



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCIÉLI FABRIS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE
DERIVADOS CUMARÍNICOS FUNCIONALIZADOS**

Londrina
2019

MARCIÉLI FABRIS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE
DERIVADOS CUMARÍNICOS FUNCIONALIZADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado em Química - Área de concentração Química Orgânica, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Profa. Dra. Marcelle de Lima
Ferreira Bispo

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Fabris, Marciéli.

Síntese e avaliação antibacteriana de derivados cumarínicos funcionalizados / Marciéli Fabris. - Londrina, 2019.
133 f. : il.

Orientador: Marcelle de Lima Ferreira Bispo.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Cumarina - Tese. 2. Amida - Tese. 3. Tiourea - Tese. 4. Antibacteriana - Tese. I. Bispo, Marcelle de Lima Ferreira . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

MARCIÉLI FABRIS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE DERIVADOS
CUMARÍNICOS FUNCIONALIZADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Mestrado em Química - Área de concentração Química Orgânica, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Marcelle de Lima
Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Carla Cristina Perez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Londrina, 19 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida que me concede e por todas as oportunidades que me proporciona.

A minha família, em especial aos meus pais, Neiva T. Camiloti Fabris e Juvenildo Fabris, e meus irmãos, Jean Carlos Fabris e Paulo Roberto Fabris, por ser meu amparo, meu porto seguro e por todo o incessável incentivo a minhas escolhas. Pelo suporte que representam, por serem as melhores pessoas de minha vida, obrigada.

A meus amigos, em especial Gabrielle Cristina Calegari, Larissa Lourdes Luz Ferreira e Giulia Caroline Borges que mesmo estando distantes fisicamente estão por perto em coração; por todo o apoio e incentivo nessa etapa de minha vida, obrigada. A meus amigos conquistados aqui em Londrina, particularmente Kaio Lancret Maciel e Anne Catherine Luz, obrigada por estarem ao meu lado nos momentos de angústia acadêmica e por sempre compartilhar esses momentos, vocês fizeram muita diferença.

A minha *roommate* linda que conviveu diariamente comigo, obrigada por ser a pessoa incrível que é, por me ajudar sempre que precisava de uma segunda opinião, por ser minha amiga de longa data, por ser você, obrigada.

A pessoa que tornou esse mestrado possível, minha orientadora maravilhosa, Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo, por toda a paciência em esclarecer minhas dúvidas, por acreditar nesse trabalho e em minha pessoa, inicialmente uma desconhecida, por sempre estar presente no laboratório e por auxiliar não só a mim, mas a todos, obrigada.

Aos professores e colegas do LaSMMed – Laboratório de Síntese de Moléculas Mediciniais, obrigada por cada momento que passaram ao meu lado, cada troca de informações, por serem maravilhosos e tornarem o trabalho rotineiro muito mais divertido. Nomeadamente, agradeço ao Michel Pedro Batista, hoje aluno de Iniciação Científica, que me auxiliou no desenvolvimento desse trabalho, muito obrigada.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Carla Cristina Perez por aceitar fazer parte deste trabalho e sempre estar disponível para esclarecer dúvidas e nos auxiliar nos percalços deste trabalho. Ao Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana, por igualmente aceitar fazer parte desse trabalho e se deslocar até a nossa

Universidade, obrigada.

A Universidade Estadual de Londrina, por todo o investimento e espaço físico que nos proporciona, em especial ao Programa de Pós Graduação em Química, por me aceitar a fazer parte de sua história, e a todos os professores vinculados ao departamento que compartilham seu conhecimento e tempo com todos os alunos, muito obrigada.

Sinto a igual necessidade de agradecer a todos os laboratórios que nos auxiliaram durante este projeto. Em especial, agradeço o Laboratório de Propriedade e Síntese de Substâncias Orgânicas (LAPSSO) por compartilhar conosco equipamentos e reagentes, bem como ao LabEspec – Laboratório de Espectroscopia, por todas as análises, obrigada.

Agradeço ainda, nomeadamente, ao Professor Gerson Nakazato do Departamento de Microbiologia (DM) da UEL e a pesquisadora Maria Cristina da Silva Lourenço no Departamento de Bacteriologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ – Rio de Janeiro) pelos bioensaios realizados.

Ao Ricardo Luís Nascimento de Matos e ao professor Nilton Syogo Arakawa por igualmente nos auxiliarem neste projeto com suas ideias e sugestões.

Por fim, agradeço imensamente a todos, sem exceção, que de uma forma ou outra contribuíram com esse projeto e o tornou possível, meu eterno agradecimento.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”

Isaac Newton

FABRIS, Marciéli. **Síntese e avaliação antibacteriana de derivados cumarínicos funcionalizados**. 2019. 133 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

RESUMO

As bactérias são organismos vivos encontrados na natureza que desempenham inúmeras funções. Contudo, estes microorganismos podem ser patógenos tornando-se um alvo terapêutico que necessita de constante desenvolvimento. Dentre as bactérias que se destacam na literatura devido a sua patogenicidade, encontram-se as do gênero *Staphylococcus*, *Escherichia* e *Pseudomonas*, além das micobactérias, em especial, o *Mycobacterium tuberculosis* que, só em 2017, matou aproximadamente 1,6 milhões de pessoas. Apesar de possuírem tratamento, o consumo irresponsável e excessivo dos antibióticos acarreta no desenvolvimento de bactérias resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado e, desse modo, há uma constante necessidade de desenvolver novos fármacos, mais específicos e mais potentes, no combate a diversos tipos de bactérias. Nesse contexto, as cumarinas e as tioureias são duas classes de substâncias que apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, tais como antibacteriana. Assim, inicialmente, visando explorar o possível potencial antibacteriano desses núcleos, propôs-se por intermédio da estratégia de hibridização molecular, a síntese de uma série de cumariltioureias, estruturas contendo o núcleo cumarínico e o grupamento tioureia onde, neste último, seriam introduzidos anéis benzênicos com substituintes de diferentes características estereo-eletrônicas, a fim de se realizar um estudo preliminar de relação estrutura-atividade. Propôs-se ainda, a síntese de uma série análoga, denominada cumarilamidas, visando verificar a influência da troca do possível farmacóforo (tioureia por amida) frente à atividade biológica desejada. A síntese de ambas as séries se iniciou com a obtenção do ácido 3-carboxicumarínico, que foi confirmada por meio de seu ponto de fusão e de técnicas espectroscópicas e espectrométricas (RMN de ¹H, RMN de ¹³C e EM). Em seguida, realizou-se a transformação do ácido no seu respectivo cloreto de acila, que, por sua vez, reagiu com diferentes anilinas para a obtenção das cumarilamidas desejadas em rendimentos que variaram de 75 a 91%, sendo três delas inéditas na literatura. A síntese das cumariltioureias resultou de formação de subprodutos e foi possível, até o momento, isolar apenas dois compostos planejados, com rendimentos de 4 e 75%. O ácido 3-carboxicumarínico e as cumarilamidas com substituintes na posição 4 do anel benzênico foram avaliados frente as cepas bacterianas Gram-positivas de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* e Gram-negativas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, contudo apresentaram valor de CIM acima de 500 µg mL⁻¹. A série completa das cumarilamidas foi então avaliada frente o *Mycobacterium tuberculosis*, porém, não foi possível inferir a atividade antimicobacteriana dessas substâncias, devido à baixa solubilidade das mesmas no meio utilizado para o crescimento do *M. tuberculosis*. Assim sendo, este trabalho tem como perspectiva, isolar o restante das cumariltioureias e testá-las frente a diferentes cepas bacterianas, bem como sintetizar novas cumarilamidas, com diferentes nucleófilos, a fim de aumentar a solubilidade desses compostos e então devidamente avaliar o potencial biológico destas estruturas.

Palavras-chave: Cumarina. Amida. Tioureia. Antibacteriana. *Mycobacterium tuberculosis*.

FABRIS, Marciéli. **Synthesis and antibacterial evaluation of functionalized coumarin derivatives**. 2019. 133 p. Dissertation (Master's degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Bacteria are living organisms found in nature that play numerous roles. However, these microorganisms can be pathogenic, causing diverse diseases and becoming a therapeutic target that needs constant development. Among the bacteria that stand out in the literature due to their pathogenicity, are the genus *Staphylococcus*, *Escherichia* and *Pseudomonas*, in addition to the *Mycobacterium tuberculosis* mycobacteria, which in 2017 alone killed approximately 1.6 million people. Despite the high mortality rate, both tuberculosis and outstanding bacterial infections are treated, but the irresponsible and excessive consumption of antibiotics leads to the development of bacteria resistant to these drugs and, therefore, there is a constant need to develop new drugs, more specific and more potent, in the fight against various types of bacteria. In this context, coumarins and thioureas are two classes of substances that exhibit a wide range of biological activities, such as antibacterial. Initially, in order to explore the possible antibacterial potential of these substances, the synthesis of a series of coumarilthioureas, structures containing the coumarin nucleus and the thiourea group were proposed through the molecular hybridization strategy, where benzene rings with substituents of different stereo-electronic characteristics would be introduced in order to carry out a preliminary study of the structure-activity relationship. It was also proposed the synthesis of an analogous series, called coumarilamides, in order to verify the influence of the exchange of the possible pharmacophore (thiourea versus amide) against the desired biological activity. The synthesis of both series started with the preparation of 3-carboxycoumarinic acid, which was confirmed by means of its melting point (M.P.) and spectroscopic and spectrometric techniques (^1H NMR, ^{13}C NMR and GC-MS). Then, the acid was converted into its respective acyl chloride, which in turn was reacted with different anilines to give the coumarilamides in 75 to 92% yield, among them, three are unpublished in the literature. The synthesis of coumarilthioureas resulted from the formation of side-products and it has been possible to isolate only two planned compounds in yields of 4 and 75%. The 3-carboxycoumarinic acid and the 4-substituted coumarilamides were evaluated against Gram-positive bacterial strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* and Gram-negative of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, but presented MIC values above 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The complete series of coumarilamides was then evaluated against *Mycobacterium tuberculosis*, however, it was not possible to infer the antimycobacterial activity of these substances, due to their low solubility in the medium used for the growth of *M. tuberculosis*. The aim of this work is to isolate the remainder of the coumarilthioureas and to test them against different bacterial strains, as well as to synthesize new coumarilamides with different nucleophiles in order to increase the solubility of these compounds and then to properly evaluate the biological potential of these structures.

Keywords: Coumarin. Amide. Thiourea. Antibacterial. *Mycobacterium tuberculosis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Principais componentes de uma célula bacteriana.....	16
Figura 2	– Ilustração da coloração de Gram para as diferentes bactérias	17
Figura 3	– Parede celular das bactérias: a) Gram-positivas e b) Gram-negativas	18
Figura 4	– Núcleo básico da cumarina	20
Figura 5	– Diversidade de atividades biológicas relacionadas ao núcleo cumarínico.....	21
Figura 6	– Métodos sintéticos clássicos para obtenção do núcleo cumarínico.....	24
Figura 7	– Diversidade biológica ao qual o núcleo da tioureia está associado	29
Figura 8	– Hibridação molecular que gerou a Tropisetrona.....	32
Figura 9	– Planejamento racional por hibridação molecular dos derivados arilsulfonato	33
Figura 10	– Hibridação molecular utilizada para gerar o composto simbiótico com ação anti-inflamatória	34
Figura 11	– Planejamento racional dos híbridos fenotiazina-1,2,3-triazol	35
Figura 12	– Planejamento estrutural por hibridação molecular das cumariltioureias	36
Figura 13	– Planejamento estrutural das cumarilamidas (3a-j) e das cumariltioureias (5a-j).....	37
Figura 14	– Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto 3c	44
Figura 15	– Possíveis fragmentos gerados no espectro de massas para a estrutura 3c	46
Figura 16	– Espectro de massas do composto 3c	46
Figura 17	– Expansão do espectro de RMN de ^1H da mistura 3c e 5c	50
Figura 18	– Espectro de massas evidenciando a obtenção de a) cumarilamida 3c e b) cumariltioureia 5c	51
Figura 19	– Expansão do espectro de RMN de ^1H da 1ª fração retirada da coluna cromatográfica aberta, referente à cumarilamida 3d	55

Figura 20	– Expansão do espectro de RMN de ^1H da 2ª fração retirada da coluna cromatográfica aberta, referente à cumariltioureia 5d	56
Figura 21	– Expansão do espectro de RMN de ^1H da 3ª fração retirada da coluna cromatográfica aberta, referente à amida primária (6).....	57
Figura 22	– Espectro de massas evidenciando a obtenção de cumarilamida 3d	57
Figura 23	– Espectro de massas evidenciando a obtenção da cumariltioureia 5d	58
Figura 24	– Espectro de massas evidenciando a obtenção da amida primária 6	58
Figura 25	– Expansão do espectro de RMN de ^1H do produto obtido na entrada 3 da Tabela 4	62
Figura 26	– Expansão do espectro de RMN de ^1H do produto obtido na entrada 4 da Tabela 5	66
Figura 27	– Expansão do espectro de RMN de ^1H do produto obtido conforme metodologia descrita por Kurt et al.	68
Figura 28	– Expansão do espectro de RMN de ^1H da cumariltioureia 5j obtida por purificação em coluna cromatográfica	69
Figura 29	– Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da cumariltioureia 5j obtida por purificação em coluna cromatográfica	70
Figura 30	– Esquema ilustrativo do método de Alamar Blue	73

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	– Métodos de síntese da cumarina (I) por meio da reação análoga de Reformatsky	25
Esquema 2	– Rota sintética livre de metais para formar 4-aril-3-acilcumarina (II)	26
Esquema 3	– Rota sintética <i>one-pot</i> de formação do cumarina (III)	26
Esquema 4	– Rota sintética via <i>umpolung</i> para formação da 3-aril-cumarina (IV)	27
Esquema 5	– Rota sintética de formação da 3-acil-4-arilcumarina (V)	27
Esquema 6	– Rota sintética de formação da cumarina (VI)	28
Esquema 7	– Rota sintética para obtenção das benzoiltioureias	31
Esquema 8	– Rota sintética para obtenção dos derivados de oxadiazol	31
Esquema 9	– Rota sintética para a obtenção do ácido 3-carboxicumarínico (1)	39
Esquema 10	– Mecanismo proposto para a obtenção do ácido 3-carboxicumarínico	40
Esquema 11	– Rota sintética para obtenção das cumarilamidas 3a-j	42
Esquema 12	– Rota sintética proposta para obtenção das cumariltioureias 5a-j	47
Esquema 13	– Mecanismo proposto para a reação de obtenção do cloreto (2)	48
Esquema 14	– Mecanismo proposto para a reação de obtenção das cumariltioureias (5a-j)	49
Esquema 15	– Rota sintética proposta para obtenção da cumariltioureia 5c	49
Esquema 16	– Mecanismo de degradação proposto para a formação da amida primária	59
Esquema 17	– Rota sintética utilizada para formar o isotiocianato (4)	63
Esquema 18	– Representação de uma proposta de formação da mistura de produtos (rotas A e B), e de como o excesso de amina poderia auxiliar nesse processo (rota C)	65
Esquema 19	– Rota sintética conforme Kurt et al.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Rendimentos em duas etapas obtidos para as cumarilamidas 3a-j .	43
Tabela 2	– Deslocamentos químicos do RMN de ¹ H (400 MHz), em ppm, obtidos para a substância 3c	45
Tabela 3	– Modificações realizadas para a síntese das cumariltioureias.....	53
Tabela 4	– Estudo sistemático para a síntese das cumariltioureias.....	63
Tabela 5	– Novas modificações nas tentativas de síntese das cumariltioureias.....	65
Tabela 6	– Atividades <i>in vitro</i> das cumarilamidas 3a, 3d, 3g e 3j	71
Tabela 7	– Atividades <i>in vitro</i> dos derivados cumarínicos (1 e 3a-g) frente a cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294), susceptível tanto à rifampicina como à isoniazida.....	73
Tabela 8	– Coeficiente de participação para as cumarilamidas e cumariltioureias.....	74
Tabela 9	– Propriedades físico-químicas para as cumarilamidas e cumariltioureias.....	76

SUMÁRIO

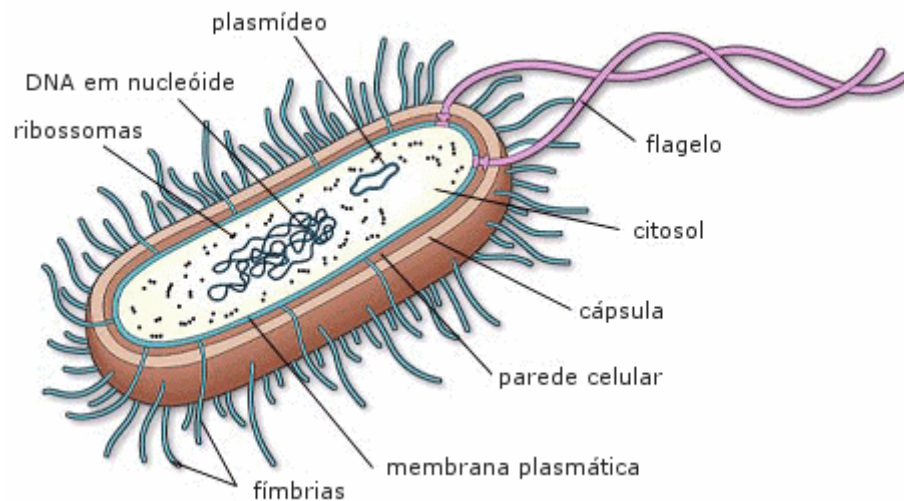
1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CUMARINAS: UMA VERSÁTIL CLASSE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	20
1.2	SÍNTESE DAS CUMARINAS	24
1.3	TIOUREIA: UM NÚCLEO DE SÍNTESE SIMPLES COM DIVERSAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS RELACIONADAS.....	28
1.4	HIBRIDAÇÃO MOLECULAR NA SÍNTESE DE POTENCIAIS FÁRMACOS	31
1.5	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS CUMARÍNICOS	35
2	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO 3-CARBOXICUMARÍNICO.....	39
3.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS CUMARILAMIDAS	41
3.3	TENTATIVAS DE SÍNTESE DAS CUMARILTIOUREIAS.....	46
3.4	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> PARA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	70
3.5	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> PARA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS	72
4	METODOLOGIA	77
4.1	PROCEDIMENTOS GERAIS	77
4.2	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	77
4.3	SÍNTESE DO ÁCIDO 3-CARBOXICUMARÍNICO	78
4.4	SÍNTESE DA CUMARILAMIDAS 3A-J	78
4.5	METODOLOGIA GERAL PARA AS TENTATIVAS DE OBTENÇÃO DAS CUMARILTIOUREIAS.....	81
4.6	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	83
4.6.1	Micro-organismos Utilizados	83
4.6.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	83
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBATERIANA	84

5	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICES	95
	APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO ÁCIDO 3-CARBOXICUMARÍNICO.....	95
	APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO ÁCIDO 3-CARBOXICUMARÍNICO	97
	APÊNDICE C – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS CUMARILAMIDAS (3A-J)	99
	APÊNDICE D – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS CUMARILTIOUREIAS	109

1 INTRODUÇÃO

As bactérias são organismos unicelulares, procariontes, portanto não apresentam um núcleo definido, de modo que seu material genético se encontra disperso no citoplasma da célula.¹ Envolto a este citoplasma, encontra-se a parede celular bacteriana, constituída, essencialmente, por peptidoglicano, um complexo de dissacarídeo e aminoácido. Além da parede celular, algumas bactérias podem apresentar outros elementos externos à parede celular, como a cápsula, flagelos e *pili* (Figura 1).¹

Figura 1 – Principais componentes de uma célula bacteriana



Fonte: Almeida et al.²

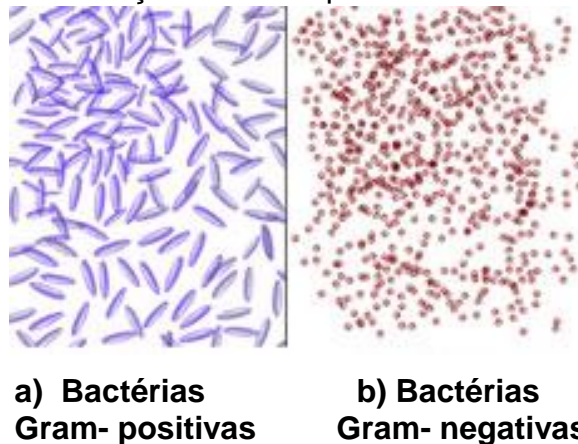
As três principais formas de bactérias são: cocos (esféricos), bacilos (bastonetes) e espiroquetas (espiral), sendo essa definida de acordo com a rigidez de sua parede celular.¹

Devido as diferentes características que a parede celular de uma bactéria pode apresentar, é possível fazer a diferenciação entre os vários tipos de bactérias por meio de colorações diferenciais, sendo as mais comuns a coloração de Gram e a coloração acidorresistente.³

A coloração de Gram utiliza sais de cristal violeta (CV) como uma coloração primária as bactérias, seguido da adição de um mordente, o iodo (I). Essa adição específica forma complexos de CV-I fazendo com que as bactérias apresentem a coloração violeta/púrpura. Posteriormente, aplica-se um agente descorante (etanol ou acetona) e então essa bactéria é novamente corada com safranina, um corante

vermelho.² A diferenciação entre as bactérias ocorre devido a espessura da camada de peptidoglicano presente em sua parede celular, de modo que as bactérias denominadas Gram-positivas, as que possuem maior espessura de peptidoglicano, retêm o complexo CV-I em sua parede celular apresentando a coloração púrpura (Figura 2A). As bactérias denominadas Gram-negativas, por possuírem apenas uma camada de peptidoglicano, ao serem lavadas com etanol, são descoradas e assim, a adição do contra corante (safranina) colore novamente estas bactérias, apresentando assim a cor rósea (Figura 2B).³

Figura 2 – Ilustração da coloração de Gram para as diferentes bactérias



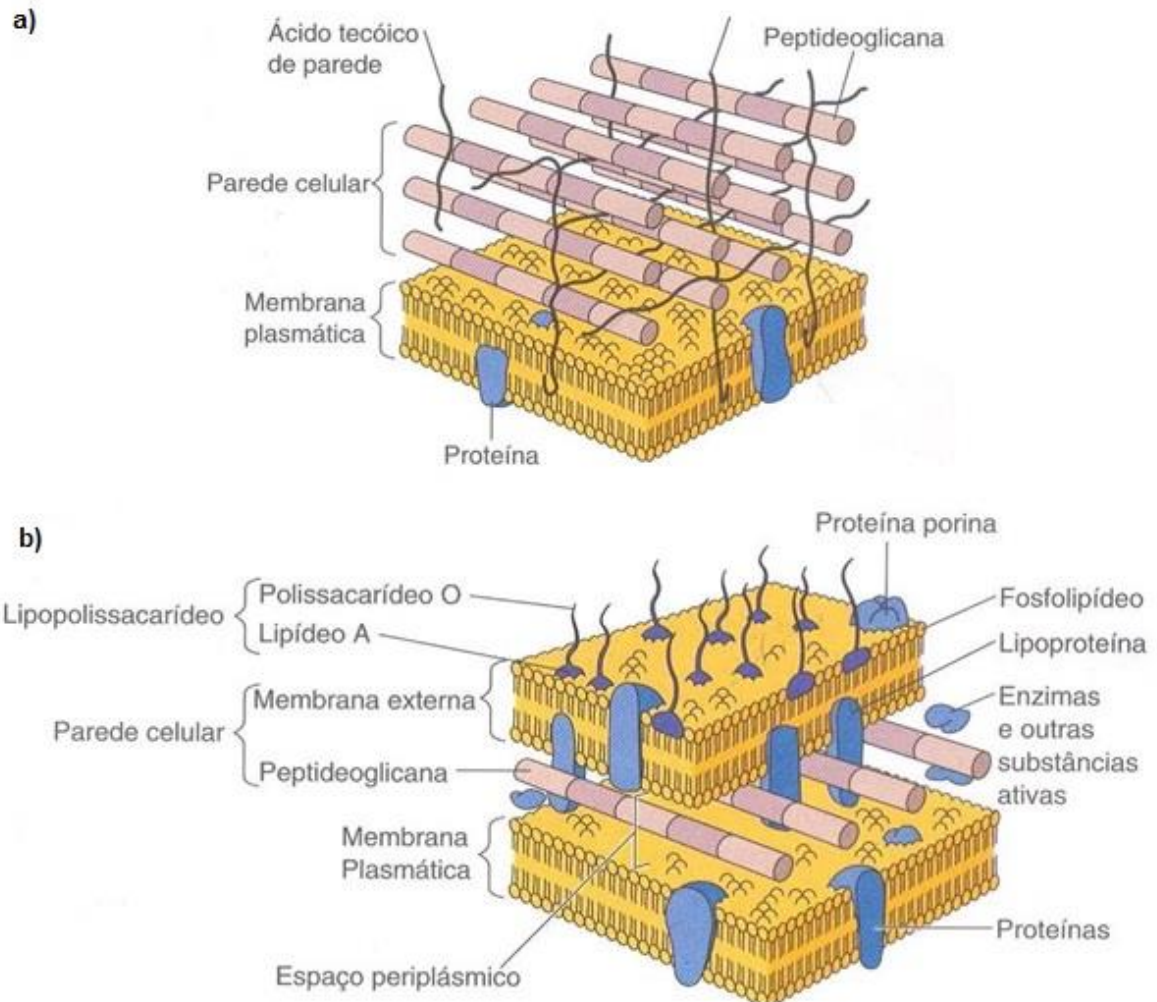
Fonte: ABCMED.⁴

Além da distinção quanto à espessura da camada de peptidoglicano, as bactérias Gram-negativas diferem-se das Gram-positivas devido à presença de uma membrana externa, composta por lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídios (Figura 3).³ São estas diferenças na composição de cada parede celular que permitem a estes microorganismos funções especializadas, como barreira a determinados corantes e a antibióticos.³

Dentre os tipos de bactérias patogênicas que compõem a classe Gram-positiva encontram-se as bactérias do gênero *Staphylococcus*, sendo sua principal espécie representante o *S. aureus*, uma bactéria capaz de produzir muitas toxinas e assim gerar graves infecções, principalmente de caráter pós-cirúrgico e relacionadas à intoxicação alimentar.³ Outro gênero patogênico de destaque é o *Clostridium*, que possui doenças associadas como o tétano, causado pelo *Clostridium tetani*, e o botulismo (*Clostridium botulinum*). O gênero *Bacillus* também é uma bactéria capaz de causar intoxicação alimentar devido ao *B. cereus*, uma espécie encontrada em

amidos, além de severas infecções como o Antraz, causada pelo o *Bacillus anthracis*.³

Figura 3 – Parede celular das bactérias: a) Gram-positivas e b) Gram-negativas



Fonte: Kostecki.⁵

Quanto às bactérias Gram-negativas destacam-se as do gênero *Pseudomonas*, sendo a espécie *Pseudomonas aeruginosa* a mais conhecida, podendo causar infecções urinárias e até mesmo infectar o trato urinário e queimaduras; o gênero *Escherichia* também é um patógeno muito conhecido devido à espécie *Escherichia coli*, uma bactéria Gram-negativa encontrada no trato intestinal humano que corresponde a um indicativo de contaminação quando presente em água e em alimentos, podendo causar infecção no trato urinário. Outro patógeno que está associado a esta classe de bactérias é a *Salmonella*, um gênero comumente encontrado no intestino de aves e mamíferos que podem infectar

alimentos. Os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* também fazem parte das bactérias Gram-negativas, sendo que no primeiro caso podemos destacar a espécie *Klebsiella pneumoniae* que pode causar pneumonia em seres humanos, e as espécies *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes* que são patógenos responsáveis por infecções hospitalares.³

Assim como as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que se diferenciam devido à parede celular, as micobactérias são outra classe de bactérias que, por apresentar uma parede celular rica em lipídeos, possuem características que os diferem das outras bactérias. Dentre estas destacam-se: taxa de crescimento lenta, resistência a detergentes, antibióticos e antibacterianos comuns, além de serem organismos acidorresistentes, de modo que necessitam de coloração diferencial para serem identificados.⁶ Os patógenos mais importantes dentro do gênero é o *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causador da tuberculose (TB), e *Mycobacterium leprae*, o agente causador da hanseníase.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a tuberculose está entre as 10 doenças que mais matam no mundo, sendo que só em 2017, 1,6 milhões de pessoas morreram vítimas da doença e 10 milhões foram diagnosticadas com TB.⁷ Outras bactérias que recebem destaque da OMS devido aos altos índices de infecção é o gênero *Salmonella* e *Campylobacter*, ambas responsáveis por surtos de doenças intestinais, estando entre as 4 principais causas globais de diarreia;^{8,9} a bactéria *Clostridium botulinum* devido ao seu potencial fatal, capaz de bloquear as funções nervosas, podendo levar o indivíduo à paralisia respiratória e muscular;¹⁰ a espécie *E. coli*, onde estima-se que 10% dos pacientes infectados podem desenvolver infecção urinária, com uma taxa de letalidade entre 3 e 5%¹¹ e ainda, ressalta-se a *Streptococcus pneumoniae*, a causa mais comum de pneumonia bacteriana em crianças, chegando a matar mais de 920 mil crianças em 2015.¹²

Apesar do alto índice de mortalidade, tanto a tuberculose como as infecções aqui destacadas possuem um tratamento, há a disponibilidade de medicamentos para a população e são distribuídos no Brasil pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Contudo, o longo tratamento envolvido e o uso excessivo e inadequado de antibióticos, acarretam no desenvolvimento de bactérias resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado.¹³ De acordo com o último relatório sobre resistência a antibióticos, recentemente divulgado pela OMS (2018), só na região Europeia, há um consumo médio de 17,9 doses diárias de antibióticos, definidas

para cada mil habitantes por dia, sendo que no Brasil, esse consumo é ainda maior, com cerca de 22,75 doses diárias de antibióticos para cada mil habitantes.¹⁴

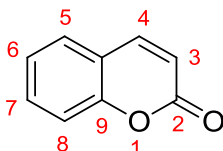
Além de ser uma das maiores ameaças a saúde global, a resistência aos antibióticos geram internações mais longas, um alto custo médico e aumento no número de óbitos.¹³ Dentre os patogênicos prioritários no desenvolvimento de novas substâncias, a *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e as bactérias do gênero *Enterobacteriaceae* (como *Klebsiella* e *E. coli*) são consideradas de prioridade crítica, uma vez que podem causar infecções graves e frequentemente mortais, como infecções da corrente sanguínea e pneumonia.¹⁵ *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* e *Streptococcus pneumoniae* são bactérias consideradas em nível alto e médio de prioridade no desenvolvimento de novos fármacos.¹⁵

Assim sendo, neste contexto de desenvolvimento de novos fármacos, as cumarinas e as tioureias são duas classes de substâncias que se destacam na literatura devido a gama de atividades biológicas aos quais estão vinculadas, inclusive com resultados consideráveis na inibição de cepas bacterianas, como destacado a seguir.

1.1 CUMARINAS: UMA VERSÁTIL CLASSE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

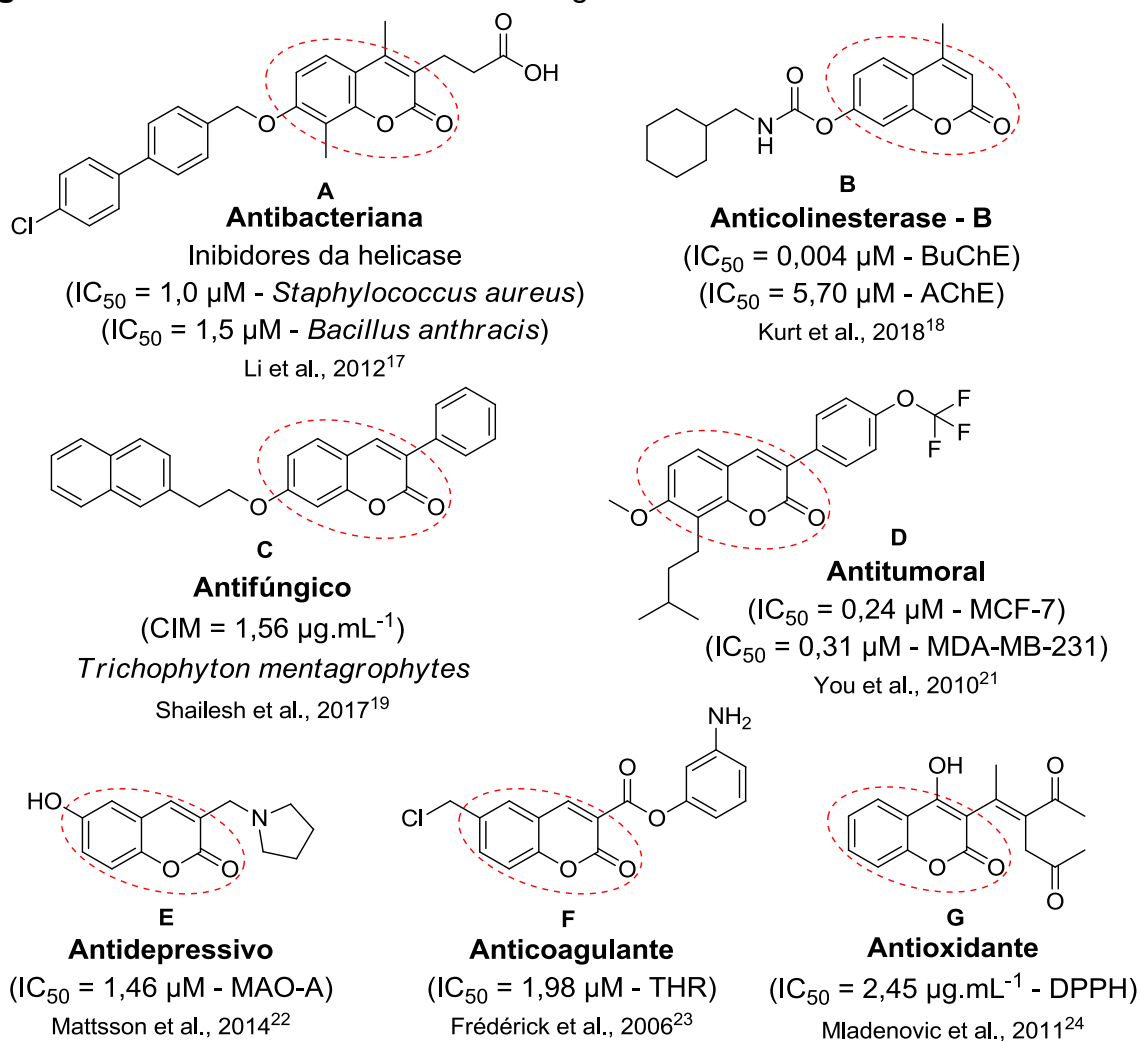
As cumarinas (1,2 benzopirona, 2H-Cromen-2-ona) são lactonas do ácido α -hidróxido-cinâmico, sendo sua estrutura básica constituída pela fusão de um anel benzênico com uma lactona α,β -insaturada (Figura 4). A cumarina foi isolada pela primeira vez em 1820, a partir de sementes de *cumaru*, uma árvore presente no norte do Brasil, popularmente conhecida como fava tonca e cujo nome botânico é *Dipteryx odorata*, que contém grande quantidade de cumarina (1 a 3%).¹⁶ Além do cumaru, a cumarina pode ser encontrada como metabólito secundário em raízes, sementes e folhas de diversas espécies de plantas, tais como guaco, agrião e canela.¹⁶

Figura 4 – Núcleo básico da cumarina



Sinteticamente, a fácil obtenção do núcleo e a possibilidade de inserção de diferentes substituintes, permite que estas estruturas estejam relacionadas a uma ampla gama de atividades biológicas, conforme demonstrado a seguir e sumarizado na Figura 5.

Figura 5 – Diversidade de atividades biológicas relacionadas ao núcleo cumarínico



Li et. al.¹⁷ sintetizaram e avaliaram o potencial biológico de derivados da cumarina no combate as bactérias *Bacillus anthracis*, o causador do Antraz, uma doença infecciosa grave e fatal, e *Staphylococcus aureus*, uma bactéria muito comum, mas que vem desenvolvendo resistência aos fármacos já utilizados em seu tratamento, como a Meticilina (MRSA – do inglês, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Visando a síntese de novos medicamentos com alvo moleculares diferenciados, o grupo avaliou a atividade dos compostos frente a inibição da helicase bacteriana, uma enzima replicativa que catalisa a abertura das

hélices do DNA, um passo essencial limitante na replicação do DNA das células. A bifênol cumarina (Figura 5 - **A**) mostrou a atividade mais significativa contra ambas as helicases *S. aureus* e *B. Anthracis*, com valores de IC_{50} de 1,0 e 1,5 μM , respectivamente. Além disso, o composto foi testado contra múltiplas cepas de MRSA, resistentes a ciprofloxacina, e apresentou valores relevantes, com Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 0,52 a 2,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Outro derivado da cumarina que mostrou atividade relevante foi sintetizado por Kurt et. al.¹⁸ em 2018, como um potente inibidor de colinesterases (ChEs). Estas enzimas são responsáveis por inibirem a ação da acetilcolina (ACh), um importante neurotransmissor associado a memória, de modo que a diminuição dos níveis dessa enzima estaria intimamente ligada com a doença de Alzheimer. As colinesterases, a acetilcolinesterase (AChE) e a butilcolinesterase (BuChE) hidrolisam a ACh, portanto, substâncias capazes de inibir o efeito destas colinesterases (AChE e BuChE) auxiliam no tratamento da doença de Alzheimer. O derivado da cumarina, contendo o grupo carbamato (Figura 5 - **B**) foi capaz de inibir as duas ChEs com valores de IC_{50} de 0,004 e 5,70 μM , respectivamente, para BuChE e AChE.

Shailesh et al.¹⁹ sintetizaram diversos compostos contendo o núcleo cumarínico e os avaliaram quanto a sua capacidade de inibir diversas cepas bacterianas e fúngicas. O composto 3-Fenil-7-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-2H-1-benzopirran-2-ona (Figura 5 - **C**) apresentou ótimos resultados ao inibir o fungo *Trichophyton mentagrophytes*, um dermatófito que invade tecidos queratinizados como pele, cabelos e unhas,²⁰ com CIM de 1,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valor inibitório mais baixo que o encontrado para o padrão fluconazol (CIM = 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Importantes resultados também foram descritos por You et al.²¹ Eles sintetizaram uma série de compostos contendo o núcleo cumarínico por meio da modificação estrutural do Ostol, uma substância natural presente em diversas ervas medicinais que são muito utilizadas na medicina tradicional chinesa, devido a sua ampla gama de atividades biológicas. Estudos anteriores haviam demonstrado que as posições 3 e 4 poderiam estar associadas à sua atividade biológica e assim, com o intuito de melhorar a atividade anticancerígena desse composto, o grupo propôs a inserção de diferentes radicais no grupo arila adicionado na posição 3 do anel cumarínico. Os pesquisadores obtiveram ótimos resultados para o composto **D** da Figura 5, ao apresentar ação antitumoral *in vitro* para o carcinoma da mama MCF-7

e MDA-MB-231, com valores de IC₅₀ de 0,24 e 0,31 µM, respectivamente para as linhagens analisadas.

A cumarina também pode estar relacionada à atividade antidepressiva. Inúmeros são os neurotransmissores envolvidos no controle das funções corporais, entre elas encontram-se a norepinefrina, a serotonina e a dopamina, substâncias conhecidas como monoaminas, que são responsáveis pela regulação do humor. As Monoamina Oxidase (MAO) são enzimas responsáveis pela desaminação oxidativa de hormônios e neurotransmissores do tipo monoamina, sendo estas, portanto, as responsáveis pela diminuição dessas enzimas.²² As monoaminas oxidases da isoforma MAO-A tem maior atração de serotonina e noradrenalina, sendo assim responsáveis pelo metabolismo das enzimas do humor. Dessa forma, Mattsson et al.¹⁹ sintetizaram e avaliaram a ação de derivados cumarínicos como inibidores de MAO-A, com o intuito de oferecer uma estratégia multi-neurotransmissora para o tratamento da depressão. A substância **E** mostrada na Figura 5, foi capaz de inibir a MAO-A com IC₅₀ de 1,46 µM, além de apresentar bons resultados *in vivo*, indicando ser um potencial inibidor para o tratamento de depressão e perturbações de humor.

Frédérick et al.²³ sintetizaram outros compostos com o núcleo cumarínico, planejando-os para serem anticoagulantes. De acordo com resultados prévios obtidos pelo grupo, o mecanismo de inibição da trombina (THR), uma serina protease que possui papel fundamental na coagulação do sangue e, acredita-se ser o mediador central da trombogênese, consiste no ataque nucleofílico da serina a porção lactona da cumarina, gerando um metóxido de quinona altamente reativo que pode ser alquilado, levando a inativação da enzima. Assim sendo, o composto **F** (Figura 5) sintetizado pelo grupo, apresentou a mais alta potência inibitória de THR com IC₅₀ de 1,98 µM.

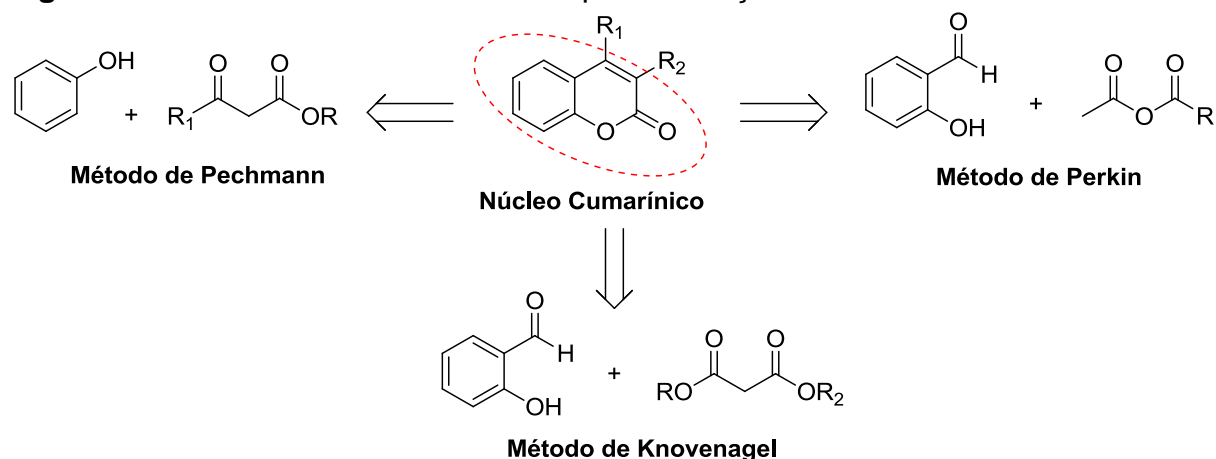
As cumarinas também podem demonstrar atividade antioxidante. O trabalho publicado por Mladenović et al.²⁴ avaliou um grupo de derivados de 4-hidroxicumarina em relação ao seu potencial antioxidante. A capacidade oxidante total (*in vitro*) do composto **G**, Figura 5, foi avaliada pelo método DPPH (1,1-difenil-2-picrilo-hidrazilo) e comparado com os padrões de ácido ascórbico (Asc) e BHT (hidroxitolueno butilado). O derivado **G** foi capaz de consumir o DPPH com um IC₅₀ de 2,45 µg mL⁻¹ ao ser exposto por 60 min, enquanto que os padrões apresentaram IC₅₀ de 15,61 e 6,05 µg mL⁻¹, respectivamente, para os controles Asc e BHT.

Assim sendo, podemos afirmar que a cumarina é um núcleo interessantíssimo quando o relacionamos a sua diversidade biológica e seu potencial medicinal, que o permite ser cada vez mais explorado.

1.2 SÍNTESE DAS CUMARINAS

Como exposto no tópico anterior, apesar de serem amplamente encontradas na natureza, as cumarinas também podem ser facilmente obtidas por meios sintéticos. Os principais métodos de síntese das cumarinas correspondem a reações clássicas de condensação do tipo Knoevenagel, Perkin e Pechman (Figura 6).

Figura 6 – Métodos sintéticos clássicos para obtenção do núcleo cumarínico

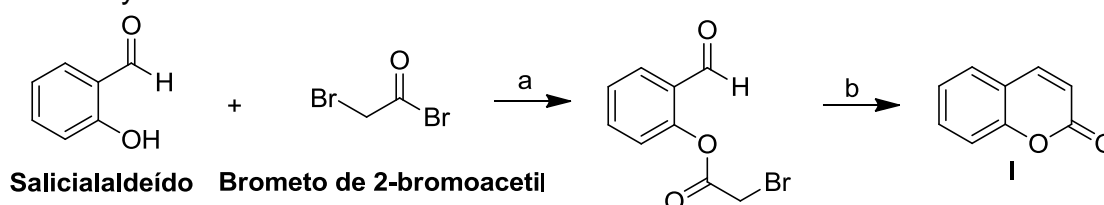


A condensação pelo método de Pechman ocorre por intermédio da reação entre fenóis com β -cetoésteres, sob condições ácidas, de modo que o fenol promove o ataque nucleofílico ao grupo carbonila e, subsequentemente, acontecem desidratações sucessivas para gerar a cumarina. Os métodos de Knoevenagel e Perkin, por sua vez, se baseiam em reações entre 2-carboxifenol e reagentes contendo o grupo metileno ativado ou anidrido acético, respectivamente. Ambas as metodologias utilizam base como catalisador para gerar o núcleo cumarínico.^{25,26}

Inúmeros outros métodos de síntese de cumarinas se encontram descritos na literatura nos últimos anos. Dentre estes, Dittmer et al.²⁷ conseguiram sintetizar a cumarina por meio do aprimoramento de metodologias análogas à reação de Reformatsky. Essa reação envolve, classicamente, a adição de um organozinco a um éster α -halocarbonila, de modo a formar um β -hidroxiéster. Um trabalho anterior²⁸ havia reportado uma tentativa inicial de preparar cumarina por ciclização

intramolecular do éster de bromoacetato de salicilaldeído, utilizando como catalisador o telureto de sódio, porém a reação não foi bem sucedida e, de acordo com Dittmer et al.²⁷ novas tentativas não haviam sido reportadas. Assim sendo, realizando pequenas modificações na síntese, o grupo conseguiu realizar a ciclização dos compostos, conforme Esquema 1 (representativo da melhor condição), de modo que o fenolato formado ataca a carbonila, formando o intermediário salicilaldeído α -bromoacilado, que conduz a formação do composto (I), recuperando o telúrio elementar e o íon brometo.

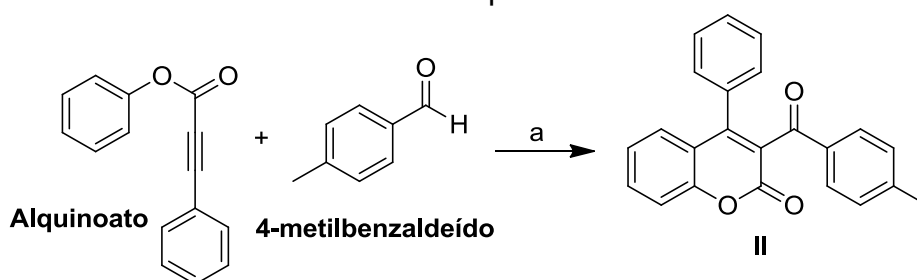
Esquema 1 – Métodos de síntese da cumarina (I) por meio da reação análoga de Reformatsky



Condições e Reagentes: a) THF, -78 °C; b) Li₂Te, THF, -78 °C - t.a. 75%

Em 2015, Mi et al.²⁹ sintetizaram eficientemente, derivados de acil-cumarinas por intermédio de um acoplamento oxidativo do tipo *Tandem* entre alcinos e aldeídos, com o auxílio de brometo de tetra-*n*-butilamônio (TBAB), sem a utilização de metais. A melhor condição de síntese é a demonstrada no Esquema 2. Os pesquisadores esclarecem que a reação ocorre, primeiramente, entre o persulfato de potássio com o TBAB para formar o radical sulfato de tetrabutilamônio, em altas temperaturas, que iria então reagir com o 4-metilbenzaldeído para formar um radical acila. Em seguida, ocorre a adição do radical acila na posição α à carbonila do alquinoato, gerando um radical vinílico altamente reativo, que sofre ciclização para formar um areno que, subseqüentemente, por transferência de elétron ao radical sulfato, seguida de desprotonação pelo mesmo, gera o composto cumarínico desejado com um rendimento de 75% (II).

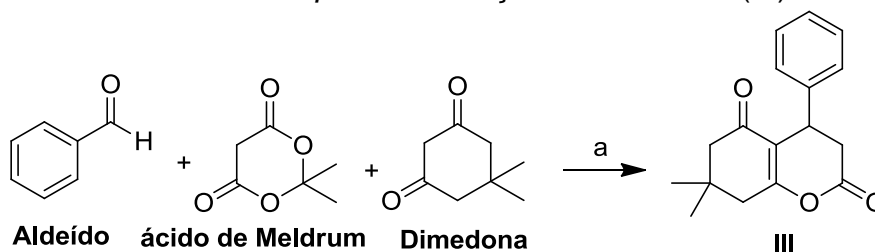
Esquema 2 – Rota sintética livre de metais para formar 4-aryl-3-acilcumarina (II)



Reagentes e Condições: TBAB, K₂S₂O₈, 1,2 dicloroetano, atm N₂, 90 °C. 75%

Visando a síntese de derivados das cumarinas livre de resíduos, Rong et al.³⁰ desenvolveu uma reação *one-pot*, sem utilização de solvente, utilizando apenas 3 componentes. Em um almofariz, foi adicionado o aldeído desejado, o 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (ácido de Meldrum), a 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona (dimedona) e o catalisador, o cloreto de trietilbenzilamônio (TEBA). A mistura foi triturada com o pistilo, a temperatura ambiente, e em aproximadamente 5-7 min o grupo conseguiu obter os compostos desejados (Ex. Derivado III – Esquema 3).

