

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Isolamento de cumarinas de espécies de *Pterocaulon* (Asteraceae)
e síntese de 4-metilcumarinas**

FERNANDO CIDADE TORRES

Porto Alegre, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Isolamento de cumarinas de espécies de *Pterocaulon* (Asteraceae)
e síntese de 4-metilcumarinas**

Tese de doutorado apresentada por
Fernando Cidade Torres
ao Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de doutor

Orientador: Prof^a. Dr. Gilsane Lino von Poser
Co-Orientador: Prof^a. Dr. Vera Lucia Eifler Lima

Porto Alegre, 2014.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 06.10.2014, pela banca constituída por:

Prof. Dr. Aloir Antonio Merlo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Ivone Carvalho
Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Garcia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Cidade Torres, Fernando
Isolamento de cumarinas de espécies de
Pterocaulon (Asteraceae) e síntese de 4-
metilcumarinas / Fernando Cidade Torres. -- 2014.
212 f.

Orientadora: Gilsane von Poser.
Coorientadora: Vera Lúcia Eifler-Lima.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2014.

1. Cumarinas. 2. Pterocaulon. 3. Click Chemistry.
4. Síntese Orgânica. I. von Poser, Gilsane, orient.
II. Eifler-Lima, Vera Lúcia, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia e Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal do Departamento de Produção de Matéria- Prima da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com financiamento da CAPES e FAPERGS.

O autor recebeu bolsa da CAPES.

Informações suplementares

Área e subárea de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Matérias-Primas Farmacêuticas / Análise química e biológica de plantas medicinais e tóxicas.

Linha de Pesquisa: Compostos fenólicos - investigação química e biológica.

AGRADECIMENTOS

À deus, pelo seu infinito amor que me fascina cada vez mais.

Ao meu pai Paulo, por ser a minha grande inspiração e o maior incentivador de minha carreira.

À minha mãe Lúcia, por ser o esteio da nossa família e pelo carinho dispensado em todos os momentos.

Aos meus amados irmãos Guilherme e Eduardo, pelo companheirismo e por fazerem parte de uma família unida e abençoada.

À minha amada namorada Daniela, por ser a minha companheira diária, por compartilhar dos problemas e das incertezas da vida de um estudante de pós-graduação. Por me tratar sempre com imenso carinho, e por ter incentivado a minha ida para Espanha colocando-se sempre ao meu lado nas horas ruins.

À minha tia-avó Márcia Torres, pelo aconselhamento semanal.

Ao professor Daniel Kawano, pelo auxílio, disposição e principalmente pela amizade.

Ao professor Saulo Andrade, pela amizade.

Aos meus colegas do laboratório de farmacognosia e síntese orgânica medicinal, pela amizade, companheirismo e pelas boas risadas que me proporcionaram nestes últimos anos.

À Farmacêutica Maribete Holzschuh, pelas análises de massas.

Ao aluno Guilherme Arraché, pela amizade e pelo companheirismo nos experimentos de síntese.

Ao professor Eduardo Cassel, pela orientação durante o mestrado.

À professora Marlise dos Santos, pela amizade.

À professora Ivone Carvalho, por disponibilizar os alcinos desta tese.

Ao professor Joaquín Campos, por me acolher na Universidad de Granada, pela amizade e pela convivência diária durante seis meses.

Por fim, gostaria de fazer um agradecimento especial às professoras Gilsane von Poser e Vera Lima, por me concederem a oportunidade de realizar este trabalho e pela amizade. Por estarem sempre dispostas a auxiliar seus alunos, e, principalmente pelo grande conhecimento que compartilharam comigo.

RESUMO

As cumarinas são estruturas interessantes aos olhos da química medicinal, apresentando diversas atividades biológicas sobre os mais variados alvos. Neste trabalho, em um primeiro momento, realizamos a extração com CO₂ em meio supercrítico das cumarinas de *Pterocaulon balansae*, planta nativa do Rio Grande do Sul que apresenta em sua composição grandes quantidades destes compostos. A extração com CO₂ supercrítico apresentou rendimentos satisfatórios em massa de sete cumarinas previamente descritas para estas espécies. Dentre estes se destacam os compostos majoritários 7-(2,3-epoxi-3-metil-3-butiloxi)-6-metoxicumarina e 5,6-dimetoxi-7-(2',3'-epoxi-3-metilbutiloxi) cumarina. Realizamos também a síntese de 4-metilcumarinas através de reação de Pechmann, obtendo o composto LaSOM 77 (7-hidroxi-4-metilcumarina) com excelentes rendimentos, onde realizamos uma diversificação estrutural através da adição de um *linker* e posteriormente a síntese de triazóis através de "Click Chemistry". Para tanto, utilizamos uma biblioteca de 35 alcinos disponíveis comercialmente e outros 3 sintetizados em nosso laboratório. Sendo assim, obtivemos uma biblioteca de 38 híbridos cumarina-triazol que apresentaram excelentes rendimentos, em tempos reacionais que variaram entre 20 e 50 minutos de reação sob irradiação de microondas. Os testes biológicos preliminares frente a linhagens cancerígenas indicaram que os compostos sintetizados apresentam potencial utilização como anticancerígenos, sendo ativos frente a linhagens celulares de câncer de pulmão, fígado e mama, apresentando baixa toxicidade em células saudáveis. A partir das investigações teóricas e experimentais relacionadas à este trabalho foi produzido um artigo de revisão, intitulado "New insights into the chemistry and antioxidant activity of coumarins" está aceito pelo periódico *Current Topics in Medicinal Chemistry*.

Palavras chave: cumarinas; *Pterocaulon*; *Click Chemistry*; semi-síntese; síntese orgânica

ABSTRACT

Isolation of coumarins from *Pterocaulon balansae* and synthesis of 4-methylcoumarins. Coumarins are interesting structures for the medicinal chemistry, because present several biological activities. At first, we performed the supercritical CO₂ extraction from *Pterocaulon balansae*, a plant native from Rio Grande do Sul, which has in its composition large amounts of these compounds. The extraction with supercritical CO₂ showed satisfactory yields of seven coumarins previously described for this species. Among these compounds the coumarins 7-(2,3-epoxy-3-methyl-3-butyloxy)-6-methoxycoumarin e 5,6-dimethoxy-7-(2',3'-epoxy-3-methylbutyloxy) coumarin are the majority compounds. We also performed the synthesis of 4-methylcoumarins using Pechmann reaction, obtaining the compound LaSOM 77 (7-hydroxy-4-methyl-coumarin) in excellent yield and performed the structural diversification through the addition of a linker and subsequently synthesis of 1,2,3-triazoles by Click Chemistry. Therefore, was used a collection of 35 commercially available alkynes and other 3 synthesized in our laboratory to obtain a collection of 38 coumarin-triazole hybrids in excellent yields and time of reaction ranging between 20 and 50 minutes under microwave radiation. Preliminary biological tests against cancerous strains indicated that the synthesized compounds have potential use as anticancer agents against cell lines of lung, liver and breast cancer. From the theoretical and experimental data from this work, one review paper was produced: The article is intitled "New insights into the chemistry and antioxidant activity of coumarins" is accepted to the journal "Current Topics in Medicinal Chemistry".

Key words: Coumarins; *Pterocaulon*; Click Chemistry; semisynthesis; organic synthesis.

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	17
INTRODUÇÃO GERAL	19
CAPÍTULO 1	31
1.1. INTRODUÇÃO.....	33
1.1.2. Extração com fluido em meio supercrítico	35
1.2. ARTIGO CIENTÍFICO - Supercritical CO ₂ : a highly selective method for extraction of coumarins from <i>Pterocaulon balansae</i> (Asteraceae)	39
CAPÍTULO 2.....	57
2.1. INTRODUÇÃO	59
2.1.1. Formação de triazóis através de Click Chemistry	61
2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
2.3. EXPERIMENTAL	68
2.3.1. Síntese da 4-metil-7-hidroxicumarina (25, LaSOM 77)	68
2.3.2 Síntese da 7-(2-bromoetoxi)-4-metil-2H-chromen-2-ona (26, LaSOM 182).....	69
2.3.3. Síntese da 7-(2-azidoetóxi)-4-metil-2H-chromen-2-ona (27, LaSOM 183).....	69
2.3.4. Procedimento geral de obtenção dos alcinos 30-67.....	70
2.3.4.4. Alcinos comerciais	71
2.3.5. Procedimento geral de obtenção dos híbridos cumarina-1,2,3-triazol (68-106).....	72
CAPÍTULO 3.....	87
3.1. INTRODUÇÃO	89
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	91
3.2.1. Materiais e Reagentes para os ensaios <i>in vitro</i>	91
3.2.2. Cultivo e Tratamento Celular.....	92
3.2.3. Ensaio MTT	93
3.2.4. Análises Estatísticas	93
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
3.3.1. Ensaios de viabilidade e dano celular.....	94
3.3.2. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células sadias	94

3.3.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células cancerígenas A549 (adenocarcinoma pulmonar)	95
3.3.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células cancerígenas HepG2 (células hepáticas cancerígenas)	98
3.3.5. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células cancerígenas MCF7 (células de câncer de mama)	100
3.4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	102
CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	109
ANEXOS.....	119

CONSIDERAÇÕES GERAIS

“Há algum tempo, o laboratório de Farmacognosia, coordenado pela professora Gilsane Lino von Poser, vem trabalhando em colaboração com o Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM), coordenado pela professora Vera Lucia Eifler Lima, dando atenção especial à busca de novos fármacos baseados em moléculas de ocorrência natural com atividades biológicas variadas. Dentre as várias espécies vegetais estudadas, destacam-se as do gênero Pterocaulon nativas do Rio Grande do Sul que são fonte abundante de cumarinas. Cumarinas correspondem a um dos principais grupos de moléculas que vêm sendo estudados pelo grupo, e as promissoras atividades antifúngica e antiproliferativa reportadas na literatura nos levam à continuação do trabalho nesta linha de pesquisa. Este grupo de moléculas torna-se ainda mais interessante quando se realiza uma busca na literatura sobre as principais atividades fisiológicas que apresentam e as potencialidades que podem ser encontradas visando o desenvolvimento de novos fármacos.”

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas medicinais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas a serem exploradas terapeuticamente. O interesse da pesquisa nesta área tem aumentado nos últimos anos, fato que pode ser confirmado pelo grande número de projetos financiados por órgãos públicos e privados nesta área. Segundo Foglio et al. (2006), nos anos 70, nenhuma das grandes companhias farmacêuticas mundiais mantinha programas nesta linha e atualmente isto tem se tornado prioridade para a maioria delas. Dentre os fatores que têm contribuído para um aumento nas pesquisas e desenvolvimento de novos medicamentos com estes fármacos estão a comprovada eficácia de substâncias originárias de espécies vegetais, o aperfeiçoamento das técnicas que permitem o isolamento e a determinação estrutural dos compostos químicos e o fato de que muitas moléculas obtidas de fontes naturais já são matérias-primas para a síntese de fármacos.

A análise do índice de novos fármacos aprovados para uso terapêutico até o ano de 2012 demonstrou que as mais diversas áreas do desenvolvimento de fármacos, em torno de 50% destes são originários de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2012). Nesse contexto, torna-se interessante investigar vegetais da flora nativa brasileira, buscando novas moléculas ativas com a finalidade de se desenvolver novos protótipos de fármacos. Neste sentido, a literatura tradicional e a medicina popular tem se mostrado valiosas fontes do conhecimento necessário para embasar as pesquisas na área. Este *feed back* obtido a partir do conhecimento da medicina popular, é um dos alicerces da busca por novos medicamentos, e a história indica que o encaminhamento terapêutico da maioria das patologias se iniciou com o uso de extratos vegetais e animais. De posse do conhecimento etnofarmacológico, determina-se as melhores espécies para determinada atividade biológica e faz-se a purificação da matéria-prima natural (principalmente vegetal), com o isolamento, determinação e identificação de seus princípios ativos (KOROLKOVAS, 1973; MATOS, 1990; HAMBURGUER e HOSTETTMANN, 1991).

A esta carga de conhecimento prévio, soma-se o fato de que a pesquisa, como parte de todo o processo que envolve a concepção de um fármaco, incorporou mudanças muito importantes nas últimas décadas. Avanços significativos alcançados através de técnicas inovadoras para elucidação de importantes processos biológicos e na identificação de novos alvos macromoleculares passíveis

de intervenção terapêutica ainda não foram suficientes para permitir um desempenho ideal no desenvolvimento de novos medicamentos (PAOLINI et al., 2006; PAUWELS, 2006). Por isso, o processo de descobrimento de novas moléculas candidatas deve envolver o estabelecimento de uma forma de trabalho multidisciplinar, muito bem planejada (VIEGAS Jr. et al., 2006; BARREIRO e FRAGA, 2008), visando facilitar o acesso à informação e rapidez no processo.

A obtenção de uma molécula protótipo ou modelo, geralmente obtida por síntese orgânica e tendo como precursora uma matriz molecular originalmente presente em substâncias naturais, é um dos aspectos mais importantes a serem avaliados na busca de novos fármacos. A partir desta matriz, podem-se produzir derivados ou análogos com propriedades farmacológicas otimizadas e resultados confiáveis quando se trata da relação estrutura-atividade tão presente nos modernos estudos de obtenção de novos fármacos (ROY et al., 2008).

A descoberta de um protótipo pode ser realizada através de ensaios randômicos, onde todas as substâncias disponíveis são testadas independentemente da sua estrutura química, e a partir dos resultados obtidos seleciona-se um protótipo. Este procedimento predominou até meados da década de 30. Atualmente, o desenvolvimento de fármacos deve ser realizado empregando o conceito de “Planejamento Racional” onde, com a ajuda de modernas técnicas computacionais, se procura detectar um protótipo com o melhor perfil terapêutico possível. Para tanto, as várias ferramentas podem ser utilizadas com a finalidade de potencializar atividades biológicas e poupar tempo e recursos, especialmente quando se trabalha com moléculas inéditas.

Com o advento destas modernas ferramentas pode-se determinar a “Relação estrutura-atividade” (REA) relacionada à aplicação que se deseja, por exemplo. Assim, as relações entre a estrutura molecular e atividade biológica ou físico-química dos candidatos fornecem noções de exploração ou semelhanças químicas (HULZEBOS et al. 2001). A abordagem “read-across” indica que as propriedades de um composto desconhecido podem ser relacionadas com as propriedades de um composto conhecido, desde que estes compostos sejam suficientemente semelhantes (XU e AGRAFIOTIS, 2002). Assim, o resultado de todas estas propriedades pode então ser avaliado comparando suas “impressões digitais” com milhares de descritores disponíveis, a densidade de elétrons ou vários outros fatores

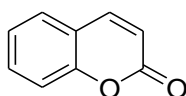
(NIKOLOVA e JAWORSKA, 2003) indicando potenciais aplicações nestes sistemas moleculares inéditos e/ou modificações moleculares que visam potencialização da atividade. Sendo assim, podemos concluir que a estrutura de um composto químico implicitamente determina as suas propriedades físicas, biológicas e de reatividade, as quais quando em contato com um sistema biológico irão determinar suas propriedades farmacológicas e de toxicidade (MCKINNEY et al., 2000).

Um grupo de estruturas que apresenta tamanha diversidade de atividades biológicas é a classe das cumarinas, moléculas que vem sendo estudadas pelo nosso grupo de pesquisa já há algum tempo por apresentarem a maioria das características supracitadas, tão interessantes aos olhos da química medicinal. Do ponto de vista científico, mais de 3.400 cumarinas encontram-se distribuídas naturalmente e são conhecidas em aproximadamente 160 famílias de plantas (BOOTH et al., 2004). Segundo Maes e colaboradores (2008), Asteraceae, Apiaceae, Moraceae e Rutaceae são as principais famílias de plantas produtoras de cumarinas. Estas substâncias são especialmente produzidas em plantas, e, embora sintetizadas principalmente nas folhas, também estão presentes em elevados níveis nos frutos, seguidos pelas raízes e talos. Esses metabólitos são encontrados em grandes quantidades em alguns óleos essenciais, particularmente no óleo de lavanda e em outras plantas bastante conhecidas e utilizadas no mercado brasileiro, tais como chá verde e chicória (LACY e O'KENEDY, 2004).

Conforme Al-barwani e Eltayeb (2004), estas moléculas são de grande importância para o desenvolvimento e interação das plantas com o meio ambiente em que convivem, visto que sua síntese é aumentada pelo contato das plantas com fungos patogênicos, predadores, insetos, microrganismos ou plantas infestantes. A planta produtora das cumarinas libera os compostos químicos no ambiente, caracterizando uma importante atividade aleloquímica da planta através deste mecanismo. Embora a grande maioria das cumarinas isoladas tenha sido obtida a partir de plantas superiores, alguns membros importantes desta classe têm sido isolados de microorganismos.

As cumarinas constituem um grupo de substâncias derivadas do metabolismo da fenilalanina, sendo um de seus primeiros precursores o ácido *p*-hidróxi-cinâmico (ácido *p*-cumarínico). Compreendem o grupo dos compostos conhecidos como benzopironas. O núcleo básico de todas as cumarinas é resultante da fusão dos

anéis benzeno e 1,2-pirona, sendo o representante principal a cumarina (**1**), também conhecida como 1,2-benzopirona (KUSTER e ROCHA, 2003). Este composto foi inicialmente isolado em 1920 por Vogel a partir do fruto de *Dipteryx odorata*, e batizado de cumarina em uma referência a outra planta, a *Coumarona odorata*, na qual este composto é encontrado em abundância (MURRAY, 1982).



1

Em virtude da sua simplicidade estrutural, a cumarina simples é conhecida como o composto líder da classe, embora geralmente a 7-hidroxicumarina (**2**, umbeliferona) seja considerada como o composto mais importante, visto que grande parte das cumarinas mais complexas é seu derivado (MURRAY et al., 1982). Riveiro et al. (2010) indica que os principais tipos de cumarinas encontradas na natureza são geralmente oxigenadas na posição C-7, e pouco frequentemente oxigenadas nas posições C-5, C-6 e C-8. A quantidade e natureza destes substituintes, independente da sua origem, classificam estas moléculas como: simples, furanocumarinas, piranocumarinas, e cumarinas substituídas no anel pirona (Tabela 1).

Tabela 1: Principais tipos de cumarinas, suas características e exemplos.

Classificação	Características	Exemplos
Cumarinas simples	Hidroxiladas, alcooxiladas ou alquiladas no anel benzeno	 7-hidroxicumarina (2)
Piranocumarinas	Anel pirano de seis membros ligado ao anel benzeno. Linear ou angular	 Seselina (3) Xantiletina (4)
Furanocumarinas	Anel furano de cinco membros ligado ao anel benzeno. Linear ou angular	 Psoraleno (5) Angelicina (6)
Substituídas no anel pirona	Substituída no anel pirano. Em C3 e/ou C4	 Varfarina (7)

Também é válido ressaltar que após a ciclização da cumarina, a natureza dos substituintes indicará suas características químicas. Substituintes ativadores (doadores de elétrons) e desativadores (retiradores de elétrons) influenciam o núcleo 1,2-benzopirona de diferentes formas e modelam as atividades biológicas e químicas atribuídas a estes compostos, bem como os demais parâmetros farmacológicos. Neste contexto, as mudanças sazonais, condições ambientais ou estresses provocados por interação com microrganismos podem afetar diretamente a ocorrência e a quantidade de cumarinas em diversas partes da planta (OJALA, 2001; TORRES et al., 2004; TRANI et al., 2004; KAI et al., 2006) e consequentemente as atividades biológicas atribuídas aos seus extratos. Por este motivo, com o decorrer dos anos, inúmeros métodos de síntese de cumarinas foram desenvolvidos, facilitando o acesso e incorporando resultados interessantes a este grupo de moléculas.

Em uma breve revisão da literatura, observa-se que a síntese de cumarinas pode ser realizada de várias maneiras, incluindo as reações de Pechmann, Perkin, de Knoevenagel, de Reformatsky, Wittig, Ponndorf, entre outras (BORGES et al. 2005). O procedimento detalhado do mecanismo destas reações pode ser encontrado no artigo científico descrito no capítulo 2, subtítulo 2. Dentre estas, a síntese de Pechmann é a metodologia mais utilizada, pois envolve a utilização de materiais de partida simples, isto é, fenóis e β -cetoésteres em meio ácido. A síntese de 4-metilcumarina, realizada a partir da condensação do fenol com acetoacetato de etila em presença de ácido sulfúrico concentrado, foi descrita pela primeira vez em 1883 por Hans von Pechmann (1850-1902) e seu estudante Friedrich Carl Duisberg (1861-1935) que sintetizaram esta cumarina no laboratório de Adolf von Baeyer na Universidade de Munique. Mais tarde, Pechmann estendeu esta metodologia para realizar a síntese de outras cumarinas, empregando ácido málico no lugar de β -cetoéster (PECHMANN, 1883). Basicamente dois caminhos reacionais estão envolvidos na formação da cumarina neste tipo de reação (Figura 1): **(a)** uma transesterificação do β -cetoéster catalisada por ácido de Lewis ou de Bronsted seguida por uma ciclodesidratação do aril acetoacetato resultante ou **(b)** uma alquilação fenólica (na posição *orto* em relação ao grupamento fenólico) semelhante à reação de Friedel-Crafts seguida por uma transesterificação e ciclização intramolecular do éster do ácido *orto*-hidroxicinâmico.

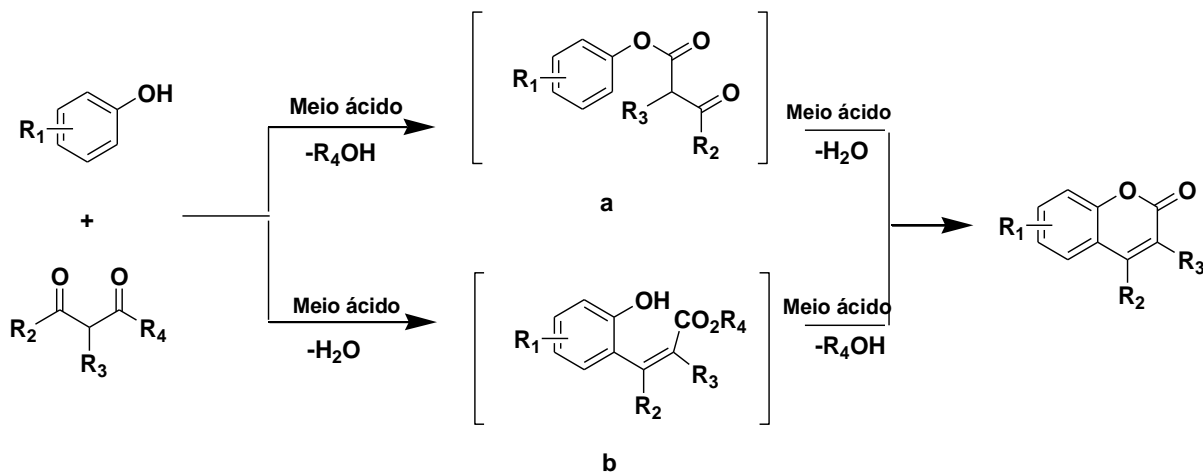


Figura 1: Métodos de síntese de cumarinas por reação de Pechmann (Li e Corey, 2011).

Embora a condensação de Pechmann seja um método simples para a preparação de diversos tipos de cumarinas substituídas a partir de uma grande quantidade de precursores fenólicos, muitos fatores influenciam na cinética destas reações limitando ou impossibilitando a obtenção do produto desejado. O primeiro aspecto a ser observado quando se trata da formação de cumarinas através da reação de Pechmann é a característica química dos substituintes presentes no fenol empregado. Fenóis com substituintes ricos em elétrons (elétron-doadores fortes como o fluoroglucinol, resorcinol e pirogalol) são rapidamente convertidos nas correspondentes cumarinas. Os fenóis pobres em elétrons (elétron-doadores moderados ou fracos) proporcionam uma redução nos rendimentos dos respectivos derivados de cumarinas e os fenóis monosubstituídos contendo grupamentos retiradores de elétrons (como o grupo ciano, nitro, acil, carboxil, entre outros) geralmente não formam cumarinas por condensação de Pechmann ou apenas formam os respectivos produtos em baixos rendimentos e a custo de elevados tempos reacionais. A posição no anel fenólico em que ocorre a substituição também é outro aspecto importante a ser observado, pois influencia diretamente na reatividade da condensação. Em fenóis simples, grupamentos doadores de elétrons (independente do tipo) na posição 3 facilitam muito a reação. A substituição na posição 2 do anel aromático geralmente impede a condensação, exceto em casos onde o 2-substituinte é um doador forte (Li e Corey, 2011).

Para fenóis que apresentam múltiplos grupamentos doadores de elétrons, o impacto da presença de um grupamento retirador de elétrons não obedece a uma

regra específica, devendo ser analisado de maneira particular caso a caso. Por exemplo, o 2- e o 4-nitroresorcinol condensam com acetoacetato de etila em ácido sulfúrico, mas o 4-nitroresorcinol não apresenta formação de cumarina quando condensado com qualquer tipo de β -cetoester alquilado na posição α , indicando que a desativação do anel aromático pelo grupamento retirador de elétrons, neste caso, fica dependente da posição em que o grupo retirador está localizado e também do tipo de substituição presente na posição α do β -cetoester. Segundo Li et al. (1998) a reatividade do β -cetoester com fenóis que possuem substituintes elétron-doadores fracos ou moderados pode ser aumentada pela utilização de precursores substituídos no carbono α com grupamentos retiradores de elétrons, sendo este outro aspecto de grande importância a ser observado quando no planejamento deste tipo de reação. Ainda sobre a reatividade dos compostos fenólicos, deve-se observar que mesmo quando estes apresentarem grupamentos ativadores (independente do tipo) é extremamente importante observar sua orientação em relação à posição *orto* que, independente do mecanismo de reação proposto (Figura 5a ou 5b) é crucial para o fechamento do respectivo anel da cumarina, e deve-se apresentar com uma densidade eletrônica satisfatória, aumentando rendimentos e diminuindo o tempo de reação (LI et al. 1998).

Outro aspecto a ser observado, e extremamente importante, é o catalisador utilizado na reação. A utilização de diversos catalisadores, tais como H_2SO_4 , P_2O_5 , FeCl_3 , ZnCl_2 , POCl_3 , AlCl_3 , PPA, HCl , ácido fosfórico, ácido trifluoroacético, entre outros, está bem documentada na literatura (LI e COREY, 2011). Em geral, as reações de síntese de cumarinas que utilizam como precursores os fenóis substituídos por grupamentos ativadores nas posições adequadas podem utilizar uma ampla gama de catalisadores, apresentando a formação dos produtos desejados com bons rendimentos. Nestes casos, a principal característica a ser observada nos catalisadores é seu caráter ácido forte ou fraco, pois os ácidos fortes geralmente produzem cumarinas através de reação de Pechmann em um menor tempo e são capazes de aumentar os rendimentos e diminuir a temperatura de reação quando se trabalha com fenóis menos reativos (KHALIGH, 2012).

A literatura disponível sobre a formação de cumarinas com fenóis que não apresentam estas características é bastante extensa indicando que a formação destes produtos não obedece a uma regra, e para cada caso devem ser realizados

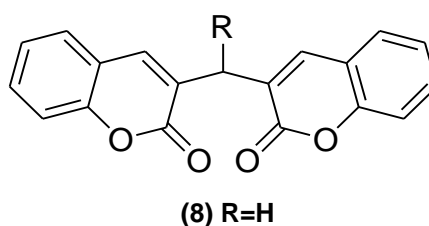
estudos aprofundados de cinética química determinando as melhores condições. Assim como o ajuste do catalisador pode melhorar os parâmetros cinéticos da reação de Pechmann, a presença de ácidos fortes e/ou temperatura aumenta a incidência de produtos não desejados nas reações, principalmente de cromonas, um grupo de moléculas que assim como as cumarinas apresentam fluorescência no UV longo (BOSE et al., 2002). Um exemplo desta diferença pode ser observado na síntese destas cumarinas utilizando o fenol e β -cetoester. Por ser um substrato pobre, o fenol não forma a 4-metilcumarina na presença de ácido sulfúrico, mas na presença de P_2O_5 ocorre a formação de cromona, mesmo quando o β -cetoester é substituído na posição α por grupamentos diversos. Outro exemplo interessante é a utilização de $AlCl_3$ como catalisador, pois exerce uma influência incomum na regioseletividade destas reações. A formação de cumarina a partir de um derivado do resorcinol usualmente formaria um produto 7-hidroxilado, mas utilizando $AlCl_3$ como catalisador há a formação apenas do isômero 5-hidroxilado (LI e COREY, 2011). Sendo assim, podemos concluir que a reação de Pechmann é uma ferramenta bastante interessante para a obtenção de 4-metilcumarinas e com rendimentos satisfatórios, desde que se observem as características químicas que determinam a reatividade de seus precursores.

Progressos consideráveis têm sido relatados acerca das propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas das cumarinas. Os resultados obtidos nestes trabalhos indicam que a 1,2-benzopirona é considerado um interessante núcleo para o desenvolvimento de novos fármacos já que, além de apresentar uma enorme gama de atividades farmacológicas, seus derivados ativos geralmente obedecem à regra dos cinco de Lipinski e apresentam uma satisfatória permeação através de barreiras biológicas, características importantes observadas para os principais fármacos disponíveis no mercado atualmente.

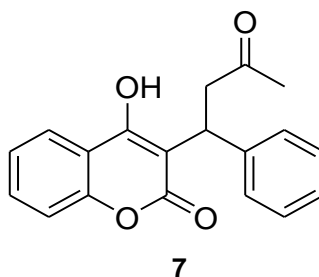
A partir da década de 1990, um número significativo de trabalhos passou a ser publicado relacionando inúmeras atividades biológicas às cumarinas, como por exemplo: antimicrobiana (SARDARI et al., 1999; OJALA, 2000), imunossupressora (TADA et al., 2002), anti-HIV (MAO et al., 2002), antimelanogênica (LEI et al., 2002), citostática (JIMÉNEZ-OROSCO et al., 2001; LIU et al., 2001) e citotóxico (VIANNA et al., 2012^b);).

Segundo Hoult e Payá (1996) e Ojala (2001), embora a grande diversidade de atividades biológicas relatadas seja atribuída a moléculas que contêm o anel benzopirano, é importante observar que as propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas das cumarinas dependem de seus padrões de substituição e modificações estruturais podem ser realizadas visando melhorar especificidade do efeito farmacológico e reduzir a toxicidade da molécula (HOULT e PAYÁ, 1996; OJALA, 2001).

Historicamente, a primeira cumarina a ser utilizada como um anticoagulante foi o dicumarol (**8**), que foi isolado a partir de sweet clover hay (*Melilotus alba*), em 1941. Este composto passou a ser utilizado na terapia anticoagulante em pacientes com doença cardiovascular (CAMPBELL e LINK, 1941).



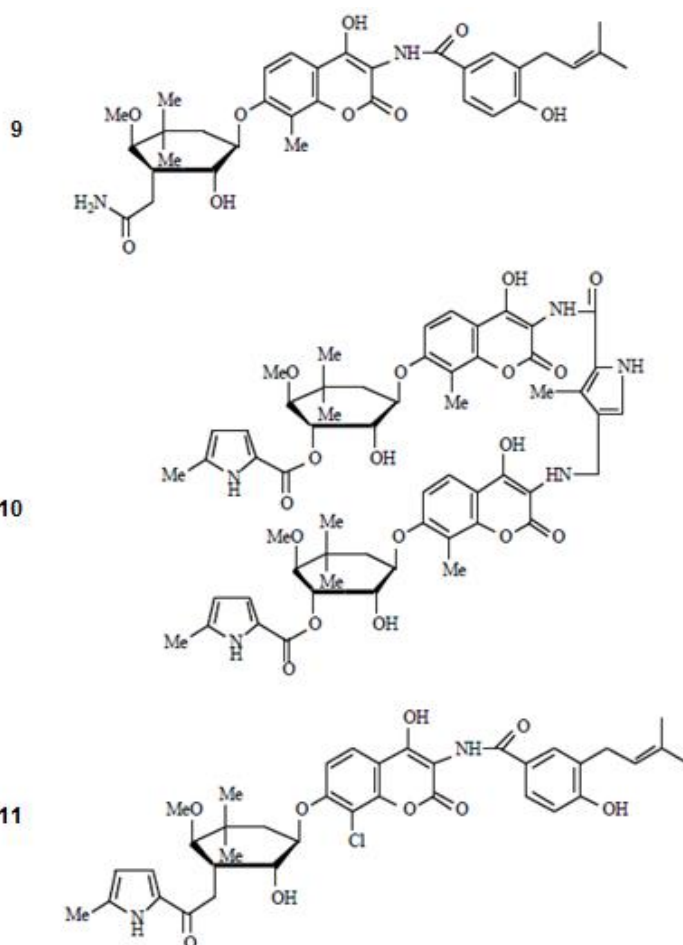
Alguns derivados do dicumarol como o Pentrombon ($R=CH_3$) e o Tromexan ($R=COOEt$) foram obtidos com sucesso para esta aplicação, mas a varfarina, um fármaco obtido naturalmente ganhou destaque. A varfarina (**7**) é uma 4-hidroxycumarina substituída que foi inicialmente utilizada como rodenticida. Atualmente, o fármaco comercializado é sintético e vem sendo empregado com sucesso como anticoagulante (GUSTAFSSON, 2004).



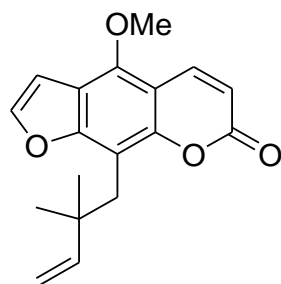
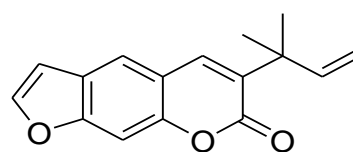
As 4-hidroxycumarinas apresentam habilidade de inibição da síntese do fator de coagulação através do bloqueio da ação da vitamina K1 no sangue, a qual ativa a

polimerização e reticulação da protrombina, a um polipeptídeo insolúvel e duro, conhecido como fibrina.

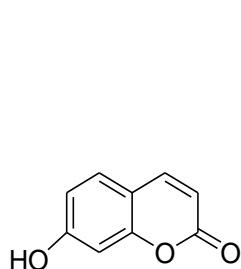
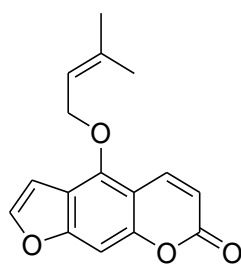
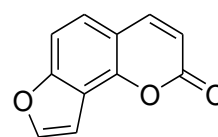
Alguns grupos de antibióticos possuem estruturas derivadas do núcleo básico de cumarinas, tais como a novobiocina (**9**, Figura 1), cumermicina (**10**) e clorobiocina (**11**), que são potentes inibidores da DNA girase e foram isolados de espécies de *Streptomyces* (CLAY e O'KENEDY, 2004). Todas estas moléculas possuem grupamento 3-amino-4-hidroxycumarina e um grupamento de noviose, que são essenciais para sua atividade biológica. A diferença entre (**11**) e (**9**) está no substituinte na posição 8 do anel aromático, onde um grupamento metil é substituído por um átomo de cloro e na substituição do grupamento carbomoila na posição 3' da noviose por um grupamento 5-metil-2-pirrolcarboxila. Já a cumermicina (**10**) apresenta um dímero de cumarina-noviose interligado por uma junção 3-metil-2,4-dicarboxilpirrol e a noviose presente neste fármaco apresenta os mesmos substituintes em 3' da clorobiocina (**11**).



Outra atividade que vem sendo abordada com frequência quando se trata de cumarinas é a atividade antifúngica. Daoubi et al. (2004) sintetizaram uma série de diidrofuranocumarinas e diidropiranocumarinas e testaram frente ao fungo *Botrytis cinerea*. Dois derivados de piranocumarina **12** e **13** mostraram inibição de 79 e 80%, respectivamente em uma concentração de 200 mg/L.

**12****13**

Os autores afirmam que o anel furano ligado ao núcleo 1,2-benzopirona parece desempenhar um importante papel no mecanismo de ação para a inibição do crescimento fúngico. Também podemos destacar a atividade antiproliferativa e citotóxica destas moléculas. Recentemente, diversas cumarinas têm sido relatadas como possuidoras de atividade frente a tumores, atuando na regulação da resposta imune, crescimento e diferenciação celular, ou sinergicamente com os ácidos *trans* retinóicos, muito utilizados no tratamento de pacientes com leucemia promielocítica aguda (RIVEIRO et al., 2004). Soma-se a estes trabalhos a pesquisa realizada por Kofinas e colaboradores (1998), que detectaram atividade frente a células de câncer rinofaríngeo e carcinoma humano brônquico epidermal em extratos de *Tordylium apulum*, que contém em sua composição umbeliferona (**2**), isoimperatorina (**14**) e derivados de angelicina (**15**).

**2****14****15**

Estes resultados sugerem que cumarinas isoladas podem ter um potencial terapêutico importante no tratamento de tumores de diferentes complexidades. Em nosso grupo de pesquisa, investigamos a atividade de cumarinas isoladas de espécies de *Pterocaulon* nativas do Rio Grande do Sul frente a gliomas e obtivemos resultados satisfatórios, como pode ser observado na revisão bibliográfica apresentada no capítulo 2. As propriedades antioxidantes relacionadas ao núcleo das cumarinas têm sido amplamente estudadas e muitas atividades biológicas vêm sendo relacionadas a estes compostos através deste mecanismo de ação. Para um melhor entendimento das atividades antioxidantes relacionadas a este núcleo e também das características químicas e métodos de obtenção, realizamos uma revisão destas propriedades na forma de um artigo submetido ao periódico *Current Medicinal Chemistry*. Este estudo está apresentado nesta tese no capítulo 4.

Sendo assim, esta tese está dividida em 3 capítulos, como segue:

- No capítulo 1 relatamos a extração, caracterização e quantificação de cumarinas obtidas a partir de *Pterocaulon balansae*, utilizando extração com CO₂ supercrítico. Este capítulo está apresentado na forma de um artigo original a ser submetido.
- O capítulo 2 descreve o desenvolvimento do trabalho de síntese orgânica, onde utilizamos a 7-hidroxi-4-metilcumarina como material de partida para modificações estruturais, visando o aumento de suas atividades biológicas através da inserção de grupamentos 1,2,3-triazóis na posição 7 para formação de uma coleção de híbridos cumarina-1,2,3-triazol.
- O capítulo 3 relata os testes biológicos preliminares realizados em linhagens de câncer utilizando os híbridos sintéticos descritos no capítulo 2.

A partir dos estudos teóricos relacionados a esta tese, foi produzido um artigo de revisão intitulado *New insights into the chemistry and antioxidant activity of coumarins* que está aceito junto ao periódico *Current Topics in Medicinal Chemistry* (Anexo 76).

CAPÍTULO 1

INVESTIGAÇÃO DE CUMARINAS EM ESPÉCIES DE *PTEROCAULON*
Extração de cumarinas de Pterocaulon balansae através de CO₂ supercrítico

1.1. INTRODUÇÃO

O gênero *Pterocaulon* pertence à família *Asteraceae*, tribo *Plucheea*, e seu nome provém do grego *Pteros* = asas e *caulon* = talos, em uma alusão aos caules alados característicos deste grupo de plantas (ANDERBERG, 1991). Este gênero é constituído de 18 espécies: 12 delas são americanas, estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina, seis espécies australianas sendo que algumas delas estendem-se até a Nova Caledônia, Indonésia e sudeste de Ásia. O gênero não existe na Europa, África e na maior parte da Ásia, Polinésia e Nova Zelândia, bem como, nas regiões mais frias da América do Sul (BARATA, 2010).

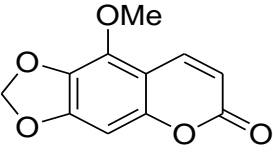
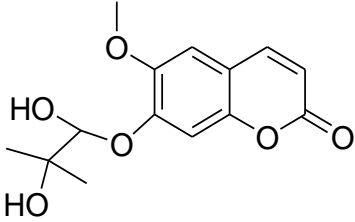
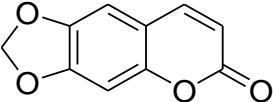
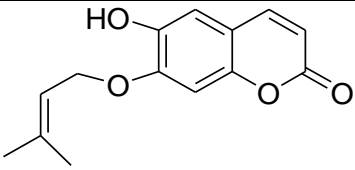
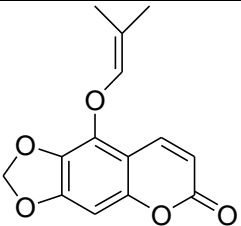
Em um estudo analisando a presença de plantas do gênero no território sul-brasileiro, Rambo (1952) colocou o gênero como pertencente ao continente setentrional, sendo que seis espécies são encontradas em todo o território: *P. alopecuroides*, *P. angustifolium*, *P. balansae*, *P. polystachyum*, *P. rugosum* e *P. virgatum*. Segundo o autor, as espécies do gênero geralmente são perenes e habitam campos naturais, cerrados restingas ou locais alterados, ou seja, formações abertas que são comuns à região da campanha, onde estas plantas são encontradas frequentemente. Ainda para o Rio Grande do Sul, o autor relata a presença da espécie *P. lorentzii* apenas em regiões arenosas.

Muitos usos medicinais são relatados para exemplares destas espécies. Comunidades rurais da Argentina utilizam partes aéreas de *P. virgatum* e *P. purpurascens* para problemas digestivos, como inseticida e também como agentes contra picadas de serpentes (DEBENEDETTI et al., 1992). A espécie *P. polystachyum*, amplamente distribuída no Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina possui relatos de usos como agente antifúngico e repelente de pulgas e moscas dentre outros. Do ponto de vista farmacológico, vários trabalhos têm sido publicados, relatando atividades que são atribuídas às cumarinas destas plantas, onde destaca-se a produção majoritária de cumarinas relatada para a maioria das espécies do gênero e frequentemente discutida pelo nosso grupo de pesquisa, bem como óleos essenciais e outros grupos de compostos fenólicos.

Dentre estes, destaca-se a pesquisa desenvolvida por Stein et al. (2005), que observando a utilização de plantas do gênero como antifúngico pela medicina popular, investigaram a atividade de extratos brutos metanólicos e frações hexano, diclorometano e metanol de *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum* quanto à atividade antimicrobiana, apresentando estes um largo espectro de ação contra

um painel de fungos patogênicos oportunistas responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas e dermatológicas em humanos. Os resultados satisfatórios encontrados bem como a alta concentração de cumarinas nos extratos destas plantas levaram a uma investigação mais profunda utilizando cumarinas isoladas. A partir das partes aéreas de *P. alopecuroides* foram isoladas a 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina (**16**) e a 7-(2,3-diidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (**17**). Das partes aéreas de *P. polysthachyum*, foram isoladas aiapina (**18**), prenilatina (**19**) e 5-(3-metil-2-butenilóxi)-6,7-metilenodioxicumarina (**20**), que foi também encontrada em *P. balansae*. Na tabela 2 se podem observar as estruturas químicas dos compostos isolados de *P. balansae* que já estão publicadas em periódicos da área.

Tabela 2: cumarinas do gênero *Pterocaulon*

	Nome	Estrutura
16	5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina	
17	7-(2,3-diidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina	
18	6,7-metilenodioxicumarina (aiapina)	
19	7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-hidroxicumarina (prenilatina)	
20	5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxicumarina	

No entanto, Stein et al. (2006) observaram que os valores de IC₅₀ das cumarinas isoladas são menores quando comparados aos valores de inibição de misturas de cumarinas ou extratos, sugerindo um sinergismo de efeito entre os compostos presentes nos extratos destas plantas. Na mesma linha, foi investigada a atividade de cumarinas frente a gliomas. Vianna et al. (2012) reportam a satisfatória atividade da 5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina (**16**) frente à linhagem humana (U138-MG) e de ratos (C6). Os autores sugerem que a conformação planar adotada pela molécula através de uma ligação de hidrogênio não clássica pode explicar a alta atividade encontrada e destacam a toxicidade seletiva observada nesta molécula através de testes utilizando células normais nas mesmas concentrações. Embora em maiores concentrações, 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxycumarina (**20**) também apresentou atividade satisfatória reportada pelos autores. A potencial utilização destas moléculas frente a linhagens de câncer é corroborada em estudo realizado por Riveiro *et al.* (2004), que demonstraram o efeito de diferentes extratos e de duas cumarinas 5,6,7-trioxigenadas isoladas de *P. polystachyum*, quanto à proliferação e diferenciação de células leucêmicas humanas U-937. A atividade mais significativa foi apresentada pelo extrato éter de petróleo. Entretanto, o tratamento com os compostos isolados (**16**) e (**20**) mostraram inibição na proliferação celular pronunciada, dependente de tempo e concentração, além de alterar a funcionalidade CD 88 e a redução de NBT, marcadores de diferenciação mitótica celular (RIVEIRO et al., 2004).

1.1.2. Extração com fluido em meio supercrítico

A tecnologia de extração com fluidos supercríticos baseia-se no fato de que as propriedades físicas de um gás são alteradas quando este se encontra em condições próximas ao seu ponto crítico. Nestas condições, a densidade de um gás tende a diminuir tornando o gás uma molécula com propriedades semelhantes às de um líquido real, e sua constante dielétrica estará alterada (List e Schmidt, 1989). Segundo Cassel et al. (2007), na extração em meio supercrítico podem ser utilizados diversos tipos de gases, como nitrogênio, hélio e outros, sendo o mais empregado para a extração de produtos naturais o dióxido de carbono, visto que este gás é não tóxico, não inflamável, inodoro, inerte, insípido e de baixo custo.

Por definição, qualquer substância mantida acima de sua temperatura e pressão críticas constitui um fluido supercrítico, o qual apresenta propriedades intermediárias entre gases e líquidos. A utilização destes fluidos na extração de produtos naturais tem como marco o processo de descafeinização dos grãos de café verde em meados de 1970. Desde então, uma ampla variedade de compostos tem sido obtida (MAUL et al., 1996), sendo o dióxido de carbono (CO_2) o solvente de escolha em mais de 90% dos casos (POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

A obtenção de solutos presentes em produtos naturais, empregando este processo, consiste na extração de princípios ativos na matriz sólida da planta através da solubilização dos mesmos no dióxido de carbono nas condições supercríticas do mesmo, ou seja, pressões e temperaturas acima do ponto crítico do dióxido de carbono que são 73,8 bar (7,38 MPa) e 31,1°C. Na extração, o dióxido de carbono percola o leito fixo de partículas sólidas e dissolve os compostos de interesse presentes na matéria-prima. A matriz sólida absorve o solvente supercrítico e em paralelo os compostos a serem extraídos são dissolvidos no solvente. Estes compostos dissolvidos são transportados para a superfície do sólido através de um mecanismo de difusão, e após a abertura de uma válvula de expansão presente no final do sistema, são separados do dióxido de carbono, que se expande sem deixar resíduo (CASSEL et al., 2007).

Quanto ao processo, diversos fatores podem influenciar diretamente na extração utilizando solventes supercríticos e devem ser observados antes do início do processo. Dentre estes, os mais importantes estão relacionados aos parâmetros de extração, representados pelo tempo, pressão e temperatura; a natureza da matriz, onde se deve observar o tamanho das partículas e presença de água na amostra; e principalmente a natureza dos solutos, onde se devem observar aspectos como polaridade e tipos de interações intermoleculares (iônica, por exemplo) que os compostos que se deseja extrair apresentam (CAMEL, 2001).

Sendo assim, este capítulo está descrito na forma de um manuscrito, a ser submetido, que trata dos nossos esforços em determinar novas metodologias para extração de compostos fenólicos a partir de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul. O processo de extração com CO_2 em meio supercrítico vêm sendo desenvolvido há alguns anos pelo nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o

laboratório de operações unitárias da PUCRS, que tem a coordenação dos professores Eduardo Cassel e Rubem Vargas.

A autorização para coleta das espécies vegetais utilizadas neste trabalho foi concedida pelo IBAMA no dia 05/11/2012 através da plataforma SISBIO, onde o documento está registrado sob o número 37170 em solicitação realizada pelo usuário 5535550 (Fernando Cidade Torres). A cópia da autorização pode ser verificada no anexo 1.

1.2. MANUSCRITO

Supercritical CO₂: a highly selective method for extraction
of coumarins from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae)

A ser submetido

**Supercritical CO₂: a highly selective method for extraction of coumarins
from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae)**

Torres, F.^a; Medeiros, B.N.^a; Teixeira, H.F.^a; Eifler-Lima, V.L.^a; Kawano, D.F.^a; Cassel, E.^b;
Vargas, R.M.F.^b; von Poser, G.L.^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract

The aerial parts of *Pterocaulon balansae* Chodat (Asteraceae) were extracted with supercritical carbon dioxide (SFE) under constant temperature (40 °C) and gradual pressure increase (90, 120, 150 and 200 bar) aiming at the recovery of enriched fractions containing coumarins. The yields of these substances were determined by high-performance liquid chromatography and indicate that the supercritical extraction from *P. balansae* presents seven coumarins previously cited by our research group. Among them, the compound **7** (5,6-dimethoxy-7-(2',3'-epoxy-3-methylbutyloxy)) is related for the first time as the major compound due to the physic-chemical characteristics of supercritical CO₂ that protect the epoxide ring opening can explain the absence of dihydroxylated coumarin as degradation product. Thus, SFE is a good solvent to extract coumarin from *P. Balansae* with high yields and protect degradation of epoxyated coumarins.

Keywords: *Pterocaulon balansae*; coumarins; supercritical fluid extraction; carbon dioxide; epoxyde.

1. Introduction

The supercritical fluid extraction using carbon dioxide (SFE) as solvent can be an efficient alternative to increase yield and selectivity in the extraction of organic compounds from plants (Cardozo et al., 2007; Azevedo et al., 2008; Barroso et al., 2011). SFE has been successfully employed by our research group for the extraction of phenolic compounds from *Hypericum* species (Cargnin et al., 2009; Barros et al., 2011; Almeida et al., 2013).

However, few articles report the application of SFE in the solubility and extraction of coumarins from plants (Rodrigues et al., 2008; Mitra et al., 2011), and there are no reports about the use of this methodology in the extraction of coumarins from *Pterocaulon* species. We have become particularly interested in the extraction of coumarins isolated from *Pterocaulon* species due to their activities against cancer and pathogenic fungi (Riveiro et al. 2004; Vianna et al., 2012;). Additionally, plants from the genus *Pterocaulon* (Asteraceae) are commonly used in veterinary medicine in South Brazil to treat animal problems popularly diagnosed as “mycoses” (Stein et al., 2006).

Considering the importance of coumarins for the cosmetic and pharmaceutical industries and the increasing demand for green chemistry, several studies were performed aiming the development of new technologies to obtain and process coumarins. Rodrigues et al. (2008) reported the coumarin (1,2-benzopyran) solubility and extraction from “emburana” (*Torresea cearensis*) in supercritical CO₂ and found high solubility. The extraction of coumarins 5, 6, 7 and 8 substituted from *Angelica dahurica* was reported by Chen et al. (2008), Wang et al. (2011) and Liang et al. (2012) and substituted dicoumarins were obtained by Peng et al. (2006). At light of these reports it can be concluded that supercritical CO₂ is a good solvent to obtain oxygenated coumarins from plants.

In a previous work, our research group developed a method to determine coumarins from *P. balansae* by UPLC/MS method and indicates the presence of 7 coumarins in the *P. balansae* aqueous extract as described in the **figure 1** (Medeiros, 2014).

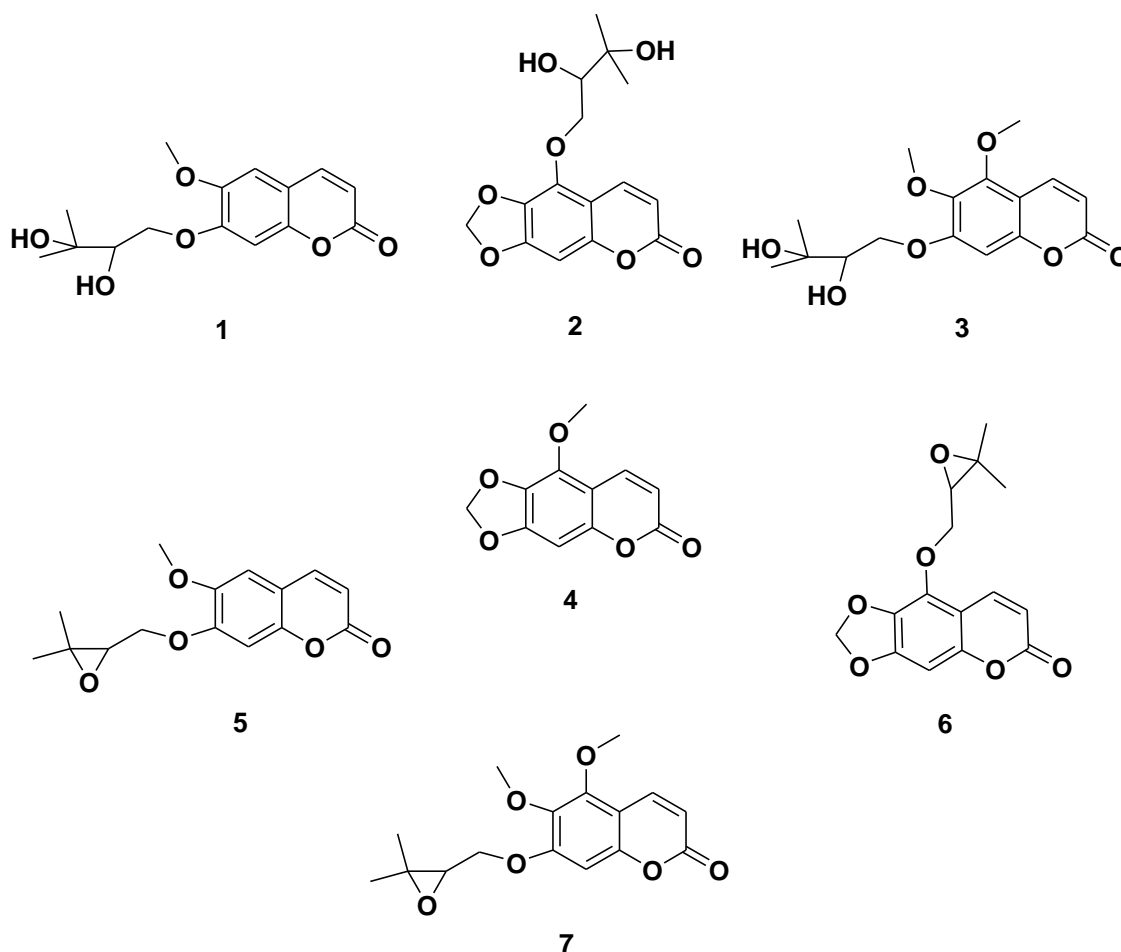


Figure 1: Coumarins from *P. balansae*

The coumarins **1**, **2**, **4**, **5** and **6** were previously described for this species (Barros, 1981; Heemann et al., 2006; Vallejo, 2010) and some works present the quantification of these compounds in *P. balansae* (Barata, 2010; Medeiros, 2014). Barata (2010) quantified coumarins by HPLC/UV in dichloromethane extract and indicates that the main compounds were 7-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyloxy)-6-methoxycoumarin (**1**) and 5-methoxy-6,7-methylenedioxy-6-methoxycoumarin (**4**) that are present as major compounds. The compounds 7-(2,3-epoxy-3-methyl-3-butylloxy)-6-methoxycoumarin (**5**), 5-(2,3-epoxy-3-methylbutyloxy)-6,7-methylenedioxy-6-methoxycoumarin (**6**) and 5-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyloxy)-6,7-methylenedioxy-6-methoxycoumarin (**2**) were present in lower amounts in extracts from *P. balansae*. Moreover, the coumarins **3** (5,6-dimethoxy-7-(3'-methyl-2',3'-dihydroxybutyloxy) coumarin) and **7** (5,6-dimethoxy-7-(2',3'-epoxy-3-methylbutyloxy) coumarin) were described for the first time in *P. balansae* by our research group (Medeiros, 2014).

Considering the important biological activities of *Pterocaulon* coumarins, the aim of this work was to perform the SFE of these compounds from the aerial parts of *P. balansae* and to determine their amounts in different extraction conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Compounds **1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 (Figure 1)**, identified by Medeiros (2014) were used as standards in the HPLC analysis. The solvents used in the chromatographic procedures were acetonitrile, ethanol, methanol, and acetic acid (Merck®). The water used was Mili-Q®. cLogP (calculated LogP) values of coumarins were assigned using ALOGPS (<http://www.vcclab.org/lab/alogps/>), a very reliable tool to predict LogP values of organic compounds (Tetko et al., 2009).

2.2. Plant material

Aerial parts of *P. balansae* were collected in Canoas, Rio Grande do Sul state, Brazil, in the summer (February, 2013), dried at room temperature and powdered in a cutting mill and stored in freezer (-20 °C). The species was identified by Dr. Sérgio Bordignon (Centro Universitário La Salle - Canoas, UNILASALLE, Brazil).

2.3. *P. balansae* extraction

SFE was carried out on pilot-scale automated equipment according to procedures previously described (Cassel et al., 2010). Powdered plant material (26.5 g DW) was extracted at constant temperature of 40 °C, while the pressure was successively increased from 90 to 120, 120 to 150 and 150 to 200 bar. The extractions were performed according to the experimental procedure defined by Cargnin et al. (2010) and the duration of the each condition and process was determined experimentally observing the decrease of mass in the collector vessel. The extraction yield was determined dividing the mass of extract by the mass of dry matter.

The supercritical carbon dioxide flow rate was 6.7×10^{-4} kg s⁻¹ (through the extraction vessel) using a flowmeter assay (Sitraus F C Massflo 2100 –Siemens) with accuracy of 0.1%. Pressure in the extractor was monitored with a digital transducer system, Novus 8800021600,

acquired from Novus Produtos Eletrônicos (Brazil) with precision of 71.0 bar. The temperature controller was connected to thermocouples (PT-100) with accuracy of <0.5.

2.4. Coumarins quantification

HPLC analyses were performed using a system equipped with Agilent Quaternary pump and 327 nm UV detector. The separation of the compounds was developed in Zorbax Eclipse XDB-C 18 RP column, 5 μm , 150 mm \times 4.6 mm using a gradient of acetonitrile and water/acetic acid (2%). For the calibration curve, the previously isolated 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin (**4**) was used. The method was validated for specificity, linearity, quantification and detection limit, precision and accuracy in order to ensure that it is suitable for analysis according to the ICH (2005). The complete procedure can be observed in (Medeiros, 2014).

2.5. Statistical analysis

Means difference among each extraction condition was tested for significance by ANOVA using a probability value of $P < 0.05$. Tukey's test was used to indicate mean separation among these conditions (GraphPad Prism Software, version 5).

3. Results and discussion

3.1. *Pterocaulon balansae* supercritical CO_2 extraction

The duration of the extraction was experimentally determined observing the exhaustion. The yield of the extracts in the final of the process was 3.16%. **Figure 2** shows the influence of each condition in the extract recovery from *P. balansae* and demonstrates that the condition of 120 bar afforded higher yields of crude extract.

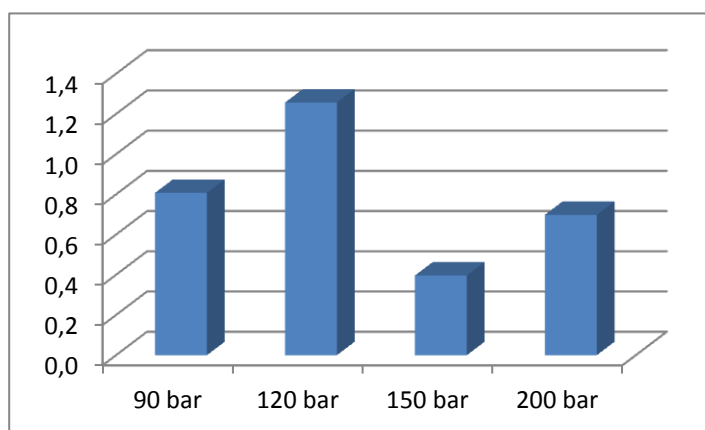


Figure 2: Yield (mg%) of crude extracts from *P. balansae*

Moreover, the extraction conducted at 120 bar was 1.55, 3.17 and 1.8 times more effective for the extract recovery when compared with the extractions at 90, 150 and 200 bar, respectively. The decrease of the extraction yield at 150 bar and subsequent increase at 200 bar could be explained observing that the increase of pressure in the system could increase the extraction of higher molecular weight and/or internalized compounds.

The time of extraction in each condition was determined and indicates that the recovery rate/time is inversely proportional to the increase of pressure in the extraction system, as shown in the **figure 3**

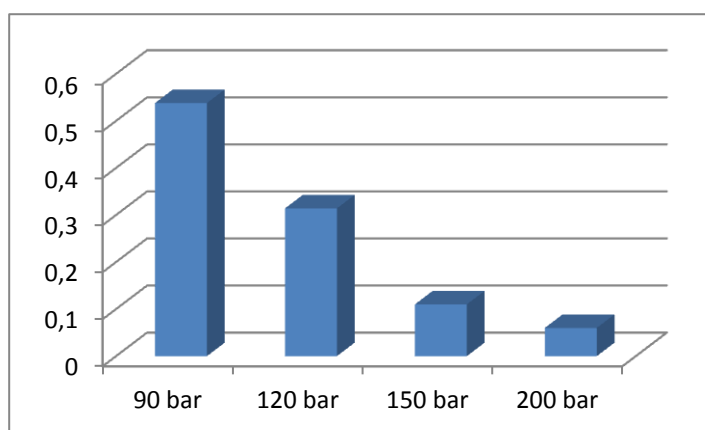


Figure 3: Recovery rate (g/min) from *P. balansae*.

From **figure 3**, it can be observed that the extract recovery rate per time is inversely proportionally to the pressure of the system, and indicates that the extract flow are lower when changes the chemical characteristics of the compounds from *P. balansae*. To determine the yields of the target compounds of *P. balansae*, HPLC/UV quantification in all CO₂ conditions was carried out as described in section 3.2.1.

3.2. Quantification of the target compounds

The amount of the coumarins was determined according the procedure above described, dividing the yield of each compound by the mass of plant. The **table 1** shows the quantification of the compounds in the process and in each condition employed.

Characterization of coumarins was carried out by their retention times, as previously determined by Medeiros (2014) and by co-injection of authentic samples.

Table 1: Summary of the coumarin contents (mg/g*) in the SFE extracts from *P. balansae*. (a,b,c,d). Different letters indicate significant differences among the different pressures ($P < 0.05$).

	90 bar	120 bar	150 bar	200 bar	Total yield
1	0.0462 ± 0.00035 ^a	0.0345 ± 0.0037 ^b	0.0210 ± 0.0002 ^c	0.046 ± 0.0004 ^a	0.1477 ± 0.0032
2	0.0287 ± 0.0003 ^a	0.0319 ± 0.0004 ^b	0.0166 ± 0.0002 ^c	0.034 ± 0.0004 ^d	0.1112 ± 0.0029
3	0.1361 ± 0.0008 ^a	0.1221 ± 0.0016 ^b	0.0454 ± 0.0006 ^c	0.073 ± 0.0011 ^d	0.3766 ± 0.0009
4	0.3436 ± 0.002 ^a	0.719505 ± 0.037 ^b	0.3166 ± 0.0011 ^a	0.539 ± 0.0062 ^c	1.9187 ± 0.0091
5	0.2693 ± 0.00034 ^a	0.6159 ± 0.0095 ^b	0.1718 ± 0.0015 ^c	0.246 ± 0.0021 ^d	1.303 ± 0.0032
6	0.2135 ± 0.0003 ^a	0.4087 ± 0.0005 ^b	0.1166 ± 0.0030 ^c	0.171 ± 0.0009 ^d	0.9098 ± 0.0005
7	1.5142 ± 0.0008 ^a	1.9001 ± 0.0013 ^b	0.4389 ± 0.000 ^c	0.688 ± 0.0011 ^d	4.5412 ± 0.0001

* Extraction yield (mg/g) = amount of target compound/plant mass

Table 2 and **figure 1** indicate the presence of the seven coumarins previously identified by Medeiros et al. (2014) in the SFE extracts. The 120 bar condition had the major recovery rate when compared with the other conditions for the compounds **4**, **5**, **6** and **7**, the less polar coumarins as suggested by the analyses of HPLC retention times. Coumarin **1** was the most polar compound and had the higher recovery rate at 90 and 200 bar. Coumarin **2** showed the high recovery rate at 200 bar and the coumarin **3** at 90 bar.

The differences observed in the extraction of coumarins **1**, **2** and **3** can be explained by the presence of their epoxyated precursors **5**, **6** and **7** on the plant surface, and the consequent exposition to chemical degradation of these coumarins by hydrolysis and UV radiation. Some works indicate compound **4** as the main coumarin of *P. balansae*, but our results indicate that the coumarin **7** have a recovery rate 2.4 times higher when compared to the coumarin **4**. The major presence of **7** was recently reported for this species (Medeiros, 2014).

