

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

MAIARA CORREA DE MORAES

**TESE DE DOUTORADO
SÍNTESE, DIVERSIDADE ESTRUTURAL E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
COMPOSTOS HÍBRIDOS URACIL-CUMARINAS**

CAXIAS DO SUL

2020

MAIARA CORREA DE MORAES

TESE DE DOUTORADO
SÍNTESE, DIVERSIDADE ESTRUTURAL E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE
COMPOSTOS HÍBRIDOS URACIL-CUMARINAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutora em Biotecnologia, sob orientação do Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva.

CAXIAS DO SUL

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

M827s Moraes, Maiara Correa de

Síntese, diversidade estrutural e atividade antitumoral de compostos híbridos uracil-cumarinas [recurso eletrônico] / Maiara Correa de Moraes. – 2020.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.

Orientação: Thiago Barcellos da Silva.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Uracil. 2. Compostos bioativos. 3. Biotecnologia. I. Silva, Thiago Barcellos da, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 547.854

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

MAIARA CORREA DE MORAES

**SÍNTESE, DIVERSIDADE ESTRUTURAL E ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE COMPOSTOS HÍBRIDOS URACIL-
CUMARINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando à obtenção do título de Doutora em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva

TESE APROVADA EM 20 DE AGOSTO DE 2020.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Barcellos da Silva

Profª. Dra. Vera Lucia Eifler-Lima

Prof. Dr. Eder João Lenardão

Prof. Dr. Leandro Tasso

Dedico essa tese a minha grande família

Em especial...

Ao meu amado Pai Noé que não está mais presente fisicamente, mas estará para sempre no meu coração e memória.

A minha amada Mãe Helenir que mesmo de longe sempre me deu forças e esteve comigo de coração e pensamento.

Vocês que sempre foram a minha base e fizeram tudo o que puderam para que eu chegasse aqui hoje, sempre apoiando as minhas escolhas.

Por todo amor e carinho que sempre recebi.

Muito obrigada!

Ao meu amado marido Mateus Both por todo apoio, carinho e companherismo que tenho contigo. Por nunca me deixar desistir e ser sempre uma fonte de paz nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos Vinícius, Laura, Alexandre, Silvio, Cuca e Lili...

Obrigada por todo apoio e amor.

Aos meus amigos, família que eu escolhi...

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Thiago Barcellos da Silva, pela orientação, paciência e apoio durante o trabalho desenvolvido, meu sincero agradecimento.

À Universidade de Caxias do Sul pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

Ao Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, pelo apoio que recebi enquanto servidora da instituição para que eu pudesse me qualificar.

À CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos meus colegas do LBIOP Aline Schio, Pauline Rosales, Luana Crocolli, Maria Gabriele Delagustin, Vinicius Molon, Paulo dos Santos, Sidnéia Danetti, Marilda Chiarello, Manuela Melin e Gabriela Antonioli, pelo convívio diário, cafés, brincadeiras e trabalho.

À minha querida amiga e colega, que me acompanha desde o mestrado, Pauline Rosales por todo apoio, carinho e amizade durante todos os momentos.

Aos meus queridos estagiários do IFRS Davi Echevarria, Milena Almeida, Julia Sbardelotto, Gustavo Velho, Bruna Bastian da Costa e Andriele Souza, por toda ajuda, cuidado e empenho com o meu trabalho. Pela paciência com as colunas e plaquinhas e pela parceria e trocas de conhecimentos que tivemos.

As ICs Natalia Royer e Keiti Tosin por toda a ajuda e comprometimento que demonstraram.

À Dra. Rafaela Frassini pela ajuda nos ensaios MTT, pelas tardes na cultura de células, pela parceria e pelas conversas.

À professora Mariana Roesch-Ely pela ajuda nos ensaios biológicos.

Ao Davi Echevarria pela ajuda com os ensaios MTT e todas as outras parcerias de trabalho que ainda faremos.

Ao professor Favero Reisdorfer Paula por sua contribuição e ajuda com a modelagem molecular.

À coordenação do curso, pelo apoio disponibilizado, em especial a secretária Lucimara Serafini Rech que sempre faz de tudo para ajudar.

Às minhas amigas do coração Roberta Centofante, Elaine Lutz Martins, Laís Antunes, Bruna Vasconcelos, Franciele Guma, Laura Mascarin e ao meu amigo Thiago Tejkowski por estarem a tanto tempo ao meu lado e mesmo longe sempre me apoiarem me dando força e me ajudando a continuar.

A Deus pela força que me fornece e oportunidade de chegar até aqui.

E a todos que contribuíram de alguma forma para esta conquista!

RESUMO

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo longo e árduo, que envolve uma ação multidisciplinar e altos investimentos. A descoberta de novas doenças, a tolerância e a resistência adquirida por patógenos ou células tumorais, bem como a procura pela redução dos efeitos adversos de medicamentos já existentes são alguns dos motivos desta busca. A síntese orgânica possui um papel essencial no processo inicial do desenvolvimento de novos compostos bioativos, não somente na concepção de novas estruturas, mas também na modificação de estruturas já existentes para que elas possam se adequar às necessidades de um fármaco.

Visando otimizar o processo de obtenção de novas moléculas biotivas, empregamos a estratégia da hibridação molecular, a qual consiste na união de dois ou mais farmacóforos em um único esqueleto molecular. Assim, buscou-se integrar as propriedades farmacológicas de dois núcleos de origem natural, a uracila e a cumarina, bem como seus derivados, com atividades biológicas já conhecidas, tendo como unidade de ligação o núcleo 1,2,3-triazólico. Foram sintetizadas uma série de 12 moléculas híbridas, compreendendo uma unidade de uracila, timina, tiouracila ou teobromina, ligadas a uma variedade de núcleos cumarínicos por meio de núcleos triazólicos. Os híbridos bis-(cumaronil-triazolil)uracilas **7a-b**, (cumaronil-triazolil)uracila, timina, tiouracila **8a-f**, (cumaronil-triazolil)teobrominas **9a-d** foram obtidos a partir de uma reação de cicloadição catalisada por cobre-(I) (CuAAC) entre derivados 4-(azidometil)cumarínicos (**4a-d**) e a 1-propargiluracila **6a**, 1-propargiltimina **6b**, 2-propargilmercaptopuracil **6c**, 1,3-dipropargiluracila **6d** e 1-propargilteobromina **6e** com rendimentos de 70% a 92%.

Os compostos sintetizados foram avaliados quanto a sua atividade antiproliferativa e antitumoral frente às linhagens de células tumorais HCT116 (colorretal), A549 (pulmão) e Hep2 (laringe) e não tumoral HaCat (queratinócitos humanos), em ensaio do brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MTT). Verificou-se que cinco dos compostos avaliados (**7a-b**, **8d**, **9a-b**) apresentaram citotoxicidade ($IC_{50} < 100 \mu M$) frente à linhagem celular HCT116 e apenas o composto **7b** se mostrou citotóxico frente à linhagem de células A549. Os compostos **7a** e **9a** se mostraram citotóxicos frente à linhagem Hep-2 e nenhum dos compostos testados apresentou citotoxicidade frente à linhagem de células não tumorais HaCat, mesmo na concentração mais elevada testada de $100 \mu M$ em todos os tempos testados. Foram realizados estudo de predição de toxicidade *in silico*, dos compostos **7a-b** e **9a-b**, que se mostraram mais promissores nos ensaios MTT, que indicaram que os compostos apresentaram baixo risco de causar efeitos mutagênicos e tumorigênicos teóricos. Apenas o composto **7a** apresentou risco moderado de causar efeito tóxico no sistema reprodutivo. Os resultados obtidos sugerem que os compostos têm baixo potencial para causar toxicidade e podem ser submetidos ao desenvolvimento e planejamento de fármacos.

O programa SEA (Search web Server) foi empregado com base na hipótese de identificação de proteínas-alvo candidatas à interação com os compostos **7a-b** e **9a-b** e os resultados indicaram que o principal modelo foi direcionado à DNA topoisomerase 1 (Topo-1). Dessa forma, optamos por utilizar essa proteína nos estudos de *docking* molecular.

Os estudos de docking demonstraram que a porção carbonila das estruturas químicas das cumarinas dos modelos gerados nesses estudos mostrou interação com a HIS 632 da Topo-1, enquanto a uracila interagiu com ARG 364 e THR 718. O anel triazólico dos compostos mostrou interação com ARG 364 da Topo-1. Esses resultados sugerem que os compostos avaliados são potenciais ligantes da proteína e podem estar atuando como inibidores da Topo-1.

Palavras chave: uracila, cumarina, triazol, híbrido, antitumoral.

ABSTRACT

The development of new drugs is a long and arduous process, which involves a multidisciplinary action and high investments. The discovery of new diseases, tolerance, and resistance acquired by pathogens or tumor cells, as well as the need to minimize the side effects, are some of the reasons for this demand. Organic synthesis plays an essential role in the initial process of developing new bioactive compounds, not only in the design of new structures but also in the modification of existing structures in order to adapt it to the needs of a pharmaceutical compound.

In order to optimize the process of obtaining new bioactive molecules, we employed the strategy of molecular hybridization, which consists of the union of two or more pharmacophores in a single molecular skeleton. Thus, we sought to integrate the pharmacological properties of two natural molecules, the uracil, and the coumarin, as well as their derivatives, with known biological activities, having the 1,2,3-triazole nucleus as the binding unit.

A series of 12 hybrid molecules were synthesized, comprising one unit of uracil, thymine, thiouracil, or theobromine, linked to a variety of coumarin nucleus by triazolic nucleus. The hybrids bis-(coumaronyl-triazolyl)uracil **7a - b**, (coumaronyl-triazolyl)uracil, thymine, thiouracil **8a - f** (coumaronyl-triazolyl)theobromine **9a - d** were obtained from a copper(I)-catalyzed cycloaddition reaction between 4-(azidomethyl)coumarin (**4b-d**) e 1-propargyluracil **6a**, 1-propargylthymine **6b**, 2-propargylmercaptouracil **6c**, 1,3-dipropargyluracil **6d** and 1-propargyltheobromine **6e**, with yields of 70% to 92%.

The hybrids compounds synthesized were evaluated by their antiproliferative and antitumoral activities against the tumor cell lines (HCT116 - colorectal cancer, A549-lung, and Hep-2 - larynx) and non-tumoral cell line (HaCat - human keratinocytes), in the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay. It was found that five of the evaluated compounds (**7a-b**, **8e**, **9a-b**) showed cytotoxicity ($IC_{50} < 100 \mu M$) against the HCT116 cell line, and only the compound **7b** was cytotoxic against the A549 cell line. The compounds **7a** and **9a** showed cytotoxicity against Hep2 cell line, and none of the tested compounds showed cytotoxicity against the non-tumor cell line HaCat, even at the highest concentration tested of 100 μM , at all times evaluated.

The *in silico* toxicity prediction studies were carried out with the compounds **7a-b** and **9a-b**, which were more promising in the MTT assays. The evaluation showed that all the evaluated compounds showed a low risk of causing theoretical mutagenic and tumorigenic effects. Only compound **7a** showed the medium risk to cause an effect on the reproductive system. These results suggest that the target compounds show low potential to cause theoretical toxicity risks, and these can be submitted to drug design development.

SEA algorithm was employed based on the hypothesis of identification of candidate target proteins to interact with the compounds **7a-b**, and **9a-b**. The results indicated the main target model is related to DNA topoisomerase 1. According to these results, this protein was chosen to be used in docking analyses.

Docking procedures demonstrated that the carbonyl moiety from coumarin chemical structures of the model generated in these studies showed interaction with HIS 632, while the uracyl interacts with ARG 364 and THR 718. The triazol ring showed interaction with ARG 364 from Topo-1. These results suggest the compounds studied are potential ligands to protein and possible acting as Topo-1 inhibitors.

Keywords: uracil, coumarin, triazole, hybrid, antitumoral.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da pirimidina e da uracila com indicação das posições de substituição.	29
Figura 2. Estruturas químicas de fármacos que apresentam bases nitrogenadas.....	30
Figura 3. Estrutura química básica da cumarina e posições comuns de substituição.....	31
Figura 4. Estrutura de fármacos contendo o núcleo cumarínico.	32
Figura 5. Possíveis ordens para as etapas de condensação de Pechmann do fenol com um β -cetoéster.....	33
Figura 6. Estrutura química dos tautômeros do 1,2,3-triazol presentes no equilíbrio.	34
Figura 7. Cicloadição 1,3-dipolar de azidas e alcinos sem catálise.....	34
Figura 8. Cicloadição de azidas frente a alcinos catalizada por Cu(I) (CuAAC).	35
Figura 9. Fármacos comerciais contendo o núcleo triazólico em sua estrutura, e exemplos de moléculas que apresentam atividade antitumoral.	35
Figura 10. Triazol como bioisóstero da função amida.	36
Figura 11. Substituição bioisostérica de uma amida por um anel triazólico levando a uma maior citotoxicidade do composto frente à linhagem de células K562 (leucemia).	37
Figura 12. Ancoragem molecular (<i>docking</i>) dos híbridos obtidos frente aos alvos tubulina e falcipaina-2. Poses de re-docking da colchicina para tubulina (A) e E64 (inibidor da falcipaina-2) para falcipaina-2 (B) são mostradas com estruturas dos ligantes originais em verde enquanto as poses de re-docking estão em vermelho. As poses do <i>docking</i> dos ligantes híbridos à tubulina (C) são mostradas com colchicina colorida em verde, GTP colorido em amarelo, ligantes coloridos em laranja e azul. Poses de encaixe dos ligantes híbridos à falcipaina-2 (D) são mostradas com E64 colorida em verde e ligantes coloridos em laranja. .	42
Figura 13. Compostos que apresentaram atividade antimalárica frente ao <i>Plasmodium falciparum</i>	43
Figura 14. Esquema bidimensional de interação proteína-ligante do composto P11 com a tubulina (A) e composto P18 com a falcipaina-2 (B).	44
Figura 15. Estudo da relação estrutura-atividade (SAR) do derivado 4-(1,2,3-triazol-1-il)cumarina.	45
Figura 16. Estudo da relação estrutura-atividade do derivado 2,3-dimetóxi substituído (52). .	46
Figura 17. Compostos híbridos 1,2,3-triazol-cumarina C4-substituídos conformacionalmente irrestritos.	48
Figura 18. Compostos sintetizados por Kraljević <i>et al.</i> 2016 que apresentaram maior citotoxicidade em ensaio <i>in vitro</i>	49

Figura 19. Compostos com atividade inibidora da dUTPase.	51
Figura 20. Substituição bioisostérica da amida no composto M6b pelo triazol levando exclusivamente ao estereoisômero <i>cis</i>	52
Figura 21. Composto obtido com ajuda do SAR com potente atividade de inibição da dUTPase humana.	53
Figura 22. Estrutura da DNA topoisomerase 1 (Topo-1, código PDB: 1K4S)	56
Figura 23. Incidência estimada dos principais tipos de câncer em homens no ano de 2020.	57
Figura 24. Incidência estimada dos principais tipos de câncer em mulheres no ano de 2020.	58
Figura 25. Representação genérica da reação de condensação de Pechmann entre fenóis e β -cetoésteres.	62
Figura 26. Fluorescência das cumarinas quando irradiadas no comprimento de 365 nm em solução aquosa.	66
Figura 27. Esquema reacional da síntese dos derivados 4-(azidometil)cumarínicos 4a-d	67
Figura 28. Esquema reacional para a síntese da 1-propargiluracila (6a) a partir da reação da uracila (5) com brometo de propargila promovida pela base DBU.	68
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do produto obtido, após extração, da reação de monopropargilação da uracila, utilizando DBU como base, segundo metodologia de Hakimelari <i>et al.</i> 2002, mostrando a formação de mistura dos produtos 6a e 6d	69
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do produto obtido, após extração, da reação de monopropargilação da uracila, utilizando DBU como base, após modificações na metodologia, mostrando a formação de mistura dos produtos 6a e 6d	70
Figura 31. Esquema reacional da propargilação da uracila e timina de forma seletiva.	71
Figura 32. Obtenção do derivado 2-propargilmercaptopuracila 6c	71
Figura 33. Esquema reacional da síntese do derivado 1,3-dipropargiluracila 6d	72
Figura 34. Estrutura química da teobromina.	72
Figura 35. Síntese do derivado 3-propargilteobromina (6e).	73
Figura 36. Esquema reacional para a síntese dos híbridos bis-(cumaronil-triazolil)uracilas 7a-b	74
Figura 37. Esquemas reacionais para a síntese dos híbridos (cumaronil-triazolil)uracila, timina, 8a-e (Esquema A) e (cumaronil-triazolil)tiouracila 8f (Esquema B).	75
Figura 38. Esquemas reacional para a síntese dos híbridos (cumaronil-triazolil)teobromina 9a-d	76
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H adquirido do composto (cumaronil-triazolil)uracila 8b sem prévia purificação.	77

Figura 40. Espectro de RMN de ¹ H adquirido do composto (cumaronil-triazolil)uracila 8b após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel.	77
Figura 41. Espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz do híbrido bis-(cumaronil-triazolil)uracila 7a adquirido em DMSO-d ₆ e com supressão do sinal referente à água.	78
Figura 42. Expansão do espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz do híbrido bis-(cumaronil-triazolil)uracila 7a adquirido em DMSO-d ₆ e com supressão do sinal referente à água.	78
Figura 43. Expansão do espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz do híbrido bis-(cumaronil-triazolil)uracila 7a em DMSO-d ₆ e com supressão do sinal referente à água.	79
Figura 44. Fluorescência dos compostos bis-(cumaronil-triazolil)uracilas 7a-b , (cumaronil-triazolil)uracilas 8a-b e (cumaronil-triazolil)teobrominas 9a-b quando irradiadas no comprimento de 365 nm em solução DMSO/água (1:1).	80
Figura 45. Estruturas moleculares das ciclodextrinas α-CD, β-CD e γ-CD.	82
Figura 46. Estrutura molecular da 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD).	83
Figura 47. Formação complexo de inclusão fármaco-CD com estequiometria 1:1 e 1:2.	83
Figura 48. Espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz do híbrido 7a adquirido em DMSO-d ₆ com supressão do sinal referente à água.	85
Figura 49. Espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz da HP-β-CD adquirido em DMSO-d ₆	85
Figura 50. Espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz do complexo de inclusão do composto 7a com a Hp-β-CD adquirido em DMSO-d ₆	85
Figura 51. Espectro 1 - expansão do espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz, adquirido em DMSO-d ₆ , do híbrido 7a destacando os dupletos referentes aos hidrogênios aromáticos da porção cumarínica (distância entre os picos de 51,79 Hz). Espectro 2 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H a 300 Hz do complexo de inclusão do composto 7a com a Hp-β-CD, destacando os dupletos referentes aos hidrogênios aromáticos da porção cumarínica (distância entre os picos de 32,79 Hz).	86
Figura 52. Conversão do MTT em formazan pela enzima succinato-desidrogenase mitocondrial.	87
Figura 53. Fluxograma do ensaio de viabilidade celular MTT.	88
Figura 54. Perfil citotóxico do composto híbridos 7a frente às linhagens de células tumorais HCT116, Hep-2 e do composto 7b frente às linhagens de células tumorais HCT116 e A549 após 24 h e 48 h de exposição em ensaio MTT.	90
Figura 55. Principais interações geradas a partir dos procedimentos de <i>docking</i> dos compostos 7a-b e 9a-b no sítio ativo da Topo-1 (código PDB: 1K4S). Visualização gráfica obtida usando o UCSF Chimera (v.1.10.1, PETERSEN <i>et al.</i> , 2004).	97

Figura 56. Ligação de 7a no sítio ativo da Topo-1 (código PDB: 1K4S). Visualização gráfica obtida usando o UCSF Chimera (v.1.10.1, PETERSEN <i>et al.</i> , 2004).	98
Figura 57. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz da uracila (5a) em DMSO- d_6	131
Figura 58. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 1-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona (6a) em DMSO- d_6	131
Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 1-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona (6a) em DMSO- d_6	132
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 5-metil-1-(prop-2-in-1-il)pirimidine-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-dione (6b) em DMSO- d_6	132
Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 5-metil-1-(prop-2-in-1-il)pirimidine-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-dione (6b) em DMSO- d_6	133
Figura 62. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 2-(prop-2-in-1-iltio)pirimidin-4(3 <i>H</i>)-ona (6c) em DMSO- d_6	133
Figura 63. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 2-(prop-2-in-1-iltio)pirimidin-4(3 <i>H</i>)-ona (6c) em DMSO- d_6	134
Figura 64. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 1,3-di-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona (6d) em CDCl_3	134
Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 1,3-di-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona (6d) em acetona- d_6	135
Figura 66. Espectro de RMN DEPT 135 a 75 MHz do composto 1,3-di-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona (6d) em acetona- d_6	135
Figura 67. Espectro de RMN DEPT 90 a 75 MHz do composto 1,3-di-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona (6d) em acetona- d_6	136
Figura 68. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 3,7-dimetil-1-propargil xantina (6e) em DMSO- d_6	136
Figura 69. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 3,7-dimetil-1-propargil xantina (6e) em DMSO- d_6	137
Figura 70. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(clorometil)-5,7-dihidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (3e) em acetona- d_6	137
Figura 71. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(clorometil)-5,7-dihidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (3e) em acetona- d_6	138
Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-5,7-dihidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (3e) em DMSO- d_6	138

Figura 73. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(clorometil)-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (3d) em DMSO- d_6	139
Figura 74. Expansão espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(chlorometil)-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (3d) em DMSO- d_6	139
Figura 75. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (3d) em DMSO- d_6	140
Figura 76. Expansão espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-7-hidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (3d) em DMSO- d_6	140
Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C a 300 MHz do composto 4-(chlorometil)-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-2-ona (3g) em DMSO- d_6	141
Figura 78. Expansão espectro de RMN de ^{13}C a 300 MHz do composto 4-(chlorometil)-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-2-ona (3g) em DMSO- d_6	141
Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(chlorometil)-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-2-ona (3g) em DMSO- d_6	142
Figura 80. Expansão espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-2-ona (3g) em DMSO- d_6	142
Figura 81. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(clorometil)-7-metóxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (3h) em DMSO- d_6	143
Figura 82. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-7-metóxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (3h) em DMSO- d_6	143
Figura 83. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-7-metóxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (3h) em DMSO- d_6	144
Figura 84. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(azidometil)-5,7-dihidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (4b) em DMSO- d_6	144
Figura 85. Expansão espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(azidometil)-5,7-dihidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (4a) em DMSO- d_6	145
Figura 86. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(azidometil)-5,7-dihidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (4a) em DMSO- d_6	145
Figura 87. Expansão espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(azidometil)-5,7-dihidroxi-2 <i>H</i> -cromen-2-ona (4a) em DMSO- d_6	146
Figura 88. Espectro de RMN de ^{13}C a 300 MHz do composto 4-(azidometil)-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-2-ona (4b) em DMSO- d_6	146
Figura 89. Espectro de RMN de ^1H a 75 MHz do composto 4-(azidometil)-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-2-ona (4b) em DMSO- d_6	147

Figura 90. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona 7a em DMSO- d_6	147
Figura 91. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona 7a em DMSO- d_6	148
Figura 92. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona 7a em DMSO- d_6 com supressão do sinal referente à água.....	148
Figura 93. Expansão do Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona 7a em DMSO- d_6 com supressão do sinal referente à água.....	149
Figura 94. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona 7a em DMSO- d_6 com supressão do sinal referente à água.....	149
Figura 95. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona 7a em DMSO- d_6	150
Figura 96. Espectro de RMN de 2D – COSY a 75 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona 7a em DMSO- d_6	150
Figura 97. Espectro de RMN de 2D – HMQC a 75 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona 7a em DMSO- d_6	151
Figura 98. Espectro de RMN de 2D – HMBC a 75 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona 7a em DMSO- d_6	151
Figura 99. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((2-oxo-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona 7b em DMSO- d_6	152
Figura 100. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((2-oxo-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-diona 7b em DMSO- d_6	152

Figura 101. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7b em DMSO- d_6	153
Figura 102. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 7b em DMSO- d_6	153
Figura 103. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8a em DMSO- d_6	154
Figura 104. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8a em DMSO- d_6	154
Figura 105. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8a em DMSO- d_6	155
Figura 106. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8a em DMSO- d_6	155
Figura 107. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8b em DMSO- d_6	156
Figura 108. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8b em DMSO- d_6	156
Figura 109. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8b em DMSO- d_6	157
Figura 110. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8b em DMSO- d_6	157
Figura 111. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8b em DMSO- d_6	158

Figura 112. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8c em DMSO- d_6	158
Figura 113. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8c em DMSO- d_6	159
Figura 114. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8c em DMSO- d_6	159
Figura 115. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8c em DMSO- d_6	160
Figura 116. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8d em DMSO- d_6	160
Figura 117. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8d em DMSO- d_6	161
Figura 118. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8d em DMSO- d_6	161
Figura 119. Expansão de espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8d em DMSO- d_6	162
Figura 120. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8e em DMSO- d_6	162
Figura 121. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8e em DMSO- d_6	163
Figura 122. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona 8e em DMSO d_6	163

Figura 123. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 2-(((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)pirimidin-4(3H)-ona 8f em DMSO- d_6	164
Figura 124. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 2-(((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)pirimidin-4(3H)-ona 8f em DMSO- d_6	164
Figura 125. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 2-(((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)pirimidin-4(3H)-ona 8f em DMSO- d_6	165
Figura 126. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 2-(((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)pirimidin-4(3H)-ona 8f em DMSO- d_6	165
Figura 127. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 2-(((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)pirimidin-4(3H)-ona 8f em DMSO- d_6	166
Figura 128. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona 9a em DMSO- d_6	166
Figura 129. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona 9a em DMSO- d_6	167
Figura 130. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do o híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona 9a em DMSO- d_6	167
Figura 131. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona 9a em DMSO- d_6	168
Figura 132. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona 9a em DMSO- d_6	168
Figura 133. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona 9a em DMSO- d_6	169
Figura 134. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona 9a em DMSO- d_6	169

Figura 135. Espectro de RMN 2D – HMQC a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9a em DMSO- <i>d</i> ₆	170
Figura 136. Espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz do híbrido 3,7-dimetil-1-((1-((2-oxo-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9b em DMSO- <i>d</i> ₆	170
Figura 137. Expansão do espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz do híbrido 3,7-dimetil-1-((1-((2-oxo-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9b em DMSO- <i>d</i> ₆	171
Figura 138. Espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz do híbrido 3,7-dimetil-1-((1-((2-oxo-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9b em DMSO- <i>d</i> ₆ com supressão do sinal referente à água.	171
Figura 139. Expansão do espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz do híbrido 3,7-dimetil-1-((1-((2-oxo-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9b em DMSO- <i>d</i> ₆ com supressão do sinal referente à água.....	172
Figura 140. Expansão do espectro de RMN de ¹³ C a 75 MHz do híbrido 3,7-dimetil-1-((1-((2-oxo-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9b em DMSO- <i>d</i> ₆	172
Figura 141. Expansão do espectro de RMN de ¹³ C a 75 MHz do híbrido 3,7-dimetil-1-((1-((2-oxo-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9b em DMSO- <i>d</i> ₆	173
Figura 142. Espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9c em DMSO- <i>d</i> ₆	173
Figura 143. Expansão do espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9c em DMSO- <i>d</i> ₆	174
Figura 144. Expansão do espectro de RMN de ¹ H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9c em DMSO- <i>d</i> ₆	174
Figura 145. Espectro de RMN de ¹³ C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9c em DMSO- <i>d</i> ₆	175

Figura 146. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9c em DMSO- d_6	175
Figura 147. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9d em DMSO- d_6	176
Figura 148. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9d em DMSO- d_6	176
Figura 149. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-4-il)metil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1 <i>H</i> -purina-2,6-diona 9d em DMSO- d_6	177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Inibição <i>in vitro</i> do crescimento de células tumorais promovida pelos compostos 1-13.....	38
Tabela 2. Atividade citotóxica (IC ₅₀ , µM) dos compostos híbridos (9-19) frente as linhagens de células tumorais HuCCA-1 (colangiocarcinoma), HepG2 (carcinoma hepatocelular), A549 (pulmão), MOLT-3 (leucemia linfoblástica) e não tumoral Vero.	40
Tabela 3. Compostos híbridos isatina-cumarinas e citotoxicidade frente as linhagens de células tumorais humanas HeLa (cervical), DU145 (próstata) e MCF- 7 (mama).....	47
Tabela 4. Efeito inibitório de crescimento <i>in vitro</i> promovido pelos compostos híbridos triazolil-cumarinas frente as linhagens de células tumorais A549 (pulmão), HepG2 (fígado), CFPAC-1 (pâncreas), HeLa (cervical), SW620 (colorectal metástase), e fibroblastos normais W138 (fibroblasto de pulmão humano) e 3T3 (fibroblasto embrionário de rato).	50
Tabela 5. Aumento a eficácia <i>in vivo</i> de 50c para atividade antitumoral de 5-FU frente ao xenoenxerto MX-1 de câncer de mama em ratos.	53
Tabela 6. Otimização das condições reacionais para a síntese da 5,7-dihidroxi-4-metilcumarina (3a). ^a	63
Tabela 7. Condições reacionais otimizadas e rendimentos das cumarinas C-4 substituídas....	64
Tabela 8. Determinação da citotoxicidade dos compostos híbridos 7a-b , 8a-d e 9a-b , 9d frente às linhagens celulares tumorais HCT116 (colorretal), A549 (pulmão) e Hep2 (laringe) e à linhagem não tumoral HaCat (queratinócitos humanos).	91
Tabela 9. Predição teórica de toxicidade dos compostos 7a-b , 9a-b e H ₂ O ₂ . A escala de risco de toxicidade varia de nenhum (-), baixo (+), medio (++) e alto (+++) calculados usando o software Osiris Property Explorer®.....	93
Tabela 10. Candidatos a alvo biológico identificados por predições SEA obtidos a partir de análise dos compostos 7b e 9b	94
Tabela 11. Candidatos a alvo biológico identificados por predições SEA obtidos a partir de análise dos compostos 7a-b e 9a-b	95
Tabela 12. Resultados do <i>docking</i> dos compostos 7a-b e 9a-b no Topo-1 usando o <i>software</i> Igemdock 2.1.	96
Tabela 13. Interações farmacológicas centrais de Van der Waals (VDW) e ligação de hidrogênio (ligação de H) de compostos e resíduos envolvidos no sítio de ligação da Topo-1 com normalidade e aplicação da Análise de Consenso de Resíduos.....	98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

δ	deslocamento químico
μM	micromolar
CCD	cromatografia em camada delgada
CD	ciclodextrina
CDCl_3	clorofórmio deuterado
COSY	do inglês: <i>Correlated Spectroscopy</i>
d	duplete
dd	duplo duplete
DEPT	do inglês: <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMEM	do inglês: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
$\text{DMSO-}d_6$	dimetilsulfóxido deuterado
DNA	do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dUTPase	desoxiuridina trifosfatase
eV	Elétron-volt
FDA	do inglês: <i>Food and Drug Administration</i>
GC-MS	do inglês: <i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografia a gás– espectrometria de massas)
GTP	guanosina trifosfato
HMBC	do inglês: <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Correlação Heteronuclear de Ligações Múltiplas)
HMQC	do inglês: <i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i> (Correlação Heteronuclear de Quantum Múltiplas)
HRMS	do inglês: <i>High Resolution Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas de Alta Resolução)
Hz	Hertz
IC_{50}	do inglês: <i>The half maximal inhibitory concentration</i> (concentração inibitória média)
J	constante de acoplamento
m/z	razão massa/carga
MTT	Teste do brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
NOESY	do inglês: <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
PDB	do inglês: <i>Protein Data Bank</i>
p.f.	ponto de fusão
q	quadruplete
$\text{RMN } ^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$	Ressonância magnética nuclear de carbono 13 (espectro desacoplado de hidrogênio)
$\text{RMN } ^1\text{H}$	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RNA	Ácido ribonucleico
s	simpleto
SAR	do inglês: <i>Structure-Activity Relationship</i> (relação estrutura-atividade)
SEAr	Substituição Eletrofílica Aromática
t	tripeto
TE	transesterificação

Sumário

1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivo específicos.....	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
3.1 Pirimidinas: Uracila	28
3.2 Cumarinas	30
3.3 Núcleo heterocíclico 1,2,3-triazol.....	33
3.4 Atividade BIOLÓGICA de compostos derivados da uracila e de compostos contendo o núcleo 1,2,3-triazolilcumarina	37
3.5 Alvos biológicos	54
3.5.1 Desoxiuridina trifosfatase (dUTPase)	54
3.5.2 Topoisomerase 1 (Topo-1)	54
3.6 Considerações sobre carcinogênese.....	57
3.6.1 Câncer colorretal.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 Síntese das cumarinas	62
2.1 Síntese dos derivados azidocumarínicos.....	66
4.2 Síntese dos INTERMEDIÁRIOS derivados da uracila e análogos (6a-e).	67
4.2.1 Síntese dos intermediários 1-propargiluracila 6a, 1-propargiltimina 6b, 2-propargilmercaptouracila 6c e 1,3-dipropargiluracila 6d.....	67
4.2.2 Síntese do intermediário 3-propargilteobromina 6e.	72
4.2.3 Síntese dos derivados bis-(cumaronil-triazolil)uracilas 7a-b, (cumaronil-triazolil)uracila, timina, tiouracila 8a-g e (cumaronil-triazolil)teobromina 9a-d.	73
4.2.4 Obtenção dos complexos de inclusão (11a-b)	81
4.2.5 Ensaio biológicos	87
4.2.6 Estudo de toxicidade <i>in silico</i>	92
4.2.7 Seleção do possível alvo biológico.....	93
4.2.8 <i>Docking</i> molecular.....	95
5. MATERIAIS E MÉTODOS	99
5.1 Síntese das cumarinas C-4 substituídas	99
5.2 Síntese dos derivados 4-(azidometil)cumarínicos	103

5.3	Síntese dos precursores 1-propargiluracila 6a , 1-propargiltimina 6b e 2-propargilmercaptouracila 6c	104
5.4	Síntese do precursor 1,3-dipropargiluracila.....	105
5.5	Síntese do precursor 3-propargilteobromina.....	106
5.6	Síntese dos híbridos BIS-(CUMARONIL-TRIAZOLIL)URACILAs (7a-B).....	107
5.7	Síntese dos compostos híbridos (cumaronil-triazolil)uracila, timina, tiouracila (8a-f) e (cumaronil-triazolil)teobrominas 9a-d.....	107
5.8	Obtenção dos complexos de inclusão	112
5.9	Ensaio biológico	113
5.9.1	Cultura de células e viabilidade celular	113
5.10	Métodos de caracterização estrutural.....	114
5.10.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	114
5.10.2	Ponto de Fusão	114
5.10.3	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS).....	114
5.10.4	Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS)	115
5.10.5	Leitor de absorvância para microplacas	115
5.11	ESTUDOS <i>IN SILICO</i> , MODELAGEM E DOCKING MOLECULAR	115
5.11.1	Previsão de alvos biológicos e toxicidade	115
5.11.2	Modelagem molecular e estudos de <i>docking</i>	116
7.	REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
8.	APÊNDICE A	131
8.1	ESPECTROS SELECIONADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C {1H} DOS COMPOSTOS OBTIDOS E CITADOS NA TESE.	131

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de fármacos pode ser descrito como um processo de identificação de entidades químicas com potencial para se tornarem agentes terapêuticos. Existe uma necessidade pela descoberta de medicamentos que possam substituir alguns dos existentes, porém a custos menores e dotados de menos efeitos adversos, além de suprir a demanda para doenças inadequadamente atendidas pelas terapias disponíveis (DECKER; SAUSVILLE, 2007). Neste aspecto, a síntese orgânica tem contribuído significativamente, sendo responsável por grande parte dos fármacos existentes no mercado farmacêutico (MENEGGATI, 2001; NEWMAN; CRAGG, 2010), promovendo não somente a criação de moléculas totalmente inéditas, mas também a modificação de moléculas naturais ou sintéticas com atividade biológica já conhecida. Mas a busca por novas moléculas bioativas pode envolver várias áreas do conhecimento, e neste contexto, a biotecnologia também incorporou essa demanda em uma de suas subdivisões, conhecida como a biotecnologia vermelha. A biotecnologia vermelha agrupa todos os usos da biotecnologia que se relacionam com a medicina, desde a produção de vacinas e antibióticos, o desenvolvimento de novos fármacos, técnicas moleculares de diagnósticos, entre outras ferramentas para fins terapêuticos (KAFERSKI, 2012; GRACIANO *et al.*, 2019).

A procura por substâncias ativas é centrada em torno da descoberta de compostos com propriedades medicinais específicas, incluindo o desenvolvimento de análogos mais eficazes e mais seguros do que os compostos já existentes. Isto normalmente envolve a síntese e o teste de centenas de compostos até encontrar aquele, ou aqueles (*hits*) que apresentem as propriedades farmacológicas esperadas. Considera-se que para cada 10.000 compostos sintetizados, apenas um seja apropriado para uso medicinal (THOMAS, 2007). O desenvolvimento de um novo medicamento começa na bancada de laboratórios de universidades, centros de pesquisa e empresas farmacêuticas, passando por todas as etapas de ensaios *in vitro* e *in vivo*, e posteriormente as etapas de ensaios clínicos para uma eventual liberação dos órgãos reguladores, e então entrada no mercado. Ou seja, é um caminho longo e árduo, e que envolve altos investimentos (CHEN *et al.*, 2018). Visando uma redução de custos e tempo, uma das estratégias para se obter novas substâncias ativas consiste em modificar quimicamente moléculas de fármacos já conhecidos, e então testá-las nos mesmos moldes das moléculas de partida, em um modelo conhecido como bioisosterismo (LIMA; BARREIRO, 2005). Em muitos casos obtém-se melhoramentos significativos na eficácia terapêutica

Um levantamento publicado em 2020, cobrindo o período de 1981 a 2019, verificou que dos 1394 medicamentos aprovados pela agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA), e considerados de baixa massa molecular (<500 u), 5,1% são moléculas naturais que não sofreram modificação, 1% são medicamentos botânicos (materiais vegetais, que podem incluir materiais de plantas, algas, fungos macroscópicos ou combinações dos mesmos), 27,5% são derivados de produtos naturais, 14,8% são obtidos por síntese e mimetizam produtos naturais, 4,7% são de origem sintética contendo farmacóforos de origem natural, 15,7% são sintéticos contendo farmacóforo de origem natural e que mimetizam um produto natural e 33,3% são drogas sintéticas (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Uma constatação interessante a respeito da estrutura molecular dos medicamentos comercializados no mundo, ou ainda aquelas moléculas candidatas a fármacos que estão sob testes pré-clínicos ou clínicos, é a presença de núcleos heterocíclicos, sendo que os heterocíclicos nitrogenados estão entre os componentes estruturais mais significativos, respondendo por cerca de 59% dos medicamentos de baixa massa molecular (<500 u) aprovados pela FDA (VITAKU; SMITH; NJARDARSON, 2014).

Os núcleos heterocíclicos são estruturas cíclicas com pelo menos um átomo diferente do carbono, em geral nitrogênio, oxigênio e enxofre (BALABAN *et al.*, 2004). Dentre os núcleos heterocíclicos, pode-se destacar as pirimidinas, que são encontradas em compostos naturais e apresentam significativa atividade biológica (JAIN *et al.*, 2016). Como exemplos de compostos naturais contendo o núcleo pirimidínico temos a uracila, que apresenta diversas atividades biológicas, sendo as atividades antiviral e antitumoral as mais relatadas para seus análogos (KUMAR *et al.*, 2012). Um exemplo representativo de um análogo da uracila com atividade medicinal é a fluoruracila (também denominada 5-fluoruracila ou 5-FU), o qual é um agente antineoplásico aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a Anvisa, bem como pela FDA e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA).

Cumarinas também são compostos heterocíclicos, de origem natural, produzidas pelo metabolismo secundário, que estão presentes em diversas partes de plantas, como em raízes, flores e frutos de algumas famílias de Angiospermas (RIBEIRO; KAPLAN, 2002; SARKER; NAHAR, 2017). A atividade medicinal da cumarina é representada pelas ações antitussígena e broncodilatadora atribuídas à cumarina, sendo esta a molécula presente em maior concentração no extrato de guaco, comercializado na forma de chás e xaropes como produtos fitoterápicos e aprovados pela Anvisa (CZELUSNIAK *et al.*, 2012). Outro exemplo representativo é a varfarina, molécula derivada da cumarina que possui atividade clinicamente

comprovada como anticoagulante e antitrombótica, e é aprovada pela Anvisa.

Além das atividades biológicas apresentadas, as cumarinas apresentam propriedades (*in vitro*) tais como antiviral, anti-inflamatória, antibacteriana e antineoplásica, demonstrando ser um núcleo interessante na obtenção de novos compostos bioativos (BISI *et al.*; 2017; IBRAR *et al.*, 2018). Nos últimos anos, tem sido relatada a síntese de derivados de cumarina conjugados com 1,2,3-triazóis, sendo que esses apresentam bioatividade (ZHANG *et al.*, 2014). Há trabalhos que relatam atividade antineoplásica pela indução de apoptose atribuída a esse tipo de sistema (DUAN *et al.*, 2013).

A incorporação de compostos heterocíclicos, como por exemplo, 1,2,3-triazóis, como unidades de ligação (*linkers*) entre dois farmacóforos, resultando em substâncias bifuncionais, mostra-se útil na construção de moléculas bioativas (PALASZ; CIEZ, 2015). Os 1,2,3-triazóis têm fácil obtenção sintética por meio de reações de cicloadição 1,3-dipolar entre azidas e alcinos, e apresenta diversas atividades biológicas, que incluem antibacterianas, fungicida, anticonvulsivante e antitumorais (KRALJEVIĆ *et al.*, 2016).

Considerando que o aprimoramento de moléculas naturais a posteriores análogos é uma clássica evolução na produção e inovação tecnológica de fármacos (MONTANARI; BOLZANI, 2001; CRAGG; NEWMAN, 2013), bem como a necessidade de novos compostos bioativos, buscamos o desenvolvimento e a diversificação estrutural de moléculas com potencial atividade antineoplásica. Os compostos propostos são baseados no núcleo dos compostos uracila e cumarina cujas estruturas químicas encontram-se em diversos compostos naturais e biotivos. Adicionalmente, visamos a diversificação estrutural contando com o núcleo heterocíclico triazólico. Além disso, como complemento à síntese, as atividades antiproliferativa e antitumoral dos compostos obtidos foram avaliadas frente ao cultivo de células tumorais e não tumorais, visando obter conhecimentos de seu efeito biológico.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo desse estudo é a síntese de série de compostos inéditos baseados nos núcleos da uracila e cumarina hibridizados pela unidade heterocíclica 1,2,3-triazol, e posteriormente avaliá-los quanto à atividade antineoplásica, utilizando cultivos de células tumorais e não tumorais, visando obter conhecimentos do efeito biológico desses compostos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter compostos derivados da uracila com modificações estruturais nas posições *N*-1, *N*-3 e *C*-5. Entre as modificações propostas estão mono- e di-propargilação nas posições *N*-1 e *N*-3 do anel da uracila, com posterior reação de cicloadição catalisada por Cu(I) entre esses produtos e azidas derivadas da cumarina, obtendo-se, assim, compostos híbridos ligados por meio de núcleos triazólicos.
- b) Caracterizar as estruturas dos compostos sintetizados por métodos espectroscópicos como ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e métodos espectrométricos como espectrometria de massas de alta resolução.
- c) Avaliar a viabilidade celular frente ao efeito biológico dos compostos propostos em ensaio MTT, em culturas de células humanas tumorais Hep-2 (carcinoma de laringe), A549 (pulmão), HCT116 (colorretal) e não tumoral HaCat (queratinócitos).
- d) Realizar estudos de predição de toxicidade *in silico*, seleção de possível alvo biológico e *docking* molecular para os compostos que apresentarem atividade biológica mais promissora nos ensaios MTT.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na busca por novos compostos bioativos algumas estratégias têm sido empregadas para otimizar o processo e, nesse contexto, tem-se a hibridização molecular, que consiste na união de dois ou mais farmacóforos em um único esqueleto molecular. Esta estratégia busca o desenvolvimento de novas moléculas que apresentem múltiplas atividades biológicas, perfil de seletividade modificado, mecanismos de ação diferentes ou duais e a redução dos efeitos adversos indesejados. Tais moléculas podem também ser modificadas para exibir uma farmacocinética favorável (SANDHU *et al.*, 2014).

Desta forma, neste projeto buscou-se integrar as propriedades farmacológicas de duas moléculas naturais, a uracila e a cumarina, bem como seus derivados, no desenvolvimento de novas moléculas híbridas. Para a união destes dois blocos farmacofóricos foi pensado o uso do núcleo triazólico como unidade de ligação, já que o sistema triazolil cumarina tem sido relatado com uma importante atividade antineoplásica (ZHANG *et al.*, 2014; DUAN *et al.*, 2013), da mesma forma que o sistema triazolil uracila (LU *et al.*, 2019). As novas moléculas propostas no presente trabalho foram idealizadas com o propósito de apresentarem atividade antitumoral.

Assim, para uma melhor contextualização das estruturas químicas que fazem parte das moléculas híbridas obtidas neste trabalho serão abordados nesta revisão bibliográfica a importância, a origem, os principais métodos de síntese e as atividades biológicas dos análogos dos núcleos heterocíclicos que compõem os compostos de interesse. Por fim, abordaremos algumas considerações sobre o câncer, apresentando as mais recentes estimativas sobre o número de casos que reforçam a importância da busca de novos compostos bioativos com atividade antineoplásica.

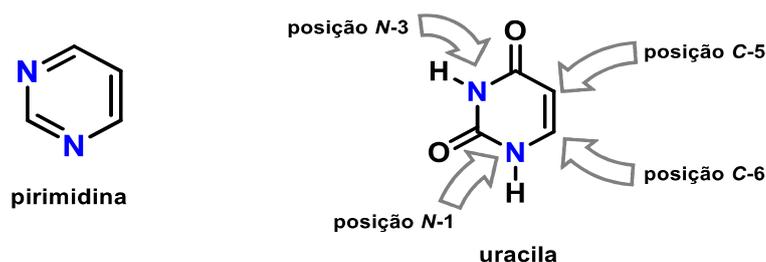
3.1 PIRIMIDINAS: URACILA

As pirimidinas são uma classe de compostos constituídos de um anel heterocíclico de seis membros com átomos de nitrogênio nas posições *N-1* e *N-3* (Figura 1). Estão amplamente presentes na estrutura de moléculas naturais, e podemos citar como exemplos as bases nitrogenadas citosina, timina e uracila, as quais fazem parte da estrutura dos nucleotídeos, que são os blocos de construção do DNA e RNA. Como consequência, esses compostos têm importância química e farmacológica considerável (KRALJEVIĆ *et al.*, 2014).

Com respeito à uracila (Figura 1), esta apresenta uma estrutura considerada versátil na

descoberta de compostos com uma grande variedade de atividades biológicas, devido à acessibilidade e capacidade sintética para conferir à substância propriedades a partir de modificações estruturais nas posições *N*-1, *N*-3, *C*-5 e *C*-6 (KUMAR *et al.*, 2012; PALASZ *et al.*, 2015).

Figura 1. Estrutura molecular da pirimidina e da uracila com indicação das posições de substituição.

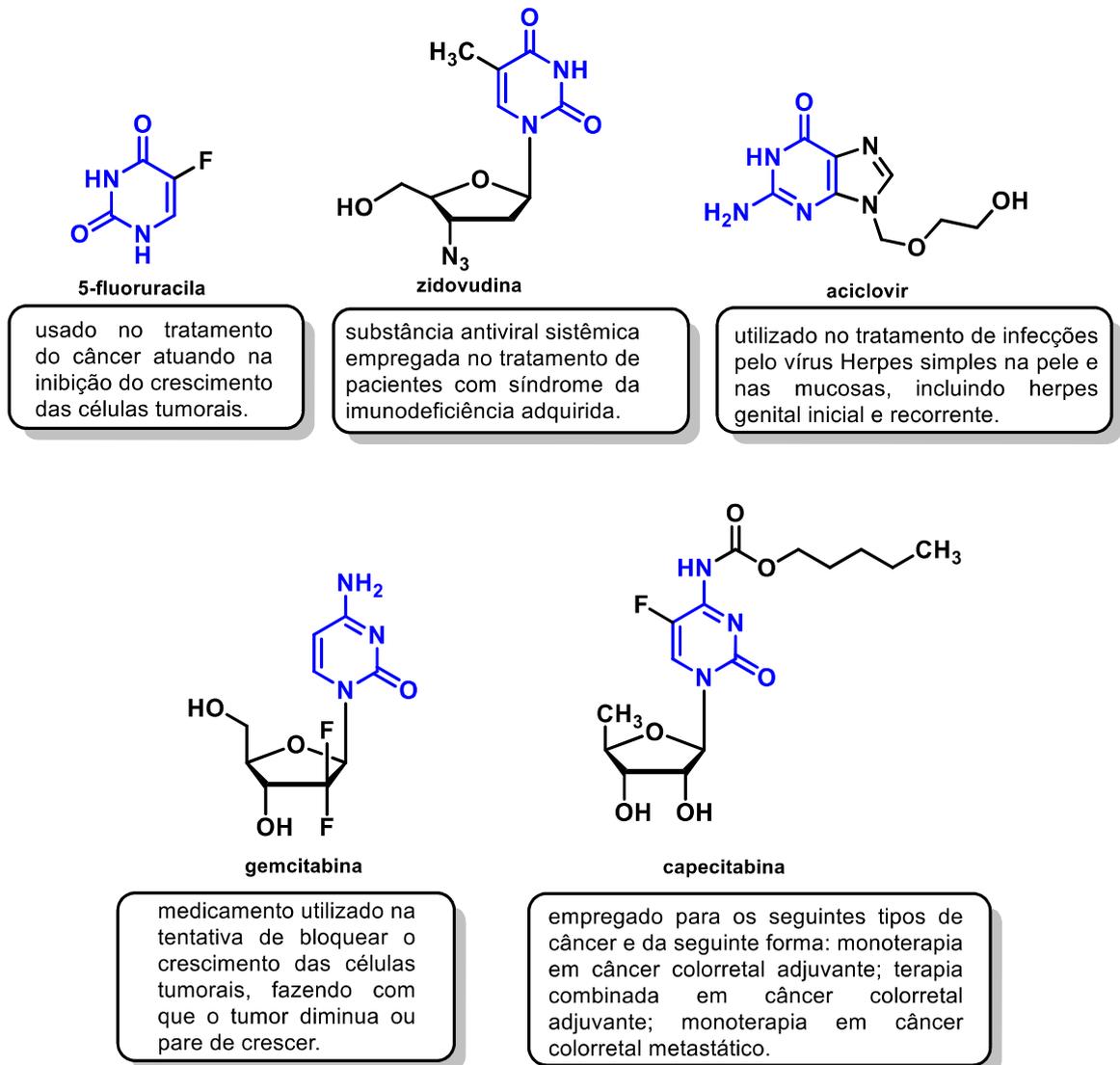


Fonte: a autora.

Como comentado anteriormente, a 5-fluorouracila (5-FU, Figura 2), a qual é uma molécula derivada da uracila, é empregada no tratamento paliativo de tumores malignos como o de cólon, mama, ovário e bexiga, entre outros. O fármaco inibe as enzimas de replicação do RNA, eliminando assim a sua síntese e inibindo o crescimento de células tumorais. Embora o 5-FU tenha sucesso clínico, ainda busca-se a obtenção de derivados que possam reduzir seus efeitos adversos, como curto tempo de meia-vida, baixa seletividade e efeitos tóxicos (PALASZ; CIEZ, 2015).

O potencial dos compostos derivados da uracila está ligado à possibilidade de serem utilizados como antagonistas nas vias biossintéticas das nucleobases de pirimidina ou em outros processos importantes, competindo pelos mesmos locais de ligação dos compostos que ocorrem naturalmente (ACCETTA *et al.*, 2009). Esses compostos têm recebido atenção de cientistas e da indústria farmacêutica devido à gama de atividades biológicas apresentadas por seus derivados sintéticos, tais como: antiviral, antitumoral, entre outras. Outros exemplos de fármacos que apresentam derivados do núcleo pirimidínico e uracila são o aciclovir, zidovudina, capecitabina e gemcitabina, mostrados na Figura 2 (SKIBA; KOWALSKI, 2015).

Figura 2. Estruturas químicas de fármacos que apresentam bases nitrogenadas.

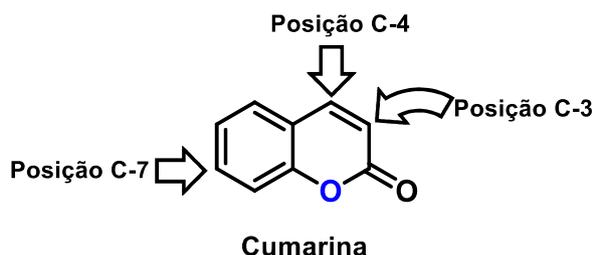


Fonte: adaptado de SKIBA; KOWALSKI, 2015.

3.2 CUMARINAS

As cumarinas (Figura 3), também conhecidas como benzopirano-2-onas, são uma classe de compostos naturais resultante do metabolismo secundário, que estão presentes em diversas partes de plantas, como em raízes, flores e frutos de algumas famílias de Angiospermas (RIBEIRO; KAPLAN, 2002; SARKER; NAHAR, 2017) e que possuem perspectivas terapêuticas promissoras. O primeiro relato do isolamento e identificação da cumarina foi reportado em 1820, a qual foi extraída das sementes da árvore popularmente chamada de cumaru, pertencente à espécie *Dipteryx odorata*, uma árvore nativa da região amazônica.

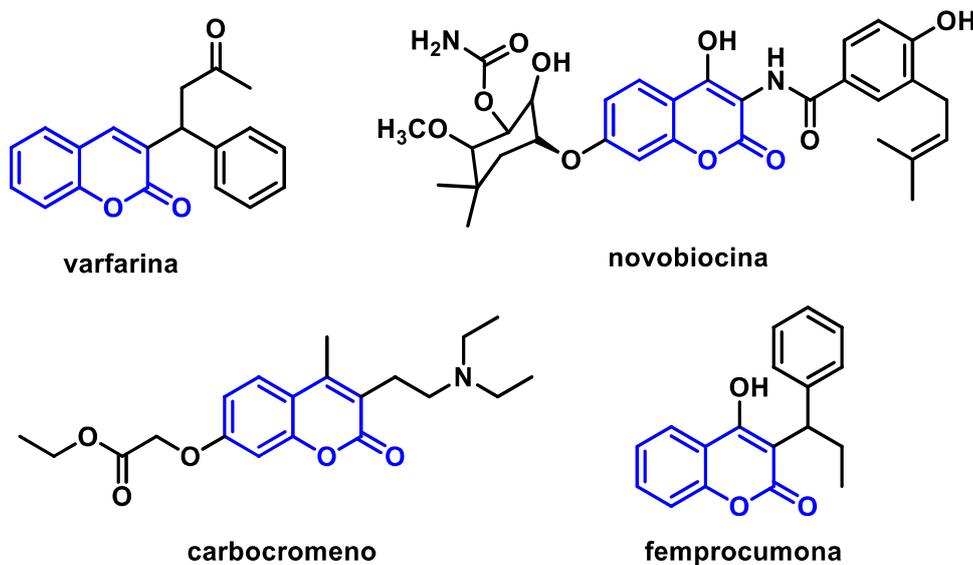
Figura 3. Estrutura química básica da cumarina e posições comuns de substituição.



Fonte: a autora.

A extensa gama de atividades farmacológicas apresentada pelas cumarinas e seus derivados depende basicamente do padrão de substituição no seu núcleo básico. Essas atividades incluem: antibacteriana, antimutagênica, antioxidante, anti-inflamatória, anticoagulante, antitrombótica, antileishmanial, vasodilatadora e antitumoral (BISI *et al.*, 2017; IBRAR *et al.*, 2018; ASHOK *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2020). Como exemplo de derivados cumarínicos que chegaram às prateleiras das farmácias temos a varfarina (anticoagulante), carbocromeno (doença coronariana), femprocumona (anticoagulante) e novobiocina (antibiótico), mostrados na Figura 4 (SANDHU *et al.*, 2014). Além disso, os membros deste grupo apresentam aplicações como componentes em fragrâncias, perfumes, aditivos alimentares, cosméticos e agroquímicos (BOSE; RUDRADAS; BABU, 2002; CAO *et al.*, 2019) e também exibem propriedades únicas de fluorescência que podem ser utilizadas para diversas aplicações fotônicas, desde tinturas a laser até sensores e dispositivos emissores de luz (DUAN *et al.*, 2020). As propriedades fotofísicas dos derivados cumarínicos, tais como o comprimento de onda de absorção e emissão, e o rendimento quântico de fotoluminescência (PLQY) também dependem fortemente da natureza e da posição dos substituintes. A presença de grupos doadores de elétrons na posição C-7 e/ou grupos retiradores de elétrons na posição C-3 das cumarinas alteram seu comportamento óptico devido à ressonância e efeitos indutivos (YU *et al.*, 2017).

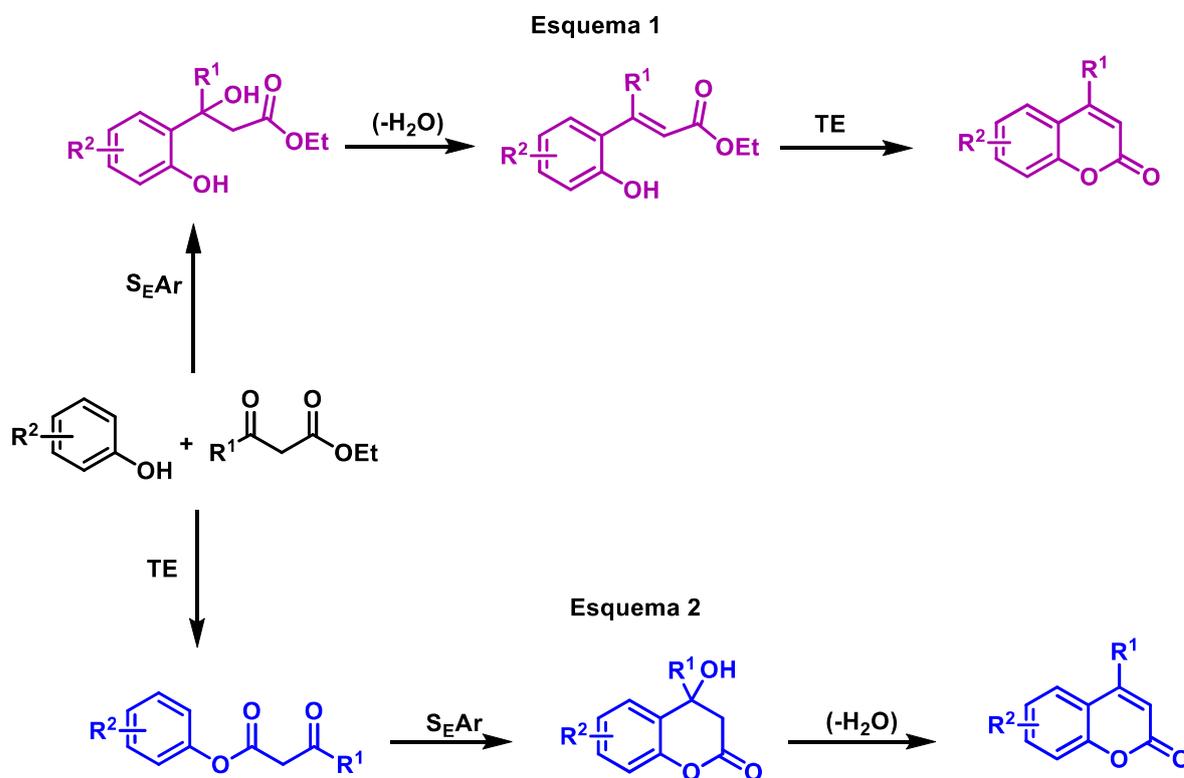
Figura 4. Estrutura de fármacos contendo o núcleo cumarínico.



Fonte: adaptado de SANDHU *et al.*, 2014.

As cumarinas podem ser preparadas a partir de diferentes estratégias, que incluem principalmente as reações de Pechmann, Perkin, Knoevenagel, Reformatsky e Wittig (PROSUIS *et al.*, 2014). Das reações citadas, a reação de condensação de Pechmann, reportada em 1883 pelos químicos alemães Hans Von Pechmann e Carl Duisberg (VON PECHMANN; DUISBERG, 1883), é uma das metodologias mais simples e versáteis na obtenção dessa classe de compostos (DEGROTE *et al.*, 2014). O método consiste na condensação de um fenol com um β -cetoéster promovida por catálise ácida, levando a cumarinas substituídas na posição C-4, e em geral, em bons rendimentos. O progresso e curso dessa reação dependem da natureza dos fenóis, dos β -cetoésteres e do catalisador (HERAVI; KHAGHANINEJAD; MOSTOFI, 2014). A reação de condensação de Pechmann é uma reação *one-pot* que acredita-se seguir três etapas; substituição aromática eletrofílica (S_{EAr}), transesterificação (TE) e desidratação (eliminação de uma molécula de H_2O). No entanto, a ordem das etapas pode variar, como mostrado na Figura 5 (TYNDALL; WONG; VANALSTINE-PARRIS, 2015).

Figura 5. Possíveis ordens para as etapas de condensação de Pechmann do fenol com um β -cetoéster.



Fonte: adaptado de TYNDALL; WONG; VANALSTINE-PARRIS, 2015.

Diversos catalisadores foram descritos para esta transformação (PROSUIS *et al.*, 2014), tais como: H_2SO_4 , InCl_3 , AlCl_3 , POCl_3 , TiCl_4 , $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ácido *p*-toluenossulfônico (PTAS), ZrCl_4 (DANDRIYAL *et al.*, 2016). Entretanto, alguns apresentam desvantagens, tais como condições ácidas muito fortes que limitam a tolerância ao grupo funcional, reagentes tóxicos/solventes ou catalisadores, grandes quantidades de catalisadores com alto custo, e dificuldade na recuperação do catalisador (LI; QI; HUANG, 2016).

3.3 NÚCLEO HETEROCÍCLICO 1,2,3-TRIAZOL

Os 1,2,3-triazóis (Figura 6) são anéis de 5 membros contendo 3 átomos de nitrogênio vicinais. São de origem exclusivamente sintética, pois é muito difícil para os sistemas bioquímicos produzirem moléculas com três átomos de nitrogênio vizinhos em um arranjo cíclico (PENG; ZHU, 2003).

Figura 6. Estrutura química dos tautômeros do 1,2,3-triazol presentes no equilíbrio.



Fonte: adaptado de MELO *et al.* 2006.

A reação de cicloadição 1,3-dipolar de azidas frente a alcinos é uma metodologia clássica para a síntese de 1,2,3-triazóis. Entretanto, quando essa reação é realizada sem o emprego de catálise ela requer longos tempos reacionais e altas temperaturas para ocorrer. Além disso, não é regioseletiva e leva a formação de regioisômeros 1,4 e 1,5-dissubstituídos (Figura 7).

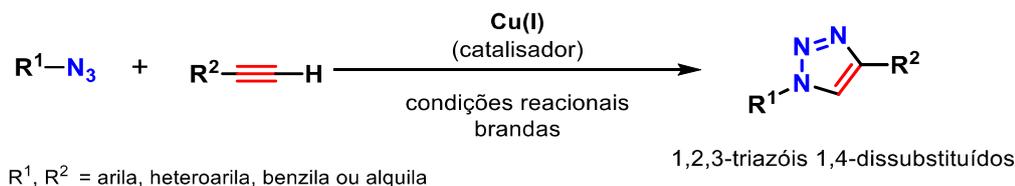
Figura 7. Cicloadição 1,3-dipolar de azidas e alcinos sem catálise.



Fonte: adaptado de HEIN; FOKIN, 2010.

A aplicabilidade desta reação começou a mudar quando estudos realizados concomitantemente pelos grupos de Meldal e de Sharpless, em 2002, mostraram que a utilização de Cu(I) acelerava a reação devido a mudanças no mecanismo reacional (FREITAS *et al.*, 2011). Essa metodologia ficou conhecida como CuAAC (do inglês: *Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) e permite a reação entre uma ampla gama de azidas orgânicas e alcinos terminais levando exclusivamente a 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos. A transformação ocorre em condições muito mais brandas, podendo ocorrer à temperatura ambiente, sem o uso de solventes, ou em solventes considerados ambientalmente seguros como água e etanol, e proporcionando os produtos desejados em altos rendimentos (Figura 8) (HEIN; FOKIN, 2010). Dessa forma, essa reação se enquadra nos critérios de uma reação *click*, termo proposto por Kolb, Finn e Sharpless, no qual a reação deve ser termodinamicamente favorável, seletiva, proporcionar altos rendimentos, empregar materiais de partida estáveis e solventes não tóxicos (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001).

Figura 8. Cicloadição de azidas frente a alcinos catalizada por Cu(I) (CuAAC).

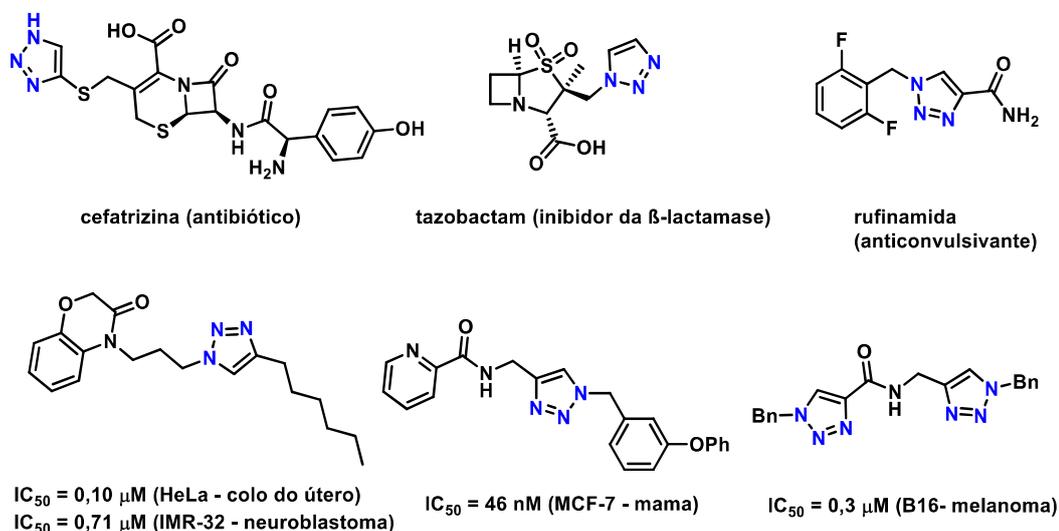


Fonte: a autora.

Outros métodos para a síntese desses compostos são a ciclização intramolecular de bis-hidrazonas ou bis-semicarbazidas, ciclização [2N + 1M], ciclização de triazinas, ou ainda a partir da modificação de outros heterocíclicos (MELO *et al.*, 2006).

Os 1,2,3-triazóis são núcleos interessantes em *drug discovery* devido à sua fácil obtenção sintética e ampla gama de atividades biológicas, que incluem atividades antibacterianas, fungicida, anticonvulsivante e antitumorais. As características estruturais dos potenciais triazóis bioativos incluem estabilidade à degradação metabólica devido à resistência a transformações biológicas como oxidação, redução e hidrólise ácida e básica, alta seletividade e capacidade de ligações de hidrogênio que podem ser favoráveis na ligação de alvos biomoleculares (KRALJEVIĆ *et al.*, 2016). Na Figura 9 são apresentadas as estruturas de três fármacos comerciais contendo o núcleo triazólico e três exemplos de moléculas que também possuem o núcleo triazólico em sua estrutura e apresentaram atividade antitumoral.

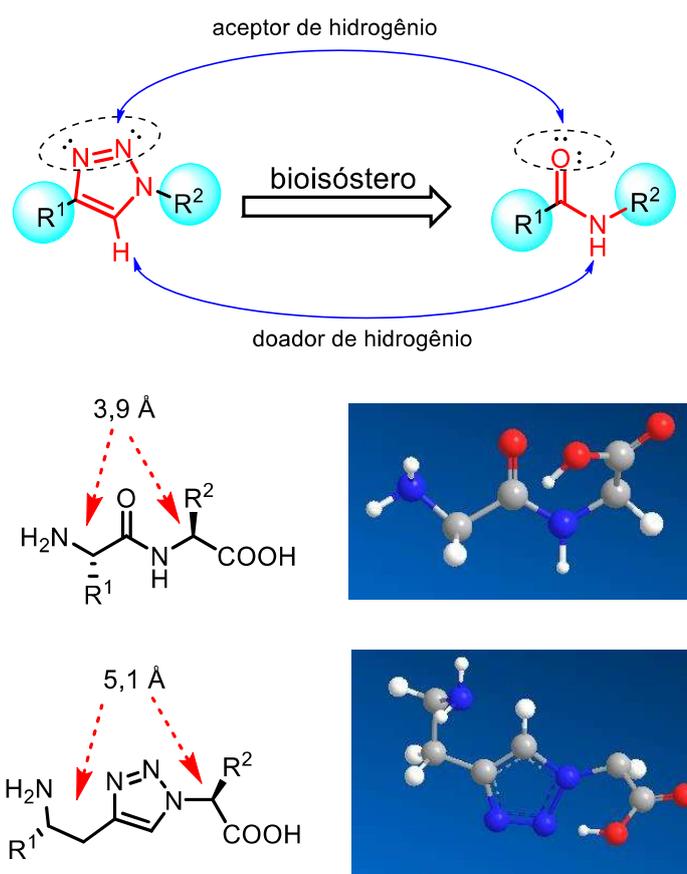
Figura 9. Fármacos comerciais contendo o núcleo triazólico em sua estrutura, e exemplos de moléculas que apresentam atividade antitumoral.



Fonte: a autora.

O anel triazólico possui similaridades com as ligações amídicas em termos de comprimento de ligação, planaridade e centros doadores e receptores de hidrogênio, sendo assim considerado um bioisótero da função amida (Figura 10). Por consequência, uma série de compostos bioativos contendo o núcleo 1,2,3-triazol em substituição à amida demonstram atividade biológica (BI *et al.*, 2018; DHEER; SINGH; SHANKAR, 2018).

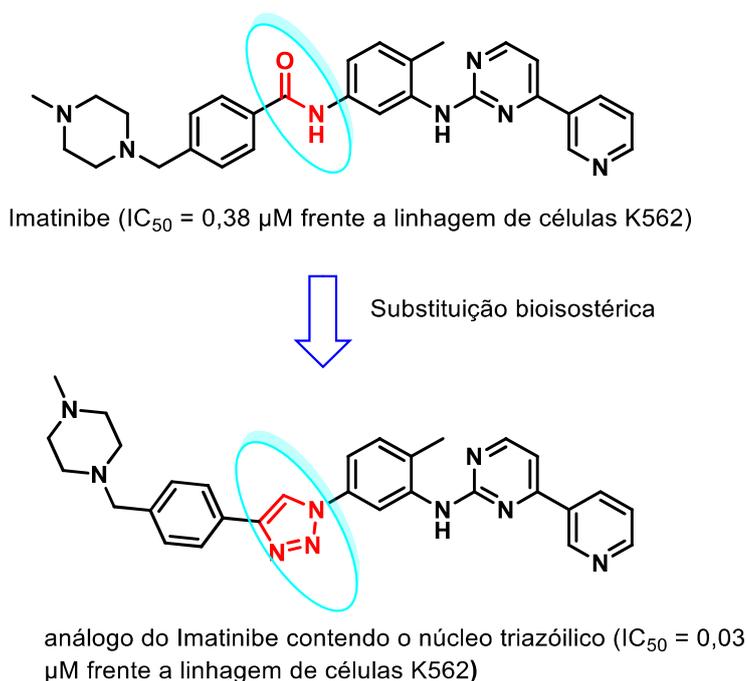
Figura 10. Triazol como bioisótero da função amida.



Fonte: a autora.

Como exemplo desse efeito, pode-se citar a substituição bioisostérica do grupo amida por um anel triazólico na estrutura do fármaco Imatinibe, como mostrado na Figura 11. A substituição levou a um aumento na citotoxicidade do composto frente à linhagem K562 (leucemia) (MALIK *et al.*, 2020). Além disso, os triazóis também têm sido aplicados como isósteros de ligações duplas (KRISTAFOR *et al.*, 2015).

Figura 11. Substituição bioisostérica de uma amida por um anel triazólico levando a uma maior citotoxicidade do composto frente à linhagem de células K562 (leucemia).



