



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO

Dissertação

**Síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de
benzotiazin-4-onas derivadas da 4-(2-aminoetil)morfolina,
da 1-(3-aminopropil)piperidina e da 1-(2-aminoetil)piperidina**

Gabriele dos Anjos Berwaldt

Pelotas, 2016

Gabriele dos Anjos Berwaldt

**Síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de
benzotiazin-4-onas derivadas da 4-(2-aminoetil)morfolina,
da 1-(3-aminopropil)piperidina e da 1-(2-aminoetil)piperidina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientador: Prof. Wilson João Cunico Filho

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B553s Berwaldt, Gabriele dos Anjos

Síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de benzotiazin-4-onas derivadas da 4-(2-aminoetil)morfolina, da 1-(3-aminopropil)piperidina e da 1-(-aminoetil)piperidina / Gabriele dos Anjos Berwaldt ; Wilson João Cunico Filho, orientador. — Pelotas, 2016.

95 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Benzotiazinona. 2. Síntese. 3. Doença de alzheimer. 4. Acetilcolinesterase. 5. Córtex . I. Cunico Filho, Wilson João, orient. II. Título.

CDD : 574.192

Gabriele dos Anjos Berwaldt

Síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de benzotiazin-4-onas derivadas da 4-(2-aminoetil)morfolina, da 1-(3-aminopropil)piperidina e da 1-(2-aminoetil)piperidina

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 09/09/2016

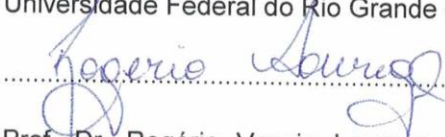
Banca examinadora:



Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho (Orientador). Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.



Prof.ª Dr.ª Roselia Maria Spanevello. Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Prof. Dr. Rogério Vescia Lourega - Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria.

Pelotas, 2016

Pelotas, 2016

Dedico esta dissertação ao meu orientador, o prof. Dr. Wilson Cunico pela oportunidade e confiança no meu trabalho e a minha família, pelo grande apoio incondicional em todos os momentos bons e ruins de minha vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, me amparou nos momentos difíceis, me deu força para superar as dificuldades e enfrentar meus medos;

Ao meu orientador e amigo Wilson, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência, fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por todo ensinamento, paciência e por ser um exemplo de profissional, o meu respeito e admiração;

Aos meus pais, Ivo e Lorena, por todo apoio incondicional, amor, carinho, compreensão e por sempre me incentivar, não medindo esforços para que eu pudesse estudar e me qualificar. Exemplo de pessoas em que me espelho pelo caráter, humildade e dedicação;

Aos meus irmãos Ângelo e Luane por todo amor e, principalmente, toda paciência para me escutar antes de cada aula dada na docência ou nas prévias de seminários;

Ao meu namorado Tiago, que me apoia sempre que e me acompanha desde o início do trabalho no LaQuiABio. Meu amor e companheiro de todas as horas, obrigada pela compreensão e paciência sempre;

Agradeço a minha grande amiga e ex-colega de laboratório Daniela, pelos ensinamentos iniciais de laboratório e conhecimentos passados. Pela grande parceria, carinho e paciência;

Um agradecimento especial a minha colega de laboratório e amiga Adriana pelo conhecimento, parceria e grande ajuda que sempre me prestou, só tenho a agradecer toda tua paciência nos momentos difíceis, e todo teu companheirismo;

Ao Daniel e a Mayara, pela amizade, parceria, eficiência e todo ensinamento para que parte desse trabalho fosse consolidado;

Aos demais colegas do LaQuiABio, em especial: Bruna, Carol, Taís, Jose, Cinara e Cesar, pelas ajudas prestadas e conversas divertidas e gordices de sempre;

Agradeço ao Juliano pela indicação ao Wilson para ingressar na família LaQuiABio, pelas conversas, amizade;

A professora Roselia, do laboratório de Neurocan, pela oportunidade na realização dos testes da inibição da AChE e Citotoxicidade;

A todos os docentes do programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, em especial aos que foram meus professores, pelos ensinamentos, por toda ajuda e paciência;

Toda minha família e meus amigos pelo carinho, pela paciência, pelos conselhos, por estarem sempre ao meu lado me proporcionando momentos de muita alegria;

As minhas amigas Jordana e Gabriela, por fazerem parte da minha jornada na química, pelos estudos, carinho, amizade que sempre demonstraram;

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção pela oportunidade, além da Universidade Federal de Santa Maria e à Universidade Estadual de Campinas pela possibilidade de realizar as análises necessárias para o trabalho que não estão à disposição na nossa universidade;

E por fim agradeço á CAPES/FAPERGS pela bolsa de mestrado e aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ e FAPERGS.

Resumo

BERWALDT, Gabriele dos Anjos. **Síntese e avaliação da atividade anticolinesterásica de benzotiazin-4-onas derivadas da 4-(2-aminoetil)morfolina, da 1-(3-aminopropil)piperidina e da 1-(2-aminoetil)piperidina.** 2016. 95f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O presente estudo avaliou a atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) de dezenove benzotiazin-4-ona. Para a obtenção das benzotiazinonas foram utilizadas reações “one-pot” entre uma amina alifática 4-(2-aminoetil)morfolina, *N*-(3-aminopropil)piperidina, 1-(2-aminoetil)piperidina, aldeídos alifático (valeraldeído) ou aromáticos (benzaldeído, 4-nitrobenzaldeído, 4-fluorbenzaldeído, 4-metoxibenzaldeído, 4-metilbenzaldeído e 4-metilsulfonilbenzaldeído) e o ácido tiosalicílico através da metodologia de aquecimento térmico convencional. Os novos compostos foram sintetizados de forma eficiente, com rendimentos de moderados a bons (43-93%), foram identificados e caracterizados através de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Além disso, a atividade anticolinesterásica *in vitro* em córtex cerebral e hipocampo de ratos, foram avaliadas em todos os compostos. Dentre as melhores moléculas que apresentaram resultados significativos com relação ao potencial de inibição da AChE, estão o compostos **5Ba** (2-butil-3-(3-(piperidin-1-il)propil)-2,3-di-hidro-4H-benzo[e] [1,3]tiazin-4-ona) que apresentou efeito inibitório na concentração a partir de 10 μM em córtex cerebral e a partir de 100 μM em hipocampo e o composto **5Bd** (2-(4-nitrofenil)-3-(3-(piperidin-1-il)propil)-2,3-di-hidro-4H-benzo[e] [1,3] tiazin-4-ona), que também apresentou efeito inibitório na concentração a partir de 10 μM no córtex cerebral e a partir de 50 μM em hipocampo quando comparado aos grupos controles (água e metanol) ($P < 0,05$). Ainda, a citotoxicidade de sete compostos foram avaliadas em linhagem celular de linhagem MCR-5 de fibroblasto humano por meio do teste sulforrodamina B por 24h. É importante salientar que os compostos **5Ba** e **5Bd** revelaram ausência de citotoxicidade na concentração de 100 μM , consideravelmente maior que a concentração ativa encontrada.

Palavras Chave: Benzotiazinona, Síntese, Doença de Alzheimer, Acetilcolinesterase, Córtex, Hipocampo.

Abstract

BERWALDT, Gabriele dos Anjos. **Synthesis and evaluation of acetylcholinesterase activity benzothiazin-4-ones derived from 4-(2-aminoethyl)morpholine, from 1-(3-aminopropyl)piperidine and 1-(2-aminoethyl)piperidine**. 2016. 95f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The present study assessed the inhibitory activity of acetylcholinesterase (AChE) of nineteen benzothiazin-4-one. To obtain benzotiazinonas reactions were used "one-pot" between an aliphatic amine (4-(2-aminoethyl)morpholine, 1-(3-aminopropyl)piperidine, 1-(2-aminoethyl)piperidine), aliphatic aldehydes (valeraldehyde) or aromatic (benzaldehyde, 4-nitrobenzaldehyde, 4-fluorbenzaldehyde, 4-methoxybenzaldehyde, 4-methylbenzaldehyde and 4-metilsulfonilbenzaldehyde) and thiosalicylic acid by conventional thermal heating. The novel compounds were synthesized efficiently with moderate to good yields (43-93%) were identified and characterized by gas chromatography coupled with mass spectrometry and nuclear magnetic resonance H^1 and C^{13} NMR and GC-MS.

Furthermore, the anticholinesterasic activity in vitro in cerebral cortex and hippocampus were evaluated in all of the compounds. Among the molecules that best results were significant with respect to the potential of AChE inhibition, are the compounds **5Ba** (2-butyl-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-2,3-dihydro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one) which showed inhibitory effect at a concentration from 10 μ M in the cerebral cortex and from 100 μ M in hippocampus and compound **5Bd** (2-(4-nitrophenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-2,3-dihydro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one), which also showed inhibitory effects in the concentration of from 10 μ M in the cerebral cortex and from 50 μ M in the hippocampus when groups compared to controls (water and methanol) ($P < 0.05$). Moreover, the cytotoxicity of seven compounds were evaluated in cell lines MCR-5 strain of human fibroblast using the sulforhodamine B test for 24h. It is important to note that **5Ba** and **5Bd** compounds showed a good therapeutic window due to the absence of cytotoxicity at the concentration of 100 μ M, considerably greater than that found active concentration.

Keywords: Benzothiazinone, Fibroblast Cells, Alzheimer's disease, Acetylcholinesterase, Piperidine, Cortex, Hippocampus.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura geral das benzotiazin-4-onas.....	13
Figura 2: Patogênese da DA. Esquema demonstrando o acúmulo de β -amilóide, levando à formação das placas amiloides e a formação dos emaranhados neurofibrilares.....	16
Figura 3: Estrutura da acetilcolina.....	18
Figura 4: Estrutura dos fármacos inibidores da AChE.....	19
Figura 5: Estrutura geral de 1,3-tiazolidin-4-onas, 1,3-tiazinan-4-onas e 1,3-benzotiazin-4-onas.....	21

Lista de Abreviaturas

ACh - Acetilcolina
AChE - Acetilcolinesterase
A β - Beta amiloide
BuChE-Butirilcolinesterase
CAT - enzima colina acetiltransferase
ChAT - Concentração da colina acetiltransferase
ChE - Colinesterase
COX-1- Cicloxigenase 1
COX-2 - Cicloxigenase 2
DA - Doença de Alzheimer
DAF- Doença de Alzheimer familiar
DAS- Doença de Alzheimer esporádica
DNA - Ácido desoxirribonucleico
FDA - Food and Drug Administration
Glu - ácido glutâmico
His - histidina
NMDA - N-metil-D-aspartato RMN-
Ressonância Magnética NuclearRNA-
Ácido ribonucleico
Ser - serina
SGLT2- Sódio-glucose co-transportador 2
SNC- Sistema nervoso central

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Objetivo Geral.....	13
2.1 Objetivos Específicos.....	14
3. Revisão da Literatura.....	15
3.1 Alzheimer e a Hipótese colinérgica.....	15
3.2 Acetilcolinesterase.....	17
3.3 Inibidores da acetilcolinesterase	18
3.4 Heterociclos.....	20
3.5 Síntese da Benzotiazinona.....	20
4. Manuscrito Científico.....	26
5. Conclusão.....	90
6. Referências Bibliográficas.....	91

1. Introdução

Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa progressiva, caracterizada pela acentuada atrofia do córtex cerebral e perda de neurônios corticais e subcorticais, sendo a forma mais comum de demência prevalente em indivíduos mais velhos no grupo de adultos com mais de 65 anos (KULSHRESHTHA et al., 2016). A OMS (Organização Mundial de Saúde) estima um crescimento constante da Doença de Alzheimer, que pode dobrar até 2030 – e atingir 65,7 milhões – e triplicar até 2050, para 115,4 milhões.

A destruição dos neurônios colinérgicos no cérebro anterior basal e a redução de colina acetiltransferase em tecidos cerebrais de pacientes com DA foram relatados pela primeira vez em 1976 e 1977. Assim, pesquisas farmacológicas sugerem que disfunções específicas na transmissão colinérgica podem ser responsáveis pelo declínio da memória observada em idades mais avançada (KUMAR et al., 2015).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) em acetato e colina interrompendo a transmissão colinérgica. Diante disso, a AChE é um dos principais alvos terapêuticos para tratar a sintomatologia da DA. A administração de inibidores da AChE impede a degradação da ACh e conseqüentemente, aumenta os níveis deste neurotransmissor nas sinapses colinérgicas (JUNG et al., 2007).

O tratamento da DA tem se concentrado em reduzir o declínio cognitivo com inibidores da colinesterase, porém, atualmente não existe tratamentos curativos. Tendo em vista a grande utilidade dos inibidores da AChE na medicina e o limitado arsenal terapêutico para o tratamento da DA, bem como os problemas relacionados com as terapias atuais, há uma necessidade de buscar novas moléculas com potencial anticolinesterásico com melhor perfil farmacológico para atingir um tratamento mais eficaz (KLIMOVA et al., 2015).

Dentro desse contexto, as substâncias heterocíclicas se destacam devido a sua vasta aplicação no campo medicinal em virtude de seus potenciais biológicos. Além disso, a maioria dos fármacos em uso clínico apresenta em sua estrutura no mínimo um núcleo heterocíclico. Esses participam de importantes processos bioquímicos, e são constituintes das principais substâncias nas células vivas, como

por exemplo, DNA e RNA. Dentre os compostos que contém um ou mais núcleos heterocíclicos destacam-se as benzotiazinonas (NIKALJE et al., 2014).

Tiazinanonas são heterociclos de seis membros contendo nitrogênio, enxofre e um grupo carbonila. Benzotiazinonas tem uma fusão com benzeno na posição 5, 6 do anel tiazinanona (Figura 1) (SILVERBERG et al.; 2015; BOSENBECKER et al., 2014). Essas substâncias representam uma classe de compostos de grande interesse científico devido às suas propriedades químicas e biológicas, tais como: agentes antibacterianos, antifúngicos, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, inibidor de aldose redutase, anti-oxidante, anti-HIV, dentre outras (MUBARAK et al., 2015; MAHESHWARI et al., 2015).

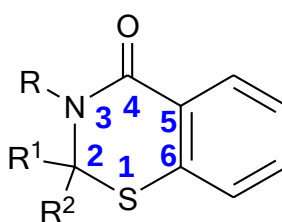


Figura 1: Estrutura geral das benzotiazin-4-ona.

Nos últimos anos o grupo de pesquisa do Laboratório de Química Aplicada a Bioativos (LaQuiABio), da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), vem desenvolvendo uma série de trabalhos referentes a síntese e atividade biológica das tiazolidinonas e tiazinonas (CUNICO et al., 2008; GOUVÊA et al., 2016; BOSENBECKER et al., 2014). O trabalho proposto referente-se as benzotiazinonas que pela primeira vez foi estudado pelo nosso grupo de pesquisa.

Neste contexto, a proposta deste trabalho foi sintetizar benzotiazinonas derivadas da 4-(2-aminoetil)morfolina, 1-(3-aminopropil)piperidina e 1-(2-aminoetil)piperidina e verificar a sua ação de potenciais inibidores da AChE na busca de novos fármacos.

2. Objetivos

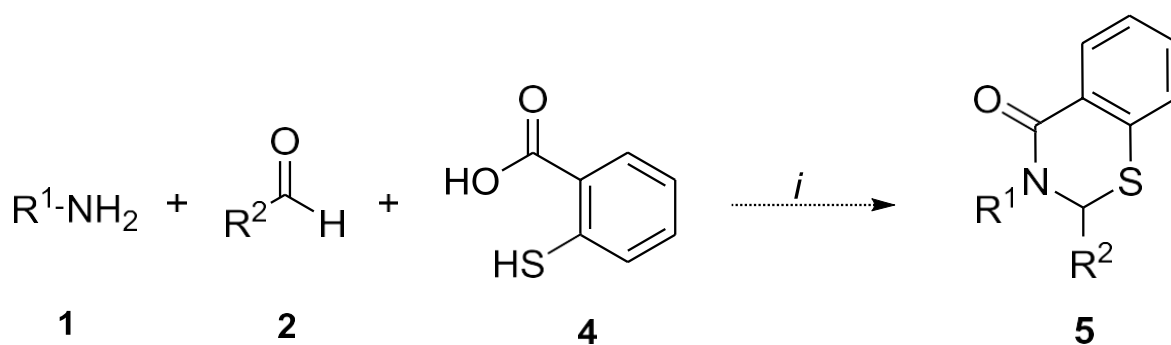
Objetivo Geral

Realizar a síntese das benzotiazinonas derivadas das 4-(2-aminoetil)morfolina, *N*-(3-aminopropil)piperidina e 1-(2-aminoetil)piperidina, avaliar o efeito destes heterociclos na atividade da enzima acetilcolinesterase em córtex cerebral e hipocampo de ratos.

Objetivos Específicos

- Estudar as condições reacionais para a obtenção das 2-aryl-3-(2-(piperidin-1-etil)-2,3-di-hidrobenzo[e][1,3]tiazin-4-ona, 2-aryl-3-(3-(piperidin-1-propil)-2,3-di-hidrobenzo[e][1,3]tiazin-4-ona benzotiazinonas e 2-aryl-3-(2-morfolinoetil)-2,3-di-hidrobenzo[e][1,3]tiazin-4-ona, por meio das metodologias de aquecimento térmico convencional, através da reação entre distintas aminas **1**, benzaldeídos substituídos **2** e do ácido tiosalicílico **4**. (Esquema 1).
- Identificar a estrutura dos compostos sintetizados, através da interpretação dos dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e Espectrometria de Massas.
- Avaliar o efeito *in vitro* das benzotiazinonas obtidas na atividade da enzima AChE em córtex cerebral e hipocampo de ratos.
- Analisar o efeito citotóxico das moléculas através do teste da sulforrodamina B (SRB) em células de linhagem MCR-5 de fibroblasto humano.

Esquema 1: Reação proposta neste trabalho



i. Aquecimento térmico convencional

R^1 = Aminas alifáticas contendo um grupo amino secundário

R^2 = Aldeídos alifáticos ou aromáticos

3. Revisão Bibliográfica

Na literatura são relatados poucos trabalhos contendo o heterociclo da benzotiazinona, em vista disso, esta revisão tem por objetivo uma discussão sobre esse heterociclo, o qual será abordado a reatividade do anel, a atividade farmacológica como inibidores da AChE, a citotoxicidade e sua importância sintética.

A síntese das benzotiazinonas será abordada posteriormente, através da metodologia de aquecimento térmico convencional, a seguir será discutida a aplicabilidade das benzotiazinona na química medicinal, dando ênfase para a doença de Alzheimer, atividade anticolinesterásica, visto que é restrito o arsenal terapêutico para o tratamento da DA. Entretanto, esta revisão busca de forma abrangente explanar assuntos descritos ao longo desta dissertação para um melhor entendimento do assunto.

Doença de Alzheimer e a Hipótese Colinérgica

A DA é uma das causas mais comuns de demência na sociedade e esta classificada em dois tipos: (1) o início precoce/DA familiar (DAF); e (2) DA esporádica (DAS). DA é uma desordem neurodegenerativa progressiva caracterizada pela perda progressiva de memória, declínio da função cognitiva e diminuição da função física (CACABELOS et al., 2014; KUMAR et al., 2015).

Na DAF, mutações que envolvem o gene PPA (proteína precursora de β -amilóide) ou genes que codificam os componentes do complexo secretase, podem promover via amiloidogénica, com consequente aumento do rácio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ e da sua agregação. Na DAS, há falha nos mecanismos de eliminação de $A\beta$. Assim, a acumulação anormal de $A\beta$, com formação de oligómeros tóxicos, resultando no desequilíbrio entre a sua produção, agregação e eliminação (CREWS et al., 2010).

As anormalidades patológicas típicas da DA são as placas amilóides, que se originam a acumulação extracelular do beta amiloide ($A\beta$) e aos emaranhados neurofibrilares formados pela proteína Tau (Figura 2). Embora o desenvolvimento das placas amiloides seja uma anormalidade precoce e invariável da DA, a acumulação dos emaranhados com o transcorrer do tempo ocorre a uma taxa que se correlaciona diretamente com o desenvolvimento da disfunção cognitiva (MUCKE, 2009; FRANCIS et al., 2010; KUMAR et al., 2015).

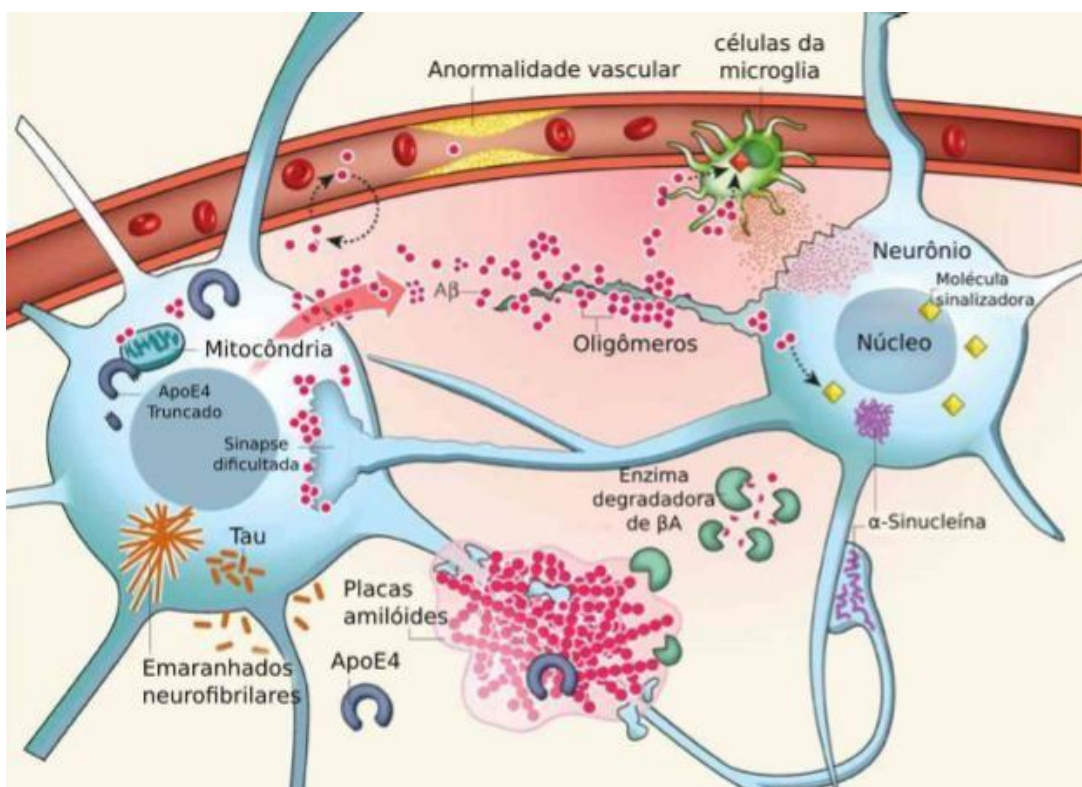


Figura 2: Patogênese da DA. Esquema demonstrando o acúmulo de β -amilóide, levando à formação das placas amiloides e a formação dos emaranhados neurofibrilares. Adaptado de (MUCKE, 2009).

Nos cérebros de pacientes com Alzheimer são encontrados um grande número de filamentos da proteína Tau e, sua ocorrência em outras doenças degenerativas tornou-se evidente que além da β -amiloide, anormalidades na proteína Tau, como por exemplo, sua hiperfosforilação também contribui para progressão da doença. Assim, a forma como estas proteínas insolúveis contribuem para a inflamação, perda neuronal e declínio comportamental devido à perda sináptica, ainda não é compreendida em sua totalidade (PAULA et al., 2009; HOLTZMAN et al., 2011).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar o mecanismo de desenvolvimento da DA. A hipótese clássica, ou seja, a hipótese colinérgica sugere que a deterioração cognitiva e o déficit de memória sejam causados principalmente, pelo baixo nível de colina no cérebro, especialmente acetilcolina (ACh). Dessa forma, a manutenção dos níveis de ACh são importantes para o alívio destes sintomas nos pacientes (GOEDERT et al., 2006; XIE et al., 2013).

A importância da função colinérgica nos processos de aprendizagem e memória, e os estudos a respeito da importância do sistema colinérgico na DA demonstraram diversas características, como por exemplo: a diminuição na

concentração da colina acetiltransferase (ChAT), bem como uma diminuição variável dos neurônios colinérgicos situados no núcleo basal de Meynert (PENNANEN et al., 2004; CONTESTABILE, 2011; ALVES et al., 2012).

Na DA, existe uma atrofia do núcleo basal de Meynert que resulta em uma deficiência da acetilcolina, pois o núcleo de Meynert é o responsável e a fonte produtora da enzima colina acetiltransferase (CAT). A enzima CAT é transferida para estruturas-alvo no sistema nervoso central (SNC), na qual catalisa a reação de síntese da ACh a partir da colina e da acetilcoenzima A. A ACh após formada, é liberada na fenda sináptica, onde será acoplada a dois tipos de receptores, o muscarínico e o nicotínico. O restante é degradada pela enzima AChE, na fenda sináptica, em acetato e colina (MARTOCCHIA et al., 2008; TEIPEL et al., 2014).

Neste sentido, existem dois tipos de colinesterases (ChE) responsáveis pela hidrólise da ACh em colina e ácido acético: a AChE e a butirilcolinesterase (BuChE). Uma vez que a AChE é responsável por aproximadamente 80% da hidrólise da ACh em cérebros normais, essa possui maior importância e tem recebido muita atenção em comparação com a BuChE (XIE et al., 2013).

Uma estratégia, portanto é desenvolver fármacos que possam aprimorar a função colinérgica, pois os níveis sinápticos de ACh podem ser aumentados pela inibição da enzima AChE. Assim, alguns fármacos usados para o tratamento da DA são baseados na teoria da hipótese colinérgica, cujo objetivo é aumentar a concentração de ACh na fenda sináptica por inibição da ChE (KULSHRESHTHA et al., 2016).

Acetilcolinesterase (AChE)

A enzima AChE tem a função de catalisar rápida e eficientemente a hidrólise da ACh (Figura 3). A AChE inativa a ação do neurotransmissor ACh hidrolisando-o em acetato e colina. A ACh é posteriormente sintetizada e armazenada em vesículas no neurônio pré-sináptico, sendo que a liberação depende de alterações iônica e elétrica da membrana plasmática. O resultado da despolarização produzida por ligação da acetilcolina ao receptor é finalizado com o objetivo de restabelecer a estabilidade da membrana pós-sináptica e a sua permeabilidade por mecanismos de repolarização (BROWN et al., 2006; SILMAN et al., 2008; SCHLIEBS et al., 2011).

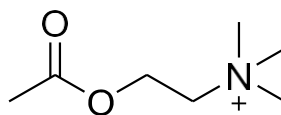


Figura 3: Estrutura da acetilcolina

O sítio ativo da AChE é composto por dois subsítios, sendo um esterásico e outro de ligação de colina, que se ligam ao grupo carbonílico e amônio quaternário da ACh, respectivamente. No sítio ativo da enzima AChE, os aminoácidos serina (Ser), histidina (His), e o ácido glutâmico (Glu) são considerados essenciais para a atividade catalítica enzimática, sendo conhecidos como a “tríade catalítica” de AChE. Existe um segundo sítio de ligação de colina, chamado de periférico, assim considerado por estar distante do sítio ativo. Os inibidores biquaternários da AChE possuem um maior poder inibitório relativo a inibidores monoquaternários devido à capacidade de se ligarem aos dois sítios de ligação de colina (TACHIKAWA et al., 2005).

Quando comparada com a serino-hidrolases, a AChE é extremamente eficiente, pois faz uso da mesma tríade catalítica. O sítio ativo da AChE está inserido próximo de uma estreita e profunda cavidade, o que era inesperado dado à alta velocidade de reação da mesma. O motivo para o sítio ativo de muitas enzimas estarem inserido e tornando a AChE como modelo, e o fato de que com o sítio da AChE inserido, o substrato, ACh estará rodeado pela proteína, permitindo múltiplas interações substrato/enzima que, por sua vez, cria um estado de transição mais eficaz (SILMAN et al., 2008).

Inibidores da Acetilcolinesterase (AChE)

Na busca de tratamentos eficazes para a DA tem se desenvolvido muitas pesquisas ao longo das últimas décadas. A maioria dos recentes estudos está concentrada nos fármacos que inibem a AChE e, assim, aumentam a disponibilidade de acetilcolina no cérebro, isso poderia reverter os prejuízos na memória e danos causados referentes à doença (ROY et al., 2012; HEBDA et al., 2016).

A hipótese colinérgica determina que pacientes com DA demonstrem disfunção cognitiva devido à grande perda de neurônios colinérgicos e a sua incapacidade de transmitir impulsos neurológicos através das sinapses colinérgicas, o que levou ao desenvolvimento e aprovação de quatro inibidores de colinesterase: rivastigmina

(Exelon®), galantamina (Razadyne®, Reminyl®), tacrina (Cognex®) e donepezil (Aricept®) (Figura 4). Além dos inibidores da AChE, também foi aprovado um antagonista do receptor do glutamato do tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA) (memantina) para o tratamento da DA (DA COSTA et al., 2013; KUMAR et al., 2015).

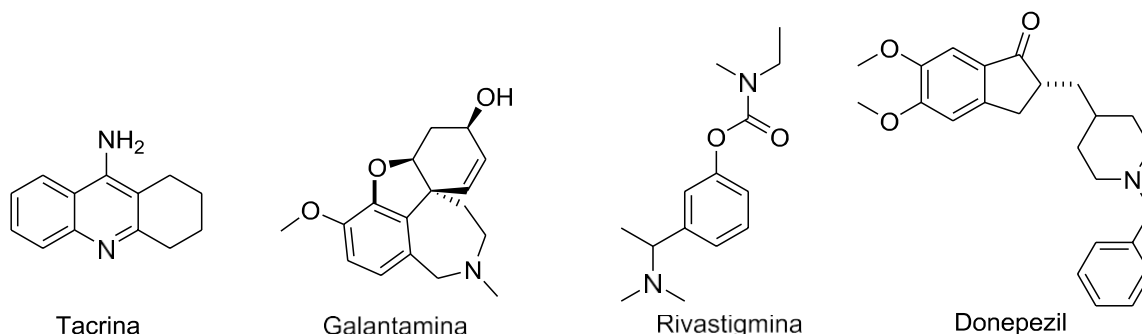


Figura 4: Estrutura dos fármacos inibidores da AChE.

Cada fármaco atua de uma maneira diferente para atrasar a hidrólise da ACh. A tacrina é raramente prescrita, devido aos seus efeitos adversos graves (lesão hepática). Em geral, a galantamina, a rivastigmina e o donepezil são mais eficazes quando o tratamento é iniciado nos primeiros estágios da doença (CACABELOS et al., 2014; KUMAR et al., 2015).

A memantina (Namenda®) é utilizado para os estágios mais avançados da doença. Esse fármaco é utilizado como coadjuvante ou alternativo aos inibidores de colinesterases para tratar DA e também é usada frequentemente para tratar outras desordens neurodegenerativas (FOND et al., 2015; REIMAN et al., 2015).

Todos os fármacos exibem efeitos benéficos sobre sintomas cognitivos, funcionais e comportamentais da DA, melhorando o déficit colinérgico. No entanto, esses são extremamente limitados porque são capazes de tratar apenas os sintomas, além disso, possuem efeitos colaterais consideráveis devido à estimulação colinérgica em tecidos periféricos (KUMAR et al., 2015).

Entretanto, muitos esforços estão sendo dirigidos para a descoberta de tratamentos modificadores da doença visando várias vias moleculares, que possam bloquear a progressão da DA em vez de apenas tratar os sintomas relacionados (CACABELOS et al., 2014).

Dessa forma, a busca por novos fármacos com propriedades cada vez mais significativas impulsiona as pesquisas na área da química medicinal e química orgânica, visando à concepção, síntese e produção de moléculas que possuem valor como agentes terapêuticos. Assim, tem-se observado que as moléculas que

possuem um ou mais núcleos heterocíclicos em sua estrutura, em geral, apresentam melhores características farmacológicas do que estruturas homogêneas por facilitar as interações nos sítios alvo (PATRICK et al., 2009; ALEXANDER et al., 2011).

Heterociclos

Os compostos heterocíclicos são parte integrante das ciências químicas e da vida, pois constituem uma soma considerável da pesquisa moderna que está sendo estudado atualmente em todo o mundo. Esses apresentam grande interesse para a química orgânica, devido a sua vasta aplicação medicinal em virtude de seus potenciais biológicos (PATRICK, 2009).

A maioria dos fármacos em uso clínico apresenta em sua estrutura no mínimo um núcleo heterocíclico. Exemplificando alguns heterociclos com distintas aplicações farmacológicas, tais como: losartan, o qual apresenta propriedade anti-hipertensiva; etravirine utilizado como antiretroviral; fluconazol como antifúngico; celecoxibe que possui propriedades anti-inflamatórias. Assim, as pesquisas em busca da síntese de substâncias com núcleos heterocíclicos têm crescido nos últimos anos (TRIPATHI et. al., 2014).

Dentre os heterociclos, destacam-se as benzotiazinonas, as quais constituem uma classe importante de um sistema heterocíclico. Na literatura são encontradas diversas aplicações desses compostos com propriedades: antibacteriana, antifúngica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, a atividade do sistema nervoso central, antirreumáticos, inibidor da aldose-redutase, antioxidante, anti-HIV, antimalárica, anti-helmíntico, dentre outros (MAHESHWARI et al., 2015).

Síntese da benzotiazinona

A química das tiazolidinonas (NEUENFELDT et al., 2011, KUNZLER et al., 2013, CUNICO et al., 2008), tiazinanonas (GOUVÊA et al., 2016; MASTELOTO et al., 2014) e benzotiazinonas (SILVERBERG et al., 2015) têm sido de crescente interesse, por constituir uma classe importante de heterocíclicos, ambos contendo N e S em sua estrutura. As diversas possibilidades de modificações no anel heterocíclico revelam um amplo alcance de atividades farmacológicas, a qual destaca-se por ser uma importante área de investigação desta classe de substâncias (PRASAD et al., 2012).

A síntese dessas moléculas foi baseada na experiência do nosso grupo de pesquisa LaQuiABio para obtenção dos heterociclos da benzotiazinona, tiazolidinona (NEUENFELDT et al., 2011, KUNZLER et al., 2013, CUNICO et al., 2008) e tiazinanona (BOSENBECKER et al., 2014) (Figura 5). Desta forma, essas moléculas podem ser sintetizadas através de reações de ciclocondensação via multicomponente entre uma amina primária ou hidrazina, um aldeído ou cetona, e o ácido tiosalicílico, o ácido mercaptoacético e o ácido mercaptopropiônico respectivamente.

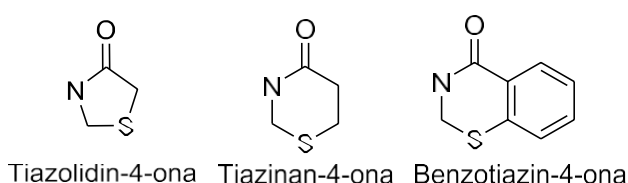
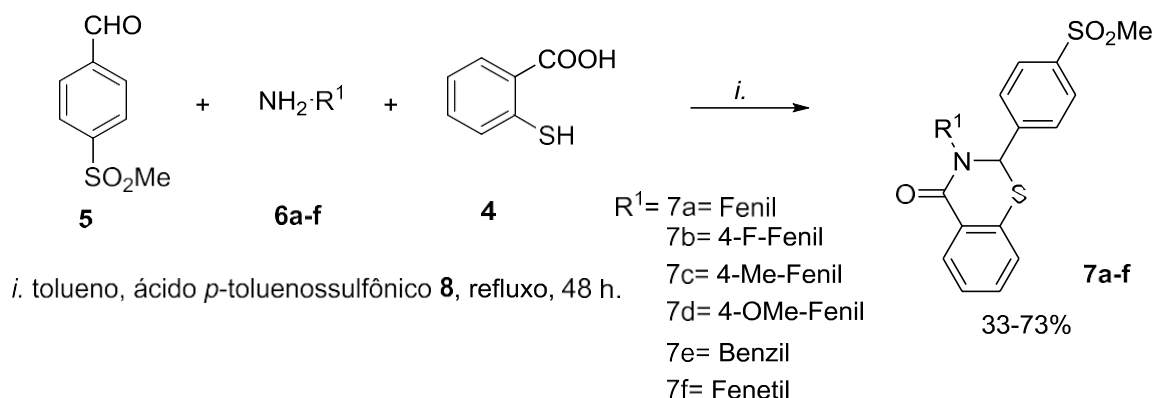


Figura 5: Estrutura geral de 1,3-tiazolidin-4-onas, 1,3-tiazinan-4-ona e 1,3-benzotiazin-4-ona.

Estas sínteses também podem ser realizadas em duas etapas, primeiramente com a formação do intermediário imina e posterior reação de acoplamento dessa imina com o respectivo ácido. Nesse caso o intermediário imina pode ser isolado para posterior reação ou formado *in situ*, sendo chamada de reação via “one-pot” (MOHAMED et al., 2013; NITIN et al., 2013; JAIN et al., 2013).

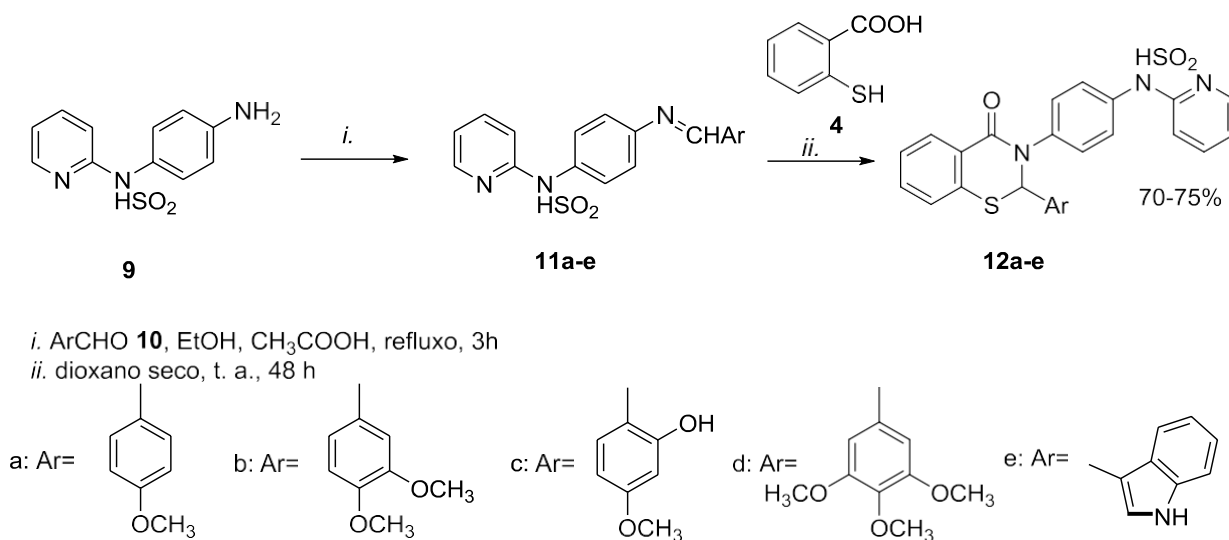
ZARGHI e colaboradores (2009) sintetizaram benzotiazinonas **7a-f** pela via multicomponente utilizando como solvente tolueno na presença do catalisador ácido *p*-toluenossulfônico **8** através da metodologia de aquecimento térmico convencional. Deste modo, a síntese ocorreu utilizando o 4-metilsulfonilbenzaldeído **5** devidamente tratado, aminas variadas **6a-f** e o ácido tiosalicílico **4** (Esquema 2). Esses derivados de benzotiazinonas com substituintes distintos na posição N-3 do anel central da benzotiazinona foram preparados para investigar o efeito da seletividade e potência na COX-2. A capacidade de inibir as isozimas COX-1 e COX-2 foi determinada utilizando ensaios de enzima quimioluminescente, onde, revelou um potencial mais significativo de (IC₅₀ = 0,05 µM) e seletividade (SI = 259) com o substituinte flúor na posição 4 do anel.

Esquema 2.