Other compound recently reported by our group is coumarin **3**. This compound is generated from compound **7** by opening of the epoxy ring. Coumarin **1** is reported as the major compound in the literature (Barata, 2010), but in this study had a lower recovery rate. Coumarin **1**, in the same way as **3**, is derived from coumarin **5**, also by opening of epoxy ring in the position 7.

To observe the selectivity of the SFE in the recovery of coumarins, we have developed a study around the quantification of the target compounds by mass of extract. These results demonstrated that the total amount of coumarins in the extract was 30% and indicated a high selectivity in the process. The selectivity in each condition for the targeted coumarins can be observed in the **table 2**.

Table 2: Summary of the coumarins selectivity (%) in SFE extracts. ^(a,b,c,d). Different letters indicate significant differences among the different pressures ($P < 0.05$).

	90 bar	120 bar	150 bar	200 bar	Total
1	0.5723 ^a	0.2568 ^b	0.5296 ^c	0.6604 ^d	0.47%
2	0.3554 ^a	0.2539 ^b	0.4190 ^c	0.4920 ^d	0.35%
3	1.6860 ^a	0.9716 ^b	1.1461 ^c	1.0460 ^d	1,20%
4	4.2560 ^a	5.7258 ^b	8.000 ^c	7.7167 ^c	6.10%
5	3.3346 ^a	4.9020 ^b	4.3364 ^c	3.5170 ^d	4,13%
6	2.6441 ^a	3.2520 ^b	2.9430 ^c	2.4554 ^d	2,90%
7	18.7516 ^a	15.121 ^b	11.078 ^c	9.8511 ^d	14,38%

* Selectivity (%) = amount of target compound/100g of extract

3.3. General discussion

The yields of the crude extracts were calculated (**table 1**), indicating that SFE can provide high recovery rate values to coumarins from *P. balansae*. Among the conditions tested, 120 bar pressure had the higher yield of crude extracts when compared to other conditions. The presence of high amounts of other chemical compounds with low molecular weight or low polarity can increased the extracts yields at these conditions. Moreover, it can

be observed that in the 120 bar pressure the yields of coumarins 4,5,6 and 7 were higher when compared to the other conditions, including the pressure of 90 bar. The higher selectivity of coumarins in the SFE extraction was described by Wang et al. (2011), that indicates high amounts of extracts in the conventional solvents when compared to SFE extraction, but a recovery rate of imperatorin and isoimperatorin in the SFE extraction from *Angelica dahurica*.

On the other hand, the chemical composition of the extracts obtained here through SFE was different of those reported by Barata (2010) using chloroformic extracts. The author indicated the presence of eight coumarins from *P. balansae* and the presence of coumarin **1** as the major product, 1.79 and 2.0 times more recovered when compared to the other major compounds **4** and **7**. Medeiros et al. (2014) reported the major presence of coumarin **3** in *P. balansae* aqueous extract. The authors indicated that coumarin **3** was 1.94 and 1.36 times more recovered when compared to compounds **4** and **7**, respectively.

Moreover, compound **1** is a 6,7-oxygenated coumarin with two hydroxyl groups coupled to the side chain at position **7**, thus increasing the polarity of this compound when compared to other coumarins from *P. balansae*. In the SFE extracts, coumarin **1** was detected as a minor compound, 9.3 times lower when compared to its precursor **5**. The major presence of hydroxylated coumarins in the dichloromethane and aqueous extracts when compared to their epoxyated precursors indicate that SFE extraction can protect coumarins of *P. balansae* from degradation.

Barata (2010) and Medeiros (2014) reported the presence of lower yields of the epoxy precursors when compared to its hydroxylated derivatives. However, they did not mention the high instability of epoxy groups, which can be easily hydrolyzed due to the high constraint associated with the three member ring. According Musto et al. (2001) when exposed to ultra-violet radiation, weakly acids or bases, water or even to the increase of temperature, epoxy rings can open. This corroborates the idea that the hydroxylated coumarins **1**, **2** and **3** are derivatives from the epoxy analogues **5**, **6** and **7**, respectively. Thus, we suggest a chemical mechanism for the degradation of **5** in the presence of the hydronium ion to form the coumarin **1** (**Figure 4**).

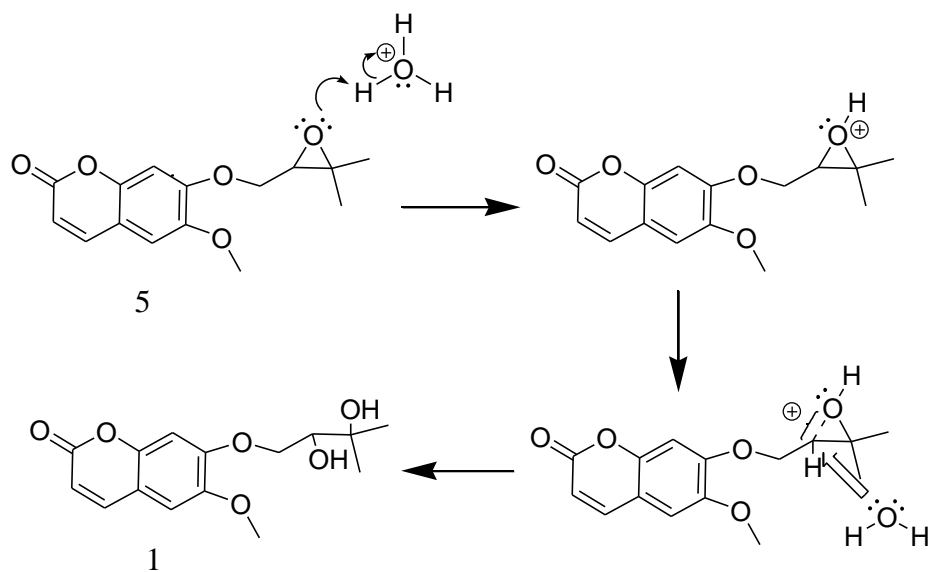


Figure 4: Mechanism of epoxide ring opening.

The mechanism includes the protonation of the epoxy oxygen, which favors the nucleophilic attack of water on the more substituted carbon because it is this carbon that holds the greater degree of positive charge. The mechanism described in the figure 4 can be used to explain the recovery rate differences between the epoxylated precursors and its respective diols. According the **table 1**, the same behavior was observed for the compound **2** (8.1 times lower than its precursor **6**) and compound **3** (13.3 times lower than its precursor **7**), as shown in the **figure 5**, that indicates the coumarins and its respective degradation products, such as the molecular weight and average cLogP for each compound.

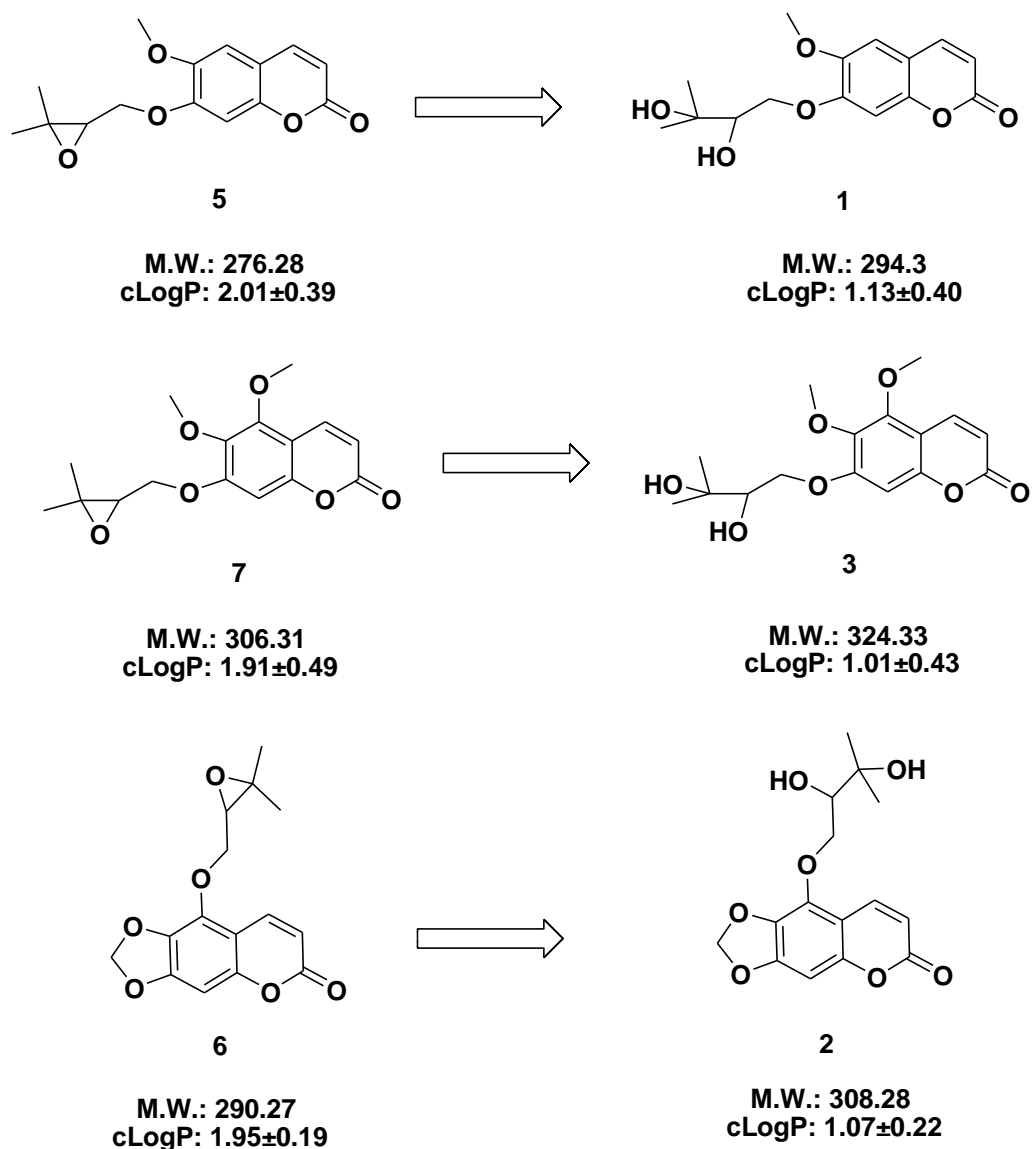


Figure 5: Precursors **5**, **6** and **7** and their degradation products **1**, **2** and **3**. The respective molecular weight and average cLogP.

On the other hand, the lower presence of the diols **1**, **2** and **3** in the SFE extracts can be explained by the physico-chemical characteristics of the molecule such as molecular weight and polarity. The presence of a vicinal diol in the side chain at the position seven increases the polarity of compounds **1**, **2** and **3** when compared to other coumarins (see average LogP, **figure 5**) and decreases the solubility of these compounds in the supercritical CO₂. In the **figure 5** it can be observed that the coumarins present similar molecular weight between 276.28 and 324.33g, indicating that this characteristic has not a significant influence in the process. The influence of functional groups in the coumarin nucleus in SFE solubility of coumarins was initially reported by Yoo et al. (1997) and corroborated by Choi et al. (1998).

The authors investigated 4,6 and 7 substitutions and concluded that the substitution of functional group at position 7 tended to reduce the solubility in the order: methyl > methoxy > hydroxy, suggesting that as the polarity of the functional groups on the coumarin derivatives are increased, the compounds become less soluble in supercritical CO₂. Moreover, the authors concluded that any substitution at the position 4 in the coumarin decreases the solubility of compounds in supercritical CO₂.

4. Conclusions

The physico-chemical characteristics of supercritical CO₂ extraction may provide ideal conditions for the isolation of coumarins such as lower extraction times and temperatures, thus protecting epoxy coumarins from degradation. The increase of the polarity that is characteristic of molecules with hydroxyl groups can decrease the solubility of compounds **1**, **2** and **3** in the supercritical CO₂ in all conditions tested.

Regardless of the pathway that causes this unexpected result, the important finding is that supercritical CO₂ is a highly selective solvent for extraction of coumarins from *P. balansae* and presents several benefits because is a green solvent, dispenses sample drying, time saving and low cost when compared to conventional solvents. Thus, it can be concluded that the SFE process is a great alternative to obtain extracts from *P. balansae* with high selectivity and yields of coumarins.

5. References

- AZEVEDO A.B.A., MAZZAFERA P., MOHAMED R.S., MELO S.A.B.V., KIECKBUSCH T.G. Braz. J. Chem. Eng. 25, **2008**, p.543-552.
- BARATA, S.V. Identificación de cumarinas en espécies autóctonas del género *Pterocaulon* ell. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Belgrano. N° 311, **2010**. Master's thesis .
- BARROS, F.M.C.; SILVA, F.C.; NUNES, J.M.; VARGAS, R.M.F.; CASSEL, E.; VON POSER, G.L. J. Sep. Sci. 34, **2011**, p.3107–3113.
- BARROSO, M. S. T. ; VILLANUEVA, G. ; LUCAS, A. M. ; PEREZ, G. P. ; VARGAS, R. M. F. ; BRUN, G. W. ; CASSEL, E. Braz. J. Chem. Eng, 28, **2011**, p.305-312.
- BEVAN, C.D.; MARSHALL, P. S. Nat. Prod. Rep. 11, **1994**, p.451.
- CABRERA, A.L. Compositae. in. BURKART, A. Flora ilustrada de entre rios (Argentina), Parte 6. Colección Científica del I.N.T.A. p. 106-554, Buenos Aires, **1974**.
- CARDOZO JR E.L., CARDOZO-FILHO L., FERRARESE-FILHO O., ZANOELO E.F. J. Agric. Food Chem., 55, **2007**, p.6835-6841.
- CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; BRUN, G.W. Nat. Prod. Commun., 03, **2008**, p.373-378.
- CASSEL, E., BEDINOT, C., VARGAS, R.M.F., **Unidade Piloto de Extração Supercrítica**, Brazilian Patent n° PROV020110081175, **2011**.
- CHEN, Q.; LI, P.; HE, J.; ZHANG, Z.; LIU, J. J. Sep. Sci. 31, **2008**, p.3218 – 3224.
- CHOI, Y.H.; KIM, J.; NOH, M.J.; CHOI, E.S.; YOO, K. Chromatographia. 47, **1998**, p.93-97.
- CHUN Y.; YAN-RONG X.; WEI-XI Y. J. Agric. Food Chem. 50, **2002**, p.846–849.
- ICH Q2 (R1) International Conference on Harmonization, Validation of analytical procedures: test and methodology, **2005**.
- LIANG, X.; LIAO, Z.; ZHU, J.; ZHAO, G.; YANG, M.; YIN, R.; CAO, Y.; ZHANG, J.; ZHAO, L.; J. ethnopharmacol. 139, **2012**, p.52–57.
- MAGALHÃES, A. F.; MAGALHÃES, E. G.; LEITÃO FILHO, H. F.; FRIGHETTO, R. T. S.; BARROS, S. M. G. Phytochemistry, 20, **1981**, p. 1369–1371.
- MEDEIROS, B. N. Nanoemulsões de uso tópico contendo extrato de *Pterocaulon balansae* (Asteraceae): Estudos de formulação e permeação cutânea. Universidade Federal do Rio grande do Sul. **2014**. Master's thesis.
- MITRA, P.; BARMAN, P. C.; CHANG, K. S. Food Bioprocess. Technol. 4, **2011**, p.737-744.

MUSTO, P.; RAGOSTA, G.; RUSSO, P.; MASCIA, L. *Chem. Phys.*, 202, **2001**, p.3445–3458.

RODRIGUES, R.F.; TASHIMA, A.K.; PEREIRA, R.M.S.; MOHAMED, R.S.; CABRAL, F.A. *J. of Supercritical fluids*, 43, **2008**, p.375-382.

STEIN, A.C., FRITZ, D., LIMA, L.F.P., MATZENBACHER, N.I., SCHRIPSEMA, J., PIRES, V., SONNET, P., VON POSER, G. *Chem. Nat. Compd.* 43 (6), **2007**, p. 691-693.

STEIN, A.C., SORTINO, M., AVANCINI, C., ZACCHINO, S., VON POSER, G. *J. Ethnopharmacol.* 99, **2005**, p.211–214.

TENG, W.; CHEN, C.; CHUN, R. *Phytochem. Anal.* 16, **2005**, p.459–462.

TETKO, I.V.; PODA, G.I.; OSTERMANN, C.; MANNHOLD, R. *Chem. Biodivers.* 6, **2009**, p. 1837-1844.

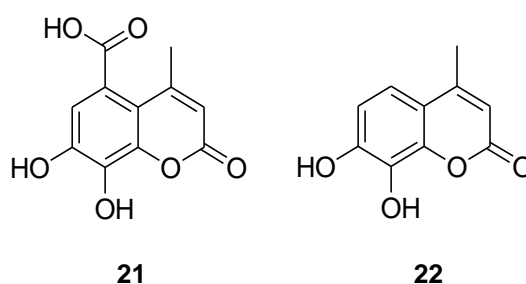
VIANNA, D.R.; HAMERSKI, L.; FIGUEIRÓ, F.; BERNARDI, A. ; VISENTIN, L.; TEIXEIRA, H.; PIRES, E.; EIFLER-LIMA, V. L.; SALBEGO, C.; BATASTINI, A. M.; VON POSER, G.; PINTO, A. *Eur. J. Med. Chem.*, 57, **2012**, p. 268–274.

2.1. INTRODUÇÃO

No laboratório de Síntese Orgânica Medicinal, temos sintetizado uma série de 4-metilcumarinas através de reação de Pechmann. Diversos autores reportam atividades farmacológicas para cumarinas dotadas de grupamento metil na posição 4, que quando comparadas aos análogos simples geralmente não apresentam diferenças significativas quanto à sua atividade biológica e toxicidade.

Os primeiros experimentos visando à formação de 4-metilcumarinas em nosso grupo de pesquisa foram realizados por Vianna e colaboradores (2011) que sintetizaram em microondas uma série de 4-metilcumarinas através da reação de Pechmann e testaram a atividade frente ao fungo *Sporothrix schenckii*. Dentre as moléculas sintetizadas, o ácido 7,8-diidroxi-4-metil-2-oxo-2H-cromeno-5-carboxílico (LaSOM79*, **21**) foi o que apresentou atividade antifúngica promissora, com CIM de 66 μ M. A aplicação de micro-ondas (MW) na síntese destas cumarinas forneceu vantagens significativas em comparação aos métodos convencionais de aquecimento empregados, como diminuição significativa dos tempos reacionais, a formação de produtos com alto grau de pureza e aumento do rendimento¹.

Resultados publicados por Vianna et al. (2012) demonstraram que **21** e LaSOM 78 (**22**) apresentam uma capacidade antioxidante importante. Os autores atribuem a atividade encontrada à presença de duas hidroxilas ligadas ao anel aromático independente da posição em que se encontram, característica responsável por um aumento na densidade eletrônica do núcleo aromático, promovendo diminuição da atividade dos radicais nas diferentes técnicas testadas.



Dando continuação a estes trabalhos, estamos realizando a síntese de novas cumarinas, através de *Click Chemistry*, com o objetivo de aumentar a variação

¹ Neste trabalho, todos os compostos finais Sintetizados no laboratório de Síntese Orgânica Medicinal e passíveis de serem avaliados farmacologicamente recebem o código LaSOM e o respectivo número. Este código será adotado no manuscrito a ser submetido.

estrutural através da inserção de grupamentos 1,2,3-triazol e conseqüentemente formar híbridos mais ativos e com características farmacológicas mais interessantes aos olhos da química medicinal.

Os 1,2,3-triazóis (Figura 2) ocupam um papel importante não só na química orgânica mas também na química medicinal devido à sua fácil obtenção e às inúmeras atividades biológicas atribuídas aos representantes desta classe (Kolb e Sharpless, 2009). Quanto às características químicas, são altamente estáveis em meio ácido e alcalino, tanto quanto em condições redutoras e oxidativas, o que indica um alto grau de estabilização do núcleo aromático destes triazóis (VATMURGE et al., 2008).

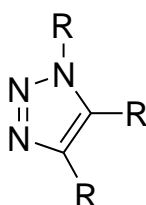


Figura 2: Núcleo básico de 1,2,3-triazóis

Por serem anéis contendo três átomos de nitrogênio, dotados de aromaticidade e de um sistema rico em elétrons, este tipo de estrutura confere aos triazóis a capacidade de se ligar facilmente a uma variedade de enzimas e receptores em meio biológico através de interações fracas, tais como ligações coordenadas, ligações de hidrogênio, íon-dipolo, cátion- π , empilhamento π - π , efeito hidrofóbico e interações de van der Waals, conferindo a estas estruturas um amplo espectro de atividades biológicas (BOCK et al., 2007; ZHOU e WANG, 2012). Os 1,2,3-triazóis são uma das principais unidades estruturais encontradas em uma grande variedade de moléculas bioativas como anti-fúngicos (AHER et al. 2009), anti-bacterianos (DEMARAY et al., 2008), anti-HIV (WHITING et al., 2006; GIFFIN et al. 2008) e agentes anti-inflamatórios, anti-tuberculosos e anti-alérgicos (SIMONE et al. 2011). Várias moléculas de fármacos contendo 1,2,3-triazol estão disponíveis no mercado, incluindo o tazobactam (BENNET et al., 1991), cefatrizina (VATMURGE et al. 2008) e o carboxiamidotriazol (SOLTIS et al. 1996).

Dentre as principais atividades relatadas para moléculas contendo 1,2,3-triazóis, destacam-se as pesquisas realizadas investigando sua atividade anticancerígena (FRAY et al. 2001; IMPERIO et al. 2007). Através da combinação

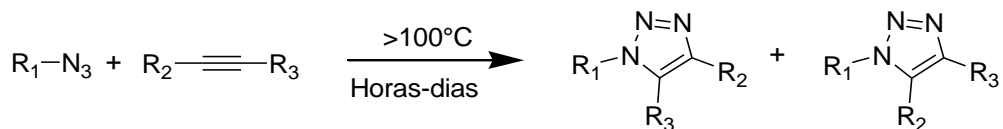
de 1,2,3-triazol com outros farmacóforos via *Click Chemistry*, diversos compostos com potente atividade anti-tumoral vêm sendo sintetizados e podem ser considerados grandes alternativas para a funcionalização de candidatos à fármaco.

2.1.1. Formação de triazóis através de *Click Chemistry*

O processo de formação de triazóis utilizando cobre como catalisador emergiu como o principal exemplo de *Click Chemistry*, um termo introduzido em 2001 por Sharpless para descrever um conjunto de reações “quase perfeitas”, visando a formação de ligações úteis na construção de moléculas com características desejadas. Reações assim classificadas apresentam como características principais a fácil execução, versatilidade, seletividade, ausência da necessidade de desproteção e presença de rendimentos elevados sem a formação de subprodutos (LUTZ e ZARAFSHANI, 2008). Uma grande variedade de reações químicas pode cumprir estas características, mas quando se trata de desenvolvimento de novos fármacos, observa-se principalmente a utilização da cicloadição 1,3-dipolar, cicloadição de Diels-Alder, reações do tipo não aldólicas com funções carbonílicas e adição a ligações múltiplas carbono-carbono (SHARPLESS et al., 2001). A reação térmica de alcinos terminais ou internos com azidas orgânicas (Esquema 1) é reportada há mais de um século como o primeiro exemplo de 1,2,3-triazol sintetizado por A. Michael à partir de fenil azida e acetilenodicarboxilato de dietilo em 1893.

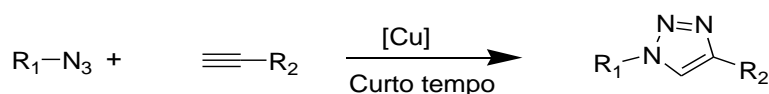
Neste trabalho utilizamos reações de *Click Chemistry* com a finalidade de formar triazóis conjugados através de cicloadição 1,3-dipolar. A adição 1,3 dipolar, a qual utiliza um alcino terminal e uma azida orgânico como materiais de partida, também é conhecida como ciclização de Huisgen. Rolf Huisgen, cientista alemão nascido em 1920, foi o primeiro a compreender esta reação que origina 1,2,3-triazóis tanto 1,4- quanto 1,5-dissubstituídos (Esquema 1). No entanto, o conceito da ciclização de Huisgen propriamente dito não pode ser classificado como uma reação do tipo “Click Chemistry”, pois ao final da reação se observa a formação de uma mistura 1:1 de triazóis 1,4- e 1,5-dissubstituídos (GIL et al., 2007) e ainda se utilizam altas temperaturas para obtenção dos produtos. Isso acontece porque embora a reação de uma azida com um alcino seja altamente exotérmica, a energia de ativação necessária para que ocorra a reação é muito alta em reagentes não ativados, apresentando baixos rendimentos e substituição assimétrica do alcino,

formando a mistura de isômeros acima citada. A reação se torna mais rápida quando R_2 e R_3 são grupamentos retiradores de elétrons.



Esquema 1

Os catalisadores de cobre mudam drasticamente o mecanismo e os resultados da reação, convertendo-a em uma sequência de passos discretos que culminam na formação de um 1,4-triazol acoplado ao cobre como intermediário. Sendo assim, a utilização de Cu(I) como catalisador em reações de azidas orgânicas e alcinos terminais têm sido o método de escolha para a formação de triazóis 1,4-dissubstituídos desde a sua descoberta, pois garante uma exclusiva regioseletividade, condições reacionais suaves e rendimentos altos (Esquema 2) (FELDMAN et al. 2004).



Esquema 2

Esta metodologia tem encontrado muitas aplicações na descoberta de fármacos, bioconjugados e na ciência dos materiais (Wang et al., 2003). Do ponto de vista químico, a reação não é significativamente afetada por propriedades estéricas ou eletrônicas dos grupos ligados ao alcino e à azida orgânica, sendo que, azidas contendo grupos doadores, retiradores, alifáticos, aromáticos normalmente reagem muito bem nas condições reacionais empregadas. A reação procede normalmente tanto em solventes próticos quanto apróticos, incluindo água, e geralmente não é afetada pela maioria dos grupamentos orgânicos e inorgânicos, eliminando a necessidade de utilização de grupamentos protetores.

As principais vantagens do ponto de vista químico são a alta estabilidade destes anéis que geralmente são estáveis em condições severas (hidrólise, oxidação e redução), momento dipolar alto, (4.8 a 5.6 Debye), caráter aromático e a capacidade de aceitar ligações de hidrogênio, muito importante para a interação em meio biológico. Em uma breve revisão da literatura, observa-se o uso de diversos

metais como catalisadores deste tipo de cicloadição, mas somente os sais de cobre apresentam uma exclusiva regioseletividade, formando apenas 1,4-triazóis em procedimentos compatíveis com a maioria dos reagentes e com comprovada robustez.

Na maioria dos procedimentos descritos são utilizados sais de cobre como catalisadores das reações de *Click Chemistry*, mas a utilização destes sais depende da formação de espécies de Cu(I), visto que sais de cobre (II) não são catalisadores competentes para este tipo de reação, além de formarem produtos indesejados quando em grandes concentrações. Sendo assim, Rostovtsev e colaboradores em 2002 desenvolveram uma prática alternativa e simples para a formação de Cu(I) *in situ*, utilizando ascorbato, um agente redutor fraco que é utilizado em excesso nas reações, pois grupos funcionais como alcools, amins, aldeídos, tióis, fenóis e ácidos carboxílicos podem ser rapidamente oxidados pelo íon cuprico, reduzindo o Cu(II) que é a espécie catalítica.

As etapas gerais que compõem o mecanismo desta reação (Figura 3) envolvem: **1)** a formação de um complexo π entre as espécies de Cu(I) geradas *in situ* com a tripla ligação do alcino terminal, ativando o alcino terminal na forma de Cu-acetileno **I**, **2)** ciclização formal para fornecer um intermediário Cu-C(triazol) **II** e **3)** quebra da ligação Cu-C para dar o composto triazólico e regenerar o catalisador, sendo que cada etapa pode envolver espécies de cobre multinucleares (RODIONOV et al., 2007).

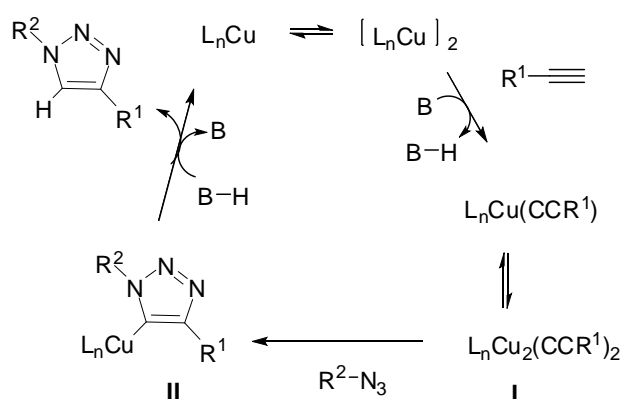


Figura 1: ciclo sintético para a obtenção de 1,2,3-triazóis através de Click Chemistry.

Quanto às azidas alifáticas, indispensáveis para a reação, estas podem ser facilmente preparadas a partir dos correspondentes halogenetos por deslocamento nucleofílico ou, em casos azidas de aril e vinil, por uma reação de azida de sódio

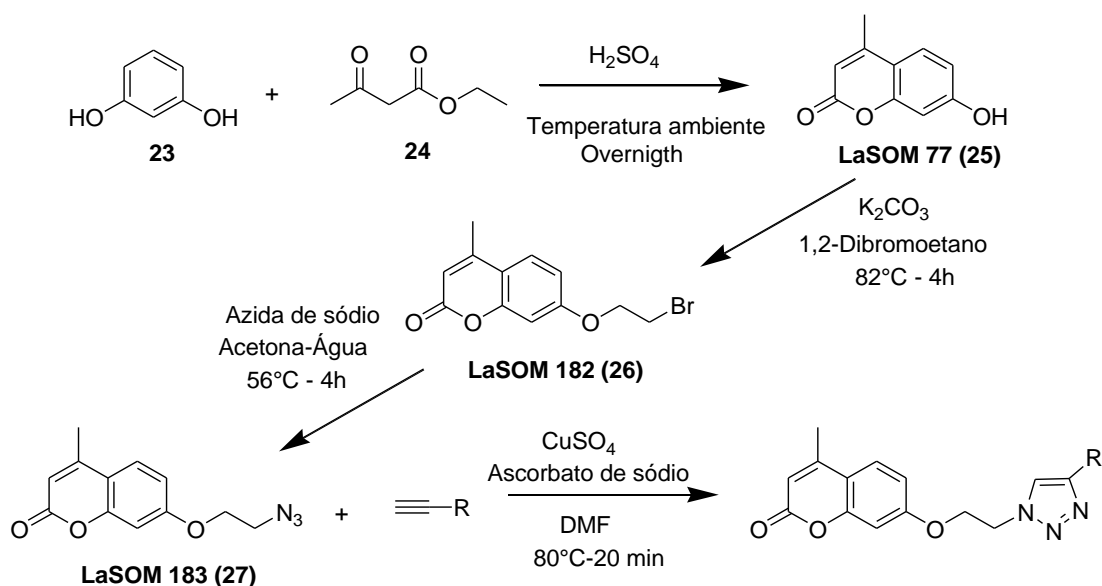
catalisada com Cu (I). A substituição é especialmente fácil quando halogenetos tais como o alílico, propargílico e benzílico são utilizados.

2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudos clínicos realizados utilizando tratamento à base da cumarina simples **1** em associação com a cimetidina para tratamento de pacientes com carcinoma renal, concluiu-se que o fígado humano tende a formar derivados 7-hidroxilados da cumarina, sendo a umbeliferona (**2**) o principal metabólito encontrado. Os resultados indicaram que a atividade satisfatória observada para estes pacientes poderia estar ligada à produção do derivado 7-hidroxilado, que é a forma ativa do fármaco, fato que confirmaria tais estudos realizados por Sharifi et al. (1992). Estudos posteriores foram realizados confirmando a acentuada atividade da umbeliferona, que foi incluída nos estudos clínicos e vem apresentando resultados satisfatórios. Não foram publicados os resultados finais do estudo em fase clínica do derivado, mas os autores afirmam baseados nos resultados já disponíveis, que a umbeliferona apresenta menores efeitos colaterais do que a cumarina (MARSHAL et al. 1994).

O derivado da umbeliferona **2** substituído por um grupamento metil na posição 4, a 4-metil-7-hidroxycumarina (**18**) ou Lasom 77 também conhecido como Hymécromone e 4-metilumbeliferona e produtos contendo a molécula como substância ativa são avaliados em humanos nos Estados Unidos e na Europa desde 1990 (SAKLANI e KUTTY, 2008). Hoje está disponível no mercado com os nomes comerciais Heparvit®, Adesin C® e Cantabiline® para uso humano na forma de complemento alimentar em diversos países da Europa e Ásia para tratamento e prevenção de transtornos hepáticos, devido às suas propriedades coleréticas (BENITEZ et al. 2012). Na natureza é encontrado em muitas plantas, incluindo manna ash, sweet woodruff, German chamomile, celery, parsley nativas do continente europeu, dentre outras. Quanto às suas atividades biológicas, muitos trabalhos relatam o Lasom 77 como uma molécula privilegiada dotada de inúmeras atividades biológicas, e dentre os vários trabalhos, destaca-se os testes clínicos de fase 2 que estão sendo realizados em pacientes portadores de hepatite B e C, no *Medical Institute of Health, University of Texas Health Science Center* em San Antonio e BioMonde Preparations Limited. Sendo assim, estamos trabalhando no

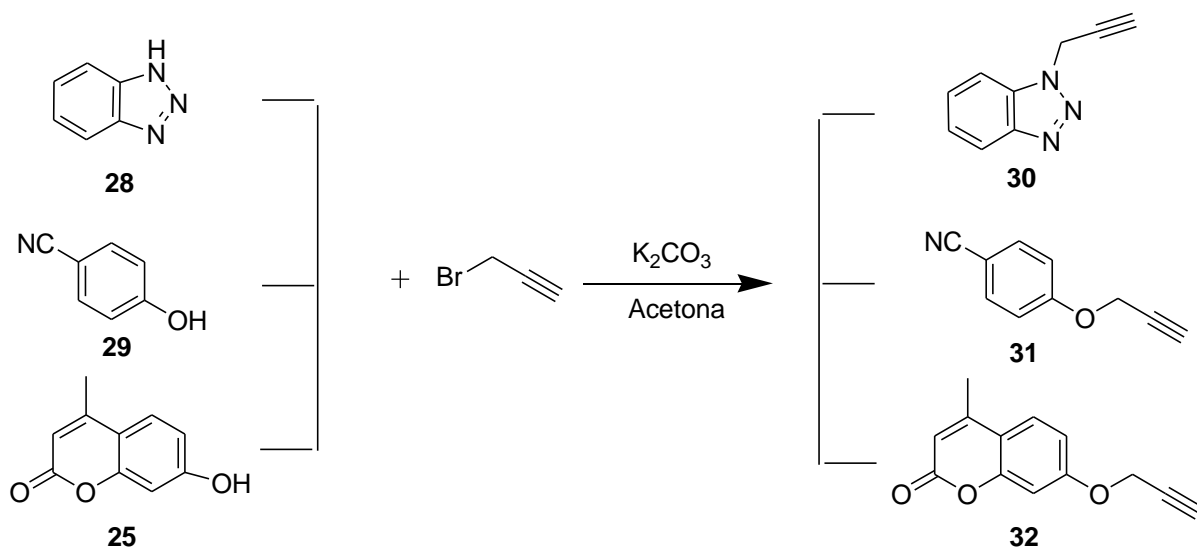
desenvolvimento de novas entidades químicas derivadas do Lasom 77, realizando modificações estruturais pontuais na posição 7 desta molécula. Dentre as modificações que estão sendo realizadas, destaca-se a introdução de 1,2,3 triazóis visando uma maior variabilidade estrutural e o aumento da atividade biológica dado à gama de interações intermoleculares que este grupo pode realizar com diferentes alvos terapêuticos. Para tanto, obtivemos o Lasom 77 através de Reação de Pechmann, inserimos um “linker” alifático na posição sete, sintetizamos um derivado contendo um grupamento azida e estamos procedendo com a produção dos respectivos triazóis com variações estruturais na posição 4 do anel triazólico (Esquema 3).



Esquema 3

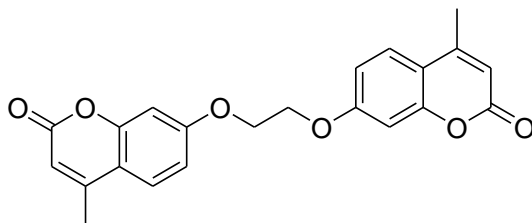
Os produtos triazólicos foram inicialmente caracterizados por espectroscopia de infravermelho, observando-se o desaparecimento do sinal correspondente à azida orgânica em δ 2103 e aparecimento de bandas de intensidade média na região de δ 2900, características de anel aromático triazólico.

Os alcinos utilizados foram obtidos de fontes comerciais ou sintetizados através da reação dos compostos benzotriazol (28), 4-cianofenol (29) e LaSOM 77(25) com brometo de propargila, conforme pode ser observado no esquema 4



Esquema 4

Sendo assim, através dos métodos de síntese descritos neste trabalho, foi sintetizado com sucesso uma 4-metilcumarina hidroxilada na posição 7, LaSOM 77, que apresentou 67% de rendimento. A formação do produto é facilmente observada através de espectroscopia de infravermelho através da presença do sinal em 1703 cm^{-1} correspondente à lactona, característico de cumarinas e ainda através de $^1\text{HRMN}$, com a presença do singlete em $\delta\ 6,05\text{ ppm}$ característico da presença do hidrogênio na posição 3. Este procedimento foi padronizado e partimos para o próximo passo da estratégia de reação, que era a alquilação da hidroxila fenólica para que se adicionasse um “linker” na posição 7 da molécula. Este procedimento foi realizado através da reação da molécula com 1,2-dibromoetano, produzindo o derivado bromado LaSOM 182, com 52% de rendimento. O rendimento relativamente baixo apresentado na obtenção do LaSOM 182 pode ser explicado observando-se a possível formação da subproduto 7,7'-(1,3-etanodilbis(oxi))bis(4-metil-2H-cromen-2-ona) (33). A caracterização estrutural deste produto está em andamento e depois de realizada, o produto será submetido aos testes de atividade biológica.

**33**

Posteriormente foi sintetizado o derivado contendo grupamento azida, LaSOM 183, com rendimento de 89%. As combinações do LaSOM 183 com 38 alcinos resultaram em uma coleção diversificada de híbridos cumarina-1,2,3-triazol com rendimentos satisfatórios e com completa regioseletividade, comprovada pelas análises de RMN nas moléculas onde foram realizadas este tipo de análise, mas principalmente pela formação de um único produto de reação, quando observado por CCD e pelas faixas de fusão bem definidas. Conforme Li e Corey (2011), nas condições utilizadas neste trabalho, que incluem temperatura baixa, utilização de catalisadores de cobre e precursores com um alto grau de pureza, a probabilidade de formação de 1,2,3-triazóis 1,5-dissubstituídos é praticamente nula, sendo a formação de 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos predominante nestas reações.

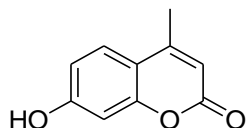
Observou-se através dos experimentos que a presença de grupos retiradores de elétrons ligados diretamente ao alcino terminal não foi deletéria para a formação dos respectivos triazóis que apresentaram um rendimento satisfatório, mas causou um aumento do tempo de reação para formação destas moléculas em micro-ondas, provavelmente causado pela menor disponibilidade do par de elétrons da ligação tripla, indispensável para o bom funcionamento do catalisador. Em termos gerais, observamos que as reações apresentaram rendimento satisfatório, tempo de reação curto em micro-ondas, e uma grande capacidade de diversificação estrutural partido de uma molécula base. Sendo assim, produzimos 38 híbridos 4-meticumarina-triazol inéditos, variando o grupamento substituinte na posição 4 do anel triazólico. Estas modificações foram planejadas observando o diagrama de Craig, onde inserimos grupamentos hidrofílicos, lipofílicos, doadores e retiradores de elétrons, além de grupamentos volumosos, abrangendo os principais grupos de substituintes que são interessantes para uma determinação de relação estrutura-atividade em fármacos.

2.3. EXPERIMENTAL

Todos os pontos de fusão foram determinados em equipamento Fisatom 431. As análises de massas foram realizadas em equipamento Q-TOF micro (Micromass®) no modo ESI positivo, com um volume de injeção entre 5 e 20 µl/min e temperatura de dessolvatação de 250°C. As análises de infra-vermelho foram realizadas em equipamento FT-IR (Perkin Elmer®). Todas as análises citadas anteriormente foram realizadas na faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de 400 MHz foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Análises de espectrometria de massas foram realizadas para todos os compostos. As análises de infra-vermelho foram realizadas para a maioria dos compostos, e o procedimento para sua determinação na totalidade dos produtos está em andamento. As análises de RMN foram realizadas para os precursores derivados de cumarina. As demais análises de RMN estão em andamento no Instituto de Química da UFRGS.

2.3.1. Síntese da 4-metil-7-hidroxycumarina (25, LaSOM 77)

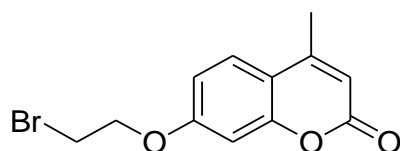


Uma solução de resorcinol (1g, 9,1 mmol) em acetoacetato de etila (1,15 mL, 9,1 mmol) foi adicionada ao balão de fundo redondo ou balão de três bocas contendo H₂SO₄ concentrado (10 mL) em banho de gelo. A mistura reacional foi mantida *overnight* sob agitação à temperatura ambiente e o término da reação foi determinado através de CCD. A reação foi interrompida através da adição de água destilada gelada para se obter um precipitado branco, o qual foi filtrado, diluído com NaOH 5% (q.s.p.) e ressuspensionado novamente através da adição de H₂SO₄ 10% (q.s.p.) para se obter o Lasom 77 com 67% de rendimento.

Sólido branco. Ponto de fusão: 185-186°C. IV ν , cm⁻¹: 3125 (OH), 1672 (CO lactona). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO, δ , ppm): 7,50 (d, 1H, $J = 0,6$ Hz), 6,77 (dd, 1H, $J_1 = 0,6$ Hz, $J_2 = 0,6$ Hz), 6,66 (d, 1H, $J = 0,6$ Hz), 6,05 (s, 1H), 2,30 (s, 3H); ¹³C NMR:

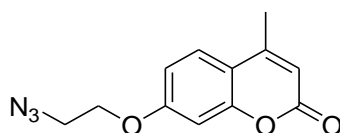
161,53, 160,70, 155,20, 153,79, 126,82, 113,21, 112,37, 110,61, 102,56, 18,44. HRMS 30eV (Q-TOF) Calculado para C₁₀H₈O₃ [M+H]⁺: 177,0552; Experimental: 177,0553.

2.3.2 Síntese da 7-(2-bromoetoxi)-4-metil-2H-chromen-2-ona (26, LaSOM 182)



A uma solução de 4-metil-7-hidroxicumarina (704 mg, 4 mmol) em CH₃CN (30 ml) foi adicionado K₂CO₃ (3,32 g, 24 mmol) e a mistura foi deixada sob refluxo por 15 minutos. Posteriormente foi adicionado 1,2-dibromoetano (1,03 mL, 12 mmol) e a mistura reacional foi refluxada por 6 horas. Após o consumo do material de partida observado por CCD, K₂CO₃ foi removido por filtração e o produto concentrado. Após, foi redissolvido em CH₂Cl₂, lavado com água, brine e seco com auxílio de Na₂SO₄ anidro. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica utilizando gradiente de hexano:acetato para se obter o composto **26** com rendimento de 52%. ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 7,51 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6,89 (d, 2H, *J*₁ = 8,4 Hz), 6,14 (s, 1H), 4,36 (t, 2H, *J* = 4,8 Hz), 3,69 (t, 2H, *J* = 4,8 Hz), 2,40 (s, 3H). Sólido branco. Ponto de fusão: 104-105°C. IV ν, cm⁻¹: 3073 (OH), 1713 ou 1619 (CO lactona)

2.3.3. Síntese da 7-(2-azidoetóxi)-4-metil-2H-chromen-2-ona (27, LaSOM 183)



A uma solução do Lasom 182 (1,7 g, 6 mmol) em acetona (30 mL), foi adicionada uma solução de azida de sódio (0,78 g, 12mmol) em água (5 mL). A mistura foi refluxada por 12 horas e o final da reação determinado por CCD. Após o consumo total do precursor, a mistura foi concentrada e o resíduo foi extraído com acetato de etila (3x30 mL). A fase orgânica lavada com brine, seca com sulfato de

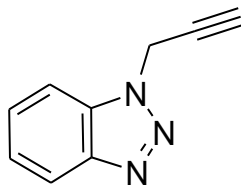
sódio anidro e novamente concentrada para obter o composto **27** com rendimento de 89%, que foi usado na próxima etapa sem purificação adicional.

Sólido branco. Ponto de fusão: 101-102°C. ν , cm^{-1} : 2103 (azida), 1717 (CO lactona). $^1\text{H NMR}$ (60 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7,52 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 6,90 (d, 2H, $J_1 = 8,4\text{Hz}$), 6,16 (s, 1H), 4,21 (t, 2H, $J = 48$ Hz), 3,66 (t, 2H, $J = 48$ Hz), 2,40 (s, 3H). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 246,0879; Experimental: 246,0879.

2.3.4. Procedimento geral de obtenção dos alcinos 30-67

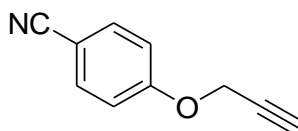
A uma solução do respectivo precursor listado no esquema 4 (0.01 mol equiv.) em acetona (5 mL), foi adicionado carbonato de potássio (0.01 mol equiv) e 3-bromoprop-1-ino (0,01 mol equiv.). A mistura resultante foi agitada por 2 horas a 50°C, resfriada e o solvente foi removido por rotaevaporação. O resíduo foi lavado com grandes quantidades de água gelada e o precipitado filtrado sob vácuo.

2.3.4.1. 1-(prop-2-inil)-1H-benzo[1,2,3]triazol (30)



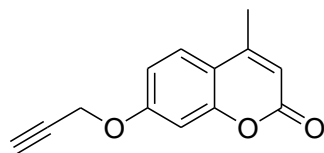
Líquido amarelo. Rendimento de 79%.

2.3.4.2. 4-(prop-2-iniloxi)benzonitrila (31)



Sólido branco. Rendimento de 67%. Ponto de fusão: 108°C.

2.3.4.3. LaSOM 184: 4-metil-7-(prop-2-iniloxi)-2H-cromen-2-ona (32)



Sólido branco. Ponto de fusão: 139-140°C. Rendimento de 91%. ν , cm^{-1} : 3303,1725. H-RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2,38 (s, 3H), 2,56 (s, 1H), 4,74 (s, 2H), 6,13 (s, 1H), 6,90–6,92 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7,49–7,51 (d, 1H, $J = 8$ Hz). ^{13}C NMR: 161,05, 160,32, 154,99, 152,39, 125,60, 114,22, 112,66, 112,37, 102,14, 56,15, 18,62.

2.3.4.4. Alcinos comerciais

Os alcinos comerciais utilizados neste trabalho podem ser observados na figura 4.

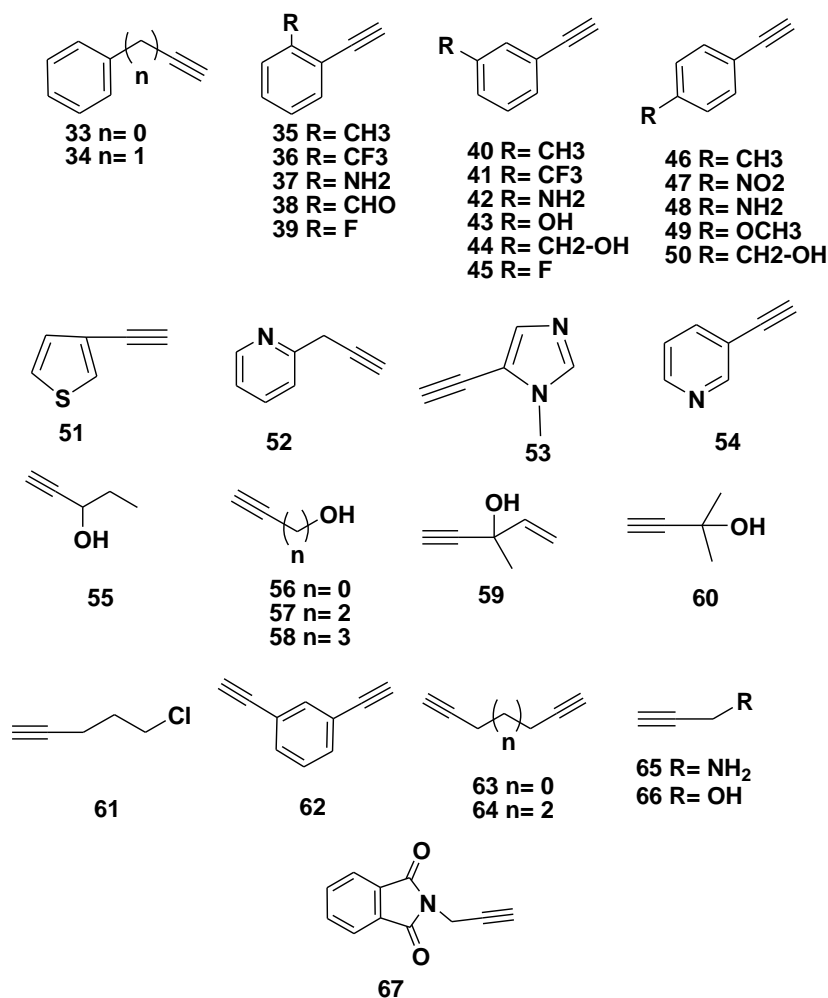


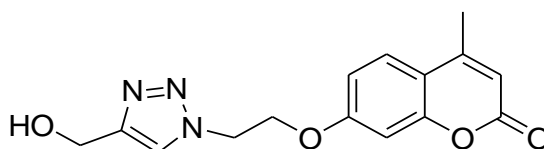
Figura 4: Série de alcinos comerciais (33-67) disponíveis comercialmente utilizados neste trabalho.

Os compostos apresentados na figura 4 foram disponibilizados pela professora Ivone Carvalho, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo.

2.3.5. Procedimento geral de obtenção dos híbridos cumarina-1,2,3-triazol (68-106)

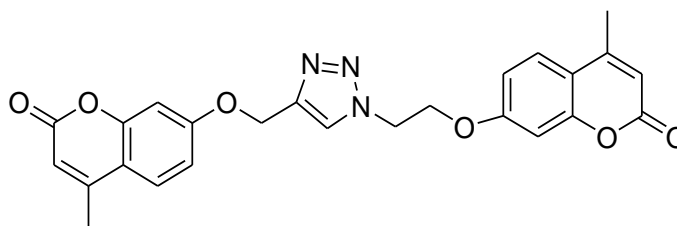
LaSOM 183 (**27**) (0.13 mM) foi dissolvido em DMF (0,1 mL, solução 0,5-1,0 M) em um tubo de micro-ondas equipado com uma barra magnética. Após a dissolução completa, foi adicionado o respectivo alcino (0.15 mM, 1,1 equiv.), ascorbato de sódio (0,1 equiv) e CuSO_4 (0,03 equiv). O tubo foi selado e a mistura foi agitada por 25 segundos e aquecida inicialmente por 20 minutos a 70°C (18 W) sob irradiação de micro-ondas. A reação foi acompanhada por CCD, e nos casos onde não foi observado o total consumo do material de partida, a mistura reacional foi submetida a 20 ou 30 minutos adicionais para consumo completo. Após o término foi particionada com água e acetato de etila (3 a 5 vezes dependendo da solubilidade do produto). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada, concentrada e submetida à coluna flash para obtenção do produto final puro. As reações de *Click Chemistry* envolvendo o LaSOM 183 e os alcinos sintetizados **30**, **31** e **32** foram realizadas sob aquecimento convencional em 4 horas, utilizando como solvente uma mistura de água:*tert*-butanol na proporção de 1:1, na mesma diluição e com os mesmos catalisadores utilizados para os demais compostos.

2.3.5.1. LaSOM 180: 7-(2-(1,2,3-triazol-4-metanol)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**68**)



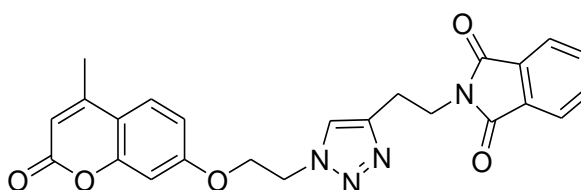
Sólido branco. Ponto de fusão $164-165^\circ\text{C}$. Rendimento: 78%. IV_v , cm^{-1} : 3354 (OH), 2875 (triazol), 1688 (CO de lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 302,1141; Experimental: 302,1146. Tempo de reação: 20 min.

2.3.5.2. LaSOM 185: 7-(2-(1,2,3-triazol-4-(7-(metoxi(4-metil-2H-cromen-2-ona)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (69)



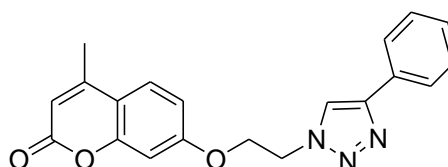
Sólido branco. Rendimento de 91%. Ponto de fusão: 139-140°C. IV v, cm^{-1} : 3303 (OH), 2955 (triazol), 1725 (CO de lactona). Tempo de reação: 4 horas².

2.3.5.4. LaSOM 186: 2-(2-(1-(2-(4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-iloxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)etil)isoindolina-1,3-diona (70)



Sólido branco. Rendimento de 69% Ponto de fusão: 217°C. . IV v, cm^{-1} : 2921 (triazol), 1770 (CO amida), 1708 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 445,1512; Experimental: 445,1515. Tempo de reação: 20 minutos.

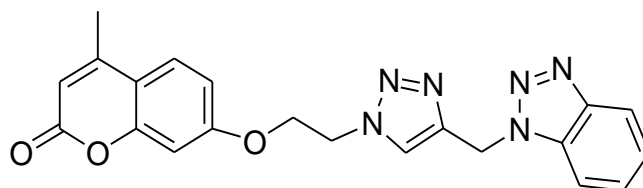
2.3.5.4. LaSOM 190: 7-(2-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (71)



Sólido branco; rendimento de 91% Sólido branco; Ponto de fusão: 180°C. IV v, cm^{-1} : 2920 (triazol), 1713 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 348,1348; Experimental: 348,1365. Tempo de reação: 40 minutos.

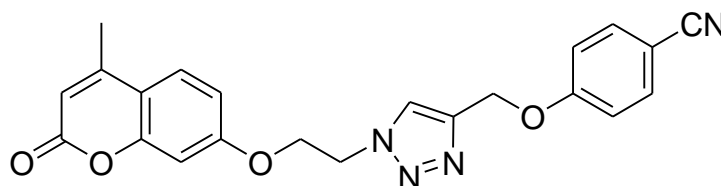
² Procedimento realizado sob aquecimento convencional.

2.3.5.5. LaSOM 191: 7-(2-(4-((1H-benzo[1,2,3]triazol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (72)



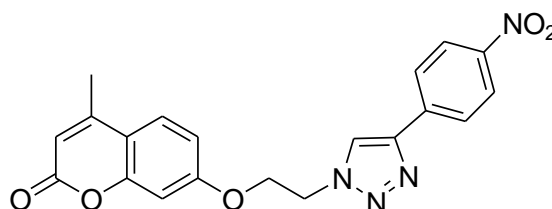
Sólido branco; rendimento de 85% Sólido amarelo. Ponto de fusão: 173-174°C. IV ν , cm^{-1} : 2921 (triazol), 1714 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 404,1233; Experimental: 404,1213. Tempo de reação: 4 horas³.

2.3.5.6. LaSOM 192: 4-(2-(1-(2-(4-metil-2-oxo-2H-cromen-7-iloxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)etil)benzonitrila (73)



Sólido amarelo; rendimento de 76%. Ponto de fusão: 187°C. IV ν , cm^{-1} : 2922 (triazol), 2218 (CN), 1712 (lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 403,1406; Experimental: 403,1412. Tempo de reação: 4 horas³.

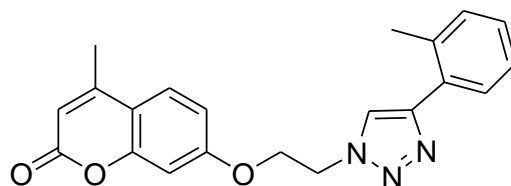
2.3.5.7. LaSOM 193 7-(2-(4-(4-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (74)



Sólido branco; rendimento de 58% Sólido branco; Ponto de fusão: 264°C. . IV ν , cm^{-1} : 2920 (triazol), 1697 (lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 393,3099; Experimental: 393,3076. Tempo de reação: 50 minutos

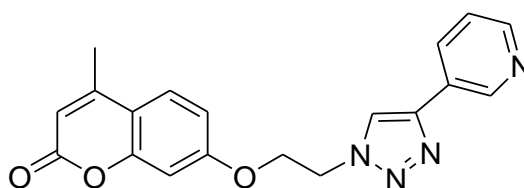
³ Procedimento realizado sob aquecimento convencional.

2.3.5.8. Lasom 195: -(2-(4-*o*-tolil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (75)



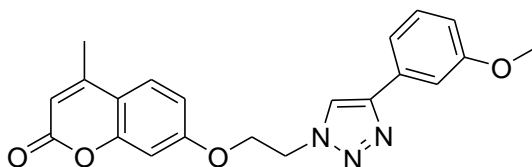
Sólido branco, rendimento de 72%. Ponto de fusão: 173-174°C. . . IV ν , cm^{-1} 2918 (triazol), 1701 (lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 362,1505; Experimental: 363,1519. Tempos de reação: 40 minutos.

2.3.5.9. LaSOM 196: 7-(2-(4-(piridin-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (76)



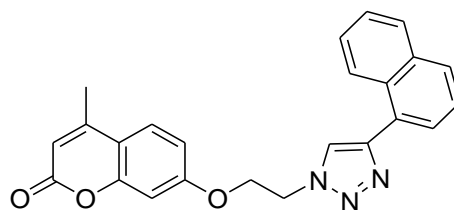
Sólido branco. Rendimento de 72%. Ponto de fusão: 174°C. IV ν , cm^{-1} : 2920 (triazol), 1712 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 349,1301; Experimental: 349,1291. Tempo de reação: 40 minutos.

2.3.5.10. LaSOM 197: 7-(2-(4-(3-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (77)



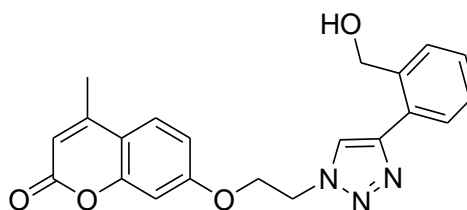
Sólido branco. Rendimento de 82%. Ponto de fusão: 146-148°C. IV ν , cm^{-1} : 2921 (triazol), 1712 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 378,1454; Experimental: 378,1468. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.11. LaSOM 198: 7-(2-(4-(naftalen-1-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (78)



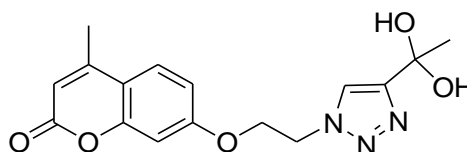
Líquido amarelo escuro. Rendimento de 59%. IV ν , cm^{-1} 2918 (triazol), 1702 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 398,1505; Experimental: 398,1505. Tempos de reação: 50 minutos.

2.3.5.12. LaSOM 199: 7-(2-(4-(2-(hidroximetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (79)



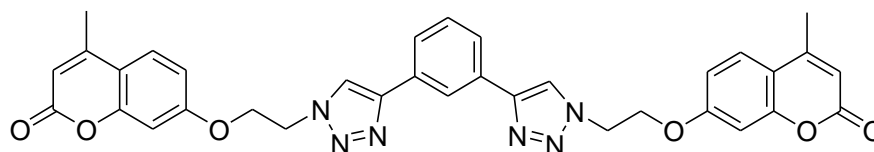
Sólido branco. Rendimento de 80%. Ponto de fusão: 168-169°C. IV ν , cm^{-1} : 3341 (OH), 2921 (triazol), 1718 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 378,1454; Experimental: 378,1468. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.13. LaSOM 200: 7-(2-(4-(2-metil-3-butin-2-ol)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)etoxi)-4-metil-2H-chromen-2-one (80)



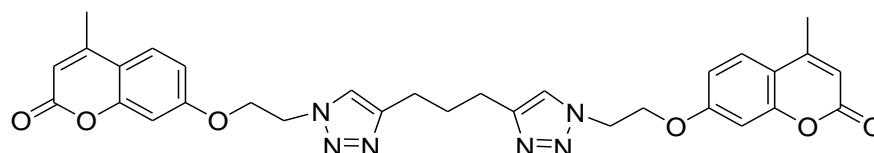
Sólido amarelo. Rendimento de 40%. Ponto de fusão: 147°C. IV ν , cm^{-1} : 3354 (OH), 2876 (triazol), 1688 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$: 355,1144; Experimental: 355,1152. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.14. LaSOM 201: 7,7'-(2,2'-(4,4'-fenil-1H,1H'-bi-1,2,3-triazol-1,1'-di-il)dietoxi)bis(4-metil-2H-cromen-2-ona) (81)



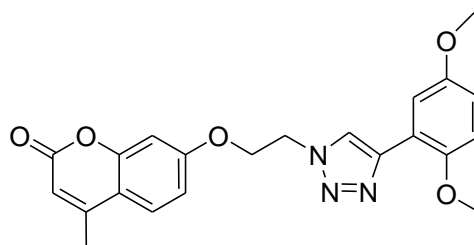
Sólido branco. Rendimento de 64%. Ponto de fusão: 247°C. IV ν , cm^{-1} : 2922 (triazol), 1725 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 617,2149; Experimental: 617,2132. Tempo de reação: 50 minutos.

2.3.5.15. LaSOM 202: 7,7'-(2,2'-(4,4'-propil-1H,1H'-bi-1,2,3-triazol-1,1'-di-il)dietoxi)bis(4-metil-2H-cromen-2-one) (82)



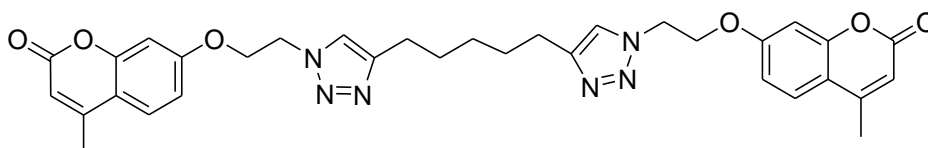
Sólido branco. Rendimento de 74%. Ponto de fusão: 138°C. IV ν , cm^{-1} : 2921 (triazol), 1714 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 583,2305; Experimental (25 eV): 583,2328. Tempo de reação: 40 minutos.

2.3.5.16. LaSOM 204: 7-(2-(4-(2,5-dimetoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-on (83)



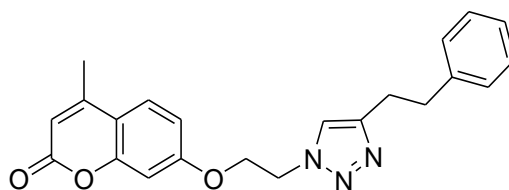
Rendimento de 81%. Ponto de fusão: 154°C.. IV ν , cm^{-1} : 2921 (triazol), 1712 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 408,1559; Experimental (30 eV): 408,1575. Tempo de reação 40 minutos.

**2.3.5.17. LaSOM 205: 7,7'-(2,2'-(4,4'-butil-1H,1H'-bi-1,2,3-triazol-1,1'-di-
l)diétoxi)bis(4-metil-2H-cromen-2-ona) (84)**



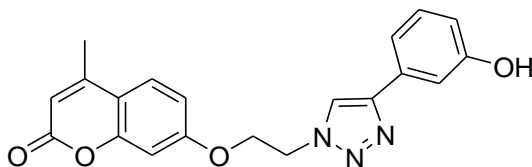
Sólido branco. Rendimento de 67%. Ponto de fusão: 168°C. IV ν , cm^{-1} : 2922 (triazol), 1709 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 611,2618; Experimental (30 eV): 611,2620. Tempo de reação: 40 minutos.

**2.3.5.18. LaSOM 206: 7-(2-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etíloxi)-4-metil-2H-
cromen-2-ona (85)**



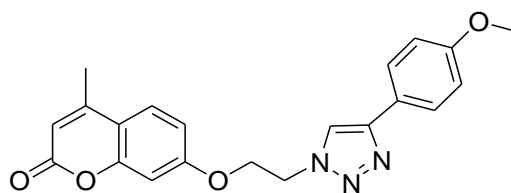
Sólido branco. Rendimento de 84%. Ponto de fusão: 135°C. IV ν , cm^{-1} : 2920 (triazol), 1712 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 376,1661; Experimental (30 eV): 376,1668. Tempo de reação: 20 minutos.

