Table 3

Compound	D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A	Symmetry codes
<b>1</b>	O(2)- H(2A)...N(12)	0.82	2.07	2.808(3)	150.6	
	N(71)- H(71B)...O(2)	0.86	2.09	2.903(2)	157.0	-x+5/2,y+1/2,- z+3/2
	C(8)-H(8)...O(2)	0.93	2.53	3.438(3)	166.7	-x+5/2,y+1/2,- z+3/2
<b>2</b>	N(71)- H(71A)...N(12)	0.99	2.718(2)	3.576(2)	145.26(5)	-x+y+2/3,- x+1/3,z+1/3
	C(1)- H(1)...N(71)					
<b>3</b>	O(2)- H(2A)...N(12)	0.97	1.940(4)	2.905(4)	174.41(11)	
	C(1)-H(1)...O(2)	0.93	2.70	3.383(5)	130.6	
	N(71)- H(71B)...O(2)	0.86	2.29	3.095(4)	157.0	x+1,y,z+1
	C(8)-H(8)...O(2)	0.93	2.59	3.459(5)	155.6	x+1,y,z+1
	O(2)- H(2B)...N(71)	1.12	2.252(4)	3.361(4)	169.60(10)	-x,-y,-z+1
	C(63)- H(63B)...Cl(91)	0.97	2.94	3.605(6)	126.9	-x+1,-y,-z+2
<b>4</b>	O(2)- H(2A)...N(12)	0.88	1.9496(18)	2.8282(18)	172.10(5)	
	N(71)- H(71B)...O(2)	0.86	2.17	2.9885(19)	159.4	x+1,y,z
	C(8)-H(8)...O(2)	0.93	2.47	3.377(2)	165.4	x+1,y,z
	C(64)- H(64A)...Br(91)	0.97	2.83	3.687(2)	147.8	x,y+1,z+1
	O(2)- H(2B)...Br(91)	0.91	3.03	3.7493(5)	137.609(7)	-x+1,-y,-z

Table 4.

Compound	nm ( $\epsilon$ , $M^{-1}cm^{-1}$ )
1	264 (5.449), 273 (6.411), 307 (2.002), 325 (2.028)
2	264 (4.845), 272 (5.468), 308 (1.716), 326 (1.809)
3	267 (3.891), 276 (4.932), 313 (1.519), 329 (1.409)
4	268 (5.331), 277 (6.704), 313 (2.196), 332 (2.091)

**Table 1.** General and Crystal Data and Summary of Intensity Data collection and Structure Refinement for Compounds **1-4**.

**Table 2.** Selected experimental bond lengths [ $\text{\AA}$ ] for structures **1-4**.

**Table 3.** Hydrogen Bonding Geometry in Structures **1-4** [ $\text{\AA}$ ].

**Table 4.** Absorption data of spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkan]-7-amine **1-4**.

**Figure 1.** Structures of 7-amine-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkanes] **1-4**.

**Figure 2.** View of the asymmetric unit of the compounds **1-4**, showing the atom labeling scheme. Displacement ellipsoids are drawn at the 50% probability level. H atoms are represented by circles of arbitrary radii.

**Figure 3.** Projection of hydrogen bonds in the crystal packing of the structure **1**.

**Figure 4.** Projection of hydrogen bonds in the crystal packing of the structure **2**.

**Figure 5.** Projection of hydrogen bonds in the crystal packing of the structure **3**.

**Figure 6.** Projection of hydrogen bonds in the crystal packing of the structure **4**.

**Figure 7.** Projections of  $\pi \dots \pi$  and C-H... $\pi$  interactions of the structure **1**.

**Figure 8.** Projections of  $\pi \dots \pi$  and C-H... $\pi$  interactions of the structure **2**.

**Figure 9.** Projections of  $\pi \dots \pi$  interactions of the structure **3**.

**Figure 10.** Projections of  $\pi \dots \pi$ , lone pair  $\pi$  and C-H... $\pi$  interactions of the structure **4**.

**Figure 11.** Comparative electronic UV-vis absorption spectra of spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkan]-7-amine containing different structures in ethyl acetate solutions.