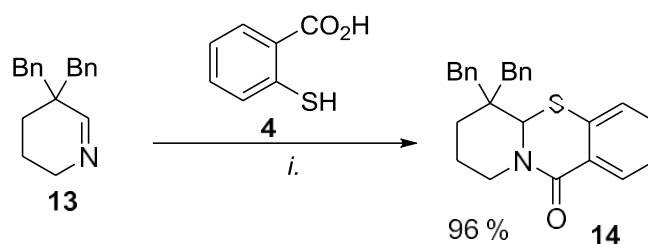
KAMEL e colaboradores (2010), realizaram a síntese de 1,3-benzotiazin-4-onas **12a-e** derivados sulfapiridina com diferentes aldeídos aromáticos **10** através da reação de ciclocondensação entre a imina **11a-e** (bases de Schiff) com o ácido tiossalílico **4** e como solvente utilizou-se o dioxano seco (Esquema 3). Além disso, foi avaliado *in vitro* a atividade inibitória de crescimento contra linhas celulares de carcinomas de cerviz (HELA) e linhas celulares de carcinoma de mama (MCF7), os resultados revelaram um potencial significativo frente à atividade antitumoral, sendo mais significativo para o composto **12a** com $\text{IC}_{50} = 1.61 \mu\text{M}$, para MCF7 e de $\text{IC}_{50} = 1.48 \mu\text{M}$, para HELA.

Esquema 3.



No trabalho reportado por KITSIOU et al., (2014) foram realizadas a síntese de uma variedade de heterociclos, dentre esses a benzotiazinona **14** utilizando como catalisador o ácido propilfosfônico anidro (T3P) **15**. A síntese foi realizada através de uma acilação direta e subsequente ciclização entre a imina **13** com o derivado do ácido benzóico **4**, em tolueno na temperatura de 90 °C por 20 h. (Esquema 4).

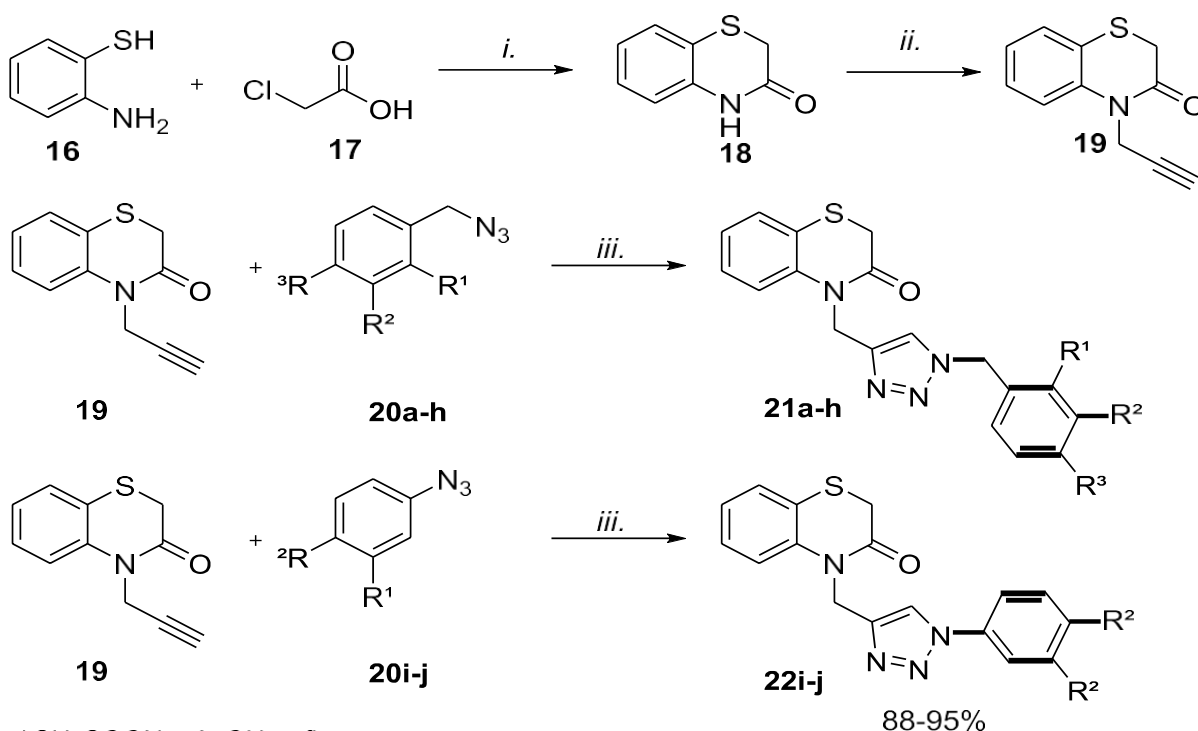
Esquema 4.



*i.*tolueno, T3P **15**, DIPEA, 90 °C, 20 h

Em outro estudo realizado, por SHAIKH et al., (2015) foram sintetizadas 1,4-dissubstituído-1,2,3-triazolecontendo benzotiazinona, em três etapas reacionais. As azidas de benzil **20** reagiram com a 4-(prop-2-in-1-il)benzotiazinona **19**, através de uma reação de cicloadição em *t*-BuOH e uma quantidade catalítica de diacetato de cobre (Cu(OAc)₂) à temperatura ambiente durante 24-30 h, obteve-se o correspondente produto regioseletivo o 1,4-dissubstituído-1,2,3-triazol incorporada 1,4-benzotiazin-3-ona **21a-h** e **22i-j** (Esquema 5). Os compostos foram submetidos à avaliação antitubercular, antioxidante e a citotoxicidade. Os resultados *in vitro* sugeriram que a incorporação do triazol ao anel benzotiazinona poderia possuir os requisitos estruturais ideais para um maior desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

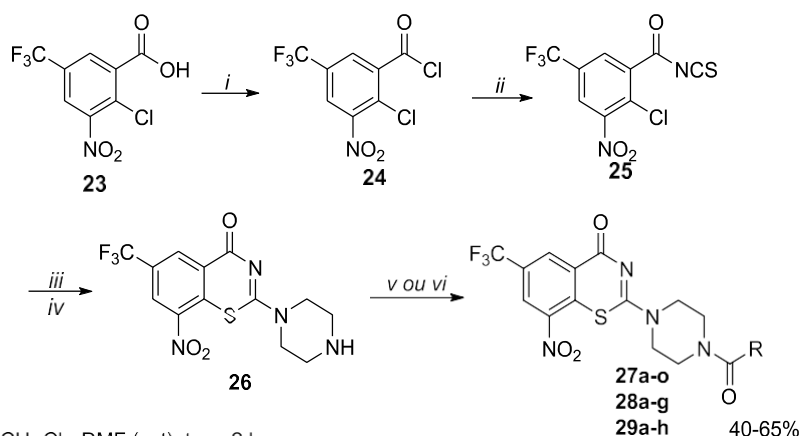
Esquema 5.



21a. $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{H}$, $\text{R}^3=\text{NO}_2$ 21b. $\text{R}^1=\text{NO}_2$, $\text{R}^2=\text{H}$, $\text{R}^3=\text{H}$
 21c. $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{H}$, $\text{R}^3=\text{F}$ 21d. $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{H}$, $\text{R}^3=\text{Cl}$
 21e. $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{Cl}$, $\text{R}^3=\text{H}$ 21f. $\text{R}^1=\text{Cl}$, $\text{R}^2=\text{H}$, $\text{R}^3=\text{H}$
 21g. $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{H}$, $\text{R}^3=\text{Br}$ 21h. $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{H}$, $\text{R}^3=\text{H}$
 22i. $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{NO}_2$ 22j. $\text{R}^1=\text{NO}_2$, $\text{R}^2=\text{H}$

PENG et al., (2015) sintetizaram uma nova série de derivados de piperazina substituídos com benzotiazinona (**27a-o**, **28a-g** e **29a-h**) e avaliaram a atividade antimicobacteriana contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Os compostos foram sintetizados em cinco etapas reacionais a partir do material de partida o ácido 2-cloro-3-nitro-5-(trifluorometil) benzóico **23** e em duas etapas utilizou-se o PEG-400 que agiu como catalisador de transferência de fase, com rendimentos de 40-65% (Esquema 6). Os resultados sugeriram que os substituintes 4-carbonilpiperazina com um andaime benzotiazinona apresentaram uma atividade antituberculose de MIC 0,008 M, mostrando uma excelente solubilidade aquosa de 104 µg/ml.

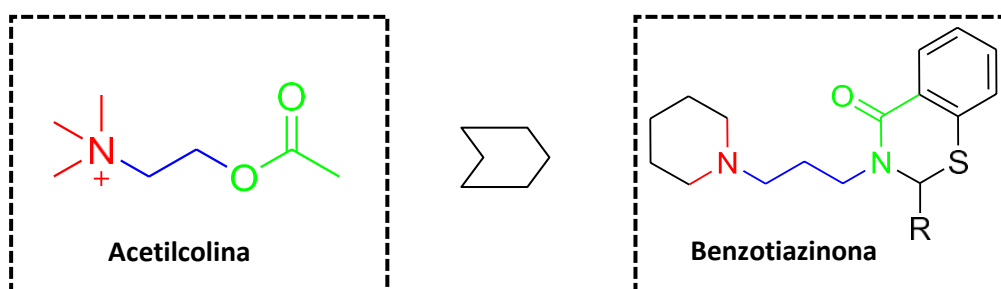
Esquema 6.



- i. $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 , DMF (cat), t. a., 2 h;
 ii. NH_4NCS , CH_2Cl_2 , PEG-400 (CAT), t. a., 2-4 h;
 iii 1-Boc-piperazina, t. a., 30 min;
 iv. TFA, 0°C - t. a., 3 h;
 v. R-COCl , 0°C , 10 min, 2 h;
 vi. R-COOH , HATU, DIPEA, t. a., *overnight*.

R= 27a. 4-nitrofenil;	28a ciclopropil;
27b. 2-nitrofenil;	28b. ciclobutil;
27c. 4-(Trifluorometil)fenil;	28c. ciclopentil;
27d. 4-metoxibenzil;	28d. cicloexil;
27e. 2-metoxifenil;	28e. cicloexilmetil;
27f. 3-metoxifenil;	28f. 4- (terc-butil) ciclo-hexil;
27g. 4-metoxifenil;	28g. adamantil;
27h. 4-metilfenil;	29a. metil;
27i. 4-etilfenil;	29b. etil;
27j. 4-terc-butilfenil;	29c. propil;
27k. 2-fluorofenil;	29d. butil;
27l. 3-fluorofenil;	29e. (metiltio) metil;
27m. 4-fluorofenil;	29f. terc-butil;
27n. 2-clorofenil;	29g. 2-metilpropil;
27o. 4-clorofenil;	29h. 1-metilpropil

Desta forma, observa-se que a literatura apresenta vários estudos demonstrando a importância das benzotiazinonas com uma variedade de propriedades biológicas, no entanto, até o momento nenhuma como agentes anticolinesterásicos. O planejamento das moléculas foi baseado na semelhança estrutural com o substrato natural acetilcolina, no qual, o grupo éster é substituído pelo grupo amida cíclico (representado em verde), a ponte etilênica é mantida ou substituída por uma propilênica (representado em azul) e o nitrogênio quaternário é substituído por uma amina terciária (piperidina ou morfolina, representado em vermelho). Nesse trabalho foram sintetizadas dezenove benzotiazinonas e avaliadas suas propriedades anticolinesterásicas, os resultados obtidos serão divulgados na forma de um manuscrito científico.



4. Manuscrito Científico

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de um manuscrito. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está formatado de acordo com as normas para publicação na revista *European Journal of Medicinal Chemistry*.

Synthesis and biological evaluation of benzothiazin-4-ones as acetylcholinesterase inhibition

Gabriele dos Anjos Berwaldt^{a,b}

Daniela Pires Gouvêa^b

Daniel Schuch da Silva^{a,b}

Adriana Machado das Neves^{a,b}

Mayara Sandrielly Pereira Soares^{a,c}

Roselia Maria Spanevello^{a,c}

Geonir Machado Siqueira^{a,b}

Wilson Cunico^{a,b}

^aPrograma de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

^bLaboratório de Química Aplicada a Bioativos, Centro Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

^cLaboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

Corresponding author. Tel.: +55 53 8125-6343

E-mail address: gabrieleaberwaldt@hotmail.com (Gabriele dos Anjos Berwaldt)

Abstract

A series of nineteen benzothiazinones from *N*-(3-aminopropyl)-piperidine, 4-(2-aminoethyl)morpholine and 1-(2-aminoethyl)piperidine, were synthesized by one-pot reactions among an aliphatic amine, an aliphatic or aromatic aldehyde and the thiosalicylic acid in good yields by conventional thermal heating methodology. Identification and characterization of compounds were achieved by NMR and GC-MS techniques. In vitro AChE activities of all synthesized compounds were evaluated in cerebral cortex and hippocampus of rats and in general, the results in cortex were more promising than hippocampus. Two compounds (**5Ba** and **5Bd**), from *N*-(3-aminopropyl)-piperidine, showed the best AChE inhibition activities, including significant inhibition at 10 μ M in cortex. **5Ba** has 27.1% of inhibition at 10 μ M and 76.5% at 250 μ M, while **5Bd** has 47.1% at 10 μ M and 80.1% at 250 μ M, both in cortex. Furthermore, compound **5Cd**, synthesized from 1-(2-aminoethyl)piperidine, was also active since 25 μ M. Then, were evaluated the cytotoxicity of seven compounds in MCR-5 human fibroblast cell by SRB test in 24 h and compounds **5Ba** and **5Bd** revealed a good therapeutic window, showing no cytotoxicity at 100 μ M. These important results could be considered a starting point for the development of new anticholinesterasic agents. This research provides a preliminar structure-activity relationship and the confirmation of potential effect of benzothiazinones. Finally, this study will provide the basis for new studies, including in vivo trials and determination of mechanism of action.

Keywords: Benzothiazinone, Fibroblast Cells, Alzheimer's disease, Acetylcholinesterase, Piperidine.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by the loss of cortical and subcortical neurons. Typical pathological abnormalities of AD are the formation of amyloid plaques that are due to accumulation of extracellular A β and neurofibrillary tangles formed by Tau protein. Although the development of amyloid plaques are an early and invariant abnormalities of AD, the accumulation of tangles with the passage of time, occurs at a rate that is directly correlated with the development of cognitive dysfunction [1,2,3].

In AD, there is an atrophy of the Nucleus basalis of Meynert which results in a deficiency of acetylcholine (ACh), as the nucleus of Meynert is a responsible and productive source of the enzyme choline acetyltransferase (CAT). The CAT enzyme is transferred to target structures in the central nervous system (CNS), which catalyzes the synthesis reaction of ACh from choline and acetyl coenzyme A. After the formation of ACh, the same is released into the synaptic cleft, which will be coupled to two types of receptors: muscarinic and nicotinic receptors. The remainder is degraded by the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in the synaptic cleft and choline acetate [3,4,5].

The activity of enzyme acetylcholinesterase (AChE) is responsible for the hydrolysis of acetylcholine (ACh) and choline acetate, and also interrupts the cholinergic transmission. Therefore, AChE is a major therapeutic target for treating the symptoms of AD. The administration of AChE inhibitors prevents degradation of ACh and increases the levels of this neurotransmitter in the cholinergic synapses [6].

Thus, tacrine and donepezil are used for the treatment of AD are based on the theory of cholinergic hypothesis, which aims to increase the concentration of ACh in the synaptic cleft by inhibiting the cholinesterase (ChE) [7, 8, 9]. The treatment of AD has focused on reducing cognitive decline with cholinesterase inhibitors, however, currently there is not an efficient treatment able to cure disease. Considering the great usefulness of AChE inhibitors in medicine and limited therapeutic arsenal for the treatment of AD, as well as the problems associated with current therapies, there is need to find new compounds that have anticholinesterase potential to improved pharmacological profile [10, 11].

In this context the heterocycles stand out among the others due to its wide application in the medical field because of their biological potential. Additionally, most clinically used drugs present in its structure at least one heterocyclic ring. These rings

participate in important biochemical processes, and are major constituents of living cells substances, such as DNA and RNA. Among the compounds containing one or more heterocyclic nuclei are the benzothiazinones [10, 12, 13].

Thiazinones are six membered heterocycles containing nitrogen, sulfur and carbonyl group. Benzothiazinones has a fusion with benzene at 5, 6 position of thiazinanone ring [12]. These substances represent a class of compounds that have a great scientific interest due to their chemical and biological properties such as antibacterial, antifungal, anti-hypertensive, anti-inflammatory, antirheumatic, aldose reductase inhibitor, antioxidant, anti-HIV, anti-malarial and anti-helminth [14, 15, 16].

Therefore, the objective of this study was synthesize benzothiazinones using aliphatic amines, valeraldehyde or arenaldehydes and thiosalicylic acid. This work also evaluates the effect of these heterocycles as AChE inhibitors for in cerebral cortex and hippocampus of rats or brain rats and we also evaluated the citotoxicity of this molecules against MCR-5 human fibroblast cells.

2. Material and Methods

Chemistry

General

Reagents and solvents were used as obtained from commercial suppliers without further purification. Reactions progress was monitored by thin-layer chromatography (TLC) (hexane:ethyl acetate 3:1) and/or by Shimadzu Gas Chromatograph GC-2010, HP-1 column (cross linked methyl siloxane, 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm): Column head pressure, 14 psi, program: Ti = 60 °C; ti = 2.0 min; rate 10.0 °C min⁻¹; Tf = 280 °C; tf = 40.0 min; Inj. = 250 °C; Det. = 280 °C. The melting points were determined using open capillaries on a Fisatom model 430 apparatus and are uncorrected. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 400 spectrometer (¹H at 400 MHz and ¹³C at 100 MHz), on a Bruker Avance 600 spectrometer (¹H at 600 MHz and ¹³C at 150 MHz), and on a Bruker Avance III 600 MHz (¹H at 600 MHz and ¹³C at 150 MHz), in CDCl₃ containing TMS as an internal standard or DMSO. The mass spectra were obtained on a Shimadzu GCMS-QP2010SE with a split-splitless injector and equipped with a RDX-SMS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm); helium was used as the carrier gas (56 kPa). The Log P values, or a measure of lipophilicity, was

calculated in ChemBioDraw Ultra 13.0 software. Mass spectra were acquired in a GCT-Premier Waters (EI) equipment.

General procedure for the synthesis of benzothiazinones 5Aa-g, 5Ba-f and 5Ca-f

To a flask containing toluene (70 mL) were added of an aliphatic amine **1** (1 mmol) and corresponding aldehyde (**2a-g**) (1 mmol) and thiosalicylic acid **4** (1 mmol), which was added in pre-heated reaction mixture due to low acid solubility. The reaction was maintained in toluene refluxed for 5 h using a Dean-Stark apparatus. The organic layer was washed with a saturated solution of NaOH (3 x 30 mL), dried with MgSO₄ and the solvent removed on the rotary evaporator apparatus. The crude products were purified by column chromatography using silica gel and hexane/ethyl acetate (9:1) as eluent.

2-butyl-3-(2-morpholinoethyl)-2,3-dihydro-4*H*-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

5Aa

Yield: 77%; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.07 (dd, 1H, H7, Ar, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.1 Hz); 7.34 (td, 1H, H9, Ar, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz); 7.26 (dd, 2H, H8, H10, Ar, ²*J* = 12.3 Hz, ³*J* = 4.5 Hz) 4.53 (dd, 1H, H2, ³*J* = 9.6 Hz, ³*J* = 5.4 Hz); 4.27 (dt, 1H, H11a, ²*J* = 13.7 Hz, ³*J* = 6.0 Hz); 3.22 (dt, 1H, H11b, ²*J* = 13.7 Hz, ³*J* = 6.8 Hz); 3.82-3.66 (m, 4H, H15); 2.69 (dt, 2H, H12a, H12b, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 6.2 Hz); 2.62-2.54 (m, 4H, H14); 1.80-1.94 (m, 2H, H17); 1.45-1.38 (m, 2H, H18); 1.30-1.21 (m, 2H, H19); 0.86 (t, 3H, H20, ³*J* = 7.2 Hz). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 162.8 (C4); 134.0 (Ar); 131.8 (Ar); 129.9 (Ar); 129.0 (Ar); 127.8 (Ar); 125.8 (Ar); 66.8 (C15); 61.8 (C2); 57.0 (C12); 53.7 (C14); 45.6 (C11); 34.5 (C17); 29.0 (C18); 21.9 (C19); 13.8 (C20). MS *m/z*: 281 (M⁺-53, 0.5%); 248 (0.6%); 220 (1.0%); 113 (47.8%); 100 (100.0%); 83 (1.6%) 70 (4.5%); 56 (8.9%); 44 (7.5%).

3-(2-morpholinoethyl)-2-phenyl-2,3-dihydro-4*H*-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

5Ab

Yield: 81%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.06 (dd, 1H, H7, Ar, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz); 7.23-7.10 (m, 7H, H9, H10, H18, H19, H20, Ar); 7.01 (dd, 1H, H8, Ar, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 1.1 Hz) 5.89 (s, 1H, H2,); 4.18 (dt, 1H, H11a, ²*J* = 13.9 Hz, ³*J* = 5.8 Hz); 3.65-3.54 (m, 4H, H15); 3.24 (dt, 1H, H11b, ²*J* = 13.9 Hz, ³*J* = 6.4 Hz); 2.68-2.48 (m, 2H, H12a, H12b); 2.45-2.37 (m, 4H, H14). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.9 (C4); 139.1 (Ar); 132.9 (Ar); 131.9 (Ar); 129.8 (Ar); 129.1 (Ar); 128.4 (Ar);

128.1 (Ar); 127.4 (Ar); 126.2 (Ar); 126.2 (Ar); 67.0 (C15); 62.5 (C2); 57.1 (C12); 53.7 (C14); 45.3 (C11). MS *m/z*: 354 (M^+ , 2.9%); 281 (4.6%); 207 (2.4%); 191 (1.6%); 113 (40.9%); 100 (100.0%); 91 (8.3%); 70 (4.8%); 56 (10.9%); 44 (7.7%).

3-(2-morpholinoethyl)-2-(*p*-tolyl)-2,3-dihydro-4*H*-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

5Ac

Yield: 81%; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz): 8.12 (dd, 1H, H7, Ar, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.3 Hz); 7.27 (td, 1H, H9, Ar, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.4 Hz); 7.21 (td, 1H, H10, Ar, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.1 Hz); 7.14 (d, 2H, H19, 3J = 8.1 Hz); 7.08 (d, 1H, H8, Ar, 3J = 7.7 Hz); 7.03 (d, 2H, H18, 3J = 8.0 Hz); 5.94 (s, 1H, H2); 4.26 (dt, 1H, H11a, 2J = 13.9 Hz, 3J = 5.9 Hz); 3.69-3.59 (m, 4H, H15); 3.31 (dt, 1H, H11b, 2J = 13.8 Hz, 3J = 6.8 Hz); 2.74 (dt, 1H, H12a, 2J = 13.5 Hz, 3J = 6.9 Hz); 2.64 (dt, 1H, H12b, 2J = 12.8 Hz, 3J = 5.8 Hz); 2.52 (s, 4H, H14); 2.25 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 164.0 (C4); 138.0 (Ar); 135.9 (Ar); 133.0 (Ar); 131.9 (Ar); 129.7 (Ar); 129.0 (Ar); 129.0 (Ar); 127.4 (Ar); 126.1 (Ar); 126.0 (Ar); 66.7 (C15); 62.4 (C2); 56.9 (C12); 53.6 (C14); 45.2 (C11); 20.9 (CH_3). MS *m/z*: 368 (M^+ , 2.9 %); 254 (3.3%); 136 (4.0%); 113 (42.7%); 98 (5.2%); 100 (100.0%); 70 (6.1%); 56 (10.9%); 42 (3.8%).

3-(2-morpholinoethyl)-2-(4-nitrophenyl)-2,3-dihydro-4*H*-benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Ad**

Yield: 79%; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz): 8.13 (dd, 1H, H7, Ar, 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.4 Hz); 8.08 (d, 2H, H19, 3J = 8.8 Hz); 7.31 (td, 1H, H9, Ar, 3J = 7.6 Hz, 4J = 1.5 Hz); 7.25 (td, 1H, H10, Ar, 3J = 7.7 Hz, 4J = 1.2 Hz); 7.09 (dd, 1H, H8, Ar, 3J = 7.7 Hz, 4J = 0.9 Hz); 7.46 (d, 2H, H18, 3J = 8.7 Hz); 6.11 (s, 1H, H2); 4.27 (dt, 1H, H11a, 2J = 14.1 Hz, 3J = 5.5 Hz); 3.67 (dtd, 4H, H15, 2J = 15.5 Hz, 2J = 10.9 Hz, 3J = 4.5 Hz); 3.40 (ddd, 1H, H11b, 2J = 13.6 Hz, 3J = 7.5 Hz, 3J = 5.4 Hz); 2.78 (dt, 1H, H12a, 2J = 13.1 Hz, 3J = 7.4 Hz, 3J = 5.4 Hz); 2.68 (dt, 1H, H12b, 2J = 13.2 Hz, 3J = 5.4 Hz); 2.55 (s, 4H, H14). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 163.7 (C4); 147.4 (C20); 146.7 (Ar); 132.3 (Ar); 131.9 (Ar); 129.9 (Ar); 128.9 (C17); 127.6 (Ar); 127.0 (Ar); 126.7 (Ar); 123.5 (Ar); 66.7 (C15); 61.9 (C2); 57.1 (C12); 53.6 (C14); 45.4 (C11). MS *m/z*: 399 (M^+ , 2.6%); 313 (0.4%); 286 (0.5%); 245 (0.1%); 136 (3.6%); 113 (17.4%); 100 (100.0%); 90 (2.0%); 70 (3.4%); 56 (8.8%); 42 (2.1%).

2-(4-methoxyphenyl)-3-(2-morpholinoethyl)-2,3-dihydro-4*H*-benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Ae**

Yield: 50%; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz): 8.12 (d, 1H, H7, Ar, 3J = 7.8 Hz); 7.28 (td, 1H, H9, Ar, 3J = 7.5 Hz, 4J = 1.5 Hz); 7.21 (t, 1H, H10, Ar, 3J = 7.6

Hz); 7.18 (d, 2H, H19, Ar, $^3J = 8.7$ Hz); 7.09 (d, 1H, H8, Ar, $^3J = 7.7$ Hz); 6.75 (d, 2H, H18, Ar, $^3J = 8.7$ Hz); 5.94 (s, 1H, H2); 4.25 (dt, 1H, H11a, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 5.9$ Hz); 3.72 (s, 3H, OCH₃); 3.72-3.66 (m, 4H, H15); 3.33 (dt, 1H, H11b, $^2J = 13.8$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz); 2.74 (dt, 1H, H12a, $^2J = 13.4$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz); 2.64 (dt, 1H, H12b, $^2J = 12.8$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz); 2.53 (s, 4H, H14). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 164.0 (C4); 159.4 (Ar); 131.9 (Ar); 130.8 (Ar); 129.7 (Ar); 127.4 (Ar); 127.4 (Ar); 126.0 (Ar); 113.7 (Ar); 66.7 (C15); 62.2 (C2); 56.9 (C12); 55.1 (OCH₃); 53.6 (C14); 45.1 (C11). MS m/z : 384 (M⁺, 4.4%); 351 (0.6%); 270 (6.0%); 245 (0.1%); 113 (38.0%); 121 (11.5%); 100 (100.0%); 91 (2.2%); 70 (4.5%); 56 (11.1%); 42 (2.2%).

2-(4-fluorophenyl)-3-(2-morpholinoethyl)-2,3-dihydro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Af**

Yield: 88%; ^1H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz): 8.12 (dd, 1H, H7, Ar, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz); 7.28 (td, 1H, H9, Ar, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz); 7.25-7.20 (m, 3H, H10, H19, Ar); 7.09 (dd, 1H, H8, Ar, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz); 6.94-6.87 (m, 2H, H18, Ar); 5.96 (s, 1H, H2); 4.25 (dt, 1H, H11a, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz); 3.68 (dtd, 4H, H15, $^2J = 15.7$ Hz, $^2J = 11.1$ Hz, $^3J = 4.6$ Hz); 3.34 (dt, 1H, H11b, $^2J = 13.7$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz); 2.73 (dt, 1H, H12a, $^2J = 13.3$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz); 2.63 (dt, 1H, H12b, $^2J = 12.9$ Hz, $^3J = 5.9$ Hz); 2.52 (s, 4H, H14). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.8 (C4); 162.3 (d, C20, $^1J_{\text{C-F}} = 247.8$ Hz); 134.9 (d, C17, $^3J_{\text{C-F}} = 3.0$ Hz); 132.7 (Ar); 132.0 (Ar); 129.8 (Ar); 129.0 (Ar); 127.9 (d, C19, $^3J_{\text{C-F}} = 8.3$ Hz); 127.5 (Ar); 126.3 (Ar); 115.2 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21.8$ Hz); 61.9 (C2); 66.8 (C15); 57.0 (C12); 53.6 (C14); 45.3 (C11). MS m/z : 372 (M⁺, 5.2%); 150 (1.1%); 136 (7.9 %); 114 (8.5 %); 113 (50.0%); 109 (11.1%); 100 (100.0%); 86 (6.6%); 70 (6.2%); 56 (15.4%); 42 (3.4%).

2-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-3-(2-morpholinoethyl)-2,3-dihydro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Ag**

Yield: 78%; ^1H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz): 8.13 (d, 1H, H7, Ar, $^3J = 7.0$ Hz); 7.79 (d, 2H, H19, Ar, $^3J = 8.4$ Hz); 7.47 (d, 2H, H18, Ar, $^3J = 8.2$ Hz); 7.31 (td, 1H, H9, Ar, $^3J = 7.5$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz); 7.25 (td, 1H, H10, $^3J = 7.3$ Hz, $^4J = 0.7$ Hz); 7.09 (d, 1H, H8, Ar, $^3J = 7.5$ Hz); 6.09 (s, 1H, H2); 4.31 (dt, 1H, H11a, $^2J = 13.8$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz); 3.73-3.64 (m, 4H, H15); 3.37 (dt, 1H, H11b, $^2J = 13.9$ Hz, $^3J = 6.7$ Hz); 2.99 (s, 3H, H21); 2.80 (dt, 1H, H12a, $^2J = 13.1$ Hz, $^3J = 6.7$ Hz); 2.71 (dt, 1H, H12b, $^2J = 12.9$ Hz, $^3J = 6.2$ Hz); 2.57 (s, 4H, H14). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.7 (C4); 145.7 (Ar); 140.1 (Ar); 132.3 (Ar); 132.0 (Ar); 129.9 (Ar); 128.7 (Ar); 127.5 (Ar); 127.4 (Ar);

127.0 (Ar); 126.6 (Ar); 66.5 (C15); 61.7 (C2); 56.8 (C12); 53.5 (C14); 45.3 (C11); 44.2 (C21).

2-butyl-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-2,3-dihydro-4*H*-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

5Ba

Yield: 50%; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.07 (d, 1H, H7, Ar, ³*J* = 7.8 Hz); 7.34 (td, 1H, H9, Ar, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz); 7.23 (t, 2H, H8, H10, Ar, ³*J* = 7.6 Hz); 4.58 (dd, 1H, H2, ³*J* = 8.4 Hz, ³*J* = 6.5 Hz); 4.24 (dt, 1H, H11a, ²*J* = 13.5 Hz, ³*J* = 6.3 Hz); 3.05 (dt, 1H, H11b, ²*J* = 13.5 Hz, ³*J* = 7.1 Hz); 2.62 (dt, 1H, H12a, ²*J* = 12.6 Hz, ³*J* = 7.9 Hz); 2.56-2.34 (m, 5H, H12b, H14); 1.93 (dt, 2H, H13a, H13b, ²*J* = 13.5 Hz, ³*J* = 6.5 Hz); 1.63 (td, 4H, H15, ²*J* = 11.2 Hz, ³*J* = 5.6 Hz); 1.88-1.81 (m, 2H, H17); 1.49-1.45 (m, 2H, H18); 1.33-1.22 (m, 2H, H19); 0.86 (t, 3H, H20, ³*J* = 7.2 Hz). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 162.7 (C4); 133.9 (Ar); 131.6 (Ar); 129.8 (Ar); 129.2 (Ar); 127.7 (Ar); 125.8 (Ar); 61.3 (C2); 55.3 (C13); 54.1 (C14); 46.6 (C11); 34.5 (C17); 28.8 (C18); 25.5 (C15); 25.0 (C12); 24.1 (C16); 21.8 (C19); 13.7 (C20). MS *m/z*: 346 (M⁺, 1.3%); 290 (7.8%); 164 (3.9 %); 136 (6.5 %); 124 (6.4%); 112 (17.7%); 98 (100.0%); 84 (19.5%); 70 (6.1%); 56 (3.5%); 41 (8.3%).

2-phenyl-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-2,3-dihydro-4*H*-benzo[e][1,3]thiazin-4-one

5Bb

Yield: 52%; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.14 (dd, 1H, H7, Ar, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz); 7.28-7.19 (m, 7H, H9, H10, H18, H19, H20, Ar); 7.08 (dd, 1H, H8, Ar, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.0 Hz); 6.05 (s, 1H, H2); 4.32 (ddd, 1H, H11a, ²*J* = 13.4 Hz, ³*J* = 6.8 Hz, ³*J* = 5.3 Hz); 3.04 (dt, 1H, H11b, ²*J* = 13.5 Hz, ³*J* = 6.2 Hz); 2.64 (dt, 1H, H12a, ²*J* = 12.5 Hz, ³*J* = 8.0 Hz); 2.51-2.30 (m, 5H, H12b, H14); 2.03-1.84 (m, 2H, H13a, H13b); 1.59 (dt, 4H, H15, ²*J* = 11.1 Hz, ³*J* = 5.7 Hz); 1.45 (s, 2H, H16). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.9 (C4); 139.3 (Ar); 132.8 (Ar); 131.8 (Ar); 129.7 (Ar); 129.4 (Ar); 128.4 (Ar); 128.0 (Ar); 127.3 (Ar); 126.1 (Ar); 126.0 (Ar); 61.9 (C2); 55.3 (C13); 54.2 (C14); 46.8 (C11); 25.9 (C15); 25.1 (C12); 24.3 (C16). MS *m/z*: 366 (M⁺, 12.7%); 347 (3.4%); 289 (4.4%); 136 (5.8%); 124 (7.4%); 118 (9.1%); 112 (12.7%); 98 (100.0%); 84 (15.6%); 70 (4.3%); 55 (6.1%); 41 (6.0%).

3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-2-(*p*-tolyl)-2,3-dihydro-4*H*-benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Bc**

Yield: 43%; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.12 (dd, 1H, H7, Ar, ³*J* = 7.9 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz); 7.26 (dt, 1H, H9, Ar, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz); 7.20 (td, 1H, H10, Ar, ³*J* = 7.7 Hz, ⁴*J* = 1.2 Hz); 7.12 (d, 2H, H19, ³*J* = 8.1 Hz); 7.08 (dd, 1H, H8, Ar,

$^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 0.7$ Hz); 7.03 (d, 2H, H18, $^3J = 8.0$ Hz); 5.95 (s, 1H, H2); 4.30 (dt, 1H, H11a, $^2J = 13.3$ Hz, $^3J = 6.5$ Hz); 3.04 (dt, 1H, H11b, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz); 2.72 (dt, 1H, H12a, $^2J = 12.5$ Hz, $^3J = 7.9$ Hz); 2.47-2.56 (m, 5H, H12b, H14); 2.03-1.98 (m, 2H, H13a, H13b); 2.24 (s, 3H, CH₃); 1.67 (dt, 4H, H15, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz); 1.51-1.48 (m, 2H, H16). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 164.1 (C4); 137.9 (Ar); 135.9 (Ar); 133.0 (Ar); 131.9 (Ar); 129.6 (Ar); 129.1 (Ar); 127.4 (Ar); 126.0 (Ar); 126.0 (Ar); 61.6 (C2); 55.1 (C13); 53.9 (C14); 46.4 (C11); 25.0 (C15); 24.5 (C12); 23.8 (C16); 20.9 (CH₃). MS m/z : 380 (M⁺, 11.1%); 347 (2.6%); 289 (3.1%); 192 (0.5%); 164 (0.9%); 136 (9.3%); 112 (11.7%); 105 (11.4%); 98 (100.0%); 84 (13.7%); 70 (6.0%); 55 (6.5%); 41 (10.0%).

2-(4-nitrophenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-2,3-dihydro-4*H*-benzo[e]
[1,3]thiazin-4-one **5Bd**

Yield: 52%; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, $J_{H-H} =$ Hz): 8.12 (d, 1H, H7, Ar, $^3J = 7.9$ Hz); 8.06 (d, 2H, H19, Ar $^3J = 8.7$ Hz); 7.41 (d, 2H, H18, Ar, $^3J = 8.7$ Hz); 7.28 (t, 1H, H9, Ar, $^3J = 7.4$ Hz); 7.23 (t, 1H, H10, Ar, $^3J = 7.6$ Hz); 7.07 (d, 1H, H8, Ar, $^3J = 7.7$ Hz); 6.23 (s, 1H, H2); 4.38 (ddd, 1H, H11a, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 6.7$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz); 3.08 (dt, 1H, H11b, $^2J = 12.7$ Hz, $^3J = 7.9$ Hz); 2.78 (dt, 1H, H12a, $^2J = 12.7$ Hz, $^3J = 7.9$ Hz); 2.69-2.43 (m, 5H, H12b, H14); 2.13-1.96 (m, 2H, H13b, H13b); 1.68 (dt, 4H, H15, $^2J = 11.1$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz); 1.51-1.48 (m, 2H, H16). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.8 (C4); 146.7 (C20); 132.3 (Ar); 132.0 (Ar); 129.9 (Ar); 129.0 (Ar); 127.5 (Ar); 127.0 (Ar); 126.6 (Ar); 123.6 (Ar); 61.2 (C2); 54.9 (C13); 54.0 (C14); 46.7 (C11); 25.1 (C15); 24.5 (C12); 23.8 (C16). MS m/z : 411 (M⁺, 5.0%); 378 (0.7%); 355 (0.7%); 327 (1.4%); 281 (5.1%); 207 (14.1%); 191 (1.7%); 163 (2.2%); 136 (5.6%); 112 (9.0%); 98 (100.0%); 84 (11.6%); 70 (4.7%); 55 (5.5%); 41 (6.4%).

2-(4-methoxyphenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-2,3-dihydro-4*H*-
benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Be**

Yield: 47%; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, $J_{H-H} =$ Hz): 8.12 (dd, 1H, H7, Ar, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz); 7.27 (td, 1H, H9, Ar, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz); 7.20 (t, 1H, H10, Ar, $^3J = 7.6$ Hz); 7.15 (d, 2H, H19, Ar, $^3J = 8.8$ Hz); 7.08 (d, 1H, H8, Ar, $^3J = 7.7$ Hz); 6.75 (d, 2H, H18, Ar, $^3J = 8.7$ Hz); 5.96 (s, 1H, H2); 4.28 (dt, 1H, H11a, $^2J = 13.1$ Hz, $^3J = 6.4$ Hz); 3.79 (t, 1H, H11b, $^3J = 4.8$ Hz); 3.72 (s, 3H, OCH₃); 3.05 (dt, 1H, H12a, $^2J = 13.9$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz); 2.65 (dt, 1H, H12b, $^2J = 12.5$ Hz, $^3J = 8.0$ Hz); 2.01-1.93 (m, 2H, H13a, H13b); 2.50-2.39 (m, 4H, H14); 1.63 (dt, 4H, H15, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz); 1.46 (s, 2H, H16). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.9 (C4); 159.3 (Ar); 133.0 (Ar);

131.8 (Ar); 130.9 (Ar); 129.6 (Ar); 129.1 (Ar); 127.4 (Ar); 127.4 (Ar); 126.0 (Ar); 113.7 (Ar); 61.5 (C2); 55.3 (C13); 55.1 (OCH₃); 54.1 (C14); 46.5 (C11); 25.4 (C15); 24.8 (C12); 24.0 (C16). MS *m/z*: 396 (M⁺, 8.9%); 363 (1.9%); 312 (1.0%); 289 (2.1%); 278 (1.2%); 257 (1.5%); 136 (3.9%); 121 (9.0%); 98 (100.0%); 84 (11.6%); 70 (4.7%); 55 (4.6%); 41 (5.5%).