**2.3.5.19. LaSOM 207: 7-(2-(4-(3-fenol)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etíloxi)-4-metil-
2H-cromen-2-ona (86)**



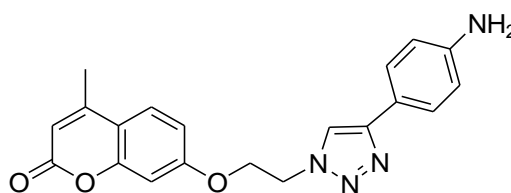
Semi-sólido amarelado. Rendimento de 65%. Ponto de fusão: 146°C. HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 364,1297; Experimental (30 eV): 364,1282. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.20. LaSOM 208: 7-(2-(4-(4-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (87)



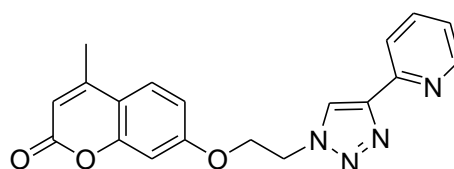
Rendimento de 72%. Ponto de fusão: 138°C. IV v, cm⁻¹: 2918 (triazol), 1701 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para C₂₁H₁₉N₃O₄ [M+H]⁺: 378,1454; Experimental (30 eV): 358,1466. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.21. LaSOM 209: 7-(2-(4-(4-aminofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (88)



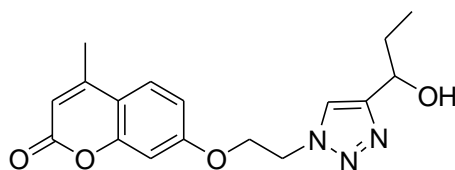
Rendimento de 63%. Ponto de fusão: 175°C. HRMS (Q-TOF) Calculado para C₂₀H₁₈N₄O₃ [M+H]⁺: 363,1457; Experimental (30 eV): 363,1449. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.22. LaSOM 210: 7-(2-(4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (89)



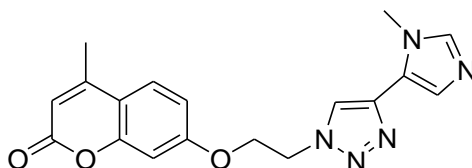
Sólido branco. Rendimento de 74%. Ponto de fusão: 180°C. IV v, cm⁻¹: 2921 (triazol), 1712 (CO lactona) HRMS (Q-TOF) Calculado para C₁₉H₁₆N₄O₃ [M+H]⁺: 349,1301; Experimental (30 eV): 349,1314. Tempo de reação: 40 minutos.

2.3.5.23. LaSOM 211: 7-(2-(4-(1-pentin-3-ol)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (90)



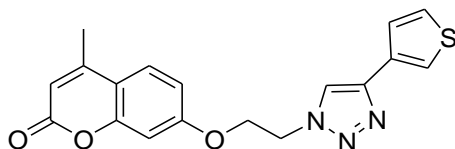
Sólido branco. Rendimento de 58%. Ponto de fusão: 157°C. IV ν , cm^{-1} : 3341 (OH), 2921 (triazol), 1688 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{K}+\text{H}]^+$: 369,1091; Experimental (30 eV): 369,1002. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.24. LaSOM 212: 7-(2-(4-(1-metil-1H-imidazol-5-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (91)



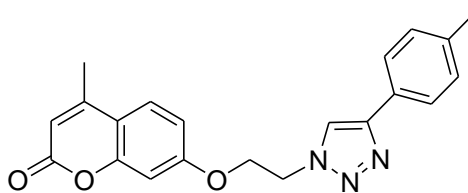
Semi-sólido amarelado. Rendimento de 61%. HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 352,1410; Experimental (25 eV): 352,1408. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.25. LaSOM 213: 7-(2-(4-(tiofen-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (92)



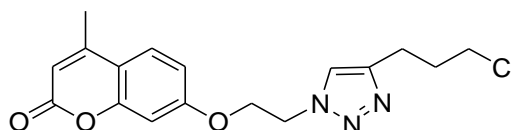
Sólido amarelo. Rendimento de 62%. Ponto de fusão: 163°C. IV ν , cm^{-1} : 3116 (tiofeno), 2922 (triazol), 1712 (cumarina). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}]^+$: 355,0991; Experimental (25 eV): 355,1007. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.26. LaSOM 214: 7-(2-(4-*p*-tolil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (93)



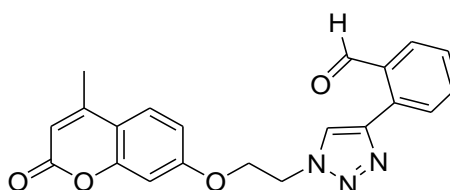
Sólido branco. Rendimento de 67%. Ponto de fusão: 133°C. HRMS (Q-TOF) Calculado para C₁₈H₁₇N₃O₃ [M+Na+H]⁺: 385,1402; Experimental (25 eV): 385,1403. Tempo de reação: 40 minutos.

2.3.5.27. LaSOM 215: 7-(2-(4-(3-cloropropil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (94)



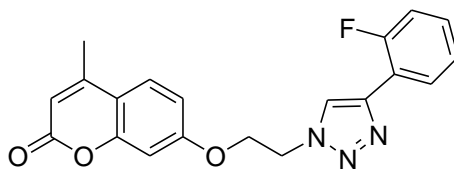
Sólido branco. Rendimento de 90%. IV v, cm⁻¹: 2963 (triazol), 1715 (CO lactona) Ponto de fusão: 138°C.. HRMS (Q-TOF) Calculado para C₁₇H₁₈ClN₃O₃ [M+Na+H]⁺: 371,1013; Experimental (25 eV): 371,1023. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.28. LaSOM 216: 2-(1-(2-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-iloxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)benzaldeído (95)



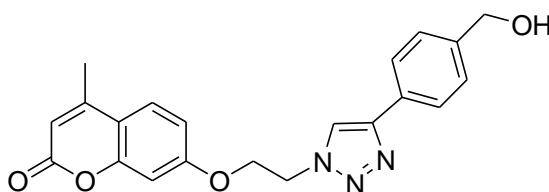
Sólido amarelo. Rendimento de 62%. Ponto de fusão: 184°C.: IV v, cm⁻¹: 2925 (triazol), 1709 (CO cumarina). HRMS (Q-TOF) Calculado para C₂₁H₁₇N₃O₄ [M+H]⁺: 376,1297; Experimental (25 eV): 376,1284. Tempo de reação: 40 minutos.

2.3.5.29. LaSOM 217: 7-(2-(4-(2-fluorfenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (96)



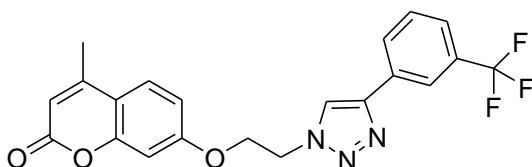
Sólido branco. Rendimento de 70%. Ponto de fusão: 168°C. HRMS (Q-TOF) Calculado para $C_{20}H_{16}FN_3O_3$ $[M+H]^+$: 366,1254; Experimental (25 eV): 366,1270. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.30. LaSOM 218: 7-(2-(4-(4-(hidroximetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (97)



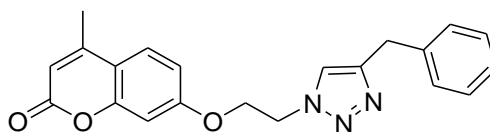
Sólido amarelo. Rendimento de 89%. Ponto de fusão: 181°C. HRMS (Q-TOF) Calculado para $C_{21}H_{19}N_3O_4$ $[M+Na+H]^+$: 401,1352; Experimental (45 eV): 401,1337. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.31. LaSOM 219: 7-(2-(4-(3-(trifluormetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (98)



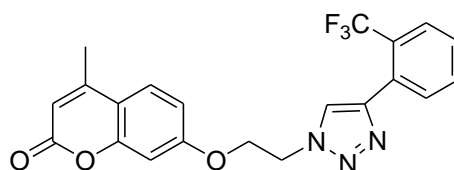
Sólido Branco. Rendimento de 89%. Ponto de fusão: 145°C. . IV ν , cm^{-1} : 2927 (triazol), 1741 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $C_{21}H_{16}F_3N_3O_3$ $[M+H]^+$: 416,1222; Experimental (35 eV): 416,1240. Tempo de reação: 40 minutos.

2.3.5.32. LaSOM 220: 7-(2-(4-benzil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (99)



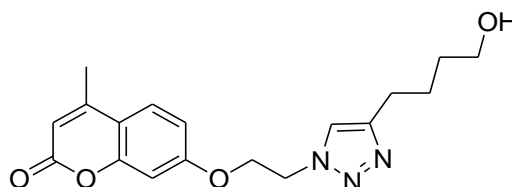
Sólido branco. Rendimento de 80%. Ponto de fusão: 143°C. HRMS (Q-TOF) Calculado para $C_{21}H_{19}N_3O_3$ $[M+H]^+$: 362,1505; Experimental (35 eV): 362,1519. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.33. LaSOM 221: 7-(2-(4-(2-(trifluormetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (100)



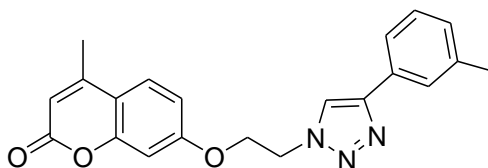
Sólido branco. Rendimento de 85%. Ponto de fusão: 157°C. . IV ν , cm^{-1} : 2919 (triazol), 1725 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $C_{21}H_{16}F_3N_3O_3$ $[M+H]^+$: 416,1222; Experimental (35 eV): 416,1234. Tempo de reação: 40 minutos.

2.3.5.34. LaSOM 222: 7-(2-(4-(5-hexin-1-ol)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (101)



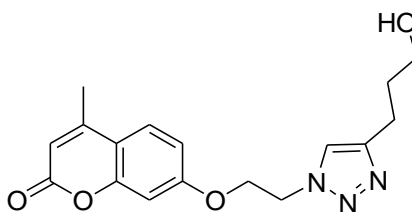
Rendimento de 79%. Ponto de fusão: 177°C. HRMS (Q-TOF) Calculado para $C_{18}H_{21}N_3O_4$ $[M+H]^+$: 344,1610; Experimental (20 eV): 344,1620. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.35. LaSOM 223: 7-(2-(4-*m*-tolil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (102)



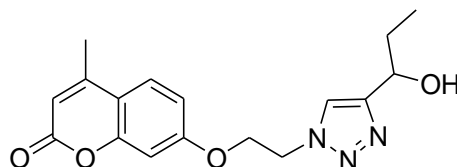
Sólido branco. Rendimento de 70%. Ponto de fusão: 146°C. . IV ν , cm^{-1} : 2923 (triazol), 1713 (CO lactona). HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 362,1505; Experimental (20 eV): 362,1512. Tempo de reação: 40 minutos.

2.3.5.36. LaSOM 224: 7-(2-(4-(4-pent-1-ol)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (103)



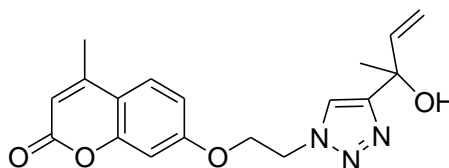
Sólido branco. Rendimento de 80%. Ponto de fusão: 149°C. HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 330,1454; Experimental (25 eV): 330,1443. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.37. LaSOM 225: 7-(2-(4-(1-pent-3-ol)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (104)



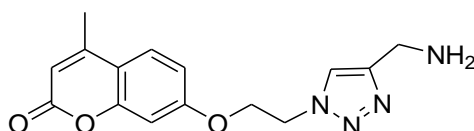
Sólido branco. Rendimento de 72%. Ponto de fusão: 157°C. HRMS (Q-TOF) Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$: 353,1352; Experimental (30 eV): 353,1361. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.38. LaSOM 226: 7-(2-(4-(3-metil-1-penten-3-ol)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (105)



Sólido branco. 65% de rendimento. Ponto de fusão: 134°C. HRMS (Q-TOF) Calculado para $C_{18}H_{19}N_3O_4$ $[M+Na+H]^+$: 365,1352; Experimental (30 eV): 365,1358. Tempo de reação: 20 minutos.

2.3.5.39. LaSOM 227: 7-(2-(4-(aminometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)-4-metil-2H-cromen-2-ona (106)



Rendimento de 69%. Ponto de fusão: 165°C. HRMS (Q-TOF) Calculado para $C_{15}H_{16}N_4O_3$ $[M+Na+H]^+$: 324,1198; Experimental (25 eV): 324,1204. Tempo de reação: 20 minutos.

CAPÍTULO 3

TESTES BIOLÓGICOS FRENTE A LINHAGENS DE CÂNCER

Testes preliminares *in vitro*

3.1. INTRODUÇÃO

A partir das estruturas sintetizadas conforme os procedimentos descritos no capítulo 2, realizamos um estudo sobre o potencial antitumoral desta coleção de compostos, selecionando alguns representantes para a realização de testes biológicos frente a linhagens de câncer.

O interesse na investigação das propriedades antitumorais destes compostos foi ampliado através dos estudos *in silico* realizados pelo nosso grupo de pesquisa, que estão descritos no trabalho de conclusão do curso da aluna Bruna Gauer, orientada pela professora Solange Garcia (GAUER, 2014). Neste trabalho foi realizado um *screening* do núcleo básico dos híbridos cumarina-1,2,3-triazol no webserver Phammapper, que indicou um índice de complementariedade significativo destes compostos com a enzima Proteína Quinase Dependente de Fosfoinosítídeo 1 (PDK-1), importante alvo biológico de fármacos anticancerígenos (PEARCE et al., 2010). Sendo assim, neste capítulo estão descritos os testes biológicos preliminares em linhagens de câncer realizados pelo laboratório de toxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a coordenação da professora Dr. Solange Garcia. Os testes biológicos preliminares foram realizados através de teste viabilidade celular (MTT) em quatro linhagens celulares J774A1 (macrófagos saudáveis), A549 (adenocarcinoma pulmonar), HepG2 (células hepáticas cancerígenas) e MCF7 (células de câncer de mama). Sendo assim, foram selecionados os compostos LaSOM 77, LaSOM 180, LaSOM 185, LaSOM 186 e LaSOM 190 (figura 5) para os testes, de acordo com a natureza dos grupamentos presentes na posição 4 do anel 1,2,3-triazol, e no caso do LaSOM 77, de modo a averiguar a influência da presença do grupamento 1,2,3-triazol nas atividades propostas.

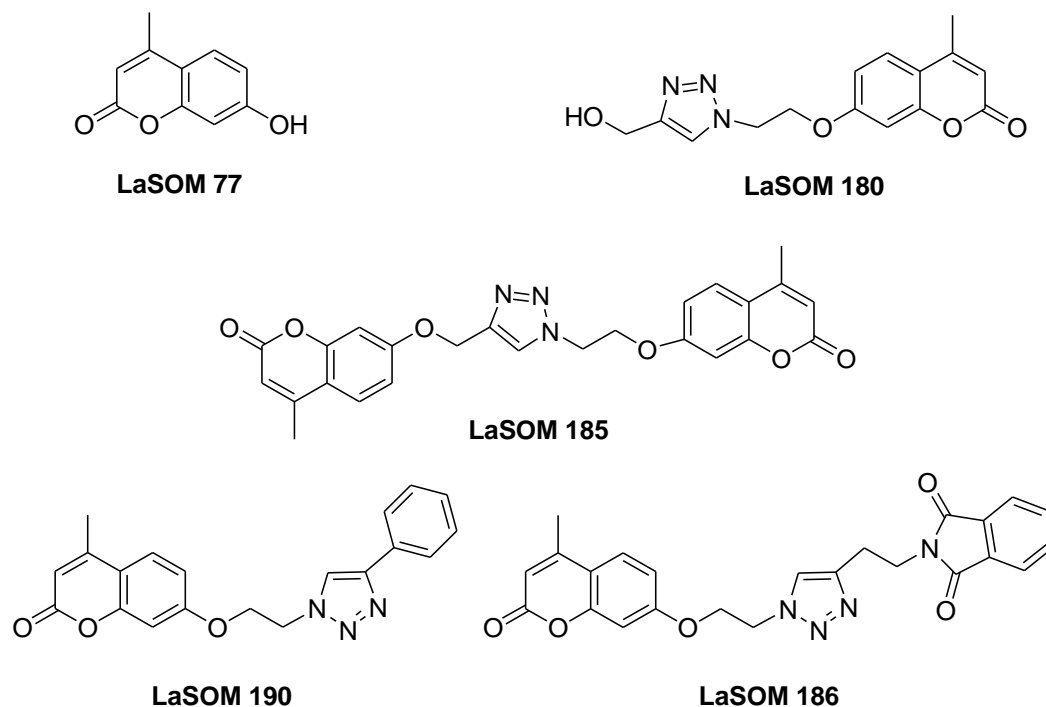


Figura 5: Compostos sintéticos utilizados nos testes frente a linhagens de câncer.

No ensaio de MTT (um acrônimo para brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), as desidrogenases mitocondriais de células com metabolismo ativo convertem o brometo de metiltetrazólio em um produto de formazano com cor púrpura. Quando ocorre morte celular, as células perdem a capacidade de converter o MTT em formazano, de modo que a formação de cor serve como um marcador útil e conveniente de viabilidade celular (ABE e MATSUKI, 2000; RISS et al., 2004). Em testes de citotoxicidade de antitumorais, o ensaio do MTT pode ser usado para avaliar a sensibilidade de linhagens cancerígenas a esses fármacos (ULUKAYA et al. 2008).

O mecanismo exato da redução celular do MTT em formazano não é bem compreendido, mas envolve reação com NADH ou algum semelhante, reduzindo moléculas que transferem elétrons para MTT e, provavelmente, envolve enzimas mitocondriais como a succinato desidrogenase (LOBNER, 2000; RISS et al., 2004). A intensidade da coloração formada é dependente de vários parâmetros que incluem: a concentração de MTT, o tempo de incubação, o número de células viáveis e sua atividade metabólica, e todos estes devem ser considerados na otimização das condições de ensaio para gerar uma quantidade suficiente de produto que possa ser detectado (RISS et al., 2004). Estudos com biomateriais

particulados, onde concentrações elevadas fazem com que as partículas se acumulem na parte inferior do poço, podem interferir com a medição da densidade óptica (ALLEN et al., 1994). A redução do MTT a formazano, por estar relacionada às enzimas mitocondriais, pode ser afetada quando a função mitocondrial se encontra alterada (LOBNER, 2000). Os principais fatores críticos para a reprodutibilidade e sucesso incluem: a utilização de uma fonte controlada e consistente de células, a caracterização adequada da concentração do reagente e a padronização do tempo de incubação para cada sistema de modelo experimental (RISS et al., 2004). O ensaio de adenosina trifosfato (ATP) por luminescência é um método mais preciso que o ensaio MTT, porém mais caro e menos e frequentemente usado, ao passo que os dois ensaios apresentam boa correlação em estudos de citotoxicidade (ULUKAYA et al., 2008).

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Materiais e Reagentes para os ensaios *in vitro*

Híbridos cumarina-1,2,3-triazol, foram sintetizados no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul conforme procedimento descrito no capítulo 2. Concentrações de 0,01 a 5 μ M de cada molécula (LaSOM 77, LaSOM 180, LaSOM 185, LaSOM 186 e LaSOM 190) foram utilizadas nos experimentos. As linhagens celulares J774A1 (macrófagos sadios), A549 (adenocarcinoma pulmonar), HepG2 (células hepáticas cancerígenas) e MCF7 (células de câncer de mama) foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD, Estados Unidos).

Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), meios de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium-low glucose (DMEM) e Nutrient Mixture F-12 Ham (F-12), estreptomicina/penicilina e anfotericina B, foram adquiridos da Sigma Aldrich (Estados Unidos). Soro fetal bovino e de bezerro foram obtidos da Gibco (Estados Unidos). Cisplatina (cis-diaminadichloroplatina(II)) 1 mg/mL (Platistine® CS, Pfizer). Os reagentes dimetilsulfóxido (DMSO) (Nuclear) e Triton X-100 (Vetec) também foram utilizados durante os experimentos.

3.2.2. Cultivo e Tratamento Celular

A linhagem celular de macrófagos J774A1 foi mantida em meio DMEM suplementado com 10% de soro de bezerro. Essa linhagem celular sadia foi utilizada para verificar a citotoxicidade das moléculas em estudo. As linhagens de células tumorais foram cultivadas em meio F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, sendo utilizada para avaliação do potencial efeito antitumoral dos híbridos em estudo. Os meios receberam estreptomicina/penicilina e anfotericina B em concentrações finais de 1 e 0,4%, respectivamente. As células foram cultivadas em estufa incubadora umidificada a 37°C sob uma atmosfera a 5% de CO₂.

Através de testes preliminares pelo ensaio MTT, foi calculado o valor de IC₁₀ (concentração capaz de reduzir em torno de 10% a viabilidade) das moléculas em estudo nos macrófagos sadios. A partir desse cálculo, concentrações na faixa do valor de IC₁₀ de cada molécula foram testadas nas linhagens cancerígenas, a fim de verificar a eficácia dessas como antitumorais em concentrações pouco citotóxicas à linhagem sadia.

Para os experimentos, as células foram dispostas em placas de 96 poços (7x10³ células/poço para J774A1 e A549) e deixadas overnight para aderirem à placa. As moléculas LaSOM 77, LaSOM 180, LaSOM 185, LaSOM 186 e LaSOM 190 foram testadas nas concentrações 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 e 5 µM para verificar a toxicidade nos macrófagos sadios e a eficácia sobre a linhagem cancerígena A549. Todas as moléculas foram solubilizadas em DMSO. A concentração de DMSO no meio de cultura durante todos os tratamentos foi de 0,25%, a qual não afetou a viabilidade das células. Como controle positivo de eficácia nas células cancerígenas, foi utilizado o antitumoral cisplatina, testado nas seguintes concentrações: 0,5, 1 e 5 µM, as quais foram comparadas às mesmas concentrações dos compostos sintetizados. Além disso, foi averiguada a capacidade das moléculas testadas de serem mais efíazes que a cisplatina em células tumorais e menos tóxicas em células sadias. O tempo de exposição das células para todas as moléculas foi de 24 horas. Após esse período foram realizados ensaios de viabilidade e dano celular, a fim de avaliar a citotoxicidade na linhagem sadia e a eficácia antitumoral.

3.2.3. Ensaio MTT

Para todas as linhagens utilizadas, 7×10^3 células/poço foram dispostas em placas de 96 poços e incubadas overnight para que as células aderissem ao fundo da placa de cultivo. Em um primeiro momento, a linhagem sadia J774A1 foi tratada com as moléculas LaSOM 77, 180, 185, 186 e 190, previamente diluídas em DMSO, nas concentrações finais de 0,01 μM a 2000 μM , por um período de 24 horas. Foram verificadas as concentrações das moléculas que não diminuiriam mais de 10% da viabilidade nas células saudáveis. Após esta verificação, as moléculas que obtiveram esses resultados foram testadas em concentrações na faixa de 0,01 a 5 μM na linhagem A549.

O reagente MTT foi preparado em uma concentração final de 0,5 mg/mL nos respectivos meios de cada linhagem e 100 μL foram adicionados nos poços da placa de tratamento. Após incubação por 2 horas a 37°C, a solução de MTT foi removida e foram adicionados às placas 100 μL de DMSO para dissolver os cristais de formazano, sob agitação, durante 15 minutos, à temperatura ambiente e em local protegido da luz. A viabilidade celular foi estimada por leitura da absorção a 585 nm com o leitor de microplacas (Spectramax Me2 Molecular Devices). As células viáveis produzem um produto formazano de coloração roxo escuro, enquanto essa coloração não é formada em células mortas. Resultados foram analisados com o software Soft Max Pro (versão 2.2.1).

A viabilidade celular foi definida como a razão (expressa em porcentagem) de absorbância das células tratadas em relação às células não tratadas. O controle negativo (100% viável) continha somente meio de cultivo. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e repetidas 3 vezes.

3.2.4. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do Software Statistic. A comparação entre as variáveis foi realizada com o teste ANOVA de uma via, seguida por Tukey. Comparação entre dois grupos foi realizada pelo teste t de Student. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Ensaios de viabilidade e dano celular

Os ensaios *in vitro* com linhagens celulares são muitas vezes utilizados com objetivo de triar (*screening*) compostos de modo a avaliar se estes possuem potenciais efeitos sobre a proliferação celular ou efeitos citotóxicos diretos que, eventualmente, podem levar à morte celular (RISS et al., 2004).

Os ensaios de MTT nos permitiram avaliar a viabilidade e dano celular após a exposição das linhagens a tratamentos de 24 horas com diferentes concentrações das moléculas sintetizadas. Os resultados foram comparados tanto entre as linhagens sadias e cancerígenas, como dos híbridos comparados com o seu precursor (LaSOM 77), bem como com um antitumoral reconhecido (cisplatina).

3.3.2. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células sadias

Com o intuito de minimizar erros metodológicos, os experimentos foram padronizados (concentração dos reagentes, tempos de incubação, número de células), assim como controles positivo e negativo que sempre foram aplicados concomitantemente aos tratamentos realizados nas placas de cultura. As concentrações testadas dos compostos eram baixas, então provavelmente não houve interferência na densidade óptica.

A linhagem sadia J774A1 foi tratada com LaSOM 77, 180, 185, 186 e 190, previamente diluídos em DMSO, nas concentrações finais de 0,01 μM a 2000 μM , por um período de 24 horas. Os resultados encontrados em relação à viabilidade celular podem ser observados na figura 6.

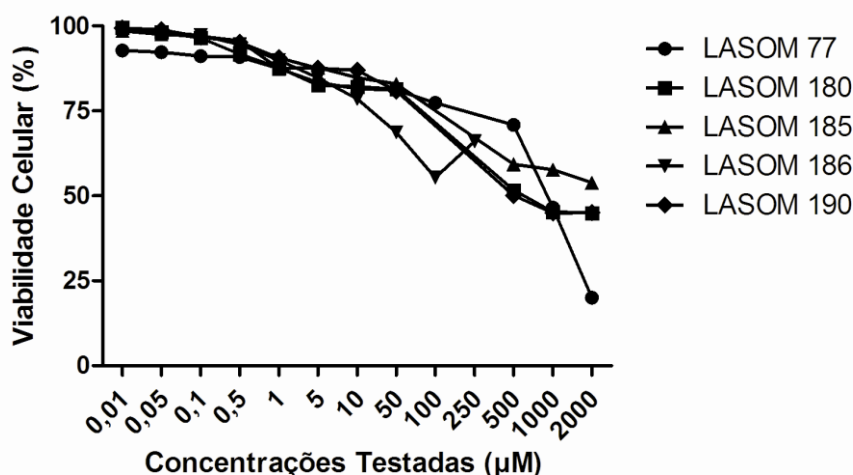


FIGURA 6 – Avaliação da citotoxicidade na linhagem sadia de macrófagos (J774A1) do LaSOM 77, 180, 185, 186 e 190 em estudos em concentrações de 0,01 a 2000 µM. Viabilidade celular foi definida como a razão (expressa em porcentagem) de absorbância das células tratadas em relação às células não tratadas. O controle negativo (100% viável) continha somente meio de cultivo.

Concentrações dos compostos que não diminuíram em mais do que 10% a viabilidade das células sadias foram utilizadas para o estudo nas linhagens cancerígenas. Conforme esperado, as concentrações mais baixas para todas as moléculas (0,01 e 0,05 µM), geralmente apresentaram menor citotoxicidade frente à linhagem sadia de macrófagos e o aumento da citotoxicidade em macrófagos sadios foi diretamente proporcional ao aumento da concentração da molécula testada no meio de cultura.

3.3.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células cancerígenas A549 (adenocarcinoma pulmonar)

De acordo com a tabela 3, em relação aos LaSOM 180 e 190, as menores concentrações testadas (0,01 e 0,05 µM), assim como a concentração de 0,05 µM do LaSOM 186, apresentaram viabilidade celular significativamente menor na linhagem cancerígena A549 quando comparadas às células sadias, revelando que essas moléculas têm potencial antitumoral para esta linhagem. Os compostos LaSOM 77 e 185 foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade da linhagem cancerígena em relação a sadia na concentração de 1 µM ($p < 0,05$). O mesmo comportamento foi observado para o composto LaSOM 180 nas concentrações de 1 e 5 µM, para o composto LaSOM 186 na concentração de 0,05 µM e para o composto LaSOM 190 nas concentrações 0,05 e 0,1 µM (tabela 3).

Tabela 3: Teste de viabilidade celular (MTT) realizado em duas linhagens celulares J774A1 (macrófagos saudáveis) e A549 (adenocarcinoma pulmonar).

LaSOM		0,01	0,05	0,1	0,5	1	5
77	J774A1	92,75±6,76	92,30±6,42	91,14±7,06	90,87±7,59	87,49±2,14	83,39±5,02
	A549	72,41±12,32	86,37±1,64	86,19±3,15	73,88±4,66	63,47±3,97*	64,33±19,26
180	J774A1	99,52±0,65	98,21±0,56	96,47±3,53	91,67±1,29	87,74±7,36	82,55±3,32
	A549	72,11±4,73 [†]	72,97±9,12 [†]	81,25±3,46 [†]	87,41±0,49	72,68±2,15 [#]	67,83±2,61 [*]
185	J774A1	98,56±1,07	87,54±0,16	96,94±2,08	95,63±3,04	87,43±0,81	87,75±5,15
	A549	94,24±3,73	85,40±7,06	86,98±1,04	75,88±1,88	65,43±4,14 [*]	—
186	J774A1	98,52±0,57	97,94±1,40	97,30±1,69	94,57±2,57	89,95±4,99	84,69±0,97
	A549	71,10±10,64	70,35±11,22 [*]	75,82±2,47 [#]	86,69±2,01	80,52±0,58 [#]	—
190	J774A1	99,37±2,73	98,89±1,41	96,83±0,68	95,21±0,53	90,64±3,63	87,56±4,65
	A549	67,21±9,25 [†]	71,45±13,18 [†]	77,22±0,76 [#]	70,92±11,71	—	—

Resultados expressos em porcentagem (média ±DP). A unidade das concentrações testadas é µM.

* Diferença significativa em relação à linhagem J774A1 ($p < 0,05$).

Diferença significativa em relação ao LaSOM 77 testado na mesma concentração para a linhagem A549 ($p < 0,05$).

— Concentrações não testadas neste ensaio.

Estes resultados indicam que todos os compostos testados apresentam diferença significativa de citotoxicidade entre a linhagem de macrófagos saudáveis e A549 cancerígena, em pelo menos uma das concentrações testadas. Nenhum híbrido provocou alteração significativamente diferente na viabilidade celular em relação à mesma concentração testada de LaSOM 77 na linhagem sadia ($p > 0,05$). Na linhagem A549, os híbridos LaSOM 186 e 190 foram capazes de promover uma sensibilização significativamente maior ($p < 0,05$) que a mesma concentração (0,1 µM) do LaSOM 77, indicando um possível aumento de atividade biológica relacionado à presença do substituinte 1,2,3-triazol nestes compostos (tabela 3).

A comparação dos compostos sintetizados em nosso laboratório com o fármaco antitumoral cisplatina pode ser observada na figura 7.

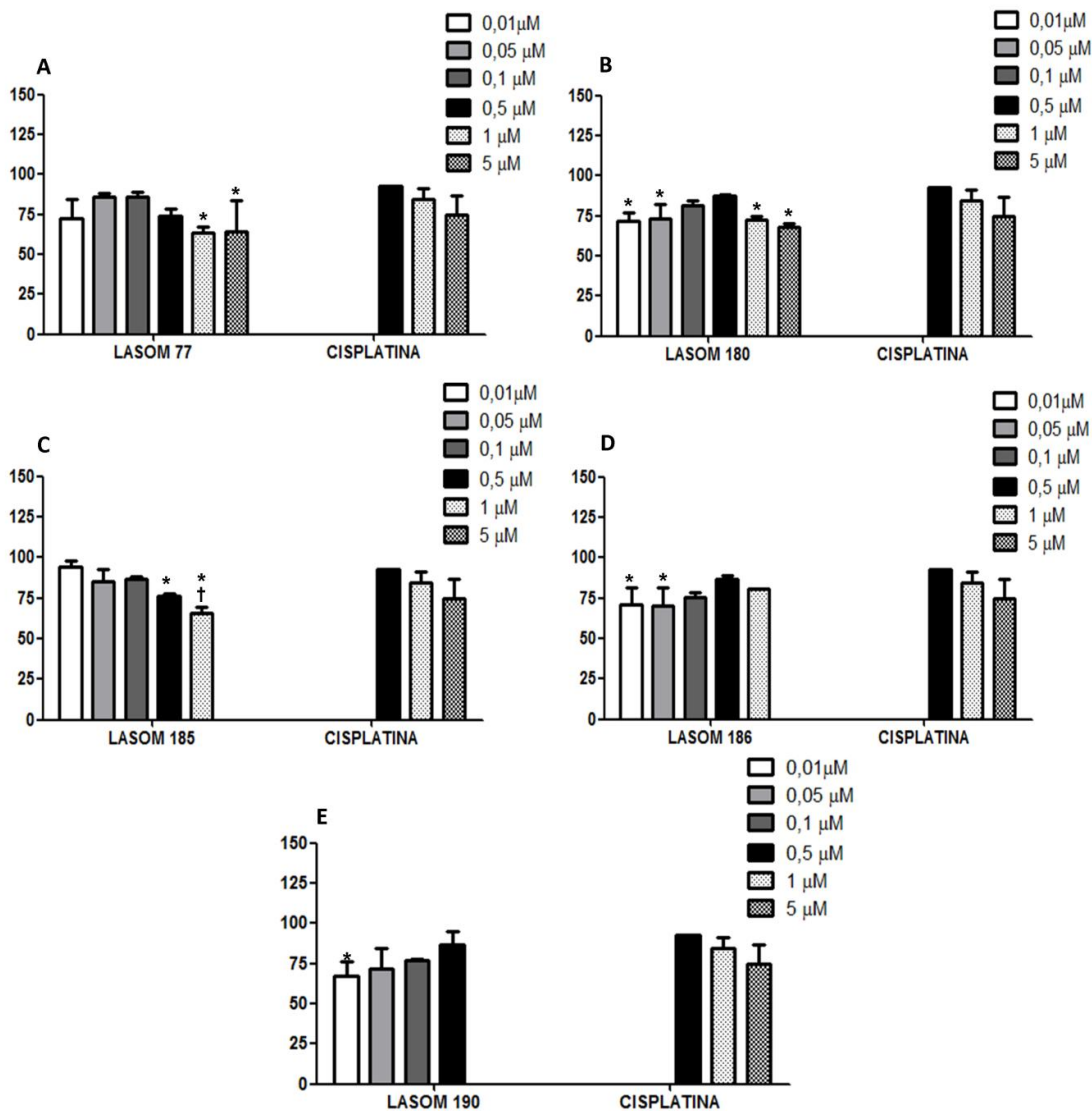


Figura 7 - Comparação de viabilidade celular através do ensaio de MTT na linhagem A549 entre diferentes concentrações das moléculas testadas em relação as da cisplatina. (A) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 77 e de cisplatina; (B) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 180 e de cisplatina; (C) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 185 e de cisplatina; (D) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 186 e de cisplatina (E) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 190 e de cisplatina. * Diferença significativa em relação à concentração 0,5 μM de cisplatina ($p < 0,05$); † Diferença significativa em relação à concentração 1 μM de cisplatina ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos pelo ensaio MTT comparando os compostos sintetizados com a cisplatina (figura 7) indicam que os LaSOM 180, 185, 186 e 190 são mais efetivos, isto é, diminuem significativamente mais a viabilidade celular na linhagem de adenocarcinoma pulmonar em concentrações iguais 0,5, 1 e 5 μM que o conhecido fármaco antitumoral cisplatina ($p < 0,05$) (Figura 61). Estes resultados indicam que os híbridos cumarina-1,2,3-triazol sintetizados em nosso laboratório possuem uma potencial utilização no tratamento do câncer de pulmão, demonstrando significativa toxicidade em células tumorais quando comparada à

cultura sadia, bem como, maior toxicidade às células tumorais quando comparadas ao fármaco antitumoral cisplatina. Testes complementares serão realizados para determinação do IC₅₀ destas moléculas nas linhagens de câncer de pulmão, bem como determinar os mecanismos de morte celular e atividades nos alvos específicos.

3.3.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células cancerígenas HepG2 (células hepáticas cancerígenas)

Os ensaios de MTT realizados para a linhagem HepG2 (Tabela 4) indicaram que os híbridos 185, 186 e 190 não apresentaram diferença significativa em relação à citotoxicidade, quando comparados os valores observados para células sadias na linhagem J774A1 e de carcinoma hepático HepG2. O composto LaSOM 77 apresentou diferença significativa na concentração de 0,5 µM e não foi significativamente diferente nas outras concentrações testadas, conforme observado na tabela 4.

Tabela 4: Teste viabilidade celular (MTT) realizado em HepG2 (células hepáticas cancerígenas).

LaSOM		0,01	0,05	0,1	0,5	1	5
77	J774A1	92,75±6,76	92,30±6,42	91,14±7,06	90,87±7,59	87,49±2,14	83,39±5,02
	HepG2	68,47±6,84	82,51±6,18	64,00±7,18	75,42±6,02*	77,31±13,68	76,18±7,24
180	J774A1	99,52±0,65	98,21±0,56	96,47±3,53	91,67±1,29	87,74±7,36	82,55±3,32
	HepG2	68,52±6,95*	68,71±6,60*	73,87±3,93	87,72±5,12*	74,44±2,81*	79,83±9,02
185	J774A1	98,56±1,07	87,54±0,16	96,94±2,08	95,63±3,04	87,43±0,81	87,75±5,15
	HepG2	76,13±2,57	85,21±10,38	83,15±12,48	92,89±6,49	88,91±13,50	87,45±14,91
186	J774A1	98,52±0,57	97,94±1,40	97,30±1,69	94,57±2,57	89,95±4,99	84,69±0,97
	HepG2	—	85,40±15,03	86,53±10,18	81,43±12,04	82,88±6,34	81,14±15,83
190	J774A1	99,37±2,73	98,89±1,41	96,83±0,68	95,21±0,53	90,64±3,63	87,56±4,65
	HepG2	—	—	87,03±8,10	88,72±14,49	83,71±10,87	85,00±10,57

Resultados expressos em porcentagem (média ±DP). A unidade das concentrações testadas é µM.

* Diferença significativa em relação à linhagem J774A1 (p<0,05).

Diferença significativa em relação ao LaSOM 77 testado na mesma concentração para a linhagem HepG2 (p<0,05).

— Concentrações não testadas neste ensaio.

Ainda na tabela 4, observa-se que o composto LaSOM 180 apresentou diminuição da viabilidade celular na linhagem celular cancerígena HepG2

significativamente maior quando comparada à linhagem sadia J774A1, indicando que o composto LaSOM 180 é o híbrido mais promissor quando se trata da atividade biológica na linhagem HepG2, bem como o composto LaSOM 77. Com base nestes dados realizamos a comparação das atividades biológicas dos compostos sintetizados LaSOM 77 e LaSOM 180 com o antitumoral cisplatina, que pode ser observada na figura 8.

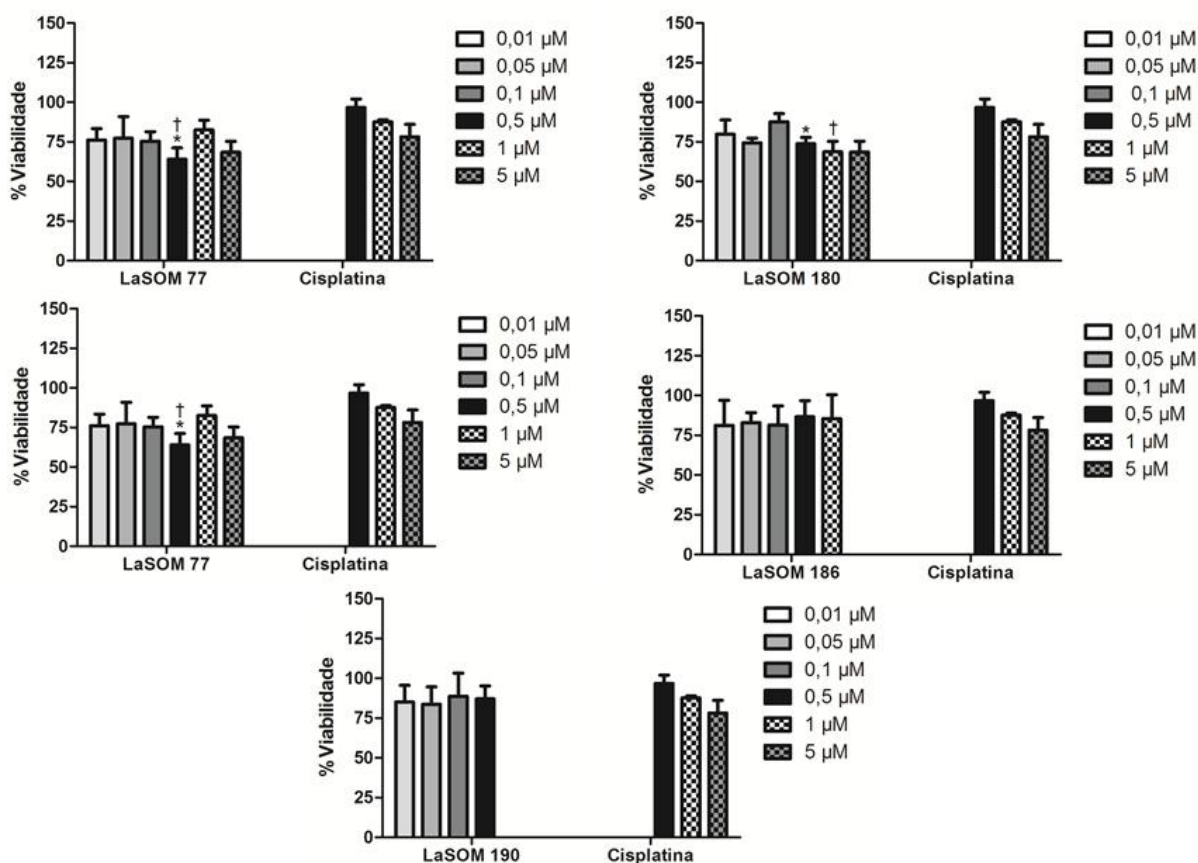


Figura 8 - Comparação de viabilidade celular através do ensaio de MTT na linhagem HepG2 entre diferentes concentrações das moléculas LaSOM 77, 180, 185, 186 e 190 testadas em relação as concentrações testadas de cisplatina (0,5, 1 e 5 μM). * Diferença significativa em relação à concentração 0,5 μM de cisplatina ($p < 0,05$); † Diferença significativa em relação à concentração 1 μM de cisplatina ($p < 0,05$).

Através da figura 8, pode-se observar que na concentração de 0,5 μM o composto LaSOM 77 matou significativamente mais células HepG2 que o antitumoral cisplatina. As concentrações de 1,0 e 0,5 μM do LaSOM 180 apresentaram atividade antitumoral maior quando comparadas à cisplatina. Os compostos LaSOM 185, 186 e 190 não apresentaram valores de citotoxicidade significativamente diferentes quando comparados à cisplatina para a linhagem cancerígena HepG2.

Estes resultados indicam que o híbrido LaSOM 180 sintetizado em nosso laboratório possui uma potencial para utilização no tratamento de câncer hepático, demonstrando significativa toxicidade em células tumorais quando comparada à cultura sadia, bem como, maior toxicidade às células tumorais quando comparadas ao fármaco antitumoral cisplatina. Testes complementares serão realizados para determinação do IC₅₀ desta molécula nas linhagens de câncer de pulmão, bem como determinar os mecanismos de morte celular e atividades nos alvos específicos.

3.3.5. Ensaio de viabilidade celular (MTT) em células cancerígenas MCF7 (células de câncer de mama)

Os ensaios biológicos de MTT realizados para a linhagem MCF7 (Tabela 5) indicaram que composto LaSOM 77 apresentou citotoxicidade significativamente maior para a linhagem tumoral MCF7 em relação à linhagem sadia J774A1 na concentração de 0,5 µM. Os compostos híbridos LaSOM 185, 186 e 190 não apresentaram citotoxicidade significativamente maior na linhagem MCF7 tumoral quando comparada à linhagem de macrófagos saudios.

Tabela 5: Teste viabilidade celular (MTT) realizado em MCF7 (células de câncer de mama).

LaSOM		0,01	0,05	0,1	0,5	1	5
77	J774A1	92,75±6,76	92,30±6,42	91,14±7,06	90,87±7,59	87,49±2,14	83,39±5,02
	MCF7	83,72±8,69	96,33±13,73	44,07±15,01	61,90±27,22*	74,11±10,76	73,01±4,02
180	J774A1	99,52±0,65	98,21±0,56	96,47±3,53	91,67±1,29	87,74±7,36	82,55±3,32
	MCF7	75,85±7,17	78,06±2,08	78,98±1,05	86,49±5,22*#	85,65±1,05	85,76±9,22
185	J774A1	98,56±1,07	87,54±0,16	96,94±2,08	95,63±3,04	87,43±0,81	87,75±5,15
	MCF7	—	87,90±2,73	88,78±7,86	84,40±18,28*#	85,74±15,60*	78,48±11,17
186	J774A1	98,52±0,57	97,94±1,40	97,30±1,69	94,57±2,57	89,95±4,99	84,69±0,97
	MCF7	—	75,59±11,98	81,21±2,42	99,60±18,87*#	86,24±3,60	81,88±11,86
190	J774A1	99,37±2,73	98,89±1,41	96,83±0,68	95,21±0,53	90,64±3,63	87,56±4,65
	MCF7	—	—	90,00±3,93	85,15±5,59*#	87,41±6,61	81,63±12,37

Resultados expressos em porcentagem (média ±DP). A unidade das concentrações testadas é µM.

* Diferença significativa em relação à linhagem J774A1 (p<0,05).

Diferença significativa em relação ao LaSOM 77 testado na mesma concentração para a linhagem MCF7 (p<0,05).

— Concentrações não testadas neste ensaio.

Em contrapartida, a tabela 4 indica que o composto LaSOM 180 apresentou citotoxicidade maior para células cancerígenas quando comparado com as células saudias, assim como observado para a linhagem HepG2, descrita anteriormente. A figura 9 apresenta uma comparação entre as atividades biológicas observadas para os compostos sintetizados e a cisplatina em cultura MCF7 de câncer de mama.

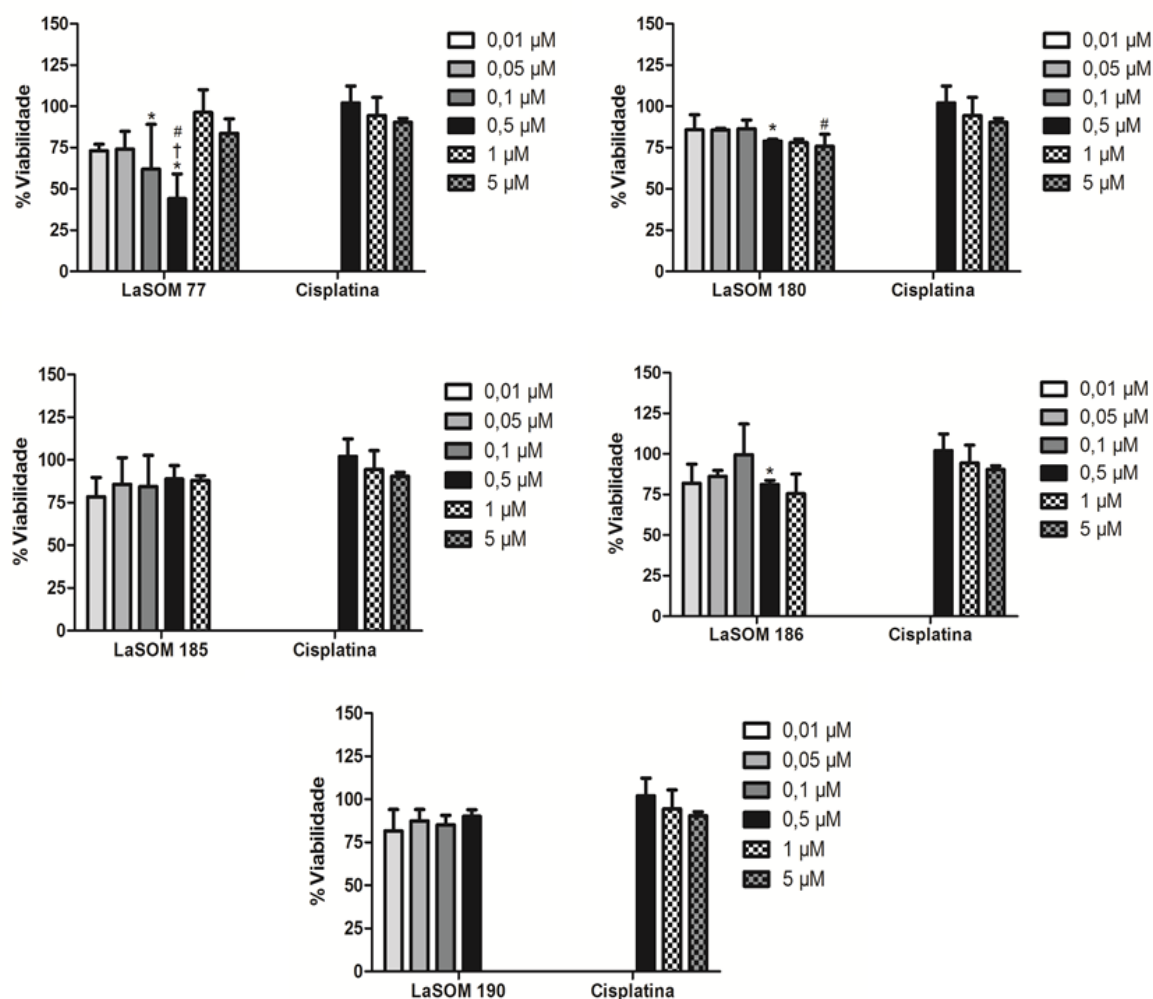


Figura 9 - Comparação de viabilidade celular através do ensaio de MTT na linhagem MCF7 entre diferentes concentrações das moléculas LaSOM 77, 180, 185, 186 e 190 testadas em relação as concentrações testadas de Cisplatina (0,5, 1 e 5 µM). * Diferença significativa em relação à concentração 0,5 µM de Cisplatina ($p < 0,05$); † Diferença significativa em relação à concentração 1 µM de Cisplatina ($p < 0,05$).

De acordo com a figura 9 pode-se concluir que a concentração de 0,5 µM do composto LaSOM 77 foi significativamente mais citotóxica que as concentrações 0,5, 1 e 5 µM de cisplatina, assim como a concentração de 0,1 µM, matou significativamente mais células que a concentração 0,5 µM de cisplatina. Quanto aos

híbridos, o LaSOM 180 nas concentrações de 0,5 e 5 μM causou uma redução significativamente maior que as mesmas concentrações de cisplatina que foram testadas. Embora não tenha apresentado diferença de citotoxicidade significativa entre a cultura de macrófagos saudios e MCF7 tumoral, o híbrido LaSOM 186 reduziu significativamente mais a viabilidade da linhagem MCF7 que a mesma concentração de cisplatina testada.

Assim como os resultados obtidos para a linhagem celular HepG2, os resultados preliminares indicaram que o híbrido LaSOM 180 sintetizado em nosso laboratório possui uma potencial utilização no tratamento de câncer de mama, demonstrando significativa toxicidade em células tumorais da linhagem MCF7 quando comparada à cultura sadia, bem como, maior toxicidade às células tumorais quando comparadas ao fármaco antitumoral cisplatina. Testes complementares serão realizados para determinação do IC_{50} desta molécula nas linhagens de câncer de mama, bem como determinar os mecanismos de morte celular e atividades nos alvos epecíficos.

3.4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os testes biológicos preliminares realizados com linhagens cancerígenas indicaram a utilização dos híbridos cumarina-1,2,3-triazol sintetizados em nosso laboratório como possíveis agentes citotóxicos no tratamento do câncer. Os resultados indicaram diferenças significativas entre as linhagens celulares saudias e cancerígenas na maioria dos casos. Para as culturas celulares A549 (adenocarcinoma pulmonar), todos os compostos testados apresentaram diferença significativa de citotoxicidade entre a cultura sadia e a cancerosa em pelo menos uma das diluições utilizadas no estudo. Estes compostos foram comparados com o fármaco cisplatina, e os testes indicaram que os híbridos LaSOM 180, 185, 186 e 190, além do composto LaSOM 77, são mais efetivos para a linhagem de adenocarcinoma pulmonar quando comparados à cisplatina. Os testes realizados na cultura celular HepG2 (células hepáticas cancerígenas) indicaram que o composto LaSOM 77 e o híbrido LaSOM 180 são as moléculas mais promissoras quando em comparação com a citotoxicidade observada para a cultura de macrófagos saudios, apresentando diferença significativa em ao menos uma concentração testada. Estes compostos foram então comparado ao fármaco cisplatina, que indicou uma maior

efetividade dos compostos LaSOM 77 e LaSOM 180 em relação ao fármaco. Os mesmos resultados observados para a linhagem cancerosa hepática foram observados para a linhagem MCF7 de câncer de mama, onde os compostos mais promissores foram o LaSOM 77 e 180, que foram significativamente mais tóxicos para a linhagem cancerosa quando em comparação com a linhagem de macrófagos saudáveis, bem como mais efetivos na linhagem cancerígena quando comparados ao fármaco cisplatina. Do ponto de vista químico, podemos inferir que a presença do grupamento 1,2,3-triazol nos compostos derivados do LaSOM 77 não foi tão benéfica quando inicialmente hipotetizado, embora tenha-se observado a manutenção das atividades frente às células cancerígenas. Em relação ao LaSOM 180, estudos adicionais envolvendo os alvos específicos sobre os quais estes híbridos atuam serão necessários para definir se a atividade antitumoral observada em conjunto com a redução de toxicidade em relação ao LaSOM 77 se devem à conjugação do triazol aos núcleos cumarínicos ou se esta atividade está simplesmente relacionada à duplicação do núcleo farmacofórico cumarínico em uma mesma molécula. De qualquer modo, um maior número de híbridos, já sintetizados, deverá ser testado para definir conclusivamente esta questão.

Os testes biológicos preliminares ainda nos indicaram que a adição do grupamento 1,2,3-triazol foi extremamente benéfica quando se observa a toxicidade dos híbridos em relação ao composto LaSOM 77, que não possui este substituinte. Todos os derivados híbridos apresentaram valores inferiores de toxicidade quando comparados ao LaSOM 77, fato que os torna mais interessante do ponto de vista farmacológico. Novos experimentos serão realizados para determinação das atividades destes novos compostos, tais como o seu mecanismo de morte celular, determinação de IC_{50} , e testes específicos para alvos biológicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

O presente trabalho desenvolvido teve como objetivo um estudo aprofundado sobre os compostos da classe das cumarinas de ocorrência natural. Uma metodologia para extração de cumarinas a partir da planta *P. balansae* foi desenvolvida, utilizando extração com dióxido de carbono em meio supercrítico. A utilização desta metodologia apresentou excelentes resultados devido à recuperação significativa das cumarinas em questão, e principalmente pela diminuição da degradação dos compostos epoxilados presentes nas amostras. Realizamos também a síntese de uma coleção de híbridos cumarina-1,2,3-triazóis inéditos, utilizando a 7-hidróxi-4-metilcumarina que é um composto de ocorrência natural bastante estudado pelas suas atividades biológicas. Sendo assim, sintetizamos este composto e realizamos as devidas modificações estruturais para a obtenção da coleção de 38 híbridos totalmente inéditos. Estes compostos foram testados frente a linhagens de câncer de pulmão, mama e fígado.

Os estudos biológicos preliminares indicaram atividades frente às linhagens cancerígenas testadas bastante interessantes, sendo alguns destes representantes sintetizados mais ativos que o fármaco antitumoral cisplatina, com toxicidade frente à linhagem de macrófagos sadia relativamente baixa. Do ponto de vista farmacológico, estes compostos apresentam uma potencialidade muito grande na pesquisa de fármacos para câncer, e novos estudos serão realizados para determinar os mecanismos de morte celular e de ação frente a alvos específicos. Os estudos em torno das cumarinas e compostos heteroaromáticos serviram como base para um período de doutorado-sanduíche na Espanha, mais especificamente na *Universidad de Granada*, sob a orientação do professor Joaquín Campos. Além do mais, esta base foi utilizada como referência para a confecção de dois artigos de revisão relacionados à tese, que foram apresentados no capítulo 4 e 5. Estes artigos apresentam opiniões e idéias relacionadas à química e biologia dos compostos heteroaromáticos fruto de anos de experiência dos grupos de pesquisa brasileiro e espanhol, com uma abordagem qualificada visando compartilhar nossas experiências com grupos de pesquisa ao redor do mundo.

Compartilharam deste conhecimento, dois alunos de iniciação científica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Nicole Agostini, que ganhou o prêmio de destaque no salão de iniciação científica UFRGS

do ano de 2012 e Guilherme Arraché, que participou ativamente da síntese dos híbridos cumarina-1,2,3-triazol.

Além dos conteúdos descritos nesta tese de doutorado, alguns trabalhos relacionados foram publicados assim como se pode observar abaixo.

Artigo científico aceito para publicação

- TORRES, F.C.; BRUCKER, N.; ANDRADE, S.F.; KAWANO, D.F.; GARCIA, S.C.; POSER, G.L.; EIFLER-LIMA, V.L. New insights into the chemistry and antioxidant activity of coumarins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.14, n.00, p.00, 2014.

Resumo expandido publicados em congresso

- TORRES, F. C.; CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; EIFLER-LIMA, V.L.; POSER, G. V. Supercritical extraction of coumarins from *Pterocaulon balansae*. In: 10th International Symposium on Supercritical Fluids, 2012, San Francisco. USA. The Versatility of Supercritical Fluid Technology, 2012. v. 1. p. 1-4.

Resumos publicados em congressos

- TORRES, F. C.; CASSEL, E.; EIFLER-LIMA, V.L.; POSER, G. V. Isolation of 6,7-methylenedioxicoumarins from *Pterocaulon* species (Asteraceae) and synthesis of new derivatives. In: III Encontro PPGCF, 2011, Porto Alegre. Encontro PPGCF, 2011.

- VIANNA, D.; TORRES, F. C.; POSER, G. V.; EIFLER-LIMA, V.L. Validation of HPLC analytical method for quantification of 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin in extracts from *Pterocaulon* obtained by sonication and microwave-assisted extraction. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Poços de Caldas. SBQ, 2012.

- TORRES, F. C.; VIANNA, D.; VARGAS, R.M.F.; EIFLER-LIMA, V.L.; Cassel, E.; POSER, G. V. Quantification of coumarins obtained by supercritical CO₂ in leaves and flowers of *Pterocaulon balansae*. In: XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Bento Gonçalves. 2012.

Apresentação oral

- TORRES, F. C. Synthesis of coumarin-triazole hybrids by Click Chemistry. 5th Meeting of the Pharmaceutical Sciences Program, Mercosur meeting of the pharmaceutical sciences, Porto Alegre, Brazil, 2013.

ABE, K.; MATSUKI, N. Measurement of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. **Neuroscience Research**, v.38, n. 4, p.325-329, 2000.

AHER, N. G.; PORE, V. S.; MISHRA, N. N.; KUMAR, A.; SHUKLA, P. K.; SHARMA, A.; BHAT, M. K. Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole containing fluconazole analogues, **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p.759-763, 2009.

AL-BARWANI, F.M.; ELTAYEB, E. A. Antifungal compounds from induced *Conium maculatum* L. plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 1097-1108, 2004.

ALLEN, M.; MILLETT, P.; DAWES, E.; RUSHTON, N. Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers *in vitro*. **Clinical Materials**, v. 16, n. 4, p. 189-194, 1994.

ANDERBERG, A. A. Taxonomy and phylogeny of the tribe Plucheeae (Asteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 176, p.75, 1991.

BARATA, S.V. **Identificación de cumarinas en espécies autóctonas del género *pterocaulon* ell.** 2010, N° 311. Dissertação de mestrado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Belgrano.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos.** Porto Alegre: ARTMED, 2ªed., 2008.

BENITEZ, A.; YATES, T.J.; SHAMALDEVI, N.; BOWEN, T.; LOKESHWAR, V.B.; Dietary supplement hymecromone and Ssorafenib: a novel combination for the control of renal cell carcinoma. **The Journal of Urology**, v.190, p. 185-290, 2012.

BENNET, I.S.; BROOKS, G.; BROOM, N.J.P.; CALVERT, S.H.; COLEMAN, K.; FRANCOIS, I. 6-(substituted methylene) penems, potent broad spectrum inhibitors of bacterial β -Lactamase. V. chiral 1,2,3-triazolyl derivatives. **The Journal of Antibiotics**, v.44, p. 969-978, 1991.

BOCK, V.D.; SPEIJER, D.; HIEMSTRA, H.; MAARSEVEEN, J.H.V. 1,2,3-Triazoles as peptide bond isosteres: synthesis and biological evaluation of cyclotetrapeptide mimics, **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 971-976, 2007.

BOOTH, N. L.; NIKOLIC, D.; BREEMEN, R.B.V.; GELLER, S.B.; SHULMAN, L.P.; FARNSWORTH, N.R. Confusion regarding anticoagulant coumarins in dietary supplements. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 76, p. 511-516, 2004.

BORGES, F.; ROLEIRA, F.; MILHAZES, N.; SANTANA, L.; URIARTE, E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. **Current Medicinal Chemistry**, v.12, p.887-916, 2005.

BOSE, D.S.; RUDRADAS, A.P.; BABU, M.H. The indium (III) chloride-catalyzed von Pechmann reaction: a simple and effective procedure for the synthesis of 4-substituted coumarins. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 9195-9197, 2002.

BUBOLS, G.; VIANNA, D.R.; MEDINA-REMON, A. ; VON POSER, G.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; GARCIA, S.C. ; EIFLER-LIMA, V. L. The Antioxidant Activity of coumarins and flavonoids. **Mini-Reviews in Medical Chemistry**, v. 13, p. 318-334, 2013.

CAMEL, V. Recent extraction techniques for solid matrices - supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. **The Analyst**, v. 126, p. 1182-1193, 2001.

CAMPBELL, H.A.; KARL PAUL LINK, K.P. Studies on the hemorrhagic sweet clover disease: The isolation and crystallization of the hemorrhagic agent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 138, p.21-33, 1941.

CASSEL, E. ; VARGAS, R.M.F. ; BEDINOT, C. Unidad piloto de extracción supercrítica automatizada. In: CASSEL, E. ; VARGAS, R.M.F. **Aplicaciones industriales de los taninos vegetales**. Porto Alegre : EDIPUCRS, 2007. p. 95-102.

CECHINEL FILHO, V. CORRÊA, R.; VAZ, Z.; CALIXTO, J. B.; NUNES, R. J.; PINHEIRO, T.; ANDRICOPULO, A. D.; YUNES, R. A. Further studies on analgesic activity of cyclic imides. **Il Farmaco**, v. 53, p. 55-57, 1998.

CORREA, R.; FILHO, V. C.; ROSA, P. W.; PEREIRA, C. I.; SCHLEMPER, V.; NUNES, R. J. Synthesis of new succinimides and sulphonated derivatives with analgesic action in mice. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v.3, p. 67-71; 1997.

DAOUBI, M.; DURÁN-PATRÓN, R.; HMAMOUCI, M.; HERNANDEZ-GALÁN, R.; BENHARREF, A.; COLLADO, I.G. Screening study for potential lead compounds for natural product-based fungicides: I. Synthesis and *in vitro* evaluation of coumarins against *Botrytis cinerea*. **Pest Management Science**. v. 60, p. 927-932, 2004.

DEBENEDETTI, S.L.; NADINIC, E.; GOMEZ, M.A.; COUSSIO, J.D.; DE KIMPE, N.; BOEYKENS, M. Purpurazol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. **Phytochemistry**. v. 31, p. 3284-3285, 1992.

DEMARAY, J.A.; THUENER, J.E.; DAWSON, M.N.; SUCHECK, S.J. Synthesis of triazole-oxazolidinones via a one-pot reaction and evaluation of their antimicrobial activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p. 4868-4871, 2008.

FELDMAN, A.K.; COLASSON, B.; FOKIN, V.V. One-Pot Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles from in situ generated azides. **Organic Letters**, v.6, p. 3897-3899, 2004.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; FERREIRA, A. F. R. Plantas medicinais como fontes de recursos terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência** (UNICAMP). v.7, 2006.

