



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 – Alfenas/MG – CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



ISRAEL APARECIDO ROSA

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS CUMARÍNICOS COM
POTENCIAL LEISHMANICIDA E ANTITUMORAL**

ALFENAS/MG

2014

ISRAEL APARECIDO ROSA

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS CUMARÍNICOS COM
POTENCIAL LEISHMANICIDA E ANTITUMORAL**

Dissertação, para obtenção do título de mestre, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração: Química Orgânica. Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos. Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho.

ALFENAS-MG

2014

Rosa, Isael Aparecido.

Planejamento e síntese de derivados cumarínicos com potencial leishmanicida e antitumoral / Isael Aparecido Rosa, Alfenas. - 2014. 125 f. -

Orientador: Marcelo Henrique dos Santos
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.
Bibliografia.

1. Cumarinas. 2. Leishmania. 3. Câncer . I. Santos, Marcelo Henrique dos. II. Título.

CDD: 547

ISAEL APARECIDO ROSA

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS CUMARÍNICOS
COM POTENCIAL LEISHMANICIDA E ANTITUMORAL**

A Banca examinadora, abaixo-assinada,
aprova a dissertação apresentada como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Química pela
Universidade Federal de Alfenas. Área de
Concentração: Química Orgânica.

Aprovado em: 21/02/2014

Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Assinatura: 

Prof. Dr. Alberto de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Assinatura: 

Prof. Dr. Fábio Antônio Colombo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Assinatura: 

Alfenas-MG
2014

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Maria Aparecida e JoseAntonio**, sem os quais jamais teria conseguido vencer mais esta luta.*

*Ofereço este trabalho, com amor, a minha esposa **Karina**, pelo companheirismo e apoio durante todo o tempo da minha graduação e de mestrado.*

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

Agradecimentos

Este estudo só se tornou possível pela colaboração de algumas pessoas e órgãos a quem gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde para a batalha do dia-a-dia. Sem ele, nunca conseguiria forças para finalizar este Mestrado. Agradeço pela sublime presença em minha vida, por me fortalecer nas angústias, por me enriquecer nos momentos de exaustão, por me ajudar a vencer todas as dificuldades encontradas na trajetória e principalmente por me iluminar com sua sabedoria o verdadeiro valor das minhas aspirações;

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) pela oportunidade oferecida.

Ao Professor Dr. Marcelo Henrique dos Santos pela orientação e amizade durante todos estes anos. Obrigado pela oportunidade.

Ao Professor Dr. Diogo Teixeira Carvalho pela co-orientação, pela confiança depositada na área científica, pelas correções e discussões deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Marisa Ionta pela parceria nos ensaios de avaliação da atividade antitumoral. Muito obrigado pela dedicação e parceria.

Ao Pós-Doc. Claudinei Alves da Silva pela amizade e atenção nos momentos difíceis de trabalho.

A todos os amigos ligados ao Grupo de Oração Universitário bem como todos os participantes do Movimento Universidades Renovadas pelos momentos de descontração, fortalecimento pessoal e ORAÇÃO.

Ao grupo do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da UNIFAL-MG, pelo auxílio e infraestrutura disponibilizada. Em especial ao Professor Dr. Marcos José Marques que disponibilizou seu Laboratório para realização dos ensaios leishmanicidas e auxílio na análise dos resultados obtidos; a Letícia e a Karina, pela ajuda e colaboração, e principalmente pela amizade que construímos.

Ao grupo do Laboratório de Biologia Animal Integrativa(LABAIInt) da UNIFAL-MG, pelo auxílio e infraestrutura disponibilizada.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da UNIFAL-MG, pela amizade, momentos de alegria: Carlinha, Claudinha, Vanessa Gontijo, Éderson, Francieli, Paloma, Larissa, Kris, Bianca, Cláudia Mara, Maria Cecília e Danielle. Em especial a Aline, Jaqueline e Ítalo.

À auxiliar de limpeza do LFQM Glorinha pela grande amizade, sorrisos e pelo cafezinho.

À aluna de iniciação científica Eduarda Cardoso Marinho pelo apoio oferecido durante os experimentos, sem você este trabalho não seria possível, muito obrigada pela colaboração.

Aos professores, funcionários e colegas do programa de Pós-Graduação em Química pela colaboração na realização do Mestrado.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro e àCAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

As cumarinas são amplamente utilizadas na indústria como intermediários sintéticos de agrotóxicos, medicamentos e produtos farmacêuticos. Elas são alvo de contínuas investigações de interesse biológico devido a propriedades, tais como: anti-HIV, antituberculose, anti-influenza, contra Doença de Alzheimer, anti-inflamatório, antimicrobiana, imunossupressora e antimelanogênica. Neste trabalho são descritas as sínteses dos derivados metilados, butilados, glicolisados e prenilados das cumarinas, seguido da caracterização por técnicas espectroscópicas e espectrométricas (IV, RMN e EM). Quatorze derivados de cumarina foram sintetizados a partir de 4-fenil-7-hidroxicumarina (1), 4-(4-cloro-fenil)-7-hidroxicumarina (11) e 4-(4-fluorfenil)-7-hidroxicumarina (14), obtidos por modificações em C-7, sendo que três substâncias (9, 13 e 16) são inéditas e foram avaliadas suas atividades frente a linhagens de células tumorais, leishmanicida nas formas promastigota e amastigota de cepas de *Leishmania amazonenses* e citotoxicidade em macrófagos. No teste de atividade antitumoral, os resultados mais significativos foram dos compostos 8 e 9. Esses foram efetivos na inibição da proliferação celular e foram capazes de induzir apoptose em células A549. Esta atividade pode estar relacionada ao substituinte éster, uma vez que a estrutura de partida (1) não apresentou tal atividade. No teste leishmanicida, os derivados somente apresentaram atividade relevante contra as formas promastigotas, sendo os compostos 3 e 7 cerca de 2,5 vezes mais ativos que o precursor e com atividade tão eficaz quanto anfotericina B. Os resultados obtidos sugerem que a variação da lipofilicidade da molécula é um ponto importante para a atividade biológica e que algumas modificações estruturais realizadas nas cumarinas levaram a derivados mais potentes, seletivos e pouco tóxicos.

Palavras-chave: cumarinas, *Leishmania amazonenses*, câncer.

ABSTRACT

Coumarins are widely used in industry as synthetic intermediates of pesticides, drugs and pharmaceuticals. They are the subject of ongoing investigations of biological interest because of properties such as: anti-HIV, antituberculosis, anti-influenza, anti-Alzheimer disease, anti-inflammatory, anti-microbial, immunosuppressive and anti-melanogenic. In this work the derivatives synthesis methylated, butylated, glycosylated and prenylated of coumarin were prepared, followed by characterization by spectroscopic and spectrometric techniques (IR, NMR and MS). Fourteen coumarin derivatives were synthesized from 7-hydroxy-4-phenylcoumarin (1), 7-dihydro-4-(4-chlorophenyl)coumarin (11) and 7-hydroxy-4-(4-fluorophenyl)coumarin (14) and have evaluated their activities against tumor cell lines, leishmanicide in promastigote and amastigote forms of *Leishmaniaamazonensis* strains and cytotoxicity in macrophages. In the anti-tumor activity test, the most significant results were for the 8 and 9 compounds. They were effective in inhibiting cell and capable of inducing apoptosis in A549 cell proliferation. This activity may be related to the ester substituent, once the starting structure showed not such activity. In leishmanicide test, only the derivatives showed significant activity against promastigotes, and compounds 3 and 7, about 2.5 times more activity than its precursor (1) and activity as effective as amphotericin B. The results suggest that the variation of the lipophilicity of the molecule is an important point for biological activity and that some structural changes made to coumarin derivatives led to more potent, selective and less toxic.

Keywords: Coumarins, *Leishmania*, Cancer.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Diversidade de manifestações clínicas na leishmaniose tegumentar americana..	21
FIGURA 2 - Ciclo de vida de <i>Leishmania spp</i>	21
FIGURA 3 - Núcleo cumarínico.....	25
FIGURA 4 - Derivados cumarínicos com atividade leishmanicida.....	28
FIGURA 5- Via biossintética do ácido chiquímicoao ácido cinâmico.....	29
FIGURA 6 - Isomerização cis/trans e formação da cumarina.....	30
FIGURA 7 - Hidroxilaçãoà cadeia lateral para síntese da 7-hidroxycumarina.....	30
FIGURA 8 - Origem biossintética de cumarinas e derivados.....	31
FIGURA 9 - Estrutura das cumarinas: (a) simples, (b) furanocumarina, (c) piranocumarinalinear, (d) piranocumarina angular, (e) biscumarina e (f) tricumarina.....	32
FIGURA 10 - Reação de obtenção do núcleo cumarínico pela reação de Von Pechmann.....	33
FIGURA 11 - Reação de obtenção do núcleo cumarínico pela reação de Knoevenagel.....	33
FIGURA 12 - Reação de obtenção do núcleo cumarínico pela reação de Perkin.....	33
FIGURA 13 - Reação de obtenção do núcleo cumarínico pela reação de Kadnikov.....	33
FIGURA 14 - Retrossíntese da 4-fenil-7- <i>O</i> -prenilcumarina.....	35
FIGURA 15 - 4-Fenil-7-hidroxycumarina.....	37
FIGURA 16 - Esquema de síntese dos derivados cumarínicos.....	38
FIGURA 17 - 1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -acetil- β -D-glicopirranose.....	40
FIGURA 18 - Brometo de 2,3,4,6-penta- <i>O</i> -acetil- β -D-glicopirranose.....	40
FIGURA 19 - 4-Fenil-7-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosiloxi)cumarina, 4-fenil-7-(β -D-glucopiranosiloxi)cumarina.....	41
FIGURA 20- Mecanismo proposto de formação da 4-fenil-7-hidroxycumarinaadaptado de Daru(2011).....	47
FIGURA 21 - Derivados da 4-fenil-7-hidroxycumarina.....	48
FIGURA 22 - Derivado 1.....	49
FIGURA 23 - Espectro no infravermelho do derivado 1 (KBr).....	50
FIGURA 24 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 1 a 400 MHz, em DMSO - d_6	51
FIGURA 25 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 1 a 50 MHz, em DMSO - d_6	51
FIGURA 26 - Subespectro DEPT 135 do derivado 1 a 50 MHz, em DMSO - d_6	52

FIGURA 27 - Espectro de Massas do derivado 1 obtido por MALDI-TOF.....	53
FIGURA 28 - Derivado 2.....	53
FIGURA 29 - Espectro no infravermelho do derivado 2(KBr).....	54
FIGURA 30 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 2 a 400 MHz, em CDCl_3	55
FIGURA 31 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 2 a 100 MHz, em CDCl_3	56
FIGURA 32 - Subespectro DEPT 135 do derivado 2 a 100 MHz, em CDCl_3	56
FIGURA 33 - Espectro de massas da 4-fenil-7- <i>O</i> -metilcumarina obtido por MALDI-TOF..	57
FIGURA 34 - Derivado 3.....	57
FIGURA 35 - Espectro no infravermelho do derivado 3 (KBr).....	58
FIGURA 36 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 3 a 400 MHz, em CDCl_3	59
FIGURA 37 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 3 a 100 MHz, em CDCl_3	60
FIGURA 38 - Subespectro DEPT 135 do derivado 3 a 100 MHz, em CDCl_3	60
FIGURA 39 - Espectro de massas do derivado 3 obtido por MALDI-TOF.....	61
FIGURA 40 - Derivado 7.....	61
FIGURA 41 - Espectro no infravermelho do derivado 7 (KBr).....	62
FIGURA 42 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 7 a 400 MHz, em CDCl_3	64
FIGURA 43 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 7 a 100 MHz, em CDCl_3	64
FIGURA 44 - Subespectro DEPT 135 do derivado 7 a 100 MHz, em CDCl_3	65
FIGURA 45 - Espectro de massas do derivado 7 obtido por MALDI-TOF.....	65
FIGURA 46 - Derivado 6.....	66
FIGURA 47 - Espectro de infravermelho do derivado 6.....	67
FIGURA 48 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 6 a 400 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$	68
FIGURA 49 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 6 a 100 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$	68
FIGURA 50 - Subespectro DEPT 135 do derivado 6 a 100 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$	69
FIGURA 51 - Espectro de Massas do derivado 6 obtido por MALDI-TOF.....	70
FIGURA 52 - Derivado 8.....	70
FIGURA 53 - Espectro de infravermelho do derivado 8 (KBr).....	71
FIGURA 54 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 8 a 400MHz, em CDCl_3	72
FIGURA 55 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 8 a 100MHz, em CDCl_3	73
FIGURA 56 - Subespectro DEPT 135 do derivado 8 a 100MHz, em CDCl_3	73
FIGURA 57 - Espectro de massas do derivado 8 obtido por MALDI-TOF.....	74
FIGURA 58 - Derivado 9.....	74
FIGURA 59 - Espectro de infravermelho do derivado 9 (KBr).....	75
FIGURA 60 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 9 a 400 MHz, em CDCl_3	76

FIGURA 61 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 9 a 100 MHz, em CDCl_3	77
FIGURA 62 - Subespectro DEPT 135 do derivado 9 a 100 MHz, em CDCl_3	77
FIGURA 63 - Espectro de massas do derivado 9 obtido por MALDI-TOF.....	78
FIGURA 64 - Derivado 10.....	78
FIGURA 65 - Espectro de infravermelho do derivado 10 (KBr).....	79
FIGURA 66 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 10 a 200 MHz, em CDCl_3	80
FIGURA 67 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 10 a 50 MHz, em CDCl_3	81
FIGURA 68 - Subespectro DEPT 135 do derivado 10 a 50 MHz, em CDCl_3	81
FIGURA 69 - Derivado 11.....	82
FIGURA 70 - Espectro de infravermelho do derivado 11 (KBr).....	83
FIGURA 71 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 11 a 300 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$	84
FIGURA 72 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 11 a 75 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$	84
FIGURA 73 - Subespectro DEPT 135 do derivado 11 a 75 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$	85
FIGURA 74 - Espectro de Massas do derivado 11 obtido por MALDI-TOF.....	85
FIGURA 75 - Derivado 12.....	86
FIGURA 76 - Espectro de infravermelho do derivado 12 (KBr).....	87
FIGURA 77 -Espectro de RMN de ^1H do derivado 12 a 200 MHz, em CDCl_3	88
FIGURA 78 -Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 12 a 50 MHz, em CDCl_3	88
FIGURA 79 - Subespectro DEPT 135 do derivado 12 a 50 MHz em CDCl_3	89
FIGURA 80 - Derivado 13.....	89
FIGURA 81 - Espectro de infravermelho do derivado 13 (KBr).....	90
FIGURA 82 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 13 a 200 MHz, em CDCl_3	91
FIGURA 83 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 13 a 50 MHz em CDCl_3	92
FIGURA 84 - Subespectro DEPT 135 do derivado 13 a 50 MHz, em CDCl_3	92
FIGURA 85 - Espectro de Massas do derivado 13 obtido por MALDI-TOF.....	93
FIGURA 86 - Derivado 14.....	93
FIGURA 87 - Espectro de infravermelho do derivado 14 (KBr)	94
FIGURA 88 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 14 a 200 MHz, em DMSO	95
FIGURA 89 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 14 a 50MHz, em $\text{DMSO}-d_6$	96
FIGURA 90 - Subespectro DEPT 135 do derivado 14 a 50 MHz em $\text{DMSO}-d_6$	96
FIGURA 91 - Espectro de Massas do derivado 14 obtido por MALDI-TOF.....	97
FIGURA 92 - Derivado 15.....	97
FIGURA 93 - Espectro de infravermelho do derivado 15 (KBr).....	98
FIGURA 94 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 15a 200MHz, em CDCl_3	99

FIGURA 95- Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 15 a 100 MHz, em CDCl_3	100
FIGURA 96- Subespectro DEPT 135 do derivado 15.....	100
FIGURA 97- Espectro de Massas do derivado 15 obtido por MALDI-TOF.....	101
FIGURA 98 - Derivado 16.....	101
FIGURA 99 - Espectro de infravermelho do derivado 16 (KBr).....	102
FIGURA 100 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 16 a 400 MHz em CDCl_3	103
FIGURA 101 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 16 a 100 MHz, em CDCl_3	104
FIGURA 102- Subespectro DEPT 135 do derivado 16 a 100 MHz, em CDCl_3	104
FIGURA 103 - Espectro de Massas do derivado 16 obtido por MALDI-TOF.....	105
FIGURA 104- Viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico (MTS). Linhas de células MCF- 7 e Hs578T tratadas por 48h com os diferentes compostos a 40 μmol	106
FIGURA 105 - Viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico (MTS). Linhas de células A549 tratadas por 48h com os diferentes compostos a 40 μM	108
FIGURA 106 - Viabilidade celular relativa determinada por ensaio de MTS. As culturas de células foram tratadas com o composto por 48 horas.....	108
FIGURA 107 - Determinação das populações de células viáveis e não viáveis realizada por exclusão com azul de Tripano, após 24h e 48h de tratamento com 8 e 9 a 40 μmol . * p \square 0,05 de acordo com análise de variância e teste de Tukey.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ – Deslocamento químico

δ_C – Deslocamento químico do carbono

δ_H – Deslocamento químico do hidrogênio

cm – Centímetros

DMF - Dimetilformamida

DMSO – d_6 – Dimetilsulfóxido deuterado

Hz – Hertz

IC₅₀ – Concentração inibitória que causa 50% do efeito

IV – Infravermelho

J – Constantes de acoplamento

LABiQ – Laboratório interdisciplinar de Química (UNIFAL-MG)

LAREMAR - Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (UFMG)

LC – Leishmaniose cutânea

LFQM – Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (UNIFAL-MG)

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose visceral

nm – Nanômetro

ppm - Partes por milhão

RMN de ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono

RMN de ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

TMS – Tetrametilsilano

v/v – Volume por volume

λ – Comprimento de onda

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Compostos utilizados no tratamento de leishmaniose.....	23
Tabela 2- Atividades farmacológicas de cumarinas.....	26
Tabela 3- Propriedades físicas dos derivados cumarínicos.....	39
Tabela 4- Derivados cumarínicos sintetizados.....	48
Tabela 5- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 1..	50
Tabela 6- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 2...	55
Tabela 7- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 3...	59
Tabela 8- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 7....	63
Tabela 9- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 6....	67
Tabela 10- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 8..	72
Tabela 11- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 9..	76
Tabela 12- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 10...	80
Tabela 13- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 11...	83
Tabela 14- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 13...	87
Tabela 15- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 14....	91
Tabela 16- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 14...	95
Tabela 17- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 15.....	99
Tabela 18- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 16.....	103
Tabela 19- Os valores de IC_{50} (μM) calculados a partir dos resultados obtidos por ensaio de MTS.....	108
Tabela 20- Populações celulares determinadas pelo ensaio de Anexina V/ iodeto de propídio (IP) em amostras tratadas com 8 ou 9 por 48h	110
Tabela 21- Estrutura química, a atividade biológica contra ambas as formas de <i>L. amazonensis</i> de derivados de cumarina, em comparação com a anfotericina B.....	111

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Câncer.....	19
2.2	Leishmaniose.....	20
2.3	Plantas medicinais como fonte de fármacos.....	24
2.4	Cumarinas.....	25
2.4.1	Biossíntese.....	28
2.4.2	Estrutura e Classificação.....	31
2.4.3	Síntese de cumarinas.....	32
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Objetivos gerais.....	34
3.1.2	Objetivos específicos.....	34
4	PLANEJAMENTO.....	35
5	PARTE EXPERIMENTAL.....	36
5.1	Materiais, Métodos e Equipamentos.....	36
5.2	Síntese dos derivados.....	37
5.2.1	Síntese da 4-fenil-7-hidroxicumarina (1), 4-(4-Cloro-fenil)-7-hidroxicumarina (11),4-(4-fluorfenil)-7-hidroxicumarina (14).....	37
5.2.2	Procedimento geral para síntese dos derivados cumarínicos.....	38
5.2.3	Síntese da 1, 2, 3, 4, 6-penta- <i>O</i> -acetil- β -D-glicopirranose (4).....	39
5.2.4	Síntese do brometo de 2, 3, 4, 6-penta- <i>O</i> -acetil- β -D-glicopirranose (5).....	40
5.2.5	Síntese da 4-fenil-7-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosiloxi)cumarina (7) e 4-fenil-7-(β -D-glucopiranosiloxi)cumarina(6).....	40
5.3	Ensaio Biológicos.....	42
5.3.1	Atividade antitumoral.....	42
5.3.1.1	Linhagens celulares e condições de cultivo.....	42
5.3.1.2	Viabilidade celular.....	42
5.3.1.2.1	Ensaio colorimétrico (MTS).....	42
5.3.1.2.2	Ensaio de Exclusão por azul de tripano.....	43
5.3.1.3	Ensaio de Anexina V.....	43

5.3.2	Atividade Leishmanicida.....	44
5.3.2.1	Ensaio da atividade antipromastigota.....	44
5.3.2.2	Ensaio da atividade anti-amastigota.....	44
5.3.2.3	Avaliação Citotóxica.....	44
5.4	Análise estatística.....	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6.1	Síntese e caracterização dos derivados cumarínicos.....	46
6.1.1	Síntese da 4-fenil-7-hidroxicumarina.....	46
6.1.2	Síntese dos derivados da 4-fenil-7-hidroxicumarina.....	48
6.1.2.1	Elucidação estrutural das substâncias sintetizadas.....	49
6.1.3	Ensaio de Atividade Antitumoral “In Vitro”.....	105
6.1.3.1	Determinação da viabilidade Celular.....	105
6.1.4	Testes Antiparasitários.....	110
6.1.4.1	Atividade leishmanicida contra as formas promastigotas e amastigotas de <i>L.(L.)amazonensis</i>	110
7	CONCLUSÕES.....	114
	REFERÊNCIAS.....	116

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são derivados de diversas fontes, como plantas, animais, micro-organismo, insetos, invertebrados marinhos, entre outros (BAKER *et al.*, 2007). Os metabólitos secundários provenientes destes diversos tipos de organismos têm sido uma fonte muito importante para a descoberta de novos compostos que são utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos ou serem utilizados como protótipos de novas entidades bioativas.

O desenvolvimento das técnicas espectroscópicas e metodologias cada vez mais modernas para o isolamento e a elucidação das estruturas moleculares de fontes naturais têm favorecido a descoberta de novas substâncias bioativas, que, até pouco tempo, eram identificadas de forma complexa (BRANDÃO *et al.*, 2010).

A obtenção de um novo fármaco é um processo longo, difícil, dispendioso e arriscado, no qual o planejamento inicial são etapas cruciais. As fontes para a obtenção de fármacos são variadas e neste contexto destaca-se a síntese de produtos naturais e seus análogos, que tem sido explorada já há algum tempo e considerada muito importante para a descoberta de novos agentes terapêuticos (NEWMAN; CRAGG, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2012). As cumarinas e seus derivados têm sido amplamente estudados porque apresentam diferentes propriedades biológicas, as quais incluem atividade antitumoral e leishmanicida (KIM *et al.*, 2004; MANIDHAR *et al.*, 2012; SAKUNPAK *et al.*, 2013). Estudos mostram que o padrão de substituição na estrutura química básica da cumarina pode influenciar suas propriedades bioquímicas e farmacológicas (MUSA; COOPERWOOD; KHAN, 2008). Assim sendo, a síntese de análogos sintéticos de cumarinas podem contribuir para a identificação de novos fármacos que possam melhorar as propostas terapêuticas para o câncer e para as doenças negligenciáveis.

O câncer representa a segunda causa de morte da população mundial. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), surgem anualmente mais de dez milhões de novos casos, sendo que em 2008 foram registradas 7,6 milhões de mortes (WHO, 2013). Nos países desenvolvidos, a taxa de mortalidade é superada apenas pelas doenças cardiovasculares e o índice tende a aumentar nos próximos anos (SAKLANI; KUTTY, 2008; GARÓFOLO *et al.*, 2004). Tendo em vista a elevada incidência de câncer no mundo e a alta taxa de mortalidade, torna-se necessária a identificação de compostos que sejam mais efetivos no seu combate.

Quanto às atividades das cumarinas frente às doenças negligenciáveis, pode-se destacar a atividade antiprotozoária contra *Leishmania major*, *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi* (SCHMIDT *et al.*, 2012) e como a leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, que ameaça cerca de 350 milhões de homens, mulheres e crianças em 98 países ao redor do mundo, e acredita-se que 12 milhões estão infectados, sendo aproximadamente 1 a 2 milhões de novos casos por ano, nosso trabalho vem colaborar com uma série de derivados com atividade leishmanicida (WHO, 2014).

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo a síntese, caracterização e avaliação da atividade antitumoral e leishmanicida de derivados cumarínicos, visando um aumento da atividade biológica por meio de modificações estruturais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

O processo de carcinogênese é complexo e envolve várias modificações no fenótipo celular que são decorrentes principalmente de modificações genéticas, embora alterações epigenéticas também estejam associadas ao fenótipo maligno (SADIKOVIC *et al.*, 2008). Células cancerosas apresentam alterações na expressão de genes que controlam de forma direta ou indireta a progressão do ciclo celular, fato que contribui para a intensa atividade proliferativa dessas células. Além disso, há alteração no perfil de expressão de genes associados tanto à capacidade de invasão como à resistência aos sinais de morte (BHATT *et al.*, 2010 COSTELLO; FRANKLIN, 2012).

Os vários estágios associados ao processo de carcinogênese compreendem iniciação, promoção e progressão. Os eventos que ocorrem ao longo desses estágios estão relacionados principalmente às alterações em duas categorias gênicas: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (BOYD; BARRETT, 1990; KLAUNIG *et al.*, 2010). Os oncogenes representam cópias mutadas dos proto-oncogenes, os quais codificam proteínas que regulam positivamente o ciclo celular. Por outro lado, os genes supressores de tumor codificam proteínas que atuam inibindo a progressão do ciclo celular. Assim sendo, os mecanismos que regulam a progressão do ciclo celular são alterados na célula tumoral, fato determinante para a proliferação descontrolada. Vale ressaltar que os produtos codificados por oncogenes apresentam ganho de função, enquanto mutações nos genes supressores de tumor levam à perda de atividade dos seus produtos proteicos (CHO; MYERS, 2008).

A resistência à apoptose constitui uma característica importante da célula tumoral e pode ser decorrente de alterações quantitativas e/ou qualitativas em proteínas-chave que regulam a apoptose (FUDA; ARDEHALI, B; LIS, 2009). Muitas das clivagens proteolíticas que ocorrem durante a execução da apoptose dependem da ativação de uma família de proteases dependentes de cisteína, as caspases. Em geral, a ativação de caspases representa um estágio crítico no processo apoptótico. Em humanos, das 12 caspases descritas, seis (caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10) estão relacionadas à apoptose (HENGARTNER, 2000), sendo que as caspases 8,9 e 10 são caspases iniciadoras, enquanto que as caspases 3, 6 e 7 são caspases executoras.

O processo apoptótico pode ser iniciado pela via extrínseca, a qual envolve os receptores de morte, presentes na superfície celular; ou pela via intrínseca, desencadeada por agentes que alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial. Com consequência, há liberação de citocromo C e ativação da caspase 9, uma caspase iniciadora que, posteriormente, ativa caspases executoras (KAUFMANN; EARNSHAW, 2000).

A identificação de compostos com atividade pró-apoptótica em células tumorais é extremamente relevante na pesquisa contra o câncer. Atualmente, muitos dos agentes terapêuticos usados no tratamento do câncer são efetivos por induzir apoptose nas células malignas (KAMAL *et al.*, 2007). Nos últimos anos tem aumentado o conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na ativação, execução e regulação da apoptose. Dessa forma, é possível identificar compostos que atuem de maneira mais específica no combate ao câncer .

Considerando que o câncer é uma das principais causas de morte no mundo (cerca de 13% de todas as mortes, em 2008) (WHO, 2013; GLOBOCAN, 2012; IARC, 2010) e que, segundo os dados da OMS, a estimativa aponta para mais 13,1 milhões de mortes até 2030 (WHO, 2012) é essencial a busca por novos compostos que possam contribuir efetivamente no combate à doença.

2.2 Leishmaniose

Dentre as doenças infecciosas no Brasil, se encontra a leishmaniose, que constitui um problema sério para a saúde pública do país. A leishmaniose é uma das 17 doenças tropicais negligenciadas (DTNs) que representam as doenças mais comuns das pessoas mais pobres do mundo (HOTEZ; SAVIOLI; FENWICK, 2012). A doença foi relatada em 88 países em cinco continentes (VAN ASSCHE *et al.*, 2011), dos quais 16 são países desenvolvidos, 72 estão em desenvolvimento, e 13 deles estão entre os menos desenvolvidos (BHARGAVA; SINGH, 2012). A evolução da doença é dividida em várias formas clínicas: a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), a leishmaniose visceral (LV) (Figura 1-D), também conhecida como Kala-azar (VAN ASSCHE *et al.*, 2011) e leishmaniose dérmica pós-Kala-azar (PKDL) (BEATTIE; KAYE, 2011).

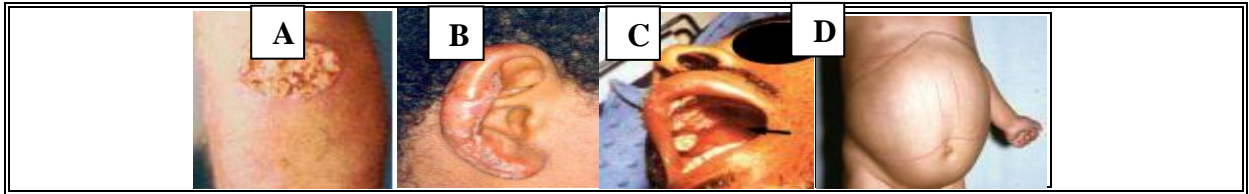


FIGURA 1- Diversidade de manifestações clínicas na leishmaniose tegumentar americana.

- A) Forma cutânea
- B) Forma difusa
- C) Forma mucosa
- D) Forma visceral

Fonte: Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana (BRASIL, 2010).

A leishmaniose é uma doença parasitária que acomete o homem, causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que mantêm o seu ciclo de vida (Figura 2) através de transmissão entre um inseto (flebotomíneo) e um hospedeiro mamífero (KAYE; SCOTT, 2011). O parasita existe em duas formas distintas: uma forma promastigota, encontrada no vetor, e uma forma amastigota, que se desenvolve no meio intracelular no hospedeiro mamífero susceptível (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

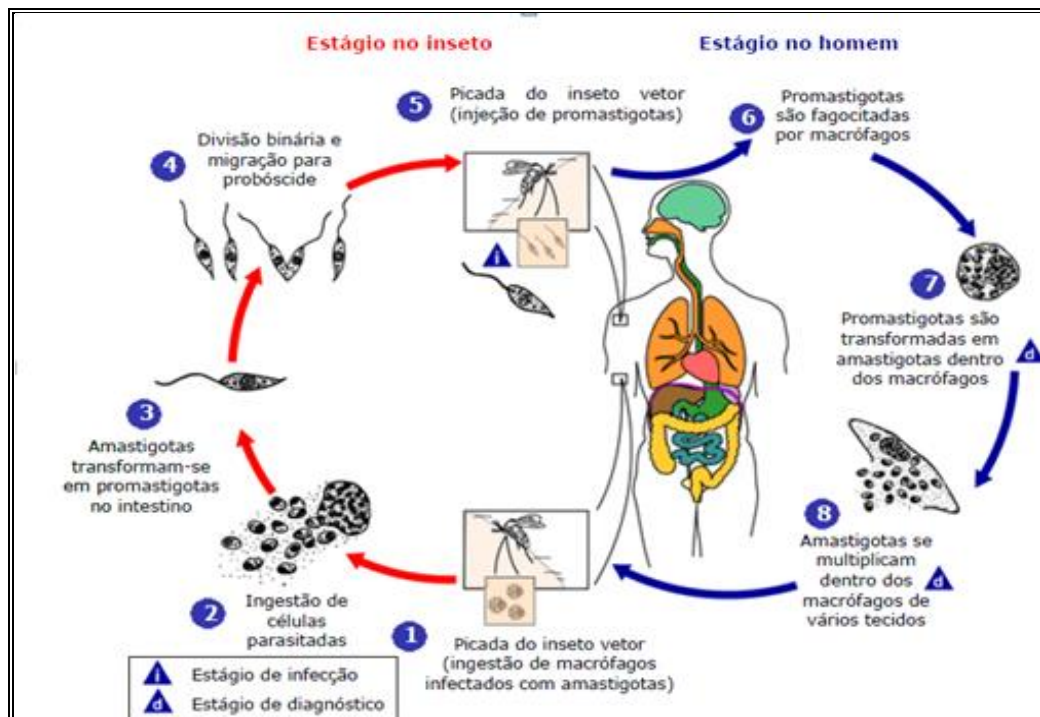


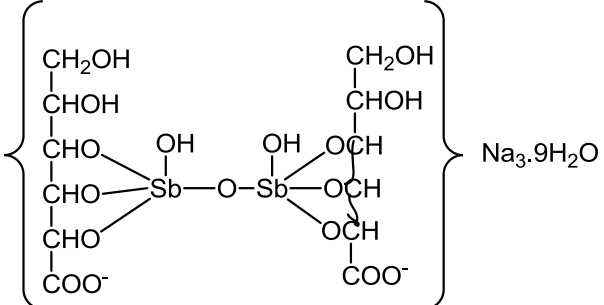
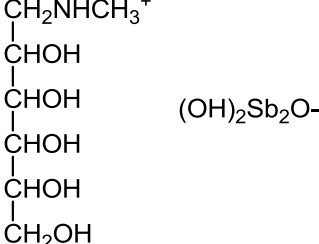
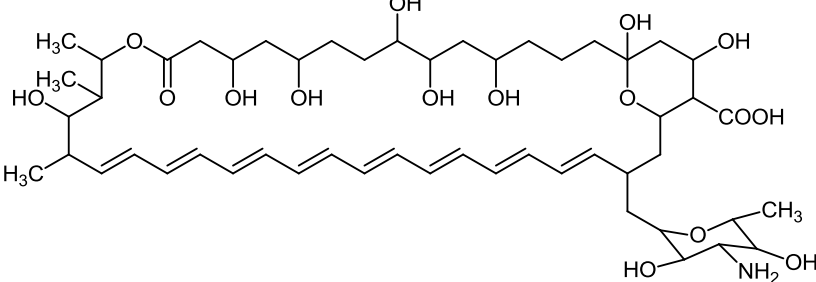
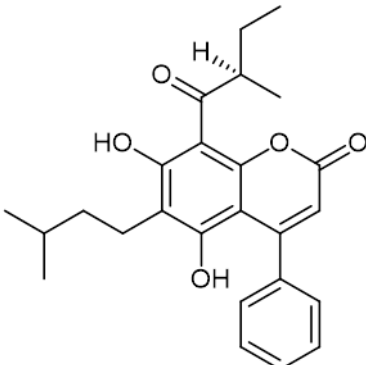
FIGURA2 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention.

Opções de tratamento atuais para a leishmaniose (Tabela 1) incluem antimônio pentavalente (estibogluconato de sódio ou de meglumina), o polienoanfotericina B (na forma de sal ou de desoxicolato de uma formulação lipossomal), a miltefosina (SEIFERT *et al.*, 2012).

Como alternativas aos tratamentos convencionais, os compostos naturais têm sido utilizados no tratamento de diversas doenças tropicais provocadas por parasitas, tais como os agentes causadores da tripanossomíase, leishmaniose, esquistossomose, filariose e oncocercíase (VIEIRA *et al.*, 2001; NDJONKA *et al.*, 2013). Estudos têm demonstrado que as cumarinas apresentam atividade significativa contra a *Leishmania*. Dentre os compostos pertencentes à classe das cumarinas podemos destacar a 7-*O*-geranilcumarina (Figura 4-b), que apresentou inibição significativa do crescimento do parasita *Leishmania major* (NAPOLITANO *et al.*, 2004). Outro tipo de cumarina é a (-) mammea A/BB (Tabela 1), purificada a partir de um extrato bruto de folhas de *Calophyllum brasiliense*, que mostrou uma atividade significativa contra as duas formas de *L. amazonensis*, e recentemente foi utilizada para tratamento de lesões em modelos animais (BRENZAN *et al.*, 2008; TIUMAN *et al.*, 2012). Este estudo nos encorajou a investigar a atividade leishmanicida de novos derivados cumarínicos sintéticos.

Tabela1-Compostos utilizados no tratamento de leishmaniose

Estrutura	Nome químico/comercial
	Estibogluconato de sódio
	Meglumina
	Anfotericina B
$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_2\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Miltefosina
	Cumarina (-) mammaea A/BB

Fonte: SEIFERT *et al.* (2012); BRENZAN *et al.* (2008).

2.3 Plantas medicinais como fonte de fármacos

As plantas medicinais têm sido uma abundante fonte para obtenção de moléculas para serem analisadas terapêuticamente. Vários estudos têm enfatizado o impacto que os produtos naturais apresentam na produção de terapias antibióticas e anticancerígenas (PFEIFER, 2008).

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção de grande soma das substâncias orgânicas conhecidas e vem do reino vegetal maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura científica. E tudo isso seria a ação direta de milhões de anos de evolução, levando a um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (MONTANARI *et al.*, 2005).

Essa diversidade de metabólitos secundários foi utilizada pelas antigas civilizações, seja na forma de extratos ou chás, da mesma forma que é utilizada pela população de muitos países pobres e em desenvolvimento que não têm acesso a medicina moderna para o tratamento de suas enfermidades (KUSTER; ROCHA 2003).

Segundo os dados da OMS (WHO, 2013), aproximadamente 65% a 80% da população mundial não têm acesso ao atendimento primário de saúde e com isso recorre à medicina popular, especialmente às plantas medicinais, na procura do alívio para muitas doenças (CALIXTO, 2003; KVIECINSKI, 2007).

Segundo Nogueira e colaboradores (2009), historicamente, a busca de novos candidatos a fármacos, tendo os produtos naturais como ponto de partida para síntese, é dividida em três períodos: o primeiro período entre 1800 e 1900 marcado pela descoberta de vários fármacos, entre eles morfina (*Papaversomniferum*) e salicilina (de *Salix Alba*), precursor do ácidoacetil salicílico.

O segundo período, entre 1901 e 1970/80 quando apareceram somente os antibióticos obtidos dos fungos como produtos naturais de importância, sendo este período marcado também pela síntese dos mesmos e o terceiro período, que compreende as décadas de 1970/80 até o presente, em que se tem uma retomada à busca de novos fármacos, tendo os vegetais como as fontes principais (NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009).

2.4 Cumarinas

Cumarinas são compostos do tipo lactona, derivadas do ácido *o*-hidroxicinâmico (Figura3), que pertencem aos heterocíclicos oxigenados chamados 1-benzopirano-2-ona e podem ser encontradas naturalmente em diversas famílias de plantas, como *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae* e *Solanaceae* (SMYTH; RAMACHANDRAN; SMYTH, 2009; VIDOSLAV *et al.*, 2011). A cumarina base, 1-benzopirano-2-ona, foi isolada pela primeira vez do feijão tonka (*Dipteryx odorata*) por Vogel em 1820 (VOGEL, 1820; MURRAY; MENDEZ; BROWN, 1982; WEINMANN, 1997).

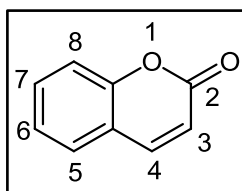


FIGURA 3 –Núcleocumarínico.

Cerca de mil derivados cumarínicos foram isolados a partir de mais de 800 espécies de plantas e micro-organismos (SMYTH; RAMACHANDRAN; SMYTH, 2009). Sua rota biossintética se origina do ácido chiquímico ou pela via dos policetídeos (Figura 6) (BOURGAUD *et al.*, 2006; VENUGOPALA *et al.*, 2013). Na literatura são relatadas diversas atividades biológicas das cumarinas (tabela2),pode-se citar a ação anti-HIV (BENG *et al.*, 2011; RAVAL *et al.*, 2008), antituberculose, antialzheimer, anti-inflamatório (FLAVIN *et al.*, 1996; KARIMI *et al.*, 2010; SANDEEP *et al.*, 2009), antimicrobiana (AJANI; NWINYL, 2010), imunossupressora e antime lanogênica (BOURGAUD *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, diferentes grupos de pesquisa tem trabalhado na obtenção de derivados sintéticos da cumarina com atividade antitumoral. Kim e colaboradores (2004) mostraram que a 7-dietilamino-3-benzoxazolilcumarina (Tabela 2-D) foi efetiva em inibir proliferação de células derivadas de câncer gástrico. Yi-ming e colaboradores (2012) demonstraram que 6-cloro-4-metoxifenilcumarina (Tabela 2-C) apresenta expressiva atividade antimitótica sobre nove linhagens celulares derivadas de cânceres humanos. Foi demonstrado também que modificações no núcleo cumarínico nas posições 3 e 7 (Tabela1) são críticas para a atividade antitumoral.

Tabela2 -Atividades farmacológicas de cumarinas

(continua)

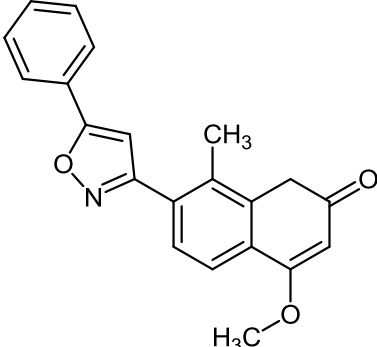
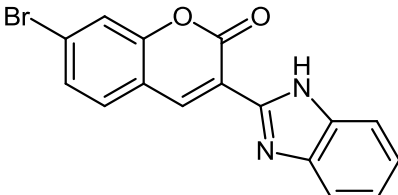
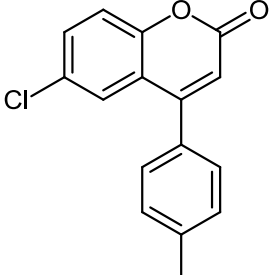
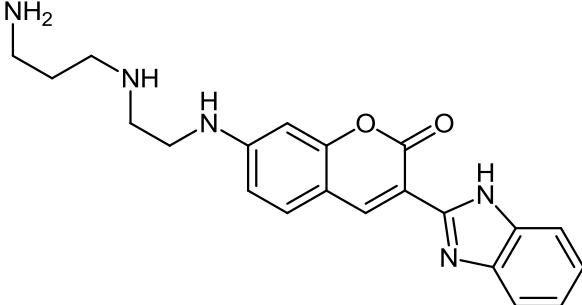
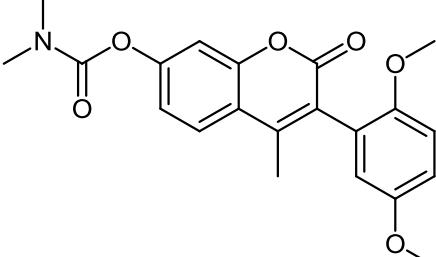
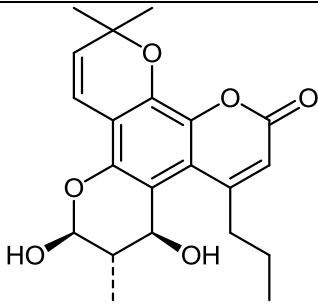
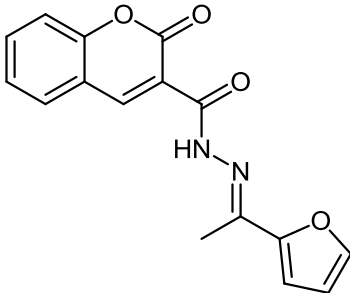
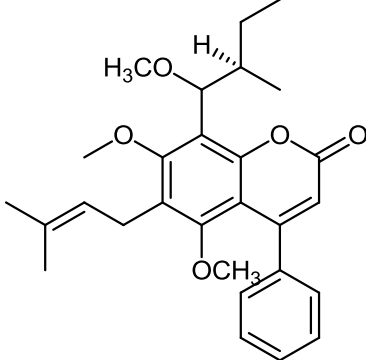
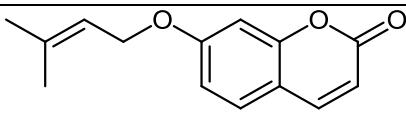
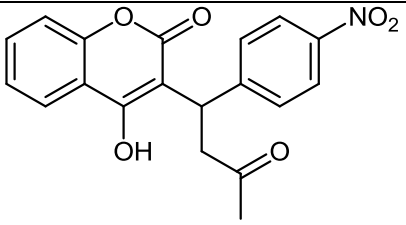
	Autores	Estrutura	Atividade farmacológica
A	SANDEEP <i>et al.</i> , 2009		Anti-inflamatório
B	KIMet <i>et al.</i> , 2004		Anti-câncer
C	KIMet <i>et al.</i> , 2004		Anti-câncer
D	KIMet <i>et al.</i> , 2004		Anti-câncer
E	BENG <i>et al.</i> , 2011		Anti-HIV

Tabela2 -Atividades farmacológicas de cumarinas

(conclusão)

	Autores	Estrutura	Atividade farmacológica
F	FLAVIN <i>et al.</i> , 1996		Antituberculose
G	MOHAREB; EL-ARAB; EL-SHARKAWY, 2009.		Antimicrobiana
H	BRENZAN <i>et al.</i> , 2008		Leishmanicida
I	KARIMI <i>et al.</i> , 2010		Anti- Alzheimer
J	KOSTOVA; NIKOLOVA,2006		Anticoagulante

Napolitano e colaboradores (2004) descreveram a atividade leishmanicida para o composto sintético 7-O-geranilcumarina (Figura 4-b) que inibe o crescimento do parasita, na espécie *Leishmania major* (NAPOLITANO *et al.*, 2004). Além disto, os produtos naturais têm sido fontes de cumarinas com potencial leishmanicida (ROCHA *et al.*, 2005), por exemplo,

Iranshahi e colaboradores (2007) isolaram cumarinas da *Ferula szowitsiana* que possuem atividade contra a mesma espécie de leishmaniae posteriormente foi relatado pelo mesmo grupo a síntese da 7-*O*-geranilcumarina e 7-*O*-prenilcumarina (Figura 4a, 4b).

Brenzan e colaboradores (2008) isolaram e sintetizaram derivados cumarínicos prenilados (Figura 4c, 4d) com uma atividade maior do que os não prenilados, demonstrando a importância da prenila na cumarina frente à atividade leishmanicida.

Doenças causadas por protozoários apresentam-se como um sério problema de saúde pública em várias regiões do mundo. Entre essas enfermidades, a doença de Chagas e a leishmaniose, afetam milhões de pessoas ao redor do mundo (KAPPAGODA; SINGH; BLACKBURN, 2011). Portanto, a descoberta de novos fármacos eficazes e de baixo custo para o tratamento desta doença negligenciada é uma necessidade urgente, assim, essa classe de composto poderia ser explorada para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas.

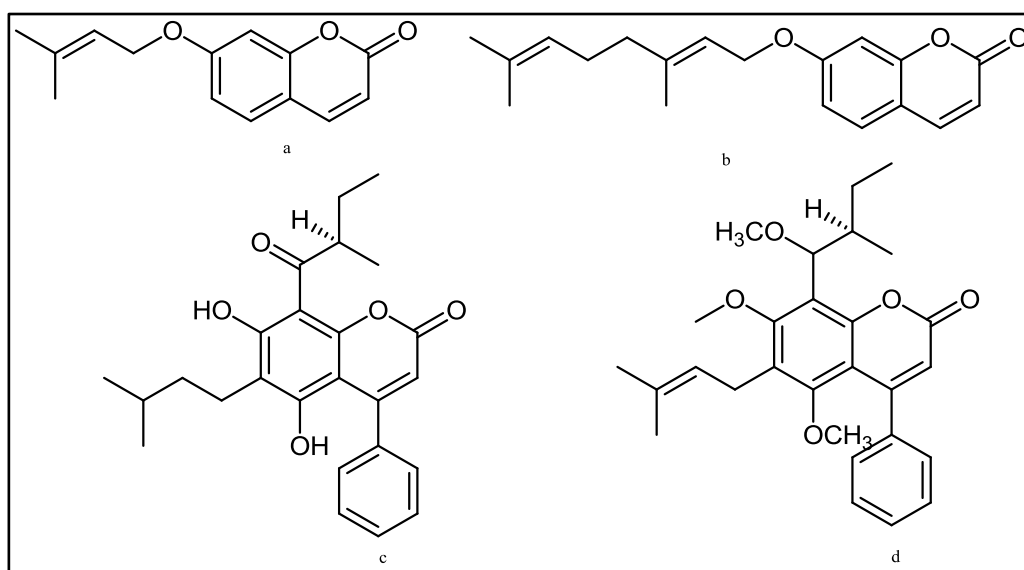


FIGURA 4 - Derivados cumarínicos com atividade leishmanicida.

2.4.1 Biossíntese

As cumarinas são derivadas da via do ácido chiquímico, o qual é formado pela condensação de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato. A junção do ácido chiquímico com fosfoenolpiruvato que, em condições normais, catalisa, na planta, a reação que envolve transferência do fosfoenolpiruvato (PEP) para o chiquimato-3-fosfato, a enzima EPSP sintase catalisa a reação que converte chiquimato-3-fosfato mais fosfoenolpiruvato a 5-enolpiruvil-3-fosfochiquimato.