2-(4-fluorophenyl)-3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-2,3-dihydro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Bf**

Yield: 65%; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.12 (dd, 1H, H7, Ar, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 0.9 Hz); 7.27 (td, 1H, H9, Ar, ³*J* = 7.4 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz); 7.29-7.19 (m, 3H, H10, H19, Ar); 7.08 (d, 1H, H8, Ar, ³*J* = 7.7 Hz); 6.09 (t, 2H, H18, Ar, ³*J* = 8.6 Hz); 6.02 (s, 1H, H2); 4.30 (dt, 1H, H11a, ²*J* = 12.9 Hz, ³*J* = 6.2 Hz); 3.06 (dt, 1H, H11b, ²*J* = 13.4 Hz, ³*J* = 7.2 Hz); 2.64 (dt, 1H, H12a, ²*J* = 12.6 Hz, ³*J* = 7.9 Hz); 2.56-2.33 (m, 5H, H12b, H14); 2.00-1.89 (m, 2H, H13a, H13b); 1.61 (dt, 4H, H15, ²*J* = 11.2 Hz, ³*J* = 5.6 Hz); 1.47-1.46 (m, 2H, H16). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.8 (C4); 162.4 (d, C20, ¹*J*_{C-F} = 247.6 Hz); 135.1 (d, C17, ³*J*_{C-F} = 3.1 Hz); 132.7 (Ar); 131.9 (Ar); 129.7 (Ar); 129.2 (Ar); 127.9 (d, C19, ³*J*_{C-F} = 8.3 Hz); 127.4 (Ar); 126.2 (Ar); 115.3 (d, ²*J*_{C-F} = 21.8 Hz); 61.5 (C2); 55.2 (C13); 54.2 (C14); 46.8 (C11); 25.7 (C15); 25.0 (C12); 24.2 (C16). MS *m/z*: 384 (M⁺, 6.2%); 351 (1.8%); 289 (1.7%); 259 (1.1%); 164 (1.1%); 151 (1.0%); 136 (13.8%); 124 (6.8%); 112 (11.6%); 98 (100.0%); 84 (14.7%); 69 (4.7%); 55 (5.4%); 41 (7.8%).

2-butyl-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-2,3-dihydro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Ca**

Yield: 57%; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.07 (dd, 1H, H7, Ar, ³*J* = 8.3 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz); 7.36 (td, 1H, H9, Ar, ³*J* = 7.5 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz); 7.26 (dd, 2H, H8, H10, Ar, ²*J* = 11.2 Hz, ³*J* = 4.3 Hz); 4.63 (dd, 1H, H2, ³*J* = 9.6 Hz, ³*J* = 5.4 Hz); 4.29 (ddd, 1H, H11a, ²*J* = 13.3 Hz, ³*J* = 7.4 Hz, ³*J* = 5.6 Hz); 3.32 (dt, 1H, H11b, ²*J* = 13.6 Hz, ³*J* = 6.7 Hz); 2.60 (s, 4H, H14); 2.78-2.68 (m, 2H, H12a, H12b); 1.97-1.79 (m, 2H, H17); 1.72-1.61 (m, 4H, H15); 1.50-1.39 (m, 2H, H18); 1.33-1.22 (m, 2H, H19); 0.86 (t, 3H, H20, ³*J* = 7.2 Hz). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 162.7 (C4); 134.1 (Ar); 131.7 (Ar); 129.8 (Ar); 129.0 (Ar); 127.8 (Ar); 125.8 (Ar); 61.8 (C2); 54.7 (C14); 57.1 (C12); 45.7 (C11); 34.5 (C17); 28.9 (C18); 25.5 (C15); 23.8 (C16); 21.9 (C19); 13.8 (C20). MS *m/z*: 332 (M⁺, 0.8%); 304 (0.1%); 276 (0.5%); 248 (0.9%); 192 (0.4%); 136 (2.2%); 111 (35.2%); 112 (7.0%); 98 (100.0%); 84 (3.6%); 70 (4.4%); 55 (7.4%); 42 (7.7%).

2-phenyl-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-2,3-dihydro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Cb**

Yield: 62%; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.15 (dd, 1H, H7, Ar, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz); 7.30-7.20 (m, 7H, H9, H10, H18, H19, H20, Ar); 7.10 (d, 1H, H8, Ar, ³*J* = 7.7 Hz); 6.09 (s, 1H, H2); 4.38 (dt, 1H, H11a, ²*J* = 13.7 Hz, ³*J* = 5.8 Hz); 3.28 (dt, 1H, H11b, ²*J* = 13.9 Hz, ³*J* = 7.1 Hz); 2.83 (dt, 1H, H12a, ²*J* = 12.7 Hz, ³*J* = 6.8 Hz); 2.69 (ddd, 1H, H12b, ²*J* = 12.5 Hz, ³*J* = 7.0 Hz, ³*J* = 5.3 Hz); 2.56 (s, 4H, H14); 1.71-1.52 (m, 4H, H15); 1.55-1.43 (m, 2H, H16). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.9 (C4); 139.1 (Ar); 133.0 (Ar); 131.9 (Ar); 129.0 (Ar); 128.3 (Ar); 128.0 (Ar); 127.4 (Ar); 126.1 (Ar); 62.1 (C2); 56.8 (C12); 54.4 (C14); 45.3 (C11); 25.4 (C15); 23.8 (C16). MS *m/z*: 352 (M⁺, 2.8%); 268 (0.6%); 136 (3.8%); 112 (4.6%); 111 (21.9%); 98 (100.0%); 84 (7.2%); 70 (4.1%); 55 (5.5%); 44 (6.4%).

3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-2-(*p*-tolyl)-2,3-dihydro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Cc**

Yield: 61%; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.12 (dd, 1H, H7, Ar, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz); 7.26 (dt, 1H, H9, Ar, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz); 7.20 (td, 1H, H10, Ar, ³*J* = 7.7 Hz, ⁴*J* = 1.2 Hz); 7.12 (d, 2H, H19, ³*J* = 8.1 Hz); 7.08 (dd, 1H, H8, Ar, ³*J* = 7.7 Hz, ⁴*J* = 0.8 Hz); 7.03 (d, 2H, H18, ³*J* = 8.0 Hz); 6.03 (s, 1H, H2); 4.34 (dt, 1H, H11a, ²*J* = 13.4 Hz, ³*J* = 7.4 Hz); 3.26 (dt, 1H, H11b, ²*J* = 14.0 Hz, ³*J* = 7.1 Hz); 2.80 (dt, 1H, H12a, ²*J* = 12.7 Hz, ³*J* = 7.1 Hz); 2.67 (ddd, 1H, H12b, ²*J* = 12.6 Hz, ³*J* = 7.2 Hz, ³*J* = 5.2 Hz); 2.57 (s, 4H, H14); 2.25 (s, 3H, CH₃); 1.67-1.57 (m, 4H, H15); 1.44-1.48 (m, 2H, H16). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.9 (C4); 137.9 (Ar); 136.0 (Ar); 133.2 (Ar); 131.9 (Ar); 129.7 (Ar); 129.0 (Ar); 129.0 (Ar); 127.4 (Ar); 126.0 (Ar); 126.0 (Ar); 62.1 (C2); 56.8 (C12); 54.4 (C14); 45.3 (C11); 25.4 (C15); 23.8 (C16); 20.9 (CH₃). MS *m/z*: 366 (M⁺, 3.1%); 282 (0.6%); 136 (2.3%); 112 (6.6%); 111 (23.7%); 98 (100.0%); 84 (8.7%); 70 (4.0%); 55 (5.5%); 44 (4.2%).

2-(4-nitrophenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-2,3-dihydro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Cd**

Yield: 93%; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H} = Hz): 8.12 (dd, 1H, H7, Ar, ³*J* = 7.8 Hz, ³*J* = 1.3 Hz); 8.06 (d, 2H, H19, Ar, ³*J* = 8.8 Hz); 7.42 (d, 2H, H18, Ar, ³*J* = 8.7 Hz); 7.28 (td, 1H, H9, Ar, ³*J* = 7.5 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz); 7.22 (dd, 1H, H10, Ar, ²*J* = 11.0 Hz, ³*J* = 4.1 Hz); 7.07 (d, 1H, H8, Ar, ³*J* = 7.6 Hz); 6.27 (s, 1H, H2); 4.29 (dt, 1H, H11a, ²*J* = 14.0 Hz, ³*J* = 5.5 Hz); 3.28 (dt, 1H, H11b, ²*J* = 13.9 Hz, ³*J* = 5.9 Hz); 2.77 (ddd, 1H, H12a, ²*J* = 13.2 Hz, ³*J* = 7.3 Hz, ³*J* = 5.9 Hz); 2.64 (dt, 1H, H12b, ²*J* = 11.2 Hz, ³*J* = 5.5

Hz); 2.48 (s, 4H, H14); 1.63-1.47 (m, 4H, H16); 1.44 (m, 2H, H16, $^2J = 11.3$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 163.7 (C4); 147.5 (C20); 147.07 (Ar); 132.2 (Ar); 132.2 (Ar); 129.9 (Ar); 129.1 (Ar); 127.0 (Ar); 126.6 (Ar); 123.4 (Ar); 61.2 (C2); 54.9 (C13); 54.0 (C14); 46.7 (C11); 25.1 (C15); 24.5 (C12); 23.8 (C16). MS m/z : 397 (M^+ , 1.7%); 267 (0.3%); 163 (1.2%); 136 (3.5%); 111 (7.5%); 98 (100.0%); 70 (4.6%); 55 (5.3%); 44 (3.5%).

2-(4-methoxyphenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-2,3-dihydro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Ce**

Yield: 72%; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-H}} = \text{Hz}$): 8.13 (dd, 1H, H7, Ar, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz); 7.27 (td, 1H, H9, Ar, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz); 7.21 (td, 1H, H10, Ar, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz); 7.17 (d, 2H, H19, Ar, $^3J = 8.7$ Hz); 7.09 (dd, 1H, H8, Ar, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 0.8$ Hz); 6.75 (d, 2H, H18, Ar, $^3J = 8.8$ Hz); 6.03 (s, 1H, H2); 4.31 (ddd, 1H, H11a, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, $^3J = 5.1$ Hz); 3.26 (dt, 1H, H11b, $^2J = 13.9$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz); 3.73 (s, 3H, OCH_3); 2.74 (ddd, 1H, H12a, $^2J = 12.9$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz); 2.62 (dt, 1H, H12b, $^2J = 12.8$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz); 2.49 (s, 4H, H14); 1.67-1.53 (m, 4H, H15); 1.50-1.40 (s, 2H, H16). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 163.9 (C4); 159.3 (Ar); 133.2 (Ar); 131.8 (Ar); 131.0 (Ar); 129.7 (Ar); 129.0 (Ar); 127.4 (Ar); 127.4 (Ar); 126.0 (Ar); 113.7 (Ar); 62.0 (C2); 57.2 (C12); 55.1 (OCH_3); 54.6 (C14); 45.3 (C11); 25.7 (C15); 24.0 (C16). MS m/z : 382 (M^+ , 5.2%); 349 (0.3%); 243 (0.9%); 136 (1.8%); 121 (6.1%); 111 (24.8%); 98 (100.0%); 84 (10.1%); 70 (3.9%); 55 (6.2%); 44 (3.1%).

2-(4-fluorophenyl)-3-(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-2,3-dihydro-4H-benzo[e][1,3]thiazin-4-one **5Cf**

Yield: 88%; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-H}} = \text{Hz}$): 8.12 (dd, 1H, H7, Ar, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz); 7.28-7.25 (m, 1H, H9, Ar); 7.24-7.17 (m, 3H, H10, H19, Ar); 7.08 (d, 1H, H8, Ar, $^3J = 7.7$ Hz); 6.89 (t, 2H, H18, Ar, $^3J = 8.6$ Hz); 6.08 (s, 1H, H2); 4.29 (dt, 1H, H11a, $^2J = 13.7$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz); 3.26 (dt, 1H, H11b, $^2J = 13.8$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz); 2.72 (ddd, 1H, H12a, $^2J = 12.9$ Hz, $^3J = 7.2$ Hz, $^3J = 6.3$ Hz); 2.59 (dt, 1H, H12b, $^2J = 12.9$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz); 1.61 (s, 4H, H14); 1.46-1.39 (m, 2H, H16). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 163.8 (C4); 162.3 (d, C20, $^1J_{\text{C-F}} = 247.6$ Hz); 135.1 (d, C17, $^3J_{\text{C-F}} = 3.2$ Hz); 132.9 (Ar); 131.9 (Ar); 129.8 (Ar); 129.2 (Ar); 127.9 (d, C19, $^3J_{\text{C-F}} = 8.3$ Hz); 127.4 (Ar); 126.2 (Ar); 115.2 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21.8$ Hz); 61.8 (C2); 57.5 (C12); 54.7 (C14); 45.5 (C11); 25.9 (C15); 24.1 (C16). MS m/z : 370 (M^+ , 1.8%); 286 (0.5%); 136 (3.3%); 123 (0.8%); 111 (15.8%); 98 (100.0%); 70 (3.8%); 55 (5.3%); 44 (3.8%).

Animals

Rats male Wistar (60 day-old) were used. These animals were obtained from the Central Animal House of Universidade Federal de Pelotas (Brazil). The protocol was approved by the Ethics Committee and Animal Experimentation of the Universidade Federal de Pelotas, Brazil under the protocol number (CEEA 9220).

AChE enzyme assay

The cerebral cortex and hippocampus of animals was removed and homogenized in the same buffer 10mM Tris HCl (pH 7.4). The compounds are solubilized in methanol and introduced in the enzymatic assay at final concentrations of 1, 5, 10, 25, 50, 100 and 250 μ M. The AChE activity was determined according to the method of ELMANN et al. (1961). The principle of the technique was based on the hydrolysis of acetylcholine into two products, acetate and thiocholine. Thiocholine reacts with 5,5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to form 5-thio-2-nitrobenzoic acid which is quantified spectrophotometrically at 412 nm. The enzymatic activity was expressed in μ mol of AcSCh/ h/ mg protein. The proteins were determined by Bradford method (1976) using Coomassie Blue Reagent, bovine albumin was used as standard.

Cytotoxicity assay

The cultures of MRC-5 (human fibroblast) were treated with benzothiazinones (**5Ag**, **5Ba**, **5Bc**, **5Bd**, **5Bf**, **5Cc**, **5Cd**) to determine cell proliferation, according to the method of SKEHAN et al. (1990). After 24 h, the cells were washed and added trichloroacetic acid 50% for 45 min in the fridge for cell fixation. After, were carried out 5 washes with distilled water to full removal of the acid. A solution of B sulfarodamina (SRB) 0.4% acetic acid was added followed by a 30 minute incubation to stain proteins. Then, washings were made 5 of the wells with 1% acetic acid for complete removal of uncomplexed dye with proteins. Finally, the plates were solubilized with Tris solution at 10 mM and then read in a spectrophotometer at a wavelength of 530 nm. B sulforodamina binds to the amino terminal portions of the cells that were fixed with trichloroacetic acid, which is quantified spectrophotometrically. The results are presented in percentage of cell proliferation, considering the proliferation of the DMSO control group as 100%.

Statistical analysis

Data were analyzed by using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons in the softwares Graphpad Prism 5 or Statistics 8. Furthermore, all data were expressed as mean $\pm$ standard error and the differences between mean values were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results and Discussion

Benzothiazinones derivatives have attracted continuing interest over the years because of their diverse biological activities, see review MAHESHWARI 2015. A literature survey reveals that several benzothiazin-4-ones have been prepared based on different synthetic routes as reported by ZARGHI et al., 2009, which used the *p*-toluenesulfonic acid catalyst in toluene reflux, sodium sulfate in dioxane (KAMEL et al., 2010) or dicyclohexylcarbodiimide catalysis (ZHOU et al., 2008, Srivastava, et al., 2002). In study reported by Silverberg et al. 2015, two equivalents of 2,4,6-tripropyl-1,3,5,2,4,6-trioxatrimphosphino-2,4,6-trioxide (T3P) and four equivalents of pyridine to form an amide was that was applied to the *N*-benzylidene-aniline reaction with thiosalicylic acid to successful formation of the benzothiazinone ring.

In this work, the compounds were synthesized using the thermal heating methodology, according to reaction conditions described by GOUVEA et al., (2016). For this purpose, all reactions were monitored by TLC and/or GC analysis. Novel nineteen 1,3 -benzothiazin-4-ones (**5Aa-g**, **5Ba-f** and **5Ca-f**) were synthesized from one-pot reactions between different amines **1A-C**, different aldehydes **2a-g** and thiosalicylic acid **4** (Scheme 1). All reactions were realized in toluene refluxing using a Dean-Stark apparatus for water removal by azeotropic distillation.

All compounds were obtained in regular to good yields and have been properly purified and characterized. In general, the yields obtained after purification varied from moderate to excellent and the methodologies were considerate efficient, in view of the obtaining of all proposed products.

$$\begin{array}{c}
 \text{R}^1\text{-NH}_2 + \text{R}^2\text{-CHO} \xrightarrow{i.} \left[\text{R}^1\text{-N}=\text{CH}-\text{R}^2 \right] \xrightarrow{ii.} \text{Product} \\
 \text{1A-C} \qquad \text{2a-g} \qquad \qquad \text{3a-g} \qquad \qquad \text{4} \qquad \qquad \text{5Aa-g, 5Ba-f, 5Ca-f}
 \end{array}$$

i. Toluene, 50 °C, 15 min.
ii. reflux, 5 h.

$\text{R}^1 =$

A **B** **C**

$\text{R}^2 =$

a **b** **c** **d** **e** **f** **g**

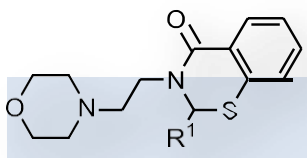
After the synthesis, we explore the potential AChE inhibitory activity of all benzothiazinones. For this purpose, it was used hippocampus and cerebral cortex of rats, structures which play an important role in cognitive functions. Compounds **5Aa-g**, **5Ba-f** and **5Ca-f** were solubilized in methanol and placed in enzyme assays at final concentrations of 1, 5, 10, 25, 50, 100 and 250 μM . Firstly, it emphasized that the methanol did not reveal any AChE inhibition compared to water control.

41

obtained results. These tables shows the lower concentration of each compound that presented AChE inhibition ($p < 0,05$) in cortex and hippocampus of rats.

Analysing Table 1, it was verified that only **5Ad** and **5Ag** revealed inhibitory activity at 100 μM , both in cortex and hippocampus. Therefore, in general, benzothiazinones **A** did not demonstrated good inhibitory potential.

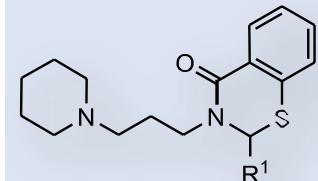
Table 1. In vitro AChE inhibitory activity of benzothiazinone **A**.

In vitro AChE inhibitory activity of Benzothiazinones A - Active concentration (% of inhibiton) *				
Structure	Compound	R ¹	Brain structure	
			Cerebral cortex	Hippocampus
	5Aa	n-Bu	>250 μM	>250 μM
	5Ab	Phenyl	>250 μM	>250 μM
	5Ac	4-methylphenyl	>250 μM	>250 μM
	5Ad	4-nitrophenyl	100 μM (24.94%)	100 μM (46.41%)
	5Ae	4-metoxiphenyl	>250 μM	>250 μM
	5Af	4-fluorophenyl	>250 μM	>250 μM
	5Ag	4-methylsulfonylphenyl	100 μM (35.49%)	100 μM (28.93%)

*Lower concentration tested with significant activity in ANOVA, considering $p < 0,05$, (percentage of AChE inhibition).

On the other hand, Table 2 revelead that all benzothiazinones **B** presented significant AChE inhibition. Benzothiazinones **5Ba** and **5Bd** stood out and presented the best activities of the series. Analysing the lower active concentrations, in hippocampus, **5Ba** presented 46.16% of inhibition at 100 μM and in cerebral cortex, **5Ba** presented 27.12% at 10 μM . Compound **5Bd** presented good activity at 50 μM , with 50.04% of inhibition in hippocampus and 47,17% at 10 μM in cerebral cortex. In general, these compounds presented better results in cortex than hippocampus.

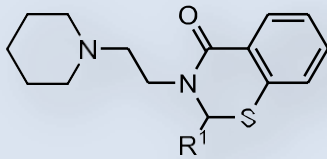
Table 2. In vitro AChE inhibitory activity of benzothiazinone **B**.

In vitro AChE inhibitory activity of Benzothiazinones B - Active concentration (% of inhibiton)*				
Structure	Compound	R	Brain structure	
			Cerebral cortex	Hippocampus
	5Ba	n-Bu	10 μM (27.12%)	100 μM (46.16%)
	5Bb	Phenyl	50 μM (25.95%)	250 μM (36.52%)
	5Bc	4-methylphenyl	50 μM (27.82%)	250 μM (48.37%)
	5Bd	4-nitrophenyl	10 μM (47.17%)	50 μM (50.04%)
	5Be	4-metoxiphenyl	100 μM (39.95%)	250 μM (45.82%)
	5Bf	4-fluorophenyl	100 μM (23.78%)	100 μM (58.22%)

*Lower concentration tested with significant activity in ANOVA, considering $p < 0,05$, (percentage of AChE inhibition).

According Table 3, all benzothiazinones **C** presented AChE inhibition. It is important to highlight that **5Cd** shows the best enzyme inhibition of compounds **C** presenting activity at 25 μ M in cortex and at 100 μ M in hippocampus.

Table 3. In vitro AChE inhibitory activity of benzothiazinone **C**.

In vitro AChE inhibitory activity of Benzothiazinones C - Active concentration (% of inhibition) *				
Structure	Compound	R	Brain structure	
			Cerebral cortex	Hippocampus
	5Ca	n-Bu	100 μ M (32.57%)	100 μ M (34.54%)
	5Cb	phenyl	250 μ M (37.09%)	100 μ M (34.42%)
	5Cc	4-methylphenyl	50 μ M (28.40%)	250 μ M (35.18%)
	5Cd	4-nitrophenyl	25 μ M (30.68%)	100 μ M (32.77%)
	5Ce	4-metoxiphenyl	100 μ M (33.85%)	250 μ M (39.04%)
	5Cf	4-fluorophenyl	250 μ M (39.06%)	>250 μ M

*Lower concentration tested with significant activity in ANOVA, considering $p < 0,05$, (percentage of AChE inhibition).

Therefore, the best results of all synthesized compounds was verified with compounds **5Ba**, **5Bd** and **5Cd**, and its results in cerebral cortex and hippocampus was demonstrated in Figure 1.

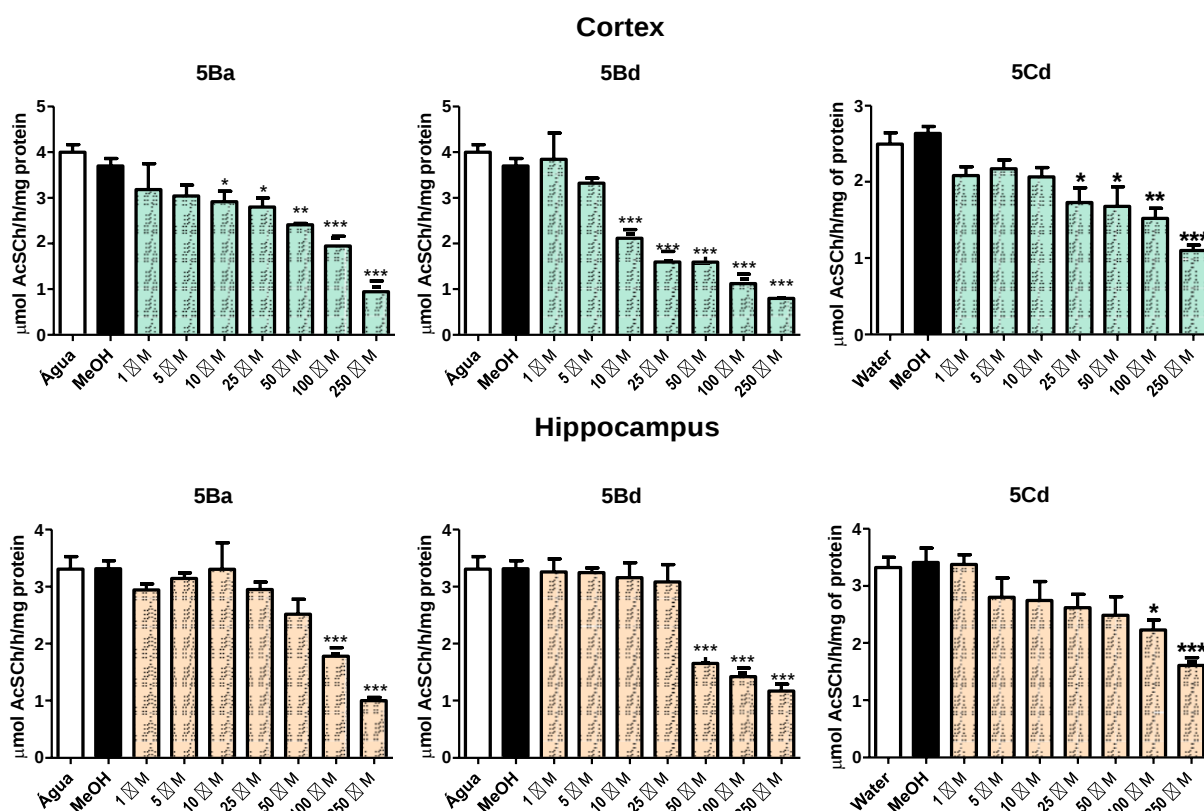


Figure 1. In vitro effect of **5Ba**, **5Bd** and **5Cd** in the acetylcholinesterase activity in rat cerebral cortex and hippocampus. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to the water control group ($n = 4-5$).

Analysing the structure-activity relationship, compounds **5A**, derived from aminoethylmorpholine, did not present expressive inhibition rates, when compared to **5B** (derived from 1-(3-aminopropyl)piperidine) and **5C** (derived from 1-(2-aminoethyl)piperidine). Therefore, the oxygen atom in morpholine ring apparently reduces the inhibitory potential of compounds. Thus, the compounds **5B** demonstrated better activity than **5C**. This fact shows that the extent of carbon chain between nitrogens of piperidine and benzothiazinone rings is important once a propylene moiety of compounds **5B** improve the activity.

Assessing the different aldehydes varied in the synthesis, the compounds with the best activity (**5Ba**, **5Bd** and **5Cd**) were derived from valeraldehyde **a** and 4-nitrobenzaldehyde **d**. However, compounds **5Bb**, **5Bc** and **5Cc**, that were derived from benzaldehyde **b** and *p*-tolualdehyde **c**, also presented good results in cerebral cortex. Thus, the type of aldehyde did not show significant change to activity and new studies are necessary to confirm and establish the structure-relationship of this part of the molecules.

Finally, to evaluate the cytotoxic effect of benzothiazinones, it was selected seven compounds that presented the best results of AChE inhibition, and was realized B sulfarodamine test. It can be noted in Figure 2, that **5Ag** did not present cytotoxicity at any tested concentrations in human fibroblasts cells compared to DMSO control. It is important to emphasize the obtained results with compounds **5Ba** and **5Bd**, in view of its were the best active compounds in enzyme inhibition assay.

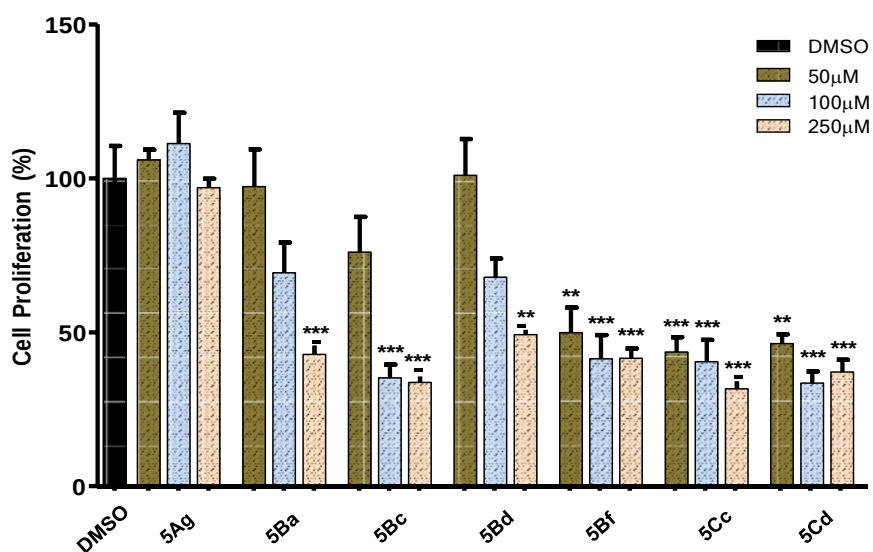


Figure 2. Cytotoxicity of benzothiazinones (**5Ag**, **5Ba**, **5Bc**, **5Bd**, **5Bf**, **5Cc** and **5Cd**) in MCR-5, human fibroblast cell. The results were expressed at percentage of cell proliferation, considering DMSO control group as 100%. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

These compounds were active at 10 μM and did not show cytotoxicity at 100 μM . The other four tested compounds, including **5Cd**, showed toxicity at the lowest concentration tested, 50 μM . Therefore, the benzothiazinones appear like good compounds to enzyme inhibition, and the obtained results encourage the sequence of the studies, with different analysis to determine the structure-activity relationship and the correct mechanism of action.

4. Conclusions

In summary, novel benzothiazin-4-ones were efficiently synthesized by one-pot reaction in good yields through conventional heating methodology. The compounds were fully characterized by ^1H , ^{13}C NMR and by GC-MS. In addition, two benzothiazin-4-ones (**5Ba** and **5Bd**) showed the most significant results in vitro anticholinesterase activity at a concentration of 10 μM . Even **5Ba** than **5Bd**, the best active compounds in AChE assay, revealed a good cytotoxicity profile, due to did not show cytotoxicity at 100 μM .

The difference in results between different substances consists of benzothiazinone substituents attached to the ring, conferring different pharmacological properties. These preliminary results encourage further investigation on heterocyclic benzothiazinones aiming to the development of new potent anticholinesterase agent. Lastly, studies are needed to evaluate correctly mechanism of AChE inhibition and study the pharmacophore core.

5. Supplementary Information

The supplementary information contains a table with vitro effect of the acetylcholinesterase activity in rat cerebral cortex and hippocampus, the GC-MS and ^1H and ^{13}C NMR spectra of all synthesized compounds and HRMS spectrum of **5Ab**.

6. Acknowledgements

The authors thank Universidade Federal de Pelotas (UFPEl) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (proc. 11/2068-7) for financial support. Fellowships granted to G.A.B. by CAPES/FAPERGS and W.C. and R.M.S. by CNPq.

7. References

1. FIGUEIREDO, J. A.; ISMAEL, M. I.; PINHEIRO, J. M.; SILVA, A. M. S.; JUSTINO, J.; SILVA, F. V. M.; GOULART, M.; MIRA, D.; ARAÚJO, M. E. M.; CAMPOY, R.; RAUTER, A. P. Facile synthesis of oxo-/thioxopyrimidines and tetrazoles C-C linked to sugars as novel non-toxic antioxidant acetylcholinesterase inhibitors. **Carbohydrate Research**, v. 347, p. 47-54, 2012.
2. XIE, S. S.; WANG, X. B.; LI, J. Y.; YANG, L.; KONG, L. Y. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64; p. 50-53, 2013.
3. GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M, G. A Century of Alzheimer's Disease. **Science**, v. 314, p. 777-781, 2006.
4. MARTOCCHIA, A.; FALASCHI, P. Current Strategies of Therapy in Alzheimer's Disease. **The Open Neuropsychopharmacology Journal**, v. 1, p. 19-23, 2008.
5. TEIPEL, S.; HEINSEN, H.; AMARO, E.; GRINBERG, L. T.; KRAUSE, B.; GROTHE M. Cholinergic basal forebrain atrophy predicts amyloid burden in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 35, p. 482-491, 2014.
6. TALESA, V. N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 122, p. 1961-1969, 2001.
7. KULSHRESHTHA, A.; PIPLANI, P. Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. **Neurological Sciences**, v. 37; p. 1403-1435, 2016.
8. ANAND, P.; SINGH, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, p. 375-399, 2013.
9. KLIMOVA, B.; MARESOVA, P.; VALIS, M.; HORT, J.; KUČA, K. Alzheimer's disease and language impairments: social intervention and medical treatment. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p. 1401-1408, 2015.
10. NIKALJE, A. P.; SHAIKH, A. N.; SHAIKH, S. I.; KHAN, F. A.; SANGSHETTI, J. N.; SHINDE, D. B. Microwave assisted synthesis and docking study of N-(2-oxo-2-(4-oxo-2-substituted thiazolidin-3-ylamino)ethyl)benzamide derivatives as anticonvulsant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 5558-5562, 2014.

11. HEBDA, M.; BAJDA, M.; WIĘCKOWSKA, A.; SZALAŁAJ, N.; PASIEKA, A.; PANEK, D.; GODYŃ, J.; WICHUR, T.; KNEZ, D.; GOBEC, S.; MALAWSKA, B. Synthesis, Molecular Modelling and Biological Evaluation of Novel Heterodimeric, Multiple Ligands Targeting Cholinesterases and Amyloid Beta. **Molecules**, v. 26, p. 410, 2016.
12. SILVERBERG, L. J.; PACHECO, C. N.; LAGALANTE, A.; CANNON, K. C.; BACHERT, J. T.; XIE, Y.; BAKER, L.; BAYLIFF, J. A. Synthesis and Spectroscopic Properties of 2,3-Diphenyl-1,3-thiaza-4-one Heterocycles. **International Journal of Chemistry**, v. 7, 2015.
13. ROY, K. K.; TOTA, S.; TRIPATHI, T.; CHANDER, S.; NATH, C.; SAXENA, A. K. Lead optimization studies towards the discovery of novel carbamates as potent AChE inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1613-1620, 2012.
14. LI, A. R.; ZHANG, J.; GREENBERG, J.; LEE, T.; LIU, J. Discovery of non-glucoside SGLT2 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 2472-2475, 2011.
15. SHAIKH, M. H.; SUBHEDAR, D. D.; ARKILE, M.; KHEDKAR, V. M.; JADHAV, N.; SARKAR, D.; SHINGATE, B. B. Synthesis and bioactivity of novel triazole incorporated benzothiazinone derivatives as antitubercular and antioxidant agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 561-569, 2016.
16. ELMANN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.
17. MAHESHWARI, M.; GOYAL, A. A review: synthesis and medicinal importance of 1,4-benzothiazine analogs. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, p. 41-46, 2015.
18. SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.
19. ZARGHI, A.; ZEBARDAST, T.; DARAIE, B.; HEDAYATI, M. Design and synthesis of new 1,3-benzothiazin-4-one derivatives as selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 5369-5373, 2009.

- 20.KAMEL, M. M.; ALI, H. I.; ANWAR, M. M.; MOHAMED, N. A.; SOLIMAN, A. M. M. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel Sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 572-580, 2010.
- 21.ZHOU, H.; LIU, A.; LI, X.; MA, X.; FENG, W.; ZHANG, W.; YAN, B. Microwave-Assisted Fluorous Synthesis of 2-Aryl-Substituted 4-Thiazolidinone and 4-Thiazinanone Libraries. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 10, p. 303- 312, 2008.

Supplementary Material

Synthesis, acetylcholinesterase inhibition and cytotoxicity activity of 1,3-benzothiazin-4-ones from 4-(2-aminoethyl)morpholine, *N*-(3-aminopropyl)piperidine and 1-(2-aminoethyl)piperidine

Gabriele dos Anjos Berwaldt^{a,b}, Daniela Pires Gouvêa^b, Daniel Schuch da Silva^{a,b}, Adriana Machado das Neves^{a,b}, Mayara Sandrielly Pereira Soares^{a,c}, Roselia Maria Spanevello^{a,c}, Geonir Machado Siqueira^{a,b}, Wilson João Cunico Filho^{a,b}

Supplementary Information

Table of Contents	Figure	Page
¹ H- and ¹³ C-NMR spectra	S01-38	52-70
HRMS spectra	S39-41	71-72
Mass spectra	S42-52	73-89

Table S1. In vitro effect of the acetylcholinesterase activity in rat cerebral cortex and hippocampus.

