

Erlon Ferreira Martin

SÍNTESE DE 4-ARIL-4H-CROMENOS E ARIL-PIRANO-CUMARINAS E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia, sob orientação do Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo.

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martin, Erlon Ferreira

Síntese de 4-aril-4-H-cromenos e aril-pirano
cumarinas e avaliação da citotoxicidade e atividade
antiprotzoária / Erlon Ferreira Martin ;
orientador, Louis Pergaud Sandjo, coorientadora,
Maíque Weber Biavatti, 2018.
202 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Síntese Orgânica. 3.
Citotoxicidade. 4. Cromenos. 5. Ciclo celular. I.
Sandjo, Louis Pergaud. II. Biavatti, Maíque Weber.
III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

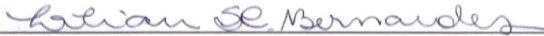
**“SÍNTESE DE 4-ARIL-4H-CROMENOS E ARIL-
PIRANO-CUMARINAS E AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE
ANTIPROTOZOÁRIA”**

POR

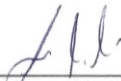
Erlon Ferreira Martin

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



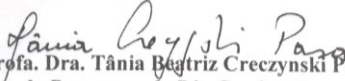
Prof(a). Dr(a). Lilian Sibelle Campos Bernardes (UFSC – Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). Luis Alberto Kanis (UNISUL – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Louis Sandjo Pergaud (UFSC – Orientador(a))



Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 22 de março de 2018.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ivan e Inês, e a todos os amigos e pessoas que me guiaram e auxiliaram até alcançar esta etapa da minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

A elaboração desta dissertação, com certeza foi o maior desafio intelectual até este momento. Sozinho, jamais concluiria todas as etapas para chegar até a conclusão deste projeto. Começo agradecendo ao meu orientador, o Professor Doutor Louis Pergaud Sandjo, pela confiança depositada, e por ter aceitado o desafio de desenvolver o presente trabalho com um orientando até então desconhecido.

À UFSC, ao Programa de Pós-graduação em Farmácia por toda a infraestrutura oferecida e disponibilizada, e todos os professores pelos ensinamentos durante esses dois anos de mestrado. a Professora Doutora Maique Weber Biavatti, por ter me acolhido e por proporcionar a oportunidade de aprender e de me aperfeiçoar, tanto profissionalmente quanto como pessoa.

À CAPES pela bolsa de estudos, o constante apoio a pesquisa e pela colaboração financeira que possibilitou a realização deste estudo.

Um agradecimento especial aos amigos pessoais, em especial à Edna e o Murilo, por estarem presentes, pelo carinho, amizade, e por sempre me apoiar e escutar. E aos amigos de laboratório, alguns se tornaram grandes amigos pessoais, Layzon, Rafaela, Ana Claudia, Larissa F., Luiz, Larissa G., Narjara, Vanessa, Amanda, Daniela, Gabriele, Maria Gabriela, Satomy, Tauana, Cíntia, Maria Izabel, Carolina, Vinicius, Fernanda, Lara, entre outros colegas dos laboratórios vizinhos e parceiros. À técnica do laboratório de Farmacognosia Claudia Barcelos Terrazas, e ao Professor Doutor Flávio Reginatto por toda a ajuda, educação e amizade que sempre demonstraram.

Aos parceiros Amelle Mbaveng e Victor Kuete da Johannes Gutenberg University e University of Dschang de onde é também Thomas Efferth, que colaboraram gentilmente para a realização dos testes de citotoxicidade e se mostraram tão dispostos e interessados em contribuir com este estudo. Bem como o professor Dr. Mário Steindel e a Milene Moraes, do laboratório de protozoologia da UFSC, pela atenção e realização dos ensaios parasitológicos.

Aos meus pais, Ivan e Inês, que jamais deixaram de me apoiar e me dar suporte para fazer o que eu sempre quis. Aos familiares que de alguma forma estiveram ou estão presentes contribuindo para meu crescimento e estão sempre torcendo por mim.

A todas as pessoas citadas, e as não citadas, mas que fizeram parte desses anos, só tenho a dizer: -Desculpem-me pelos meus erros! Muito obrigado, e eu amo muito todos vocês.

RESUMO

Os compostos 4-aril-4*H*-cromenos foram descritos previamente como compostos que apresentaram atividade anticancer. O presente trabalho foi delineado para preparar dezoito derivados cromenos através de estratégias de reação de multicomponentes em um único passo, utilizando como solventes metanol e água. Entre os compostos preparados, sete contém um centro cromeno e onze deles possuem um esqueleto piranocumarínico. Todos estes compostos foram caracterizados através de técnicas espectrométricas de Ressonância Magnética Nuclear e Esctrometria de Massa de Alta Resolução e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os derivados foram avaliados quanto à sua toxicidade em linhagem de células leucêmicas sensíveis e resistentes e avaliado *in vitro* às atividades leishmanicida, frente a *Leishmania amazonensis*, e tripanocida frente a *Trypanossoma cruzi*, ambos na forma amastigota. Dois produtos sintetizados apresentaram citotoxicidade promissora com valores de IC₅₀ menores que 1 µM. Explorando mais os resultados obtidos, ambos derivados apresentaram alterações no ciclo celular de células da leucemia sensíveis. Dez destes produtos mostraram ter atividade tripanocida, enquanto apenas dois deles apresentaram atividade moderada frente a *L. amazonensis*. No entanto, todos os derivados que apresentaram atividade antiparasitária, mostraram também uma seletividade baixa às células THP-1 utilizadas como hospedeiros.

Palavras-chave: Cromenos, piranocumerinas, atividade antiparasitária, citotoxicidade, ciclo celular.

ABSTRACT

Synthesis of 4-Aryl-4H-chromene and aryl-pyrano-coumarin and evaluation of the cytotoxicity and antiprotozoal activity.

Inspired by the compounds previously described as anticancer compounds, the 4-aryl-4H-chromenes. This present work was designed to prepare eighteen pyran derivatives obtained mainly from multiple reagents one pot reaction. Among the prepared compounds, eleven contained a pyranocoumarin skeleton and seven a chromene core. These compounds were characterized by techniques of spectrometry mass high resolution, resonance magnetic nuclear and high performance liquid chromatography. The products were evaluated against two parasites namely *T. cruzi* and *L. amazonensis* amastigote and their cytotoxicity on sensitive and resistant leukemia cancer cells lines. Trypanocidal activity was obtained with ten of the synthetic products while only two of them were moderately active on *L. amazonensis*. Nevertheless, all the antiparasitic compounds showed their potency with a very low selectivity towards TPH-1 cells. used as host. Promising cytotoxicity was obtained with two of the derivatives with IC₅₀ values less than 1 μ M. In addition, both also showed alterations on the cell cycle of the sensitive leukemia cell lines.

Keywords: Chromenes, pyranocoumarins, antiparasitic activity, cytotoxicity, cells cycle.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação do: a) anel benzêno, b) anel pirano, c) *2H*-cromeno, d) *4H*-cromeno, e) núcleo cumarínico. 37
- Figura 2** – Representação da configuração do anel cumarínico, carbonos numerados. 38
- Figura 3** – Substâncias com esqueleto cromeno e cumarínicos com atividades biológicas publicadas em manuscritos. 41
- Figura 4** – Molécula do composto 5,7-dihidroxi-4-metilcumarina (**3**). 55
- Figura 5** – Molécula do derivado 8-amino-10-(4-clorofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (**4**). 55
- Figura 6** – Molécula do derivado 8-amino-10-(4-bromofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (**5**). 56
- Figura 7** – Molécula do derivado 8-amino-5-hidroxi-4-metil-10-(4-nitrofenil)-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (**6**). 56
- Figura 8** – Molécula do derivado 8-amino-10-(3,4-dimetoxifenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (**7**). 57
- Figura 9** – Molécula do derivado 8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carbonitrila (**8**). 58
- Figura 10** – Molécula do derivado (E)-8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-estiril-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carbonitrila (**9**). 58
- Figura 11** – Molécula do derivado metil 8-amino-10-(4-clorofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano [2,3-f]cromeno-9-carboxilato (**10**). 59
- Figura 12** – Molécula do derivado metil 8-amino-10-(4-bromofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carboxilato (**11**). 59
- Figura 13** – Molécula do derivado metil 8-amino-10-(4-nitrofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carboxilato, derivado (**12**). 60
- Figura 14** – Molécula do derivado metil 8-amino-10-(3,4-dimetoxifenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carboxilato (**13**). 61

- Figura 15** – Molécula do derivado 8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carbonitrila (14). 61
- Figura 16** – Molécula do derivado metil 2-amino-4-(4-clorofenil)-5,7-dihidroxi-4*H*-cromene-3-carboxilato (16). 62
- Figura 17** – Molécula do derivado metil 2-amino-4-(4-bromofenil)-5,7-dihidroxi-4*H*-cromene-3-carboxilato (17). 62
- Figura 18** – Molécula do derivado metil 2-amino-4-(4-nitrofenil)-5,7-dihidroxi-4*H*-cromene-3-carboxilato (18). 63
- Figura 19** – Molécula do derivado metil 2-amino-4-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dihidroxi-4*H*-chromene-3-carboxilato (19). 64
- Figura 20** – Molécula do derivado 8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carbonitrila (20). 64
- Figura 21** – Molécula do derivado metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-4*H*-cromeno-3-carboxilato (21). 65
- Figura 22** – Molécula do derivado metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4*H*-cromeno-3-carboxilato (22). 65
- Figura 23** – Molécula do derivado (2*E*,4*E*)-metil 2-ciano-5-fenilpenta-2,4-dienoate (15). 66
- Figura 24** – Esquema de síntese da cumarina através da condensação de Pechmann. 72
- Figura 25** – Mecanismo de reação do derivado 5,7-dihidroxi-4-metilcumarina, através da reação de Von Pechmann. 73
- Figura 26** – Cromatograma do derivado **3** por CLUE-PDA. 74
- Figura 27** – Espectro de RMN ¹H (300Hz, TMS) para o composto **3**. 75
- Figura 28** – Espectro de RMN ¹H RMN (300Hz, TMS, CD₃COCD₃) para o esqueleto da cumarina, o derivado **3**, ampliado entre 5.7ppm - 6.4ppm. 76
- Figura 29** – Espectro de RMN ¹H (75Hz, TMS, CD₃COCD₃) para o esqueleto da cumarina, o derivado **3**, ampliado entre 2.8ppm - 5.6ppm. 76
- Figura 30** – Espectro de ¹³C RMN (75Hz, TMS, CD₃COCD₃) do derivado **3**. 77
- Figura 31** – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ¹H e 75 MHz ¹³C, TMS, acetona-d₆) para o composto **3**. 78

- Figura 32** – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, CD_3COCD_3) para o composto **3**. 78
- Figura 33** – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, CD_3COCD_3) do composto **3**, ampliado na região 3.4.0-6.6ppm para ^1H e 85-125ppm para ^{13}C . 78
- Figura 34** – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o composto **3**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z). 80
- Figura 35** – Esquema de reação dos derivados com esqueleto cumarínico e função amino na posição 9. 81
- Figura 36** – Esquema de reação dos derivados com esqueleto cumarínico e função éster na posição 9. 81
- Figura 37** – Proposta de mecanismo de formação para a obtenção dos derivados de piranocumarinas. 82
- Figura 38** – Cromatograma da derivado **4** por CLUE-PDA. 84
- Figura 39** – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **4**. 85
- Figura 40** – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d_6) o derivado **4**. 85
- Figura 41** – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **4**, ampliado entre 7.5 ppm - 6.0 ppm. 86
- Figura 42** – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO-d_6) para o derivado **4**. 86
- Figura 43** – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO-d_6) para o derivado **4**. 87
- Figura 44** – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **4**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z). 91
- Figura 45** – Cromatograma do derivado **5** por CLUE-PDA. 92
- Figura 46** – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **5**. 93
- Figura 47** – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **5**, ampliado entre 7.6-6.0ppm. 94
- Figura 48** – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d_6) o derivado **5**. 95

Figura 49 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, TMS, DMSO-d ₆) para o derivado 5 .	96
Figura 50 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ¹ H e 75 MHz ¹³ C, TMS, DMSO-d ₆) para o derivado 5 , ampliado na região de 8.1-3.5ppm para ¹ H RMN.	96
Figura 51 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o composto 5 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (<i>m/z</i>).	98
Figura 52 – Cromatograma da derivado 6 por CLUE-PDA.	99
Figura 53 – Espectro de ¹ H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d ₆) para o derivado 6 .	100
Figura 54 – Espectro de ¹³ C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d ₆) o derivado 6 .	100
Figura 55 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 6 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (<i>m/z</i>).	102
Figura 56 – Cromatograma da derivado 7 por CLUE-PDA.	103
Figura 57 – Espectro de ¹ H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d ₆) para o derivado 7 .	104
Figura 58 – Espectro de ¹ H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d ₆) para o derivado 7 ampliado na área entre 7,00-6,45ppm.	104
Figura 59 – Espectro de ¹³ C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d ₆) para o derivado 7 .	105
Figura 60 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 7 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (<i>m/z</i>).	107
Figura 61 – Cromatograma da derivado 8 por CLUE-PDA.	108
Figura 62 – Espectro de ¹ H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d ₆) para o derivado 8 .	109
Figura 63 – Espectro de ¹³ C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d ₆) para o derivado 8 .	109
Figura 64 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 8 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (<i>m/z</i>).	111
Figura 65 – Cromatograma da derivado 9 por CLUE-PDA.	112

Figura 66 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 9 .	113
Figura 67 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 9 , ampliado na região entre 6,50 - 4,00 ppm.	113
Figura 68 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 9 , ampliado na região entre 7,50 - 7,08 ppm.	114
Figura 69 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado 9 .	114
Figura 70 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado 9 .	115
Figura 71 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 9 .	116
Figura 72 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 9 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).	118
Figura 73 – Cromatograma da derivado 10 por CLUE-PDA.	119
Figura 74 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 10 .	120
Figura 75 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) o derivado 10 .	120
Figura 76 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado 10 .	121
Figura 77 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado 10 .	122
Figura 78 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 10 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).	124
Figura 79 – Cromatograma da derivado 11 por CLUE-PDA.	125
Figura 80 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 11 .	126
Figura 81 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) o derivado 11 .	126
Figura 82 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 11 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).	129
Figura 83 – Cromatograma da derivado 12 por CLUE-PDA.	130

Figura 84 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 12 .	131
Figura 85 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) o derivado 12 .	131
Figura 86 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 12 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).	133
Figura 87 – Cromatograma da derivado 13 por CLUE-PDA.	134
Figura 88 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 13 .	135
Figura 89 – Espectro de ^{13}C RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 13 .	135
Figura 90 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 13 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).	137
Figura 91 – Cromatograma da derivado 14 por CLUE-PDA.	138
Figura 92 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 14 .	139
Figura 93 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 14 .	139
Figura 94 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 14 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).	141
Figura 95 – Esquema de reação dos derivados 4-aril-4 <i>H</i> -cromenos.	142
Figura 96 – Proposta de mecanismo de formação para obtenção dos derivados 4-aril-4 <i>H</i> -cromenos.	143
Figura 97 – Cromatograma da derivado 16 por CLUE-PDA.	144
Figura 98 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 16 .	145
Figura 99 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 16 .	145
Figura 100 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado 16 .	146
Figura 101 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado 16 .	147

- Figura 102** – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) de para o derivado **16**, ampliado nas áreas ^1H 8,00 - 4,50 ppm e de ^{13}C 120 - 180 ppm. 148
- Figura 103** – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado **16**, ampliado nas áreas ^1H 7,50 - 3,00 ppm e de ^{13}C 25 - 115 ppm. 148
- Figura 104** – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **16**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z). 150
- Figura 105** – Cromatograma da derivado **17** por CLUE-PDA. 151
- Figura 106** – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado **17**. 152
- Figura 107** – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **17**. 152
- Figura 108** – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **17**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z). 154
- Figura 109** – Cromatograma da derivado **18** por CLUE-PDA. 155
- Figura 110** – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **18**. 156
- Figura 111** – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **18**, ampliado entre 8,20 - 5,90 ppm. 157
- Figura 112** – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **18**. 157
- Figura 113** – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **18**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z). 159
- Figura 114** – Cromatograma da derivado **19** por CLUE-PDA. 160
- Figura 115** – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **19**. 161
- Figura 116** – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **19**, ampliado na região entre δ 7,05 - 6,48 ppm. 161
- Figura 117** – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **19**. 162
- Figura 118** – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **19**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z). 164

Figura 119 – Cromatograma da derivado 20 por CLUE-PDA.	165
Figura 120 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 20 .	166
Figura 121 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado 20 .	166
Figura 122 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) de para o derivado 20 .	167
Figura 123 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 20 .	168
Figura 124 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 20 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).	170
Figura 125 – Cromatograma da derivado 21 por CLUE-PDA.	171
Figura 126 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 21 .	172
Figura 127 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 21 .	172
Figura 128 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 21 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).	174
Figura 129 – Cromatograma da derivado 22 por CLUE-PDA.	175
Figura 130 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 22 .	176
Figura 131 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 22 , ampliado na região entre 8,00 - 5,90 ppm.	176
Figura 132 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 22 .	177
Figura 133 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 22 . Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).	179
Figura 134 – Cromatograma do derivado 15 por CLUE-PDA.	180
Figura 135 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado (2E,4E)-metil 2-ciano-5-fenilpenta-2,4-dienoate, derivado (15).	181

Figura 136 – Espectro de ^{13}C RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado (2E,4E)-metil 2-ciano-5-fenilpenta-2,4-dienoate, derivado (15).

181

Figura 137 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado (2E,4E)-metil 2-ciano-5-fenilpenta-2,4-dienoate, derivado 15. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).

183

Figura 138 – Distribuição do ciclo celular de células leucêmicas CCRF-CEM tratadas com os derivados **12**, **15** e doxorrubicina por 24h.

188

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Doenças tropicais negligenciadas.	41
Quadro 2 – Quadro comparativo dos casos de leishmaniose reportados no ano de 2014 frente aos valores médios da doença na década 00-09.	45
Quadro 3 – Estrutura dos derivados Aril-Cromenos sintetizados.	184

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, CD_3COCD_3) para o composto 3 , e dados comparativos da literatura.	79
Tabela 2 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o o derivado 4 e comparação com literatura.	89
Tabela 3 – Dados de ^1H RMN e (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o o derivado 5 .	94
Tabela 4 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o 5 e comparação com derivado 4 .	97
Tabela 5 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o 6 e comparação com derivado 4 e literatura.	101
Tabela 6 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 7 e comparação com derivado 4 .	105
Tabela 7 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 8 e comparação com derivado 4 .	110
Tabela 8 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 9 , e comparação com derivado 4 .	116
Tabela 9 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 10 e comparação com derivado 4 .	122
Tabela 10 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 11 e comparação com derivado 10 .	127
Tabela 11 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 12 e comparação com derivado 10 .	132
Tabela 12 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 13 e comparação com derivado 10 .	136
Tabela 13 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 14 e comparação com derivado 10 .	140
Tabela 14 – Dados compilados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 16 .	149
Tabela 15 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 17 comparados aos dados do derivado 16 .	153
Tabela 16 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 18 , comparados aos dados do derivado 16 .	157
Tabela 17 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 19 , comparados aos dados do derivado 16 .	162

Tabela 18 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 20 , comparados aos dados do derivado 19 .	169
Tabela 19 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 21 , comparados aos dados do derivado 19 .	173
Tabela 20 – ados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 22 , comparados aos dados do derivado 19 .	177
Tabela 21 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 15 , comparados aos dados da literatura.	182
Tabela 22 – Citotoxicidade das piranocumarinas e da doxorubicina frente a células leucêmicas, determinada pelo ensaio de resazurina.	185
Tabela 23 – Efeito de inibição dos derivados 3-22 contra amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> e <i>L. amazonensis</i> e seus índices de seletividade (SI) em células THP-1.	189

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, FÓRMULAS E UNIDADES

AcOEt	<i>Acetato de etila</i>
C	<i>Carbono</i>
CD ₃ COCD ₃	<i>Acetona deuterada</i>
CCD	<i>Cromatografia em camada delgada</i>
CLUE	<i>Cromatografia líquida de ultra eficiência</i>
CN	<i>Ciano</i>
COOR	<i>Éster</i>
<i>d</i>	<i>Dupleto</i>
<i>dd</i>	<i>Dupleto de dupleto</i>
<i>ddd</i>	<i>Duplo-dupleto de dupleto</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DMSO-d ₆	<i>Dimetilsulfóxido deuterado</i>
EM	<i>Espectrometria de massas</i>
ESI-Q-TOF	<i>Ionização por eletronebulização com analisadores do tipo quadrupolo acoplado a tempo de voo (do inglês, Electrospray ionization-quadrupole-time of flight)</i>
FID	<i>Decaimento de indução livre (do inglês, Free induction decay)</i>
FM	<i>Fase móvel</i>
g	<i>Gramas</i>
H	<i>Hidrogênio</i>
HMBC	<i>Correlação heteronuclear de ligações múltiplas (do inglês, Heteronuclear multiple bond correlation)</i>
HSQC	<i>Correlação heteronuclear de quantum simples (do inglês, Heteronuclear single quantum correlation)</i>
IC ₅₀	<i>Concentração que inibe 50% dos parasitos ou 50% das células</i>
INCA	<i>Instituto Nacional de Câncer</i>
<i>J</i>	<i>Constante de acoplamento (expresso em Hertz, Hz)</i>
¹ <i>J</i>	<i>Constante de acoplamento J um</i>
² <i>J</i>	<i>Constante de acoplamento J dois</i>
³ <i>J</i>	<i>Constante de acoplamento J três</i>
kg	<i>Quilograma</i>
K ₂ CO ₃	<i>Carbonato de potássio</i>
L	<i>Litro</i>
<i>m</i>	<i>Multiplete</i>
MeOH	<i>Metanol</i>

mg	<i>Miligrama</i>
min	<i>Minuto</i>
mL	<i>Mililitro</i>
mm	<i>Milímetro</i>
O	<i>Oxigênio</i>
ppm	<i>Parte por milhão</i>
<i>q</i>	<i>Quadrupletto</i>
<i>quint</i>	<i>Quintupletto</i>
Rf	<i>Fator de retenção (do inglês, Retention factor)</i>
RMN	<i>Ressonância magnética nuclear</i>
RMN ¹ H	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio</i>
RMN ¹³ C	<i>Ressonância magnética nuclear de carbono</i>
<i>s</i>	<i>Simpleto</i>
<i>sl</i>	<i>Simpleto largo</i>
SBF	<i>Soro bovino fetal</i>
<i>t</i>	<i>Tripletto</i>
TMS	<i>Tetrametilsilano</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>
<i>v</i>	<i>Volume</i>
δ (delta)	<i>Deslocamento químico (expresso em partes por milhão – ppm, em relação ao padrão interno - TMS)</i>
°C	<i>Grau Celsius</i>
μg	<i>Micrograma</i>
μL	<i>Microlitro</i>
μM	<i>Micromolar</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	33
2 REVISÃO DA LITERATURA	36
2.1 BENZOPIRANOS	36
2.1.1 Atividades Biológicas	38
2.2 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	41
2.2.1 Leishmanioses	42
2.2.2 Tripanossomíases	46
2.2.2.1 Doença de Chagas	46
2.3 CÂNCER	49
3 OBJETIVOS	52
3.1 OBJETIVO GERAL	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES	53
4.2 METODOLOGIA	53
4.2.1 Procedimento Geral para a Síntese de derivados pirano[2,3-<i>H</i>]cumarinas	53
4.2.1.1 Procedimento Geral para a Síntese da 5,7-dihidroxi-4-metil-2 <i>H</i> -cromen-2-ona	53
4.2.1.2 Procedimento Geral Para a Síntese dos Derivados Piranocumarínicos (4-14)	54
4.2.2 Procedimento Geral para a Síntese de derivados 2-amino-4<i>H</i>-cromenos	54
4.2.3 Caracterização, Rendimentos e Atribuições de RMN ¹H, ¹³C	54
4.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	67
4.3.1 Monitoramento Cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	67
4.3.2 Análise de pureza por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)	67
4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR ESTRUTURAL	68
4.4.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)	68
4.4.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EM)	69
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>in vitro</i>	69
4.5.1 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida	69
4.5.2 Avaliação da atividade citotóxica	71
4.5.2.1 Cultura de Células	71
4.5.2.2 Metodologia	71

4.5.2.3. Análise do ciclo celular e detecção de células apoptóticas por citometria de fluxo	71
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS DA [2,3- <i>H</i>]-CUMARINA, GRAU DE PUREZA E CARACTERIZAÇÃO	72
5.1.1 Síntese da 5,7-dihidroxi-4-metilcumarina (3)	72
5.1.1.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	74
5.1.1.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	79
5.1.2 Síntese da 8-amino-10-(4-clorofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-<i>f</i>]cromeno-9-carbonitrila (4)	81
5.1.2.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	84
5.1.2.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	89
5.1.3 Síntese da 8-amino-10-(4-bromofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-<i>f</i>]cromeno-9-carbonitrila (5)	92
5.1.3.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	92
5.1.3.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	97
5.1.4 Síntese da 8-amino-5-hidroxi-4-metil-10-(4-nitrofenil)-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-<i>f</i>]cromeno-9-carbonitrila (6)	99
5.1.4.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	99
5.1.4.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	101
5.1.5 Síntese da 8-amino-10-(3,4-dimetoxifenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-<i>f</i>]cromeno-9-carbonitrila (7)	103
5.1.5.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	103
5.1.5.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	106
5.1.6 Síntese da 8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,10-dihidropirano[2,3-<i>f</i>]cromeno-9-carbonitrila (8)	108
5.1.6.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	108
5.1.6.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	110
5.1.7 Síntese da (E)-8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-styryl-2,10-dihidropirano[2,3-<i>f</i>]cromeno-9-carbonitrila (9)	112
5.1.7.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	112
5.1.7.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	117
5.1.8 Síntese do metil 8-amino-10-(4-clorofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-<i>f</i>]cromeno-9-carboxilato (10)	119
5.1.8.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	119
5.1.8.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	123
5.1.9 Síntese do metil 8-amino-10-(4-bromofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-<i>f</i>]cromeno-9-carboxilato (11)	125
5.1.9.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	125
5.1.9.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	127

5.1.10 Síntese do metil 8-amino-10-(4-nitrofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carboxilato (12)	130
5.1.10.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	130
5.1.10.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	132
5.1.11 Síntese do metil 8-amino-10-(3,4-dimetoxifenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carboxilato (13)	134
5.1.11.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	134
5.1.11.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	136
5.1.12 Síntese do metil 8-amino-10-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carboxilato (14)	138
5.1.12.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	138
5.1.12.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	140
5.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS BENZOPIRANOS, GRAU DE PUREZA E CARACTERIZAÇÃO	142
5.2.1 Síntese do metil 2-amino-4-(4-clorofenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (16)	143
5.2.1.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	144
5.2.1.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	149
5.2.2 Síntese do metil 2-amino-4-(4-bromofenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (17)	151
5.2.2.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	151
5.2.2.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	153
5.2.3 Síntese do metil 2-amino-4-(4-nitrofenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (18)	155
5.2.3.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	155
5.2.3.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	158
5.2.4 Síntese do metil 2-amino-4-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (19)	160
5.2.4.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	160
5.2.4.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	163
5.2.5 Síntese do metil 2-amino-4-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (20)	165
5.2.5.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	165
5.2.5.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	169
5.2.6 Síntese do metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-metóxifenil)-4H-cromeno-3-carboxilato (21)	171
5.2.6.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	171
5.2.6.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	173

5.2.7 Síntese do metil 2-amino-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (22)	175
5.2.7.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	175
5.2.7.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	178
5.2.8 Síntese do (2E,4E)-metil 2-ciano-5-fenilpenta-2,4-dienoate (15)	180
5.2.8.1 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	180
5.2.8.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	182
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>in vitro</i>	185
5.3.1 Citotoxicidade	185
5.3.2 Atividade Antiparasitária	189
6 CONCLUSÃO	191
7 REFERÊNCIAS	193

1 INTRODUÇÃO

Os derivados 4-*aril-4H*-cromenos têm despertado grande interesse no tratamento quimioterápico. Este interesse se dá devido a habilidade destes derivados em induzirem a apoptose celular. O derivado MX-58151, um derivado aril-cromeno sintetizado que possui bromo e hidroxilas como substituintes no grupo aril, demonstrou esta habilidade em células promiélócitas de leucemia (HL-60). O efeito de inibição observado ocorreu quando estas pequenas moléculas agiram no ciclo celular bloqueando as células na fase G2-M (CAI; DREWE; KEMNITZER, 2009) (GOURDEAU et al., 2004) (KASIBHATLA et al., 2004).

Indicadores da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontaram o câncer como a segunda maior causa de morte no mundo. São 8.8 milhões de óbitos, registrados ao redor do mundo, devidos a algum tipo de neoplasia no ano de 2015. Para entender o impacto deste número, significa que, considerando os números de mortes do mundo todo em 2015, a cada 6 mortes uma é causada pela doença. Estes valores são refletidos na realidade brasileira. Em território nacional, no ano de 2014, o número de mortes relacionadas ao câncer foram de 223.000 óbitos, número corresponde a aproximadamente 17% do total de óbitos (WHO, 2017).

As principais estratégias para superar a doença são baseadas em prevenção e diagnóstico precoce. Quanto ao tratamento, a quimioterapia é uma das opções amplamente utilizada, no entanto, a adesão ao tratamento é problemática devido ao aumento da resistência do medicamento inicialmente utilizado e aos efeitos colaterais destes medicamentos. Por meio das informações apresentadas, a busca de novas moléculas permanece muito necessária (WHO, 2007).

Entre as várias estratégias sintéticas para a obtenção dos cromenos, a utilização da estrutura das cumarinas como esqueletos para a formação dos 4-*aril-4H*-cromenos é uma estratégia aplicada em estudos anteriores com sucesso e reportada em literatura. Ambas as rotas de síntese para a obtenção dos arilcromenos, bem como os seus derivados, utilizadas no presente estudo seguiram vias sintéticas similares a esta (KARAMI; KHODABAKHSHI; ESKANDARI, 2012; MASESANE; MIHIGO, 2015).

Apesar do fácil acesso a síntese desses 4-*aril-4H*-cromenos, faltam informações de suas atividades biológicas. Contudo, as piranocumarinas naturais como a aloxantoxiletina, seselina e seus

análogos sintéticos foram descritos como agentes antitumorais. Expandindo a leitura das atividades de piranocumarinas e cromenos, estudos reportaram uma atividade antiprotozoária interessante frente ao *P. falciparum*, *T. brucei rhodesiense*, *T. cruzi*, *L. donovani*, e *L. tarentolae* (OSTROWSKA et al., 2017) (HAREL et al., 2013).

As doenças parasitárias estão espalhadas ao redor do mundo, presentes em 149 países tropicais e subtropicais, e infectam mais de um bilhão de pessoas todo ano. Dentro deste contexto, a maioria dos países em desenvolvimento apresentam um grave problema de saúde pública em comum, as doenças negligenciadas tropicais. Um total de dezessete doenças crônicas causadas por infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias integram o grupo de doenças citada acima (HOTEZ et al., 2007) (HOTEZ et al., 2008) (FEASEY et al., 2009) (GYAPONG et al., 2010) (WHO, 2016).

Destas dezessete, as leishmanioses e as tripanossomíases demandam uma atenção especial principalmente por sua distribuição e evolução da doença na população acometida. Ambas causadas por protozoários, as leishmanioses são um complexo de doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania*. Já as tripanossomíases são ocasionadas pela infecção de várias espécies do gênero *Trypanosoma* sp. As duas espécies mais conhecidas são as *T. cruzi*, responsável pela causa da tripanossomíase americana ou doença de Chagas nas Américas, e a *T. brucei* que causa a doença do sono na África (HOTEZ et al., 2007) (BARRETT et al., 2003) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005).

Traduzindo estas informações em números, a OMS estima que existam entre seis e sete milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi* ao redor do mundo, onde a grande maioria delas está presente na América Latina. De acordo com o terceiro relatório da OMS sobre doenças negligenciadas tropicais, a leishmaniose está presente em noventa e oito países em cinco dos seis continentes do mundo. O relatório ainda aponta que aproximadamente 1,3 milhões de novos casos ocorrem anualmente, onde 1 milhão dos casos são de leishmaniose cutânea, e 300 mil são do tipo visceral (DIAS et al., 2016; WHO, 2016).

Só o Brasil registrou 19395 casos de leishmaniose cutânea, ocupando o 3º lugar entre os três países com o maior número de casos. O país está ainda entre os sete países que concentram 90% dos casos de leishmaniose visceral no mundo todo, foram três mil duzentos e oitenta e nove casos reportados à OMS. Os dados são da OMS e referentes ao ano de 2015, e eles confirmam o quão presente estão estas doenças na realidade brasileira. (WHO, 2016) (WHO, 2017).

Um outro ponto envolvido nos processos de síntese orgânica, é o meio ambiente. Tanto no ambiente acadêmico, quanto no industrial, um grande gargalo da utilização de solventes orgânicos e reagentes tóxicos é a geração de resíduos tóxicos. Para tal, a delimitação deste estudo também preocupou-se com o desenvolvimento autossustentável, procurando sempre minimizar os impactos ao meio ambiente, portanto a reação em um passo e utilizando a estratégia da mistura de multicomponentes já se encaixam dentre alguns dos 12 princípios da química verde, assim como a utilização de água e etanol como solventes para reação e para o processo final de obtenção dos derivados (LENARDÃO et al., 2003)

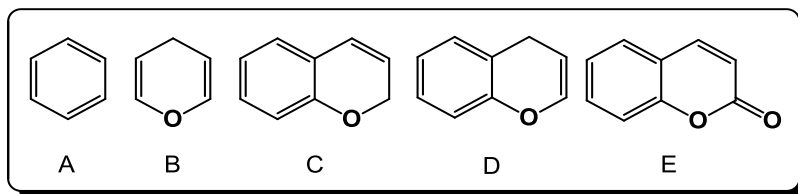
Portanto a demanda de novas terapias para estas doenças parasitárias permanece alta, devido a alta toxicidade, a baixa eficiência e o alto custo dos medicamentos existentes. É visível a quem lê sobre estas doenças que o investimento em pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos para estas enfermidades tornou-se necessário. Nesta linha, dezoito derivados piranos foram sintetizados entre eles sete novos 4-aril-4H-cromenos e onze (dois conhecidos e nove novos) 4-aril-4H-piranocumarinas, procurando sempre reduzir o número de resíduos gerados. O precursor cumarínico e os outros compostos foram avaliados quanto ao seu efeito de inibição de crescimento de células tumorais e na atividade biológica intracelular frente à forma amastigota de *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi* (MRAZEK; MOSSIALOS, 2003; BUCKNER; WATERS; AVERY, 2012).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BENZOPIRANOS

O anel pirano é um anel heterocíclico de seis membros que possui duas duplas ligações, com 5 átomos de carbono (C) e 1 átomo de oxigênio (O). Muitos derivados contendo o anel pirano possuem grande importância devido, principalmente, as suas atividades biológicas. Um grande número de patentes já foram concedidas para agentes farmacêuticos que possuem esta unidade em sua estrutura (ELLIS, 1977; GEEN; EVANS; VONG, 1996; FRAVEL, 2008).

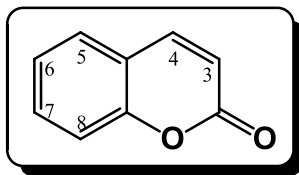
Figura 1 – Representação do: a) anel benzênio, b) anel pirano, c) 2*H*-cromeno, d) 4*H*-cromeno, e) núcleo cumarínico.



Quando há a fusão de um anel benzênico ao anel pirano, dá-se a nomenclatura de benzopiranos ou cromanos. Sendo assim, o que caracteriza estes compostos é a fusão dos dois anéis de seis membros. Contudo esta nomenclatura mudou diversas vezes desde o fim do século XIX, quando foram descobertos os primeiros 1-benzopiranos. A nomenclatura de 1-benzopirano ou 2-benzopirano é atribuída a duas variações existentes, o nome se diferencia dependente da posição do heteroátomo no anel pirano (ELLIS, 1977; GREEN et al., 1995).

Uma das primeiras revisões de cromenos é datada de 1917, e descreve sobre a estrutura de cromenos halogenados. Os mesmo autores já haviam reportado a síntese de metil cumarinas em literatura. Após amplos estudos, foram escritas outras revisões, contudo, já em 1917, Simonis descreveu a numeração de configuração do anel de acordo com a Figura 2 (ELLIS, 1977) (SIMONIS; SCHUHMANN, 1917) (WEINMANN, 1997).

Figura 2 – Representação da configuração do anel cumarínico, carbonos numerados.



Fonte: adaptado de Simonis (1917).

Simonis baseou-se na numeração adotada por Vogel, em 1820, quando isolou a α -benzopirona. Este sistema de anéis apresenta uma variedade de derivados, que variam em níveis de oxidação, saturação, fusão com outros anéis. Cada alteração estrutural, logicamente altera o nome do derivado, conseqüentemente quando oxidado este sistema de anéis recebe o sufixo -ona. Por sua vez, a posição da dupla ligação também altera a nomenclatura, por permitir estas duplas ligações apenas em duas posições a nomenclatura aplicada pode ser *2H*-cromeno ou *4H*-cromeno (ELLIS, 1977).

As cromanonas e/ou seu esqueleto, podem ser encontradas na natureza em diversas famílias de plantas. Estes derivados formam uma lista de inúmeros exemplos de metabólitos secundários descritos em literatura, bem como sua respectiva biossíntese. Flavonas, flavanonas, isoflavonas, isoflavanonas, cumarinas, e derivados, são alguns tipos de compostos derivados cromenos mais descritos em literatura. Isto se dá devido aos benzopiranos apresentarem uma variedade de possíveis reações químicas, e terem suas aplicações amplamente estudadas (GREEN et al., 1995; COSTA et al., 2016).

As sínteses para a formação de benzopiranos são amplamente descritas, e uma das primeiras estratégias descritas foi a obtenção de *2H*-1-benzopiranos 2,2-disubstituídos, utilizando reagentes de Grignard em cumarinas, com a presença de solvente, geralmente benzeno ou dietiléter anidro. Utilizando a desidratação nestes benzopiranos sintetizados, é possível ainda obter-se os *2H*-1-benzopiranos. O problema deste método é a formação de subprodutos. A desidratação de cromanoís sob aquecimento é mais uma estratégia para a obtenção de benzopiranos (SIMONIS; SCHUHMANN, 1917; GREEN et al., 1995).

Para obter-se os *4H*-1-benzopiranos uma reação que se aplica neste caso, é a pirrólise de acetil-óxi-cromanos, com tempos de reação baixíssimos. Existem ainda outras reações a partir de cromanos e cromanoís, reações de condensação catalisadas por ácidos, reações

apartir de aldeídos como α,β -insaturados também catalisados com ácidos. Reações utilizando como reagentes isobutilenos ou precursores reagindo com salicialdeído na presença de alumina-sílica ou cloreto de zinco, sob aquecimento, também atingem o objetivo de obtenção de derivados 2*H*-1-benzopiranos. São reportadas ainda estratégias de condensação aldólica e condensação de carbonilas fenólicas atalisadas por ácidos, para obtenção de cromoeno (ELLIS, 1977; GREEN et al., 1995).

Reações com catalisadores básicos também são aplicadas para a obtenção de cromenos. Condensações de Dieckmann, de Perkin e, principalmente, as aldólicas são relatadas como estratégias para a formação de benzopiranos. A condensação do tipo aldólica, seguida de uma adição de Michael, formação de imina e fechamento do anel, foram estratégias utilizadas no presente estudo. Bem como condensação utilizando como reagentes ésteres cianoacetato e acetoacetato em solvente polar, geralmente EtOH, MeOH e água (ELLIS, 1977; GREEN et al., 1995; KURTI; CZAKÓ, 2005).

Ainda são relatados métodos baseados em ciclização de quinonas alil substituídas catalisadas por base, rearranjos por temperatura, reações de ilidas utilizando sais, redução de benzoquinonas mostrando assim a diversidade de rotas sintéticas para obtenção destes derivados. (GREEN et al., 1995).

2.1.1 Atividade biológica

As pesquisas realizadas demonstram que os derivados benzopirânicos sintéticos e orgânicos, incluindo as cumarinas, têm grande potencial para o desenvolvimento de novas substâncias bioativas, como demonstrado na Figura 3, principalmente devido aos seus resultados apresentados em ensaios de citotoxicidade. Seguindo esta linha de pesquisas, Sabry e colaboradores realizaram seus estudos com derivados cumarínicos que apresentaram atividade citotóxica, além de atividade microbiana. Dentre estes derivados, os estudos sobre derivados 4-aril-4*H*-cromenos e sua ação anticancer também vem sendo amplamente estudada (KEMNITZER et al., 2004) (KHEIROLLAHI et al., 2014) (KEMNITZER et al., 2005) (LACY; O'KENNEDY, 2004) (SABRY et al., 2011) (RAFINEJAD et al., 2012) (SHARMA; TIWARI; SUPURAN, 2014).

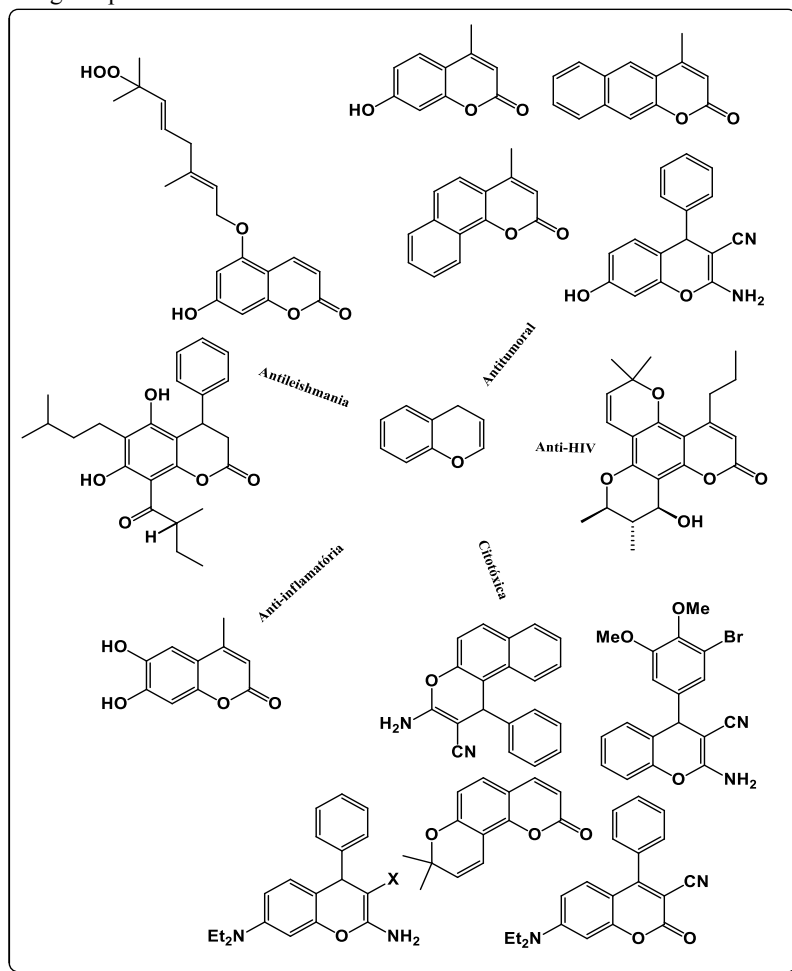
Os estudos de atividade biológica de alfa-cromenos e seus análogos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, incluindo seres humanos, demonstraram várias atividades promissoras, além de anticâncer, como:

ação anti-HIV, antituberculose, antialzheimer, anti-inflamatório, imunossupressora, antifúngica. Dentre as atividades biológicas conhecidas e estudadas, o presente trabalho dá o enfoque nas atividades leishmanicida e antitumoral (BRENZAN et al., 2008) (NEWMAN; CHEN; MADDEN, 1998) (ONG et al., 2011) (PATIL et al., 1993) (SAKUNPAK, 2013) (VEGA et al., 2007; MUSA et al., 2010) (WANG et al., 2009; WITAICENIS; SEITO; DI STASI, 2010).

Egan e colaboradores em sua revisão reportaram que um derivado da cumarina (1,2-benzopirona), apresentou atividade citotóxica e citostática em diferentes linhagens celulares: K562, HL60, EJ (linhagens celulares humanas); e CHOK1 e CHrC5 (linhagens celulares murinas). Em 3 destas linhagens celulares foi observada a ação citotóxica, porém a atividade citostática ocorreu nas 5 linhagens de células testadas. A toxicidade observada foi irreversível, porém a ação citostática foi reversível em uma linhagem de célula das cinco testadas. (EGAN et al., 1997).

Estudos que abordaram a citotoxicidade de aril-4*H*-cromenos incentivaram este projeto, como o de Kemnitzer e colaboradores, onde reportaram a atividade citotóxica de alguns derivados benzopirânicos 2-aril-3-ciano-4*H*-cromenos capazes de induzirem a apoptose em células tumorais. Em 2012 Akbarzadeh e colaboradores sintetizaram derivados benzopirânicos e descreveram sua atividade citotóxica *in vitro*. Já em um estudo de 2016, Fouda descreveu sobre a ação antitumoral de derivados 4*H*-cromenos (AKBARZADEH et al., 2012) (M EL-AGRODY; KHATTAB; M FOU DA, 2014) (FOUDA, 2016) (KEMNITZER et al., 2004) (KEMNITZER et al., 2005) (CAI; DREWE; KEMNITZER, 2009) (KEMNITZER et al., 2007).

Figura 3 - Substâncias com esqueleto cromeno e cumarínicos com atividades biológicas publicadas em manuscritos.



As cumarinas, cromonas, cromenos, demonstram grande potencial de se tornarem importantes modelos bioativos e/ou novos agentes terapêuticos a serem desenvolvidos (Figura 3) como alternativas para o tratamento de patologias com terapias ineficazes ou pouco seguras. Com base nas atividades biológicas, buscou-se neste trabalho sintetizar novos compostos afim de não só, desenvolver novos medicamentos, novas terapias, como também auxiliar antigas e futuras

pesquisas a compreender melhor a ação antileishmania, antitripanossoma e antitumoral de alguns subgrupos de cromenos (FOUDA, 2016).

2.2 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) compreendem as doenças que acometem pessoas principalmente, nas regiões tropicais. Este termo é atualmente aplicado fazendo referência a doenças infecciosas que progridem em condições quentes e úmidas, como malária, esquistossomose, oncocercose, filariose linfática, dengue, tripanosomiasis africana, doença de Chagas e leishmaniose. Este grupo de doenças abrange 17 doenças endêmicas, citadas no quadro 1 em 149 países e o número de pessoas afetadas ultrapassa o 1 bilhão de indivíduos (FEASEY et al., 2009; WHO, 2016).

Quadro 1 – Doenças tropicais negligenciadas.

Grupo do Patógeno	Doenças
Bactérias	Úlcera de Buruli Lepra (Hanseníase) Tracoma (Conjuntivite granulomatosa) Bouba
Helmintos	Cisticercose/Teníase Dracunculíase (doença do “verme-da-guiné”) Equinococose Trematodíases transmitidas por alimentos Filariose linfática (Elefantíase) Oncocercose (“cegueira dos rios”) Esquistossomose Helmintíases transmitidas pelo solo
Protozoários	Doença de Chagas Tripanossomíase Humana Africana (“doença do sono”) Leishmanioses Malária
Vírus	Dengue e Chicungunha Raiva

Fonte: adaptado de WHO (2015).

Impressiona o fato de que as DTNs são doenças que acometem quase que exclusivamente populações de baixa renda ou marginalizadas, muito devido a falta de necessidades básicas. São doenças predominantes geograficamente nos trópicos e representam um grave problema de saúde pública para os países ainda em desenvolvimento. A representatividade não seria tão grande se a pobreza não fosse um fator preponderante para tal, pois a falta de vacinas e tratamentos medicamentosos adequados nesses países elevam as taxas de morbidade e mortalidade (GYAPONG et al., 2010) (MUELLER-LANGER, 2013) (HOTEZ et al., 2008) (WHO, 2007).

Uma classificação para essas doenças é a divisão em quatro menores grupos conforme seus patógenos: protozoários, bactérias, helmintos e vírus. Sendo assim é possível afirmar que este é um grupo diversificado de doenças que promovem infecções virais, fungicas, bacterianas e parasitárias, e tem efeitos debilitante, incapacitante, desfigurante e crônico (GYAPONG et al., 2010) (MUELLER-LANGER, 2013) (HOTEZ et al., 2008) (WHO, 2007).

Dentre as diferentes enfermidades contempladas neste grupo a Doença de Chagas merece destaque por ser uma doença endêmica na América Latina e no Caribe. Foi destacada como mais importante condição parasitária humana no Novo Mundo. No Brasil, além da doença de Chagas, a incidência de casos de leishmanioses também necessita de atenção (FEASEY et al., 2009) (HOTEZ et al., 2007) (WHO, 2016).

Há a necessidade dos países desenvolvidos, ou capazes, de fornecerem medicamentos adequados e vacinas para os países subdesenvolvidos. Assim como também são necessários investimentos na pesquisa e desenvolvimento de terapias mais seguras e eficazes para estas e outras doenças, diminuindo os gastos em saúde pública de países subdesenvolvidos, tornando-se possível auxiliar o desenvolvimento destes (GYAPONG et al., 2010) (MUELLER-LANGER, 2013) (HOTEZ et al., 2008).

2.2.1 Leishmanioses

Dentre as doenças infecciosas incidentes no Brasil encontra-se as leishmanioses, causadas por cerca de vinte espécies de protozoários do gênero *Leishmania* parasitas intracelulares obrigatórios. Este gênero compõem espécies de protozoários unicelulares, digenéticos que se reproduzem por divisão binária simples em ambos os hospedeiros. São encontrados nas formas paramastigota e promastigota, flagelados livres

ou aderidas no trato gastrointestinal de hospedeiros invertebrados, e amastigotas, onde não há flagelo livre e desenvolve-se no meio intracelular do hospedeiro mamífero infectado (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005) (FEASEY et al., 2009) (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002).

O ciclo de vida do protozoário é mantido através da transmissão entre um invertebrado flebotomíneo fêmea e um hospedeiro mamífero. A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre na ingestão das formas amastigotas que acompanham o sangue no momento do repasto sanguíneo, após três a quatro dias de multiplicação celular no intestino do hospedeiro as células amastigotas tornam-se promastigotas. É durante o repasto sanguíneo também que os insetos vetores inoculam formas promastigotas metacíclicas nos hospedeiros mamíferos, e a internalização da *Leishmania* ocorre através da endocitose mediada por receptores na superfície celular de macrófagos. A célula promastigota transforma-se em amastigota iniciando assim o processo de sucessivas multiplicações, onde na ausência de controle parasitário pela célula hospedeira a mesma se rompe liberando no meio extracelular células amastigotas que serão internalizadas por novos macrófagos (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002) (VAN ASSCHE et al., 2011).