Figure 1

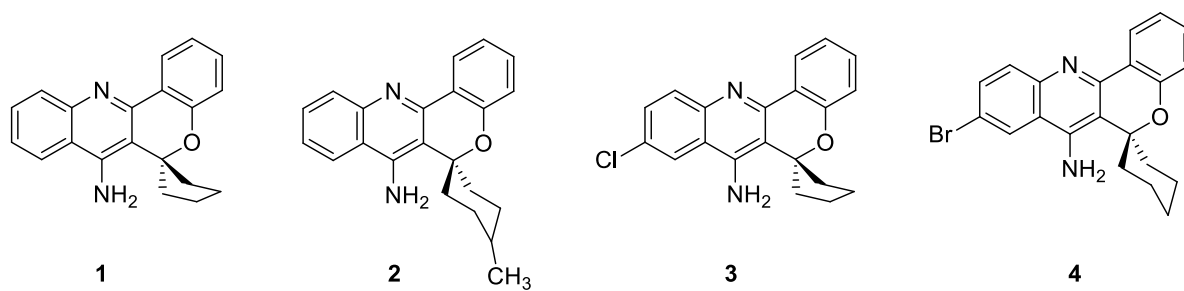


Figure 2

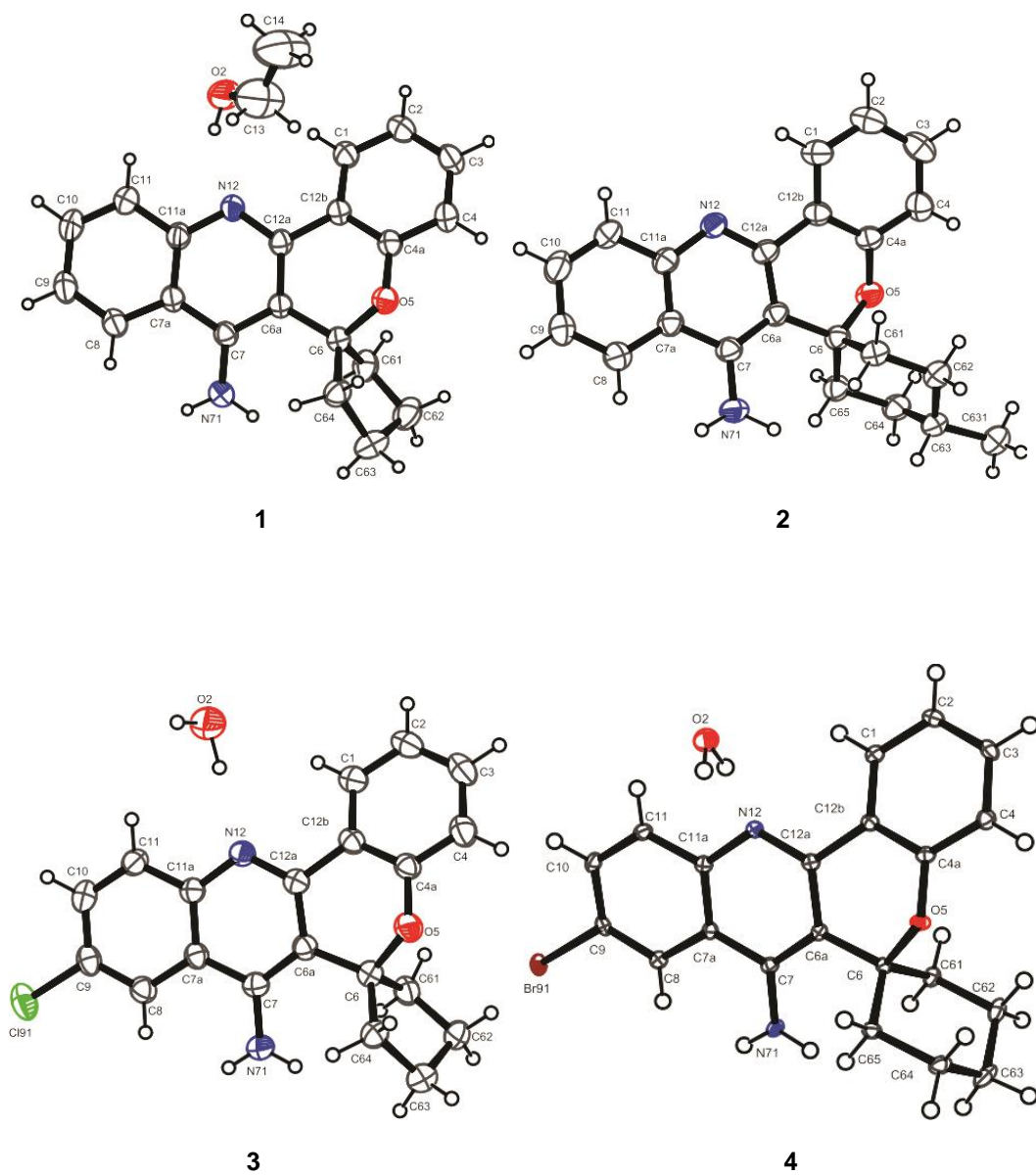




Figure 3

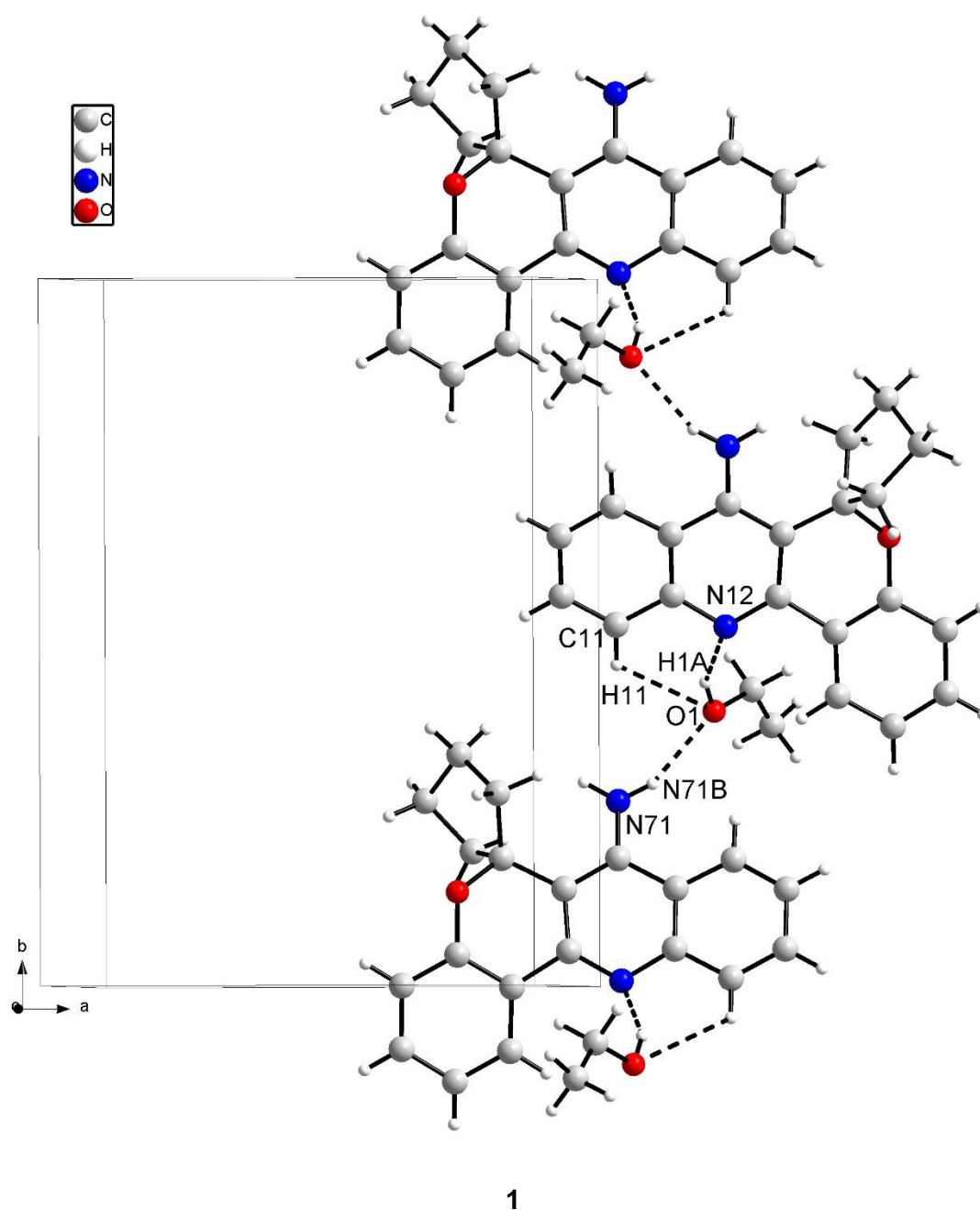
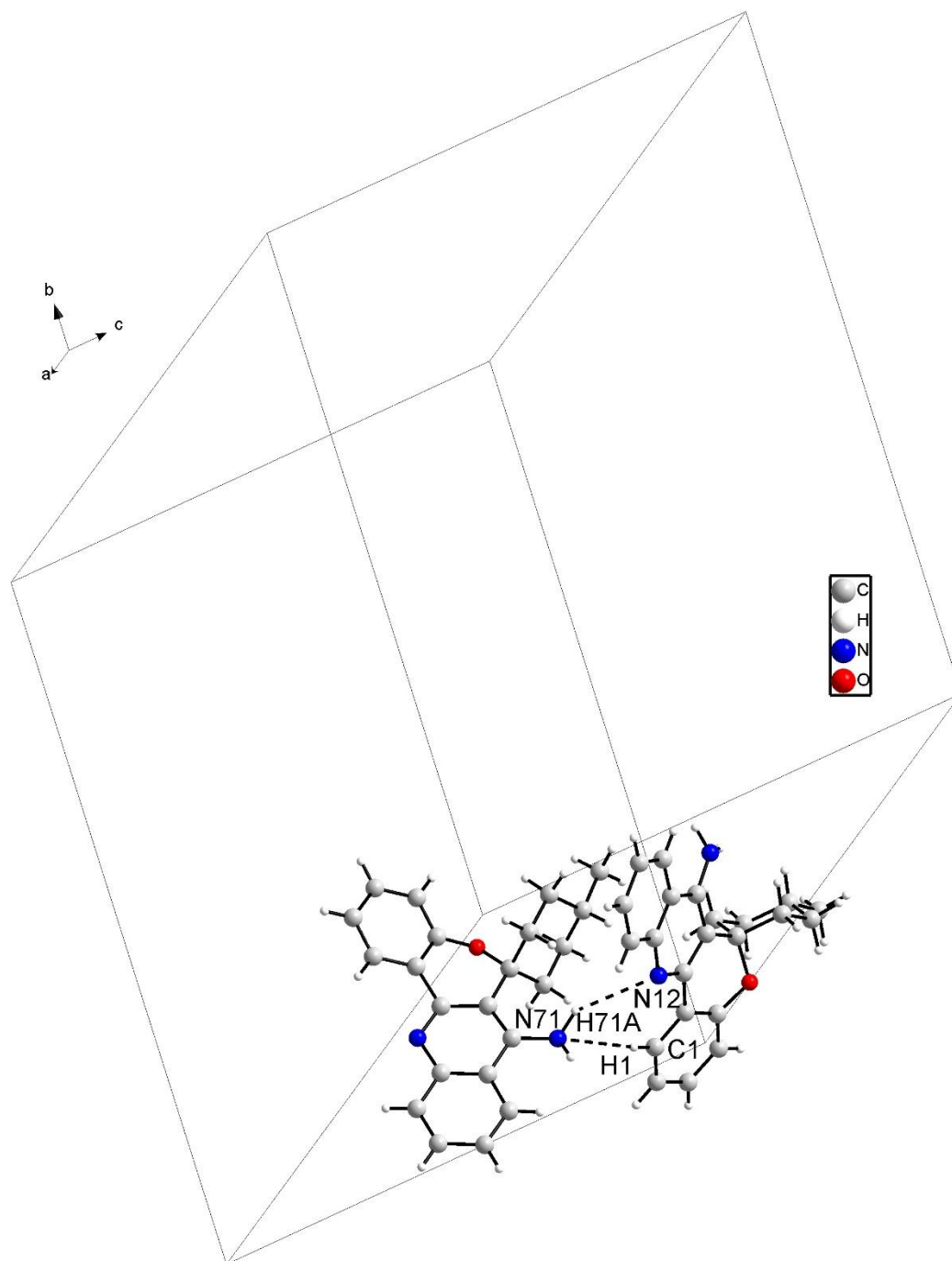