Benzotiazinanonon as vitro activity of the enzyme acetylcholinesterase in the hippocampus and cortex of rats										
Compound	Activity	Control (Water)	Control (Methanol)	1 μ M	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	250 μ M
5Aa	Hippocampus	3,327 $\pm$ (0,28)	3,273 $\pm$ (0,10)	2,890 $\pm$ (0,10)	2,875 $\pm$ (0,13)	2,783 $\pm$ (0,12)	2,431 $\pm$ (0,16)	2,769 $\pm$ (0,06)	2,771 $\pm$ (0,06)	2,582 $\pm$ (0,05)
	Cerebral cortex	1,663 $\pm$ (0,22)	1,765 $\pm$ (0,22)	1,717 $\pm$ (0,25)	1,595 $\pm$ (0,15)	1,708 $\pm$ (0,25)	1,557 $\pm$ (0,16)	1,805 $\pm$ (0,28)	1,570 $\pm$ (0,14)	1,482 $\pm$ (0,16)
5Ab	Hippocampus	3,327 $\pm$ (0,28)	3,273 $\pm$ (0,10)	2,974 $\pm$ (0,12)	3,003 $\pm$ (0,04)	3,067 $\pm$ (0,18)	2,954 $\pm$ (0,14)	2,956 $\pm$ (0,10)	2,873 $\pm$ (0,13)	2,622 $\pm$ (0,05)
	Cerebral cortex	1,663 $\pm$ (0,22)	1,765 $\pm$ (0,22)	1,757 $\pm$ (0,13)	1,696 $\pm$ (0,13)	1,682 $\pm$ (0,15)	1,753 $\pm$ (0,20)	1,942 $\pm$ (0,16)	1,701 $\pm$ (0,14)	1,521 $\pm$ (0,19)
5Ac	Hippocampus	3,327 $\pm$ (0,28)	3,273 $\pm$ (0,10)	2,941 $\pm$ (0,12)	3,085 $\pm$ (0,13)	2,846 $\pm$ (0,11)	2,750 $\pm$ (0,16)	2,886 $\pm$ (0,04)	2,844 $\pm$ (0,09)	2,489 $\pm$ (0,08)
	Cerebral cortex	1,663 $\pm$ (0,22)	1,765 $\pm$ (0,22)	1,707 $\pm$ (0,19)	1,671 $\pm$ (0,17)	1,798 $\pm$ (0,18)	1,692 $\pm$ (0,17)	1,639 $\pm$ (0,24)	1,677 $\pm$ (0,08)	1,255 $\pm$ (0,06)
5Ad	Hippocampus	3,327 $\pm$ (0,28)	3,273 $\pm$ (0,10)	2,984 $\pm$ (0,02)	2,996 $\pm$ (0,23)	2,814 $\pm$ (0,11)	2,442 $\pm$ (0,19)	2,506 $\pm$ (0,04)	1,783 $\pm$ (0,29) ^{***}	1,574 $\pm$ (0,03) ^{***}
	Cerebral cortex	1,663 $\pm$ (0,22)	1,765 $\pm$ (0,22)	1,650 $\pm$ (0,21)	1,726 $\pm$ (0,18)	1,622 $\pm$ (0,04)	1,586 $\pm$ (0,19)	1,539 $\pm$ (0,16)	1,276 $\pm$ (0,08)	1,011 $\pm$ (0,12) ^{***}
5Ae	Hippocampus	3,327 $\pm$ (0,28)	3,273 $\pm$ (0,10)	3,116 $\pm$ (0,03)	3,428 $\pm$ (0,15)	3,062 $\pm$ (0,12)	3,051 $\pm$ (0,24)	3,124 $\pm$ (0,04)	3,261 $\pm$ (0,14)	2,898 $\pm$ (0,21)
	Cerebral cortex	1,663 $\pm$ (0,22)	1,765 $\pm$ (0,22)	1,689 $\pm$ (0,24)	1,910 $\pm$ (0,42)	1,784 $\pm$ (0,40)	1,702 $\pm$ (0,38)	1,614 $\pm$ (0,29)	1,470 $\pm$ (0,39)	1,360 $\pm$ (0,27)
5Af	Hippocampus	3,327 $\pm$ (0,28)	3,273 $\pm$ (0,10)	3,520 $\pm$ (0,16)	2,966 $\pm$ (0,14)	2,988 $\pm$ (0,27)	2,988 $\pm$ (0,27)	3,115 $\pm$ (0,06)	3,101 $\pm$ (0,12)	2,949 $\pm$ (0,34)
	Cerebral cortex	1,663 $\pm$ (0,22)	1,765 $\pm$ (0,22)	1,478 $\pm$ (0,15)	1,656 $\pm$ (0,20)	1,745 $\pm$ (0,22)	1,696 $\pm$ (0,16)	1,671 $\pm$ (0,14)	1,477 $\pm$ (0,25)	1,322 $\pm$ (0,11)
5Ag	Hippocampus	3,327 $\pm$ (0,28)	3,273 $\pm$ (0,10)	3,059 $\pm$ (0,02)	3,118 $\pm$ (0,13)	3,118 $\pm$ (0,13)	2,938 $\pm$ (0,03)	2,752 $\pm$ (0,06)	2,365 $\pm$ (0,14) [*]	2,015 $\pm$ (0,10) ^{**}
	Cerebral cortex	1,663 $\pm$ (0,22)	1,765 $\pm$ (0,22)	1,512 $\pm$ (0,18)	1,508 $\pm$ (0,20)	1,478 $\pm$ (0,08)	1,172 $\pm$ (0,11)	1,137 $\pm$ (0,07)	1,069 $\pm$ (0,17)	0,8857 $\pm$ (0,08)
5Ba	Hippocampus	3,309 $\pm$ (0,21)	3,314 $\pm$ (0,14)	2,937 $\pm$ (0,10)	3,146 $\pm$ (0,09)	3,306 $\pm$ (0,46)	2,949 $\pm$ (0,13)	2,519 $\pm$ (0,26)	1,782 $\pm$ (0,15) ^{***}	0,9992 $\pm$ (0,05) ^{***}
	Cerebral cortex	4,000 $\pm$ (0,16)	3,703 $\pm$ (0,15)	3,179 $\pm$ (0,56)	3,037 $\pm$ (0,24)	2,915 $\pm$ (0,23) [*]	2,792 $\pm$ (0,20) [*]	2,408 $\pm$ (0,03) ^{**}	1,942 $\pm$ (0,21) ^{***}	0,9394 $\pm$ (0,23) ^{***}
5Bb	Hippocampus	3,309 $\pm$ (0,21)	3,314 $\pm$ (0,14)	3,321 $\pm$ (0,14)	3,184 $\pm$ (0,16)	3,426 $\pm$ (0,35)	3,259 $\pm$ (0,18)	2,825 $\pm$ (0,22)	2,458 $\pm$ (0,19)	2,100 $\pm$ (0,30) ^{**}
	Cerebral cortex	4,000 $\pm$ (0,16)	3,703 $\pm$ (0,15)	3,699 $\pm$ (0,38)	3,592 $\pm$ (0,40)	3,469 $\pm$ (0,24)	3,334 $\pm$ (0,16)	2,962 $\pm$ (0,12) [*]	2,231 $\pm$ (0,06) ^{***}	2,099 $\pm$ (0,09) ^{***}
5Bc	Hippocampus	3,309 $\pm$ (0,21)	3,625 $\pm$ (0,33)	3,391 $\pm$ (0,23)	3,227 $\pm$ (0,14)	3,097 $\pm$ (0,10)	2,797 $\pm$ (0,32)	2,683 $\pm$ (0,31)	2,517 $\pm$ (0,09)	1,709 $\pm$ (0,18) ^{**}
	Cerebral cortex	4,000 $\pm$ (0,16)	3,703 $\pm$ (0,15)	3,422 $\pm$ (0,24)	3,099 $\pm$ (0,68)	3,779 $\pm$ (0,24)	3,192 $\pm$ (0,15)	2,887 $\pm$ (0,25) [*]	2,486 $\pm$ (0,22) ^{***}	2,120 $\pm$ (0,12) ^{***}
5Bd	Hippocampus	3,309 $\pm$ (0,21)	3,314 $\pm$ (0,14)	3,257 $\pm$ (0,23)	3,244 $\pm$ (0,08)	3,159 $\pm$ (0,25)	3,080 $\pm$ (0,30)	1,653 $\pm$ (0,11) ^{***}	1,423 $\pm$ (0,14) ^{***}	1,169 $\pm$ (0,12) ^{***}

5Be	Cerebral cortex	4,000±(0,16)	3,703±(0,15)	3,842±(0,57)	3,321±(0,11)	2,113±(0,19) ^{***}	1,593±(0,23) ^{***}	1,590±(0,12) ^{***}	1,122±(0,20) ^{***}	0,7923±(0,10) ^{***}
	Hippocampus	3,309±(0,21)	3,625±(0,33)	3,821±(0,36)	3,182±(0,16)	3,410±(0,28)	3,192±(0,26)	2,861±(0,24)	2,741±(0,14)	1,793±(0,19) [*]
5Bf	Cerebral cortex	4,000±(0,16)	3,703±(0,15)	3,883±(0,26)	3,808±(0,40)	3,383±(0,16)	3,244±(0,30)	3,209±(0,22)	2,402±(0,25) ^{***}	1,737±(0,09) ^{***}
	Hippocampus	3,280±(0,39)	3,505±(0,52)	3,358±(0,18)	3,190±(0,27)	3,307±(0,18)	2,671±(0,17)	2,179±(0,28)	1,383±(0,28) ^{***}	0,7748±(0,16) ^{***}
5Ca	Cerebral cortex	3,709±(0,15)	3,422±(0,12)	3,400±(0,19)	3,231±(0,32)	3,212±(0,14)	3,149±(0,25)	2,925±(0,19)	2,827±(0,16) [*]	2,106±(0,08) ^{***}
	Hippocampus	3,320±(0,18)	3,410±(0,25)	3,014±(0,15)	3,017±(0,22)	2,924±(0,20)	2,962±(0,21)	2,711±(0,26)	2,173±(0,11) [*]	1,890±(0,14) ^{***}
5Cb	Cerebral cortex	2,496±(0,14)	2,637±(0,09)	2,160±(0,17)	2,284±(0,22)	2,285±(0,26)	2,101±(0,19)	1,870±(0,17)	1,683±(0,08) [*]	1,187±(0,09) ^{***}
	Hippocampus	3,320±(0,18)	3,410±(0,25)	3,007±(0,14)	2,893±(0,16)	3,020±(0,20)	2,600±(0,21)	2,781±(0,23)	2,177±(0,18) [*]	1,614±(0,13) ^{***}
5Cc	Cerebral cortex	2,496±(0,14)	2,637±(0,09)	2,489±(0,27)	2,368±(0,24)	2,298±(0,17)	2,372±(0,23)	2,419±(0,26)	2,075±(0,16)	1,570±(0,08) [*]
	Hippocampus	3,320±(0,18)	3,410±(0,25)	3,448±(0,16)	3,244±(0,21)	2,893±(0,18)	2,631±(0,18)	2,837±(0,13)	2,582±(0,18)	2,152±(0,13) ^{**}
5Cd	Cerebral cortex	2,496±(0,14)	2,637±(0,09)	2,024±(0,04)	2,158±(0,12)	2,248±(0,23)	2,071±(0,21)	1,787±(0,17) [*]	1,722±(0,15) [*]	1,395±(0,07) ^{***}
	Hippocampus	3,320±(0,18)	3,410±(0,25)	3,380±(0,16)	2,802±(0,34)	2,747±(0,33)	2,621±(0,23)	2,484±(0,32)	2,232±(0,17) [*]	1,612±(0,13) ^{***}
5Ce	Cerebral cortex	2,496±(0,14)	2,637±(0,09)	2,081±(0,11)	2,173±(0,11)	2,063±(0,12)	1,730±(0,19) [*]	1,679±(0,25) [*]	1,522±(0,13) ^{**}	1,102±(0,07) ^{***}
	Hippocampus	3,337±(0,21)	3,393±(0,29)	3,355±(0,11)	3,138±(0,26)	2,804±(0,32)	2,746±(0,21)	2,624±(0,19)	2,400±(0,15)	2,034±(0,19) [*]
5Cf	Cerebral cortex	2,496±(0,14)	2,637±(0,09)	2,461±(0,16)	2,363±(0,18)	2,579±(0,12)	1,844±(0,30)	1,842±(0,04)	1,651±(0,19) [*]	1,499±(0,20) ^{**}
	Hippocampus	3,320±(0,18)	3,410±(0,25)	3,604±(0,10)	3,480±(0,38)	3,431±(0,26)	3,293±(0,24)	3,198±(0,29)	2,975±(0,37)	2,806±(0,28)
	Cerebral cortex	2,496±(0,14)	2,637±(0,09)	2,281±(0,12)	2,257±(0,18)	2,158±(0,14)	2,119±(0,22)	2,203±(0,20)	2,097±(0,28)	1,521±(0,09) ^{**}

One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. *P <0.05, **P <0.01 and ***P <0.001 compared to the water control group (n = 4-5).

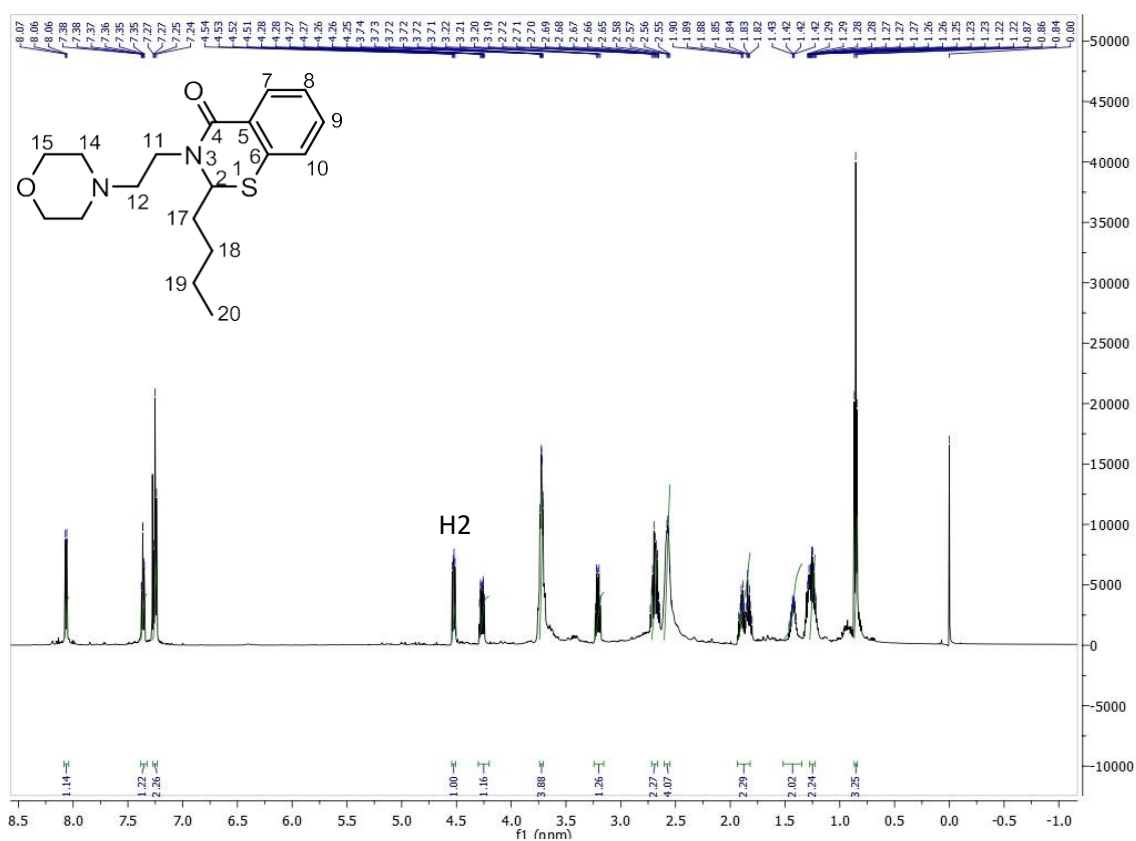


Figure S1: NMR ^1H spectrum of benzothiazin-4-one 5Aa.

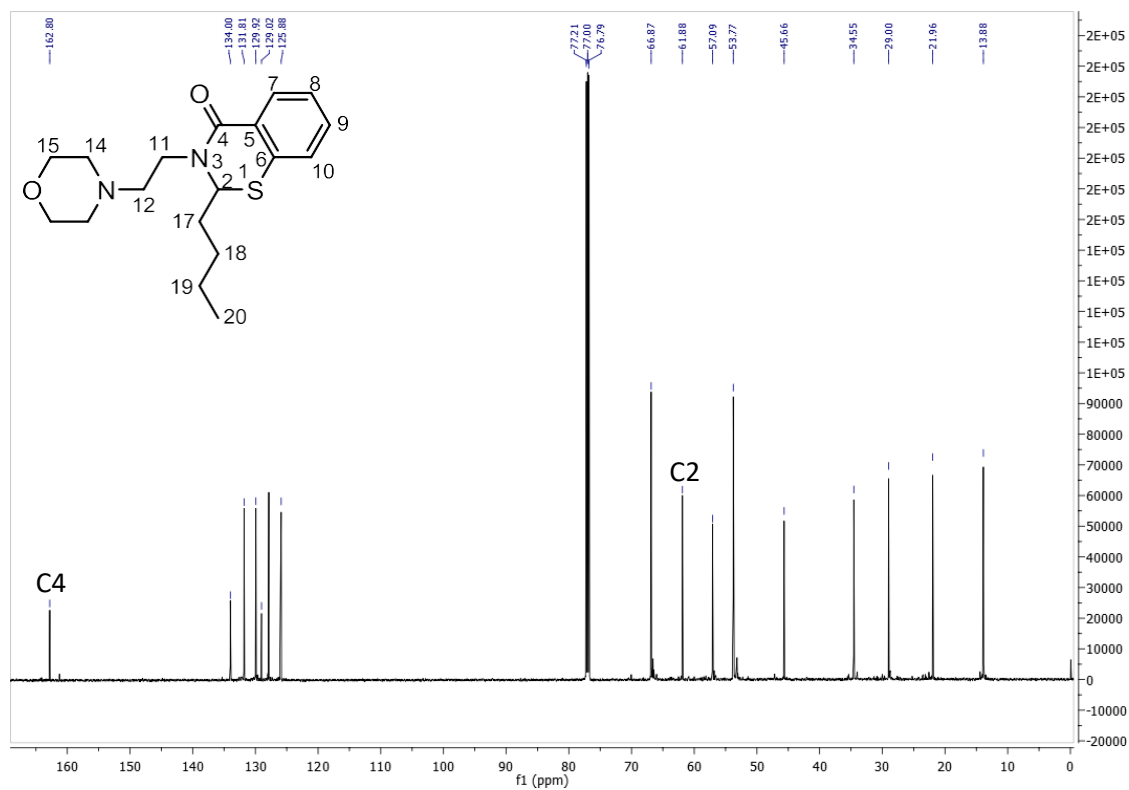
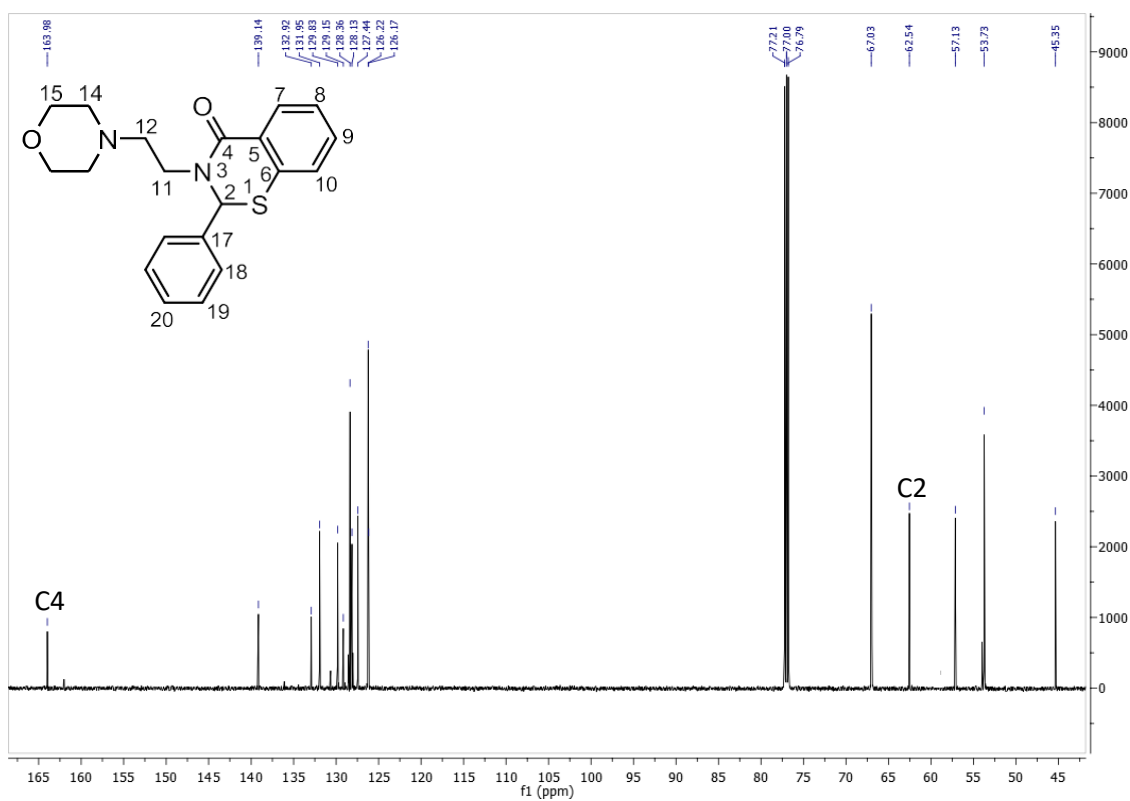
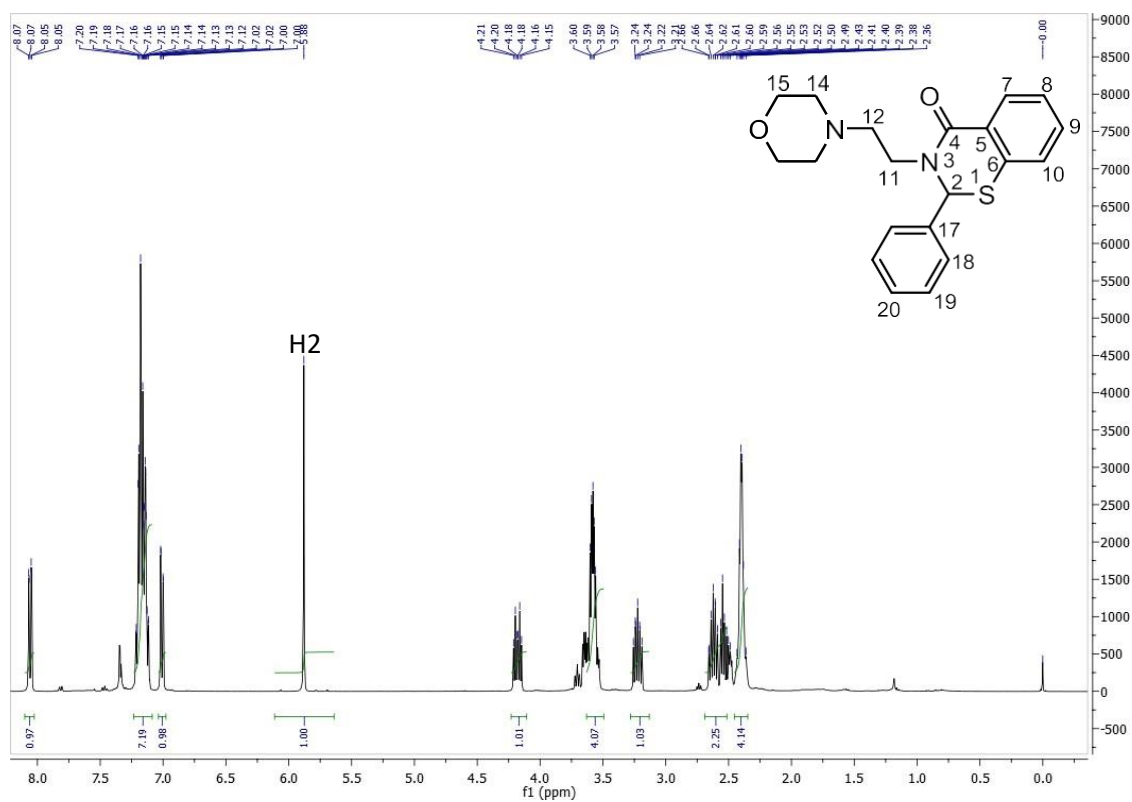


Figure S2: NMR ^{13}C spectrum of benzothiazin-4-one 5Aa.



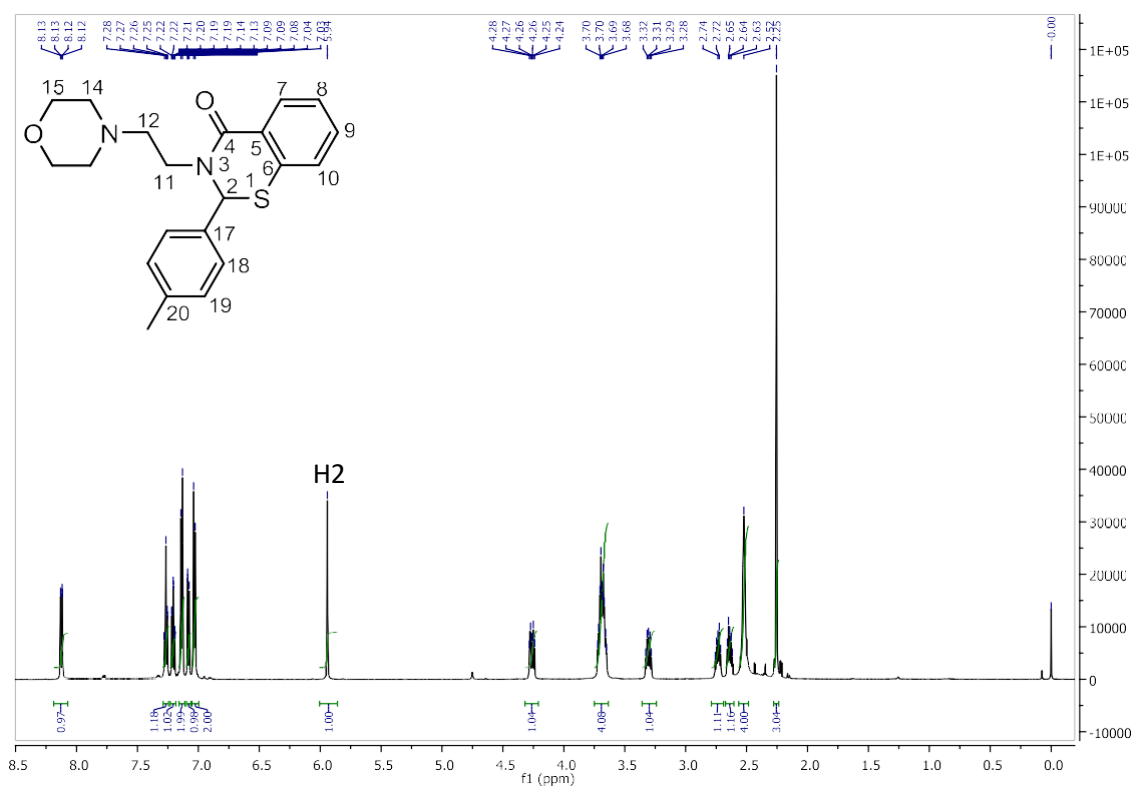


Figure S5: NMR ¹H spectrum of benzothiazin-4-one 5Ac.

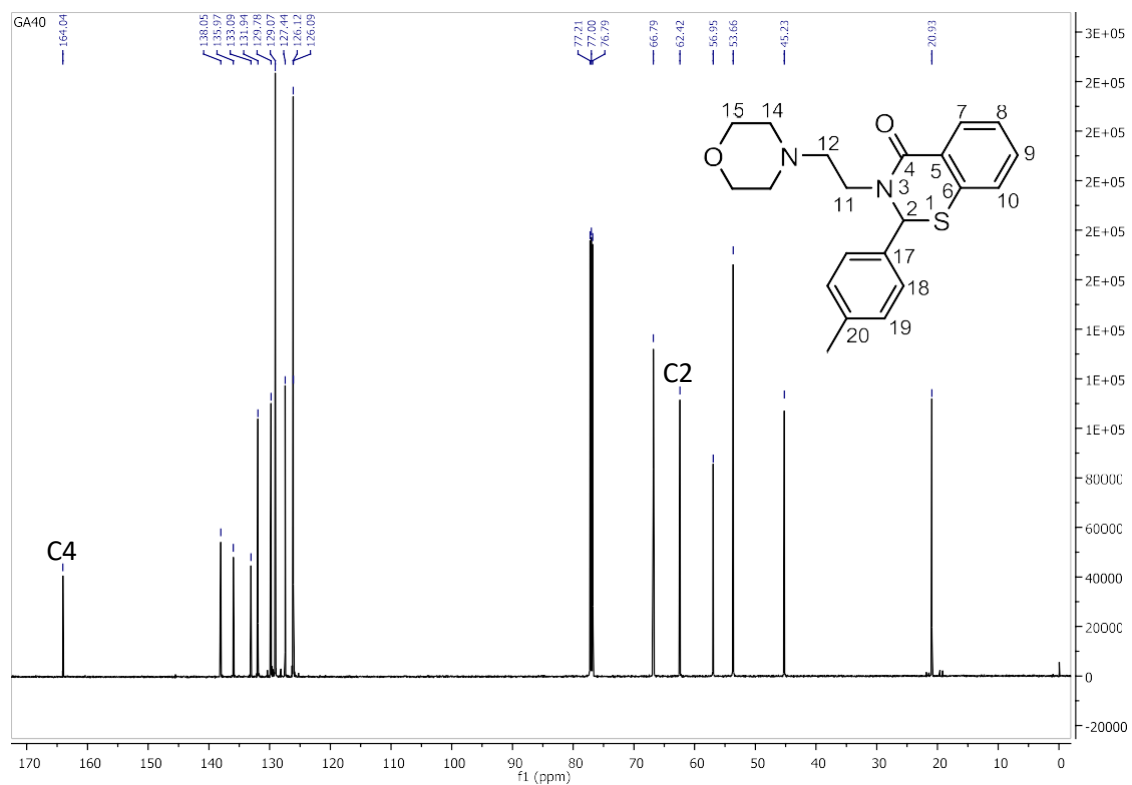


Figure S6: NMR ¹³C spectrum of benzothiazin-4-one 5Ac.

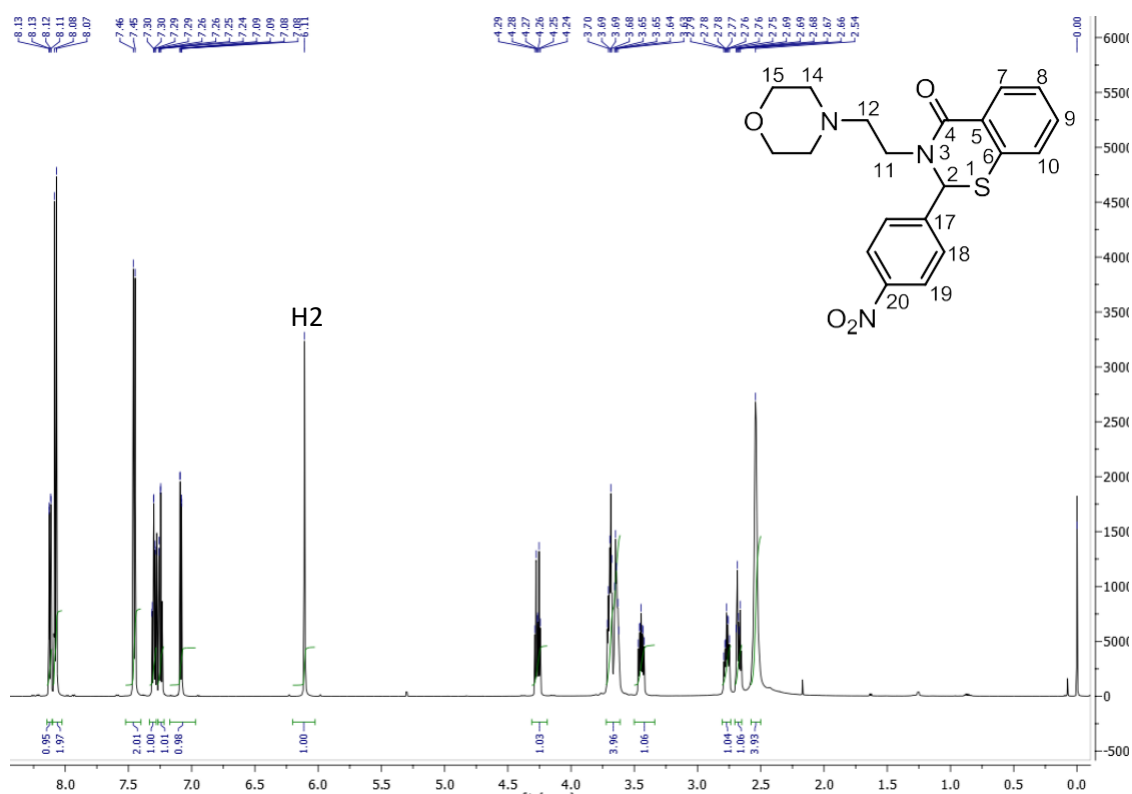


Figure S7: ^1H NMR spectrum of benzothiazin-4-one **5Ad**.

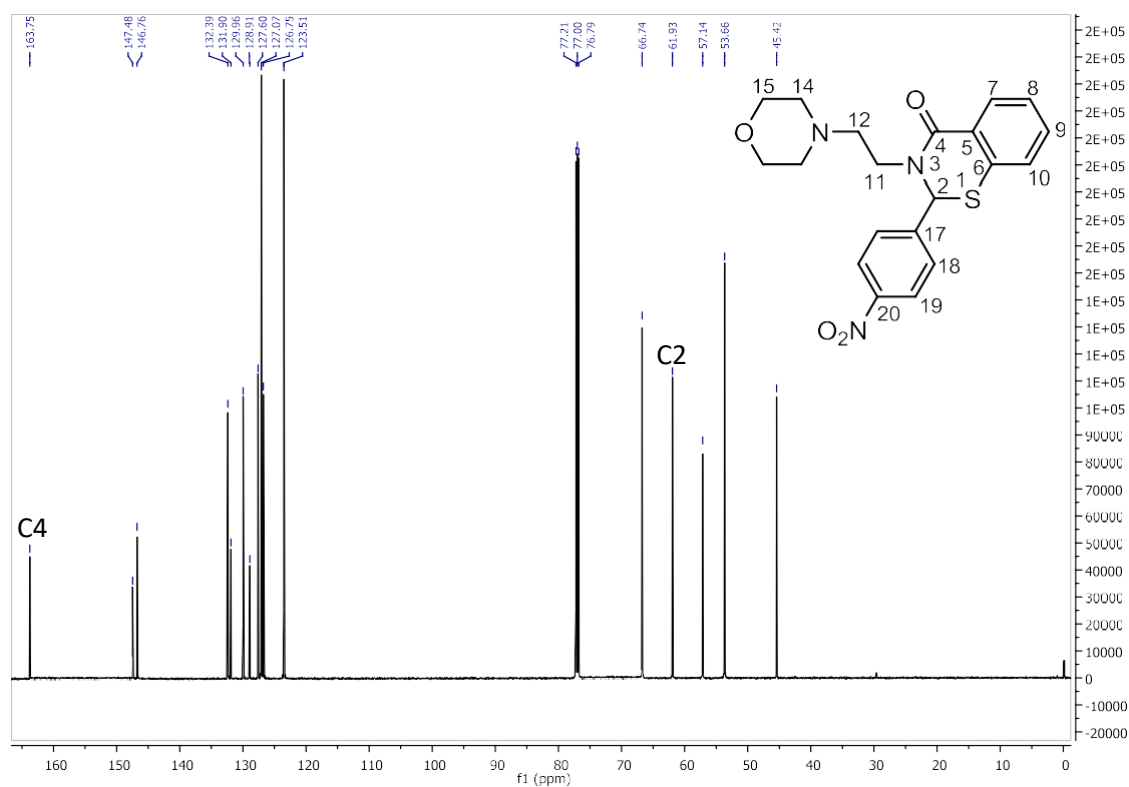


Figure S8: ^{13}C NMR spectrum of benzothiazin-4-one **5Ad**.

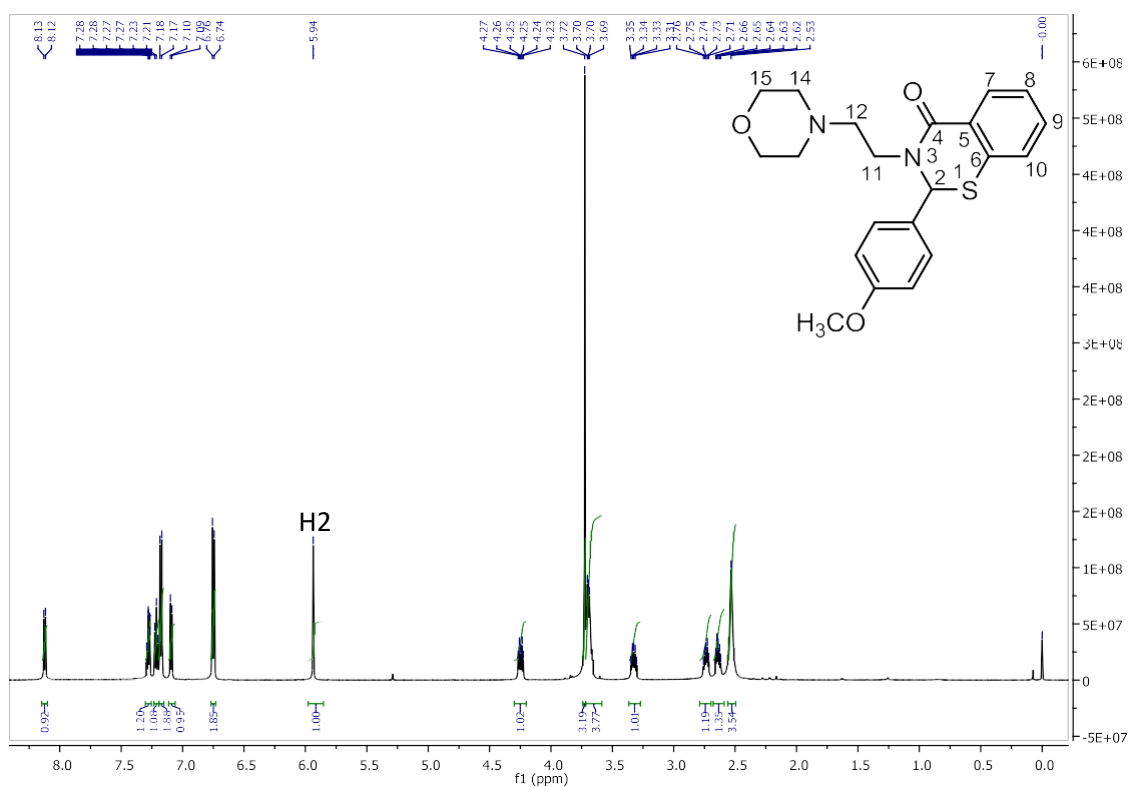


Figure S9: NMR ^1H spectrum of benzothiazin-4-one 5Ae.

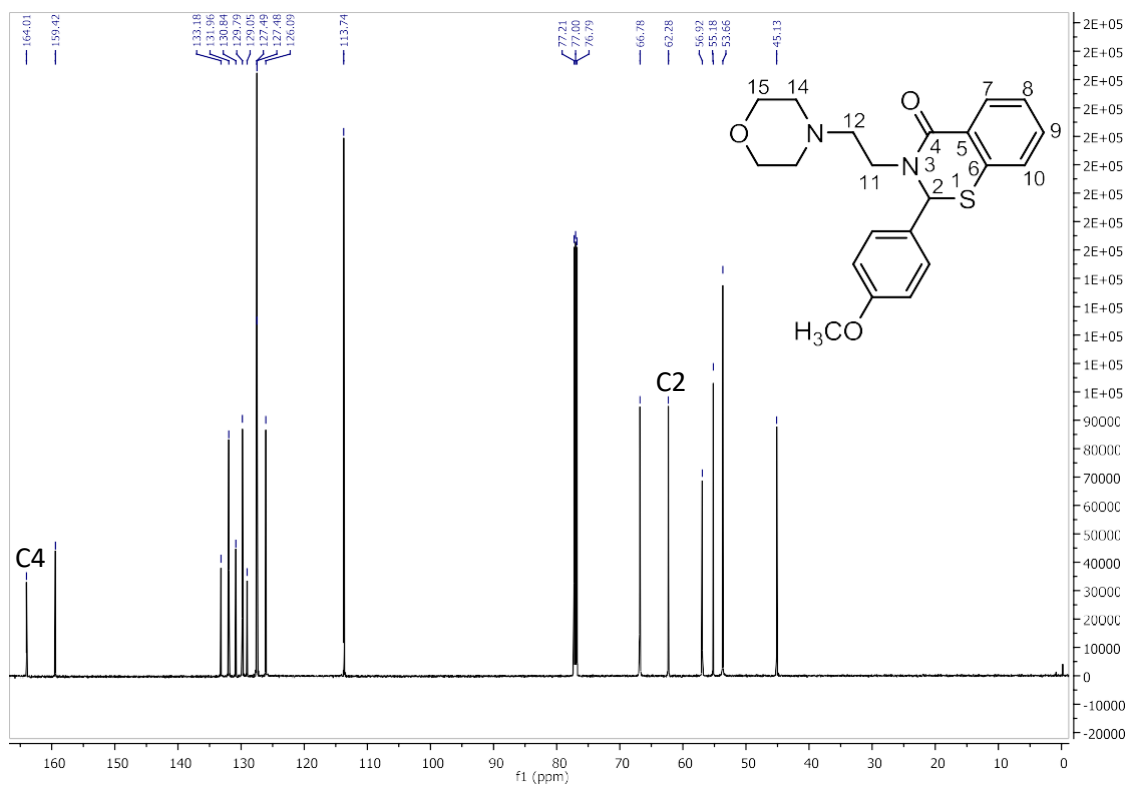


Figure S10: NMR ^{13}C spectrum of benzothiazin-4-one 5Ae.

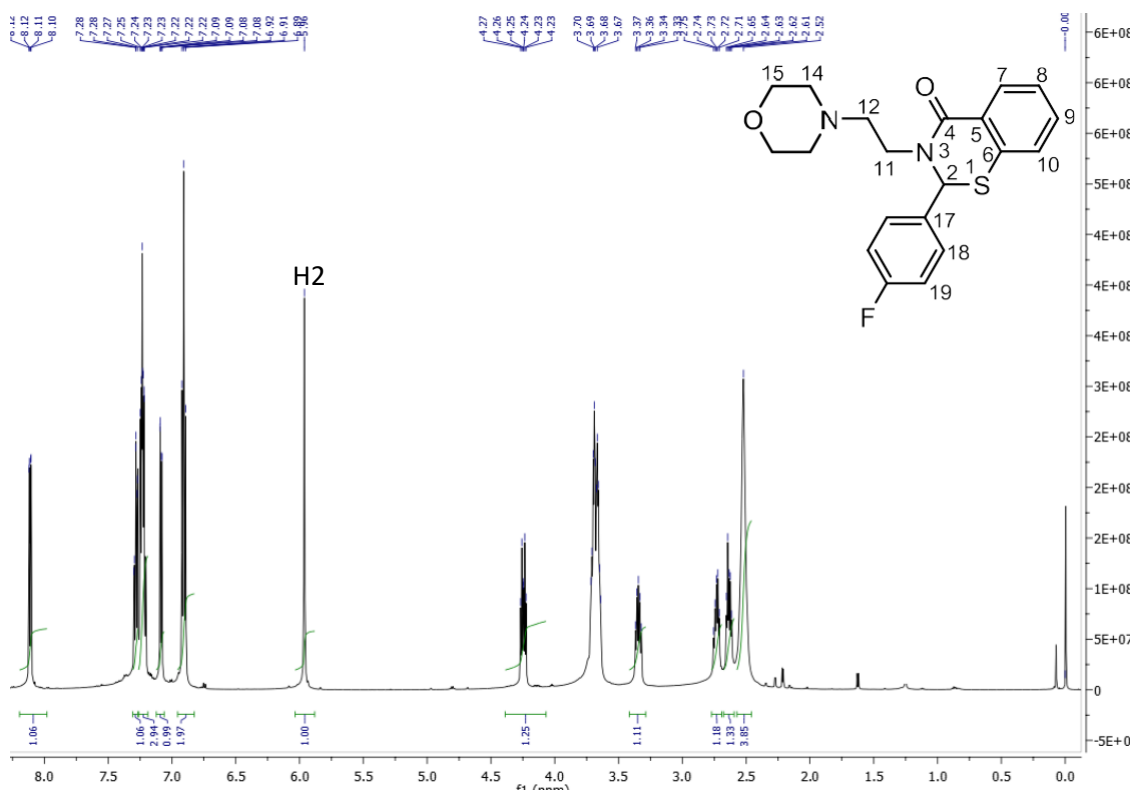


Figure S11: NMR ^1H spectrum of benzothiazin-4-one 5Af.