Fonte: adaptado de MALIK *et al.* 2020

3.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS DERIVADOS DA URACILA E DE COMPOSTOS CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZOILCUMARINA

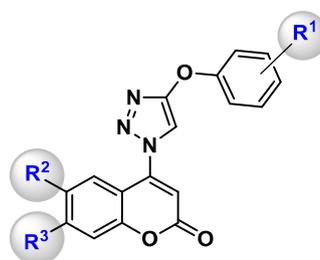
Como previamente discutido, a uracila apresenta uma abrangente e pronunciada atividade biológica, fazendo parte da estrutura de fármacos conhecidos (Figura 2). Da mesma forma, as cumarinas também apresentam pronunciada atividade biológica (Figura 4). Sendo assim, nesta seção serão apresentados exemplos de estudos de atividade antineoplásica de compostos derivados da uracila e cumarinas, incluindo compostos que apresentam o núcleo 1,2,3-triazólico.

Zhang e coautores (ZHANG *et al.*, 2014) sintetizaram uma série de 4-(1,2,3-triazol-1-il)cumarinas conjugadas e avaliaram a atividade antitumoral *in vitro* frente a três linhagens de células tumorais humanas, incluindo células do carcinoma de mama estrogênio dependente (MCF-7), células do carcinoma de cólon (SW480), e células do carcinoma de pulmão (A549). Neste estudo foram avaliados o efeito da variabilidade dos grupos substituintes na posição C-4 do anel 1,2,3-triazólico, bem como nos grupos substituintes no anel aromático e nas posições C-6 e C-7 da cumarina. As atividades provenientes dos compostos **Z1-Z13** foram comparadas à atividade da doxorrubicina, a qual foi escolhida como fármaco controle (Tabela 1). Nos ensaios *in vitro* de viabilidade celular,

em que foi empregado o ensaio de redução do MTT, a maioria dos compostos sintetizados apresentaram atividade antitumoral, principalmente frente à linhagem de carcinoma de pulmão A549 (Tabela 1).

Dentre os compostos avaliados, os compostos **Z8**, **Z9** e **Z13** (Tabela 1) foram os que apresentaram os melhores resultados quanto ao valor de IC₅₀ frente à linhagem A549. O composto **8** com um IC₅₀ = 0,88 μM, o composto **9** com IC₅₀ = 0,66 μM e o composto **Z13**, o qual apresentou o menor valor, com um IC₅₀ = 0,52 μM, todos foram inferiores ao apresentado pelo fármaco controle (IC₅₀ = 1,65 μM).

Tabela 1. Inibição *in vitro* do crescimento de células tumorais promovida pelos compostos **Z1-Z13**.



Z1-Z13

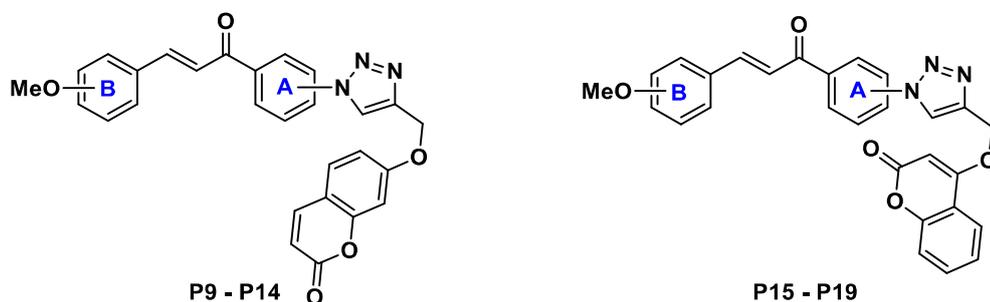
Composto	Substituinte (R ¹)	Substituinte (R ²)	Substituinte (R ³)	IC ₅₀ (μM) ^a		
				MCF-7	SW480	A549
Z1	<i>o</i> -COOCH ₃	Br	H	34,14 ± 2,2	20,23 ± 3,4	5,25 ± 0,24
Z2	<i>o</i> -Br	Br	H	28,91 ± 1,3	20,13 ± 1,7	8,43 ± 0,51
Z3	<i>2</i> -OH	Br	H	24,82 ± 0,89	19,14 ± 3,3	7,94 ± 3,4
Z4	<i>p</i> -CH ₂ CH ₃	Br	H	12,67 ± 1,4	10,82 ± 0,6	11,58 ± 0,36
Z5	<i>p</i> -Br	Br	H	1,92 ± 0,71	1,31 ± 3,2	24,47 ± 2,5
Z6	<i>p</i> -NH ₂	Br	H	2,04 ± 1,1	2,09 ± 0,13	11,85 ± 0,24
Z7	<i>p</i> -CF ₃	Br	H	11,41 ± 2,3	3,09 ± 2,0	1,62 ± 1,1
Z8	<i>p</i> -F	Br	H	7,00 ± 0,25	1,77 ± 0,03	0,85 ± 0,09
Z9	<i>p</i> -COOCH ₃	Br	H	3,13 ± 0,24	3,62 ± 0,25	0,66 ± 0,03
Z10	F	H	H	5,84 ± 0,22	5,84 ± 0,22	3,82 ± 0,40
Z11	F	OCH ₃	H	8,56 ± 0,23	25,87 ± 1,4	3,15 ± 0,39
Z12	F	OH	H	4,62 ± 0,65	2,72 ± 0,30	2,01 ± 0,314
Z13	F	H	OCH ₃	5,89 ± 0,14	1,99 ± 0,38	0,52 ± 0,21
doxorubicina				3,51 ± 0,31	2,43 ± 0,25	1,65 ± 0,09

^a Atividade inibidora determinada por exposição das células aos compostos pelo período de 48 h, e expressa como a concentração necessária para inibir a proliferação de células tumorais em 50% (IC₅₀). SD, desvio padrão (n = 3).

Por fim, os compostos 4-(1,2,3-triazol-1-il)cumarinas se mostraram citotóxicos frente às demais linhagens de células que foram testadas, sendo que os melhores resultados foram obtidos pelo composto **Z5** com $IC_{50} = 1,92 \mu\text{M}$ frente às células MCF-7 e $IC_{50} = 1,31 \mu\text{M}$ frente as células SW480 (Tabela 1).

Pingaew e colaboradores (PINGAEW *et al.*, 2014) sintetizaram onze moléculas híbridas derivadas de chalconas e cumarinas, as quais foram ligadas por um anel 1,2,3-triazólico obtido a partir de uma reação *click*. Neste estudo os autores submeteram as moléculas sintetizadas à avaliação das atividades antimalárica e citotóxica *in vitro* frente à quatro linhagens de células tumorais: HuCCA-1 (colangiocarcinoma), HepG2 (carcinoma hepatocelular), A549 (pulmão), MOLT-3 (leucemia linfoblástica), e também às células Vero, as quais são uma linhagem não tumoral isoladas a partir de células epiteliais renais do macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*. Como apresentado na Tabela 2, os ensaios de citotoxicidade demonstraram que a maioria dos compostos obtidos nesse estudo foram citotóxicos frente à linhagem de células MOLT-3. Em particular, a chalcona-cumarina **P16** foi o composto com maior atividade citotóxica ($IC_{50} = 0,53 \mu\text{M}$). Os compostos **P10**, **P11**, **P16** e **P18** apresentaram alta citotoxicidade frente a linhagens de células HepG2, a qual foi superior à apresentada pelo fármaco controle, o etoposídeo. O composto **P16** foi o mais potente frente a esta linhagem de células ($IC_{50} = 4,26 \mu\text{M}$), porém apresentou toxicidade frente às células não tumorais (Vero). Já o análogo **P11** apresentou a segunda maior atividade frente a HepG2 com IC_{50} de $8,18 \mu\text{M}$ e sem toxicidade frente à linhagem de células Vero. Em relação à atividade antimalárica, os autores relatam que o composto **P18** exibiu a atividade mais pronunciada, com IC_{50} de $1,60 \mu\text{M}$, e sem afetar as células não tumorais (Figura 13).

Tabela 2. Atividade citotóxica (IC_{50} , μM) dos compostos híbridos (**P9-P19**) frente às linhagens de células tumorais HuCCA-1 (colangiocarcinoma), HepG2 (carcinoma hepatocelular), A549 (pulmão), MOLT-3 (leucemia linfoblástica) e não tumoral Vero.



Composto	Substituinte no Anel-A	Substituinte no Anel-B	Linhagem de células tumorais IC_{50} (μM)				Vero
			HuCCA-1*	HepG2*	A549*	MOLT-3*	
P9	3'-triazolil	3',4'-diOMe	33,37 \pm 0,84	NC	NC	3,13 \pm 0,11	NC
P10	3'-triazolil	2',3'-diOMe	11,13 \pm 0,40	15,70 \pm 2,00	31,40 \pm 1,00	5,16 \pm 0,69	35,03
P11	4'-triazolil	2',3'-diOMe	4,81 \pm 0,81	8,18 \pm 0,76	7,95 \pm 3,04	NC	NC
P12	3'-triazolil	2',3',4'-triOMe	NC	NC	NC	3,89 \pm 0,28	NC
P13	4'-triazolil	2',3',4'-triOMe	NC	NC	NC	22,50 \pm 3,63	NC
P14	4'-triazolil	2',3',5'-triOMe	NC	NC	NC	79,49 \pm 1,44	NC
P15	3'-triazolil	3',4'-diOMe	38,57 \pm 1,48	NC	NC	3,91 \pm 0,34	NC
P16	3'-triazolil	2',3'-diOMe	2,36 \pm 0,14	4,26 \pm 0,29	18,06 \pm 1,07	0,53 \pm 0,08	3,91
P17	3'-triazolil	2',3',4'-triOMe	6,13 \pm 0,06	NC	NC	1,13 \pm 0,18	NC
P18	4'-triazolil	2',3',4'-triOMe	NC	22,85 \pm 0,51	NC	12,33 \pm 1,78	NC
P19	4'-triazolil	2',3',5'-triOMe	NC	NC	NC	6,58 \pm 1,78	NC
Etoposídeo			ND	30,16 \pm 0,50	ND	0,051 \pm 0,002	ND
Doxorrubicina			0,83 \pm 0,07	0,79 \pm 0,08	0,44 \pm 0,01	ND	ND
Elipticina			ND	ND	ND	ND	1,94

*Linhagens HuCCA-1 (colangiocarcinoma), Hep-G2 (fígado), A549 (pulmão), MOLT-3 (leucemia linfoblástica); NC, não citotóxico = $IC_{50} > 50 \mu g/mL$; ND, não determinado; Etoposídeo, Doxorrubicina e Elipticina foram utilizados como fármacos de referência.

Fonte: PINGAEW *et al.* 2014.

Neste trabalho, os autores relatam que a atividade citotóxica relacionada à chalcona está associada a sua capacidade de inibir a formação da proteína β -tubulina por meio da ligação dos compostos ao sítio de ligação da colchicina. A α - e a β -tubulina são proteínas globulares que ao passarem pelo processo de polimerização formam os microtúbulos, que

desempenham papéis importantes em uma variedade de processos celulares. Durante a mitose, os microtúbulos formam eixos mitóticos altamente dinâmicos, críticos para a orientação e segregação adequada dos cromossomos. O comprometimento dos fusos mitóticos leva à parada mitótica e conseqüentemente à apoptose. O papel crítico dos microtúbulos na divisão celular e outras funções celulares os torna um alvo importante para a quimioterapia oncológica. A colchicina é um alcalóide, originalmente extraído de plantas do gênero *Colchicum*, utilizada para o tratamento de gota (anti-inflamatório) e tem potencial antitumoral. Desta forma, o estudo de ancoragem molecular, comumente referido ao termo em inglês *molecular docking*, foi também realizado para investigar as interações intermoleculares dos derivados obtidos no trabalho frente à β -tubulina. Os resultados obtidos sugeriram que todos os análogos de chalcona-triazol-cumarina conseguiram ocupar o sítio de ligação colchicina da β -tubulina, como mostrado na Figura 12 C.

As energias de ligação da β -tubulina com esses compostos estão de acordo com suas atividades citotóxicas, em que os compostos que se apresentaram mais potentes, ou seja, os análogos com os grupos substituintes dimetoxila (**P9-P11**, **P15** e **P16**, Tabela 2) mostraram energias de ligação mais baixas em torno de -10,5 a -10,8 kcal/mol, em relação ao composto que apresentou menor atividade citotóxica (**P14**, Tabela 2) com energia de ligação de -9,6 kcal/mol.

Um ponto importante descoberto por meio das poses dos compostos foi que eles poderiam ocupar também o sítio de ligação GTP (guanosina trifosfato) da α -tubulina, que é adjacente ao sítio de ligação colchicina da β -tubulina. Essa descoberta pode indicar que essa série de compostos chalcona-triazol-cumarinas podem atuar como um inibidor dual de sítios dos complexos α -tubulina e β -tubulina, o que seria uma justificativa para sua atividade citotóxica.

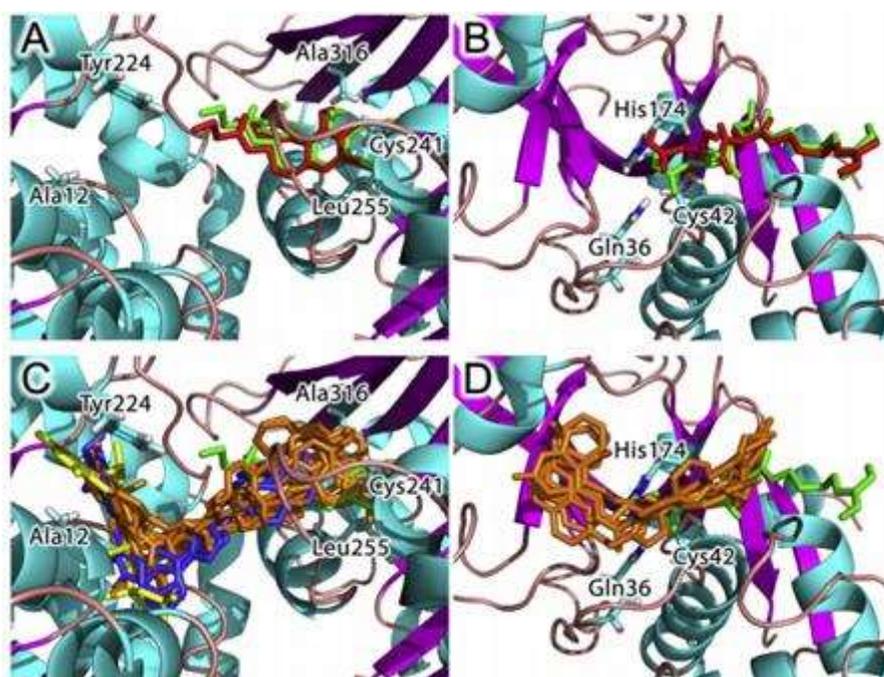
A análise de modelagem molecular da estrutura cristalina revelou que a colchicina co-cristalizada interage com a β -tubulina por meio da formação de ligações de hidrogênio envolvendo um grupo metoxila com o resíduo de aminoácido Cys241, e também envolve interações hidrofóbicas com os resíduos Leu255 e Ala316 (Figura 12 A).

O GTP liga-se à α -tubulina por meio da formação de uma rede de ligações de hidrogênio entre a porção fosfato e Ala12, Asp69, Ser140, Thr145, Ser178 e Glu183, enquanto o anel guanina forma ligações de hidrogênio com Asn206 e Asn288, além de empilhamento π - π com Tyr224. Além disso, interações hidrofóbicas entre Ala12 e Tyr224 da α -tubulina com GTP também foram observadas. Dessa forma, os autores concluíram que estes resíduos supramencionados podem ser o local essencial para o acoplamento do ligante de

modo a inibir a formação de microtúbulos.

O composto **P11**, que apresentou citotoxicidade frente às linhagens HuCCA-1, HepG2 e A549, sem afetar as células normais, poderia interagir tanto com o sítio de ligação da colchicina quanto com sítios de ligação a GTP de β - e α -tubulinas, respectivamente (Figura 14 A). A porção cumarínica do composto pode ocupar a bolsa hidrofóbica definida pelos resíduos Leu248, Ala316 e Ala354 da β -tubulina, que estão localizados dentro do sítio de ligação da colchicina. O anel **B** da porção chalcona do composto pode formar interações hidrofóbicas com Ala12 e Tyr224, juntamente com interação $\pi - \pi$ com Tyr224 da α -tubulina, que constitui a bolsa de ligação do GTP. A menor citotoxicidade dos análogos com substituinte trimetoxila (**P13**, **P14**, **P18** e **P19**) em comparação com o análogo com substituinte 2,3-dimetoxila (**P11**) pode estar relacionado ao efeito estérico nesta área hidrofóbica. Além disso, essa interação foi fortalecida por meio de ligação de hidrogênio entre o átomo de N na posição 2 do anel triazólico com o resíduo Asn101 da α -tubulina, e interação $\pi - \text{cátion}$ do anel **A** da chalcona com a cadeia lateral da Lys254 da β -tubulina carregada positivamente.

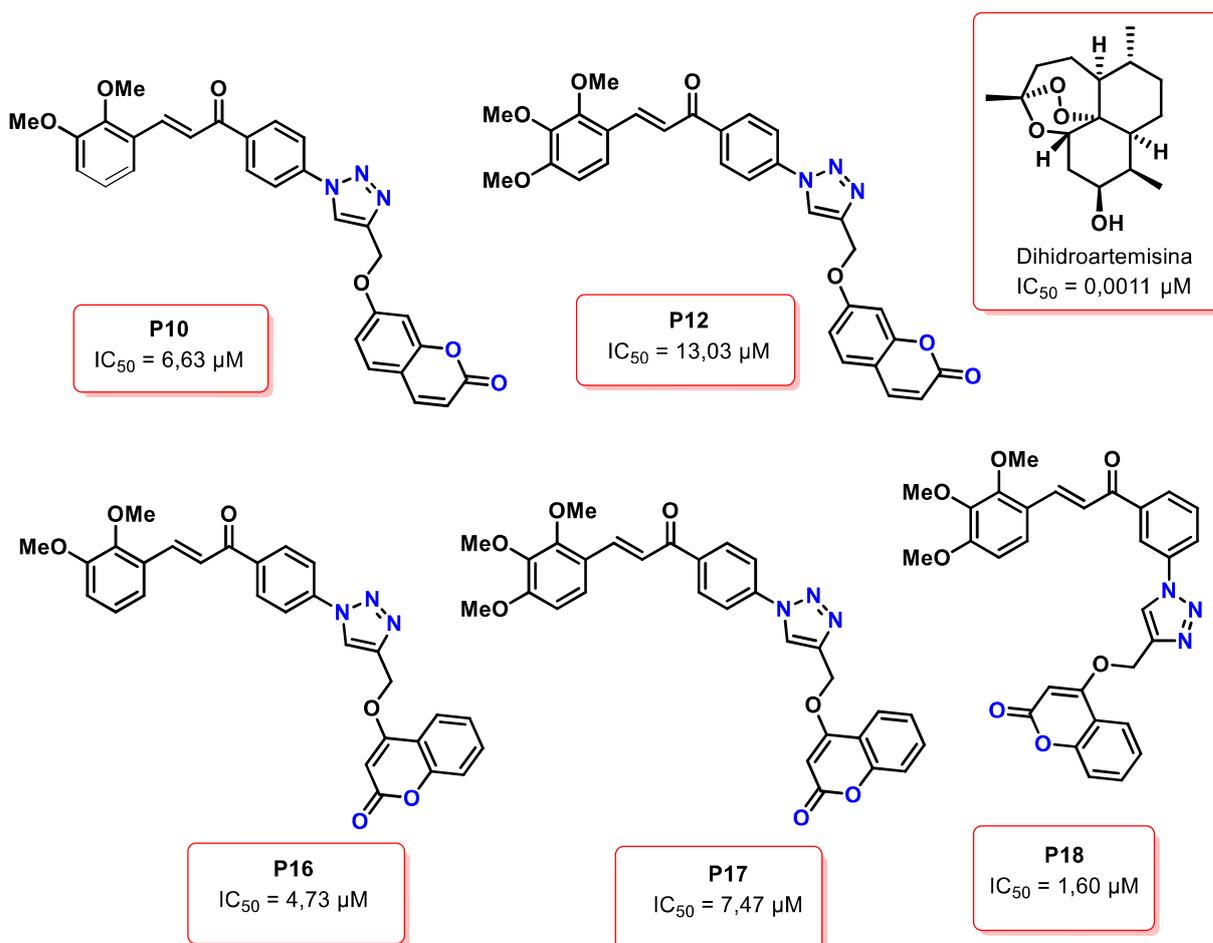
Figura 12. Ancoragem molecular (*docking*) dos híbridos obtidos frente aos alvos tubulina e falciapaína-2. Poses de re-docking da colchicina para tubulina (A) e E64 (inibidor da falciapaína-2) para falciapaína-2 (B) são mostradas com estruturas dos ligantes originais em verde enquanto as poses de re-docking estão em vermelho. As poses do *docking* dos ligantes híbridos à tubulina (C) são mostradas com colchicina colorida em verde, GTP colorido em amarelo, ligantes coloridos em laranja e azul. Poses de encaixe dos ligantes híbridos à falciapaína-2 (D) são mostradas com E64 colorida em verde e ligantes coloridos em laranja.



Fonte: PINGAEW *et al.* 2014.

Em relação à atividade antimalárica, os autores reportam que derivados de chalconas demonstraram inibir a cisteína protease da malária. Essa enzima desempenha um papel essencial na degradação da hemoglobina do hospedeiro em pequenos peptídeos como nutrientes. Dessa forma, o alvo falcipaina-2 também foi avaliado na ancoragem molecular, frente aos compostos que apresentaram melhor atividade antimalárica (Figura 13).

Figura 13. Compostos que apresentaram atividade antimalárica frente ao *Plasmodium falciparum*.



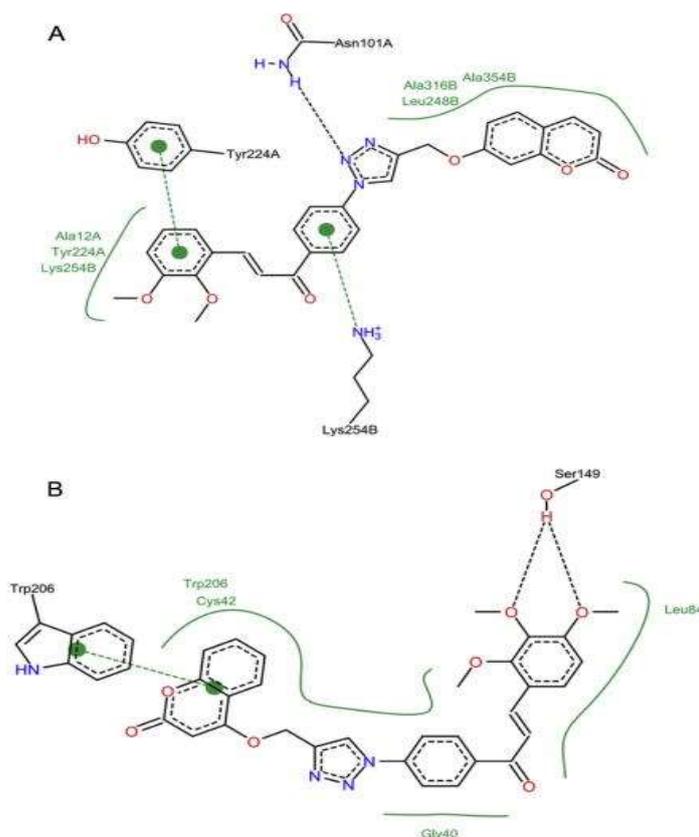
Fonte: adaptado de PINGAEW *et al.* 2014

Os resultados do estudo de *docking* sugeriram que todos os compostos selecionados poderiam se ligar ao sítio ativo da falcipaina-2 (Figura 12 D) com energias de ligação na faixa de -8,1 a -8,9 kcal / mol. O composto **P18**, que apresentou atividade antimalárica mais elevada, se ligaria ao sítio ativo da falcipaina-2 através do esquema de interação mostrado na Figura 14 B. A porção cumarínica do composto poderia ocupar o sítio de ligação da falcipaina-2 via interação hidrofóbica com os resíduos Cys42 e Trp206 juntamente com a formação de empilhamento π - π com o Trp206. Essa interação proporcionou uma forte

estabilidade porque o anel **A** e o anel **B** da porção chalcona formaram interações hidrofóbicas com a Gly40 e Leu84, respectivamente. Além disso, os substituintes 3,4-dimetoxila do anel **B** de chalcona proporcionaram ligação de hidrogênio com a Ser149, resultando assim em uma forte ligação do composto **P18** com o sítio ativo da falcipaina-2.

Os resultados do docking sugeriram que a atividade antimalárica dos derivados chalcona-triazol-cumarina pode ser relacionada à inibição da falcipaina-2. Por fim, outro fator que pode influenciar na atividade desses compostos é que as vias metabólicas em parasitas intracelulares (ou seja, *P. falciparum*) e células tumorais são mais sensíveis ao estresse oxidativo do que as células normais. Dessa forma, os autores presumem que as porções dimetoxichalconas possam ser metabolizadas em catecóis, depois em radicais fenóxi e, finalmente, em ânions superóxidos, que são tóxicos para as células.

Figura 14. Esquema bidimensional de interação proteína-ligante do composto **P11** com a tubulina (A) e composto **P18** com a falcipaina-2 (B).



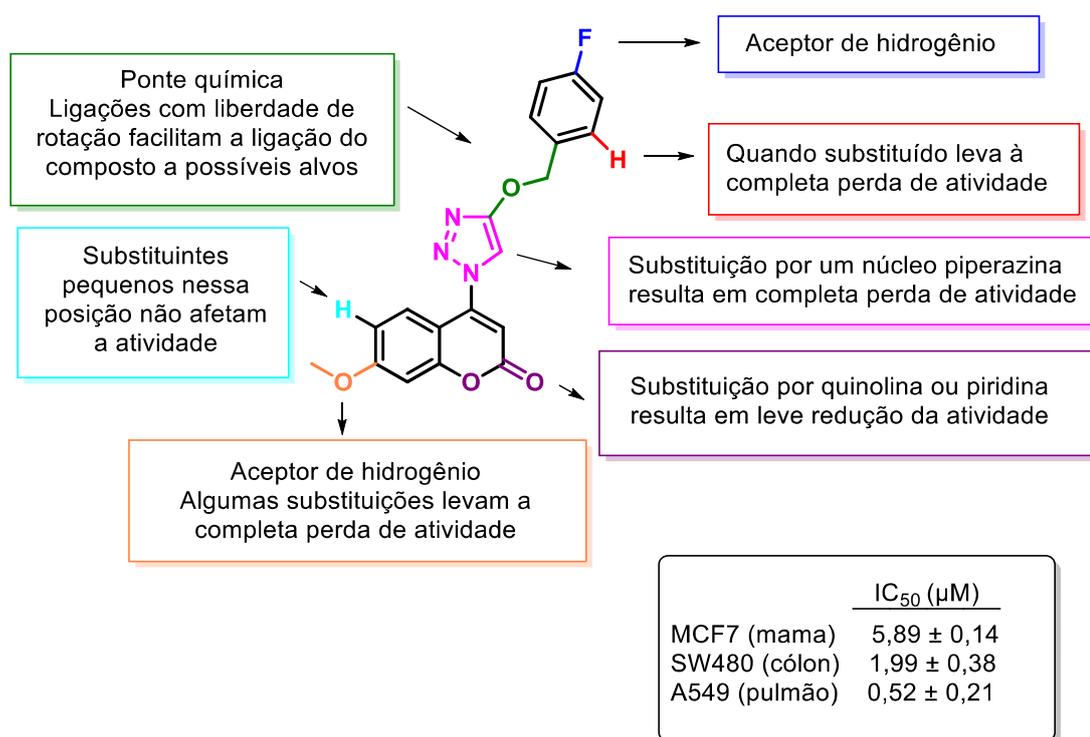
Fonte: PINGAEW *et al.* 2014.

Thakur, Singla e Jaitak (2015) realizaram uma revisão da literatura, referente ao período de 2011 a 2014, onde apresentam o grande potencial das cumarinas como agentes

antitumorais, com um mínimo de efeitos adversos. Os autores destacaram a capacidade dos derivados cumarínicos de regular diversos tipos de vias celulares que podem ser exploradas para a atividade antitumoral seletiva, além de alguns alvos importantes para estudos de terapia do câncer molecularmente direcionadas. Por fim, apresentam estudos de relação estrutura-atividade, destacando os grupos químicos responsáveis por promover as atividades observadas.

Um dos exemplos reportados é o trabalho de Zhang *et al.* 2014, no qual os autores afirmam que as substituições no núcleo da cumarina mudam drasticamente a atividade biológica dos compostos, podendo levar a melhorias na atividade ou até mesmo a sua perda completa. Estudos de SAR (Figura 15) evidenciaram que as ligações com movimento de rotação livre facilitam a ligação do composto com o sítio do receptor.

Figura 15. Estudo da relação estrutura-atividade (SAR) do derivado 4-(1,2,3-triazol-1-il)cumarina.

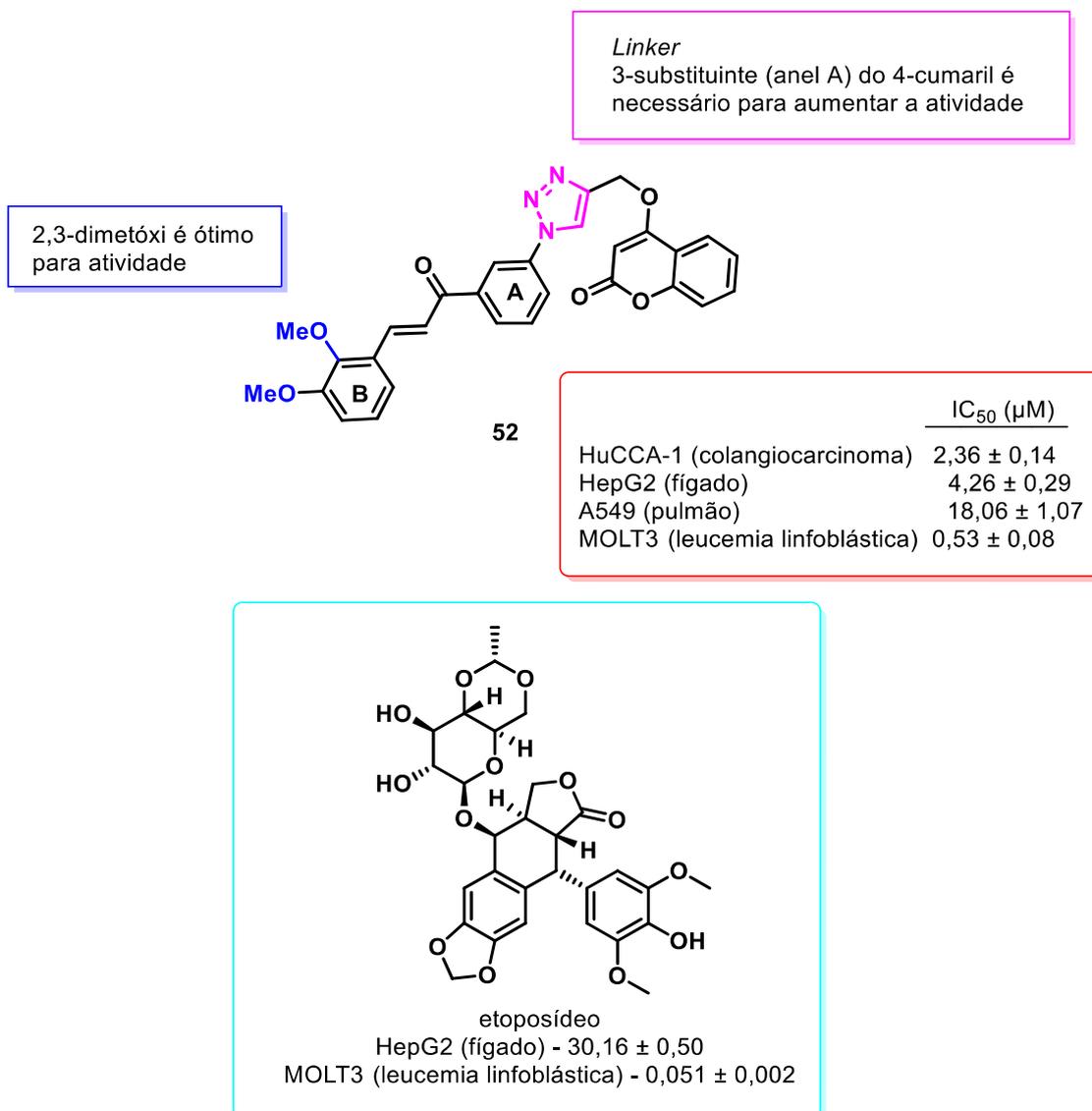


Fonte: adaptado de THAKUR; SINGLA; JAITAK, 2015

Outro exemplo reportado no artigo de revisão foi o trabalho de Pingaew *et al.* 2014, no qual destacam dentre todos os compostos sintetizados o composto **52** como o mais ativo, sendo sete vezes mais potente, frente à linhagem de células HepG2, que o etoposídeo, o qual é

o fármaco utilizado como padrão de comparação. O aumento na atividade é atribuído aos grupos metoxilas presentes nas posições 2 e 3 do anel benzênico **B**, e também a porção cumarínica ligada à posição 3 do anel **A** (Figura 16).

Figura 16. Estudo da relação estrutura-atividade do derivado 2,3-dimetóxi substituído (**52**).

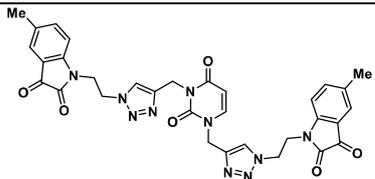
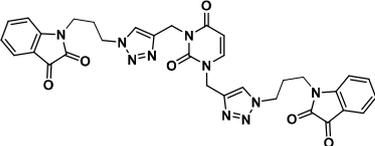
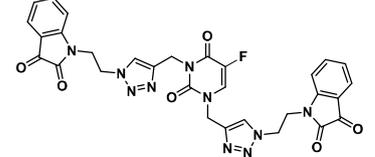
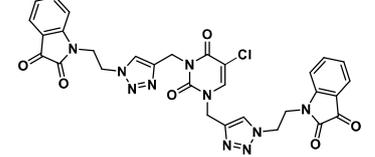
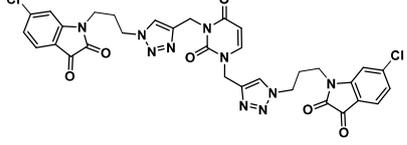
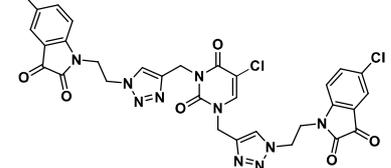


Fonte: adaptado de THAKUR; SIGLA; JAITAK, 2015

Com relação à atividade antineoplásica dos derivados da uracila, um exemplo interessante é o estudo reportado por Kumar e colaboradores (KUMAR *et al.*, 2012), na qual foram sintetizados uma série de 1*H*-1,2,3-triazóis conjugados à uracila-isatina, que foram então avaliados quanto à atividade citotóxica frente a três linhagens de células tumorais humanas, HeLa (cervical), MCF-7 (mama) e DU145 (próstata), usando o ensaio MTT. Os autores relataram que o perfil citotóxico depende dos substituintes na posição C-5 da uracila,

bem como na isatina, além do tamanho da cadeia alquílica. Os compostos que apresentaram as melhores atividades, bem como os respectivos valores de IC_{50} , são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Compostos híbridos isatina-uracila e citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais humanas HeLa (cervical), DU145 (próstata) e MCF-7 (mama).

Composto	IC_{50} (μ M)			
	HeLa	DU145	MCF-7	
1		52,17	38,17	51,08
2		50,7	>100	56,44
3		>100	28,59	>100
4		>100	18,21	>100
5		33,08	13,9	>100
6		65,68	>100	38,16

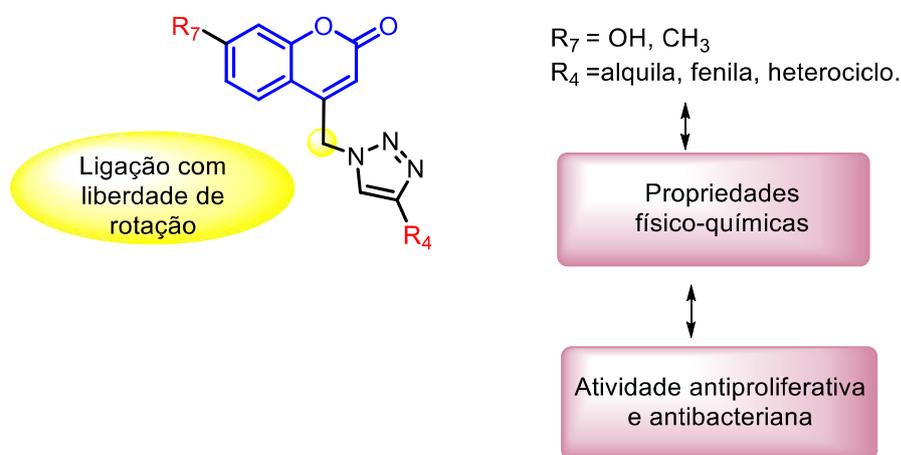
Fonte: KUMAR *et al.* 2012

Pode-se observar na Tabela 3 que dentre as linhagem avaliadas, os compostos foram mais citotóxicos frente às células tumorais de próstata (DU145), levando a valores de IC_{50} baixos de 13,9 e 18,2 μ M (entradas 5 e 4). A linhagem de células HeLa se mostrou resistente a alguns compostos da série, como os mostrados nas entradas 3 e 4, e o composto mais citotóxico frente a essa linhagem apresentou $IC_{50} = 33,08 \mu$ M (Tabela 3, entrada 5). Em relação à linhagem de células MCF-7, o melhor valor de IC_{50} obtido foi de 38,16 μ M (Tabela

3, entrada 6). A partir dos resultados encontrados, os autores relatam a importância da presença de halogênios na posição C-5 da uracila, bem como na isatina, além da influência do aumento da cadeia alquílica na atividade expressa pelos compostos sintetizados.

Kraljević *et al.* 2016, relataram a síntese de uma série de compostos em que o núcleo 1,2,3-triazólico está ligado ao núcleo cumarínico, apresentando substituições na posição C-4 do anel triazólico (Figura 17) e sendo os substituintes alquil, fenil, alquilfenil, ditiocarbamato, benzenosulfonamida e heterociclos benzofundidos.

Figura 17. Compostos híbridos 1,2,3-triazol-cumarina C4-substituídos conformacionalmente irrestritos.



Fonte: adaptado de KRALJEVIĆ *et al.* 2016.

Os compostos obtidos no decorrer do estudo foram avaliados quanto à sua atividade antiproliferativa frente à cinco linhagens de células tumorais A549 (pulmão), HepG2 (fígado), CFPAC-1 (pâncreas), HeLa (cervical), SW620 (colorectal metástase), e duas linhagens de células não tumorais W138 (fibroblasto de pulmão humano) e 3T3 (fibroblasto embrionário de rato). Os compostos com maior atividade são apresentados na Figura 18 e os resultados obtidos na Tabela 4.

Figura 18. Compostos sintetizados por Kraljević *et al.* 2016 que apresentaram maior citotoxicidade em ensaio *in vitro*.

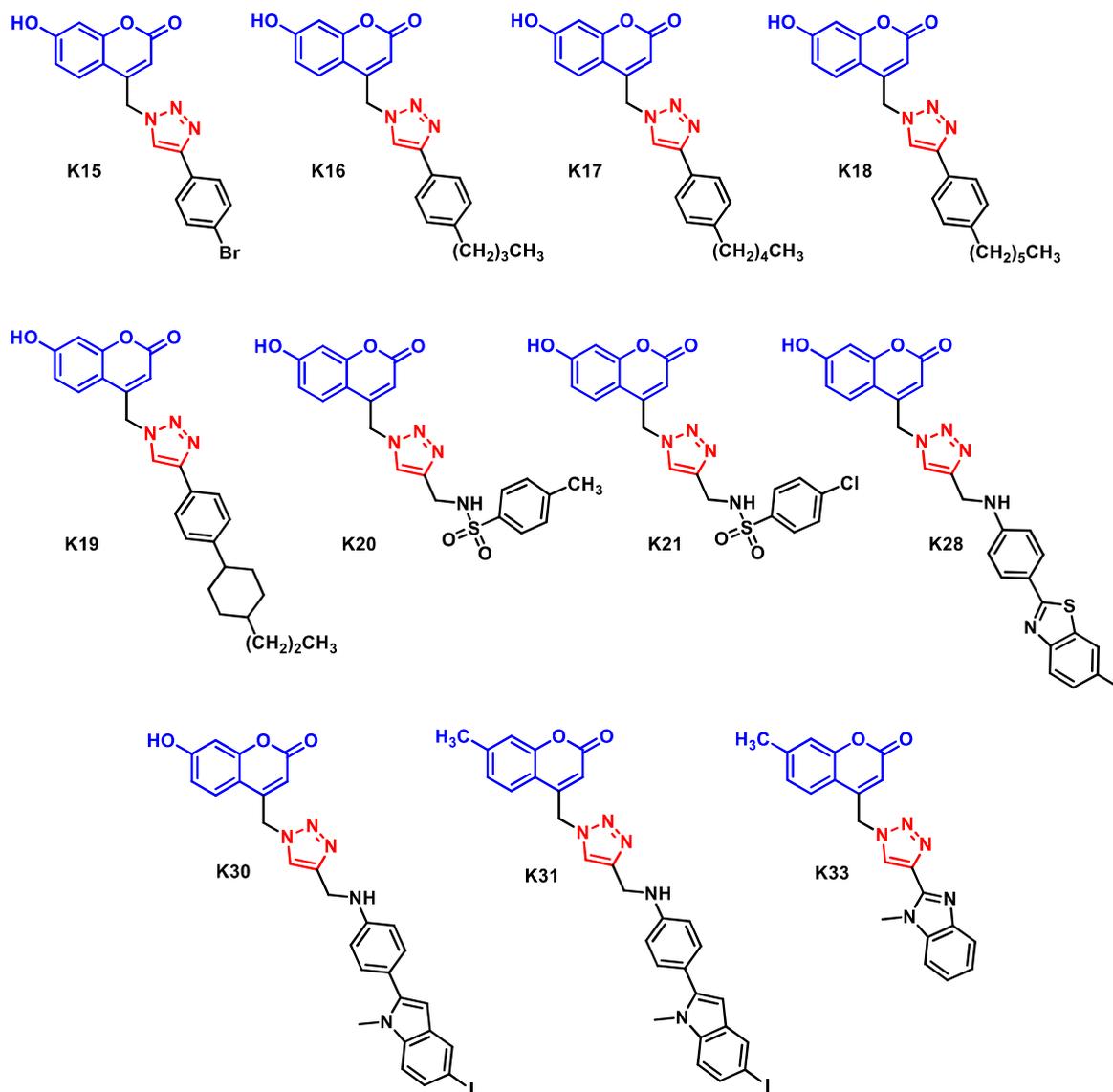


Tabela 4. Efeito inibitório de crescimento *in vitro* promovido pelos compostos híbridos triazol-cumarinas frente às linhagens de células tumorais A549 (pulmão), HepG2 (fígado), CFPAC-1 (pâncreas), HeLa (cervical), SW620 (colorectal metástase), e fibroblastos normais W138 (fibroblasto de pulmão humano) e 3T3 (fibroblasto embrionário de rato).

Entrada	Composto	IC ₅₀ (μM)					
		A549*	HepG2*	CFPAC-1*	HeLa*	SW620*	3T3/ W138*
1	K15	32,34	61,11	52,92	40,17	97,66	0,05
2	K16	13,83	48,40	69,77	38,99	49,24	0,35
3	K17	13,65	27,34	50,40	24,63	39,64	0,71
4	K18	8,87	9,16	>100	8,73	36,79	13,96
5	K19	41,03	30,41	52,79	34,26	37,52	7,91
6	K20	46,40	29,84	68,86	55,71	92,19	0,03
7	K21	47,93	31,40	81,91	58,46	>100	0,82
8	K28	16,16	52,82	10,54	7,26	89,95	5,01
9	K30	28,63	8,57	29,89	14,16	34,34	25,84
10	K31	34,09	38,06	41,71	34,43	70,02	8,31
11	K33	16,85	0,90	59,41	17,48	>100	45,33

*Linhagens A549 (pulmão), HepG2 (fígado), CFPAC-1 (pâncreas), HeLa (cervical), SW620 (colorectal metástase), W138 (fibroblasto de pulmão humano) e 3T3 (fibroblasto embrionário de rato).

Fonte: KRALJEVIĆ *et al.* 2016

Os autores relataram que entre os compostos que exibiram atividade mais elevada ($IC_{50} \leq 30 \mu M$), a maioria apresentou efeito inibitório frente às linhagens celulares A549 e HeLa. Entretanto, nenhum dos compostos exibiu efeito inibidor ($IC_{50} \leq 30 \mu M$) frente à linhagem de células SW620, como pode ser observado na Tabela 4. Os híbridos 1,2,3-triazol-cumarina com substituintes alquila e fenila na posição C-4 do triazol, e os compostos contendo as cadeias 4-alquílica e 4-(hidroxialquílica) mostraram atividades antiproliferativas fracas, ou até mesmo não apresentaram atividade alguma.

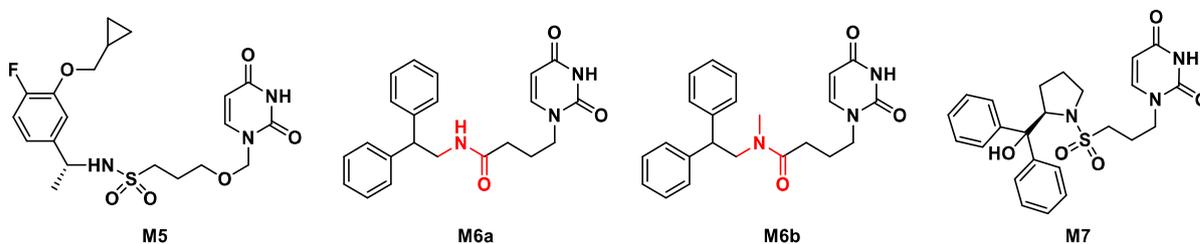
A introdução do substituinte 4-(*p*-alquilfenil) (Tabela 4, entrada 4, composto **K18**) na porção triazólica do híbrido levou a um aumento na atividade, principalmente frente à linhagem tumoral de pulmão (A549; $IC_{50} = 8,87 \mu M$).

O composto **K28** (Tabela 4, entrada 8) demonstrou excelente atividade contra carcinoma cervical (HeLa, $IC_{50} = 7,26 \mu M$). Além disso, 7-hidroxycumarina-1,2,3-triazolil-5-iodoindol (**K30**) (Tabela 4, entrada 9) mostrou “alta potência” frente à linhagem de células HepG2 ($IC_{50} = 8,57 \mu M$) com índice de seletividade de 3. O índice de seletividade (IS) pode

sugerir a seletividade de um composto entre uma linhagem tumoral e uma não tumoral, sendo que um valor de 3 indica que o composto é três vezes mais ativo frente a células tumorais do que em células normais. A substituição na posição C-7 do anel cumarínico demonstrou ter um impacto considerável sobre a atividade antiproliferativa. O híbrido 7-metilcumarina-1,2,3-triazolil-2-metilbenzimidazol (Tabela 4, entrada 11) apresentou citotoxicidade frente à linhagem de células HepG2 na faixa de nM, com o mais alto índice de seletividade de 50. Os modelos baseados em valores de logP utilizados no trabalho confirmaram que a lipofilicidade foi um bom parâmetro para distinguir compostos ativos de inativos para todas as linhagens de células tumorais testadas. Por fim, os autores relatam que a maioria dos híbridos apresentaram citotoxicidade contra as linhagens de células não tumorais WI38 e 3T3.

Miyakoshi *et al.* 2012(a), descreveram o planejamento e a síntese de uma série de compostos derivados da uracila contendo 1,2,3-triazóis e avaliaram seu potencial como inibidores da desoxiuridina trifosfatase (dUTPase) humana, além da sua capacidade de aumentar a atividade de inibição do crescimento de um inibidor da timidilato sintase (TS) frente a células tumorais *in vitro* e *in vivo*. Previamente, os autores já haviam reportado um estudo no qual obtiveram compostos **M5** – **M7** com potente atividade inibidora da dUTPase humana (Figura 19, MIYAKOSHI *et al.*, 2012b). Entre estes, o composto **M5** demonstrou a atividade inibitória mais potente ($IC_{50} = 0,021 \mu\text{M}$) e a maior capacidade de aumentar a atividade antitumoral do 5-fluoruracila (5-FU) *in vivo*. Dando prosseguimento ao desenvolvimento dos inibidores da dUTPase, os autores fizeram uma triagem inicial que levou à identificação de **M6b** como um composto com um nível favorável em relação a sua lipofilicidade e peso molecular.

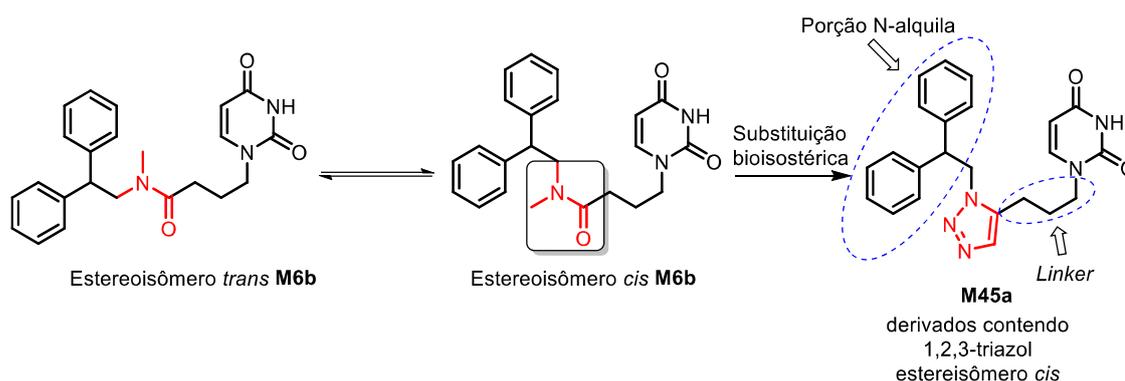
Figura 19. Compostos com atividade inibidora da dUTPase.



Fonte: adaptado de MIYAKOSHI *et al.* 2012(a)

Foram então realizados estudos de relação estrutura-atividade dos derivados uracila contendo amida em sua estrutura **M6a-M6b** que revelaram que o composto contendo uma *terc*-amida **M6b** tem uma atividade inibidora da dUTPase humana quase 12 vezes maior em relação ao composto contendo uma *sec*-amida **M6a**. Experimentos de RMN de ^1H e NOE realizados com o composto **M6b** revelaram que ele existe como uma mistura de dois isômeros conformacionais a 25 °C (*cis*: *trans* = 2: 3). Esses dados indicaram que a conformação *cis* de **M6b** poderia dar uma contribuição importante a sua potência. Para confirmar esse resultado, foi realizado um estudo de acoplamento da dUTPase humana com o isômero *cis* do composto **M6b**, e isso sugeriu que o composto com essa conformação interage com sucesso com o sítio catalítico da dUTPase. Estudos de modelagem mostraram que a uracila e um dos grupamentos fenila terminais de **M6b** foram atribuídos a sua potente interação e específica com a dUTPase. Dessa forma, visando aumentar a potência inibitória dos compostos, os autores decidiram fazer uma substituição bioisostérica da amida terciária por 1,2,3-triazóis 1,5-dissubstituídos, obtendo-se assim compostos unicamente com a conformação *cis*. Primeiramente, foi sintetizado o derivado **M45a**, que corresponde ao derivado da uracila **M6b** (Figura 20), e a potência inibidora da dUTPase humana desses compostos foi comparável, ambos com $\text{IC}_{50} = 1,3 \mu\text{M}$.

Figura 20. Substituição bioisostérica da amida no composto **M6b** pelo triazol levando exclusivamente ao estereoisômero *cis*.

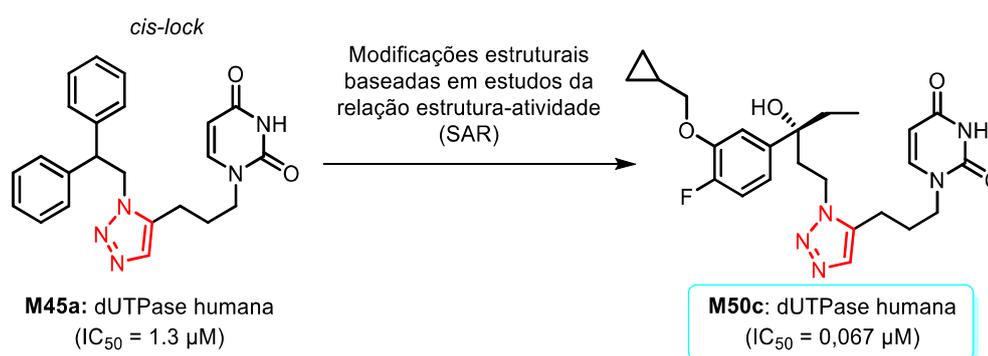


Fonte: adaptado de MIYAKOSHI *et al.* 2012(a)

Estudos da relação estrutura-atividade (SAR) focados nos derivados de uracila contendo 1,2,3-triazol foram realizados e identificaram inibidores altamente potentes da dUTPase humana com valores de IC_{50} na faixa de 10^{-8} M. Foram sintetizados vários derivados da uracila contendo 1,2,3-triazol, nos quais foram feitas modificações estruturais baseadas nos resultados de SAR visando obter o composto *hit* com as propriedades desejadas. Dentre os

compostos, o que se mostrou mais promissor foi o **M50c**, o qual apresentou um $IC_{50} = 0,067 \mu\text{M}$ frente à dUTPase humana (Figura 21), além de apresentar um perfil farmacocinético desejável, de acordo com os objetivos dos autores, em camundongos, e aumentar a atividade antitumoral da 5-FU (inibidor da TS) *in vivo* (Tabela 5).

Figura 21. Composto obtido com ajuda do SAR com potente atividade de inibição da dUTPase humana.



Fonte: adaptado de MIYAKOSHI *et al.* 2012(a)

Tabela 5. Aumento da eficácia *in vivo* de **M50c** para atividade antitumoral da 5-FU frente ao xenoinxerto MX-1 de câncer de mama em ratos.

	Dose (mg/kg/dia)	Tratamento	VT ^a (mm ³ , ± desvio padrão)	VRT ^b (± desvio padrão)	TI (%) ^c
Controle			2047,62 ± 693,70	11,41 ± 3,74	
5-FU	15	ci	1644,48 ± 322,60	9,13 ± 1,35	20,0
50c	300	po	2474,95 ± 534,68	14,06 ± 3,35	-23,2
5-FU/50c	15/300	ci/po	300,68 ± 103,20	1,72 ± 0,55 ^d	84,9

^a. O volume do tumor (VT) no dia 15 foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $VT \text{ (mm}^3\text{)} = [(largura)^2 \times (comprimento)]/2$. ^b. O volume relativo do tumor (VRT) no dia 15 foi calculado como a razão do VT no dia 15 para a do dia 0 de acordo com a seguinte fórmula: $VRT = (VT \text{ no dia } 15) / (VT \text{ no dia } 0)$. ^c. A taxa de inibição (TI) do crescimento do tumor no dia 15 com base no VRT foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $TI \text{ (\%)} = [1 - (VRT \text{ médio do grupo tratado}) / (VRT \text{ médio do grupo controle})] \times 100$. ^d. **: $p < 0,01$ teste de Dunnet em comparação com o grupo controle. ###: $p < 0,01$ Teste t de Student em comparação com o grupo 5-FU. ci: infusão contínua (do inglês: *continuous infusion*); po: via oral (do latim: *per os*).

Fonte: MIYAKOSHI *et al.* 2012(a)

Os resultados obtidos no decorrer desse estudo indicaram que novos inibidores da dUTPase devem abrir caminho para estratégias no tratamento quimioterápico oncológico de pacientes quando usadas em combinação com inibidores da TS, como a 5-fluoruracila.

3.5 ALVOS BIOLÓGICOS

3.5.1 Desoxiuridina trifosfatase (dUTPase)

A regulação refinada dos conjuntos de nucleotídeos celulares é indispensável para a replicação fiel do ácido desoxirribonucleico (DNA). A informação genética também é protegida pelos processos de reconhecimento e reparo de danos ao DNA. A uracila é uma das nucleobases errôneas que ocorrem com mais frequência no DNA, podendo surgir da deaminação da citosina ou incorporação de substituição da timina. Duas enzimas estão envolvidas principalmente na manutenção da atividade do DNA livre da uracila que são a uracila-DNA glicosilase (que extrai a uracila do DNA e inicia o reparo por excisão de uracila) e a dUTPase (KEREPESI *et al.*, 2016). A desoxiuridina trifosfatase (dUTPase) é uma enzima que reconhece especificamente o trifosfato de desoxiuridina (dUTP) entre os nucleosídeos trifosfatos naturais e o hidrolisa em monofosfato de desoxiuridina (dUMP) e pirofosfato. Acredita-se que ela seja responsável por dois papéis biológicos: (1) diminuir os *pools* intracelulares de dUTP para evitar a incorporação incorreta de uracila em vez de timina no DNA e (2) fornecer o dUMP como substrato da timidilato sintase (TS) para conversão em timidina monofosfato (dTMP), um precursor essencial para a via de novo da síntese de DNA (MYAKOSHI *et al.*, 2012b). Estudos têm demonstrado que compostos com potencial de inibição da dUTPase podem ser usados em combinação com compostos inibidores da TS, como a 5-fluoruracila, levando a uma maior redução de tumores, o que pode indicar um caminho para estratégias no tratamento quimioterápico oncológico de pacientes (MYAKOSHI *et al.*, 2012a).

3.5.2 Topoisomerase 1 (Topo-1)

O ácido desoxirribonucleico (DNA) compreende todo material genético de todos os organismos celulares, sendo responsável por armazenar em sua estrutura a informação genética necessária para especificar a realização de todos os processos que tornam o organismo funcional. O DNA se organiza em uma estrutura em dupla fita em forma de hélice, que propicia benefícios para o armazenamento estável e seguro dessa informação, reduzindo os riscos de alterações nas bases causadas pelo meio. Entretanto, apesar das vantagens dessa estrutura, ela pode causar naturalmente problemas de ordem topológica para a molécula (JORGE, 2012).

As DNA topoisomerasas são enzimas que resolvem os problemas topológicos associados à replicação, transcrição, recombinação e remodelação da cromatina, introduzindo interrupções temporárias de fita simples ou dupla no DNA. Além disso, elas ajustam o nível de superenrolamento de DNA, tanto para facilitar as interações de proteínas com o DNA quanto para evitar o superenrolamento excessivo, que é prejudicial e pode levar à quebra das fitas (CHAMPOUX, 2001).

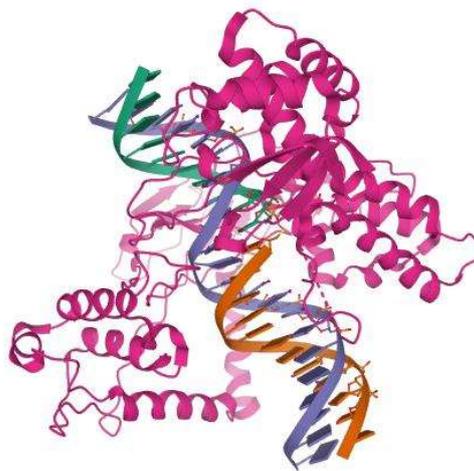
A compactação genômica nas células exemplifica as ações críticas das topoisomerasas do DNA. A compactação de DNA é tal que todo o genoma de uma única célula humana (3×10^9 pares de bases que correspondem a aproximadamente 1,8 m) precisa ser espremido em um núcleo com um diâmetro médio de 6 μm . Em outras palavras, a circunferência de um núcleo celular médio de mamíferos é quase um milhão de vezes menor que o comprimento do genoma que precisa ser compactado nele. As DNA topoisomerasas são necessárias para manter o DNA compactado e evitar tensão e nós nas super hélices (POMMIER *et al.*, 2010).

A separação das cadeias de DNA é obrigatória para transcrever e replicar genomas. Devido à estrutura helicoidal dupla do DNA e à falta de rotação livre nas células, a separação das cadeias gera superenrolamento do DNA onde as duas cadeias são separadas pelos complexos polimerase-helicase. Como resultado, um superenrolamento positivo é gerado em frente aos locais de replicação ou transcrição e um superenrolamento negativo por trás. Sem a ação das topoisomerasas de DNA, o superenrolamento positivo interrompe rapidamente a replicação e a transcrição e o superenrolamento negativo favorece a formação de estruturas anormais de DNA (POMMIER *et al.*, 2010).

As topoisomerasas são geralmente classificadas em tipos I e II, com base em sua função catalítica, mecanismo de reação, sequência e estrutura de aminoácidos. As topoisomerasas I induzem a quebra de apenas uma fita, enquanto as topoisomerasas II promovem a quebra das duas fitas de DNA (LIANG *et al.*, 2019).

A topoisomerase I (Figura 22) relaxa a tensão torcional do DNA (superenrolado). Para realizar o relaxamento do DNA, a topoisomerase I introduz um nick (uma quebra) da fita simples no esqueleto fosfodiéster do DNA, permitindo que o fio intacto passe pelo nick e depois se una ao fio cortado. O relaxamento do DNA resulta da rotação deste entalhe e desempenha um papel importante na replicação do DNA e na transcrição do RNA. As quebras de pontes enzimáticas são seladas novamente pela topoisomerase I (religação) (GUERRITS *et al.*, 1997).

Figura 22. Estrutura da DNA topoisomerase 1 (Topo-1, código PDB: 1K4S)



Fonte: Protein Data Bank (PDB)

Os inibidores da topoisomerase têm se mostrado agentes antineoplásicos potentes. A explicação para este potencial pode estar no mecanismo de ação dos medicamentos direcionados à topoisomerase, que tem sua atividade relacionada à concentração celular dessas enzimas. Células tumorais tem crescimento mais rápido e geralmente expressam concentrações mais altas da topoisomerase do que as células normais. Portanto, medicamentos que geram mais quebras de DNA são mais tóxicos para as células tumorais. Outro fator importante é que para manter sua taxa de crescimento rápido, as células tumorais se replicam com frequência e são altamente sensíveis aos venenos da topoisomerase. Além disso, as células tumorais geralmente apresentam pontos de verificação do ciclo celular ou vias de reparo do DNA prejudicados, por isso, são frequentemente mais sensíveis que as células normais aos efeitos dos agentes danosos ao DNA (DEWEESE; OSHEROFF; OSHEROFF, 2009).

A atividade antitumoral de alguns compostos contendo os núcleos triazólicos, cumarínicos ou uracílicos é atribuída à atividade inibidora da topoisomerase (LIANG *et al.*, 2019; PAUL; BINDAL; LUXAMI, 2013; GURUGE; UDAWATTE; WEERASINGHE, 2016; XU *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017), o que pode indicar a importância desses núcleos na construção de novas moléculas direcionadas a esse alvo biológico.

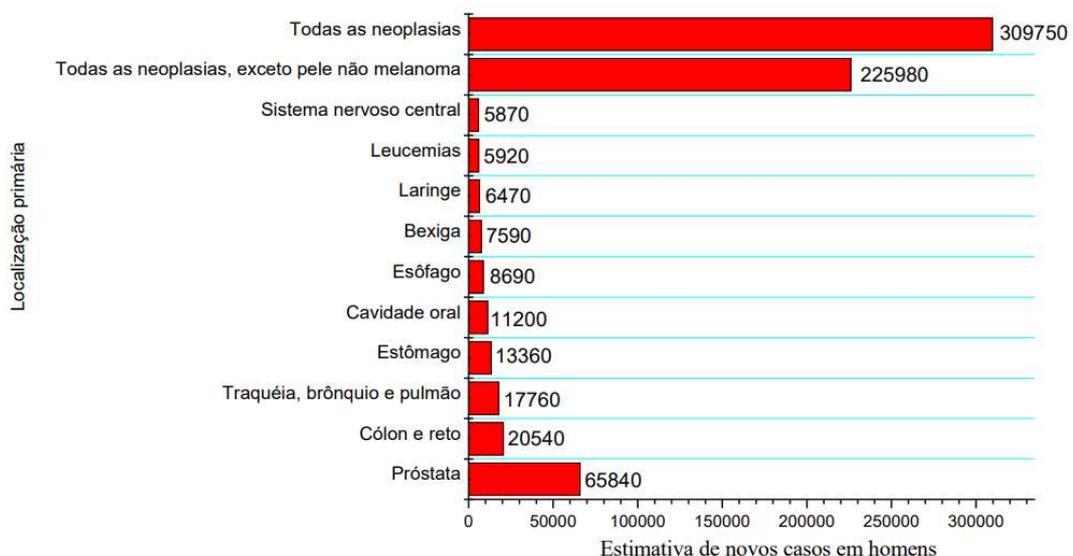
3.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE CARCINOGENESE

O câncer é o nome geral dado a um conjunto complexo e heterogêneo de condições, que engloba mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado das células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (INCA, 2020; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Os índices referentes aos casos de mortalidade relacionada ao câncer ainda são bastante elevados. Em 2018, o câncer foi a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 9,6 milhões de mortes. Aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorreram em países de baixa e média renda (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS). Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS, o câncer é atualmente responsável por uma em cada seis mortes no mundo. Mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer todos os anos, e esse número deve subir para mais de 21 milhões de pessoas em 2030.

Dados estimados pelo Instituto Nacional do Câncer – INCA, divulgados em 2020, mostram que os tipos de cânceres mais incidentes para o sexo masculino são: próstata, traqueia, brônquio e pulmão, cólon e reto e estômago; já para o sexo feminino são: mama, cólon e reto, colo do útero, traqueia, brônquio e pulmão (INCA 2020). Os números estimados para os principais tipos de câncer no Brasil podem ser observados na Figura 23 (sexo masculino) e Figura 24 (sexo feminino).

Figura 23. Incidência estimada dos principais tipos de câncer em homens no ano de 2020.



Fonte: MS / INCA 2020 Estimativa de Câncer no Brasil, 2020.

Figura 24. Incidência estimada dos principais tipos de câncer em mulheres no ano de 2020.



Fonte: MS / INCA / Estimativa de Câncer no Brasil, 2020.

O câncer resulta de mutações em genes que normalmente controlam o crescimento, divisão, reparo de DNA e morte celular. Essas mutações algumas vezes ocorrem de forma acidental, de modo que quando uma célula se replica, parte do código genético é “grafada incorretamente”. Fatores ambientais como: substâncias químicas, radiação ou vírus e bactérias infecciosas podem danificar o DNA. Os agentes mutagênicos químicos e biológicos podem se inserir no DNA ou danificar o DNA de forma que quando ocorre a replicação da célula, seu código genético é alterado de forma irreversível (DUNN, 2012).

As células tumorais são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Conforme as células tumorais vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções, podendo levar à falência dos órgãos e à morte dos pacientes. O câncer é classificado de acordo com o tipo de célula normal que o originou, e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou. Isso é o que pode se chamar de classificação primária (ALMEIDA et al., 2005).

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e, em geral, acontece lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula tumoral proliferasse e dê origem a um tumor visível. Os efeitos cumulativos de diferentes agentes cancerígenos são os responsáveis pelo início, promoção, progressão e inibição do tumor (INCA, 2018).

No nível fisiológico, as mutações em oncogenes e em genes supressores de tumores funcionam de forma semelhante havendo o aumento no número de células tumorais, pelo estímulo da proliferação celular ou a inibição da morte celular ou parada do ciclo celular. O

aumento pode ser causado pela ativação dos genes que dirigem o ciclo celular, seja por meio da inibição dos processos apoptóticos, ou facilitando o fornecimento de nutrientes pelo aumento da angiogênese. Os genes de estabilidade ou cuidadores promovem tumorigênese de uma forma completamente diferente quando sofrem mutação. Esta categoria inclui o reparo por mal pareamento (MMR), reparo de excisão de nucleotídeos (NER) e reparação de excisão de bases (BER), genes responsáveis pela reparação de erros sutis cometidos durante a replicação do DNA normal ou induzidos por exposição aos agentes mutagênicos. Genes de estabilidade mantêm as alterações genéticas minimizadas, porém quando estão inativados, as mutações ocorrem em outros genes a uma taxa maior (VOGELSTEIN; KINZLER 2004).

Apesar de sua toxicidade severa, a quimioterapia oncológica, a radioterapia, a imunoterapia e a ressecção cirúrgica são as abordagens empregadas para o tratamento do câncer em todo o mundo. Análises detalhadas de vias, mecanismos e estruturas dos compostos antitumorais tem permitido o desenvolvimento significativo na prevenção e no tratamento do câncer. O estabelecimento de linhagens celulares tumorais e a avaliação de muitos compostos com potencial atividade antitumoral, de origem natural ou sintéticos, tem levado a resultados promissores na busca de tratamentos menos agressivos (ALI *et al.*, 2012).

3.6.1 Câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR), originário no cólon ou reto (LIANG *et al.*, 2020), é o terceiro tipo de câncer mais diagnosticado no mundo em homens e o quarto mais comum em mulheres; é também a segunda principal causa de morte por câncer (9,2% de todas as mortes por câncer), de acordo com as Estatísticas Globais de Câncer de 2018 (BRAY *et al.*, 2018). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer – INCA de 2020, foi o terceiro tipo de câncer mais diagnosticado para homens, sendo responsável por 17760 casos, e o segundo tipo mais diagnosticado para mulheres, com 20470 casos.

Devido a mecanismos patogênicos complexos e heterogêneos, e apesar dos avanços nas abordagens cirúrgicas, o câncer colorretal ainda é um desafio significativo à saúde pública (LIU *et al.*, 2019).

Quando diagnosticado nos estágios iniciais (I, II e III), o CCR tem 80% de chances de cura, porém em estágios mais avançados da doença (IV), os percentuais são de apenas 13%. Em 60% dos casos em estágio avançado, ocorrem metástases no fígado. Nestes casos, os tratamentos mais indicados são quimioterapia, radioterapia e ressecção do fígado. Ressecção hepática é a terapia mais eficaz com 29% a 48% de chances de cura, porém, em 9% a 13%

dos casos, ocorrem recidivas (OKI *et al.*, 2018).

A etiologia do câncer colorretal envolve uma forte contribuição genética e determinantes ambientais e socioeconômicos complexos, incluindo dieta, estilo de vida e tabagismo (STECK; MURPHY, 2019). Um fator de risco positivo para o câncer colorretal é o histórico prévio de inflamação intestinal crônica. Pacientes com doença inflamatória intestinal (DII) correm maior risco de desenvolver o câncer colorretal do que a população em geral. A DII representa distúrbios intestinais que compreendem a doença de Crohn (CD) e colite ulcerativa (UC), resultando em inflamação crônica ao longo da vida de diferentes segmentos do intestino. O câncer colorretal associado à colite (CA-CRC) é a consequência mais grave da DII (JEYAKUMAR *et al.*, 2019).

Estudos demonstram que a inativação do gene adenomatous polyposis coli (APC) causa o aparecimento inicial do adenoma, e mutações no KRAS ou outras alterações genéticas (como exclusão no cromossomo 18q), levam ao crescimento e progressão do adenoma. A inativação da p53 resulta na transição de adenoma para carcinoma. Alguns estudos de mecanismos da carcinogênese do cólon indicaram que a ativação aberrante de vias, como sinalização Wnt / β -catenina, sinalização PI3K / Akt e inativação da sinalização do fator de crescimento transformador β (TGF- β) / Smads, contribui para o início e progressão do câncer de cólon. A mutação e desregulação de componentes, incluindo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), PI3K, Akt, alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR), TGF β R, Smad4, adenomatous polyposis coli, Axin e β -catenina, são causas conhecidas de anormalidades de sinalização que resultam em câncer (NIE *et al.*, 2014).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo serão apresentadas a otimização das condições reacionais para a síntese dos precursores e dos compostos inéditos obtidos no decorrer desse trabalho, bem como sua elucidação estrutural por métodos espectroscópicos e espectrométricos, avaliação da atividade antitumoral frente às linhagens tumorais HCT116 (colorretal), A549 (pulmão) e Hep-2 (laringe) e à linhagem não tumoral HaCat (queratinócitos humanos) em ensaio MTT, finalizando com estudos de predição de toxicidade *in silico*, seleção de possível alvo biológico e *docking* molecular dos compostos que se mostraram mais citotóxicos.

