



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**SÍNTESE OTIMIZADA DE 2-AMINOCROMENOS VIA REAÇÃO SEQUENCIAL  
KNOEVENAGEL-MICHAEL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA EM  
CÉLULAS TUMORAIS**

**POLIANA GOMES DE ABRANTES**

**SAPIENTIA AEDIFICAT**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**SÍNTESE OTIMIZADA DE 2-AMINOCROMENOS VIA REAÇÃO SEQUENCIAL  
KNOEVENAGEL-MICHAEL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA EM  
CÉLULAS TUMORAIS**

**POLIANA GOMES DE ABRANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química Orgânica.

**ORIENTADORA: JULIANA ALVES VALE**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2023**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

A161s Abrantes, Poliana Gomes de.

Síntese otimizada de 2-aminocromenos via reação sequencial Knoevenagel-Michael e avaliação da atividade biológica em células tumorais / Poliana Gomes de Abrantes. - João Pessoa, 2023.

98 f. : il.

Orientação: Juliana Alves Vale.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Química orgânica. 2. Química verde. 3. Cromenos.  
4. Reação sequencial Knoevenagel-Michael. 5. Atividade anticâncer. I. Vale, Juliana Alves. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547(043)

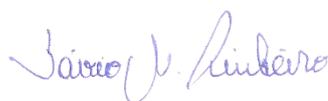
# Síntese otimizada de 2-aminocromenos via reação sequencial Knoevenagel-Michael e avaliação da atividade biológica em células tumorais.

Dissertação de Mestrado apresentada pela aluna Poliana Gomes de Abrantes e aprovada pela banca examinadora em 02 de março de 2023.



---

Profa. Dra. Juliana Alves Vale  
DQ/CCEN/UFPB  
Orientadora/Presidente



---

Prof. Dr. Sávio Moita Pinheiro  
DQ/CCEN/UFPB  
Examinador externo



---

Prof. Dr. Claudio Gabriel Lima Junior  
DQ/CCEN/UFPB  
Examinador interno

Assinaturas da Banca realizadas em modo Webconferência, digitalizadas e certificadas pela Profa. Dra Juliana Alves Vale em 02/03/2023.

Dedico este trabalho àqueles que genuinamente acreditaram em mim e torceram por essa conquista.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela força e sabedoria a mim concedidas, pela oportunidade de vivenciar essa experiência única e aproveitar intensamente cada dia.

Agradeço a minha família que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me aconselhando. Por me ensinarem respeitar ao próximo e a cumprir com as minhas responsabilidades. Por sempre se esforçarem para me educar da melhor forma possível, mesmo diante todas as dificuldades.

Agradeço a professora Dra. Juliana Vale pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço também pela paciência e tudo o que me foi ensinado. Tens meu respeito e admiração.

Agradeço a todos os professores do PPGQ da UFPB e aos professores do IFPB – campus Sousa, em especial a João Batista Moura, José Aurino Arruda, Valmiza Durand, Higo Lima, Antônio Gadelha, Anderson Sávio, Patrícia Roque que sempre acreditaram nos meus esforços e me incentivaram a buscar mais.

Agradeço a todos os colegas e amigos do Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise (LaSOB), Damião Alves, Renata Magalhães, Ryan Freitas e Nathalia Falcão pelo suporte e apoio emocional. Agradeço também e, principalmente, Paloma Abrantes (minha irmã), que me ajudou desde o início, sempre presente me auxiliando.

Agradeço a Paulo Santos, Renato Galdino, Kelvin Costa, Alcides Siqueira e Lidiane Gomes que sempre foram solícitos. Agradeço também a Evandro Ferreira e Marcelo Felipe (técnicos da Central Analítica), Thiago Brito (doutorando em Farmácia da UFPB), Profa. Gardênia Militão da UFPE e Gabriel Franco da UFG pelas análises realizadas.

Agradeço ao meu noivo, Breno Francisco, que mesmo sabendo o quão difícil seriam esses anos, nunca deixou de me incentivar, sempre acreditando no meu potencial mesmo quando eu duvidava. Sou grata por tê-lo em minha vida, por ser tão compreensivo e por construir este sonho comigo.

Agradeço aos meus amigos, em especial, Maíre Meneses, por me ajudar, apoiar e incentivar desde o início. Minha parceira preferida e irmã de outra mãe.

Agradeço a Universidade Federal da Paraíba, ao Programa de Pós-Graduação em Química e a Capes pelo suporte fornecido.

Se por ventura esqueci de mencionar alguém, perdoe-me. Mas saiba que sou muito grata por tudo. Enfim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e colaboraram para eu chegar aqui, o meu mais singelo obrigada.

*“Devemos manter a nossa certeza de que depois dos dias ruins, os bons virão novamente.”*

*– Marie Curie*

## RESUMO

A síntese de 2-aminocromenos através da reação sequencial Knoevenagel-Michael entre salicilaldeídos e malononitrila tem gerado grande interesse da comunidade científica nos últimos anos, especialmente por gerar compostos inéditos e com grande variedade estrutural. Entretanto, os protocolos da literatura ainda apresentam desvantagens por possuírem elevados tempos de síntese, métodos laboriosos e/ou agressivos ao meio ambiente. Desta forma, o presente trabalho consiste na investigação e aplicação de solventes para síntese de forma otimizada de 2-aminocromenos sem a necessidade de catalisadores, ao empregar salicilaldeídos e malononitrila. Entre os testes de solvente, o que mais se destacou para síntese dos 2-aminocromenos **3(a-g)** na proporção 1:2 (salicilaldeído:malononitrila), em termos de aumento de velocidade de reação, foi a mistura binária etanol:água (3:7). A mistura binária se mostrou mais eficiente para as reações com os aldeídos substituídos com grupos doadores de elétrons cujos produtos puros foram obtidos em tempos curtos (30-40 min) com altos rendimentos (90-93%). Também foi possível obter de forma otimizada outra classe de 2-aminocromenos **4(a-g)**, na proporção 1:3 (salicilaldeído:malononitrila), utilizando apenas etanol em refluxo. A aplicação do etanol permitiu sintetizar quatro novos compostos, além de outros três já conhecidos, com tempos reacionais curtos e moderados (60-300 min) e altos rendimentos isolados (75-93%). Além disso, essa reação apresentou alta economia atômica estando em conformidade com o segundo princípio da Química Verde. Os compostos **4(a-g)** ainda foram testados *in vitro* em três linhagens de células tumorais para determinação de seus potenciais de inibição. Os resultados obtidos mostraram que os compostos **4b**, **4e** e **4f** são bastantes promissores com percentagem de inibição superior a 75%, sendo o **4e** com índice de seletividade maior que 2,0 para todas as células cancerígenas testadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cromenos; Knoevenagel-Michael; Química Verde; Atividade Anticâncer.

## ABSTRACT

The synthesis of 2-aminochromenes through the sequential Knoevenagel-Michael reaction between salicylaldehydes and malononitrile has generated great interest in the scientific community in recent years, especially for generating new compounds with great structural variety. However, the protocols in the literature still have disadvantages because they have high synthesis times, laborious methods and/or aggressive to the environment. Thus, the present work consists of the investigation and application of solvents for the optimal synthesis of 2-aminochromenes without the need for catalysts, when using salicylaldehydes and malononitrile. Among the solvent tests, the one that stood out the most for the synthesis of 2-aminochromenes **3(a-g)** in the proportion 1:2 (salicylaldehyde:malononitrile), in terms of increasing the reaction speed, was the binary mixture ethanol:water (3:7). The binary mixture proved to be more efficient for reactions with aldehydes substituted with electron donating groups whose pure products were obtained in short times (30-40 min) with high yields (90-93%). It was also possible to optimally obtain another class of 2-aminochromenes **4(a-g)**, in the proportion 1:3 (salicylaldehyde: malononitrile), using only ethanol at reflux. The application of ethanol allowed the synthesis of four new compounds, in addition to three others already known, with short and moderate reaction times (60-300 min) and high isolated yields (75-93%). In addition, this reaction presented high atomic economy, being in accordance with the second principle of Green Chemistry. Compounds **4(a-g)** were also tested in vitro in three tumor cell lines to determine their inhibition potentials. The results obtained showed that compounds **4b**, **4e** and **4f** are very promising with an inhibition percentage greater than 75%, with **4e** having a selectivity index greater than 2.0 for all cancer cells tested.

**KEYWORDS:** Chromenes; Knoevenagel-Michael; Green Chemistry; Anticancer Activity.

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> – Compostos sintéticos derivados de cromenos que apresentam atividade biológica conhecida.....	29
<b>Esquema 2</b> - Representação mecanística da síntese do 2-aminocromeno <b>3</b> a partir do aduto de Knoevenagel.....	30
<b>Esquema 3</b> - Representação mecanística da síntese do 2-aminocromeno <b>4</b> a partir do aduto de Knoevenagel.....	31
<b>Esquema 4</b> - Medidas instrumentais usadas na caracterização dos 2-aminocromenos.....	44
<b>Esquema 5</b> - Proposta mecanística de reação entre salicilaldeído e malononitrila para síntese dos cromenos <b>3</b> e <b>4</b> e seus derivados.....	63

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Os doze Princípios da Química Verde.....	22
<b>Figura 2</b> – Representação da reação de Grignard e sua respectiva eficiência atômica.....	23
<b>Figura 3</b> – Representação da reação de Diels-Alder e sua respectiva eficiência atômica.....	24
<b>Figura 4</b> - Representação genérica para a reação de Condensação de Knoevenagel.....	25
<b>Figura 5</b> – Rota genérica de formação de cumarina ou iminocromeno com os metilenos ativos: cianoester de metila ou cianoester de metila.....	26
<b>Figura 6</b> – Rota genérica de formação de derivados de 2-amino-3-ciano-4H-cromenos via reação sequencial Knoevenagel-Michael-Ciclização Intramolecular.....	27
<b>Figura 7</b> - Síntese de derivados quinolino-pirano-cumarinas pentacíclicos via reação dominó Knoevenagel-IHDA sob condições “verdes”.....	27
<b>Figura 8</b> – Representação de rota sintética para formação dos derivados de cromenos <b>3</b> , <b>4</b> e <b>5</b> a partir de salicilaldeído e malononitrila.....	29
<b>Figura 9</b> - Representação de rota para síntese da molécula <b>4</b> a partir do composto <b>3</b> .....	33
<b>Figura 10</b> - Representação de rota para síntese do composto <b>4</b> a partir de malononitrila e salicilaldeído.....	34
<b>Figura 11</b> - Representação de rota de síntese de novo cromeno ( <b>6</b> ) a partir de malononitrila e salicilaldeído catalisada por eletrólise ou irradiação de luz visível.....	35
<b>Figura 12</b> - Interações intermoleculares da água, solvente polar prótico.....	36
<b>Figura 13</b> – Representação de processo de solvatação de ânion ( <b>a</b> ) e de cátion ( <b>b</b> ) por solvente polar prótico, água.....	38
<b>Figura 14</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) (2-amino-3-ciano-8-metoxi-4H-cromeno-4-il)malononitrila ( <b>3c</b> ).....	56
<b>Figura 15</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (101 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) (2-amino-3-ciano-8-metoxi-4H-cromeno-4-il)malononitrila ( <b>3c</b> ).....	57
<b>Figura 16</b> - Cromatogramas de uma amostra da reação com 2,4-dihidroxibenzaldeído e malononitrila (1:2) ( <b>a</b> ) e padrão de reagente ( <b>b</b> ).....	58
<b>Figura 17</b> - Cromatograma comparando tempos de retenção de uma amostra da reação com 5-bromosalicilaldeído e malononitrila (1:2) (amostra 1) e reagente (5-bromosalicilaldeído).....	59
<b>Figura 18</b> - Cromatograma comparando tempos de retenção de amostra da reação salicilaldeído e malononitrila (1:3) em etanol sem aquecimento (amostra 1), e produtos <b>3a</b> e <b>4a</b> .....	61
<b>Figura 19</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de 2-(4,5-diamino-9-bromo-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4b</b> ).....	67

<b>Figura 20</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-9-bromo-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4b</b> ).....	67
<b>Figura 21</b> – Espectro de Massa de Alta Resolução do produto <b>4b</b> .....	68
<b>Esquema 22</b> – Equação balanceada que representa reação entre salicilaldeído e malononitrila para síntese da molécula <b>4a</b> , com suas respectivas massas molares.....	69
<b>Figura 23</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de (2-Amino-3-ciano-4H-cromeno-4-il)malononitrila ( <b>3a</b> ).....	89
<b>Figura 24</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, DMSO- $d_6$ ) de (2-Amino-3-ciano-4H-cromeno-4-il)malononitrila ( <b>3a</b> ).....	89
<b>Figura 25</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(2-amino-3-ciano-6-metoxi-4H-cromeno-4-il)malononitrila ( <b>3b</b> ).....	90
<b>Figura 26</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(2-amino-3-ciano-6-metoxi-4H-cromeno-4-il)malononitrila ( <b>3b</b> ).....	90
<b>Figura 27</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4a</b> ).....	91
<b>Figura 28</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4a</b> ).....	91
<b>Figura 29</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-9-cloro-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4c</b> ).....	92
<b>Figura 30</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-9-cloro-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4c</b> ).....	92
<b>Figura 31</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-9-nitro-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4d</b> ).....	93
<b>Figura 32</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-9-nitro-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4d</b> ).....	93
<b>Figura 33</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-9-metoxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4e</b> ).....	94
<b>Figura 34</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-9-metoxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4e</b> ).....	94
<b>Figura 34</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-7-metoxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4f</b> ).....	95
<b>Figura 36</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, DMSO- $d_6$ ) de (4,5-Diamino-1-ciano-7-metoxi-1,10b-dihidro-2H-cromeno-[3,4-c]piridin-2-ilideno)malononitrila ( <b>4f</b> ).....	95
<b>Figura 37</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-8-hidroxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4g</b> ).....	96

<b>Figura 38</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-8-hidroxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila ( <b>4g</b> ).....	96
<b>Figura 39</b> – Espectro de massa de alta resolução para o 2-aminocromeno <b>4d</b> .....	97
<b>Espectro 40</b> - Espectro de Massa de Alta Resolução para o 2-aminocromeno <b>4e</b> .....	97
<b>Figura 41</b> - Espectro de massa de alta resolução para o 2-aminocromeno <b>4g</b> .....	98
<b>Figura 42</b> - Cromatograma comparando tempos de retenção de uma amostra da reação com 5-clorosalicilaldeído e malononitrila (1:2) (amostra 3) e reagente (5-clorosalicilaldeído).....	98
<b>Figura 43</b> - Cromatograma comparando tempos de retenção de uma amostra da reação com 5-nitrosalicilaldeído e malononitrila (1:2) (amostra 4) e reagente (5-nitrosalicilaldeído).....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Sínteses do derivado de cromo <b>3</b> descritas na literatura, variando as condições de reação.....	32
<b>Tabela 2</b> - Constante dielétrica ( $\epsilon$ ) de alguns solventes .....	36
<b>Tabela 3</b> - Reagentes e solventes utilizados nos procedimentos experimentais e suas procedências.....	43
<b>Tabela 4</b> - Teste de solvente para reação entre salicilaldeído e malononitrila (cromo – <b>3a</b> ).....	52
<b>Tabela 5</b> - Efeito do grupo substituinte do aldeído na síntese dos derivados de cromos <b>3(b-g)</b> .....	55
<b>Tabela 6</b> - Teste de solvente para reação entre salicilaldeído e malononitrila (cromo – <b>4a</b> ).....	60
<b>Tabela 7</b> - Efeito do grupo substituído do aldeído para o síntese do derivado de cromo <b>4(b-g)</b> .....	64
<b>Tabela 8</b> – Fator economia atômica dos derivados de cromos <b>4(b-g)</b> formados nas reações, a partir das massas molares da malononitrila e espécie de salicilaldeído.....	69
<b>Tabela 9</b> – Fator economia atômica experimental dos compostos <b>4(b-g)</b> formados nas reações, a partir dos rendimentos obtidos com reações .....	70
<b>Tabela 10</b> - Porcentagem de inibição do crescimento celular (% INIB) e desvio padrão da média (DP) das amostras em três linhagens tumorais. Doxorrubicina (DOX) como controle positivo.....	71
<b>Tabela 11</b> – Concentração que causa 50% de inibição do crescimento ( $CI_{50}$ ) e seu intervalo de confiança (IC) em $\mu\text{g/mL}$ das amostras nas linhagens MRC-5, H-1299, K-562 e HCT-116.....	72
<b>Tabela 12</b> – Índice de seletividade dos compostos ativos.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- Lis - Líquidos Iônicos
- NPMs - Nanopartículas Magnéticas
- MOFs – Estrutura Metalorgânica
- EA – Economia Atômica
- %EA – Porcentagem de Economia Atômica
- GEA – Grupo Eletrotrator
- v:v - Relação Proporcional Volumétrica
- IDHA – Intramolecular hetero-Diels-Alder
- THF – Tetraidrofurano
- CFL – Lâmpada Fluorescente Compacta
- $\epsilon$  - Constante Dielétrica
- SN<sub>1</sub> – Substituição Nucleofílica Unimolecular
- SN<sub>2</sub> – Substituição Nucleofílica Bimolecular
- CLUR – Cromatografia Líquida Ultra Rápido
- RMN – <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética de Hidrogênio
- RMN – <sup>13</sup>C – Ressonância Magnética de Carbono 13
- EMAR – Espectrometria de Massa de Alta Resolução
- P.F – Ponto de Fusão
- DOD – Detector de Díodo
- MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
- CI<sub>50</sub> – Concentração Inibitória em 50%
- $\delta$  – Deslocamento Químico
- TR – Tempo de Retenção
- EA<sub>exp</sub> - Economia Atômica Experimental
- DOX – Doxorrubicina
- %INIB – Porcentagem de Inibição do Crescimento Celular
- IC – Intervalo de Confiança
- IS – Índice de Seletividade
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- Rf – Fator de Retenção

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>21</b>
2.1 QUÍMICA VERDE.....	21
2.2 CONDENSAÇÃO DE KNOEVENAGEL E AS REAÇÕES SEQUENCIAIS.....	24
2.3 SÍNTESE DE 2-AMINOCROMENOS.....	28
2.4 EFEITOS DO SOLVENTE NA QUÍMICA.....	35
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>43</b>
4.1 SOLVENTES E REAGENTES.....	41
4.2 MEDIDAS INSTRUMENTAIS.....	41
4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada.....	44
4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13.....	44
4.2.3 Cromatografia Líquida Ultra Rápida (CLUR).....	44
4.2.4 Espectrometria de Massa de Alta Resolução.....	45
4.2.5 Determinação do Ponto de Fusão (P.F).....	45
4.3 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA A SÍNTESE DE 2-AMINOCROMENOS.....	45
4.3.1 Obtenção da Mistura Binária Etanol:Água (3:7).....	45
4.3.2 Síntese dos derivados de cromenos 3(a-g).....	46
4.3.3 Síntese dos derivados de cromenos 4(a-g).....	46
4.4 METODOLOGIA UTILIZADO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE <i>IN VITRO</i> – CITOTOXICIDADE E CI <sub>50</sub> .....	46
4.5. DADOS ESPECTROSCÓPICOS (RMN DE <sup>1</sup> H E <sup>13</sup> C) E ESPECTROMÉTRICOS.....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
5.1 TESTE DE SOLVENTE PARA SÍNTESE DO 2-AMINOCROMENO 3a.....	52
5.2 SÍNTESE DE UMA SÉRIE DE DERIVADOS DE CROMENOS 3(b-g) .....	54
5.3 TESTE DE SOLVENTE E TEMPERATURA PARA SÍNTESE DO 2-AMINOCROMENO 4a .....	60
5.4 SÍNTESE DE UMA SÉRIE DE DERIVADOS DE CROMENOS 4(b-g) .....	63
5.4.1 Determinação da economia atômica para a síntese dos derivados de cromenos 4(a-g).....	68
5.4.2 Teste de atividade biológica <i>in vitro</i> – citotoxicidade e CI <sub>50</sub> em células de câncer.....	70

<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>75</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE A – RMN de <math>^1\text{H}</math> e <math>^{13}\text{C}</math>.....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICE B – Espectro de Massa de Alta Resolução.....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE C – Cromatogramas.....</b>	<b>98</b>

# **CAPÍTULO 1**

**INTRODUÇÃO**



## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o meio ambiente vem sofrendo com os impactos provocados pela formação de subprodutos tóxicos, uso exagerado de solventes orgânicos e descarte inadequado desses materiais, gerados pela produção química. Discutir questões ambientais e métodos de preservação da natureza trata-se de uma realidade para diversos setores da sociedade.<sup>1</sup> Visando diminuir os problemas ocasionados pela indústria química, a Química Verde busca minimizar os danos ao meio ambiente através de metodologias “ecoamigáveis” que façam uso de reagentes alternativos adequados, possuam baixo custo e menor consumo de energia, alta seletividade para maximizar o uso dos materiais de partida e reduzir a produção de resíduos.<sup>2</sup>

No que concerne à Síntese Orgânica, além da idealização de novas moléculas, o foco atual também está no desenvolvimento de novos catalisadores e maneiras que visem melhorar o rendimento, reduzir os tempos de reação e que se adequem às novas políticas socioambientais regidas pela Química Verde.<sup>3,4</sup> Com isso, os catalisadores heterogêneos ou heterogeneizados têm ganhado notoriedade por se enquadrarem a essas metodologias “verdes”.<sup>5</sup> De modo geral, na catálise das reações orgânicas existem diversos materiais utilizados como catalisadores, por exemplo, líquidos iônicos (LIs),<sup>6</sup> enzimas,<sup>7</sup> organocatalisadores,<sup>8</sup> nanopartículas magnéticas (NPMs),<sup>9</sup> estruturas metal-orgânico (MOFs),<sup>10</sup> complexos,<sup>11</sup> entre outros.

Além do estudo e desenvolvimento de catalisadores, há também pesquisas de novas metodologias com sistemas sem catalisadores, que são considerados sistemas mais ecologicamente favoráveis por dispensarem uso de tal composto, se valendo, geralmente, do efeito de solvente como promotor da reação.<sup>12</sup> A variação das condições de temperatura, pressão, superfície de contato, entre outros, também é considerada para otimização das reações químicas com elevados tempos reacionais.<sup>13,14</sup>

Muitas reações sequenciais possuem como uma de suas etapas a condensação de Knoevenagel. A exemplo disso, pode-se citar a síntese de 2-aminocromenos, realizada a partir da reação de um aldeído (salicilaldeído) e um composto de metileno ativo (malononitrila), seguida de reações de adição de Michael após a condensação. Os 2-aminocromenos pertencem a uma importante classe de compostos amplamente encontrados em plantas, incluindo frutas comestíveis e vegetais,<sup>15</sup> e apresentam propriedades biologicamente ativas associadas à prevenção de doenças.<sup>16</sup> Análogos sintéticos têm sido desenvolvidos e apresentado efeitos medicinais significativos como antiviral, anti-HIV, antidepressivo, antioxidante, anticoagulante, antimicrobiano, mutagenicidade, antiproliferativo, antitumoral, diurético,

antianafilático, bactericida, entre outras.<sup>17</sup> Entretanto, os estudos retratados na literatura para a síntese de tais substâncias possuem condições reacionais com elevado tempo de síntese, métodos laboriosos e/ou agressivos ao meio ambiente, além de alguns métodos fazerem uso de catalisadores orgânicos ou inorgânicos.<sup>18-20</sup> Desta forma, com base no que foi previamente exposto, o presente trabalho consiste na investigação e aplicação de solventes para otimização da reação de síntese de 2-aminocromenos sem utilização de catalisadores via reação Knoevenagel-Michael.

