

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E
ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS 5,7-DIIDROXICUMARINA**

DIEGO RANGEL CARDOSO SILVA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO-2012**

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E
ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS 5,7-DIIDROXICUMARINA

DIEGO RANGEL CARDOSO SILVA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais.”

Orientador: Prof. D.Sc. Rodrigo Rodrigues de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO-2012

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E
ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS 5,7-DIIDROXICUMARINA

DIEGO RANGEL CARDOSO SILVA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais.”

Aprovada em 08 de março de 2012

Comissão Examinadora:

Prof. Edmilson José Maria (Doutor em Química) - UENF

Prof. Maria Raquel Garcia Veiga (Doutora em Química) - UENF

Prof. Pedro de Azevedo Castelo Branco (Doutor em Química)-
IFF *Campus* Campos-Centro

Prof. Rodrigo Rodrigues de Oliveira (Doutor em Química de Produtos
Naturais) – UENF
Orientador

Dedico este trabalho aos meus avós, Salatiel e Helenir e à minha grandiosa mãe, Marta, por todos os ensinamentos e todo amor recebido.

AGRADECIMENTOS

O Deus, por toda Sua grandeza e bondade, nos momentos bons e ruins, por guiar pelos caminhos certos e pela benção da vida

Aos meus avós, Salatiel Cardoso e Helenir Rangel Cardoso por todo cuidado e carinho recebido em toda minha vida.

À minha querida mãe, Marta Helena Rangel, por todo amor, ensinamento e incentivo recebido durante minha trajetória.

Aos meus irmãos Douglas Rangel, Kamilla Rangel, Jefferson Rangel e Ludmilla Rangel e à minha tia Elizabeth Rangel pela convivência e por ser parte de minha história.

Aos eternos amigos Manuela Oliveira e Jhonnatan Chagas pela gratidão, companheirismo e auxílio à busca dos meus objetivos desde a graduação.

Às amigas Josilaine Gomes, Luísa Mendes e Samila Morcelli pelas alegrias compartilhadas e apoio recebido

Ao meu orientador, Rodrigo Rodrigues de Oliveira, que sempre me ajudou a superar as dificuldades, acreditou no meu potencial e por todo aprendizado recebido.

Aos grandes professores da UENF Edmilson José Maria, Raimundo Braz Filho, Luciano Pasqualoto Canellas, Maria Raquel Garcia Vega, Michelle Frazão Muzitano e Ivo José Curcino Vieira pela cooperação no desenvolvimento deste projeto.

Aos grandes professores do IFF Pedro de Azevedo Castelos Branco e Christian Marcelo Paraguassú Cecchi pelos bons conselhos e ensinamentos acadêmicos.

Aos amigos do meu laboratório Adriana Lima, Amaro Ramos, Fernanda Neves, João Bastos, Quetlane Salles, Nayara Nocchi, Virgínia Oliveira e dos laboratórios vizinhos Marina Meirelles, Marco Antônio, Daniela Pereira, Roberto Ottoni, Rennê Costa, Glaucia Gonzaga, Wagner Terra e Jéssica Ribeiro pelas alegrias, companheirismo, conversas compartilhadas e ajudas recebidas.

À doutoranda Thatiana Ventura, aluna do CBB/UENF, pela cooperação nos testes biológicos.

Aos amigos da UENF Nilton Roberto, Cristiane Alvez e Valéria Pereira pelas boas conversas, alegrias e ajudas oferecidas.

À FAPERJ e UENF pelo suporte financeiro, técnico e administrativo.

E a todos que contribuíram para a realização dessa pesquisa.

Muito obrigado!

ÍNDICE GERAL

Lista De Abreviaturas, Fórmulas E Símbolos	ix
Índice De Tabelas	xii
Índice De Gráficos	xiv
Índice De Figuras	xv
Índice De Espectro	xix
Resumo	xxii
<i>Abstract</i>	xxiv
1- Introdução	1
2- Revisão de Literatura	3
2.1- Sínteses De Cumarina	3
2.2- Atividades Biológicas	18
2.2.1- Atividade Antiinflamatória	18

2.2.2- Atividade Citotóxica	20
2.2.3- Atividade Antituberculose	22
3- Objetivos	24
3.1- Objetivo Geral	24
3.2- Objetivos Específicos	24
4- Materiais e Métodos	26
4.1 – Equipamentos	25
4.2- Sínteses Orgânicas	25
4.2.1 – Formação do 5-metoxiresorcinol (1b).	27
4.2.2–Formação do anel lactona. Síntese da 5,7-diidroxycumarina (2a) e da 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b).	27
4.2.3-Formação do bergaptol (3) por sal de piridina.	28
4.2.4-Formação do bergaptol (3) por ácido de Lewis BBr ₃ .	29
4.2.5-Formação de derivados cumarínicos, síntese da 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e da 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina(4b).	30
4.2.6-Formação de derivados furocumarínicos. Síntese do 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e do 5-bromobutoxipsoraleno (5b).	30
4.2.7-Formação de ligantes cumarínicos. Síntese da 5-{4-[bis(2-piridinilmetil)amino]propoxi}-7-metoxicumarina (6a) e da 5-{4-[bis(2-piridinilmetil)amino]butoxi}-7-metoxicumarina (6b).	31
4.2.8 – Formação dos derivados cumarínicos 7-(2,2-dietoxietoxi)-5-hidroxycumarina (7a), 5,7-bis(dietoxietoxi)cumarina (7b) e 5-(dietoxietoxi)-7-metoxicumarina (7c). Substituição com grupos acetais.	32
4.2.9-Formação do anel furano (8a-b).	33

4.2.10-Síntese da 5-epoxipsoraleno (9)	34
4.2.11-Síntese do ligante com epoxipsoraleno: Formação do 4-(3-{bis[2-(2-piridinil)etil]amino}-2-hidroxi)propoxi)psoraleno (10).	35
4.3 - Testes Biológicos	35
4.3.1- Preparação De Macrófagos Para Ensaios In Vitro	36
4.3.2- Produção De Óxido Nítrico (NO)	36
4.3.3- Produção De TNF- α	37
4.3.4- Teste De Citotoxicidade	37
4.3.5- Teste De Antimicrobiano Contra <i>Mycobacterium bovis</i>	38
5- Resultados e Discussões	39
5.1- Sínteses Orgânicas	39
5.1.1 – Formação do 5-metoxiresorcinol (1b).	39
5.1.2 – Síntese da 5,7-diidroxycumarina (2a) e da 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b).	42
5.1.3- Síntese de bergaptol (3) por cloridrato de piridina.	54
5.1.4- Formação de bergaptol (3) por Ácido De Lewis BBr ₃ .	56
5.1.5- Síntese dos derivados cumarínicos. Síntese da 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e da 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b).	58
5.1.6- Formação de derivados furocumarínicos. Síntese do 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e do 5-bromobutoxipsoraleno (5b).	69
5.1.7- Formação de ligantes cumarínicos. Síntese da 5-{4-[bis(2-piridinilmetil)amino]propoxi}-7-metoxicumarina (6a) e da 5-{4-[bis(2-piridinilmetil)amino]butoxi}-7-metoxicumarina (6b).	81
5.1.8 – Formação dos derivados cumarínicos 7-(2,2-dietoxietoxi)-5-hidroxycumarina (7a), 5,7-bis(dietoxietoxi)cumarina (7b) e 5-(dietoxietoxi)-7-metoxicumarina (7c). Substituição com grupos acetais.	89

5.1.9- Formação do anel furano (8a-b).	108
5.1.10- Formação de epóxido. Síntese do 5-epoxipsoraleno (9).	108
5.1.11- Formação de ligante com epoxipsoraleno: Síntese do 4-(3-{bis[2-(2-piridinil)etil]amino}-2-hidroxi)propoxi)psoraleno (10).	109
5.1.12 – Síntese da 7-Cloroacetoxi-5-Metoxicumarina (11)	110
5.2 - Testes Biológicos	112
5.2.1- Produção De Óxido Nítrico (NO)	113
5.2.2- Produção De TNF- α	115
5.2.3- Teste De Citotoxicidade	116
5.2.4- Teste De Antimicrobiano Contra Mycobacterium bovis	119
6- Conclusão	121
7- Referências Bibliográficas	123

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

ADC	Albumina, dextrose e catalase
ATP	Adenosina trifosfato
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BPH	Benign prostatic hypertrophy
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CFU	Colony-forming unit
cNOS	Oxido nítrico sintase constitutiva
COSY	Correlation spectroscopy
CYP3A4	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4
DEPTQ	Distorsionless enhancement by polarization transfer including the detection of quaternary nuclei.
DMAPP	Dimetilpirofosfato
DMEM-F12	Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desocirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HL-60	Células leucêmicas promioclótica aguda
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation

HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
iNOS	Oxido nítrico sintase induzida
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada
IV	Infravermelho
KH	Quantidade de carbonatos e bicarbonatos dissolvidos na água.
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
m/z	Relação massa / carga
MeOD	Metanol deuterado
MHz	Mega Hertz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-brometo de difenilpirozolina
NAD	Difosfopiridinonucleótido
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NOS	Oxido nítrico sintase
$\text{Pd}_2(\text{dba})_2\text{CHCl}_3$	Tris(dibenzilideneacetone)dipalladium(0)
PPA	Ácido polifosfórico
ppm	Parte por milhão
RAW	Linhagem de células macrofagas
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
$\text{S}_{\text{N}}2$	Substituição nucleofílica de segunda ordem
TB	Tuberculose
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UVA	Ultravioleta A
Zr-TMS	Catalisador de óxido de zircônio com armação mesoestruturada em peneiras moleculares
α 1-AR	Receptor adrenérgico alfa 1
B-anel	Deformação de anel aromático polinuclear e heteronuclear
δ	Deformação angular no plano
ν	Deformação axial

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1:** Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C (100MHz) da substância 5,7-diidroxycumarina (2a), em MeOD e as correlações observadas nos mapas de contornos HMQC e HMBC. 48
- Tabela 2:** Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), em MeOD e as correlações observadas nos mapas de contornos HSQC e HMBC. 53
- Tabela 3:** Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 7-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a), em CDCl_3 e as correlações observadas no mapa de contornos ^1H - ^1H COSY. 63
- Tabela 4:** Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), em CDCl_3 e as correlações observadas no mapa de contornos ^1H - ^1H COSY. 68
- Tabela 5:** Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5-bromopropoxipsoraleno (5a), em CDCl_3 e as correlações observadas nos mapas de contornos HSQC e HMBC. 73

- Tabela 6:** Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C – experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5-bromobutoxipsoraleno (5b), em CDCl_3 e as correlações observadas nos mapas de contorno HMQC e HMBC. 78
- Tabela 7:** Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C – experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5-{4-[bis(2-piridinilmetil)amino]propoxi}-7-metoxicumarina (6a), em CDCl_3 e as correlações observadas nos mapas de contornos HMQC e HMBC. 85
- Tabela 8:** Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C – experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5-(2,2-dietoxietoxi)-7-hidroxycumarina (7a), em CDCl_3 e as correlações observadas nos mapas de contornos HMQC e HMBC. 93
- Tabela 9:** Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C – experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5,7-bis(dietoxietoxi)cumarina (7b), em CDCl_3 e as correlações observadas nos mapas de contornos HMQC e HMBC. 99
- Tabela 10:** Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C (100MHz) da substância 5-(dietoxietoxi)-7-metoxicumarina (7c), em CDCl_3 e as correlações observadas nos mapas de contornos HMQC e HMBC. 104

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Gráfico em linhas dos resultados de inibição de NO para 5,7- 113
diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-
hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-
bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e
5-bromobutoxipsoraleno (5b)
- Gráfico 2.** Gráfico em linhas dos resultados de inibição de NO para 5,7- 113
diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-
hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-
bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e
5-bromobutoxipsoraleno (5b).
- Gráfico 3.** Gráfico em linhas dos resultados de inibição de TNF- α para 114
5,7-diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-
hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-
bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e
5-bromobutoxipsoraleno (5b).
- Gráfico 4.** Gráfico em barras dos resultados de inibição de TNF- α para 115
5,7-diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-
hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-
bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e
5-bromobutoxipsoraleno (5b).

Gráfico 5. Gráfico em linhas dos resultados citotoxicidade por MTT 116 para 5,7-diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b)

Gráfico 6. Gráfico em barra dos resultados citotoxicidade por MTT para 116 5,7-diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b).

Gráfico 7. Gráfico em linhas dos resultados citotoxicidade por LDH 118 para 5,7-diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b).

Gráfico 8. Gráfico em barra dos resultados citotoxicidade por LDH para 118 5,7-diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b).

Gráfico 9. Gráfico em linhas dos resultados de atividade antimicrobiana 119 contra *Mycobacterium bovis* para 5,7-diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b).

Gráfico 10. Gráfico em barras dos resultados de atividade 120 antimicrobiana contra *Mycobacterium bovis* 5,7-diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da cumarina.	3
Figura 2. Desaminação oxidativa da L-fenilalanina.	4
Figura 3. Biossíntese da Cumarina. Fonte: Dewick, 2002.	5
Figura 4. Rota biossintética das furocumarinas naturais.	6
Figura 5. Estrutura da Varvarina.	7
Figura 6. Reação de Michael assimétrica entre cumarina e a cetonas β -insaturados com catalisadores imidazolidinas.	7
Figura 7. Mecanismo reacional para a reação de Pechmann.	8
Figura 8. Síntese da 4-clorometil-7,8-diidroxycumarina.	9
Figura 9. Reação de ciclização-esterificação para formação das cumarinas.	9
Figura 10. Reação de ciclização-esterificação para formação das cumarinas.	10
Figura 11. Síntese de derivados cumarínicos com fenilpiperazinas.	11
Figura 12. Síntese de derivados cumarínicos com substituintes oxadiazole.	12
Figura 13. Estrutura da furocumarina.	13

Figura 14. Estrutura do bergapteno (a) e da angelicina (b)	14
Figura 15. Formação do anel furano em cumarinas substituídas.	15
Figura 16. Formação de furocumarinas com tributílfosfina e cloreto de acila.	16
Figura 17. Formação de furocumarinas com cetonas halogenadas.	16
Figura 18. Estrutura do fotoaduto entre benzoquinolizona e timina (cis–anti)	18
Figura 19. Representação da reação de 5-metoxiresorcinol.	28
Figura 20. Representação da reação de formação de lactona.	29
Figura 21. Representação da reação de formação do bergaptol por cloreto de piridina.	30
Figura 22. Representação da reação de formação do bergaptol por ácido de Lewis	31
Figura 23. Representação da reação de formação dos derivados cumarínicos.	32
Figura 24. Representação da reação de formação dos derivados furocumarínicos 5a-b.	32
Figura 25. Representação da reação de formação de ligantes cumarínicos 6a-b	33
Figura 26. Representação da reação de formação derivados cumarínicos 7a-c.	34
Figura 27. Representação da reação para formação do anel furano 8a-b.	35
Figura 28. Representação da reação para formação da epóxicumarina.	36
Figura 29. Representação da reação para síntese do ligante com epoxipsoraleno	36
Figura 30. Representação da reação de formação do derivado cumarínico 11.	37
Figura 31. Substâncias submetidas aos testes biológicos.	38
Figura 32. Estrutura, tempo de reação e rendimento das substâncias	42

sintetizadas.

Figura 33. Mecanismo de reação para formação de 1b.	43
Figura 34. Mecanismo de reação para formação de 2a-b.	46
Figura 35. Mecanismo de reação para formação de 3 por cloridrato de piridina.	55
Figura 36. Mecanismo de reação para formação de 3 por BBr ₃ .	58
Figura 37. Mecanismo de reação para formação de 4a-b.	60
Figura 38. Mecanismo de reação para formação de 5a-b.	70
Figura 39. Mecanismo de reação para formação de 6a-b.	82
Figura 40. Mecanismo de reação para formação de 7a-c.	89
Figura 41. Mecanismo de reação para formação de 9.	108
Figura 42. Mecanismo de reação para formação de 10.	109
Figura 43. Mecanismo de reação para formação de 11.	110
Figura 44. Estruturas das substâncias avaliadas biologicamente.	111

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro no IV da substância 1b.	44
Espectro 2. Espectro de massas da substância 1b.	44
Espectro 3. Espectro de RMN de ^1H (400MHz) em CDCl_3 da substância 1b	45
Espectro 4. Espectro no IV da substância 2a.	47
Espectro 5. Espectro de massas da substância 2a.	48
Espectro 6. Espectro de RMN de ^1H (400MHz) e de ^{13}C (100MHz) em MeOD da substância 2a.	49
Espectro 7. Mapa de contornos HMQC em MeOD da substância 2a	49
Espectro 8. Mapa de contornos HMBC em MeOD da substância 2a.	50
Espectro 9. Espectro no IV da substância 2b.	52
Espectro 10. Espectro de massas da substância 2b.	52
Espectro 11. Espectro de RMN de ^1H (400MHz) e de ^{13}C (100MHz) em MeOD da substância 2b.	53
Espectro 12. Mapa de contornos HSQC em MeOD da substância 2b.	54
Espectro 13. Mapa de contornos HMBC em MeOD da substância 2b.	54
Espectro 14. Espectro no IV do material de partida bergapteno.	56

Espectro 15. Espectro no IV da substância 3 obtida por cloridrato de piridina.	57
Espectro 16. Espectro de massas da substância 3 obtida por cloridrato de piridina.	57
Espectro 17. Espectro no IV da substância 3 obtida por BBr ₃ .	59
Espectro 18. Espectro de massas da substância 3 obtida por BBr ₃ .	59
Espectro 19. Espectro no IV da substância 4a.	62
Espectro 20. Espectro de massas da substância 4a.	63
Espectro 21. Espectro de RMN de ¹ H (400MHz) em CDCl ₃ da substância 4a.	64
Espectro 22. Espectro de RMN de ¹³ C – experimento DEPTQ (100MHz) em CDCl ₃ da substância 4a.	64
Espectro 23. Mapa de contornos de ¹ H- ¹ H COSY em CDCl ₃ da substância 4a.	65
Espectro 24. Espectro no IV da substância 4b.	67
Espectro 25. Espectro de massas da substância 4b.	67
Espectro 26. Espectro de RMN de ¹ H (400MHz) em CDCl ₃ da substância 4b.	68
Espectro 27. Espectro de RMN de ¹³ C - experimento DEPTQ (100MHz) em CDCl ₃ da substância 4b.	69
Espectro 28. Mapa de contornos de COSY ¹ H- ¹ H da substância 4b.	69
Espectro 29. Espectro no IV da substância 5a.	72
Espectro 30. Espectro de massas da substância 5a.	72
Espectro 31. Espectro de RMN de ¹ H (400MHz) em CDCl ₃ da substância 5a.	74
Espectro 32. Espectro de RMN de ¹³ C - experimento DEPTQ (100MHz) em CDCl ₃ da substância 5a.	74
Espectro 33. Mapa de contornos HSQC em CDCl ₃ da substância 5a.	74

Espectro 34. Mapa de contornos HMBC em CDCl ₃ da substância 5a.	75
Espectro 35. Espectro no IV da substância 5b.	77
Espectro 36. Espectro de massas da substância 5b.	78
Espectro 37. Espectro de RMN de ¹ H (400MHz) em CDCl ₃ da substância 5b.	79
Espectro 38. Espectro de RMN de ¹³ C - experimento DEPTQ - (100MHz) em CDCl ₃ da substância 5b.	79
Espectro 39. Mapa de contornos HSQC em CDCl ₃ da substância 5b.	80
Espectro 40. Mapa de contornos HMBC em CDCl ₃ da substância 5b.	80
Espectro 41. Espectro no IV da substância 6a.	84
Espectro 42. Espectro de RMN de ¹ H (400MHz) em CDCl ₃ da substância 6a.	86
Espectro 43. Espectro de RMN de ¹³ C - experimento DEPTQ - (100MHz) em CDCl ₃ da substância 6a.	87
Espectro 44. Mapa de contornos HSQC em CDCl ₃ da substância 6a.	87
Espectro 45. Mapa de contornos HMBC em CDCl ₃ da substância 6a.	88
Espectro 46. Espectro no IV da substância 7a.	92
Espectro 47. Espectro de massas da substância 7a.	93
Espectro 48. Espectro de RMN de ¹ H (400MHz) em CDCl ₃ da substância 7a.	94
Espectro 49. Espectro de RMN de ¹³ C - experimento DEPTQ - (100MHz) em CDCl ₃ da substância 7a.	94
Espectro 50. Mapa de contornos HSQC em CDCl ₃ da substância 7a.	95
Espectro 51. Mapa de contornos HMBC em CDCl ₃ da substância 7a.	95
Espectro 52. Espectro no IV da substância 7b.	98
Espectro 53. Espectro de massas da substância 7b.	98
Espectro 54. Espectro de RMN de ¹ H (400MHz) em CDCl ₃ da substância 7b.	100

Espectro 55. Espectro de RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (100MHz) em CDCl_3 da substância 7b.	100
Espectro 56. Mapa de contornos HSQC em CDCl_3 da substância 7b.	101
Espectro 57. Mapa de contornos HMBC em CDCl_3 da substância 7b.	101
Espectro 58. Espectro no IV da substância 7c.	103
Espectro 59. Espectro de massas da substância 7c.	104
Espectro 60. Espectro de RMN de ^1H (400MHz) em CDCl_3 da substância 7c.	105
Espectro 61. Espectro de RMN de ^{13}C (100MHz) em CDCl_3 da substância 7c.	105
Espectro 62. Mapa de contornos HSQC em CDCl_3 da substância 7c.	106
Espectro 63. Mapa de contornos HMBC em CDCl_3 da substância 7c.	106
Espectro 64. Espectro no IV da substância 11.	110
Espectro 65. Espectro de massas da substância 11.	111

RESUMO

SILVA, Diego Rangel Cardoso; M. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2012. Síntese e avaliação das atividades biológicas de cumarinas e seus derivados. Orientador: Rodrigo Rodrigues de Oliveira.

Numerosos estudos indicam que as cumarinas, e seus derivados sintéticos, apresentam atividades biológicas e farmacológicas como anticancerígenas, antivirais, anti-hipertensiva, inseticidas e antioxidantes. Além disso, a sua estrutura planar vem despertando o interesse de pesquisadores devido à interação com o DNA de inúmeros organismos celulares. Essas cumarinas podem ser sintetizadas por diversas reações, como as reações de Pechmann, Perkin, Knoevenagel, Reformatsky e reação de Wittig, utilizando-se ácidos bem como com catalisadores básicos. Nesse âmbito, este trabalho teve como objetivo a síntese de cumarinas e novos derivados, a fim de avaliá-los quanto ao efeito antiinflamatório, citotóxico e antibiótico. No presente trabalho foram realizadas diversas sínteses, envolvendo mecanismos de substituição nucleofílica e eletrofílica, que permitiram a obtenção das 3 cumarinas 5,7-diidroxycumarina, 5-hidroxi-7-metoxicumarina, 5-hidroxipsoraleno e dos 9 derivados cumarínicos inéditos 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina, 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina, 5-bromopropoxipsoraleno, 5-bromobutoxipsoraleno, 5-{4-[bis(2-piridinilmetil)amino]propóxi}-7-metóxicumarina, 7-(2,2-dietoxietoxi)-5-hidroxycumarina, 5,7-bis(dietoxietoxi)cumarina, 5-

(dietoxietoxi)-7-metoxicumarina e 5-cloroacetóxi-7-metoxicumarina em rendimento satisfatório. Todas as substâncias foram caracterizadas por técnicas de espectroscopias IV, Massas e RMN, principalmente uni e bidimensional (^1H - ^1H COSY, HSQC e HMBC). As cumarinas conhecidas 5,7-dihidróxicumarina, 5-hidroxi-7-metoxicumarina, 5-hidroxipsoraleno e os novos derivados cumarínicos 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina, 5-bromopropoxipsoraleno e 5-bromobutoxipsoraleno apresentaram importante atividade antiinflamatória, levando em consideração a inibição da produção de NO e TNF- α em culturas de macrófagos e baixo efeito citotóxico frente a células fibroblasto murino, o que indica um potencial farmacológico promissor. No tangente à atividade antimicrobiana, as mesmas substâncias avaliadas acima apresentaram resultados positivos em relação a inibição de crescimento em cultura de micobactérias causadoras de tuberculose comparado com o controle antimicrobiano rifampicina.

ABSTRACT

Numerous studies indicate that the coumarins, and their synthetic derivatives, exhibit pharmacological and biological activities such as anti-cancer, antiviral, anti-hypertensive, insecticides and antioxidants. Furthermore, the planar structure has awakened the interest of researchers due to the interaction with the cellular DNA of many organisms. These coumarins can be synthesized by various reactions, such as Pechmann, Perkin, Knoevenagel, Reformatsky and Wittig reaction, using acids as well as basic catalysts. In this context, this study aimed at the synthesis of new coumarins and derivatives in order to evaluate them as to the anti-inflammatory, cytotoxic and antibiotic. In the present paper, were performed various synthesis involving nucleophilic and electrophilic substitution mechanisms, which allowed the production of three coumarin 5,7-dihydroxycoumarin, 5-hydroxy-7-methoxycoumarin, 5-hydroxypsoralen, and nine novel coumarin derivatives 5-(3-bromopropoxy)-7-methoxycoumarin, 5-(4-bromobutoxy)-7-methoxycoumarin, 5-bromopropoxypsoralen, 5-bromobutoxypsoralen, 5-{4-[bis(2-pyridinylmethyl)amino] propoxy}-7-methoxycoumarin, 7-(2,2-diethoxyethoxy)-5-hydroxycoumarin, 5,7-bis(diethoxyethoxy)coumarin, 5-(diethoxyethoxy)-7-methoxycoumarin and 5-chloroacetoxy-7-methoxycoumarin, in satisfactory yield. All substances were confirmed by spectroscopic technique IR, Mass and NMR, mainly one and two dimensional (^1H - ^1H COSY, HSQC and HMBC). The coumarins known 5,7-dihydroxycoumarin, 5-hydroxy-7-methoxycoumarin, 5-hydroxypsoralen and the new coumarin derivatives 5-(3-bromopropoxy)-7-methoxycoumarin, 5-(4-

bromobutoxy)-7-methoxycoumarin, 5-bromopropoxypsoralen, 5-bromobutoxypsoralen showed anti-inflammatory activity, taking into account the inhibition of production of NO and TNF- α by cultures of macrophages and low cytotoxic effect against cells murine fibroblast. Indicating a promising pharmacological potential. In the tangent to the antimicrobial activity, the same substances evaluated above showed positive results relative to the inhibition of growth in culture of mycobacteria, that cause the tuberculosis, compared with antimicrobial rifampin control.

1- INTRODUÇÃO

Uma das importantes áreas de desenvolvimento industrial, a síntese química, especialmente a síntese de fármacos, nos possibilita a produção de novos medicamentos, mais eficientes e com menor custo-benefício. Dentro dessa área encontram-se a utilização de meio convencionais em laboratórios de química, como sínteses racêmicas e assimétricas reações catalisadas, com uso de ligantes e metais de transição, variação molecular ou manipulação molecular para a produção de compostos semelhantes ao isolados em vegetais da flora brasileira por vias de reação químicas, possibilitando a preservação ambiental.

As plantas medicinais são fontes riquíssimas de obtenção de moléculas a serem exploradas terapeuticamente. Muitas substâncias isoladas de plantas continuam sendo usadas como medicamentos. Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a fonte principal da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso, reduzindo as pesquisas com produtos naturais. Entretanto, nota-se, nos últimos anos, um aumento expressivo no interesse em substâncias de origem vegetal devido sua eficácia em tratamentos e pela sua complexidade estrutural (FOGLIO *et al.*, 2007).

A síntese orgânica representa a vertente da química orgânica capaz de construir moléculas, com altos graus de complexidade estrutural, utilizando-se de conceitos fundamentais inerentes ao comportamento químico dos diversos grupos funcionais e classes químicas. Dentro dessa vertente, a síntese de fármacos, se

destaca por permitir o acesso a substâncias que possam ser utilizadas em tratamentos de enfermidades (BARREIRO, 1991).

Os fármacos de origem sintética representam uma parcela significativa do mercado farmacêutico, estimado em 724,5 bilhões de dólares, no ano de 2008 com cerca de 60% dos produtos prescritos e industrializados originários de síntese. No Brasil, o mercado é estimado em torno de 160 milhões de dólares por ano (TORRES, 2010).

Isso significa que os produtos obtidos de um processo sintético apresentam pureza e qualidade importantes para o uso terapêutico. Essa pureza está relacionada à metodologia sintética empregada, seu controle cinético e termodinâmico, à pureza dos intermediários e matérias-primas envolvidas na síntese, bem como o tratamento de purificação empregado. A síntese de fármaco diferencia-se entre a de escala de bancada e de escala industrial. A primeira permite a definição experimental de uma rota sintética de acesso às substâncias planejadas, e se dá em escala menor do que a segunda, que objetiva a adaptação da metodologia sintética desenvolvida à escala da produção (BARREIRO, 1991).

Nesse âmbito, a pesquisa e busca de rotas de síntese de substâncias cumarínicas, em escala de bancada, é de grande interesse uma vez que as substâncias naturais obtidas de extratos vegetais já mostraram atividades anti-hipertensiva, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória e anticancerígena, o que indica possíveis características bioativas para os análogos obtidos por síntese (MAGIATIS *et al.*, 1998; MONTEIRO, 1999; SOUZA, 2005).

Essas cumarinas podem ser sintetizadas usando diversas reações, como as reações de Pechmann, Perkin, Knoevenagel, Reformatsky e reação de Wittig, sendo elas usadas com ácidos bem como com catalisadores básicos (KALITA & KUMAR, 2011). Cientes da importância de tais substâncias, de seus potenciais farmacológicos, da importância da síntese química para a produção de um fármaco e inspirados neste propósito, demos início ao estudo da síntese de substâncias cumarínicas e de novos derivados cumarínicos, a fim de avaliá-los quanto ao efeito antiinflamatório, citotóxico e antibiótico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Sínteses de Cumarina

A cumarina (Fig. 1, p. 3) é o esqueleto base de todas as substâncias derivadas dessa classe, sendo constituída de uma fusão dos anéis benzeno e 1,2-pirona. A estrutura demonstrada foi denominada de anel lactona condensado, e, de acordo com IUPAC, pode ser descrita como 1,2-benzopirona, 2H-1-benzopir-2-ona, ácido lactona *cis*-o-cumarínico e anidrido cumarínico (LAKE, 1999).

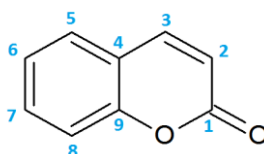


Figura 1. Estrutura da cumarina.

As cumarinas obtidas de fontes naturais são formadas através do metabolismo da glicose via ácido chiquímico (chiquimato). O ácido chiquímico produz três aminoácidos aromáticos em sua rota sintética: fenilalanina, triptofano e tirosina, os quais intermeiam a biossíntese de numerosos produtos naturais aromáticos, como, por exemplo, as cumarinas (SOUZA, 2005).

Essa via sintética tem início na desaminação oxidativa de L-fenilalanina (Fig. 2, p. 4), catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL), dando origem ao ácido cinâmico (MONTEIRO, 1999).

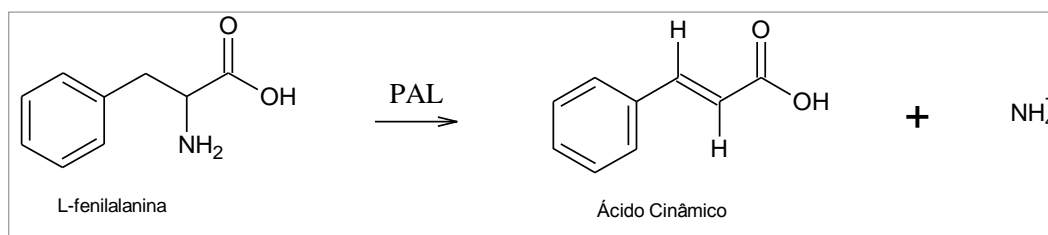


Figura 2. Desaminação oxidativa da L-fenilalanina.

A seqüência dessa via das cumarinas ocorre com a hidroxilações do ácido cinâmico em posição *orto* e *para* em relação à cadeia lateral, levando a formação de hidroxicinamatos, precursores diretos das cumarinas (Fig. 3, p. 5). A hidroxilação na posição C2 pode ocorrer após uma primeira etapa de hidroxilação na posição C4. Os ácidos 2-cumárico e 2,4-diidroxicumárico, em seguida, sofrem uma isomerização *cis-trans* na cadeia lateral. Esse processo é importante por possibilitar a que a etapa seguinte, a lactonização, ocorra, gerando assim, a estrutura base das cumarinas: o anel lactona. O processo de isomerização pode ser catalisado via ação da energia solar ou pela ação enzimática das isomerases (DEWICK, 2002).

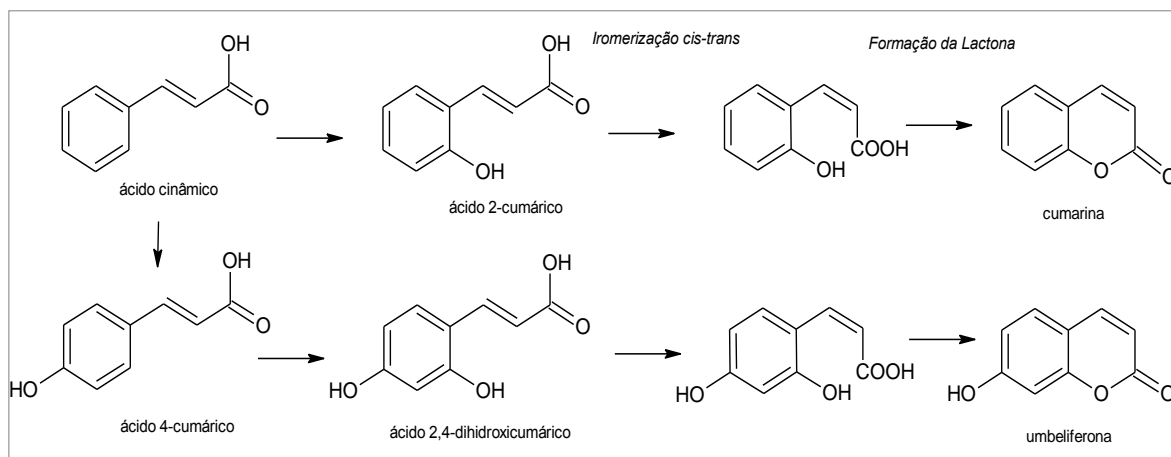


Figura 3. Biossíntese da Cumarina. Fonte: Dewick, 2002.

Em alguns casos, o ácido cinâmico sofre glicosilação, o que impede o processo de lactonização devido à ligação na posição C4. No entanto, o ácido cinâmico glicosilado sofre ação de uma glicosidase (hidrólise enzimática), perdendo assim, a molécula de açúcar, que por seqüência, através de esterificação, origina a molécula de cumarina. Esse processo é iniciado após injúria tecidual, que acontece na colheita ou por maceração em laboratório (SOUZA, 2005).

As furanocumarinas e piranocumarinas são originadas da reação de prenilação do anel benzênico pela unidade isoprênica dimetilalilpirofosfato (DMAPP) na posição C6 (Fig. 4, p. 6). Essas cumarinas são derivadas de metabolismos envolvendo a umbeliferona, cumarina que apresenta uma hidroxila substituinte na posição C7. Dessa forma, o grupo DMAPP inserido reage com o grupo fenol, originando o anel furano, característico da classe das furanocumarinas, ou o anel pirano, presente nas piranocumarinas. As furanocumarinas e piranocumarinas angulares são originadas pela incorporação de DMAPP na posição 8 e por subsequente ciclização com o grupo fenol. Esta transformação é catalisada pela enzima tipo citocromo P-450 monooxigenase (DEWICK, 2002).

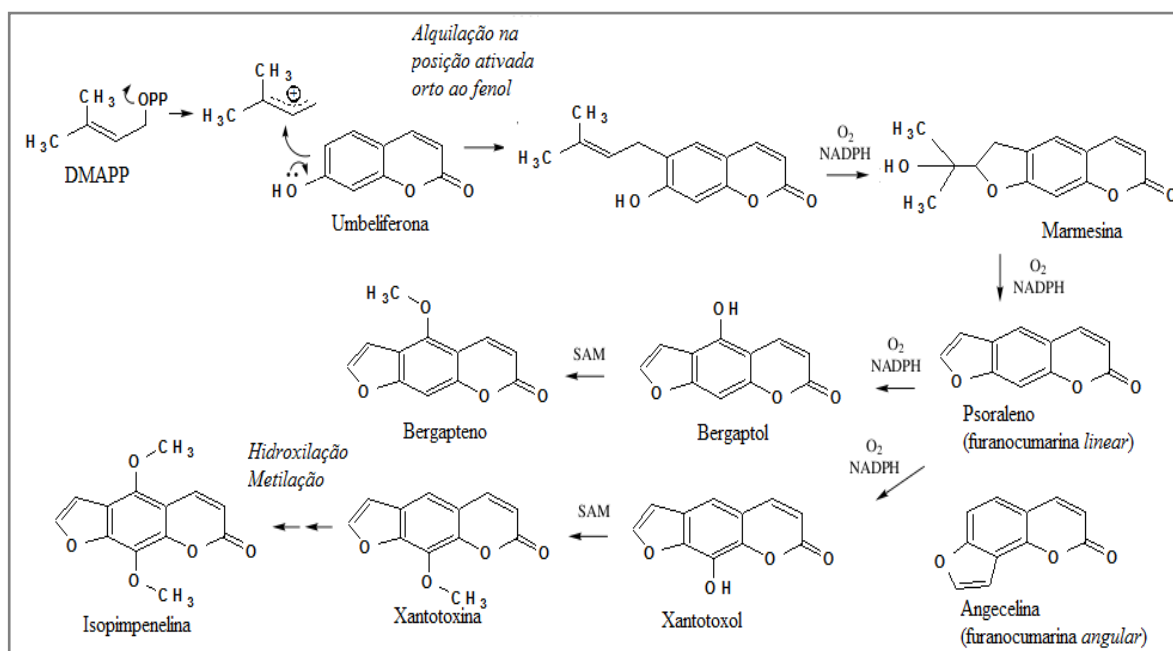


Figura 4. Rota biossintética das furocumarinas naturais.

Numerosos estudos indicam que cumarinas naturais ou sintéticas, e seus derivados, apresentam excelentes reatividades químicas e diferentes bioatividades. As cumarinas naturais possuem papel importante na bioquímica e fisiologia vegetal (ZAVRŠNIK *et al.*, 2011). Nesse âmbito, a síntese de derivados cumarínicos é de grande interesse para a indústria farmacêutica, devido às propriedades farmacológicas que essas substâncias possuem, como por exemplo, atividades anticancerígenas, antivirais, anti-hipertensiva, inseticidas e antioxidantes (MAGIATIS *et al.*, 1998; MONTEIRO, 1999; SOUZA, 2005). Vários derivados de 4-hidroxicumarina têm sido usados na maioria em tratamentos de doenças vasculares periféricas como varizes e trombose (KUMAR *et al.*, 2011; SITRÂNGULO JR., 2011; MURI *et al.*, 2010).

Recentemente, diversas rotas sintéticas foram relatadas para formação de cumarinas e seus derivados, bem como suas atividades biológicas (KUMAR *et al.*, 2011; LIMA, 2008). Essas podem ser sintetizadas usando reações diversas, como as reações de Pechmann, Perkin, Knoevenagel, Reformatsky e reação de Wittig, sendo elas usadas com ácidos bem como com catalisadores básicos (KALITA & KUMAR, 2011).

Um importante exemplo de derivado cumarínico obtido por rotas sintéticas é a substância conhecida como varfarina. Jorgensen, em seus estudos, relatou a

síntese de uma etapa da varfarina (Fig. 5, p. 7) enantiomericamente pura que foi obtida através da organocatálise. Essa síntese representa o primeiro exemplo de uma organocatálise, realizada através de uma reação de Michael assimétrica entre cumarina e a cetonas α,β -insaturados com catalisadores imidazolidinas (Fig. 6, p. 7). Chin e Chen relataram a mesma estratégia para a síntese de warfarin pura catalisada por uma amina primária e diamina, respectivamente (ZHU *et al.*, 2011; HALLAND *et al.*, 2003).

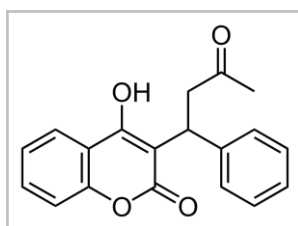


Figura 5. Estrutura da Varfarina.

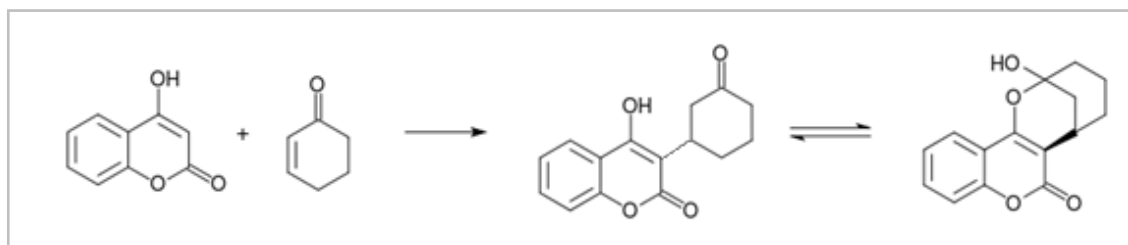


Figura 6. Reação de Michael assimétrica entre cumarina e a cetonas β -insaturados com catalisadores imidazolidinas.

Com o reconhecimento do uso de catalisadores, novas metodologias foram se desenvolvendo para a síntese dessa classe de substâncias a partir de produtos fenólicos, como relata KALITA, na síntese de 7-hidroxi-4-metilcumarina. Nessa síntese, o uso de catalisadores ácido trifílico ($\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$) funcionalizados sobre Zr-TMS em condições catalíticas heterogêneas converte, cerca de 80% do resorcinol e acetato de etila na cumarina. Essa reação do tipo Pechman entre o composto fenólico e β -ceto ésteres é a reação mais convencional para a síntese

de cumarinas e seus derivados. Na Figura 7 (p. 8) observa-se o mecanismo reacional para a reação de Pechmann (KALITA & KUMAR, 2011).

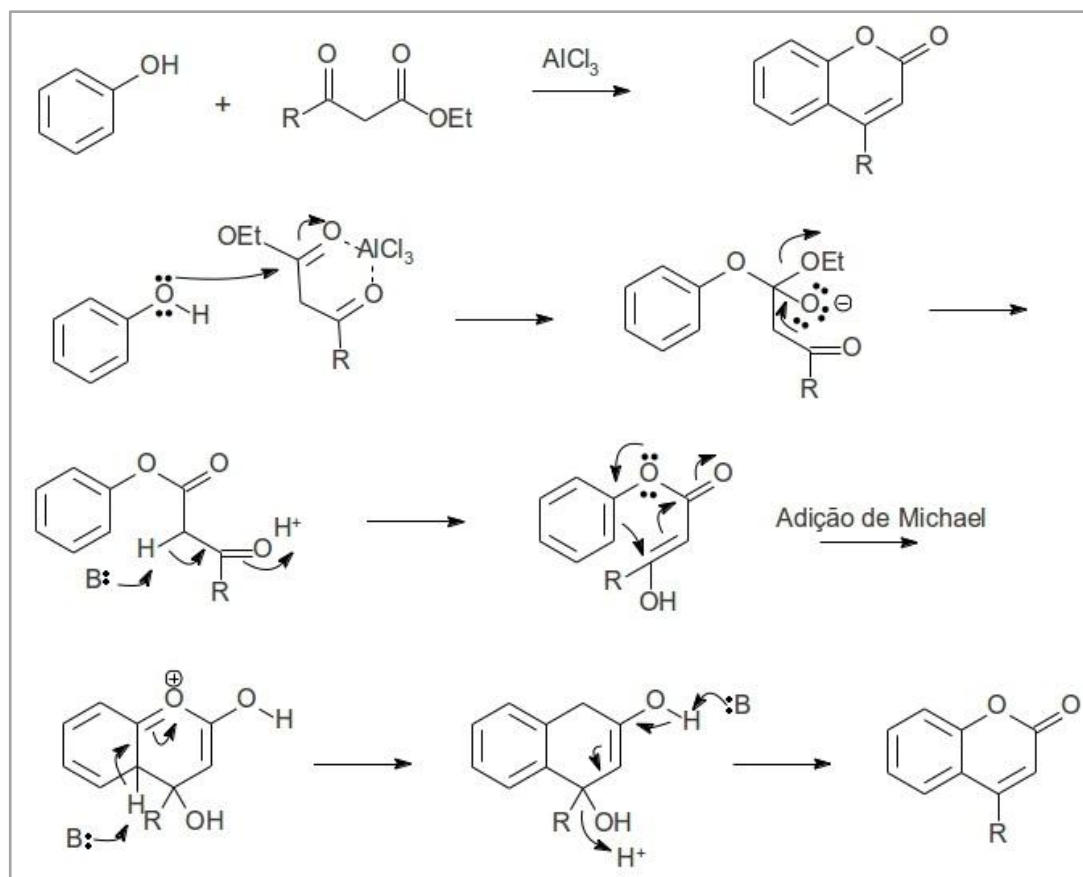


Figura 7. Mecanismo reacional para a reação de Pechmann.

Outro exemplo do uso desses mecanismos de síntese foi relatado por CAMPOS-TOIMIL (2002) quando obteve 4-clorometil-7,8-dihidroxicumarina em 65% de rendimento a partir de pirogalol (1,2,3-benzenotriol) (Fig. 8, p. 9). Após hidrólise do halogênio obteve-se com 88% de rendimento a cumarina 4-hidroximetilcumarina, demonstrando a facilidade no emprego dessa reação (CAMPOS-TOIMIL *et al.*, 2002).

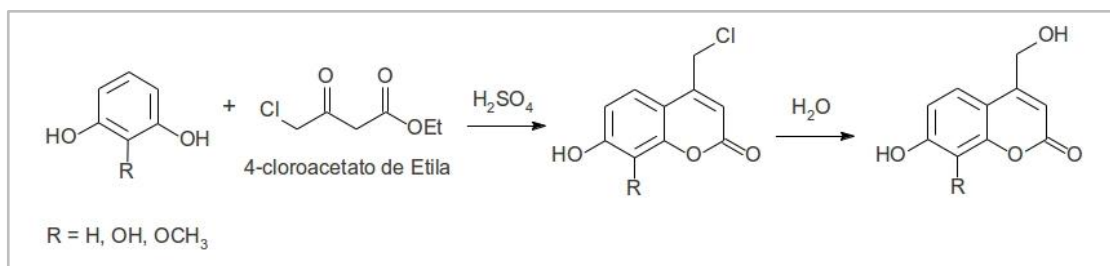


Figura 8. Síntese da 4-clorometil-7,8-diidroxicumarina.

No entanto, algumas cumarinas são sintetizadas com o uso de propiolato de etila como reagente, em meio catalisado por ZnCl_2 . Essas reações, conhecida como ciclização-esterificação catalisado por ZnCl_2 , promovem a obtenção de cumarinas sem substituintes no anel pirona. Partindo de produtos fenólicos como o floroglucinol (1a) e o 5-metoxiresorcinol (1b) chegam-se ao rendimento de 85% de formação de cumarinas (Fig. 9, p. 9) (CHANG *et al.*, 2008; ODA *et al.*, 2005).

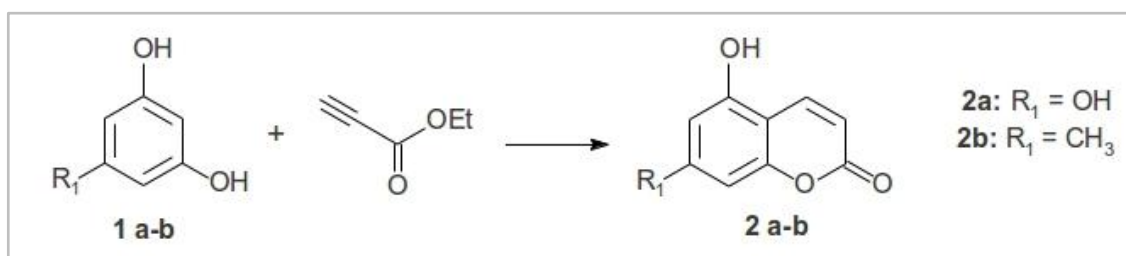


Figura 9. Reação de ciclização-esterificação para formação das cumarinas.

Diversas cumarinas e seus derivados sintéticos foram alcançados, como relatado por Oyamada, na síntese átomo-econômica de cumarinas a partir da reação de ácidos propílico e fenóis, também com uso de catalisadores $\text{Pd}_2(\text{dba})_3\text{CHCl}_3$ ou $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ em meio ácido. A reação de hidroarilação de alcino que foi realizada em ácido trifluoroacético, resultou na formação da cumarina e da di-hidrocumarina (Fig. 10, p.10) (OYAMADA *et al.*, 2011).

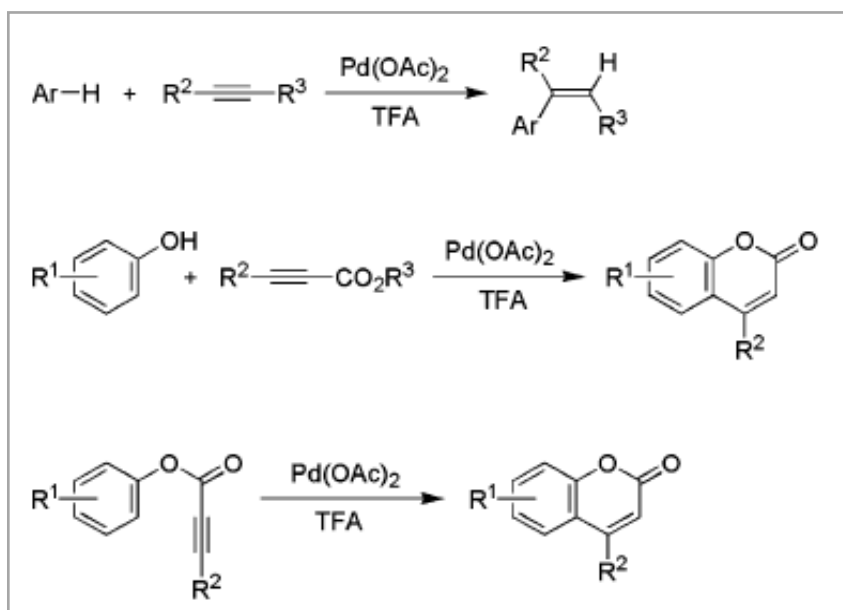


Figura 10. Reação de ciclização-esterificação para formação das cumarinas.

Nesse sentido, muitos trabalhos no campo da síntese de derivados de cumarinas e da farmacologia demonstram com clareza a importância dessas metodologias. As atividades biológicas dos derivados cumarínicos, em particular, sua aplicação terapêutica como agentes anticoagulantes e antibacterianos, tem estimulado mais interesse para a síntese desta classe de compostos. Muitos também exercem eficiente ação anti-proliferativa, antifúngica, antipsoríase, antiinflamatórios, bem como atividades antivirais (YADAV & PUROHIT, 2011; (SANDHYA *et al.*, 2011; ARSHAD *et al.*, 2011).

Os derivados benzilideno-bis-(4-hidroxicumarina) e 3-[6-oxo-(1H)-benzopirano[4,3-b]benzopiran-7-il]-4-hidroxicumarina inibem HIV (vírus da imunodeficiência humana), por afetar integrase e transcriptase reversa, que desempenham um papel crítico no ciclo replicativo do HIV (ZAVRSNIK, 2011). Nesse âmbito também encontramos sínteses de triazolilglicosídeos de cumarinas utilizando cicloadição 1,3 dipolar, catalisada por cobre azida-alcino (CuAAC) de xilose, glicose e galactose com 4-alcinila-cumarinas substituídas. O produtos dessas reações foram identificados como inibidores possível de galectina, implicados no apoptose celular e fixação do vírus HIV-1 às células hospedeiras levando a potentes propriedades anti-câncer ou anti-HIV (NYUCHEV *et al.*, 2011)

Nova classe de derivados cumarínicos 2H-1-benzopiran-2-ona com altas

eficácias para α 1-adrenérgicos (α 1-AR), que regulam várias funções do sistema nervoso simpático, cujas divergentes antagonistas têm sido desenvolvidas para o tratamento de doenças cardiovasculares e hiperplasia prostática benigna (BPH). Entre os diferentes derivados sintetizados com esse propósito, a cumarina com uma substituição fenilpiperazinil mostra atividade anti-receptor α 1-adrenérgico (Fig. 11, p. 11) (ZHOU *et al.*, X 2011).