Na primeira etapa desse capítulo será descrita a síntese de uma série de cumarinas substituídas na posição C-4 (**3a–o**), obtidas a partir da reação de condensação de Pechmann entre os fenóis (**1a–e**) e os β -cetoésteres (**2a–d**). Para promover a reação foi empregado o ácido sulfâmico como catalisador, seguindo metodologia descrita inicialmente por Zareyee e Serehneh (2014), e otimizada nesse trabalho. Em seguida, será descrita a síntese dos derivados 4-(azidometil)cumarínicos (**4a–d**) a partir das cumarinas substituídas com o grupo clorometila na posição C-4 (**3d–e**, **3g–h**).

Dando sequência à descrição da síntese dos precursores, serão apresentados os protocolos sintéticos para a obtenção dos intermediários 1-propargiluracila (**6a**), 1-propargiltimina (**6b**), 2-propargilmercaptouracila **6c**, 1,3-dipropargiluracila (**6d**) e 3-propargilteobromina (**6e**).

Completando a síntese, serão descritos os métodos para obtenção dos híbridos bis-(cumaronil-triazolil)uracila **7a–b**, (cumaronil-triazolil)uracila, timina, tiouracila **8a–f**, e (cumaronil-triazolil)teobromina **9a–d**, por meio de reação de cicloadição catalisada por Cu(I) (CuAAC).

A caracterização dos compostos sintetizados foi realizada pelas técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , e de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$, espectrometria de massas de baixa resolução (GC-MS), e espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). Para alguns compostos, a caracterização estrutural foi complementada com os experimentos de RMN DEPT 135, 2D HMQC, 2D HMBC e COSY.

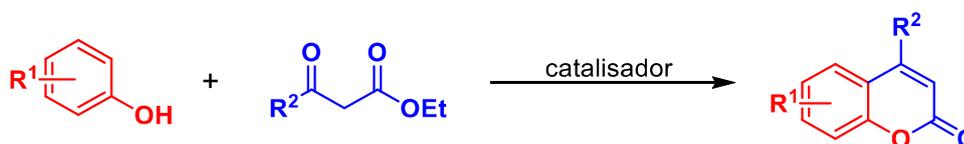
Por fim, apresentaremos os resultados da avaliação da atividade antitumoral dos compostos híbridos por meio de ensaio MTT, seguido pelos resultados dos estudos de predição de toxicidade *in silico*, seleção de alvo molecular e *docking* molecular.

4.1 SÍNTESE DAS CUMARINAS

Visando desenvolver uma metodologia eficiente, de baixo custo, e menos agressiva ao meio ambiente, neste trabalho optamos pela síntese das cumarinas substituídas na posição C-4 a partir da reação de condensação de Pechmann (Figura 25). Para alcançar uma maior variabilidade estrutural foram empregados como precursores os fenóis resorcinol, floroglucinol, pirogalol, 3-metóxfenol, 3-metilfenol e 1-naftol, e os β -cetoésteres acetoacetado de etila, 4-cloroacetoacetato de etila, 4,4,4-trifluoracetoacetato de etila e benzoilacetato de etila.

Como catalisador da reação, foi empregado o ácido sulfâmico. O ácido sulfâmico ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$) é um ácido inorgânico zwitteriônico relativamente forte, com propriedades importantes para processos em larga escala, pois ele é não higroscópico, facilmente manipulável, não corrosivo, não volátil, sem odor, barato e comercialmente disponível. Assim como o ácido sulfâmico, os fenóis e β -cetoésteres foram obtidos comercialmente.

Figura 25. Representação genérica da reação de condensação de Pechmann entre fenóis e β -cetoésteres.

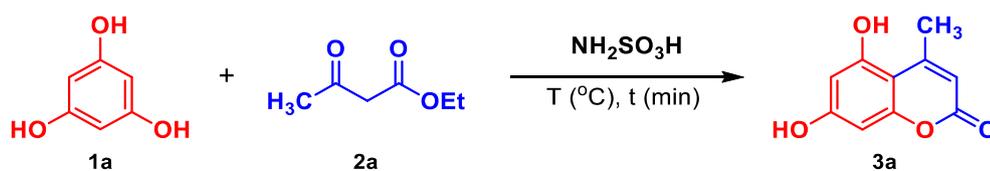


Fonte: a autora.

A fim de avaliar e otimizar as condições reacionais, inicialmente conduzimos um experimento empregando quantidades equimolares de acetoacetato de etila (**2a**) (1 mmol) com floroglucinol (**1a**) (1 mmol) na presença de ácido sulfâmico (10 mol%) em um frasco de reação fechado com septo. A experiência foi realizada a 130 °C, durante 40 minutos (Tabela 6, entrada 1). Nesta condição, a cumarina **3a** foi produzida com um rendimento de 20% após a etapa de purificação por recristalização com etanol-água. Aumentando a quantidade do β -cetoéster **2a** para 1,2, 1,5 e 2 equivalentes, obteve-se o produto **3a** com 40%, 84% e 84% de rendimento, respectivamente (Tabela 6, entradas 2-4). Em seguida, estudamos o efeito da quantidade do catalisador. A redução da quantidade do catalisador para 5 mol%, em relação ao floroglucinol, proporcionou o produto **3a** com apenas 38% de rendimento (entrada 7). Nenhum produto foi detectado com 2 mol% ou na ausência do catalisador (entradas 5 e 6). No entanto, o aumento da quantidade de catalisador para 20 mol% demonstrou pouco efeito no rendimento da reação em relação a quando empregamos 10 mol% (Tabela 6, entrada 3 e 8).

Em relação à temperatura de reação, a condensação de Pechmann geralmente requer temperaturas elevadas, mesmo na presença de ácidos fortes de Brønsted ou Lewis. No entanto, as tentativas de diminuir a temperatura inicialmente avaliada, de 130 °C, impactaram negativamente o rendimento (entradas 9 e 10). Temperaturas mais elevadas não foram testadas, pois segundo relatos na literatura (BOSE; RUDRADAS; BABU, 2002) elas podem levar à formação de dímeros e outros subprodutos. A cumarina **3a** foi obtida com um rendimento ligeiramente superior quando o tempo de reação foi de 60 minutos. No entanto, o tempo de reação mais longo (120 minutos, entrada 12) não melhorou significativamente o rendimento. De fato, observamos uma pequena diminuição no rendimento que pode estar relacionada a produtos secundários indesejáveis.

Tabela 6. Otimização das condições reacionais para a síntese da 5,7-diidroxí-4-metilcumarina (**3a**).^a



Entrada	Razão molar (1a:2a)	Catalisador (mol%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Rend. (%) ^b
1	1:1	10	130	40	20
2	1:1,2	10	130	40	40
3	1:1,5	10	130	40	84
4	1:2	10	130	40	84
5	1:1,5	-	130	40	0 ^c
6	1:1,5	2	130	40	0 ^c
7	1:1,5	5	130	40	38
8	1:1,5	20	130	40	80
9	1:1,5	10	80	40	65
10	1:1,5	10	100	40	74
11	1:1,5	10	130	60	88
12	1:1,5	10	130	120	80
13	1:1,5	10	130	20	64

^a Condições reacionais: floroglucinol (1 mmol, 0,126 g), acetoacetato de etila, agitação magnética e aquecimento em banho seco. ^b obtidos após recristalização. ^c recuperação do material de partida.

Na literatura, encontra-se relatos que a síntese de cumarinas com fenóis simples, ou seja, não substituídos, sob as condições de Pechmann é problemática e demanda condições severas de reação, embora os rendimentos possam ainda ser razoáveis. Já as reações com

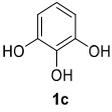
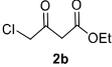
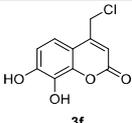
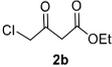
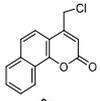
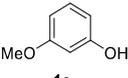
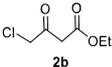
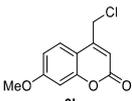
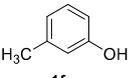
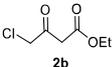
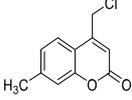
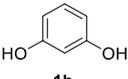
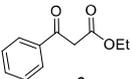
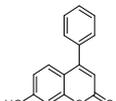
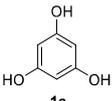
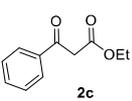
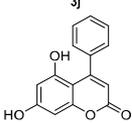
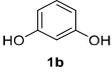
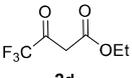
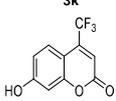
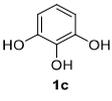
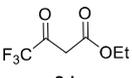
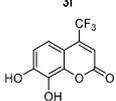
fenóis altamente ativados podem ser realizadas sob condições muito mais brandas (HERAVI; KHAGHANINEJAD; MOSTOFOLI, 2014). Tal comportamento foi observado quando tentamos a reação empregando *p*-nitrofenol, no qual apesar de um tempo de reação de 48 horas não observamos formação do produto desejado.

Realizamos reações empregando o β -cetoéster 4-cloroacetoacetato de etila (**2b**), e foi observado um comportamento um pouco diferente dos demais, pois apresentou um melhor rendimento na temperatura de 100 °C do que a 130 °C. Por exemplo, temos a reação entre o 4-cloroacetoacetato de etila (**2b**) com o floroglucinol (**1a**), no qual quando a reação foi realizada a uma temperatura a 130 °C obtivemos um rendimento de 75%, enquanto que quando realizada a 100 °C o produto **3e** foi obtido com um rendimento de 86%.

A purificação dos compostos **3a-m** foi feita por recristalização em etanol, no entanto em alguns casos foram formadas impurezas coloridas difíceis de eliminar, sendo necessário o emprego de coluna cromatográfica. Os produtos obtidos, condições reacionais otimizadas, bem como os rendimentos, são apresentados na Tabela 7.

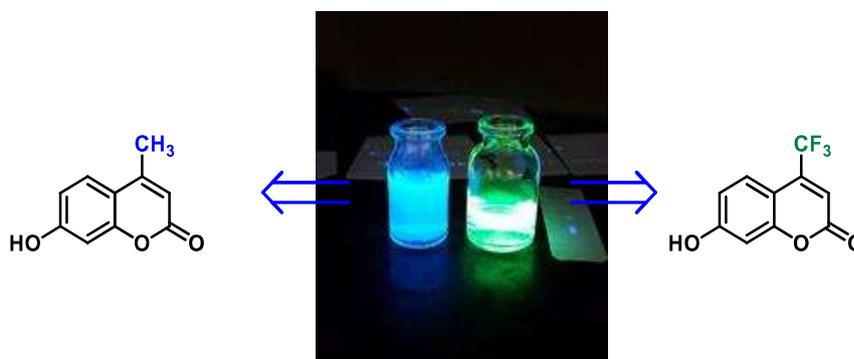
Tabela 7. Condições reacionais otimizadas e rendimentos das cumarinas C-4 substituídas.

Entrada	fenol (1a-f)	β -cetoéster (2a-d)	Cumarina (3a-m)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Rend.(%)
1				130	1	88
2				130	1,5	90
3				130	4	82
4				100	1	72
5				100	0,33	86

Entrada	fenol (1a-f)	β -cetoéster (2a-d)	Cumarina (3a-m)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Rend.(%)
6	 1c	 2b	 3f	100	1	70
7	 1d	 2b	 3g	100	6	70
8	 1e	 2b	 3h	100	4	90
9	 1f	 2b	 3i	100	12	52
10	 1b	 2c	 3j	130	24	60
11	 1a	 2c	 3k	130	18	50
12	 1b	 2d	 3l	130	2	60
13	 1c	 2d	 3m	130	3	50

Uma característica importante das cumarinas é que elas apresentam propriedades fluorescentes, como mostrado na Figura 26, apresentando cores que variam do azul ao verde dependendo do substituinte na posição C-4. Quando os substituintes são metila ou fenila observa-se a fluorescência na cor azul, já quando os substituintes são trifluorometila e clorometila observa-se a fluorescência na cor verde.

Figura 26. Fluorescência das cumarinas quando irradiadas no comprimento de 365 nm em solução aquosa.



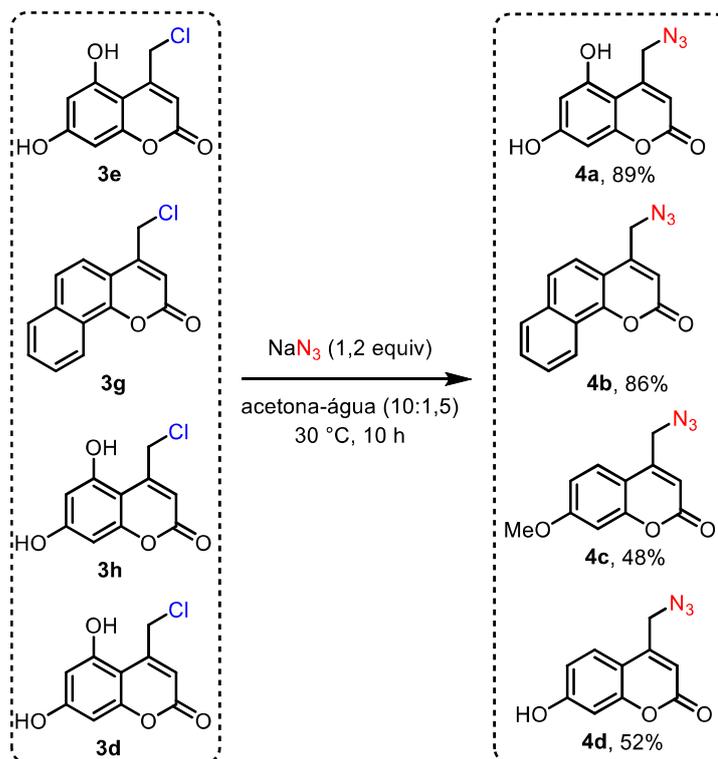
Fonte: o autor.

Algumas cumarinas (**3d-e**, **3g-h**) derivadas do β -cetoéster 4-cloroacetoacetato de etila (**2b**) foram empregadas na sequência desse trabalho, devido à presença do grupo clorometila na posição C-4. Esse substituinte é necessário para a obtenção dos derivados 4-(azidometil)cumarínicos, empregados na síntese dos compostos bis-(cumaronil-triazolil)uracila, (cumaronil-triazolil)uracila e (cumaronil-triazolil)teobromina.

2.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS AZIDOCUMARÍNICOS

A síntese dos derivados 4-(azidometil)cumarínicos **4a-d** foi baseada na metodologia descrita por Naik *et al.* 2012 (Figura 27), que consiste em uma reação de substituição nucleofílica entre as cumarinas substituídas com o grupo clorometila na posição C-4 e o ânion azida.

Figura 27. Esquema reacional da síntese dos derivados 4-(azidometil)cumarínicos **4a-d**.



Fonte: a autora.

Para essa síntese foram obtidos rendimentos de 48-89% dependendo do derivado **3** empregado. O melhor rendimento foi observado para a 4-(azidometil)cumarina **4a** obtida a partir da 4-(clorometil)cumarina derivada do floroglucinol **3e** (89%), seguido do derivado obtido a partir da 4-(clorometil)cumarina derivada naftol **3g**, foi obtido um rendimento de 86%, após recristalização em etanol. Já os derivados **4c** e **4d** foram obtidos com rendimentos inferiores, de 48% e 52%, respectivamente, e foi necessário o emprego de coluna cromatográfica para sua purificação.

4.2 SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS DERIVADOS DA URACILA E ANÁLOGOS (**6a-e**).

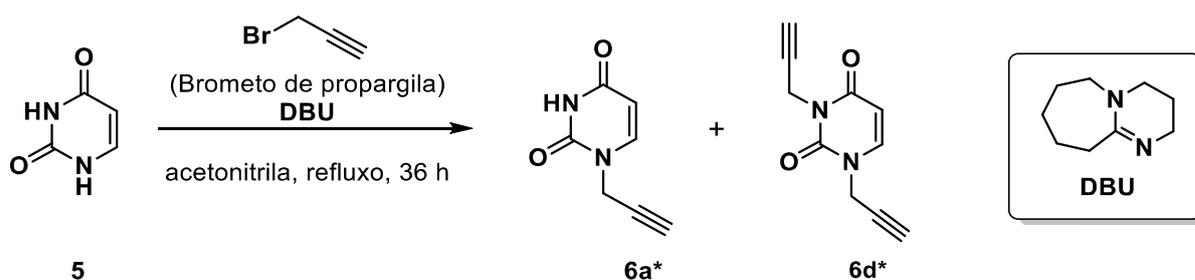
4.2.1 Síntese dos intermediários 1-propargiluracila **6a**, 1-propargiltimina **6b**, 2-propargilmercaptopuracila **6c** e 1,3-dipropargiluracila **6d**.

Visando a obtenção dos compostos (cumaronil-triazolil)uracilas, buscou-se por uma metodologia para a obtenção do bloco precursor da 1-propargiluracila **6a**. Neste caso, a metodologia deveria ser regioseletiva quanto à posição da propargilação, sendo desejado que ocorresse no nitrogênio *N1*. Segundo Accetta *et al.* 2009, a alquilação da uracila no nitrogênio

N1 é necessária para a introdução de grupos lipofílicos ou para ligar estes compostos ao esqueleto de nucleosídeos, nucleotídeos ou análogos de nucleotídeos. O autor também relata que a preservação do hidrogênio na posição *N3* pode ser importante para sua atividade biológica.

Inicialmente foi utilizado o método descrito por Hakimelari *et al.* 2002 (Figura 28), no qual a base 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (DBU) foi empregada com intuito de obter seletividade na remoção do hidrogênio na posição *N1* da uracila (**5**). O DBU é uma base considerada volumosa, e portanto, a abstração do hidrogênio na posição *N3* é dificultada devido ao maior impedimento estérico, levando assim ao produto de interesse.

Figura 28. Esquema reacional para a síntese da 1-propargiluracila (**6a**) a partir da reação da uracila (**5**) com brometo de propargila promovida pela base DBU.

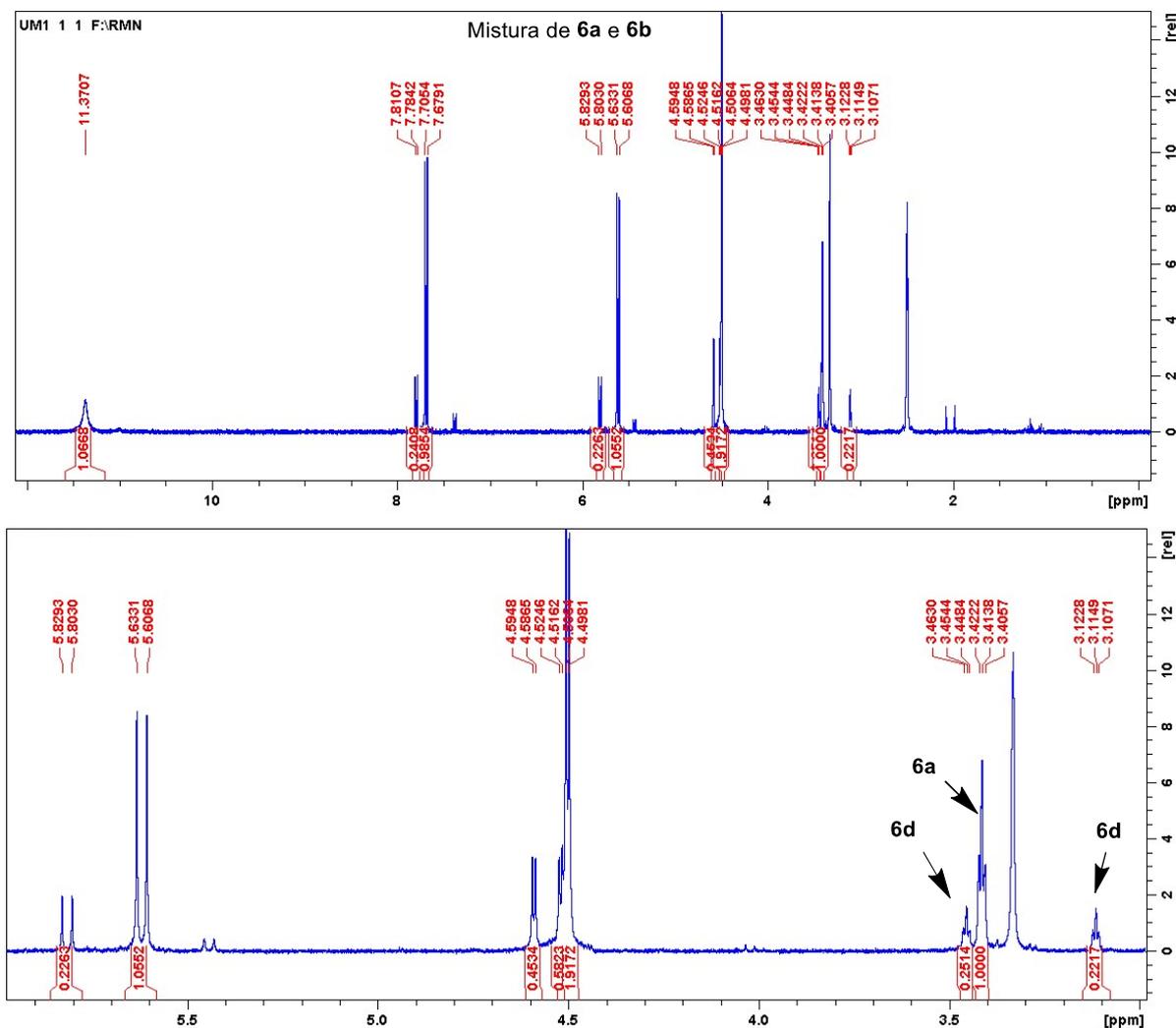


* Proporção de **6a:6b** formado foi de 4:1 (observado no espectro de RMN de ^1H a 300 MHz)

Fonte: a autora.

No decorrer da reação observamos por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) que o produto dipropargilado **6d** também era formado. Ao realizarmos a extração da reação observamos que houve sobra da uracila. A partir do espectro de RMN de ^1H foi possível perceber que o derivado de interesse **6a** era formado na proporção de 4:1 e relação ao produto dipropargilado **6d** (Figura 29). Por fim, eles foram separados por coluna cromatográfica utilizando como fase móvel uma mistura de hexano:acetato de etila (30:70 v/v), e obteve-se o derivado monopropargilado com rendimento de 40% (Figura 28).

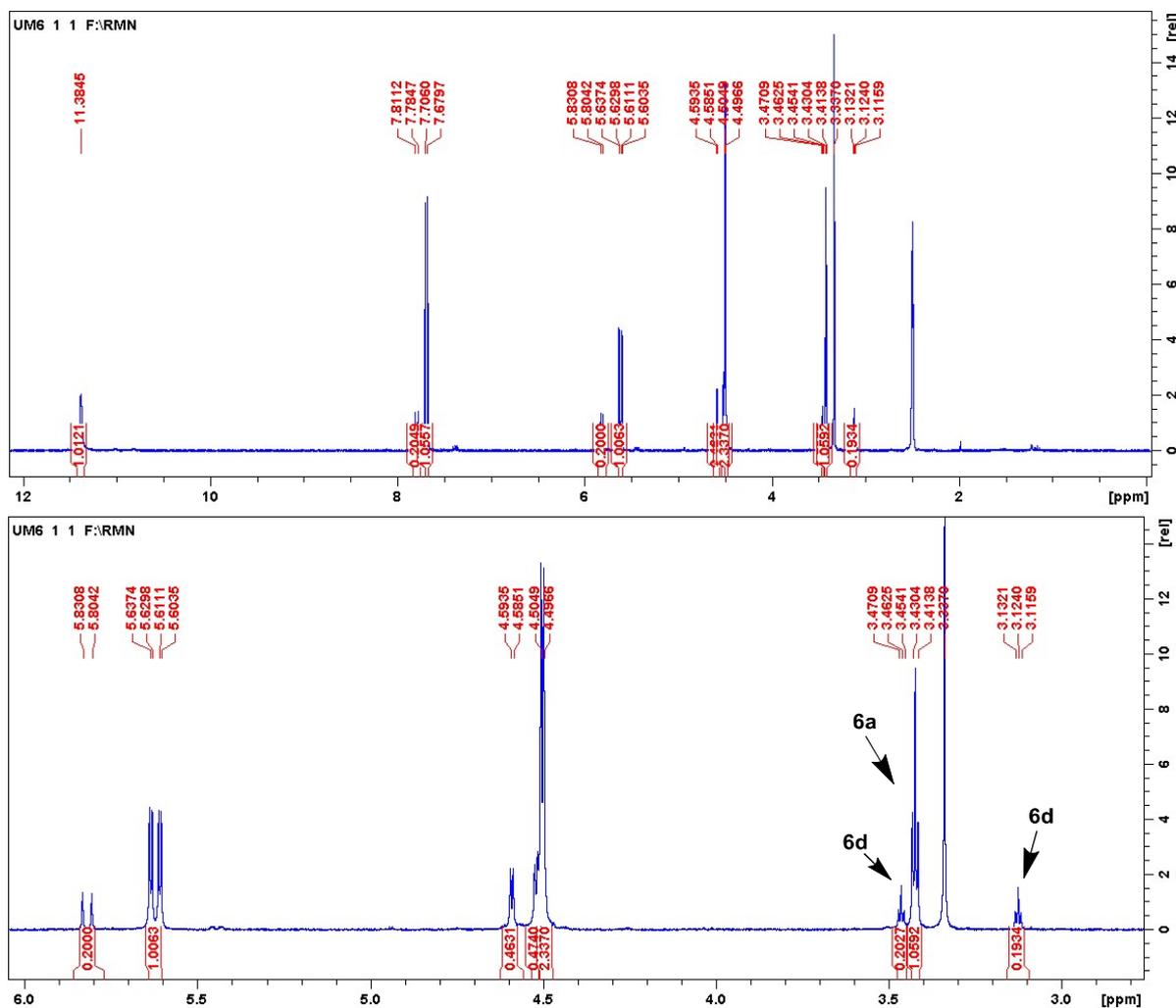
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do produto obtido, após extração, da reação de monopropargilação da uracila, utilizando DBU como base, segundo metodologia de Hakimelari *et al.* 2002, mostrando a formação de mistura dos produtos **6a** e **6d**.



Fonte: a autora.

Na busca por maior seletividade, investigamos a influência da temperatura e do tempo reacional. Ao conduzirmos reações a uma temperatura de 30 °C, por tempos de 36 e 48 horas, observamos resultados semelhantes, ou seja, ainda obtivemos mistura entre os produtos **6a** e **6d**. Para o tempo de 48 horas essa proporção foi de 5:1 de **6a** em relação ao **6d**, o qual observamos por meio do espectro de RMN de ^1H do produto, realizado após a extração da reação (Figura 30).

Figura 30. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do produto obtido, após extração, da reação de monopropargilação da uracila, utilizando DBU como base, após modificações na metodologia, mostrando a formação de mistura dos produtos **6a** e **6d**.

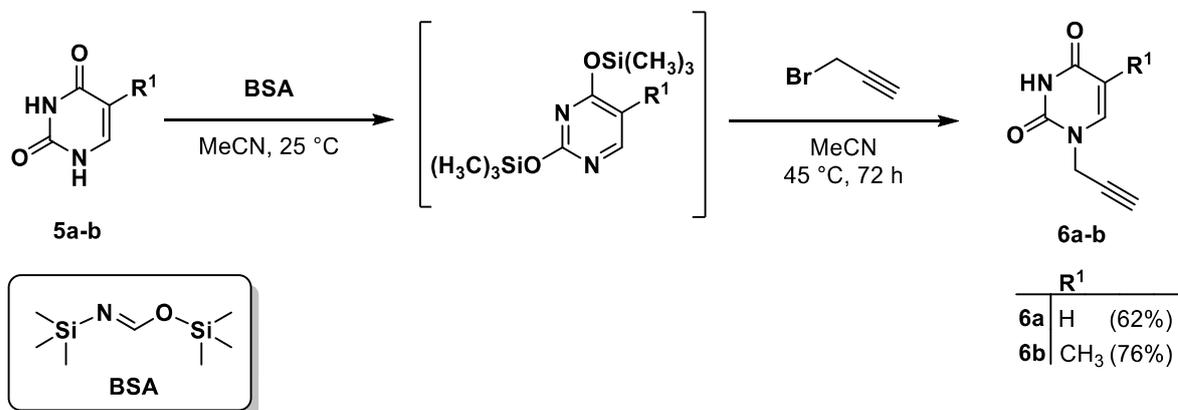


Fonte: a autora.

Devido ao fato de as modificações realizadas na metodologia empregando DBU como base não levarem a uma síntese seletiva, testamos outros protocolos. Com base na metodologia descrita por González-Olvera e col. (2013), na qual emprega-se a base bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), obtivemos o produto desejado **6a** como o único produto da reação. O composto **6a** foi obtido em um rendimento de 62%, sem a necessidade de purificação por coluna cromatográfica (Figura 31). Acreditamos que a seletividade obtida com a utilização do BSA está relacionada à formação de um intermediário de silício que possivelmente deixa a posição *N3* mais impedida estericamente (Figura 31). Essa metodologia também foi utilizada para a obtenção do precursor 1-propargiltimina, obtendo-se o produto bruto com bom grau de pureza, como pode ser observado por meio do espectro de RMN

de ^1H , o qual não demandou nenhum processo de purificação posterior e em um rendimento isolado de 76%.

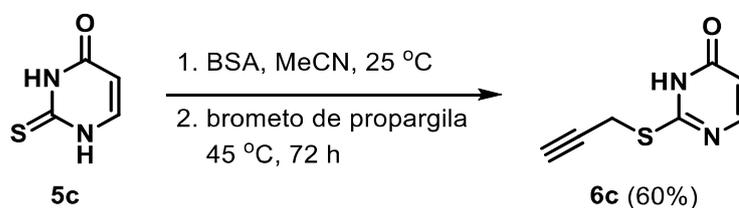
Figura 31. Esquema reacional da propargilação da uracila e timina de forma seletiva.



Fonte: a autora.

Não foi possível a obtenção do derivado 1-propargiltiouracila, como inicialmente era desejado. Ao realizarmos a reação de alquilação ela ocorreu no enxofre ao invés da posição *NI* da tiouracila, dessa forma obtivemos o precursor 2-propargilmercaptouracila. Para essa reação testamos, inicialmente, a base DBU, porém assim como na síntese envolvendo a uracila obtivemos mistura entre os derivados mono e o dipropargilados, com o produto **6c** como majoritário. Buscando seletividade, empregamos a metodologia utilizando a base BSA, e assim como na síntese dos derivados **6a-b** o produto **6c** foi obtido como produto único com rendimento de 60% (Figura 32).

Figura 32. Obtenção do derivado 2-propargilmercaptouracila **6c**.

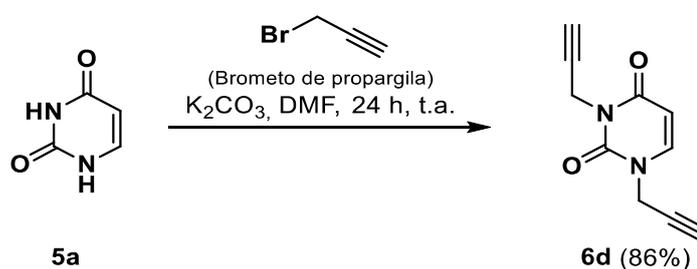


Fonte: a autora.

A síntese do precursor 1,3-dipropargiluracila **6d** foi necessária para posterior obtenção dos compostos bis-(cumaronil-triazolil)uracilas **7a-b**, compostos baseados em estruturas semelhantes com atividade antineoplásica descrita na literatura (Kumar et al., 2012). O protocolo sintético foi baseado na metodologia descrita por Kumar et al., 2012, na qual, envolve uma dipropargilação da uracila, nas posições *N*-1 e *N*-3 do anel pirimidínico,

utilizando como reagente alquilante o brometo de propargila na presença da base K_2CO_3 em DMF anidro. Para essa reação empregamos uracila (1 mmol) e um excesso de carbonato de potássio (4 mmol). Primeiramente, essa suspensão foi agitada por 2 horas, em temperatura ambiente, seguido da adição de brometo de propargila, também em um pequeno excesso (2,4 mmol, Figura 33). O protocolo de Kumar *et al.*, 2012 empregava um tempo reacional de seis horas com monitoramento por CCD, porém após esse tempo ainda havia material de partida e então a reação foi agitada por mais tempo, estando completa após 24 horas.

Figura 33. Esquema reacional da síntese do derivado 1,3-dipropargiluracila **6d**.

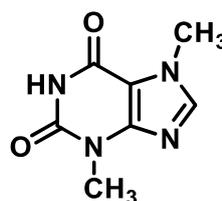


Fonte: a autora.

4.2.2 Síntese do intermediário 3-propargilteobromina **6e**.

Além do núcleo uracílico, decidimos investigar também a influência do núcleo teobromina. A teobromina (3,7-dimetilxantina, Figura 34) da família das metilxantinas, é encontrada sobretudo, em produtos de cacau, e tem ação diurética (ALVES; BRAGAGNOLO, 2002). Além disso, Ma *et al.* 2019 e Johnson, *et al.* 2012, relatam que derivados da teobromina demonstraram potenciais atividades antitumorais através de múltiplos mecanismos e também poderiam reverter a resistência a múltiplas drogas. Em vista desse potencial, derivados da teobromina podem levar a potentes agentes antitumorais, seletivos e com menor toxicidade.

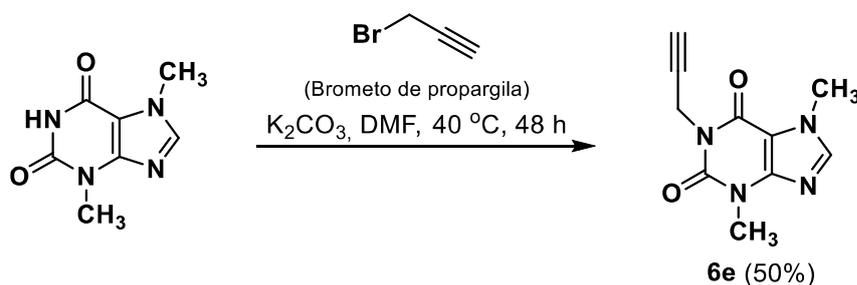
Figura 34. Estrutura química da teobromina.



Fonte: a autora.

A síntese do derivado propargílico da teobromina **6e** foi baseada na metodologia descrita por Kumar *et al.*, 2012. em que foi empregado o carbonato de potássio como base, e DMF anidro como solvente, da mesma forma que para a obtenção do derivado dipropargil substituído da uracila **6d**. Porém, após 24 h de reação, ainda era possível observar o material de partida (CCD). Para a completa conversão foi então necessário 48 h de reação. Entretanto, o rendimento dessa reação foi de 50% (Figura 35).

Figura 35. Síntese do derivado 3-propargilteobromina (**6e**).



Fonte: a autora.

4.2.3 Síntese dos derivados bis-(cumaronil-triazolil)uracilas **7a-b**, (cumaronil-triazolil)uracila, timina, tiouracila **8a-g** e (cumaronil-triazolil)teobromina **9a-d**.

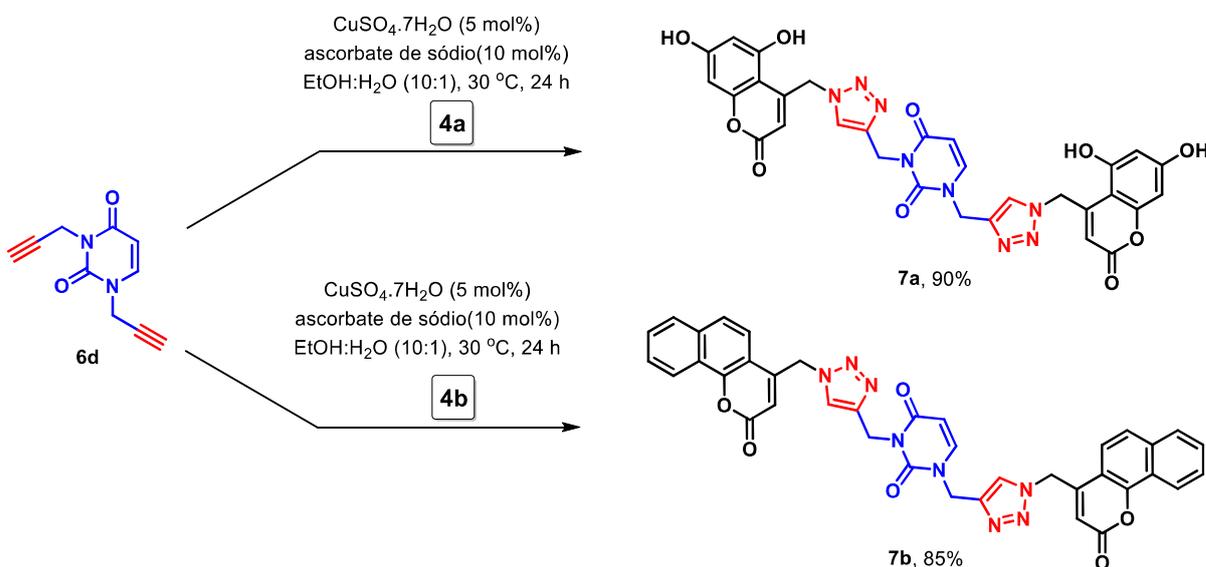
A síntese dos híbridos bis-(cumaronil-triazolil)uracilas **7a-b**, (cumaronil-triazolil)uracila, timina, tiouracila **8a-f** e (cumaronil-triazolil)teobromina **9a-d** ocorreu por meio do mecanismo de cicloadição catalisada por Cu(I) (CuAAC) empregando os derivados 4-(azidometil)-cumarínicos como dipolo e os derivados mono e di-propargil substituídos da uracila, timina, tiouracila e da teobromina como dipolarófilos.

Inicialmente empregamos como catalisador o cloreto de cobre(I), o qual promoveu a formação do derivado **7a**, com um bom rendimento de 85%. Porém, o uso desse catalisador demanda maiores cuidados como atmosfera inerte, já que sais de cobre (I) podem apresentar instabilidade termodinâmica, podendo ser oxidado para Cu(II) e/ou sofrer desproporcionamento no decorrer da reação levando à formação de cobre metálico e Cu(II) (FREITAS *et al.* 2011). Para solucionar esses possíveis problemas, e para que essa reação pudesse se enquadrar nos critérios de uma reação do tipo “click”, utilizamos o sistema catalítico em que é a espécie de cobre(I) é gerada *in situ* por meio do emprego de sulfato de cobre e de ascorbato de sódio como agente redutor.

Para que uma reação seja “click” ela deve seguir alguns critérios, como ser realizada sem solventes ou que estes sejam atóxicos e inofensivos, usar materiais de partida estáveis e de simples obtenção e não necessitar, por exemplo, de cuidados especiais, ou seja, idealmente o processo deve ser insensível a oxigênio e água (FREITAS *et al.* 2011).

O protocolo reacional selecionado foi baseado no descrito por Kumar *et al.* 2012, e para a obtenção dos híbridos bis-(cumaronil-triazolil)uracilas **7a-b** foi empregado o precursor 1,3-dipropargiluracila **6d** (1 mmol) frente aos derivados 4-(azidometil)-cumarina **4a-b** (2 mmol). A reação foi realizada em etanol-água (10:1), e foi catalisada por Cu(I) gerado *in situ* a partir do sulfato de cobre (0,055 mmol) e ascorbato de sódio (0,143 mmol). Além do solvente atóxico, essa metodologia empregou temperatura branda de 25 °C por 24 horas, tendo sido acompanhada por CCD. Após completada a reação, foi adicionada água gelada e o produto precipitou instantaneamente, sendo então filtrado, seco por liofilização e purificado por coluna cromatográfica utilizando hexano:acetato de etila (50:50 v/v) e diclorometano:metanol (95:5 v/v), e foram obtidos em rendimentos de 90% e 85% para o composto **7a** e **7b**, respectivamente.

Figura 36. Esquema reacional para a síntese dos híbridos bis-(cumaronil-triazolil)uracilas **7a-b**.



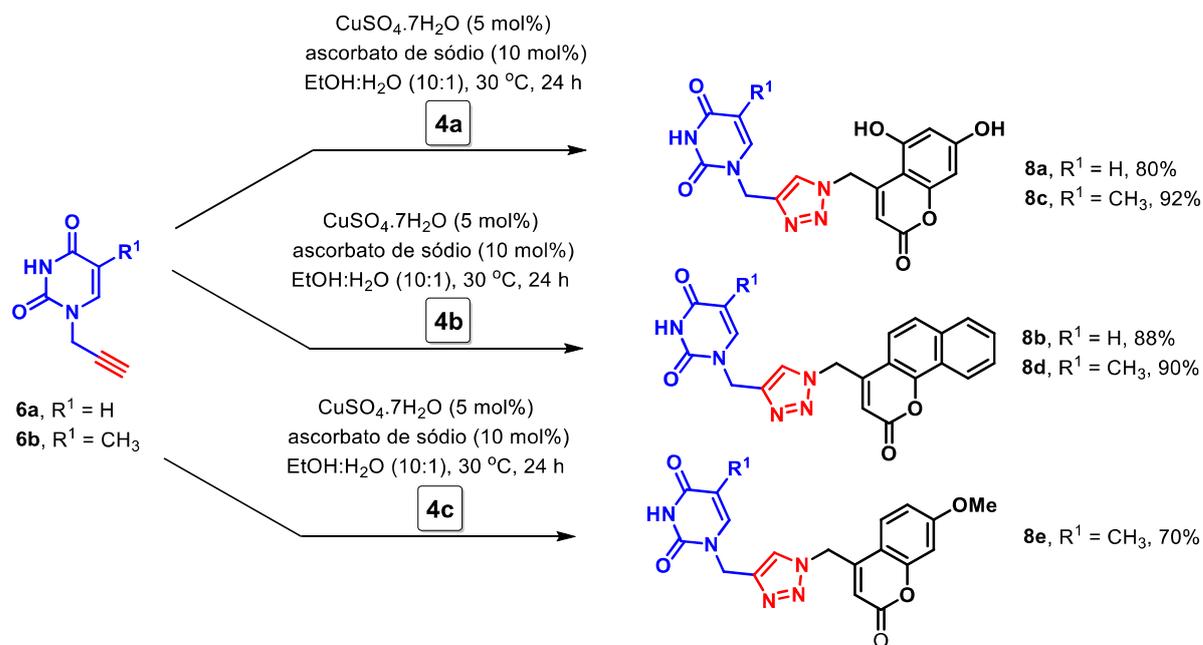
Fonte: a autora.

Os híbridos (cumaronil-triazolil)uracila, timina **8a-e** (Esquema A, Figura 37), (cumaronil-triazolil)tiouracila **8f** (Esquema B, Figura 37) e (cumaronil-triazolil)teobromina

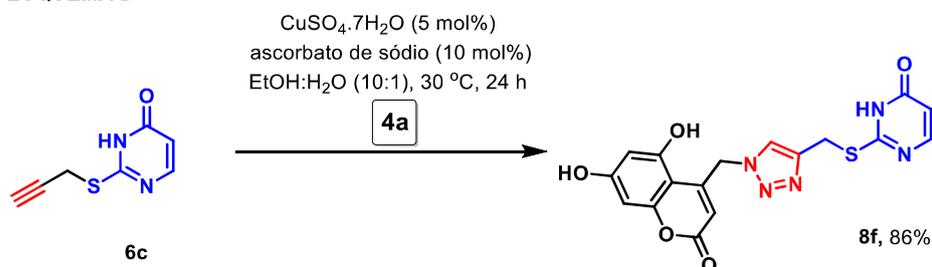
9a-d (Figura 38) também foram obtidos por meio do protocolo reacional baseado no descrito por Kumar *et al.* 2012, empregando os precursores 1-propargiluracila **6a**, 1-propargiltimina **6b**, 2-propargilmercaptouracila **6c** e 3-propargilteobromina **6e** frente aos derivados 4-(azidometil)-cumarina **4a-d**. Para a síntese desses derivados foi utilizada a metade da quantidade de sulfato de cobre (0,0275 mmol) e ascorbato de sódio (0,0715 mmol) do que para a obtenção dos derivados bis-(cumaronil-triazolil)uracilas. As reações foram realizadas em etanol-água, a 30 °C por 24 horas, e foram obtidos rendimentos de 70% – 92%.

Figura 37. Esquemas reacionais para a síntese dos híbridos (cumaronil-triazolil)uracila, timina, **8a-e** (Esquema A) e (cumaronil-triazolil)tiouracila **8f** (Esquema B).

ESQUEMA A

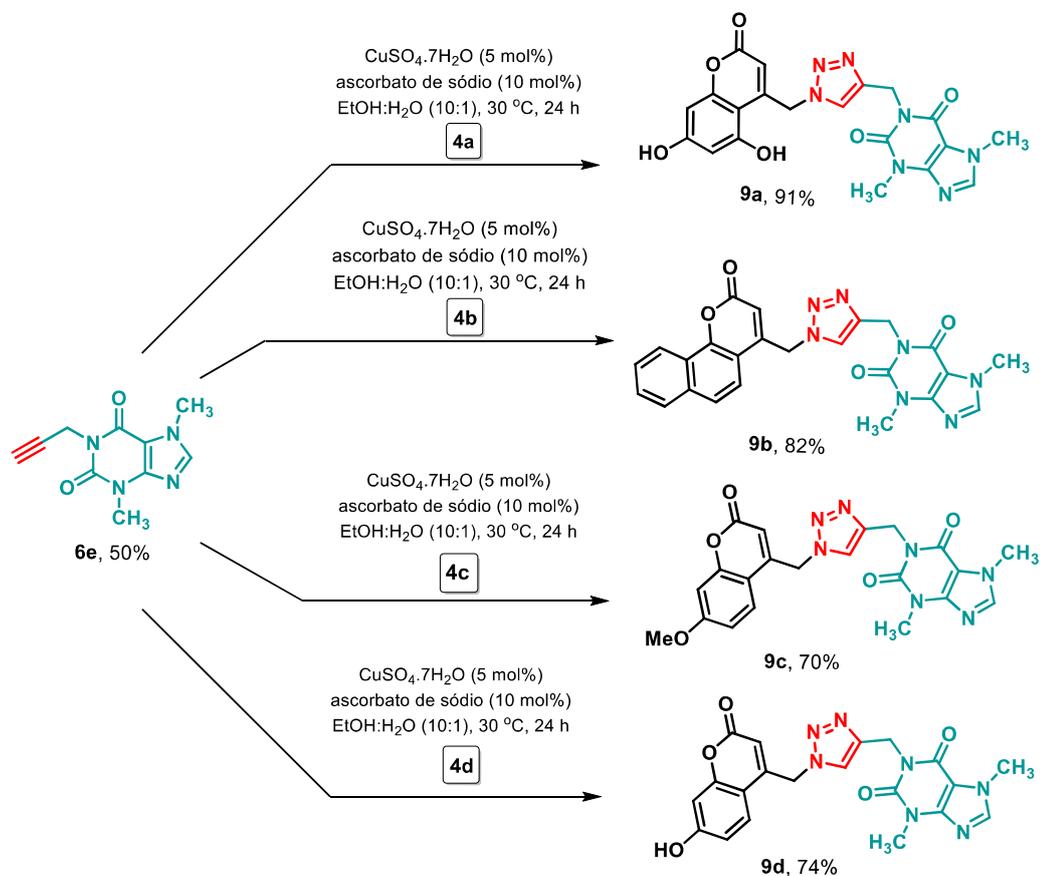


ESQUEMA B



Fonte: a autora.

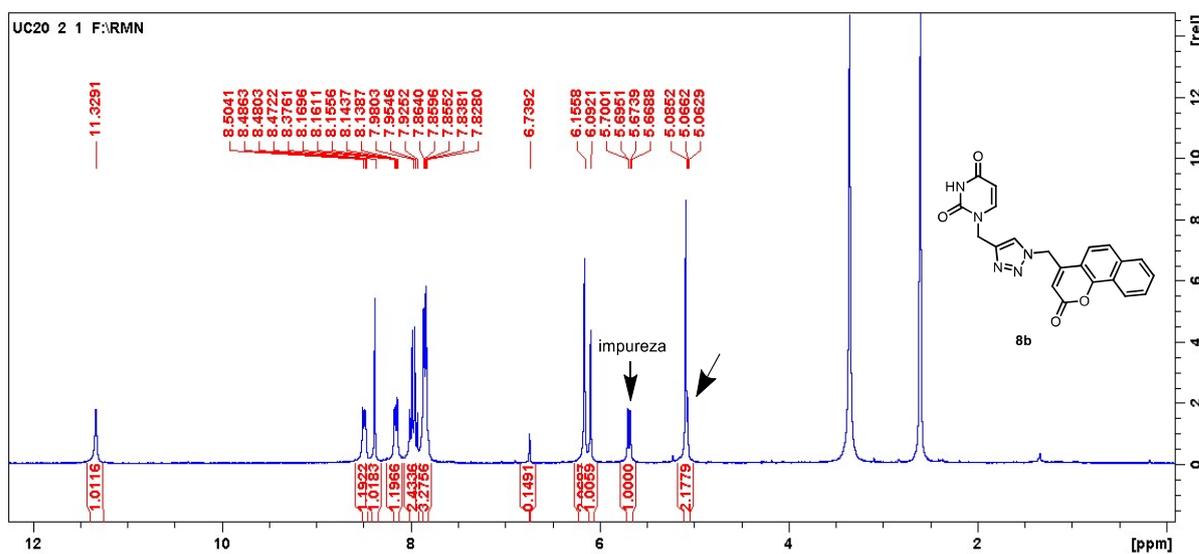
Figura 38. Esquemas reacional para a síntese dos híbridos (cumaronil-triazolil)teobromina **9a-d**.



Fonte: a autora.

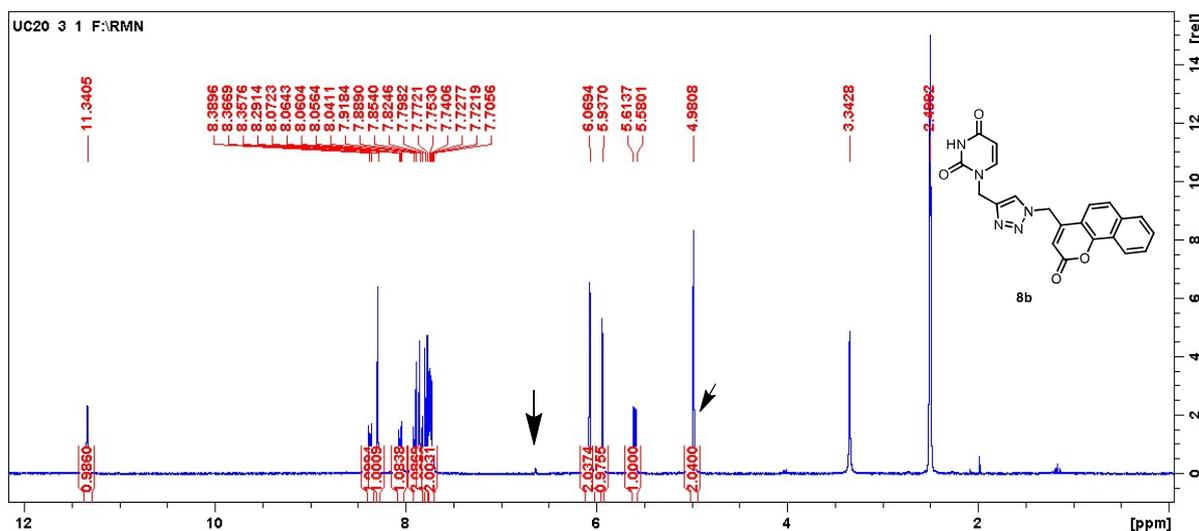
Os produtos brutos foram obtidos, em geral, apenas com pequenos resquícios da cumarina precursora, como pode ser observado no espectro de RMN de ¹H do composto **8b** (Figura 39), que foram retirados por meio de coluna cromatográfica utilizando hexano:acetato de etila (50:50 v/v) e diclorometano:metanol (95:5 v/v), obtendo-se unicamente o produto de interesse (Figura 40).

Figura 39. Espectro de RMN de ^1H adquirido do composto (cumaronil-triazolil)uracila **8b** sem prévia purificação.



Fonte: a autora.

Figura 40. Espectro de RMN de ^1H adquirido do composto (cumaronil-triazolil)uracila **8b** após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel.



Fonte: a autora.

A identificação dos compostos **7a-b**, **8a-f** e **9a-d** foi realizada por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ e espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). Os espectros de RMN foram registrados em $\text{DMSO-}d_6$. A atribuição de sinais de RMN de ^1H e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ para os compostos **7a-b**, **8a-f** e **9a-d** foi baseada na elucidação estrutural do composto **7a**, além dos dados espectroscópicos dos compostos precursores **4a** e **6d**. Para melhor discussão a respeito da atribuição dos sinais do composto **7a** numeramos a estrutura da seguinte forma: iniciando

com a letra C (C1, C1'...) os hidrogênios presentes no núcleo cumarínico; iniciando com a letra T (T1, T1'...) os hidrogênios presentes no núcleo triazólico; iniciando com a letra U (U1, U1'...) os hidrogênios presentes no núcleo uracila; e por fim, UT1 e UT1' referentes aos CH₂ pontes de ligação entre os núcleos uracila e triazol e CT1 e CT1' referentes aos CH₂ pontes de ligação entre os núcleos cumarina e triazol (Figura 41).

Figura 41. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz do híbrido bis-(cumaronil-triazolil)uracila **7a** adquirido em DMSO-d₆ e com supressão do sinal referente à água.

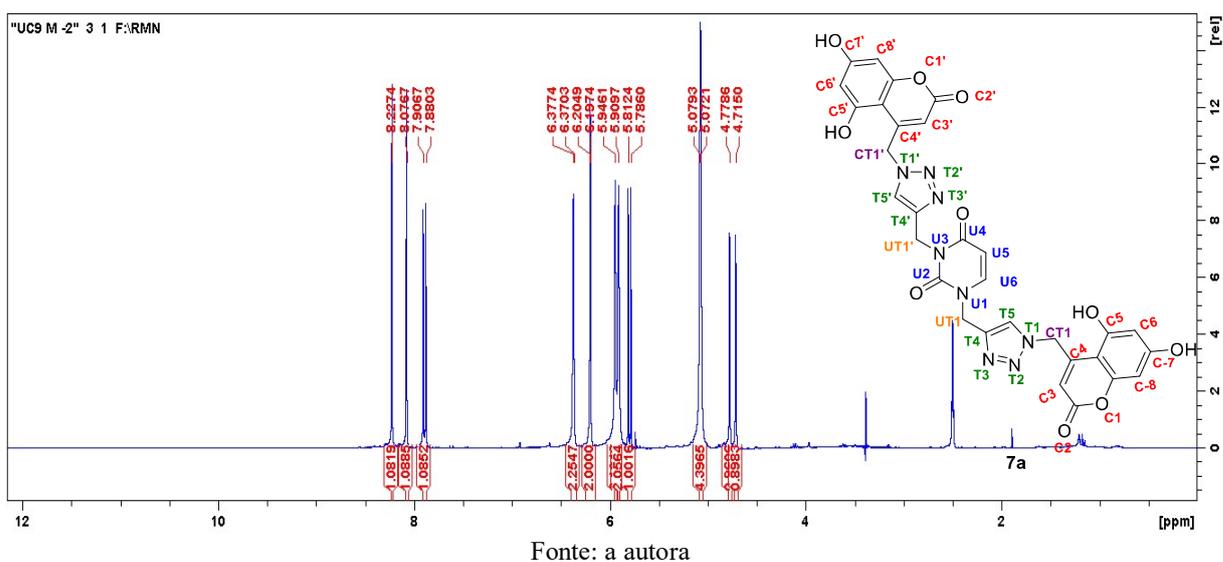
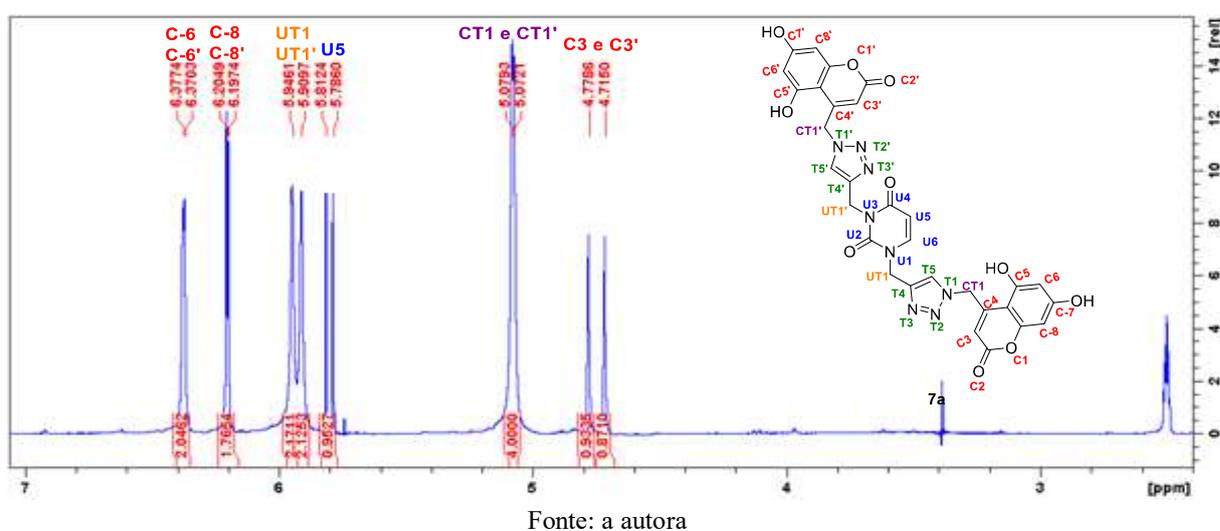


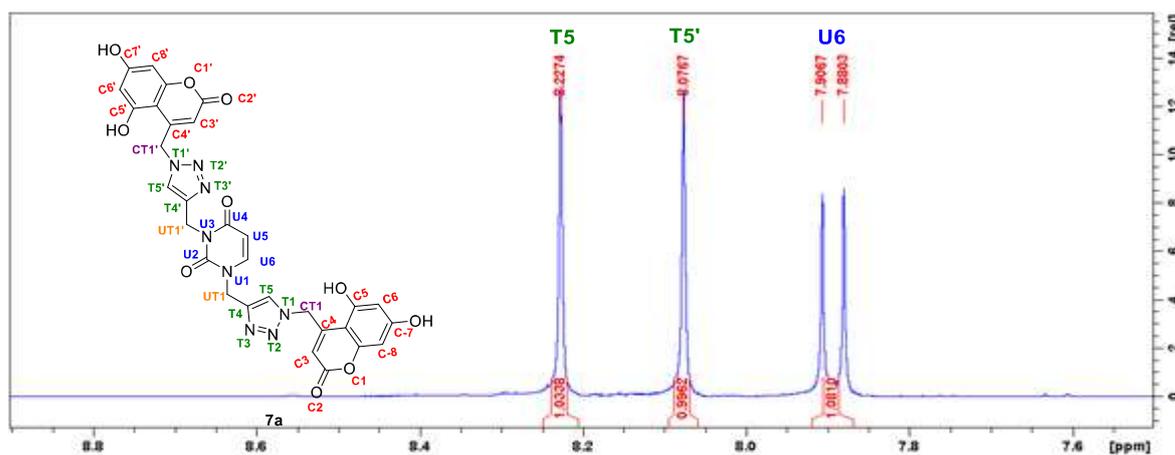
Figura 42. Expansão do espectro de RMN de ¹H a 300 MHz do híbrido bis-(cumaronil-triazolil)uracila **7a** adquirido em DMSO-d₆ e com supressão do sinal referente à água.



No espectro de RMN de ¹H do composto **7a** (Figura 41 e Figura 42) pôde-se observar os sinais referentes aos hidrogênios vinílicos (C3 e C3') das cumarinas, como simpletos na

região de 4,71 e 4,77 ppm. Em 5,07 ppm podemos visualizar um simpleto com integração 4H referente aos hidrogênios do CH₂ pontes que ligam os núcleos cumarinas aos triazóis (CT1 e CT1'). Os sinais referentes aos hidrogênios do CH₂ pontes entre os núcleos uracila e triazol podem ser observados com simpletos em 5,90 (UT1) e 5,94 (UT1') ppm, sendo que esses valores de deslocamentos mais desblindados demonstram os fortes efeitos dos ciclos ao qual eles estão ligados. Os hidrogênios cumarínicos aromáticos C8, C8' e C6, C6' podem ser observados em 6,20 e 6,37, respectivamente, como dupletos com integração de 2H cada e $J = 2,4$ Hz, devido ao acoplamento entre os hidrogênios do anel com distância de duas ligações.

Figura 43. Expansão do espectro de RMN de ¹H a 300 MHz do híbrido bis-(cumaronil-triazolil)uracila **7a** em DMSO-d₆ e com supressão do sinal referente à água.



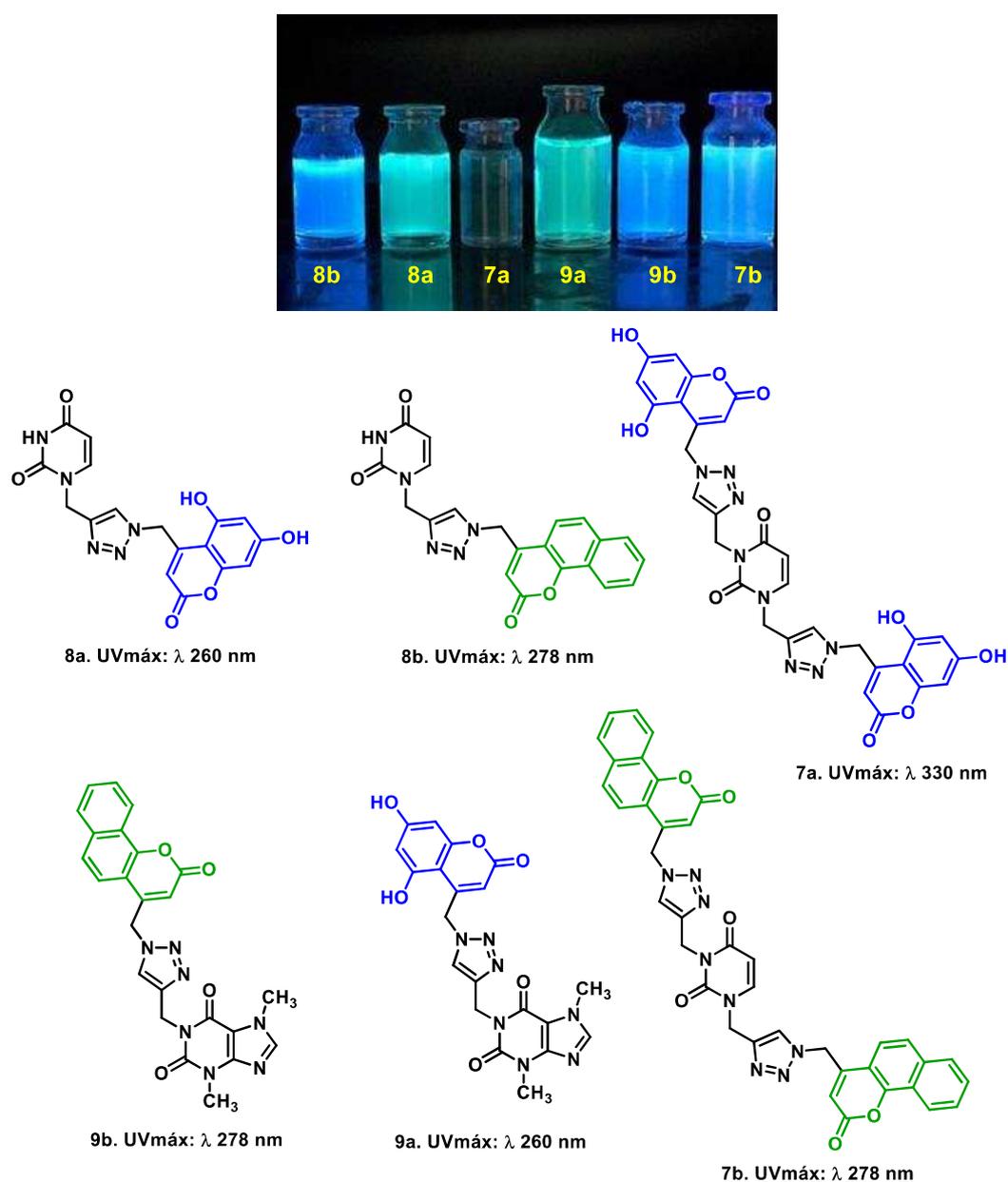
Fonte: a autora

Observou-se ainda, os sinais referentes aos hidrogênios vinílicos da uracila como dupletos com $J = 7,7$ Hz em δ 5,80 ppm (U5) e em δ 7,89 ppm (U6) com integração igual a 1H cada. Por fim, verifica-se os sinais relativos aos hidrogênios T5' e T5 do triazol, como simpletos com integração de 1H nas regiões bastante desblindadas de 8,07 e 8,22 ppm, respectivamente (Figura 42 e Figura 43), o que comprovaria sua formação e está de acordo com o que foi relatado na literatura para estruturas similares (KRISHNA *et al.*, 2018; NEGRÓN-SILVA *et al.*, 2013). A estrutura foi ainda suportada pelo espectro de RMN de ¹³C, que mostrou os sinais correspondentes aos átomos de carbono do triazol em δ 125,26 - 125,30 para CH (C-5) e δ 142,8 - 143,36 ppm para o carbono quaternário (C-4). O HRMS (ESI)-MS de todos os compostos mostrou os correspondentes íons moleculares protonados $[M + H]^+$ ou sodiados $[M + Na]^+$ confirmando suas estruturas.

Os híbridos bis-(cumaronil-triazolil)uracila **7a - b**, (cumaronil-triazolil)uracila, timina,

tiouracila **8a – g** e (cumaronil-triazolil)teobromina **9a – d**, assim como suas cumarinas precursoras, apresentam propriedades fluorescentes, como mostrado na Figura 44, apresentando cores que variam do azul ao verde dependendo dos substituintes na porção cumarínica de sua estrutura. Nos híbridos contendo a porção cumarínica derivada do naftol observa-se a fluorescência na cor azul, já nos com a parte cumarínica derivada do florglucinol observa-se a fluorescência na cor verde.

Figura 44. Fluorescência dos compostos bis-(cumaronil-triazolil)uracilas **7a-b**, (cumaronil-triazolil)uracilas **8a-b** e (cumaronil-triazolil)teobrominas **9a-b** quando irradiadas no comprimento de 365 nm em solução DMSO/água (1:1).



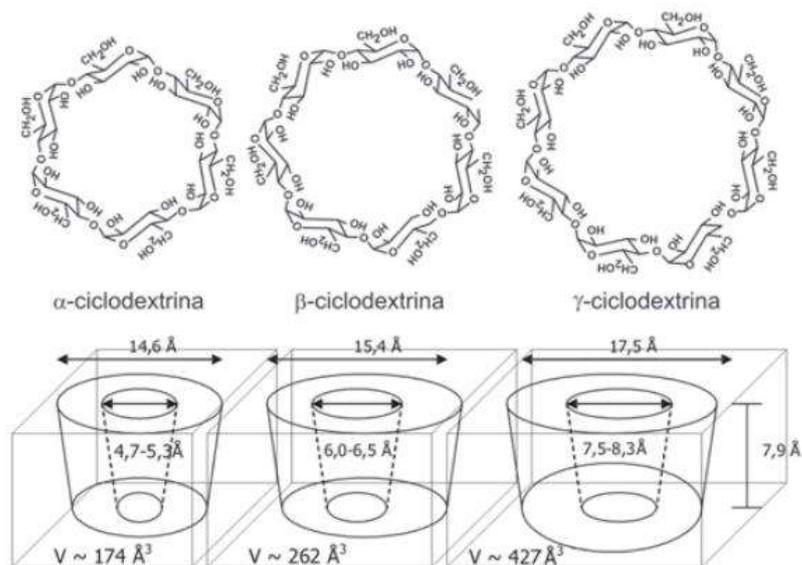
Fonte: a autora.

4.2.4 Obtenção dos complexos de inclusão (11a-b)

Após a obtenção dos compostos de interesse puros e caracterizados, iniciou-se o protocolo para a realização dos testes de viabilidade celular. Uma das características fundamentais para que o experimento seja possível é que o composto apresente boa solubilidade em água, ou em DMSO em uma concentração final de 0,1%. Porém, os compostos bis-(cumaronil-triazolil)uracila **7a-b**, (cumaronil-triazolil)uracila **8a-g** e (cumaronil-triazolil)teobromina **9a-d** não foram solúveis. Na busca de soluções que permitissem a execução dos testes, pensou-se no emprego dos complexos de inclusão com ciclodextrinas (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Esses compostos têm sido amplamente utilizados para amplificar a biodisponibilidade oral em formulações farmacêuticas, sendo especialmente aplicados para fármacos lipofílicos, uma vez que o seu efeito terapêutico pode ser melhorado (KELLICI *et al.*, 2016). A incorporação das ciclodextrinas (CDs) em sistemas farmacêuticos constitui uma realidade consolidada. Mais de 30 medicamentos comercializados no mercado mundial contam com a presença deste excipiente em suas formulações (CUNHA-FILHO; SÁ BARRETO, 2007).

Ciclodextrinas são produtos cíclicos obtidos do amido através de uma reação de transglicosilação intramolecular (ciclização), realizada pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC 2.4.1.19), produzida por alguns microorganismos como o *Thermoanaerobacterium*, *Klebsiella oxytoca* e algumas espécies de *Bacillus*, como *B. macerans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. stearothermophilus* e *B. Lentus* (MORIWAKI *et al.*, 2009). As três ciclodextrinas naturais são alfa (α -CD), beta (β -CD) e gamaciclodextrinas (γ -CD), compostas de seis, sete e oito unidades de D-(+)-glicopiranoose, respectivamente, e unidas pela ligações α -1,4-glicosídica (Figura 45) (FRACETO *et al.*, 2007). Elas apresentam conformação espacial tronco cônica (Figura 45), com grupos hidroxilas primários e secundários voltados para a face externa, conferindo certa hidrofília para a superfície externa, enquanto a cavidade da molécula é hidrofóbica (AGUIAR *et al.*, 2014).

Figura 45. Estruturas moleculares das ciclodextrinas α -CD, β -CD e γ -CD.

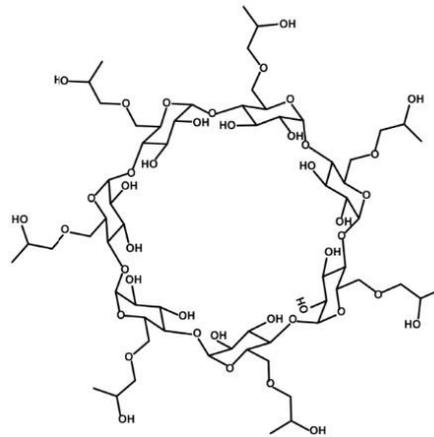


Fonte: VENTURINI *et al.* 2008

A cavidade das ciclodextrinas permite a elas complexarem moléculas que apresentem dimensões compatíveis, alterando suas propriedades físico-químicas, como solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade. As β -CDs são as ciclodextrinas mais amplamente utilizadas na complexação com várias classes de fármacos (FRACETO *et al.*, 2007), pois a dimensão de sua cavidade é adequada para a maioria dos compostos com pesos moleculares de 200 a 800 g/mol, possibilitando a complexação de compostos aromáticos e heterocíclicos (ZIGONE; RUBESSA, 2005).

Além das ciclodextrinas de origem natural, um grande número de CDs modificadas tem sido sintetizado. Essas CDs modificadas surgiram a partir da necessidade de alterar ou melhorar suas estruturas a fim de obter complexos de inclusão adequados a vários setores, como industrial, alimentício e farmacêutico (VENTURINI *et al.*, 2008). Um dos derivados das CDs muito utilizado na complexação de fármacos é o das CDs hidroxialquiladas, com destaque para a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD, Figura 46), que apresenta alta solubilidade em água e baixa toxicidade (GUEDES *et al.*, 2008).

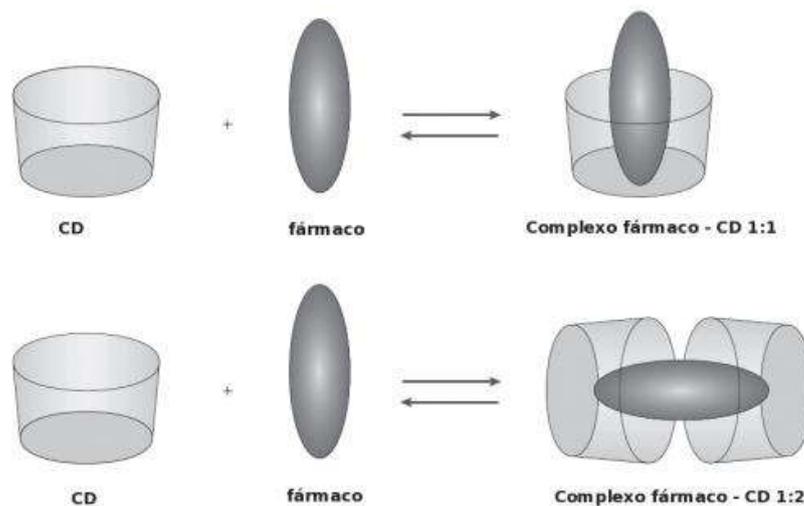
Figura 46. Estrutura molecular da 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD).