## **CAPÍTULO 2**



## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 QUÍMICA VERDE

Mesmo que nada seja verdadeiramente benigno ao meio ambiente e à saúde humana, existem substâncias e metodologias conhecidas por serem menos nocivas do que outras.<sup>21,22</sup> Realizar trabalhos de maneira mais econômica e ecológica pelos fabricantes de produtos químicos, é possível ao seguir os preceitos oferecidos pela Química Verde,<sup>23</sup> que surgiu em 1991, quando a agência ambiental norte-americana *Environmental Protection Agency* (EPA), comandada por Paul Anastas e colaboradores, criou um programa de financiamento denominado “Rotas Sintéticas Alternativas para Prevenção de Poluição” a fim de desenvolver projetos de pesquisa que introduzissem a prevenção da poluição em suas rotas sintéticas.<sup>24,25</sup>

Diante disso, diversos países aderiram a prática de processos ambientalmente corretos sugeridos pela Química Verde, dando origem a novos programas e iniciativas governamentais, tais como a criação, em 1995, da premiação *The Presidential Green Chemistry Challenge* (PGCC) idealizada pelo governo dos Estados Unidos da América, ao buscar premiar inovações tecnológicas que pudessem ser adotadas pelas indústrias para minimizar os impactos causados ao meio ambiente;<sup>24,25</sup> a abertura do Instituto de Química Verde (do inglês, *Green Chemistry Institute*) em 1997;<sup>26</sup> como também, a publicação do primeiro volume do *Jornal de Química Verde* (do inglês, *Green Chemistry Journal*) da *Royal Society of Chemistry*, em 1999,<sup>27</sup> entre outros.

A Química Verde pode ser definida como a parte da Química que delinea os produtos e processos químicos para diminuir ou extinguir o uso, produção e emissão de substâncias perigosas à saúde humana e ao meio ambiente,<sup>21,28,29</sup> se esforçando para alcançar a sustentabilidade no nível molecular. Por apresentar tecnologia limpa, vem sendo trabalhada nos mais diversos setores da indústria, desde o aeroespacial, automotivo, cosmético, eletrônico, energético, farmacêuticos até a agricultura. Além disso, vem ganhando notável espaço no meio acadêmico-científico nos últimos anos.<sup>30-33</sup>

Como é possível perceber com sua definição, a palavra-chave da Química Verde é a redução, principalmente quando se tratando da poluição ambiental, e apresenta os seguintes objetivos: (a) Reduzir o consumo de energia; (b) Reduzir a geração de resíduos; (c) Reduzir a toxicidade; (d) Reduzir o uso de fontes não renováveis; (e) Reduzir os riscos de poluição ao meio ambiente; e (f) Reduzir o uso de matéria-prima.<sup>24,29</sup> Seu perfil é desenhado por 12

princípios que foram determinados com o intuito de se estabelecer uma base unificada para efetuação desses preceitos em procedimentos experimentais e industriais,<sup>23,29,34</sup> mostrados na

**Figura 1:**

**Figura 1** – Os doze Princípios da Química Verde.



Como visto na **Figura 1**, o segundo princípio da Química Verde é a economia de átomos, que busca diminuir a quantidade de rejeitos produzidos em uma reação química.<sup>23,29,34</sup> Mesmo apresentando alto rendimento, processos nos quais um grande número de átomos dos materiais de partida se transformam em resíduo e fazem uso ineficiente dos recursos empregados, acabam elevando os custos da produção.<sup>22,35</sup> Embora o rendimento seja muitas vezes pensado como uma forma de verificar quão eficiente é uma reação no desenvolvimento do produto final, ignora uma medida da proporção de átomos dos reagentes que são incorporados no produto desejado versus a fração que acaba sendo descartada.<sup>24,36</sup>

Apesar das indústrias químicas buscarem desenvolver processos com alta seletividade e alto rendimento para melhor utilizar os átomos dos reagentes que serão agregados no produto final, o que acontece na prática é que, geralmente, esses tais processos não conseguem evitar a produção de materiais nocivos ao meio ambiente, além do volumoso uso de solventes para a purificação, indo contra esse princípio da Química Verde.<sup>37,38</sup>

A Economia de Átomos ou Eficiência Atômica (EA) é um cálculo teórico que assume o uso de quantidades estequiométricas absolutas de reagentes e um rendimento químico teórico, desconsiderando as substâncias químicas auxiliares como solventes, ácidos ou bases,

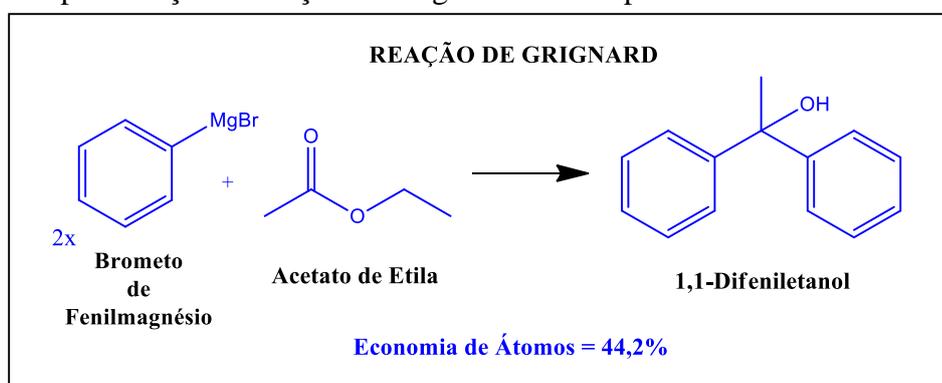
que não aparecem na equação estequiométrica. Pode ser aplicada sem a necessidade de experimentação, sendo uma ferramenta extremamente útil para uma rápida previsão e avaliação das quantidades de desperdícios de uma rotas alternativas para uma determinada molécula-alvo, bem como o número de átomos que serão agrupados no produto desejado.<sup>25,39</sup>

A EA é medida a partir da razão da massa molar do produto desejado sobre a soma das massas molares de todos os reagentes usados na reação (Eq. 1).<sup>39</sup>

$$(\%EA) = \left( \frac{\text{MM do produto desejado}}{\sum \text{MM de todos os reagentes utilizados}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

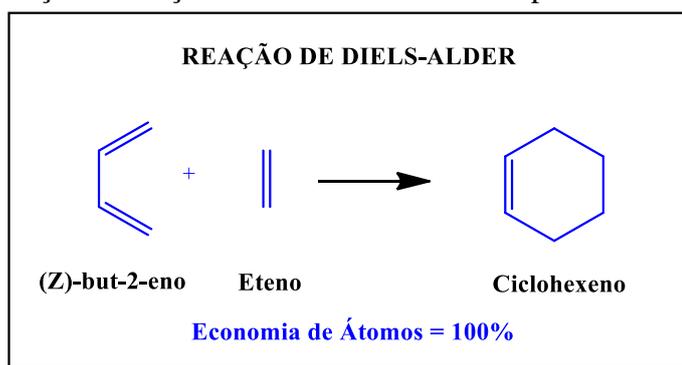
A reação de Grignard pode ser utilizada como exemplo para ilustrar a baixa eficiência atômica de uma síntese, apesar de suas grandes contribuições para a síntese orgânica (Figura 2). É considerada uma reação atômica relativamente pobre devido ao uso de uma grande quantidade estequiométrica de reagente com metal e à necessidade de prepará-lo separadamente. Apresenta valor de EA de 44% refletindo uma perda de metade da matéria-prima empregada.<sup>35</sup>

**Figura 2** – Representação da reação de Grignard e sua respectiva eficiência atômica.



**Fonte:** Adaptado de Anastas e Eghbali.<sup>35</sup>

Outras reações com baixa economia de átomos são as reações de eliminação, acilação de Friedel-Crafts e reação de Wittig, que utilizam grande quantidade de reagentes que não são incorporados totalmente ao produto final.<sup>39,40</sup> Por outro lado, a reação de Diels-Alder é um excelente modelo de uma reação econômica atômica (Figura 3).

**Figura 3** – Representação da reação de Diels-Alder e sua respectiva eficiência atômica.

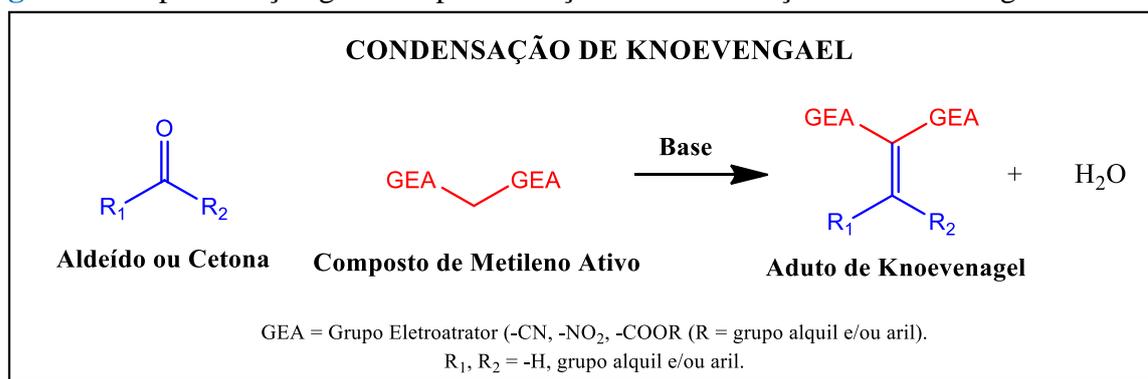
**Fonte:** Adaptado de Anastas e Eghbali.<sup>35</sup>

A EA é igual a 100%, já que todos os átomos dos reagentes são inseridos no produto final. As reações do tipo Diels-Alder fazem parte da categoria de cicloadição, que está entre os tipos de reações mais ecologicamente corretas da Química tradicional.<sup>35,39,40</sup> A Condensação de Knoevenagel,<sup>41</sup> bem como as reações sequenciais Knoevenagel-Ugi,<sup>42</sup> Knoevenagel-Michael,<sup>43</sup> Knoevenagel-Hidratação-Esterificação<sup>44</sup> também atendem a esse princípio, apresentando alta eficiência atômica.

## 2.2 CONDENSAÇÃO DE KNOEVENAGEL E AS REAÇÕES SEQUENCIAIS

A Condensação de Knoevenagel é uma das reações mais importantes para a formação de ligação carbono-carbono na síntese orgânica, diferenciando-se da condensação aldólica comum apenas pela maior reatividade do composto de metileno ativo (-CH<sub>2</sub> diretamente ligado a dois grupos eletroatratores -GEA) utilizado.<sup>41,45</sup> Os átomos de hidrogênio do metileno ativo apresentam elevada acidez devido ao efeito de ressonância envolvendo o metileno e os dois grupos eletroatratores, que promove a estabilização da carga negativa e, consequentemente, aumenta a estabilidade da base conjugada.<sup>46</sup>

A Condensação de Knoevenagel ocorre entre o composto de metileno ativo e um composto carbonílico (aldeído ou cetona), sob catálise básica, e permite a formação de produtos  $\alpha,\beta$ -insaturados, também denominados adutos (**Figura 4**).<sup>41,45</sup> As moléculas sintetizadas nessa reação possuem múltiplas aplicabilidades, sendo intermediários chave para a síntese de polímeros, cosméticos e perfumes,<sup>47</sup> além de também serem utilizados na produção de fármacos com atividades antivirais, antituberculosa, antiparkinsoniana, antidiabética, antioxidante e anticancerígena.<sup>48-52</sup>

**Figura 4** - Representação genérica para a reação de Condensação de Knoevenagel.

Em nosso grupo de pesquisa a síntese dos adutos de Knoevenagel já foi bastante explorada. Em um dos estudos, por exemplo, esses compostos foram sintetizados utilizando de metodologia ecologicamente correta e eficiente, sem uso de catalisador, a partir de uma série de aldeídos e malononitrila, em mistura binária etanol:água (3:7, v:v) e aquecimento convencional (75 °C). Os produtos foram obtidos em tempos reacionais curtos e moderados (3-240 min) e bons rendimentos isolados (55-100%).<sup>53</sup>

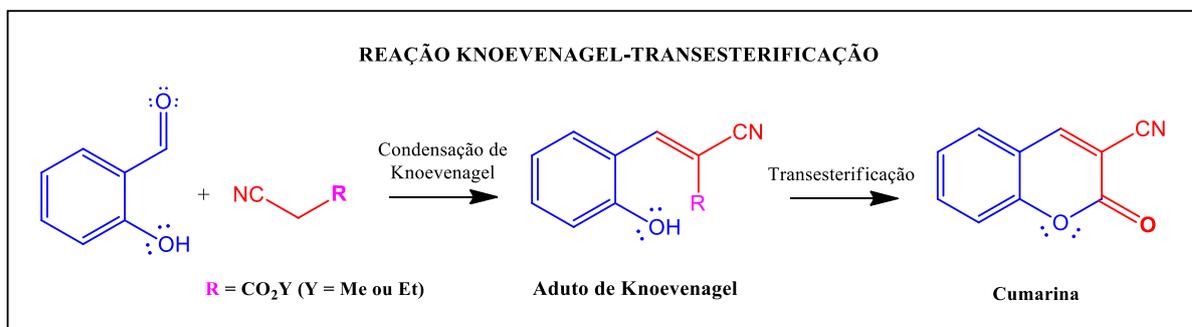
Ao longo dos anos, vários estudos têm sido desenvolvidos incluindo a Condensação de Knoevenagel como etapa de reações em cascata ou dominó.<sup>54-61</sup> Essa terminologia é utilizada para retratar a combinação de duas ou mais reações distintas que ocorrem consecutivamente em um único sistema, as também denominadas reações sequenciais. Isto é, o produto gerado na reação anterior será o material de partida da reação seguinte.<sup>62,63</sup>

As reações sequenciais são, cada vez mais, relevantes para a Química Orgânica moderna devido à necessidade de métodos mais eficientes e menos trabalhosos para a síntese de compostos orgânicos, como também devido à crescente preocupação com questões ambientais. Tais reações têm apresentado benefícios econômicos e ecológicos significativos por realizar várias etapas sintéticas em um único sistema sem a necessidade de isolar os intermediários da reação.<sup>62</sup>

Na literatura é possível identificar vários relatos de diversas reações sequenciais nas quais a condensação de Knoevenagel faz parte: Knoevenagel-Michael,<sup>54-57</sup> Knoevenagel-hetero-Diels-Alder,<sup>58-61</sup> oxo-Knoevenagel,<sup>64</sup> Knoevenagel/Perkin-Heck/Suzuki,<sup>65</sup> Ugi-Knoevenagel<sup>66</sup> ou Knoevenagel-Ugi,<sup>42</sup> entre outras. As cumarinas, por exemplo, são compostos heterocíclicos cuja rota sintética também passa pela reação de Knoevenagel. Normalmente, a síntese ocorre a partir de uma reação em cascata entre salicilaldeído e um composto de metileno

ativado. O aduto, formado após a condensação de Knoevenagel, sofre uma reação de transesterificação resultando no produto final<sup>67</sup> (**Figura 5**).

**Figura 5** – Rota genérica de formação de cumarina com os compostos de metilenos ativos: cianoester de metila ou cianoester de metila.

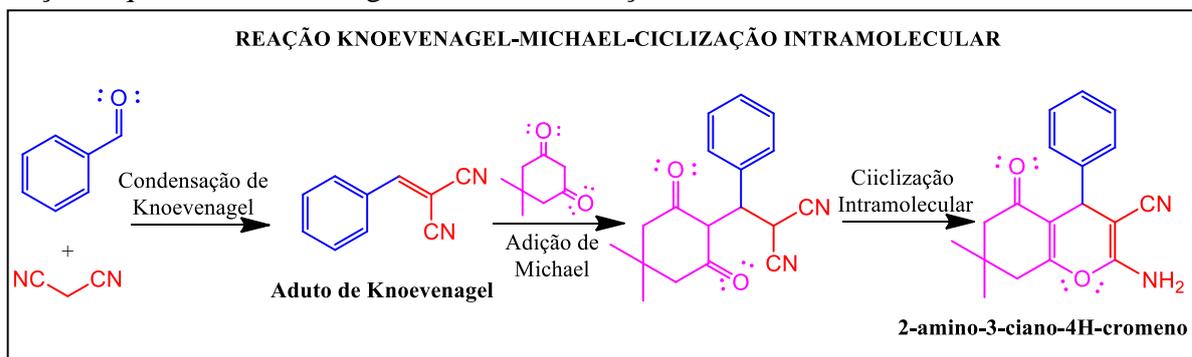


**Fonte:** Adaptado de Keshavarzipour e Tavakol.<sup>67</sup>

As cumarinas possuem estrutura base que permite realizar inúmeros tipos de sínteses, cujos produtos e intermediários são muito utilizados na indústria de cosméticos e corantes<sup>68</sup> e, principalmente, farmacêutica.<sup>69</sup> Esses compostos se destacam por apresentarem atividades anticâncer,<sup>70,71</sup> analgésica,<sup>72</sup> antimicrobiana/antituberculose<sup>73</sup> e anti-HIV.<sup>74</sup>

Assim como a síntese das cumarinas, os derivados de 2-amino-3-ciano-4H-cromenos também apresentam rota sintética via reação sequencial, tendo a reação de Knoevenagel como uma de suas etapas, como demonstram os estudos desenvolvidos por Ortiz-Bustos e colaboradores<sup>75</sup>. Esses produtos são obtidos a partir da reação multicomponente entre benzaldeído, malononitrila e dimedona, em etanol e a 25 °C catalisada por nanopartículas de TiO<sub>2</sub> funcionalizadas com polímero polietilenimina hiperramificado (PEI) ou com N1-(3-trimetoxissililpropil)-dietilenotriamina (DT) (**Figura 6**). O sistema utilizado, além de “ecoamigáveis”, permite a formação dos produtos em tempos relativamente curtos (30-120 min) e altos rendimentos isolados (85-100%). Na reação, inicialmente, ocorre a condensação do aldeído com a malononitrila levando a formação do aduto de Knoevenagel, que atuará como um acceptor Michael deficiente em elétrons. Em seguida, a molécula de dimedona ataca o composto deficiente de elétrons para dar origem ao produto da adição de Michael, que sofre reação de ciclização intramolecular simultânea para produzir o correspondente derivado de cromeno.

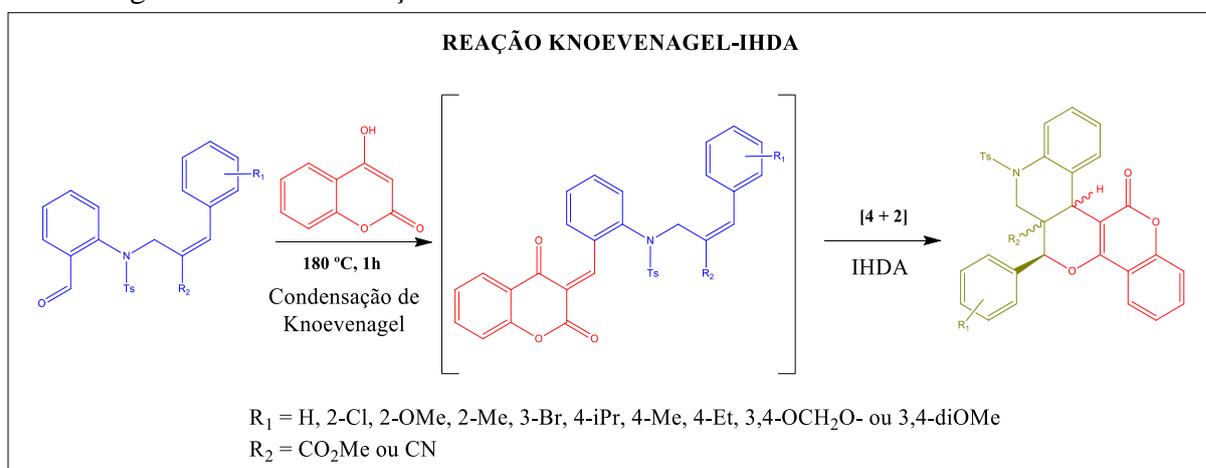
**Figura 6** – Rota genérica de formação de derivados de 2-amino-3-ciano-4H-cromenos via reação sequencial Knoevenagel-Michael-Ciclização Intramolecular.



**Fonte:** Adaptado de Ortiz-Bustos e colaboradores.<sup>75</sup>

Do ponto de vista da Química Verde, outro exemplo que pode ser citado é a reação dominó de Knoevenagel-hetero-Diels-Alder, utilizando catalisadores “ecoamigáveis”. Essa reação dominó pode ser destacada graças ao uso de um procedimento “verde”, principalmente no que diz respeito ao segundo princípio - economia de átomos - e à prevenção da formação de subprodutos. Nessa reação dominó, apenas uma molécula de água é perdida na condensação de Knoevenagel, enquanto na reação de ciclização intramolecular-hetero-Diels-Alder, nenhum átomo é perdido.<sup>76,77</sup> Bakthadoss e Kannan,<sup>78</sup> tal como, desenvolveram uma nova rota sintética para derivados de quinolino-pirano-cumarinas pentacíclicos via reação sequencial Knoevenagel-IHDA (intramolecular hetero-Diels-Alder), com tempos reacionais consideravelmente curtos (~1 h), rendimentos elevados (92-98%) e sem utilização de catalisadores e solventes (**Figura 7**).

**Figura 7** - Síntese de derivados quinolino-pirano-cumarinas pentacíclicos via reação dominó Knoevenagel-IHDA sob condições “verdes”.



**Fonte:** Adaptado de Bakthadoss e Kannan.<sup>78</sup>

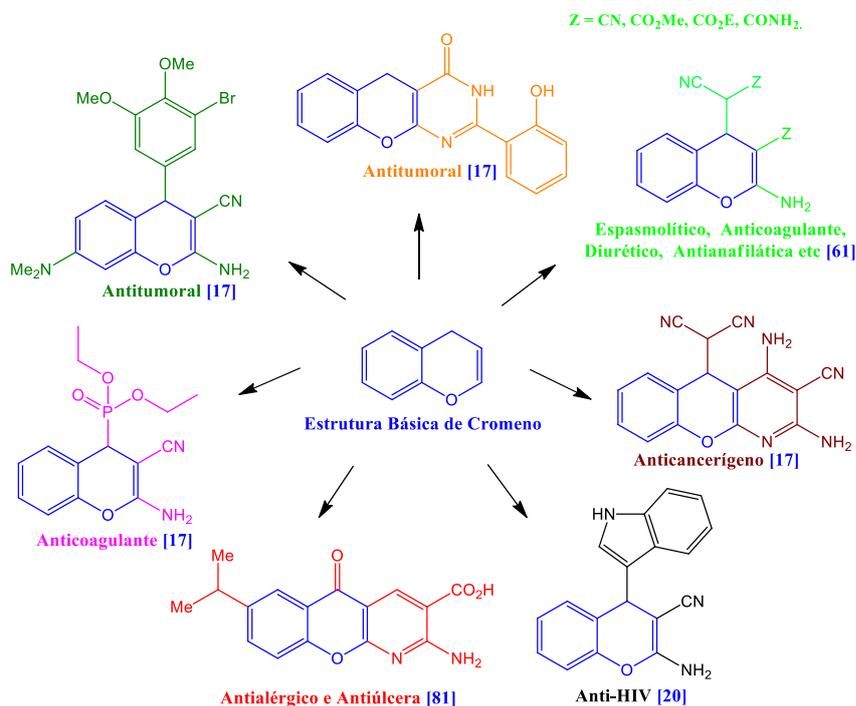
Esses trabalhos e vários outros envolvendo reações sequenciais e reformulações das sínteses clássicas, sugerem caminhos reacionais que buscam alcançar melhores resultados, principalmente relacionados a rendimento e tempo de reação, assim como a síntese de derivados de cromenos, objeto de estudo dessa pesquisa, que também se encaixam nessa perspectiva de reações sequenciais e será discutida no tópico a seguir.