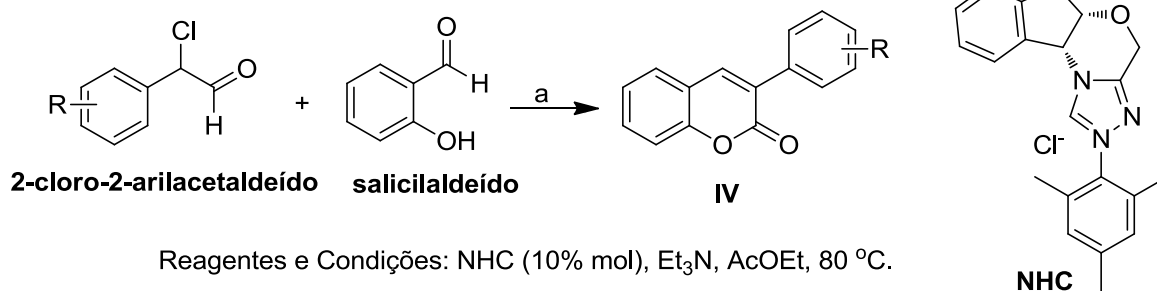
Esquema 3 – Rota sintética *one-pot* de formação do cumarina (III)



Reagentes e Condições: a) TEBA, fricção, 5-7 min, 92%.

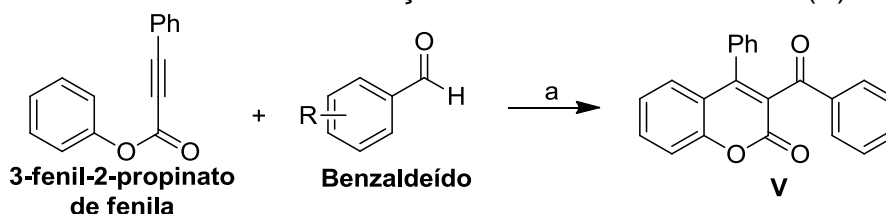
Outra estratégia que pode ser utilizada para formação de derivados cumarínicos, mais precisamente derivados de 3-aryl-cumarina, é por intermédio da reação de *umpolung* (inversão de polarização). Jiang et al.³¹ relataram a síntese 3-aryl-cumarinas por meio da condensação entre 2-cloro-2-aryl-acetaldeídos e salicilaldeído, catalisada por um carbeno *N*-heterocíclico (NHC). O produto da ciclização foi adquirido com bom rendimento (80%), ao utilizar 10% de NHC, trietilamina como base e acetato de etila como solvente (Esquema 4).

Esquema 4 – Rota sintética via *umpolung* para formação da 3-aryl-cumarina (**IV**)



Kawaai et al.³² sintetizaram 3-acil-4-aryl-cumarina por meio da formação de radicais acila sob irradiação de luz visível. Para isso, o grupo utilizou peróxido de benzoíla (BPO), 2-*t*-butil antraquinona (2-*t*Bu-AQN) como catalisador, carbonato de potássio (K₂CO₃) como base e radiação com luz ultravioleta para formar os radicais acila correspondentes ao benzaldeído substituído. A reação do radical acila com o 3-fenil-2-propinato de fenila forma um radical vinil intermediário, que é então reduzido a 3-acil-4-aryl-cumarina correspondente (**V**). Os compostos foram obtidos com rendimentos de aproximadamente 70% (Esquema 5).

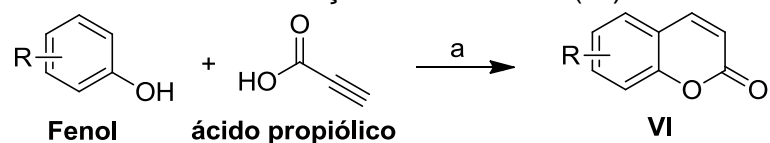
Esquema 5 – Rota sintética de formação da 3-acil-4-aryl-cumarina (**V**)



Reagentes e Condições: a) 2-*t*Bu-AQN (10 mol%), BPO (200 mol%), K₂CO₃ (50 mol%), pentanol, UV, Ar.

Outro método de obtenção do núcleo cumarínico foi aprimorado por Choi et al.³³, ao promover a ciclização intramolecular de fenóis e ácidos propiólicos sem a utilização de metais. A reação otimizada pelo grupo corresponde a reação de fenóis com o ácido propiólico, mediada por 2,0 eq. de ácido trifílico (TfOH) e utilizando clorobenzeno a 100 °C como solvente, conforme demonstrado no Esquema 6, com rendimento de até 95% após duas horas de reação.

Esquema 6 – Rota sintética de formação da cumarina (**VI**)



Reagentes e Condições: a) TfOH (2,0 eq), Clorobenzeno, 100 °C.

1.3 TIUREIA: UM NÚCLEO DE SÍNTESE SIMPLES COM DIVERSAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS RELACIONADAS

A tioureia é um núcleo derivado da ureia onde, ao invés de um átomo de oxigênio, tem-se um átomo de enxofre (S), portanto, apresenta a fórmula molecular de $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CS}$, conforme destacado em azul na Figura 7. Com massa molecular de $76,12 \text{ g mol}^{-1}$, apesar de pequeno, este núcleo destaca-se na literatura devido às diversas atividades biológicas as quais está relacionada (Figura 7).

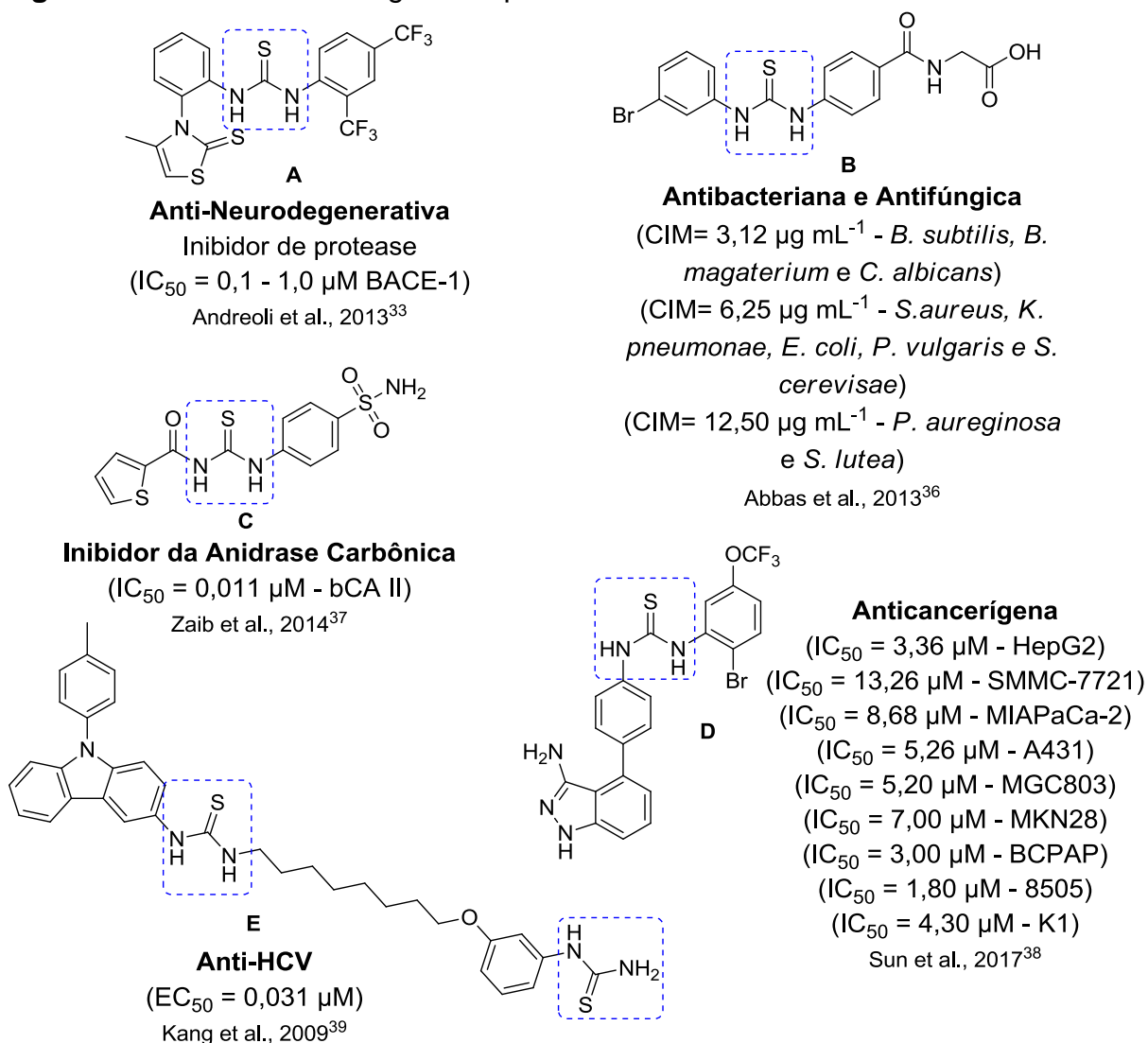
Em 2013, Andreoli et al.³⁴ sintetizaram uma série de compostos contendo o núcleo da tioureia, como potenciais inibidores da enzima protease BACE-1. A inibição da protease BACE-1 permite a diminuição nos níveis de peptídeos β -amilóide ($\text{A}\beta$), principais constituintes das placas amiloides que se acumulam no cérebro, e estão relacionadas ao desenvolvimento patológico da doença de Alzheimer.³⁵ Entre os compostos da série sintetizada, o derivado **A** da Figura 7 é o inibidor mais potente de BACE-1 com valor de IC_{50} entre 0,1 e 1 μM .

No mesmo ano, o grupo de pesquisa de Abbas et al.³⁶ sintetizou 26 compostos derivados do ácido hipúrico, contendo em sua estrutura o núcleo da tioureia, e os avaliaram quanto a sua capacidade antibacteriana e antifúngica. As cepas bacterianas Gram-positivas utilizadas para o teste foram: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*; quanto às bactérias Gram-negativas, as cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea* e *Proteous vulgaris* foram utilizadas nos testes. Por sua vez, as cepas *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* foram utilizadas para a análise antifúngica dos compostos. O composto **B** (Figura 7) foi apontado como o mais promissor, inibindo todas as cepas com valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) entre 3,12 e 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As tioureias também estão associadas à inibição da anidrase carbônica (AC). A atividade enzimática destas isoenzimas está associada a diversos processos

biológicos como transporte de gás carbônico (CO₂) e íons, respiração, reabsorção óssea, entre outros.³⁷ Contudo, estas enzimas também estão associadas ao desenvolvimento de tumores hipóxicos, ao favorecer a sobrevivência e migração dessas células. Assim sendo, Zaib et al.³⁷ realizou a síntese de treze compostos com o grupamento tioureia, e os avaliaram quanto sua capacidade de inibir a AC de células bovinas (bCA II). O derivado contendo o núcleo tiofeno, substância **C** da Figura 7, foi o mais promissor ao inibir a bCA II com valor de IC₅₀ de 0,011 µM.

Figura 7 – Diversidade biológica ao qual o núcleo da tioureia está associado



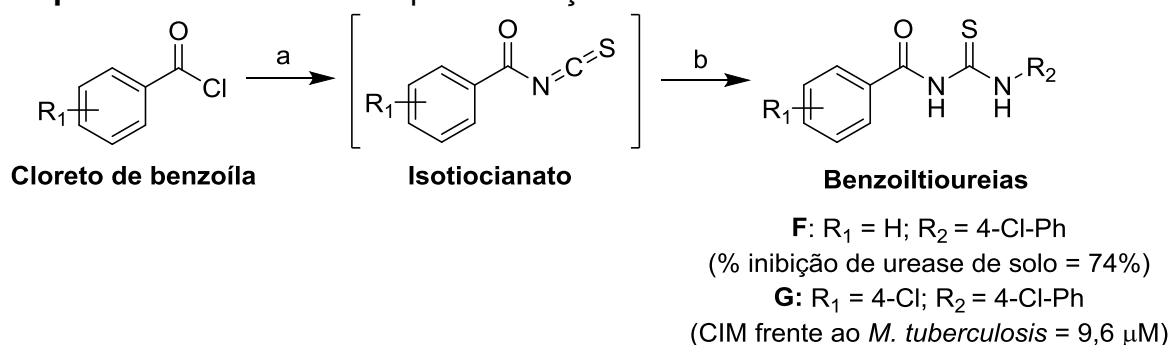
Sun et al.³⁸ desenvolveram três séries de derivados contendo o núcleo da tioureia, com o intuito de analisar a capacidade destes compostos como inibidores multi-alvo de RTKs (receptores tirosina quinases). Estes receptores são reguladores-chave de processos celulares como o crescimento e desenvolvimento celular e,

portanto, estão relacionados ao desenvolvimento de angiogênese e crescimento tumoral. Os resultados obtidos pelo grupo indicam que a diariltioureia **D** (Figura 7) possui atividade anticancerígena para as nove linhagens de células humanas testadas, duas hepáticas (HepG2, SMMC-7721), uma de câncer de pâncreas (MIAPaCa-2), outra de câncer de pele (A431), outras duas de câncer de estômago (MGC-803 e MKN28) e três linhagens de câncer de tireoide (BCPAP, 8505 e K1), com valores de IC₅₀ entre 1,80 µM e 13,26 µM, conforme demonstrado na Figura 7. Além disso, o grupo reportou que a diariltioureia é um inibidor multi-alvo da atividade das quinases VEGFR-2, TIE-2 e EphB4, com IC₅₀ de 3,45, 2,13 e 4,71 nM, respectivamente.

As tioureas também são reportadas na literatura como inibidoras do vírus da hepatite C (HCV). De acordo com Kang et al.,³⁹ o derivado carbazol (composto **E** – Figura 7) apresentou valor de EC₅₀ (concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo) de 0,031 µM, quando avaliado frente ao vírus HCV.

Em relação à síntese dos compostos contendo o núcleo da tioureia, em geral, ocorre por meio da reação de um cloreto de acila com tiocianato de potássio (KSCN) ou tiocianato de amônio (NH₄SCN), utilizando um solvente aprótico, geralmente acetona ou acetonitrila, para estabilização das cargas geradas. Dois exemplos são mostrados a seguir, o primeiro (Esquema 7) foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, onde objetiva-se a obtenção de benzoiltiureias. Para tal, Brito et al.⁴⁰ reagiu o cloreto de benzoíla com o NH₄SCN, utilizando acetona como solvente, sob refluxo e agitação por 30 minutos, seguido de arrefecimento do meio e, posterior adição *one-pot* da amina desejada para a geração dos compostos desejados. O grupo sintetizou 65 compostos, contendo substituintes (R₂) alifáticos e aromáticos, com rendimentos de 38 – 99%. É válido ressaltar que dezesseis dessas benzoiltiureias apresentaram excelente capacidade de inibição de ureases de solo, com porcentagens de inibição entre 41 – 74%, sendo que o derivado **F** apresentou resultado superior as referências utilizadas para teste (tioureia (22,6%) e hidroxiiurea (73,6%)).⁴⁰ Além disso, dez substâncias apresentaram excelentes CIMs frente ao *M. tuberculosis*, com valores entre 74,5 e 9,6 µM, sendo o derivado **G** mais ativo do que o fármaco de primeira escolha etambutol (CIM = 17,1 µM), o que confirma o potencial antibacteriano dessa classe de substâncias (Esquema 7).⁴¹

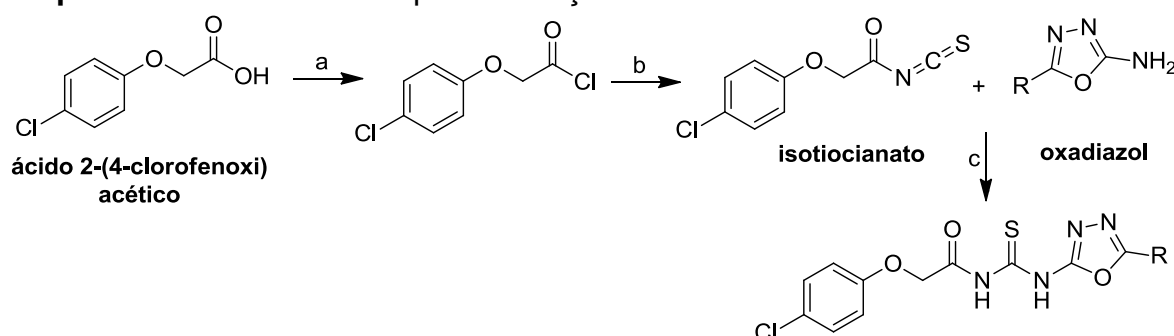
Esquema 7 – Rota sintética para obtenção das benzoiltioureias



Reagentes e Condições: a) NH_4SCN , acetona, refluxo, 30 min; b) Amina correspondente, acetona.

O segundo exemplo aqui demonstrado foi sintetizado por Fenhua et al.⁴² A formação dos compostos contendo a tiourea iniciou-se com a reação entre o ácido 2-(4-clorofenoxi) acético com o cloreto de tionila (SOCl_2), para formar seu respectivo cloreto. Na sequência, realizou-se a síntese do intermediário isotiocianato, ao reagir o cloreto do ácido com o tiocianato de potássio, utilizando acetonitrila como solvente, seguida de retirada do cloreto de potássio formado e posterior reação do isotiocianato com o oxadiazol correspondente para formar os compostos desejados (Esquema 8). Ao todo, foram sintetizadas dez substâncias, com rendimentos entre 38 e 75%.

Esquema 8 – Rota sintética para obtenção dos derivados de oxadiazol



Reagentes e Condições: a) SOCl_2 , 70 °C, 4h; b) KSCN , CH_3CN , 30 min; c) 70 °C, 2h.

1.4 HIBRIDAÇÃO MOLECULAR NA SÍNTESE DE POTENCIAIS FÁRMACOS

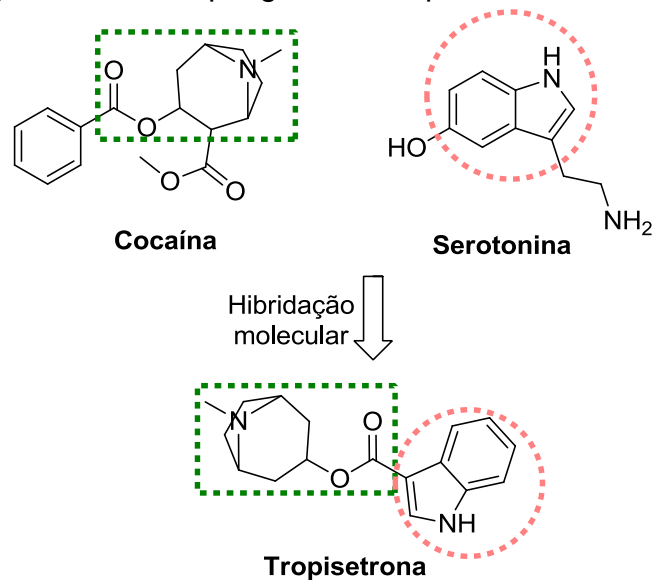
O desenvolvimento de fármacos é uma necessidade que deve estar em constante adaptação, de modo a superar novas enfermidades e as complicações que surgem ao longo de tratamentos disponíveis, como é o caso da resistência das

bactérias, destacado anteriormente. Assim sendo, estratégias de modificação molecular, bem como a utilização de ferramentas de modelagem molecular, baseadas na estrutura da proteína-alvo, recebem destaque na literatura como um esforço no desenvolvimento de terapêuticas mais eficientes, seletivas e economicamente acessíveis.

Entre as estratégias utilizadas no desenvolvimento de fármacos, destaca-se aqui a hibridação molecular, uma técnica de foco estrutural que consiste na união de duas ou mais unidades farmacofóricas presentes em determinadas substâncias bioativas, de modo a formar uma estrutura molecular híbrida que potencialize as atividades biológicas desejadas.⁴³

Diversas substâncias foram desenvolvidas por meio dessa técnica, como por exemplo, a Tropisetrona (Figura 8), um fármaco que contém o biciclo tropano, grupamento presente na cocaína, ligado por uma função éster ao carbono 3 do anel indólico presente na serotonina. Este composto é um antiemético, antagonista de receptores 5-HT₃, que foi desenvolvido em 1983.⁴⁴

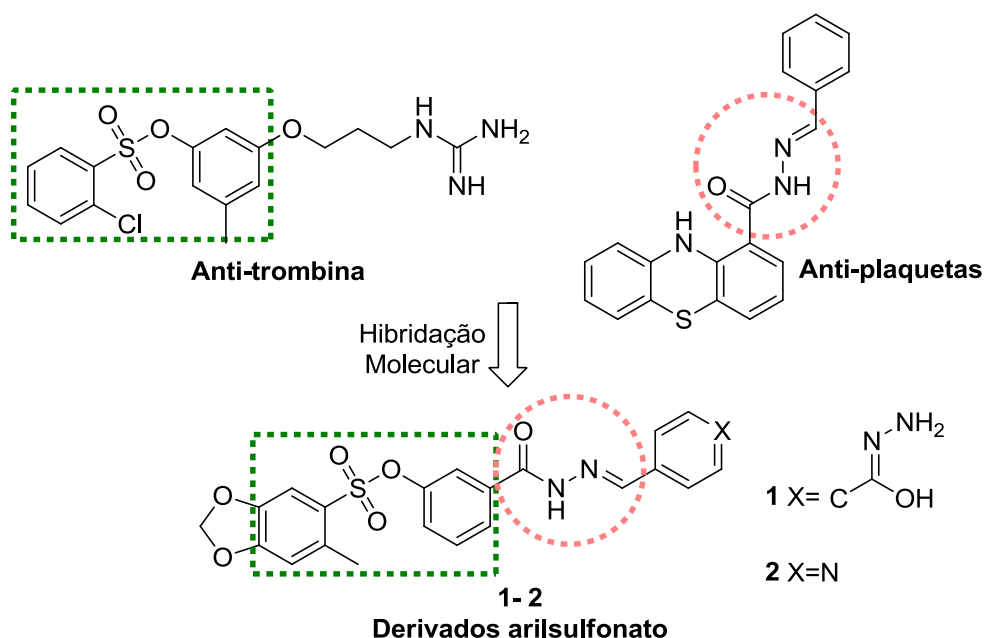
Figura 8 – Hibridação molecular que gerou a Tropisetrona



Também por meio da hibridação molecular, pesquisadores da UFRJ desenvolveram dois protótipos capazes de impedir a formação da trombose. De acordo com o que foi relatado pelo grupo, os compostos aqui destacados (Figura 9), tem ação simbiótica com relação à inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno ou ácido araquidônico e pela trombina.⁴⁵ Para o desenvolvimento das

substâncias, o grupo baseou-se na estrutura de compostos conhecidos, um por seu potencial inibidor da trombina e outro por seu potencial de inibição de plaquetas, ambos os fatores envolvidos no processo de trombogênese. O planejamento racional dos protótipos (Figura 9) iniciou-se pela substituição isostérica do átomo de cloro, presente na estrutura da anti-trombina, pelo grupo metila, seguida da introdução do grupamento N-acilhidrazônico, presente no inibidor de plaquetas, no lugar do alquiloxi. A esse espaçador, adicionou-se a subunidade desejada, nesse caso, hidroxibenzamidina e piridina.⁴⁵

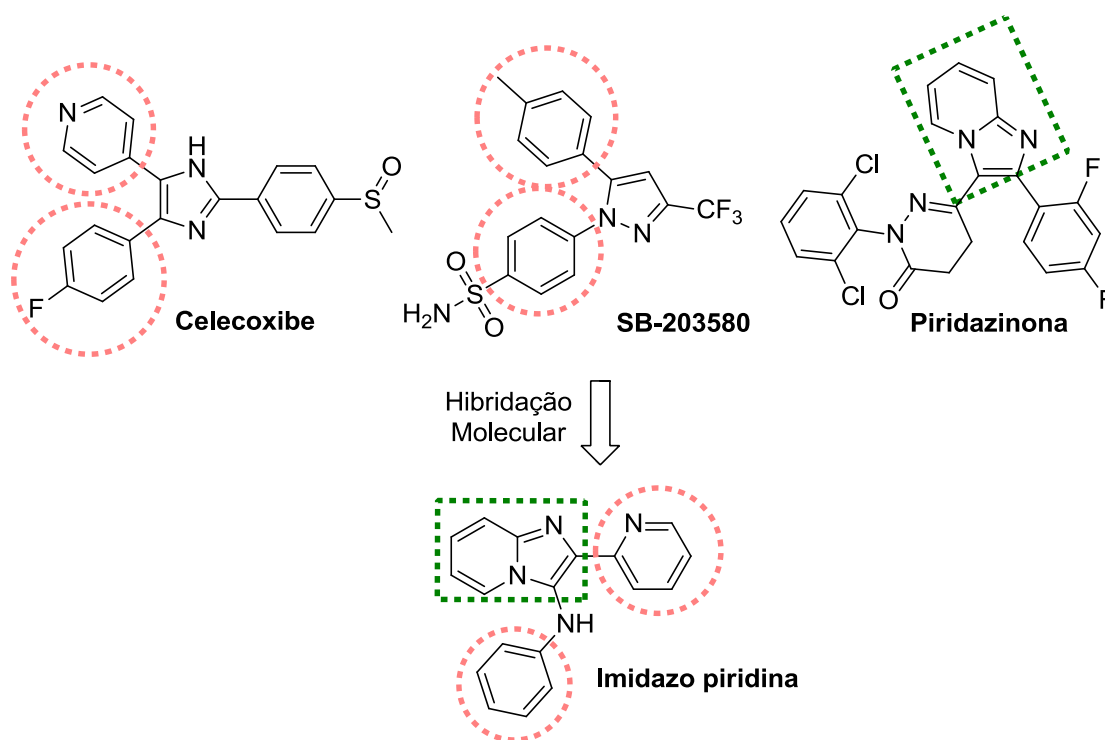
Figura 9 – Planejamento racional por hibridação molecular dos derivados arilsulfonato



Uma abordagem simbiótica foi utilizada no planejamento de compostos anti-inflamatórios, visando à inibição tanto da enzima quinase ativada por mitógeno p38 (p38-MAPK) quanto da prostaglandina-endoperóxido sintase (PGHS-2) como alvos terapêuticos. De acordo com a literatura, um composto simbiótico é descrito como uma substância capaz de atuar sobre mais de um alvo terapêutico, desde que pertença a diferentes vias bioquímicas, mas que estejam relacionados à mesma doença.^{46,47} Assim sendo, o grupo de Lacerda et al. baseou-se na estrutura de agentes terapêuticos conhecidos como o celecoxibe e SB-203580 (Figura 10), que possuem diaril-heterociclos em suas estruturas, sendo essa uma característica comum presente em inibidores seletivos de ambos os alvos (p38-MAPK e PGHS-2), para desenvolver os compostos anti-inflamatórios.⁴⁸ Além disso, o anel piridina-

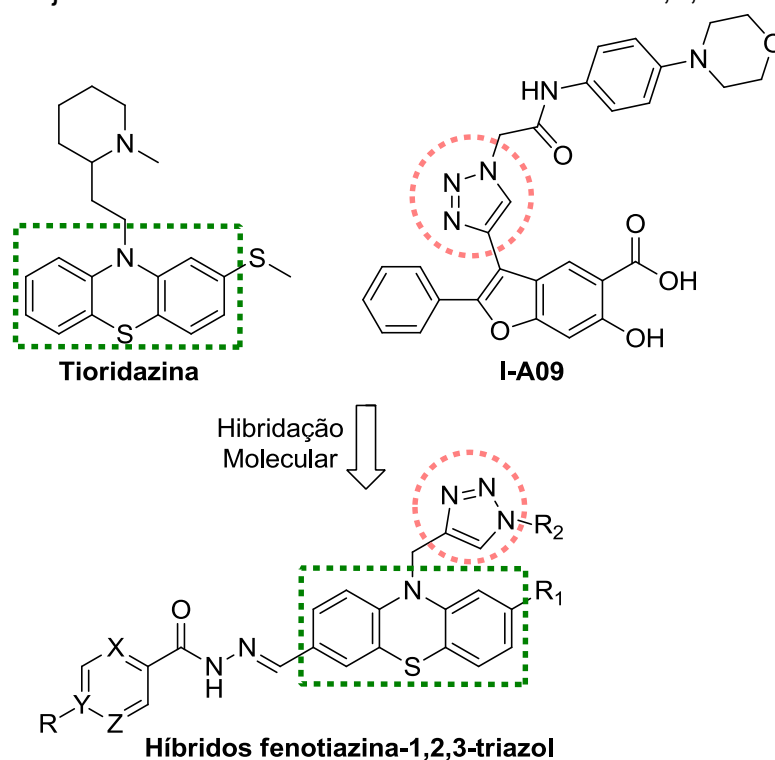
imidazólico, presente na piridazinona, um inibidor p38-MAPK, foi introduzido nos compostos planejados de modo a ser o heterociclo central em um padrão estrutural comum de homólogos azo, conforme demonstrado na Figura 10.⁴⁸

Figura 10 – Hibridação molecular utilizada para gerar o composto simbiótico com ação anti-inflamatória



Em 2019, Reddyrajula et al. utilizaram essa estratégia para sintetizar 1,2,3-triazóis incorporados à fenotiazina com potentes atividades antimicrobianas frente ao *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. Como destacado pelos próprios autores, ambos os grupos farmacofóricos (fenotiazina e 1,2,3-triazol) são consideradas substâncias privilegiadas por estarem presentes em diversas substâncias com atividade biológica comprovada.⁴⁹ Assim, os pesquisadores basearam-se nestes núcleos presentes, por exemplo, na Tioridazina e no I-A09, para sintetizar derivados híbridos fenotiazina-1,2,3-triazol, conforme demonstrado na Figura 11. Destes compostos, dezenove foram considerados promissores ao apresentar um CIM de 1,6 µg mL⁻¹, o que é duas vezes maior do que o valor de CIM do medicamento padrão de primeira linha contra a tuberculose Pirazinamida. (CIM = 3,125 µg mL⁻¹).⁴⁹

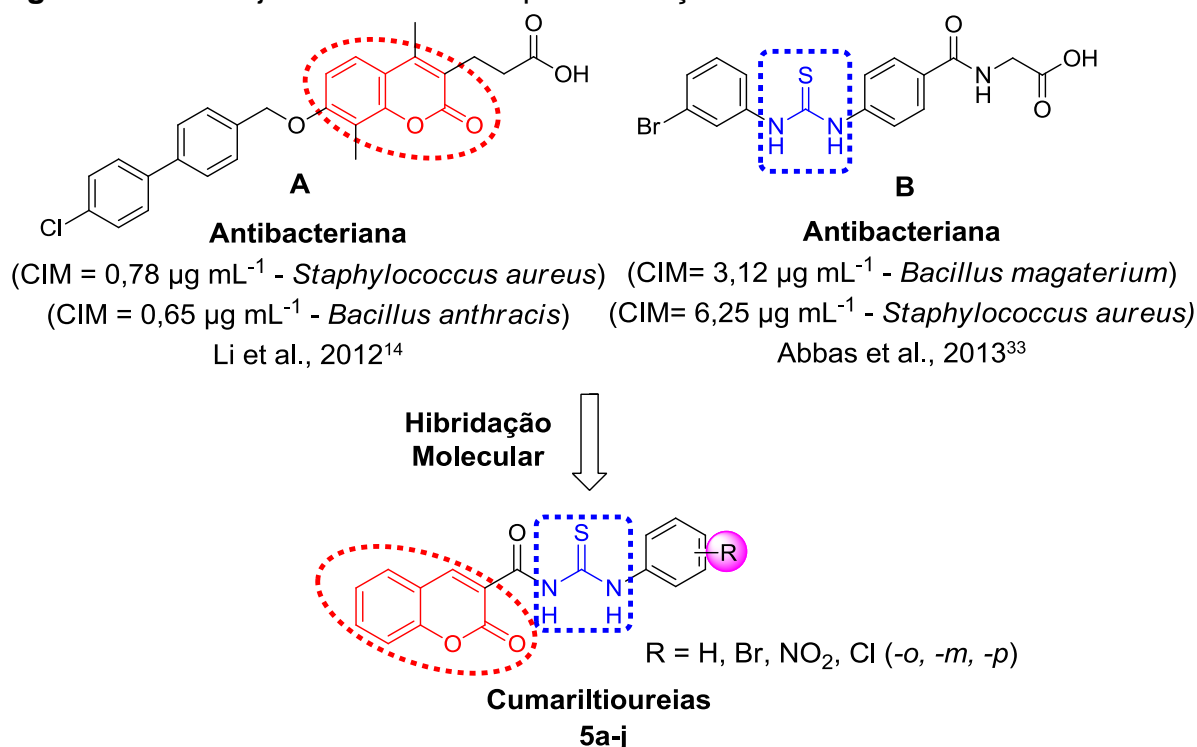
Figura 11 – Planejamento racional dos híbridos fenotiazina-1,2,3-triazol



1.5 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS CUMARÍNICOS

Assim sendo, considerando a relevância do núcleo cumarínico e do grupamento tioureia como compostos antibacterianos, propõem-se nesse trabalho a síntese de uma série de cumariltioureias (**5a-j**), planejadas estruturalmente por hibridação molecular (Figura 12). Além disso, substituintes com diferentes características estereo-eletrônicas serão introduzidos na porção tioureia da estrutura com o objetivo de se realizar um estudo de relação estrutura-atividade (REA) dessa classe de substâncias como possíveis agentes antibacterianos.

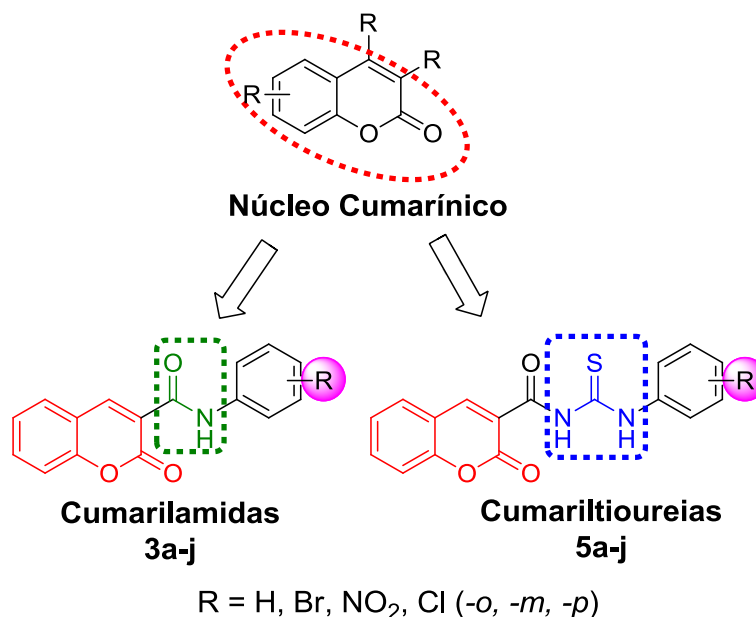
Figura 12 – Planejamento estrutural por hibridação molecular das cumariltioureas



Legenda: Em vermelho = núcleo cumarínico presente no ácido 3-(7-((4'-cloro-[1,1'-bifenil]-4-il)metoxi)-4,8-dimetil-cumarina)propanoico (A). Em azul = grupo tiourea presente no ácido 2-(4-(3-(3-bromofenil)tiourea)benzamida)acético (B). Em rosa = substituintes com diferentes características estéreo-eletrônicas, visando realização de REA.

Ainda, em paralelo, com o intuito de avaliar a relevância do grupo tiourea com relação à atividade biológica dos compostos, propôs-se também a síntese de cumarilamidas (**3a-j**), substâncias contendo a função amida ligada ao carbono 3 do anel cumarínico. Esta porção apresentará os mesmos substituintes presentes na porção tiourea, de modo a se obter duas séries análogas, visando verificar a influência da troca do possível farmacóforo frente à atividade biológica desejada, bem como em relação às propriedades físico-químicas dessas duas classes de substâncias (Figura 13).

Figura 13 – Planejamento estrutural das cumarilamidas (**3a-j**) e das cumariltioureas (**5a-j**)



Legenda: Em vermelho = núcleo cumarínico presente em diversas substâncias com atividades biológicas relevantes. Em verde: Função amida (possível farmacóforo). Em azul = grupo tiourea (possível farmacóforo). Em rosa = substituintes com diferentes características estereo-eletrônicas, visando realização de REA.

Com o intuito de explorar o potencial bioativo do núcleo cumarínico, além da avaliação da atividade antibacteriana desses derivados cumarínicos, tais substâncias também poderão ser avaliadas futuramente com relação a diferentes atividades biológicas, tais como: antifúngica, antitumoral, antioxidante e antiparasitária, visando à identificação de compostos-líderes que possam ser submetidos a ensaios mais avançados no desenvolvimento de novos fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

✓ Sintetizar cumarinas diferentemente funcionalizadas e avaliar seus possíveis efeitos biológicos frente a diferentes microorganismos patogênicos, tais como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e *Mycobacterium tuberculosis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

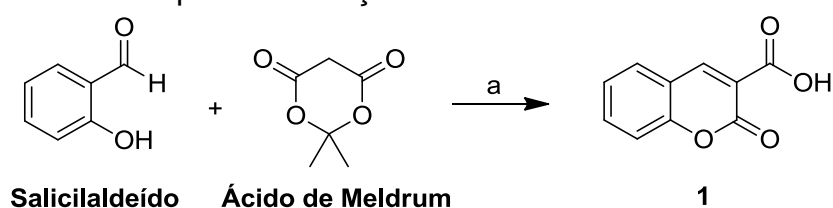
- ✓ Síntese e caracterização espectroscópica de cumariltioureas e cumarilamidas diferentemente funcionalizadas;
- ✓ Avaliação do potencial antibacteriano das cumarinas obtidas, incluindo bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e micobactérias (*M. tuberculosis*);
- ✓ Realização de um estudo de relação estrutura-atividade para identificar os pontos-chave para as atividades antibacteriana e antimicobacteriana.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO 3-CARBOXICUMARÍNICO

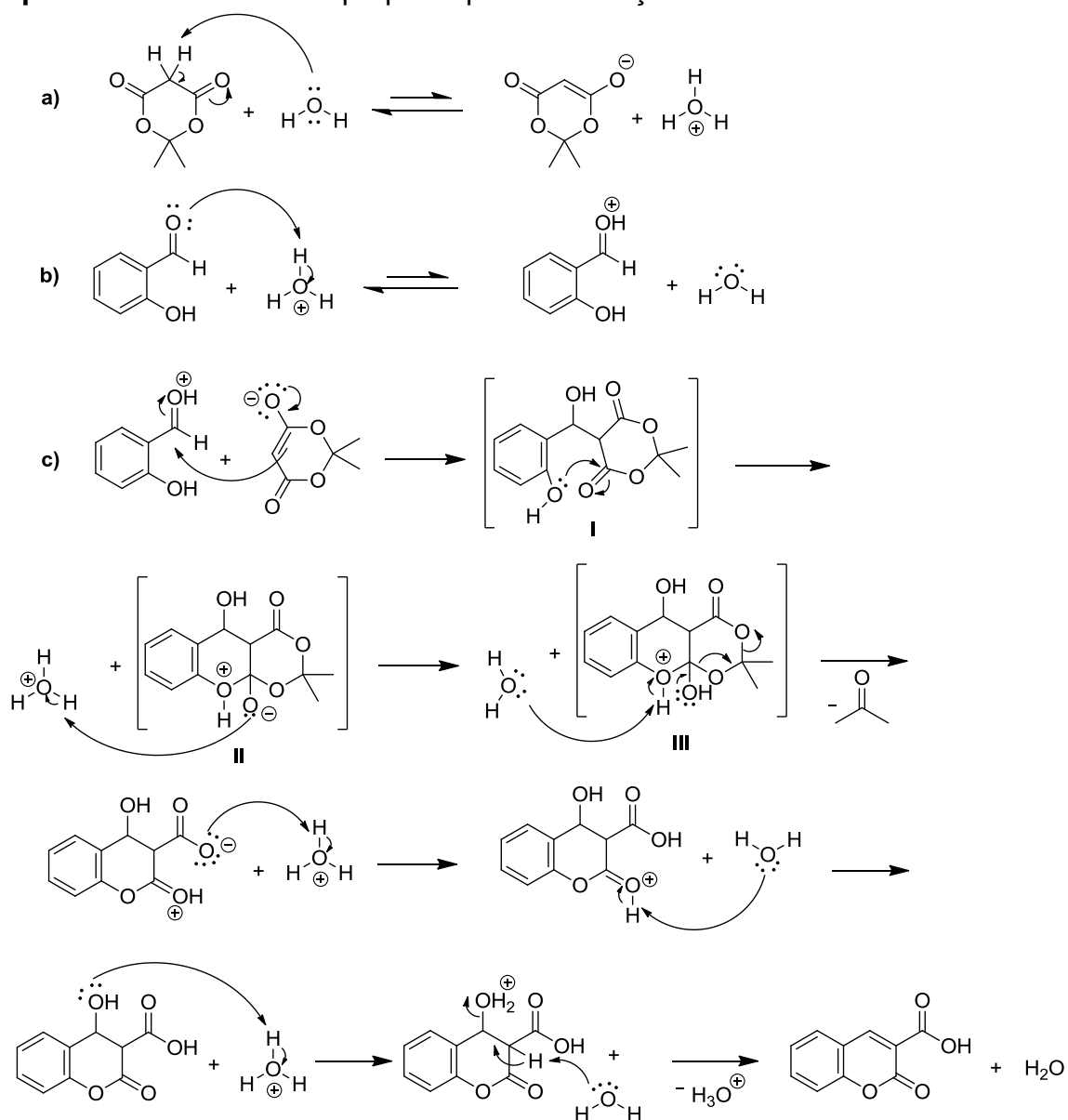
A síntese do ácido 3-carboxicumarínico foi realizada por meio da reação do salicilaldeído com o ácido de Meldrum, utilizando água como solvente, conforme descrito por Deshmukh et al.⁵⁰ (Esquema 9).

Esquema 9 – Rota sintética para a obtenção do ácido 3-carboxicumarínico (**1**)



Reagentes e condições: a) H₂O, 75 °C, 4 horas.

A proposta mecanística para a formação desse composto se inicia com a consideração de que o ácido de Meldrum possui uma acidez anormalmente alta. Em solução aquosa seu pKa é de 4,97⁵¹ (7,32 em DMSO)⁵² sendo comparável ao ácido acético, enquanto que o salicilaldeído possui pKa de 8,37. Assim sendo, conforme Esquema 10, propõem-se que a formação do ácido 3-carboxicumarínico (**c**) pode ocorrer por meio da adição nucleofílica do ácido de Meldrum, que se encontra parcialmente ionizado no meio aquoso (**a**). Na sequência, ocorre o ataque intramolecular do oxigênio para formar o anel da lactona (**I**), bem como a eliminação de uma molécula de acetona (**III**), seguida então da protonação do ácido carboxílico, formação da dupla carbono-carbono e eliminação de uma molécula de água.

Esquema 10 – Mecanismo proposto para a obtenção do ácido 3-carboxicumarínico

Como resultado da síntese proposta, o produto foi obtido na forma de um sólido branco, que precipita no meio reacional conforme ocorre a reação, obtendo-se assim uma substância com alto rendimento (92%), pois o equilíbrio é deslocado no sentido da formação do produto devido à sua precipitação.⁵³ Além do alto rendimento observado na síntese deste composto, ressalta-se aqui a utilização da água como solvente, uma alternativa adequada, quando pensada de acordo com os princípios da Química Verde.⁵⁴

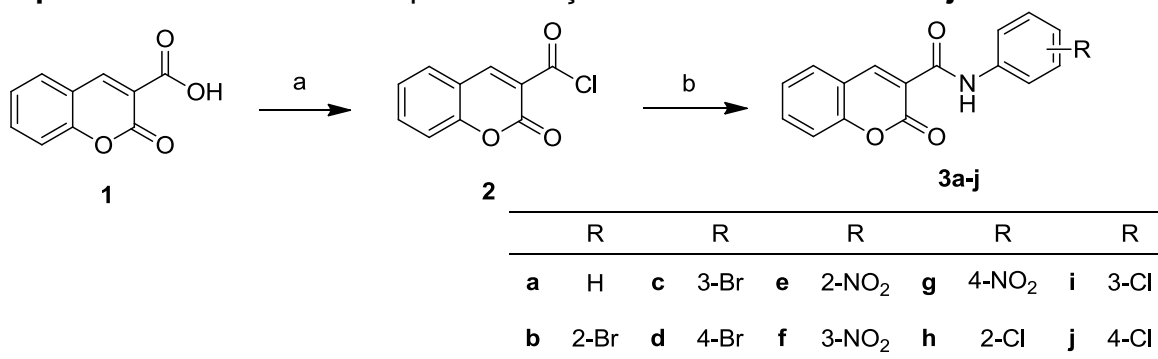
A identificação da substância foi iniciada com a análise do seu ponto de fusão, 191 °C, que está de acordo com os valores encontrados na literatura 191 – 192 °C,⁵⁰ de modo que, além de confirmar sua identidade, o P.F. indica que o

produto foi obtido com alto grau de pureza, não havendo necessidade de um processo de purificação subsequente. Esse fato foi evidenciado quando se realizou a caracterização do ácido por técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e CG-EM.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 1A – Apêndice A), observou-se a presença de sinais característicos da formação do produto, tais como um simpleto em 8,95 ppm, equivalente ao hidrogênio cumarínico mais desblindado (H4), um outro simpleto em 12,20 ppm referente ao hidrogênio ligado ao oxigênio da carboxila (COOH), assim como multipletos entre 7,46 e 7,81 ppm correspondentes aos demais hidrogênios aromáticos. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2A – Apêndice A), observou-se a presença de 10 sinais de carbono, sendo os mais desblindados relativos aos carbonos das carbonilas (C11 e C2) com deslocamentos de 164 e 162 ppm, respectivamente, bem como sinais em 155 e 152 ppm (C9 e C4), característicos de carbonos diretamente ligados a elementos eletronegativos e/ou pertencentes a anéis aromáticos, assim como os demais sinais que são referentes aos carbonos aromáticos com deslocamento químico observados entre 136 e 115 ppm, condizentes com valores descritos na literatura. O espectro de massas (Figura 3A – Apêndice A) também confirma a obtenção do ácido, ao apresentar o pico do íon molecular com razão massa carga (m/z) de 190, conforme esperado para seu peso molecular de $190,15 \text{ g mol}^{-1}$, e pico base de $m/z = 146$, correspondente ao fragmento do núcleo cumarínico.

3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS CUMARILAMIDAS

Com a obtenção e caracterização do ácido 3-carboxicumarínico (**1**), a síntese das cumarilamidas foi iniciada por intermédio da reação de **1** com excesso de cloreto de tionila (SOCl_2), para formação do cloreto do ácido (**2**). Sequencialmente, as respectivas anilinas foram adicionadas ao **2**, utilizando-se acetona como solvente, para gerar as cumarilamidas correspondentes (**3a-j**), conforme Esquema 11.

Esquema 11 – Rota sintética para obtenção das cumarilamidas 3a-j


Reagentes e condições: a) SOCl₂ (20,0 eq), refluxo, 2h30min; b) Anilina correspondente (1,0 eq, a-j), acetona, refluxo, 1h.

A obtenção do cloreto (**2**) foi comprovada por análise de seu espectro na região do infravermelho (Figura 1B – Apêndice B), onde foram observadas bandas características do estiramento da ligação C–Cl em 758 e 731 cm⁻¹ (lit: 785–540 cm⁻¹)⁵⁵, bem como o evidente estiramento C=O em 1770 cm⁻¹, que em cloretos de ácidos conjugados aparecem na faixa de 1780–1760 cm⁻¹,⁵⁵ condizente com a banda encontrada em 1770 cm⁻¹. Outra evidência importante é a ausência da banda larga e intensa de estiramento da ligação O–H de ácidos carboxílicos, que normalmente se apresentam na faixa de 3400–2400 cm⁻¹. Além disso, constatou-se no espectro de massas a presença do pico do íon molecular (m/z = 207), o que também corrobora com a obtenção do cloreto **2** (Figura 2B – Apêndice B).

Todas as cumarilamidas preparadas foram obtidas com êxito e em bons rendimentos (75 – 92%, Tabela 1), considerando o rendimento em duas etapas, tendo suas estruturas confirmadas por espectrometria de massas e RMN de ¹H (Figuras 1C-20C – Apêndice C). De um modo geral, os espectros de massas apresentaram os picos do íon molecular com razão m/z compatíveis com a massa molar (MM) das substâncias, que variaram de 265 a 344 g mol⁻¹, de acordo com o substituinte presente no anel benzênico. Enquanto que os espectros de RMN de ¹H, apresentaram sinais característicos da formação das amidas desejadas, tais como simpletos com deslocamento químico entre 10,84 e 12,56 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio das amidas (NH), bem como um simpleto com deslocamento entre 9,06 e 9,00 ppm, relativo ao hidrogênio do anel cumarínico (H4). Devido as características eletrônicas dos substituintes do anel aromático das amidas, observou-se ainda, na região entre 8,75 e 7,01 ppm, a presença de diversos

sinais como dupletos, duplo dupletos, tripletos e multipletos, correspondentes aos hidrogênios aromáticos.