A lise celular seguida da liberação de células amastigotas estimula a atração de mais macrófagos, estes se fixam e são infectados. Por consequência, as lesões iniciais são semelhantes independente da espécie do parasito e se manifestam através de um infiltrado inflamatório composto principalmente destes macrófagos infectados e linfócitos na derme. A lesão pode evoluir para um regresso espontâneo, estacionar ou evoluir para um nódulo na derme, na região da picada do vetor, denominado histiocitoma, e a progressão acarreta no desenvolvimento de uma úlcera leishmaniótica característica (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005; BEATTIE; KAYE, 2011).

As leishmanioses são agrupadas em três tipos básicos: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral ou kala-azar (LV), formas clínicas estas que são provocadas por diferentes espécies de *Leishmania* e o grau de acometimento tem associação ao estado imune do hospedeiro. Enquanto a forma mais comum da doença é a cutânea, a mais letal é a visceral. A forma cutânea se apresenta com formações de úlceras únicas ou múltiplas confinadas na derme, com epiderme ulcerada e pode apresentar variações, essas relacionadas a hospedeiros imunossuprimidos. No Brasil, a leishmaniose cutânea pode ser promovida por diferentes espécies: *Leishmania braziliensis*, *L.*

guyanensis, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. amazonensis* (FEASEY et al., 2009) (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002; NEVES; LINARDI; VITOR, 2005).

A mucocutânea tem como característica o desenvolvimento de lesões destrutivas secundárias na região das mucosas e cartilagens, como exemplo áreas da região da boca e nariz. Isto pode ocorrer após meses ou anos do aparecimento da lesão inicial primária. A LV é uma doença infecciosa sistêmica, crônica, grave e quando não tratada é letal. É causada por parasitas do complexo *L. donovani* e tem como características clínicas a febre irregular de média intensidade e longa duração, esplenomegalia, hepatomegalia. Já a doença cutânea causa incapacidade grave além de deixar cicatrizes profundas e desfigurantes permanentemente (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005; FEASEY et al., 2009).

Em 2012 a OMS trouxe a informação de que as leishmanioses estavam presentes em 102 países, sendo prevalentes na América Latina, Caribe, na África Subsaariana, Sul da Ásia e Índia. Uma análise realizada com dados de 25 países com altas taxas de leishmaniose publicada em 2014 revelou que uma população de aproximadamente 339 milhões de pessoas estão em situação de risco de contrair a infecção cutânea, este número sobe para 556 milhões quando tratamos da infecção visceral. O número total do somatório de casos reportados nestes países foram de 30758 casos de LV e 153027 casos da forma cutânea (ALVAR et al., 2012) (WHO, 2016) (WHO, 2017).

O Brasil foi um dos 25 países selecionados para avaliação no estudo publicado em 2014 citado anteriormente. O país foi incluído no estudo por estar entre os que mais tem casos reportados tanto da doença visceral quanto cutânea, os dados revelaram que no referente ano o Brasil foi responsável por 11% dos casos na forma visceral reportados no mundo e 12% dos casos na forma cutânea. Quando comparados esses números com os valores com a média de casos registrados na década de 2000 a 2009, observa-se uma redução importante nos casos de leishmaniose cutânea, o que já não foi observado quanto a doença visceral (WHO, 2016) (HOTEZ et al., 2007) (PELLISSARI et al., 2011).

Quadro 2 - Quadro comparativo dos casos de leishmaniose reportados no ano de 2014 frente aos valores médios da doença na década 00-09.

Doença	Casos Reportados	Valor médio de Casos Reportados de 2000-2009
Leishmaniose Cutânea	19402	24864
Leishmaniose Visceral	3453	3679

Fonte: WHO 2016; PELISSARI

O tratamento é complexo para todas as formas da doenças, entre os problemas relacionados ao tratamento medicamentoso estão a alta incidência de efeitos colaterais, resistência aos fármacos, o alto custo e a baixa adesão. Entre os medicamentos utilizados estão os antimoniais, anfotericina B e sua forma lipossomal. Os antimoniais são tratamento de primeira escolha, porém o mecanismo de ação permanece incerto. É pressuposto dos antimoniais pentavalentes serem pródrogas que são convertidas em trivalentes para exercer o efeito leishmanicida através da inibição seletiva de algumas enzimas de *Leishmania spp*, e bloqueio de adenosina trifosfato, pela inibição da fosfoquinase (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005) (PELISSARI et al., 2011) (VAN ASSCHE et al., 2011).

A tolerância aos antimoniais motivou uma busca por uma nova alternativa de tratamento, e nos anos 60 foi introduzida a anfotericina B como medicamento de segunda escolha. O mecanismo de ação se baseia na ligação ao ergosterol, o principal esterol sintetizado na membrana celular da *Leishmania*, aumentando a permeabilidade da membrana celular. Devido a alta toxicidade apresentada foram desenvolvidas através de nanotecnologia a forma lipossomal da anfotericina B. Ambos os medicamentos citados tem administração parenteral, demonstrando assim as dificuldades apresentadas no tratamento da doença. Há a necessidade urgente de medicamentos inovadores para o tratamento dessas doenças, e as estratégias para controlar a doença focam em trabalhar no desenvolvimento de novos agentes antiprotozoários e novas ferramentas, através das pesquisas e ensaios clínicos (MUELLER-LANGER, 2013) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005) (VAN ASSCHE et al., 2011).

2.2.2 Tripanossomíases

A tripanossomíase é uma doença também ocasionada pela infecção de protozoários de várias espécies do gênero *Trypanossoma* sp. As duas espécies mais conhecidas são as *T. cruzi*, responsável pela causa da doença de Chagas nas Américas, e a *T. brucei* que causa a doença do sono na África. Estes protozoário possuem duas fases distintas a promastigota e amastigota em seu ciclo de vida parasitária, onde também é intercalado entre um vetor, flebotomíneo e um hospedeiro mamífero (BARRETT et al., 2003) (BRUN et al., 2010) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005).

Em literatura foram descritos mais de 150 espécies de trypanossomas parasitando todas as classes de vertebrados. Essas espécies podem ser divididas em subgrupos, destacando-se os tripanossomas com desenvolvimento na porção posterior do intestino de triatomídeos hematófagos, transmitidos aos vertebrados através das fezes do vetor, e tem como exemplo mais conhecido o *T. cruzi*. O *T. brucei* compõe o grupo dos trypanossomas com desenvolvimento e transmissão através das partes anteriores do tubo digestivo de dípteros. Essa espécie apresenta uma particularidade, são parasitas extracelulares habitando o sangue e a linfa como tripomastigotas alongados, por consequência são vulneráveis aos mecanismos de defesa humoral, que ocorre pela ligação de anticorpos na superfície do protozoário facilitando o reconhecimento, a fagocitose e sua morte pelo sistema monocítico fagocitário (BARRETT et al., 2003) (FEASEY et al., 2009) (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005).

2.2.2.1 - Doença de Chagas

Como já mencionado anteriormente a doença de Chagas tem como agente etiológico o *Trypanossoma cruzi*, um protozoário heteroxênico, diplóide, que se reproduz por divisão binária simples, possuindo uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiros mamíferos e extracelular no vetor triatomíneo. Foi descrito pela primeira vez pelo cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas que descreveu também a doença (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005).

O ciclo biológico envolve várias formas evolutivas nos hospedeiros vertebrados e invertebrado. Nos mamíferos e na cultura de tecidos as formas amastigotas foram encontradas no meio intracelular e

tripomastigotas no meio extracelular, encontrada no sangue circulante. O triatomíneo se infecta através da ingestão dos tripomastigotas presentes no sangue, o protozoário sofre algumas modificações até chegar ao intestino posterior do vetor e transformar-se em epimastigota. Esta forma possibilita a multiplicação do protozoário nesta região e quando chega no reto ele muda para tripomastigota metacíclico, que presente nas fezes do inseto estão aptas a penetrar as células do hospedeiro vertebrado (BARRETT et al., 2003) (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005).

A infecção do *T. cruzi* nos mamíferos então se dá no momento do repasto sanguíneo através dos tripomastigotas metacíclicos eliminados nas fezes ou urina do vetor que penetram através local da picada e ocorre a interação com células do sistema mononuclear fagocitário da pele e mucosas. Essa interação entre parasita e célula hospedeira ocorre em três fases que se sucedem: a adesão celular, a interiorização e os fenômenos intracelulares. No meio intracelular ocorre nova transformação destes tripomastigotas em amastigotas, que permitem a reprodução por multiplicação binária, a cada 12 horas, e posteriormente ocorre a diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas no interior da célula hospedeira através de um fenômeno denominado “alongamento”. Por fim esta última forma é liberada no interstício através da lise celular pelo acúmulo de parasitos no meio intracelular, e por seguinte atingindo a corrente circulatória do mamífero, e livre no sangue circulante pode atingir novas células e cumprir novo ciclo celular e podem ainda ser ingeridos novamente pelo inseto vetor (BARRETT et al., 2003) (FEASEY et al., 2009) (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005).

Há outras formas de transmissão da doença, como transfusão sanguínea e transplantes, acidentes de laboratórios, transmissão oral (ingestão do triatomíneo infectado). E a doença de chagas apresenta duas fases mais comuns, a fase aguda e a fase crônica, assintomática e a sintomática. A fase aguda pode ser ainda aparente ou inaparente, sendo esta última a mais frequente, e tem início através de manifestações locais da penetração do protozoário na pele (chagoma de inoculação) ou na conjuntiva (sinal de Romana). São lesões que ocorrem dentro de 4 à 10 dias, em 50% dos infectados com regressão em um ou dois meses, e as manifestações gerais são febre, hepatomegalia, esplenomegalia, edema localizado e generalizado, e menos frequente insuficiência cardíaca e raramente perturbações neurológicas (BARRETT et al., 2003) (FEASEY et al., 2009) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005).

Os que sobrevivem a fase aguda podem passar anos sem apresentar sintomas da doença, apesar de apresentar lesões muito discretas e presença constante de anticorpos líticos. Essa fase é denominada crônica assintomática e é uma fase latente caracterizada por alguns parâmetros clínicos e laboratoriais. A fase crônica da doença é relacionada a reativação intensa do processo inflamatório de órgãos do sistema digestivo, cardíaco ou neurológico e sintomatologia relacionada com estes órgãos. Na cardiopatia chagásica crônica sintomática o sintoma clínico característico é a insuficiência cardíaca congestiva, devido a diminuição da massa muscular cardíaca e destruição do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático e também ao exsudato inflamatório em atividade (BARRETT et al., 2003) (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005).

A forma crônica digestiva causa alterações morfológicas e funcionais importantes como o megaesôfago e megacólon. Os principais sintomas do megaesôfago são: dor retroesternal, tosse, soluço, disfagia, odinofagia, regurgitação, pirose e sialose, já o megacólon faz referência as dilatações dos cólons (reto e sigmóide) que podem gerar obstrução intestinas e perfuração. A desnutrição é uma condição relacionada a doença, e as duas alterações quando associadas agrava este quadro. Já a forma nervosa, mesmo tendo sido admitida por Carlos Chagas, é muito discutida entre os patologistas por falta de comprovações morfológicas (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005).

A doença de Chagas é uma das doenças mais prevalentes na América Latina, e estimativas mais recentes reportadas no Brasil indicam a existência de um população de 1,9 milhão à 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi.*, o dado de mortalidade da doença registrados no país foram de 53924 óbitos no período que compreende os anos 1999 à 2007. Essa é uma doença característica das DTN's pois está relacionada a ambientes e regiões de baixa renda e/ou rurais. A forma mais comum de contração da doença é a transmissão do protozoário pelo triatomíneo selvagem, e estes vieram do desmatamento e de processos de urbanização, ocorrendo assim a domiciliação do vetor, neste caso principalmente do barbeiro. O inseto se abriga em pequenas frestas, e o fator de pobreza faz com que as casas sejam com pouco acabamento ou sem nenhum, ou de madeira, barro ou pau a pique, sendo assim ótimos abrigos para o vetor (DIAS et al., 2016) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005; HOTEZ et al., 2008).

Apesar de predominante em áreas rurais, a migração de infectados para grandes centros preocupa também os países

desenvolvidos. Só nos Estados Unidos são estimados 300000 imigrantes latino-americanos com a infecção e aproximadamente 45000 com a doença na forma crônica cardíaca. O objetivo do tratamento medicamentoso é diminuir ou eliminar a infecção, e os melhores resultados são obtidos iniciado o tratamento na fase aguda ou infecção recente. É notório o caráter de negligência desta doença, caráter este que fica evidenciado pela limitação de opções terapêuticas, existem apenas dois antiparasitários disponíveis com eficácia estabelecida e são indicados especialmente nos casos agudos e tem eficácia questionada frente a casos crônicos (DIAS et al., 2016) (FEASEY et al., 2009) (FORSYTH et al., 2016) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005).

O tratamento de primeira escolha é o benznidazol, um medicamento derivado 2-nitroimidazol com atividade comprovada contra as formas sanguíneas do *Trypanossoma cruzi*. Este é um medicamento que apresenta efeitos adversos severos e em casos de intolerância e/ou falha terapêutica com o benznidazol utiliza-se o nifurtimox, um fármaco derivado nitrofurano que age contra as formas sanguíneas e parcialmente contra as formas teciduais. Se já não houvessem muitos obstáculos no tratamento da doença de Chagas, outra é a obtenção do nifurtimox, o medicamento não é distribuído nos países e deve ser solicitado junto ao Ministério da Saúde (MS) e chega ao país via doação da Organização Panamericana de Saúde (OPAS) (DIAS et al., 2016) (FORSYTH et al., 2016) (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2002) (NEVES; LINARDI; VITOR, 2005) (MRAZEK; MOSSIALOS, 2003).

As enzimas que participam das vias metabólicas dos trypanossomas estão sendo utilizadas como potencial alvo para novos fármacos à serem desenvolvidos. Para atingir os alvos, na forma amastigota do trypanossoma, o composto deve interagir com vários tipos de células mamíferas. Essa interação afeta a disponibilidade do fármaco, diminuindo a chance de interagir com o protozoário e aumentando o risco de toxicidade devido a interação com as células sadias do hospedeiro (BARRETT et al., 2003) (DIAS et al., 2016).

2.3 CÂNCER

A transformação de células normais em células malignas é denominada carcinogênese. Uma das visões mais aceitas hoje, reflete a revisão realizada por Vogelstein e Kinzler onde o câncer é, na sua essência, uma doença genética. Iniciação, promoção e progressão são

estágios associados ao processo de carcinogênese e estes estão relacionados a alterações gênicas, onde as principais alterações são: inativação dos genes de supressão de tumor e mutações ativadas por oncogeneses (KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010) (COSTELLO; FRANKLIN, 1998).

As alterações genéticas nas células ocorrem durante o ciclo celular das células, que nada mais é que o período de vida da célula onde ela se desenvolve e se multiplica. Em células eucariontes o ciclo celular compreende cinco principais fases: G₀, G₁, S, G₂ e M. O ciclo celular é regulado positivamente por proteínas codificadas por proto-oncogeneses, algumas alterações são causadas através das oncogeneses, cópias mutadas dos proto-oncogeneses. Já a proliferação desregulada das células se deve a inativação dos genes supressores de tumor, pois estes codificam proteínas que atuam na inibição da progressão celular (COSTELLO; FRANKLIN, 1998) (ELMORE, 2007) (KLAUNIG; KAMENDULIS; HOCEVAR, 2010) (JAIN et al., 2015)

Na fase G₁, são produzidas proteínas, essenciais para a replicação cromossômica, necessárias na fase S. Fase este onde os cromossomos são duplicados e há a síntese de histonas. A fase G₂ é uma fase importante para a terapia oncológica, é a fase onde são produzidas proteínas globulares que formam os microtúbulos, proteínas essenciais para a fase M. Como já dito anteriormente, um importante alvo no desenvolvimento de fármacos para o tratamento do câncer. Na fase M os cromossomos duplicados se unem em pares (ELMORE, 2007) (FIELD; KANAKKANTHARA; MILLER, 2014) (JAIN et al., 2015).

De acordo com o INCA o tratamento do câncer pode ser realizado por meio de cirurgia, radioterapia ou quimioterapia. É classificada como quimioterapia o tratamento realizado com a utilização de medicamentos. A quimioterapia apresenta problemas devido a resistência ao tratamento utilizado e apresenta problemas de adesão ao tratamento e reações adversas como queda capilar, náuseas e vômito (FRANÇA et al., 2015) (GALMARINI; GALMARINI; GALMARINI, 2012).

Um dos mecanismos fisiológicos mais importantes para a inibição da proliferação descontrolada de células no corpo é a apoptose. A apoptose é um modo distinto de morte celular programada, onde a programação da eliminação de uma determinada célula é genética. Um exemplo onde o mecanismo de regulação do ciclo celular está desregulado é o câncer. A supressão da apoptose que ocorre durante a carcinogênese tem um papel fundamental na progressão e proliferação da doença (ELMORE, 2007).

Assim, a atividade pró apoptótica nas células tumorais é uma atividade biológica importante na pesquisa de novos compostos anticâncer. Considerando que em 2015 cerca de 8.8 milhões de pessoas vieram a óbito devido a algum tipo de tumor, o câncer atingiu o patamar de a segunda maior causa de morte no mundo. Quando trazemos estes dados para o Brasil, de acordo com a OMS no ano de 2014, a doença foi responsável por aproximadamente 17% do total de mortes em território nacional (WHO, 2014) (WHO,2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Síntezar derivados benzopirânicos com potencial ação citotóxica e antiparasitária *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Síntezar de novos compostos derivados 4-aril-4*H*-cromenos;

Síntezar derivados de piranocumarinas e benzopiranos com potencial atividade citotóxica e antiparasitária (antileishmania e antitripanosoma);

Caracterizar os compostos sintetizados por meio de técnicas espectrométricas e espectroscópicas usuais como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução;

Determinar a citotoxicidade dos compostos sintetizados em linhagem celular de células leucêmicas de origem humana;

Ensaiair os compostos sintetizados em modelos biológicos *in vitro* para avaliação da atividade antiparasitária;

Estabelecimento da relação estrutura atividade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES

Os reagentes utilizados neste estudo foram todos adquiridos da Sigma Aldrich[®], bem como os aldeídos, os cetoésteres, o metilcianoacetato, a malononitrila, o floroglucinol e o agente catalítico, o ácido polifosfórico. O carbonato de potássio (K₂CO₃), outro catalisador reacional, foi adquirido da empresa Spectrum[®]. Os solventes utilizados foram adquiridos das empresas Vetec[®], Química Moderna[®] e NEON[®]. Os equipamentos e vidrarias utilizadas estão vinculados ao laboratório da Central Analítica do Departamento de Ciências Farmacêuticas.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Procedimento Geral para a Síntese de derivados pirano[2,3-*H*]cumarinas

4.2.1.1 Procedimento Geral para a Síntese da 5,7-dihidroxi-4-metil-2*H*-cromen-2-ona

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados o floroglucinol (15,8 mmol), 0,8 equivalentes de etilacetoacetato, sem a presença de solvente. Como catalisador foi utilizado 0,1mol% de ácido polifosfórico. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética constante a temperatura de 60°C durante 18 horas. O progresso da reação foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD) em placa de sílica (eluente HEX:AcOEt, 1:1 (v/v)). Foi observado a extinção de luz e uma fluorescência de cor azulada, respectivamente. Após a revelação com anisaldeído sulfúrico, apresentou coloração vermelha.

Observado o consumo total do material de partida, a reação foi encerrada. Para neutralizar o catalisador foi utilizada uma solução aquosa saturada de NaHCO₃. O produto reacional foi então ressuspenso em água purificada, filtrado e lavado. O produto final foi solubilizado em MeOH e evaporado o solvente. O produto da reação apresentou-se como um sólido opaco de cor branca para creme, e com rendimento de 55% (1.687 g).

4.2.1.2 Procedimento Geral Para a Síntese dos Derivados Piranocumarínicos (4-14)

Para a síntese destes derivados piranocumarínicos (4-14) foi utilizado um sistema adaptado com refluxo e mantido o sistema sob constante agitação. Foram adicionados a malononitrila (1mmol), juntamente com 1,0 equivalente do benzaldeído em um balão de fundo redondo de 50mL contendo 10 mL de MeOH. Posteriormente foi adicionado 10mol% do catalisador K_2CO_3 e após um minuto adicionou-se 1,0 equivalente da 5,7-dihidroxi-4-metilcumarina (3), e o tempo reacional foi de até duas horas (KARAMI; KHODABAKHSHI; ESKANDARI, 2012).

Para a obtenção dos derivados piranocumarínicos carboxilados (10-14) a malononitrila foi substituída pelo metilcianoacetato (1mmol).

A reação foi monitorada através de CCD como descrito no item anterior. Outra forma de monitorar foi o aparecimento de um precipitado. A reação foi resfriada e posteriormente o bruto reacional foi filtrado e lavado com água purificada e MeOH, permitindo assim a obtenção do produto final.

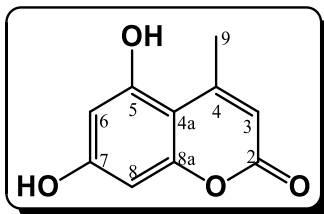
4.2.2 Procedimento Geral para a Síntese de derivados 2-amino-4H-cromenos

A síntese desta série de compostos 4H-cromenos, foi utilizado um sistema de agitação magnética constante, sem aquecimento. Em um balão de fundo redondo de 50mL, contendo 1,0mL de MeOH, foram solubilizados o floroglucinol (1,0 mmol), 1,0 equivalente do benzaldeído e 1,0 equivalente do metilcianoacetato. Posteriormente foram adicionados 19 mL da solução aquosa de K_2CO_3 com concentração de 4,73 mg/mL. O tempo reacional foi de 18 horas e a reação foi monitorada por CCD, como descrito no item 4.2.2.1. O produto reacional foi filtrado e lavado com água purificada (MASESANE; MIHIGO, 2015).

4.2.3 Caracterização, Rendimentos e Atribuições de RMN 1H , ^{13}C

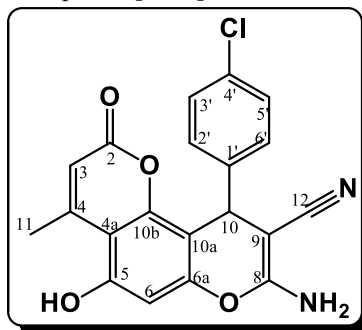
5,7-dihidroxi-4-metilcumarina (3): P.M.: 192,16 g.mol⁻¹. Pó branco opaco. Rend.: 56% (1.687 g). RMN 1H (300 MHz, $(CD_3)_2CO$) δ (ppm) 6.35 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 5.83 (q, J = 1.1 Hz, 1H), 2.56 (d, J = 1.1 Hz, 3H). RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3COCD_3) δ (ppm) 160.9, 159.9, 157.7, 157.1, 154.4, 109.6, 102.6, 99.0, 95.0, 23.0.

Figura 4 - Molécula da 5,7-dihidroxi-4-metilcumarina (3).



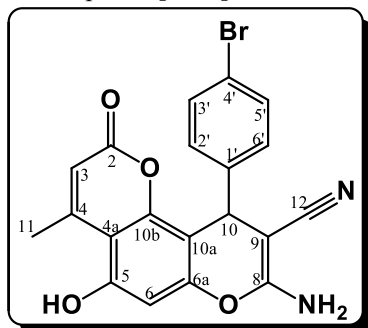
8-amino-10-(4-clorofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (4): P.M.: 380,78 g.mol⁻¹. Sólido, em forma de pó, branco opaco. Rend.: 64% (0.2432 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.15 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.08 (s, 2H, NH₂), 6.49 (s, 1H), 6.09 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 4.63 (s, 1H), 2.60 (sl, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 160.1, 159.9, 158.0, 155.0, 153.9, 148.0, 144.7, 131.6, 129.5 (2C), 128.9 (2C), 120.4, 112.1, 108.5, 102.4, 99.1, 57.4, 36.3, 24.5.

Figura 5 - Molécula do derivado 8-amino-10-(4-clorofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (4).



8-amino-10-(4-bromofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (5): P.M.: 425,23 g.mol⁻¹. Pó alaranjado opaco. Rend.: 71% (0.3010 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 7.47 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.10 (d, J = 8.40 Hz, 2H), 7.08 (s, 2H, NH₂), 6.49 (s, 1H), 6.09 (d, J= 0.90 Hz, 1H), 4.62 (s, 1H), 2.60 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 159.5, 159.4, 157.5, 154.5, 153.4, 147.5, 144.6, 131.3 (2C), 129.4 (2C), 119.9, 119.6, 111.6, 107.9, 101.9, 98.6, 56.9, 35.9, 24.0.

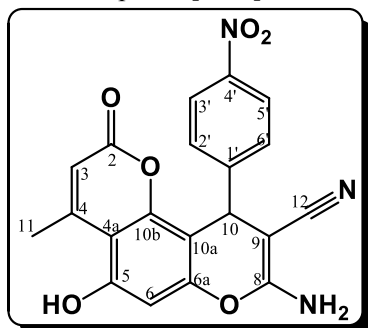
Figura 6 - Molécula do derivado 8-amino-10-(4-bromofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (5).



8-amino-5-hidroxi-4-metil-10-(4-nitrofenil)-2-oxo-2,10-

dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (6): P.M.: 391,33 g.mol⁻¹. Sólido em forma de pó laranja claro opaco. Rend.: 43% (0.2658 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.18 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.56 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.56 (s, 1H), 6.48 (s, 2H, NH₂), 6.03 (sl, 1H), 4.79 (s, 1H), 2.71 (sl, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 160.2, 160.0, 155.4, 153.9, 153.4, 148.0, 146.6, 128.9 (2C), 124.2 (2C), 120.3, 111.1, 109.4, 107.9, 101.4, 99.2, 56.7, 36.8, 24.4.

Figura 7 - Molécula do derivado 8-amino-5-hidroxi-4-metil-10-(4-nitrofenil)-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (6).

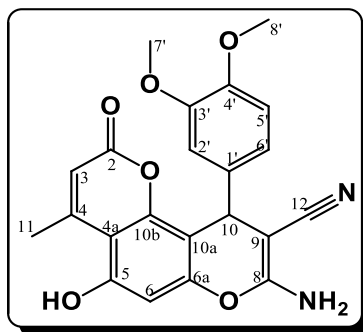


8-amino-10-(3,4-dimetoxifenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-

dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (7): P.M.: 406,38 g.mol⁻¹. Sólido em forma de pó amarelo claro. Rend.: 56% (0.2273 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 6.92 (s, 2H, NH₂), 6.85 (d, J = 1.8

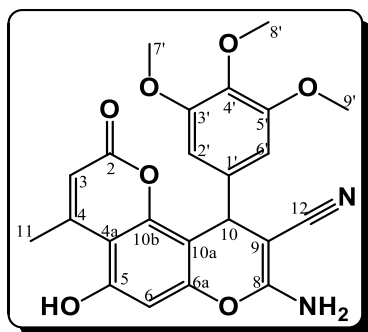
Hz, 1H), 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.59 (dd, J = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 4.57 (s, 1H), 3.68 (s, 6H), 2.56 (s, 3H). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 161.8, 160.6, 160.3, 155.2, 153.9, 148.8, 148.0, 147.9, 138.5, 120.9, 119.2, 112.3, 111.7, 110.1, 110.0, 100.4, 99.2, 58.0, 56.0, 55.9, 36.1, 24.4.

Figura 8 - Molécula do derivado 8-amino-10-(3,4-dimetoxifenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (7).



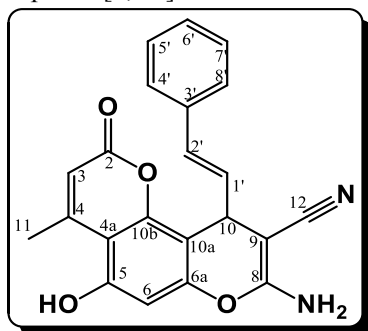
8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (8): P.M.: 436,41 g.mol⁻¹. Sólido em forma de pó branco opaco. Rend.: 54% (0.2354 g). RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 6.99 (s, 2H, NH₂), 6.47 (s, 2H), 6.41 (s, 1H), 5.96 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 3.68 (s, 6H), 3.60 (s, 3H), 2.58 (s, 3H). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 161.2, 160.7, 160.2, 155.2, 154.0, 153.1 (2C), 148.1, 141.1, 136.6, 121.0, 110.4, 109.7, 104.7 (2C), 101.0, 99.2, 60.4, 57.6, 56.3 (2C), 36.7, 24.5.

Figura 9 - Molécula do derivado 8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carbonitrila (8)



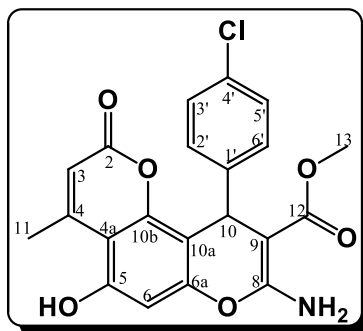
(E)-8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-estiril-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (9): P.M.: 372,37 g.mol⁻¹. Sólido em forma de pó, bege. Rend.: 54% (0.2008 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 7.39 (dd, J = 7.3, 1.2 Hz, 2H), 7.29 (dd, J = 7.3, 1.2Hz, 2H), 7.20 (m, J = 7.3, 7.3, 1.2, 1.2 Hz, 1H), 7.07 (s, 2H, NH₂), 6.51 (s, 1H), 6.40 (d, J = 15.7 Hz, 1H), 6.20 (dd, J = 15.7, 7.1 Hz, 1H), 6.00 (sl, 1H), 4.24 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 2.56 (sl, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 160.9, 160.1, 155.0, 153.8 (2C), 147.9, 136.9, 131.4, 129.1 (2C), 128.9, 127.8, 126.7 (2C), 120.8, 111.0, 108.1, 101.7, 99.2, 54.8, 34.3, 24.4.

Figura 10 - Molécula do derivado (E)-8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-estiril-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carbonitrila (9)



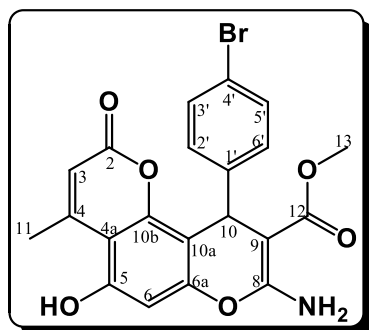
Metil 8-amino-10-(4-clorofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano [2,3-f]cromeno-9-carboxilato (10): P.M.: 413,80 g.mol⁻¹. Sólido branco opaco. Rend.: 69% (0.2849 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 7.62 (s, 2H, NH₂), 7.40 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.13 (d, J = 8.4 Hz), 6.52 (s, 1H), 6.10 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 4.98 (s, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.66 (s, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 168.5, 160.9, 159.9, 157.7, 154.5, 153.7, 148.1, 145.8, 131.0, 129.6 (2C), 128.4 (2C), 111.9, 111.6, 102.4, 98.9, 77.2, 51.1, 33.9, 24.4.

Figura 11 - Molécula do derivado metil 8-amino-10-(4-clorofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano [2,3-f]cromeno-9-carboxilato (10).



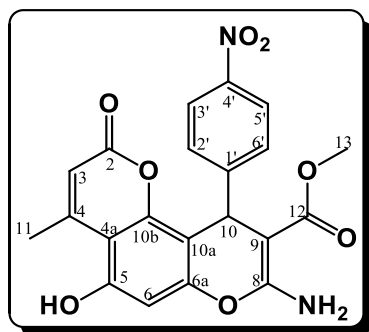
Metil 8-amino-10-(4-bromofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano [2,3-f]cromeno-9-carboxilato (11): P.M.: 458,25 g.mol⁻¹. Sólido branco opaco 73% (0.3307 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 7.61 (s, 2H, NH₂), 7.39 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.13 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 6.08 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 4.97 (s, 1H), 3.57 (s, 3H), 2.65 (s, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 168.5, 160.9, 159.9, 157.8, 154.6, 153.7, 148.2, 146.2, 131.3 (2C), 130.1 (2C), 119.4, 111.9, 111.5, 102.4, 98.9, 77.2, 51.1, 34.0, 24.4.

Figura 12 - Molécula do derivado metil 8-amino-10-(4-bromofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carboxilato (11).



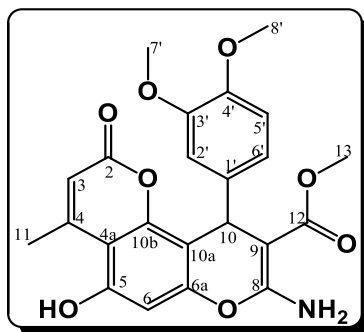
Metil 8-amino-5-hidroxi-4-metil-10-(4-nitrofenil)-2-oxo-2,10-dihidropirano [2,3-f]cromeno-9-carboxilato (12): P.M.: 424,36 g.mol⁻¹. Sólido branco opaco. Rend.: 75% (0.3180 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.11 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.70 (s, 2H, NH₂), 7.45 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.52 (s, 1H), 6.11 (sl, 1H), 5.12 (s, 1H), 3.59 (s, 3H), 2.69 (sl, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 168.4, 160.8, 159.8, 157.9, 154.9, 154.4, 153.7, 148.1, 146.2, 129.2 (2C), 123.8 (2C), 111.9, 110.6, 102.4, 98.9, 76.5, 51.2, 34.8, 24.4.

Figura 13 - Molécula do derivado metil 8-amino-10-(4-nitrofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carboxilato (12).



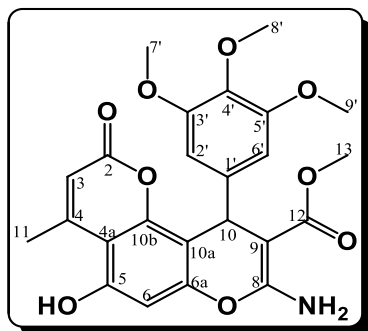
Metil 8-amino-10-(3,4-dimetoxifenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano [2,3-f]cromeno-9-carboxilato (13): P.M.: 439,41 g.mol⁻¹. Sólido braco opaco. Rend.: 70% (0.3073 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 7.50 (s, 2H, NH₂), 7.02 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.63 (dd, J = 8.4, 1.7 Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 5.75 (sl, 1H), 5.06 (s, 1H), 3.65 (s, 5H, OH), 3.58 (s, 3H), 2.59 (sl, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 169.1, 161.8, 160.7, 155.4, 153.4, 153.9, 148.4, 148.3, 147.3, 140.3, 119.0, 113.9, 112.2, 112.1, 107.7, 99.3, 98.7, 78.2, 55.9, 55.7, 50.9, 33.3, 24.4.

Figura 14 - Molécula do derivado metil 8-amino-10-(3,4-dimetoxifenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carboxilato (13).



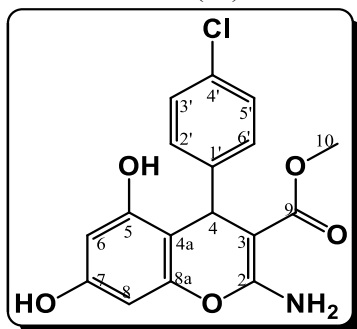
Metil 8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carboxilato (14): P.M.: 469,44 g.mol⁻¹. Sólido amarelo claro. Rend.: 58% (0.2720 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 7.61 (s, 2H, NH₂), 6.58 (s, 1H), 6.50 (s, 2H), 6.09 (sl, 1H), 5.06 (s, 1H), 3.70 (s, 6H, OH), 3.66 (s, 3H, OH), 3.61 (s, 3H), 2.68 (sl, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 168.7, 161.4, 160.0, 157.9, 154.4, 153.7, 152.9 (2C), 148.4, 142.4, 136.4, 112.2, 111.8, 104.9, 102.4, 77.5, 60.3, 56.2 (2C), 51.1, 34.2, 24.4.

Figura 15 - Molécula do derivado 8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carbonitrila (14).



Metil 2-amino-4-(4-clorofenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (16): P.M.: 347,75 g.mol⁻¹. Sólido amarelo opaco. Rend.: 52% (0.1804 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.64 (s, 1H, OH), 9.43 (s, 1H, OH), 7.55 (s, 2H, NH₂), 7.23 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.12 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.04 (sl, 1H), 5.96 (sl, 1H), 4.83 (s, 1H), 3.52 (s, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 168.9, 161.9, 157.5, 155.4, 150.9, 147.2, 130.3, 129.6 (2C), 128.1 (2C), 105.3, 99.0, 94.1, 77.5, 50.8, 33.9.

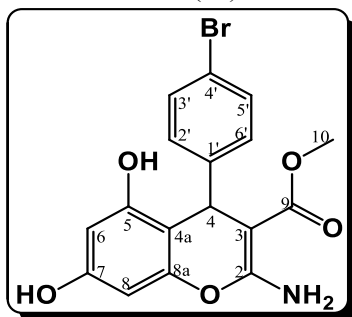
Figura 16 - Molécula do derivado metil 2-amino-4-(4-clorofenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (16).



Metil 2-amino-4-(4-bromofenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (17): P.M.: 392,20 g.mol⁻¹. Sólido branco amarelado. Rend.: 51% (0.1994 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.65 (s,

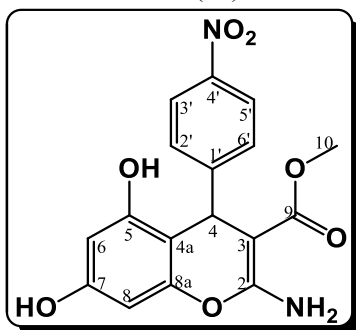
1H, OH), 9.44 (s, 1H,OH), 7.55 (s, 2H, NH₂), 7.37 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.05 (d, J=1.6, 1H), 5.97 (d, J = 1.6, 1H), 4.82 (s, 1H), 3.52 (s, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 168.9, 161.8, 157.6, 155.5, 150.8, 147.6, 131.1 (2C), 130.1 (2C), 118.8, 105.2, 99.0, 94.0, 77.4, 50.8, 33.9.

Figura 17 - Molécula do derivado metil 2-amino-4-(4-bromofenil)-5,7-dihidroxi-4*H*-cromene-3-carboxilato (17).



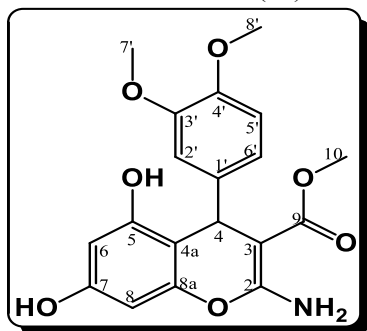
Metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(4-nitrofenil)-4*H*-cromeno-3-carboxilato (18): P.M.: 358,30 g.mol⁻¹. Sólido amarelo opaco. Rend.: 55% (0.1969 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.65 (s, 2H, OH), 8.08 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.64 (s, 2H, NH₂), 7.37 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.04 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.99(d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.95 (s, 1H), 3.52 (s, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 168.8, 161.8, 158.0, 156.0, 155.7, 150.8, 145.9, 129.1 (2C), 123.7 (2C), 104.3, 99.1, 94.2, 76.8, 50.9, 34.8.

Figura 18 - Molécula do derivado metil 2-amino-4-(4-nitrofenil)-5,7-dihidroxi-4*H*-cromene-3-carboxilato (18).



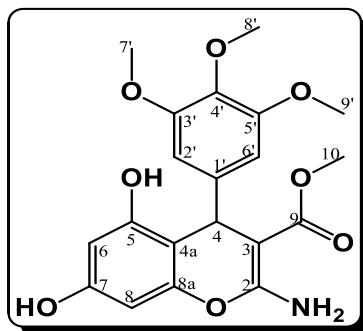
Metil 2-amino-4-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-chromene-3-carboxylate (19): P.M.: 373,35 g.mol⁻¹. Sólido marrom opaco. Rend.: 56% (0.2088 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.60 (s, 1H, OH), 9.39 (s, 1H, OH), 7.49 (s, 2H, NH₂), 6.82 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 6.75 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.55 (dd, J = 8.4; 1.2 Hz, 1H), 6.05 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 5.95 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 4.83 (s, 1H), 3.66 (s, 3H, OH), 3.65 (s, 3H, COH), 3.55 (s, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 169.1, 162.0, 157.2, 155.3, 151.1, 148.4, 147.2, 140.9, 119.2, 112.1, 112.0, 106.2, 99.0, 94.0, 78.1, 55.9, 55.8, 50.8, 33.5.

Figura 19 - Molécula do derivado metil 2-amino-4-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-chromene-3-carboxilato (19).



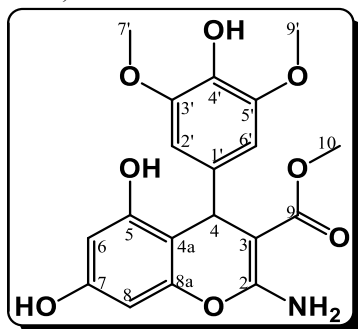
Metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-4H-cromeno-3-carboxilato (20): P.M.: 403,38 g.mol⁻¹. Sólido branco opaco. Rend.: 60% (0.2418 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.65 (s, 1H, OH), 9.41 (s, 1H, OH), 7.51 (s, 2H, NH₂), 6.42 (s, 2H), 6.07 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 5.97 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.86 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.58 (s, 6H, OH, CH). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 169.1, 162.2, 157.4, 155.4, 152.7 (2C), 151.3, 143.9, 136.0, 105.9, 104.8 (2C), 99.1, 94.1, 77.8, 60.3, 56.1 (2C), 50.8, 34.3.

Figura 20 - Molécula do derivado 8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromene-9-carbonitrila (20).



Metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-4H-cromeno-3-carboxilato (21): P.M.: 389, 35 g.mol⁻¹. Sólido laranja opaco. Rend.: 71% (0.3010 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9.61 (s, 1H, OH), 9.38 (s, 1H, OH), 8.06 (s, 1H, OH), 7.48 (s, 2H, NH₂), 6.39 (s, 2H), 6.07 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 5.97 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 4.82 (s, 1H), 3.64 (s, 6H), 3.57 (s, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 169.2, 162.1, 157.2, 155.4, 151.3, 147.8 (2C), 138.4, 134.2, 106.3, 105.3 (2C), 99.1, 94.0, 78.2, 56.4 (2C), 50.8, 33.8.

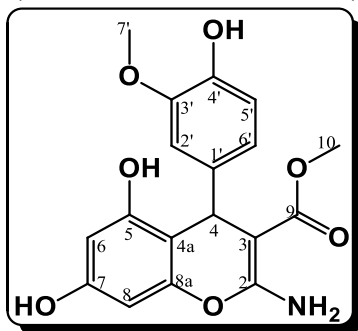
Figura 21 - Molécula do derivado metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-4H-cromeno-3-carboxilato (21).



Metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4H-cromeno-3-carboxilato (22): P.M.: 359,33 g.mol⁻¹. Sólido bege escuro opaco. Rend.: 54% (0.1938 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)

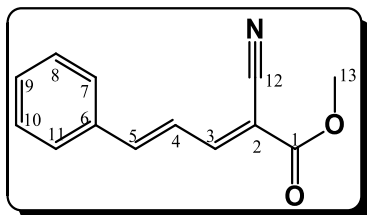
9.57 (s, 1H, OH), 9.36 (s, 1H, OH), 8.62 (s, 1H,OH), 7.46 (s, 2H, NH₂), 6.78 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.43 (dd, J = 8.1; 1.4 Hz, 1H), 6.05 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.94 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.80 (s, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.56 (s, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 169.2, 162.1, 157.1, 155.4, 151.2, 147.1, 144.8, 139.3, 119.5, 115.3, 112.4, 106.5, 99.0, 94.0, 78.4, 55.9, 50.8, 33.4.

Figura 22 - Molécula do derivado metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4*H*-cromeno-3-carboxilato (**22**).



(2E,4E)-methyl 2-cyano-5-phenylpenta-2,4-dienoate (15): P.M.: 213,23 g.mol⁻¹. Sólido em forma de pó amarelo claríssimo. Rend.: 89% (0.1913 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.05 (m, 1H), 7.61 (m, 2H), 7.42-7.44 (m, 3H), 7.31 (m, 1H), 7.29 (m, 1H), 3.91 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 162.8, 155.7, 149.1, 134.6, 131.2, 129.1(2C), 128.5(2C), 123.0, 114.5, 104.0, 53.1.

Figura 23 - Molécula do derivado (2E,4E)-metil 2-ciano-5-fenilpenta-2,4-dienoate (**15**).



4.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

4.3.1 Monitoramento Cromatográfico por Cromatografia em Camada Delgada

A CCD foi utilizada para acompanhar e monitorar o andamento das reações e determinar o final da reação. Foram utilizadas folhas cromatográficas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (F₂₅₄) em suporte de alumínio (SiliCycle®). Após aplicação das manchas dos produtos de partida e do produto da reação, as manchas foram observadas sob luz visível e luz UV, nos comprimentos de onda de 254 (extinção) e 365 nm (fluorescência), e posteriormente foram revelados com anisaldeído sulfúrico.

A fase móvel, composta por HEX:AcEtO 1:1 (v/v), favoreceu a obtenção de um sistema cromatográfico que proporcionasse o melhor perfil para observação de mancha de diferente R_f que os produtos de partida utilizados.

Para o preparo da solução reveladora foram utilizados o anisaldeído e o etanol (EtOH), o ácido acético glacial e o ácido sulfúrico (H₂SO₄). O revelador seguiu a seguinte ordem de reação: adicionar 85mL de EtOH, 10mL do ácido acético glacial, 5mL de H₂SO₄ e mais 0,5mL de anisaldeído.

4.3.2 Análise de Pureza por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE)

Os compostos sintetizados foram submetidos à análise de pureza por CLUE e foram realizados em equipamento WATERS® modelo *Acquity UPLC*, com injetor automático e forno. Possui ainda o detector de arranjo de fotodiodos (PDA) acoplado e hifenado ao detector de espalhamento de luz evaporativo. Este equipamento é vinculado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC, e antes de sua utilização, filtrados por membrana (0,22 µm) e desgaseificados em banho de ultrassom durante 15 minutos, sob pressão reduzida. Os produtos da reação foram preparadas utilizando em acetonitrila grau HPLC e filtradas por membrana Millipore® (poro de 0,22 µm).

Para as análises empregou-se uma coluna *Acquity UPLC BEH C₁₈* (1,0 x 50 mm i.d., 1,7 µm)(Waters) com temperatura de forno de coluna à 40 °C (± 2 °C). A FM utilizada constituiu de gradiente combinando a solução aquosa acidificada com ácido fórmico (99.9:0.1, v/v)(A) e acetonitrila (B). As condições do gradiente aplicadas foram as

seguintes: 0-2 min, gradiente da proporção de A:B (95:5, v/v), 2.1-10 min, gradiente até proporção A:B (55:45, v/v) e assim permanece até o minuto 14; 14.1-15 min, gradiente até proporção A:B (5:95, v/v); 15.1-20 min, retorno do gradiente até proporção inicial de A:B (95:5, v/v), totalizando 20 minutos de análise a um fluxo constante de 0,30 mL.min⁻¹. O volume de injeção utilizado foi de 2 µL (SANDJO et al., 2017).

Os cromatogramas foram adquiridos no comprimento de onda de 240 nm, e por fim os dados foram analisados e integradas as áreas dos picos no cromatograma do compostoos em software *MassLynxV4.1ks*. As áreas dos picos foram salvas e calculadas a porcentagem respectiva de cada pico, sendo o primeiro pico desconsiderado do cromatograma por ser considerado impureza do solvente, em relação à somatória total, obtendo-se assim o grau de pureza da substância (expressa em porcentagem).

4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR ESTRUTURAL

Os derivados sintetizados que ao serem avaliados por CCD apresentaram uma mancha distinta às manchas dos produtos de partida foram submetidas a análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EM), para a elucidação estrutural e caracterização das substâncias.

Os experimentos espectroscópicos foram todos realizados na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC.

4.4.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os produtos das reações foram submetidas a análises de RMN de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono (RMN ¹³C) e experimentos bidimensionais (HSQC e HMBC).

A obtenção dos dados foi realizada no espectrômetro Bruker modelo *Fourier 300* (300 MHz para ¹H e 75 MHz para ¹³C) vinculado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC. Os solventes utilizados para solubilizar as amostras para análises foram a acetona deuterada (acetona-d₆), dimetilsilano deuterado (DMSO-d₆), ambos com tetrametilsilano (TMS) para calibração.

Por consequencia, os sinais são expressos em ppm em relação ao TMS. Os dados adquiridos (FID) foram processados em software *TopSpin 3.1* (Bruker®).

4.4.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EM)

Para a caracterização utilizando a espectrometria de massa, dos dados de LC/MS-MS foram obtidos utilizando um sistema cromatográfico com espectrômetro de massa de alta resolução acoplado, *Xevo G2-XS QTOF* (Quadripole - Time Of Fly) (Waters®), vinculada a Central de Cromatografia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC, e antes de sua utilização, filtrados por membrana (0,22 µm) e desgaseificados em banho de ultrassom durante 15 minutos, sob pressão reduzida. Os produtos da reação foram preparadas utilizando em acetonitrila grau HPLC e filtradas por membrana Millipore® (poro de 0,22 µm).

As amostras foram solubilizadas em acetonitrila grau HPLC, posteriormente filtradas por membrana Millipore® (poro de 0,22 µm). A fonte de ionização utilizada foi o electrospray (ESI), no modo positivo com força de colisão de 3.5kV, e posteriormente Os dados foram salvos e processados utilizando o software MassLynx v4.1(Waters®).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro*

4.5.1 Avaliação das Atividades Leishmanicida e Tripanocida

A investigação *in vitro* das atividades leishmanicida e tripanocida foi realizada em parceria com o Laboratório de Protozoologia, vinculado ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC, sob supervisão do professor Dr. Mário Steindel.

Para o teste em questão, empregou-se linhagem celular THP-1 (ATCC TIB202) de macrófagos humanos cultivada em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, CO. St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% (v/v) de FBS (Life Technologies, USA), tampão HEPES a 12,5 mM, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e Glutamax® (2 mM), em incubação a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) utilizadas, expressando β-galactosidase, foram cultivadas a 26 °C em meio *Schneider's insect medium* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementados com 5% (v/v) de SBF inativado por calor e 2% (v/v) de urina humana.

Para a triagem leishmanicida contra formas amastigotas intracelulares as células THP-1 ($4,0 \times 10^4$ células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços em meio RPMI-1640 e tratadas com 100 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) durante 72 horas a 37 °C em 5% de CO₂, para permitir a diferenciação das células THP-1 em macrófagos que não se dividem (SCHWENDE et al., 1996).

Após quatro dias de cultivo a cultura de promastigotas ajustada para $4,0 \times 10^6$ parasitos/mL foi lavada com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4 (PBS) e incubada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro humano AB⁺ inativado por calor durante uma hora a 34 °C para a opsonização do parasito. As células THP-1 foram incubadas com a solução de promastigotas opsonizadas na proporção parasitos: célula de 10:1, durante quatro horas a 34 °C e 5% de CO₂. Após este período os parasitos não aderentes foram removidos por lavagem com PBS e as células infectadas foram incubadas com 180 µL de meio completamente suplementado de RPMI-1640 nas mesmas condições de opsonização durante 24 horas, para permitir a transformação das promastigotas em amastigotas intracelulares.

Para avaliação tripanocida, as cepas de *Trypanosoma cruzi*, β-galactosidase, (Tulahuen) foram fornecidas pelo Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte. Tripomastigotas derivados de culturas obtidas a partir de linhagem celular L929 infectadas foram usadas para infectar células THP-1 diferenciadas ($4,0 \times 10^4$ células/poço) em microplacas de 96 poços, numa proporção de 3:1 parasito:célula, e incubados durante a noite a 37 °C com 5% de CO₂. O meio contendo parasitos não internalizados foi removido e substituído por 180 µL de meio fresco.