FRAY, M.J.; BULL, D.J.; CARR, C.L.; GAUTIER, E.C.L.; MOWBRAY, C.E.; STOBIE, A. Structure-activity relationships of 1,4-dihydro-(1H,4H)-quinoxaline-2,3-diones N-methyl-D-aspartate (glycine site) receptor antagonists. 1. Heterocyclic substituted 5-alkyl derivatives, **Journal of Medicinal Chemistry**, v.24, p.1951-1962, 2001.

GAUER, B. **Avaliação da toxicidade e eficácia de híbridos triazóis**. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Farmácia). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

GIFFIN, M.J.; HEASLET, H.; BRIK, A.; LIN, Y.C.; CAUVI, G.; WONG, C.H.; MCREE, D.E.; ELDER, J.H.; STOUT, C.D.; TORBETT, B.E. A copper(I)-catalyzed 1,2,3-triazole azide-alkyne click compound is a potent inhibitor of a multidrug-resistant HIV-1 protease variant. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, p.6263-6270, 2008.

GIL, M.V.; AREVALO, M.J.; LOPEZ, O. Click chemistry - What's in a name? Triazole Synthesis and Beyond. **Synthesis**, v.11, p.1589– 1620, 2007.

GUSTAFSSON, D.; BYLUND, R.; ANTONSSON, T.; NILSSON, I.; NYSTRÖM, J.; BREDBERG, U.; ERIKSSON, U.; TEGER-NILSON, A. A new oral anticoagulant: the 50-year challenge. **Nature Reviews on Drug Discovery**, v.3, p. 649-659, 2004.

HAMBURGUER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HEIN, J. E.; FOKIN, V. V. Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides **Chemical Society Reviews**, v.39, p.1302, 2010.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

HULZEBOS, E.M.; JANSSEN, P.A.H.; MASLANKIEWICZ, L.; MEIJERINK, M.C.M.; MULLER, J.J.A.; PELGROM, S.M.G.; VERDAM, L.; VERMEIRE, T.G. The application of structure-activity relationships in human hazard assessment: a first approach. **RIVM Report No 601516008**, 2001.

ICH-Q2 (R1). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization: Geneva. 2005.*

IMPERIO, D.; PIRALI, T.; GALLI, U.; PAGLIAI, F.; CAFICI, L.; CANONICO, P.L.; SORBA, G.; GENAZZANI, A.A.; TRON, G.C. Replacement of the lactone moiety on podophyllotoxin and steganacin analogues with a 1,5-disubstituted 1,2,3-triazole via ruthenium-catalyzed click chemistry. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.15, p.6748-6757, 2007.

JIMÉNEZ-OROZCO, F. A.; LÓPEZ-GONZÁLES, J.; VELASCO-VELÁZQUEZ, M.A.; MENDOZA-PATIÑO, N.; MANDOKI, J.J. Decrease of cyclin D1 in the human lung

adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. **Lung Cancer**, v. 34, p. 185-194, 2001.

KAI, K.; SHIMIZU, B.; MIZUTANI, M. SAKATA, K. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 379-386, 2006.

KHALIGH, N. G. Synthesis of coumarins *via* Pechmann reaction catalyzed by 3-methyl-1-sulfonic acid imidazolium hydrogen sulfate as an efficient, halogen-free and reusable acidic ionic liquid. **Catalyses Science and Technology**, v.8, p.1633-1636, 2012.

KINDL, H. Der ortho-Hydroxylierung aromatischer Carbonsäuren in höheren pflanzen. **Hoppe-Seylers Zeitschrift Physiologische Chemie**, v.352, p.78-84, 1971.

KOLB, H.C.; SHARPLESS, K.B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.8, p.1128-1137, 2009.

KOROLKOVAS, A. Como nascem os medicamentos. **Revista Paulista Medicina**, v. 81, p. 105-126, 1973.

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

LACY A.; O'KENEDY R. Studies on Coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 30. p.3797-381, 2004.

LEI, T. C.; VIRADOR, V.; KEN-ICHI, Y.; VIEIRA, W.D., HEARNING, V.J. Stimulation of Melanoblast Pigmentation by 8-methoxypsoralen: The involvement of microphthalmia-associated transcription factor, the protein kinase A signal pathway, and proteasome-mediated degradation. **Journal Investigative Dermatology**, v. 119, p. 1341-1349, 2002.

LI, T.; ZHANG, Z.; FU, F. Y. C. Montmorillonite clay catalysis: An environmentally friendly procedure for the synthesis of coumarins *via* Pechmann condensation of phenols with ethyl acetoacetate. **Journal of Chemical Research - synopses**, v.1, p.38-39,1998.

LI, J. J.; COREY, E. J. **Name reactions in heterocyclic chemistry II**. New York - John Wiley. 2011

LIST, P. H. ; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. London: Heyden and Son, 1989. p. 96-185.

LIU, X.; ZHANG, L.; FU, L.; CHEN, K.; QIAN, B. Effect of scopoletin on PC3 cell proliferation and apoptosis. **Acta Pharmacologica Clinica**, v. 22, p. 929-933, 2001.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 96, n. 2, p. 147-152, 2000.

LUTZ, F.; ZARAFSHANI, Z. Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide-alkyne "click chemistry". **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, p.958–970, 2008.

MAO, P. C.; MOUSCADET, J.; LEH, H.; AUCLAIR, C.; HSU, L. Chemical modification of coumarin dimer and HIV-1 integrase inhibitory activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 50, n. 12, p. 1634-1637, 2002.

MAES, D.; DEBENEDETTI, S.; DE KIMPE, N. New coumarins from *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 165-169, 2006.

MARSHALL, M. E.; MOHLER, J.L.; EDMONDS, K.; WILLIAMS, B.; BUFFER, K.; RYLES, M.; WEISS, L.; URBAN, D.; BUESCHEN, A. MARKIEWICZ, M.; CLOUD, G.; An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.120, p.42, 1994.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, p. 185-200, 1996.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais brasileiras: um desafio para nossos químicos orgânicos. **Revista de Extensão-Desafio**, v. 3, n. 1, p. 5-13, 1990.

MCKINNEY J. D.; RICHARD A.; WALLER C.; NEWMAN M. C.; GERBERICK F. The practice of structure activity relationships (SAR) in toxicology. **Toxicological Sciences**, v.56, p.8-17, 2000.

MONGE, A. Research and training in Medicinal Chemistry. **Química nova (online)**, v.20, n.6, p.683-686, 1997

MURRAY, R. D. H. **Naturally Occurring Plant Coumarins**. New York: Springer-Verlag, 1978.

MURRAY R.D.H.; MENDEZ J.; BROWN S.A. **The natural coumarins – occurrence, chemistry and biochemistry**. New York: John Wiley, 1982.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, M.G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. v. 70, p. 461-477, 2007.

NIKOLOVA, N.; JAWORSKA, J. Approaches to Measure chemical similarity – a review. **QSAR and Combinatorial Science**. v.22, p.1006-1026, 2003.

OJALA, T.; REMES, S.; HAANSUU, P.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; HAAHTELA,K.; VUORELA, P. Antimicrobial activity of some coumarin containing

herbal plants growing in Finland. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 299-305, 2000.

OJALA, T. **Biological Screening of Plant Coumarins**. 2001. 62f. Dissertação de mestrado, University of Helsinki.

PEARCE, L. R.; KOMANDER, D.; ALESSI, D. R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.11, n. 1, p.9-22, 2010.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1163, p. 2-24, 2007.

RAMBO, B.A. Análise geográfica das Compostas Sulbrasileiras. **Anais Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues**. v. 4, n. 4, p. 87-160, 1952.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.; BENINK, H.; WORZELLA, T.; MINOR, L. Cell Viability Assays. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

RIVEIRO, O.; SHAYO,C.; MONEZOR,F.; FERNANDEZ, N.; BALDI, A.; DE KIMPE, N.; ROSSI, J.; DEBENEDETTI, S.; DAVIO, C. Induction of cell differentiation in human leukemia U-937 cells by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. **Cancer Letters**. v.210, p.179-188, 2004.

RIVEIRO, M. E.; DE KIMPE, N.; MOGLIONI, A.; VAZQUEZ, R.; MONCZOR, F.; SHAYO, C.; DAVIO, C. Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v.17, n.13, p. 1325-1338, 2010.

ROY, K. K.; DIXIT, A.; SAXENA, A. K. An investigation of structurally diverse carbamates for acetylcholinesterase (AChE) inhibition using 3D-QSAR analysis. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 27, p. 197-208, 2008.

SARDARI, S.; MORI, Y.; HORITA, K.; MICETICH, R.; NISHIBE, S. DANESHTALAB, M. Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1933-1940, 1999.

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

SIMONE, R.D.; CHINI, M.G.; BRUNO, I.; RICCIO, R.; MUELLER, D.; WERZ, O.; BIFULCO, G. Structure-based discovery of inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1,5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein: promising hits for the development of new anti-inflammatory agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54 p.1565-1575, 2011.

SOLTIS, M.J.; YEH, H.J.; COLE, K.A.; WHITTAKER, N.; WERSTO, R.P.; KOHN, E.C. Identification and characterization of human metabolites of CAI [5-amino-1-(4'-chlorobenzoyl-3,5-dichlorobenzyl)-1,2,3-triazole-4-carboxamide], **Drug Metabolism and Disposition**, v.24, p.799-806, 1996.

STEIN, A.C. **Análise química de espécies de *Pterocaulon* (Asteraceae) e determinação da atividade antifúngica.** 2005. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Stein, A.C.; ALVAREZ, S.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G.L. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p.95-98, 2006.

TADA, Y.; SHIKISHIMA, Y.; TAKAISHI, Y.; SHIBATA, H.; HIGUTI, H.; HONDA, G.; ITO, M.; TAKEDA, Y.; KODZIMATOV, L.; ASHURMATOV, O.; OHMOTO, Y. Coumarins and γ -pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release. **Phytochemistry**, v. 59, p. 649-654, 2002.

TORRES, R.; FAINI, F.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G. Two new O-geranyl coumarins from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 5-8, 2004.

TRANI, M.; CARBONETTI, A.; DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F. Dihydrochalcones and coumarins of *Esenbeckia grandiflora* subsp. *Brevipetiolata*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 99-102, 2004.

ULUKAYA, E.; OZDIKICIOGLU, F.; ORAL, A.Y.; DEMIRCI, M. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 1, p. 232-239, 2008.

VATMURGE, N.S.; HAZRA, B.G.; PORE, V.S.; SHIRAZI, F.; CHAVAN, P.S.; DESHPANDE, M.V. Synthesis and antimicrobial activity of β -lactam-bile acid conjugates linked via triazole, **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p.2043-2047, 2008.

VIANNA, D.R.; CANTO, R. F. S.; STOPIGLIA, C. D. O.; CORVELLO, F.; CRESTANI, A. R.; MEIRELLES, G.; SCROFERNEKER, M. L.; LANZMASTER, M.; PINTO, A. C.; TEIXEIRA, H. F.; VON POSER, G. L.; EIFLER-LIMA, V. L. Microwave-assisted synthesis of 4-methyl- coumarins and antifungal activity against *Sporoxyhrix Schenckii*. *Manuscrito em preparação*.

VIANNA, D.R. ; BUBOLS, G. ; MEIRELLES, G.; SILVA, B. ; DA ROCHA A.; LANZMASTER, M. ; MONSERRAT, J.M.; GARCIA, S. C.; VON POSER, G.; EIFLER LIMA, V. L. Evaluation of the Antioxidant Capacity of Synthesized Coumarins. **International Journal of Molecular Sciences (Online)**, v. 13, p. 7260-7270, 2012a.

VIANNA, D.R. ; HAMERSKI, L.; FIGUEIRÓ, F.; BERNARDI, A. ; VISENTIN, L.; TEIXEIRA, H.; PIRES, E.; EIFLER LIMA, V. L.; SALBEGO, C.; BATASTTINI, A. M.; VON POSER, G.; PINTO, A. Selective cytotoxicity and apoptosis induction in glioma

cell lines by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon* species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 268-274, 2012b.

VIEGAS JR. C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 02, p. 326-337, 2006.

WANG, Q.; CHAN, T. R.; HILGRAF, R.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B.; FINN, M. G. Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. **Journal of the American Chemical Society**, v.125, p.3192. 2003.

WHITING, M.; TRIPP, J. C.; LIN, Y. C.; LINDSTROM, W.; OLSON, A. J.; ELDER, J. H.; SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V. V. Rapid discovery and structure-activity profiling of novel inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 protease enabled by the copper(I)-catalyzed synthesis of 1,2,3-triazoles and their further functionalization. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 4 p.7697-7710, 2006.

XU, H.; AGRAFIOTIS, D. K. Retrospect and prospect of virtualscreening in drug lead discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2, p.1305-1320, 2002.

ZHOU, C. H.; WANG, Y. Recent Researches in Triazole Compounds as Medicinal Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.239-280, 2012.

Anexo 1. Autorização de coleta SISBIO

Usuário: Fernando Cidade Torres Número do CPF: 828706-██ Número do Registro: 5535550

[Solicitação](#) [Relatório](#) [Sair](#)

Selecionar solicitação ✕

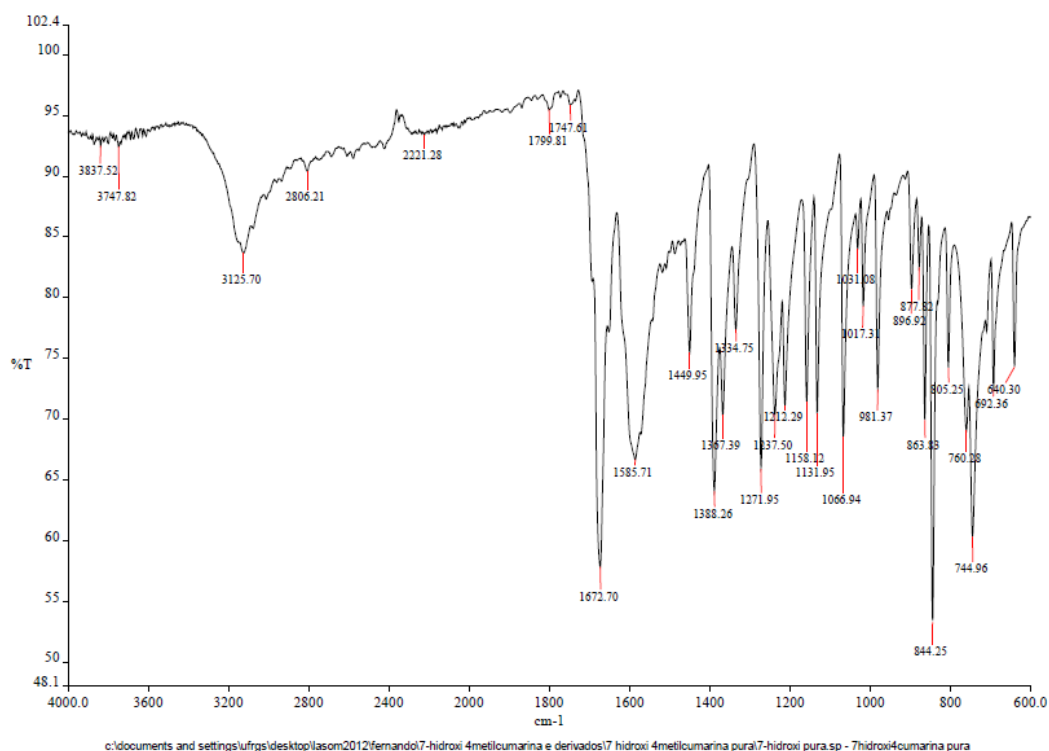
[Ajuda](#)

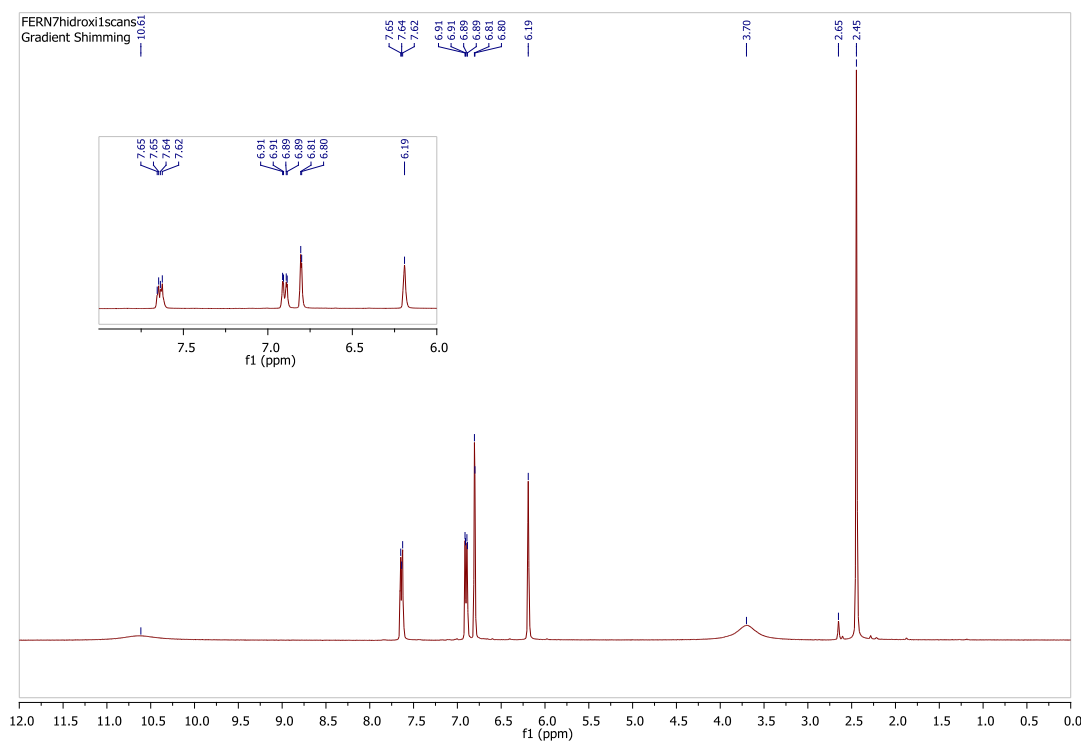
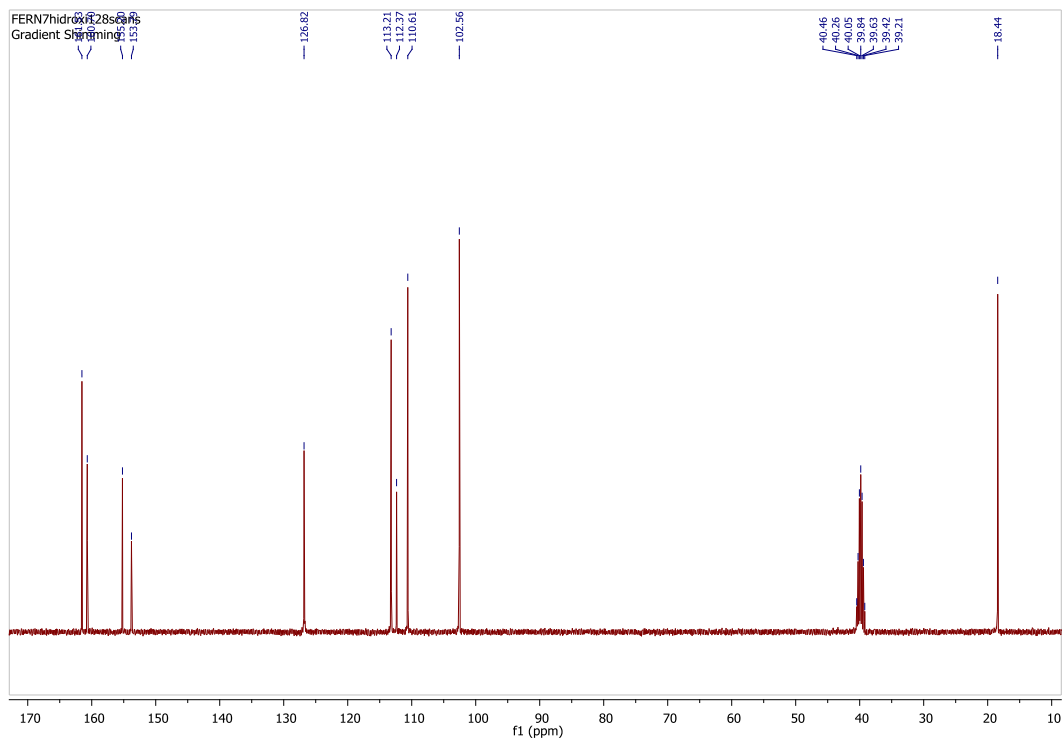
Caso queira reativar uma solicitação que esteja desativada, envie mensagem para atendimento.sisbio@icmbio.gov.br

Nº	Tipo da Solicitação	Situação atual	Data	OPERAÇÃO
35288	Autorização para atividades com finalidade científica	Solicitação devolvida para correção	16/07/2012	Selecionar
37170	Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico	Documento concedido	05/11/2012	Selecionar

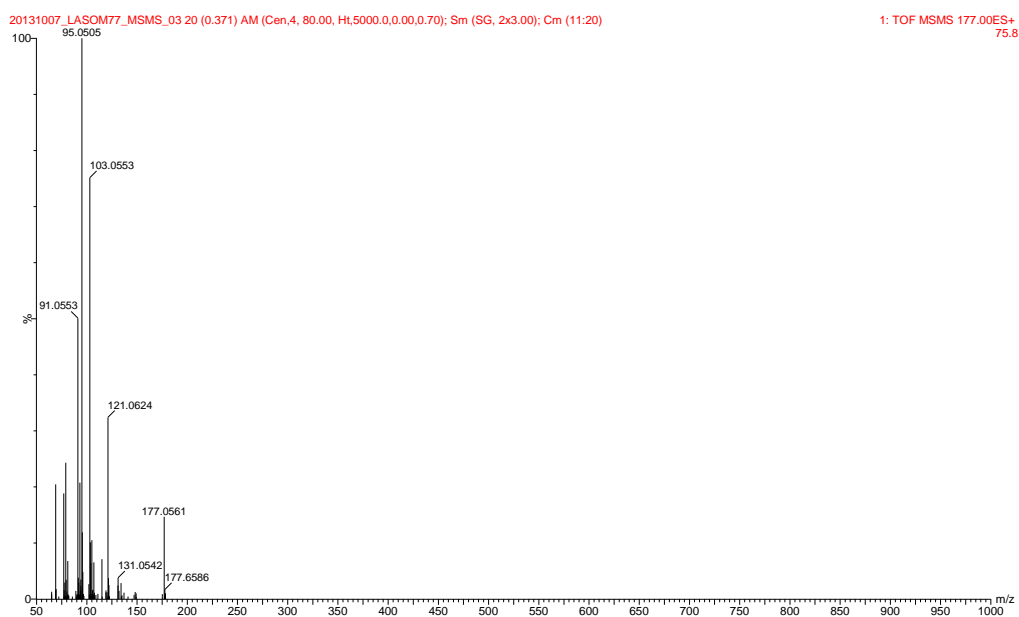
[Nova solicitação](#)

Anexo 2. Espectro de IR do composto LaSOM 77

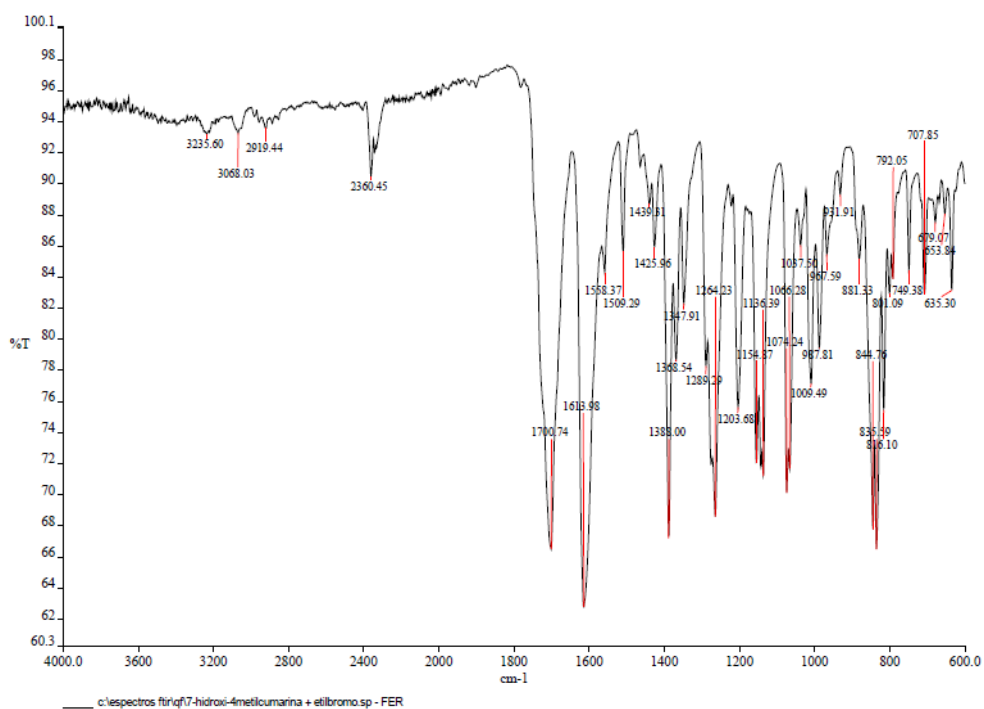


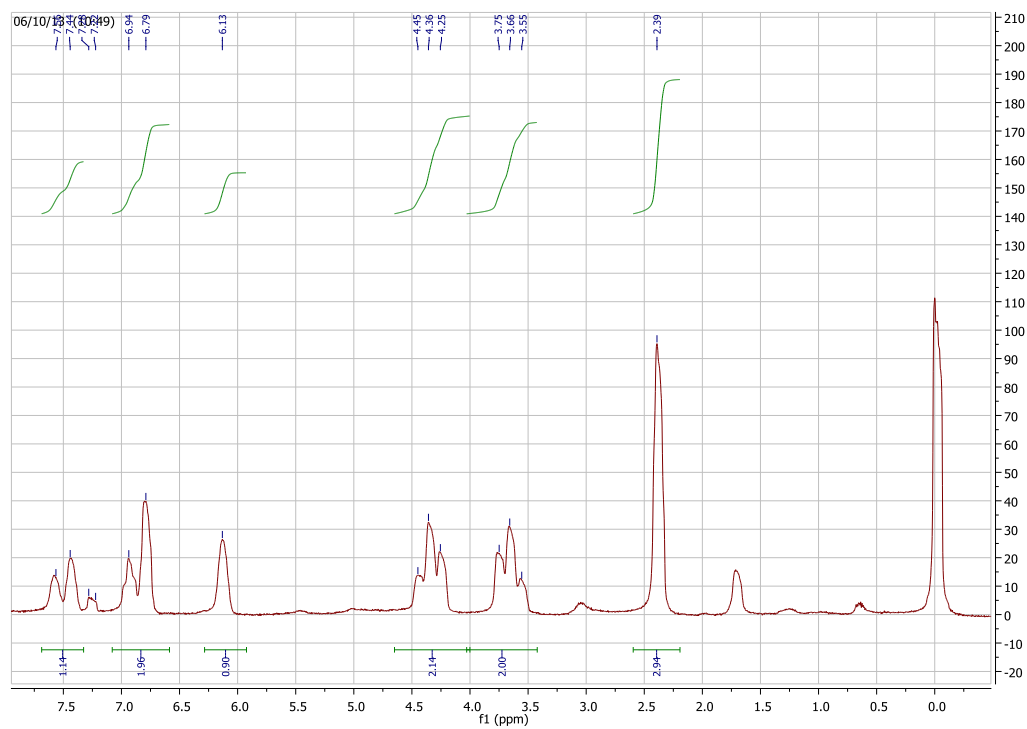
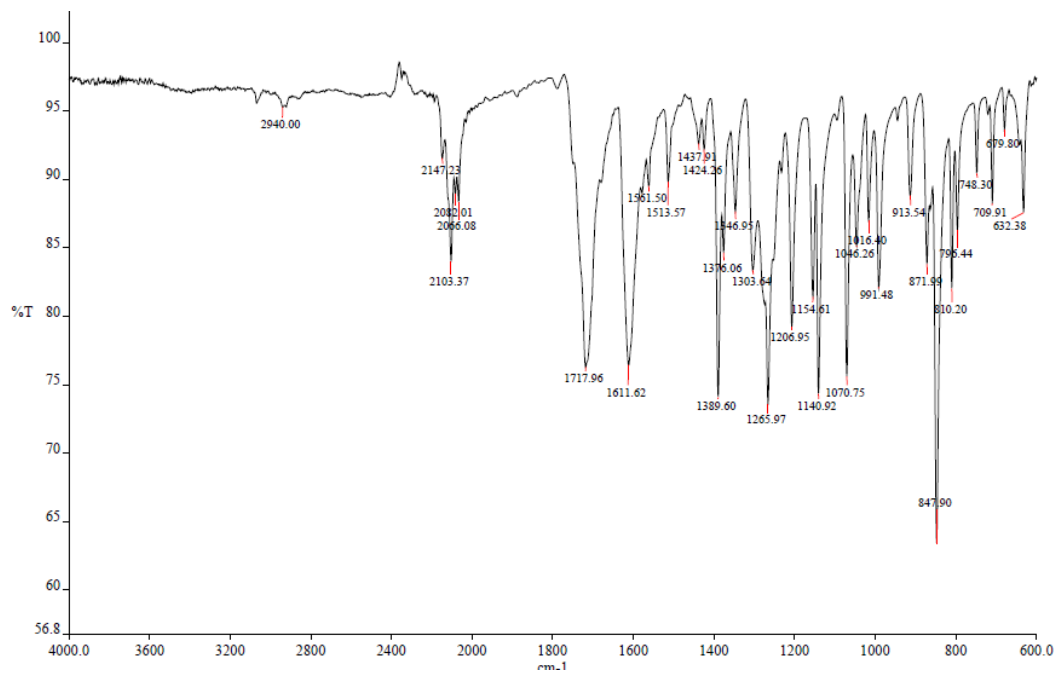
Anexo 3: Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 – 400MHz) do composto LaSOM 77**Anexo 4: Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3 – 400MHz) do composto LaSOM 77**

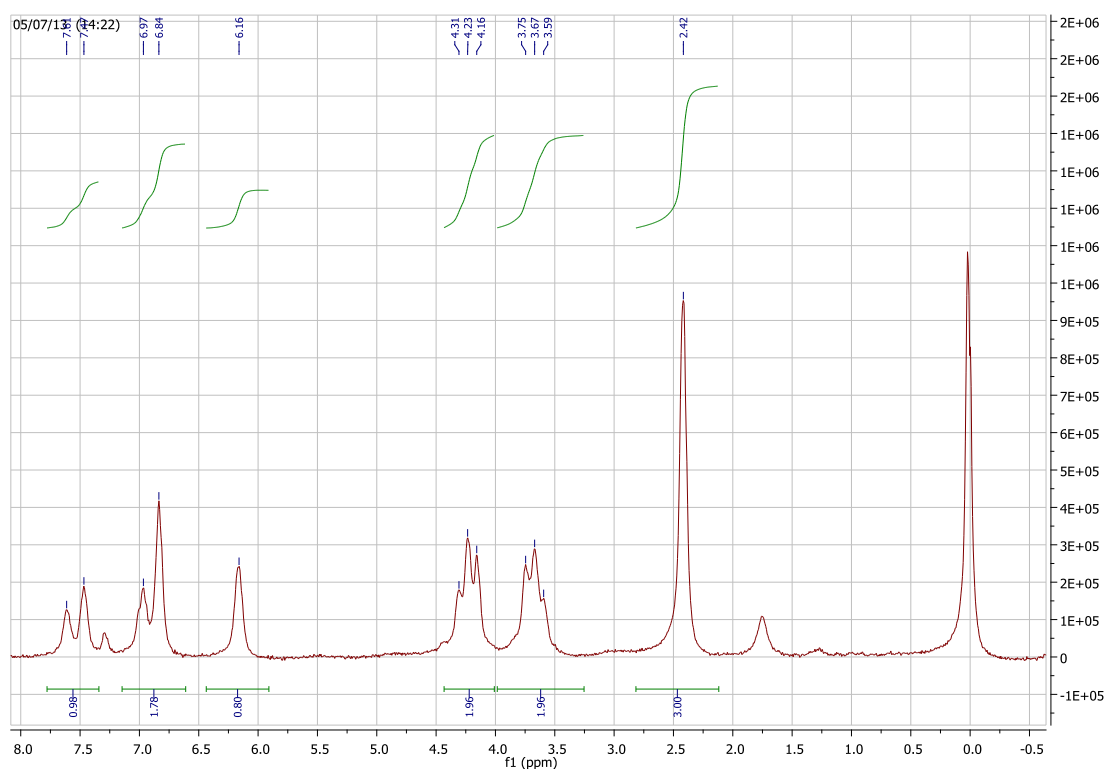
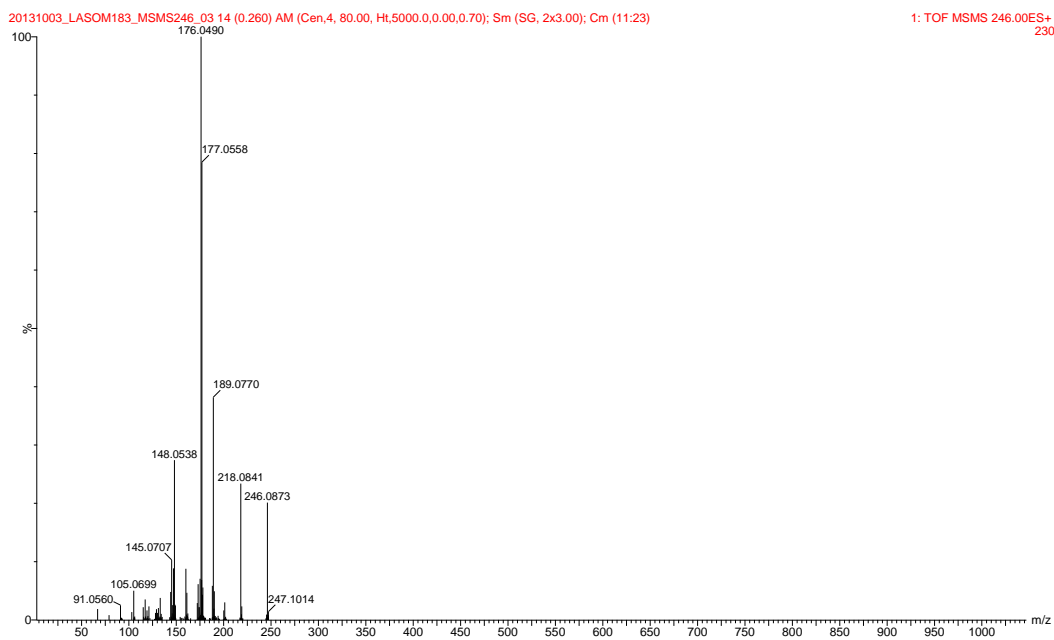
Anexo 5. Espectro HRMS do LaSOM 77

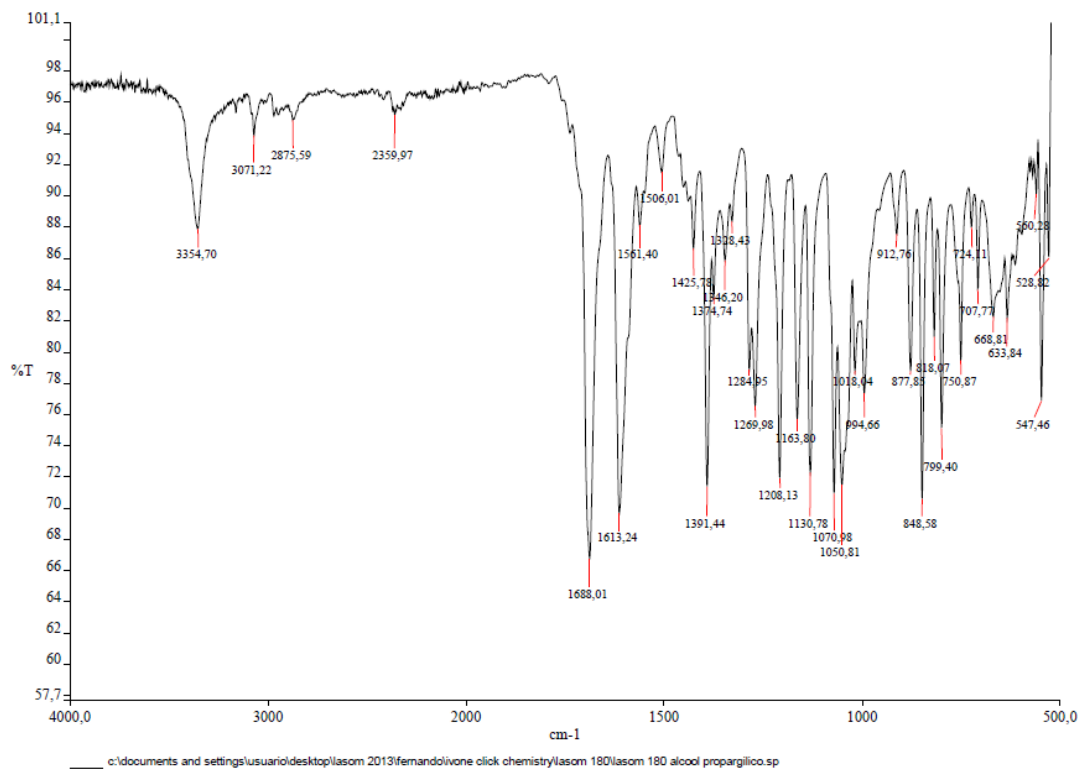
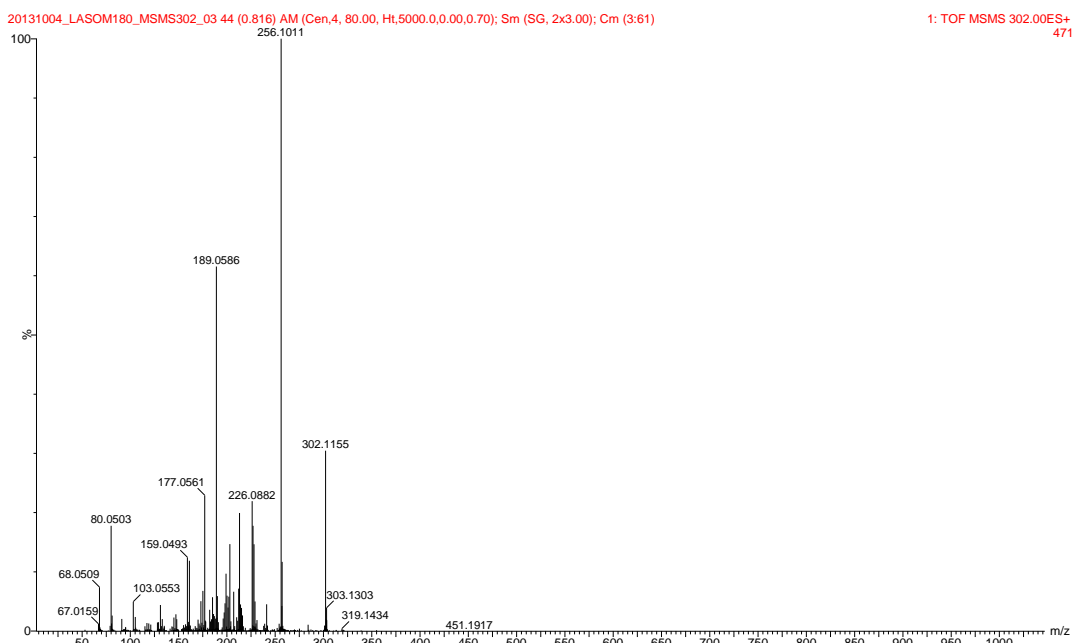


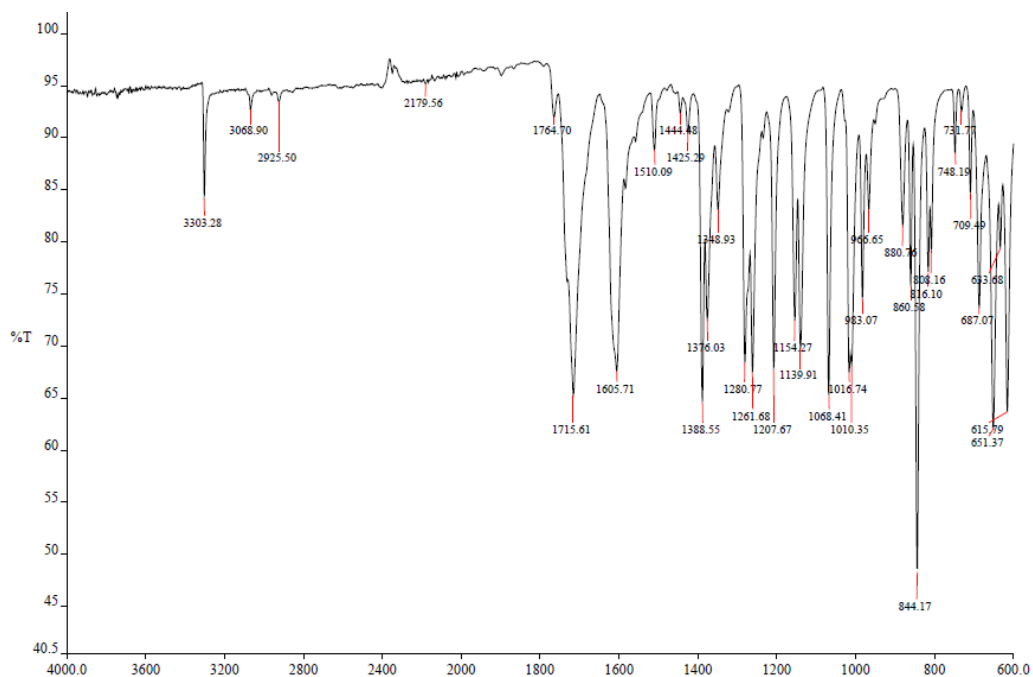
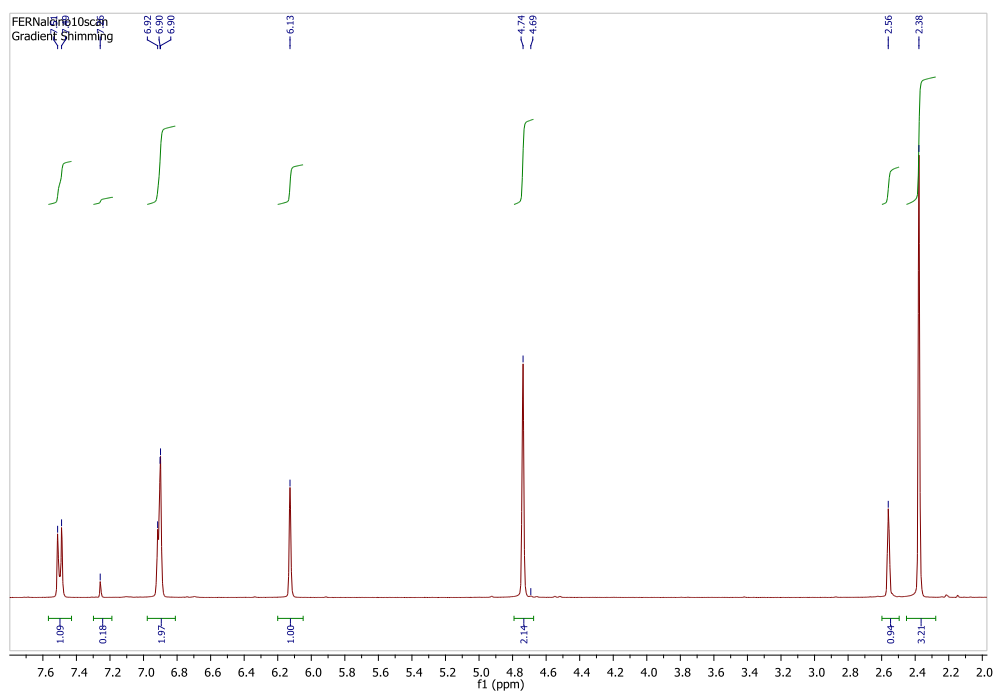
Anexo 6. Espectro de IR do composto LaSOM 182

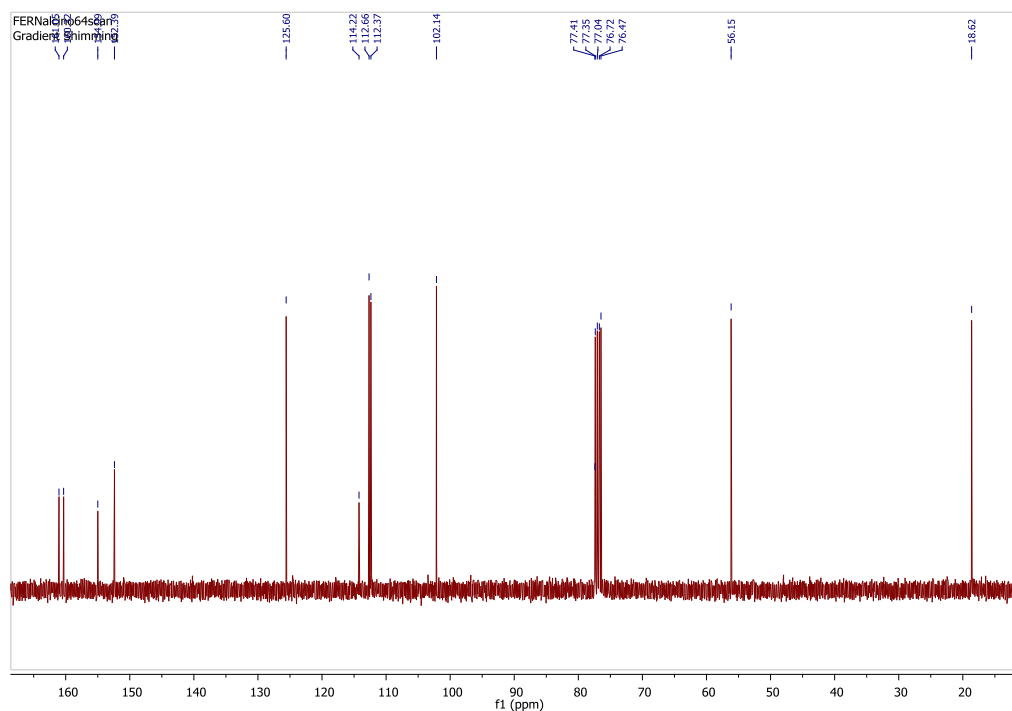
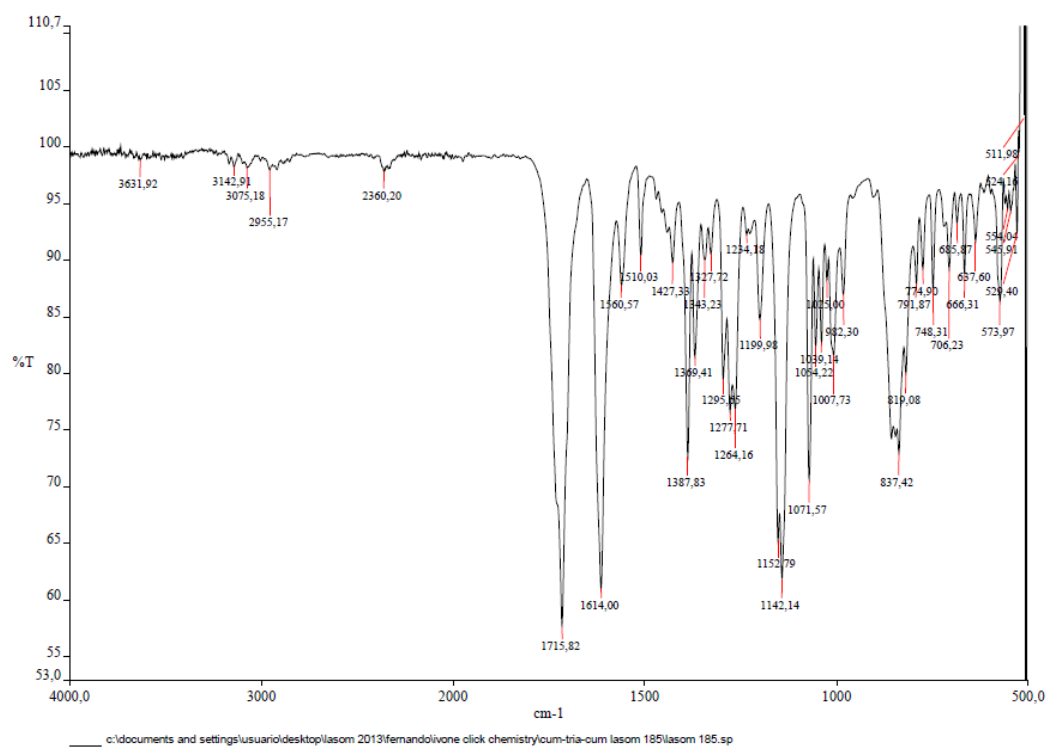


Anexo 7. Dados de ^1H RMN (CDCl_3 – 60MHz) do composto LaSOM 182**Anexo 8. Espectro de IR do composto LaSOM 183**

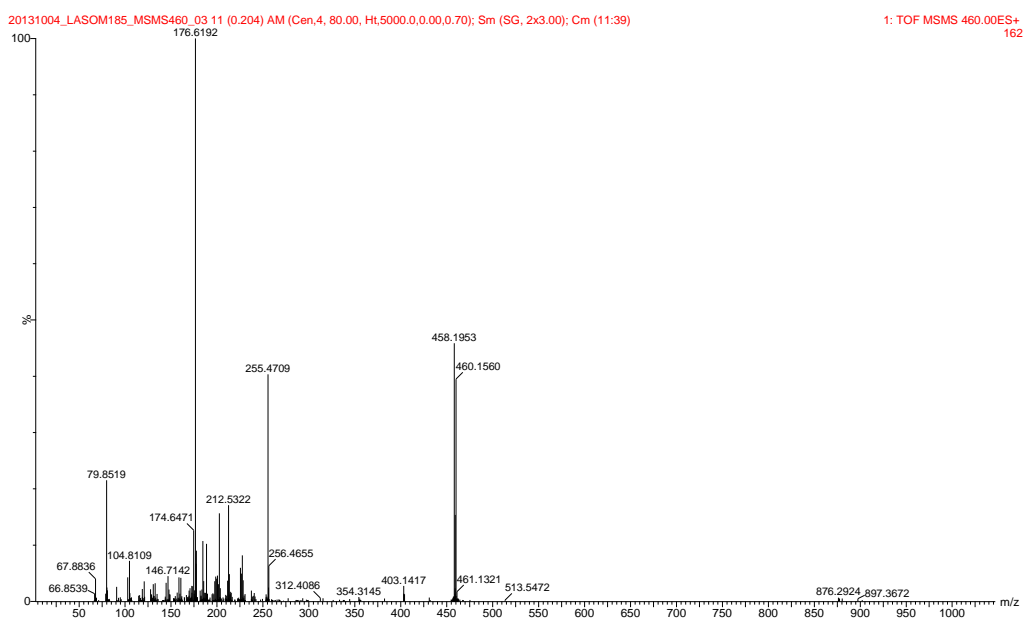
Anexo 9. Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 – 60MHz) do composto LaSOM 183**Anexo 10. Espectro de HRMS do composto LaSOM 183**

Anexo 11. Espectro de IR do composto LaSOM 180**Anexo 12. Espectro HRMS do composto LaSOM 180**

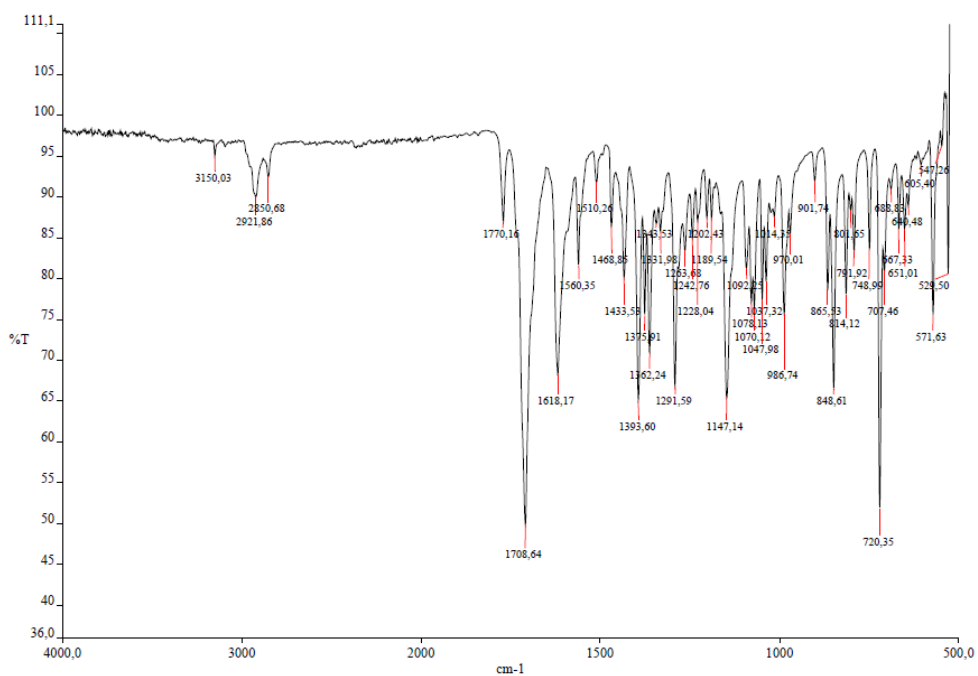
Anexo 13. Espectro de IR do composto LaSOM 184**Anexo 14. Espectro de ¹H-RMN do composto LaSOM 184**

Anexo 15. Espectro de ^{13}C -RMN do composto LaSOM 184**Anexo 16. Espectro de IR do composto LaSOM 185**

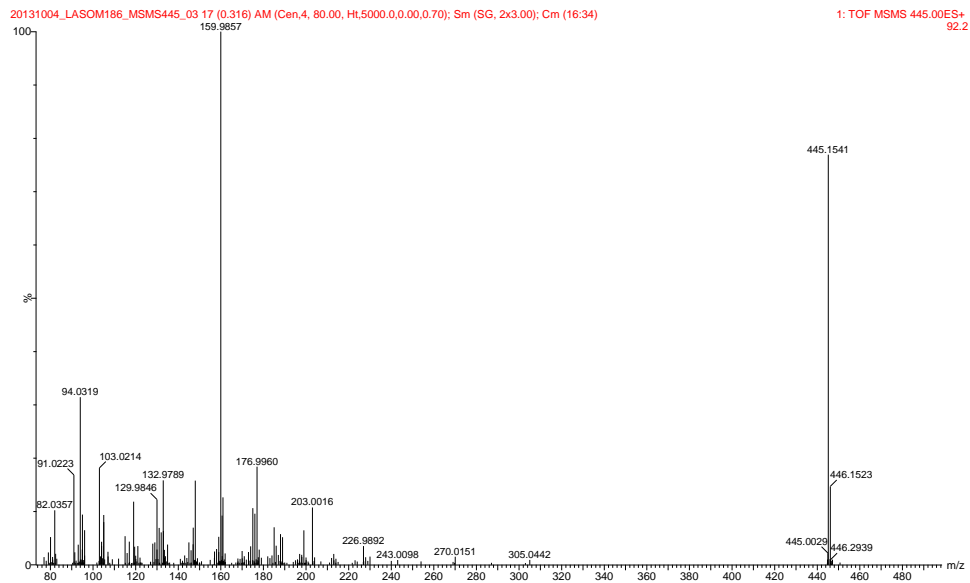
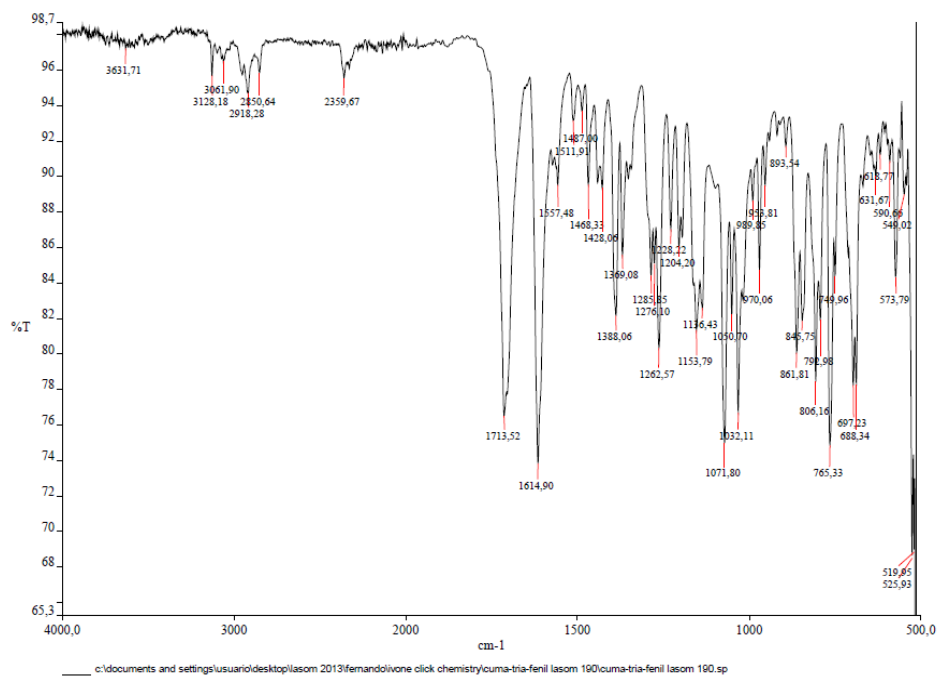
Anexo 17. Espectro de HRMS do composto LaSOM 185



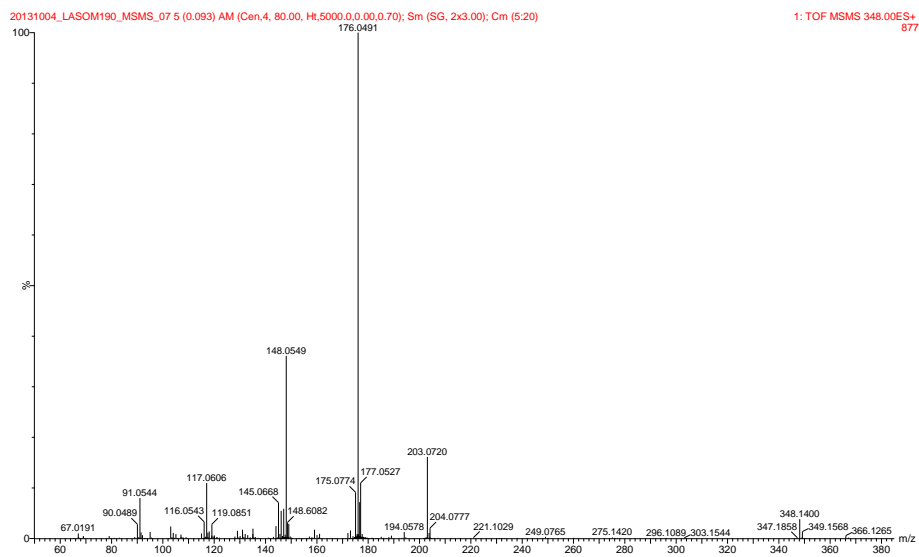
Anexo 18. Espectro de IR do composto LaSOM 186



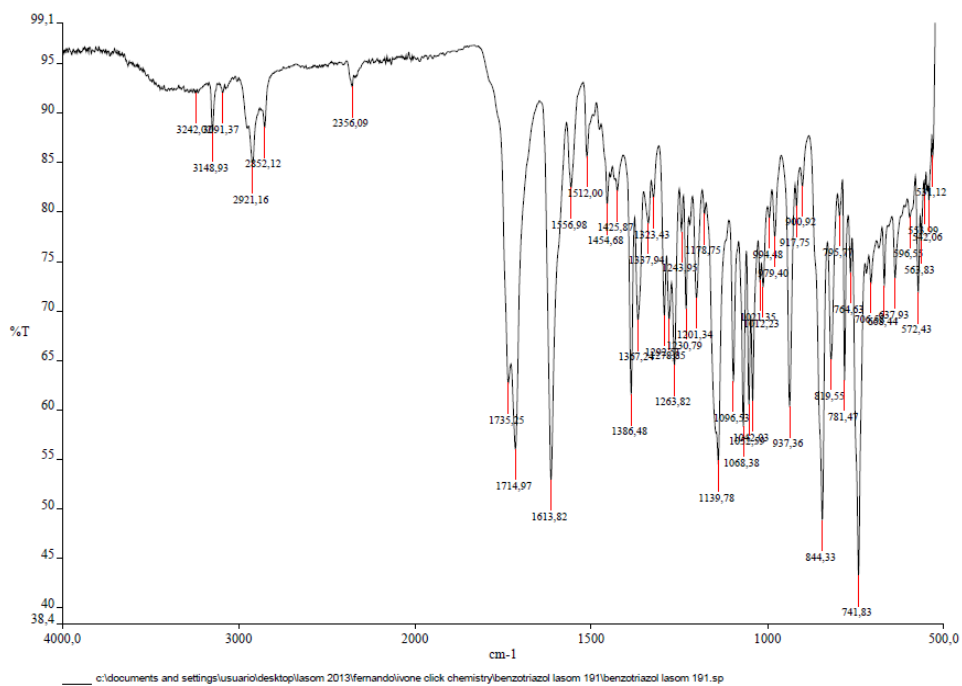
c:\documents and settings\usuarioridestop\lasom 2013\fermandolivone click chemistry\cum-tria-phthalimida lasom 186\cumarina-tria-phthalimida.sp - cumarina-tria-phthalimida lasom 186

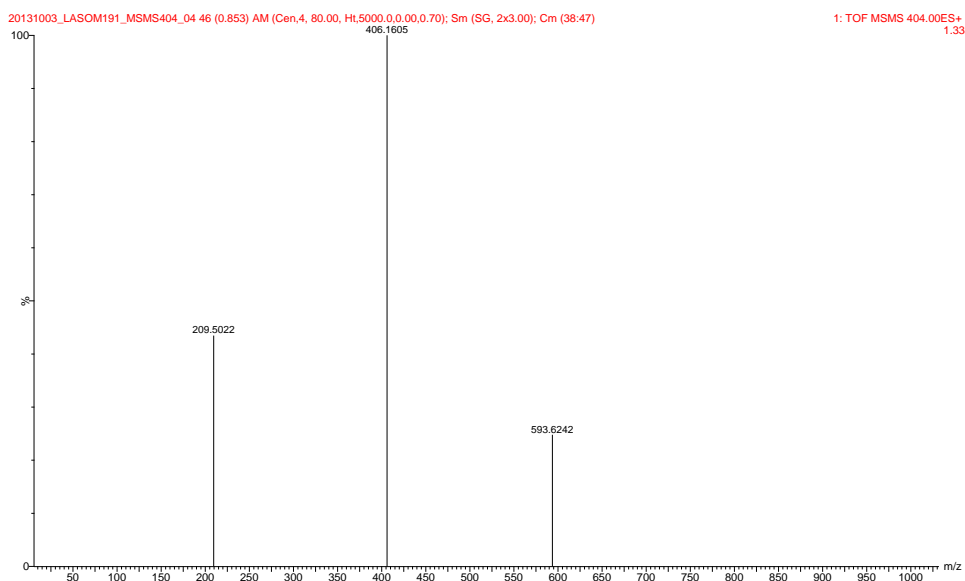
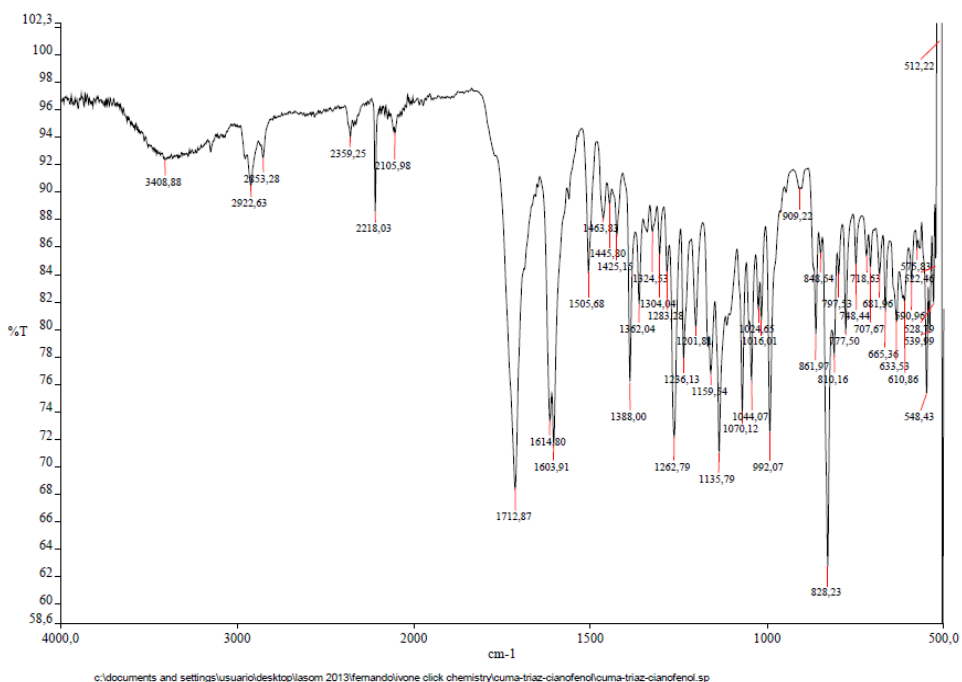
Anexo 19. Espectro de HRMS do composto LaSOM 186**Anexo 20. Espectro de IR do composto LaSOM 190**