O principal precursor da maioria dos compostos classificados como fenilpropanoides, o ácido cinâmico, se origina de uma desaminação da fenilalanina promovida pela enzima fenilalanina amonialiase a qual é abstraído uma amônia da fenilalanina, dando origem ao ácido cinâmico, que por sua vez origina o ácido *o*-cumárico (Figura5).

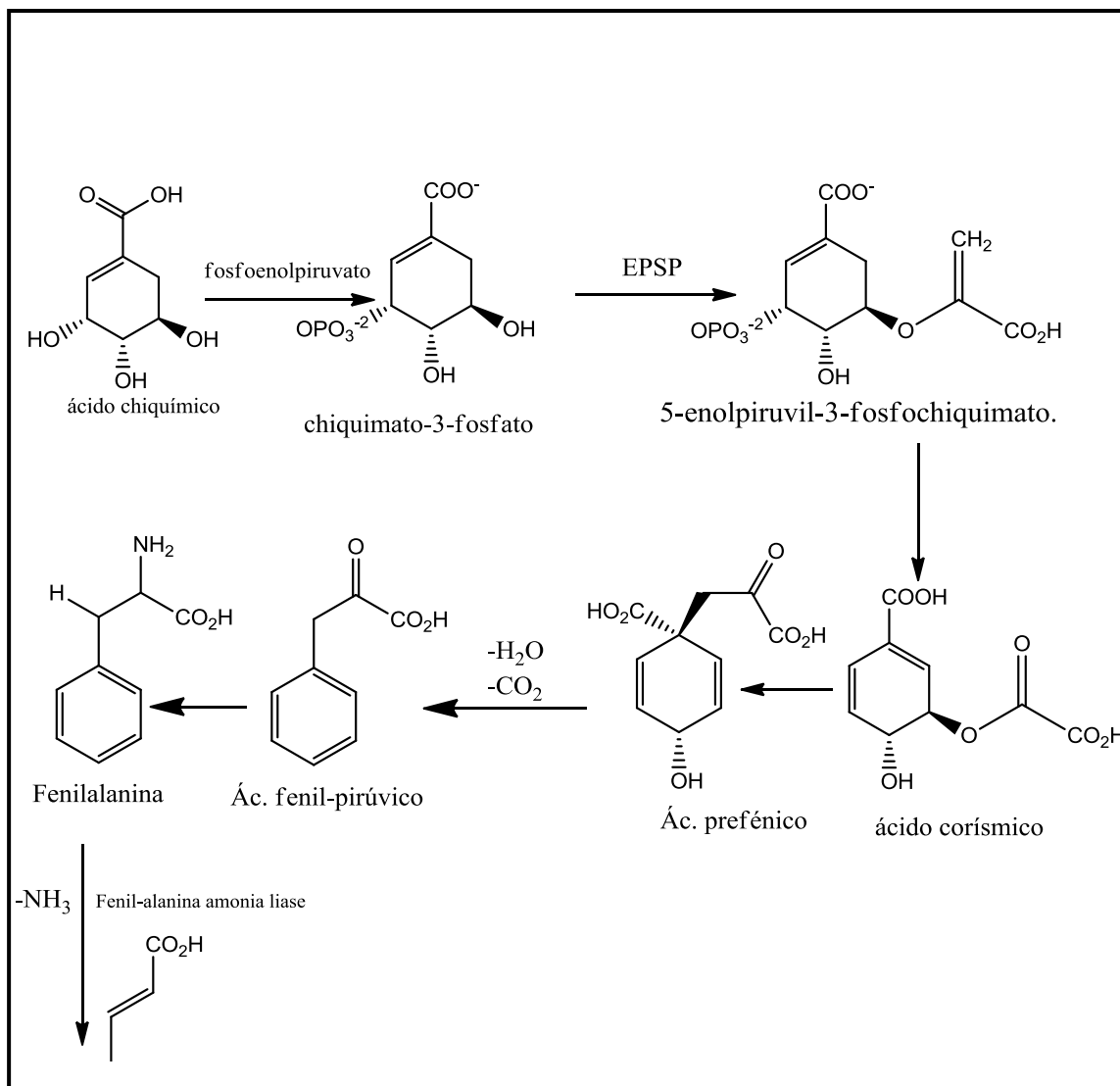


FIGURA5 - Via biossintética do ácido chiquímico ao ácido cinâmico.

Fonte: CZELUSNIAK *et al.*(2012).

Nos ácidos cinâmicos a isomerização *cis/trans* ocorre facilmente, catalisada pela luz com incidência de 360 nanômetros e a radiação UV é suficiente para produzir uma mistura equilibrada de isômeros (DEWICK, 1997; SCIO, 2004;). O ácido *o*-cumárico sofre, em seguida, glicosilação e isomerização *cis/trans*, o que é fundamental para o processo de lactonização e formação final do núcleo cumarínico (Figura6).

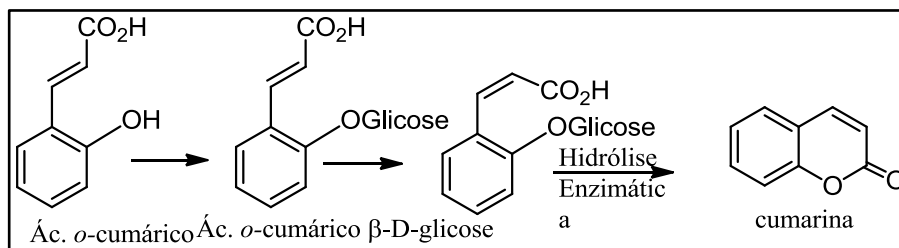


FIGURA6- Isomerização *cis/trans* e formação da cumarina.
Fonte: CZELUSNIAK *et al.* (2012).

Na via do acetato ocorre a hidroxilação da cadeia lateral dos ácidos, passo importante para a formação das cumarinas. Enquanto a hidroxilação direta do anel aromático do ácido cinâmico é comum, a hidroxilação geralmente envolve inicialmente a posição 7- para a cadeia lateral, e hidroxilação subsequente então se dá na posição *orto* a este substituinte. Em contraste, para as cumarinas, a hidroxilação do ácido cinâmico ou ácido 4-cumárico pode ocorrer *orto* à cadeia lateral (Figura7).

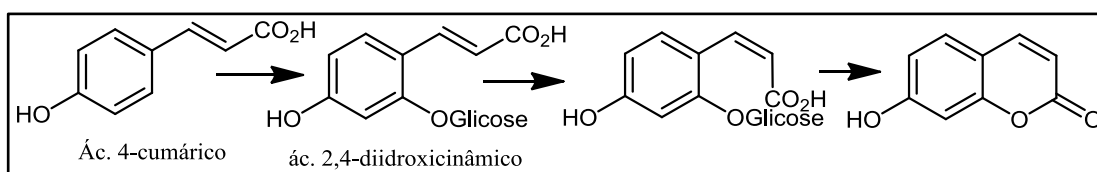


FIGURA7- Hidroxilação à cadeia lateral para síntese da 7-hidroxicumarina.

As furanocumarinas e piranocumarinas são formadas a partir da prenilação do anel benzênico nas posições 6 ou 8. A prenilação na posição 6 leva à formação das furanocumarinas e piranocumarinas, enquanto a ocorrência na posição 8 leva a homólogos angulares (Figura8).

A Figura 8 mostra a formação da hidroxil-isopropil-diidrofuranocumarina ou o hidroximetildiidropiranocumarina, que ocorre pela ciclização dos derivados 6- ou 8-isoprenilcumarina onde há o ataque nucleofílico do grupo hidroxila em C-7 ao epóxido (formado a partir da oxidação do resíduo isopentenila) levando à formação dos derivados furanocumarinas e piranocumarinas (KUSTER; ROCHA, 2003).

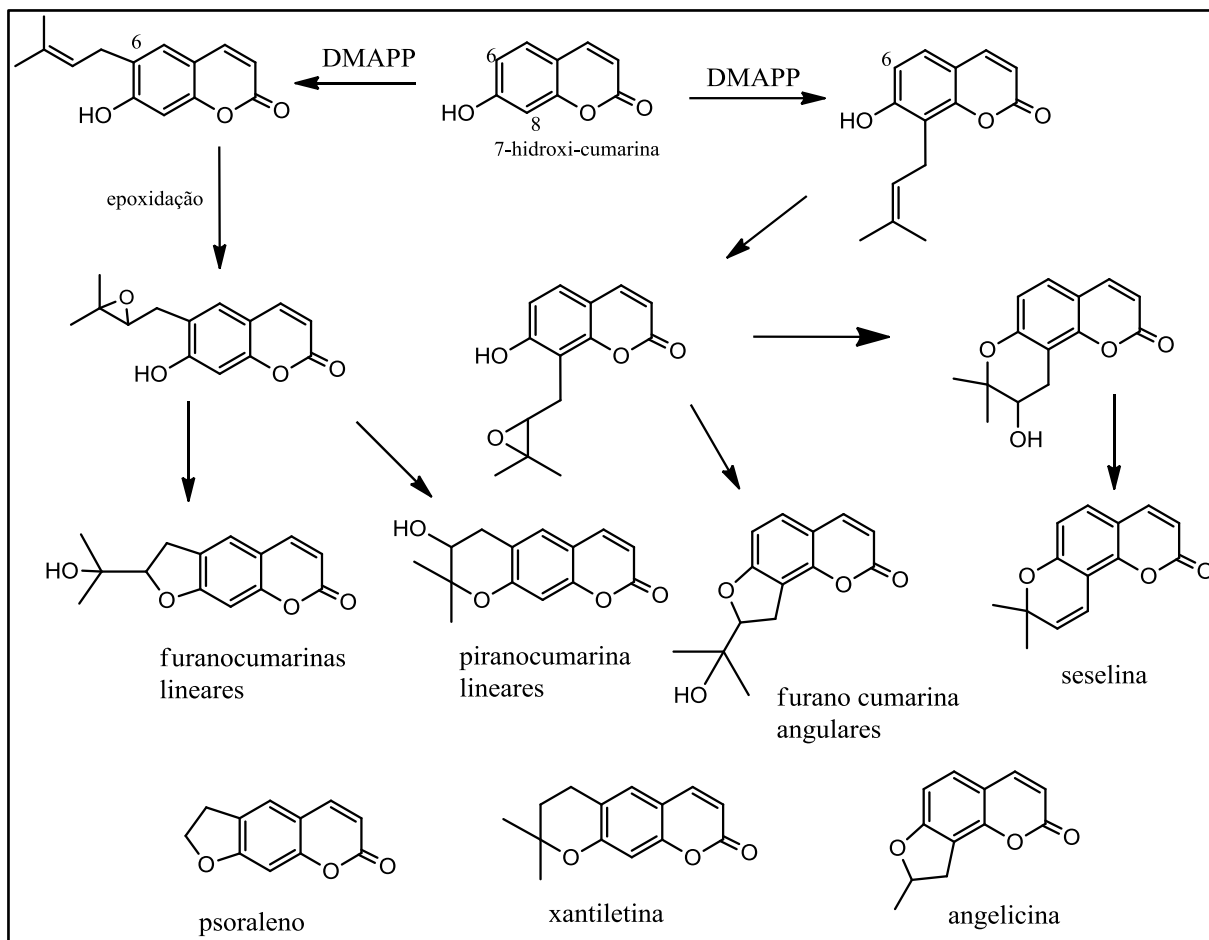


FIGURA8-Origem biossintética de cumarinas e derivados.

Fonte: KIM; PARK(2003).

2.4.2 Estrutura e classificação

As cumarinas têm como núcleo básico um sistema anelar vindo da fusão dos anéis benzênico e 1,2 pirona, sendo classificadas de acordo com as substituições nestes anéis em: a) cumarinas simples; b) furanocumarinas; c) piranocumarinas lineares ou angulares e d) cumarinas substituídas no anel pirona (Figura9) (VENUGOPALA *et al.*, 2013; BORGES; VIANNA; MEDINA-REMÓN, 2013).

As cumarinas simples são compostos derivados do núcleo básico da cumarina podendo conter grupos substituintes como: hidróxi, alcóxi, acetóxi, alquila, entre outros. As furanocumarinas podem ser classificadas em lineares ou angulares, tendo um anel furano condensado ao núcleo cumarínico, e as piranocumarinas apresentam um anel pirano (MURRAY; MENDEZ; BROWN, 2003), enquanto a biscumarina e a tricumarina se dá pelo acoplamento de duas e três moléculas de cumarina.

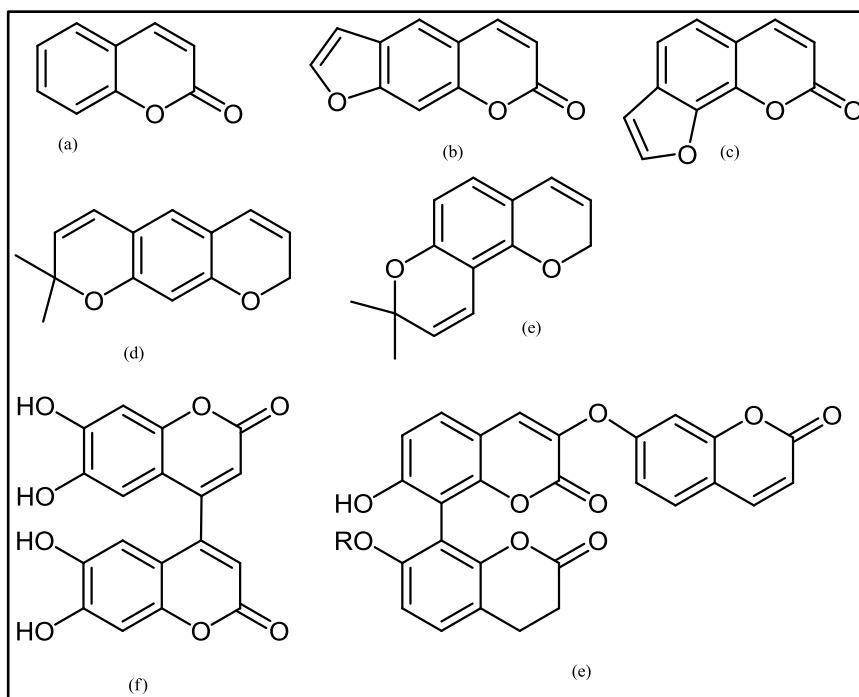


FIGURA9 - Estrutura das cumarinas: (a) simples, (b) furanocumarina, (c) piranocumarina linear, (d) piranocumarina angular, (e) biscumarina e (f) tricumarina.

2.4.3 Síntese de cumarinas

Existem diversos métodos descritos na literatura para a obtenção de cumarinas por meio do uso de catalisadores ácidos, básicos e de metais de transição, tais como: a condensação de Von Pechmann e reações de Knoevenagel, Perkin e Kadnikov.

A condensação de Von Pechmann (Figura10) é a metodologia mais largamente aplicada para síntese de cumarinas, pois envolve a condensação de fenóis com β -cetoésteres utilizando um agente catalizador levando à formação de cumarinas substituídas na posição 4 com bons rendimentos. Entre os catalisadores utilizados na formação de cumarinas por essa metodologia, utilizam-se o ácido sulfúrico, pentóxido de fósforo, cloreto de alumínio, ácido trifluoroacético, além de outros (LAUFER;HAUSMANN; HÖLDERICH, 2003).



FIGURA10- Reação de obtenção do núcleo cumarínico pela reação de Von Pechmann.

Em 1894, Knoevenagel relatou uso de salicilaldeídos e compostos dicarboxílicos na formação de cumarinas via intermediários α,β -insaturados formados por uma esterificação intramolecular (Figura 11)(RANU;JANA, 2006).

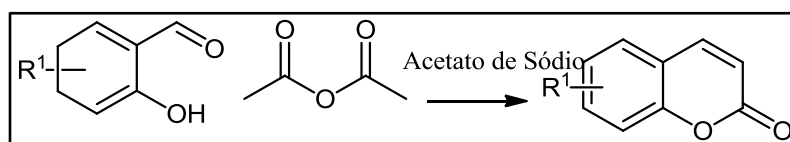


FIGURA11- Reação de obtenção do núcleo cumarínico pela reação de Knoevenagel.

Perkin, em 1868, descreveu a síntese de uma cumarina por meio do aquecimento de sais sódicos de salicilaldeídos em anidrido acético (SETHNA; SHAH, 1945). Após este primeiro relato, Perkin pesquisou e descobriu que também a síntese poderia ser adaptada para a produção de ácidos cinâmicos e cumarinas. Na condensação de salicilaldeídos com ácidos carboxílicos alifáticos utiliza-se como agente catalizador uma base fraca, permitindo a síntese de cumarinas substituídas na posição 3 (Figura 12) (CURCINO, 2010).

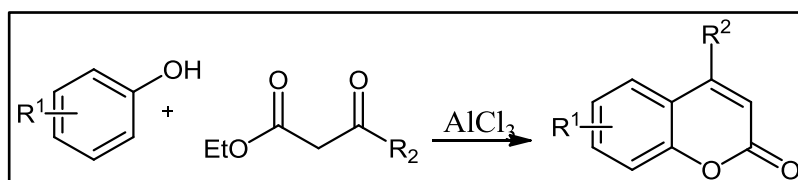


FIGURA 12 - Reação de obtenção do núcleo cumarínico pela reação de Perkin.

A metodologia utilizada por Kadnikov e seus colaboradores (2000) mencionam a síntese de cumarinas por intermédio de acoplamento catalisado por paládio de iodofenóis com alquinos internos e monóxido de carbono. A síntese pode ser utilizada com uma ampla variedade de grupos funcionais, tanto no alquino quanto no fenol (Figura 13).

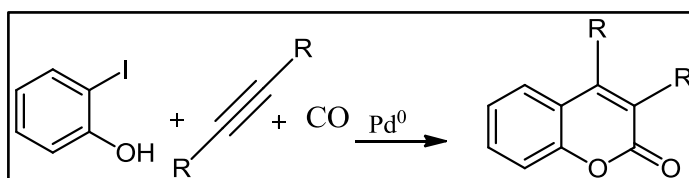


FIGURA 13 - Reação de obtenção do núcleo cumarínico pela reação de Kadnikov.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

A proposta deste trabalho consistiu na realização da síntese total de derivados cumarínicos que possam potencializar o controle de algumas células tumorais e cepas de *Leishmaniaamazonensis*.

3.1.2Objetivos específicos

- ✓ Síntese dos derivados cumarínicos: 4-fenil-7-hidroxycumarina, 4-fenil-7-*O*-metilcumarina, 4-fenil-7-*O*-prenilcumarina, 4-fenil-7-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)cumarina, 4-fenil-7-(β -D-Glucopiranosiloxi)cumarina, 7-*O*-acetil-4-fenilcumarina, 7-*O*-butanoil-4-fenilcumarina, 7-*O*-alil-4-fenilcumarina, 4-(4-cloro-fenil)-7-hidroxycumarina, 4-(4-cloro-fenil)-7-*O*-metilcumarina, 4-(4-cloro-fenil)-7-*O*-prenilcumarina, 4-(4-flúor-fenil)-7-hidroxycumarina, 4-(4-flúor-fenil)-7-*O*-metilcumarina, 4-(4-flúor-fenil)-7-*O*-prenilcumarina
- ✓ Caracterizar os compostos sintetizados por meio de técnicas espectrométricas e espectroscópicas usuais (IV, EM e RMN);
- ✓ Determinar a atividade dos compostos obtidos nas linhagens de células MCF-7, Hs578T e A549;
- ✓ Determinar atividade anti-*Leishmani* dos compostos obtidos;
- ✓ Determinar citotoxicidade em macrófagos.

4 PLANEJAMENTO

A busca de compostos bioativos tendo como fontes os produtos naturais foi uma das primeiras estratégias e continua a ser uma alternativa para o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos, destacando-seos casos da morfina isolada da *Papaver somniferum* e salicilina isolada da *Salix Alba*, que posteriormente foi o precursor do ácido acetil salicílico, entre outros. Tendo em vista ampla utilização dos produtos naturais como estratégia para o planejamento, optou-se pelo uso do núcleo cumarínico, como já relatado, pois possui uma vasta atividade biológica descrita na literatura.

Assim, a fim de avaliar a atividade antitumoral e leishmanicida dos compostos cumarínicos, foi planejada a síntese da cumarina, e para a obtenção dos derivados, planejou-sea presença de uma cadeia lipofílica.A Figura14 mostra a retrosíntese da 4-fenil-7-*O*-prenilcumarina (Figura 14-c), pois, segundo Misra e colaboradores (2003), o aumento da lipofilicidadedos compostos tem a intenção de melhorar a permeabilidade da membrana e com isso aumentar a concentração e a distribuição da ligação com as proteínas plasmáticas e consequentemente tende a mexer nosparâmetros farmacocinéticos.

Uma das variações propostas seria a substituição na posição 7 da cumarina, utilizando como substituinte o preniloxi que, segundo Epifano e colaboradores (2007), derivados de metabólitos secundários com este substituinte pode melhorar a atividade biológica.

A preparação dos compostos cumarínicos consiste, primeiramente, na obtenção da 4-fenil-7-hidrocumarina (Figura 14-b), partindo-se de benzoilacetato de etila e resorcinol(Figura 14-a). Para a obtenção da cumarina foi utilizadaa metodologia deTimonen e colaboradores (2011). A substituição da hidroxila na posição 7 do anel cumarínico por derivados alquila pode ser realizado através da reação com cloretos de alquila obtendo o derivado 4-fenil-7-aquilocumarina (Figura 14-c).

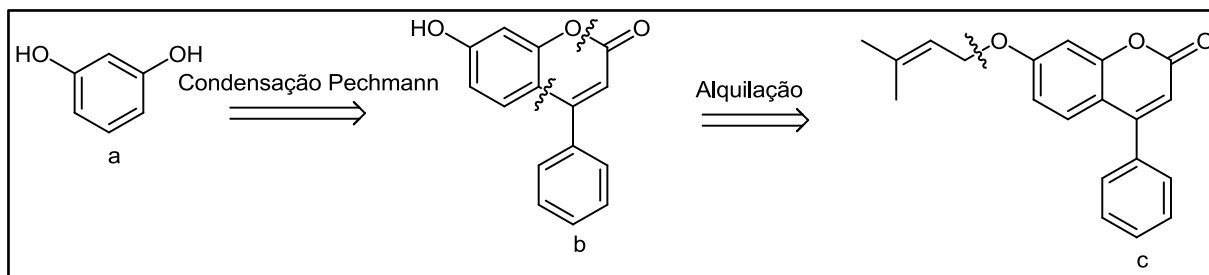


FIGURA 14: Retrossíntese da 4-fenil-7-*O*-prenilcumarina.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Materiais, Métodos e Equipamentos

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho Metler PFM 2, banho de ultrassom Quimis Q335D pertencentes ao LFQM da UNIFAL-MG. Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro, modelo Prestig-21, no Laboratório de Química Inorgânica da UNIFAL-MG. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de brometo de potássio (KBr) e as absorções expressas em número de ondas (cm^{-1}).

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em espectrômetros *Avance* DPX 200 e *Avance* DRX 400, ambos da Bruker. Foram empregados como padrão interno o tetrametilsilano ou o próprio solvente deuterado. Os valores de deslocamentos químicos foram descritos em ppm no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os espectros de massas foram obtidos em um sistema cromatográfico acoplado ao espectrômetro de massas HR-LCMS-IT-TOF Shimadzu do Departamento de Química da UFMG. As amostras foram solubilizadas com CHCl_3 e diluídas em MeOH ou solubilizadas apenas com MeOH de acordo com a polaridade e injetadas manualmente. A fonte de ionização utilizada foi electrospray (modo negativo -3,5 KV e modo positivo 4,5 KV), o fluxo de gás nebulizador (N_2) a 1,5 L/min, pressão do gás de secagem a 100 KPa e temperatura da interface a 200 °C.

A análise foi realizada em cromatógrafo Shimadzu UFLC 20 A, pertencente ao LFQM da UNIFAL-MG, coluna NST (Nano Separation Technologies) C18 – 154605 (150 x 4,6mm; 5 μm de tamanho de partícula). A fase móvel foi constituída de uma mistura de solução de ácido acético 5 mmol/L (elute A) e metanol/ácido acético 0,1% v/v (elute B). O volume de injeção foi de 20 μL , e fluxo de 1,0 mL/min. Durante os 10 minutos iniciais a concentração

de B aumentou linearmente de 50% a 100% e seguiu 100% de B até 15 min. Depois a concentração de B foi retomada à inicial para preparar a coluna para a próxima análise.

A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada de sílica, utilizando placas confeccionadas com sílica gel 60 G (Merck). Os sistemas de eluentes empregados foram especificados em cada procedimento. Como reveladores, foram utilizados o vapor de iodo; luz ultravioleta ($\lambda = 254$ ou 365 nm); solução (1:1, v/v) de vanilina a 1% em etanol com solução de ácido sulfúrico a 3% (v/v) em água destilada e solução etanólica de ácido sulfúrico 15% v/v (com aquecimento a 100 °C).

Os testes de viabilidade celular em linhagens celulares derivadas de tumores humanos (adenocarcinoma mamário, MCF-7; carcinoma hepatocelular, HepG2; carcinoma de pulmão, A549) foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG sob a supervisão da professora Marisa Ionta.

Os ensaios microbiológicos de *Leishmania* foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular (UNIFAL-MG) e as leituras dos resultados foram feitas em leitor automático de microplacas (Zenith - modelo 200 rt) sob a coordenação do Prof. Marcos José Marques.

5.2 Síntese dos derivados

5.2.1 Síntese da 4-fenil-7-hidroxicumarina (1),4-(4-Cloro-fenil)-7-hidroxicumarina (11),4-(4-fluorfenil)-7-hidroxicumarina(14)

Inicialmente, foram sintetizados os compostos 1, 11 e 14 (Figura 15) e em um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados 0,482g de resorcinole 1,0 g dos derivados de benzoilacetato de etila(1) (cloreto de benzoilacetato de etila 11 e fluoreto de benzoilacetato de etila 14) em 20 mL de ácido perclórico (TIMONEN *et al.*, 2011). Manteve-se a mistura sob agitação, à temperatura ambiente, e após o término da reação detectado por CCD (Hexano/EtOAc6:4), verteu-se o produto no gelo picado e separou-se o sólido formado por filtração a vácuo, obtendo-se rendimento de 86%.

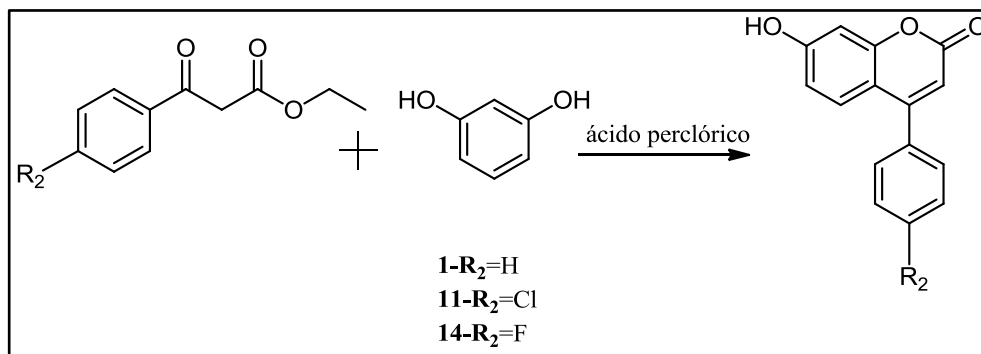


FIGURA 15—4-Fenil-7-hidroxicumarina.

5.2.2 Procedimento geral para síntese dos derivados cumarínicos

Os compostos 1, 11 e 14, após serem sintetizados, serviram para a síntese dos diferentes derivados de alquila e acila onde foram submetidos a reações (Figura 16). Os derivados (Figura 17) foram obtidos por reação de alquilação e acilação entre o derivado 4-fenil-7-hidroxicumarina e os iodetos, cloretos, brometos de alquila e acila [CH_3I , $(CH_3)_2CCH_2Br$, $(CH_3CO)_2$, $CH_3CH_2CH_2COCl$, CH_2CHCH_2Cl] e o anidrido acético, na qual foi utilizado o carbonato de potássio (K_2CO_3) e os solventes dimetilformamida (DMF) e acetona (YANG *et al*, 2009).

Em um balão de 100 mL foram adicionados o derivado 1 e os 11 e 14 em acetona para que fosse solubilizado e manteve-se a mistura sob agitação, à temperatura ambiente, durante 0h40min. Em seguida, adicionaram-se os derivados de alquila ou acila, deixou-se a mistura reagente sob as mesmas condições e o desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD (Hexano:EtOAc,9:1). A reação foi finalizada adicionando-se água ao produto formado e extraído 3 vezes com 30 mL de diclorometano e as fases orgânicas reunidas e lavadas 4 vezes de 30 mL de solução de hidróxido de sódio a 10% p/v. A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro e o solvente eliminado no rotaevaporador. As características físicas estão apresentadas na Tabela 3.

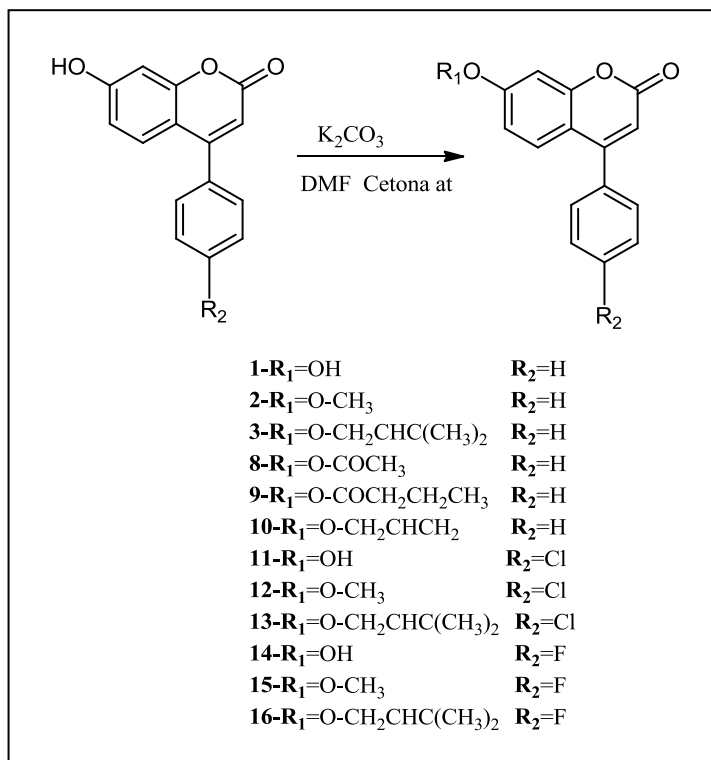


FIGURA 16 - Esquema de síntese dos derivados cumarínicos.

Tabela 3- Propriedades físicas dos derivados cumarínicos

Composto	Temperatura de Fusão °C	Rendimento %	Estado Físico	Massa Molecular g.mol^{-1}	Tempo de Reação	Log P
1	210-212	86,0	Cristais Branco	238,24	1h40	3,51
2	111-112	56,0	Sólido Branco	252,26	2h30	3,63
3	202-205	57,2	Sólido Branco	306,36	2h00	5,33
8	211-213	62,0	Sólido Branco	280,27	0h40	3,06
9	188-190	56,0	Sólido Branco	308,33	1h00	4,12
10	183-184	55,0	Sólido Branco	278,09	0h30	4,40
11	216-217	83,0	Cristais Branco	272,02	2h00	4,22
12	201-214	60,0	Sólido Branco	286,04	2h55	3,63
13	201-202	58,0	Sólido Branco	238,06	2h20	6,04
14	220.221	80,0	Sólido Rosa claro	256,06	1h50	3,65

15	110-112	50,0	Sólido Branco	270,26	0h57	3,77
16	122-123	55,3	Sólido Branco	324,35	1h55	5,47

5.2.3 Síntese da 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-acetil- β -D-glicopiranosose (4)

Em um balão de fundo redondo de 500 mL foram adicionados 10,0 g (55 mmol) de D-glicose, 8,0 g (100 mmol) de acetato de sódio anidro e 50 mL de anidrido acético. Amistura foi realizada por imersão em banho de ultrassom durante 15 minutos. O acompanhamento da reação foi feito por CCD (eluente: diclorometano/acetato de etila 7:3 v/v; revelador: solução de ácido sulfúrico e aquecimento a 120°C). Ao final da reação, a mistura foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio e extraída com acetato de etila (3x30mL). Em seguida, a mistura reagente foi vertida em gelo pilado, ocorrendo formação de um precipitado branco que foi recolhido por filtração a vácuo e, em seguida, recristalizado em etanol. Foram obtidos 17,9 g (43,83 mmol, 78,9%) de 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-acetil- β -D-glicopiranosose. Ponto de fusão (p.f.= 125-126°C).

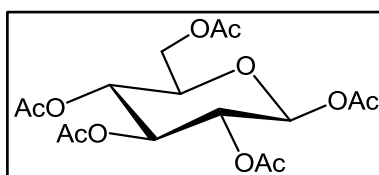


FIGURA17- 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-acetil- β -D-glicopiranosose.

5.2.4 Síntese do brometo de 2, 3, 4, 6-penta-*O*-acetil- β -D-glicopiranosose (5)

Em um balão de 250 mL foi preparada uma solução de bromação de ácido bromídrico em anidrido acético, pela adição gota a gota de 25 mL de ácido bromídrico 48% p/p vertido no balão com 50 mL de anidrido acético sob banho de gelo. Em outro balão de 250 mL, foram solubilizados 5,7g de glicose peracetilado em 50 mL de diclorometano mantido em banho de água e gelo. A solução reagente foi deixada sob agitação magnética à temperatura ambiente por 16 horas.

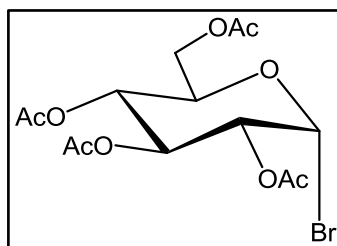


FIGURA18 - Brometo de 2, 3, 4, 6-penta-*O*-acetil- β -D-glicopiranosose.

A mistura foi então vertida em gelo e água e extraída com diclorometano (4x 40 mL). A fase orgânica foi separada e transferida para funil de decantação e lavada com solução gelada de bicarbonato de sódio a 10% p/v tantas vezes o suficiente para que a fase aquosa atingisse o mesmo pH dessa solução. A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro, este separado por filtração e o solvente eliminado em rotaevaporador à temperatura não superior a 40°C. O produto obtido foi usado imediatamente na reação seguinte.

5.2.5 Síntese da 4-fenil-7-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)cumarina(7) e 4-fenil-7-(β -D-glucopiranosiloxi)cumarina(6)

Em um balão de 100 mL foram adicionados 0,2g ($12,60 \times 10^{-4}$ mol) do composto de partida 1 em 5mL de acetona e 0,050g de hidróxido de potássio ($12,60 \times 10^{-4}$ mol). Manteve-se a mistura sob agitação, à temperatura ambiente, até a solubilização completa dos reagentes. Em seguida, adicionou-se 0,172g ($4,20 \times 10^{-4}$ mol) do derivado 5. Deixou-se a mistura reagente sob as mesmas condições e o desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD (diclorometano). A acetona foi então evaporada no rotaevaporador e o produto residual foi particionado entre água e diclorometano. A fase orgânica foi lavada com solução de NaOH a 10 p/v, e então seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi eliminado em rotaevaporador e o produto foi purificado por recristalização em água/etanol 6,5:3,5 v/v.

Para a síntese do 4-fenil-7-(β -D-glucopiranosiloxi)cumarina(6) foram adicionados 20 mL de metanol anidro em um balão de fundo redondo de 100 mL e colocou-se o balão em banho de gelo e sob agitação magnética. Adicionou-se quantidade catalítica de sódio metálico. Após a dissolução de todo o sódio adicionou-se $1,0 \times 10^{-3}$ mmol de 4-fenil-7-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)cumarina. O balão foi mantido sob agitação magnética por 1 hora e 40 minutos. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: diclorometano/acetato de etila 7:3 v/v; revelador: solução de ácido sulfúrico e aquecimento a 120°C).

Adicionou-se resina ácida Amberlite IRA-120 à mistura reagente até pH 6. A mistura

reagente foi filtrada e lavada com metanol. O filtrado foi concentrado em evaporador segundo o método de Zemplén (CONCHIE;LEVY; MARSH, 1957; KIM, 2004; GARAZD; GARAZD; KHILYA, 2005). Obteve-se um sólido branco, com 68% de rendimento. Ponto de fusão (p.f.= 298-300°C).

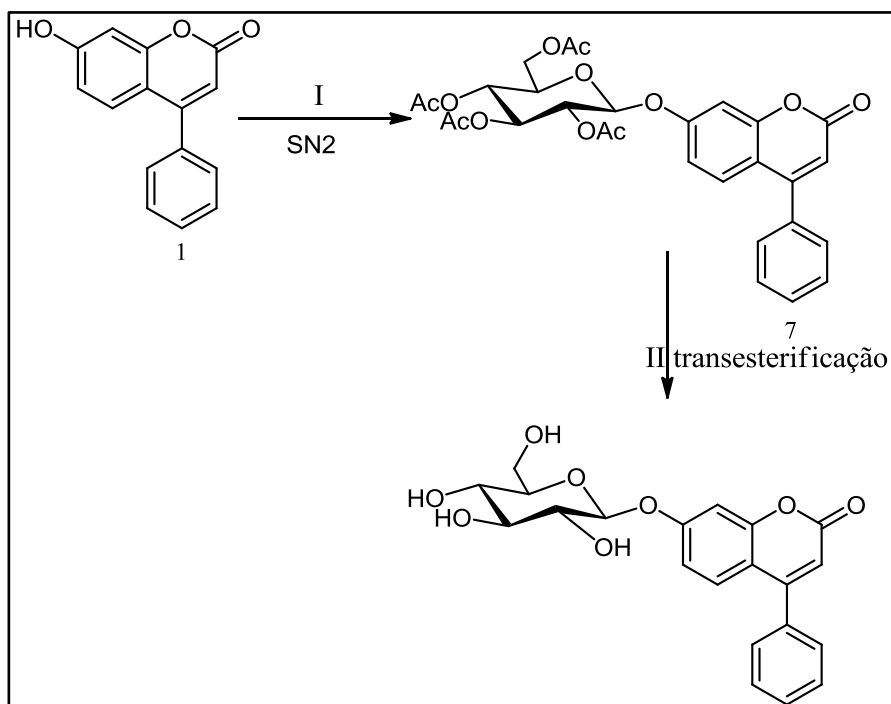


FIGURA19 - 4-Fenil-7-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)cumarina e 4-fenil-7-(β-D-glucopiranosiloxi)cumarina.

5.3 Ensaio Biológicos

5.3.1 Atividade antitumoral

5.3.1.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

No presente estudo foram utilizadas linhagens celulares derivadas de tumores humanos: MCF-7 e Hs578T (carcinomas de mama) e A549 (carcinoma de pulmão). As células foram mantidas em Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma, MO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Athena, SP, Brasil) em estufa a 37°C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO₂).

5.3.1.2 Viabilidade celular

5.3.1.2.1 Ensaio colorimétrico (MTS)

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 ou 1×10^4 células/poço dependendo a linhagem celular considerada. Na varredura inicial, as células foram tratadas por 48h com 4-fenil-7-hidroxycumarina, 4-fenil-7-*O*-metilcumarina, 4-fenil-7-*O*-prenilcumarina, 4-fenil-7-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)cumarina, 4-fenil-7-(β -D-Glucopiranosiloxi)cumarina, 7-*O*-acetil-4-fenilcumarina, 7-*O*-butanoil-4-fenilcumarina, 7-*O*-alil-4-fenilcumarina, 4-(4-cloro-fenil)-7-hidroxycumarina, 4-(4-cloro-fenil)-7-*O*-metilcumarina, 4-(4-cloro-fenil)-7-*O*-prenilcumarina, 4-(4-fluorfenil)-7-hidroxycumarina, 4-(4-fluorfenil)-7-*O*-metilcumarina, 4-(4-fluorfenil)-7-*O*-prenilcumarina a concentração de 40 μ mol. Na sequência, os compostos 8 e 9 apresentaram atividade antiproliferativa significativa sobre células A549 selecionadas e novos ensaios foram realizados, sendo que os compostos foram utilizados em diferentes concentrações (5 – 80 μ mol). A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico (MTS) usando o *Kit CellTiter 96[®]Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega). O método baseia-se na conversão metabólica, via desidrogenases, do sal [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólio)] em formazano, um composto solúvel em meio aquoso que absorve luz a 490 nm (CORY *et al.*, 1991). A quantidade de formazano produzida é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas. Os valores de absorbância de amostras tratadas foram comparados com os valores de absorbância obtidos nas amostras controles. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os resultados apresentados são correspondentes à média \pm desvio padrão. Os valores de IC₅₀ foram obtidos a partir de curvas de regressão usando o Software GraphPad[®]. A cisplatina, uma droga altamente citotóxica, utilizada em quimioterapia foi utilizada como controle positivo.

5.3.1.2.2 Ensaio de Exclusão por azul de tripano

As células foram semeadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro (densidade de 7×10^4 células). Após a adesão, as células foram tratadas com 8 e 9 nas concentrações de 20 ou 40 μ M por 24h ou 48h. Nos dias de interesse, as células foram coletadas por digestão enzimática e na sequência uma alíquota de 100 mL foi usada para contagem em câmara de

Neubauer. Foi realizada uma diluição de 1:1 (suspensão celular: azul de tripano a 0,4%). As células viáveis apresentam integridade de membrana e não incorporam o corante, ao contrário das células não viáveis que permitem a entrada do corante por apresentarem permeabilidade de membrana. O experimento foi conduzido em triplicadas e os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão (DP).

5.3.1.3 Ensaio de Anexina V

As células foram semeadas em placas de Petri de 35mm de diâmetro (densidade de 7×10^4 células). Após a adesão, as células foram tratadas com 8 e 9 nas concentrações de 20 ou 40 μmol por 48h. As células foram coletadas por digestão enzimática e após lavagens em PBSA, as células foram suspensas em tampão de ligação. Em seguida, Anexina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) e Iodeto de Propídio (IP) foram adicionados à amostra. Após 15 minutos de incubação (temperatura ambiente), as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (Guava Mini EasyCyte, GE). Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os dados são apresentados como média \pm DP.

5.3.2 Atividade Leishmanicida

5.3.2.1 Ensaio da atividade antipromastigota

Formas promastigotas de *L.(L) amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) foram mantidas em meio Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa a 25°C. Para a realização dos testes foram transferidas cerca de 1×10^6 células/mL para placas de 24 poços, onde então foram adicionadas as substâncias a serem avaliadas em várias concentrações (40, 20, 10 e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Após 72 horas de incubação a 25°C, os protozoários foram contados em câmara de Neubauer para a determinação do IC₅₀ (concentração inibitória de 50% do crescimento celular), tendo como controles protozoários em meio de cultura sem a adição dos compostos. Este IC₅₀ foi então comparado ao IC₅₀ do padrão Amphotericin B nas mesmas concentrações empregadas para as amostras (PEREIRA *et al.*, 2010).

5.3.2.2 Ensaio da atividade anti-mastigota

Macrófagos foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos, sendo estes sacrificados por deslocamento da coluna cervical, e as células contadas em câmara de Neubauer. Os macrófagos peritoneais murinos foram mantidos em meio RPMI1640 a 37°C e 5% de CO₂, em placas de 24 poços, os quais foram infectados com promastigotas de *L.amazonensis* na fase log de crescimento na razão de 10:1. A cada poço foram adicionadas as substâncias a serem avaliadas em várias concentrações (40, 20, 10 e 5 µg/mL), e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas, quando então foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa a 10% para posterior análise por microscopia ótica e determinação da razão entre macrófagos infectados e não infectados para determinação do IC₅₀ em relação ao controle sem adição dos compostos. O resultado foi comparado ao IC₅₀ do padrão pentamidina nas mesmas concentrações empregadas para as amostras, e como controle foram utilizados macrófagos infectados sem a adição dos compostos (PEREIRA *et al.*, 2010).

5.3.2.3 Avaliação Citotóxica

Para avaliar o efeito de citotoxicidade das substâncias sobre os macrófagos não infectados o cultivo foi feito como descrito acima (subseção 5.3.2.2), com o diferencial de se ter empregado azul de tripan para avaliar a viabilidade celular. Foi determinada a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀). O controle foi “macrófago não infectado sem adição das substâncias” e os testes foram feitos em duplicatas.

5.4 Análise estatística

Os dados quantitativos foram apresentados como a média ± SD. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey usando o software GraphPadPrism® (San Diego, CA, USA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Síntese e caracterização dos derivados cumarínicos

6.1.1 Síntese da 4-fenil-7-hidroxicumarina

Para a obtenção da 4-fenil-7-hidroxicumarina foi utilizado a metodologia de Pechmann e uma proposta simplificada do mecanismo de formação da 4-fenil-7-hidroxicumarina está representada na Figura 20.

Segundo Von Pechmann, a formação da 7-hidroxi-fenilcumarina ocorre pela protonação do benzoilacetato de etila pelo ácido perclórico, onde o par de elétrons do oxigênio do resorcinol ataca o carbono beta carbonila e o oxigênio da etoxila irá abstrair o

hidrogênio ligado ao oxigênio do resorcinol ao mesmo tempo a base conjugada irá abstrair o hidrogênio do oxigênio da carbonila protonada, novamente ocorrerá a protonação da carbonila e a base conjugada do ácido perclórico abstrairá o hidrogênio ácido do enol β -dicetona, logo após a dupla do anel atacará a alfa carbonila fechando o ciclo. Após a ciclização a hidroxila na posição 4 abstrairá o hidrogênio do anel restituindo a aromaticidade do anel liberando uma molécula de água.

A 4-fenil-7-hidroxicumarina foi um intermediário importante para a obtenção dos análogos 4-fenil-7-*O*-metilcumarina, 4-fenil-7-*O*-prenilcumarina, 4-fenil-7-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)cumarina, 4-fenil 7-(β -D-glucopiranosiloxi)cumarina. Os outros derivados cumarínicos, substituídos no grupo fenílico na posição 4, foram formados seguindo o mesmo mecanismo mostrado, onde se obteve os derivados 4-(4-cloro-fenil)-7-hidroxicumarina, 4-(4-cloro-fenil)-7-*O*-metilcumarina, 4-(4-cloro-fenil)-7-*O*-prenilcumarina, 4-(4-flúor-fenil)-7-hidroxicumarina, 4-(4-flúor-fenil)-7-*O*-metilcumarina, 4-(4-flúor-fenil)-7-*O*-prenilcumarina.

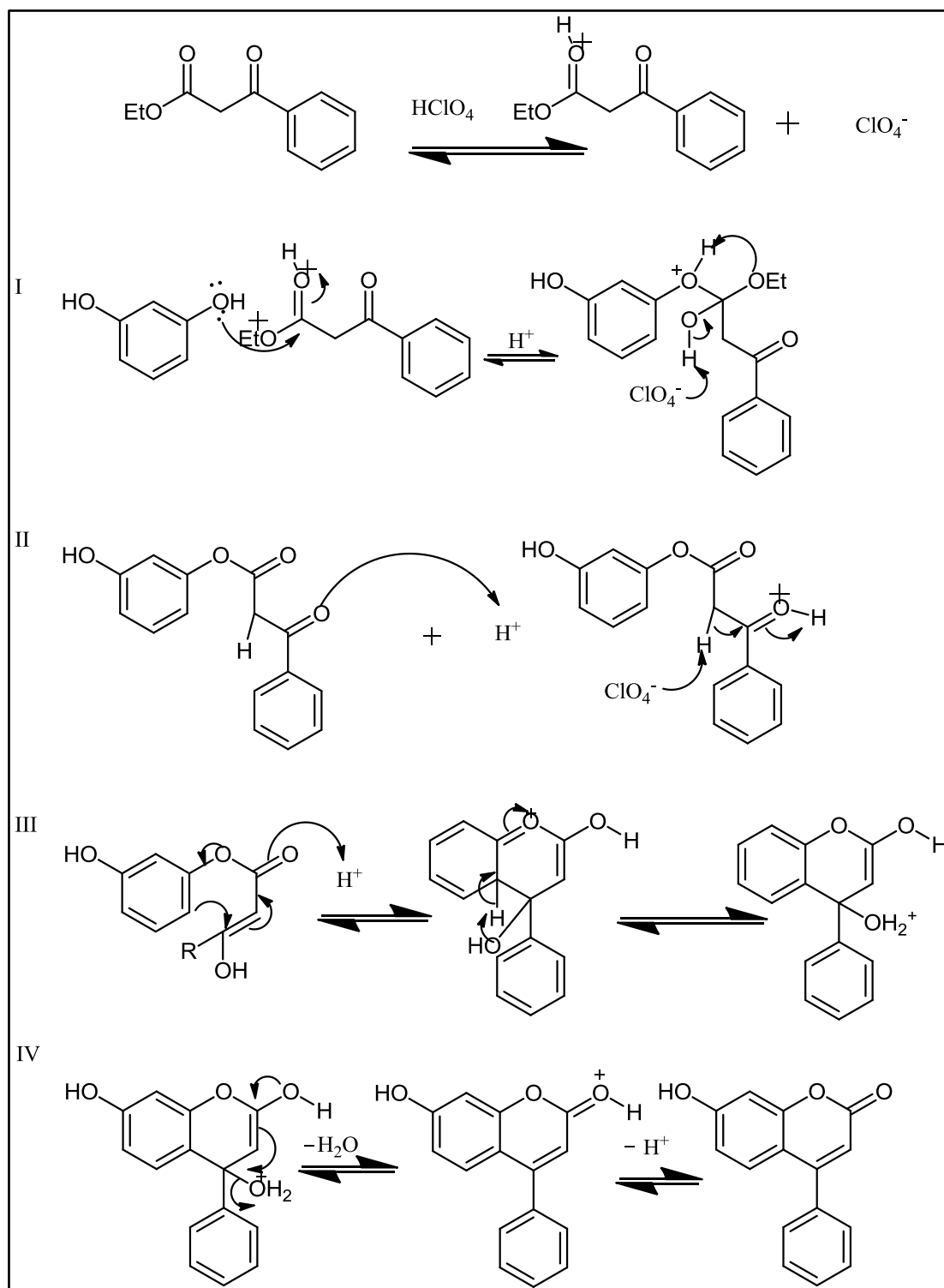


FIGURA20- Mecanismo proposto de formação da 4-fenil-7-hidroxicumarina adaptado de Daru (2011).