Os derivados foram solubilizados em DMSO e diluídos em PBS nas concentrações de 50 µM a 1,56 µM. As células infectadas foram tratadas com 20 µL de cada amostra, em triplicata, seguido da incubação durante 48 horas a 34 °C ou 37 °C e 5% de CO₂. Após o tratamento, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e incubadas durante 16 horas a 37 °C com 250 µL de clorofenol-vermelho-β-D-galactopiranosídeo (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (CPRG) a 100 µM e Nonidet P-40 (Amresco Inc, Solon, Ohio, USA) (NP-40) a 0,1%. A densidade óptica foi determinada a 570 e 630 nm em espectrofotômetro Tecan® modelo *Infinite M200*, Austria. A concentração de cada amostra que reduziu a viabilidade do parasita em 50% foi comparado com o controle não tratado (IC₅₀).

A anfotericina B (Sigma-Aldrich) e o benzinidazol (Sigma-Aldrich) foram utilizados como controle positivo para as atividades leishmanicida e tripanocida, respectivamente. DMSO 1% foi empregado como controle negativo. A concentração da capacidade de inibição de 50% (IC₅₀) dos parasitas e da proliferação de células THP-1 (CC₅₀) foram utilizadas para expressar a atividade antiparasitária e citotóxica, respectivamente. O índice de seletividade (SI) das amostras foram determinadas pela razão de CC₅₀/IC₅₀.

4.5.2 Avaliação da Atividade Citotóxica

4.5.2.1 Cultura de Células

As linhagens celulares testadas neste trabalho são linhagens de células de leucemia linfoblástica aguda de origem humana CCRF-CEM sensíveis, e sua linhagem multiresistente CEM/ADR5000 (EFFERTH et al., 2003) (GILLET et al., 2004) (KIMMIG et al., 1990).

4.5.2.2 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio redução de Resazurina aplicado é um método validado e amplamente descrito em literatura. Este ensaio foi utilizado para avaliar a citotoxicidade dos derivados sintetizados (KUETE et al., 2013) (O'BRIEN et al., 2000).

4.5.2.3 Análise do Ciclo Celular e Detecção de Células Apoptóticas por Citometria de Fluxo Cultura de Células

Os compostos mais ativos e a doxorubicina ou DMSO (solvente controle) foram utilizadas para tratar células CCRF-CEM (1×10^6) em várias concentrações, por seguinte a análise do ciclo celular ocorreu 24 horas após a incubação, técnica esta descrita em literatura. O marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio, utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas, pois permite a avaliação da integridade da membrana celular, foi avaliado utilizando citômetro de fluxo BD Accury C6 (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) (KUETE et al., 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS DA [2,3-*H*]-CUMARINA, GRAU DE PUREZA E CARACTERIZAÇÃO

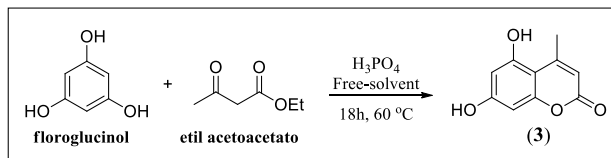
O primeiro passo foi a obtenção do composto de partida, o derivado cumarínico, via condensação de Pechmann do floroglucinol com etilacetoacetato catalisada por um ácido. Este composto foi um intermediário que possibilitou a obtenção dos derivados através de metodologia publicada por Karami e colaboradores (KARAMI; KHODABAKHSHI; ESKANDARI, 2012) (LEAO et al., 2011).

Para elucidação estrutural os compostos foram submetidos a análises de RMN e para confirmação da massa molecular uma análise por espectrometria de massas em sistema LC-MS/MS – Q-TOF e análise do grau de pureza.

5.1.1 Síntese da 5,7-dihidroxi-4-metilcumarina (3)

A reação de Pechmann foi reportada em 1883, e esta condensação é uma síntese para obtenção de derivados cumarínicos através da condensação de fenóis e um β -cetoesteres na presença de um ácido de Lewis. Os melhores reagentes são os mono-, di-, ou trihidróxifenóis que possuem grupos electrón doadoras, neste estudo então foi aplicada o floroglucinol, um trihidróxifenol. Os β -cetoesteres utilizados foram acíclicos e o ácido utilizado foi o ácido polifosfórico $[\text{HO}(\text{PO}_2\text{OH})_n\text{H}]$ (KURTI; CZAKÓ, 2005) (SETHNA; PHADKE, 1953).

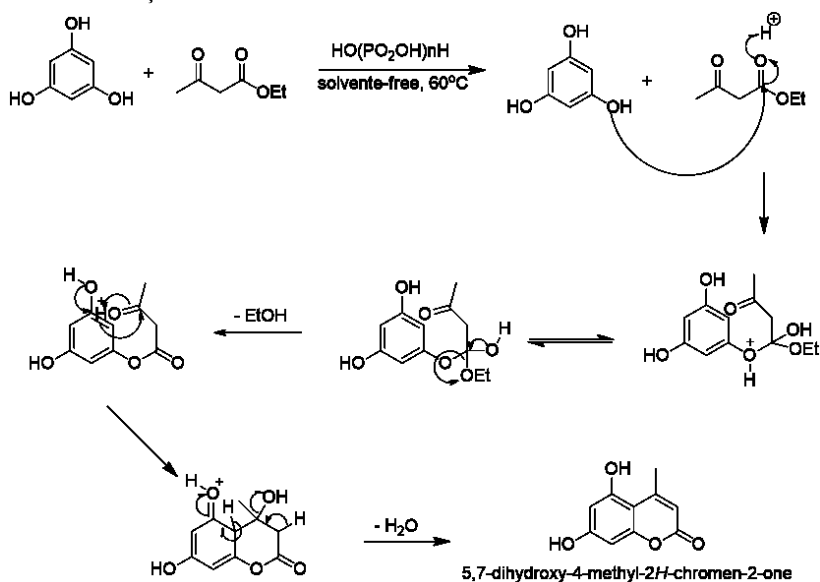
Figura 24 - Esquema de síntese da cumarina através da condensação de Pechmann.



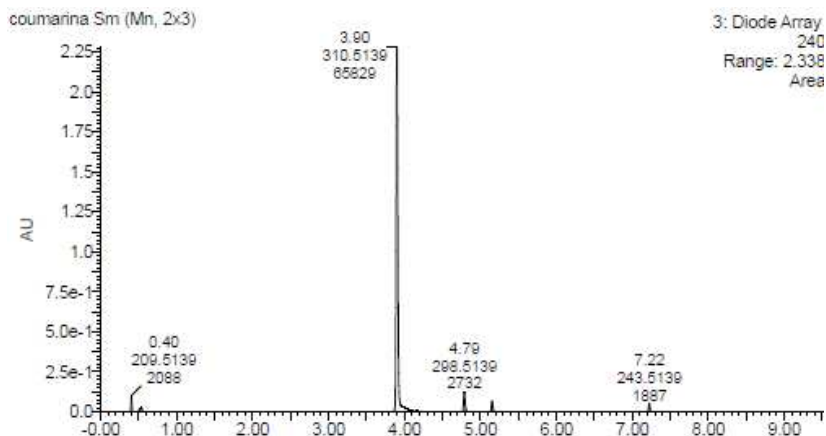
O mecanismo de formação descrito em literatura se dá primeiramente pela formação do enol do o etilacetoacetato catalisada por um ácido, atacando a posição beta do β -cetoester, esse enol formado torna-se um acceptor de Michael, e assim permite a adição na posição

alfa da dupla ligação. Essa reação forma um conformêro mesomérico do anel, que é uma conformação menos estável que o anel aromático, favorecendo assim o retorno a conformação aromática. Uma subsequente eliminação de água induzida pelo meio ácido permite uma nova adição forma enol do β -cetoester. Por fim ocorre a transesterificação através do ataque nucleofílico da hidroxilixa no grupamento éster do cetoester. Este ataque resulta em uma eliminação de álcool, neste caso o etanol, e para melhor compreensão o mecanismo está representado na Figura 8 (BARRIS; ISRAELSTAM, 1930) (KURTI; CZAKÓ, 2005).

Figura 25 – Mecanismo de reação do derivado 5,7-dihidroxi-4-metilcumarina, através da reação de Von Pechmann.



O esqueleto cumarínico sintetizado é amplamente descrito e a reação foi realizada sem a necessidade da utilização de solvente sob aquecimento à temperatura de 90°C , e foi mantida sob agitação durante 18 horas. A pureza foi realizada através de análise de LC, já descrito nos métodos, e seu cromatograma demonstrou que o método aplicado para síntese resultou em um produto com pureza de 93,4%.

Figura 26 - Cromatograma do derivado **3** por CLUE-PDA.

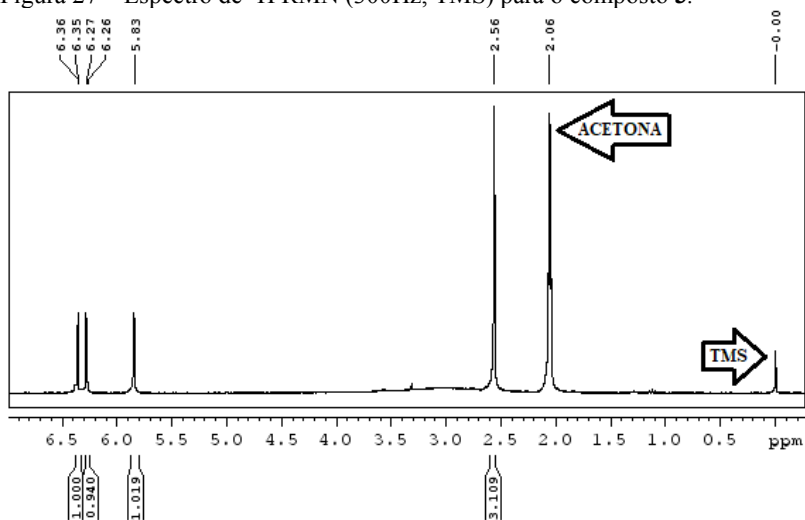
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.1.1.1 Caracterização e Elucidação Estrutural por RMN

A nomenclatura utilizada nesta dissertação, segue as regras gerais da IUPAC, utilizado também o sistema Hantzsh-Widman para os heterociclos e o sistema de nomenclatura para anéis fundidos, e vai de acordo com a publicação de von Pechmann. A numeração iniciou no heteroátomo do anel pirano, representado na Figura 10, e assim seguiu-se para todos os derivados a seguir apresentados nesta dissertação (MCNAUGHT; SMITH, 1984) (SIMONIS; SCHUHMANN, 1917).

A análise de ^1H RMN (Figura 27), iniciou pela identificação do sinal do TMS, todos os valores de deslocamento são expressos em ppm em relação ao TMS, sendo assim o TMS é o ponto “zero” dos espectros e dos mapas de correlação, entenda este para todos os espectros realizados. Por seguinte, foi realizada a identificação do sinal do solvente utilizado, para o derivado cumarínico o presente estudo utilizou como solvente a acetona deuterada. O sinal deste solvente, para espectros de ^1H RMN, se apresenta como um *quint* com um deslocamento de valor de 2.05ppm e o sinal de ^{13}C RMN se apresenta como um setupletto em δ 28.9ppm. Todos os derivados foram analisados em DMSO- d_6 .

Figura 27 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS) para o composto 3.

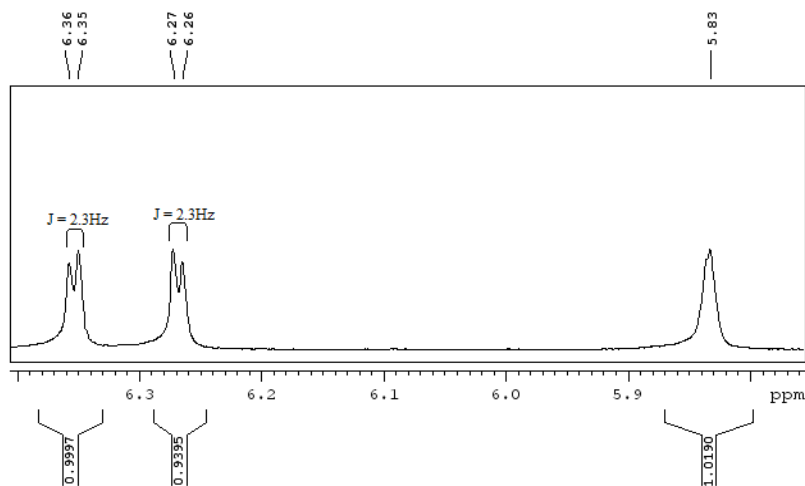


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

A análise de ^1H RMN (Figura 11), iniciou pela identificação do sinal do TMS, todos os valores de deslocamento são expressos em ppm em relação ao TMS, sendo assim o TMS é o ponto “zero” dos espectros e dos mapas de correlação, entenda este para todos os espectros realizados. Por seguinte, foi realizada a identificação do sinal do solvente utilizado, o presente estudo utilizou os solventes CD_3COCD_3 , onde para espectros de ^1H RMN o sinal se apresenta como um *quint* com um deslocamento do sinal tem valor de 2.05ppm e o sinal de ^{13}C RMN setupleto em δ 28.9ppm, para a metilcumarina utilizada como esqueleto. Todos os derivados foram analisados em DMSO-d_6 .

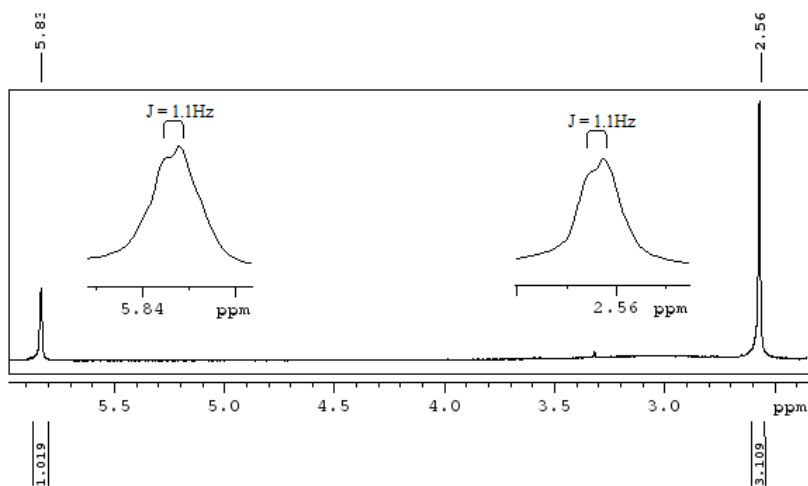
O espectro mostra quatro sinais, onde dois sinais de duplete em 6,35 (1H, H-6) e 6,27 (1H, H-8) ppm, com $J=2,3$ Hz, sinais característicos de H de anel aromático, onde os valores de J destes dois hidrogênios sugerem ser substituintes do mesmo anel, acoplando entre si, sendo o H δ 6.35 *d* em posição *meta* em relação a δ 6,27 *d* (Figura 12). Os outros dois sinais observados também foram dois dupletos 5,83 (1H, H-3) ppm, indicativo de H de anel e/ou alceno com $J=1,1$ Hz e 2,56 (3H, H-9) ppm, com $J=1,1$ Hz indicando ser H de metil. E a constante de acoplamento destes dois sugere ser substituinte do mesmo sistema de anel, com uma interação alílica, δ 5,83 *d* e δ 2,56 *d* (Figura 13).

Figura 28 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, CD_3COCD_3) para o esqueleto da cumarina, o derivado 5,7-dihidroxi-4-metilcumarina ampliado entre 5.7ppm - 6.4ppm.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

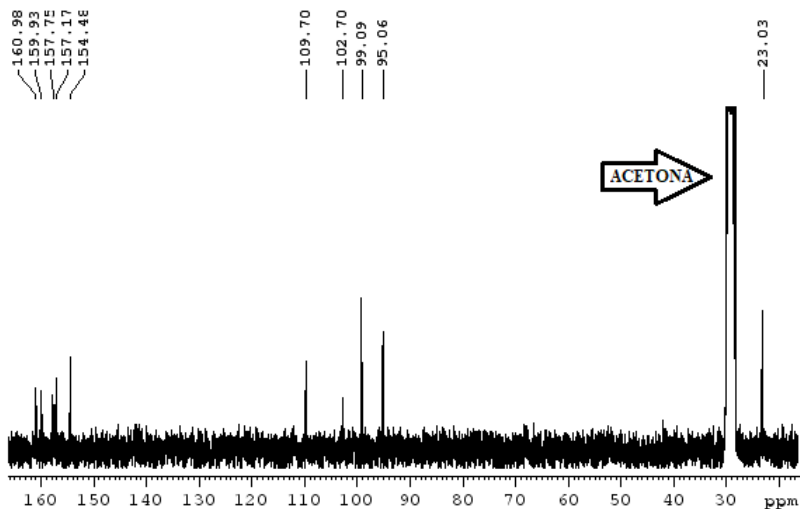
Figura 29 – Espectro de ^1H RMN (75Hz, TMS, CD_3COCD_3) para o esqueleto da cumarina, o derivado **3** ampliado entre 2.8ppm - 5.6ppm.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Evidenciou-se a presença de um sistema de dois anéis com a presença de uma metila. Quando observado o espectro de RMN ^{13}C , observou-se 10 sinais, sendo os seus deslocamentos com valores de δ 160,9; 159,9; 157,7; 157,1; 154,4; 109,6; 102,6; 99,0; 95,0; 23,0 ppm; o que corresponde com a molécula sintetizada em questão.

Figura 30 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, CD_3COCD_3) do derivado 3.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Utilizando o mapa de correlação HSQC (Figura 31) permitiu identificar as correlações de 1J de todos os hidrogênios e carbonos ligados. Foi possível observar o CH_3 em δ 2,56/23,0, valor de carbono este que característico de carbono sp^3 , os três CH δ 5,83/109,6; δ 6,27/95,0 ; δ 6,35/99,0. Assim permitindo identificar as posições 3, 6, 8 e 9.

Para a finalização o mapa de correlação HMBC (Figura 32) permitiu identificar os C quaternários. Foi possível observar correlações H-9 com carbonos C-4 (δ 154,4ppm), C-3(δ 109,6), C-4a (δ 102,6ppm).

Figura 31 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, CD_3COCD_3) para o derivado **3**.

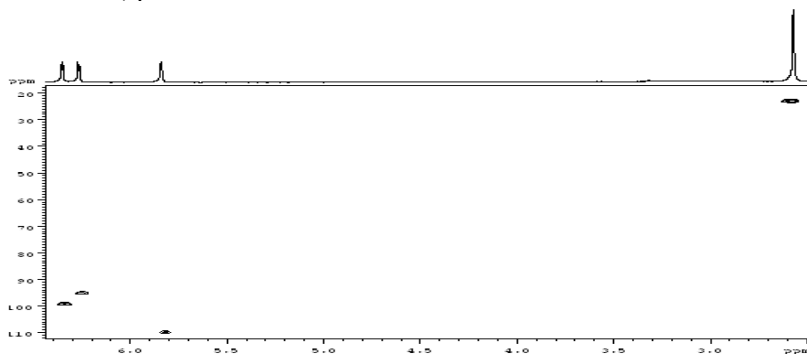


Figura 32 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, CD_3COCD_3) para o derivado **3**.

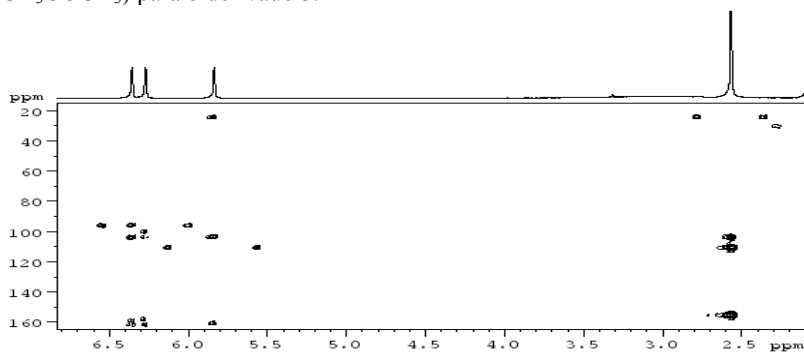
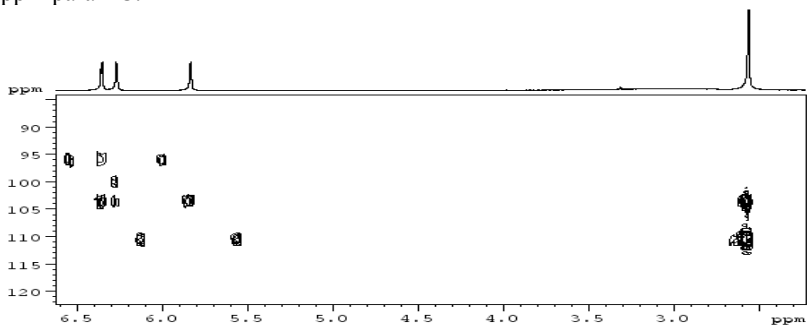


Figura 33 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, CD_3COCD_3) o derivado **3**, ampliado na região 3.4.0 - 6.6 ppm para ^1H e 85-125 ppm para ^{13}C .



Quando analisamos no mapa de correlações HMBC quanto as correlações do H-3, há a correlação 1J confirmando estar ligado ao C-3, ainda é possível observar correlações com os C-9 e C-4, e confirmou o C-4a (δ 102,6ppm). Por conseguinte, observa-se uma correlação com o sinal do carbono C-2 (δ 160,9ppm), característico de estercíclico. As correlações de H-8 com carbonos C-6 (δ 99,0ppm), C-7 (δ 157,1 ppm), e C-8a (δ 159.9ppm); e ainda o H-6 correlacionando com o C-4a, C-5 (δ 157,7ppm); permitindo assim caracterizar o composto como sendo a metilcumarina sintetizada esperada, tendo os valores todos expostos na tabela 1 e comparados com a literatura dos autores Qian e Suo de 2005.

Tabela 1 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, CD_3COCD_3) para o composto **3**, e dados comparativos da literatura.

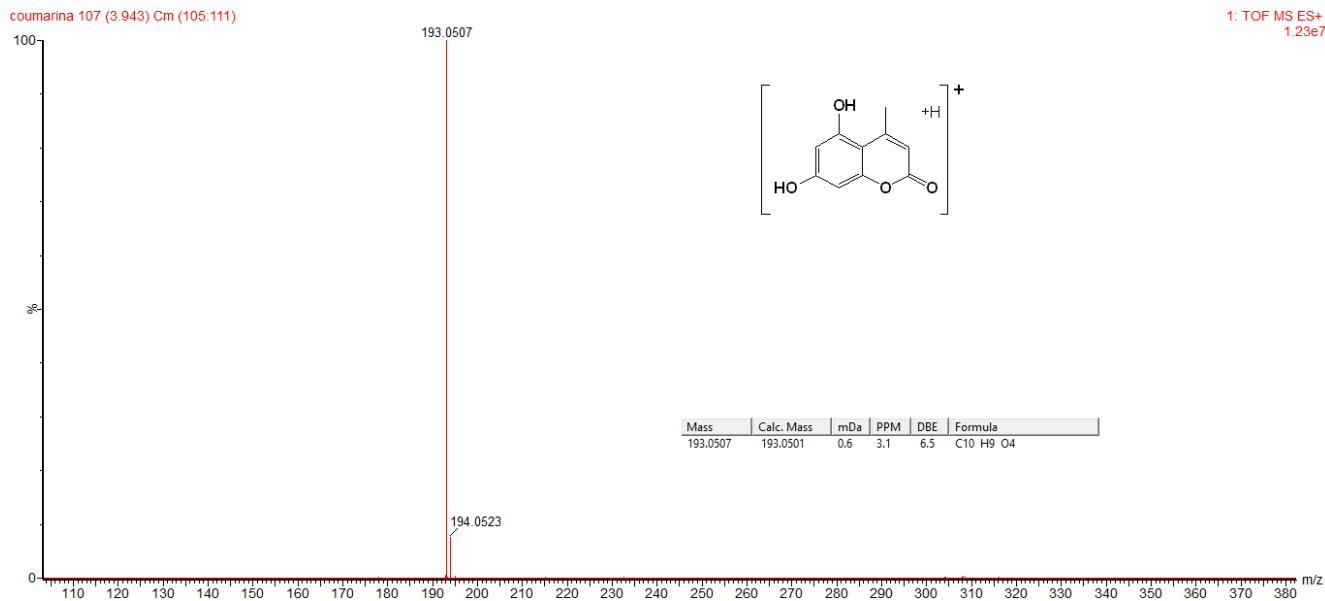
Posição	3		(QIAN & SUO; 2005)	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	160,9	-	-
3	5,83 <i>d</i> (1.1)	109,6	5,83 <i>s</i>	-
4	-	154,4	-	-
5	-	157,7	9,57 <i>s</i>	-
6	6,35 <i>d</i> (2.3)	99,0	6,36 <i>d</i> (2,4)	-
7	-	157,1	9,57 <i>s</i>	-
8	6,27 <i>d</i> (2.3)	95,0	6,27 <i>d</i> (1.6)	-
9	2,56 <i>s</i> -	25,3	2,63 <i>s</i>	-
4a	-	102,6	-	-
8a	-	159,9	-	-
	<i>(300 MHz ^1H, 75 MHz ^{13}C, acetona-<i>d</i>6)</i>		<i>(400 MHz ^1H, acetona-<i>d</i>6)</i>	

Os sinais de RMN do H-5 e do H-7 não foram possíveis de serem observados, diferente do apontado na literatura. Os H em questão são os pertencentes as hidroxilas nestas posições. A explicação pode ser uma baixa concentração do composto na amostra utilizada, ou a diferença da potência dos equipamentos.

5.1.1.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Na análise de confirmação de massa molecular foi utilizada a massa de alta resolução . O espectro (Figura 34) apresentou um pico com relação massa carga (m/z) de 193.0507, o qual corresponde a fórmula $[\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4+\text{H}]^+$, onde a massa molecular teórica calculada é de m/z 193.0501.

Figura 34 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o composto **3**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.1.2 Síntese da 8-amino-10-(4-clorofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (4)

Após a obtenção do esqueleto metilcumarina, os derivados piranocumarínicos foram obtidos através da estratégia da reação de multicomponentes. Esta estratégia consistiu em, um único sistema, misturar o derivado cumarínico, mais a malononitrila, ou o metilcianoacetato, e mais o benzaldeído, todos na presença do catalisador K_2CO_3 (KARAMI; KHODABAKHSI; ESKANDARI, 2012).

Figura 35 - Esquema de reação dos derivados com esqueleto cumarínico e função amino na posição 9.

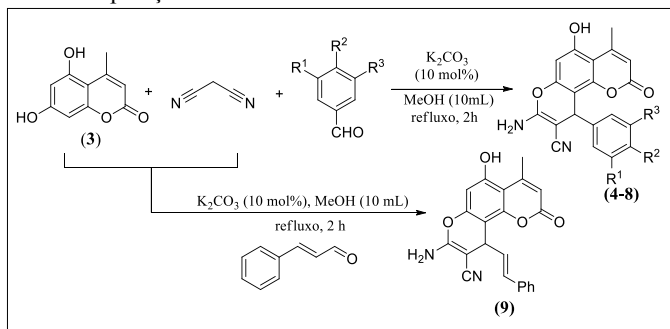
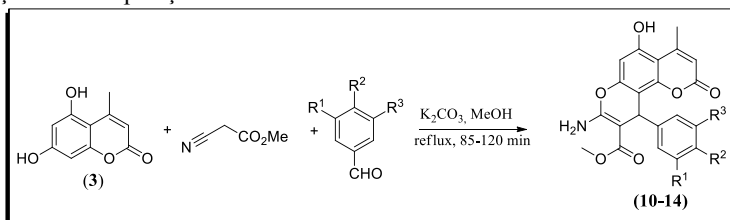


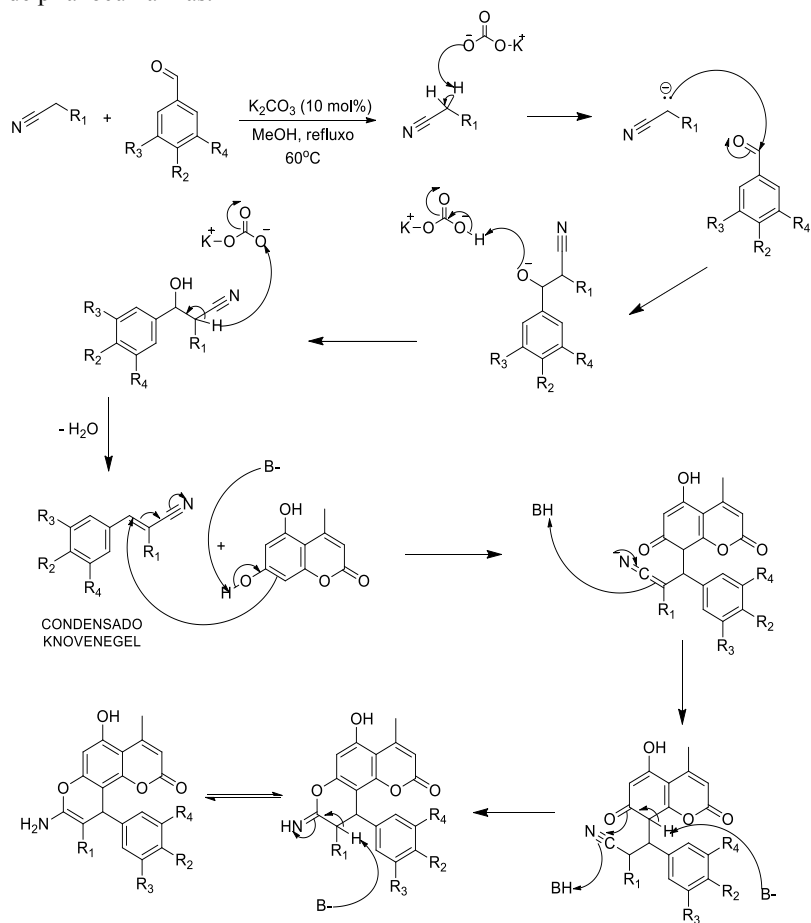
Figura 36 - Esquema de reação dos derivados com esqueleto cumarínico e função éster na posição 9.



A proposta de mecanismo de formação (Figura 18) envolve primeiramente a formação do condensado de Knoevenagel. Este produto se forma através do resultado da condensação do benzaldeído com a malononitrila ou metilcianoacetato. O subproduto em questão é um acceptor de Michael, por consequência o próximo passo proposto é a ocorrência de uma adição de Michael na dihidroxicumarina com o produto da condensação. A etapa final proposta ocorre logo depois, que

é a ciclização, formando assim os derivados pirano[2,3-*f*]cumarínicos (KARAMI; KHODABAKHSI; ESKANDARI, 2012).

Figura 37 – Proposta de mecanismo de formação para a obtenção dos derivados de piranocumarinas.



A reação de Knoevenagel é amplamente empregada na síntese de cumarinas e seus derivados, que são importantes matérias-primas para a produção de cosméticos, perfumes e compostos com outras aplicações farmacêuticas. Na condensação de Knoevenagel os aldeídos reagem com compostos que possuem ligação C-H ácida e se condensam,

neste estudo foram utilizados a malononitrila e o metilcianoacetato, reagentes onde o metileno é vizinho a um ou mais grupos, CN e COOR.

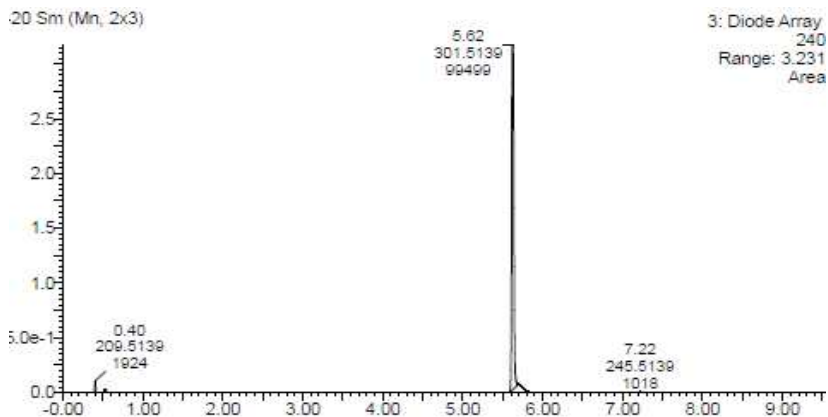
Logo, compostos β -cetoácidos e β -cianoésteres são metilênicos ativos, substâncias que apresentam ligação C-H ácida. O K_2CO_3 , confere ao meio um caráter básico, isto favorece a desprotonação do metileno ativo; seguido da adição do íon do C ao composto carbonílico, com uma eliminação de água a partir do intermediário aldólico. Por esta razão essa é uma reação pertencente à classe geral das condensações aldólicas catalisadas por bases (MARCH, 1992) (KURTI; CZAKÓ, 2005).

O solvente selecionado também favorece a condensação, estudos reportaram que a utilização de solventes próticos como etanol, metanol, e principalmente água, aceleraram a velocidade da reação do que quando utilizou-se solventes como tolueno ou tetracloreto de carbono, este efeito só pode ser explicado pela solvatação alta dos reagentes e catalizador (KURTI; CZAKÓ, 2005).

O produto da condensação é um aceptor de Michael devido a sua nitrila α,β -insaturada anexa ao anel aromático e favorece a adição desse nucleófilo ao C-8, carbono este na posição β da carbonila insaturada, da cumarina sintetizada. Após o tautomerismo da forma enol menos estável para a forma ceto mais estável, ocorre a ciclização através da captura do H no ponto da adição favorecendo a formação do enol menos estável novamente e este elétron livre do O interage com CN ocorrendo assim a ciclização (KURTI; CZAKÓ, 2005).

Para o derivado (4) o benzaldeído utilizado foi o 4-clorobenzaldeído, o tempo de reação foi de 20 minutos e o grau de pureza do composto foi de 97.1% via LC-MS.

Figura 38 - Cromatograma do derivado 4 por CLUE-PDA.



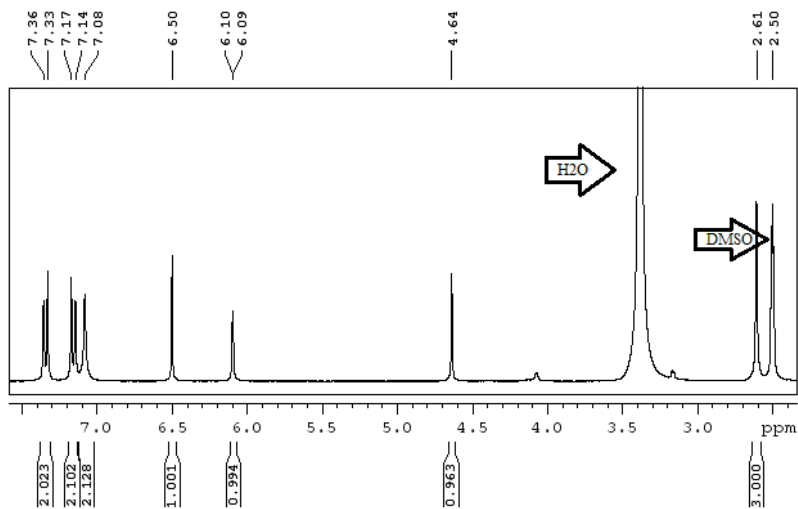
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.1.2.1 Caracterização Estrutural por RMN

Iniciando a análise de ^1H RMN (Figura 39) os sinais da cumarina utilizada como esqueleto foram observados, um singlete integrando para 1H com deslocamento de δ 6,49ppm (H-6), característico de C aromático. Outros sinais característicos também foram observados como o *d* δ 6,09ppm com $J=1.1\text{Hz}$, indicando ser um H de olefina de anel com acoplamento alílico, correspondente ao H-3 do anel pirano e o *s/l* com deslocamento em 2,60ppm; indicativo de C sp^3 , integrando pra 3 hidrogênios (H-11).

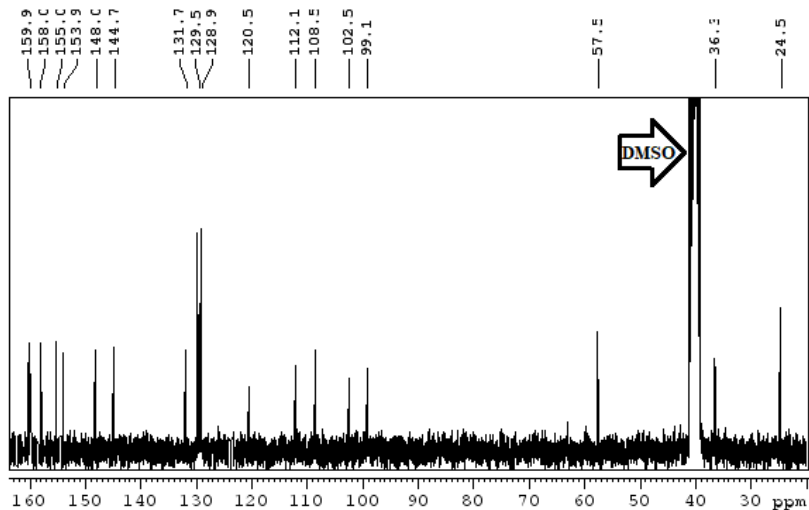
Para determinar com clareza o esqueleto metilcumarina foi possível observar no mapa de correlação HSQC foi possível observar as correlações 1J , o carbono sp^3 (C-11) aos 3H com deslocamento em δ 24,5ppm, foi também observado o H-6 correlacionando com C δ 99,1ppm, característico de carbono aromático (C-6) e por fim, para a caracterização do esqueleto a correlação do H-3 (δ 6,09ppm), com o carbono de deslocamento δ 112.1ppm (C-3).

Figura 39 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 4.



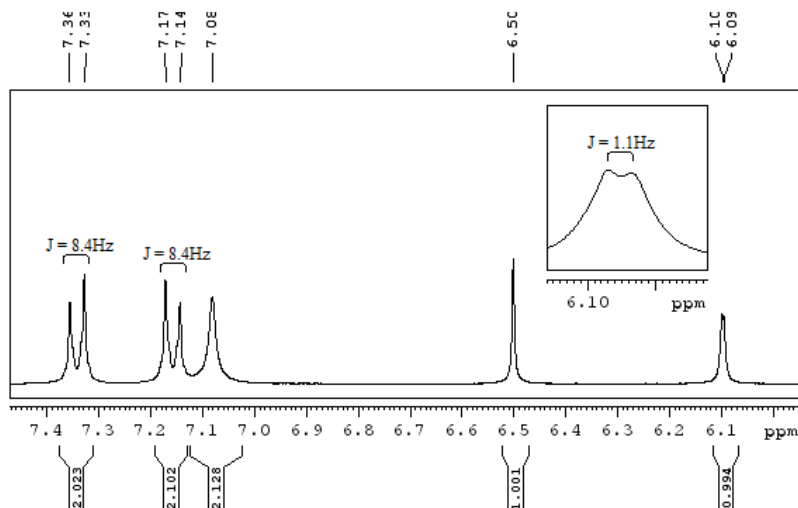
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 40 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d_6) o derivado 4.



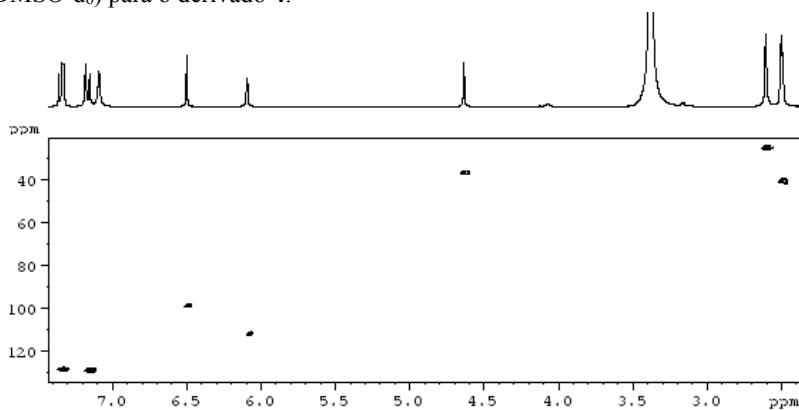
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 41 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 4, ampliado entre 7.5 ppm - 6.0 ppm.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 42 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO-d_6) para o derivado 4.

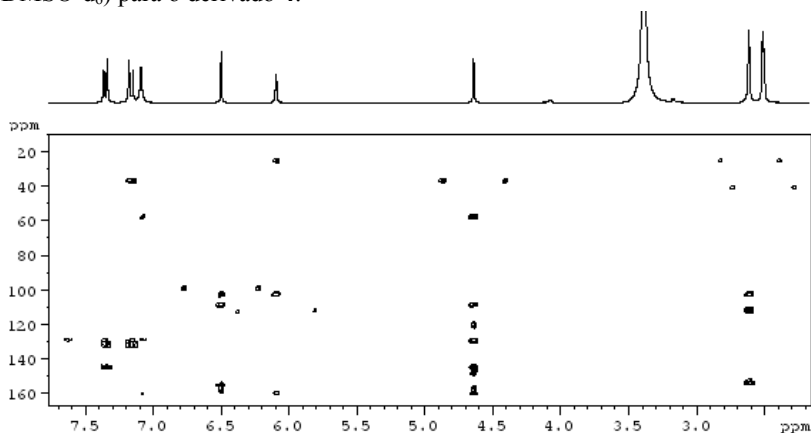


Os sinais mais desblindados no espectro foram dois sinais de *d* com deslocamento em δ 7.34 e δ 7.15 ppm. Os dois sinais integram pra dois H e constante de acoplamento de valor 8.4Hz, valor de constante de acoplamento em *orto* característicos de H de anel aromático *para*-substituído ligado ao sistema piranocumarínico. Na seqüência foram

correlacionados os C aos quais estes hidrogênios estão ligados através do mapa de correlações HSQC. Este apresentou as correlações dos 4H aromáticos, os 2 hidrogênios em δ 7.34 ppm correlacionam com os C com valor de deslocamento δ 128,9ppm (2C), sendo estes os C-2',C-6'. O mesmo mapa permitiu identificar também os 2H em δ 7.15 ppm correlacionando com os carbonos δ 128,9 ppm (2C)..

No espectro de ^1H RMN foram observados mais dois singletos, um ressonando em δ 7,08ppm e integrando para dois H e o sinal em δ 4,63ppm, o primeiro sinal não foi possível ver a correlação dele com o ^{13}C , o que indica que eles estejam ligados a um heteroátomo e não à carbono e estes então só podem ser os H do NH_2 na posição C-8. Já para o outro s o mapa de correlação HSQC permitiu observar a correlação com o C com valor de deslocamento em δ 36,3ppm, atribuído ao carbono de metino, e o valor de deslocamento pode ser explicado devido ao efeito de proteção do cone do substituinte aril, e/ou a tripla ligação CN ligada ao C-9. Logicamente que a confirmação foi possível devido ao mapa de correlação HMBC, que é um mapa de correlação da interação spin-spin a longa distância de átomos de carbono e hidrogênio.

Figura 43 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO-d_6) para o derivado 4.



O sinal 4,63 δ é um sinal característico desta série de compostos, mas primeiramente objetivou-se caracterizar ainda mais o sistema cumarina, assim analisando as correlações do H-11 é possível observar a correlação 1J com C em 24,5 ppm; logo após é possível observar correlações com o 112,1ppm (C-3), confirmando a posição do

C-11 ligado ao C-4 auxiliado pela correlação observada com o C δ 102,5ppm (C-4a) e o C δ 153,9, indicativo de carbono olefínico de anel, o C-4. Ainda das correlações do H-3, é possível ver uma fraca correlação com o sinal δ 159,9ppm indicando uma carbonila de éster confirmando como sendo o C-2. Estes deslocamentos, quando comparados com os dados do produto de partida utilizado como esqueleto são muito semelhantes.

Observando o mapa de correlações quanto ao H-6, é possível observar a sua correlação em 1J , confirmando o carbono indicado no HSQC, correlacionando com o C-4a, e também com o C δ 108.7 (C-10a), carbono este também indicando a metilcumarina presente na molécula, este último sinal também tem correlação com o H-10. O sinal principal, mais tarde identificado como sinal diagnóstico, foi o H-10, pois este hidrogênio deve correlacionar tanto com o esqueleto piranocumarina, quando ao anexo aril. O hidrogênio em questão teve deslocamento de δ 4,63ppm e o 1J foi confirmado por HMBC, a correlação com o C-2' e/ou C-6' foi observado, assim como a correlação com C-10a. Ainda foi possível confirmar a posição CN em C-9, sendo observada a correlação com o C com deslocamento químico em 57,6 ppm, correlação esta também observada nos 2 hidrogênios ligados ao N. Os hidrogênios do NH₂ tem uma correlação fraca com C-8 (δ 160,1 ppm).

As demais atribuições foram realizadas atribuindo os sinais de C de acordo com as correlações observadas. Quanto ao anexo aril os sinais de H-2' ou H-6' tem uma correlação forte em 3J com o carbono com deslocamento em C-4' (δ 144,7ppm), ligado ao halogênio cloro. Tanto estes H quanto aos H-3' ou H-4' tem correlação observada com o carbono δ 131,6 ppm, e este C também tem correlação com o sinal diagnóstico, sendo então caracterizado pelo C-1'.

O C com deslocamento em C-6a (δ 158,0 ppm), característico de carbonila com dupla ligação ou anel aromático, possui correlação com o H-6 e um 3J com o H-10. O carbono com valor de deslocamento de C-12 (δ 120,4 ppm) tem correlação forte apenas com o sinal diagnóstico, o que caracteriza como C da tripla ligação com o nitrogênio, e o C-5 foi caracterizado como sendo o C com deslocamento de δ 155,0 ppm, pois este é correlacionado apenas com o H-6 e o C com valor δ 148,0 ppm o C-10b, comprovando um carbono ligado a heteroátomo eletronegativo em anel.

Tabela 2 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **4** e comparação com literatura.

Posição	DERIVADO 4		(KARAMI, B., KHODABAKHSHI, S., ESKANDARI, K.; 2012)	
	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	159,9	-	159,8
3	6,09 <i>d</i> (1.1)	112,1	6,08 <i>s</i>	112,0
4	-	153,9	-	153,7
5	-	155,0	-	154,9
6	6,49 <i>s</i>	99,1	6,51 <i>s</i>	99,0
7	-	-	-	-
8	-	160,1	-	160,0
9	-	57,5	-	57,5
10	4,63 <i>s</i>	36,3	4,66-	36,3
11	2,60 <i>sl</i>	24,5	2,62 <i>s</i>	24,5
12	-	120,5	-	120,4
4a	-	102,5	-	102,4
6a	-	158,0	-	157,9
10a	-	108,5	-	108,4
10b	-	148,0	-	147,9
1°	-	131,6	-	131,6
2°	7,15 <i>d</i> (8,4)	129,5	7,18 <i>d</i> (8,4)	129,4
3°	7,34 <i>d</i> (8,4)	128,9	7,35 <i>d</i> (8,4)	128,8
4°	-	144,7	-	144,6
5°	7,34 <i>d</i> (8,4)	128,9	7,35 <i>d</i> (8,4)	128,8
6°	7,15 <i>d</i> (8,4)	129,5	7,18 <i>d</i> (8,4)	129,4
NH₂	7,08 <i>s</i>	-	7,06 <i>s</i>	-
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)		(400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	

Este composto já foi sintetizado e reportado por Karami e colaboradores, e como podemos observar, os dados confirmam o sucesso da reação em sintetizar o composto em questão. Para os demais compostos desta série de aril piranocumarinas foi utilizado a mesma técnica, e os dados correlacionados foram elucidados como apresentado neste composto.

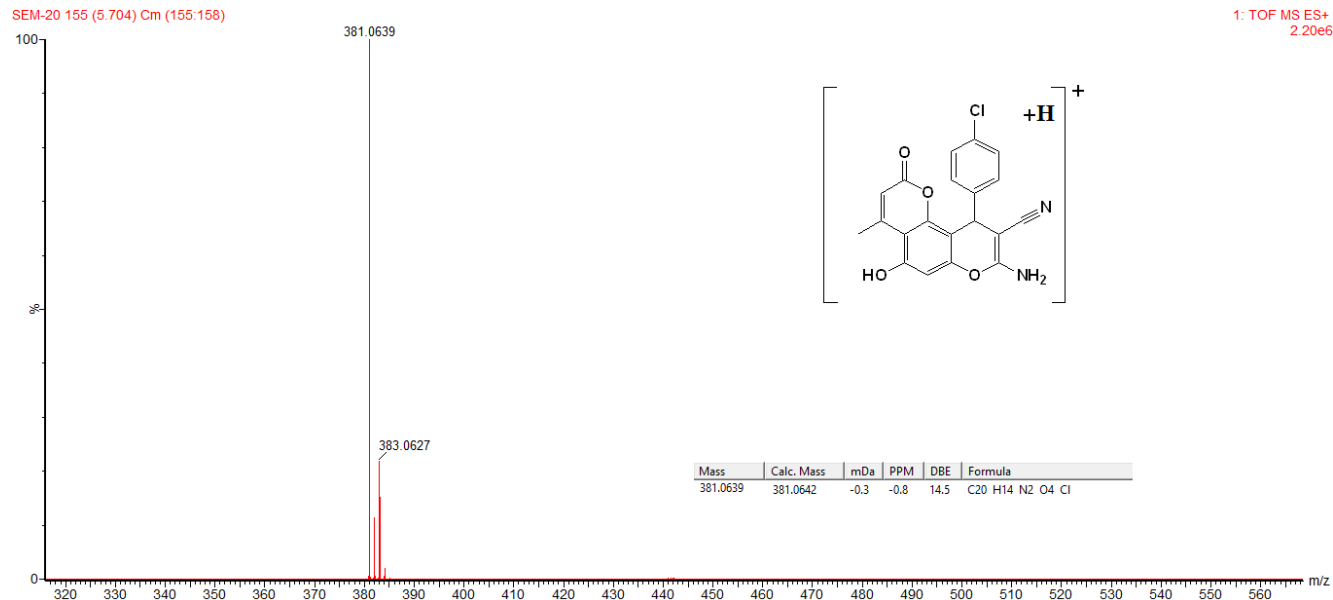
5.1.2.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Para confirmação da massa molecular, o composto foi submetido a uma análise por espectrometria de massas em sistema LC-MS/Q-TOF. O espectrograma (Figura 27) reportou dois picos com uma relação isotrópica 3:1 característico do átomo de Cl. O maior pico

apresentou um valor de relação massa carga (m/z) de 381.0639, $[\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4^{35}\text{Cl}+\text{H}]^+$, que teve massa teórica calculada em m/z 381.0642. O segundo pico apresentou valor de m/z 383.0627 o qual corresponde a massa do íon de fórmula $[\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4^{37}\text{Cl}+\text{H}]^+$ com valor teórico calculado em m/z 383.0608.

O espectro é característico do isótopo do elemento Cloro-35 e Cloro 37, a diferença da intensidade dos picos é explicada pela abundância destes isótopos na natureza, que é de 75,77% e 24,23% respectivamente.