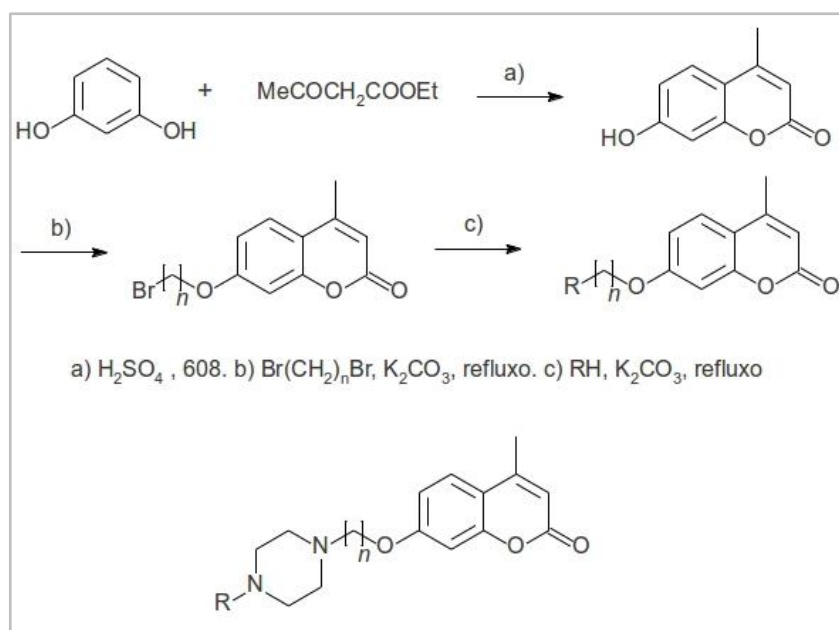


Figura 11. Síntese de derivados cumarínicos com fenilpiperazinas.

Uma série de isocumarinas 3,4-dissubstituído e 3,4,8-trissubstituídas, incorporando nitrogênio e oxigênio como parte do anel heteroaromático (piperidina, morfolina, dibenzofuranos, cumarina), foram sintetizados e os testes confirmaram atividades inibitória de crescimento contra os fungos patógenos *Pallidoroeseum*, *Fusarium*, *Chaetonium* e contra bactérias *E. Coli*, *S. Aureus*. (YADAV & PUROHIT, 2011). Novos compostos sintetizados também foram testados quanto à suas atividades antimicobacterianas *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis* (PATEL *et al.*, 2011).

Além desses, a síntese dos novos derivados 4-(4-acetil-5-substituído-4,5-dihidro-1,3,4-oxodiazol-2-il)metoxi)-2H-chromen-2-onas (Fig. 12, p. 12), realizado pelo uso de 4-hidroxycumarina como matéria-prima, revelou que os compostos

também mostraram significativa atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. As substâncias com substituintes 4-fenil, 4-metoxifenil, 4-fluorofenil e 4-nitrofenil no anel 1,3,4-oxodiazole exibiram atividade antioxidante mais elevada do que Trolox[®] (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), um derivado antioxidante lipo-solúvel da vitamina E usado como referência para a capacidade antioxidante de outras substâncias e usado em aplicações biológica ou bioquímicas para reduzir o stress oxidativo (HAMDÍ *et al.*, 2011).

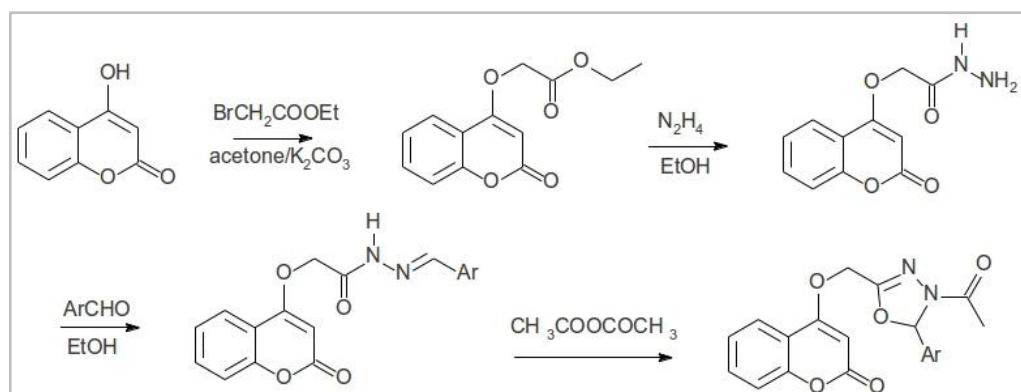


Figura 12. Síntese de derivados cumarínicos com substituintes oxadiazole.

Outros derivados que apresentaram importantes atividades são as cumarinas com substituintes anéis tiazol. Compostos contendo anéis tiazol têm valor medicinal devido às suas potenciais propriedades quimioterápica, fungicida, antivirais e pesticidas. Recentemente, relataram a síntese de novas cumarinas incorporadas com semicarbazonas e tiazolil exibindo atividade anticonvulsivante, analgésica e antiinflamatória (ARSHAD *et al.*, 2011). Os derivados cumarínicos que apresentam aminas aromáticas e heterocíclicas em sua estrutura, também foram testadas e suas atividades analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana foram comprovadas, como, por exemplo, heterocíclicos ligados com nitrogênio em 7 posições de cumarina parecem ser drogas potencialmente ativos (SANDHYA *et al.*, 2011).

As furanocumarinas (Fig. 13, p. 13), uma outra classe de cumarinas,

consistem de um anel furano condensado ao núcleo cumarínico e podem ser subdivididas em lineares e angulares.

As furocumarínicos lineares são amplamente utilizadas na clínica, principalmente na terapia de doenças de pele (PUVA terapia), que é baseada na ação conjunta de outras drogas, como o psoraleno, e uma exposição à irradiação de ultravioleta. O principal efeito terapêutico determinante destes compostos é a cicloadição de psoraleno à base aminada, como a timina, do DNA. A doença conhecida como psoríase é caracterizada pela proliferação descontrolada das células da pele, sendo, portanto, esse efeito inibido através das ligações entre psoraleno e DNA celular (ODA et al., 2005). A molécula intercala entre os pares de bases no DNA de cadeia dupla interagindo assim com o núcleo das bases. Após a irradiação com luz UVA, a furocumarínia é fotoexcitada formando adutos covalentes através de reações pericíclicas [2 + 2] reagindo, assim, com DNA. (SAENZ-MÉNDEZ *et al.*, 2007).

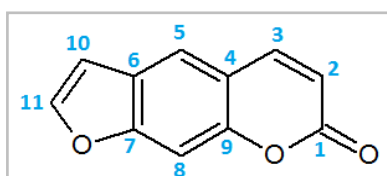


Figura 13. Estrutura da furocumarina.

As rotas sintéticas para formação de furocumarinas também são de grande interesse, como, por exemplo, a formação de bergapteno e angelicina (Fig. 14, p. 14), principais furanocumarinas que possuem atividades biológicas importantes como fotossensibilização da pele humana, com aplicações em medicina valiosas em tratamento de doenças da pele, por exemplo, psoríase e vitiligo. Eles também são conhecidos por serem fototóxico para insetos, fungos, vírus e bactérias. (MELLIU *et al.*, 2005). Estudos relatam a formação de anéis furano em compostos cumarínicos, obtendo-se estruturas tanto lineares quanto angulares destas substâncias, os quais apresentam atividades biológicas semelhantes aos produtos naturais isolados de vegetas (BRENDÉ *et al.*, 1979; LEE, 1995; XIE *et al.*, 1999).

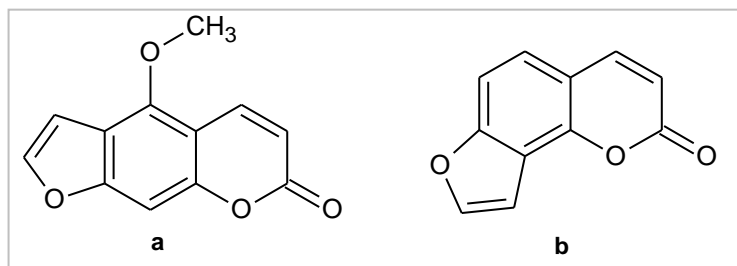


Figura 14. Estrutura do bergapteno (a) e da angelicina (b)

Uma das principais rotas sínteses para furocumarinas se baseia em rearranjos de Fries catalisada por ácidos de Lewis. Por exemplo, reação com a cumarina substituída 7-cloroacetoxi-4-metilcumarina com AlCl_3 , seguida de desidratação e condensação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e heteroarenos, gerando 4-metilangelicina e dímeros 2,3'-bifurano (Fig. 15, p. 15) (TRAVEN *et al.*, 1997). Estruturas como dihidrofuro[2,3-H]cumarona e dihidrofuro[2,3-G]cumarona também foram conseguidas através do rearranjo Fries de cumarinas substituídas (TRAVEN, 2000.) Outras furocumarinas obtidas por essas reação foram 6-aminocoumarina, pela redução de 6-fenilazo-4-metildihidrofuro[2,3-h]cumarona. As substâncias 6-substituídos de 4-metildihidrofuro[2,3-h]cumarona foram convertidos à angelicina por redução do grupo carbonila do anel dihidrofurano e conseqüente desidratação do álcool obtido, demonstrando ser uma metodologia fácil e mais básica para essa classe de substâncias (TRAVEN *et al.*, 2001).

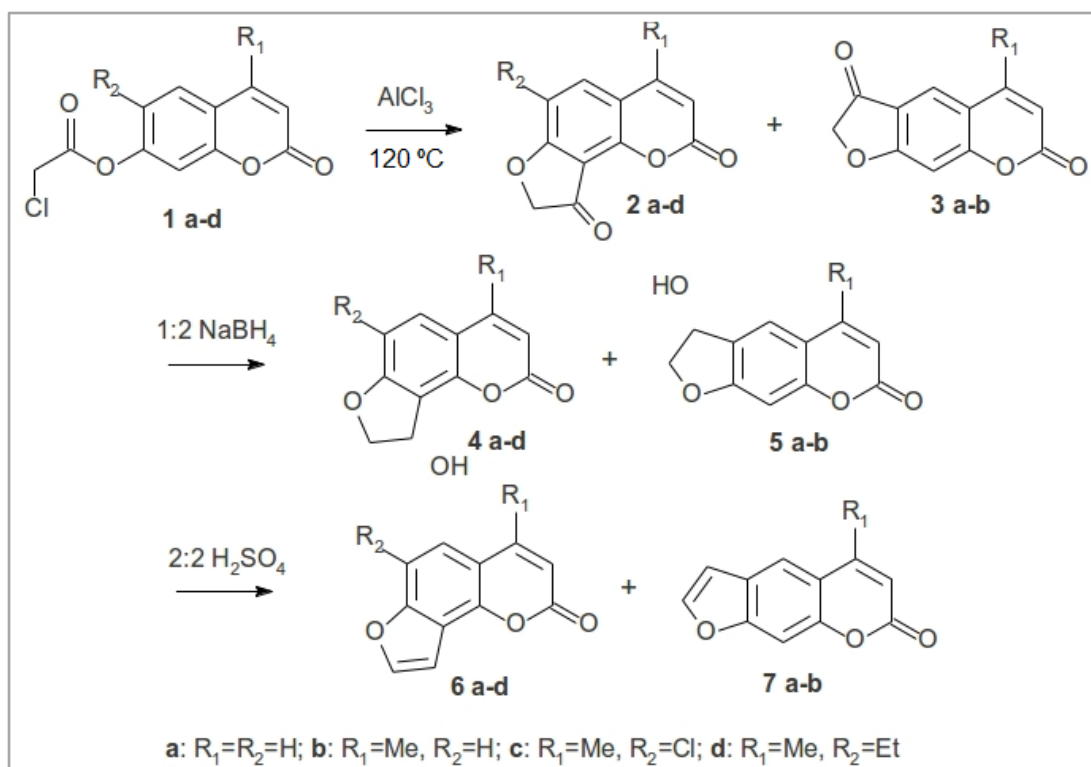


Figura 15. Formação do anel furano em cumarinas substituídas.

Outros autores relatam a síntese de furocumarinas e derivados a partir de dienófilos de tetrazinas, em reações de Diels-Alder, via brominação, condensação com aldeídos e cetonas, formação de oxima, acoplado com sais de benzeno diazônio e outros (BEGALA *et al.*, 2003).

Reações de Wittig intramolecular, que consiste na formação de intermediários íletos de fósforo (molécula neutra na qual dois átomos de cargas opostas, cada uma com um octeto de elétrons, estão diretamente ligados um ao outro, sendo um o carbono e o outro o fósforo) também foram usadas para reações de formação de anel furano acoplado ao centro cumarínico a partir de cetonas α,β -insaturadas com tributílfosfina e cloreto de acila. Os intermediários para a construção do anel furano foram cruciais, levando a uma grande variedade de cumarinas substituídas em uma única etapa (Fig. 16, p. 16) (JANG *et al.*, 2011).

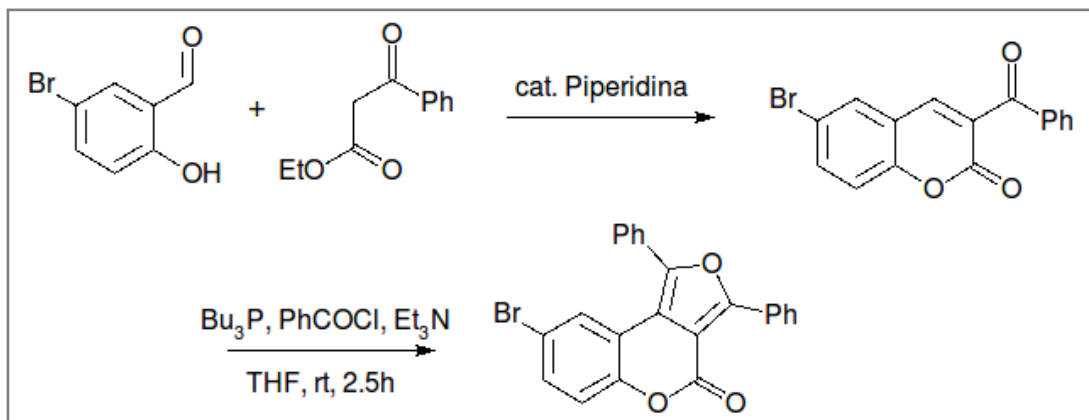


Figura 16. Formação de furocumarinas com tributilfosfina e cloreto de acila.

Alguns pesquisadores sintetizaram derivados furocumarínicos com substituintes nos anéis furo e piranona. GARAZD (2009), por exemplo, relata a síntese de furocumarínicos contendo substituintes arila nas posições 2 e 3 do anel piranona obtendo a 6-arilfuro[3,2-g]chromen-7-ones, baseado no núcleo 3-arilcumarina. Substituintes 7-acetoxicumarina foram preparados por uma reação de Perkin-Oglialoro a partir de 2,4-dihidroxibenzaldeído e ácidos fenilacéticos substituídos em anidrido acético e na presença de piridina. Acidólise de 7-acetoxicumarina formou 7-hidroxi-3-arilcumarinas que foram utilizadas na reação com cetonas halogenadas, produzindo substituintes oxoéteres que, após aquecimento em solução alcalina, cicliza em 3-substituído-6-arilfuro[3,2-g]chromen-7-ones (Fig. 17, p. 16) (GARAZD *et al.*, 2009).

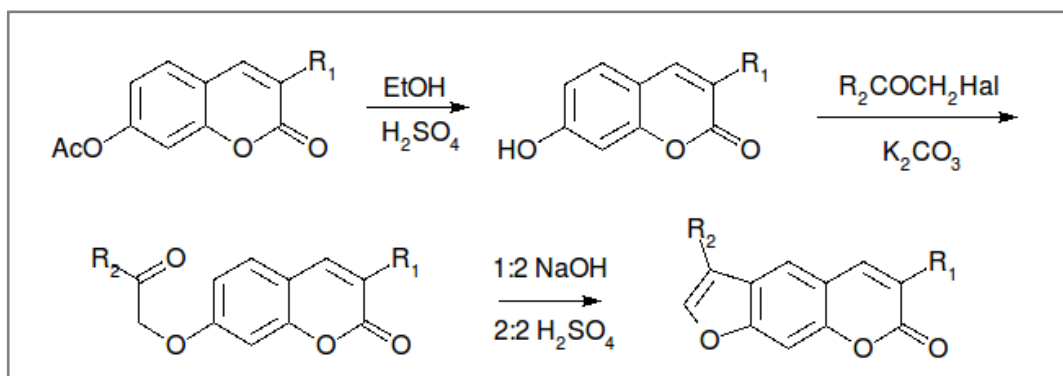


Figura 17. Formação de furocumarinas com cetonas halogenadas.

A síntese dessas furocumarinas angulares tem sido alcançada por rearranjos de claisen de 7-alliloxicumarina, reações benzanulação de complexos carbenos com acetilenos e acoplamento de reagente acetilênico e com iodohidroxycumarina. Entretanto, a dificuldade no controle da regioquímica de rearranjos de claisen nos remete a procura de melhores rotas sintéticas como relata LEE (1995) em uma reação de diazocetona com acetatos vinil seguido por desidratação catalisada por ácido formando derivados dihidrobenzofurano. Os derivados dihidrobenzofuranos foram formilados usando excesso NaH em presença de catalisador KH e metanoato de etila em THF. Na construção do anel pirona, o grupamento aldeído foi condensado com um reagente Horner-Emmons (fosfonoacetato de trietila) e uma base (LEE, 1995).

Todas essas reações e seus respectivos derivados furocumarínicos apresentados demonstram a grande importância da síntese dessas substâncias. Logicamente, todas as substâncias sintetizadas apresentaram atividades biológicas interessantes, o que justifica sua produção em laboratório.

Bergapteno e derivados obtidos foram responsáveis por diferenciação induzida em linhas de células leucêmicas promielocítica aguda (HL-60) aparentando serem, clinicamente, eficazes contra a desordem mieloproliferativas (KAWAII *et al.*, 1999).

Derivados sintetizados a partir de reações de condensação de Pechmann mostraram um perfil farmacológico semelhante a vasodilatadores comerciais, portanto, um futuro promissor como anti-hipertensivos e agentes espasmolíticos (CAMPOS-TOIMIL *et al.*, 2002). As furocumarinas lineares obtidas com a mesma reação apresentaram, também, atividade citotóxica frente às células carcinogênicas do tipo ascítico de Ehrlich, que são células causadoras do tumor de mama, e atividade antioxidante, capturando o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (método DPPH) (RANGANATH *et al.*, 2011). Outros derivados do bergapteno também inibiram a atividade da CYP3A4, uma enzima de fígado que metaboliza a maioria dos fármacos. Essas substâncias foram obtidas através de uma desmetilação do bergapteno por ação do tribormeto de boro (BBr_3) e substituições subseqüentes com grupos alquilas e epóxidos (ROW *et al.*, 2006).

Em sua maioria, as furocumarinas e seus derivados são amplamente relacionados às atividades biológicas inerentes ao DNA, ou seja, por inibição de expressões gênicas ou impedindo sua replicação.

Derivados benzoquinolizina, análogos de furocumarinas, apresentaram atividades foto reativas com o DNA, após irradiações com luz UVA. Esses compostos possuem capacidade de intercalarem com o DNA, consistindo na reação de fotocicloadição [2+2] com as bases pirimidinas (Fig. 18, p. 18) (MIOLO *et al.*, 1999).

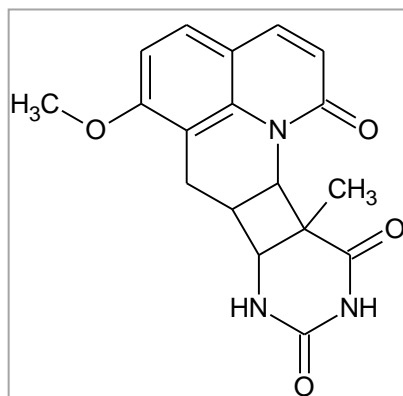


Figura 18. Estrutura do fotoaduto entre benzoquinolizina e timina (cis-anti)

Atualmente, extensos estudos foram realizados sobre a síntese de novos derivados psoraleno com aplicação na terapia da PUVA.

A fusão de um ciclopentano, ciclohexano, benzeno ou um anel piridazina no fragmento furano do esqueleto psoraleno e introdução de um grupo propoxi (dimetilamino) na posição 5 ou 8 (para melhorar a solubilidade em água) resultou em mudanças na fototoxicidade, sendo o derivado com o anel piridazina fundida, mostrou um considerável aumento da atividade fotoantiproliferativa (LIPEEVA *et al.*, 2011).

Como é o caso do 5,8-dietoxipsoraleno assim como alguns derivados, os quais apresentaram atividades bloqueadoras em canais de potássio (Kv1.2) realizando interações com DNA por irradiação (WULFF *et al.*, 1992), o que indica um potencial terapêutico como drogas antiarrítmicas para fibrilação atrial (EUN *et al.*, 2006). Substâncias derivadas de 5-(4-fenilbutoxi)psoraleno também apresentaram atividade bloqueadora de canais de potássio, principalmente Kv1.3, presente em linfócitos. Isso reduz a produção e proliferação de citocinas, sendo,

portanto, importantes substâncias para o uso como imunomoduladores em terapias de desordem autoimune (VENNEKAMP *et al.*, 2004).

Aliás, o uso de furocumarinas em testes contra doenças auto-imunes e inflamatórias vem se tornando comum. A exemplo recente, testes de inibição com NF- κ B mostrou que os derivados de psoralenos são relevantes no uso terapêutico. O fator nuclear kappa B (NF- κ B) é um complexo protéico que desempenha função na transcrição e está envolvida em processos biológicos como regulação do ciclo celular, expressão de genes específicos e em respostas celulares à estímulos. A incorreta regulação de NF- κ B é responsável por doenças inflamatórias e auto-imunes (BORGATTI *et al.*, 2011). Os derivados sintetizados inibiram a interação entre NF- κ B e DNA e a expressão de genes reguladas por este complexo protéico em células de fibrose cística, uma doença genética, infectadas com bactérias da própria microbiota humana, o que é muito importante na fisiopatologia da fibrose cística, uma vez que várias complicações clínicas são causadas por exacerbação da resposta inflamatória (PICCAGLI *et al.*, 2010).

2.2 - Atividades Biológicas

2.2.1 - Atividade Antiinflamatória

O processo inflamatório é uma resposta do organismo frente a uma infecção ou a uma injúria tecidual e compreende dois mecanismos de defesa: a resposta inespecífica (resposta inata), responsável pelas características da região inflamada (vermelhidão, edema, calor, dor e perda de função) e a resposta imunológica, na qual há produção de anticorpos específicos contra um determinado agente agressor. Essas respostas se caracterizam pela produção e liberação de mediadores químicos do processo inflamatório, responsáveis nos processos inflamatórios. Ambos os processos ocorrem através dos macrófagos (COUTINHO *et al.*, 2009).

Entre os mediadores químicos de grande importância pode-se destacar o óxido nítrico (NO), gás solúvel que possui potente ação vasodilatadora, reguladora do recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra micro-organismos e a citocina TNF- α , uma proteína solúvel identificada como pertencente à categoria de moléculas monocinas secretadas por macrófagos e

que possui papel central na defesa, funcionando como marcados pro-inflamatório, recrutando neutrófilos e induzindo a síntese de citocinas e quimiocinas no processo inflamatório. (GEHRKE & PEREIRA, 2007; FILHO, 2002).

A óxido nítrico-sintase (NOS) é a enzima responsável pela síntese do NO. Essa enzima se mostra em três isoformas, sendo uma NOS induzida (iNOS) e duas NOS constitutivas (cNOS). O NO é formado tanto pela cNOS como pela iNOS e sua quantidade irá determinar sua ação protetora ou tóxica. Embora pequenas quantidades sejam necessárias para a homeostasia, grandes quantidades, como aquelas produzidas na ativação da iNOS são citotóxicas. A expressão da iNOS é o resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa resultante de uma infecção ou dano tecidual, sendo benéfica quando parte de uma resposta à infecção ou sepse, porém, nociva quando parte de uma inflamação anormal, isto é, respostas autoimune (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

A produção de NO por diferentes células durante a resposta imunológica é controlada por diversos mecanismos. Em adição ao papel protetor do NO, há um mecanismo dependente da liberação de citocinas com função autócrina, tal como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (MARQUES, 2006). O principal efeito fisiológico do TNF- α é promover a resposta imune e a inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além da ativação de macrófagos, modulando sua função fagocitária e a síntese de mediadores pró-inflamatórios, assim como também a indução da enzima iNOS. O TNF- α é um dos principais alvos terapêuticos em uma série de doenças inflamatórias crônicas (VITALE, 2007; HOWART *et al.*, 2005).

As doenças autoimunes são provocadas pelo ataque do sistema imune do organismo os seus próprios tecidos, ou seja, são provocadas por respostas imunes inadequadas. Dessa forma, o controle da inflamação pode resultar em potenciais imunomoduladores, pois são capazes de interferir no processo reacional de defesa do organismo, minimizando os danos e proporcionando maior conforto ao paciente (NUNES *et al.*, 2006).

Os antiinflamatórios são fármacos, cuja finalidade é a contenção e a reversão da inflamação, seja ela local ou sistêmica. Devem apresentar rapidez de ação, potência analgésica e segurança (MENDES, 2001).

Atualmente diversas substâncias de origem natural são conhecidas por

apresentarem atividades antiinflamatórias. Entre eles se encontram triterpenos, esteroides, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, cumarinas e alcaloides. Dentre desses, destaca-se algumas substâncias das classes das cumarinas (VIEGAS JR *et al.*, 2006). Por exemplo, a cumarina escoparona (6,7-dimetoxicumarina) reduz o recrutamento de células inflamatórias diminuindo a produção de citocinas, como consequência inibe a sinalização celular de fatores de transcrição pró-inflamatórios, além de modular a função de MØ e linfócitos. Outras cumarinas como umbeliferona (7-hidroxycumarina), esculetina (6,7-diidroxycumarina), fraxetina (7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina) e daphnetina (7,8-diidroxycumarina) apresentam atividades antiinflamatórias (CORRÊA *et al.*, 2008).

2.2.2 - Atividade Citotóxica

Vários métodos para se avaliar a toxicidade de substâncias já foram padronizados utilizando-se células cultivadas *in vitro*. Nestes testes, as substâncias em contato direto ou indireto com uma cultura de células mamíferas são avaliadas de acordo com as alterações celulares que possam ocorrer, como, por exemplo, a inibição de crescimento ou incorporações de corantes vitais (ROGERO *et al.*, 2003).

Estes testes de toxicidade, utilizando células isoladas ou em conjuntos, têm a finalidade de estudar os efeitos dos novos medicamentos, cosméticos e produtos químicos na sobrevivência e crescimento em ampla variedade de tipos de células (RYAN, 2008).

A interferência induzida por agente químico nesse processo de crescimento/multiplicação celular e a maneira em que esses processos podem ocorrer é à base dos ensaios citotóxicos. Estes ensaios tendem a simplificar os eventos quantificados, contudo, por serem métodos simples, de baixo custo e reprodutíveis são extensamente empregados em processos de triagem (FRESHNEY, 1994).

Um dos ensaios mais utilizados e aceitos de maneira confiável no meio científico é o método de redução de sais tetrazólio. Esse método fornece informações sobre a função mitocondrial através da avaliação da atividade da succinato desidrogenase (DANI *et al.*, 2010). O amarelo de tetrazólio MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-brometo de difenilpirazolina) é reduzido a sal azul de

formazina em células metabolicamente ativas, processo que envolve as coenzimas NADH e NADPH, que estão extremamente ligadas à respiração celular uma vez que uma célula totalmente ativa apresenta altas taxas de atividades das coenzimas NADH e NADPH (BERRIDGE & TAN, 1993).

Os testes de metabolização do MTT são rápidos, sensíveis e baratos, e permite avaliar a quantidade de células vivas em uma cultura ao analisar as funcionalidades das mitocôndrias. Ao medir a taxa de conversão do MTT em azul de formazano através de método colorimétrico, é possível quantificar a percentagem de células vivas. Dessa forma, é possível definir a citotoxicidade de determinada substância química frente às células, mas não seu mecanismo de ação (NUNES *et al.*, 2011).

Entretanto, apesar de ser considerado um método conveniente e rápido para medições viáveis, o ensaio MTT nem sempre tem boa correlação com outras medidas de crescimento e viabilidade celular (BERRIDGE & TAN, 1993). Contudo, é possível converter o resultado obtido em percentual de citotoxicidade, a fim de se comparar com o método LDH, lactato desidrogenase (MUZITANO *et al.*, 2006).

A lactato desidrogenase é uma enzima que atua na via de conversão do ácido láctico em ácido pirúvico e leva à produção de ATP. Encontra-se dispersa pelo citoplasma da grande maioria das células sendo liberada para o meio extracelular quando uma célula sofre danos em sua membrana plasmática. Dessa forma, a sua presença é indicativa de morte celular seguida de rompimento de membrana, o que se denomina de necrose (NUNES *et al.*, 2011).

Muitas substâncias têm sido testadas quanto à sua atividade citotóxica, como é o caso das cumarinas, as quais apresentam ação antineoplásica, como descreve KOSTOVA (2005) em seus inúmeros trabalhos sobre essa classe de substâncias natural ou sintética. As substâncias 7-hidroxycumarina, 4-hidroxycumarina e seus derivados induziram a liberação de LDH em culturas de hepatócitos de ratos. Os efeitos citotóxicos em ratos dessas substâncias foram comprovados por testes de MTT. Outras cumarinas como: a 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina (fraxetina), a 3-(acetoni-4-clorobenzil)-4-hidroxycumarina (cumacloro), a 4-hidroxi-3-(3-oxo-1-fenilbutil)cumarina (varfarina) e a 7-hidroxi-4-metilcumarina (mendiaxon), também foram testadas e exibiram atividade citotóxica (KOSTOVA, 2005).

2.2.3 - Atividade Antituberculose

A tuberculose bovina (TB) é uma doença mundialmente conhecida, causada pela bactéria *Mycobacterium bovis*, que é um organismo patogênico tanto para humanos e quanto para outros animais.

Nos seres humanos, tal bactéria causa a chamada tuberculose zoonótica, que é clinicamente semelhante à tuberculose, causada pela *M. tuberculosis*.

A *M. bovis* foi à causa importante de tuberculose humana, especialmente em crianças antes do processo de pasteurização do leite. Após a adoção desse tratamento para o leite e outros produtos lácteos, a TB caiu drasticamente (LEÓN *et al.*, 2009).

A maioria dos indivíduos infectados permanecerem livre de doença ativa durante a vida, porém, aproximadamente 10% dos infectados desenvolvem a doença. As características da doença são muito diversas, e diferem pelo tipo de patologia desenvolvida nos pulmões, na área de tecido do pulmão infectado, pela presença de bacilos nos escarros e pela taxa de progressão da tuberculose (LYADOVA *et al.*, 2010).

Em 1908, os cientistas Albert Calmette e Camille Guérin conseguiram isolar uma cepa do bacilo da tuberculose, produzindo culturas vivas atenuadas, que foram usadas e denominadas como vacina Bacilo Calmette-Guérin ou BCG. Em 1944 foi inventado o primeiro antibiótico, a estreptomicina, produzida a partir da garganta de uma galinha. Entretanto, sem o apoio ao tratamento e o contato entre doentes, surgiram bactérias resistentes ao medicamento. Para contornar o problema, desenvolveu-se um coquetel com quatro antibióticos (PEREIRA, *et al.*, 2007).

No Brasil, os procedimentos para o tratamento da tuberculose são padronizados desde 1979 pelo Ministério da Saúde, sendo indicada a utilização de quatro drogas em um único comprimido com dose fixa combinada: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol por dois meses e, numa segunda fase, isoniazida e rifampicina por mais quatro meses (ARBEX *et al.*, 2010).

Além disso, existem casos de cepas das bactérias resistentes a vários fármacos, comprometendo tanto o resultado do tratamento como programas de controle da doença. Esses fenômenos da multidroga-resistência e da resistência ao sistema imune impulsiona a pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos.

As bactérias causadoras da tuberculose estão ligadas aos macrófagos pela capacidade de infectá-los. Essas bactérias são capazes de entrar nas células macrófagos através de receptores da superfície celular. Uma vez dentro do macrófago hospedeiro, as bactérias residem dentro de um vacúolo ligado à membrana. As bactérias modificam a maturação deste compartimento a fim de melhorar a sua própria sobrevivência intracelular (GLICKMAN & JACOBS, 2001).

Dessa forma, diversas substâncias como derivados quinolônicos, da ansamicina e da pirazinamida vêm sendo avaliados em ensaios terapêuticos para o tratamento de tuberculose (CAMPOS, 2007), bem como muitas outras substâncias análogas ou de estruturas diferenciadas a estes medicamentos vem sendo desenvolvidas para o combate a tuberculose (SOUZA, 2009).

Um das substâncias são os derivados cumarínicos que apresentam atividades contra tuberculose como, por exemplo, os derivados hidrazona tiazolil cumarina (ARSHAD *et al.*, 2011; GÜRSÓY & KARALI, 2003), tetriaciclodipiranil cumarinas (LIU *et al.*, 2010) e hidrazida benzilideno cumarinas (NARASIMHAN *et al.*, 2010) mostrando assim a importância da síntese na busca de novas drogas no tratamento de tuberculose.

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Esse trabalho teve como objetivo sintetizar novos produtos cumarínicos a partir do floroglucinol e a sua avaliação quanto ao efeito antiinflamatório e antimicrobiano.

3.2 – Objetivos Específicos

- ✦ Sintetizar derivados com estrutura cumarínica a partir do floroglucinol.
- ✦ Avaliar o potencial antiinflamatório das substâncias sintetizadas com testes biológicos em culturas células humanas.
- ✦ Avaliar o potencial antimicrobiano das substâncias sintetizadas com testes em micobactérias *Mycobacterium bovis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Materiais e Equipamentos

As sínteses das substâncias cumarinicas foram realizadas utilizando-se solventes e reagentes de grau PA e vidrarias adquiridas de fontes comerciais (Aldrich, Synth Vetec e Merck)

As sínteses foram acompanhadas por análise cromatográfica em camada delgada (TLC – gel 60 F₂₅₄), obtida de fonte comercial (Merck).

A purificação das substâncias obtidas foi feita por cromatografia em coluna com sílica gel 60 200-250, obtida de fonte comercial (Merck).

Foram utilizados placas de aquecimento e agitação das marcas Fisatom e Fisher, evaporadores rotatórios modelos R-114 Büchi e MA120 Marconi, estufa de secagem A-HT Fanem, câmara com lâmpada ultravioleta (254 nm e 365 nm) Adamo, balança analítica AY 220 Shimadzu,

Para as análises espectroscópicas das substâncias sintetizadas foram utilizados os equipamentos:

- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear, modelo Elipse (400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C) Jeol, cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas, modelo CG/EM-QP-5050, SHIMADZU e espectrômetro de infravermelho, modelo SHIMADZU FT-IR 8300, aparelho de ponto de fusão Kofler marca Microquímica modelo MQRPF-301, do Laboratório de Ciências Químicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense;

- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker (AC-200

AVANCE 400 MHz), do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;

4.2 – Sínteses Orgânicas

Nesse tópico, descrevemos as reações realizadas com sucesso em laboratório. As reações propostas tem como o objetivo:

- metilação do material de partida floroglucinol para obtenção de 5-metoxiresorcinol;
- formação de anel lactona para obtenção de cumarinas a partir de produtos fenólicos;
- desmetilação de bergapteno para obtenção de psoraleno;
- reações de substituições para obtenção de derivados de cumarinas e furocumarinas;

4.2.1 – Formação de 5-metoxiresorcinol (1b).

Na primeira etapa desta reação obteve-se o metanol acidificado, para tal foi adicionado a um frasco dosador 20mL de ácido sulfúrico concentrado. Conectou-se o frasco dosador a um balão de 150mL de duas bocas contendo 10g de Cloreto de Sódio. Na boca lateral do balão foi acoplada uma conexão com mangueira de silicone. A extremidade dessa conexão foi inserida em um Erlenmeyer contendo 100mL de Metanol P.A. Em banho de gelo. Após a preparação desse sistema descrito acima, abriu-se a torneira do frasco dosador e deixou-se gotejar lentamente o ácido sobre o sal presente no balão. Após total consumo do ácido e ao cessar a produção de gás HCl, o metanol acidificado foi mantido em geladeira até o uso.

Em um balão de 50 mL, adicionou-se 100mg (1mmol) de floroglucinol (**1a**). O material foi diluído em solvente dioxano e em seguida adicionou-se 35mg (1,88mmol) de NaH ao poucos em pequenas porções. Após total adição de NaH e o sistema cessar a reação com o sal, foi adicionado 40mL de Metanol acidificado. Em seguida o sistema foi agitado e aquecido a 70°C totalmente fechado por 12 horas. Após o termino, a solução foi evaporada e o produto obtido foi submetido à separação por cromatografia líquida em coluna empacotada com gel de sílica,

inicialmente eluída com hexano (100%), seguida de gradiente de polaridade até a concentração de acetato de etila 100%. A substância de interesse foi eluída a uma concentração de 50:50 (v:v hexano:acetato de etila). O produto obtido foi analisado por espectroscopia de IV, Massas e RMN.

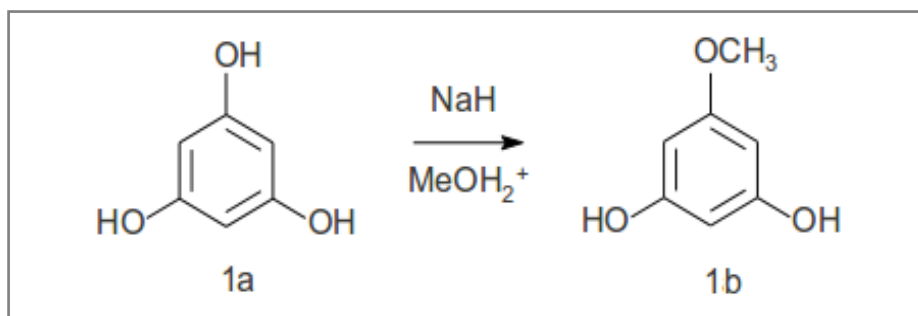


Figura 19. Representação da reação de 5-metoxiresorcinol.

4.2.2 – Formação de anel lactona. Síntese de 5,7-diidroxicumarina (2a) e 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b).

Para síntese de 5,7-diidroxicumarina foram adicionadas 500mg (4mmol) de floroglucinol (**1a**), 420mg (0,75mmol) de ZnCl₂ e 0,5 mL de propiolato de etila ao balão de 250 mL

Para síntese de 5-hidroxi-7-metoxicumarina, adicionou-se ao balão de 25 mL, 200mg (1mmol) metoxiresorcinol (**1b**), 196mg (1mmol) de ZnCl₂ e 218μL de propiolato de etila.

Após a solubilização dos reagentes, deixou-se o sistema por cerca de 2h-3h em agitação à temperatura de 100 °C. Após esse período, balão contendo a mistura foi resfriado e, em seguida, adicionados 10 mL de HCl 5%. O precipitado de coloração vermelha foi filtrado e lavado com água quente (100° C). Os produtos obtidos de cada reação foram purificados por cromatografia líquida em coluna de gel-sílica, sendo, cada coluna, inicialmente eluída com hexano (100%), seguida de gradiente de polaridade até a concentração de acetato de etila 100%. A substância de interesse da reação com 1a foi eluída a uma concentração de 30:70 (v:v hexano:acetato de etila) e a substância de interesse da reação com 1b

foi eluída a uma concentração de 40:60 (v:v hexano:acetato de etila). Os produtos foram submetidos a análises espectroscópicas de IV, Massas e RMN.

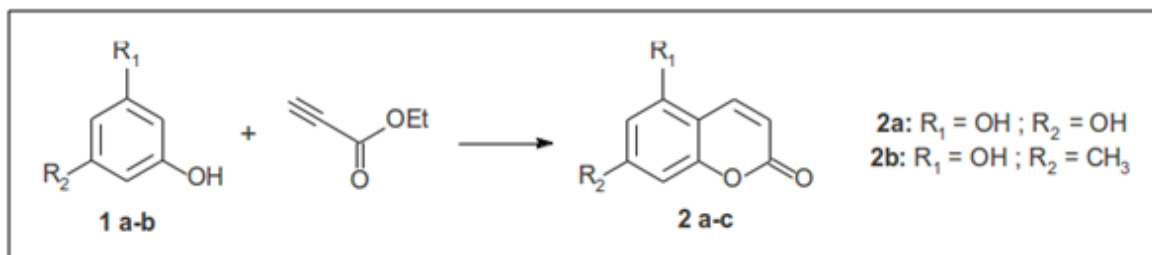


Figura 20. Representação da reação de formação de lactona.

4.2.3- Formação de bergaptol (3) por cloreto de piridina.

Cloreto de piridina - Em um balão de 100ml foram adicionados 10ml de piridina previamente tratada e posteriormente, a solução concentrada de ácido clorídrico (20 ml) foi gotejada. Após essa etapa o balão foi aquecido em banho de óleo a 120°C a fim de retirar toda a água presente na reação. O sal formado foi conservado em dessecador até que o mesmo fosse utilizado na reação de desmetilação do bergapteno.

Em um balão de 100 ml com duas bocas foram adicionados 1,2g (15mmol) do cloreto de piridina e o sistema foi agitado e aquecido a uma temperatura de 220°C por 25 minutos. Em seguida, 216mg (1mmol) do bergapteno foram adicionados ao balão deixando o sistema em refluxo por mais 25 minutos. Após esse tempo, a mistura reacional, ainda quente, foi vertida em uma solução de 350 ml de ácido clorídrico a 1M. O precipitado formado foi lavado com água e colocado na estufa por 4h à 80°C. O produto obtido foi purificado por cromatografia líquida em coluna de gel-sílica, inicialmente eluída com hexano (100%), seguida de gradiente de polaridade até a concentração de acetato de etila 100%. A substância de interesse foi eluída a uma concentração de 35:65 (v:v hexano:acetato de etila). O produto foi submetido a análises espectroscópicas de IV e Massas.

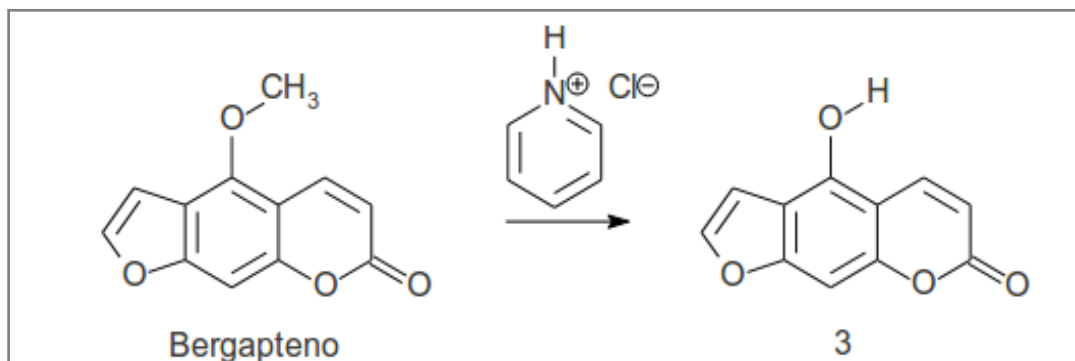


Figura 21. Representação da reação de formação do bergaptol por cloreto de piridina.

4.2.4- Formação de bergaptol (3) por ácido de Lewis BBr_3 .

Preparou-se em um Becker uma solução de 2ml de diclorometano contendo 100mg (0,231mmol) de bergapteno. Em seguida, preparou-se um balão de 25 mL com 3mL de diclorometano, trocando-se a atmosfera por N_2 gasoso e mantendo-se em frasco com gelo. Em outro recipiente de vidro manteve-se o ácido de Lewis tribrometo de boro sob temperatura baixa evitando que se libere muito vapor do ácido devido sua reatividade.

Na etapa seguinte, transfere-se para o balão em gelo, 0,5mL de BBr_3 . Adicionou-se ao balão a alíquota de bergapteno diluída em solvente. Após esse procedimento, o balão foi mantido sob agitação a temperatura ambiente por 2 a 3 horas. Em seguida, verteu-se a solução do balão em 20mL de água destilada. Posteriormente, filtrou-se a solução aquosa e lavou-se o precipitado com água. O produto obtido foi purificado por cromatografia líquida em coluna de gel-sílica, inicialmente eluída com hexano (100%), seguida de gradiente de polaridade até a concentração de acetato de etila 100%. A substância de interesse foi eluída a uma concentração de 35:65 (v:v hexano:acetato de etila). Os produtos foram submetidos análises espectroscópicas de IV e Massas.

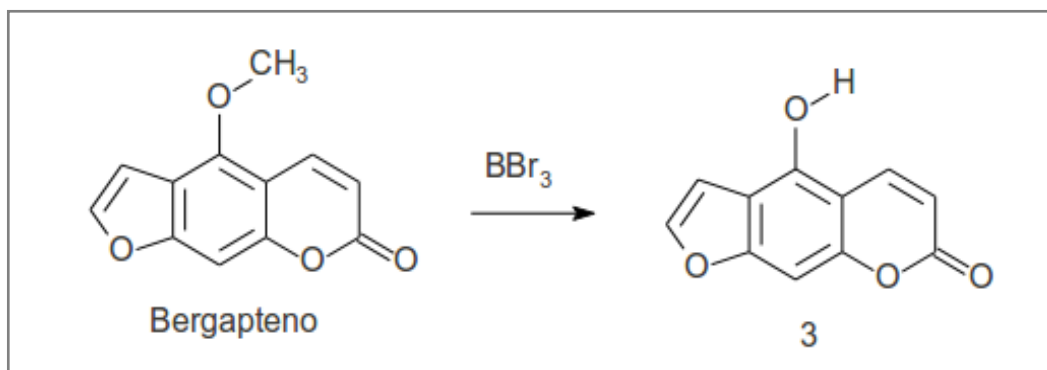


Figura 22. Representação da reação de formação do bergaptol por ácido de Lewis

4.2.5- Formação de derivados cumarínicos, síntese da 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e da 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b).

Adicionou-se 100mg de 7-hidroxi-5-metoxicumarina (**2b**) (1mmol) em dois balões (A e B) de 25 mL e diluídos em dimetilformamida (DMF). Em seguida, adicionou-se 18,8mg do reagente NaH (1,5 mmol) em cada balão, aos poucos até cessar a produção de gás. Após essa etapa adicionou-se 465 μ L de 1,3-dibromopropano (8 mmol) ao balão A e 540 μ L de 1,4-dibromobutano (8mmol) ao balão B. A mistura foi deixada em agitação e aquecimento (60°C) por 2h. Após esse período, verteu-se a solução contida no balão em H₂O destilada e extraiu-se o produto de reação com os solventes diclorometano e acetato de etila. A fase orgânica obtida de cada reação foi evaporada e o produto seco foi purificado por cromatografia líquida em coluna de gel-sílica, sendo, cada coluna, inicialmente eluída com hexano (100%) e seguida de gradiente de polaridade até a concentração de acetato de etila 100%. As substâncias de interesse foram eluídas a uma concentração de 40:60 (v:v hexano:acetato de etila). Os produtos foram submetidos análises espectroscópicas de IV, Massas e RMN.

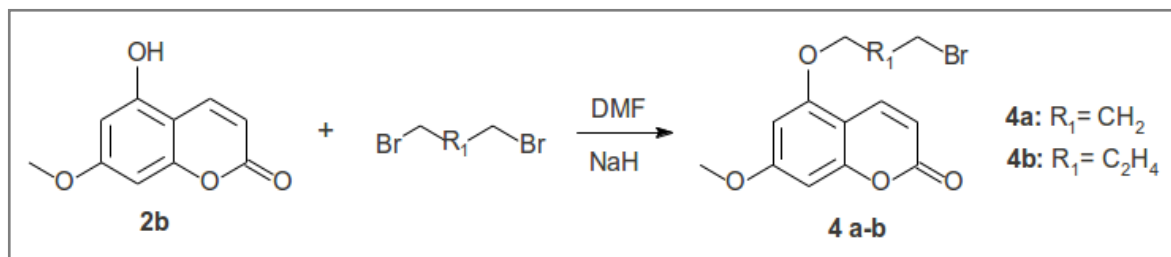


Figura 23. Representação da reação de formação dos derivados cumarínicos.

4.2.6- Formação de derivados furocumarínicos. Síntese do 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e do 5-bromobutoxipsoraleno (5b).

Adicionou-se 100mg do bergaptol (**3**) (1 mmol) em dois balões (A e B) de 25 mL e diluídos em dimetilformamida (DMF). Em seguida, adicionou-se 18mg do reagente NaH (1,5 mmol) em cada balão, aos poucos até cessar a produção de gás. Após essa etapa adicionou-se 442 μ L do 1,3-dibromopropano (4 mmol) ao balão A e 514 μ L do 1,4-dibromobutano (4 mmol) ao balão B. A mistura foi deixada em agitação e aquecimento (60°C) por 4h. Após esse período, verteu-se a solução contida no balão em H₂O destilada e extraiu-se o produto de reação com os solventes diclorometano e acetato de etila. A fase orgânica obtida de cada reação foi concentrada em evaporador rotatório e o produto seco foi purificado por cromatografia líquida em coluna de gel-sílica, sendo, cada coluna, inicialmente eluída com hexano (100%) e seguida de gradiente de polaridade até a concentração de acetato de etila 100%. As substâncias de interesse foram eluídas a uma concentração de 30:70 (v:v hexano:acetato de etila). Os produtos foram submetidos análises espectroscópicas de IV, Massas e RMN.

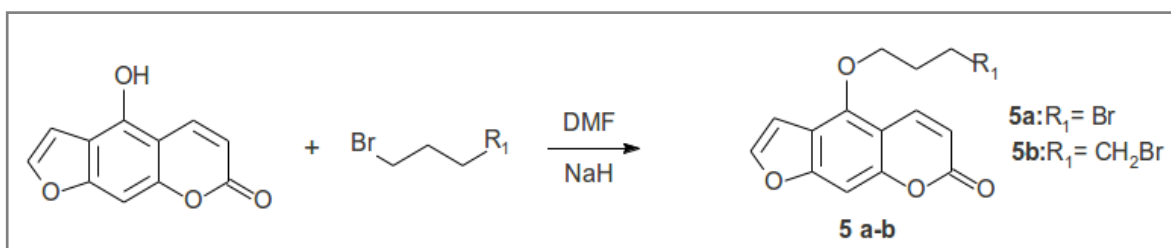


Figura 24. Representação da reação de formação dos derivados furocumarínicos 5a-b.

4.2.7- Formação de ligantes cumarínicos. Síntese de 5-{4-[bis(2-piridinilmetil)amino]propoxi}-7-metoxicumarina (6a) e 5-{4-[bis(2-piridinilmetil)amino]butoxi}-7-metoxicumarina (6b).

Preparou-se 2 balões A e B de 25 mL. Adicionou-se ao balão A, 145,9mg da 7-(3-bromopropoxi)-5-metoxicumarina (**4a**) (1 mmol) e ao balão B, 163,8mg da 7-(4-bromobutoxi)-5-metoxicumarina (**4b**) (1 mmol). Em seguida, adicionou-se em cada balão 276,8mg do reagente N-bis-(2-metilpiridil)amina (3 mmol), 1 mL de Trietilamina e 100mg de K_2CO_3 (1 mmol). A mistura foi dissolvida em DMF (1,5 mL) e submetida à agitação e aquecimento (60°C) por 7 dias. Ao término desse período, a mistura foi feita uma extração por solvente diclorometano. A fase orgânica foi recolhida e concentrada. O produto seco foi purificado por cromatografia líquida em coluna de gel-sílica, inicialmente eluída com hexano (100%), seguida de gradiente de polaridade até a concentração de acetato de etila 100%. As substâncias de interesse foi eluída a uma concentração de 50:50 (v:v hexano:acetato de etila). O produto foi submetido análises espectroscópicas de IV e RMN.

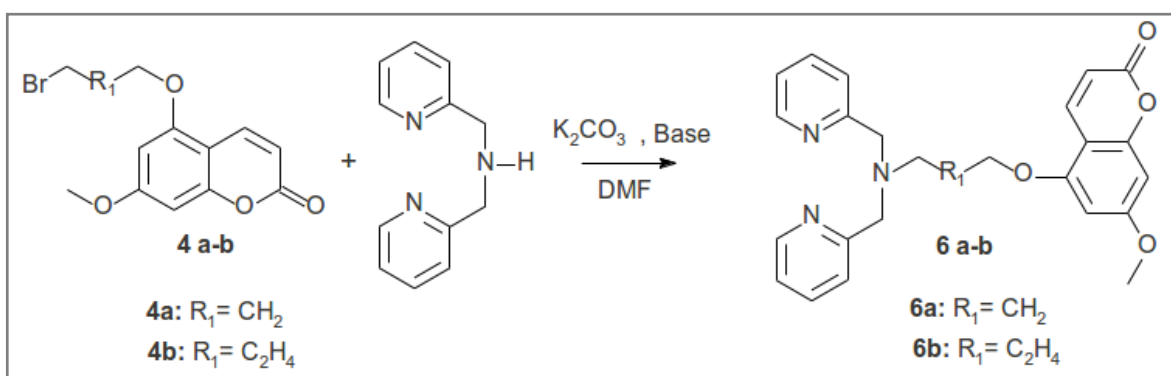


Figura 25. Representação da reação de formação de ligantes cumarínicos 6a-b

4.2.8 – Formação de derivados cumarínicos 7-(2,2-dietoxietoxi)-5-hidroxycumarina (7a), 5,7-bis(dietoxietoxi)cumarina (7b) e 5-(dietoxietoxi)-7-metoxicumarina (7c). Substituição com grupos acetais.