6.1.2 Síntese dos derivados da 4-fenil-7-hidroxicumarina

Para a preparação dos derivados planejados (Figura 21), foram realizadas reações de esterificação e eterificaçãoII (Figura 21) sobre a hidroxila fenólica da cumarina do derivado de partida 1, segundo metodologia adaptada descrita por Yang e colaboradores (2009).

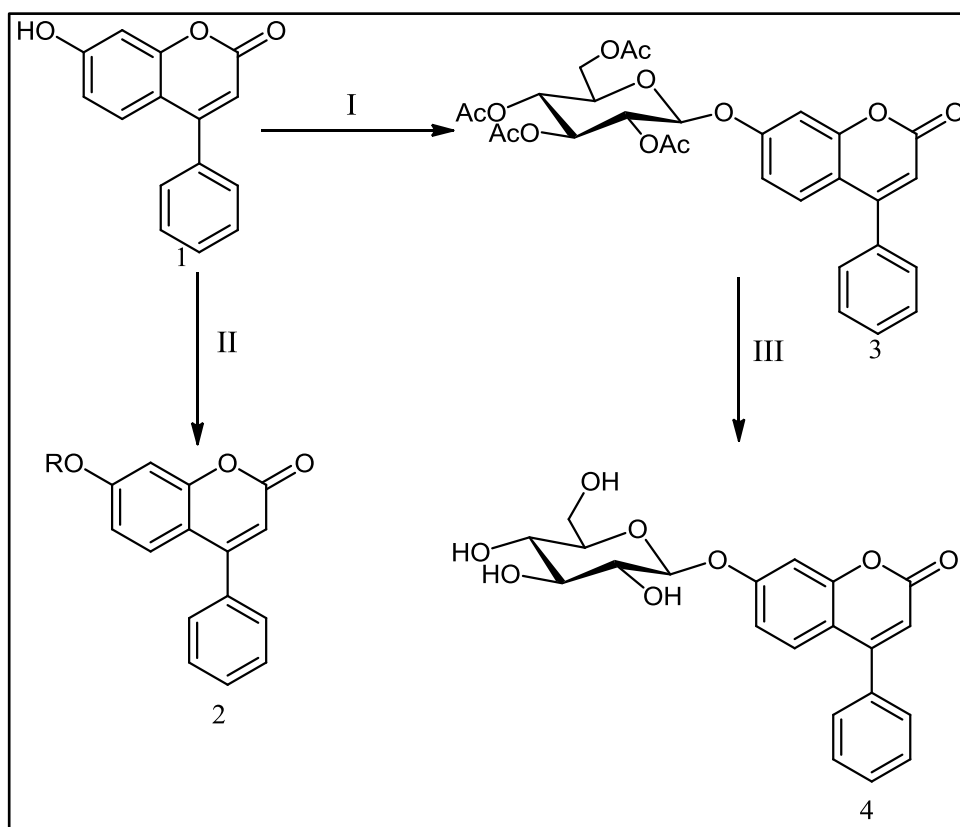


FIGURA 21 - Derivados da 4-fenil-7-hidroxicumarina.

Tabela 4- Derivados cumarínicos sintetizados.

Composto	R ₁	W
1	OH	H
2	<i>O</i> -CH ₃	H
3	<i>O</i> -CH ₂ CHC(CH ₃) ₂	H
6	<i>O</i> -Glicosídeo	H
7	<i>O</i> -Glicosídeo peracetilado	H
8	<i>O</i> -COCH ₃	H
9	<i>O</i> -COCH ₂ CH ₂ CH ₃	H
10	<i>O</i> -CH ₂ CHCH ₂	H
11	OH	Cl
12	<i>O</i> -CH ₃	Cl
13	<i>O</i> -CH ₂ CHC(CH ₃) ₂	Cl
14	OH	F
15	<i>O</i> -CH ₃	F
16	<i>O</i> -CH ₂ CHC(CH ₃) ₂	F

6.1.2.1 Elucidação estrutural das substâncias sintetizadas

Composto: 4-fenil-7-hidroxicumarina (**1**)(GARAZD *et al.*, 2005)

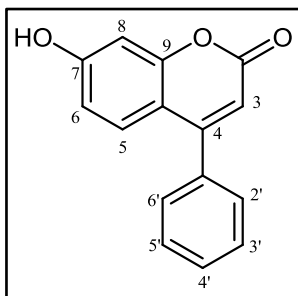


FIGURA 22 - Derivado 1.

O derivado 1 (Figura 22) foi obtido por condensação de Pechamann entre o resorcinol e benzoilacetato de etila, na qual foi utilizado o ácido perclórico (TIMONEN *et al.*, 2011). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. 210°C e rendimento de 86%, índice de pureza 98,9%.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 24) para 4-fenil-7-hidroxicumarina foi obtido em DMSO- d_6 , o qual apresentou sinais compatíveis para uma cumarina, a região entre 6,81-7,33 ppm – correspondente aos hidrogênios do anel aromático da cumarina - apresentou sinais de duplos dupletos em 6,84 ppm com $J=2,0; 4,0$ Hz) referente ao H_8 . Dois dupletos referentes aos H_8 e H_5 com $J= 4,0; 8,0$ Hz, respectivamente, um sinal em 6,19 ppm com integração para um hidrogênio, duplete em 6,75 ppm com integração para 1 hidrogênio referente ao hidrogênio da hidroxila. Também se observou multipletos em 7,56-7,57 ppm referentes aos hidrogênios da fenila que está ligada ao núcleo cumarínico e multiplete 7,60-7,61 ppm também ligado ao mesmo.

O espectro de RMN de ^{13}C forneceu 13 sinais (Figura 25). Os sinais observados em 103,76, 111,39 e 111,72 ppm são referentes aos carbonos C8, C6 e C10 respectivamente. Em 129,17, 129,45, 129,90 e 136,22 ppm, foram observados os carbonos C4', C2'-C6', C3'-C5' e C1' respectivamente referentes ao anel aromático ligado na posição 4 da cumarina. Em 162,47, 114,29 e 156,62 ppm, estes referem aos carbonos carbonila C2, alfa carbonila C3, beta carbonila C4. Em 130,66, 141,82 e 161,27 ppm foram observados os carbonos C5, C9 e C7 do anel aromático da cumarina.

O espectro na região do IV (Figura 23) evidenciou banda forte e larga, de deformação axial de OH centrada em 3097 cm^{-1} . Apresenta banda de absorção forte em 1701,22 cm^{-1} referente ao estiramento C=O de carbonila. Uma banda de absorção forte em 1238,17 cm^{-1} característico de C-O-C de éster.

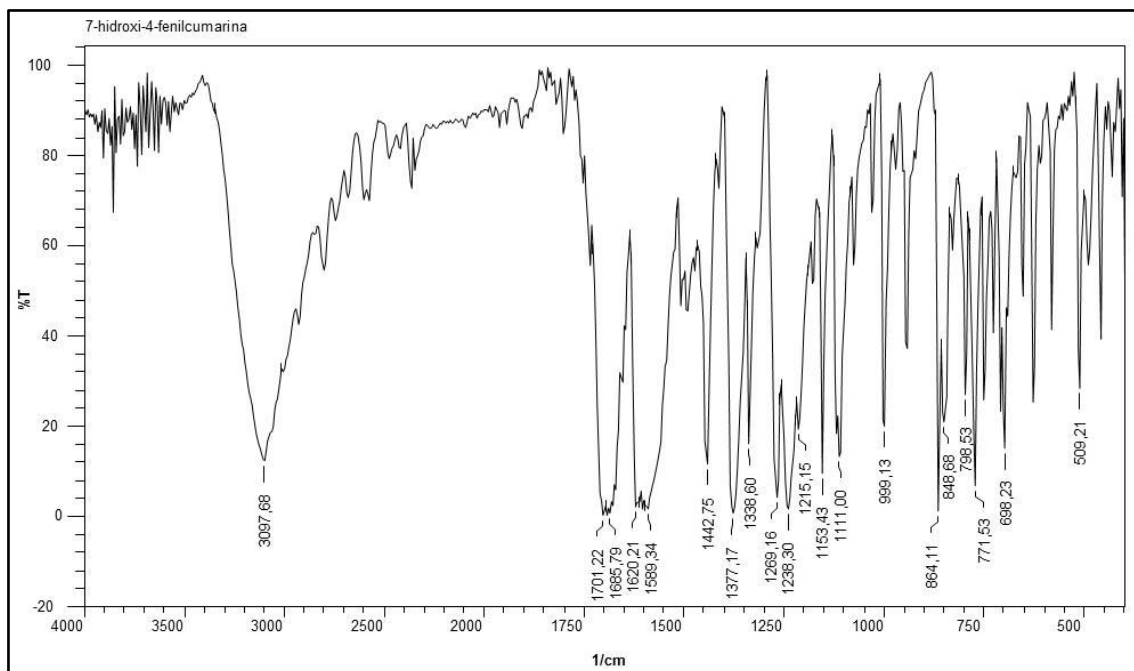


FIGURA23 - Espectro no infravermelho do derivado 1(KBr).

A Tabela 5 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura24) e RMN de ^{13}C (Figura25).

Tabela 5 - Deslocamentos químicos δ_H de RMN de ^1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 1.

δ_H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	δ_C	Carbono	δ_C	DEPT
6,19	H-3	simpleto	103,76	C-8	103,76	C-8
6,81	H-8	dupleto; 4	111,39	C-6	111,39	C-6
6,84	H-6	duplo dupleto; 2,0; 4,0	111,72	C-10	114,28	C-3
7,31	H-5	dupleto;8	114,29	C-3	129,16	C-4'
7,56-7,57	H-2'- H-6'	multipeto	129,17	C-4'	129,43	C3'C5'
7,60	H-3', H-5', H-4'	multipeto	129,45	C-2'C-6'	129,89	C2'C6'
			129,90	C-3'C5'	130,65	C-5
			130,66	C-5		
			136,22	C-1'		
			141,82	C-9		
			156,62	C-4		
			161,27	C-7		
			162,47	C-2		

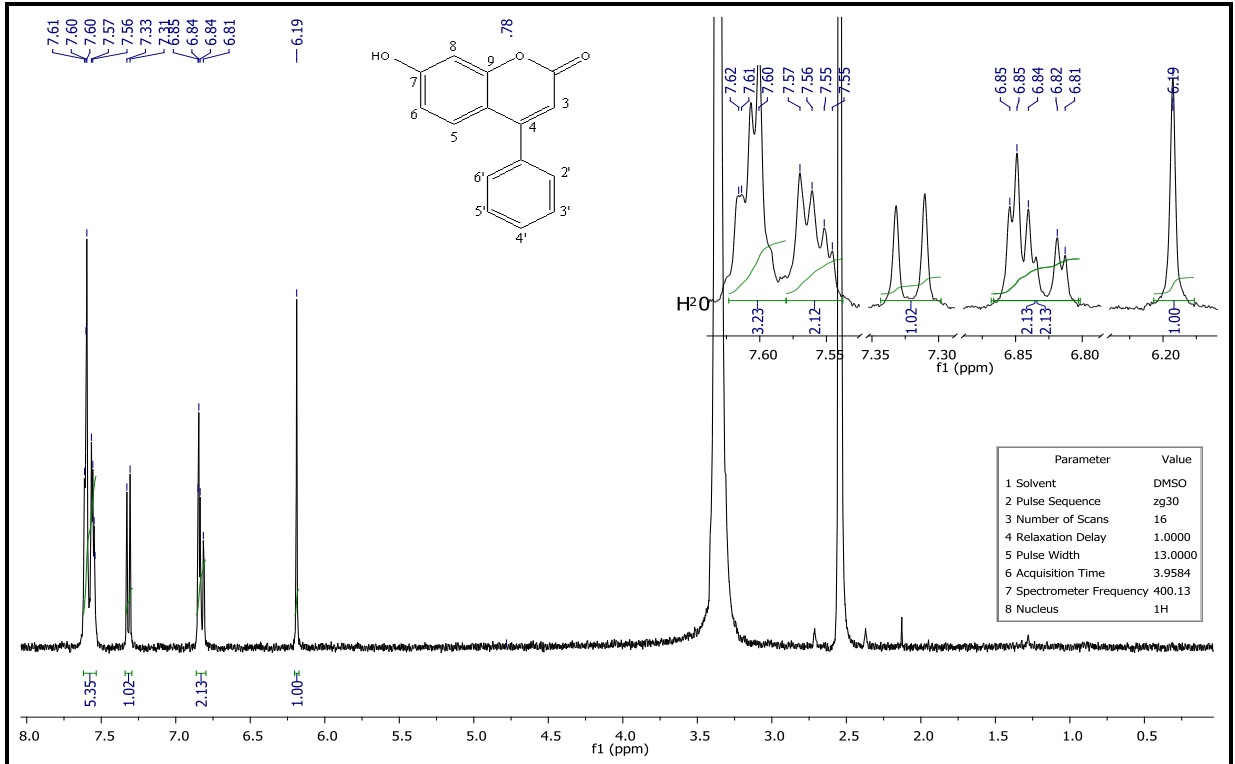


FIGURA 24 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 1 a 400 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$.

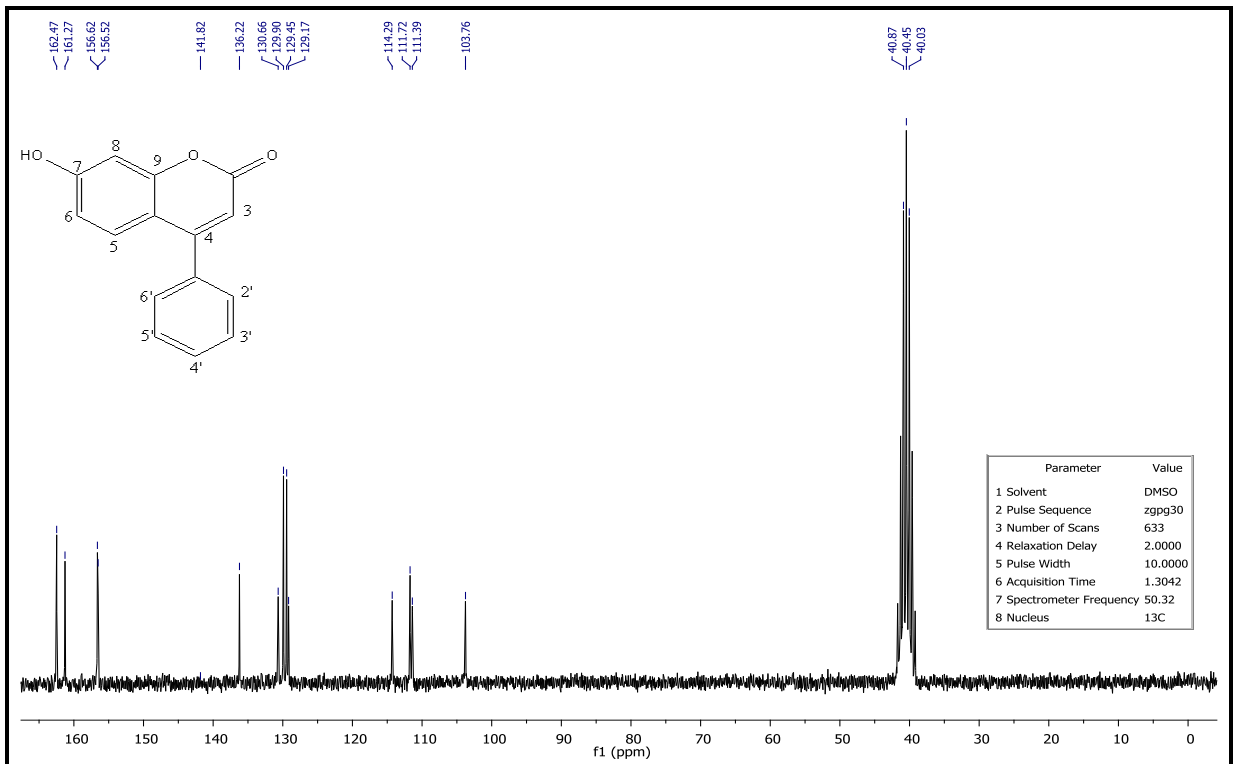


FIGURA 25 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 1 a 50 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$.

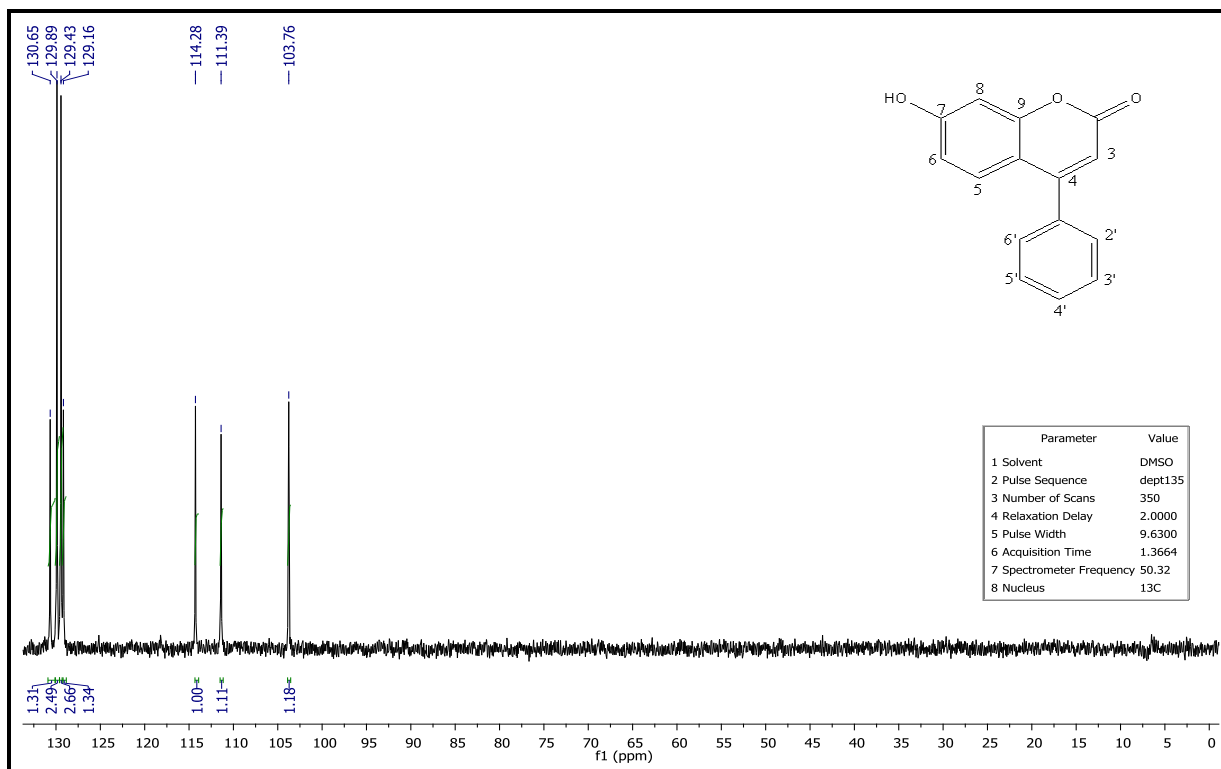


FIGURA26- Subespectro DEPT 135 do derivado 1 a 50 MHz, em DMSO- d_6 .

Para confirmação da massa molecular do 4-fenil-7-hidroxycumarina foi realizada uma análise por espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight). O espectrograma (Figura27) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 261,0611, o qual é massa do íon de fórmula $C_{15}H_{10}O_3Na^+$.

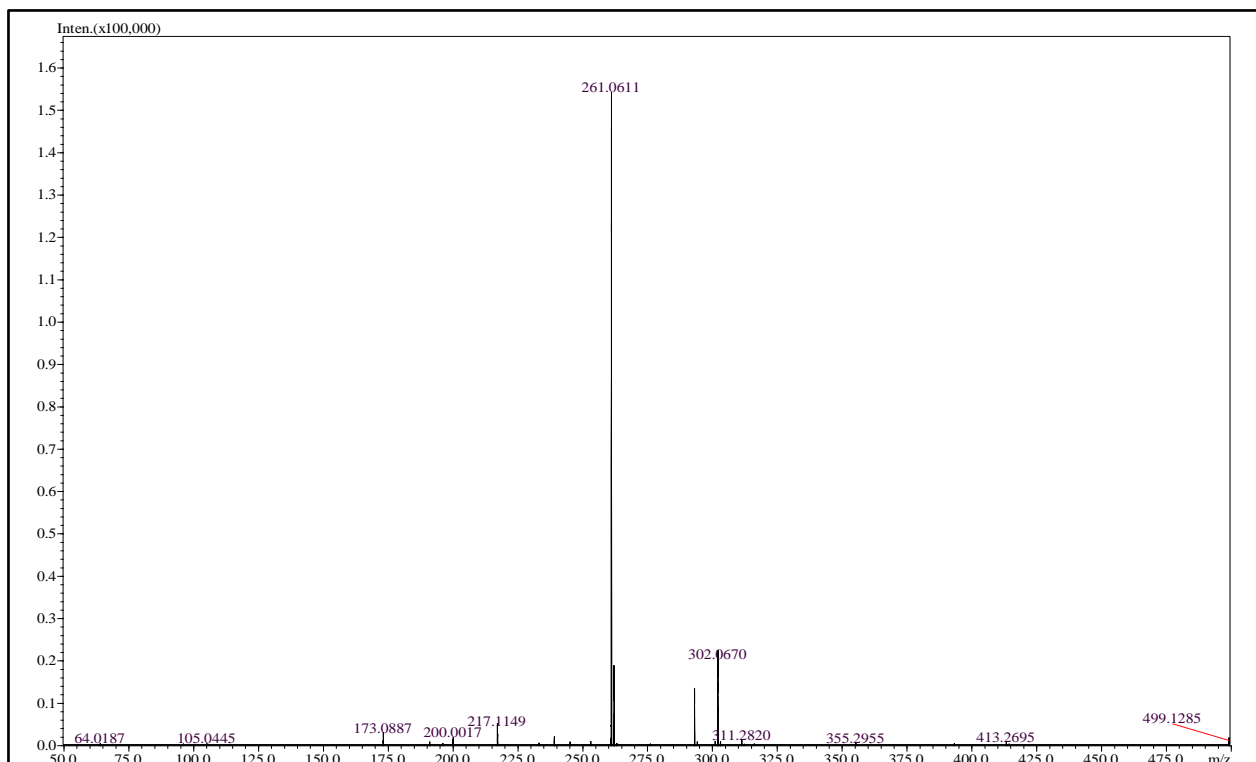


FIGURA27 - Espectro de Massas do derivado 1 obtido por MALDI-TOF.

Composto: 4-fenil-7-*O*-metilcumarina(2) (SURESH *et al.*, 2012)

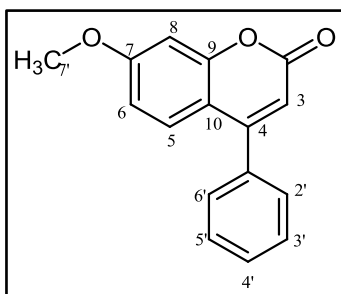


FIGURA28 - Derivado 2.

O derivado 2 (Figura28) foi obtido por reação de alquilação entre o 4-fenil-7-hidroxycumarinae iodeto de metila (CH_3I), na qual foi utilizado o carbonato de potássio (K_2CO_3) e os solventes dimetilformamida (DMF) e acetona (YANG *et al.*, 2009). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. 211°C e rendimento de 56,0%, índice de pureza 99,7%.

Os sinais de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C observados são compatíveis à estrutura base da cumarina referente ao composto 1. No espectro de RMN de ^1H (Figura30) foi observado um sinal intenso de simpleto em 3,89 ppm referente aos hidrogênios metílicos H-7'. Na observação do espectro de RMN de ^{13}C notou-se um sinal em 56,14 ppm referente ao carbono

metílico. Com os sinais observados em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (Figura 31) comprova-se a modificação na estrutura base do derivado 1 com inserção de um grupo metílico.

O espectro na região do IV (Figura 29) exibe banda forte em 3062 cm^{-1} característico de estiramento C-H de anel aromático, estiramento simétrico e assimétrico em $2850,79$ e $2860,79\text{ cm}^{-1}$, uma banda característica de deformação axial de ligação C-H do grupo metila, não é observada a banda de OH na região típica, indicando que o grupo encontra-se substituído e evidenciando a modificação. Apresenta banda de absorção forte em $1743,36\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C=O de carbonila e uma banda de absorção forte em $1207,44\text{ cm}^{-1}$ característico de C-O-C de éter e de formação angular fora do plano em $748,38\text{ cm}^{-1}$ (C-H de anel aromático monossustituído).

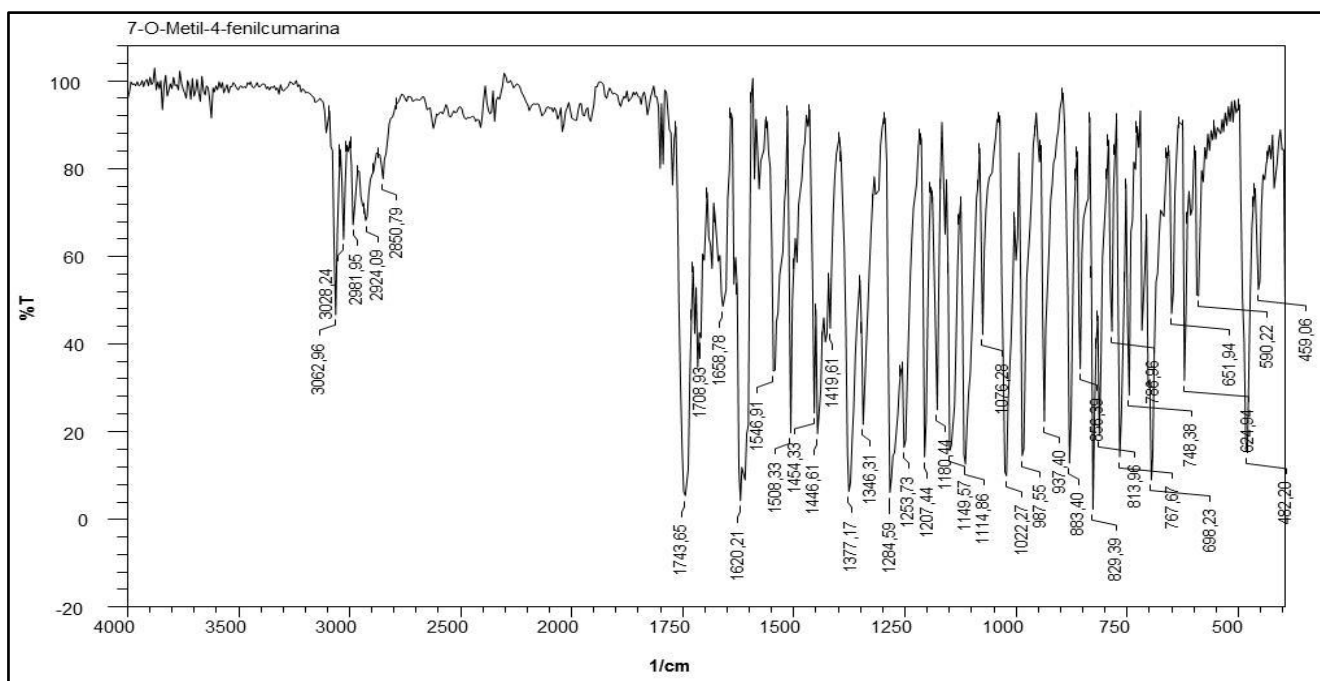
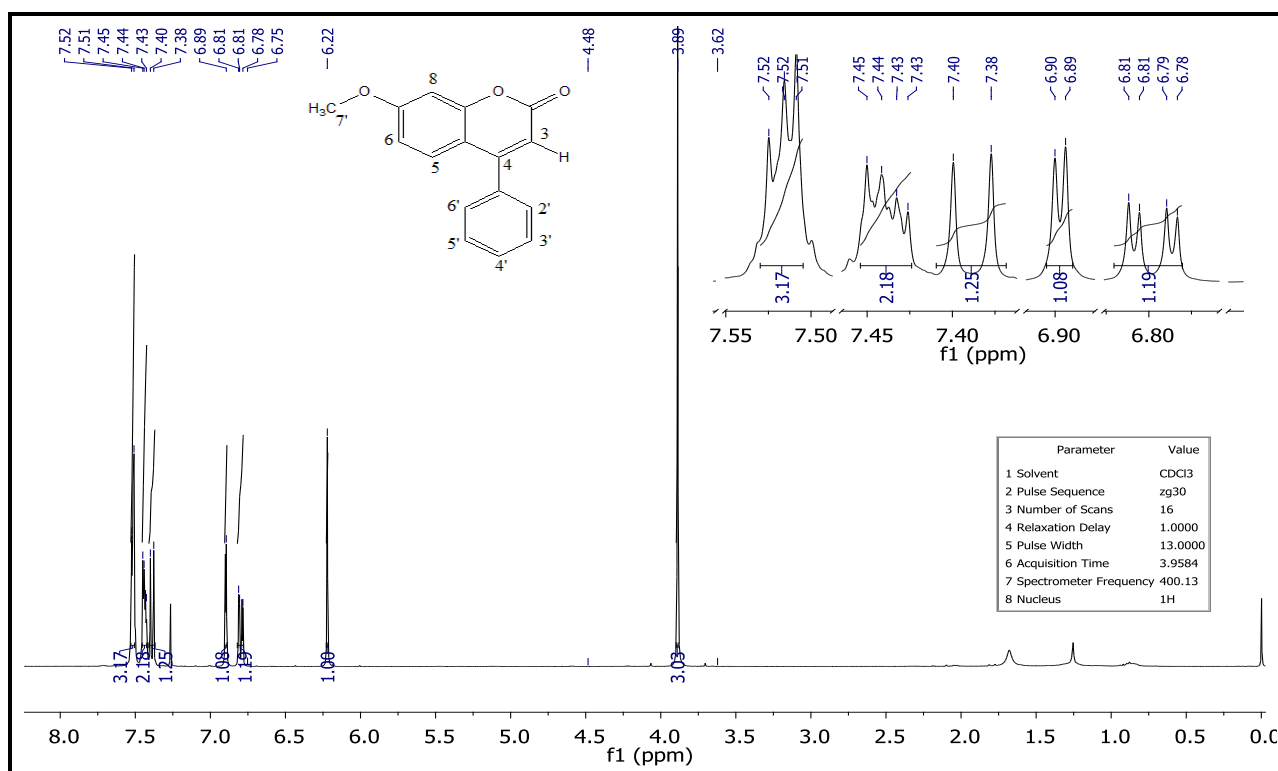


FIGURA 29 - Espectro no infravermelho do derivado 2 (KBr).

A Tabela 6 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura 30) e RMN de ^{13}C (Figura 31).

Tabela 6 - Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 2.

δ_H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	δ_C	Carbono	δ_C	DEPT
3,89	H-7'	simpleto	56,14	C-7'	56,14	C-7'
6,22	H-3	simpleto	101,46	C-8	101,02	C-8
6,81	H-6	duplo dupleto; 4;0;8,0	112,24	C-6	111,81	C-6
6,89	H-8	dupleto; 4,0	112,68	C-3	112,25	C-3
7,39	H-5	dupleto; 8,0	112,90	C-10	127,90	C-5
7,43-7,52	H-2,H-3', H-4', H-5', H-7'	multipleto	128,33	C-5	128,29	C-2'C-6'
			128,72	C-2'C-6'	128,74	C-3'C5'
			129,17	C-3'C5'	129,49	C-4'
			129,92	C-4'		
			135,95	C-1'		
			156,17	C-9		
			156,39	C-4		
			161,56	C-7		
			163,17	C-2		

**FIGURA30** - Espectro de RMN de 1H do derivado 2 a 400 MHz, em $CDCl_3$.

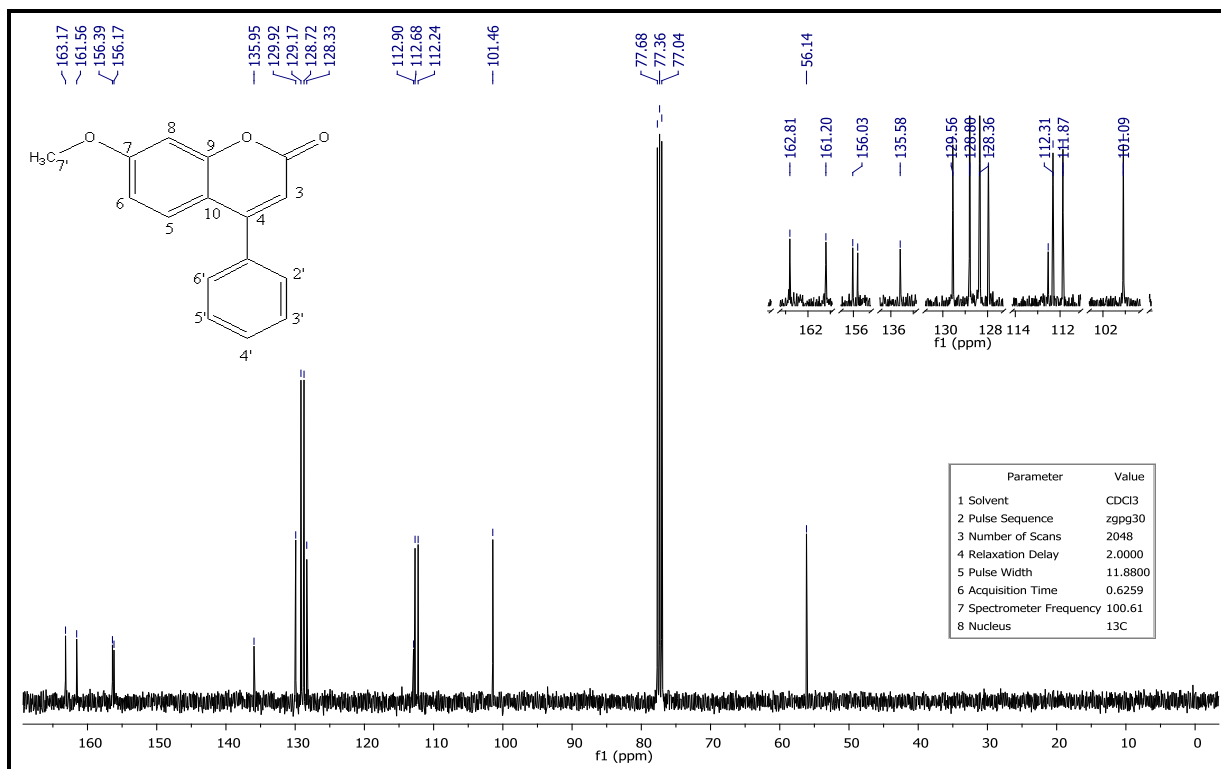


FIGURA31 - Espectro de RMN de ¹³C do derivado 2 a 100 MHz, em CDCl₃.

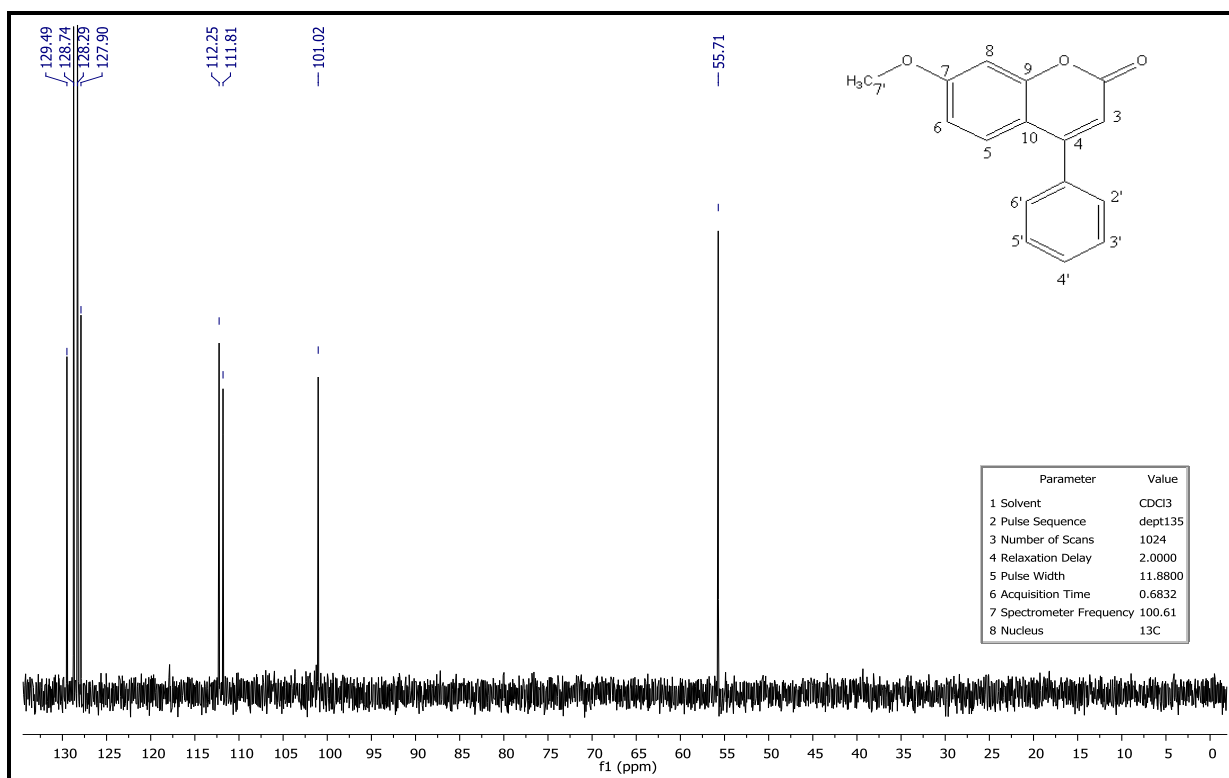


FIGURA32- Subespectro DEPT 135 do derivado 2 a 100 MHz, em CDCl₃.

Para confirmação da massa molecular do 4-fenil-7-*O*-metilcumarina foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O

espectrograma (Figura 33) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 275,0049, o qual é massa do íon de fórmula $C_{16}H_{12}O_3Na^+$.



FIGURA 33 - Espectro de massas da 4-fenil-7-*O*-metilcumarina obtido por MALDI-TOF.

Composto: 4-fenil-7-*O*-prenilcumarina(3) (RIZZI *et al.*, 2012)

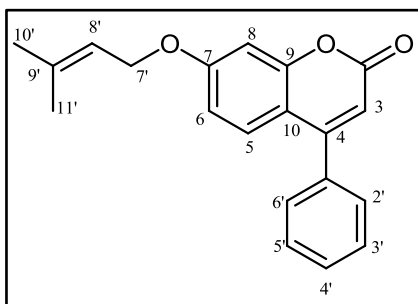


FIGURA 34 - Derivado 3.

O derivado 3 (Figura 34) foi obtido por reação de alquilação entre o 4-fenil-7-hidroxycumarina e 1-cloro-3-metil-but-2-eno, na qual foi utilizado o carbonato de potássio (K_2CO_3) e os solventes dimetilformamida (DMF) e acetona (YANG *et al.*, 2009). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. 222°C e rendimento de 57,2%, índice de pureza 98,3%.

Os sinais de RMN de 1H e RMN de ^{13}C observados são compatíveis à estrutura base da cumarina referente ao composto 1. No espectro de RMN de 1H (Figura 36) foram

observados dois simpletos em 1,77 e 1,81 ppm referentes aos hidrogênios metílicos H11' e H10', um duplete em 4,59 ppm com $J=8,0$ Hz referente ao hidrogênio H7' e um tripleto em 5,48 ppm com $J=4,0$ Hz referente ao hidrogênio H8'. Observou-se sinais no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 37) em 18,64 e 26,17 ppm referentes aos carbonos metílicos C10' e C11' e um sinal em 65,75 referente ao carbono C7'. Em 118,93 ppm um sinal também foi observado, referente ao carbono C8' e outro sinal em 135,93 ppm referente ao carbono C9'. Com os sinais observados em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C comprova-se a modificação na estrutura base do derivado 1 com a inserção de um grupo prenil.

O espectro na região do IV (Figura 36) exibe banda forte em $3062,96\text{ cm}^{-1}$, característico de estiramento C-H de anel aromático; estiramento simétrico e assimétrico em $2862,36$ e $2966,52\text{ cm}^{-1}$ referente a C-H₃; estiramento de ligação C-H sp^2 em $3032,10\text{ cm}^{-1}$; não é observada a banda de OH na região típica, indicando que o grupo encontra-se substituído, evidenciando a modificação. Apresenta banda de absorção forte em $1708,93\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C=O de carbonila e uma banda de absorção forte em $1149,57\text{ cm}^{-1}$ característico de C-O-C de éter e de formação angular fora do plano em $702,09\text{ cm}^{-1}$ (C-H de anel aromático monossustituído).

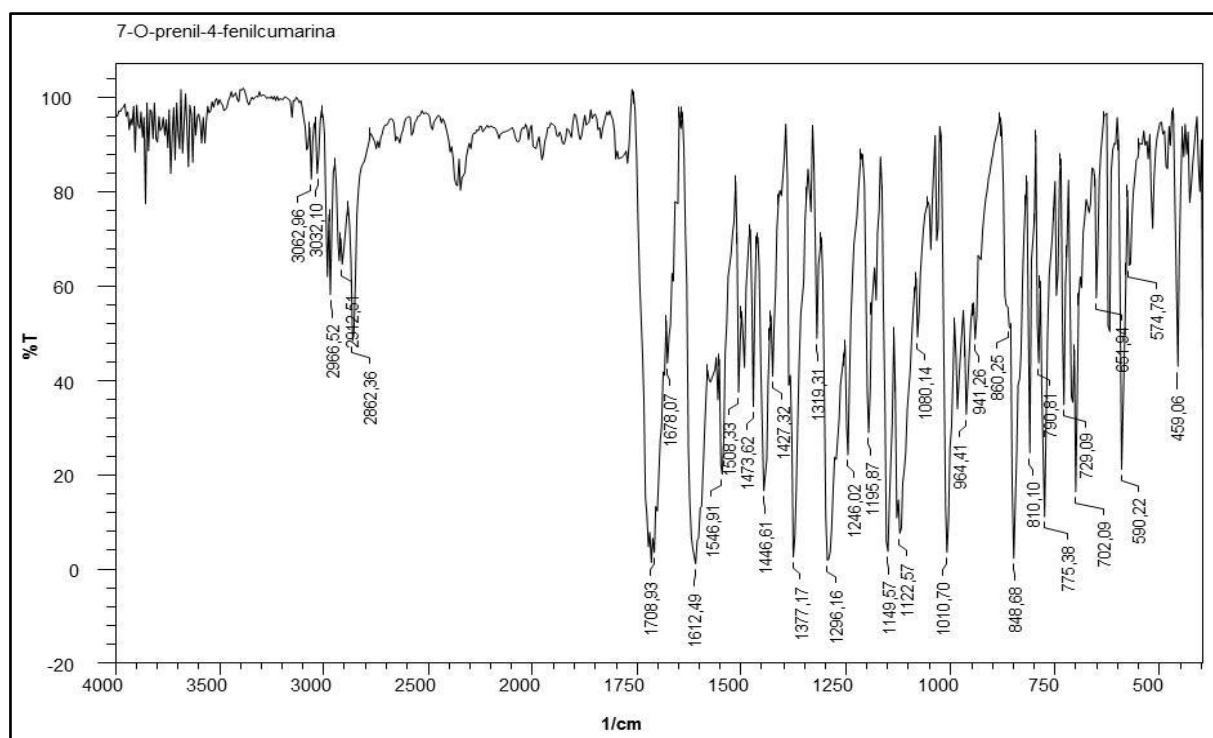
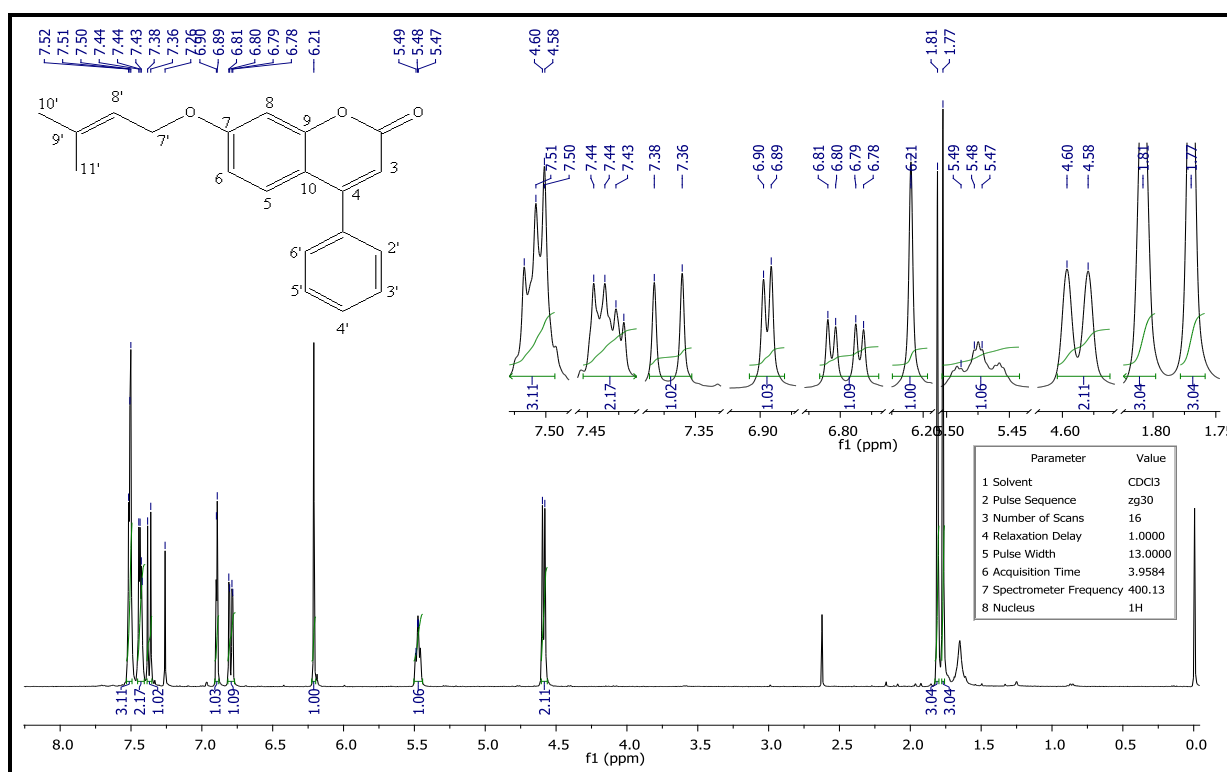


FIGURA35 - Espectro no infravermelho do derivado 3 (KBr).

A Tabela 7 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura36) e RMN de ^{13}C (Figura37).

Tabela 7- Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 3.