Tabela 1 – Rendimentos em duas etapas obtidos para as cumarilamidas **3a-j**

Substância	R	Característica Física	Rendimento (%)	Ponto de Fusão (°C)	P.F. lit. (°C)
3a	H	Sólido amarelo esverdeado	89	266	253-255 ⁵⁶
3b	2-Br	Sólido branco gelo	88	236	196-197 ⁵⁷
3c	3-Br	Sólido amarelo	92	246	Inédito
3d	4-Br	Sólido amarelo	83	268	269-271 ⁵⁸
3e	2-NO ₂	Sólido amarelo	80	243	226-227 ⁵⁷
3f	3-NO ₂	Sólido branco	82	292	Inédito
3g	4-NO ₂	Sólido branco	79	366	Inédito
3h	2-Cl	Sólido branco	92	238	220-221 ⁵⁷
3i	3-Cl	Sólido amarelo esverdeado	84	248	240 ⁵⁹
3j	4-Cl	Sólido amarelo	75	260	250 ⁵⁹

Sendo assim, a título de exemplo, ilustrar-se-á como se procedeu a caracterização espectroscópica do derivado **3c**, inédito na literatura, que apresentou ponto de fusão igual a 246 °C. No espectro de RMN de ¹H (Figura 14), identificou-se o sinal correspondente ao hidrogênio mais desblindado do anel cumarínico (H4), encontrado com um deslocamento químico de 9,02 ppm, e então fez-se a integração do sinal, correspondente a 1,00. Em seguida, fez-se a integração dos outros sinais presentes no espectro, normalizados conforme a integral de H4, encontrando-se assim a soma total de 10H, distribuídos em 8 sinais. Sabe-se que o sinal com o maior deslocamento químico (10,89 ppm) corresponde ao hidrogênio mais desblindado da estrutura (NH), pois possui integral equivalente a 1H e apresenta-se na forma de simpleto largo, sugerindo assim que este hidrogênio está ligado a um elemento eletronegativo, o nitrogênio. Observou-se ainda no espectro, a presença de um tripleto em 8,04 ppm, com integral equivalente a 1H e constante de acoplamento de 1,9 Hz, sugerindo assim que o sinal corresponde a um hidrogênio relativamente desblindado, o H14. Na região de 7,77 – 7,70 ppm encontrou-se um multipletto com integração para 2H referente aos hidrogênios na posição meta (-m)

do anel cumarínico (H5 e H7). Em 7,62 ppm apareceu um duplo duplo duplete (ddd), com constantes de acoplamento de 8,0, 1,9 e 1,2 Hz, portanto este H acopla com o H14 ($J = 1,9$ Hz). Assim, considerando a proximidade do hidrogênio com o grupo carbonila, o H18 é o provável correspondente a este sinal. Na região de 7,49 a 7,40 ppm, observou-se a presença de mais um multipeto, com integral de 2H, correspondente aos hidrogênios mais blindados do anel cumarínico, H6 e H8. Outro multipeto pôde ser visto em 7,32–7,28 ppm, correspondente ao H16, que está em para (-*p*) em relação ao doador de elétrons (N). Por fim, observou-se a presença de um duplete em 7,23 ppm, com integração para 1H e constante de acoplamento de 8,0 Hz, corroborando com o acoplamento com o H18, concluindo-se assim que se trata do H17. Com estas informações, concluiu-se o assinalamento dos sinais presentes no espectro de RMN de ^1H do derivado **3c**, que se encontra resumido na Tabela 2.

Figura 14 – Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto **3c**

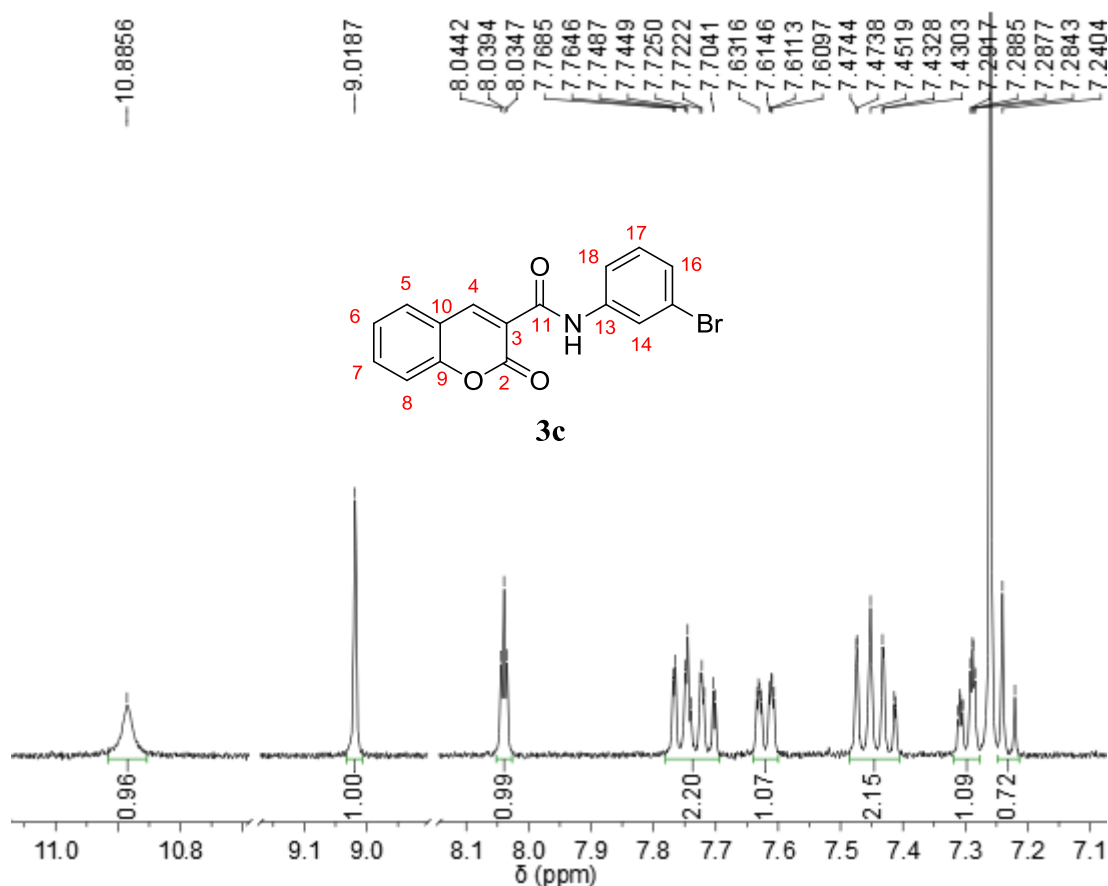
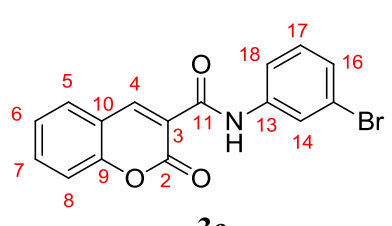


Tabela 2 – Deslocamentos químicos do RMN de ^1H (400 MHz), em ppm, obtidos para a substância **3c**

	Nº H	δH (nH, m, J em Hz)
 <p style="text-align: center;">3c</p>	NH	10,89 (1H, s)
	4	9,02 (1H, s)
	14	8,04 (1H, t, 1,9)
	5 e 7	7,78 – 7,69 (2H, m)
	18	7,62 (1H, ddd, 8,0, 1,9 e 1,2)
	6 e 8	7,49 – 7,40 (2H, m)
	16	7,32 – 7,28 (1H, m)
	17	7,23 (1H, d, 8,0)

A caracterização por espectrometria de massas foi realizada por meio de propostas de fragmentações, conforme demonstrado na Figura 15, com o intuito de apresentar os principais possíveis fragmentos da estrutura. Para a molécula **3c**, observou-se um fragmento correspondente ao íon molecular com a m/z de 343, e intensidade de 1% em relação ao pico base, que está de acordo com o esperado para a massa molecular da estrutura (344 g mol^{-1} – Figura 16). O pico base corresponde a m/z de 173, que está de acordo com o esperado para a formação do íon acílio, um fragmento estável muito comum para compostos carbonilados, provenientes de fragmentações α .⁵⁵ Sinais como M-28 são muito comuns para cumarinas e heterociclos oxigenados, como $m/z = 118$ referente a perda do monóxido de carbono (CO), que leva a formação do benzofurano, bem como um sinal muito intenso (97%) com $m/z = 89$ que pode ser atribuído a uma segunda perda de CO, conforme relatos da literatura.^{60,61}

Figura 15 – Possíveis fragmentos gerados no espectro de massas para a estrutura **3c**

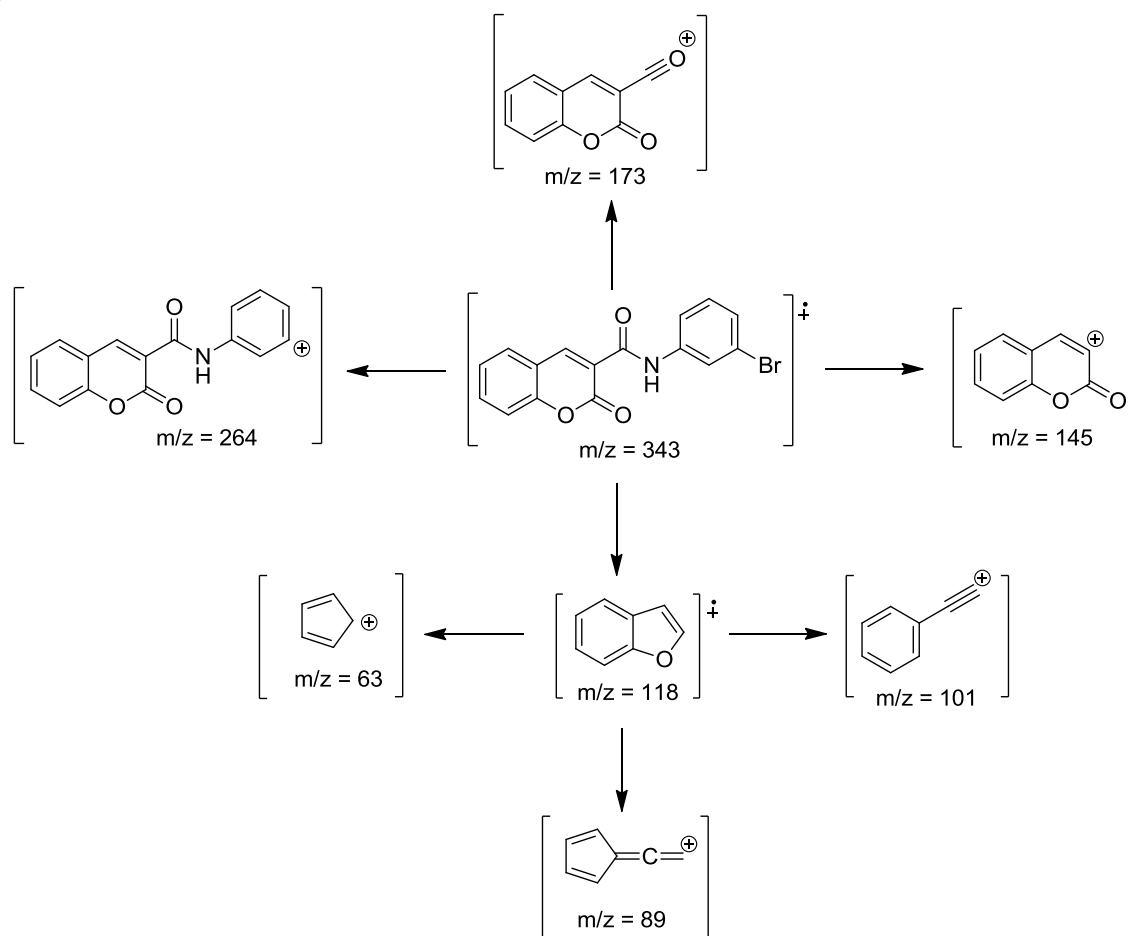
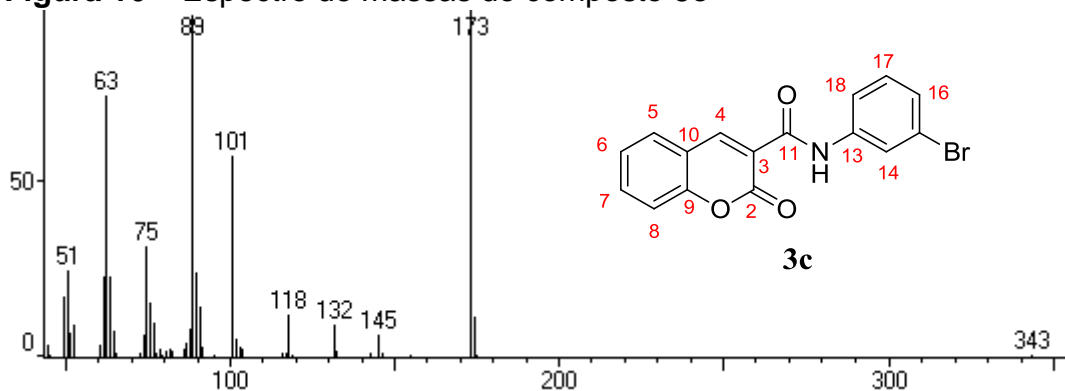


Figura 16 – Espectro de massas do composto **3c**

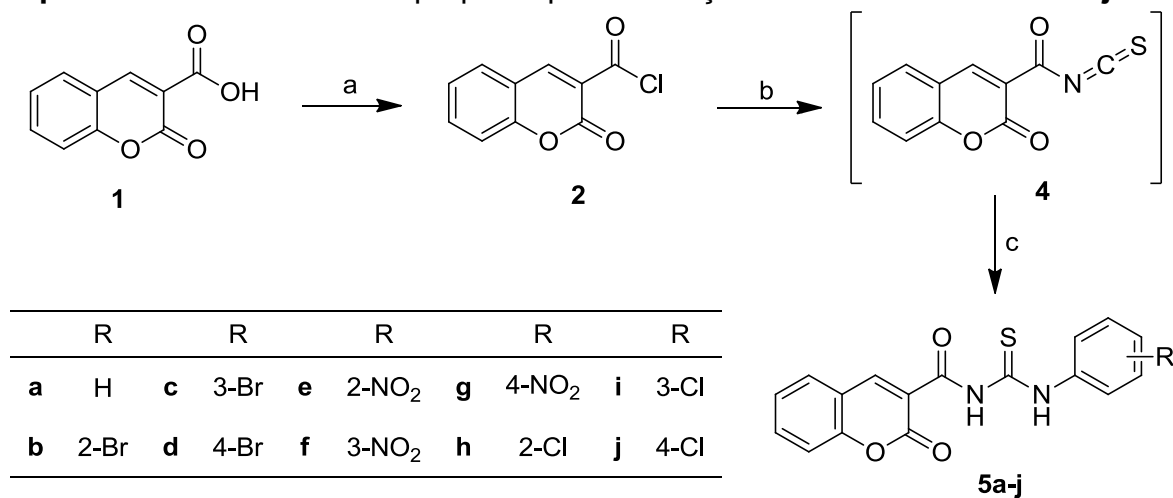


3.3 TENTATIVAS DE SÍNTESE DAS CUMARILTIOUREIAS

Inicialmente, o procedimento experimental adotado para a obtenção das cumariltioureias foi baseado na experiência e no trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa, que descreveu a síntese de uma grande série de benzoiltioureias.⁴⁰

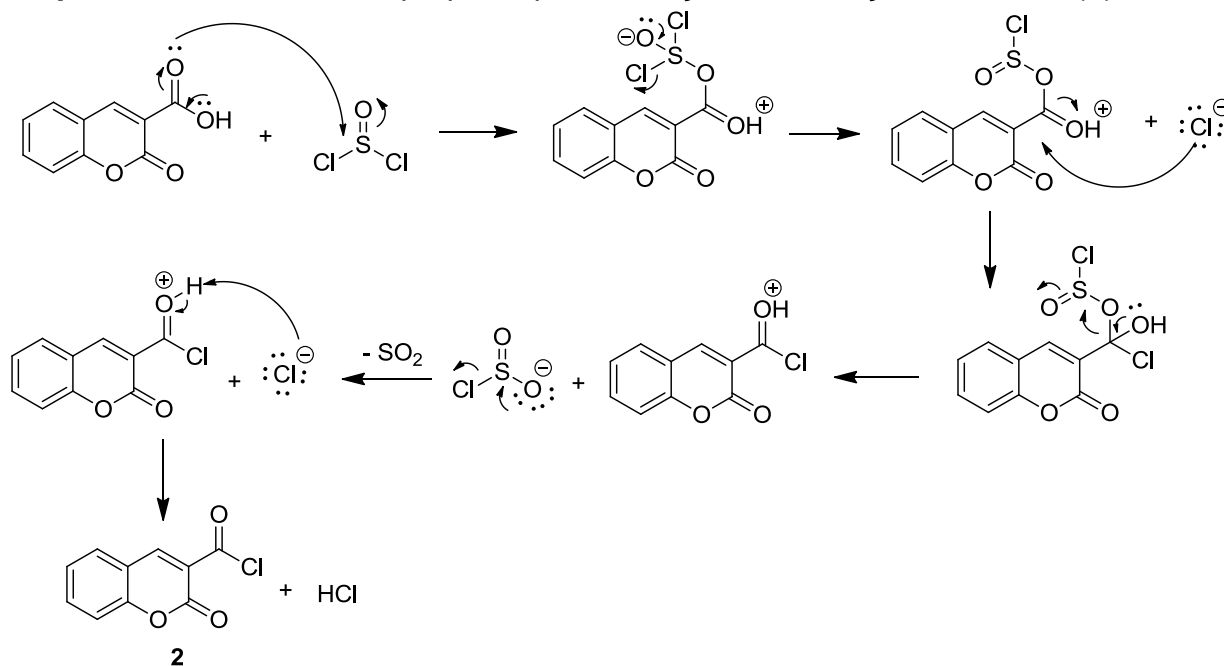
Assim sendo, propôs-se a síntese das cumariltioureas a partir da reação entre o cloreto do ácido cumarínico (**2**, 1,0 eq em relação ao ácido) e o tiocianato de amônio (NH_4SCN – 1,0 eq), utilizando acetona seca como solvente, para formar o intermediário isotiocianato **4** *in situ*. Em seguida, uma solução da anilina correspondente (1,0 eq) em acetona seca seria adicionada sobre isotiocianato **4** (*one-pot*), para formar as cumariltioureas desejadas (**5a-j** – Esquema 12).

Esquema 12 – Rota sintética proposta para obtenção das cumariltioureas **5a-j**



Reagentes e condições: a) SOCl_2 , refluxo, 2h30min; b) NH_4SCN , acetona, refluxo, 30 min; c) Anilina correspondente (**a-j**), acetona, refluxo, 2h30min.

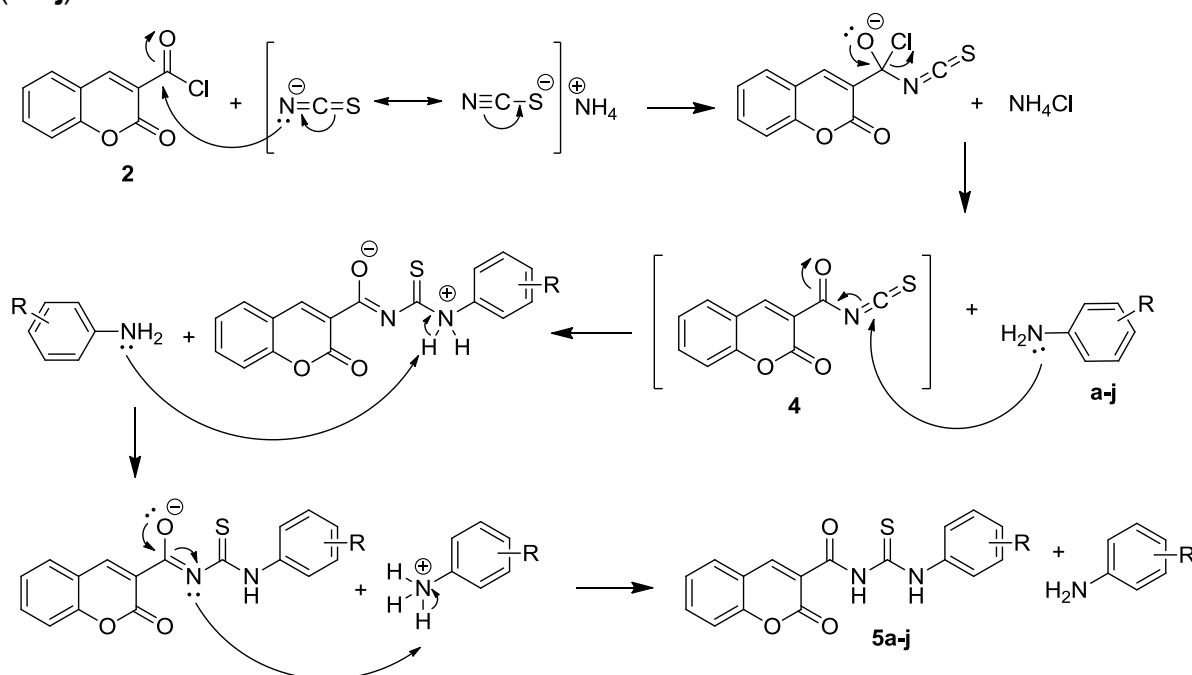
O mecanismo de reação proposto para esta síntese se inicia pelos processos de adição-eliminação nucleofílica da hidroxila presente no ácido cumarínico (**1**), pelo íon cloreto proveniente do cloreto de tionila. Para tal, primeiramente ocorre o ataque nucleofílico do oxigênio de **1** ao SOCl_2 , seguido de eliminação de um cloreto e posterior ataque deste nucleófilo ao carbono mais eletropositivo do ácido **1** (Esquema 13). Após o ataque do cloreto, ocorre então a eliminação do dióxido de enxofre (SO_2) e do ácido clorídrico, de modo a se obter o cloreto de acila correspondente (**2**).

Esquema 13 – Mecanismo proposto para a reação de obtenção do cloreto (**2**)

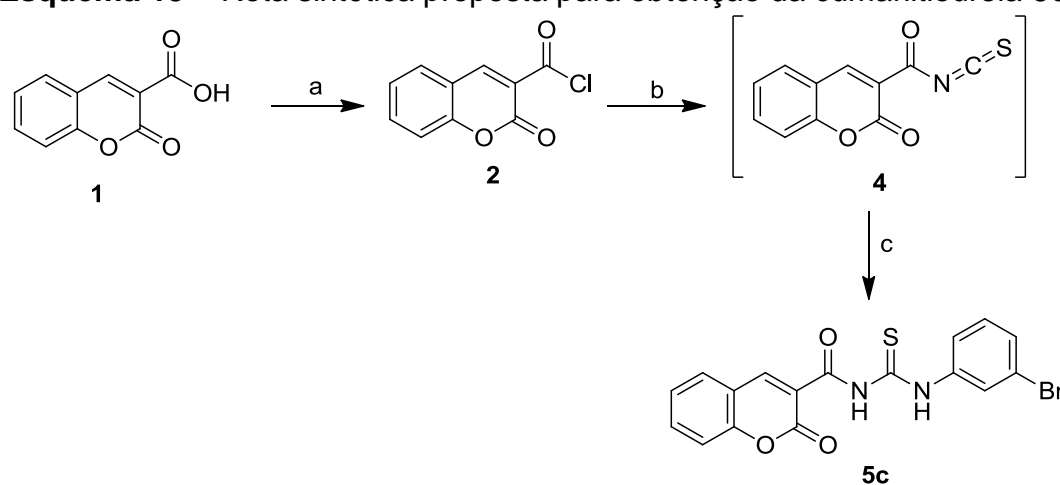
Na sequência, ocorre então a adição do íon tiocianato ao cloreto cumarínico **2**, seguida de eliminação de um ânion cloreto, para formar o isotiocianato (**4**) *in situ* correspondente e, como subproduto, tem-se a formação do sal de cloreto de amônio (NH_4Cl). Posteriormente, a adição da amina correspondente, promove o ataque nucleofílico do grupo amina (NH_2) ao isotiocianato e formação da cumariltiureia correspondente, em sua forma carregada, seguida de processos de desprotonação/protonação do N e do O, com o auxílio da amina, que pode funcionar como uma base de Lewis (Esquema 14).

O primeiro procedimento realizado para a síntese do derivado **5c** está demonstrado no Esquema 15. Neste procedimento, o cloreto (**2**) foi adicionado, gota a gota, sobre a solução de NH_4SCN , a qual permaneceu sob refluxo por 15 min, seguida de adição *one-pot* da 3-bromoanilina, que permaneceu sob refluxo por mais 2 horas.

Esquema 14 – Mecanismo proposto para a reação de obtenção das cumariltioureas (5a-j)



Esquema 15 – Rota sintética proposta para obtenção da cumariltiourea 5c

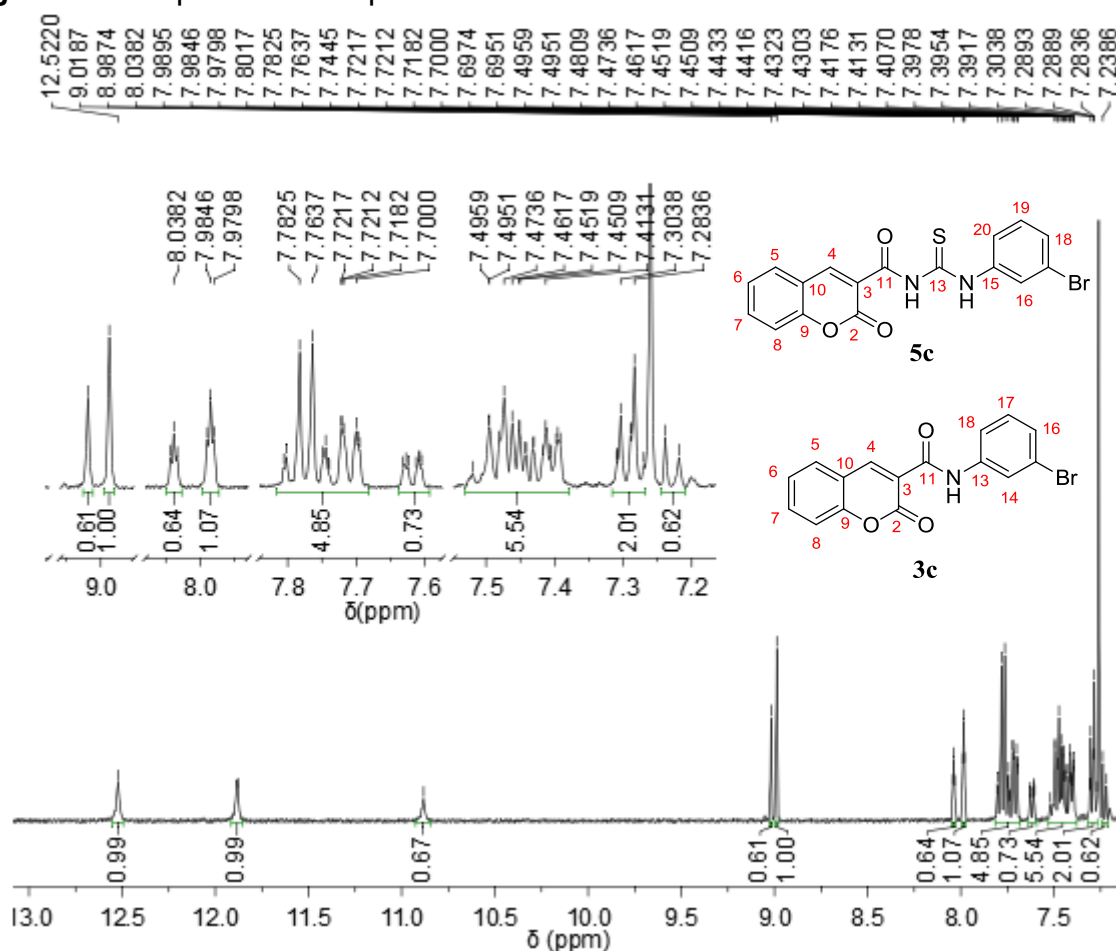


Reagentes e condições: a) SOCl_2 , refluxo, 2h30; b) NH_4SCN (1,0 eq.), acetona seca, 15 min, refluxo; c) 3-bromoanilina (1,0 eq), acetona seca, refluxo, 2 h.

Surpreendentemente, após a realização do procedimento experimental e caracterização do produto obtido por espectrometria de massas e RMN de ^1H (Figura 17), observou-se a duplicação de sinais e o aparecimento de alguns outros já conhecidos, mais precisamente um simpleto largo em 10,88 ppm, referente a NH , e outro simpleto em 9,02 ppm do H4, além dos sinais referentes a hidrogênios dos anéis aromáticos no deslocamento químico de 8,04 a 7,22 ppm. Assim sendo,

constatou-se a presença da cumarilamida **3c**, como um subproduto, bem como a formação da cumariltioureia **5c**, devido aos sinais duplicados na região aromática do espectro e também ao aparecimento dos sinais em 12,52 e 11,88 ppm, que estão correlacionados com os NH da porção tioureia. O H4 da cumariltioureia (sinal mais intenso em 8,99 ppm), foi integrado como 1,00 e os outros sinais foram normalizados a ele, evidenciando assim que, possivelmente o produto **5c** é majoritário nessa mistura com uma proporção de 1:0,6 em relação ao **3c**. É válido ressaltar que essa proporção pode não corresponder exatamente à realidade, uma vez que ainda havia parte do sólido insolúvel em CDCl_3 no tubo durante a aquisição do espectro.

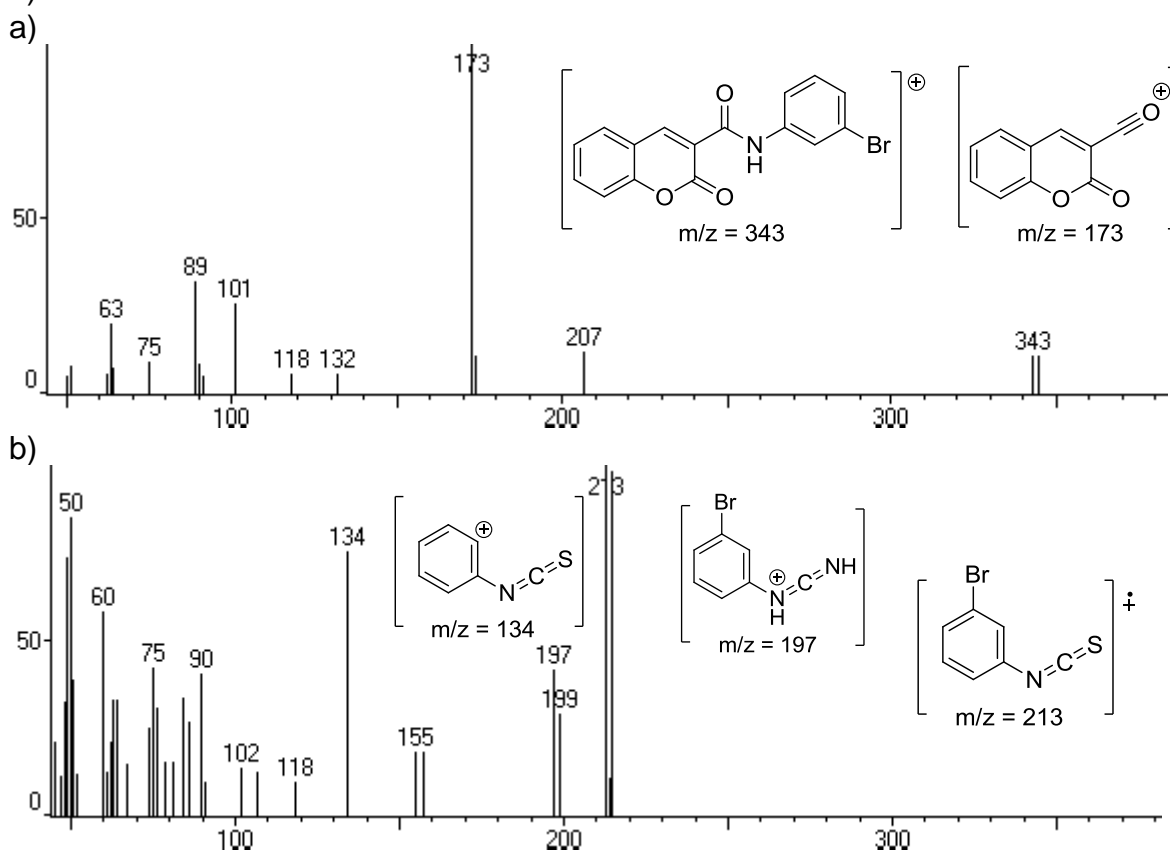
Figura 17 – Expansão do espectro de RMN de ^1H da mistura **3c** e **5c**



A obtenção desses produtos foi corroborada com o espectro de massas obtido para a mistura de produtos, como observado na Figura 18 (a e b). A Figura 18a corresponde à cumarilamida **3c**, onde se observa a presença do íon molecular em $m/z = 343$, correspondente ao íon molecular do composto ($\text{MM} = 344 \text{ g mol}^{-1}$), bem como o sinal do pico base, referente ao íon acílio ($m/z = 173$). A Figura 18b,

refere-se ao espectro de massas da cumariltioureia **5c**, pois apesar do pico do íon molecular do composto não ser observado, é possível caracterizá-lo devido aos fragmentos referentes ao isotiocianato ligado a porção bromo benzeno (MM = 213 g mol⁻¹), como o pico base com m/z de 213, bem como a observação do isótopo do bromo (M+2) nas razões correspondentes a sua presença (m/z = 197 com M+2 de 199 e m/z = 195 com M+2 de 199). Além disso, observa-se a perda do Br em m/z 134, onde não é mais possível observarmos seu isótopo, e presença de demais fragmentos referentes à cumarina, como o fragmento do benzofurano com m/z de 118, como destacado anteriormente no tópico 4.2.

Figura 18 – Espectro de massas evidenciando a obtenção de a) cumarilamida **3c** e b) cumariltioureia **5c**



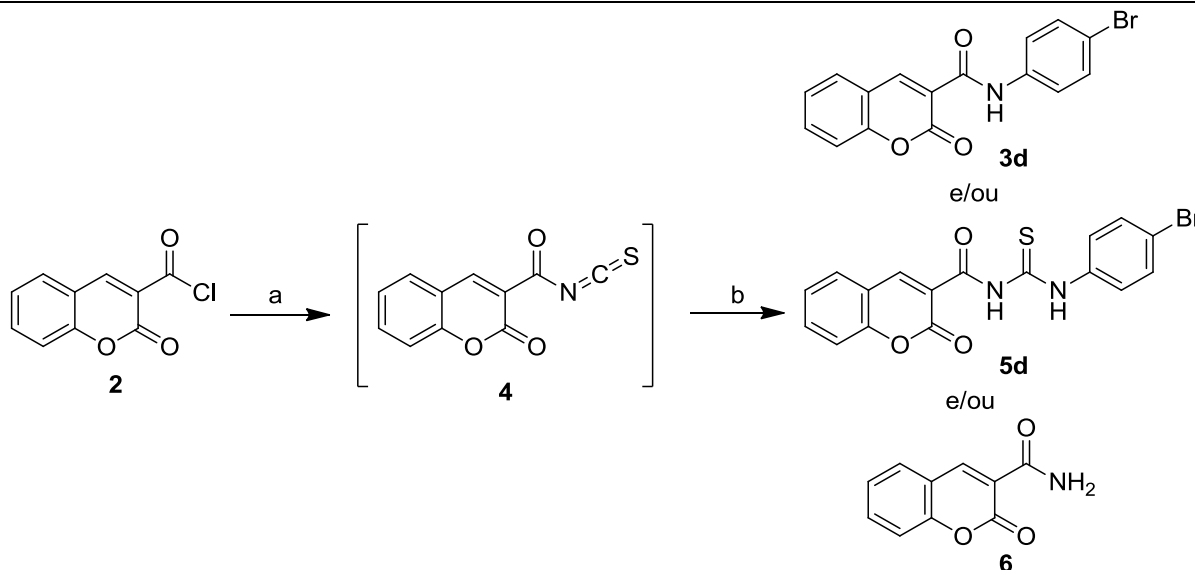
Uma vez que foram obtidas como mistura, tentou-se separar por coluna cromatográfica a cumariltioureia **5c** e a cumarilamida **3c** (Esquema 15). Primeiramente, foi feita uma coluna alta e fina, com 18 cm de altura e aproximadamente 2 cm diâmetro, utilizando como fase móvel um gradiente de hexano e acetato de etila. Contudo, a grande proximidade dos produtos, observada

pela CCD, com fator de retenção (R_f) de 0,52 e 0,57 para a cumarilamida e cumariltioureia, respectivamente, contribuiu para a separação de apenas uma fração, referente a cumarilamida, com uma massa de apenas 11 mg, sendo que a massa inicial da qual partimos foi de 102 mg, de modo que o restante permaneceu como mistura.

Assim, uma nova tentativa de coluna cromatográfica foi feita para o mesmo produto (Esquema 15), com altura de 21 cm e aproximadamente 2 cm de diâmetro, utilizando agora como fase móvel diclorometano. Essa coluna foi realizada com o diferencial de ser empacotada com 1% de trietilamina (Et_3N), visando diminuir a acidez da sílica e assim, considerando a maior interação da fase móvel com a cumarilamida e da fase estacionária com a cumariltioureia, esperava-se que houvesse uma melhor separação dos compostos e, conseqüentemente, a separação seria facilitada. Contudo, isso não aconteceu, os compostos permaneceram com R_f s muito próximos (0,48 e 0,54) e, portanto, não foi possível isolar os produtos.

Realizou-se assim uma última tentativa de purificação por coluna cromatográfica, para a mesma mistura, unindo-se as frações das colunas anteriores realizadas. A coluna em questão foi feita com 20 cm de altura e 2 cm de diâmetro, sendo empacotada com apenas 0,1% de Et_3N em diclorometano. Novamente, os compostos não foram separados.

Desse modo, com o intuito de se obter apenas as cumariltioureias como produto dessas reações, foram realizadas pequenas modificações no procedimento experimental, tais como: tempo de reação com o NH_4SCN ; ordem de adição (NH_4SCN sobre **2** ou vice-versa); quantidade de equivalentes da amina (4-bromoanilina) em relação ao cloreto; tempo de reação com a anilina e controle da atmosfera, conforme dispostas na Tabela 3. Além disso, nestas novas modificações, foi utilizado a 4-bromoanilina como nucleófilo, com o objetivo de aumentar a nucleofilicidade da amina.

Tabela 3 – Modificações realizadas para a síntese das cumariltioureas

Reagentes e condições: a) NH_4SCN , acetona seca, refluxo; b) 4-bromoanilina, acetona seca, refluxo.

Entrada	R	Tempo com NH_4SCN	Ordem de adição	Cloreto: Amina (Nº Eq.)	Tempo com anilina	Atmosfera	RMN de ^1H
1	4-Br	15 min	Cl sobre SCN	1:1	2 horas	N_2	5d , 3d e 6
2	4-Br	1 hora	Cl sobre SCN	1:1	3h30	N_2	5d e 3d
3*	4-Br	1 hora	Cl sobre SCN	1:1	2 horas	N_2	5d , 3d e 6
4	4-Br	30 min	SCN sobre Cl	1:0,8	2 horas	N_2	5d , 3d e 6

*Nesta modificação foi utilizado o dobro de NH_4SCN em relação ao ácido.

Na entrada 1 da Tabela 3, a modificação realizada no procedimento experimental foi com relação a atmosfera inerte. Com o controle da atmosfera pretendia-se inibir a hidrólise do isotiocianato e assim garantir a formação das cumariltioureas. Pela caracterização do produto obtido para essa entrada, por RMN de ^1H (Figura 1D – Apêndice D), foi observada a formação de três produtos, um com sinais correspondentes a obtenção da cumariltiourea (**5d**), outros com relação à formação de uma amida secundária, como as cumarilamidas (**3d**), já sintetizadas, e outro produto que, posteriormente, foi identificado como sendo a amida primária (**6**) do ácido cumarínico.

Na entrada 2 da Tabela 3, o tempo de reação do NH_4SCN com o cloreto **2** foi aumentado para 1 hora, visando promover a total formação do intermediário

isotiocianato, pois não se sabe o tempo adequado para a formação do **4**. Além disso, aumentou-se o tempo de reação com a anilina (3h30), uma vez que se desejava verificar se o acréscimo de tempo de reação poderia favorecer a formação de um ou outro produto (acompanhado por CCD). A caracterização do produto obtido revelou a obtenção da mistura de cumariltioureia e cumarilamida, sem formação da amida primária. Desse modo, de acordo com a observação experimental, o tempo de reação com a anilina não está correlacionado com a obtenção de maior quantidade de cumariltioureia, talvez, apenas com relação a não formação da amida primária.

Na entrada 3 foi mantido o tempo de 1 hora de reação sob refluxo com o NH_4SCN , e apenas 2 horas de reação com a anilina correspondente. O diferencial foi a quantidade de NH_4SCN utilizado, o dobro (2,0 eq.) em relação ao ácido cumarínico **1**, com o intuito de verificar se o aumento da concentração do nucleófilo no meio reacional poderia favorecer a formação do intermediário isotiocianato. No entanto, a caracterização espectroscópica confirmou a obtenção dos 3 produtos já mencionados.

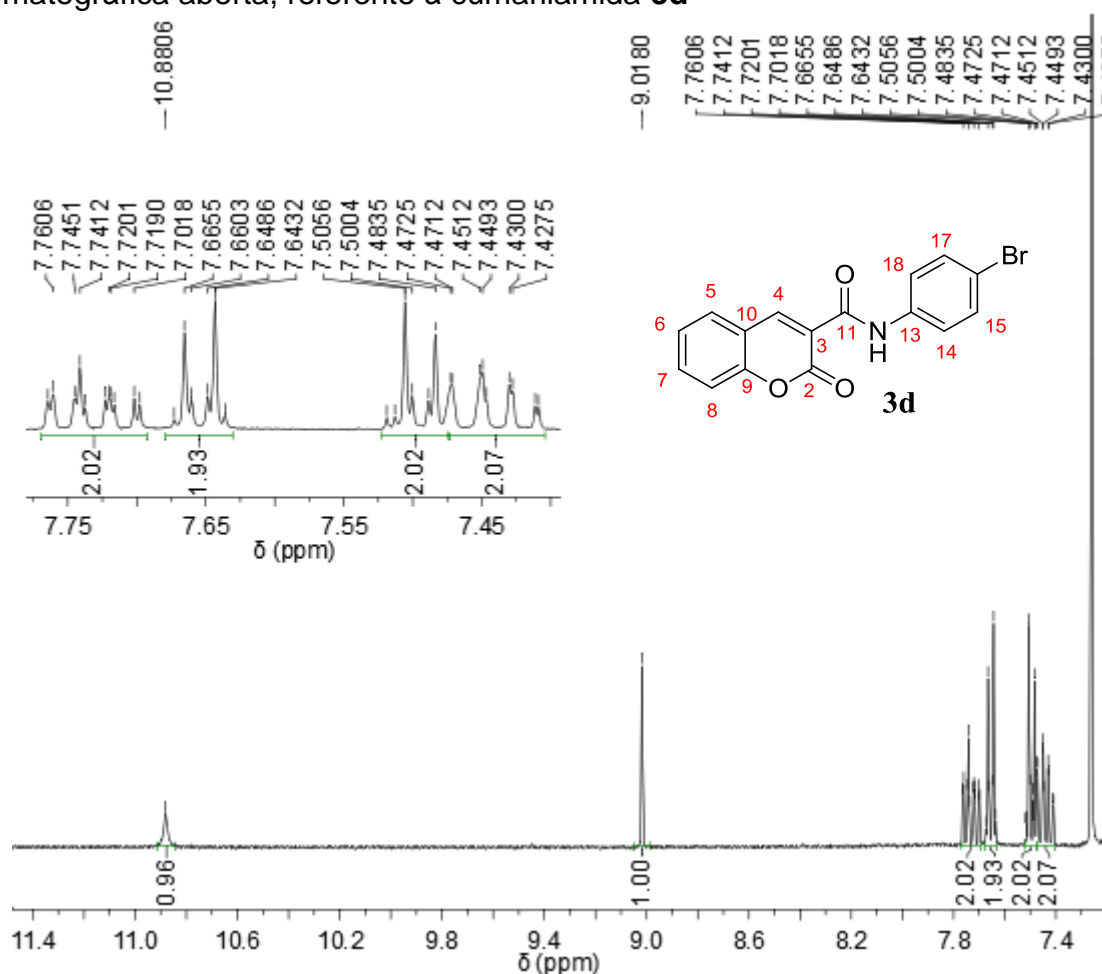
Considerando os resultados obtidos, a entrada 4 da Tabela 3 foi responsável pelo maior número de modificações. Dentro destas, o tempo de reação com o NH_4SCN foi de 30 min e fez-se a adição do tiocianato sobre o cloreto. Até então, havia-se realizado a adição inversa, pois acreditava-se que a reação entre o NH_4SCN e o cloreto seria favorecida desta forma, uma vez que o cloreto, um composto altamente reativo, adicionado gota a gota, ao entrar em contato com um ambiente contendo excesso de íons tiocianato deveria reagir prontamente e promover a substituição nucleofílica. Pensou-se também na possibilidade de que a baixa disponibilidade da amina poderia inibir a formação da cumarilamida. Assim sendo, nesta entrada, foi utilizado apenas 0,8 eq. de anilina em relação ao cloreto e mantido o mesmo tempo de reação (2 horas). Novamente, pelos resultados de caracterização obtidos (Figura 7D – Apêndice D), as mudanças realizadas não foram capazes de suprimir a obtenção das amidas.

Desse modo, na tentativa de purificação da amostra e isolamento dos compostos obtidos, foi realizada uma coluna cromatográfica aberta com altura de 10 cm e diâmetro de 2,5 cm, para os produtos obtidos na entrada 3 da Tabela 3, utilizando como fase móvel um gradiente de hexano e acetato de etila. Todavia, partindo de uma massa inicial de 142 mg, apenas a fração correspondente a amida

primária pode ser perfeitamente isolada ($m = 24,0$ mg), a cumarilamida e a cumariltioureia correspondentes foram obtidas isoladamente com baixíssima massa, 4,8 e 5,6 mg, respectivamente.

Os espectros de RMN de ^1H das frações comprovam a formação dos compostos. A primeira fração retirada da coluna cromatográfica corresponde a amida secundária, com sinais característicos em 9,02 ppm (H4) e 10,88 ppm (NH), ambos simpletos, como observado na Figura 19.

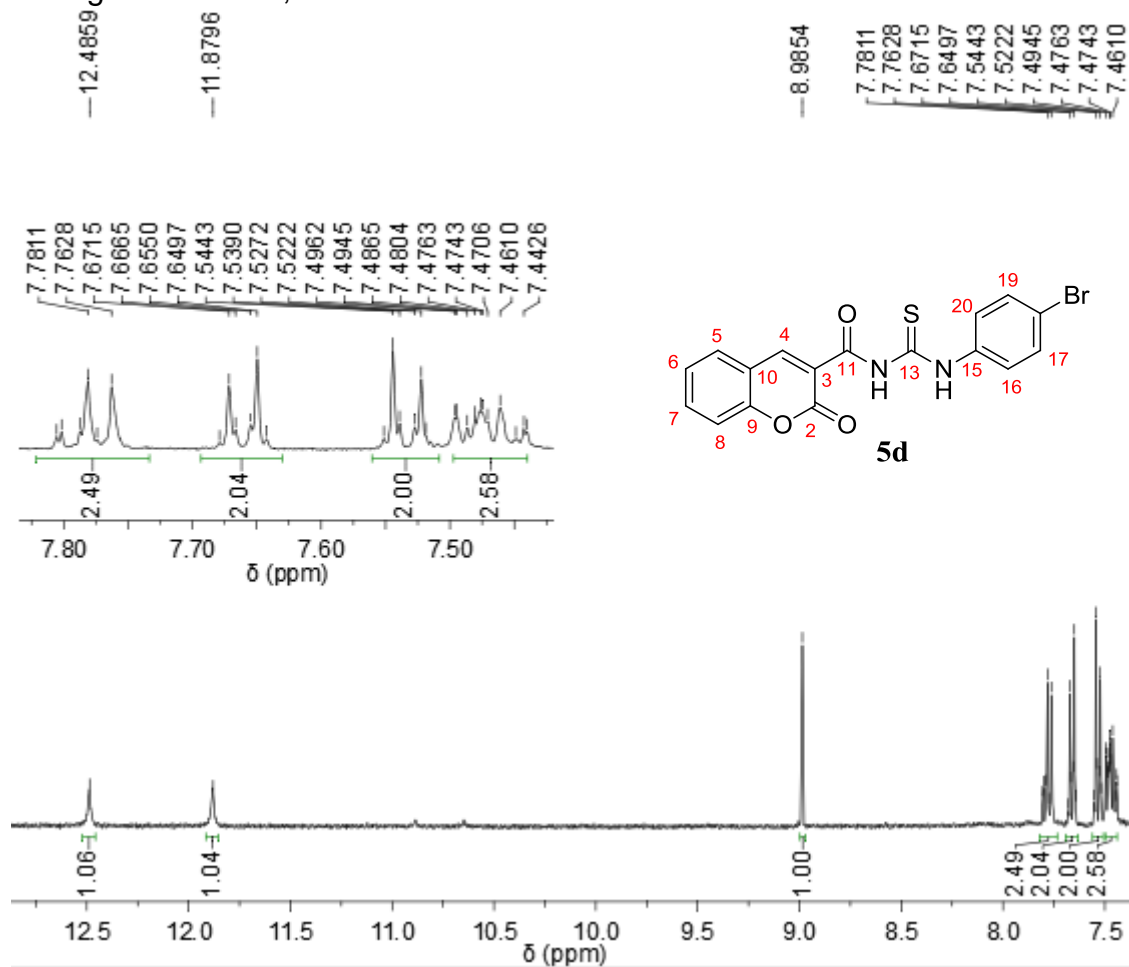
Figura 19 – Expansão do espectro de RMN de ^1H da 1ª fração retirada da coluna cromatográfica aberta, referente à cumarilamida **3d**



A 2ª fração retirada corresponde à cumariltioureia **5d** (Figura 20), onde se observa a presença dos sinais característicos da formação do produto em 12,49 e 11,88 ppm, como simpletos com integração para 1H cada, bem como o simpleto característico do anel cumarínico em 8,99 ppm, com integral de 1H, condizente com H4. Além dos sinais característicos, observa-se a presença dos sinais aromáticos em 7,81 – 7,76 ppm que condizem com os hidrogênios cumarínicos mais

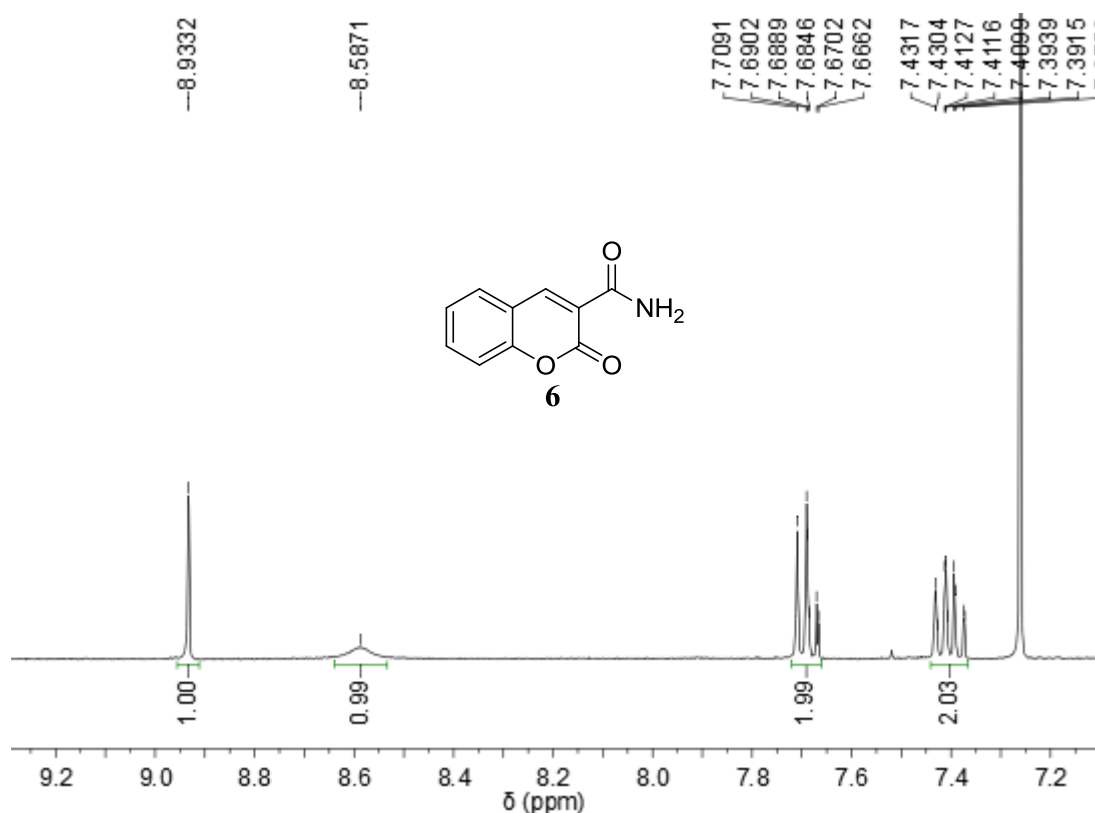
desblindados (H5 e H7), bem como o multipeto em 7,68 – 7,64 ppm com integral para 2H, que está de acordo com H17 e H19. Em 7,55 – 7,52 ppm, é possível notar um multipeto, novamente com 2H, que corroboram com H16 e H20, bem como o multipeto em 7,50 – 7,44 ppm referente aos hidrogênios H6 e H8.