### 2.3 SÍNTESE DE 2-AMINOCROMENOS

Os 2-aminocromenos são uma classe importante de compostos heterocíclicos cuja estrutura básica é característica comum de muitos taninos, tocoferóis, antocianinas e flavonoides, compostos medicinalmente importantes, presentes em chás, frutas comestíveis, vegetais e vinho tinto.<sup>17</sup> Numerosos produtos naturais bioativos foram identificados, e a presença da estrutura à base de cromeno tem sido associada à capacidade de prevenir doenças, tornando-se mais importantes devido seus efeitos promotores da saúde.<sup>7,18</sup>

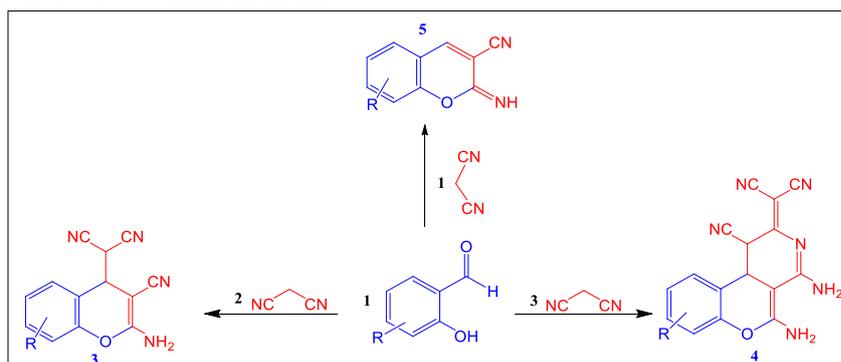
Derivados sintéticos foram desenvolvidos com o decorrer dos anos (**Esquema 1**) e identificados como agentes antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes antituberculose, antiproliferativo,<sup>79,80</sup> podendo ainda atuar na prevenção de várias doenças como artrite reumatóide e psoriática, além de colaborar no tratamento do câncer,<sup>62</sup> entre outros. Além disso, algumas porções de cromenos, como cumarinas e iminocumarinas, por exemplo, têm propriedades fluorescentes e, portanto, são usadas em agentes clareadores, branqueadores ópticos e como corantes a laser em farmácia e biologia, além de serem empregados como sensores fluorescentes para a avaliação de íons metálicos em concentrações micromolares.<sup>17</sup>

**Esquema 1** – Compostos sintéticos derivados de cromenos que apresentam atividade biológica conhecida.



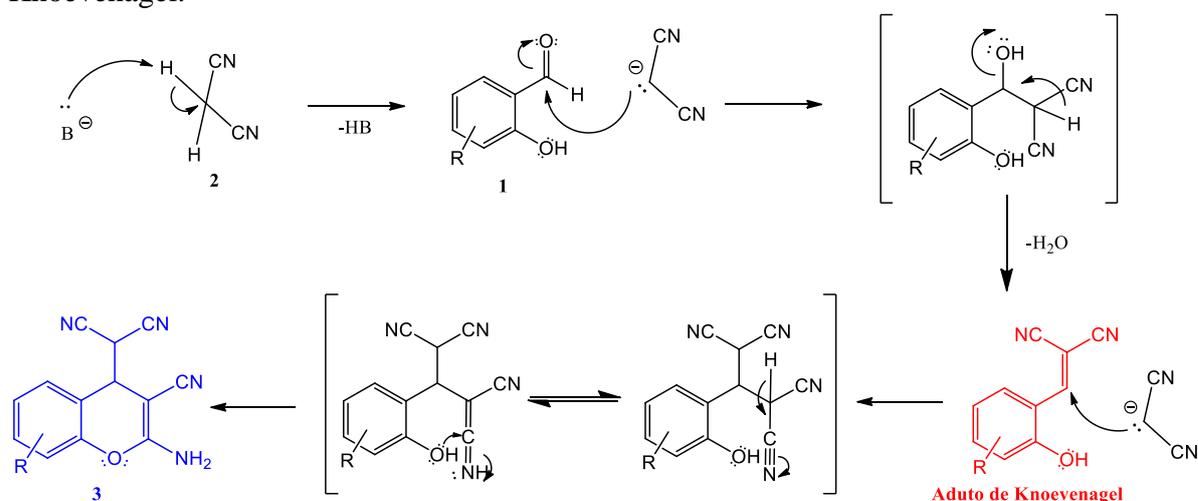
O método clássico para a síntese dos 2-aminocromenos **3** e **4** (**Figura 8**), compostos heterocíclicos que vêm sendo estudados por serem fortes candidatos à fármacos, também se dá a partir de uma reação sequencial, cuja etapa inicial é a condensação Knoevenagel envolvendo aldeídos salicílicos e compostos de metileno ativos.<sup>7,19,82,83</sup> Uma investigação precisa dos relatórios sobre a reação entre salicilaldeído e malononitrila revela que um controle delicado de solvente, temperatura e proporção de reagentes são determinantes para a incorporação de 1, 2 ou 3 equivalentes molares de malononitrila na molécula de aldeído,<sup>18,84</sup> isto é, esses fatores associados, principalmente, a proporção estequiométrica de reagentes, influenciará diretamente no produto final formado.

**Figura 8** – Representação de rota sintética para formação dos derivados de cromenos **3**, **4** e **5** a partir de salicilaldeído e malononitrila.



Geralmente, ao utilizar um equivalente de salicilaldeído para dois de malononitrila (1:2), tem-se a incorporação desses dois equivalentes de malononitrila na molécula de salicilaldeído, sendo o primeiro inserido pela condensação de Knoevenagel e o segundo pela adição de Michael, com posterior ciclização intramolecular do intermediário formado anteriormente, para obtenção do 2-aminocromeno **3**,<sup>84</sup> como mostra a representação mecanística no **Esquema 2**:

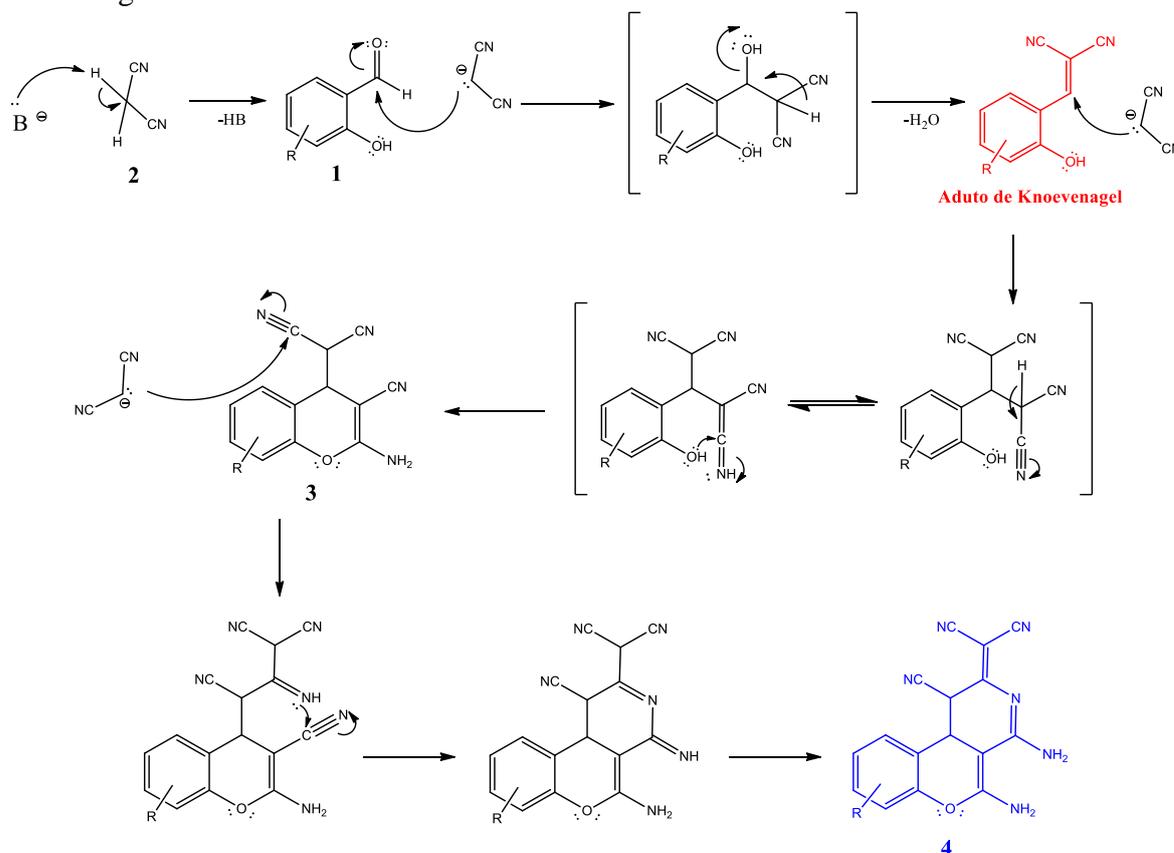
**Esquema 2** - Representação mecanística da síntese do 2-aminocromeno **3** a partir do aduto de Knoevenagel.



**Fonte:** Adaptado de Bhat e colaboradores.<sup>84</sup>

Para o caso da aplicação de um equivalente de salicilaldeído e três de malononitrila (1:3), tem-se a produção do 2-aminocromeno **4**. A princípio, acontece a condensação de Knoevenagel de um equivalente de salicilaldeído com um de malononitrila. Consecutivamente, ocorre a adição de Michael do segundo equivalente de metileno ativo ao aduto de Knoevenagel formado na etapa anterior. Posteriormente, há a ciclização intramolecular com subsequente incorporação do terceiro equivalente de malononitrila por meio de ataque nucleofílico e, por fim, a molécula sofre isomerização originando o produto final,<sup>7</sup> como mostra a representação mecanística no **Esquema 3** a seguir:

**Esquema 3** - Representação mecânica da síntese do 2-aminocromeno **4** a partir do aduto de Knoevenagel.



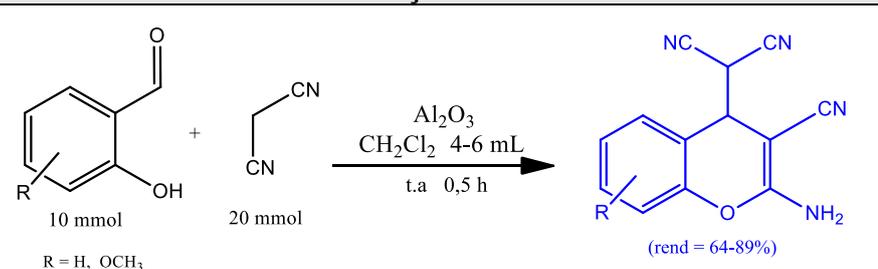
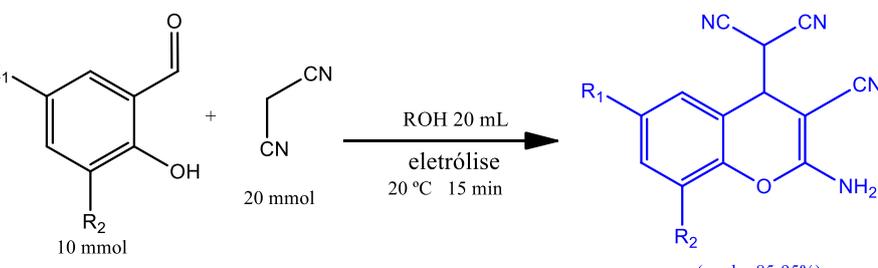
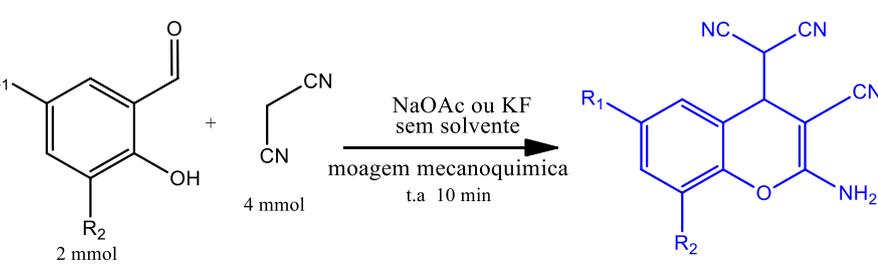
**Fonte:** Adaptado de Yang e colaboradores.<sup>7</sup>

Ainda é possível formar um novo derivado de cromeno, o iminocromeno **5**, mostrado na **Figura 8**, quando a reação acontece com proporções equimolares iguais de salicilaldeído e malononitrila (1:1), onde ocorre uma condensação de Knoevenagel entre os reagentes seguida de ciclização intramolecular.<sup>66</sup>

Na literatura foi observado um número limitado de métodos relatando a síntese dos 2-aminocromenos **3** e **4**, sendo alguns deles descritos a seguir. O primeiro estudo realizado para obtenção do derivado de cromeno **3** foi publicado em 1984 por Roudier e Foucaud,<sup>85</sup> ao reagir salicilaldeído e malononitrila na proporção 1:2 em um sistema contendo diclorometano e óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), com formação de produto em 0,5 h e rendimento de 64% (reação 1, **Tabela 1**). Elinson e colaboradores<sup>86</sup>, em 2006, desenvolveram um sistema eletrolítico onde uma solução de salicilaldeído, malononitrila em álcool foi eletrolisada usando célula indivisível de brometo de sódio ( $\text{NaBr}$ ), à 20 °C, por 15 min, exibindo rendimentos entre 85-95% (reação 2, **Tabela 1**). Em contrapartida, Elinson e colaboradores (2013)<sup>87</sup> sintetizam tal composto através de moagem mecanoquímica dos reagentes catalisados por acetato de sódio ( $\text{NaOAc}$ ) ou fluoreto

de potássio (KF), em um sistema livre de solvente e a temperatura ambiente, com rendimentos de 94-99% no tempo de 10 min (reação 3, **Tabela 1**). Enquanto isso, Bahuguna e colaboradores (2018)<sup>20</sup> relataram a síntese a partir de um sistema sem aquecimento, na presença de etanol e empregando como catalisador nanocompósitos de polianilina com nanofolhas de nitreto de carbono grafítico dopado com amônia (NPGCN), apresentando tempos de reações variando entre 10-60 min e rendimentos isolados entre 85-97% (reação 4, **Tabela 1**). Em trabalho recém publicado (2021) por González-Rodal e colaboradores,<sup>83</sup> a síntese do 2-aminocromeno **3** é retratada ao reagir o composto carbonílico com o composto de metileno ativo na presença de MOF (CuBTC enriquecida com amino – EN/CuBTC), sem solvente e a 30 °C, originando o produto em 15 min e apresentando rendimento de 87% (reação 5, **Tabela 1**).

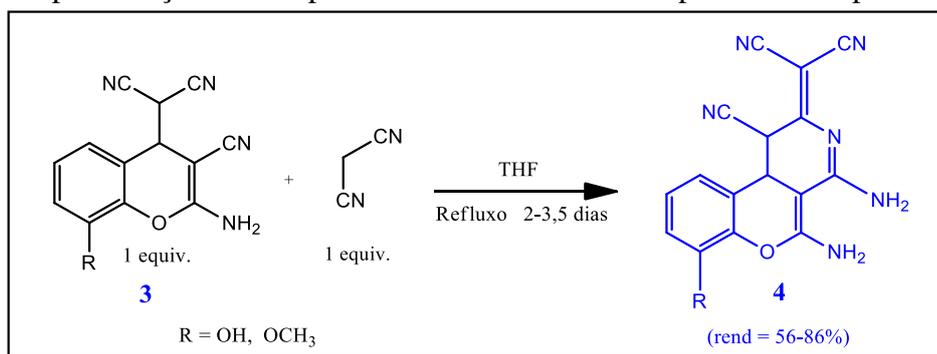
**Tabela 1** - Sínteses do derivado de cromeno **3** descritas na literatura, variando as condições de reação. (continua)

	Reação	Referência
<b>1</b>	 <p>10 mmol 20 mmol R = H, OCH<sub>3</sub> Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4-6 mL t.a 0,5 h (rend = 64-89%)</p>	Roudier e Foucaud [85]
<b>2</b>	 <p>10 mmol 20 mmol R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> ROH 20 mL eletrólise 20 °C 15 min (rend = 85-95%)</p> <p>a R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H; b R<sub>1</sub> = Br, R<sub>2</sub> = H; c R<sub>1</sub> = NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = H; d R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OMe; e R<sub>1</sub> = Br, R<sub>2</sub> = OMe;</p>	Elinson e colaboradores [86]
	 <p>2 mmol 4 mmol R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> NaOAc ou KF sem solvente moagem mecanoquímica t.a 10 min (rend = 94-99%)</p> <p>a R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H b R<sub>1</sub> = Me, R<sub>2</sub> = H c R<sub>1</sub> = Cl, R<sub>2</sub> = H d R<sub>1</sub> = Br, R<sub>2</sub> = H e R<sub>1</sub> = NO<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = H f R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OMe g R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OEt</p>	Elinson e colaboradores [87]

**Tabela 1** - Sínteses do derivado de cromeno **3** descritas na literatura, variando as condições de reação. (continuação)

	Reação	Referência
<b>4</b>		Bahuguna e colaboradores [20]
<b>5</b>		González-Rodal e colaboradores [83]

A síntese do 2-aminocromeno **4**, por sua vez, foi retratada inicialmente pelo grupo de pesquisa de Costa e colaboradores<sup>18</sup> que realizou a reação entre um equivalente do composto de metileno ativo, malononitrila, e uma solução do derivado de cromeno **3** em THF, sem catalisador e sob refluxo, com tempos reacionais de 2-3,5 dias e rendimentos de 56 e 86% (**Figura 9**). Isto é, para obtenção do produto em questão, foi necessário sintetizar inicialmente o composto **3** para, posteriormente, utilizá-lo como material de partida na produção da molécula **4**.

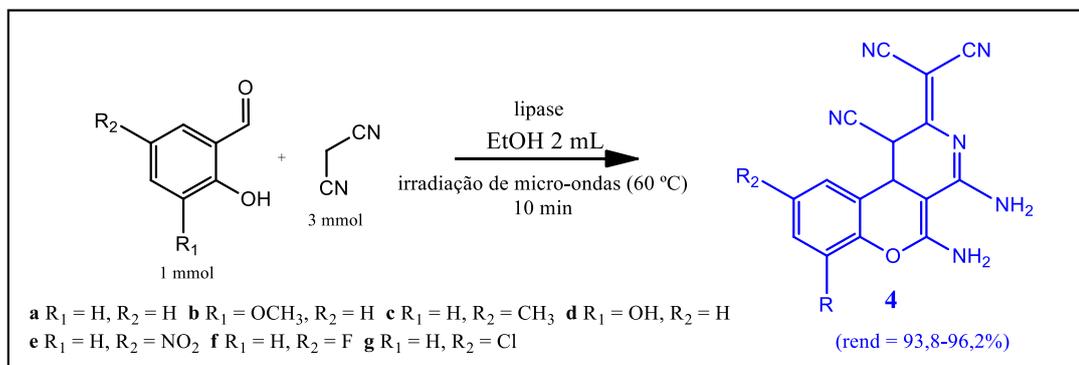
**Figura 9** - Representação de rota para síntese da molécula **4** a partir do composto **3**.

**Fonte:** Adaptado de Costa e colaboradores.<sup>18</sup>

A equipe de Yang e colaboradores,<sup>7</sup> utilizou lipase como catalisador numa reação “ecoamigáveis” de síntese do produto **4**. Porém, diferentemente de Costa e colaboradores, os pesquisadores prepararam uma reação *one-pot* entre um equivalente de salicilaldeído e três de

malononitrila, em etanol e sob irradiação de micro-ondas à 60 °C. O tempo reacional foi de 10 min e os rendimentos obtidos variaram entre 93,8-96,2% (**Figura 10**).

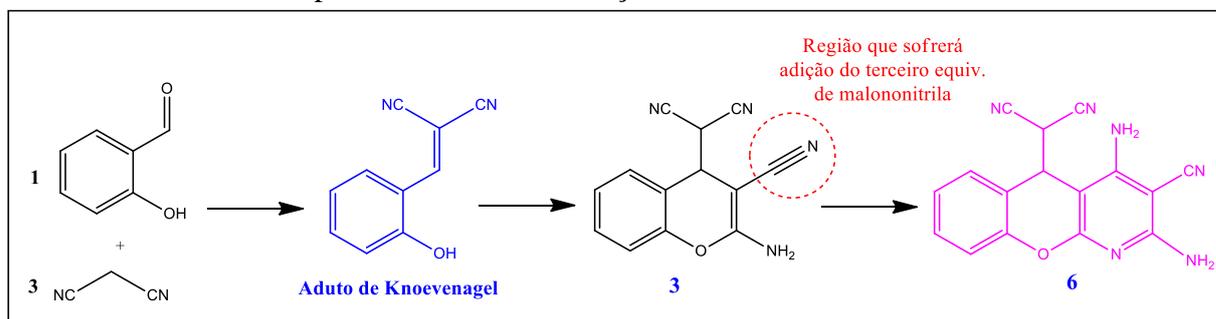
**Figura 10** - Representação de rota para síntese do composto **4** a partir de malononitrila e salicilaldeído.



**Fonte:** Adaptado de Yang e colaboradores.<sup>7</sup>

A reação envolvendo salicilaldeído e malononitrila na proporção 1:3, além de proporcionar os 2-aminocromenos **4**, ainda pode originar outro produto ao modificar as condições empregadas no meio reacional, como é possível observar no trabalho de Elinson e colaboradores<sup>62</sup>. Os autores obtiveram o composto **6** ao usar um equivalente de salicilaldeído para três de malononitrila (**Figura 11**), em reação catalisada por eletrólise usando célula não dividida na presença de brometo de sódio (NaBr) como eletrólito, ânodo de grafite e cátodo de ferro, em etanol, a 78 °C, durante 1 h. Os produtos obtidos apresentaram rendimentos variados entre 83 e 90%. A abordagem eletrocatalítica desenvolvida é benéfica do ponto de vista da Síntese Orgânica ambientalmente responsável e eficiente. Yadav e colaboradores<sup>17</sup> também obtém o mesmo produto ao reagir os substratos mencionados, em um protocolo altamente eficiente, “verde” e ecologicamente correto. A síntese do novo tipo de cromeno **6** foi realizada sob irradiação de luz visível (22 W CFL – lâmpada fluorescente compacta) em mistura binária água:etanol (1:1, v:v) à temperatura ambiente, com tempos de 8-15 min e rendimentos de 88-97%.

**Figura 11** - Representação de rota de síntese de novo cromeno (**6**) a partir de malononitrila e salicilaldeído catalisada por eletrólise ou irradiação de luz visível.