δ_H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	δ_C	Carbono	δ_C	DEPT
1,77	H-10'	Simpleto	18,64	C-11'	18,64	C-11'
1,81	H-11'	Simpleto	26,17	C-10'	26,18	C-10'
4,59	H-7'	duplete 8,0	65,75	C-7'	65,75	C-7'
5,48	H-8'	tripleto 4,0;4,0	102,10	C-8	102,10	C-8
6,21	H-3	Simpleto	112,05	C-6	112,05	C-6
6,79	H-6	duplo duplete; 4,0;7,6	112,72	C-10	113,32	C-3
6,89	H-8	duplete; 4,0	113,32	C-3	118,93	C-8'
7,37	H-5	duplete; 7,6	118,93	C-8'	128,26	C-5
7,43- 7,52	H-2',H-3', H-4',H-5', H-7'	multiplete	128,26	C-5	128,72	C-2'C-6'
			128,72	C-2'C-6'	129,15	C-3'C5'
			129,15	C-3'C5'	129,90	C-4'
			129,90	C-4'		
			135,93	C-9'		
			139,71	C-1		
			156,24	C-9		
			156,28	C-4		
			161,64	C-7		
			162,41	C-2		

**FIGURA36** - Espectro de RMN de 1H do derivado 3 a 400 MHz, em $CDCl_3$.

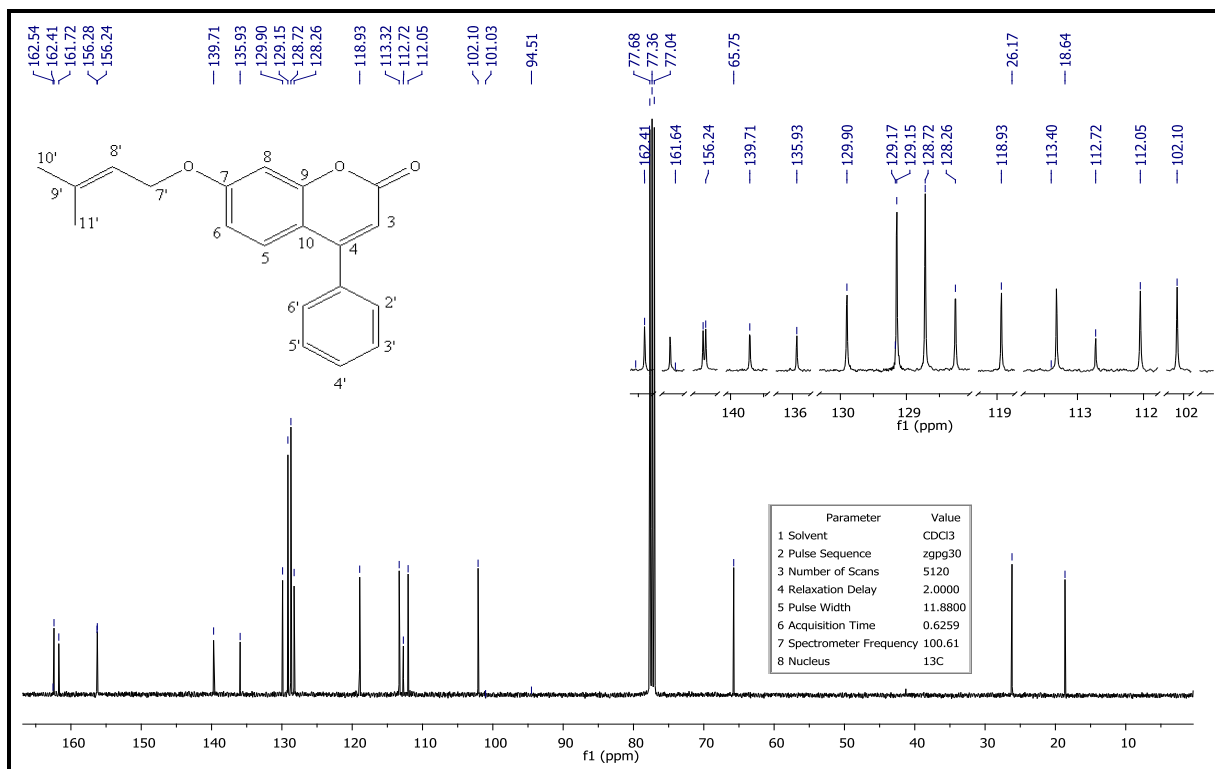


FIGURA 37- Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 3 a 100 MHz, em CDCl_3 .

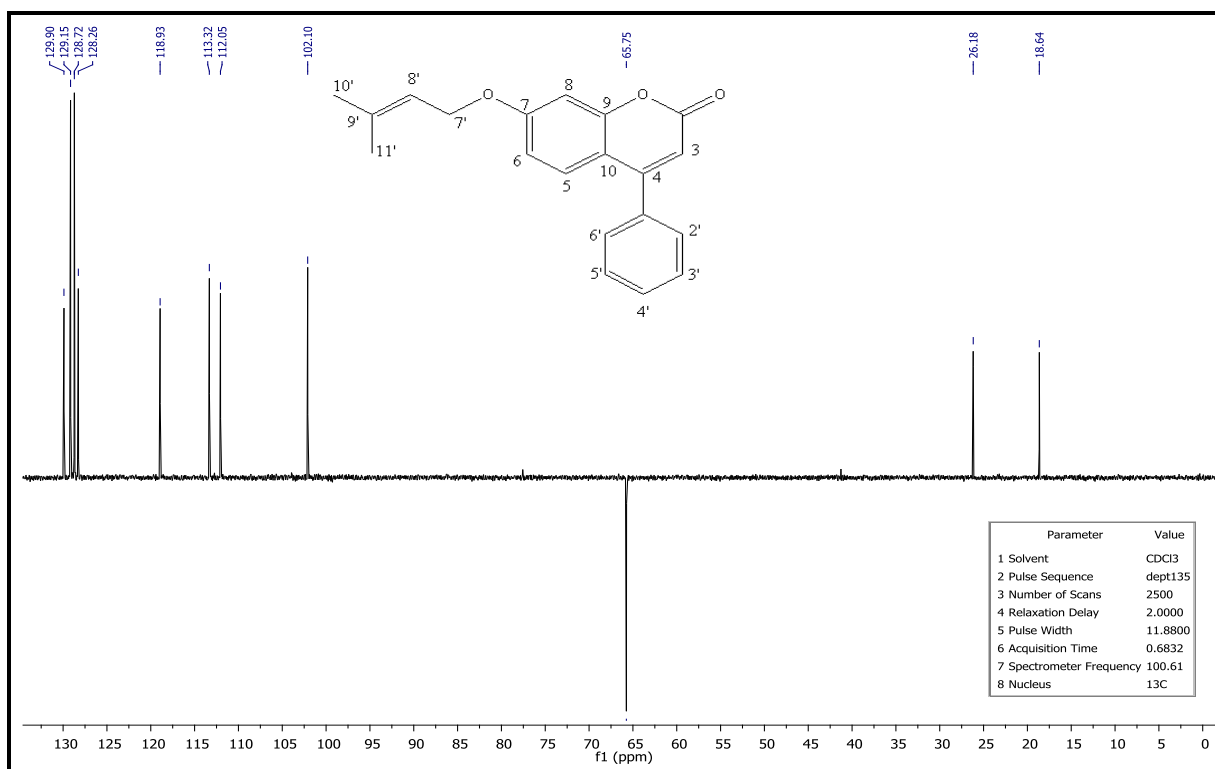


FIGURA 38 - Subespectro DEPT 135 do derivado 3 a 100 MHz, em CDCl_3 .

Para confirmação da massa molecular do 7-O-prenil-4-fenilcumarinafoi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O

espectrograma (Figura39) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 329,0928, o qual é massa do íon de fórmula $C_{20}H_{18}O_3Na^+$.

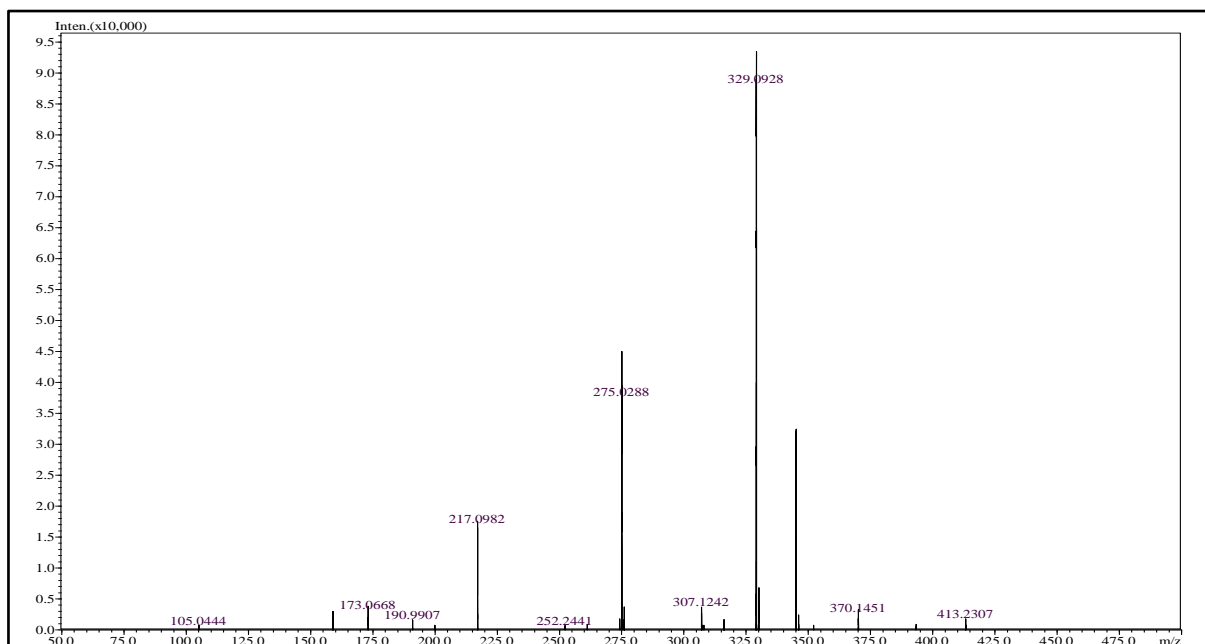


FIGURA39 - Espectro de massas do derivado 3 obtido por MALDI-TOF.

Composto- 4-fenil-7-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)cumarina(IC7)
(BRENZAN *et al.*,2008).

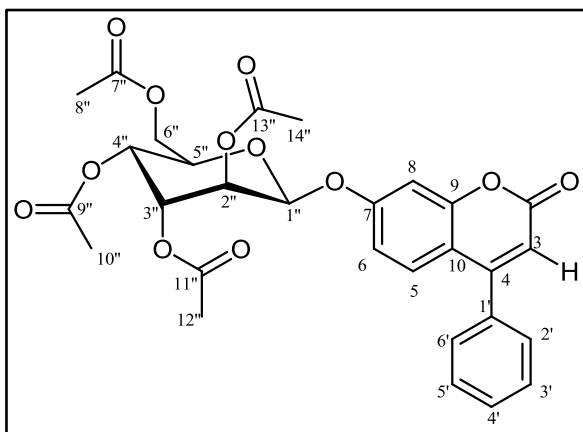


FIGURA 40 - Derivado 7.

O derivado 7 (Figura 40) foi obtido por reação de glicosilação entre os derivados 6 e 4-fenil-7-hidroxycumarina, onde utilizou-se hidróxido de potássio (KOH) e acetona (YANG *et al.*, 2009). O derivado apresentou-se como um sólido branco com p.f. 180°C e rendimento de 58,6%, índice de pureza de 100,0%.

Os sinais de RMN de 1H e RMN de ^{13}C observados são compatíveis à estrutura base da cumarina referente ao composto 1. No espectro de RMN de 1H (Figura 42) foram

observados quatro simpletos referentes à 12H, das quatro CH_3COO em 2,04-2,12 ppm. Um multipletto em 3,90-3,94 ppm, referente ao hidrogênio H5''. Em 4,18 ppm dupletto com $J=10,0$ Hz referente ao H1''. Em 4,27 a 5,35 ppm, observou-se multipletos referentes aos hidrogênios H2'', H3'', H4'' e H6''. Os sinais do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 43) foram observados dois sinais em 20,91; 20,98; 21,03 ppm referentes aos carbonos C8'', C10'', C11'' e C14'' do CH_3COO . Os sinais observados, em 159,66; 169,73; 170,49 e 170,93 ppm referentes aos carbonos carbonílicos CH_3COO referentes aos carbonos C7'', C9'', C12'' e C13'' do CH_3COO . Os sinais em 62,17; 68,45; 71,31; 72,83; 72,93 e 98,71 ppm referentes aos C6'', C5'', C4'', C3'', C2'' e C1'', respectivamente, foram atribuídos aos carbonos do glicosídeo peracetilado. Com os sinais observados em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C comprovam a modificação na estrutura base do derivado 1 com a inserção de um grupo glicosídeo peracetilado.

O espectro na região do IV (Figura 41) exibe banda forte em $2970,38\text{ cm}^{-1}$ característico de estiramento C-H₃, estiramento de ligação C-H sp² em $2881,85\text{ cm}^{-1}$. Apresenta banda de absorção forte em $1752,22\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C=O de carbonila e uma banda de absorção forte em $1114,85\text{ cm}^{-1}$ característico de C-O-C de éter, de formação angular fora do plano em $709,80\text{ cm}^{-1}$ (C-H de anel aromático monossustituído).

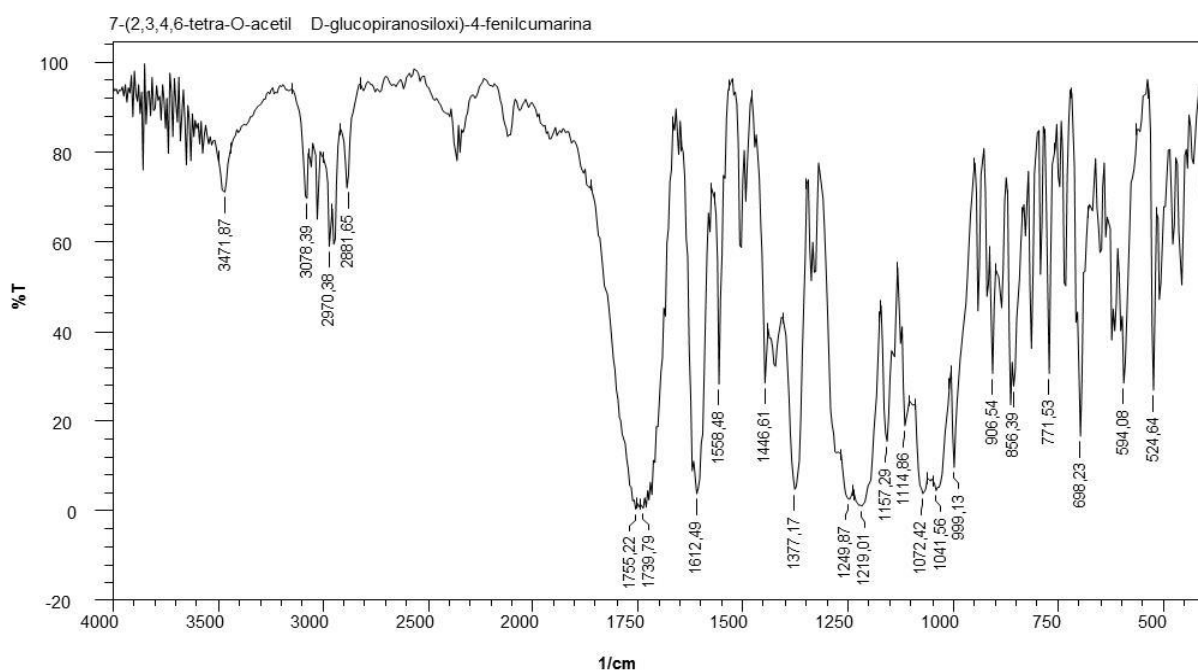


FIGURA 41 - Espectro de infravermelho do derivado 7 (KBr).

A Tabela 8 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura 42) e RMN de ^{13}C (Figura 43).

Tabela 8 - Deslocamentos químicos δ_H de RMN de ^1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 7.

δ_H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	δ_C	Carbono	δ_C	DEPT
2,04	H-12'	simpleto	20,91	C-10''C-12''	20,91	C-10''11''
2,06	H-10'	simpleto	20,98	C-8''	20,93	C-8''
2,06	H-14,'	simpleto	21,03	C-14''	21,03	C-14''
2,12	H-8''	simpleto	62,17	C-6''	62,17	C-6''
3,90-3,94	H-5''	multipeto	68,45	C-5''	68,45	C-5''
4,18	H-1''	dupeto; 10,0	71,31	C-4''	71,31	C-4''
4,27-4,30	H-2''	multipeto	72,83	C-3''	72,83	C-3''
5,14-5,17	H-3''	multipeto	72,93	C-2''	72,93	C-2''
5,17-5,19	H-4''	multipeto	98,71	C-1''	98,71	C-1''
5,28-5,35	H-6''	multipeto	104,54	C-5	104,54	C-5
6,27	H-3	simpleto	113,50	C-6	113,50	C-6
6,85	H-6	duplo dupeto; 2,4;6,4;	114,30	C-8	114,31	C-8
7,02	H-5	dupeto 6,4	114,87	C-1'	128,56	C-4'
7,39-7,52	H-8, H-2', H-3', H-4', H-5', H-7'	multipeto	128,56	C-4'	128,68	C-5'C-3'
			128,67	C-5'C-3'	129,27	C6'C2'
			129,27	C-6'C-2'	130,10	C-3
			130,10	C-3		
			135,58	C-10		
			155,81	C-4		
			155,92	C-7		
			159,66	C-9		
			161,02	C-2		
			169,56	C-11''		
			169,73	C-9''		
			170,49	C-7''		
			170,93	C-13''		

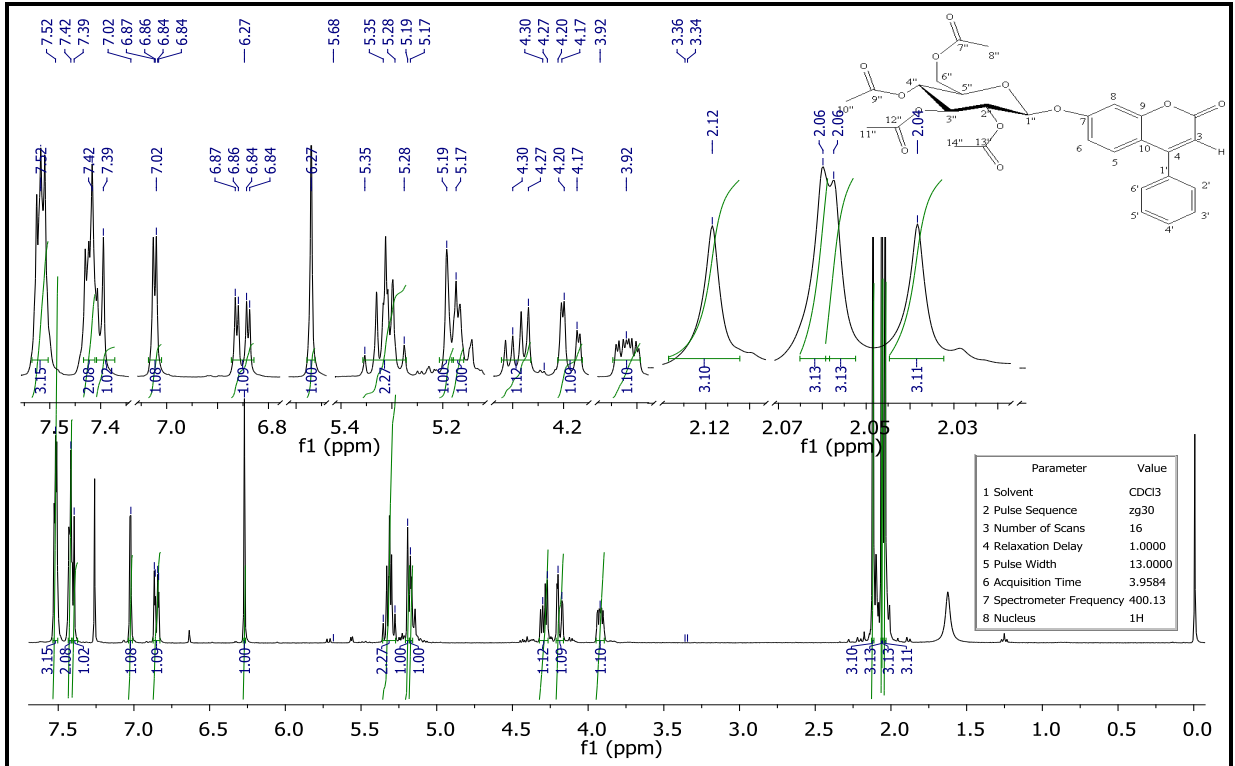


FIGURA 42 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 7 a 400 MHz, em CDCl_3 .

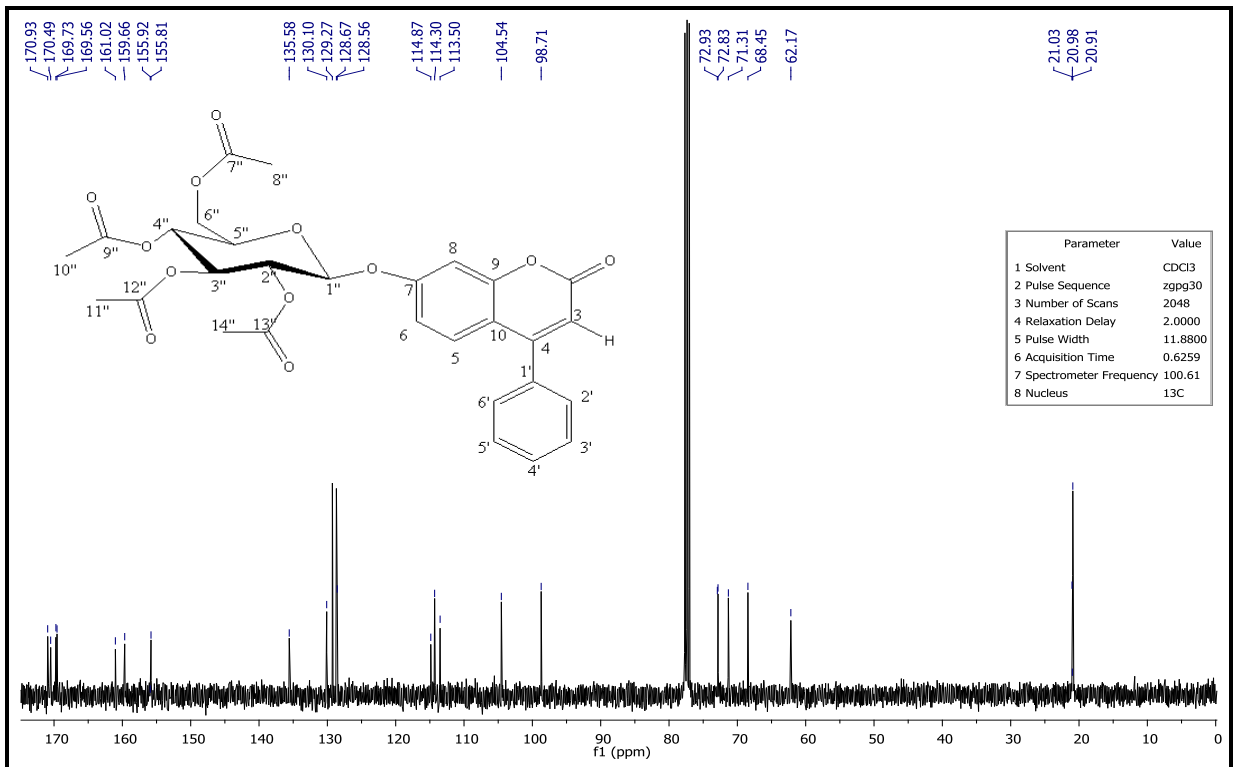


FIGURA 43- Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 7 a 100 MHz, em CDCl_3 .

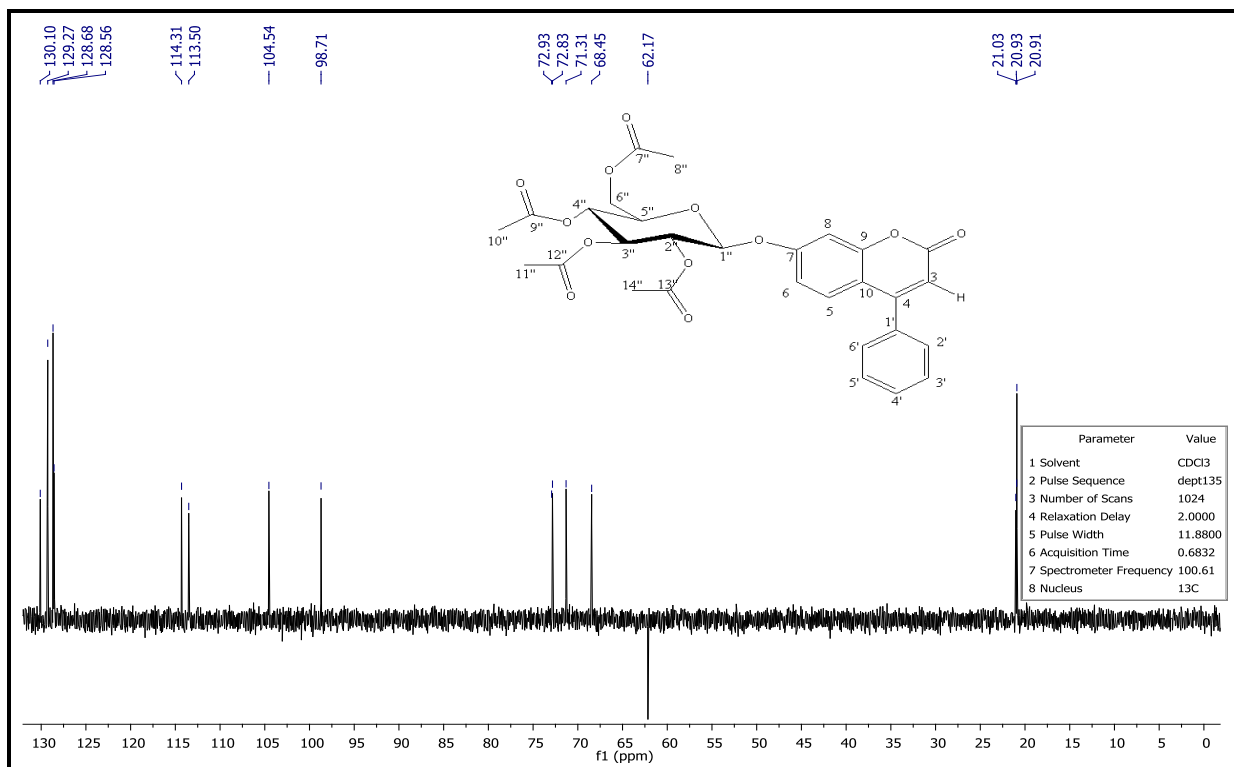


FIGURA 44 - Subespectro DEPT 135 do derivado 7 a 100 MHz, em CDCl_3 .

Para confirmação da massa molecular do 4-fenil-7(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)cumarina foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O espectrograma (Figura 45) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 591,1538, o qual é massa do íon de fórmula $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{O}_{12}\text{Na}^+$.

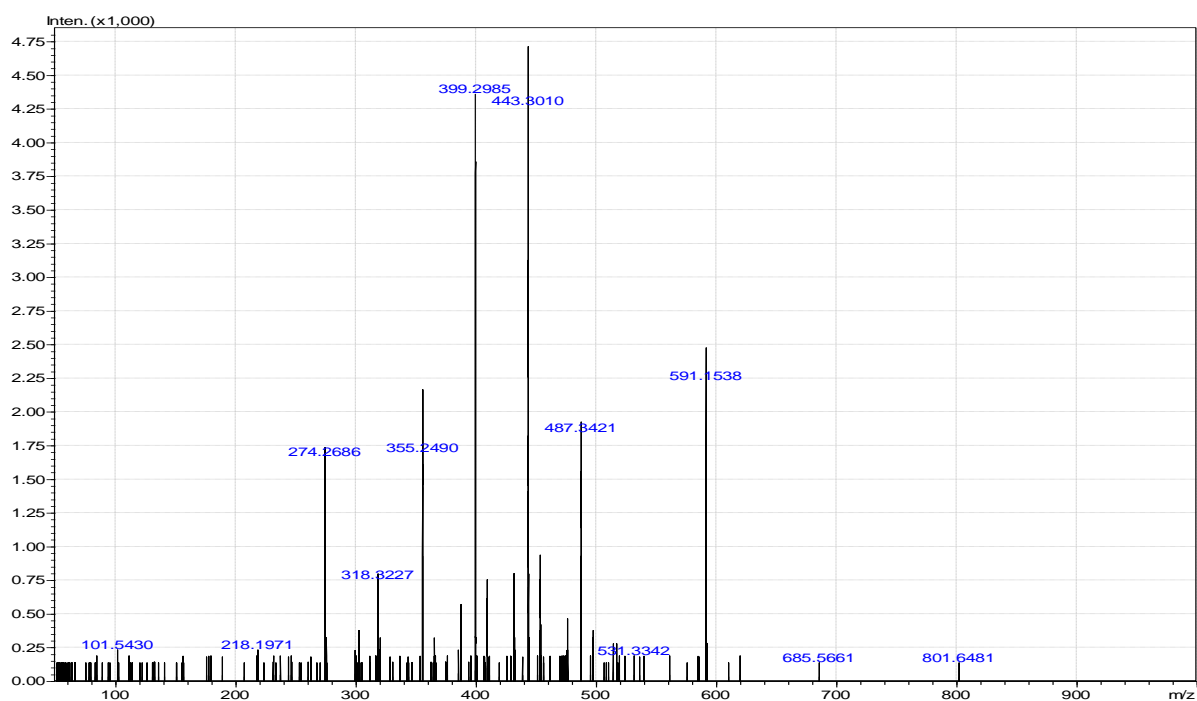


FIGURA 45 - Espectro de massas do derivado 7 obtido por MALDI-TOF.

Composto: 4-fenil-7-(β -D-Glucopiranosiloxi)cumarina (**IC6**) (BRENZAN *et al.*,2008)

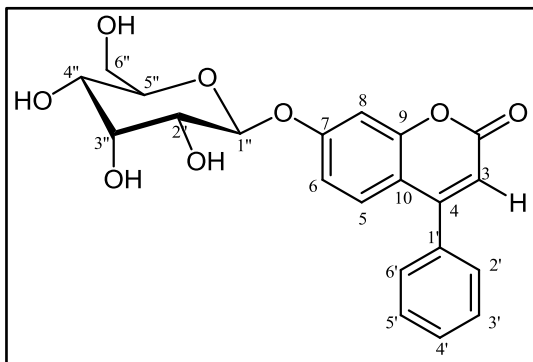


FIGURA 46 - Derivado 6.

O derivado 6 (Figura46) foi obtido por reação de transesterificação de 6 pelo método Zemplén para levar à formação de 4-fenil-7-(β -D-glucopiranosiloxi)cumarina, na qual foi utilizado metóxido de sódio (NaOMe). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. 233-234°C e rendimento de 68,2%, índice de pureza de pico: 0,996.

Os sinais de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C observados são compatíveis à estrutura base da cumarina referente ao composto 1. No espectro de RMN de ^1H (Figura 48) foram observados multipletosem 3,70-3,14 ppm referentes aos hidrogênios H-6'', H-5'', H-4'' e H-3''. Em 5,02 ppm, duplete com $J=4,0$ Hz referente ao H1''. Em 5,46-4,59 multipletos referentes aos hidrogênios H7'', H8'', H-9'' e H-10''. Os sinais do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 49) foram observados em 61,58 e 70,56 ppm referentes aos carbonos C6'' e C3''. Os sinais observados em 77,43; 78;13 e 135,85 ppm referentes aos carbonos C2''; C5'' e C1'' foram atribuídos aos carbonos do glicosídeo. Com os sinais observados em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C comprovou-se a modificação na estrutura base do derivado 1 com a inserção de um grupo glicosídeo peracetilado.

O espectro na região do IV (Figura 47) é observada uma banda larga e estreita em 3466,44 cm^{-1} de OH indicando que o grupo acetil foi removido, evidenciando a modificação C-H de anel aromático, estiramento em 2931,80 cm^{-1} referente à C-H₂. Apresenta banda de absorção forte em 1701,22 cm^{-1} referente ao estiramento C=O de carbonila e uma banda de absorção forte em 1122,57 cm^{-1} característico de C-O-C de éter, de formação angular fora do plano em 709,80 cm^{-1} referente a C-H de anel aromático monossustituído.

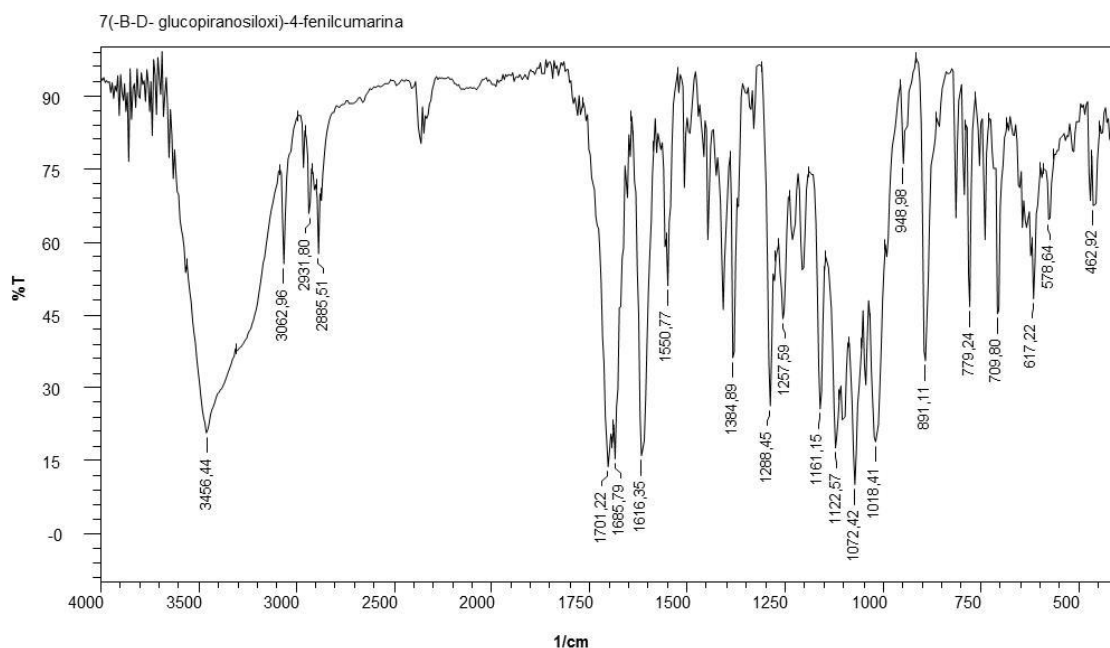


FIGURA 47 - Espectro de infravermelho do derivado 6.

A Tabela 9 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura48) e RMN de ^{13}C (Figura49).

Tabela 9 - Deslocamentos químicos δ_H de RMN de ^1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 6.

δ_H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	δ_C	Carbono	δ_C	DEPT
3,70- 3,14	H-6''H-5'' H-4''H-3''H-2''	multipeto	61,58	C-6''	61,58	C-6''
5,02	H-1''	dupeto; 4,0	70,56	C-3''	70,56	C-3''
5,46- 4,59	H-7''H-8'' H-9''H-10''	multipeto	74,06	C-4	74,06	C-4
6,25	H-3	simpleto	77,43	C-2''	77,43	C-2''
6,99	H-6	duplo dupeto; 8,8	78,13	C-5''	78,13	C-5''
7,12	H-8	dupeto 4,0	100,96	C-10	100,96	C-10
7,34	H-5	dupeto 8,8;	104,60	C-5	104,60	C-5
7,53	H-2',H-3', H-4', H-5', H-7'	multipeto	112,83	C-6	112,92	C-6
			113,68	C-7	114,70	C-1'
			114,70	C-1'	128,72	C-4'
			128,71	C-4'	129,39	C-5'C-3'
			129,39	C-5'C-3'	129,82	C-6'C-2'
			129,81	C-6'C-2'	130,64	C-8
			130,64	C-8		
			135,85	C-1''		
			155,98	C-9		
			160,90	C-3		
			161,25	C-2		

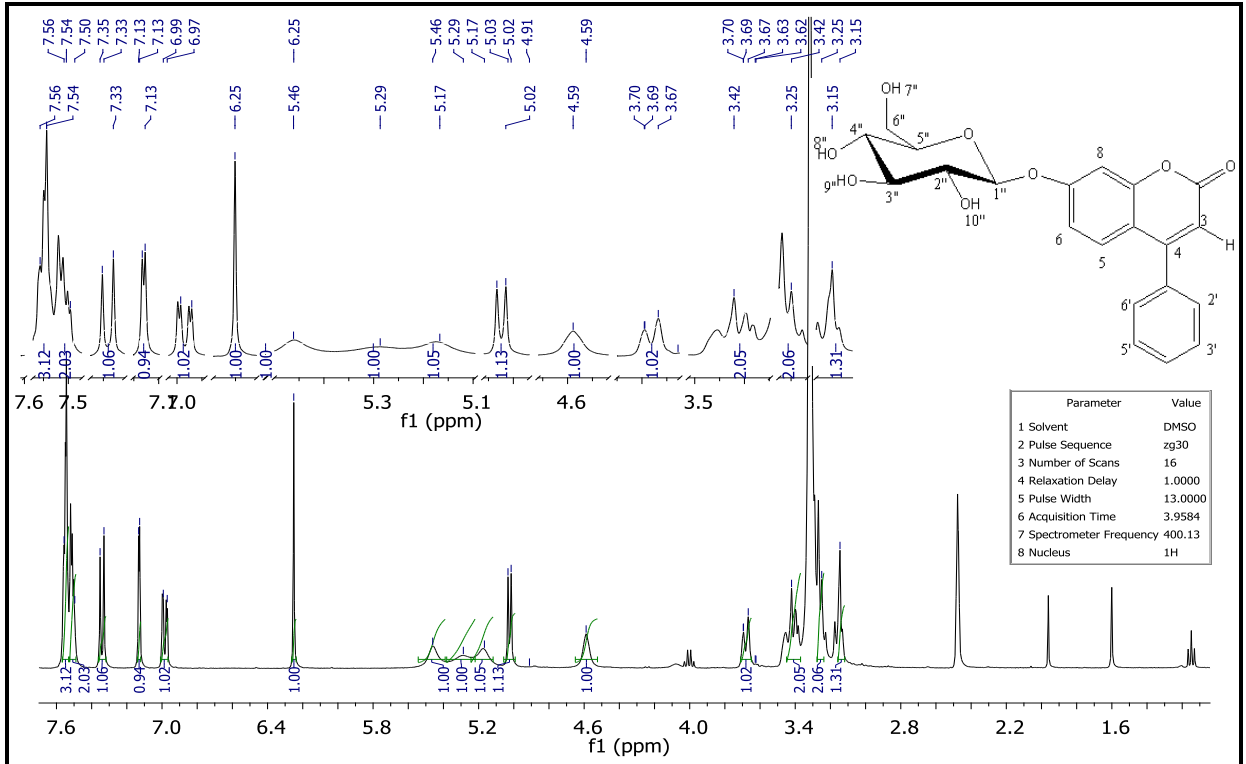


FIGURA 48 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 6 a 400 MHz, em DMSO-d_6 .

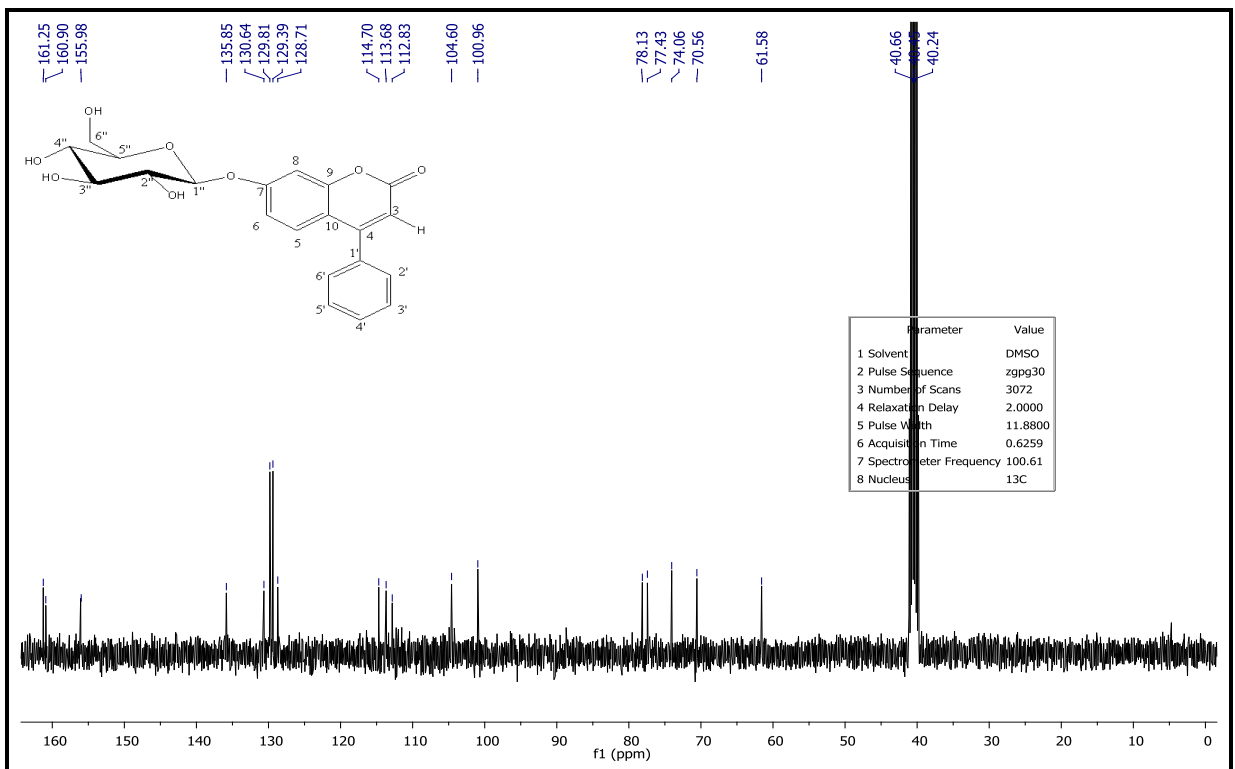


Figura 49 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 6 a 100 MHz, em DMSO-d_6 .

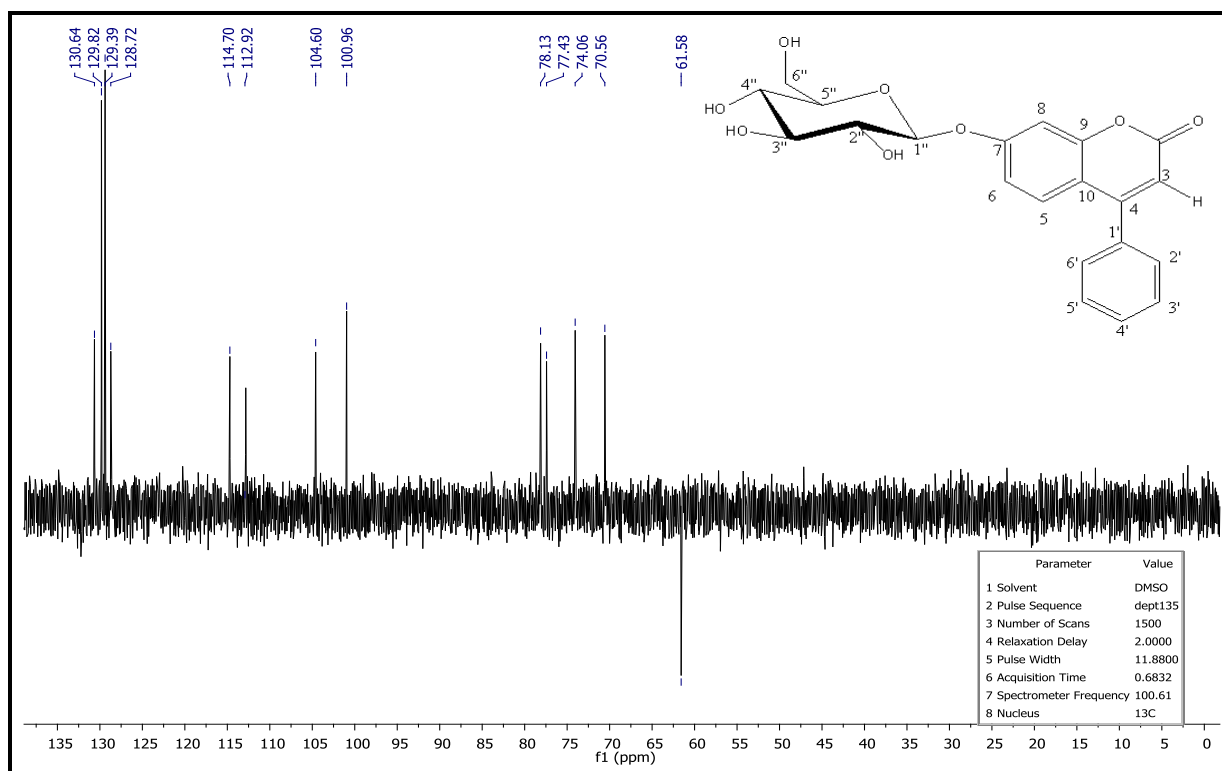


FIGURA50 - Subespectro DEPT 135 do derivado 6 a 100 MHz, em DMSO-d₆.

Para confirmação da massa molecular do 4-fenil-7-(β-D-glucopiranosiloxi)cumarina foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O espectrograma (Figura 51) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 423,1375, o qual é massa do íon de fórmula $C_{21}H_{20}O_8Na^+$.

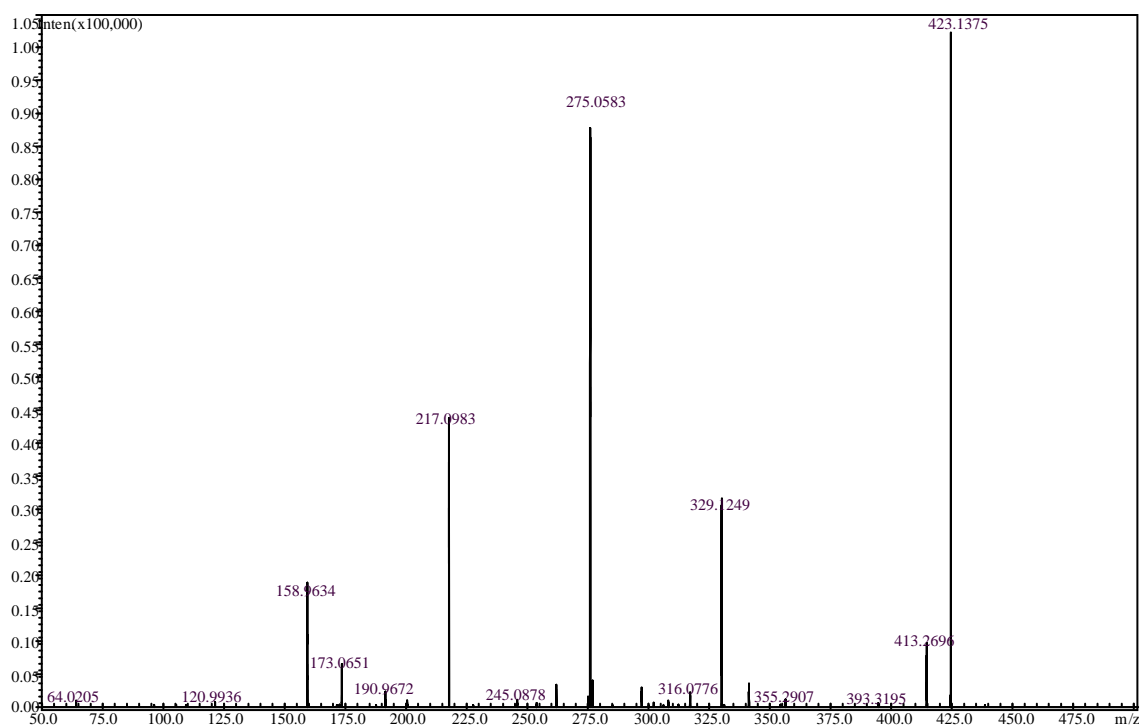


FIGURA51 - Espectro de Massas do derivado 6 obtido por MALDI-TOF.

Composto: 7-*O*-acetil-4-fenilcumarina (8) (SUBRAMANYAM *et al.*, 1974)

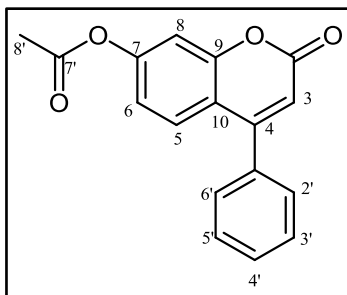


FIGURA52 - Derivado 8.

O derivado 8 (Figura 52) foi obtido por reação de alquilação entre o 4-fenil-7-hidroxicumarina e anidrido acético, na qual foi utilizado o carbonato de potássio (K_2CO_3) e os solventes dimetilformamida (DMF) e acetona (YANG *et al.*, 2009). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. 211°C e rendimento de 56,0%, índice de pureza de pico:.