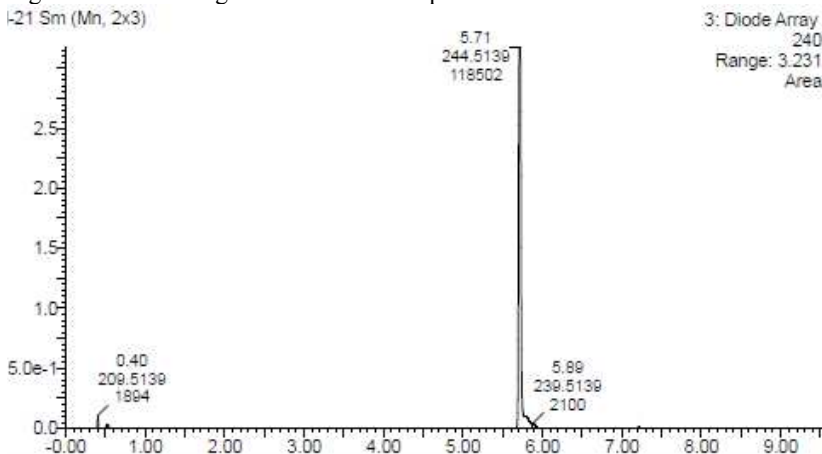
Figura 44 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 4. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.1.3 Síntese da 8-amino-10-(4-bromofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (**5**)

Para este composto o benzaldeído utilizado foi o 4-bromobenzaldeído, o tempo de reação foi de 30 minutos. A reação resultou em um precipitado com uma pureza de 98,2% (Figura 45).

Figura 45 - Cromatograma da derivado **5** por CLUE-PDA.

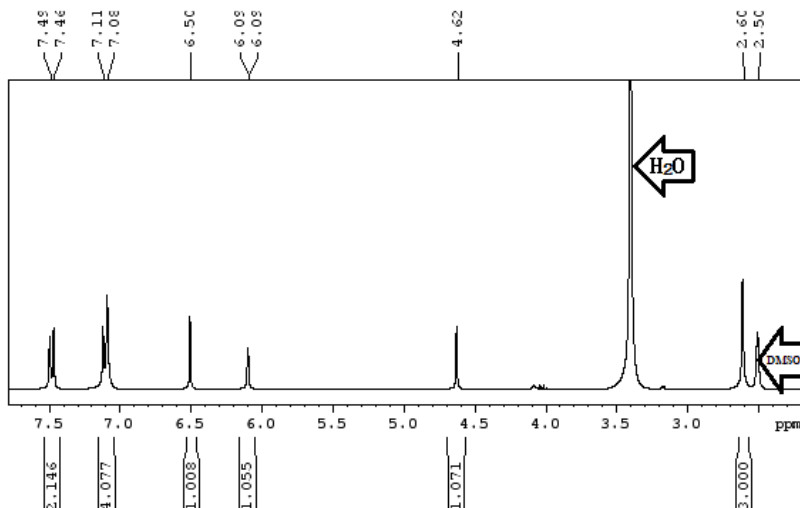


Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.1.3.1 Caracterização Estrutural por RMN

Como já apresentado na elucidação estrutural por RMN do composto anterior, foi realizada a identificação dos sinais do TMS e do solvente utilizado, DMSO- d_6 , no espectro de 1H RMN do derivado **5**. Os valores de deslocamento obtidos foram: um *s* em δ 6,49 integrando pra 1H, um *d* em δ 6,09 com constante de acoplamento de 0.90Hz integrando pra 1H, um singleto com valor de deslocamento em δ 4,62ppm integrando pra 1H e um *s* integrando pra 3H com deslocamento em δ 2,60ppm. Estes sinais são idênticos aos do derivado **4** caracterizando a metilcumarina presente no derivado.

Figura 46 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 5.

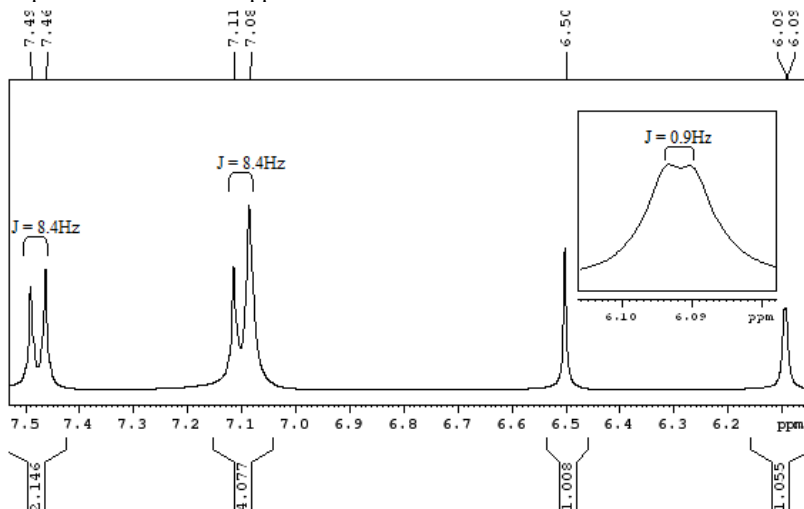


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Os sinais com valores de deslocamento em δ 7,47ppm e δ 7,10 são dois dupletos com valores de J iguais a 8,4Hz e ambos integram pra 2H, sinais característicos de hidrogênios de anel aromático com substituição *para*, o que comprova a presença do anexo aril a molécula. Comparado ao derivado 4 houve uma leve alteração nos valores de deslocamento, devido ao halogênio na posição *para* ter sido modificado do Cl para o Br alterando as características de blindagem dos prótons em questão. O valor de δ 7,08 integrando pra 2H confirma a função amino também presente.

A correlação dos sinais então foi sendo confirmada por correlação. Para dar maior suporte a esta caracterização foi realizada a correlação dos carbonos por meio da análise do espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) e o mapa de correlação HSQC.

Figura 47 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 5, ampliado entre 7.6 - 6.0 ppm.

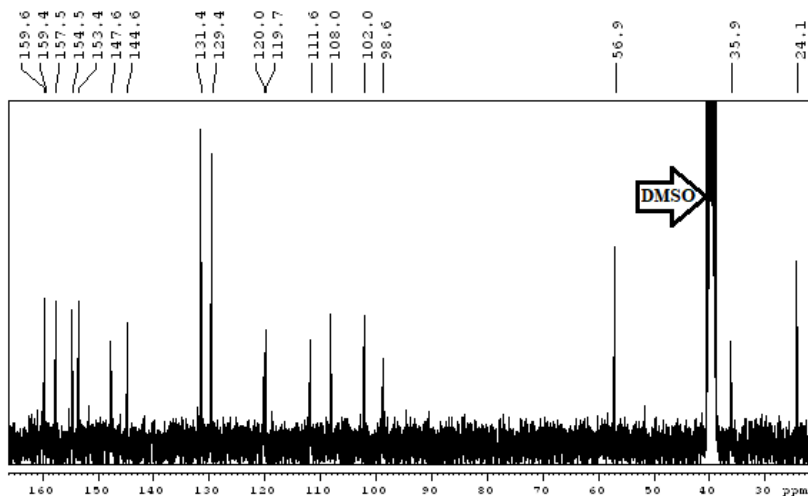


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Tabela 3 – Dados de ^1H RMN e (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o o derivado 5.

Posição	DERIVADO 5		DERIVADO 4	
	δ ^1H (ppm)	mult. (J Hz)	δ ^1H (ppm)	mult. (J Hz)
3	6,09	<i>d</i> (0,9)	6,09	<i>d</i> (1,1)
6	6,49	<i>s</i>	6,49	<i>s</i>
10	4,62	<i>s</i>	4,63	<i>s</i>
11	2,60	<i>s</i>	2,60	<i>sl</i>
2'	7,10	<i>d</i> (8,4)	7,15	<i>d</i> (8,4)
3'	7,47	<i>d</i> (8,4)	7,34	<i>d</i> (8,4)
5'	7,47	<i>d</i> (8,4)	7,34	<i>d</i> (8,4)
6'	7,10	<i>d</i> (8,4)	7,15	<i>d</i> (8,4)
NH ₂	7,08	<i>s</i>	7,08	<i>s</i>
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- <i>d</i> ₆)		(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- <i>d</i> ₆)	

Figura 48 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) o derivado 5.



O sinal δ 4,63 ppm no composto **4** foi identificado como sinal diagnóstico para conferir a presença do anel aril ligado ao esqueleto da piranocumarina sintetizada, então foram identificados estes pontos no espectro de HMBC. A substituição do halogenado na posição 4' provou-se por alterações nos valores de deslocamento dos carbonos do anel aromático anexo na posição C-10. O valor de maior alteração foi o C-1' onde o valor de deslocamento foi de δ 119,6, mas sua posição foi confirmada pelo mapa de correlação HMBC.

Figura 49 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado **5**.

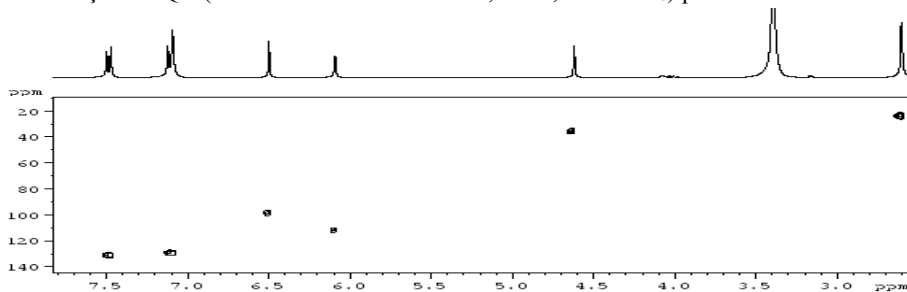


Figura 50 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado **5**, ampliado na região de 8.1 ppm - 3.5 ppm para ^1H RMN.

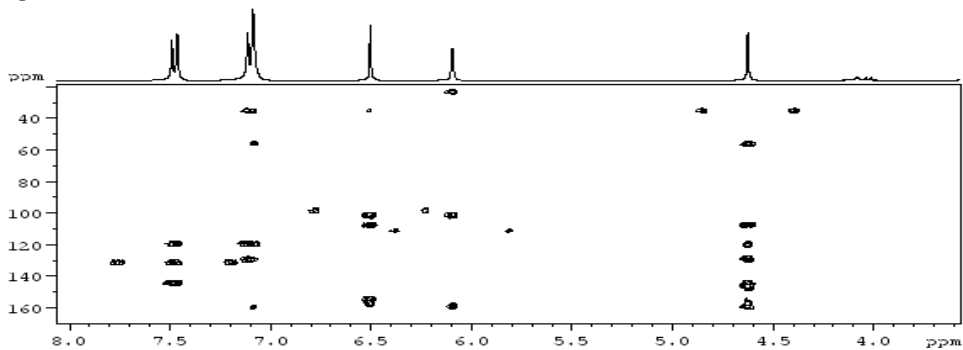


Tabela 4 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **5**, e comparação com derivado **4**.

Posição	DERIVADO 5		DERIVADO 4	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	159,4	-	159,9
3	6,09 <i>d</i> (0.9)	111,6	6,09 <i>d</i> (1.1)	112,1
4	-	153,4	-	153,9
5	-	154,5	-	155,0
6	6,49 <i>s</i>	98,6	6,49 <i>s</i>	99,1
7	-	-	-	-
8	-	159,6	-	160,1
9	-	56,9	-	57,5
10	4,62 <i>s</i>	35,9	4,63 <i>s</i>	36,3
11	2,60 <i>s</i>	24,1	2,60 <i>sl</i>	24,5
12	-	120,0	-	120,5
4a	-	102,0	-	102,5
6a	-	157,5	-	158,0
10a	-	108,0	-	108,5
10b	-	147,6	-	148,0
1°	-	119,7	-	131,6
2°	7,10 <i>d</i> (8,4)	131,4	7,15 <i>d</i> (8,4)	129,5
3°	7,47 <i>d</i> (8,4)	129,4	7,34 <i>d</i> (8,4)	128,9
4°	-	144,6	-	144,7
5°	7,47 <i>d</i> (8,4)	129,4	7,34 <i>d</i> (8,4)	128,9
6°	7,10 <i>d</i> (8,4)	131,4	7,15 <i>d</i> (8,4)	129,5
NH₂	7,08 <i>s</i>	-	7,08 <i>s</i>	-
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)		(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	

5.1.3.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Para confirmação da massa molecular o composto foi submetido a uma análise por espectrometria de massas em sistema LC-MS/Q-TOF. O espectro reportou dois picos de padrão isotópico 1:1, de praticamente mesma intensidade, característico do átomo de Br, com valores de relação massa carga (m/z) de 425,0123 ($[\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4^{79}\text{Br}+\text{H}]^+$), o valor teórico calculado para m/z 425,0137; e outro com m/z 427,0131 ($[\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4^{81}\text{Br}+\text{H}]^+$), com valor teórico calculado para m/z 427,0111).

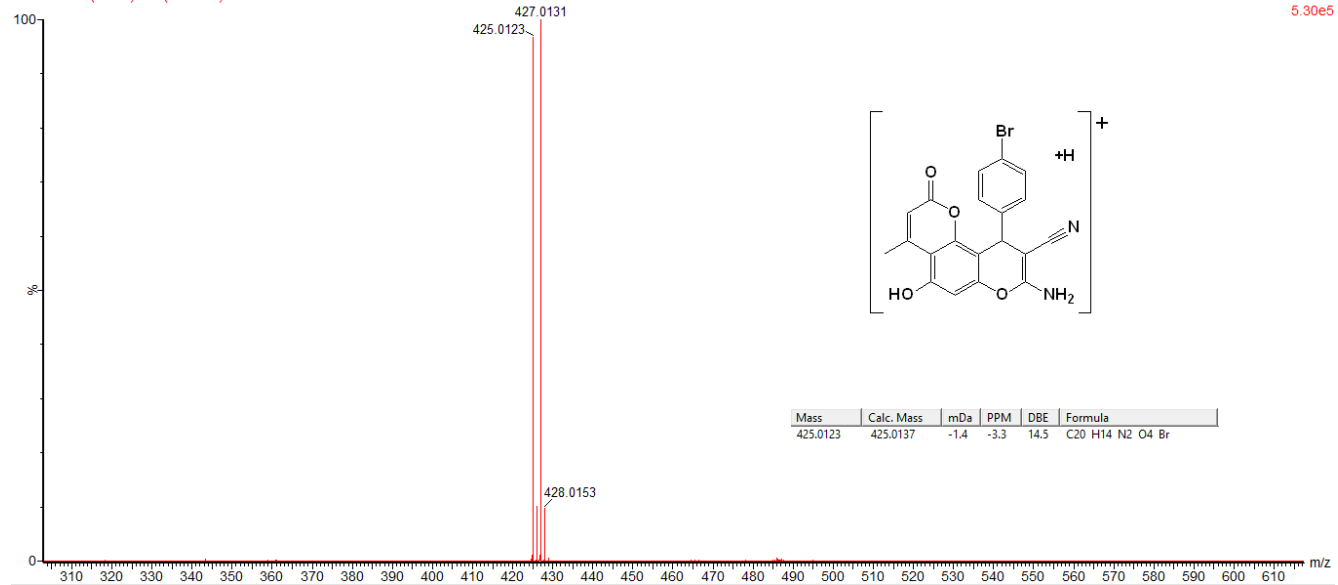
Os picos correspondem a massa do íon de fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br}$, os valores de m/z representam o padrão isotópico do ^{79}Br e o ^{81}Br , e a intensidade dos picos do espectro é explicada pela

abundância destes isótopos na natureza que é de aproximadamente 50% entre os isótopos.

Figura 51 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **5**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).

SEM-21 158 (5.814) Cm (157:162)

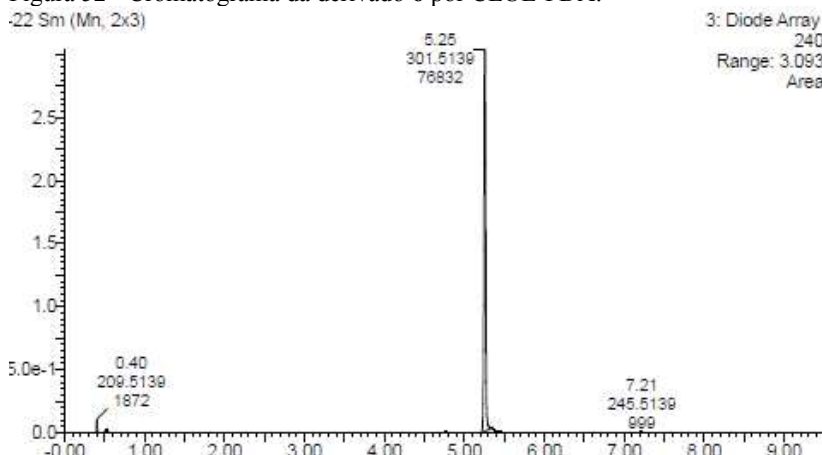
1: TOF MS ES+
5.30e5



5.1.4 Síntese da 8-amino-5-hidroxi-4-metil-10-(4-nitrofenil)-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (6)

O benzaldeído utilizado para este composto foi o 4-nitrobenzaldeído, e a primeira avaliação foi o tempo de reação que foi de 25 minutos. A reação resultou em um precipitado em forma de pó com uma pureza de 98,7% (Figura 52).

Figura 52 - Cromatograma da derivado 6 por CLUE-PDA.



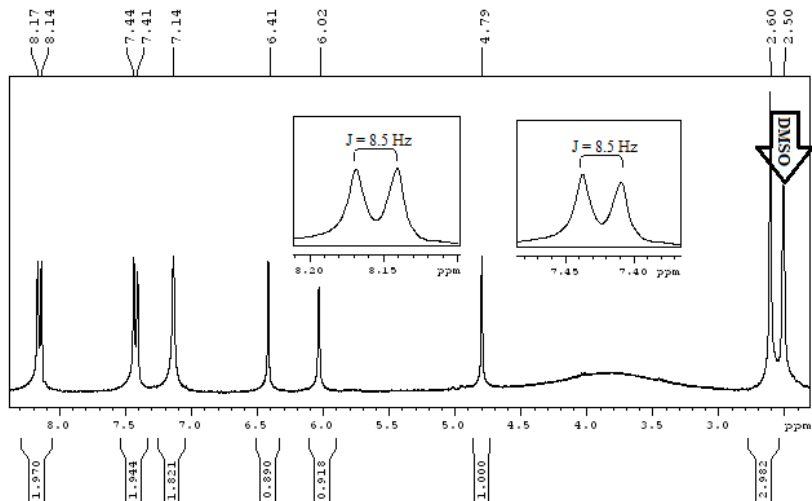
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.1.4.1 Caracterização Estrutural por RMN

A elucidação estrutural do derivado 6 seguiu a forma apresentada neste estudo. As alterações foram confirmadas através dos mapas de correlação HSQC e/ou HMBC. O derivado em questão já foi sintetizado e reportado por Karami e colaboradores no ano de 2017 (FARAHI et al., 2017).

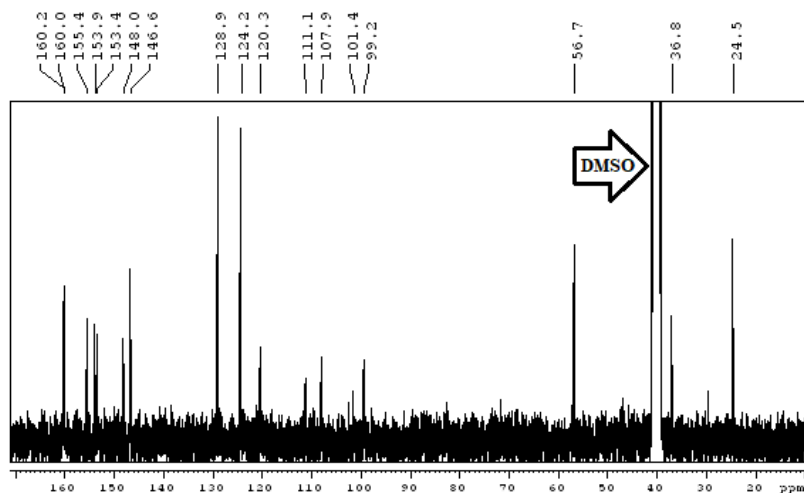
A única diferença observada, entre o derivado 4 e este, está no anel aril que mostra no espectro ^1H RMN e ^{13}C RMN dois deslocamentos mais desblindados. Foram observados, 2 dupletos com valores de C-3' e C-5' (δ 8,15ppm/124,2); C-2' e C-6' (δ 7,42ppm/128,9), ambos integrando pra 2H e com valor de constante de acoplamento de 8,5Hz.

Figura 53 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **6**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 54 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) do derivado **6**.



Uma vez os sinais do composto **6** identificados, os dados foram compilados em tabela. Como mencionado anteriormente, este derivado já foi reportado em literatura, então fez-se o comparativo com o derivado **5** e com os dados de literatura.

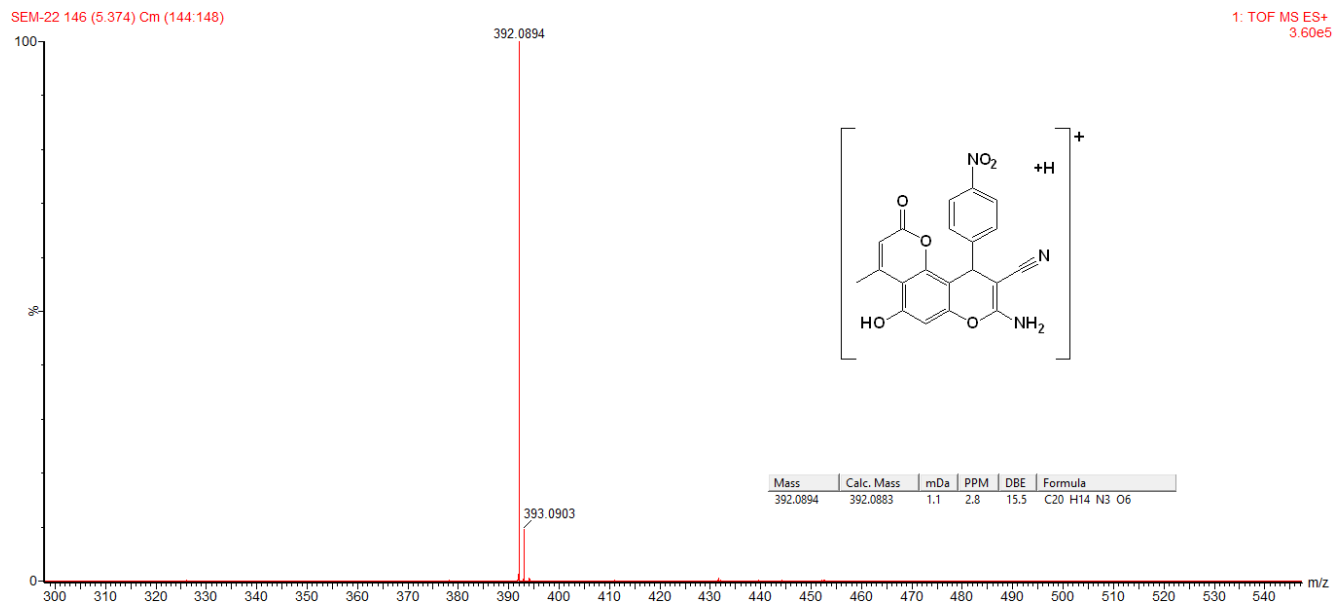
Tabela 5 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **6** e comparação com derivado **5** e literatura.

Posição	DERIVADO 6		DERIVADO 5		KARAMI 2017	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-	-	-
2	-	160,2	-	159,9	-	160,2
3	6,02 <i>sl</i>	111,1	6,09 <i>d</i> (1.1)	112,1	6,12 <i>s</i>	112,1
4	-	153,9	-	153,9	-	153,7
5	-	155,4	-	155,0	-	155,1
6	6,40 <i>s</i>	99,2	6,49 <i>s</i>	99,1	6,51 <i>s</i>	99,1
7	-	-	-	-	-	-
8	-	160,0	-	160,1	-	159,7
9	-	56,7	-	57,5	-	56,6
10	4,79 <i>s</i>	36,8	4,63 <i>s</i>	36,3	4,82 <i>s</i>	36,8
11	2,60 <i>sl</i>	24,5	2,60 <i>sl</i>	24,5	2,63 <i>sl</i>	24,4
12	-	120,3	-	120,5	-	120,1
4a	-	101,4	-	102,5	-	102,4
6a	-	-	-	158,0	-	157,9
10a	-	107,9	-	108,5	-	107,5
10b	-	148,0	-	148,0	-	147,9
1*	-	146,6	-	131,6	-	146,7
2*	7,42 <i>d</i> (8,5)	128,9	7,15 <i>d</i> (8,4)	129,5	7,44 <i>d</i> (8,4)	128,9
3*	8,15 <i>d</i> (8,5)	124,2	7,34 <i>d</i> (8,4)	128,9	8,18 <i>d</i> (8,0)	124,2
4*	-	153,4	-	144,7	-	153,1
5*	8,15 <i>d</i> (8,5)	124,2	7,34 <i>d</i> (8,4)	128,9	8,18 <i>d</i> (8,0)	124,2
6*	7,42 <i>d</i> (8,5)	128,9	7,15 <i>d</i> (8,4)	129,5	7,44 <i>d</i> (8,4)	128,9
NH₂	7,08 <i>s</i> (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	-	7,08 <i>s</i> (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	-	7,17 <i>s</i> (400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	-

5.1.4.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Para confirmar o composto, foi realizada a análise de confirmação de massa molecular, onde o espectro (Figura 55) apresentou um pico com relação massa carga (m/z) de 392,0894 que corresponde a massa do produto de reação mais uma molécula de hidrogênio $[\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_6+\text{H}]^+$, com valor teórico de massa calculada 392,0883.

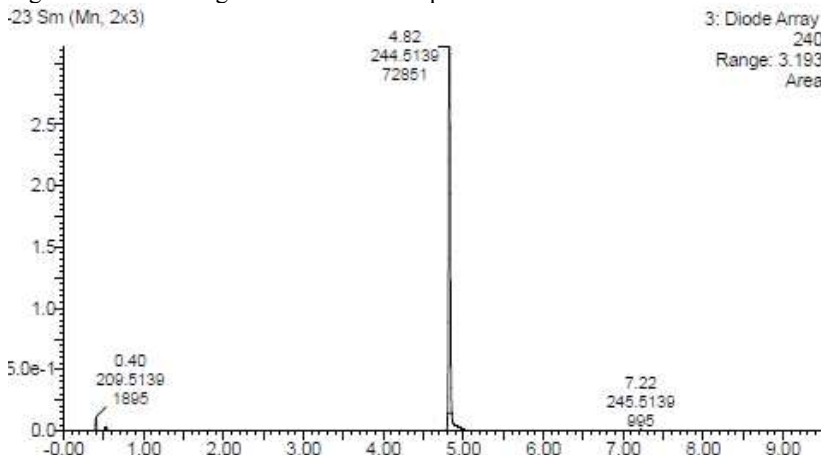
Figura 55 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 6. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.1.5 Síntese da 8-amino-10-(3,4-dimetoxifenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (7)

Para a obtenção do derivado em questão o benzaldeído utilizado foi o 3,4-dimetoxibenzaldeído, o tempo de reação foi de 40 minutos. Foi obtido através desta reação um produto com uma pureza de 98,6%.

Figura 56 - Cromatograma da derivado 7 por CLUE-PDA.



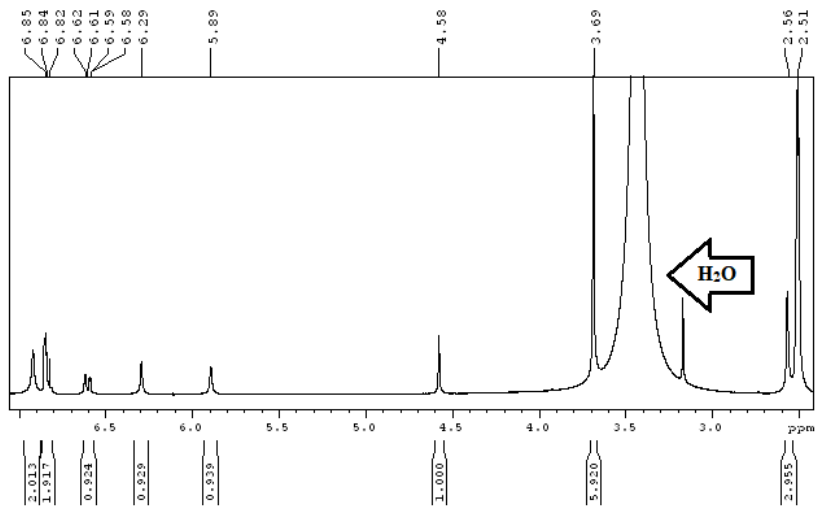
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.1.5.1 Caracterização por RMN

Observando o espectro de ^1H RMN do referente composto, foi possível observar os sinais característicos da pironocumarina. Para a caracterização do sistema aromático, o substituinte no C-10, foram observados sinais característicos de um sistema ABX, sistema de anel aromático com substituintes em *meta*, na região dos H aromáticos. Apesar de uma leve sobreposição de sinais, o espectro apresentou um *d* com deslocamento em δ 6,84ppm, com integração de 1H e com $J=1,8\text{Hz}$, sugerindo um acoplamento em *meta* com 1 hidrogênio. Após esse sinal foi observado o *d* em δ 6,83ppm integrando pra 1H com valor de acoplamento de 8,4Hz, sugerindo um acoplamento em *orto* e por fim foi observado um *dd* de 1 hidrogênio em δ 6,59ppm com duas constantes de acoplamento, uma em 8,4Hz e 1,8Hz, sugerindo que este H está

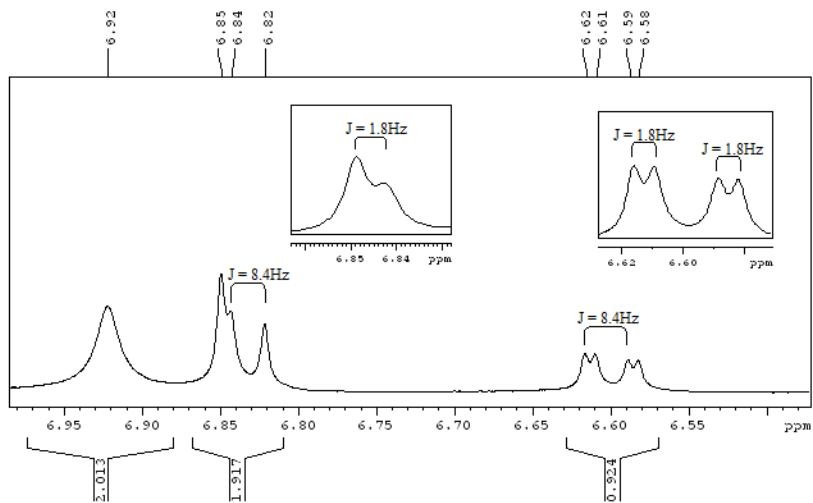
acoplando seu sinal com outros dois H, um na posição orto e outro na posição meta à sua posição

Figura 57 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 7.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

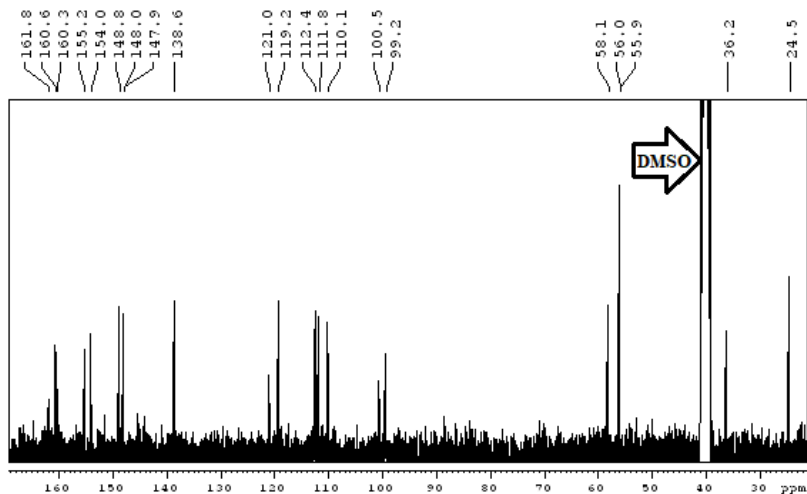
Figura 58 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 7 ampliado na área entre 7,00-6,45ppm.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Assim foram caracterizados estes sinais aos H do anel aromático em C-10, que é a única diferença nesta molécula sintetizada.

Figura 59 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 7.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Tabela 6 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 7 e comparação com derivado 4.

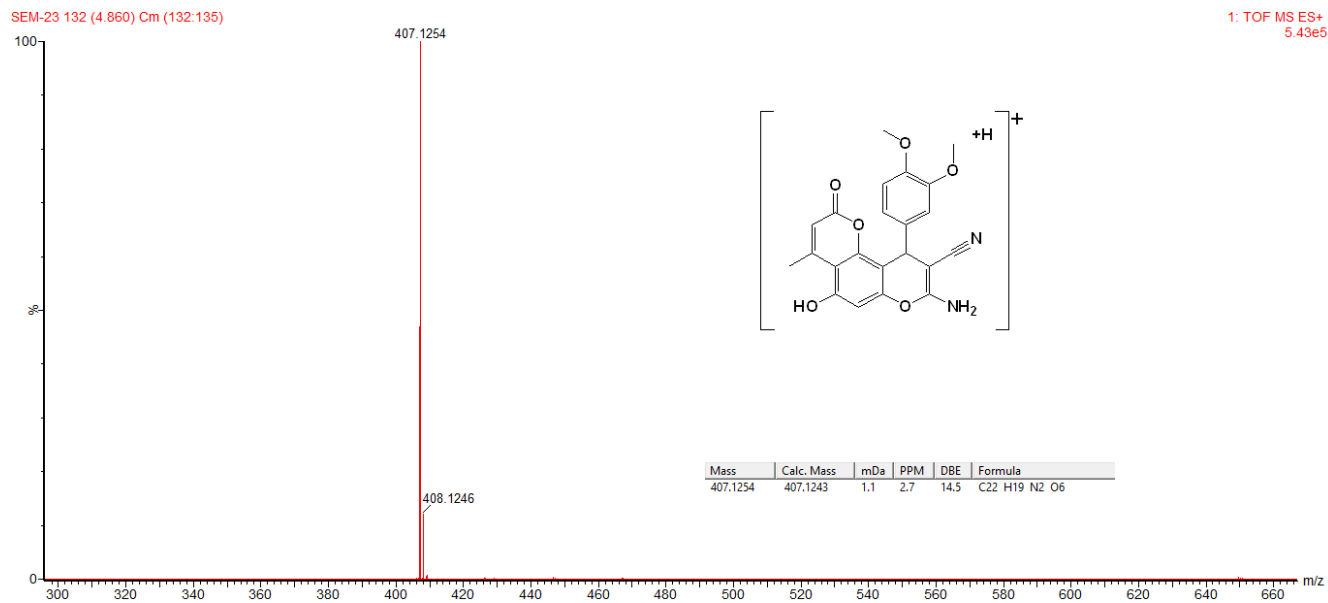
Posição	DERIVADO 7		DERIVADO 4	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	161,8	-	159,9
3	5,89 <i>sl</i>	110,1	6,09 <i>d</i> (1.1)	112,1
4	-	154,0	-	153,9
5	-	155,2	-	155,0
6	6,29 <i>s</i>	99,2	6,49 <i>s</i>	99,1
7	-	-	-	-
8	-	160,6	-	160,1
9	-	58,1	-	57,5
10	4,58 <i>s</i>	36,2	4,63 <i>s</i>	36,3
11	2,56 <i>s</i>	24,5	2,60 <i>sl</i>	24,5
12	-	121,0	-	120,5
4a	-	100,5	-	102,5
6a	-	160,3	-	158,0
10a	-	-	-	108,5
10b	-	148,8	-	148,0
1'	-	138,6	-	131,6

2'	6,60 <i>dd</i> (8,4; 1,8)	112,4	7,15 <i>d</i> (8,4)	129,5
3'	6,83 <i>d</i> (8,4)	119,2	7,34 <i>d</i> (8,4)	128,9
4'	-	147,9	-	144,7
5'	-	148,0	7,34 <i>d</i> (8,4)	128,9
6'	6,85 <i>d</i> (1,8)	111,8	7,15 <i>d</i> (8,4)	129,5
7'	3,59 <i>s</i>	56,0	-	-
8'	3,59 <i>s</i>	55,9	-	-
NH₂	6,92 <i>s</i>	-	7,08 <i>s</i>	-
	(300 MHz ¹ H, 75 MHz ¹³ C, DMSO- <i>d</i> ₆)		(300 MHz ¹ H, 75 MHz ¹³ C, DMSO- <i>d</i> ₆)	

5.1.5.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

O espectro reportou um pico intenso com valor de relação massa carga (*m/z*) de 407,1254, que é atribuído ao valor do ión da molécula sintetizada [C₂₂H₁₈N₂O₆+H]⁺, onde o valor teórico calculado foi de 407,1243, confirmando assim a massa do produto da reação como sendo o composto **7**.

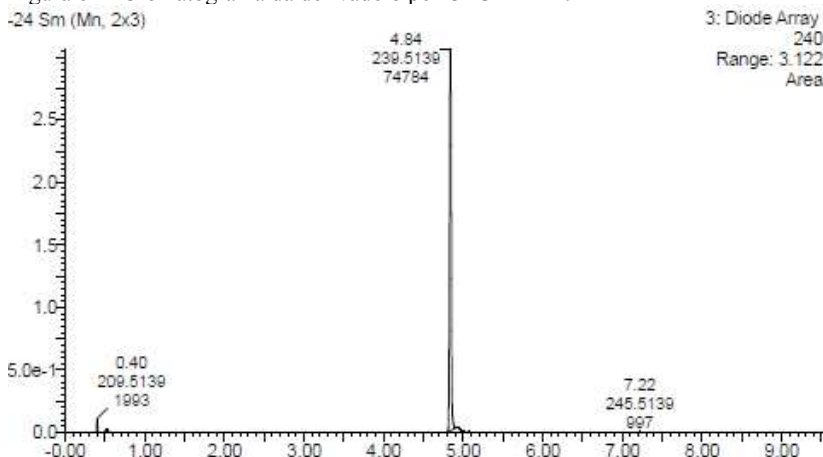
Figura 60 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado 7. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.1.6 Síntese da 8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (8)

Empregando o 3,4,5-metoxibenzaldeído como reagente, o tempo de reação foi de 40 minutos e resultou em um produto reacional com uma pureza de 98,7%.

Figura 61 - Cromatograma da derivado 8 por CLUE-PDA.

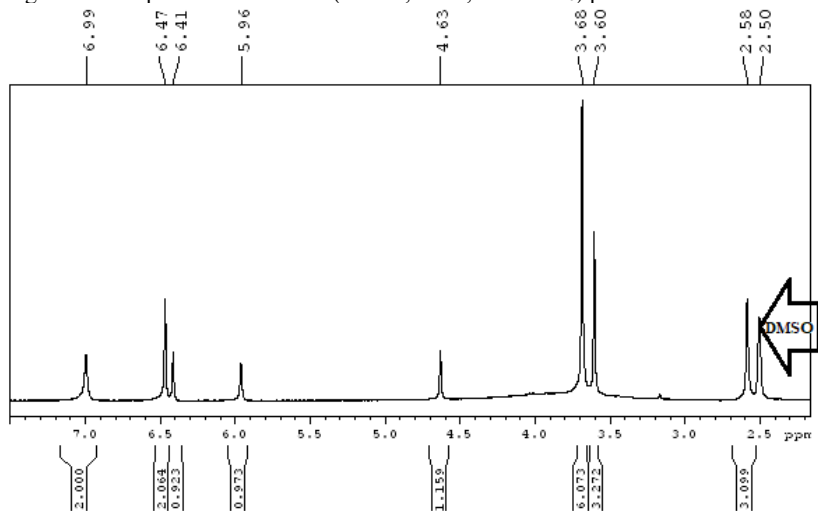


Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.1.6.1 Caracterização Estrutural por RMN

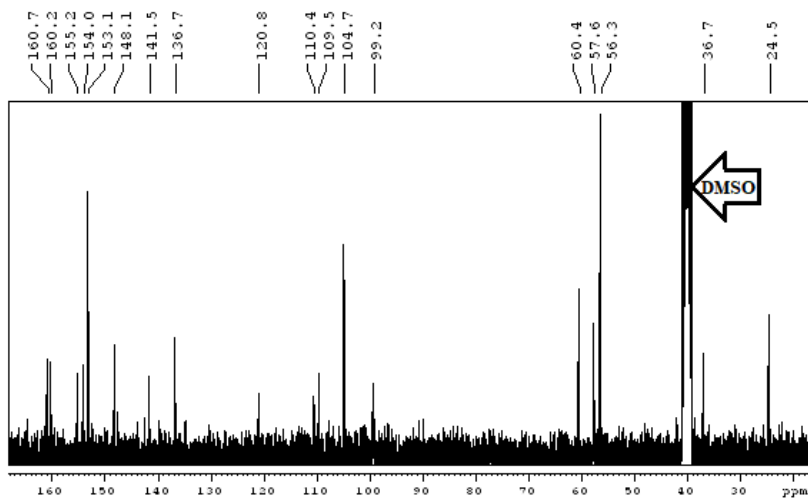
O espectro de ^1H NMR em 300 MHz (Figura 49) utilizando como solvente o DMSO-d_6 , apresentou no espectro sinais característicos já representados até a presente dissertação. Os sinais diferentes são os com deslocamento de δ 3,68ppm e δ 3,60ppm, dois *s* com valor de integração de 6H e 3H respectivamente, são carbonos característicos de metoxilas. Como o substituinte aril em C-10 é um anel de 6 membros trissubstituído, nas posições 3', 4', 5', com 3 metoxilas. Os hidrogênios com valor de deslocamento δ 3,68ppm estão divididos igualmente nas posições 7', 9'; e o outro singleto está na posição 8'. O *s* com deslocamento de δ 6,46ppm integrando pra 2 hidrogênios é indicativo de H presentes no sistema aromático, sendo os dois identificados sendo ligados aos C-2' e C-6', pois tem o mesmo valor de deslocamento

Figura 62 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **8**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 63 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **8**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Tabela 7 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **8** e comparação com derivado **7**.

Posição	DERIVADO 8		DERIVADO 7	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	160,7	-	161,8
3	5,96 <i>sl</i>	110,4	5,89 <i>sl</i>	110,1
4	-	153,1	-	154,0
5	-	154,0	-	155,2
6	6,41 <i>s</i>	99,2	6,29 <i>s</i>	99,2
7	-	-	-	-
8	-	160,2	-	160,6
9	-	57,0	-	58,1
10	4,63 <i>s</i>	36,7	4,58 <i>s</i>	36,2
11	2,58 <i>s</i>	24,5	2,56 <i>s</i>	24,5
12	-	120,8	-	121,0
4a	-	104,7	-	100,5
6a	-	155,2	-	160,3
10a	-	109,5	-	-
10b	-	148,1	-	148,8
1'	-	154,0	-	138,6
2'	6,47 <i>s</i>	104,7	6,60 <i>dd</i> (8,4; 1,8)	112,4
3'	-	136,6	6,83 <i>d</i> (8,4)	119,2
4'	-	141,5	-	147,9
5'	-	136,7	-	148,0
6'	6,47 <i>s</i>	104,7	6,85 <i>d</i> (1,8)	111,8
7'	3,68 <i>s</i>	56,3	3,59 <i>s</i>	56,0
8'	3,60 <i>s</i>	60,4	3,59 <i>s</i>	55,9
9'	3,68 <i>s</i>	56,3	-	-
NH₂	6,99 <i>s</i>	-	6,92 <i>s</i>	-
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)		(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	

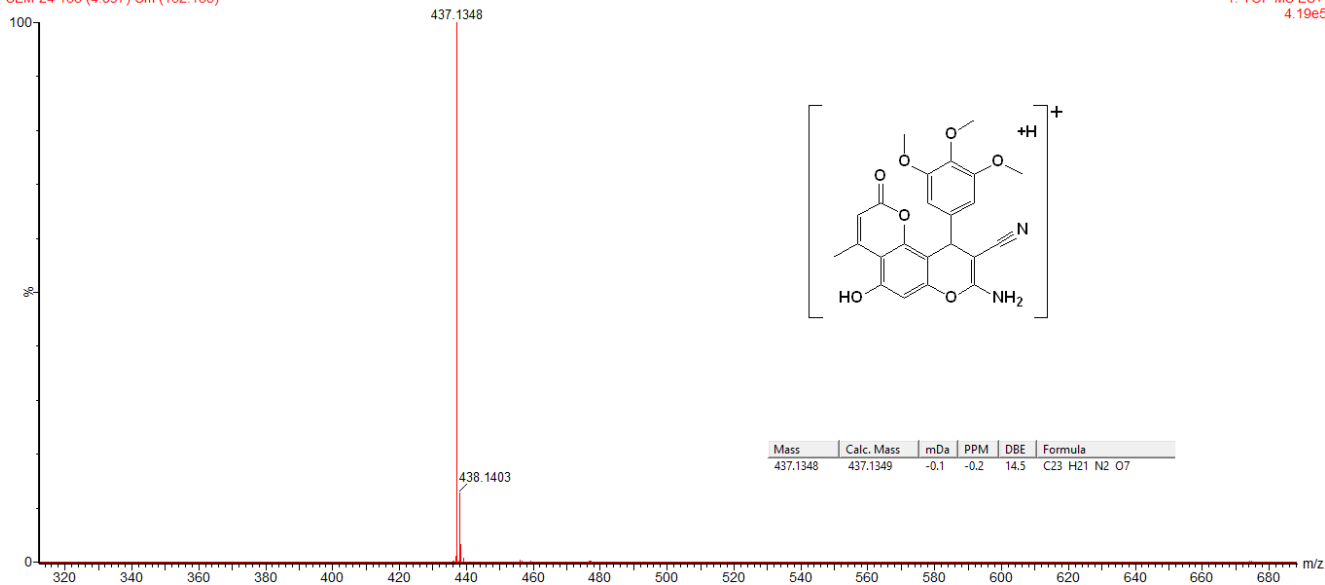
5.1.6.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Para confirmar a massa do produto de reação e confirmar ainda mais a caracterização do derivado, foi utilizada a massa de alta resolução. O espectro (Figura 64) reportou um pico com relação massa carga (m/z) de 437,1348 para a massa do cátion que corresponde a massa do produto de reação mais uma molécula de hidrogênio, $[\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7+\text{H}]^+$ com valor teórico de massa calculada 437,1349.

Figura 64 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **8**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).

SEM-24 133 (4.897) Cm (132:135)

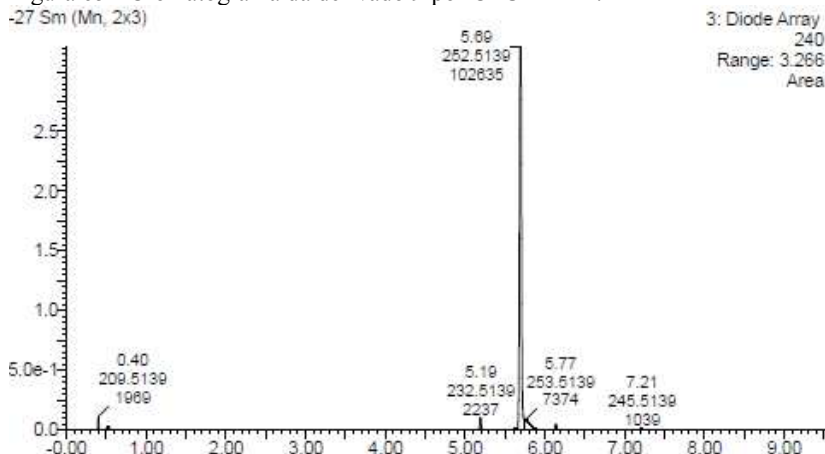
1: TOF MS ES+
4.19e5



5.1.7 Síntese da (E)-8-amino-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-10-estiril-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carbonitrila (9)

O benzaldeído utilizado na presente reação foi o cinamaldeído, e o tempo de reação foi de 45 minutos e o produto reacional foi obtido com uma pureza de 90,6%.

Figura 65 - Cromatograma da derivado 9 por CLUE-PDA.



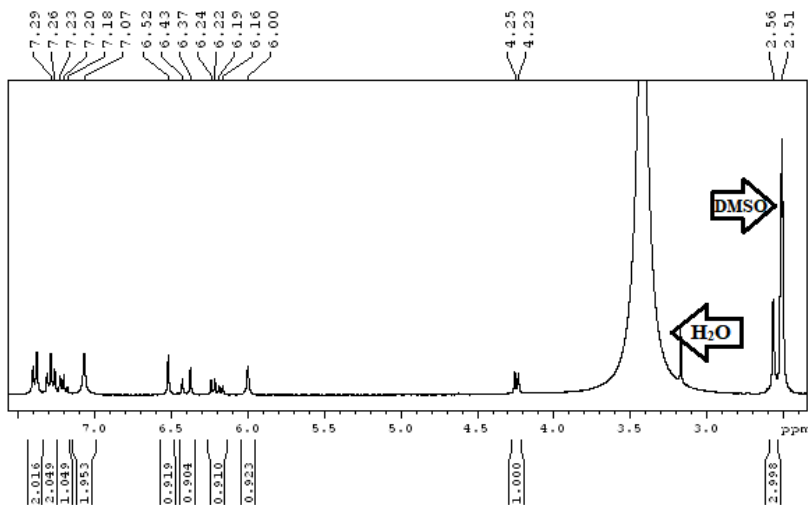
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.1.7.1 Caracterização Estrutural por RMN

Analisando o espectro de ^1H RMN (Figura 66) foi possível observar sinais nas regiões relacionadas a hidrogênios aromáticos e também olefínicos. Sinais característicos das piranocumarinas foram observados. O sinal em δ 4,24ppm integrando pra 1H, que geralmente se apresenta como um *s* nesta série de derivados, mas nesta molécula ele está acoplado com um H vicinal (Figura 67), a sua constante de acoplamento tem valor de 7,1Hz indica um acoplamento com o *dd* integrando pra 1H com deslocamento em δ 6,20ppm, que possui constantes de acoplamento com valor de 15,7Hz e 7,1Hz, característico de hidrogênio de metileno com dois hidrogênios vicinais, sendo um na posição *trans* da dupla ligação, sugerindo este ser o H-1'. O *d* com valor de deslocamento de δ 6,40ppm e $J=15,7\text{Hz}$ e integrando pra 1H

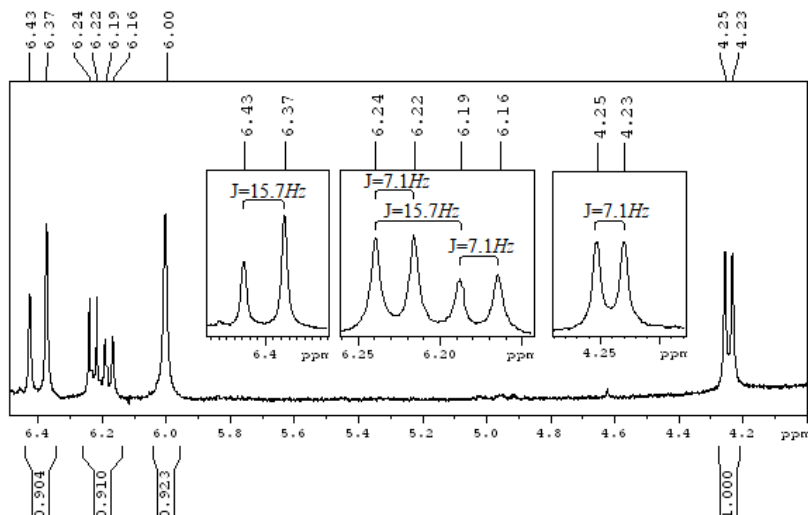
característico também de hidrogênio olefínico com acoplamento com H na posição *trans*, caracterizando este hidrogênio como o H-2'.