Fonte: KELLICI *et al.* 2016.

As CDs formam complexos relativamente não específicos com uma grande variedade de substratos e a principal condição é que o substrato possa se adaptar à cavidade, ainda que parcialmente (VENTURINI *et al.*, 2008). A formação de complexos é possível com toda a molécula de fármaco ou englobando apenas parte dela, como esquematizado na Figura 47 (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Figura 47. Formação complexo de inclusão fármaco-CD com estequiometria 1:1 e 1:2.



Fonte: Oliveira *et al.*, 2009.

Assim, as CDs funcionam como transportadores moleculares, carregando as moléculas hidrofóbicas hóspedes em solução até as membranas celulares lipofílicas para qual apresentam maior afinidade, facilitando assim sua absorção. A absorção das CDs pelas

membranas celulares é insignificante, devido ao seu elevado tamanho (massa molecular acima de 1000) e superfície hidrofílica (GUEDES *et al.*, 2008).

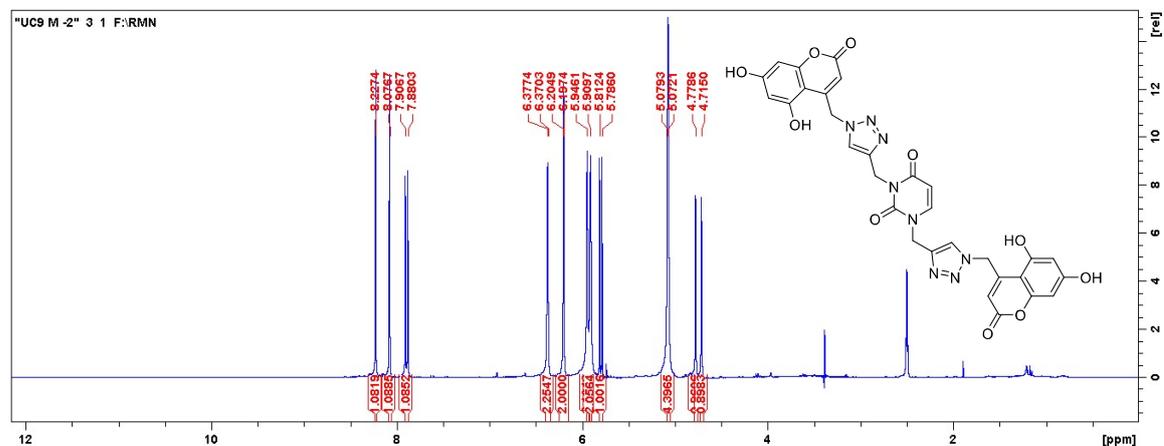
Devido às características fundamentais para aplicação em testes biológicos como alta solubilidade aquosa e baixa toxicidade, selecionamos a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) para o preparo dos complexos de inclusão. O protocolo foi realizado por meio do método de cossolubilização baseado no descrito por Azevedo *et al.* 2000. O complexo de inclusão entre as bis-(cumaronil-triazolil)uracilas **7a-b**, (cumatonil-triazolil)uracila, timina **8a-d**, e (cumaronil-triazolil)teobromina **9a-b**, **9d** e HP- β -CD **10** foi preparado empregando a seguinte sequência de procedimentos:

Primeiramente, uma solução etanólica contendo os compostos (**7a-b**, **8a-d**, **9a-b**, **9d**) foi preparada. O etanol foi escolhido como solvente devido a maior solubilidade dos compostos neste solvente. Paralelamente, uma solução de HP- β -CD **10** foi preparada em água, ambas nas mesmas proporções molares (estequiometria 1:1, composto:ciclodextrina) e volume. Ambas as soluções foram mantidas sob agitação até que os compostos estivessem completamente solúveis. Após, as soluções foram misturadas, e novamente mantidas sob agitação constante por 150 horas. Após, a solução final foi concentrada no evaporador rotativo para a retirada dos solventes. A água residual foi removida com o uso da técnica de liofilização, obtendo-se assim um sólido que foi armazenado em um frasco âmbar, selado e sob refrigeração, para a posterior utilização. A identificação dos complexos foi feita por meio de RMN de ^1H .

Algumas mudanças, sutis, foram observadas no espectro de RMN de ^1H dos compostos puros em relação aos espectros dos complexos de inclusão. Como exemplo, temos o composto **7a**, onde houve pequenas mudanças nos deslocamentos químicos dos picos referentes aos hidrogênios aromáticos da cumarina. Os dupletos com $J = 2,4$ Hz, que eram visualizados em δ 6,20 e 6,37 ppm (Figura 48), no complexo de inclusão são observados em δ 6,19 e 6,30 ppm (Figura 50). Além disso, observamos uma mudança na distância entre esses picos, que no composto **7a** era de 51,79 Hz (Figura 51, espectro 1) e no complexo de inclusão com a HP- β -CD é de 32,79 Hz (Figura 51, espectro 2).

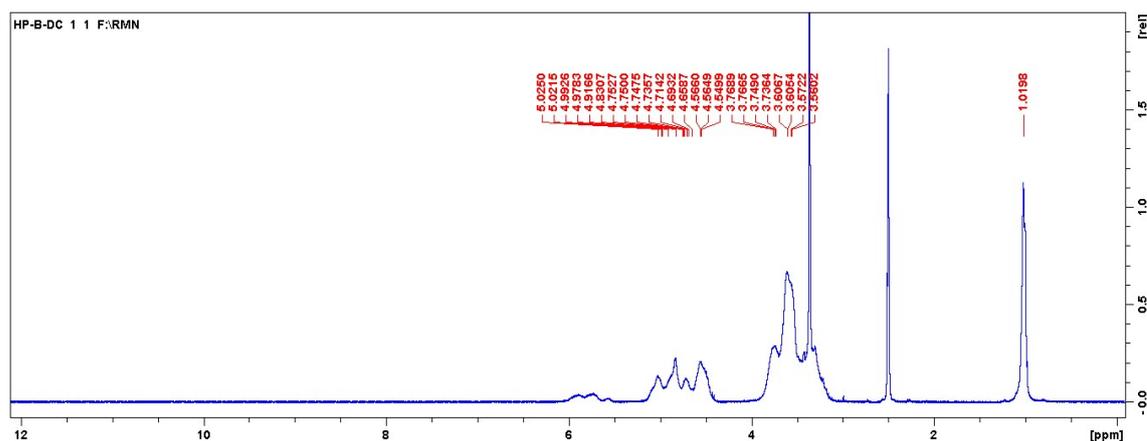
Os complexos composto:HP- β -CD obtidos demonstraram ser, visualmente, mais solúveis do que o composto puro em uma mistura de água e 0,5% de DMSO, o que permitiu a realização dos testes de viabilidade celular por meio deles.

Figura 48. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido **7a** adquirido em DMSO-d_6 com supressão do sinal referente à água.



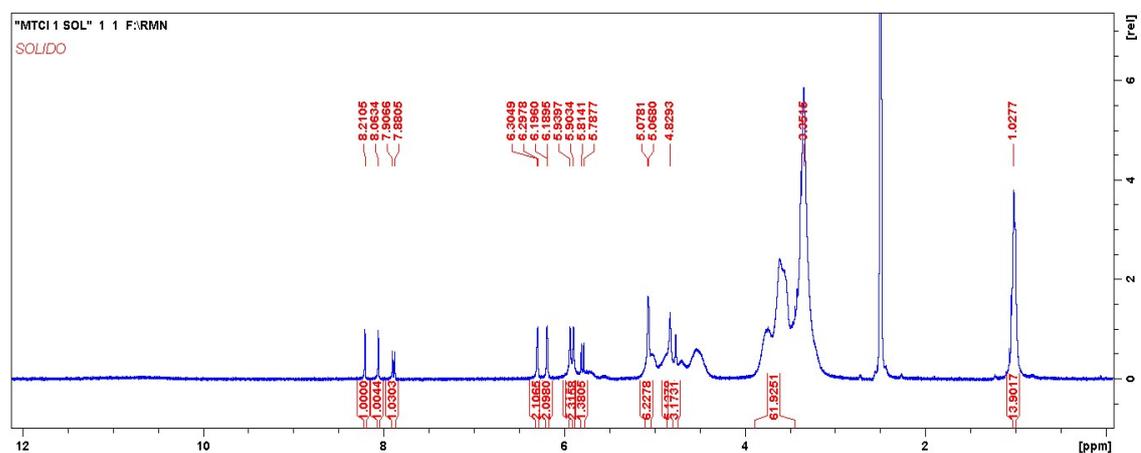
Fonte: a autora.

Figura 49. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz da HP- β -CD adquirido em DMSO-d_6 .



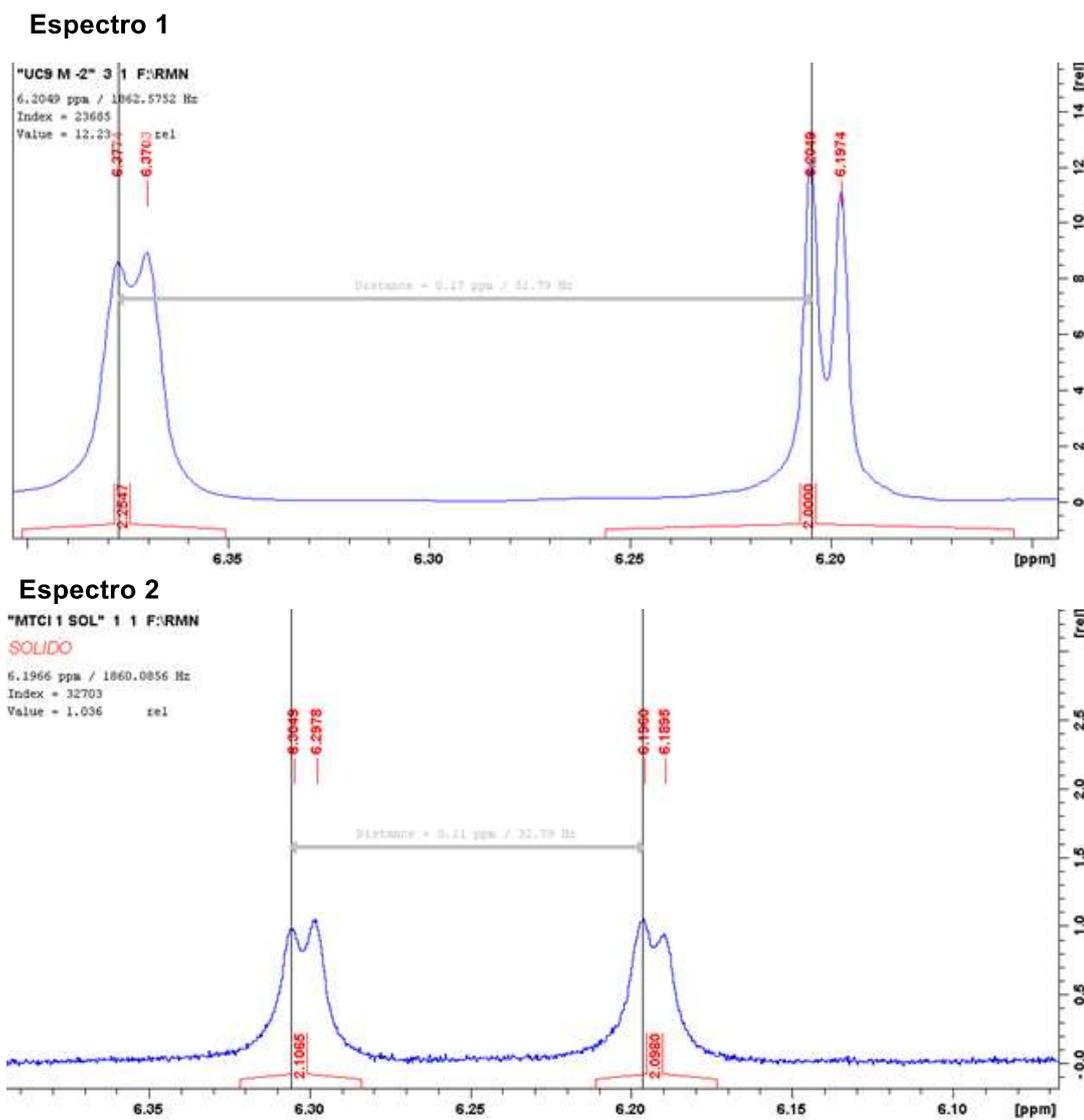
Fonte: a autora

Figura 50. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do complexo de inclusão do composto **7a** com a Hp- β -CD adquirido em DMSO-d_6 .



Fonte: a autora.

Figura 51. Espectro 1 - expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz, adquirido em DMSO-d_6 , do híbrido **7a** destacando os dupletos referentes aos hidrogênios aromáticos da porção cumarínica (distância entre os picos de 51,79 Hz). Espectro 2 - Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 Hz do complexo de inclusão do composto **7a** com a Hp- β -CD, destacando os dupletos referentes aos hidrogênios aromáticos da porção cumarínica (distância entre os picos de 32,79 Hz).



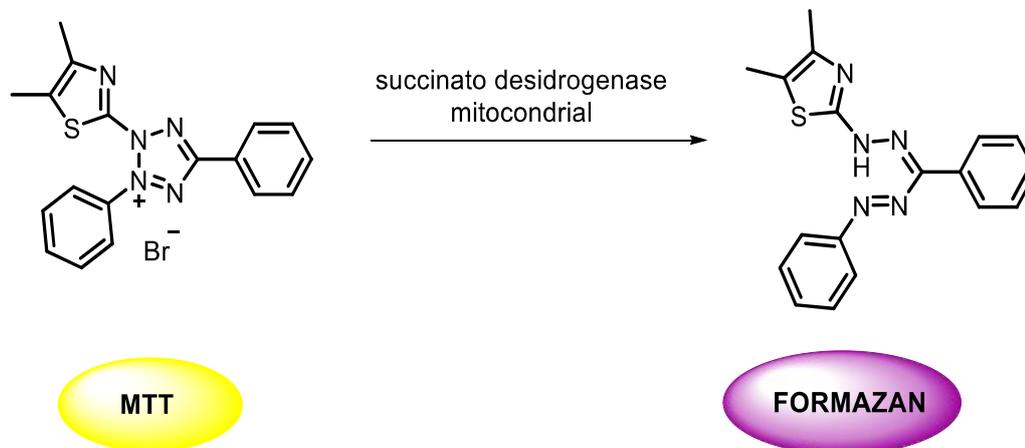
Fonte: a autora.

4.2.5 Ensaios biológicos

Quando um novo composto, obtido de fonte natural ou sintética, está sob avaliação de suas atividades biológicas ele precisa ser examinado quanto ao seu efeito citotóxico (BAHUGUNA *et al.*, 2017). Testes de citotoxicidade consistem em colocar o composto direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular (ROGERO *et al.*, 2003).

O ensaio colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) é utilizado para avaliar a viabilidade celular. O mecanismo consiste na clivagem do sal de tetrazólio MTT em um produto de cor púrpura (formazan) pela enzima succinato-desidrogenase mitocondrial (EC 1.3.5.1), como mostrado na Figura 52, e a quantidade de formazan produzida (intensidade da cor púrpura) é proporcional ao número de células viáveis presentes (DENIZOT; LANG, 1986).

Figura 52. Conversão do MTT em formazan pela enzima succinato-desidrogenase mitocondrial.

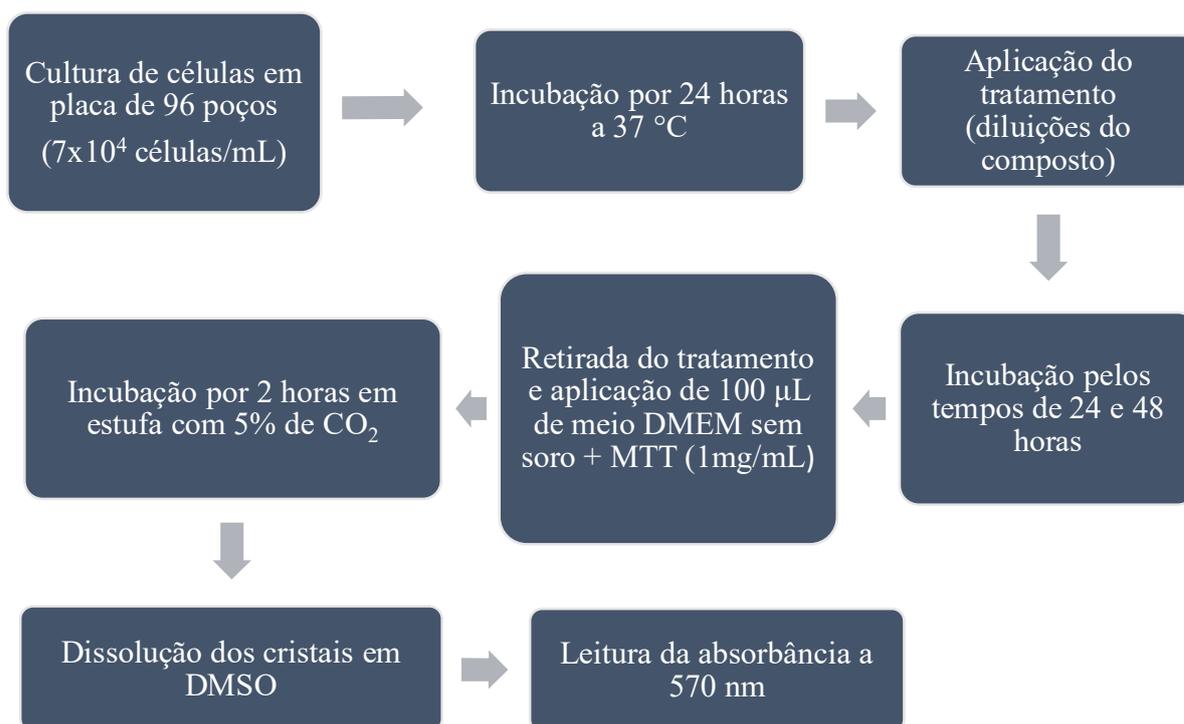


Fonte: a autora.

Os compostos híbridos bis-(cumaronil-triazolil)uracilas **7a-b**, (cumaronil-triazolil)uracilas **8a-b**, (cumaronil-triazolil)timinas **8c-d** e (cumaronil-triazolil)teobrominas **9a-b**, **9d** foram investigados pelo ensaio MTT frente às linhagens tumorais HCT116 (colorretal), Hep-2 (laringe) e A549 (pulmão) e a linhagem não tumoral HaCat (queratinócitos humanos). Para a avaliação da atividade antitumoral foram utilizados os valores de IC₅₀ (concentração inibitória 50% - concentração que inibe o crescimento celular em 50%) e cada experimento foi realizado em triplicata e em três dias diferentes.

Os testes foram conduzidos com os compostos híbridos na forma de complexos de inclusão com a Hp- β -CD. Foram avaliadas, nos tratamentos, as concentrações de 5, 10, 20 e 50 μ M para a linhagem Hep-2 e 5, 10, 20, 50 e 100 μ M para as linhagens A549, HCT116 e HaCat, por 24 e 48 horas. A sequência experimental para os ensaios de viabilidade celular foi realizada como apresentado no fluxograma a seguir (Figura 53).

Figura 53. Fluxograma do ensaio de viabilidade celular MTT.



Fonte: a autora

Com o intuito de avaliar a possível toxicidade da HP- β -CD no ensaio de viabilidade celular, que poderia levar a uma interferência no resultado dos ensaios para os compostos, foi realizado um ensaio controle contendo apenas a HP- β -CD na concentração mais alta (100 μ M) a qual foi avaliada na mistura com os compostos híbridos. Adicionalmente, a solução veículo, contendo 0,5% de DMSO, foi também submetida aos ensaios, sendo o controle negativo.

Não foi observada toxicidade e interferência da HP- β -CD nos ensaios de viabilidade celular, frente a nenhuma das células testadas, na concentração avaliada, obtendo-se valores de absorbância semelhantes aos valores do controle de meio de cultura. Verificou-se que cinco dos compostos híbridos avaliados (**7a-b**, **8d**, **9a-b**) apresentaram citotoxicidade ($IC_{50} < 100 \mu$ M) frente à linhagem de células HCT116 (câncer colorretal).

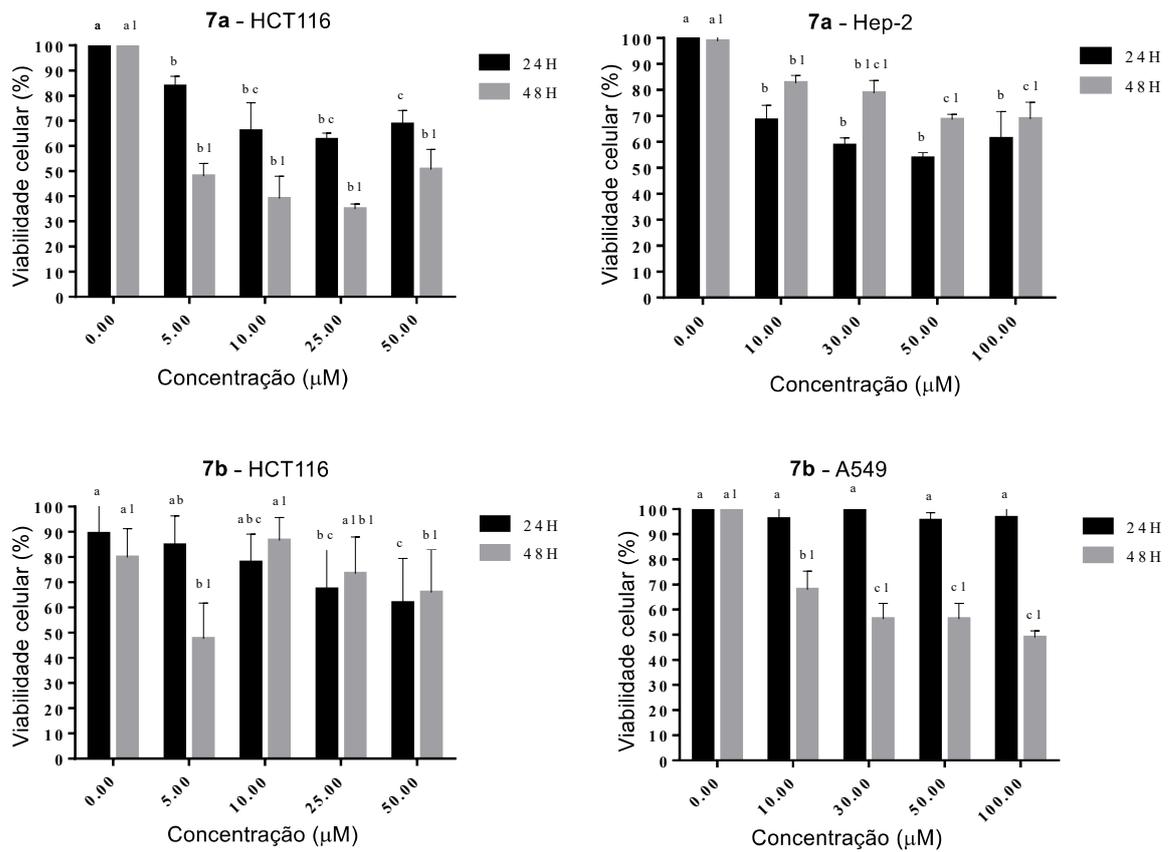
O composto **7a**, resultante da hibridização da uracila e duas cumarinas derivadas de floroglucinol, apresentou a maior citotoxicidade frente à linhagem de células HCT116 com um IC_{50} calculado de 24,19 μM para 48 h de exposição (Tabela 8, entrada 1). Além disso, o composto **7a** não apresentou citotoxicidade frente à linhagem de células não tumorais HaCat, mostrando um índice de seletividade (IS) igual a 6. O índice de seletividade foi calculado como a razão entre o IC_{50} da HaCat (linhagem não tumoral) e o IC_{50} das linhagens tumorais, e pode sugerir a seletividade de um composto entre um linhagem tumoral e uma não tumoral, sendo que um valor de 6 indica que o composto é seis vezes mais ativo frente a células tumorais do que em células normais. Houve uma diminuição no IC_{50} apresentado pelo composto **7a** com o tempo de exposição frente à linhagem HCT116, com valores de 69,22 μM para 24 horas de exposição e 24,19 μM para 48 h de exposição.

Observamos um comportamento inesperado em relação a viabilidade celular apresentada pelo composto **7a** frente à linhagem de células HCT116. A viabilidade celular ficou abaixo de 40% na concentração de 25 μM para 48 horas de exposição e aumentou em doses mais altas, ficando acima de 50% na concentração de 50 μM (Figura 54). Ou seja, a citotoxicidade observada não foi dose-dependente. Infelizmente, não foi possível explicar esse comportamento a partir dos ensaios realizados e são necessários mais estudos para que seja possível compreendê-lo.

Nenhum efeito de citotoxicidade foi observado para o composto **7a** frente às células A549 em 24 e 48 h de tratamento (Tabela 8, entrada 1). Em relação à linhagem de células Hep-2, um IC_{50} de $51,55 \pm 1,71 \mu M$ foi observado para 24 h de exposição. Houve um aumento no valor de IC_{50} apresentados pelo composto **7a** frente à linhagem de células Hep-2 com o tempo de exposição, sendo que ele ficou acima de 100 μM para 48 horas de exposição.

O composto **7b**, que é análogo ao **7a**, mas com a porção cumarina derivada do 1-naftol, apresentou IC_{50} frente às células HCT116 de $54,50 \pm 1,74$ e $59,17 \pm 1,77 \mu M$ para tratamento de 24 e 48 h. Esse composto foi o único da série que apresentou atividade frente à linhagem de células A549, com um IC_{50} de $51,03 \pm 1,71 \mu M$ para 24 h de exposição (Tabela 8, entrada 2). Além da citotoxicidade moderada, o índice de seletividade em relação à linhagem de células HaCat foi de 63. Nenhuma citotoxicidade foi observada frente às células Hep-2. Em relação a viabilidade celular o composto **7b**, frente a linhagem HCT116, apresentou comportamento semelhante ao composto **7a**. A viabilidade celular ficou abaixo de 50% na concentração de 5 μM e acima de 60% na concentração de 50 μM , ou seja, observamos um aumento em doses mais altas (Figura 54).

Figura 54. Perfil citotóxico do composto híbridos **7a** frente às linhagens de células tumorais HCT116, Hep-2 e do composto **7b** frente às linhagens de células tumorais HCT116 e A549 após 24 h e 48 h de exposição em ensaio MTT. Letras diferentes representam significância estatística utilizando o teste ANOVA-Tukey; $p \leq 0.05$.



Fonte: a autora

No caso dos compostos mono *N*1-(cumaronil-triazolil)uracilas **8a-d**, eles não foram citotóxicos frente às linhagens tumorais avaliadas, com $IC_{50} > 100 \mu M$, com exceção do composto **8d**, que apresentou citotoxicidade moderada apenas frente às células HCT116 com um IC_{50} de $87,58 \pm 1,94 \mu M$ (Tabela 8, entrada 6).

Os compostos **9a** e **9b**, ambos derivados da teobromina, mostraram citotoxicidade frente às células HCT116. No entanto, o composto **9b** mostrou maior potência com um IC_{50} $40,98 \pm 1,61 \mu M$ para 24 h de exposição com um índice de seletividade de 6 (Tabela 8, entrada 8). O composto **9a** mostrou um IC_{50} de $78,26 \pm 1,89$ em 24 h de exposição frente às células HCT116 e um IC_{50} de $56,55 \pm 1,75 \mu M$ frente às células Hep-2 (Tabela 8, entrada 7), com um índice de seletividade de 4 e 5, respectivamente.

Por fim, nenhum dos compostos testados apresentou citotoxicidade frente à linhagem de células não tumorais HaCat, mesmo na concentração mais elevada testada de $100 \mu M$ em todos os tempos testados (Tabela 8).

4.2.6 Estudo de toxicidade *in silico*.

Determinar a toxicidade de produtos químicos é necessário para identificar seus efeitos nocivos sobre seres humanos, animais, plantas ou meio ambiente. É também uma das principais etapas no planejamento de medicamentos. Modelos animais são utilizados há muito tempo para testes de toxicidade. No entanto, testes em animais *in vivo* são limitados pelo tempo, por considerações éticas e, também, encargos financeiros (RAIES; BAJIC, 2016). Diante deste cenário, os métodos de avaliação da toxicidade *in silico* (IST – do inglês: *in silico toxicology*) são considerados úteis, uma vez que permitem a obtenção de resultados que balizam os riscos potenciais de substâncias em fase anterior ao ensaio experimental. Esses métodos consistem em abordagens computacionais que geram, simulam, ou prevêm a toxicidade de produtos químicos, o que permite a sua visualização e análise. O IST abrange todas as metodologias que são utilizadas para calcular propriedades químicas e biológicas envolvidas em efeitos tóxicos e geralmente baseado em uma estrutura química ou similaridade a esta, que representa um produto químico real ou proposto (isto é, virtual). Hoje, as abordagens *in silico* são frequentemente usadas em combinação com outros testes de toxicidade (MYATT *et al.*, 2018).

Tendo isso em vista, a partir dos resultados de citotoxicidade obtidos nos ensaios de viabilidade celular MTT, decidimos realizar estudos *in silico* avaliando o risco de toxicidade

teórica dos compostos que se mostraram mais promissores. Os estudos foram realizados com a colaboração do Prof. Dr. Favero Reisdorfer Paula, na Universidade Federal do Pampa (Unipampa) – Campus Uruguaiana.

Para isso, nesse trabalho, o software *Osiris Property Explorer* foi usado para calcular o risco de toxicidade baseados em fragmentos dos compostos **7a-b** e **9a-b** em comparação com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como controle positivo. O programa *Osiris* utiliza um banco de dados com medicamentos comercializados e com compostos do catálogo *Fluka*, não utilizados como medicamentos, e seus fragmentos com toxicidade avaliada para se prever o risco de toxicidade do composto estudado. O software calcula ainda as propriedades *druglikeness* e o *drugscore*, que representam o potencial da molécula em apresentar características de um fármaco e um ranqueamento numérico em relação a um composto ativo ou agente terapêutico, respectivamente.

Todos os compostos apresentaram efeitos tóxicos previstos mais baixos em comparação com o H₂O₂. Todos os resultados obtidos usando o software *Osiris* são mostrados na Tabela 11. A avaliação mostrou que os compostos submetidos ao estudo apresentaram baixo risco de causar efeitos mutagênicos e tumorigênicos teóricos. Além disso, apenas o composto **7a** apresentou risco moderado de causar efeito tóxico no sistema reprodutivo, e esses resultados sugerem que os compostos têm baixo potencial para causar toxicidade e podem ser submetidos ao desenvolvimento e planejamento de fármaco.

Tabela 9. Predição teórica de toxicidade dos compostos **7a-b**, **9a-b** e H₂O₂. A escala de risco de toxicidade varia de nenhum (-), baixo (+), moderado (++) e alto (+++) calculados usando o software *Osiris Property Explorer*[®].

Risco de Toxicidade	7a	7b	9a	9b	H ₂ O ₂
Mutagênico	-	+	-	+	+++
Tumorigênico	-	+	-	+	+++
Irritante	-	-	-	-	+++
Sistema reprodutivo	++	-	-	-	+

4.2.7 Seleção do possível alvo biológico

O programa de busca de alvos biológicos por conjuntos de moléculas usando similaridade intitulado SEA *Search web Server* (do inglês: *Similarity Ensemble Approach*) foi empregado com base na hipótese de identificação de proteínas-alvo candidatas à interação

com as estruturas químicas dos compostos **7a-b** e **9a-b**. Vários alvos biológicos podem estar envolvidos na quimioterapia oncológica (KE; SHEN, 2017), e os três núcleos moleculares que compõem a estrutura química dos híbridos sintetizados possuem atividade antitumoral reportada na literatura associada a uma ampla gama deles. Como exemplo pode-se citar a dUTPase (MYAKOSHI *et al.*, 2012a), Topoisomerase I e II (LIANG *et al.*, 2019; PAUL; BINDAL; LUXAMI, 2013; GURUGE; UDAWATTE; WEERASINGHE, 2016; XU *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017), tubulina (PINGAEW *et al.*, 2014; SANDUJA *et al.*, 2020), inibidores de kinases, inibidores da aromatase/sulfatase (THAKUR; SIGLA; JAITAK, 2015), entre outros. A partir da busca de proteínas receptoras para estas moléculas é possível refinar a variedade de alvos biológicos propostos. Ao realizarmos, inicialmente, a modelagem apenas com os compostos **7b** e **9b**, o principal modelo foi direcionado à desoxiuridina 5'-trifosfatase (dUTPase), que apresentou valor de p de $4,341e^{-17}$ (probabilidade de observação de escore bruto por chance aleatória; quanto menor o, valor mais forte a interação) e max-TC (Coeficiente de similaridade de Tanimoto) de 0,30 (Tabela 10). O coeficiente de Tanimoto realiza a comparação de moléculas através de uma simples contagem de características compartilhadas (grupos funcionais, propriedades, etc) entre as moléculas submetidas à comparação. Essa contagem gera um determinado valor entre 0 e 1 que indica o grau de similaridade entre as estruturas verificadas (MA; WANG; XIE, 2011).

Tabela 10. Candidatos a alvo biológico identificados por predições SEA obtidos a partir da análise dos compostos **7b** e **9b**.

Descrição	Valor de P	MaxTC
Desoxiuridina 5'-trifosfatase	$4,341e^{-17}$	0,30
Subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA	$1,389e^{-8}$	0,38
Proteína dissulfeto isomerase	$1,026e^{-6}$	0,30

Esse resultado está de acordo com o reportado por Myakoshi *et al.* (2012a) o qual sugere que derivados da uracila contendo triazol em suas estruturas podem apresentar inibição da dUTPase, o que poderia indicar essa proteína como alvo biológico da interação. Ao realizarmos o *docking* molecular com a dUTPase como alvo com o composto **7b** verificamos que ele encaixou bem no sítio ativo da mesma. Entretanto, quando realizamos o mesmo procedimento com os demais compostos **7a** e **9a** não obtivemos bons resultados. Outro fator

que nos chamou a atenção foi que os compostos híbridos **8a-d**, com o hidrogênio na posição N3 da uracila, mais próximos estruturalmente aos compostos avaliados por Myakoshi *et al.* (2012a), não se mostraram citotóxicos nos ensaios MTT, nos levando a acreditar que esse não seria o alvo mais adequado.

Uma nova análise dos compostos, agora incluindo os híbridos **7a** e **9a**, empregando o algoritmo SEA nos levou a possíveis candidatos a alvos biológicos que englobassem de forma mais adequada a série de compostos avaliados, e neste caso o principal modelo foi direcionado à DNA topoisomerase 1 (Topo-1), que apresentou valor de p de $3,83 \times 10^{-31}$ e max-TC de 0,29. De acordo com esses resultados, optamos por utilizar essa proteína nos estudos de *docking* molecular. A Topo-1 tem sido identificada como potencial alvo biológico de vários medicamentos antineoplásicos devido ao seu envolvimento na replicação e na proliferação celular, além de que esse complexo proteico é mais expresso em células tumorais do que em células normais (ROSALES *et al.*, 2019).

Tabela 11. Candidatos a alvo biológico identificados por predições SEA obtidos a partir de análise dos compostos **7a-b** e **9a-b**.

Descrição	Valor de P	MaxTC
DNA topoisomerase 1	$3,83 \times 10^{-31}$	0,29
Proteína fosfatase fosfotirosina de baixo peso molecular	$7,128 \times 10^{-21}$	0,30
Testosterona 17-beta-desidrogenase 3	$1,058 \times 10^{-20}$	0,37

4.2.8 *Docking* molecular

O *docking* molecular é um dos métodos mais usados no desenvolvimento de fármacos baseados na estrutura (SBDD – do inglês: *structure based drug design*), devido à sua capacidade de prever, com um grau substancial de precisão, a conformação de moléculas pequenas ligantes no sítio de ligação do alvo apropriado (FERREIRA *et al.*, 2015).

Os estudos de modelagem molecular foram realizados usando Spartan 08 para Windows, para gerar os confôrmeros de menor energia das estruturas químicas dos compostos **7a-b** e **9a-b**. Estruturas minimizadas em extensão mol2 foram usadas para as análises de *docking*. O procedimento de *docking* foi realizado para identificação da pose individual que apresenta menor energia e que se liga seletivamente ao sítio ativo da Topo-1. A função de pontuação do iGEMDOCK é calculada usando a soma total das forças de Van der Waals,

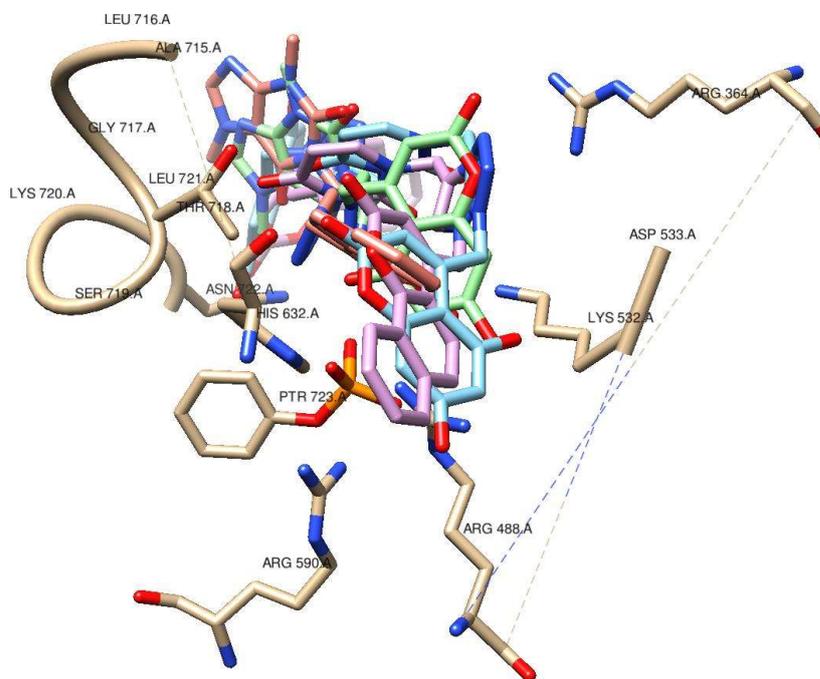
ligação de hidrogênio e energia eletrostática. Considerando as poses dos ligantes, valores muito próximos de energia foram obtidos de -113,3 a -117,8 kcal mol⁻¹ para todos os derivados avaliados (Tabela 12). Algumas diferenças foram observadas nos valores da ligação de H comparando os compostos **7b** e **9a**, -21,8 e -45,3 kcal mol⁻¹, respectivamente. Não foi observada interação eletrostática entre os compostos e a Topo-1. Todos os valores de interações de Van der Waals, hidrogênio e eletrostática são mostrados na Tabela 13.

Tabela 12. Resultados do *docking* dos compostos **7a-b** e **9a-b** no Topo-1 usando o *software* IGDock 2.1.

Composto	Energia de afinidade (kcal mol ⁻¹)	Van der Waals (kcal mol ⁻¹)	Ligação de H (kcal mol ⁻¹)	Eletrostática (kcal mol ⁻¹)
7a	-117,8	-85,6	-32,9	0
9b	-114,4	-80,9	-21,8	0
9a	-113,7	-68,4	-45,3	0
7b	-113,3	-91,5	-21,8	0

De acordo com os dados gerados a partir dos procedimentos de *docking*, as principais interações ocorrem com os resíduos ARG 364, ARG 488 LYS 532, ASP 533, ILE 535, HIS 632, THR 718, LEU 721, ASN 722, TYR 723 (O-fosfo-L-Tirosina), LYS 571 (Figura 55). Na análise pós-triagem realizada utilizando a Análise de Consenso de Resíduos, foi detectado o HIS 632 como o principal resíduo envolvido nessa ligação ligante-receptor (com Z-score 1,94 e WPharma 1.00).

Figura 55. Principais interações geradas a partir dos procedimentos de *docking* dos compostos **7a-b** e **9a-b** no sítio ativo da Topo-1 (código PDB: 1K4S). Visualização gráfica obtida usando o UCSF Chimera (v.1.10.1, PETERSEN *et al.*, 2004).



Alguns resíduos de aminoácidos como ARG 364, LYS 532, ASP 533, ASN 722 e TYR 723 são os mesmos observados em estudo de docking realizado por LACO *et al.* 2011, que sugerem o sítio ativo da Topo-1 estudada. As interações de Van der Waals dos derivados e proteínas são locais numéricos mais altos em energia, e algumas interações relevantes das poses dos compostos são observadas no LYS 532, HIS 632 e LEU 721.

As principais regiões moleculares de interação entre o composto **7a** e o modelo *in silico* da Topo-1 são mostrados na Figura 56. A porção carbonila das estruturas químicas das cumarinas dos modelos gerados nesses estudos mostrou interação com a HIS 632, enquanto a uracila interage com ARG 364 e THR 718. O anel triazólico dos compostos mostrou interação com ARG 364 da Topo-1. Esses resultados sugerem que os compostos avaliados são potenciais ligantes da proteína e podem estar atuando como inibidores da Topo-1.

Figura 56. Ligação de **7a** no sítio ativo da Topo-1 (código PDB: 1K4S). Visualização gráfica obtida usando o UCSF Chimera (v.1.10.1, PETTERSEN *et al.*, 2004).

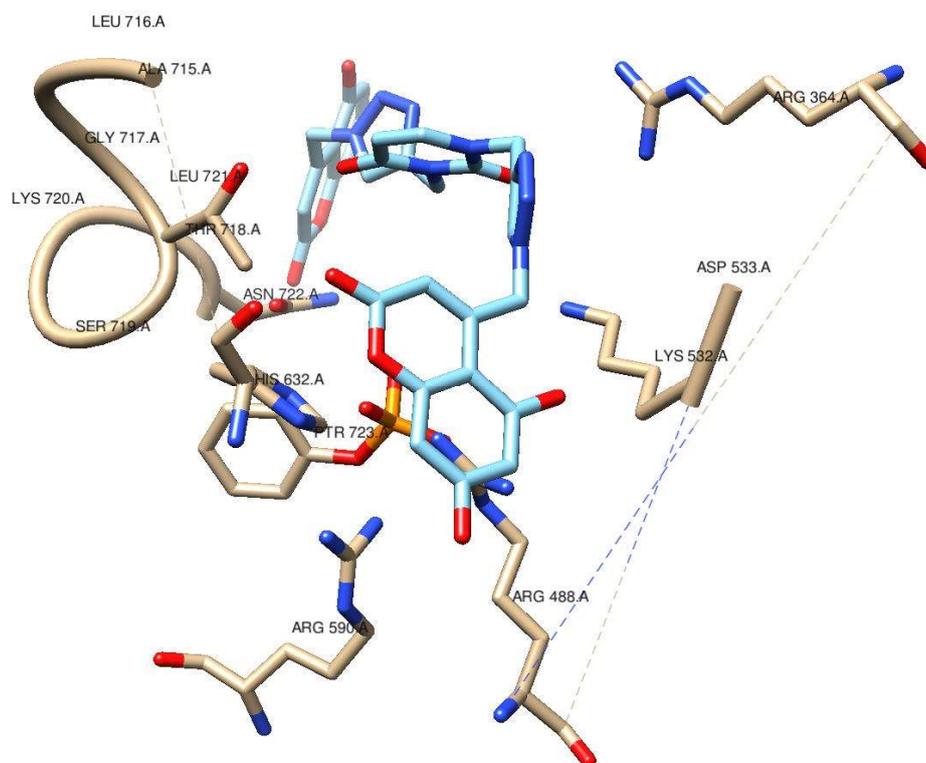


Tabela 13. Interações farmacológicas centrais de Van der Waals (VDW) e ligação de hidrogênio (ligação de H) de compostos e resíduos envolvidos no sítio de ligação da Topo-1 com normalidade e aplicação da Análise de Consenso de Resíduos. Valores reportados em kcal mol⁻¹.

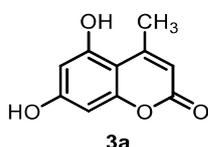
Resíduos de aminoácidos	Compostos							
	7a		7b		9a		9b	
	VDW	Ligação de H	VDW	Ligação de H	VDW	Ligação de H	VDW	Ligação de H
ARG 364	-5,8	0,0	-4,1	0,0	-1,5	0,0	0,0	0,0
ARG 488	-4,4	-3,4	-3,8	0,0	1,5	-6,3	-4,5	-7,0
LYS 532	-10,2	-4,2	-8,7	0,0	-9,0	-2,2	-1,0	-3,5
ASP 533	1,6	-10,5	-4,7	-8,2	-5,7	-2,5	-0,8	0,0
ILE 535	-16,7	0,0	-15,0	0,0	-4,1	0,0	-1,6	0,0
HIS 632*	-13,6	-3,5	-21,1	0,0	-4,6	-3,5	-22,5	0,0
THR 718	-3,8	0,0	-5,7	0,0	-6,0	0,0	-5,6	0,0
LEU 721	-9,5	0,0	-2,7	0,0	-13,6	0,0	-19,3	0,0
ASN 722	-1,2	-3,5	-7,3	0,0	-4,4	-3,5	-6,3	-9,9
TYR 723	-0,4	0,0	-2,0	0,0	-4,0	-9,3	-7,3	-4,2
LYS 751	0,0	-7,0	0,0	-3,5	0,0	0,0	0,0	0,0

*Confirmado pela análise de consenso de resíduos

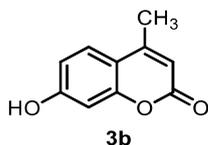
5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 SÍNTESE DAS CUMARINAS C-4 SUBSTITUÍDAS

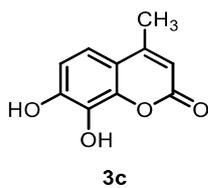
Uma mistura de fenol (**1a-g**) (1 mmol) com β -cetoéster (**2a-d**) (1,5 mmol), foi adicionada a um *vial* reacional selado na presença de ácido sulfâmico (10 mol%; 0,0097 g), e então a mistura reacional foi aquecida a 100 °C ou 130 °C (dependendo do β -cetoéster empregado), por 20 minutos (**3a**) ou 24 horas. Após, a mistura reacional foi resfriada à temperatura ambiente e dissolvida em 5 mL de etanol quente. Após, água gelada e com gelo picado foi adicionada (aproximadamente 50 mL) até que o produto precipitasse. O composto foi então filtrado, lavado com água e seco no liofilizador levando à obtenção da cumarina de interesse em moderados a bons rendimentos (50% – 90%). Em alguns casos (compostos **3d**, **3f**, **3m**), foi necessária a purificação dos compostos usando coluna cromatográfica (hexano:acetato de etila 7:3). Os compostos foram caracterizados por RMN de ^1H e de ^{13}C , GC-MS e por suas massas exatas através de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS).



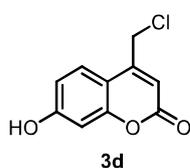
5,7-dihidroxi-4-metil-cromen-2-ona (3a): obtido como um sólido branco, rendimento 88%, p.f. 286 - 288 °C (lit. 288 – 290 °C, BAHRAMNEZHAD *et al.*, 2020). CAS: 2107-76-8. RMN de ^1H (300 MHz, acetona- d_6): δ 2,56 (d, $J = 1,2$ Hz, 3H); 5,84 (q, $J = 1,2$ Hz, 1H); 6,27 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 6,35 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 9,29 (s, 1H, OH); 9,55 (s, 1H, OH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 23,50; 94,65; 99,20; 102,19; 108,95; 155,11; 156,58; 158,03; 160,23; 161,15. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4$: 193,0495 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 193,0496.



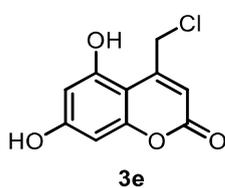
7-hidroxi-4-metil-cromen-2-ona (3b): obtido com um sólido amarelo claro, rendimento 90%, p.f. 180 – 182 °C (lit. 183 – 185 °C, BAHRAMNEZHAD *et al.*, 2020). CAS: 90-33-5. RMN de ^1H (300 MHz, acetona- d_6): δ 2,42 (d, $J = 1,2$ Hz, 3H); 6,08 (q, $J = 1,2$ Hz, 1H); 6,74 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 6,86 (dd, $J = 8,7$ e $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,61 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 9,47 (s, 1H, OH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 18,15; 102,22; 110,32; 112,93; 112,87; 126,54; 153,47; 154,87; 160,35; 161,20. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3$: 177,0546 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 177,0548.



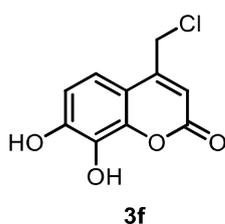
7,8-dihidroxi-4-metil-cromen-2-ona (3c): obtido como um sólido branco, rendimento 82%, p.f. 235 – 237 °C (lit. 240 – 242 °C, BAHRAMNEZHAD *et al.*, 2020). CAS: 2107-77-9. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,34 (d, $J = 1,2$ Hz, 3H); 6,12 (q, $J = 1,2$ Hz, 1H); 6,80 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 7,08 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 9,31 (s, 1H, OH); 10,08 (s, 1H, OH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 18,32; 110,28; 112,19; 112,84; 115,54; 132,23; 143,38; 149,46; 153,99; 160,31. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4$: 193,0495 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 193,0495.



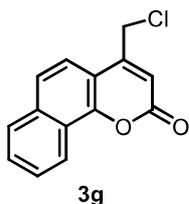
4-clorometil-7-hidroxi-cromen-2-ona (3d): obtido como um sólido amarelo claro, rendimento 72%, p.f. 182 – 184 °C (lit. 184 – 185 °C, YE *et al.*, 2014). CAS: 25392-41-0. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4,94 (s, 2H); 6,41 (s, 1H); 6,75 (d, $J = 2,4$ Hz); 6,83 (dd, $J = 8,7$ e $J = 2,4$ Hz); 7,66 (d, $J = 8,7$ Hz); 10,66 (s, 1H, OH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 41,42; 102,57; 109,39; 111,10; 113,13; 126,57; 151,00; 155,34; 160,22; 161,51. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClO}_3$: 211,0156 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 211,0154.



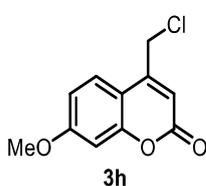
4-clorometil-5,7-di-hidroxi-cromen-2-ona (3e): obtido como um sólido branco, rendimento 86%, p.f. 231 – 233 °C (lit. 240 – 242 °C, ABBASI *et al.*, 2017). CAS: 809234-33-1. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 5,07 (d, $J = 1,2$ Hz, 2H); 6,28 (t, $J = 1,2$ Hz, 1H); 6,33 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 6,39 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 9,36 (s, 1H, OH); 9,88 (s, 1H, OH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 45,10; 94,89; 99,32; 99,88; 108,85; 152,14; 156,59; 157,25; 160,19; 161,63. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClO}_4$: 227,0100 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 227,0105.



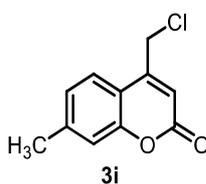
4-clorometil-7,8-di-hidroxi-cromen-2-ona (3f): obtido como um sólido amarelo claro, rendimento 70%, p.f. 194 – 196 °C (lit. 196 – 198 °C, YE *et al.*, 2014). CAS: 19040-71-2. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4,93 (s, 2H); 6,41 (s, 1H); 6,84 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 7,17 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 9,40 (s, 1H, OH); 10,20 (s, 1H, OH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 41,56; 110,17; 111,02; 112,38; 115,54; 132,52; 143,73; 149,81; 151,45; 160,18. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClO}_4$: 227,0105 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 227,0105.



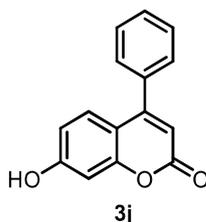
4-(clorometil)-2H-benzo[h]cromen-2-ona (3g): obtido como um sólido amarelo queimado, rendimento 70%, p.f. 154 - 156 °C (lit. 159 – 161 °C, ABBASI *et al.*, 2017). CAS: 41321-76-0. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 5,13 (s, 2H, CH₂); 6,77 (s, 1H, CH); 7,77 – 7,69 (m, 2H); 7,93 – 7,84 (m, 2H); 8,08 – 8,03 (m, 1H); 8,39 – 8,35 (m, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 41,66; 112,78; 114,85; 120,89; 121,61; 122,23; 124,07; 127,53; 127,98; 128,97; 134,36; 150,32; 151,44; 159,52. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada C₁₄H₁₀ClO₂: 245,0363 [M+H]⁺; obtido 245,0369.



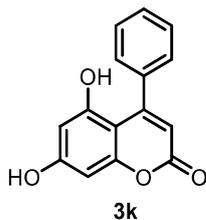
4-clorometil-7-metoxi-cromen-2-ona (3h): obtido como um sólido com leve tom rosado, rendimento 90%, p.f. 195 - 197 °C (lit. 198 – 201 °C, BISTROVIĆ *et al.*, 2013). CAS: 41295-55-0. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,86 (s, 3H, OCH₃); 4,99 (s, 2H, CH₂); 6,50 (s, 1H); 7,01 (dd, $J = 2,4$ Hz e $J = 8,7$ Hz, 1H); 7,04 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,77 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 41,37; 56,03; 101,08; 110,46; 112,02; 112,36; 126,38; 150,86; 155,28; 160,05; 162,62. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada C₁₁H₁₀ClO₃: 225,0313 [M+H]⁺; obtido 225,0309.



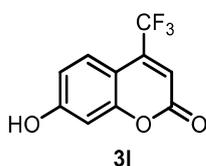
4-clorometil-7-metil-cromen-2-ona (3i): obtido como um sólido branco, rendimento 52%, p.f. 215 – 217 °C (lit. 215 -216 °C, YE *et al.*, 2014). CAS: 41295-51-6. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl₃): δ 2,46 (s, 3H); 4,65 (s, 2H); 6,51 (s, 1H); 7,13 – 7,18 (m, 2H); 7,54 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl₃): δ 22,05; 41,63; 115,12; 115,19; 117,99; 124,12; 126,01; 143,99; 149,84; 154,27; 160,95. HRMS (ESI – TOF) m/z [M+H]⁺ calculado para C₁₁H₁₀ClO₂: 209,0363; Obtido 209,0364.



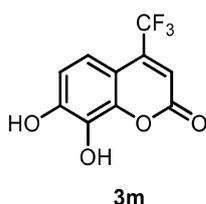
7-hidroxi-4-fenil-cromen-2-ona (3j): obtido como um sólido branco, rendimento 60%, p.f. 233 - 235 °C (lit. 242 - 244 °C, KATKEVIČS *et al.*, 2007). CAS: 2555-30-8. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 6,15 (s, 1H); 6,76 – 6,81 (m, 2H); 7,27 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 7,49 – 7,58 (m, 5H); 10,67 (s, 1H, OH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 102,73; 110,39; 110,43; 110,69; 113,24; 128,16; 128,44; 128,86; 129,62; 135,22; 155,44; 155,60; 160,18; 161,44. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada C₁₅H₁₁O₃: 239,0702 [M+H]⁺; obtido 239,0704.



5,7-dihidroxi-4-fenil-cromen-2-ona (3k): obtido como um sólido branco, rendimento 60%, p.f. 232 – 234 °C (lit. 242 - 244 °C, KATKEVIČS *et al.*, 2007). CAS: 7758-73-8. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 6,15 (s, 1H); 6,76 – 6,81 (m, 2H); 7,27 (d, $J = 8,8$ Hz); 7,49 – 7,58 (m, 5H); 10,67 (s, 1H, OH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 94,72; 99,18; 100,63; 110,20; 110,25; 127,30; 127,46; 127,82; 139,64; 156,06; 156,82; 157,16; 159,98; 161,78. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_4$: 255,0651 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 255,0697.



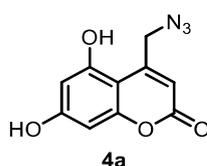
7-hidroxi-4-(trifluormetil)-cromen-2-ona (3l): obtido como um sólido branco, rendimento 60%, p.f. 186 – 188 °C (lit. 183 -184 °C, KATKEVIČS *et al.*, 2007). CAS: 575-03-1. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 6,74 (br, 1H); 6,84 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 6,91 (dd, $J = 8,7$ e $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,51 – 7,58 (m, 1H); 10,98 (s, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 103,17; 105,26; 112,02 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 5,95$ Hz); 114,10; 121,81 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 276,7$ Hz); 126,18; 139,75 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32,42$ Hz); 155,95; 158,93; 162,23. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{F}_3\text{O}_3$: 231,0263 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 231,0268.



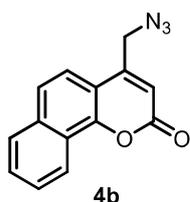
7,8-dihidroxi-4-(trifluormetil)-2H-cromen-2-ona (3m): obtido como um sólido branco, rendimento 50%, p.f. 203 – 205 °C (lit. 202 – 203, KATKEVIČS *et al.*, 2007). CAS: 78277-31-3. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 6,73 (s, 1H); 6,90 (d, $J = 9$ Hz, 1H); 7,02 – 7,09 (m, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 106,04; 111,80 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 5,7$ Hz); 113,20; 115,29; 121,88 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 276,7$ Hz); 133,01; 140,26 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 31,94$ Hz); 144,12; 150,63; 158,92. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{F}_3\text{O}_4$: 247,0212 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 247,0212.

5.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS 4-(AZIDOMETIL)CUMARÍNICOS

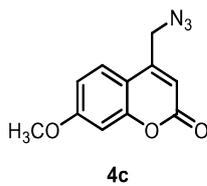
A síntese dos derivados 4-(azidometil)cumarínicos seguiu o protocolo descrito por Naik *et al.* 2012, no qual a 4-(clorometil)cumarina (**3d-e**, **3g-h**) (2 mmol) foi adicionada a um balão de fundo redondo contendo 4 mL de acetona. Então, azida de sódio (2,4 mmol) em 0,6 mL de água foi adicionada, gota a gota, sob agitação que prosseguiu por 10 horas. Após completa a reação, a mistura reacional foi adicionada a um béquer com água e gelo levando à precipitação do produto. O sólido obtido foi filtrado e recristalizado em etanol.



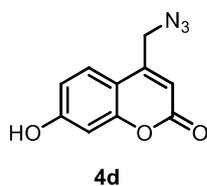
4-(azidometil)-5,7-dihidroxi-cromen-2-ona (4a): obtido como um sólido branco acizentado, rendimento de 89%, mp. 215 - 217 °C (lit. 220 – 221 °C, YE *et al.*, 2014). RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4,87 (d, $J = 1,2$ Hz, 2H, CH₂); 6,05 (t, $J = 1,2$ Hz, 1H, CH); 6,21 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 6,27 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 10,42 (s, 1H, OH); 10,88 (s, 1H, OH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 52,79; 94,82; 99,11; 100,07; 106,76; 151,76; 156,52; 157,31; 160,09; 161,56. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada C₁₀H₈N₃O₄: 234,0509 [M+H]⁺; obtido: 234,0513. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada C₁₀H₇N₃O₄Na: 256,0328 [M+Na]⁺; obtido: 256,0325.



4-(azidometil)-2H-benzof[h]cromen-2-ona (4b): obtido como um sólido caramelo claro, rendimento de 86%, p.f. 136 - 138 °C (lit. 131 °C, KUSANUR *et al.*, 2010). CAS: 1017970-97-6. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4,97 (s, 2H, CH₂); 6,63 (s, 1H, CH); 7,76 – 7,70 (m, 3H); 7,88 (d, $J = 8,4$ Hz 1H); 8,06 – 8,04 (m, 1H); 8,38 – 8,35 (m, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 50,40; 113,24; 113,35; 120,89; 122,03; 122,58; 124,57; 127,94; 128,40; 129,33; 134,76; 150,48; 151,23; 159,87. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada C₁₄H₁₀N₃O₂: 252,0767 [M+H]⁺; obtido: 252,0762



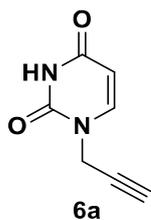
4-(azidometil)-7-metoxi-2H-cromen-2-one (4c): obtido como um sólido amarelo claro, rendimento 48%, p.f. 140 – 142 °C (lit. 143 – 146 °C, BISTROVIĆ *et al.*, 2013). RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,85 (s, 3H, OMe); 4,82 (s, 2H); 6,34 (s, 1H); 6,98 (dd, $J = 8,7$ Hz e $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,02 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,63 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 49,63; 55,99; 101,02; 110,31; 110,64; 112,38; 125,99; 150,14; 155,11; 159,94; 162,63. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_3$: 232,0716 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido: 232,0709.



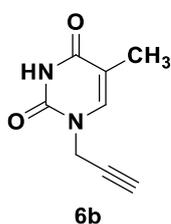
4-(azidometil)-7-hidroxi-2H-cromen-2-one (4c): obtido como um sólido branco levemente amarelado, rendimento 52%, mp. 158 – 160 °C (lit. 166 – 167 °C, YE *et al.*, 2014). CAS: 866560-73-8. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4,78 (d, $J = 1$ Hz, 2H); 6,27 (t, $J = 1$ Hz, 1H); 6,74 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 6,81 (dd, $J = 8,7$ Hz e $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,55 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 50,23; 102,75; 110,20; 110,29; 112,88; 125,89; 149,67; 155,78; 159,91; 161,24. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_3$: 218,0560 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Obtido: 218,0559.

5.3 SÍNTESE DOS PRECURSORES 1-PROPARGILURACILA **6a**, 1-PROPARGILTIMINA **6b** E 2-PROPARGILMERCAPTOURACILA **6c**.

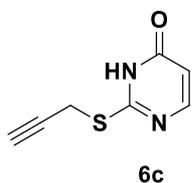
A síntese dos precursores 1-propargiluracila **6a**, 1-propargiltimina **6b** e 2-propargilmercaptopuracila **6c** foi baseada na metodologia descrita por González-Olvera *et al.* 2013, na qual a uma solução de uracila **5a**, timina **5b** ou tiouracila **5c** (**a**. 0,560g; 5 mmol, **b**. 0,631g; 5 mmol ou **c**. 0,640g; 5 mmol) em acetonitrila foi adicionada BSA (3,06 mL; 12,5 mmol). A mistura foi então deixada sob agitação por alguns minutos até que uma solução “clara” (transparente) fosse obtida. Após esse período, foi adicionado brometo de propargila (0,615 mL, 6,9 mmol), gota-a-gota lentamente. Em seguida, a mistura reacional foi aquecida a 45 °C e agitada por 72 horas, sendo monitorada por CCD. Por fim, a acetonitrila foi evaporada sob vácuo e o resíduo foi tratado com NH_4Cl aquoso (5%, 20 mL) e extraído com diclorometano (4 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato sódio anidro. Os produtos foram cristalizados em CH_2Cl_2 / hexano (1:2 v:v) e obtidos com rendimentos na faixa de 60 – 76%.



1-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (6a): obtido como um sólido branco, rendimento de 62%, p.f. 153 - 155°C (lit. 169 - 170 °C, GONZÁLEZ-OLVERA *et. al.*, 2013). CAS: 168413-01-2. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,42 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H); 4,50 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H); 5,61 (d, $J = 7,8$ Hz 1H); 7,69 (d, $J = 7,8$ Hz 1H); 11,38 (br, 1H, NH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 36,67; 75,89; 78,50; 101,70; 144,56; 150,43; 163,61. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 151,0502; obtido: 151,0507.



5-metil-1-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (6b): obtido como um sólido branco, rendimento de 76%, mp. 150 - 152 °C (lit. 155 - 157 °C, GONZÁLEZ-OLVERA *et. al.*, 2013). CAS: 198827-85-9. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1,76 (d, $J = 1$ Hz, 3H); 3,40 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H); 4,46 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H); 7,56 (d, $J = 1$ Hz, 1H); 11,38 (br, 1H, NH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 11,98; 36,36; 75,69; 78,70; 109,43; 140,19; 150,40; 164,19. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2$: 165,0658 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido: 165,0654.

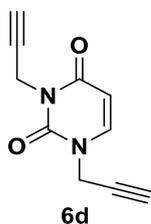


1-(prop-2-in-1-tio)pirimidin-4(3H)-ona (6c): obtido como um sólido branco, rendimento de 60%, p.f. 140 - 142 °C (lit. 152 - 153 °C, BAKHERAD; GHOLIPOOR, 2012). CAS: 90997-77-6. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,18 (t, $J = 2,58$ Hz, 1H); 3,96 (d, $J = 2,58$ Hz, 2H); 6,17 (d, $J = 6,40$ Hz, 1H); 7,94 (d, $J = 6,40$ Hz, 1H), 12,98 (br, 1H, NH). ^{13}C de NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ 18,40; 73,76; 79,88; 109,73; 154,56; 162,04; 163,78. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{OS}$: 167,0273 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido: 167,0289.

5.4 SÍNTESE DO PRECURSOR 1,3-DIPROPARGILURACILA

O protocolo sintético para a obtenção do precursor 1,3-dipropargiluracila **6d** foi baseado na metodologia descrita por Kumar *et al.* 2012. Primeiramente, a suspensão de carbonato de potássio (4 mmol) em DMF anidro (10 mL), e uracila **5a** (1 mmol) foi agitada por 2 horas, à temperatura ambiente, seguido pela adição de brometo de propargila (2,4 mmol). A reação foi agitada por 24 horas à temperatura ambiente, e o seu progresso foi acompanhado por CCD. Após completada a reação, a mistura foi tratada com salmoura (20

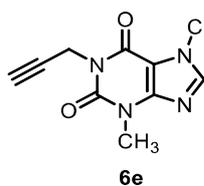
mL) e extraída com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e concentrado sobre pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna utilizando hexano:acetato de etila (65:35 v/v).



1,3-di-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (6d): obtido como um sólido branco, rendimento de 86%, p.f. 98 - 100 °C (lit. 102 - 104 °C, NEGRÓN-SILVA *et al.*, 2013). CAS: 450356-83-9. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 2,19 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H); 2,52 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H); 4,61 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H); 4,72 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H); 5,85 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,47 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H). RMN de ¹³C (75 MHz, acetone-*d*₆): δ 30,51; 38,38; 71,75; 75,53; 78,19; 79,45; 101,95; 143,33; 151,00; 162,09. HRMS (ESI-QTOF) *m/z* calculada C₁₀H₉N₂O₂: 189,0658 [M+H]⁺; obtido: 189,0668.

5.5 SÍNTESE DO PRECURSOR 3-PROPARGILTEOBROMINA

A síntese do precursor 3-propargilteobromina foi baseada na metodologia descrita por Kumar *et al.* 2012. Segundo o protocolo, a uma suspensão de carbonato de potássio (29,70 mmol; 4,10 g) em DMF anidro (30 mL), sob agitação constante, foi adicionada a teobromina **5d** (14,85 mmol; 2,67g) e a suspensão resultante foi agitada por 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado brometo de propargila (17,82 mmol; 2,62g) e a reação foi mantida por 48 horas sob agitação a 40 °C, sendo monitorada por CCD. Após este tempo, a mistura reacional foi tratada com salmoura e extraída com acetato de etila (4 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e concentrada à pressão reduzida. O produto **6e** foi purificado por cristalização em hexano:acetato de etila (1:1).



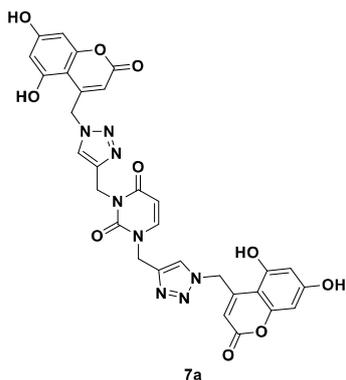
3,7-dimetil-1-propargilxantina (6e): obtido como um sólido branco, rendimento de 50%, p.f. 204 - 205 °C (lit. 209 °C, CASASCHI; GRIGG; SANSANO, 2000). CAS: 14114-46-6. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3,09 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H); 3,12 (s, 3H); 3,88 (s, 3H); 4,58 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H); 8,05 (s, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 29,93; 30,36; 33,70; 73,26; 80,03; 106,89; 143,77; 148,89; 150,64; 153,88. HRMS (ESI-QTOF) *m/z* calculada C₁₀H₁₀N₄O₂: 241,0695 [M+Na]⁺; obtido: 241,0690.

5.6 SÍNTESE DOS HÍBRIDOS BIS-(CUMARONIL-TRIAZOLIL)URACILAS (**7a-b**)

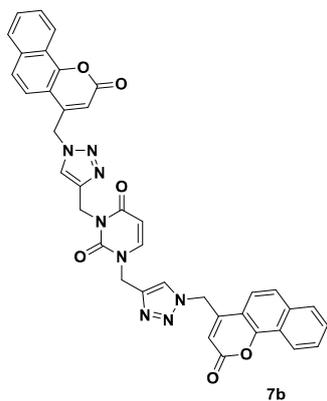
A síntese dos compostos bis-(cumaronil-triazolil)uracilas **7a-b** foi baseada no protocolo descrito por Kumar *et al.* 2012. A uma solução de 1,3-dipropargiluracila **6d** (1 mmol) e 4-(azidometil)-cumarina (**4a-b**) (2 mmol), sob agitação, em etanol-água (10:1, 10 mL), foi adicionado em sequência sulfato de cobre (0,055 mmol) e ascorbato de sódio (0,143 mmol) a 30 °C. O progresso da reação foi acompanhado por CCD, e após completa, foi adicionado água gelada (aproximadamente 50 mL) até que o produto precipitasse, sendo então filtrado. Os produtos foram purificados por coluna cromatográfica utilizando hexano:acetato de etila (50:50 v/v) e diclorometano:metanol (95:5 v/v).

5.7 SÍNTESE DOS COMPOSTOS HÍBRIDOS (CUMARONIL-TRIAZOLIL)URACILA, TIMINA, TIOURACILA (**8a-f**) E (CUMARONIL-TRIAZOLIL)TEOBROMINAS **9a-d**.

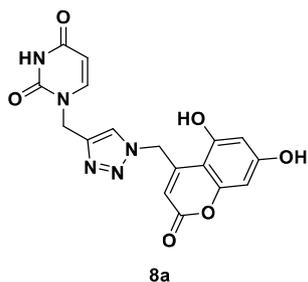
A síntese dos compostos (cumaronil-triazolil)uracila, timina, tiouracila **8a - g** e (cumaronil-triazolil)teobromina **9a - d** foi baseada no protocolo descrito por Kumar *et al.* 2012, no qual a uma solução de 1-propargiluracila, 1-propargiltimina (**6a-b**, 1 mmol), 2-propargilmercaptouracila **6c** 3-propargilteobromina **6e** (1mmol) e 4-(azidometil)-cumarina **4a-d** (1 mmol), em etanol-água (10:1, 10 mL), sob agitação, foi adicionado em sequência sulfato de cobre (0,0275 mmol) e ascorbato de sódio (0,0715 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação a 30°C, por 24 horas, sendo acompanhado por CCD. Após completa a reação, foi adicionado água gelada (aproximadamente 50 mL) até que o produto precipitasse, sendo então filtrado. Os produtos foram purificados por coluna cromatográfica utilizando hexano:acetato de etila (50:50 v/v) e diclorometano:metanol (95:5 v/v).



1,3-bis((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (7a): obtido como um sólido amarelo claro, rendimento de 90%, p.f. 302 °C (degradação). RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 4,71 (s, 1H); 4,77 (s, 1H); 5,07 (s, 4H); 5,80 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 5,90 (s, 2H); 5,94 (s, 2H); 6,20 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H); 6,37 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H); 7,89 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 8,07 (s, 1H); 8,22 (s, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 36,02; 43,82; 52,15; 52,27; 62,93; 94,75; 99,55; 100,09; 100,69; 100,74; 105,29; 105,49; 124,99; 125,03; 125,32; 125,34; 142,58; 143,10; 144,61; 150,96; 152,77; 153,01; 156,42; 156,43; 158,19; 160,21; 160,23; 162,16; 162,18; 162,29. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{30}\text{H}_{23}\text{N}_8\text{O}_{10}$: 655.1531 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 655,1527; e HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{Na}$: 677,1351 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; obtido: 677,1341.