Figure 4



2

Figure 5

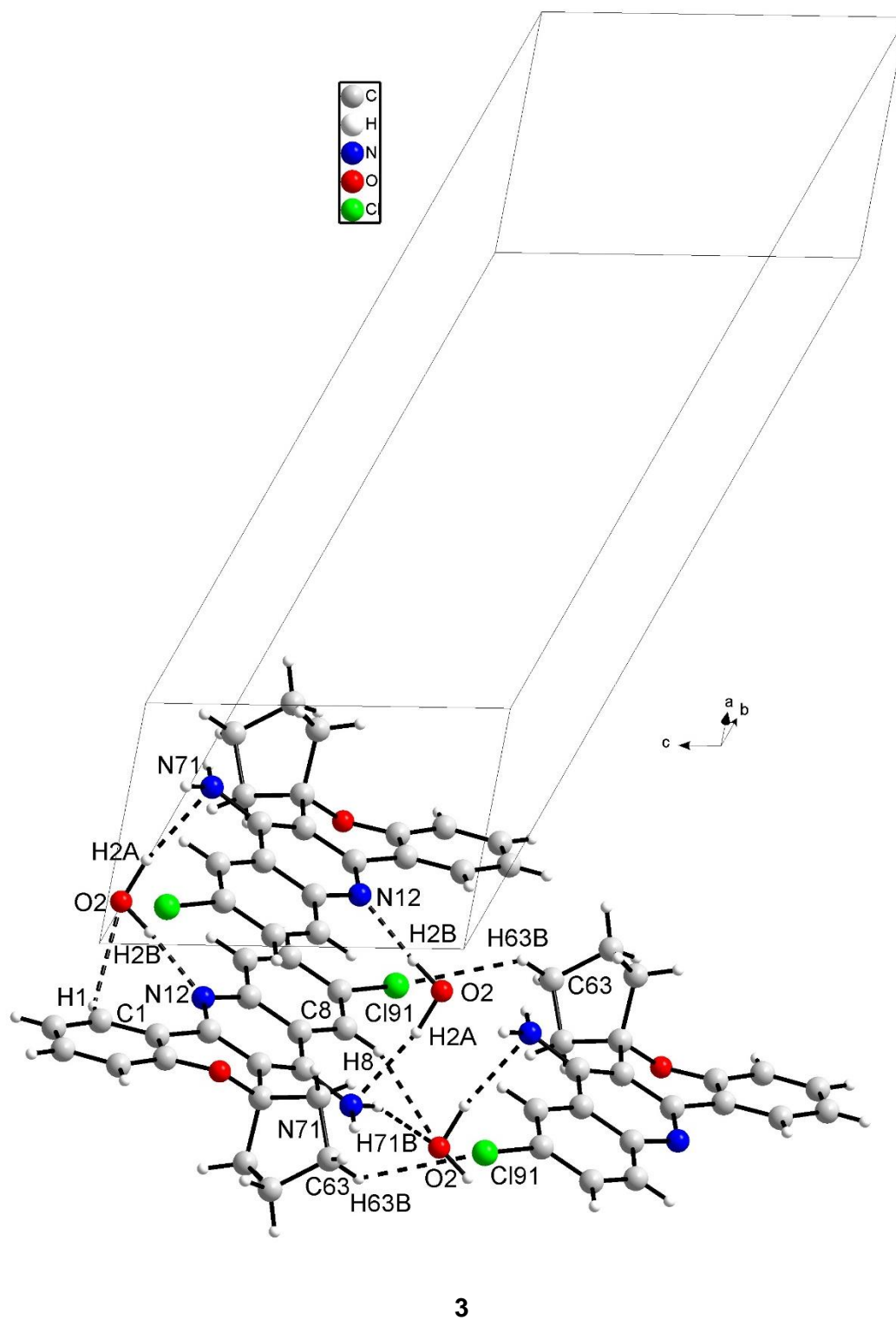


Figure 6

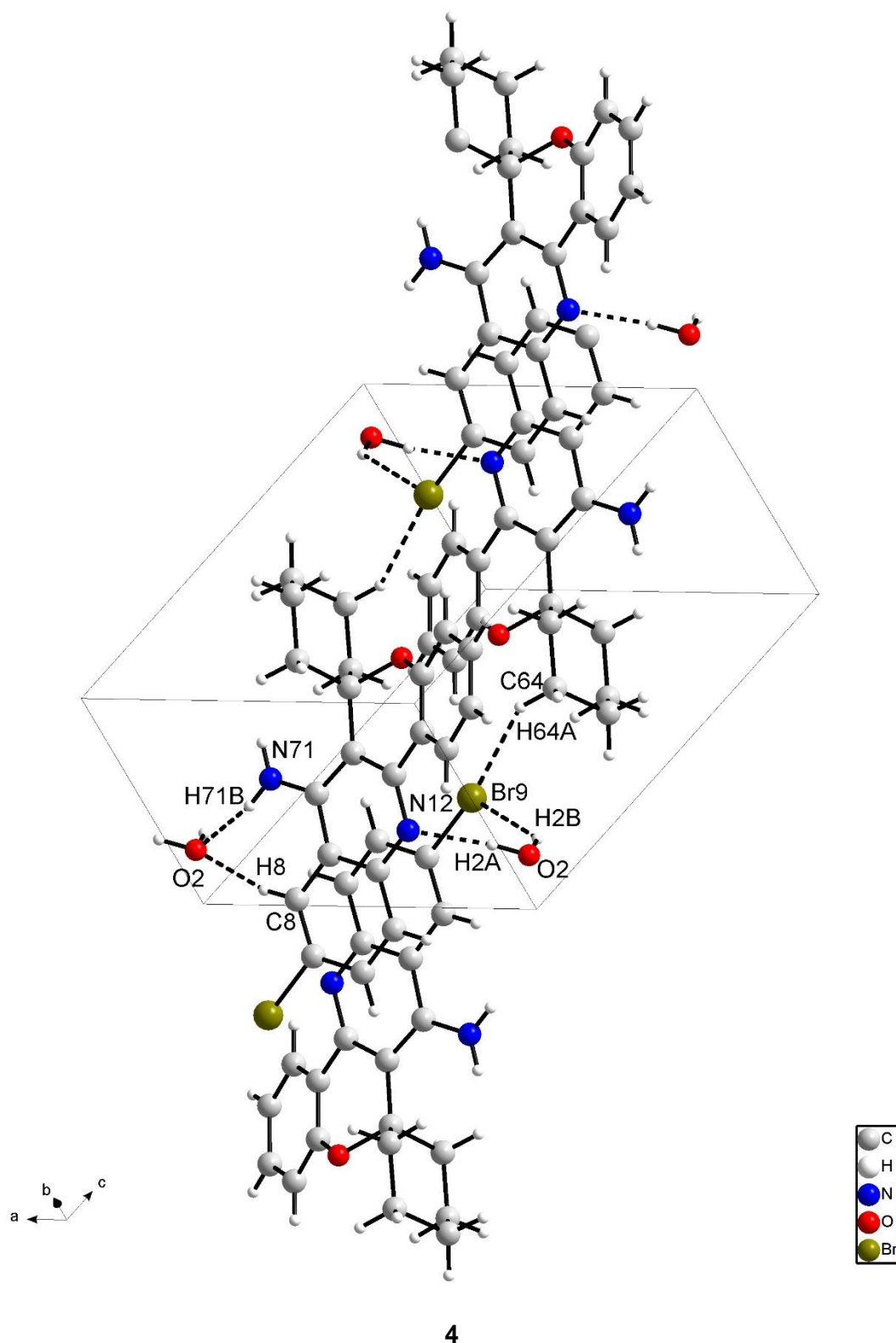
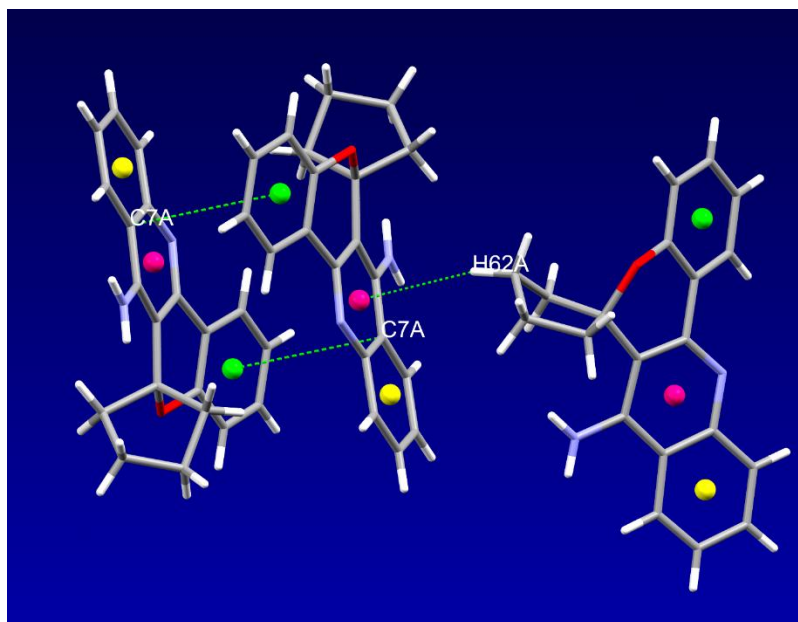
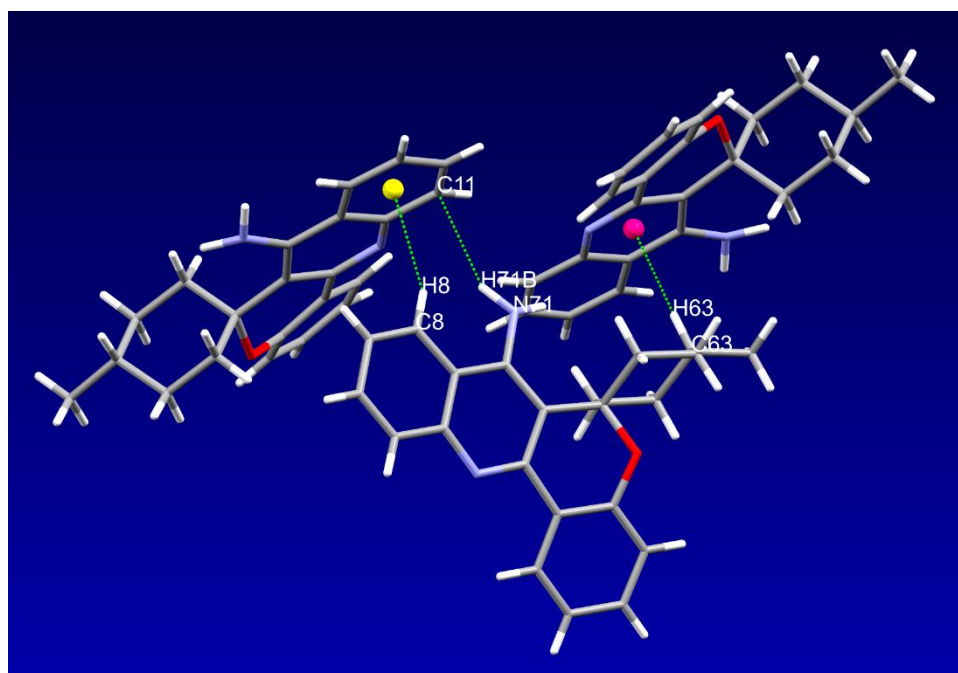
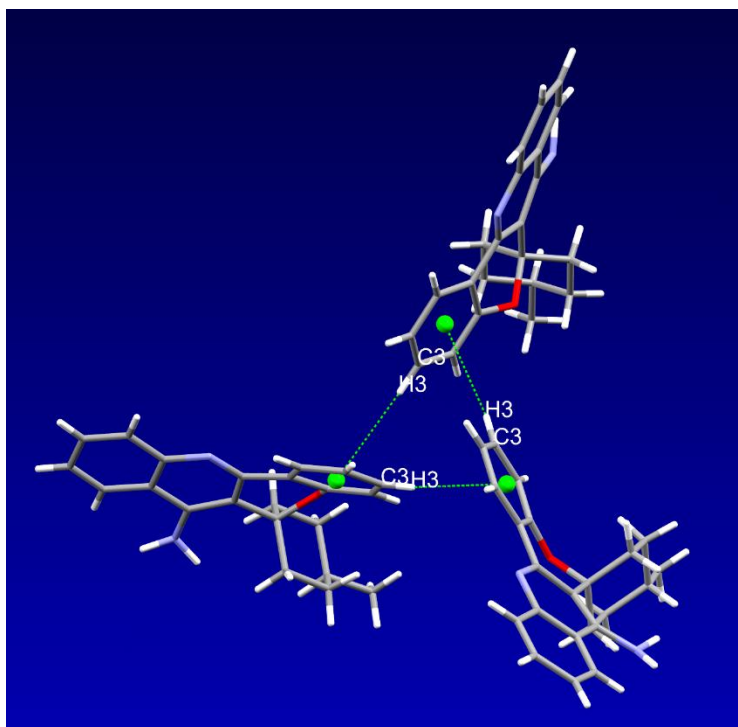


Figure 7



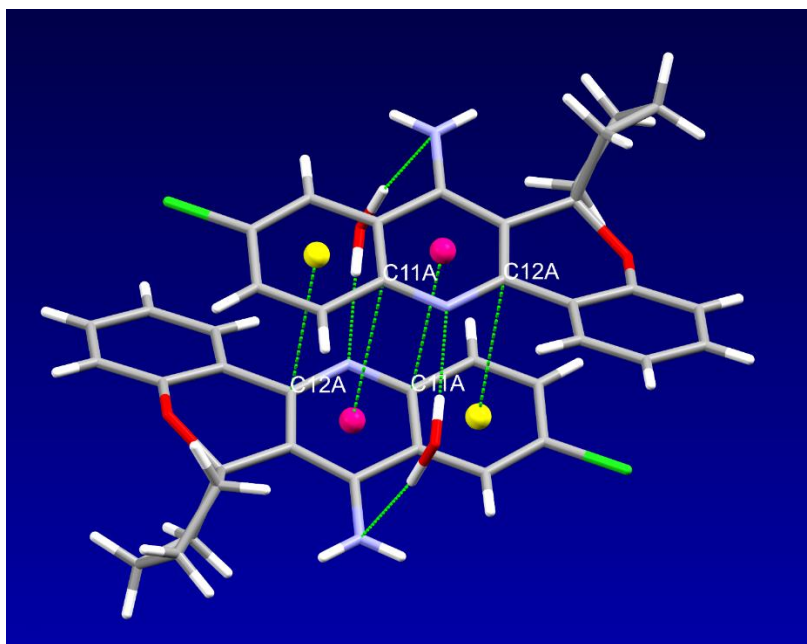
1

Figure 8



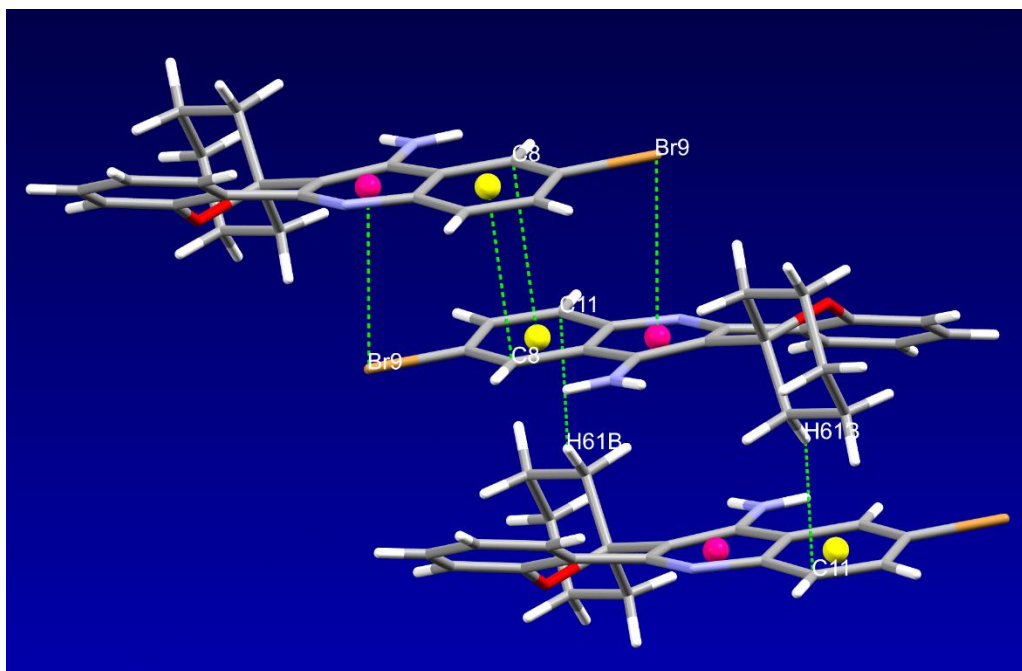
2

Figure 9



3

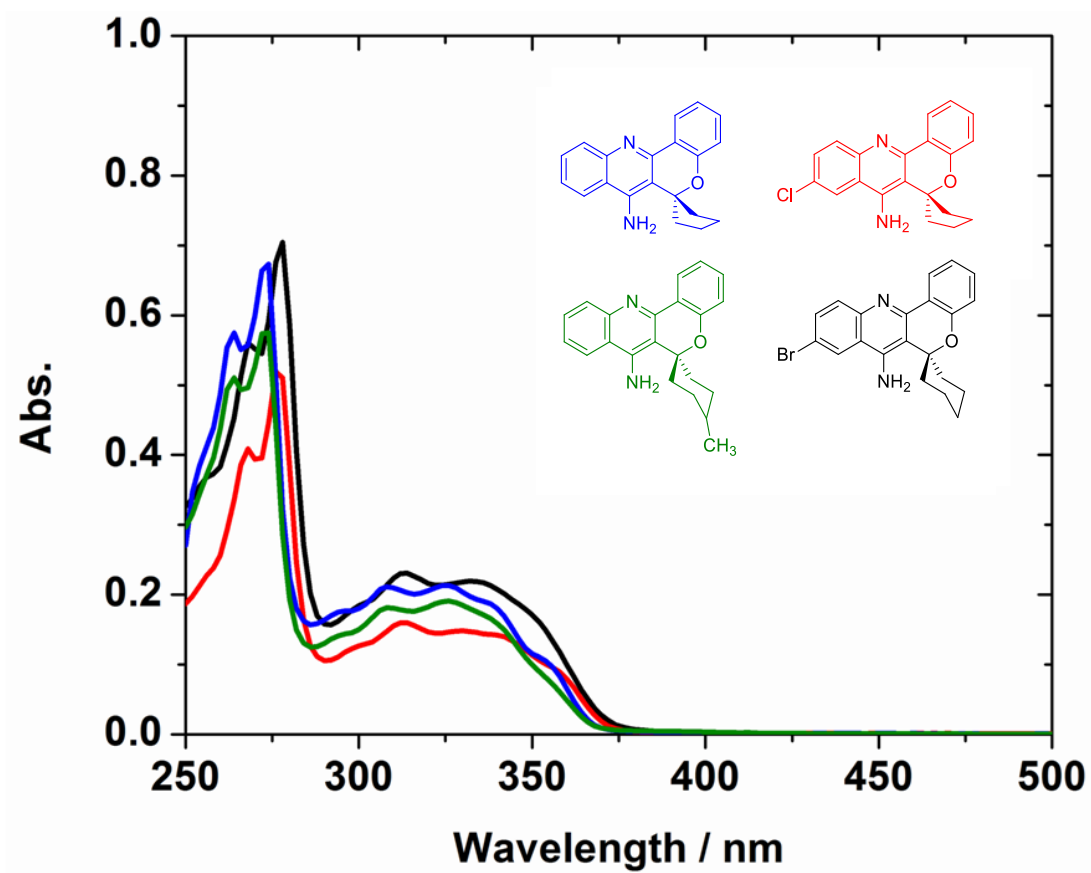
Figure 10



4



Figure 11.