Estabeleceu-se a seguinte reação para formação dos produtos 7-dietoxietoxi-5-hidroxycumarina (**7a**), 5,7-bisdietoxietoxicumarina (**7b**) e 5-

dietoxietoxi-7-metoxicumarina (**7c**):

Para a síntese de **7a** e **7b**, adicionou-se à um balão de 25mL, 300mg (1,68mmol) de 5,7-diidroxicumarina (**2a**) e solubilizou-se em DMF (10mL). Em seguida, adicionou-se 60mg (2,53mmol) de NaH em pequenas partes, até o cessar das bolhas antes de cada adição. Ao término da adição e formação de bolhas, aplicou-se 0,282mL de 3-bromo-1,1-dietoxipropano .

Para a síntese de **7c**, adicionou-se à um balão de 25mL, 100mg (0,216mmol) de 7-hidroxi-5-metoxicumarina (**2b**) e solubilizou-se em DMF (3mL), 15mg (0,259mmol) de NaH e 93 μ L de 3-bromo-1,1-dietoxipropano seguindo-se mesmos procedimentos descritos acima.

Após as adições, manteve-se o sistema em agitação à temperatura de 160 a 180 °C por 18h. Após esse período, a mistura foi dissolvida em solução saturada de cloreto de sódio e extraída com acetato de etila. O produto seco foi purificado por cromatografia líquida em coluna de gel-sílica, inicialmente eluída com hexano (100%), seguida de gradiente de polaridade até a concentração de acetato de etila 100%. As substâncias de interesse foram eluídas a uma concentração de 40:60 (v:v hexano:acetato de etila). O produto foi submetido análises espectroscópicas de IV, Massas e RMN.

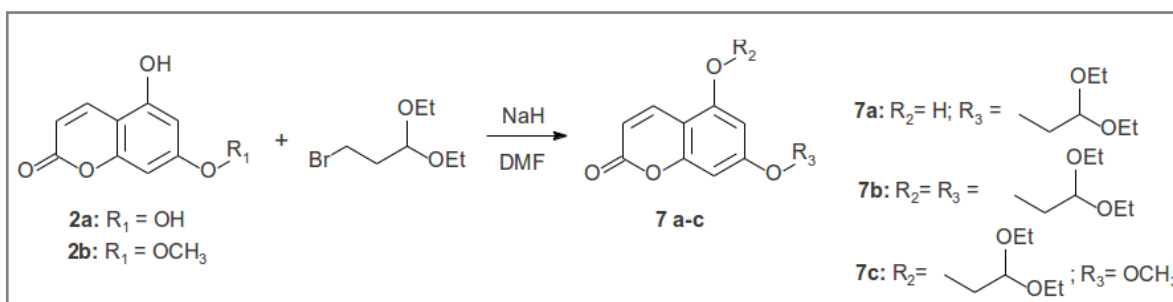


Figura 26. Representação da reação de formação derivados cumarinicos 7a-c.

4.2.9- Formação de anel furano (8)

Estabeleceu-se a seguinte reação para síntese de bergaptol (**3**), isobergaptol (**8a**), difurocumarina (**8b**):

Para síntese de 3 e 8a, adicionou-se 20mg (1mmol) de 7a em balão de

25mL. Em seguida, adicionou-se 6,6mg (1,4mmol) de ácido polifosfórico (H_3PO_4) e solubilizou-se a mistura em 5mL de benzeno. Para a síntese de 8b, adicionou-se 10,4mg (1mmol) de 7b, 11,3mg (2,2mmol) de H_3PO_4 e 5mL de benzeno em balão de 25mL.

Após adições, manteve-se o sistema em agitação a temperatura de $60^\circ C$ por 2h. Ao término do período, o solvente foi concentrado por evaporador rotatório.

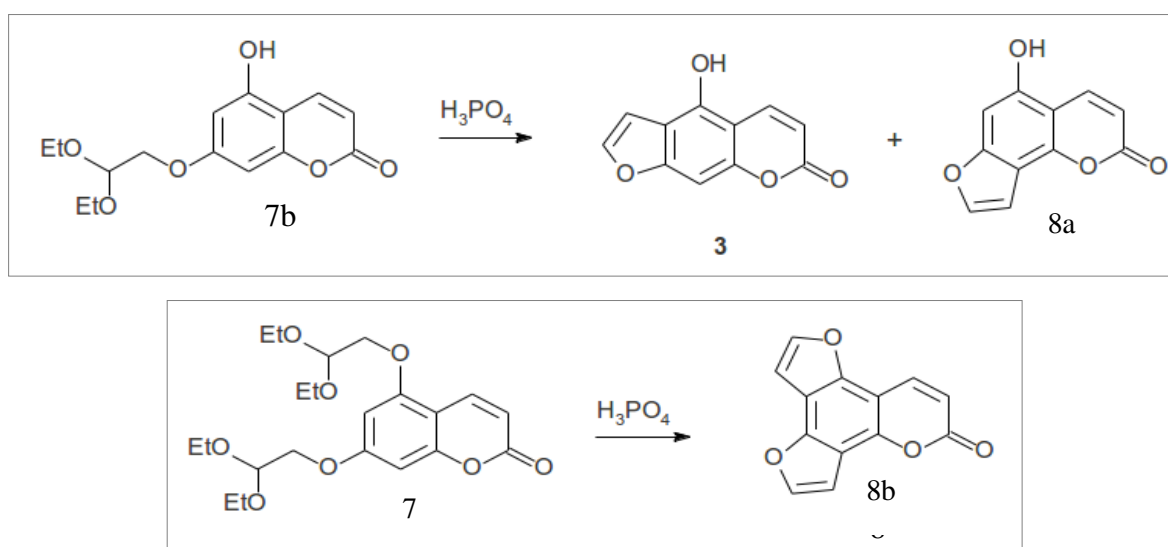


Figura 27. Representação da reação para formação do anel furano 8a-b.

4.2.10- Síntese da 5-epoxipsoraleno (9)

Em um balão com capacidade de 25ml adicionou-se uma solução contendo 148mg (1mmol) de bergaptol em 10mL de metanol. A solução foi agitada e aquecida a $50^\circ C$ e em seguida adicionou-se 78mg (0,87mmol) de Na_2CO_3 . Manteve-se mistura reacional em refluxo a $62^\circ C$ por 48h para total formação do fenolato de sódio. Após esse período adicionou-se $70\mu L$ (1,2mmol - excesso de 20%) epiclordinina no sistema e a reação foi agitada por 48h até total reação de substituição e conseqüentemente formação de NaCl. O produto reacional foi filtrado e lavado com metanol.

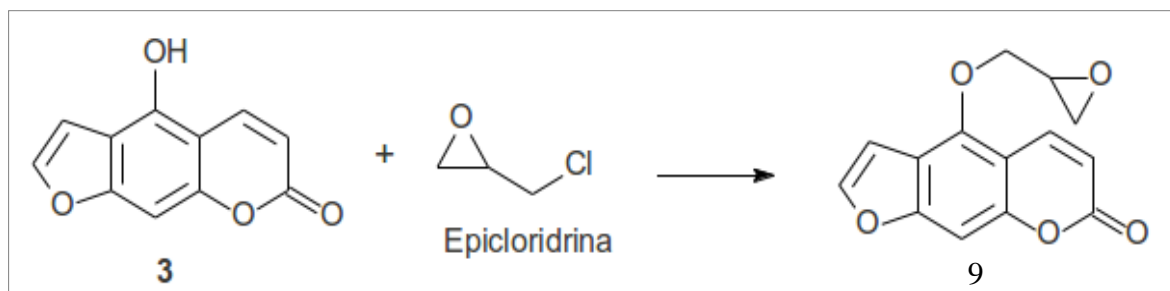


Figura 28. Representação da reação para formação da epóxicumarina.

4.2.11- Síntese do ligante com epoxipsoraleno: Formação 4-(3-{bis[2-(2-piridinil)etil]amino}-2-hidroxi)propoxi)psoraleno (10).

Em um balão de 25 mL adicionou-se 206mg do epóxido 9 (1mmol), obtido da reação anterior, dissolvido previamente em 10 mL de metanol. Em seguida, adicionou-se o ligante N-bis-(2-metilpiridil)amina 171,3mg (1mmol). Manteve-se o sistema reacional em agitação a temperatura ambiente por um período de 5 dias. O produto reacional foi concentrado até total remoção do solvente.

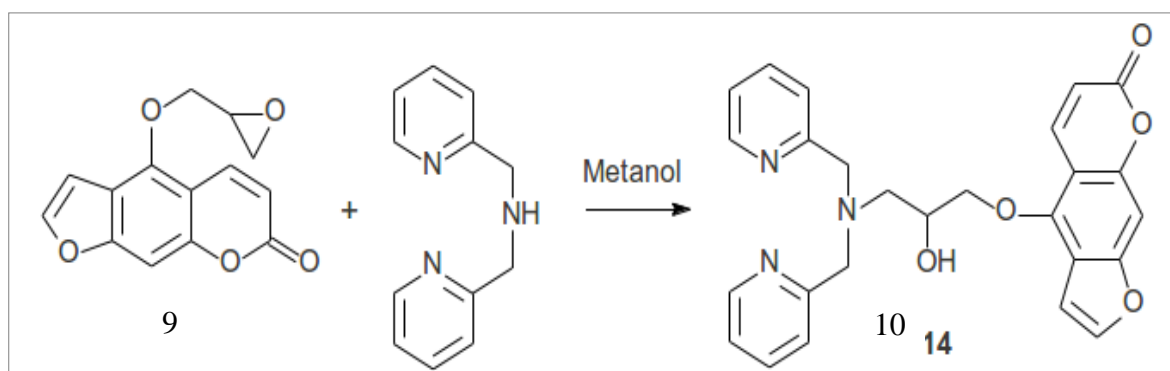


Figura 29. Representação da reação para síntese do ligante com epoxipsoraleno

4.2.12 – Síntese de 7-cloroacetoxi-5-metoxicumarina (11)

Em um balão de reação 25mL, adicionou-se 100mg de 5-metoxicumarina (2b) (15,9mmol) em 500µL de cloreto de cloreto de cloreto. Uma porção da base 4-(dimetilamino)-piridina foi adicionada para catalisar a reação. A mistura foi

submetida à agitação e aquecimento (100°) por um período de 5h. Após este intervalo, a mistura foi vertida em gelo e o precipitado foi agitado por um período de 30min, sendo, em seguida, realizada uma extração com o solvente diclorometano. A fase orgânica foi recolhida e evaporada sob baixa pressão. O produto seco foi purificado por cromatografia líquida em coluna de gel-sílica, inicialmente eluída com hexano (100%), seguida de gradiente de polaridade até a concentração de acetato de etila 100%. A substância de interesse foi eluída a uma concentração de 30:70 (v:v hexano:acetato de etila). O produto foi submetido análises espectroscópicas de IV e Massas.

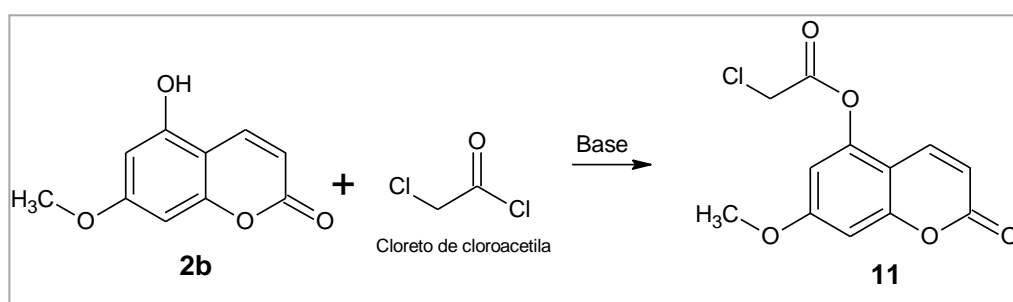


Figura 30. Representação da reação de formação do derivado cumarínico 11.

4.3 - Testes Biológicos

Os testes biológicos foram realizados no Laboratório de Biologia do Reconhecer do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) em parceria com Thatiana Lopes Biá Ventura (Doutoranda em Biotecnologia/UENF) e Michelle Muzitano Frazão (Doutora em Química dos Produtos Naturais/UFRJ).

As substâncias 5,7-diidroxycumarina (**2a**), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (**2b**), 5-hidroxipsoraleno (**3**), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (**4a**) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (**4b**), 5-bromopropoxipsoraleno (**5a**) e 5-bromobutoxipsoraleno (**5b**) foram testadas em ensaios biológicos com o objetivo de se avaliar suas atividades de inibição de NO, inibição de TNF- α , citotoxicidade e antituberculose.

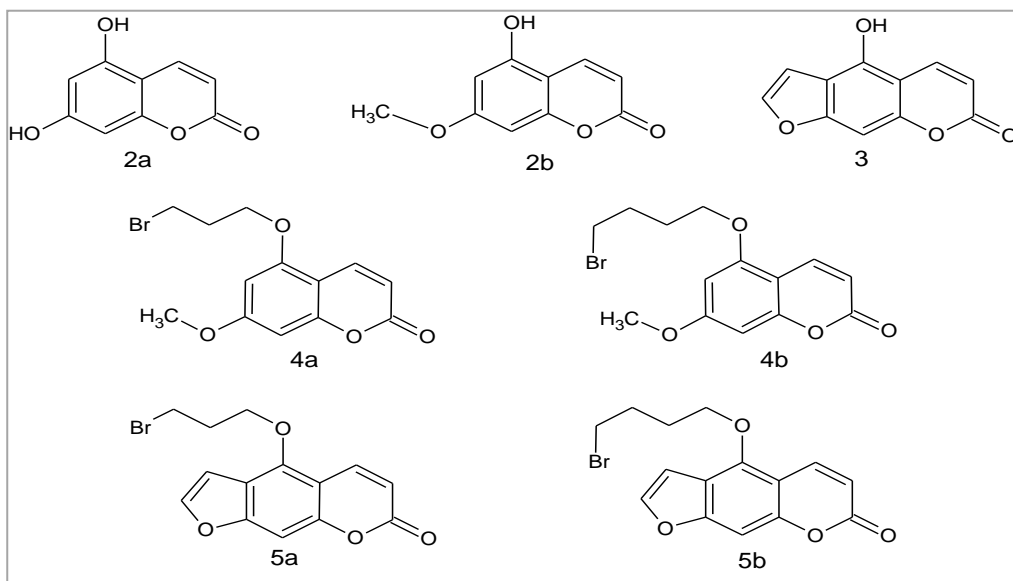


Figura 31. Substâncias submetidas aos testes biológicos.

4.3.1- Preparação de macrófagos para ensaios *in vitro*

Linhagens como RAW 264.7 também foram utilizadas. As células foram contadas em Câmara de Neubauer e, com a permanência do exsudato no gelo, distribuídas em placa de 96 poços, 5×10^4 células/poço, com meio DMEM-F12 + 5% SFB, em um volume de 0,2 ml/poço. Manteve-se a placa em estufa de 37°C/ 5%CO₂, e centrifugada por 2 min a baixa rotação, apenas para baixar possíveis células soltas. Os macrófagos foram ativados por LPS (1ug/ml) e logo em seguida foi efetuado os tratamentos com as substâncias em 4 diferentes concentrações 100, 20, 4 e 0,8 ug/mL.

4.3.2- Produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi estimada indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito. 50ul dos sobrenadantes (obtido conforme item 4.3.1) foram misturados aos 100ul de reagente de Griess (p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico, Sigma Chemical Co.), recém preparado. Após 10 min, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 570nm em espectrofotômetro de placa. A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada usando como referência uma curva de nitrito de sódio decrescida

do valor obtido com os aditivos sem células. Utilizou-se como controle macrófagos estimulados com LPS a 1ug/ml e macrófagos não estimulados, ambos não tratados com as amostras.

4.3.3- Produção de TNF- α

As células L929 (linhagem de fibroblasto murino) foram tratadas com solução de tripsina 0,025%+ EDTA 0,2% e plaqueadas na concentração 2×10^5 células/ml com meio DMEM-F12 contendo 10% de SFB e 20 μ g/ml de gentamicina, em placa de 96 poços. Após a incubação a 37°C por 24h, o meio da cultura foi removido e adicionou-se 50ul de meio de cultura com actinomicina D (2ug/ml) em cada poço. Após nova incubação por 24h a 37°C, a viabilidade celular foi determinada técnica do MTT, descrita no próximo item.

4.3.4- Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade dos extratos foi efetuado utilizando o ensaio de LDH e de MTT. Para o MTT, as células foram plaqueadas na concentração 2×10^5 células/poço e preparadas na condição de cultura acima citados, num volume final de 100ul. Após 2 horas para a aderência dos macrófagos, as células foram estimuladas ou não com 1ug/ml de LPS sozinho ou em combinação com os extratos ou frações por 24horas. Ao fim da incubação, adicionou-se 5 ul of 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazol (MTT, 5mg/ml) em cada poço e 2h depois o sobrenadante na placa foi removido e os cristais formados serão solubilizados por HCl (4mM) adicionado em isopropanol. A leitura foi feita por espectrofotômetro de placa a 570nm.

No caso do LDH, para analisar o teor da enzima lactato desidrogenase no meio, as culturas também foram mantidas em incubação por 24h e 50ul do sobrenadante da amostra foi coletado e acrescido de 100 μ L de solução de alumínio férrico e substrato, mantendo-se a 37°C por 3 min. Após, acrescentou-se 100 μ L da solução de NAD e fenasina metasulfato, mantendo-se a 37°C por mais 5min (Kit comercial Labrax). A leitura também foi feita em espectrofotômetro de placa a 490nm. Para obtenção da lise máxima utilizou-se Triton 0,1%, e lise mínima, o sobrenadante de cultura de macrófagos não tratados.

4.3.5- Teste de antimicrobiano contra *Mycobacterium bovis*

Os extratos foram avaliados quanto a sua atividade direta no parasita, através de experimento *in vitro* em cultura de *Mycobacterium* para a cepa avirulenta *M. bovis*-BCG.

A - Obtenção e cultivo das micobactérias

A vacina de BCG (vacina onco-BCG viva, cepa Moreau) foi cedida pelo Instituto Butantan/SP e cultivada em meio 7H9, acrescido de 0,05% Tween 80 e suplemento ADC (albumina, dextrose, catalase) até a fase mid-log durante 7 dias. Antes da execução dos experimentos, a cultura foi sonicada por 1 minuto para dispersão dos grumos (FATTORINI et al., 2002) e incubada em estufa por 3 dias.

B - Atividade Micobactericida

A suspensão de *Mycobacterium* (3×10^7 CFU/ml) foi preparada segundo item A. Na fase logarítmica de crescimento, 50ul foram plaqueados em placa de 96 poços (1×10^6 CFU/poço) junto com as amostras (50ul), adicionadas em concentração 2 vezes maior do que a concentração final desejada. A placa então foi incubada a 37 °C por 7 dias. Após esse período, adicionou-se 10 ul de MTT e 3 horas depois, 100ul de tampão de lise. A leitura foi realizada no espectrofotômetro de placa a 570 nm. Como controle positivo utilizou-se meio de cultura acrescido de bactérias e rifampicina e como controle negativo poços acrescidos de bactérias e não tratados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Sínteses Orgânicas

Nesse tópico estão representadas, na figura 32 a seguir (p.42) as estruturas das substâncias sintetizadas, tempo de reação e o rendimento obtido.

No total foram obtidas e caracterizadas 12 substâncias, sendo 3 cumarinas: 5,7-diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3); e 9 derivados cumarínicos inéditos: 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a), 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a), 5-bromobutoxipsoraleno (5b), 5-{4-[bis(2-piridinilmetil)amino]propóxi}-7-metóxicumarina (6), 7-(2,2-dietoxietoxi)-5-hidroxycumarina (7a), 5,7-bis(dietoxietoxi)cumarina (7b), 5-(dietoxietoxi)-7-metoxicumarina (7c) e 5-cloroacetóxi-7-metoxicumarina (11).

Nos tópicos seguintes, serão discutidos os resultados para cada reação realizada.

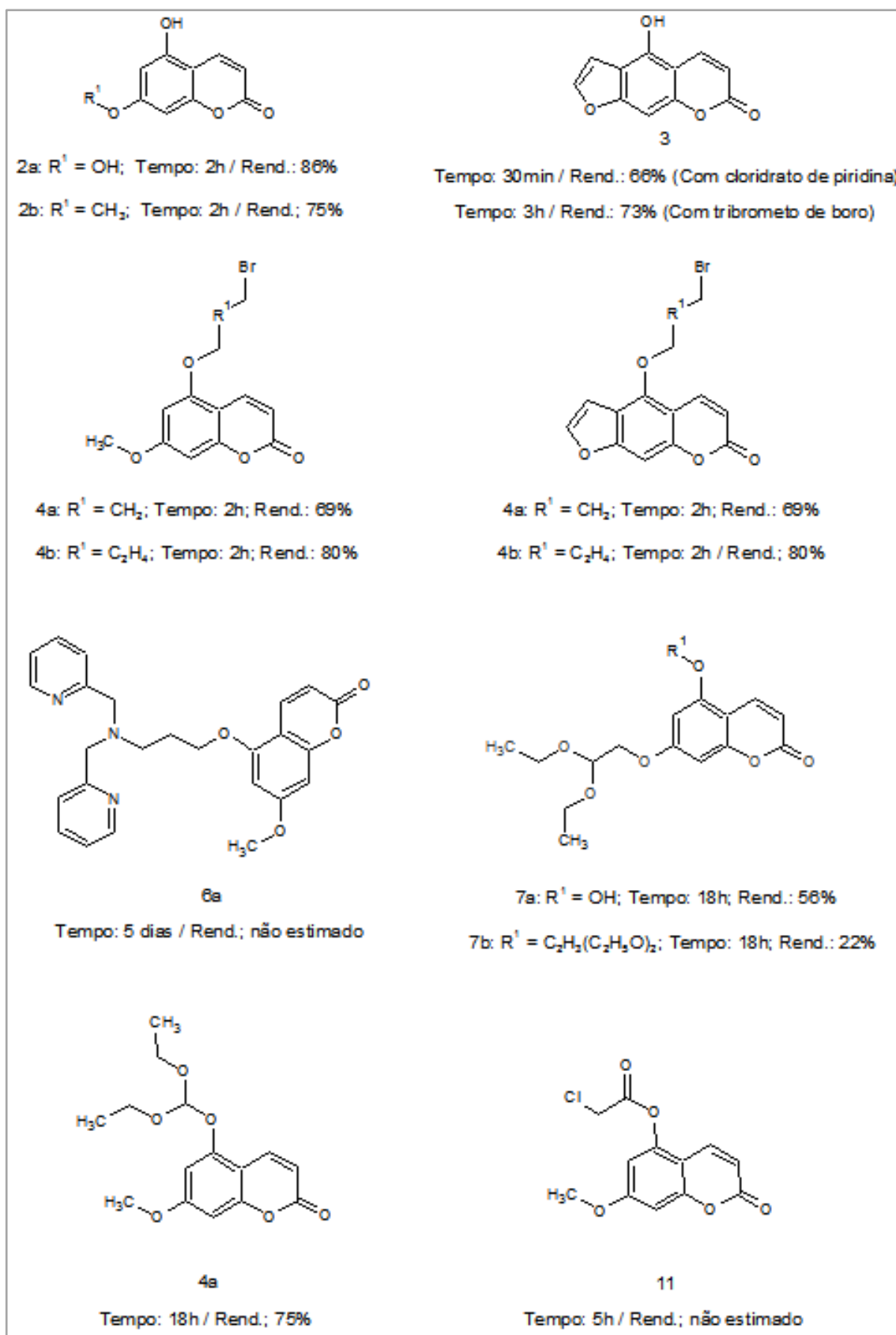


Figura 32. Estrutura, tempo de reação e rendimento das substâncias sintetizadas.

5.1.1 – Síntese do 5-metoxiresorcinol (1b).

Nessa primeira síntese, ocorreu a reação de alquilação em um hidroxila fenólica, presente no material de partida 1,3,5-tri-hidroxibenzeno (floroglucinol). A reação ocorre por mecanismo de substituição nucleofílica por deslocamento direto (S_N2) entre o íon fenolato de sódio, formado a partir do floroglucinol e o metanol acidificado (Fig. 33, p.40)

Primeiramente, foi adicionado o NaH, a fim de capturar o hidrogênio de uma das hidroxila fenólica presente no produto de partida, pela produção do gás H_2 e, conseqüentemente, formação do ânion fenolato. Em seguida, esse íon reage com o metanol acidificado, através do ataque nucleofílico entre o átomo de oxigênio aniônico e o átomo de carbono metanólico. Como consequência dessa reação, ocorre liberação do grupo de saída H_2O e formação de 5-metoxiresorcinol com um rendimento de 58% (58mg). Esse material se apresentou como um sólido na forma de pó de cor branca.

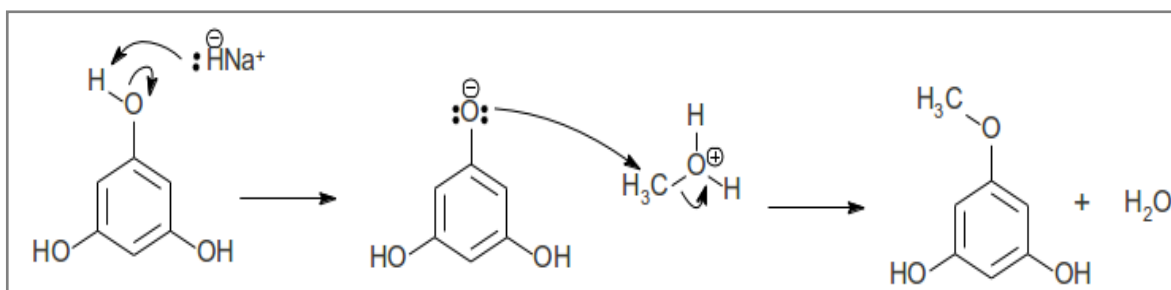
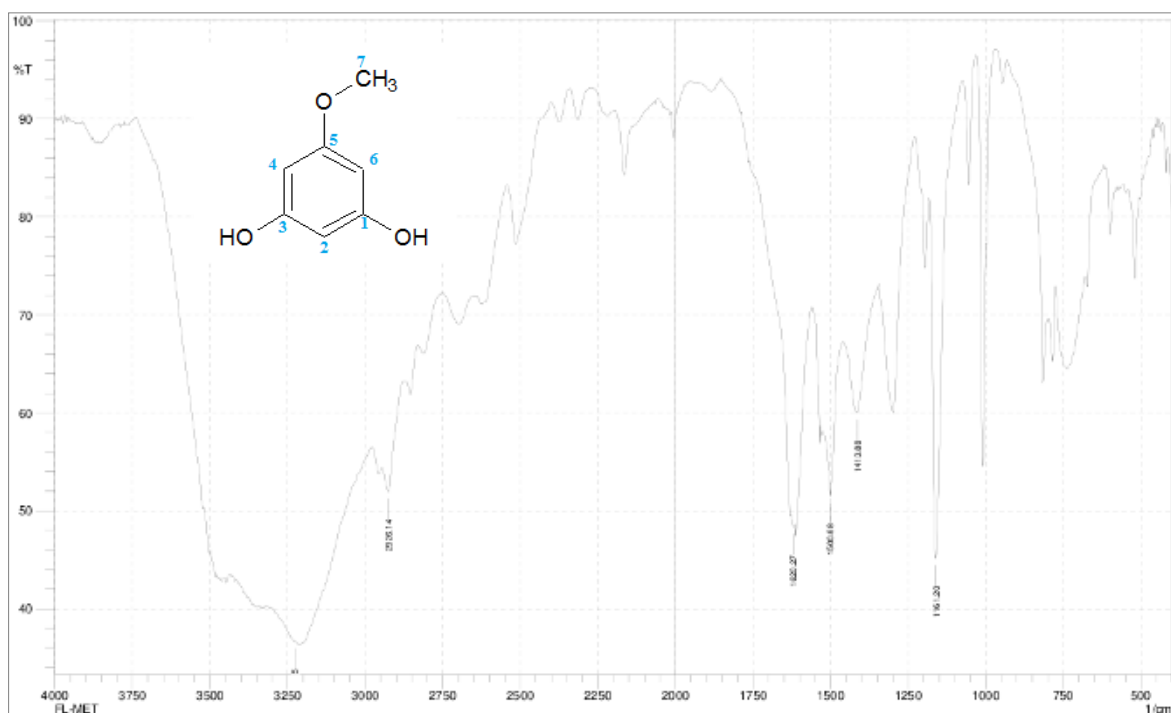


Figura 33. Mecanismo de reação para formação de 1b.

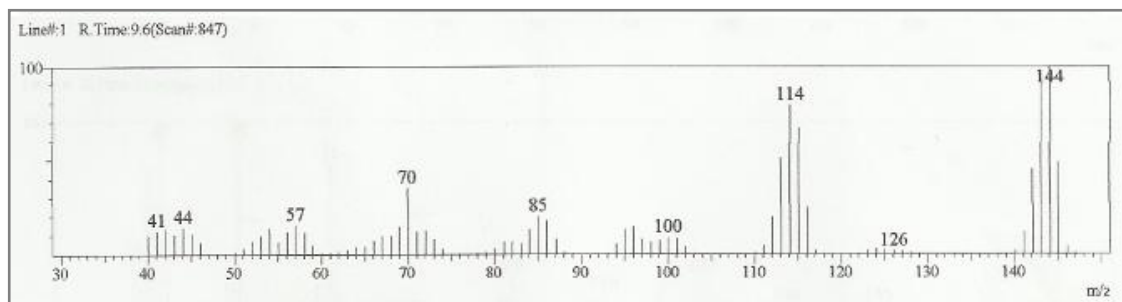
No Espectro de IV (Espectro 1, p.44) identifica-se as bandas de estiramento de OH, em $\nu 3250\text{ cm}^{-1}$, de C-H em $\nu 2950\text{ cm}^{-1}$, de C=C de anel aromático em 1620 e 1500 cm^{-1} . Observam-se também as deformações axiais assimétricas de CH_3 em $\nu 2850\text{ cm}^{-1}$, simétrica de CH_3 em $\nu 2926\text{ cm}^{-1}$ confirmando a presença de metil do grupo metoxila. Além disso, a análise por espectroscopia de massas (Espectro 2, p. 44) confirma a estrutura pela detecção do sinal m/z 144 relativo ao íon molecular com a fórmula molecular $C_7H_8O_3$

O 5-metoxiresorcinol foi confirmado através dos dados de RMN de 1H ,

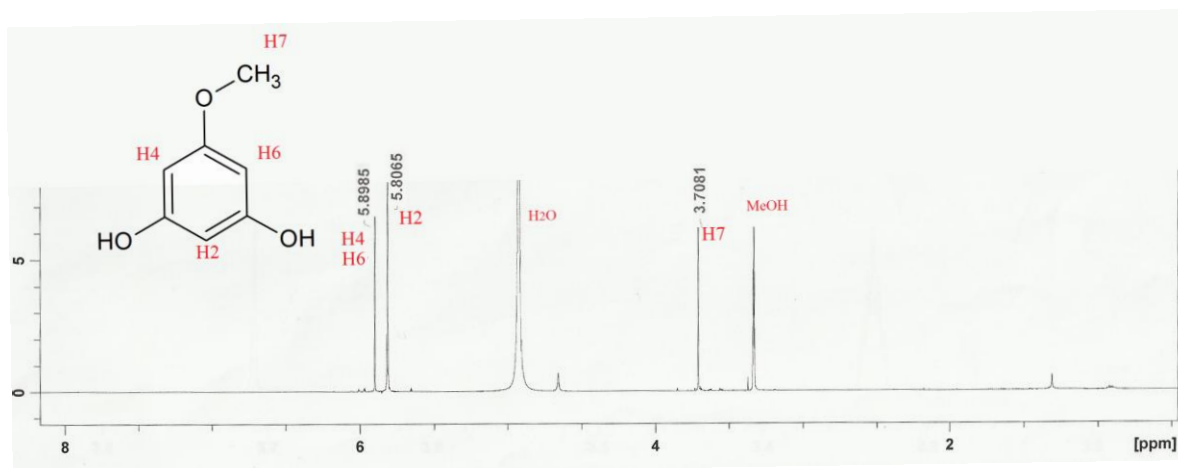
espectroscopia de Infravermelho e massas. A análise realizada no espectro de RMN de ^1H (Espectro 3, p.45) mostrou um sinal com o deslocamento químico em 3,71 ppm (singlete), atribuído ao carbono metilênico do grupo metoxila ligado ao sistema aromático, indicando que a reação de metilação do grupo hidroxila foi alcançada. Os sinais com o deslocamento químico em 5,90 (singlete) e 5,81 (singlete) ppm são referentes aos átomos de hidrogênio aromáticos.



Espectro 1. Espectro no IV da substância 1b.



Espectro 2. Espectro de massas da substância 1b.



Espectro 3. Espectro de RMN de 1H (400MHz) em CDCl_3 da substância 1b

5.1.2 – Formação do anel lactônico. Síntese da 5,7-dihidroxicumarina (2a) e da 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b).

Essa etapa é considerada a mais importante e fundamental para todo o trabalho realizado. Nessas reações são obtidas as substâncias bases para as sínteses posteriores a partir da formação da estrutura básica de um anel lactona condensado. A síntese é baseada na reação de ciclização-esterificação, catalisada por ácido de Lewis. A figura 34 (p.46) representa o mecanismo dessa síntese.

Essa reação consiste na formação de um anel lactona condensado acoplado à cadeia aromática de um fenol utilizando um éster como reagente. O cloreto de zinco foi utilizado nessa reação formando um complexo com a hidroxila fenólica e com a carboxila do éster. Essa complexação reduz a energia de ativação do estado de transição promovendo a reação de substituição eletrofílica ao anel aromático do floroglucinol. O intermediário formado, por fim, cicliza formando o anel lactona, tendo como produto uma molécula de etanol e a substância de interesse

Essa reação foi utilizada na obtenção das cumarinas 5,7-dihidroxicumarina (2a), com 86% (430mg) de rendimento e 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), com 75% (315mg) rendimento. A substância 2a apresentou-se na forma de pó de cor branca e a substância 2b apresentou-se como sólido na forma de pó de cor amarelo claro.

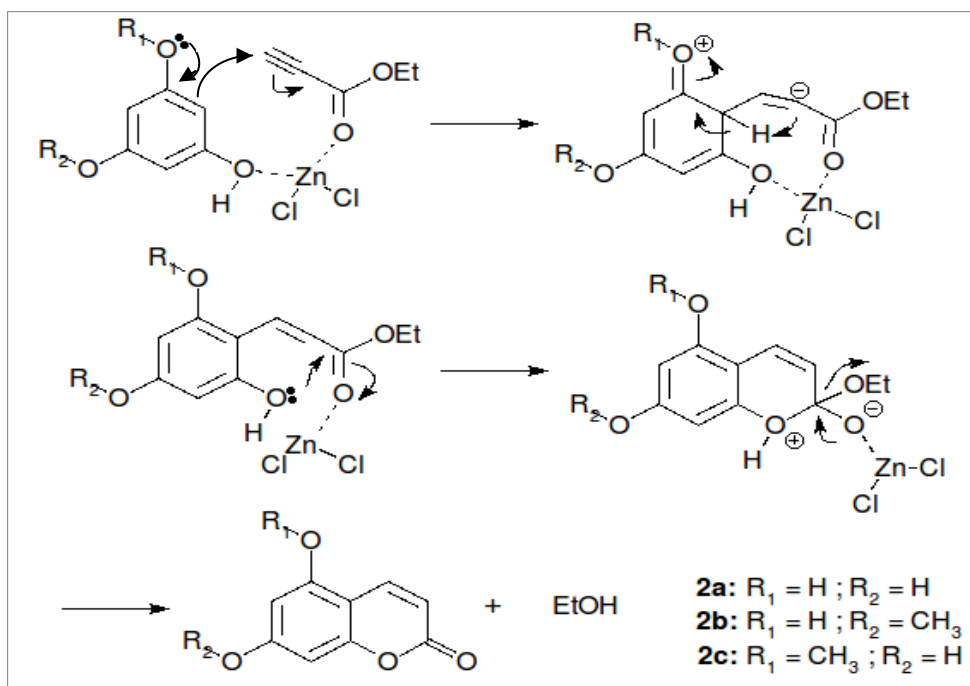


Figura 34. Mecanismo de reação para formação de 2a-b.

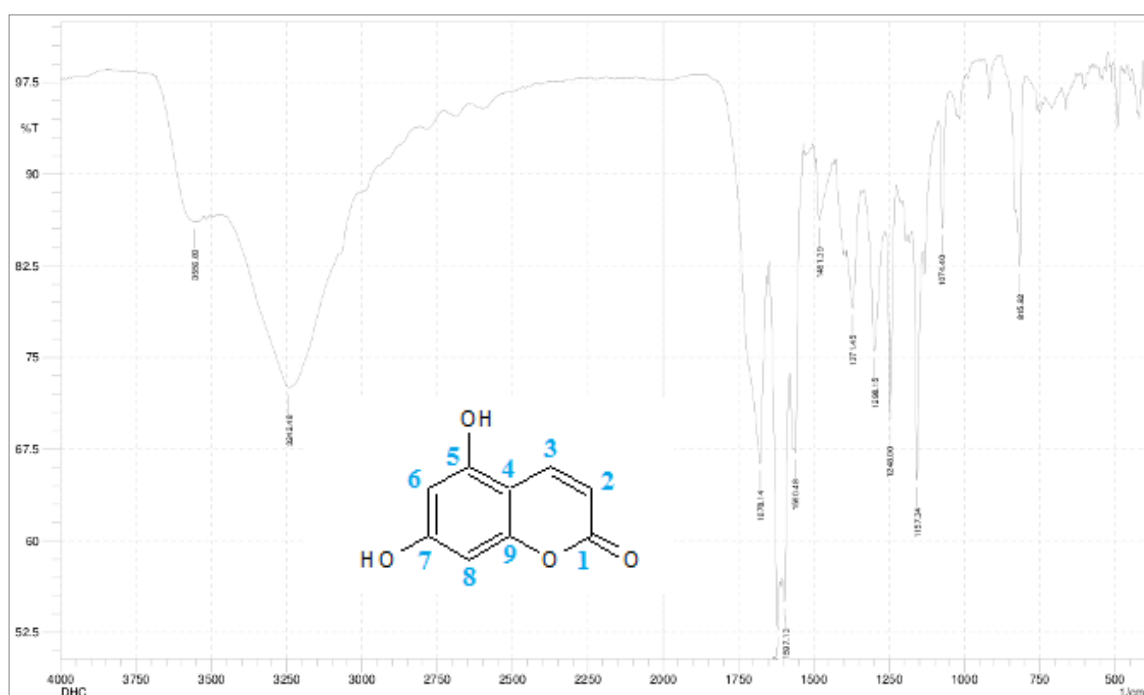
Os espectros de Infravermelho das duas substâncias confirmam a formação do anel lactona pela presença de banda de estiramento dupla de $\nu C=O$ de α -lactonas em $\nu 1678\text{ cm}^{-1}$, para **2a** e em $\nu 1698\text{ cm}^{-1}$, para **2b** (chamado de ressonância de Fermi) e pela banda de estiramento de C-O em $\nu 1248$, $\nu 1157$ e 1074 cm^{-1} para a substância **2a** e em $\nu 1240$, $\nu 1199$ e $\nu 1159$ para substância **2b**. Os espectros mostram as bandas larga de ligação de OH intramolecular em região de $\nu 3242\text{ cm}^{-1}$ para **2a** e em $\nu 3200\text{ cm}^{-1}$ para **2b**. Observa-se as bandas de estiramento de C-H em $\nu 2980\text{ cm}^{-1}$, de C=C de anel aromático em $\nu 1625$, $\nu 1597$, $\nu 1560$ e $\nu 1481$ para substância **2a** e de C-H em $\nu 2960\text{ cm}^{-1}$, de C=C de anel aromático em $\nu 1600$, $\nu 1508$, $\nu 1479$ e $\nu 1429\text{ cm}^{-1}$ para a substância **2b**. Para a substância **2b**, observam-se, também, as bandas de estiramento assimétrica de CH_3 em $\nu 2880\text{ cm}^{-1}$ e simétrica em $\nu 3000\text{ cm}^{-1}$, caracterizando o grupo metil da metoxila (Espectro 4, p.47 e Espectro 10, p. 50).

O espectro de massas (Espectro 5, p. 45) da substância 2a mostra o sinal m/z 178 relativo ao íon molecular compatível com a fórmula molecular $C_9H_6O_4$ da estrutura obtida.

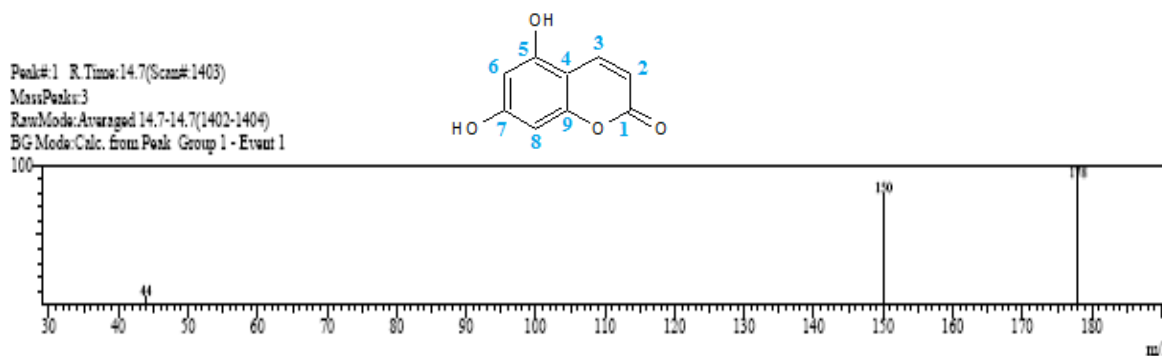
O espectro de RMN de 1H (Espectro 6, p. 49) mostrou 6 sinais característicos da cumarina, observados por dois dupletos em 6,00 e 8,01 ppm

atribuídos aos átomos de hidrogênio da ligação dupla de configuração *cis* da porção pirona da cumarina e outros dois sinais duplos em 6,20 e 6,18 são referentes as dois átomos de hidrogênios de anel aromático nas posições H6 e H8.

O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 6, p. 49) da substância 2a mostrou 5 sinais relativos aos átomos de carbono quartenário, sendo o grupo de sinais 162,5, 163,2, 156,7 e 156,2 ppm atribuídos aos carbonos diretamente ligados a átomo de oxigênio nas posições C1, C5, C7 e C9, respectivamente. O sinal 102,5 ppm representa o átomo de carbono quartenário na posição C4. O espectro mostra, também, sinais de átomo de carbono metínico aromático, compreendendo o grupo de sinais 108,0, 140,3, 98,1 e 94,0 ppm nas posições C2, C3, C6 e C8, respectivamente. O mapa de contornos HMQC (Espectro 7, p. 49) da substância 2a mostra as correlações entre os núcleos de carbono e de hidrogênio, correspondente a uma ligação ($^1J_{\text{CH}}$). Através do mapa de contornos HMBC (Espectro 8, p. 50) foi possível obter o correto posicionamento dos átomos de carbono na estrutura 2a por mostrar as correlações à longa distância ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$). Na tabela 1 (p. 48) estão reunidos os sinais atribuídos aos átomos de carbono e hidrogênio e as suas correlações.



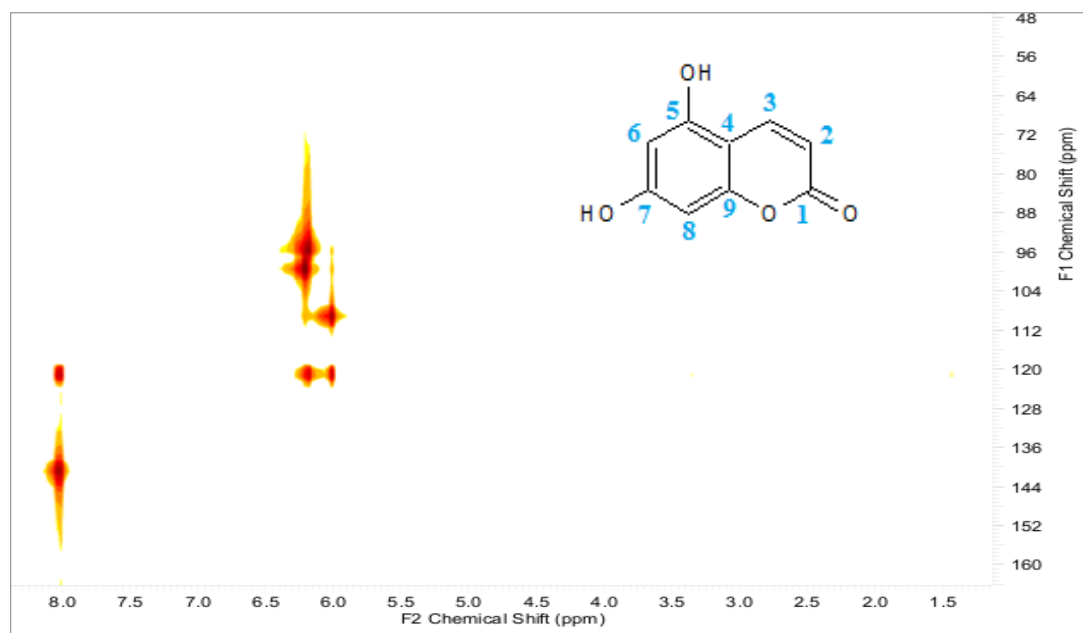
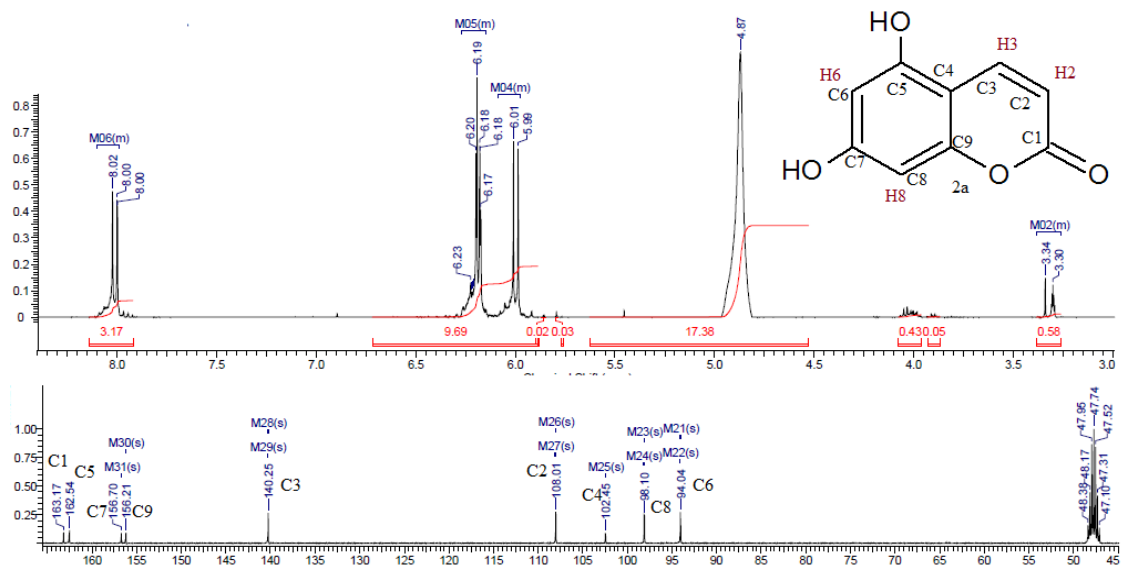
Espectro 4. Espectro no IV da substância 2a.

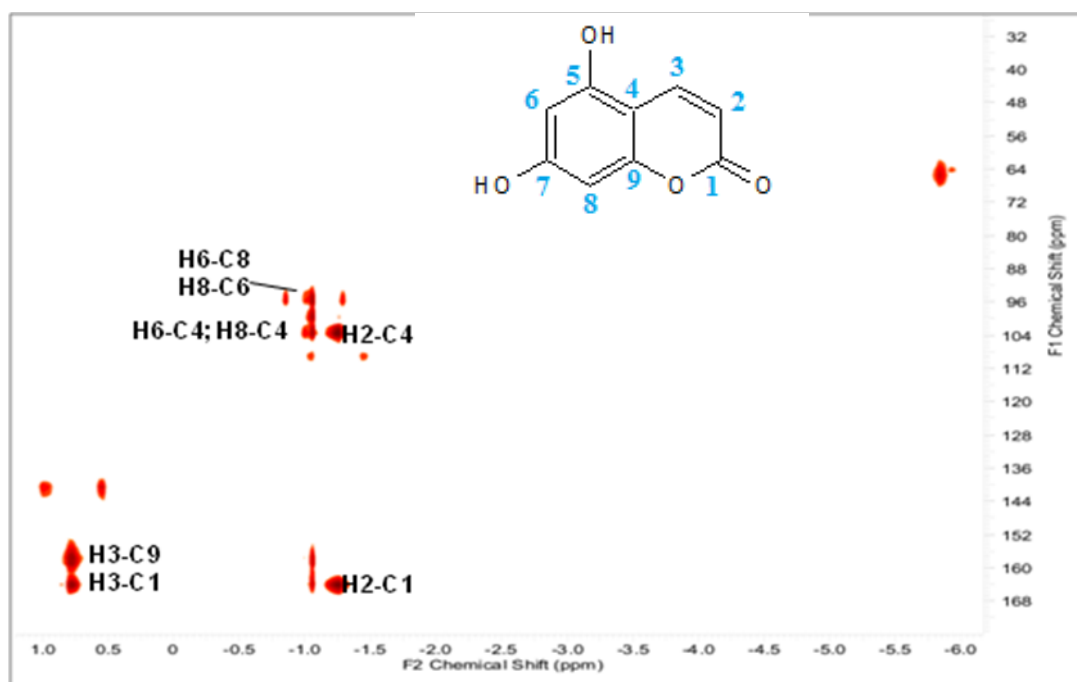


Espectro 5. Espectro de massas da substância 2a.

Tabela 1: Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C (100MHz) da substância 5,7-diidroxicumarina (2a), em MeOD e as correlações observadas nos mapas de contornos HMQC e HMBC.

Atribuição (n° C)	^{13}C (ppm)	HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) ^1H (ppm)	HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$)
1	162,5	-	-
2	108,0	6,00 (<i>d</i> ; $J = 8,0\text{Hz}$)	102,5 (C4); 162,5 (C1)
3	140,3	8,01 (<i>d</i> ; $J = 8,0\text{Hz}$)	156,6 (C9); 162,5 (C1)
4	102,5	-	-
5	163,2	-	-
6	98,1	6,20 (<i>s</i>)	94,0 (C8); 156,7 (C7); 163,2 (C5); 102,7 (C4)
7	156,7	-	-
8	94,0	6,18 (<i>s</i>)	98,1 (C6); 156,2 (C9); 102,7 (C4);
9	156,2	-	-





Espectro 8. Mapa de contornos HMBC em MeOD da substância 2a.

O espectro de massas (Espectro 10, p. 52) da substância 2b mostra o sinal m/z 192 relativo ao íon molecular compatível com a fórmula molecular $C_{10}H_8O_4$ da estrutura obtida.