Figura 20 – Expansão do espectro de RMN de ^1H da 2^a fração retirada da coluna cromatográfica aberta, referente à cumariltiureia **5d**



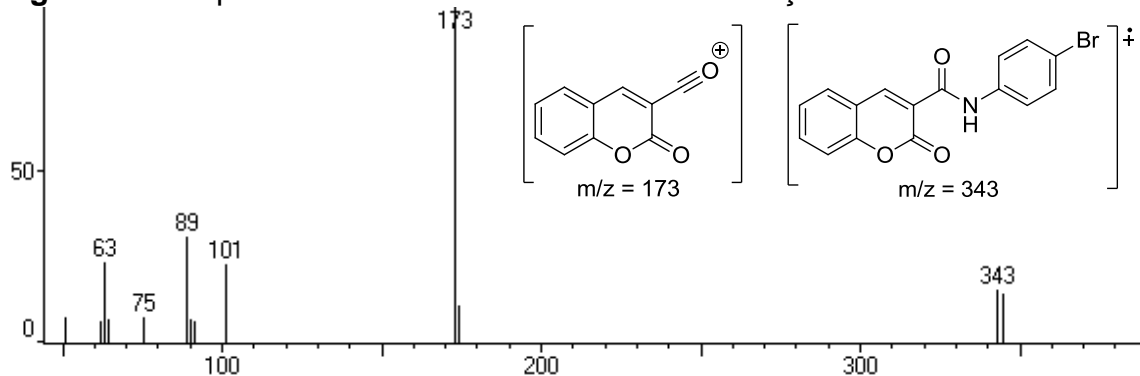
Na Figura 21, encontra-se o espectro obtido para a 3^a fração da coluna, correspondente a formação de uma amida primária. No espectro foi observada a presença dos sinais já conhecidos da cumarina, simpleto referente à 1H em 8,93 ppm e os multipletos aromáticos na região de 7,71 – 7,37 ppm com integração para 4H. De acordo com a literatura, a região de 5,0 – 9,0 ppm é característica de hidrogênios amídicos, e essa variação está relacionada a diversos fatores como temperatura, concentração da amostra e solvente utilizado.⁵⁵ Assim sendo, atribuiu-se o simpleto largo observado em 8,59 ppm ao NH da amida primária.

Figura 21 – Expansão do espectro de RMN de ^1H da 3^a fração retirada da coluna cromatográfica aberta, referente à amida primária



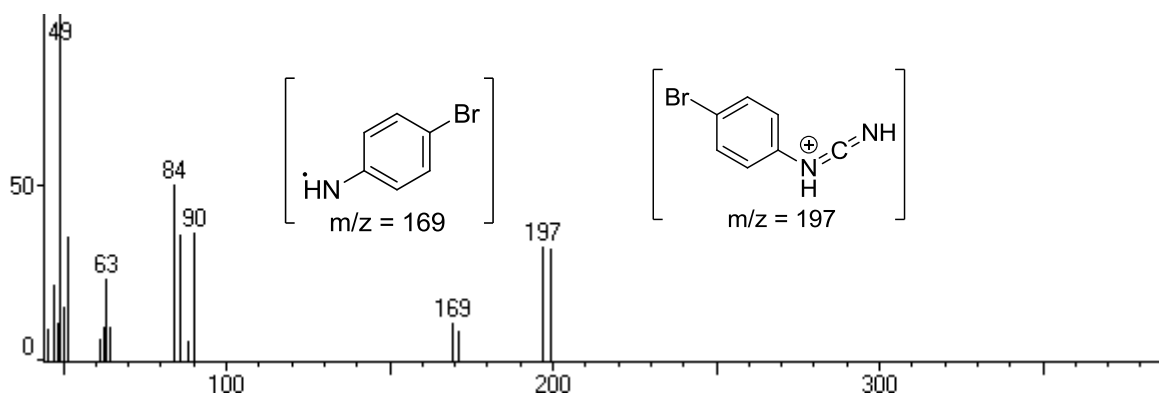
As frações também foram analisadas em CG-EM e os fragmentos obtidos corroboram com os resultados encontrados com RMN de ^1H . Na Figura 22, o espectro de massas da 1^a fração apresenta o fragmento da cumarilamida com íon molecular de m/z 343 e pico base como o íon acílio, com m/z de 173.

Figura 22 – Espectro de massas evidenciando a obtenção de cumarilamida **3d**



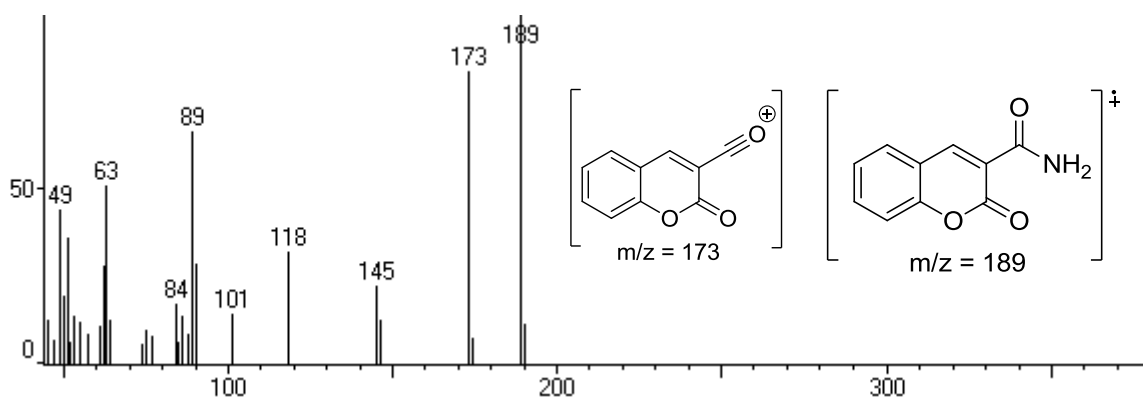
A 2^a fração, referente à cumarilatiourea **5d**, apresenta fragmentos em m/z 197 e m/z 169 como esperado para o produto (Figura 23).

Figura 23 – Espectro de massas evidenciando a obtenção da cumariltioureia **5d**



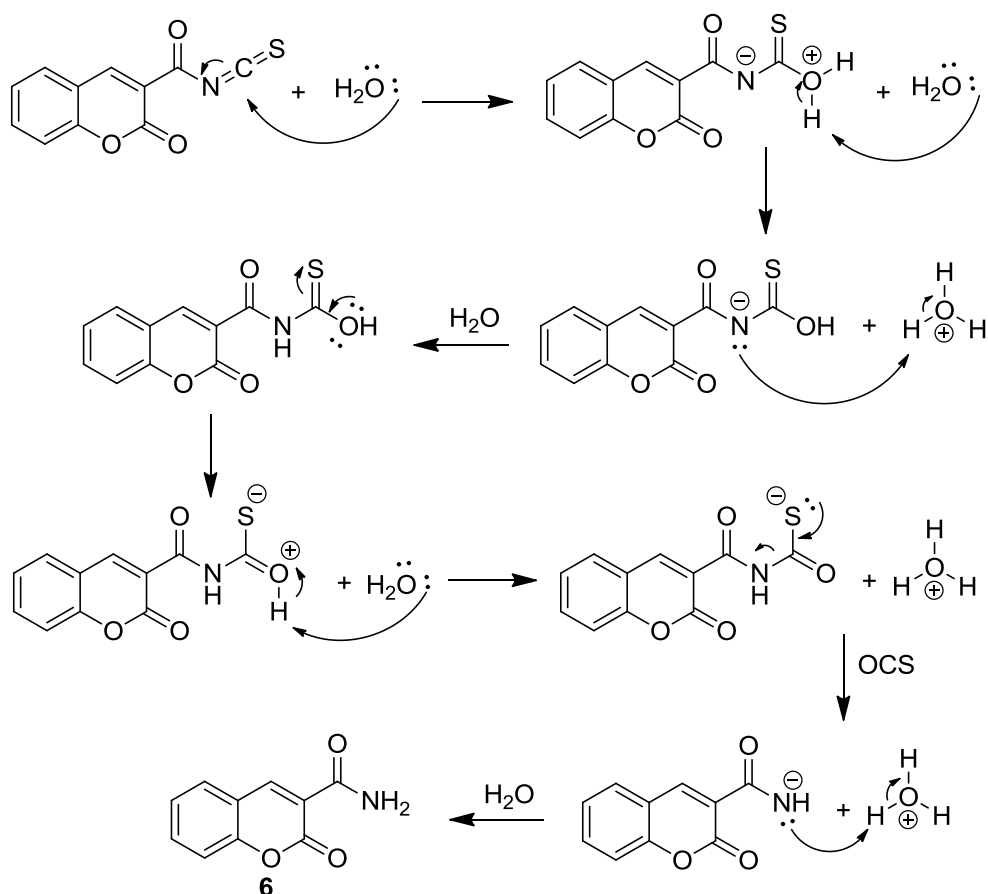
O espectro de massas obtido para a 3^a fração (Figura 24) possui como íon molecular e pico base o fragmento m/z 189, que está de acordo com a massa molecular da amida primária **6** (MM = 189 g mol⁻¹), além de apresentar outros fragmentos já conhecidos como o íon acílio em m/z 173.

Figura 24 – Espectro de massas evidenciando a obtenção da amida primária **6**

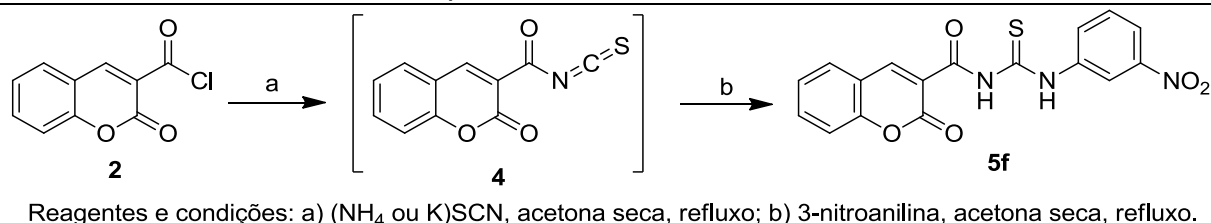


Com base nessas evidências experimentais, propôs-se que a formação da amida primária **6** se deve a presença de água no meio reacional, promovendo assim a degradação do intermediário isotiocianato, conseguinte eliminação do oxissulfeto de carbono e formação da amida primária, conforme Esquema 16.

Esquema 16 – Mecanismo de degradação proposto para a formação da amida primária



Considerando a dificuldade de purificação dos compostos por coluna cromatográfica, foi proposta a realização de um estudo sistemático na síntese das cumariltioureas, de modo a definir a melhor condição de síntese para favorecer a formação exclusiva destes compostos. Para isso, retomando a análise da Tabela 3, observamos que a atmosfera inerte, a menor quantidade de anilina utilizada e a adição de cloreto sobre o NH_4SCN não foram responsáveis por prover melhorias na obtenção dos produtos desejados. Assim, avaliou-se agora a proporção entre o cloreto e o tiocianato (1:1 ou 1:2), bem como o tempo de reação com tiocianato (30 min ou 4 horas), com o objetivo de garantir a formação do isotiocinato. Realizou-se ainda a retirada ou não do sal formado (cloreto de amônio – NH_4Cl), bem como a substituição do NH_4SCN por KSCN , conforme demonstrado na Tabela 4. Fez-se ainda a substituição da amina utilizada, ao invés da 4-bromoanilina foi utilizada a 3-nitroanilina, com o intuito de tornar a amina menos nucleofílica e assim diminuir a possibilidade de formação da cumarilamida.

Tabela 4 – Estudo sistemático para a síntese das cumariltioureas

Entrada	R	Cloreto: SCN (Nº Eq.)	Tempo com SCN	Sal formado	Outras mudanças	RMN de ¹ H
1	3-NO ₂	1:1	30 min			5f e 3f
2	3-NO ₂	1:1	4 horas			5f, 3f e 6
3	3-NO ₂	1:1	30 min	Retirado		5f e 3f
4	3-NO ₂	1:1	4 horas	Retirado		5f e 3f
5	3-NO ₂	1:2	30 min			5f, 3f e 6
6	3-NO ₂	1:2	4 horas			5f, 3f e 6
7	3-NO ₂	1:1	30 min		KSCN	5f e 3f
8	3-NO ₂	1:1	4 horas		KSCN	3f e 2 sub- produtos

As primeiras entradas (1 e 2) da Tabela 4 foram modificadas apenas com relação ao tempo de reação com o NH₄SCN, sendo a primeira com 30 minutos de reação e a segunda com 4 horas. A caracterização dos produtos (Figuras 8D e 9D – Apêndice D), demonstrou que apenas a modificação do tempo de reação não foi responsável por melhorias significativas e os produtos obtidos para a entrada 1 corresponde a uma mistura de cumariltiourea **5f** e cumarilamida **3f** e, para a entrada 2, além de **5f** e **3f**, observou-se a formação da amida primária **6**.

Assim sendo, nas entradas 3 e 4 o tempo de reação com o tiocianato foi mantido e, como diferencial, foi feita a remoção do sal de NH₄Cl formado, por meio de uma filtração, em sistema aberto, visando retirar um possível interferente na reação, uma vez que o NH₄Cl é um sal ácido e poderia assim diminuir ainda mais a nucleofilicidade da base. Os resultados obtidos comprovam a obtenção da mistura dos compostos **5f** e **3f** (Figuras 10D e 11D – Apêndice D).

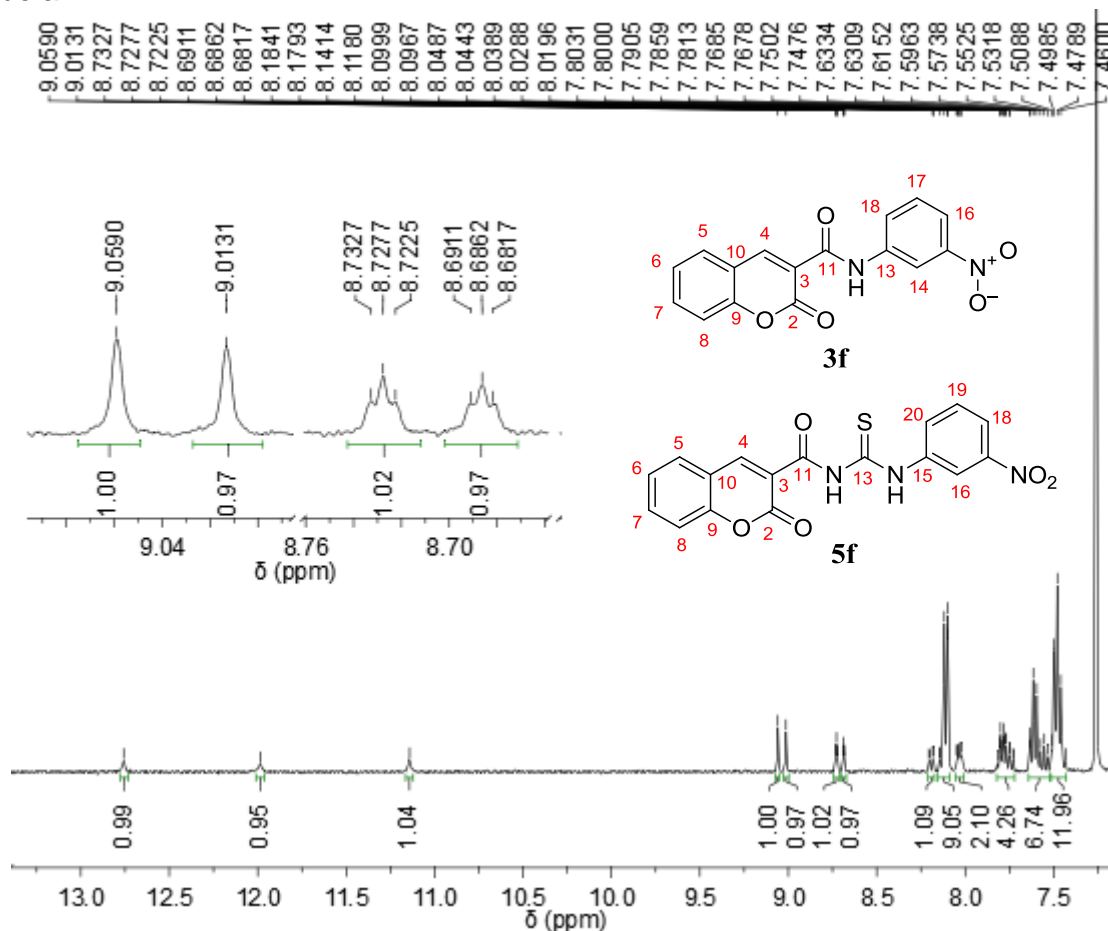
Nas entradas 5 e 6 da Tabela 4, foi então utilizado o dobro de tiocianato de amônio em relação ao cloreto (2:1). O intuito desta modificação era garantir a formação do isotiocianato, reduzindo a possibilidade do cloreto não reagir com o nucleófilo e assim formar a cumariltiourea. Contudo, a caracterização espectroscópica (Figuras 12D e 13D – Apêndice D) demonstrou a formação dos três

produtos discutidos anteriormente, a cumariltioureia, a cumarilamida e, neste caso, a amida primária (**5f**, **3f** e **6**, respectivamente).

O próximo estudo realizado foi com relação à troca do sal, ao invés de NH_4SCN utilizou-se o KSCN (entradas 7 e 8 da Tabela 4). Como o solvente utilizado foi acetona, um solvente com baixa constante dielétrica ($\epsilon = 21,0$)⁶² a troca do sal de amônio pelo sal de potássio poderia favorecer a separação das cargas. Tal explicação pode ser embasada na Teoria de ácidos e bases de Pearson,⁶³ uma vez que o íon K^+ é mais duro do que o NH_4^+ , enquanto que o ânion SCN^- pode ser considerado uma espécie mole, logo, no sal de potássio existe uma interação do tipo duro-mole mais forte do que no sal de amônio, sendo assim, as cargas no sal de potássio tenderiam a ser mais facilmente solvatadas pela acetona do que no sal de amônio. Por essa razão, a maior disponibilidade do íon SCN^- aumenta a nucleofilicidade do mesmo, o que poderia favorecer a formação do isotiocianato e, portanto, da cumariltioureia. Entretanto, o resultado obtido para a entrada 7 foi o mesmo obtido anteriormente, formação de uma mistura da cumariltioureia e da cumarilamida. Todavia, a caracterização gerada para a entrada 8, quando foi utilizado um tempo de reação de 4 horas com o tiocianato, demonstrou a formação apenas da cumarilamida **3f** e mais 2 subprodutos que não puderam ser identificados (Figura 15D – Apêndice D).

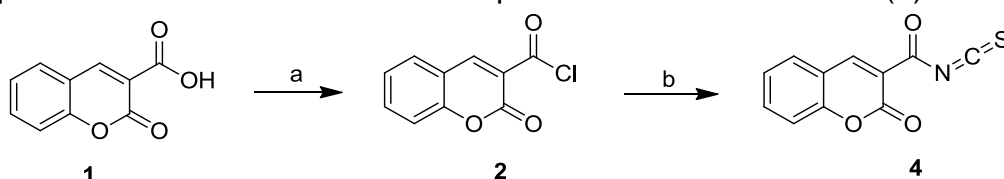
Todos os produtos obtidos foram caracterizados por RMN de ^1H e os resultados obtidos corroboram com os espectros de CG-EM. Ressalta-se ainda que os espectros obtidos das misturas, cumarilamida e cumariltioureia nas entradas 1, 3 e 4 foram os que indicaram a igual formação da cumariltioureia em relação à cumarilamida (proporção de aproximadamente 1:1) (Figura 25), enquanto que na entrada 7 estimou-se que a formação de **5f** em relação a **3f** foi de apenas 0,4:1, e nas outras entradas (2, 5 e 6) a formação da amida primária foi majoritária.

Figura 25 – Expansão do espectro de RMN de ^1H do produto obtido na entrada 3 da Tabela 4



O insucesso na síntese de apenas as cumariltioureas gerou a necessidade de se realizar algumas tentativas de isolar o intermediário isotiocianato (**4** – Esquema 17). A síntese ocorreu como já descrito anteriormente, por meio da cloração do ácido cumarínico utilizando excesso de SOCl_2 (20,0 eq.), sob refluxo e agitação, por 2 horas e 30 minutos. O cloreto foi então concentrado em rotaevaporador e dissolvido em acetona seca; em seguida adicionou-se o NH_4SCN (2,0 eq.) e deixou-se reagir por 1 ou 2 horas, sob refluxo e agitação, acompanhando o processo por CCD. Na sequência, a solução foi filtrada, de modo a retirar o sal de cloreto de amônio formado, e então propôs-se algumas formas de isolar e purificar o isotiocianato.

Esquema 17 – Rota sintética utilizada para formar o isotiocianato (**4**)



Reagentes e condições: a) SOCl_2 (20,0 eq.), refluxo, 2h30min; b) NH_4SCN , acetona seca, refluxo, 1 ou 2 horas.

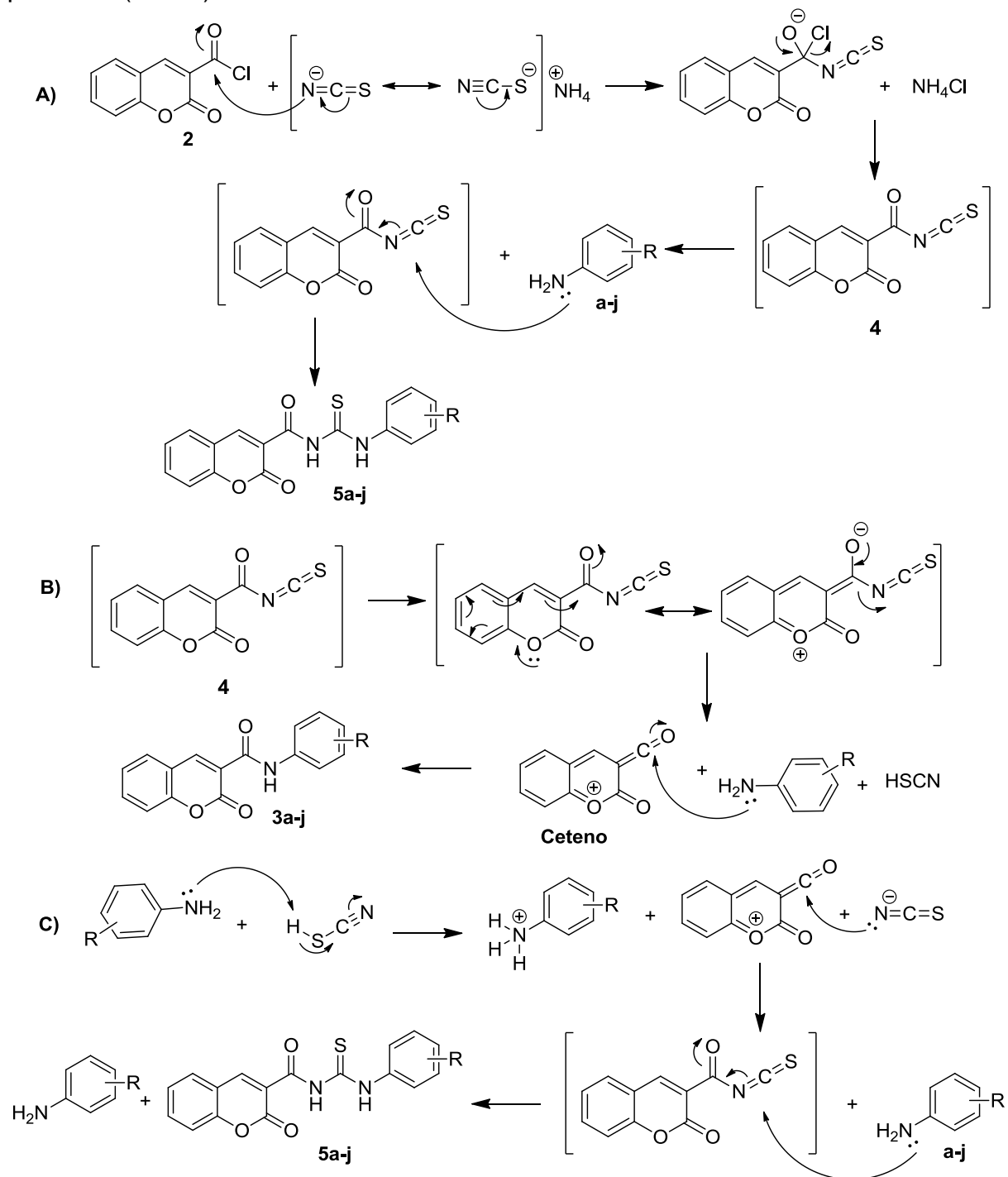
As tentativas consistiram em concentrar o isotiocianato em rotaevaporador, retirar o excesso de NH_4SCN por meio de extração com água (3 x 10 mL) e, então, realizar lavagens com etanol e éter etílico gelados ou purificação por pequenas colunas abertas. Infelizmente, nenhuma tentativa pode isolar o composto com sucesso. A instabilidade do intermediário **4** é tanta que, no momento em que a acetona é retirada no rotaevaporador, ocorre a degradação do produto.

Considerando assim a grande dificuldade que seria isolar o isotiocianato, as modificações realizadas até o momento e o fato de nenhuma proposta ter promovido uma rota sintética adequada, buscou-se na literatura novas possibilidades de modificações. Nesta busca, foi encontrado um artigo que descreve brevemente a obtenção de amidas como subprodutos, ao realizar a síntese de análogos de indóis contendo o grupo tioureia. Segundo Kutschy et al.,⁶⁴ ocorre uma decomposição parcial do isotiocianato ao ácido tiociânico e consequente formação de um intermediário ceteno, de modo que as amidas seriam formadas a partir desse intermediário. Os mesmos autores descrevem que a obtenção dos compostos desejados só foi alcançada após a utilização de excesso de amina, que seria responsável por disponibilizar os íons tiocianato do ácido tiociânico e assim produzir o isotiocianato desejado.

De acordo com o que foi descrito por Kutschy et al.,⁶⁴ o mesmo poderia ser aplicado aos nossos compostos. O Esquema 18 demonstra as possibilidades do que poderia estar acontecendo nas rotas A e B e a possível solução (rota C). Na rota **A**, o ataque da amina ocorre na forma isotiocianato do composto, formando a cumariltioureia, enquanto que a rota **B** exemplifica, de modo geral, a degradação do isotiocianato resultando na formação do intermediário ceteno e, considerando a acidez do meio, a formação do ácido tiociânico. Um ataque nucleofílico a este intermediário levaria, portanto, a formação da amida secundária (cumarilamida). A possível solução seria então, conforme a rota **C** apresentada, a utilização de excesso de amina, que serviria como uma base e disponibilizaria os íons tiocianato

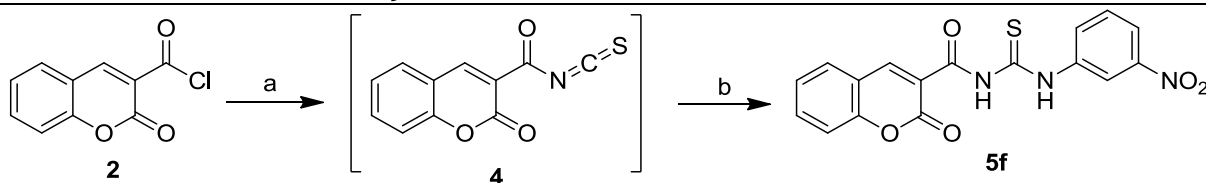
para formar o derivado isotiocianato e como na sequência prevista as cumariltioureas desejadas.

Esquema 18 – Representação de uma proposta de formação da mistura de produtos (rotas **A** e **B**), e de como o excesso de amina poderia auxiliar nesse processo (rota **C**)



Assim sendo, novas sínteses foram realizadas, agora com excesso da amina, conforme as entradas 1 – 5 da Tabela 5. Além disso, pensando na possível degradação do isotiocianato, o tempo de reação para a formação do intermediário foi mantido em 15 minutos.

Tabela 5 – Novas modificações nas tentativas de síntese das cumariltioureias



Reagentes e condições: a) NH_4SCN , acetona seca, refluxo; b) 3-nitroanilina, acetona seca, refluxo.

Entrada	R	Cloreto: SCN	Tempo com	Cloreto: Amina	RMN de ^1H
		(Nº Eq.)	SCN	(Nº Eq.)	
1	3- NO_2	1:1	15 min	1:2	5f e 3f
2	3- NO_2	1:1	15 min	1:3	5f e 3f
3	3- NO_2	1:2	15 min	1:2	5f e 3f
4	3- NO_2	1:2	15 min	1:3	5f e 3f
5	3- NO_2	1:2	15 min	1:4	5f , 3f e 1

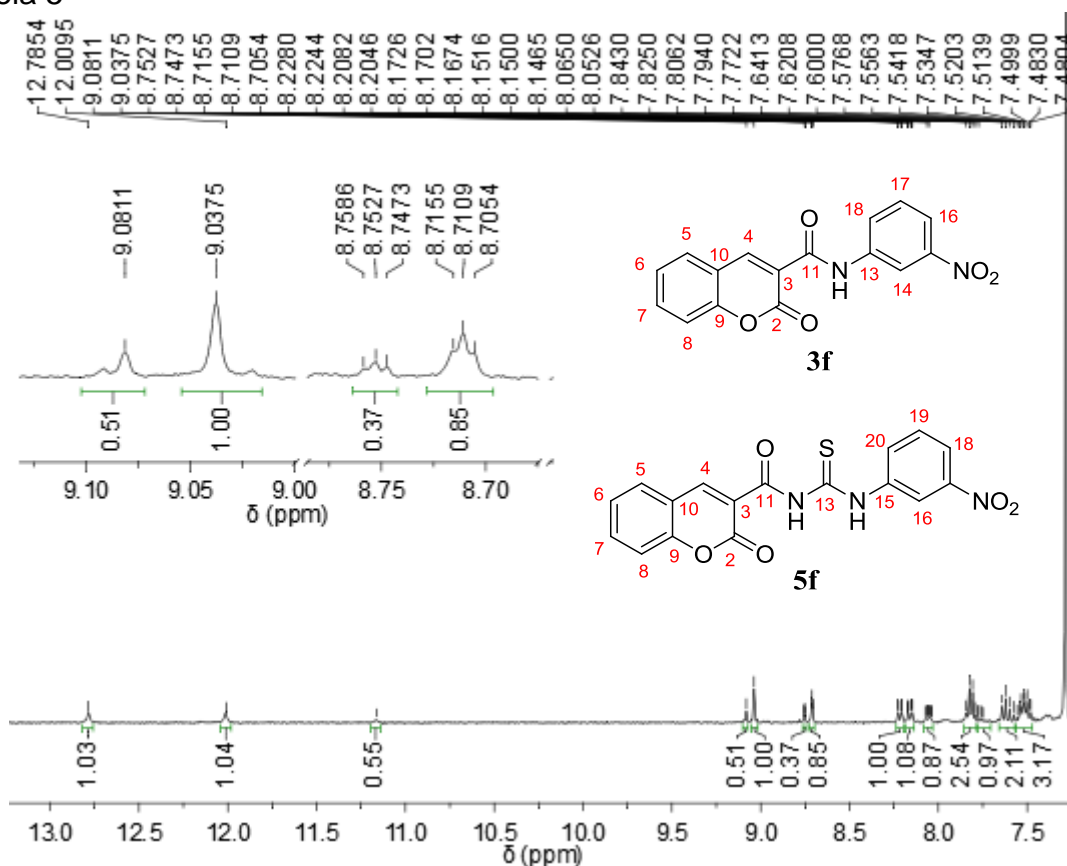
Primeiramente, na entrada 1, foi utilizado um excesso de 1,0 eq. da 3-nitroanilina, em relação ao cloreto. Como este pequeno excesso não proveu melhorias na síntese do composto, uma segunda tentativa foi realizada, utilizando 3,0 equivalentes da anilina em relação ao cloreto, conforme entrada 2 da Tabela 5. Os produtos obtidos correspondem a cumariltioureia e a cumarilamida (Figuras 16D e 17D – Apêndice D).

Assim sendo, uma nova entrada foi proposta, agora utilizando, além de 2,0 eq. da anilina, excesso de NH_4SCN (2,0 eq) (entrada 3). Como o resultado não foi diferente dos obtidos anteriormente, mais duas sínteses foram realizadas, a primeira, conforme a entrada 4 demonstra, foi utilizado 3,0 eq de 3-nitroanilina, além de 2,0 eq de anilina, enquanto que na entrada 5 utilizou-se 4,0 eq. da anilina. Nesta última entrada, além da obtenção da cumariltioureia **5f** e da cumarilamida **3f**, observou-se a presença de sinais que condizem com impurezas e até mesmo presença do ácido cumarínico (**1**) (Figura 20D – Apêndice D).

Destas propostas, a entrada 4 foi a responsável pelo melhor resultado, de acordo com a caracterização do RMN de ^1H , esta apresentou a melhor proporção de cumariltioureia em relação a cumarilamida (2:1) (Figura 26). Contudo, faz-se

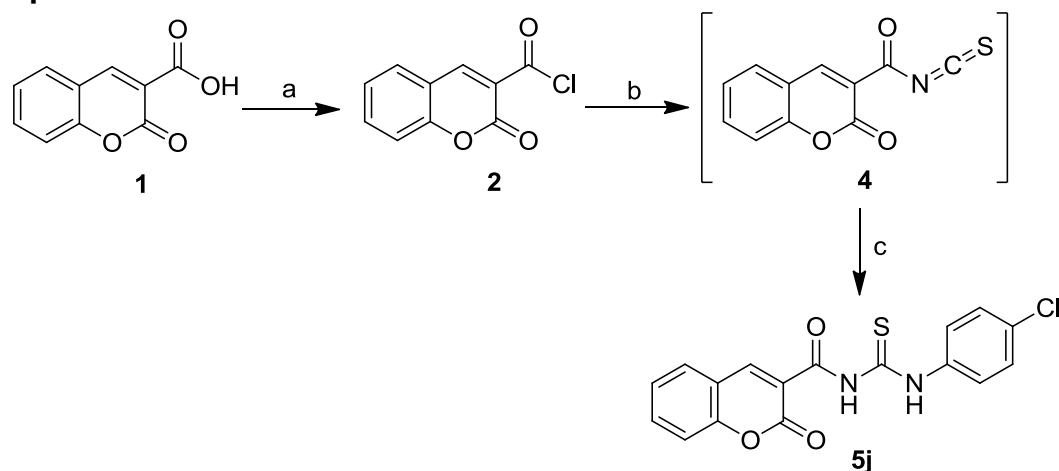
novamente uma ressalva com relação à solubilidade dos compostos, pois estes são pouco solúveis e esta proporção pode não corresponder à realidade.

Figura 26 – Expansão do espectro de RMN de ^1H do produto obtido na entrada 4 da Tabela 5



Ainda objetivando novas modificações, Kurt et al.⁶⁵ sintetizou 20 derivados cumarínicos contendo o núcleo da tioureia, utilizando uma metodologia similar a aqui proposta. Desse modo, duas novas tentativas de síntese das cumariltioureias foram propostas, ambas conforme metodologia proposta por Kurt et al.⁶⁵ (Esquema 19).

Nestas novas sínteses utilizou-se a 4-cloroanilina como amina, temendo que a 3-nitroanilina, por ser a menos nucleofílica das aminas planejadas, talvez fosse a responsável pelos resultados insatisfatórios.

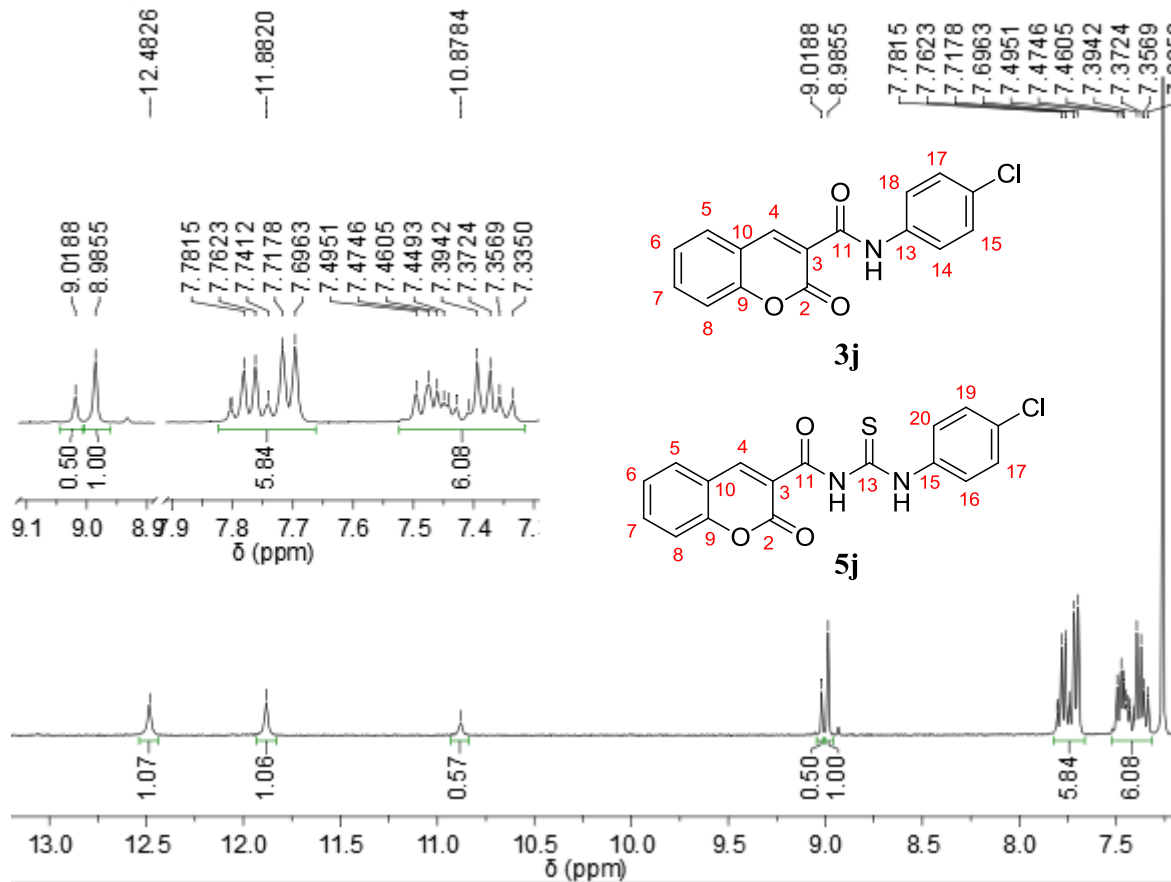
Esquema 19 – Rota sintética conforme Kurt et al.

Reagentes e condições: a) SOCl_2 (5,0 eq), refluxo (80 °C), 4 horas; b) KSCN (1,2 eq.), acetonitrila seca, refluxo, 30 min; c) 4-cloroanilina, acetonitrila seca, refluxo, 4 horas.

A formação do cloreto (**2**) iniciou-se pela reação de **1** com o SOCl_2 (5,0 eq.) sob refluxo e agitação por 4 horas. Na sequência, o cloreto foi concentrado em rotaevaporador, lavado com éter etílico gelado e filtrado. O cloreto devidamente isolado e caracterizado por infravermelho (Figura 21D – Apêndice D), foi dissolvido em 5 mL de acetonitrila seca e sobre ele adicionou-se o KSCN (1,2 eq.), dissolvido em mais 5 mL de acetonitrila. A reação permaneceu sob refluxo e agitação por 30 min, quando se adicionou uma solução de 4-cloroanilina dissolvida em 5 mL de acetonitrila. A reação permaneceu sob refluxo e agitação por mais 4 horas, quando se fez o isolamento do produto por meio de concentração em rotaevaporador, seguida de extração com diclorometano e água destilada (3 x10 mL).

A diferença na síntese destas novas tentativas se dá no fato de que, na última, o KSCN utilizado foi tratado por recristalização no dia anterior com metanol grau HPLC e deixado na estufa a 150 °C por 24 horas.⁶⁶ O tratamento do KSCN aliado a utilização de uma amina mais nucleofílica, proporcionou um bom resultado, com uma proporção de 2:1 de cumariltioureia em relação a cumarilamida, conforme demonstrado pela Figura 27.

Figura 27 – Expansão do espectro de RMN de ^1H do produto obtido conforme metodologia descrita por Kurt et al.



Considerando assim a maior quantidade aparente de cumariltiourea, uma nova tentativa de purificação por coluna cromatográfica foi realizada para esta última síntese. Com altura de 30 cm e diâmetro de aproximadamente 1,2 cm, utilizou-se como fase móvel um gradiente inicial de hexano, acetato de etila e diclorometano (7:2:1) até a retirada da primeira fração correspondente a cumarilamida, aumentando assim, na sequência, a polaridade da fase móvel até a retirada da segunda fração, referente a cumariltiourea (**5j**).

O produto foi purificado com êxito e bom rendimento (75%) e então caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C , conforme Figura 28 e Figura 29, respectivamente, onde se observa os sinais de H correspondentes a obtenção do produto, como um simpleto em 8,99 ppm referente ao H4, bem como os simpletos largos em 12,42 e 11,82 ppm condizentes com os deslocamentos dos NH da função tiourea. No RMN de ^{13}C , foi observado a presença de 15 sinais, que correspondem aos 17 carbonos presentes na estrutura, sendo que o sinal mais desblindado (178 ppm) corresponde ao carbono na função tiourea C13, seguido de um sinal em 161

ppm que corresponde ao carbono ligado aos oxigênios da lactona (C2) e outro sinal em 160 ppm que condiz com o carbono da função amida (C11). Os sinais observados em 155 e 151 ppm correspondem aos outros carbonos mais desblindados da cumarina, como visto na caracterização do ácido cumarínico (Figura 2S – Apêndice A), nomeadamente C9 e C4. Em seguida, no deslocamento de 136 ppm tem-se um sinal correspondente ao C15, um carbono ligado a um elemento eletronegativo, o N. Em 135 ppm tem-se um outro sinal referente ao anel da cumarina, o C7, e então, em 132 ppm, o sinal correspondente ao carbono ligado ao átomo de cloro (C18). C5 encontra-se no deslocamento de 130 ppm e em 129 ppm tem-se os carbonos C17 e C19, seguido do sinal referente a C8 em 125,9 ppm e próximo a ele, outro sinal em 125,2 ppm referente aos carbonos C16 e C20. Por fim, tem-se os três sinais correspondente aos carbonos da cumarina, C3, C10 e C6, com deslocamentos de 118, 117 e 116 ppm.

Figura 28 – Expansão do espectro de RMN de ^1H da cumariltioureia **5j** obtida por purificação em coluna cromatográfica

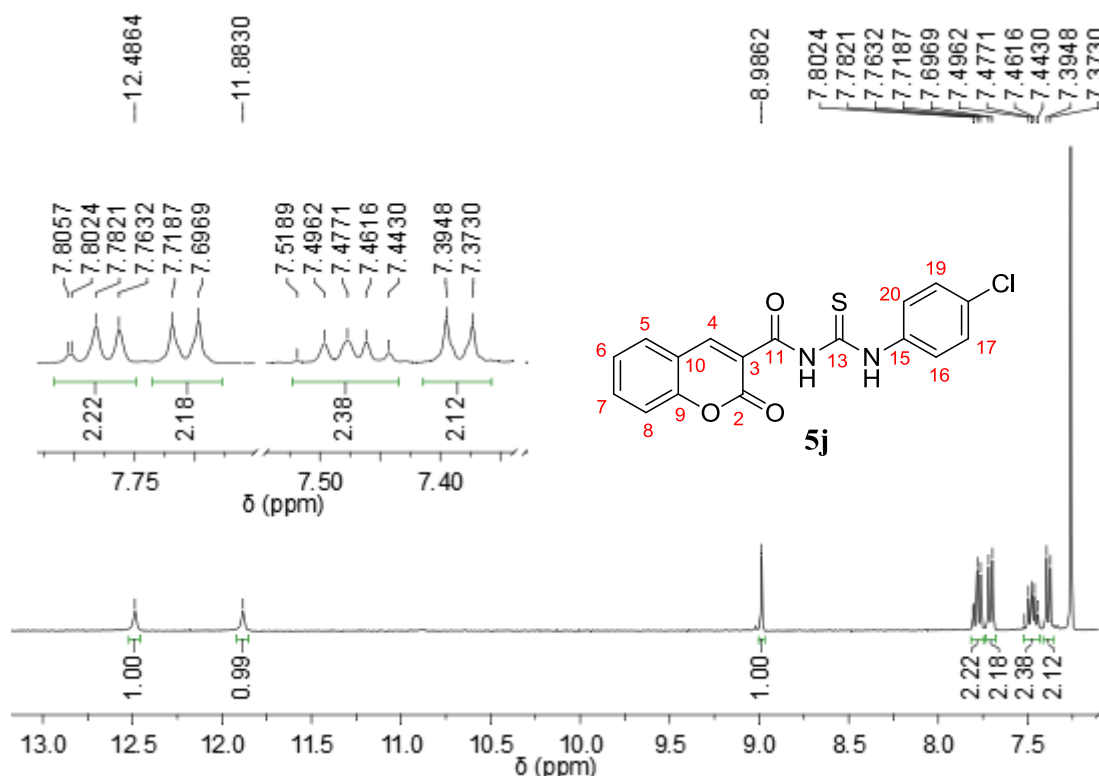
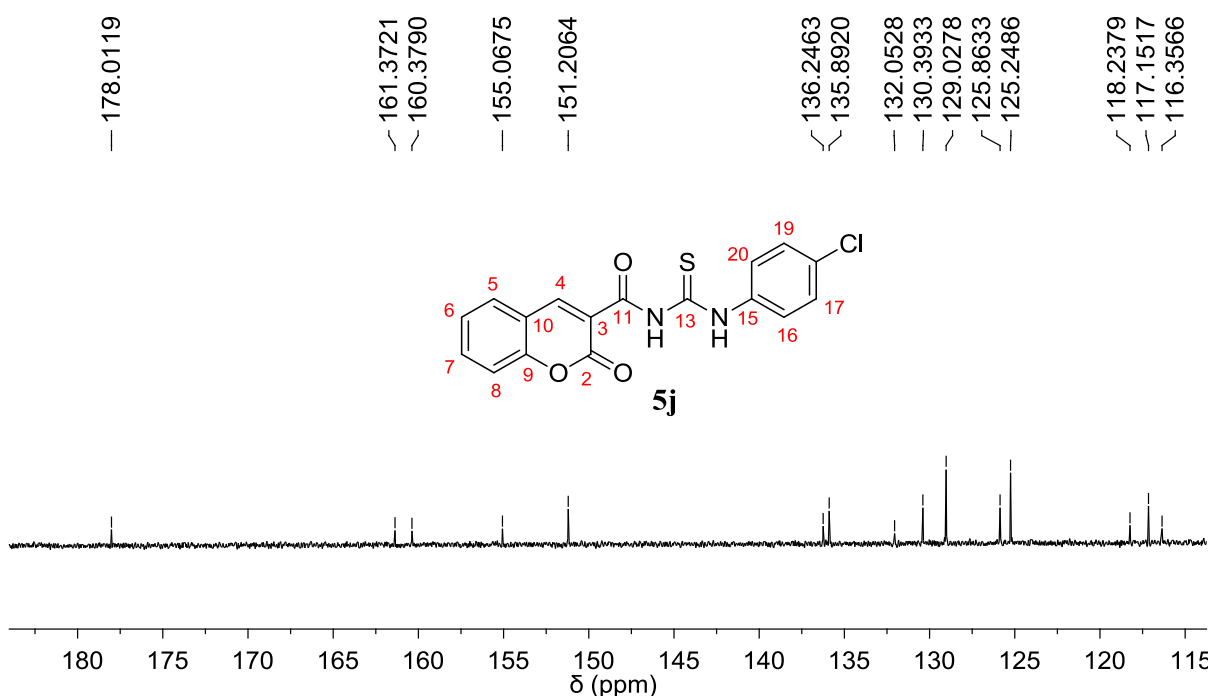


Figura 29 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da cumariltioureia **5j** obtida por purificação em coluna cromatográfica



O sucesso na purificação da cumariltioureia **5j** nos levou a repetir este processo para as outras misturas obtidas, na tentativa de isolar as cumariltioureias **5c** (3-Br), obtida conforme metodologia ilustrada no Esquema 15, e **5f** (3-NO₂), resultante da metodologia citada na entrada 3 da Tabela 4, no entanto, não foi possível isolá-las de maneira eficiente.