Anexo 21. Espectro de HRMS do composto LaSOM 190

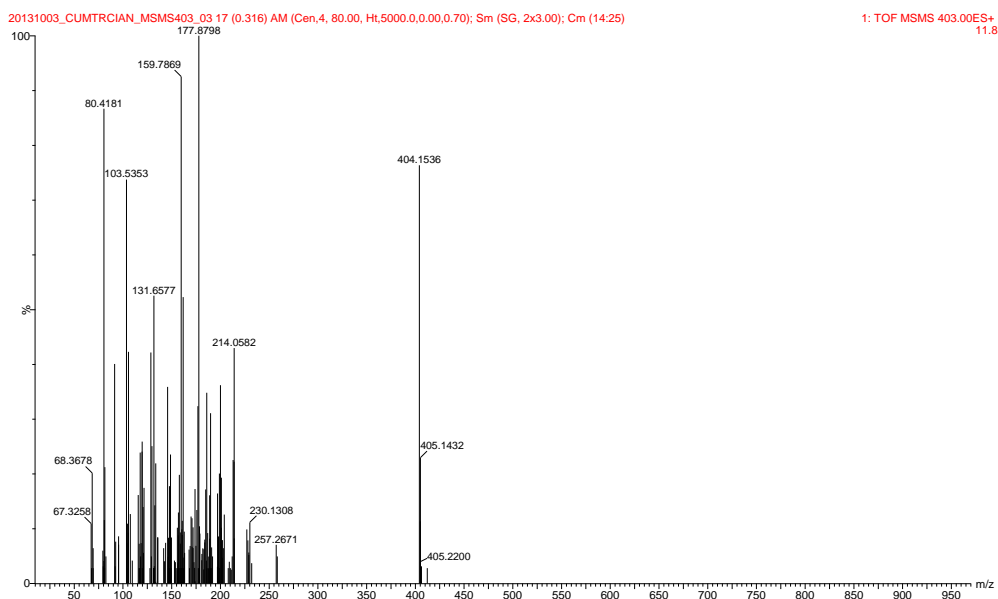


Anexo 22. Espectro de IR do composto LaSOM 191

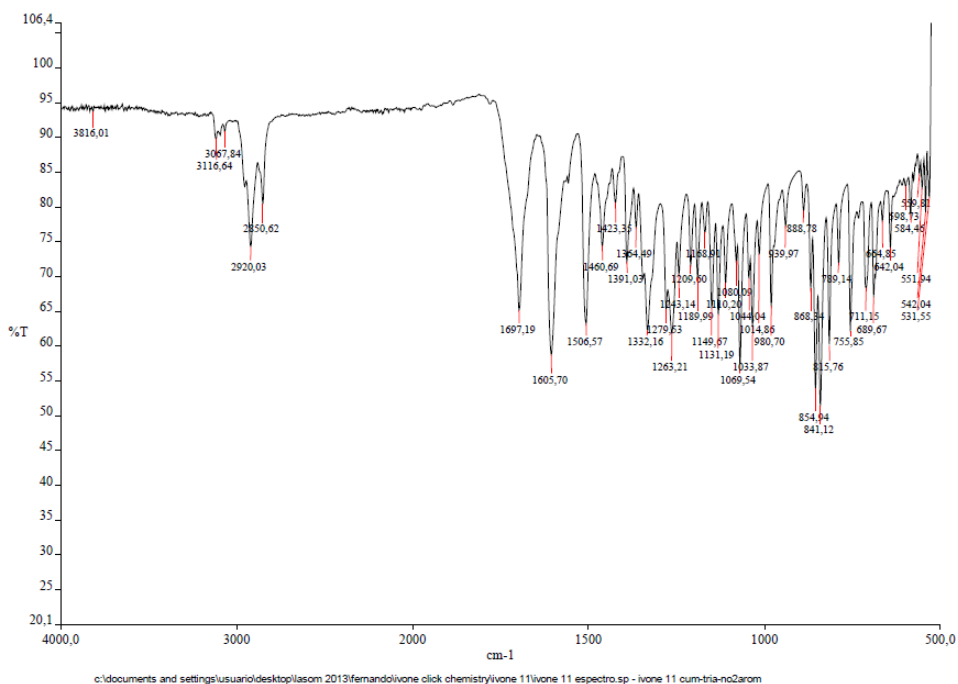


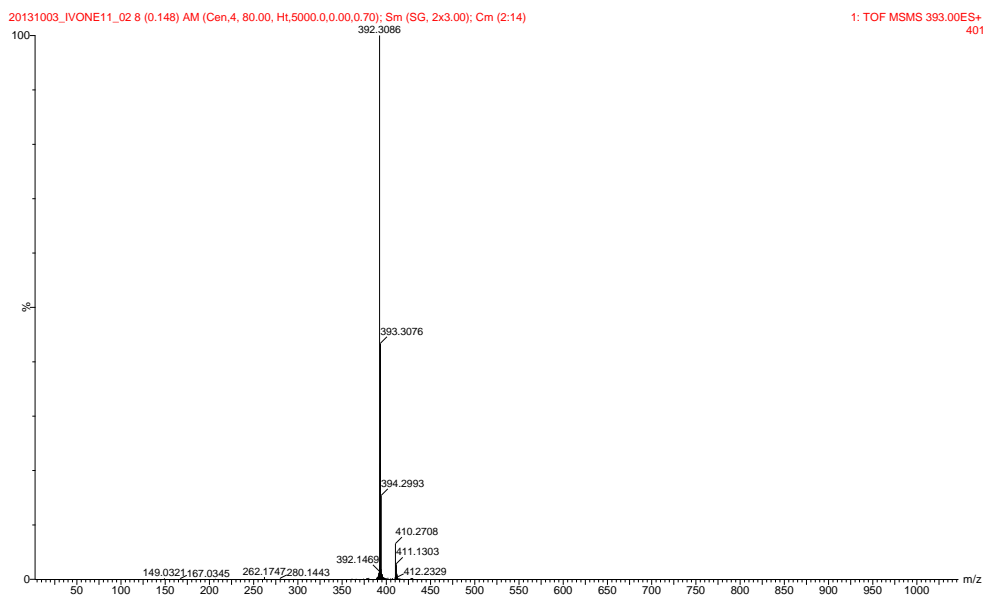
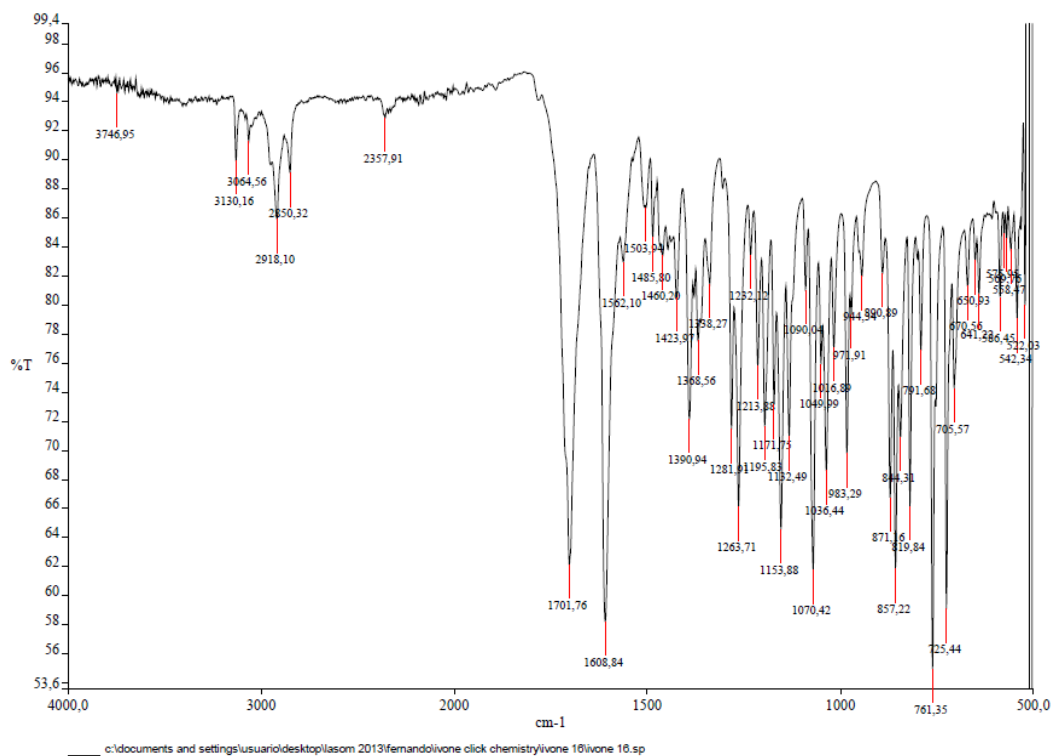
Anexo 23. Espectro de HRMS do composto LaSOM 191**Anexo 24. Espectro de IR do composto LaSOM 192**

Anexo 25. Espectro de HRMS do composto LaSOM 192

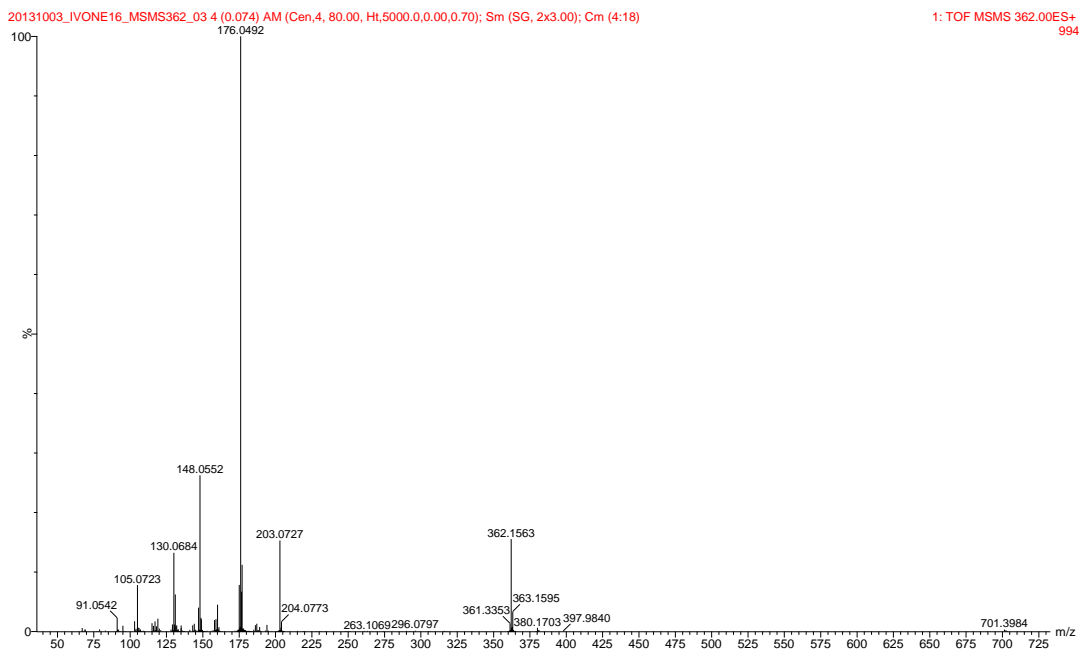


Anexo 26. Espectro de IR do composto LaSOM 193

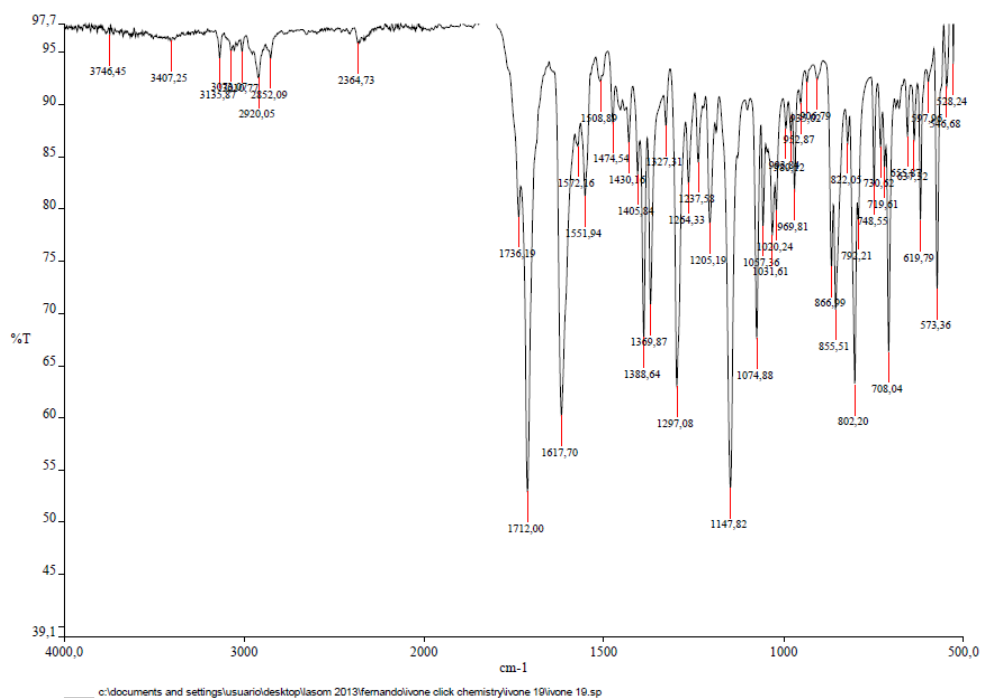


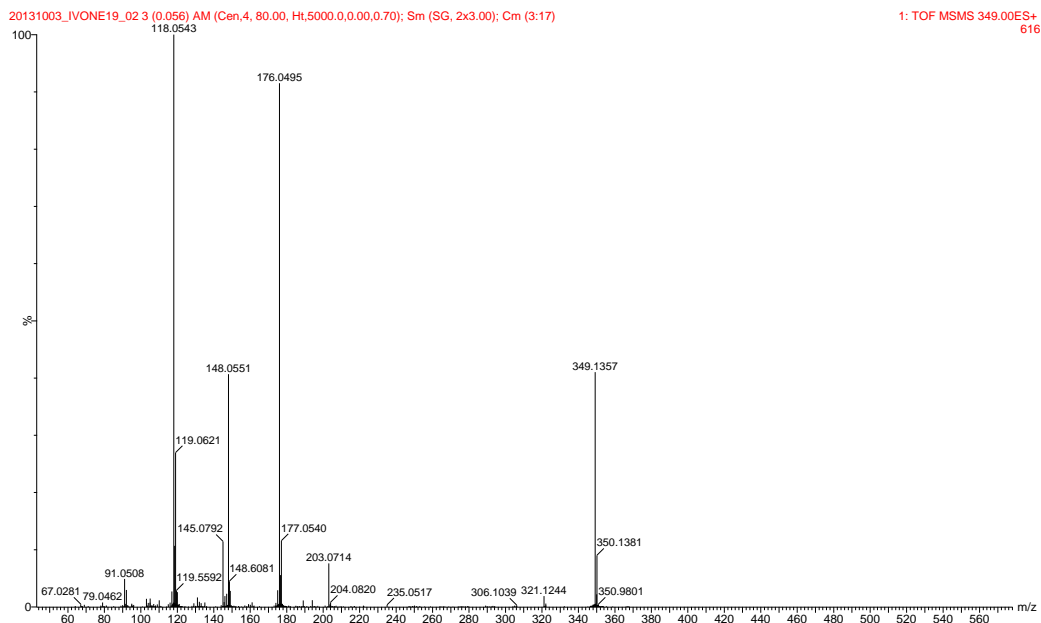
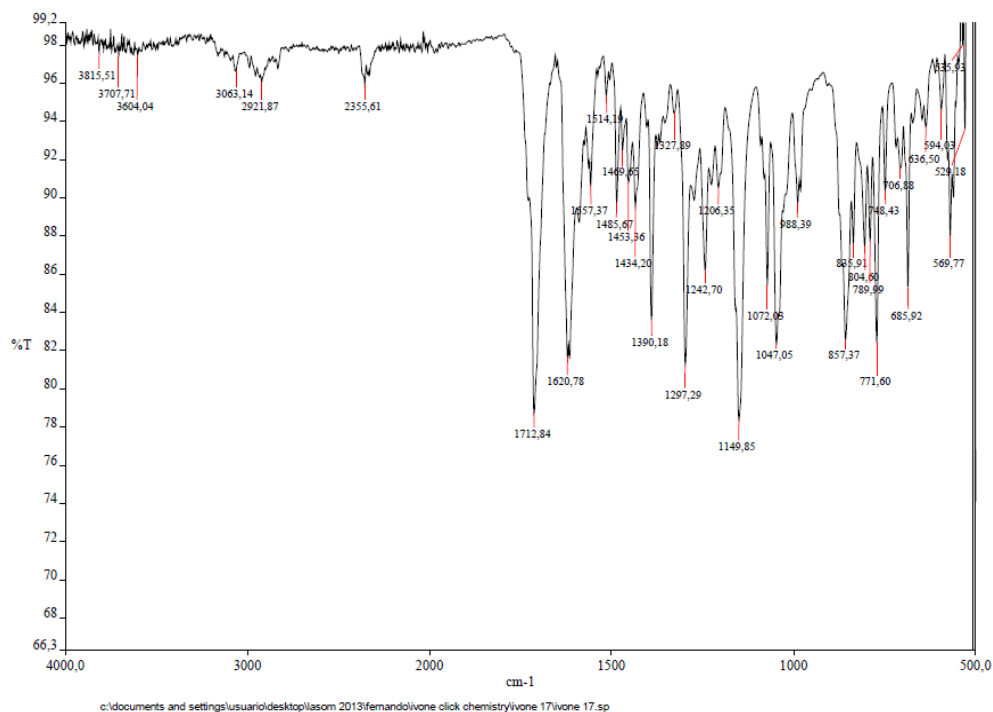
Anexo 27. Espectro de HRMS do composto LaSOM 193**Anexo 28. Espectro de IR do composto LaSOM 195**

Anexo 29. Espectro de HRMS do composto LaSOM 195

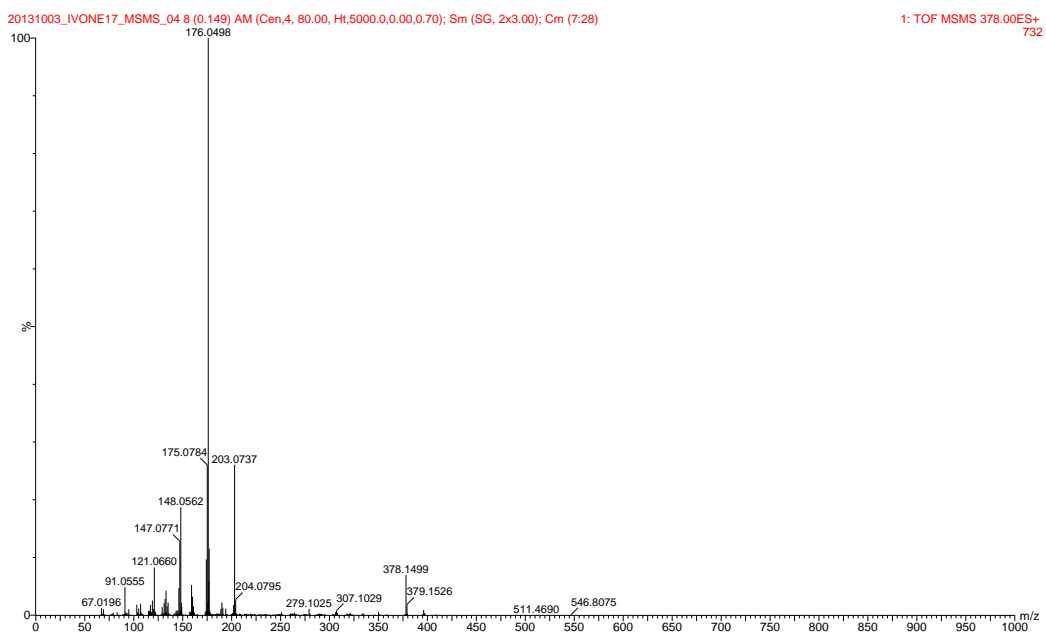


Anexo 30. Espectro de IR do composto LaSOM 196

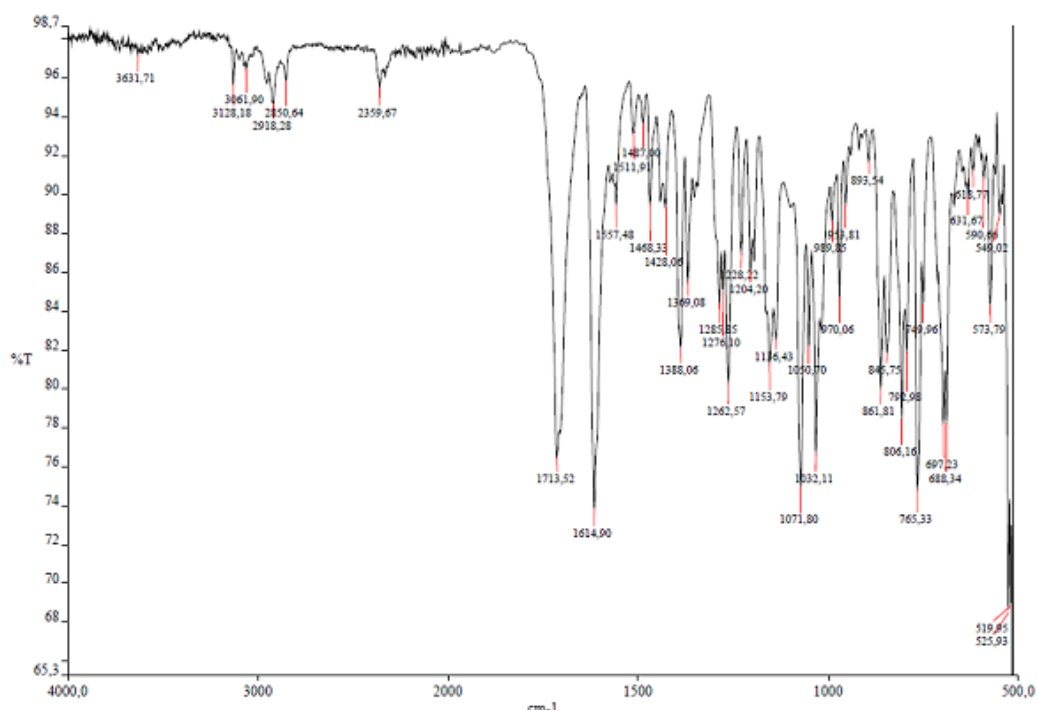


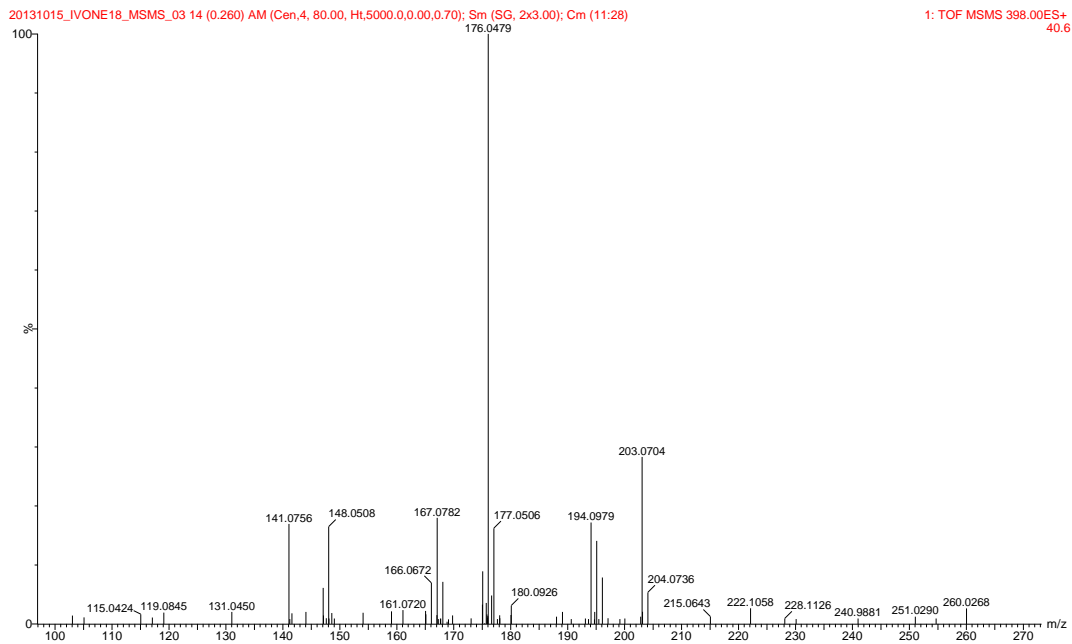
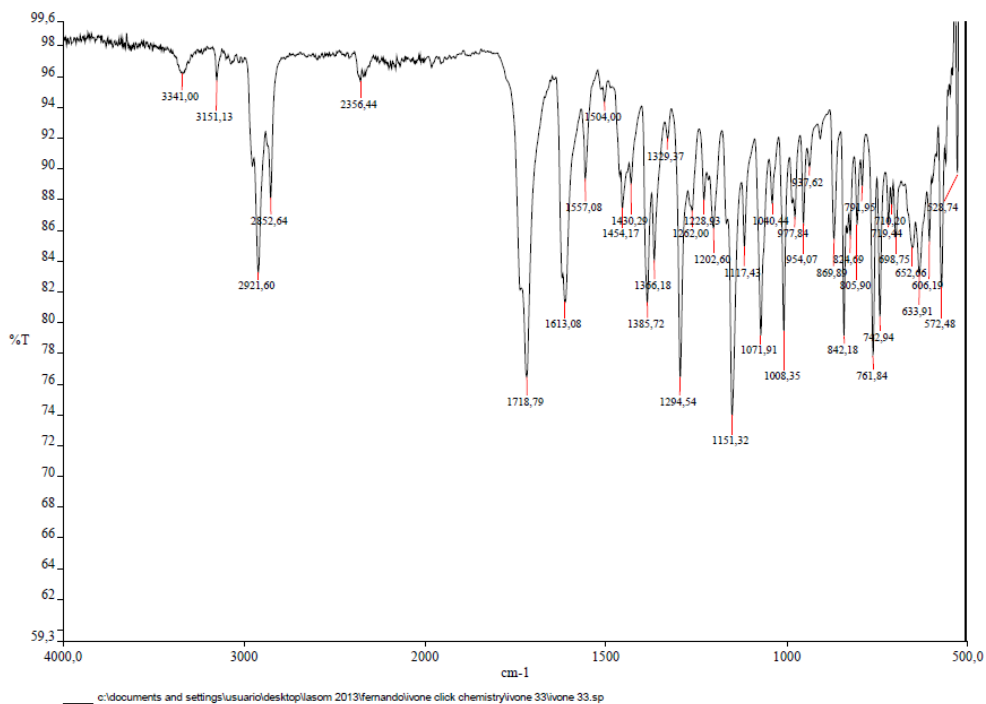
Anexo 31. Espectro de HRMS do composto LaSOM 196**Anexo 32. Espectro de IR do composto LaSOM 197**

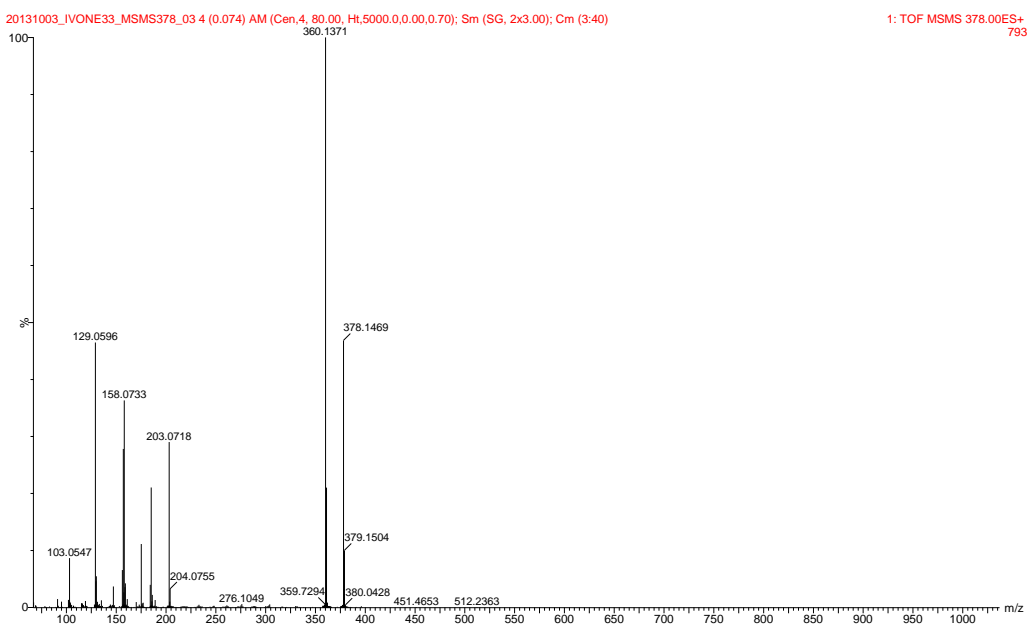
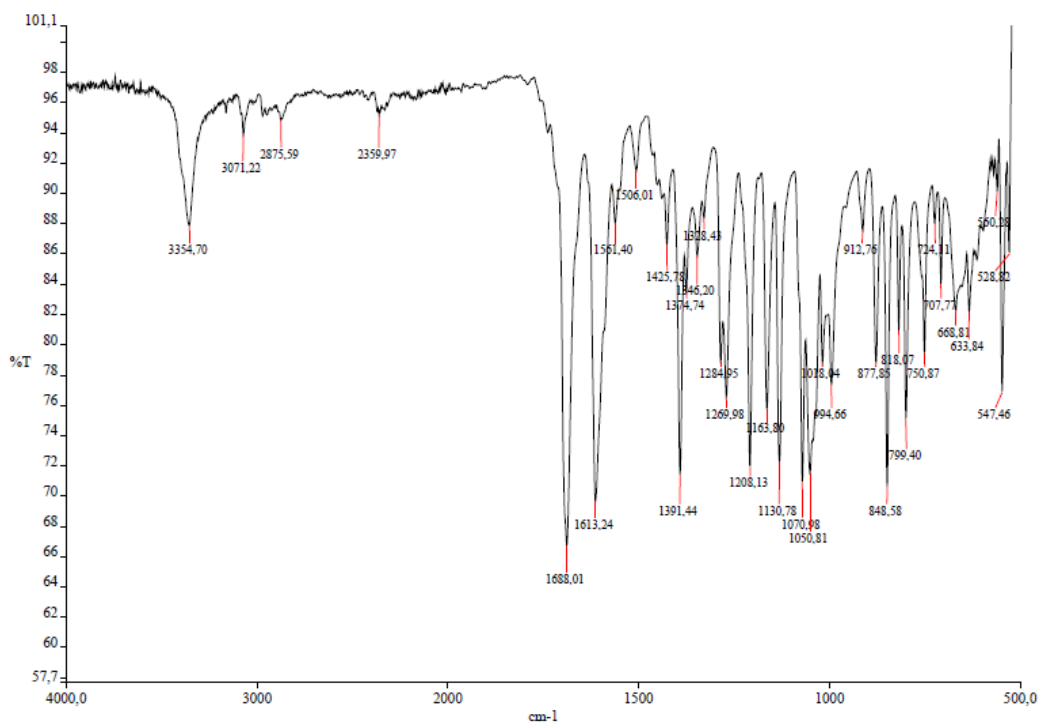
Anexo 33. Espectro de HRMS do composto LaSOM 197

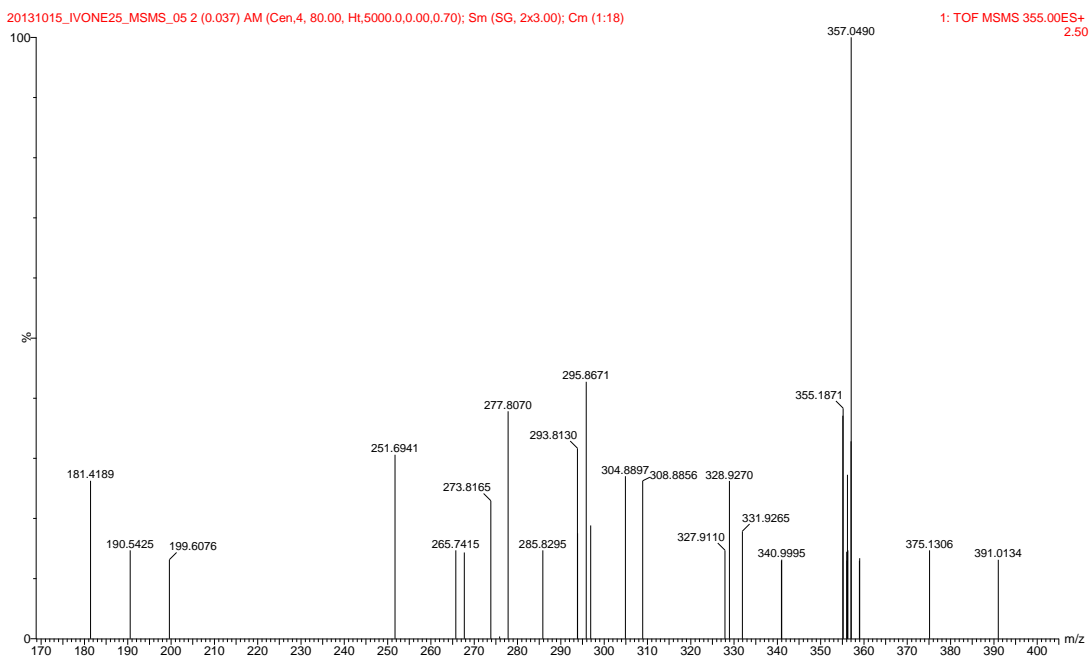
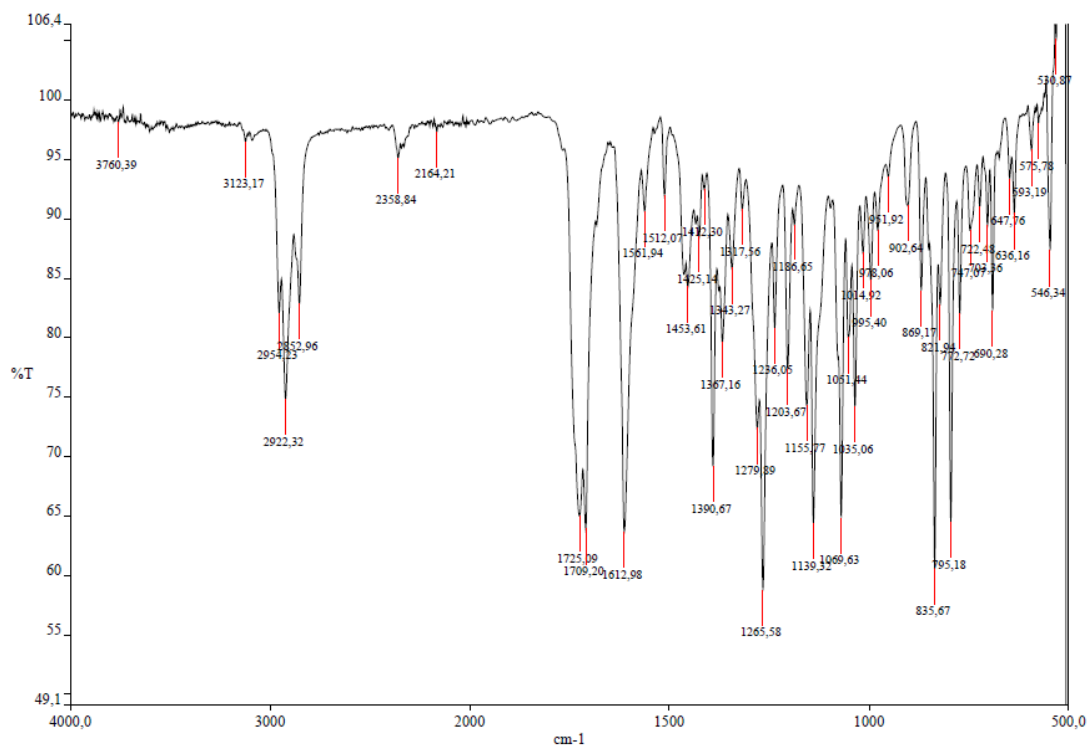


Anexo 34. Espectro de IR do composto LaSOM 198

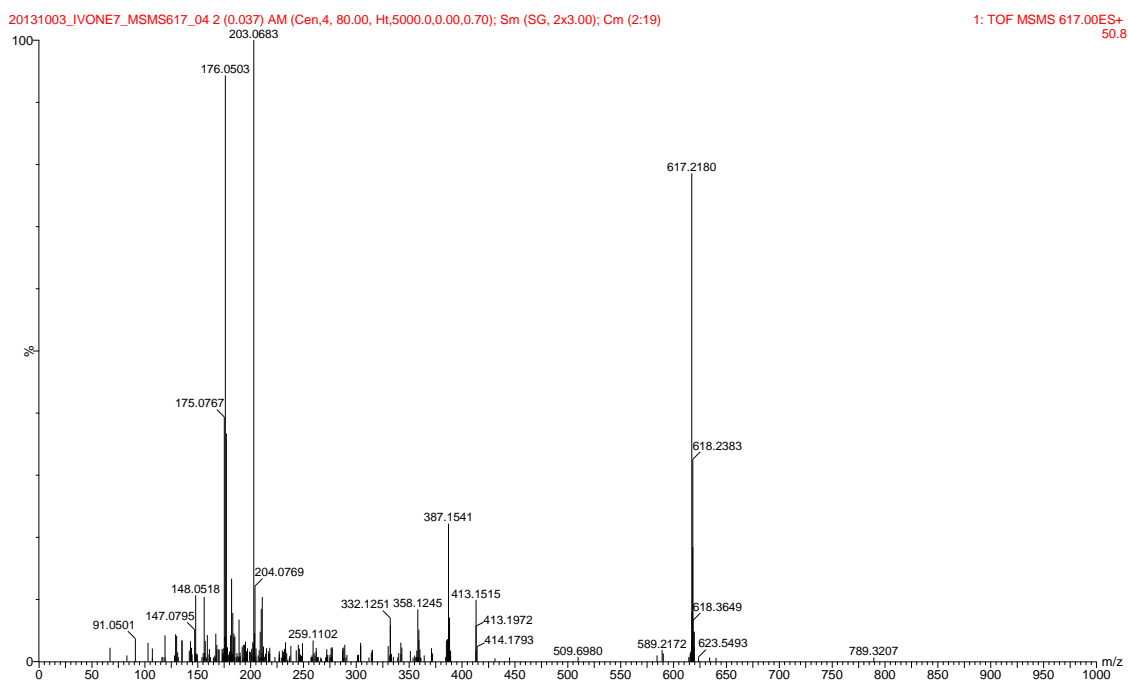


Anexo 35. Espectro de HRMS do composto LaSOM 198**Anexo 36. Espectro de IR do composto LaSOM 199**

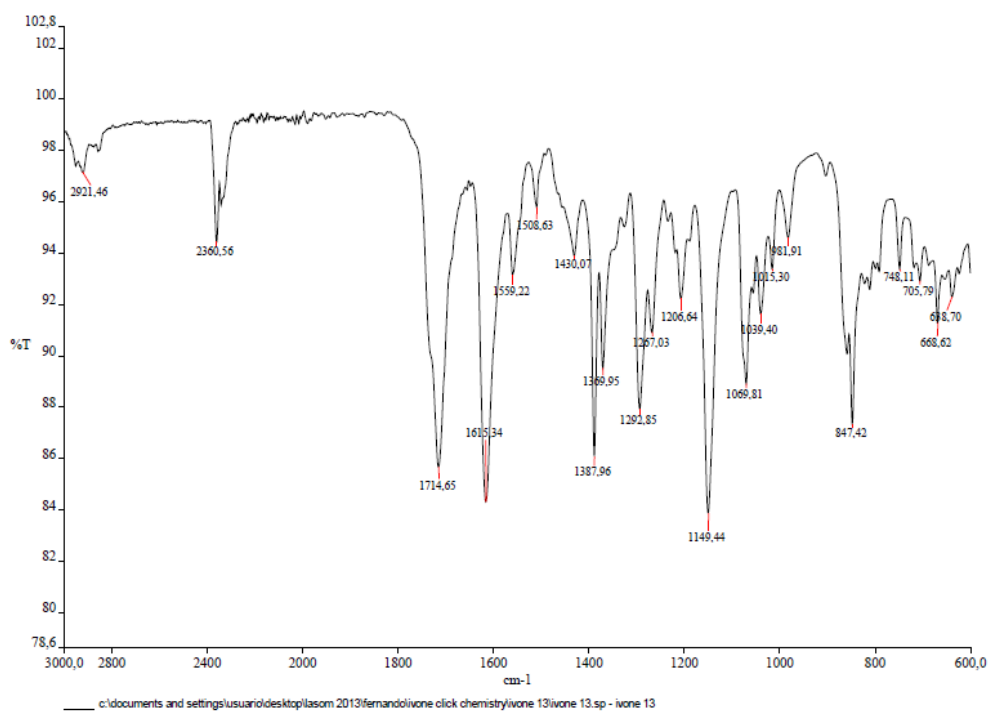
Anexo 37. Espectro de HRMS do composto LaSOM 199**Anexo 38. Espectro de IR do composto LaSOM 200**

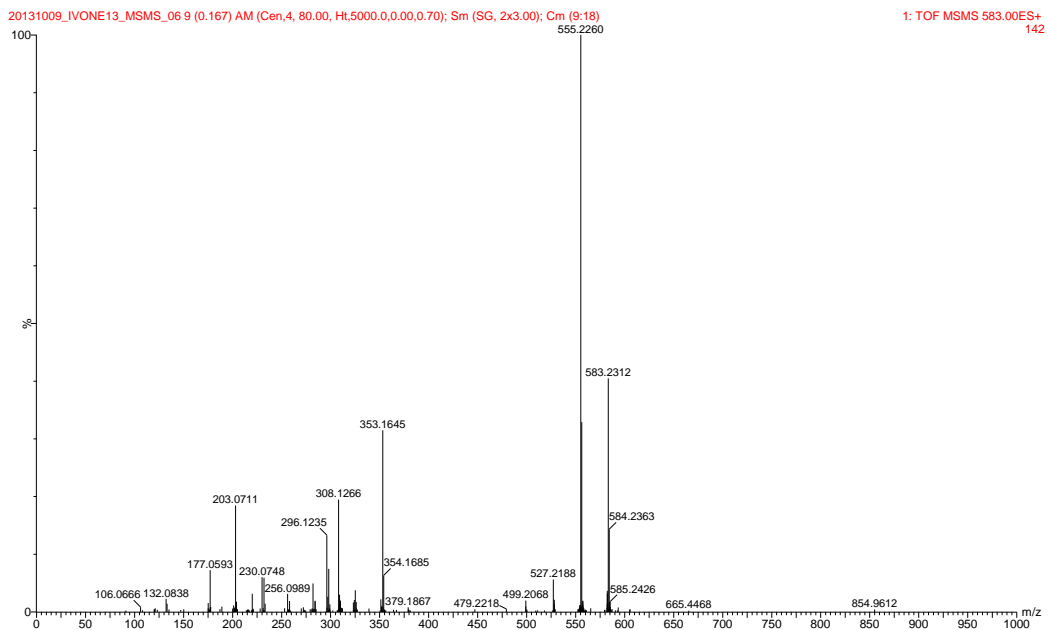
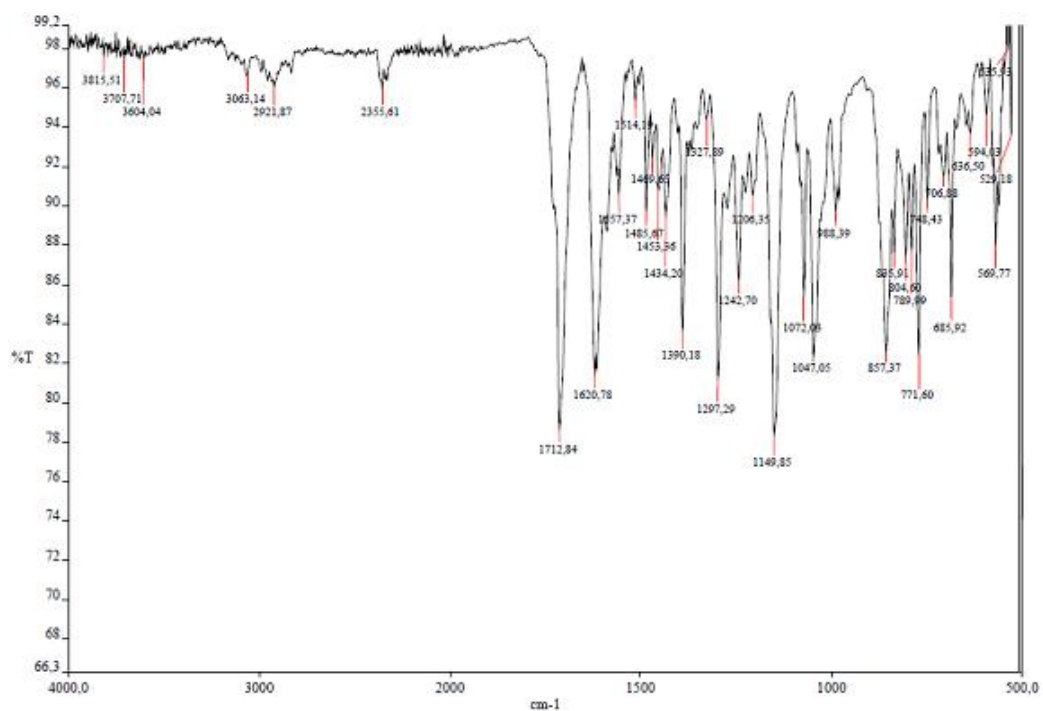
Anexo 39. Espectro de HRMS do composto LaSOM 200**Anexo 40. Espectro de IR do composto LaSOM 201**

Anexo 41. Espectro de HRMS do composto LaSOM 201

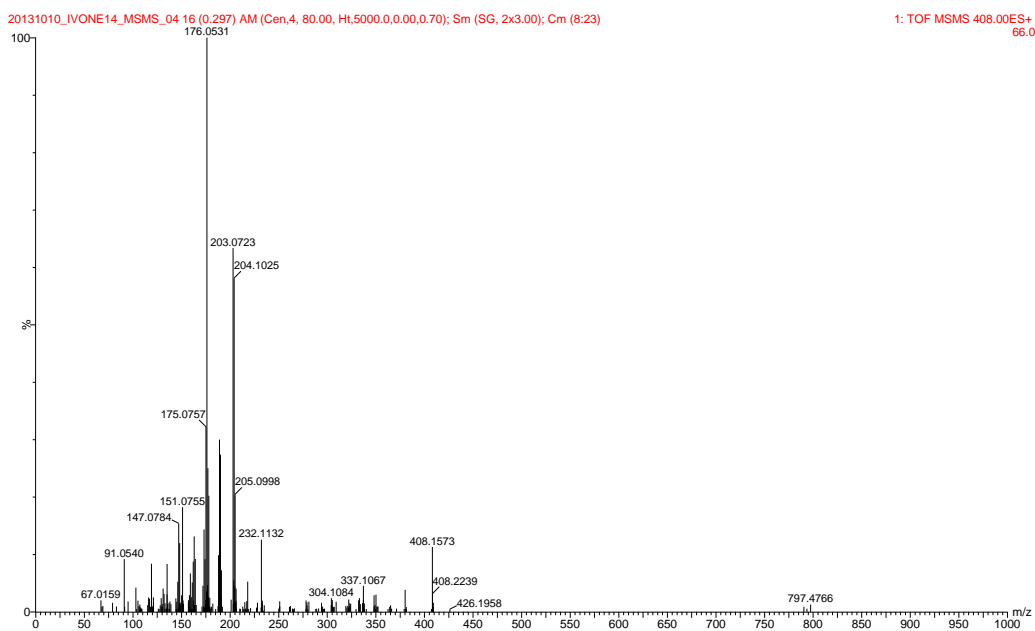


Anexo 42. Espectro de IR do composto LaSOM 202

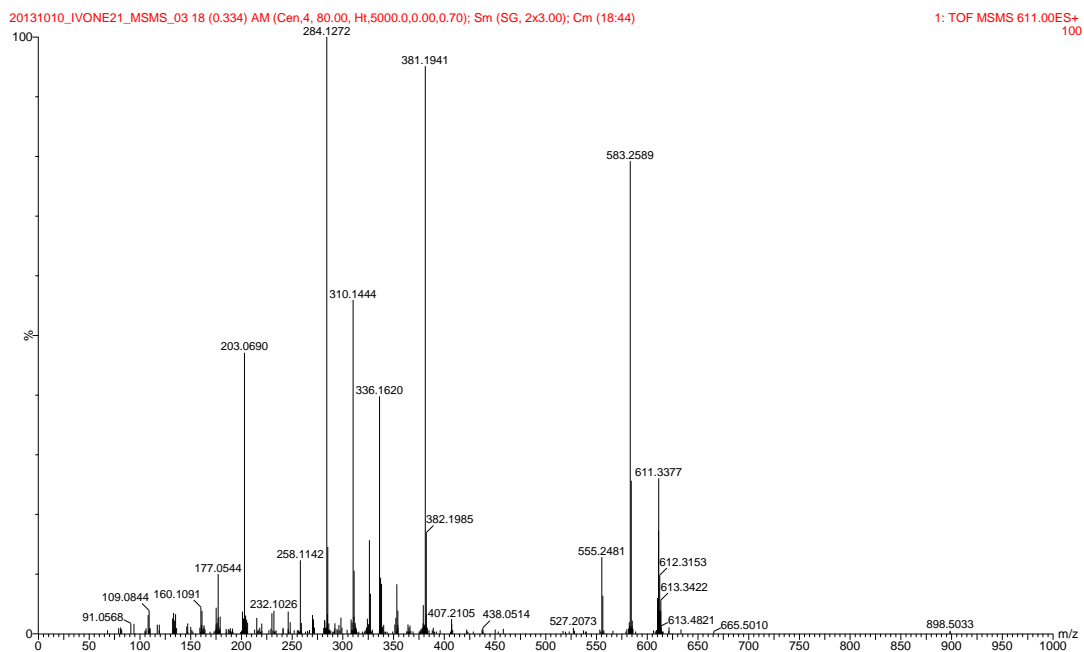


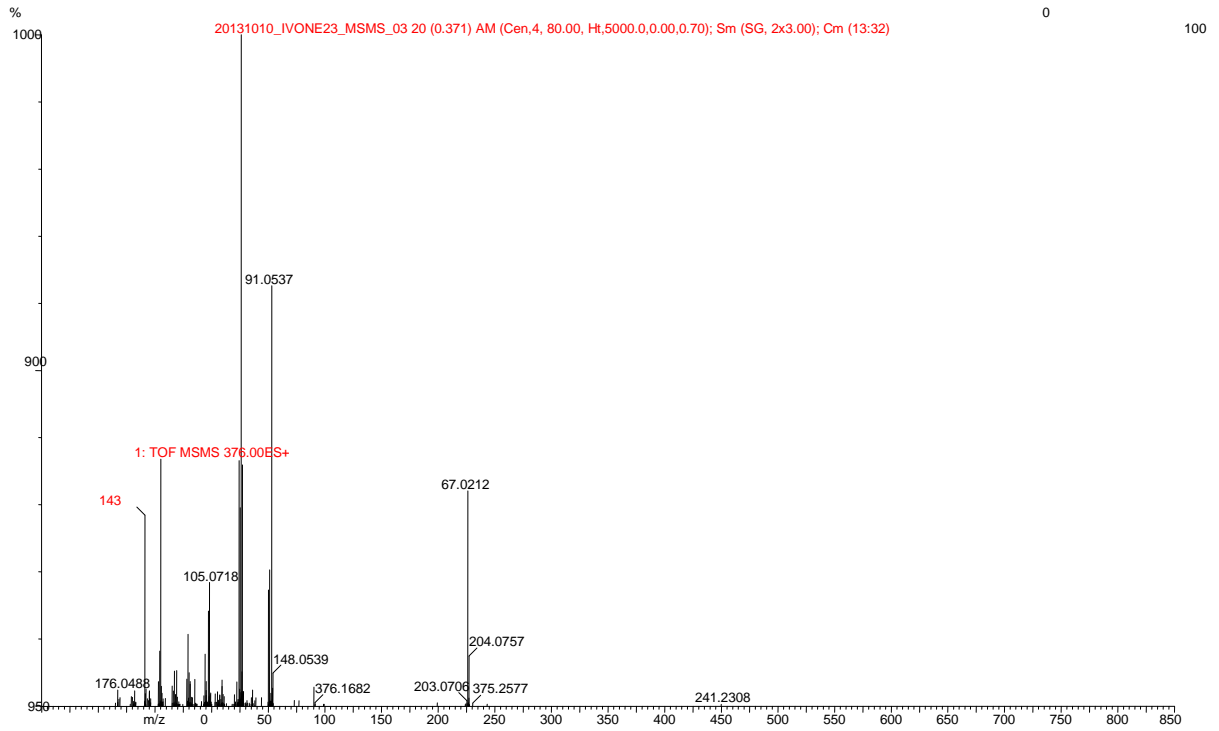
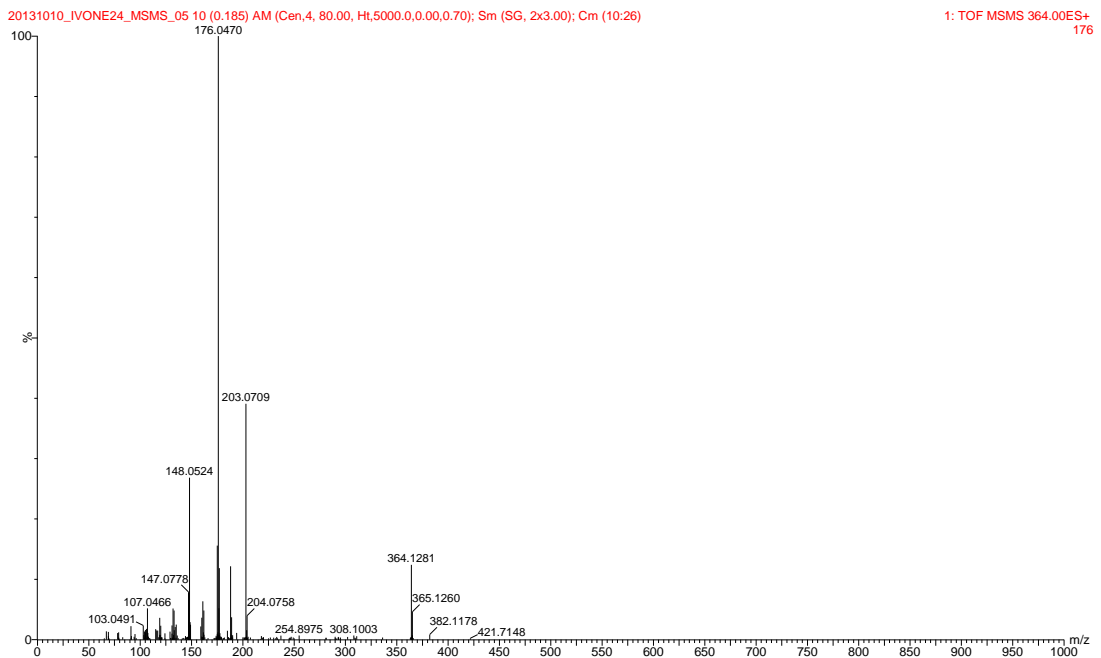
Anexo 43. Espectro de HRMS do composto LaSOM 202**Anexo 44. Espectro de IR do composto LaSOM 204**

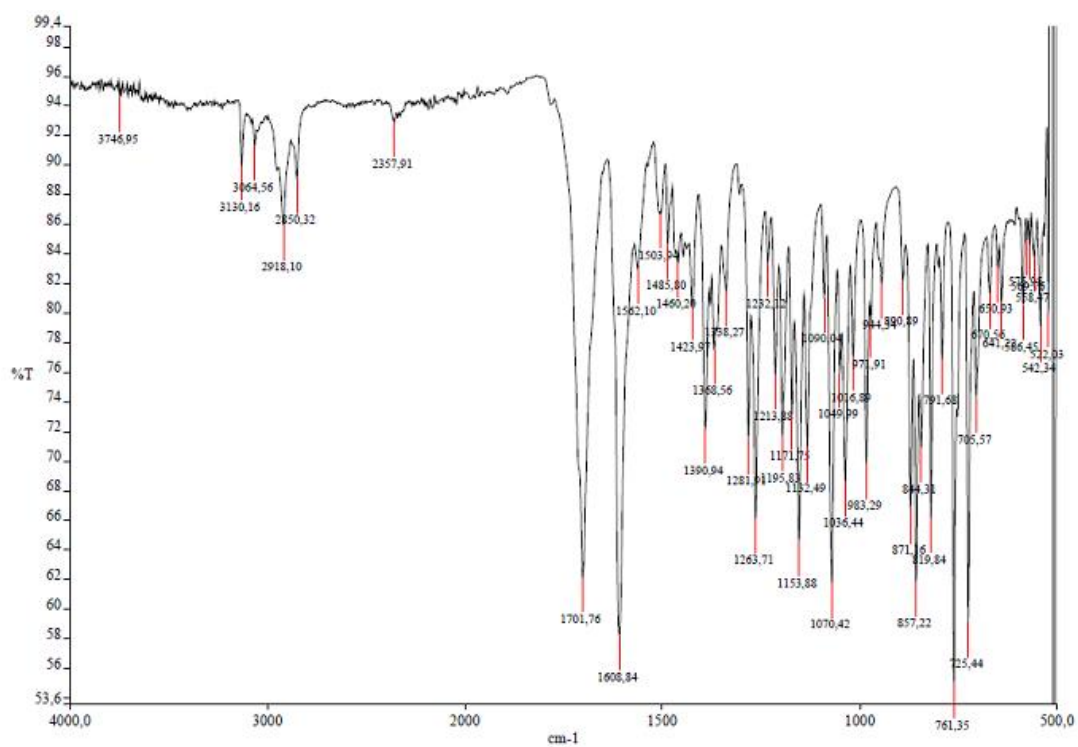
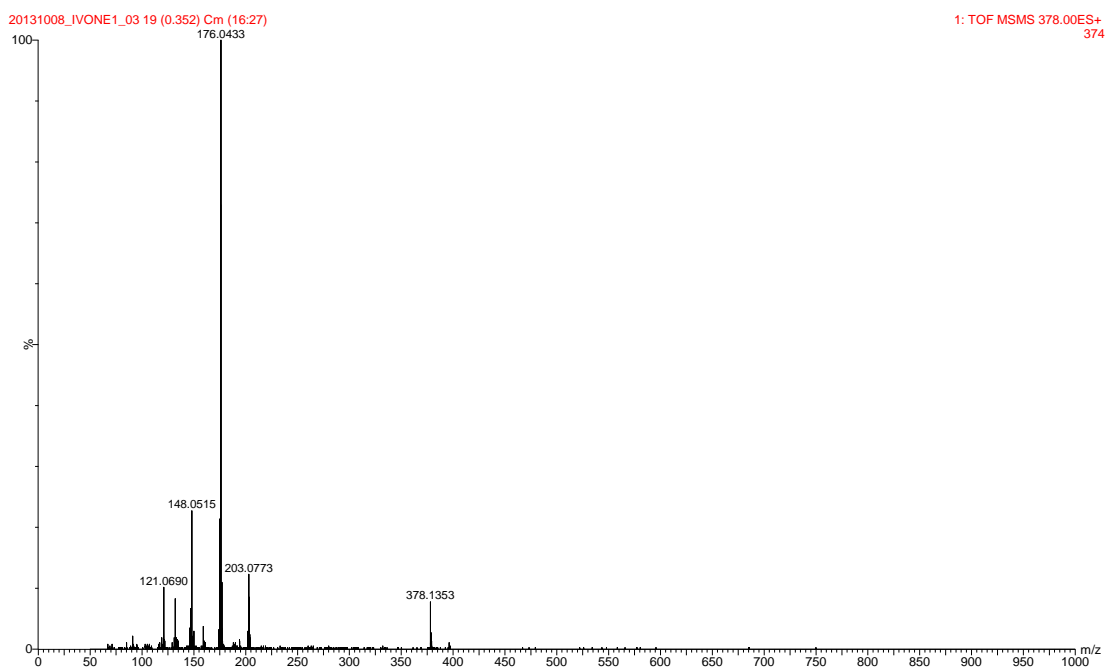
Anexo 45. Espectro de HRMS do composto LaSOM 204

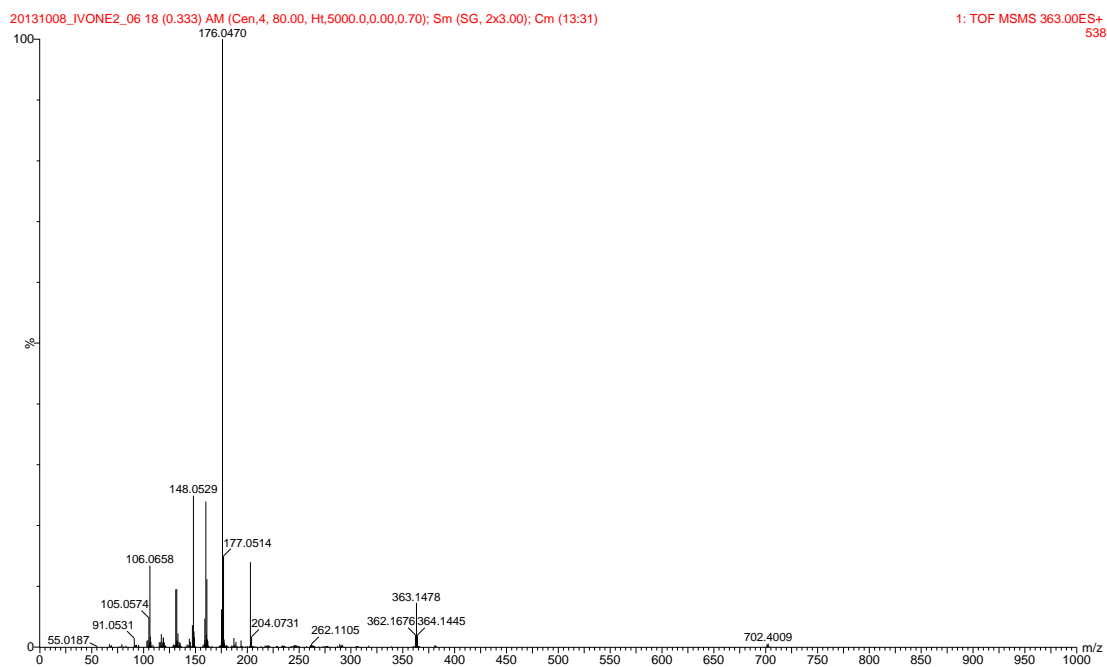
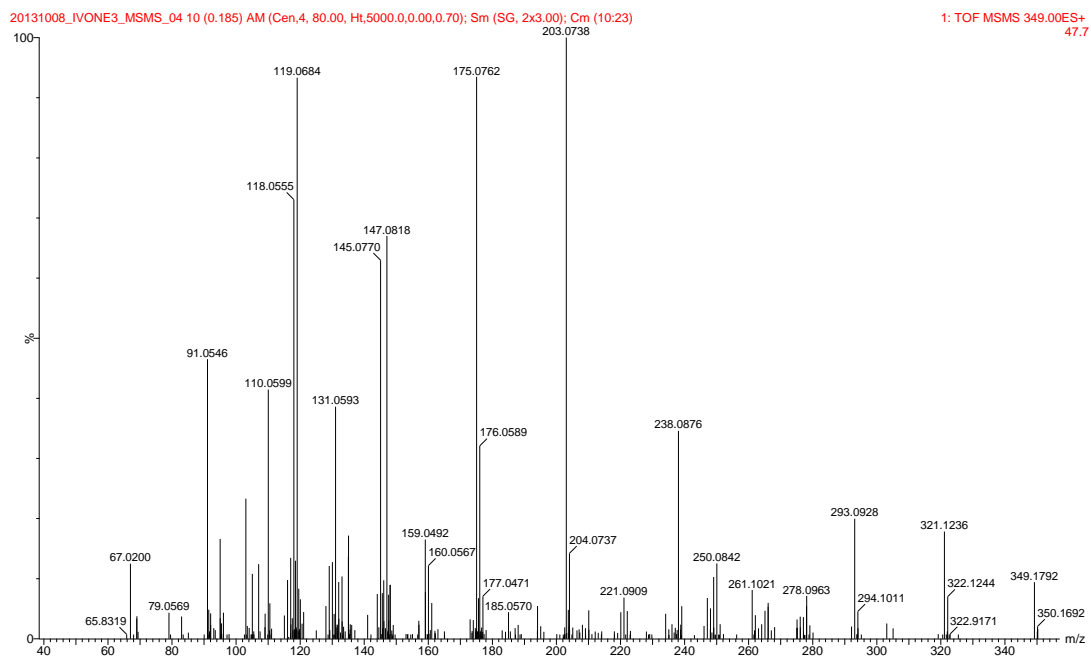