Os sinais de RMN de 1H e RMN de ^{13}C observados são compatíveis à estrutura base da cumarina referente ao composto 1. No espectro de RMN de 1H (Figura 54) foi observado um simpleto em 2,34 ppm referente ao hidrogênio metílico H8''. Observou-se no espectro de RMN de ^{13}C um sinal em 20,87 ppm referente ao carbono metílico C8' e um sinal em 160,21 ppm referente ao carbono C7' do grupo acetil. Com os sinais observados em RMN de 1H e RMN de ^{13}C comprovou-se a modificação na estrutura base do derivado IC1.

O espectro na região do IV (Figura 53) exibe banda forte em $3077,48\text{ cm}^{-1}$ característico de estiramento C-H de anel aromático, estiramento simétrico e assimétrico em $2941,49$ referente a C-H₃, não é observada a banda de OH na região típica, indicando que o grupo encontra-se substituído pelo grupo acetil, evidenciando a modificação. Apresenta banda de absorção forte em $1733,07\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C=O de carbonila e uma banda de absorção forte em $1266,28\text{ cm}^{-1}$ característico de C-O-C de éter.

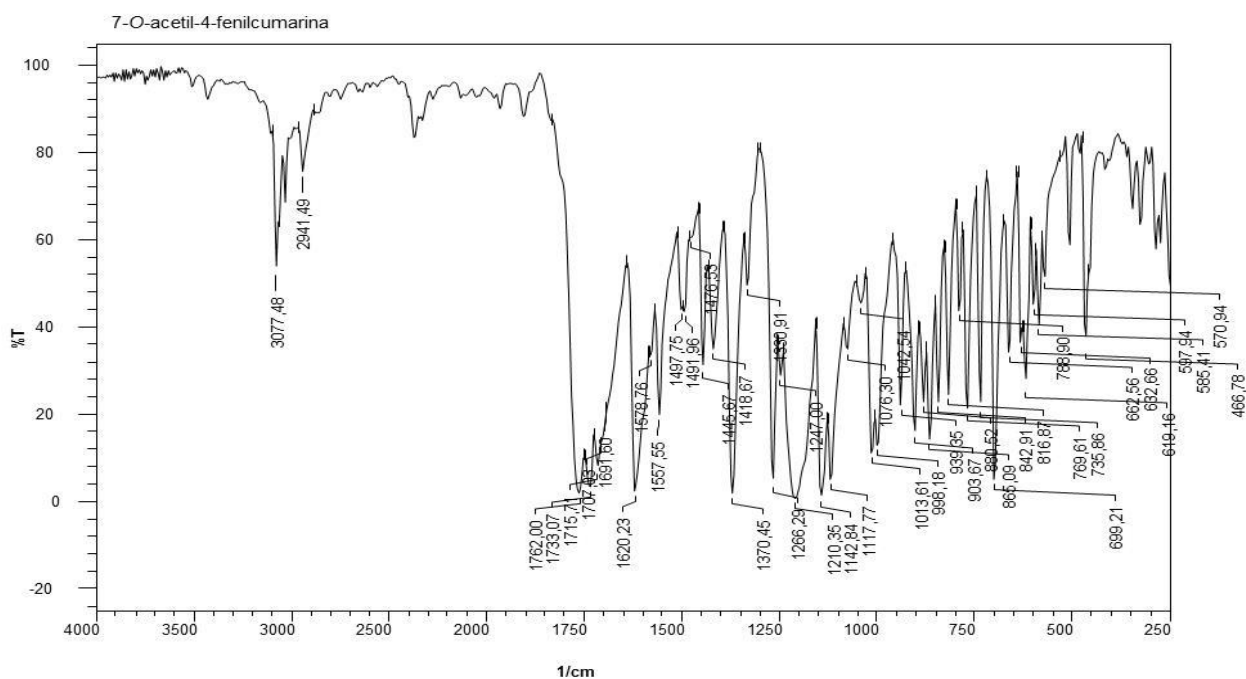
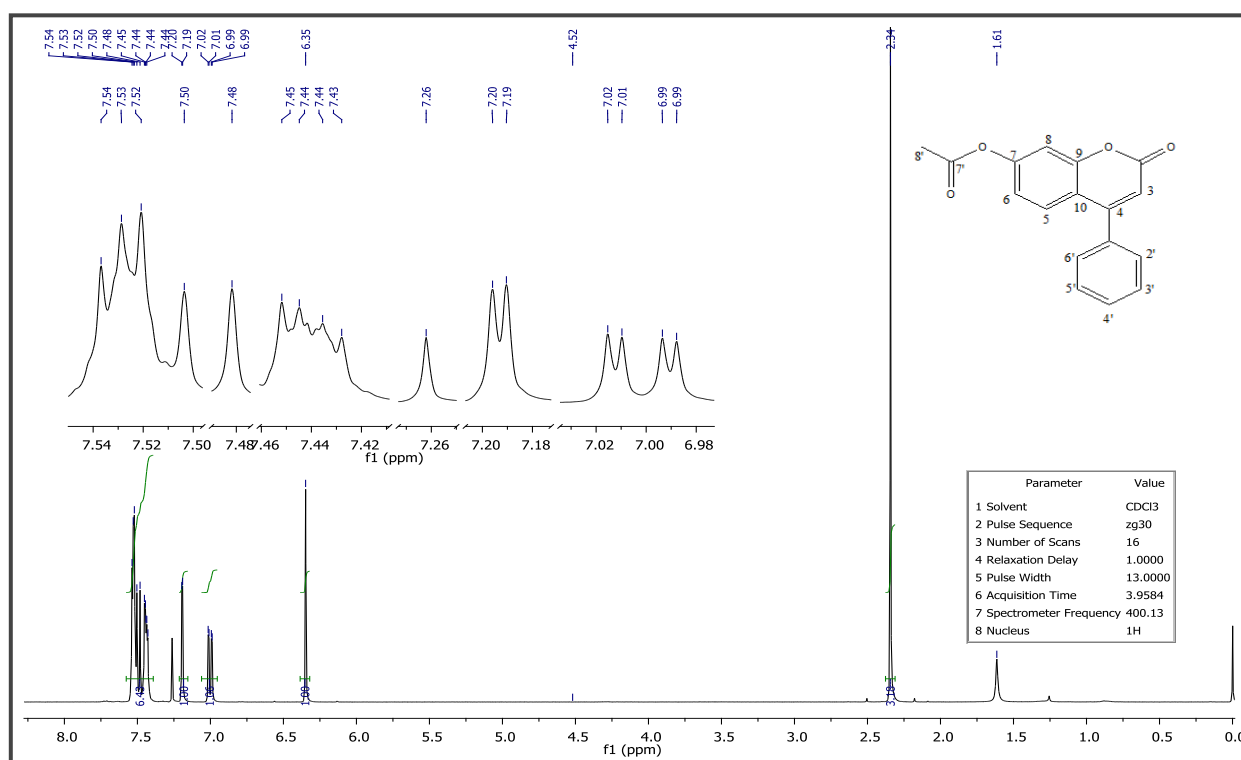


FIGURA 53 - Espectro de infravermelho do derivado 8 (KBr).

A Tabela mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura54) e RMN de ^{13}C (Figura55).

Tabela 10 - Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 8.

δ_H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	δ_C	Carbono	δ_C	DEPT
2,34	H-8'	simpleto	20,87	C-8'	20,87	C-8'
6,35	H-3	simpleto	110,47	C-3	110,46	C-3
7,01	H-6	duploduplo 2,4;7,6	114,31	C-8	114,30	C-8
7,19	H-8	duplo 2,4	116,68	C-10	117,84	C-6
7,49	H-5	duplo 7,6	117,84	C-6	127,64	C-5
7.44- 7,54	H-2',H-3' H-4' H-5'	multiplo	127,65	C-5	128,13	C-4'
			128,14	C-4'	128,72	C-3'C-5'
			128,73	C-2'C-6'	129,57	C-2'C-6'
			129,58	C-3'C-5'		
			134,85	C-1'		
			152,97	C-9		
			154,60	C-7		
			155,03	C-4		
			160,21	C-7'		
			168,47	C-2		

**FIGURA 54** - Espectro de RMN de 1H do derivado 8 a 400MHz, em $CDCl_3$.

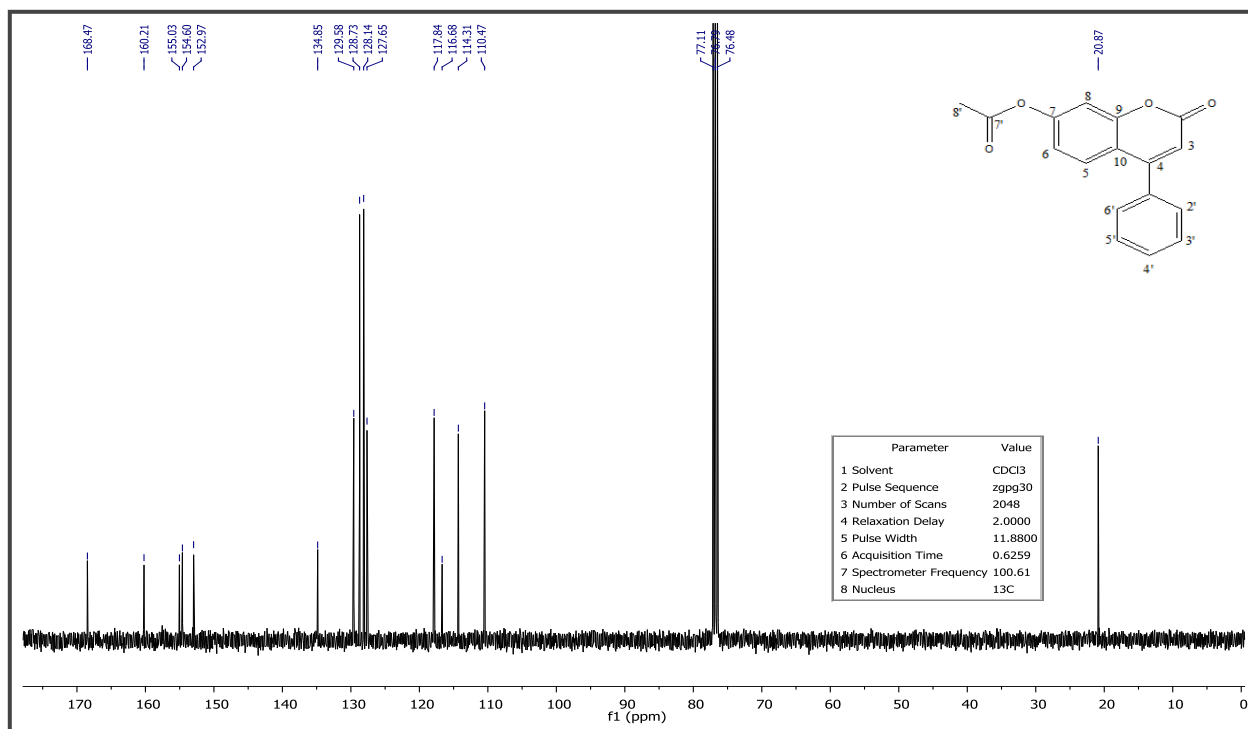


FIGURA 55 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 8 a 100MHz, em CDCl_3 .

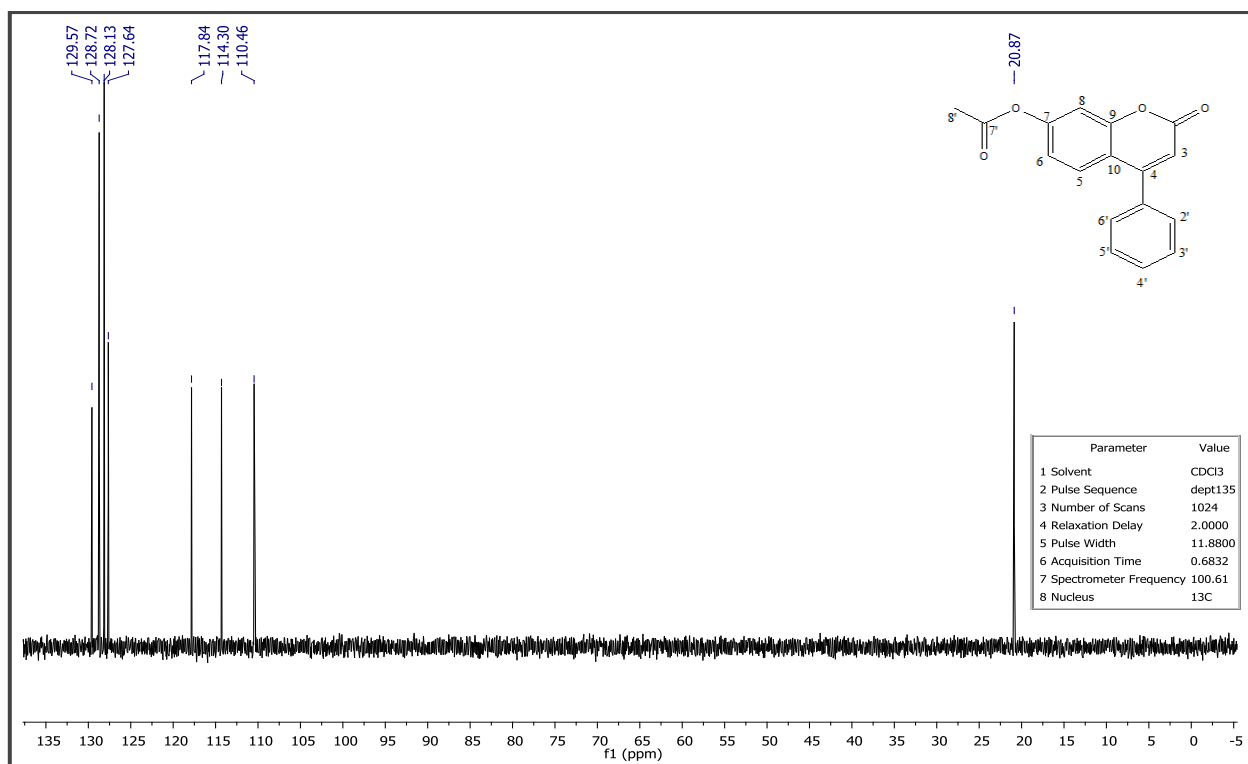


FIGURA 56 - Subespectro DEPT 135 do derivado 8 a 100MHz, em CDCl_3 .

Para confirmação da massa molecular do 7-O-acetil-4-fenilcumarina foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O

espectrograma (Figura 57) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 303,0515, o qual é massa do íon de fórmula $C_{17}H_{12}O_3Na^+$.

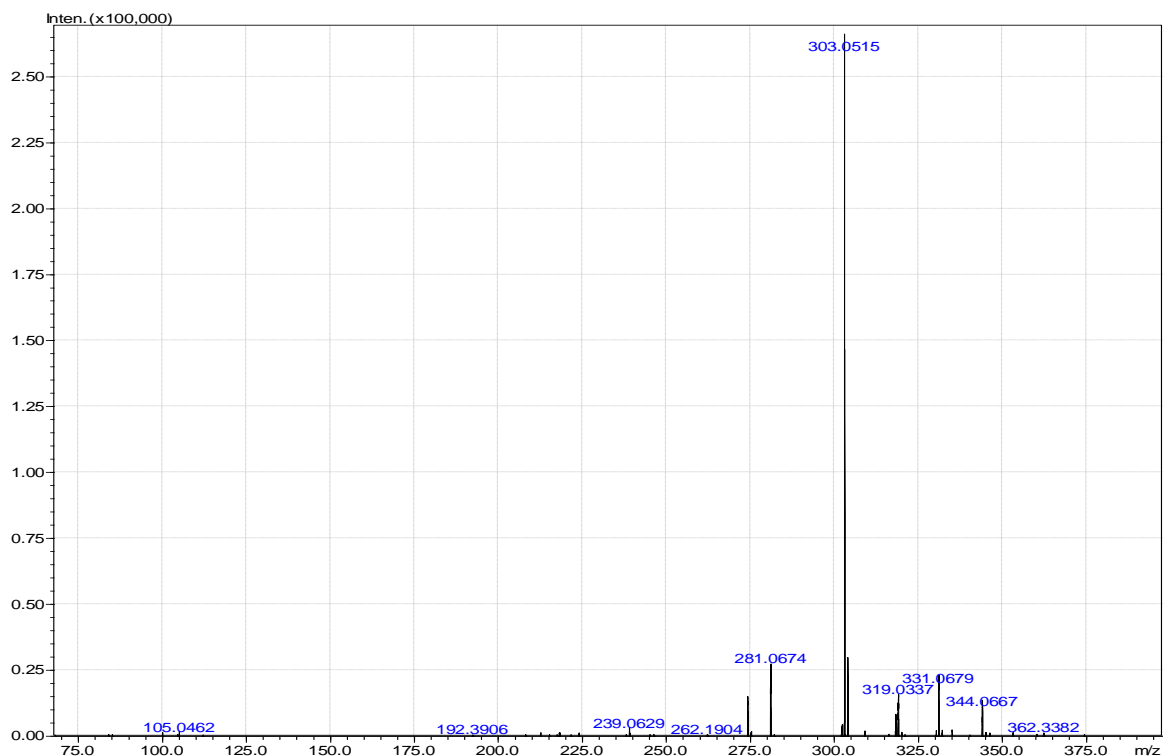


FIGURA57 - Espectro de massas do derivado 8 obtido por MALDI-TOF.

Composto: 7-*O*-butanoil-4-fenilcumarina (9) (Descrito pela primeira vez na literatura)

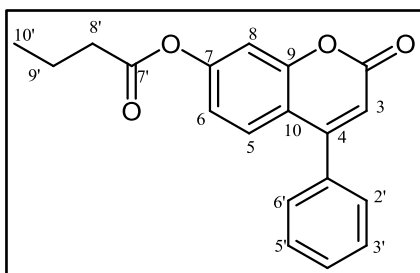


FIGURA 58 - Derivado 9.

O derivado 9 (Figura 58) foi obtido por reação de acilação entre o 4-fenil-7-hidroxicumarina e cloreto de butanoila, na qual foi utilizado o carbonato de potássio (K_2CO_3) e os solventes dimetilformamida (DMF) e acetona (YANG *et al.*, 2009). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. $188^\circ C$ e rendimento de 56,0%.

Os sinais de RMN de 1H e RMN de ^{13}C observados são compatíveis à estrutura base da cumarina referente ao composto 1. No espectro de RMN de 1H (Figura 60) foi observado um tripleto em 1,06 ppm com $J=8,0$ Hz referente ao hidrogênio H10', um sexteto em

1,80ppm com $J=8,0$ Hz referente ao hidrogênio H19' em triplete em 2,58 ppm com $J=8,0$ Hz, referente ao hidrogênio H8'.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 61) foi observado um sinal em 13,92 e 18,66 ppm referente ao carbono C9' e C10', um sinal em 36,50 referente ao carbono C8' e em 171,77 ppm um sinal referente ao carbono C6' ao carbono carbonílico. Com os sinais observados em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C comprovou-se a modificação na estrutura base do derivado 1 com a inserção de um grupo butanoila.

O espectro na região do IV (Figura 59) exibe banda forte em $3066,82\text{ cm}^{-1}$ característico de estiramento C-H de anel aromático, na região típica de OH é observado estiramento simétrico e assimétrico em $2883,58$ e $2951,09\text{ cm}^{-1}$ referente a C-H₃, evidenciando a modificação no grupamento OH. Apresenta banda de absorção forte em $1757,15\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C=O de carbonila e uma banda de absorção forte em $1259,52\text{ cm}^{-1}$ característico de C-O-C de éster.

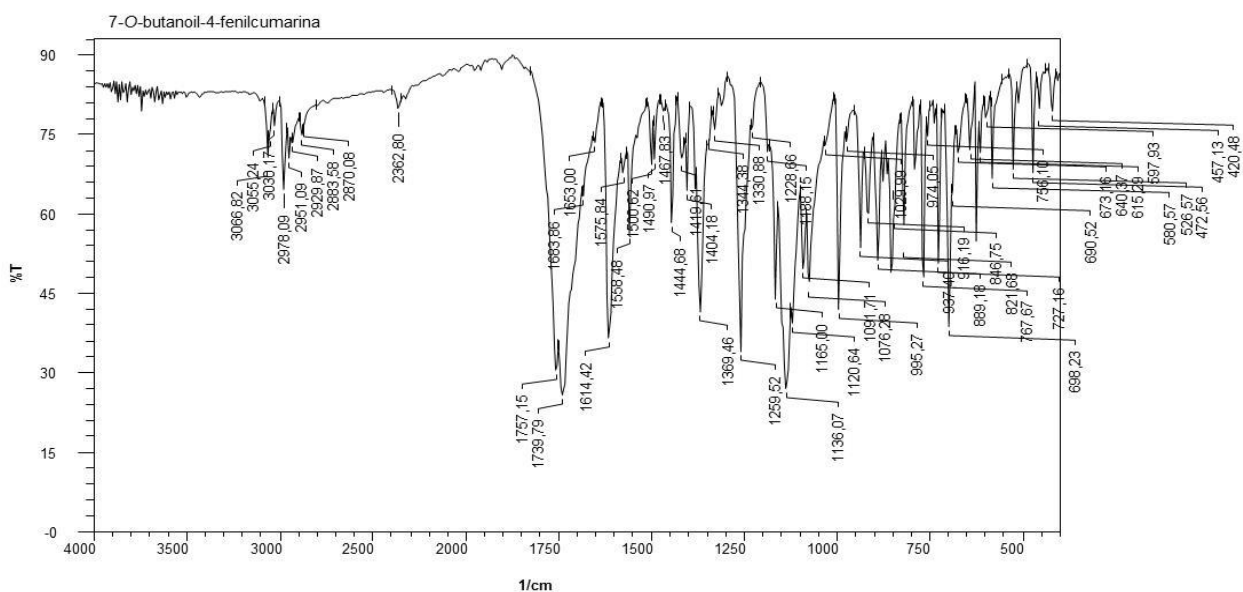
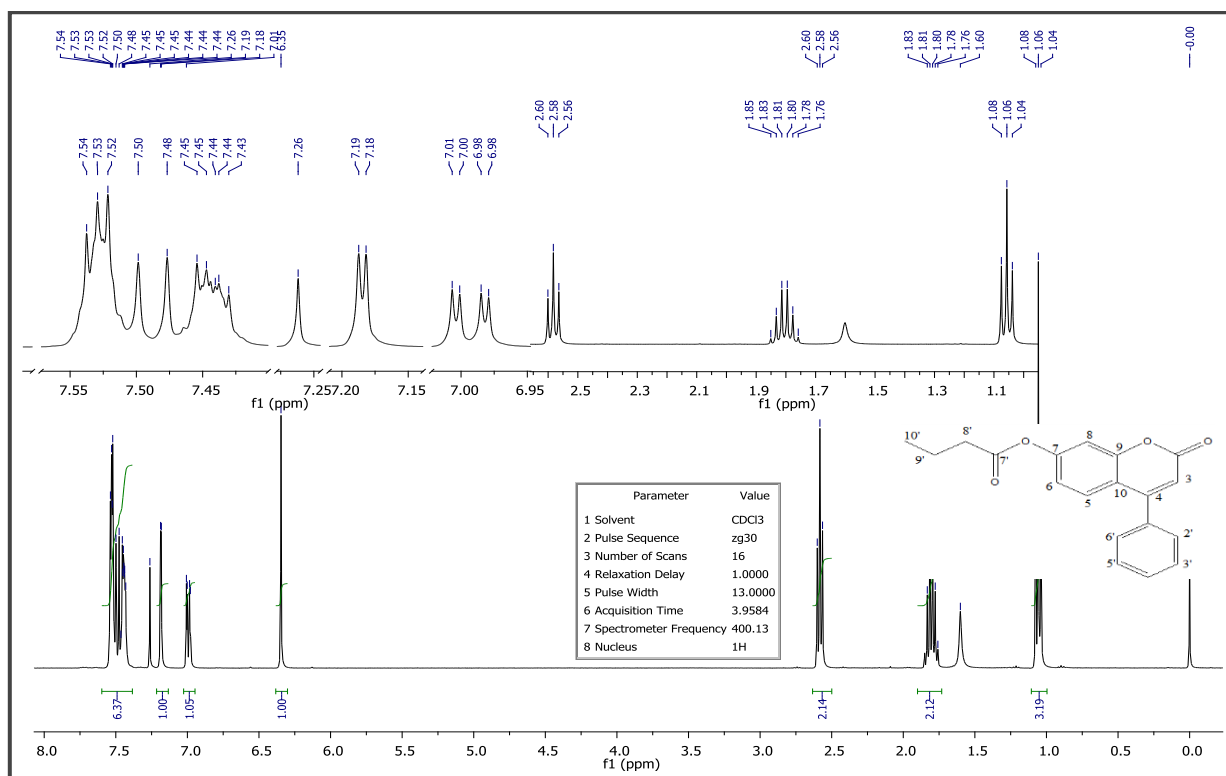


FIGURA 59 - Espectro de infravermelho do derivado 9 (KBr).

A Tabela 11 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura 60) e RMN de ^{13}C (Figura 61).

Tabela 11 - Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 9.

δ_H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	δ_C	Carbono	δ_C	DEPT
1,06	H-10'	triplete 8,0	13,92	C-10'	13,92	C-10'
1,80	H-9'	sexteto 8,0	18,66	C-9'	18,65	C-9'
2,58	H-8'	triplete 8,0	36,50	C-8'	36,50	C-8'
6,35	H-3	simpleto	111,03	C-3	111,03	C-3
6,99	H-6	duplo duplete; 2,4; 8,8	114,82	C-8	114,86	C-8
7,18	H-5	duplete; 2,0	117,15	C-10	118,49	C-6
7,46	H-8	duplete 8,0	118,45	C-6	128,17	C-5
			128,17	C-5	128,71	C6'C2'
7,43-7,53	H-2',H-3', H-4', H-5', H-8	multiplete	128,72	C6'C2'	129,29	C5'C3'
			129,29	C5'C3'	130,18	C-4'
			130,14	C-4'		
			135,46	C-1'		
			153,69	C-9		
			155,19	C-7		
			155,62	C-4		
			160,81	C-2		
			171,77	C-7'		

**FIGURA 60** - Espectro de RMN de 1H do derivado 9 a 400 MHz, em $CDCl_3$.

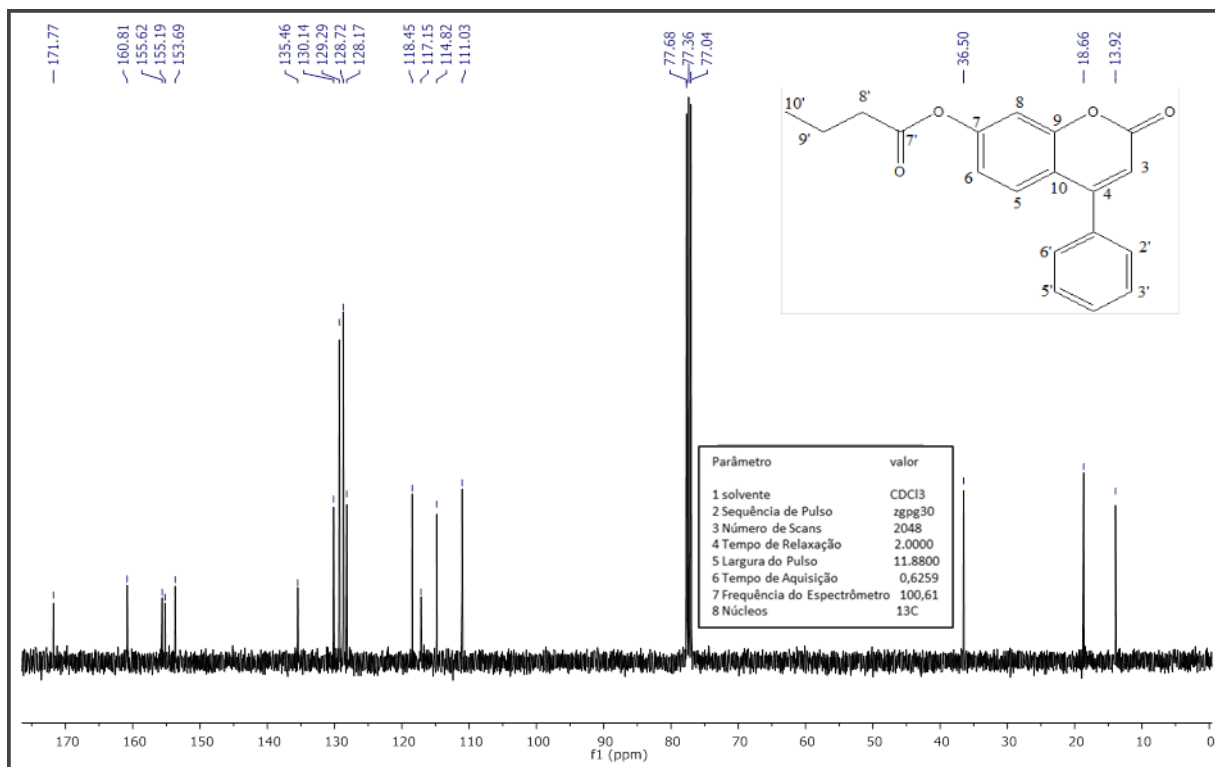


FIGURA61 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 9 a 100 MHz, em CDCl_3 .

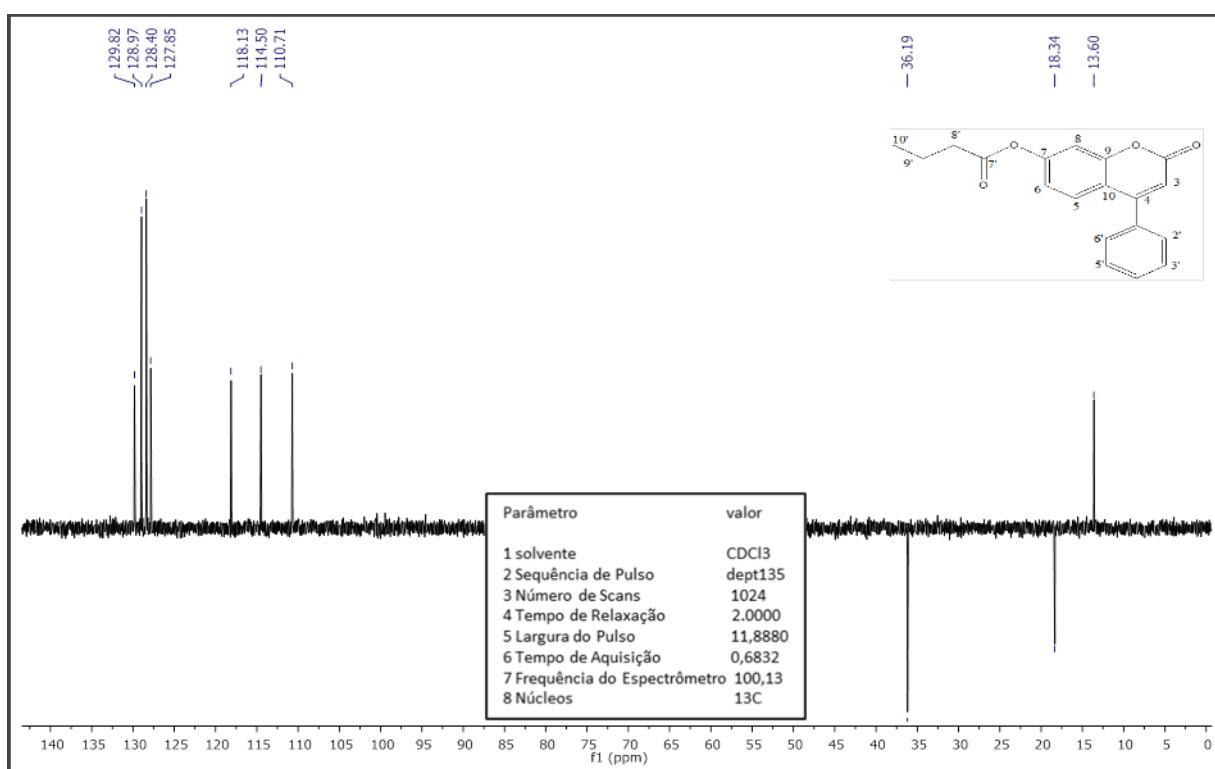


FIGURA62 - Subespectro DEPT 135 do derivado 9 a 100 MHz, em CDCl_3 .

Para confirmação da massa molecular do 7-*O*-butanoil-4-fenilcumarina foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O

espectrograma (Figura 63) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 331,1168, o qual é massa do íon de fórmula $C_{19}H_{16}O_4Na^+$.

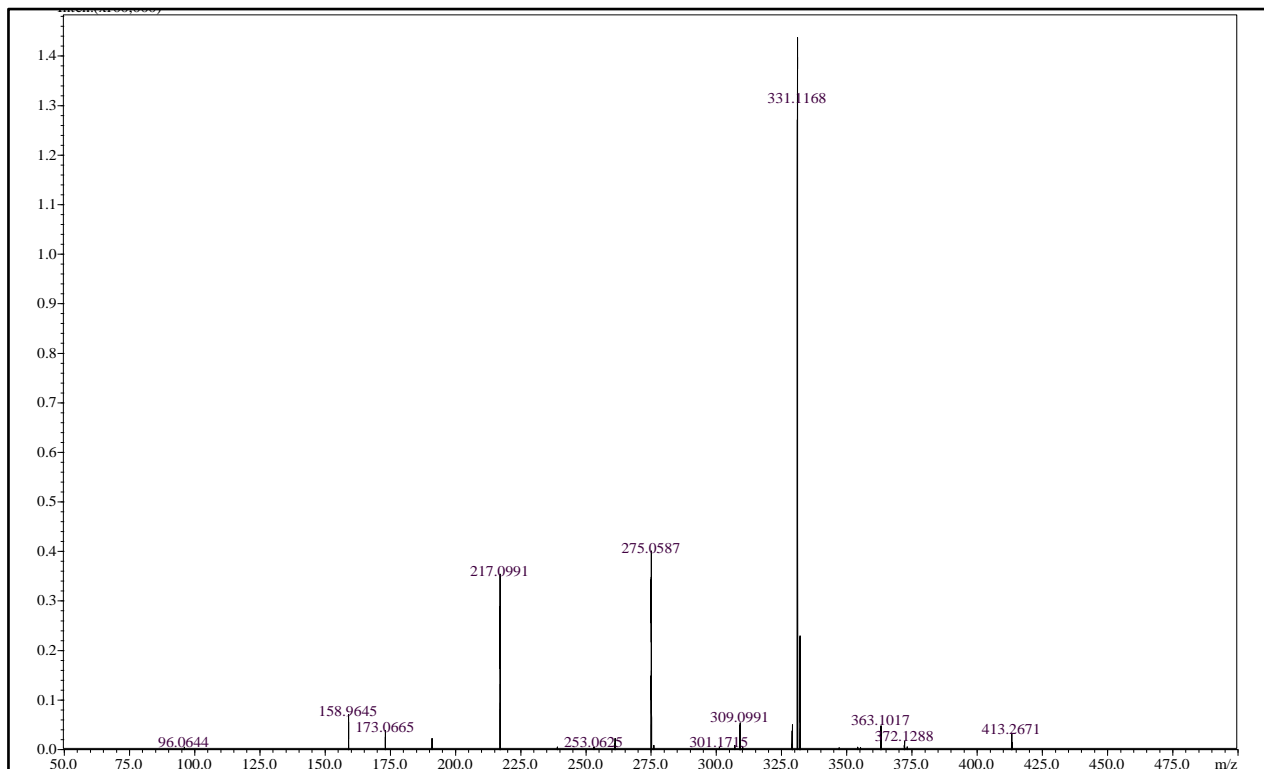


FIGURA 63 - Espectro de massas do derivado 9 obtido por MALDI-TOF.

Composto: 7-*O*-Alil-4-fenilcumarina (10) (EL-ANSARY *et al.*, 1998)

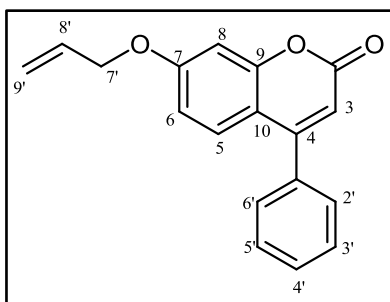


FIGURA 64 - Derivado 10

O derivado 10 (Figura 64) foi obtido por reação de alquilação entre o 4-fenil-7-hidroxycumarina e 3-cloropropeno, na qual foi utilizado o carbonato de potássio (K_2CO_3) e os solventes dimetilformamida (DMF) e acetona (YANG *et al.*, 2009). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. $183^\circ C$ e rendimento de 57,2%.

Os sinais de RMN de 1H e RMN de ^{13}C observados são compatíveis à estrutura base da cumarina referente ao composto 1. No espectro de RMN de 1H foram observados: um duplete em 4,60-4,62 ppm com $J=4,0$ referente ao hidrogênio H7'; um duplo duplete em 5,32-

5,49 ppm com $J=10,0$; 6,0 Hz, um duploduplete duplo em 5,95-6,14 ppm referente ao hidrogênio H8' e um multiplete que contém o hidrogênio H7' referente ao grupamento alila.

Do espectro de RMN de ^{13}C foram observados sinais em 69,60 e 118,94 ppm referentes ao carbono C7' e C9' e um sinal em 132,44 ppm referente ao carbono C8'. Com os sinais observados em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C comprovou-se a modificação na estrutura base do derivado 1 com a inserção de um agrupamento alílico.

O espectro na região do IV (Figura 65) exibe banda forte em $3079,41\text{ cm}^{-1}$ característico de estiramento C-H de anel aromático, estiramento simétrico e assimétrico em $2965,61\text{ cm}^{-1}$ referente ao C-H₂. Apresenta banda de absorção forte em $1729,21\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C=O de carbonila e uma banda de absorção forte em $1152,49\text{ cm}^{-1}$ característico de C-O-C de éter.

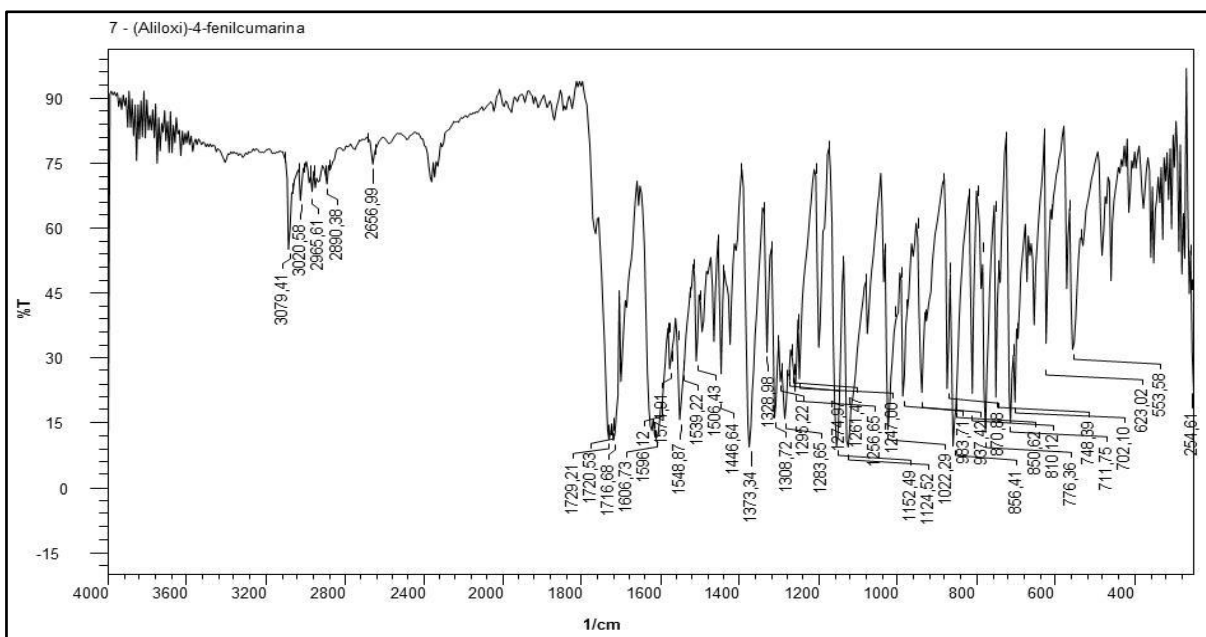
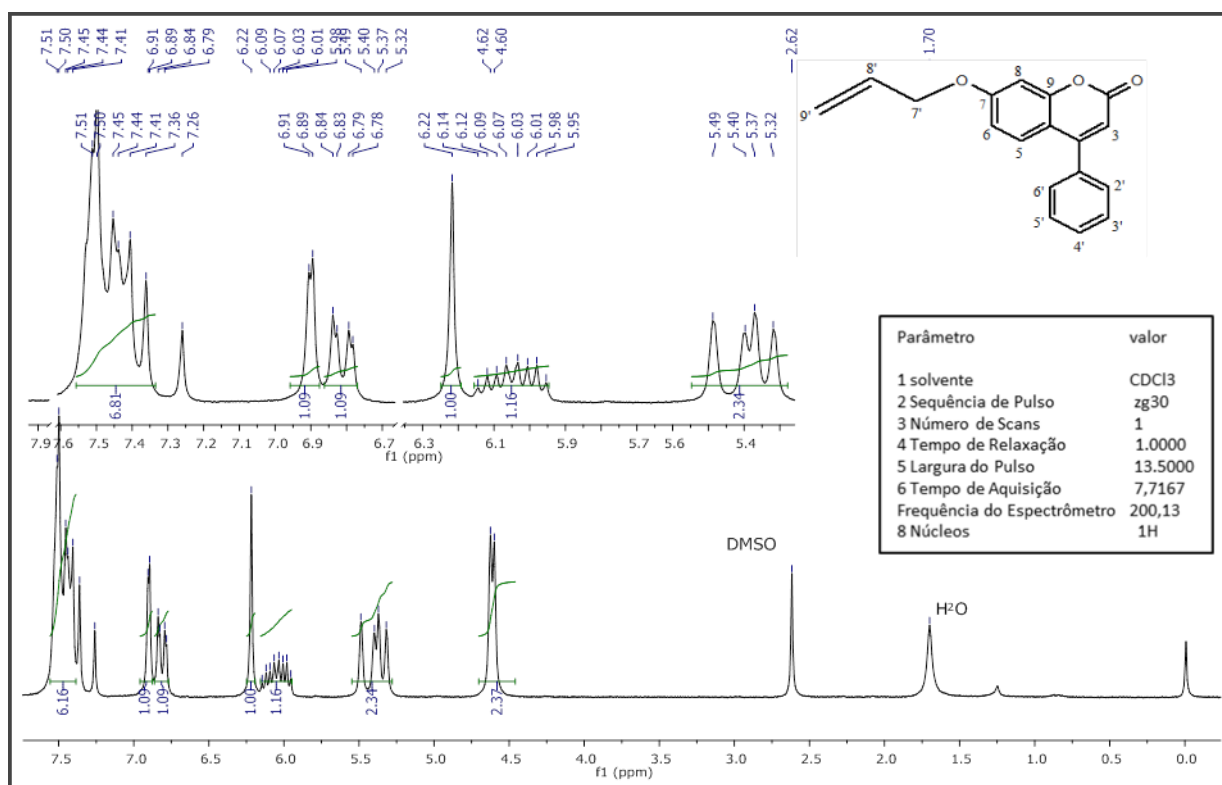


FIGURA 65 - Espectro de infravermelho do derivado 10 (KBr).

A Tabela 12 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura 66) e RMN de ^{13}C (Figura 67).

Tabela 12 - Deslocamentos químicos ^1H de RMN de ^1H e ^1C de RMN de ^{13}C do derivado 10.

^1H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	^1C	Carbono	^1C	DEPT
4,61	H-7'	duplete 4,0	69,60	C-7'	69,60	C-7'
5,32-5,49	H-9'	multiplete	102,29	C-8	102,29	C-8
5,95-6,14	H-8'	multiplete	112,25	C-6	112,25	C-6
6,22	H-3	simpleto	112,95	C-10	113,18	C-3
6,79-6,87	H-6	duploduplete 4,0;8,0	113,18	C-3	118,94	C-9'
6,89-6,90	H-8	duplete; 4,0	118,94	C-9'	128,33	C-5
7,41-7,52	H-5H-2',H-3', H-4', H-5', H-7'	multiplete	128,32	C-5	128,71	C-3'C-5'
			128,81	C-2'C-6'	129,16	C-2'C6'
			129,16	C-3'C5'	129,33	C-4'
			129,33	C-4'	132,44	C-8'
			132,44	C-8'		
			135,87	C-1'		
			156,16	C-9		
			156,24	C-4		
			161,60	C-7		
			162,04	C-2		

**FIGURA 66** - Espectro de RMN de ^1H do derivado 10 a 200 MHz, em CDCl_3 .

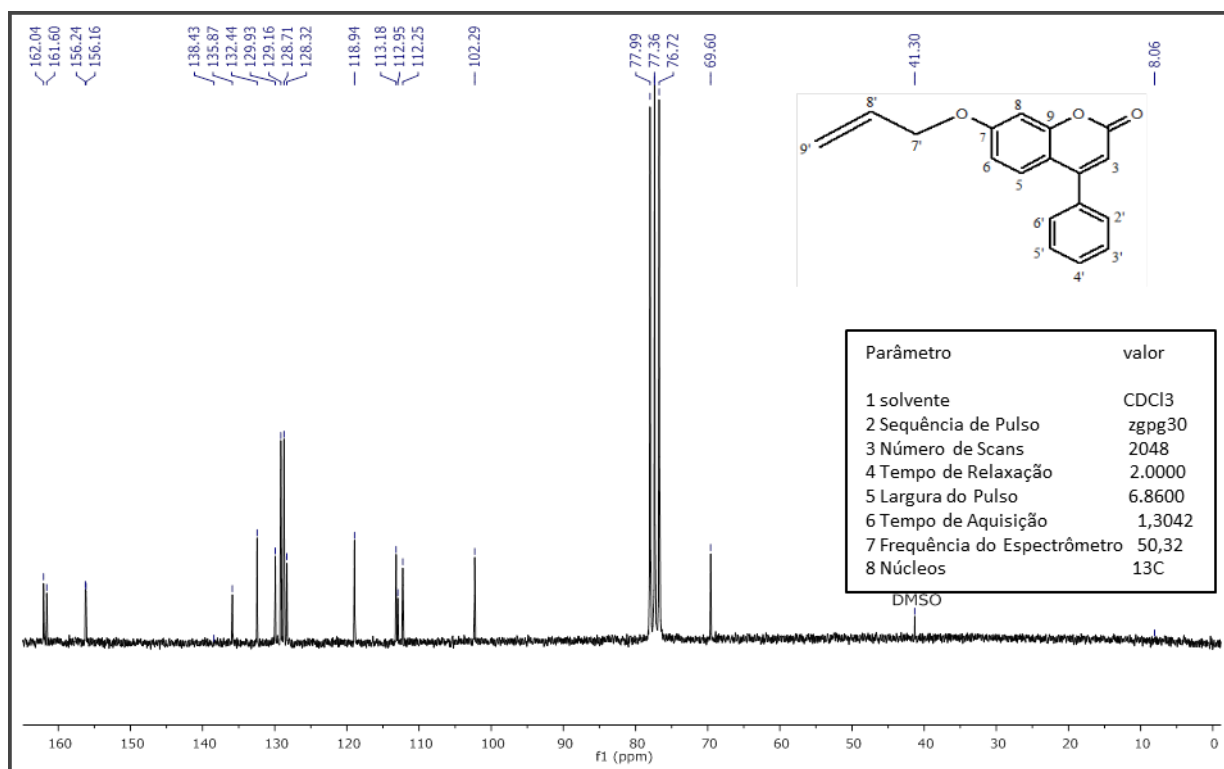


FIGURA 67 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 10 a 50 MHz, em CDCl_3 .