3.4 ENSAIOS *IN VITRO* PARA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

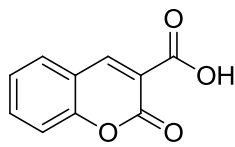
Os antibióticos devem ser capazes de permear a parede celular das bactérias e assim interferir na síntese de peptídeoglicano, ou então gerar lesões na membrana citoplasmática ou ainda, interferir na síntese do ácido nucleico, proteínas, ou metabólitos essenciais, que são substâncias necessárias para sobrevivência e replicação das bactérias.³ Assim sendo, é necessário avaliar as substâncias-protótipo com relação a sua ação nos diferentes tipos de células bacterianas, tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Uma vez que as bactérias Gram-negativas possuem uma camada de lipopolissacarídeo, as moléculas devem ser mais lipossolúveis, para assim serem capazes de permear tanto a membrana

externa quanto a camada de peptídeoglicano, que por sua vez constitui a parede celular das bactérias Gram-positivas.

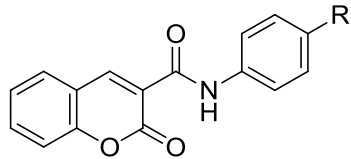
Desse modo, o ácido 3-carboxicumarínico (**1**) e as cumarilamidas **3a**, **3d**, **3g** e **3j** foram avaliadas quanto a sua atividade antibacteriana frente as cepas Gram-positivas de *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228) e Gram-negativas de *Escherichia coli* (ATCC25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), que estão envolvidas em diversos casos clínicos de infecção, principalmente hospitalar.⁶⁷

A atividade destes compostos foi determinada por meio de ensaios de microdiluição, e avaliada por meio da concentração inibitória mínima (CIM), em $\mu\text{g mL}^{-1}$, que é definida como a menor concentração da substância capaz de impedir a turbidez do meio e assim inibir o crescimento celular. Os resultados obtidos para os compostos testados estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 – Atividades *in vitro* das cumarilamidas **3a**, **3d**, **3g** e **3j**



1



3a-j

Substância	Substituinte (R)	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	-	1000	1000	1000	>1000
3a	H	>500	>500	>500	>500
3d	Br	>500	>500	>500	>500
3g	NO ₂	>500	>500	>500	>500
3j	Cl	>500	>500	>500	>500

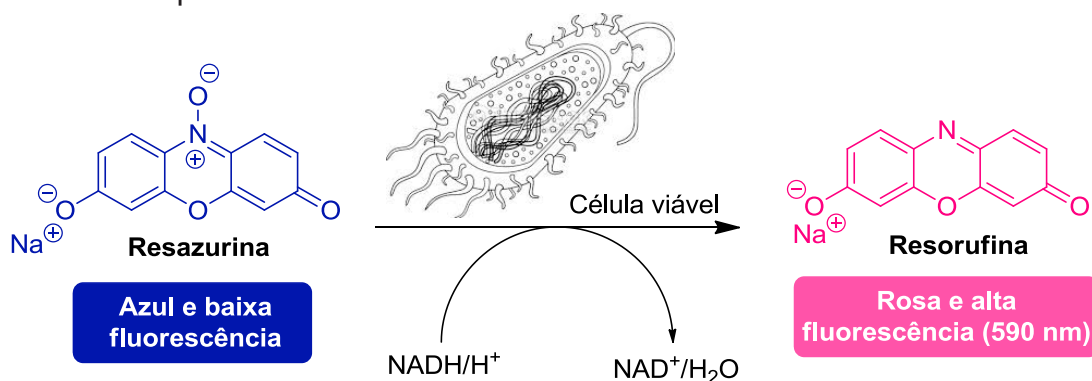
O ácido carboxícumarínico (**1**) foi capaz de inibir as cepas bacterianas com concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, com exceção da bactéria *P. aeruginosa*, que apresentou valor superior a concentração máxima utilizada para este teste ($>1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Quanto as cumarilamidas, estas apresentaram valor de CIM acima de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando que as amostras não possuem atividade antibacteriana apreciável frente as cepas testadas. Ainda assim, as demais cumarilamidas serão avaliadas frente a essas cepas com o objetivo de verificar a existência de uma

possível relação entre a posição do substituinte no anel aromático com a atividade antibacteriana.

Entretanto, verificou-se que os compostos testados foram de difícil dissolução no meio utilizado, o que pode influenciar significativamente na determinação da atividade antibacteriana das substâncias, como destacado por Silva et al.,⁶⁸ que conseguiu determinar a atividade antimicrobiana da cumarina após a utilização de uma solução etanólica 30% (ao invés de DMSO, utilizado por nossos colaboradores), para solubilização dessa substância no meio utilizado para a realização do teste antimicrobiano. Isso permitiu determinar a excelente atividade antibacteriana da cumarina frente à bactéria *S. epidermidis*, que apresentou CIM abaixo de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.5 ENSAIOS *IN VITRO* PARA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E ANÁLISE *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS

O ácido cumarínico (**1**) e as cumarilamidas **3a-j** também foram avaliados frente ao *M. tuberculosis* ATCC 27294, utilizando o método MABA (do inglês, *Microplate Alamar Blue Assay*)⁶⁹. Esta metodologia avalia o crescimento celular por meio de um indicador, o Alamar Blue[®], um sal de resazurina que possui propriedade redox. Este sal é disponibilizado em sua forma oxidada, azul, com baixa fluorescência que, ao ser reduzido por uma célula viável (com metabolismo celular) muda sua cor para rosa (Figura 30), permitindo assim análises quantitativas por meio de leituras colorimétricas e/ou fluorométricas.⁷⁰ Assim, se há crescimento celular, o meio de presente no poço apresenta coloração rosada, enquanto que a inibição deste crescimento celular tem por consequência a não redução da molécula, portanto, o meio se torna azulado.

Figura 30 – Esquema ilustrativo do método de Alamar Blue

Fonte: Adaptado de <<http://www.abpbio.com/product/cell-viability-assay-based-on-metabolic-activity/>>

Após o período de incubação necessário, a CIM (em $\mu\text{g mL}^{-1}$) é determinada e definida como a menor concentração do fármaco capaz de impedir a mudança de cor e assim inibir o crescimento celular. Os resultados obtidos para os compostos testados (**1** e **3a-g**) estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Atividades *in vitro* dos derivados cumarínicos (**1** e **3a-g**) frente a cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (ATCC 27294), susceptível tanto à rifampicina como à isoniazida

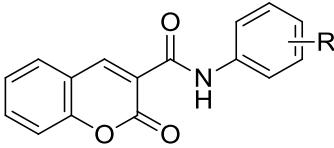
Substância	Substituinte (R)	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	-	>100
3a	H	>100 ^a
3b	2-Br	>100 ^a
3c	3-Br	>100 ^a
3d	4-Br	>100 ^a
3e	2-NO ₂	>100 ^a
3f	3-NO ₂	>100 ^a
3g	4-NO ₂	>100 ^a
3h	2-Cl	>100 ^a
3i	3-Cl	>100 ^a
3j	4-Cl	>100 ^a

^aEstas substâncias apresentaram precipitado após diluídas em meio de cultura bacteriano (7H9+OADC).

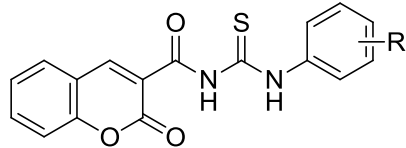
A partir dos resultados da Tabela 7, observa-se que apenas o ácido **1** pode ser devidamente avaliado frente ao *M. tuberculosis*, enquanto as amidas **3a-j** precipitaram no meio de cultura durante a execução dos testes. Isso pode ser explicado com base nas características aquosas apresentadas pelo meio utilizado (7H9) durante os ensaios, o que indica que as amidas apresentam baixa hidrossolubilidade. Assim sendo, não é possível aferir que os compostos são inativos frente à micobactéria, pois não há como garantir a concentração das substâncias presentes no meio.

A hidrossolubilidade das substâncias pode ser avaliada por meio do cálculo do coeficiente de partição (clogP), cujo valor obtido é diretamente proporcional a lipofilicidade da substância. Sabendo-se da baixa solubilidade das substâncias **3a-j** em água, objetivou-se então avaliar, por meio do cálculo de clogP, se as cumariltioureas (**5a-j**) poderiam ser mais solúveis no meio de cultura (Tabela 8).

Tabela 8 – Coeficiente de participação para as cumarilamidas e cumariltioureas



3a-j



5a-j

R	Cumarilamida	cLogP ^b	Cumariltiourea	cLogP ^b
H	3a	2,83	5a	2,39
2-Br	3b	3,59	5b	3,15
3-Br	3c	3,62	5c	3,17
4-Br	3d	3,64	5d	3,20
2-NO ₂	3e	2,74	5e	2,30
3-NO ₂	3f	2,77	5f	2,32
4-NO ₂	3g	2,79	5g	2,35
2-Cl	3h	3,46	5h	3,02
3-Cl	3i	3,49	5i	3,04
4-Cl	3j	3,51	5j	3,06

^bclogP calculado em: <<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>>⁷¹

Sabendo-se que quanto menor o valor de clogP (quanto mais negativo), mais hidrossolúvel é a substância, podemos afirmar que, possivelmente, as cumariltioureas apresentariam maior hidrossolubilidade comparadas às

cumarilamidas. Todavia, vários fatores estão envolvidos na solubilidade de uma substância, fatores estes que vão desde presença de átomos capazes de atuarem como aceptores ou doadores de ligações de hidrogênio, até a energia necessária para romper a rede cristalina de um sólido para torna-lo solúvel.⁷²

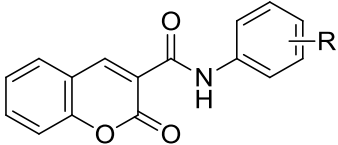
Assim sendo, outros parâmetros físico-químicos também foram calculados pela plataforma Molinspiration®⁷¹. Nesta plataforma são realizados diversos cálculos que auxiliam no processo de análise de permeabilidade pelas membranas de novas substâncias, tais como a área de superfície polar topológica (TPSA), a quantidade de grupos doadores de ligação de hidrogênio (DLH), quantidade de grupos aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) e número de ligações rotacionáveis (NLR), além de o número de violações à Regra de Lipinski (Tabela 9).

A Regra de Lipinski, ou a regra dos 5 como também é conhecida, estima a solubilidade e a permeabilidade de um composto, quando administrado por via oral, de acordo com sua estrutura química, ao descrever as características comuns de má absorção ou permeação de uma substância. De acordo com essas “regras”, se um composto possuir uma massa molar (MM) acima de 500 g mol^{-1} , log P acima de 5, mais de 10 aceptores de hidrogênio (N+O) e mais de 5 grupos doadores de hidrogênio (NH+OH), possivelmente a substância irá apresentar perfil farmacocinético inadequado.⁷² Extensões as regras de Lipinski foram desenvolvidas e a mais significativa é a extensão de Veber, que sugere que uma molécula terá melhor biodisponibilidade oral se apresentar uma área superficial topológica (TPSA) não superior a 140 \AA^2 e menos de 10 ligações rotacionáveis (NLR).⁷³

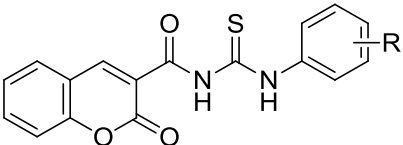
Analisando as propriedades físico-químicas calculadas (Tabela 9), observou-se que a massa molecular dos compostos, como citado nas discussões anteriores, está de acordo com as regras de Lipinski, abaixo de 500 g mol^{-1} , uma vez que variam de $299,71 - 403,26 \text{ g mol}^{-1}$.

Quanto à quantidade de grupos doadores e aceptores de elétrons (N e O), como esperado, as cumariltioureias apresentam 2 átomos a mais em relação às cumarilamidas, o que contribui ainda mais para a hidrossolubilidade das substâncias. Além disso, as cumariltioureias possuem maior número de ligações rotacionáveis, que pode contribuir para a biodisponibilidade das substâncias.

Tabela 9 – Propriedades físico-químicas para as cumarilamidas e cumariltioureas



Cumarilamida



Cumariltiourea

R	Substância	MM (g mol⁻¹)	TPSA	ALH	DLH	NLR
H	Cumarilamida	265,27	59,31	4	1	2
	Cumariltiourea	324,36	71,34	5	2	4
Br	Cumarilamida	344,16	59,31	4	1	2
	Cumariltiourea	403,26	71,34	5	2	4
NO₂	Cumarilamida	310,26	105,13	7	1	3
	Cumariltiourea	369,36	117,16	8	2	5
Cl	Cumarilamida	299,71	59,31	4	1	2
	Cumariltiourea	358,81	71,34	5	2	4

O TPSA está relacionado a uma previsão de transporte da substância e, em geral, se correlaciona muito bem com a absorção intestinal humana. Assim sendo, é possível inferir que os compostos apresentariam uma boa absorção, com valores de 59,31 e 105,15 para as cumarilamidas e 71,34 e 117,16 para as cumariltioureas.

Portanto, considerando os valores previstos de clogP (Tabela 8) e os apresentados na Tabela 9, as substâncias não violam nenhuma das regras de Lipinski e Veber, e acredita-se que as cumariltioureas sejam substâncias mais solúveis em meio aquoso.

4 METODOLOGIA

4.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

Os solventes e reagentes, para fins sintéticos, foram tratados, destilados e secos, conforme necessidades requeridas nas metodologias adotadas e de acordo com os processos descritos por Armarego e Chai.⁶⁶ O processo de monitoramento das reações foi realizado através da cromatografia em camada delgada (CCD), em cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F-254 com espessura de 0,25 mm com indicador para UV (254 nm), marca Merck. Os eluentes foram preparados volume a volume (v/v) e a revelação das substâncias em CCD foi realizada em lâmpada de UV (254-366 nm) ou em solução etanólica de ninhidrina a 2% (p/V) ou em vanilina sulfúrica.

4.2 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Os pontos de fusão (P.F.) dos compostos foram determinados em aparelho digital da Microquímica Ltda. mod. MQAPF-302.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos no Laboratório de Química Prebiótica (LQP) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) no espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), marca Bruker, modelo Vertex 70, com acessório de refletância Platinum ATR. Os espectros foram analisados na região de 4000 a 400 cm^{-1} e processados no programa OriginPro 8.0.

Os espectros de massas foram obtidos no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) Shimadzu modelo GCMS-QP5000, 99604 do Laboratório de Propriedade e Síntese de Substâncias Orgânicas (LAPSSO) da UEL.

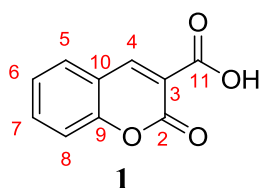
Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker modelo Avance III, operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , equipado com sondas multinucleares de 5 mm. Este espectro foi registrado utilizando CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. O software utilizado para o processamento dos espectros de RMN foi o MestReNova (Versão 6.0). Para calibração do espectro de RMN de ^1H foram adotados os valores de 0,00 ppm para TMS e 7,26 ppm para CDCl_3 . As áreas dos sinais foram obtidas por integração

eletrônica, e suas multiplicidades foram descritas da seguinte forma: simpleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), duplo duplete (dd), duplo duplo-duplete (ddd) e multiplete (m). As constantes de acoplamento (J) foram relatadas em Hz.

4.3 SÍNTESE DO ÁCIDO 3-CARBOXICUMARÍNICO

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, preparou-se uma solução do 2-hidroxibenzaldeído (0,85 g; 7,00 mmol) em 25 mL de água destilada, à qual foi adicionada o ácido de Meldrum (1,01 g; 7,01 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação e aquecimento a 75 °C durante 4 horas, quando se evidenciou o término da reação por CCD (eluente: acetato de etila: hexano (1:1)). Na sequência, a mistura reacional foi arrefecida a temperatura ambiente, e então, o precipitado obtido foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada gelada (3 x 5 mL).

Ácido 3-carboxicumarínico (1): Sólido branco; 92%; **P.F.** 191 °C; **Lit:** 191-192 °C.⁵⁰



EM (m/z): 190 (35%), 146 (100%). **RMN de ¹H [CDCl₃, 400 MHz]** δ : 12,21 (1H, s, OH); 8,95 (1H, s, H₄); 7,82-7,76 (2H, m, H₅ e H₇); 7,52-7,47 (2H, m, H₆ e H₈); **Lit.: RMN de ¹H [CDCl₃, 400 MHz]** δ : 8,97 (1H, s, H₄), 7,83-7,78 (2H, m, Ar-H), 7,50 (2H, t, $J = 8,4$ e $7,6$ Hz, Ar-H). **RMN de ¹³C [CDCl₃, 100 MHz]** δ :

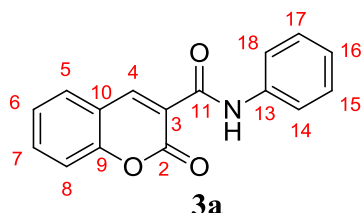
164,21 (C₁₁); 162,55 (C₂); 154,71 (C₉); 151,64 (C₄); 135,91 (C₇); 130,64 (C₅); 126,40 (C₈); 118,60 (C₁₀); 117,34 (C₃); 115,02 (C₆).

4.4 SÍNTESE DA CUMARILAMIDAS 3a-j

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, acoplado a um condensador de refluxo, suspendeu-se 0,15 g do ácido **1** (0,792 mmol) em 1,20 mL de cloreto de tionila (20 eq.). A mistura reacional permaneceu sob refluxo e agitação por 2 horas e 30 minutos, conforme descrito por Saeed et al.⁷⁴ Então, o excesso de SOCl₂ foi retirado com o auxílio do rotaevaporador e, ao cloreto formado, foi adicionada uma solução da anilina correspondente (0,792 mmols, 1,0 eq) em 10 mL de acetona. A reação permaneceu sob refluxo e agitação por 1 hora, quando se evidenciou o término da reação por CCD (eluente: CH₂Cl₂, revelador: ninhidrina). Posteriormente, a solução foi vertida em um bquer contendo gelo picado e o precipitado obtido foi

então filtrado à vácuo e lavado com água destilada e éter etílico gelados (ambos 3 x 5 mL). Assim, obteve-se as substâncias **3a-j** com rendimentos entre 75–92%.

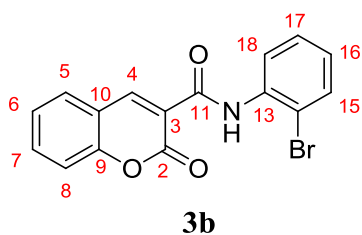
N-fenil-3-carboxiamida-cumarina (3a): Sólido amarelo esverdeado; 89%; **P.F.** 266 °C; **Lit:** 253,5–255 °C.⁵⁶ **EM (m/z)**: 265 (9%), 173 (100%).



RMN de ¹H [CDCl₃, 400 MHz] δ: 10,84 (1H, s, NH); 9,03 (1H, s, H₄); 7,77 – 7,68 (4H, m, H₅, H₇, H₁₅ e H₁₇), 7,47 – 7,37 (4H, m, H₆, H₈, H₁₄ e H₁₈); 7,19 – 7,15 (1H, m, *J* = 8,5, 1,0 Hz, H₁₆). **Lit.:** **RMN de ¹H [CDCl₃] δ**: 10,88 (1H, s, NH); 9,05 (1H, s, =C-H), 7,85 – 6,75 (9H, m, Ar-

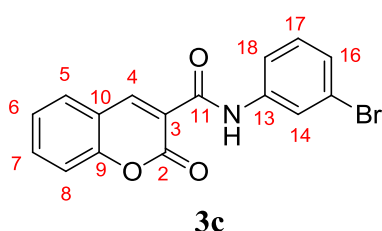
H).⁵⁶

N-(2-bromofenil)-3-carboxiamida-cumarina (3b): Sólido branco gelo; 88%; **P.F.** 236 °C; **Lit:** 196-197 °C.⁵⁷ **EM (m/z)**: 264 (21%), 173 (67%), 89 (100%). **RMN de ¹H [CDCl₃, 400 MHz] δ**:

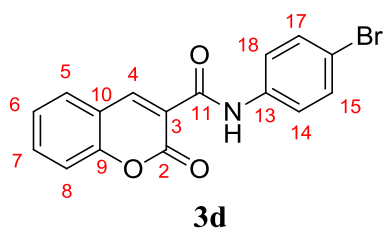


11,23 (1H, s, NH); 9,02 (1H, s, H₄); 8,52 (1H, dd, *J* = 8,3, 1,5 Hz, H₁₅); 7,77 – 7,68 (2H, m, H₅ e H₇), 7,61 (1H, dd, *J* = 8,0, 1,4 Hz, H₁₈), 7,48 – 7,33 (3H, m, H₆, H₈ e H₁₇); 7,06 – 7,01 (1H, m, H₁₆). **Lit.:** **RMN de ¹H [CDCl₃, 250 MHz] δ**: 11,21 (1H, s, NH); 9,01 (1H, s, H-4); 8,51 (1H, d, *J* = 8,0, H-6'); 7,76-7,60 (3H, m, H-5, H-7, H-3'); 7,47-7,33 (3H, m, H-6, H-8, H-5'); 7,04 (1H, t, *J* = 7,6, H-4').⁵⁷

N-(3-bromofenil)-3-carboxiamida-cumarina (3c): Sólido amarelo; 92%; **P.F.** 246 °C. **EM (m/z)**: 343 (1%), 173 (100%), 89 (97%). **RMN de ¹H [CDCl₃, 400 MHz] δ**: 10,89 (1H, s, NH); 9,02 (1H, s, H₄); 8,04 (1H, t, *J* = 1,9 Hz, H₁₄); 7,78 – 7,69 (2H, m, H₅ e H₇), 7,62 (1H, ddd, *J* = 8,0, 1,9, 1,2 Hz, H₁₈), 7,49 – 7,40 (2H, m, H₆ e H₈); 7,32 – 7,28 (1H, m, H₁₆); 7,23 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H₁₇).

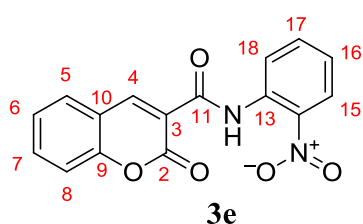


N-(4-bromofenil)-3-carboxiamida-cumarina (3d): Sólido amarelo; 83%; **P.F.** 268 °C; **Lit:** 269 – 271 °C.⁵⁸ **EM (m/z)**: 343 (1%), 173 (96%), 89 (100%). **RMN de ¹H [CDCl₃, 400 MHz] δ**: 10,88 (1H, s, NH); 9,02 (1H, s, H₄); 7,77 – 7,69 (2H, m, H₅ e H₇), 7,68-7,63 (1H, m, H₁₅ e H₁₇), 7,52 – 7,48 (2H, m, H₁₄ e H₁₈); 7,48 – 7,40 (2H,



m, H6 e H8); **Lit.: RMN de ^1H [DMSO, 400 MHz] δ :** 10,67 (1H, s, NH); 8,88 (1H, s, H4), 7,98 (1H, dd, $J = 8,0$, 1,5 Hz); 7,76 (1H, m); 7,69 (2H, d, $J = 7,0$), 7,56 (2H, d, $J = 7,0$ Hz); 7,53 (1H, m); 7,45 (1H, $J = 7,0$ Hz).⁵⁸

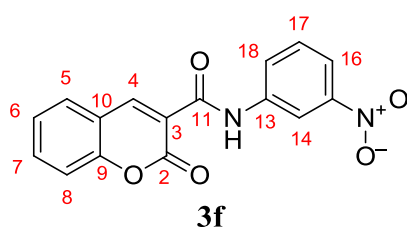
N-(2-nitrofenil)-3-carboxiamida-cumarina (3e): Sólido amarelo; 80%; P.F. 243 °C.



Lit.: 226-227 °C.⁵⁷ **EM (m/z):** 264 (11%), 173 (93%), 89 (100%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 12,56 (1H, s, NH); 9,00 (1H, s, H4); 8,75 (1H, dd, $J = 8,5$, 1,2 Hz, H15); 8,22 (1H, dd, $J = 8,4$, 1,4 Hz, H18), 7,77 – 7,65 (3H, m, H5, H7 e H17), 7,49 – 7,38 (2H, m, H6 e H8);

7,29 (1H, dd, $J = 8,4$, 1,1 Hz, H16). **Lit.: RMN de ^1H [CDCl_3 , 250 MHz] δ :** 12,57 (1H, s, NH); 9,00 (1H, s, H-4); 8,75 (1H, d, $J = 8,0$, H-6'); 8,21 (1H, dd, $J = 8,3$, 1,4 Hz, H-5'); 7,78 – 7,64 (3H, m, H-6, H-7, H-6'); 7,49 – 7,37 (2H, m, H-8, H-5), 7,33 – 7,22 (1H, m, H-4').⁵⁷

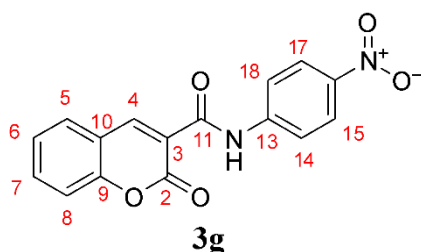
N-(3-nitrofenil)-3-carboxiamida-cumarina (3f): Sólido branco; 82%; P.F. 292 °C.



EM (m/z): 310 (2%), 173 (100%), 89 (84%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 11,14 (1H, s, NH); 9,06 (1H, s, H4); 8,73 (1H, t, $J = 2,1$ Hz, H14); 8,01 – 8,05 (2H, m, H16 e H18), 7,80 – 7,72 (2H, m, H5 e H7), 7,57 – 7,51 (1H, dd, $J = 14,9$, 6,8 Hz, H17);

7,49 – 7,43 (2H, m, H6 e H8).

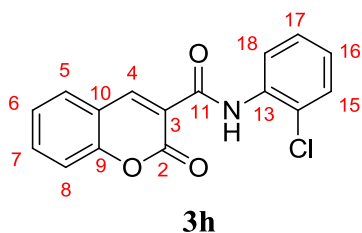
N-(4-nitrofenil)-3-carboxiamida-cumarina (3g): Sólido branco; 79%; P.F. 366 °C.



EM (m/z): 310 (3%), 173 (100%), 89 (84%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 11,27 (1H, s, NH); 9,05 (1H, s, H4); 8,28 (2H, d, $J = 9,1$ Hz, H15 e H17); 7,94 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H14 e H18), 7,80 – 7,73 (2H, m, H5 e H7), 7,52 – 7,44 (2H, m, H6 e H8).

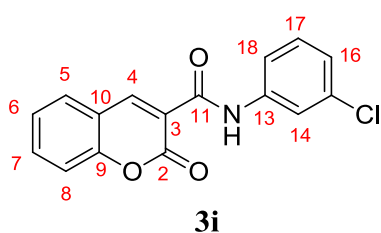
N-(2-clorofenil)-3-carboxiamida-cumarina (3h): Sólido branco; 92%; P.F. 238 °C.

Lit.: 220-221 °C.⁵⁷ **EM (m/z):** 299 (5,3%), 173 (100%), 264 (61%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 11,34 (1H, s, NH); 9,02 (1H, s, H4); 8,56 (1H, dd, $J = 8,2$, 1,0



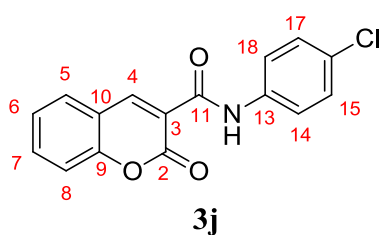
Hz, H15); 7,77 – 7,68 (2H, m, H5 e H7), 7,49 – 7,39 (3H, m, H6, H8 e H17); 7,33 (1H, m, H18); 7,14 – 7,07 (1H, m, H16). **Lit.: RMN de ^1H [CDCl_3 , 250 MHz] δ :** 11,34 (1H, s, NH); 9,02 (1H, s, H-4); 8,56 (1H, dd, $J = 8,2, 1,5$ Hz, H-5'); 7,76 – 7,67 (1H, m, , H-8 e H-3'); 7,47 – 7,26 (4H, m, H-6, H-4' H-5' e H-6'); 7,10 (1H, dt, $J = 7,7, 1,5$ Hz H-7).⁵⁷

N-(3-clorofenil)-3-carboxiamida-cumarina (3i): Sólido amarelo esverdeado; 84%;



P.F. 248 °C. **Lit:** 240 °C.⁵⁹ **EM (m/z):** 299 (14%), 173 (100%), 89 (34%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 10,90 (1H, s, NH); 9,02 (1H, s, H4); 7,90 (1H, t, $J = 1,8$ Hz, H14); 7,78 – 7,69 (2H, m, H5 e H7), 7,56 (1H, dd, $J = 8,2, 1,0$ Hz, H18), 7,47 – 7,41 (2H, dd, $J = 16,3, 8,4$ Hz, H6 e H8); 7,30 (1H, t, $J = 8,2$ Hz, H16); 7,14 (1H, dd, $J = 8,0, 0,9$ Hz, H17).

N-(4-clorofenil)-3-carboxiamida-cumarina (3j): Sólido amarelo; 75%; **P.F.** 260 °C;



Lit: 250 °C.⁵⁹ **EM (m/z):** 299 (16%), 173 (100%), 89 (32%). **RMN de ^1H [CDCl_3 , 400 MHz] δ :** 10,88 (1H, s, NH); 9,02 (1H, s, H4); 7,76 – 7,69 (4H, m, H5, H7, H15 e H17); 7,47 – 7,41 (2H, dd, , $J = 16,2, 8,2$ Hz, H6 e H8); 7,34 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, H14 e H18).

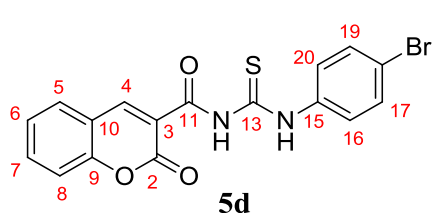
4.5 METODOLOGIA GERAL PARA AS TENTATIVAS DE OBTENÇÃO DAS CUMARILTIOUREIAS

De modo geral, em um balão de fundo redondo, acoplado a um condensador de refluxo, reagiu-se o ácido cumarínico (**1**; 0,15 g; 1,0 eq.) com o cloreto de tionila (SOCl_2 , 5,0 ou 20,0 eq.), sob refluxo e agitação magnética por 4 horas ou 2h30. Na sequência, o excesso de SOCl_2 foi removido com o auxílio do rotaevaporador, obtendo-se o cloreto do ácido cumarínico (**2**). Então, uma solução de tiocianato de amônio (1,0 ou 2,0 eq.) em 10 mL de acetona seca foi adicionada sobre o cloreto **2**, permanecendo sob refluxo e agitação magnética por um período que variou de 15 min a 4 horas. Em alguns casos, a adição inversa, tiocianato sobre o cloreto também foi realizada, conforme descrito na Seção 3.3. Posteriormente, adicionou-se à mistura reacional uma solução da anilina correspondente (0,8, 1,0, 1,2, 2,0, 3,0 ou

4,0 eq.) em 5 mL de acetona seca, permanecendo ainda sob agitação e refluxo até o término da reação, acompanhado por CCD (eluente: CH₂Cl₂ ou acetato de etila: hexano (1:1), revelador: ninhidrina). Em seguida, a solução foi vertida em um béquer contendo gelo triturado e o precipitado obtido foi então filtrado a vácuo e lavado com água destilada e éter etílico gelados (ambos 3 x 5 mL), obtendo-se sólidos amarelos, que foram identificados como uma mistura de produtos, com rendimentos brutos que variaram de 17 a 92%.

Os produtos **5d** e **5j** foram obtidos após purificação por coluna cromatográfica, utilizando sílica gel 60 (0,063–0,040 mm, Merck) como fase estacionária. Para o produto **5d** utilizou-se uma coluna de 10 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, utilizando como fase móvel um gradiente de hexano e acetato de etila. Para o segundo produto (**5j**) utilizou-se uma coluna de 30 cm de altura e 1,2 cm de diâmetro e, como fase móvel, um gradiente de hexano, acetato de etila e diclorometano.

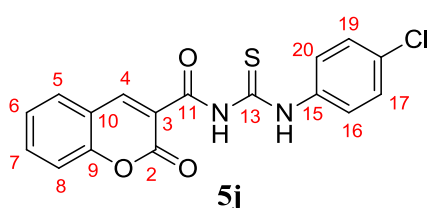
N-((4-bromofenil)carbamotioil)-3-carboxiamida-cumarina (5d): Sólido amarelo;



4%. **P.F. Lit:** 238 – 240 °C.⁷⁵ **EM (m/z):** 197 (34%), 169 (11%), 49 (100%). **RMN de ¹H [CDCl₃, 400 MHz] δ:** 12,49 (1H, s, NH); 11,88 (1H, s, NH); 8,99 (1H, s, H4); 7,81 – 7,76 (2H, m, H5 e H7); 7,68 –

7,64 (2H, m, H17 e H19); 7,55 – 7,52 (2H, m, H16 e H20), 7,50 – 7,44 (2H, m, H6 e H8).

N-((4-clorofenil)carbamotioil)-3-carboxiamida-cumarina (5j): Sólido amarelo;



75%; **P.F.** 215 °C. **Lit:** 236 – 237 °C.⁷⁵ **RMN de ¹H [CDCl₃, 400 MHz] δ:** 12,42 (1H, s, NH); 11,82 (1H, s, NH); 8,92 (1H, s, H4); 7,72 (2H, dd, *J* = 12,6, 4,5 Hz, H5 e H7); 7,64 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, H17 e H19); 7,43 –

7,37(2H, m, H6 e H8); 7,32 (2H, d, *J* = 8,8 Hz H16 e H20). **RMN de ¹³C [CDCl₃, 100 MHz] δ:** 178,01 (C13); 161,37 (C2); 160,38 (C11); 155,07 (C9); 151,21 (C4); 136,24 (C15); 135,89 (C7); 132,05 (C18); 130,39 (C5); 129,03 (C16 e C20); 125,86 (C8); 125,25 (C17 e C19); 118,24 (C3); 117,15 (C10); 116,36 (C6).

4.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

4.6.1 Micro-organismos Utilizados

Cepas bacterianas de interesse médico, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Escherichia coli* ATCC25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 foram utilizadas neste estudo. Estes micro-organismos pertencem à coleção dos Laboratórios de Bacteriologia Básica e Aplicada (LBBA) e Biologia Molecular de Micro-organismos (LBMM), do Departamento de Microbiologia (DM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

4.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os testes de atividade antibacteriana foram realizados sob responsabilidade do Professor Gerson Nakazato no Departamento de Microbiologia (DM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

A determinação das CIMs foi realizada em triplicata por ensaios de microdiluição em microplacas de 96 poços (Corning®), conforme padronização do *Clinical Laboratory Standard Institute*⁷⁵. Diferentes concentrações do ácido 3-carboxicumarínico **1** e das cumarilamidas **3a**, **3d**, **3g** e **3j** ($62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram testadas. Colônias bacterianas, crescidas durante 18-24 h em ágar Mueller-Hinton (MH) (Difco®), foram diluídas em salina esterilizada, e a quantidade de bactérias ajustada na escala 0,5 de McFarland, que corresponde a $1,5 \cdot 10^8$ bactérias mL^{-1} . As suspensões bacterianas foram diluídas em caldo MH (Difco®), colocadas em microplacas de 96 poços a uma concentração de aproximadamente $5,0 \cdot 10^5$ UFC mL^{-1} . Como controle negativo foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®) em caldo MH (Difco®) nas concentrações iguais às usadas para diluir as cumarinas. As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 18 h e, em seguida, a leitura foi realizada através da turbidez. A CIM correspondeu a menor concentração do composto em que não houve crescimento bacteriano visível (turbidez).

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBATERIANA

Os testes de atividade antimicobacteriana foram realizados sob responsabilidade da pesquisadora Maria Cristina da Silva Lourenço no Departamento de Bacteriologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ – Rio de Janeiro).

A cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 (*American Type Culture Collection, Rockville, Md.*) foi subcultivada no ágar Middlebrook 7H10 (*Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.*). A suspensão foi preparada em 0,02% (v/v) de Tween 80 e 0,2% de albumina de soro bovino (*Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.*) e ajustada à uma turbidez correspondente a 1,0 da escala de McFarland. Posteriormente, a mistura foi diluída 1:25 em caldo 7H9GC (base de caldo Middlebrook 7H9) e casitona (Difco, Detroit, Michigan). As soluções dos compostos foram diluídas em meio 7H9GC até duas vezes o máximo da concentração final desejada no teste, antes da adição às microplacas. Subsequentemente, foram adicionados 200 µL de água deionizada e esterilizada em todo o perímetro exterior das placas de micropoços esterilizados (Nuncion™; Nunc A/S, Roskilde, Denmark), a fim de minimizar a evaporação do meio durante o período de incubação dos testes. As microplacas contendo 96 poços foram organizadas pelas linhas B a G, com colunas numeradas de 2 a 11, para receber 100 µL de meio 7H9GC. Em seguida, 100 µL de solução dos compostos teste foram adicionados nos poços das linhas B a G, nas colunas 2 e 3, utilizando uma pipeta de multicanal, sendo o conteúdo de cada poço homogeneizado posteriormente. As diluições idênticas de 1:2 em série foram realizadas através das colunas restantes (exceto a coluna 11). Os intervalos de concentração final de composto foram de 100 a 3,2 µg/mL.

A inoculação do *M. tuberculosis* foi realizada através da adição de 100 µL de inóculo aos poços nas filas B a G nas colunas 2 a 11 utilizando uma pipeta de repetição, originando um volume final de 200 µL por poço. As placas (realizadas em triplicata) foram na sequência seladas com Parafilm® e incubadas a 37 °C durante 5 dias. O reagente de Alamar Blue e 10% de Tween 80 foram adicionados à coluna B11 (controle de viabilidade celular) e as placas reincubadas a 37 °C por 24h. Se o poço B11 adquiriu a coloração rosa, a mistura do reagente foi adicionada a todos os poços restantes das microplacas, sendo novamente vedadas com Parafilm® e

incubadas durante mais 24 h a 37 °C. Após este período, as cores de todos os poços registradas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de substância-teste que impediu a mudança de cor de azul para rosa.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que as cumarilamidas (**3a-j**) foram obtidas em ótimos rendimentos (75 a 92%), ressaltando-se que dentre as dez amidas sintetizadas, três são inéditas na literatura (3-Br, 3-NO₂ e 4-NO₂). Todavia, as cumarilamidas **3a**, **3d**, **3g** e **3j**, testadas quanto a sua atividade antibacteriana frente as cepas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* apresentaram CIM acima de 500 µg mL⁻¹. Além disso, não foi possível inferir a atividade antimicobacteriana das cumarilamidas sintetizadas, devido à pouca solubilidade das mesmas no meio utilizado para o crescimento do *M. tuberculosis*. Como perspectiva, visa-se a síntese de novas cumarilamidas, agora inserindo cadeias alifáticas ligadas diretamente a carbonila da amida, com o intuito de melhorar a hidrossolubilidade dessas substâncias, para que se possa avaliar as suas atividades antibacteriana e antimicobacteriana. Uma vez que o perfil de solubilidade esteja otimizado, pretende-se avaliar o potencial biológico dessas moléculas com relação a diferentes atividades biológicas, tais como: antibacteriana, antifúngica, antimicobacteriana, antioxidante, antiparasitária e até mesmo antitumoral.

Em relação às cumariltioureas (**5a-j**), a síntese exclusiva dos compostos não foi alcançada. Contudo, duas amostras puderam ser isoladas, **5d** com rendimento de 4% e **5j** com rendimento de 75%. As mesmas serão encaminhadas para avaliação de suas atividades frente as bactérias abordadas nesse trabalho. Além disso, pretende-se continuar tentando realizar a separação das misturas de cumarilamidas e cumariltioureas de modo a se completar essa série de substâncias para avaliação de suas atividades biológicas.

REFERÊNCIAS

1 LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. Porto Alegre: 2016.

2 ALMEIDA, M.; et al. **Biologia**. 2016. Disponível em: <<http://biocmpa.blogspot.com/2016/04/esquema-estrutural-das-bacterias.html>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

3 TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; et al. **Microbiologia**. Porto Alegre: 2017.

4 ABCMED. **Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: o que são? Como é a técnica de Gram? Quais as vantagens de diferenciar as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas?**. 2014. Disponível em: <<https://www.abc.med.br/p/587007/bacterias-gram-positivas-e-gram-negativas-o-que-sao-como-e-a-tecnica-de-gram-quais-as-vantagens-de-diferenciar-as-bacterias-gram-negativas-e-gram-positivas.htm>>. Acesso em: 14 mar. 2019

5 KOSTECKI, M. E.; MIURA, T. Y. **Coloração de Gram**. Disponível em: <https://aia1317.fandom.com/pt-br/wiki/Colora%C3%A7%C3%A3o_de_Gram>. Acesso em: 14 mar. 2019.

6 MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; et al. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier Inc., 2014.

7 WHO. **Tuberculosis**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>>. Acesso em: 26 jan. 2019

8 WHO. **Salmonella**. 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))>. Acesso em: 26 jan. 2019

9 WHO. **Campylobacter**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>>. Acesso em: 26 jan. 2019

10 WHO. **Botulism**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/botulism>>. Acesso em: 26 jan. 2019

11 WHO. **E.coli**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>>. Acesso em: 26 jan. 2019

12 WHO. **Pneumonia**. 2016. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>>. Acesso em: 26 jan. 2019

13 WHO. **Antibiotic resistance**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>>. Acesso em: 26 jan. 2019

14 WHO. **WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption: 2016-2018 early implementation**. Geneva: World Health Organization; 2018.

15 OPAS. **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812>. Acesso em: 29 jan. 2019

16 KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: 2007.

17 LI, B.; PAI, R.; et al. Coumarin-Based Inhibitors of Bacillus anthracis and Staphylococcus aureus Replicative DNA Helicase: Chemical Optimization, Biological Evaluation, and Antibacterial Activities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 24, p. 10896–10908, 2012.

18 KURT, B.Z.; GAZIOGLU, I.; et al. Synthesis, Anticholinesterase, Antioxidant, and Anti-Aflatoxigenic Activity of Novel Coumarin Carbamate Derivatives. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 14, p. 3978–3983, 2018.

19 SHAILESH, K.; DEVDUTT, C.; et al. Synthesis and Antimicrobial Activity of Novel 3,7-Disubstituted 2H-1- Benzopyran-2-Ones. **Medicinal chemistry**, v. 07, n. 04, p. 857–864, 2017.

20 SALCI, T.P.; SALCI, M.A.; et al. Microepidemia familiar por Trichophyton tonsurans. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 1003–1006, 2011.

21 YOU, L.; AN, R.; et al. Discovery of novel osthole derivatives as potential anti-breast cancer treatment. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 24, p. 7426–7428, 2010.

22 MATTSSON, C.; SVENSSON, P.; et al. A novel series of 6-substituted 3-(pyrrolidin-1-ylmethyl)chromen-2-ones as selective monoamine oxidase (MAO) A

inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 73, p. 177–186, 2014.

23 FRÉDÉRIC, R.; CHARLIER, C.; et al. Investigation of mechanism-based thrombin inhibitors: Implications of a highly conserved water molecule for the binding of coumarins within the S pocket. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 7, p. 2017–2021, 2006.

24 MLADENOVIĆ, M.; MIHAILOVIĆ, M.; et al. In Vitro Antioxidant Activity of Selected 4-Hydroxy-chromene-2-one Derivatives—SAR, QSAR and DFT Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 2822–2841, 2011.

25 SALEM, M.A.; HELAL, M.H.; et al. An overview on synthetic strategies to coumarins. **Synthetic Communications**, v. 48, n. 13, p. 1534–1550, 2018.

26 CUNHA, S.; IUNES, C.E.M.; et al. Síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos e sua aplicação na síntese total da aiapina, cumarina e umbeliferona. **Química Nova**, v. 38, n. 8, p. 1125–1131, 2015.

27 DITTMER, D.C.; LI, Q.; et al. Synthesis of Coumarins, 4-Hydroxycoumarins, and 4-Hydroxyquinolinones by Tellurium-Triggered Cyclizations 1. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 12, p. 4682–4686, 2005.

28 PADMANABHAN, S.; OGAWA, T.; et al. Formation of Furan Derivatives from Phenacyl Bromides and Sodium Telluride; Attempted Extension to Coumarin Synthesis. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 62, n. 6, p. 2114–2116, 1989.

29 MI, X.; WANG, C.; et al. Preparation of 3-Acyl-4-arylcoumarins via Metal-Free Tandem Oxidative Acylation/Cyclization between Alkynoates with Aldehydes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 148–155, 2015.

30 RONG, L.; LI, X.; et al. Efficient Green Procedure for the Synthesis of Coumarin Derivatives by a One-Pot, Three-Component Reaction under Solvent-Free Conditions. **Synthetic Communications**, v. 37, n. 2, p. 183–189, 2007.

31 JIANG, Y.; CHEN, W.; et al. Synthesis of 3-arylcoumarins through N-heterocyclic carbene catalyzed condensation and annulation of 2-chloro-2-arylacetaldehydes with salicylaldehydes. **Tetrahedron**, v. 69, n. 18, p. 3669–3676, 2013.

32 KAWAAI, K.; YAMAGUCHI, T.; et al. Photoinduced Generation of Acyl Radicals

from Simple Aldehydes, Access to 3-Acyl-4-arylcoumarin Derivatives, and Evaluation of Their Antiandrogenic Activities. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 1988–1996, 2018.

33 CHOI, H.; KIM, J.; et al. Metal-free, Brønsted acid-mediated synthesis of coumarin derivatives from phenols and propiolic acids. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 32, p. 3600–3603, 2016.

34 ANDREOLI, F.; DOUKARA, A.L.; et al. Novel phenyl(thio)ureas bearing (thio)oxothiazoline group as potential BACE-1 inhibitors: Synthesis and biological evaluation. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 153–162, 2013.

35 DAS, B.; YAN, R. Role of BACE1 in Alzheimer's synaptic function. **Translational Neurodegeneration**, v. 6, n. 1, p. 23, 2017.

36 ABBAS, S.Y.; EL-SHARIEF, M.A.M.S.; et al. Thiourea derivatives incorporating a hippuric acid moiety: Synthesis and evaluation of antibacterial and antifungal activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 111–120, 2013.

37 ZAIB, S.; SAEED, A.; et al. New aminobenzenesulfonamide-thiourea conjugates: Synthesis and carbonic anhydrase inhibition and docking studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 78, p. 140–150, 2014.

38 SUN, Y.; SHAN, Y.; et al. Discovery of novel anti-angiogenesis agents. Part 8: Diaryl thiourea bearing 1H-indazole-3-amine as multi-target RTKs inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 373–385, 2017.

39 KANG, I.; WANG, L.-W.; et al. Design and efficient synthesis of novel arylthiourea derivatives as potent hepatitis C virus inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 21, p. 6063–6068, 2009.

40 BRITO, T.O.; SOUZA, A.X.; et al. Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. **RSC Advances**, v. 5, n. 55, p. 44507–44515, 2015.

41 BRITO, T. de O. **Benzoiltioureas: síntese, atividade antimicobacteriana, antiureolítica e estudo de interação com urease por RMN**. 2017. p. 282. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Química Associado, UEL-UEPG-Unicento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

42 FENHUA, W.; QIN, Z.; et al. Synthesis and Fungicidal Activity of 1,3,4-Oxadiazole Substituted Acylthioureas. **Frontiers of Chemistry in China**, v. 1, n. 1, p. 112–114, 2006.

43 VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; et al. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.

44 STRUPCZEWSKI, J.D., ELLIS, D.B. Chapter 33. To Market, To Market - 1991. 1992, p. 321–337.

45 LIMA, L.M.; FRATTANI, F.S.; et al. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate–acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 348–356, 2008.

46 BALDWIN, J.J.; LUMMA, W.C.; et al. Symbiotic approach to drug design: antihypertensive .beta.-adrenergic blocking agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1284–1290, 1979.

47 BARREIRO, E.E.J.; FRAGA, C.M.A.M. New Insights for Multifactorial Disease Therapy: The Challenge of the Symbiotic Drugs. **Current Drug Therapy**, v. 3, p. 1–13, 2008.