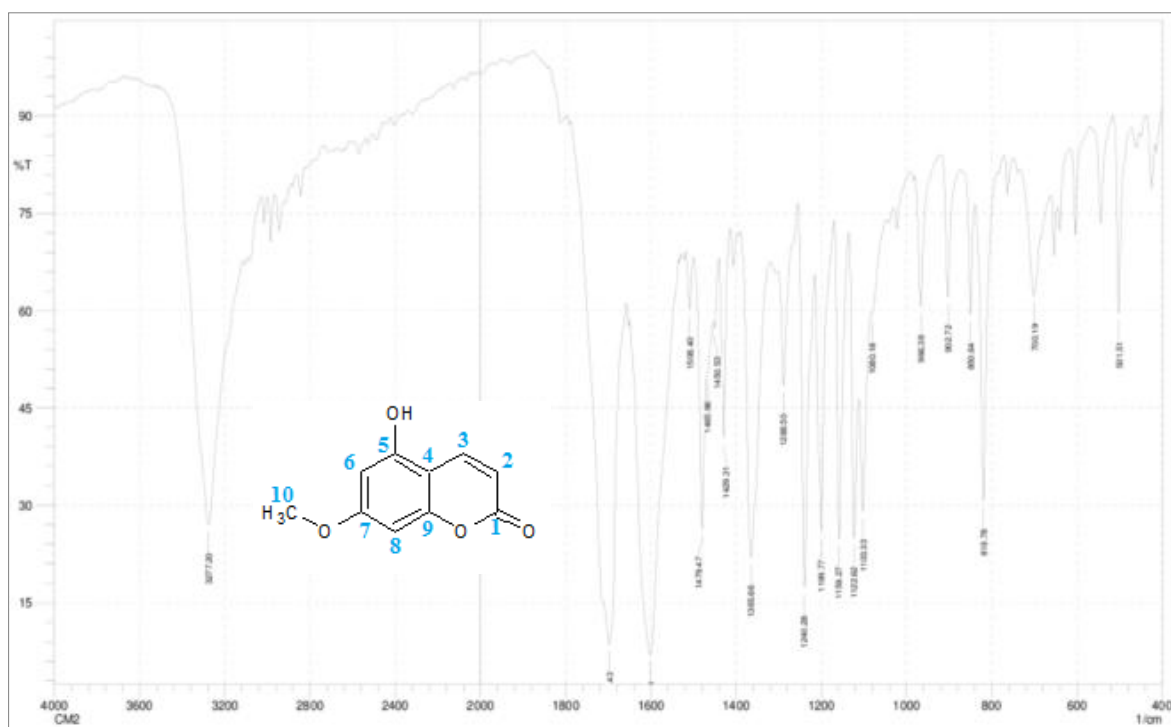
O espectro de RMN de 1H (Espectro 11, p. 53) da substância 2b mostrou 7 sinais. Os sinais característicos da cumarina podem ser observados por dois dupletos em 6,13 e 8,07 ppm atribuídos aos átomos de hidrogênio da ligação dupla de configuração *cis* da porção pirona da cumarina e outros dois sinais duplos em 6,36 e 6,32 relativos a dois hidrogênios de anel aromático na posição H6 e H8, respectivamente. O sinal simples em 3,92 ppm é característico dos átomos de hidrogênio da metoxila ligada ao anel aromático.

O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 11, p. 53) da substância 2b mostrou 5 sinais relativos aos átomos de carbono quartenários, sendo o grupo de sinais 162,6, 162,8, 157,6 e 156,6 ppm, atribuídos aos carbonos diretamente ligados a átomo de oxigênio nas posições C1, C5, C7 e C9, respectivamente. O sinal 102,4 ppm representa ao átomo de carbono quartenário na posição C4. O espectro mostra sinais de átomos de carbono metínico com o deslocamento químico em compreendendo o grupo de sinais 108,0, 140,3, 98,1 e 94,0 ppm, que corresponde as átomos de carbono nas posições C2, C3, C6 e C8,

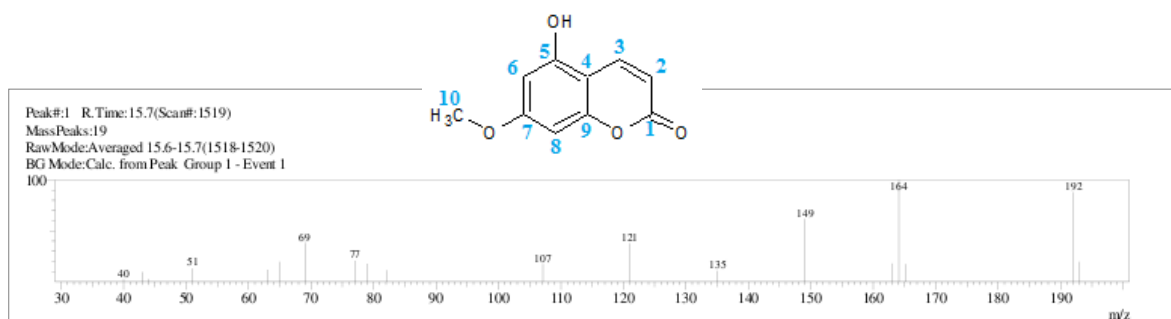
respectivamente. Diferentemente da substância anterior, o espectro de RMN ^{13}C mostra um sinal em 55,2 ppm atribuído ao átomo de carbono da metoxila.

O mapa de contornos HSQC (Espectro 12, p. 54) da substância 2b mostra as correlações entre os núcleos de carbono e hidrogênio a uma ligação ($^1\text{J}_{\text{CH}}$), mostrando assim a correlação entre o H10 em δ 3,92 ppm e C10 em δ 55,2 ppm, confirmando a presença de grupo metoxila.

Através do mapa de contornos HMBC (Espectro 13, p. 54) obtêm-se as correlações à longa distância entre os núcleos de hidrogênio e de carbono ($^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$), permitindo o correto posicionamento dos átomos de carbono na estrutura 2b. Observa-se que os sinais dos hidrogênios H2 (6,13 ppm) e H3 (8,07 ppm) do anel pirona se correlacionam com carbono quartenário 162,6 ppm, sendo atribuído esse sinal ao carbono C1 devido à ausência de outra correlação entre hidrogênios. A correlação dos hidrogênios H3 e H6 (6,36 ppm) com sinal 162,8 ppm, confirma a atribuição deste sinal ao carbono quartenário C5. Esses mesmos hidrogênios correlacionam com o sinal 102,5 ppm, atribuído ao carbono C4 por este não apresentar ligação com átomos de oxigênio, confirmando sua posição. A correlação entre H10 (3,92 ppm) e C7 (157,6 ppm) confirma a presença do grupo metoxila na posição 7 da cumarina, o que indica que o mecanismo majoritário da reação ocorre para formação de 2b. Na tabela 2 (p. 53) estão reunidos os sinais atribuídos aos átomos de carbono e hidrogênio e as suas correlações.



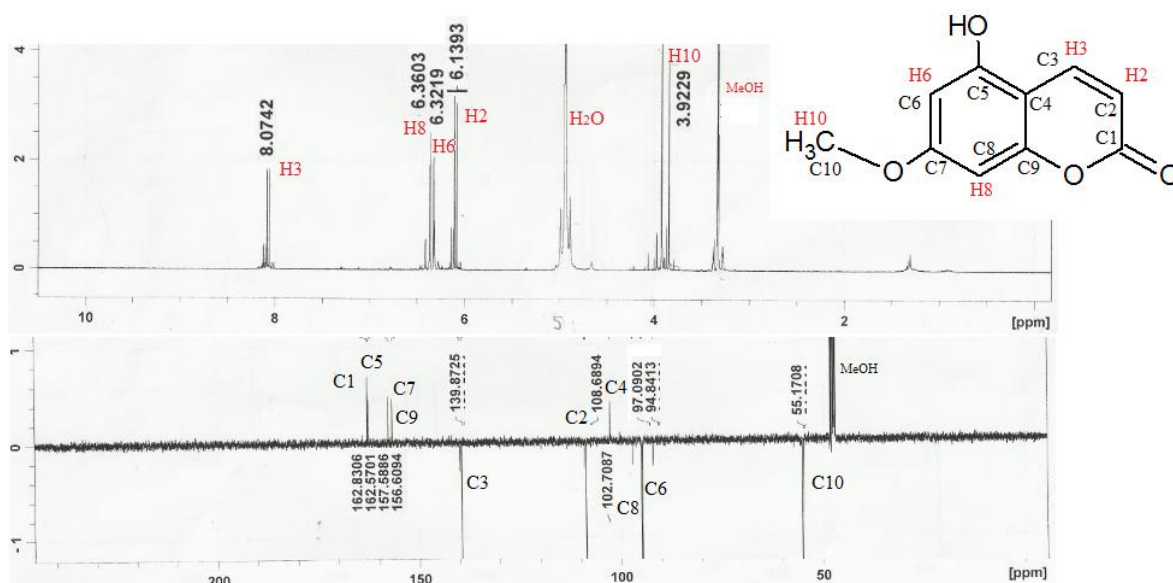
Espectro 9. Espectro no IV da substância 2b.



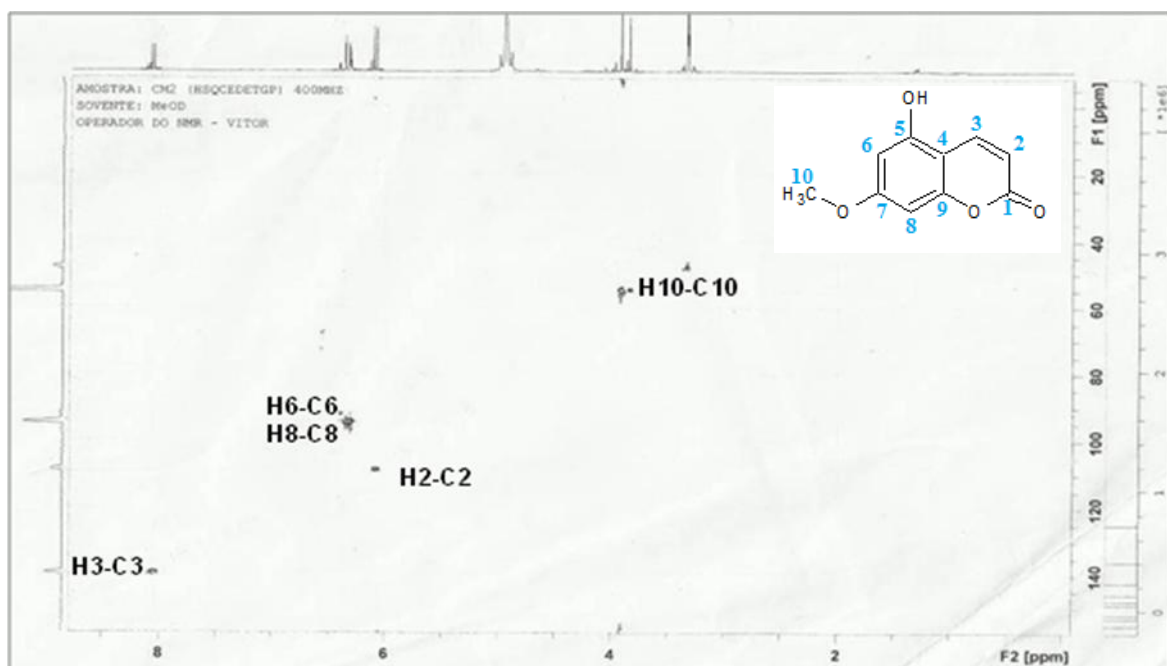
Espectro 10. Espectro de massas da substância 2b.

Tabela 2: Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), em MeOD e as correlações observadas nos mapas de contornos HSQC e HMBC.

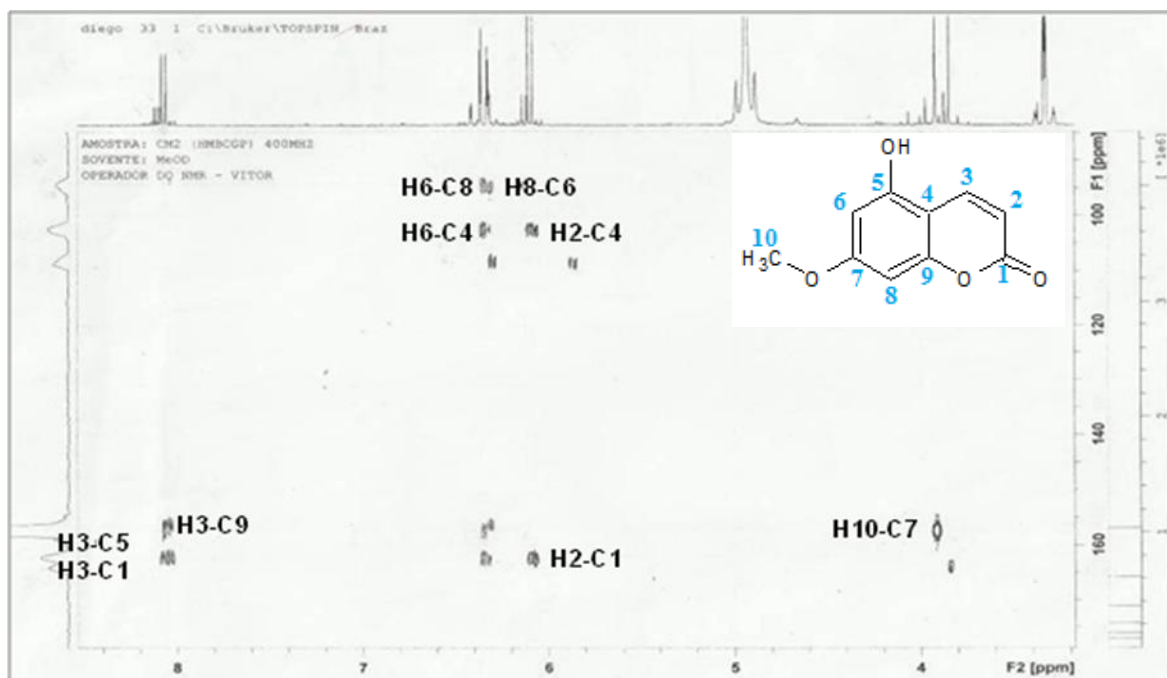
Atribuição (n° C)	HMQC ($^1J_{\text{CH}}$)		HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$)
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	
1	162,6	-	-
2	108,6	6,13 (d; $J = 9,6\text{Hz}$)	102,4 (C4); 162,8 (C5); 162,6 (C1)
3	139,5	8,07 (d; $J = 10\text{Hz}$)	156,6 (C9); 162,8 (C5); 162,6 (C1)
4	102,4	-	-
5	162,8	-	-
6	94,8	6,36 (s)	94,6 (C8); 157,6 (C7); 162,8 (C5); 102,7 (C4)
7	157,6	-	-
8	94,6	6,32 (s)	94,8 (C6); 156,6 (C9); 102,7 (C4)
9	156,6	-	-
10	55,2	3,92 (s)	157,7 (C7)



Espectro 11. Espectro de RMN de ^1H (400MHz) e ^{13}C (100MHz) em MeOD da substância 2b.



Espectro 12. Mapa de contornos HSQC em MeOD da substância 2b.



Espectro 13. Mapa de contornos HMBC em MeOD da substância 2b.

5.1.3- Síntese de bergaptol (3) por cloridrato de piridina.

Inicialmente essa reação foi utilizada para retirar o grupo metil da metoxila,

resultando em um grupo hidroxila, com o intuito de se obter um sítio de substituições na furocumarina para outras reações.

O produto em contato com cloreto de piridina sofre uma clivagem na ligação carbono-oxigênio na metoxila, sendo formado um grupo hidroxila na posição C5 da furocumarina.

Apesar do bom rendimento, esta reação apresenta alguma dificuldade e risco pelos seguintes motivos: o preparo do cloreto de piridina é dificultado pelo alto teor de umidade no ambiente. Embora os frascos estejam vedados é inevitável a absorção de água durante o transporte de material na montagem e término do preparo, na pesagem do sal antes da reação e no término da reação, devido à alta hidrofiliabilidade do cloridrato de piridina. Outro fator é a alta temperatura de reação, em torno de 200° C, prejudicando o rendimento devido ao bergaptool sublimar facilmente nessa temperatura.

O rendimento obtido dessa reação foi de 66% (142,6mg), resultando em uma substância sólida na forma de pó de cor branca. Uma nova rota de reação foi proposta para a desmetilação do bergapteno, utilizando o ácido de Lewis tribrometo de boro à temperatura ambiente, que será discutida no item 5.1.4.

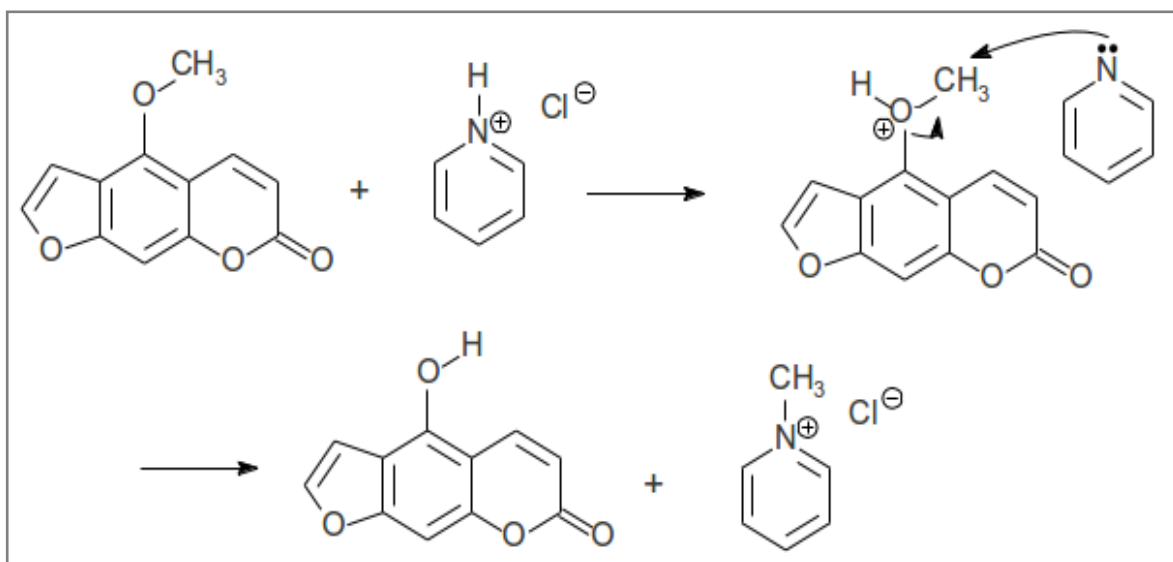
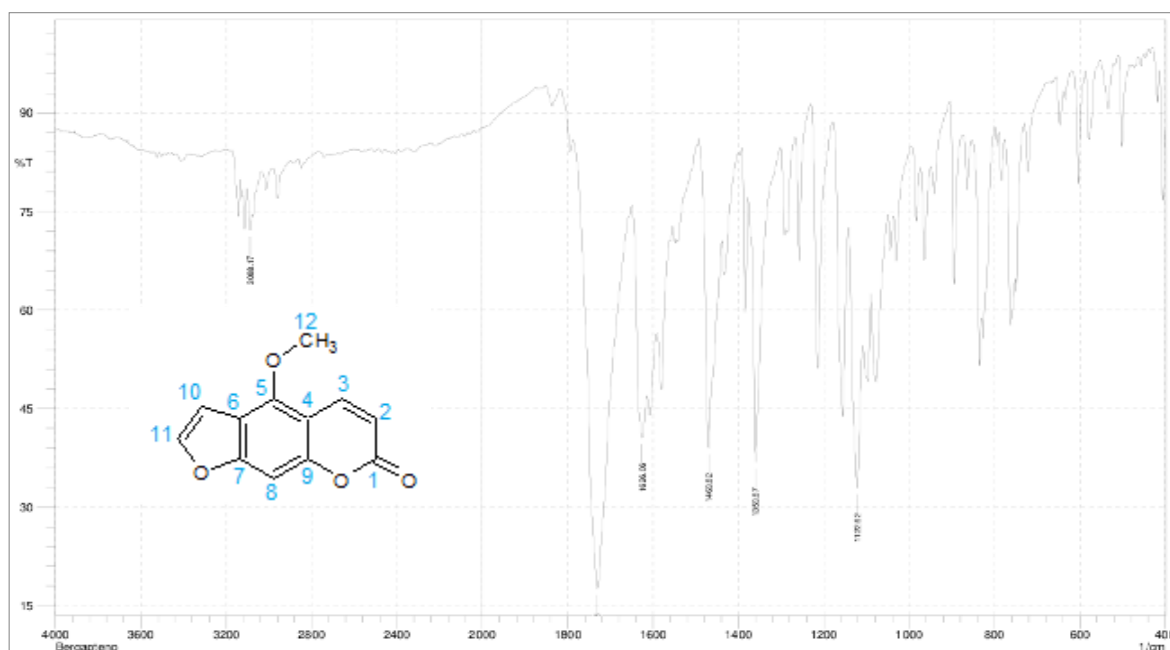


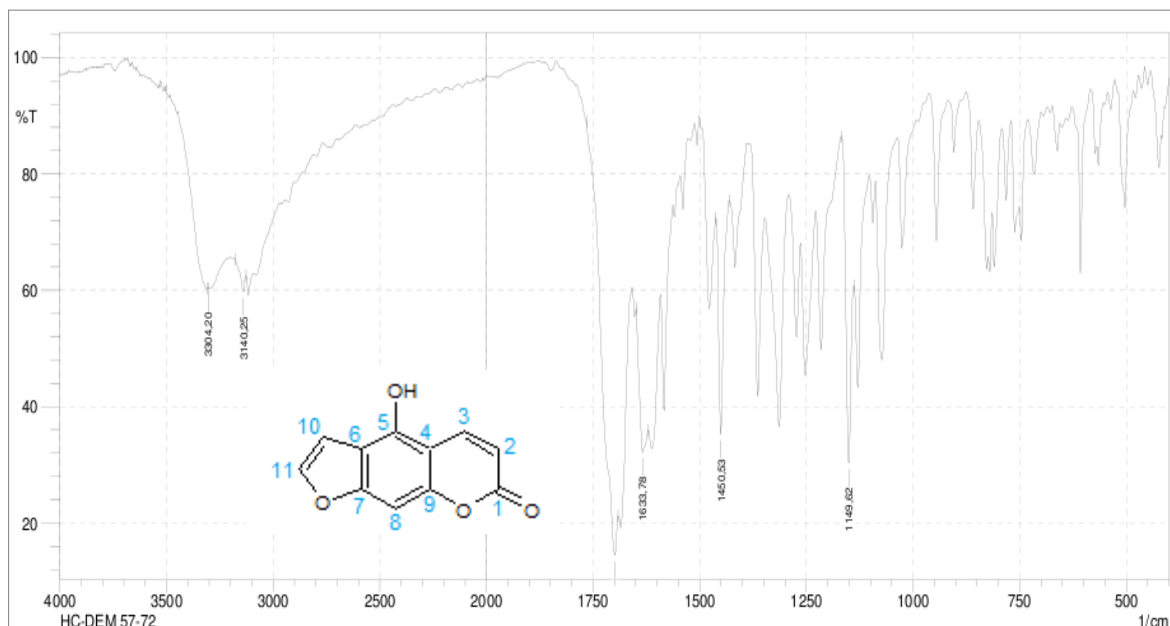
Figura 35. Mecanismo de reação para formação de 3 por cloridrato de piridina.

O espectro de Infravermelho (Espectro 15, p. 57) da substância confirma a desmetilação pela presença de banda larga de ligação de OH intramolecular em região de $\nu 3304 \text{ cm}^{-1}$, ausente no espectro do bergapteno (Espectro 14, p. 56). Observam-se, também, as bandas de estiramento dupla de C=O de α -lactonas em $\nu 1699 \text{ cm}^{-1}$ (ressonância de Fermi), banda de estiramento de C-O em $\nu 1166$, $\nu 1149$ e 1138 cm^{-1} . O espectro mostra as bandas de estiramento de C-H em $\nu 3126 \text{ cm}^{-1}$, de C=C de anel aromático em $\nu 1633$, $\nu 1620$, $\nu 1431$ e $\nu 1450$ confirmando a estrutura furocumarínica.

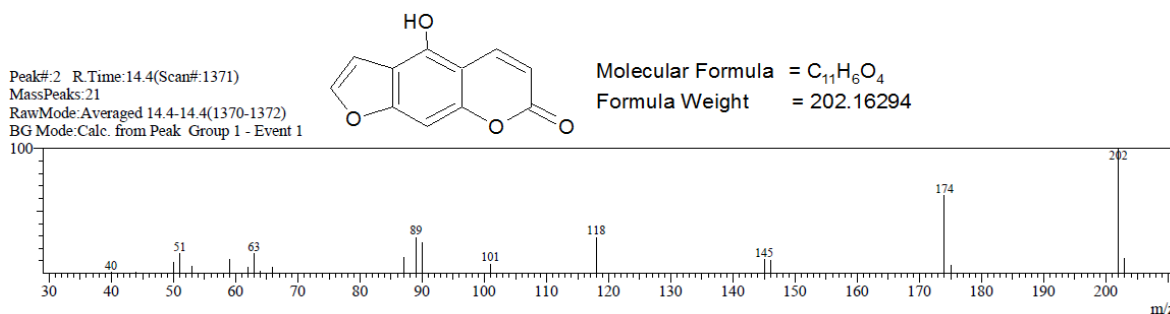
O espectro de massa (espectro 16, p. 57) mostra o sinal m/z 202 relativo ao íon molecular compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_4$ da estrutura obtida, confirmando a formação da substância 3.



Espectro 14. Espectro de IV do material de partida bergapteno.



Espectro 15. Espectro no IV da substância 3 obtida por cloridrato de piridina.



Espectro 16. Espectro de massas da substância 3 obtido por cloridrato de piridina.

5.1.4- Formação de bergaptol (3) por ácido de Lewis BBr₃.

Essa etapa do trabalho consiste em uma reação semelhante à utilizada com cloridrato de piridina. Essa reação foi mais eficiente em comparação com o uso de cloridrato de piridina, através do rendimento de 73% (73mg) de bergaptol formado. Esse material apresentou-se como um sólido na forma de pó e cor branca.

A desmetilação do bergapteno nessa reação ocorre através de ligações intermediárias com o ácido de Lewis tribrometo de boro. A formação do bergaptol, tanto com cloreto de piridina quanto com o BBr₃ trata-se de uma desmetilação de

aril metil éteres através de complexo formado entre o átomo de oxigênio etérico e o reagente em uso. Estes mecanismos é resumido em ativação do grupo metil da metoxila pela coordenação entre o reagente eletrofílico com o oxigênio etérico, o que gera íon bromo, possibilitando um ataque nucleofílico e concomitante clivagem de ligação C-O da metoxila gerando o bromoalcano CH_3Br . O complexo formado entre a substância e o ácido de Lewis então desfeito pela adição de água no meio, resultando em um produto com grupo funcional hidroxila, o bergaptol, além dos ácidos bórico e hidrobromídrico.

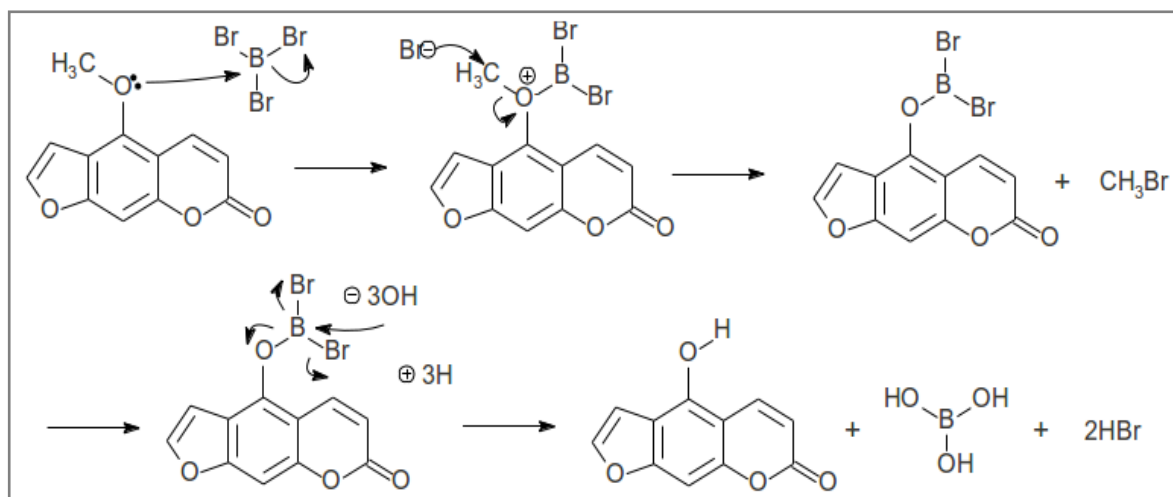
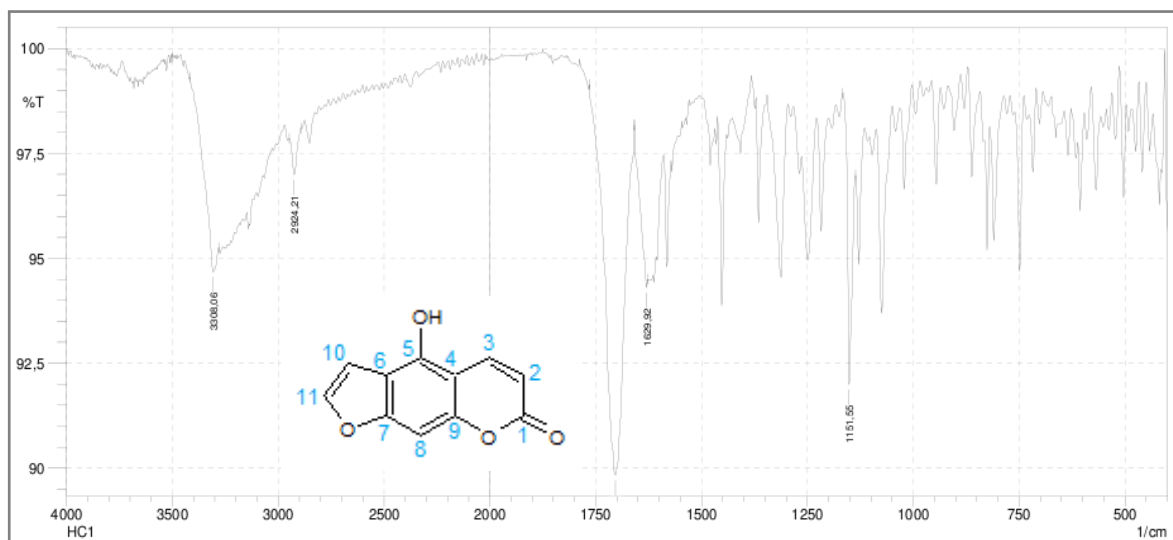


Figura 36. Mecanismo de reação para formação de 3 por BBr_3 .

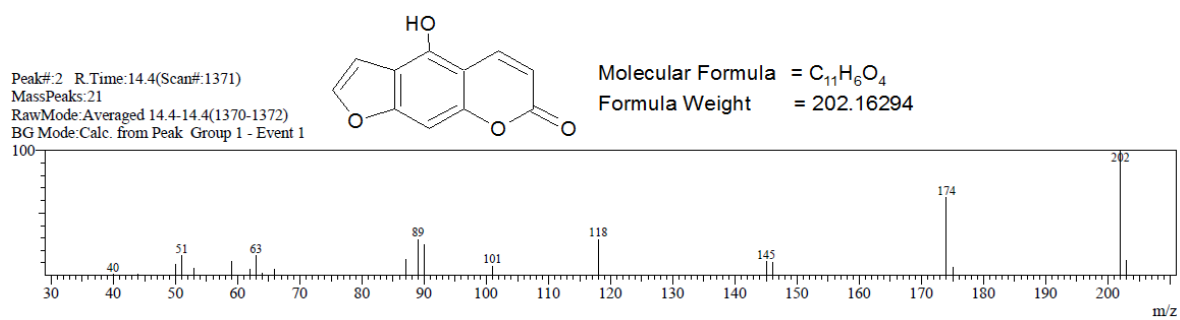
O espectro de Infravermelho (Espectro 17, p. 59) da substância 3 confirma a desmetilação pela presença de banda larga de ligação de OH intramolecular em região de $\nu 3308 \text{ cm}^{-1}$, ausente no espectro do bergapteno. Observam-se, também, as bandas de estiramento dupla de $\text{C}=\text{O}$ de α -lactonas em $\nu 1705 \text{ cm}^{-1}$ (ressonância de Fermi), banda de estiramento de $\text{C}-\text{O}$ em $\nu 1250$, $\nu 1180$, $\nu 1130$ e $\nu 1075 \text{ cm}^{-1}$. O espectro mostra as bandas de estiramento de $\text{C}-\text{H}$ em $\nu 3135 \text{ cm}^{-1}$, de $\text{C}=\text{C}$ de anel aromático em $\nu 1629$, $\nu 1608$, $\nu 1570$ e $\nu 1450$ confirmando a estrutura furocumarínica.

O espectro de massa (Espectro 18, p. 59) mostra o sinal m/z 202 relativo

ao íon molecular compatível com a fórmula molecular $C_{11}H_6O_4$ da estrutura obtida, confirmando a formação da substância 3 pela reação com BBr_3 .



Espectro 17. Espectro no IV da substância 3 obtido por BBr_3 .



Espectro 18. Espectro de massas da substância 3 obtido por BBr_3 .

5.1.5- Síntese dos derivados cumarínicos. Síntese de 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b).

As reações para formação de derivados são de fácil execução. Os produtos 4a e 4b foram obtidos com rendimentos de 69% (69mg) e 80% (80mg), respectivamente. As duas substâncias se apresentaram como sólido na forma de cristais agulha de cor amarelo claro.

Essa síntese foi feita através da substituição de um átomo de bromo nos dibromos alifáticos pelo átomo de oxigênio do fenolato na posição C7 da cumarina 2a. Como a reação se processa por mecanismos de S_N2 , utilizou-se um solvente aprótico polar dimetilformamida (DMF), favorável por dissolver bem os compostos iônicos e solvatar os cátions formados na reação. Por ser um solvente não doador de protons, ou seja, ausência de interações ion-dipolo com hidrogênio, a molécula de DMF tem uma carga parcial negativa superficial que pode solvatar os cátions, enquanto a carga parcial positiva ocorre internamente na molécula, tendo baixa acessibilidade. Além disso, o nucleófilo estando desimpedido no meio reacional pode atacar mais facilmente o sítio do carbono eletrofílico. Dessa forma, a efetiva desprotonação da hidroxila fenólica pelo ânion hidreto possibilita, então, o ataque nucleofílico do íon alcóxido no carbono terminal do reagente, liberando o íon bromo e formando o grupo éter na posição C7 da cumarina.

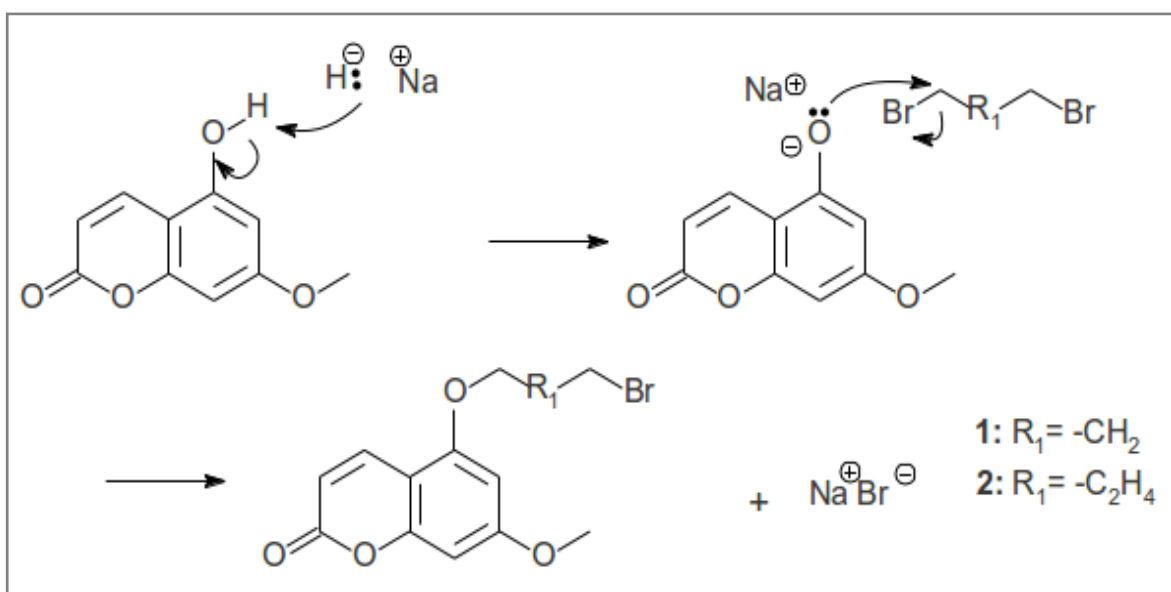


Figura 37. Mecanismo de reação para formação de 4a-b.

Com base na substância 2a utilizada como produto de partida, a estrutura das substâncias obtidas foi identificada por técnicas espectroscópicas de Infravermelho, de massas e de RMN de ^1H , de ^{13}C e COSY ^1H - ^1H . Esses dados foram suficientes para confirmar o resultado da reação identificando as mudanças previstas na estrutura.

O espectro de Infravermelho (Espectro 19, p. 62) da substância 4a mostra as bandas de estiramento dupla de C=O de α -lactonas em $\nu 1720\text{ cm}^{-1}$ (ressonância de Fermi), banda de estiramento de C-O em $\nu 1237$, $\nu 1186$, $\nu 1163$ e $\nu 1134\text{ cm}^{-1}$. O espectro mostra as bandas de estiramento de C-H_{aromáticos} em $\nu 3105$ e 3015 cm^{-1} , de C=C de anel aromático em $\nu 1612$, $\nu 1500$, $\nu 1465$ e $\nu 1379$. Observam-se, também, as bandas de estiramento assimétrica de C-O-C alifático em $\nu_s 1245\text{ cm}^{-1}$, de assimétrico de CH₂ em $\nu 2941\text{ cm}^{-1}$ e simétrico de CH₂ em $\nu 2845\text{ cm}^{-1}$, de deformação angular do anel (β -anel) em $\delta 830\text{ cm}^{-1}$ e estiramento C-Br em $\nu 630\text{ cm}^{-1}$.

O espectro de massas (Espectro 20, p. 63) da substância 4a mostra o sinal m/z 314 relativo ao íon molecular compatível com a fórmula molecular C₁₃H₁₃O₄Br da estrutura obtida.

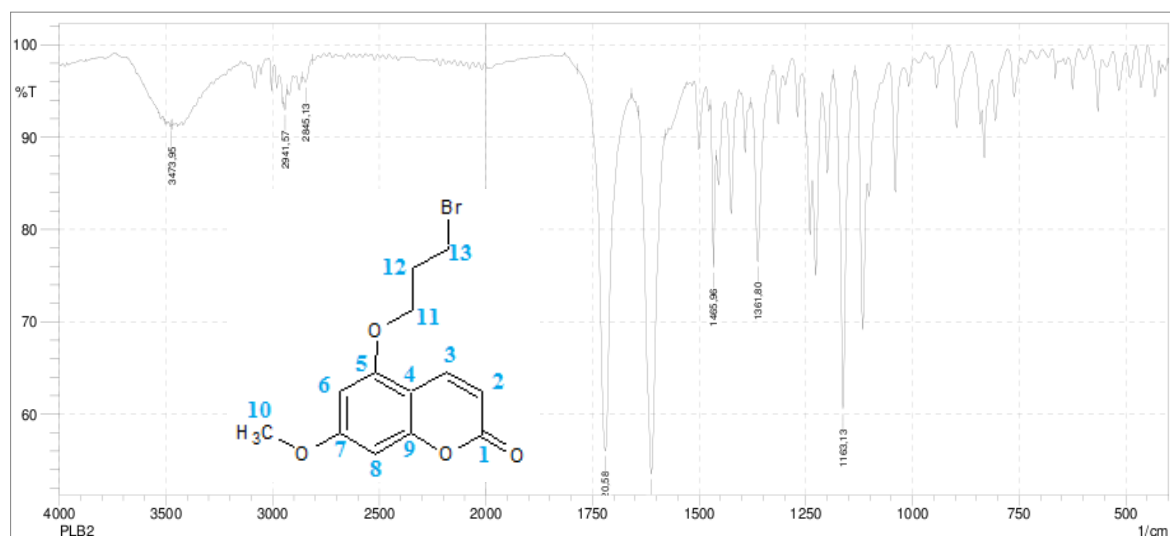
O espectro de RMN de ^1H (Espectro 21, p. 64) da substância 4a mostrou 8 sinais. Os sinais característicos da cumarina podem ser observados por dois dupletos em 6,19 e 7,99 ppm atribuídos aos hidrogênios da ligação dupla de configuração *cis* da porção pirona da cumarina e outros dois sinais em 6,32 e 6,46 relativos a dois hidrogênios de anel aromático nas posições H6 e H8, respectivamente. O sinal simples em 3,88 ppm é característico de hidrogênios da metoxila ligada ao anel aromático. Os sinais 4,18, 2,37 e 3,63 ppm foram atribuídos ao hidrogênios metilênicos da cadeia alifática nas posições H11, H12 e H13, respectivamente. Os deslocamentos observados em H11 (4,18 ppm) e em H13 (3,63 ppm) ocorrem devido às ligações direta com o átomo de oxigênio ligado à aromático e o átomo de bromo, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (Espectro 22, p. 64) da substância 4a mostrou sinais relativos aos átomos de carbono quartenário, sendo o grupo de sinal 162,7, 161,3, 156,7 e 156,4 ppm, atribuídos aos carbonos diretamente ligados a átomo de oxigênio nas posições C1, C5, C7 e C9, respectivamente. O sinal 103,2 ppm representa ao átomo de carbono quartenário na posição C4. O espectro mostra sinais de átomos de carbono metínico com o

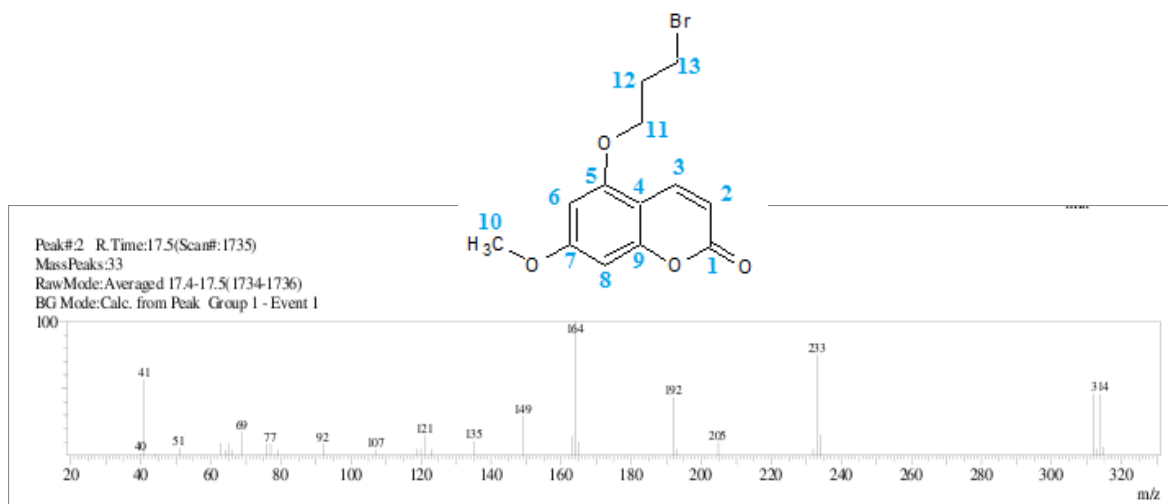
deslocamento químico compreendendo o grupo de sinais em 111,2, 138,7, 95,0 e 93,5 ppm, que corresponde aos átomos de carbono nas posições 2, 3, 6 e 8, respectivamente. Os sinais em 65,9, 29,5 e 32,0 ppm foram atribuídos aos carbonos metilênicos nas posições C11, C12 e C13, respectivamente. Esses deslocamentos são atribuídos às ligações direta com o átomo de oxigênio ligado à aromático e o átomo de bromo, respectivamente.. O sinal em 56,0 ppm representa o carbono de grupo metil da metoxila.

Através do mapa de contornos ^1H - ^1H COSY (Espectro 23, p. 65) obtêm-se os acoplamentos entre átomos hidrogênios. Os acoplamentos entre hidrogênios H11-H12 e H12-H13 indicam que o átomo de hidrogênio em 2,37 ppm está ligado ao carbono central da cadeia alifática (C12).

Na tabela 3 (p. 63) estão os sinais atribuídos aos átomos de hidrogênio e carbono e as correlações ^1H - ^1H (COSY) da substância 4a.



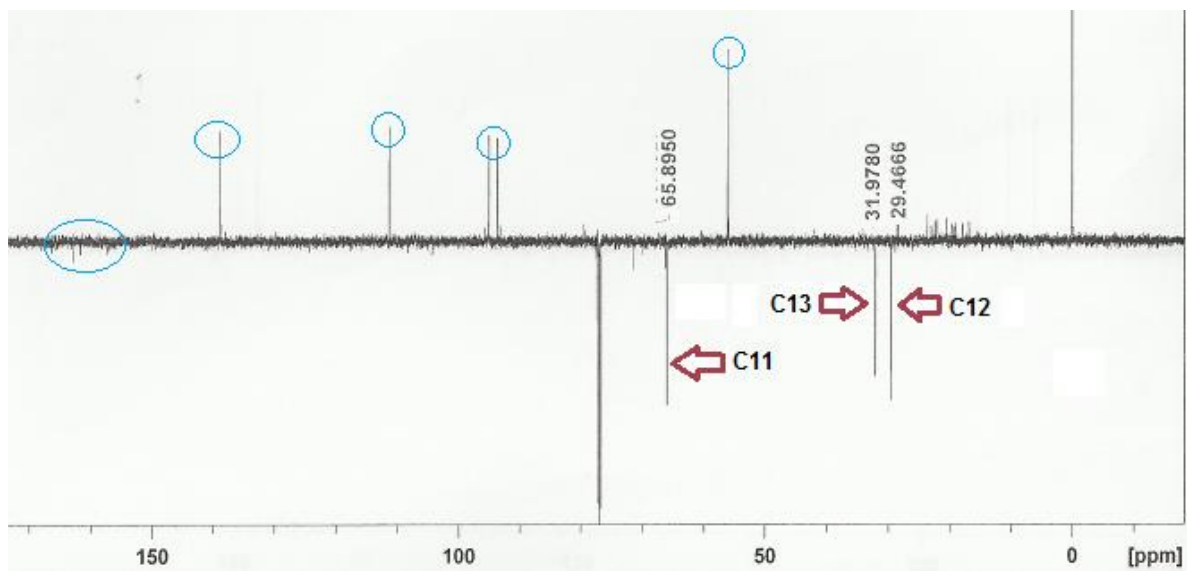
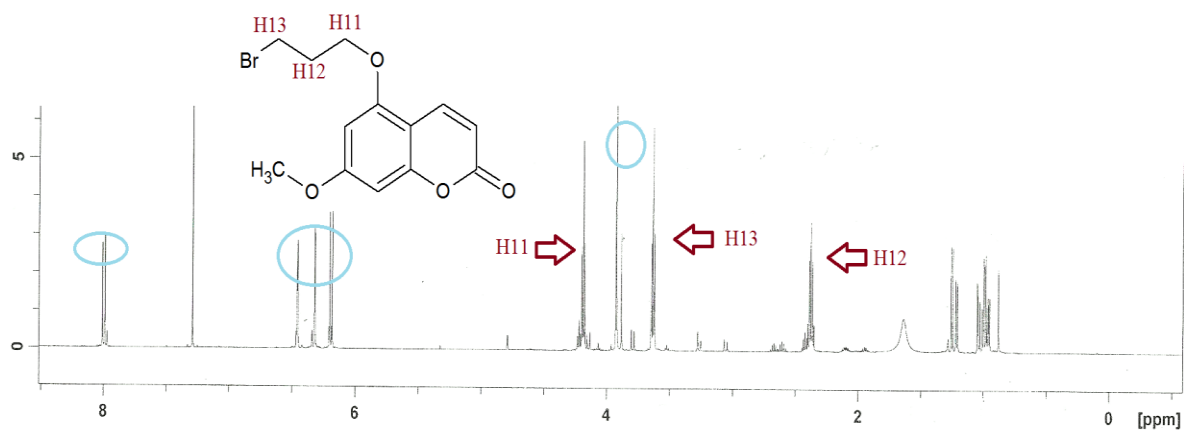
Espectro 19. Espectro no IV da substância 4a.

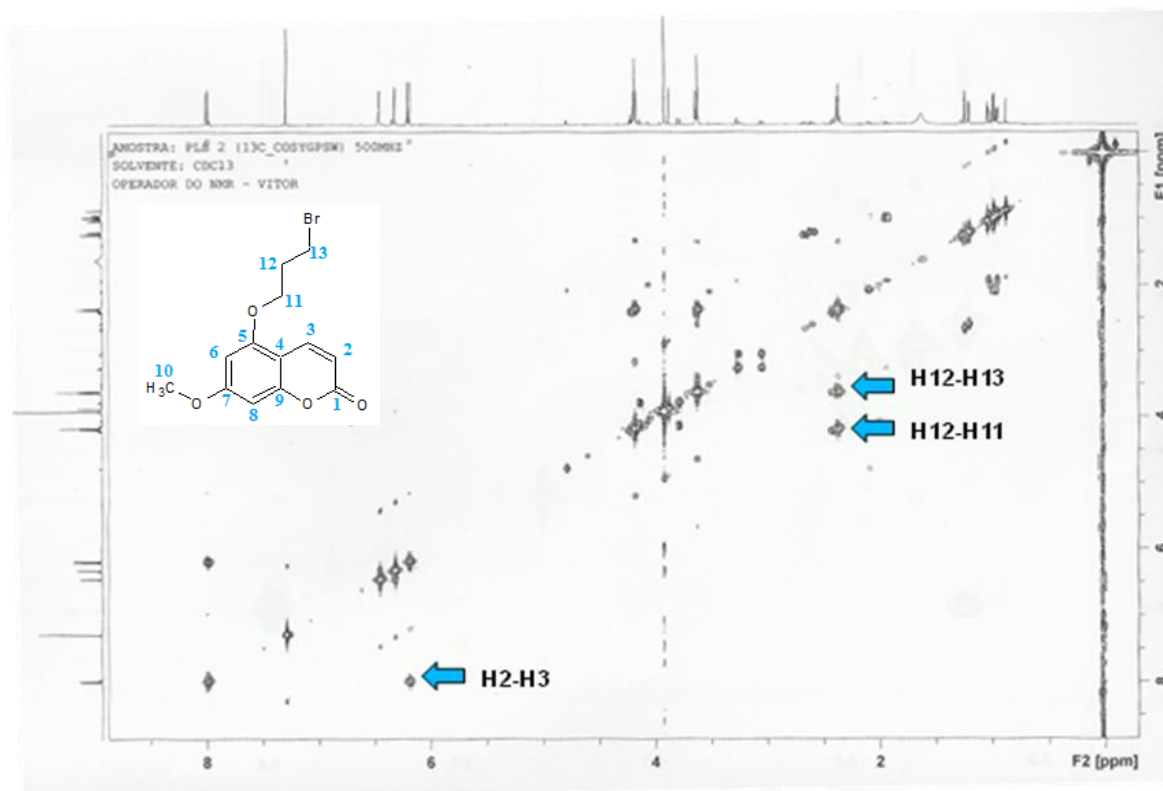


Espectro 20. Espectro de massas da substância 4a.

Tabela 3: Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 7-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a), em CDCl_3 e as correlações observadas no mapa de contornos ^1H - ^1H COSY.

Atribuição (n° C)	HMQC ($^1J_{\text{CH}}$)		COSY ^1H - ^1H
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	
1	162,7	-	-
2	111,2	6,19 (<i>d</i> ; $J = 9,6\text{Hz}$)	7,66 (H3)
3	138,7	7,99 (<i>d</i> ; $J = 9,6\text{Hz}$)	6,16 (H2)
4	103,2	-	-
5	161,3	-	-
6	95,0	6,32 (s)	-
7	156,7	-	-
8	93,5	6,46 (s)	-
9	156,4	-	-
10	56,0	3,88 (s)	-
11	65,9	4,18 (<i>m</i>)	2,37 (H12)
12	29,5	2,37 (<i>m</i>)	4,18 (H11); 3,63 (H13);
13	32,0	3,63 (<i>m</i>)	2,37 (H12)





Espectro 23. Mapa de contornos ^1H - ^1H COSY em CDCl_3 da substância 4a.

Assim como a substância 4a, a elucidação estrutural da substância 4b foi feita através da análise espectroscópica por infravermelho, espectroscopia de massas e RMN de ^1H , ^{13}C e ^1H - ^1H COSY, que foram suficientes para confirmar o resultado da reação.