---

**ANEXO V**

*Estudo de docking molecular*

## 11. ESTUDO DE *DOCKING MOLECULAR*

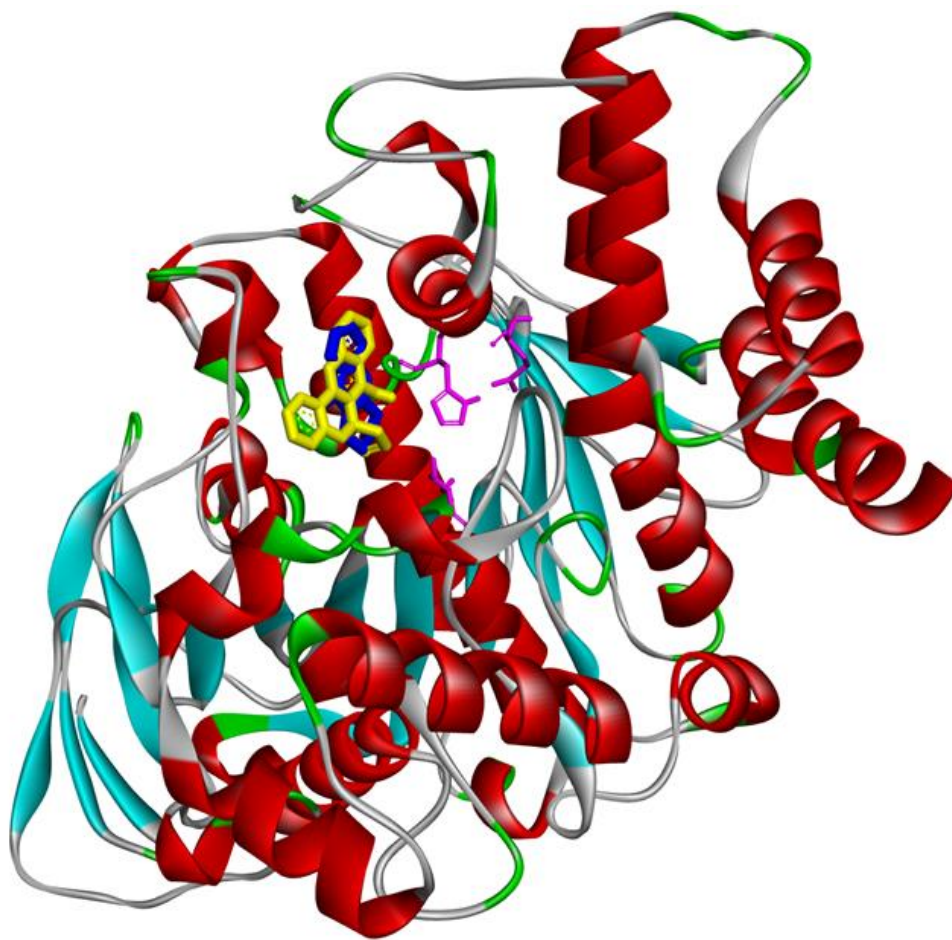
*Docking* molecular é um estudo computacional que prevê a orientação preferencial de uma molécula relacionada a outra. O conhecimento da orientação preferida por sua vez pode ser utilizado para prever a força de associação ou a afinidade de ligação entre duas moléculas. Assim, esse estudo pode ser utilizado como complemento dos resultados de ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*.

O estudo de *docking* molecular foi realizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFSM com a colaboração do Prof. Dr. João B. T. da Rocha e do seu aluno de doutorado Pablo Andrei Nogara.

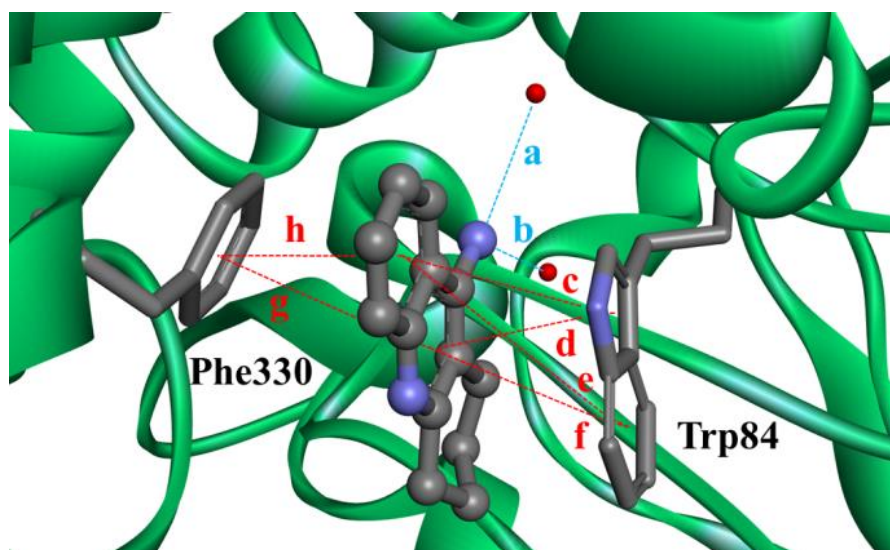
### 11.1 Ensaio *in silico* dos compostos 9a-g

De acordo com os resultados do *docking*, é possível verificar na **Figura 1**, que o composto **9a** interage com a AChE nas mesmas regiões que a tacrina. A tacrina interage com a enzima através de interações  $\pi$ - $\pi$  com a Phe330 e Trp84 (subsítio aniônico periférico e subsítio aniônico, respectivamente) e através de duas ligações hidrogênio com duas moléculas de água (**Figura 2**).

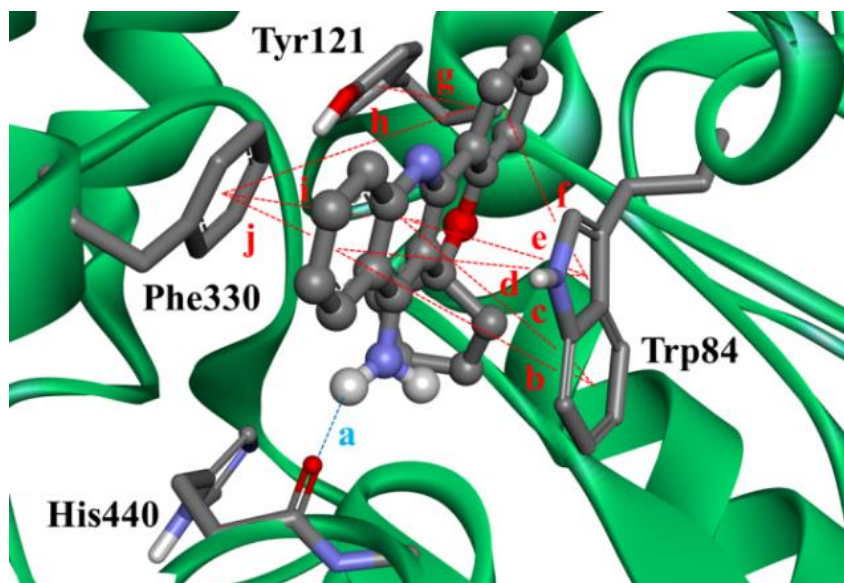
O Composto **9a** apresentou um comportamento muito semelhante ao da tacrina na interação com a enzima. Esse análogo da tacrina formou interações  $\pi$ - $\pi$  com a Phe330, Tyr121, Trp84 (subsítio aniônico periférico e subsítio aniônico, respectivamente) e ligações hidrogênio com o grupo carbonila do His440 (**Figura 3**).



**Figura 1.** Resultado do *docking* para o composto **9a** (em amarelo) que interage nas mesmas regiões da enzima AChE que a tacrina (em azul). A tríade catalítica (Ser200, Glu327 e His440) estão mostradas em rosa.



**Figura 2.** Interações da tacrina na estrutura de raio-X da AChE. “a” e “b” são as ligações hidrogênio (3,16 Å e 3,12 Å, respectivamente) e “c-h” são interações  $\pi$ - $\pi$  (c = 4,13 Å; d = 3,58 Å; e = 5,39 Å; f = 4,08 Å; g = 4,33 Å; h = 3,77 Å).



**Figura 3.** Resultados do *docking* para as interações do composto **9a** na AChE. “a” é a ligação hidrogênio (2,19 Å) e “b-j” são as interações  $\pi$ - $\pi$  (b = 5,70 Å; c = 4,80 Å; d = 4,57 Å; e = 3,73 Å; f = 5,43 Å; g = 6,29 Å; h = 6,39 Å; i = 3,78 Å e j = 3,89 Å).

Os valores de  $\Delta G$  obtidos através do *docking* (Tabela 1) demonstram que a molécula **9a** apresenta maior afinidade com a AChE quando comparada com os compostos **9b** e **9c**, pois apresenta o menor valor de  $\Delta G$ , ou seja, o processo é mais favorável.

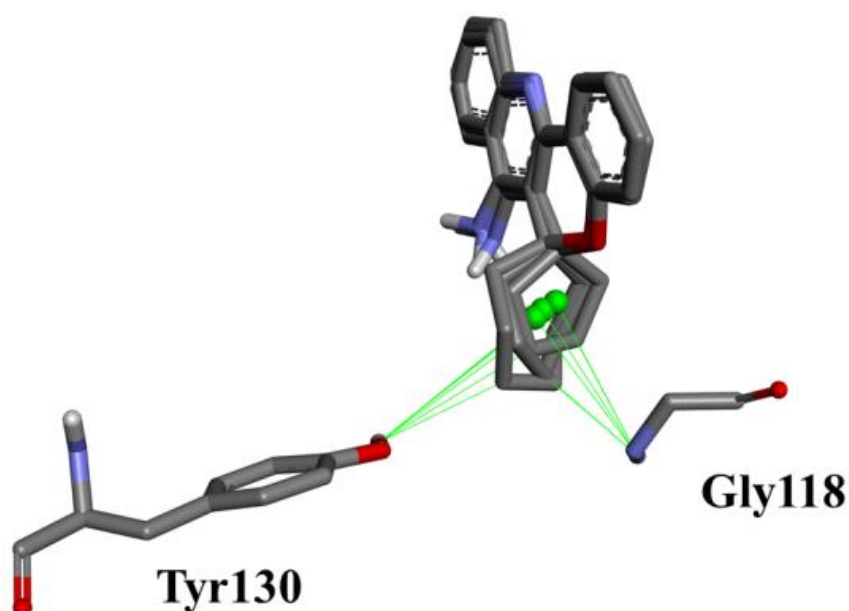
**Tabela 1.** Valores de energia livre de ligação ( $\Delta G$ ) para as moléculas **9a**, **9b** e **9c** obtidas através do programa Vina 1.1.1.