Figura 66 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 9.



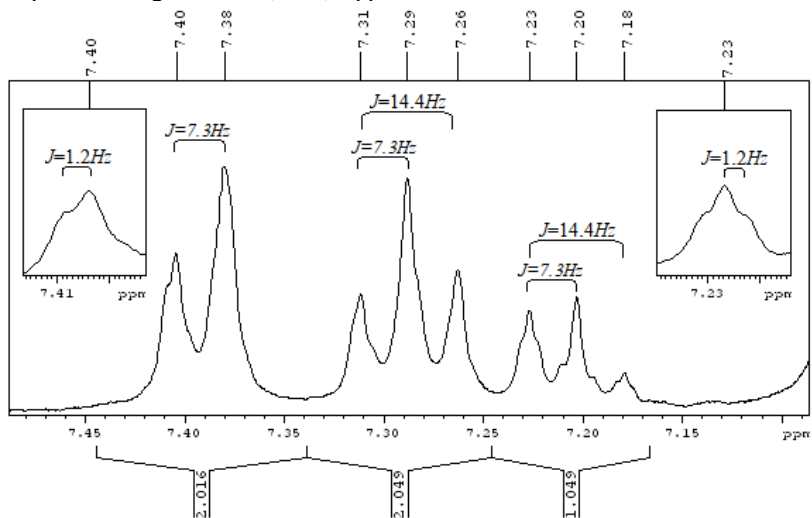
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 67 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 9, ampliado na região entre 6,50-4,00ppm.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 68 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **9**, ampliado na região entre 7,50-7,08ppm.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 69 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado **9**.

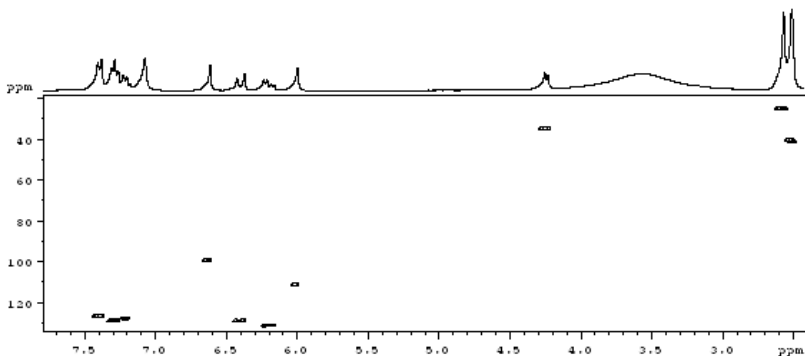
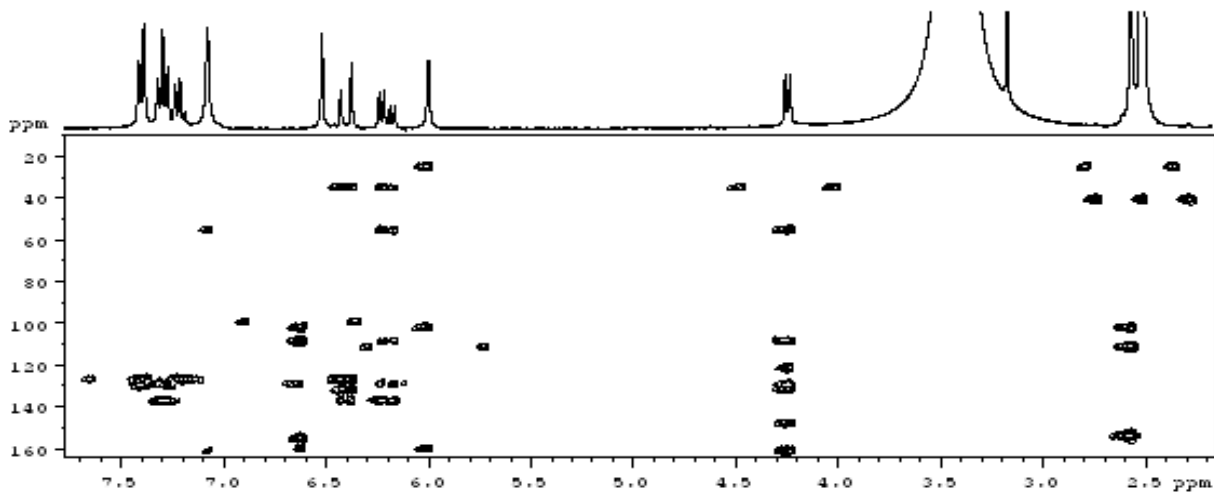
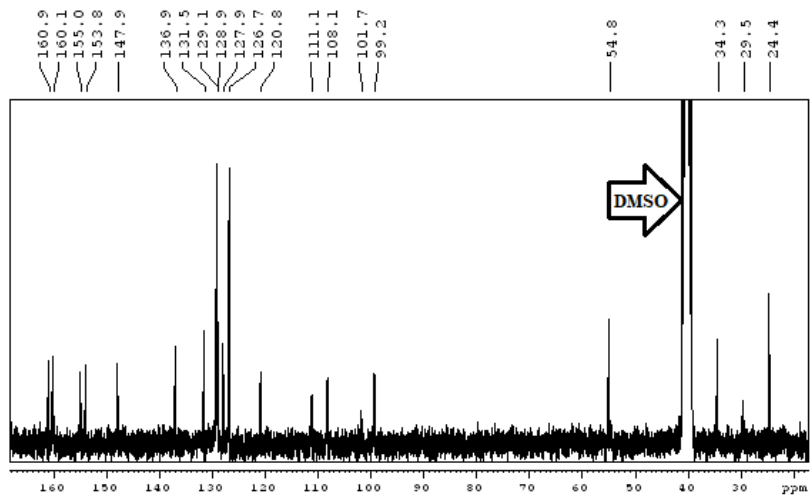


Figura 70 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO-d_6) para o derivado 9.



A elucidação do sistema aromático presente no derivado em questão, se deu na análise dos m presentes no espectro na região característica de H de anel aromático. O sinal com deslocamento de δ 7.39, um m integrando pra 2H, com valores de J iguais a 7,3Hz e 1,2Hz, acoplando assim com os sinais δ 7,29ppm e o 7,20ppm. Observando as correlações nos mapas bidimensionais HSQC e HMBCfoi possível correlacionar as ligações 1J , 2J e 3J .

Figura 71 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **9**.

Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Tabela 8 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **9** e comparação com derivado **4**.

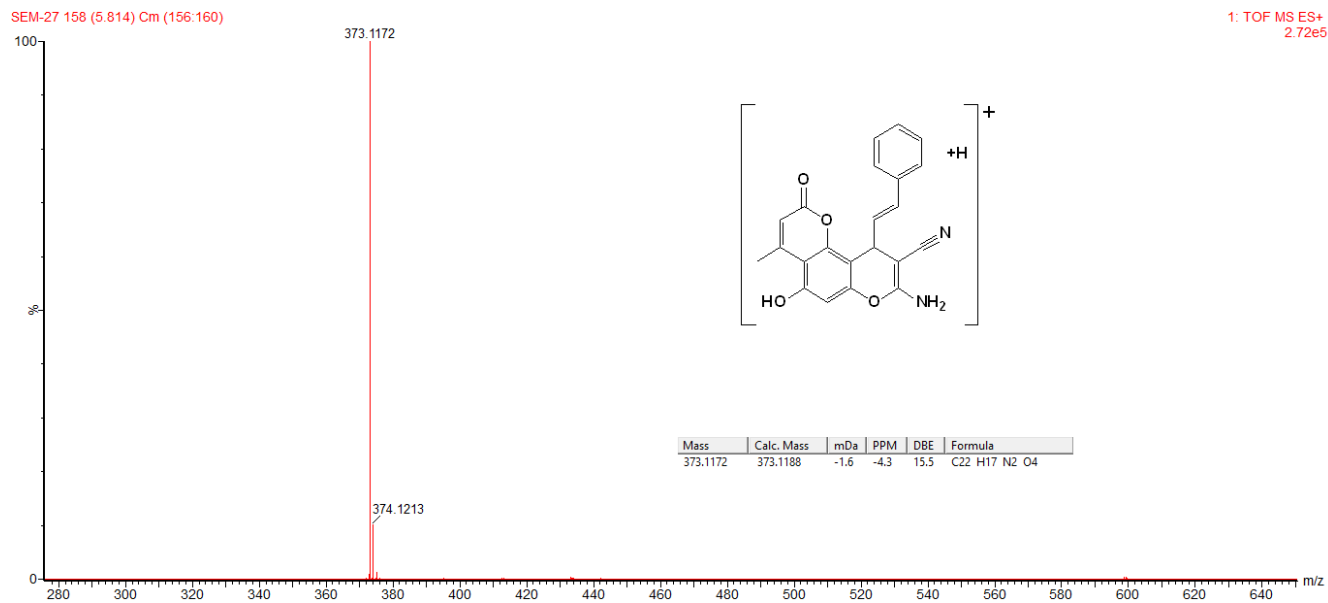
Posição	DERIVADO 7		DERIVADO 4	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	160,9	-	159,9
3	6,00 <i>sl</i>	111,6	6,09 <i>d</i> (1,1)	112,1
4	-	153,8	-	153,9
5	-	155,0	-	155,0
6	6,41 <i>s</i>	99,2	6,49 <i>s</i>	99,1
7	-	-	-	-
8	-	160,1	-	160,1
9	-	54,8	-	57,5
10	4,24 <i>d</i> (7,1)	34,3	4,63 <i>s</i>	36,3
11	2,56 <i>sl</i>	24,4	2,60 <i>sl</i>	24,5
12	-	120,8	-	120,5
4a	-	101,7	-	102,5
6a	-	-	-	158,0
10a	-	108,1	-	108,5
10b	-	147,9	-	148,0
1'	6,20 <i>dd</i> (15,7;7,1)	131,2	-	131,6
2'	6,40 <i>d</i> (15,7)	128,9	7,15 <i>d</i> (8,4)	129,5
3'	-	127,9	7,34 <i>d</i> (8,4)	128,9
4'	7,39 <i>m</i> (7,3; 1,2)	126,7	-	144,7
5'	7,29 <i>m</i> (14,4; 7,3)	129,1	7,34 <i>d</i> (8,4)	128,9
6'	7,20 <i>m</i> (14,4; 7,3; 1,2)	127,8	7,15 <i>d</i> (8,4)	129,5

7'	7,29 m (14,4; 7,3)	129,1	-	-
8'	7,39 m (7,3; 1,2)	126,7	-	-
NH₂	7,07 s (300 MHz ¹ H, 75 MHz ¹³ C, DMSO-d ₆)	-	7,08 s (300 MHz ¹ H, 75 MHz ¹³ C, DMSO-d ₆)	-

5.1.7.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Para auxiliar e confirmar que realmente este é o produto obtido da síntese proposta neste estudo, foi realizada a análise em espectrômetro de massa de alta resolução. O espectro (Figura 72) apresentou um pico com relação massa carga (m/z) de 373,1172 que corresponde a fórmula $[C_{22}H_{16}N_2O_4+H]^+$ com valor teórico de massa calculada em m/z 373,1188.

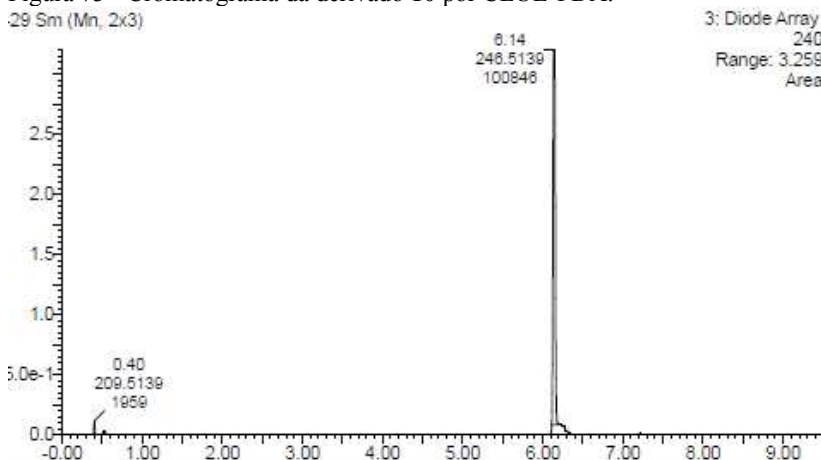
Figura 72 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **9**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.1.8 Síntese do metil 8-amino-10-(4-clorofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carboxilato (10)

Neste ponto do estudo, foi feita a proposta de substituição da malononitrila por um β -cianoéster, o metilcianoacetato, e como uma observação geral, o tempo de reação para a obtenção dos derivados a seguir foi maior do que as reações anteriores. Para este composto o benzaldeído utilizado foi o 4-clorobenzaldeído, e o tempo de reação foi de 85 minutos. A reação proporcionou a obtenção de um produto reacional com uma pureza de 100%.

Figura 73 - Cromatograma da derivado **10** por CLUE-PDA.

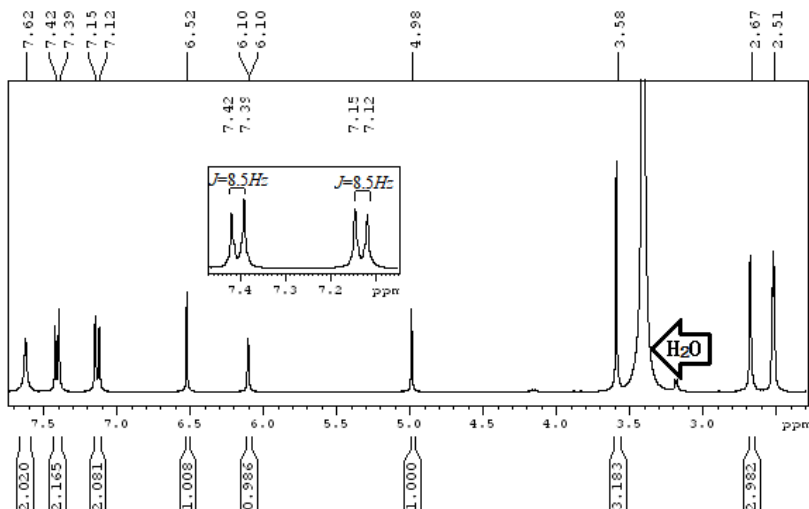


Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.1.8.1 Caracterização Estrutural por RMN

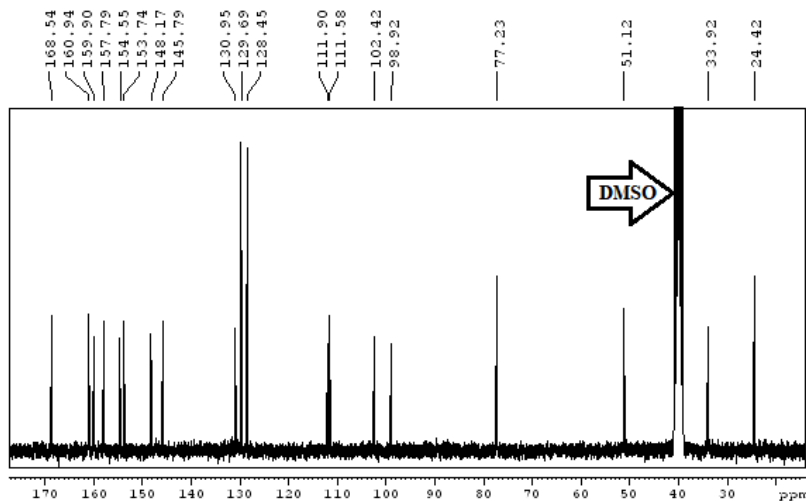
Com o espectro de ^1H NMR (Figura 74) apresentou os seguintes sinais: um singlete δ 7,62 ppm com valor de integração de 2H, indicando ser um hidrogênio de NH_2 , o sinal de d integrando pra 2H com deslocamento de δ 7,40 ppm com valor de constante de acoplamento igual 8,4Hz, o mesmo valor de J encontrado no d em δ 7,13 ppm também integrando para 2H, caracterizando hidrogênios aromáticos (sinais mais desblindados são explicados por halogenado na posição 4' do anel) com sistema *para* substituído.

Figura 74 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **10**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 75 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) o derivado **10**.



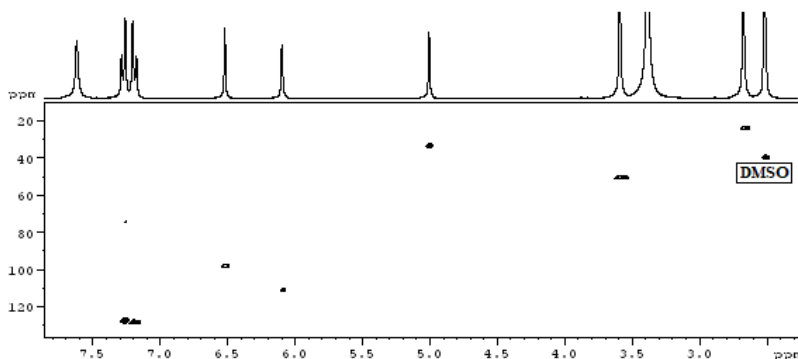
Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

O sinal *s* com valor de δ 6,52 ppm integrando pra 1H, indicando ser um sinal de H aromático, caracterizando o hidrogênio da cumarina na posição 6 e em δ 6,10 ppm um sinal de *d* com constante de

acoplamento de 1.1Hz e integrando pra 1H, caracterizando olefinico acoplando com H na posição *meta* em relação a ele mesmo, caracterizando ser o hidrogênio na posição 3 da molécula sintetizada. O singleto em δ 4,98 ppm integrando pra 1H, indicando estar ligado a um carbono em um sistema de anéis conjugados ou carbonos ligados a carbonos olefinicos, indicando ser o H-10.

Os sinais menos desblindados são característicos de carbonos em sp^3 , no entanto o singleto em δ 3.58 ppm integrando pra 3H é relacionado a hidrogênios ligados a um carbono de metoxila, cujo o C esta ressonando com valor de deslocamento de 51,1 ppm. Essa correlação foi confirmada via mapa de correlação HSQC (Figura 76) e assim caracteriza a modificação na posição 9 da carbonitrila pelo carboxilato. Já o *sl* C-4 (δ 2.66/24,4ppm) integrando pra 3H, é indicativo de carbono sp^3 .

Figura 76 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO-d_6) para o derivado **10**.



O mapa de correlação HMBC (Figura 77) apresentou as correlações do sistema carboxilato na posição 9. O sinal C-13 (δ 3,58ppm/ δ 51,1ppm), confirmado pelo mapa de correlação HSQC mostrou uma correlação forte em *J3* com o C-12 (δ 168,5ppm), indicativo de carbonila de éster.

Ainda, é apresentado uma correlação muito fraca com o C δ 77,2 ppm, valor indicativo de carbono olefinico e ligado a um C=O de éster, este carbono tem uma correlação muito forte com o sinal de ^1H RMN δ 4,98 ppm, caracterizando o carbono na posição 9. Como reforço desta posição, a única correlação visível nos hidrogênios do NH_2 é com este carbono em δ 77,2 ppm.

Figura 77 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado **10**.

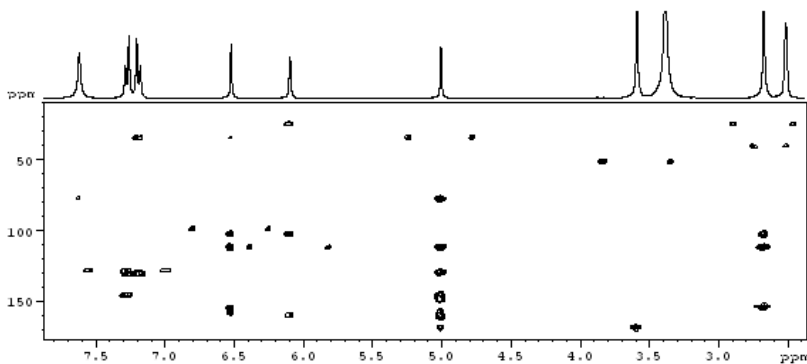


Tabela 9 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **10** e comparação com derivado **4**.

Posição	DERIVADO 10		DERIVADO 4	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	159,9	-	159,9
3	6,10 <i>d</i> (1,1)	119,9	6,09 <i>d</i> (1,1)	112,1
4	-	153,7	-	153,9
5	-	154,5	-	155,0
6	6,52 <i>s</i>	98,9	6,49 <i>s</i>	99,1
7	-	-	-	-
8	-	160,9	-	160,1
9	-	77,2	-	57,5
10	4,98 <i>s</i>	33,9	4,63 <i>s</i>	36,3
11	2,66 <i>s</i>	24,4	2,60 <i>sl</i>	24,5
12	-	168,5	-	120,5
13	3,58 <i>s</i>	51,1	-	-
4a	-	102,4	-	102,5
6a	-	157,7	-	158,0
10a	-	111,6	-	108,5
10b	-	148,8	-	148,0
1'	-	131,2	-	131,6
2'	7,13 <i>d</i> (8,4)	129,6	7,15 <i>d</i> (8,4)	129,5
3'	7,40 <i>d</i> (8,4)	128,4	7,34 <i>d</i> (8,4)	128,9
4'	-	145,8	-	144,7
5'	7,40 <i>d</i> (8,4)	128,4	7,34 <i>d</i> (8,4)	128,9
6'	7,13 <i>d</i> (8,4)	129,6	7,15 <i>d</i> (8,4)	129,5
NH₂	7,62 <i>s</i>	-	7,08 <i>s</i>	-
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)		(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	

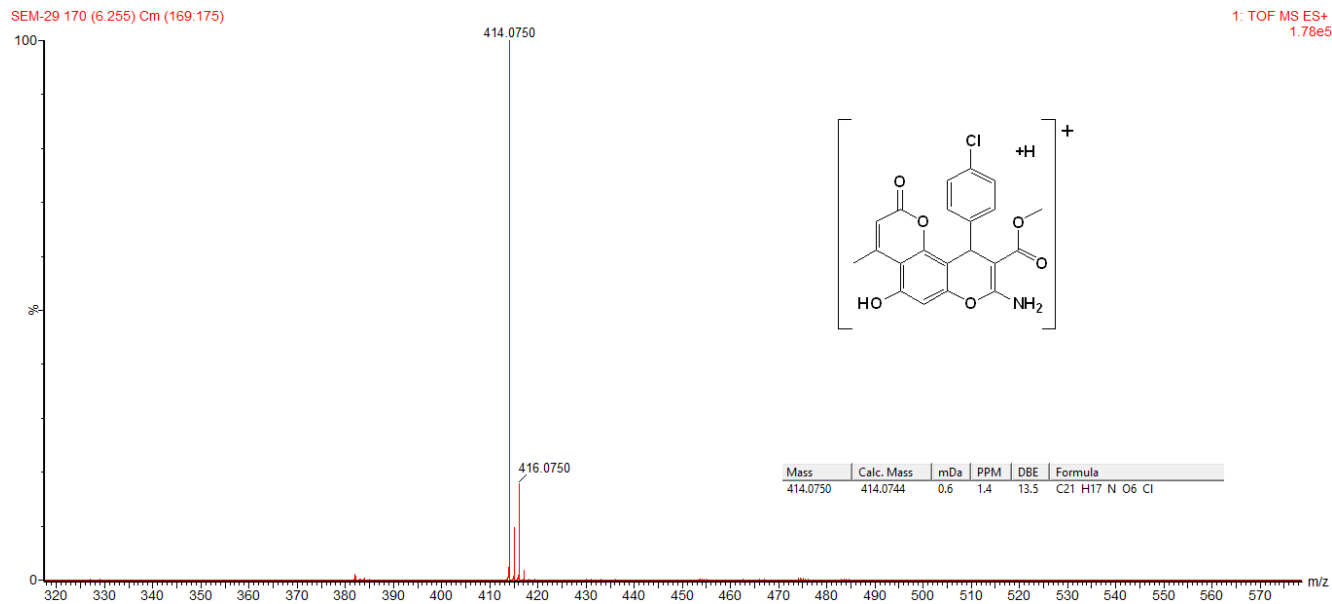
Assim a reação de obtenção do derivado proposto, por consequência a alteração de grupamento funcional na posição C-9 foi realizada.

5.1.8.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Para confirmação da massa molecular o composto foi submetido a uma análise por espectrometria de massas em sistema LC-MS/Q-TOF, e o espectro apresentou dois picos de padrão isotópico 3:1, característico de átomo de Cl. O maior pico apresentou um valor de relação massa carga (m/z) de 414,0744 para o íon $[C_{21}H_{16}NO_6^{35}Cl+H]^+$, que teve massa teórica calculada em m/z 414,0744. O segundo pico apresentou valor de m/z 416,0750 o qual corresponde a massa do íon de fórmula $[C_{21}H_{16}NO_6^{37}Cl+H]^+$ com valor teórico calculado em m/z 416,0710.

A diferença da intensidade dos picos é explicada pela abundância destes isótopos na natureza, que são ^{35}Cl e o ^{37}Cl , com abundância de 75,77% e 24,23% respectivamente. Portanto o espectro é característico da presença do halogênio na molécula.

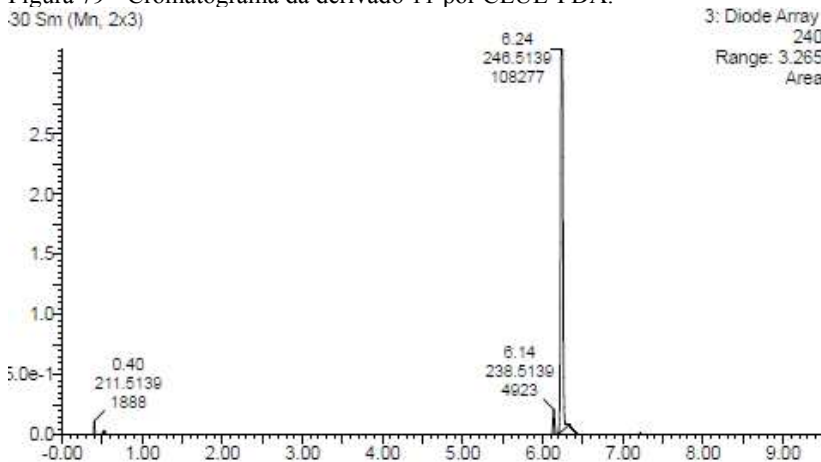
Figura 78 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **10**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.1.9 Síntese do metil 8-amino-10-(4-bromofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carboxilato (11)

Para este composto é esperada a substituição do halogênio Cl, pelo Bromo, assim o reagente utilizado foi o 4-bromobenzaldeído, o tempo de reação foi de 100 minutos. O produto de reação obtido foi um sólido com uma pureza de 95,6%.

Figura 79 - Cromatograma da derivado 11 por CLUE-PDA.



Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

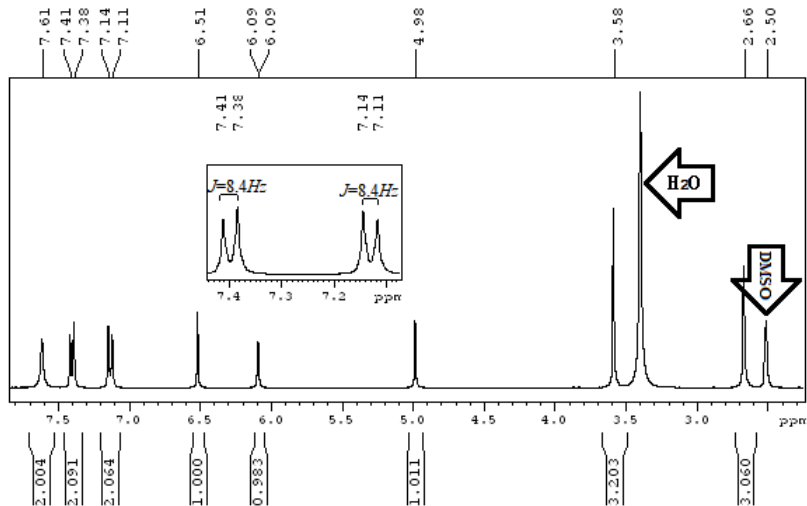
5.1.9.1 Caracterização por RMN

Os sinais apresentados pelo espectro de ^1H NMR (Figura 68) foram: o singleto em δ 7,61 ppm com integração igual a 2H, característico de NH_2 ; os *d* com valor de deslocamento de δ 7,39 ppm e δ 7,13 ppm, ambos integrando pra 2H e com constante de acoplamento igual a 8,4Hz, são sinais da região dos H aromáticos assim como o sinal de *s* ressonando em δ 6,51 ppm e integrando pra 1H, todos sinais característicos da piranocumarina sintetizada.

Os demais sinais de hidrogênio são: δ 6,08 ppm, um duplete com valor de $J = 0,8\text{Hz}$, é caracter H olefínico, o singleto δ 4,97 ppm integrando pra 1H característico de carbono sp^3 ligado a $-\text{C}=\text{C}$; por fim os dois sinais mais desblindados, o *s* com deslocamento de δ 3,57 ppm e

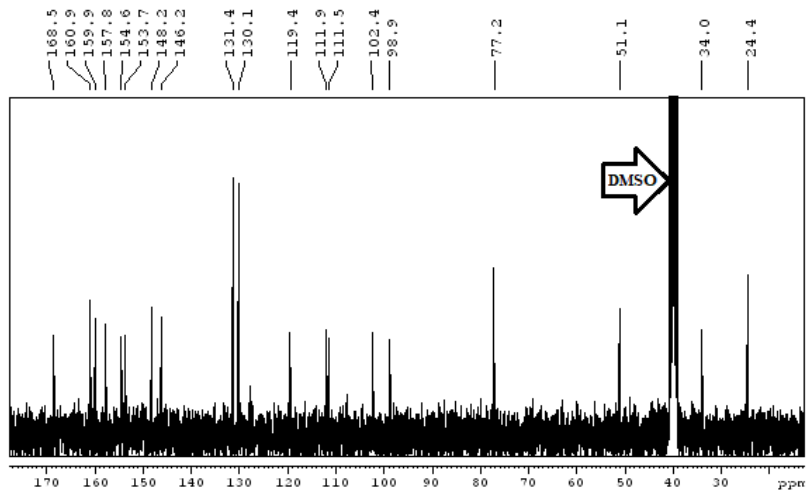
o *sl* em δ 2,65 ppm, ambos integrando pra 3H, relacionados a hidrogênios de metil, também característicos da piranocumarina.

Figura 80 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **11**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 81 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) o derivado **11**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Tabela 10 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **11** e comparação com derivado **10**.

Posição	DERIVADO 11		DERIVADO 10	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	159,9	-	159,9
3	6,08 <i>d</i> (0.8)	111,5	6,10 <i>d</i> (1.1)	112,0
4	-	153,7	-	153,7
5	-	154,6	-	154,5
6	6,51 <i>s</i>	98,9	6,52 <i>s</i>	98,9
7	-	-	-	-
8	-	160,9	-	160,9
9	-	77,2	-	77,2
10	4,97 <i>s</i>	34,0	4,98 <i>s</i>	33,9
11	2,65 <i>s</i>	24,4	2,66 <i>s</i>	24,4
12	-	168,5	-	168,5
13	3,57 <i>s</i>	51,1	3,58 <i>s</i>	51,1
4a	-	102,4	-	102,4
6a	-	157,8	-	157,7
10a	-	111,9	-	111,9
10b	-	148,2	-	148,8
1°	-	119,4	-	145,8
2°	7,13 <i>d</i> (8,4)	131,3	7,13 <i>d</i> (8,4)	129,6
3°	7,39 <i>d</i> (8,4)	130,1	7,40 <i>d</i> (8,4)	128,4
4°	-	146,2	-	131,2
5°	7,39 <i>d</i> (8,4)	131,3	7,40 <i>d</i> (8,4)	128,4
6°	7,13 <i>d</i> (8,4)	130,1	7,13 <i>d</i> (8,4)	129,6
NH₂	7,61 <i>s</i> (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	-	7,62 <i>s</i> (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	-

A reação alcançou o objetivo e a modificação da posição 4° foi realizada.

5.1.9.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

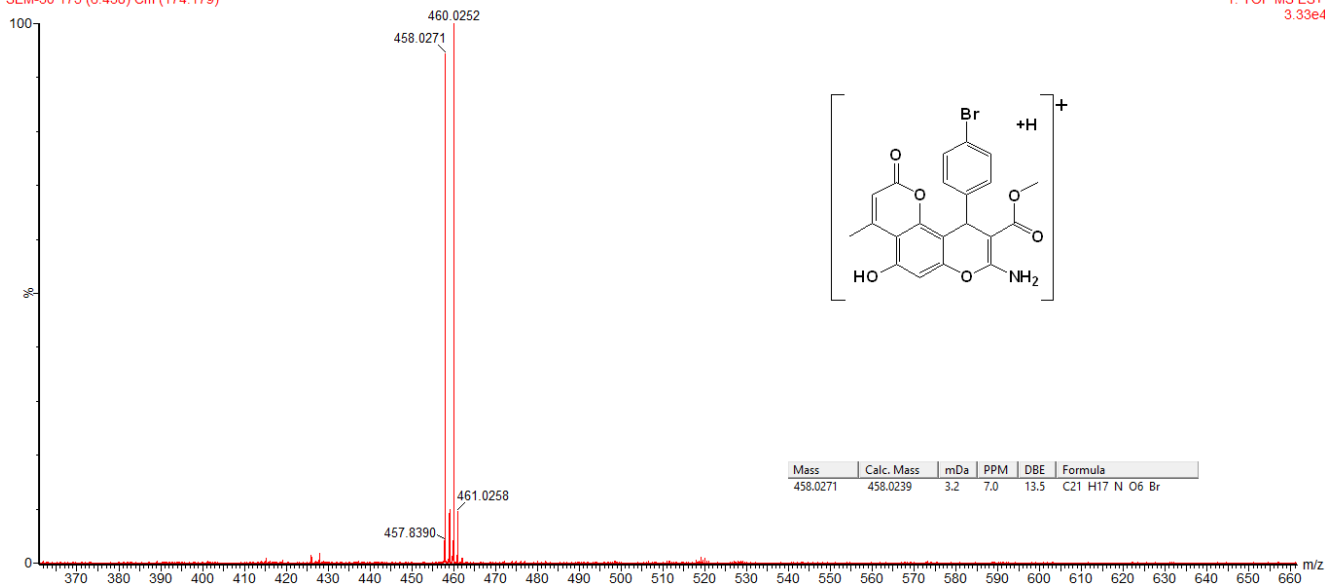
O espectrograma de massas de alta resolução (Figura 82) apresentou dois picos de padrão isotópico 1:1 de praticamente mesma intensidade, característico de átomo de Br, com valores de relação massa carga (m/z) de 458,0271 ($[\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{NO}_6^{79}\text{Br}+\text{H}]^+$). O valor teórico calculado foi m/z 458,0239; e outro com m/z 460,0252 correspondente ao ión $[\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{NO}_6^{81}\text{Br}+\text{H}]^+$, com valor teórico calculado para m/z 460,0214, confirmando assim a massa molecular do composto sintetizado.

Os picos correspondem a massa do íon de fórmula $C_{20}H_{14}N_2O_4Br$, os valores de m/z representam o padrão isotópico do ^{79}Br e o ^{81}Br , e a intensidade dos picos do espectrograma é explicada pela abundância destes isótopos na natureza que é de aproximadamente 50% entre os isótopos.

Figura 82 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **11**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).

SEM-30 175 (6.438) Cm (174:179)

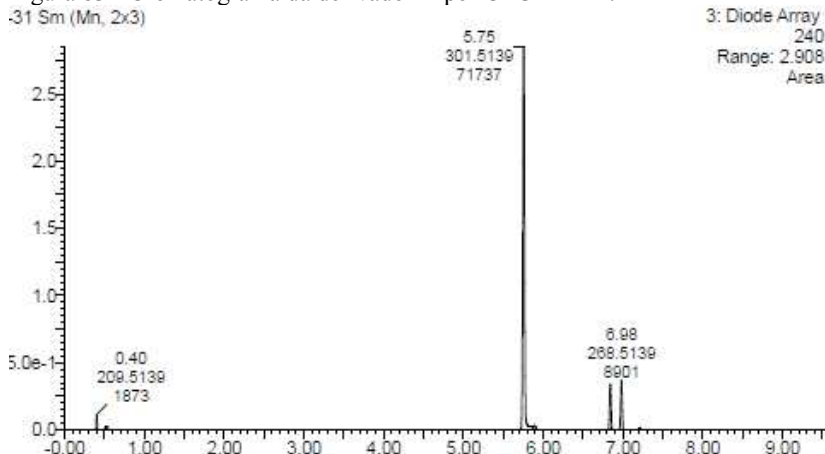
1: TOF MS ES+
3.33e4



5.1.10 Síntese do metil 8-amino-10-(4-nitrofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carboxilato (12)

Um novo substituinte na posição 4' foi proposto e o 4-nitrobenzaldeído foi selecionado como reagente para esta reação. O tempo de reação foi de 100 minutos, com uma pureza de 88,9%.

Figura 83 - Cromatograma da derivado 12 por CLUE-PDA.



Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

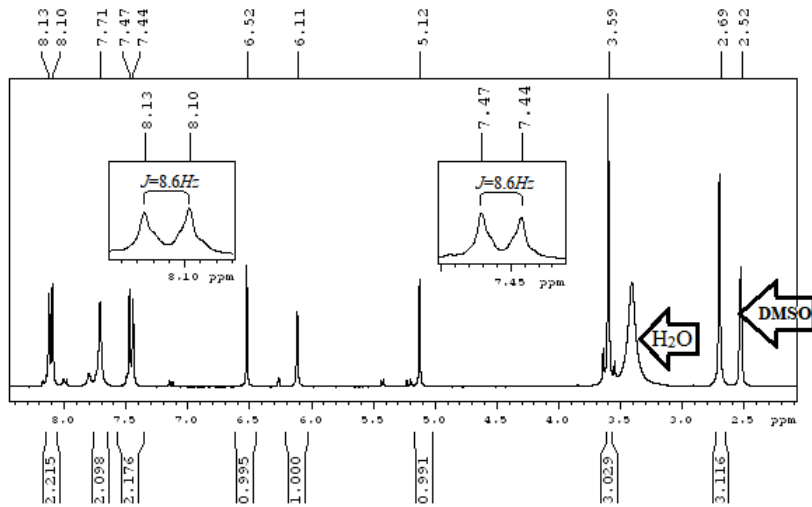
5.1.10.1 Caracterização Estrutural por RMN

A partir da análise de ^1H RMN foram observados os seguintes sinais: um *d* δ 8,11 ppm integrando pra 2H e com constante de acoplamento de 8,6Hz. E outro *d* δ 7,45 ppm integrando pra 2H e de $J = 8,6\text{Hz}$, característicos de H aromáticos com sinal mais desblindado devido a presença de átomo eletronegativo na posição *p*; o *s* δ 7,70 ppm integrando pra 2H, caracterizando os hidrogênios do NH_2 ; o *s* δ 6,52 ppm integrando pra 1H, indicando ser um hidrogênio aromático; o singleto largo δ 6,11 ppm integrando pra 1H característico de H de metileno.

Os dados restantes no espectro são: um *s* em δ 5,12ppm, com integração igual a 1H, indicando um hidrogênio carbono olefinico; δ 3,59ppm é um singleto integrando pra 3H característico de hidrogênio

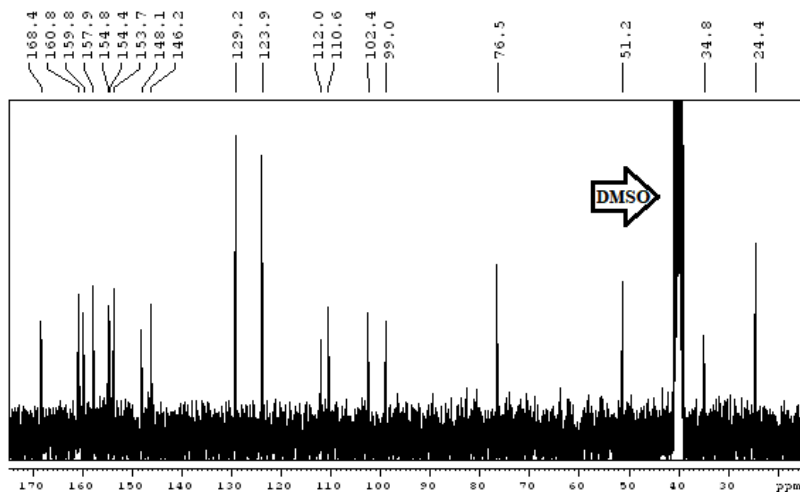
de carbono sp^3 , e o sl de δ 2,69ppm integrando pra 3H sugerindo também hidrogênio ligado a carbono sp^3 .

Figura 84 – Espectro de 1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 12.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 85 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) o derivado 12.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

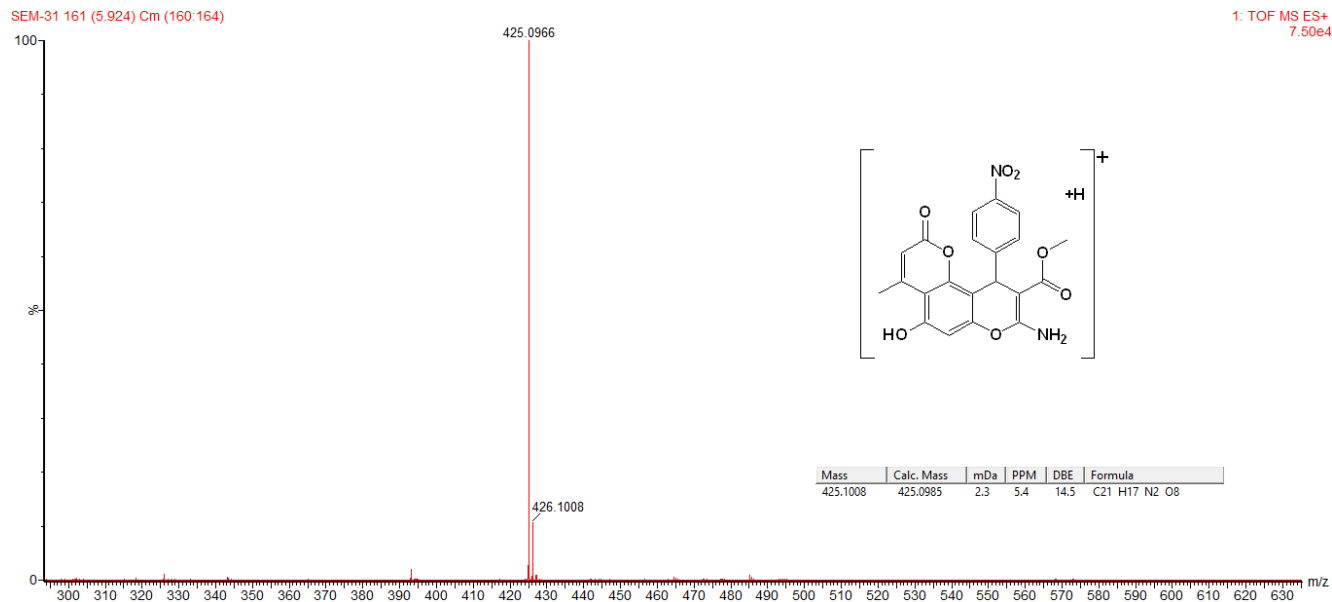
Tabela 11 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **12** e comparação com derivado **10**.

Posição	DERIVADO 12		DERIVADO 10	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	159,8	-	159,9
3	6,11 <i>sl</i>	110,6	6,10 <i>d</i> (1.1)	112,0
4	-	153,7	-	153,7
5	-	154,4	-	154,5
6	6,52 <i>s</i>	98,9	6,52 <i>s</i>	98,9
7	-	-	-	-
8	-	160,8	-	160,9
9	-	76,5	-	77,2
10	5,12 <i>s</i>	34,8	4,98 <i>s</i>	33,9
11	2,69 <i>sl</i>	24,4	2,66 <i>s</i>	24,4
12	-	168,4	-	168,5
13	3,59 <i>s</i>	51,2	3,58 <i>s</i>	51,1
4a	-	102,4	-	102,4
6a	-	157,9	-	157,7
10a	-	111,9	-	111,9
10b	-	148,1	-	148,8
1'	-	146,2	-	145,8
2'	7,45 <i>d</i> (8,4)	129,2	7,13 <i>d</i> (8,4)	129,6
3'	8,11 <i>d</i> (8,4)	123,8	7,40 <i>d</i> (8,4)	128,4
4'	-	154,9	-	131,2
5'	8,11 <i>d</i> (8,4)	129,2	7,40 <i>d</i> (8,4)	128,4
6'	7,45 <i>d</i> (8,4)	123,8	7,13 <i>d</i> (8,4)	129,6
NH₂	7,70 <i>s</i> (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	-	7,62 <i>s</i> (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	-

5.1.10.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

O espectro reportou um pico com valor de relação massa carga (m/z) de 425,0966, que é atribuído ao valor da fórmula $[\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8+\text{H}]^+$, onde o valor teórico calculado foi de 425,0985, confirmando assim a massa do produto da reação como sendo o composto 12.

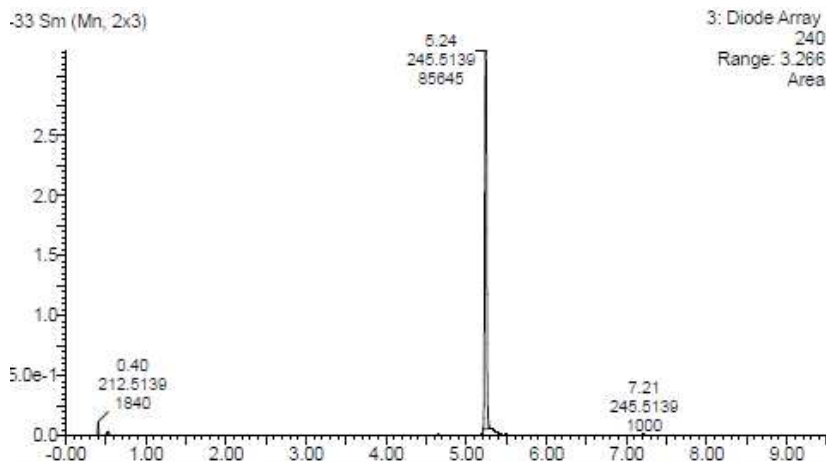
Figura 86 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **12**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.1.11 Síntese do metil 8-amino-10-(3,4-dimetoxifenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carboxilato (13)

Para este composto o benzaldeído utilizado foi o 3,4-dimetoxibenzaldeído e o tempo de reação foi de 120 minutos. Assim, foi obtido o produto reacional com uma pureza de 98,8%.

Figura 87 - Cromatograma da derivado 13 por CLUE-PDA.



Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

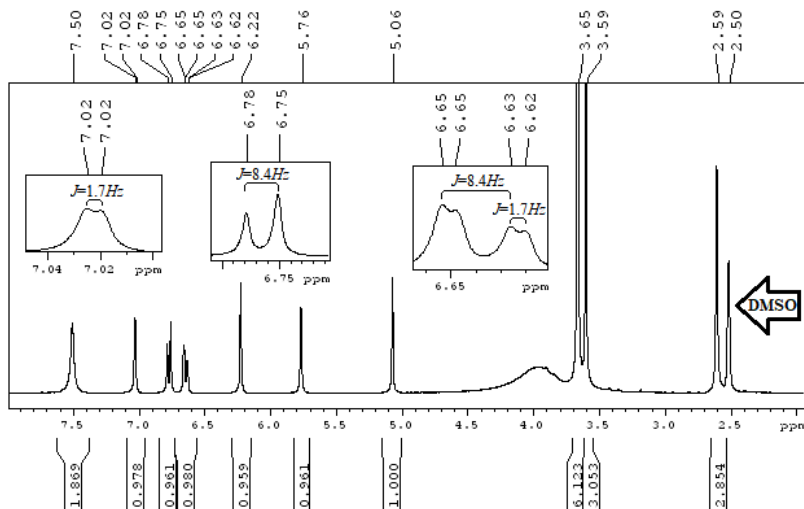
5.1.11.1 Caracterização Estrutural por RMN

O espectro de ^1H RMN apresentou os seguintes dados: o singleto δ 7,50 ppm integrando pra 2H, indicativo de hidrogênio de NH_2 , o *d* δ 7,02 ppm integrando pra 1H e com constante de acoplamento igual a 1,7Hz, o *d* integrando pra 1H δ 6,76 ppm com valor de $J = 8,4\text{Hz}$, e o H *dd* δ 6,63ppm com constantes de acoplamento de 8,4Hz e 1,7Hz, são característicos do sistema aromático ABX.

Os dados seguintes apresentados pelo espectro de ^1H RMN foram: o singleto δ 6,21 ppm integrando pra 1H, indicando ser um hidrogênio aromático; o *sl* δ 5,75 ppm integrando pra 1H, sujere um H de carbono olefínico; o *s* δ 5,06 ppm integrando pra 1H. Os sinais: singleto com deslocamento em δ 3,65 ppm integrando pra 6H, indicativo

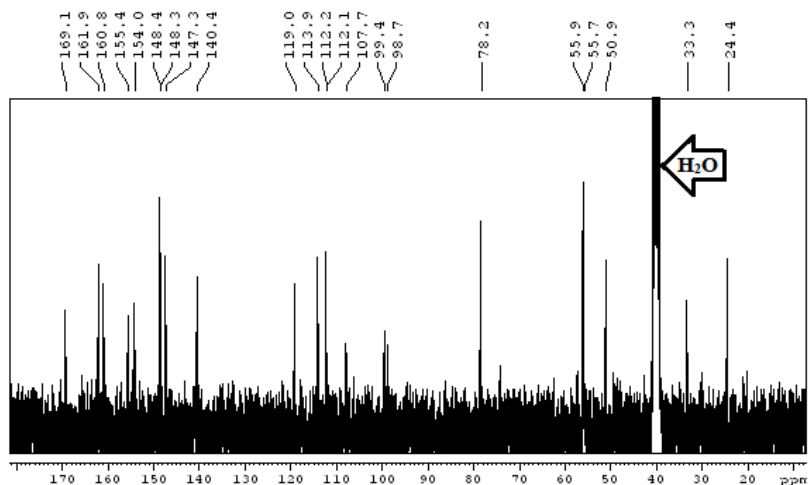
de hidrogênios de carbono sp^3 ligado a um O, assim como o s em δ 3,58 ppm (s, 3H); já o s δ 2,59 ppm integrando pra 3H é indicativo de hidrogênio de carbonos sp^3 , metil.