O espectro de Infravermelho (Espectro 24, p.67) da substância 4b observa-se as bandas de estiramento dupla de $\text{C}=\text{O}$ de α -lactonas em $\nu 1720\text{ cm}^{-1}$ (ressonância de Fermi), banda de estiramento de $\text{C}-\text{O}$ em $\nu 1226$, $\nu 1163$, $\nu 1116$ e $\nu 1047\text{ cm}^{-1}$. O espectro mostra as bandas de estiramento de $\text{C}-\text{H}_{\text{aromáticos}}$ em $\nu 3010$ e 3084 cm^{-1} , de $\text{C}=\text{C}$ de anel aromático em $\nu 1608$, $\nu 1500$, $\nu 1465$ e $\nu 1361$. Observam-se, também, as bandas de estiramento assimétrica de $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ alifático em $\nu_s 1243\text{ cm}^{-1}$, de assimétrico de CH_2 em $\nu 2924\text{ cm}^{-1}$ e simétrico de CH_2 em $\nu 2880\text{ cm}^{-1}$, de deformação angular do anel (β -anel) em $\delta 831\text{ cm}^{-1}$ e estiramento $\text{C}-\text{Br}$ em $\nu 570\text{ cm}^{-1}$.

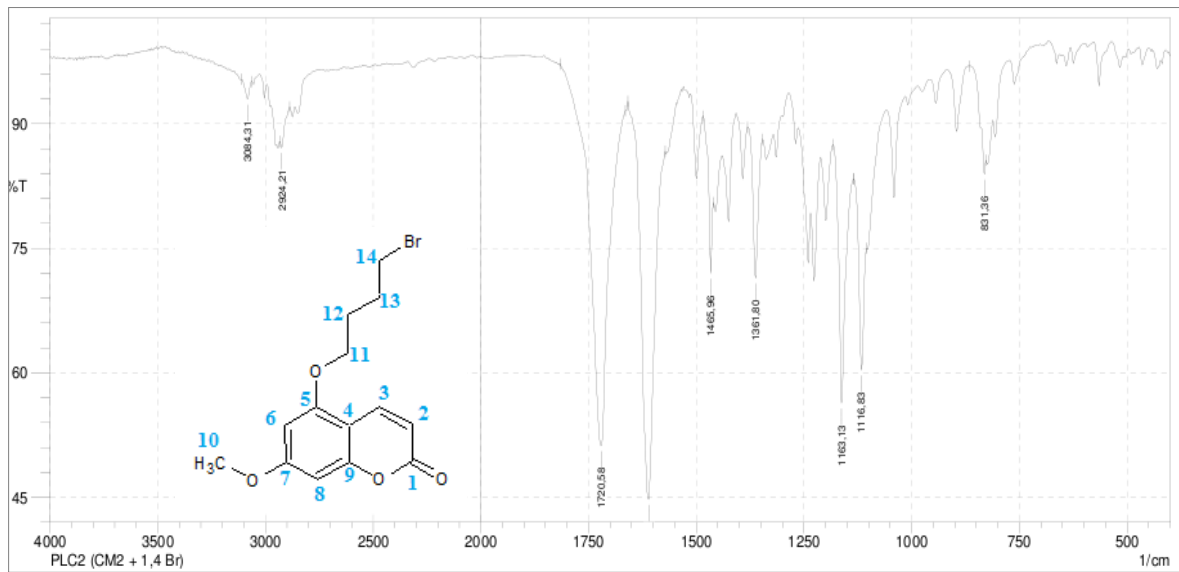
O espectro de massas (Espectro 25, p. 67) da substância 4b mostra o sinal m/z 328 relativo ao íon molecular compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{Br}$.

O espectro de RMN de ^1H (Espectro 26, p. 68) da substância 4b mostrou 9 sinais. Os sinais característicos da cumarina podem ser observados por dois dupletos em 6,18 e 7,99 ppm atribuídos aos hidrogênios da ligação dupla de configuração *cis* da porção pirona da cumarina e outros dois sinais em 6,31 e 6,42 relativos a dois hidrogênios de anel aromático nas posições H6 e H8, respectivamente. O sinal simples em 3,96 ppm é característico de hidrogênios da metoxila ligada ao anel aromático. Os sinais 4,06, 2,01, 2,06 e 3,52 ppm foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos da cadeia alifática nas posições H11, H12, H13 e H14, respectivamente. Os deslocamentos observados em H11 (4,06 ppm) e em H14 (3,52 ppm) ocorrem devido às ligações direta com o átomo de oxigênio ligado à aromático e o átomo de bromo, respectivamente.

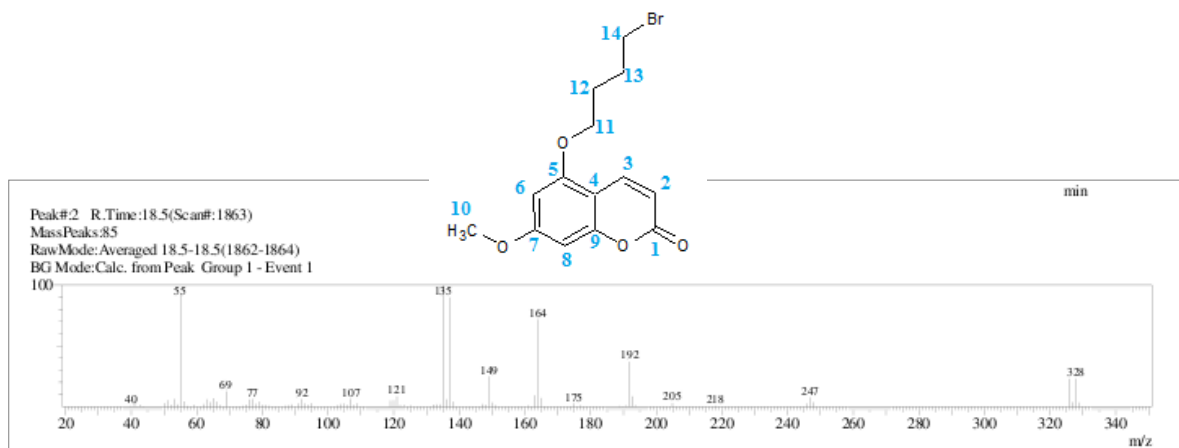
O espectro de RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (Espectro 27, p. 69) da substância 4b mostrou sinais relativos aos átomos de carbono quartenário, sendo o grupo de sinal 162,9, 161,5, 157,0 e 156,8 ppm, atribuídos aos carbonos diretamente ligados a átomo de oxigênio nas posições C1, C5, C7 e C9, respectivamente. O sinal 104,1 ppm representa ao átomo de carbono quartenário na posição 4. O espectro mostra sinais de átomos de carbono metínico com o deslocamento químico compreendendo o grupo de sinais em 111,0, 138,7, 95,1 e 93,3 ppm, que corresponde aos átomos de carbono nas posições C2, C3, C6 e C8, respectivamente. Os sinais em 67,5, 29,4, 27,7 e 33,1 ppm foram atribuídos aos carbonos metilênicos nas posições C11, C12, C13 e C14, respectivamente. Esses deslocamentos são atribuídos às ligações direta com o átomo de oxigênio ligado a aromático e o átomo de bromo aos carbonos C11 e C14, respectivamente. O sinal em 56,0 ppm representa o carbono de grupo metil da metoxila.

Através do mapa de contornos ^1H - ^1H COSY (Espectro 28, p.69) obtêm-se os acoplamentos entre hidrogênios. Os acoplamentos entre hidrogênios H11-H12 e H13-H14 indicam que o átomo de hidrogênio em 2,01 e 2,06 ppm estão ligados aos carbonos centrais da cadeia alifática (C12 e C13, respectivamente).

Na tabela 4 (p. 68) estão os sinais atribuídos aos átomos de hidrogênio e carbono e as correlações ^1H - ^1H (COSY) da substância 4a.



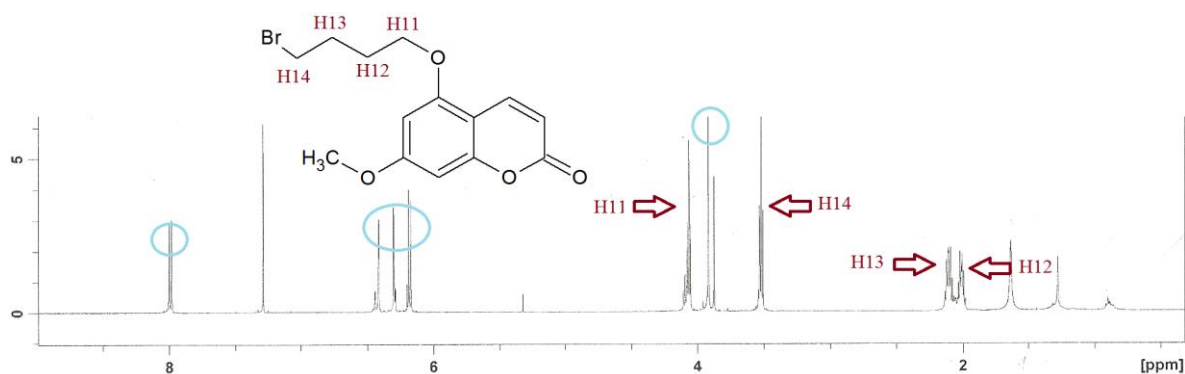
Espectro 24. Espectro no IV da substância 4b.



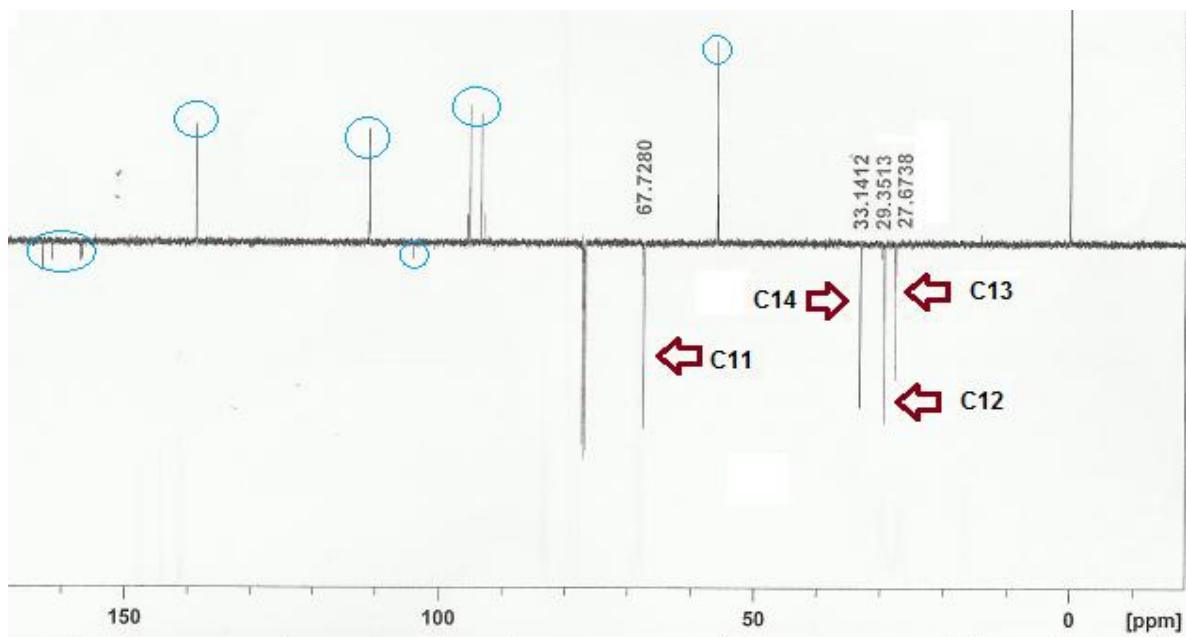
Espectro 25. Espectro de massas da substância 4b.

Tabela 4: Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C – experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), em CDCl_3 e as correlações observadas no mapa de contornos ^1H - ^1H COSY.

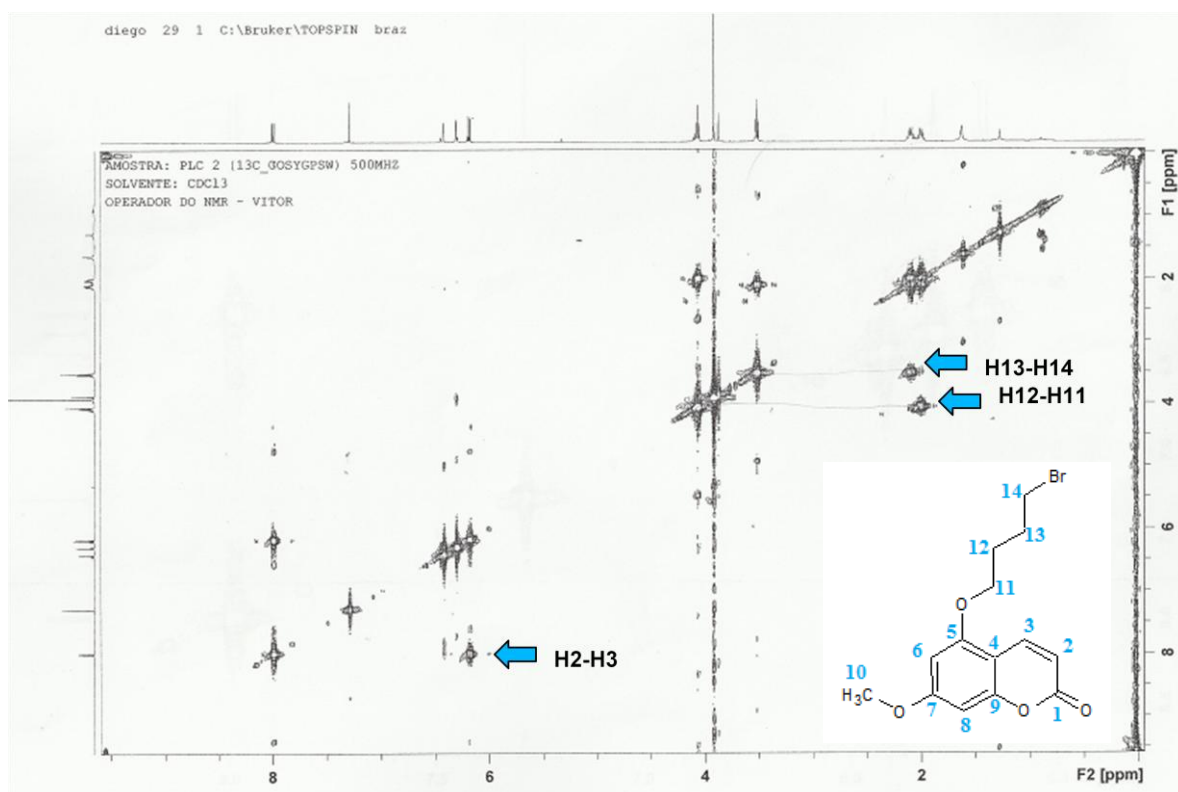
Atribuição (n° C)	HMQC ($^1J_{\text{CH}}$)		COSY ^1H - ^1H
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	
1	162,9	-	-
2	111,0	6,18 (<i>d</i> , $J = 7,6\text{Hz}$)	7,99 (H3)
3	138,7	7,99 (<i>d</i> , $J = 8,0\text{Hz}$)	6,18 (H2)
4	104,1	-	-
5	161,5	-	-
6	95,1	6,31 (s)	-
7	157,0	-	-
8	93,3	6,42 (s)	-
9	156,8	-	-
10	56,0	3,96 (s)	-
11	67,5	4,06 (<i>m</i>)	2,01 (H12)
12	29,4	2,01 (<i>m</i>)	4,06 (H11); 2,06 (H13);
13	27,7	2,06 (<i>m</i>)	2,01 (H12); 3,52 (H14);
14	33,1	3,52 (<i>m</i>)	2,06 (H13);



Espectro 26. Espectro de RMN de ^1H (400MHz) em CDCl_3 da substância 4b.



Espectro 27. Espectro de RMN de ^{13}C – experimento DEPTQ - (100MHz) em CDCl_3 da substância 4b.



Espectro 28. Mapa de contornos ^1H - ^1H COSY da substância 4b.

5.1.6- Formação de derivados furocumarínicos. Síntese de 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b).

As rotas sintética que leva à formação dos derivados furocumarínicos foram as mesmas que utilizadas nas reações de formação de 4a e 4b, sendo o bergaptol (3) utilizado como material de partida. Os rendimentos foram de 50% (50mg) para síntese de 5a e de 72% (72mg) para síntese de 5b. As duas substâncias se apresentaram como sólidos na forma de cristais agulha de cor amarelo claro.

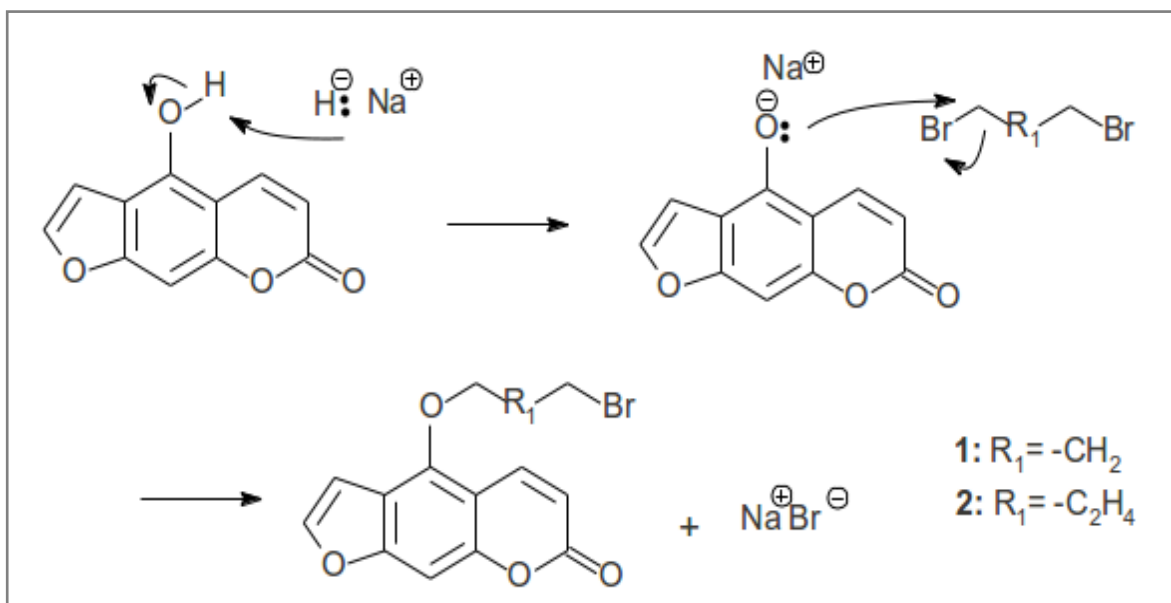


Figura 38. Mecanismo de reação para formação de 5a-b.

Os espectros de Infravermelho (Espectro 29, p. 72) da substância 5b observam-se as bandas de estiramento dupla de $\text{C}=\text{O}$ de α -lactonas em $\nu 1724 \text{ cm}^{-1}$ (ressonância de Fermi), banda de estiramento de $\text{C}-\text{O}$ em $\nu 1190$, $\nu 1152$, $\nu 1135$ e $\nu 1040 \text{ cm}^{-1}$. O espectro mostra as bandas de estiramento de $\text{C}-\text{H}_{\text{aromáticos}}$ em $\nu 3132$ e 3105 cm^{-1} , de $\text{C}=\text{C}$ de anel aromático em $\nu 1640$, $\nu 1610$, $\nu 1577$, $\nu 1456$ e 1350 cm^{-1} . Observam-se, também, as bandas de estiramento assimétrica de $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ alifático em $\nu_{\text{as}} 1223 \text{ cm}^{-1}$, de assimétrico de CH_2 em $\nu_{\text{as}} 2957 \text{ cm}^{-1}$ e simétrico de CH_2 em $\nu_{\text{s}} 2854 \text{ cm}^{-1}$, de deformação angular do anel

(β -anel) em δ 821 e δ 750 cm^{-1} e estiramento C-Br em ν 600 cm^{-1} .

O espectro de massas (Espectro 30, p. 72) da substância 5a mostra o sinal m/z 322 relativo ao íon molecular compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{Br}$ da estrutura obtida.

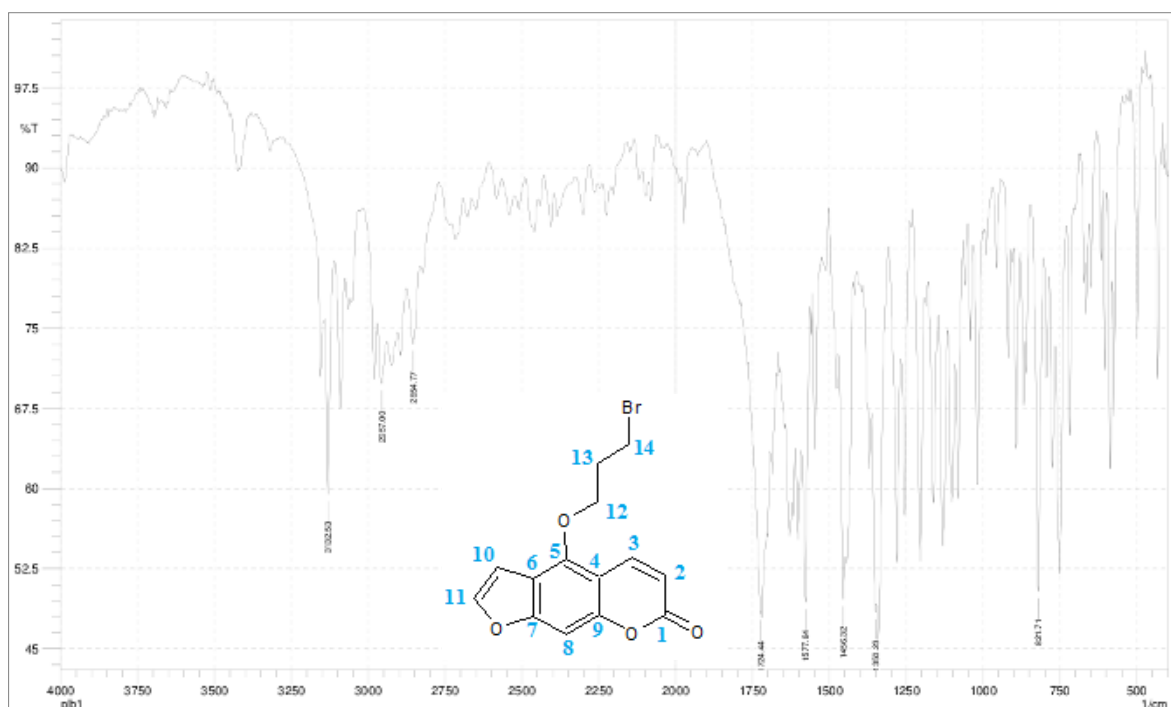
O espectro de RMN de ^1H (Espectro 31 p. 74) da substância 5a mostrou 8 sinais. Os sinais característicos da cumarina podem ser observados por quatro dupletos de hidrogênios *cis* de ligação dupla em 6,33 e 8,16 ppm, atribuídos aos hidrogênios H2 e H3 presentes no anel pirona da cumarina e em 7,03 e 7,64 ppm, atribuídos aos hidrogênios H10 e H11 presentes no anel furano. O sinal em 7,21 ppm é característico de hidrogênio aromático, sendo atribuído ao H8. O grupo de sinal em 4,60, 2,46 e 3,71 ppm são atribuídos aos hidrogênios metilênicos da cadeia alifática, nas posições H12, H13 e H14. Os deslocamentos observados em H12 (4,60 ppm) e em H14 (3,71 ppm) ocorrem devido às ligações direta com o átomo de oxigênio ligado à aromático e o átomo de bromo, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C – experimento DEPTQ - (Espectro 32, p. 74) da substância 5a mostrou 6 sinais relativos aos átomos de carbono quartenários característicos da estrutura furocumarina, sendo o grupo de sinais em 162,7, 149,9, 158,9 e 153,9 ppm, atribuídos aos carbonos diretamente ligados a átomo de oxigênio e os sinais 103,3 e 114,9 ppm representa os carbonos quartenários ligados à átomos de carbono. Identifica-se, também, os sinais de carbonos metínicos aromáticos, compreendendo o grupo de sinais 113,0, 138,9, 94,3, 104,9 e 145,1 ppm. Os sinais em 70,3, 32,7 e 29,4 são referentes aos metilenos da cadeia alifática nas posições C12, C13 e C14, respectivamente.

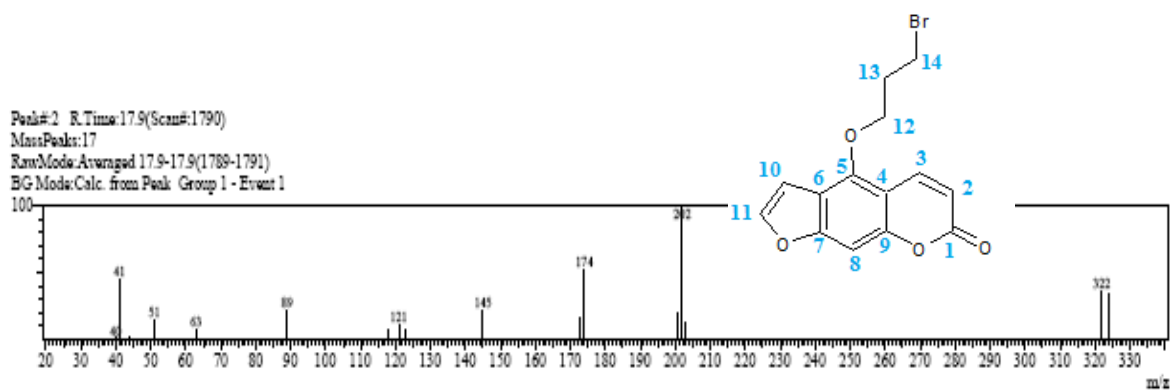
O mapa de contornos HSQC (Espectro 33, p. 74) da substância 5a mostra as correlações entre dos núcleos de carbono e de hidrogênio geminais ($^1J_{\text{CH}}$). Nesse espectro observam-se as importantes correlações que identificam as ligações dos quatros dupletos e os seus respectivos carbonos metínicos.

Através do mapa de contornos HMBC (Espectro 34, p. 75) obtêm-se o correto posicionamento dos átomos de carbono na estrutura 5a por mostrar as correlações à longa distância ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$). Observa-se que os sinais dos hidrogênios H2 (6,33 ppm) e H3 (8,16 ppm) do anel pirona se correlacionam com a carboxila lactônica em 162,7 ppm, na posição C1.. O hidrogênio aromático H8 e as suas correlações a longa distância possibilitaram a identificação das posições corretas dos carbonos quartenários C6, C9 e C7 presentes na estrutura. Outra

importante correlação ocorre entre H12 (4,60 ppm) e C5 (144,9 ppm) confirma a presença da cadeia alifática na estrutura. Além dessas correlações, as interações entre o átomo de hidrogênio na posição H10 e átomo de carbono na posição C11, possibilitaram o correto posicionamento dos carbonos no anel furano. Todas as correlações estão descritas na tabela 5 (p. 73).



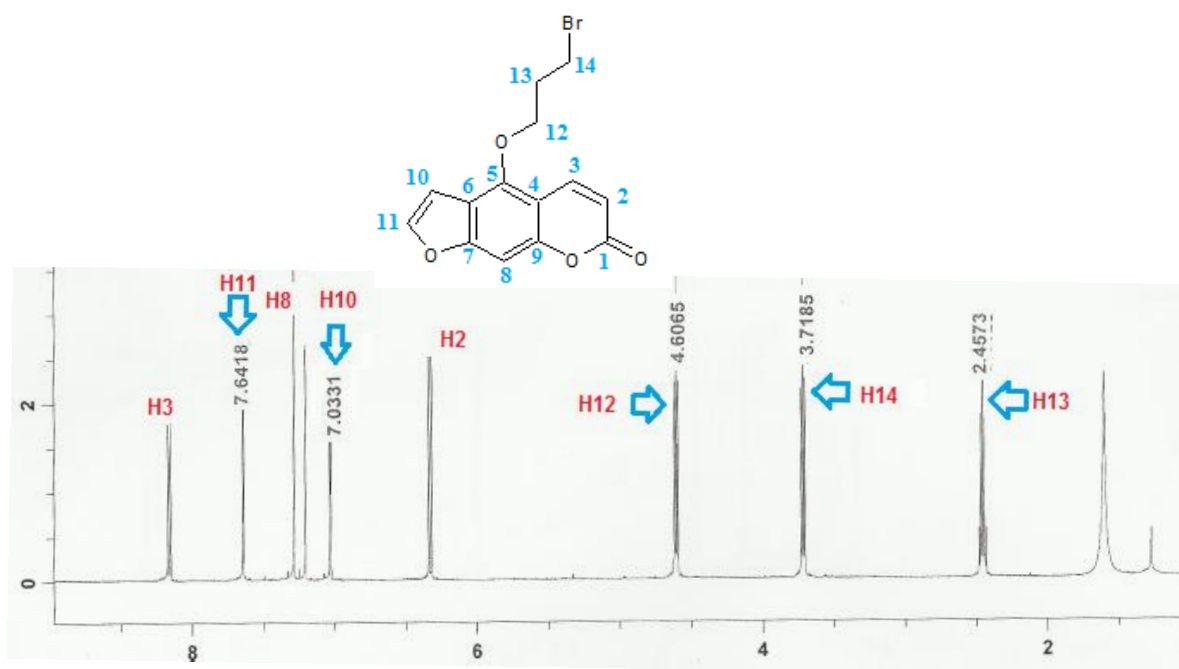
Espectro 29. Espectro no IV da substância 5a.



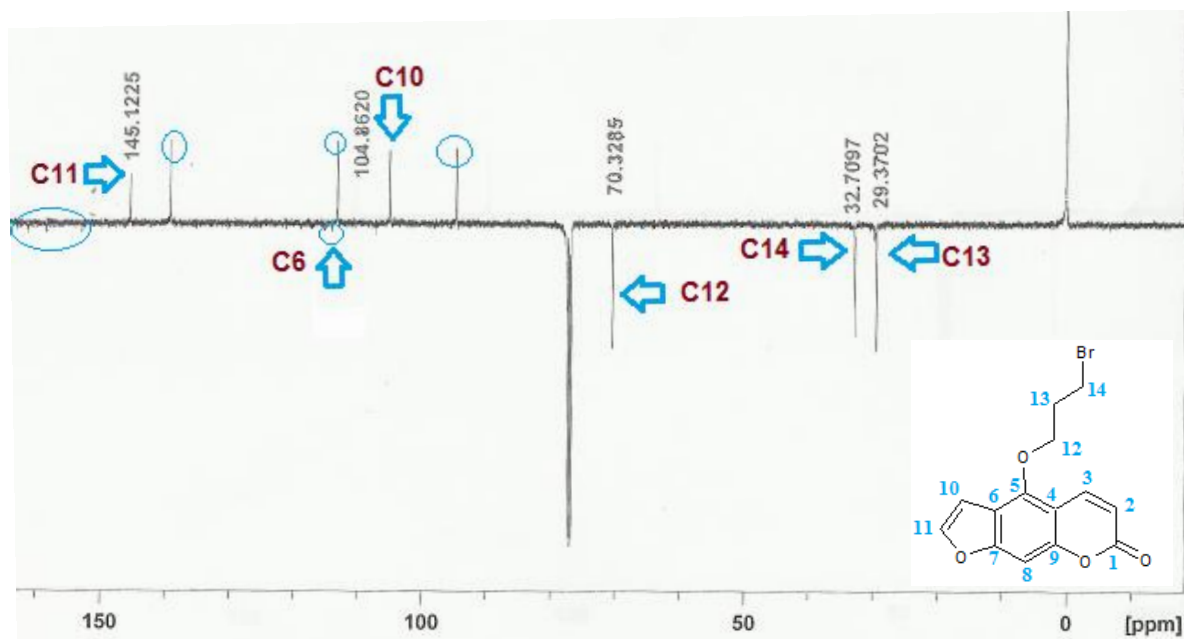
Espectro 30. Espectro de massas da substância 5a.

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5-bromopropoxipsoraleno (5a), em CDCl_3 e as correlações observadas nos mapas de contornos HSQC e HMBC.

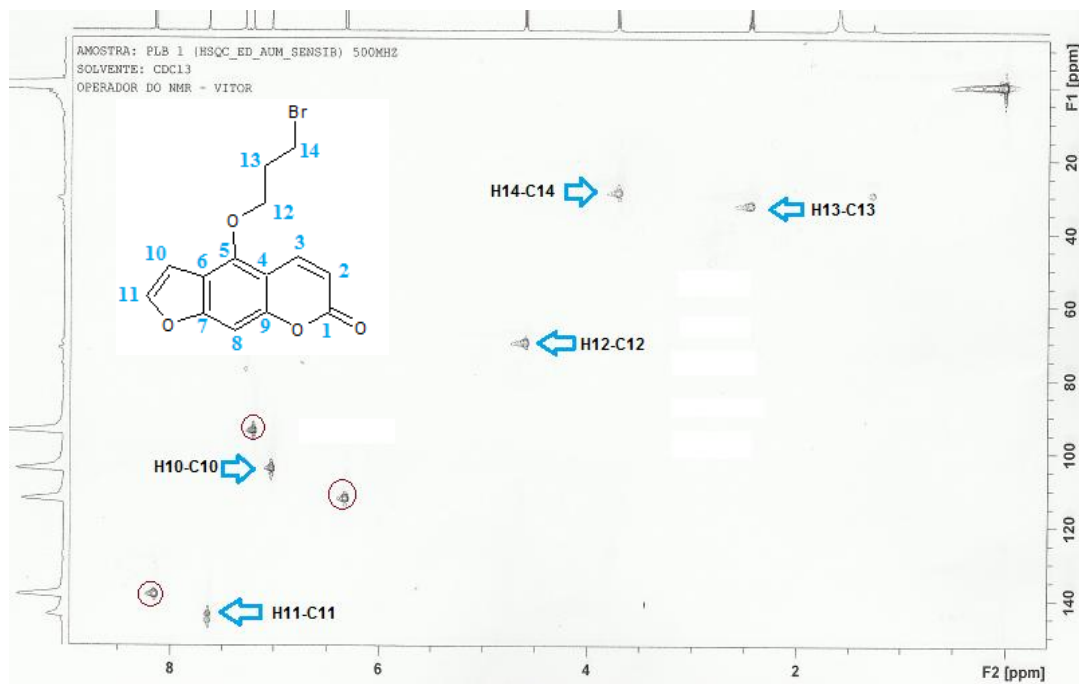
Atribuição (n° C)	HMQC ($^1J_{\text{CH}}$)		HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$)
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	
1	162,7	-	-
2	113,0	6,33 (<i>d</i> , $J = 7,8\text{Hz}$)	103,3 (C4); 162,7 (C1);
3	138,9	8,16 (<i>d</i> , $J = 7,8\text{Hz}$)	153,6 (C9); 149,9 (C5); 162,7 (C1);
4	103,3	-	-
5	149,9	-	-
6	114,9	-	-
7	158,9	-	-
8	94,3	7,21 (<i>s</i>)	114,9 (C6); 103,3 (C4); 153,6 (C9); 158,9 (C7);
9	153,9	-	-
10	104,9	7,03 (<i>d</i> , $J = 1,9\text{Hz}$)	145,1 (C11); 114,9 (C6); 158,9 (C7);
11	145,1	7,64 (<i>d</i> , $J = 1,8\text{Hz}$)	114,9 (C6); 158,9 (C7);
12	70,3	4,60 (<i>m</i>)	29,4 (C14); 32,7 (C13); 149,9 (C5);
13	32,7	2,46 (<i>m</i>)	29,4 (C14); 70,3 (C12);
14	29,4	3,71 (<i>m</i>)	32,7 (C13); 70,3 (C12);



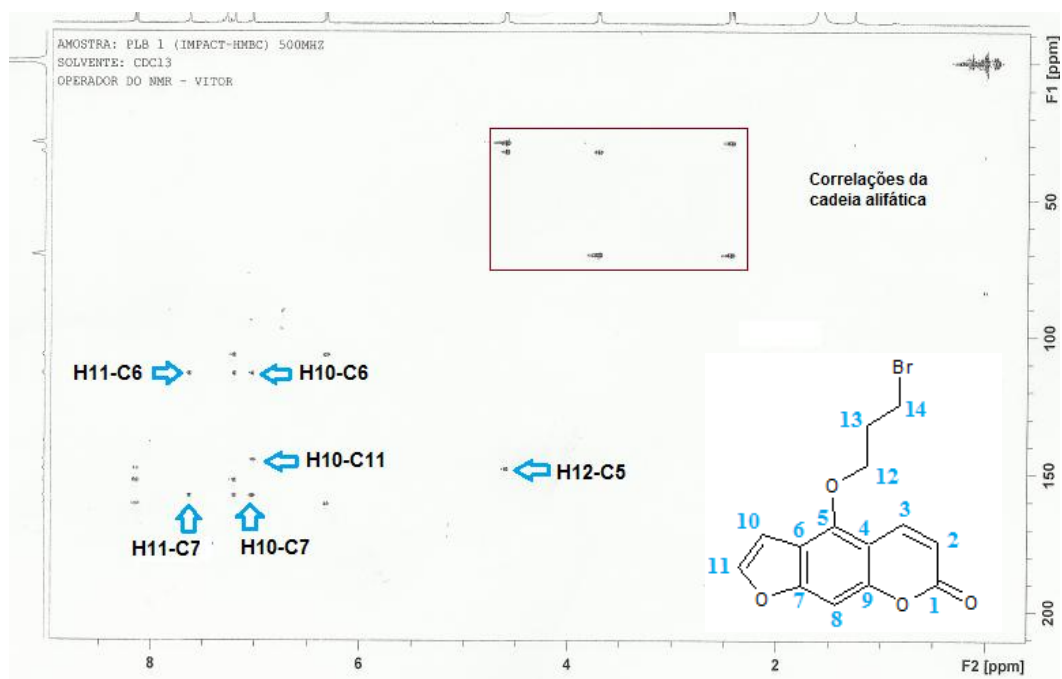
Espectro 31. Espectro de RMN de ¹H (400MHz) em CDCl₃ da substância 5a.



Espectro 32. Espectro de RMN de ¹³C -experimento DEPTQ - (100MHz) em CDCl₃ da substância 5a.



Espectro 33. Mapa de contornos HSQC em CDCl_3 da substância 5a.



Espectro 34. Mapa de contornos HMBC em CDCl_3 da substância 5a.

Os espectros de Infravermelho (Espectro 35, p. 77) da substância 5b observam-se as bandas de estiramento dupla de C=O de α -lactonas em ν 1760 cm^{-1} (ressonância de Fermi), banda de estiramento de C-O em ν 1210, ν 1157, ν 1136 e ν 1099 cm^{-1} . O espectro mostra as bandas de estiramento de C-H_{aromáticos} em ν 3122, de C=C de anel aromático em ν 1635, ν 1600, ν 1577, ν 1458 e 1344 cm^{-1} . Observam-se, também, as bandas de estiramento assimétrica de C-O-C alifático em ν_{as} 1243 cm^{-1} , de assimétrico de CH₂ em ν_{as} 2924 cm^{-1} e simétrico de CH₂ em ν_{s} 2875 cm^{-1} , de deformação angular do anel (β -anel) em δ 817 e δ 746 cm^{-1} e estiramento C-Br em ν 570 cm^{-1} .

O espectro de massas (Espectro 36, p. 78) da substância 5b mostra o sinal m/z 336 relativo ao íon molecular compatível com a fórmula molecular C₁₅H₁₃O₄Br da estrutura obtida.

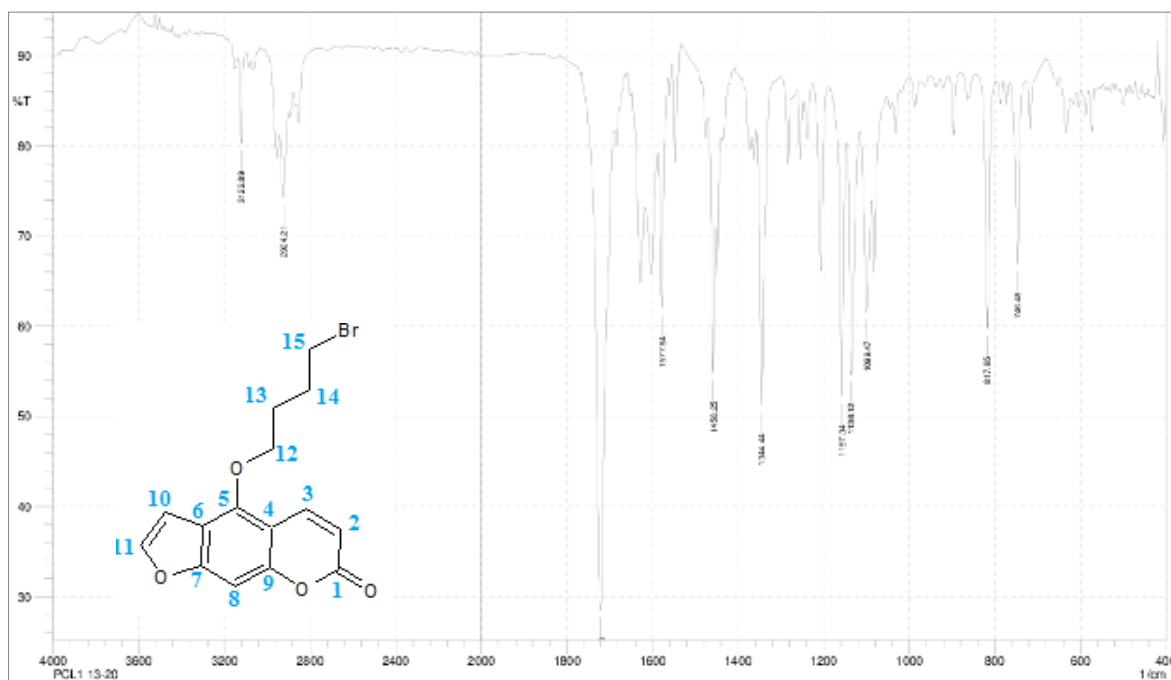
O espectro de RMN de ¹H (Espectro 37, p. 79) da substância 5b mostrou 8 sinais. Os sinais característicos da cumarina podem ser observados por quatro dupletos de hidrogênios *cis* de ligação dupla em 6,32 e 8,17 ppm, atribuídos aos hidrogênios H2 e H3 presentes no anel pirona da cumarina e em 6,97 e 7,62 ppm, atribuídos aos hidrogênios H10 e H11 presentes no anel furano. O sinal em 7,17 ppm é característico de hidrogênio aromático, sendo atribuído ao H8. O grupo de sinal em 4,53, 2,09, 2,17 e 3,55 ppm são atribuídos aos hidrogênios metilênicos da cadeia alifática, nas posições H12, H13, H14 e H15. Os deslocamentos observados em H12 (4,60 ppm) e em H15 (3,71 ppm) ocorrem devido às ligações direta com o átomo de oxigênio ligado à aromático e o átomo de bromo, respectivamente.

O espectro de RMN de ¹³C – experimento DEPTQ - (Espectro 38, p. 79) da substância 5b mostrou 6 sinais relativos aos átomos de carbono quartenários característicos da estrutura furocumarina, sendo o grupo de sinais em 161,7, 148,7, 158,3 e 152,7 ppm, atribuídos aos carbonos diretamente ligados a átomo de oxigênio e os sinais 106,7 e 113,2 ppm representa os carbonos quartenários ligados à átomos de carbono. Identifica-se, também, os sinais de carbonos metínicos aromáticos, compreendendo o grupo de sinais em 112,7, 138,2, 94,1, 105,0 e 144,9 ppm. Os sinais em 71,9, 28,9, 29,4 e 33,1 são referentes aos metilenos da cadeia alifática nas posições C12, C13, C14 e C15, respectivamente.

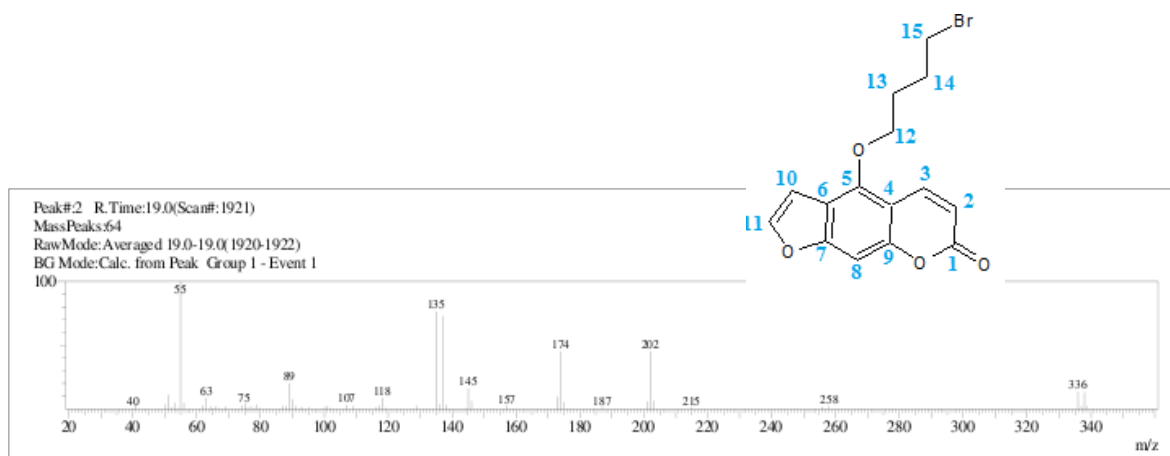
O mapa de contornos HSQC (Espectro 39, p. 80) da substância 5b mostra

as correlações entre dos núcleos de carbono e de hidrogênio geminais ($^1J_{CH}$). Nesse espectro observam-se as importantes correlações que identificam as ligações dos quatros dupletos e os seus respectivos carbonos metínicos.

Através do mapa de contornos HMBC (Espectro 40, p. 80) obtêm-se o correto posicionamento dos átomos de carbono na estrutura 5a por mostrar as correlações à longa distância ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$). Observa-se que os sinais dos hidrogênios H2 (6,32 ppm) e H3 (8,17 ppm) do anel pirona se correlacionam com a carboxila lactônica em 161,7 ppm, na posição C1. O hidrogênio aromático H8 e as suas correlações a longa distância possibilitaram a identificação das posições corretas dos carbonos quartenários C6, C9 e C7 presentes na estrutura. Outra importante correlação ocorre entre H12 (4,53 ppm) e C5 (148,7 ppm) confirma a presença da cadeia alifática na estrutura. Além dessas correlações, as interações entre o átomo de hidrogênio na posição H10 e átomo de carbono na posição C11, possibilitaram o correto posicionamento dos carbonos no anel furano. Todas as correlações estão descritas na tabela 6 (p. 78).



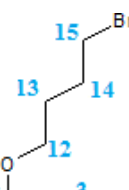
Espectro 35. Espectro no IV da substância 5b.



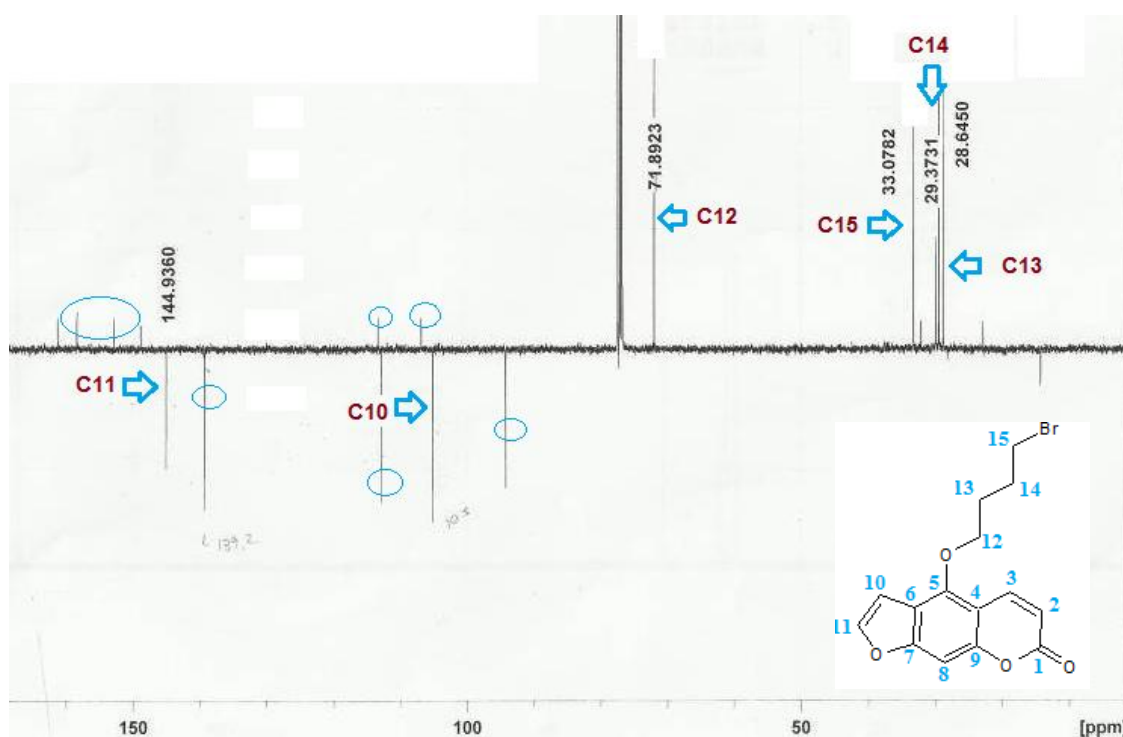
Espectro 36. Espectro de massas da substância 5b.

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C – experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5-bromobutoxipsoraleno (5b), em CDCl_3 e as correlações observadas nos mapas de contorno HMQC e HMBC.

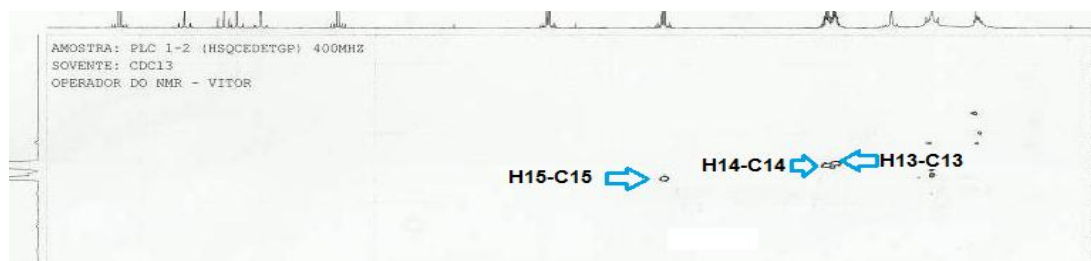
Atribuição (n $^\circ$ C)	HMQC ($^1J_{\text{CH}}$)		HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$)
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	
1	161,7	-	-
2	112,7	6,32 (<i>d</i> , $J = 9,8\text{Hz}$)	161,7 (C1); 106,7 (C4);
3	139,2	8,17 (<i>d</i> , $J = 9,8\text{Hz}$)	161,7 (C1); 148,7 (C5); 152,7 (C9);
4	106,7	-	-
5	148,7	-	-
6	113,2	-	-
7	158,3	-	-
8	94,1	7,17 (<i>s</i>)	106,7 (C4); 113,2 (C6); 152,7 (C9); 158,3 (C7);
9	152,7	-	-
10	105	6,97 (<i>d</i> , $J = 2,4\text{Hz}$)	113,2 (C6); 158,3 (C7); 144,9 (C11);
11	144,9	7,62 (<i>d</i> , $J = 2,4\text{Hz}$)	113,2 (C6); 158,3 (C7);
12	71,9	4,53 (<i>m</i>)	148,7 (C5); 29,4 (C14);
13	28,9	2,09 (<i>m</i>)	71,9 (C12); 29,4 (C14); 33,1 (C15);
14	29,4	2,17 (<i>m</i>)	71,9 (C12); 28,9 (C13); 33,1 (C15);
15	33,1	3,55 (<i>m</i>)	28,9 (C13);



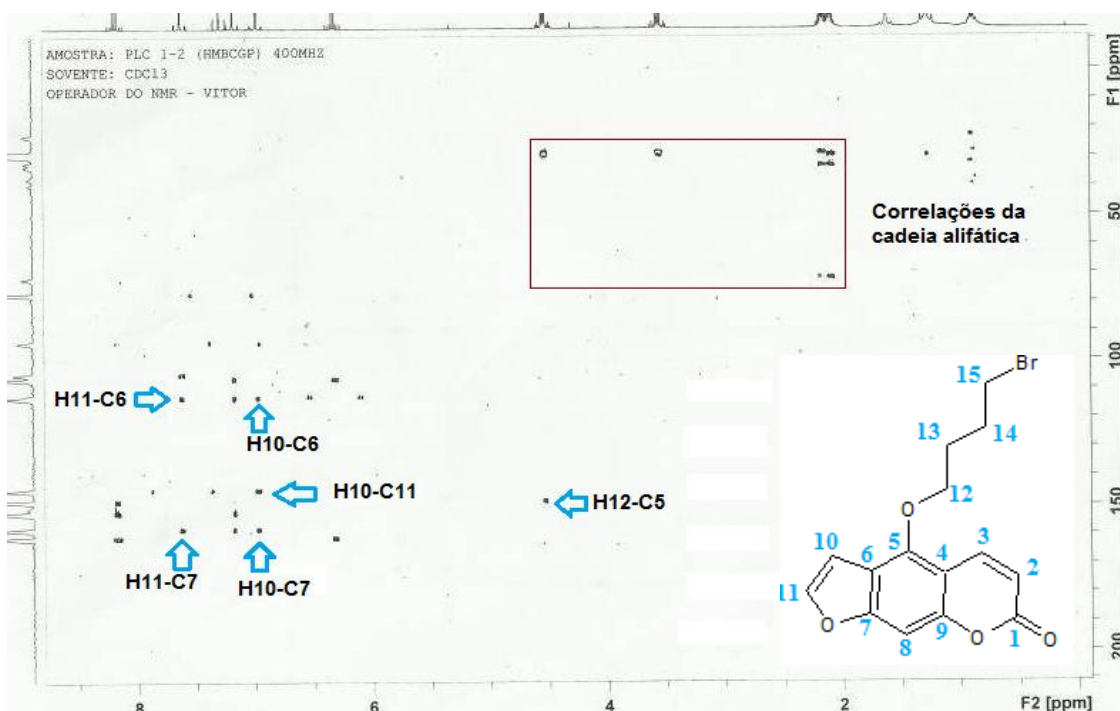
Espectro 37. Espectro de RMN de ^1H (400MHz) em CDCl_3 da substância 5b.