Composto	$\Delta G$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )
<b>9a</b>	-11.1
<b>9b</b>	-10,5
<b>9c</b>	-9.8

Os maiores valores de  $\Delta G$  das moléculas **9b** e **9c** podem ser explicados pelo efeito estérico do anel espiro. Quanto maior o número de carbonos no anel espiro maior será o efeito estérico com os resíduos de Tyr130 e Gly118 (Tabela 2, Figura 4), subsítio aniônico e *oxyanion hole*, respectivamente.

**Tabela 2.** Comparação da distância (em Å) entre os carbonos inferiores do anel espiro e os hidrogênios polares dos resíduos Tyr130 e Gly118. \*A partir do centroide de anel.

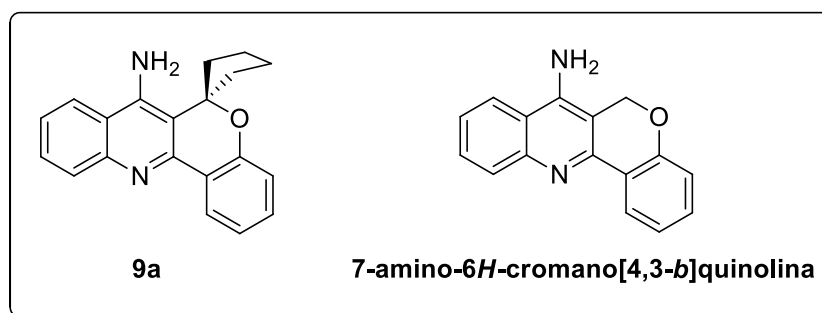
Resíduos	Composto		
	9a	9b	9c
Tyr130	4,29	3,89	3,30
Gly118	3,32	2,91	2,67
Tyr130*	5,44	5,10	4,80
Gly118*	4,04	4,04	3,99



**Figura 4.** Sobreposição dos compostos 9a, 9b e 9c. As esferas verdes são os centroides de cada anel espiro e as linhas verdes suas respectivas distâncias. Os valores das distâncias podem ser vistos na Tabela 2.

## 11.2 Ensaio *in silico* dos compostos **9a** e 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina

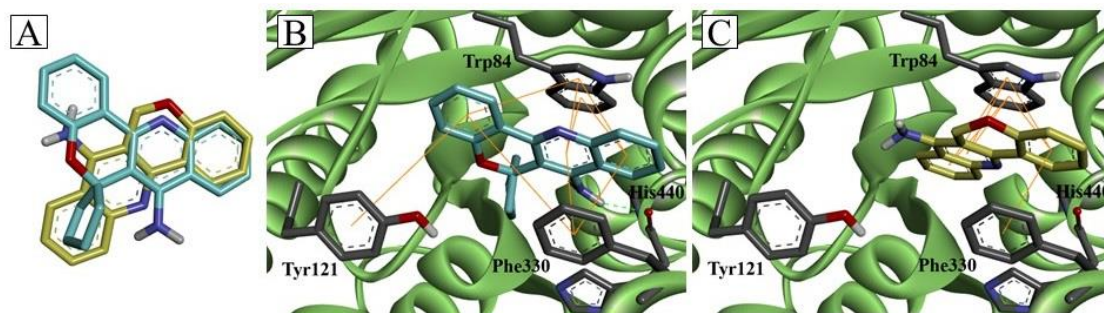
Valenti e col. sintetizaram uma série de análogos da tacrina e avaliaram o potencial de inibição da AChE e BChE. Dentre os compostos avaliados, a 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina foi a que apresentou maior valor de IC<sub>50</sub> para AChE (245 ± 7,4 μM). O potencial de inibição da AChE, em geral, diminui com o tamanho da molécula provavelmente devido ao maior efeito estérico entre composto e enzima. Assim, foi realizado um estudo de *docking molecular* comparando os tipos de interações dos compostos **9a** e 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina com a AChE, visto que o composto **9a** apesar de apresentar maior volume molecular que a 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina é mais ativo na inibição da AChE que esse composto (**Figura 1**).



**Figura 1.** Estrutura química dos compostos 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina e **9a**.

Os resultados do docking sugerem que os compostos **9a** e 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina apesar de interagirem na mesma região da enzima, suas conformações são distintas (**Figura 2**), sendo assim, apresentam diferentes afinidades para com a AChE. A sobreposição das moléculas, na **Figura 2A** mostra melhor essa diferença de orientação. De acordo com as **Figuras 2B e 2C**, podemos perceber ambos possuem interação do tipo π-π com os resíduos de aminoácidos Trp84 e Phe330, mas a presença da porção espirocarbocíclica, faz com que o composto **9a** adote uma conformação distinta no sítio ativo da AChE, possibilitando, que o mesmo possa fazer uma interação do tipo π-π, com a Tyr121 e uma ligação de hidrogênio com a His440; o que não se observa para o composto 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina, pois este, não possui a porção espirocarbocíclica.

Além disso, os valores de termodinâmicos logrados do *docking* sugerem que **9a** possui uma maior afinidade pela AChE do que a 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina, pois seus respectivos valores de  $\Delta G_{\text{binding}}$  são: -11,0 kcal/mol e -9,6 kcal/mol.



**Figura 2.** (A) Sobreposição dos compostos **9a** e 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina. (B) Interações do composto **9a** e 7-amino-6*H*-cromano[4,3-*b*]quinolina (C) com a enzima AChE, de acordo com o docking. Interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  são mostradas em linhas laranjas e ligações de hidrogênio em linhas pontilhadas verdes.



---

**ANEXO VI**

*Atividade antitumoral in vitro*

## 12. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE 7-AMINO-ESPIRO[CROMENO[4,3-*b*]QUINOLINA-6,1'-CICLOALCANOS] CONTRA O GLIOBLASTOMA

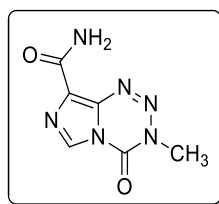
Glioblastoma é o tumor mais comum e agressivo do CNS. É muito resistente as quimioterapias e apresenta baixas taxas de sobrevivência. A temozolomida é a droga utilizada para tratamento do glioblastoma, porém não é suficientemente eficaz (**Figura 1**). Assim, novos compostos tem sido sintetizados para o tratamento desse tipo de câncer com o objetivo de aumentar a eficiência do tratamento.

Assim sendo, 6 novas moléculas de 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] foram avaliadas para linhas de células resistentes ao glioblastoma (SF295-R) e não resistente (SF295). Essas moléculas foram avaliadas quanto a viabilidade celular, via de morte celular, atividade de caspases, geração de ROS e quanto ao potencial de perturbação da membrana mitocondrial (MMP).

Conforme os resultados obtidos, as 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] induziram a citotoxicidade em células de SF295 e SF295-R com CC<sub>50</sub> de aproximadamente 25 e 40 µM, respectivamente. Esses valores de CC<sub>50</sub> foram inferiores ao do fármaco temozolomida, principalmente para a linha de células resistentes, indicando que esses compostos apresentam maior atividade e seletividade que a temozolomida para esse tipo de célula.

Ainda, os compostos **9a** e **9b** diminuíram o MMP e o composto **9a** aumentou a atividade da caspase-9, indicando uma ruptura mitocondrial e a ação da apoptose intrínseca. Entretanto os compostos **9e** e **9f** aumentaram o MMP e o composto **9c** aumentou a atividade da caspase-8, indicando a ação por apoptose extrínseca. O composto **9g** não alterou a atividade de caspases, porém induziu a geração de ROS.

Contudo, esses resultados indicam que as 7-amino-espiro[cromeno[4,3-*b*]quinolina-6,1'-cicloalcanos] apresentam atividade antitumoral promissora, sendo mais ativas e seletivas que o fármaco temozolomida.



**Figura 1.** Estrutura química da temozolomida.

---

**ANEXO VII**

*Atividade antimicrobiana in vitro*

### **13. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO***

As atividades antimicrobianas *in vitro* foram realizadas no Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFSM com a colaboração do Prof. Dr. Sydney Hartz Alves.

#### **13.1 Testes de suscetibilidade para bactérias**

A suscetibilidade das bactérias frente aos compostos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo Muller-Hinton, de acordo com o protocolo M31-A3 (2009), aprovado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Referência:

CLSI, 2009. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-third edition. CLSI document M31-A3 Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.

Bactérias testadas:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Gram-positivo)
- *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativo)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram-negativo)

#### **Preparação dos compostos para a avaliação da atividade antimicrobiana**

Uma alíquota do composto foi dissolvida em 1 mL de uma mistura de DMSO:MEIO (1:7), para a obtenção da solução estoque a 6,4 mg/mL (Solução I). A seguir, a Solução I foi diluída 1:4 em caldo Muller-Hinton, resultando na concentração de 1600 µg/mL (Solução II).

#### **Técnica de Microdiluição em Caldo Muller-Hinton:**

- 1- Para determinar as CIMs (concentrações inibitórias mínimas) foram utilizadas microplacas de poliestireno contendo 96 poços com fundo chato. Primeiramente foram depositados 200 µL (Solução II) de cada composto no primeiro poço teste, e posteriormente, foram realizadas sucessivas diluições 1:2 em caldo Muller-

Hinton, previamente depositado, até o poço 10 das microplacas. As concentrações testadas foram: 1600; 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 µg/ml).

- 2- Após foram adicionados 10 µL do inóculo\*, previamente ajustado e diluído em caldo Muller-Hinton, em cada poço teste (1 ao 10) e também ao controle de crescimento.
- 3- As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C.
- 4- A leitura foi realizada com base na inibição visual do crescimento da bactéria, comparado com o seu controle de crescimento. Todos os testes foram realizados em triplicatas, contendo seus respectivos controles de crescimento e esterilidade.

\*Preparação do inóculo:

As bactérias foram cultivadas em tubos contendo Ágar BHI (Brain Heart Infusion Agar) a 35°C por 24 horas. Primeiramente, foi realizada uma suspensão direta de colônias de mesma morfologia em salina (0,85%). As densidades dessas suspensões bacterianas foram ajustadas para uma densidade óptica variável entre 0,08 a 0,10 (88 a 92% de transmitância) em 625 nm através de um espectrofotômetro, correspondendo à escala McFarland 0,5. Estas suspensões, assim padronizadas, foram diluídas a 1:50 em Caldo Muller-Hinton, e posteriormente, a 1:20 no mesmo caldo. A concentração final dos inóculos apresentava aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mL) em cada poço teste.

**Resultados:**

**Atividade antimicrobiana *in vitro* do 14b frente a bactérias (CIM, µg/ml):**

Composto/Padrão	Gram-positiva		Gram-negativa	
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>14b</b>	>1600		>1600	>1600
Imipenem	0,03		0,125	2

O composto **14b** não apresentou atividade antibacteriana nas concentrações testadas.

### 13.2 Testes de suscetibilidade para fungos

A suscetibilidade dos fungos frente aos compostos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo RPMI 1640, de acordo com os protocolos M27-A3 (para leveduras e alga) e M38-A2 (para fungos filamentosos), aprovado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

#### Referências:

CLSI, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLSI. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

#### Fungos leveduriformes testados:

- *Candida albicans* ATCC 24433
- *Candida dubliniensis* ATCC 646

#### Fungos filamentosos testados:

- *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305
- *Aspergillus flavus*

#### Alga testada:

*Prototheca zopfii*

### **Preparação dos compostos para a avaliação da atividade antimicrobiana**

Uma alíquota do composto foi dissolvida em 1 mL de uma mistura de DMSO:MEIO (1:7), para a obtenção da solução estoque a 6,4 mg/mL (Solução I). A seguir, a Solução I foi diluída 1:4 em caldo RPMI 1640, resultando na concentração de 1600 µg/mL (Solução II).