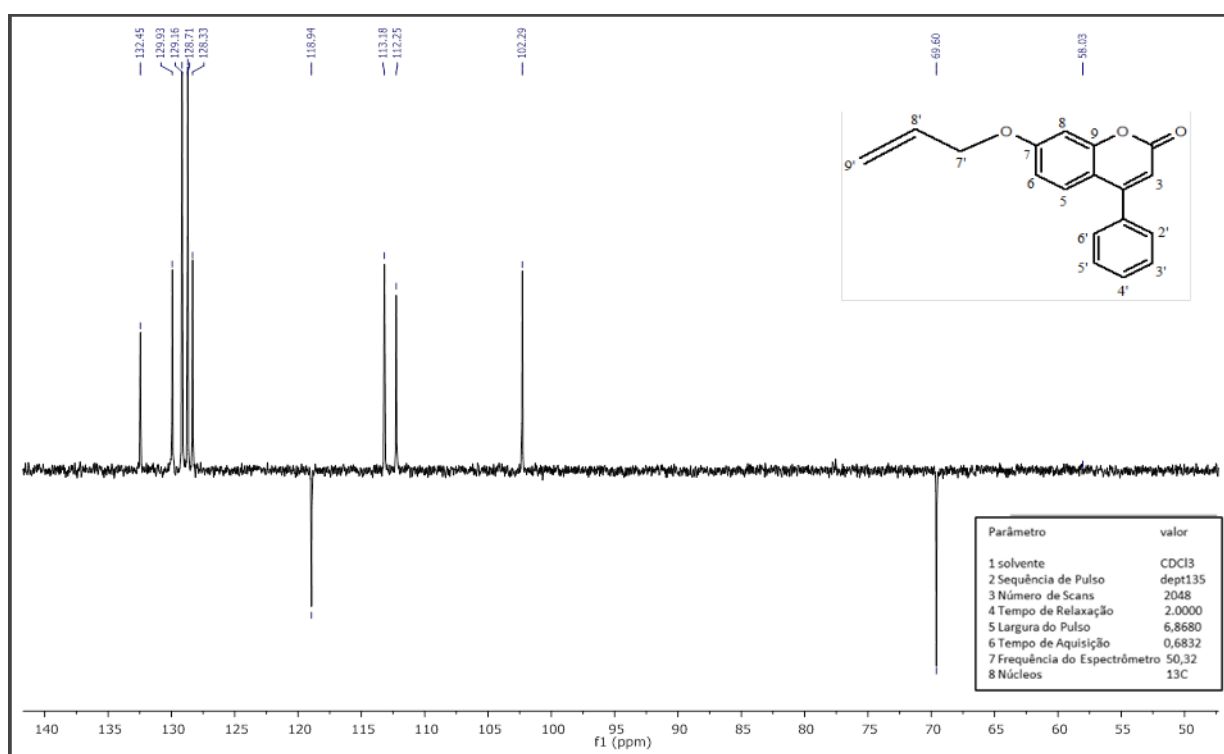


FIGURA 68 - Subespectro DEPT 135 do derivado 10 a 50 MHz, em CDCl_3 .

Composto:4-(4-clorofenil)-7-hidroxicumarina (11)

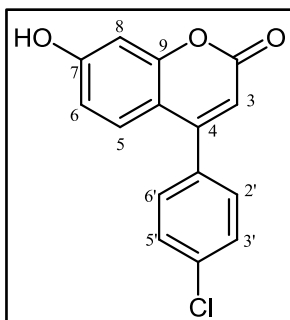


FIGURA69– Derivado 11.

O derivado 11 (Figura 69) foi obtido por condensação de Pechmann entre o resorcinol e 4-clorobenzoilacetato de etila (TIMONEN *et al.*, 2011). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. 216°C e rendimento de 86%.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 71) para 4-fenil-7-hidroxicumarina foi obtido em $\text{DMSO-}d_6$, o qual apresentou sinais compatíveis para uma cumarina, a região entre 6,72-6,77 ppm correspondente aos hidrogênios do anel aromático da cumarina H8 e H6 apresentou um duplete em 7,20-7,23 ppm com $J=9,0$ Hz referente ao H5. Em 7,48-7,60 ppm observou-se um multiplete referente aos hidrogênios da fenila, ligada ao núcleo cumarínico, e um sinal em 6,10 ppm com integração para um hidrogênio, referente ao hidrogênio da hidroxila.

O espectro de RMN de ^{13}C forneceu 13 sinais (Figura 72). Os sinais observados em 104,27, 111,94 e 111,99 ppm são referentes aos carbonos C8, C6 e C10 respectivamente. Em 135,29, 130,49, 131,84 e 136,10 ppm, foram observados os carbonos C4', C2'-C6', C3'-C5' e C1', respectivamente, referentes ao anel aromático ligado na posição 4 da cumarina. Em 163,00, 115,02 e 157,00 ppm, estes referem-se aos carbonos carbonila C2, alfa carbonila C3 e beta carbonila C4. Em 129,60, 156,08 e 162,09 ppm foram observados os carbonos C5, C9 e C7 do anel aromático da cumarina.

O espectro na região do IV (Figura 70) evidenciou banda forte e larga, de deformação axial de OH centrada em $3017,27\text{ cm}^{-1}$ característico de estiramento O-H. Apresenta também banda de absorção forte em $1701,22\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C=O de carbonila e uma banda de absorção forte em $1275,15\text{ cm}^{-1}$ característico de C-O-C de éter.

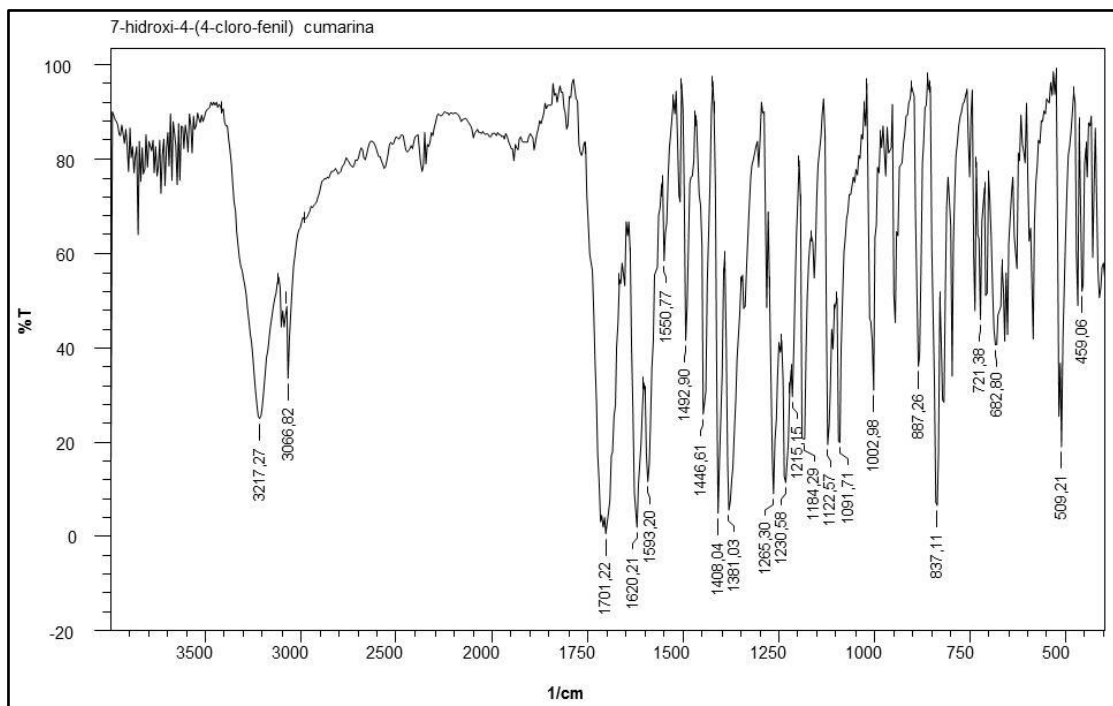


FIGURA 70 - Espectro de infravermelho do derivado 11 (KBr).

A Tabela 13 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura 71) e RMN de ^{13}C (Figura 72).

Tabela 13- Deslocamentos químicos ^1H de RMN de ^1H e ^{13}C de RMN de ^{13}C do derivado 11.

H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	δ	Carbono	δ	DEPT
6,10	H-3	simpleto	104,27	C-8	104,30	C-8
6,72-6,77	H-8-H-6	multipeto	111,94	C-6	111,97	C-6
7,21	H-5	dupeto; 9,0	111,99	C-10	115,02	C-3
7,48-7,60	H-6'H-5' H-2',H-3'	multipeto	115,02	C-3	129,64	C-5
			129,60	C-5	130,49	C-6'C-2'
			130,49	C-6'C-2'	131,84	C-5'C3'
			131,84	C-5'C3'		
			135,29	C-4'		
			136,10	C-1'		
			156,08	C-9		
			157,00	C-4		
			162,09	C-7		
			163,00	C-2		

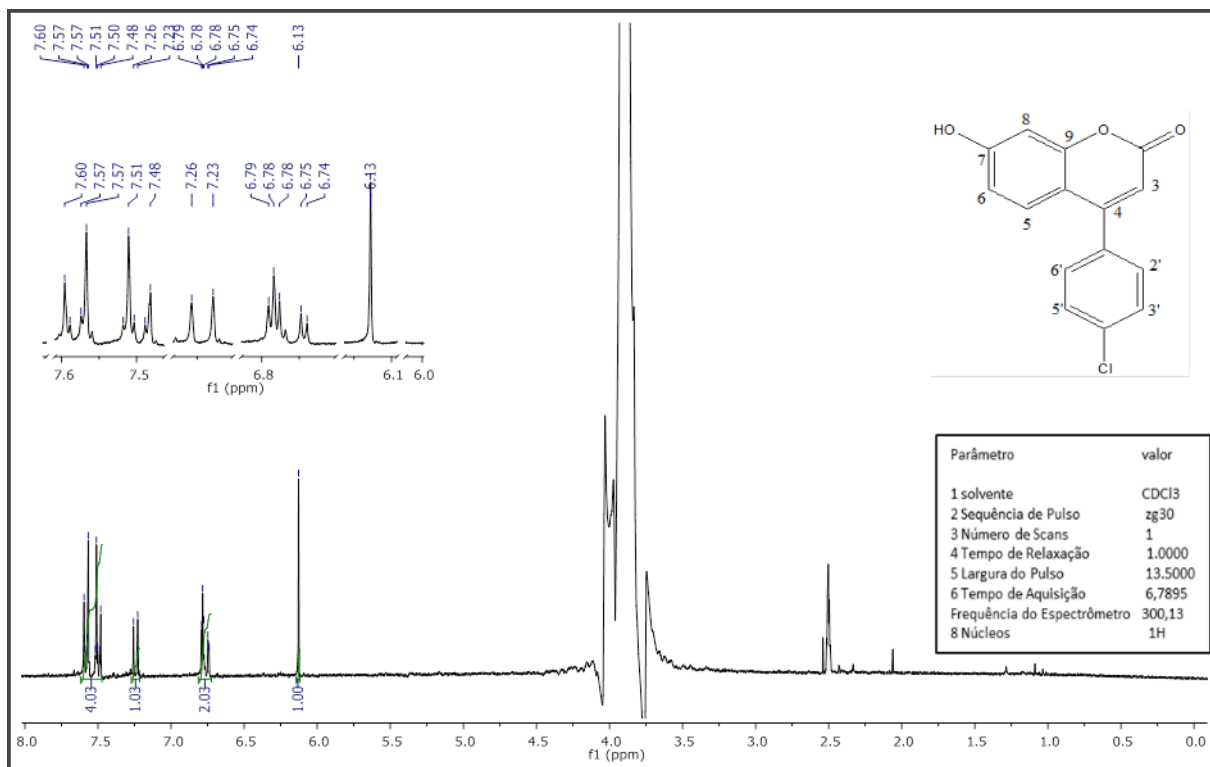


FIGURA71 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 11 a 300 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$.

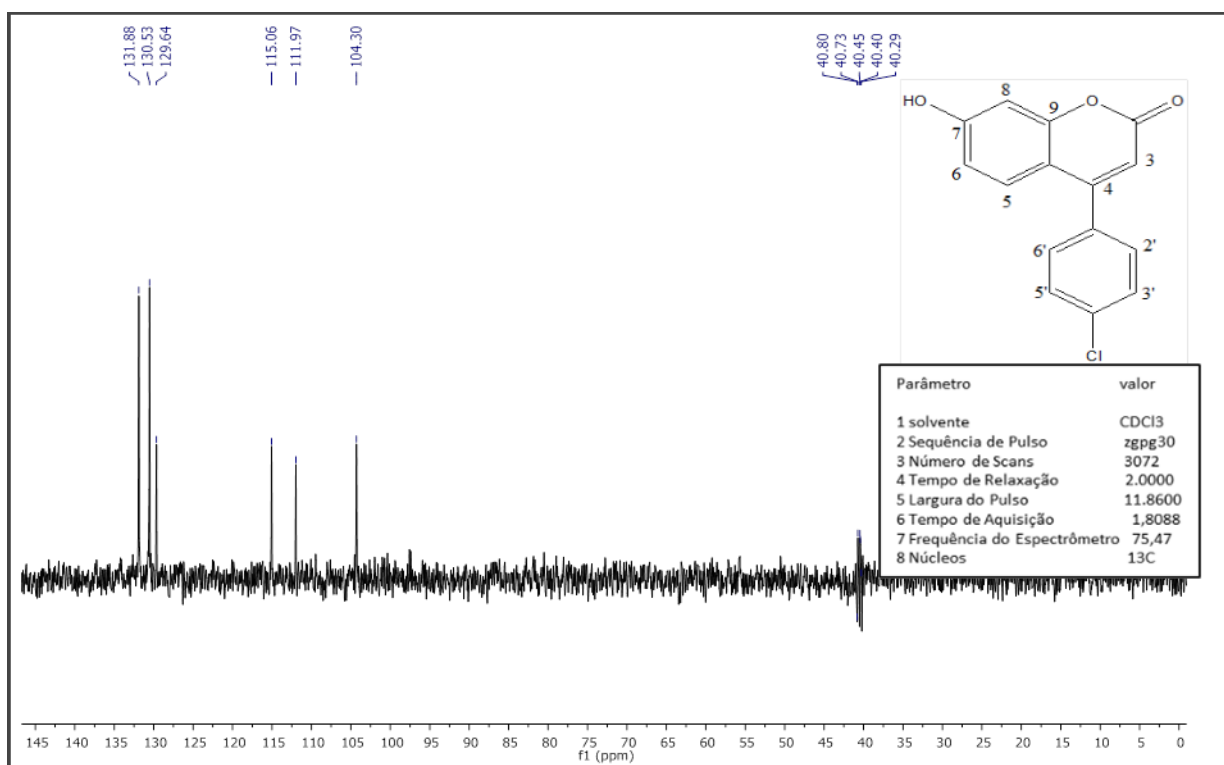


FIGURA72 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 11 a 75 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$.

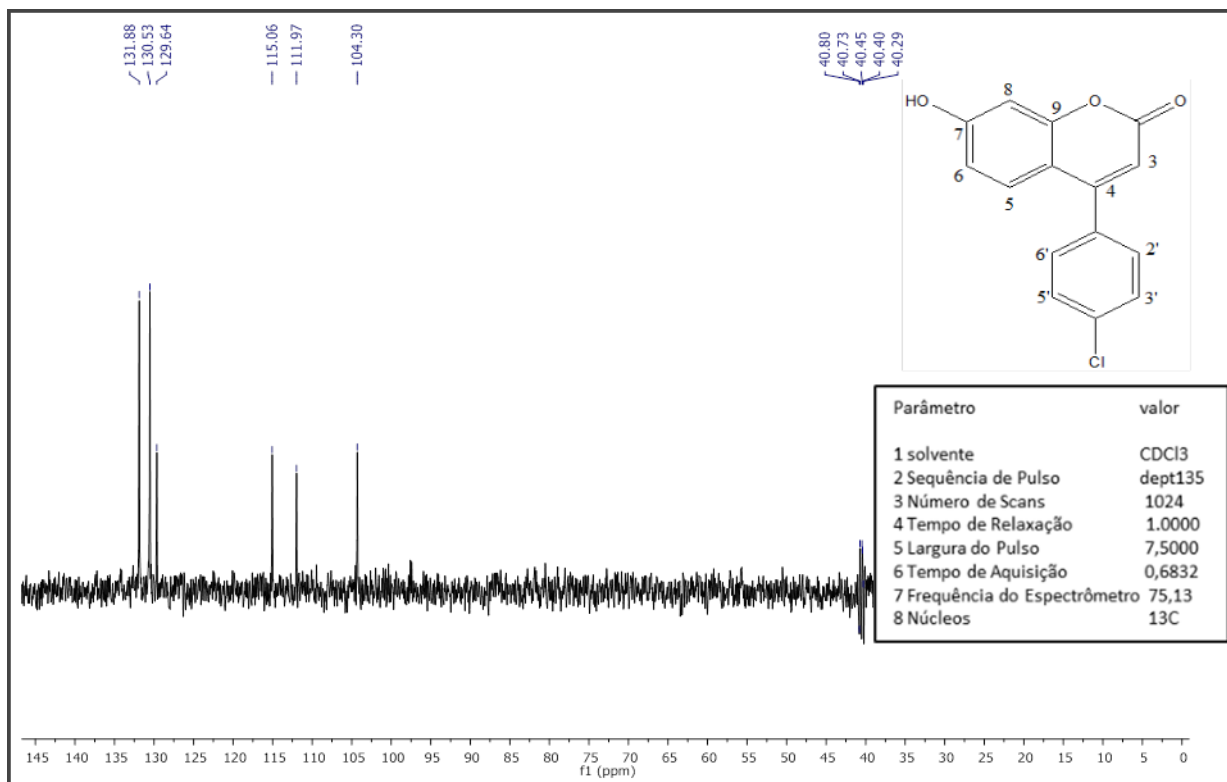


FIGURA 73 - Subspectrum DEPT 135 do derivado 11 a 75 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$.

Para confirmação da massa molecular do 4-(4-clorofenil)-7-hidroxycumarina foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O espectrograma (Figura 74) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 295,02, o qual é massa do íon de fórmula $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_3\text{Na}^+$.

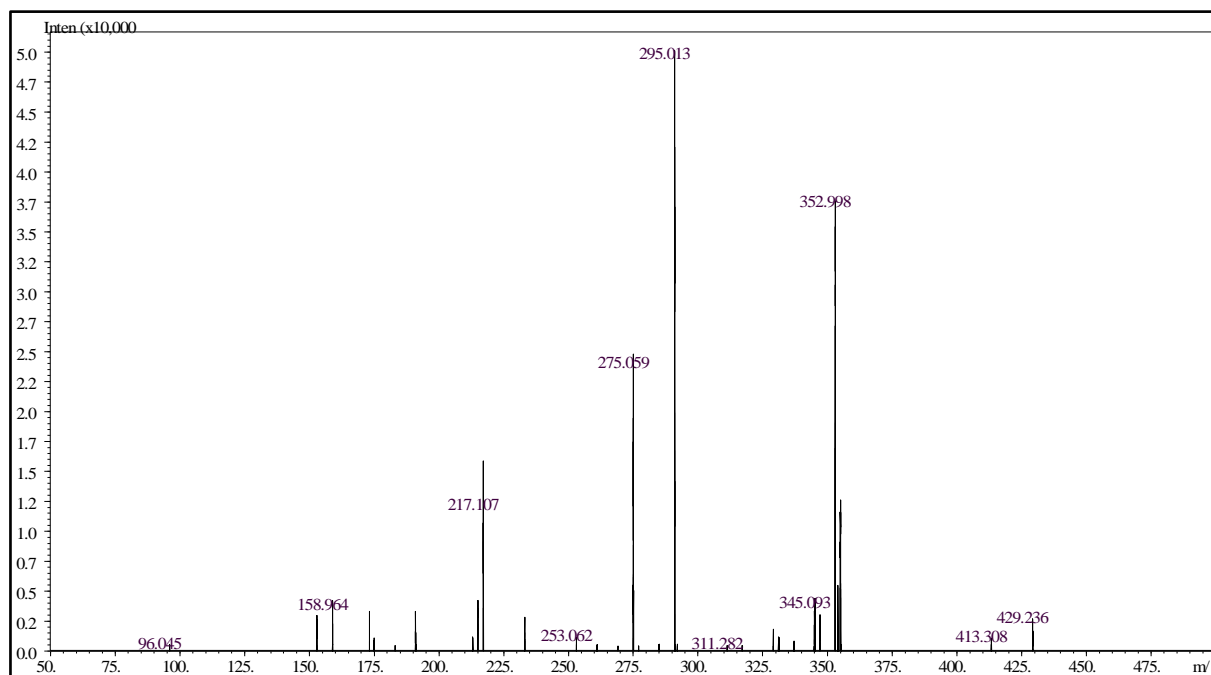


FIGURA 74 - Espectro de Massas do derivado 11 obtido por MALDI-TOF

Composto: 4-(4-clorofenil)-7-*O*-metil-cumarina (12)

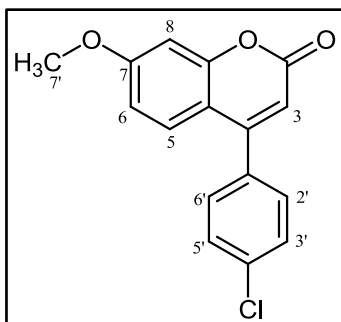


FIGURA 75 - Derivado 12.

O derivado 12 (Figura 75) foi obtido por reação de alquilação entre o 4-(4-clorofenil)-7-hidroxycumarinae iodeto de metila (CH_3I), na qual foi utilizado o carbonato de potássio (K_2CO_3) e os solventes dimetilformamida (DMF) e acetona (YANG *et al*, 2009). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. 211°C e rendimento de 56,0%.

Os sinais de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C observados são compatíveis à estrutura base da cumarina referente ao composto 1. No espectro de RMN de ^1H (Figura 77)foi observado um sinal intenso de simpleto em 2,49 ppm referente aos hidrogênios metílicos H-7'. O sinaldo espectro de RMN de ^{13}C foi observado em 19,12 ppm referente ao carbono metílico.Com os sinais observados em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (Figura 78)comprovou-se a modificação na estrutura base do derivado 1 com inserção de um grupo metílico.

O espectro na região do IV (Figura 76) exibiu banda forte em $3062,96\text{ cm}^{-1}$ característico de estiramento C-H de anel aromático.Não seobservou a banda de OH na região típica, indicando que o grupo encontrava-se substituído pelo grupo metil nesta mesma região.Pôde-se observar um estiramento simétrico e assimétrico em 2850,79 e $2962,66\text{ cm}^{-1}$ referente à C-H₃. Apresentou banda de absorção forte em $1743,65\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C=O de carbonilae uma banda de absorção forte em $1257,59\text{ cm}^{-1}$ característico de C-O-C de éter.

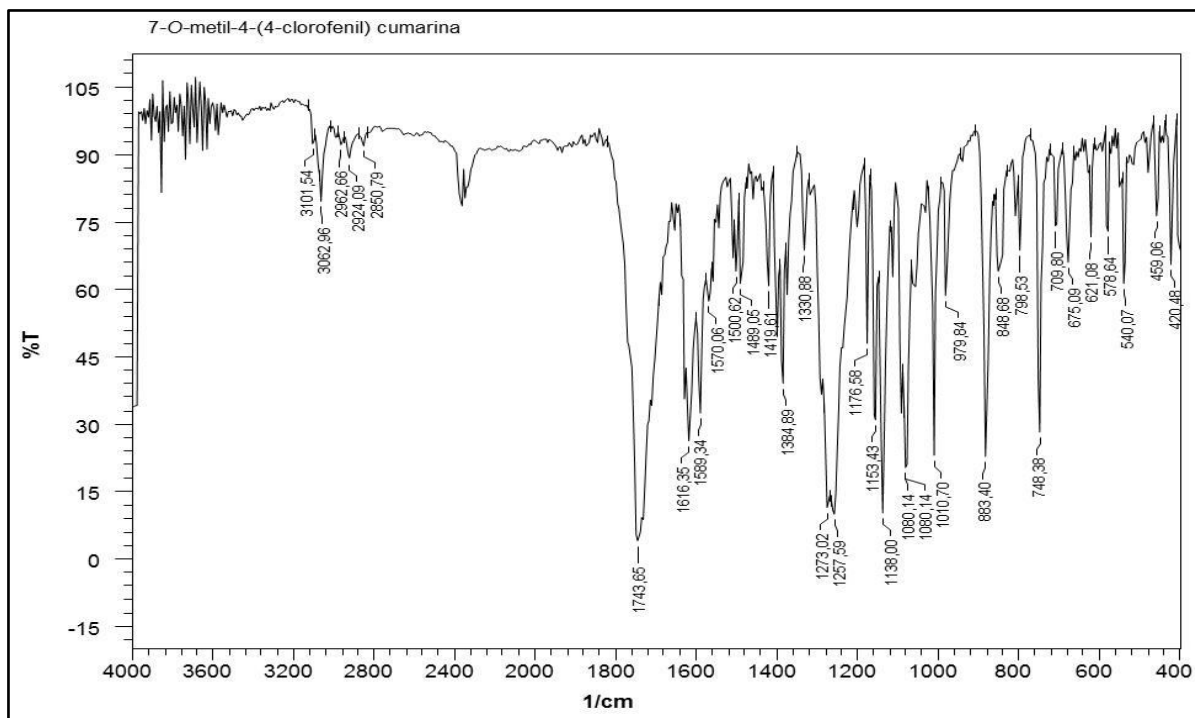


FIGURA 76 - Espectro de infravermelho do derivado 12 (KBr).

A Tabela 14 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura77) e RMN de ^{13}C (Figura78).

Tabela 14 - Deslocamentos químicos δ_{H} de RMN de ^1H e δ_{C} de RMN de ^{13}C do derivado 13.

δ_{H}	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	δ_{C}	Carbono	δ_{C}	DEPT
2,49	H-7'	simpleto	19,12	C-7'	19,18	C-7'
6,32	H-3	simpleto	110,92	C-8	110,99	C-8
7,20-7,27	H-8-H-6	multipeto	115,01	C-6	115,06	C-6
7,52	H-5	dupeto; 8,0	112,02	C-9	118,55	C-3
7,68	H-6'H-5'	dupeto; 8,0	117,16	C-10	125,91	C-6
8,15	H-2',H-3'	dupeto; 8,0	118,40	C-3	129,52	C-3'C-2'
			127,56	C-5	132,07	C-6'C-5'
			129,40	C-6'C-2'		
			132,02	C-5'C3'		
			141,03	C-4'		
			153,27	C-1'		
			154,58	C-4		
			160,83	C-7		
			164,08	C-2		

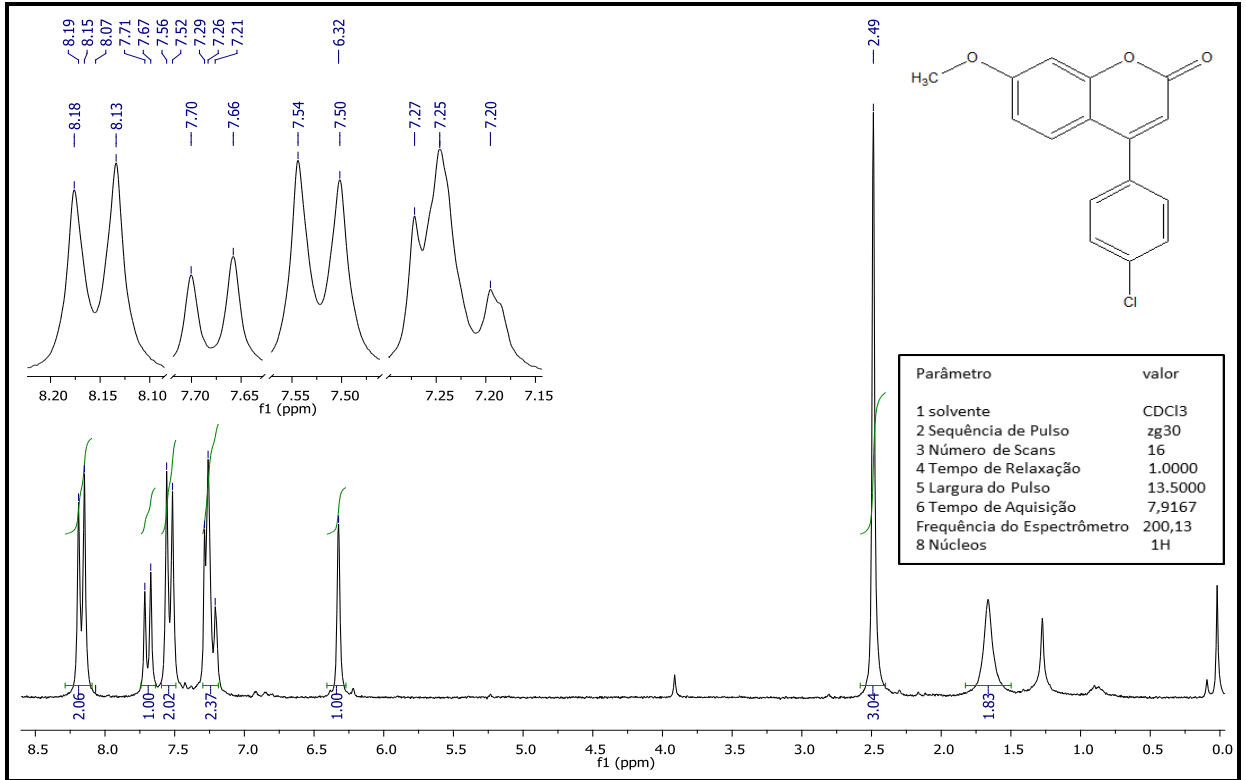


FIGURA 77 - Espectro de RMN de ^1H do derivado 12 a 200 MHz, em CDCl_3 .

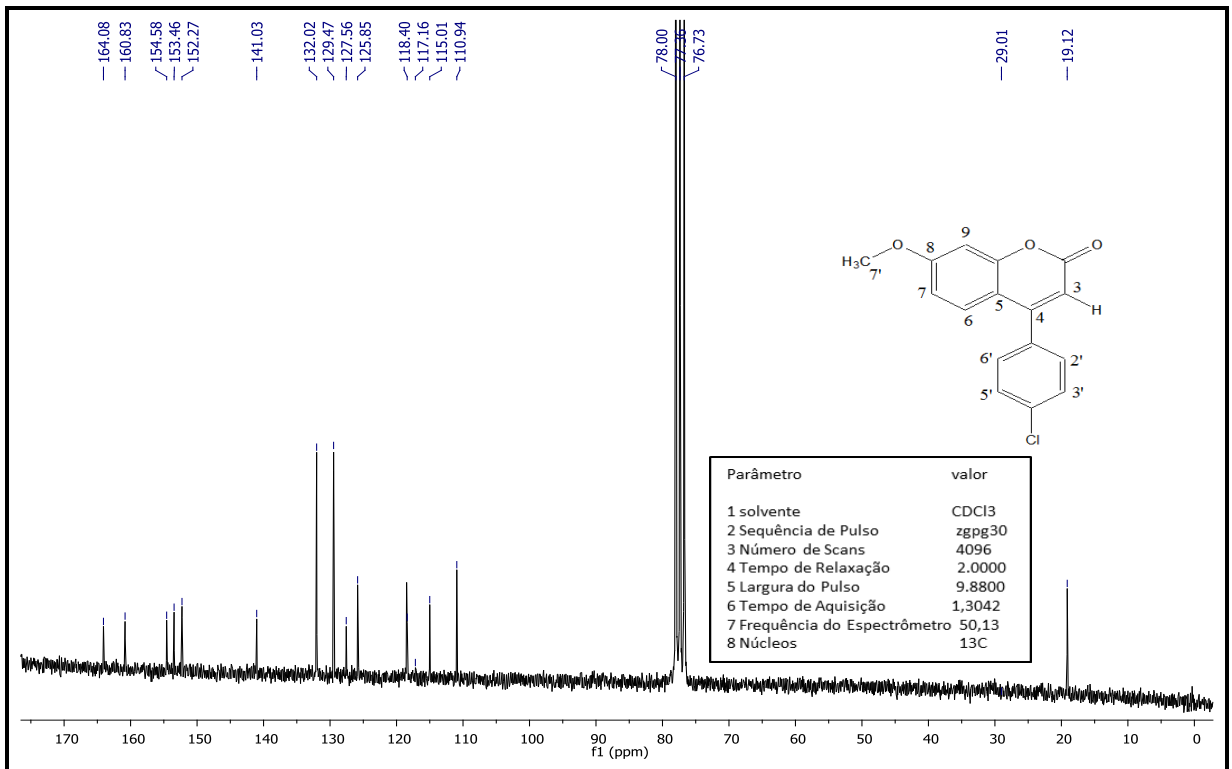


FIGURA 78 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 12 a 50 MHz, em CDCl_3 .

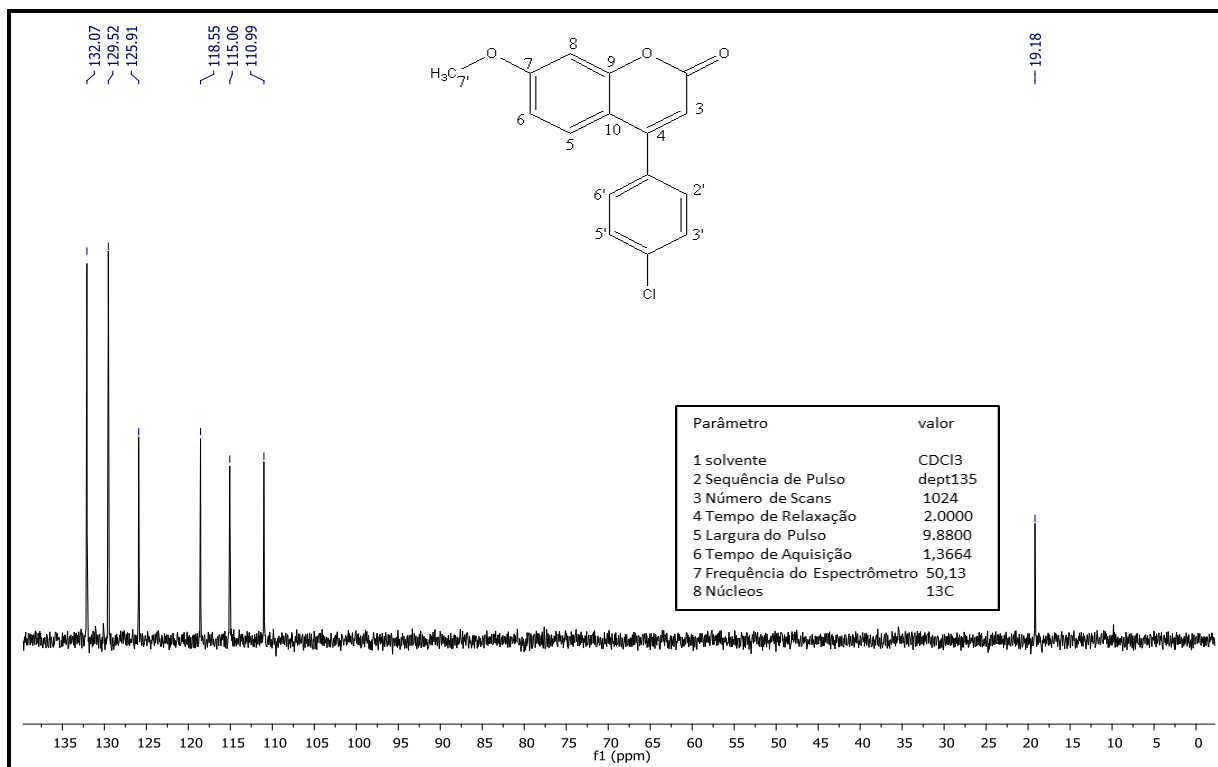


FIGURA 79 - Subespectro DEPT 135 do derivado 12 a 50MHz em CDCl₃.

Composto: 4-(4-clorofenil)-7-O-prenilcumarina (13) (Descrito pela primeira vez na literatura)

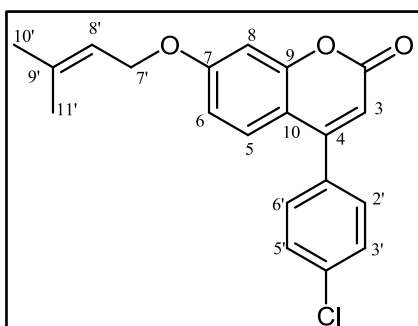


FIGURA 80 - Derivado 13.

O derivado 13 (Figura 80) foi obtido por reação de alquilação entre o 7-hidroxi-(4-clorofenil)cumarina e 1-cloro-3-metil-2-buteno, na qual foi utilizado o carbonato de potássio (K₂CO₃) e os solventes dimetilformamida (DMF) e acetona (YANG *et al*, 2009). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. 201°C e rendimento de 57,2%.

Os sinais de RMN de ¹H e RMN de ¹³C observados são compatíveis à estrutura base da cumarina referente ao composto 1. No espectro de RMN de ¹H (Figura 82) foram observados dois simpletos em 1,63 e 1,67 ppm referentes aos hidrogênios metílicos H10' e H11', um duplete em 4,43-4,47 ppm com *J*=8,0 Hz referente ao hidrogênio H7' e um tripleto em 5,30-5,37 ppm com *J*=6,0 Hz referente ao hidrogênio H8'. Observou-se no espectro de RMN de ¹³C (Figura 83) um sinal em 18,61 e 26,14 ppm referente ao carbono metílico C10' e

C11' e um sinal em 65,75 ppm referente ao carbono C7'. Em 118,81 e 136,10 ppm foram observados sinais referentes aos carbonos C8' e C9'. Com os sinais observados em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C comprovou-se a modificação estrutural na estrutura base do derivado 1 com a inserção de um grupo prenil.

O espectro na região do IV (Figura 81) exibe banda forte em $3059,10\text{ cm}^{-1}$ característico de estiramento C-H de anel aromático, estiramento simétrico e assimétrico em $2920,23\text{ cm}^{-1}$ referente ao C-H₃, estiramento de ligação C-H sp² em $3032,10\text{ cm}^{-1}$. Apresenta banda de absorção forte em $1732,08\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C=O de carbonila e uma banda de absorção forte em $1157,29\text{ cm}^{-1}$ característico de C-O-C de éter.

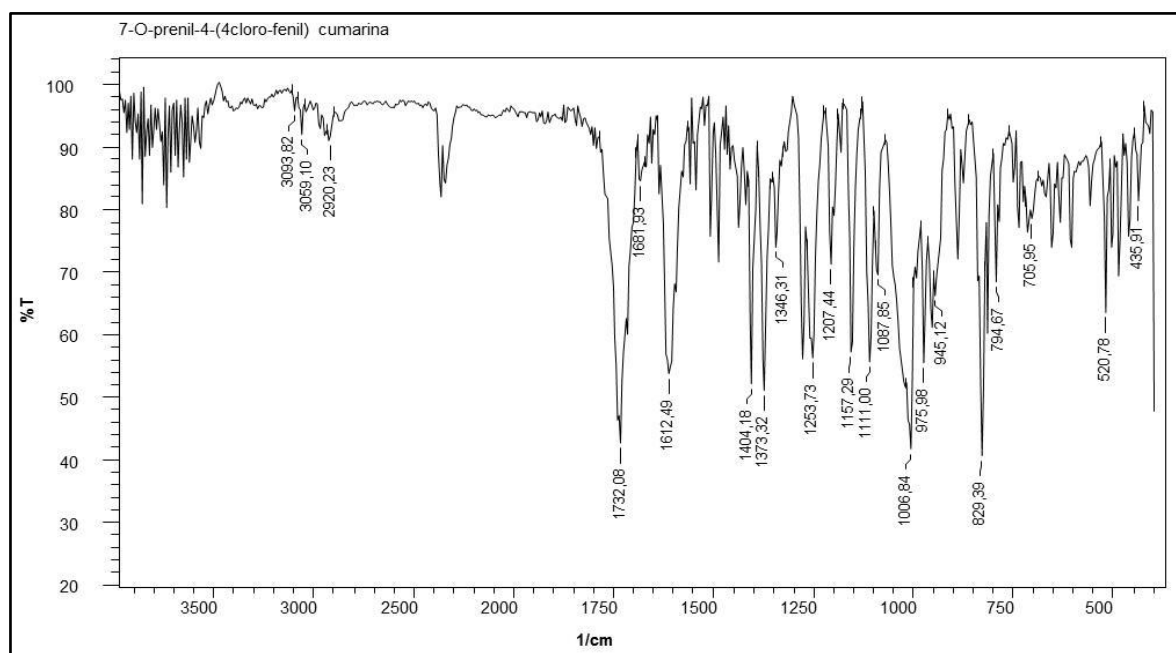
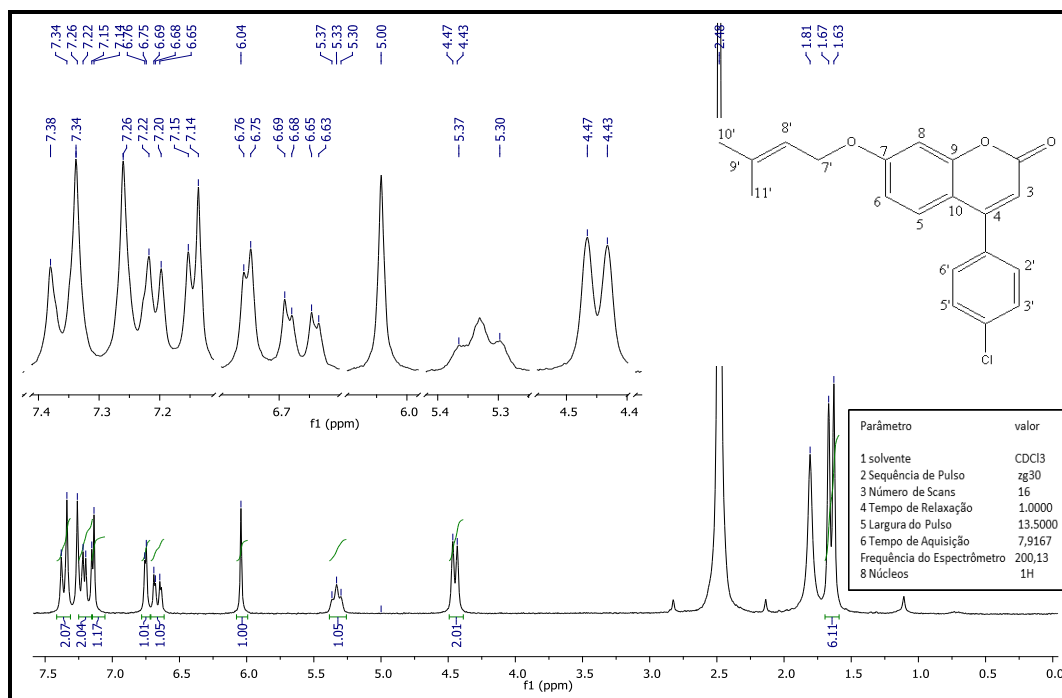


FIGURA81 - Espectro de infravermelho do derivado 13 (KBr).

A Tabela 15 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura 82) e RMN de ^{13}C (Figura 83).

Tabela 15 - Deslocamentos químicos ^1H e ^{13}C de RMN de ^{13}C do derivado 14.

H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	C	Carbono	C	DEPT
1,63	H-11'	simpleto	18,61	C-11'	18,61	C-11'
1,67	H-10'	simpleto	26,14	C-10'	26,14	C-10'
4,45	H-7'	dupleto 8,0	65,75	C-7'	65,75	C-7'
5,34	H-8'	triplete 6,0	102,18	C-8	102,18	C-8
6,04	H-3	simpleto	112,12	C-6	112,12	C-6
6,67	H-6	duplo dupleto; 2,4;6,4	112,35	C-10	113,41	C-3
6,75-	H-8	dupleto 2,4	113,41	C-3	118,81	C-8'
7,14-	H-5	dupleto 6,4	118,81	C-8'	127,90	C-5
7,20-7,22	H-2' H-6'	dupleto 4,0	127,90	C-5	129,45	C-2'C-6'
7,34-7,38	H-3' H-5'	dupleto 4,0	129,46	C-2'C-6'	130,03	C-3' C5'
			130,03	C-3' C5'		
			134,03	C-4'		
			136,10	C-9'		
			154,97	C-9		
			156,24	C-4		
			161,40	C-7		
			162,53	C-2		

**FIGURA 82** - Espectro de RMN de ^1H do derivado 13 a 200 MHz, em CDCl_3 .

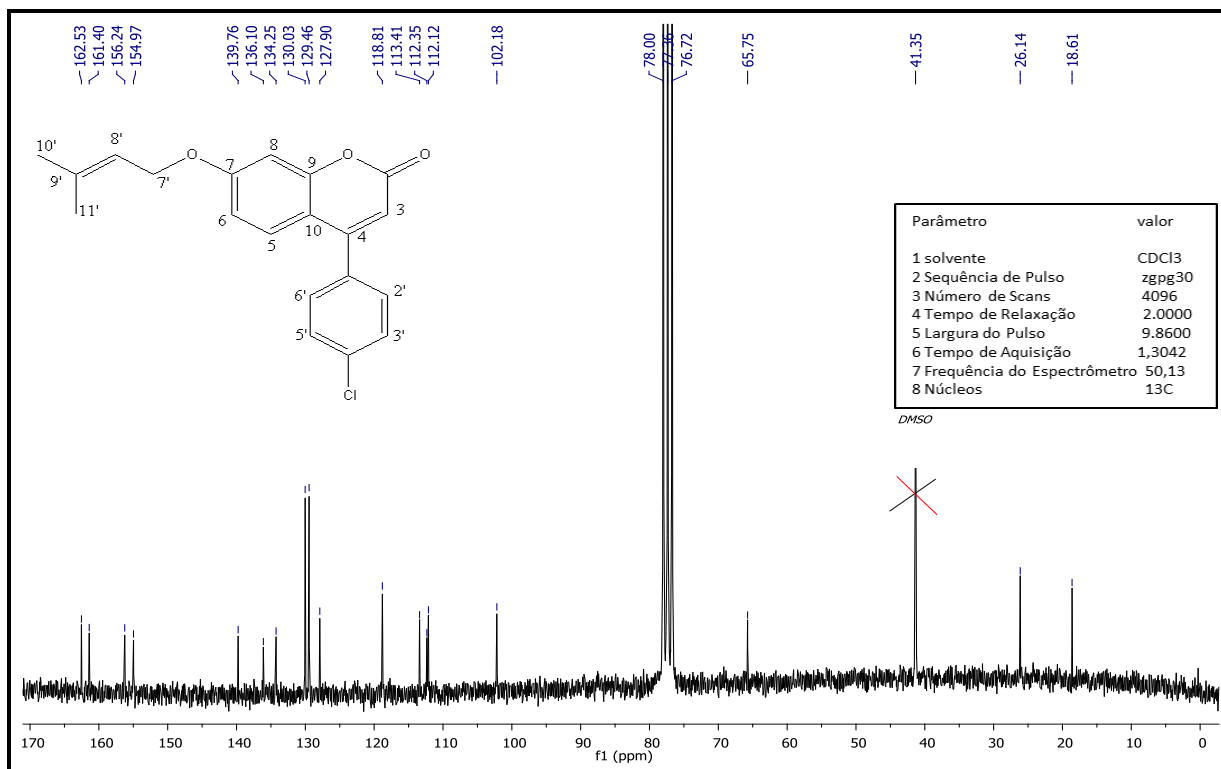


FIGURA 83 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 13 a 50 MHz em CDCl_3 .

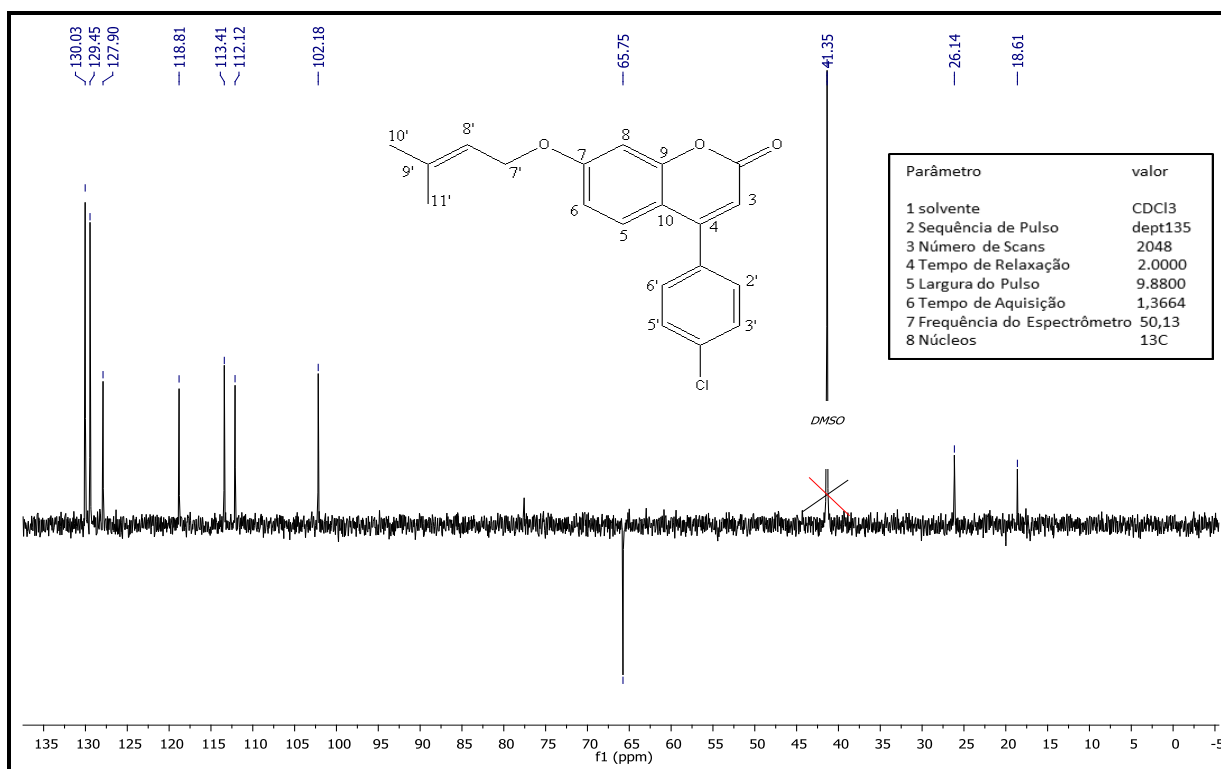


FIGURA 84 - Subespectro DEPT 135 do derivado 13 a 50 MHz, em CDCl_3 .