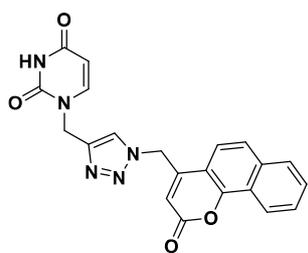


1,3-bis((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (7b): obtido como um sólido amarelo claro, rendimento 85%, p.f. 193 – 195 °C. RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 5,06 – 5,07 (m, 4H); 5,79 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 5,84 (s, 1H); 5,90 (s, 1H); 6,01 (s, 2H); 6,05 (s, 2H); 7,65 – 7,73 (m, 4H); 7,79 – 7,91 (m, 5H); 7,99 – 8,02 (m, 2H); 8,16 (s, 1H); 8,27 – 8,30 (m, 3H). RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 35,86; 43,81; 49,52; 49,62; 100,63; 112,69; 113,00; 113,06; 120,24; 121,60; 122,07; 124,29; 124,73; 125,03; 127,59; 127,95; 129,04; 134,38; 142,89; 143,32; 144,49; 150,02; 150,84; 150,93; 151,10; 159,37; 162,12. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{38}\text{H}_{27}\text{N}_8\text{O}_6$: 691.2048 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 691,2034



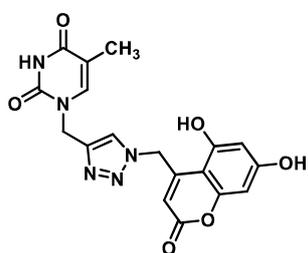
8a

1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (8a): obtido como um sólido branco acinzentado, rendimento de 80%, p.f. 230 °C (degradação). RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4,64 (s, 1H); 4,99 (s, 2H); 5,59 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 5,99 (s, 1H); 6,03 (s, 2H); 6,16 (s, 1H); 7,77 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 8,21 (s, 1H); 11,33 (br, 1H, NH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 42,55; 52,26; 62,84; 92,89; 99,76; 100,45; 101,31; 103,13; 125,01; 142,75; 145,70; 150,84; 153,74; 156,74; 160,48; 162,89; 163,83. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_6$: 384,0938 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido: 384,0937; e HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_6$: 406,0758 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; obtido: 406,0751.



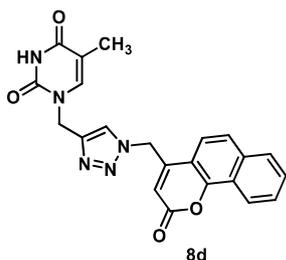
8b

1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (8b): obtido como um sólido branco, rendimento de 88%, p.f. 235 °C (degradação). RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4,98 (s, 2H); 5,58 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 5,99 (s, 1H); 6,05 (s, 2H); 7,71 – 7,78 (m, 3H); 7,82 – 7,91 (m, 2H); 8,04 – 8,07 (m, 1H); 8,27 (s, 1H); 8,37 – 8,40 (m, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 42,55; 49,56; 101,28; 112,72; 113,20; 120,29; 121,65; 122,11; 124,25; 124,79; 127,62; 127,98; 129,07; 134,39; 143,12; 145,61; 150,07; 150,79; 150,90; 159,32; 163,74. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4\text{Na}$: 424,1016 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; obtido: 424,1001.

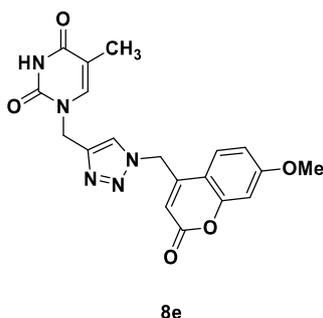


8c

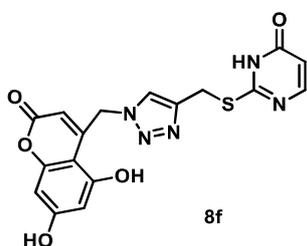
1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona (8d): obtido como um sólido branco, rendimento de 92%, p.f. 282 °C (degradação). RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1,76 (s, 3H); 4,80 (s, 1H); 4,95 (s, 2H); 5,94 (s, 2H); 6,22 (d, $J = 2$ Hz, 1H); 6,30 (d, $J = 2$ Hz, 1H); 7,65 (s, 1H); 8,19 (s, 1H); 11,32 (br, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 12,09; 42,46; 52,18; 94,94; 99,31; 100,06; 105,89; 109,06; 125,05; 141,40; 143,04; 150,88; 152,60; 156,46; 157,68; 160,05; 161,95; 164,50. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_6$: 398,1095 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 398,1089.



1-((1-((2-oxo-2H-benzof[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona (8e): obtido como um sólido branco, rendimento de 90%, mp. 270 – 272 °C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,74 (s, 3H); 4,94 (s, 2H); 5,94 (s, 1H); 6,06 (s, 2H); 7,64 (s, 1H); 7,72 – 7,74 (m, 2H); 7,81 – 7,91 (m, 2H); 8,03 – 8,06 (m, 1H); 8,28 (s, 1H); 8,35 – 8,38 (m, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,00; 42,39; 49,59; 108,93; 112,71; 113,23; 120,27; 121,64; 122,10; 124,24; 124,83; 127,60; 127,96; 129,05; 134,38; 141,25; 143,32; 150,07; 150,78; 150,87; 159,33; 164,33. HRMS (ESI-QTOF) *m/z* calculada C₂₂H₁₈N₅O₄: 413.1353 [M+H]⁺; obtido 416.1358; e HRMS (ESI-QTOF) *m/z* calculada C₂₂H₁₇N₅O₆Na: 438,1172 [M+Na]⁺; obtido: 438,1179.

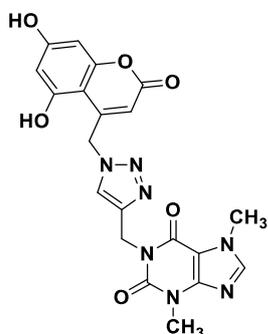


1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona (8f): obtido como um sólido amarelo claro, rendimento 80%, p.f. 174 – 176 °C. RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,75 (d, *J* = 1 Hz, 3H); 3,86 (s, 3H, OMe); 4,93 (s, 2H); 5,65 (s, 1H); 5,92 (s, 2H); 7,00 (dd, *J* = 8,7 e *J* = 2,4 Hz, 1H); 7,05 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); 7,65 (d, *J* = 1 Hz, 1H); 7,76 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); 8,24 (s, 1H); 11,32 (br, 1H, NH). RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ. 11,99; 42,38; 49,23; 56,05; 101,09; 108,94; 110,36; 110,45; 112,43; 124,80; 125,87; 141,19; 141,29; 150,26; 150,75; 155,03; 159,85; 162,74, 164,34. HRMS (ESI-QTOF) *m/z* calculada C₁₉H₁₈N₅O₅: 396,1302 [M+H]⁺; obtido: 396,1311



2-(((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)pirimidin-4(3H)-ona (8g): obtido como um sólido branco, rendimento 86%, p.f. 239 – 241 °C. RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): 4,48 (s, 2H); 4,73 (s, 1H); 5,92 (s, 2H); 6,13 (br, 1H); 6,22 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); 6,30 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); 7,89 (br, 1H); 8,17 (s, 1H); 10,51 (s, 1H); 11,06 (s, 1H); 12,83 (br, 1H). RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,69; 52,17; 94,91; 94,98; 99,27; 100,03; 105,64; 125,22; 125,28; 143,50; 152,82; 156,43; 157,64; 160,03; 161,94. HRMS (ESI-QTOF) *m/z* calculado para

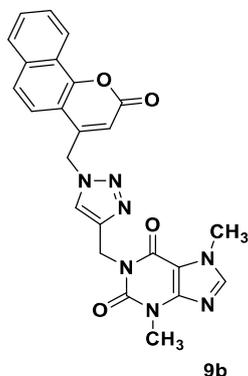
$C_{17}H_{13}N_5O_5S$: 400,0710 $[M+H]^+$; obtido: 400,0710; e HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada para $C_{17}H_{12}N_5O_5SNa$: 422,0520 $[M+Na]^+$; obtido: 422,0529.



9a

1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona

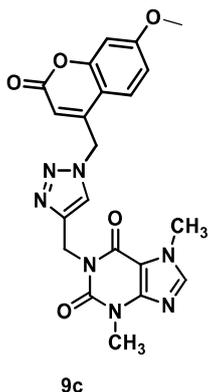
(9a): obtido como um sólido branco levemente amarelado, rendimento de 91%, p.f. 315 °C (degradação). RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,41 (s, 3H); 3,88 (s, 3H); 4,77 (s, 1H); 5,15 (s, 2H); 5,89 (s, 2H); 6,21 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 6,29 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 8,03 (s, 1H); 8,09 (s, 1H); 10,50 (s, 1H, OH); 11,04 (s, 1H, OH). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 29,46; 33,19; 33,24; 35,98; 51,96; 94,80; 99,14; 99,89; 105,67; 106,65; 124,82; 143,14; 148,42; 150,73; 152,57; 154,05; 156,31; 157,51; 159,91; 161,81. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $C_{20}H_{18}N_7O_6$: 452.1313 $[M+H]^+$; obtido: 452.1326; e HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $C_{20}H_{17}N_7O_6Na$: 474,1132 $[M+Na]^+$; Obtido: 474,1145.



9b

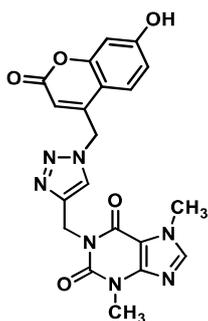
3,7-dimetil-1-((1-((2-oxo-2H-benzof[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (9b):

obtido como um sólido branco, rendimento de 82%, p.f. 288 – 290 °C. RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,42 (s, 3H); 3,88 (s, 3H); 5,15 (s, 2H); 5,93 (s, 1H); 6,03 (s, 2H); 7,70 – 7,78 (m, 2H); 7,84 – 7,92 (m, 2H); 8,04 – 8,08 (m, 2H); 8,19 (s, 1H); 8,36 – 8,40 (m, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 29,45; 33,17; 35,94; 49,46; 106,64; 112,80; 113,30; 120,37; 121,66; 122,14; 124,25; 124,57; 127,65; 128,00; 129,08; 134,41; 143,11; 143,86; 148,43; 150,10; 150,72; 151,01; 154,06, 159,37. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $C_{24}H_{20}N_7O_4$: 470.1571 $[M+H]^+$; obtido: 470.1580.



9c

1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (9c): obtido como um sólido amarelo claro, rendimento de 70%, p.f. 188 – 190 °C. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,39 (s, 3H); 3,84 (s, 3H); 3,86 (s, 3H); 5,13 (s, 2H); 5,63 (s, 1H); 5,87 (s, 2H); 6,97 (dd, $J = 2,4$ Hz e $J = 8,9$ Hz); 7,00 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H); 7,75 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H); 8,01 (s, 1H); 8,14 (s, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 29,47; 33,28; 35,97; 49,13; 56,10; 101,12; 106,67; 110,51; 112,46; 124,58; 125,95; 143,11; 143,20; 143,80; 148,46; 150,36; 150,76; 154,09; 155,05; 159,86; 162,75. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_7\text{O}_5$: 450,1520 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido: 450,1514; e HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_5\text{Na}$: 472,1339 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; obtido: 472,1331.



9d

1-((1-((7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona (9d): sólido branco acinzentado, rendimento 74%, p.f. 240 °C com degradação. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,41 (s, 3H); 3,87 (s, 3H); 5,13 (s, 2H); 5,53 (s, 1H); 5,83 (s, 2H); 6,73 – 6,82 (m, 2H); 7,68 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 8,03 (s, 1H); 8,13 (s, 1H). RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6): δ 29,28; 35,81; 48,94; 102,42; 106,56; 109,31; 113,07; 124,33; 125,96; 142,88; 143,08; 148,35; 150,20; 150,63; 153,96; 154,99; 159,76; 161,48. HRMS (ESI-QTOF) m/z calculada $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_7\text{O}_5$: 436,1363 $[\text{M}+\text{H}]^+$; obtido 436,1361.

5.8 OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

A obtenção dos complexos de inclusão entre as bis-(cumaronil-triazolil)uracila **7a - b**, (cumaronil-triazolil)uracila, timina **8a-d**, (cumaronil-triazolil)teobromina **9a-b**, **9d** e HP- β -CD **10** se baseou no protocolo descrito por Azevedo *et al.* 2000 e Melo *et al.* 2007. Primeiramente uma solução contendo bis-(cumaronil-triazolil)uracila **7a-b**, (cumaronil-triazolil)uracila, timina **8a-d**, (cumaronil-triazolil)teobromina **9a-b**, **9d** foi preparada utilizando etanol como solvente (1 mL), enquanto outra solução de HP- β -CD **10** foi preparada em água (1 mL), ambas em mesmas proporções molares (1:1, composto:ciclodextrina). As soluções

foram deixadas sob agitação até que os compostos estivessem completamente solúveis, sendo em seguida misturadas e deixadas sob agitação novamente. Após completa, a solução final foi concentrada no evaporador rotativo para a retirada do etanol, e a água restante foi retirada com o uso do liofilizador, obtendo-se assim um sólido que foi armazenado em frasco âmbar selado e guardado na geladeira para posterior utilização. A identificação dos complexos foi feita por meio de RMN ^1H .

5.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.9.1 Cultura de células e viabilidade celular

A cultura das células e os ensaios de viabilidade celular foram realizadas no Laboratório de Genoma Proteômica e Reparos de DNA do Instituto de Biotecnologia sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Mariana Roesch-Ely.

As linhagens celulares de câncer colorretal (HCT 116), pulmão (A549), laringe (Hep-2) e queratinócitos humanos não tumorais (HaCat) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina). As células foram mantidas em garrafas para cultura de tecido em estufa a 37 °C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Previamente ao tratamento, as células foram lavadas com tampão PBS e soltas da garrafa com solução de tripsina. As células foram semeadas em 5 mL de meio completo em garrafas de 25 cm² e incubadas para crescimento por no mínimo 24 horas, para que atingissem 60% - 70% de confluência.

A viabilidade celular foi determinada pela redução do MTT (brometo de (3-4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) de acordo com metodologia descrita por Denizolt; Lang, 1986. Resumidamente, 7×10^4 células por mililitro foram semeadas com 100 μL de meio de cultura suplementado por poço na placa de 96 poços. Após incubação de 24 horas a 37°C, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos sintetizados, com três tempos de incubação (24 e 48). Após cada tempo de incubação, de 24 e 48 horas, o meio com o tratamento foi removido e foi acrescentado 100 μL de meio DMEM sem soro contendo MTT (1mg/mL). A mistura foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por duas horas. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO) durante 15

minutos. A leitura espectrofotométrica foi feita utilizando um leitor de microplacas (Spectra Max 190, Molecular Devices) a 570 nm e os resultados expressos em porcentagem de viabilidade. A absorbância do controle negativo (células que não receberam tratamento com o composto) representou 100% de viabilidade e os valores das células tratadas foram calculadas como porcentagem do controle, ou seja: viabilidade celular (%) = (a absorbância experimental / absorbância do controle) x 100, gerando proporção de IC₅₀. Cada experimento foi realizado em triplicata.

5.10 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

5.10.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C {¹H}, HMQC, HMBC, COSY, NOESY, DEPT 135 e DEPT 90 foram registrados em Espectrômetro Bruker Fourier 300 FT-NMR, com campo magnético aplicado de 7.05 Tesla, 300 MHz para o núcleo ¹H e 75,48 MHz para o núcleo ¹³C, pertencente a Central Analítica do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm), e as constantes de acoplamento são reportadas em Hz. Os experimentos de ¹H, ¹³C {¹H} e HMQC, MBC, COSY, NOESY, DEPT 135 e DEPT 90 foram realizados em tubos de 5 mm, na temperatura de 293 K, em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆), acetona deuterada ou clorofórmio deuterado (CDCl₃). Para a aquisição e processamento dos dados de RMN foi utilizado o software TopSpin™ (Bruker).

5.10.2 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho da marca Fisatom, modelo 431, com faixa de medição de 50°C a 350°C, potência de 50W e frequência de 60 Hz.

5.10.3 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

As análises por cromatografia gasosa foram efetuadas em um Cromatógrafo a gás HP 6890, acoplado a um detector seletivo de massas Hewlett Packard 6890/MSD5973,

equipado com software HP Chemstation e espectroteca Wiley 275. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m x 250 mm), 0,50 mm espessura de filme (Hewlett Packard, Palo Alto, USA). As seguintes: temperatura máxima de 325°C-(30 m x 0.32 mm, 0,25 µm); fluxo de gás Hélio de 2 mL/min, pressão de 5,05 psi; temperatura do injetor 250°C; seringa de 10 µL, com injeção de 1 µL; temperatura inicial do forno de 70 °C por 1 min e após aquecimento de 12 °C por min até 280 °C, realizadas na central analítica do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

Para a fragmentação dos compostos, foi utilizado impacto de elétrons de 70 eV no espectrômetro de massas.

5.10.4 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS)

As análises de espectrometria de massas de alta resolução foram efetuadas em um sistema de tempo de voo quadrupolo (Espectrômetro modelo Bruker, Q-TOF II® Billerica, EUA). ESI (*electrospray ionization*), ESI (+) MS e ESI (+) MS/MS foram adquiridos usando um espectrômetro de massa híbrido de alta resolução e alta precisão (5µL/mL) microTof (Q-TOF) (Bruker Scientific®) sob as seguintes condições: capilar e as tensões do cone ajustados para +3500 V e +40 V, respectivamente, com uma temperatura de dissolução de 200 °C. As amostras foram diluídas em metanol 0,1% ácido fórmico, e as análises foram feitas usando modo positivo. A análise das *m/z* foi realizada com o auxílio do software Bruker Daltonics – Compass DataAnalysis e IsotopePattern. As análises empregando esse equipamento foram realizadas na central analítica do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul – RS.

5.10.5 Leitor de absorbância para microplacas

A absorbância do ensaio MTT foi medida utilizando um leitor de microplacas Spectra Max 190, Molecular Devices, a 570 nm, no Laboratório de Genoma Proteômica e Reparos de DNA do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul – RS.

5.11 ESTUDOS *IN SILICO*, MODELAGEM E DOCKING MOLECULAR

5.11.1 Previsão de alvos biológicos e toxicidade

Os compostos **7a-b** e **9a-b** foram submetidos a avaliação do potencial risco de causar efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e no sistema reprodutivo com o emprego do

software Osiris Property Explorer[®] disponível gratuitamente na web (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>). O servidor de triagem virtual Similarity Ensemble Approach (SEA) (<http://sea.bkslab.org>) (KEISER *et al.*, 2007) foi usado para prever os possíveis alvos de ligação. As estruturas químicas dos compostos mais ativos e também seus principais fragmentos foram descritos em *smiles sequences* antes da execução do software.

5.11.2 Modelagem molecular e estudos de *docking*

Todos os estudos de modelagem molecular foram realizados com os compostos mais ativos **7a-b** e **9a-b**, com o objetivo de encontrar informações que pudessem auxiliar no entendimento da atividade biológica.

Cálculos computacionais baseados na metodologia DFT B3LYP/6-311G* na fase gasosa, avaliados no software Spartan'08 para Windows (Wavefunction Inc., Irvine, USA) foram utilizados para a otimização da geometria e análise conformacional. A geometria dos compostos foi otimizada seguida de análise conformacional sistemática com ângulo de torção de 30° na faixa de 0 - 360°. O confôrmero de menor energia para a estrutura química foi salvo no arquivo mol2 antes de ser utilizado nos estudos de *docking*.

A estrutura da DNA Topoisomerase-1 humana, (Topo-1) codificada por PDB ID: 1K4S (STAKER *et al.*, 2002) foi baixado do *Protein Data Bank* (PDB), antes da realização dos estudos de *docking*. A cavidade de interação da Topo-1 foi utilizada neste estudo. A estrutura da proteína foi preparada removendo as moléculas de água e adicionando hidrogênios polares usando o Autodock Tools 1.5.6 (MORRIS *et al.*, 2009). Os estudos de *docking* foram realizados usando o software iGemdock (YANG E CHEN, 2004), no qual as poses de ligação individuais dos compostos foram avaliadas e submetidas à ancoragem na proteína. O método de cálculo de *docking* realizado na seleção de poses moleculares dos compostos ativos foi de algoritmo genético GA, e usos de *Docking Accuracy Setting*, com parâmetros definidos para tamanho de população, geração e número de soluções como 200, 70 e 8, respectivamente, energia de entrada de ligante ativo, e função de pontuação Gemdock de hidrofóbicidade e eletrostática (1:1). O software iGemdock foi utilizado para propor as interações moleculares entre o receptor biológico e os compostos estudados.

6. CONCLUSÕES

Considerando-se os objetivos propostos para a realização deste trabalho, analisando-se os métodos desenvolvidos e os resultados obtidos, pode-se concluir que eles foram integralmente atingidos.

Foi possível a síntese de todos os precursores das moléculas híbridas de interesse deste trabalho, através de metodologias adaptadas da literatura em bons rendimentos.

Foi desenvolvida uma metodologia para a síntese de uma série de cumarinas C-4 substituídas, contendo 13 derivados, via condensação de Pechmann, a partir dos precursores fenóis resorcinol, floroglucinol, pirogalol, 3-metóxfenol, 3-metilfenol e 1-naftol frente aos β -cetoésteres acetoacetato de etila, 4-cloroacetoacetato de etila, 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etila e benzoilacetato de etila, empregando ácido sulfâmico como catalisador. As reações foram realizadas sem o uso de solventes, em temperaturas de 100 e 130 °C (dependendo do β -cetoéster empregado) e tempos de 25 min a 24 h, levando aos produtos em rendimentos de 50% a 90%.

Foi sintetizada uma série de moléculas híbridas, contendo 12 compostos, compreendendo uma unidade de uracila, timina, teobromina ou tiouracila ligadas a uma variedade de núcleos cumarínicos por meio de núcleos triazolínicos. Os híbridos bis-(cumaronil-triazolil)uracilas **7a - b**, (cumaronil-triazolil)uracila, timina, tiouracila **8a - f**, (cumaronil-triazolil)teobrominas **9a - d**, foram obtidos a partir de uma reação de cicloadição catalisada por cobre(I) (CuAAC) entre derivados 4-(azidometil)cumarínicos (**4a - d**) e os precursores 1-propargiluracila **6a**, 1-propargiltimina **6b**, 2-propargilmercaptouracila **6c**, teobromina e 1,3-dipropargiluracila **6d**, com rendimentos de 70% a 92%.

Foi possível a caracterização de todos os compostos por meio de métodos espectroscópicos como ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C , bem como RMN bidimensional HMQC e HMBC, e métodos espectrométricos como espectrometria de massas de alta resolução (HRMS).

Os compostos híbridos **7a-b**, **8a-d**, **9a-b**, **9d** foram avaliados pela sua atividade antiproliferativa e antitumoral frente às linhagens de células tumorais (HCT116 - câncer colorretal, Hep2 - laringe, A549 - Pulmão) e não tumorais (HaCat - queratinócitos humanos), visando obter conhecimentos da ação biológica desses compostos. Verificou-se que cinco dos compostos híbridos avaliados (**7a -b**, **8d**, **9a-b**) apresentaram citotoxicidade ($\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{M}$) frente à linhagem celular HCT116 (câncer colorretal), sendo que o composto **7a** apresentou a

maior citotoxicidade com um IC_{50} calculado de 24,19 μM para 48 h de exposição. Dos compostos avaliados, apenas o composto **7b** se mostrou citotóxico frente à linhagem de células A549 (pulmão), com IC_{50} de 51,03 μM em 48 horas de exposição. Os compostos **7a** e **9a** se mostraram citotóxicos frente à linhagem Hep-2 (laringe) apresentando IC_{50} de 51,55 μM para 24h de exposição e IC_{50} de 56,55 μM para 24h de exposição. Por fim, nenhum dos compostos testados apresentou citotoxicidade frente à linhagem de células não tumorais HaCat, mesmo na concentração mais elevada testada de 100 μM em todos os tempos testados.

Foram realizados estudos de predição de alvos biológicos e toxicidade *in silico*, além de modelagem molecular e *docking* para os compostos **7a-b** e **9a-b**, que apresentaram maior atividade biológica no ensaio MTT. Os resultados obtidos no estudo de predição de toxicidade *in silico*, empregando o software *Osiris Property Explorer*, demonstraram que os compostos apresentaram baixo risco de causar efeitos mutagênicos e tumorigênicos teóricos em comparação com o H_2O_2 . Além disso, apenas o composto **7a** apresentou risco moderado de causar efeito tóxico no sistema reprodutivo. Dessa forma, os resultados sugerem que os compostos têm baixo potencial para causar toxicidade e podem ser submetidos ao desenvolvimento e planejamento de fármaco.

O programa de busca de alvos biológicos por conjuntos de moléculas usando similaridade intitulado SEA (Search web Server) foi empregado com base na hipótese de identificação de proteínas alvo candidatas à interação com as estruturas químicas dos compostos **7a-b** e **9a-b**, e os resultados indicaram que o principal modelo foi direcionado à DNA topoisomerase 1 (Topo-1), que apresentou valor de p de $3,83 \times 10^{-31}$ e max-TC de 0,20. De acordo com esses resultados, utilizamos essa proteína nos estudos de *docking* molecular.

O procedimento de *docking* foi realizado para identificação da pose individual dos compostos que apresenta menor energia e que se liga seletivamente ao sítio ativo da Topo-1, utilizando o iGEMDOCK. Foram obtidos valores, considerando as poses dos ligantes, muito próximos em energia -113,3 a -117,8 Kcal mol^{-1} para todos os derivados avaliados. O resíduo HIS 632 foi detectado como o principal envolvido nessa ligação ligante-receptor. A porção carbonila das estruturas químicas das cumarinas dos modelos gerados nesses estudos mostrou interação com a HIS 632, enquanto a uracila interage com ARG 364 e THR 718. O anel triazólico dos compostos mostrou interação com ARG 364 da Topo-1. Esses resultados sugerem que os compostos avaliados são potenciais ligantes da proteína e podem estar atuando como inibidores da Topo-1.

7. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, Z.; REZAYATI, S.; BAGHERI, M.; HAJINASIRI, R. Preparation of a novel, efficient, and recyclable magnetic catalyst, γ -Fe₂O₃@HAp-Ag nanoparticles, and a solvent – halogen-free protocol for the synthesis of coumarin derivatives. **Chim. Chem. Lett.** 28, 75 – 82, 2017.
- ACCETTA, A.; CORRADINI, R.; SFORZA, S.; TEDESCHI, T.; BROGNARA, E.; BORGATTI, M.; GAMBARI, R.; MARCHELLI, R.. New uracil dimers showing erythroid differentiation inducing activities. **J. Med. Chem.** 52, 87 – 94, 2009.
- AGUIAR, U. N.; LIMA, G.; ROCHA, M. S.; FREITAS, R. M.; OLIVEIRA, T. M.; SILVA, R. M.; MOURA, L. C. B.; ALMEIDA, L. T. G. Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de *Croton zehntneri* com β -ciclodextrina. **Quim. Nova**, 37, nº 1, 50 – 55, 2014.
- ALI, R.; MIRZA, Z.; ASHURAF, G. M. D.; KAMAL, M. A.; ANSARI, S. A.; DAMANHOURI, G. A.; ABUZENADAH, A. M.; CHAUDHARY, A. G.; SHEIKH, I. A. New agentes anticancer: Recent developments in tumor therapy. **Cancer Res.** 32, 2999 – 3006, 2012.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quim. Nova.** 28 (1), 118 – 129, 2005.
- ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** 38, n 2, 237 – 243, 2002.
- ASHOK, D.; GUNDU, S.; AAMATE, V. K.; DEVULAPALLY, M. G.; BATHINI, R.; MANGA, V. Dimers of coumarin-1,2,3-triazole hybrids bearing alkyl spacer: evaluation as antimycobacterial and antimicrobial agents. **J. Mol. Struct.** 1157, 312 – 321, 2018.
- AZEVEDO, M. B. M.; ALDERETE, J.; RODRIGUEZ, J. A.; SOUZA, A. O.; RETTORI, D.; TERSONI, M. A.; FALJONI-ALARIO, A.; HAUN, M.; DURÁN. Biological activities of Violacein, a new antitumoral indole derivative, in an inclusion complex with β -ciclodextrin. **J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.** 37, 93 – 101, 2000.
- BADE, R.; CHAN, H.; REYNISSON, J. Characteristics of known drug space. Natural products, their derivatives and synthetic drugs. **Eur. J. Med. Chem.** 45, 5646 – 5652, 2010.
- BAHRAMNEZHAD, B.; GHAZANFARI, D.; SHEIKHHOSSEINI, E.; AKHGAR, M. R.; AHMADI, S. A. MnSb₂O₆-chitosan nanocomposite: An efficient catalyst for the synthesis of coumarins via Pechmann reaction. **J. Hetecycl. Chem.** 57, 173 – 181, 2020.
- BAKHERAD, M.; GHOLIPOOR, F. Regioselective synthesis of 3-benzyl-substituted 7H-thiazolo[3,2-a]pyrimidine-7-ones through palladium-catalyzed heteroannulation of acetylenic compounds. **Org. Chem. Int.** 956584, 5 pp.; 2012.

- BALABAN, A. T.; ONICIU, D. C.; KATRITZKY, A. R. Aromaticity as a cornerstone of heterocyclic chemistry. **Chem. Rev.** 104, 2777 – 2812, 2004.
- BI, F.; JI, S.; VENTER, H.; LIU, J.; SEMPLE, S. J.; MA, S. Substitution of terminal amide with 1*H*-1,2,3-triazole: identification of unexpected class of potent antibacterial agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 28, 884 – 891, 2018.
- BISI, A.; CAPPADONE, C.; RAMPA, A.; FARRUGIA, G.; SARGENTI, A.; BELLUTI, F.; DI MARTINO, R. M. C.; MALUCELLI, E.; MELUZZI, A.; IOTTI, S.; GOBBI, S. Coumarin derivatives as potencial antitumor agents: growth inhibition, apoptosis induction and multidrug resistance reverting activity. **Eur. J. Med. Chem.** 127, 577 – 585, 2017.
- BISTROVIĆ, A.; STIPANIČEV, N.; OPAČAK-BERNARDI, T.; JUKIĆ, M.; MARTINEZ, S.; GLAVAŠ-OBROVAC, LJ.; RAIĆ-MALIĆ, S. Synthesis of 4-aryl-1,2,3-triazolyl appended natural coumarin-related compounds with antiproliferative and radical scavenging activities and intracellular ROS production modification. **New J. Chem.** 41, 7531 – 7543, 2017.
- BODDU, R. K.; THUMMURI, D.; NAIDU, V. G. M.; SISTLA, R.; UPPULURI, V. M. Synthesis of some novel orcinol based coumarin triazole hybrids with capabilities to inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis through NF- κ B signaling pathway. **Bioorg. Chem.** 2018, 78, 94 – 102.
- BONCEL, S.; MACZKA, M.; WALCZAK, K. Michael versus retro-michael reaction in the regioselective synthesis of N-1 and N-3 uracil adducts. **Tetrahedron.** 66, 8450 – 8457, 2010.
- 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. Lett.** 43, 9195 – 9197, 2002.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A., JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J. Clin.** 68, 394 – 424, 2018.
- CAO, D.; LIU, Z.; VERWILST, P.; KOO, S.; JANGJILI, P.; KIM, J. S.; LIN, W. Coumarin-based small-molecule fluorescent chemosensors. **Chem. Rev.** 119, 18, 10403 – 10519, 2019.
- CASASCHI, A.; GRIGG, R.; SANSANO, J. M. Palladium catalysed Tandem cyclisation-anion capture, Part 6: synthesis of sugar, nucleoside, purine, benzodiazepinone and β -lactam analogues via capture of in situ generated vinylstannanes. **Tetrahedron**, 56, 7553 – 7560, 2000.
- CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: Structure, function, and Mechanism. **Annu. Rev. Biochem.** 70, 369 – 413, 2001.
- CHEN, J.; LUO, X.; QIU, H.; MACKAY, V.; SUN, L.; OUYANG, X. Drug discovery and drug marketing with the critical roles of modern administration. **Am. J. Transl. Res.** 10(12), 4302 – 4312, 2018.

- CUNHA-FILHO, M. S.S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 28, 1 – 9, 2007.
- CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. Ex Baker. **Rev. Bras. Pl. Med.** 14, n 2, 400 – 409, 2012.
- DANDRIYAL, J.; SINGLA, R.; KUMAR, M.; JAITAK, V. Recent developments of C-4 substituted coumarin derivatives as anticancer agents. **Eur. J. Med. Chem.** 119, 141 – 168, 2016.
- DECKER, S.; SAUVILLE, E. Drug Discovery. In: ATKINSON Jr, A. J.; DANIELS, C. E.; MARKEY, S. P.; ABERNETHY, D. R.; DEDRICK, R. L. Principles of Clinical Pharmacology. Academic Press, segunda edição, 2007, p 439 – 447.
- DEGROTE, J.; TYNDALL, S.; WONG, K. F.; VANALSTINE-PARRIS, M. Synthesis of 7-alkoxy-4-trifluoromethylcoumarins via the Von Pechmann reactions catalyzed by molecular iodine. **Tetrahedron Lett.** 55, 6715 – 6717, 2014.
- DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: current developments. **Bioorg. Chem.** 71, 30 – 54, 2017.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods.** 89, 271 – 277, 1986.
- DEWEESE, J. E.; OSHEROFF, M. A.; OSHEROFF, N. DNA topology and topoisomerases: Teaching a “knotty” subject. **Biochem. Mol. Biol. Educ.** 37(1), 2 – 10, 2009.
- DUAN, Y. C.; MA, Y. C.; ZHANG, E.; SHI, X. J.; WANG, M. M.; YE, X. W.; LIU, H. M. Design and synthesis of novel 1,2,3-triazole-dithiocarbamate hybrids as potential anticancer agents. **Eur. J. Med. Chem.** 62, 11 – 19, 2013.
- DUAN, L.; YAN, X.; GUO, LI.; WU, T.; ZHANG, F.; GAO, L.; GUO, K.; SUN, Y.; MIAO, Y. Slight substituent modification in coumarin molecular structures for strong solid emission and application in light-emitting devices. **Dyes and Pigm.** 174, 108117, 2020.
- DUNN, B. Cancer: Solving an age-old problem. *Nature.* 483, S2 – S6, 2012.
- FRACETO, L. F.; GONÇALVES, M. M.; MORAES, C. M.; ARAÚJO, D. R.; ZANELLA, L.; PAULA, E.; PERTINHEZ, T. A. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína:β-ciclodextrina. **Quim. Nova.** 30, n° 5, 1203 – 1207, 2007.
- FREITAS, L. B. O.; RUELA, F. A.; PEREIRA, G. R.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P. A reação “click” na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. **Quim. Nova.** 34, n°10, 1791 – 1804, 2011.

- GERRITS, C. J. H.; JONGE, M. J. A.; SCHELLENS, J. H. M.; STOTER, G.; VERWEIJ, J. Topoisomerase I inhibitors: The relevance of prolonged exposure for present clinical development. **Br. J. Cancer.** 76(7), 952 – 962, 1997.
- GRACIANO, R. C. D.; RIBEIRO, J. A. T. R.; MACÊDO, A. K. S.; LAVAREDA, J. P. S.; OLIVEIRA, P. R.; NETTO, J. B.; NOGUEIRA, L. M.; MACHADO, J. M.; CAMPOS-PAZ, M.; GIUNCHETTI, R. C.; GALDINO, A. S. Recent patent applications in red biotechnology: a mini-review. **Recent. Pat. Biotechnol.** 13(3), 170 – 186, 2019.
- GONÇALVES, G. A.; SPILLERE, A. R.; NEVES, G. M.; KAGAMI, L. P.; POSER, G. L.; CANTO, R. F. S.; EIFLER-LIMA, V. L. Natural and synthetic coumarins as antileishmanial agents: A review. **Eur. J. Med. Chem.** 203, 112514, 2020.
- GONZÁLEZ-OLVERA, R.; ESPINOZA-VÁSQUEZ, A.; NEGRÓN-SILVA, G. E.; PALOMAR-PADRAVÉ, M. E.; ROMERO-ROMO, M. A.; SANTILLAN, R. Multicomponent click synthesis of new 1,2,3-triazole derivatives of pyrimidine nucleobases: Promising acidic corrosion inhibitors for steel. **Molecules.** 18, 15064 – 15079, 2013.
- GUEDES, F. L.; ALVES, G. M. C.; SANTOS, F. L. A.; LIMA, L.F.; ROLIM, L. A.; NETO, P. J. R. Cyclodextrins: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Rev. Bras. Farm.** 89 (3), 220 – 225, 2008.
- GURUGE, A. G.; UDAWATTE, C.; WEERASINGHE, S. An *in silico* approach of coumarin-derived inhibitors for human DNA topoisomerase I. **Australian J. Chem.** 69(9), 1005 - 1015, 2016.
- HAKIMELAHI, G. H.; GASSANOV, G. S.; HSU, M.; HWU, J. R.; HAKIMELAHI, S. A novel approach towards studying non-genotoxic enediynes as potential anticancer therapeutics. **Bioorg. Med. Chem.** 10, 1321 – 1328, 2002.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell.** 100, 57 – 70, 2000.
- HERAVI, M. M.; KHAGHANINEJAD, S.; MOSTOFI, M. Pechmann reaction in the synthesis of coumarin derivatives. In: KATRITZKY, A. (Ed.). *Advances in Heterocyclic Chemistry*. Vol. 112, 2014, p. 1 – 44.
- HERR, J. R. 5-Substituted-1*H*-tetrazoles as carboxylic acid isosteres: medicinal chemistry and synthetic methods. **Bioorg. Med. Chem.** 10, 3379 – 3393, 2002.
- IBRAR, A.; SHEHZADI, S. A.; SAEED, F.; KHAN, I. Developing hybrid therapeutics for diverse enzyme inhibitory action: Active role of coumarin-based structural leads in drug discovery. **Bioorg. Med. Chem.** 26, 3731 – 3762, 2018.
- JAIN, K. S.; ARYA, N.; INAMDAR, N. N.; AUTI, P. B.; UNAWANE, S. A.; PURANIK, H. H.; SANAP, M. S.; INAMKE, A. D.; MAHALE, V. J.; PRAJAPATI, C. S.; SHISHOO, C. J. The chemistry and bio-medicinal significance of pyrimidines & condensed pyrimidines. **Curr. Top. Med. Chem.** 16, 3133 – 3174, 2016.

- JEYAKUMAR, T.; FODIL, N.; VAN DER KRAAK, L.; MEUNIER, C.; CAYROL, R.; MCGREGOR, K.; LANGLAIS, D.; GREENWOOD, C. M. T.; BEAUCHEMIN, N.; GROS, P. Inactivation of interferon regulatory factor 1 causes susceptibility to colitis-associated colorectal cancer. **Sci Rep.** 9, 18897, 2019.
- JOHNSON, I. M.; PRAKASH, H.; PRATIBA, J.; RAGHUNATHAN, R.; MALATHI, R. Spectral analysis of naturally occurring methylxantines (theophylline, theobromine and caffeine) binding with DNA. **PLoS ONE.** 7, e50019, 1- 11, 2012.
- JORGE, P. M. Indução de parada no ciclo celular e apoptose pelo ditelureto de difenila: Uma possível relação com inibição de enzimas topoisomerases. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2012.
- JUN, M.; BACAY, A. F.; MOYER, J.; WEBB, A.; MONIZ, D. C. Synthesis and biological evaluation of isoprenylated coumarins as potential cancer agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 24, 4654 – 4658, 2014.
- KAFERSKI, P. Rainbow code of biotechnology. **Chemik,** 66, 8, 811 – 816, 2012.
- KATKEVIČS, M.; KONTIJEVSKIS, A.; MUTULE, I.; SŪNA, E. Microwave-promoted automated synthesis of a coumarin library. **Chem. Heterocycl. Compd.** 43, n° 2, 2007.
- KATRITZKY, A. R.; RESS, C.W. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry: The Structure, Reactions, Synthesis and Uses of Heterocyclic Compound.* Pergamon Press Ltd. New York, 1984. 5: 669.
- KE, X.; SHEN, L. Molecular targeted therapy of cancer: the progress and future prospect. **Front Lab Med.** 1, 69 – 75, 2017.
- KEISER, M.J.; ROTH, B.L.; ARMBRUSTER, B.N.; ERNSBERGER, P.; IRWIN, J.J.; SHOICHET, B.K. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. **Nat. Biotechnol.** 25(2), 197–206, 2007.
- KELLICI, T. F.; CHATZIATHANASIADOU, M. V.; DIAMANTIS, D.; CHATZIKONSTANTINOY, A. V.; ANDREADELIS, I.; CHRISTODOULOU, E.; VALSAMI, G.; MAVROMOUSTAKOS, T.; TZAKOS, A. G. Mapping the interactions and bioactivity of quercetin-(2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin complex. **Int. J. Pharm.** 511, 303 – 311, 2016.
- KEREPESI, C.; SZABÓ, J. E.; PAPP-KÁDÁR, V.; DOBAY, O.; SZABÓ, D.; GROLMUSZ, V.; VÉRTESSY, B. G.; Life without dUTPase. **Front. Microbiol.** 7, 1768, 2016.
- KLENCAR, J.; MOLNAR, M. Natural and synthetic coumarins as potencial anticancer agents. **J. Chem. Pharm. Res.** 7(7), 1223 – 1238, 2015.
- KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. **Angew. Chem. Int. Ed.** 40, 2004 – 2021, 2001.

- KRALJEVIĆ, T. G.; ILIĆ, N.; STEPANIĆ, V.; SAPPE, L.; PETRANOVIĆ, J.; PAVELIĆ, S. K.; RAIĆ-MALIĆ, S. Synthesis and *in vitro* antiproliferative evaluation of novel n-alkylated 6-isobutyl and propyl pyrimidine derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 24, 2913 – 2917, 2014.
- KRALJEVIĆ, T. G.; HAREJ, M.; SEDIĆ, M.; PAVELIĆ, S. K.; STEPANIĆ, V.; DRENJANCEVIĆ, D.; TALAPKO, J.; RAIĆ-MALIĆ, S. Synthesis, *in vitro* anticancer and bacterial activities and *in silico* studies of new 4-substituted 1,2,3-triazole-coumarin hybrids. **Eur. J. Med. Chem.** 124, 794 – 808, 2016.
- KRISTAFOR, S.; BISTROVIC, A.; PLAVEC, J.; MAKUC, D.; MARTINOVIC, T.; KRALJEVIĆ, S. P.; RAIĆ-MALIĆ, S. One-Pot click synthesis of 1,2,3-triazoles-embedded unsaturated uracil derivatives and hybrids of 1,5- and 2,5-disubstituted tetrazoles and pyrimidines. **Tetrahedron Lett.** 56, 1222 – 1228, 2015.
- KUMAR, K.; SAGAR, S.; ESAU, L.; KAUR, M.; KUMAR, V. Synthesis of novel 1,2,3-*H*-triazoles tethered C-5 substituted uracil-isatin conjugates and their cytotoxic evaluation. **Eur. J. Med. Chem.** 58, 153 – 159, 2012.
- KUSANUR, R. A.; KULKARNI, M. V.; KULKARNI, G. M.; NAYAK, S. K.; ROW, T. N. G.; GANESAN, K.; SUN, C. M.; Unusual anisotropic effects from 1,3-dipolar cycloadducts of 4-azidomethyl coumarins. **J. Heterocyclic Chem.** 47, 91, 2010.
- LACO, G. S. Evaluation of two models for human topoisomerase I interaction with dsDMS and camptothecin derivatives. **Plos One**, 6 (8), e24314, 2011.
- LI, S.; QI, X.; HUANG, B. Synthesis of 7-hydroxy-4-methylcoumarin via the Pechmann reaction with pvp-supported phosphotungstic acid catalyst. **Catal. Today.** 276, 139 – 144, 2016.
- LI, DZ.; ZHANG, QZ.; WANG, CY.; ZHANG, YL.; LI, XY.; HUANG, JT.; LIU, HY.; FU, ZD.; SONG, HX.; LIN, JP.; JI, TF.; PAN, XD. Synthesis and antitumor activity of novel substituted uracil-1'(N)-acetic acid ester derivatives of 20(S)-camptothecins. **Eur. J. Med. Chem.** 125, 1235 – 1246, 2017.
- LIANG, X.; WU, Q.; LUAN, S.; YIN, Z.; HE, C.; YIN, L.; ZOU, Y.; YUAN, Z.; LI, L.; SONG, X.; HE, M.; LV, C.; ZHANG, W. A comprehensive review of topoisomerase inhibitors as anticancer agents in past decade. **Eur. J. Med. Chem.** 171, 129 – 168, 2019.
- LIANG, Y.; ZHU, D.; HOU, L.; WANG, Y.; HUANG, X.; ZHOU, C.; ZHU, L.; WANG, Y.; LI, L.; GU, Y.; LUO, M.; WANG, J.; MENG, X. MiR-107 confers chemoresistance to colorectal cancer by targeting calcium-binding protein 39. **Br. J. Cancer**, 2020.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drud design. **Curr. Med. Chem.** 12(1), 23 – 49, 2005.
- LIU, X.; ZHANG, P.; XIE, C.; SHAM, K. W. Y.; NG, S. S. M.; CHEN, Y.; CHENG, C. H. K. Activation of PTEN by inhibition of TRPV4 supresses colon cancer development. **Cell Death and Disease.** 10:460, 1 – 14, 2019.

- LU, G.; LI, X.; MOHAMED, K. O.; WANG, D.; MENG, F. Design, synthesis and biological evaluations of novel uracil derivatives bearing 1,2,3-triazole moiety as thymidylate synthase (TS) inhibitors and potential antitumor drugs. **Eur. J. Med. Chem.** 171, 282 – 296, 2019.
- MA, C.; WANG, L.; XIE, X.-Q. Gpu accelerated chemical similarity calculation for compound library comparison. **J. Chem. Inf. Model.** 51, 7, 1521 – 1527, 2011.
- MA, T.; MA, Q, YU, B.; LIU, H. Discovery of the theobromine derivative MQS-14 that induces death of MCG-803 cells mainly through ROS-mediated mechanisms. **Eur. J. Med. Chem.** 174, 76 – 86, 2019.
- MALIK, S. M.; AHMED, S. A.; ALTHAGALI, I. I.; ANSARI, M. A.; KAMAL, A. Application of triazoles as bioisosteres and linkers in the development of microtubule targeting agents. **RSC Med. Chem.** 11, 327 – 348, 2020.
- MARTINS, Z.; BOTTA, O.; FOGEL, M. L.; SEPHTON, M. A.; GLAVIN, D. P.; WATSON, J. S.; DWORKIN, J. P.; SCHWARTZ, A. W.; EHRENFREUND, P. Extraterrestrial nucleobases in the murchison meteorite. **Earth Planet Sc Lett.** 270, 130 – 136, 2008.
- MELDAL, M.; TORNØE, C. W.; CHRISTENSEN, C. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. **J. Org. Chem.** 67, 3057 – 3064, 2002.
- MELO, J. O. F.; DONNICI, C. L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. V.; FERREIRA, M. L. G.; CUNHA, A. C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Quim. Nova.** 29, 569 – 579, 2006.
- MELO, N. F. S.; GRILLO, R.; MORAES, C. M.; BRITO, C. L.; TROSSINI, G. H. G.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Preparação e caracterização inicial de complexo de inclusão entre nitrofurazona e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 28, 35 – 44, 2007.
- MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. A importância da síntese de fármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola.** N° 3 –maio, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – INCA - Estatísticas de câncer no brasil, 2020. Disponível (online) em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer> acessado em 19/02/20.
- MIYAKOSHI, H.; MIYAHARA, S.; YOKOGAWA, T.; ENDOH, K.; MUTO, T.; YANO, W.; WAKASA, T.; UENO, H.; CHONG, K. T.; TAGUSHI, J.; NOMURA, M.; TAKAO, Y.; FUJIOKA, A.; HASHIMOTO, A.; ITOU, K.; YAMAMURA, K.; SHUTO, S.; NAGASAWA, H.; FUKUOKA, M. 1,2,3-Triazole-containing uracil derivatives with excellent pharmacokinetics as a novel class of potent human deoxyuridine triphosphatase inhibitors. **J. Med. Chem.** 55, 6427 – 6437, 2012 (a).

- MIYAKOSHI, H.; MIYAHARA, S.; YOKOGAWA, T.; CHONG, K.T.; TAGUCHI, J.; ENDOH, K.; YANO, W.; WAKASA, T.; UENO, H.; TAKAO, Y.; NOMURA, M.; SHUTO, S.; NAGASAWA, H.; FUKUOKA, M. Synthesis and discovery of N-carbonylpyrrolidine- or N-sulfonylpyrrolidine-containing uracil derivatives as potent human deoxyuridine triphosphatase inhibitors. **J. Med. Chem.** 55, 2960 – 2969, 2012 (b).
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Quim. Nova.** 24, 105 – 111, 2001.
- MORIWAKI, C.; MAZZER, C.; PAZZETO, R.; MATIOLI, G. Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferases para a produção de ciclodextrina. **Quim. Nova.** 32, nº 9, 2360 – 2366, 2009.
- MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSELL, D. S. AND OLSON, A. J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **J. Comp. Chem.** 16, 2785-2791, 2009.
- MYATT, G. J.; AHLBERG, E.; AKAHORI, Y.; ALLEN, D.; AMBERG, A.; ANGER, L.T.; APTULA, A.; AUERBACH, A.; BEILKE, L.; BELLION, P.; BENIGNI, R.; BERCU, J.; BOOTH, E.D.; BOWER, D.; BRIGO, A.; BURDEN, N.; CAMMERER, Z.; CRONIN, M.T.D.; CROSS, K.P.; CUSTER, L.; DETTWILER, M.; DOBO, K.; FORD, K.A.; FORTIN, M.C.; GAD-MCDONALD, S.E.; GELLATLY, N.; GERVAIS, V.; GLOVER, K.P.; GLOWIENKE, S.; VAN GOMPEL, J.; GUTSELL, S.; HARDY, B.; HARVEY, J.S.; HILLEGASS, J.; HONMA, M.; HSIEH, J.H.; HSU, C.W.; HUGHES, K.; JOHNSON, C.; JOLLY, R.; JONES, D.; KEMPER, R.; KENYON, M.O.; KIM, M.T.; KRUHLAK, N.L.; KULKARNI, S.A.; KÜMMERER, K.; LEAVITT, P.; MAJER, B.; MASTEN, S.; MILLER, S.; MOSER, J.; MUMTAZ, M.; MUSTER, W.; NEILSON, L.; OPREA, T.I.; PATLEWICZ, G.; PAULINO, A.; LO PIPARO, E.; POWLEY, M.; QUIGLEY, D.P.; REDDY, M.V.; RICHARZ, A.N.; RUIZ, P.; SCHILTER, B.; SERAFIMOVA, R.; SIMPSON, W.; STAVITSKAYA, L.; STIDL, R.; SUAREZ-RODRIGUEZ, D.; SZABO, D.T.; TEASDALE, A.; TREJO-MARTIN, A.; VALENTIN, J.P.; VUORINEN, A.; WALL, B.A.; WATTS, P.; WHITE, A.T.; WICHARD, J.; WITT, K.L.; WOOLLEY, A.; WOOLLEY, D.; ZWICKL, C.; HASSELGREN, C. In silico toxicology protocols, Regul. **Toxicol. Pharmacol.** 96, 1–17, 2018.
- NAIK, R. J.; KULKARNI, M. V.; PAI, K. S. R.; NAYAK, P. G. (2012). Click chemistry approach for bis-chrometil triazole hybrids and their antitubercular activity. **Chem. Biol. Drug. Des.** 80, 516 – 523, 2012.
- NEGRÓN-SILVA, G. E.; GONZÁLEZ-OLVERA, R.; ANGELES-BELTRÁN, D.; MALDONADO-CARVONA, N.; ESPINOZA-VÁSQUES, A.; PALOMAR-PARDAVÉ, M. E.; ROMERO-ROMO, M. A.; SANTILLAN, R. Synthesis of new 1,2,3-triazole derivatives of uracil and thymine with potencial inhibitory activity against acidic corrosion of steels. **Molecules**, 2013, 18, 4613 – 4627.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** 75(3), 311 – 335, 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta.** 1830(6), 3670 – 3695, 2013.

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nt. Prod.** 79, 629 – 661, 2016.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **J. Nt. Prod.** 83(3), 770 – 803, 2020.
- NIE, J., LIU, L., XING, G. ZHANG, M.; WEI, R.; GUO, M.; XI, X.; XIE, P.; LI, L.; HE, F.; WAN, W.; ZHANG, L. CKIP-1 acts as a colonic tumor suppressor by repressing oncogenic Smurf1 synthesis and promoting Smurf1 autodegradation. **Oncogene**, 33, 3677–3687, 2014.
- OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. 6, 70 – 83, 2009.
- OKI, E.; ANDO, K.; NAKANISHI, R.; SUGIYAMA, N.; NAKASHIMA, Y.; KUBO, N.; KUDOU, K.; SAEKI, H.; NOZOE, T.; EMI, Y.; MAEHARA, Y. Recent advances in treatment for colorectal liver metastasis. **Ann. Gastroenteral. Surg.** 2:167–175, 2018.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE - Folha informativa – Câncer, 2018. Disponível (online) em https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=839 acessado em jan/01/2019.
- PALASZ, A.; CIEZ, D. In search of uracil derivatives as bioactive agents. uracils and fused uracils: synthesis, biological activity and applications. **Eur. J. Med. Chem.** 97, 582 – 611, 2015.
- PALASZ, A.; CIEZ, D.; MUSIELAK, B.; TLUSCIK, J. K. Application of dimedone enamines as dienophiles: stereoselective synthesis of amino enols of fused uracils containing a sugar moiety by hetero-diels-alder reactions of barbituric acid 5-ylidene alditols with dimedone enamines. **Tetrahedron**. 71, 8911 – 8924, 2015.
- PAUL, K.; BINDAL, S.; LUXAMI, V. Synthesis of new conjugated coumarin-benzimidazole hybrids and their anticancer activity. **Bioog. Med. Chem. Lett.** 23(12), 3667 – 3672, 2013.
- PENG, W.; ZHU, S. Efficient synthesis of 5-fluoroalkylated 1*H*-1,2,3-triazoles and application of the bromodifluoromethylated triazole to the synthesis of novel bicyclic *gem*-difluorinated 1*h*-pyrano[3,4-*d*][1,2,3]-triazol-4-one compounds. **Tetrahedron**. 59, 4395 – 4404, 2003.
- PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG E.C.; FERRIN, T.E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.** 25(13), 1605-1612, 2004.
- PINGAEW, R.; SAEKEE, A.; MANDI, P.; NANTASENAMAT, C.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel chalcone-coumarin hybrids as anticancer e antimalarial agents. **Eur. J. Med. Chem.** 85, 65-76, 2014.

- POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, HL.; MARCHANDI, C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* 17(5), 421 – 433, 2010.
- PROTEIN DATA BANK (PDB). Disponível (online) em: <https://www.rcsb.org/structure/1K4S> acessado em fev/2020.
- PROUSIS, K. C.; AVLONITIS, N.; HEROPOULOS, G. A.; GALOGEROPOULOU, T. FeCl₃-Catalysed ultrasonic-assisted, solvent-free synthesis of 4-substituted coumarins. a useful complement to the pechmann reaction. *Ultrason. Sonochem.* 21, 937 – 942, 2014.
- QIAO, L.; HAO, S. Novel trifluoromethylcoumarinyl urea derivatives: Synthesis, characterization, fluorescence, and bioactivity. *Molecules*, 23, 600, 1 – 14, 2018.
- RAIES, A.B.; BAJIC, V.B. *In silico* toxicology: computacional methods for the prediction of chemical toxicity. *WIREs Comput. Mol. Sci.* 6, 147 – 172, 2016.
- RIBEIRO, C.V.C; KAPLAN, M. A. C. Tendências Evolutivas de Famílias Produtoras de Cumarinas em *Angiospermae*. *Quim. Nova*, 25, 533 – 538, 2002.
- RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drugs leads: past successes and present day issue. *Am. J. Cardiol.* 101, 43D - 49D, 2008.
- ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metologias. *Mat. Res.* 6, n° 3, 317 – 320, 2003.
- ROSALES, P. F.; MARINHO, F. F.; GOWER, A.; CHIARELLO, M.; CANCI, B.; ROESCHELY, M.; PAULA, F. R.; MOURA, S. Bio-guided search of active indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*: Antitumour activity, toxicity *in silico* and molecular modelling studies. *Bioorg. Chem.* 85, 66 – 74, 2019.
- SANDHU, S.; BANSAL, Y.; SILAKARI, O.; BANSAL, G. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 3806 – 3814, 2014.
- SANDUJA, M.; GUPTA, J.; SINGH, H.; PAGARE, P. P.; RANA, A. Uracil-coumarin based hybrid molecules as potente anticancer and anti-bacterial agentes. *J. Saudi Chem. Soc.* 24, 2, 251 – 266, 2020.
- SARKER, S. D.; NAHAR, L. Progress in the Chemistry of Naturally Occuring Coumarins. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 106, 241 – 304, 2017.
- SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V. V.; ROSTOVTSEV, V. V.; GREEN, L. G. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, N° 14, 2596 – 2599, 2002.
- SCHIMIDT, B.; RIBINICK, D. M.; POULEV, A.; LONGEDRAS, S. CEFALU, W.T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism.* 57, S3 - S9, 2007.
- SILVA, V. D.; FARIA, B. M.; COLOMBO, E.; ASCARI, L.; FREITAS, G. P. A.; FLORES, L. S.; CORDEIRO, Y.; ROMÃO, L.; BUARQUE, C. D. *Bioorg. Chem.* 83, 87 – 97, 2019.

- SKIBA, J.; KOWALSKI, K.; PROCHINICKA, A.; OTT, I.; SOLECKA, J.; RAJNISZ, A.; THERRIEN, B. Metallocene-uracil conjugates: synthesis and biological evaluation of novel mono-, di-, and tri-nuclear systems. **J. Organomet. Chem.** 782, 52 – 61, 2015.
- SPARTAN FOR WINDOWS 08, Wavefunction Inc., Von Karman, Suite 370, Irvine, CA, USA.
- STECK, S.E., MURPHY, E.A. Dietary patterns and cancer risk. **Nat. Rev. Cancer**, 2019.
- THAKUR, A.; SINGLA, R.; JAITAK, V. Coumarins as anticancer agents: a review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. **Eur. J. Med. Chem.** 101, 476 – 495, 2015.
- THE PROTEIN DATA BANK www.rcsb.org. BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N.; BOURNE, P.E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res.** 28, 235-242, 2000.
- THOMAS, G. Medicinal Chemistry: An Introduction, 2th Edition; John Wiley & Sons, Ltd. England; p. 1-9, 2007.
- TYNDALL, S.; WONG, K. F.; VANALSTINE-PARRIS, M. A. Insight into the mechanism of the Pechmann reaction using NMR. **J. Org. Chem.** 80, 18, 8951 – 8953, 2015.
- VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V.G. Propriedades e Aplicações Recentes das Ciclodextrinas. **Quim. Nova**, 31, 360 – 368, 2008.
- VITAKU, E., SMITH, D. T., NJARDARSON, J. T. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals. **J. Med. Chem.** 57(24), 10257–10274, 2014.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and pathways they control. **Nat. Med.** 10 (8), 789 – 799, 2004.
- VON PECHMANN, H. DUISBERG, C. Ueber die verbindungen der phenole mit acetessigäther. **Ber. Dtsch. Chem. Ges.** 16 (2), 2119 – 2128, 1883.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – Early cancer diagnosis saves lives cuts treatment costs. Disponível (online) em <https://www.who.int/en/news-room/detail/03-02-2017-early-cancer-diagnosis-saves-lives-cuts-treatment-costs> acessado em jan/2019.
- WORREL, B. T.; MALIK, J. A.; FOKIN, V. V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. **Sci.** 340, 457, 2013.
- XU, X.; WU, Y.; LIU, W.; SHENG, C.; YAO, J.; DONG, G.; FANG, K.; LI, J.; YU, Z.; MIN, X.; ZHANG, H.; MIAO, Z.; ZHANG, W. Discovery of 7-methyl-10-hydroxyhomocamptothecins with 1,2,3 - Triazole Moiety as Potent Topoisomerase I Inhibitors. **Chem. Biol. Drug Des.** 88: 398-403, 2016.
- YANG, J.M.; CHEN, C.C. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking, **Proteins: Struct. Func. Bioinf.** 55, 288-304, 2004.
- YE, X.; ZHENG, Y.; DUAN, Y.; WANG, M.; YU, B.; REN, J.; MA, J.; ZHANG, E.; LIU, H.

- Synthesis and Biological Evaluation of Coumarin-1,2,3-Triazole-Dithiocarbamate Hybrids as Potent LSD1 Inhibitors. **Med. Chem. Commun.** 5, 650 – 654, 2014.
- YU, T.; ZHU, Z.; BAO, Y.; ZHAO, Y.; LIU, X.; ZHANG, H. Investigation of novel carbazole-functionalized coumarin derivatives as organic luminescent materials. **Dyes and Pigm.** 147, 260 – 269, 2017.
- ZAREYEE, D.; SEREHNEH, M. Recyclable CMK-5 supported sulfonic acid as an environmentally benign catalyst for solvent-free one-pot construction of coumarin through Pechmann condensation. **J. Mol. Catal. A-Chem.** 391, 88 – 91, 2014.
- ZHANG, W.; LI, Z.; ZHOU, M.; WU, F.; HOU, X.; LUO, H.; LIU, H.; HAN, X.; YAN, G.; DING, Z.; LI, R. Synthesis and biological evaluation of 4-(1,2,3-triazol-1-yl) coumarin derivatives as potential antitumor agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 24, 799 – 807, 2014.
- ZINGONE, G.; RUBESSA, F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin- β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 291, 3 – 10, 2005.

8. APÊNDICE A

8.1 ESPECTROS SELECIONADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C $\{1\text{H}\}$ DOS COMPOSTOS OBTIDOS E CITADOS NA TESE.

Figura 57. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz da uracila (**5a**) em DMSO- d_6 .

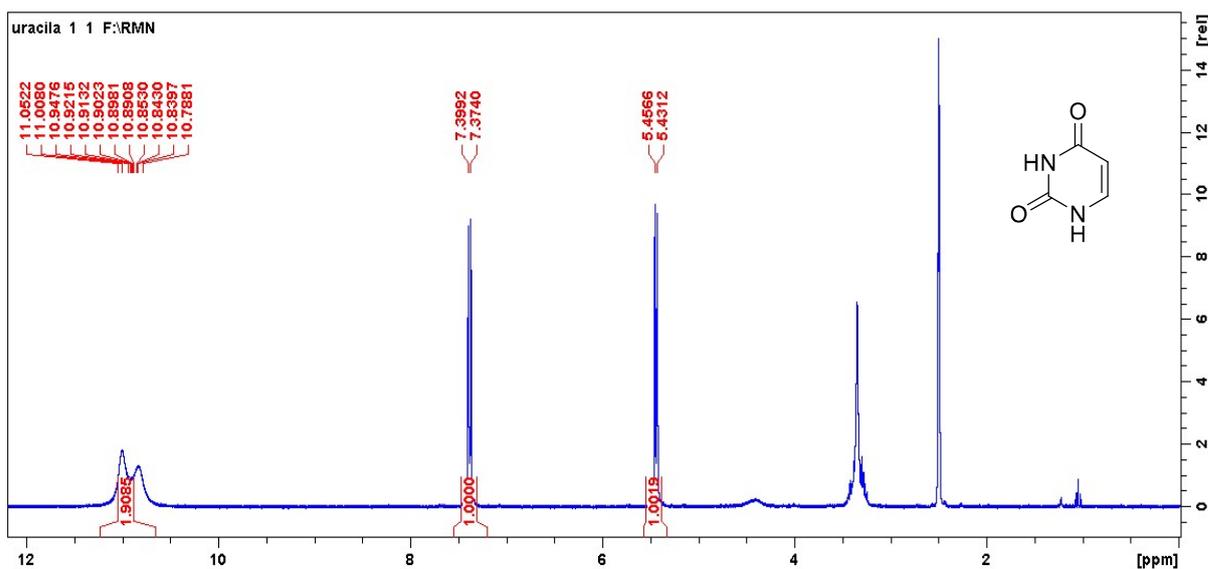


Figura 58. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 1-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4-(1*H*,3*H*)-diona (**6a**) em DMSO- d_6 .

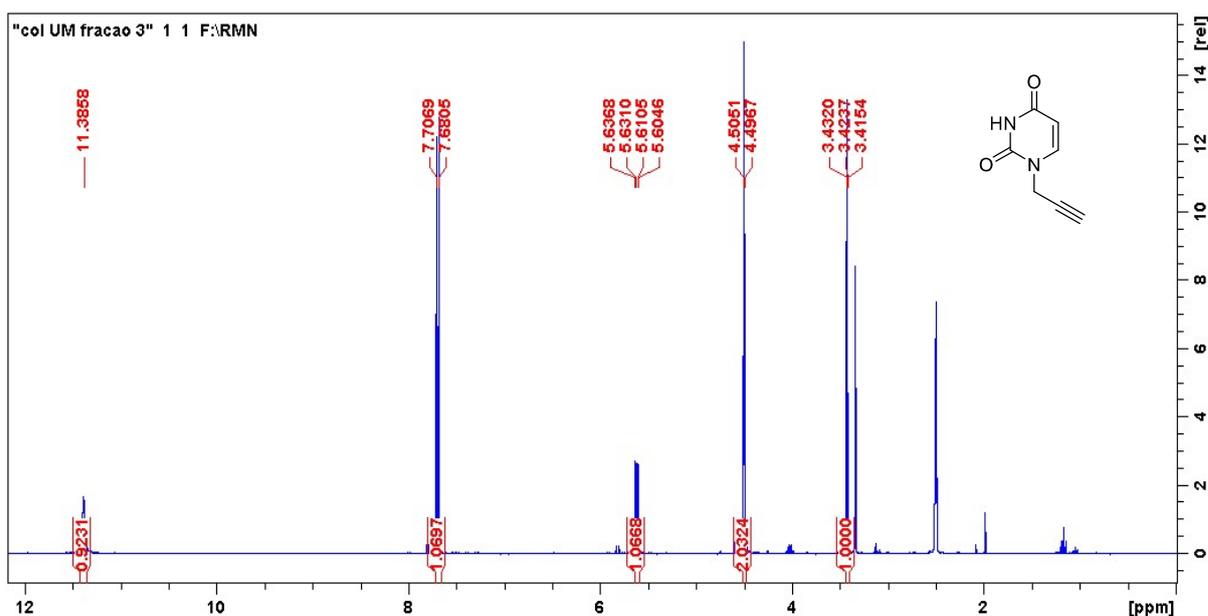


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 1-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4-(1*H*,3*H*)-diona (**6a**) em DMSO-d_6 .

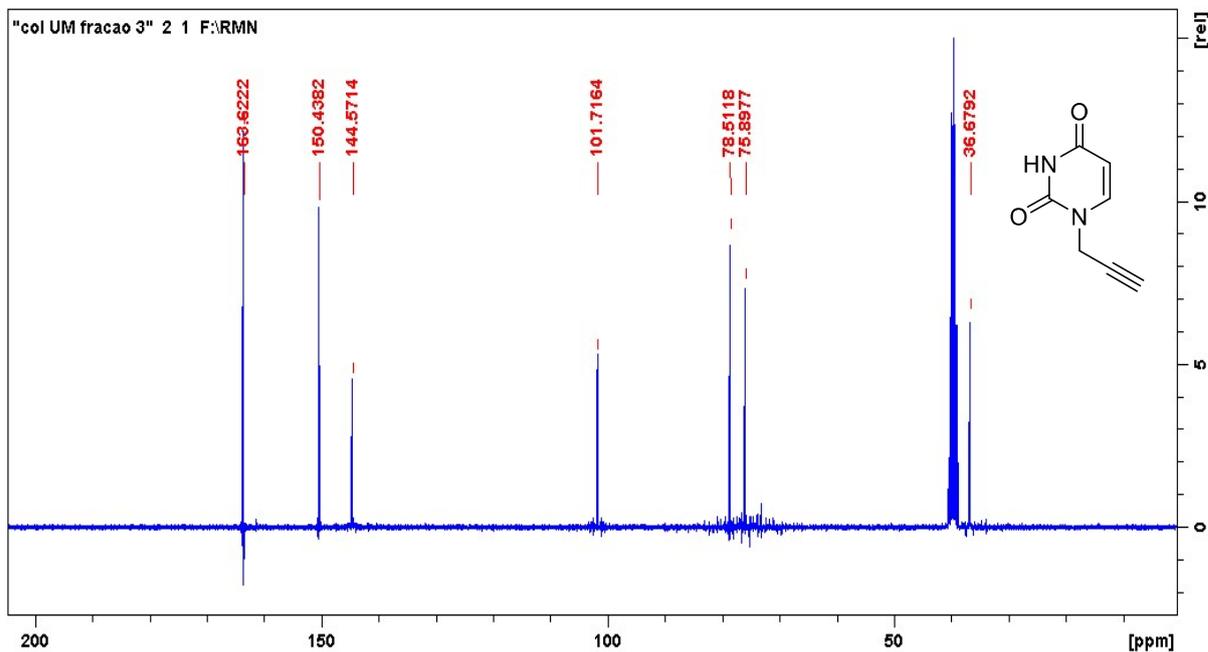


Figura 60. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 5-metil-1-(prop-2-in-1-il)pirimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (**6b**) em DMSO-d_6 .

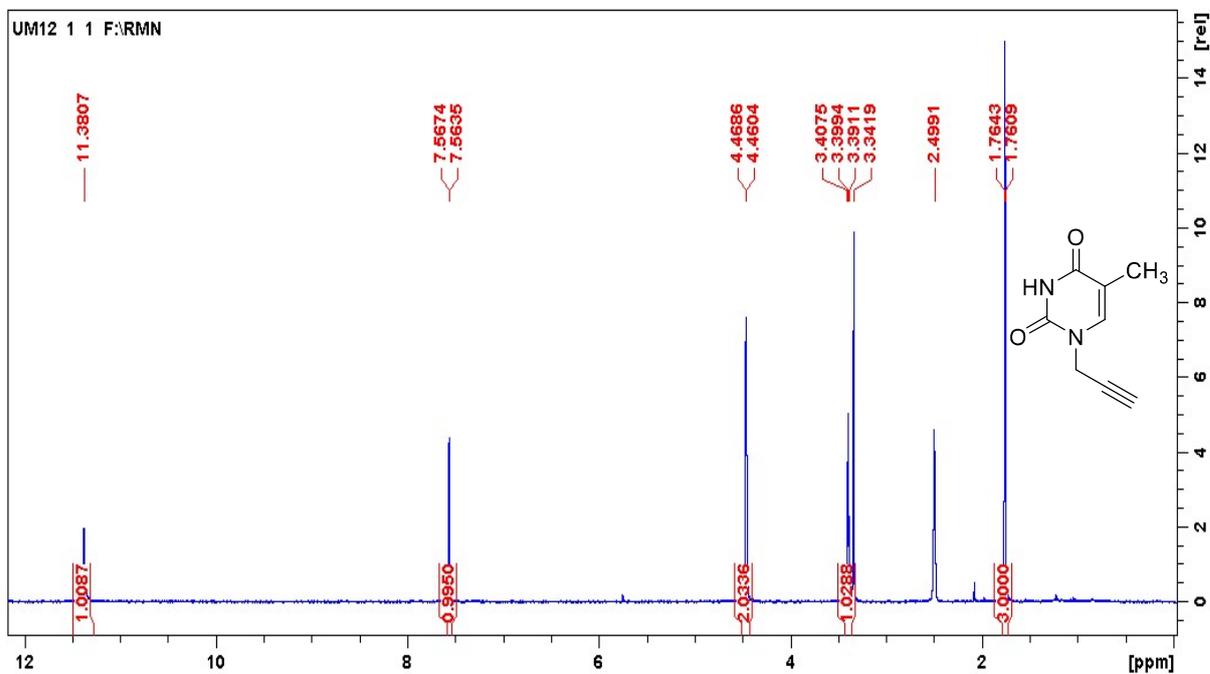


Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 5-metil-1-(prop-2-in-1-il)pirimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (**6b**) em DMSO- d_6 .