### **Técnica de Microdiluição em Caldo RPMI 1640:**

- 1- Para determinar as CIMs (concentrações inibitórias mínimas) foram utilizadas microplacas de poliestireno contendo 96 poços com fundo chato. Primeiramente foram depositados 200 µL (Solução II) de cada composto no primeiro poço teste, e posteriormente, foram realizadas sucessivas diluições 1:2 em caldo RPMI 1640, previamente depositado, até o poço 10 das microplacas. As concentrações testadas foram: 800; 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56 µg/ml).
- 2- Após foram adicionados 100 µL do inóculo\*, previamente ajustado e diluído em caldo RPMI 1640, em cada poço teste (1 ao 10) e também ao controle de crescimento.
- 3- As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas.
- 4- A leitura foi realizada com base na inibição visual do crescimento do fungo ou alga, comparado com o seu controle de crescimento. Todos os testes foram realizados em triplicatas, contendo seus respectivos controles de crescimento e esterilidade.

#### **\*Preparação do inóculo:**

##### **LEVEDURAS (ou alga):**

As leveduras (ou alga) foram cultivadas em tubos contendo Ágar Sabouraud Dextrose a 35°C por 24 horas. Primeiramente, foi realizada uma suspensão direta de colônias de mesma morfologia em salina (0,85%). As densidades dessas suspensões foram ajustadas para uma densidade óptica variável entre 0,08 a 0,10 (88 a 92% de transmitância) em 530nm. Os inóculos, assim padronizados, foram diluídos 1:50 em salina estéril e, posteriormente, 1:20 em caldo RPMI 1640. Isto resultou em uma concentração final de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mL) em cada poço teste.

##### **FUNGOS FILAMENTOSOS**

*Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* foram cultivados em tubos contendo Ágar Batata Dextrose a 35°C por 7 dias. Para a preparação dos inóculos, as colônias de sete dias foram cobertas com aproximadamente 1 mL de solução salina estéril a 0,85%. Foram adicionadas às colônias uma gota (aproximadamente 0,01 mL) de Tween 20 para facilitar a remoção dos conídios. As suspensões foram obtidas através de movimentos delicados com auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril. A mistura de

conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um novo tubo estéril e mantida em repouso por cinco minutos. O sobrenadante foi removido por aspiração e transferido para um novo tubo também estéril. As densidades das suspensões de conídios foram ajustadas para uma densidade óptica variável entre 0,09 a 0,13 (80 a 82% de transmitância) em 530 nm. Os inóculos, assim padronizados, foram diluídos 1:50 em caldo RPMI 1640 para se obter uma concentração final de aproximadamente  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mL).

### **Resultados:**

#### **Atividade antimicrobiana *in vitro* do 14b frente a fungos e alga (CIM, µg/ml):**

Composto/Padrão	Fungos leveduriformes		Fungos filamentosos		Alga
	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>P. zopfii</i>
<b>14b</b>	>800	>800	>800	>800	>800
Anfotericina B	-	-	1,0	0,5	0,5
Fluconazol	4,0	1,0	-	-	-

O composto **14b** não apresentou atividade antifúngica contra leveduras nas concentrações testadas.



---

**ANEXO VIII**

*Atividade antitumoral dos compostos 14-16*

## 14. CITOTOXICIDADE DE 7-(1*H*-PIRROL-1-IL)ESPIRO[CROMENO [4,3-*b*] QUINOLINA-6,1'-CICLOALCANOS]

NUNES, Fernanda<sup>1</sup>; WINTER, Evelyn<sup>1</sup>; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

### 1 – Introdução

Entre os tumores que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC), os gliomas são os mais frequentes, correspondendo a 80% de todos os casos de malignidade (ZHANG, XU, LIU, 2015). O glioblastoma é o tipo de glioma mais comum e agressivo, culminando em invasão generalizada do cérebro (LUO et al, 2015). Além disso, é muito resistente as terapias empregadas atualmente, visto que mesmo sob tratamento, que consiste principalmente em cirurgia e quimioterapia com temozolomida, os pacientes atingem sobrevida média de um ano (BADRI et al, 2015). Na busca por terapias mais eficientes, novas moléculas estão sendo desenhadas. Para cânceres do sistema nervoso, como o glioblastoma, moléculas que tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica recebem maior atenção. Nesse sentido, análogos da tacrina foram eleitos para esse estudo, uma vez que esse fármaco é utilizado no tratamento da doença de Alzheimer, apresentando essa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica.

### 2 – Materiais

O soro fetal bovino foi adquirido da Cultilab (São Paulo, Brasil), enquanto todos os outros reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, US). Os compostos foram sintetizados na Universidade Federal de Santa Maria. A linhagem celular de glioblastoma humano (SF295) foi doada pelo Prof. Attilio Di Pietro (University of Lyon – France) e a linhagem oriunda da veia umbilical humana (HUVEC) foi adquirida da American Type Culture Cell (ATCC)

### 3 – Metodologia

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar Blue® (WESELSKY, 1871; PESCH, SIMMERT, 1929), o qual é considerado uma medida quantitativa da proliferação de linhagens celulares humanas, de animais, bem como de fungos e bactérias e nos últimos anos têm sido muito utilizado em estudos de viabilidade celular e citotoxicidade (RAMPERSAD, 2012). Neste ensaio, utiliza-se um indicador REDOX na forma oxidada chamado resazurina, sendo esta uma substância de coloração azul e sem nenhuma fluorescência. Já a resofurina, forma reduzida, apresenta fluorescência e tem coloração vermelha. Portanto, medindo-se a alteração da fluorescência resultante da atividade oxidativa das células, tem-se a detecção do número de células metabolicamente ativas (BONNIER, 2015). Para realização do ensaio, foram incubadas  $7 \times 10^3$  células por 48 horas, em duplicata com os compostos, em placa de 96 poços. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e um novo meio contendo a solução de Alamar Blue® (0,1mg/mL) foi acrescentado em todos os poços. Posteriormente, as células foram novamente incubadas por 120 minutos à 37°C. A leitura foi realizada em espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55. O valor obtido do grupo controle foi considerado como 100% de células viáveis. O procedimento foi realizado com a linhagem tumoral SF295 e também com a linhagem não tumoral HUVEC. A SF295 é uma linhagem celular humana de glioblastoma multiforme a qual foi gentilmente cedida pelo professor Attilio Di Pietro do Intitut de Biologie et Chimie des protéines, Lyon, França, já a linhagem HUVEC corresponde a células não tumorais, derivadas do endotélio de veias de cordão umbilical e foram adquiridas através do banco de células ATCC.

#### 4 – Resultados e Discussão

Na **tabela 1** estão representados os valores de  $CC_{50}$  (concentração citotóxica para 50% das células) dos compostos **14-16**, todos contendo o grupo pirrol nas suas estruturas. Observa-se que nove compostos apresentaram  $CC_{50}$  maior que  $100 \mu\text{M}$ . Somente o composto **14a** apresentou  $CC_{50}$  menor que  $100 \mu\text{M}$  indicando que a porção espirocarbocíclica que corresponde ao ciclopentano presente na estrutura pode ser importante para a atividade citotóxica. Esse composto também apresentou valor de  $CC_{50}$  similar na linhagem não-tumoral estudada (HUVEC) sugerindo que este composto não apresenta seletividade para células tumorais. Outras linhagens celulares não-tumorais deveriam ser testadas e testes em animais precisariam ser realizados afim de confirmar a

não seletividade do composto **14a**. Um estudo ainda em andamento em nosso grupo de pesquisa também visa analisar a citotoxicidade de derivados de tacrina que não apresentam pirrol. Neste caso, observou-se valores de  $CC_{50}$  inferiores aos encontrados nos compostos mencionados na **tabela 1** (dados ainda não publicados). Ou seja, para aspectos de relações entre as estruturas e atividade a presença do grupo pirrol, no arranjo apresentado, não aumentou a atividade das moléculas.

**Tabela 1.** Citotoxicidade dos compostos **14-16** na linhagem tumoral (SF295) e não tumoral (HUVEC).

Compostos	$CC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>[a]</sup>	
	SF295	HUVEC
Controle	>100	>100
<b>14a</b>	39	28
<b>14b</b>	>100	>100
<b>14c</b>	>100	>100
<b>14d</b>	>100	>100
<b>15a</b>	>100	>100
<b>15b</b>	>100	>100
<b>15c</b>	>100	>100
<b>16a</b>	>100	>100
<b>16b</b>	>100	>100
<b>16c</b>	>100	>100

<sup>[a]</sup>O valor de  $CC_{50}$  foi calculado através do programa GraphPad Prism (n = 3).

## 5 - Referências Bibliográficas

BADRI, H. et al. Optimization of radiation dosing schedules for proneural glioblastoma. *Mathematical Biology*, 2015.

BONNIER, F. et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicology in Vitro*, 2015.

LUO, H. et al. c-Myc-miR-29c-REV3L signalling pathway drives the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma. *Brain*, 2015.

PESCH, K. L., SIMMERT, U., Milchw Forsch, 8, 551 (1929).

RAMBERSAD, S. N. Multiple Application of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. Sensors, 2012.

WESELSKY, Berichte, 4 32,613 (1871).

ZHANG, F.; XU, C. L.; LIU, C. M. Drug delivery strategies to enhance the permeability of the blood-brain barrier for treatment of glioma. Dovepress, 2015.

---

**ANEXO IX**

*Publicações*

## 15. PUBLICAÇÕES

Parte dessa tese deu origem as seguintes publicações:

- i. Artigo científico no periódico *Tetrahedron Letters* aceito em 02 de novembro de 2015 e publicado em dezembro de 2015 intitulado: **“Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of 7-amine-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1’-cycloalkanes] as new tacrine hybrids”**
- ii. Foi apresentado na forma de pôster no seguinte evento acadêmico: XVIII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, 2016, São Paulo, SP, o trabalho com o título: **“Tacrine derivatives: new approach for glioblastoma treatment”**
- iii. Foi apresentado na forma de pôster no seguinte evento acadêmico: XXIII Encontro de Química da Região Sul, 2016, Santa Maria, RS, o trabalho intitulado: **“Síntese de 7-(1*H*-pirrol-1-il)-espiro[cromeno [4,3-*b*] quinolina-6,1’-cicloalcanos] através da reação de Clauson-Kass”**
- iv. Artigo submetido ao periódico *Journal of Chemical Crystallography* em dezembro de 2016 intitulado: **“Structural investigation, UV-vis analysis and crystal packing of 7-amine-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1’-cycloalkan] – novel tacrine hybrids by X-ray diffractometry” (Anexo IV).**



Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tetlet](http://www.elsevier.com/locate/tetlet)

## Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of 7-amine-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkanes] as new tacrine hybrids



Helio G. Bonacorso<sup>a,\*</sup>, Letícia B. Silva<sup>a</sup>, João B. T. Rocha<sup>b</sup>, Pablo A. Nogara<sup>a</sup>, Emily P. Waczuk<sup>b</sup>,  
Fernanda D'A. Silva<sup>b</sup>, Diones C. Bueno<sup>b</sup>, Yeriah N. A. M. Kader<sup>a</sup>, Marcos A. P. Martins<sup>a</sup>, Nilo Zanatta<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Núcleo de Química de Heterociclos (NUQJIMHE), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Bioquímica Toxicológica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 August 2015

Revised 28 October 2015

Accepted 2 November 2015

Available online 3 November 2015

#### Keywords:

Tacrine

Spirochromene

Alzheimer's disease

Cholinesterase inhibitors

Molecular docking

### ABSTRACT

This Letter reports the first series of seven examples of novel 7-amine-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkanes], where cycloalkane is cyclopentane, cyclohexane, cycloheptane, 2-methyl-, 3-methyl-, 4-methyl-, and 4-*t*-butyl-cyclohexane. These new compounds were synthesized at yields of 30–65% by a one-pot cyclocondensation reaction of 2-aminobenzonitrile and seven examples of spiro[chroman-2,1'-cycloalkan]-4-ones, using  $AlCl_3$  as the catalyst, without solvent and under conventional thermal heating. Subsequently, these spirochromeno-quinolines were subjected to AChE and cytotoxicity activity, and molecular docking studies. Both results for these new tacrine analogues were correlated with the structural features and showed the best results for the tacrine hybrid that possesses the spirocyclopentane moiety.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