Espectro 38. Espectro de RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (100MHz) em CDCl_3 da substância 5b.



Espectro 39. Mapa de contornos HSQC em CDCl_3 da substância 5b.



Espectro 40. Mapa de contornos HMBC em CDCl_3 substância 5b.

5.1.7- Formação de ligantes cumarínicos. Síntese de 5-{4-[bis(2-piridinilmetil)amino]propoxi}-7-metoxicumarina (6a) e 5-{4-[bis(2-

piridinilmetil)amino]butoxi}-7-metoxicumarina (6b).

Nessa etapa do projeto foi proposta a adição de bis-(2-piridinilmetil)amina aos produtos 5a e 5b para obtenção de novos derivados cumarínicos. Essa reação consiste em uma substituição nucleofílica, processo que ocorre pelo ataque de elétrons livres do átomo de nitrogênio da amina presente no reagente ao carbono terminal do grupo etérico, presente na posição 5 da cumarina.

No entanto, essa reação se mostrou lenta, provavelmente pelo efeito estérico e pela dificuldade de estabilizar os íons formados durante a reação. Para isso utilizou-se catalisadores aminados para facilitar a retirada de H⁺ do sal de amina quartenário formado durante o ataque nucleofílico.

Embora tenha facilitado o direcionamento da reação para formação dos produtos, não foi possível detectar seu rendimento absoluto devido à presença de impurezas e materiais de partidas no meio. Além disso, a baixa volatilidade do produto impede de se realizar a análise em cromatógrafo gasoso e espectrômetro de massa.

Contudo, a análise de RMN de ¹H e ¹³C foi possível detectar a presença dos sinais da estrutura final para a substância 6a apenas. O material apresentou-se como um óleo de coloração castanha. Entretanto é necessário realizar uma purificação do material obtido.

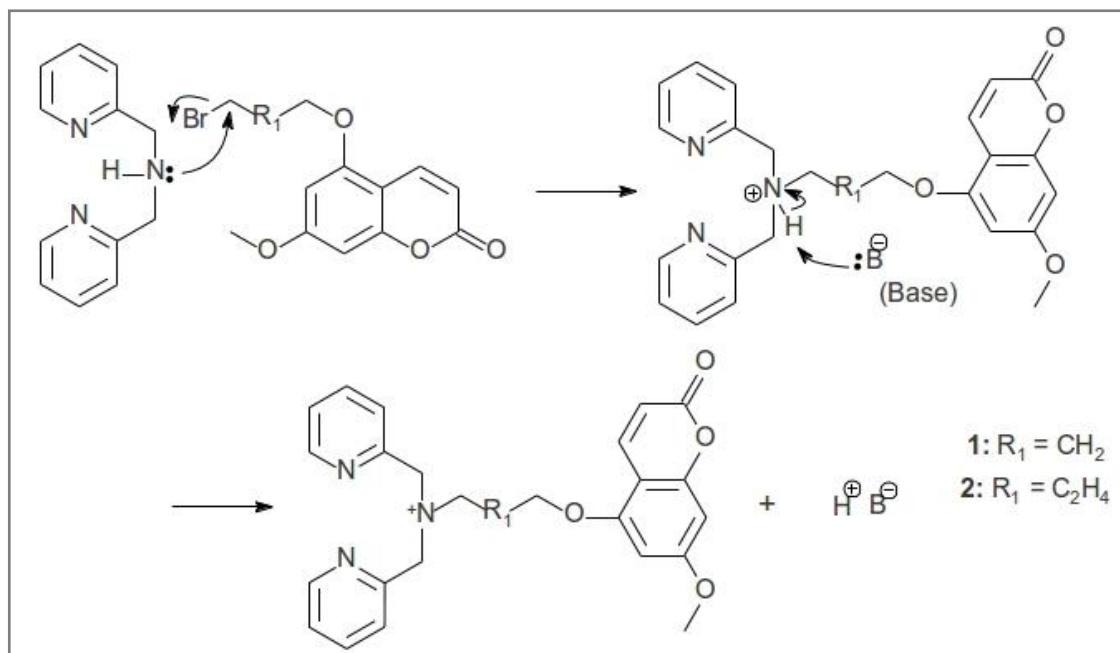


Figura 39: Mecanismo de reação para formação de 6a-b.

O espectro de Infravermelho (Espectro 41, p. 84) da substância 6a mostra as bandas de estiramento dupla de C=O de α -lactonas em $\nu 1726 \text{ cm}^{-1}$ (ressonância de Fermi), banda de estiramento de C-O em $\nu 1213$, $\nu 1159$, $\nu 1114$ e $\nu 1038 \text{ cm}^{-1}$. O espectro mostra as bandas de estiramento de C-H_{aromáticos} em $\nu 3028$ e 3105 cm^{-1} , de C=C e C=N de anel aromático em $\nu 1610$, $\nu 1500$, $\nu 1467$, $\nu 1365$ e 1350 cm^{-1} e de C-N_{aromática} em 1320 cm^{-1} , confirmando a presença de grupos aminados. Observam-se, também, as bandas de estiramento assimétrica de C-O-C alifático em $\nu_{\text{as}} 1224 \text{ cm}^{-1}$, de assimétrico de CH₂ em $\nu_{\text{as}} 2926 \text{ cm}^{-1}$ e simétrico de CH₂ em $\nu_{\text{s}} 2854 \text{ cm}^{-1}$, de deformação angular do anel heteroaromático (β -anel) em $\delta 893$, $\delta 823$ e $\delta 763 \text{ cm}^{-1}$.

O espectro de RMN de ^1H (Espectro 42 p.86) da substância 6a mostrou 5 sinais característicos da estrutura cumarínica, sendo eles, dois dupletos em 6,16 e 7,97 ppm, atribuídos à H2 e H3, hidrogênios *cis* do anel lactona, e em 6,30 e 6,43 ppm dos hidrogênios aromáticos, atribuídos à H6 e H8. O sinal em 3,87 ppm é atribuído ao átomo de hidrogênio da metoxila presente em posição 7 da cumarina. Três sinais dos átomos de hidrogênio metilênico são identificados em 4,18, 2,07 e 3,94 ppm, sendo atribuídos, respectivamente aos átomos de hidrogênio nas posições H11, H12 e H13. Os demais sinais mostrados no

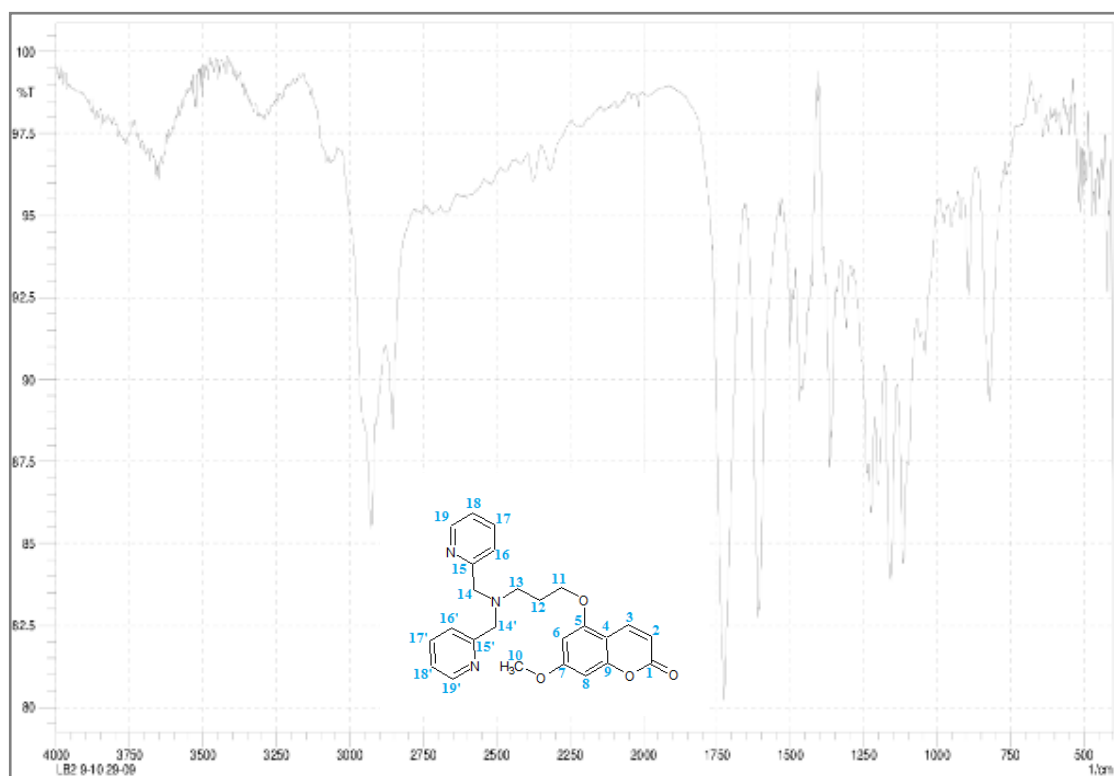
espectro confirmam a presença do substituinte ligado à cadeia alifática da cumarina. O sinal duplo em 4,82 ppm, é referente aos átomos de hidrogênio metilênico na posição H14. O grupo de sinais em 7,37, 8,23, 7,69, 7,87, 7,23, 7,46, 8,62 e 8,61 ppm representam os hidrogênios aromáticos dos anéis piridínicos. Esses dados confirmam a presença desse grupo estrutural na molécula, além de indicar um arranjo espacial assimétrico através dos diferentes deslocamentos químicos tanto de carbono quanto de hidrogênio, da porção bis(2-piridinilmetil)amino.

O espectro de RMN de ^{13}C – experimento DEPTQ - (Espectro 43, p. 87) da substância 6a também mostra os sinais característicos da estrutura cumarínica e outros sinais relativos aos substituintes. Os sinais em 161,9, 163,0, 157,0 e 156,7 ppm são atribuídos aos átomos de carbono diretamente ligados a átomo de oxigênio e o sinal 104,0 ppm representa o carbono quartenário ligados à átomos de carbono. Nesse espectro é possível identificar os sinais de metínicos aromáticos 110,9, 138,8, 95,5, 93,5 ppm do núcleo cumarínico nas posições C1, C5, C7 E C7. O sinal 55,9 ppm corresponde ao átomo de carbono da metoxila na posição 7. Os sinais em 70,3, 32,7 e 29,4 correspondem aos metilenos da cadeia alifática ligada em posição 5 na cumarina. O sinal em 44,7 ppm corresponde aos metilenos na posição 14 do substituínte. O carbono quartenário presente no anel piridínico não foi observado no espectro, entretanto, estima-se que ocorra em, aproximadamente, 158,9 ppm. Os sinais dos carbonos piridínicos podem ser identificados pelo grupo em 122,0, 122,3, 136,9, 137,3, 122,4, 126,2, 148,3 e 149,3 ppm, confirmando a presença da estrutura e demonstrando a diferença de sinais devido ao ambiente químico espacial assimétrico.

O mapa de contornos HSQC (Espectro 44, p. 87) da substância 6a mostra as correlações entre dos núcleos de carbono e de hidrogênio geminais ($^1\text{J}_{\text{CH}}$). Nesse espectro observam-se as importantes correlações que identificam as ligações dos dupletos e dos hidrogênios aromáticos e seus respectivos carbonos metínicos.

Através do mapa de contornos HMBC (Espectro 45, p. 88) obtêm-se o correto posicionamento dos átomos de carbono na estrutura 6a por mostrar as correlações à longa distância ($^2\text{J}_{\text{CH}}$ e $^3\text{J}_{\text{CH}}$). Observa-se que os sinais dos hidrogênios H2 (6,16 ppm) e H3 (7,97 ppm) do anel pirona se correlacionam com a carboxila lactônica em 161,9 ppm, na posição C1. O hidrogênio aromático H8 e

as suas correlações a longa distância possibilitaram a identificação das posições corretas dos carbonos quaternários C4, C6, C9 e C7 presentes na estrutura. Outra importante correlação ocorre entre H11 (4,18 ppm) e C5 (163,0 ppm) confirma a presença da cadeia alifática na estrutura. Além dessas correlações, as interações entre o átomo de hidrogênio na posição H10 e átomo de carbono na posição C11, possibilitaram o correto posicionamento dos carbonos no anel furano. As diferentes correlações observadas entre os grupos de hidrogênios aromáticos na porção bis(2-piridinilmetil)amino indicam um arranjo espacial assimétrico. Todas as correlações estão descritas na tabela 7 (p. 85).



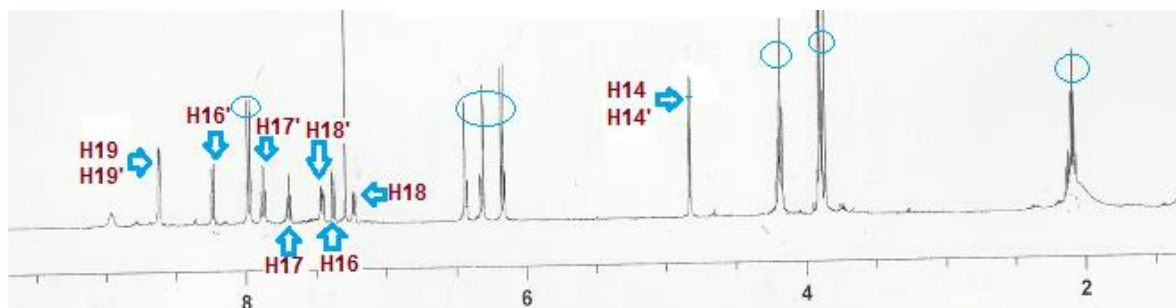
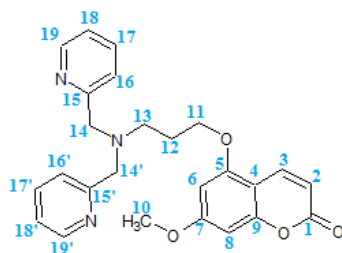
Espectro 41. Espectro no IV da substância 6a.

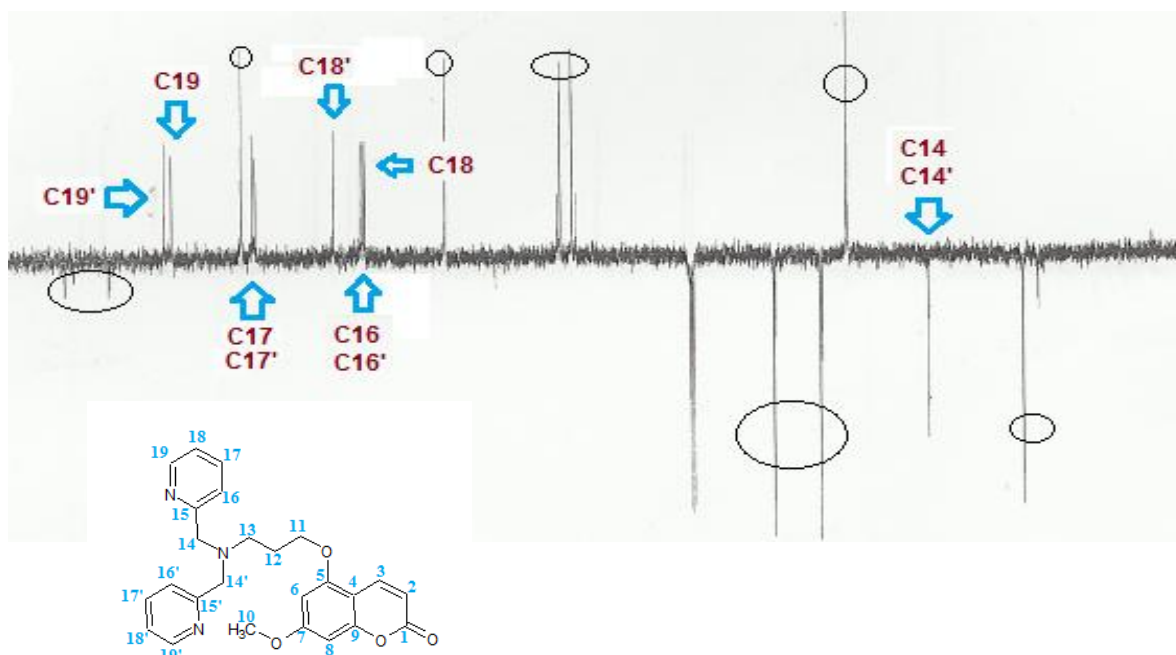
Tabela 7: Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5-{4-[bis(2-piridinilmetil)amino]propoxi}-7-metoxicumarina (6a), em CDCl_3 e as correlações observadas nos mapas de contornos HMQC e HMBC.

Atribuição (n° C)	HMQC ($^1J_{\text{CH}}$)		HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$)
	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	
1	-	161,9	-
2	6,16 (<i>d</i> , $J = 7,7\text{Hz}$)	110,9	104,0 (C4); 161,9 (C1);
3	7,97 (<i>d</i> , $J = 7,7\text{Hz}$)	138,8	156,7 (C9); 161,9 (C1);
4	-	104,0	-
5	-	163,0	-
6	6,30 (<i>s</i>)	95,5	104,0 (C4); 93,5 (C8); 163,0 (C5); 157,0 (C7);
7	-	157,0	-
8	6,43 (<i>s</i>)	93,5	104,0 (C4); 95,5 (C6); 156,7 (C9); 163,0 (C5);
9	-	156,7	-
10	3,87 (<i>s</i>)	55,9	157,0 (C7);
11	4,18 (<i>m</i>)	65,8	31,9 (C12); 59,5 (C13); 163,0 (C5);
12	2,07 (<i>m</i>)	31,9	59,5 (C13); 65,9 (C11);
13	3,94 (<i>m</i>)	59,5	31,9 (C12); 65,9 (C11);
14	4,82 (<i>s</i>)	44,7	122,0 (C16); 158,6 (C15)*;
14'	4,82 (<i>s</i>)	44,7	123,0 (C16'); 158,6 (C15)*;
15	-	(~158,9)	-
15'	-	(~158,9)	-
16	7,37 (<i>m</i>)	122,0	122,4 (C18)
16'	8,23 (<i>m</i>)	122,3	126,2 (C18')
17	7,69 (<i>m</i>)	136,9	148,3 (C19);
17'	7,87 (<i>m</i>)	137,3	149,3 (C19');

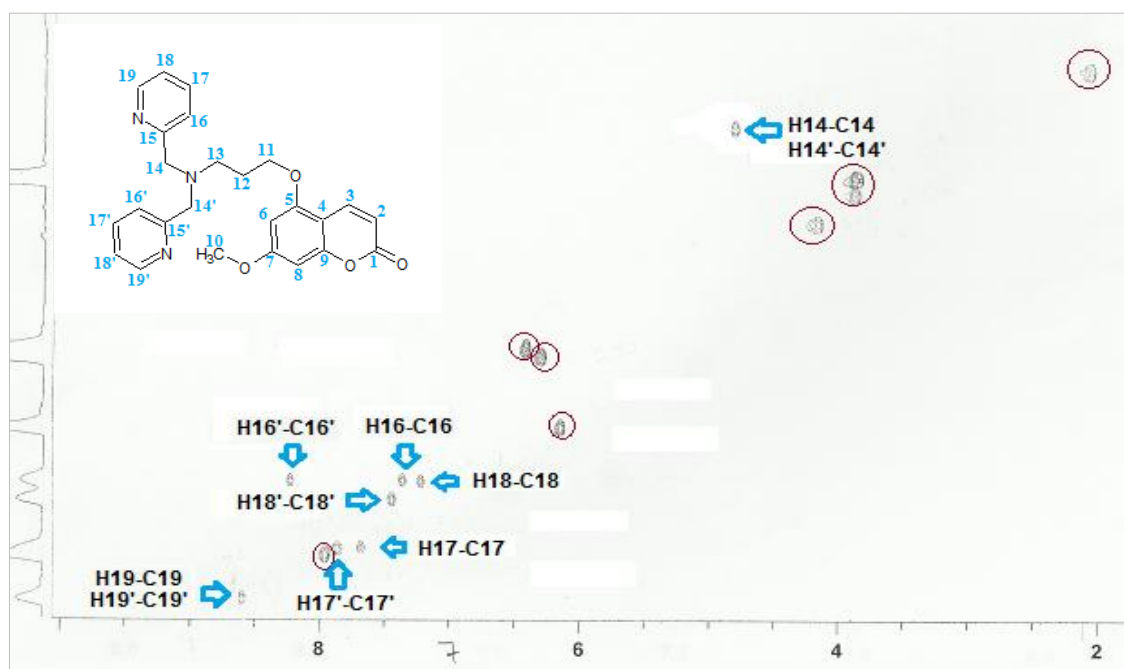
Tabela 7, Cont.

Atribuição (n° C)	HMQC ($^1J_{CH}$)		HMBC ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$)
	1H (ppm)	^{13}C (ppm)	
18	7,23 (m)	122,4	122,0 (C16);
18'	7,46 (m)	126,2	123,0 (C16');
19	8,62 (s)	148,3	122,4 (C18); 136,9 (C17)
19'	8,61 (s)	149,3	126,0 (C18'); 137,3 (C17')

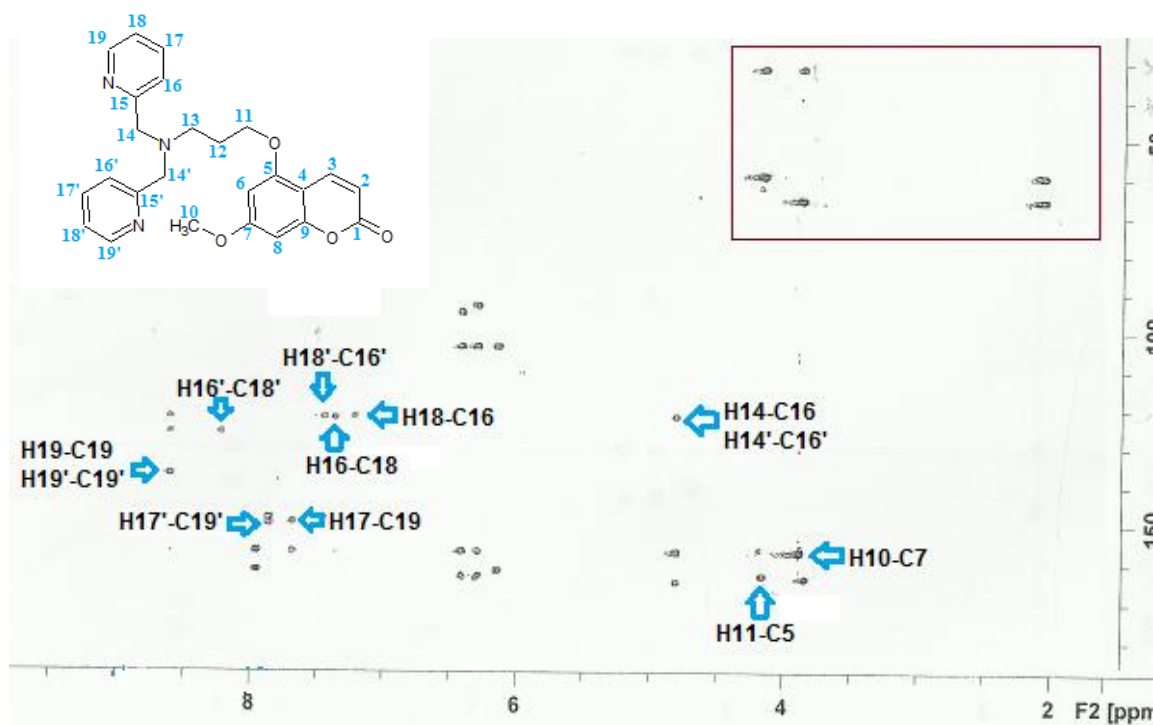
Espectro 42. Espectro de RMN de 1H (400MHz) em $CDCl_3$ da substância 6a.



Espectro 43. Espectro de RMN de ^{13}C – experimento DEPTQ - (100MHz) em CDCl_3 da substância 6a.



Espectro 44. Mapa de contornos HSQC em CDCl_3 da substância 6a.



Espectro 45. Mapa de contornos HMBC em CDCl_3 da substância 6a.

5.1.8 – Formação de derivados cumarínicos 7-(2,2-dietoxietoxi)-5-hidroxycumarina (7a), 5,7-bis(dietoxietoxi)cumarina (7b) e 5-(dietoxietoxi)-7-metoxicumarina (7c). Substituição com grupos acetais.

As substâncias 7a e 7b foram obtidas na reação entre a substância 2a com o reagente 3-bromo-1,1-dietoxipropano, enquanto o 7c foi obtido pela reação do mesmo reagente com a substância 2c. A substituição dos átomos de hidrogênio fenólicos por grupos alquil acetais mostrou um ótimo rendimento global que foi de aproximadamente 80%, apesar da formação de dois produtos 7a com 56% (168mg) e 7b com 22% (66mg) de rendimento na reação com a substância 2a. A substância 7c foi obtida com o rendimento de 79% (79mg). Todas as substâncias se apresentaram como um sólido na forma de pó com cor amarelo claro.

Essas duas reações consistem em uma simples substituição nucleofílica, através do ataque nucleofílico do íon alcóxido ao carbono terminal do reagente, liberando íon bromo no meio e resultando em grupo acetal na posição 7 da cumarina na substância 7a, posição 5 na substância 7c, e ambas posições na substância 7b. Essa dupla substituição, não esperada, pode ter ocorrido devido à relação molar entre os reagentes e a cumarina, o que possibilitou a inserção do grupo na posição 5. O maior rendimento para formação de 7a indica que o grupo

hidroxi na posição 7 é mais favorável para a formação de íon alcóxido. Esse efeito ocorre por melhor estabilização do íon pelo grupo éster da lactona, por efeito de ressonância mais efetiva, deslocando a carga negativa do íon alcóxido para o oxigênio da carboxila. Esse efeito facilita a captura do hidrogênio da hidroxila, formando um intermediário estabilizado por ressonância capaz de realizar o ataque nucleofílico ao reagente.

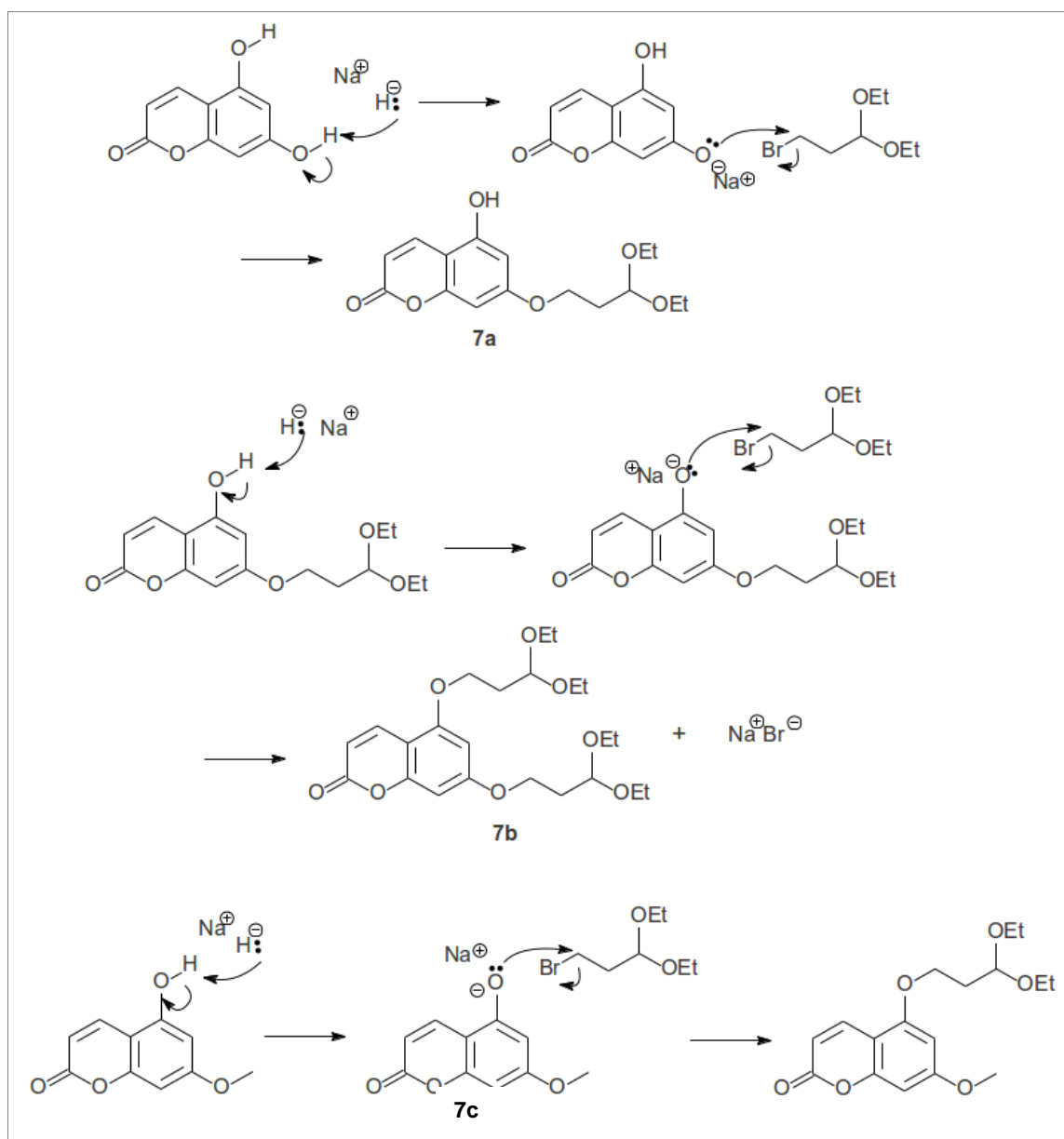


Figura 40. Mecanismo de reação para formação de 7a-c.

O espectro de Infravermelho (Espectro 46, p. 92) da substância 7a mostra as bandas de estiramento dupla de C=O de α -lactonas em ν 1682 cm^{-1} (ressonância de Fermi), banda de estiramento de C-O em ν 1195, ν 1160, ν 1140 e ν 1075 cm^{-1} e banda de ligação OH intramolecular em ν 3248 cm^{-1} . O espectro mostra as bandas de estiramento de C-H_{aromáticos} em ν 3075 cm^{-1} , de C=C de anel aromático em ν 1640, ν 1600, ν 1525, ν 1475 e 1398 cm^{-1} . Observam-se, também, as bandas de estiramento assimétrica de C-O-C alifático em ν_{as} 1270 cm^{-1} , de assimétrico de CH₃ em ν_{as} 2955 e simétrica em ν_{s} 2856 cm^{-1} e de deformação angular do anel heteroaromático (β -anel) em δ 814 cm^{-1} .

O espectro de massas (Espectro 47, p. 93) da substância 7a mostra o sinal m/z 296 relativo ao íon molecular compatível com a fórmula molecular C₁₅H₁₆O₈ da estrutura obtida.

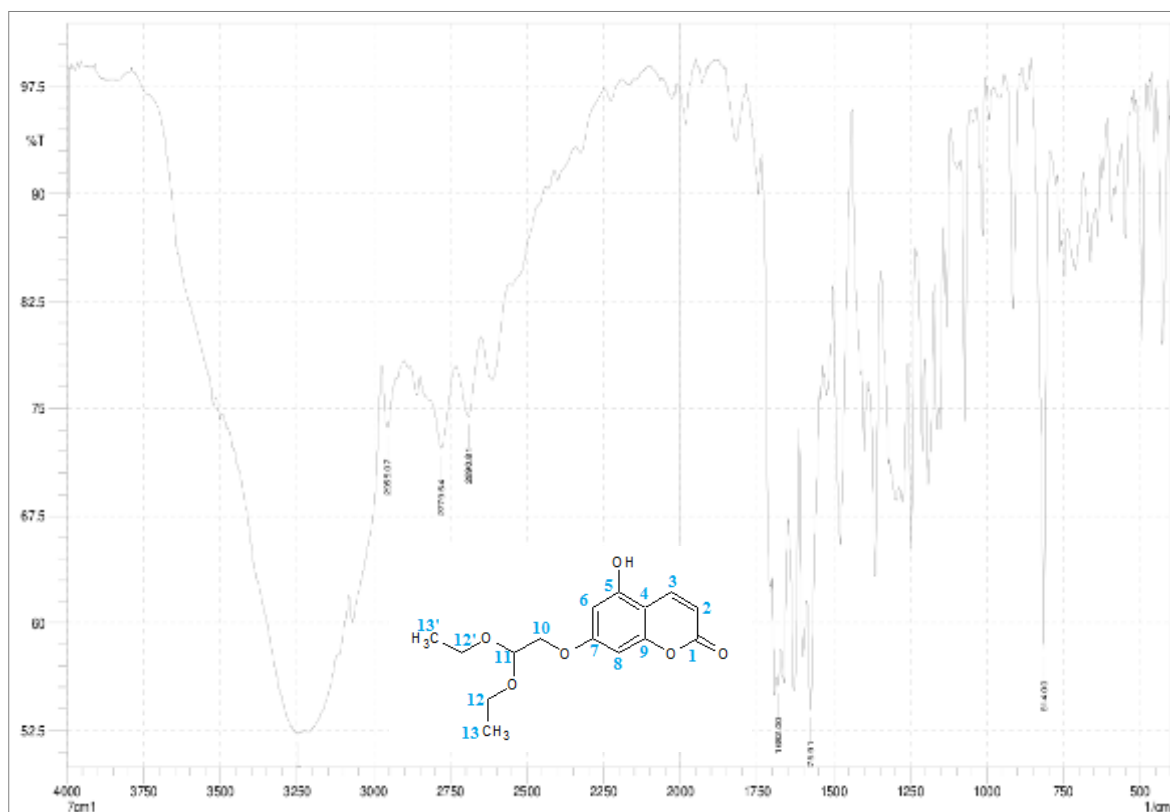
O espectro de RMN de ¹H (Espectro 48, p. 94) da substância 7a mostrou 4 sinais característicos da estrutura cumarínica, sendo eles, dois dupletos em 6,09 e 8,06 ppm, atribuídos à H2 e H3, hidrogênios *cis* do anel lactona, e em 6,34 e 6,36 ppm dos hidrogênios aromáticos, atribuídos à H6 e H8. O sinal em 4,06 ppm representa os hidrogênios metilênicos na posição H10. Os sinais em 3,96 e 3,80 ppm foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos, ambos nas posições, H12 e H12'. O deslocamento observado ocorre devido às ligações entre os átomos de carbonos com átomos de oxigênio. O sinal em 4,96 ppm foi atribuído ao hidrogênio metínico na posição H11. O sinal em 1,23 ppm representa os hidrogênios metílicos nas posições terminais H13 e H13'.

O espectro de RMN de ¹³C – experimento DEPTQ - (Espectro 49, p. 94) da substância 7a também mostra os sinais característicos da estrutura cumarínica e outros sinais relativos aos substituintes. Observa-se os sinais relativos aos átomos de carbono quartenário, sendo o grupo de sinais 162,4, 162,7, 156,6, 156,4 ppm atribuídos aos carbonos diretamente ligados a átomo de oxigênio nas posições C1, C5, C7 e C9, respectivamente e o sinal 102,8 ppm representa o átomo de carbono quartenário na posição C4. Nesse espectro é possível identificar os sinais de metínos aromáticos 108,9, 139,4, 95,9 e 95,1 ppm nas posições nas posições C2, C3, C6 e C8. O sinal em 68,6 foi atribuído ao carbono metilênico na posição C10. Os sinais em 100,2 ppm, atribuído ao carbono metínico na posição C11, em 62,6 ppm, atribuído aos dois carbonos metilênicos nas posições C12 e C12' e em 14,3 ppm, atribuído aos carbonos metílicos

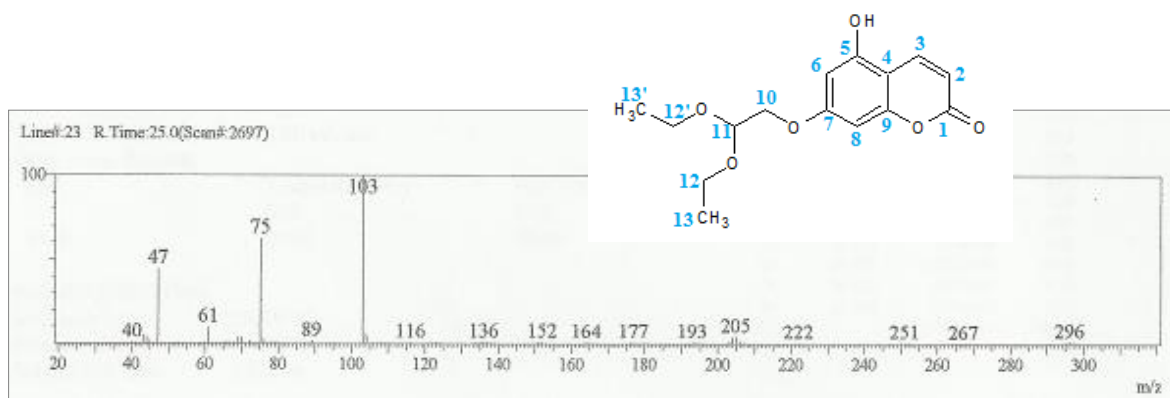
terminais nas posições C13 e C13' confirmam a presença do substituinte alquil acetal.

O mapa de contornos HSQC (Espectro 50, p. 95) da substância 7a mostra as correlações entre dos núcleos de carbono e de hidrogênio geminais ($^1J_{CH}$). Nesse espectro observam-se as importantes correlações que identificam as ligações dos dupletos e dos hidrogênios aromáticos e seus respectivos carbonos metínicos.

Através do mapa de contornos HMBC (Espectro 51, p. 95) obtêm-se o correto posicionamento dos átomos de carbono na estrutura 7a por mostrar as correlações à longa distância ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$). Observa-se que os sinais dos hidrogênios H2 (6,09 ppm) e H3 (8,06 ppm) do anel pirona se correlacionam com a carboxila lactônica em 162,4 ppm, na posição C1. O hidrogênio aromático H8 e as suas correlações a longa distância possibilitaram a identificação das posições corretas dos carbonos quartenários C4, C6, C9 e C7 presentes na estrutura. Outra importante correlação ocorre entre H10 (4,06 ppm) e C7 (156,6 ppm) confirma a presença da cadeia alquil acetal na posição 7 da cumarina Todas estão descritas na tabela 8 (p. 93).



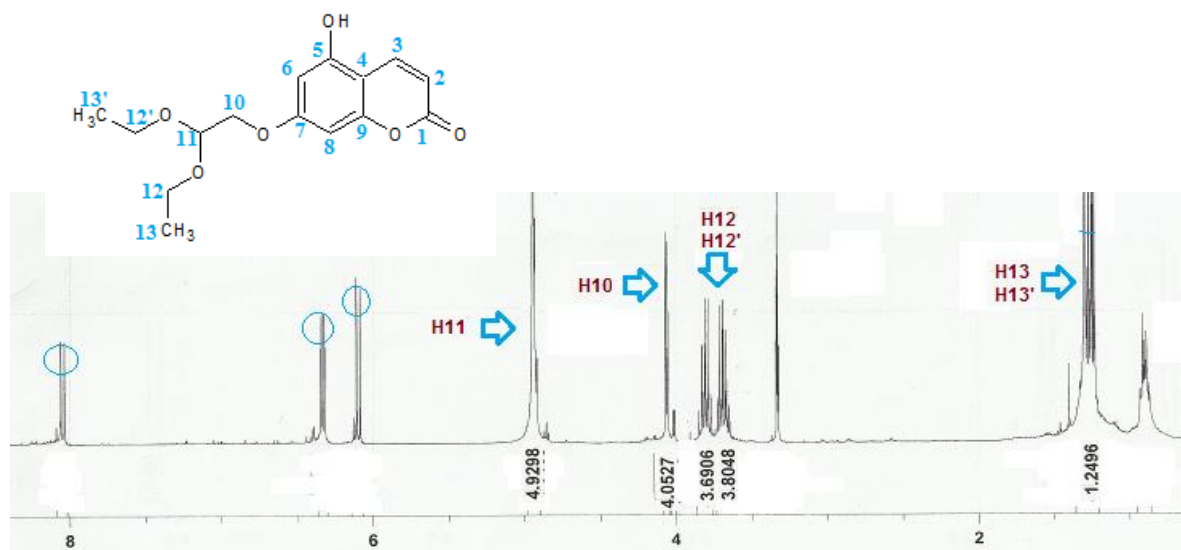
Espectro 46. Espectro no IV da substância 7a.



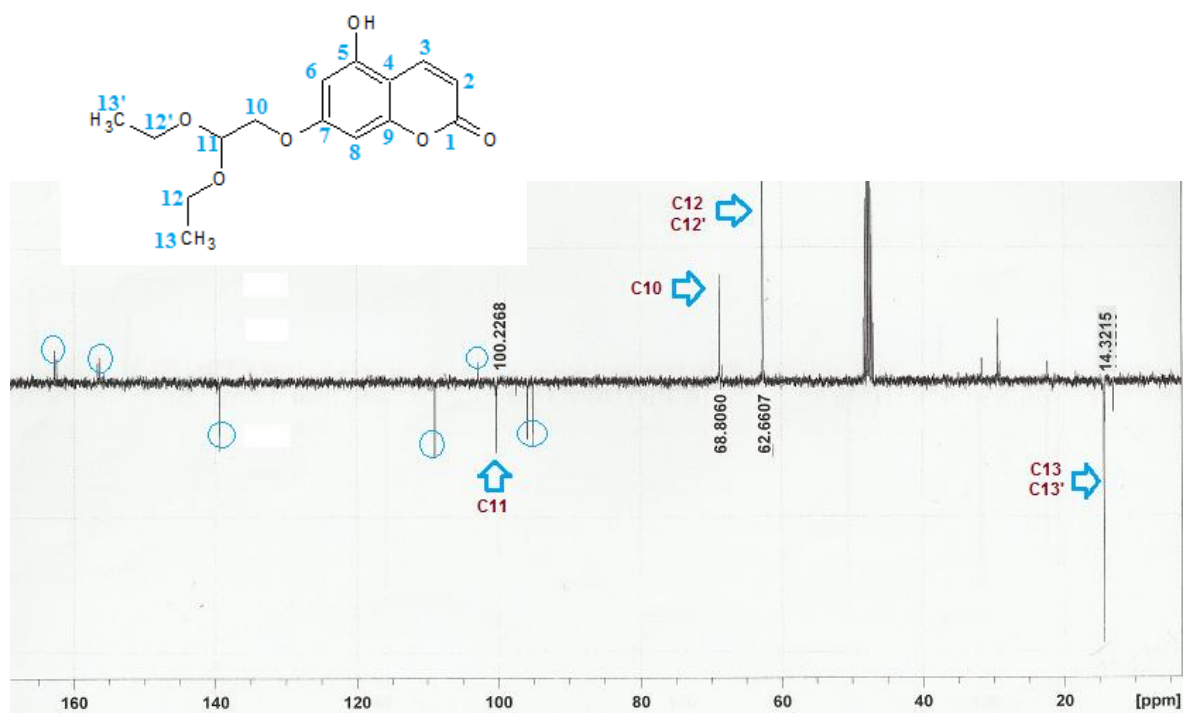
Espectro 47. Espectro de massas da substância 7a.

Tabela 8: Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C – experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5-(2,2-dietoxietoxi)-7-hidroxycumarina (7a), em CDCl_3 e as correlações observadas nos mapas de contornos HMQC e HMBC.

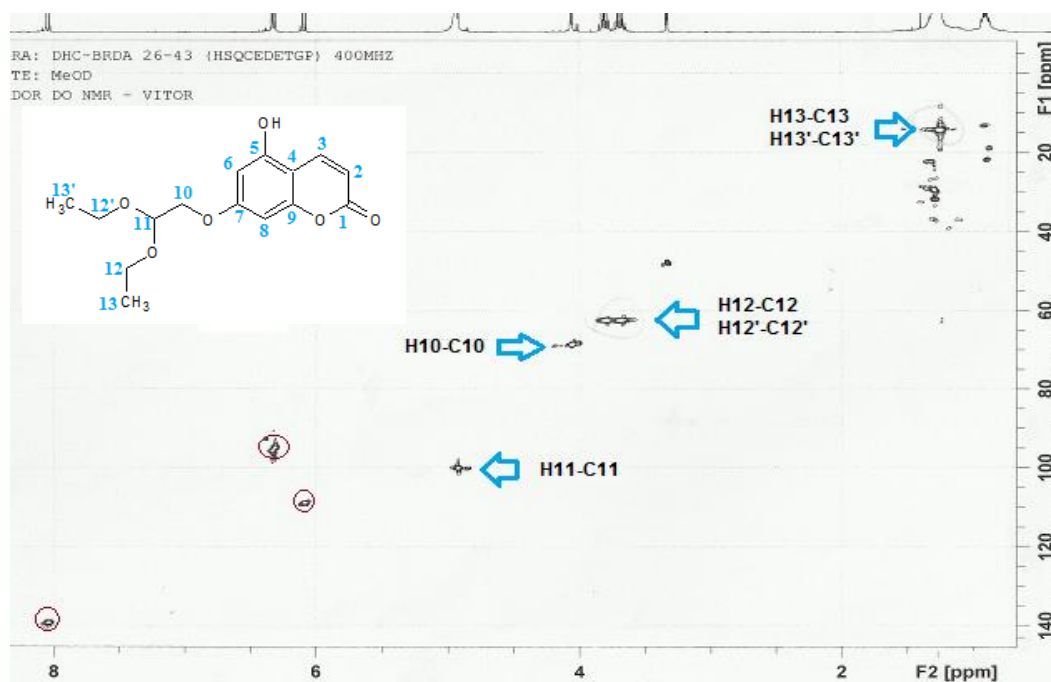
Atribuição (n° C)	HMQC ($^1J_{\text{CH}}$)		HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$)
	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	
1	-	162,4	-
2	6,09 (<i>d</i> , $J = 9,4\text{Hz}$)	108,9	104,0 (C4); 161,9 (C1);
3	8,06 (<i>d</i> , $J = 9,6\text{Hz}$)	139,4	156,7 (C9); 161,9 (C1);
4	-	102,8	-
5	-	162,7	-
6	6,34 (<i>s</i>)	95,9	104,0 (C4); 93,5 (C8); 163,0 (C5); 157,0 (C7);
7	-	156,6	-
8	6,36 (<i>s</i>)	95,1	104,0 (C4); 95,5 (C6); 156,7 (C9); 163,0 (C5);
9	-	156,4	-
10	4,06 (<i>s</i>)	68,8	157,0 (C7);
11	4,93 (<i>s</i>)	100,2	31,9 (C12); 59,5 (C13); 163,0 (C5);
12	3,69 A (<i>m</i>); 3,80 B (<i>m</i>)	62,6	59,5 (C13); 65,9 (C11);
12'	3,69 A (<i>m</i>); 3,80 B (<i>m</i>)	62,6	31,9 (C12); 65,9 (C11);
13	1,25 (<i>m</i>)	14,3	122,0 (C16); 158,6 (C15)*;
13'	1,25 (<i>m</i>)	14,3	123,0 (C16'); 158,6 (C15)*;



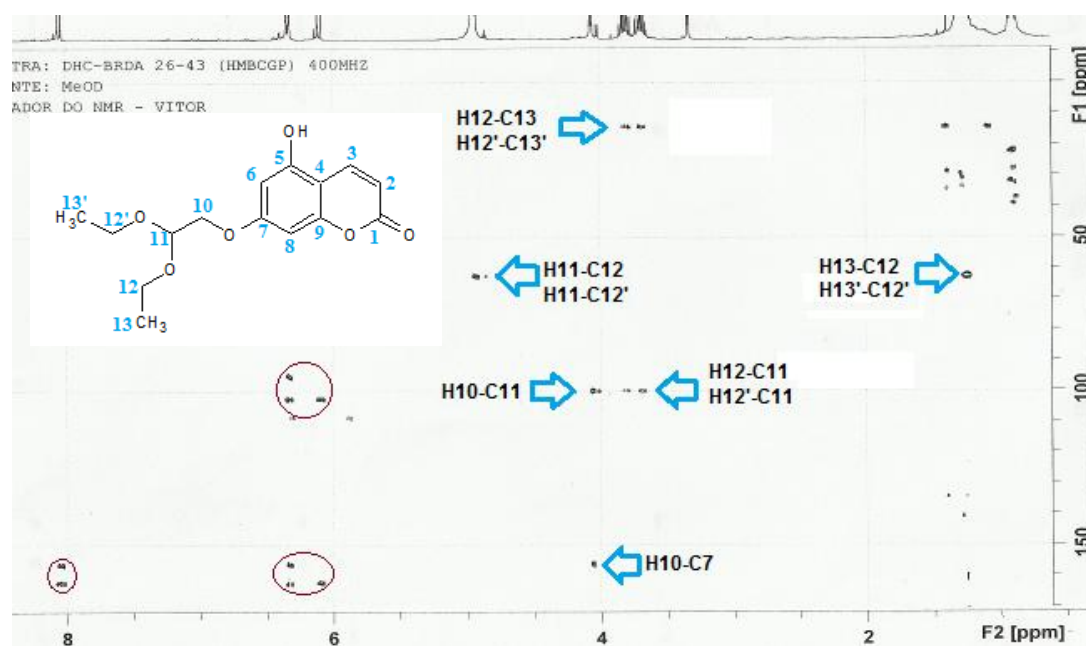
Espectro 48. Espectro de RMN de ^1H (400MHz) em CDCl_3 da substância 7a.



Espectro 49. Espectro de RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (100MHz) em CDCl_3 da substância 7a.



Espectro 50. Mapa de contornos HSQC em CDCl_3 da substância 7a.



Espectro 51. Mapa de contornos HMBC em CDCl_3 da substância 7a.

O espectro de Infravermelho (Espectro 52, p. 98) da substância 7b mostra as bandas de estiramento dupla de C=O de α -lactonas em ν 1738 cm^{-1} (ressonância de Fermi) e banda de estiramento de C-O em ν 1178, ν 1135, ν 1122 e ν 1060 cm^{-1} . O espectro mostra as bandas de estiramento de C-H_{aromáticos} em ν 3080 cm^{-1} , de C=C de anel aromático em ν 1612, ν 1560, ν 1500 e ν 1442 cm^{-1} . Observam-se, também, as bandas de estiramento assimétrica de C-O-C alifático em ν_{as} 1240 cm^{-1} , de assimétrico de CH₃ em ν_{as} 2975 e simétrica em ν_s 2879 cm^{-1} e de deformação angular do anel heteroaromático (β -anel) em δ 840 e ν 862 cm^{-1} .

O espectro de massas (Espectro 53, p. 98) da substância 7b mostra o sinal m/z 410 relativo ao íon molecular compatível com a fórmula molecular C₂₁H₃₀O₈ da estrutura obtida.

O espectro de RMN de ¹H (Espectro 54, p. 100) da substância 7b mostrou 4 sinais característicos da estrutura cumarínica, sendo eles, dois dupletos em 6,16 e 8,04 ppm, atribuídos à H2 e H3, hidrogênios *cis* do anel lactona, e em 6,48 e 6,49 ppm dos hidrogênios aromáticos, atribuídos à H6 e H8. O sinais em 4,09 e 4,07 ppm representa os hidrogênios metilênicos na posição H10 e H10', respectivamente. Os dois sinais em 3,69 e 3,70 ppm foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos nas posições H12, H12', H12'' e H12'''. O deslocamento observado ocorre devido às ligações entre os átomos de carbonos com átomos de oxigênio. Os sinais em 4,93 e 4,87 ppm foram atribuído aos hidrogênios metínicos nas posições H11 e H11', respectivamente. O sinal em 1,25 ppm representa os hidrogênios metílicos nas posições terminais H13, H13', H13'' e H13'''.