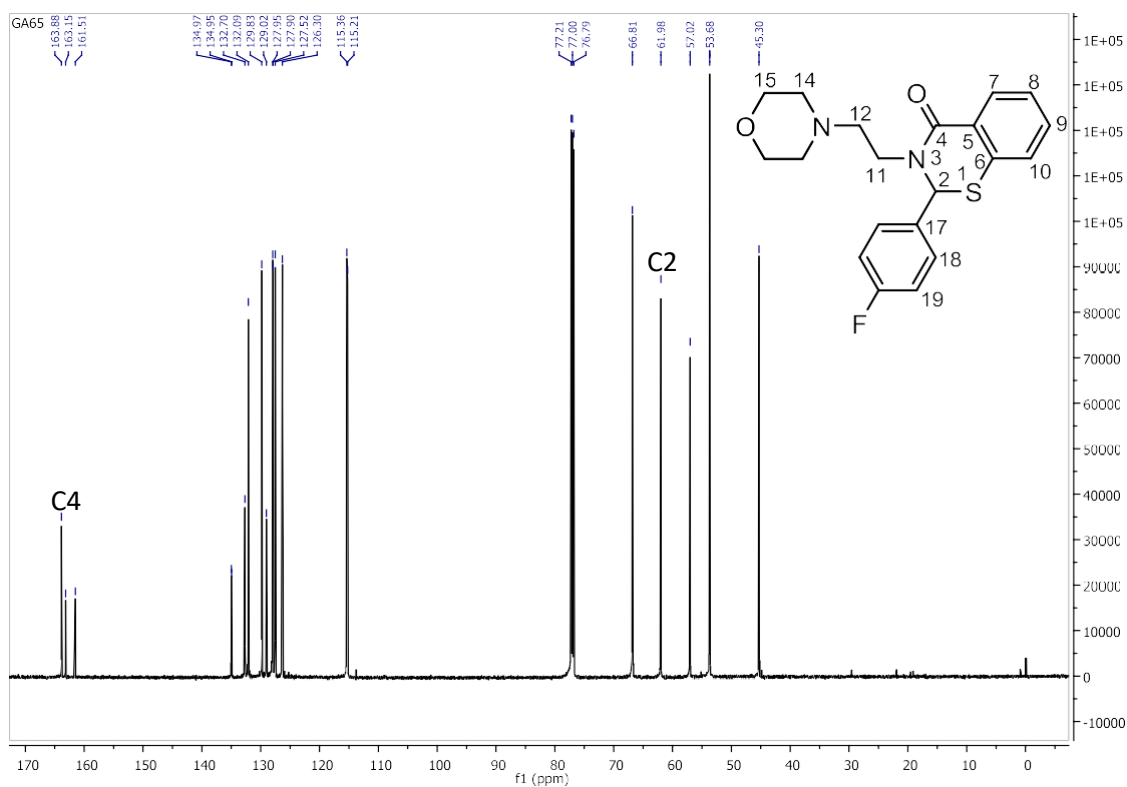


Figure S12: NMR ^{13}C spectrum of benzothiazin-4-one 5Af.

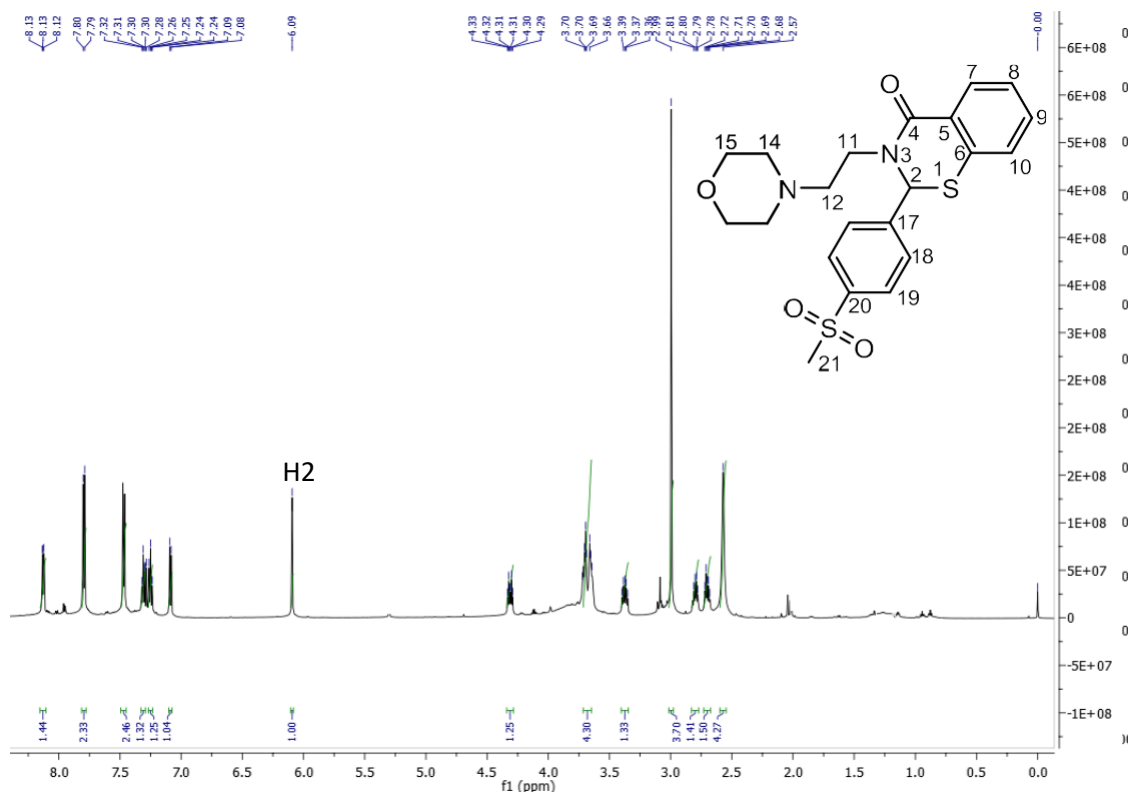


Figure S13: ^1H NMR spectrum of benzothiazin-4-one **5Ag.**

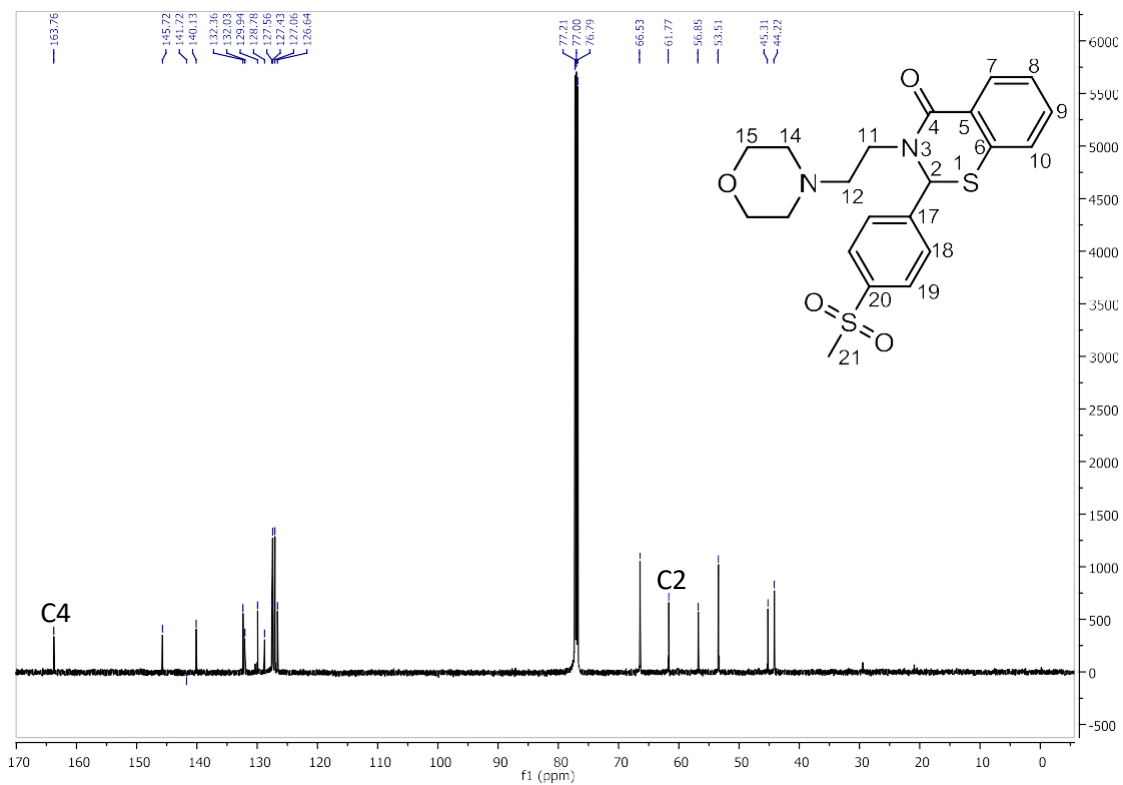


Figure S14: ^{13}C NMR spectrum of benzothiazin-4-one **5Ag.**

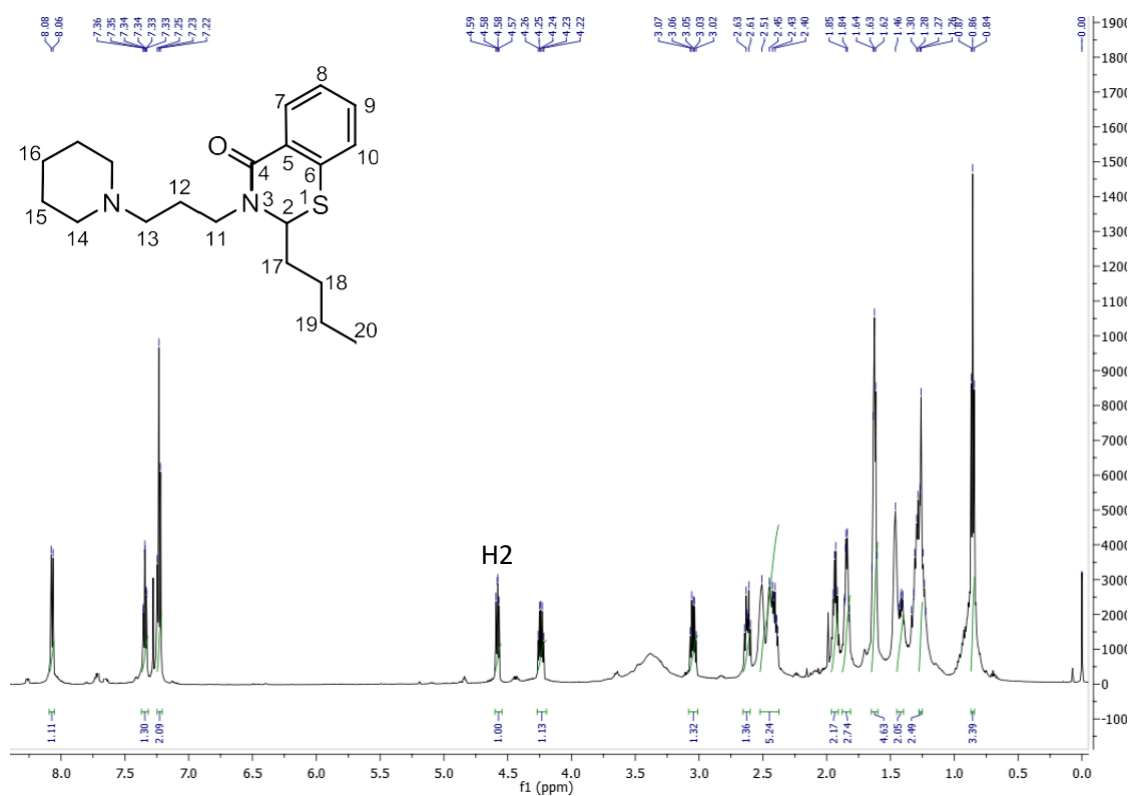


Figure S15: NMR ¹H spectrum of benzothiazin-4-one **5Ba**.

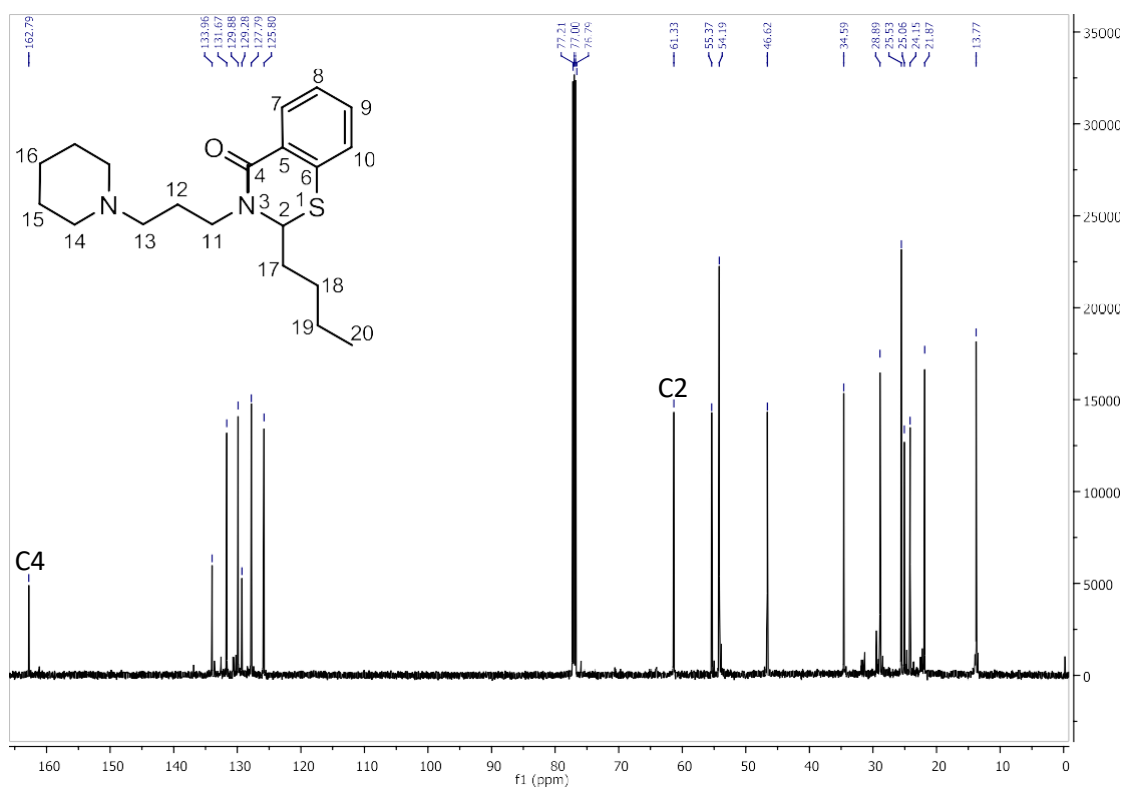


Figure S16: NMR ¹³C spectrum of benzothiazin-4-one **5Ba**.

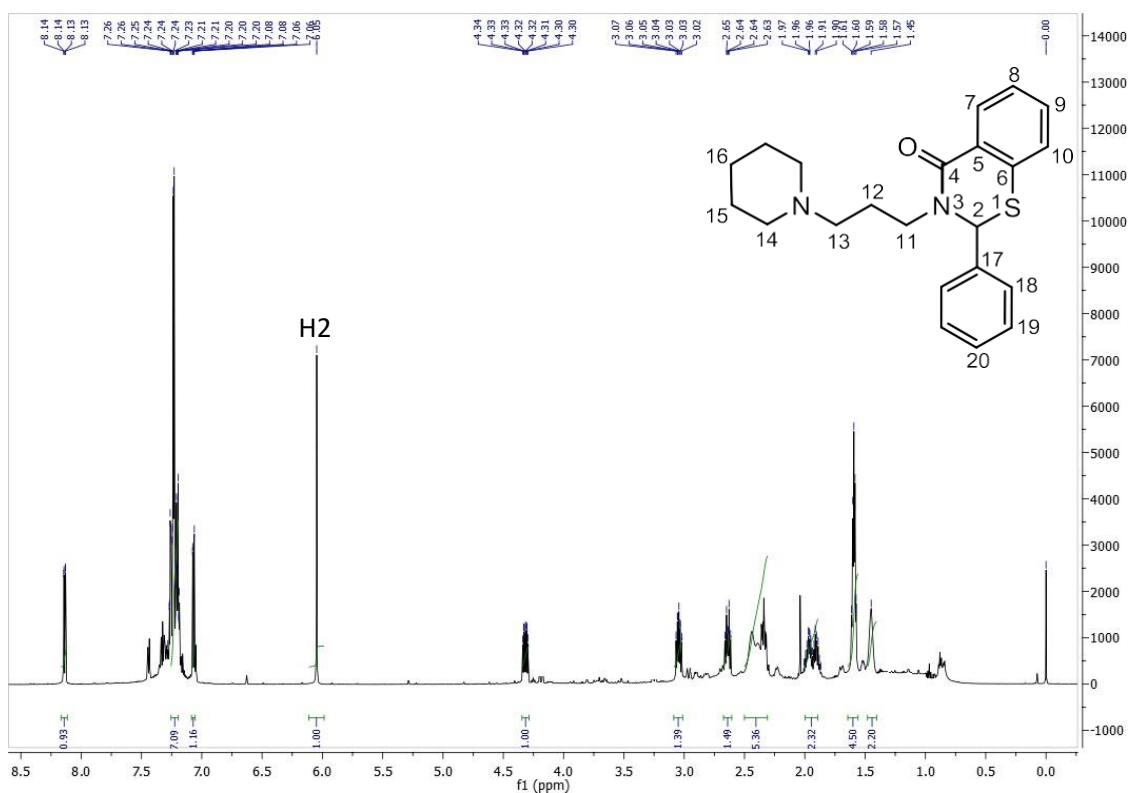


Figure S17: NMR ¹H spectrum of benzothiazin-4-one 5Bb.

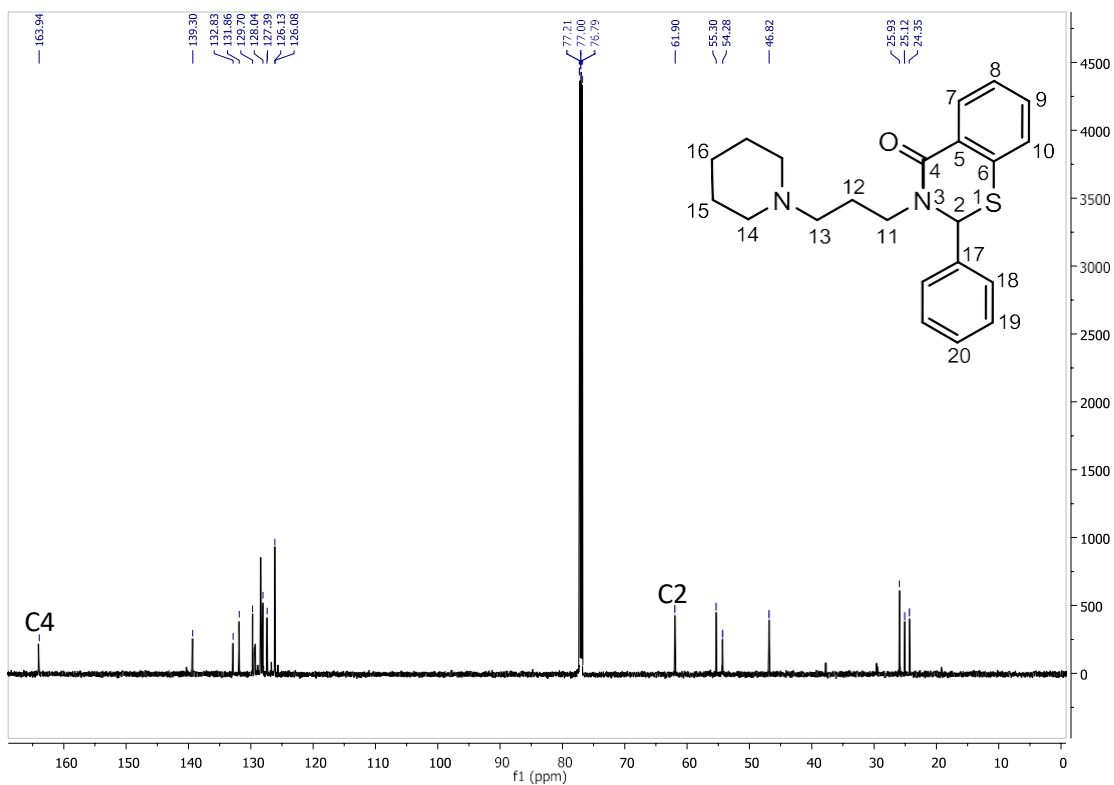


Figure S18: NMR ¹³C spectrum of benzothiazin-4-one 5Bb.

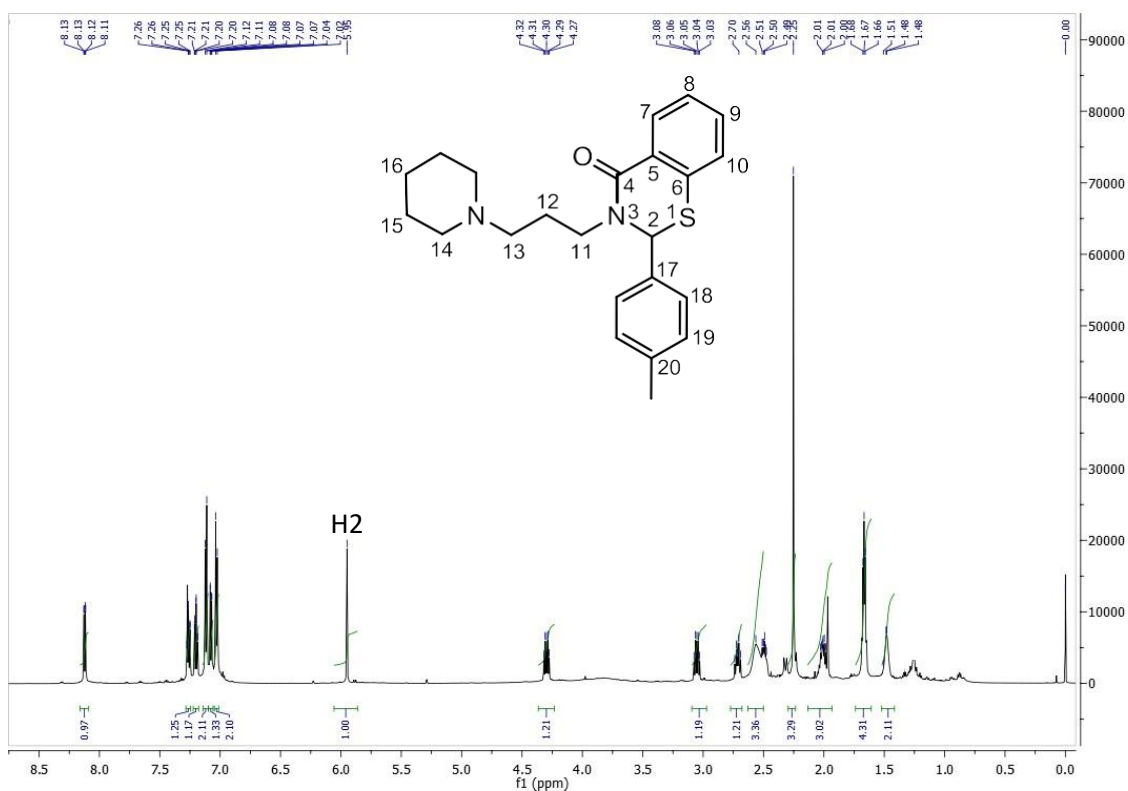


Figure S19: NMR ¹H spectrum of benzothiazin-4-one 5Bc.

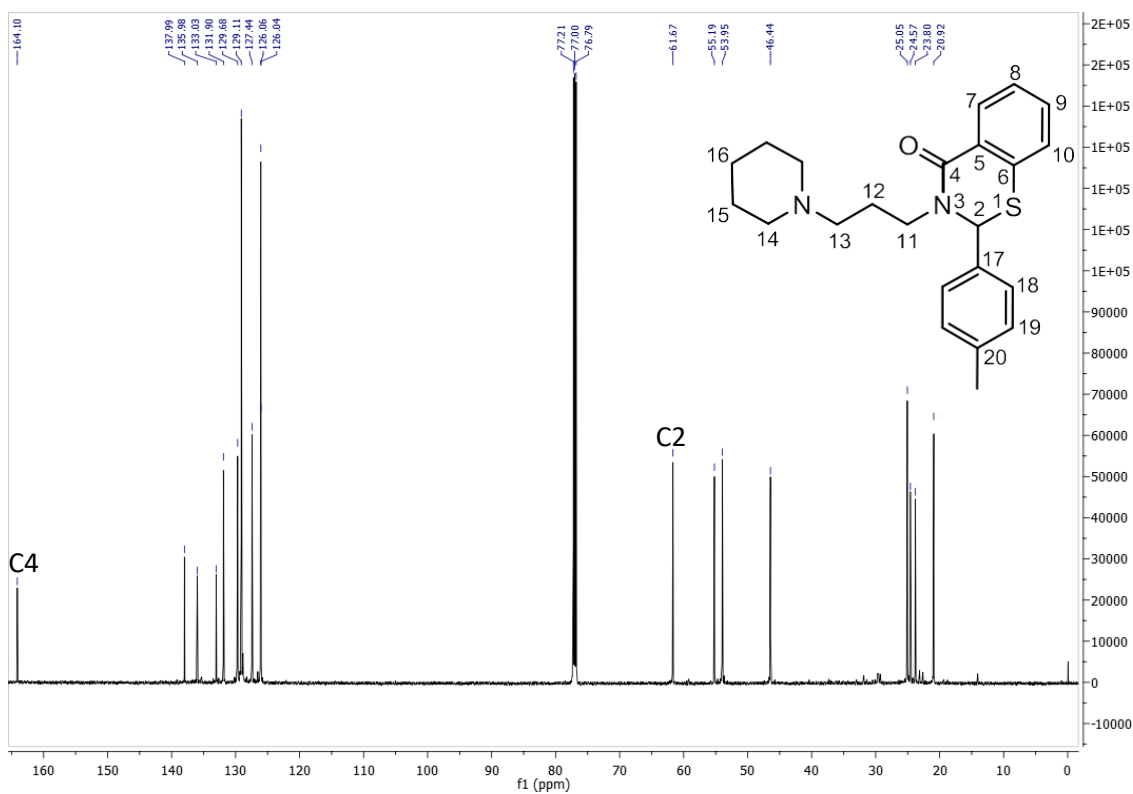


Figure S20: NMR ¹³C spectrum of benzothiazin-4-one 5Bc.

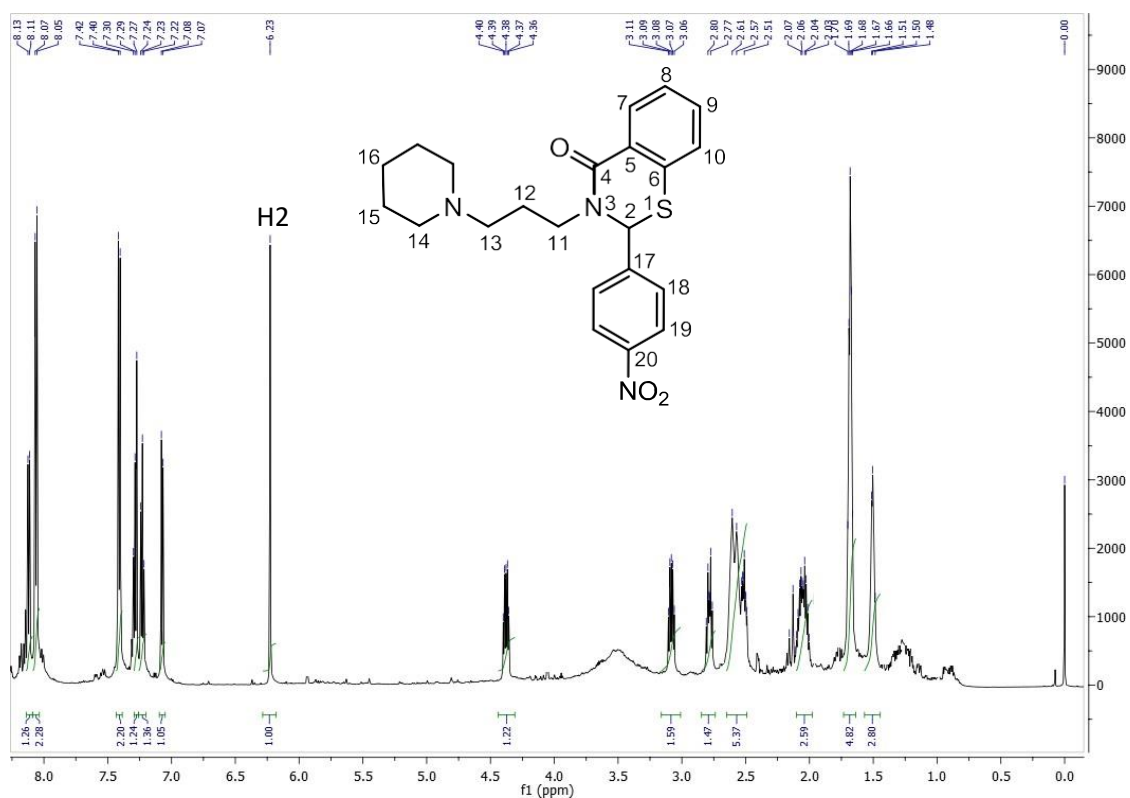


Figure S21: NMR ¹H spectrum of benzothiazin-4-one 5Bd.

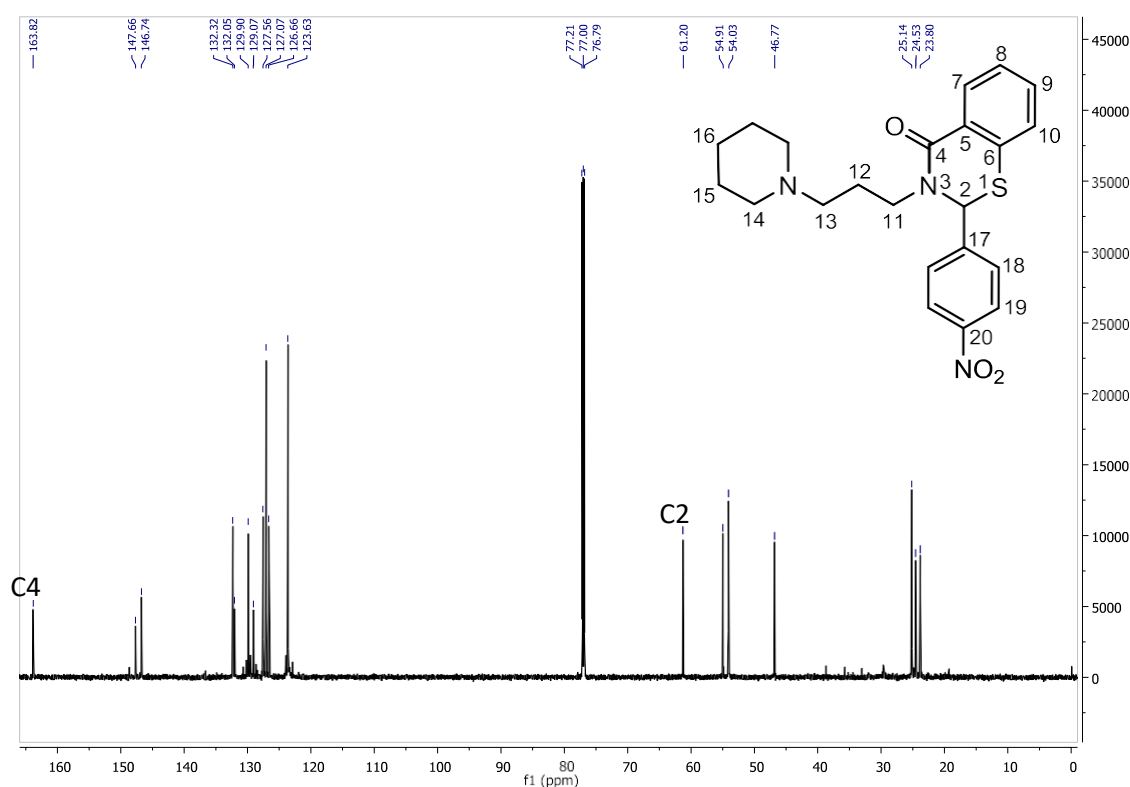


Figure S22: NMR ¹³C spectrum of benzothiazin-4-one 5Bd.

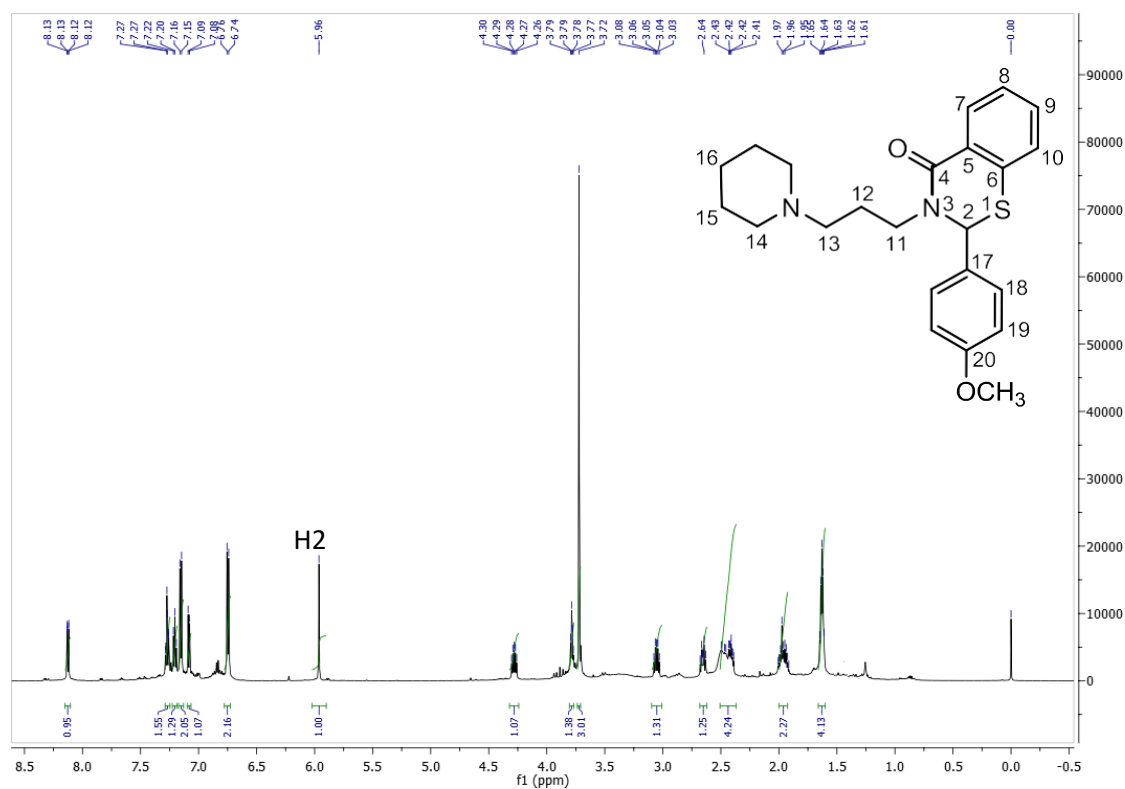


Figure S23: NMR ¹H spectrum of benzothiazin-4-one 5Be.

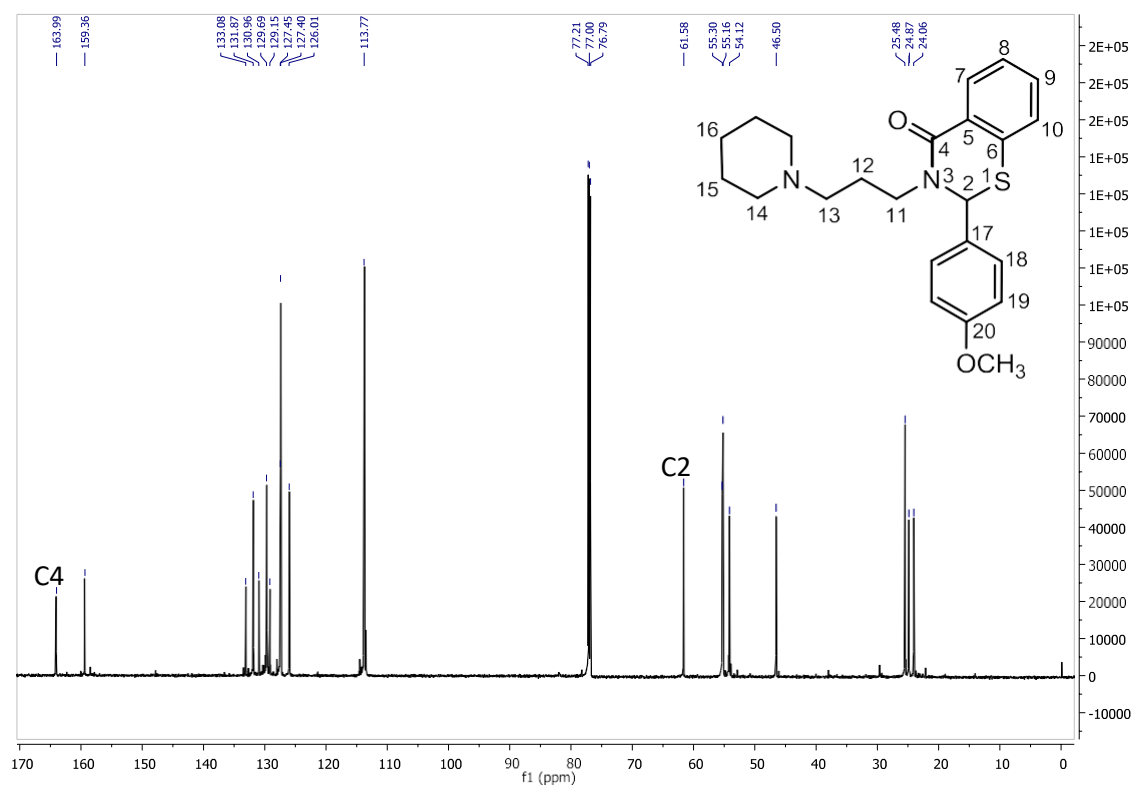


Figure S24: NMR ¹³C spectrum of benzothiazin-4-one 5Be.

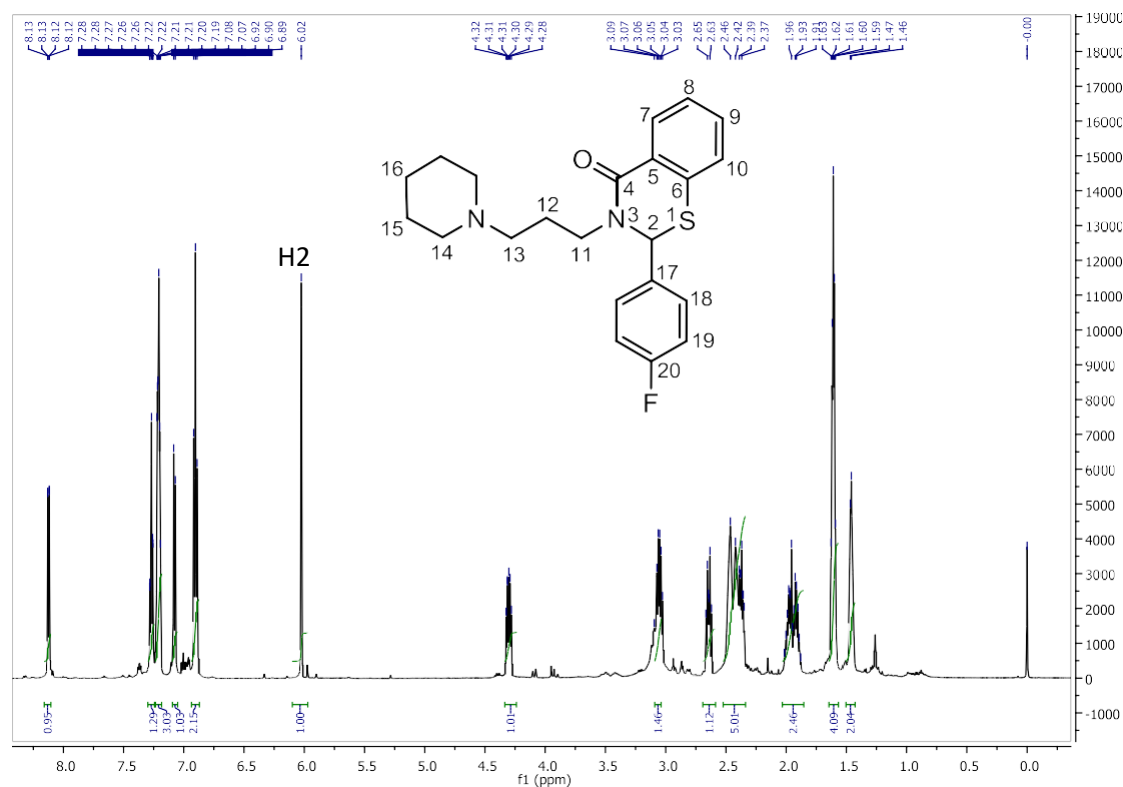


Figure S25: ^1H NMR spectrum of benzothiazin-4-one 5Bf.