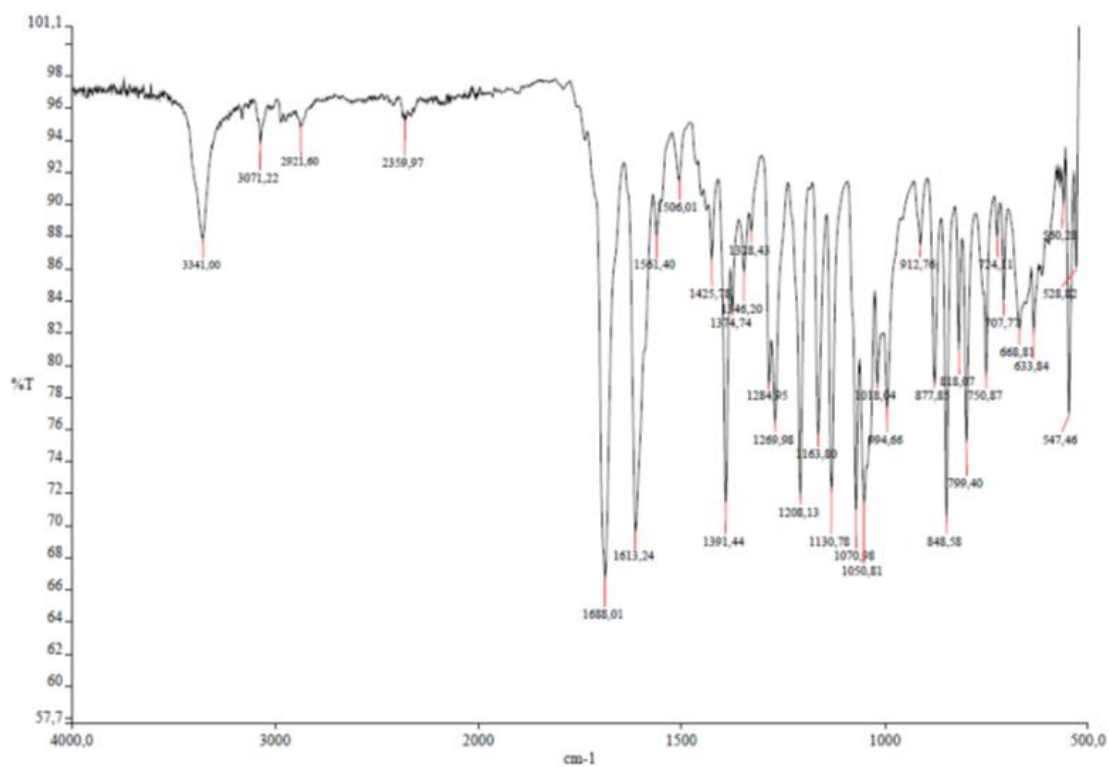
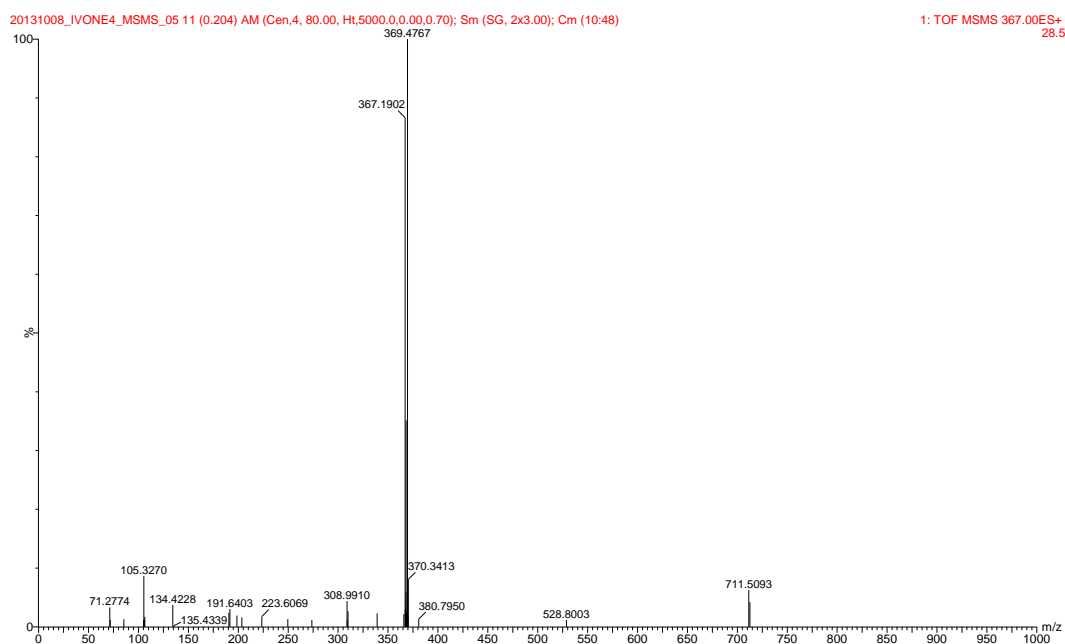
Anexo 46. Espectro de HRMS do composto LaSOM 205

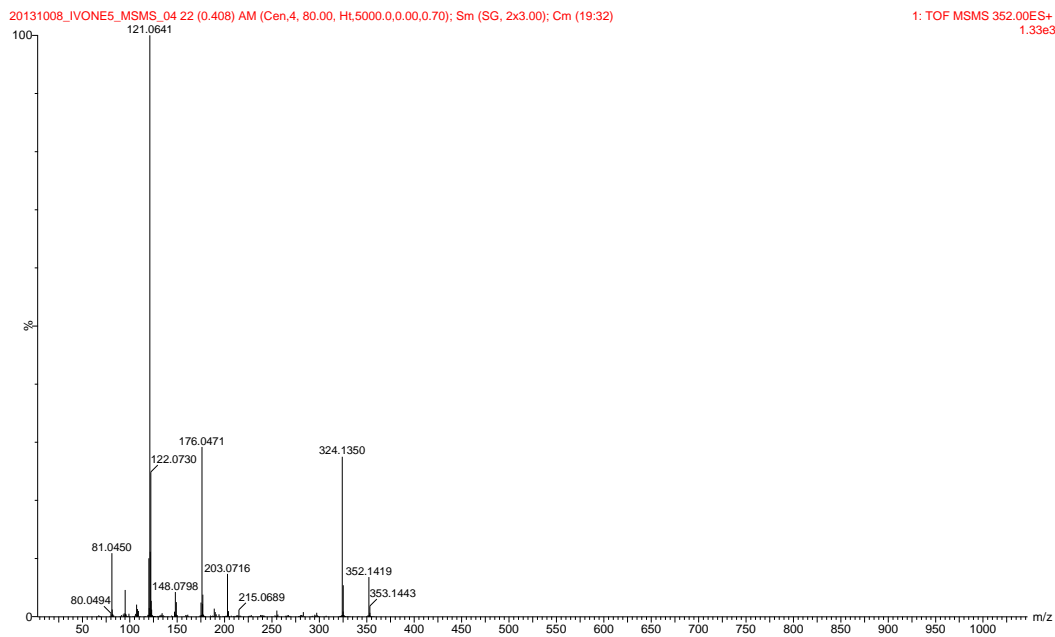
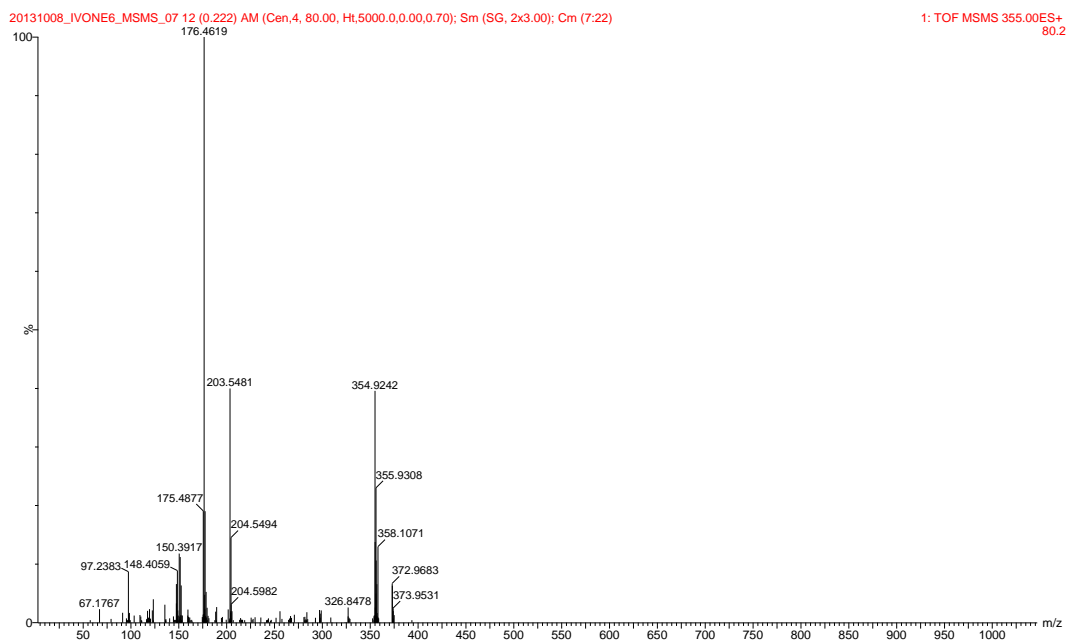


Anexo 47. Espectro de HRMS do composto LaSOM 206**Anexo 48. Espectro de HRMS do composto LaSOM 207**

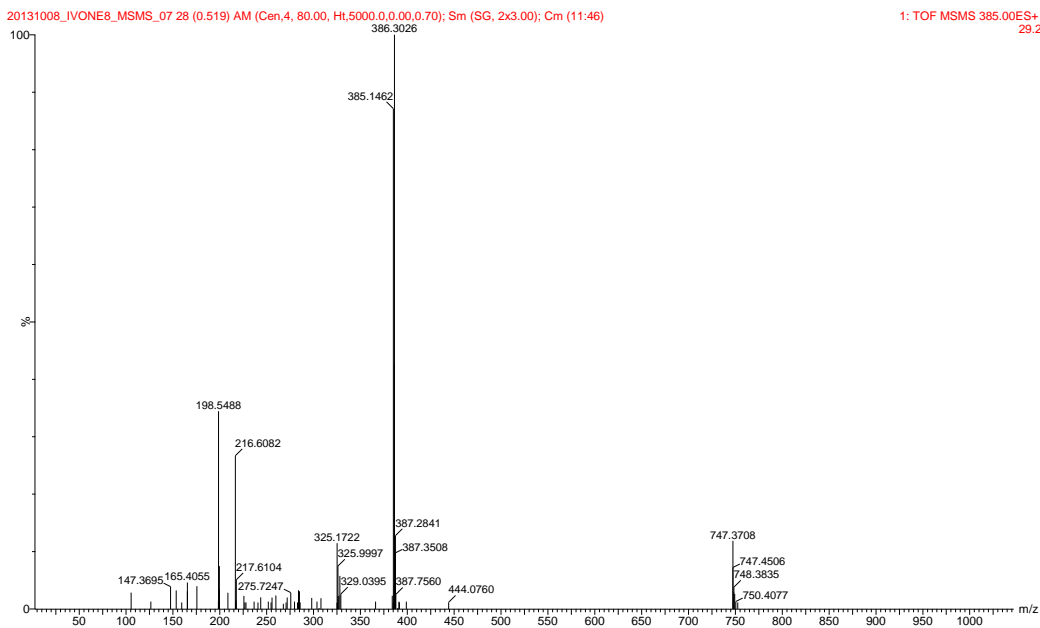
Anexo 49. Espectro de IR do composto LaSOM 208**Anexo 50. Espectro de HRMS do composto LaSOM 208**

Anexo 51. Espectro de HRMS do composto LaSOM 209**Anexo 52. Espectro de HRMS do composto LaSOM 210**

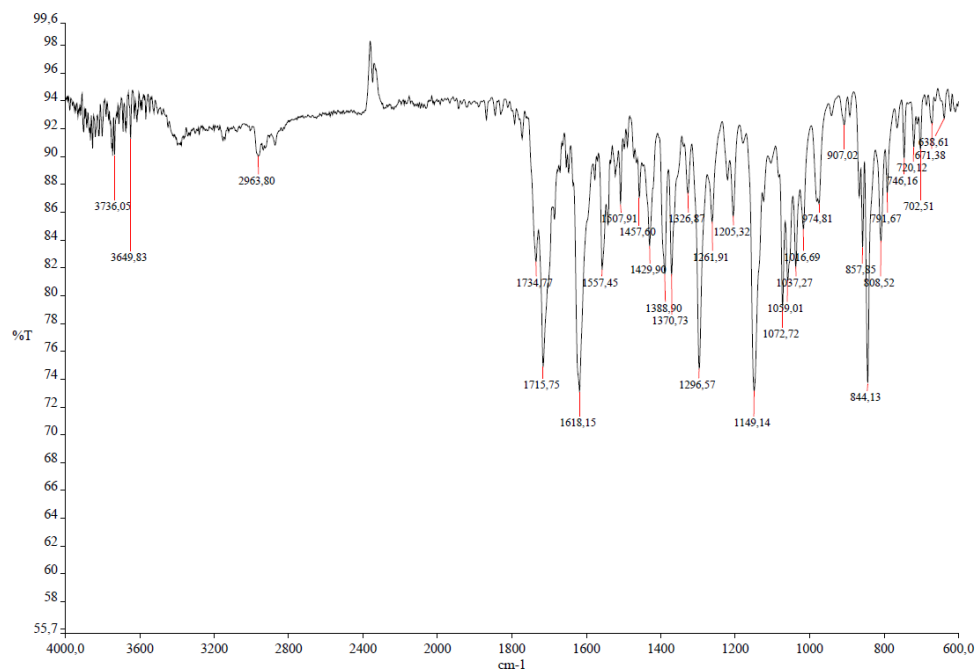
Anexo 53. Espectro de IR do composto LaSOM 211**Anexo 54. Espectro de HRMS do composto LaSOM 211**

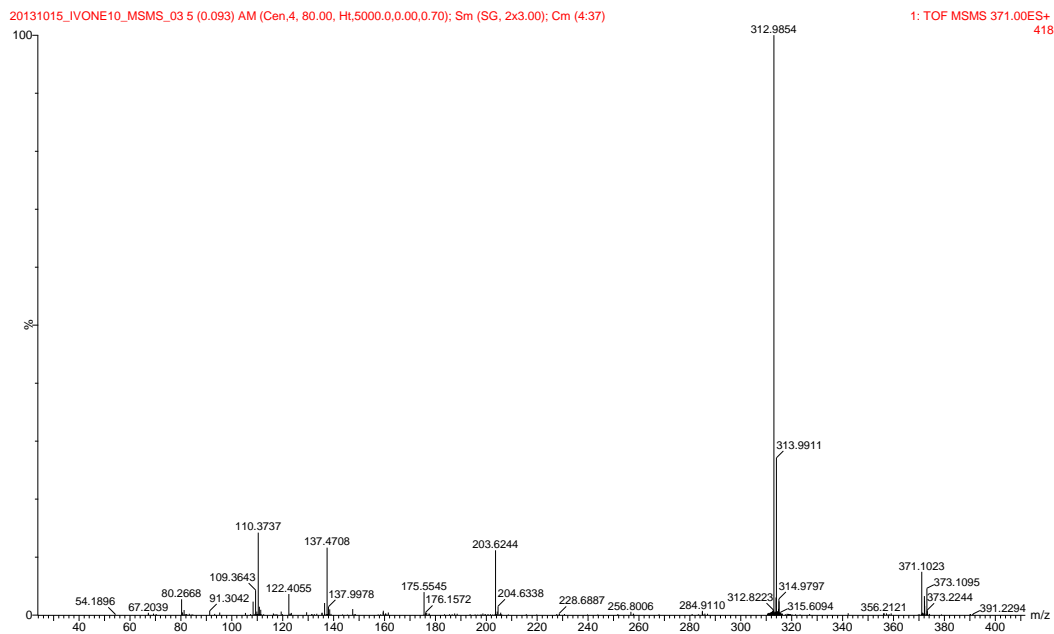
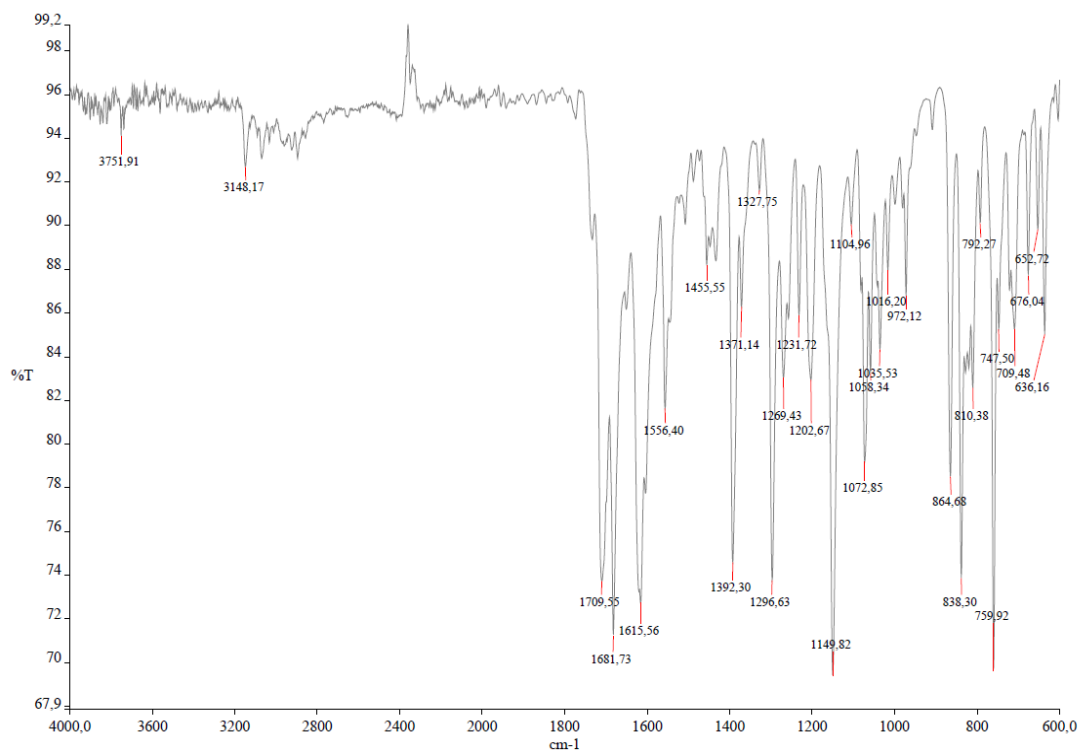
Anexo 55. Espectro de HRMS do composto LaSOM 212**Anexo 56. Espectro de HRMS do composto LaSOM 213**

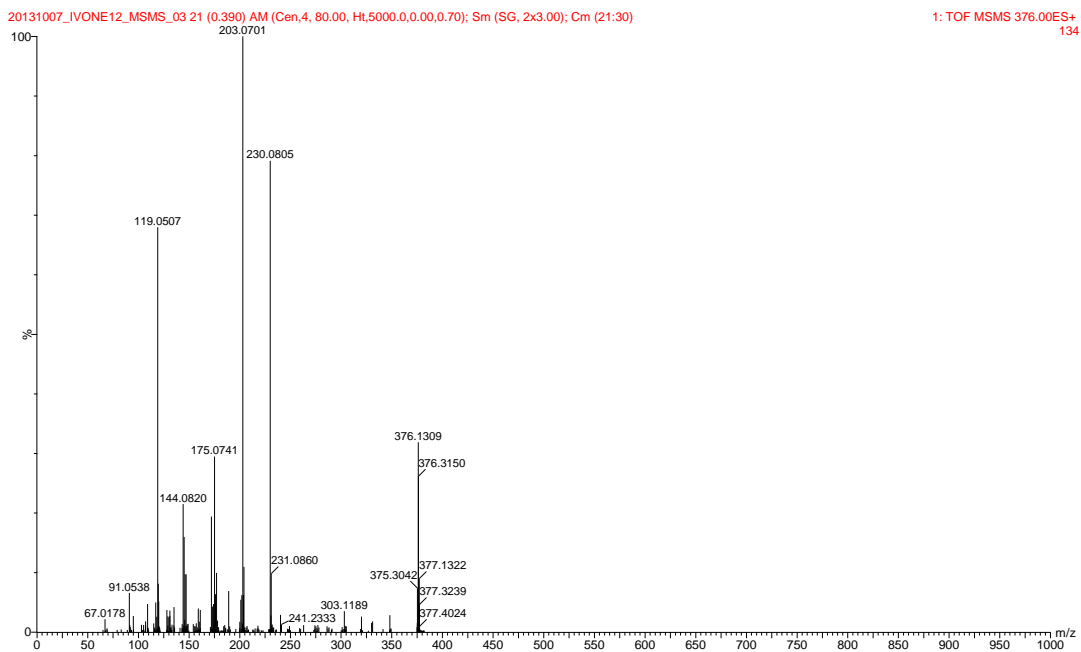
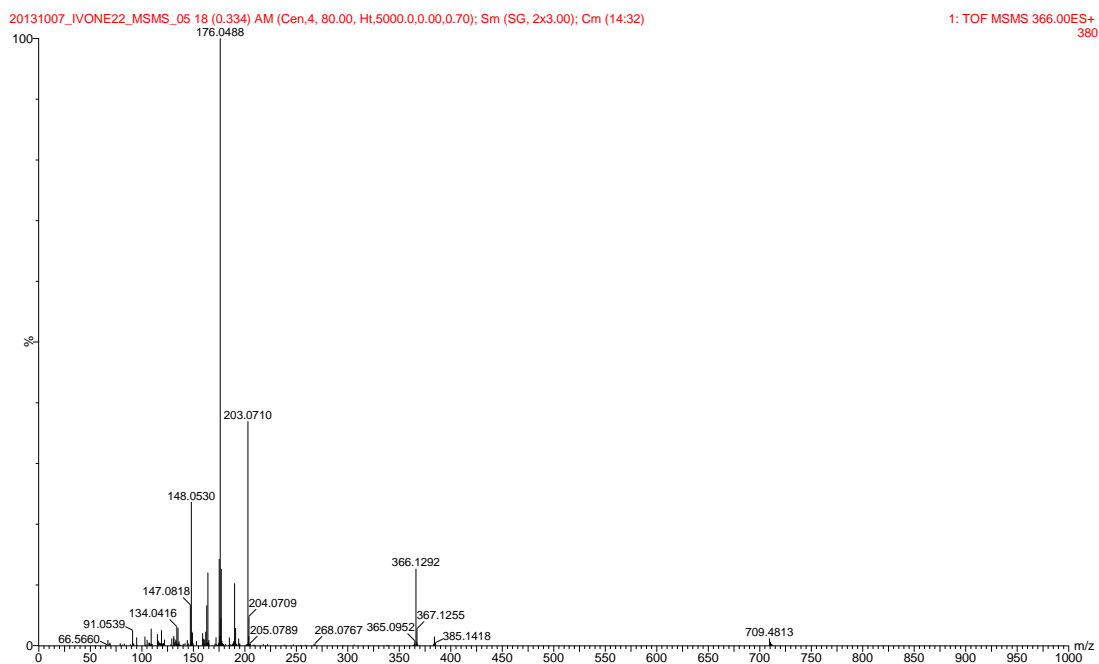
Anexo 57. Espectro de HRMS do composto LaSOM 214

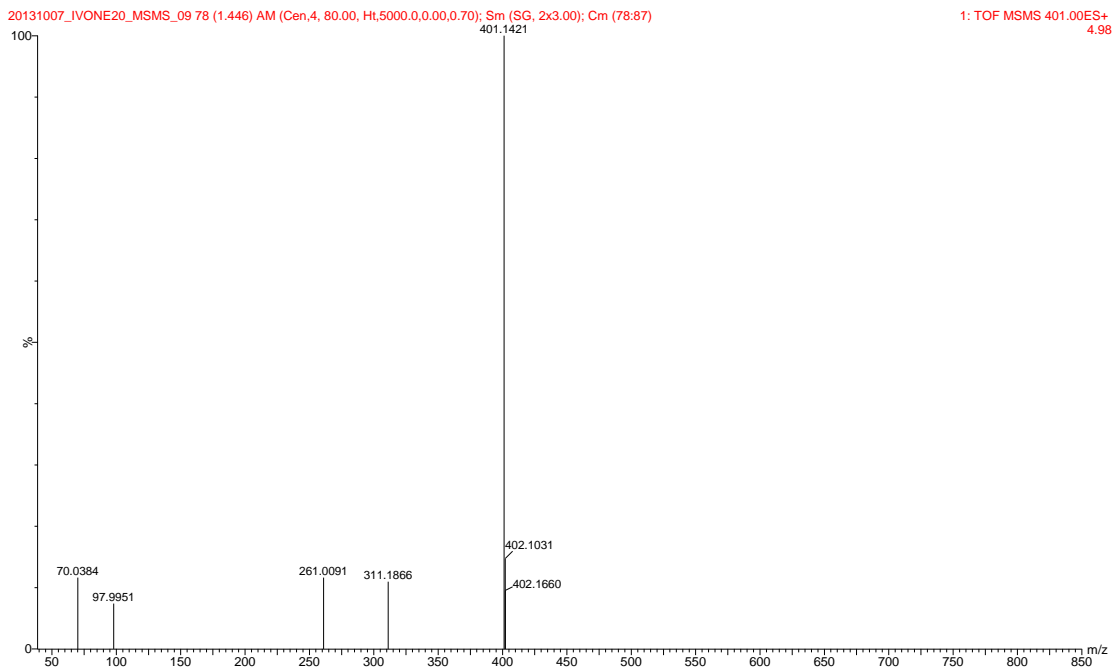
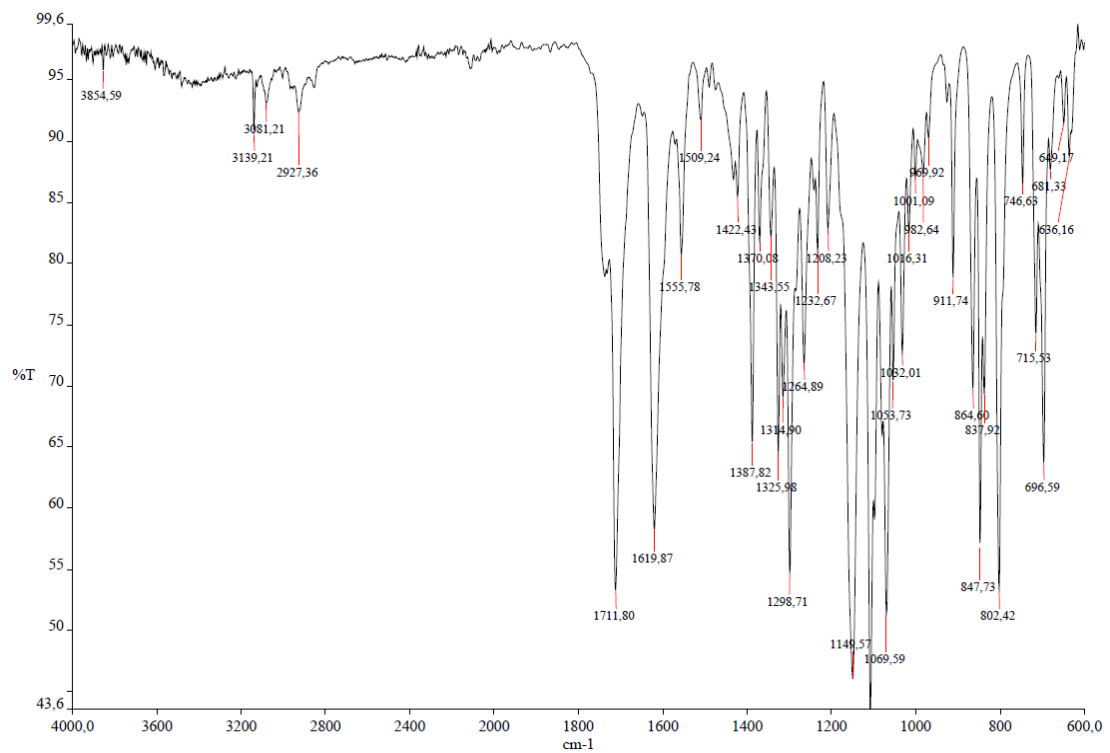


Anexo 58. Espectro de IR do composto LaSOM 215

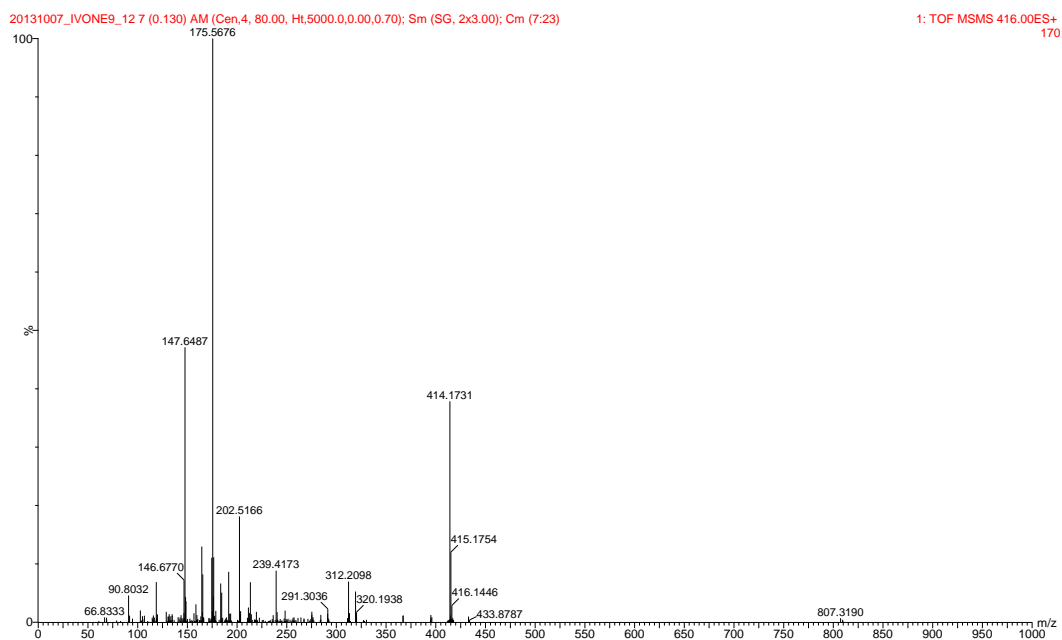


Anexo 59. Espectro de HRMS do composto LaSOM 215**Anexo 60. Espectro de IR do composto LaSOM 216**

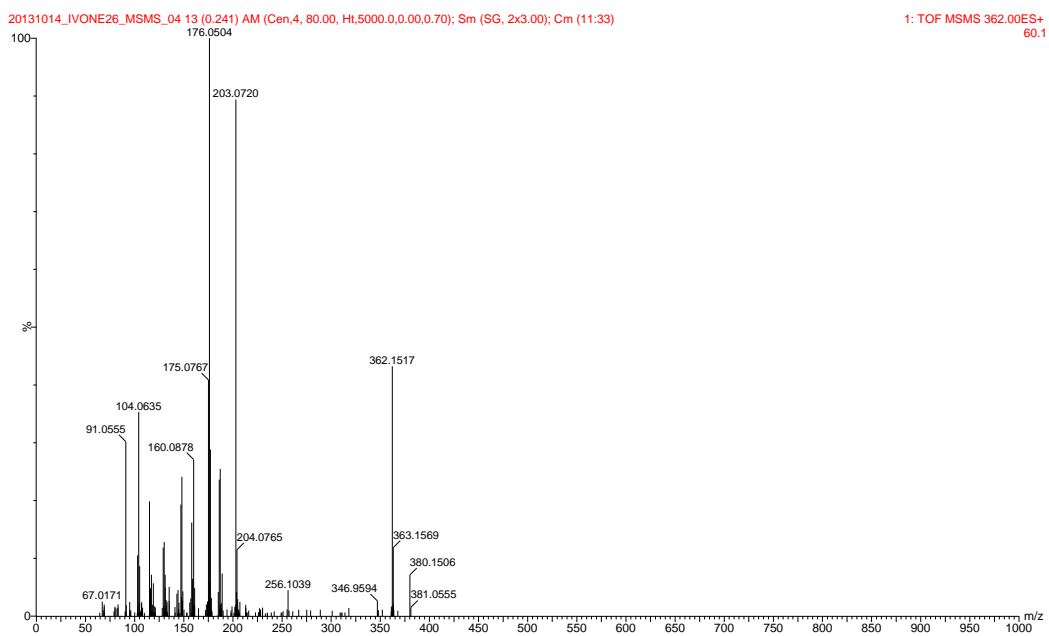
Anexo 61. Espectro de HRMS do composto LaSOM 216**Anexo 62. Espectro de HRMS do composto LaSOM 217**

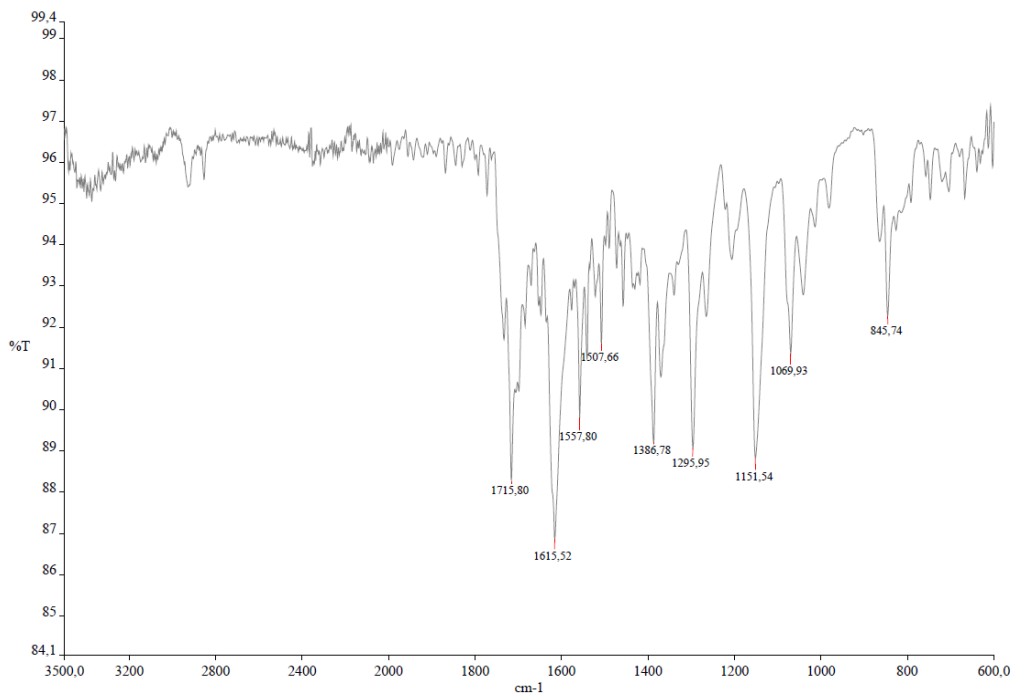
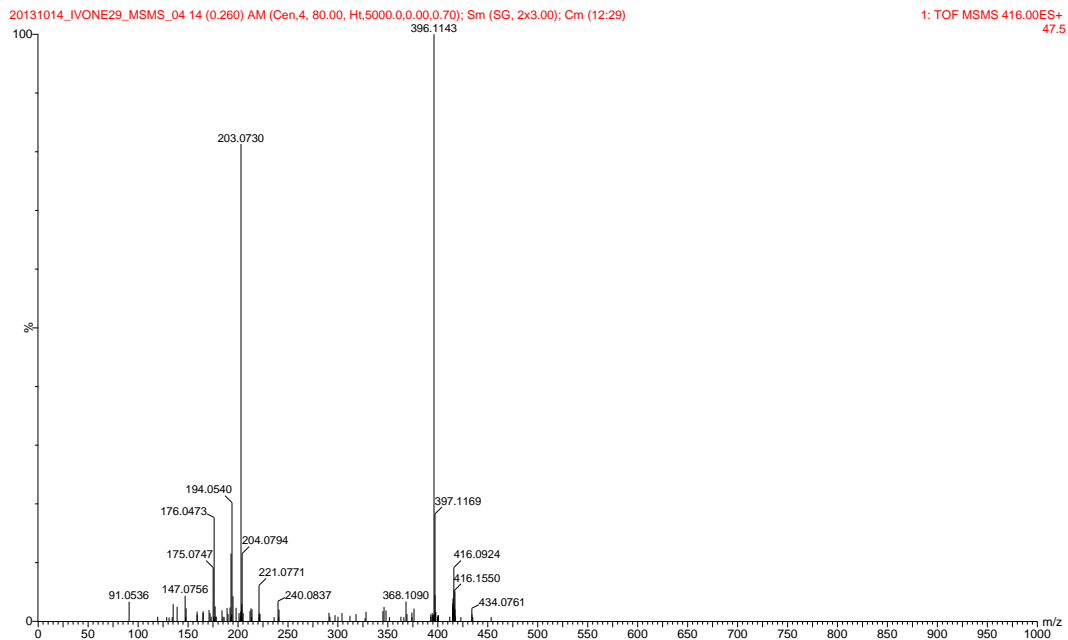
Anexo 63. Espectro de HRMS do composto LaSOM 218**Anexo 64. Espectro de IR do composto LaSOM 219**

Anexo 65. Espectro de HRMS do composto LaSOM 219

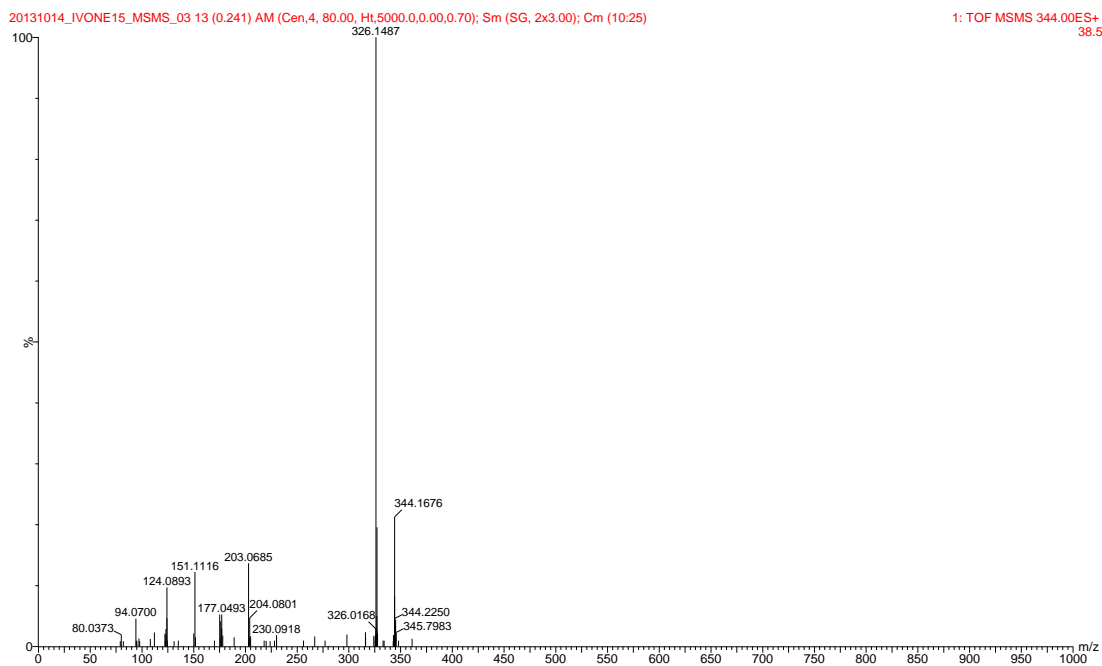


Anexo 66. Espectro de HRMS do composto LaSOM 220

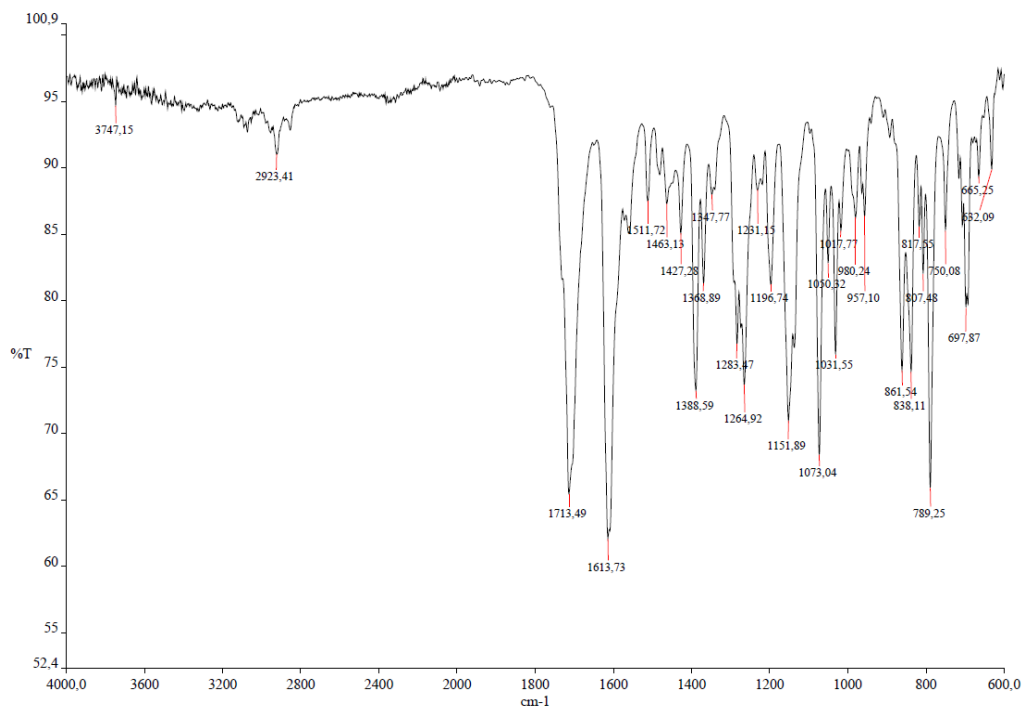


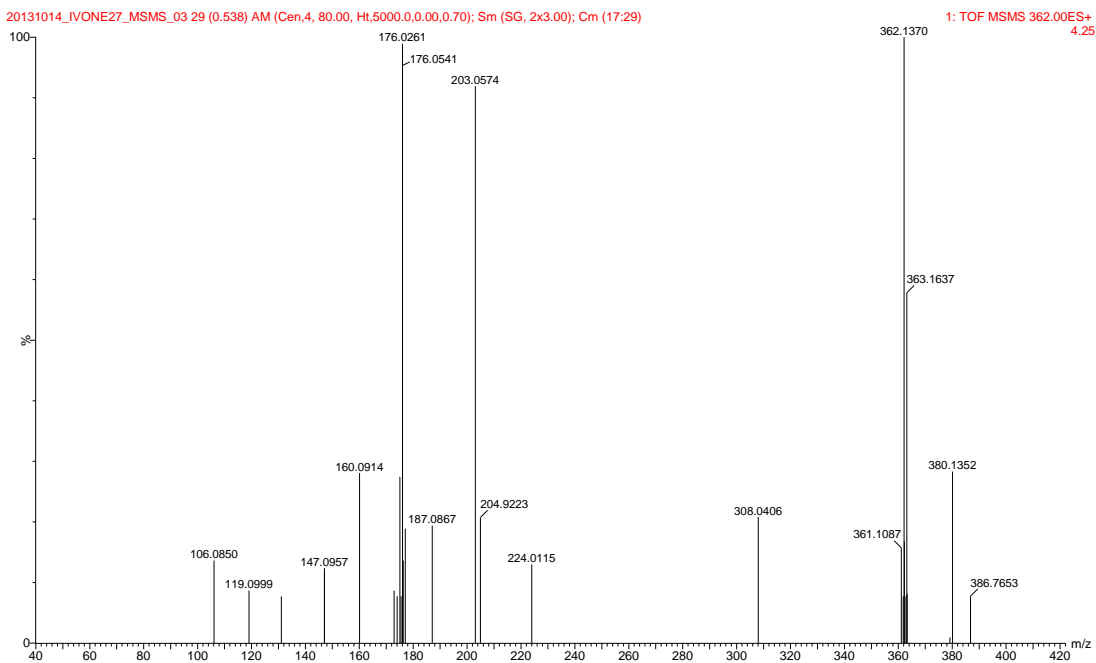
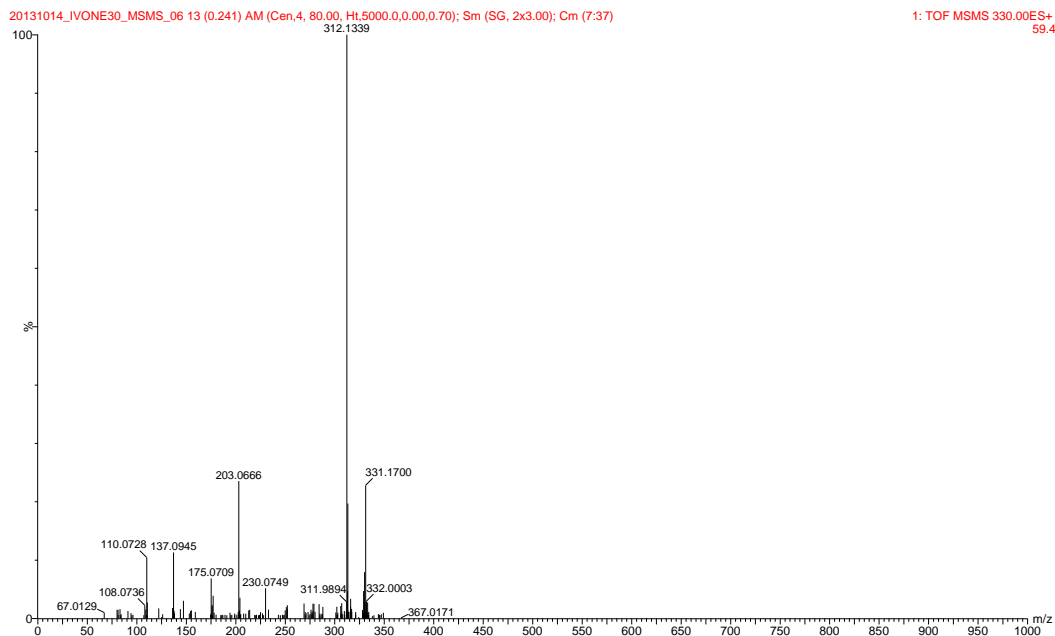
Anexo 67. Espectro de IR do composto LaSOM 221**Anexo 68. Espectro de HRMS do composto LaSOM 221**

Anexo 69. Espectro de HRMS do composto LaSOM 222

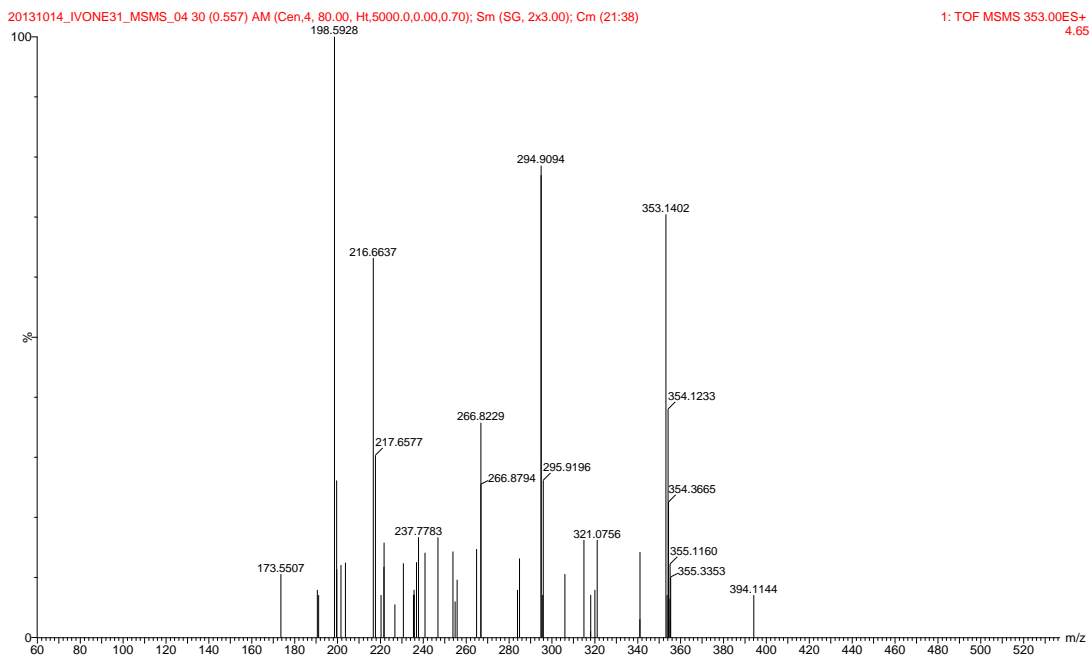


Anexo 70. Espectro de IR do composto LaSOM 223

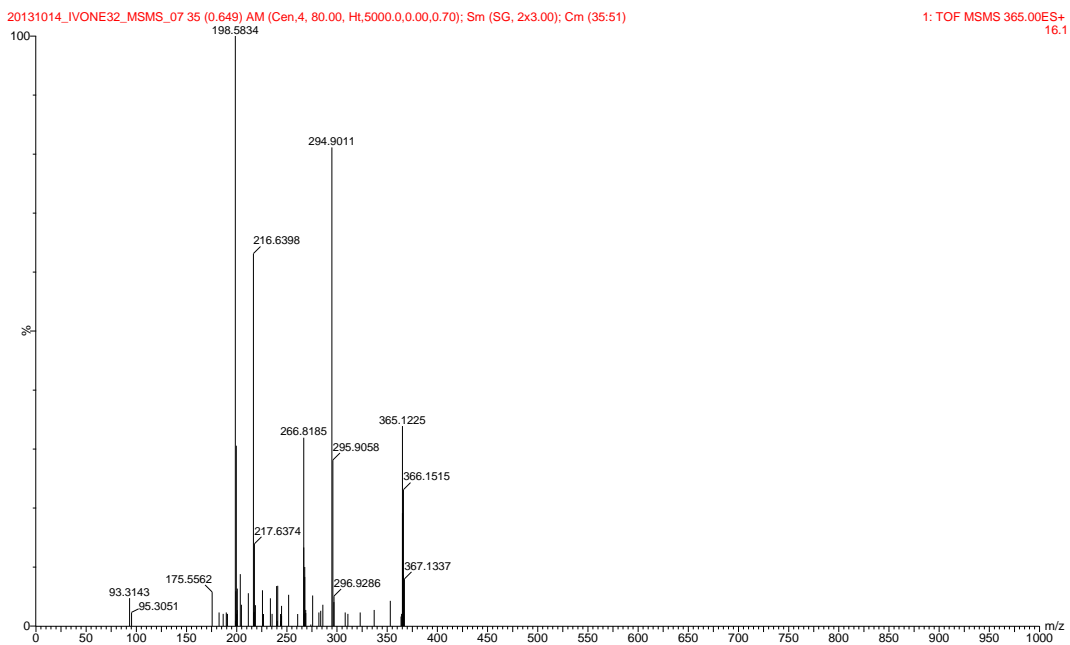


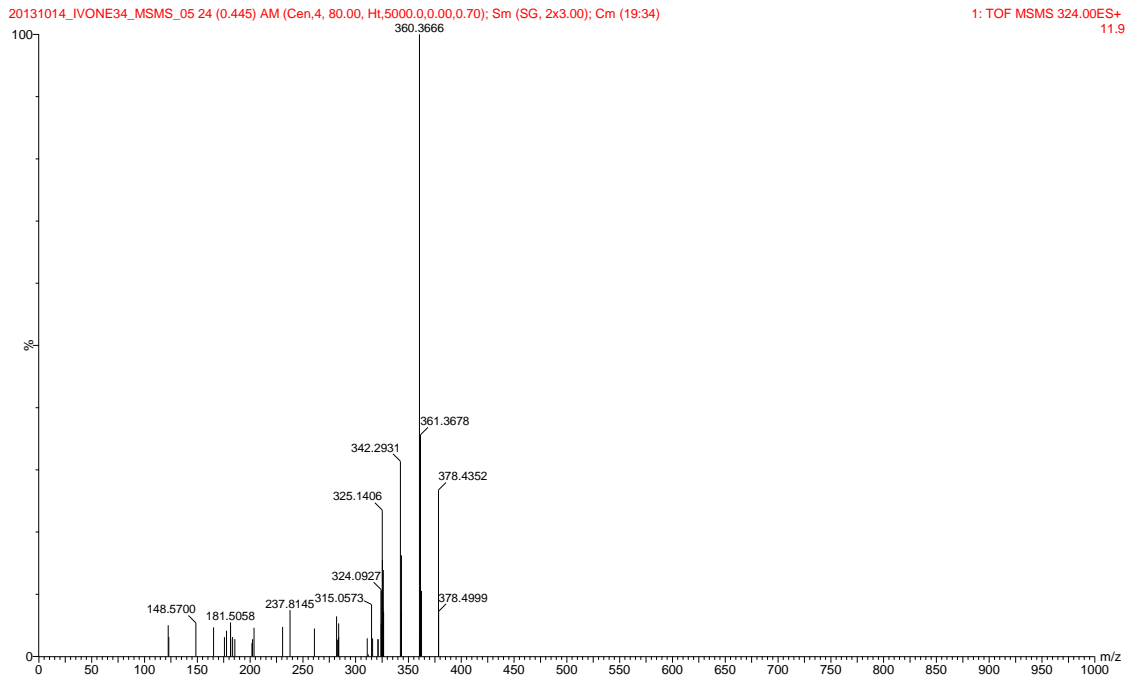
Anexo 71. Espectro de HRMS do composto LaSOM 223**Anexo 72. Espectro de HRMS do composto LaSOM 224**

Anexo 73. Espectro de HRMS do composto LaSOM 225



Anexo 74. Espectro de HRMS do composto LaSOM 226



Anexo 75. Espectro de HRMS do composto LaSOM 227

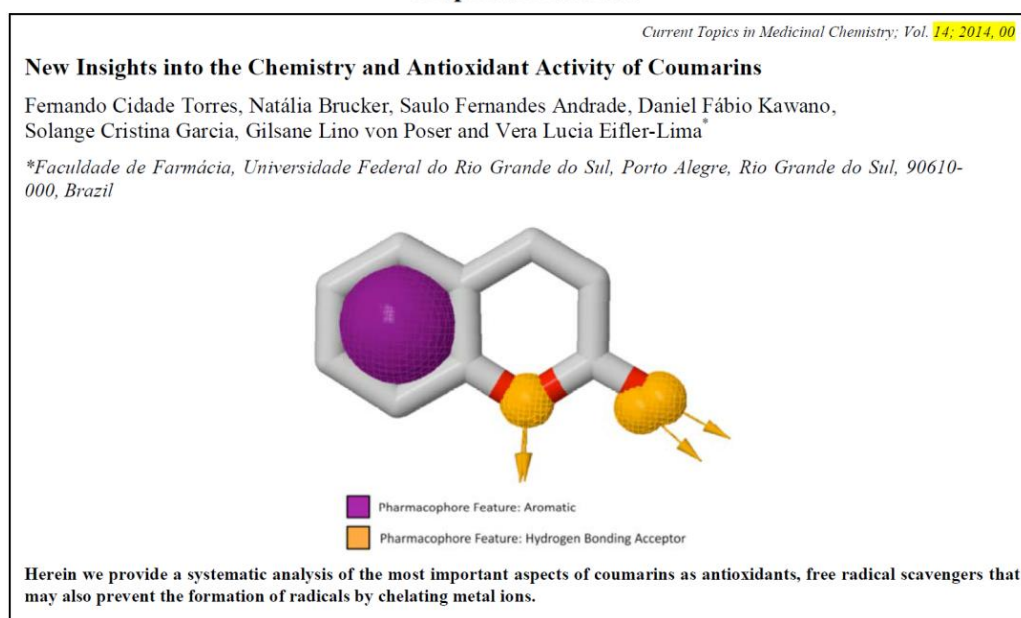
Anexo 76. Artigo aceito no periódico *Current Topics in Medicinal Chemistry*

Neste anexo pode-se observar o manuscrito intitulado *New insights into the chemistry and antioxidant activity of coumarins*, aceito para publicação na revista *Current Topics in Medicinal Chemistry*. A versão final pode ser observada a partir da página seguinte.

Graphical Abstract

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2014, Vol. 14, No. 21 i

Graphical Abstract



DOI: 10.2174/1568026614666141203144551

New Insights into the chemistry and antioxidant activity of coumarins

Fernando Cidade Torres^{1,2}, Natália Brucker³, Saulo Fernandes Andrade¹, Daniel Fábio Kawano¹, Solange Cristina Garcia³, Gilsane Lino von Poser² and Vera Lucia Eifler-Lima^{1*}

¹ Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal-LaSOM, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000, Brazil.

² Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90610-000, Brazil.

³ Laboratório de Toxicologia-LATOX, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90610-000, Brazil.

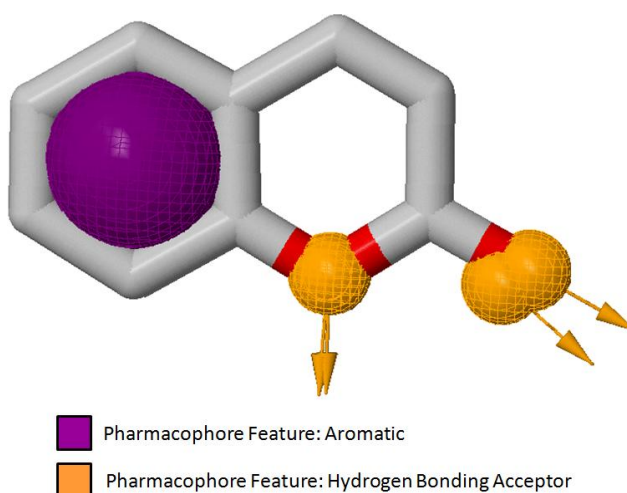
* Correspondence to: Prof. Dr. Vera Lucia Eifler Lima. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90610-000, Brazil. Phone: 55-51-3308-5362. e-mail: veraeifler@gmail.com.

KEYWORDS: Coumarins; Privileged Structures; Structure-Activity Relationships; Antioxidant; Free Radicals; DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) antioxidant assay.

RUNNING TITLE: Chemistry and antioxidant activity of coumarins.

Nº of figures: 38; Nº of references: 121.

Graphical Abstract



Abstract

Coumarins are considered privileged structures due to their broad range of biological properties such as anticoagulant, antineurodegenerative, antioxidant, anticancer and antimicrobial activities. This interesting characteristic can be ascribed to the chemical attributes of their *2H*-chromen-2-one core, in which the aromatic ring is capable of establishing a series of hydrophobic, π - π , CH- π and cation- π interactions and the two oxygen atoms in the lactone ring that may hydrogen-bond to a series of amino acid residues from different classes of enzymes and receptors. Additionally, the double bond in the lactone helps to make the entire system planar, allows charge delocalization between the carbonyl group of the lactone and the aromatic ring and confers the characteristic fluorescence of this class of compounds, which can be explained by the prevention of the *trans-cis* transformation of the double bond under the ultraviolet (UV) irradiation. It is exactly the possibility of radical deslocalization in the *2H*-chromen-2-one nucleus that make most of the coumarins good antioxidants by acting as free radical scavengers, although some coumarins (mainly hydroxycoumarins) may also prevent the formation of free radicals by chelating metal ions. In this review, we provide a systematic analysis of the most important aspects around the development of coumarins as antioxidants, including the synthesis of some complex antioxidant coumarins, the strategies of structural modification aiming to improve their antioxidant activities, qualitative/quantitative structure-antioxidant relationships studies and the main *in vitro* assays used to evaluate their antioxidant properties.

1. Introduction

Since the term "privileged structures" was first coined by Ben Evans in 1988 [1], a number of different molecular scaffolds have been recognized by their ability to provide potent and selective ligands that are capable to bind to different drug targets depending on modifications of their functional groups. Good examples of "privileged structures" are the coumarins, a large class of compounds with a common scaffold formed by the fusion of benzene and α -pyrone ring, which provides a wide range of biological properties such as anticoagulant [2], antineurodegenerative [3], antioxidant [4], anticancer [5] and antimicrobial [6] activities.

Currently, there are eight drugs marketed in several countries, which possess the coumarin framework in their structure: **1)** four anticoagulants: acenocoumarol (Sintrom/Sinthrome; Novartis) [7], dicoumarol (Apekumarol; Pharmacia Upjohn) [8], phenprocoumon (Marcoumar; Roche) [9] and warfarin (Coumadin; Bristol-Myers Squibb) [10]; **2)** two vasodilators, used to treat ischaemic heart disease: carbocromen (Intensain; Hoechst) [11] and Cloricromen (Proendotel; Bausch & Lomb) [12]; **3)** one choleretic/biliary antispasmodic drug, himecromone or 4-methyl-7-hydroxycoumarin (Unichol; Merck) [13] and **4)** one antibiotic, novobiocin (Albamycin; Upjohn) [14]. Additionally, it is worth mentioning two interesting pharmacologically active coumarins: batoprozine, a 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonist [15] that could be therapeutically explored for the modulation of aggression in animals and humans [16] and ensaculin, a weak NMDA antagonist/5HT_{1A} agonist [17] with promising nootropic activities for the treatment of dementia [18] (**Figure 1**).

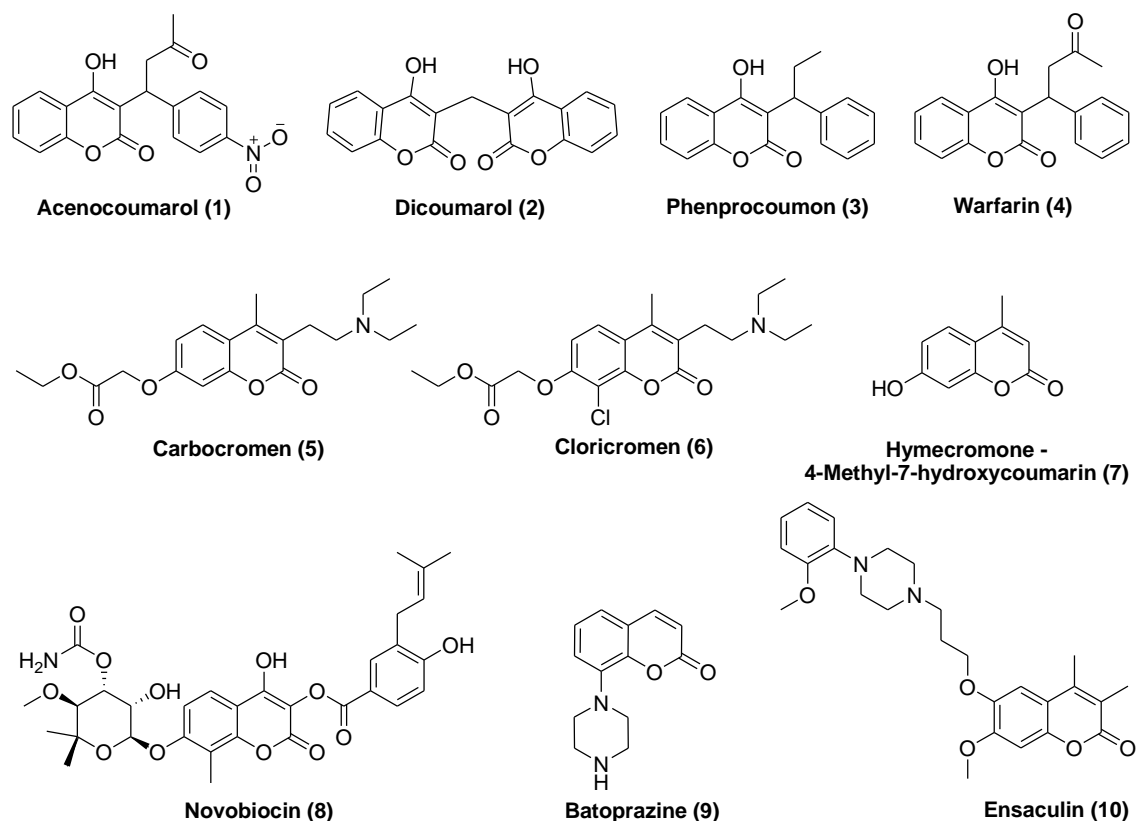


Figure 1. Coumarin drugs and prototypes.