Figura 88 – Espectro de 1H RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 13.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 89 – Espectro de ^{13}C RMN (300Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 13.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

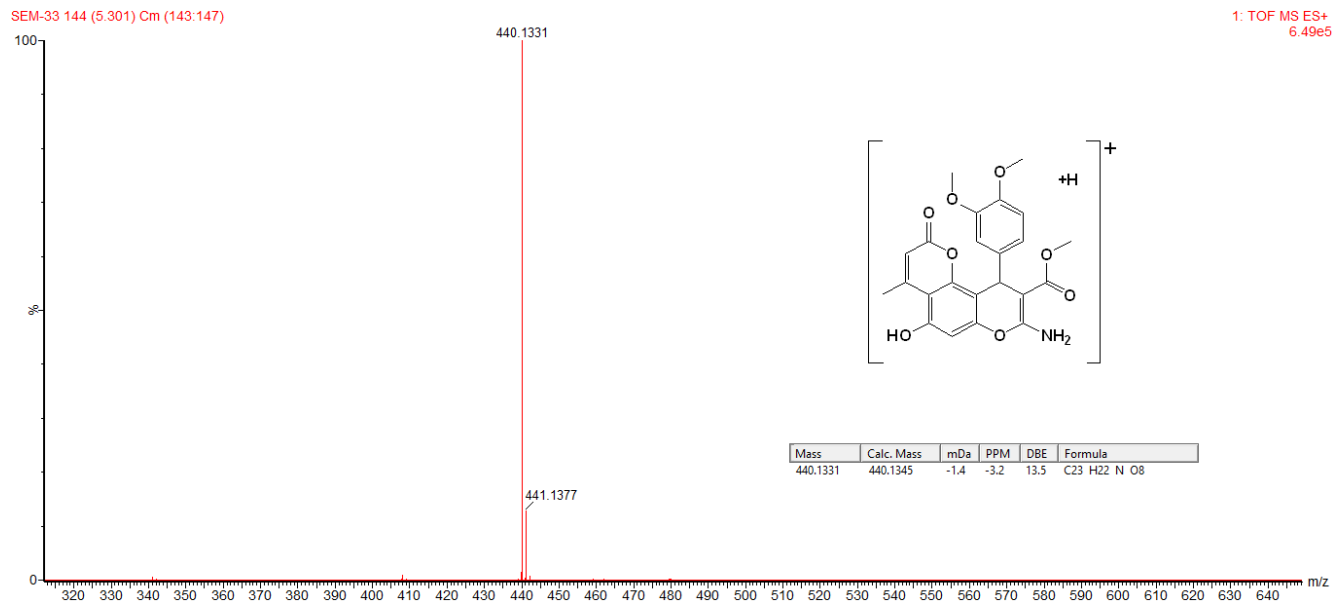
Tabela 12 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **13** e comparação com derivado **10**.

Posição	DERIVADO 13		DERIVADO 10	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	160,7	-	159,9
3	5,75 <i>sl</i>	112,2	6,10 <i>d</i> (1.1)	111,5
4	-	153,4	-	153,7
5	-	153,9	-	154,5
6	6,21 <i>s</i>	98,7	6,52 <i>s</i>	98,9
7	-	-	-	-
8	-	161,8	-	160,9
9	-	78,2	-	77,2
10	5,06 <i>s</i>	33,3	4,98 <i>s</i>	33,9
11	2,59 <i>sl</i>	24,4	2,66 <i>s</i>	24,4
12	-	169,1	-	168,5
13	3,58 <i>s</i>	50,9	3,58 <i>s</i>	51,1
4a	-	99,3	-	102,4
6a	-	155,4	-	157,7
10a	-	112,0	-	111,9
10b	-	148,3	-	148,1
1'	-	140,3	-	130,9
2'	6,76 <i>d</i> (8,4)	119,0	7,13 <i>d</i> (8,4)	129,6
3'	-	148,4	7,40 <i>d</i> (8,4)	128,4
4'	-	147,3	-	145,8
5'	7,02 <i>d</i> (1.7)	113,9	7,40 <i>d</i> (8,4)	128,4
6'	6,63 <i>dd</i> (8,4;1.7)	107,7	7,13 <i>d</i> (8,4)	129,6
7'	3,65 <i>s</i>	55,7	-	-
8'	3,65 <i>s</i>	55,9	-	-
NH₂	7,50 <i>s</i>	-	7,62 <i>s</i>	-
	<i>(300 MHz ^1H, 75 MHz ^{13}C, DMSO-d_6)</i>		<i>(300 MHz ^1H, 75 MHz ^{13}C, DMSO-d_6)</i>	

5.1.11.2 Caracterização por Espetrometria de Massas de Alta Resolução

No espectro de massas de alta resolução apresentou um pico intenso com valor de relação massa carga (m/z) de 440,1331, que é atribuído ao valor da fórmula iônica da molécula $[\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{NO}_8+\text{H}]^+$. O valor teórico calculado foi de 440,1345, confirmando assim a massa do derivado **13**.

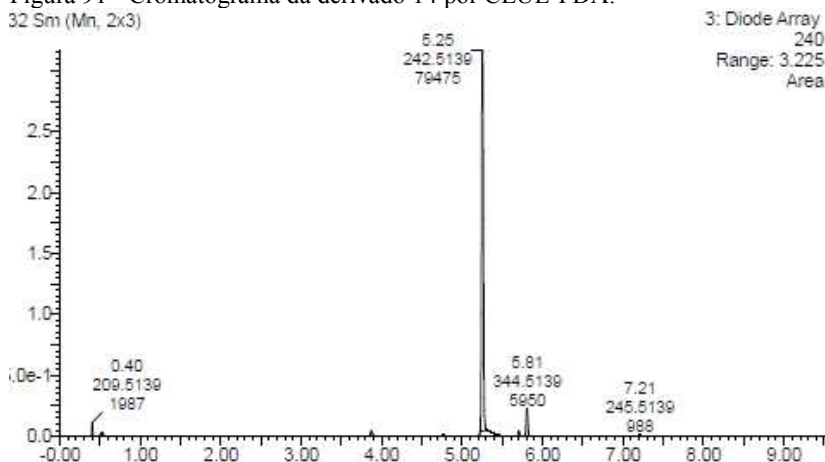
Figura 90 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **13**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.1.12 Síntese do metil 8-amino-10-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-f]cromeno-9-carboxilato (14)

A reação a seguir propôs adicionar mais uma hidroxila em relação ao derivado 13, o 3,4,5-trimetoxibelzaldeído foi empregado como reagente e o tempo de reação foi de 120 minutos. O produto reacional foi obtido com uma pureza de 91,9%.

Figura 91 - Cromatograma da derivado 14 por CLUE-PDA.



Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

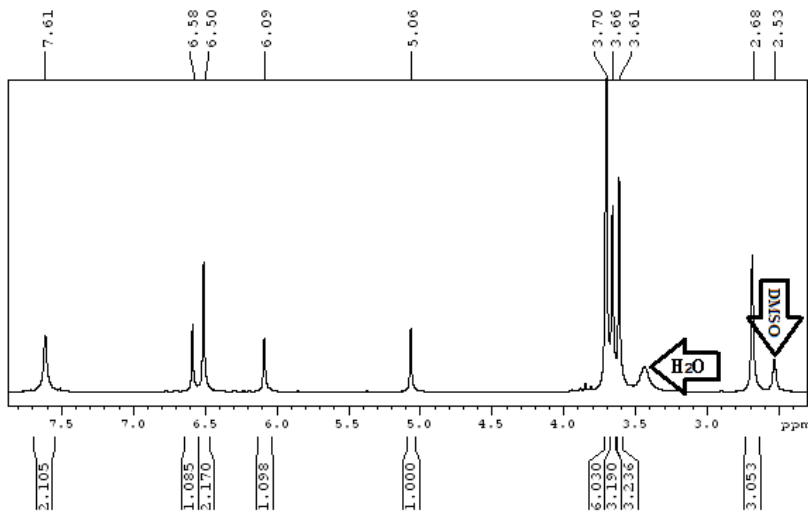
5.1.12.1 Caracterização Estrutural por RMN

O espectro de ^1H RMN mostrou picos com valores de: δ 7,61 ppm sendo este um *s* integrando pra 2H característico de NH_2 , o sinal de singleto δ 6,57 ppm integrando pra 1H, característico de hidrogênio aromático e o *s* δ 6,50 ppm integrando pra 2H, é indicativo também de hidrogênios aromáticos; o outro *s* em δ 6,08 ppm integrando pra 1H é característico de hidrogênio olefínico.

Os deslocamentos de carbonos de ligações simples como o sinal de *s* δ 5,06 ppm integrando para 1H, característico do C vizinho a metoxila, hidrogênios ressonando como *s* δ 3,70 ppm integrando pra 6H, caracterizando hidrogênios de metoxila, assim como os sinais: em *s* δ 3,66 ppm integrando pra 3H e o *s* δ 3,61 ppm também integrando pra

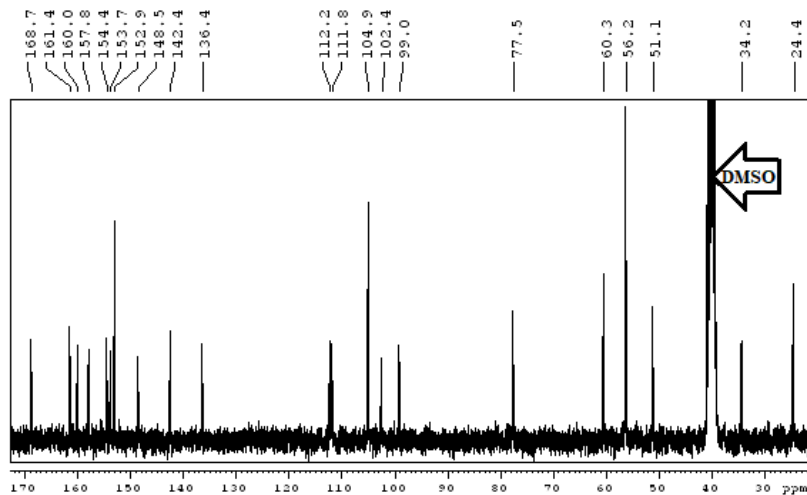
3H. Os 3 hidrogênios ressonando em δ 2,68 como forma de *s* (são característico de carbono sp^3).

Figura 92 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 14.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 93 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 14.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

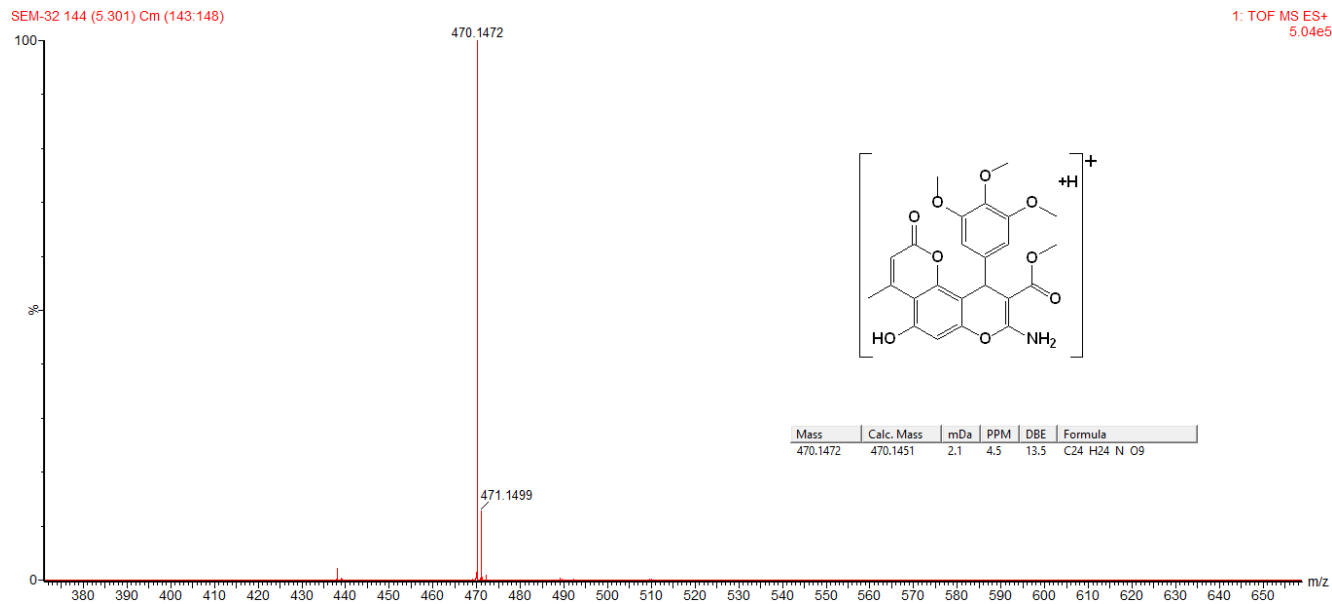
Tabela 13 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **14** e comparação com derivado **10**.

Posição	DERIVADO 14		DERIVADO 10	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	160,0	-	159,9
3	6,09 <i>sl</i>	112,2	6,10 <i>d</i> (1.1)	111,5
4	-	153,7	-	153,7
5	-	154,4	-	154,5
6	6,58 <i>s</i>	99,0	6,52 <i>s</i>	98,9
7	-	-	-	-
8	-	161,4	-	160,9
9	-	77,5	-	77,2
10	5,06 <i>s</i>	34,2	4,98 <i>s</i>	33,9
11	2,68 <i>sl</i>	24,4	2,66 <i>s</i>	24,4
12	-	168,7	-	168,5
13	3,60 <i>s</i>	51,1	3,58 <i>s</i>	51,1
4a	-	102,4	-	102,4
6a	-	157,9	-	157,7
10a	-	111,8	-	111,9
10b	-	148,4	-	148,1
1'	-	142,4	-	130,9
2'	6,50 <i>s</i>	104,9	7,13 <i>d</i> (8,4)	129,6
3'	-	152,9	7,40 <i>d</i> (8,4)	128,4
4'	-	136,4	-	145,8
5'	-	152,9	7,40 <i>d</i> (8,4)	128,4
6'	6,50 <i>s</i>	104,9	7,13 <i>d</i> (8,4)	129,6
7'	3,70 <i>s</i>	56,2	-	-
8'	3,66 <i>s</i>	60,3	-	-
9'	3,70 <i>s</i>	56,2	-	-
NH₂	7,61 <i>s</i>	-	7,62 <i>s</i>	-
	<i>(300 MHz ^1H, 75 MHz ^{13}C, DMSO-d_6)</i>		<i>(300 MHz ^1H, 75 MHz ^{13}C, DMSO-d_6)</i>	

5.1.12.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Para confirmação da massa molecular do derivado foi realizada a análise em espectrômetro de massa de alta resolução, que apresentou um pico no espectro (Figura 94) com relação massa carga (m/z) de 470,1472 para a massa do íon que corresponde $[\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_9+\text{H}]^+$ com valor teórico de massa calculada em m/z 470,1451.

Figura 94 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **14**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS BENZOPIRANOS, GRAU DE PUREZA E CARACTERIZAÇÃO

Assim como na reação para a obtenção dos derivados piranocumarínicos, a proposta de mecanismo de formação desta série de cromenos parte da formação do produto condensação através da condensação de Knoevenagel. Esta condensação ocorre entre o metilcianoacetato com o benzaldeído. Após a formação do produto de condensação ocorre uma adição de Michael com o floroglucinol, na posição β da hidroxila, assim também como ocorreu na reação com os derivados da metilcumarina. Por final há uma ciclização para obtenção da imina, onde o tauterismo iminia-enamina ocorre para a conformação mais estável da molécula, e assim obtivemos os derivados 4H-cromeno-3-carboxilatos para este estudo (MASESANE; MIHIGO, 2015) (KURTI; CZAKÓ, 2005) (KEERTHY et al., 2014).

O solvente utilizado, H₂O:MeOH (1:19, v/v), favoreceu esta reação de multi componentes em uma via. Isobe e colaboradores realizaram um estudo do efeito do solvente na condensação de Knoevenagel em sistema heterogêneo. Eles afirmam que o emprego de água como solvente traz benefícios, uma vez que a água é um solvente economicamente viável, não tóxico e ambientalmente correto. A água é um solvente prótico, e como já descrito no estudo é um solvente que tem efeito direto sobre a reação, como alterações no tempo de reação (ISOBE et al., 2005).

Figura 95 - Esquema de reação dos derivados 4-aryl-4H-cromenos.

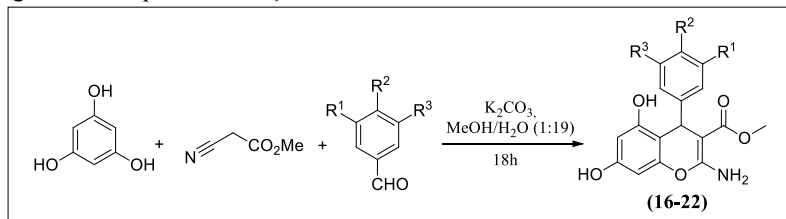
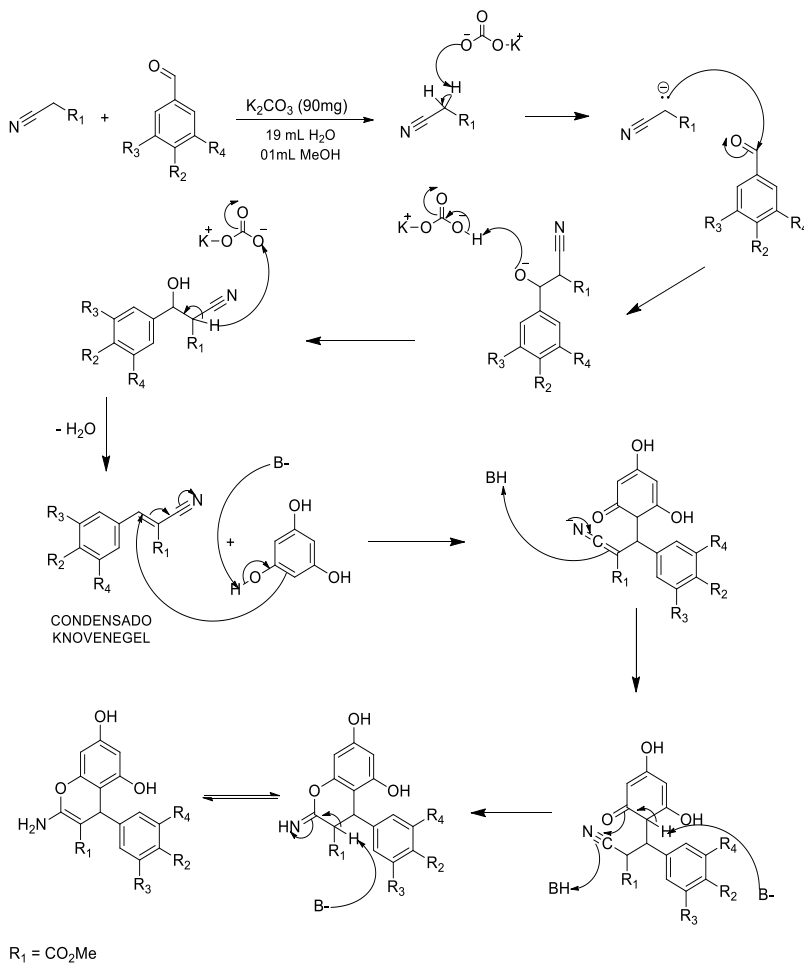


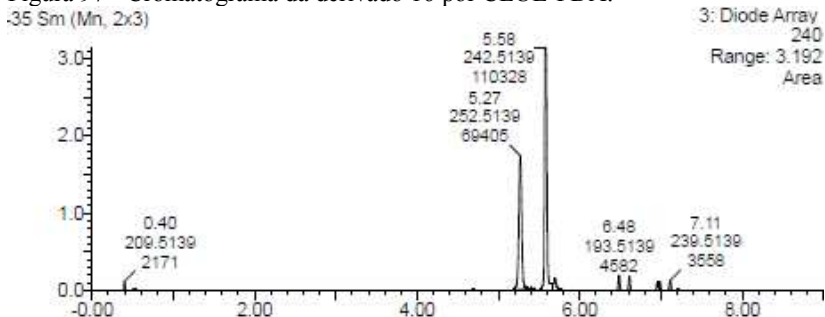
Figura 96 - Proposta de mecanismo de formação para obtenção dos derivados 4-*aril-4H*-cromenos.



5.2.1 Síntese do metil 2-amino-4-(4-clorofenil)-5,7-dihidroxi-4*H*-cromeno-3-carboxilato (16)

Para a obtenção deste derivado o benzaldeído utilizado foi o 4-clorobenzaldeído, e o tempo de reação foi de 18 horas. O produto reacional apresentou uma pureza de 58,7% através de análise LC-MS.

Figura 97 - Cromatograma da derivado 16 por CLUE-PDA.



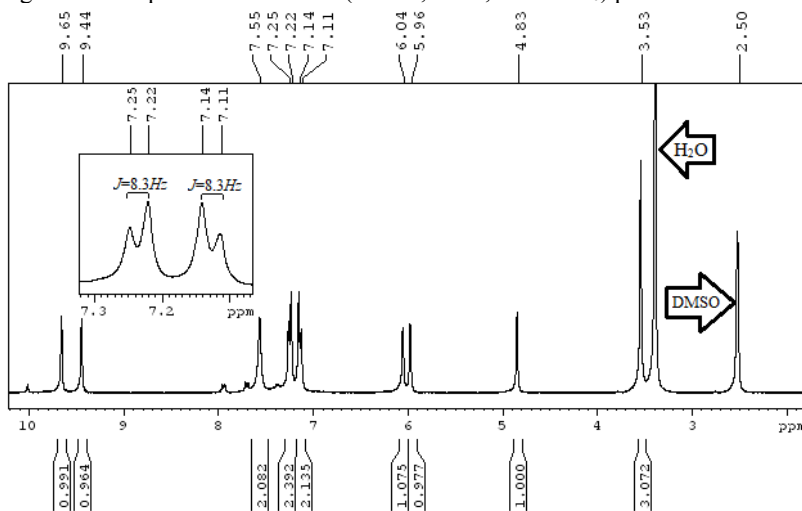
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.2.1.1 Caracterização Estrutural por RMN

O espectro de ^1H NMR apresentou dados na região de entre 9-10ppm característicos de H de hidroxila, como so *s* integrando pra 1H com valor de deslocamento de δ 9,64 e δ 9,43 ppm.. Em δ 7,55 ppm um singlete integrando pra 2H, incativo de de hidrogênio ligado a N em funções NH_x ; Na região dos H aromáticos o espectro apresentou os sinais: um *d* integrando pra 2H δ 7,23 ppm, com constante de acoplamento de 8,3Hz; um *d* integrando pra 2H δ 7,12 ppm, com J igual a 8,3Hz, sinais correlacionando entre si em um sistema aromático e integrando pra 2H, indicativo de anel aromático substituído em *p*.

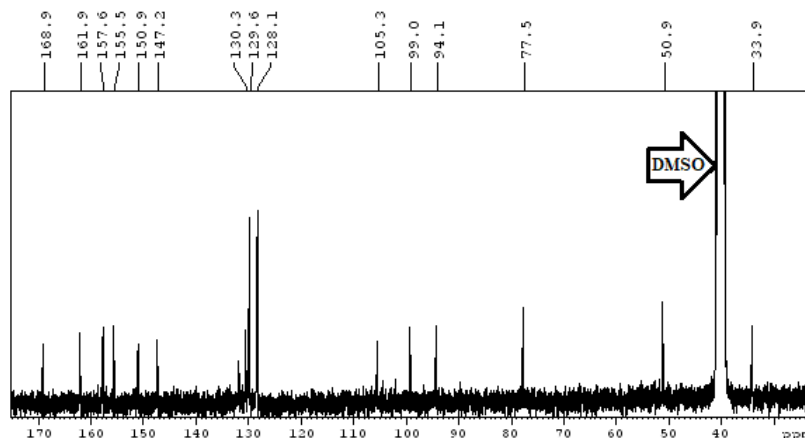
Outros sinais apresentados foram: um *sl* δ 6,04 ppm com integração igual a 1H, caracterizando hidrogênios aromáticos, o *s* (*sl*, 1H), assim como o singlete largo δ 5,96 ppm integrando pra 1H; o sinal *s* δ 4,83 ppm integrando pra 1 é indicativo de carbono com C viscinais olefinicos e/ou C ligados a $-\text{C}=\text{O}$ com ligações sp^3 e por fim o *s* δ 3,52 ppm integrando pra 3H característico hidrogênios de C sp^3 também.

Figura 98 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 16.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 99 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 16.

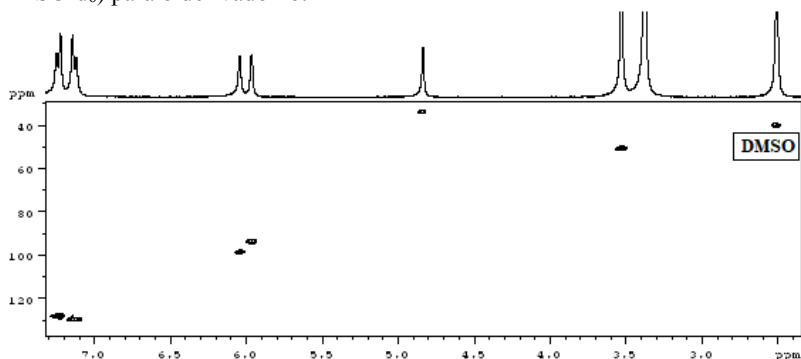


Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

O mapa de correlação HSQC correlacionou os carbonos ligados nos hidrogênios da molécula. Assim pode-se correlacionar os sinais de hidrogênio nas suas posições como: o sinal δ 3,52 ppm correlacionando com o C δ 50,8 (C-10), o δ 4,83 ppm correlaciona com o C δ 33,9 ppm

(C-4); o sinal δ 5,96 ppm correlaciona com o C δ 94,1 ppm (C-8), e o C δ 99,0 ppm com o ^1H δ 6,04 ppm (C-6).

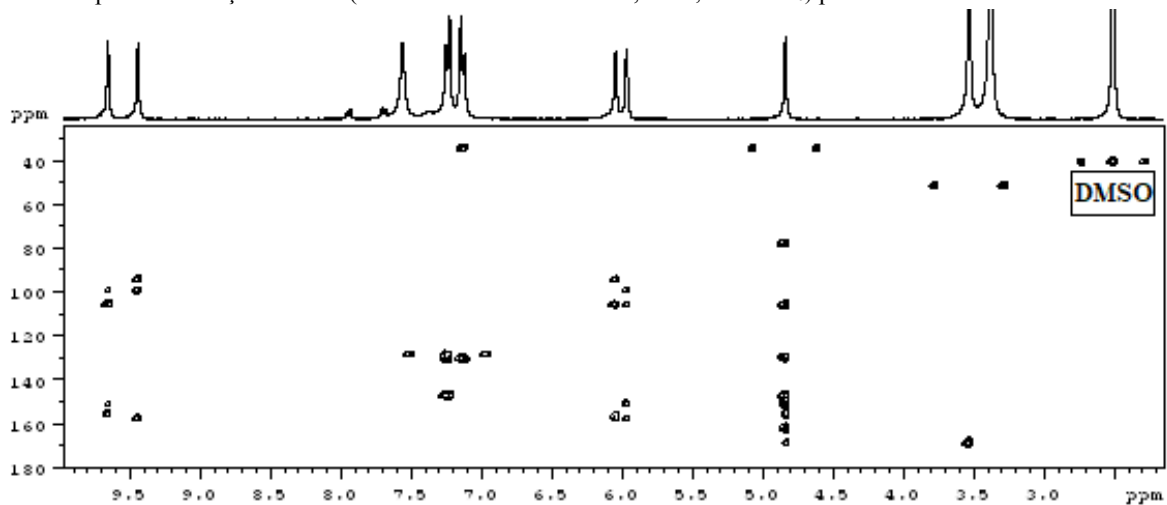
Figura 100 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado 16.



Observando o mapa de correlação HSQC pode-se, ainda, correlacionar os sinais de hidrogênio do anel aromático substituinte em C-4, o sinal δ 7,23 ppm com os dois C δ 128,1 e os dois sinais δ 7,12 com carbonos em C δ 129,6 ppm. Para as correlações 3J e caracterizar o derivado o mapa de correlação HMBC (Figura 100) apresentou correlações 3J , 2J ou 4J e a confirmação de alguns 1J .

Uma correlação 3J é observada entre o ^1H da posição C-10 e uma correlação mais fraca com o H-4, o sinal em δ 168,9 ppm, que é característico de carbonila de éster, indicando ser o carbono da posição 9. O mapa mostra também uma correlação 3J do H-4 com o sinal δ 161,9 ppm este sinal, caracteriza sendo o C-2, confirmado pela correlação com os H do NH_2 . O sinal do C δ 157,5 ppm, indicativo de carboxila presente em anel tem correlação com os sinais de H δ 9,43 ppm, e correlações mais fracas com os sinais δ 6,04 ppm e δ 5,96 ppm, caracterizando na posição C-7. O sinal ^1H : δ 9,64 ppm é indicativo da posição C-5 devido a sua correlação com o C δ 105,3 ppm, sendo que o H δ 9,43 ppm não possui esta correlação. Correlações em 3J com o C δ 155,4 ppm, sinal indicativo também de carbonila aromática, são observadas com os ^1H : δ 9,64 ppm, δ 4,83 ppm, e um correlação menos intensa com o ^1H δ 6,04 ppm, indicando a posição C-5.

Figura 101 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) para o derivado **16**.



Uma correlação 3J com o sinal δ 150,8ppm, indica carbono de carboxila aromática, é observado no ^1H δ 4,83ppm, e correlações mais fracas com o ^1H δ 5,96ppm e com o δ 9,64ppm, caracterizando a posição 8a. O sinal de ^{13}C δ 147,2ppm tem duas correlações fortes, 3J com os sinais de ^1H 7,23ppm e δ 4,83ppm, sendo identificado com o C-1'. Os sinais de ^1H aromáticos δ 7,23 e 7,12ppm tem acoplamento com o sinal ^{13}C δ 130,3ppm, carbono de anel aromático ligado a halogenado, indicando a posição C-4'.

Figura 102 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) de para o derivado **16**, ampliado nas áreas ^1H 8,00 - 4,50 ppm e de ^{13}C 120 - 180 ppm.

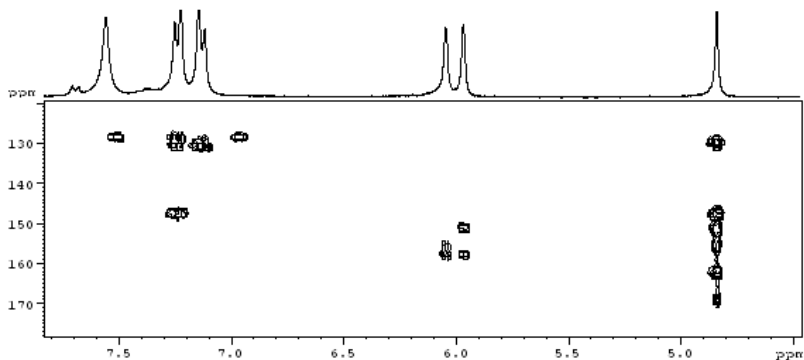
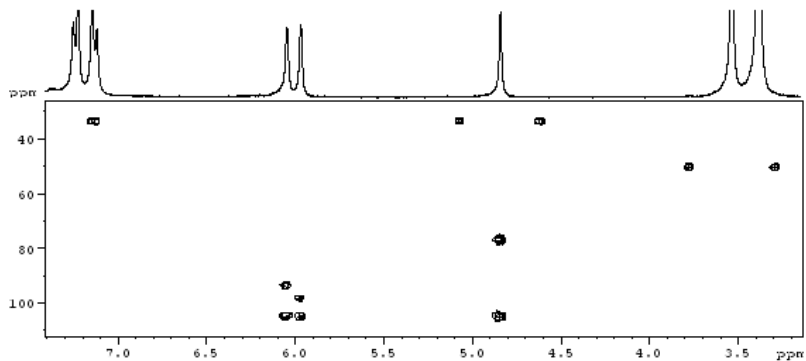


Figura 103 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) de para o derivado **16**, ampliado nas áreas ^1H 7,50 - 3,00 ppm e de ^{13}C 25 - 115 ppm..



Correlações com o sinal δ 105,3 ppm foram observadas nos sinais de ^1H : δ 9,64; δ 6,06; δ 5,96; δ 4,83 ppm, caracterizando a posição C-4a e por fim é possível observar sinais confirmatórios de 1J para os sinais de ^1H δ 7,23 ppm, δ 4,8 3ppm, δ 3,52 ppm. O sinal ^{13}C δ 77,7 ppm, indicativo de carbono olefínico ligado a átomo de oxigênio, tem uma correlação com o ^1H δ 4,83 ppm, caracterizando a posição C-3.

Os dados obtidos na análise de RMN relacionados cada um em sua posição estão compilados e apresentados na tabela 14, e a caracterização do derivado por RMN foi considerada satisfatória.

Tabela 14 – Dados compilados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **16**.

Posição	DERIVADO 16	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-
2	-	161,9
3	-l	77,5
4	4,83 s	33,9
5	-	155,4
6	6,04 sl	99,0
7	-	157,5
8	5,96 sl	94,1
9	-	168,9
10	3,52 s	50,8
4a	-	105,3
8a	-	150,9
1'	-	147,2
2'	7,12 d (8.3)	129,6
3'	7,23 d (8.3)	128,1
4'	-	130,3
5'	7,23 d (8.3)	128,1
6'	7,12 d (8.3)	129,6
NH₂	7,55 s	-
OH	9,43 s	-
OH	9,64 s	-

(300 MHz ^1H ,
75 MHz ^{13}C ,
DMSO- d_6)

5.2.1.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

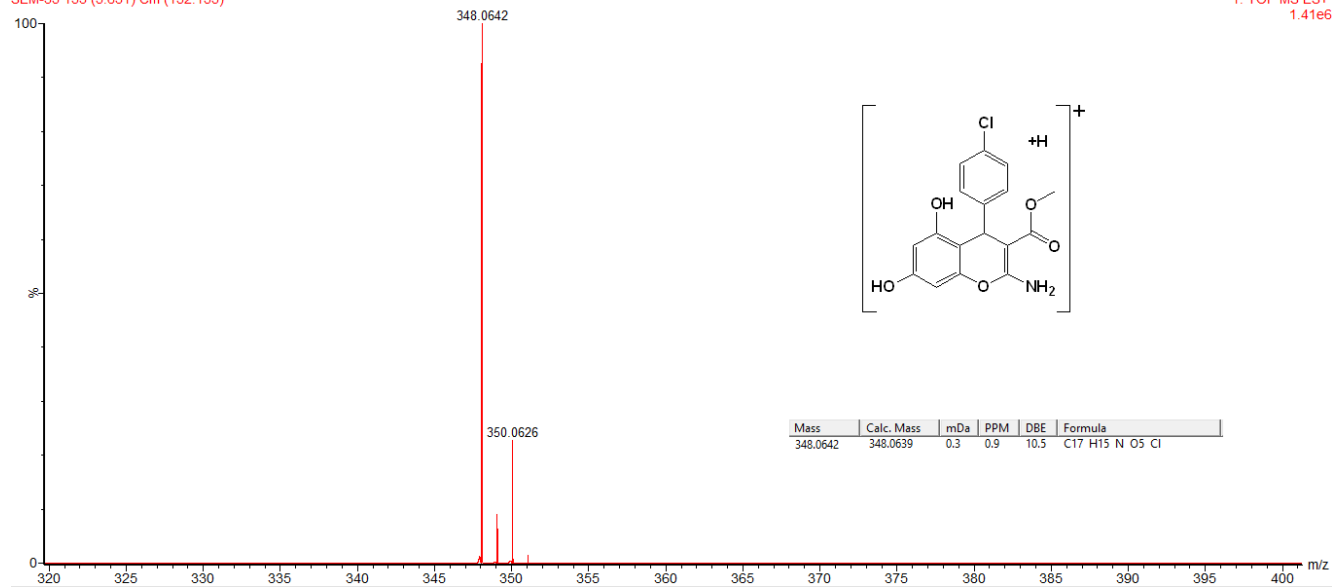
A análise do espectro (Figura 104) observou-se dois picos, de padrão isotrópico 3:1, característicos de átomo de Cl. O pico de maior intensidade apresentou um valor de relação massa carga (m/z) de 348,0642, $[\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{NO}_5^{35}\text{Cl}+\text{H}]^+$ e teve massa teórica calculada em m/z 348,0639. O segundo pico apresentou valor de m/z 350,0642 o qual corresponde a massa da fórmula $[\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{NO}_5^{37}\text{Cl}+\text{H}]^+$ com valor teórico calculado em m/z 350,0604.

O espectrograma é característico do isótopo do elemento ^{35}Cl e ^{37}Cl , a diferença da intensidade dos picos é explicada pela abundância destes isótopos na natureza, que é de 75,77% e 24,23% respectivamente.

Figura 104 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **16**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).

SEM-35 153 (5.631) Cm (152:155)

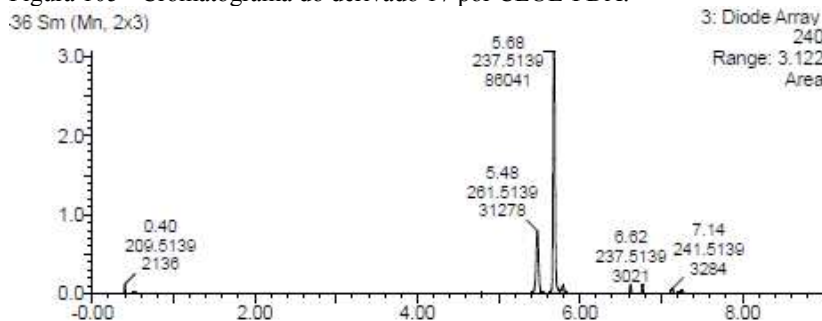
1: TOF MS ES+
1.41e6



5.2.2 Síntese do metil 2-amino-4-(4-bromofenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (17)

Como estratégia para a substituição do halogenado na posição 4' esta reação fez uso do 4-bromobenzaldeído, o tempo de reação foi padrão de 18 horas. A reação resultou em um produto com uma pureza de 69,6%.

Figura 105 - Cromatograma do derivado 17 por CLUE-PDA.



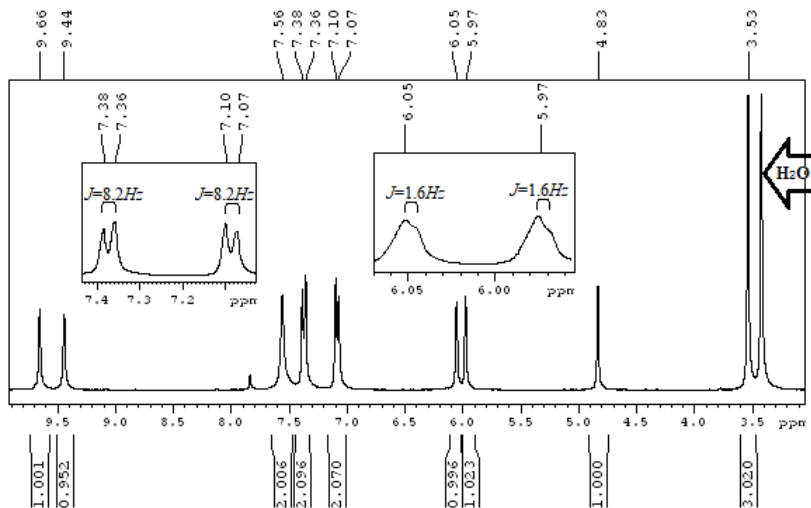
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.2.2.1 Caracterização Estrutural por RMN

O espectro de ^1H RMN apresentou sinais com valor de deslocamento: singlete δ 9,65 ppm integrando pra 1H, δ 9,44 ppm integrando pra 1H, ambos valores indicativos de hidrogênios de hidroxila; um *s* δ 7,55 ppm integrando pra 2H, indicativos de hidrogênios NH_2 , característicos dos cromenos sintetizados neste estudo.

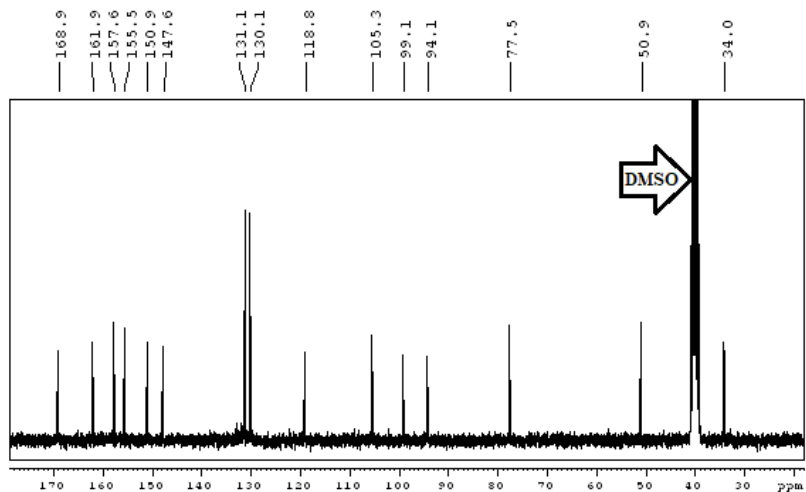
Outros sinais observados foram: um *d* δ 7,37 ppm com constante de acoplamento com valor de 8,2Hz integrando pra 2H, e *d* δ 7,08 ppm integrando pra 2H e com $J=8,2\text{Hz}$, são característicos de H aromáticos integrando entre eles com sinais levemente mais desblindados; um *d* em δ 6,05 ppm integrando pra 1H, com valor de $J = 1,6\text{Hz}$, e outro duplete δ 5,97 ppm integrando pra 1H com $J = 1,6\text{Hz}$, indicando sinais de H aromáticos acoplando entre eles em posição *orto*.

Figura 106 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 17.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 107 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado 17.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

O singlete em δ 4,82 integrando pra 1H indicativo de hidrogenio de metino, e um ultimo sinal *s* em δ 3,52ppm integrando pra 3H característico de carbono sp^3 . O espectro de ^{13}C RMN apresentou sinais indicativos de carbonos de carbonilas, de carboxilas de carbonos aromático e olefinicos e carbonos sp^3 .

Tabela 15 – Dados de 1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **17** comparados aos dados do derivado **16**.

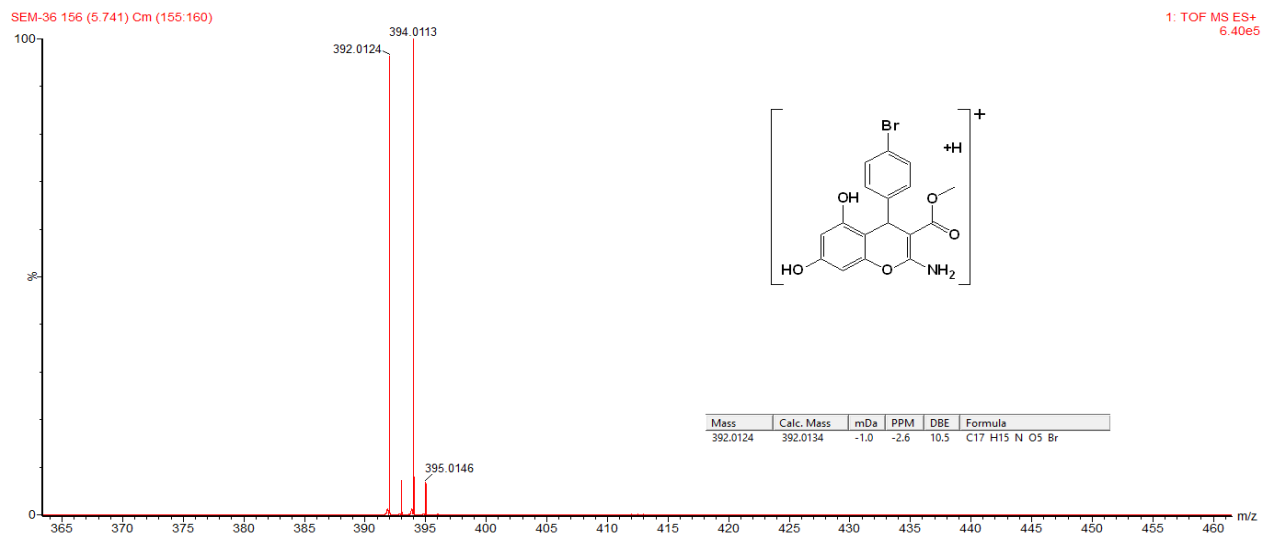
Posição	DERIVADO 17		DERIVADO 16	
	δ 1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ 1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	161,8	-	161,9
3	-	77,4	- <i>l</i>	77,5
4	4,82 <i>s</i>	33,9	4,83 <i>s</i>	33,9
5	-	155,5	-	155,4
6	6,05 <i>d</i> (1.6)	99,0	6,04 <i>sl</i>	99,0
7	-	157,6	-	157,5
8	5,97 <i>d</i> (1.6)	94,0	5,96 <i>sl</i>	94,1
9	-	168,9	-	168,9
10	3,52 <i>s</i>	50,8	3,52 <i>s</i>	50,8
4a	-	105,2	-	105,3
8a	-	150,8	-	150,9
1°	-	147,6	-	147,2
2°	7,08 <i>d</i> (8.2)	131,1	7,12 <i>d</i> (8.3)	129,6
3°	7,37 <i>d</i> (8.2)	130,1	7,23 <i>d</i> (8.3)	128,1
4°	-	118,8	-	130,3
5°	7,37 <i>d</i> (8.2)	130,1	7,23 <i>d</i> (8.3)	128,1
6°	7,08 <i>d</i> (8.2)	131,1	7,12 <i>d</i> (8.3)	129,6
NH₂	7,55 <i>s</i>	-	7,55 <i>s</i>	-
OH	9,44 <i>s</i>	-	9,43 <i>s</i>	-
OH	9,65 <i>s</i>	-	9,64 <i>s</i>	-
	(300 MHz 1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)		(300 MHz 1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	

5.2.2.2 Caracterização por Espectrometri de Massa de Alta Resolução

O espectro de massa de alta resolução (Figura 108) apresentou dois picos de padrão isotópico 1:1, característico de átomo Br, de praticamente mesma intensidade e com valores de relação massa carga (m/z) de 392,0124 para $[C_{17}H_{14}NO_5^{79}Br+H]^+$, o valor teórico calculado foi m/z 392,0134. O pico com m/z 394,0113 correspondente ao ión $[C_{17}H_{14}NO_5^{81}Br+H]^+$, com valor teórico calculado para m/z 394,0108, confirmando assim a massa molecular do composto sintetizado.

Os valores de m/z representam o padrão isotópico do ^{79}Br e o ^{81}Br , e a intensidade dos picos do espectrograma é explicada pela abundância destes isótopos na natureza que é de aproximadamente 50% entre os isótopos.

Figura 108 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **17**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).

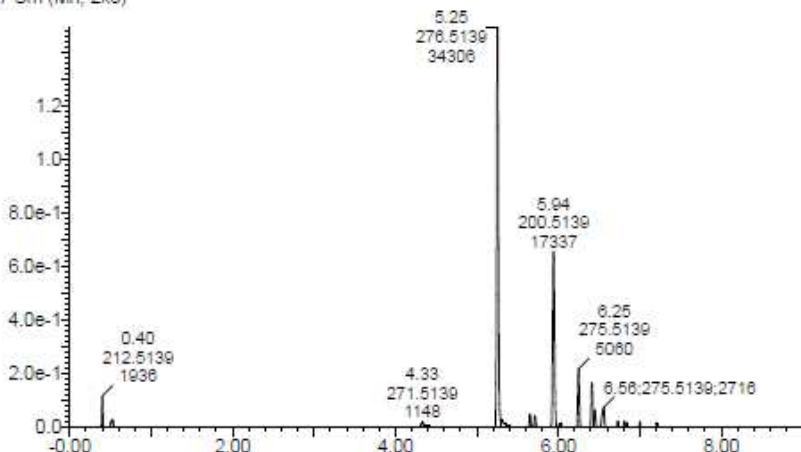


5.2.3 Síntese do metil 2-amino-4-(4-nitrofenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (18)

A obtenção deste derivado se deu pela substituição do átomo halogenado na posição 4' por um grupo NO₂ para tal foi utilizado como reagente o 4-nitrobenzaldeído, o tempo de reação foi de 18 horas. O produto reacional foi obtido com uma pureza de 56,6%.

Figura 109 - Cromatograma da derivado **18** por CLUE-PDA.

37 Sm (Mn, 2x3)



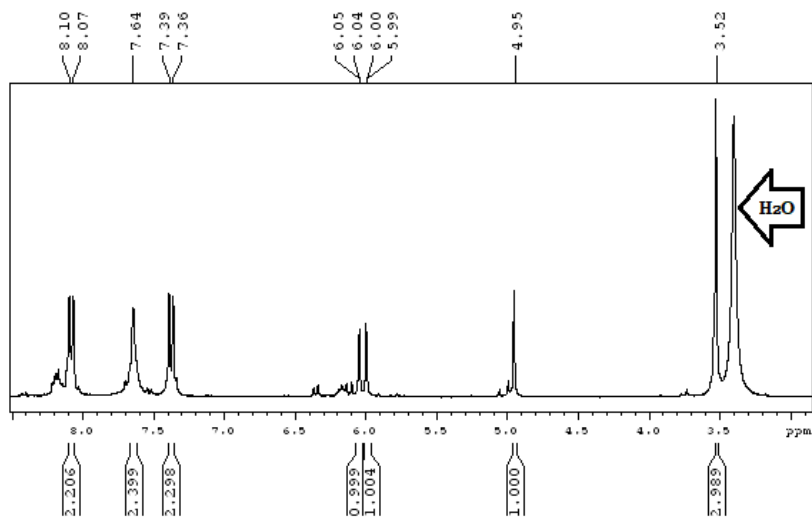
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.2.3.1 Caracterização Estrutural por RMN

Os dados obtidos no espectro de ¹H RMN foram: um *d* δ 8,08 integrando pra 2H e com constante de acoplamento de 8,6Hz; outro *d* δ 7,37 integrando pra 2H e com *J* = 8,6Hz, indicativos de hidrogênio aromáticos com sinais mais desblindados devido a átomo ou grupo eletronegativo presente no sistema de anel, indicando a modificação no sistema aril.