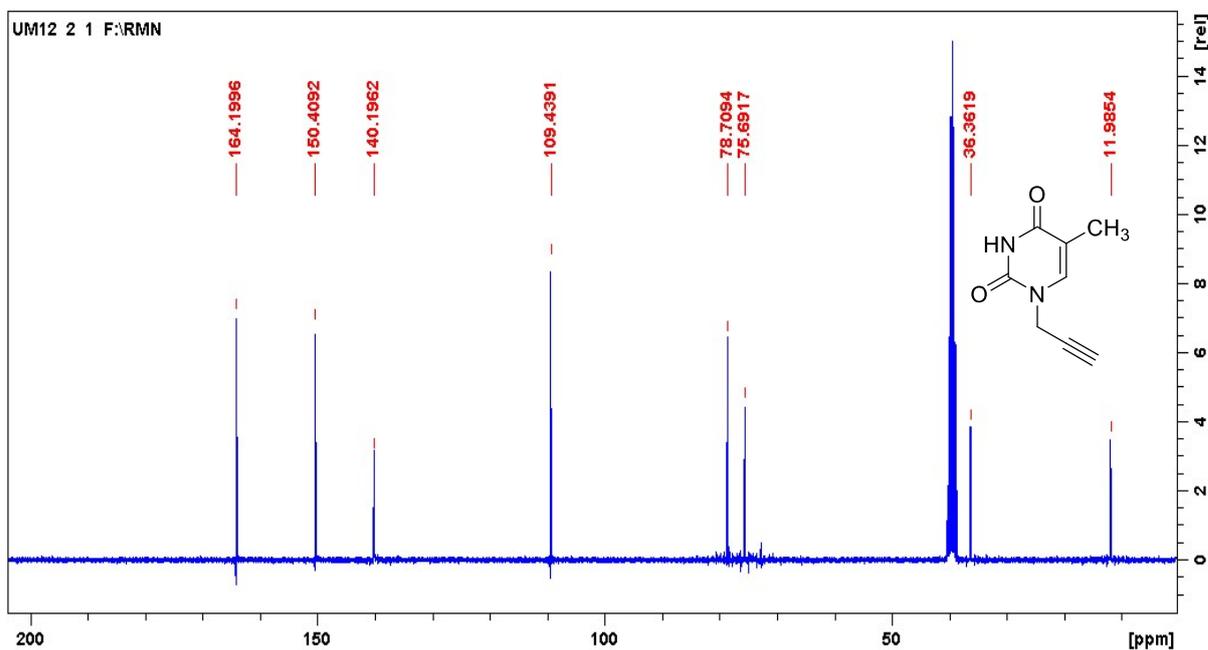


Figura 62. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 2-(prop-2-in-1-iltio)pirimidin-4(3*H*)-ona (**6c**) em DMSO- d_6 .

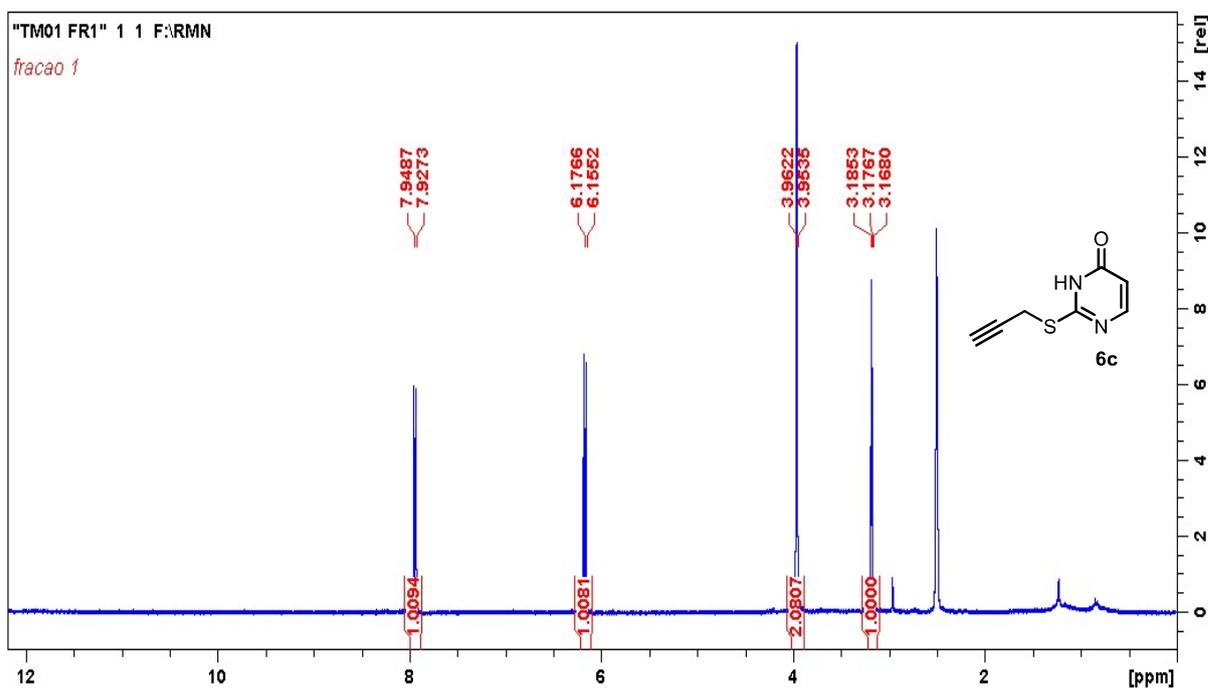


Figura 63. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 2-(prop-2-in-1-iltio)pirimidin-4(3H)-ona (**6c**) em DMSO-d_6 .

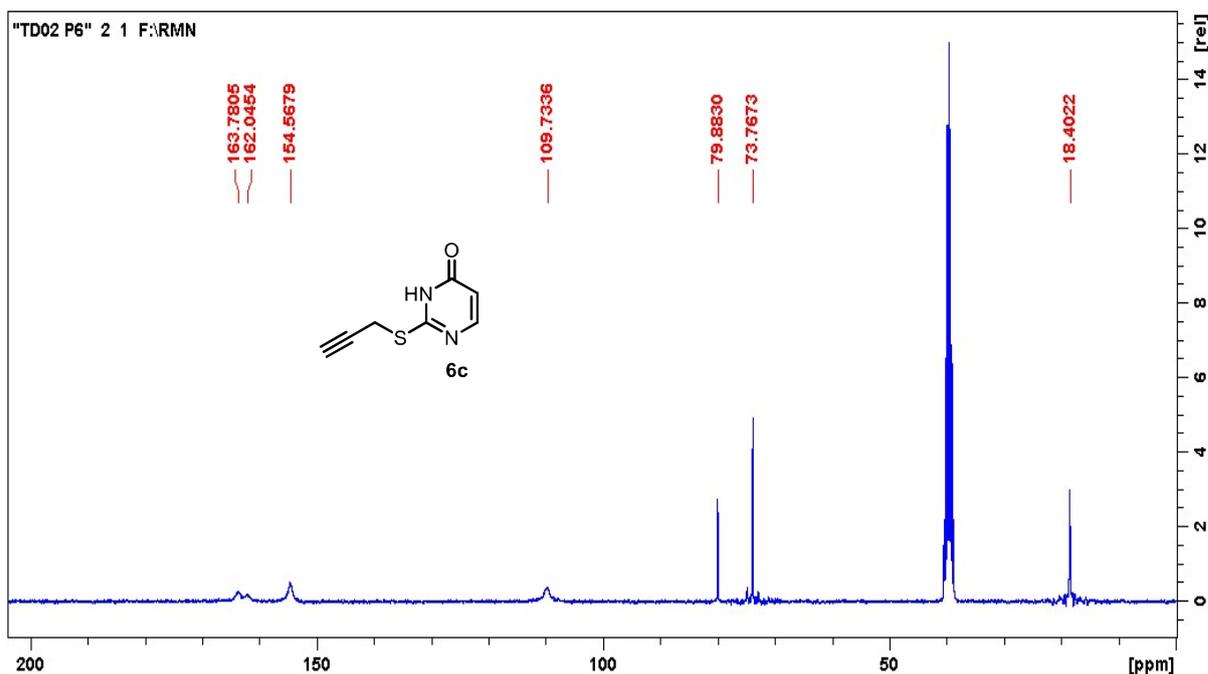


Figura 64. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 1,3-di-(prop-2-in-1-il)-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (**6d**) em CDCl_3 .

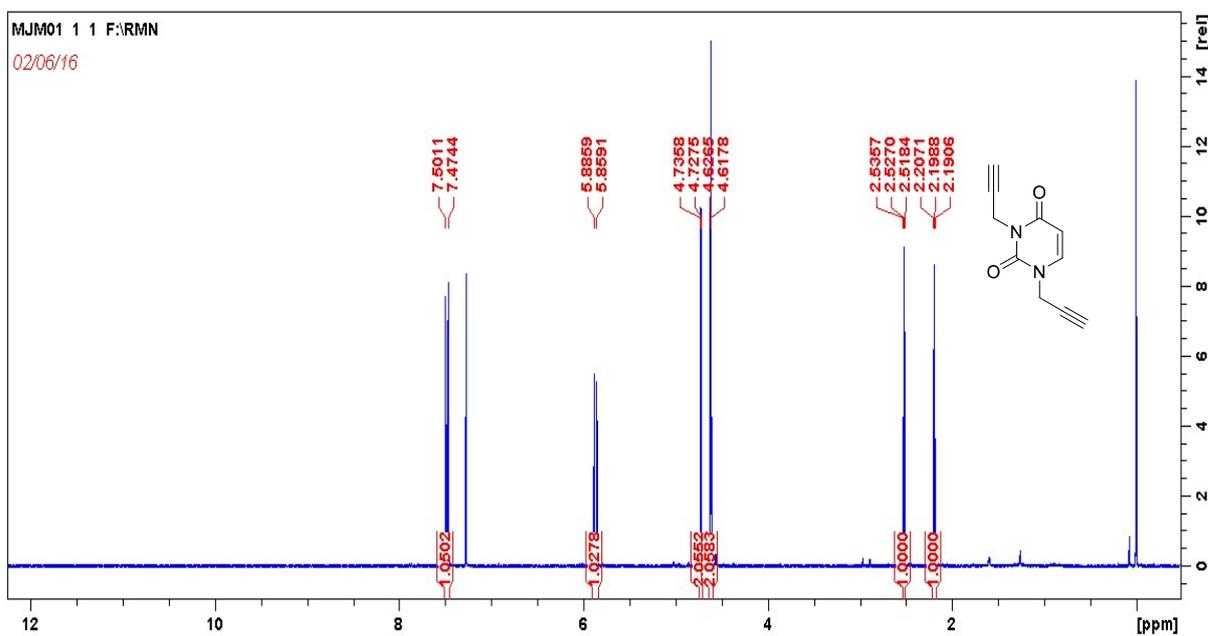


Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 1,3-di-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona (**6d**) em acetona- d_6 .

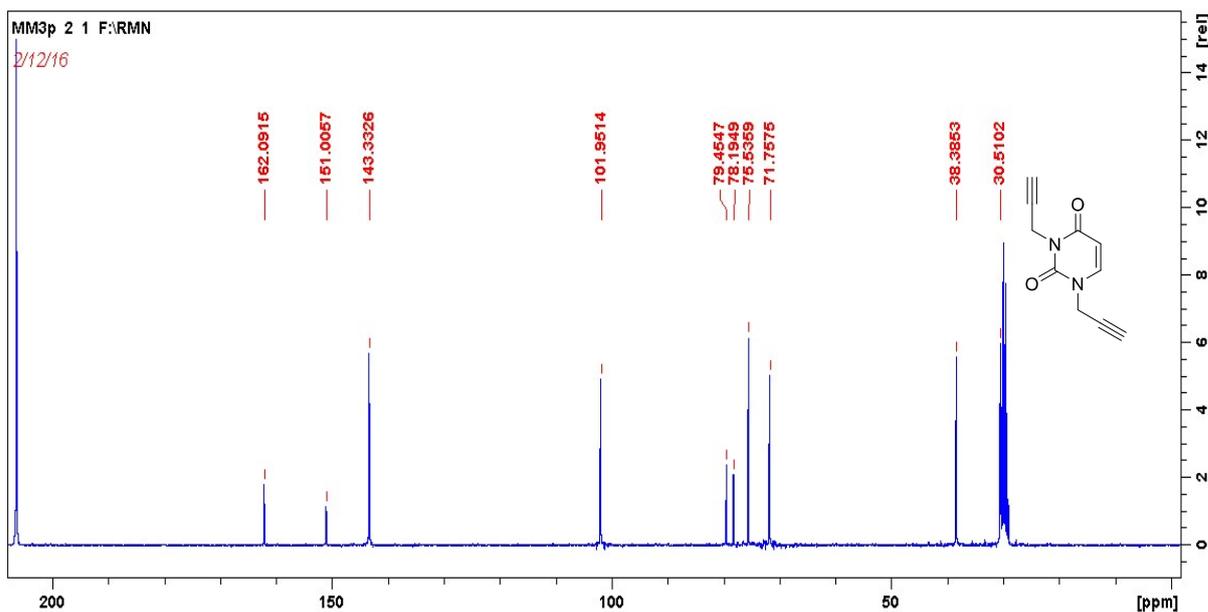


Figura 66. Espectro de RMN DEPT 135 a 75 MHz do composto 1,3-di-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona (**6d**) em acetona- d_6 .

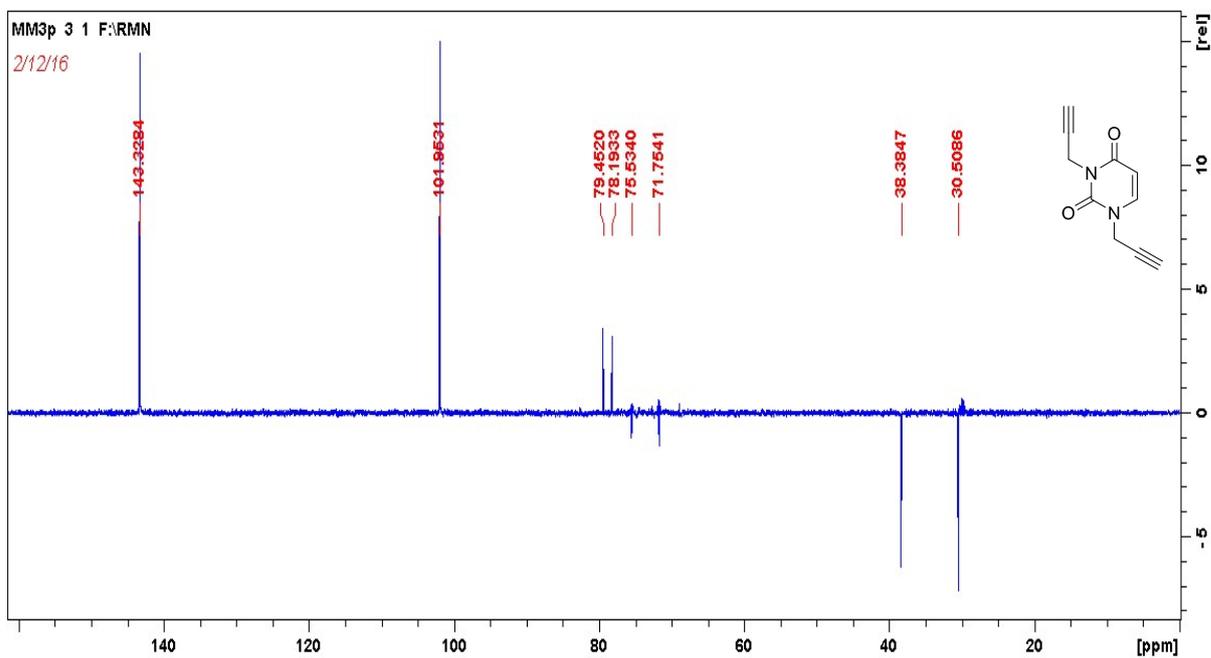


Figura 67. Espectro de RMN DEPT 90 a 75 MHz do composto 1,3-di-(prop-2-in-1-il)pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona (**6d**) em acetona- d_6 .

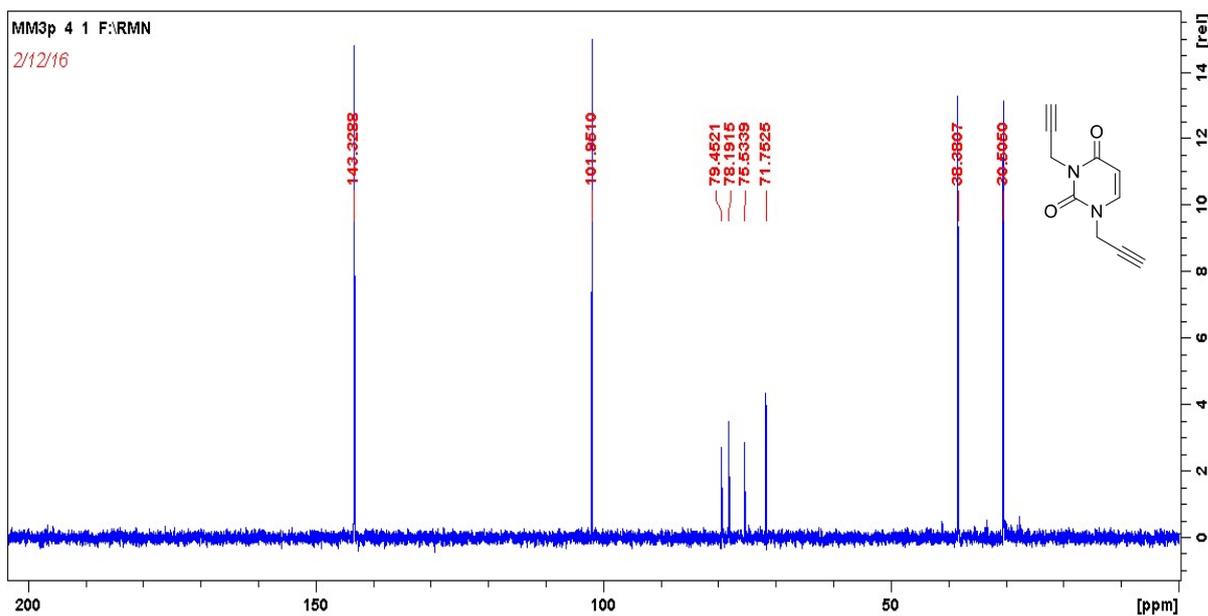


Figura 68. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 3,7-dimetil-1-propargil xantina (**6e**) em $\text{DMSO-}d_6$.

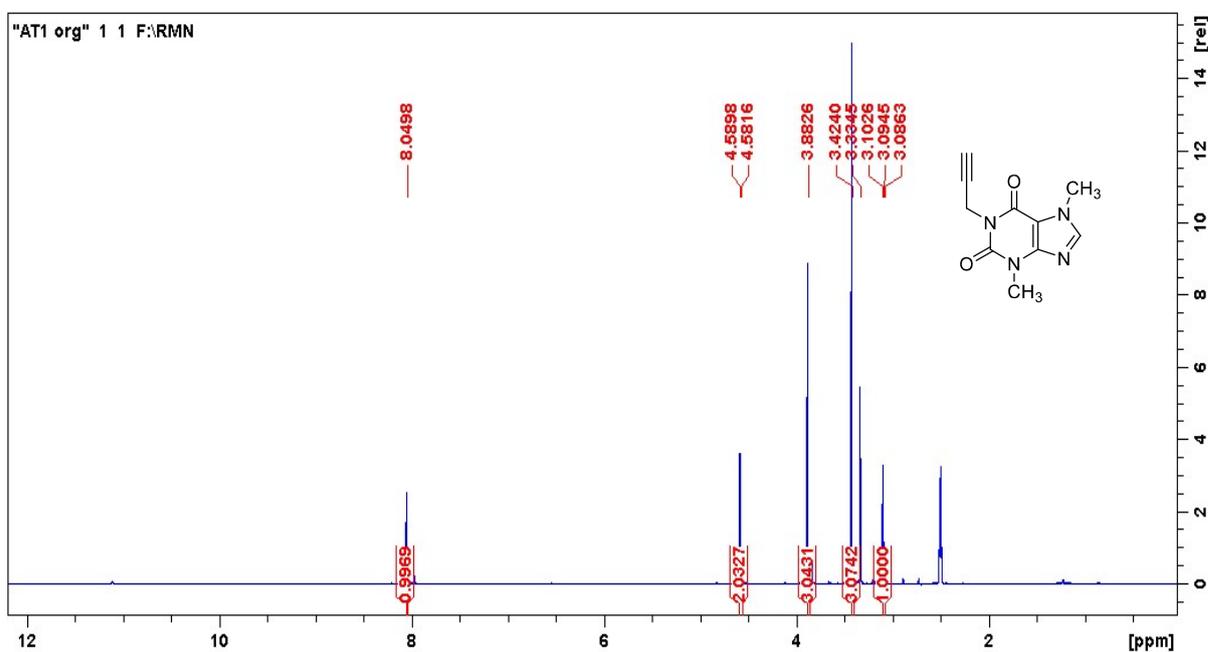


Figura 69. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 3,7-dimetil-1-propargil xantina (**6e**) em DMSO-d_6 .

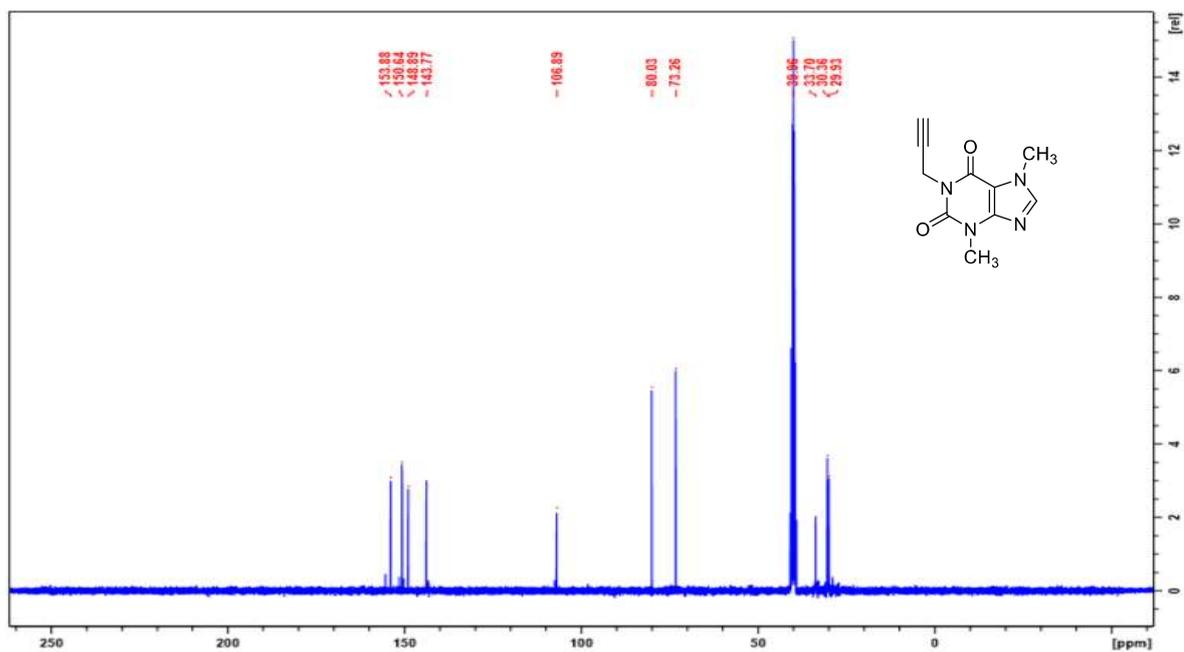


Figura 70. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(clorometil)-5,7-dihidroxi-2H-cromen-2-ona (**3e**) em acetona- d_6 .

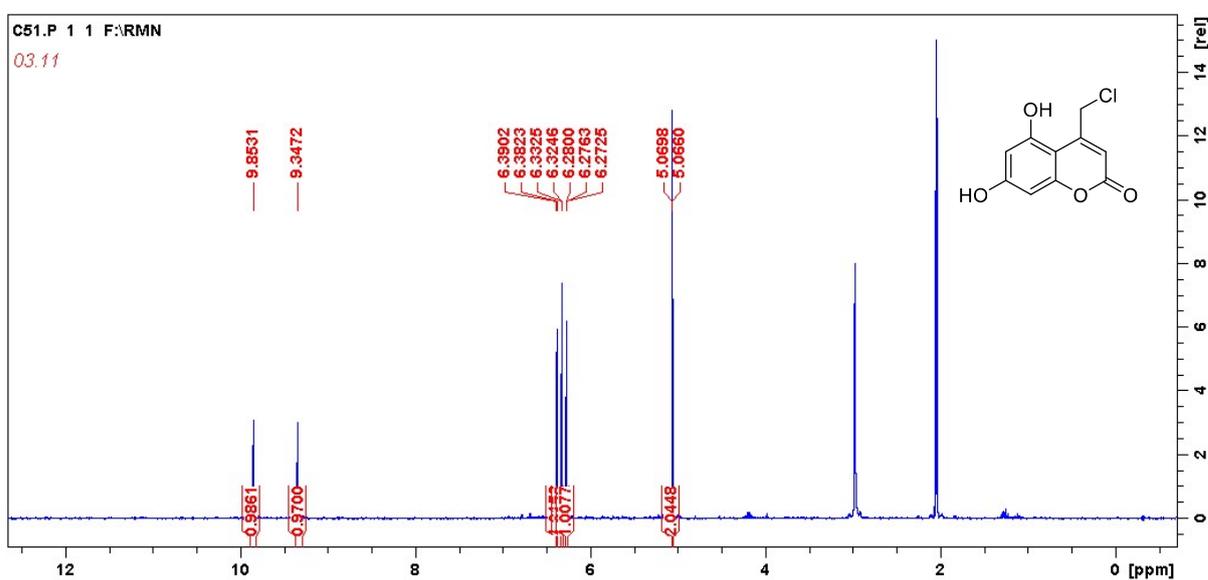


Figura 71. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(clorometil)-5,7-dihidroxi-2*H*-cromen-2-ona (**3e**) em acetona- d_6 .

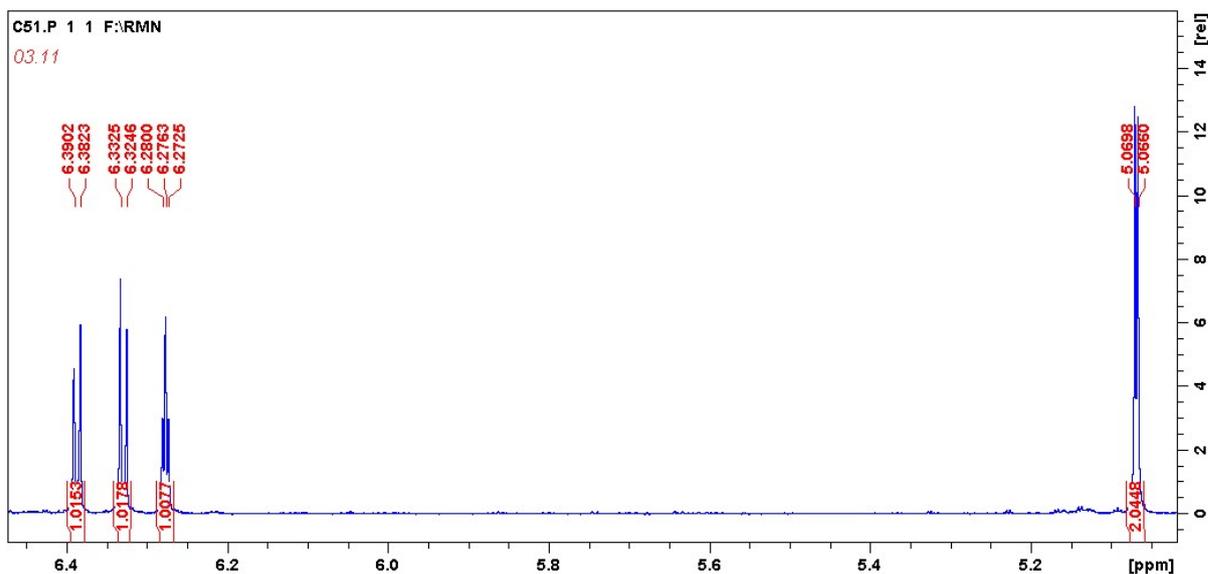


Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-5,7-dihidroxi-2*H*-cromen-2-ona (**3e**) em DMSO-d_6 .

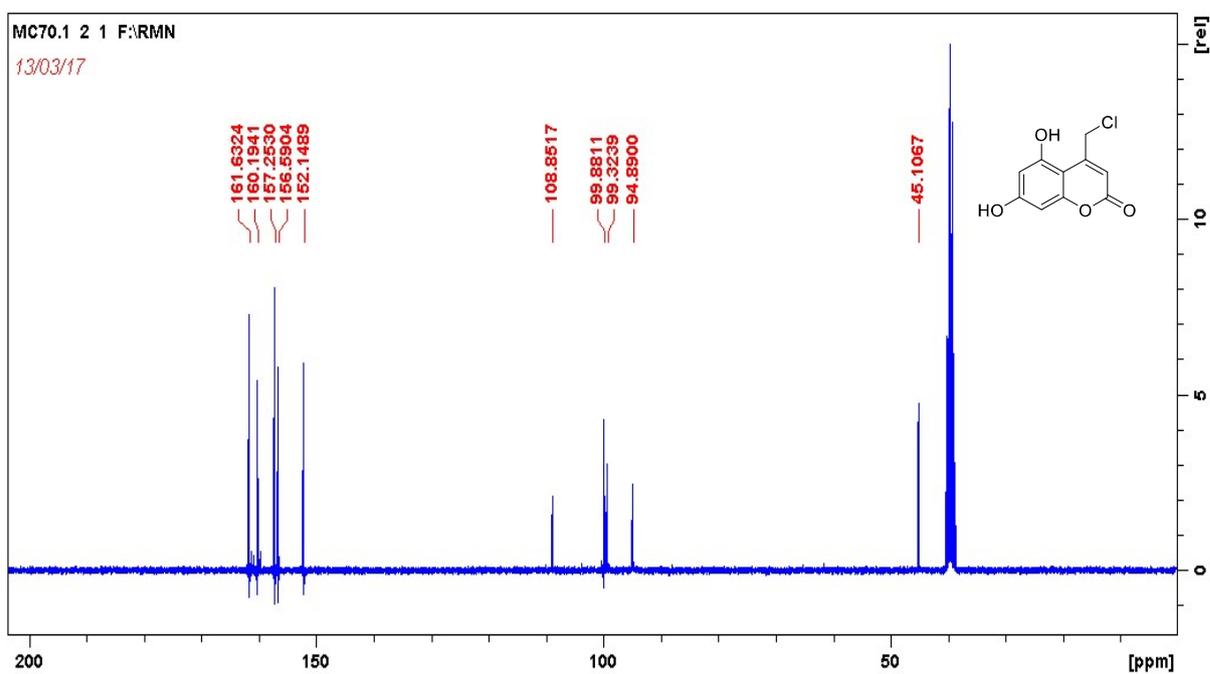


Figura 73. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(clorometil)-7-hidroxi-2*H*-cromen-2-ona (**3d**) em DMSO-d_6 .

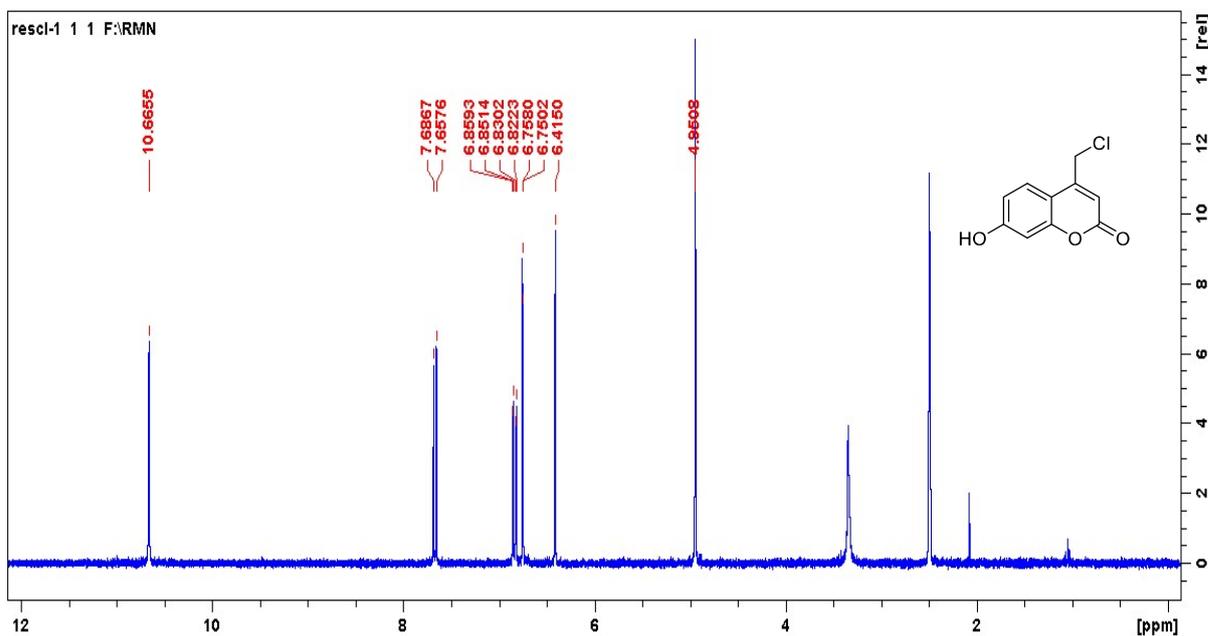


Figura 74. Expansão espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(clorometil)-7-hidroxi-2*H*-cromen-2-ona (**3d**) em DMSO-d_6 .

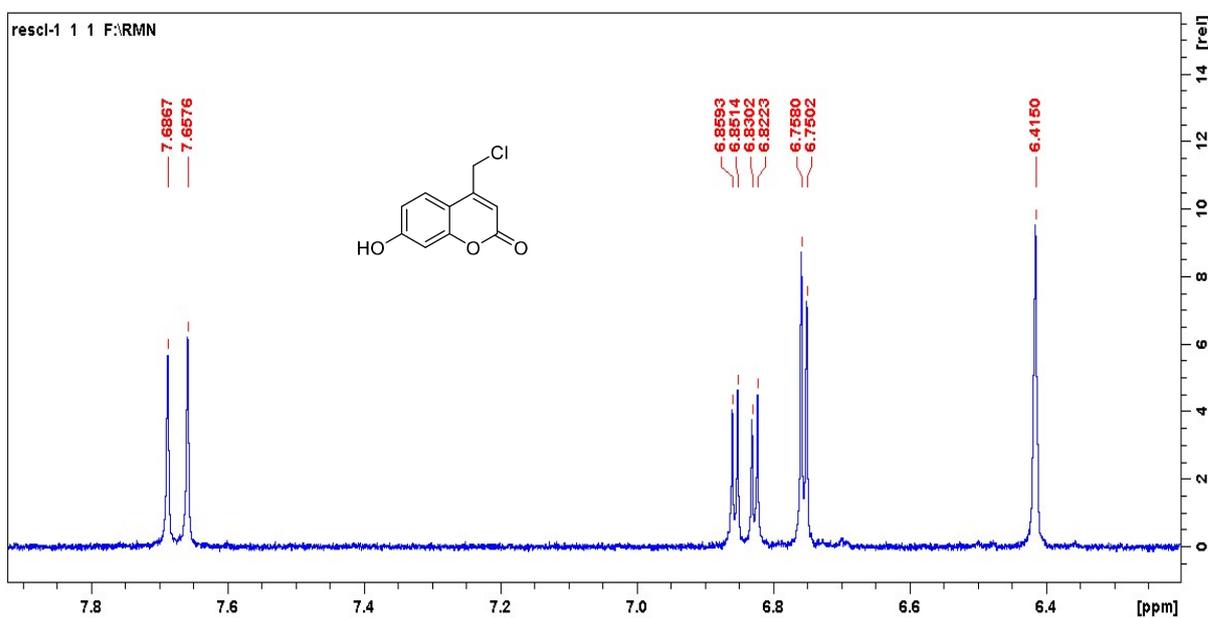


Figura 75. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-7-hidroxi-2*H*-cromen-2-ona (**3d**) em DMSO-d_6 .

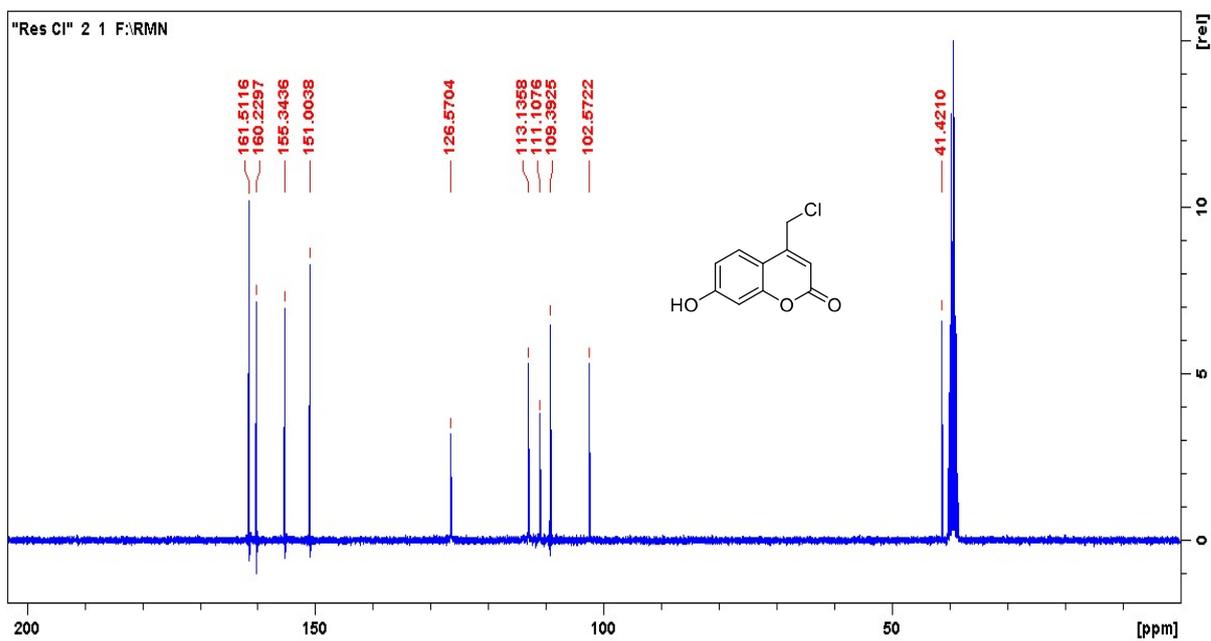


Figura 76. Expansão espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-7-hidroxi-2*H*-cromen-2-ona (**3d**) em DMSO-d_6 .

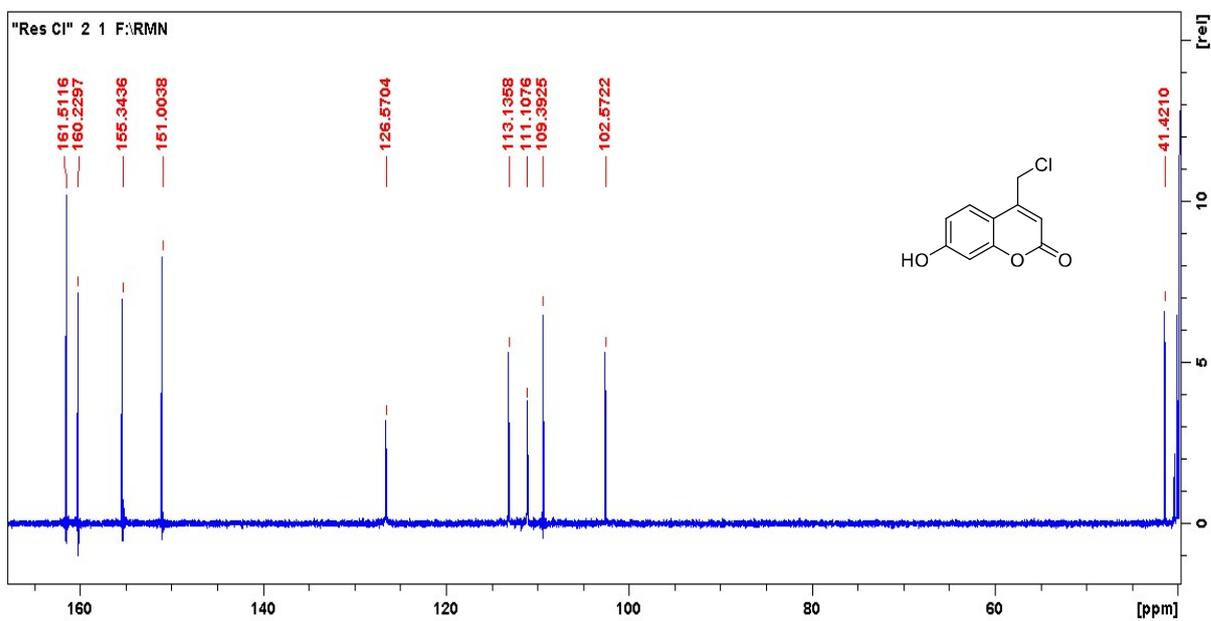


Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C a 300 MHz do composto 4-(chlorometil)-2*H*-benzo[*h*]cromen-2-ona (**3g**) em DMSO-d_6 .

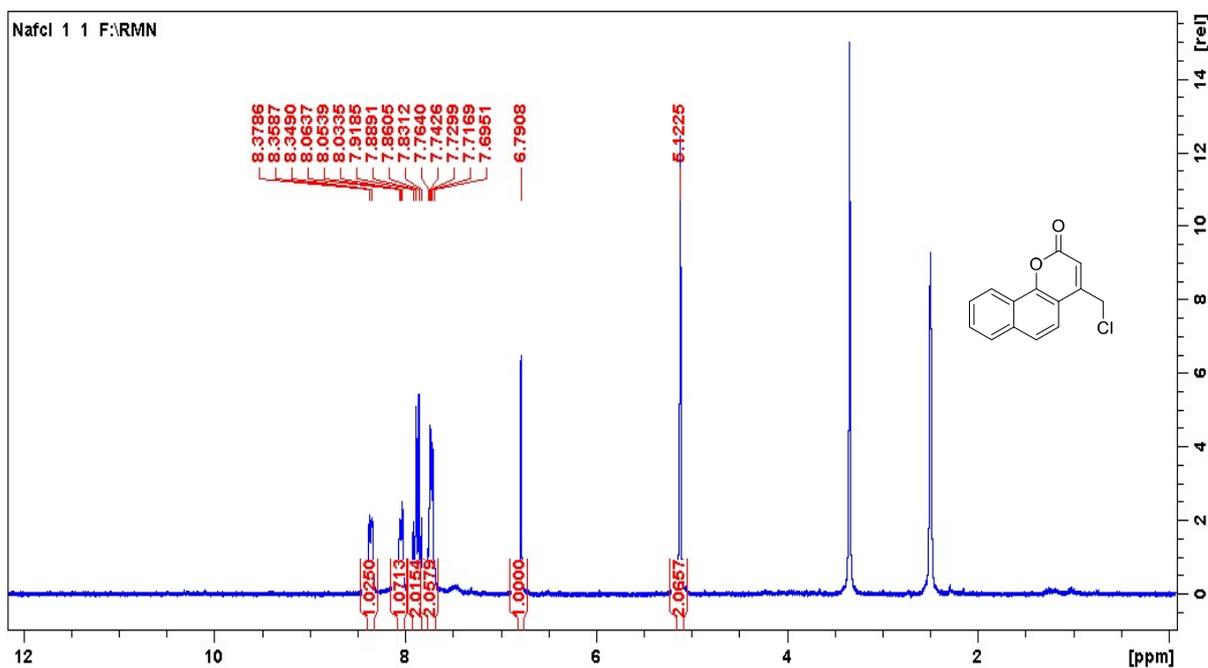


Figura 78. Expansão espectro de RMN de ^{13}C a 300 MHz do composto 4-(chlorometil)-2*H*-benzo[*h*]cromen-2-ona (**3g**) em DMSO-d_6 .

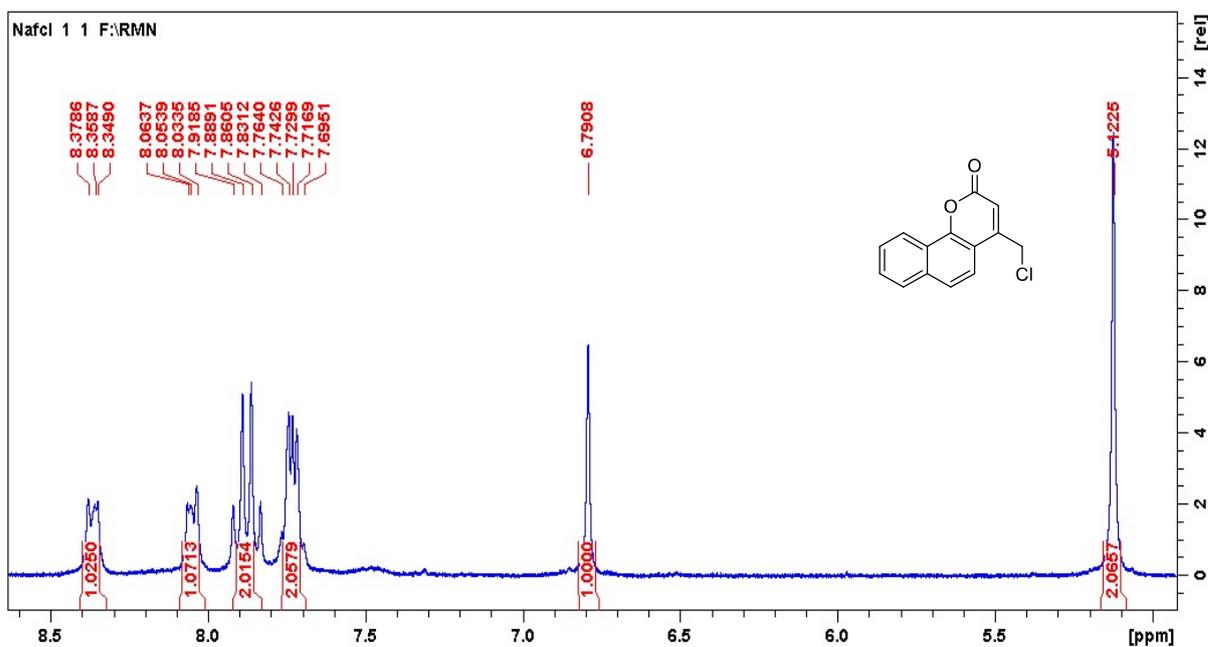


Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-2*H*-benzo[*h*]cromen-2-ona (**3g**) em DMSO-d_6 .

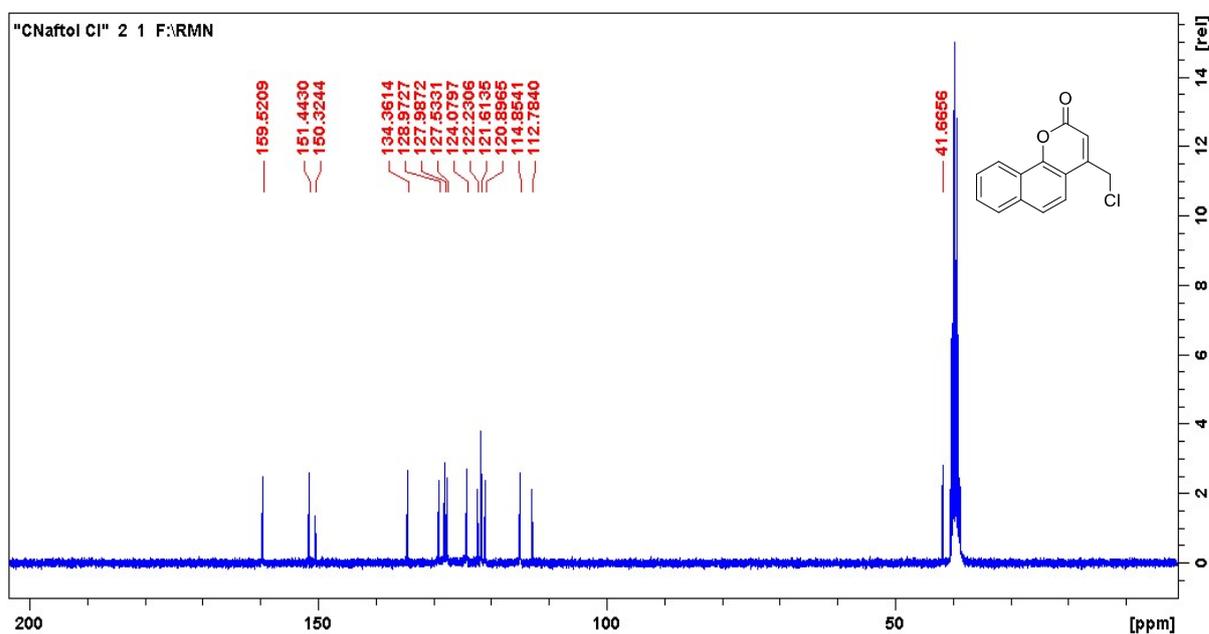


Figura 80. Expansão espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-2*H*-benzo[*h*]cromen-2-ona (**3g**) em DMSO-d_6 .

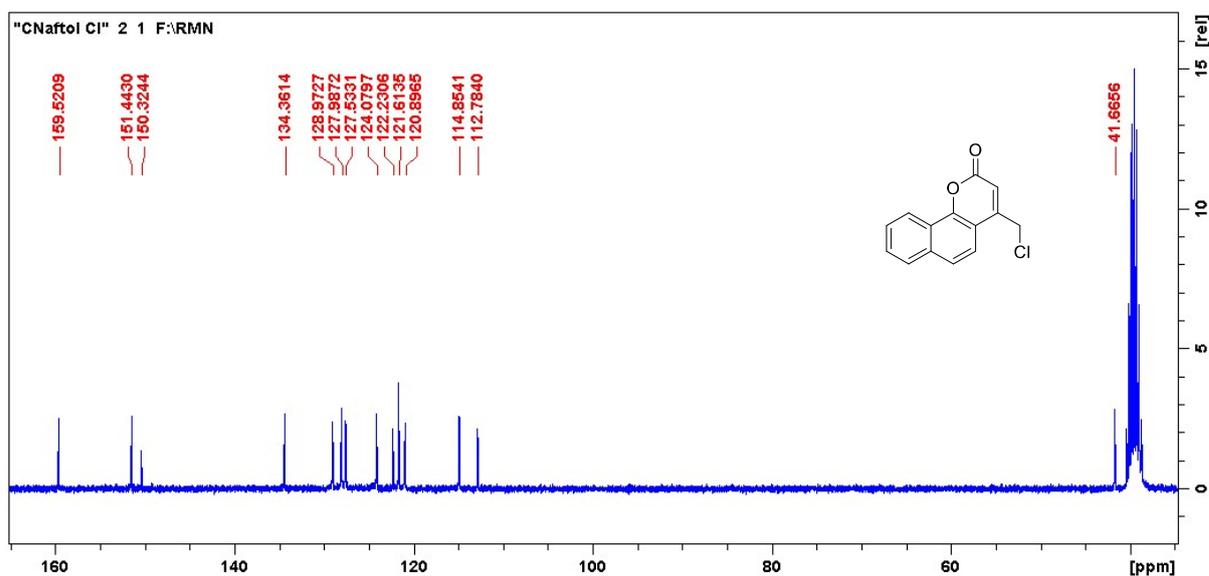


Figura 81. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(clorometil)-7-metóxi-2H-cromen-2-ona (**3h**) em DMSO-d_6 .

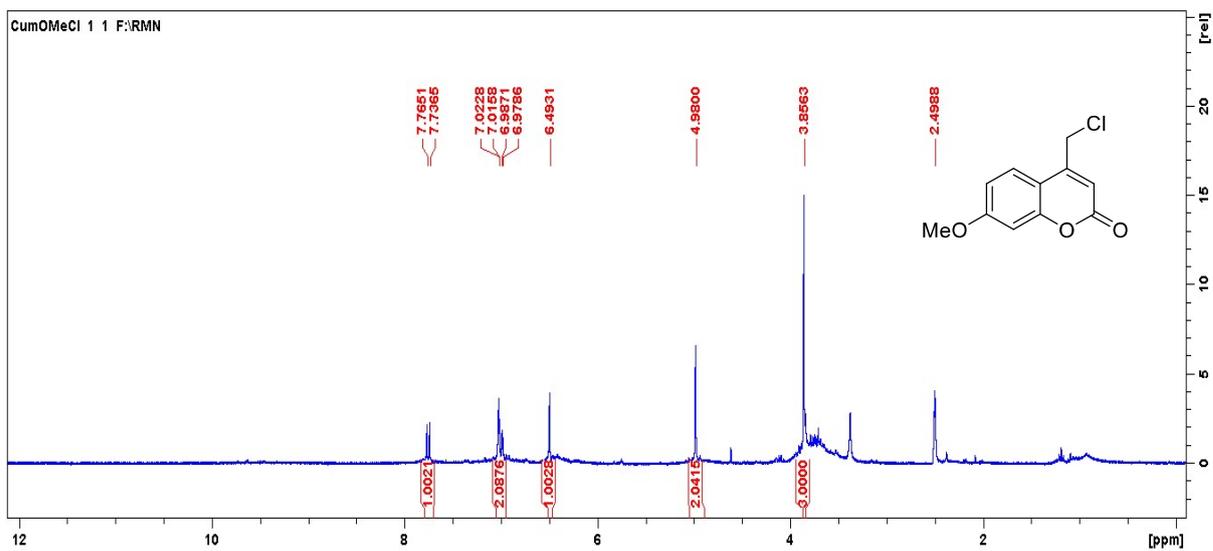


Figura 82. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-7-metóxi-2H-cromen-2-ona (**3h**) em DMSO-d_6 .

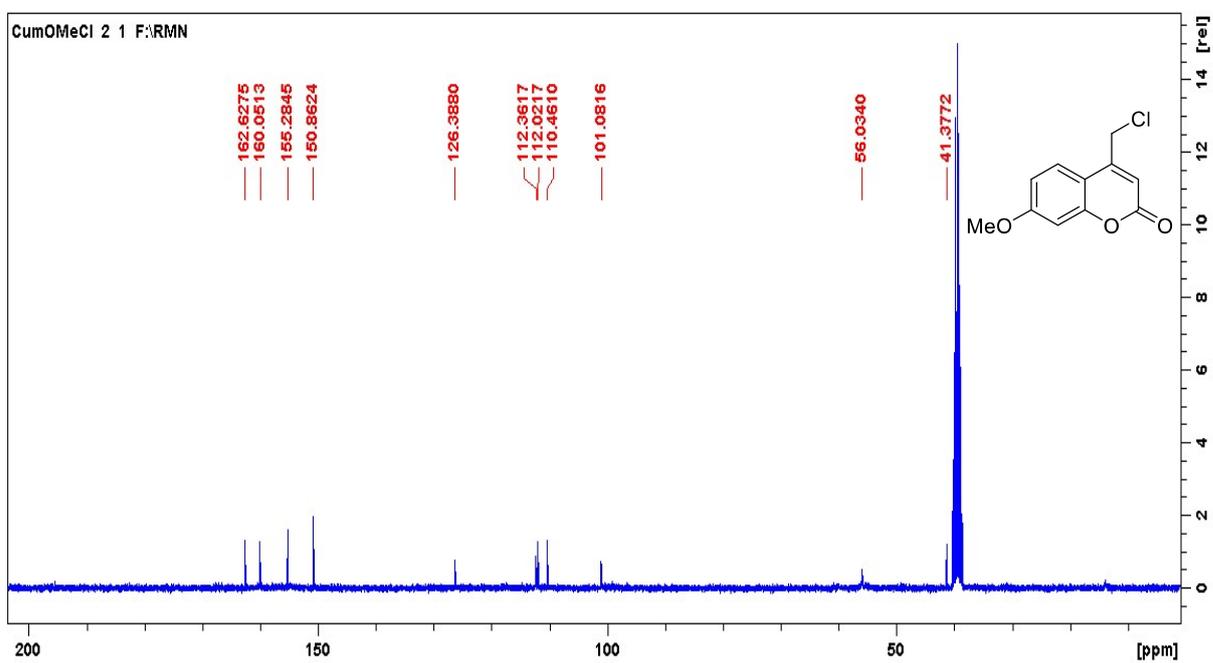


Figura 83. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(clorometil)-7-metóxi-2H-cromen-2-ona (**3h**) em DMSO-d_6 .

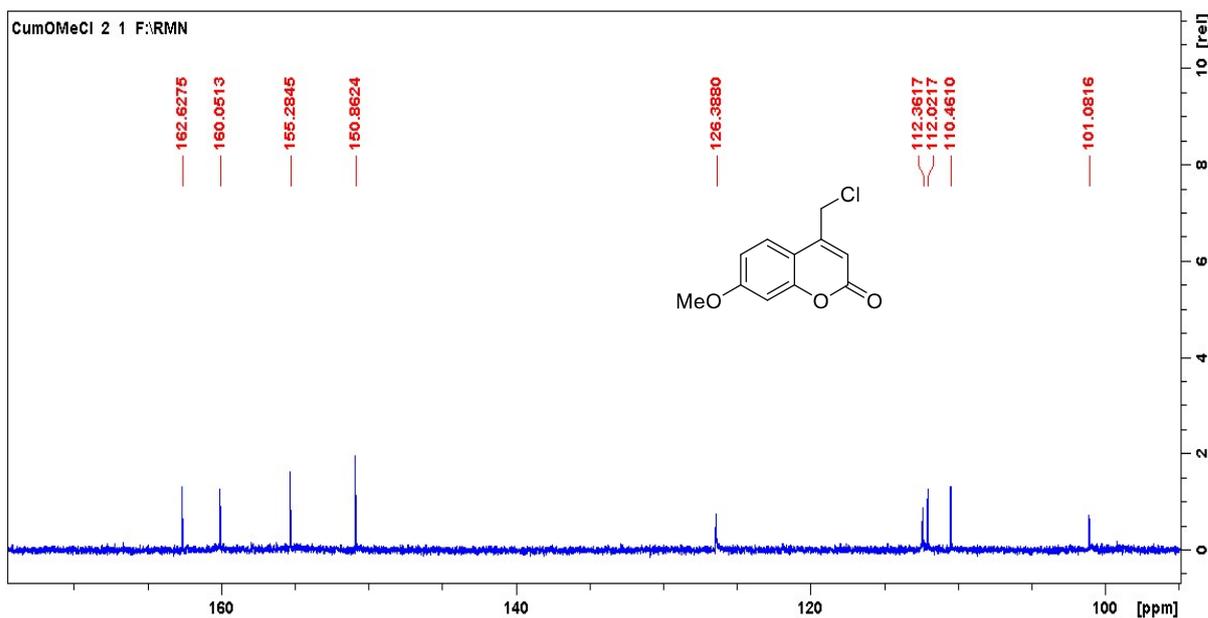


Figura 84. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(azidometil)-5,7-dihidroxi-2H-cromen-2-ona (**4b**) em DMSO-d_6 .

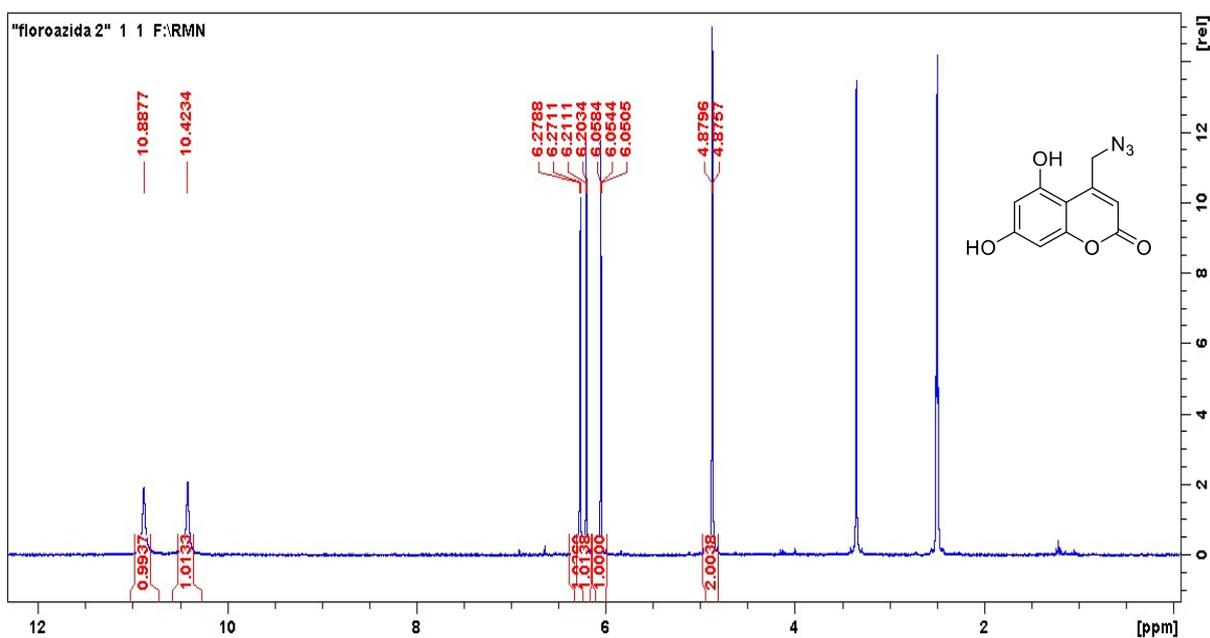


Figura 85. Expansão espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do composto 4-(azidometil)-5,7-dihidroxi-2*H*-cromen-2-ona (**4a**) em DMSO-d_6 .

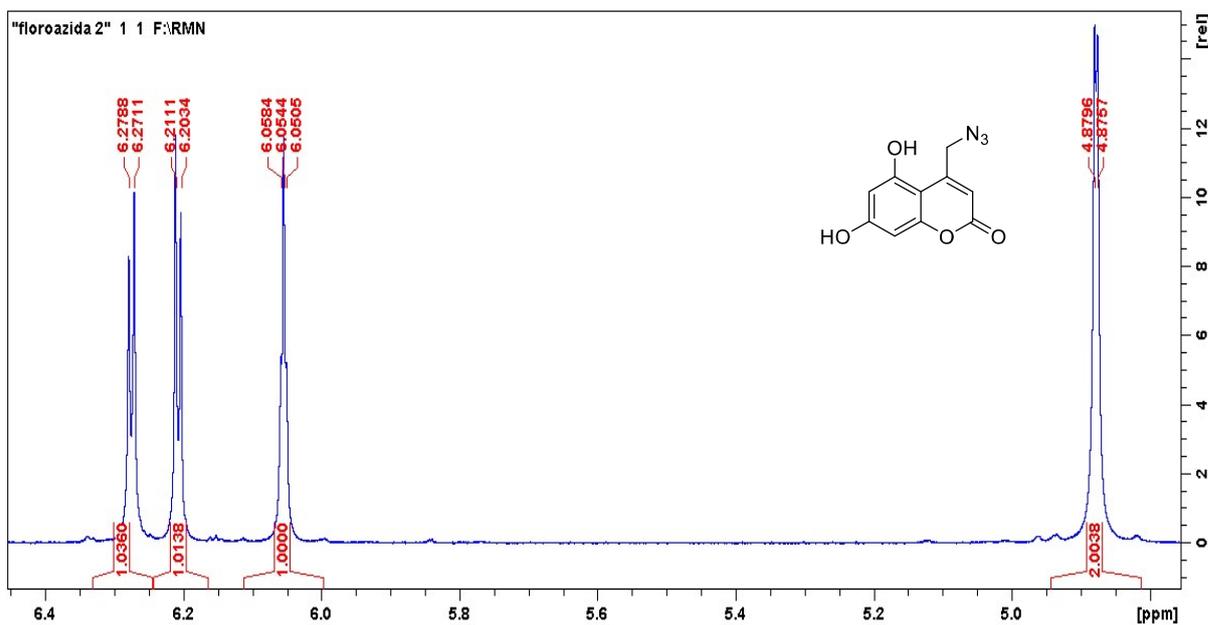


Figura 86. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(azidometil)-5,7-dihidroxi-2*H*-cromen-2-ona (**4a**) em DMSO-d_6 .

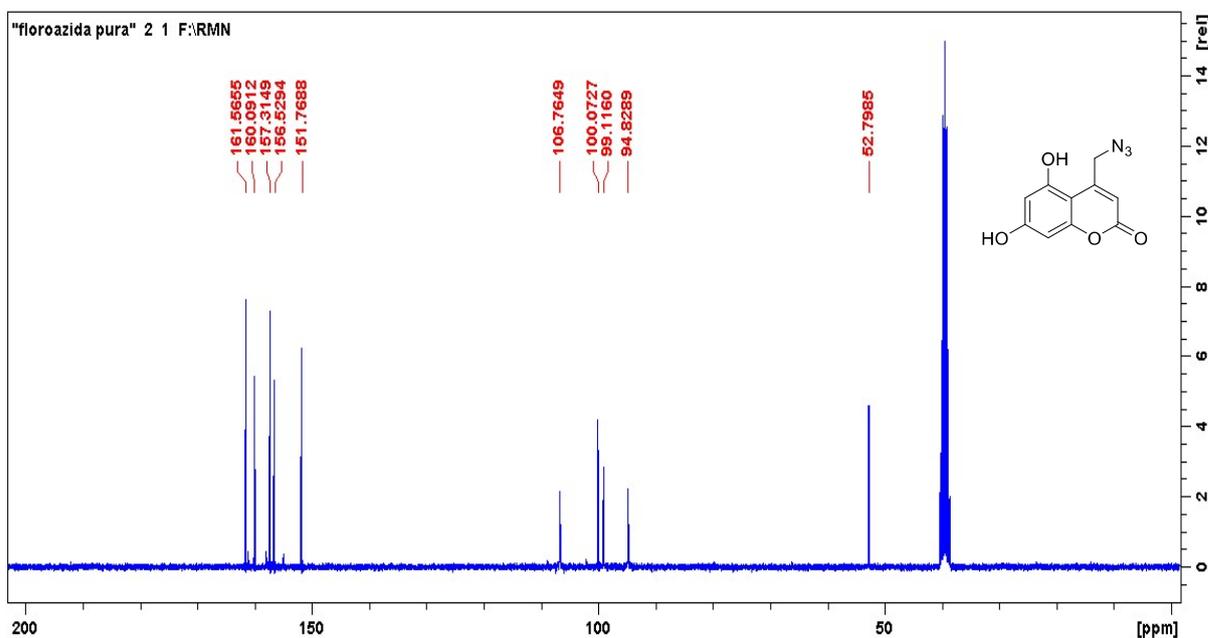


Figura 87. Expansão espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do composto 4-(azidometil)-5,7-dihidroxi-2*H*-cromen-2-ona (**4a**) em DMSO- d_6 .

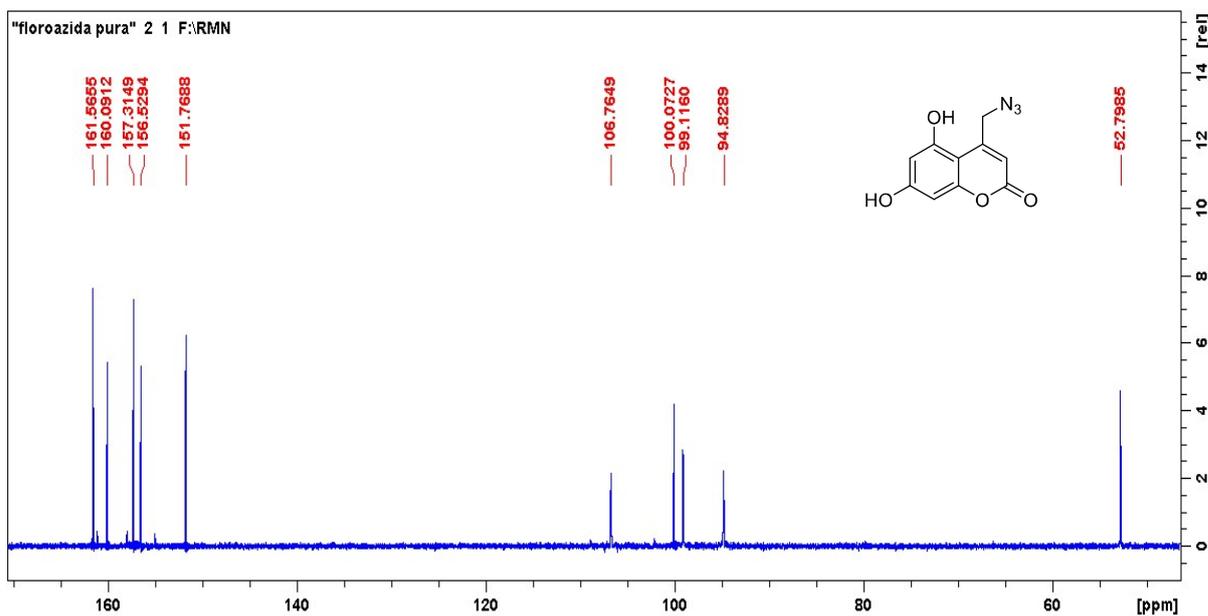


Figura 88. Espectro de RMN de ^{13}C a 300 MHz do composto 4-(azidometil)-2*H*-benzo[*h*]cromen-2-ona (**4b**) em DMSO- d_6 .

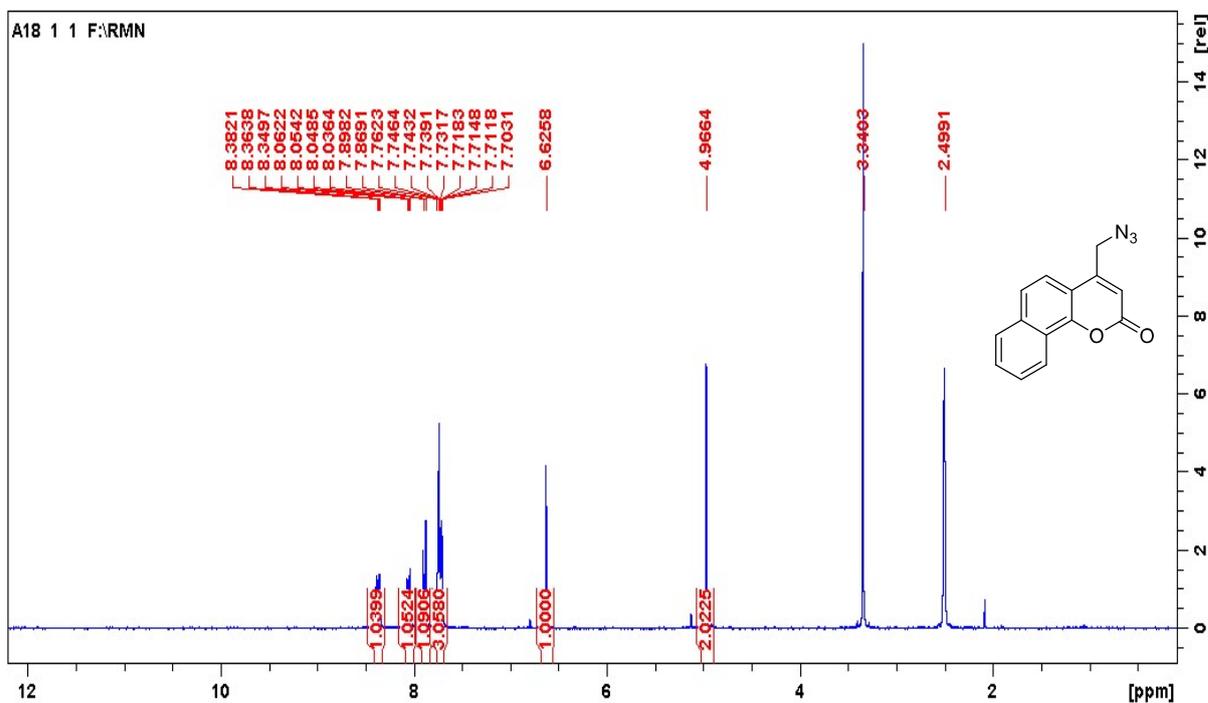


Figura 89. Espectro de RMN de ^1H a 75 MHz do composto 4-(azidometil)-2*H*-benzo[*h*]cromen-2-ona (**4b**) em DMSO- d_6 .