Ambas reações acontecem via reação sequencial, tendo também a condensação de Knoevenagel com uma de suas etapas, fornecendo a substância **3**, que sofrerá subsequente adição de Michael no carbono do grupo nitrila ( $-C\equiv N$ ) destacado de vermelho na **Figura 11**, seguida de ciclização intramolecular dando origem ao produto **6**.

## 2.4 EFEITOS DO SOLVENTE NA QUÍMICA

O ditado dos alquimistas, “*Corpora non agunt nisi fluida*”, que significa “As substâncias não reagem a menos que sejam fluidas”, não é literalmente preciso, dado que os cristais podem ser modificados por processos de nucleação e crescimento. No entanto, é significativamente verdadeiro para ser digno de atenção, já que, por exemplo, os comprimidos de Seltzer (um tipo de comprimido efervescente), precisam ser dissolvidos em água antes de reagirem para liberar dióxido de carbono. O estado fluido pode ser gasoso ou líquido, e a reação pode ser homogênea ou heterogênea, sendo que na reação homogênea, as substâncias estão dissolvidas em líquidos de vários tipos, denominados solventes.<sup>88</sup>

Grande parte das reações orgânicas se processa em solução, tornando relevante destacar o efeito que os solventes podem provocar no curso e na velocidade dessas reações químicas. Alguns dos solventes mais comuns podem ser categorizados, de modo geral, com base em sua estrutura e constantes dielétricas (**Tabela 2**). Quanto maior a constante dielétrica, maior a polaridade. Logo, os solventes orgânicos podem ser divididos em polares (altas constante dielétricas) a apolares (baixas constantes dielétricas). Além disso, os solventes polares ainda podem ser subdivididos em polares próticos (aqueles que contém hidrogênio ligado a elemento eletronegativo, sendo, portanto, possível de formar ligação de hidrogênio) e polares apróticos (aqueles que não apresentam tal característica).<sup>89,90</sup>

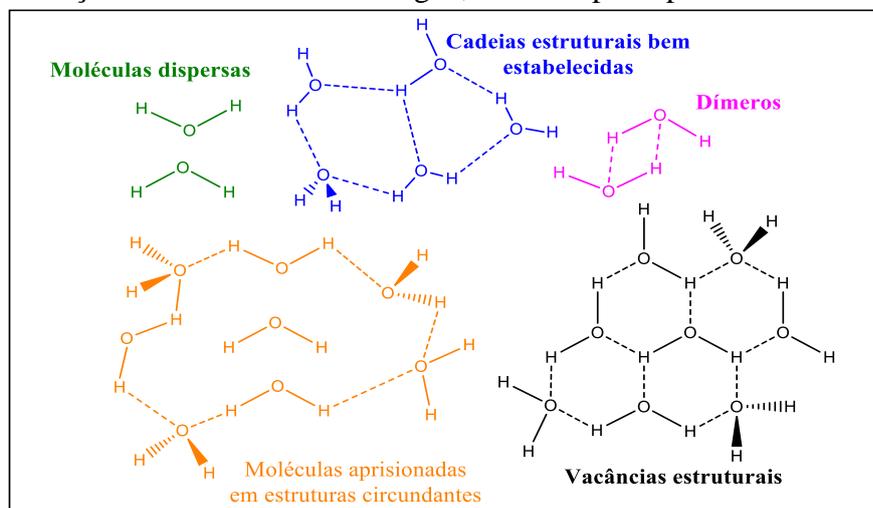
**Tabela 2** - Constante dielétrica ( $\epsilon$ ) de alguns solventes.

Solventes					
Polar			Apolar		
Prótico	$\epsilon$	Aprótico	$\epsilon$		$\epsilon$
Ácido acético	6,1	Piridina	12,0	Hexano	1,9
Amônia	22,0	Acetona	21,0	Ciclopentano	2,0
Etanol	24,5	Nitrometano	36,0	Dioxano	2,2
Metanol	32,7	Acetonitrila	38,0	Benzeno	2,3
Água	78,0	DMSO	47	Clorofórmio	4,8

**Fonte:** Adaptada de Sundberg e Carey.<sup>89</sup>

De todos os solventes, a água é obviamente o mais barato, mais abundante e mais ecologicamente correto, sendo um dos principais representantes dos solventes polares próticos. Apresenta um momento dipolo considerável de 1,85 Debye, que lhe atribui uma polaridade de carga, tornando-a susceptível à interações intermoleculares. Isso significa dizer que pode interagir tanto entre ela e outros tipos de moléculas, quanto entre si. Essas interações entre moléculas de água, assim como nos demais solventes polares próticos, ocorrem por meio de ligações de hidrogênio, instituídas pela diferença de potencial eletrostático, com energia superior a 5 Kcal/mol evidenciando sua constituição por atração eletrostática, e estabilização de carga.<sup>91,92</sup>

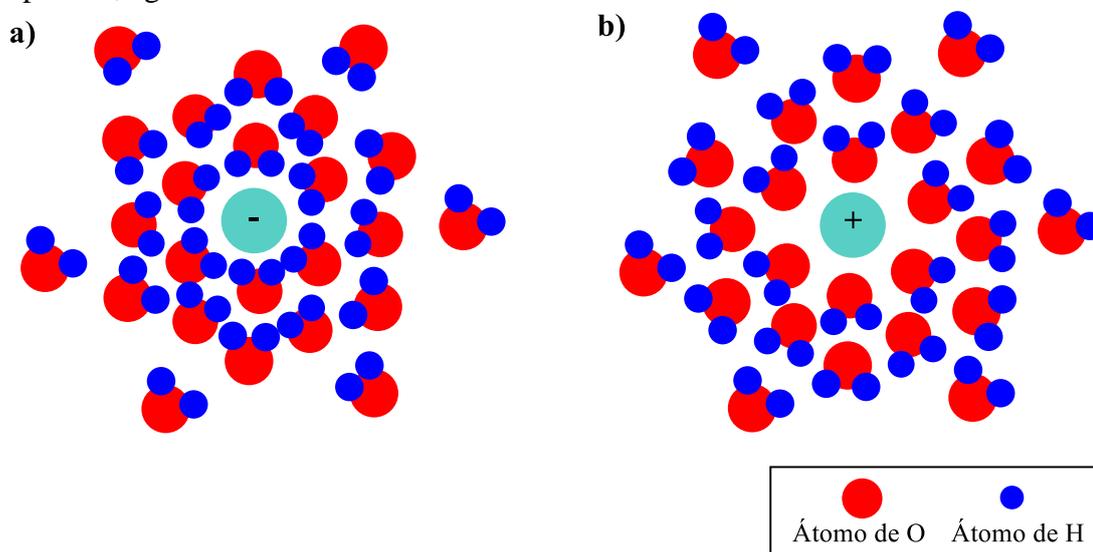
As ligações de hidrogênios se arranjam de diversas formas, tendo em vista a organização amorfa do solvente (**Figura 12**), sendo as interações mais comuns: moléculas dispersas, cadeias estruturais bem estabelecidas, dímeros, moléculas aprisionadas em estruturas circundantes e vacâncias estruturais.<sup>93</sup>

**Figura 12** - Interações intermoleculares da água, solvente polar prótico.

**Fonte:** Adaptado de Reichardt e Welton.<sup>93</sup>

Além da possibilidade de interação entre moléculas do próprio solvente, essas também podem interagir facilmente com o soluto, seja ele neutro ou carregado (catiônico ou aniônico). Diante disso, os solventes polares próticos são solventes versáteis para a química, uma vez que são capazes de interagir e solvatar tanto cátions quanto ânions, permitindo a promoção de algumas reações. A solvatação acontece entre e os sítios ácidos e os sítios básicos (Figura 13): a região do próton (eletrofílica), interage com sítios básicos (nucleófilos) o solvatando para estabilização de cargas (a). Analogamente, o heteroátomo (O, N, etc.), mais nucleofílico, interage com sítios ácidos, eletrófilos (b), para a mesma finalidade.<sup>88,94</sup>

**Figura 13** – Representação de processo de solvatação de ânion (a) e de cátion (b) por solvente polar prótico, água.



É importante enfatizar que o efeito do solvente só foi considerado para estudos a partir da percepção da diferença de valores de energia das reações quando avaliado em meio gasoso. A princípio, os estudos das reações, assim como dos seus reagentes, eram realizados considerando apenas a influência da estrutura sem levar em conta a influência do solvente, resultando em valores como se o sistema estivesse em fase gasosa.<sup>94</sup> No entanto, quando começaram a estimar o efeito do solvente por cálculos computacionais e experimentos, perceberam a diminuição significativa da energia de ativação e do estado de transição da reação. Essa variação de energia pode ser explicada pela ação do solvente, que estabiliza o estado de transição por solvatação para prosseguir com menor consumo de energia do que acontece em fase gasosa.<sup>89</sup> Além disso, o solvente pode ser influente na transferência de prótons,<sup>95</sup> como também na fluorescência de compostos orgânicos.<sup>96</sup>

Ao tratar de ácidos e bases, a avaliação da força intrínseca em fase gasosa é relativamente recente. Até o surgimento das técnicas mais modernas de espectrometria de massas, as avaliações das forças de ácidos e bases eram determinadas totalmente em solução. Ao estudar os ácidos halogenídricos, por exemplo, pôde-se perceber o efeito exercido pelo solvente na força dessas substâncias quando comparadas as energias desses ácidos em fase gasosa e em solução. Ficou evidente a discrepância existente entre os dados. Isso se deve ao fato de que em meio solvatado, usando água como solvente, há uma drástica minimização da demanda energética para a dissociação do próton e sua base conjugada. Esse fenômeno é derivado das interações do solvente que estabiliza os produtos, diminui a entropia e, conseqüentemente, a Energia Livre de Gibbs da reação, agregando um caráter mais espontâneo à dissociação em meio aquoso.<sup>94</sup>

O efeito do solvente também pode ser evidenciado em reações do tipo  $SN_1$  e  $SN_2$ .<sup>97,98</sup> Quando uma espécie carregada negativamente é colocada em um solvente polar prótico, o íon torna-se solvatado. As moléculas do solvente se organizam de modo a gerar interação íon-dipolo, entre o íon e o dipolo do solvente. Como o solvente protege o nucleófilo, pelo menos uma das interações íon-dipolo deve ser quebrada antes que o nucleófilo possa participar de uma reação. As bases fracas, a exemplo, interagem fracamente com solventes polares próticos, enquanto as bases fortes interagem mais fortemente já que são melhores em compartilhar seus elétrons. No solvente polar aprótico isso não acontece justamente por não possuir hidrogênio capaz de formar interações íon-dipolo. As moléculas de um solvente polar aprótico têm uma carga parcial negativa em sua superfície que pode solvatar cátions, mas a carga parcial positiva está no interior da molécula, o que a torna menos acessível. O ânion relativamente “nu” pode ser um poderoso nucleófilo em um solvente polar aprótico.

Se valendo disso, vários trabalhos são reportados na literatura para síntese de cromenos, nos quais os autores realizam testes de solventes a fim de determinar o que contribui mais eficientemente para otimização total do sistema.<sup>99-102</sup> Além disso, em nosso grupo de pesquisa, já existem estudos para síntese de cumarina utilizando mistura binária etanol:água como promotor da velocidade da reação, em um sistema livre de catalisador.<sup>103</sup> Essa mistura foi escolhida após várias análises variando as espécies de solventes, como também a proporção dos constituintes da mistura binária. A cumarina foi obtida a partir da reação entre salicilaldeído e algumas espécies de compostos de metileno ativo, em mistura binária etanol:água (3:7, v:v) à 75 ° C, com tempos reacionais variados (80-315 min) e rendimentos de 82-99%.

Ganwir e colaboradores<sup>102</sup> também se valem do efeito do solvente como otimizador da reação de síntese de espécies de cromenos. Em um processo *one-pot* e sem catalisador, os

autores obtêm os produtos ao reagir dimedona, malononitrila e várias espécies de aldeídos, em etanol:água (1:1, v/v) à 90 °C, após 10-15 min de reação com 76-96% de rendimentos. Safari e colaboradores<sup>101</sup> descrevem uma síntese multicomponente altamente eficiente de 2-amino-7-hidroxi-4H-cromenos, usando aldeídos, malononitrila e resorcinol sem catalisador e em água sob irradiação de ultrassom (60 °C), em que os produtos foram obtidos com tempos reacionais de 1-2,5 min e rendimentos de 91-98%. É importante destacar que todos os trabalhos mencionados relatam a realização do teste de solventes, empregando posteriormente o que apresentou melhor desempenho.

## **CAPÍTULO 3**

**OBJETIVOS**



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

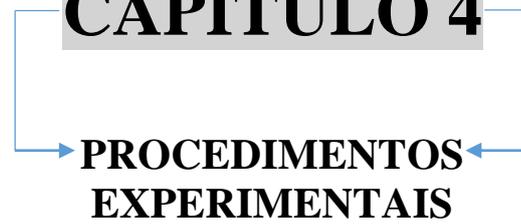
Otimizar a síntese de uma variedade de 2-aminocromenos com potencial atividade biológica utilizando o efeito do solvente como promotor da reação sequencial Knoevenagel-Michael, por meio de metodologias “ecoamigáveis”.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo geral do presente trabalho será alcançado mediante a efetivação dos seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a influência de solventes apolares, polares apróticos e polares próticos na velocidade de reação de síntese de 2-aminocromenos, nas proporções 1:2 e 1:3 (salicilaldeídos:malononitrila) sem utilização de catalisadores;
- Aplicar o sistema que apresentar o melhor desempenho para a síntese de uma série de 2-aminocromenos, a fim de verificar sua aplicabilidade;
- Verificar a citotoxicidade *in vitro* das substâncias puras obtidas em três linhagens de células tumorais (câncer de cólon humano, carcinoma de pulmão e leucemia mielóide crônica).

# **CAPÍTULO 4**



**PROCEDIMENTOS  
EXPERIMENTAIS**

## 4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 4.1 SOLVENTES E REAGENTES

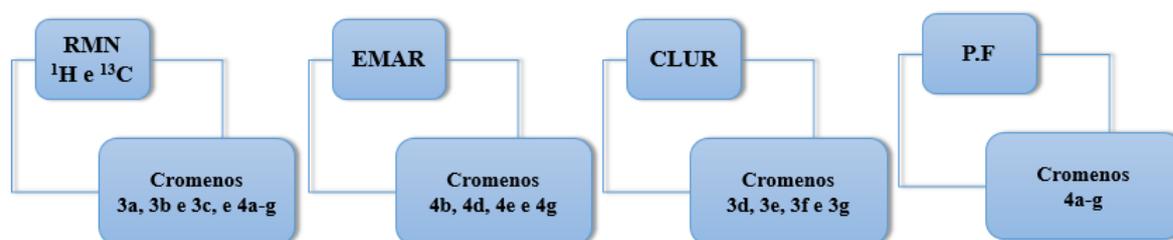
Todos os reagentes e solventes empregados na realização dos experimentos retratados nesse trabalho estão listados na **Tabela 3**, bem como a procedência dos respectivos materiais.

**Tabela 3** - Reagentes e solventes utilizados nos procedimentos experimentais e suas procedências.

<b>Síntese de Cromenos e seus Derivados</b>	
<b>Reagentes/Solventes</b>	<b>Procedência</b>
Etanol absoluto, 200 proof 99,5%	Tedia <sup>®</sup>
Etanol 95%	QHEMIS <sup>®</sup>
Água deionizada (H <sub>2</sub> O)	LCCQS
Hexano 98,5 %	Química Moderna <sup>®</sup>
Acetato de etila 99,8%	Tedia <sup>®</sup>
Acetonitrila 99,5 %	Tedia <sup>®</sup>
Malononitrila ≥ 99%	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Tolueno 99,5%	Tedia <sup>®</sup>
Tetraidrofurano (THF) 99,5 %	Tedia <sup>®</sup>
Salicilaldeído 98%	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
5-Bromosalicilaldeído 98%	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
5-Nitrosalicilaldeído 98%	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
2-Hidroxi-3-metoxi-benzaldeído 99%	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
2-Hidroxi-5-metoxi-benzaldeído 98%	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
5-Clorosalicilaldeído 98%	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
2,4-Dihidroxibenzaldeído 98%	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
<b>Medidas Instrumentais</b>	
<b>Reagentes/Solventes</b>	<b>Procedência</b>
Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d <sub>6</sub> ) 99,9% + 0,05% v/v TMS	Cambridge Isotope Laboratories
Acetonitrila ( <i>gradient grade</i> ) 99,9%	Tedia <sup>®</sup>

### 4.2 MEDIDAS INSTRUMENTAIS

As medidas instrumentais utilizadas para caracterizar os 2-aminocromenos e seus derivados estão descritas no **Esquema 4**.

**Esquema 4** - Medidas instrumentais usadas na caracterização dos 2-aminocromenos.

#### 4. 2.1 Cromatografia em Camada Delgada

O desenvolvimento das reações de síntese dos 2-aminocromenos foi acompanhado através da Cromatografia em Camada Delgada (CCD), ao fazer uso de placas de alumínio revestidas com sílica gel que possuíam marcador de fluorescência para ser revelado na câmara ultravioleta. Esse acompanhamento aconteceu mediante o consumo do aldeído (desaparecimento da mancha referente ao material de partida) e aparecimento de mancha referente ao provável produto.

#### 4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono-13 foram realizados utilizando DMSO-d<sub>6</sub> como solvente e registrados em um espectrômetro VARIAN<sup>®</sup> Mercury Spectra AC 20 (400 MHz para RMN-<sup>1</sup>H e 101 MHz para RMN-<sup>13</sup>C), pertencente à Unidade de Central Analítica, UNICAL, do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB, IPeFarMUFPPB. Os dados obtidos nas análises foram tratados no software MestReNova<sup>®</sup>, versão 14.2.0-26256.

#### 4.2.3 Cromatografia Líquida Ultra Rápida (CLUR)

Os cromatogramas das amostras das reações de formação dos compostos **3d** e **3e** para verificação da pureza dos sólidos produzidos, seus tempos de retenção e proporção entre compostos, foram registrados por um Cromatógrafo Líquido Ultra Rápido da Shimadzu<sup>®</sup> - modelo LC-20AT - (pertencente ao Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise da Universidade Federal da Paraíba – UFPB), equipado com detector UV-vis (274 nm), coluna C-18 de 15 cm, com fase reversa, e pré-coluna de 4 cm. Já os cromatogramas das amostras das

reações de formação dos compostos **3f** e **3g** foram registrados por um Cromatógrafo Líquido Ultra Rápido da Shimadzu® - modelo LC-20AT - (pertencente a Unidade de Central Analítica, UNICAL, do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da UFPB, IPeFarMUFPB), equipado com Detector de Díodo (DOD - 274 nm), coluna C-18 de 25 cm, com fase reversa, e pré-coluna de 4 cm. As amostras analisadas nos cromatógrafos líquidos foram preparadas usando 1 mg do sólido a ser examinado e dissolvido em 1,0 mL de acetonitrila (*gradient grade*), com aplicação de método isocrático, fase móvel composta por acetonitrila:água (40:60, v:v).

#### 4.2.4 Espectrometria de Massa de Alta Resolução

A Espectrometria de Massa de Alta Resolução (EMAR) foi realizada em um espectrômetro de massa microTOF III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As amostras foram preparadas em acetonitrila ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e infundidas na fonte ESI a uma vazão de  $5 \mu\text{L min}^{-1}$ . As condições da fonte ESI(+) foram as seguintes: voltagem capilar 4500 V, temperatura capilar de transferência 200 °C, gás seco  $4,0 \text{ L min}^{-1}$  e deslocamento da placa final 500 V. Os espectros de massa foram adquiridos e processados usando o *software Compass DataAnalysis* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

#### 4.2.5 Determinação do Ponto de Fusão (P.F)

Medidas de intervalos de fusão foram realizadas a partir do equipamento de fusão a seco, marca Fisatom, modelo 431, pertencente ao Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise (LASOB). As amostras foram inseridas em capilares e submetidos a aquecimento, que, por meio de uma lente de aumento, presente no equipamento, fez-se leitura do intervalo de fusão com auxílio de um termômetro.

### 4.3 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA A SÍNTESE DE 2-AMINOCROMENOS

#### 4.3.1 Obtenção da Mistura Binária Etanol:Água (3:7)

A mistura binária Etanol:Água (3:7, v:v) foi preparada utilizando 3 mL de etanol 99,5% e 7 mL de água deionizada. A solução foi agitada manualmente até atingir temperatura ambiente e armazenada sob refrigeração em recipiente âmbar.

#### 4.3.2 Síntese dos derivados de cromenos 3(a–g)

Em um tubo de ensaio foram adicionados 1,0 mmol de malononitrila, 0,5 mmol do aldeído e 400 µL de solvente (etanol:água 3:7, v:v), respectivamente. O sistema foi submetido à agitação magnética em temperatura ambiente, sendo monitorado por cromatografia em camada delgada utilizando a mistura de solvente hexano:acetato de etila na proporção (6:4, v:v) para eluição, com exceção das reações realizadas com os aldeídos, 5-nitrosalicilaldeído e 5-bromosalicilaldeído, que foram eluídas com a mistura de solvente na proporção (7:3, v:v) de hexano:acetato de etila. Após o término da reação, a mistura reacional que continha o produto precipitado foi filtrada sob pressão reduzida para obtenção do sólido. O produto foi lavado com água deionizada seguida de etanol. Os produtos puros foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C). As reações que formaram mais de um composto foram analisadas por cromatografia líquida.

#### 4.3.3 Síntese dos derivados de cromenos 4(a–g)

Em um tubo de ensaio foram adicionados 1,5 mmol de malononitrila, 0,5 mmol do aldeído e 400 µL de etanol, respectivamente. O sistema permaneceu sob agitação magnética em aquecimento (75-80 °C), sendo monitorado por cromatografia em camada delgada utilizando a mistura de solvente hexano:acetato de etila na proporção (6:4, v:v) para eluição. Após o término da reação, a mistura reacional que continha o produto precipitado foi filtrada sob pressão reduzida para obtenção do sólido. O produto foi lavado com água deionizada seguida de etanol.

Quando necessário, para purificação, o sólido obtido foi submetido a aquecimento em etanol, seguido de resfriamento e filtração. Posteriormente, foi lavado com água deionizada gelada e etanol. Os produtos obtidos foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C).

#### 4.4 METODOLOGIA UTILIZADA PARA REALIZAÇÃO DO TESTE *IN VITRO* – CITOTOXICIDADE E CI<sub>50</sub>

O *screening* inicial para determinação do potencial antitumoral das amostras foi desenvolvido no Laboratório de Proliferação Celular e Câncer da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências. As

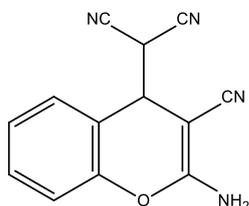
células utilizadas foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Foi realizado pelo método do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT), que consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas, permitindo definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação.<sup>104</sup>

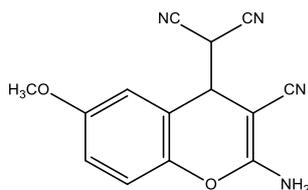
A linhagem K-562 (leucemia mielóide crônica) foi plaqueada na concentração de 0,3 x 10<sup>6</sup> células/mL e as linhagens HCT-116 (câncer cólon humano), H-1299 (carcinoma de pulmão) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão) foram plaqueadas na concentração de 1 x 10<sup>5</sup> células/mL. As substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas no meio RPMI para obtenção da concentração final e adicionadas em placa de 96 poços (200µL/ poço). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Transcorrido às 72h, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) em cada poço e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 575 nm.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivo desvio padrão da média no programa *libreoffice cal version 6.4.7.2*. A Concentração inibitória em 50% (CI<sub>50</sub>) foi calculada por regressão não linear no programa *GraphPad Prism 5.0*. Cada amostra foi diluída em DMSO puro estéril e testada em duplicata, em dois experimentos independentes.