48 LACERDA, R.B.; LIMA, C.K.F. de; et al. Discovery of novel analgesic and anti-inflammatory 3-arylamine-imidazo[1,2-a]pyridine symbiotic prototypes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 74–84, 2009.

49 REDDYRAJULA, R.; DALIMBA, U.; et al. Molecular hybridization approach for phenothiazine incorporated 1,2,3-triazole hybrids as promising antimicrobial agents: Design, synthesis, molecular docking and in silico ADME studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 168, p. 263–282, 2019.

50 DESHMUKH, M.N.; BURUD, R.; et al. A Practical and Environmentally Friendly Preparation of 3-Carboxycoumarins. **Synthetic Communications**, v. 33, n. 19, p. 3299–3303, 2003.

51 PIHLAJA, K.; SEILO, M.; et al. The Acidity and General Base-Catalyzed Hydrolysis of Meldrum's Acid and Its Methyl Derivatives. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 23, p. 3003–3010, 1969.

52 ARNETT, E.M.; MAROLDO, S.G.; et al. Ion Pairing and Reactivity of Enolate Anions. 5. Thermodynamics of Ionization of β -Di- and Tricarbonyl Compounds in Dimethyl Sulfoxide Solution and Ion Pairing of Their Alkali Salts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 22, p. 6759–6767, 1984.

53 CUNHA, S.; SANTANA, L.L.B. De Condensação de Knoevenagel de aldeídos aromáticos com o ácido de Meldrum em água: Uma aula experimental de química orgânica verde. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 642–647, 2012.

54 LENARDÃO, E.J.; FREITAG, R.A.; et al. “Green chemistry”: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.

55 PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; et al. **Introdução a Espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

56 SARD, H.; MELTZER, P.C.; et al. The Reaction Between an Azomethine and Malonyl Dichloride. **Journal of heterocyclic chemistry**, v. 22, p. 257, 1985.

57 FONSECA, A., MATOS, M., et al. Synthesis and Study of a Selected Series of Amides with the Coumarin Scaffold for the Treatment of Alzheimer’s Disease. In: **The 17th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry**. Basel, Switzerland: MDPI, 2013,

58 REDDY, N.S.; GUMIREDDY, K.; et al. Novel coumarin-3-(N-aryl)carboxamides arrest breast cancer cell growth by inhibiting ErbB-2 and ERK1. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 3141–3147, 2005.

59 GEORGE, M. V.; ITTYERAH, P.I. Condensation of o-, m- and p-chloromalonanilic acids with aldehydes. I. With benzaldehyde and o-, m- and p-hydroxybenzaldehydes. **Agra University Journal of Research**, v. 4, n. 2, p. 551–554, 1955.

60 CISSÉ, L.; TINE, A.; et al. Mass spectrometry study of coumarins: Correlation between charges of atoms and fragmentation processes. **Spectroscopy Letters**, v. 42, n. 2, p. 95–99, 2009.

61 LOPEZ-AVILA, V. Mass Spectral Fragmentation Studies of Coumarin-Type Compounds Using GC High-Resolution MS. **The Open Analytical Chemistry Journal**, v. 5, n. 1, p. 27–36, 2011.

62 LIDE, D.R. ed. **Handbook of Chemistry and Physics**. 2005.

63 COSTA, P.R.R.; FERREIRA, V.F.; et al. **Ácidos e Bases em Química Orgânica**. Porto Alegre: 2005.

64 KUTSCHY, P.; DZURILLA, M.; et al. Synthesis of Some Analogs of Indole Phytoalexins Brassinin and Methoxybrassinin B and Their Positional Isomers. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 64, n. 2, p. 348–362, 1999.

65 KURT, B.Z.; OZTEN KANDAS, N.; et al. Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-chalcone derivatives containing urea moiety as potential anticancer agents. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.

66 ARMAREGO, W.L.E.; CHAI, C.L.L. **Purification of Laboratory Chemicals**. Elsevier Science, 2003.

67 MACIEL, C.; CÂNDIDO, H. Infecção hospitalar: principais agentes e drogas administradas. **Veredas Favip**, v. 3, n. 1, p. 33–43, 2010.

68 SILVA, M.R. da; FENIMAN-DE-STEFANO, G.M.M.; et al. Solubilização da cumarina em meio aquoso e determinação da sua atividade antibacteriana. **Saúde (Santa Maria)**, v. 42, n. 2, p. 195–201, 2016.

69 FRANZBLAU, S.G.; WITZIG, R.S.; et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 362–366, 1998.

70 RAMPERSAD, S.N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012.

71 Molinspiration. Disponível em: <<http://www.molinspiration.com/>>. Acesso: 27. nov. 2018.

72 LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 4–17, 2012.

73 VEBER, D.F.; JOHNSON, S.R.; et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.

74 SAEED, A.; ZAIB, S.; et al. Synthesis, cholinesterase inhibition and molecular modelling studies of coumarin linked thiourea derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 63, p. 58–63, 2015.

75 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement, document M100-S21**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO ÁCIDO 3-CARBOXICUMARÍNICO

(1)

Figura 1A – Espectro de RMN de ^1H do composto 1

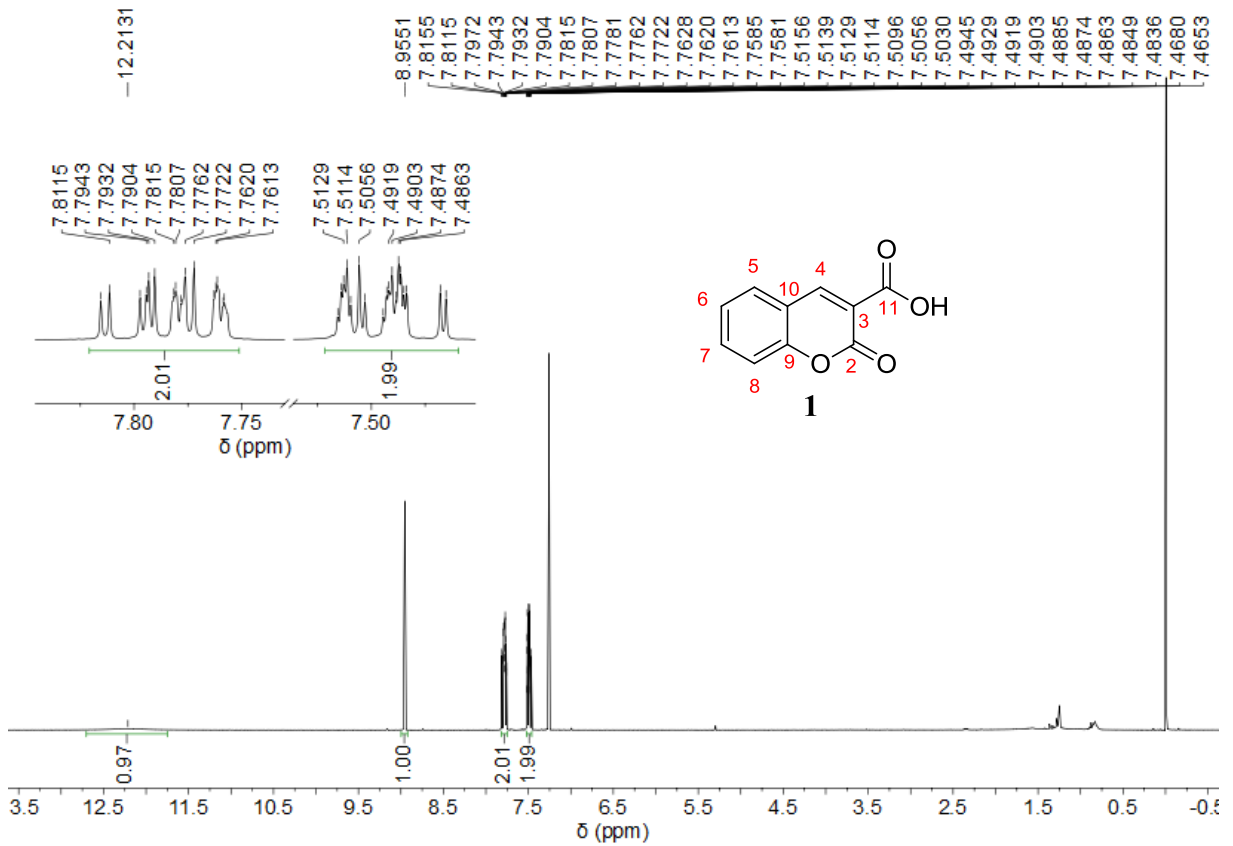


Figura 2A – Espectro de RMN de ^{13}C do composto 1

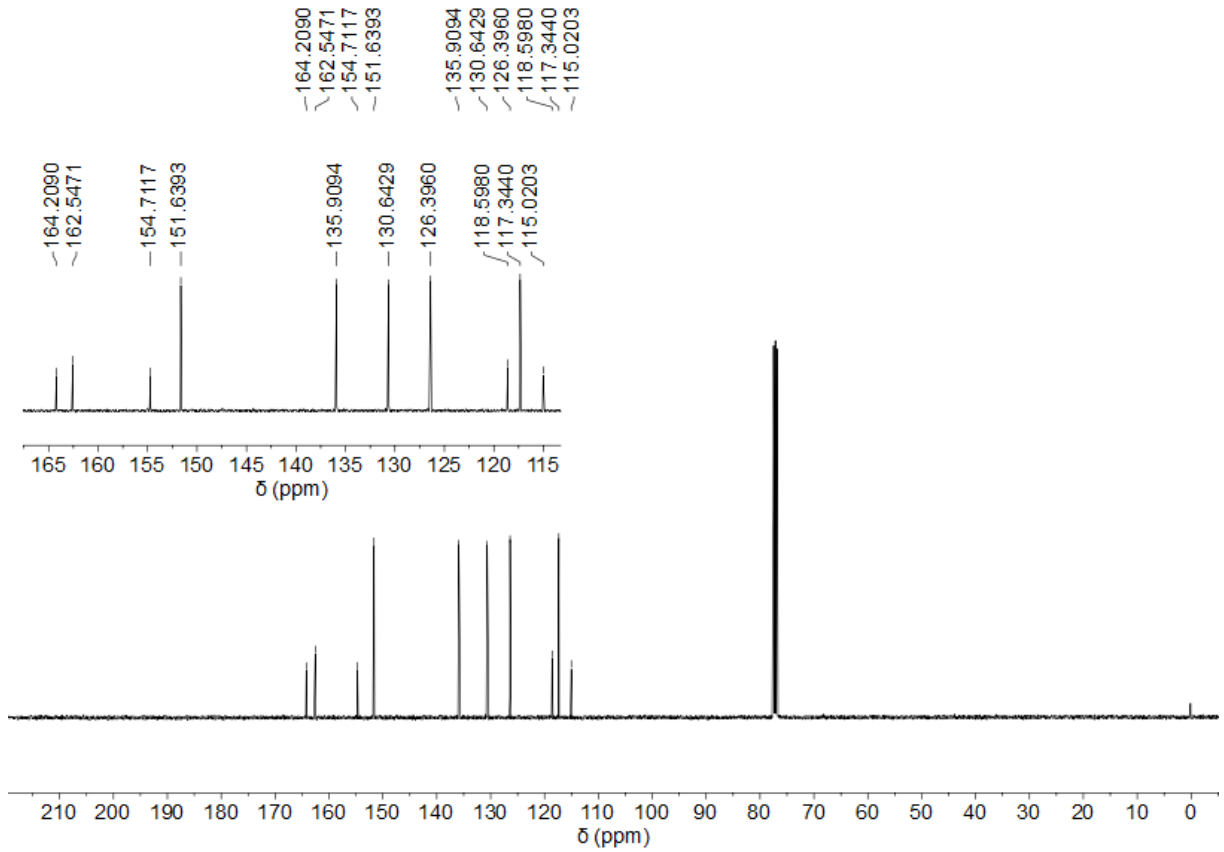
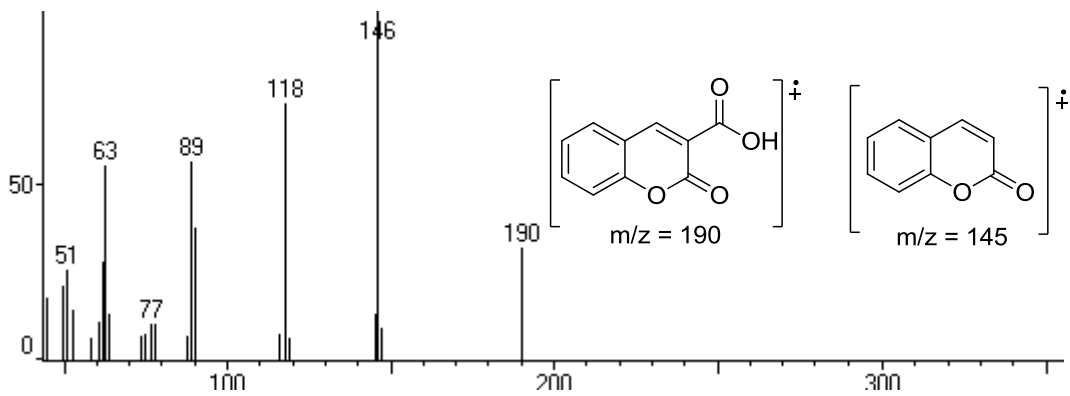


Figura 3A – Espectro de massas do composto 1 por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM)



APÊNDICE B – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO CLORETO DO ÁCIDO CUMARÍNICO
(2)

Figura 1B – Espectro de infravermelho do composto 2

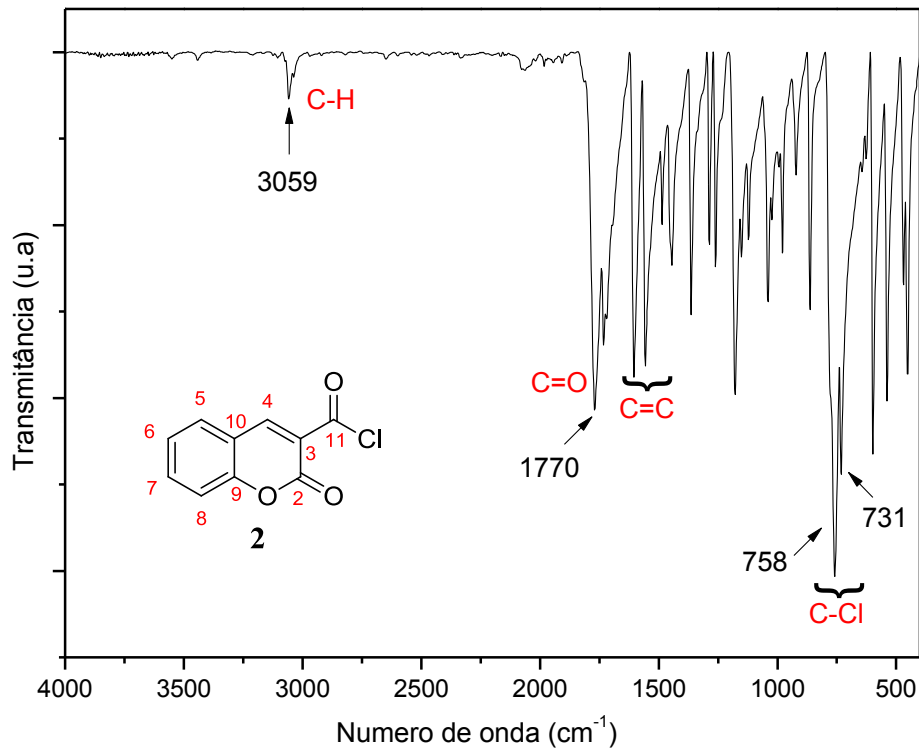


Figura 2B – Espectro de massas do composto 2 por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM)

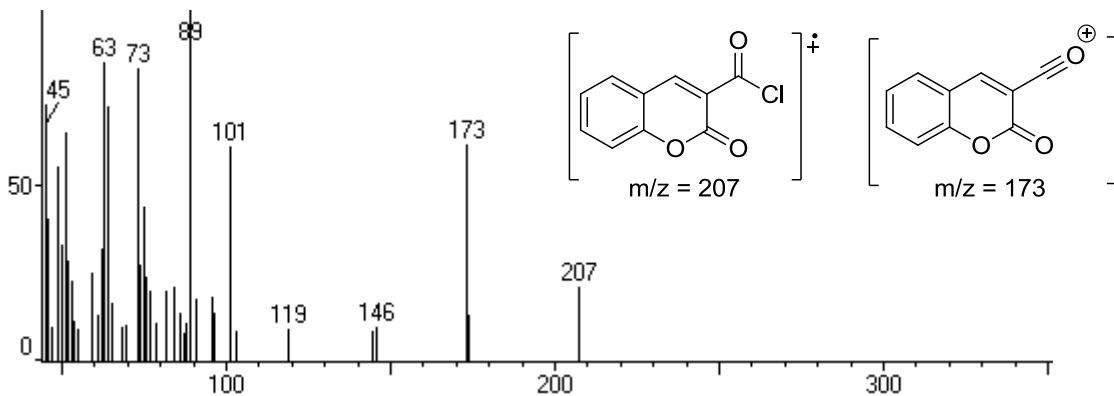
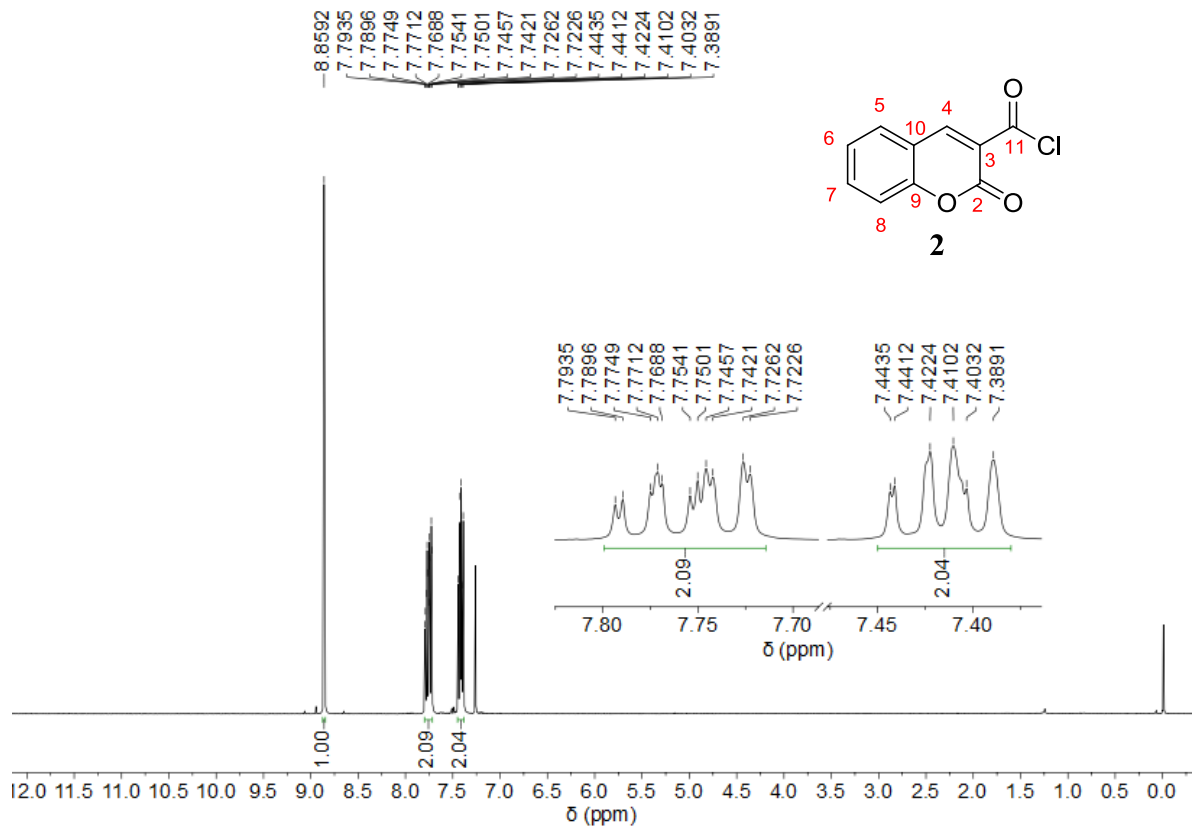


Figura 3B – Espectro de RMN de ^1H do cloreto do ácido 3-carboxicumarínico (**2**)

APÊNDICE C – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS CUMARILAMIDAS (**3A-J**)

Figura 1C – Espectro de RMN de ^1H do composto **3a**

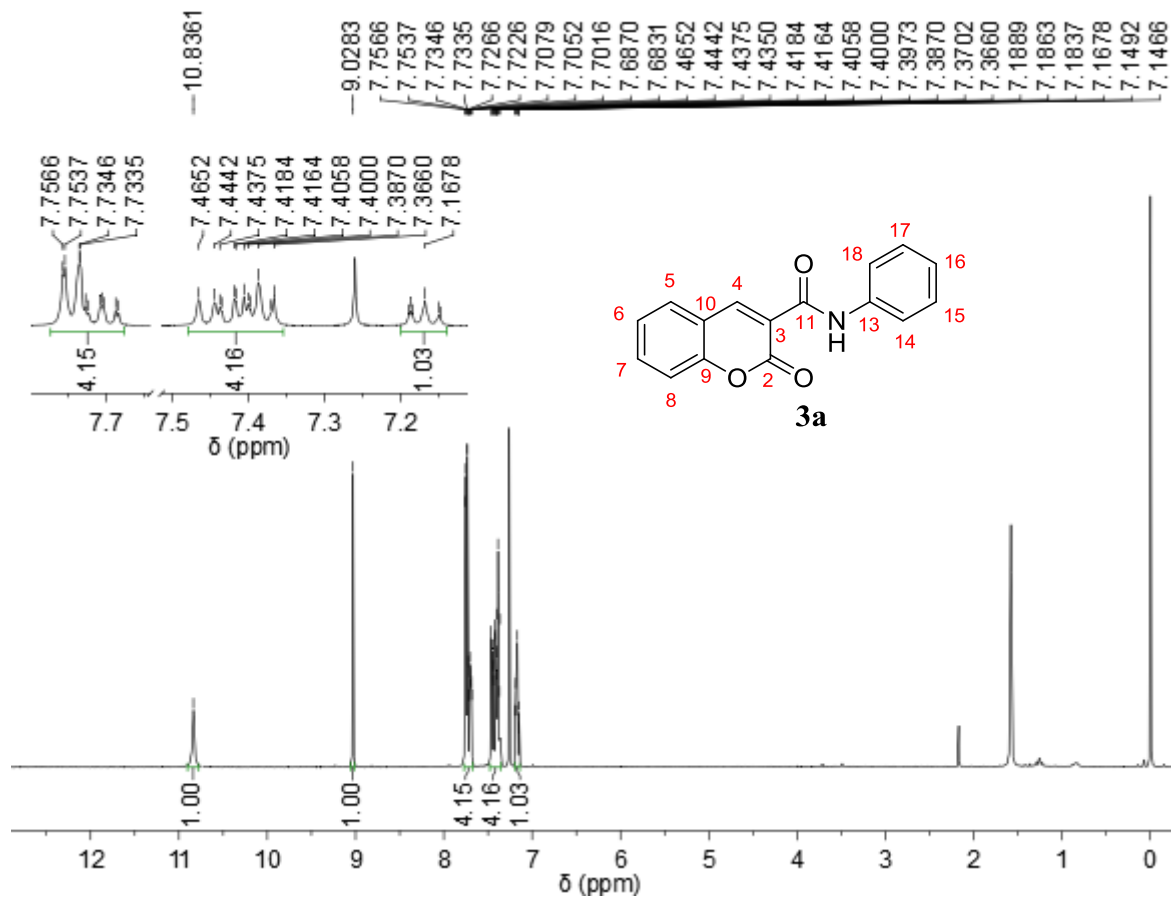


Figura 2C – Espectro de massas do composto **3a** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM)

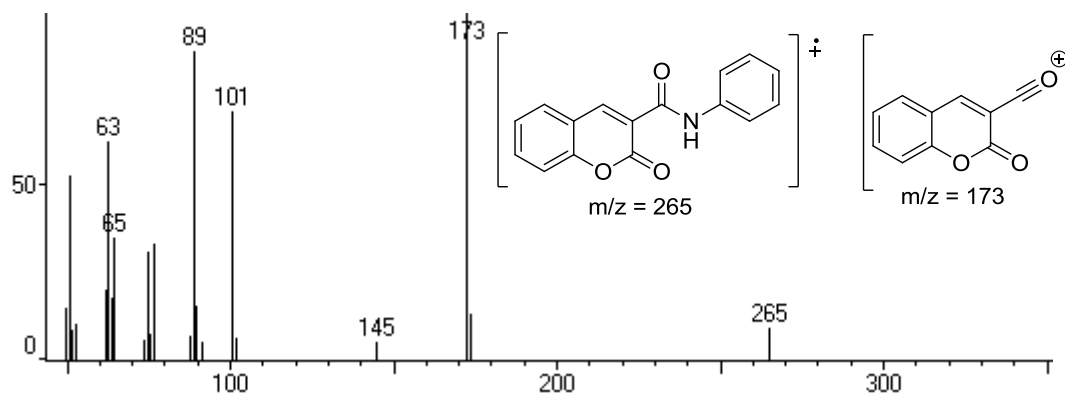


Figura 3C – Espectro de RMN de ^1H do composto **3b**

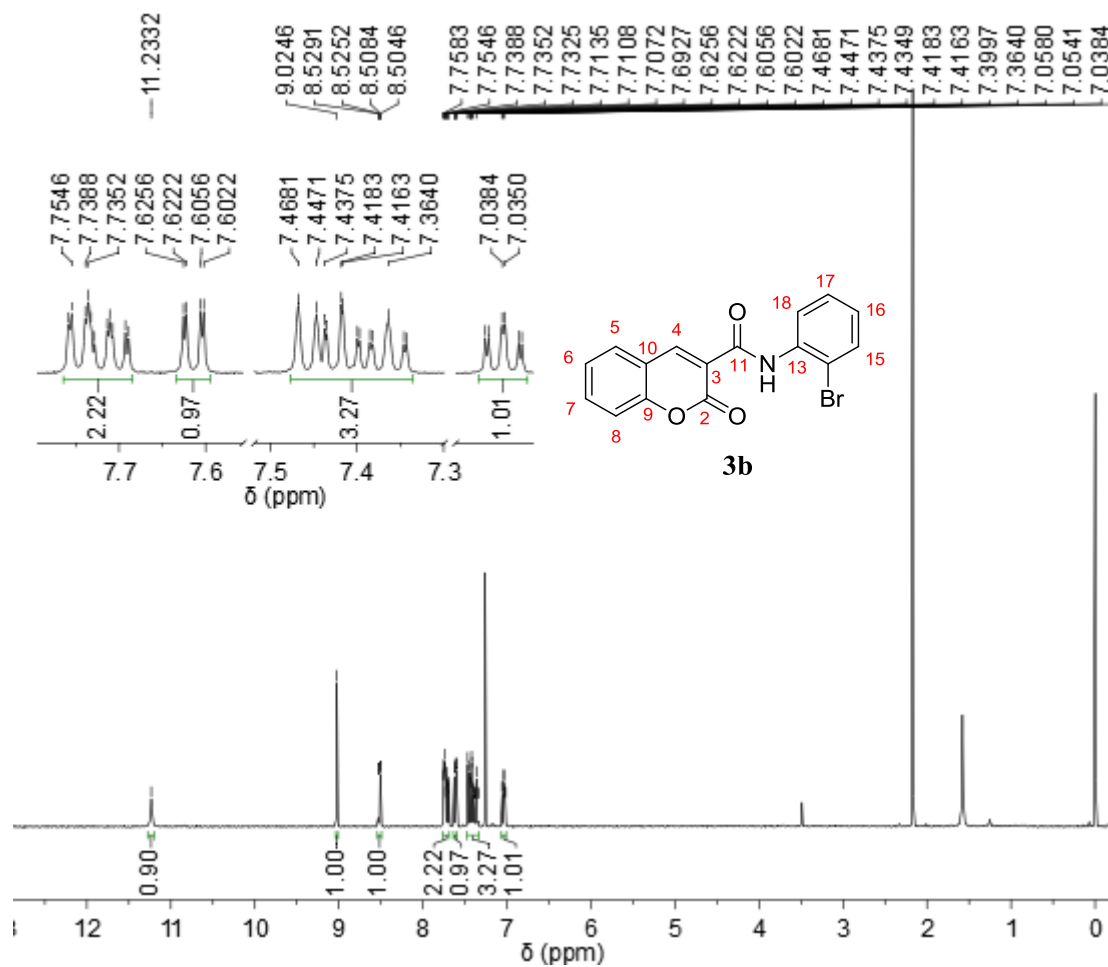


Figura 4C – Espectro de massas do composto **3b** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM)

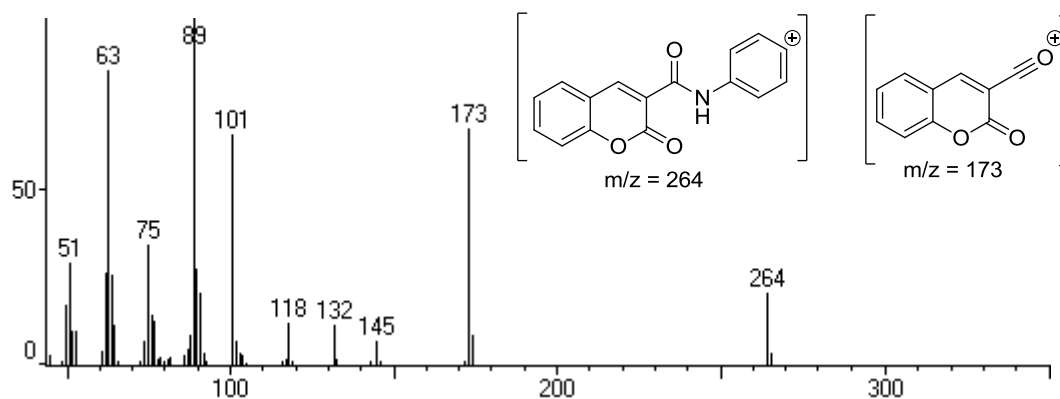


Figura 5C – Espectro de RMN de ^1H do composto **3c**

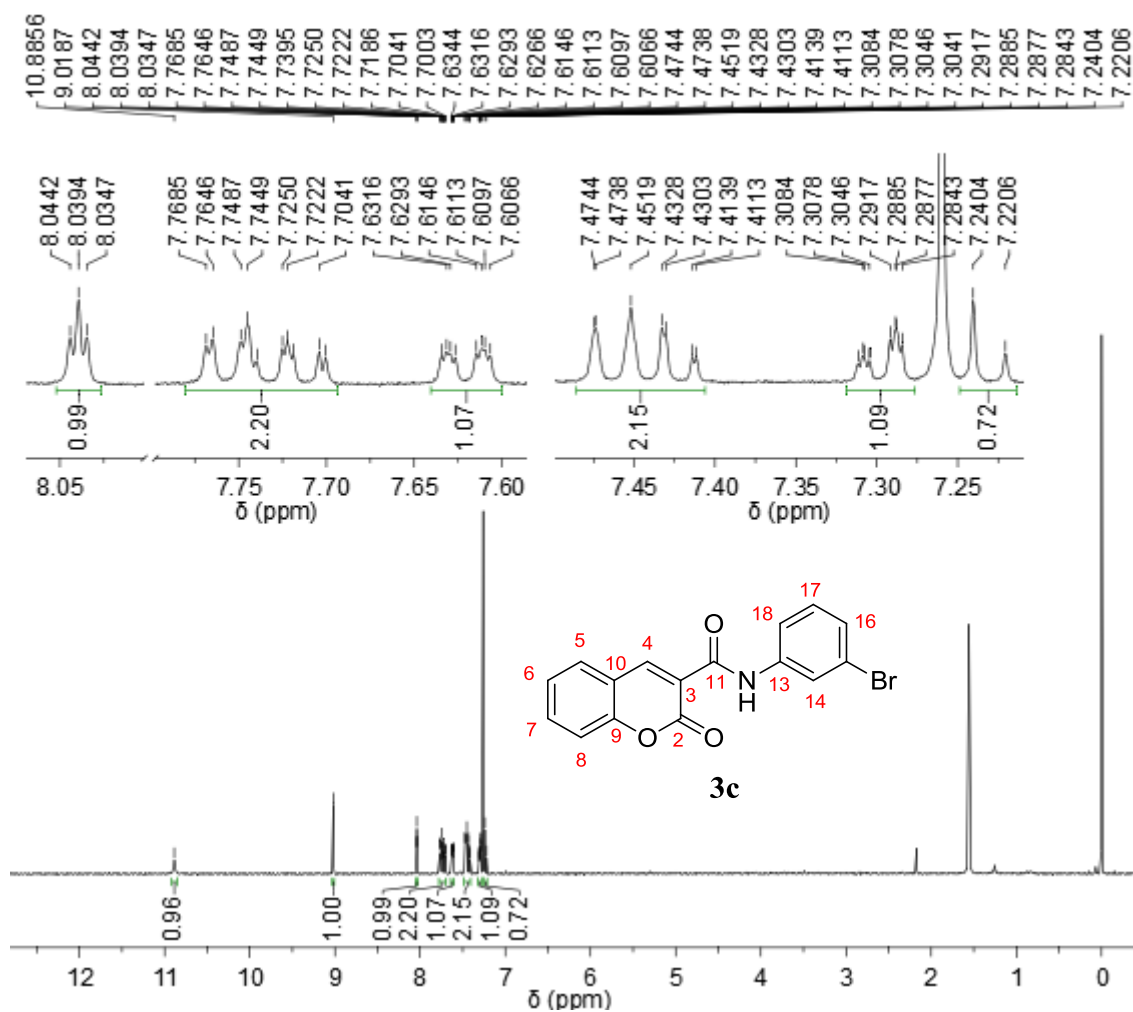


Figura 6C – Espectro de massas do composto **3c** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM)

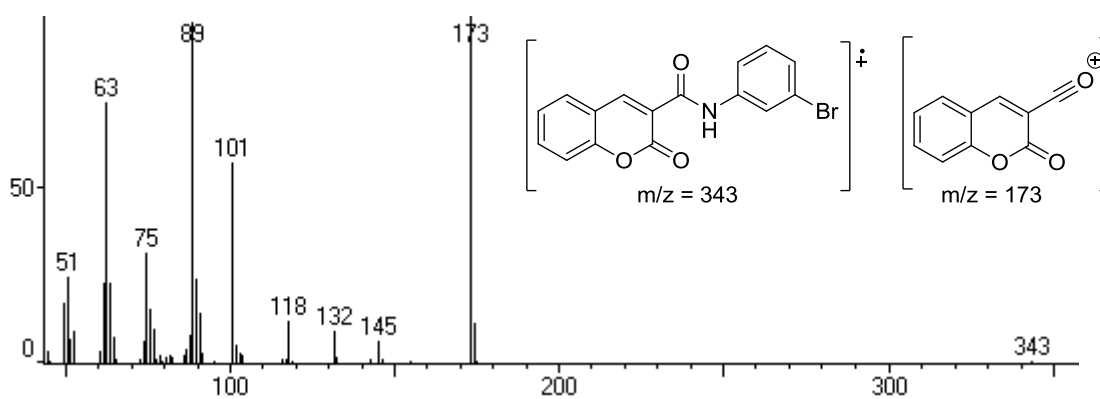


Figura 7C – Espectro de RMN de ^1H do composto **3d**

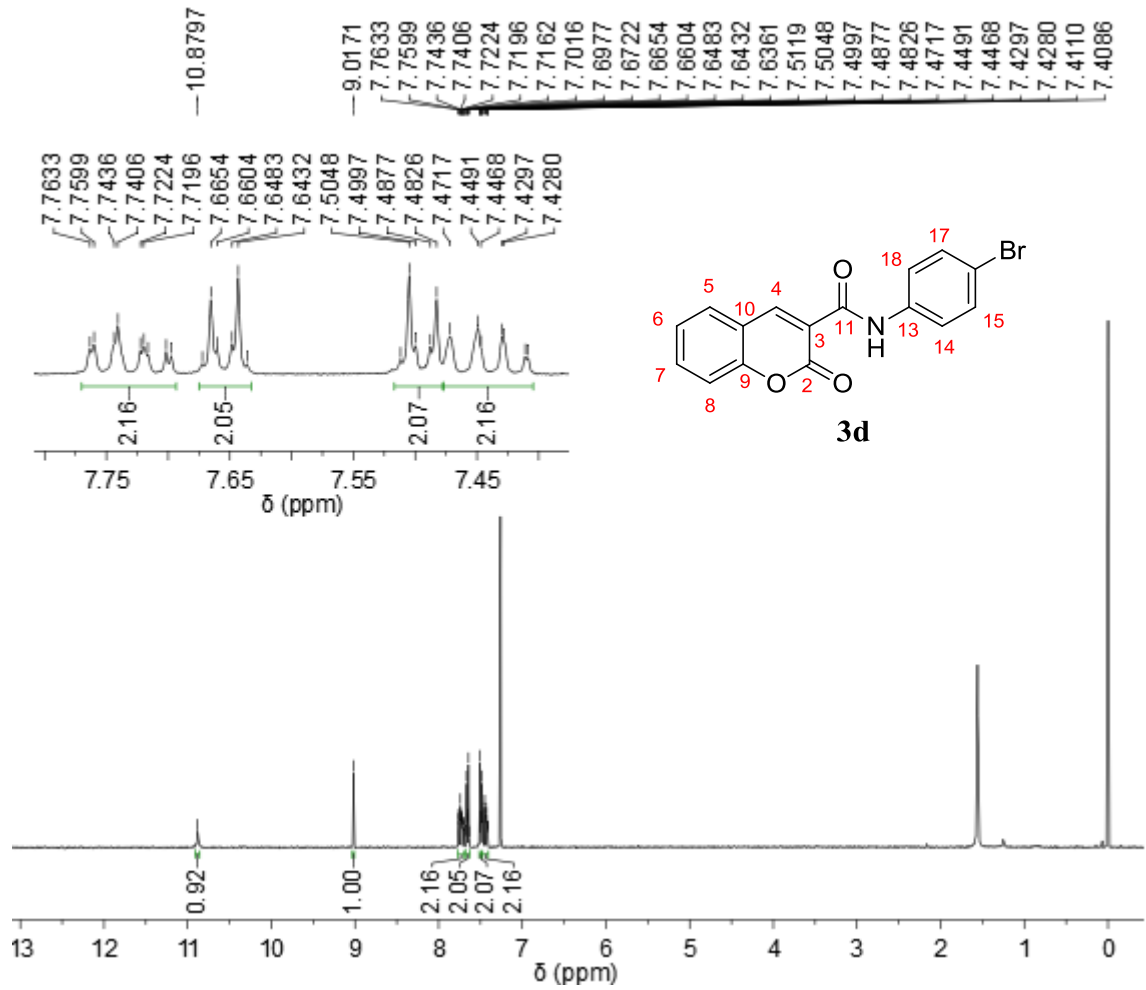


Figura 8C – Espectro de massas do composto **3d por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM)**

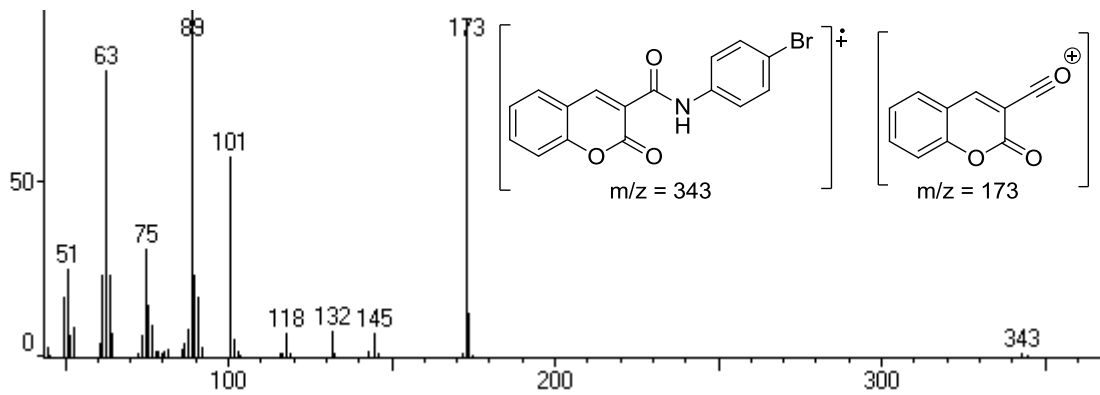


Figura 9C – Espectro de RMN de ^1H do composto **3e**

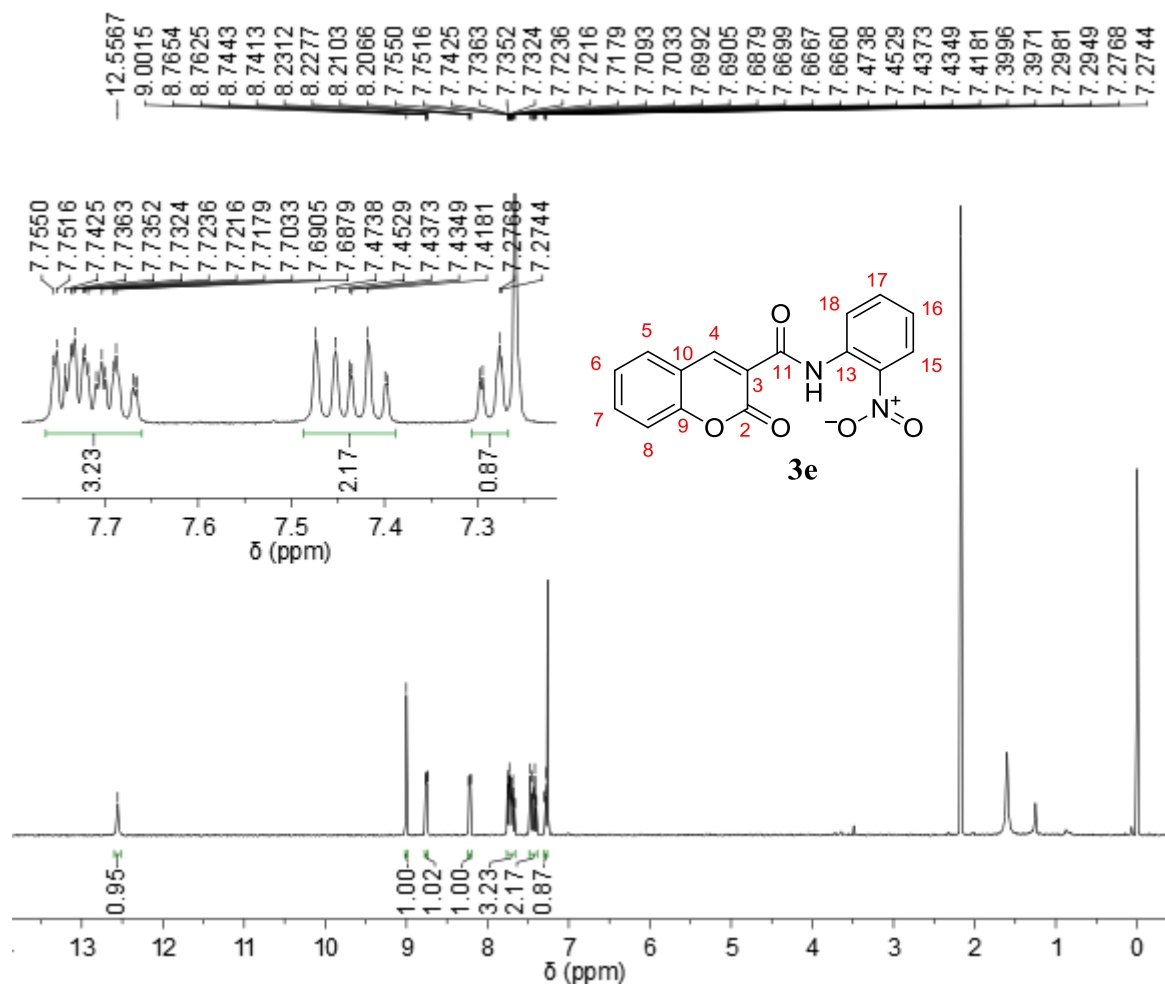


Figura 10C – Espectro de massas do composto **3e** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM)

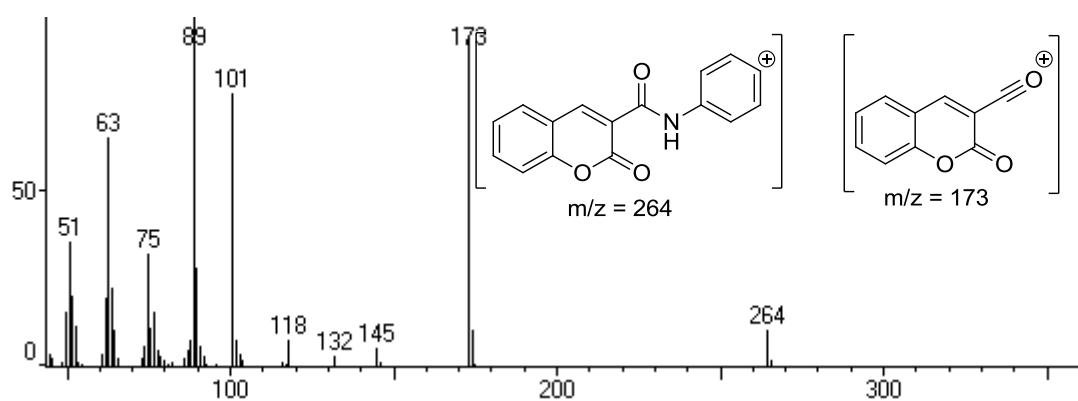


Figura 11C – Espectro de RMN de ^1H do composto **3f**

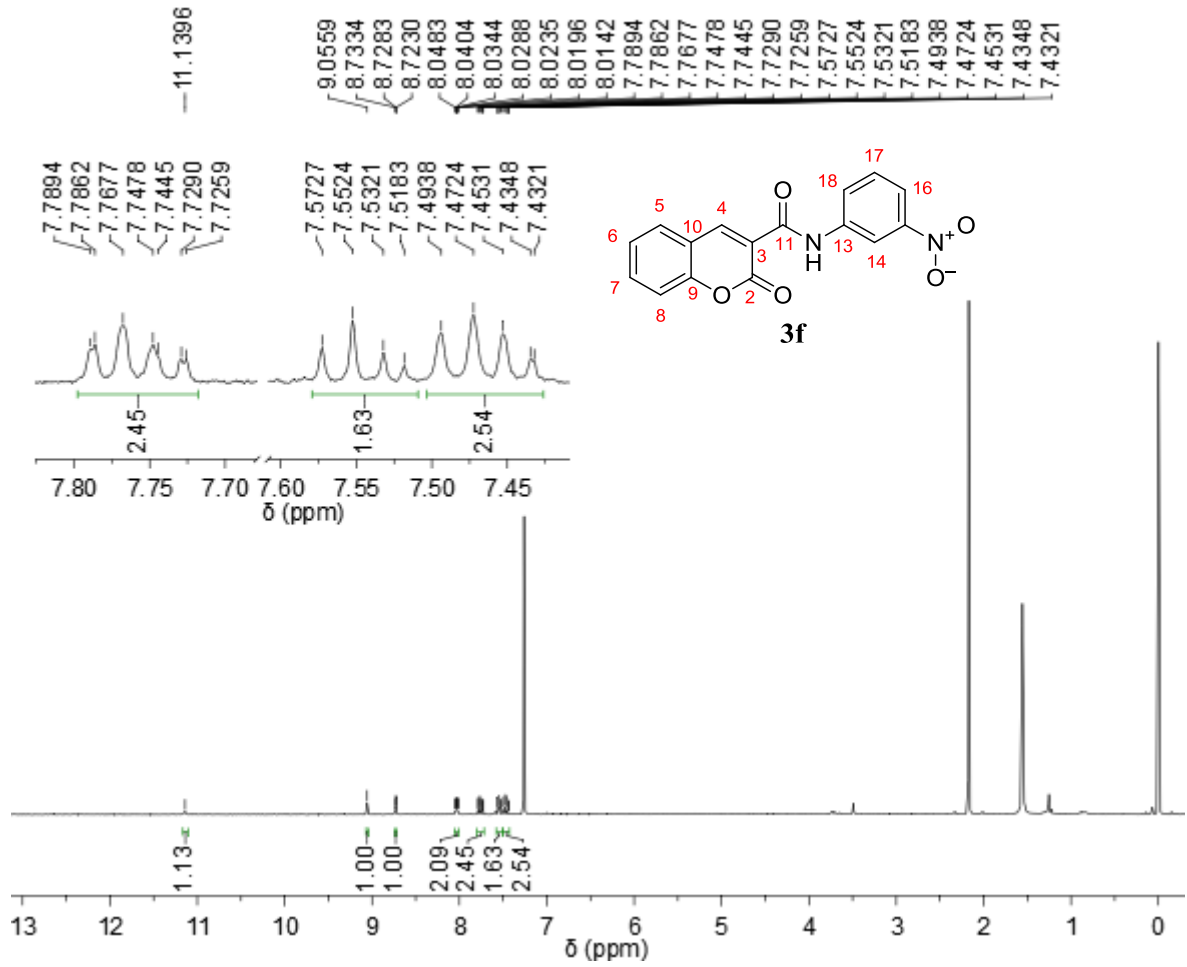


Figura 12C – Espectro de massas do composto **3f** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM)