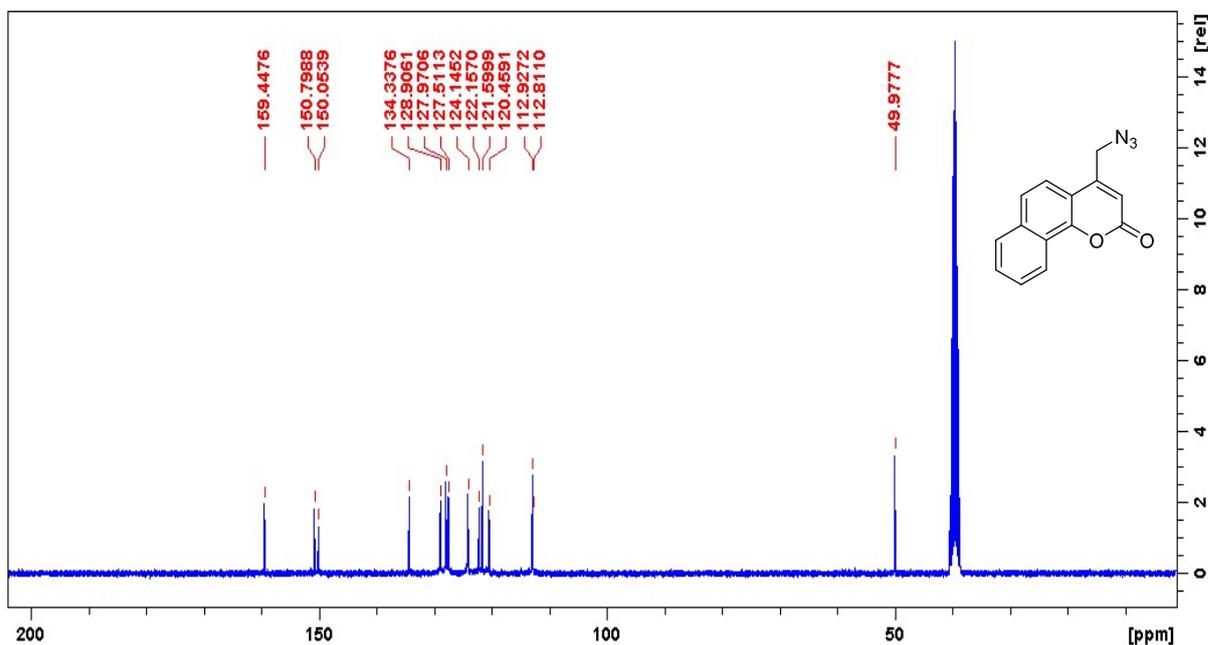


Figura 90. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona **7a** em DMSO- d_6 .

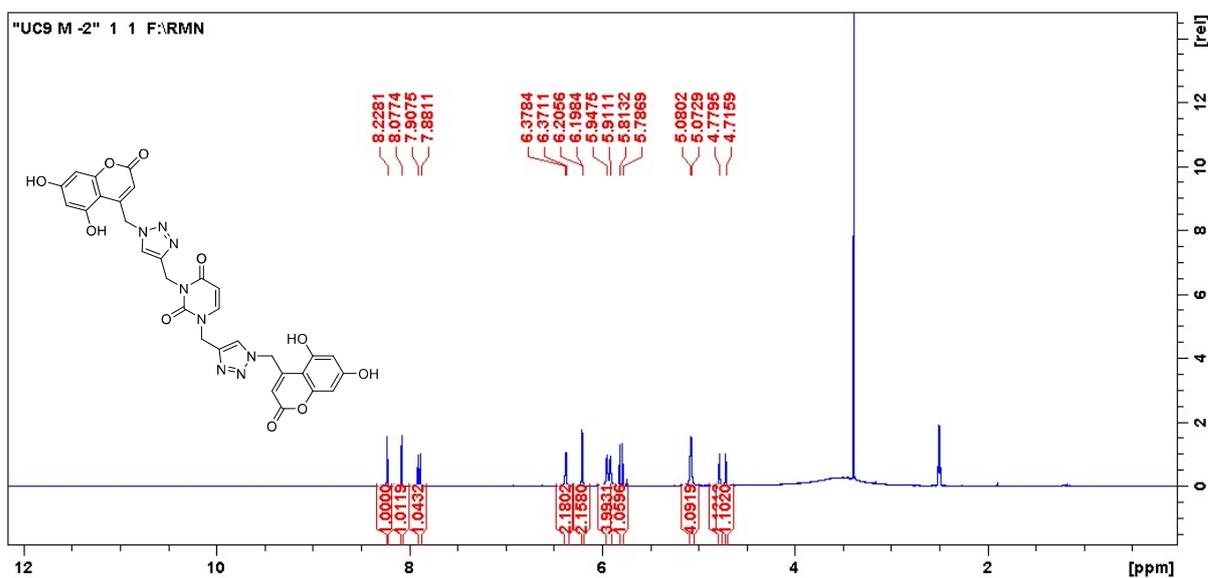


Figura 91. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona **7a** em DMSO-d_6 .

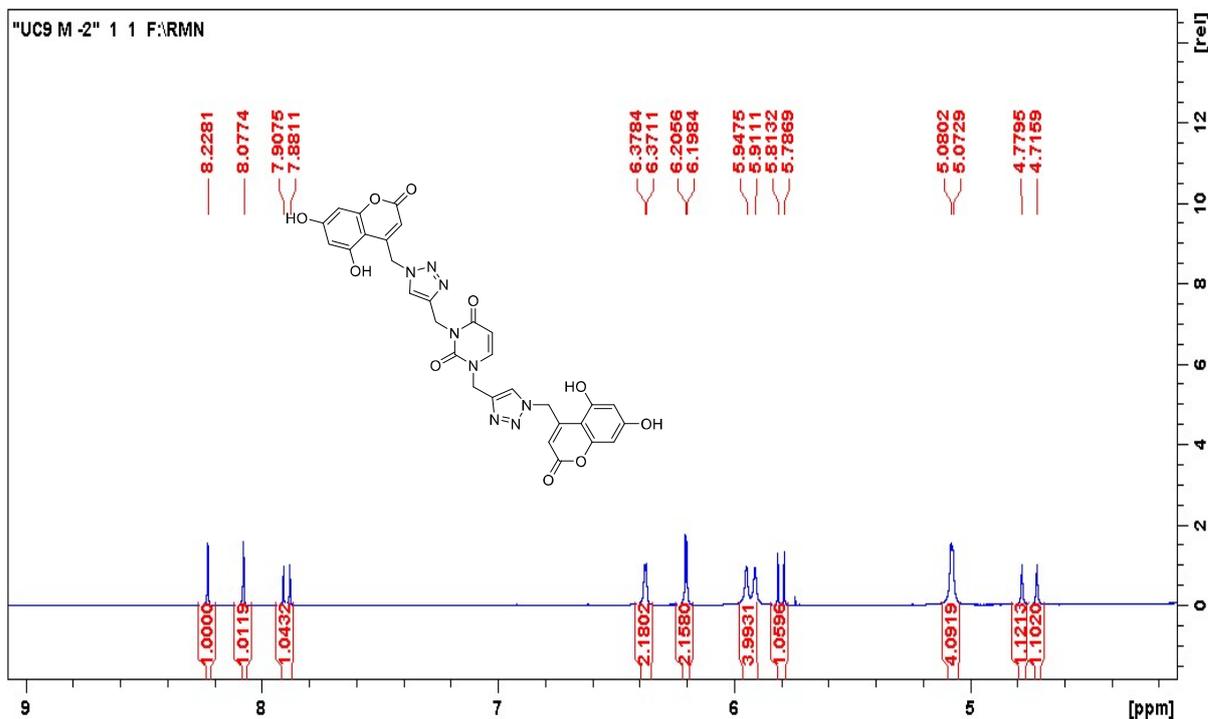


Figura 92. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona **7a** em DMSO-d_6 com supressão do sinal referente à água.

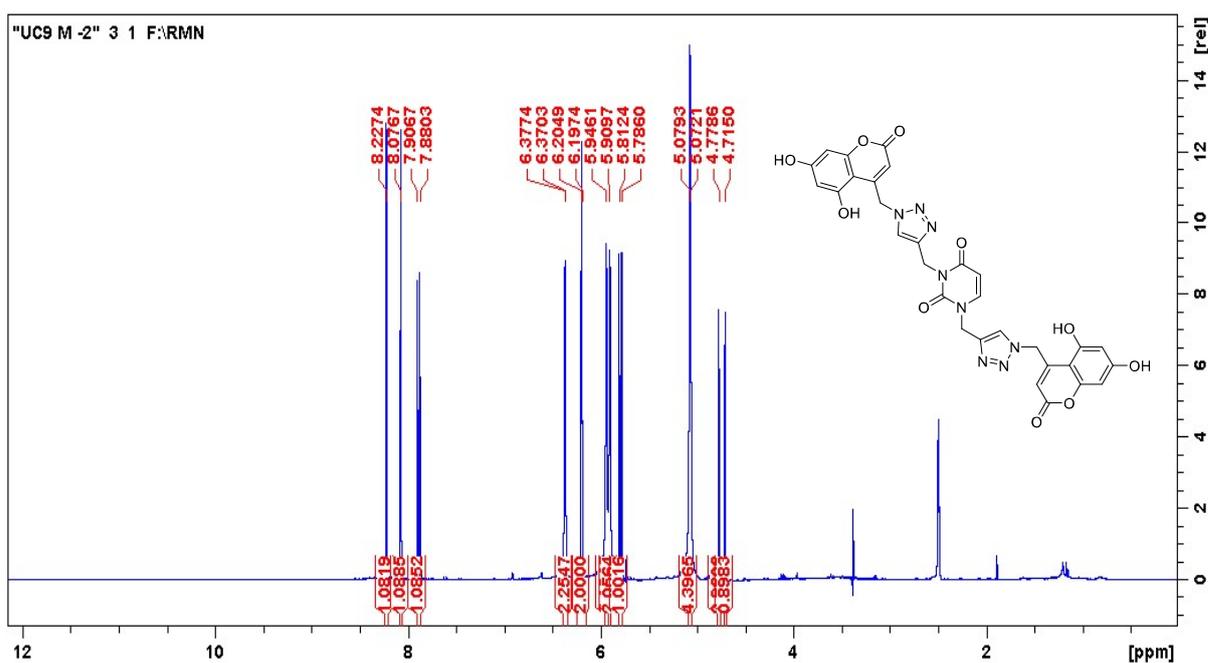


Figura 93. Expansão do Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona **7a** em DMSO-d_6 com supressão do sinal referente à água.

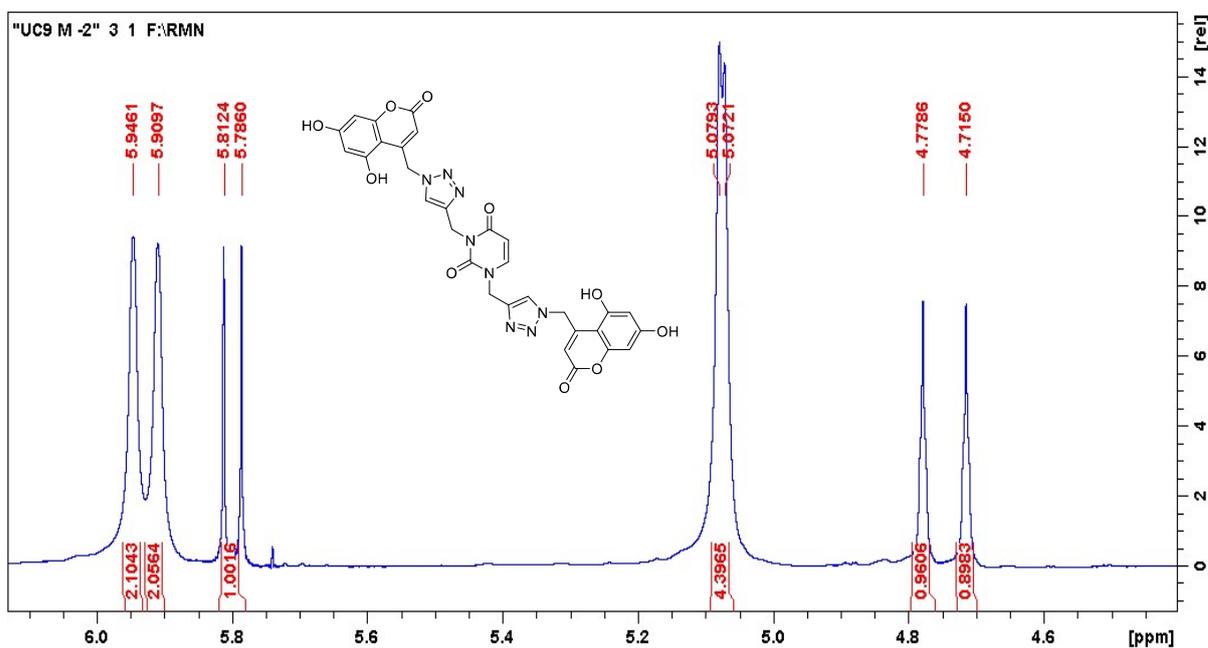


Figura 94. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona **7a** em DMSO-d_6 com supressão do sinal referente à água.

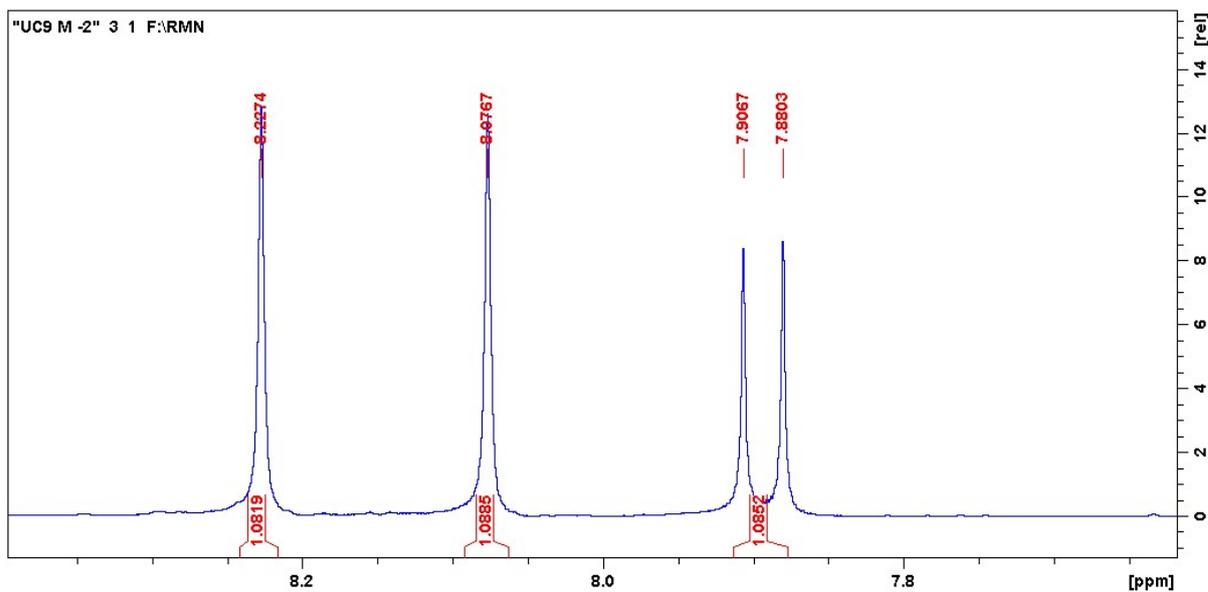


Figura 95. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona **7a** em DMSO-d_6 .

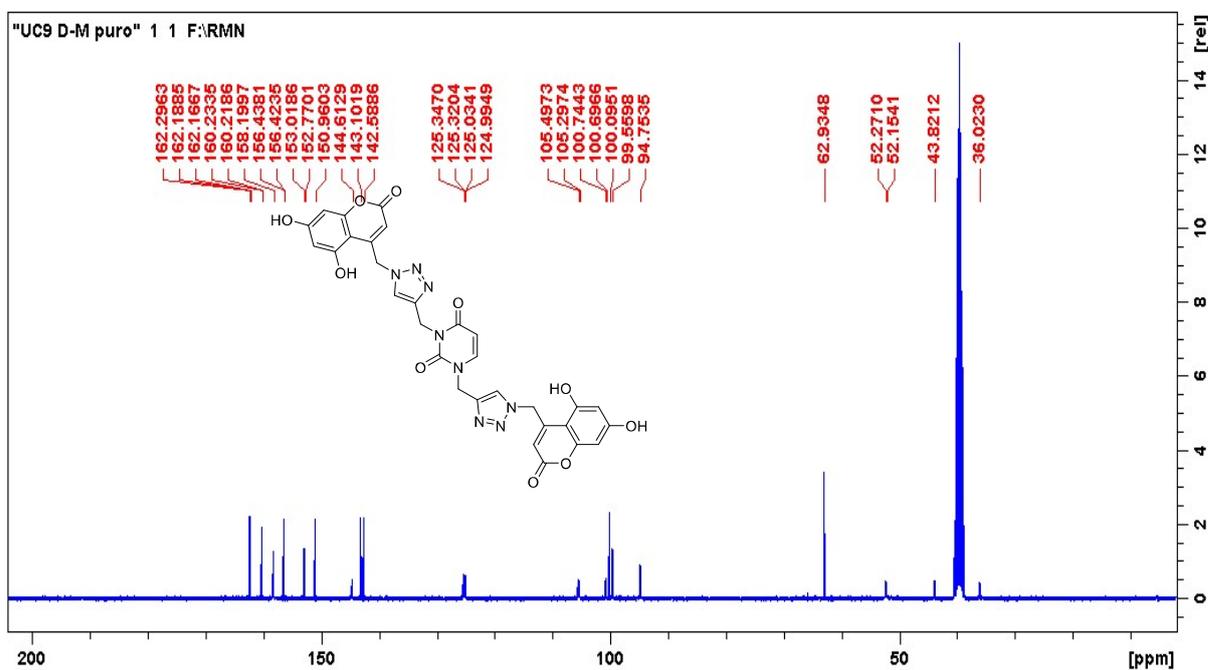


Figura 96. Espectro de RMN de 2D – COSY a 75 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-di-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1H,3H)-diona **7a** em DMSO-d_6 .

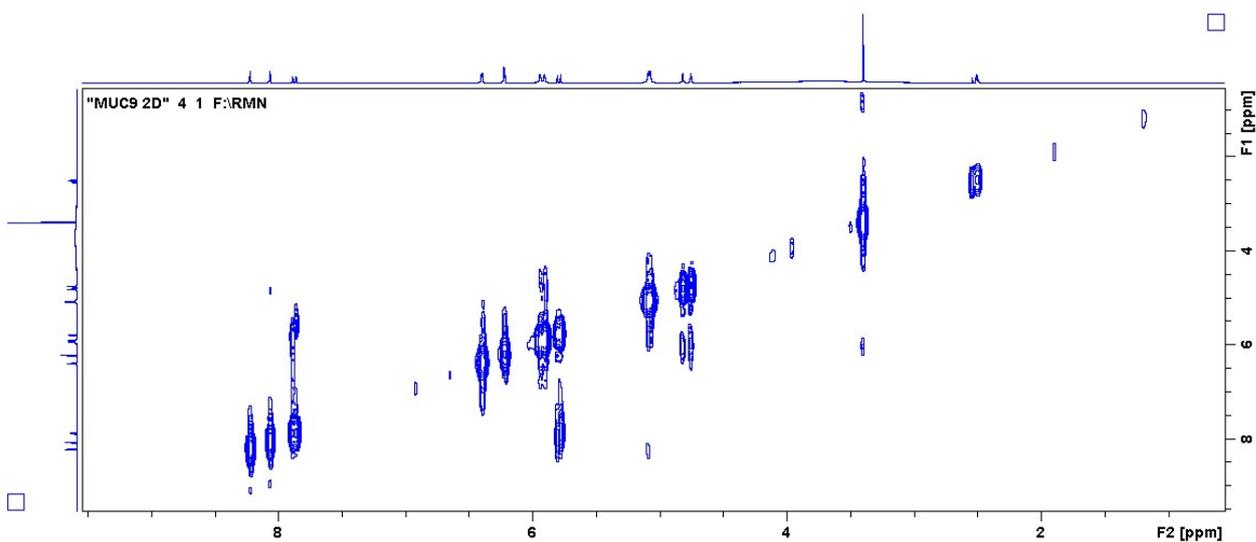


Figura 97. Espectro de RMN de 2D – HMQC a 75 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona **7a** em DMSO- d_6 .

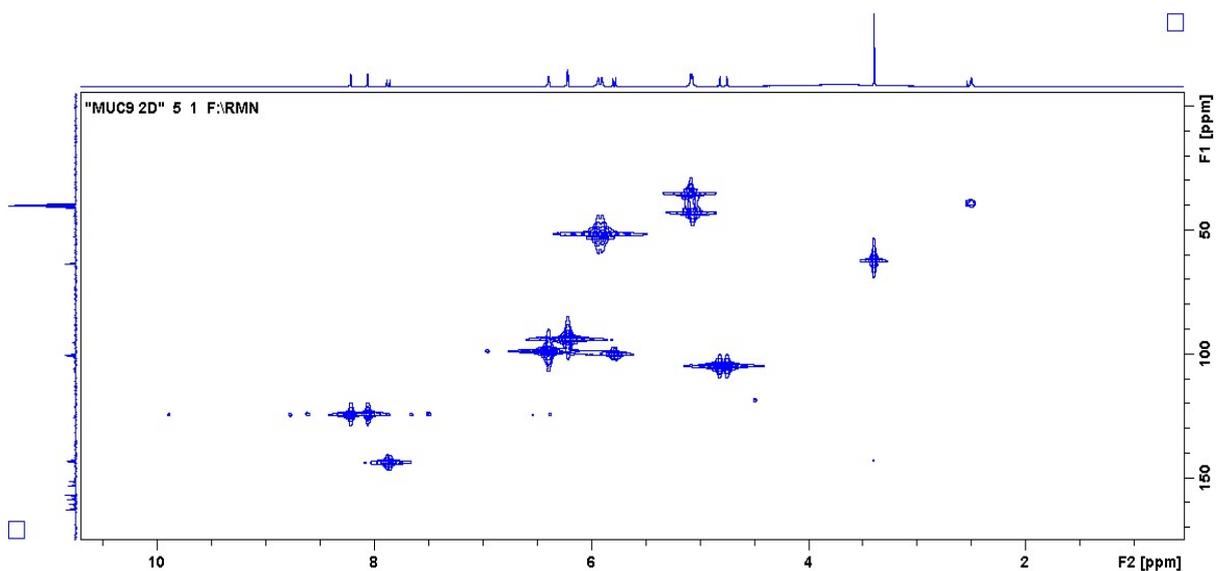


Figura 98. Espectro de RMN de 2D – HMBC a 75 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona **7a** em DMSO- d_6 .

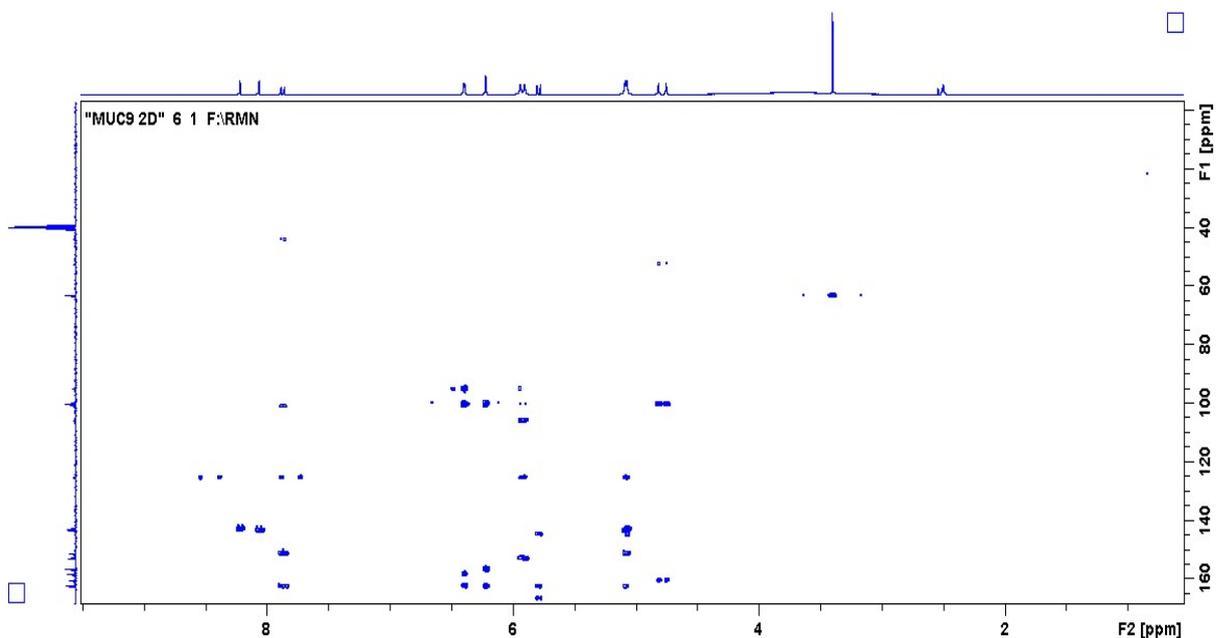


Figura 99. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((2-oxo-2*H*-benzo[*h*]cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona **7b** em DMSO-d_6 .

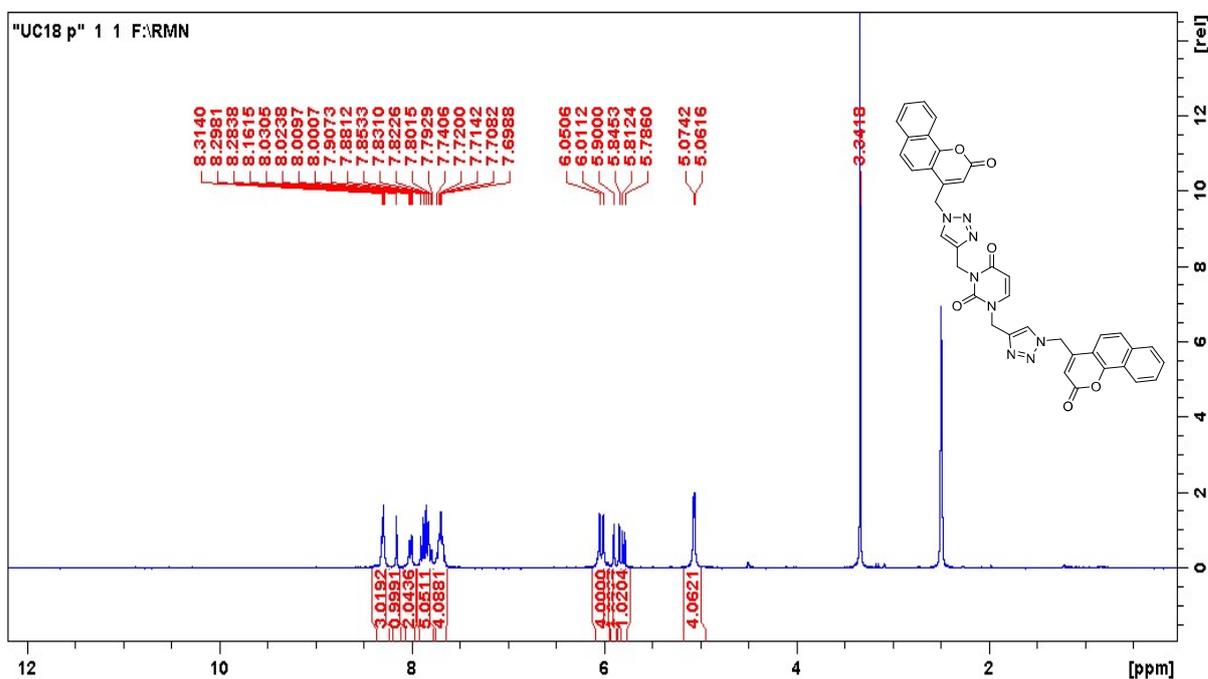


Figura 100. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((2-oxo-2*H*-benzo[*h*]cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona **7b** em DMSO-d_6 .

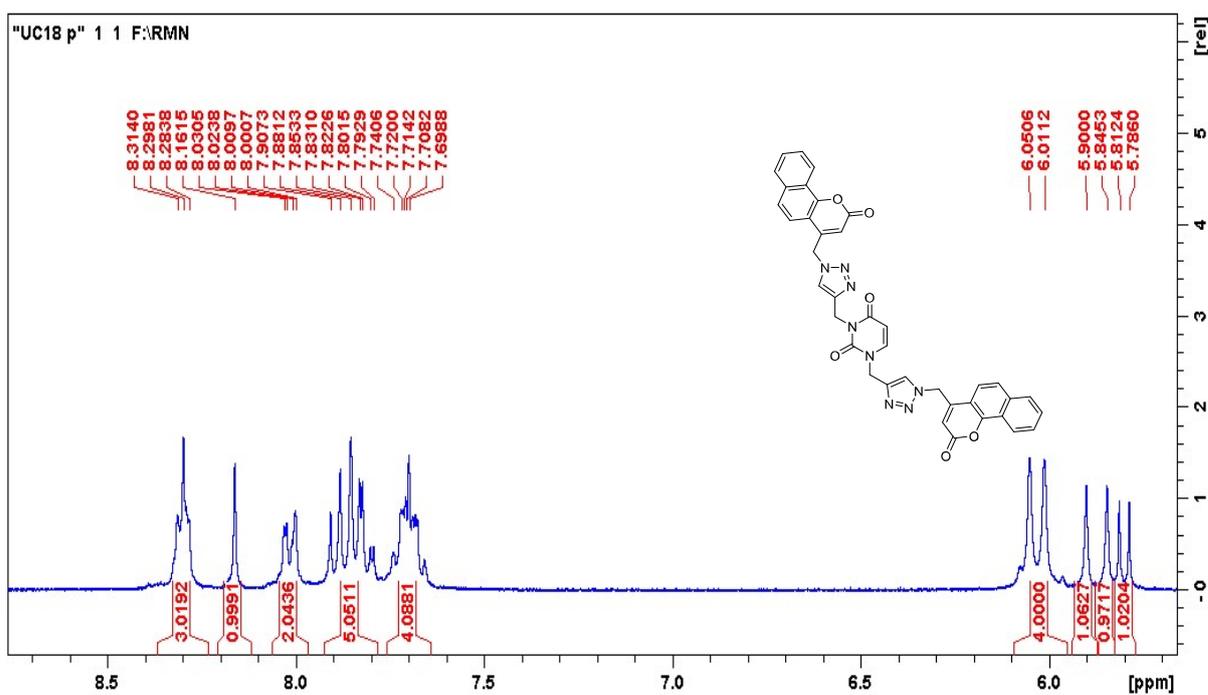


Figura 101. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((2-oxo-2*H*-benzo[*h*]cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona **7b** em DMSO-d_6 .

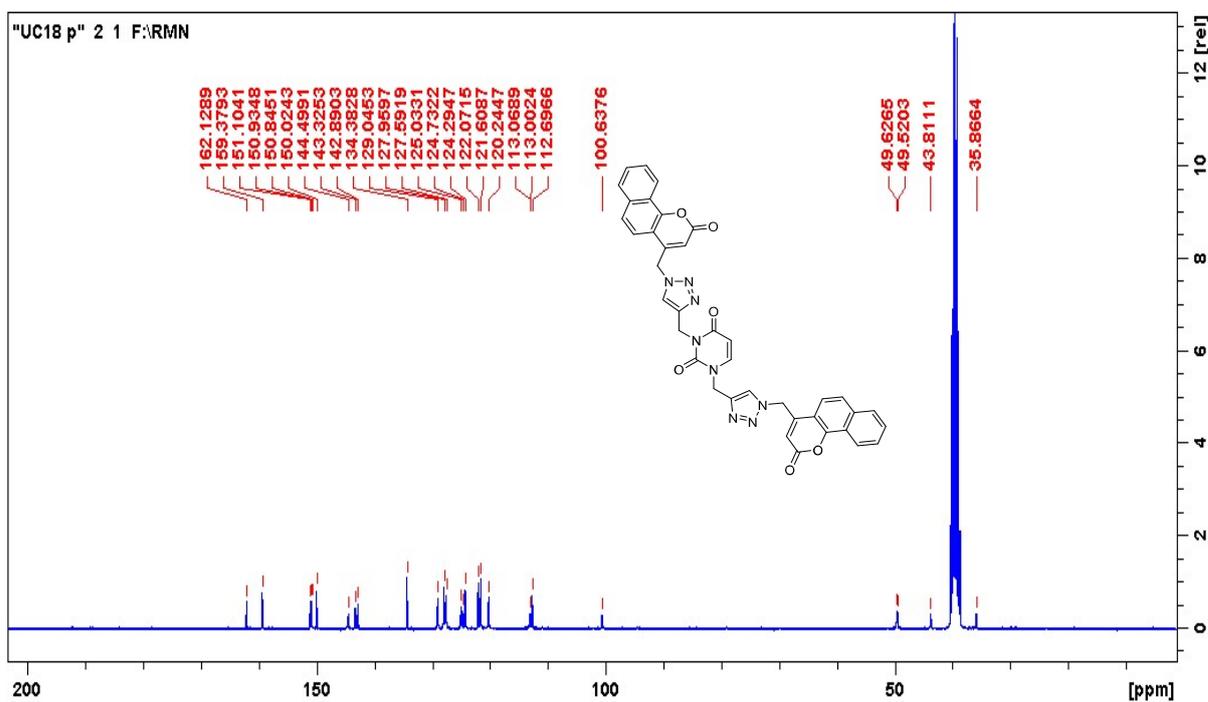


Figura 102. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1,3-bis((1-((2-oxo-2*H*-benzo[*h*]cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona **7b** em DMSO-d_6 .

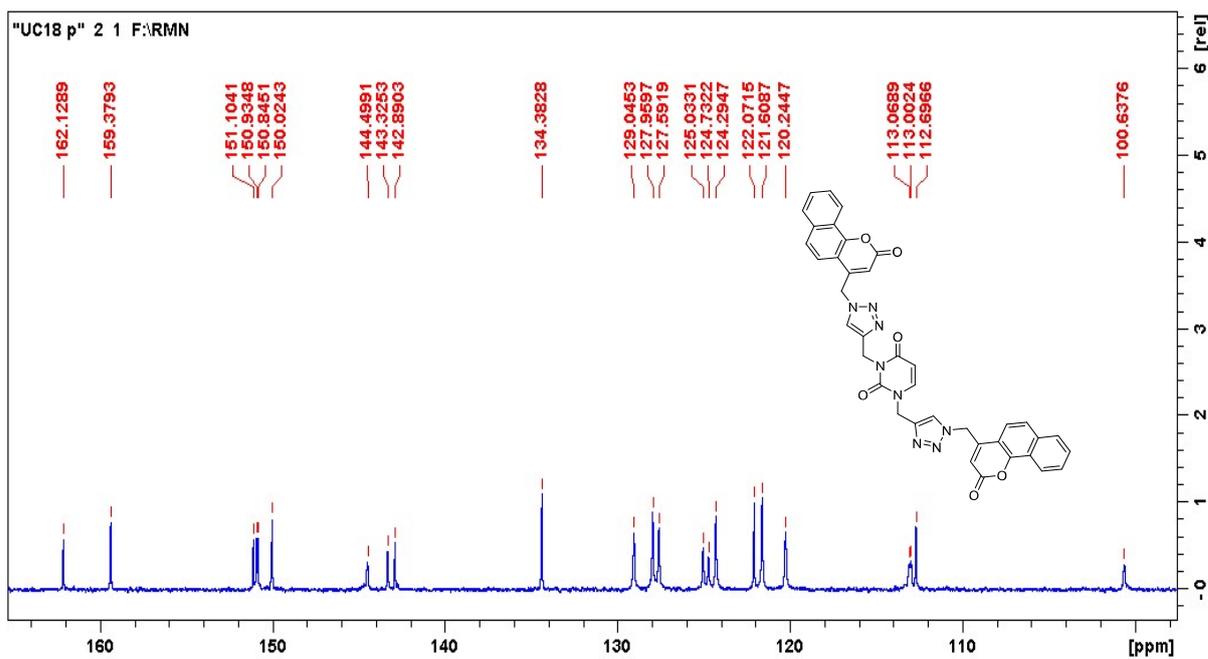


Figura 103. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8a** em DMSO-d_6 .

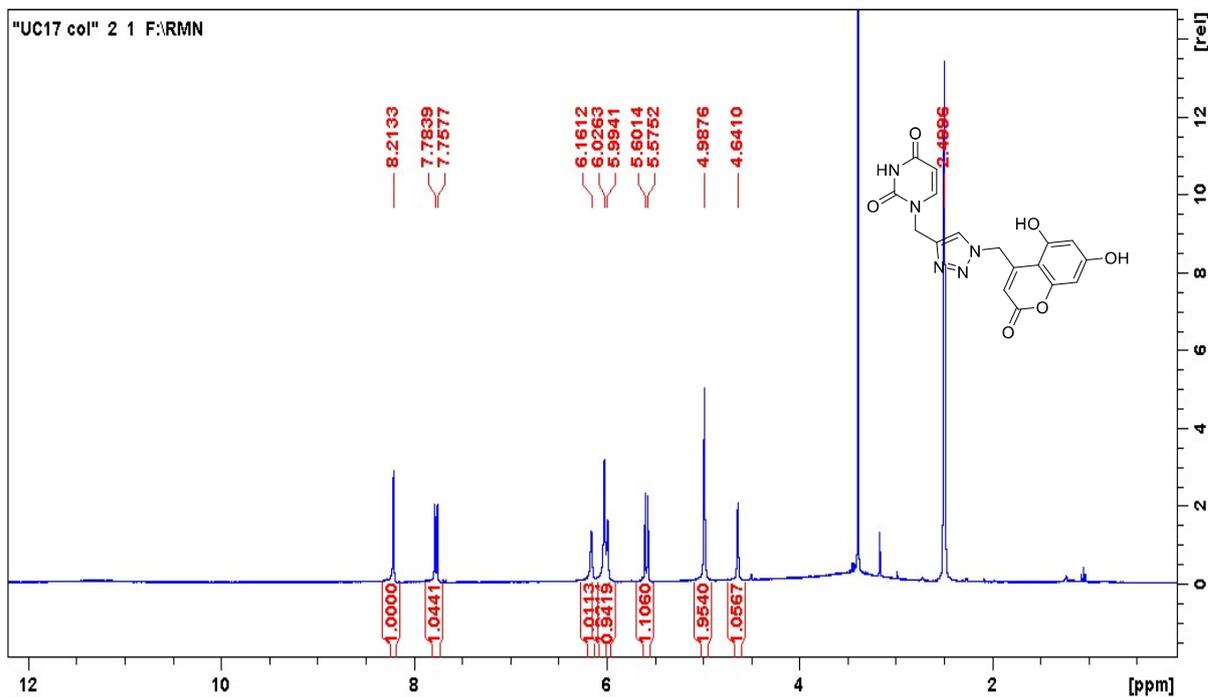


Figura 104. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8a** em DMSO-d_6 .

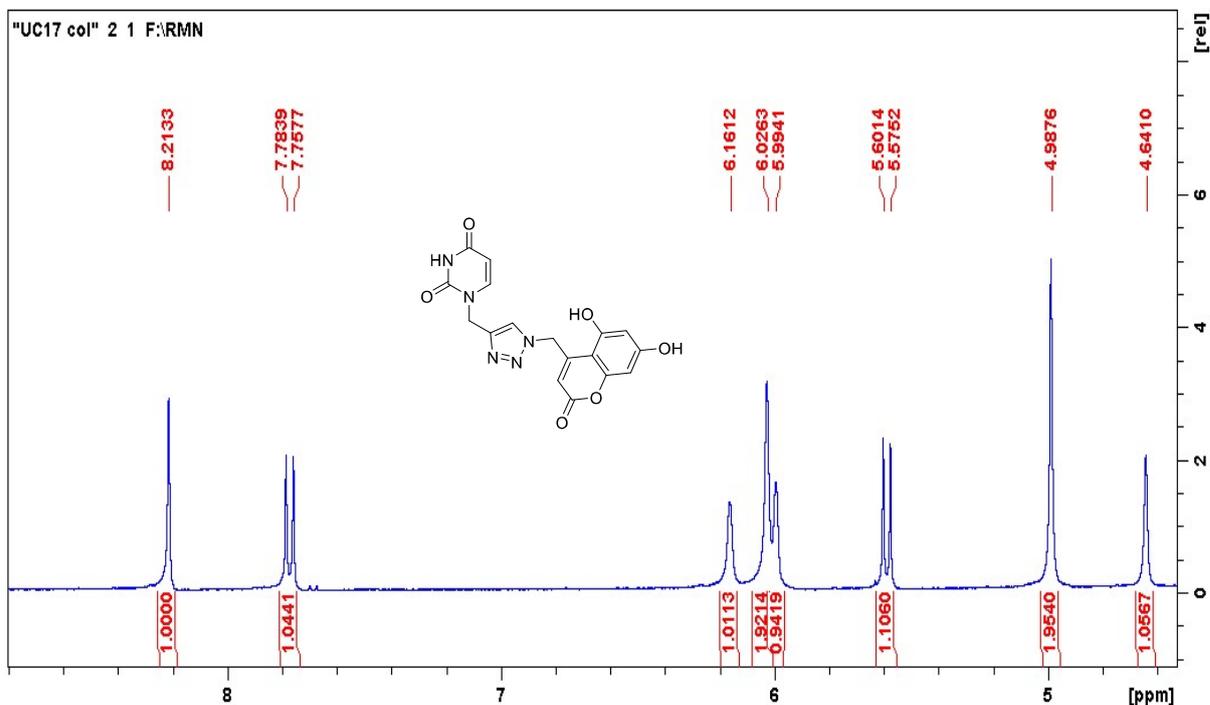


Figura 105. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8a** em DMSO- d_6 .

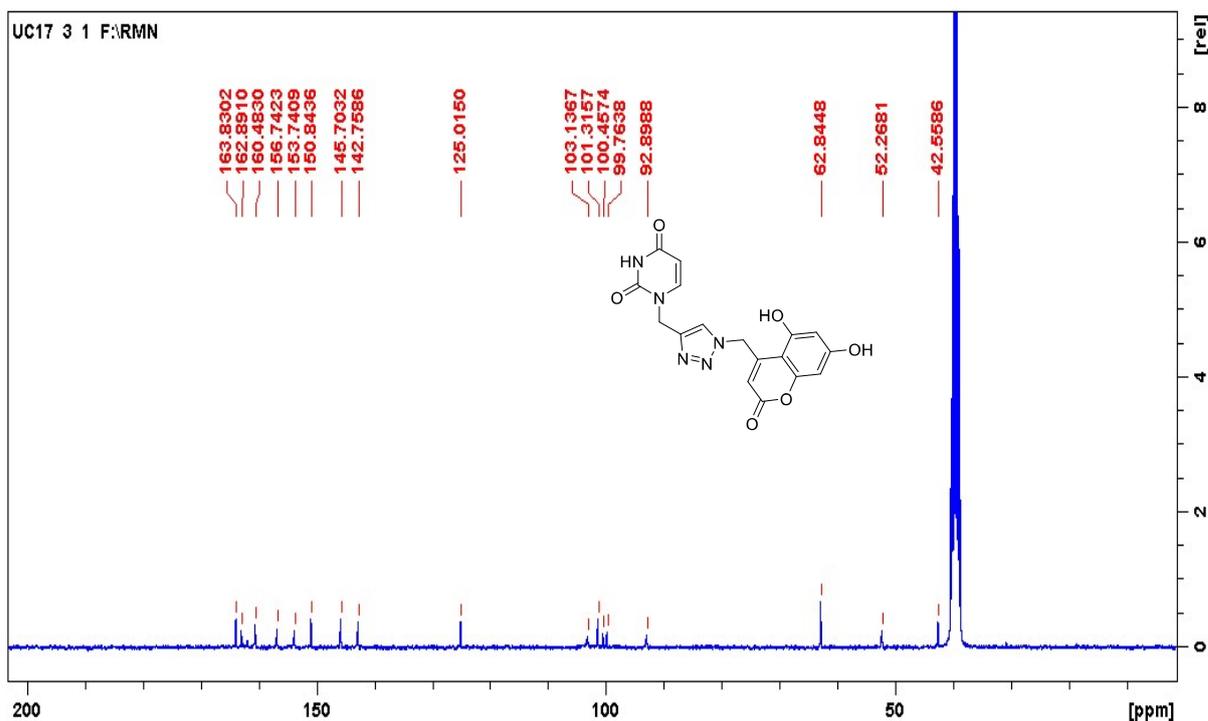


Figura 106. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8a** em DMSO- d_6 .

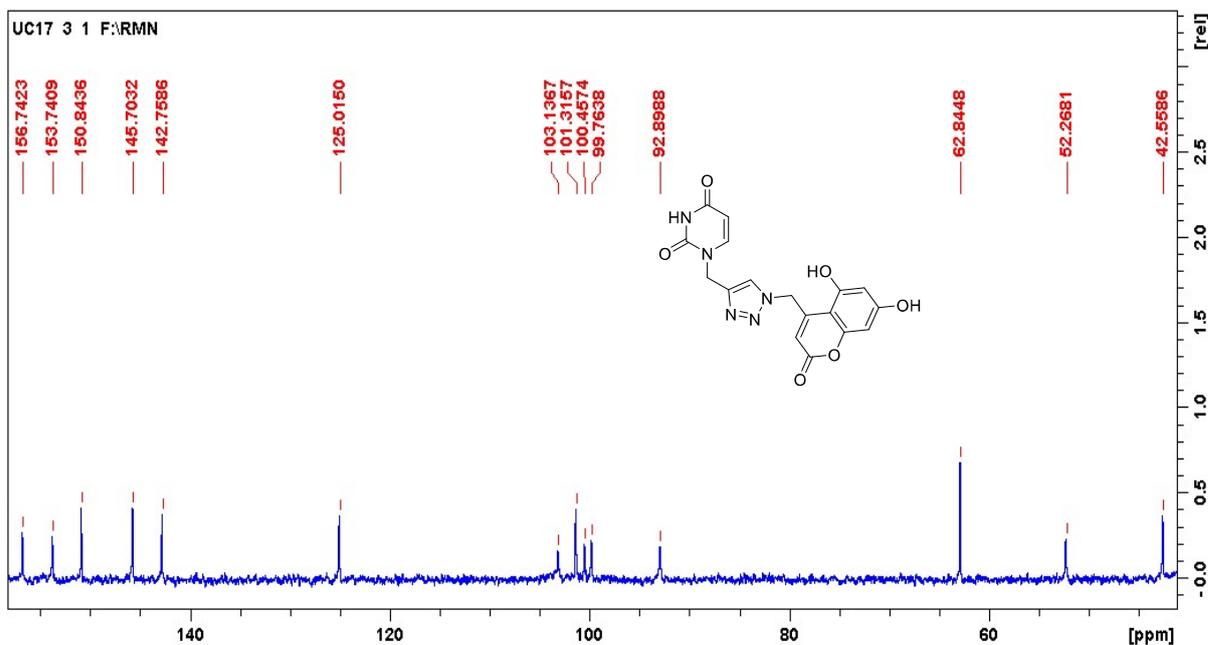


Figura 107. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8b** em DMSO- d_6 .

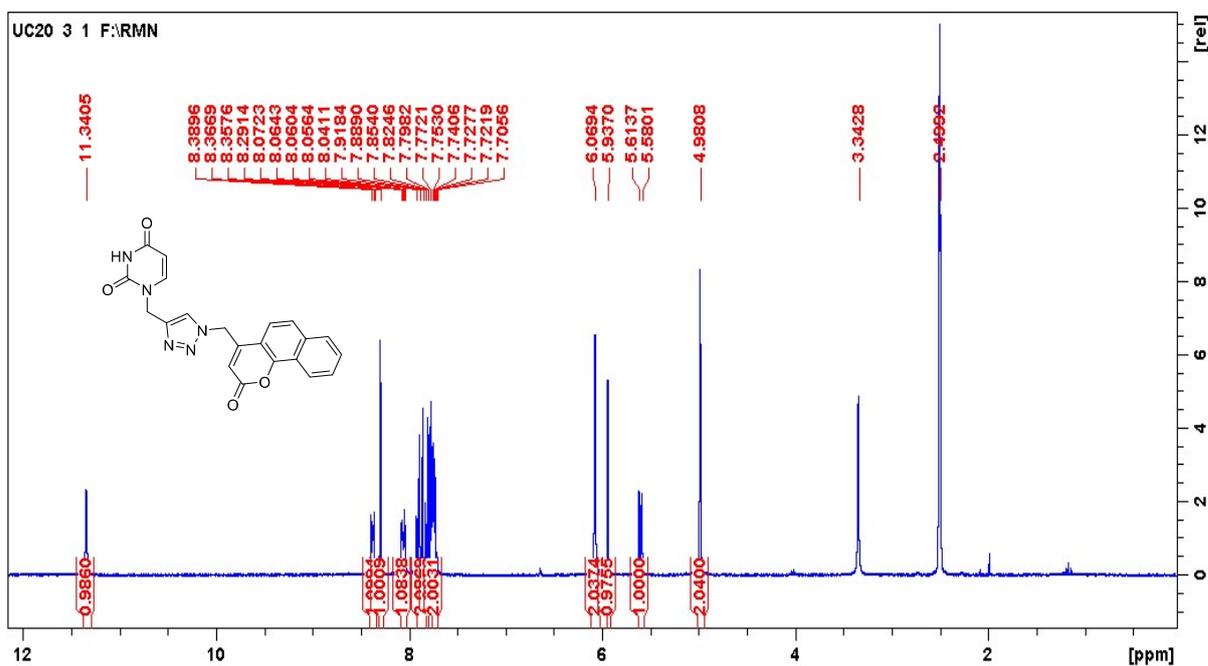


Figura 108. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8b** em DMSO- d_6 .

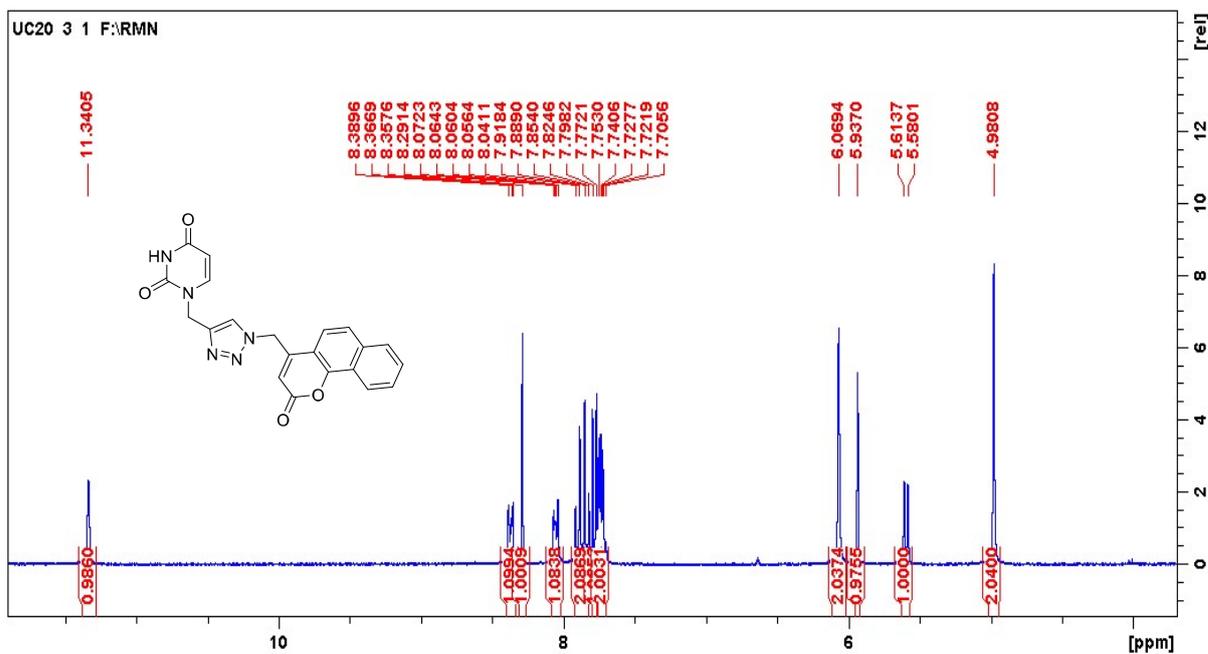


Figura 109. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8b** em DMSO-d_6 .

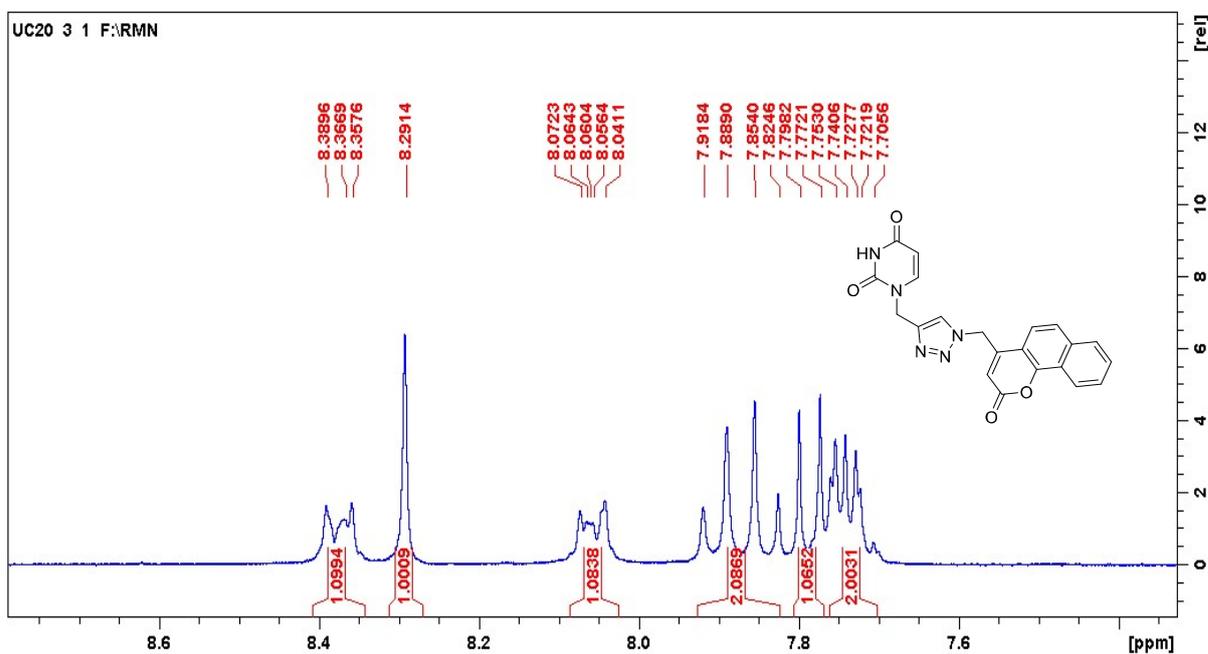


Figura 110. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8b** em DMSO-d_6 .

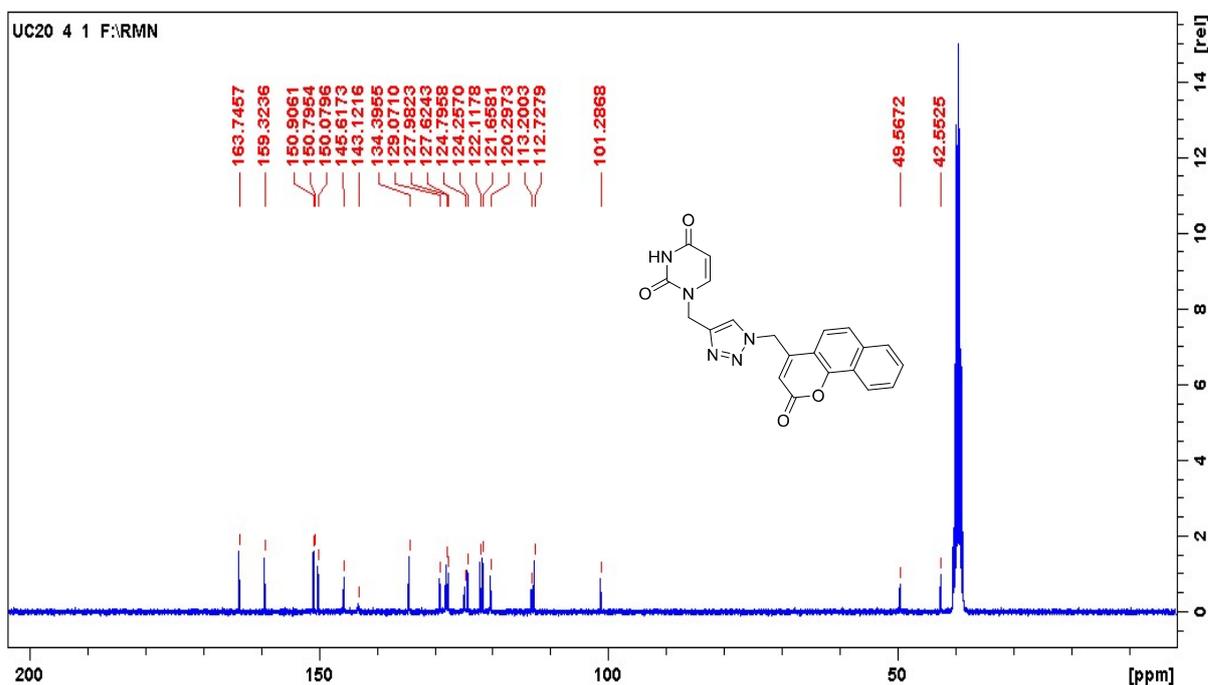


Figura 111. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8b** em DMSO-d_6 .

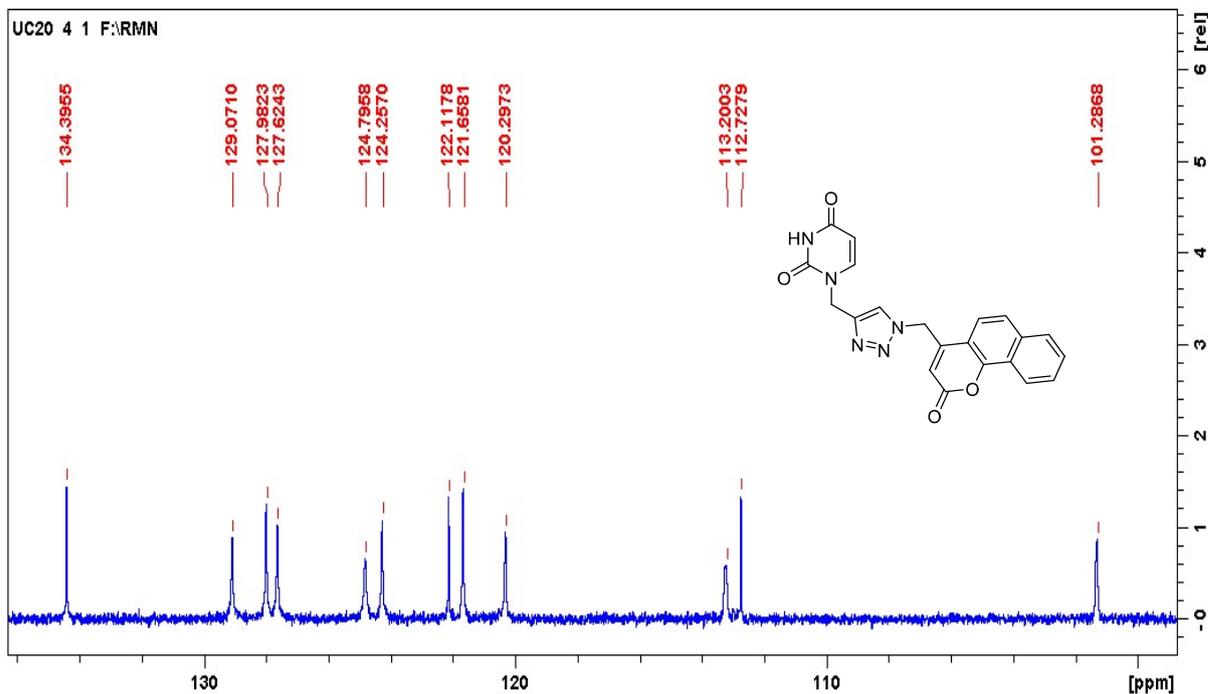


Figura 112. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8c** em DMSO-d_6 .

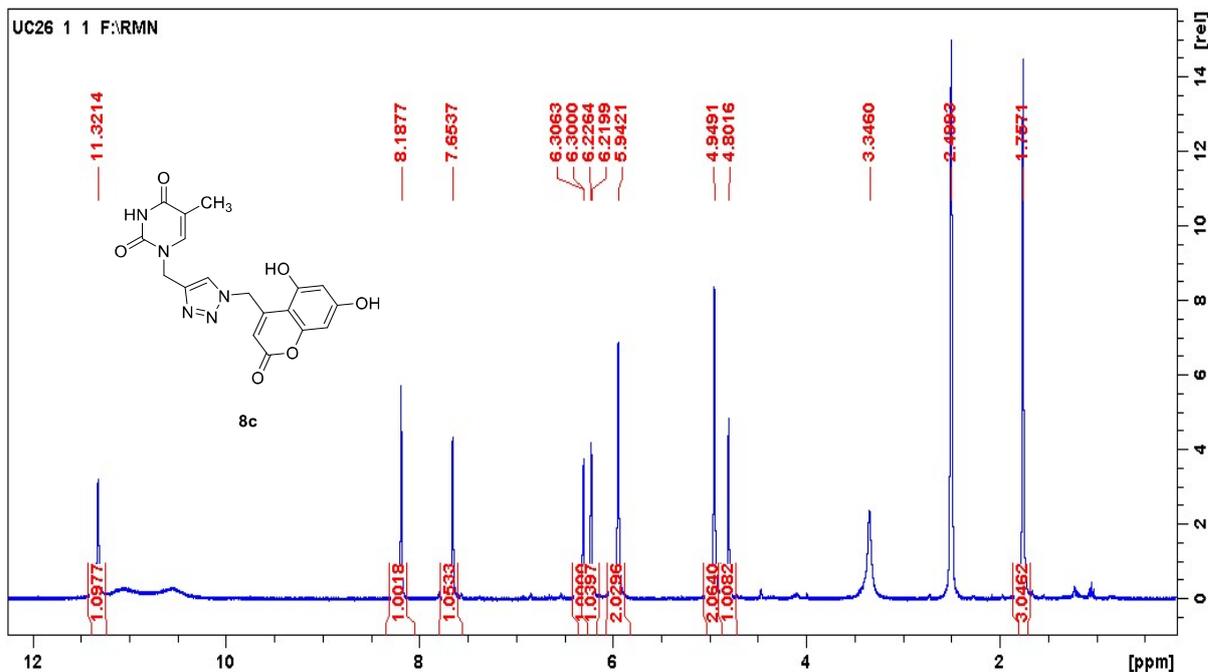


Figura 113. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8c** em DMSO- d_6 .

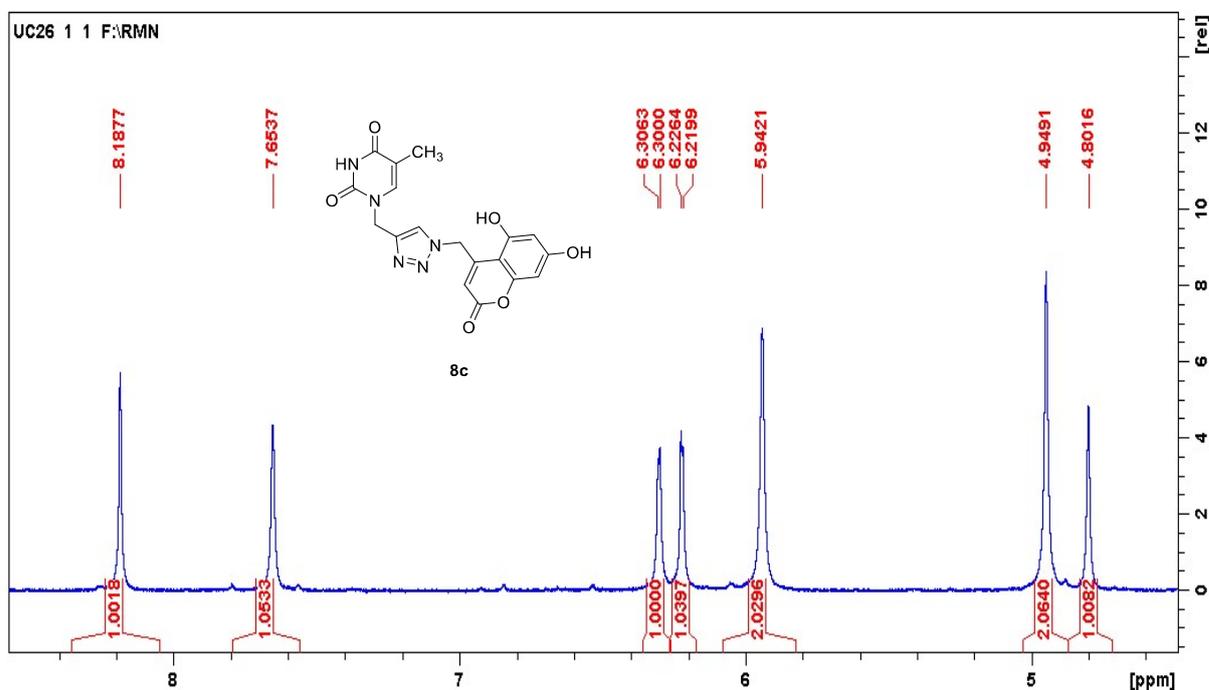


Figura 114. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8c** em DMSO- d_6 .

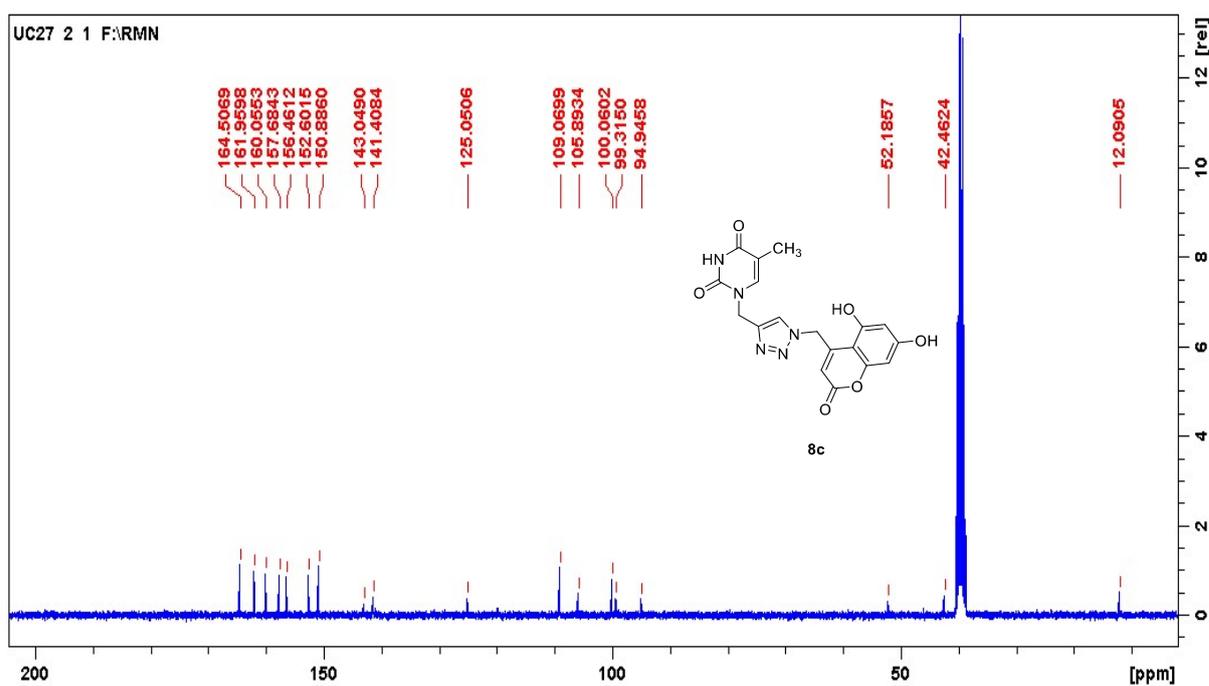


Figura 115. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8c** em DMSO-d_6 .

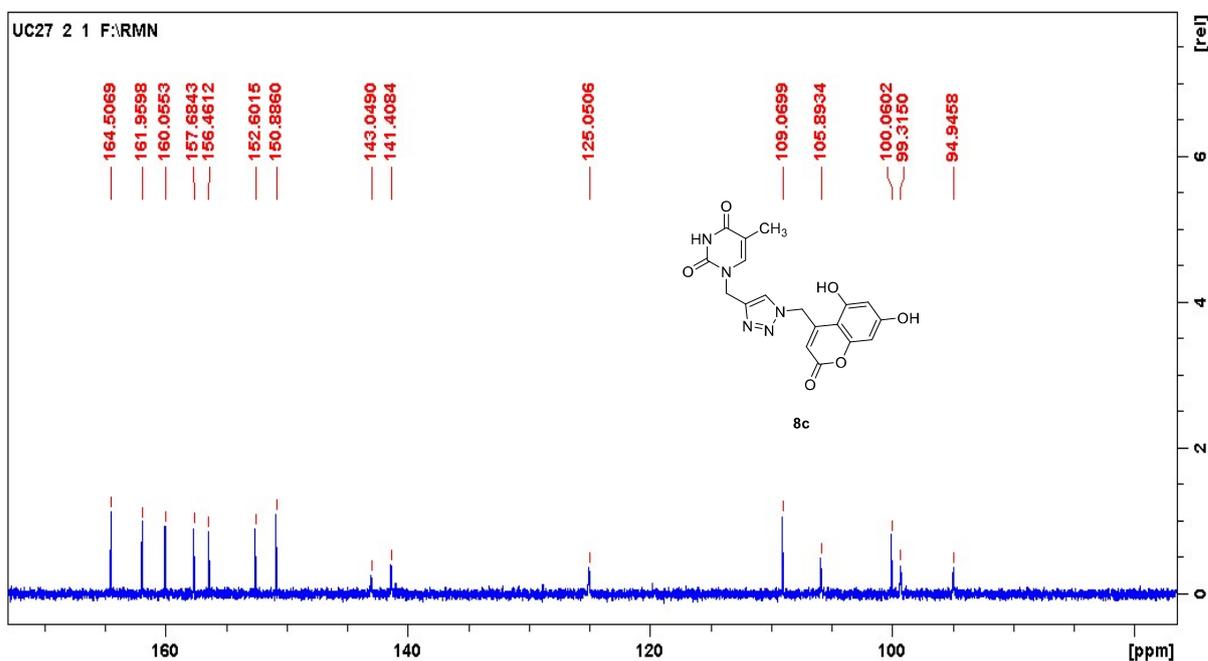


Figura 116. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8d** em DMSO-d_6 .

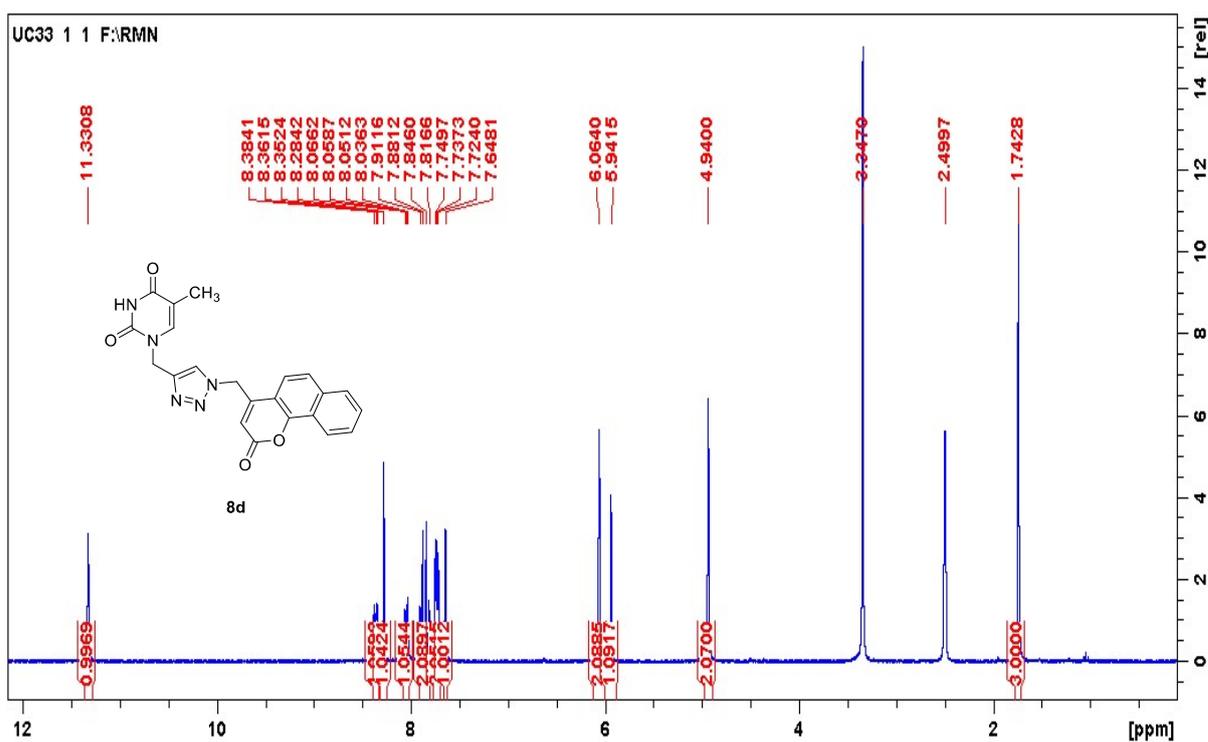


Figura 117. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8d** em DMSO-d_6 .