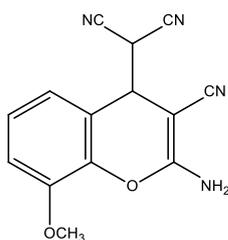
#### 4.5. DADOS ESPECTROSCÓPICOS (RMN DE <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C) E ESPECTROMÉTRICOS



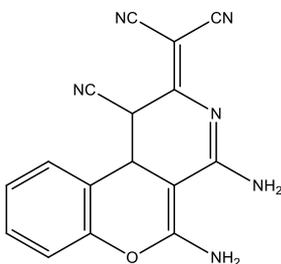
**(2-Amino-3-ciano-4H-cromeno-4-il)malononitrila (3a):** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 4.59 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 5.06 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,13 (dd, *J* = 8,1 Hz, 0,9 Hz, 1H), 7,26 (dt, *J* = 7,5 Hz, 0,9 Hz, 1H), 7,42 (dt, *J* = 7,8 Hz, 1,2 Hz, 1H), 7,47 (dd, *J* = 7,7 Hz, 1,2 Hz, 1H), 7,51 (s, 2H). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 32,43, 37,14, 48,91, 112,94, 113,10, 116,41, 117,99, 119,38, 125,09, 128,89, 130,21, 149,77, 163,48. Dados condizentes com os obtidos por Bahuguna e colaboradores.<sup>22</sup>



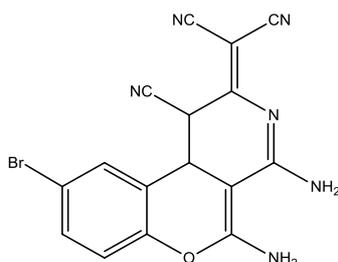
**2-(2-Amino-3-ciano-6-metoxi-4H-cromeno-4-il)malononitrila (3b):** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 3,76 (s, 3H), 4,54 (d, 1H,  $J = 4,15$  Hz), 5,10 (d, 1H,  $J = 4,15$  Hz), 6,97 (dd, 1H,  $J = 2,75$ ,  $J = 8,9$  Hz), 7,07 (m, 2H,  $J = 8,9$  Hz), 7,44 (s, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 32,85, 38,00, 48,77, 56,02, 113,38, 113,47, 113,58, 116,32, 117,74, 119,10, 119,98, 144,04, 156,34, 164,11. Dados condizentes com os obtidos por Bahuguna e colaboradores.<sup>22</sup>



**(2-amino-3-ciano-8-metoxi-4H-cromeno-4-il)malononitrila (3c):** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 3,84 (s, 3H), 4,55 (d,  $J = 3,9$  Hz, 1H), 5,03 (d,  $J = 3,9$  Hz, 1H), 7,00 (dd,  $J = 8,0$  Hz, 1,5 Hz, 1H), 7,11 (dd,  $J = 8,1$  Hz, 1,5 Hz, 1H), 7,18 (t,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,51 (s, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 32,82, 37,72, 49,28, 56,29, 113,18, 113,39, 113,54, 119,31, 119,82, 120,12, 125,39, 139,59, 147,62, 163,84. Dados condizentes com os obtidos por Yang e colaboradores.<sup>7</sup>

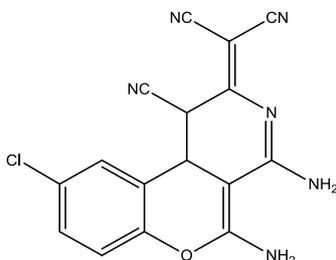


**2-(4,5-diamino-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (4a):** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 4,84 (d,  $J = 4,0$  Hz, 1H), 4,93 (d,  $J = 4,0$  Hz, 1H), 6,67 (s, 2H), 7,07 (s, 2H), 7,20 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,26 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 7,41 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 30,47, 34,73, 70,60, 83,85, 112,90, 113,47, 116,30, 116,88, 117,93, 124,18, 129,06, 130,20, 151,62, 157,00, 160,40, 160,46. Dados condizentes com os obtidos por Yang e colaboradores.<sup>7</sup>

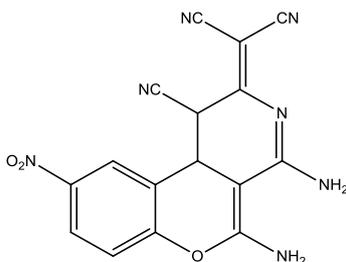


**2-(4,5-diamino-9-bromo-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (4b):** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 4,72 (d,  $J = 3,8$  Hz, 1H), 4,81 (d,  $J = 3,5$  Hz, 1H), 6,66 (s, 2H), 7,06 (s, 2H), 7,21 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 7,54 (d,  $J = 2,1$

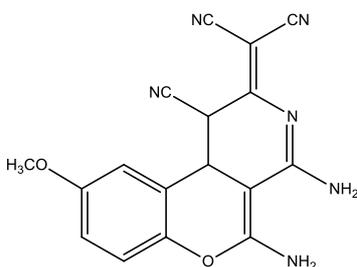
Hz, 1H), 7,65 (dd,  $J = 8,9, 2,2$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 30,45, 34,52, 70,86, 83,34, 112,66, 113,22, 115,31, 116,11, 119,18, 120,21, 131,36, 133,00, 150,97, 157,02, 160,05, 160,48. EMAR  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calculada  $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{BrN}_6\text{O}$ : 381,0094; encontrada: 381,0106.



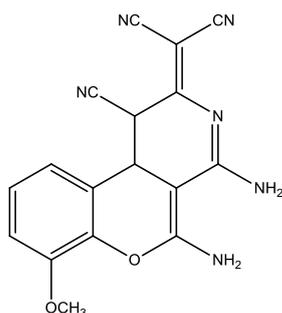
**2-(4,5-diamino-9-cloro-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (4c):** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm) 4,86 – 4,91 (dd,  $J = 3,5$  Hz, 2H), 6,66 (s, 2H), 7,06 (s, 2H), 7,24 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H), 7,41 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H), 7,48 (dd,  $J = 9,0$ , 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 30,62, 34,83, 71,06, 83,51, 112,87, 113,43, 116,33, 119,05, 119,87, 127,86, 128,69, 130,43, 150,67, 157,23, 160,30, 160,67. Dados condizentes com os obtidos por Yang e colaboradores.<sup>7</sup>



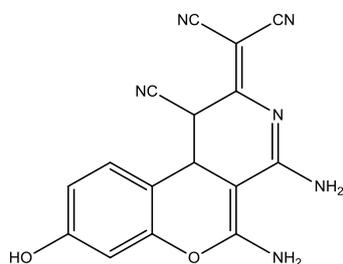
**2-(4,5-diamino-1-ciano-9-nitro-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (4d):** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 4,99 (d,  $J = 4,1$  Hz, 1H), 5,00 (d,  $J = 4,0$  Hz, 1H), 6,84 (s, 1H), 7,21 (s, 1H), 7,49 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 8,28 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 8,26 (dd,  $J = 8,3$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 30,55, 34,67, 71,11, 82,83, 112,62, 113,08, 115,99, 118,35, 118,87, 124,99, 126,05, 143,05, 156,38, 157,08, 159,42, 160,59. EMAR  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_7\text{O}_3$ : 348,0840; encontrada: 348,0896.



**2-(4,5-diamino-1-ciano-9-metoxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (4e):** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 3,76 (s, 3H), 4,81 (d,  $J = 4,8$  Hz, 1H), 4,89 (d,  $J = 4,8$  Hz, 1H), 6,58 (s, 2H), 6,64 (s,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 6,99 (s, 2H), 7,02 (dd,  $J = 7,0$ , 1H), 7,14 (d,  $J = 7,1$ , 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 30,57, 35,31, 55,75, 70,78, 83,71, 113,01, 113,68, 113,79, 115,98, 116,50, 117,99, 118,66, 145,58, 155,53, 157,19, 160,58, 160,84. EMAR  $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 333,1033. EMAR  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calculada para  $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_2$ : 333,1095; encontrada: 333,1033.



**2-(4,5-diamino-1-ciano-7-metoxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (4f):** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 3,84 (s, 3H), 4,80 (d,  $J = 4,0$  Hz, 1H), 4,91 (d,  $J = 4,0$  Hz, 1H), 6,61 (s, 2H), 6,97 (dd,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 7,03 (s, 2H), 7,11 (dd,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,17 (t,  $J = 8,0$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  v(ppm) 30,51, 35,03, 56,12, 70,89, 84,09, 112,99, 113,57, 116,46, 118,84, 120,26, 124,29, 141,17, 147,87, 157,17, 160,57. Dados condizentes com os obtidos por Yang e colaboradores.<sup>7</sup>



**2-(4,5-diamino-1-ciano-8-hidroxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (4g):** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 9,93 (s, 1H), 7,22 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 6,97 (s, 4H), 6,66 (dd,  $J = 8,5, 2,0$  Hz, 2H), 6,56 (d,  $J = 6,3$  Hz, 6H), 4,81 (d,  $J = 3,5$  Hz, 1H), 4,72 (d,  $J = 3,8$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 30,80, 34,57, 70,82, 84,63, 103,33, 108,50, 112,05, 113,17, 113,78, 116,44, 129,88, 152,67, 157,06, 159,01, 160,52, 160,60. EMAR  $[\text{M} + \text{H}]^+$  calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_2$ : 319,0938; encontrada: 319,0924.

# **CAPÍTULO 5**



**RESULTADOS  
E  
DISCUSSÃO**

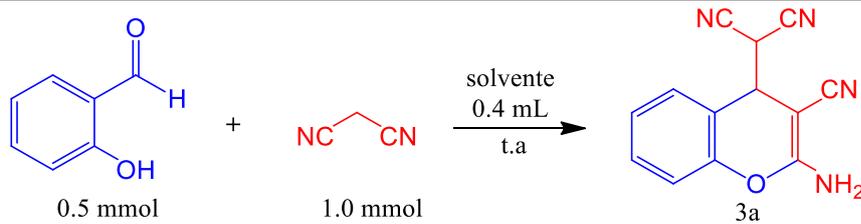
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando atingir os objetivos esperados desta pesquisa, buscou-se estabelecer as melhores condições para a síntese dos 2-aminocromenos, obtidos através da reação entre salicilaldeídos e proporções variadas de malononitrila, sem a utilização de qualquer tipo de catalisador. Desta forma, realizou-se testes variando os solventes, bem como a temperatura, quando necessário, a fim de avaliar suas influências na velocidade da reação de Knoevenagel-Michael para a síntese dos compostos **3** e **4**.

### 5.1 TESTE DE SOLVENTE PARA SÍNTESE DO 2-AMINOCROMENO **3a**

Antes de avaliar a influência dos solventes nas reações, buscou-se investigar, primeiramente, o comportamento da reação sem solvente e a temperatura ambiente. Como é possível notar (entrada 1, **Tabela 4**), a reação livre de solvente e a temperatura ambiente para síntese do produto **3a** não finalizou, mesmo transcorridos 360 min, apresentando um sistema ainda com bastante salicilaldeído e apenas traços de produto. Ao buscar na literatura sistemas semelhantes para fins de comparação de resultados, não encontrou-se nenhum relato. Entretanto, Bhat e colaboradores<sup>84</sup> usaram um sistema livre de solvente com moagem mecanoquímica obtendo o composto após 180 min de reação com rendimento de 98%.

**Tabela 4** - Teste de solvente para reação entre salicilaldeído e malononitrila (**3a**).



Entrada	Solvente	Tempo (min)	Rendimento (%)
1	-	360 <sup>a</sup>	Traços
2	Etanol:Água (3:7, v:v)	30	92
3	Água	80	90
4	Etanol	230	91
5	THF	360 <sup>a</sup>	Traços
6	Tolueno	360 <sup>a</sup>	-

Reações monitoradas por CCD. <sup>a</sup> Não finalizada.

Com isso, partiu-se para a aplicação de uma pequena série de solventes. Vale lembrar que há uma infinidade de tipos de solventes orgânicos, entretanto todos se encaixam

em uma das seguintes classes: polares próticos, polares apróticos e apolares.<sup>89,90</sup> Diante isto, foram escolhidos alguns representantes de cada categoria para o estudo em questão.

Para representar a classe de solventes apolares, utilizou-se o tolueno, como mostra a entrada 6 da **tabela 4**. Porém, o emprego desse solvente não resultou em um tempo de reação satisfatório, uma vez que, mesmo após 360 min, não houve consumo dos materiais de partida, revelando sistema sem formação de produto. Em vista disso, ficou admissível afirmar que a apolaridade do solvente não favorece as reações de Knoevenagel-Michael, atentando para a possível necessidade de solvente polar no meio reacional, como demonstram os estudos feitos por Yang e colaboradores,<sup>7</sup> que obtiveram baixo rendimento (39,8%) em 2 min de reação ao fazer uso do tolueno, em sistema catalisado por lipase e sob irradiação de micro-ondas (60 °C).

Logo, almejando corroborar com essa hipótese, escolheu-se o THF, para a classe dos solventes polares apróticos. Embora a reação de formação do cromeno **3a** não tenha finalizado ao utilizar esse solvente, ou seja, o salicilaldeído não tenha sido convertido totalmente em produto mesmo transcorridos 360 min de reação, a mesma apresentou sistema com traços de produto (entrada 5, **Tabela 4**), evidenciando a real necessidade de meio com solvente polar. Yang e colaboradores<sup>7</sup> também observaram um melhor desempenho ao utilizar THF no meio reacional (lipase e irradiação de micro-ondas), uma vez que conseguiram maior rendimento (43,6%) em 2 min de reação, quando comparado com o rendimento obtido ao usar tolueno.

Entre a gama de solventes polares próticos, a água, o etanol e uma mistura binária (etanol:água, 3:7, v:v) foram utilizadas para representar esta classe de solventes. As três espécies empregadas mostraram-se bastantes eficientes, já que apresentaram bons tempos e ótimos rendimentos. A possível explicação para esses fenômenos é que solventes polares próticos favorecem tais reações, uma vez que atuam muito bem na estabilização de intermediários carregados e reações de transferência de prótons em comparação aos solventes apolares ou polares apróticos.<sup>7,105</sup> Além disso, solventes orgânicos polares mostram-se meios mais eficientes para as reações de ciclização, que é uma das etapas para obtenção do derivado de cromeno.<sup>106</sup>

Vale destacar que o solvente que melhor atuou no sistema para a reação do composto **3a** foi a mistura binária, com menor tempo de reação (30 min) e maior rendimento (92%) (entrada 2, **Tabela 4**). O produto oriundo dessa reação foi isolado e caracterizado por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Costa e colaboradores<sup>18</sup> realizaram a síntese de tal composto usando como solvente diclorometano a 9 °C, obtendo o produto em 1 mês de reação. Empregou ainda, em

uma nova metodologia, trietilamina como catalisador e diclorometano como solvente a temperatura ambiente, obtendo o produto em 11 h.

A mistura etanol-água dispõe de propriedades distintas quando comparadas com as dos solventes isolados, por exemplo: possui maior poder de solvatação devido à formação de cadeias moleculares via ligação de hidrogênio, tem constante dielétrica intermediária em comparação com os solventes puros podendo favorecer interações mais fortes com moléculas polares menores como a malononitrila, além da possibilidade de aumentar a solubilidade de compostos orgânicos quando comparado ao uso de água como solvente e a capacidade de formar cavidades.<sup>107-109</sup> A combinação origina uma mistura azeotrópica, por seus constituintes, solventes polares próticos, apresentarem grande afinidade<sup>110</sup> e proporciona a redução da energia dos estados de transição das etapas lentas.<sup>111</sup>

Além de suas propriedades satisfatórias, a mistura binária é composta 70% de água, tornando-a uma mistura ecologicamente correta e viável por ser um solvente atóxico e abundante. Como o produto precipita no próprio meio reacional, é facilmente isolado no estado sólido, sem a necessidade de processos de isolamento complicados, tornando-se um processo bastante atraente aos olhos da Química Verde. Yadav e colaboradores,<sup>17</sup> por exemplo, aplicaram a mistura binária como solvente para a síntese de alguns tipos de cromenos. Em suas análises, utilizaram um sistema contendo salicilaldeído e malononitrila em uma mistura de etanol:água na proporção 1:1 (v:v), sob irradiação de luz visível, a fim de obter o cromeno **3a**. É importante destacar que a aplicação da mistura binária (3:7, v:v) para a síntese dos derivados de cromenos **3** sem irradiação de energia na forma de calor ou luz proposta por essa pesquisa não foi relatada na literatura, apontando o ineditismo do sistema desenvolvido e mostra-se um sistema mais “ecoamigáveis” de síntese dessa classe de compostos.

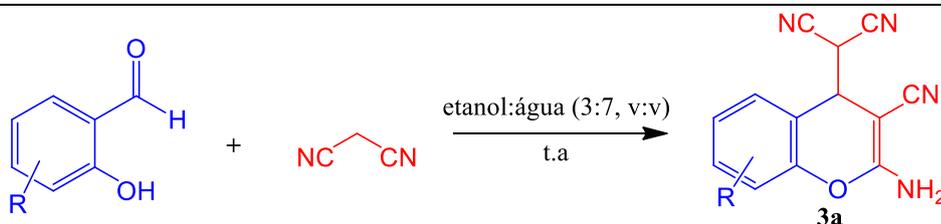
## 5.2 SÍNTESE DE UMA SÉRIE DE DERIVADOS DE CROMENOS 3(b-g)

Dados os resultados obtidos com o teste de solvente realizado, empregou-se, nas mesmas condições, o solvente que apresentou melhor desempenho quanto ao tempo (entrada 4, **Tabela 4**), para a síntese de variados 2-aminocromenos **3**, modificando apenas as espécies de salicilaldeídos, como mostra a **Tabela 5**.

As reações foram realizadas utilizando salicilaldeídos monossustituídos com grupos retiradores e doadores de elétrons, e, a partir desses testes, observou-se a influência desse substituintes para a velocidade das reações. Como representante da classe dos possíveis doadores de elétrons, usou-se o metóxido (-OCH<sub>3</sub>) e hidroxila (-OH) (entradas 1, 2 e 3, **Tabela**

5); enquanto que para a classe dos possíveis retiradores de elétrons, utilizou-se o bromo (-Br), cloro (-Cl) e nitro (-NO<sub>2</sub>) (entradas 4, 5 e 6, **Tabela 5**).

**Tabela 5** - Efeito do grupo substituinte do aldeído na síntese dos derivados de cromenos **3(b-g)**.



Entrada	Aldeído	Produto	Tempo (min) <sup>a</sup>	Rendimento (%)
1		3b	30	90
2		3c	40	93
3		3d	60	NQ*
4		3e	100	NQ*
5		3f	135	NQ*
6		3g	40	NQ*

Condição de reação: aldeído (0,5 mmol), malononitrila (1,0 mmol) e etanol:água (3:7, v:v) (0,4 mL), a temperatura ambiente. Reações monitoradas por CCD. <sup>a</sup> Tempo de consumo do aldeído. \* NQ: não quantificado.

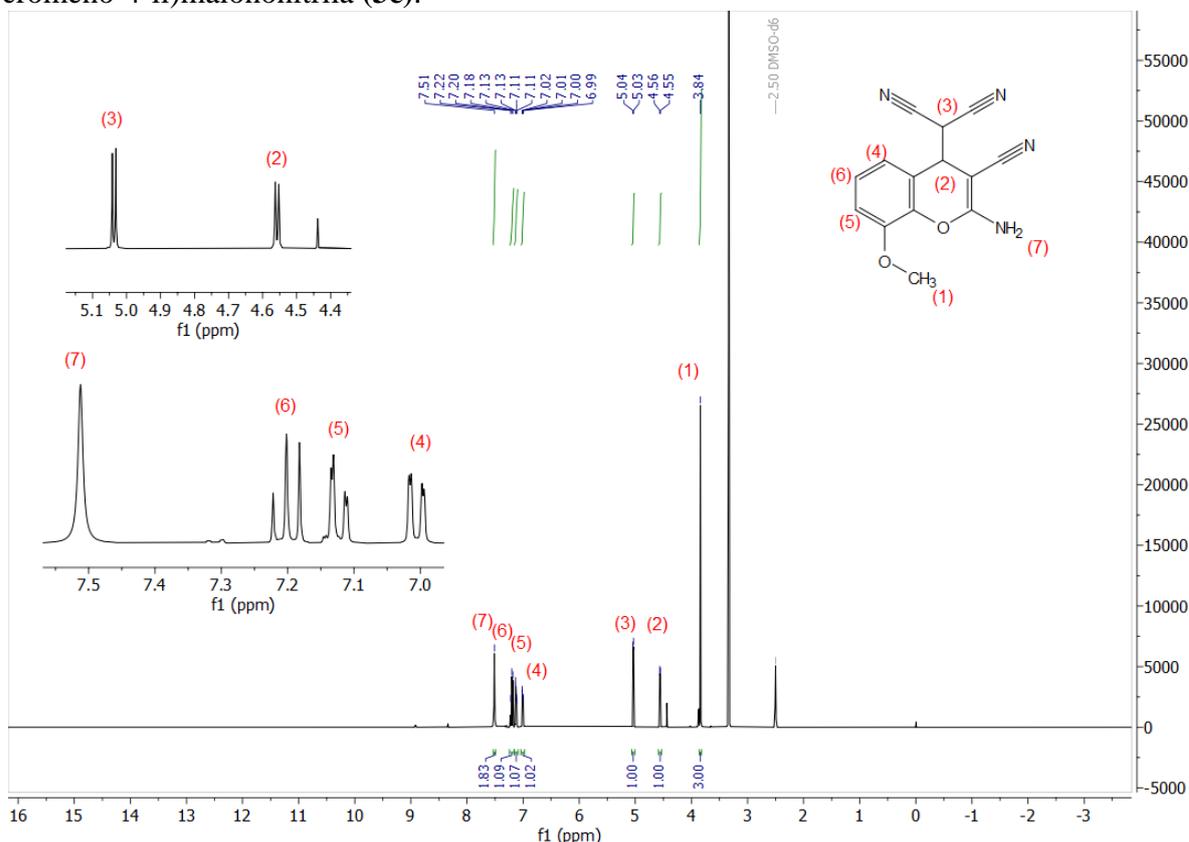
Essas reações foram acompanhadas por CCD, avaliando o consumo dos aldeídos. Ao comparar as reações feitas com salicilaldeídos substituídos (**Tabela 5**) com a reação para formação do produto **3a** (entrada 2, **Tabela 4**), observou-se um aumento no tempo reacional,

mostrando a influência dos substituintes no retardo da velocidade da reação diante o meio usado.