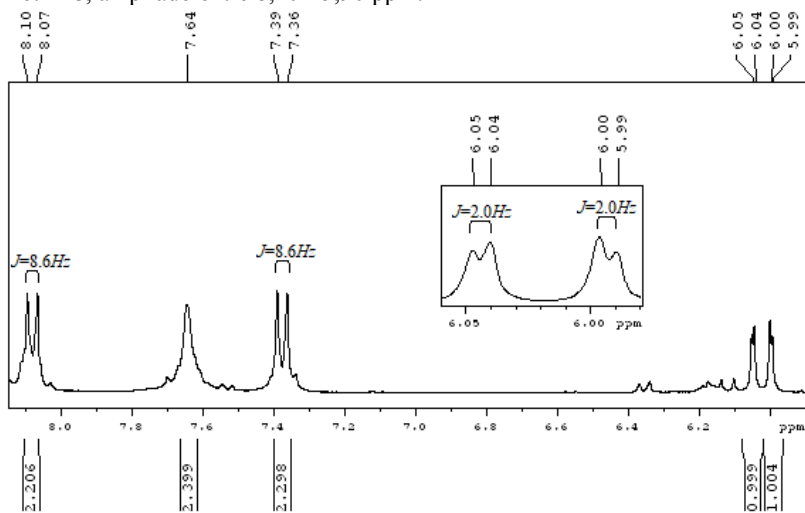
O sinal *s* δ 7,64 ppm integrando pra 2H, indicando ser um hidrogênio NH₂; um sinal de *d* δ 6,04 ppm integrando pra 1H com *J* = 2,0Hz, característico de H aromático acoplando com o *d* em δ 5,99ppm com *J* = 2,0Hz integrando pra 1H, também indicativo de hidrogênio aromático, característicos dos cromenos desta série.

Figura 110 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **18**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

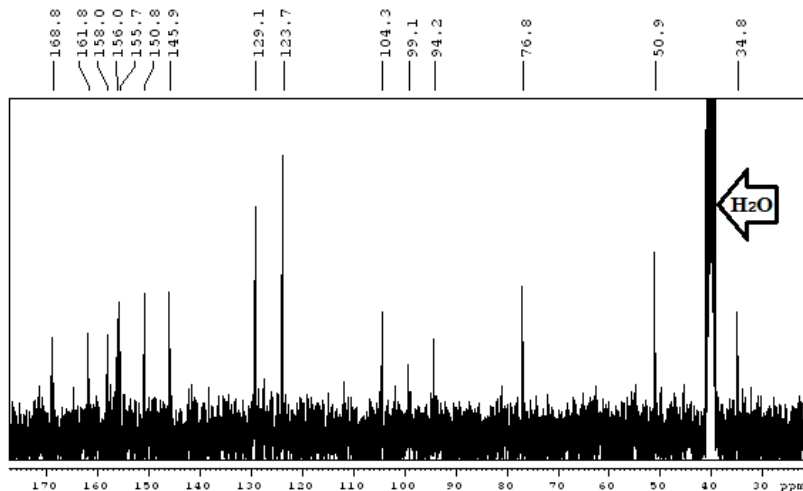
Figura 111 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado metil **18**, ampliado entre 8,20 - 5,90 ppm.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Os sinais mais desblindados foram um *s* em δ 4,95 integrando pra 1H, característico de carbono metínico e δ 3,52 integrando pra 3H também indicativo de carbono sp^3 .

Figura 112 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **18**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Tabela 16 – Dados de 1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **18**, comparados aos dados do derivado **16**.

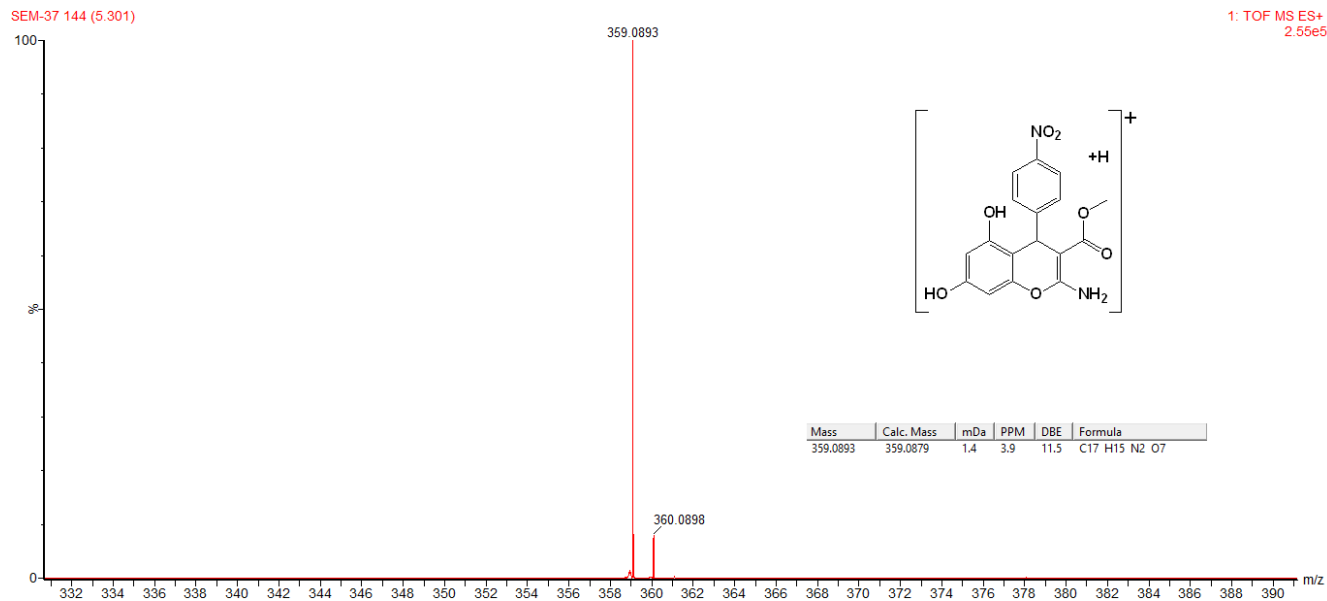
Posição	DERIVADO 18		DERIVADO 16	
	δ 1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C	δ 1H <i>mult.</i> (J Hz)	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	161,8	-	161,9
3	-	76,8	- <i>l</i>	77,5
4	4,95 <i>s</i>	34,8	4,83 <i>s</i>	33,9
5	-	155,7	-	155,4
6	6,04 <i>d</i> (2.0)	99,1	6,04 <i>sl</i>	99,0
7	-	158,0	-	157,5
8	5,99 <i>d</i> (2.0)	94,2	5,96 <i>sl</i>	94,1
9	-	168,8	-	168,9
10	3,52 <i>s</i>	50,9	3,52 <i>s</i>	50,8
4a	-	104,3	-	105,3
8a	-	150,8	-	150,9
1°	-	156,0	-	147,2
2°	7,37 <i>d</i> (8.6)	129,1	7,12 <i>d</i> (8.3)	129,6
3°	8,08 <i>d</i> (8.6)	123,7	7,23 <i>d</i> (8.3)	128,1
4°	-	145,9	-	130,3

5'	8,08 <i>d</i> (8.6)	123,7	7,23 <i>d</i> (8.3)	128,1
6'	7,37 <i>d</i> (8.6)	129,1	7,12 <i>d</i> (8.3)	129,6
NH₂	7,64 <i>s</i>	-	7,55 <i>s</i>	-
OH	-	-	9,43 <i>s</i>	-
OH	-	-	9,64 <i>s</i>	-
	(300 MHz ¹ H, 75 MHz ¹³ C, DMSO- <i>d</i> ₆)		(300 MHz ¹ H, 75 MHz ¹³ C, DMSO- <i>d</i> ₆)	

5.2.3.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

O espectro reportou um pico com valor de relação massa carga (m/z) de 359,0893, que é atribuído ao valor do ión da molécula [C₁₇H₁₄N₂O₇+H]⁺, onde o valor teórico calculado foi de m/z 359,0879, confirmando assim a massa do produto da reação como sendo o composto **18**.

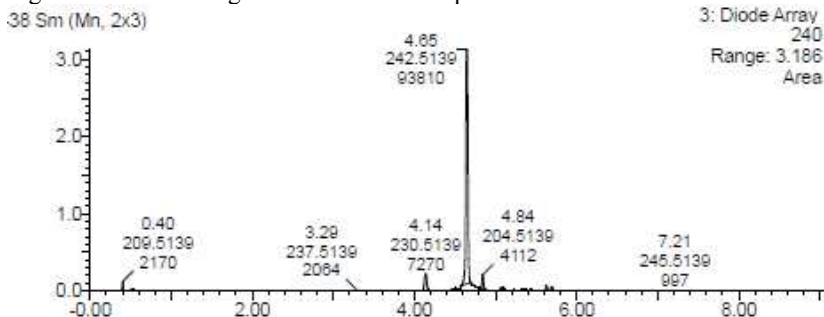
Figura 113 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado derivado **18**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.2.4 Síntese do metil 2-amino-4-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (19)

Continuando a estratégia de modificar o substituinte aril na posição 4, para este derivado foram adicionados duas metoxilas, um na posição 3' e outro na 4'. Para isto o reagente selecionado foi o 3,4-hidroxibenzaldeído, o tempo de reação foi de 18 horas, e o produto reacional foi obtido com uma pureza de 86,5%.

Figura 114 - Cromatograma da derivado **19** por CLUE-PDA.



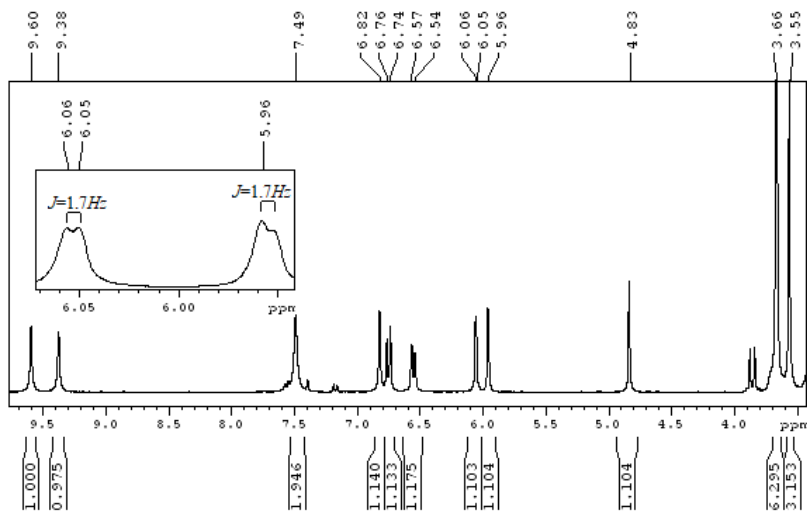
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.2.4.1 Caracterização por RMN

O espectro de ^1H NMR (Figura 113) apresentou os sinais característicos desta série de cromenos em δ 9,35, δ 9,30 ppm, ambos integrando pra 1H, e um *s* em δ 7,40 ppm integrando pra 2H.

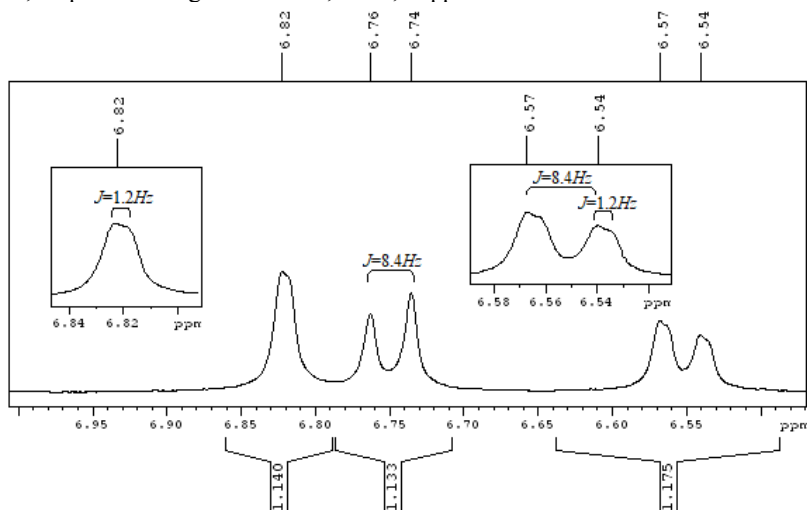
Outros sinais apresentados são: um *d* em δ 6,82 ppm integrando pra 1H com $J = 1,2\text{Hz}$, um *d* δ 6,75 ppm $J=8,4\text{Hz}$, integrando pra 1H; e um sinal *dd* δ 6,55 ppm integrando pra 1H e com constantes de acoplamento de 8,4Hz e 1,2Hz em com são sinais característico de sistema ABX ; o sinal de *d* δ 6.05 ppm integrando pra 1H e com $J = 1,7\text{Hz}$, acoplando com *d* δ 5,95 com $J = 1,7\text{Hz}$, 1H.

Figura 115 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **19**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

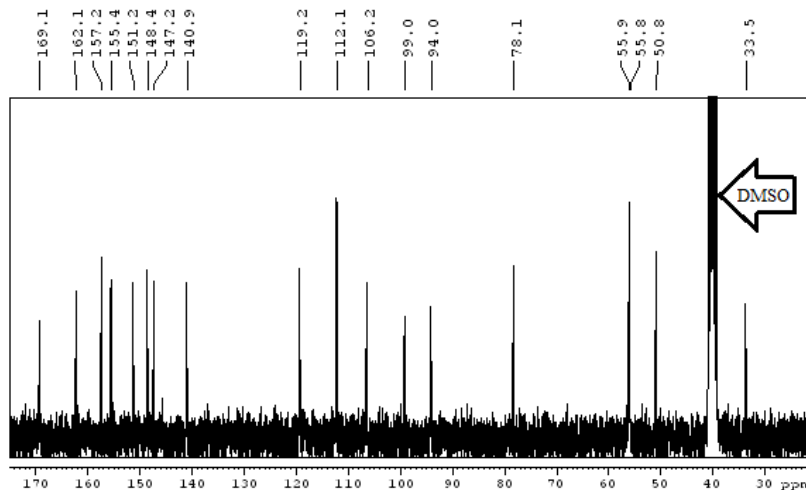
Figura 116 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **19**, ampliado na região entre δ 7,05 - 6,48 ppm.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Outros sinais observados foram: um s δ 4,83 integrando pra 1H; um s em δ 3,66 ppm integrando pra 3H, e um s em 3,65 ppm integrando pra 3H, δ 3,55 ppm integrando pra 3H todos indicativos de hidrogênio metínicos.

Figura 117 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **19**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Tabela 17 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **19**, comparados aos dados do derivado **16**.

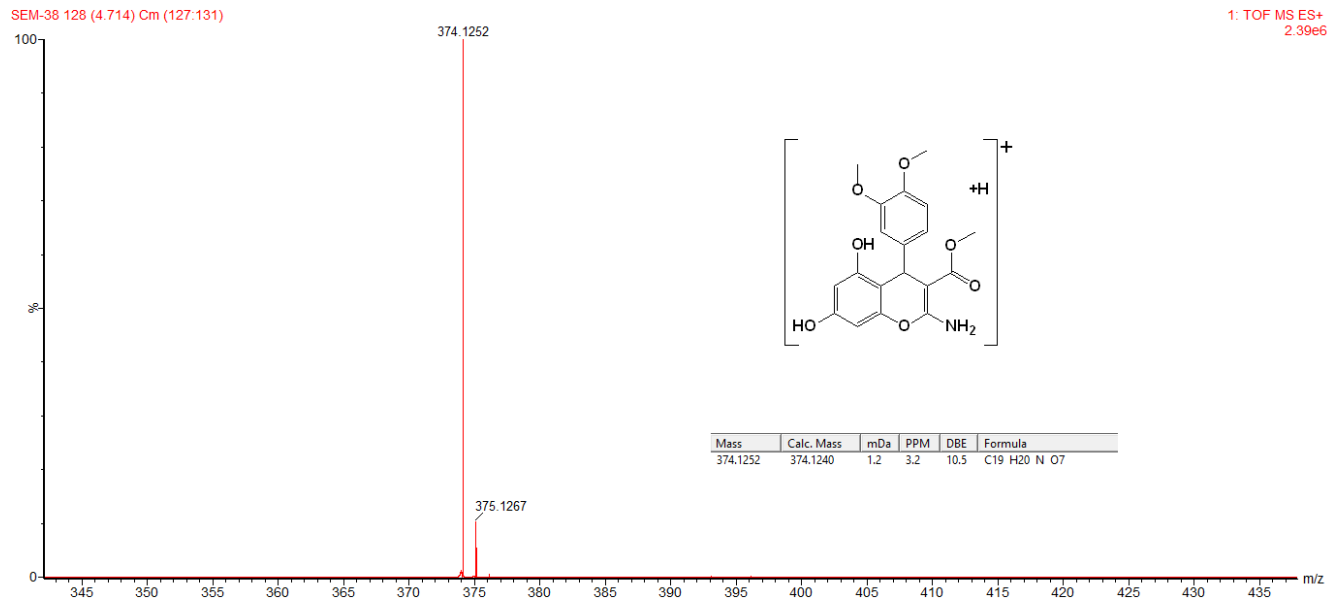
Posição	DERIVADO 19		DERIVADO 16	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	162,0	-	161,9
3	-	78,1	-	77,5
4	4,83 <i>s</i>	33,5	4,83 <i>s</i>	33,9
5	-	155,3	-	155,4
6	6,05 <i>d</i> (1.7)	99,0	6,04 <i>sl</i>	99,0
7	-	157,2	-	157,5
8	5,95 <i>d</i> (1.7)	94,0	5,96 <i>sl</i>	94,1
9	-	169,1	-	168,9
10	3,52 <i>s</i>	50,8	3,52 <i>s</i>	50,8
4a	-	106,2	-	105,3
8a	-	151,1	-	150,9
1'	-	140,9	-	147,2
2'	6,82 <i>d</i> (1.2)	112,0	7,12 <i>d</i> (8.3)	129,6
3'	-	148,4	7,23 <i>d</i> (8.3)	128,1

4'	-	147,2	-	130,3
5'	6,75 <i>d</i> (8.4)	112,1	7,23 <i>d</i> (8.3)	128,1
6'	6,55 <i>dd</i> (8.4, 1.2)	119,2	7,12 <i>d</i> (8.3)	129,6
7'	3,66 <i>s</i> -	55,9	-	-
8'	3,65 <i>s</i>	55,8	-	-
NH₂	7,64 <i>s</i>	-	7,55 <i>s</i>	-
OH	9,35 <i>s</i>	-	9,43 <i>s</i>	-
OH	9,30 <i>s</i>	-	9,64 <i>s</i>	-
	(300 MHz ¹ H, 75 MHz ¹³ C, DMSO- <i>d</i> ₆)		(300 MHz ¹ H, 75 MHz ¹³ C, DMSO- <i>d</i> ₆)	

5.2.4.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

O espectrograma reportou um pico com valor de relação massa carga (*m/z*) de 374,1252, que é atribuído ao valor do ión da molécula [C₁₉H₁₉NO₇+H]⁺, onde o valor teórico calculado foi de 374,1240, confirmando assim a massa do produto da reação como sendo o composto **19**.

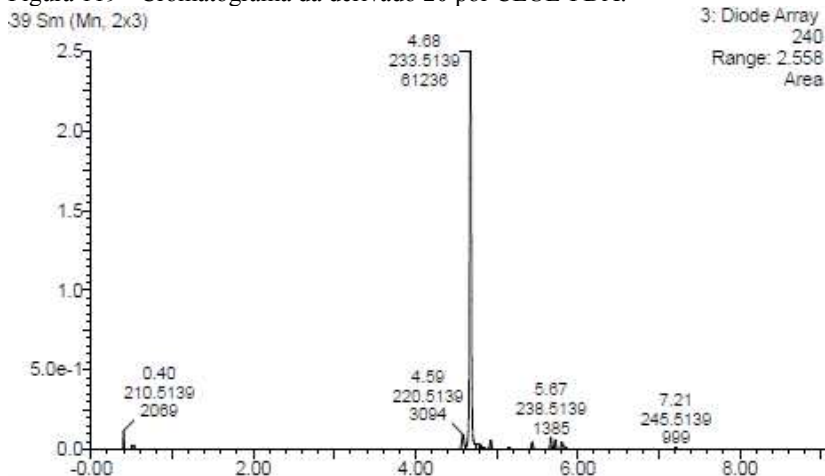
Figura 118 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado derivado **19**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.2.5 Síntese do metil 2-amino-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (20)

Um novo derivado foi sintetizado, adicionando uma metoxila na posição 5', e para realizar esta adição o reagente utilizado foi o 3,4,5-trimetoxibenzaldeído. O tempo de reação foi de 18 horas. A reação resultou em um derivado com uma pureza de 91,7%.

Figura 119 - Cromatograma da derivado 20 por CLUE-PDA.

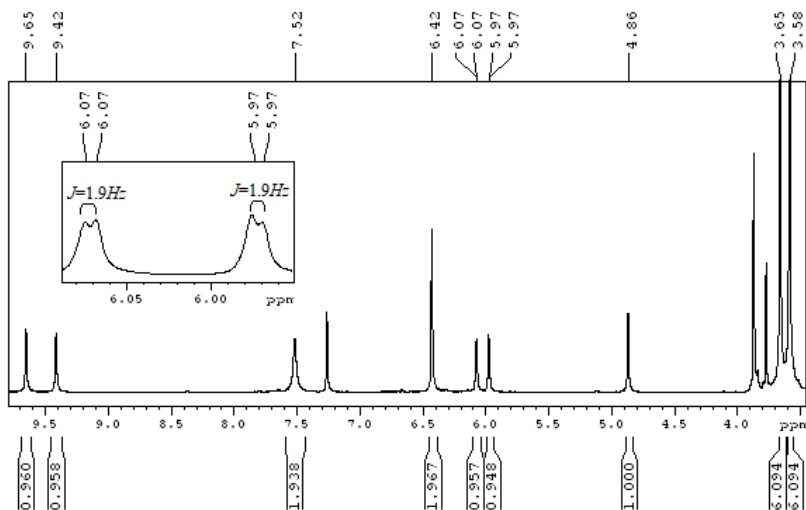


Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.2.5.1 Caracterização por RMN

Os seguintes sinais foram identificados no espectro de ^1H RMN: um *s* em δ 9,65 ppm integrando pra 1H, um *s* δ 9,41 ppm integrando pra 1H, ambos hidrogênios de hidroxila. O sinal em δ 7,51 ppm intregando pra 2H, indicativo de C-O; um sinal de *s* em δ 6,42, indicando ser H de anel aromático. Ainda é possível observar um *d* em δ 6,07 com $J=1,8\text{Hz}$ integrando pra 1H, um *d* em δ 5,97 com $J=1,8\text{Hz}$ integrando pra 1H, indicando hidrogênios aromáticos com acoplamento entre si em *orto*.

Figura 120 – Espectro de ^1H RMN (300MHz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **20**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 121 – Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) de para o derivado **20**.

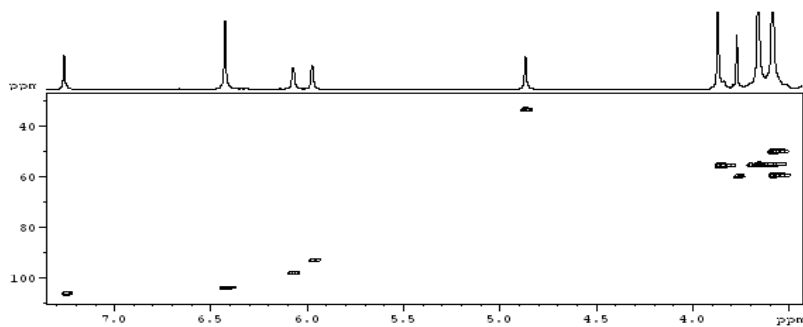
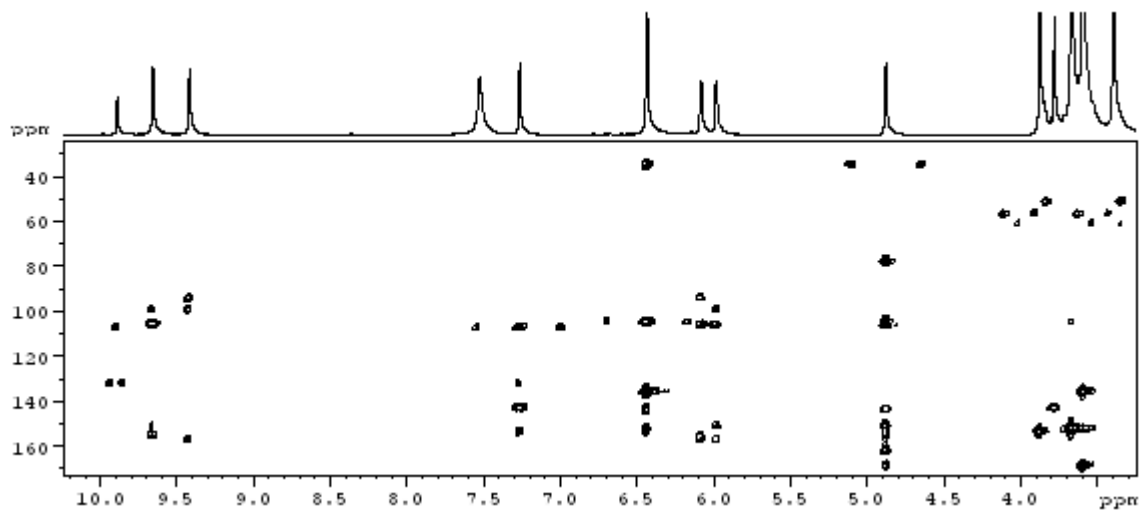
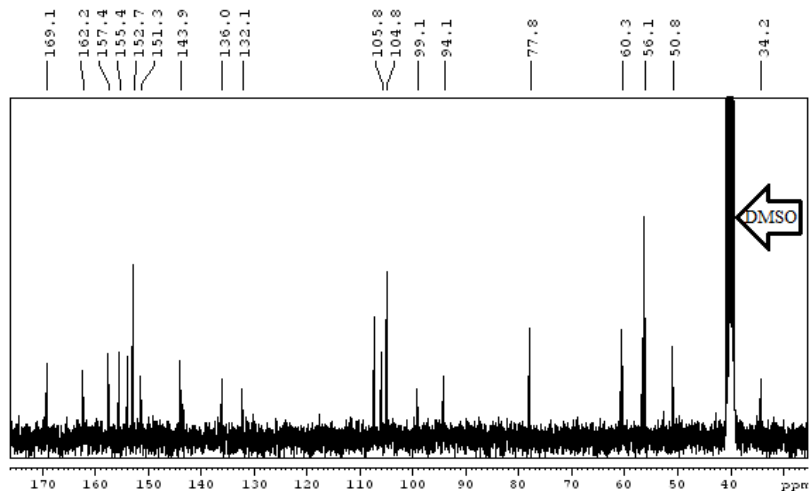


Figura 122 – Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, DMSO- d_6) de para o derivado **20**.



Os demais sinais indetificados foram sinais desblindados: um *s* em δ 4,86 ppm integrando pra 1H, um *s* em δ 3,57 ppm integrando em 6H, por sinais sobrepostos de ^1H em carbonos sp^3 , um *s* em δ 3,65ppm integrando pra 6H, indicando hidrogenios ligados a carbonos metínicos.

Figura 123 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **20**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

O processo de recuperação dos compostos derivados deste série apresentou não ser totalmente efetivo para retirar todos os reagentes, é possível ver sinais de produto de partida, provável produto de partida. Correlacionando com um valor mais baixo de pureza, assim fez uso dos mapas de correlação para caracterizar este derivado. No mapa de correlação HMBC foi possível identificar as ligações spin-spin C-H.

O mapa de correlações HMBC apresentou as correlções do ^1H δ 4,86 com os ^{13}C : δ 169,1; 162,2; 77,8ppm são característicos para as posições do carboxilato e da função amino. Este mesmo sinal tem correlações com os ^{13}C : δ 151,5; 105,9; 155,4 ppm indicativos de anel aromático e de C com hidroxilas ligadas ao anel e ainda há correlações com o aril: δ 143,9, 104,8 ppm. Os dois últimos sinais são característicos do sistema aril trissubstituído, possuem correlação com o sinal de ^1H δ 6,42 ppm integrando pra 2H ele está ligado ao carbono 104,8 ppm, apresentado pelo mapa de correlação HSQC, confirmando sua posição pela correlação com o ^{13}C δ 34,3 ppm, carbono este onde está presente o H δ 4,86ppm. Já os sinais de correlação dos ^1H δ 6,02 e 5,97ppm confirmam o anel benzênico ligado ao anel pirano principalmente pelas correlações 3J com o sinal em δ 105,9 ppm e com o δ 151,5 ppm respectivamente, e dados apresentados na tabela 18.

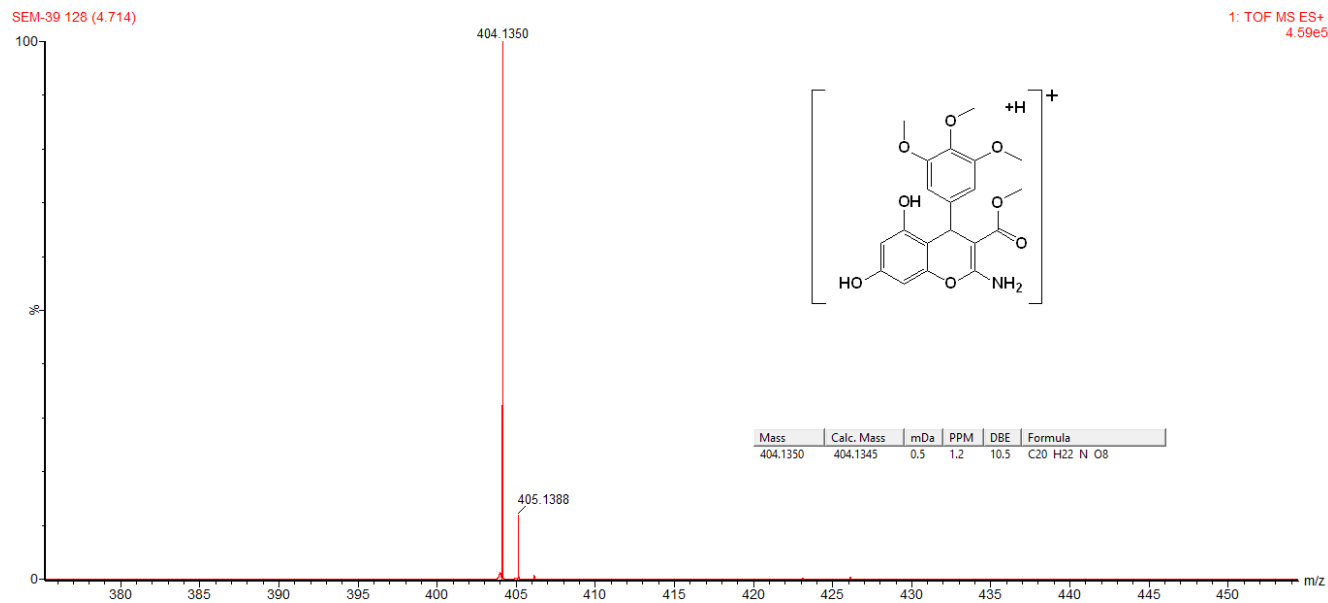
Tabela 18 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **20**, comparados aos dados do derivado **19**.

Posição	DERIVADO 20		DERIVADO 19	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	162,2	-	162,0
3	-	77,8	-	78,1
4	4,86 <i>s</i>	34,3	4,83 <i>s</i>	33,5
5	-	155,4	-	155,3
6	6,02 <i>d</i> (1.9)	99,1	6,05 <i>d</i> (1.7)	99,0
7	-	157,4	-	157,2
8	5,97 <i>d</i> (1.9)	94,1	5,95 <i>d</i> (1.7)	94,0
9	-	169,1	-	169,1
10	3,57 <i>s</i>	50,8	3,52 <i>s</i>	50,8
4a	-	105,9	-	106,2
8a	-	151,3	-	151,1
1°	-	143,9	-	141,9
2°	6,42 <i>s</i>	104,8	6,82 <i>d</i> (1.2)	112,0
3°	-	152,7	-	148,4
4°	-	136,0	-	147,2
5°	-	152,7	6,75 <i>d</i> (8.4)	112,1
6°	6,42 <i>s</i>	104,8	6,55 <i>dd</i> (8.4, 1.2)	119,2
7°	3,66 <i>s</i>	56,1	3,66 <i>s</i>	55,9
8°	3,57 <i>s</i>	60,3	3,65 <i>s</i>	55,9
9°	3,66 <i>s</i>	56,1	-	-
NH₂	7,64 <i>s</i>	-	7,64 <i>s</i>	-
OH	9,35 <i>s</i>	-	9,35 <i>s</i>	-
OH	9,30 <i>s</i>	-	9,30 <i>s</i>	-
	(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)		(300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C , DMSO- d_6)	

5.2.5.1 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Para confirmação da massa molecular do derivado foi realizada a análise em espectrômetro de massa de alta resolução, que apresentou um pico no espectro (Figura 124) com relação massa carga (m/z) de 404,1350 para a massa do íon que corresponde $[\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_8+\text{H}]^+$ com valor teórico de massa calculada em m/z 404,1345.

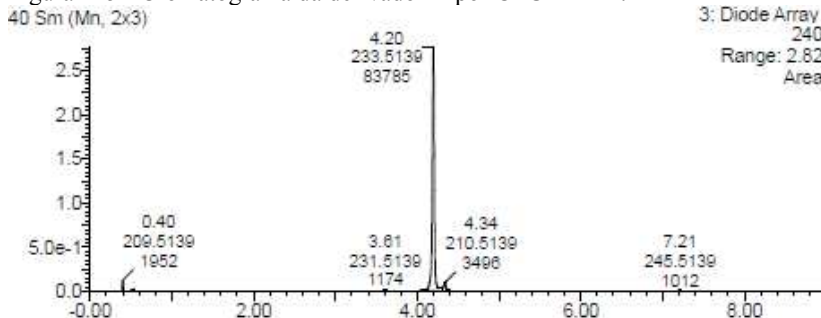
Figura 124 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **20**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.2.6 Síntese do metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-metóxi-fenil)-4H-cromeno-3-carboxilato (21)

Para este composto o benzaldeído utilizado foi o siringaldeído, e o tempo de reação foi de 18 horas, e a reação resultou em um produto com uma pureza de 93,6%.

Figura 125 - Cromatograma da derivado 21 por CLUE-PDA.



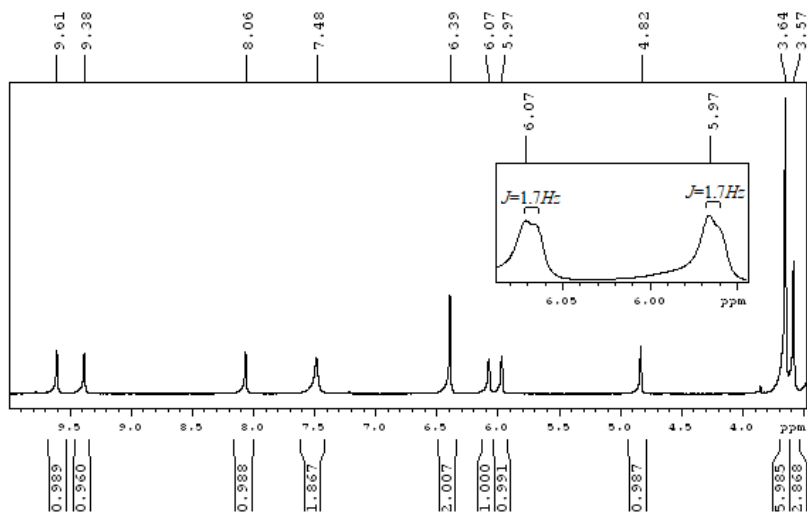
Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

5.2.6.1 Caracterização por RMN

Os sinais apresentados pelo espectro de ^1H RMN são característicos dos derivados sintetizados desta série, os sinais em: δ 9,61; 9,38; 8,06 ppm são indicativos de H de hidroxilas, suas correlações confirmam suas posições C-5, C-7 e C-4' respectivamente. Os sinais ^1H δ 6,07 e 5,97 ppm com constante de acoplamento em 1,7Hz indicativo de hidrogênios de anel aromático acoplado entre si na posição *orto*, sendo estes nas posições 6 e 8 respectivamente. Outros sinais característicos são os H de carbonos sp^3 ligados a oxigênios, por isso sinais mais desblindados, o *s* δ 3,57 ppm e o *s* em δ 3,64 ppm integrando pra 2H, sendo eles C-10, C-7' e C-9' respectivamente.

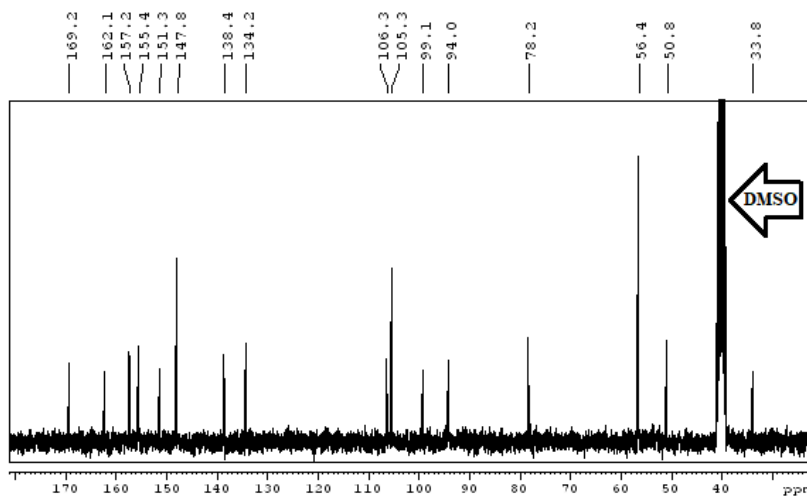
O sinal em δ 4,82 ppm, onde apresenta correlções com δ 169,2; 162,1; 147,8; 138,4 e 106,3 ppm indicativo da posição 4. O sinal δ 7,48 ppm não faz correlação com nenhum C, apenas correlações fracas com o δ 162,1 ppm e com o 78,2 ppm característico dos H do NH_2 , estes dados foram compilados na tabela 19.

Figura 126 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **21**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 127 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **21**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

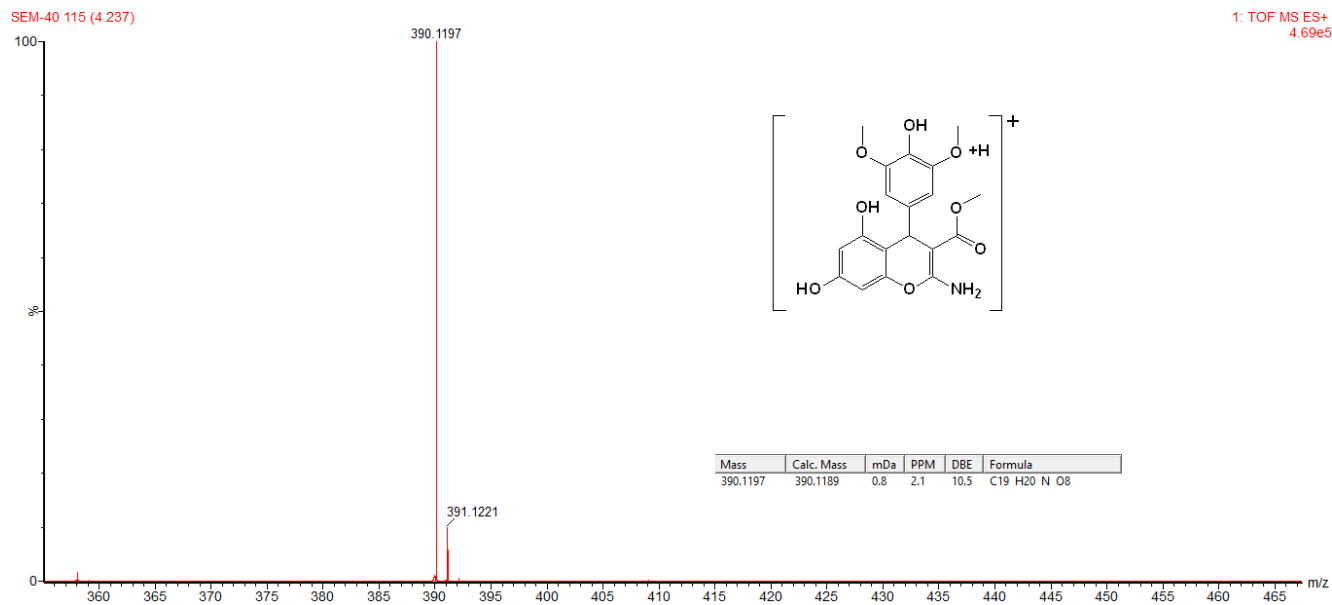
Tabela 19 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300MHz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **21**, comparados aos dados do derivado **19**.

Posição	DERIVADO 21		DERIVADO 19	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	162,1	-	162,0
3	-	78,2	-	78,1
4	4,82 <i>s</i>	33,8	4,83 <i>s</i>	33,5
5	-	155,4	-	155,3
6	6,07 <i>d</i> (1.7)	99,1	6,05 <i>d</i> (1.7)	99,0
7	-	157,2	-	157,2
8	5,97 <i>d</i> (1.7)	94,0	5,95 <i>d</i> (1.7)	94,0
9	-	169,2	-	169,1
10	3,57 <i>s</i>	50,8	3,52 <i>s</i>	50,8
4a	-	106,3	-	106,2
8a	-	151,3	-	151,1
1°	-	138,4	-	141,9
2°	6,39 <i>s</i>	147,8	6,82 <i>d</i> (1.2)	112,0
3°	-	105,3	-	148,4
4°	-	134,2	-	147,2
5°	-	105,3	6,75 <i>d</i> (8.4)	112,1
6°	6,39 <i>s</i>	147,8	6,55 <i>dd</i> (8.4, 1.2)	119,2
7°	3,64 <i>s</i>	56,4	3,66 <i>s</i> -	55,9
8°	-	-	3,65 <i>s</i>	55,9
9°	3,64 <i>s</i>	56,4	-	-
NH₂	7,48 <i>s</i>	-	7,64 <i>s</i>	-
OH	9,61 <i>s</i>	-	9,35 <i>s</i>	-
OH	9,38 <i>s</i>	-	9,30 <i>s</i>	-
OH'	8,06 <i>s</i>	-	-	-
	<i>(300 MHz ^1H, 75 MHz ^{13}C, DMSO-d_6)</i>		<i>(300 MHz ^1H, 75 MHz ^{13}C, DMSO-d_6)</i>	

5.2.6.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

O espectrograma reportou um pico com valor de relação massa carga (m/z) de 390,1197, que é atribuído ao valor do ión da molécula $[\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_8+\text{H}]^+$, onde o valor teórico calculado foi de m/z 390,1189, confirmando assim a massa do produto da reação como sendo o composto **21**.

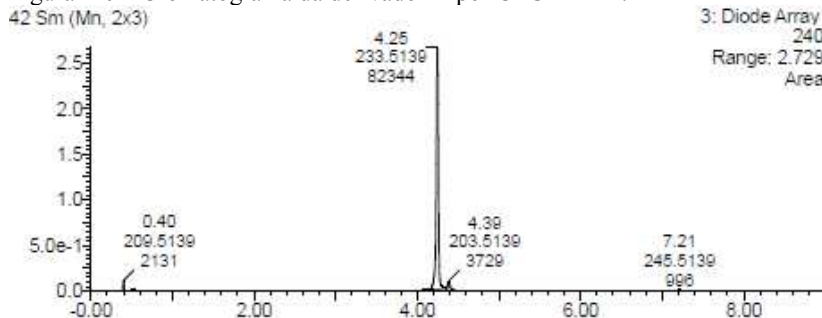
Figura 128 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **21**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.2.7 Síntese do metil 2-amino-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato (22)

Para este composto o benzaldeído utilizado foi a vanilina e o tempo de reação foi de 18 horas. A reação resultou em um precipitado em forma de pó com uma pureza de 94,5%

Figura 129 - Cromatograma da derivado 22 por CLUE-PDA.



Cromatograma adquirido em comprimento de onda de 240 nm; Eixo Y: intensidade; Eixo X: tempo de retenção (minutos). As áreas de todos os picos foram integradas e a porcentagem de cada pico foi calculada.

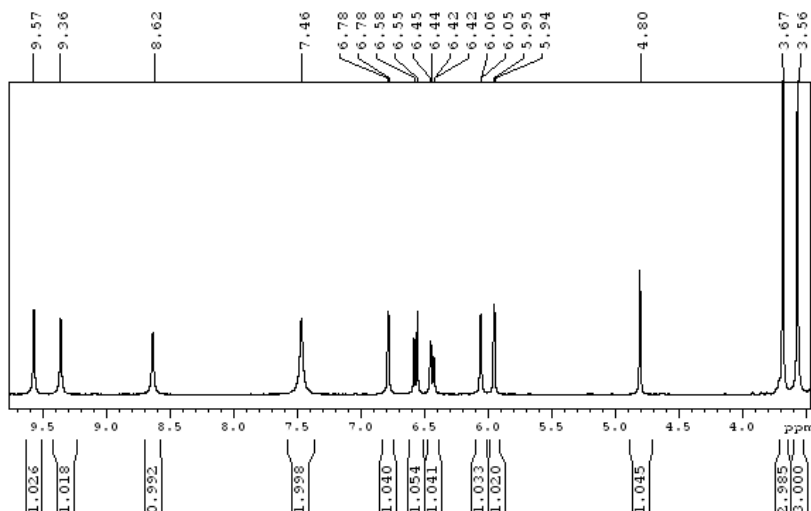
5.2.7.1 Caracterização por RMN

Os sinais apresentados no espectro de ^1H RMN foram: δ 9,57 e 9,36 ppm para os H das hidroxilas do anel benzeno ligado ao anel pirano; o sinal em δ 8,62 ppm é indicativo da hidroxila na posição *para* do anel aril, já o ^1H δ 7,46 ppm é característico dos hidrogênios ligados ao nitrogênio no NH_2 .

Os sinais seguintes são característicos de sistema ABX em anel aromático, o *d* em δ 6,78 ppm com constante de acoplamento de 1,4Hz integrando pra 1H, juntamente com o sinal em δ 6,56 ppm com $J = 8,1\text{Hz}$ apresentando um efeito telhado com o sinal em δ 6,43 ppm que possui duas constantes de acoplamento uma igual a 1,4Hz e outra com valor de 8,1Hz e integrando pra 1H.

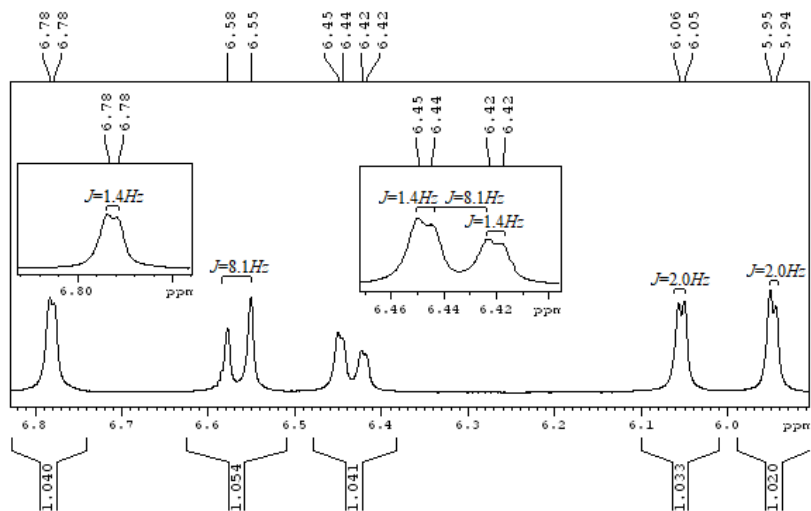
Os dois *s*, ambos integrando pra 1H, com deslocamento em δ 6,05 e 6,05 ppm, ambos com constantes de acoplamento de valor de 2,0Hz, indicando H de aromáticos com acoplamento em *orto*, característicos ds hidrogênios do anel benzeno ligado ao anel pirano.

Figura 130 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **22**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

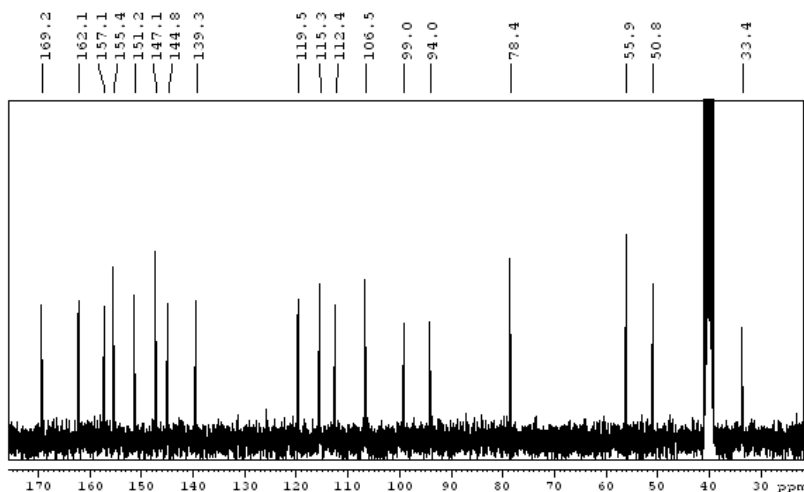
Figura 131 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **22**, ampliado na região entre 8,00 - 5,90 ppm.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Ainda e ainda é possível observar a presença do sinal em δ 4,80 ppm que é característico do sinal em C-4, tendo em vista suas correlações com o C do éster e com o C do anel pirano ligado a função amino, e dois sinais em δ 3,67 e 3,56 ppm indicativos de hidrogênios ligados a carbonos metínicos ligado a heteroátomos eletronegativos, ambos integrando pra 3H. O sinal em δ 3,56ppm devido a sua correlação com o C em δ 169,2 ppm eh indicativo da posição C-10, sendo assim a outra metoxila está na posição C-3'.

Figura 132 – Espectro de ^{13}C RMN (75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado 22.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Tabela 20 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado metil 2-amino-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromene-3-carboxilato (22), comparados aos dados do derivado 19.