Alzheimer's disease (AD) is one of the most well-known dementia problems.<sup>1,2</sup> It is a neurodegenerative, progressive, and irreversible disease that affects 35 million people worldwide, and it is estimated that this number will triple by 2050 if an effective treatment is not developed.<sup>1,2</sup>

The pathogenesis of AD can be associated with several pathways: deficiency in cholinergic neurotransmission; defective beta-amyloid protein metabolism and tau protein phosphorylation; and the involvement of inflammatory and oxidative pathways.<sup>2</sup> However, the only approved therapeutic strategy for the treatment of AD is the one that increases central cholinergic function by inhibition of two enzymes responsible for the degradation of the neurotransmitter acetylcholine (ACh): acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE).<sup>2,3</sup>

Tacrine is a reversible inhibitor of AChE and is of great importance for the treatment of AD; however, it has limited use due to its side effects such as hepatotoxicity and gastrointestinal

disorders.<sup>1</sup> Besides tacrine, there are three other AChE inhibitory drugs used in the treatment of AD: donepezil (Aricept<sup>®</sup>), galantamine (Reminyl<sup>®</sup>), and rivastigmine (Exelon<sup>®</sup>).<sup>3</sup> Galantamine is less potent, but less toxic than tacrine and the other drugs.<sup>3</sup>

Over recent years, various structural analogues of tacrine and their associated derivatives have been synthesized in order to increase the efficiency of the drug, but mainly to reduce the side effects.<sup>3</sup>

Pang et al. reported more complex computational docking studies regarding the prediction of the binding sites of tacrine in AChE.<sup>4</sup> In 1997 it was shown that alkylene-linked bis-tacrines are up to 10,000 times more selective and 1000 times more potent in reversibility-inhibiting rat AChE than the tacrine monomer.<sup>5</sup> Other recent studies have demonstrated the importance of developing a multifunctional drug for the treatment of AD, because this dementia may be associated with other conditions (e.g., oxidative stress) which appear to play a key role in the onset of AD. Thus, these conditions have become important targets in the treatment of this disease.<sup>2</sup>

On the other hand, it is known that spiro heterocycles have a wide variety of biological activities; for example, spiro-oxindole derivatives possess anti-tumor, antibiotic, and antimicrobial (anti-HIV and anti-malarial) activity.<sup>6,7</sup> The azaspiro compounds

\* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8867; fax: +55 55 3220 8031.  
E-mail address: [helio.bonacorso@ufsm.br](mailto:helio.bonacorso@ufsm.br) (H.G. Bonacorso).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.11.008>  
0040-4039/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.



(due to being a tachykinin antagonist) are used to treat depression, anxiety, pain, and migraine.<sup>6</sup> Moreover, some spiroheterocycles derived from benzopyrans are aldose reductase inhibitors, and they possess antidiabetic activity.<sup>6</sup>

Thus, in order to obtain new fused quinolines and tacrine analogues, the insertion of a benzopyran bonded to some spirocyclic moieties appears to be an important strategy for the synthesis of a new multifunctional drug. This has led our research group to developing syntheses for this class of molecules and studying their respective biological activities and molecular docking.

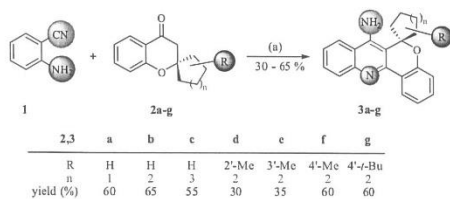
## Results and discussion

Firstly, for the synthesis of the target molecules, we started from the spirochromanones of **2a–g** which were readily prepared using a common multi-component methodology developed by Kabbe<sup>8,9</sup> that employs a thermal condensation reaction and involves 1-cycloalkenylpyrrolidine produced in situ from the respective cycloalkanones, pyrrolidine, and 2-hydroxyacetophenone. However, upon optimizing the reported reaction, we proved that when the original procedure is modified and the reactions are performed at 110 °C for 6 h without solvent, the spirochromanones **2a–g** can be isolated after a distilling process under reduced pressure, at slightly better yields (75–85%) than the data reported in the literature.

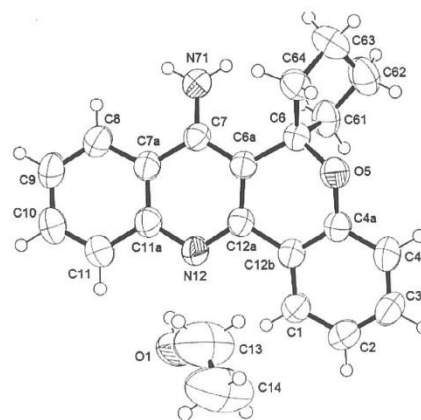
Subsequently, a series of seven examples of 7-amine-spiro [chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkanes] **3a–g** (Scheme 1) were obtained from the cyclocondensation reaction of the spirochromanones of **2a–g** with 2-aminobenzonitrile **1** in the presence of a Lewis acid (AlCl<sub>3</sub> or InCl<sub>3</sub>), in accordance with the methodology reported by Proctor et al.<sup>10</sup> and improved by us. Although many reaction conditions as well as four catalysts were tested (AlCl<sub>3</sub>, InCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, and BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O), the optimized yields pointed to AlCl<sub>3</sub> (65%) and InCl<sub>3</sub> (55%) as the best Lewis acids. However, AlCl<sub>3</sub> was chosen as the preferred catalyst for the present synthetic procedure due to it being more affordable than InCl<sub>3</sub>.

Therefore, when the syntheses of the target molecules **3a–g** were performed at 110 °C for 24 h, using AlCl<sub>3</sub>, but in the absence of solvent, compounds **3a–g** were obtained, after recrystallization from ethanol, as pure compounds and air-stable solids, and at 30–65% yields (Scheme 1).<sup>13</sup> It is important to mention that the compounds **3d** and **3e** were obtained as a mixture of one pair of enantiomers and not as two pairs as expected.

The structures of compounds **3a–g** were identified by their NMR spectroscopy data, and unequivocally confirmed by X-ray diffraction. Thus, in order to determine the real molecular structure of compound **3a**, an X-ray monocrystal diffraction measurement was performed for the new tacrine hybrid **3a** (Fig. 1).



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a) (1) AlCl<sub>3</sub>, solvent-free, 110 °C, 24 h; (2) NaOH 2 M, 110 °C, 24 h.



**Figure 1.** ORTEP of 7-amine-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cyclopentane] (**3a**) (CCDC 994958).<sup>11</sup> Displacement ellipsoids are drawn at the 50% probability level.

The evaluation of the anti-cholinesterase activity of these compounds followed the method of Ellmam et al.<sup>12,14</sup> The compounds were described using the IC<sub>50</sub> value of each compound, employing the isolated and purified enzyme acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (Table 1). The results were compared with the additional study of the molecular docking<sup>15</sup> of compounds **3a–c**.

According to the IC<sub>50</sub> values described in Table 1, compounds **3a–g** showed less inhibitory activity toward the acetylcholinesterase enzyme than tacrine. Compound **3a** showed the greatest inhibition potential in comparison with the new tacrine analogues **3b–g**. On the other hand, compound **3a** had an IC<sub>50</sub> value very similar to the drug galantamine, which is also a reversible inhibitor of AChE and used in the treatment of AD (Table 1).<sup>2</sup>

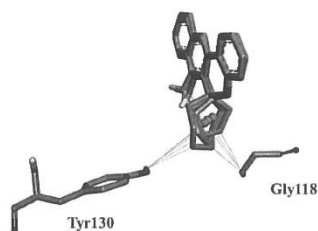
Furthermore, it was observed that the inhibitory activity of these compounds decreases with the increase in the size of the spirocyclic moiety (Table 1). These results are in agreement with the study of molecular docking, which indicates that the larger the spirocyclic moiety of these compounds, the greater

**Table 1**  
Inhibitory activity of the acetylcholinesterase enzyme of the 7-amine-spiro[chromeno[4,3-*b*]quinoline-6,1'-cycloalkanes] **3a–g**

Compounds	n	R	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> for AChE (μM)
<b>3a</b>	1	H	3.60 ± 1.2
<b>3b</b>	2	H	4.31 ± 1.32
<b>3c</b>	3	H	8.28 ± 3.32
<b>3d</b>	2	2'-Me	31.37 ± 2.46
<b>3e</b>	2	3'-Me	5.38 ± 1.53
<b>3f</b>	2	4'-Me	8.01 ± 1.26
<b>3g</b>	2	4'- <i>t</i> -Bu	41.46 ± 7.0
Tacrine	—	—	0.22 ± 0.16 <sup>b</sup>
Galantamine	—	—	3.12 ± 0.44 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> AChE from *Electrophorus electricus*; IC<sub>50</sub>, inhibitor's concentration that inhibits 50% of AChE (mean ± SD).

<sup>b</sup> Value described in the literature.<sup>2</sup>



**Figure 2.** Overlapping of the compounds **3a**, **3b**, and **3c** from docking results. The green balls are the centroid of each spiro ring, while the green lines are the respective distances. The distance values can be seen in Table 2.

the steric effect between this moiety and the Gly118 and Tyr130 residues (peripheral anionic and anionic sub-sites, respectively) of AChE (Fig. 2, Table 2). One possible explanation for this result would be that the increase in the steric effect of the spiro ring from 5 to 7 members reduces the capacity of these compounds to interact with the enzyme, thus decreasing the inhibitory capacity.

In order to investigate the influence of the substituent on the  $IC_{50}$  for AChE, we synthesized and tested some similar tacrine hybrids which possess a spiro 2'-methyl- (**3d**), 3'-methyl- (**3e**), 4'-methyl- (**3f**), or 4'-*t*-butyl- (**3g**) cyclohexane-substituted moiety. In the results for the **3d–g** series, we saw a decrease in the AChE activity in comparison with the non-substituted spiro-cyclopentane derivative (**3a**).

The  $\Delta G$  values obtained by molecular docking (Table 2) demonstrate that compound **3a** has a greater affinity to AChE when compared with the compounds **3b** and **3c**, because it has the lowest  $\Delta G$  value, which indicates that the process is more favorable.

Furthermore, the molecular docking study shows that compound **3a** interacts with the AChE in the same regions as the tacrine (Fig. 3). The tacrine interacts with this enzyme by  $\pi$ - $\pi$  interactions with Phe330 and Trp84 (peripheral anionic and anionic sub-sites, respectively) and through two hydrogen bonds with water molecules. While the addition of compound **3a** forms  $\pi$ - $\pi$  interactions with Phe330, Tyr121, and Trp84 (peripheral anionic and anionic sub-sites, respectively), hydrogen bonds are also formed with the carbonyl group of His440 (Fig. 4).

**Table 2**

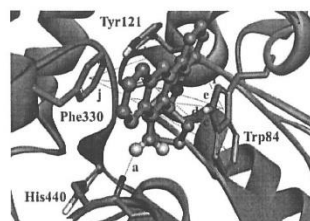
Comparison of the distance (in Å) between the spirocyclic moiety and the polar hydrogens of the Tyr130 and Gly118 residues, as well as the  $\Delta G$  values ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) of the compounds **3a–c** obtained through molecular docking

Residue	Compound/distance (Å)		
	3a	3b	3c
Tyr130	4.29	3.89	3.30
Gly118	3.32	2.91	2.67
Tyr130 <sup>a</sup>	5.44	5.10	4.80
Gly118 <sup>a</sup>	4.04	4.04	3.99
$\Delta G$ ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	-11.10	-10.50	-9.80

<sup>a</sup> From the centroid of the spirocyclic moiety ring.