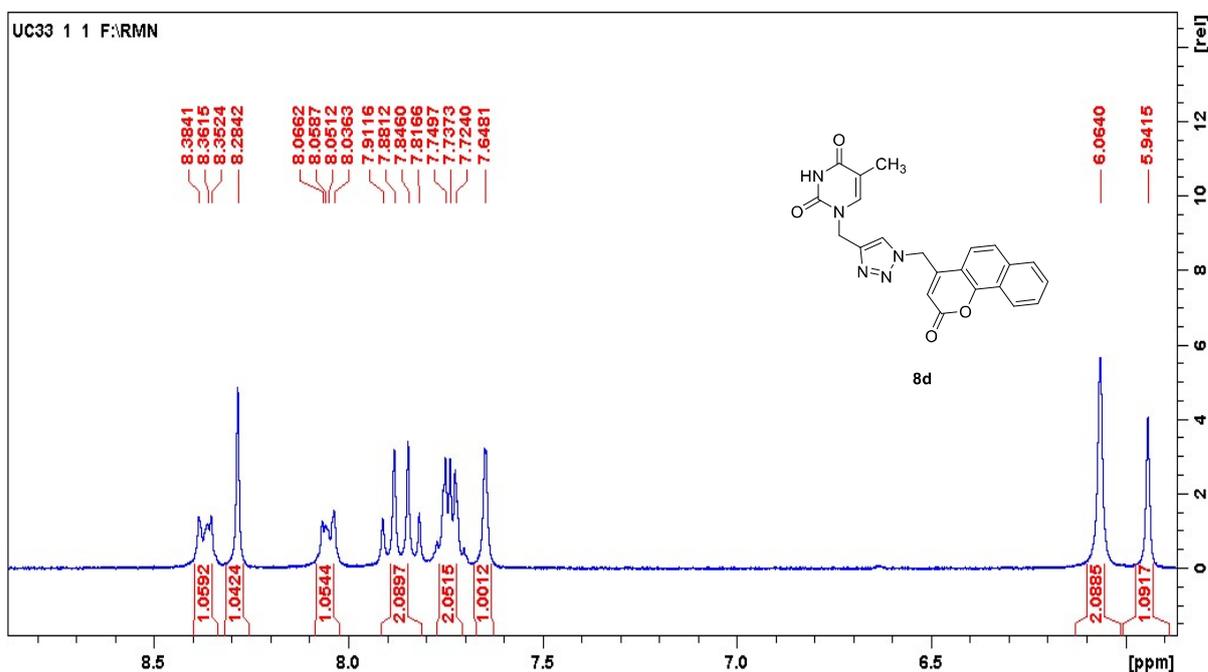


Figura 118. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8d** em DMSO-d_6 .

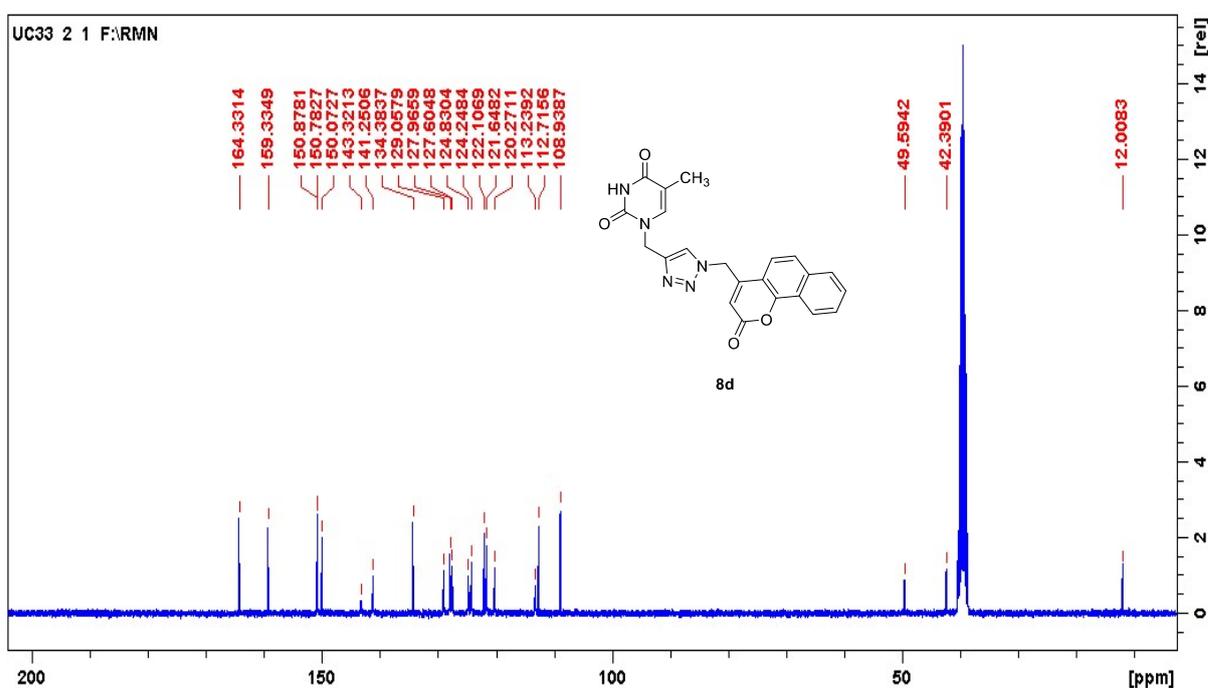


Figura 119. Expansão de espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8d** em DMSO-d_6 .

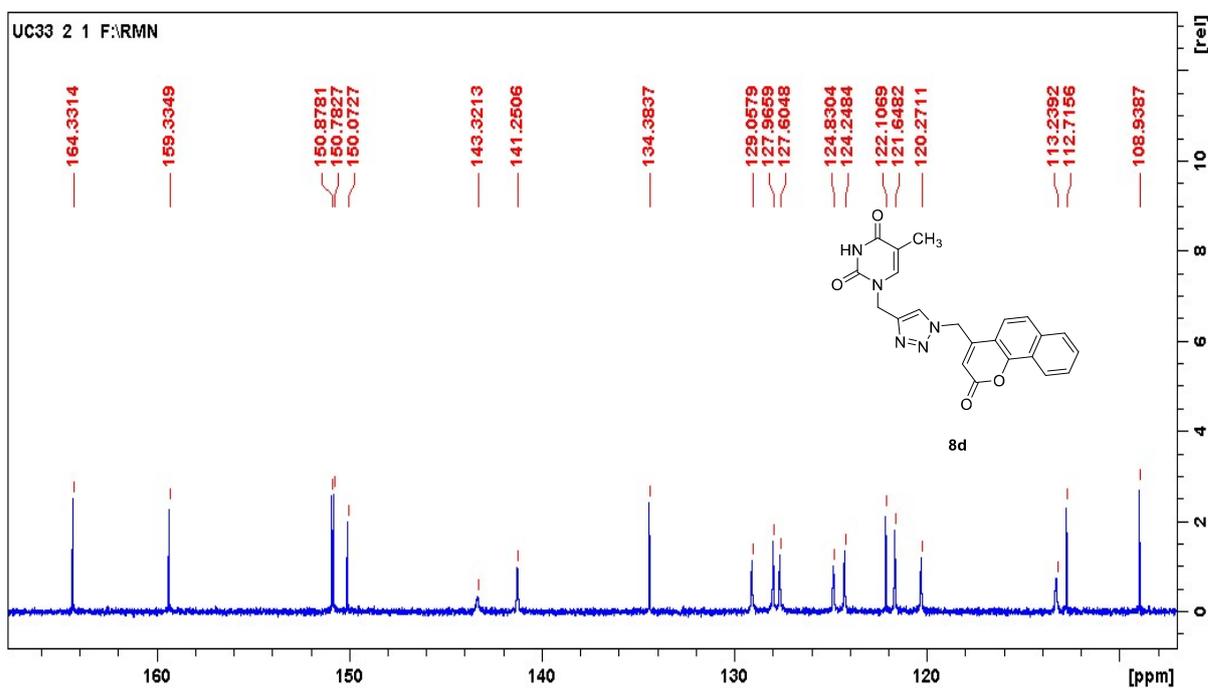


Figura 120. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8e** em DMSO-d_6 .

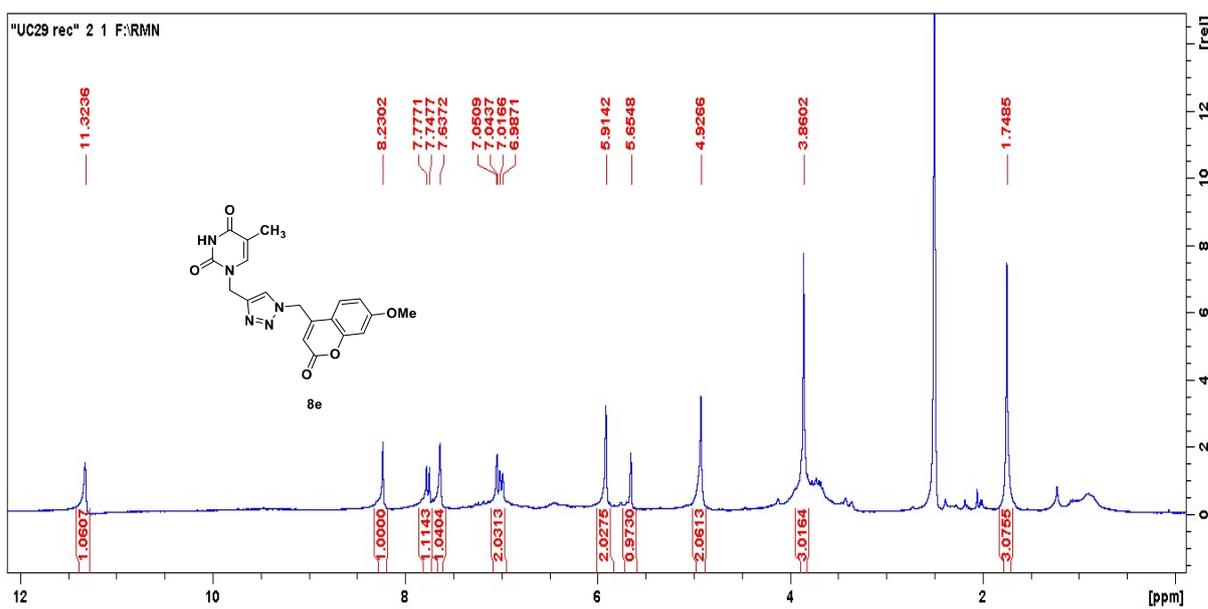


Figura 121. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8e** em DMSO-d_6 .

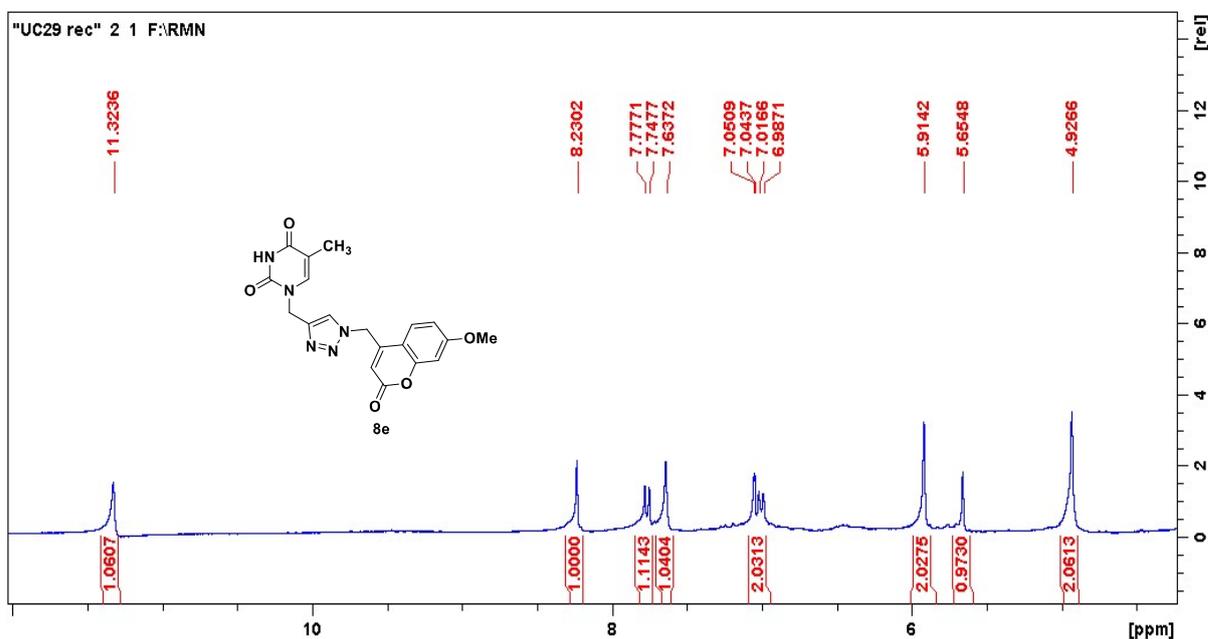


Figura 122. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona **8e** em DMSO-d_6 .

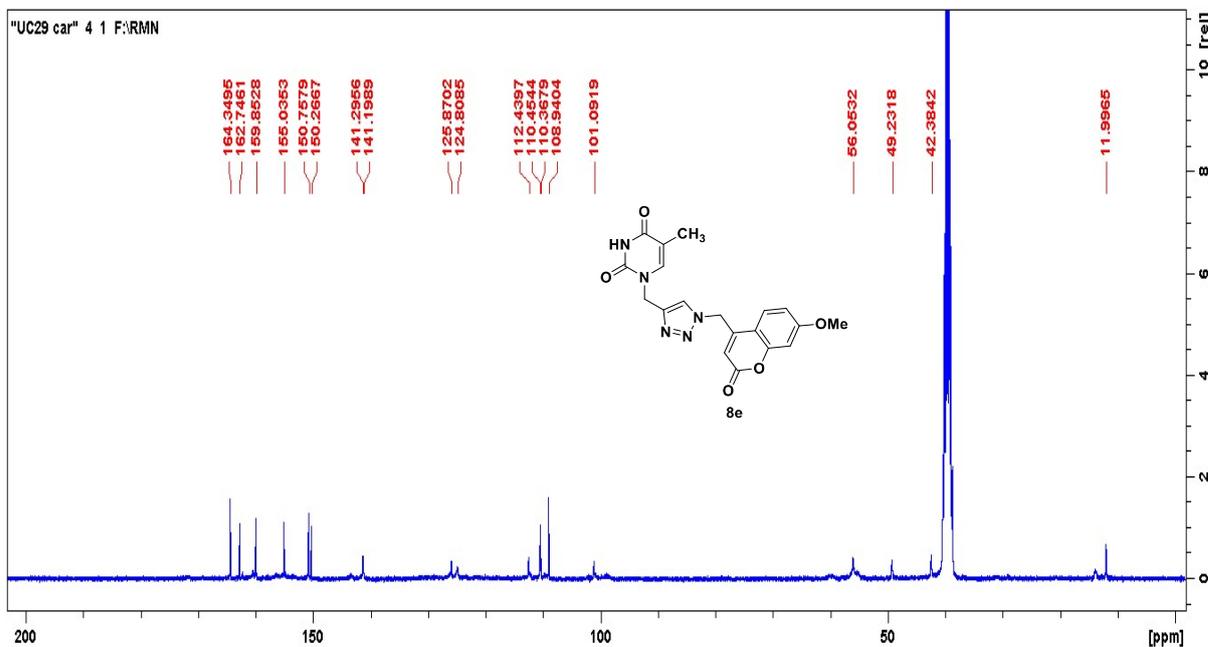


Figura 123. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 2-(((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)pirimidin-4(3H)-ona **8f** em DMSO-d_6 .

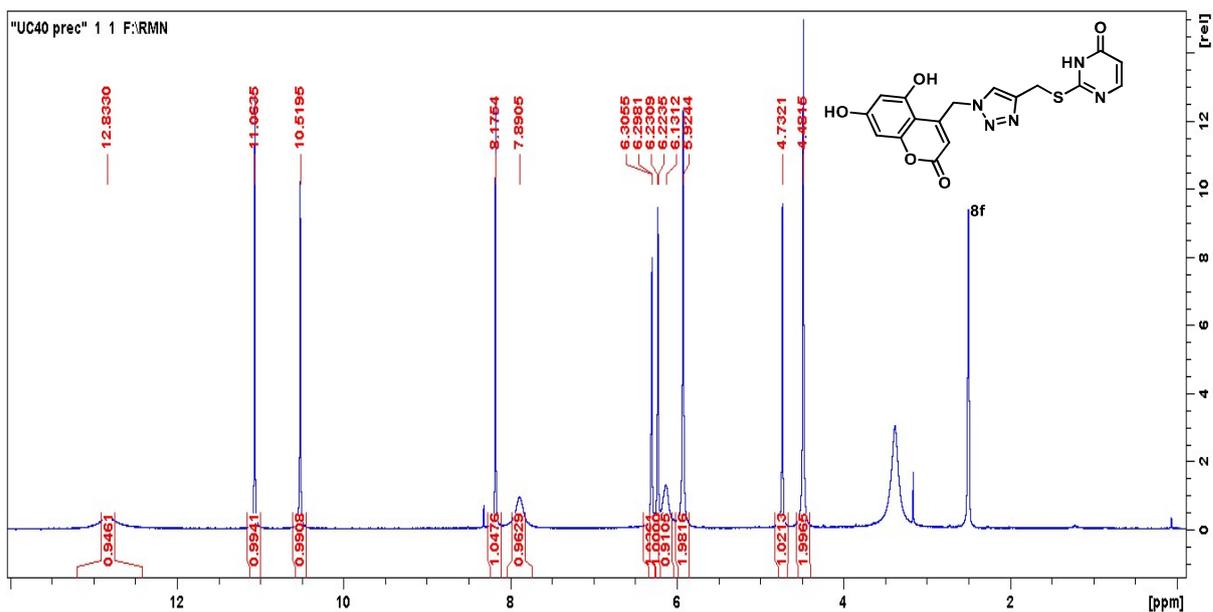


Figura 124. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 2-(((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)pirimidin-4(3H)-ona **8f** em DMSO-d_6 .

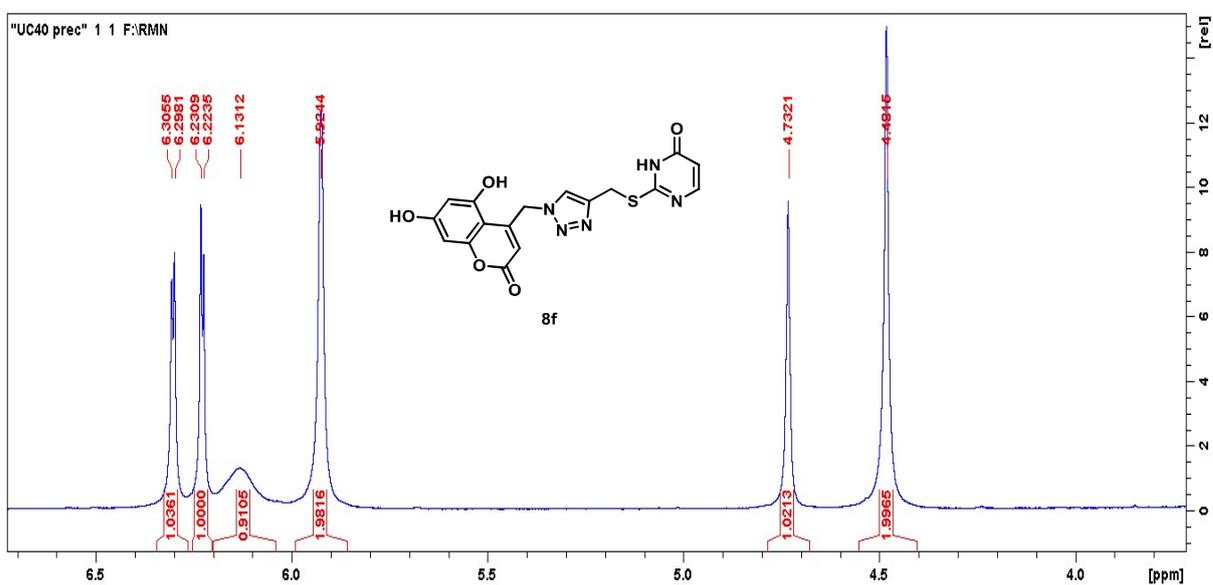


Figura 125. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 2-(((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)pirimidin-4(3*H*)-ona **8f** em DMSO-d_6 .

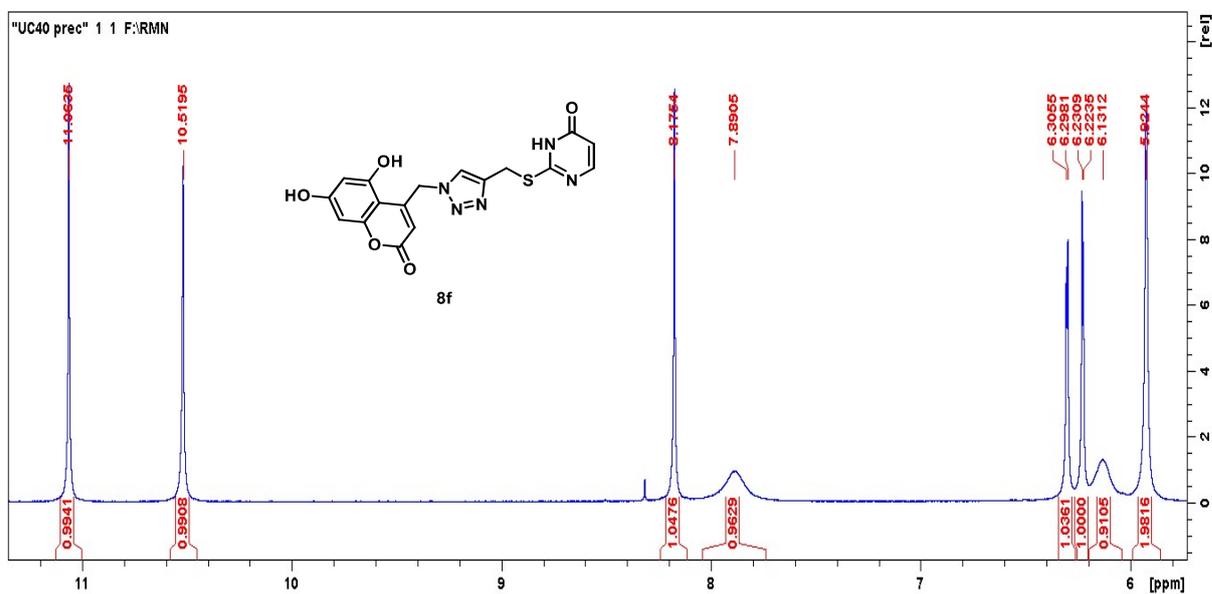


Figura 126. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 2-(((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)pirimidin-4(3*H*)-ona **8f** em DMSO-d_6 .

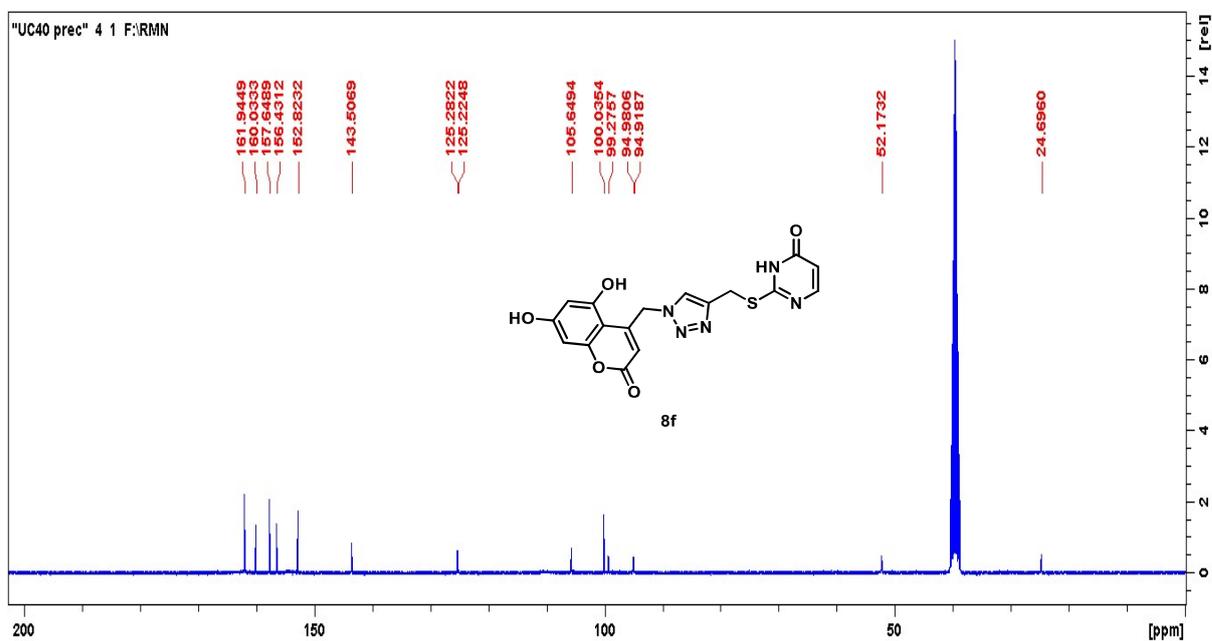


Figura 127. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 2-(((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)tio)pirimidin-4(3H)-ona **8f** em DMSO-d_6 .

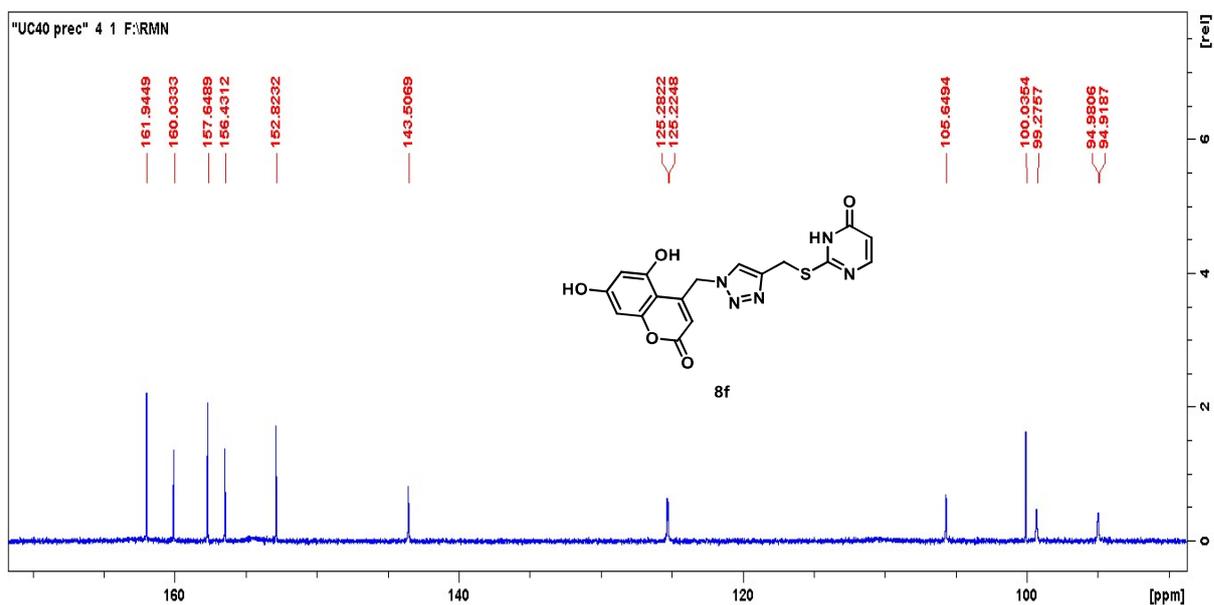


Figura 128. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona **9a** em DMSO-d_6 .

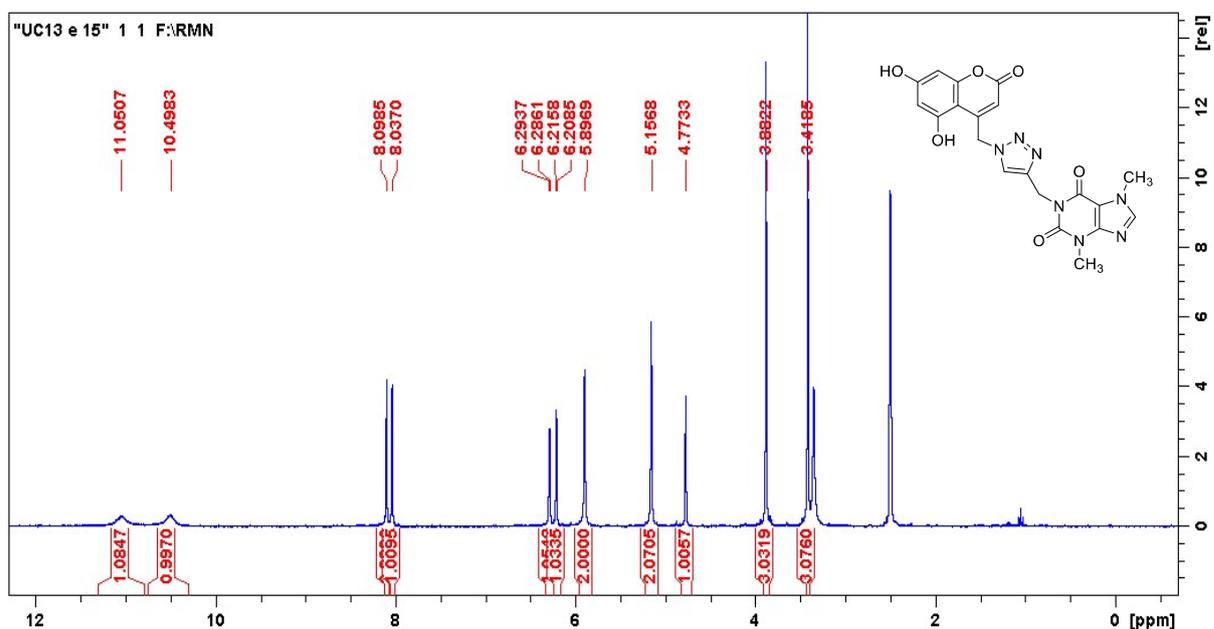


Figura 129. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona **9a** em DMSO-d_6 .

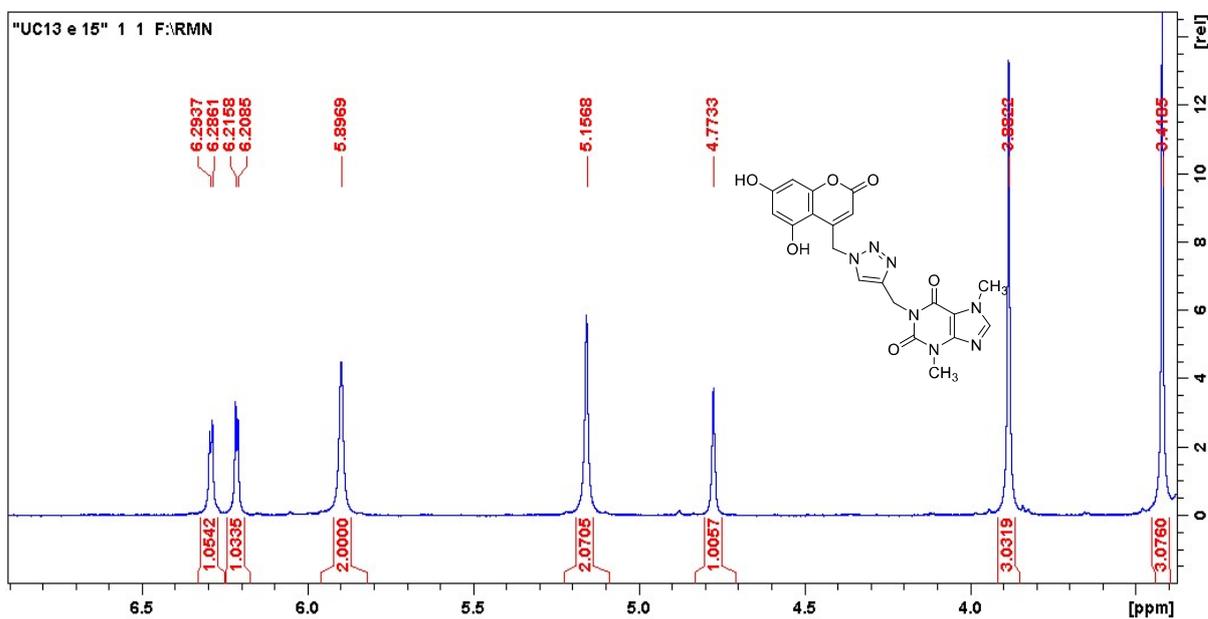


Figura 130. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do o híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona **9a** em DMSO-d_6 .

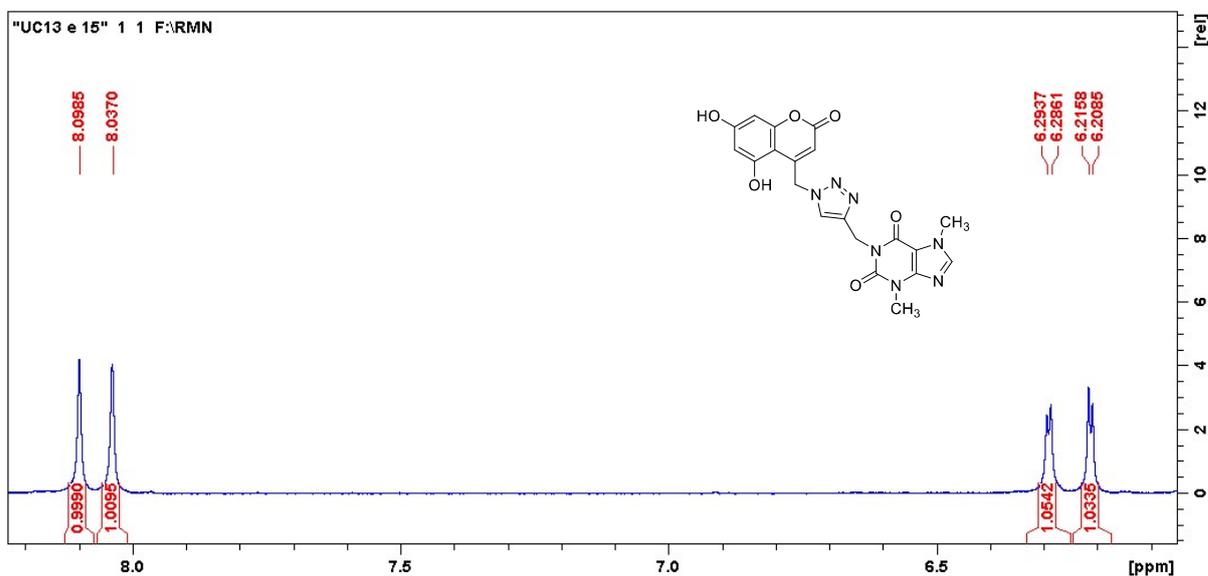


Figura 131. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona **9a** em DMSO-d_6 .

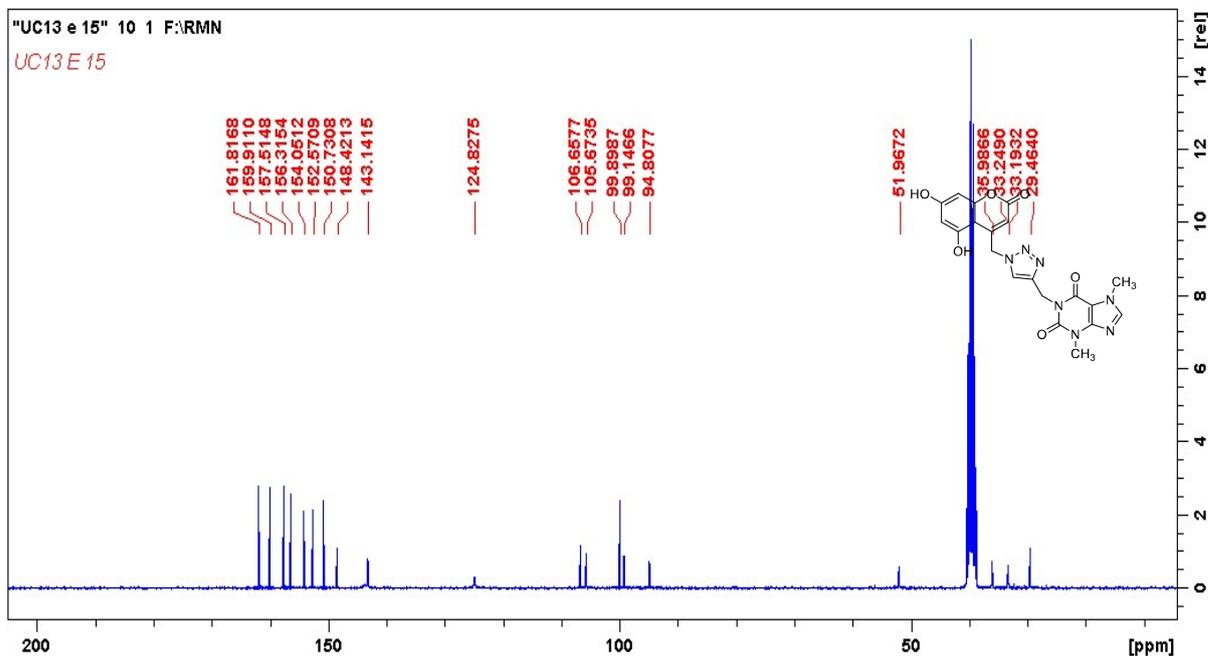


Figura 132. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona **9a** em DMSO-d_6 .

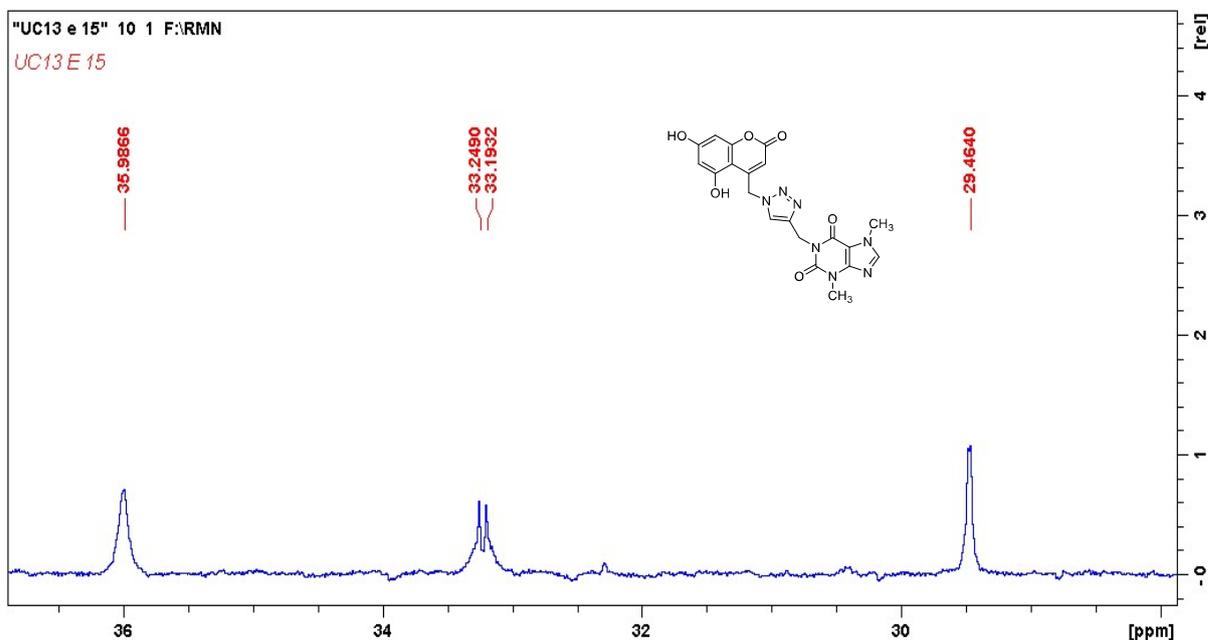


Figura 135. Espectro de RMN 2D – HMQC a 75 MHz do híbrido 1-((1-((5,7-dihidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1*H*-purina-2,6-diona **9a** em DMSO- d_6 .

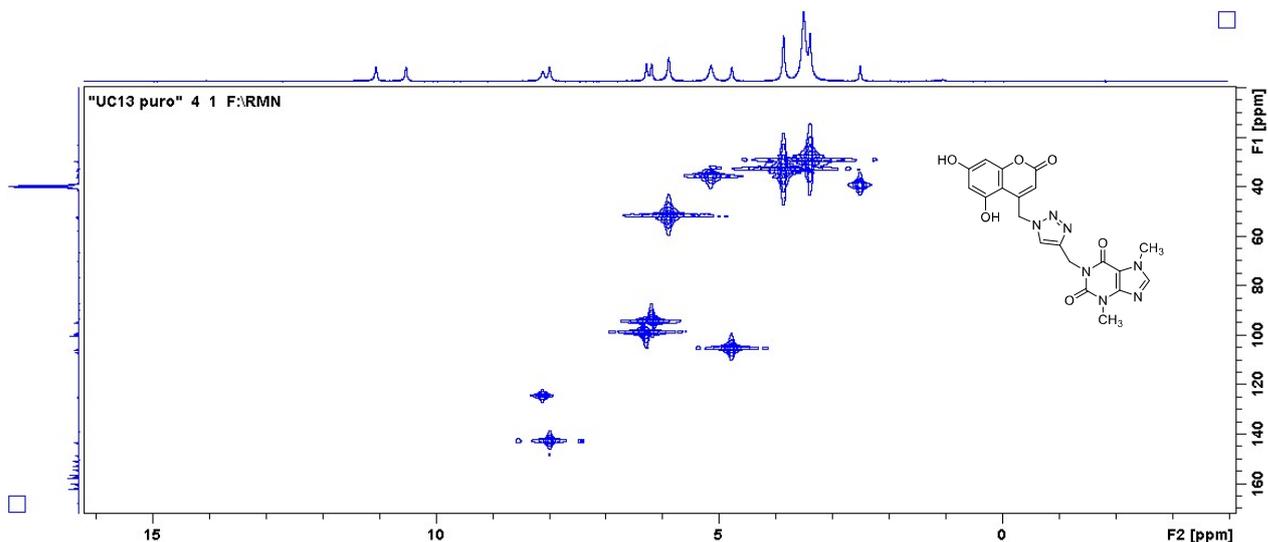


Figura 136. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 3,7-dimetil-1-((1-((2-oxo-2*H*-benzo[*h*]cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dihidro-1*H*-purina-2,6-diona **9b** em DMSO- d_6 .

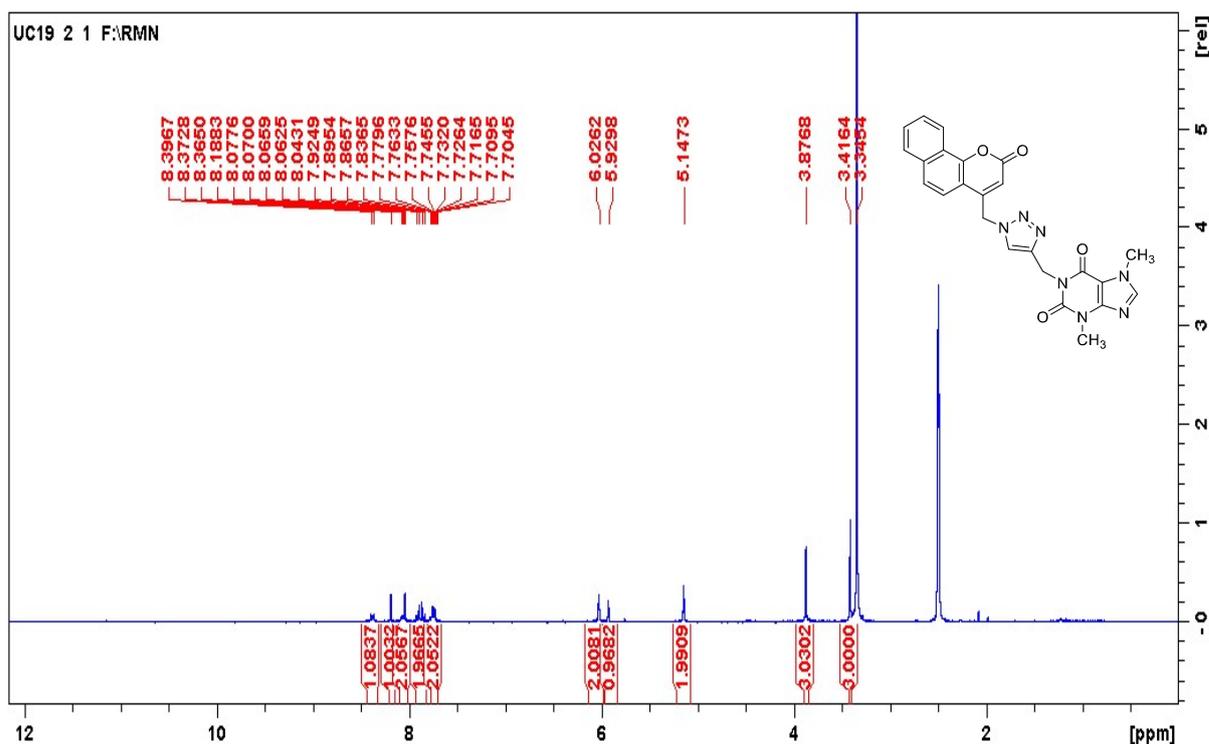


Figura 137. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 3,7-dimetil-1-((1-((2-oxo-2*H*-benzo[*h*]cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dihidro-1*H*-purina-2,6-diona **9b** em DMSO-d_6 .

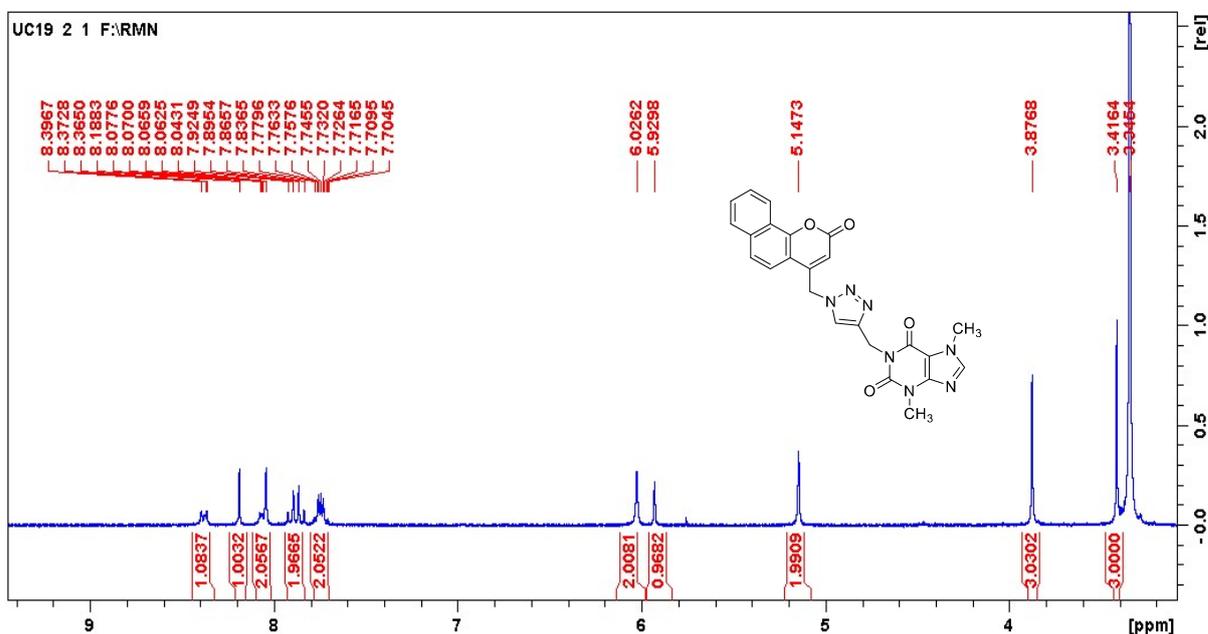


Figura 138. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 3,7-dimetil-1-((1-((2-oxo-2*H*-benzo[*h*]cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dihidro-1*H*-purina-2,6-diona **9b** em DMSO-d_6 com supressão do sinal referente à água.

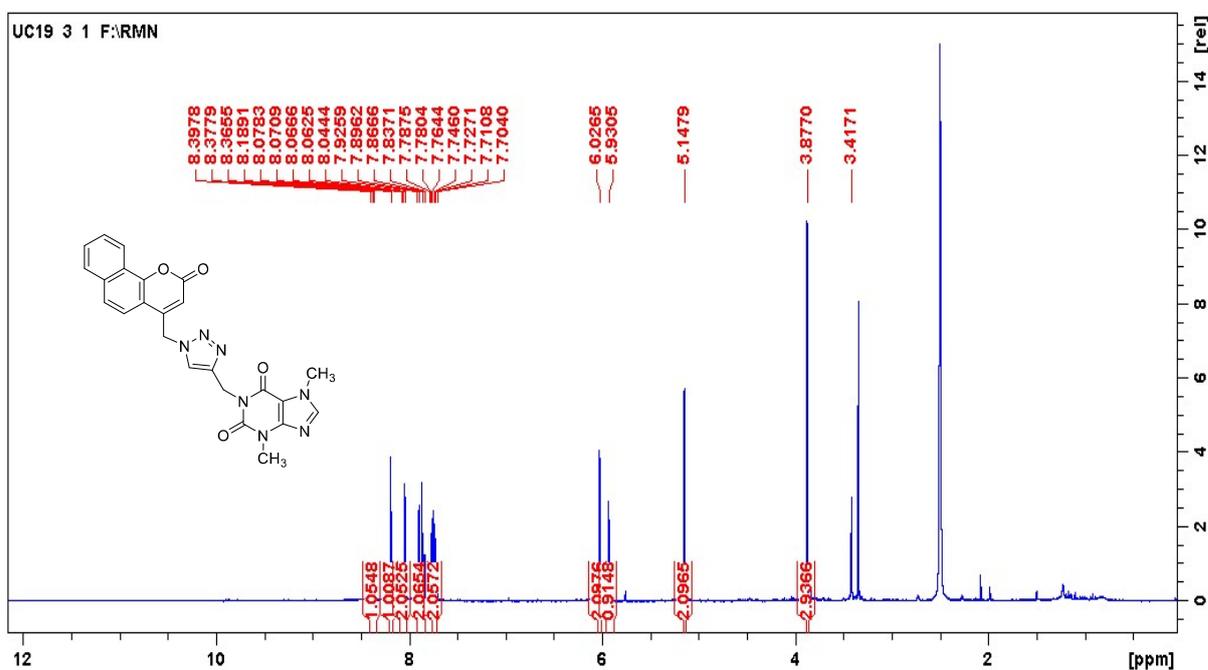


Figura 139. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 3,7-dimetil-1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona **9b** em DMSO- d_6 com supressão do sinal referente à água.

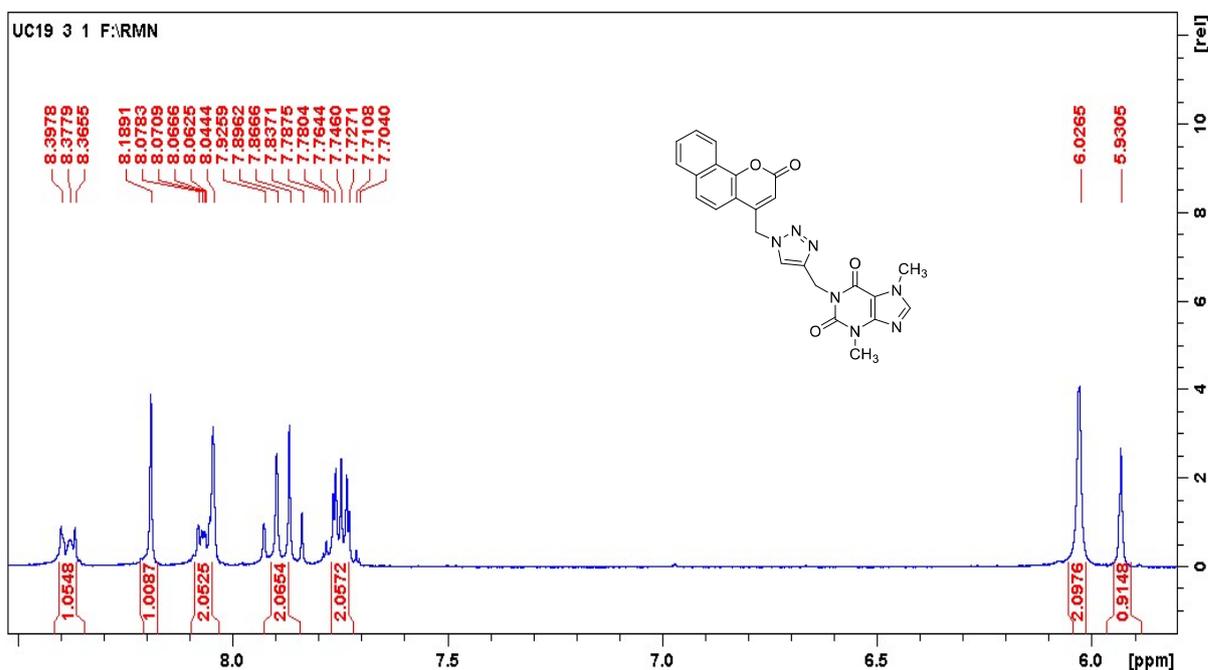


Figura 140. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 3,7-dimetil-1-((1-((2-oxo-2H-benzo[h]cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona **9b** em DMSO- d_6 .

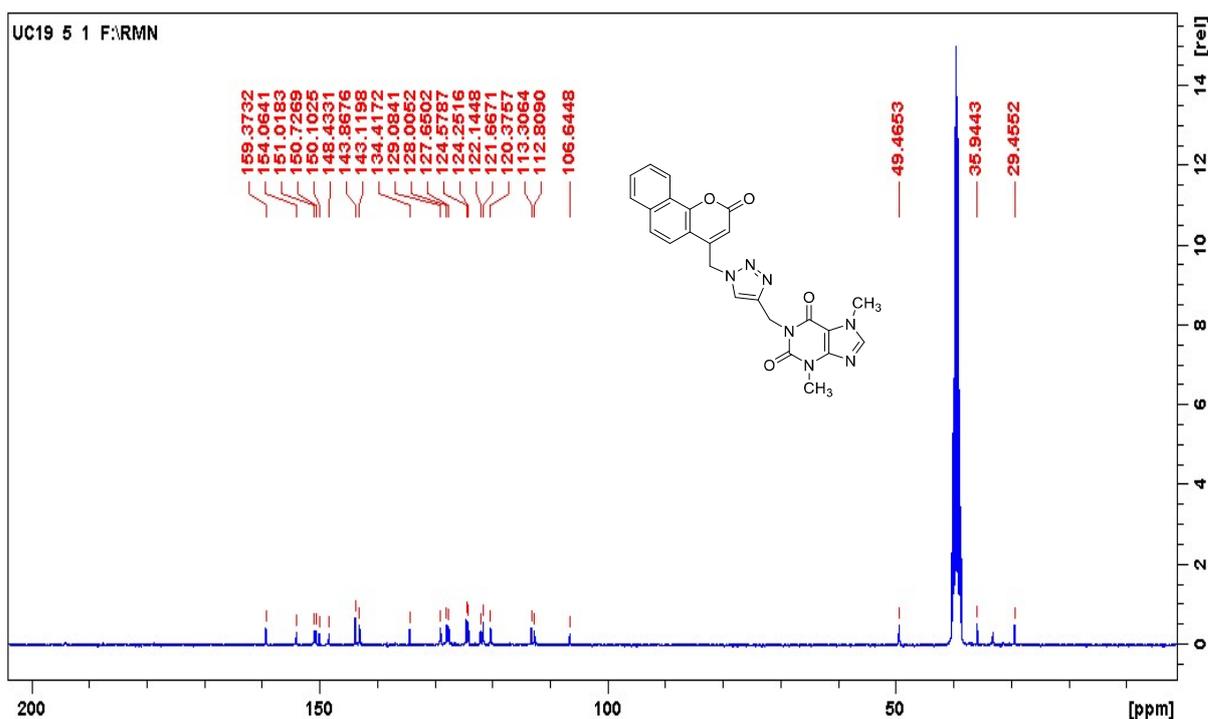


Figura 143. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona **9c** em DMSO-d_6 .

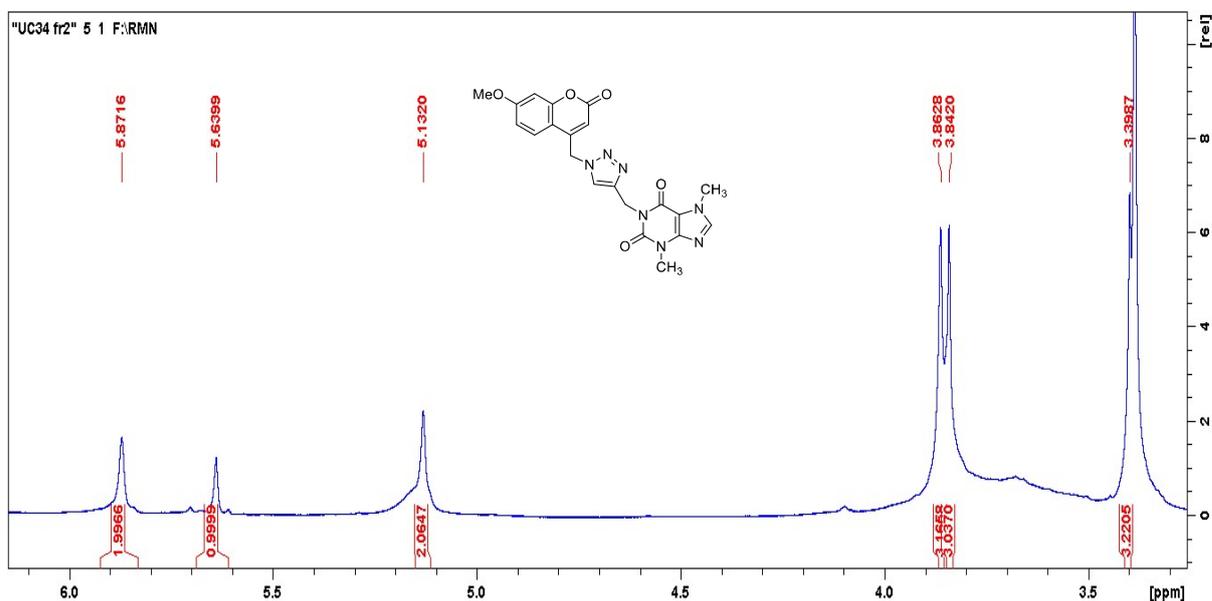


Figura 144. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona **9c** em DMSO-d_6 .

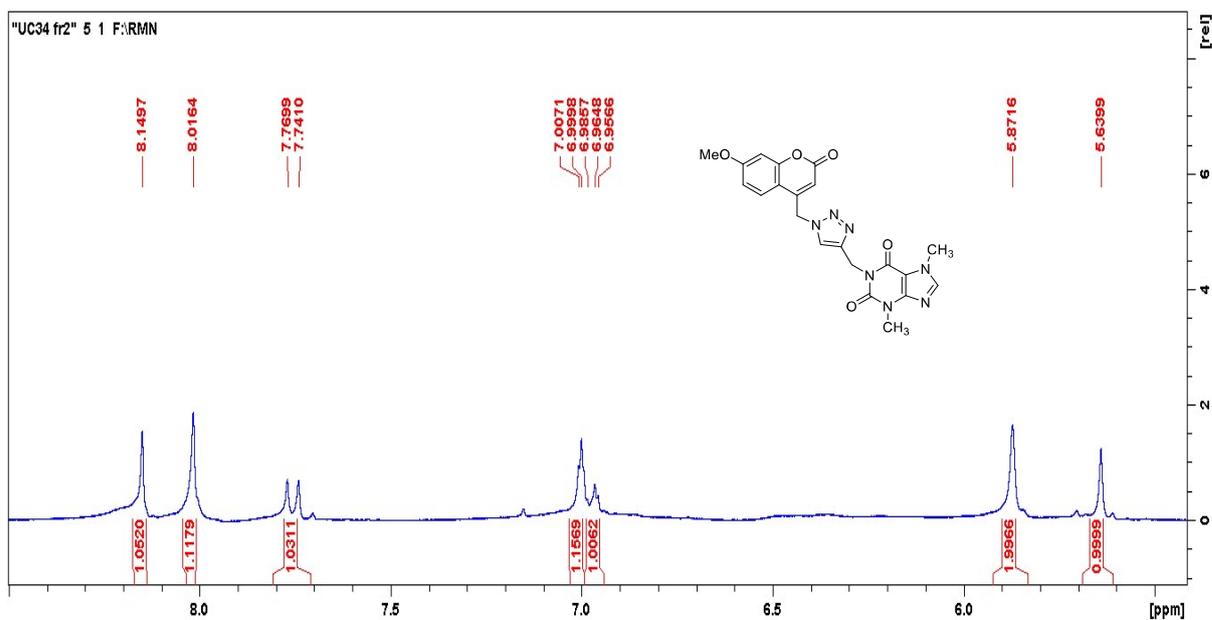


Figura 145. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona **9c** em DMSO-d_6

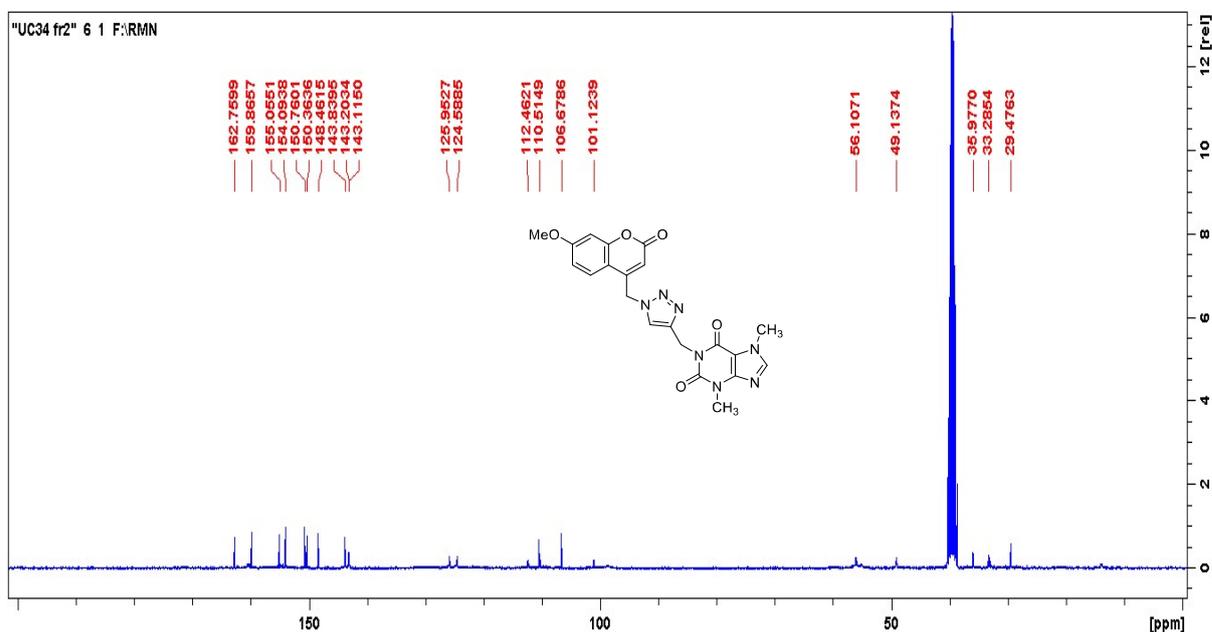


Figura 146. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((7-metoxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona **9c** em DMSO-d_6

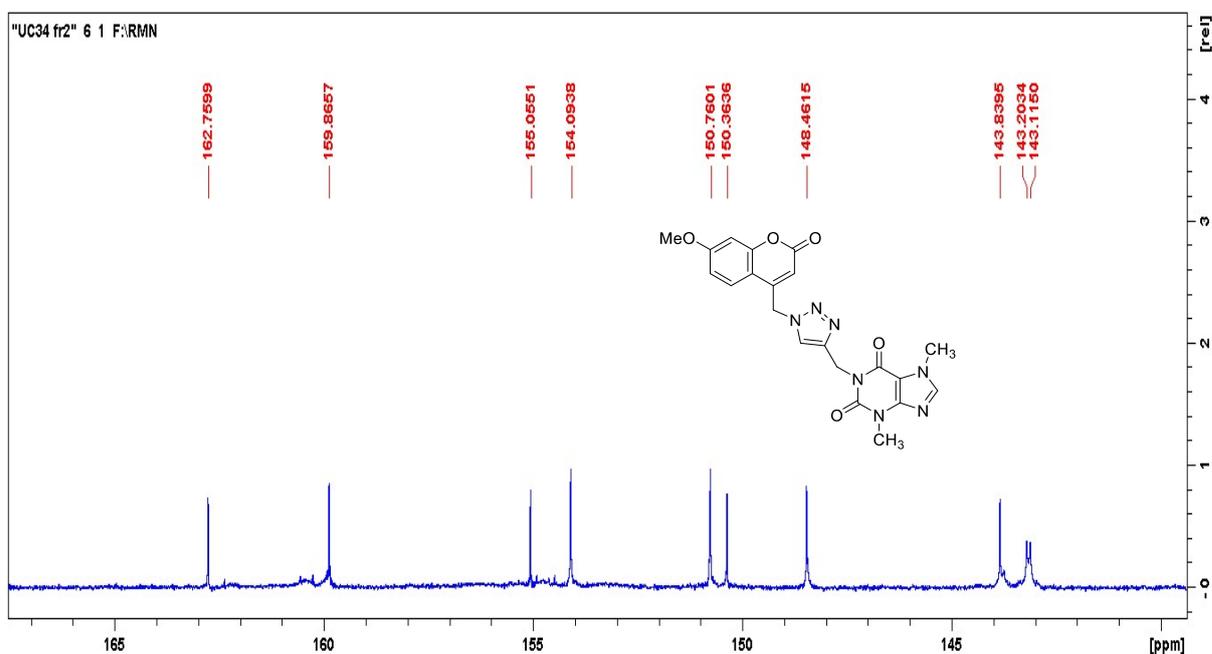


Figura 147. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1*H*-purina-2,6-diona **9d** em DMSO-d_6

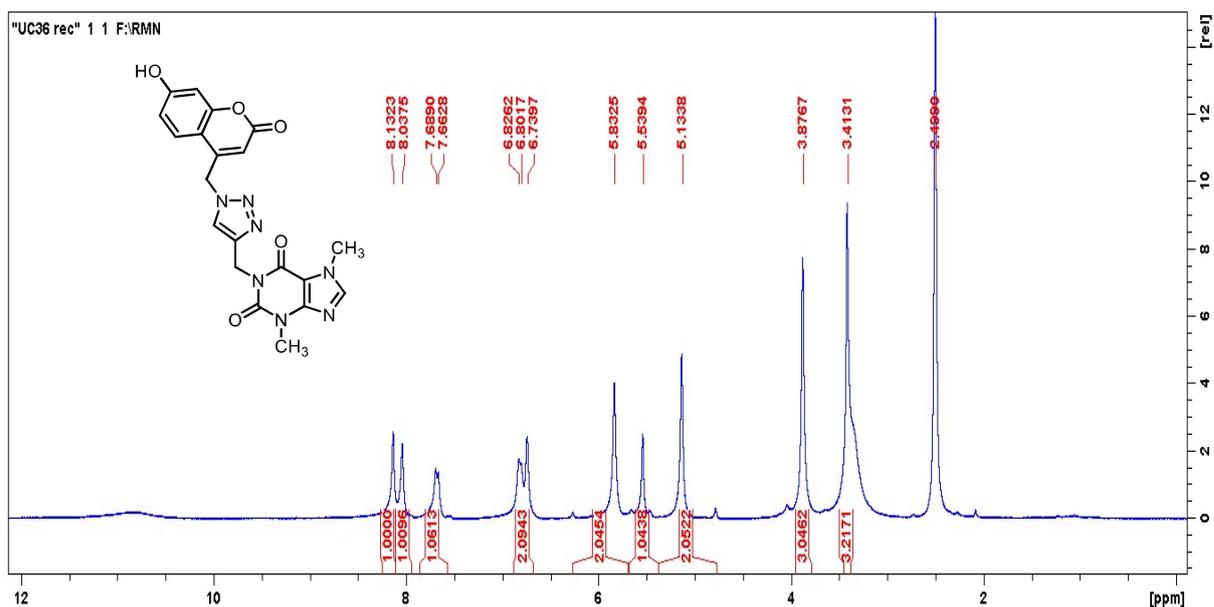


Figura 148. Expansão do espectro de RMN de ^1H a 300 MHz do híbrido 1-((1-((7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1*H*-purina-2,6-diona **9d** em DMSO-d_6

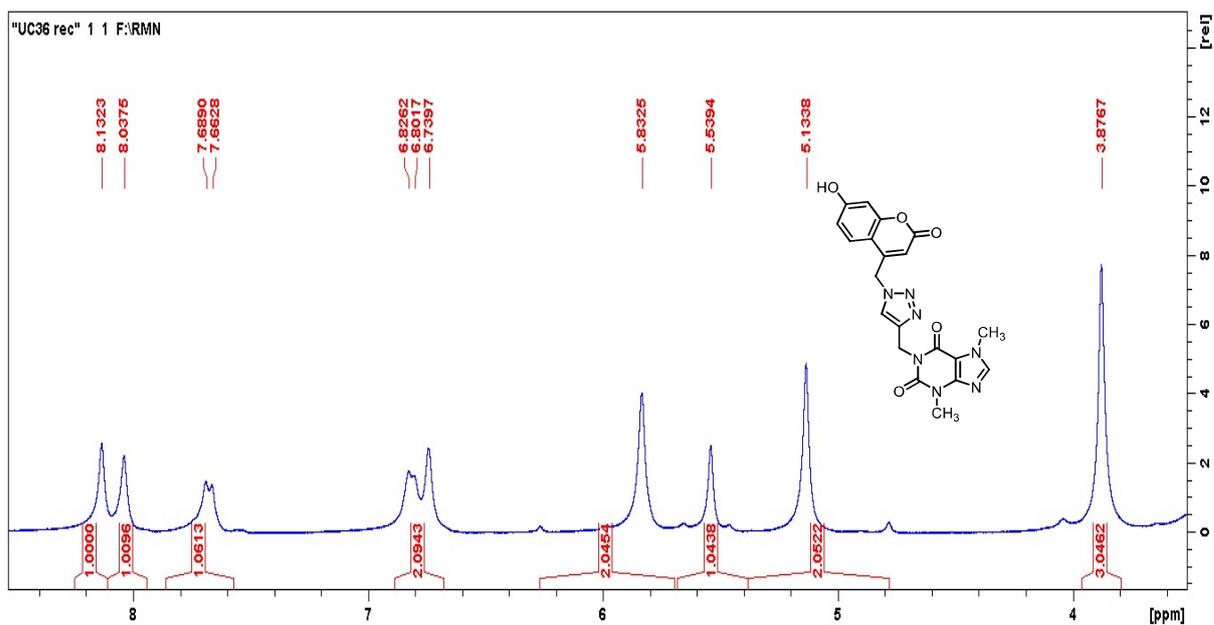


Figura 149. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz do híbrido 1-((1-((7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3,7-dimetil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona **9d** em DMSO-d_6