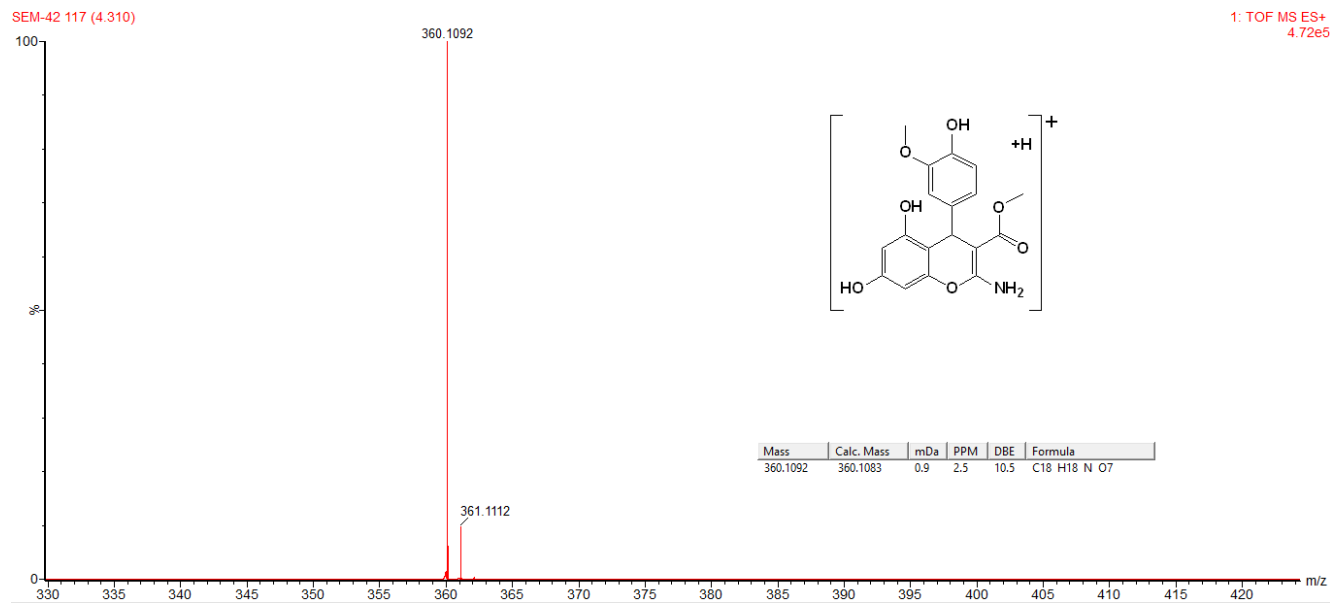
Posição	DERIVADO 22		DERIVADO 19	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	-	-	-
2	-	162,1	-	162,0
3	-	78,4	-	78,1
4	4,80 <i>s</i>	33,4	4,83 <i>s</i>	33,5
5	-	155,4	-	155,3
6	6,05 <i>d</i> (2.0)	99,0	6,05 <i>d</i> (1.7)	99,0
7	-	157,1	-	157,2
8	5,94 <i>d</i> (2.0)	94,0	5,95 <i>d</i> (1.7)	94,0

9	-	169,2	-	169,1
10	3,56 <i>s</i>	50,8	3,52 <i>s</i>	50,8
4a	-	106,5	-	106,2
8a	-	151,2	-	151,1
1'	-	139,3	-	141,9
2'	6,78 <i>d</i> (1.4)	112,4	6,82 <i>d</i> (1.2)	112,0
3'	-	144,8	-	148,4
4'	-	147,1	-	147,2
5'	6,58 <i>d</i> (8.1)	115,3	6,75 <i>d</i> (8.4)	112,1
6'	6,43 <i>dd</i> (8.1; 1.4)	119,5	6,55 <i>dd</i> (8.4, 1.2)	119,2
7'	3,67 <i>s</i>	55,9	3,66 <i>s</i> -	55,9
8'	-	-	3,65 <i>s</i>	55,9
NH₂	7,46 <i>s</i>	-	7,64 <i>s</i>	-
OH	9,36 <i>s</i>	-	9,43 <i>s</i>	-
OH	9,57 <i>s</i>	-	9,64 <i>s</i>	-
OH'	8,62 <i>s</i>	-	-	-
	(300 MHz ¹ H, 75 MHz ¹³ C, DMSO-d ₆)		(300 MHz ¹ H, 75 MHz ¹³ C, DMSO-d ₆)	

5.2.7.2 Caracterização por Espectrometria de Massa de Alta Resolução

O espectrograma de massas de alta resolução (Figura 132) apresentou um pico com valor de relação massa carga (m/z) de 360,1092 correspondente ao ión $[C_{18}H_{17}NO_7+H]^+$, o valor teórico calculado foi de m/z 360,1083.

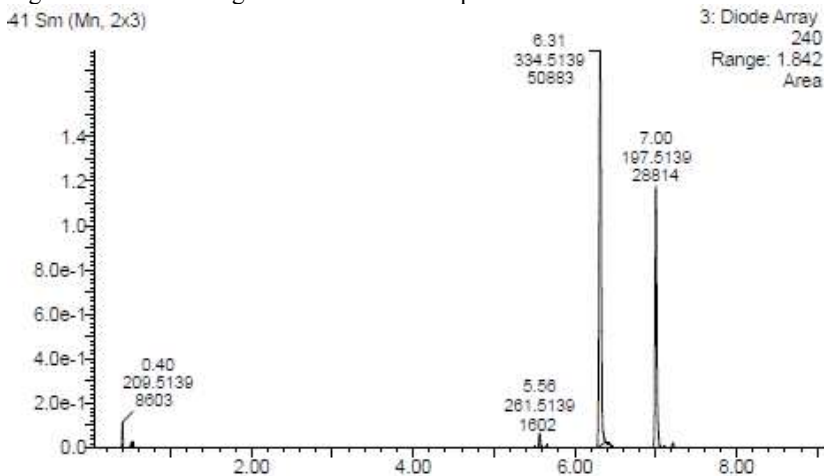
Figura 133 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado **22**. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



5.2.8 Síntese do (2E,4E)-metil 2-ciano-5-fenilpenta-2,4-dienoate (15)

Este derivado foi obtido como subproduto de uma reação, sendo identificado como o produto intermediário da condensação de Knoevenagel entre o benzaldeído, o cinamaldeído e o metilcianoacetato. Este subproduto foi identificado e posteriormente também enviado para testes de atividade biológica. Não ocorrendo então a cicloadição, este subproduto reacional, identificado como produto intermediário obteve pureza de 62,6%.

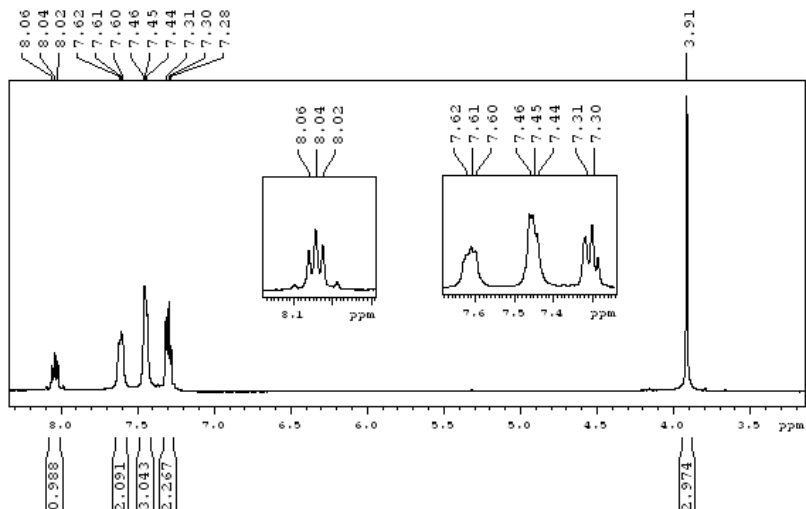
Figura 134 – Cromatograma do derivado **15** por CLUE-PDA.



5.2.8.1 Caracterização por RMN

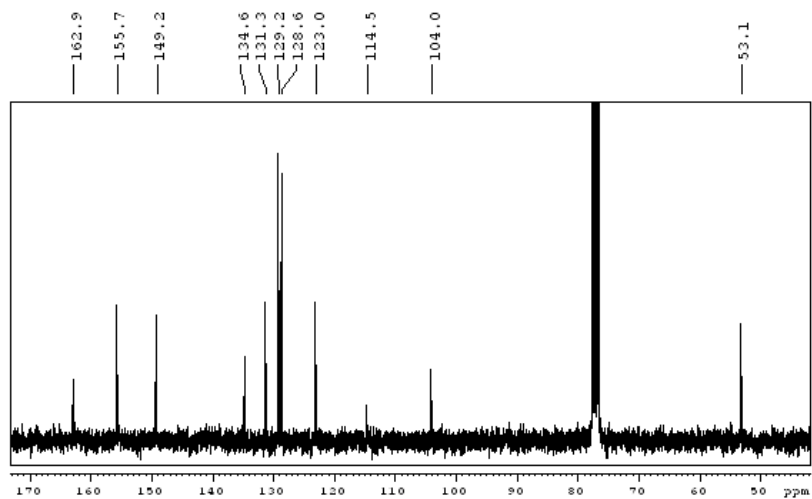
A análise de ^1H RMN (Figura 133) mostra sinais de multipletos em δ 8,04; 7,61; 7,31; 7,29 ppm; e um singletto em δ 3,91 ppm integrando pra 3H. Os sinais δ 7,61 ppm e δ 7,31 ppm integram pra 2H e o sinal em δ 7,44 ppm integra pra 3H. O espectro de ^{13}C RMN apresentam sinais com deslocamento em δ 53,1; 104,0; 114,5; 123,0; 128,6 (2C); 129,2 (2C); 131,3; 134,6; 149,2; 155,7; 162,9. Este é um composto já sintetizado e elucidado quimicamente, e foi caracterizado de acordo com a literatura (MOTOKURA et al., 2005).

Figura 135 – Espectro de ^1H RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **15**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

Figura 136 – Espectro de ^{13}C RMN (300Hz, TMS, DMSO-d_6) para o derivado **15**.



Deslocamento químico, expresso em ppm relativo ao TMS.

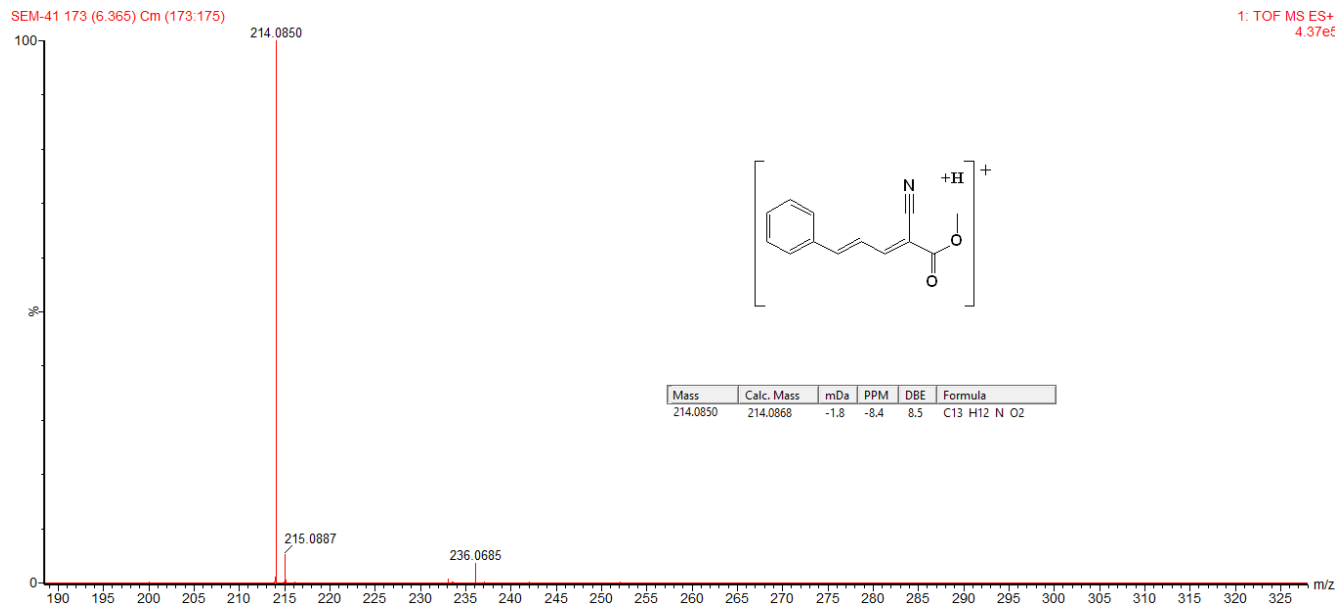
Tabela 21 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (300Hz, 75Hz, TMS, DMSO- d_6) para o derivado **15**, comparados aos dados da literatura.

Posição	DERIVADO 15		(MOTOKURA et al., 2005)	
	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C	δ ^1H <i>mult. (J Hz)</i>	δ ^{13}C
1	-	162,3	-	-
2	-	104,0	-	-
3	8,04 <i>m</i>	155,7	8,01 <i>dd</i> (4.4)	-
4	7,29 <i>m</i>	123,0	7,24 - 7,29 <i>m</i>	-
5	7,31 <i>m</i>	149,2	7,24 - 7,29 <i>m</i>	-
6	-	134,6	-	-
7	7,61 <i>m</i>	128,6	7,57 - 7,59 <i>m</i>	-
8	7,44 <i>m</i>	129,2	7,41 - 7,43 <i>m</i>	-
9	7,44 <i>m</i>	131,5	7,41 - 7,43 <i>m</i>	-
10	7,44 <i>m</i>	129,2	7,41 - 7,43 <i>m</i>	-
11	7,61 <i>m</i>	128,6	7,57 - 7,59 <i>m</i>	-
12	-	114,5	-	-
13	3,91 <i>s</i>	53,1	3,89 <i>s</i>	-
	<i>(300 MHz ^1H, 75 MHz ^{13}C, CDCl$_3$)</i>		<i>(400 MHz ^1H, 100 MHz ^{13}C, CDCl$_3$)</i>	

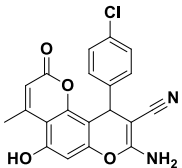
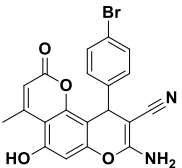
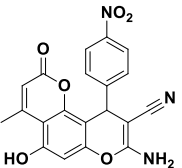
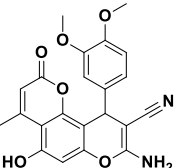
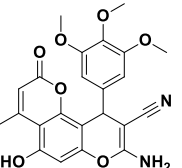
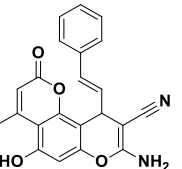
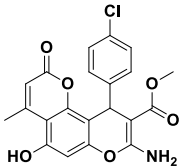
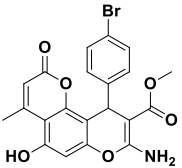
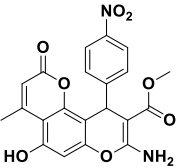
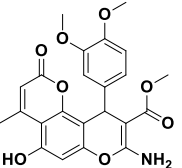
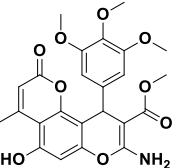
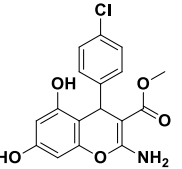
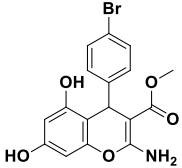
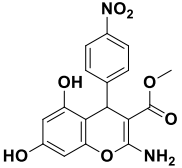
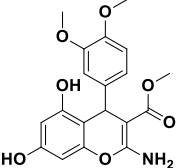
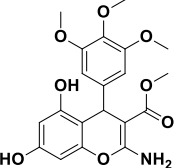
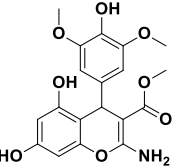
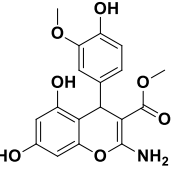
5.2.8.2 Caracterização por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

O espectro de massas de alta resolução (Figura 137) apresentou um pico, com valor de relação massa carga (m/z) de 214,0850 ($[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_2+\text{H}]^+$), o valor teórico calculado foi m/z 214,0868, confirmando assim a massa molecular do produto intermediário.

Figura 137 – Espectro de massas de alta resolução ESI-Q-TOF (modo positivo) para o derivado (2E,4E)-metil 2-ciano-5-fenilpenta-2,4-dienoate, derivado 15. Eixo Y: intensidade (%); Eixo X: relação carga/massa (m/z).



Quadro 3 - Estrutura dos Derivados Aril-Cromenos Sintetizados.

					
4	5	6	7	8	9
					
10	11	12	13	14	16
					
17	18	19	20	21	22

5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.3.1 Citotoxicidade

A citotoxicidade dos derivados **3-22** assim como a doxorubicina (fármaco controle positivo) foram determinadas em células leucêmicas em linhagem de células sensíveis a droga e em linhagens de células multiresistentes CCRF-CEM e CEM/ADR5000 respectivamente. Os compostos **10 11, 12, e 15** apresentaram atividade citotóxica significativa em ambas as linhagens celulares CCRF-CEM e CEM/ADR5000 (Tabela 22).

O valor de IC_{50} é um dado importante para avaliar a potência da atividade testada do derivado, quanto menores estes valores mais eficiente é a ação do derivado. Valores de IC_{50} menores que $1 \mu\text{M}$ foram observados nos compostos **12** ($0.78 \mu\text{M}$), **15** ($0.61 \mu\text{M}$), e na doxorubicina ($0.02 \mu\text{M}$) frente as células CCRF-CEM, o menor valor foi observado no derivado **15** que apresentou um valor de IC_{50} de $0.56 \mu\text{M}$ frente a células leucêmicas resistentes CEM/ADR5000. Esta linhagem celular de células leucêmicas apresentou hipersensibilidade ao composto **15** (Tabela 22) com um grau de resistência inferior a 0.90, sugerindo um potencial efeito na inibição da expressão glicoproteína-P (MBAVENG; KUETE; EFFERTH, 2017).

Tabela 22 - Citotoxicidade das piranocumarinas e da doxorubicina frente a células leucêmicas, determinada pelo ensaio de resazurina.

Derivados	Linhagens Celulares, valor de IC_{50} expressos em μM e grau de resistência* (entre parênteses)	
	CCRF-CEM	CEM/ADR5000
3	33.75 ± 0.93	>90 (nd)
4	1.65 ± 0.56	32.49 ± 0.04 (19.63)
5	2.02 ± 0.57	44.29 ± 5.20 (21.90)
6	7.22 ± 1.21	67.87 ± 8.09 (9.40)
7	6.75 ± 3.01	76.99 ± 2.12 (11.40)
8	6.24 ± 1.41	>90 (nd)
9	4.81 ± 2.35	17.87 ± 1.08 (3.72)
10	1.52 ± 0.39	5.65 ± 1.16 (3.71)
11	1.37 ± 0.22	5.10 ± 0.76 (3.71)
12	0.78 ± 0.11	3.12 ± 0.95 (4.02)
13	>90	29.33 ± 1.26 (nd)
14	10.43 ± 0.59	61.63 ± 7.41 (5.91)
15	0.61 ± 0.07	0.56 ± 0.03 (0.92)
16	10.70 ± 1.57	13.58 ± 1.28 (1.27)
17	15.46 ± 0.67	16.00 ± 1.03 (1.03)
18	11.46 ± 2.35	38.85 ± 2.25 (3.39)
19	27.40 ± 1.29	>90 (nd)

20	21.41 ± 7.17	>90 (nd)
21	27.22 ± 10.75	69.40 ± 4.36 (2.55)
22	22.71 ± 1.77	>90 (nd)
Doxorrubicina	0.02 ± 0.00	66.83 ± 2.20 (3341)

(*): O grau de resistência foi determinado pela razão do valor de IC₅₀ nas células resistentes CEM/ADR5000 dividido pelo IC₅₀ nas células sensíveis, CCRF-CEM. nd. não determinado

Além do derivado **15**, as células resistentes CEM/ADR5000 apresentaram uma sensibilidade moderada aos compostos de **9** à **12**, com valores de IC₅₀ de 17.87, 5.65, 5.10, e 3.12 µM, respectivamente. No entanto, todos estes valores são maiores que o encontrado para o composto **15** frente a linhagem celular CEM/ADR5000. Estes compostos mostraram atividade significativa também nas células sensíveis CCRF-CEM. Assim como o derivado **15** apresentou menores valores de IC₅₀ quando comparado com os derivados de **9-12**, esta observação permaneceu quanto aos seus graus de resistência (3.72, 3.71, 3.71, and 4.02, respectivamente).

Continuando a avaliação da atividade citotóxica, os compostos **16** e **17** apresentaram praticamente o mesmo grau de atividade que foi moderada contra as células sensíveis e multiresistentes. O mais importante observado foi que a linhagem celular resistente CEM/ADR5000 apresentou-se mais sensível aos derivados **4**, **5**, e **9-18** do que a doxorrubicina (Tabela 22).

O sistema altamente conjugado que é caracterizado por uma alta transição eletrônica do derivado **15** pode ser o parâmetro estrutural que promove a ação citotóxica contra ambas as linhagens celulares, sensível e resistente, e esta característica explicaria o porquê deste composto ser mais ativo do que os outros.

Exceto pelo derivado **13**, que não foi ativo contra as células sensíveis, todos os outros derivados piranocumarínicos foram citotóxicos. Ainda, os compostos **4-12**, e **14** foram mais ativos do que os compostos derivados 4-*aril-4H*-chromene (**16-22**). Os derivados **10-12** que possuem um grupo éster (CO₂Me) na posição 9 foram mais potentes que os seus semelhantes (**4-6**) que possuem um grupo CN na mesma posição. É importante mencionar que os derivados **10-12** que obtiveram atividade significativa frente a linhagem de células leucêmicas sensíveis CCRF-CEM contêm respectivamente 4-ClC₆H₄, 4-BrC₆H₄, and 4-NO₂C₆H₄ como substituintes no carbono CH sp³, na posição 10. Contudo, entre os derivados com atividade citotóxica moderada, as piranocumarinas angulares com o grupos aril metoxilados adjacentes ao grupo CN (**7** e **8**) demonstraram uma citotoxicidade maior do que aqueles

que trazem o mesmo grupo aril metoxilado adjacente a um grupo éster CO₂Me (**13** e **14**). Assim, foi observado que os grupos OH e MeO desfavorecem a atividade citotóxica.

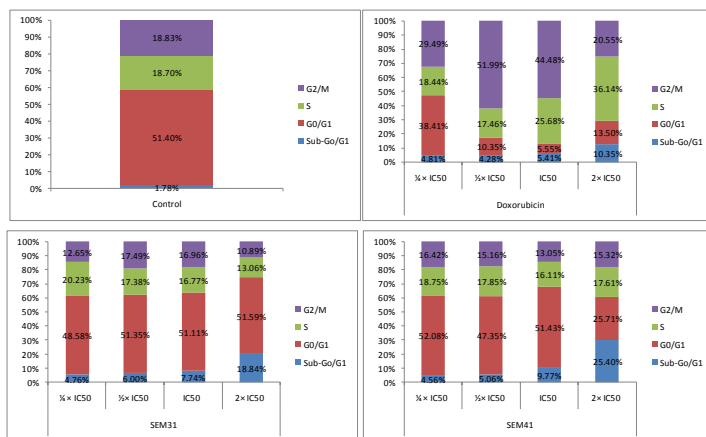
Enquanto os derivados **3**, **8**, **19**, **20**, e **22** não apresentaram citotoxicidade frente a células resistentes, os outros compostos heterocíclicos bem como o produto intermediário, apresentaram atividade. As piranocumarinas **10-12** possuem o grupo éster CO₂Me e foram mais ativas contra a linhagem resistente de células leucêmicas do que todos os derivados 4-aril-4*H*-chromenes (**16-18** and **21**), que por sua vez foram mais potentes que os piranocromenos (**4-7**) que possuem o grupo CN. Os derivados heterocíclicos mais citotóxicos (**10-12**) contêm em sua molécula o 4-ClC₆H₄, o 4-BrC₆H₄, e o 4-NO₂C₆H₄ como substituintes ao lado do grupo CO₂Me. Sendo assim, a linhagem resistente de células leucêmicas CEM/ADR5000 se mostrou mais sensível aos piranocromenos angulares com o grupo éster na posição 9 do que os que possuem o grupo CN. Os inativos ou com atividade citotóxica fraca foram os derivados que contêm o grupo MeO na porção aril (**7**, **8**, **13**, **14**, and **19-22**). Ainda, entre os derivados heterocíclicos que possuem o grupo CN, o piranocromeno com o grupo estireno demonstrou ser mais ativo na linhagem celular CEM/ADR5000 do que os que continham OH e MeO.

Os 4-aril-4*H*-cromenos que possuem halogênios e grupo nitro (**16-18**) apresentaram atividade contra células CCRF-CEM com mesmo grau de intensidade, porém o derivado **18**, que possui um grupo NO₂ foi 2 vezes menos ativo contra células CEM/ADR5000 do que os derivados **16** e **17**. Cromenos contendo outros substituintes foram 2 vezes menos ativos nas células sensíveis CCRF-CEM, e ao mesmo tempo estes compostos não apresentaram atividade ou foram de intensidade fraca contra as células resistentes CEM/ADR5000.

Como próximo passo, foi estudado a distribuição do ciclo celular da CCRF-CEM na presença dos compostos mais citotóxicos (**12** e **15**). Os derivados **12**, **15**, e doxorubicina causaram alteração nas fases do ciclo celular de maneira dose dependente causando o aumento da população de células na fase sub-G₀/G₁. O derivado **12** causou a parada do ciclo celular entre G₀/G₁, isto ocasionou uma diminuição de células nas fases S e G₂/M quando comparado ao controle, sugerindo que estas células não sofriam síntese de DNA e nem realizavam mitose (apoptose celular) na presença do derivado **12**. Além disso, o derivado **15** induziu a parada do ciclo celular nas fases S e G₂/M, enquanto que o dobro de IC₅₀ induziu a diminuição da população de células na fase G₀/G₁ comparando com o controle.

Como indicação de apoptose, foi utilizada a porcentagem de células na fase subG0/G1. Porcentagem esta que após o tratamento com o derivado **12** estava em uma faixa de 4.76% ($\frac{1}{4} \times IC_{50}$) a 18.84% ($2 \times IC_{50}$), uma faixa de 4.56% ($\frac{1}{4} \times IC_{50}$) a 25.40% ($2 \times IC_{50}$) após o tratamento com o derivado **15**, e uma faixa de 4.81% ($\frac{1}{4} \times IC_{50}$) a 10.35% ($2 \times IC_{50}$) quando tratado com doxorubicina. Nas células não tratadas, a porcentagem destas células na fase sub-G0/G1 foi de 1.78% (Figura 137). Os dados obtidos, no geral, destacam a possibilidade de utilizar, especialmente, o derivado **12** para desenvolver novos fármacos para combater a leucimia e a leucemia multi-resistente.

Figura 138 - Distribuição do ciclo celular de células leucêmicas CCRF-CEM tratadas com os derivados **12**, **15** e doxorubicina por 24h.



Estudos que visaram estudar simultaneamente quimioterapias contra o câncer e contra doenças parasitárias revelaram que compostos utilizados na terapia anticâncer podem apresentar-se como potencial agentes antiparasitários. São exemplos a alsterpaulona, relatado como inibidor de células CDK em células cancerosa, e aminobifosfonados, descritos como agentes apoptóticos em osteoclastos, que apresentaram ótimos efeitos antiparasitários em *Leishmania mexicana amazonensis* e *T. cruzi*. Uma característica semelhante entre células de cancro e os parasitas é que ambos vivem e se multiplicam de maneira independente no hospedeiro, sendo assim a carcinogênese tem sido repetidamente associada com doenças infectoparasitárias (KLINKERT; HEUSSLER, 2006).

Por tanto o presente estudo achou apropriado também avaliar a atividade antiparasitária dos derivados **3-22** em parasitas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *T. cruzi*. As células utilizadas como hospedeiro para os parasitas foi de linhagem celular de monócitos humanos de leucemia THP-1.

5.3.2 Atividade Antiparasitária

Doze dos 20 derivados testados foram ativos contra *T. cruzi*, enquanto que apenas 5 destes vinte apresentaram atividade contra *L. amazonensis*. Os compostos **4**, **10**, e **12** demonstraram significativa atividade tripanocida com um valor de IC₅₀ de 4.42, 8.16 e 9.31 µM, respectivamente (Tabela 23). Estes 3 derivados foram mais potentes que o benznidazol, utilizada como droga controle, o qual inibiu 50% dos parasitas com uma concentração de 11.05 µM. A atividade antitripanossoma dos derivados **5**, **6**, **11**, **13-18** foram fracas ou moderadas com o valor de IC₅₀ variando entre 11.43 e 42.21 µM. Todos os derivados testados foram citotóxicos para a célula hospedeira, apresentando índices de seletividade (SI) menores que 6.

Tabela 23 - Efeito de inibição dos derivados **3-22** contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e *L. amazonensis* e seus índices de seletividade (SI) em células THP-1.

Derivados	<i>T. cruzi</i>		THP-1	<i>L. amazonensis</i>	
	IC ₅₀ (µM)	SI	CC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	SI
3	-	-	-	-	-
4	4.42±1.51	<3.53	<15.60	-	-
5	42.21±1.96	<0.37	<15.60	-	-
6	34.20±3.61	<0.45	<15.60	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	8.16±1.75	<1.91	<15.60	38.43±4.20	<0.40
11	21.73±3.78	<0.72	<15.60	33.21±1.72	<0.47
12	9.31±1.56	<1.67	<15.60	33.10±1.52	<0.47
13	11.43±1.37	<1.36	<15.60	-	-
14	34.70±2.30	0.74	25.65±8.77	-	-
15	28.42±2.51	<0.55	<15.60	53.75±1.85	<0.29
16	35.54±0.11	2.13	75.62±7.18	-	-
17	39.58±1.52	1.95	77.45±8.94	-	-
18	15.45±0.60	5.78	89.26±9.96	52.27±2.07	1.71
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-
Benznidazol	11.05±0.22	>45.24	>500	-	-

Anfotericina B	-	-	27.86±0.98	0.14±0.02	199
----------------	---	---	------------	-----------	-----

Atividade antileishmania foi observada nos derivados **10-12**, **15**, e **18** com IC₅₀ em uma faixa de 33.10 a 53.75 µM. Estes são valores que caracterizam atividade fraca se comparados com o fármaco controle anfotericina B. Ainda, estes compostos antileishmania mostraram apenas uma fraca seletividade para as células THP-1.

O mais ativo derivado, o **4**, contra *T. cruzi* possui um 4-clorofenil na porção adjacente ao grupo carbonitrila, e esta atividade caiu pela metade, quando o grupo CN foi substituído pelo grupo CO₂Me (derivado **10**). Porém, o oposto foi observado quando analisada a atividade tripanocida dos derivados **5** e **6**, comparados aos derivados **11** e **12**, respectivamente. O grupo estireno presente no derivado **18** reduziu a toxicidade nas células THP-1, embora a atividade tripanocida (15.45 µM) tenha sido moderada.

6 CONCLUSÕES

- A estratégia sintética utilizada neste estudo foram adequadas para sintetizar 20 novos compostos cromenos, e posteriormente foram caracterizados.
 - A partir desta estratégia sintética, quanto a síntese das piranocumarinas foi possível sintetizar 11 compostos, **4-14**. Sendo 9 novos.
 - Quanto a síntese dos 4-*aril-4H*-cromenos, mostrou-se adequada para a obtenção de 7 compostos novos, **16-22**.
 - A síntese de benzopiranos também proporcionou a formação de um subproduto (**15**), identificado e caracterizado.
- A citotoxicidade foi determinada para todos os compostos, com exceção do composto **13**, todos foram citotóxicos para células CCRF-CEM. Sendo que os dois mais ativos em células CEM/ADR5000, o metil 8-amino-10-(4-nitrofenil)-5-hidroxi-4-metil-2-oxo-2,10-dihidropirano[2,3-*f*]cromeno-9-carboxilato (**12**) e o subproduto **15**, foram selecionados para avaliação das alterações das fases celulares e relação estrutura atividade.
- A série de compostos proporcionou a obtenção do composto **12** e o mesmo foi selecionado para a realização da análise do ciclo celular sob a ação do referido composto. O teste aplicado se mostrou adequado para avaliar as fases celulares e como indicação de apoptose, foi utilizada a porcentagem de células na fase subG0/G1, porcentagem esta que após o tratamento com o derivado **12** estava em uma faixa de 4.76% ($\frac{1}{4} \times IC_{50}$) a 18.84% ($2 \times IC_{50}$), e uma faixa de 4.81% ($\frac{1}{4} \times IC_{50}$) a 10.35% ($2 \times IC_{50}$) quando tratado com doxorrubicina. Nas células não tratadas, a porcentagem destas células na fase sub-G0/G1 foi de 1.78% (Figura 137). Os dados obtidos então demonstraram que o derivado **12** induz a apoptose e que este é um possível protótipo para desenvolver novos fármacos para combater a leucemia e a leucemia multi-resistente
- A atividade antiparasitária foi observada em 12 dos 20 compostos descritos neste trabalho. Sendo os compostos **4**, **10** e **12** mais

ativos contra o *Trypanosoma cruzi* do que o medicamento referência, o Benznidazol. Atividade antileishmania foi observada nos derivados **10-12, 15, e 18**.

7 REFERÊNCIAS

- AKBARZADEH, T.; RAFINEJAD, A.; MOLLAGHASEM, J.M.; SAFAVI, M.; FALLAH-TAFTI, A.; PORDELL, M.; ARDESTANI, S.K.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. 2-Amino-3-cyano-4-(5-arylisoxazol-3-yl)-4H-chromenes: Synthesis and In Vitro Cytotoxic Activity. **Archiv der Pharmazie**, v. 345, n. 5, p. 386-392, 2012.
- ALVAR, J.; VELEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; TEAM, W.L.C. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- BARRETT, M.P.; BURCHMORE, R.J.; STICH, A.; LAZZARI, J.O.; FRASCH, A.C.; CAZZULO, J.J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.
- BARRIS, B.; ISRAELSTAM, S. The use of small quantities of sulphuric acid and polyphosphoric acid in the Von Pechmann reaction. **South African Journal of Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 125-128, 1930.
- BEATTIE, L.; KAYE, P.M. Leishmania–host interactions: what has imaging taught us? **Cellular microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1659-1667, 2011.
- BRENZAN, M.A.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M.C.M.; CÔRREA, A.G.; JÚNIOR, J.A.; DOS SANTOS, A.O.; CORTEZ, D.A.G. Structure–activity relationship of (–) mammea A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 9, p. 651-658, 2008.
- BRUN, R.; BLUM, J.; CHAPPUIS, F.; BURRI, C. Human african trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 375, n. 9709, p. 148-159, 2010.
- BUCKNER, F.S.; WATERS, N.C.; AVERY, V.M. Recent highlights in anti-protozoan drug development and resistance research. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, n., p. 230-235, 2012.
- CAI, S.X.; DREWE, J.; KEMNITZER, W. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as potent apoptosis inducers using a cell-and caspase-based Anti-cancer Screening Apoptosis Program (ASAP): SAR studies and the identification of novel vascular disrupting agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal**

Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), v. 9, n. 4, p. 437-456, 2009.

COSTA, M.; DIAS, T.A.; BRITO, A.; PROENÇA, F. Biological importance of structurally diversified chromenes. **European journal of medicinal chemistry**, v. 123, n., p. 487-507, 2016.

COSTELLO, L.; FRANKLIN, R. Novel role of zinc in the regulation of prostate citrate metabolism and its implications in prostate cancer. **The Prostate**, v. 35, n. 4, p. 285-296, 1998.

DIAS, J.C.P.; RAMOS JR, A.N.; GONTIJO, E.D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; COURA, J.R.; TORRES, R.M.; MELO, J.R.D.C.; ALMEIDA, E.A.D.; OLIVEIRA JR, W.D. II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. ESP, p. 7-86, 2016.

EFFERTH, T.; SAUERBREY, A.; OLBRICH, A.; GEBHART, E.; RAUCH, P.; WEBER, H.O.; HENGSTLER, J.G.; HALATSCH, M.-E.; VOLM, M.; TEW, K.D. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. **Molecular pharmacology**, v. 64, n. 2, p. 382-394, 2003.

EGAN, D.; O'KENNEDY, R.; MORAN, E.; COX, D.; PROSSER, E.; THORNES, R.D. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. **Drug metabolism reviews**, v. 22, n. 5, p. 503-529, 1997.

ELLIS, G.P. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, Wiley-Interscience, 1977.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FARAHI, M.; KARAMI, B.; KESHAVARZ, R.; KHOSRAVIAN, F. Nano-Fe₃O₄@ SiO₂-supported boron sulfonic acid as a novel magnetically heterogeneous catalyst for the synthesis of pyrano coumarins. **RSC Advances**, v. 7, n. 74, p. 46644-46650, 2017.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D.C.; SOLOMON, A.W. Neglected tropical diseases. **British medical bulletin**, v. 93, n. 1, p. 179-200, 2009.

FORSYTH, C.J.; HERNANDEZ, S.; OLMEDO, W.; ABUHAMIDAH, A.; TRAINA, M.I.; SANCHEZ, D.R.; SOVEROW, J.; MEYMANDI, S.K. Safety profile of nifurtimox for treatment of chagas disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 8, p. 1056-1062, 2016.

FOUDA, A.M. Synthesis of several 4H-chromene derivatives of expected antitumor activity. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n. 6, p. 1229-1238, 2016.

FRAVEL, B. Pyrans and their Benzo Derivatives: Applications. v., n., p., 2008.

FIELD, J.J.; KANAKKANTHARA, A.; MILLER, J.H. Microtubule-targeting agents are clinically successful due to both mitotic and interphase impairment of microtubule function. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 18, p. 5050-5059, 2014.

FRANÇA, M.S.; JUNIOR, U.; SERRANO, P.L.; ANTUNES, Y.P.P.V.; PRADO, B.L.; DONNARUMMA, C.D.C.; MUTÃO, T.S.; RODRIGUES, H.V.; GIGLIO, A.D. Assessment of adherence to the guidelines for the management of nausea and vomiting induced by chemotherapy. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 13, n. 2, p. 221-225, 2015.

GEEN, G.R.; EVANS, J.M.; VONG, A.K. Pyrans and their benzo derivatives: applications. **Comprehensive heterocyclic chemistry II. Pergamon, Oxford**, p. 469-500, 1996.

GILLET, J.-P.; EFFERTH, T.; STEINBACH, D.; HAMELS, J.; DE LONGUEVILLE, F.; BERTHOLET, V.; REMACLE, J. Microarray-based detection of multidrug resistance in human tumor cells by expression profiling of ATP-binding cassette transporter genes. **Cancer research**, v. 64, n. 24, p. 8987-8993, 2004.

GOURDEAU, H.; LEBLOND, L.; HAMELIN, B.; DESPUTEAU, C.; DONG, K.; KIANICKA, I.; CUSTEAU, D.; BOUDREAU, C.; GEERTS, L.; CAI, S.-X. Antivascular and antitumor evaluation of 2-amino-4-(3-bromo-4, 5-dimethoxy-phenyl)-3-cyano-4H-chromenes, a novel series of anticancer agents. **Molecular cancer therapeutics**, v. 3, n. 11, p. 1375-1384, 2004.

GREEN, G.; EVANS, J.; VONG, A.; KATRITZKY, A.; REES, C.; SCRIVEN, E. Pyrans and their benzo derivatives synthesis. **Comprehensive heterocyclic chemistry II**, v. 5, n., p. 469, 1995.

GALMARINI, D.; GALMARINI, C.M.; GALMARINI, F.C. Cancer chemotherapy: a critical analysis of its 60 years of history. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 84, n. 2, p. 181-199, 2012.

GYAPONG, J.O.; GYAPONG, M.; YELLU, N.; ANAKWAH, K.; AMOFAH, G.; BOCKARIE, M.; ADJEL, S. Integration of control of neglected tropical diseases into health-care systems: challenges and opportunities. **The Lancet**, v. 375, n. 9709, p. 160-165, 2010.

HAREL, D.; SCHEPMANN, D.; PRINZ, H.; BRUN, R.; SCHMIDT, T.J.; WUNSCH, B. Natural product derived antiprotozoal agents: synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationships of novel chromene and chromane derivatives. **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n. 18, p. 7442-7448, 2013.

HOTEZ, P.J.; BOTTAZZI, M.E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S.K.; PERIAGO, M.R. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 9, p. e300, 2008.

HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

ISOBE, K.; HOSHI, T.; SUZUKI, T.; HAGIWARA, H. Knoevenagel reaction in water catalyzed by amine supported on silica gel. **Molecular diversity**, v. 9, n. 4, p. 317-320, 2005.

KARAMI, B.; KHODABAKHSHI, S.; ESKANDARI, K. A one-pot, three-component synthesis of new pyrano [2, 3-h] coumarin derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 12, p. 1445-1446, 2012.

KASIBHATLA, S.; GOURDEAU, H.; MEEROVITCH, K.; DREWE, J.; REDDY, S.; QIU, L.; ZHANG, H.; BERGERON, F.; BOUFFARD, D.; YANG, Q. Discovery and mechanism of action of a novel series of apoptosis inducers with potential vascular targeting activity. **Molecular cancer therapeutics**, v. 3, n. 11, p. 1365-1374, 2004.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural products as potential antiparasitic drugs. **Studies in natural products chemistry**, Elsevier, 26, p. 779-848, 2002.

KEERTHY, H.K.; GARG, M.; MOHAN, C.D.; MADAN, V.; KANOJIA, D.; SHOBITH, R.; NANJUNDASWAMY, S.; MASON, D.J.; BENDER, A.; RANGAPPA, K.S. Synthesis and characterization of novel 2-amino-chromene-nitriles that target Bcl-2 in acute myeloid leukemia cell lines. **PLoS one**, v. 9, n. 9, p. e107118, 2014.

KEMNITZER, W.; DREWE, J.; JIANG, S.; ZHANG, H.; WANG, Y.; ZHAO, J.; JIA, S.; HERICH, J.; LABREQUE, D.; STORER, R. Discovery of 4-Aryl-4 H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell-and caspase-based high-throughput screening assay. 1. structure– activity relationships of the 4-Aryl group. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 25, p. 6299-6310, 2004.

KEMNITZER, W.; DREWE, J.; JIANG, S.; ZHANG, H.; ZHAO, J.; CROGAN-GRUNDY, C.; XU, L.; LAMOTHE, S.; GOURDEAU, H.; DENIS, R. Discovery of 4-Aryl-4 H-chromenes as a New Series of Apoptosis Inducers Using a Cell- and Caspase-Based High-Throughput Screening Assay. 3. Structure– Activity Relationships of Fused Rings at the 7, 8-Positions. **Journal of medicinal chemistry**, v. 50, n. 12, p. 2858-2864, 2007.

KEMNITZER, W.; KASIBHATLA, S.; JIANG, S.; ZHANG, H.; ZHAO, J.; JIA, S.; XU, L.; CROGAN-GRUNDY, C.; DENIS, R.; BARRIAULT, N. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell-and caspase-based high-throughput screening assay. 2. Structure–activity relationships of the 7-and 5-, 6-, 8-positions. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 15, n. 21, p. 4745-4751, 2005.

KHEIROLLAHI, A.; PORDELI, M.; SAFAVI, M.; MASHKOURI, S.; NAIMI-JAMAL, M.R.; ARDESTANI, S.K. Cytotoxic and apoptotic effects of synthetic benzochromene derivatives on human cancer cell lines. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 387, n. 12, p. 1199-1208, 2014.

KIMMIG, A.; GEKELER, V.; NEUMANN, M.; FRESE, G.; HANDGRETINGER, R.; KARDOS, G.; DIDDENS, H.; NIETHAMMER, D. Susceptibility of multidrug-resistant human leukemia cell lines to human interleukin 2-activated killer cells. **Cancer research**, v. 50, n. 21, p. 6793-6799, 1990.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M.; HOCEVAR, B.A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicologic pathology**, v. 38, n. 1, p. 96-109, 2010.

KLINKERT, M.; HEUSSLER, V. The use of anticancer drugs in antiparasitic chemotherapy. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 6, n. 2, p. 131-143, 2006.

KUETE, V.; NGAMENI, B.; WIENCH, B.; KRUSCHE, B.; HORWEDEL, C.; NGADJUI, B.T.; EFFERTH, T. Cytotoxicity and mode of action of four naturally occurring flavonoids from the genus *Dorstenia*: gancaonin Q, 4-hydroxyonchocarpin, 6-prenylapigenin, and 6, 8-diprenyleriodictyol. **Planta medica**, v. 77, n. 18, p. 1984-1989, 2011.

KUETE, V.; TCHAKAM, P.D.; WIENCH, B.; NGAMENI, B.; WABO, H.K.; TALA, M.F.; MOUNGANG, M.L.; NGADJUI, B.T.; MURAYAMA, T.; EFFERTH, T. Cytotoxicity and modes of action of four naturally occurring benzophenones: 2, 2', 5, 6'-tetrahydroxybenzophenone, guttiferone E, isogarcinol and isoxanthochymol. **Phytomedicine**, v. 20, n. 6, p. 528-536, 2013.

KURTI, L.; CZAKÓ, B. **Strategic applications of named reactions in organic synthesis**, Elsevier, 2005.

LACY, A.; O'KENNEDY, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 30, p. 3797-3811, 2004.

LEAO, R.A.; DE MORAES, P.D.F.; PEDRO, M.C.; COSTA, P.R. Synthesis of coumarins and neoflavones through zinc chloride catalyzed hydroarylation of acetylenic esters with phenols. **Synthesis**, v. 2011, n. 22, p. 3692-3696, 2011.

LENARDÃO, E.J.; FREITAG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA, A.C.F.; SILVEIRA, C.D.C. Green chemistry: the 12 principles of green chemistry and its insertion in the teach and research activities. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

M EL-AGRODY, A.; KHATTAB, S.A.; M FOUDA, A. Synthesis, structure-activity relationship (SAR) studies on some 4-Aryl-4Hchromenes and relationship between lipophilicity and antitumor activity. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 11, n. 10, p. 1167-1176, 2014.

MARCH, J. **Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure**, John Wiley & Sons, 1992.

MASESANE, I.B.; MIHIGO, S.O. Efficient and green preparation of 2-amino-4H-chromenes by a room-temperature, Na₂CO₃-catalyzed, three-component reaction of malononitrile, benzaldehydes, and phloroglucinol or resorcinol in aqueous medium. **Synthetic Communications**, v. 45, n. 13, p. 1546-1551, 2015.

MBAVENG, A.T.; KUETE, V.; EFFERTH, T. Potential of Central, Eastern and Western Africa medicinal plants for cancer therapy: Spotlight on resistant cells and molecular targets. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, n., p. 343, 2017.

MCNAUGHT, A.; SMITH, P. Nomenclature of Heterocyclic Compounds. v., n., p., 1984.

MOTOKURA, K.; FUJITA, N.; MORI, K.; MIZUGAKI, T.; EBITANI, K.; KANEDA, K. An acidic layered clay is combined with a basic layered clay for one-pot sequential reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 27, p. 9674-9675, 2005.

MRAZEK, M.F.; MOSSIALOS, E. Stimulating pharmaceutical research and development for neglected diseases. **Health policy**, v. 64, n. 1, p. 75-88, 2003.

MUELLER-LANGER, F. Neglected infectious diseases: Are push and pull incentive mechanisms suitable for promoting drug development research? **Health Economics, Policy and Law**, v. 8, n. 2, p. 185-208, 2013.

MUSA, M.A.; BADISA, V.L.; LATINWO, L.M.; WARYOBA, C.; UGOCHUKWU, N. In vitro cytotoxicity of benzopyranone derivatives with basic side chain against human lung cell lines. **Anticancer research**, v. 30, n. 11, p. 4613-4617, 2010.

NEVES, D.P.; LINARDI, P.; VITOR, R. Parasitologia humana. 11^a. **São Paulo: Atheneu**, v., n., p., 2005.

NEWMAN, R.A.; CHEN, W.; MADDEN, T.L. Pharmaceutical properties of related calanolide compounds with activity against human immunodeficiency virus. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 87, n. 9, p. 1077-1080, 1998.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **The FEBS Journal**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

ONG, E.B.B.; WATANABE, N.; SAITO, A.; FUTAMURA, Y.; EL GALIL, K.H.A.; KOITO, A.; NAJIMUDIN, N.; OSADA, H. Vipirinin, a coumarin-based HIV-1 Vpr inhibitor, interacts with a hydrophobic region of Vpr. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 16, p. 14049-14056, 2011.

OSTROWSKA, K.; OLEJARZ, W.; WRZOSEK, M.; GŁUSZKO, A.; NOWICKA, G.; SZCZEPAŃSKI, M.; MATEREK, I.B.; KOZIOL, A.E.; STRUGA, M. Anticancer effects of O-aminoalkyl derivatives of alloxanthoxyletin and seselin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, n., p. 1412-1424, 2017.

PATIL, A.D.; FREYER, A.J.; EGGLESTON, D.S.; HALTIWANGER, R.C.; BEAN, M.F.; TAYLOR, P.B.; CARANFA, M.J.; BREEN, A.L.; BARTUS, H.R. The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 26, p. 4131-4138, 1993.

PELISSARI, D.M.; CECHINEL, M.P.; SOUSA-GOMES, M.L.D.; LIMA JÚNIOR, F.E.F.D. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

RAFINEJAD, A.; FALLAH-TAFTI, A.; TIWARI, R.; SHIRAZI, A.N.; MANDAL, D.; SHAFIEE, A.; PARANG, K.; FOROUMADI, A.; AKBARZADEH, T. 4-Aryl-4 H-naphthopyrans derivatives: one-pot synthesis, evaluation of Src kinase inhibitory and anti-proliferative activities. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 100, 2012.

SABRY, N.M.; MOHAMED, H.M.; KHATTAB, E.S.A.; MOTLAQ, S.S.; EL-AGRODY, A.M. Synthesis of 4H-chromene, coumarin, 12H-chromeno [2, 3-d] pyrimidine derivatives and some of their antimicrobial and cytotoxicity activities. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 2, p. 765-772, 2011.

SANDJO, L.P.; NASCIMENTO, M.V.; SILVA, L.A.; MUNHOZ, A.; POLLO, L.A.; BIAVATTI, M.W.; NGADJUI, B.T.; OPATZ, T.; FRÖDE, T.S. ESI-MS2 and Anti-inflammatory Studies of Cyclopropanic Triterpenes. UPLC-ESI-MS and MS2 Search of Related Metabolites from *Donella ubanguiensis*. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 1, p. 27-41, 2017.

SCHWENDE, H.; FITZKE, E.; AMBS, P.; DIETER, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1, 25-dihydroxyvitamin D3. **Journal of leukocyte biology**, v. 59, n. 4, p. 555-561, 1996.

SETHNA, S.; PHADKE, R. The pechmann reaction. **Organic Reactions**, v., n., p., 1953.

SHARMA, A.; TIWARI, M.; SUPURAN, C.T. Novel coumarins and benzocoumarins acting as isoform-selective inhibitors against the tumor-associated carbonic anhydrase IX. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 29, n. 2, p. 292-296, 2014.

SIMONIS, H.; SCHUHMANN, H. Über den Aufbau halogener Chromone. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 1142-1149, 1917.

VAN ASSCHE, T.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R.A.I.; MAES, L.; COS, P. Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

VEGA, J.C.; SANCHEZ, B.F.; MONTERO, L.M.; MONTAÑA, R.; DEL PILAR MAHECHA, M.; DUEÑES, B.; BARON, Á.R.; REITHINGER, R. The cost-effectiveness of cutaneous leishmaniasis patient management during an epidemic in Chaparral, Colombia in 2004. **Tropical medicine & international health**, v. 12, n. 12, p. 1540-1544, 2007.

WANG, C.-M.; ZHOU, W.; LI, C.-X.; CHEN, H.; SHI, Z.-Q.; FAN, Y.-J. Efficacy of osthol, a potent coumarin compound, in controlling powdery mildew caused by *Sphaerotheca fuliginea*. **Journal of Asian natural products research**, v. 11, n. 9, p. 783-791, 2009.

WEINMANN, I. History of the development and applications of coumarin and coumarin-related compounds. **Coumarins: biology, applications and mode of action**. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, v., n., p., 1997.

WHO. Global plan to combat neglected tropical diseases 2008-2015. v., n., p., 2007.

WHO. World cancer report 2014. **Health**, v., n., p., 2014.

WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 91, n. 22, p. 287-296, 2016.

WITAICENIS, A.; SEITO, L.N.; DI STASI, L.C. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Chemico-biological interactions**, v. 186, n. 2, p. 211-218, 2010.