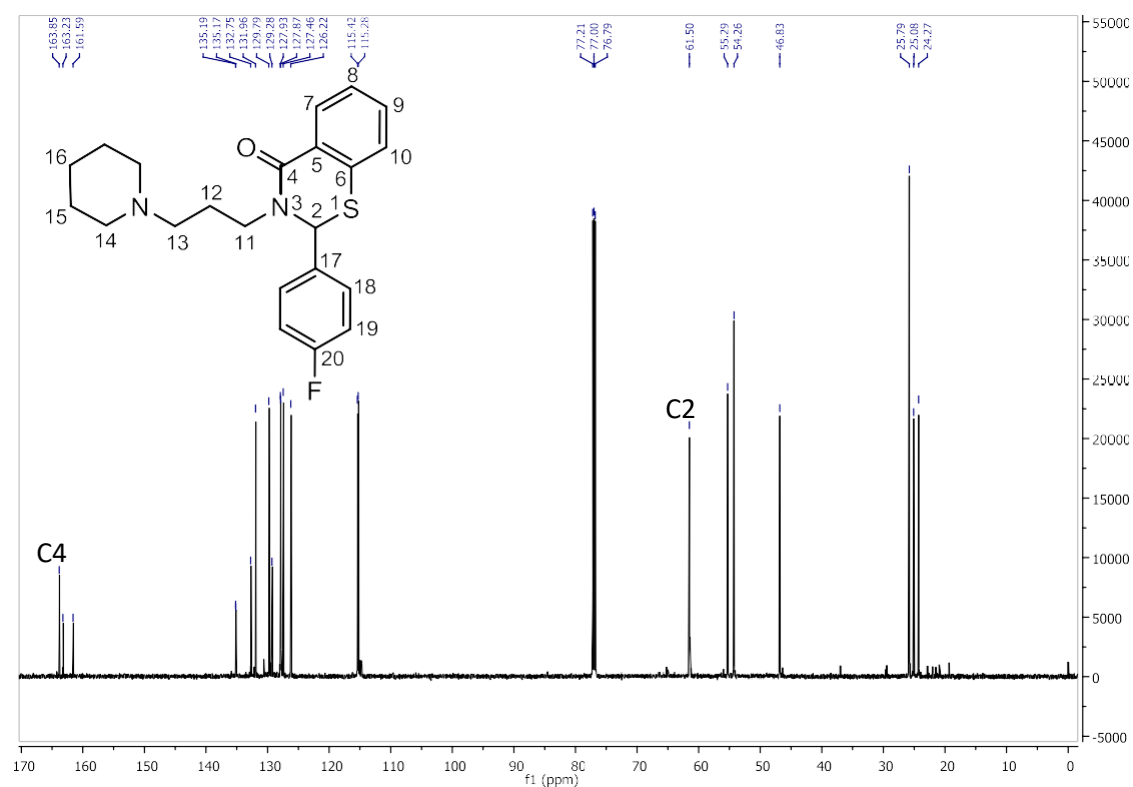


Figure S26: ^{13}C NMR spectrum of benzothiazin-4-one 5Bf.

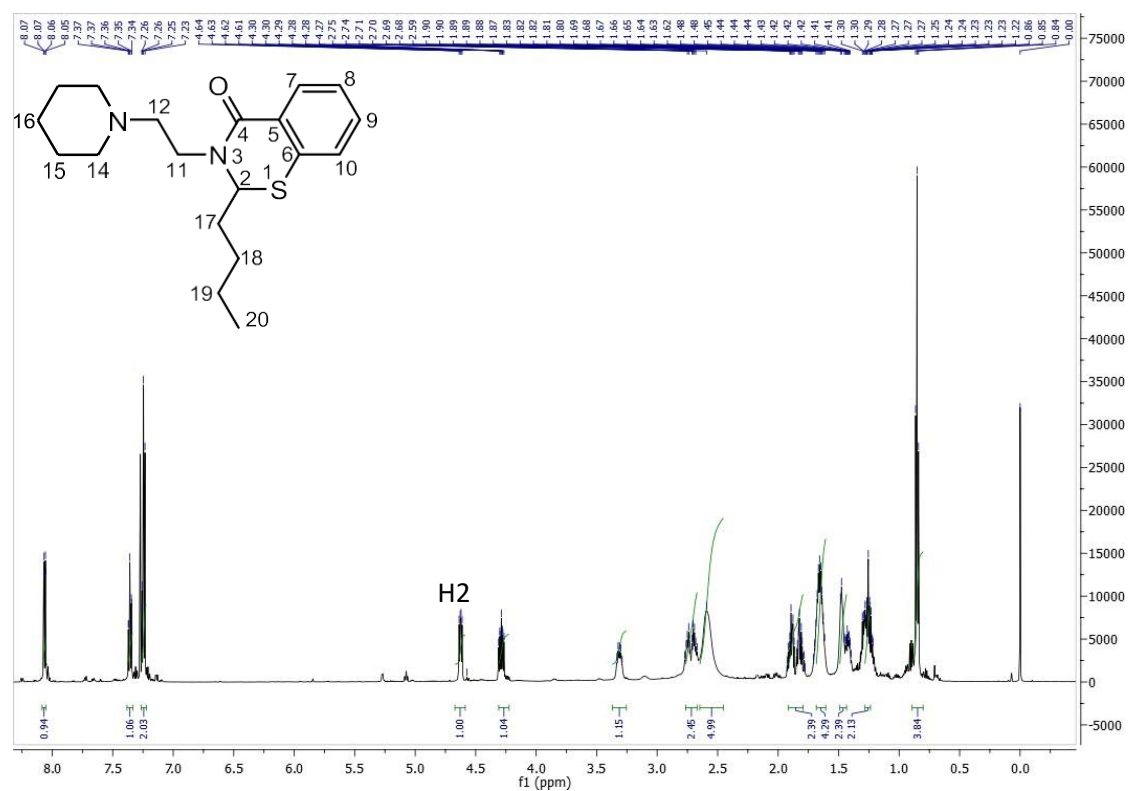


Figure 27: NMR ¹H spectrum of benzothiazin-4-one 5Ca.

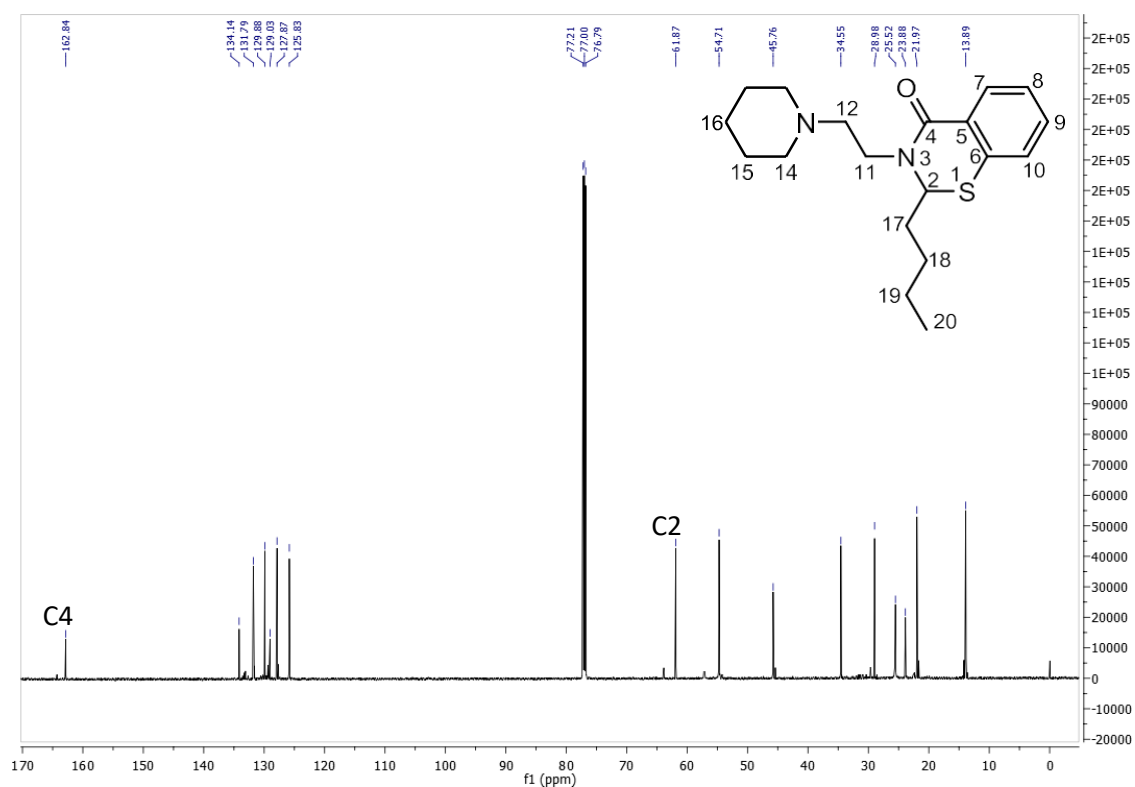


Figure 28: NMR ¹³C spectrum of benzothiazin-4-one 5Ca.

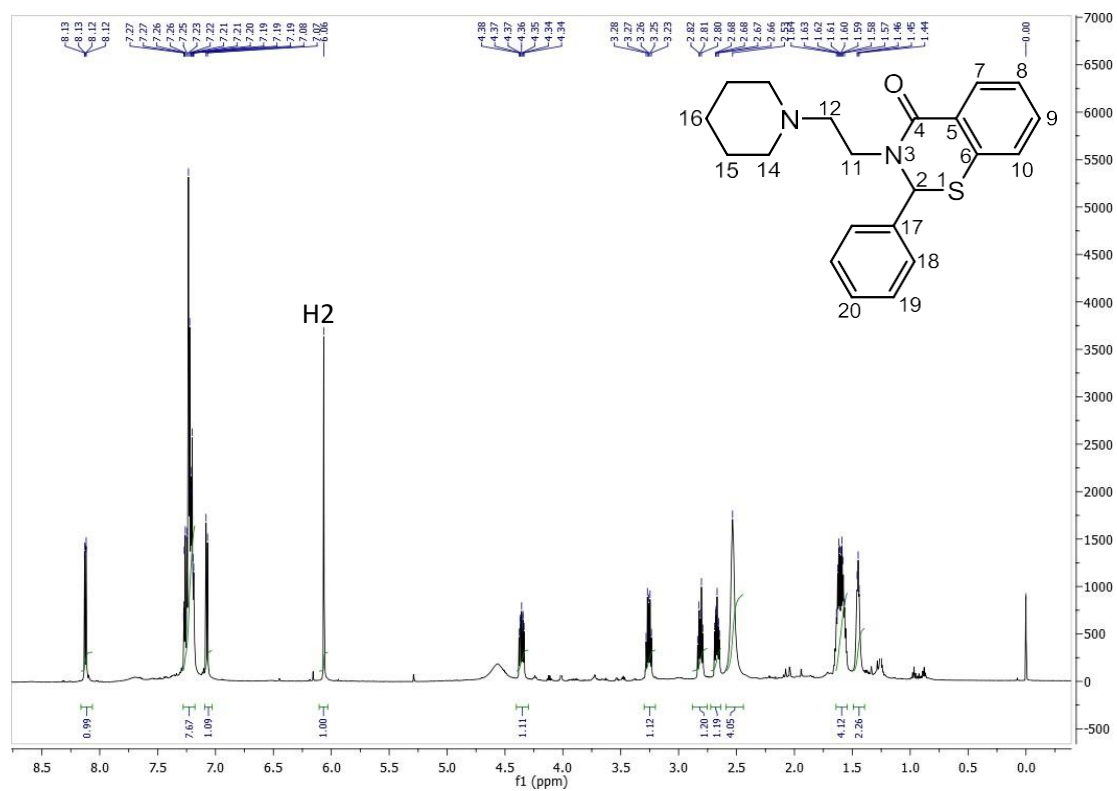


Figure S29: NMR ^1H spectrum of benzothiazin-4-one 5Cb.

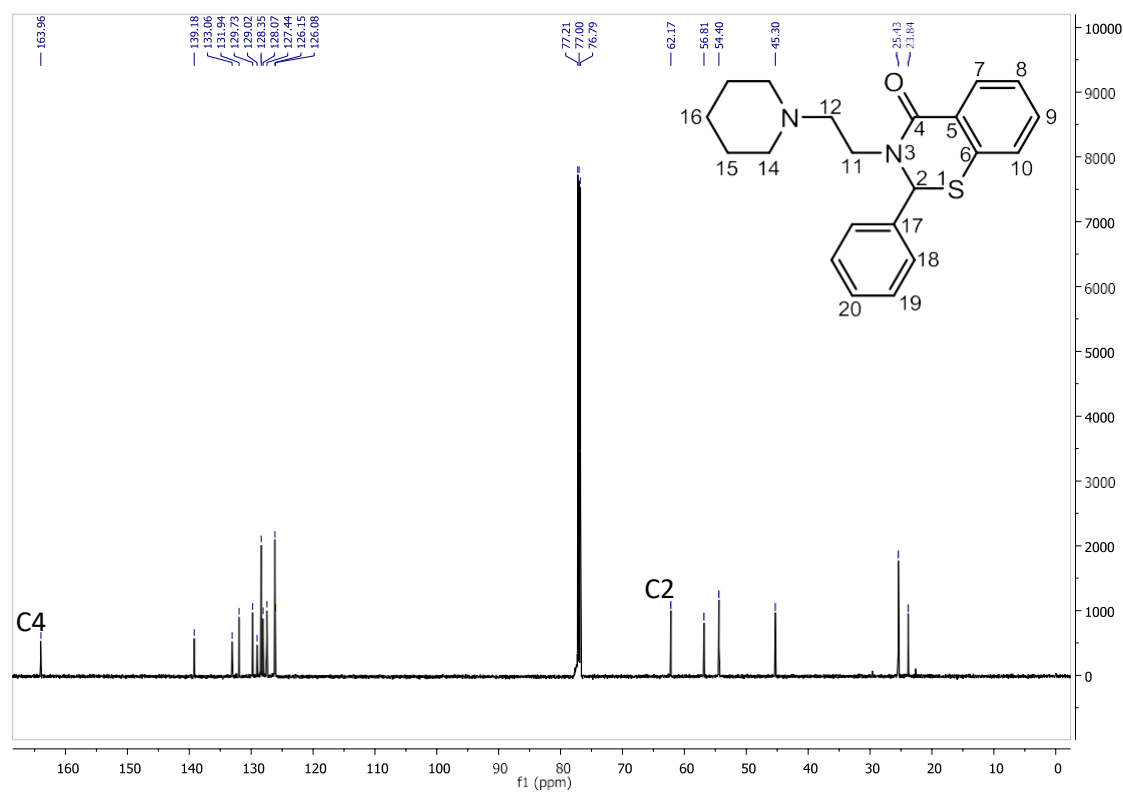


Figure S30: NMR ^{13}C spectrum of benzothiazin-4-one 5Cb.

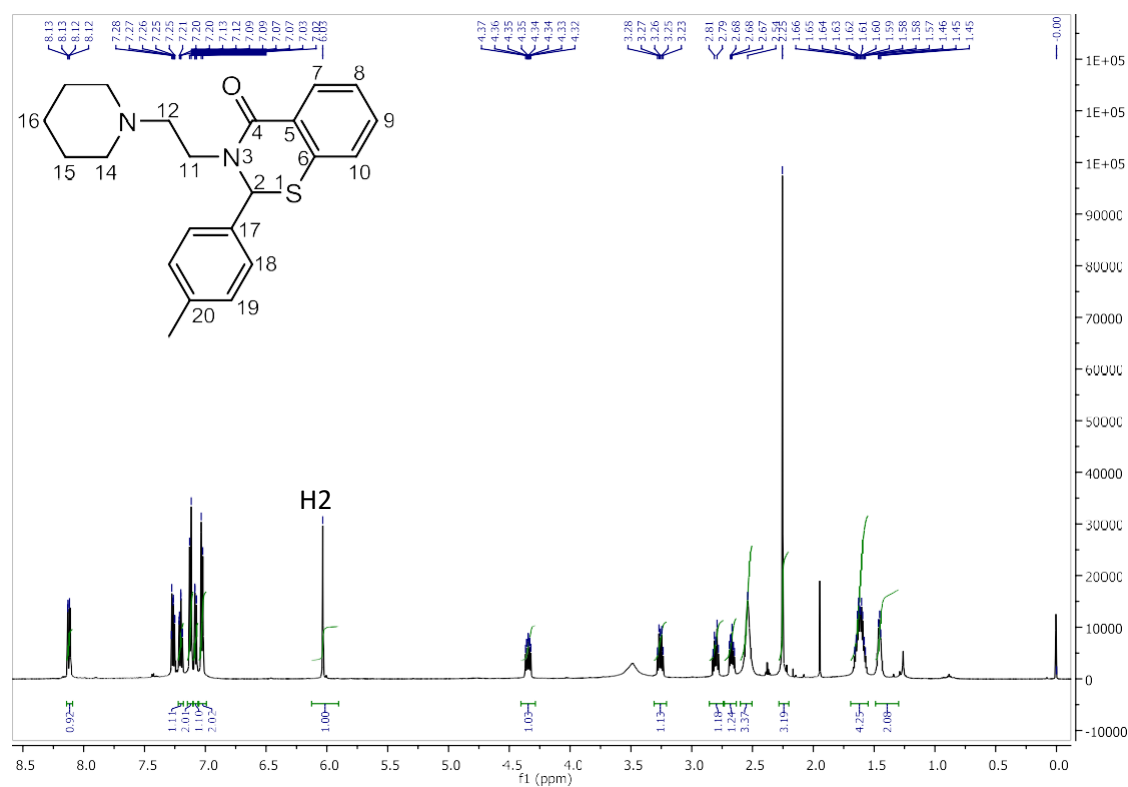


Figure S31: NMR ¹H spectrum of benzothiazin-4-one 5Cc.

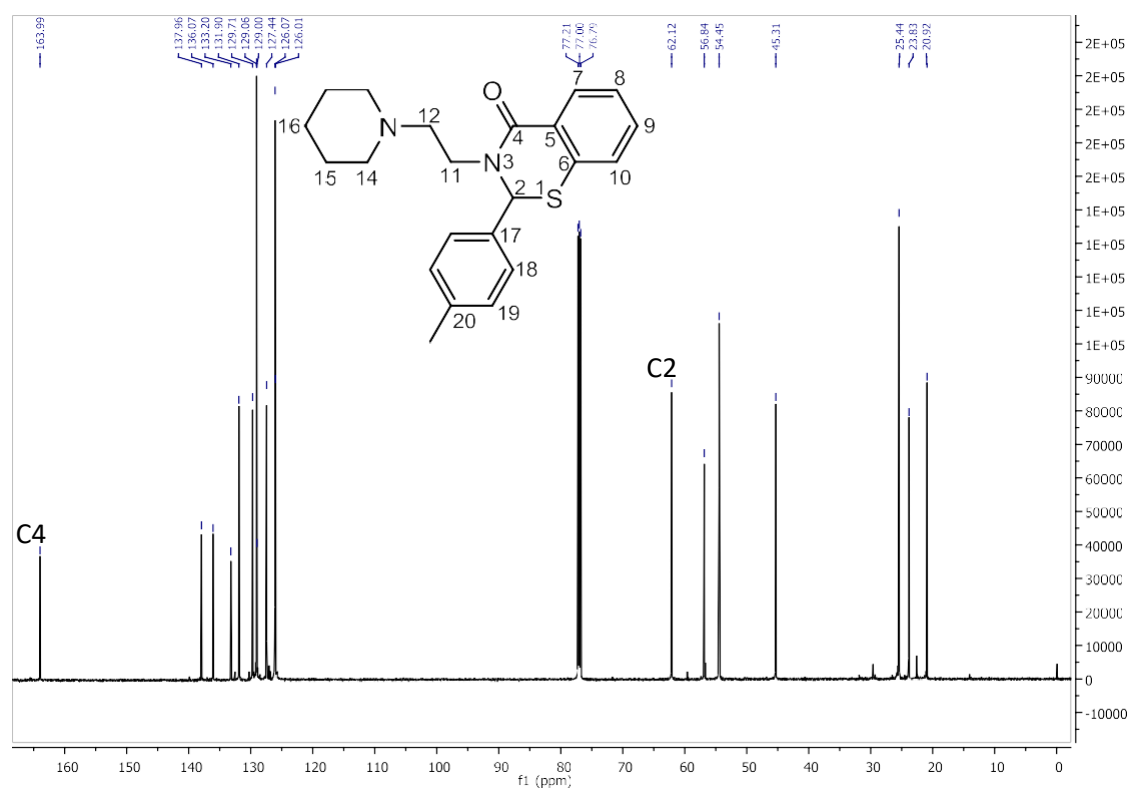


Figure S32: NMR ^{13}C spectrum of benzothiazin-4-one **5Cc**.

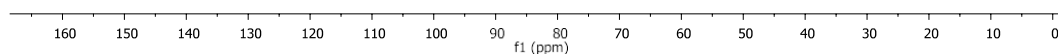
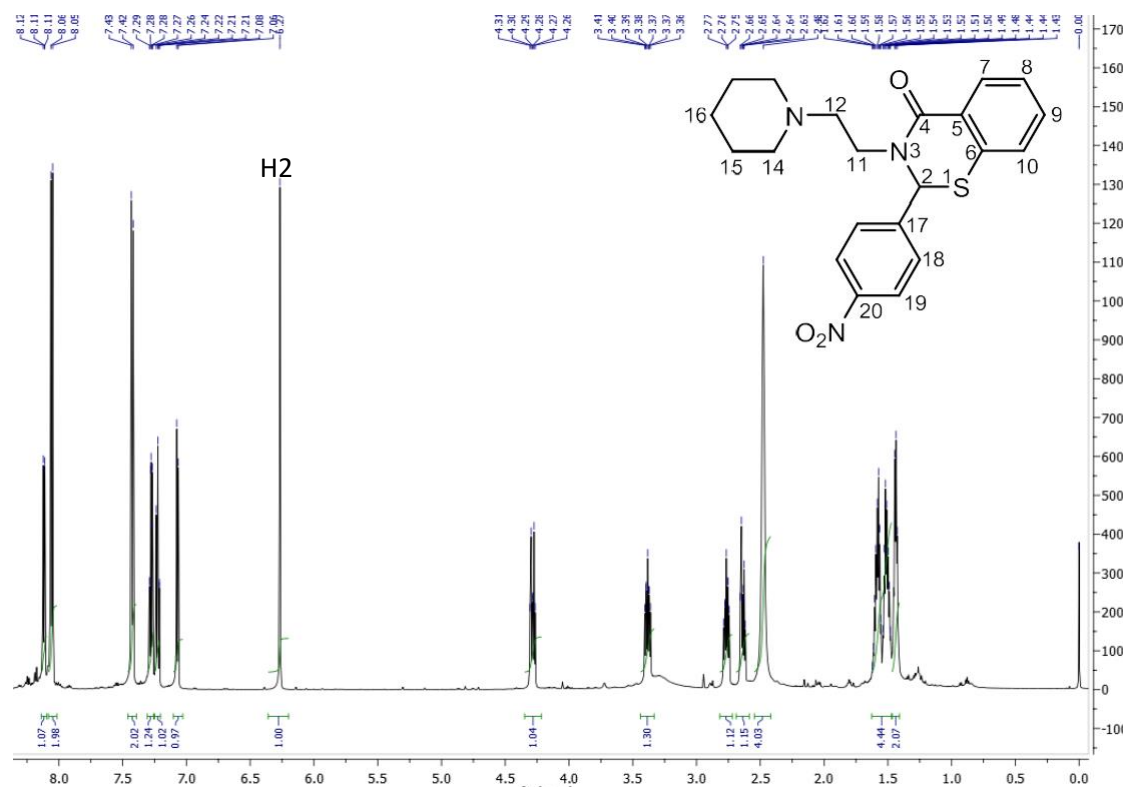


Figure S30: NMR ^{13}C spectrum of benzothiazin-4-one **5Cb**.



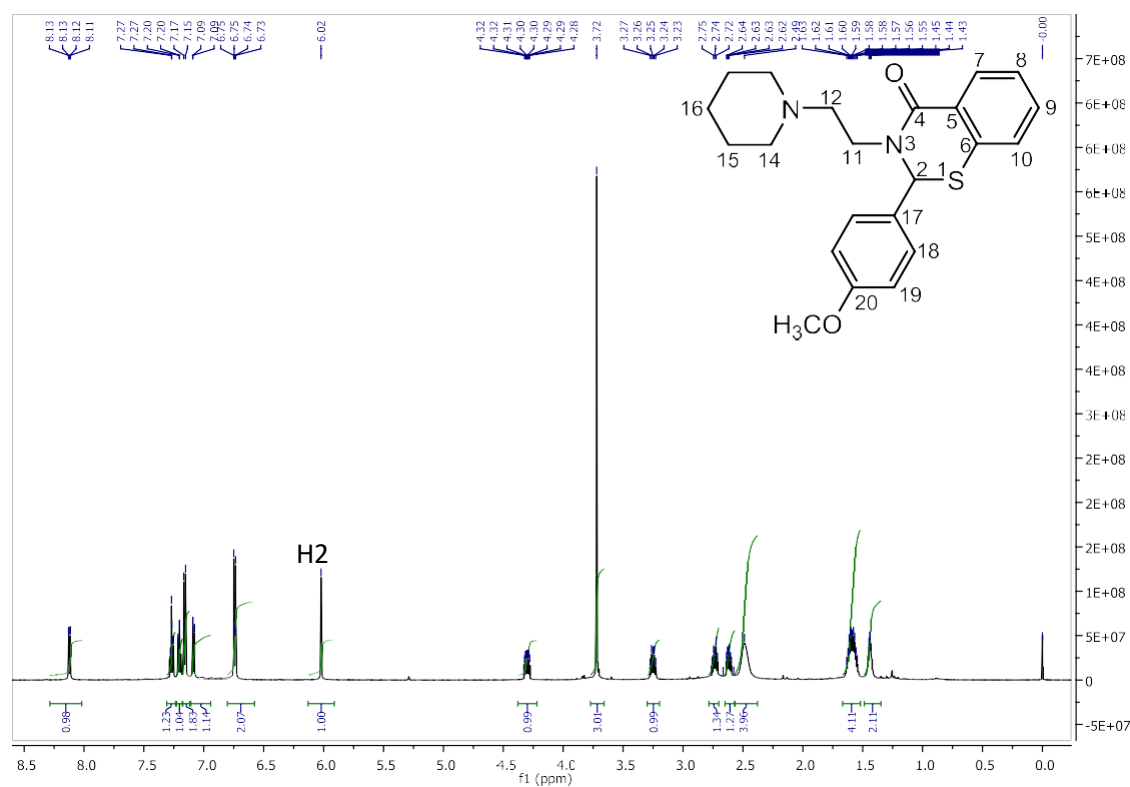


Figure S35: NMR ^1H spectrum of benzothiazin-4-one 5Ce.

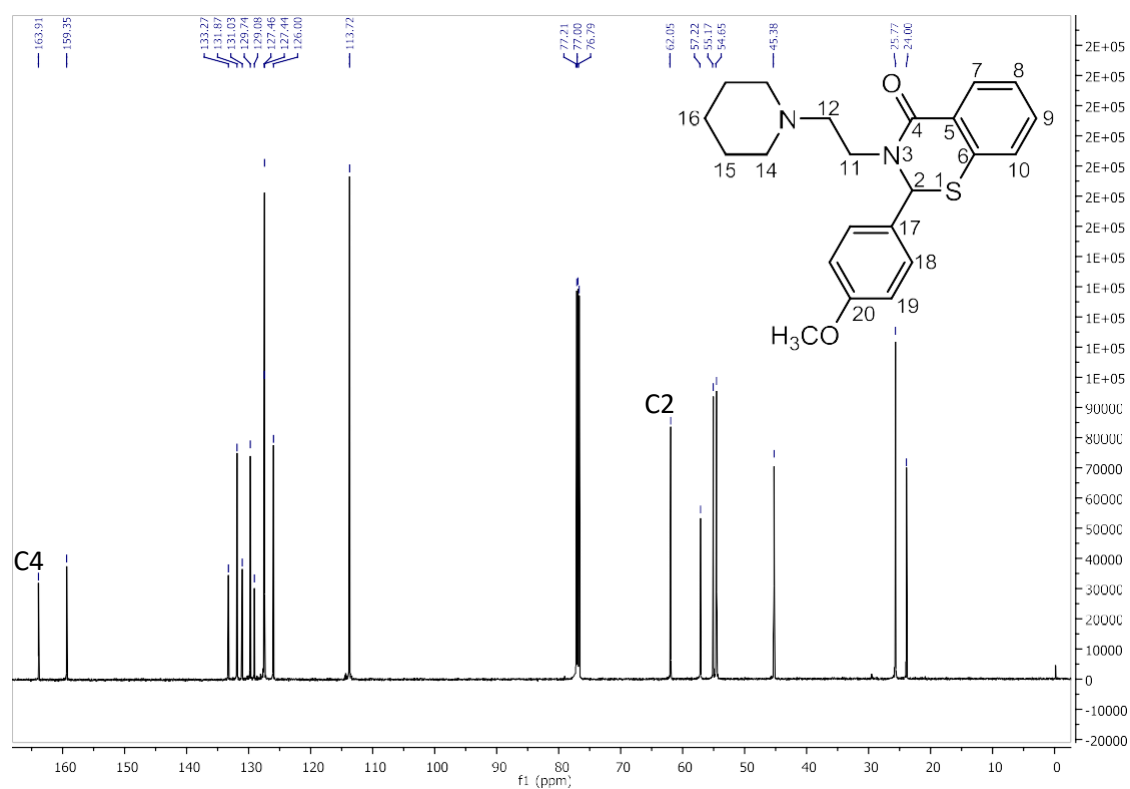


Figure S36: NMR ^{13}C spectrum of benzothiazin-4-one 5Ce.

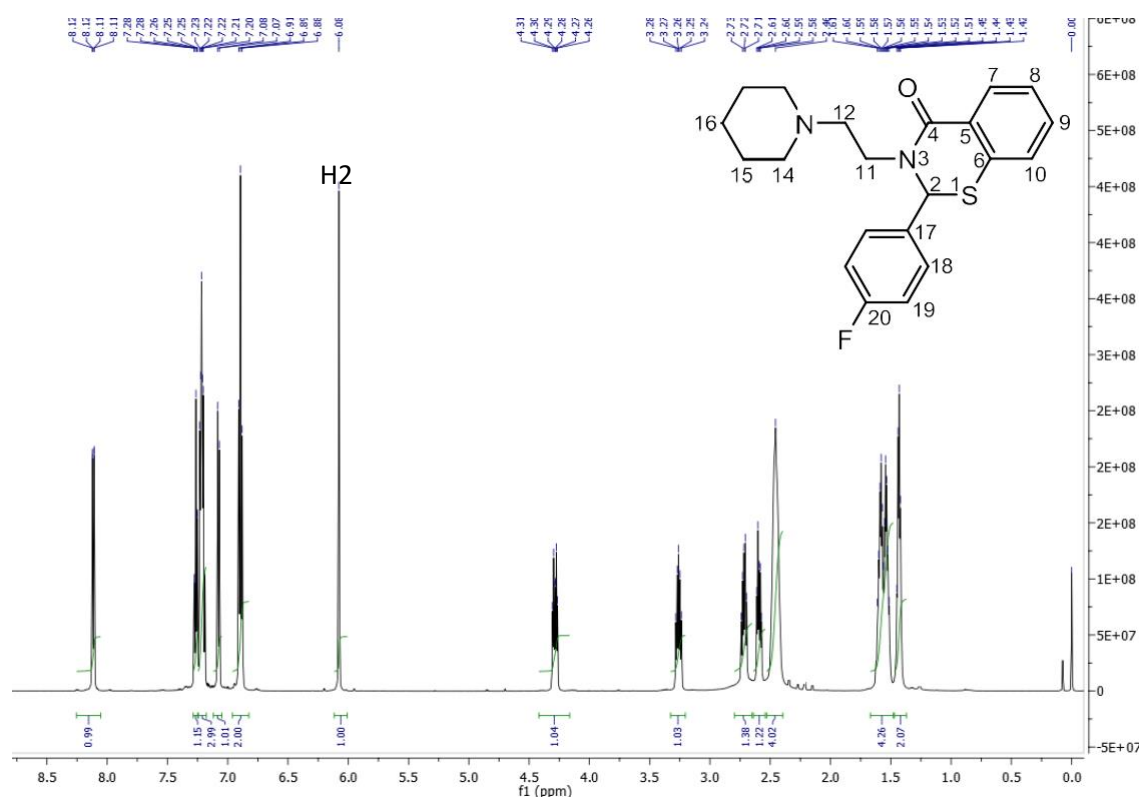


Figure S37: NMR ^1H spectrum of benzothiazin-4-one 5Cf.

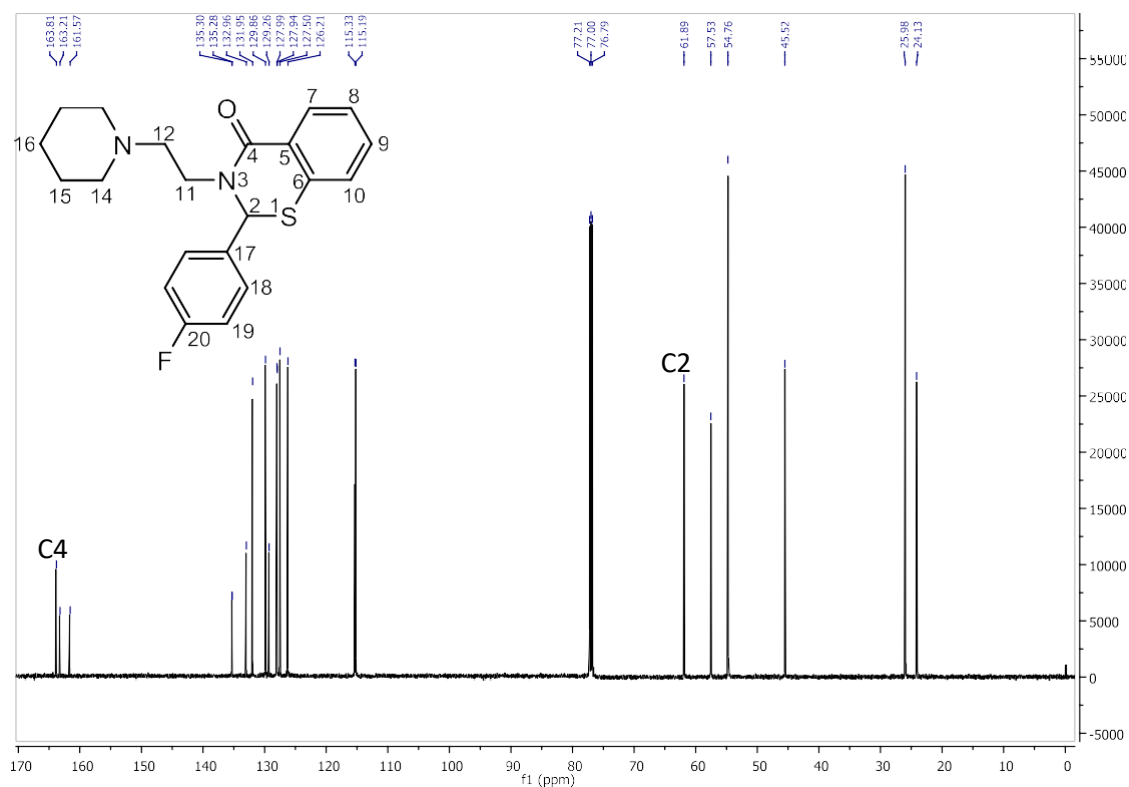


Figure S38: NMR ^{13}C spectrum of benzothiazin-4-one 5Cf.

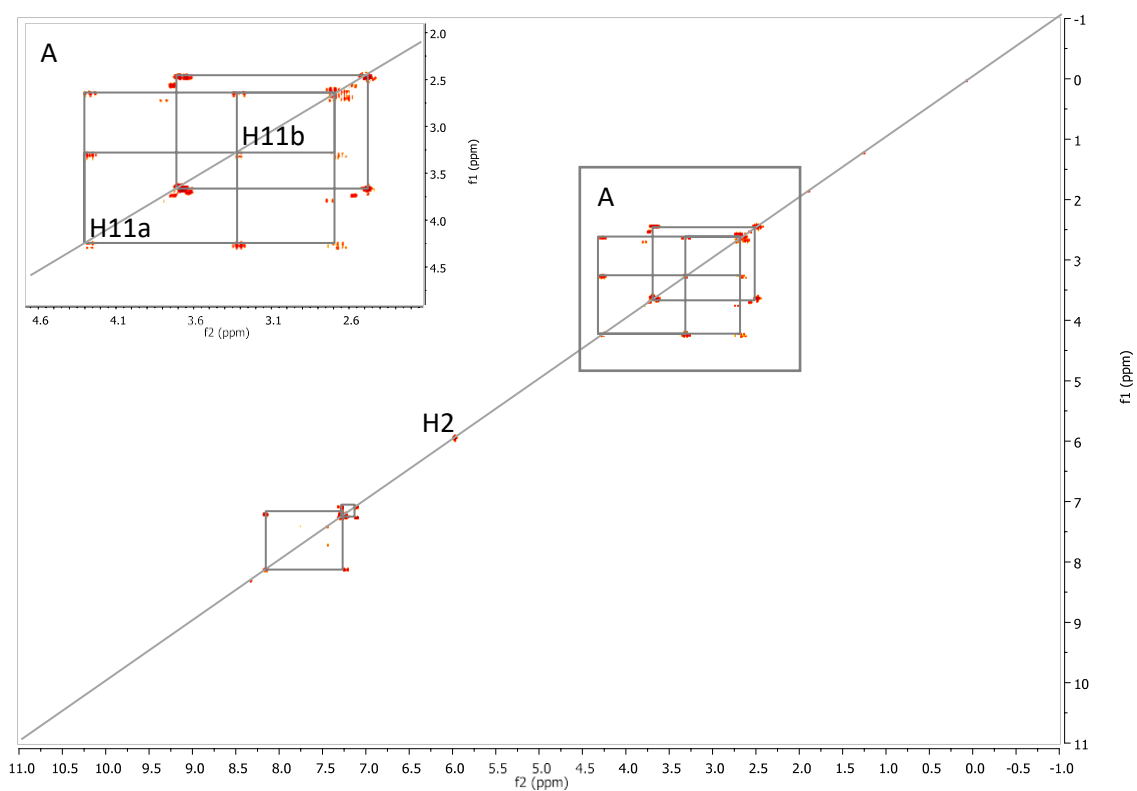


Figure S39: Spectrum 2D NMR COSY of benzothiazin-4-one **5Ab**.