The fact that such simple core may provide a wide range of potentially pharmacological properties may be explained by the chemical attributes of the *2H*-chromen-2-one nucleus (**Figure 2, I**). This planar ring system is composed by one aromatic ring (**Ring A, Figure 2, I**), capable of establishing hydrophobic, π - π , CH- π and cation- π interactions, while the two oxygen atoms in the lactone ring (**Ring B, Figure 2, I**) may interact by hydrogen-bond to a series of amino acid residues such as serine, threonine, cysteine, asparagine, glutamine and tyrosine (**Figure 2, II**). The C-C double bond in the 2-pyrone ring (**Ring B, Figure 2, I**) is also essential to confer planarity to the *2H*-chromen-2-one core and to allow charge delocalization between the carbonyl group and the aromatic ring, as we will further discuss in section 2.1.

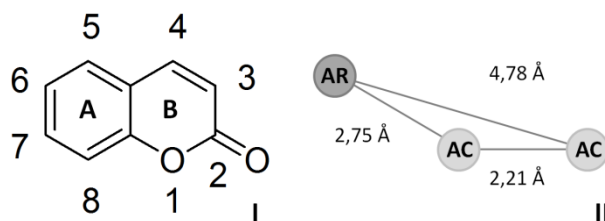


Figure 2. I) The *2H*-chromen-2-one nucleus of coumarins is composed by an aromatic ring (**Ring A**) and a lactone (**Ring B**). **II)** The main pharmacophore features in the coumarin nucleus: AR = Aromatic Feature and AC = Hydrogen bond acceptor.

The *2H*-chromen-2-one nucleus also confers to coumarins both UV-excitability and fluorescence, the latter being expressed by high quantum yields (up to 0.90), good extinction coefficients (10,000–40,000) and large Stokes shifts (up to 160 nm) [19]. Coumarins are highly fluorescent because they bear a carbon-carbon double bond that is locked in the *cis* conformation through a lactone structure. Consequently, this will avoid the *trans-cis* transformation of the double bond under the ultraviolet (UV) irradiation, resulting in strong fluorescence [20] that can be scientifically explored to design new sensors for metal cations, for example [21,22].

As previously stated, coumarins are also widely recognized by their antioxidant properties [4]. The oxidation process is a chemical reaction involving the transfer of an electron from an electron rich to an electron deficient entity and, therefore, antioxidants may slow or prevent this reaction by trapping free radicals to terminate the chain reaction (a process known as free radical scavenging). Alternatively, antioxidants may prevent the formation of free radicals by chelating metal ions and thus preventing their reaction with reactive oxygen species (heavy metals usually behave as potent oxidizing agents due to the presence of vacant d-orbital) or by chelating metal and maintaining it in a redox state leading to its incompetency to reduce molecular oxygen [23].

Regarding the antioxidant properties of coumarins, several excellent papers are devoted to review the synthesis and the antioxidant properties of coumarins, mainly hydroxycoumarins [24-27]. However, few papers actually provide an in-depth discussion of the mechanisms behind the antioxidant properties of the *2H*-chromen-2-one nucleus as well as the synthesis of more complex coumarins. Accordingly, here we review the most important aspects around the development of coumarins as antioxidants, including the synthesis of some complex antioxidant coumarins, the strategies of structural modification aiming to improve their antioxidant activities, qualitative/quantitative structure-antioxidant relationships studies and the main *in vitro* assays used to evaluate their antioxidant properties.

2. Synthesis and structure-activity relationships of coumarins with antioxidant interest

Some simple antioxidant coumarins can be prepared in a single step using classical methods for the synthesis of *2H*-chromen-2-one core. However, more complex coumarins are generally obtained by further modification of this core. Observing the higher stability of the *2H*-chromen-2-one nucleus, the substituent pattern have a key role in the additional modifications at the hetero-aromatic ring.

Knoevenagel, Perkin and Pechmann reactions are the most important methods for the formation of *2H*-chromen-2-one core of antioxidant coumarins (**Figure 3**) [28-31]. In these three classes of reactions, one always employs a phenol to form the aromatic ring (**Ring A, Figure 2, I**) and a carbonylated reagent to build the lactone ring (**Ring B, Figure 2, I**) of the bicycle system *2H*-chromen-2-one. For Knoevenagel and Perkin reactions, the ring A must be substituted by an aldehyde and also by an *ortho* hydroxyl group, producing coumarins with or without substitutions at the 3-position. To build 3-substituted coumarins, Pechmann reaction is usually the method of choice. Therefore, the choice of one method in spite of the other will greatly depend of the desired substitution pattern in ring B.

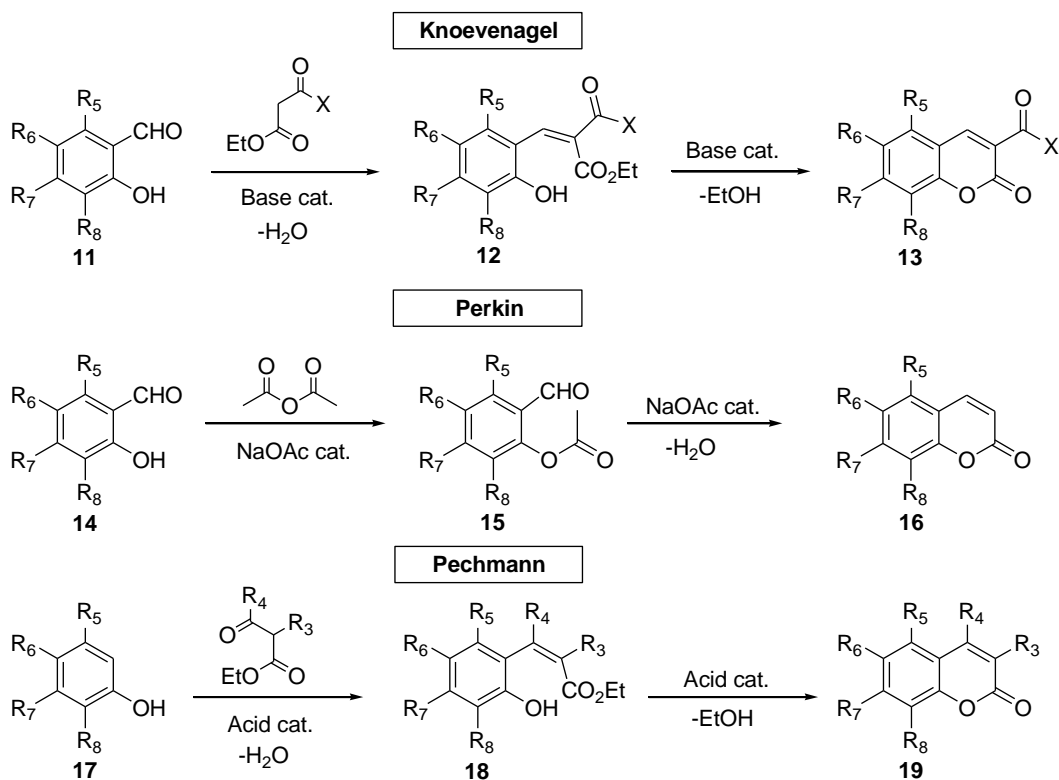


Figure 3. *2H*-chromen-2-one core formation using Knoevenagel, Perkin and Pechmann reactions

Reaction of active methylene compounds with appropriate substituted 2-hydroxybenzaldehydes in presence of base catalyst is known as Knoevenagel reaction [Borges, 2009; Borges, 2005]. Usually, β -ketoester and piperidine are used as active methylene compound and base catalyst in 2H-chromen-2-one formation, respectively (**Figure 4**). At the beginning, condensation of aldehyde **11** with methylene active compound lead to intermediate **12** that can cyclize by an intramolecular transesterification to give coumarin ring **13** [28,29].

Appropriate substituted 2-hydroxybenzaldehyde **14** is the starting material used in the Perkin method. However, in this case, it reacts with an anhydride in presence of base catalyst, as sodium acetate to give the ester intermediate **15** and then intramolecular aldol condensation occurs to give the coumarin core **16** [30]. Treatment of an appropriate substituted phenol with β -ketoesters in the presence of inorganic or organic acid catalyst is known as Pechmann reaction. It is proposed that electrophilic aromatic substitution of phenol **17** with β -ketoesters gives the intermediate **18** that cyclizes by transesterification reaction to produces the coumarin **19** [31]. The nature and position of the substituent in the phenol have a great influence in this reaction. Phenols substituted with electron donor groups are very important for the electrophilic aromatic substitution increasing the electronic density at the *ortho*-position, increasing the yields and decreasing the time of reaction [32].

Knoevenagel and Perkin reactions were used to prepare several classes of 3-substituted antioxidant coumarins as 3-alkylcarbonyl, 3-alkoxycarbonyl, 3-arylcarbonyl or 3-aryl coumarins (**21-27**; **Figure 4**) [33-38]. In all cases, 2-hydroxybenzaldehydes bearing one or more small substituent groups (R_5 - R_8) as OMe, OH, NO_2 or Me were used as starting materials. Classical Knoevenagel reactions of these 2-hydroxybenzaldehydes with β -ketoesters in the presence of piperidine gave series **21** and **23** [33, 34]. In the case of series **22**, methoxy groups were converted into hydroxy by treatment with BBr_3 [34]. Series **25-27** were prepared by adaptation of Perkin reaction [35-38]. Substituted 2-hydroxybenzaldehydes were coupled with carboxylic acids (instead of anhydride) using DCC to give coumarin series **25** and **26** after cyclization [35]. In order to obtain series **27**, anhydrides were prepared *in situ* by reaction of carboxylic acids or its sodium salts with acetic anhydride [36-38].

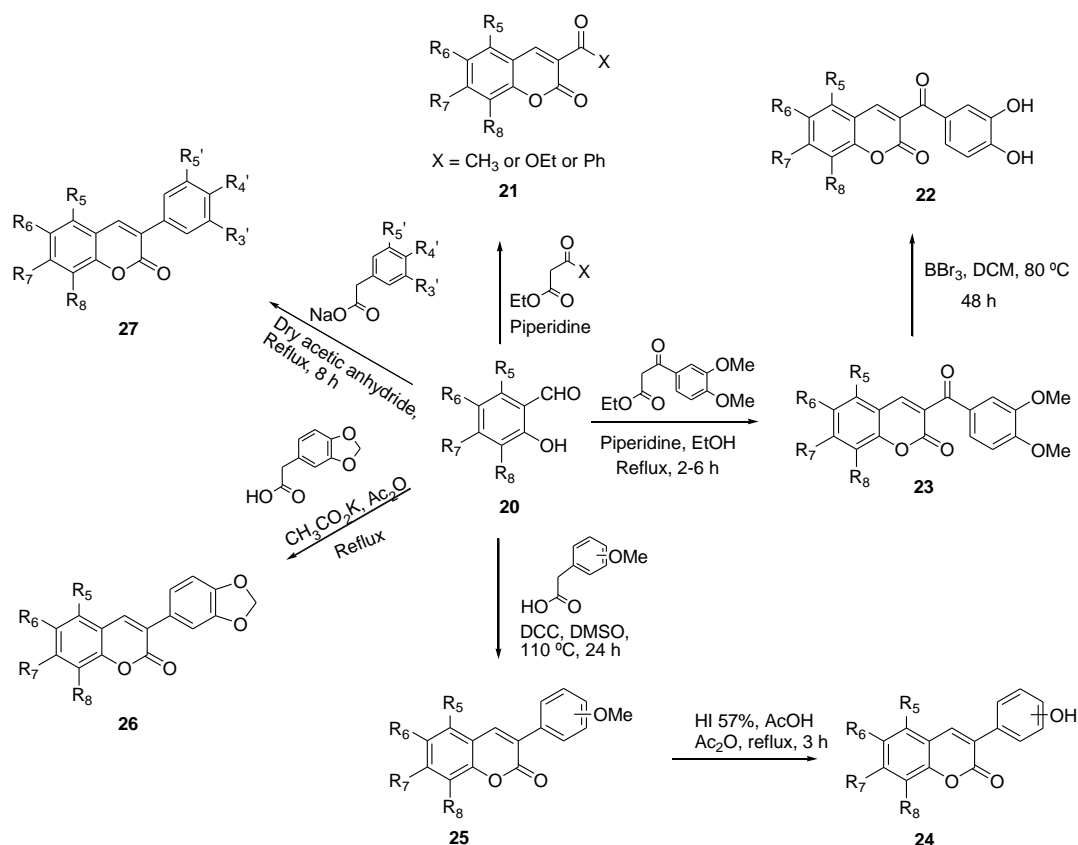


Figure 4. Synthesis of antioxidant coumarins by Knoevenagel and Perkin reactions.

Pechmann reaction is the most useful approach to obtain 4-methyl or 4-aryl antioxidant coumarins (**Figure 5**). Typically, a phenol bearing one or more small substituents (**28**) is treated with ethyl acetoacetate/benzoylacetate or other β -ketoester under acid catalysis (NaHSO₄, H₂SO₄, AlCl₃ or HCl) to give the 4-methyl (**29**) or 4-aryl (**31**) antioxidant coumarins [4, 39-44].

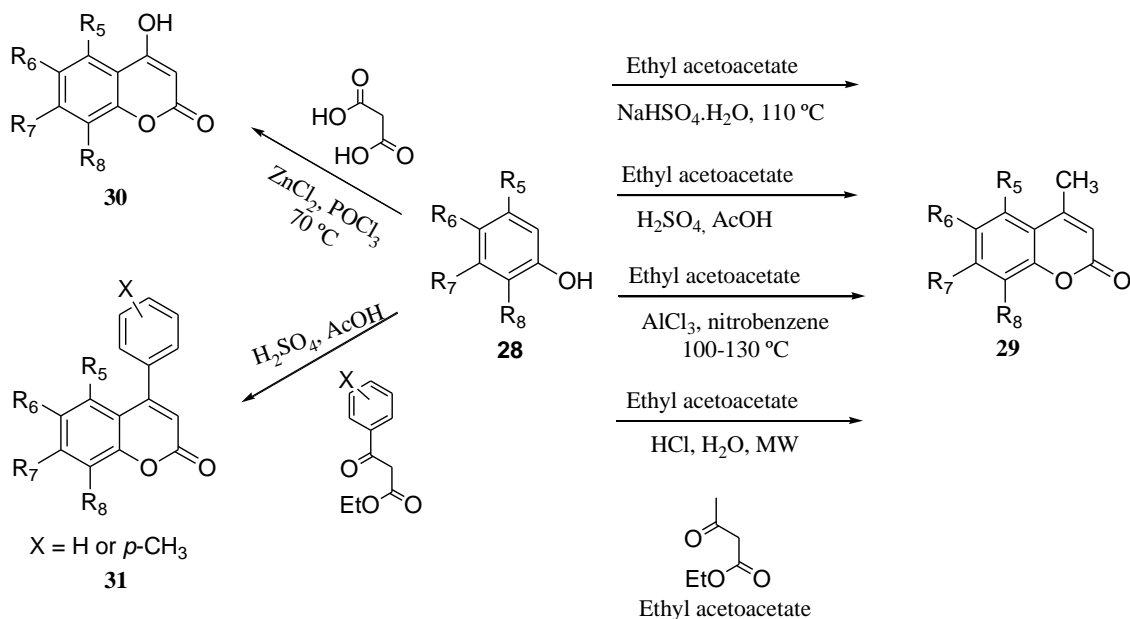


Figure 5. Synthesis of antioxidant coumarins by Pechmann reaction.

An interesting series of coumarins, 4-hydroxycoumarins (**30**), can be prepared by adaptation of this method using malonic acid. This dicarboxylic acid is converted *in situ* into acyl chloride by treatment with POCl_3 allowing coumarin formation [45]. 4-Hydroxycoumarins are good substrates for further modification, as we shall illustrate below.

2.1. Hydroxyl coumarins as antioxidant agents

Because of its structural simplicity, the simple coumarin core, 2*H*-chromen-2-one, is usually referred as the most representative coumarin. However, it must be emphasized that it is a synthetic compound rather than a natural product and, therefore, the naturally occurring 7-hydroxycoumarin or umbelliferone (**Figure 6**) can be considered to be the most important natural coumarin as many complex coumarins are its biosynthetic derivatives [46].

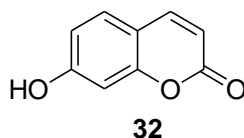


Figure 6. Chemical structure of 7-hydroxycoumarin (umbelliferone).

The synthesis of antioxidant hydroxyl coumarins can be accomplished by all the previously described methods (illustrated in **Figures 4** and **5**) according to the nature of the starting material. Moreover, the presence of dihydroxylated phenols as the starting material in the Pechmann reaction (**Figure 4**) is very favorable because strong electron-donor groups increase the reaction yields and decrease the time of reaction (see the discussion below).

In nature, the major occurrence of 7-hydroxylated coumarins and its analogues can be chemically explained observing the precursors of the coumarins in the plants (**Figure 7**). The natural occurring hydroxyl coumarins are synthesized from L-phenylalanine (**33**) that is reduced to *trans*-cinamic acid (**34**). The hydroxylation of **34** in the *para* position by 4-hydroxylases (which are present in all superior plants) to produce the intermediate **35** is a common step in the synthesis of lignin and numerous phenolic compounds. The *ortho*-hydroxylation produces the intermediate **36** that is photo isomerized to **37**, which is further submitted to lactonization to

produce the pyrone ring in coumarin **32**. Coumarins containing additional substituents are reported, according to the enzymatic pattern of the species [47].

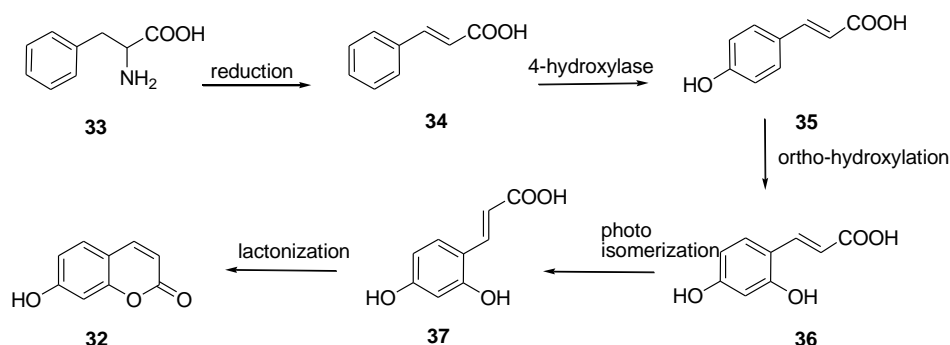


Figure 7. The biosynthesis of coumarins.

Thus, many works report the antioxidant activity of this class of natural and synthetic hydroxylated coumarins. The simplest coumarin, *2H*-chromen-2-one (**Figure 2, I**), demonstrated potential antioxidant properties “*in vivo*” by attenuating the nephrotoxicity induced by potassium bromate. This model of renal toxicity is based on the oxidative depletion of renal glutathione by the reactive oxygen species generated in the presence of KBrO_3 . Therefore, the antioxidant effect of *2H*-chromen-2-one was ascribed, among other effects, to their free radical scavenging properties [48]. However, the picture must be more complex than this as the *2H*-chromen-2-one may be metabolized “*in vivo*” by hydroxylation at all the six possible positions to yield 3-, 4-, 5-, 6-, 7- and 8-hydroxycoumarins (**32, 38, 40-41, 43-44 Figure 8**) besides the 6,7-dihydroxycoumarin and the 3,4 epoxy analog (**42 and 39, Figure 8**) [49].

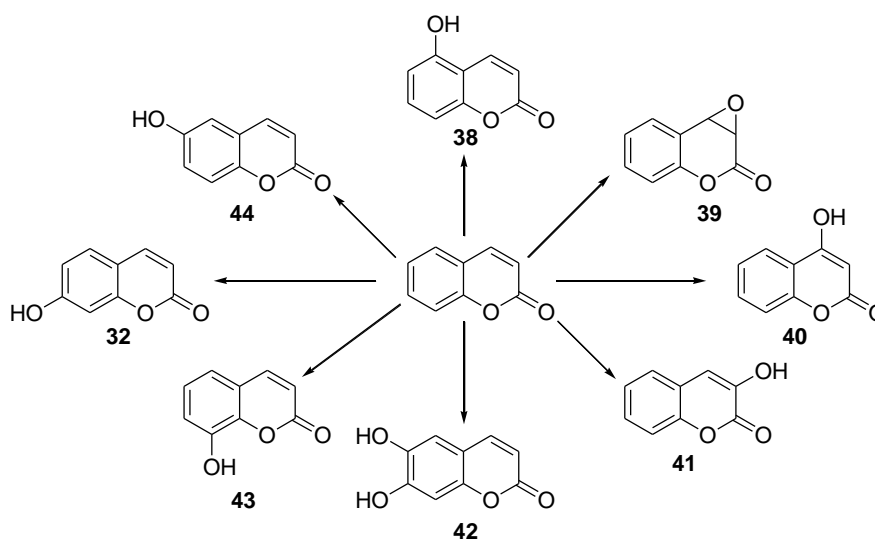


Figure 8. Some of the products from the metabolism of *2H*-chromen-2-one. Adapted from Lake, 1999 [49].

In fact, urinary 7-hydroxycoumarin may account alone for more than 85% of the dose of the unsubstituted coumarin (2 mg/human subject) after eight hours [50]. Therefore, a substantial part of the antioxidant effect of 2*H*-chromen-2-one “in vivo” must be related to generation of its hydroxy metabolites, specially the 7-hydroxycoumarin.

Coumarins containing a phenol or catechol moiety are usually stronger radical scavengers than non-hydroxylated coumarins [51], a very reasonable observation considering that several studies demonstrate that the catechol group typically enhances the radical-scavenging activity of natural antioxidants [52-59]. Phenols/catechols are good antioxidants because they react with free radicals to become new free radicals which are less active, longer-lived and less dangerous than those radicals they have neutralized, as they are able to delocalize the unpaired electron.

A very effective way to start to understand how the 1,2-pyrone ring group in a hydroxycoumarin (e.g. 5-, 6-, 7- and 8-hydroxycoumarins) affects its free radical scavenger ability is to consider the coumarin structure as a di-substituted phenol, were the substituents stand for the 1,2-pyrone ring [60]. As the first and determinant step in the conversion of a phenolic antioxidant into a free radical is the abstraction of the hydrogen atom from the hydroxyl group (**Figure 9**), the free radical scavenging activity of a phenolic antioxidant inversely correlates with the strength of the O-H bond, which can be quantitatively expressed by the values of the OH bond dissociation enthalpy (O-H BDE) [61].

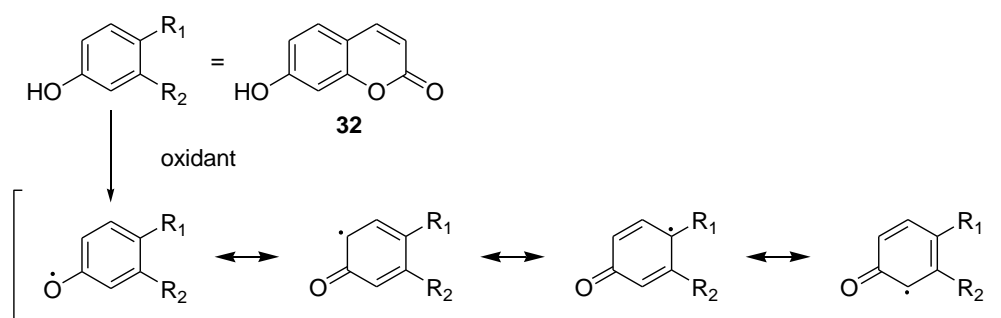


Figure 9. Canonical forms of phenoxyl radicals generated from the 7-hydroxycoumarin. Coumarin structure is represented as a di-substituted phenol, were the substituents stand for the 1,2-pyrone ring.

The conjugation of the phenolic ring with the 1,2-pyrone in 7-hydroxycoumarin increases its O-H BDE value by approximately 1 kcal/mol in comparison with respective phenol. Therefore, the 1,2-pyrone ring behaves as a weak electron-

withdrawing group, thus slightly decreasing the stability of the oxygen-centered radical and its free radical scavenging activity. The same behavior can be observed for a catechol derivative, 7,8-dihydroxycoumarin, which the hydroxyl groups have lower O-H BDE values (better antioxidant profile) than a phenol but still have higher O-H BDE values than those in the corresponding unsubstituted catechol [60]. However, as we mentioned before, the free radical scavenging ability of a compound accounts only in part for the total antioxidant activity as the metal chelating properties may be as important, or even more important, for the total activity [23]. Therefore, it was observed that the 1,2-pyrone ring really adds to the antioxidant effect of some coumarins as the ability to neutralize lipid peroxy radicals of 6,7-hydroxycoumarin is increased in comparison with its corresponding phenolic acid, the caffeic acid (**Figure 10**) [62].

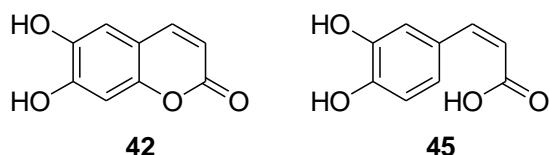


Figure 10. Structure of 6,7-hydroxycoumarin (**42**) and its phenolic acid analogue, caffeic acid (**45**).

Moreover, the antioxidant activity of compounds containing *ortho* dihydroxyl groups is higher when compared to with the *meta* and *para* dihydroxylated compounds or the respective phenol, indicating that the antioxidant activity is largely dependent on the number and position of hydroxyl groups on the phenyl ring. This could be rationalized by the increase of the stabilization of the semiquinone radical *via* intramolecular hydrogen bond as observed in the **Figure 11**. The intramolecular hydrogen bond is, in fact, stronger than in the parent phenol [63].

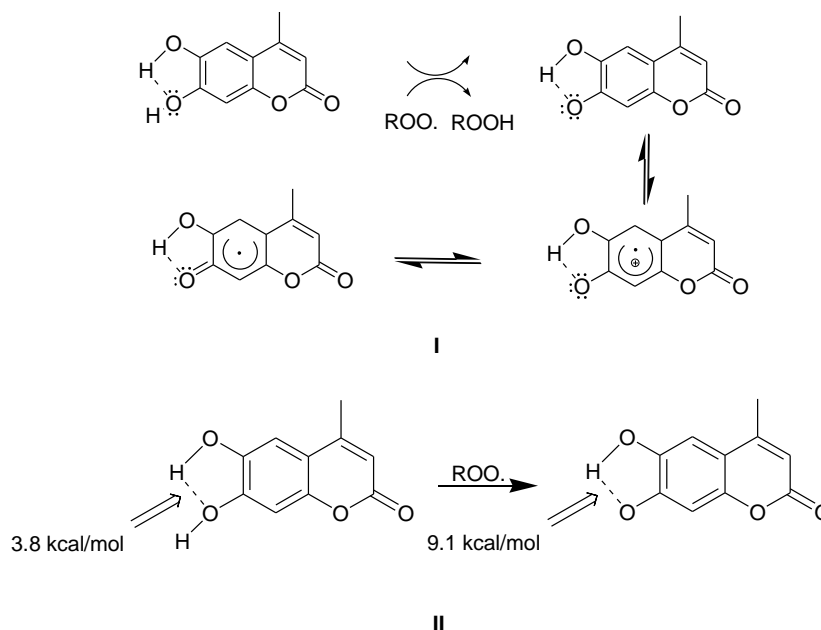


Figure 11. Increase of the stabilization of the semiquinone radical. Adapted from Xiao et al., 2012 [63].

It can be observed from **Figure 9** that a significant amount of spin density is located at the *ortho* and *para* positions in the phenoxyl radical and, therefore, the addition of substituents at these positions that can efficiently compensate this electronic deficiency by resonance or inductive effects tend to yield more stable radicals (better free radical scavenging properties) [64]. So, the relative position of the 1,2-pyrone to the hydroxyl group will affect the free radical scavenging activity, with the more pronounced positive effects observed when the double bond of the 1,2-pyrone ring (resonance effects) is *ortho* or *para* to the hydroxyl group. Accordingly, although 8-hydroxycoumarin (**43**, **Figure 8**) is basically equipotent to the 2*H*-chromen-2-one in the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) antioxidant assay, the 5-hydroxycoumarin (**38**, **Figure 8**) tend to be a slightly stronger antioxidant [65]. At the same time, 7-hydroxycoumarin (**32**, **Figure 8**) is considerably more potent as an antioxidant than its 6-OH (**44**, **Figure 8**) structural isomer and both are less active than the 4-OH (**40** **Figure 8**) and the 3OH-coumarin (**41** **Figure 8**) [66].

Although the stabilization of the radical by delocalization, which is possible due to the planar conformation of the coumarin [67], may be one of the most important factors that drive its free radical scavenging activity, it must be stressed that such delocalization is restricted to the ketone-alkene-phenyl system (**Figure 12, I**) and there is no fully aromaticity in the 2*H*-chromen-2-one core. It is well documented that

this core has considerable aliphatic properties and there are no experimental evidences to support the theory that canonical forms that would confer fully aromaticity to the *2H*-chromen-2-one core (as depicted in **Figure 12, II**) might occur [68].

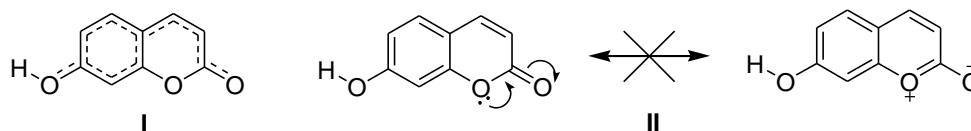


Figure 12. I) Charge delocalization in 7-hydroxycoumarin. II) A putative canonical form that would confer aromaticity to the *2H*-chromen-2-one core of 7-hydroxycoumarin.

Few modifications in the pyrone ring of hydroxycoumarins conduced to considerable increments in the antioxidant activity. A successful case of structure modification was the addition of a *p*-methoxyphenyl group at the position 3 of 4-hydroxycoumarin (**Figure 13, A**). The resulting compound was 7 times more active in the DPPH antioxidant assay than the 4-hydroxycoumarin. At the same time, the antioxidant activity of the *o*-methoxyphenyl analogue (**Figure 13, B**) was only the double of the observed for 4-hydroxycoumarin and 4-hydroxy-3-phenylcoumarin, which are equipotent (**Figure 13, C**) [69]. These observations highlight the existence of possible steric effects for the *o*-methoxyphenyl analogue that theoretically would hinder the coplanarity between the *2H*-chromen-2-one and the methoxyphenyl ring, thus decreasing the additional stabilization of the radical by conjugation with the methoxyphenyl ring.

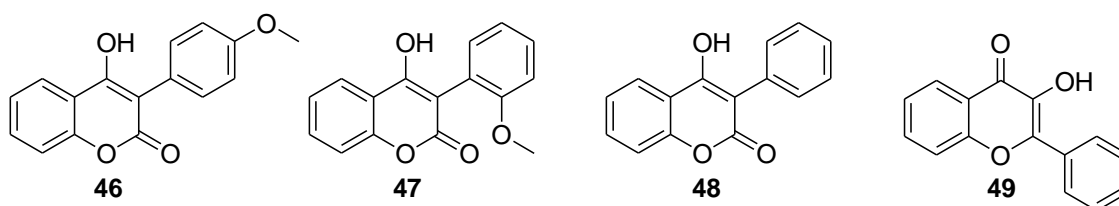


Figure 13. Chemical structures of 4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)coumarin (**46**), 4-hydroxy-3-(2-methoxyphenyl)coumarin (**47**), 4-hydroxy-3-phenylcoumarin (**48**) and a flavonol (**49**).

As one can easily notice, these compounds are structural isomers of flavonols (**49**), a class of flavonoids, which are recognized to be better antioxidants than simple coumarins [70] because of the additional ring that confers an extra area to delocalize the radical [71] (**Figure 14**). As observed for the 4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)coumarin, *p*-methoxy and specially *p*-hydroxy groups tends to improve the antioxidant activity in these flavonoids [72]. Therefore, some

improvement in the antioxidant activities of synthesized hydroxycoumarins can be achieved by extending the conjugation beyond the 2*H*-chromen-2-one core, simply by adding an extra aromatic/heteroaromatic ring attached to it. As a rule of thumb, the presence of electron-donating groups in these rings tends to stabilize the oxygen-centered radical whereas electron-withdrawing groups have the opposite effect [73].

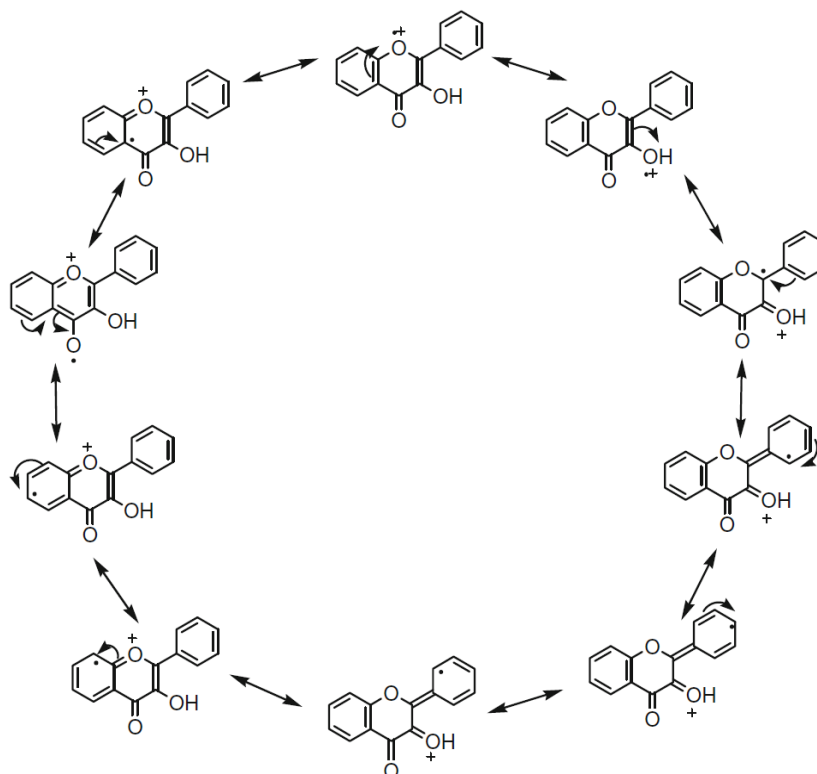


Figure 14. Resonance structures of a cation free-radical in flavonoids. Adapted from Mendes et al., 2012 [71].

There are examples, however, in which the substituent of the 2*H*-chromen-2-one may have interestingly free radical scavenging properties by itself, independently of the coumarin. Kadhum et al. (2011) synthesized an antioxidant phenyloxazepinedione analogue of 4-hydroxycoumarin (**50**, **Figure 15**) and the main stabilization mechanism of the free radical was attributed by the authors to this group alone [74].

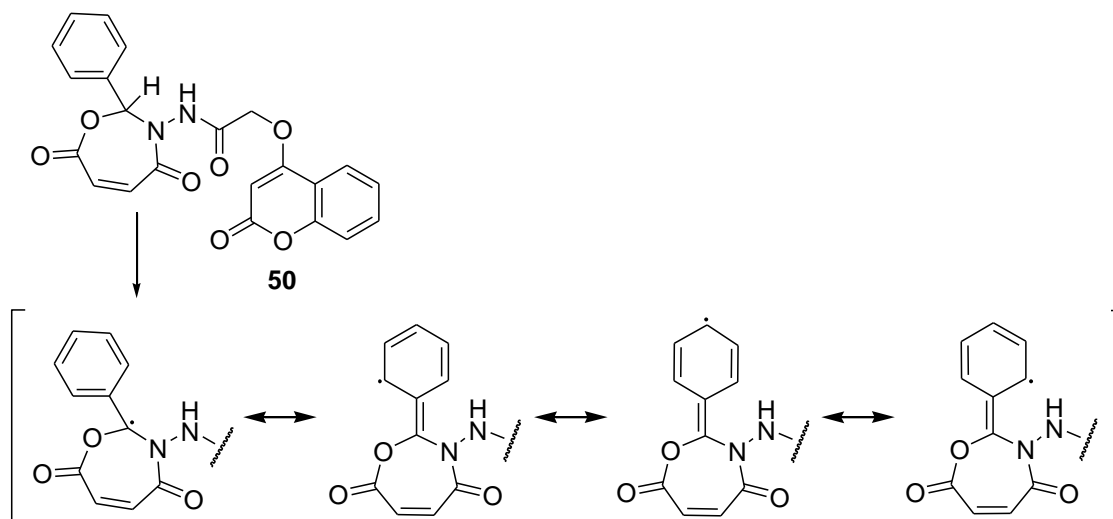


Figure 15. Proposed mechanism of radical stabilization by a synthesized analogue of 4-hydroxycoumarin. Adapted from Kadhum et al. (2011) [74].

The synthesis of ten coumarin-chalcones hybrids was performed and the antioxidant activities evaluated by cyclic voltammetry, ORAC FL-PGR and ESR. The synthesis was accomplished by Knoevenagel reaction (**Figure 4**), in which an aromatic α,β -ketoester reacts with differently substituted *ortho*-hydroxybenzaldehydes. All derivatives proved to be good antioxidants, but the compounds **51** and **52** (**Figure 16**) were reported to be the most promising. These compounds, which have a hydroxyl group at the 7 or 8 position of the coumarin ring, were the most active when compared to other compounds of the series, including their 6-hydroxylated analog [75].

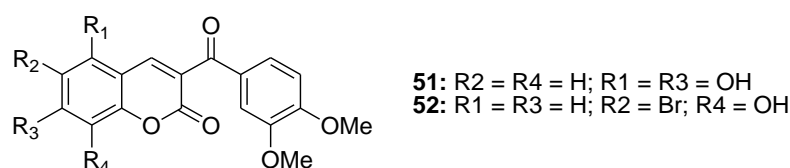


Figure 16. Coumarin-chalcone hybrids [75].

The *in vitro* antioxidant activities of eight 3-carboxycoumarin derivatives were assayed by quantitative DPPH radical scavenging [33]. The synthesis of these compounds, in which *ortho*-hydroxy benzaldehydes react with aliphatic α,β -ketoesters, is depicted in **Figure 4**. Among the compounds synthesized, 3-acetyl-6-hydroxy-2*H*-1-benzopyran-2-one **53** and ethyl 6-hydroxy-2-oxo-2*H*-1-benzopyran-3-carboxylate **54** (**Figure 17**) showed the best radical-scavenging activities when compared to unsubstituted compounds or containing nitro and methoxyl groups at the position 6. Using structural, geometrical, topological and quantum-chemical descriptors, the

authors also performed a QSAR study demonstrating that the presence of hydroxyl groups on the aromatic ring of 3-carboxycoumarins correlates with higher DPPH radical scavenging activities. These results indicate that the antioxidant activity of 6-substituted 3-carboxycoumarins is reduced by the presence of an electron withdrawing group (e. g. 6-nitro) or by the substitution of the 6-hydroxyl group (a strong electron donor group) by a methoxy group (a weaker donor compared to hydroxyl).

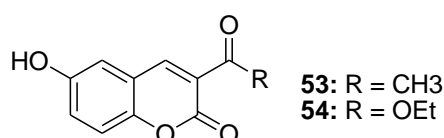


Figure 17. Carboxycoumarins with free radical-scavenging properties [76].

A series of hydroxylated 3-aryl coumarins was synthesized via Knoevenagel reaction (**Figure 4**) and their antioxidant properties evaluated by ORAC-FL, DPPH using ESR and CV tests [34]. The results indicate that all the targeted 3-aryl coumarins are good antioxidants and demonstrated very interesting DPPH, hydroxyl and superoxide radical scavenging profiles. In particular, the compound **63** (**Figure 18**) was the most active when compared to the other compounds of the series. By comparing the antioxidant activities in this series, they suggested that the presence of hydroxyl groups at the 8-position in the coumarin ring and at the 4' position in the 3-phenyl substituent is very important to enhance the antioxidant profile. Thus, compound **63**, a dihydroxylated coumarin, was more efficient as antioxidant when compared to other trihydroxylated compounds of the series with different substitution pattern, suggesting that the position rather than the number of hydroxyl groups was the main determinant of the antioxidant activity.

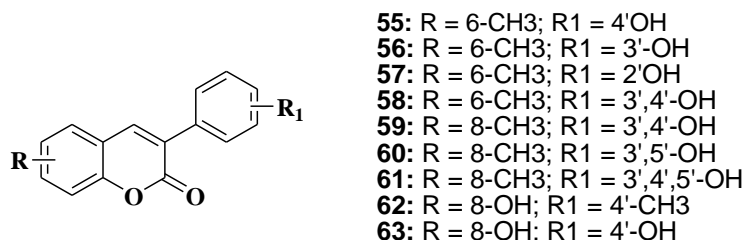


Figure 18. Series of 3-aryl coumarins [34].

At the same time, twenty hydroxylated and acetoxylated 3-phenyl coumarins were synthesized (**series 27, Figure 4**) and the SARs were investigated by evaluating the ability of these compounds to modulate horseradish peroxidase (HRP) catalytic activity and comparing these results to four flavonoids known as HRP

inhibitors: myricetin, quercetin, kaempferol and galangin (**64-67**, **Figure 19**) [36]. In order to propose a binding mode for the HRP inhibitors, flexible docking calculations were performed employing 20 coumarins and the 4 above cited flavonoids, using the crystal structure of the unbound HRP receptor. Both the experimental values of HRP inhibition and the docking simulations indicated that the catechol group is the main structural requirement to achieve high inhibitory effects.

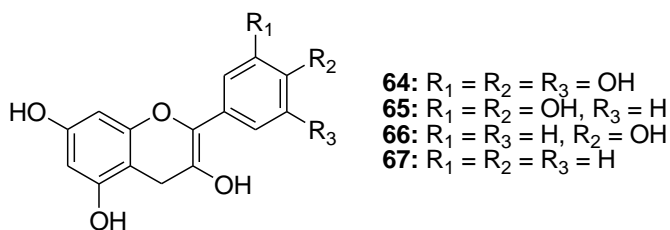


Figure 19. Chemical structures of the flavonoids myricetin (**64**), quercetin (**65**), kaempferol (**66**) and galangin (**67**) [36].

In a previous work, we synthesized via Pechmann reaction (**Figure 5**) two antioxidant derivatives of methyl coumarins (**Figure 20**). Reactions were carried out under microwave irradiation to react pyrogallol and gallic with ethyl acetoacetate in the presence of catalytic amounts of concentrated HCl. The antioxidant activities were evaluated via DPPH, cyclic voltammetry and by measuring the antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP). Both the 7,8-dihydroxy-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-5-carboxylic acid **68** and the 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin **69** (**Figure 20**) demonstrated significant antioxidant properties, probably because of the two hydroxyl groups attached to the aromatic ring that help to delocalize the free radicals and to chelate metal ions from the media [4].

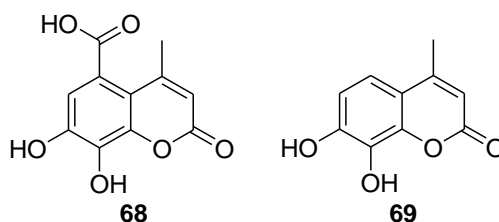


Figure 20. Chemical structures of 7,8-dihydroxy-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-5-carboxylic acid (**68**) and the 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin (**69**) [4].

The same strategy was employed to synthesize three 6-substituted 4-methyl antioxidant coumarins: 6-hydroxy-4-methylcoumarin (**70**), 4,7-dimethyl-6-hydroxy-4-methylcoumarin (**71**) and 6-acetoxy-4-methylcoumarin (**72**) (**Figure 21**) [40]. In addition to previously reported values of DPPH radical assay [41], the authors also tested antioxidant properties of these compounds using different spectrophotometric

and spectrofluorometric radical testing methods and the IC_{50} values found were satisfactory. These compounds also demonstrated antioxidant properties in the ABTS, ORAC and ORAC_{ROO} comparable to Trolox, a known antioxidant that is used as the standard in most testing methods. Interestingly, the esterification of the hydroxyl group at the 6-position do not significantly decreased their antioxidant activities, as it could be naturally expected because of the importance of free hydroxyl groups to scavenge free radicals.

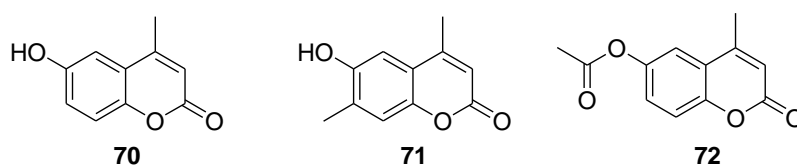


Figure 21. Chemical structures of 6-hydroxy-4-methylcoumarin (**70**), 4,7-dimethyl-6-hydroxy-4-methylcoumarin (**71**) and 6-acetoxy-4-methylcoumarin (**72**) [40].

2.2. Non-hydroxyl coumarins as antioxidant agents

3-Methylcarbonylcoumarins (**73**, **Figure 22**), obtained by Knoevenagel reactions (**Figure 4**), are useful intermediates for the synthesis of several 3-substituted antioxidant coumarins (**74-77**, **Figure 22**). Condensations of **73** with appropriate aldehydes give many types of enones as **74** and **75** series [76-79]. These enones are generally used to prepare some heterocyclic compounds. Reaction of enone **75** with thiourea in basic conditions gave 3-dihydropyrimidinethionyl derivatives **76** [76].

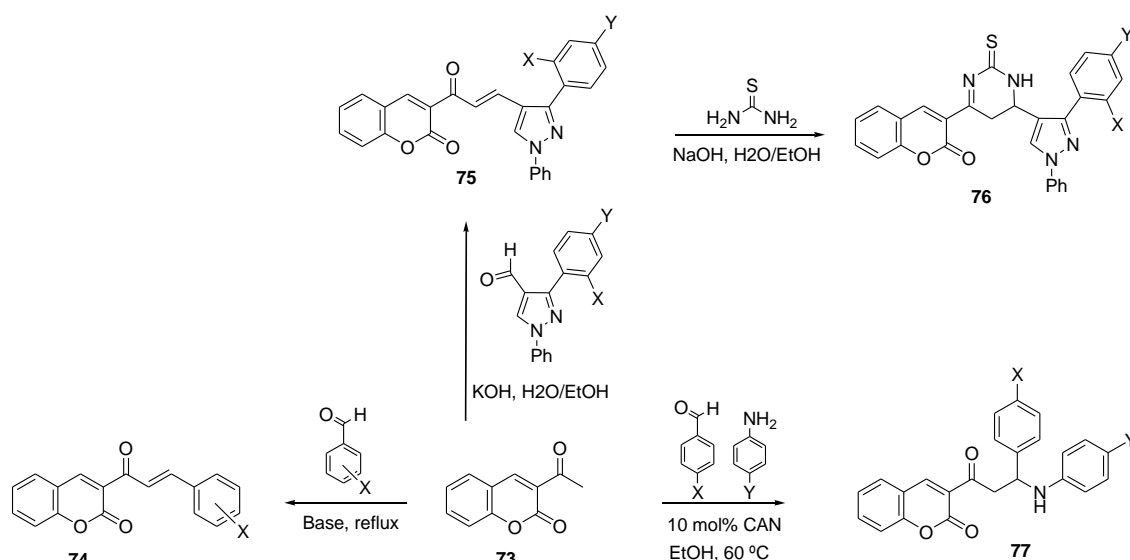
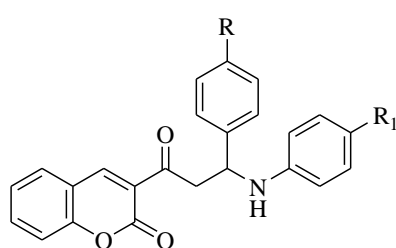


Figure 22. Modifications at position 3.

In one interesting approach, a multicomponent reaction was carried out by condensation of **73** with appropriate benzaldehyde and aniline, using CAN as Lewis acid catalyst, to afford coumarin series **77** [80]. This series of new 3-functionalized coumarins **78-85** (**Figure 23**) had its antimicrobial and antioxidant properties evaluated. The results indicate that the compound **79** presents the higher antioxidant activity on DPPH assay and iron-chelating capacity. According to the authors, the incorporation of electron-withdrawing groups at the position R (compounds **82-84**) significantly decreased the antioxidant activity, whereas they have shown better antimicrobial activity.



78: R= H; R₁= H

79: R= H; R₁= COOH

80: R= CH₃; R₁= COOH

81: R= OCH₃; R₁= COOH

82: R= Cl; R₁= COOH

83: R= F; R₁= COOH

84: R= NO₂; R₁= COOH

85: R= N(CH₃)₂; R₁= COOH

Figure 23. Series of new 3-functionalized coumarins Mannich bases from Kenchappa et al (2013).

Enone **74** is a key intermediate for the synthesis of 3-dihydropyrazolyl and 3-pyrazolyl antioxidant coumarins **86-89** (**Figure 24**). Treatment of **74** with phenylhydrazine or hydrazine hydrate give aryl dihydropyrazolyl **87** or diaryl dihydropyrazolyl **88** series, respectively [77,78]. In order to obtain diaryl pyrazolyl series **88**, a different strategy was adopted. Initially, enone **74** is converted into α,β -dibromocetone **89** followed by phenylhydrazine addition in basic conditions [79]. The initial event is an elimination to give bromoenone **89** as previously reported [81]. Probably, in this series 1,4-addition precedes 1,2-addition. To obtain the regioisomer **86**, presumably the first step is the 1,2 addition of phenylhydrazine followed by intramolecular 1,4-addition.

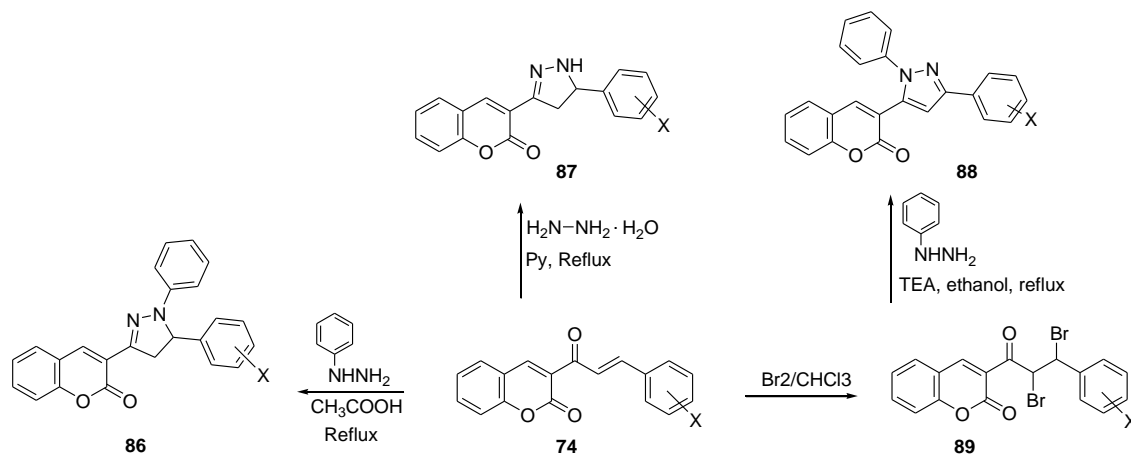


Figure 24. Enones as starting material to obtain pyrazole and dihydropyrazole rings.

The diaryldihydropyrazolyl **87** series (**Figure 25**) were screened for their *in vitro* activities as antioxidants and anti-inflammatory agents [77].

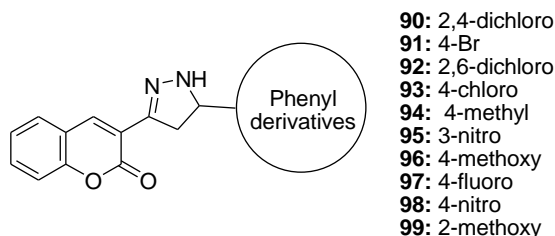


Figure 25. Series of coumarin derivatives with attached heterocyclic pyrazoline rings.

The antioxidant activity was screened by DPPH free radical scavenging method in comparison with ascorbic acid (as standard). The compounds **90**, **93**, **96-99** are potent antioxidants and exhibit inhibition values at all concentrations tested comparable to the standard. The results indicate that the compounds having electron withdrawing substitutions shows potent antioxidant and anti-inflammatory activities. In a comparison between the substitution pattern, the results indicates that the compounds *para* substituted are effective at all selected concentrations, while the same substitutions at *ortho* and *meta* or abolished/decreased their antioxidant activities. The authors explain these observations based on the steric hindrance caused by *ortho* and *meta* substituents, thus decreasing the availability of hydrogen radical to combine to DPPH and provide the antioxidant activity. Moreover, the presence of Br substituents in the phenyl derivatives decreased the antioxidant activities [77]. These results are not in accordance with Kenchappa et al. (2013) that report the decrease of the antioxidant activity in the presence of phenyl electron withdrawing groups [80] and Hamdi (2012) that reports the increase of the antioxidant activity in compounds with Br substituent at the phenyl group [82].

Addition of a thiazepine moiety at 2- and 3-positions can also be carried out starting by reaction of 4-hydroxycoumarin **100** with substituted benzaldehydes (**Figure 26**). The enol group of 4-hydroxycoumarin **100** is very reactive and it is not necessary catalyst addition to accomplish this transformation. The reaction of enones **101** with 2-aminoethanethiol hydrochloride gave antioxidant coumarin-fused thiazepines **102** [45]. It seems that the first step is the conjugated addition of thiol that is the most reactive group. In sequence, 1,2-addition of amine leads to enamine formation. Despite of the possibility of obtain imine, just enamine was detected. This could be explained by the stability of coumarin ring.

Evaluation of antioxidant activities of the intermediates **101** and coumarin-fused thiazepines **102** and **103** via DPPH radical scavenging test and FRAP ability indicate that the presence of thiazepine ring is very important to enhance the antioxidant activities of these compounds. The compound **102** presented the most potent scavenging activity, while the bromo-derivative **103** was the most efficient compound in the FRAP assay. A cytotoxic evaluation against the human cancer cell lines MCF-7, SK-N-MC and MDA-MB 231 was performed and indicated that the compound **103** is at least twofold more potent than etoposide against all cancer cell lines. These results indicate that the coumarin-fused 1,4-thiazepines **102** and **103** could be used as scaffold for finding new antioxidants and anticancer agents and that the *para*-substitution in the phenyl substituent seems to be important for the biological activity [45].

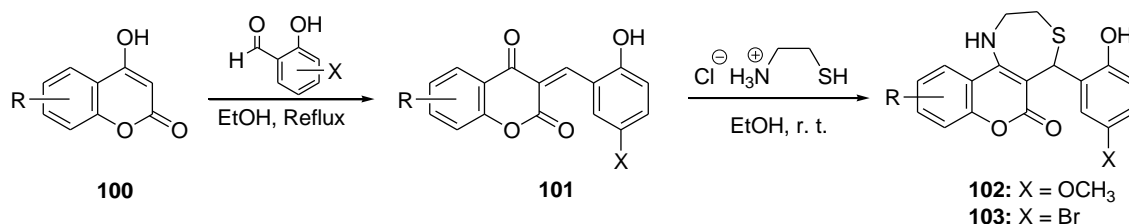


Figure 26. 4-Hydroxycoumarins as starting materials for the preparation of antioxidant coumarin-fused thiazepines.

A series of coumarin-3-carboxamides **107-113** and their hybrids with the alpha-lipoic acid **114-118** (**Figure 27**) were designed, synthesized and tested for their antioxidant and anti-inflammatory properties [83]. The 3-ethoxycarbonyl 4-hydroxycoumarins **106** core was obtained by an efficient short-step strategy involving a C-acylation-cyclization reaction of diethyl malonate with the *N*-hydroxybenzotriazolyl esters of functionalized acetyl salicylic acids. Reaction of

coumarins **106** with the appropriate aliphatic diamines led to coumarin-3-aminocarboxamides **107-113**, which were subsequently reacted with lipoic acid via activation with N-hydroxysuccinimide and DCC to yield **114-118**.

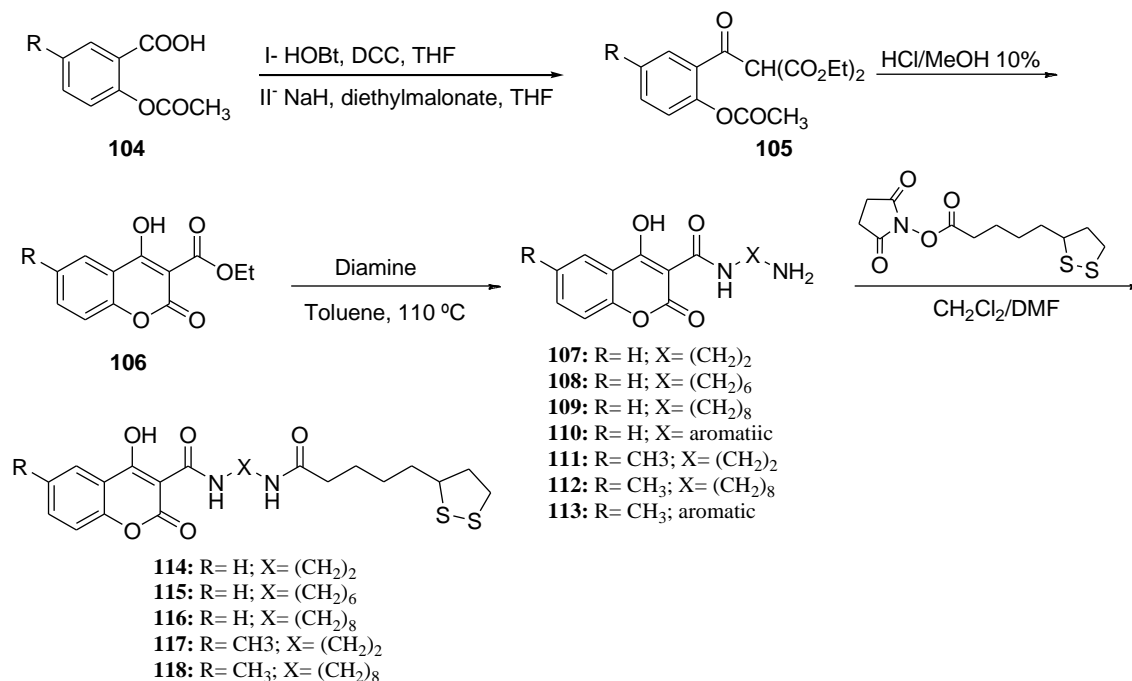


Figure 27. Synthesis of the two series of coumarin-3-carboxamides (**107-113**) and their hybrids with the alpha-lipoic acid (**114-118**).

These two series of compounds were assayed *in vitro* by DPPH and LOX and the *in vivo* anti-inflammatory activity was assessed by using the functional model of carrageenan-induced rat paw edema. The results indicate that both amidoamides and the final hybrids possess significantly anti-inflammatory activity *in vivo* and also that **115** and **118** are potent OH scavengers exhibiting significantly higher activity than lipoic acid. Also products **115** and **118**, seem to be more potent *in vivo* than the corresponding aminoamides **108** and **112**, indicating that the presence of a lipoic acid substituent at the position 3 of the coumarin ring is very interesting. Although lower when compared to **115** and **118**, the compounds **111-113** exhibit satisfactory combined antioxidant-anti-inflammatory activities.

In other hand, 4-methylcoumarins are excellent substrates for allylic oxidation with selenium dioxide (SeO₂) as represented in **Figure 28** [39]. The overall reaction is the simple conversion of methyl group of **119** into aldehyde **120**, but the route involves successive pericyclic reactions [84]. Initially, SeO₂ reacts with coumarin **122** in a [4+2] cycloaddition reminiscent of the ene reaction. Next, allylic seleninic acid **123** undergoes [2,3] sigmatropic rearrangement to give an unstable intermediate

124, which rapidly decomposes to an allylic alcohol **125**. Finally, alcohol **125** is oxidized by SeO_2 to afford the desired 4-formylcoumarin **127** [39].

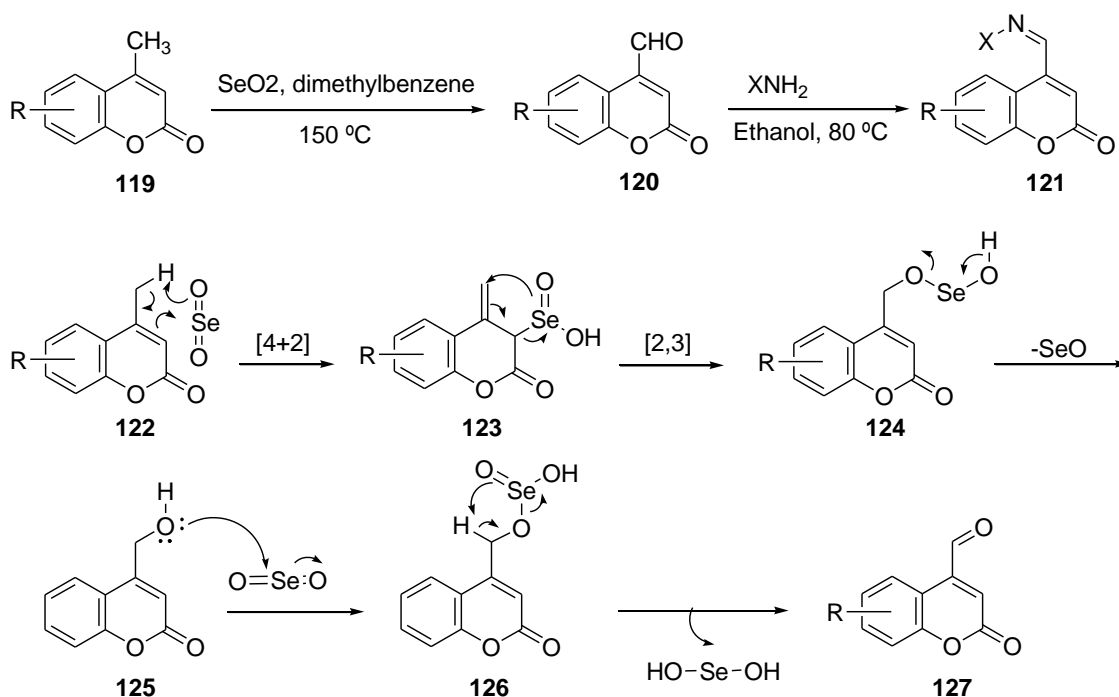
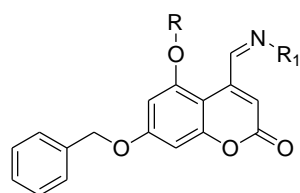


Figure 28. Modification at 4-position by allylic oxidation with SeO_2 .

In order to obtain antioxidant series **128-141**, 4-formylcoumarin **127** was reacted with several nitrogen nucleophiles. The 4-Schiff base-7-benzyloxy-coumarins **121** (**Figures 28**) and its derivatives **128-141** (**Figures 29**) were evaluated by the DPPH, ABTS and superoxide anion radical tests and the results indicates that this family of compounds have a great antioxidant potential, presenting 17 derivatives with satisfactory activity in all tests presenting better activity when compared to commercial antioxidant BHA, BHT and ascorbic acid. Of the all compounds, **130**, **134**, **138** and **139** showed better radical scavenging activities than BHT in the DPPH assay; compounds **128**, **130**, **132**, **133**, **134**, **136**, **137**, **139**, **140**, **141**, and **142** demonstrated better ABTS radical scavenging than BHT; compounds **129** and **141** exhibited stronger superoxide anion radical scavenging activities than BHA and the compound **136** presented much better DPPH and ABTS activity when compared to the ascorbic acid. The above results demonstrate that the rational design of Schiff-base linked to coumarin core is a great alternative to develop new antioxidants compounds [39].