De todas as entradas, as reações de formação dos compostos **3b** e **3c** (entradas 1 e 2, **Tabela 5**), mostraram-se mais reativas, mesmo os aldeídos possuindo em sua constituição grupos doadores de elétrons. Essas reações finalizaram em tempos curtos (30 e 40 min, respectivamente) e apresentaram elevados rendimentos isolados (90 e 93%), sendo seus produtos caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

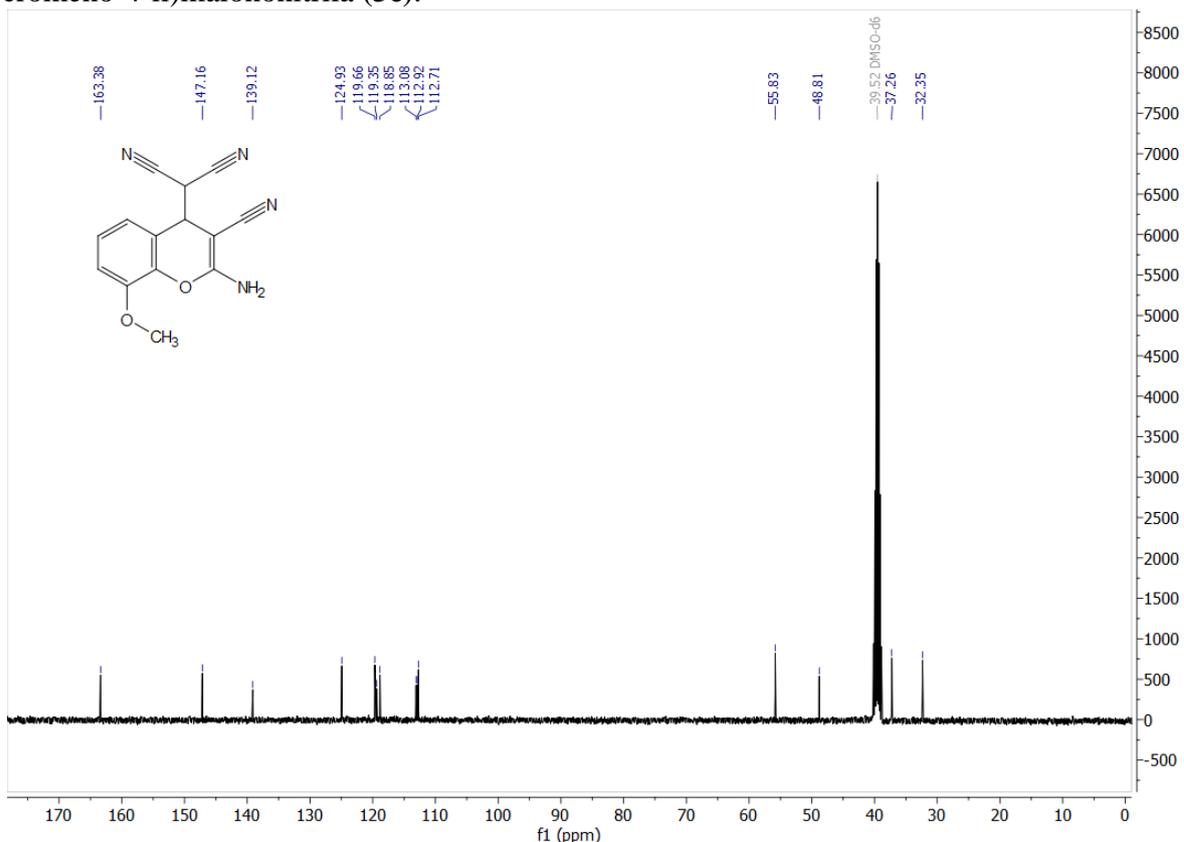
Com base no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do 2-aminocromeno **3c** (**Figura 14**) pode-se confirmar a estrutura do composto sintetizado, já que é possível observar um simpleto em  $\delta$  3,84 ppm integrado para três prótons, caracterizando a metila da metoxila (**1**). Os sinais em  $\delta$  4,56 e  $\delta$  5,04 ppm, respectivamente, confirmam o acoplamento entre os prótons **2** e **3** gerando dois dupletos integrados para um próton, cada. Os dois dupletos em  $\delta$  7,00 e  $\delta$  7,13 ppm, integrados para um próton, cada, mostram que o próton **4** acopla com o próton **6** que, por sua vez, acopla com os prótons **4** e **5**, gerando um tripleto em  $\delta$  7,2 ppm, integrado para um próton. Além disso, os prótons da amina ( $\text{NH}_2$ ) resultam em um simpleto com descolamento de  $\delta$  7,51 ppm, integrado para dois prótons.

**Figura 14** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) (2-amino-3-ciano-8-metoxi-4H-cromeno-4-il)malononitrila (**3c**).



Com o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 15**), pôde-se ainda confirmar o número de carbonos do composto **3c** com sinais característicos de anel aromático na região de  $\delta$  113,18-125,39 ppm. O sinal correspondente a carbono de éter ( $-\text{OCH}_3$ ) pôde ser identificado na região de  $\delta$  55 ppm. Além disso, os carbonos sem prótons, por estarem mais blindados, geram sinais com deslocamentos menores, entre  $\delta$  30-40 ppm.

**Figura 15** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) (2-amino-3-ciano-8-metoxi-4H-cromeno-4-il)malononitrila (**3c**).



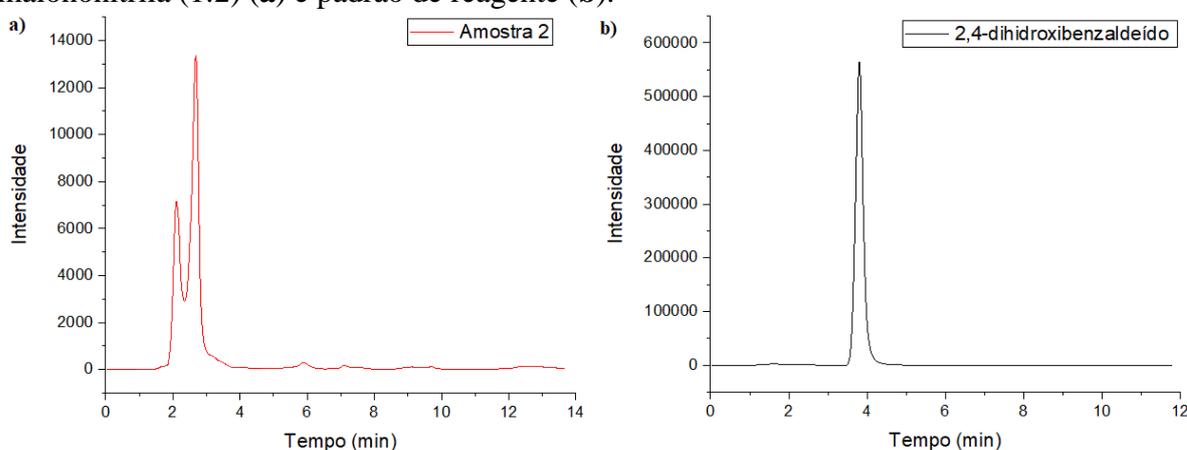
Bhat e colaboradores<sup>84</sup> obtiveram os mesmos produtos (**3b** e **3c**) com tempos moderados (5.5 e 4.5 h, respectivamente) e altos rendimentos (95 e 97%, respectivamente) ao realizarem suas sínteses com moagem mecanoquímica em um sistema sem solvente. Já Costa e colaboradores<sup>18</sup> fizeram a reação de formação de **3c** usando diclorometano e trietilamina numa síntese a temperatura ambiente com duração de 5 h e 82% de rendimento.

Diferentemente das reações anteriores e contrariando o que se esperava, ao eluir amostras da reação do composto **3d** em placas de CCD, percebeu-se a presença de duas manchas, mesmo após o consumo do aldeído (entrada 3, **Tabela 5**). O mesmo foi observado para as reações de formação dos produtos **3e**, **3f** e **3g** (entradas 4, 5 e 6 da **Tabela 5**).

A fim de obter apenas os produtos esperados, todos os procedimentos foram repetidos, as reações foram deixadas em agitação até completarem 360 min, porém, não houve modificações significativas. Os sólidos precipitados nos meios reacionais foram isolados por filtração sob pressão reduzida, lavados com várias espécies de solventes, contudo, não foi possível separar os produtos. Técnicas cromatográficas também foram utilizadas, porém sem sucesso, devido à alta polaridade dos compostos. Assim, essas amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido com o intuito de verificar o número de compostos formados, a conversão dos compostos almeçados em relação ao substrato e as proporções entre os produtos.

Ao analisar uma amostra da reação do produto **3d** por cromatografia líquida dois picos com tempos de retenções diferentes foram identificados (**Figura 16**). Além disso, confirmou-se o consumo total do aldeído, tendo em vista que o cromatograma da amostra da reação (**a**) não apresentou sinal com tempo de retenção (TR) correspondente ao 2,4-dihidroxibenzaldeído (**b**). Acredita-se que o pico mais intenso (2,680 min) e área de 66,3%, referira-se ao composto **3d**, e o menor, com TR = 2,100 min e área de 33,7%, seja intermediário da reação.

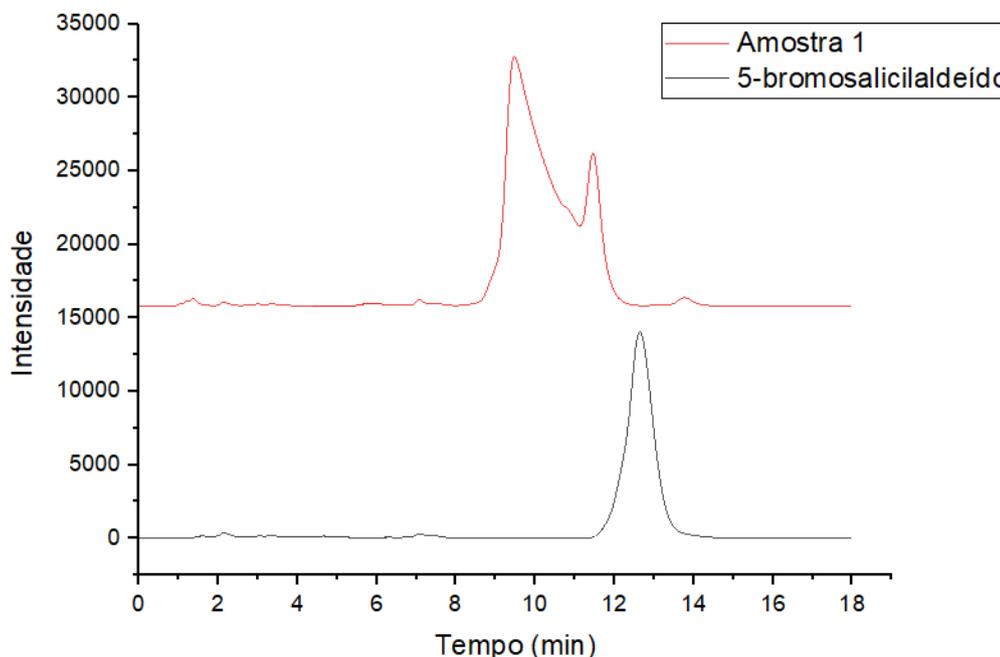
**Figura 16** - Cromatogramas de uma amostra da reação com 2,4-dihidroxibenzaldeído e malononitrila (1:2) (**a**) e padrão de reagente (**b**).



Com a análise de uma amostra da reação para obtenção do produto **3e**, como mostra o cromatograma a seguir (**Figura 17**), pôde-se também confirmar o consumo completo do 5-bromosalicilaldeído e a existência de dois picos com tempos de retenções distintos para o sólido obtido. Acredita-se que o pico mais intenso (80% de conversão), com TR = 9,473 min, seja do produto desejado e o menor (20% de conversão), com TR = 11,453 min, seja de intermediário da reação. Todavia, os tempos de retenções dos compostos apresentados não coincidiram com

nenhum dado já conhecido, permanecendo-os desconhecidos até o momento e necessitando de estudos mais aprofundados.

**Figura 17** - Cromatograma comparando tempos de retenção de uma amostra da reação com 5-bromosalicilaldeído e malononitrila (1:2) (amostra 1) e reagente (5-bromosalicilaldeído).



O mesmo comportamento se repetiu para as reações de formação dos produtos **3f** e **3g**. Não foram observados sinais de reagentes, evidenciando o consumo total dos salicilaldeídos, apenas dois picos para cada reação foram identificados nos cromatogramas (**Ver apêndice C**), ambos com tempos de retenção e intensidades diferentes. Para a reação do **3f** o pico mais intenso, com TR = 17,04 min apresentou conversão de 67,5%, enquanto que o menos intenso, com TR = 24,25 min, mostrou conversão de 32,5%. Já a reação de formação do composto **3g**, apresentou sinal de maior área (61,4%) com TR = 16,69 min e o de menor área (38,6%) em TR = 12,42 min.

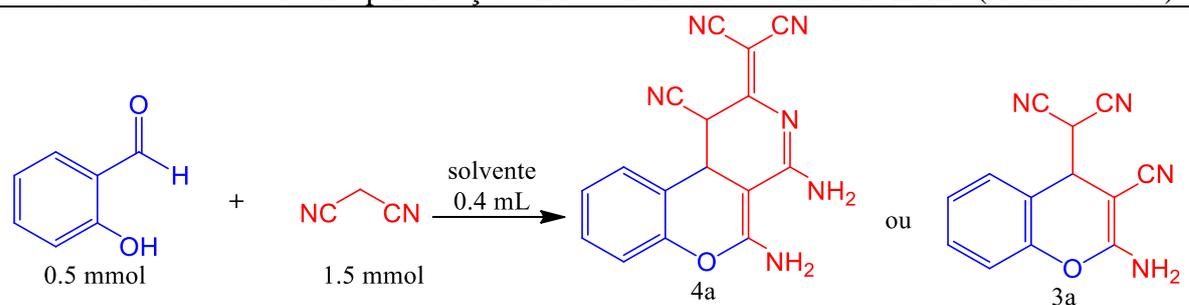
Apesar dos esforços empregados para encontrar as condições ideais, principalmente no que tange o fator tempo, para a síntese dos cromenos **3a-g** utilizando solvente como promotor da velocidade da reação, é evidente que a metodologia sugerida por esse trabalho não funciona eficientemente para todos os compostos empregados. Além disso, ainda se faz necessário aprimorar o sistema de análise, utilizando LC-MS, assim como também desenvolver um método de purificação que sirva para os compostos estudados e que estejam em conformidade com os princípios da Química Verde.

## 5.3 TESTE DE SOLVENTE E TEMPERATURA PARA SÍNTESE DO 2-AMINOCROMENO

4a

O teste de solvente para a síntese do produto **4a** foi realizado seguindo os procedimentos desenvolvidos para a síntese do cromeno **3a**. Inicialmente, a reação sem solvente e a temperatura ambiente foi analisada, objetivando avaliar a influência desses parâmetros para a velocidade das reações (entrada 1, **Tabela 6**). Com esse ensaio observou-se que a reação não se processou eficientemente, uma vez que, mesmo após 360 min de reação, não houve formação de produto, comprovando os resultados obtidos pelos estudos de Smuszkiewicz e colaboradores,<sup>19</sup> que fizeram a reação sem solvente e a 30 °C para formação do composto **4a** e obtiveram percentagem de conversão de apenas 5% em 2 h de reação.

**Tabela 6** - Teste de solvente para reação entre salicilaldeído e malononitrila (cromeno – **4a**).



Entrada	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Rendimento (%)
1	-	t.a	360 <sup>a</sup>	-
2	-	75-80	140 <sup>b</sup>	30
3	Água	t.a	60	86 <sup>d</sup>
4	Etanol:Água (3:7, v:v)	t.a	20	89 <sup>d</sup>
5	Etanol	t.a	180	82 <sup>d</sup>
6	Etanol:Água (3:7, v:v)	75-80	150	92
7	Água	95-100 <sup>c</sup>	150	90
8	Etanol	75-80 <sup>c</sup>	60	93
9	THF	60-66 <sup>c</sup>	240	89
10	Tolueno	105-110 <sup>c</sup>	360 <sup>a</sup>	Traços

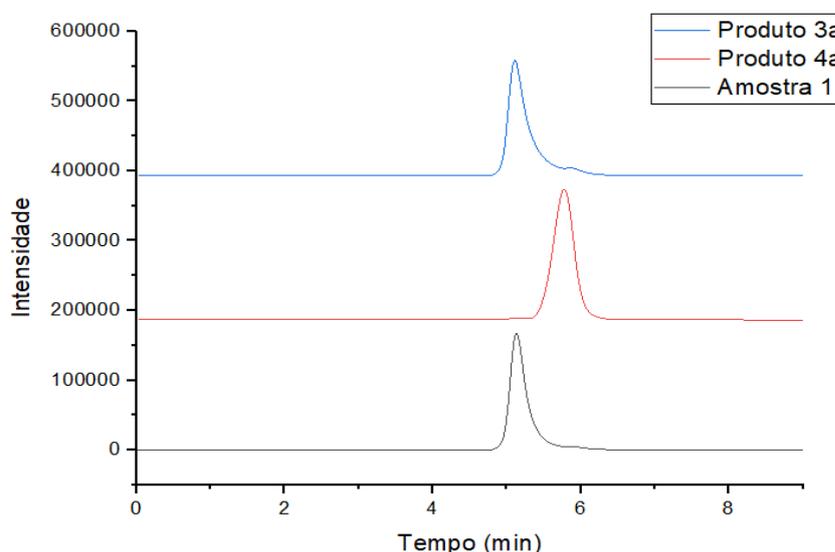
Reações monitoradas por CCD. <sup>a</sup> Não finalizada. <sup>b</sup> Reação interrompida por impossibilidade de manter agitação do sistema pós precipitação. <sup>c</sup> Temperatura de refluxo do respectivo solvente. <sup>d</sup> Apenas composto **3a** obtido.

Com a execução da reação livre de solvente e em refluxo (entrada 2, **Tabela 6**), percebeu-se um precipitado amarelado quando transcorridas 120 min, seguida da impossibilidade de agitação do sistema 20 min posteriores. Esse sólido foi isolado, purificado e caracterizado como produto **4a**, isto é, com 140 min de reação em refluxo obteve-se 30% de

rendimento, indicando que o meio reacional necessitava de solvente para melhor homogeneização e aquecimento para efetiva formação do produto desejado. É sabido que a energia cinética das partículas aumenta quando elevada a temperatura. Assim, a probabilidade de ocorrer colisões efetivas com energia mínima suficiente é maior, favorecendo o progresso da reação.<sup>112</sup>

Embora a Química Verde sugira o desenvolvimento de processos químicos conduzidos à temperatura e pressão ambientes, para economia e minimização dos impactos ambientais,<sup>24</sup> é notória a necessidade de aquecimento para seletiva formação do produto **4a**, em um sistema sem aplicação de catalisador. Esses resultados puderam ainda ser comprovados com a efetuação das reações em água, etanol:água (3:7, v:v) e etanol, a temperatura ambiente. Com esses testes, percebeu-se que o salicilaldeído do meio reacional foi consumido completamente em tempos curtos (entradas 3, 4 e 5, **Tabela 6**), mas apenas o produto **3a** foi identificado, posto que demonstrou mesmo tempo de retenção do produto previamente caracterizado, ao ser analisado por cromatografia líquida (**Figura 18**). Os sistemas ainda permaneceram em agitação até completar 360 min, mas não foram observadas modificações.

**Figura 18** - Cromatograma comparando tempos de retenção de amostra da reação salicilaldeído e malononitrila (1:3) em etanol sem aquecimento (amostra 1), e produtos **3a** e **4a**.



Diante o exposto, buscou-se realizar os ensaios aplicando alguns solventes apolares, polares apróticos e polares próticos, além do aquecimento convencional, para formação do produto de interesse (**4a**). Como já esperado, o emprego do tolueno como solvente apolar resultou em um sistema com bastantes materiais de partida e nenhuma formação do produto previsto (entrada 10, **Tabela 6**). Escolheu-se o THF, para a classe dos solventes polares

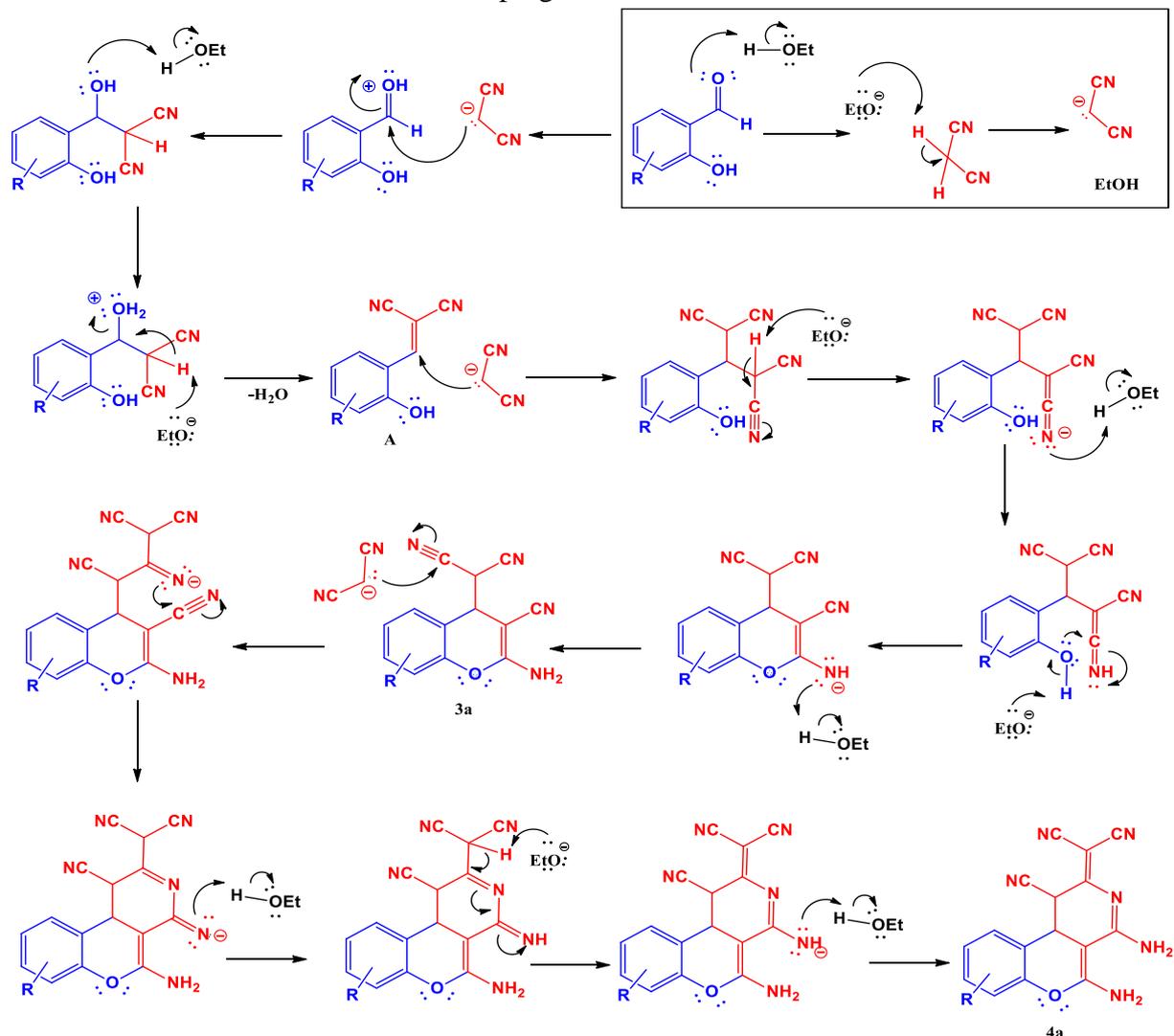
apróticos. A aplicação de tal solvente para a síntese, mostrou-se bastante promissora, visto que a reação finalizou em 240 min e teve rendimento de 89% (entrada 9, **Tabela 6**), levando a enfatizar que as reações estudadas são favorecidas por solventes polares.