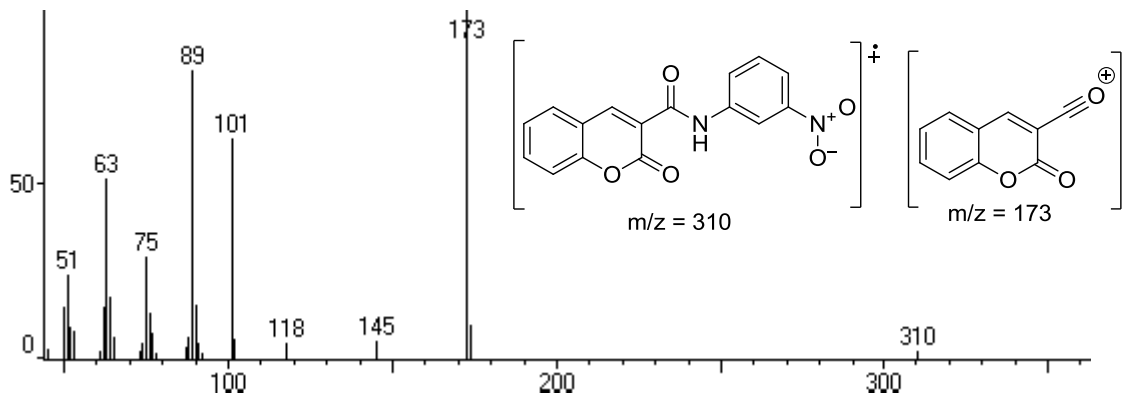


Figura 13C – Espectro de RMN de ^1H do composto **3g**

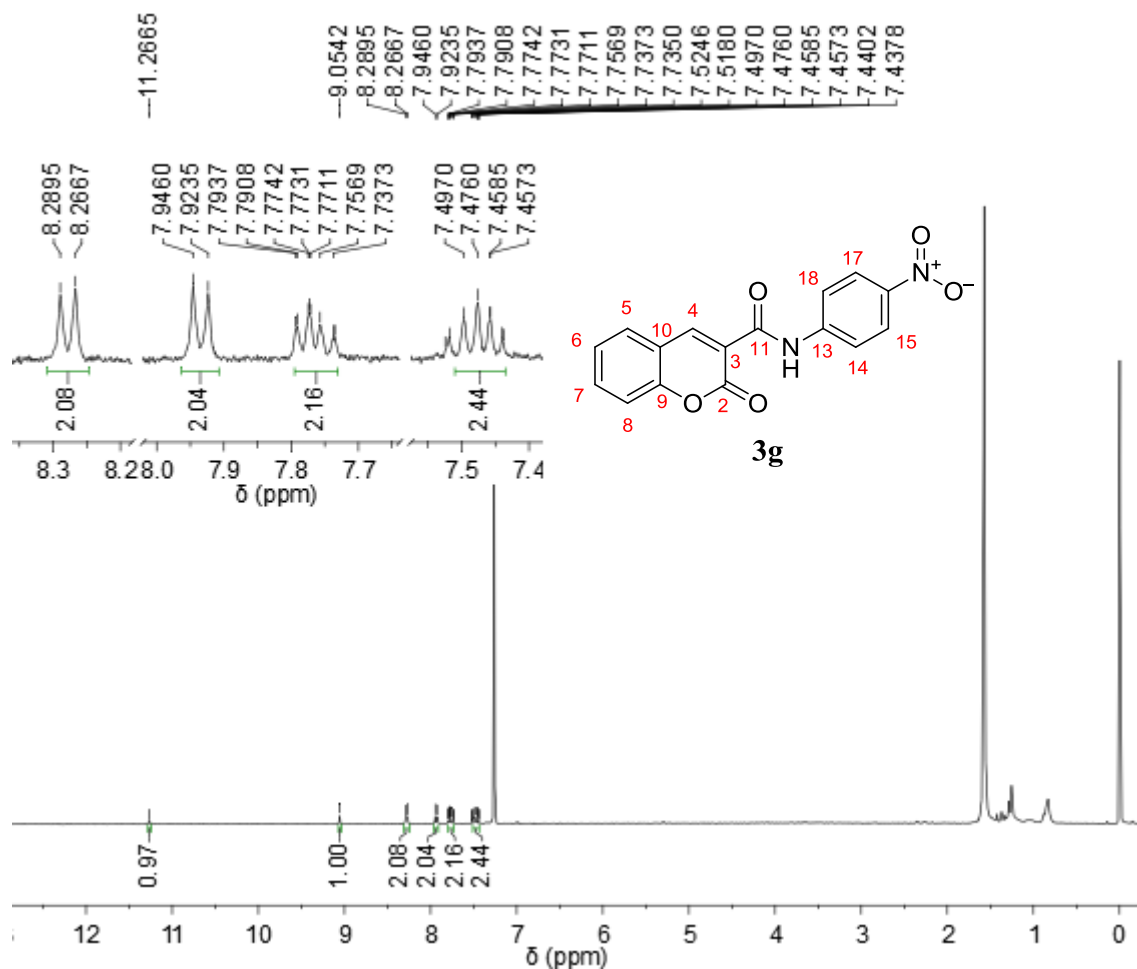


Figura 14C – Espectro de massas do composto **3g** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM)

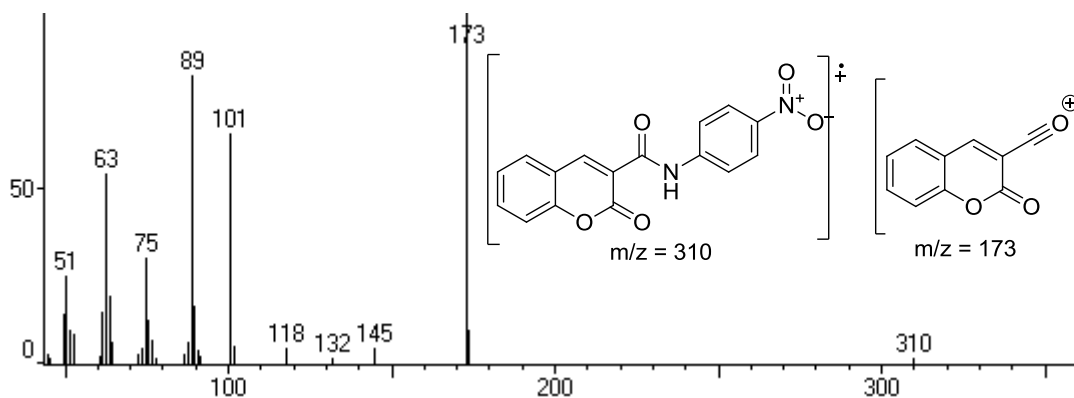


Figura 15C – Espectro de RMN de ^1H do composto **3h**

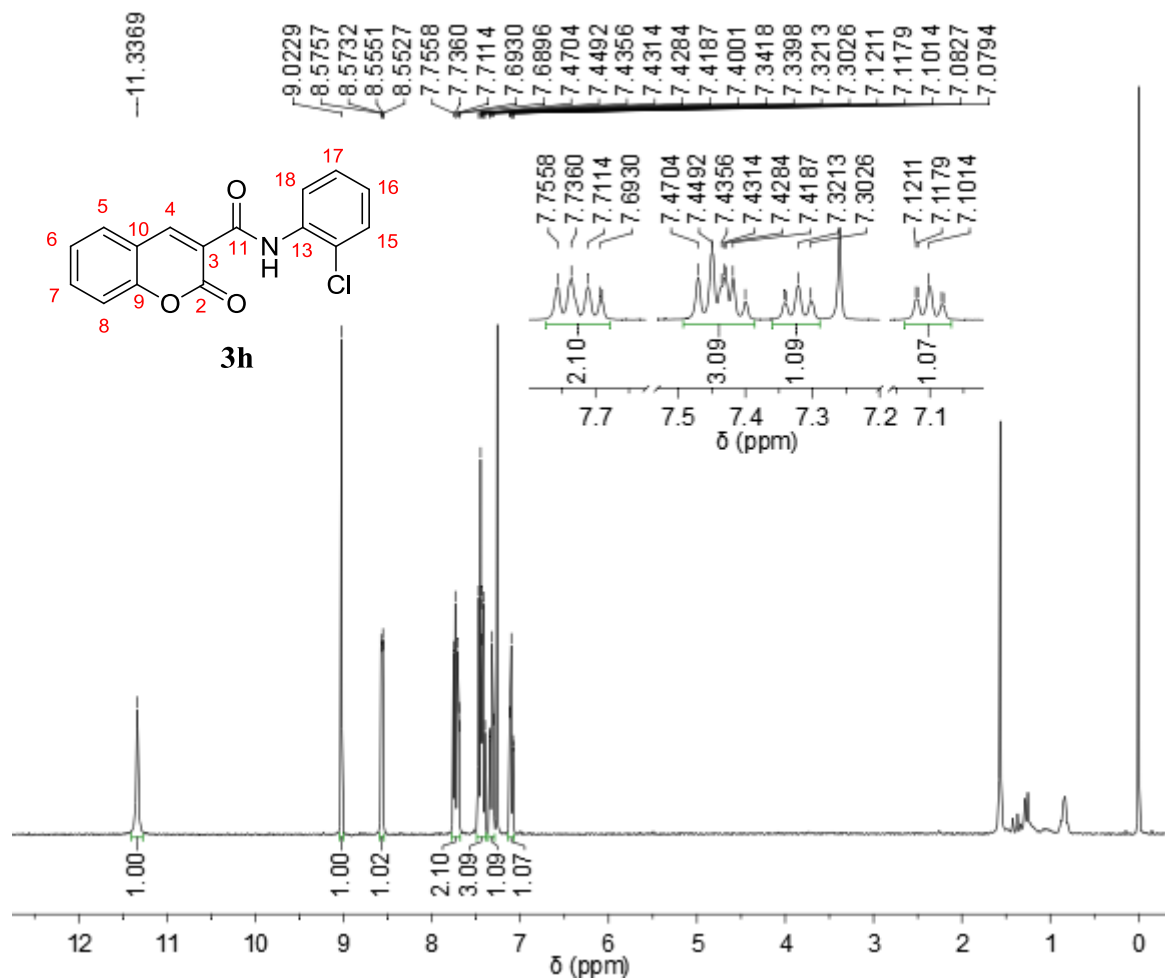


Figura 16C – Espectro de massas do composto **3h** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM)



Figura 17C – Espectro de RMN de ^1H do composto **3i**

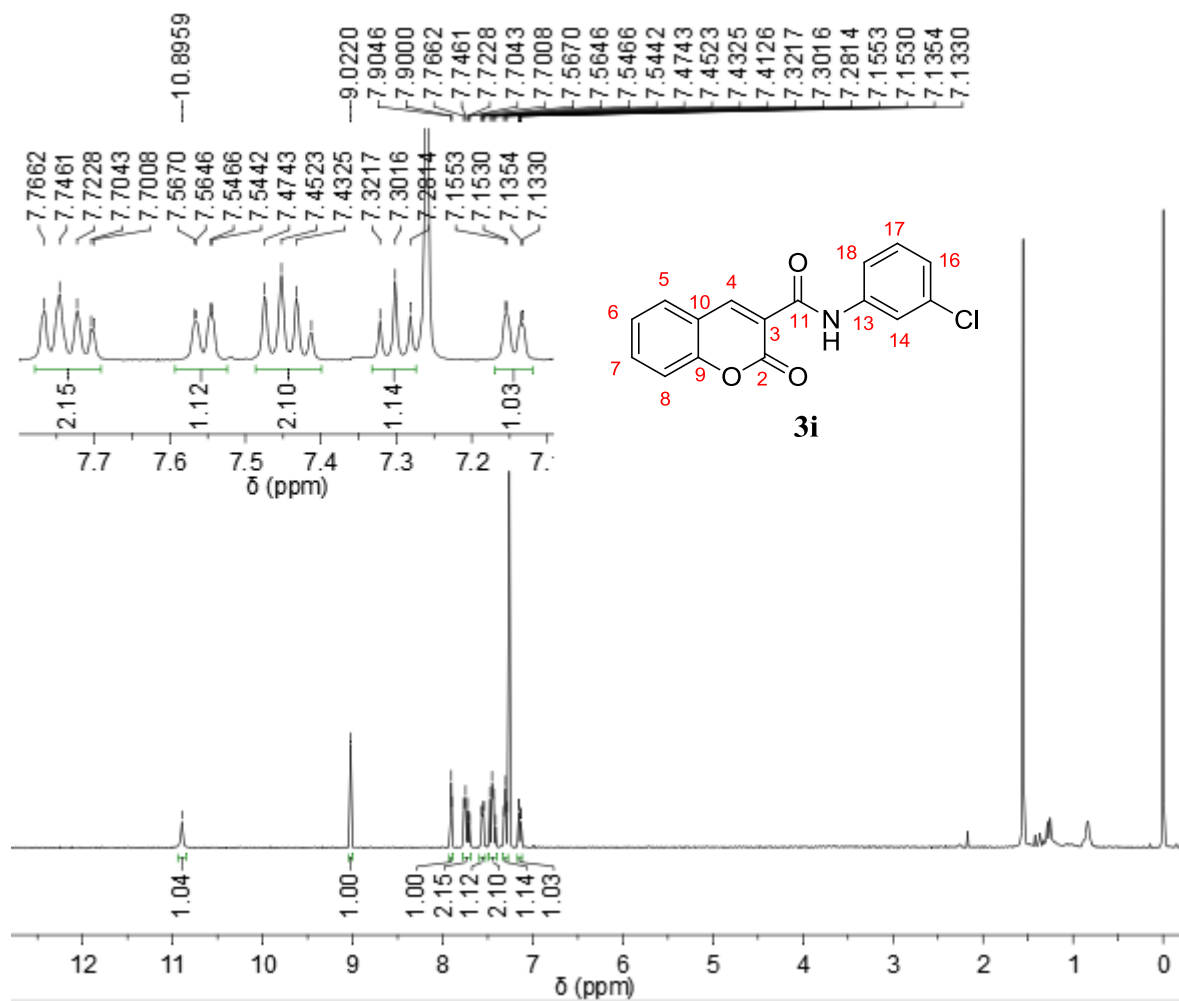


Figura 18C – Espectro de massas do composto **3i** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM)

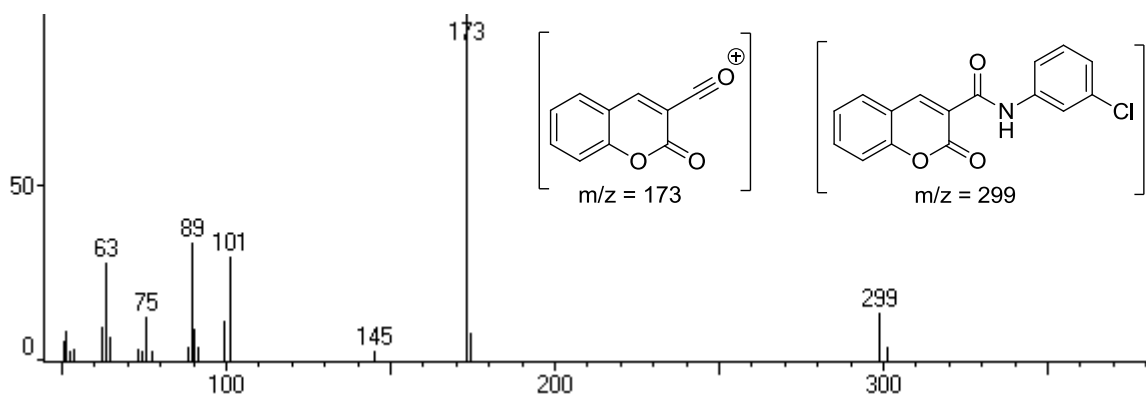


Figura 19C – Espectro de RMN de ^1H do composto **3j**

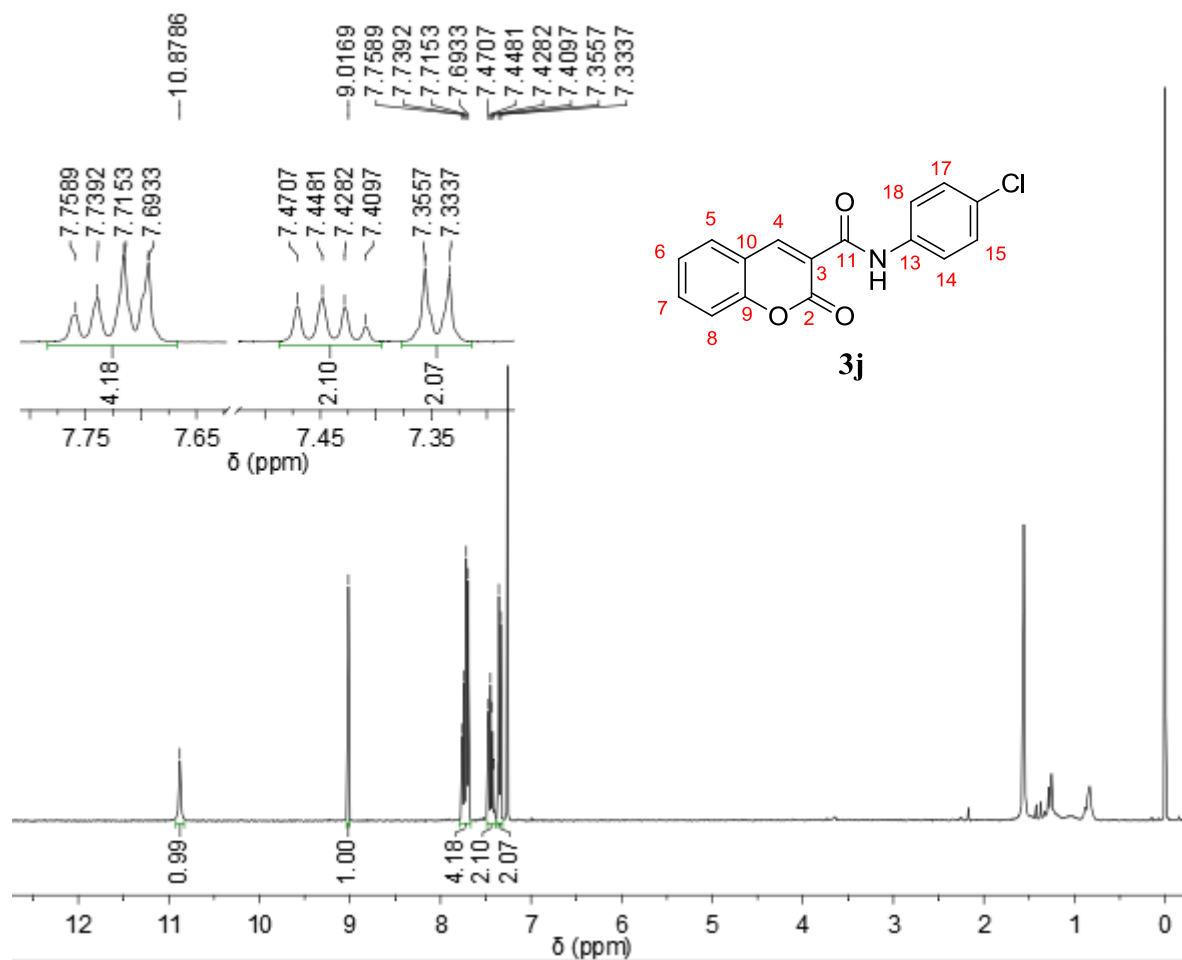
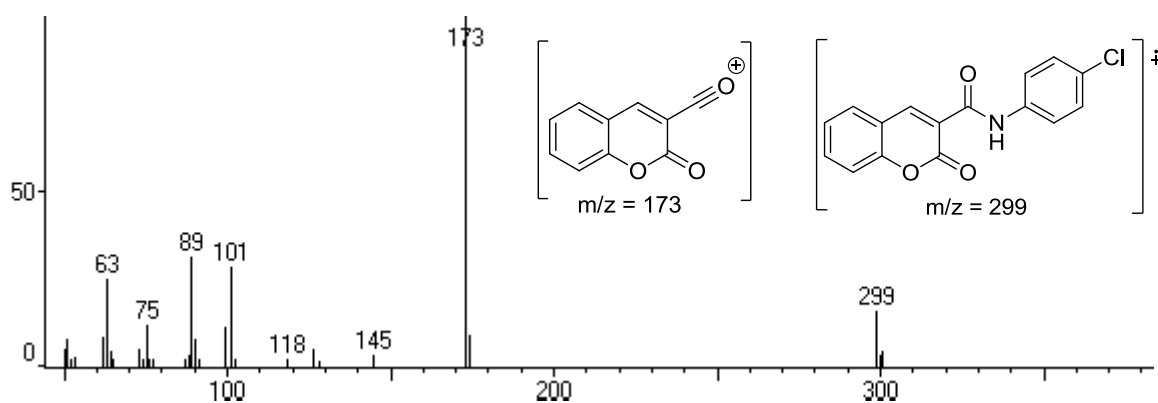


Figura 20C – Espectro de massas do composto **3j** por espectrômetro de massas acoplado a cromatografia gasosa (CG-EM)



APÊNDICE D – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DAS CUMARILTIOUREIAS

Figura 1D – Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados **5c** e **3c** conforme metodologia inicial (Esquema 15)

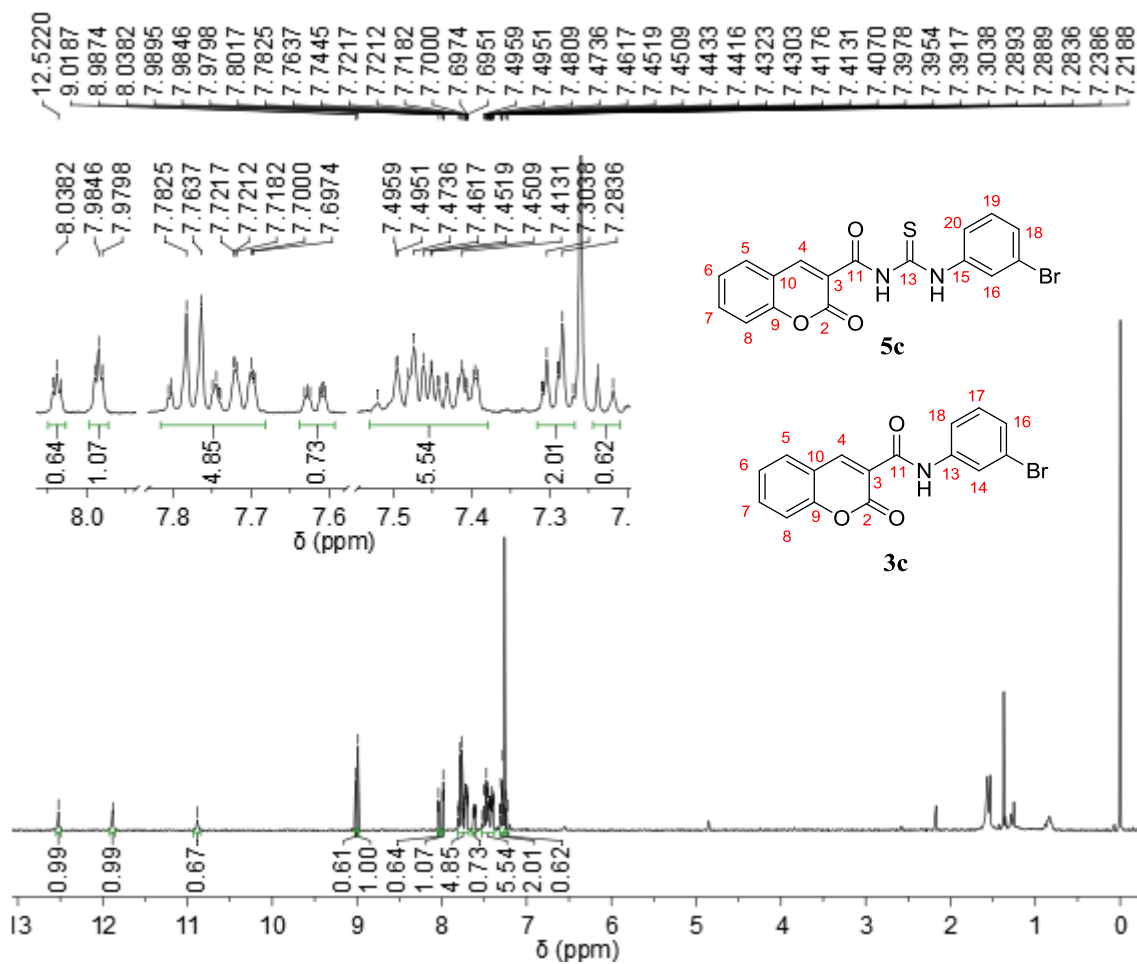


Figura 2D – Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados **5d** e **3d** e **6**, conforme metodologia disposta na entrada 1 da Tabela 3

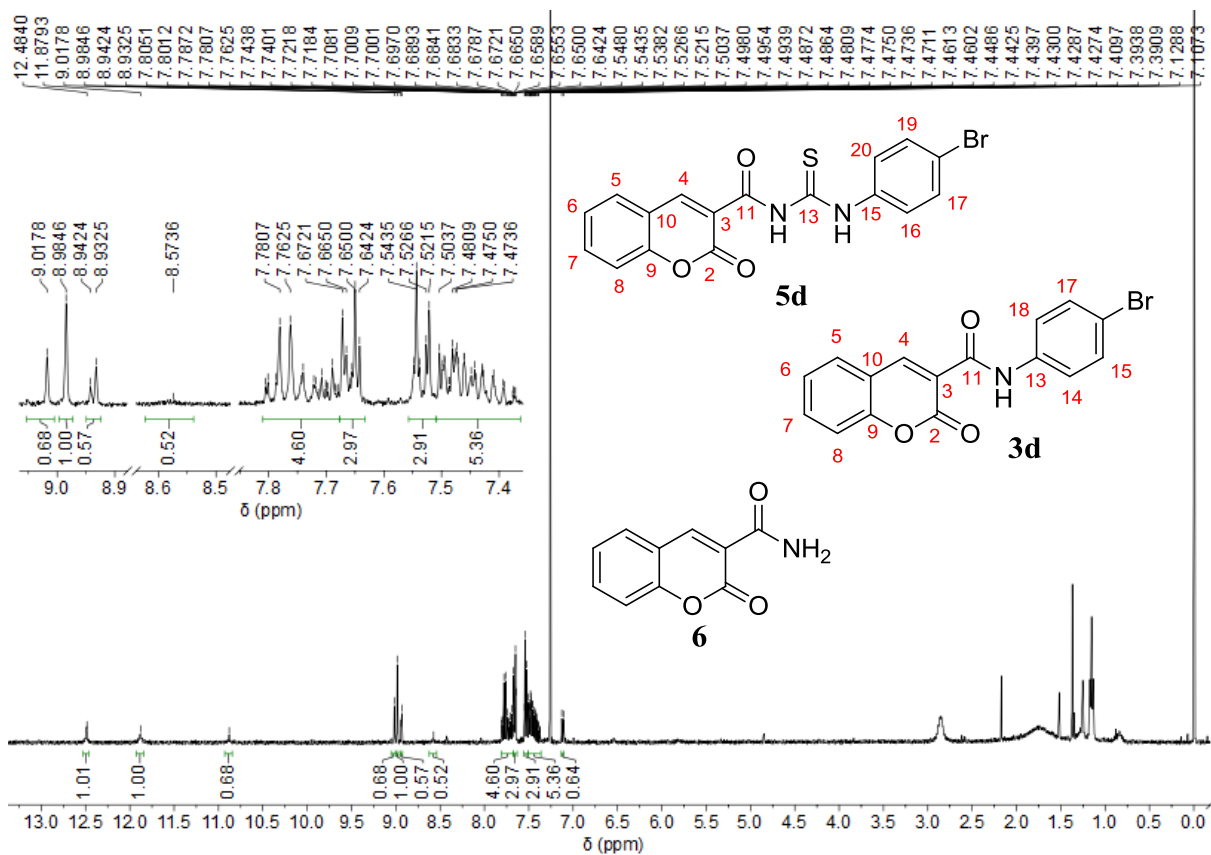


Figura 3D – Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados **5d** e **3d**, conforme metodologia disposta na entrada 2 da Tabela 3

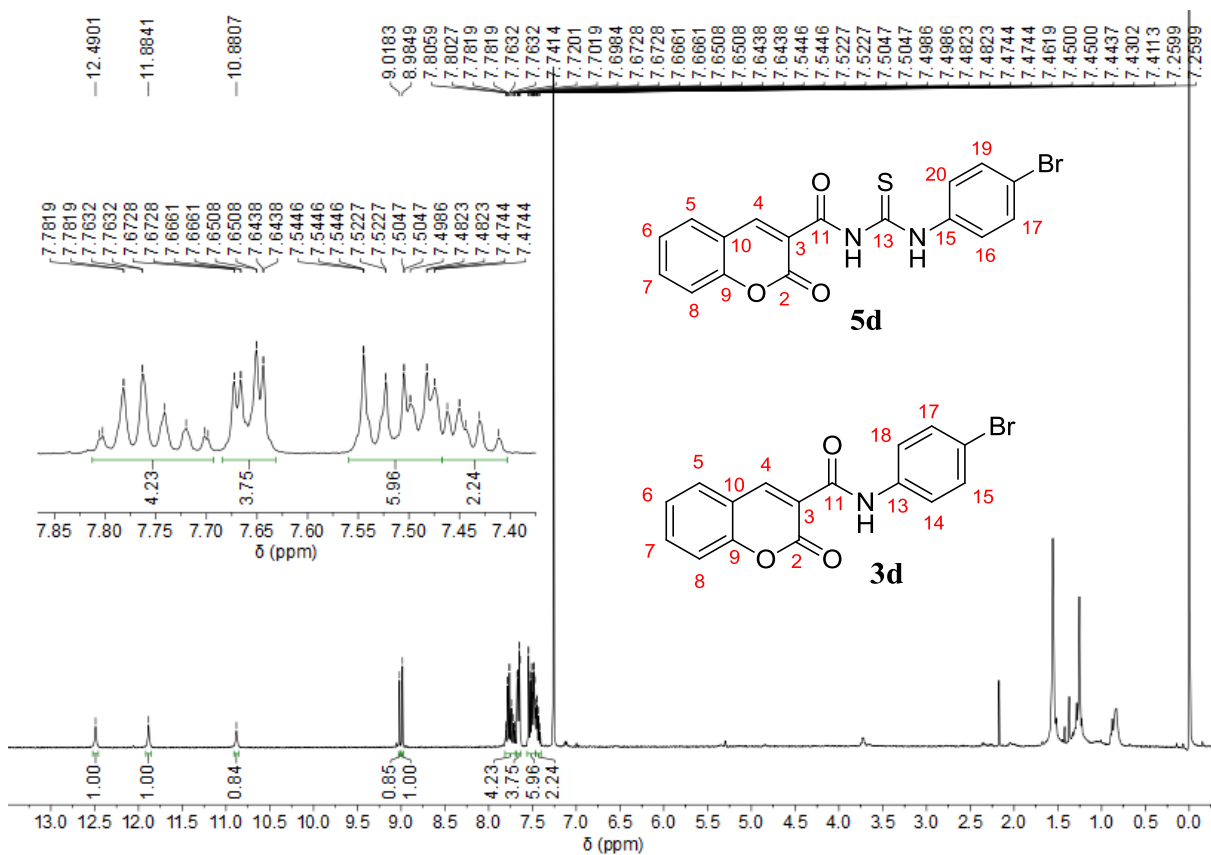


Figura 4D – Espectro de RMN de ^1H da 1^a fração da coluna cromatográfica, correspondente a cumarilamida (**3d**), obtida na metodologia conforme entrada 3 da Tabela 3

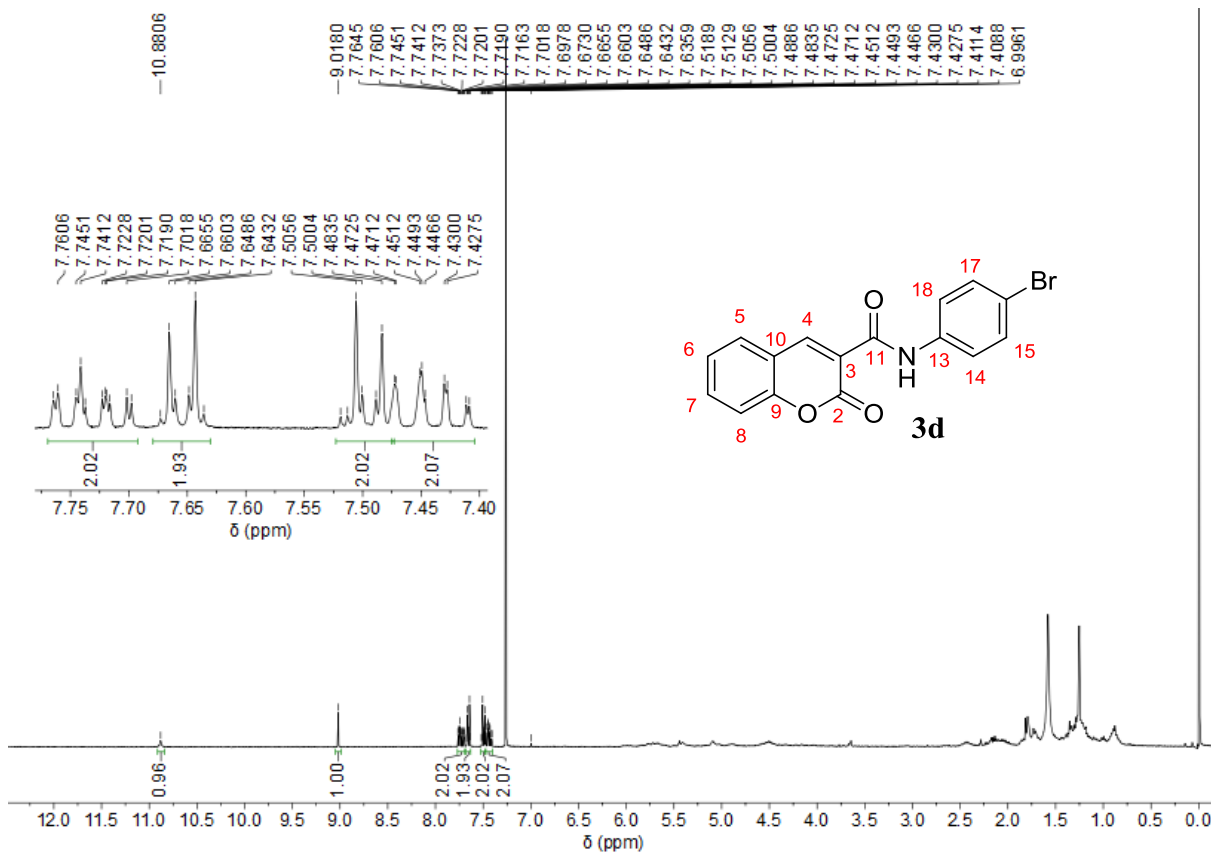


Figura 5D – Espectro de RMN de ^1H da 2^a fração da coluna cromatográfica, correspondente a cumariltioureia (**5d**), obtida na metodologia conforme entrada 3 da Tabela 3

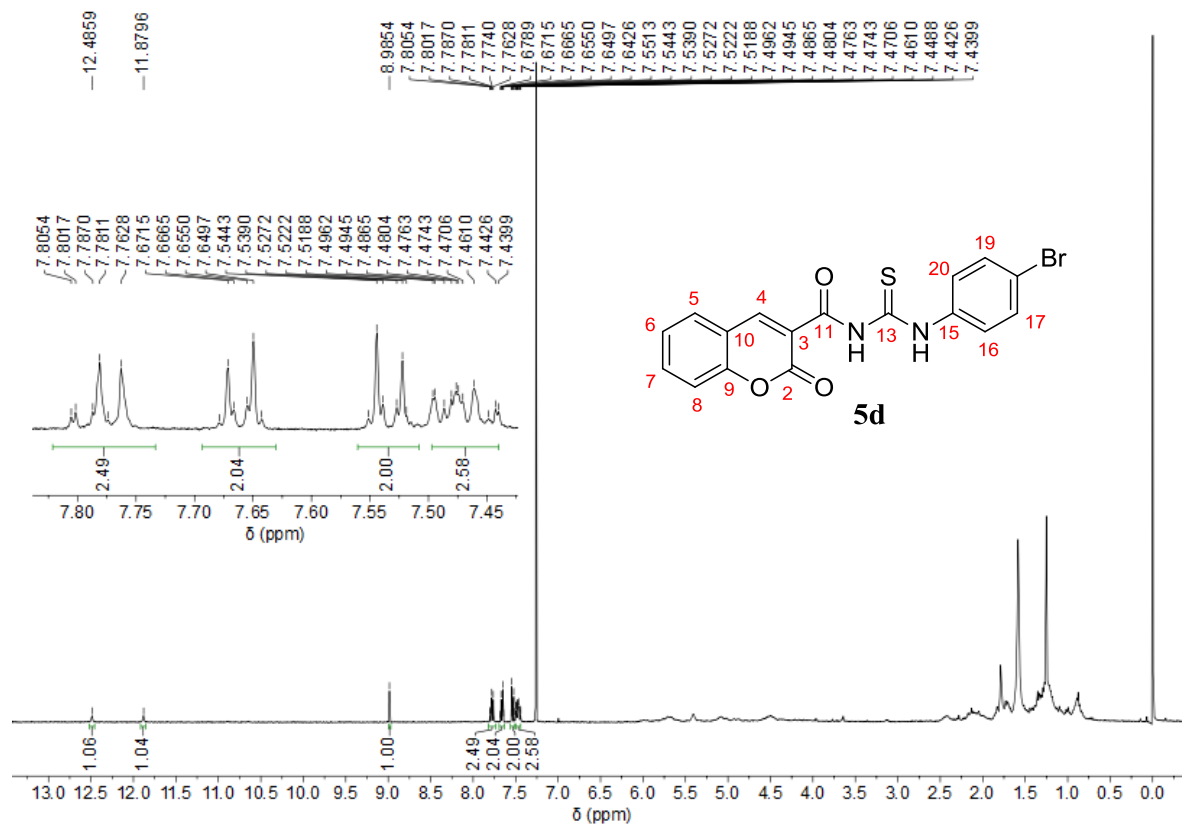


Figura 6D – Espectro de RMN de ^1H da 3^a fração da coluna cromatográfica, correspondente a amida primária (**6**), obtida na metodologia conforme entrada 3 da Tabela 3

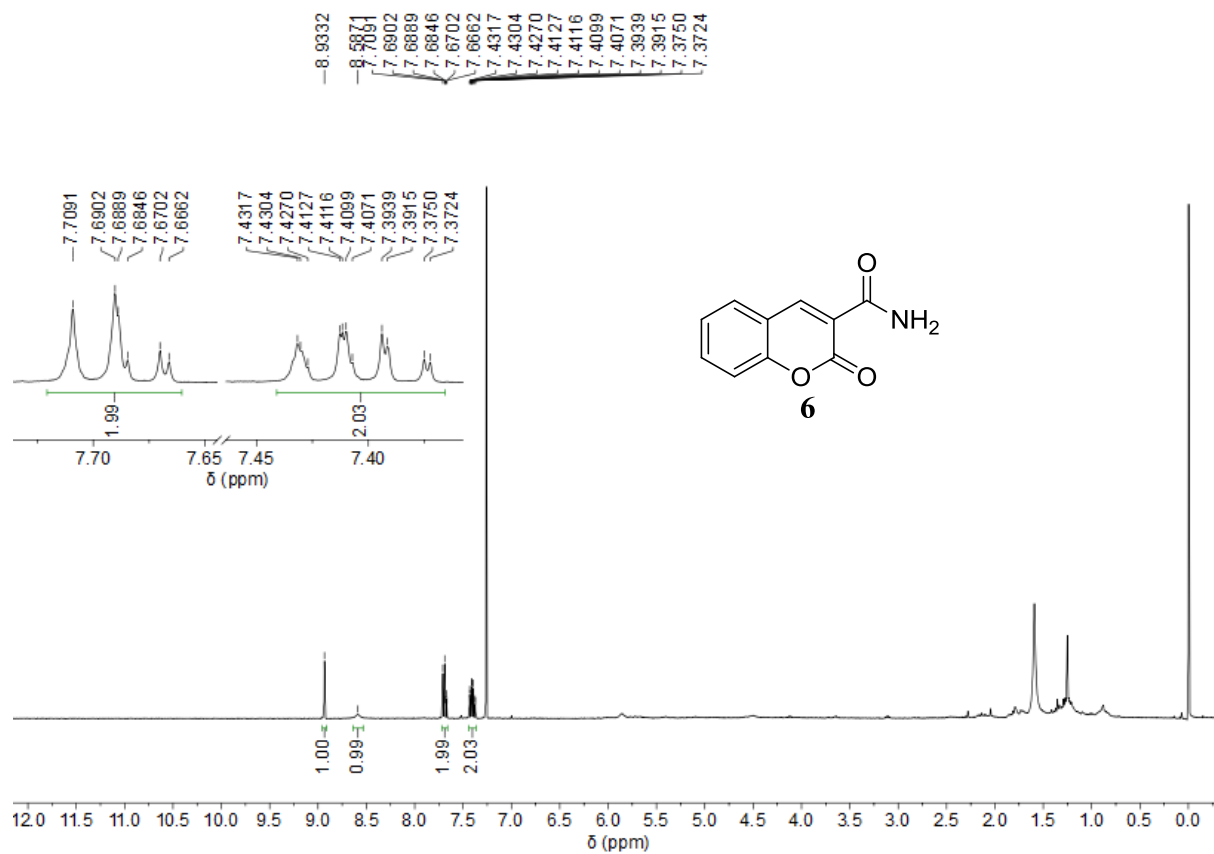


Figura 7D – Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados **5d** e **3d** e **6**, conforme metodologia disposta na entrada 4 da Tabela 3

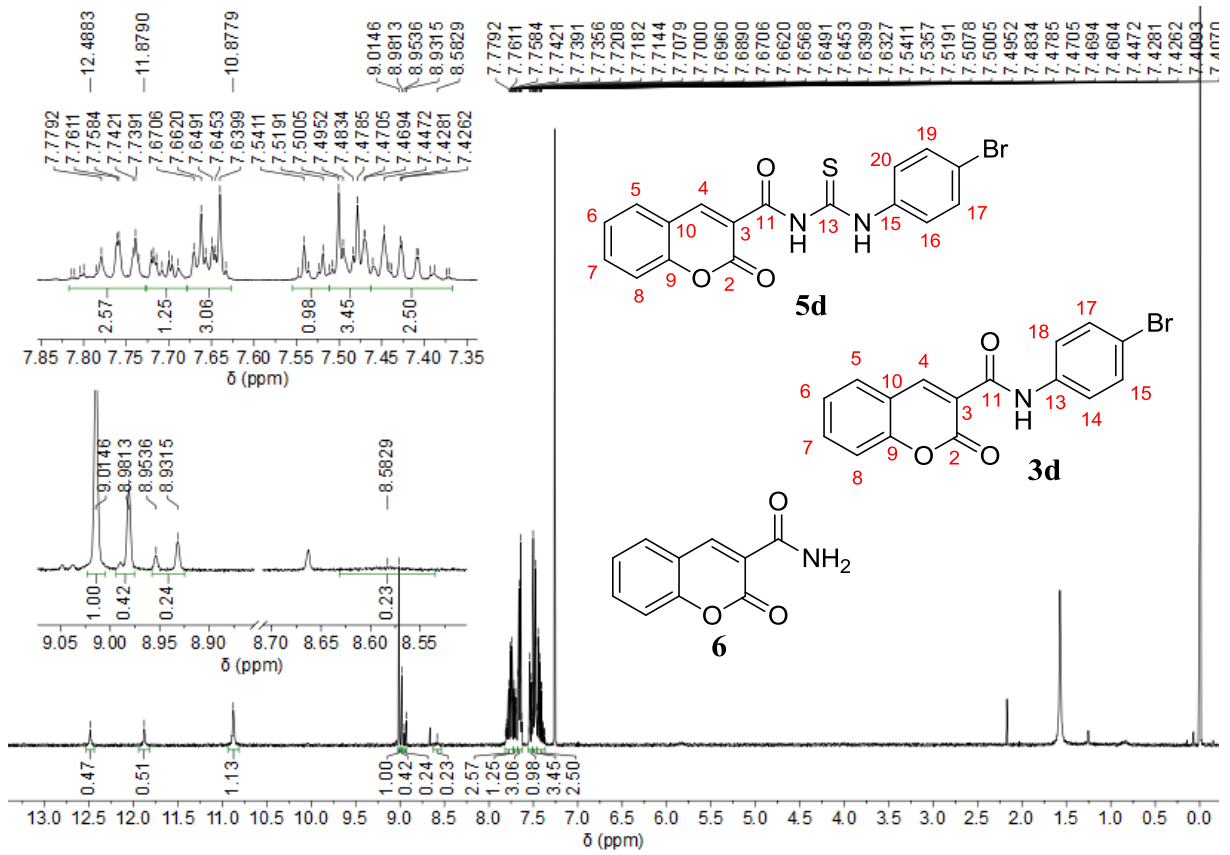


Figura 8D – Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados **5f** e **3f**, conforme metodologia disposta na entrada 1 da Tabela 4

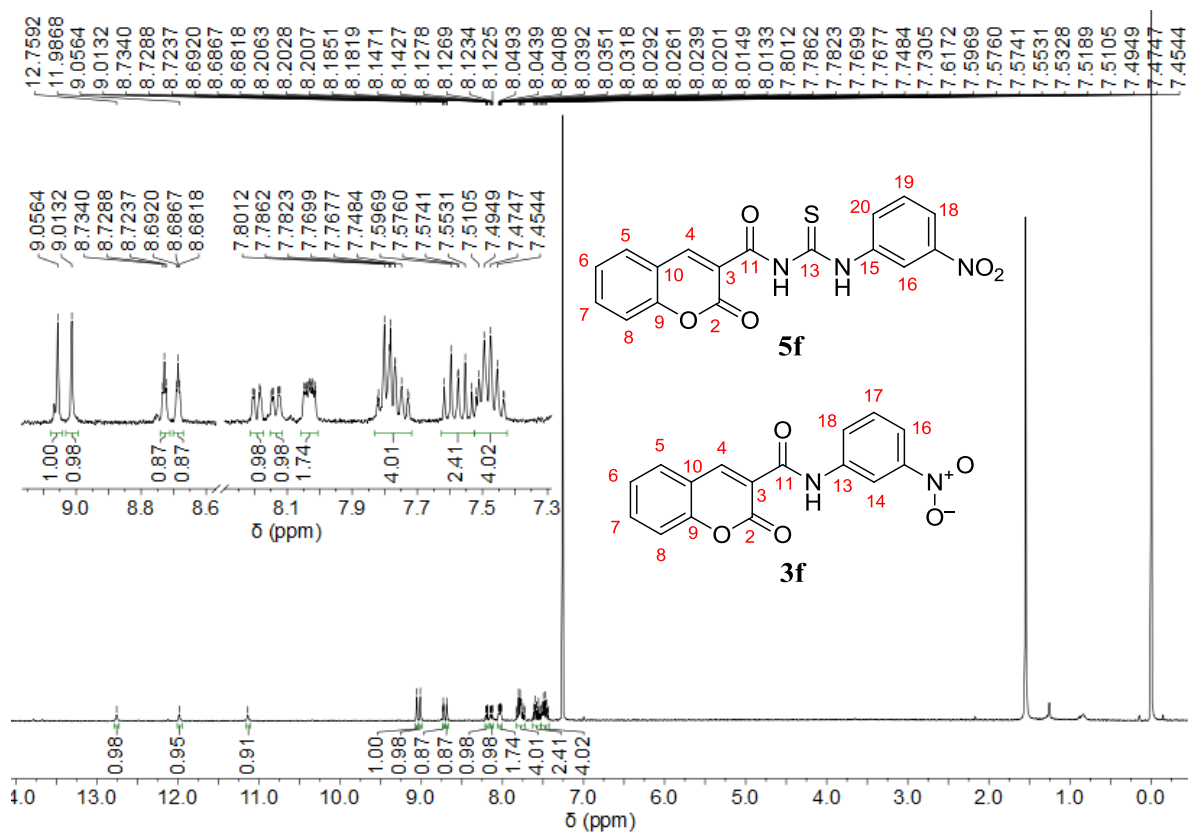


Figura 9D – Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados **5f**, **3f** e **6** obtido conforme entrada 2 da Tabela 4

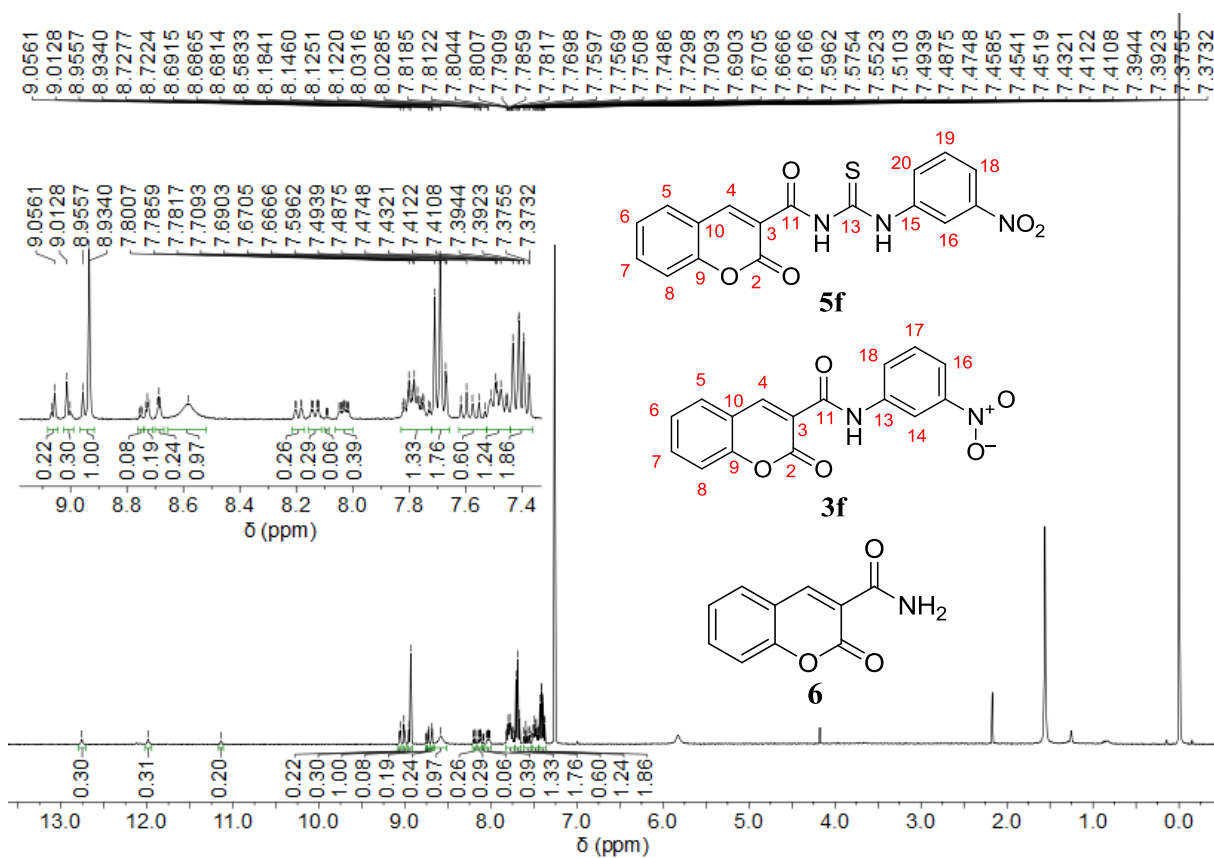


Figura 10D – Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados **5f** e **3f**, conforme metodologia disposta na entrada 3 da Tabela 4