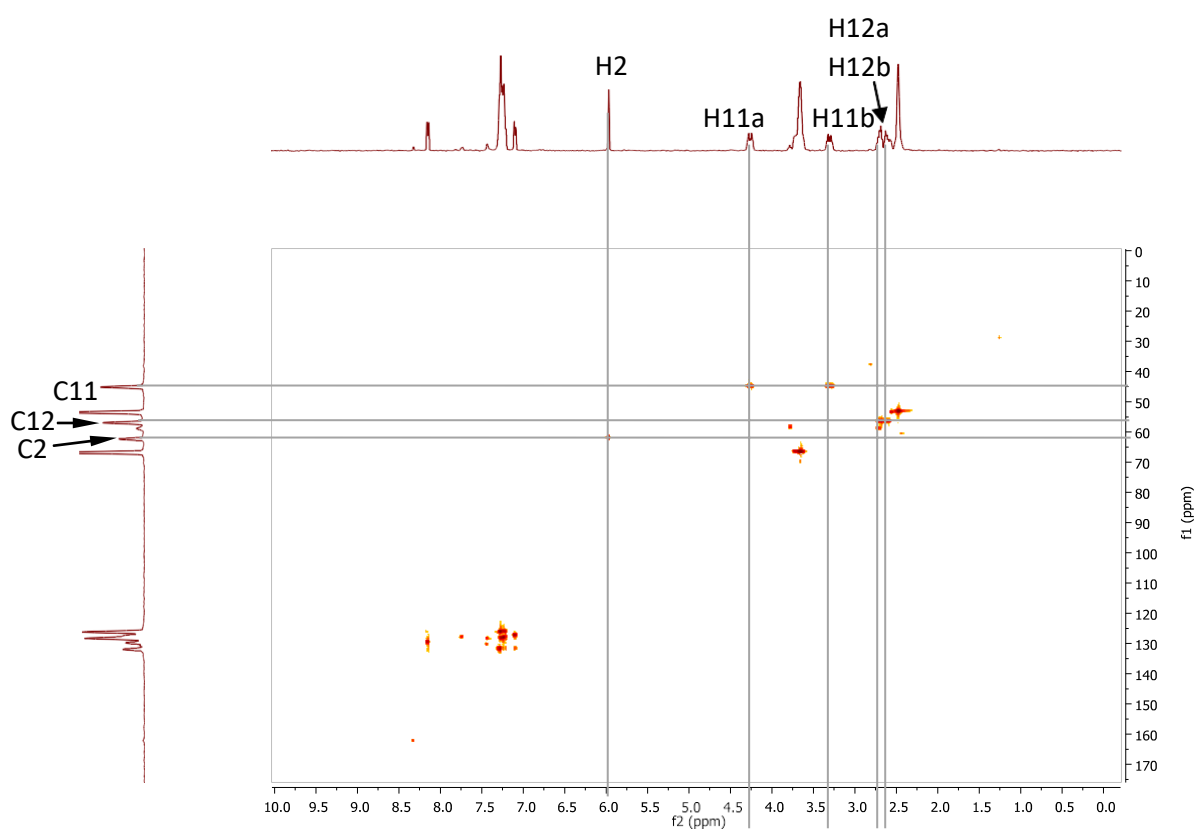


Figure S40: Spectrum 2D NMR HSQC of benzothiazin-4-one **5Ab**.

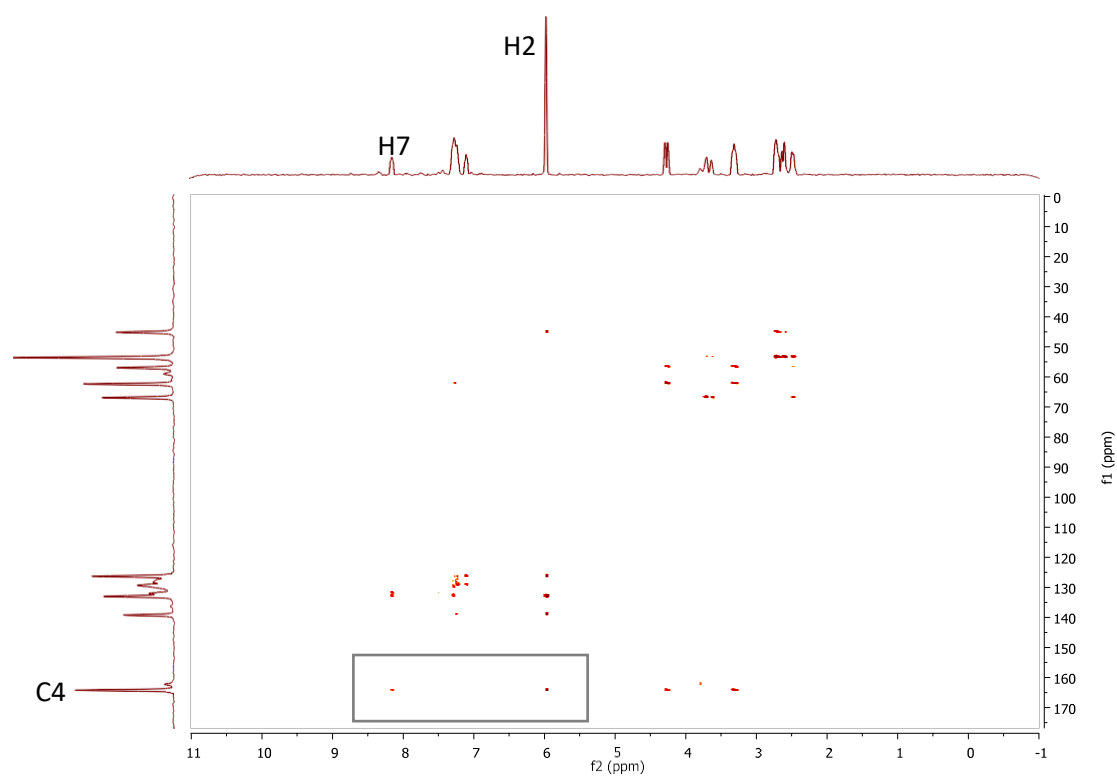


Figure S41: Spectrum 2D NMR HMBC of benzothiazin-4-one **5Ab**.

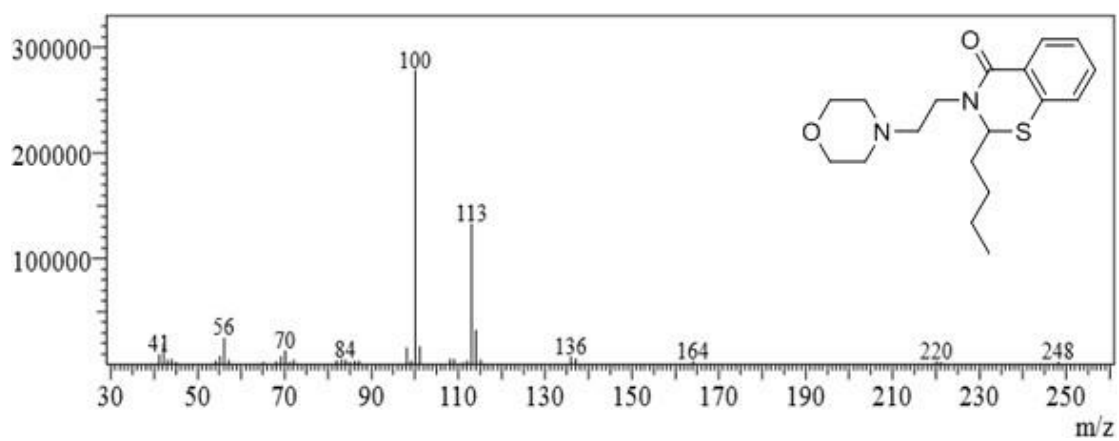
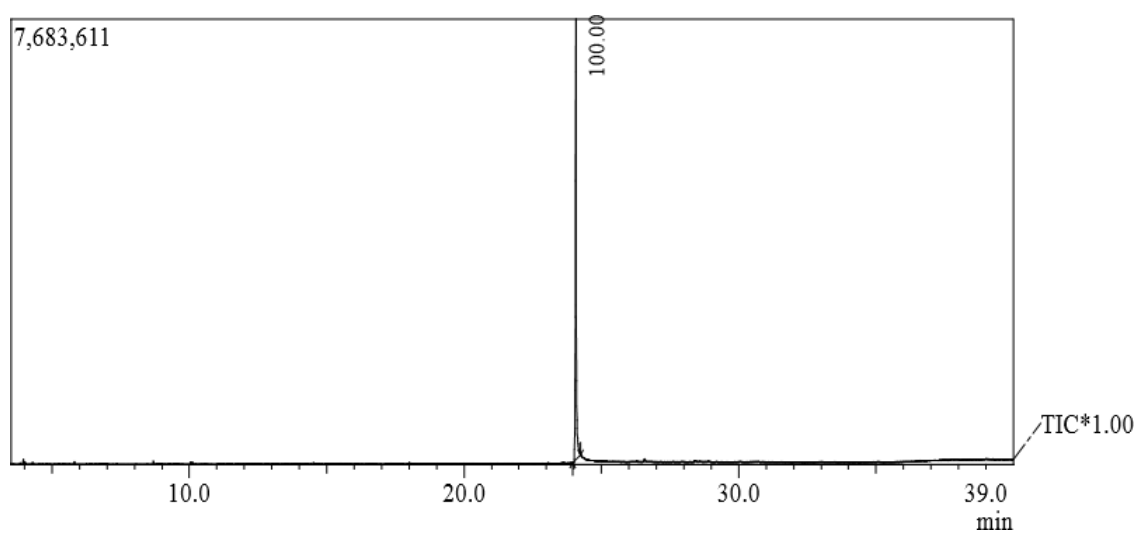


Figure S42: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Aa**.

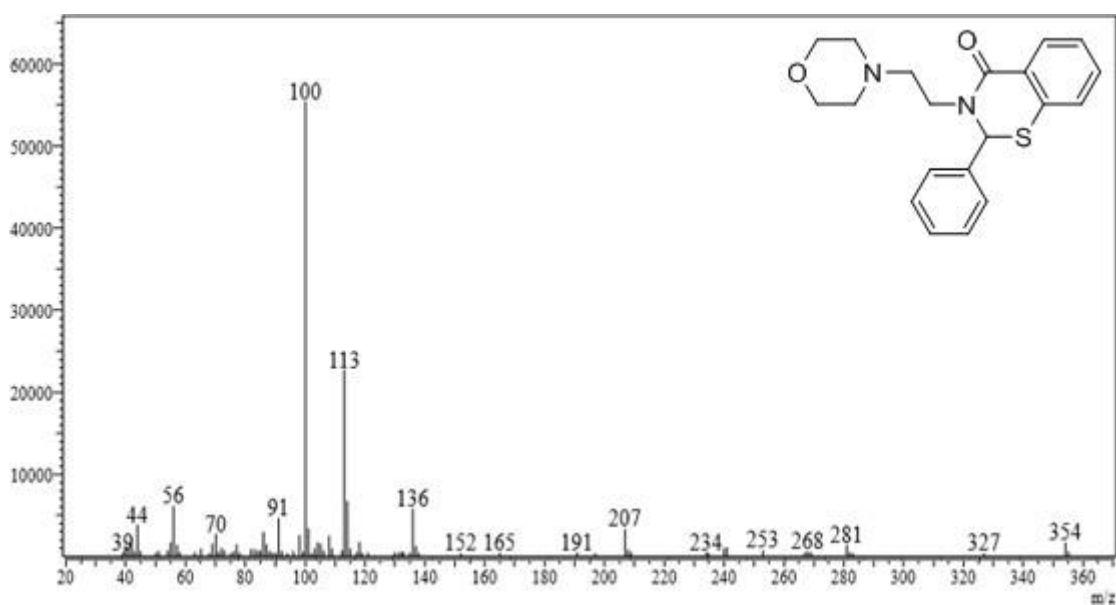
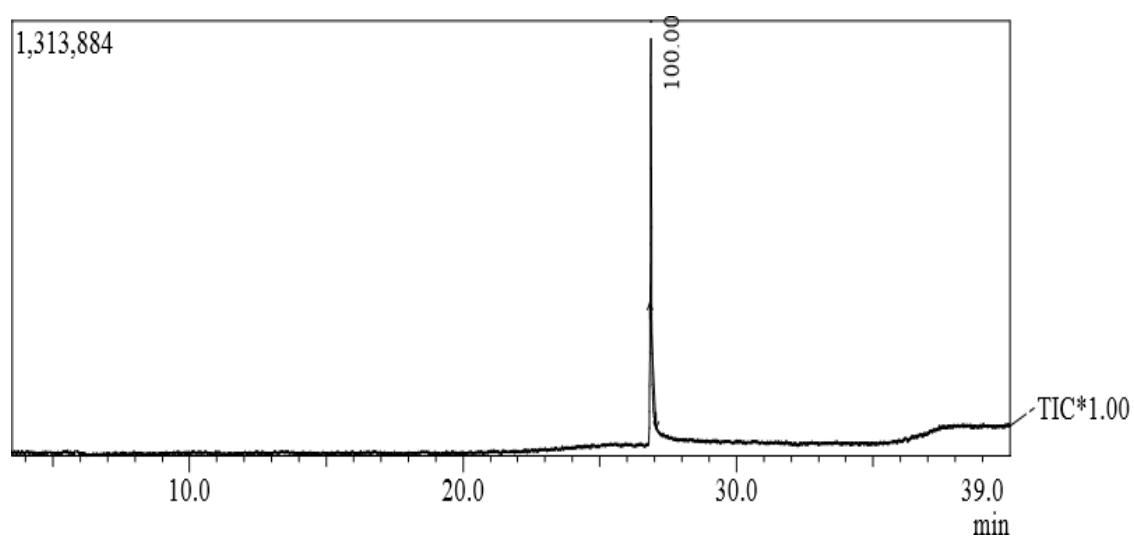


Figure S43: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Ab**.

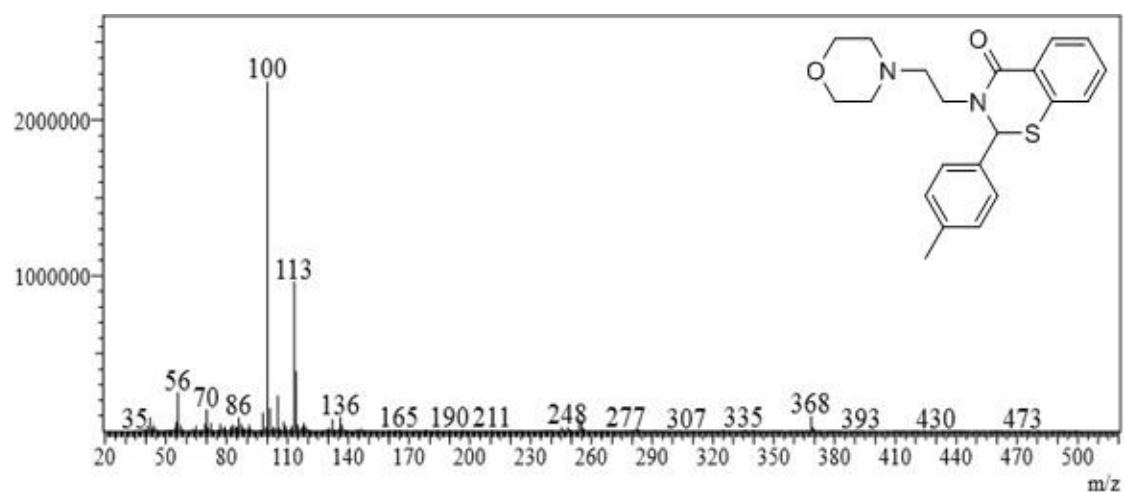
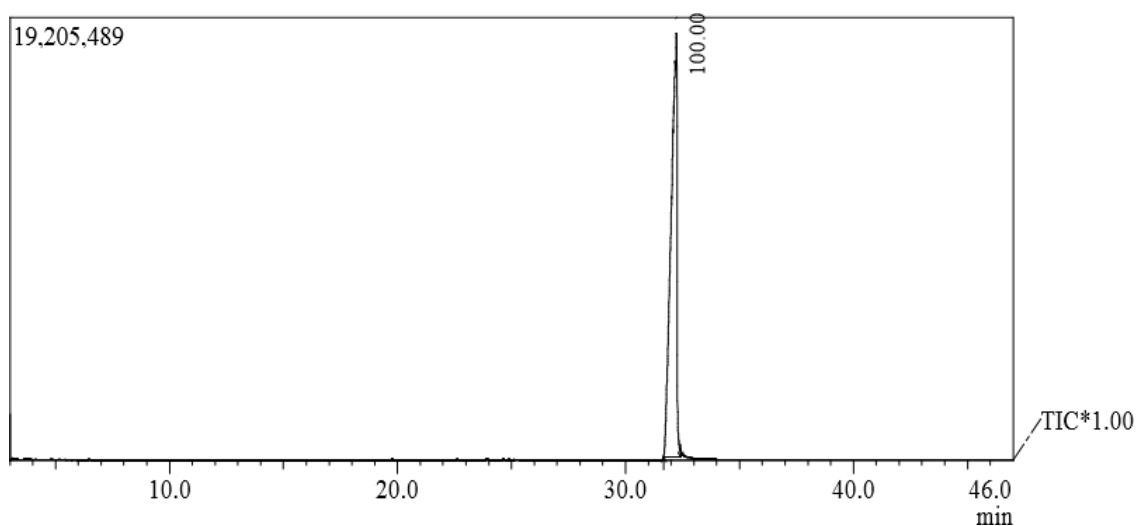


Figure S44: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Ac**.

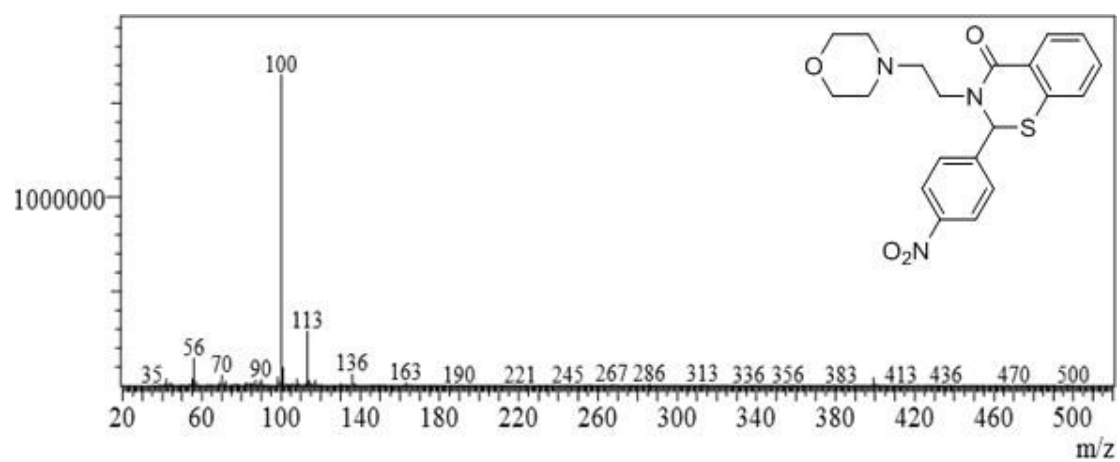
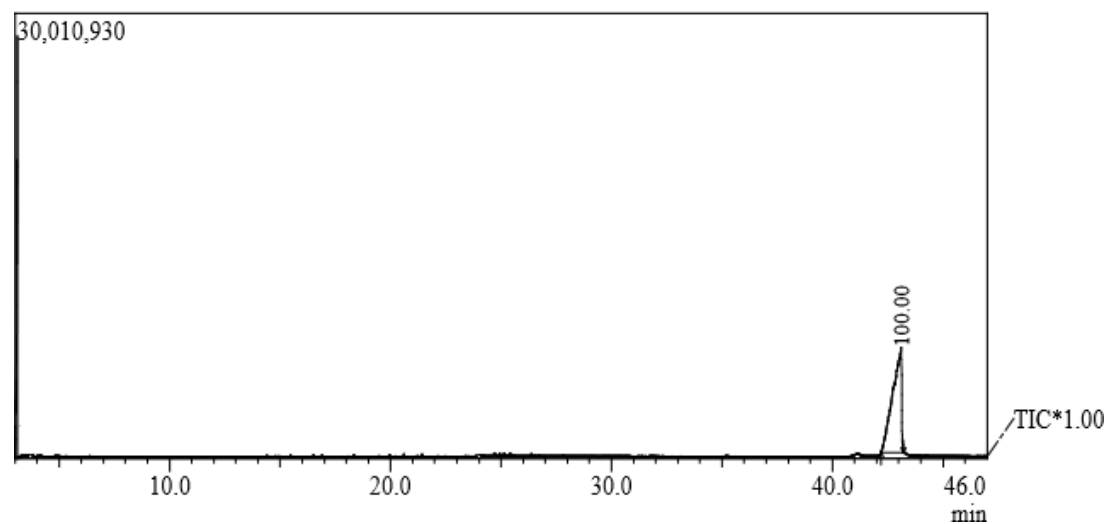


Figure S45: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Ad**.

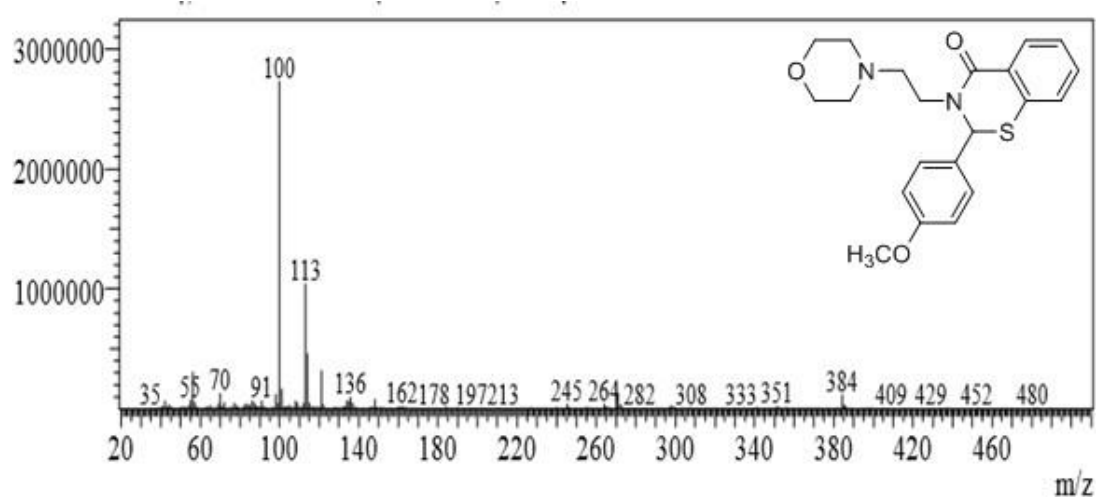
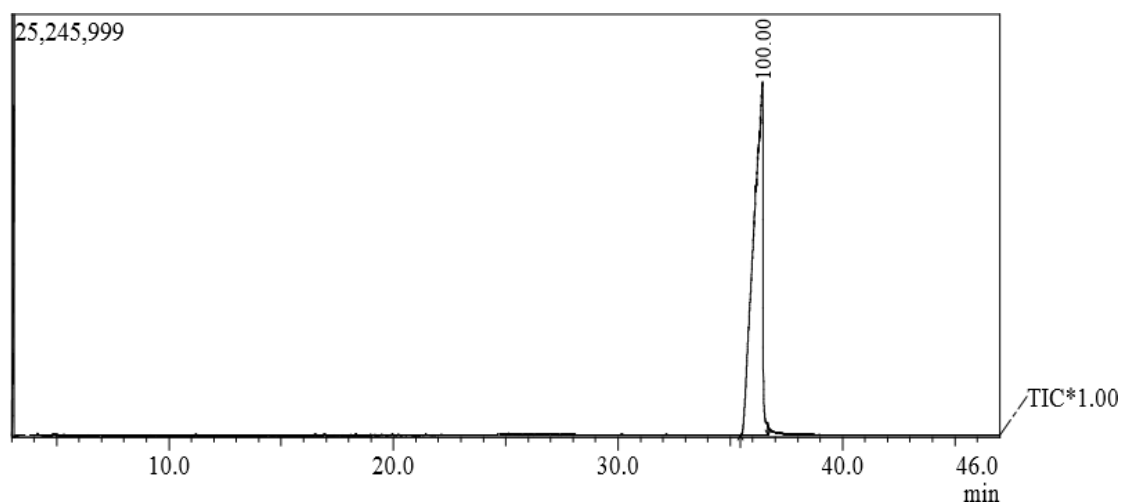


Figure S46: GC/MS of benzothiazin-4-one 5Ae.

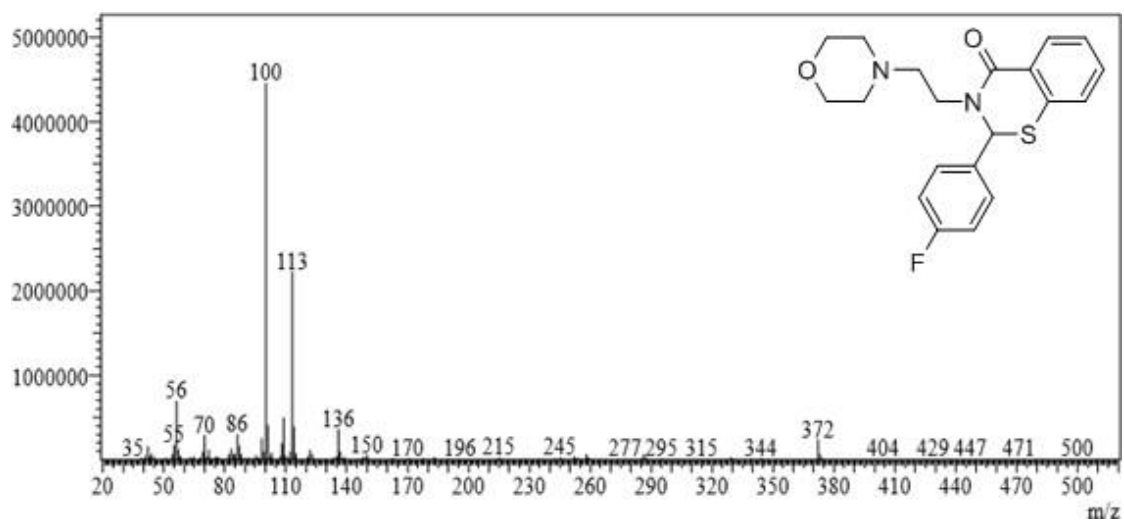
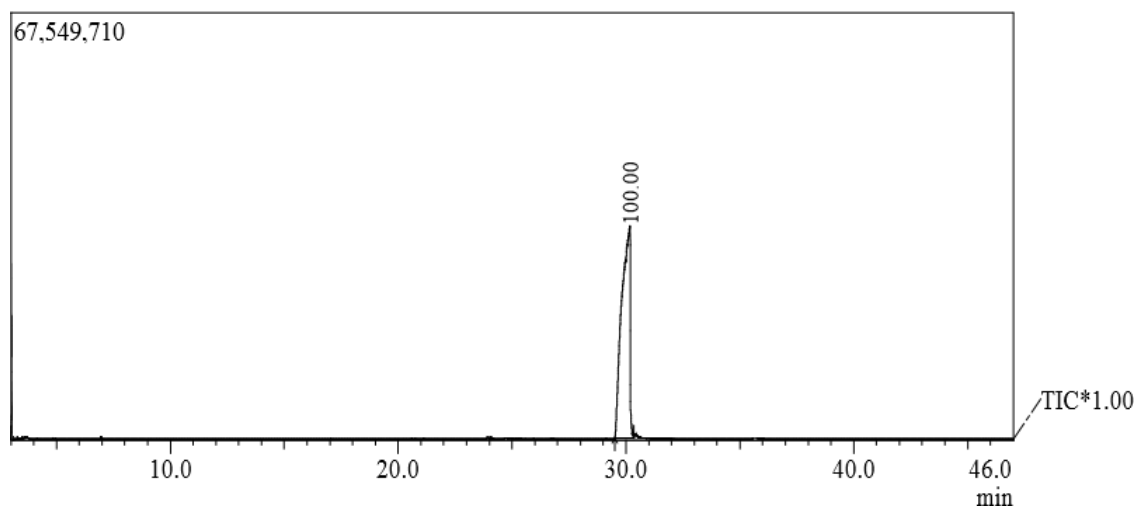


Figure S47: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Af**.

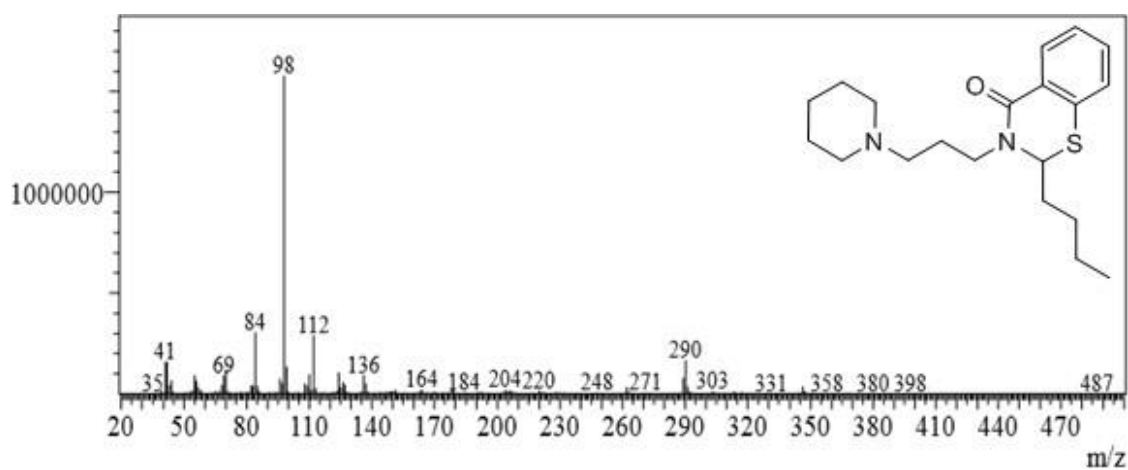
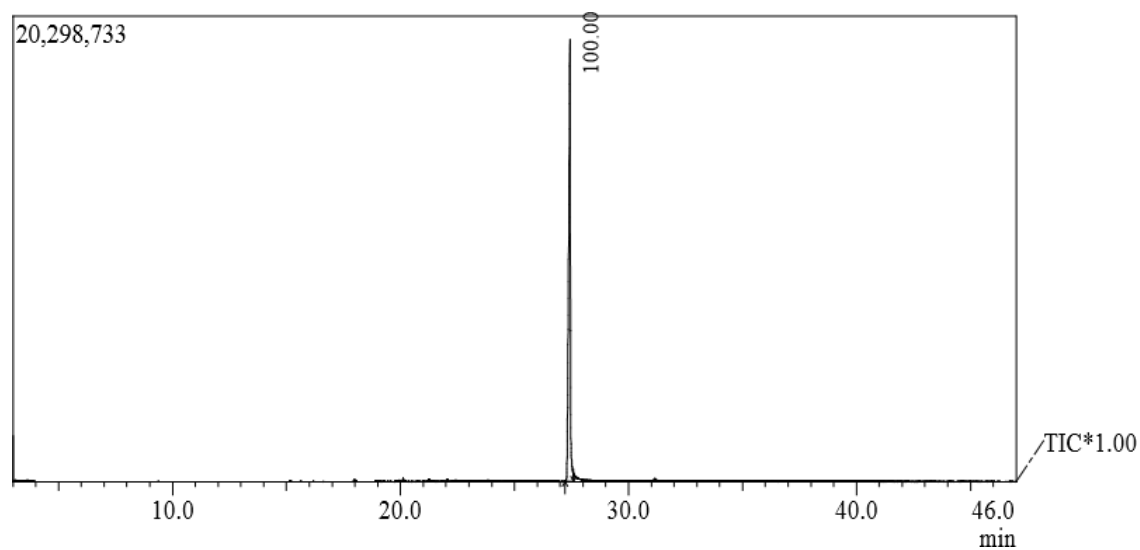


Figure S48: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Ba**

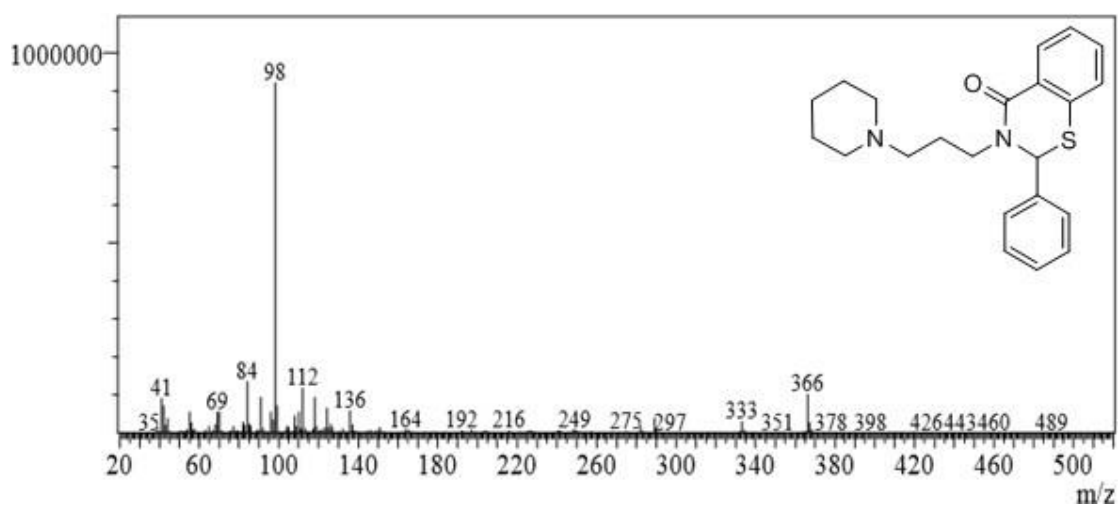
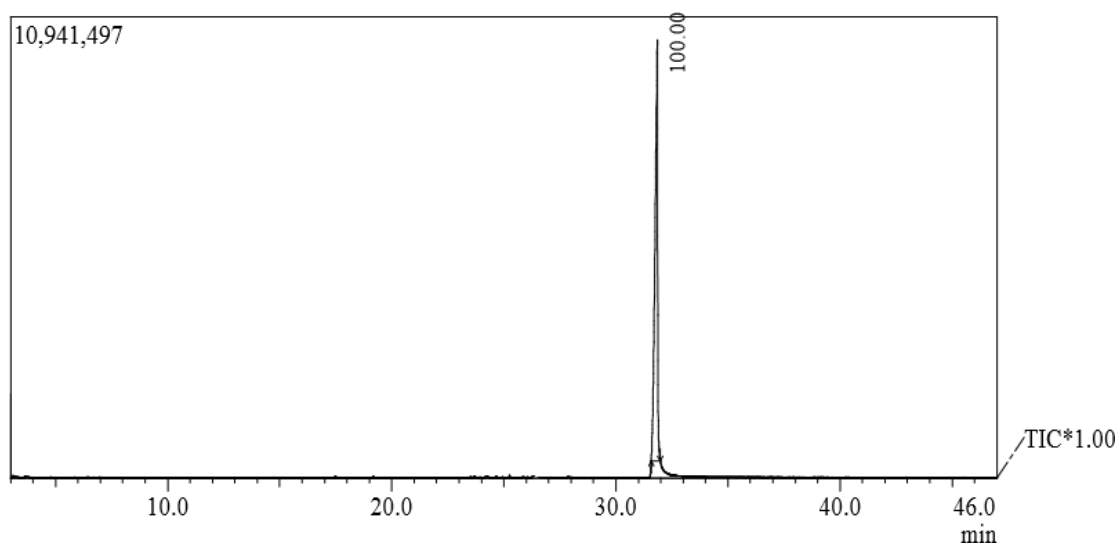


Figure S49: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Bb**

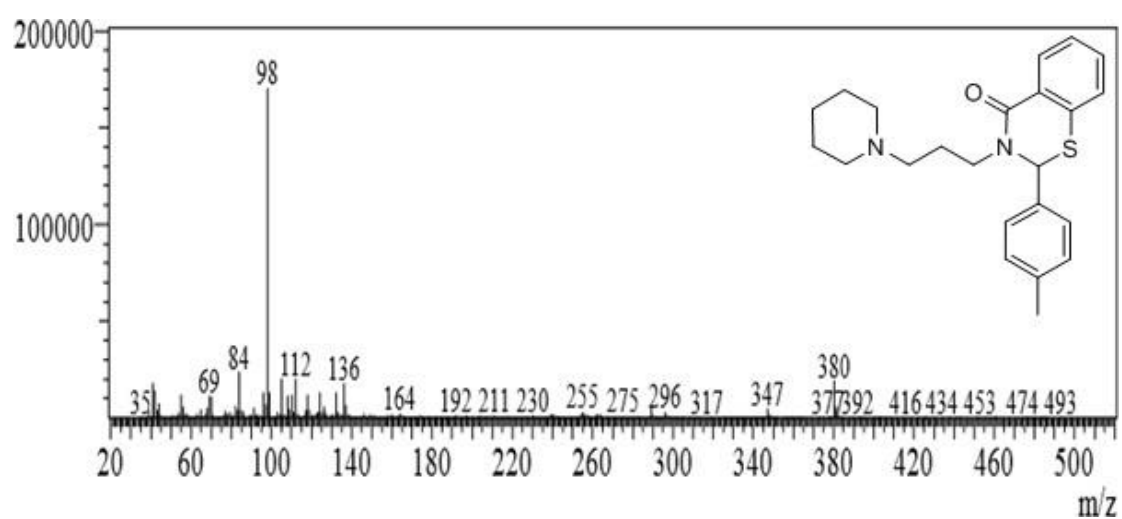
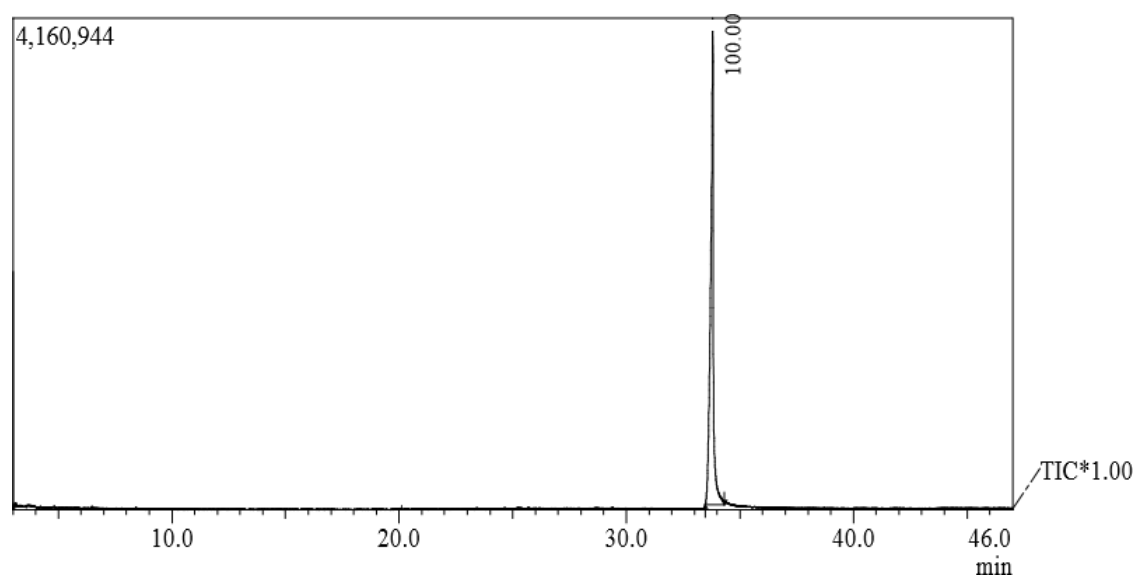


Figure S50: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Bc**.

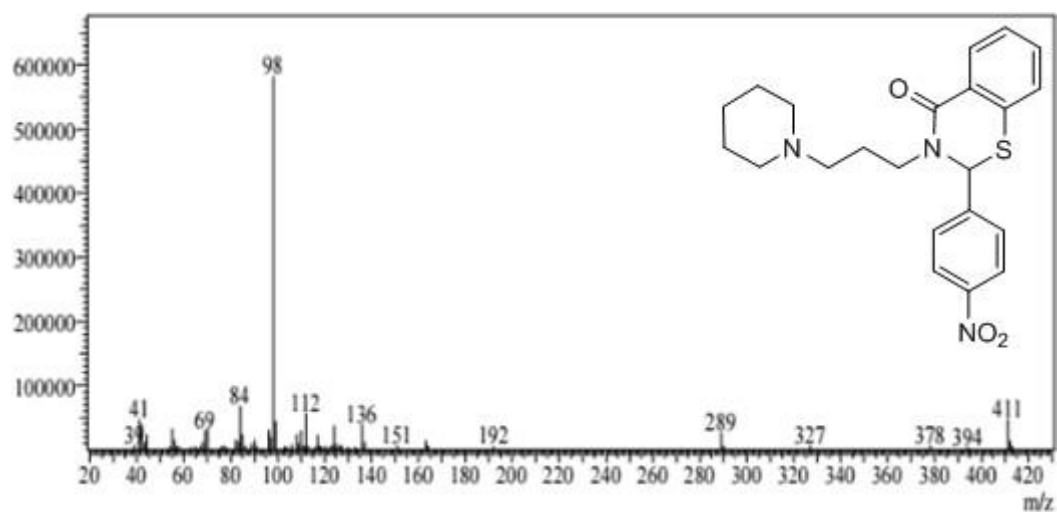
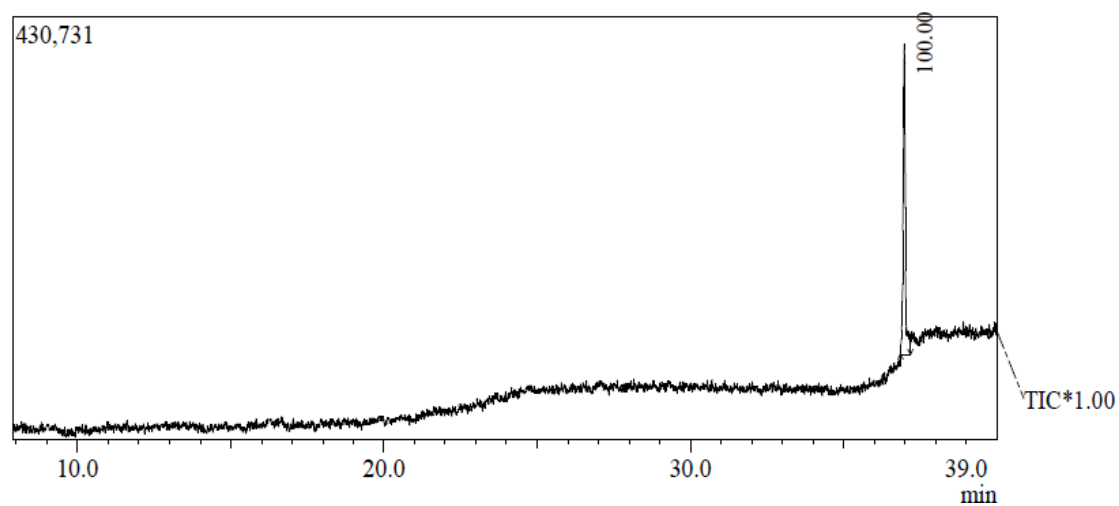


Figure S51: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Bd**.