Era esperado que a mistura binária desempenhasse melhor atividade, tendo em vista suas propriedades, como mencionado anteriormente - maior poder de solvatação, constante dielétrica intermediária em comparação com os solventes puros, possibilidade de aumentar a solubilidade de compostos orgânicos e capacidade de formar cavidades.<sup>107-109</sup> Em contrapartida, foi o etanol que demonstrou excelente papel na aceleração da velocidade da reação, demandando apenas 60 min para a conclusão da mesma e apresentando rendimento isolado de 93% (entrada 8, **Tabela 6**). Isso se deu, possivelmente, ao fato de o sistema estar sob aquecimento. Kolbe<sup>113</sup> relata em seus estudos que a mistura binária etanol-água apresenta maior atividade de interação em sistemas com temperaturas inferiores a 70° C. Isso se deve ao fato de que em maiores temperaturas, a agitação cinética das partículas é maior, consequentemente, há uma diminuição no número de interações do tipo ligação de hidrogênio realizado entre água e o etanol,<sup>114</sup> minimizando seus efeitos na velocidade da reação.

Entre os solventes orgânicos, um dos mais aceitáveis pela Química Verde é o etanol, por causar menos impactos ambientais e riscos para a saúde humana, podendo ser disponibilizado através da fermentação de fontes renováveis, incluindo açúcares, amidos e lignocelulósicos, apresentando custo relativamente baixo em comparação aos demais solventes orgânicos.<sup>20,115-117</sup> Além disso, o produto precipita no meio reacional durante o progresso, dispensando de processos de isolamentos mais complexos.

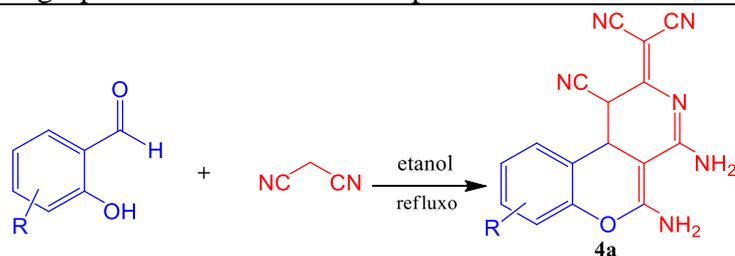
Uma proposta de mecanismo para síntese dos compostos **3** e **4** foi desenvolvida como mostra o **Esquema 5**. A etapa inicial da reação consiste na desprotonação de um equivalente de malononitrila, pela ação do solvente (etanol) para formação do carbânion que atuará como nucleófilo. Em seguida, ocorre a condensação de Knoevenagel desse carbânion ao carbono carbonílico do salicilaldeído, com perda de uma molécula de água, dando origem ao aduto de Knoevenagel **A**. Posteriormente, um segundo equivalente de malononitrila passa novamente pelo processo de desprotonação, para subsequente adição de Michael desse intermediário aniônico no carbono  $\alpha,\beta$ -insaturado do composto **A**. Logo após, ocorre a ciclização intramolecular dando origem ao produto **3a**. A reação segue com novo ataque de outro equivalente de malononitrila já desprotonada (quando realizada com três equivalentes de malononitrila) ao carbono da nitrila do composto **3a**. Subsequentemente, acontece a ciclização intramolecular que sucede com uma isomerização para formação do composto **4a**.

**Esquema 5** - Proposta mecanística de reação entre salicilaldeído e malononitrila para síntese dos cromenos **3** e **4** e seus derivados empregando etanol.



#### 5.4 SÍNTESE DE UMA SÉRIE DE DERIVADOS DE CROMENOS 4(b-g)

Levando em consideração os resultados obtidos a partir dos ensaios de solvente realizados, empregou-se, nas mesmas condições, o solvente que apresentou melhor desempenho quanto ao tempo (entrada 8, **Tabela 6**), para a síntese de variados cromenos, modificando apenas as espécies de salicilaldeídos substituídas com grupos retiradores e doadores de elétrons, ponderando a mesma lógica do princípio de Hammett,<sup>118</sup> como mostra a **Tabela 7** a seguir. Com isso, verificou-se a influência desses substituintes para o progresso das reações.

**Tabela 7** - Efeito do grupo substituído do aldeído para o síntese do derivado de cromeno **4b-g**.

Entrada	Aldeído	Produto	Tempo (min)	Rendimento (%)
1		4b	180	87
2		4c	300 <sup>a</sup>	75
3		4d	300	89
4		4e	150	90
5		4f	140	93
6		4g	90	92

Condição de reação: aldeído (0,5 mmol), malononitrila (1,5 mmol) e etanol (0,4 mL), em refluxo. Reações monitoradas por CCD. <sup>a</sup> Reação não finalizada.

Todas as reações apresentaram tempos moderados, variando entre 90-300 min, e moderados a altos rendimentos, variando entre 75-93%, uma vez que não fizeram uso de catalisadores, valendo-se apenas do efeito do solvente e da temperatura como promotores das reações.

Quando comparados os tempos reacionais de todos os processos químicos, notou-se que as reações com o 5-bromosalicilaldeído, 5-clorosalicilaldeído e 5-nitrosalicilaldeído

(entradas 1, 2 e 3, **Tabela 7**), que possuem grupos retiradores de elétrons, apresentaram maiores tempos reacionais em relação as reações com o 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído, 2-hidroxi-5-metoxi-benzaldeído e 2,4-dihidroxibenzaldeído (entradas 4, 5 e 6, **Tabela 7**), que possuem grupos doadores de elétrons. É importante considerar que a reação passa por uma etapa de ciclização intramolecular em que o oxigênio da hidroxila (-OH) do salicilaldeído atua como nucleófilo (**Esquema 5**).

Visto isso, o efeito dos grupos substituintes também irá influenciar no papel desempenhado pelo grupo hidroxila. Como os grupos bromo, cloro e nitro atuam como retiradores de elétrons, os elétrons livres da hidroxila ficam menos disponíveis, menos reativos, para a promoção do ataque nucleofílico intramolecular, justificando, assim, o maior tempo de reação (entradas 1, 2 e 3, **Tabela 7**), fenômeno esse já percebido por Yang e colaboradores.<sup>7</sup> Já no caso das metoxilas e hidroxila, por atuam como grupos doadores de elétrons, a hidroxila do salicilaldeído fica rica em densidade eletrônica, seus elétrons livres ficam mais disponíveis, conseqüentemente, mais nucleofílicos, demandando menos tempo para a etapa de ciclização, o que pode justificar os menores tempos reacionais das entradas 4, 5 e 6 (**Tabela 7**).

Ao buscar na literatura, verificou-se a existência de apenas três artigos relatando a síntese dessas moléculas: Costa e colaboradores,<sup>18</sup> Yang e colaboradores<sup>7</sup> e Smuszkiewicz e colaboradores.<sup>19</sup> Como já discutido anteriormente, Costa e colaboradores realizaram a síntese do composto **4f** a partir da reação entre o composto de metileno ativo, malononitrila, e uma solução do composto (2-amino-3-ciano-8-metoxi-4H-cromeno-4-il)malononitrila (**3f**) em THF, sem utilizar catalisador e em refluxo, apresentando tempo reacional longo de 3,5 dias, e baixo rendimento, apenas 56%. Isto é, para obtenção do produto em questão, foi necessário sintetizar inicialmente o produto **3f** para, posteriormente, utilizá-lo como material de partida na produção da molécula **4f**, não se enquadrando dentro dos princípios da Química Verde, uma vez que a mesma busca diminuir o número de etapas de uma reação para minimizar a geração de resíduos bem como os custos da produção.<sup>119</sup>

No trabalho de Yang e colaboradores, também já discutido anteriormente, relata a síntese dos produtos **4a**, **4c** e **4f** utilizando lipase como catalisador. Porém, diferentemente de Costa e colaboradores, os pesquisadores prepararam uma reação *one-pot* entre um equivalente de salicilaldeído e três de malononitrila, em etanol e sob irradiação de micro-ondas à 60 °C. Como a reação se procedeu sob irradiação de micro-ondas, cuja forma de aquecimento é diferenciado, já que aplica energia diretamente nas moléculas aquecendo-as volumetricamente em menos tempo que o aquecimento convencional,<sup>120</sup> o tempo reacional foi otimizado para 10 minutos e os rendimentos obtidos variaram entre 93,8-96,2%. Vale ressaltar que os autores

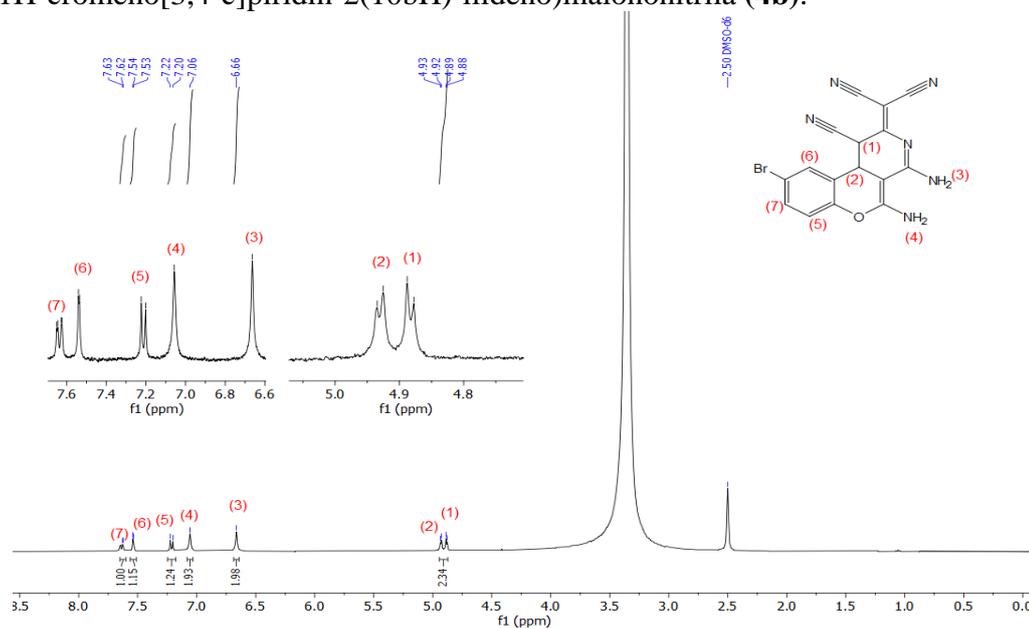
executaram também, reações para a síntese do cromeno derivado do 5-nitrosalicilaldeído, porém não tiveram êxito na obtenção do produto **4d**.

Mais recentemente, Smuszkiewicz e colaboradores utilizaram sílicas mesoporosas TMCF (T = Ta - tântalo), modificados com metais alcalinos lítio (Li), potássio (K) ou cério (Cs) para a obtenção do produto **4a**, num sistema sem solvente e à 30 °C, com o salicilaldeído e a malononitrila na proporção 1:3 equivalentes, respectivamente. O catalisador de Li proporcionou melhor seletividade, levando apenas a formação do produto **4a**, com conversão de 80% em 30 minutos de reação. Já os catalisadores de K e Cs revelaram baixa seletividade para o produto **4a**, mas apresentaram 91 e 87% de conversão, respectivamente.

É importante destacar que não existem relatos na literatura para a metodologia empregada na síntese sequencial dos produtos **4a-g** via sistema *one-pot* com etanol em aquecimento convencional, proposta nesse trabalho, bem como, execução dos produtos **4b**, **4d**, **4e** e **4g**, mostrando-se, portanto, produtos inéditos. Com isso, realizou-se RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para comprovar que as moléculas produzidas eram as esperadas, e para confirmar as massas molares dos compostos originais, fez-se análises de Espectrometria de Massa de Alta Resolução.

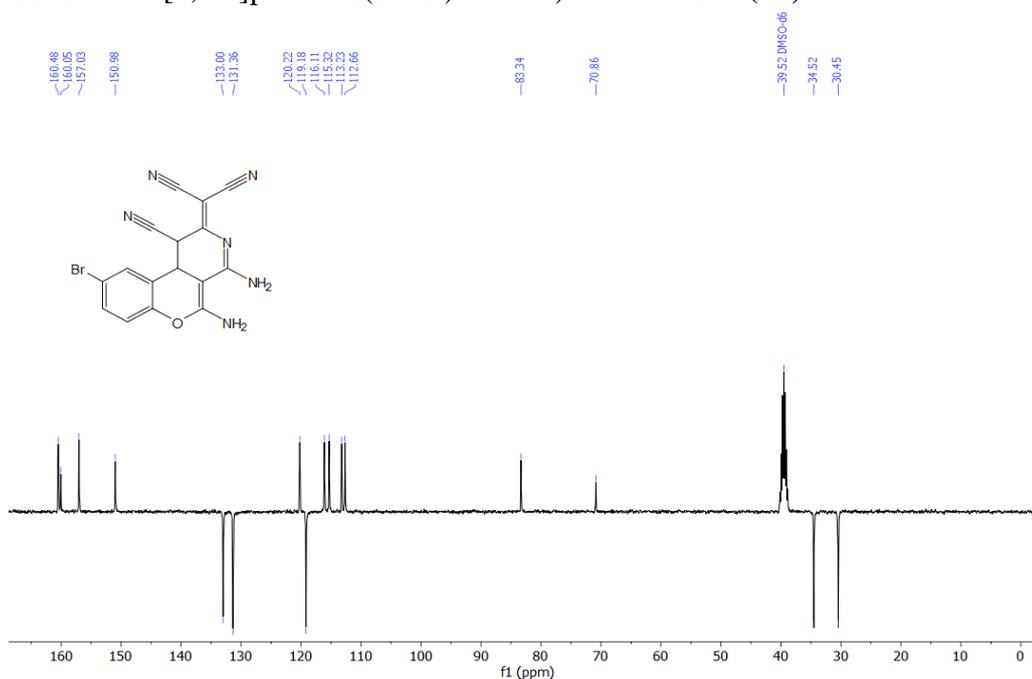
Ao analisar o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **4b** (**Figura 19**), é possível observar um duplo duplete integrado para dois prótons em  $\delta$  4,79 ppm referente aos prótons **1** e **2**. Os prótons das aminas ( $\text{NH}_2$ ) resultam em dois simpletos com descolamentos de  $\delta$  6,66 e  $\delta$  7,05 ppm integrados para dois prótons cada. Já os prótons **5** e **7** acoplam entre si gerando um duplete em  $\delta$  7,02 ppm, e outro em  $\delta$  7,62 ppm, integrados para um próton cada. Enquanto isso, o próton **6** resulta em um simpleto integrado para um próton, confirmando que o composto sintetizado é de fato o esperado.

**Figura 19** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de 2-(4,5-diamino-9-bromo-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4b**).



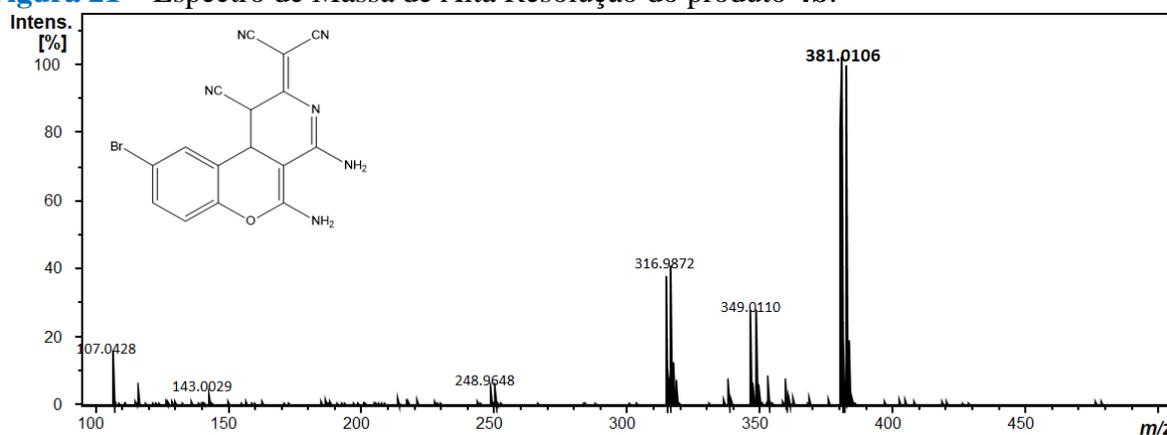
Com o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 20**) pôde-se ainda confirmar o número de carbonos do composto **4b** com sinais característicos de anel aromático na região de  $\delta$  115-160 ppm. Além disso, sinais correspondentes a carbonos de nitrilas ( $-\text{C}\equiv\text{N}$ ) puderam ser identificados entre 80-110 ppm. Os carbonos sem prótons e mais blindados, apresentam sinais com deslocamentos menores, por volta de  $\delta$  30-35 ppm.

**Figura 20** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de 2-(4,5-diamino-9-bromo-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4b**).



Com auxílio da EMAR confirmou-se sua massa, cujo pico do íon molecular para a fórmula  $C_{16}H_9BrN_6O$  corresponde a  $M^+ = 381,0106$  (Figura 21).

**Figura 21** – Espectro de Massa de Alta Resolução do produto **4b**.

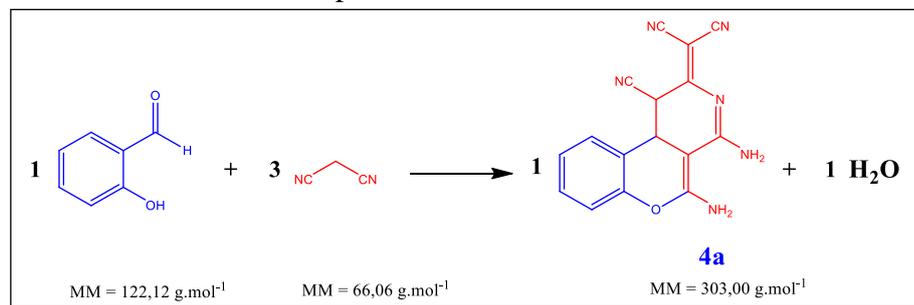


Além disso, a fim de determinar o ponto de fusão dessas estruturas **4(a-g)**, as amostras foram submetidas a aquecimento, uma vez que, um dos indicadores usados pelos químicos orgânicos tanto para identificação de uma substância quanto para determinar sua pureza é seu intervalo de fusão.<sup>121</sup> Ao atingir temperaturas entre 220-250 °C, observou-se que os materiais mostraram mudanças de coloração, antes mesmo de se fundirem, significando que se decompuseram antes de alcançarem seu ponto de fusão.

#### 5.4.1 Determinação da economia atômica para a síntese dos derivados de cromenos **4(a-g)**

Para verificar quão eficiente é o método empregado nesse trabalho para a síntese dos compostos **4(a-g)**, realizou-se ainda cálculos de Economia Atômica (EA), levando em conta a quantidade de átomos fornecida pelos reagentes que deve estar presente no produto final, com base na estequiometria da reação estudada (Figura 22). O valor ideal do fator EA é de 100%, significando que todos os átomos dos reagentes residem no produto desejado.<sup>36</sup> Vale enfatizar que esta determinação é um parâmetro de natureza teórica, que desconsidera o rendimento da reação e a utilização de solventes durante o procedimento, bem como os processos de purificação do produto.

**Figura 22** – Equação balanceada que representa reação entre salicilaldeído e malononitrila para síntese da molécula **4a**, com suas respectivas massas molares.



Utilizando a **equação 1**, calculou-se a percentagem de economia atômica para a formação do derivado de cromeno **4a**, como mostra a seguir, cujo valor demonstra alta eficiência atômica (EA = 94,6%). Os 5,4% obtidos por diferença correspondem a perda de água que é liberada no processo químico.

$$(\%EA) = \left( \frac{\text{MM do produto desejado}}{\Sigma \text{MM de todos os reagentes utilizados}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

$$(\%EA) = \left( \frac{303,00}{(1 \times 122,12) + (3 \times 66,06)} \right) \times 100$$

$$(\%EA) = 94,6$$

Os dados apresentados pela **Tabela 8** mostram EA variando entre 95,0–95,4% para os produtos **4(b-g)**. Isto significa dizer que, do ponto de vista de aproveitamento dos reagentes, esta reação atende ao segundo princípio da Química Verde, uma vez que a maior parte dos átomos empregados na síntese está incorporada no produto final. Desta forma, pode ser classificada como síntese “verde”, não havendo formação de subprodutos tóxicos/nocivos para o meio ambiente, assim como não necessita de tratamentos de purificação para o material obtido, sendo os reagentes convertidos totalmente em um único produto.

**Tabela 8** – Fator economia atômica dos compostos **4(b-g)** a partir das massas molares da malononitrila e espécie de salicilaldeído.

Produto	M do aldeído (g.mol <sup>-1</sup> )	M da malononitrila (g.mol <sup>-1</sup> )	M do produto desejado (g.mol <sup>-1</sup> )	EA (%)
<b>4b</b>	201,02	66,06	381,01	95,4
<b>4c</b>	156,57	66,06	337,10	95,0
<b>4d</b>	167,12	66,06	347,07	95,0
<b>4e</b>	152,15	66,06	333,10	95,1
<b>4f</b>	152,15	66,06	333,10	95,1
<b>4g</b>	138,12	66,06	319,09	95,0

Esses resultados puderam ainda ser confirmados com a aplicação da **equação 2**, para determinar a percentagem de Economia Atômica Experimental ( $EA_{exp}$ ), que se dá a partir da razão da massa obtida da reação pela soma das massas de todos os reagentes utilizados,<sup>24</sup> da reação de formação do 2-aminocromeno **4a**, como mostra a seguir:

$$(\%EA_{exp}) = \left( \frac{\text{massa obtida da reação}}{\Sigma \text{ das massas de todos os reagentes}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

$$(\%EA_{exp}) = \left( \frac{140,90 \text{ g}}{0,06106 \text{ g} + 0,09909 \text{ g}} \right) \times 100$$

$$(\%EA_{exp}) = 88,0$$

Ao analisar os dados acima, percebe-se que um total de 0,16015 g de reagentes (0,06106 g de salicilaldeído + 0,09909 g de malononitrila) foram utilizados na reação, fornecendo 140,90 g do produto desejado (**4a**). Essa reação, portanto, pode apresentar 88,0% da massa dos reagentes incorporada ao produto final.

**Tabela 9** – Fator economia atômica experimental dos compostos **4(b-g)** formados nas reações, a partir dos rendimentos obtidos com reações.

Produto Analisado	Massa obtida da reação (g)	EA <sub>exp</sub> (%)
<b>4b</b>	0,03314	83,0
<b>4c</b>	0,02527	71,3
<b>4d</b>	0,03088	84,6
<b>4e</b>	0,02995	85,5
<b>4f</b>	0,03097	88,4
<b>4g</b>	0,02936	87,3

As informações da **Tabela 9** mostram  $EA_{exp}$  variando entre 71,3–88,4% para os compostos **4(b-g)**. Isto é, da perspectiva de aproveitamento de reagentes, essa reação é muito boa, uma vez que a maior parte dos átomos postos em uso nas reações é incorporada no produto desejado. No geral, as reações exibem alta eficiência atômica.