O espectro de RMN de ¹³C – experimento DEPTQ - (Espectro 55, p. 100) da substância 7b também mostra os sinais característicos da estrutura cumarínica e outros sinais relativos aos substituintes. Observa-se os sinais relativos aos átomos de carbono quartenário, sendo o grupo de sinais 161,9, 162,9, 156,3, 156,1 ppm atribuídos aos carbonos diretamente ligados a átomo de oxigênio nas posições C1, C5, C7 e C9, respectivamente e o sinal 104,0 ppm representa o átomo de carbono quartenário na posição C4. Nesse espectro é possível identificar os sinais de metínicos aromáticos 110,3, 139,9, 95,9 e 93,6 ppm nas posições nas posições C2, C3, C6 e C8. Os sinais em 68,6 e 68,7 ppm foram atribuídos aos carbonos metilênicos nas posições C10 e C10'. Os sinais em 100,2 e 100,3 ppm foram atribuídos aos carbonos metínicos nas posições C11 e C11',

respectivamente. O sinal em 62,6 ppm, atribuído aos quatro carbonos metilênicos nas posições C12, C12', C12'' e C12''' e em 14,3 ppm, atribuído aos carbonos metílicos terminais nas posições C13, C13', C13'' e C13''', confirmam a presença do substituinte alqui acetal.

O mapa de contornos HSQC (Espectro 56, p. 101) da substância 7b mostra as correlações entre dos núcleos de carbono e de hidrogênio geminais ($^1J_{CH}$). Nesse espectro observam-se as importantes correlações que identificam as ligações dos dupletos e dos hidrogênios aromáticos e seus respectivos carbonos metínicos.

Através do mapa de contornos HMBC (Espectro 57, p. 101) obtêm-se o correto posicionamento dos átomos de carbono na estrutura 7b por mostrar as correlações à longa distância ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$). Observa-se que os sinais dos hidrogênios H2 (6,16 ppm) e H3 (8,04 ppm) do anel pirona se correlacionam com a carboxila lactônica em 161,9 ppm, na posição C1. O hidrogênio aromático H8 e as suas correlações a longa distância possibilitaram a identificação das posições corretas dos carbonos quartenários C4, C6, C9 e C7 presentes na estrutura. Outra importante correlação ocorre entre H10 (4,09 ppm) e C7 (156,3 ppm) confirma a presença da cadeia alquil acetal na posição 7 da cumarina. Observa-se, também, a correlação entre H10' (4,07 ppm) e C5 (162,9 ppm), confirmando a segunda substituição na posição 5 da cumarina. Todas estão descritas na tabela 9 (p. 99).

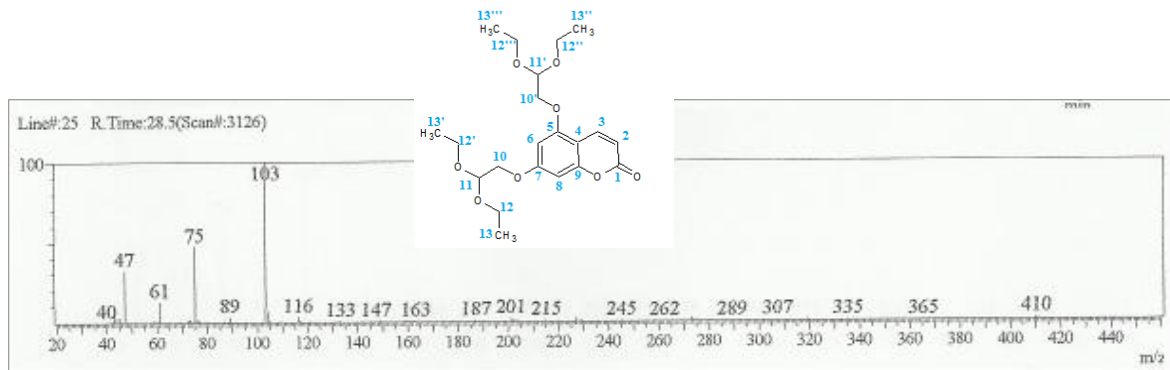
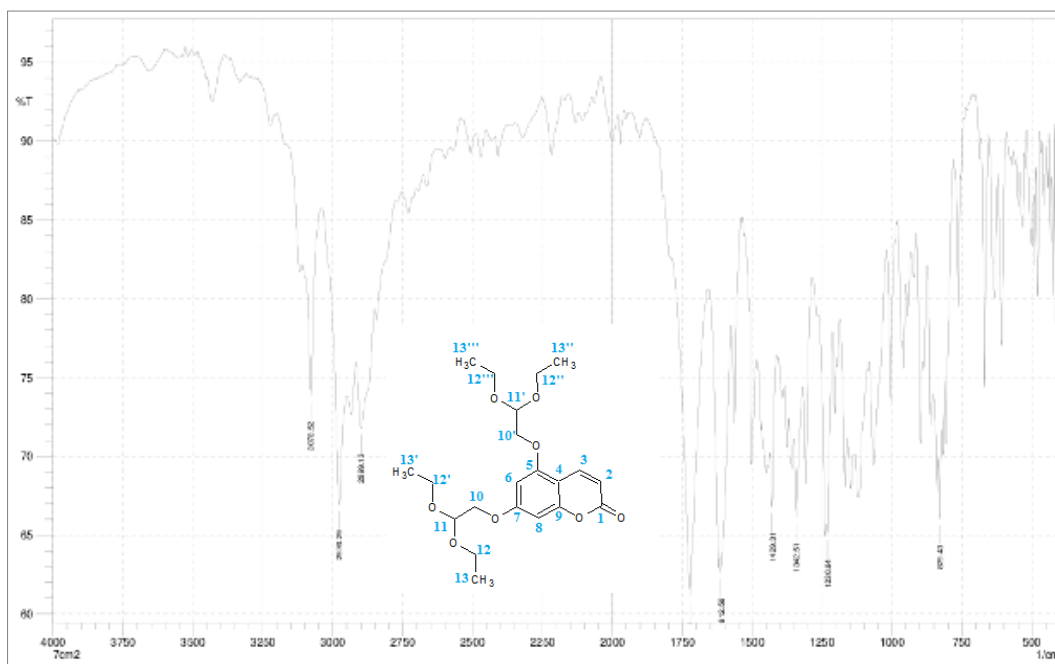
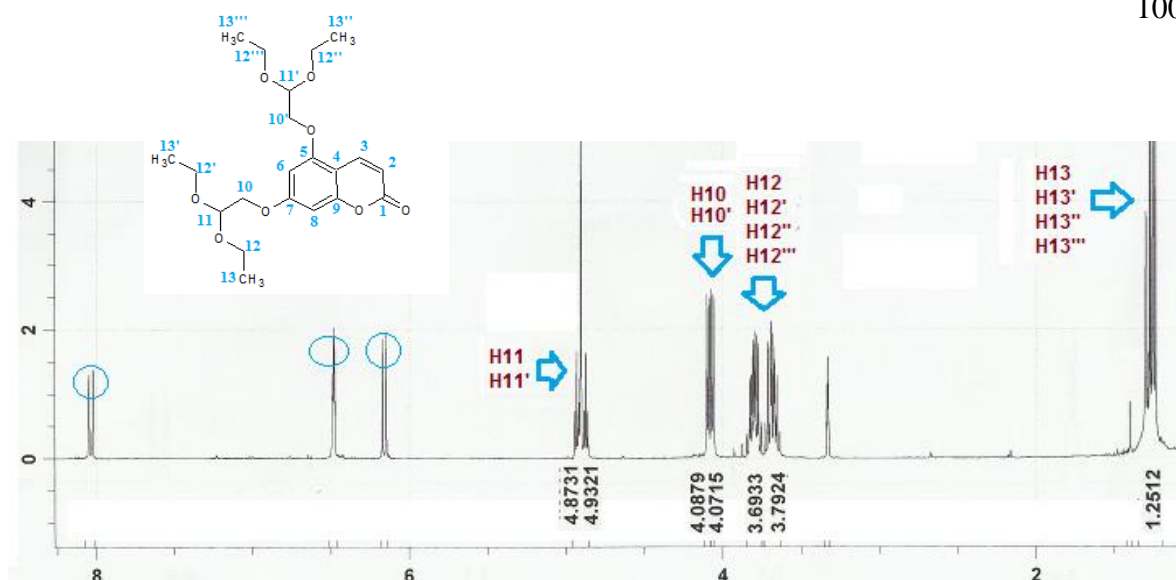
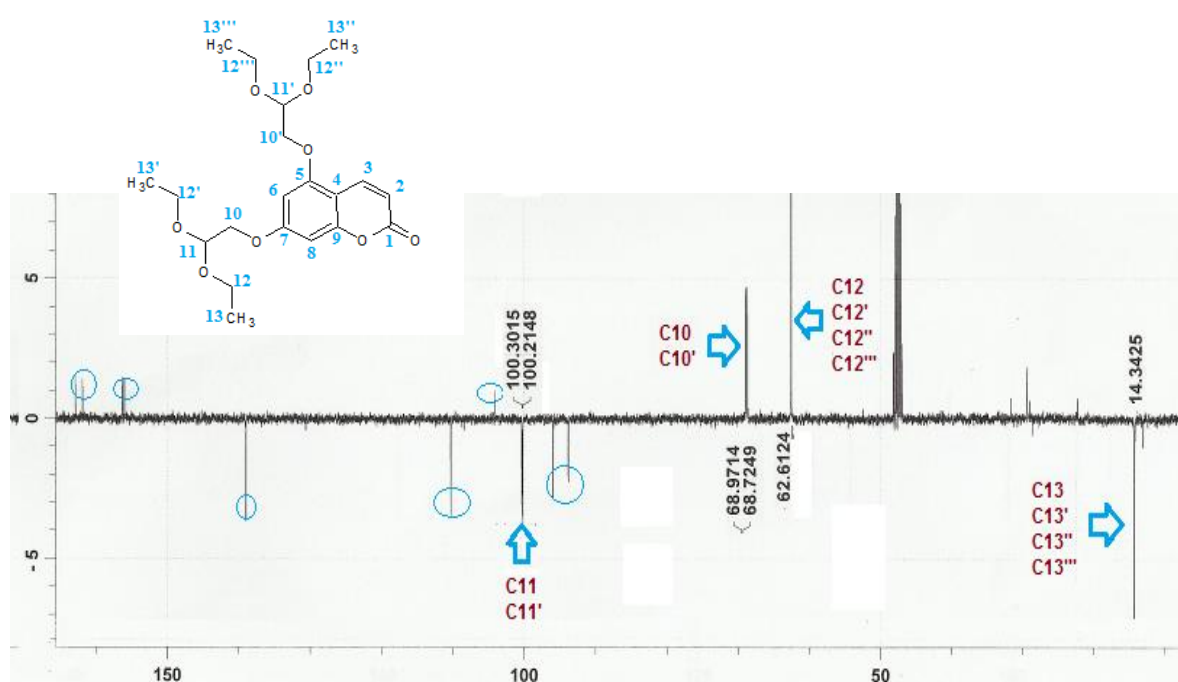


Tabela 9: Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C – experimento DEPTQ - (100MHz) da substância 5,7-bis(dietoxietoxi)cumarina (7b), em CDCl_3 e as correlações observadas nos mapas de contornos HMQC e HMBC.

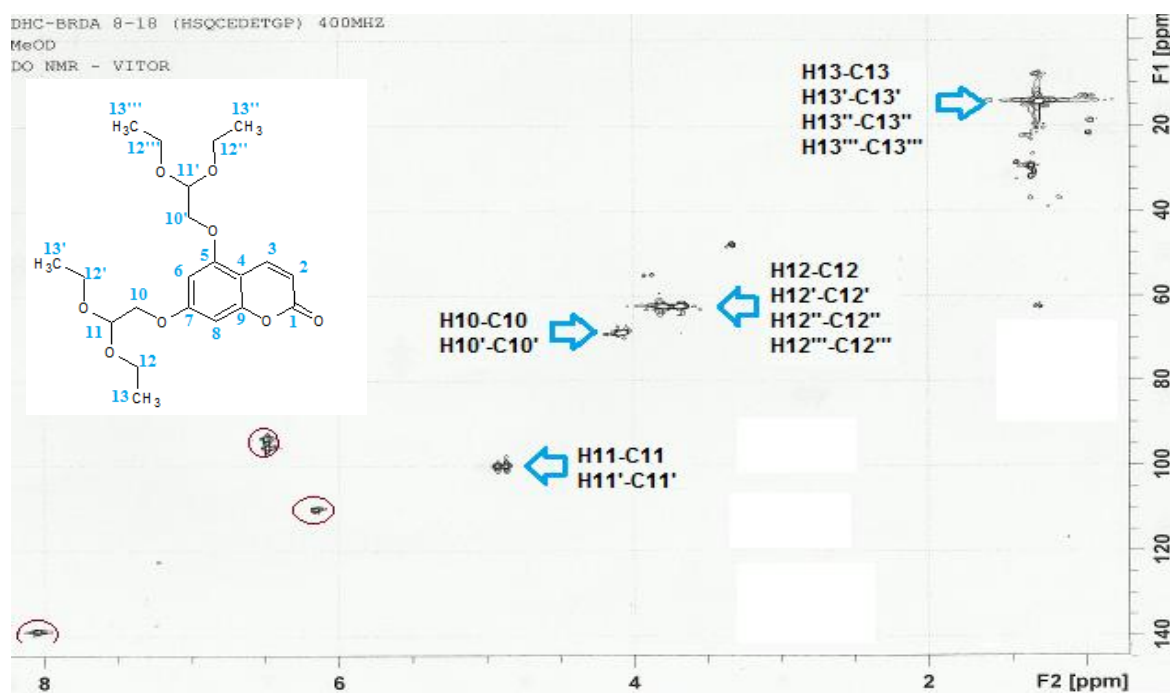
Atribuição (n ^o C)	HMQC ($^1J_{\text{CH}}$)		HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$)
	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	
1	-	161,9	-
2	6,16 (<i>d</i> , $J = 9,6\text{Hz}$)	110,3	104,0 (C4); 161,9 (C1);
3	8,04 (<i>d</i> , $J = 9,6\text{Hz}$)	139,9	156,1 (C9); 161,9 (C1);
4	-	104	-
5	-	162,9	-
6	6,48 (<i>s</i>)	95,9	104,0 (C4); 93,6 (C8); 156,3 (C7); 162,9 (C5);
7	-	156,3	-
8	6,49 (<i>s</i>)	93,6	104,0 (C4); 95,9 (C6); 156,1 (C9); 162,9 (C5);
9	-	156,1	-
10	4,09 (<i>s</i>)	68,9	100,2 (C11); 156,3 (C7);
10'	4,07 (<i>s</i>)	68,7	100,2 (C11'); 162,9 (C5);
11	4,93 (<i>s</i>)	100,2	62,6 (C12, C12')
11'	4,87 (<i>s</i>)	100,3	62,6 (C12'', C12''')
12, 12'	3,69 A (<i>m</i>) 3,79 B (<i>m</i>)	62,6	14,3 (C13, C13'); 100,2 (C11);
12'', 12'''	3,69 A (<i>m</i>) 3,79 B (<i>m</i>)	62,6	14,3 (C13'', C13'''); 100,3 (C11');
13, 13'	1,25 (<i>m</i>)	14,3	62,6 (C12, C12')
13'', 13'''	1,25 (<i>m</i>)	14,3	62,6 (C12, C12')



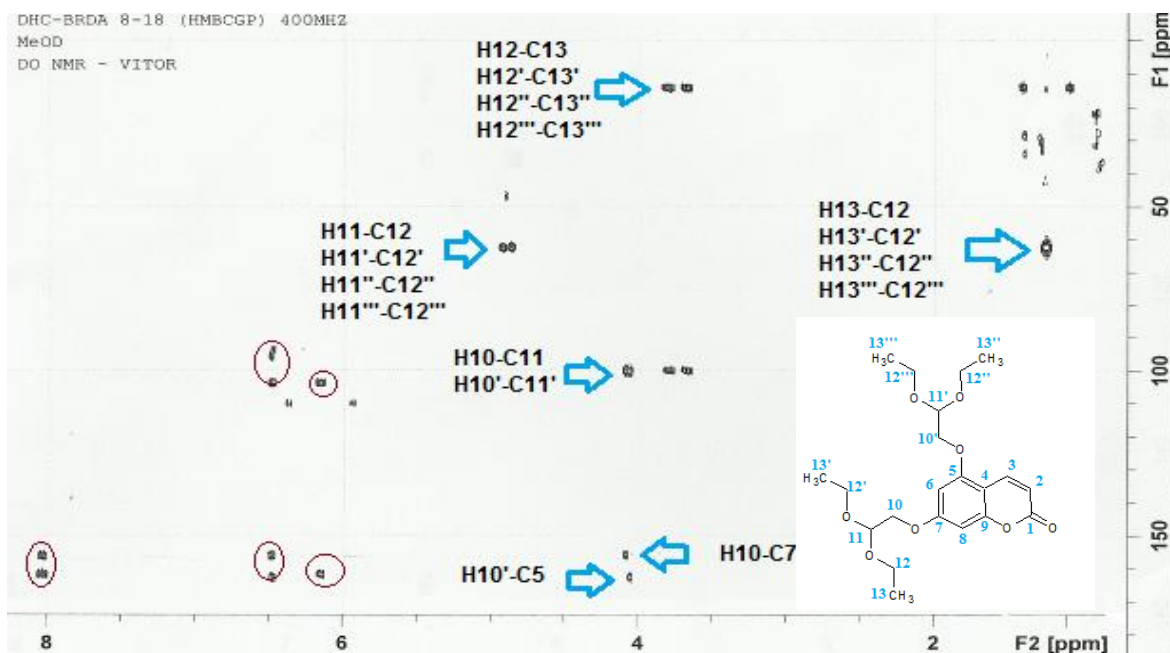
Espectro 54. Espectro de RMN de ^1H (400MHz) em CDCl_3 da substância 7b.



Espectro 55. Espectro de RMN de ^{13}C - experimento DEPTQ - (100MHz) em CDCl_3 da substância 7b.



Espectro 56. Mapa de contornos HSQC em CDCl_3 da substância 7b.



Espectro 57. Mapa de contornos HMBC em CDCl_3 da substância 7b.

O espectro de Infravermelho (Espectro 58, p. 103) da substância 7c mostra as bandas de estiramento dupla de C=O de α -lactonas em ν 1740 cm^{-1} (ressonância de Fermi) e banda de estiramento de C-O em ν 1164, ν 1150, ν 1125 e ν 1067 cm^{-1} . O espectro mostra as bandas de estiramento de C-H_{aromáticos} em ν 3078 cm^{-1} , de C=C de anel aromático em ν 1612, ν 1563, ν 1505, ν 1429 e ν 1342 cm^{-1} . Observam-se, também, as bandas de estiramento assimétrica de C-O-C alifático em ν_{as} 1230 cm^{-1} , de assimétrico de CH₃ em ν_{as} 2976 e simétrica em ν_{s} 2899 cm^{-1} e de deformação angular do anel heteroaromático (β -anel) em δ 829 cm^{-1} .

O espectro de massas (Espectro 59, p. 104) da substância 7c mostra o sinal m/z 296 relativo ao íon molecular compatível com a fórmula molecular C₁₆H₂₀O₆ da estrutura obtida.

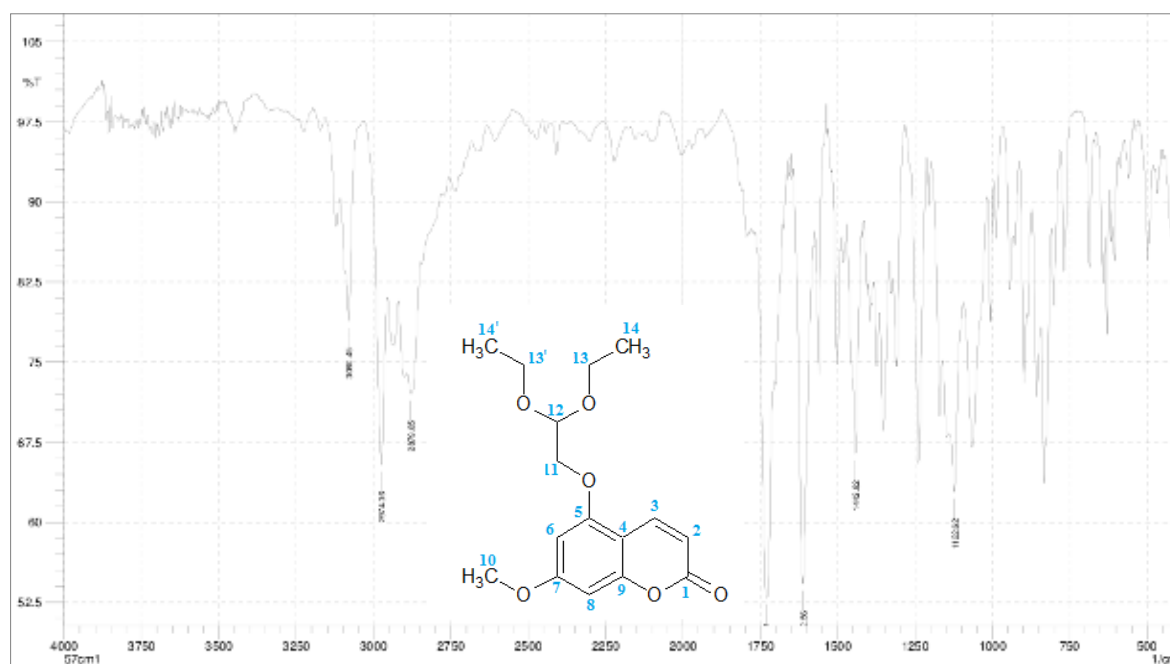
O espectro de RMN de ¹H (Espectro 60, p. 105) da substância 7c mostrou 4 sinais característicos da estrutura cumarínica, sendo eles, dois dupletos em 6,16 e 7,96 ppm, atribuídos à H2 e H3, hidrogênios *cis* do anel lactona, e em 6,34 e 6,41 ppm dos hidrogênios aromáticos, atribuídos à H6 e H8. O sinal em 3,89 ppm representa os sinais dos hidrogênios metílicos do grupo metoxila na posição 7 da cumarina. O sinal em 4,05 ppm representa os hidrogênios metilênicos na posição H11. Os sinais em 3,66 e 3,70 ppm foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos, ambos nas posições, H13 e H13'. O deslocamento observado ocorre devido às ligações entre os átomos de carbonos com átomos de oxigênio. O sinal em 4,85 ppm foi atribuído ao hidrogênio metínico na posição H12. O sinal em 1,23 ppm representa os hidrogênios metílicos nas posições terminais H14 e H14'.

O espectro de RMN de ¹³C – experimento DEPTQ - (Espectro 61, p. 105) da substância 7c também mostra os sinais característicos da estrutura cumarínica e outros sinais relativos aos substituintes. Observa-se os sinais relativos aos átomos de carbono quartenário, sendo o grupo de sinais 161,5, 162,6, 157,0, 156,7 ppm atribuídos aos carbonos diretamente ligados a átomo de oxigênio nas posições C1, C5, C7 e C9, respectivamente e o sinal 104,2 ppm representa o átomo de carbono quartenário na posição C4. Nesse espectro é possível identificar os sinais de metínos aromáticos 111,2, 138,7, 95,2 e 93,7 ppm nas posições nas posições C2, C3, C6 e C8. O sinal em 68,8 foi atribuído ao carbono metilênico na posição C11. Os sinais em 100,1 ppm, atribuído ao carbono metínico na posição C12, em 62,7 ppm, atribuído aos dois carbonos metilênicos

nas posições C13 e C13' e em 15,3 ppm, atribuído aos carbonos metílicos terminais nas posições C14 e C14' confirmam a presença do substituinte alquil acetal.

O mapa de contornos HSQC (Espectro 62, p. 105) da substância 7c mostra as correlações entre dos núcleos de carbono e de hidrogênio geminais ($^1J_{CH}$). Nesse espectro observam-se as importantes correlações que identificam as ligações dos dupletos e dos hidrogênios aromáticos e seus respectivos carbonos metínicos.

Através do mapa de contornos HMBC (Espectro 63, p. 106) obtêm-se o correto posicionamento dos átomos de carbono na estrutura 7c por mostrar as correlações à longa distância ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$). Observa-se que os sinais dos hidrogênios H2 (6,16 ppm) e H3 (7,96 ppm) do anel pirona se correlacionam com a carboxila lactônica em 161,5 ppm, na posição C1. O hidrogênio aromático H8 e as suas correlações a longa distância possibilitaram a identificação das posições corretas dos carbonos quartenários C4, C6, C9 e C7 presentes na estrutura. Outra importante correlação ocorre entre H11 (4,05 ppm) e C7 (157,0 ppm) confirma a presença da cadeia alquil acetal na posição 7 da cumarina. Todas estão descritas na tabela 10 (p. 104).



Espectro 58. Espectro no IV da substância 7c.

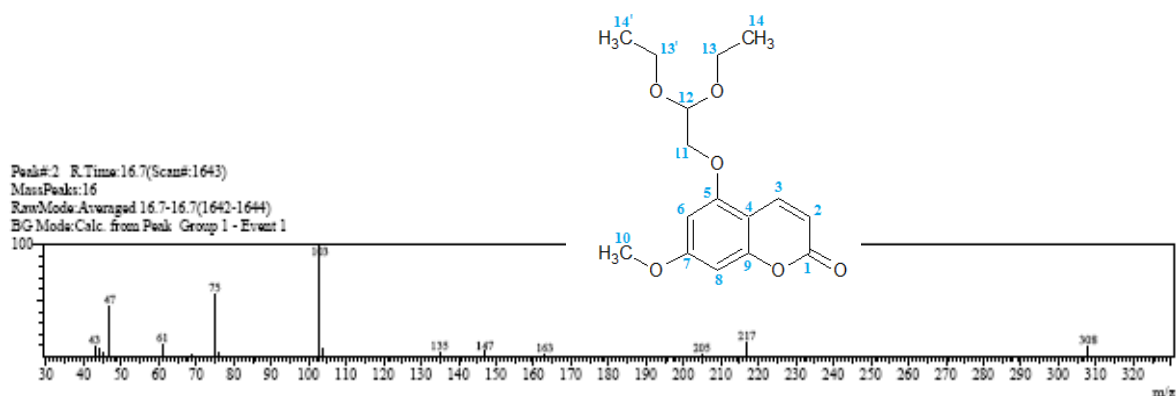
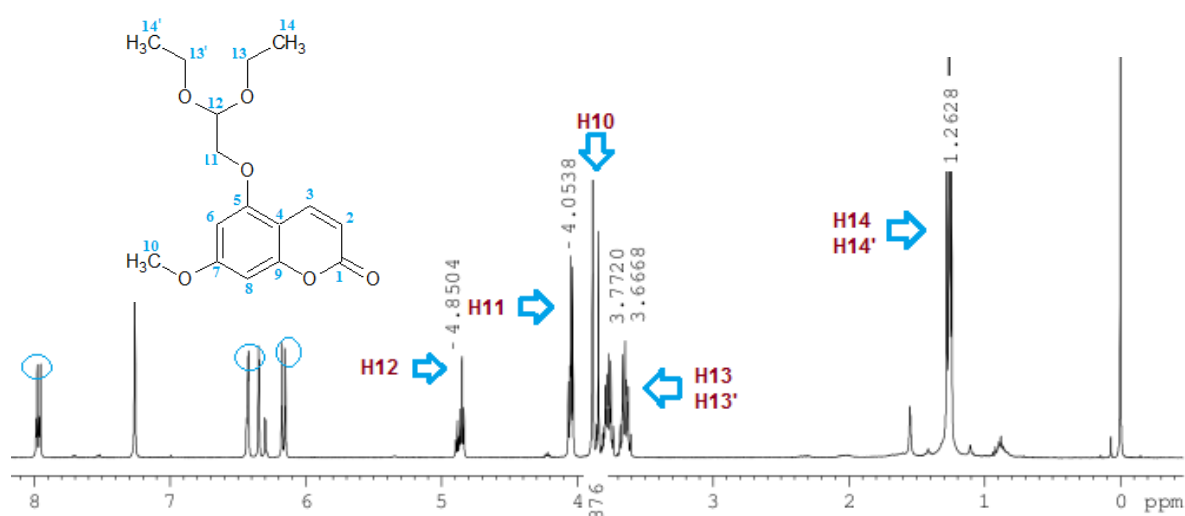
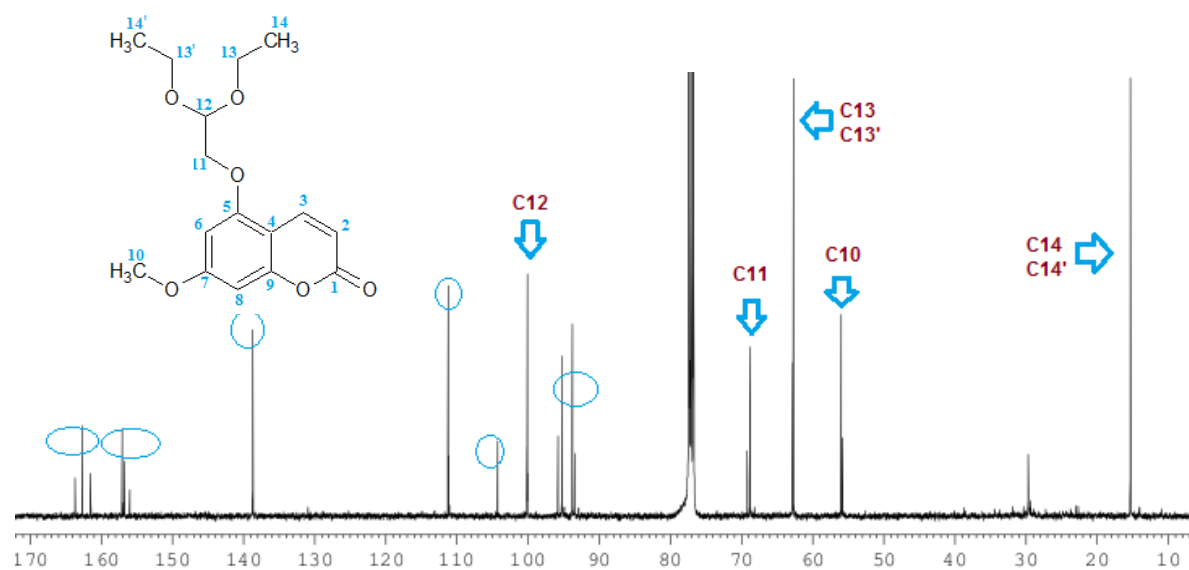


Tabela 10: Dados de RMN de ^1H (400MHz) e RMN de ^{13}C (100MHz) da substância 5-(dietoxietoxi)-7-metoxicumarina (7c), em CDCl_3 e as correlações observadas nos mapas de contornos HMQC e HMBC.

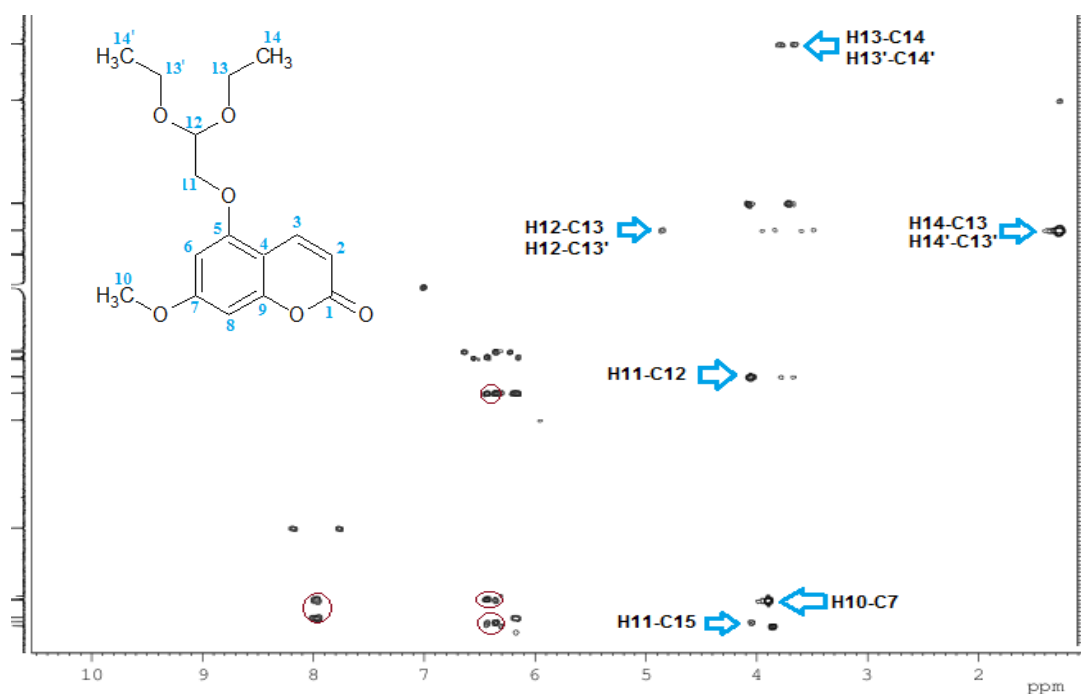
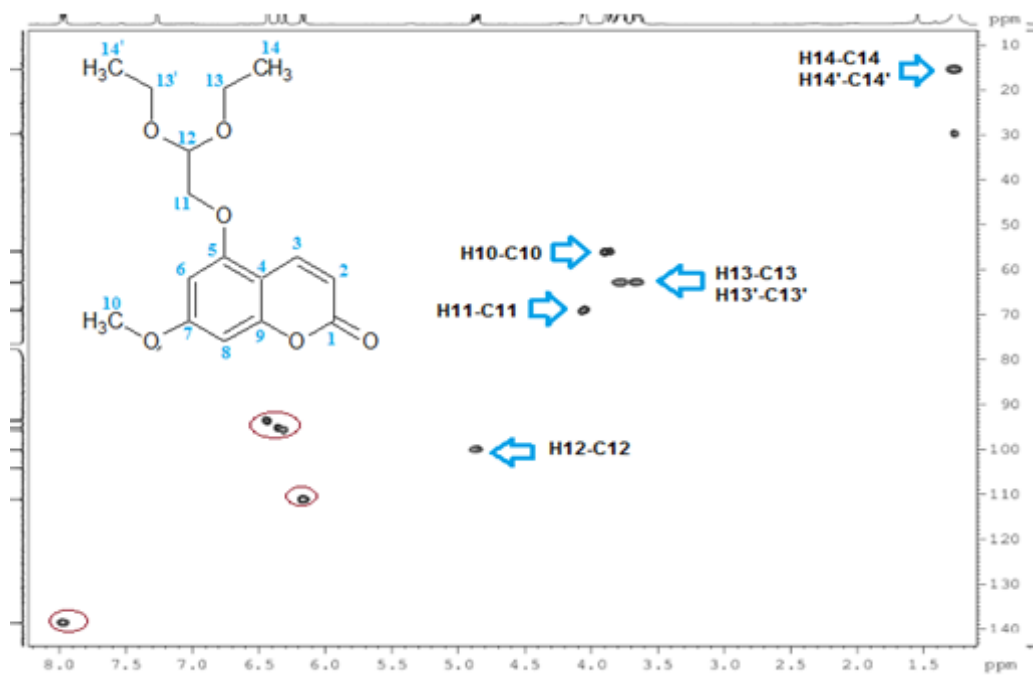
Atribuição (n° C)	HMQC ($^1J_{\text{CH}}$)		HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$)
	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	
1	-	161,5	-
2	6,16 (<i>d</i> , $J = 9,6\text{Hz}$)	111,2	104,2 (C4); 161,5 (C1);
3	7,96 (<i>d</i> , $J = 9,6\text{Hz}$)	138,7	156,7 (C9); 161,5 (C1);
4	-	104,2	-
5	-	162,6	-
6	6,34 (<i>s</i>)	95,2	104,2 (C4); 93,7 (C8); 162,6 (C5);
7	-	157	-
8	6,42 (<i>s</i>)	93,7	104,2 (C4); 95,2 (C6); 156,7 (C9);
9	-	156,7	-
10	3,89 (<i>s</i>)	56	156,0 (C7);
11	4,05 (<i>m</i>)	68,8	100,1 (C12); 162,6 (C5);
12	4,85 (<i>m</i>)	100,1	62,6 (C13, C13')
13, 13'	3,66 A (<i>m</i>) 3,77 B (<i>m</i>)	62,7	15,3 (C14')
14, 14'	1,26 (<i>m</i>)	15,3	62,7 (C13)



Espectro 60. Espectro de RMN de ^1H (400MHz) em CDCl_3 da substância 7c.



Espectro 61. Espectro de RMN de ^{13}C (100MHz) em CDCl_3 da substância 7c.



5.1.9- Formação de anel furano (8).

Essa síntese consiste em uma ciclização do anel furano acoplado ao anel benzeno da cumarina. Utilizou-se os produtos obtidos 7a e 7b submetendo-o ao meio em presença de PPA. Esse processo constitui em hidrólise de cetal para gerar aldeído. Posteriormente, ocorre ciclização de Claisen seguida de desidratação, formando, assim, o anel furano. Através de análises em cromatografia de camada delgada verificaram-se manchas de diferentes R_f em comparação o produto de partida, além de fluorescência azul no produto de reação, ausente nas substâncias 7a e 7b. Entretanto, não foi possível realizar análises espectroscópicas do material devido pouco massa obtida na síntese. São necessários novos procedimentos e melhor caracterização para melhorar a síntese desses derivados pretendidos.

5.1.10- Formação de epóxido. Síntese da 5-epoxipsoraleno (9).

Nessa reação, o produto formado não foi submetido à purificação em coluna de gel-sílica devido à possibilidade de abertura do anel epóxido em meio ácido. Com isso, a análise química mais precisa e o cálculo de rendimento não foi efetuado. Essa reação consiste em uma substituição nucleofílica, que ocorre na hidroxila fenólica presente na posição 5 da furocumarina. O íon alcóxido formado pela captura do hidrogênio da hidroxila pelo íon carbonato, proveniente da dissolução do sal de potássio, ataca o carbono secundário do anel epóxido, ocorrendo abertura do anel da epicloridrina que, em seguida, ciclizará novamente, pelo ataque nucleofílico ao carbono terminal halogenado, liberando o íon cloro. O controle da reação foi realizado por cromatografia de camada delgada de sílica, onde se verificou a formação de produto durante o decorrer da síntese em comparação com o padrão, no caso, o produto de partida 3. Após a reação ser finalizada, iniciou-se a próxima etapa que consiste na síntese de 4-(3-{bis[2-(2-piridinil)etil]amino}-2-hidroxi)propoxi)psoraleno.

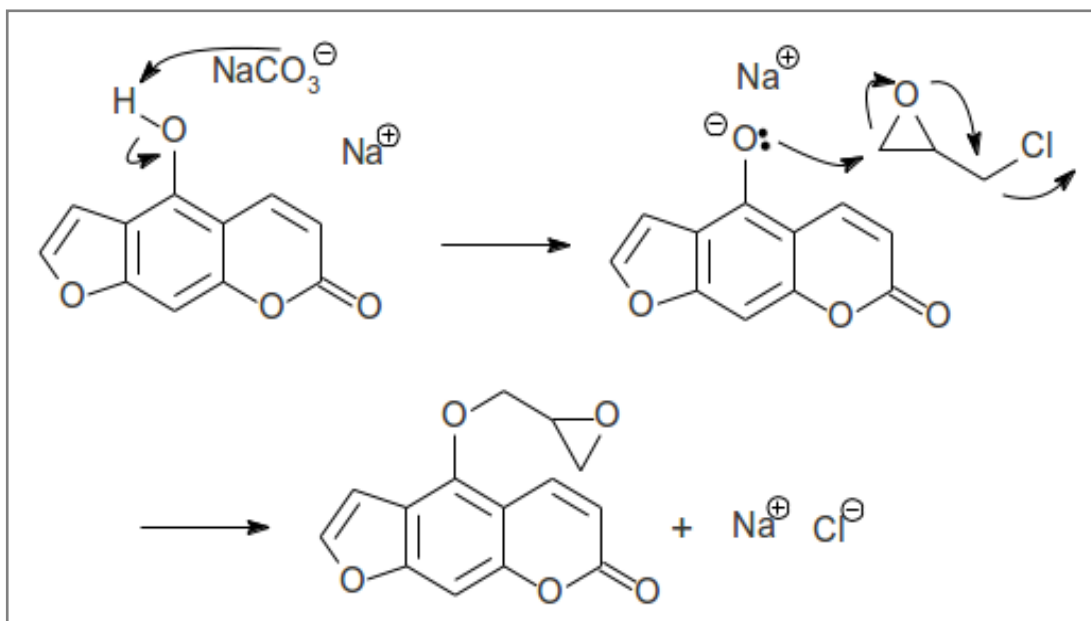


Figura 41. Mecanismo de reação para formação de 9.

5.1.11- Formação de ligante com epoxipsoraleno: Síntese de 4-(3-{bis[2-(2-piridinil)etil]amino}-2-hidroxiopropoxi)psoraleno (10).

Devido à pequena quantidade utilizada na síntese, não foi possível realizar uma metodologia eficiente para purificação. O controle da reação foi realizado por cromatografia de camada delgada de sílica, onde se verificou a formação de produto durante o decorrer da síntese em comparação com o padrão, no caso, o produto de partida 3. Entretanto, não foi possível submeter à análise por espectroscopia. A reação foi considerada sem resultados suficientes para comprovação da formação do produto.

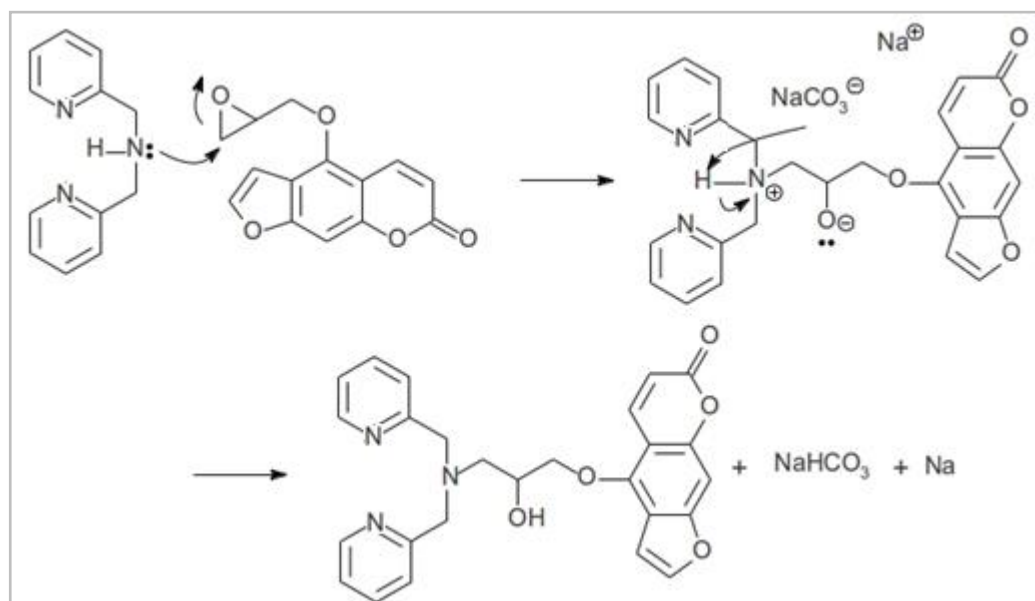


Figura 42. Mecanismo de reação para formação de 10.

5.1.12 – Síntese de 7-cloroacetoxi-5-metoxicumarina (11)

Essa síntese consiste em uma substituição nucleofílica que ocorre na hidroxila presente na posição 5 da cumarina. O íon alcóxido formado pela captura do hidrogênio da hidroxila pelo íon hidreto, ataca o carbono metilênico do reagente, liberando íon cloro e substância de interesse. Através de análises em cromatografia de camada delgada verificaram-se manchas diferentes tempos de retenção em comparação com o padrão, que no caso, é substância 2b.

O espectro de Infravermelho (Espectro 64, p. 110) da substância 11 mostra as bandas de estiramento dupla de C=O de α -lactonas e C=O de haleto de acila próximos em ν 1705 cm^{-1} (ressonância de Fermi) e banda de estiramento de C-O em ν 1200, ν 1152 e ν 1125 cm^{-1} . O espectro mostra as bandas de estiramento de C-H_{aromáticos} em ν 3078 cm^{-1} , de C=C de anel aromático em ν 1600, ν 1490, ν 1435 e ν 1360 cm^{-1} . Observam-se, também, as bandas de estiramento assimétrica de C-O-C alifático em ν_{as} 1240 cm^{-1} , de assimétrico de CH₃ em ν_{as} 2986 e simétrica em ν_{s} 2848 cm^{-1} e de deformação angular do anel heteroaromático (β -anel) em δ 827 cm^{-1} . De acordo com o sinal m/z 268 do espectro de massa (Espectro 65, p.111) para reação de 7c, relativo a fórmula molecular C₁₄H₁₆O₆, comprova-se que etapa da reação foi alcançada.

No entanto, não se pode verificar o rendimento da reação devido à

pequena quantidade utilizada. São necessárias novas reações para verificação do rendimento e caracterização da substância.

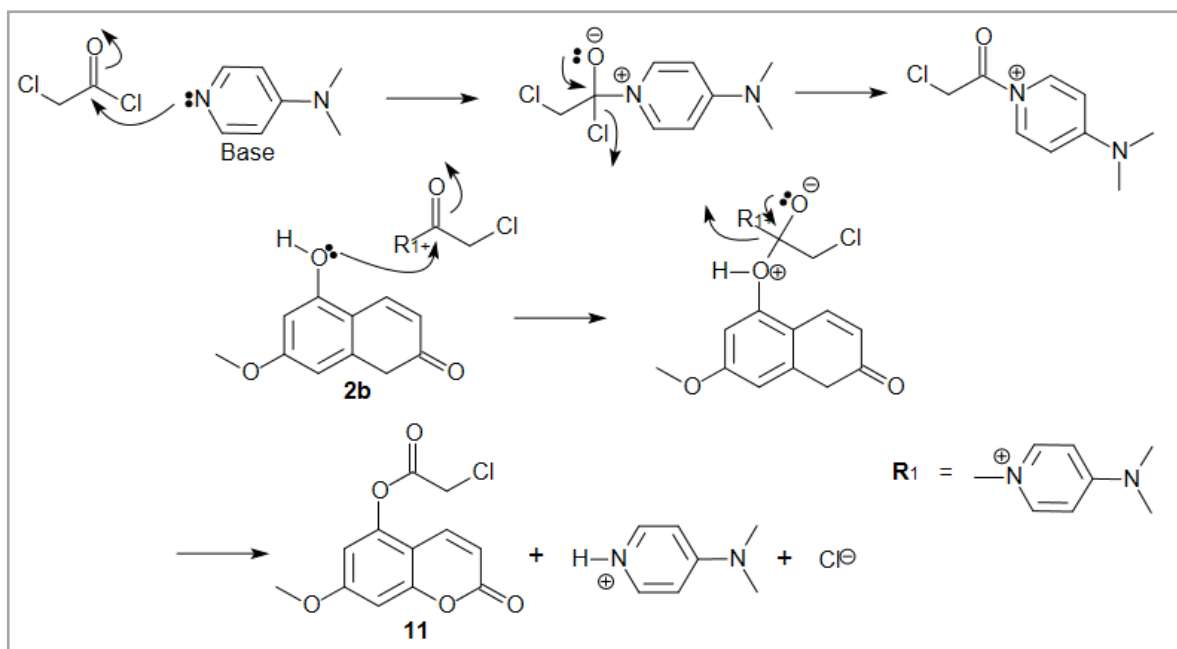
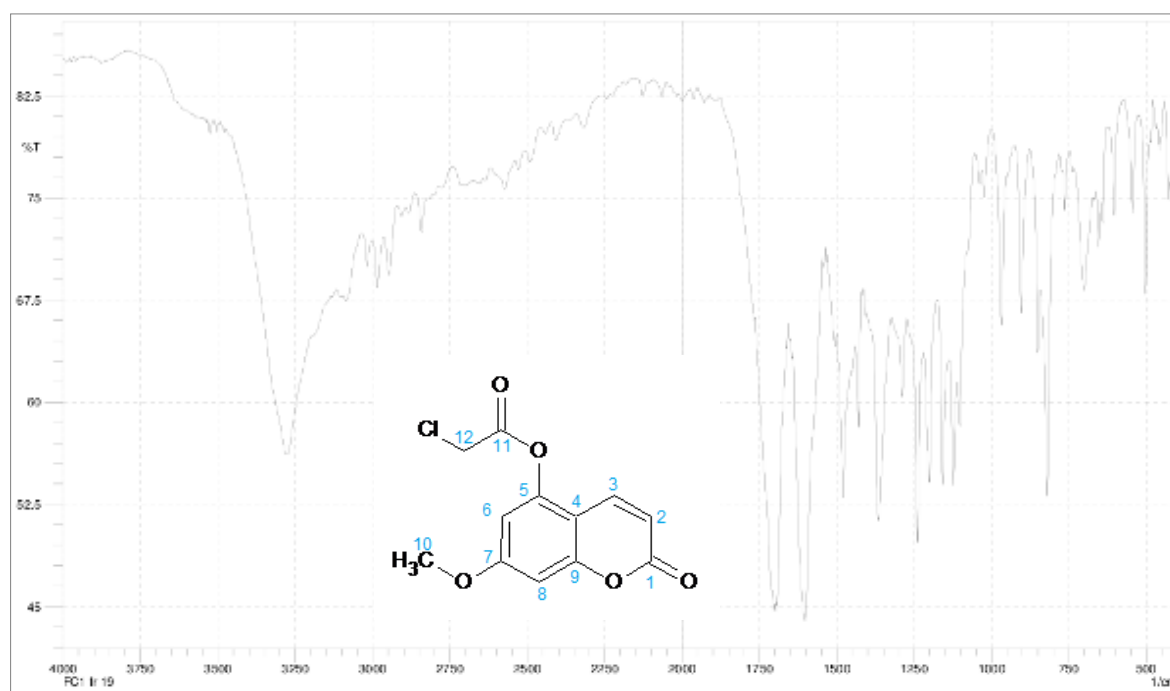
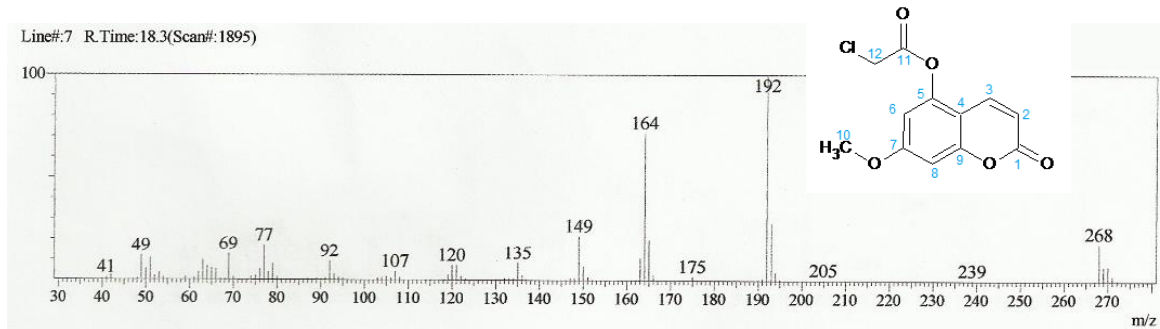


Figura 43. Mecanismo de reação para formação de 11.



Espectro 64. Espectro no IV da substância 11.



5.1 - Testes Biológicos

As substâncias 5,7-diidroxicumarina (**2a**), 7-hidroxi-5-metoxicumarina (**2b**), 5-hidroxiorsoraleno (**3**), 7-(3-bromopropoxi)-5-metoxicumarina (**4a**) e 7-(4-bromobutoxi)-5-metoxicumarina (**4b**), 5-bromopropoxiorsoraleno (**5a**) e 5-bromobutoxiorsoraleno (**5b**) (Fig. 44, p. 111) foram testadas a fim de se avaliar suas atividades de inibição de NO, inibição de TNF- α , citotoxicidade e antituberculose.