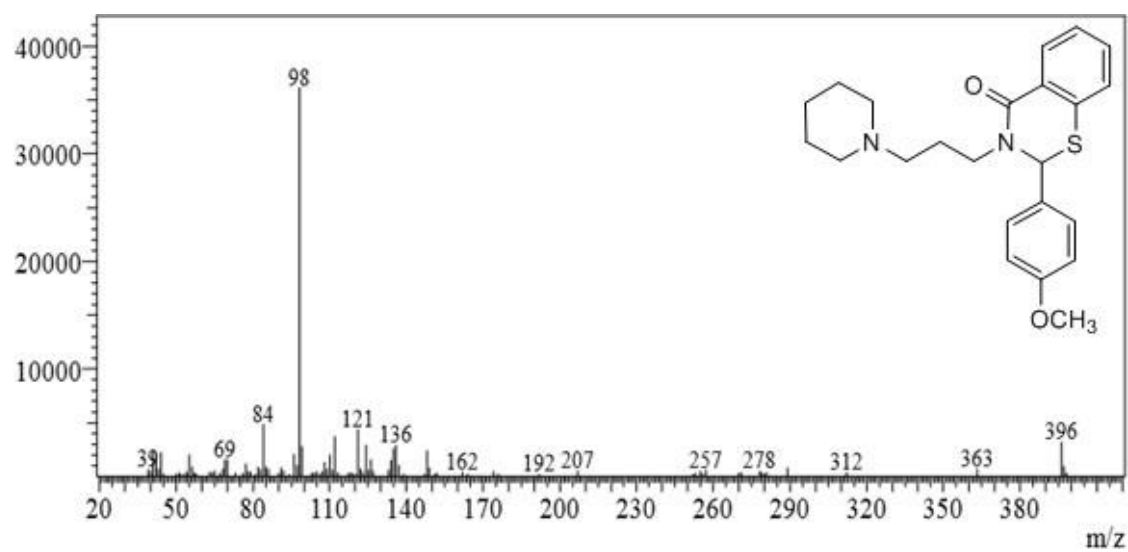
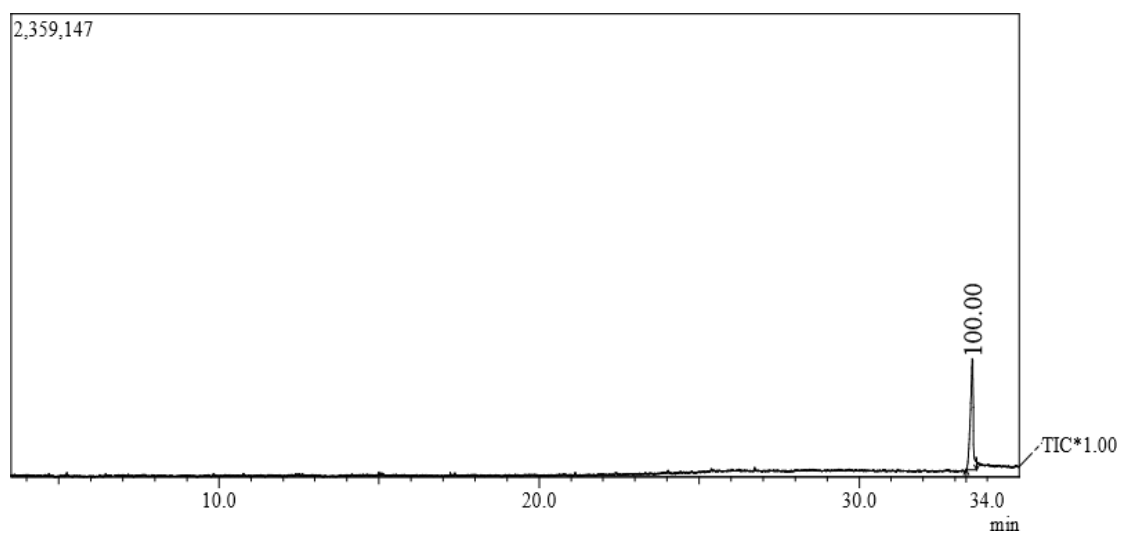


Figure S52: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Be**

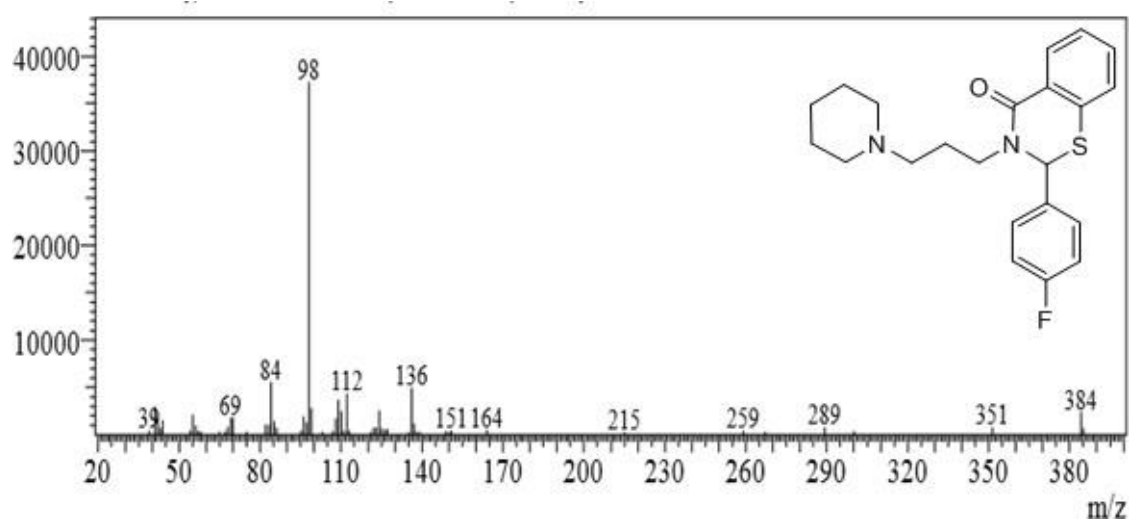
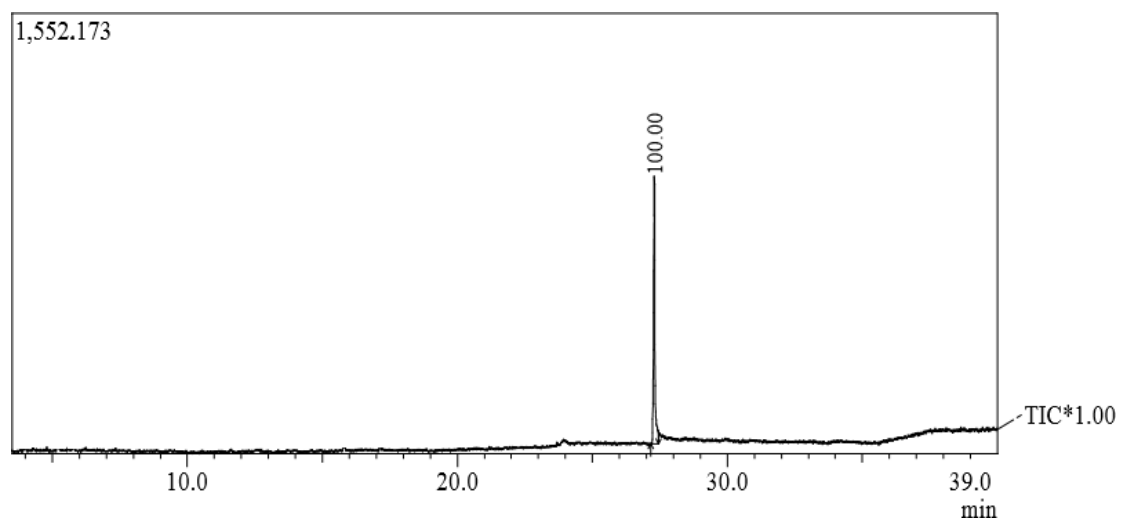


Figure S53: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Bf**

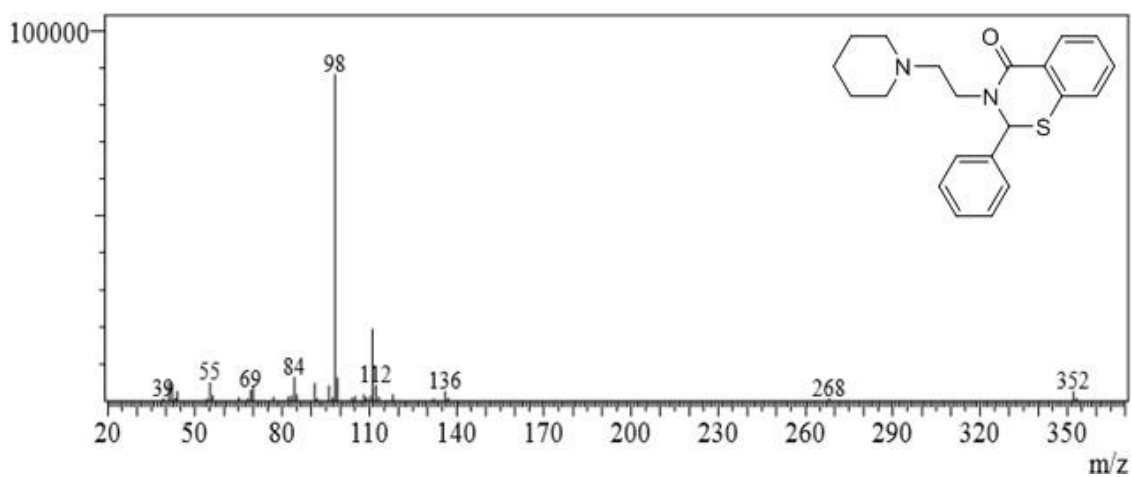
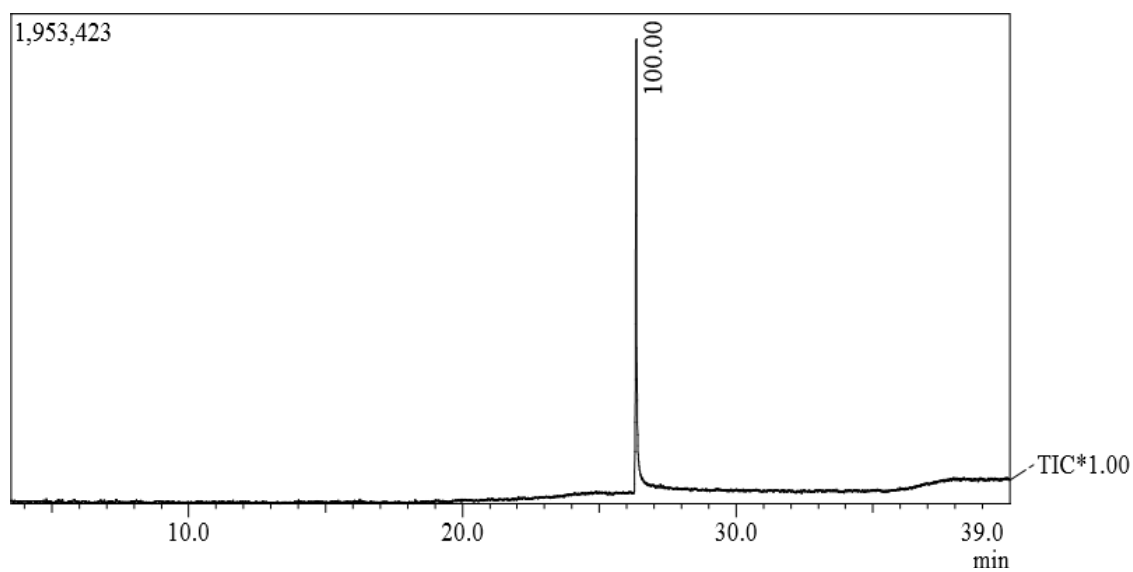


Figure S54: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Cb**

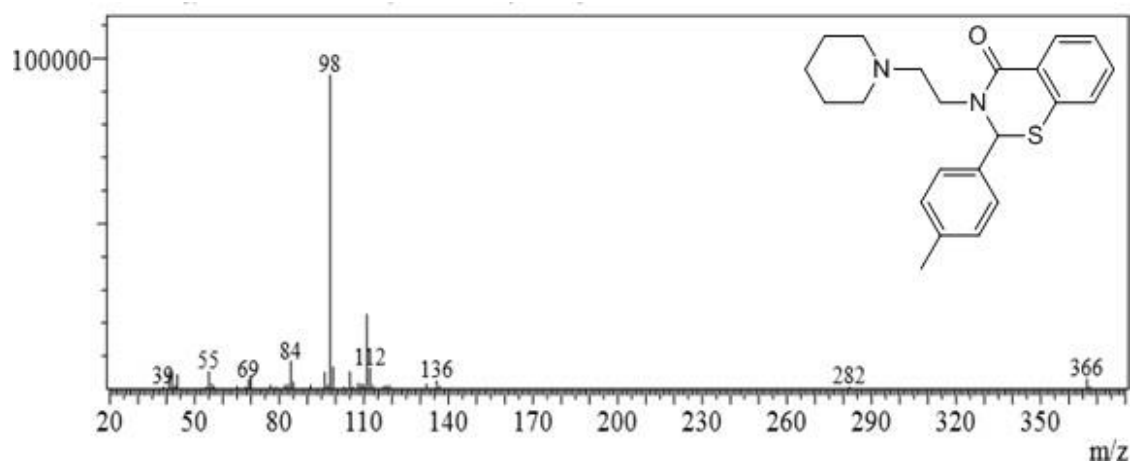
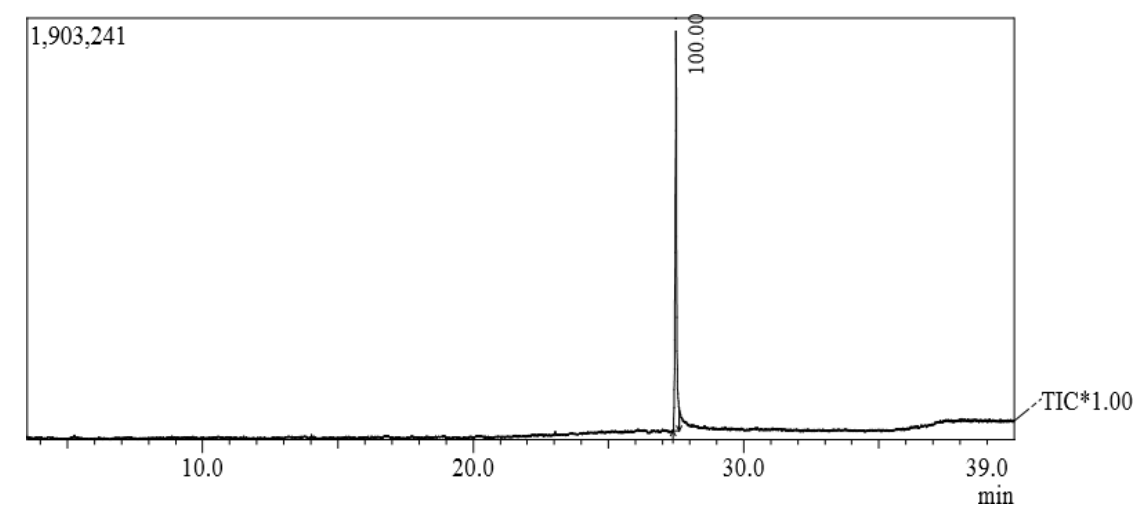


Figure S55: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Cc**

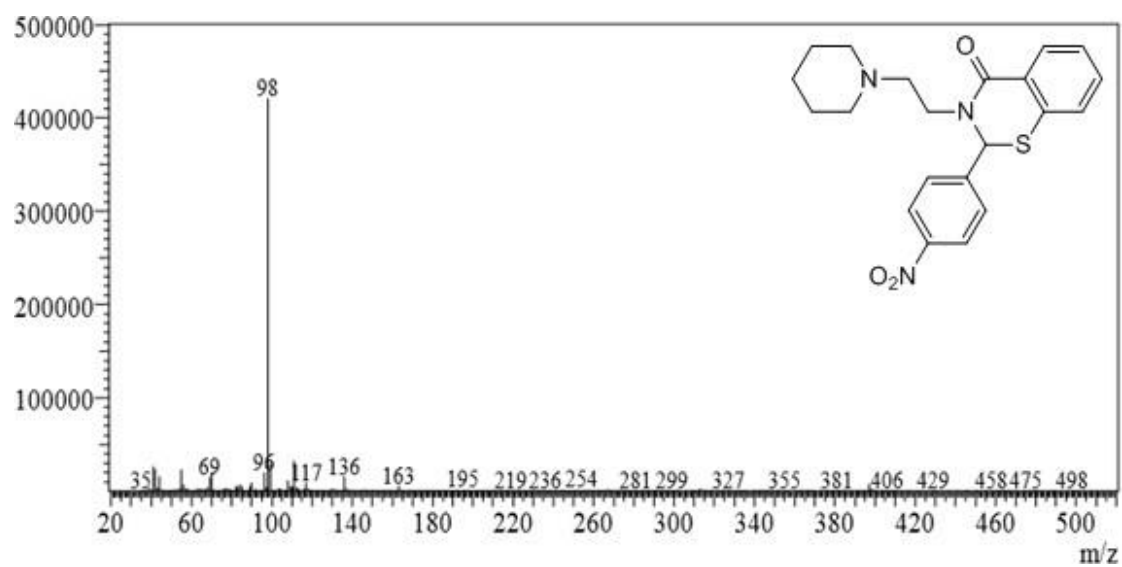
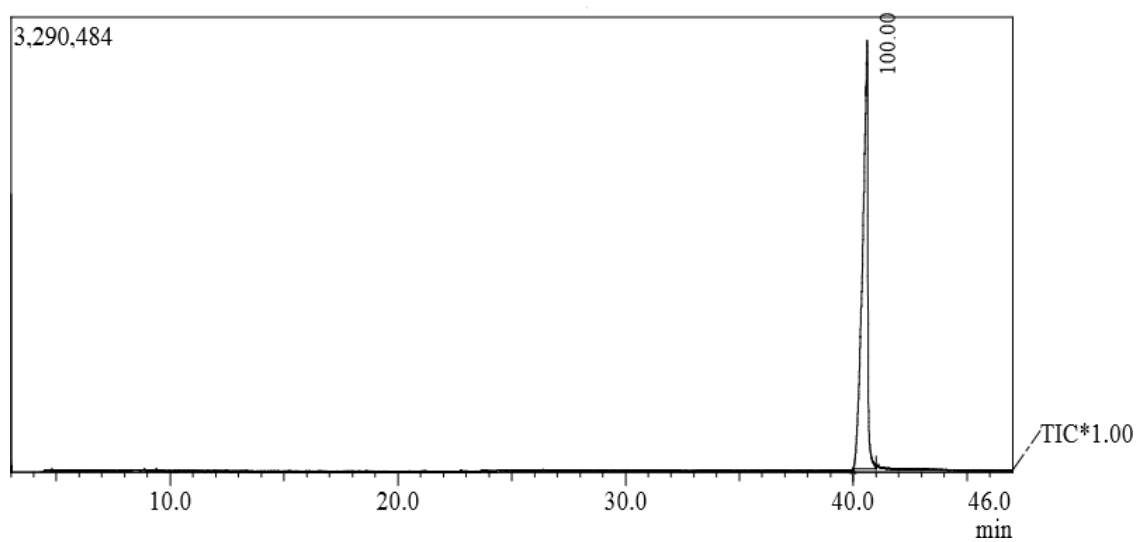


Figure S56: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Cd**

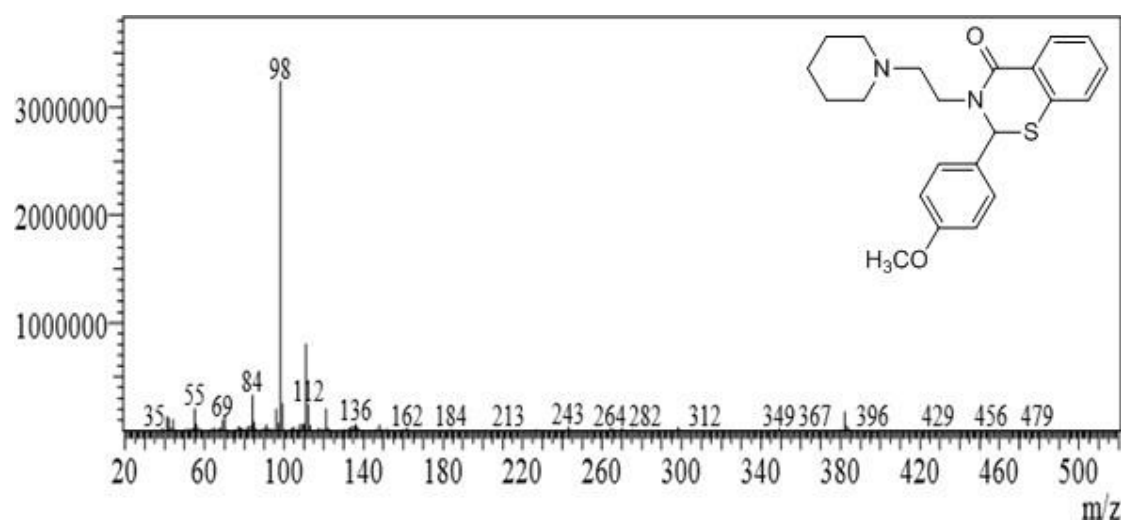
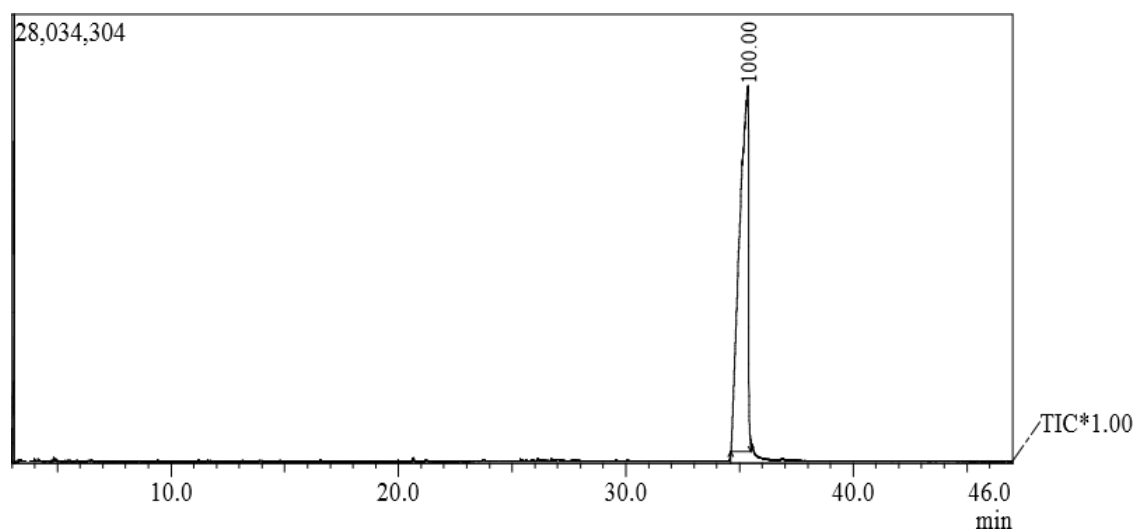


Figure S57: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Ce**

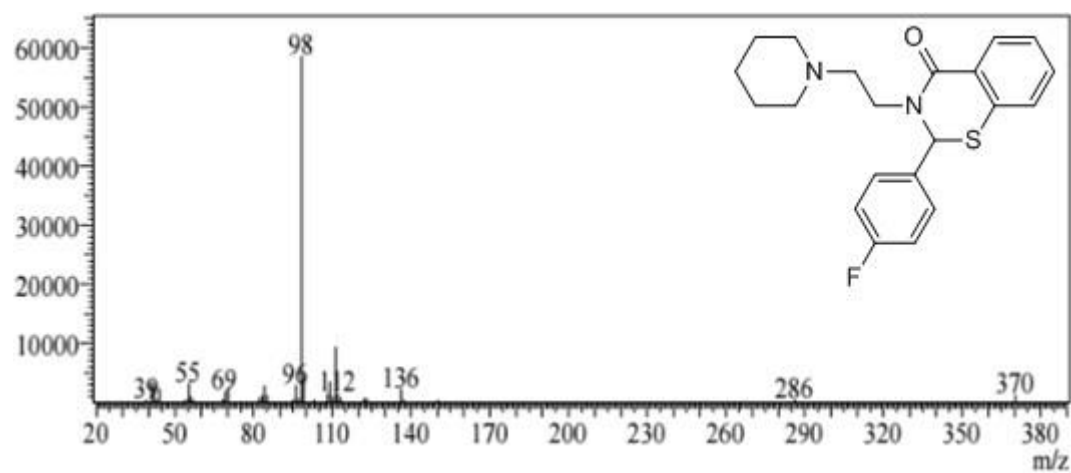
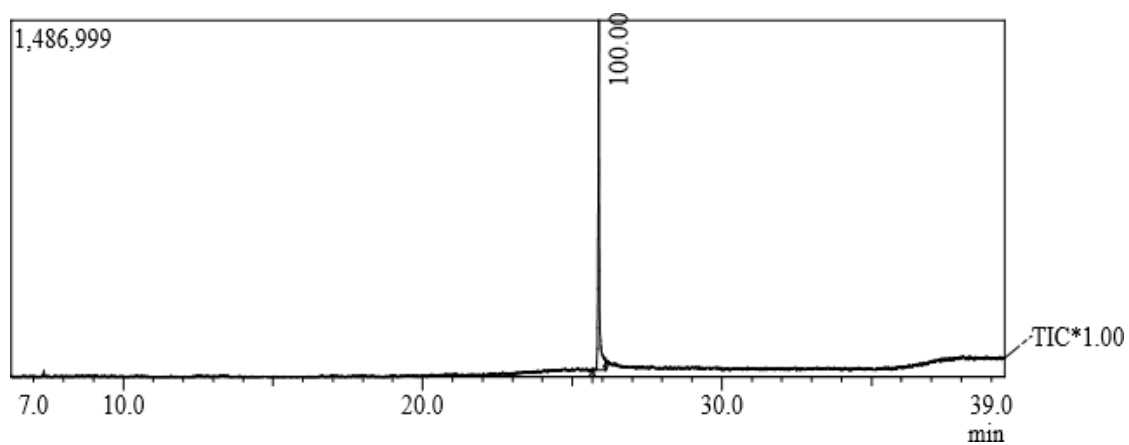


Figure S58: GC/MS of benzothiazin-4-one **5Cf**.

5. Conclusão

Foram sintetizadas dezenove benzotiazinonas derivadas 4-(2-aminoetilmorfolina), 1-(2-aminoetil)piperidina e *N*-(3-aminopropil)piperidina e diferentes aldeídos e o ácido tiosalicílico. As estruturas sintetizadas foram confirmadas pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C e CG-MS, caracterizando assim as substâncias sintetizadas.

Os resultados obtidos no desenvolvimento do trabalho levaram à seleção de 16 compostos com perfil efetivo em inibir a atividade da enzima AChE em hipocampo e córtex de ratos. Salientando que, as moléculas **5Ba** e **5Bd** merecem destaque por terem apresentado resultados mais significativos de inibição da atividade desta enzima, e por inibir expressivamente já na concentração de 10 μM .

Os melhores compostos ativos no ensaio da AChE, revelaram um perfil seguro, devido à ausência de citotoxicidade na concentração de 100 μM . Os mesmos compostos demonstraram um possível efeito citotóxico em cultura de fibroblasto humano, porém apenas na maior concentração analisada, 250 μM , consideravelmente maior que a concentração ativa encontrada.

A diferença de resultados entre as substâncias consiste em diferentes substituintes ligados ao anel da benzotiazinona, que conferem diferentes propriedades farmacológicas. Tendo em vista a procura de novos fármacos eficientes no tratamento da doença de Alzheimer.

6. Referências Bibliográficas

ALEXANDER, F. P.; ANATOLY, S.; ALAN, R. Heterocycles in Life and Society: An Introduction to Heterocyclic Chemistry, Biochemistry and Applications. 2 ed. West Sussex. John Wiley & Sons, 2011.

ALVES, L.; CORREIA, A. S.; MIGUEL, R.; ALEGRIA, P.; BUGALHO, P. Alzheimer's disease: a clinical practice-oriented review. **Frontiers in Neurology**, v. 3, 2012.

BOSENBECKER, J.; BAREÑO, V. D.; DIFABIO, R.; VASCONCELLOS, F.A.; DUTRA, F. S.; OLIVEIRA, O. S.; BARSCHAK, A. G.; STEFANELLO, F. M.; CUNICO, W. Synthesis and antioxidant activity of 3-(Pyridin-2-ylmethyl)-1,3-thiazinan(thiazolidin)4-ones. **Journal Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 28, p. 425-32, 2014.

BROWN, D. A. Acetylcholine. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 120-126, 2006.

CACABELOS, R.; CACABELOS, P.; TORRELLAS, C.; TELLADO, I.; CARRIL, J. C. Pharmacogenomics of Alzheimer's disease: novel therapeutic strategies for drug development. **Methods in Molecular Biology**, v. 1175, p. 323-556, 2014.

CONTESTABILE, A.; The history of the cholinergic hypothesis. **Behavioural Brain Research**, v. 221, p. 334-340, 2011.

CREWS, L.; MASLIAH, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 19, p. 12-20, 2010.

CUNICO, W.; GOMES, C. R. B.; VELLASCO, Jr. W. T. Chemistry and Biological Activities of 1,3-Thiazolidin-4-ones. **Mini-Reviews in Organics Chemistry**, v. 5, p. 336-344, 2008.

DA COSTA, J. S.; LOPES, J. P. B.; RUSSOWSKY, D.; PETZHOLD, C. L.; BORGES, A. C. A.; CESCHI, M. A.; KONRATH, E.; BATASSINI, C.; LUNARD, P. S.; GONÇALVES, C. A. S. Synthesis of tacrine-lophine hybrids via one-pot four component reaction and biological evaluation as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 556-563, 2013.

FIGUEIREDO, J. A.; ISMAEL, M. I.; PINHEIRO, J. M.; SILVA, A. M. S.; JUSTINO, J.; SILVA, F. V. M.; GOULART, M.; MIRA, D.; ARAÚJO, M. E. M.; CAMPOY, R.; RAUTER, A. P. Facile synthesis of oxo-/thioxopyrimidines and

tetrazoles C-C linked to sugars as novel non-toxic antioxidant acetylcholinesterase inhibitors. **Carbohydrate Research**, v. 347, p. 47-54, 2012.

FOND, G.; MICOULAUD-FRANCHI, J. A.; BRUNEL, L.; MACGREGOR, A.; MIOT, S.; LOPEZ, R.; RICHERI, R.; ABBAR, M.; LANCON, C.; REPANTIS, D. Innovative mechanisms of action for pharmaceutical cognitive enhancement: A systematic review. **Psychiatry Research**, v. 229, p. 12-20, 2015.

FRANCIS, P.T.; RAMÍREZ, M.J.; LAI, M.K. Neurochemical basis for symptomatic treatment of Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 59; p. 221-229; 2010.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M, G. A Century of Alzheimer's Disease. **Science**, v. 314, p. 777-781, 2006.

HEBDA, M.; BAJDA, M.; WIĘCKOWSKA, A.; SZŁAJ, N.; PASIEKA, A.; PANEK, D.; GODYŃ, J.; WICHUR, T.; KNEZ, D.; GOBEC, S.; MALAWSKA B. Synthesis, Molecular Modelling and Biological Evaluation of Novel Heterodimeric, Multiple Ligands Targeting Cholinesterases and Amyloid Beta. **Molecules**, v. 26, p. 410, 2016.

HOLTZMAN, D. M.; MORRIS, J. C.; GOATE, A. M. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. **Science Translational Medicine**, v. 6, p. 73-77, 2011.

JAIN, N. P.; UPASANI, C. D.; JAIN, U. N. Synthesis and Antifungal Activity of 1,4-Benzothiazine Derivatives. **American Journal PharmTech Research**, v. 5, p. 2249-3387, 2013.

JUNG, M.; PARK, M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrinoma pilosa*. **Molecules**, v. 12, p. 2130-2139, 2007.

KAMEL, M. M.; ALI, H. I.; ANWAR, M. M.; MOHAMED, N. A.; SOLIMAN, A. M. M. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel Sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 572-580, 2010.

KITSIOU, C.; UNSWORTH, W. P.; COULTHARD, G.; TAYLOR, R. J. K. Substrate scope in the direct imine acylation of ortho-substituted benzoic acid derivatives: the total synthesis (±)-cavidine. **Tetrahedron**, v. 70, p. 7172-7180, 2014.

KLIMOVA, B.; MARESOVA, P.; VALIS, M.; HORT, J.; KUČA, K. Alzheimer's disease and language impairments: social intervention and medical treatment. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p. 1401-1408, 2015.

KULSHRESHTHA, A.; PIPLANI, P. Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. **Neurological Sciences**, v. 37, p. 1403-1435, 2016.

KULSHRESHTHA, A.; PIPLANI, P. Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. **Neurological Sciences**; v. 37, p. 1403-1435, 2016.

KUMAR, A.; NISHA, C. M.; SILAKARI, C.; SHARMA, I.; ANUSHA, K.; GUPTA, N.; NAIR, P.; TRIPATHI, T. Current and novel therapeutic molecules and targets in Alzheimer's disease. **Journal of the Formosan Medical Association**, p. 1-8, 2015.

KUMAR, A.; SINGH, A. A review on Alzheimer's disease pathophysiology 4 and its management: An update. **Pharmacological Reports**, v. 67; p. 195-203, 2015.

KUNZLER, A.; NEUENFELDT, P. D.; DAS NEVES, A. M.; PEREIRA, C. M. P.; MARQUES, G. H.; NASCENTE, P. S.; FERNANDES, M. H. V.; HÜBNER, S. O.; CUNICO, W. Synthesis, antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 74-80, 2013.

MAHESHWARI, M.; GOYAL, A. A review: synthesis and medicinal importance of 1,4-benzothiazine analogs. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, p. 41-46, 2015.

MARTOCCHIA, A.; FALASCHI, P. Current Strategies of Therapy in Alzheimer's Disease. **The Open Neuropsychopharmacology Journal**, v. 1, p. 19-23, 2008.

MASTELOTO, H. G.; DRAWANZ, B. B.; BERWALDT, G. A.; NEUENFELDT, P. D.; SIQUEIRA, G. M.; CUNICO, W. 3,4-(Methylenedioxy)aniline as precursor to the synthesis of thiazolidin-4-ones. **Monatshefte für Chemie**, v. 146, p. 327-334, 2015.

MOHAMED, S. K.; ABDELHAMIDA, A. A.; OMARAC, W.; JABERE, A. A. M.; ALBAYATIF, M. An efficient one-pot synthesis and in-vitro anti-microbial study of

new thiazolidinones, imidazolidinones and thiazinanones based amino alcohols. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 19-31, 2013.

MUCKE, L. Neuroscience: Alzheimer's disease. **Nature**, v. 461, p. 895-7, 2009.

NEUENFELDT, P. D.; DRAWANZ, B. B.; AGUIAR, A. C.; FIGUEIREDO Jr., F.; KRETTLI, A. U.; CUNICO, W. Multicomponent Synthesis of New Primaquine Thiazolidinone Derivatives. **Synthesis**, v. 23, p. 3866-3870, 2011.

NIKALJE, A. P.; SHAIKH, A. N.; SHAIKH, S. I.; KHAN, F. A.; SANGSHETTI, J. N.; SHINDE, D. B. Microwave assisted synthesis and docking study of N-(2-oxo-2-(4-oxo-2-substituted thiazolidin-3ylamino)ethyl)benzamide derivatives as anticonvulsant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 5558-5562, 2014.

NITIN P. J.; CHANDRASHEKHAR D.U.; USHA N. J. Synthesis and Antifungal Activity of 1,4-Benzothiazine Derivatives. **American Journal of PharmTech Research**, v. 3, p. 2249-3387, 2013.

PATRICK, G. L. An introduction to medicinal chemistry, 4 ed. New York, Oxford University Press, 2009.

PENG, C. T.; GAO C.; WANG, N. Y.; YOU X.Y.; ZHANG, L. D.; ZHU Y. X.; YING, LEI, Q.; XIAO, K. J.; YU L.T. Synthesis and antitubercular evaluation of 4-carbonyl piperazine substituted 1,3-benzothiazin-4-one derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2015.

PENNANEN, C.; KIVIPELTO, M.; TUOMAINEN, S.; HARTIKAINEN, P.; HANNINEN, T.; HALLIKAINEN, M. Hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment. **Neurobiology of Aging**, v. 25, p. 303-310, 2004;

PRASAD, D.; PREETAM, A.; NATH, M. DBSA catalyzed, one-pot three-component "on water" green protocol for the synthesis of 2,3-disubstituted 4-thiazolidinones. **Royal Society of Chemistry**, v. 2, p. 3133-3140, 2012.

ROY, K. K.; TOTA, S.; TRIPATHI, T.; CHANDER, S.; NATH, C.; SAXENA, A. K. Lead optimization studies towards the discovery of novel carbamates as potent AChE inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1613-1620, 2012.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural Brain Research**, v. 221, p. 555-563, 2011.

SHAIKH, M. H.; SUBHEDAR, D. D.; ARKILE, M.; KHEDKAR, V. M.; JADHAV, N.; SARKAR, D.; SHINGATE, B. B. Synthesis and bioactivity of novel triazole incorporated benzothiazinone derivatives as antitubercular and antioxidant agent. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, p. 561-569, 2016.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, p. 3-10, 2008.

SILVERBERG, L. J.; PACHECO C. N.; LAGALANTE, A.; CANNON, K. C.; BACHERT, J. T.; XIE, Y.; BAKER L.; BAYLIFF, J. A. Synthesis and Spectroscopic Properties of 2,3-Diphenyl-1,3-thiaza-4-one Heterocycles. **International Journal of Chemistry**, v. 7, 2015.

TACHIKAWA, H.; IGARASHI, MANABU N. J.; ISHIBASHI, T. Ab initio model study on acetylcholinesterase catalysis: potential energy surfaces of the proton transfer reactions. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 79, p. 11-23, 2005.

TEIPEL, S.; HEINSEN, H.; AMARO, E.; GRINBERG, L. T.; KRAUSE, B.; GROTHE M. Cholinergic basal forebrain atrophy predicts amyloid burden in Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 35, p. 482-491, 2014.

TRIPATHI, A. C.; GUPTA, S. J.; FATIMA, G. N.; SONAR, P. K.; VERMA, A.; SARAF, S. K. Thiazolidinones: The advances continue. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 72, p. 52-77, 2014.

XIE, S. S.; WANG, X. B.; LI, J. Y.; YANG, L.; KONG, L. Y. Design, synthesis and evaluation of novel tacrinee coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 50-53, 2013.

ZARGHI, A.; ZEBARDAST, T.; DARAIE, B.; HEDAYATI, M. Design and synthesis of new 1,3-benzthiazinan-4-one derivatives as selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 5369-5373, 2009.