- 128:** R= H; R₁= NH₂
129: R= OCH₂Ph; R₁= NH₂
130: R= H; R₁= C₆H₅NH
131: R= OCH₂Ph; R₁= C₆H₅NH
132: R= H; R₁= *p*-NO₂-C₆H₄NH
133: R= OCH₂Ph; R₁= *p*-NO₂-C₆H₄NH
134: R= H; R₁= *p*-NO₂*p*-NO₂-C₆H₃NH
135: R= H; R₁= *p*-NO₂*p*-NO₂-C₆H₃NH
136: R= OCH₂Ph; R₁= *p*-NO₂*p*-NO₂-C₆H₃NH
137: R= H; R₁= *o*-NH₂-C₆H₄
138: R= OCH₂Ph; R₁= *o*-NH₂-C₆H₄
139: R= H; R₁= *p*-OH-C₆H₄
140: R= OCH₂Ph; R₁= *p*-OH-C₆H₄
141: R= H; R₁= OH
142: R= OCH₂Ph; R₁= OH

Figure 29. Series of 4-Schiff base-7-benzyloxy-coumarins.

Employing the 4-HO-coumarin **143** as starting material Kadhum et al. (2011) synthesized and investigated the antioxidant activity of two new coumarins, **147** and **148** (**Figure 30**), by DPPH, hydrogen peroxide and nitric oxide radical methods and compared their activities with the known antioxidant ascorbic acid [74]. Classical protocols are involved in this synthesis such as, the *O*-alkylation of 4-HO-coumarin with Ethyl bromoacetate, followed by hydrazinolysis of ester **144** with hydrazine hydrate leading to hydrazide derivatives **145** in good yields. Treatment of **145** with benzaldehyde furnished the hydrazone **146**, which was further cyclized with maleic anhydride or mercaptoacetic acid to yield compounds **50** and **147**.

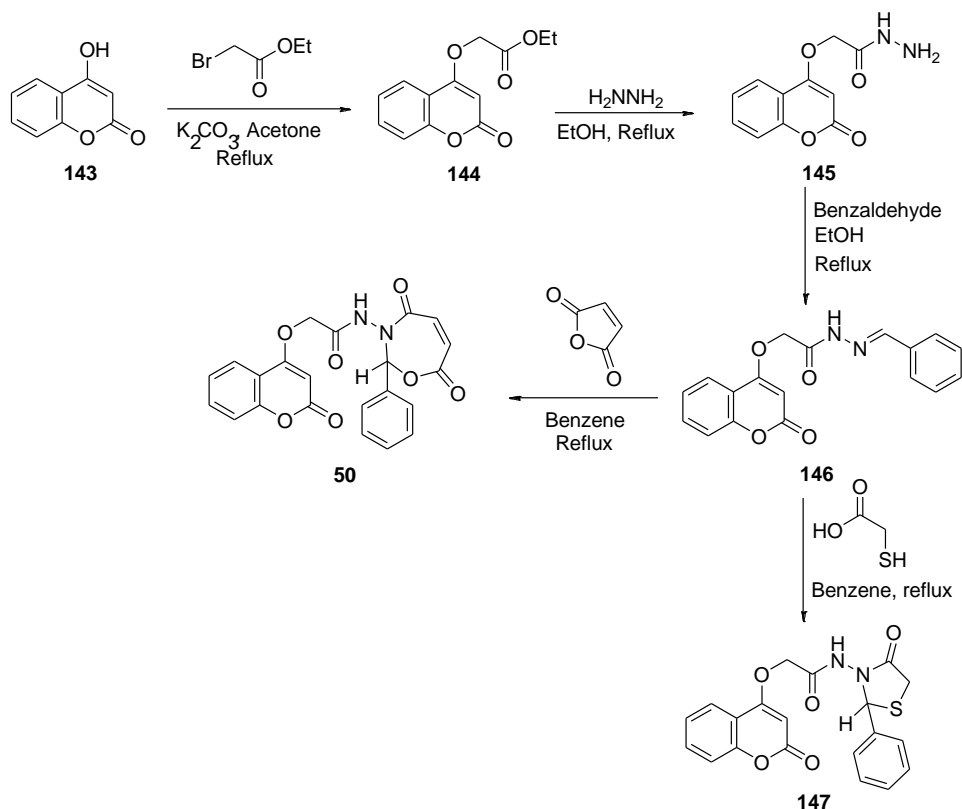


Figure 30. Synthesis of 4-Schiff base-7-benzyloxy-coumarins **50** and **147**.

Compounds **50** and **147** showed satisfactory antioxidant activities, comparable to ascorbic acid in all experiments. Computational studies were developed to determine the influence of molecular atomic charges in the antioxidant effects based on previous reference models. The postulated mechanism proposed for the action of compound **50** as antioxidant was mentioned before and can be observed in the **Figure 15**. Alternatively, the authors proposed a second mechanism based in the keto-enol forms of these compounds that is depicted in the **Figure 31**.

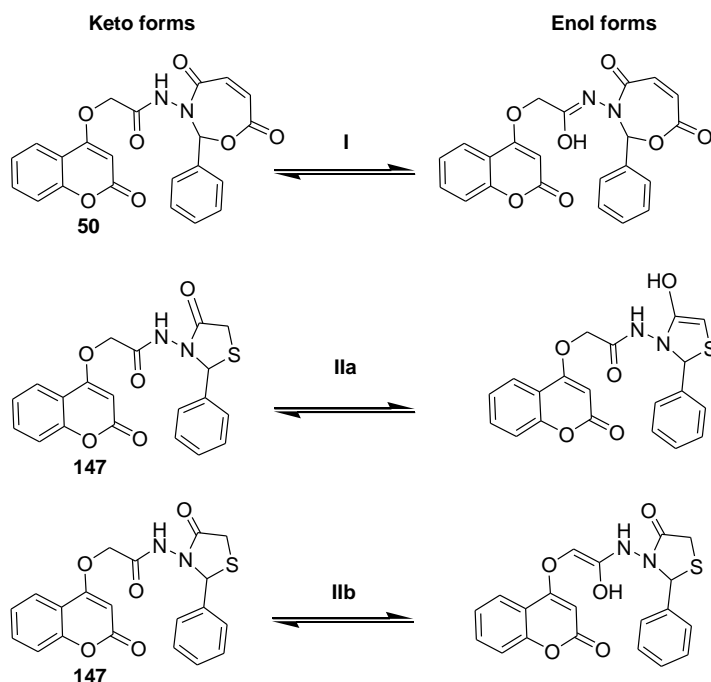


Figure 31. I) Keto-enol forms of **50**. IIa and IIb) Keto-enol forms of **147**.

2.3. Substitutions on the aromatic ring

The substitution on the aromatic core of coumarins should be observed as a separate section because of its complex substitution pattern. Electrostatic potential map of *2H*-chromen-2-one was generated using Wavefunction Spartan '14 (**Figure 31, II**). Among the carbons, electron density is higher at C6 and C8, which is explained by the delocalization of nonbonding electron pair of O1. In this way, it is expected that electrophilic aromatic substitution occurs at 6- or 8-position. In fact, some experimental results confirm this model as we will discuss below.

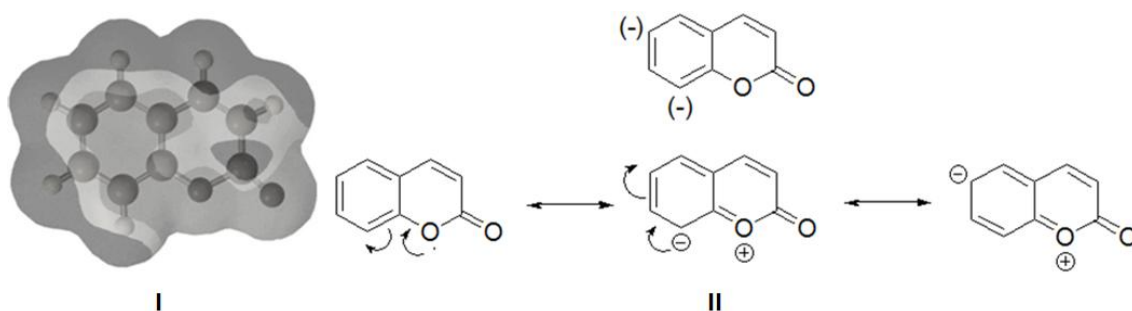


Figure 32. I) Electrostatic potential map of *2H*-chromen-2-one generated using Wavefunction Spartan '14: gray areas = negative, light gray = intermediate and dark gray regions = positive. II) Resonance on *2H*-chromen-2-one core.

Nitration of *2H*-chromen-2-one **148** gives only 6-substituted compound **149** (**Figure 33**) [85-87]. Probably the steric hindrance at 8-position results in this great selectivity for 6-position. Nitrocompound **149** is a key intermediate for the synthesis

of 6-dihydropyrylylcoumarins **152** and **153**. The reduction of nitro group of **149** by catalytic transfer hydrogenation gave amine **150** that was bisalkylated with allylbromide in basic conditions to produce **151**. Intramolecular olefin metathesis of **151** using Grubb's catalyst gave 6-dihydropyrazolylcoumarin **152** as the major product [85]. Formation of by product **153** is due to spontaneous dehydrogenation of **152** to give aromatic pyrazole rings.

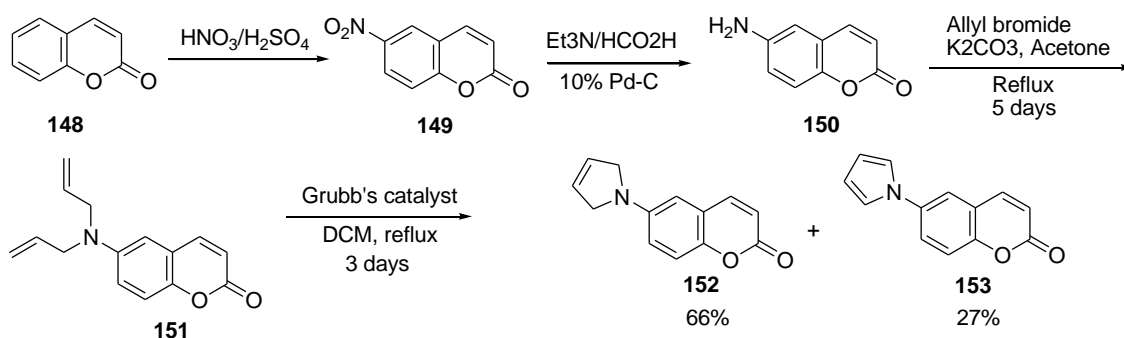


Figure 33. Selective nitration of 6-position as the key step to prepare 6-substituted coumarins.

The 6-dihydropyrylylcoumarins derivatives **152** and **153** were evaluated *in vitro* for their ability to interact with DPPH stable free radical, to inhibit the lipid peroxidation and to scavenge the superoxide anion. The author reports the broad antioxidant spectrum for the majority of the compounds tested and indicates the potential use of these compounds in human diseases that involves the reactive oxygen species. Attempts have been made to develop some preliminary SAR conclusions and indicates that **152** and **153** demonstrate to be the more active of the study and when compared with the 4 and 7-substituted compounds, indicating that the presence of pyrazole derivatives at the position six of the coumarin ring is very important to enhance the antioxidant activity of this class of compounds [85].

Functionalization of 8-position could be carried out by Fries rearrangement of 7-HO-coumarins (**Figure 34**). It involves migration of acetyl group (from compound **154**) of 7-acetoxy to 8-position to afford 8-methylcarbonyl **155** as the exclusive product [88]. This rearrangement is highly temperature independent and kinetic factors seem to explain these results, since both 8-acetyl- and 6-acetyl-isomers possess similar thermodynamic stability [89]. Besides mechanism studies showed that this reaction takes place by an intermolecular mechanism [89, 90]. The 8-

methylcarbonyl **155** is a key intermediate to prepare 8-dihydropyrazolyl derivatives **157-165** in a similar manner [88].

The antioxidant activities of these 8-dihydropyrazolyl derivatives were evaluated in AAPH-induced oxidation of DNA, trapping DPPH and ABTS cationic radical. Among these coumarin derivatives, the compounds **157-160** and **163-165** exhibited the termination of radical propagation-chains in AAPH-induced oxidation of DNA. The *ortho* dihydroxyphenyl substitution at 5 position and 1-unsubstitution of the 4,5-dihydropyrazole was found enhancing the antioxidant activities of coumarin derivatives. Moreover, the results indicates that the introduction of hydroxyl groups onto the benzene ring at the 5-position of 4,5-dihydropyrazole and leave the 1-position of the 4,5-dihydropyrazole core unsubstituted improve the DNA activity against APPH-induced oxidation via ABTS and DPPH trapping. With two hydroxyl groups *ortho* to each other in the benzene ring of 4,5-dihydropyrazole, these coumarins possess stronger antioxidant capacity, which can be explained by the presence of semiquinone radical as described in the **Figure 11**. Thus, the results indicate that the compounds **158** and **163** are two novel and promising lead compounds suitable for further development in the design of antioxidants [88].

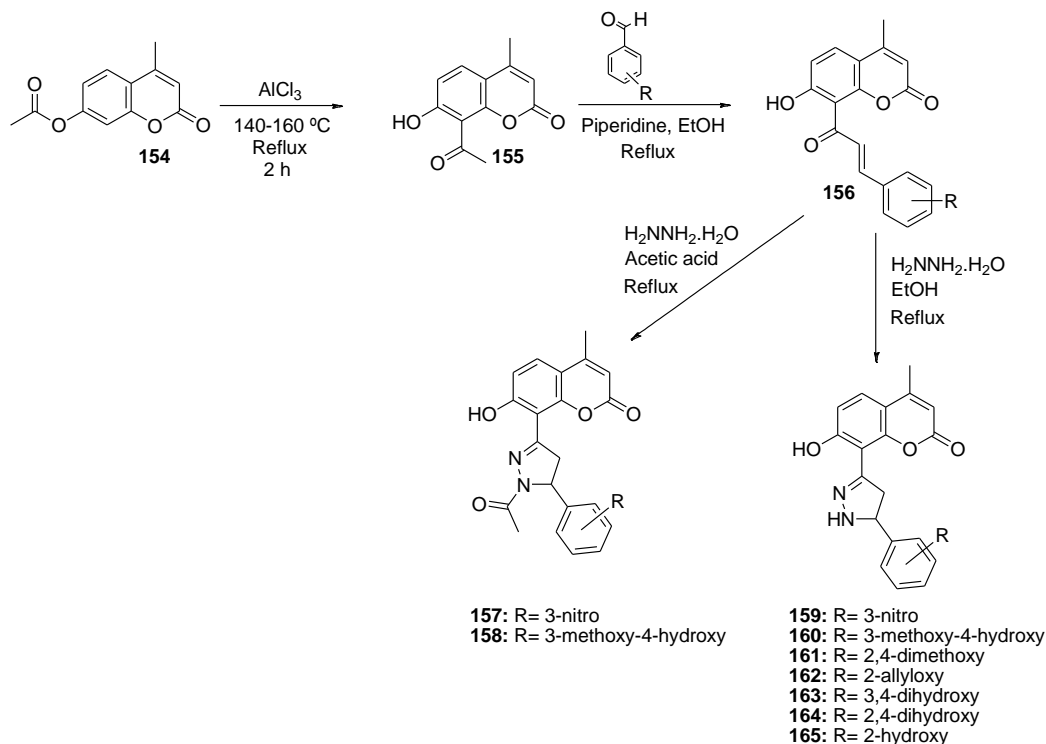


Figure 34. Synthesis of 8-dihydropyrazolyl derivatives.

A similar approach was used by Renuka et al. (2013) to synthesize a series of formyl pyrazoles **171–175** (Figure 35) [91]. The starting materials **166-170** [88] are also employed here in reactions with different aromatic hydrazines, followed by Vilsmeier Haack reactions to build a series of formyl-pyrazoles. The synthesized new compounds and the intermediates were screened *in vitro* for their anti-bacterial, antifungal and antioxidant activities and compound **174** demonstrated a remarkable antioxidant profile, suggesting that the presence of a *para*-chlorine substitution at the phenyl ring is very interesting to enhance the antioxidant activity of this series of compounds. Furthermore, **169** and **174** were also the most potent compounds in the anti-bacterial and antifungal assays, demonstrating again the importance of *para*-chlorine substitution for these biological activities [91].

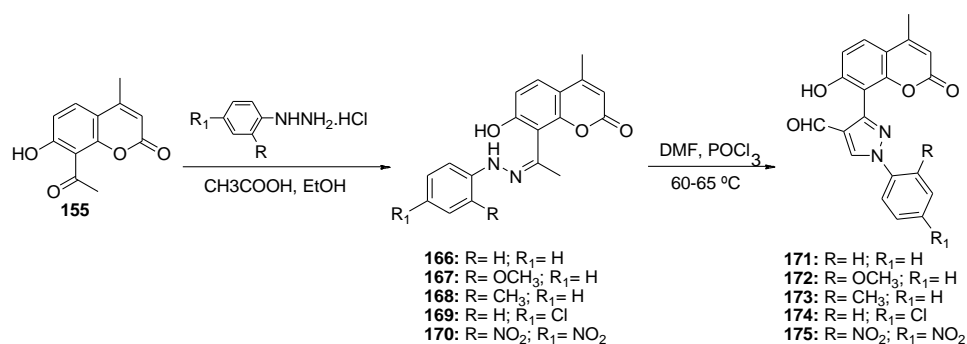


Figure 35. Synthesis of formyl-pyrazoles coumarin series.

Another approach is currently used to chemical diversification on the coumarin core and increase of its biological activities. The presence of functional groups such as hydroxyl, aldehydes, amines among others as substituents can produce derivatives using traditional synthetic methods with higher yields and short reaction times. Kallitsakis et al. (2013) synthesized two series of coumarin-purines derivatives (series **180** and **181**) via butenylaton of 6- or 7-Hydroxycoumarins (**176**) under basic conditions to afford **177** that was subsequently coupled with alkenylpurines (**178**) using Grubbs catalyst (**179**) (Figure 36). Compounds were tested in the DPPH test, inhibition of linoleic acid lipid peroxidation, soybean lipoxygenase inhibition and inhibition of thrombin [92].

The *in vitro* tests indicated that these compounds have significantly antioxidant activities and the presence of purines and pentenyloxy moiety is very important for the activities of these hybrids. All compounds demonstrated significant antioxidant activities, but the 6-substituted compounds are most promising when compared to the 7-substituted derivatives. The authors concluded that the antioxidant activities

observed in the study can be attributed to the cumulative antioxidant effects of the coumarin ring linked with the purine substituent, but the differences on the substituent pattern may also indicate a different mechanism since the antioxidant activity of non-hydroxylated coumarins can't be explained by the same approach of the hydroxylated coumarins [92].

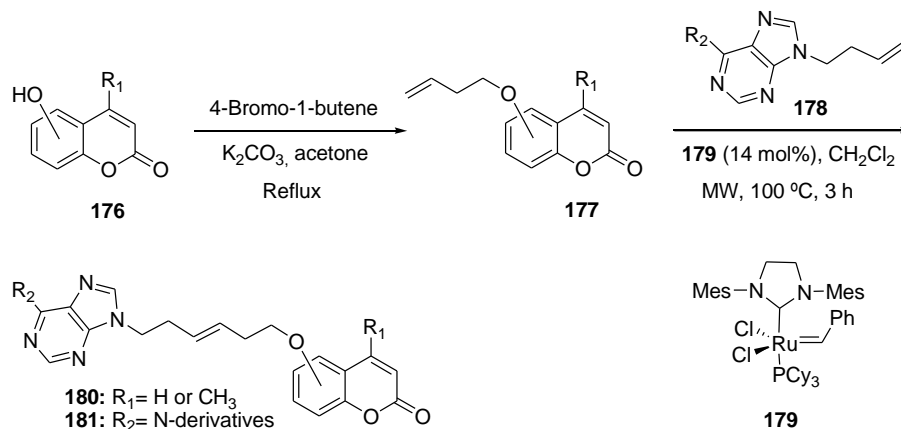


Figure 36. Synthesis of the coumarin-purines derivatives **180** and **181**.

New coumarin-thiazolidinones derivatives were synthesized from 7-hydroxy-4-methylcoumarin **182** according the procedure described in the **Figure 37** and screened for the antioxidant DPPH/ABTS and antibacterial activity. For this synthesis, the intermediate **184** was prepared by esterification of 7-hydroxy-4-methylcoumarin **182** with ethyl 2-bromoacetate (**183**). Hydrazinolysis of **184** with hydrazine hydrate in ethanol at reflux for 4h afforded hydrazide **185**. The reflux of **185** with aromatic aldehydes in ethanol for 4h produces the derivatives **186-189**. Compounds **190-193** were obtained by refluxing **186-189** with thioglycolic acid in 1,4-dioxane with anhydrous ZnCl_2 [82]. The series of coumarin-thiazolidinones **190-193** showed good anti-bacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* and some of the analogs were more active than ampicillin, the standard reference. Compounds **192** and **193** had antioxidant activities in the DPPH and ABTS assays similar to the standard compound Trolox, indicating that in this series the presence of 2,3,4-methoxyl groups or Br substituents at the phenyl ring are very important to enhance the antioxidant activities.

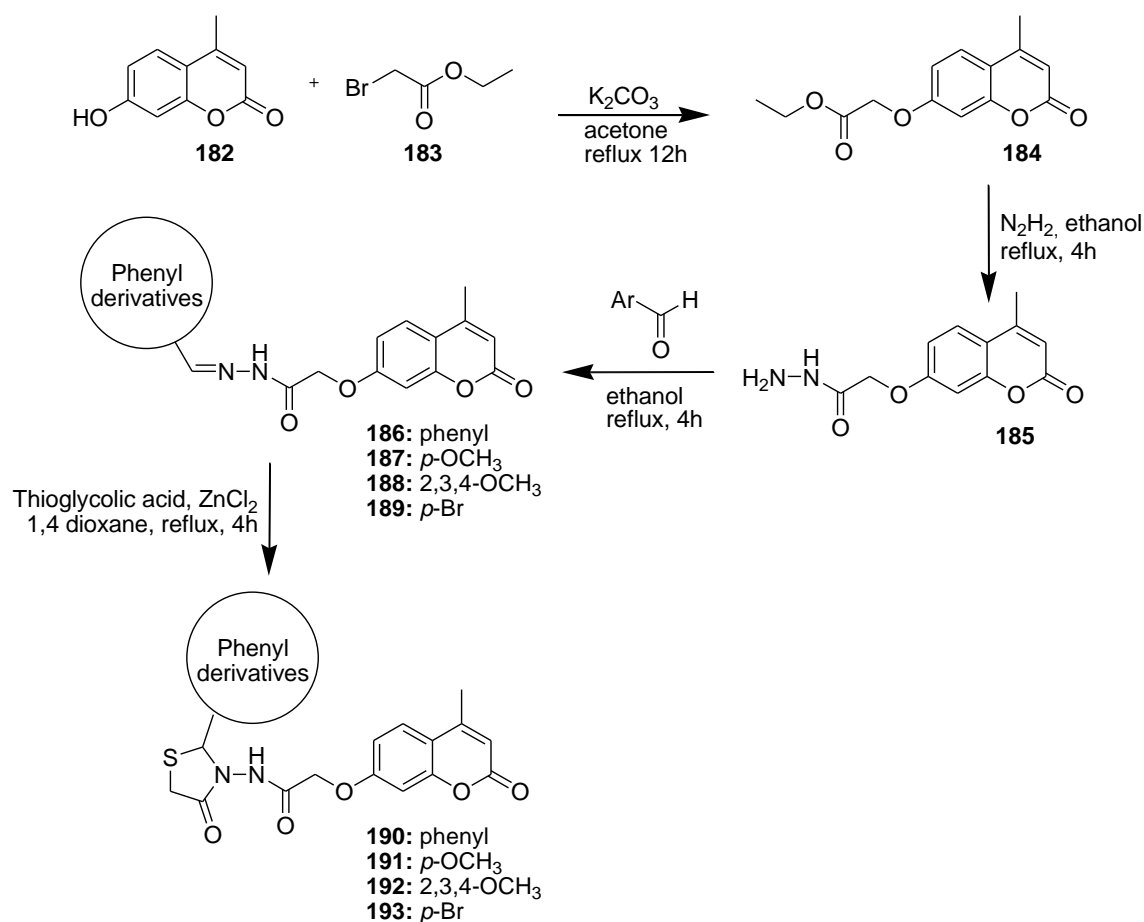


Figure 37. Synthesis of new coumarin-thiazolidinones derivatives.

2.3. Quantitative structure-antioxidant relationships studies

There are few studies that aim to establish quantitative structure-activity relationships (QSARs) in antioxidant coumarins. As reviewed by Kontogiorgis et al. (2005), the ability of several mono- and di- hydroxy/methoxy coumarins in preventing lipid peroxidation may be quantitatively correlated with their LogP values as the lipophilicity of these coumarins inversely correlated with their antioxidant activities. However, the number of hydroxy and methoxycoumarins used to derive the QSAR equation in the study was only thirteen [93] and, therefore, extrapolations based on these results must be made with care.

Alternatively, Razo-Hernández et al. (2014) constructed a QSAR model to predict the antioxidant properties of coumarins based on the data of DPPH radical scavenging activities of sixteen hydroxy/methoxy coumarins. According to the authors, the main factors that correlated with the DPPH antiradical biological activities were the molecular shape, chemical hardness (a density functional theory-

based descriptor of chemical reactivity) and the hydrophilic factor. The hydrophilic factor expresses the ability of a molecule to donate a hydrogen atom [94] and, consequently, may be used to predict the radical scavenging ability of one compound in a similar way to the OH bond dissociation enthalpy that we described before. Again, the size of the dataset may be considered a limiting factor for this work as the quality of the predictions in a QSAR study correlate positively with the size of the dataset used [95].

Mitra et al. (2013) described a descriptor-based QSAR model correlating the antioxidant activity of antioxidant activities of 45 coumarins with five descriptors: **a)** two electronic (3D) descriptors, one referring to the partial positive surface area of the molecule and the other to a density-based 3D shape descriptor and **b)** three topological (2D) descriptors, two atom-centered fragment descriptors and one based on the degree of branching of fragments. Possible interferences in the construction of this QSAR model may come from the fact that the authors built the dataset based on the antioxidant activities reported by three different research groups [96] and, therefore, it is not possible to assure that the variance of the random error was always constant [97].

3. Evaluation of antioxidant activity

It is known that many diseases such as cardiovascular, cancer and neurodegenerative appear and/or develop faster in virtue of increased oxidative damage. Thus, there is an imbalance between antioxidants and oxidant/pro-oxidants triggering the so-called oxidative stress. DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis [98]. For this reason, currently, new molecules with antioxidant capacity are targets of much research. There are many *in vitro* methods, non-biological assays, to evaluate antioxidant activity (DPPH, ORAC, TRAP, FRAP, CUPRAC, ABTS, ABAP), but these tests are few reliable. On the other hand, the assay selected to evaluation in medicinal chemistry will produce results more reliable if it performed with cellular culture.

In the literature, there are a different chemical and biochemical methods described for evaluation of *in vitro* antioxidant activities. These assays are important tools for screening of synthetic compounds [99,100]. As reported by Veselinovic et al., 2014, different *in vitro* assays (DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC) were

employed for assess structure-activity of some coumarins, thus, it is shows that the combination of different methodologies for the assessment of antioxidant activity of compounds is necessary [101].

Numerous studies described that most commonly used methods for *in vitro* determination of antioxidant capacity are based either on non-biological assays [4, 101, 102]. However, a single *in vitro* chemical assay is not adequate and enough to assess the antioxidant properties of compounds, thus it is also recommended that a combination of non-biological assays with methodology that involves a biological assay such as using cell culture [75, 99, 100]. In this line, this review presents two groups tests which can be performed for the measurement of antioxidant capacity.

3.1. Chemical-Based Assays (Models of Non-Biological Assay)

3.1.1. DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

DPPH molecule is characterized as a free radical stable, which does not have to be generated prior to analysis; it is due to the delocalization of the unpaired electron by the whole molecule. In this assay, the purple chromogenic radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) is reduced by antioxidant compounds to pale yellow hydrazine [103]. Thus, this assay is based on the measure of the antioxidant ability of a substance in kidnap radical DPPH reducing it to hydrazine. This reduction is monitored by absorbance decrease, which presents a typical absorption in the range at 515-520 nm in ethanol [103-105]. The mechanism is based on an electron transfer reaction whilst the hydrogen atom abstraction is a marginal reaction, the scavenging capacity against DPPH radical is strongly influenced by the solvent and the pH of reaction. The DPPH assay is widely used in antioxidant screening capacity of pure compounds and complex samples, due for simplicity, reproducibility and commercially available [99, 103-105]. Nevertheless, the results should be interpreted carefully. The steric accessibility of DPPH[•] radical is determinant in reaction, since small molecules that have better access to the radical site have relatively higher antioxidant capacity [99, 107]. On the other hand, many antioxidants that react quickly with peroxy radicals may react slowly due to steric inaccessibility. Furthermore, the results of measurements can be affected by some compounds that absorb in the same DPPH wavelength such as carotenoids [99, 104].

The results of DPPH assay are reported as the efficient concentration (EC_{50}), that is the concentration able to scavenge 50% of the initial DPPH concentration, but the percentage of radical scavenged is dependent of the initial concentration of DPPH' radical [99]. In this context, some articles reported use the absorbance variation or concentration of DPPH' consumed. This absorbance value is interpolated in a curve of a standard antioxidant and the results are expressed as equivalent concentration (Magalhães et al., 2008). In several studies, DPPH assay has been applied for evaluation of the radical scavenging activity of coumarins [4, 107, 108].

3.1.2. FRAP assay (Ferric reducing antioxidant power)

The reaction detects compounds with redox potentials. In this assay measures the capacity of antioxidants sample to reduce the ferric 2,4,6- tripyzidyltriazine complex (Fe III -TPTZ) to ferrous (Fe II -TPTZ) under acidic medium conditions, the acidic pH request is far from the physiological conditions. The complex formed by this reaction has intensely blue colored with maximum absorption at 593 nm. The results are calculated by measuring the absorbance and relating with ferrous ions standard or an antioxidant standard solutions [109, 110]. FRAP assay measures only the reducing capability based upon the ferric ion, which is not relevant to antioxidant activity mechanistically and physiologically, since antioxidants that act by radical quenching, for example, thiols antioxidants will not be measured [99, 110, 111].

3.1.3. CUPRAC assay (Cupric ion reducing antioxidant capacity)

The method is based on the reduction of light-blue colored Cu (II) to yellow-orange colored Cu (I) by antioxidants present in a compound [104]. There are some assays for total antioxidant capacity assessment based on cupric ion reduction that differ in the chelating agent used: bathocuproine and neocuproine. These chelators form stable complexes that have a typical absorption at 450-490 nm [104, 112-114]. According to Apak et al., 2004 the CUPRAC reagent is stable, easily accessible and sensitive toward thiol-type oxidants, unlike the FRAP assay. Furthermore, this reaction is carried out at nearly physiological conditions pH as opposed to the acidic pH of FRAP [112].

3.1.4. ORAC assay (Oxygen radical absorbance capacity)

The oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay is well known and extensively described in literature. This method is based on the property of peroxy radical decrease of fluorescein and phycoerythrin. The antioxidant species react rapidly with free radicals by transfer hydrogen atoms and inhibiting the fluorescence intensity. This inhibition is proportional with antioxidant capacity of samples. In the presence of antioxidants, fluorescein is protected from oxidative degradation [102, 115].

Antioxidant capacity is determined by a decreased rate and amount of product formed over time. Using known concentrations of Trolox, a curve standard is generated and ORAC activity of the sample can be calculated. ORAC values are usually expressed as Trolox unit or equivalents. ORAC assay use fluorescence as measure of oxidative damage. This is an advantage for this assay in relation of other methods of determining antioxidant capacity that use the absorbance measurement, since has less interference to color compounds [102, 116]. According to López-Alarcón et al., 2013 this assay is one of the most employed to estimate antioxidant capacity among methodologies developed [114].

Perez-Cruz et al., 2013 evaluated the antioxidant capacity of novel hydroxy-coumarin-chalcone hybrid compounds by ORAC assay and they also using to biological assays, culture cells, to evaluate the cytotoxicity and cytoprotection capacity against oxidative stress [75].

3.1.5. ABTS assay (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) or TEAC assay (Trolox equivalent antioxidant capacity)

The principle of ABTS method is the formation of a radical which oxidizes the ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) to a radical cation, ABTS^{•+}. In this line, the antioxidant activity of the compounds is determined by the discoloration of the ABTS by measuring the reduction of the radical cation as the percentage inhibition of absorbance at that can be measured by spectrophotometric methods [99, 100, 117]. The absorbance of the reaction is compared to Trolox standard, and the results are expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity. This assay has been applied to investigating the antioxidant activities of natural products. Previous studies, the radical scavenging activity of the series of coumarin

derivatives were assessed using two different assay systems: ABTS and DPPH [118, 119].

3.1.6. TRAP assay (total reactive antioxidant potential)

This assay consists in generating peroxy radicals by thermal decomposition at 37°C of AAPH or ABAP [2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride]. The basic reactions of the assay are similar to those of ORAC. Antioxidant activity has been determined as time to consume all of the antioxidant and TRAP values are usually expressed as a lag time or reaction time of the sample compared to corresponding times for Trolox [115].

Arora et al., 1998 evaluated the abilities of some flavonoids to scavenge peroxy radicals generated by the aqueous-phase azo compound 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) [55]. Recently, our research group reported analyses using ABAP, which provided more specific information concerning the type of radicals scavenged by the coumarins, indicating that coumarins were able to act against the peroxy radicals [4].

3.1.7. FC assay (Folin-Ciocalteu reducing capacity)

The chemistry behind the FC assay relies on the transfer of electrons in alkaline medium from phenolic compounds and other reducing species to molybdenum, forming blue complexes that can be detected at 750-765 nm [120]. As reference standard compound is used gallic acid and the results are expressed as gallic acid equivalents. The FC method is simple method, reproducible for assessment of dietary antioxidant capacity, since the reagent is commercially available and can be useful in characterizing and standardizing natural products, but this assay has some limitations. It necessary highlights that, the blue complex formed are independent of the structure of phenolic compounds. Therefore, this assay is not suitable for determination of total phenolic content, unless interfering species are removed. There is always the controversy over what is being detected in total antioxidant capacity assays only phenols, since the FC reagent is non-specific to phenolic compounds [99, 115, 120].

3.2. Biological Assays

The studies *in vitro*, without using cell culture, to evaluate antioxidant activity of molecules are rapid, simple and low cost, however, do not correspond in fact with bioactivity of molecules, thus cannot be extrapolated to performance *in vivo*. For this reason, it is recommended increasingly using cell culture assays for evaluation of antioxidant capacity in medicinal chemistry because cellular antioxidant activity assays are considered intermediate testing methods compared with chemical-based assays and animal models and human studies [121].

The choice of cell line is important to studies on antioxidant capacity. Thus healthy cell lines should be most selected because the response against new molecules in tumor cell lines may be different from those observed in healthy cell lines. However, López-Alarcón et al. reported that several cell types have been performed, e.g. HepG2, Caco-2, human gastric adenocarcinoma cell line, vascular endothelial cells, human macrophage cell line and human lung fibroblasts.

The assay widely performed in cellular antioxidant activity is DCFH-DA assay which is based in DCFH₂-DA that after permeate the membrane and to be inside of cell will be hydrolyzed by endogenous esterases. AAPH decomposition produces ROO[•] that oxidize DCFH₂ to fluorescent dichlorofluorescein DCF. Thus, higher the antioxidant capacity of molecule, lower the DCF formation and lower fluorescence [114].

The tests to evaluate cellular antioxidant capacity of coumarins and their derivatives could follow the suggestion from **Figure 38**. Thus, if many newly synthesized compounds with potential antioxidant capacity, it is interesting to perform chemical-based assays. However, as it is a screening test is recommended to carry out 2 to 3 different tests. From these results, those more promising in two assays (lower EC₅₀) should follow the testing cell lines. For this, DCFH-DA assay is the first choice. Besides this, it can be performed the test with H₂O₂ and SRB assay that assesses viability by protecting via oxidative stress. To advance in studies on antioxidant mechanism is possible to assess damage of lipid (MDA), protein (protein carbonyls) and DNA (comet assay), and also antioxidant enzymes and antioxidant, e.g. GSH.

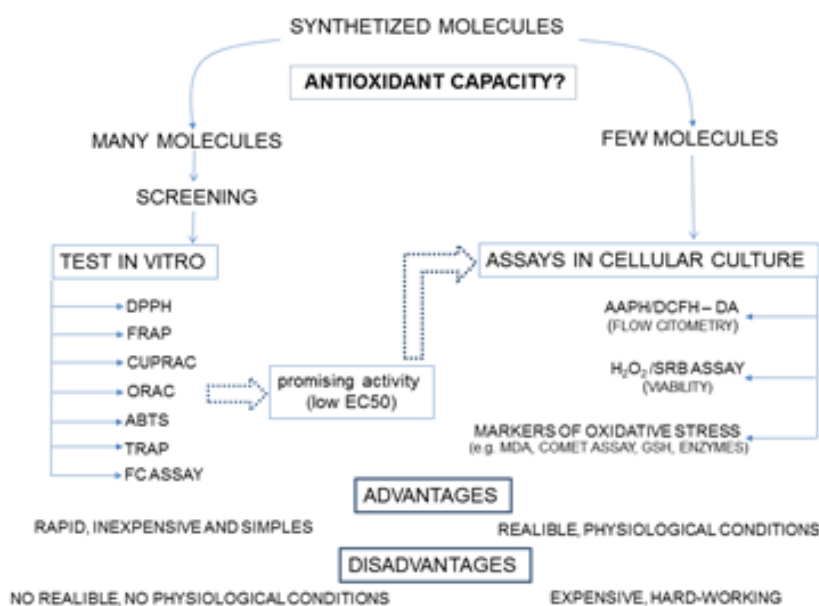


Figure 38: Tests performed to assess antioxidant capacity of molecules; screening tests allow selecting of the most promising for cell culture assays which are more reliable and allow studies on potential mechanisms of antioxidant activity. AAPH 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride; ATBS 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate); SRB assay (sulphorhodamine); DCFH-DA dichlorofluorescein–diacetate; MDA (Malondialdehyde); GSH (reduced glutathione).

Conclusions

Increased oxidative damage is involved in the appearance and/or progression of many diseases as cardiovascular, cancer, inflammatory and neurodegenerative processes. Thus, the discovery of efficient antioxidant compounds is an interestingly strategy to prevent/treat several important diseases. In this context, hydroxycoumarins is an important class of natural and synthetic compounds because it can reduce oxidative damage due to its free radical scavenging ability and metal chelating properties. Recently, many groups reported that most complex substituted non-hydroxylated coumarins are also excellent antioxidant compounds with potential to treat different diseases. Considering the broad diversity of this class, many approaches are used to prepare these compounds, however the 2*H*-chromen-2-one core is generally synthesized using three different and classical reactions: Knoevenagel, Perkin and Pechmann. Further modification of this core can lead to wide chemical diversification, generating different compound libraries of hits candidates. In order to evaluate the antioxidant potential, different chemical and biochemical methods are available. It is recommended to carry out a combination of assays to confirm the antioxidant activity. In this review, we presented different approaches to design, prepare and access the antioxidant activity of coumarins. We

hope that optimization efforts of these new libraries of coumarins could lead to discovery of new antioxidant-based drugs.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian funding agencies CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) for the financial support.

References:

- [1] Evans, B.E.; Rittle, K.E.; Bock, M.G.; DiPardo, R.M.; Freidinger, R.M.; Whitter, W.L.; Lundell, G.F.; Veber, D.F.; Anderson, P.S. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*(12), 2235–2246.
- [2] Gómez-Outes, A.; Suárez-Gea, M.L.; Calvo-Rojas, G.; Lecumberri, R.; Rocha, E.; Pozo-Hernández, C.; Terleira-Fernández, A.I.; Vargas-Castrillón, E. Discovery of anticoagulant drugs: a historical perspective. *Curr. Drug Discovery Technol.*, **2012**, *9*(2), 83-104.
- [3] Matos, M. J.; Viña, D.; Vazquez-Rodriguez, S.; Uriarte, E.; Santana, L. Focusing on new monoamine oxidase inhibitors: differently substituted coumarins as an interesting scaffold. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2012**, *12*(20), 2210-2239.
- [4] Vianna, D. R.; Bubols, G.; Meirelles, G.; Silva, B.; Rocha, A.; Lanznaster, M.; Monserrat, J. S.; Garcia, S. C.; von Poser, G.; Eifler-Lima, V. L. Evaluation of the antioxidant capacity of synthesized coumarins. *Int. J. Mol. Sci.*, **2012**, *13*, 7260-7270.
- [5] Vianna, D.; Hamerski, L.; Figueiró, F.; Bernardi, A.; Visentin, L.; Teixeira, H.; Pires, E.; Eifler-Lima, V.L.; Salbego, C.; Batastini, A. M.; von Poser, G.; Pinto, A. Selective cytotoxicity and apoptosis induction in glioma cell lines by 5-oxygenated-

6,7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon* species. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *57*, 268-274.

[6] Matos, M.J.; Vazquez-Rodriguez, S.; Santana, L.; Uriarte, E.; Fuentes-Edfuf, C.; Santos, Y.; Muñoz-Crego, A. Looking for new targets: simple coumarins as antibacterial agents. *Med. Chem.*, **2012**, *8*(6), 1140-1145.

[7] Sweetman, S. *Acenocoumarol (Martindale)*, electronic version; Thomson Micromedex: Greenwood Village, Colorado, **2006**.

[8] Sweetman, S. *Dicoumarol (Martindale)*, electronic version; Thomson Micromedex: Greenwood Village, Colorado, **2006**.

[9] Sweetman, S. *Phenprocoumon (Martindale)*, electronic version; Thomson Micromedex: Greenwood Village, Colorado, **2006**.

[10] Sweetman, S. *Warfarin (Martindale)*, electronic version; Thomson Micromedex: Greenwood Village, Colorado, **2006**.

[11] Sweetman, S. *Carbocromen Hydrochloride (Martindale)*, electronic version; Thomson Micromedex: Greenwood Village, Colorado, **2006**.

[12] Sweetman, S. *Cloricromen (Martindale)*, electronic version; Thomson Micromedex: Greenwood Village, Colorado, **2006**.

[13] Sweetman, S. *Hymecromone (Martindale)*, electronic version; Thomson Micromedex: Greenwood Village, Colorado, **2006**.

[14] Sweetman, S. *Novobiocin (Martindale)*, electronic version; Thomson Micromedex: Greenwood Village, Colorado, **2006**.

[15] Gommans, J.; Hijzen, T.H.; Maes, R.A.; Olivier, B. Discriminative stimulus properties of eltoprazine. *Life Sci.*, **1997**, *61*(1), 11-19.

- [16] Olivier, B.; van Oorschot, R. 5-HT_{1B} receptors and aggression: a review. *Eur. J. Pharmacol.* **2005** 526(1-3), 207-217.
- [17] Winter, J.C.; Helsley, S.E.; Rabin, R.A. The discriminative stimulus effects of KA 672, a putative cognitive enhancer: evidence for a 5-HT_{1A} component. *Pharmacol., Biochem. Behav.* **1998**, 60(3), 703-707.
- [18] Hoerr, R; Noeldner, M. Ensaculin (KA-672 HCl): a multitransmitter approach to dementia treatment". *CNS Drug Rev.* **2002**, 8(2), 143-158.
- [19] Signore, G.; Nifosì, R.; Albertazzi, L.; Bizzarri, R. A novel coumarin fluorescent sensor to probe polarity around biomolecules. *J. Biomed. Nanotech.* **2009**, 5, 722–729.
- [20] Li, H.; Li, C.; Chen, Z. *In: Advances in Chemical Sensors*; Wang, W., Ed; InTech: Rijeka, **2012**, pp. 212-150.
- [21] Lin, W.; Yuan, L.; Feng, J.; Cao, X. A fluorescence-enhanced chemodosimeter for Fe³⁺ based on hydrolysis of bis(coumarinyl) schiff base. *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 2689.
- [22] Wang, J.; Qian, X.; Cui, J. Detecting Hg²⁺ ions with an ICT fluorescent sensor molecule: Remarkable emission spectra shift and unique selectivity. *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 4308.
- [23] Flora, S.J.S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2009** 2(4), 191-206.
- [24] Fylaktakidou, K.C.; Hadjipavlou-Litina, D.J.; Litinas, K.E.; Nicolaidis, D.N. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr. Pharm. Des.*, **2004**, 10(30), 3813-33.

- [25] Kostova I. Synthetic and natural coumarins as antioxidants. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2006**, 6(4), 365-74.
- [26] Kostova, I.; Bhatia, S.; Grigorov, P.; Balkansky, S.; Parmar, V.S.; Prasad, A.K.; Saso, L. Coumarins as antioxidants. *Curr. Med. Chem.*, **2011**, 18(25), 3929-3951.
- [27] Bubols, G.B.; Vianna, D.R.; Medina-Rejon, A.; von Poser, G.; Lamuela-Raventos, R.M.; Eifler-Lima, V.L.; Garcia, S.C. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2013**, 13(3), 318-334.
- [28] Borges, M.F.M.; Roleira, F.M.F.; Milhazes, N.J.S.P.; Villares, E.U.; Penin, L.S. In: *Frontiers in Medicinal Chemistry*; Atta-Ur-Rahman, Ed; Bentham Science Publishers: Sharjah, **2009**, vol. 4, pp. 23-85.
- [29] Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 887-916.
- [30] Majumber, P.L.; Majumber, S. In: *Further evidence of mechanism of formation of coumarin by Perkin reaction from salicylaldehyde and a novel synthesis of 1,1-diphenyl-2-(2'-hydroxyphenyl)ethene from O- α,α -diphenylacetylsalicylaldehyde with Et₃N*, 11th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, November, 2007; Li, S.-K., Ed; MDPI: Basel, Switzerland, **2007**; a013.
- [31] Lanman, B.A. In: *Name Reactions in Heterocyclic Chemistry-II*; Li, J.J., Ed; 1st ed.; John Wiley & Sons: New Jersey, **2011**, pp. 454-469.
- [32] Li, J.J.; Corey, E.J. *Name Reactions in Heterocyclic Chemistry II*, 1st ed.; John Wiley & Sons: New Jersey, **2011**.
- [33] Martínez-Martínez, F.J.; Razo-Hernández, R.S.; Peraza-Campos, A.L.; Villanueva-García, M.; Sumaya-Martínez, M.T.; Cano, D.J.; Gómez-Sandoval, Z.

Synthesis and *in Vitro* Antioxidant Activity Evaluation of 3-Carboxycoumarin Derivatives and QSAR Study of Their DPPH• Radical Scavenging Activity. *Molecules*, **2012**, *17*, 14882-14898.

[34] Vazquez-Rodriguez, S.; Figueroa-Guñez, R.; Matos, M.J.; Santana, L.; Uriarte, E.; Lapier, M.; Mayac, J.D.; Olea-Azar, C. Synthesis of coumarin–chalcone hybrids and evaluation of their antioxidant and trypanocidal properties. *Med. Chem. Commun.*, **2013**, *4*, 993-1000.

[35] Matos, M.J.; Pérez-Cruz, F.; Vazquez-Rodriguez, S.; Uriarte, E.; Santana, L.; Borges, F.; Olea-Azar, C. Remarkable antioxidant properties of a series of hydroxy-3-arylcoumarins. *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 3900–3906.

[36] Kabeya, L.M.; Marchi, A.A.; Kanashiro, A.; Lopes, N.P.; Silva, C.H.T.P.; Pupo, M.T.; Lucisano-Valim, Y.M. Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenylcoumarin derivatives: Synthesis and structure–activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 1516-1524.

[37] Marchi, A.A.; Castilho, M.S.; Nascimento, P.G.B.; Archanjo, F.C.; Ponte, G.D.; Oliva, G.; Pupo, M.T. New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 4823-4833.

[38] Yang, J.; Liu, G.-Y.; Dai, F.; Cao, X.-Y.; Kang, Y.-F.; Hu, L.-M.; Tang, J.-J.; Li, X.-Z.; Li, Y.; Jin, X.-L.; Zhou, B. Synthesis and biological evaluation of hydroxylated 3-phenylcoumarins as antioxidants and antiproliferative agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 6420–6425.

[39] Zhang, Y.; Zou, B.; Chen, Z.; Pan, Y.; Wang, H.; Liang, H.; Yi, X. Synthesis and antioxidant activities of novel 4-Schiff base-7-benzyloxy-coumarin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 6811-6815.

- [40] Cavar, S.; Kovac, F.; Maksimovic, M. Evaluation of the antioxidant activity of a series of 4-methylcoumarins using different testing methods. *Food Chem.*, **2012**, *133*, 930-937.
- [41] Cavar, S.; Kovac, F. The Oxyfunctionalization of 4-Methylcoumarins Using Dimethyldioxirane. *Int. J. Chem. Kinet.* **2009**, *41*, 414-420.
- [42] Cavar, S.; Kovac, F.; Maksimovic, M. Synthesis and antioxidant activity of selected 4-methylcoumarins. *Food Chem.*, **2009**, *117*, 135-142.
- [43] Lin, M.-H.; Chou, Y.-S.; Tsai, Y.-J.; Chou, D.-S. Antioxidant Properties of 5,7-Dihydroxycoumarin Derivatives in vitro Cell-free and Cell-containing Systems. *J. Exp. Clin. Med.*, **2011**, *3*, 126-131.
- [44] Lin, C.-M.; Huang, S.-T.; Lee, F.-W.; Kuo, H.-S.; Lina, M.-H. 6-Acyl-4-aryl/alkyl-5,7-dihydroxycoumarins as anti-inflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 4402-4409.
- [45] Khoobi, M.; Foroumadi, A.; Emami, S.; Safavi, M.; Dehghan, G.; Alizadeh, B.H.; Ramazani, A.; Ardestani, S.K.; Shafiee, A. Coumarin-Based Bioactive Compounds: Facile Synthesis and Biological Evaluation of Coumarin-Fused 1,4-Thiazepines. *Chem. Biol. Drug. Des.*, **2011**, *78*, 580-586.
- [46] Murray, P.D.; Garnic, J.D.; Bettmann, M.A. Pharmacology of angioplasty and intravascular thrombolysis. *AJR Am. J. Roentgenol.* **1982**, *139*(4), 795-803.
- [47] Kuster, R.M.; Rocha, L.M. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*; Simões, C.O.S., Ed.; Editora da UFSC: Florianópolis, **2003**; Vol. 5, pp. 537-556.
- [48] Khan, N.; Sharma, S.; Sultana, S. Attenuation of potassium bromate-induced nephrotoxicity by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats: chemoprevention against free radical-mediated renal oxidative stress and tumor promotion response. *Redox Rep.*, **2004**, *9*(1), 19-28.

- [49] Lake, B.G. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food. Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 423-453.
- [50] Cholerton, S.; Idle, M.E.; Vas, A.; Gonzalez, F.J.; Idle, J.R. Comparison of a novel thin-layer chromatographic-fluorescence detection method with a spectrofluorometric method for the determination of 7-hydroxycoumarin in human urine. *J. Chromatogr.* **1992**, *575*(2), 325-330.
- [51] Yu, W.; Liu, Z.; Liu, Z. Antioxidant effect of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of linoleic acid in micelles. *J. Chem. Soc., 1999, Perkin Trans. 2*, 969–974.
- [52] Roginsky, V.A.; Barsukova, T.K.; Remorova, A.A.; Bors, W. Moderate Antioxidative Efficiencies of Flavonoids During Peroxidation of Methyl Linoleate in Homogeneous and Micellar Solution. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1996**, *73*, 777-86.
- [53] Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, *20*, 933.
- [54] Ogata, M.; Hoshi, M.; Shimotohno, K.; Urano, S.; Endo, T. Antioxidant activity of magnolol, honokiol, and related phenolic compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1997**, *74*, 557.
- [55] Arora, A.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.*, **1998**, *24*, 1355.
- [56] Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*, 1035.
- [57] Zhang, H.Y.; Sun, Y.M.; Wang, X.L. Substituent effects on O-H bond dissociation enthalpies and ionization potentials of catechols: A DFT study and its implications in

the rational design of phenolic antioxidants and elucidation of structure–activity relationships for flavonoid antioxidant. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 502.

[58] Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, **1988**, *37*, 785.

[59] Stephens, P.J.; Devlin, F.J.; Chabalowski, C.F.; Frisch, M.J. *Ab Initio* Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *J. Phys. Chem.*, **1994**, *98*, 11623.

[60] Zhang, H.; Wang, L. Theoretical elucidation of structure–activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. *J. Mol. Struct.*, **2004**, *673*, 199–202.

[61] Denisova, T. G.; Denisov, E. T. Dissociation energies of O-H bonds in natural antioxidants. *Russ. Chem. B.*, **2008**, *57*(9), 1858-1866.

[62] Thuong, P.T.; Hung, T.M.; Ngoc, T.M.; Ha, T.; Min, B.S.; Kwack, S.J.; Kang, T.S.; Choi, J.S.; Bae K. Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure-activity relationships. *Phytother Res.* **2010**, *24*(1), 101-6.

[63] Xiao, C.; Luo, X.Y.; Li, D.J.; Lu, H.; Liu, Z.Q.; Song, Z.G.; Jin, Y.H. Synthesis of 4-methylcoumarin derivatives containing 4,5-dihydropyrazole moiety to scavenge radicals and to protect DNA. *Eur. J. Med Chem.*, **2012**, *53*, 159-67.

[64] Thomas, F. In: *Stable Radicals: fundamentals and applied aspects of odd-electron compounds*; Hicks, R., Ed; 1st ed.; John Wiley & Sons: New Jersey, **2010**, pp. 281-316.

[65] Steffan, B.; Wätjen, W.; Michels, G.; Niering, P.; Wray, V.; Ebel, R.; Edrada, R.; Kahl, R.; Proksch, P. Polyphenols from plants used in traditional Indonesian medicine (Jamu): uptake and antioxidative effects in rat H4IIE hepatoma cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2005**, *57*(2), 233-240.

[66] Gacche, R.N.; Jadhav, S.G. Antioxidant Activities and Cytotoxicity of Selected Coumarin Derivatives: Preliminary Results of a Structure Activity Relationship Study Using Computational Tools. *J. Exp. Clin. Med.* **2012**, *4*(3), 165-169.

[67] Senthilkumar, S.; Nath, S.; Pal, H. Photophysical Properties of Coumarin-30 Dye in Aprotic and Protic Solvents of Varying Polarities. *Photochem. Photobiol.*, **2004**, *80*, 104-111

[68] Staunton, J. In: *Comprehensive Organic Chemistry: the synthesis and reactions of organic compounds*; Barton, D.; Ollis, D., Ed; 1st ed.; Pergamon Press: London, **1979**, vol. 4, pp. 629-658.

[69] Rodríguez, S.A.; Nazareno, M.A.; Baumgartner, M.T. Effect of different C3-aryl substituents on the antioxidant activity of 4-hydroxycoumarin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*(21), 6233-6238.

[70] Arora, A.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.*, **1998**, *24*(9), 1355-63.

[71] Mendes, A.P.S.; Borges, R.S.; Neto, A.M.C.; de Macedo, L.G.M.; da Silva, A.B.F. The basic antioxidant structure for flavonoid derivatives. *J. Mol. Model.*, **2012**, *18*, 4073–4080

[72] Jeong, J.M.; Choi, C.H.; Kang, S.K.; Lee, I.H.; Lee, J.Y.; Jung, H. Antioxidant and chemosensitizing effects of flavonoids with hydroxy and/or methoxy groups and structure-activity relationship. *J. Pharm.* **2007**, *10*(4), 537-546.

[73] dos Santos, R.M.B.; Simões, J.A.M. Energetics of the O–H Bond in Phenol and Substituted Phenols: A Critical Evaluation of Literature Data. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1998**, *27*(3), 707-739.

- [74] Kadhum, A.A.H.; Al-Amiery, A.A.; Musa, A.-Y.; Mohamad, A.B. The Antioxidant Activity of New Coumarin Derivatives. *Int. J. Mol. Sci.*, **2011**, *12*, 5747-5761.
- [75] Pérez-Cruz, F.; Vazquez-Rodriguez, S.; Matos, M.J.; Herrera-Morales, A.; Villamena, F.A.; Das, A.; Gopalakrishnan, B.; Olea-Azar, C.; Santana, L.; Uriarte E. Synthesis and electrochemical and biological studies of novel coumarin-chalcone hybrid compounds. *J. Med. Chem.* **2013** *56*(15), 6136-6145.
- [76] Goudgaon, N.M.; U, S.B.; Dhage, D. Synthesis and biological activities of 3-{6-[3-(substituted phenyl)-1-phenyl-1*H*-pyrazol-4-yl]-2-thioxo-1,2,5,6-tetrahydropyrimidin-4-yl}-2*H*-chromen-2-ones. *Heterocycl. Lett.* **2012**, *2*, 154-161.
- [77] Bhatnagar, A.; Sharma, P.K.; Kumar, N.; Upadhyay, A. Synthesis and *in vitro* evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of 3-[4,5-dihydro-(5-substituted phenyl)-1*H*-pyrazol-3-yl]-2*H*-chromen-2-one derivatives. *Pharm. Chem. J.*, **2012**, *46*, 482-487.
- [78] Xi, G.-L., Liu, Z.-Q. Antioxidant effectiveness generated by one or two phenolic hydroxyl groups in coumarin-substituted dihydropyrazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 385-393.
- [79] Aragade, P.; Venkatnarayanan, R.; Patil, P. Synthesis and Biological Evaluation of a Novel Series of Pyrazolylcoumarins as Anti-Inflammatory and Antioxidant Agents. *Drug Res.*, **2013**, *63*, 28-33.
- [80] Kenchappa, R.; Bodke, Y.D.; Peethambar, S.K.; Telkar, S.; Bhovi, V.K. Synthesis of β -amino carbonyl derivatives of coumarin and benzofuran and evaluation of their biological activity. *Med. Chem. Res.*, **2013**, *22*, 4787-4797.
- [81] Abdel-Rahman, A.A.-H.; Abdel-Megied, A.E.-S.; Hawata, M.A.M.; Kasem, E.R.; Shabaan, M.T. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Some Chalcones and Their Derived Pyrazoles, Pyrazolines, Isoxazolines, and 5,6-Dihydropyrimidine-2-(1*H*)-thiones. *Monatsh. Chem.*, **2007**, *138*, 889-897.

[82] Hamdi, N.; Al-Ayed, A.S.; Said, R.B.; Fabienne, A. Synthesis and Characterization of New Thiazolidinones Containing Coumarin Moieties and Their Antibacterial and Antioxidant Activities. *Molecules* **2012**, *17*(8), 9321-9334.

[83] Melagraki, G.; Afantitis, A.; Markopoulou, O.I.; Detsi, A.; Koufaki, M.; Kontogiorgis, C.; Litina, D.J.H. Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*(7), 3020-3026.

[84] Trost, B.M.; Fleming, I. *Comprehensive Organic Synthesis*, 1st ed.; Elsevier: Oxford, **1991**.

[85] Balabani, A.; Hadjipavlou-Litina, D.J.; Litinas, K.E.; Mainou, M.; Tsironi, C.-C.; Vronteli, A. Synthesis and biological evaluation of (2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-2H chromen-2-ones as free radical scavengers. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, *46*, 5894-5901.

[86] Amin, K.M.; Awadalla, F.M.; Eissa, A.A.M.; Abou-Seri, S.M.; Hassan, G.S. Design, synthesis and vasorelaxant evaluation of novel coumarin-pyrimidine hybrids. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6087-6097.

[87] Datta, P.; Mukhopadhyay, A.P.; Manna, P.; Tiekink, E.R.T.; Sil, P.C.; Sinha, C. Structure, photophysics, electrochemistry, DFT calculation, and in-vitro antioxidant activity of coumarin Schiff base complexes of Group 6 metal carbonyls. *J. Inorganic Biochem.*, **2011**, *105*(4), 577-588.

[88] Xiao, C.; Luo, X.-Y.; Li, D.-J.; Lu, H.; Liu, Z.-Q.; Song, Z.-G.; Jin Y.-H. Synthesis of 4-methylcoumarin derivatives containing 4,5-dihydropyrazole moiety to scavenge radicals and to protect DNA. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *53*, 159-167.

[89] Traven, V.F. New Synthetic Routes to Furocoumarins and Their Analogs: A Review. *Molecules*, **2004**, *9*, 50-66.

- [90] Traven, V.F.; Chibisova, T.A. New Methods of Synthesis of 4-Methylangelicin. *Mendeleev Commun.* **1995**, *1*, 21.
- [91] Renuka, N.; Ajay, K. Synthesis and biological evaluation of novel formyl-pyrazoles bearing coumarin moiety as potent antimicrobial and antioxidant agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6406-6409.
- [92] Kallitsakis, M.G.; Hadjipavlou-Litina, D.J.; Litinas, K.E. Synthesis of purine homo-N-nucleosides modified with coumarins as free radicals scavengers. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28*(4), 765-775.
- [93] Kontogiorgis, A.C.; Pontiki, A.E.; Hadjipavlou-Litina, D. A Review on Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs) of Natural and Synthetic Antioxidants Compounds. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 563-574.
- [94] Razo-Hernández, R. S.; Pineda-Urbina, K.; Velazco-Medel, M.A.; Villanueva-García, M.; Sumaya-Martínez, M.T.; Martíne-Martíne, F.J.; Gómez-Sandoval, Z. QSAR study of the DPPH radical scavenging activity of coumarin derivatives and xanthine oxidase inhibition by molecular docking. *Cent. Eur. J. Chem.* **2014**, *12*(10), 1067-1080.
- [95] Gedeck, P.; Rohde, B.; Bartels, C. QSAR: how good is it in practice? Comparison of descriptor sets on an unbiased cross section of corporate data sets. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*(5), 1924-1936.
- [96] Mitra, I.; Saha, A.; Roy, K. Predictive Modeling of Antioxidant Coumarin Derivatives Using Multiple Approaches: Descriptor-Based QSAR, 3D-Pharmacophore Mapping, and HQSAR. *Sci Pharm.* **2013**, *81*(1), 57-80.
- [97] Jaworska, J.; Nikolova-Jeliazkova, N.; Aldenberg T. QSAR applicability domain estimation by projection of the training set descriptor space: a review. *Altern. Lab. Anim.* **2005**, *33*(5), 445-459.

- [98] Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Gold, L.S. DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **1993**, *5*:35-44.
- [99] Magalhães, L.M; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta.* **2008**, *14*, 1-19.
- [100] Moon, J.; Shibamoto, T. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1655-1666.
- [101] Veselinović, J.B.; Veselinović, A.M.; Vitnik, Ž.J.; Vitnik, V.D.; Nikolić, G.M. Antioxidant properties of selected 4-phenyl hydroxycoumarins: Integrated *in vitro* and computational studies. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *214*, 49-56.
- [102] Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619-4926.
- [103] Foti, M.C.; Daquino, C.; Geraci, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2309-2314.
- [104] Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841-1856.
- [105] Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Moyá, M.L.; Troncoso, A.M.; García-Parrilla, M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* **2007**, *71*, 230-235.
- [106] Torres, R.; Faini, F.; Modak, B.; Urbina, F.; Labbe, C.; Guerrero, J. Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 984-987.

- [107] Lin, H.; Tsai, S.; Chen, C.; Chang, Y.; Lee, C.; Lai, Z.; Lin, C. Structure activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 1416-1425.
- [108] Svinyarov, I.; Bogdanov, M.G. One-pot synthesis and radical scavenging activity of novel polyhydroxylated 3-arylcoumarins. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *78*, 198-206.
- [109] Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*(1):70-76.
- [110] Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*(8), 3396-402.
- [111] Pinchuk, I.; Shoval, H.; Dotan, Y.; Lichtenberg, D. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem. Phys. Lipids.* **2012**, *165*(6), 638-47.
- [112] Apak, R.; Güçlü, K.; Ozyürek, M.; Karademir, S.E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*(26):7970-81.
- [113] Campos, C.; Guzmán, R.; López-Fernández, E.; Casado, A. Evaluation of the copper (II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: The CUPRAC–BCS assay. *Anal. Biochem.* **2009**, *392*, 37-44.
- [114] López-Alarcón, C.; Denicola, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta.* **2013**, *6*, 763, 1-10.

- [115] Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290-4302.
- [116] Becker, K.; Schroecksnadel, S.; Gostner, J.; Zaknun, C.; Schennach, H.; Uberall, F.; Fuchs, D. Comparison of *in vitro* tests for antioxidant and immunomodulatory capacities of compounds. *Phytomedicine* **2014**, *21*, 164-171.
- [117] Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Ynag, M.; Rice-Evance, C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237.
- [118] Khoobi, M.; Emami, S.; Dehghan, G.; Foroumadi, A.; Ramazani, A.; Shafiee, A. Synthesis and free radical scavenging activity of coumarin derivatives containing a 2-methylbenzothiazoline motif. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2011**, *344*, 588-594.
- [119] Xi, G.L.; Liu, Z.Q. Antioxidant effectiveness generated by one or two phenolic hydroxyl groups in coumarin-substituted dihydropyrazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 385-393.
- [120] Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamanuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocateau reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152-178.
- [121] Liu, R.H.; Finley, J. Potential cell culture models for antioxidant research. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*(10), 4311-4314.