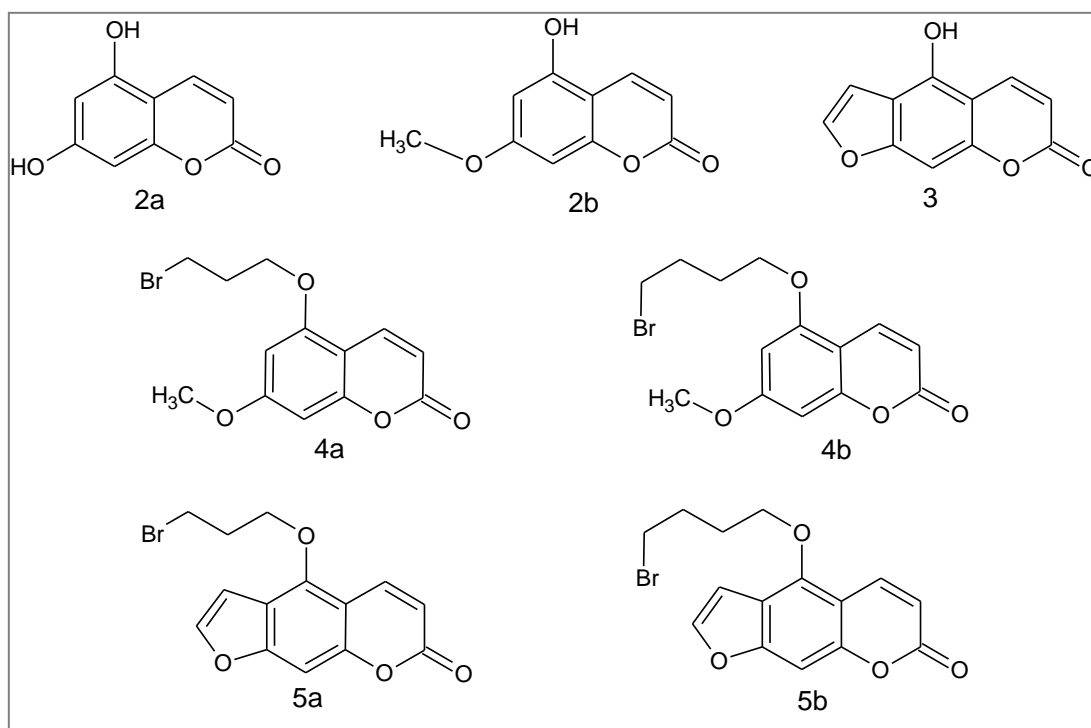


Figura 44. Estruturas das substâncias avaliadas biologicamente.

5.2.1- Produção de óxido nítrico (NO)

Os resultados obtidos nos testes foram tratados estatisticamente e expresso em gráfico de inibição da produção de NO contra a concentração da substância em $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1, p. 113 e gráfico 2, p. 113) tomando como controle positivo (100% de inibição) valores obtidos dos macrófagos não estimulados por LPS e controle negativo (0% de inibição) valores obtidos dos macrófagos estimulados por LPS e sem tratamento com as amostras.

Os gráficos mostram que as substâncias inibiram a produção de NO em mais de 60% na concentração de $100\mu\text{g/mL}$ em culturas de macrófagos (RAW 264.7) estimuladas por lipolissacarídeo (LPS).

Na concentração de $20\mu\text{g/mL}$, observa-se que as substâncias **2a, 4a, 4b e 5a** apresentaram atividade de inibição em mais de 80%. Nessa mesma concentração, as substâncias **2b, 3 e 5b** apresentaram atividades abaixo de 60% de inibição.

Em concentração de $100\mu\text{g/mL}$, as substâncias **2a, 2b, 3, 4a, 4b e 5a** apresentaram atividade de inibição em mais de 80%. Nessa mesma concentração, a substância **5b** apresentou inibição abaixo de 70%.

Esses resultados conclui que as substâncias mais ativas foram a **2a, 4a, 4b e 5a**. As menos ativas foram as substâncias **2b, 3 e 5b**.

Esses resultados indicam que as substâncias sintetizadas possuem capacidade inibitória de NO em células do sistema imune, portanto, possível atividade antiinflamatória das mesmas.

Embora os resultados indiquem atividades de inibição de NO, é necessário realizar testes mais elaborados para avaliação dos mecanismos de ação inibitória.

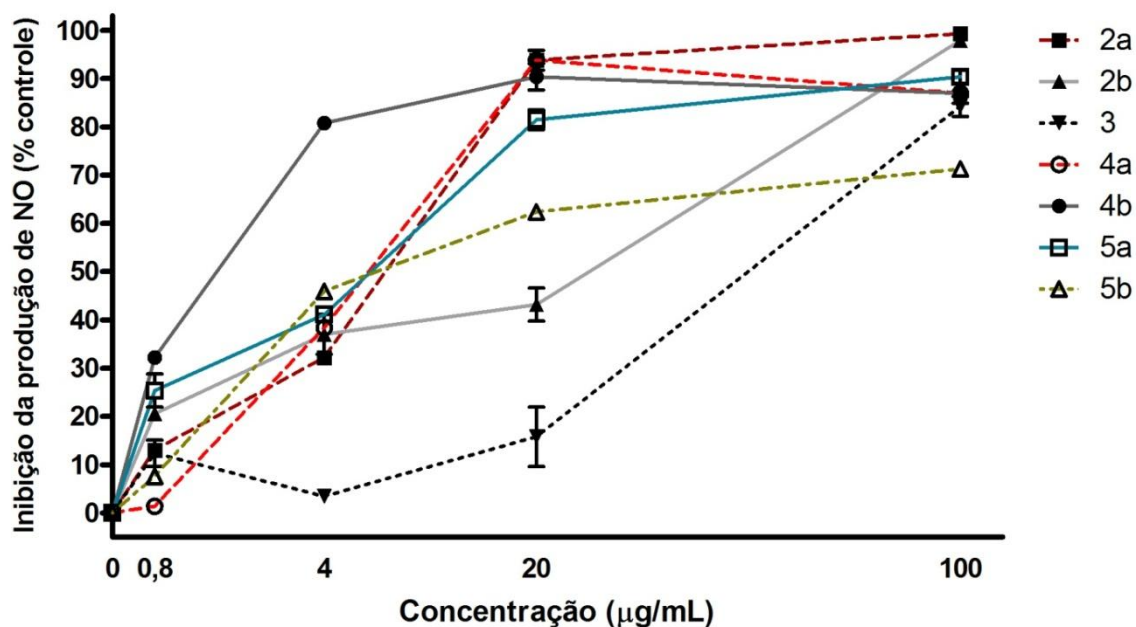


Gráfico 1. Gráfico em linhas dos resultados de inibição de NO para 5,7-diidroxicumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b)

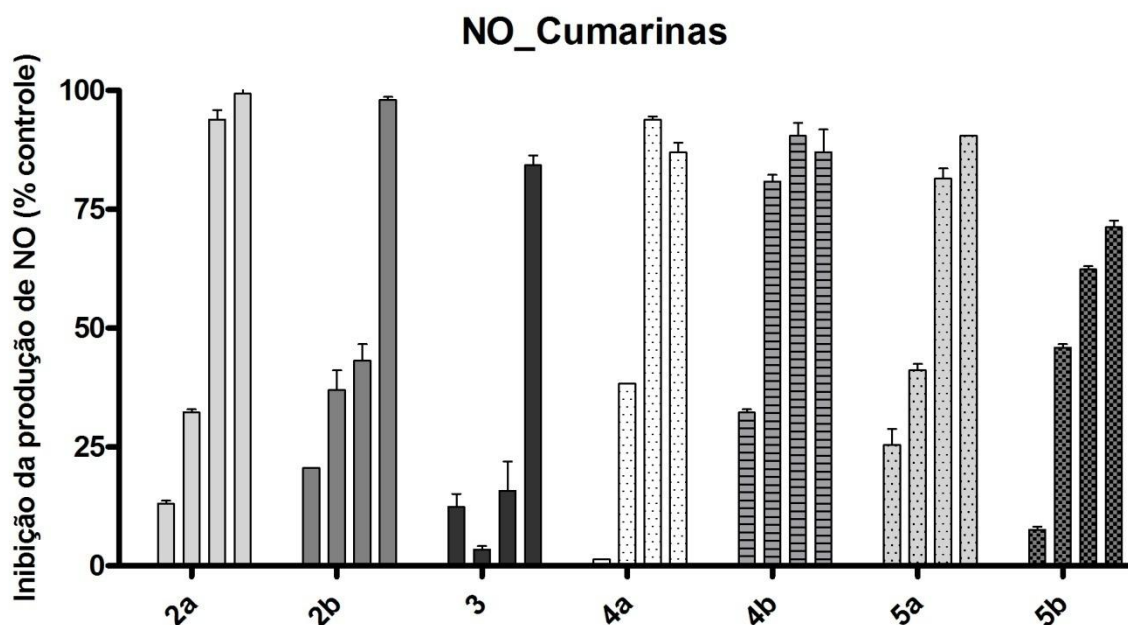


Gráfico 2. Gráfico em barras dos resultados de inibição de NO para 5,7-diidroxicumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b)

5.2.2- Produção de TNF- α

Os resultados obtidos nos testes foram tratados estatisticamente e expresso em gráfico de concentração de TNF- α contra a concentração da substância em $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 3, p. 114 e gráfico 4, p. 115) tomando como controle positivo (100% de inibição) os valores obtidos de fibroblastos não estimulados e como controle negativo (0% de inibição) os valores obtidos de fibroblastos estimulados e não tratados com as amostras.

Observa-se que os resultados para as substâncias **4a** e **4b** indicam a redução de TNF- α em mais de 50%, na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando uma capacidade antiinflamatória. As substâncias **2a** e **3** não apresentaram tal atividade durante os testes. As demais substâncias obtiveram ação antiinflamatória, reduzindo em mais de 50% TNF- α quando na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Percebe-se, com esses resultados, que a inclusão de grupos alquila na cadeia cumarínica favoreceram a ação biológica obtida no teste realizado contra TNF- α .

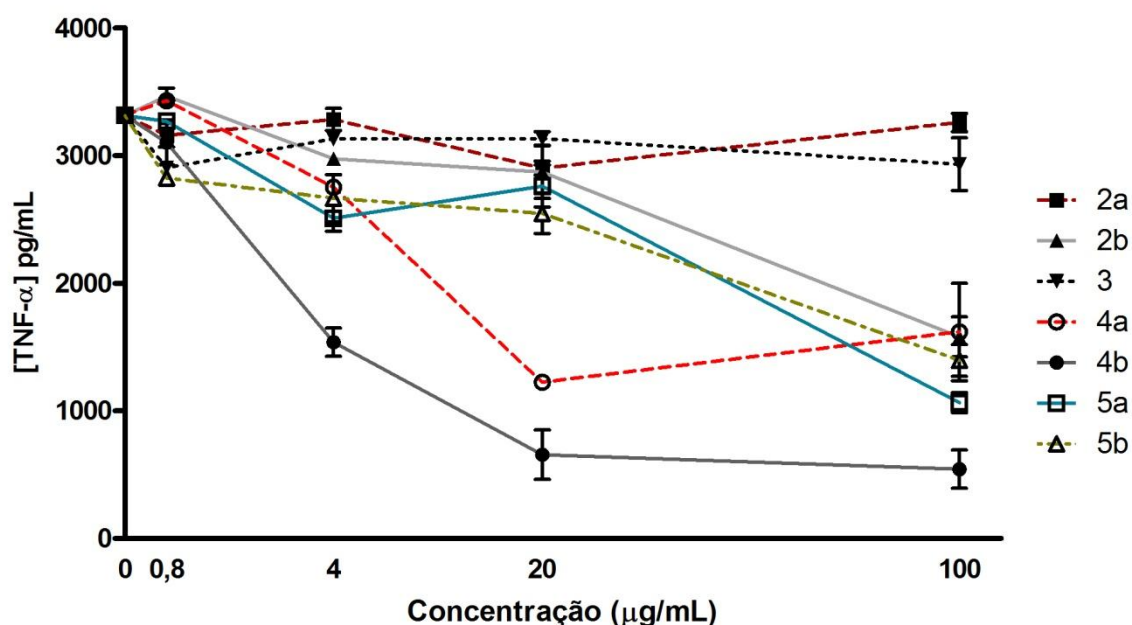


Gráfico 3. Gráfico em linhas dos resultados de inibição de TNF- α para 5,7-diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b)

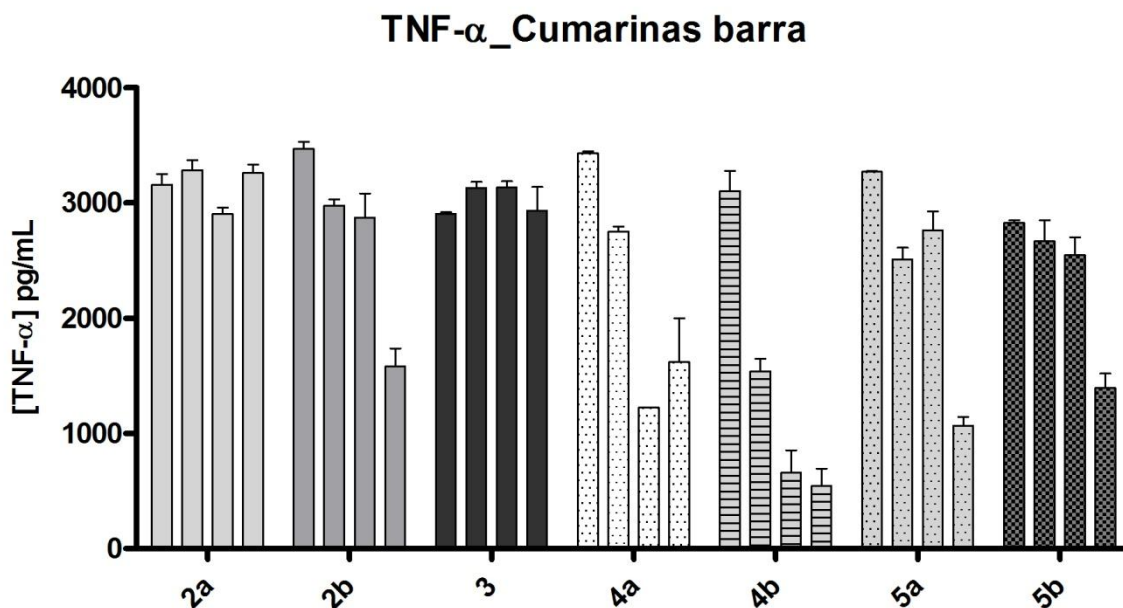


Gráfico 4. Gráfico em barras dos resultados de inibição de TNF- α para 5,7-diidroxicumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b)

5.2.3- Teste de citotoxicidade

No ensaio de MTT, o percentual de viabilidade obtido foi convertido à percentual de citotoxicidade, a fim de comparar com o método de LDH. Sendo assim, os resultados obtidos nos testes foram tratados estatisticamente e expresso em gráfico de porcentagem de citotoxicidade pelo método MTT contra a concentração da substância em ug/mL (Gráfico 5, p. 116 e gráfico 6, p. 116) tendo como controle positivos (0% de citotoxicidade) os valores obtidos de macrófagos não tratados e controle negativos (100% de citotoxicidade) os valores obtidos de macrófagos tratados com solução de Triton. Nesse teste é observado que apenas as substâncias 2a, 4a e 4b obtiveram altos valores de citotoxicidade, com mais de 80% de inibição do crescimento celular, em concentrações de 100ug/mL. As substâncias 5a e 5b apresentaram valores entre 50 e 70% de citotoxicidade indicando ação moderada em concentração de 100ug/mL. As substâncias 2b e 3 obtiveram resultados de menos de 40% de inibição, demonstrando a fraca ação citotóxica das mesmas. Em concentração de 20ug/mL apenas a substância 5b demonstrou ação citotóxica acima de 50%.

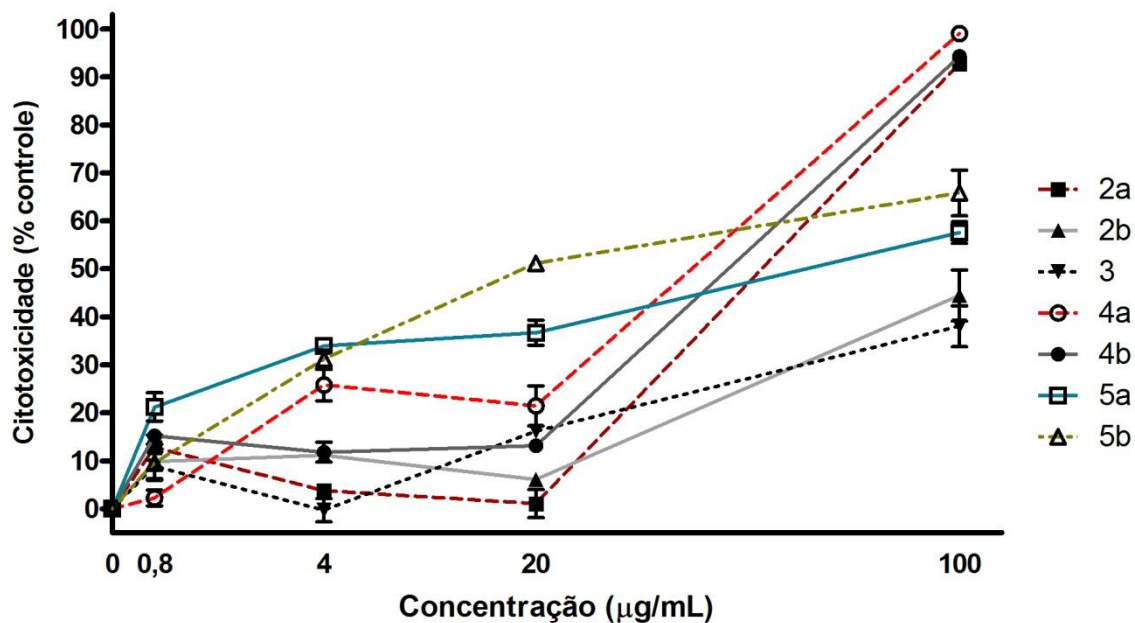


Gráfico 5. Gráfico em linhas dos resultados de citotoxicidade por MTT para 5,7-diidroxicumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b)

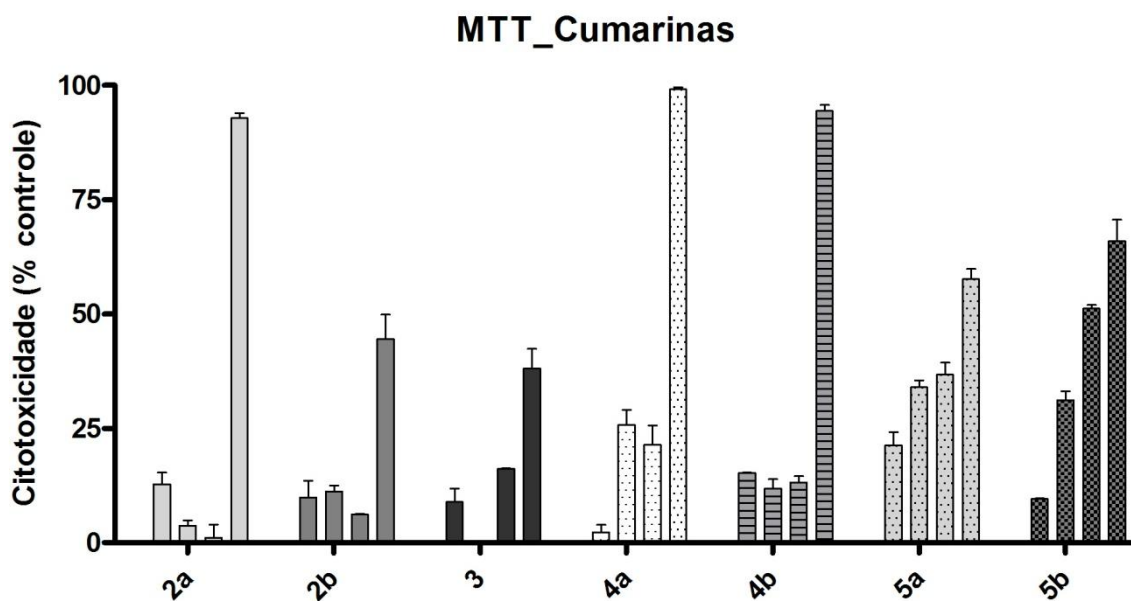


Gráfico 6. Gráfico em barra dos resultados de citotoxicidade por MTT para 5,7-diidroxicumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b).

Essas atividades citotóxicas podem ser confirmadas pelos resultados do método LDH. Os resultados de liberação de LDH foram convertidos em porcentagem de citotoxicidade e expresso no gráfico de porcentagem de citotoxicidade contra a concentração da substância em $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 7, p. 118 e gráfico 8 p. 118) tendo como controle positivos (0% de citotoxicidade) os valores obtidos de macrófagos não tratados e controle negativos (100% de citotoxicidade) os valores obtidos de macrófagos tratados com solução de Triton. Os gráficos mostram que as substâncias 2a, 4a e 4b foram as que apresentaram maior ação citotóxica (entre 60 e 80%), as substâncias 5a, 5b e 2b com ação moderada (entre 30 e 50%) e a substância 3 com fraca ação de citotoxicidade (<15%).

Dessa forma, percebe-se que as hidroxilas presentes em 2a podem influenciar na citotoxicidade. A inclusão de grupo metila, conforme em 2b, diminui a atividade citotóxica da cumarina. No entanto, a segunda substituição na posição 5 da cumarina por grupos alquilas, conforme em 4a e 4b resultou em ação citotóxica comparada à 2a.

As substâncias 5a e 5b foram às menos ativas quanto a citotoxicidade, o que pode indicar que o anel furano presente na cadeia, conforme em 3, 5a e 5b, diminui a ação citotóxica.

Embora os resultados indiquem baixa atividades de citotoxicidade de modo geral, faz-se necessário a realização novos testes, a fim de avaliar o mecanismo da ação citotóxica.

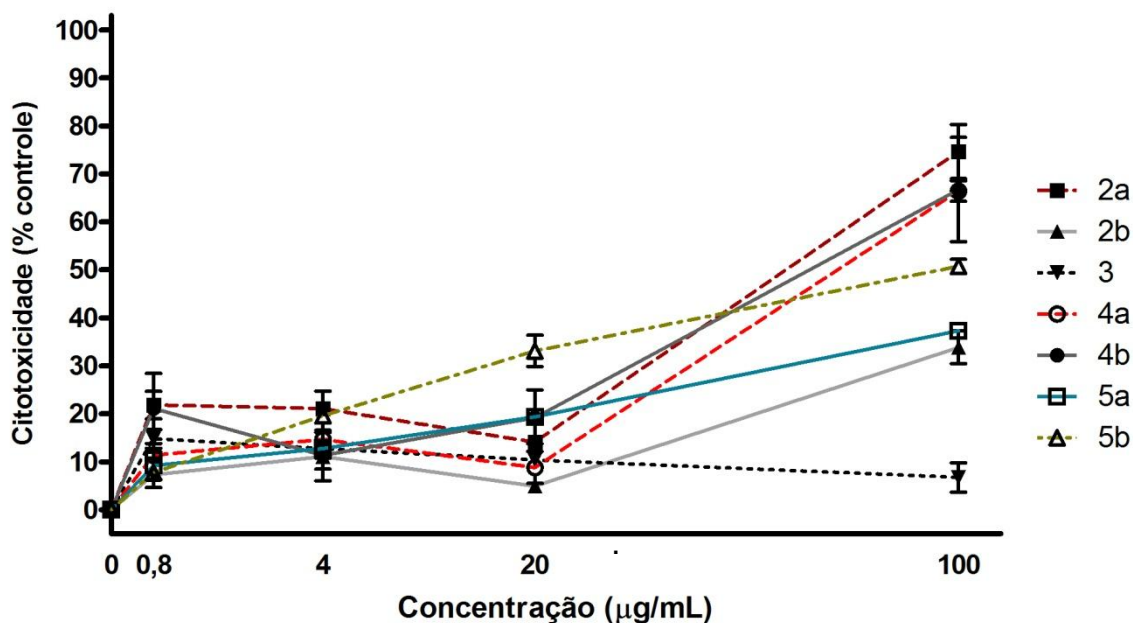


Gráfico 7. Gráfico em linhas dos resultados citotoxicidade por LDH para 5,7-diidroxicumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b).

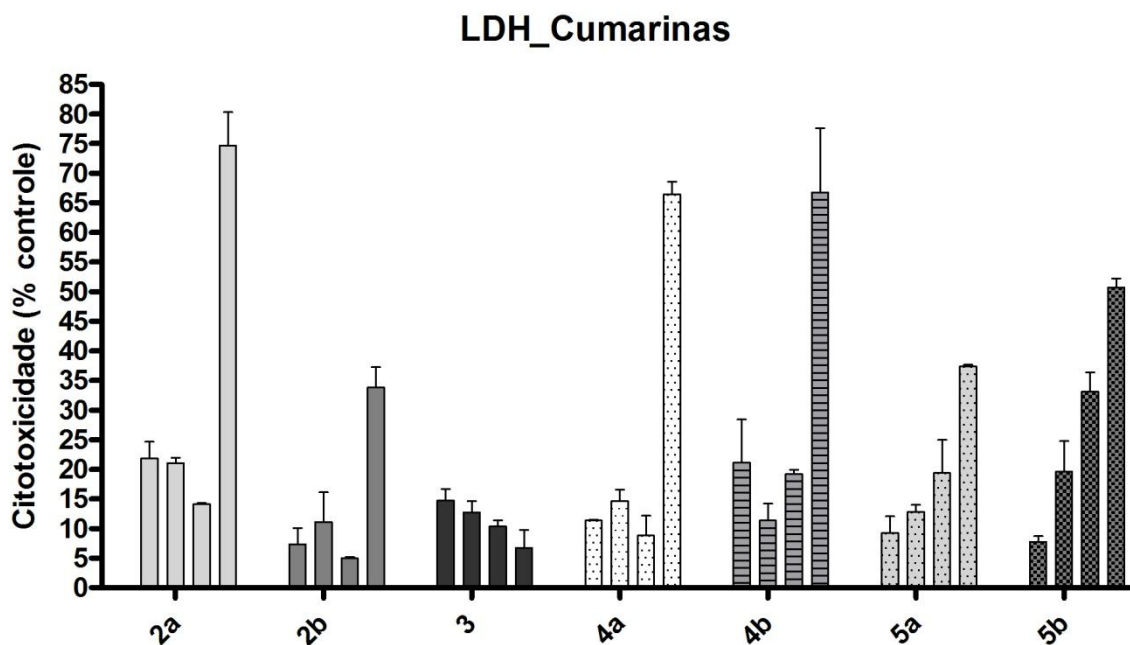


Gráfico 8. Gráfico em barra dos resultados citotoxicidade por LDH para 5,7-diidroxicumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b).

5.2.4- Teste de antimicrobiano contra *Mycobacterium bovis*

Os resultados obtidos nos testes de BCG foram tratados estatisticamente e expresso em gráfico de porcentagem de inibição do crescimento de *M. bovis* contra a concentração da substância em $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 9, p. 119 e gráfico 10, p. 120) tendo como controle positivos (100% de inibição) os valores obtidos de cultura tratada com rifampicina e controle negativos (0% de inibição) os valores obtidos de cultura não tratada com as amostras. As substâncias testadas apresentaram atividade inibitória moderada na concentração de $20\mu\text{g/mL}$, com valores de 40 a 70% de inibição e atividade satisfatória na concentração de $100\mu\text{g/mL}$, com valores acima de 90% de inibição, exceto para a substância 5b, que apresentou inibição entre 60 a 70%.

Embora os resultados sejam significativos, são necessárias novas análises para avaliar o mecanismo de ação inibitória das substâncias.

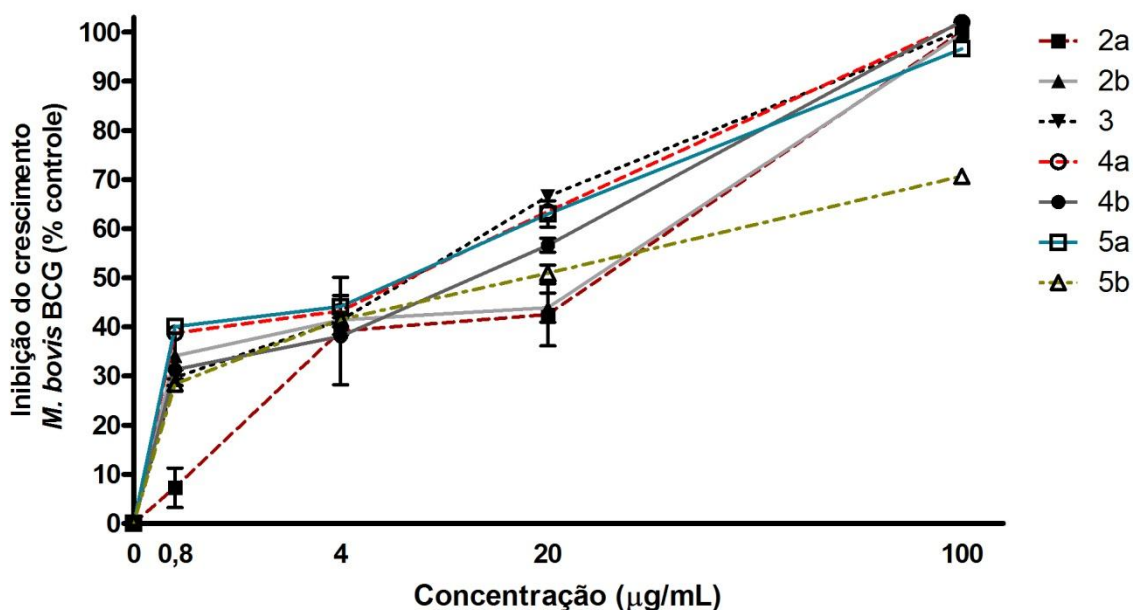


Gráfico 9. Gráfico em linhas dos resultados de atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium bovis* para 5,7-diidroxycumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b).

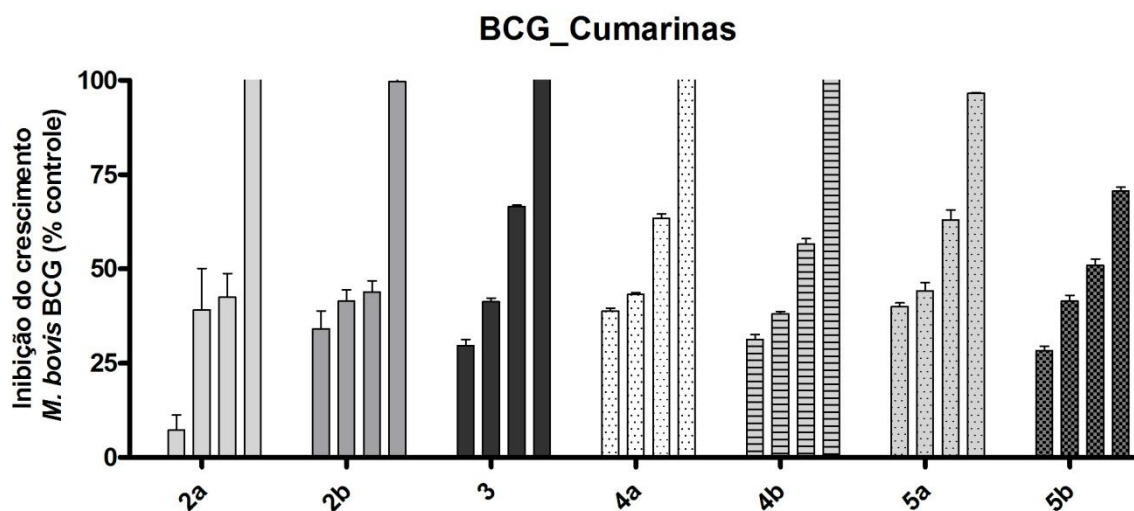


Gráfico 10. Gráfico em barras dos resultados de atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium bovis* 5,7-diidroxicumarina (2a), 5-hidroxi-7-metoxicumarina (2b), 5-hidroxipsoraleno (3), 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina (4a) e 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina (4b), 5-bromopropoxipsoraleno (5a) e 5-bromobutoxipsoraleno (5b).

6. CONCLUSÃO

Este projeto permiti concluir que as metodologias empregadas nas síntese das 3 cumarinas 5,7-diidroxycumarina, 5-hidroxi-7-metoxicumarina, 5-hidroxipsoraleno e dos 9 derivados cumarinicos inéditos 5-(3-bromopropoxi)-7-metoxicumarina, 5-(4-bromobutoxi)-7-metoxicumarina, 5-bromopropoxipsoraleno, 5-bromobutoxipsoraleno, 5-{4-[bis(2-piridinilmetil)amino]propoxi}-7-metoxicumarina, 7-(2,2-dietoxietoxi)-5-hidroxycumarina, 5,7-bis(dietoxietoxi)cumarina e 5-(dietoxietoxi)-7-metoxicumarina e 5-cloroacetóxi-7-metoxicumarina foram adequados, uma vez que essas reações se mostraram rápidas, de baixo custo e com bons rendimentos.

Os resultados das sínteses de formação do anel lactônico mostram que reação de esterificação-ciclização acontece de forma rápida e satisfatória, proporcionando bons rendimentos. O estudo dessa reação possibilitou compreender e desenvolver um mecanismo reacional, mostrando as influências do impedimento estérico do grupo metila e a importância do uso de catalisadores como $ZnCl_2$ na formação do anel lactônico.

Outra reação estudada foi a desmetilação do bergapteno, a fim de se obter o bergaptol. Essa reação se mostrou mais efetiva com o uso do ácido de Lewis BBr_3 em comparação com o uso do cloreto de piridina, uma vez que a alta temperatura e umidade prejudicam o rendimento dessa reação.

Os resultados dos testes biológicos mostraram que as substâncias avaliadas apresentaram atividades antiinflamatórias e antibacteriana contra

bactérias causadoras da tuberculose, o que se conclui que tais substâncias apresentam grande potencial para serem utilizadas em tratamento de doenças autoimunes e da tuberculose. Entretanto, são necessários testes mais avançados para maior caracterização farmacológica das substâncias antes destas serem comercializadas no mercado farmacêutico.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARBEX, M. A.; VARELLA, M. De C. L.; SIQUEIRA, H. R. De; MELLO, F. A. F. De. (2010). Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de primeira linha. J. Bras. Pneumol., 36(5): p. 626-640.

ARSHAD, A.; OSMAN, H.; BAGLEY, M. C.; LAM, C. K.; MOHAMAD, S.; ZAHARILUDDIN, A. S. M. (2011). Synthesis and antimicrobial properties of some new thiazolyl coumarin derivatives. Eur. J. Med. Chem., 46: p. 3788-3794.

ATCC – American Type Culture Collection.(2011). MTT cell proliferation assay. Disponível em <www.atcc.org>. Acesso em 22 de Agosto de 2011.

BARREIRO, E. J. (1991). A importância da síntese de fármacos na produção de medicamentos. Quím. Nova, 14(3): p. 179-188.

BEGALA, M.; DELOGU, G.; PODDA, G.; GOMEZ, J. C. G.; SANTANA L.; URIARTE, E. (2003). Atom economy. Palladium-catalyzed formation of coumarins by addition of phenols and alkynoates via a net C-H insertion. J. Am. Chem. Soc., 125: p. 4518-4526.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular

localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 303(2): p. 474-482.

BORGATTI, M.; CHILIN, A.; PICCAGLI, L.; LAMPRONTI, I.; BIANCHI, N.; MANCINI, I.; MARZARO, G.; DALL'ACQUA, F.; GUIOTTO, A.; GAMBARI, R. (2011). Development of a novel furocoumarin derivative inhibiting NF- κ B dependent biological functions: Design, synthesis and biological effects. *Eur. J. Med. Chem.*, 46: p. 4870-4877.

BRENDER, D. R., HEARST, J. E., RAPOPORT, H. (1979). Psoralen synthesis. Improvements in furano ring formation. Application to the synthesis of 4,5'-trimethylpsoralen. *J. Org. Chem.*, 44(13): p. 2176–2180.

CAMPOS, H. S. (2007). Tratamento de tuberculose. *Pulmão*, 16(1): p. 21-31.

CAMPOS-TOIMIL, M.; ORALLO, F.; SANTANAB, L.; URIARTEB, E. (2002). Synthesis and vasorelaxant activity of new coumarin and furocoumarin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12: p. 783–786.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. (2002). Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir. Bras.*, 17(6): p. 417-423.

CHANG, C.; YANG, L.; CHANG, S.; FANG, Y.; LEE, Y. (2008). Total synthesis of demethylwedelolactone and wedelolactone by Cu-mediated/Pd(0)-catalysis and oxidative-cyclization. *Tetrahedron*, 64: p. 3661-3666.

CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O. De; COSTA, S. S. (2008). Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. *Rev. Bras. Farmacog.*, 18: p. 785-797.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. (2009). Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Rev. Virtual Quim.* 1(3): p. 241-256.

DANI, C.; AGINONI, J. C.; CALLONI, G.; SALVADOR, M.; SPADA, P. D. S. (2010). Viabilidade celular de cultura de linfócitos tratados com *Annona muricata* L. Ciênc. em Movim., 7(24): p. 95-102.

DEWICK, P. M. (2002). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. School of Pharmaceutical Sciences University of Nottingham, UK. 2^a Ed., 515 páginas.

EUN, J. S.; KIM, K. S.; KIM, H. N.; PARK, S. A.; MA, T.; LEE, K. A.; KIM, D. K.; KIM, H. K.; KIM, I. S.; JUNG, Y. H.; ZEE, O. P.; YOO, D. J.; KWAK, Y. G. (2007). Synthesis of psoralen derivatives and their blocking effects on Kv1.5 channel. Arch Pharm Res, 30(2): p. 155-160.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. de O.; RODRIGUES, R. A. F. (2007). Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Multiciência (ASSER), 7.

FRESHNEY, R. I. (2001) Basic principles of cell culture. Scotland, UK: John Wiley & Sons, Inc. 21 p.

GARAZD, M. M.; GARAZD, Y. L.; OGORODNIICHUK, A. S.; KHILYA, V. P. (2009). Modified coumarins. 29. Synthesis of structural analogs of natural 6-arylfuro[3,2-g]chromen-7-ones. Chem. Nat. Compd., 45(2): p. 158-163.

GEHRKE, J.; PEREIRA, R. Z. (2007). Associação do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) com a obesidade. Rev. Bras. Obesid.Nutri.Emagrec., 1(1): p. 1-10.

GLICKMAN, M.; JACOBS, W. R. (2001). Microbial pathogenesis review of mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline. Cell, 104: p. 477-485.

GÜRSÓY, A.; KARALI, N.; (2003). Synthesis, Characterization and Primary Antituberculosis Activity Evaluation of 4-(3-Coumarinyl)-3-benzyl-4-thiazolin-2-one Benzylidenehydrazones. Turk J. Chem., 27: p. 545-551.

HALLAND, N.; HANSEN, T.; JORGENSEN, K. A. (2003). Organocatalytic asymmetric Michael reaction of cyclic 1,3-dicarbonyl compounds and α,β -

unsaturated ketones—a highly atom-economic catalytic one-step formation of optically active warfarin anticoagulant. *Angew. Chem. Int.*, 42: p. 4955–4957.

HAMDI, N.; PASSARELLI, V.; ROMEROSA, A. (2011). Synthesis, spectroscopy and electrochemistry of new 4-(4-acetyl-5-substituted-4, 5-dihydro-1, 3,4-oxodiazol-2-yl)methoxy)-2H-chromen-2-ones as a novel class of potential antibacterial and antioxidant derivatives. *Comptes.Rendus.Chim.*, 14: p. 548–555.

HOWARTH, P. H.; BABU, K. S.; ARSHAD, H. S.; LAU, L.; BUCLDEY, M.; MCCONNELL, W.; BECKETT, P.; ALI, M. A.; CHAUHAN, A.; WILSON, S. J.; REYNOLDS, A.; DAVIES, D. E.; HOLGATE, S. T. (2005). Tumour necrosis factor (TNF α) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax*, 60: p. 1012-1018.

JANG, Y.; SYU, S.; CHEN, Y.; YANG, M.; LIN, W. (2012). Syntheses of Furo[3,4-c]coumarins and Related Furyl Coumarin Derivatives via Intramolecular Wittig Reactions. *Org. Biom. Chem.*, 10: p. 843-847.

JANIN, Y. L. (2007). Antituberculosis drugs: ten years of research. *Bioorg. Med. Chem.*, 15: p. 2479–2513.

KALITA, P.; KUMAR, R. (2011). Solvent-free coumarin synthesis via Pechmann reaction using solid catalysts. *Microporous Mesoporous Mater.*, 149: p. 1–9.

KAWAII, S.; TOMONO, Y.; KATASE, E.; OGAWA, K.; YANO, M. (1999). Isolation of furocoumarins from bergamot fruits as HL-60 differentiation-inducing compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47: p. 4073-4078.

KOSTOVA, I. (2005). Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, 5: p. 29-46.

KOSTOVA, I.; NIKOLOVA, I. (2006). Stability of Neodymium(III) Complexes of 4-Hydroxycoumarins with Anticoagulant Activity. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.*, 1(2): p. 30-35.

KUMAR, A.; GUPTA, M. K.; KUMAR, M. (2011). An efficient non-ionic surfactant catalyzed multicomponent synthesis of novel benzylamino coumarin derivative via Mannich type reaction in aqueous media. *Tetrahedron Lett.*, 52: p. 4521–4525.

LAKE, B. G. (1999). Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food Food Chem. Toxicol.*, 37: p. 423-453.

LEE, Y. R. (1995). A concise new synthesis of angular furanocoumarins: angelicin, oroselone & oroselol. *Tetrahedron*, 51(11): p. 3087-3094.

LEÓN, D. A.; ZUMÁRRAGA, M. J.; OROPEZA, R. J.; GIOFFRÉ, A. K.; BERNARDELLI, A.; ESTÉVEZ, H. O.; CATALDI, A. A.; PANDO, R. H. (2009). *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 157: p. 139–147.

LIMA, N. (2008). Varfarina: uma revisão baseada na evidência das interações alimentares e medicamentosas. *Rev. Port. Clin. Geral*, 24: p. 475-482.

LIPEEVA, A. V.; SHUL'IS, E. E.; SHAKIROV, M. M.; TOLSTIKOV, G. A. (2011). Plant Coumarins: V.* Palladium-Catalyzed Amination of 2-(1,3-Dibromopropan-2-ylidene)oreoselone. *Russ. J. Org. Chem.*, 46(12): p. 1858–1868.

LIU, G.; XUE, H.; MA, T.; CHEN, Z.; WANG, L. (2010). Tetriacyclodipyranyl coumarins and the anti-hiv and anti-tuberculosis uses thereof. *European Patent Application EP 2 216 335 A1*.

LYADOVA, I. V.; TSIGANOV, E. N.; KAPINA, M. A.; SHEPELKOVA, G. S.; SOSUNOV, V. V.; RADAIEVA, T. V.; MARJOROV, K. B.; SHMITOVA, N. S.; HAM, H. Van Den; GANUSOV, V. V.; BOER, R. J. De; RACINE, R.; WINSLOW, G. M. (2010). In mice, tuberculosis progression is associated with intensive inflammatory response and the accumulation of Gr-^{1dim} cells in the lungs. *PLoS One*, 5: p. 1-16.

MAGIATIS, P.; MELLIU, E.; SKALTSOUNIS, A.; MITAKU, S.; LÉONCE, S.; RENARD, P.; PIERRÉ, A.; ATASSI, G. (1998). Synthesis and Cytotoxic Activity of Pyranocoumarins of the Seselin and Xanthyletin Series. *J. Nat. Prod.*, 61: p. 982-986.

MARQUES, M. F. (2006). Estudo da resposta imunológica induzida por *Arnica montana* L. Tese de Doutorado em Análises Clínicas. Universidade Estadual Paulista – UNESP. 112 p.

MELLIU, E.; MAGIATIS, P.; MITAKU, S.; SKALTSOUNIS, A.; CHINO, E.; CHINO I. (2005). Natural and Synthetic 2,2-Dimethylpyranocoumarins with Antibacterial Activity. *J. Nat. Product*, 68: p. 78-82.

MENDES, A. A. M. (2001). Avaliação em larga escala do diclofenaco colestiramina em lesões traumáticas agudas. *Rev. Bras. Med.*, 58(4): p. 249-256.

MIOLO, G.; MORO, S.; VEDALDI, D.; CAFFIERI, S.; GUIOTTO, A.; DALL'ACQUA, F. (1999). New benzoquinolizin-5-one derivatives as furocoumarin analogs: DNA-interactions and molecular modeling studies. *Il Farmaco*, 54: p. 551–561.

MONTEIRO, V. de F. F. (1999). Estudo Fitoquímico de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). Dissertação em Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense – RJ, 164 páginas.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. de M.; METSAVAHT, L. (2010). Farmacologia de drogas vasoativas. *Acta Fisiatr*, 17(1): p. 22 – 27.

MUZITANO, M. F.; TINOCO, L. W.; GUETTE, C.; KAISER, C. R.; ROSSIBERGMANN, B.; COSTA, S. S. (2006). The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochem.*, 67: p. 2071-2077.

NARASIMHAN, B.; KUMAR, P.; SHARMA, D. (2010). Biological activities of hydrazide derivatives in the new millennium. *Acta Pharm. Sci.*, 52: p. 169-180.

NUNES, C. Dos R.; FREITAS, W. R.; VENTURA, T. L. B.; KANASHIRO, M. M.; MUZITANO, M. F.; OLIVEIRA, D. B. De; (2011). Inibição da produção de óxido nítrico e efeito citotóxico de extrato aquoso de *Annona muricata*. Ciênc. Bio. Saúde, 1(2): 1-8.

NUNES, E. Dos R.; NASCIMENTO, J. W. L.; ANTONIALLI, M. M. S.; MENEZES, F. G. De. (2006). Estudo dos usos de medicamentos anti-inflamatórios em drogaria da região de Guarulhos (SP). ConScientiae Saúde, 5: p. 83-89.

NYUCHEV, A. V.; SHARONOVA, E. A.; LENSINA, N. A.; SHAVYRIN, A. S.; LOPATIN, M. A.; BALALAEVA, I. V.; BELETSKAYA, I. P.; FEDORAV, A. Y. (2011). Synthesis of fluorescent coumarin triazolylglycosides. Tetrahedron Lett., 52: p. 4196–4199.

ODA, K.; NISHIZONO, N.; TAMAI, Y.; YAMAGUCHI, Y.; YOSHIRURA, T.; WADA, K.; MACHIDA, M. (2005). An efficient synthesis of bergapten. Heterocyc., 65(8): p. 1985-1988.

OYAMADA, J.; KITAMURA, T. (2011). Synthesis of coumarins by Pt-catalyzed hydroarylation of propiolic acids with phenols. Tetrahedron, 62: p. 6918–6925.

PATEL, D.; PATEL, N.; KUMARI, P.; PATEL, N. (2011). Synthesis and Characterization of Some New Azetidin-2-ones Containing Coumarin Moiety and Their Antimicrobial Study. Int. J. Chem., 3: p. 117-123.

PICCAGLI, L.; BORGATTI, M.; NICOLIS, E.; BIANCHI, N.; MANCINI, I.; LAMPRONTI, I.; VEVALDI, D.; DALL'ACQUA, F.; CABRINI, G.; GAMBARI, R. (2010). Virtual screening against nuclear factor κ B (NF- κ B) of a focus library: Identification of bioactive furocoumarin derivatives inhibiting NF- κ B dependent biological functions involved in cystic fibrosis. Bio. Med. Chem., 18: p. 8341–8349.

RANGANATH, Y. S.; BABU, V. H.; SANDEEP, G.; PARAMESHWAR, R. (2011). Synthesis and evaluation of some novel furocoumarin derivatives for

radical scavenging profile and cytotoxic studies. *J Chem. Pharm. Res.*, 3(4): p.62-68.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. (2003). Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat. Res.*, 6(3): p. 317-320.

ROW, E. C.; BROWN, S. A.; STACHULSKI, A. V.; LENNARD, M. S. (2006). Design, synthesis and evaluation of furanocoumarin monomers as inhibitors of CYP3A4. *Org. Biomol. Chem.*, 4: p. 1604-1610.

RYAN, J. A. (2008)
Introduction to animal Cell Culture. Corning Life Sciences. Technical Bulletin. Disponível no site da Corning Life Sciences. Endereço eletrônico:
["www.corning.com/lifesciences"](http://www.corning.com/lifesciences).

SAENZ-MÉNDEZ, P.; GUEDES, R. C.; SANTOS, D. J. V. A. dos; ERIKSSON, L. A. (2007). Theoretical Study of Sequence Selectivity and Preferred Binding Mode of Psoralen with DNA. *Res. Lett. Physical. Chem.*, p. 1-5.

SANDHYA, B.; GILES, D.; MATHEW, V.; BASAVARAJASWAMY, G.; ABRAHAM, R. (2011). Synthesis, pharmacological evaluation and docking studies of coumarin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 46: p. 4696-4701.

SITRÂNGULO JR., C. J. (2011). Eficácia da troxerrutina + cumarina no tratamento das varizes dos membros inferiores. Moreira JR Editora. Disponível em: www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=4627&fase=imprime. Acesso em 16-11-2011.

SOUZA, M. V. N. De. (2009). A tuberculose e o desenvolvimento de novos tuberculostáticos em Farmanguinhos (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro. *Rev. Virtual Quim.*, 1(1): p. 9-16.

SOUZA, S. M. de. (2005). Atividade Antibacteriana de Cumarinas Naturais e Derivados. Dissertação em Microbiologia e Parasitologia. Universidade Federal De Santa Catarina-SC, 94 páginas.

TORRES, R. P. (2010). A dinâmica do Mercado farmacêutico brasileiro segundo o modelo das estratégias genéricas de Porter. Soc. Contab. Gest, 5: p. 118-132.

TRAVEN, V. F. (2000). Dihydrofurocoumarinones - new useful intermediates for substituted and condensed furocoumarins. Arkivoc, 4: p. 523-562.

TRAVEN, V. F.; KRAVTCHENKO, D. V.; CHIBISOVA, T. (1997). The first synthesis of furocoumarin dimmers. Mendeleev Commun., 7(6): p. 249–250.

TRAVEN, V. F.; SAKHARUK, I. I.; KRAVCHENKO, D. V.; IVASHCHENKO, A. V. (2001). Dihydrofuro[2,3-h]coumarin-9-one–synthon in the synthesis of 6-substituted angelicins. Chem. Heterocycl. Compd., 37(3): p. 283-293.

VENNEKAMP, J.; WULFF, H.; BEETON, C.; CALABRESI, P. A.; GRISSMER, S.; HANSEL, W.; CHANDY, K. G. (2004). Kv1.3-Blocking 5-Phenylalkoxypsoralens: A New Class of Immunomodulators. Mol. Pharmacol., 65(6): p. 1364–1374.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. (2006). Os produtos naturais e a química medicinal moderna. Quim. Nova, 29(2): p. 326-337.

VITALE, R. F., et al (2007). O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no Processo de Erosão Óssea Presente no Colesteatoma Adquirido da Orelha Média. Rev. Bras. Otorrinolaringol., V. 73, No. 1, p. 123-127.

WULFF, H.; RAUER, H.; DÜRING, T.; HANSELMANN, C.; RUFF, K.; WRISCH, A.; GRISSMER, S.; HÄNSEL, W. (1998). Alkoxypsoralens, Novel Nonpeptide Blockers of Shaker-Type K⁺ Channels: Synthesis and Photoreactivity. J. Med. Chem., 41: p. 4542-4549

XIE, L.; TAKEUCHI, Y.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. (1999). Anti-AIDS Agents. 37.1 Synthesis and Structure-Activity Relationships of (3 ϕ R,4 ϕ R)-(+)-cis-

Khellactone Derivatives as Novel Potent Anti-HIV Agents. *J. Med. Chem.* 42: p. 2662-2672.

YADAV, P.; PUROHIT, N. V. (2011). Synthesis and antibacterial action of some new isocoumarin derivatives. *Der. Pharm. Chem.*, 3(3): p. 189-199.

ZAVRŠNIK, D.; MURATOVIĆ, S.; MAKUC, D.; PLAVEC, J.; CETINA, M.; NAGL, A.; CLERCQ, E. De; BALZARINI, J.; MINTAS, M. (2011). Benzylidene-bis-(4-hydroxycoumarin) and benzopyrano-coumarin derivatives: synthesis, ¹H/¹³C-NMR conformational and X-ray crystal structure studies and *in vitro* antiviral activity evaluations. *Molecules*, 16: p.6023-6040.

ZHOU, X.; CHEN, Y.; WANG, T.; WANG, X.; KONG, L. (2011). Rational Design, Synthesis, Biological Evaluation, Homology and Docking Studies of Coumarin Derivatives as α_1 -Adrenoceptor Antagonists. *Chem. Biodiversity*, 8: p.1052-1064.