Para confirmação da massa molecular do 4-(4-clorofenil)-7-O-prenilcumarina foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF.

O espectrograma (Figura 85) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 363,0657, o qual é massa do íon de fórmula $C_{20}H_{17}ClO_3Na^+$.

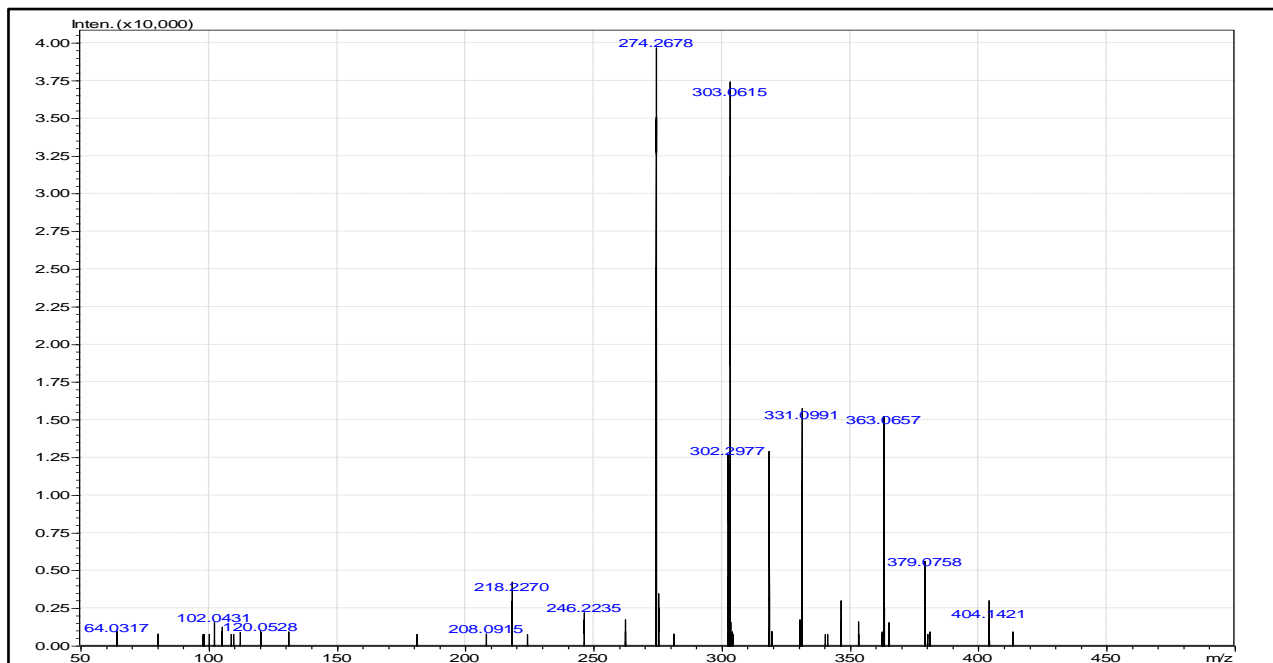


FIGURA 85 -Espectro de Massas do derivado 13 obtido por MALDI-TOF.

Composto: 7-hidroxi-4-(4-fluorfenil)cumarina (14)

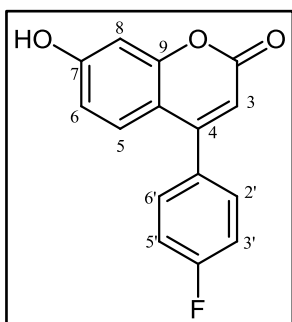


FIGURA 86 - Derivado 14.

O derivado 14 (Figura 86) foi obtido por condensação de Pechmann entre o resorcinol e 4-fluor-benzoilacetato de etila (TIMONEN *et al.*, 2011). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. 212°C e rendimento de 86%.

O espectro de RMN de 1H (Figura 88) para 4-(4-fluorfenil)-7-hidroxycumarina foi obtido em $DMSO-d_6$, e apresentou sinais compatíveis para uma cumarina, a região entre 6,74-7,22 ppm – correspondente aos hidrogênios do anel aromático da cumarina - apresentou sinais duplos 6,74-6,78 ppm com $J=8,0$ Hz referentes ao H6-H8. Um sinal em 6,13 ppm com integração para um hidrogênio.

O espectro de RMN de ^{13}C forneceu 13 sinais (Figura 89). Os sinais observados em 103,77,111,71, 132,53 ppm são referentes aos carbonos C8, C6 e C10 respectivamente. Em 166,30,131,78,131,95,129,11,117,12 e 155,49 ppm foram observados os carbonos C4', C2', C6', C3', C5' e C1', respectivamente, referentes ao anel aromático ligado na posição 4 da cumarina. Em 162,53, 116,69 e 161,20 ppm, estes referem-se aos carbonos carbonila C2, alfa carbonila C3 e beta carbonila C4. Em 114,34, 156,58 e 161,39 ppm foram observados os carbonos C5, C9 e C7 do anel aromático da cumarina.

O espectro na região do IV (Figura 87) exibe banda forte em $3213,41\text{ cm}^{-1}$ característico de estiramento O-H. Apresenta banda de absorção forte em $1693,50\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C=O de carbonila.

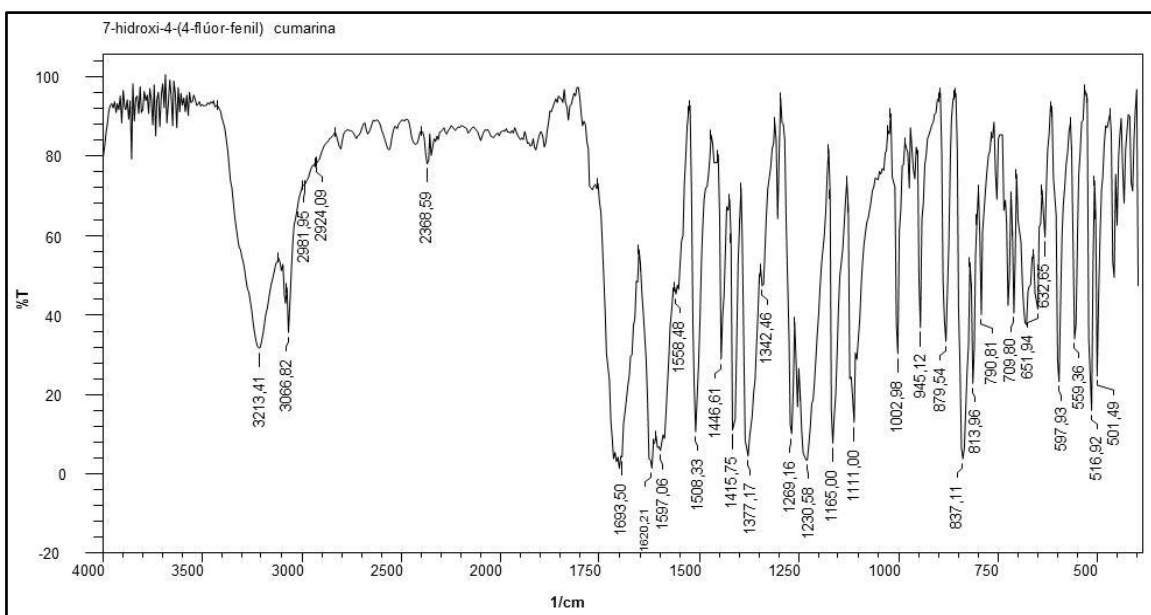
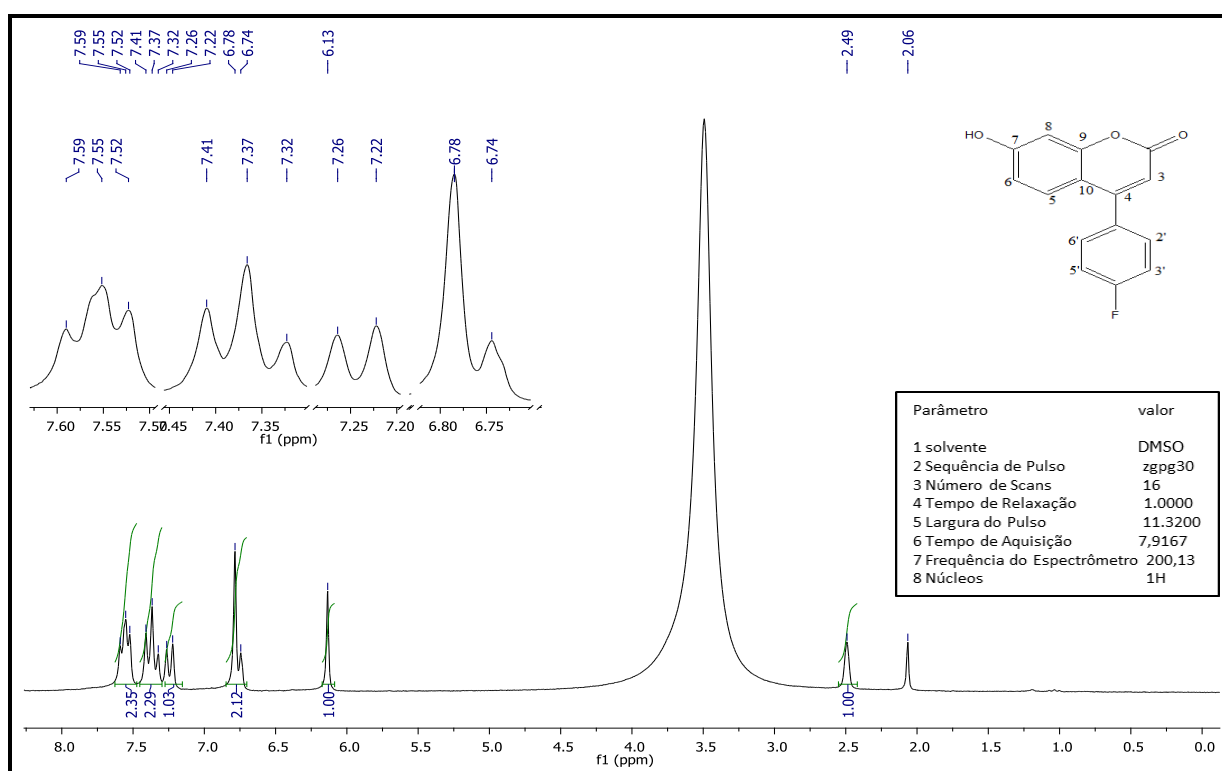


FIGURA87 - Espectro de infravermelho do derivado 14 (KBr).

A Tabela 16 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura88) e RMN de ^{13}C (Figura89).

Tabela 16 - Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 14.

H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	δ_C	Carbono	δ_C	DEPT
6,13	H-3	simpleto	103,77	C-8	103,77	C-8
6,74-6,78	H-8 H-6	multipeto	111,71	C-6	111,61	C-6
7,26-7,22	H-5	multipeto	114,34	C-5	114,34	C-5
7,32-7,59	H-2'- H-6' H-5-H-1'	multipeto	116,69	C-3	116,69	C-3
		multipeto	117,12	C-5'	117,12	C-5'
			129,11	C-3'	129,11	C-3'
			131,78	C-2'	131,77	C-2'
			131,95	C-6'	131,94	C-6'
			132,53	C-10		
			155,49	C-1'		
			156,58	C-9		
			161,20	C-4		
			161,39	C-7		
			162,53	C-2		
			166,30	C-4'		

**FIGURA88** - Espectro de RMN de 1H do derivado 14 a 200 MHz, em DMSO.

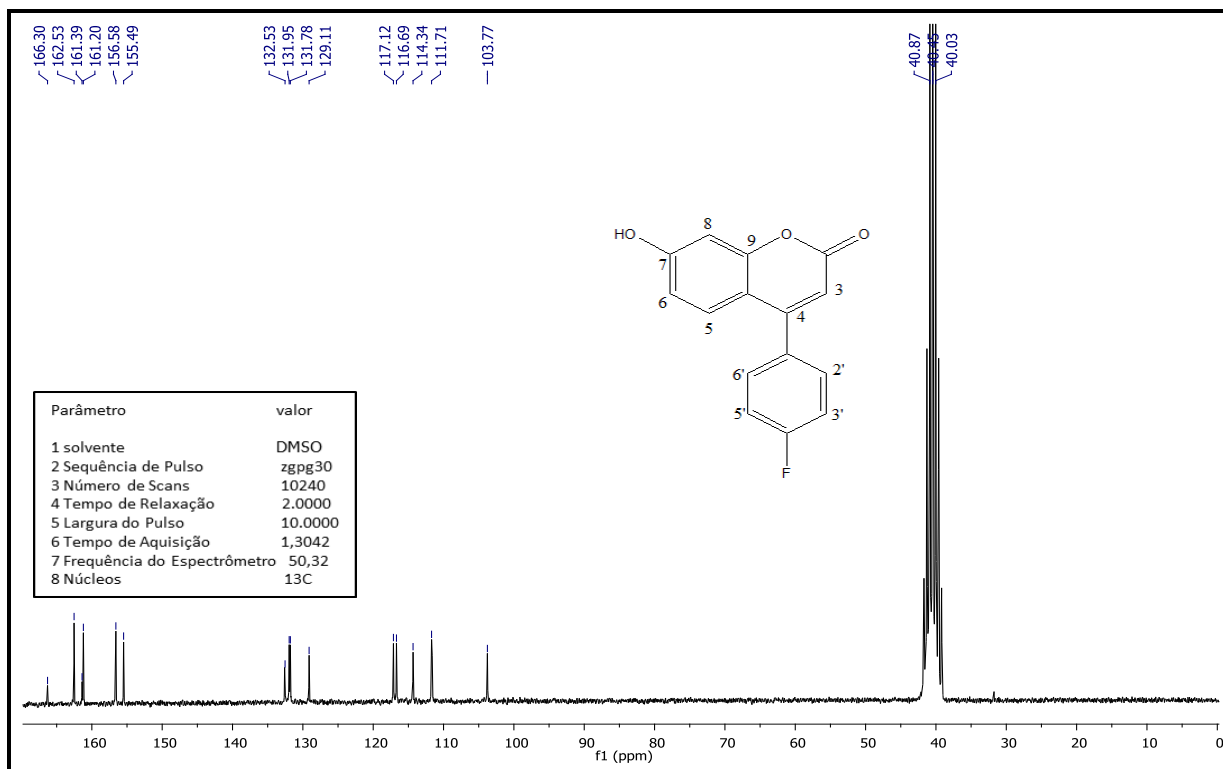


FIGURA 89 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 14 a 50MHz, em $\text{DMSO}-d_6$.

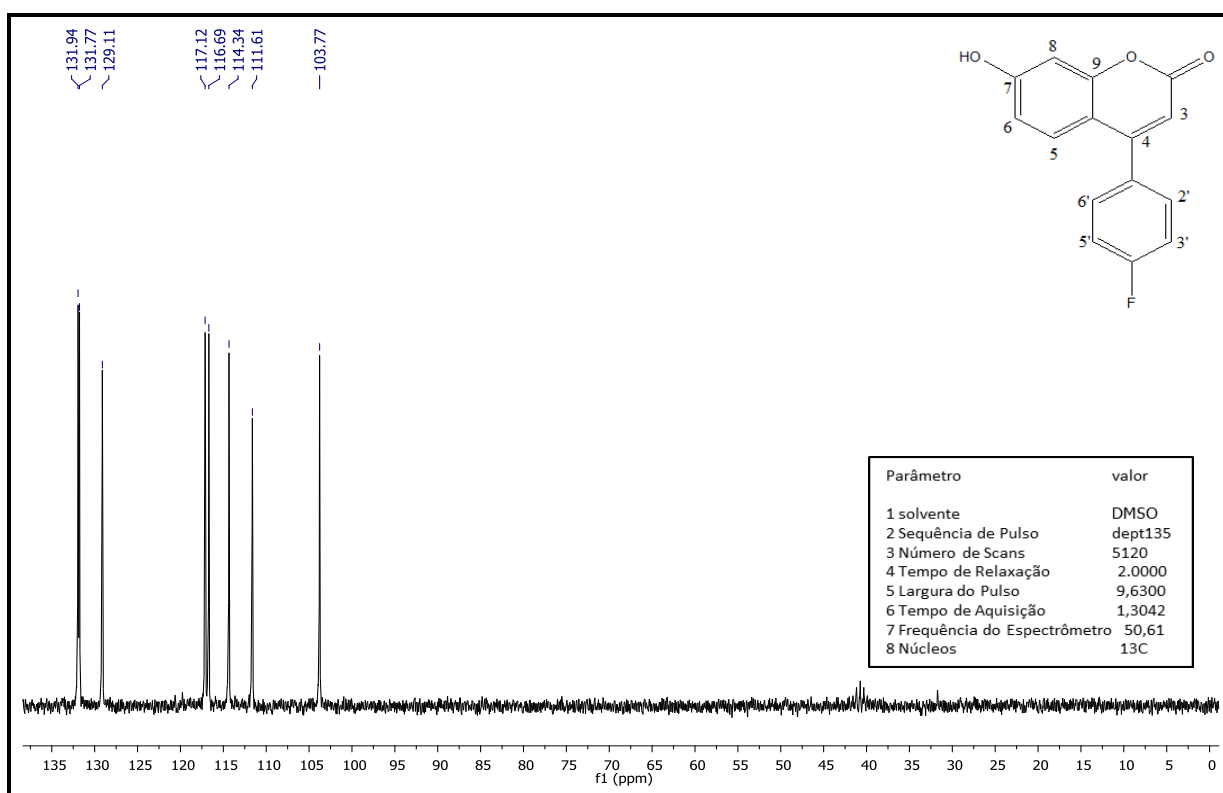


FIGURA 90 - Subespectro DEPT 135 do derivado 14 a 50 MHz em $\text{DMSO}-d_6$.

Para confirmação da massa molecular do 7-hidroxi-4-(4-fluorfenil)cumarina foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF. O

espectrograma (Figura 91) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 279,0256, o qual é massa do íon de fórmula $C_{15}H_9FO_3Na^+$.

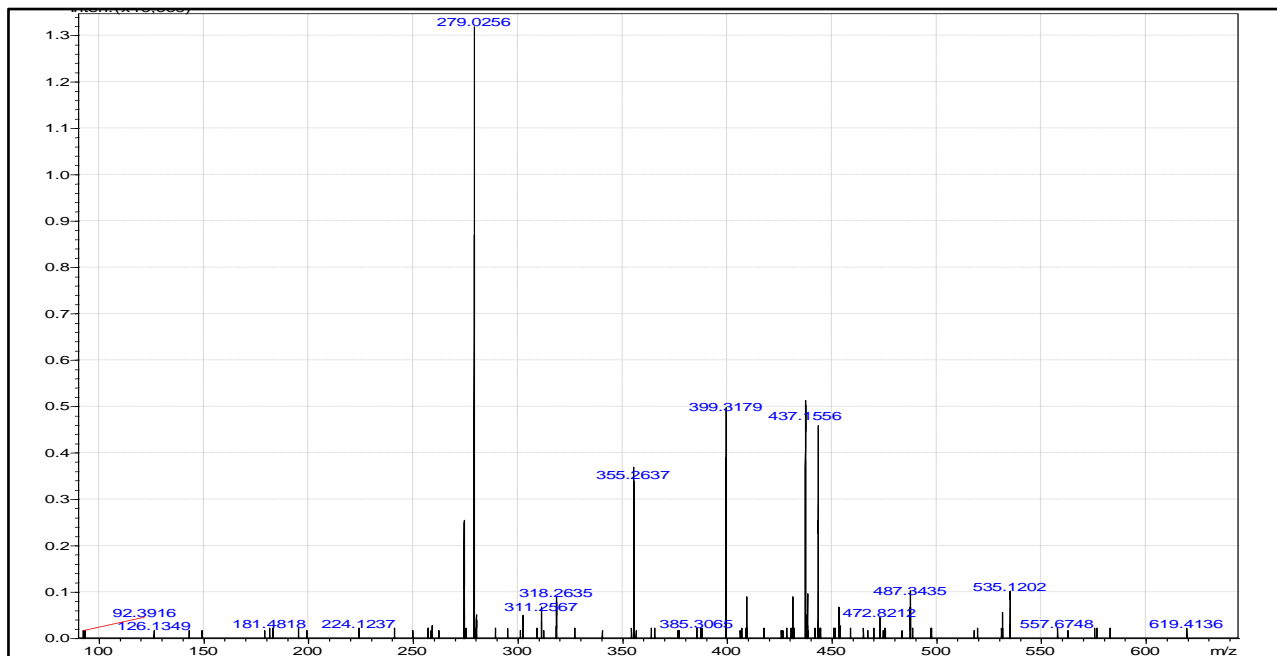


FIGURA 91 - Espectro de Massas do derivado 14 obtido por MALDI-TOF.

Composto: 4-(4-fluorfenil)-7-*O*-metil-cumarina (15)

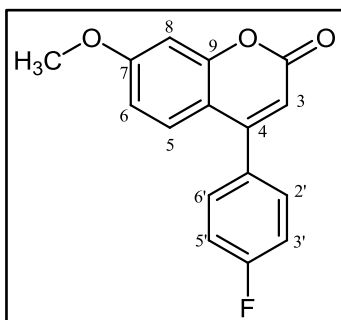


FIGURA 92- Derivado 15.

O derivado 15 (Figura92) foi obtido por reação de alquilação entre o 4-(4-fluorfenil)-7-hidroxycumarina e iodeto de metila (CH_3I), na qual foi utilizado o carbonato de potássio (K_2CO_3), dimetilformamida (DMF) e acetona (YANG *et al.*, 2009). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. $110^\circ C$ e rendimento de 56,0%.

Os sinais de RMN de 1H e RMN de ^{13}C observados são compatíveis à estrutura base da cumarina referente ao composto 1. No espectro de RMN de 1H (Figura 94)foi observado um sinal intenso de simpleto em 3,89 ppm referente aos hidrogênios metílico H-7'. Observou-seno espectro de RMN de ^{13}C um sinal em 56,17 ppm referente ao carbono metílico.Com os

sinais observados em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (Figura 95) comprovou-se a modificação na estrutura base do derivado 1 com inserção de um grupo metílico.

O espectro na região do IV (Figura 93) exibe banda forte em $3056,26\text{ cm}^{-1}$ característico de estiramento C-H de anel aromático, estiramento simétrico e assimétrico em $2846,02$ e $2938,60\text{ cm}^{-1}$ referente ao C-H₃. Apresenta banda de absorção forte em $1722,46\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C=O de carbonila e uma banda de absorção forte em $1220,00\text{ cm}^{-1}$ característico de C-O-C de éter.

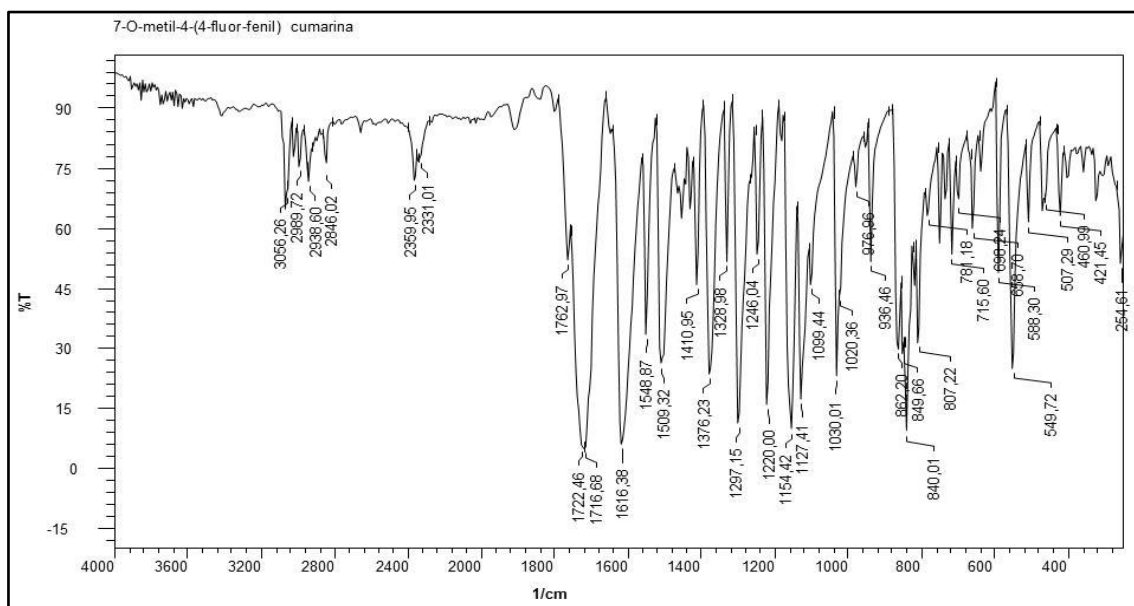
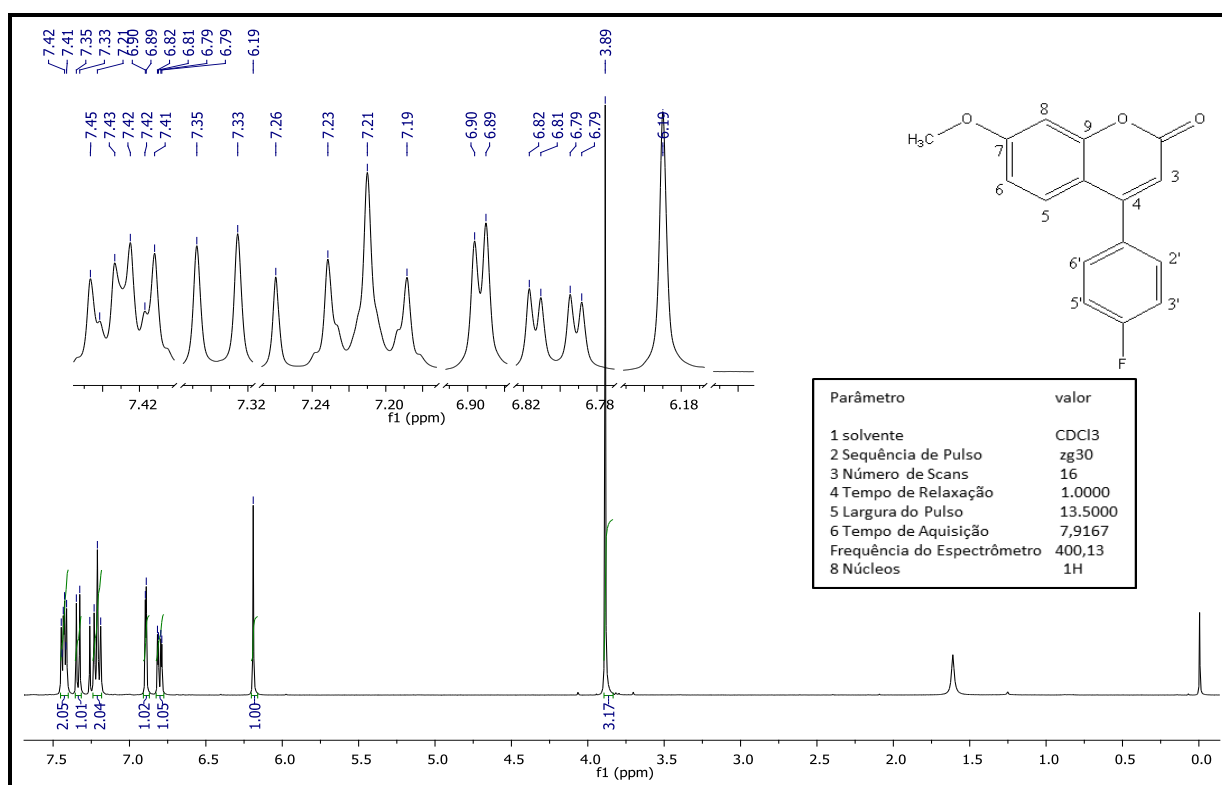


FIGURA 93 - Espectro de infravermelho do derivado 15 (KBr).

A Tabela 17 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura 94) e RMN de ^{13}C (Figura 95).

Tabela 17 - Deslocamentos químicos ^1H de RMN e ^{13}C de RMN de ^{13}C do derivado 15.

H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	^1H	Carbono	^{13}C	DEPT
3,89	H-7'	simpleto	56,17	C-7'	56,17	C-7'
6,19	H-3	simpleto	101,54	C-8	101,54	C-8
6,80	H-6	duplo dupleto 2,4;7,6	111,53	C-10	112,39	C-6
6,89	H-8	dupleto; 2,4	112,39	C-6	112,79	C-3
7,19-7,23	H-2'H-6'	multipleto	112,79	C-3	116,27	C-3'
7,34	H-5	dupleto; 7,6	116,27	C-3'	116,49	C-4'
7,41-7,45	H-3'H5'	multipleto	116,48	C-4'	128,07	C-5
			128,07	C-5	130,62	C-3'
			128,69	C-1'	130,70	C-5'
			130,61	C-3'		
			130,69	C-5'		
			139,33	C-9		
			155,08	C-4		
			159,39	C-7		
			161,36	C-2'		
			163,28	C-4'		

**FIGURA 94** - Espectro de RMN de ^1H do derivado 15 a 200MHz, em CDCl_3

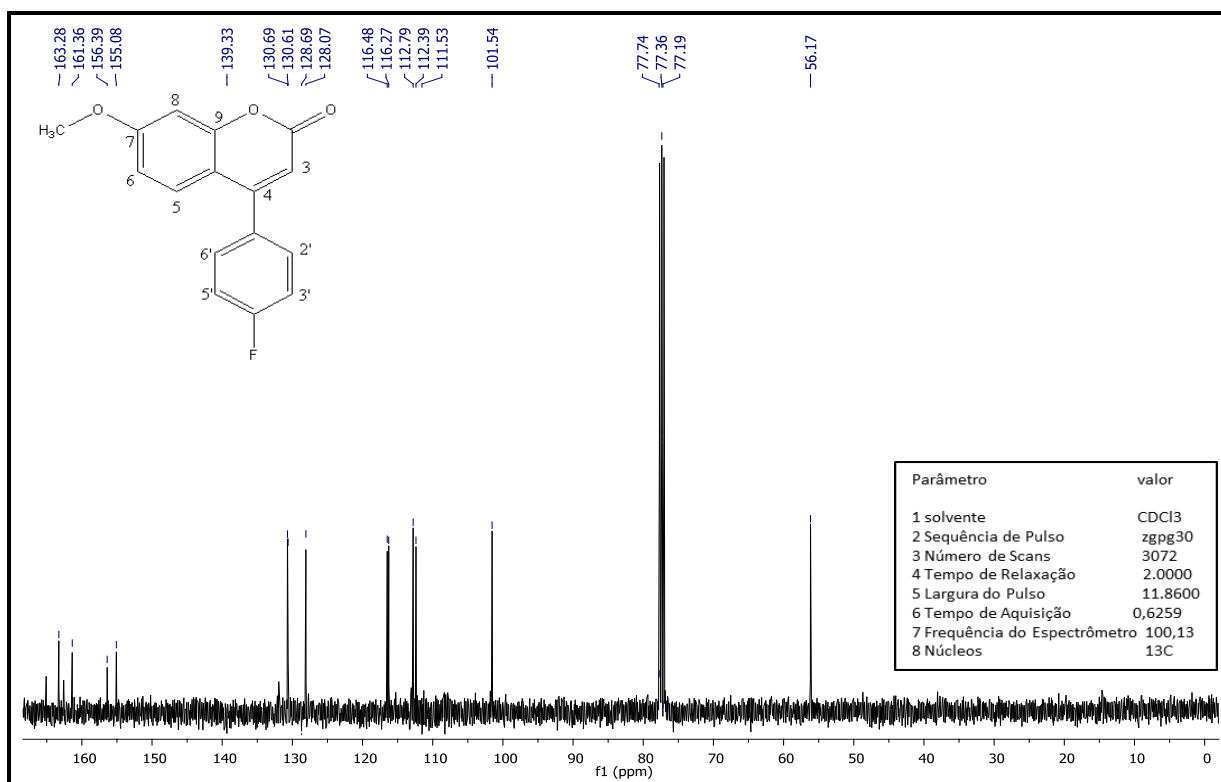


FIGURA 95 - Espectro de RMN de ^{13}C do derivado 15 a 100 MHz, em CDCl_3

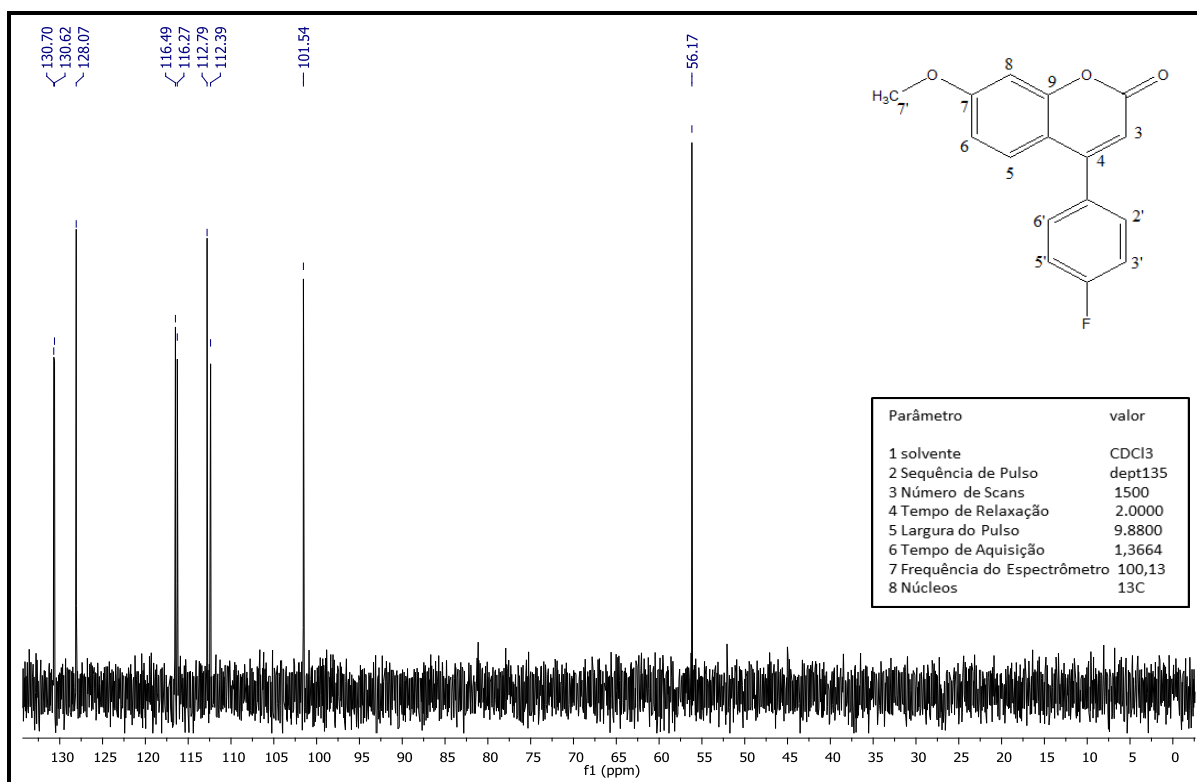


FIGURA 96 - Subespectro DEPT 135 do derivado 15.

Para confirmação da massa molecular do 4-(4-fluorfenil)-7-*O*-metilumarina foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF.

O espectrograma (Figura 97) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 293,0697 o qual é massa do íon de fórmula $C_{15}H_{11}FO_3Na^+$.

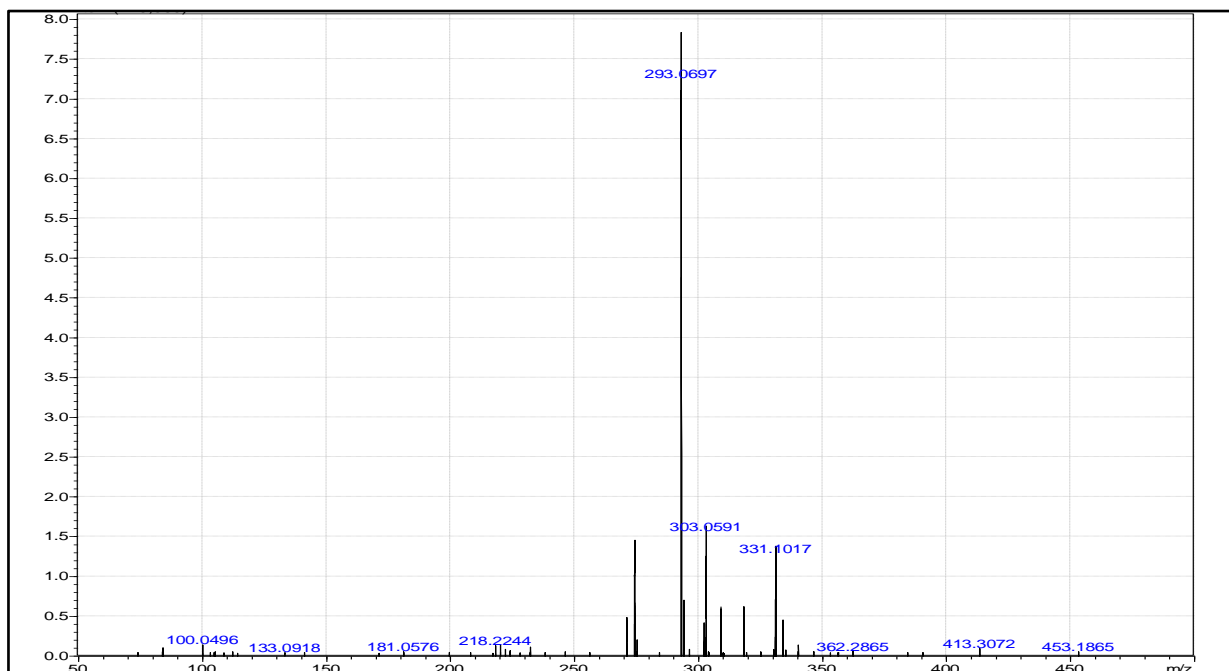


FIGURA 97 - Espectro de Massas do derivado 15 obtido por MALDI-TOF.

Composto: 4-(4-fluorfenil)-7-*O*-prenilcumarina (16) (Descrito pela primeira vez na literatura).

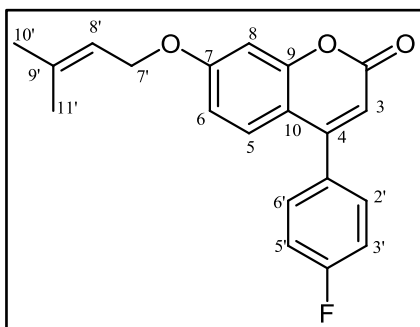


FIGURA 98 - Derivado 16.

O derivado 16 (Figura 98) foi obtido por reação de alquilação entre o (4-fluorfenil)-7-hidroxycumarina e 1-cloro-3-metil-2-buteno, na qual foi utilizado o carbonato de potássio (K_2CO_3), dimetilformamida (DMF) e acetona (YANG *et al.*, 2009). O derivado apresentou-se como um sólido branco, com p.f. $122^\circ C$ e rendimento de 57,2%.

Os sinais de RMN de 1H e RMN de ^{13}C observados são compatíveis à estrutura base da cumarina referente ao composto 1. No espectro de RMN de 1H (Figura 100) foram observados dois simpletos em 1,76 e 1,80 ppm referentes aos hidrogênios metílico H10' e H11', um duplete em 4,57-4,59 ppm com $J=8,0$ Hz referente ao hidrogênio H7' e um tripleto

em 5,44-5,48 ppm com $J=6,4;6,4$ Hz referente ao hidrogênio H8'. Os sinais do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 101) foram observados em 18,60 e 26,12 ppm referentes aos carbonos metílico C10' e C11', um sinal em 65,79 ppm referente ao carbono C7', em 118,91 ppm um sinal referente ao carbono C8' e um sinal em 139,67 ppm referente ao carbono C9'. Com os sinais observados em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C comprovou-se a modificação estrutural na estrutura base do derivado 1 com a inserção de um grupo prenil.

O espectro na região do IV (Figura 99) exibe banda forte em $3070,73\text{ cm}^{-1}$ característico de estiramento C-H de anel aromático, estiramento simétrico e assimétrico em $2932,81$ referente ao C-H₃. Apresenta banda de absorção forte em $1726,32\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento C=O de carbonila, e uma banda de absorção forte em $1164,06\text{ cm}^{-1}$ característico de C-O-C de éter.

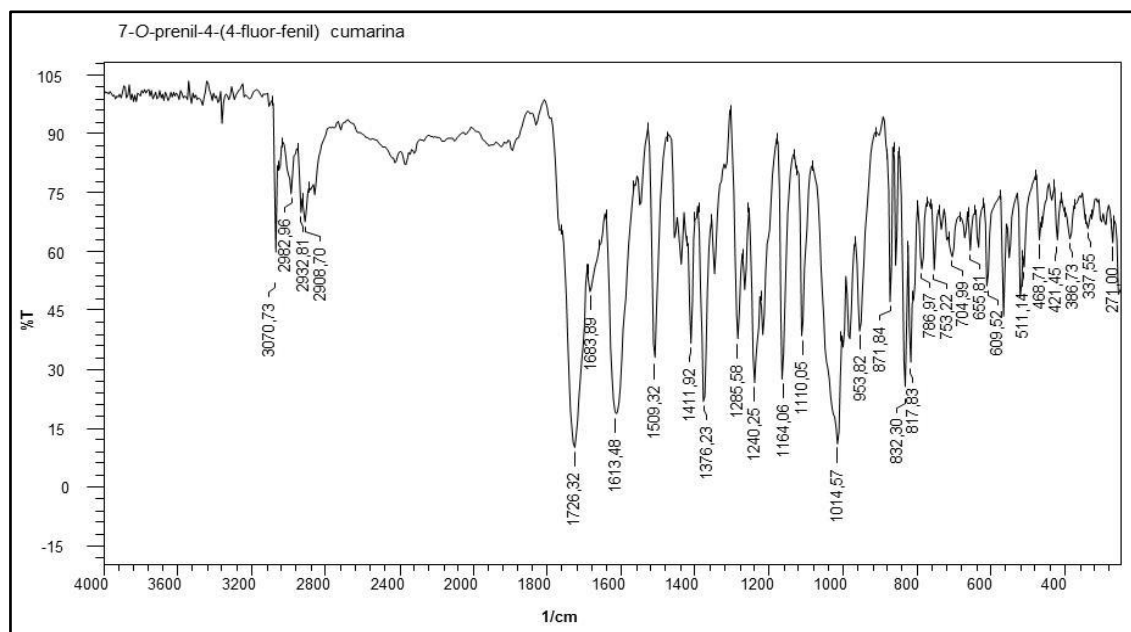
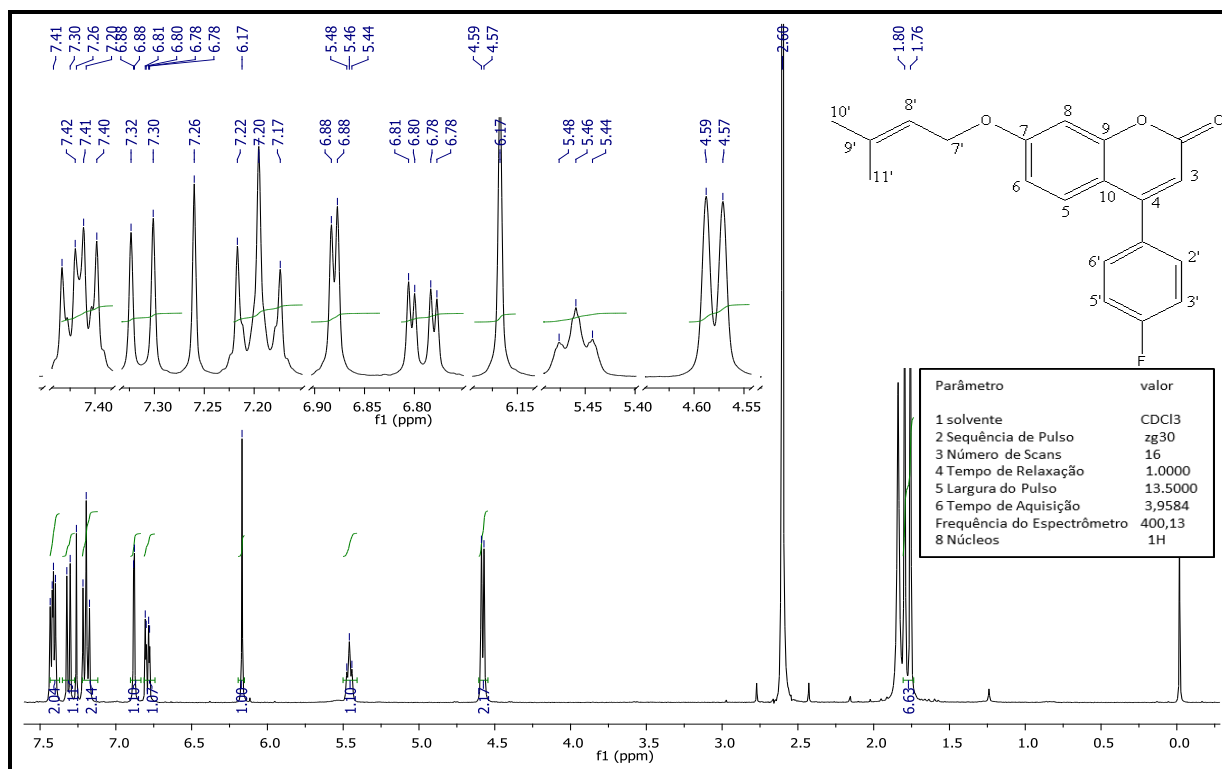


FIGURA 99 - Espectro de infravermelho do derivado 16 (KBr).

A Tabela 18 mostra os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H (Figura 100) e RMN de ^{13}C (Figura 101).

Tabela 18 - Deslocamentos químicos δ_H de RMN de 1H e δ_C de RMN de ^{13}C do derivado 16.