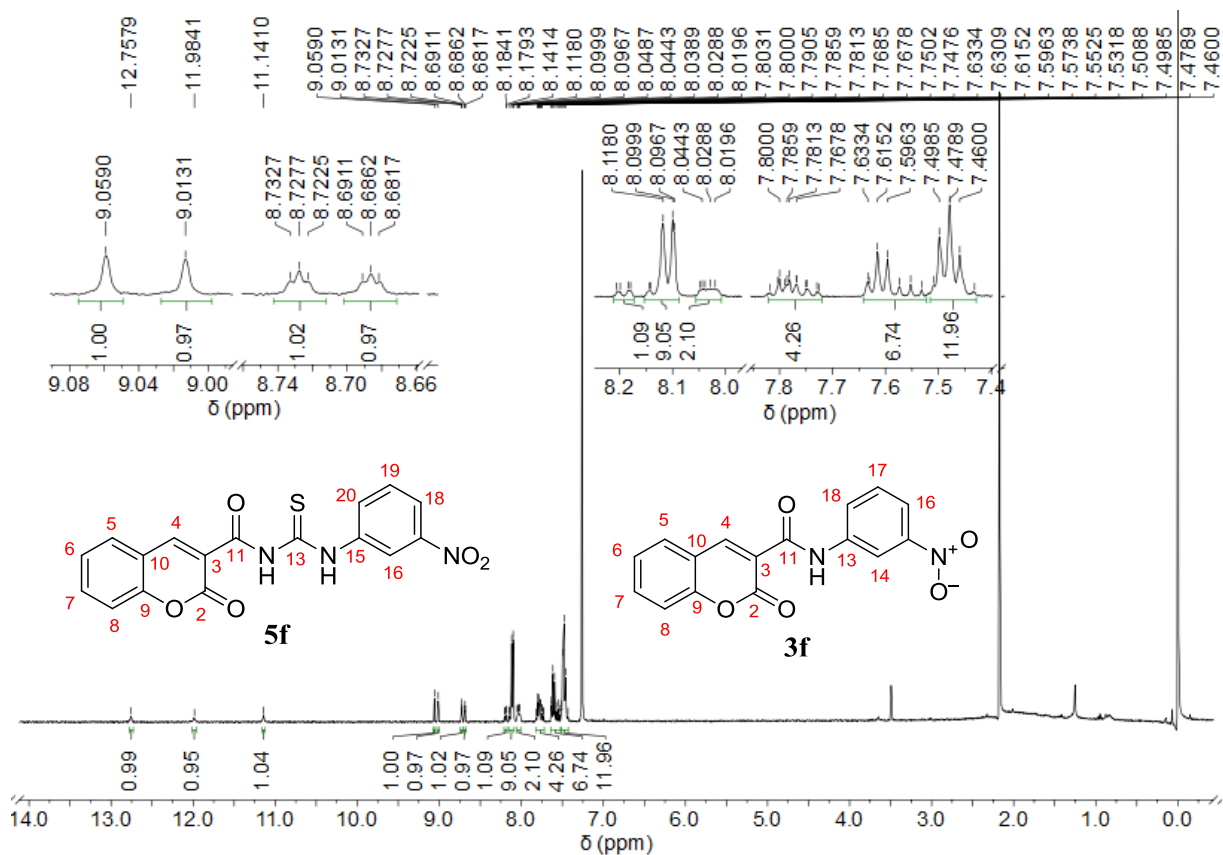


Figura 11D – Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados **5f** e **3f**, obtida na entrada 4 da Tabela 4

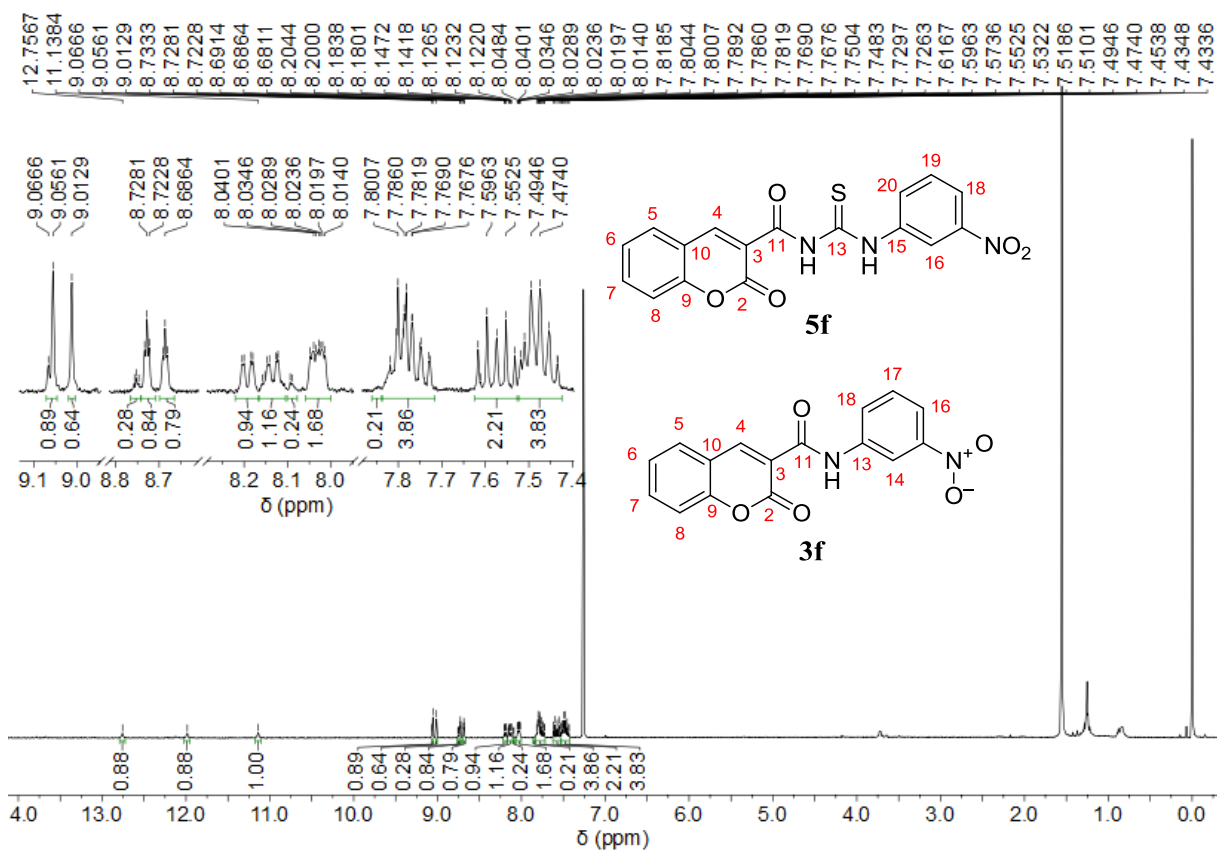


Figura 12D – Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados **5f**, **3f** e **6** obtida na entrada 5 da Tabela 4

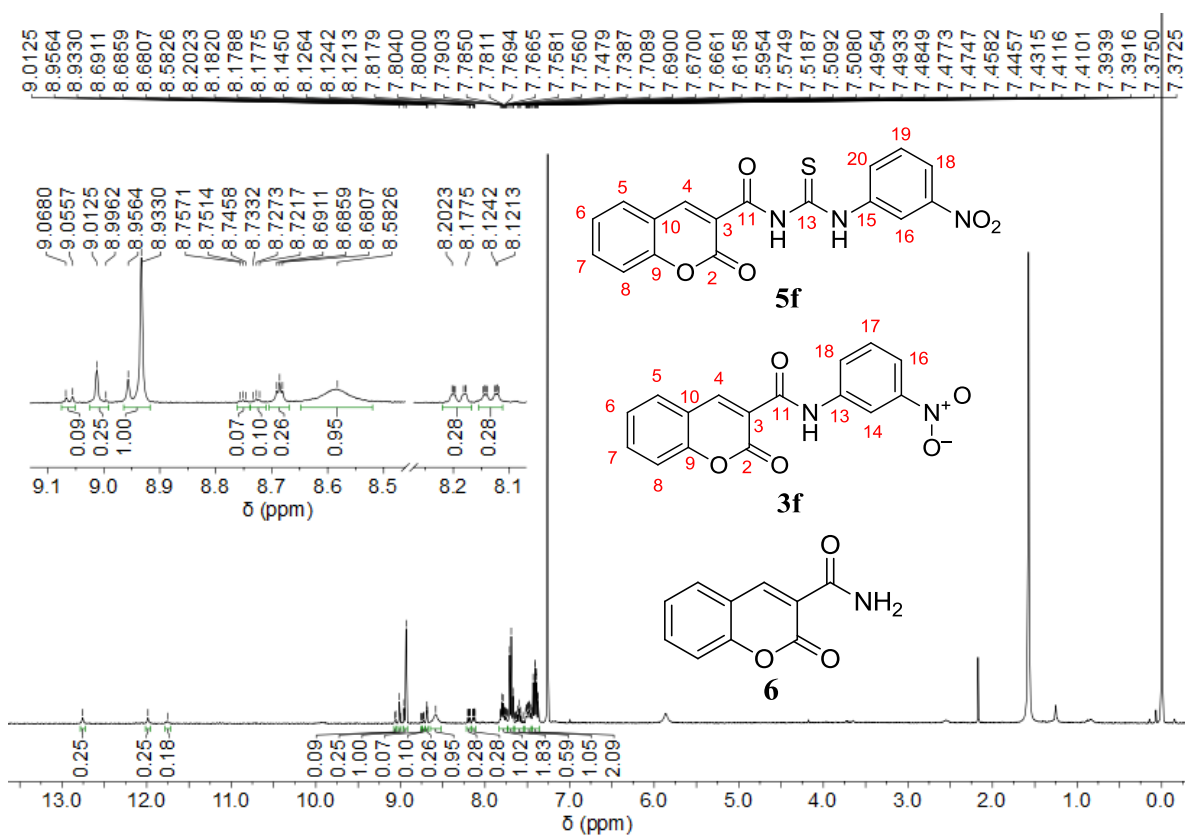


Figura 13D – Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados **5f**, **3f** e **6** obtida na entrada 6 da Tabela 4

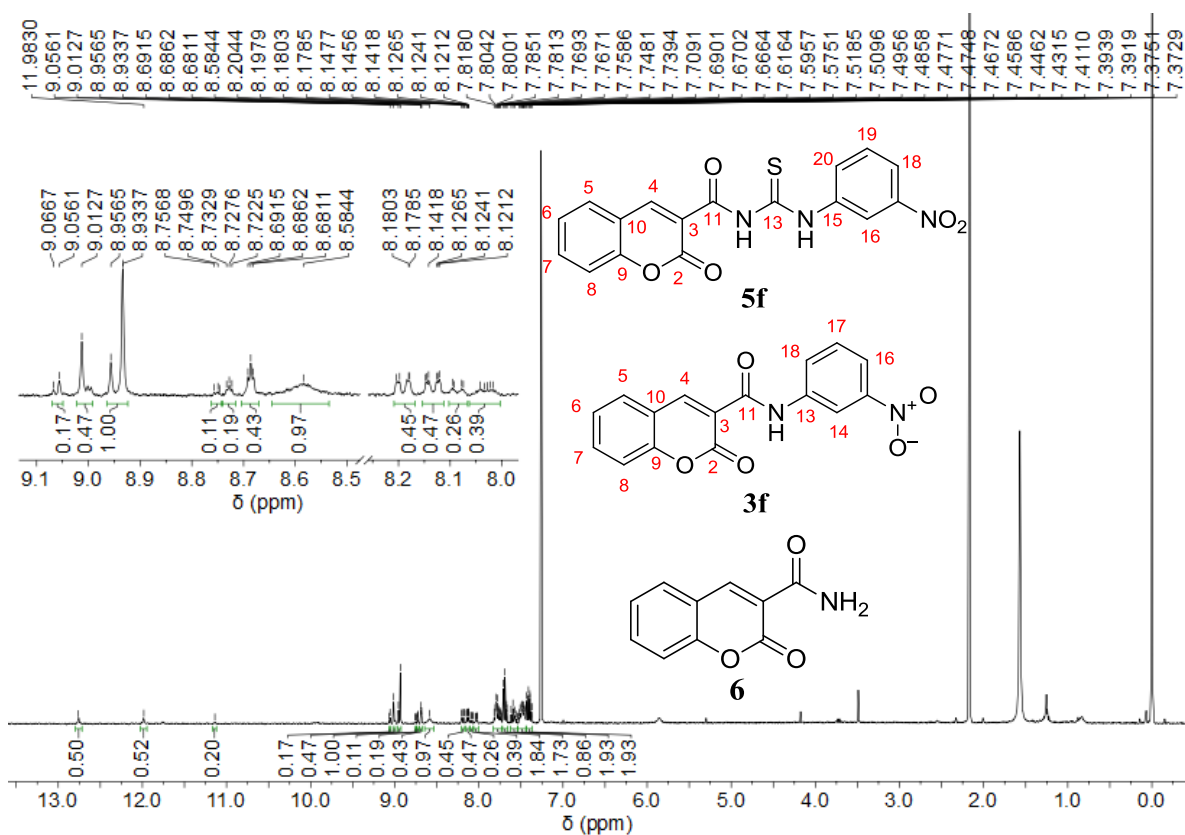


Figura 14D – Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados **5f** e **3f** obtida na entrada 7 da Tabela 4

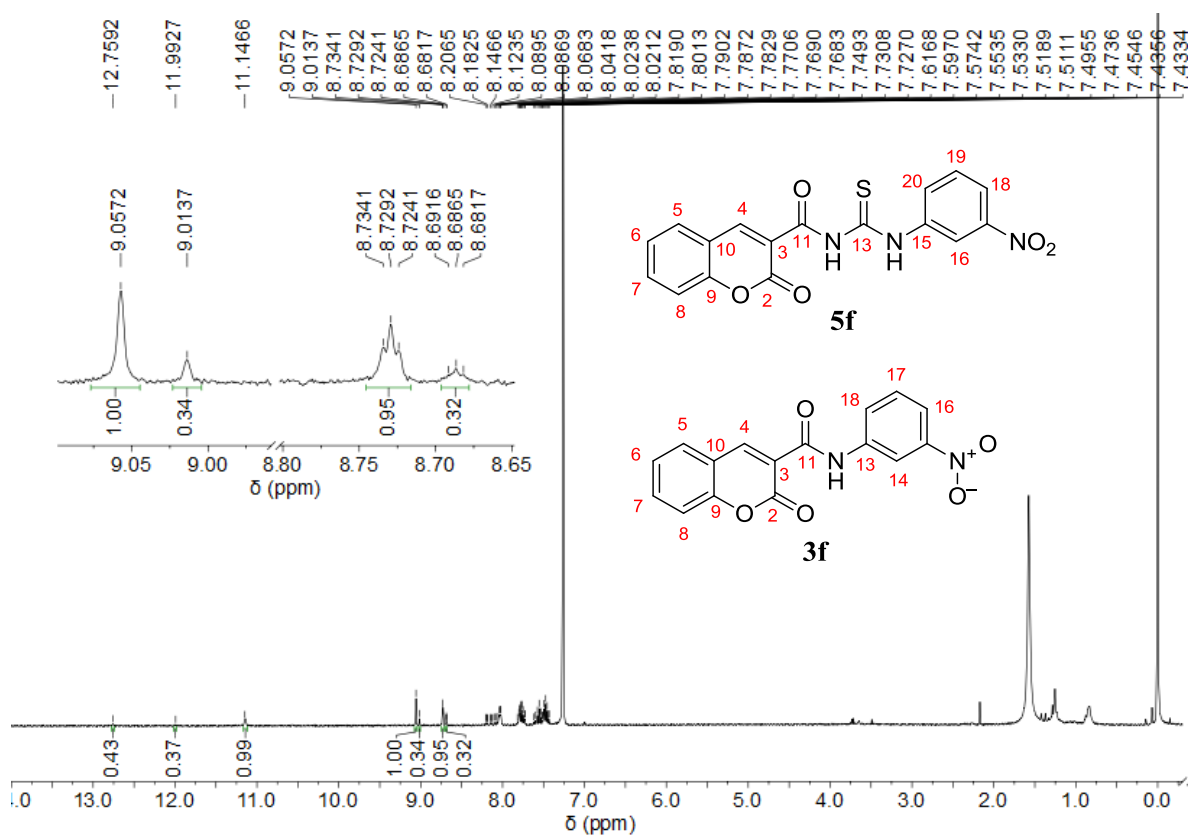


Figura 15D – Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na entrada 8 da Tabela

4

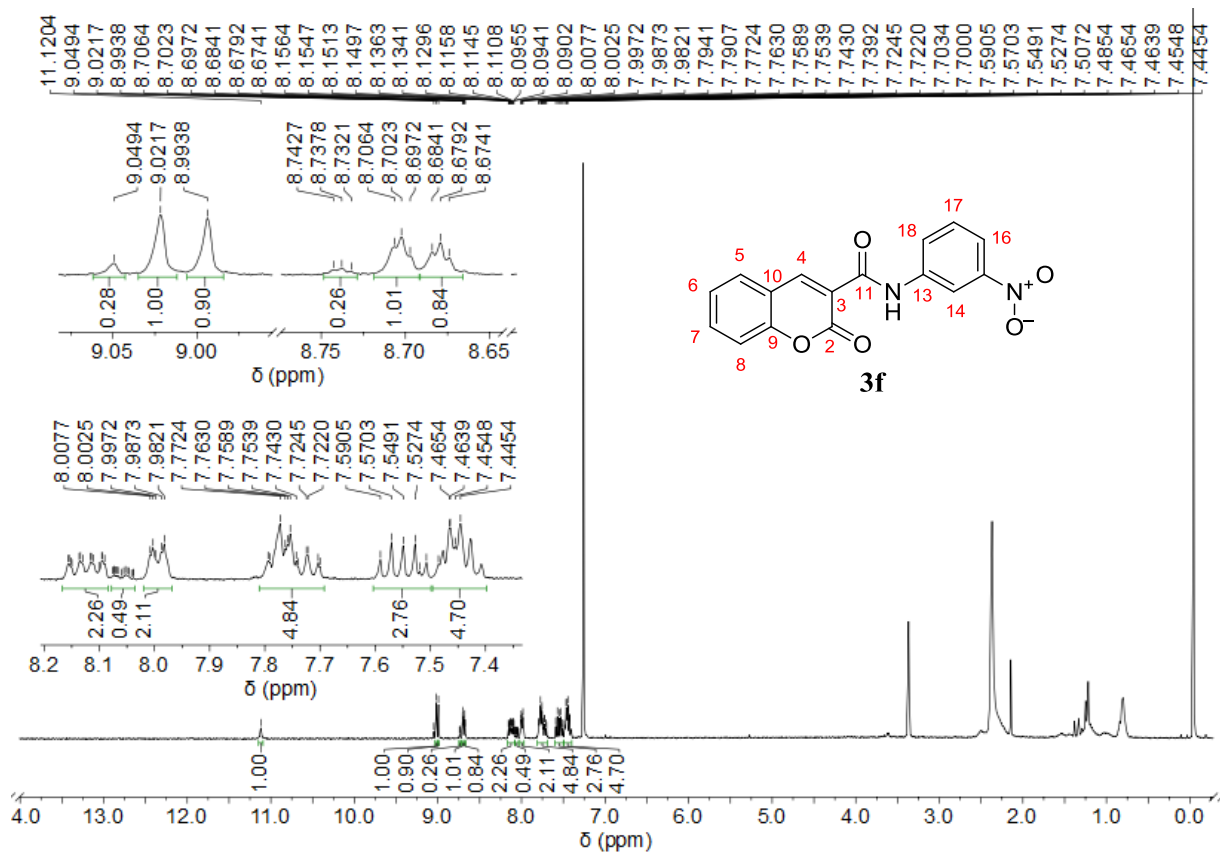


Figura 16D – Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na entrada 1 da Tabela 5

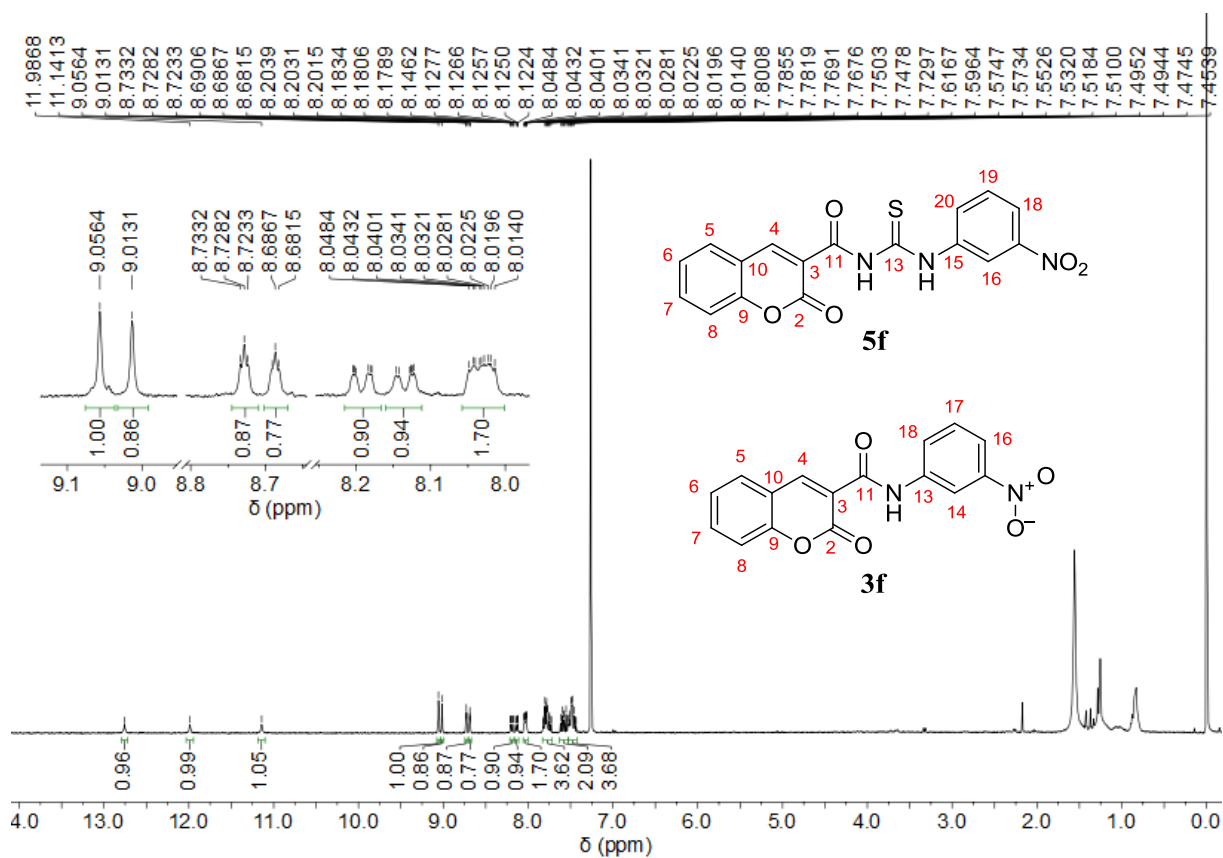


Figura 17D – Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na entrada 2 da Tabela 5

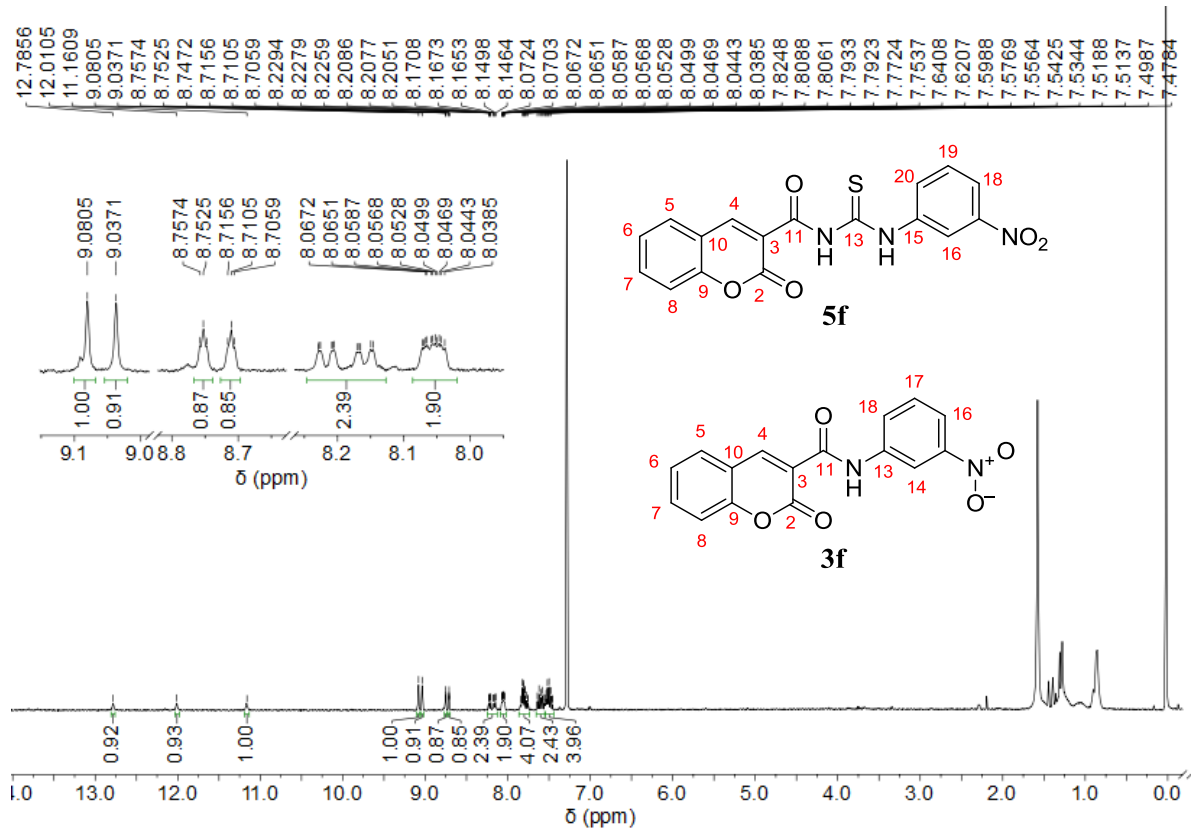


Figura 18D – Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na entrada 3 da Tabela 5

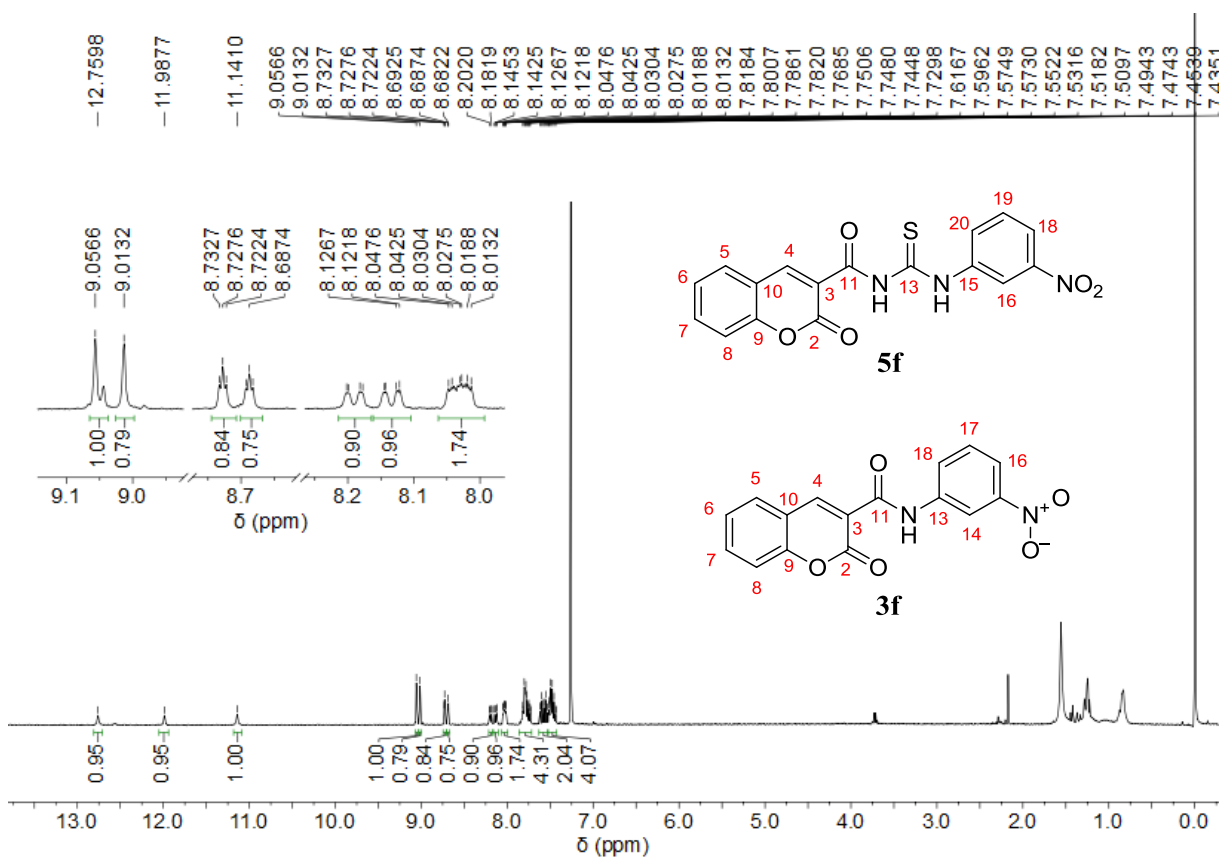


Figura 19D – Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na entrada 4 da Tabela 5

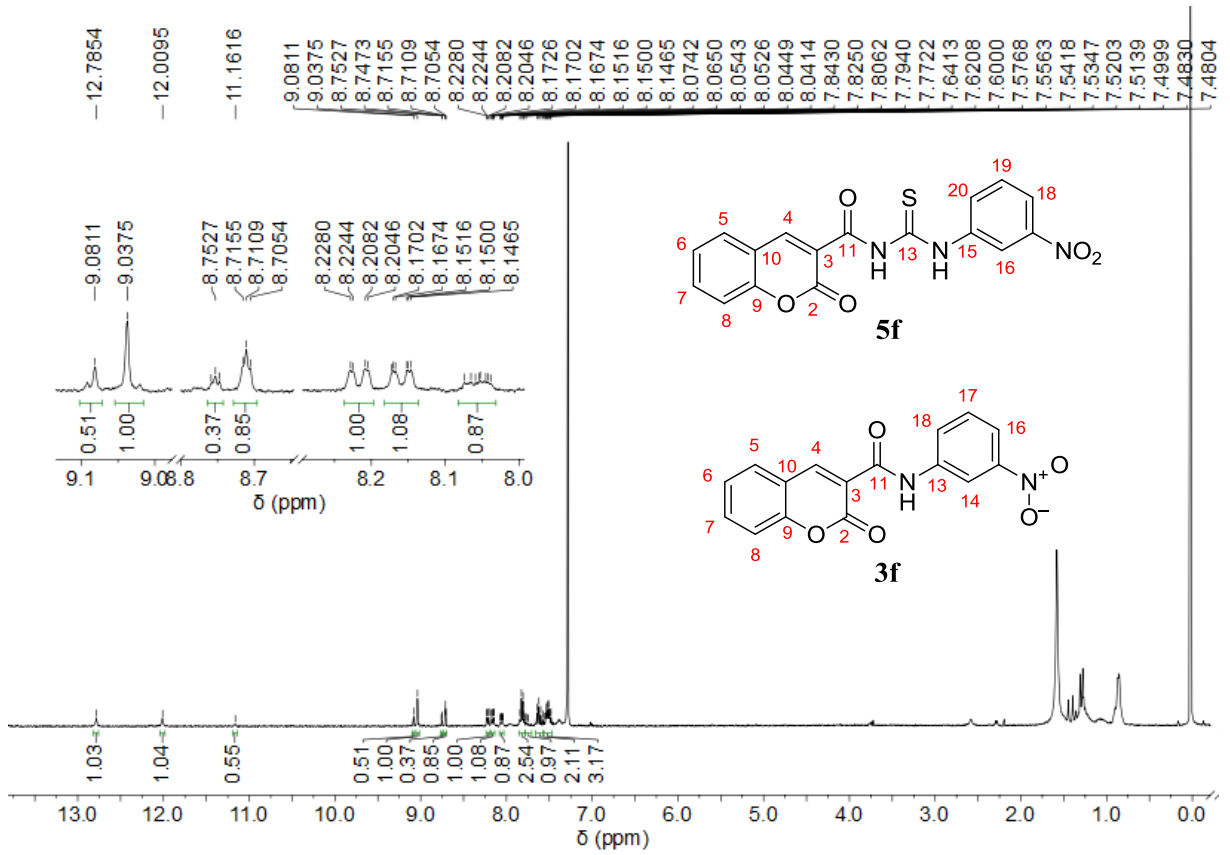


Figura 20D – Espectro de RMN de ^1H dos produtos obtidos na entrada 5 da Tabela 5

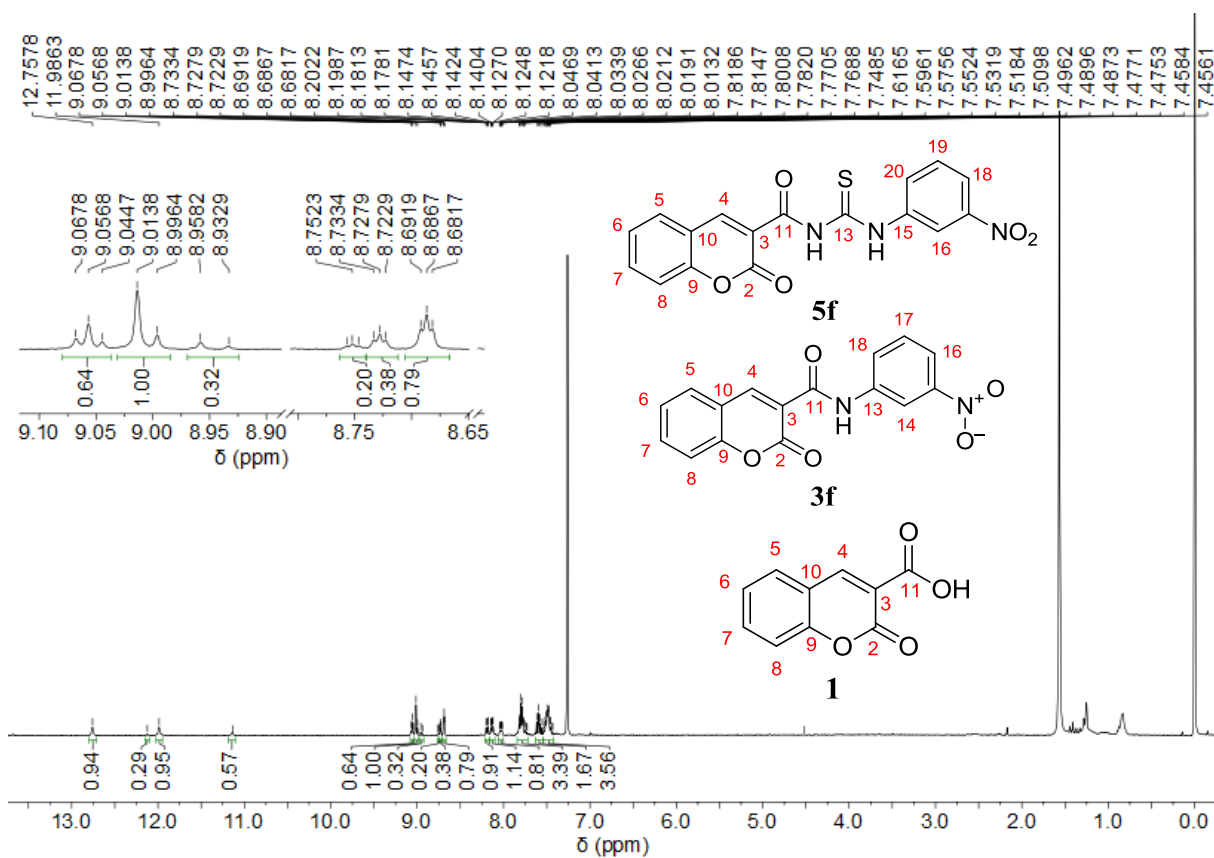


Figura 21D – Espectro de infravermelho do composto **2**, conforme metodologia de Kurt et al.

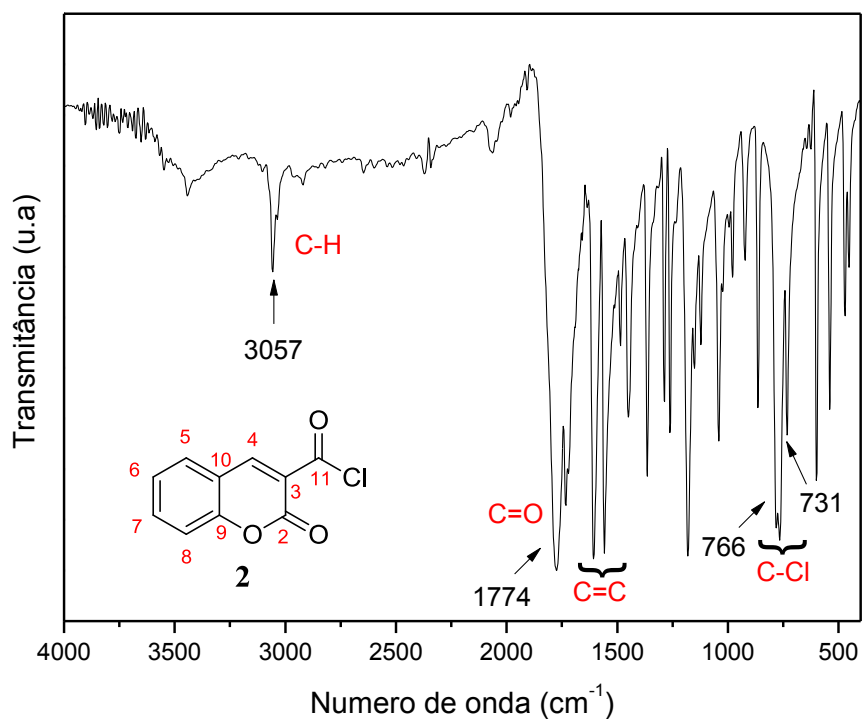


Figura 22D – Espectro de RMN de ^1H da mistura **5j** e **3j**, obtido conforme metodologia de Kurt et al.

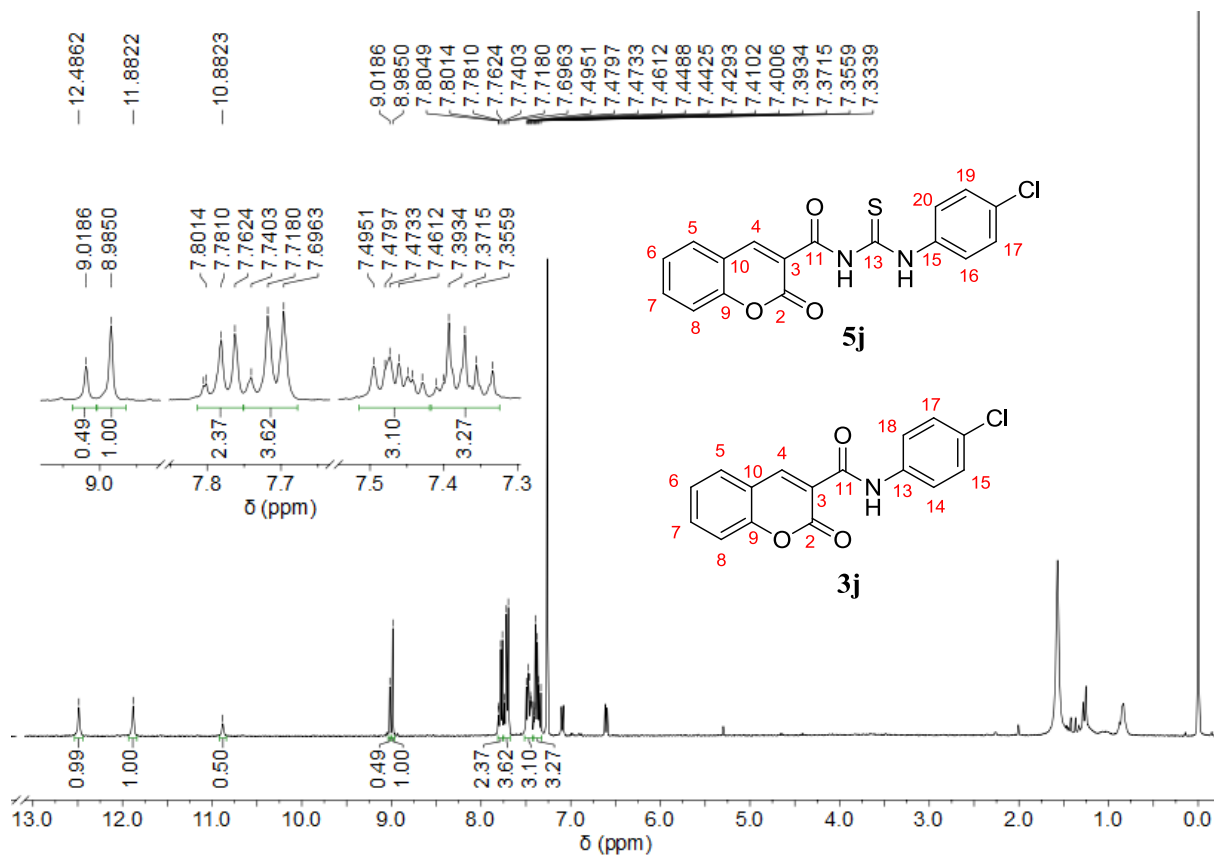


Figura 23D – Espectro de RMN de ^1H da mistura **5j** e **3j**, obtido conforme metodologia de Kurt et al., com KSCN tratado

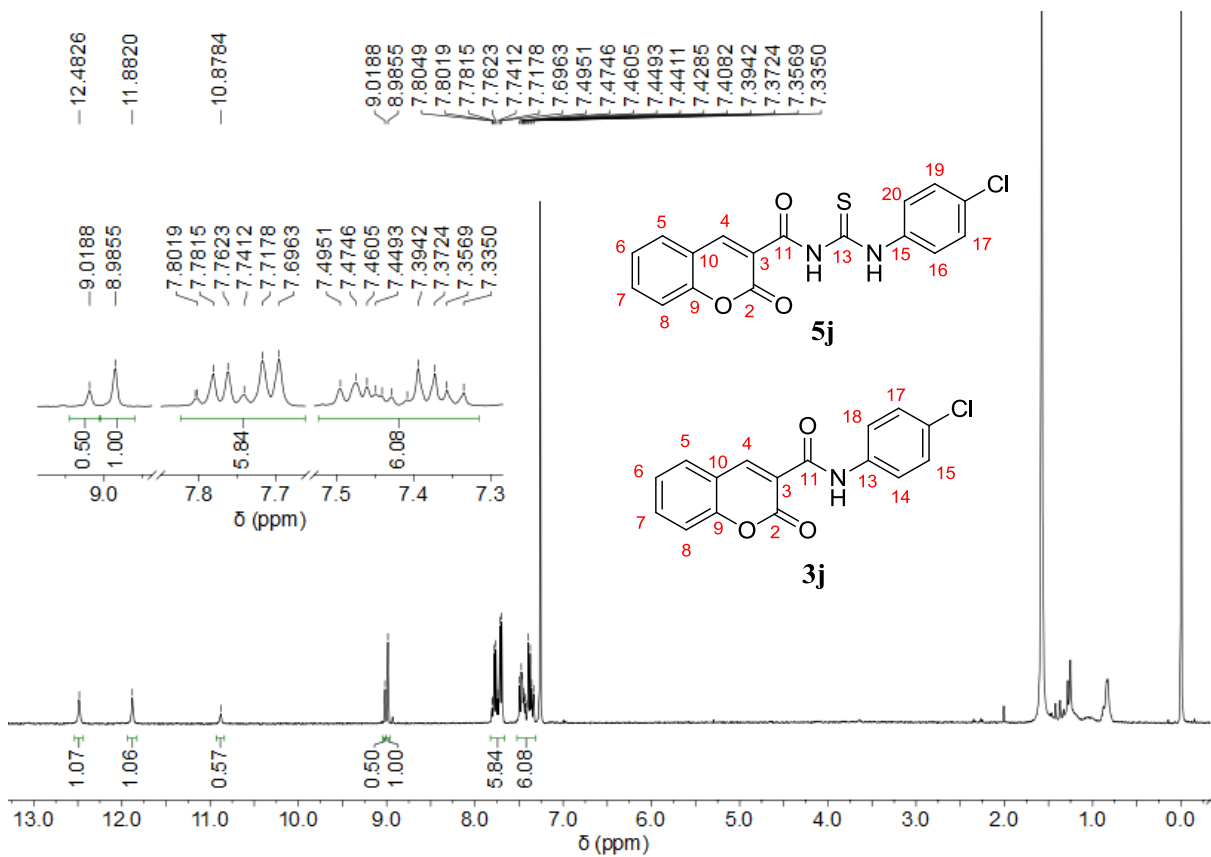


Figura 24D – Espectro de RMN de ^1H da cumariltiourea **5j**, obtida por purificação em coluna cromatográfica

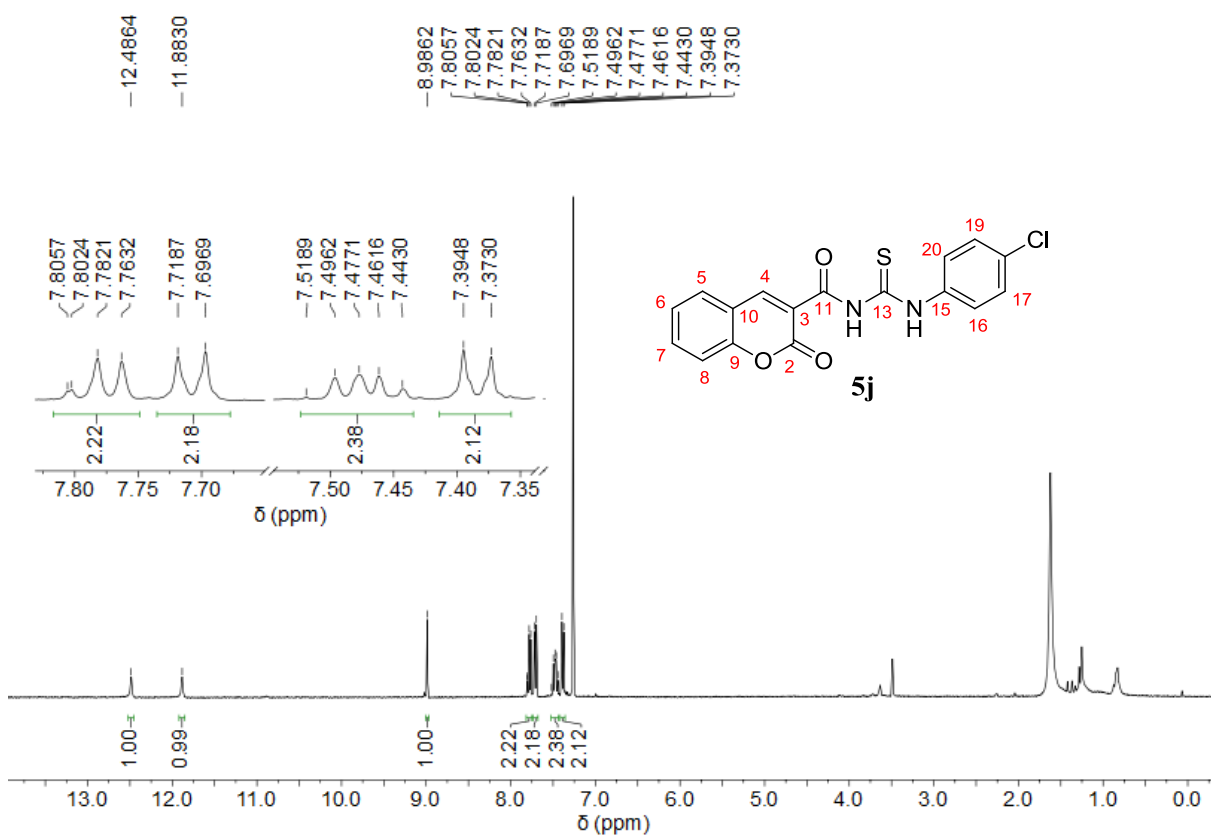


Figura 25D – Espectro de RMN de ^{13}C da cumariltiourea **5j** obtida após purificação em coluna cromatográfica