**Figure 3.** Docking results for compound **3a** (in yellow) showing interaction in the same region of the tacrine (in blue) in the AChE enzyme. The catalytic triad (Ser200, Glu327, and His440) is shown in pink.



**Figure 4.** Interaction of compound **3a** in AChE from docking results: "a" is a hydrogen bond (2.19 Å); while "b–j" are  $\pi$ - $\pi$  stackings (b = 5.70 Å, c = 4.80 Å, d = 4.57 Å, e = 3.73 Å, f = 5.43 Å, g = 6.29 Å, h = 6.39 Å, i = 3.78 Å, and j = 3.89 Å).

Also, the cytotoxicity assays<sup>21</sup> and sample preparation were performed in accordance with the methods previously described in the literature.<sup>22,23</sup> According to the cell viability values described in Table 3, the incubation of human leukocytes with  $\text{NaNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$  caused a significant decrease in cell viability ( $p < 0.01$ ), whereas the incubation with compounds **3a–g** did not modify the cell viability. Thus, compounds **3a–g** did not exhibit cytotoxicity in human leukocytes at concentrations of 100 and 200  $\mu\text{M}$ .

In summary, we performed a solvent-free synthesis, isolation, and complete structural elucidation of a new class of tacrine (tacrine hybrids), and determined that the increase in the spirocyclic moiety (alkyl-substituted or not), which is linked to the chromene heterocycle fused to a quinoline ring, seems to decrease the anticholinesterase activity of the studied compounds **3a–g**. However, this new initial structural feature may confer upon these compounds important biological activities which need to be further investigated in order to assist in the treatment of AD. Other biological assessments for these tacrine hybrids are being done; for example, determination of inhibition of the butyrylcholinesterase enzyme, as well as determination of the level of antioxidant. Furthermore, compounds **3a–g** did not exhibit cytotoxicity in human leukocytes at concentrations of 100 and 200  $\mu\text{M}$ .

**Table 3**  
Effect of compounds **3a-g** on human leukocytes viability in vitro

Concentration	Compounds/cell viability (% of intact cells)						
	<b>3a</b>	<b>3b</b>	<b>3c</b>	<b>3d</b>	<b>3e</b>	<b>3f</b>	<b>3g</b>
100 $\mu$ M	94.87 $\pm$ 0.69	95.57 $\pm$ 0.23	96.81 $\pm$ 0.29	96.69 $\pm$ 1.02	96.40 $\pm$ 0.04	95.06 $\pm$ 0.21	95.21 $\pm$ 0.29
200 $\mu$ M	95.22 $\pm$ 1.03	95.79 $\pm$ 0.57	96.81 $\pm$ 0.29	96.18 $\pm$ 0.59	95.57 $\pm$ 0.48	94.93 $\pm$ 0.15	89.60 $\pm$ 2.67
DMSO (0.5%)	96.52 $\pm$ 0.18	—	—	—	—	—	—
NaN <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	69.30 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—

<sup>a</sup> Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3) performed in duplicate. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.6 mM) + NaN<sub>3</sub> was used as a positive control. One-way ANOVA followed by Newman–Keuls ( $p < 0.01$  versus control).

### Acknowledgments

The authors thank the Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the fellowships, as well as the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Rio Grande do Sul Foundation for Research Support (FAPERGS) for financial support (Process numbers 303.013/2011-7 and 470.788/2010.0-CNPq/Universal).

### Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.11.008>.

### References and notes

- Pisoni, S. D.; Costa, S. J.; Gamba, D.; Petzhold, L. C.; Borges, A. C. A.; Ceschi, A. M.; Lunardi, P.; Gonçalves, S. A. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 526.
- Thirantmatrakul, S.; Yenjai, C.; Waiwut, P.; Vajragupta, O.; Reubroycharoen, P.; Tohda, M.; Boonyarat, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 21.
- Anand, P.; Singh, B. *Arch. Pharm. Res.* **2013**, *36*, 375.
- Pang, Y. P.; Kozikowski, A. P. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 669.
- Pang, Y. P.; Hong, F.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Brimijoin, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. J* **1997**, 171.
- Pradhan, R.; Patra, M.; Behera, A. K.; Mishra, B. K.; Behera, R. K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 779.
- Singh, S. G.; Desta, Y. Z. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 6104.
- Kabbe, H. *J. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 241.
- Kabbe, H. *J. Synthesis* **1978**, 886.
- Proctor, R. G.; Harvey, L. A. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 295.
- The crystallographic data for the structure of **3a** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre and allocated the deposition number CCDC 994958. Copies of the data can be obtained free of charge upon application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK, (fax: +44 1223 336033 or deposit@ccdc.com.ac.uk).
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. J.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.
- General procedure for the preparation of 7-amine-spiro[chromenof(4,3-b)quinoline-6,1'-cycloalkanes] 3a-g:** To a mixture of 2-aminobenzonitrile **1** (3 mmol) and spirochromanones **2a-g** (3 mmol), Lewis acid (3 mmol), AlCl<sub>3</sub>, or InCl<sub>3</sub> was added. The reaction mixture was heated at 110 °C under magnetic stirring for 24 h. Then, a NaOH 2 M solution was added (20 mL) and the reaction mixture was held under magnetic stirring at the same temperature for further 24 h. After cooling the system to room temperature, the compounds **3a-g** were extracted with CHCl<sub>3</sub> (20 mL) and the organic phase was dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and then the solvent was removed under reduced pressure. The product was purified by recrystallization from ethyl alcohol (5 mL). For NMR data, refer to the numbering of the atoms in the ORTEP for compound **3a** (Fig. 1).  
**Data for 7-amine-spiro[chromenof(4,3-b)quinoline-6,1'-cyclopentan] 3a:** yellow solid, yield 60%, mp 118–119 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C)  $\delta$  (ppm): 8.39
- (dd,  $J = 9$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H, H-1), 8.00 (dd,  $J = 9$  Hz,  $J = 0.7$  Hz, 1H, H-11), 7.67 (dd,  $J = 9$  Hz,  $J = 0.7$  Hz, 1H, H-8), 7.58–7.62 (m, 1H, H-10), 7.35–7.39 (m, 1H, H-9), 7.26–7.30 (m, 1H, H-3), 7.05–7.09 (m, 1H, H-2), 6.88 (dd,  $J = 9$  Hz,  $J = 0.8$  Hz, 1H, H-4), 4.62 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.30–2.36 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.05–2.15 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.79–1.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C)  $\delta$  (ppm): 154.3 (C-4a), 148.3 (C-12a), 147.5 (C-11a), 143.6 (C-7), 130.9 (C-3), 129.6 (C-11), 129.0 (C-10), 125.7 (C-1), 124.5 (C-9), 123.3 (C-12b), 121.6 (C-2), 119.5 (C-8), 119.0 (C-7a), 117.4 (C-4), 112.3 (C-6a), 89.1 (C-6), 37.5 (CH<sub>2</sub>), 25.4 (CH<sub>2</sub>). Anal. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O: C, 79.44; H, 6.00; N, 9.26. Found: C, 79.39; H, 5.78; N, 9.13.
- ACHe assay:** The assays for acetylcholinesterase enzyme activity followed the protocol of Ellman et al.<sup>12</sup> The compounds **3a-g** were dissolved in DMSO to give the final concentrations of 0.5, 1.0, and 10  $\mu$ M, which enabled 3 experiments (n) in triplicate for each sample. The tests were performed in phosphate buffer (10 mM, pH 7.5) and 1 mM of DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)), and the samples were pre-incubated at 30 °C for 10 min with 0.05 U ml<sup>-1</sup> of purified acetylcholinesterase enzyme (isolated from *Electrophorus electricus*). The reaction was started by the addition of acetylthiocholine (0.8 mM final) and monitored for 10 min.
- In silico assay:** The Vina 1.1.1 program was used for the in silico molecular docking studies, using an exhaustiveness of 200, and grid box coordinates: x = 5.286, y = 65.457, and z = 58.647 (dimensions of the grid box: 66  $\times$  64  $\times$  62 Å). The AChE X-ray structure with tacrine was obtained beforehand from the Protein Data Bank (PDB: 1ACJ). The waters, ions, ligands, and other molecules were removed, while the hydrogens were added, and the protein structure was minimized with AMBERff99SB force field<sup>16</sup> (100 steps) using the CHIMERA 1.8rc program. The tacrine analogue molecules **3a-c** were created using the Avogadro 1.1.1 software,<sup>17</sup> followed by semi empirical PM6<sup>18</sup> geometry optimization using the MOPAC2012 program.<sup>19</sup> The AChE and the compounds **3a-c** were prepared for the docking using AutoDock Tools 4.2,<sup>20</sup> in which the compounds were considered to be flexible and the enzyme rigid. The non-polar hydrogens were omitted. The structures with the most favorable binding free energy were selected and analyzed using Accelrys Discovery Studio 3.5.
- Lindorff-Larsen, K.; Piana, S.; Palmo, K.; Maragakis, P.; Klepeis, J. L.; Dror, R. O.; Shaw, D. E. *Proteins* **2010**, *78*, 1950.
- Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. *J. Cheminformatics* **2012**, *4*, 1.
- Stewart, J. J. P. *J. Mol. Mod.* **2007**, *13*, 1173.
- Stewart, J. J. P.; MOPAC2012. Stewart Computational Chemistry. Colorado Springs, CO, USA, 2012 <http://OpenMOPAC.net>.
- Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785.
- Human leukocytes viability:** The sample preparation and cell viability were carried out as previously described in literature.<sup>22,23</sup> Heparinized venous blood was obtained from healthy volunteer donors from the Hospital of Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil (age 25–52 years). The protocol used in this study was approved by the Ethical Committee of the UFSM (n. 089.0.243.000-07). Isolated leukocytes ( $2 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>) were then incubated for 5 h with DMSO (0.5%), 0.3 mM NaN<sub>3</sub> + 0.6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (positive control) or the indicated compounds in a Hank's buffer solution containing 10% human plasma.
- Bueno, D. C.; Meinerz, D. F.; Allebrandt, J.; Waczuk, E. P.; Santos, D. B.; Mariano, D. O. C.; Rocha, J. B. T. *Bio. Med. Res. Int.* **2013**, *1*.
- Waczuk, E. P.; Kamdem, J. P.; Abolaji, A. O.; Meinerz, D. F.; Bueno, D. C.; Gonzaga, T. K. S. N.; Dorow, T. S. C.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Rocha, J. B. T.; Avila, D. S. *Toxicol. Res.* **2015**, *4*, 739.



## C E R T I F I C A T E

We certify that

**Fernanda Nunes, Evelyn Winter da Silva, Leticia Barros Silva, Sarah Coelho Feitosa, Helio Gauze Bonacorso, Tânia Beatriz Creczynski Pasa**

presented the poster entitled

**Tacrine derivatives: new approach for glioblastoma treatment**

during the XVIII Congress of the Brazilian Society for Cell Biology

held in Hotel Maksoud Plaza, São Paulo, Brazil, July 13th to 16th, 2016.

Patricia Gama  
Congress Co-President

Hernandes Carvalho  
Congress Co-President



**XXIII SBQ Sul** 24 a 26 de outubro de 2016  
Santa Maria, RS, Brasil

**XXIII Encontro de Química da Região Sul**  
Química e Suas Linguagens em um Universo de Inovações



## CERTIFICADO

Certifico que o trabalho “SÍNTESE DE 7-(1H-PIRROL-1-IL)-ESPIRO[CROMENO[4,3-B]QUINOLINA-6,1'-CICLOALCANOS] ATRAVÉS DA REAÇÃO DE CLAUSON-KAAS”, autoria de Gean M. Dal Forno, Leticia B. Silva, Sarah C. Feitosa e Helio G. Bonacorso foi apresentado na forma de pôster durante o XXIII Encontro de Química da Região Sul.

Santa Maria, 26 de outubro de 2016



**Fábio Andrei Duarte**  
Coordenador da XXIII SBQSul