H	Hidrogênio	Multiplicidade e J (Hz)	C	Carbono	C	DEPT
1,76	H-10'	simpleto	18,60	C-11'	18,60	C-11'
1,80	H-11'	simpleto	26,12	C-10'	26,18	C-10'
4,58	H-7'	dupleto 7,6	65,79	C-7'	65,79	C-7'
5,46	H-8'	triplete 7,6	102,22	C-8'	102,13	C-8'
6,17	H-3	simpleto	112,18	C-6	112,04	C-6
6,80	H-6	duplo dupleto; 2,8;6,4	113,39	C-8	113,39	C-3
6,88	H-8	dupleto; 2,8	116,22	C-10	115,96	C-8'
7,18	H-2' H-6'	dupleto; 2,4	116,44	C-3	116,33	C-5
7,31	H-5	dupleto; 6,4	118,91	C-5	118,91	C-2'
7,40-7,42	H-3' H-5'	multipleto	127,98	C-8'	127,28	C-6'
			130,58	C-3'C-5'	127,95	C3'
			130,66	C-2'C-6'	130,41	C5'
			139,67	C-9		
			155,16	C-4		
			156,15	C-7		
			161,33	C-2		
			162,53	C-4'		

**FIGURA 100** - Espectro de RMN de 1H do derivado 16 a 400 MHz em $CDCl_3$.

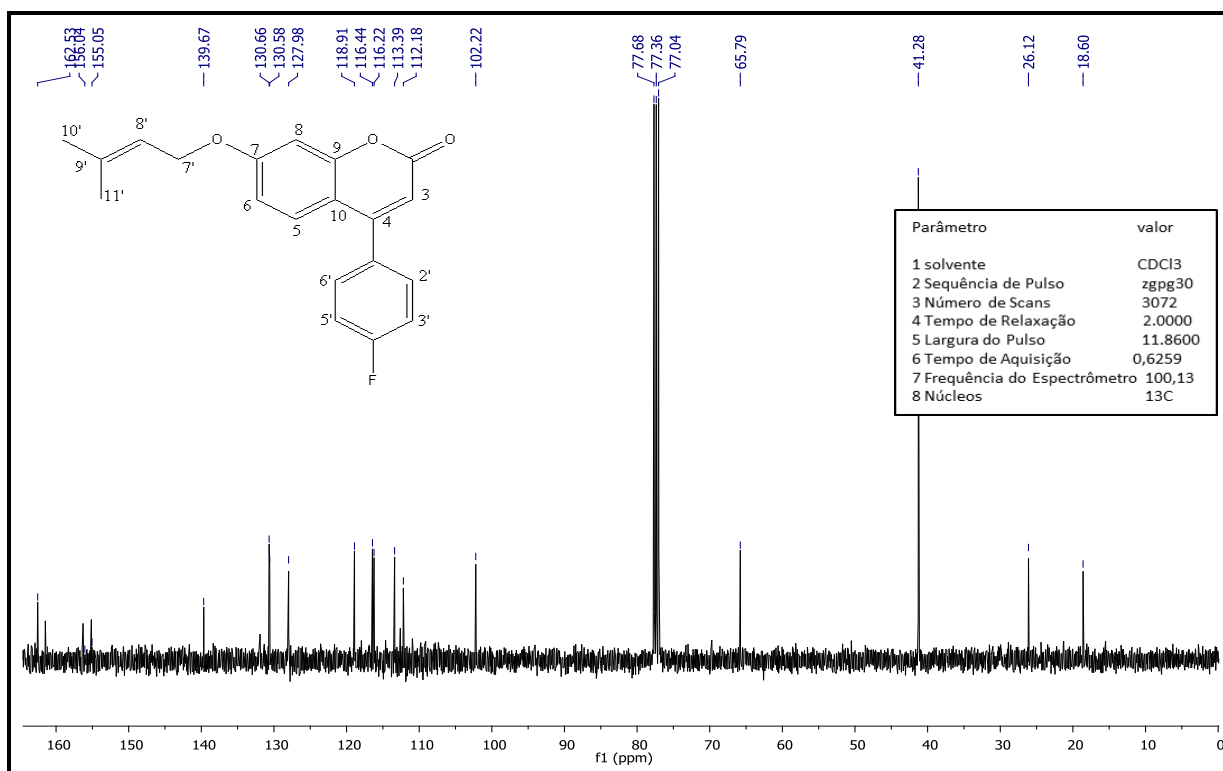


FIGURA101 - Espectro de RMN de ¹³C do derivado 16 a 100 MHz, em CDCl₃

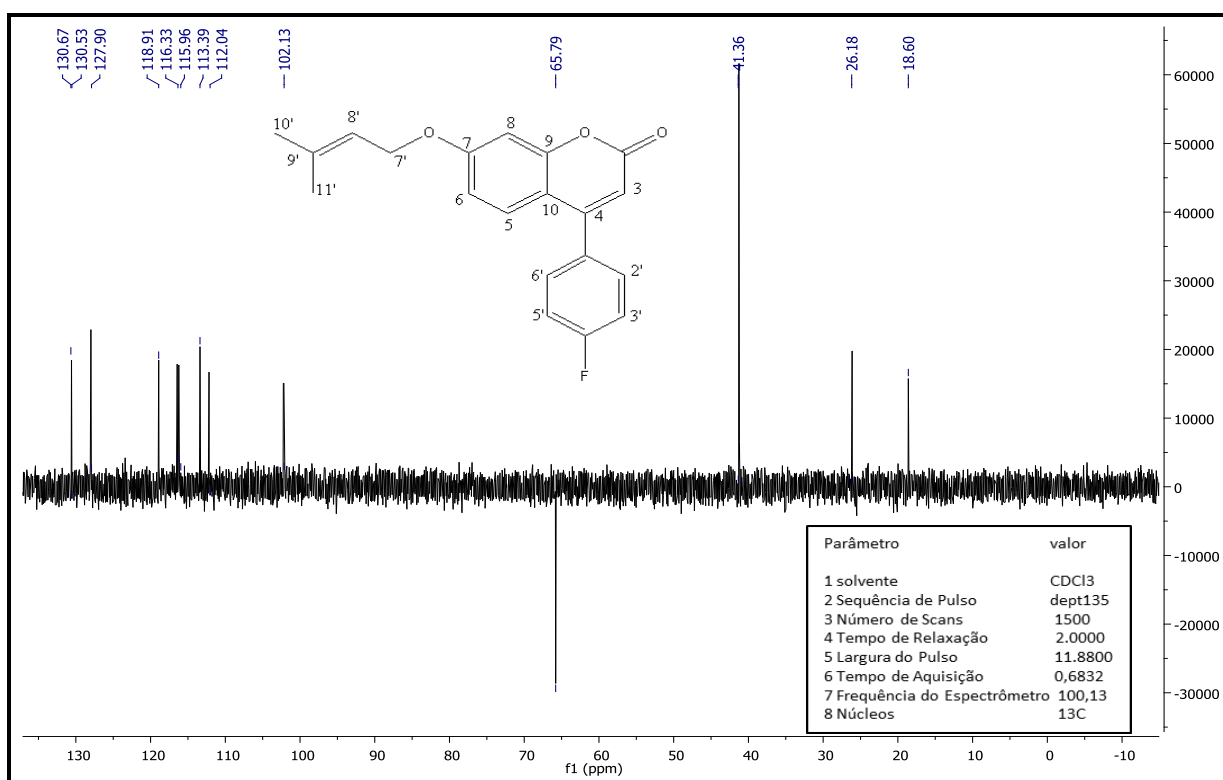


FIGURA 102- Subespectro DEPT 135 do derivado 16 a 100 MHz, em CDCl₃

Para confirmação da massa molecular do 4-(4-fluorfenil)-7-*O*-prenilcumarina foi obtido um perfil através das análises de espectrometria de massas em sistema MALDI-TOF.

O espectrograma (Figura 103) apresentou um pico com relação massa e carga (m/z) de 347,1114 o qual é massa do íon de fórmula $C_{20}H_{17}FO_3Na^+$.

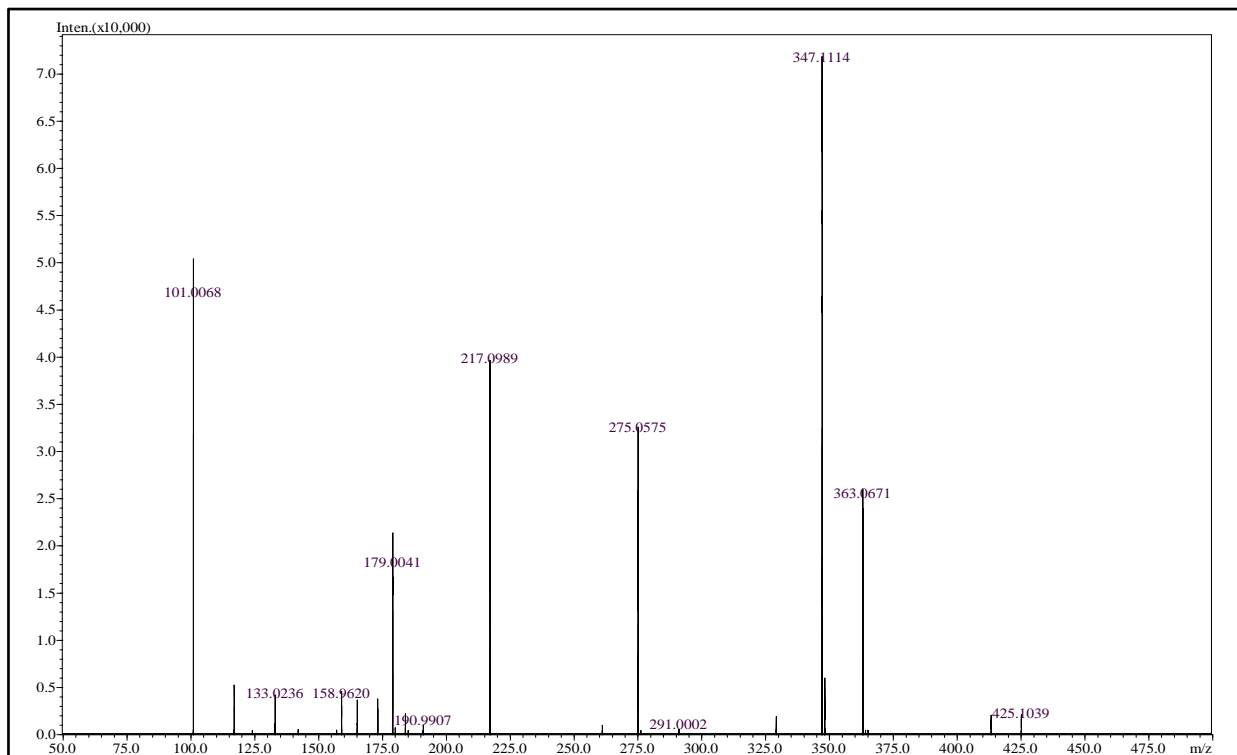


FIGURA103 - Espectro de Massas do derivado 16 obtido por MALDI-TOF.

6.1.3 Ensaios de Atividade Antitumoral “*In Vitro*”

6.1.3.1 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi inicialmente avaliada por ensaio colorimétrico (MTS), um método amplamente utilizado em varreduras que objetivam selecionar moléculas com atividade antiproliferativa. Os compostos 4-fenil-7-hidroxycumarina, 4-fenil-7-*O*-metilcumarina, 4-fenil-7-*O*-prenilcumarina, 4-fenil-7(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)cumarina, 4-fenil-7-(β-D-Glucopiranosiloxi)cumarina, 7-*O*-acetil-4-fenilcumarina, 7-*O*-butanoil-4-fenilcumarina, 7-*O*-alil-4-fenilcumarina, 4-(4-clorofenil)-7-hidroxi-cumarina, 4-(4-clorofenil)-7-*O*-metil-cumarina, 4-(4-clorofenil)-7-*O*-prenilcumarina, 4-(4-fluorfenil)-7-hidroxycumarina, 4-(4-fluorfenil)-7-*O*-metil-cumarina e 4-(4-fluorfenil)-7-*O*-prenilcumarina (40 μmol) foram testados em duas linhagens derivadas de carcinoma de mama humana (MCF-7, estrogênio-dependente; e Hs578T, estrogênio-independente).

Os resultados mostraram que os compostos 1 e 14 não apresentaram atividade para as linhagens MCF-7 e Hs578T quando houve a substituição no anel fenílico ligado na posição 4, já o composto 11 tendo um cloro substituído na posição 4 do anel houve uma redução de 20% da viabilidade, para os compostos 2, 12 e 15 substituído com metoxi na posição 7 não apresentou nenhuma atividade para as linhagens MCF-7 e Hs578T.

Os compostos 7, 9 e 10 contendo um glicosídeo, um éster e um éter ligados na posição 7 respectivamente da fenil cumarina observou-se que não houve atividade para as linhagens MCF-7 e Hs578T.

A interação de estrogênio com seus receptores (ERs) estimula a proliferação das células do câncer de mama. Assim, os ERs têm sido considerados importantes alvos para o desenvolvimento de medicamentos contra o câncer de mama (JENSEN; JORDAN, 2003). Em geral, células de câncer de mama que expressam ERs respondem à terapia hormonal, ao contrário das células que são negativas para esses receptores. Assim sendo, a proposta terapêutica para o câncer de mama é realizada com base nas características do tumor. No presente trabalho, os dois derivados (6 e 8) que reduziram a viabilidade nas culturas da linhagem MCF-7 não alteraram o percentual de células viáveis nas culturas da linhagem Hs578T. Assim sendo, é possível que a moderada atividade antiproliferativa observada sobre a linhagem MCF-7 esteja relacionada à presença dos receptores de estrogênio.

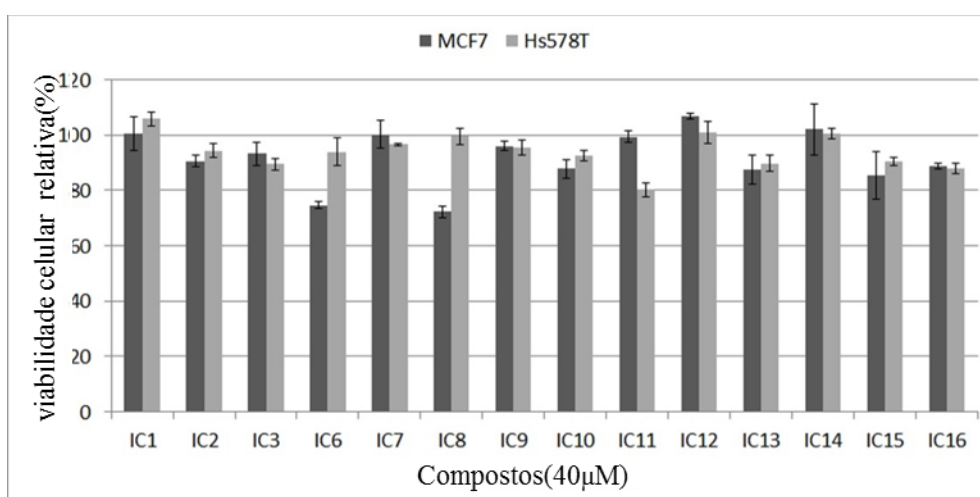


FIGURA 104 - Viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico (MTS). Linhas de células MCF-7 e Hs578T tratadas por 48h com os diferentes compostos a 40 µM.

Considerando a modesta resposta observada sobre as linhagens de câncer de mama, os compostos estudados foram testados em uma linhagem derivada de câncer de pulmão (A549). Os resultados relacionados à viabilidade celular são mostrados na Figura 105.

Os resultados mostraram que os compostos 1 e 14 apresentaram uma redução da viabilidade de aproximadamente 20% e o composto contendo um cloro na posição 4 do anel fenílico não apresentou nenhuma atividade para linhagem A549.

Os compostos 2,12 e 15 apresentaram uma pequena viabilidade, sendo o composto 2 o que apresentou melhor atividade (22%) e os compostos 12 e 15 uma baixa viabilidade quando comparado ao controle para os compostos com modificação de uma metoxila na posição 7.

A modificação feita na posição por um prenila na posição 7 mostra uma viabilidade celular de 26% para o composto 3 e para o composto 6 uma viabilidade de 19% e para o composto 13 não apresentou viabilidade. Esses resultados mostram que a modificação de um hidrogênio para um cloro interfere na viabilidade, e quando este é modificado para um flúor há perda dessa viabilidade.

A modificação feita para um glicosídeo per acetilado e para um glicosídeo, ambos na posição 7 da cumarina modificada, apresentou uma baixa viabilidade, mostrando que este tipo de modificação não interfere na viabilidade e não é interessante para mais estudos.

Os compostos contendo um éster na posição 7 (composto 8 e 9) apresenta uma viabilidade significativa, observa-se que o aumento de 2 para 4 carbonos do éster à um aumento significativo, já o composto contendo um substituinte éter na mesma posição mostrou uma viabilidade de 22%.

Com a soma desses resultados podemos ver que a modificação do cloro pode interferir na viabilidade tanto para linhagem A549 quanto para as linhagens MCF-7 e Hs578T, porém não há um aumento significativo se comparado com o apresentado pelo hidrogênio na mesma posição, já os compostos contendo o flúor, esse não interfere na atividade. Estes resultados mostram que a posição 4 contendo o anel fenílico é uma posição importante, que pode interferir tanto para o aumento quanto para a diminuição da viabilidade.

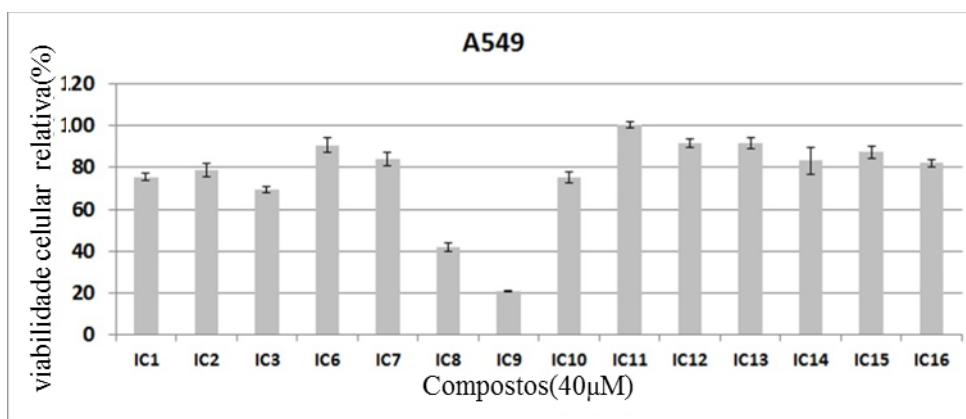


FIGURA 105 - Viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico (MTS). Linhas de células A549 tratadas por 48h com os diferentes compostos a 40 μM .

Como os compostos 8 e 9 reduziram drasticamente o percentual de células viáveis, estes foram selecionados para novas investigações.

Após a seleção dos compostos, um novo ensaio de viabilidade foi realizado para a obtenção de uma curva dose-resposta. Os resultados obtidos neste passo confirmam aqueles observados na triagem inicial e mostram que os compostos 8 e 9 apresentam expressiva atividade antiproliferativa, sendo que seus efeitos são dependentes da concentração utilizada (Figura 106). Os valores de IC_{50} (Inhibitory Concentration, ou seja, concentração necessária para inibir 50% do crescimento) foram $42,45 \pm 1,49 \mu\text{M}$ e $41,25 \pm 1,56 \mu\text{M}$, respectivamente para os compostos 8 e 9. Esses valores são próximos ao observado para a cisplatina ($\text{IC}_{50} = 29,95 \pm 1,96 \mu\text{M}$), um composto altamente citotóxico utilizado em quimioterapia (Tabela 19).

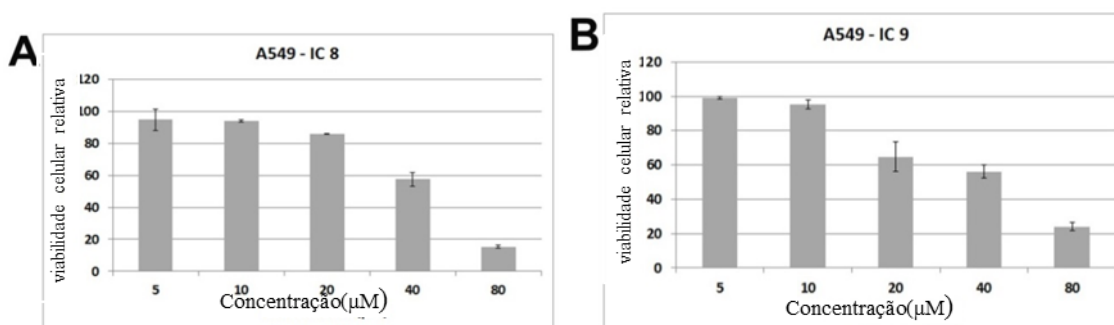


FIGURA 106 - Viabilidade celular relativa determinada por ensaio de MTS. As culturas de células foram tratadas com os compostos por 48 horas.

Tabela 19 - Valores de IC_{50} (μM) calculados a partir dos resultados obtidos por ensaio de MTS

	8	9	Cisplatina
Linha celular (A549)	$42,45 \pm 1,49$	$41,25 \pm 1,56$	$29,95 \pm 1,96$

O software GraphPadPrism $\text{\textcircled{R}}$ foi utilizado para calcular os valores de IC_{50} .

Para investigar se o efeito citotóxico dos compostos sobre a linhagem A549 foi consequência da indução de morte celular ou bloqueio no ciclo celular, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão com Azul de Tripano. Essa abordagem permite identificar e quantificar as populações de células viáveis e não viáveis. As células foram contadas em hemocitômetro na presença de azul de tripano, um corante vital, que é capaz de penetrar apenas em células que apresentam perda de integridade da membrana. Assim sendo, o azul de tripano trata-se de um marcador para células mortas.

A determinação da população de células viáveis e não viáveis foi realizada após 24h e 48h de tratamento. Os resultados mostraram que ambos os compostos (8 e 9) reduziram significativamente ($p < 0,05$) o número de células viáveis, quando comparados com os controles. Além disso, foi possível observar aumento no número de células inviáveis (Figura 107). Em conjunto, os dados mostram que os compostos 8 e 9 exercem atividade antiproliferativa e citotóxica sobre as células A549.

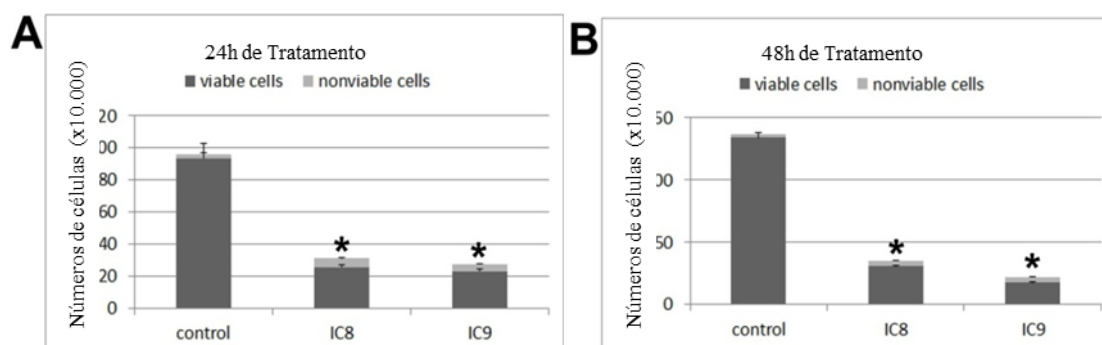


FIGURA107- Determinação das populações de células viáveis e não viáveis realizada por exclusão com azul de Tripano, após 24h e 48h de tratamento com 8 e 9 a 40 μmol . * $p < 0,05$ de acordo com análise de variância e teste de Tukey.

Considerando a atividade citotóxica de 8 e 9, foi investigado se o processo de morte envolvido é apoptose. Essa abordagem foi realizada pelo ensaio de Anexina V que permite identificar 4 populações: células viáveis, células em apoptose em fase inicial, células em apoptose em fase tardia e células necróticas.

Os resultados mostraram que 8 e 9 induzem um aumento significativo ($p < 0,05$) de apoptose após 48 h de tratamento (Tabela 20). Lopez-Gonzalez e colaboradores (2004) demonstraram que 7-hidroxicumarina induz bloqueio no ciclo celular e apoptose em células derivadas de câncer de pulmão, contudo, esses resultados foram observados somente quando elevadas concentrações foram empregadas (160 $\mu\text{g/mL}$). Assim sendo, os derivados 8 e 9 mostram-se mais efetivos como agente antitumoral em relação a 7-hidroxicumarina.

Tabela 20- Populações celulares determinadas pelo ensaio de Anexina V/ iodeto de propídio (IP) em amostras tratadas com os compostos 8 ou 9 por 48h

	Células positivas para IP Necrose (%)	Células positivas para AnexinV/FITC apoptose inicial (%)	Células positivas para Anexina V/FITC e IP apoptose tardia (%)	Apoptose inicial + apoptose tardia (%)
Control	1.0 \pm 0.12	1.2 \pm 0.22	1.5 \pm 0.25	2.7 \pm 0.47
8 (20 μM)	3.7* \pm 0.80	2.6* \pm 0.54	2.5* \pm 0.49	5.1* \pm 1.03
8 (40 μM)	19.8* \pm 2.15	3.5* \pm 1.10	4.2* \pm 1.05	7.7* \pm 2.15

9 (20 μ M)	4.80* \pm 1.11	2.9* \pm 1.05	4.10* \pm 1.10	7.0* \pm 2.15
9 (40 μ M)	26.10* \pm 2.30	3.2* \pm 1.19	4.7* \pm 1.18	7.9* \pm 2.37

* P < 0,05 de acordo com análise de variância e teste de Tukey.

Considerando os testes realizados para avaliar a atividade antitumoral dos derivados de cumarina (8 e 9), o presente trabalho demonstrou que os referidos compostos têm atividade antiproliferativa sobre a linhagem A549 e induzem apoptose. Nota-se que a lipofilia dos compostos 7 e 8 são semelhantes, entretanto a presença de grupo éster pode estar sendo determinante para a atividade.

Assim sendo, esses compostos podem ser úteis como agentes anticancerígenos. Novas investigações deverão ser feitas para elucidar os mecanismos moleculares relacionados à atividade antitumoral observada.

6.1.4 Testes Antiparasitários

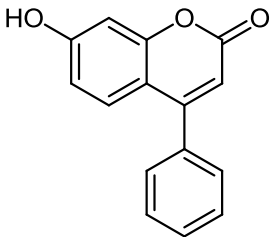
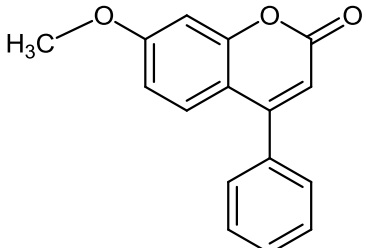
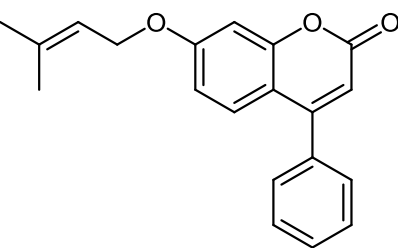
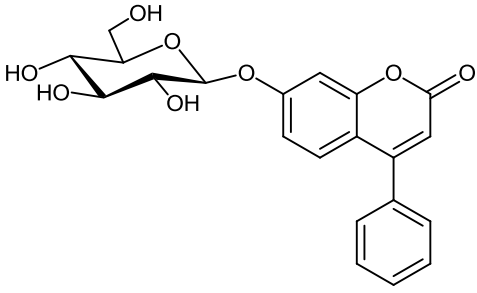
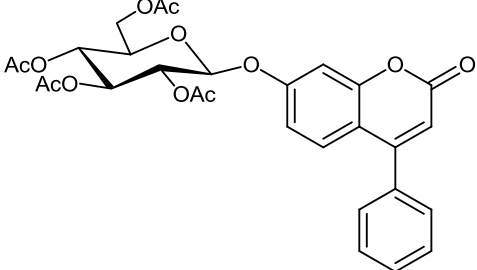
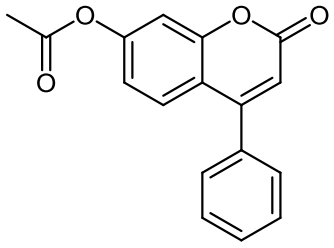
6.1.4.1 Atividade leishmanicida contra as formas promastigotas e amastigotas de *L.(L.) amazonensis*

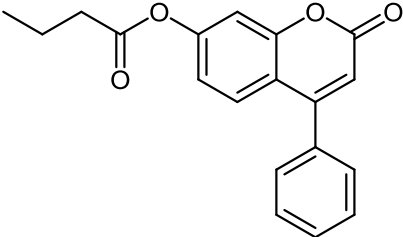
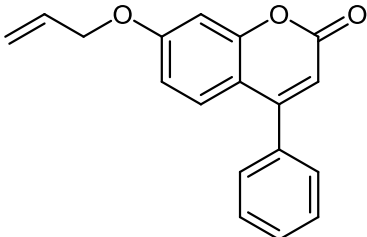
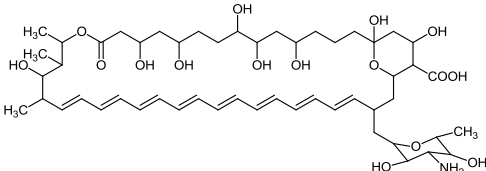
Os resultados (Tabela 21) mostram os valores de IC₅₀ das substâncias sintetizadas frente às formas promastigotas e amastigotas de *L.amazonensis*. Os derivados 2, 3, 7, 8, 9 e 10 mostraram uma atividade significativa, comparadas ao composto 1.

Os derivados mais promissores foram (3) e (7), que exibiram significativa atividade contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*. Por outro lado, considerando a atividade contra formas amastigotas estes derivados mencionados não foram tão eficazes como a anfotericina B. Os derivados que apresentaram valores elevados de IC₅₀ contra as formas promastigotas não foram selecionados para avaliar a sua atividade contra a forma intracelular do parasita. Todos os resultados são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21- Estrutura química, a atividade biológica contra ambas as formas de *L. amazonensis* de derivados de cumarina, em comparação com a anfotericina B

Composto	Estrutura química	IC ₅₀ PRO (μ g/mL) ^a	IC ₅₀ AMA (μ g/mL) ^b
----------	-------------------	--	--

(1)	 <chem>Oc1ccc2c(c1)oc(=O)c(c2)C3=CC=CC=C3</chem>	16.70	22.30
(2)	 <chem>COC1=CC=C2C(=C1)OC(=O)C=C2C3=CC=CC=C3</chem>	14.68	20.95
(3)	 <chem>CC(C)=CCOC1=CC=C2C(=C1)OC(=O)C=C2C3=CC=CC=C3</chem>	6.54	17.80
(6)	 <chem>O[C@H]1O[C@@H](OC2=CC=C3C(=O)OC=C3C=C2C4=CC=CC=C4)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O</chem>	36.75	n.d.
(7)	 <chem>CC(=O)OC[C@H]1OC(OC(=O)C)[C@H](OC(=O)C)[C@@H](OC(=O)C)[C@H]1OC2=CC=C3C(=O)OC=C3C=C2C4=CC=CC=C4</chem>	5.70	19.86
(8)	 <chem>CC(=O)OC1=CC=C2C(=C1)OC(=O)C=C2C3=CC=CC=C3</chem>	9.40	23.35

(9)		11.91	27.56
(10)		10.43	25.55
Amphotericin B		4.70	5.68

^a: atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*

^b: atividade leishmanicida contra as formas amastigotas de *L. amazonensis*

n.d.: não determinado

Todos os compostos apresentam grupos fenila na posição C-4 no esqueleto da cumarina. Outros grupamentos foram inseridos na posição C-7. Os compostos 3 e 7 que apresentamos grupos *O*-prenila e *O*-penta-*O*-acetil-glicopiranosila respectivamente na mesma posição, na qual foram cumarinas mais ativas contra formas promastigotas de *L. amazonensis* com $IC_{50} = 6,54$ e $5,70 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes dois compostos foram também os mais eficazes contra as formas amastigotas com $IC_{50} = 17,80$ e $19,86 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, mas eles não foram eficazes quando comparados aos medicamentos de referência, a anfotericina B, $IC_{50} = 5,68 \text{ mg/mL}$.

Os compostos 8, 6, 4, 2 e 1, que apresentam *O*-acetila, *O*-vinila, *O*-butanoila, *O*-metila e hidroxila mostrara-se menos ativos contra ambas as formas, promastigotas e amastigotas. Também o grupo tetra-*O*-acetil- β -D-glicopiranosiloxi na posição C-7 não parece ser promissor considerando a atividade leishmanicida, uma vez que o composto não apresentou uma atividade significativa contra amastigota de *L. amazonensis* comparada com anfotericina B.

Estes resultados confirmam que a variação dos substituintes no núcleo de cumarina influencia a polaridade da molécula e, portanto, a sua atividade biológica, facilitando a passagem de moléculas ativas através da barreira da membrana da célula.

Pereira e colaboradores (2010) mostraram que benzofenonas com maior lipofilicidade apresentaram maiores atividades contra espécies de *Leishmania*, o que poderia de fato estar relacionado com a facilidade para entrar no macrófago e alcançar o parasita. Maciel-Rezende e colaboradores, recentemente, constataram que um aumento no tamanho dos substituintes da cadeia lateral levou a um aumento proporcional de lipofilicidade de derivados de benzofenona e conseqüentemente o aumentada potência leishmanicida (MACIEL-REZENDE *et al.*, 2013).

7 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos conclui-se que:

Neste trabalho foi relatada a síntese de 14 derivados cumarínicos a partir da 7-hidro-4-fenilcumarina, 4-(4-clorofenil)-7-hidroxicumarina e 4-(4-fluorfenil)-7-hidroxicumarina, obtidos por modificações em C-4, sendo que três substâncias (9, 13 e 16) são inéditas e foram caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C , espectrometria de massa de alta resolução e infravermelho. Uma vantagem do processo sintético conseguido neste trabalho foi que a purificação dos derivados foi feita por extração ácido-base, e não necessitou do uso de cromatografia em coluna, obtendo-os com bons rendimentos e com índice de pureza acima de 95%, acompanhado por HPLC.

Os derivados obtidos foram avaliados em testes de ensaios de atividade antitumoral e estes mostraram que as modificações feitas no derivado de partida, interfere de uma forma significativa na viabilidade celular, quando se é modificado para um composto contendo um éster na estrutura, e se há um aumento na cadeia do éster também há um aumento na atividade.

Os compostos modificados contendo um flúor na posição *para* do anel fenílico não interfere na atividade, isto talvez não encoraje novos compostos contendo este halogênio nesta posição, mas exclui outros. No caso do cloro ocupando a mesma posição, verifica-se uma certa atividade, ainda que baixa, quando comparada com os compostos contendo hidrogênio na mesma posição.

Com esses resultados vê-se que a modificação no anel cloro pode interferir na viabilidade tanto para linhagem A549 quanto para as linhagens MCF-7 e Hs578T, porém é mais expressivo para linhagem A549. Verifica-se também que os compostos testados a uma especificidade para determinado tipo de células cancerígenas sendo, portanto de grande interesse devido sua especificidade.

Os resultados para a atividade antitumoral mostram que os compostos 8 e 9 são efetivos na inibição da proliferação celular, além de serem capazes de induzir a apoptose em células A549. Portanto, esses compostos podem ser úteis como agentes anticancerígenos e podem anunciar novos rumos para a terapia do câncer de pulmão. Outras investigações devem ser realizadas para verificar as principais vias de sinalização envolvidas com a atividade antitumoral destes compostos.

Os derivados obtidos foram avaliados em testes de ensaios leishmanicida nas formas promastigota e amastigota "*in vitro*", e os resultados mais destacados contra ambas as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* são os compostos 3 e 7. Por outro lado, considerando a atividade contra formas amastigotas estes derivados mencionados não foram tão eficazes como a anfotericina B.

Estes resultados confirmam que a variação dos substituintes sobre o esqueleto da cumarina na posição 7 diminui a polaridade dos compostos, com isso é possível ver uma influência sobre a lipofilicidade da molécula e, portanto, a sua atividade biológica facilitando a passagem de moléculas ativas através da barreira da membrana da célula. Nota-se ainda que os derivados esterificados possuem mais atividade e que outros grupos devem ser avaliados.

Outras investigações devem ser realizadas para verificar as principais vias de sinalização envolvidas com a atividade antitumoral e leishmanicida destes compostos.

REFERÊNCIAS

AHMAD, R.; SIDDIQUI, M. A. Z. N.; KUMAR, A. Screening of synthetic new heterocyclic derivatives of 3-Formyl-4-hydroxycoumarin for anti-inflammatory activity In albino rats. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care**, v. 1, n.1, p.46-62, 2009.

AJANI, O. O.; NWINYI, O. C. Microwave-assisted synthesis and evaluation of antimicrobial activity of 3-{3-(s-aryl and s-heteroaromatic)acryloyl}-2H-chromen-2-one derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 47,p. 179-187, 2010.

BAKER, D. D. *et al.* The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1225-1244, 2007.

BEATTIE, L.; KAYE, P. M. Leishmania-host interactions: what has imaging taught us? **Cellular Microbiology**,v. 13, n. 11, p. 1659-1667, 2011.

BENG, B. E. *et al.* Vipirinin, a coumarin-based HIV-1 Vpr inhibitor, interacts with a hydrophobic region of VPR. **Journal of Biological Chemistry**, v.286, n. 16, 2011.

BHARGAVA, P.; SINGH, R. Developments in Diagnosis and Antileishmanial Drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v.2012, p. 1-13, 2012.

BHATT, A. N. *et al.* Cancer biomarkers - Current perspectives. **Indian Journal of Medical Research**,v. 132, p. 129-149, 2010.

BORGES, G.; VIANNA, R.;MEDINA-REMÓN, A. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**,n.13, v.3, p. 318-340, 2013.

BOURGAUD, F. *et al.* Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Reviews**,v.2,n.5,p. 293-308, 2006.

BOYD, A. J.; BARRETT, J. C.; Genetic and cellular basis of multistep Carcinogenesis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 46, p. 469-486, 1990.

BRANDÃO, H. N.*et al.* Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n.6, p. 99-105, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2013.

BRENZAN, M. A. *et al.* Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 101, n. 3, p. 715-722, 2007.

BRENZAN, M. A. *et al.* Structure-activity relationship of (-) mammea A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 651-658, 2008.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n. 3, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2013. **Parasites – Leishmaniasis**. Biology. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 20 abr. 2013.

CHO, S.; MYERS, J.N. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. **Journal of Dental Research**. v.87, n.1, 2008.

CONCHIE, J.; LEVVY, G. A.; MARSH, C. A. Methyl and phenyl glycosides of the common sugars. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 12, p. 157-179, 1957.

COSTELLO, L. C.; FRANKLIN, R. B. The genetic/metabolic transformation concept of carcinogenesis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, p. 123-130, 2012.

CURCINO, V. C. L. Síntese de uma coleção de cumarinas, possíveis inibidores da enzima acetilcolinesterase. 2010. 161f. Dissertação (Mestrado em Química), UFSCar, São Carlos, 2010.

CZELUSNIAK, K.E. *et al.* Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DARU, J; STIRLING, A. Mechanism of the Pechmann Reaction: A Theoretical Study. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, p. 8749-8755, 2011.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural products: a biosynthetic approach**. West Sussex John Wiley & Sons, 1997.

DIGHE, N. S. *et al.* Synthetic and pharmacological profiles of coumarins. **A review Archives of Applied Science Research**, v. 2, p. 65-71, 2010.

DUVOIX, A. *et al.* Chemopreventive and Therapeutic Effects of Curcumin. **Cancer Letters**, v. 233, p. 181-190, 2005.

EL-ANSARY, S. L. *et al.* New furobenzopyrone analogs as photochemotherapeutic agents. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v.36, n.3, p. 73–83,1998.

EPIFANO, F. *et al.* Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. **Phytochemistry**, v. 68, p.939-953, 2007.

FILHO, V.C.; YUNES, A. R. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

FLAVIN, M. T. *et al.* Synthesis, chromatographic resolution, and anti-human immunodeficiency virus activity of (+/-)-calanolide A and its enantiomers. **Medicinal Chemistry**, 39, 1303–1313, 1996.

FUDA, N. J.; ARDEHALI, B. M.; LIS, J.T. Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription *in vivo*. **Nature**, v.461, p. 186-192, 2009.

GARAZD, Y. L.; GARAZD, M.M.; KHILYA, V. P. Modified coumarins. 19. Synthesis of neoflavone d-glycopyranosides. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 6, p. 663-668, 2005.

GARÓFOLO, A. *et al.* Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de Nutrição**, v. 17, n.4, p.491-505, 2004.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 12, p. 770- 776, 2000.

HOTEZ, P. J.; SAVIOLI, L.; FENWICK, A. Neglected Tropical Diseases of the Middle East and North Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Opportunities for Control. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.

GLOBOCAN. 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Acesso em: 12 jan. 2014.

IARC. 2010. Disponível em: <http://www.iarc.fr/>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

IRANSHAHI, M. *et al.* Sesquiterpenecoumarins from *Ferula szowitsiana* and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. **Phytochemistry**, v. 68, p.554–561, 2007.

JACQUES, A.M. **Caracterização fotofísica de derivados de cumarinas**. 2001. 143f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, UFU, Uberlândia, 2001.

JENSEN, E. V.; JORDAN, V. C. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 1980-1989, 2003.

JI, H.F.; LI, X.J.; ZHANG, H.Y. Natural products and drug discovery. **European Molecular Biology Organization**, v. 10, n. 3, p. 194-200, 2009.

KADNIKOV, D. V.; LAROCK, R. C. Synthesis of Coumarins via Palladium-Catalyzed Carbonylative Annulation of Internal Alkynes by o-Iodophenols. **Organic Letters**, v. 2, p. 3643, 2000.

KAMAL, G.S. *et al.* Effects of genotype, explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot in vitro organogenesis. **Africa Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 861–867, 2007.

KAPPAGODA, S.; SINGH, U.; BLACKBURN, B. G. Antiparasitic Therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 6, p. 561-583, 2011.

KARIMI, G. *et al.* Screening of Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Terpenoid and Coumarin Derivatives from the Genus *Ferula*. **Pharmacology online**, v. 1, p. 566-574, 2010.

KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. **Experimental Cell Research**, n. 256, p. 42-49, 2000.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KIM, K-M.; PARK, I. H. A Convenient Halogenation of α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds with OXONE[®] and Hydrohalic Acid (HBr, HCl). **Synthesis**, v.16, p. 2641-2644, 2004.

KLAUNIG, J. E. *et al.* Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. **Toxicol Pathol**, v. 38, n. 1, 2010.

KOSTOVA, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 29-46, 2005.

KOSTOVA, I.; NIKOLOVA, I. Stability of Neodymium(III) Complexes of 4-Hydroxycoumarins with Anticoagulant Activity. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v.1, n.2, p. 30-35, 2006.

KUARM, B. S.; MADHAV, J. V.; RAJITHA, B. Xanthan sulfuric acid: an efficient and recyclable solid acid catalyst for pechmann condensation. **Synthetic Communications**, v. 1, n. 42, p. 1770–1777, 2012.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, Cromonas e Xantonomas. In: SIMÕES, C. O. S. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ Ed. da UFSC, 2003. Bibliografia: p. 537-556.

KVIECINSKI, M. R. Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). 2007. 134f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2007.

LAMBERT, J. D. *et al.* Inhibition of Carcinogenesis by Polyphenols: Evidence From Laboratory Investigations. **American Journal Clinican Nutrition**, v. 81, p. 284-291, 2005.

LAUFER, M. C.; HAUSMANN, H.; HÖLDERICH, W. F. Synthesis of 7-hydroxycoumarins by Pechmann reaction using Nafion resin/silica nanocomposites as catalysts. **Journal of Catalysis**, v. 218, p. 315-320, 2003.

LOPEZ-GONZALEZ, J. S. *et al.* Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. **Lung Cancer**, v. 43, p. 275-283, 2004.

MANIDHAR, M. D. *et al.* Synthesis of New 8-Formyl-4-methyl-7-hydroxy Coumarin Derivatives. **Journal of the Korean Chemical Societ**, v. 56, n. 4, p. 459-463, 2012.

MACIEL-REZENDE, C. M. *et al.* Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonenses* of a series of alkyl-substituted benzophenones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 3114-3119, 2013.

MAO, P. C. *et al.* Chemical Modification of Coumarin Dimer and HIV-1 Integrase Inhibitory Activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 12, p. 1634-1637, 2002.

MILAN, M.*et al.* Synthesis and Molecular Descriptor Characterization of Novel 4-Hydroxy-chromene-2-one Derivatives as Antimicrobial Agents.**Molecules**, v. 14, p.1495-1512,2009.

MISRA, A.; GANESH, S.; SHAHIWALA, A. Drug delivery to the central nervous system: a review.**Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.2, p.252-273, 2003.

MOHAREB, R. M.; EL-ARAB, E. E.; EL-SHARKAWY, K. A. The Reaction of Cyanoacetic Acid Hydrazide with 2-Acetylfuran: Synthesis of Coumarin, Pyridine, Thiophene and Thiazole Derivatives with Potential Antimicrobial Activities, **Scientia Pharmaceutica**, v. 77, p. 355-366, 2009.

MONTANARI, E. *et al.* Evidence of a Long Duration Component in the Prompt Emission of Short Gamma Ray Bursts Detected with BeppoSAX. **The Astrophysical Journal**, v. 625, p. 17-21, 2005.

MURRAY, R. D. H.; MENDEZ, J.; BROWN, S. A. The natural coumarins: Occurance, chemistry and biochemistry, Wiley and Sons, New York. 1982, **Origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. 5. ed. Porto Alegre, p. 291-320, 2003.

MUSA, M. A; COOPERWOOD, J. S.; KHAN, M.O.F. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 2664-2679, 2008.

NAPOLITANO, H. B. *et al.* Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 37, n. 12, p. 1847-1852, 2004.

NDJONKA, D.*et al.*, Natural Products as a Source for Treating Neglected Parasitic Diseases.**International Journal of Molecular Sciences**, v.14,n. 2, p. 3395-3439, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, M. G. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, 2007.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C.L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch.**Revista Virtual Química**, v. 1, n. 3, p. 227-240, 2009.

OJALA, T.; *et al.* Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 299-305, 2000.

OLIVEIRA, M. H. *et al.* Semi-síntese: uma solução para problemas farmacológicos de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 62-88, 2012.

OTTOBELLI, I. *et al.* Estudo químico de duas plantas medicinais da Amazônia: *Philodendron scabrum* k. Krause (araceae) e *Vatairea guianensis* aubl. (fabaceae). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 393-400, 2011.

PAUL, K.; BINDAL, S.; LUXAMI, V. Synthesis of new conjugated coumarin-benzimidazole hybrids and their anticancer activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 3667-3672, 2013.

PECHMANN, H. V. Neue Bildungsweise der Cumarine Synthese des Daphnetins. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 17, p. 929-936, 1884.

PEREIRA, I.O. *et al.* Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, p. 339-345, 2010.

PFEIFER, B. Natural Products and Production Systems: Opening Comments. **Molecular pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 165-166, 2008.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

RAJU, M.S.; RAO, N. V. S. Synthesis of 7,8-furano, pyrono and 3- methyl-4- phenylcoumarins. **Search for physiologically active compounds**. p. 222- 229, 1974.

RANU, B. C.; JANA, R. Ionic Liquid as Catalyst and Reaction Medium – A Simple, Efficient and Green Procedure for Knoevenagel Condensation of Aliphatic and Aromatic Carbonyl Compounds Using a Task-Specific Basic Ionic Liquid. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2006, p. 3767-3770, 2006.

RAVAL, J. P. *et al.* A comparative study of microwave assisted and conventional synthesis of 2,3-dihydro-2-aryl-4-[4-(2-oxo-2H-chromen-3-yl)-1,3-thiazol-2-ylamino]-1,5-benzothiazepines and its antimicrobial activity. **ARKIVOC**, v. 12, p. 233-244, 2008.

RIVLIN, N. *etal.* Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 4, p. 466-474, 2011.

RIZZI, E.; DALLAVALLE, S.; MERLINI, L. Short Synthesis of Cytotoxic 4-Arylcoumarins. **Synthetic Communications**, v. 36, n. 1, p. 1117–1122, 2012.

ROCHA, L. G. *et al.* Review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, p.514-535, 2005.

SADIKOVIC, B. *et al.* Cause and Consequences of Genetic and Epigenetic Alterations in Human Cancer. **Current Genomics**, v. 9, p. 394-408, 2008.

SAKLANI, A.;KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials.**Drug Discov Today**,v. 13, n.11, p. 161-171, 2008.

SAKUNPAK, A, *et al.* Isolation of new monoterpene coumarins from *Micromelum minutum* leaves and their cytotoxic activity against *Leishmania major* and cancer cells. **Food Chemistry**, v. 139 p. 458-463, 2013.

SANCHO, R. *et al.*Imperatorin inhibits HIV-1 replication through an Sp1-dependent pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 36, p. 37349-37359, 2004.

SANDEEP, G.*et al.* Synthesis and Biological Screening of Some Novel Coumarin Derivatives. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 155-160, 2009.

SASHIDHARAA, K. V. *et al.*Discovery of coumarinemonastrol hybrid as potential antibreast tumor-specific agent. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 120-127, 2013.

SCHMIDT, T. J. *et al.* The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2128-2175, 2012.

SCIO, E. Cumarinas encontradas no gênero *Kielmeyera* - Família Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.85, n.1, p.27-31, 2004.

SEIFERT, K. *et al.* *In vitro* interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*.**Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 850-854, 2012.

SETHNA, S. M.; SHAH, N. M. The Chemistry of Coumarins. **Chemical Reviews**, v.36, n.31, p. 1-62, 1945.

SMYTH, T.; RAMACHANDRAN, V. N.; SMYTH, W. F. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.33, p.421-426, 2009.

TADA, Y. *et al.* Coumarins and γ -pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. **Phytochemistry**, v. 59, p. 649-654, 2002.

TIMONEN, M. J. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory effects of a series of novel 7-hydroxycoumarin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 3845-3850, 2011.

TIUMAN, T. S. *et al.* Intramuscular and topical treatment of cutaneous leishmaniasis lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* using coumarin (-) mammea A/BB. **Phytomedicine**, v. 19, n. 13, p. 1196-1199, 2012.

VAN ASSCHE, T. *et al.* Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 309-322, 2012.

VENUGOPALA, K. N. *et al.* Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14, 2013.

VIDOSLAV, D. *et al.* Influence of the aryl substituent identity in 4-arylamino-3-nitrocoumarins on their antimicrobial activity. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 371-375, 2011.

VIEIRA, P. C. *et al.* Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 617-622, 2001.

VOGEL, A. G.. **Annals of Physics**, p. 64-161, 1820. Não encontrei nada diferente disso

WEINMANN, I. History of the development and application of coumarin and coumarin-related compounds. In: O'Kennedy R, Thornes RD, editors. **Coumarins: biology, applications and mode of action**. Chichester, UK: Wiley Press, p. 1-22, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fight against cancer strategies that prevent, cure and care.** 2012. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241595438_eng.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2013.

_____. Technical Report Series. **Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis:** Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77472/1/WHO_TRS_975_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 24 fev. 2014.

WÜNSCH, V. F.; MONCAU, J. E. Mortalidade por Câncer no Brasil 1980-1995: Padrões Regionais e Tendências Temporais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 3, p. 250-257, 2002.

YANG, Z. et al. Design, synthesis, antitumor activity and mode of action of novel oxiranyl and thiiranyl phenol derivatives. *Bull. Korean Chemistry Societat*, v. 30, p. 1463-1469, 2009

YI-MING, L.; ZHUO-LUN, Z.; YONG-FU, H. New phenolic derivatives from Galeolafabri. **Planta Med.** 1993; 59: 363-365.

ZUO, H. *et al.* Microwave-assisted synthesis of fluorinated coumarino sulfonamides, **ARKIVOC**, v. 2, p. 183-189, 2008.