#### 5.4.2 Teste de atividade biológica *in vitro*, citotoxicidade e $CI_{50}$ em células de câncer

A fim de verificar se os compostos **4a-g** sintetizados apresentam potencial de inibição em células cancerígenas, os mesmos foram testados *in vitro* em três linhagens de células: HCT-116 (câncer de cólon humano), K562 (leucemia mielóide crônica) e H-1299 (carcinoma de pulmão).

Para concentração única, uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade ou com pouca atividade apresentam percentual de inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%, as com atividade moderada variam entre 50 a 75% e com muita atividade variam entre 75 a 100%.

Como é possível notar na **Tabela 10**, os resultados expressos como a média dos percentuais de crescimento inibitório (%) seguidos de seus respectivos desvios padrão (DP) revelaram que os compostos **4a**, **4b** e **4d**, embora não tenham apresentado potencial de inibição para as três linhagens de células, mostraram-se bastante promissoras para as células K-562, tendo percentagem de inibição de crescimento celular acima de 94,0%, próximo ao do fármaco de referência (Doxorrubicina - DOX). O composto **4b** ainda apresentou 75,6% de inibição para as células HCT-116, resultado satisfatório. Já os produtos **4e** e **4f** mostraram resultados excelentes, tendo em vista que foram capazes de inibir o crescimento dos três tipos de células testadas, com percentuais superiores a 93,0%. Além disso, ainda tiveram percentual de inibição maior que a doxorrubicina para as células HCT-116 e H-1299.

**Tabela 10** - Porcentagem de inibição do crescimento celular (% INIB) e desvio padrão da média (DP) das amostras em três linhagens tumorais. Doxorrubicina (DOX) como controle positivo.

Composto	HCT-116		H-1299		K-562	
	% INIB	DP INIB	% INIB	DP INIB	% INIB	DP INIB
<b>4a</b>	39,1	12,2	14,1	7,7	94,0	3,2
<b>4b</b>	75,6	12,9	8,7	5,3	94,0	3,2
<b>4c</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	32,0	1,9
<b>4d</b>	36,0	18,0	0,0	0,0	95,1	2,7
<b>4e</b>	93,1	4,1	97,7	1,6	94,5	3,0
<b>4f</b>	93,4	3,6	95,6	3,3	97,0	1,7
<b>4g</b>	30,9	13,6	0,0	0,0	50,0	14,6
DOX	87,0	3,4	93,2	5,4	97,1	1,2

HCT-116: linhagem de células de câncer de cólon humano; H-1299: linhagem de células de carcinoma de pulmão; e K562: linhagem de células de leucemia mielóide crônica.

Levando em consideração os resultados anteriores, ao compostos **4b**, **4e** e **4f** foram aplicados nas células HCT-116, K562 e H-1299, como também na linhagem não tumoral MRC-5 (fibroblasto de pulmão), para determinação da Concentração Inibitória (CI<sub>50</sub>), ou seja, a quantidade mínima necessária para inibir 50% do crescimento das células nocivas. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. Os resultados disponíveis na **Tabela 11** são dados pela média dos valores de CI<sub>50</sub> seguidos de seus respectivos intervalos de confiança (IC).

Os resultados do CI<sub>50</sub> mostram que o grupo metoxi na posição 9 tem forte influência na atividade das moléculas sintetizadas, já que resultados expressivos podem ser observados

nas atividades do composto **4e** contra as três linhagens de células tumorais H-1299, K-562 e HCT-116, quando comparados com o composto **4f** que possui grupo metoxi na posição 7. O composto **4b**, que também apresenta grupo substituinte na posição 9 (-Br), apresenta maior atividade citotóxica em relação ao composto **4f**, indicando que tal posição do grupo substituinte possivelmente favorece o aumento da atividade.

**Tabela 11** – Concentração que causa 50% de inibição do crescimento (CI<sub>50</sub>) e seu intervalo de confiança (IC) em µg/mL das amostras frente as linhagens MRC-5, H-1299, K-562 e HCT-116.

Compostos	MRC-5	H-1299	K-562	HCT-116
	CI <sub>50</sub> (IC) <sup>a</sup>			
<b>4b</b>	14,78 (19,1 – 49,4)	10,9 (7 – 16,9)	*NT	13,5 (9,5 – 19,3)
<b>4e</b>	21,33 (19,1 – 49,4)	9,7 (5,7 – 16,5)	1,1 (0,2 – 4,5)	6,5 (3,8 – 11,2)
<b>4f</b>	27,66 (9,2 – 82,7)	>25	8,7 (3,4 – 22,2)	27,9 (4,7 – 165)
DOX	>25	2,2 (1,2 – 4,1)	1,1 (0,8 – 1,5)	0,7 (0,5 – 0,9)

<sup>a</sup> Os valores da concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) foram calculados por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%. MRC-5: linhagem de células não tumorais de fibroblasto de pulmão; H-1299: linhagem de células de carcinoma de pulmão; K562: linhagem de células de leucemia mielóide crônica; e HCT-116: linhagem de células de câncer de cólon humano. \*NT: Não testado.

Com relação a aplicação dos produtos nas células não tumorais (MRC-5), os compostos **4b** e **4e** apresentaram menores teores necessários para inibir em 50% o crescimento de tais células, quantidade inferior ao do fármaco de referência (DOX), sendo o **4b** com maior eficiência. Já a atividade do composto **4f** contra as células MCR-5 necessitou de maior concentração que o doxorrubicina. Após os testes contra as células cancerígenas, as moléculas tiveram sua seletividade avaliada em células saudáveis, tendo em vista que um dos grandes percalços da quimioterapia está relacionado ao ataque do fármaco a essas células, causando complicações no tratamento.

O índice de seletividade (IS) corresponde à razão entre os respectivos valores de CI<sub>50</sub> do composto puro contra célula saudável (MCR-5) e o composto puro contra as células cancerígenas, de modo que um valor de IS menor que 2,0 indica possível toxicidade do candidato a fármaco.<sup>122</sup> A **Tabela 12** mostra os resultados obtidos, onde a estrutura **4e** apresentou resultados satisfatórios (IS > 2,0) para as três linhagens de células cancerígenas testadas, sendo promissora principalmente por apresentar IS = 19,4 frente a linhagem de células K-562, já que são bastante agressivas e muito resistentes ao tratamento.<sup>123</sup> O composto **4f**

também se mostrou muito eficiente para essa linhagem apresentando resultado satisfatório com IS = 3,2, abrindo perspectivas para novos estudos.

**Tabela 12** – Índice de seletividade dos compostos ativos.

Compostos	Índice de Seletividade (IS)			
	MRC-5 CI <sub>50</sub> (IC) <sup>a</sup> (µg/mL)	H-1299	K-562	HCT-116
<b>4b</b>	14,78 (19,1 – 49,4)	1,4	*NT	1,09
<b>4e</b>	21,33 (19,1 – 49,4)	2,2	19,4	3,3
<b>4f</b>	27,66 (9,2 – 82,7)	1,1	3,2	1,0
DOX	>25	11,4	22,7	35,7

<sup>a</sup> Os valores da concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) foram calculados por regressão não linear com intervalo de confiança (IC) de 95%. MRC-5: linhagem de células não tumorais de fibroblasto de pulmão; H-1299: linhagem de células de carcinoma de pulmão; K562: linhagem de células de leucemia mielóide crônica; e HCT-116: linhagem de células de câncer de cólon humano. \*NT: Não testado.

# **CAPÍTULO 6**



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visando corresponder às expectativas e exigências da Química verde, como a redução da toxicidade, minimização da geração de resíduos, além de reduzir o custo das sínteses, o presente trabalho propôs o desenvolvimento de novas metodologias para a síntese dos derivados de cromenos **3(a-g)** e **4(a-b)**, a partir da reação entre diferentes salicilaldeídos e malononitrila, que utilizassem de sistemas sem catalisadores, se valendo apenas do efeito do solvente e da temperatura para otimização da velocidade das reações sequenciais Knoevenagel-Michael.

As análises possibilitaram determinar que os solventes polares próticos favorecem mais as reações sequenciais estudadas. Com isso, dos solventes testados, o que melhor atuou na síntese dos derivados de cromenos **3(a-g)** foi a mistura binária etanol:água (3:7, v:v) em um sistema sem aquecimento. Tal sistema se mostrou mais eficiente para as reações que empregaram os aldeídos substituídos com grupos doadores de elétrons (**3e** e **3f**) dando origem a produtos puros em tempos curtos (30-40 min) com altos rendimentos isolados (90-93%), além de revelar a necessidade de novos estudos para otimização das condições reacionais que empregam os aldeídos substituídos com grupos retiradores de elétrons como material de partida, já que não foi possível obter os compostos puros.

O solvente que apresentou o melhor desempenho para a síntese dos derivados de cromenos **4(a-g)** foi o etanol, em um sistema aquecido convencionalmente à 75-80 °C. A aplicação desse solvente possibilitou sintetizar quatro novos compostos (**4b**, **4d**, **4e** e **4g**), além de outros três já conhecidos, em tempos curtos e moderados (60-300 min) e altos rendimentos isolados (75-93%). Cálculos de eficiência atômica também foram realizados para a reação sequencial de síntese desses cromenos e exibiram alta economia atômica, com percentagem de  $EA_{exp}$  variando entre 71,3-88,4%, estando em conformidade com o segundo princípio da Química Verde.

Além disso, os derivados de cromenos **4** obtidos com os experimentos foram testados *in vitro* em três linhagens de células tumorais (câncer de cólon humano, leucemia mielóide crônica e carcinoma de pulmão) para determinação do potencial antitumoral dessas amostras. Com o *screening* inicial frente a células tumorais verificou-se que os compostos **4b**, **4e** e **4f** apresentaram os melhores resultados, com percentagem de inibição de crescimento superior a 75,6%, levando a determinar o  $CI_{50}$ . Para esse estudo, além dos três tipos de células tumorais, a linhagem de células não tumorais de fibroblasto de pulmão também foi usada, sendo o cromoeno **4e** mais eficiente para todas as células tumorais, enquanto que para inibir em 50% o

crescimento das células não tumorais necessitou-se de apenas 14,78  $\mu\text{g/mL}$  do cromeno **4b**, concentração inferior ao do fármaco de referência, doxorubicina. Ainda foi possível determinar o IS desses compostos, revelando que a molécula **4e** apresentou resultados mais satisfatórios ( $\text{IS} \geq 2,0$ ) para as três espécies de células cancerígenas.

De modo geral, os solventes utilizados, além de serem “ecoamigáveis”, se mostraram bons otimizados para as reações de Knoevenagel-Michael possibilitando a utilização de diferentes aldeídos em sistema livre de catalisador para a síntese de moléculas inéditas, como também de moléculas já elucidadas, ambas candidatas à fármacos.

# **CAPÍTULO 7**

**PERSPECTIVAS**



## PERSPECTIVAS

- Otimizar metodologia empregado para a síntese dos derivados de cromenos **3(a-g)**;
- Estudar a fluorescência e a voltametria cíclica dos derivados de cromenos **4(a-g)** para ampliar suas aplicabilidades;
- Realizar análise termogravimétrica para os derivados de cromenos **4(a-g)**, a fim de verificar a estabilidade térmica dos materiais e entender como eles se decompõem;
- Fazer estudo teórico para determinação das energias livres de Gibbs das reações de síntese dos 2-aminocromenos **4(a-g)** com e sem aquecimento.

## REFERÊNCIAS

- [1] CHEN, T. L.; KIM, H.; PAN, S. Y.; TSENG, P. C.; LIN, Y. P.; CHIANG, P. C. Implementation of green chemistry principles in circular economy system towards sustainable development goals: Challenges and perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 716, 2020.
- [2] TO, M. H.; UISAN, K.; OK, Y. S.; PLEISSNER, D.; LIN, C. S. K. Recent trends in Green and Sustainable Chemistry: Rethinking textile waste in a circular economy. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**. v. 20, 2019.
- [3] FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. **Química Nova**, v. 34, 2011.
- [4] IVANKOVIĆ, A.; DRONJIĆ, A.; BEVANDA, A.M.; TALIC, S. Review of 12 Principles of Green Chemistry in Practice. **International Journal of Sustainable and Green Energy**, v. 6, 2017.
- [5] HAGEN, J. **Industrial Catalysis A Practical Approach**, 2. ed. Germany: Wiley - Vch, 2006.
- [6] LUO, J.; XIN, T.; WANG, Y. A PEG bridged tertiary amine functionalized ionic liquid exhibiting thermoregulated reversible biphasic behavior with cyclohexane/isopropanol: synthesis and application in Knoevenagel condensation. **New Journal of Chemistry**, v. 37, 2013.
- [7] YANG, F.; WANG, Z.; WANG, H.; WANG, C.; WANG, L. An efficient condensation of substituted salicylaldehyde and malononitrile catalyzed by lipase under microwave irradiation. **RSC Advances**, v. 5, 2015.
- [8] XU, D; SHI, S.; WANG, Y. Polystyrene-immobilized DABCO as a highly efficient and recyclable organocatalyst for the Knoevenagel condensation reaction. **RSC Advances**, v. 3, 2013.
- [9] PIPPAL, P.; SINGH, P. P. Calcium ferrite, an efficient catalyst for knoevenagel condensation (A green approach). **Oriental Journal of Chemistry**, v. 33, 2017.
- [10] KITAGAWA, S.; ZHOU, H. Structuring of metal–organic frameworks at the mesoscopic/macrosopic scale. **Journal Chemical Society Reviews**, v. 43, 2014.
- [11] SRIVASTAVA, S.; AGGARWAL, H.; GUPTA, R. Three-Dimensional Heterometallic Coordination Networks: Syntheses, Crystal Structures, Topologies, and Heterogeneous Catalysis. **Crystal Growth & Design**, v. 15, 2015.
- [12] OMAR, A.; ABLAJAN, K. Efficient one-pot catalyst-free synthesis of novel coumarin-spiro[indoline-3,4'-pyran] conjugates via three-component domino reaction in aqueous médium. **Green Chemistry Letters and Reviews**. v. 12, 2019.
- [13] SUZUKI, S.; SAKAKI, S.; ISHIZUKA, S.; NISHINO, T.; ITO, H.; NONAKA, R.; NOIKE, M.; KODAMA, T.; NOZAKA, H.; SATO, T.; AGEMATSU, H.; MARUYAMA, K.;

OYAMADA, S.; KUROISHI, T.; SASAKI, K.; YAGAWA, K.; YOSHIOKA, M.; YOKOYAMA, Y. Efficient Solvent- and Catalyst-Free Syntheses of Imine Derivatives Applying the Pressure Reduction Technique: Remarkable Change of the Reaction Rate with the Phase Transition. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 8, 2018.

[14] TIAN, T., HU, R.; TANG, B.Z. Room Temperature One-Step Conversion from Elemental Sulfur to Functional Polythioureas through Catalyst-Free Multicomponent Polymerizations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, 2018.

[15] CURINI, M.; CRAVOTTO, G.; EPIFANO, F.; GIANNONE, G. IL-13: A Promising Therapeutic Target for Bronchial Asthma. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, 2006.

[16] O'KENNEDY, R.; THORNES, R. D. Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. **Wiley**, 1997.

[17] YADAV, S.; SRIVASTAVA, M.; RAI, P.; SINGH, J.; PRASAD T., K.; SINGH, J. Visible light induced, catalyst free, convenient synthesis of chromene nucleus and its derivatives using water-ethanol mixture as a solvent. **New Journal of Chemistry**, v. 39, 2015.

[18] COSTA, M.; AREIAS, F.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; PROENÇA, F. The Condensation of Salicylaldehydes and Malononitrile Revisited: Synthesis of New Dimeric Chromene Derivatives. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, 2008.

[19] SMUSZKIEWICZ, A.; LÓPEZ-SANZ, J.; SOBCZAK, I.; MARTÍN-ARANDA, R. M.; ZIOLEK, M.; PÉREZMAYORAL, E. Tantalum vs Niobium MCF nanocatalysts in the green synthesis of chromene derivatives. **Catalysis Today**, v. 325, 2019.

[20] BAHUGUNA, A.; CHOUDHARY, P.; CHHABRA, T.; KRISHNAN, V. Ammonia-Doped Polyaniline-Graphitic Carbon Nitride Nanocomposite as a Heterogeneous Green Catalyst for Synthesis of Indole-Substituted 4H-Chromenes. **ACS Omega**, v. 3, 2018.

[21] ANASTAS, P. T.; WILLIAMSON, T. C. **Green Chemistry: Designing Chemistry for the Environment**, American Chemical Series Books, Washington, DC, 1996, pp. 1-20.

[22] SHELDON, R. A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. **Chemical Society Reviews**, v. 41, 2012.

[23] LANKEY, R. L.; ANASTAS, P. T. Life-Cycle Approaches for Assessing Green Chemistry Technologies. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 4, 2002.

[24] LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. C. **Química Nova**, v. 26, 2003.

[25] ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, 2010.

[26] FORUM. Chemical Educational Foundation—a network of resources. **Green Chemistry**, 1999, 1.

- [27] CLARK, J. H. Green chemistry: challenges and opportunities. **Green Chemistry**, 1999, 1.
- [28] ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**, Oxford University Press, New York, 1998.
- [29] ARMOR, J. Striving for catalytically green processes in the 21st century. **Applied Catalysis A: General**, v. 189, 1999.
- [30] COLLINS, T. ESSAYS ON SCIENCE AND SOCIETY: Toward Sustainable Chemistry. **Science**, v. 291, 2001.
- [31] COLLINS, T. J. Introducing Green Chemistry in Teaching and Research. **Journal of Chemical Education**, v. 72, 1995.
- [32] CANN, M. C.; CONNELLY, M. E.; **Real World Cases in Green Chemistry**, American Chemical Society: Washington, DC, 2000.
- [33] SINGH, M. M.; SZAFRAN, Z.; PIKE, R. M.; **Journal of Chemical Education**. v. 76, 1999.
- [34] FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. **Química Nova**, v. 34, 2011.
- [35] SHELDON, R. A. Metrics of Green Chemistry and Sustainability: Past, Present, and Future. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, 2017.
- [36] FREUND, R.; LÄCHELT, U.; GRUBER, T.; RÜHLE, B.; WUTTKE, S. Multifunctional Efficiency: Extending the Concept of Atom Economy to Functional Nanomaterials. **ACS Nano**, v. 12, 2018.
- [37] TROST, B. M. The atom economy--a search for synthetic efficiency. **Science**, v. 254, 1991.
- [38] TROST, B. M. Atom Economy—A Challenge for Organic Synthesis: Homogeneous Catalysis Leads the Way. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 34, 1995.
- [39] LI, C. J.; TROST, B. M. Green chemistry for chemical synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, 2008.
- [40] SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure**, John Wiley & Sons Inc., New York, 6th edn, 2007, pp. 1205–1209.
- [41] PERIN, G.; JACOB, R. G.; BOTTESELLE, G. V.; KUBLIK, E. L.; LENARDÃO, E. J.; CELLA, R.; SANTOS, P. C. S. Clean and atom-economic synthesis of alpha-phenylselenoacrylonitriles and alpha-phenylseleno- alpha,beta-unsaturated esters by knoevenagel reaction under solvent-free conditions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, 2005.

- [42] KUMAR, S.; MUKESH, K.; HARJAI, K.; SINGH, V. Synthesis of Coumarin based Knoevenagel-Ugi Adducts by a sequential one pot Five-Component Reaction and their Biological evaluation as Anti-Bacterial agents, **Tetrahedron Letters**, 2018.
- [43] BAHUGUNA, A.; KUMAR, A.; CHHABRA, T.; KUMAR, A.; KRISHNAN, V. Potassium-Functionalized Graphitic Carbon Nitride Supported on Reduced Graphene Oxide as a Sustainable Catalyst for Knoevenagel Condensation. **ACS Applied Nano Materials**, v. 1, 2018.
- [44] WAN, J. P.; JING, Y.; LIU, Y.; SHENG, S. Metal-free synthesis of cyano acrylates via cyanuric chloride-mediated three-component reactions involving a cascade consists of Knoevenagel condensation/cyano hydration/esterification. **The Royal Society of Chemistry**, v. 4, 2014.
- [45] MOEMENI, M. H.; AMROLLAHI, M. A.; TAMADDON, F. A facile catalyst-free Knoevenagel condensation of pyridinecarbaldehydes and active methylene compounds. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 47, 2015.
- [46] JONES, G. The Knoevenagel Condensation. **Organic Reactions**, v. 15, 1967.
- [47] VAN SCHIJNDEL, J.; CANALLE, L. A.; MOLENDIJK, D.; MEULDIJK, J. The green Knoevenagel condensation: solvent-free condensation of benzaldehydes. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 10, 2017.
- [48] UGWU, D. I.; EZEMA, B. E.; EZE, F. U.; UGWUJA, D. I. Synthesis and Structural Activity Relationship Study of Antitubercular Carboxamides. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 6, 2014.
- [49] UNLUSOY, M. C.; KAZAK, C.; BAYRO, O.; VERSPOHL, E. J.; ERTAN, R.; DUNDAR, O.B. Synthesis and Antidiabetic Activity of 2,4- Thiazolidindione, Imidazolidinedione and 2-Thioxo-Imidazolidine-4-one Derivatives Bearing 6-Methyl Chromonyl Pharmacophore. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, 2012.
- [50] ALI, I.; HAQUE, A.; HSIEH, M. Curcumin-I Knoevenagel's Condensates and Their Schiff's Bases as Anticancer Agents: Synthesis, Pharmacological and Simulation Studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, 2013.
- [51] KIM, S.; KIM, E.; HONG, J. H. The First Synthesis of 4'-Branched 5'-Deoxycarbocyclic 9-Deazaadenosine and Phosphonic Acids as Antiviral Agents. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 34, 2015.
- [52] GOKSU, H.; GÜLTEKIN, E. Pd nanoparticles Incarcerated in Aluminium Oxy-Hydroxide: an efficient and recyclable heterogeneous catalyst for selective Knoevenagel condensation. **ChemistrySelect**, v. 2, 2017.
- [53] FERREIRA, J. M. G. O; RESENDE-FILHO, J. B. M.; BATISTA, P. K.; TEOTONIO, E. E. S.; VALE, J. A. Rapid and Efficient Uncatalyzed Knoevenagel Condensations from Binary Mixture of Ethanol and Water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, 2017.

- [54] FAN, R.; WANG, W.; PU, D.; WU, J. Tandem Knoevenagel—Michael Addition of Aryl Sulfonylimines with Diethyl Malonate for Synthesis of Arylidene Dimalonates. **ChemInform**, v. 38, 2007.
- [55] ELINSON, M. N.; SOKOLOVA, O. O.; NASYBULLIN, R. F. Catalyst-free tandem Knoevenagel-Michael reaction of aldehydes and pyrazolin-5-one: fast and convenient approach to medicinally relevant 4,4'-(arylmethylene)bis(1H-pyrazol-5-ol)s. **Heterocyclic Communications**, v. 21, 2015.
- [56] SOBHANI, S.; HASANINEJAD, A.; MALEKI, M. F.; PARIZI, Z. P. Tandem Knoevenagel—Michael reaction of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone with aldehydes using 3-aminopropylated silica gel as an efficient and reusable heterogeneous catalyst. **Synthetic Communications**, v. 42, 2012.
- [57] BHAT, S. I.; TRIVEDI, D. R. A highly efficient and green cascade synthesis of 3-methyl-substituted-4-hydroxy-1-methyl-quinolin-2(1H)-ones under solvent- and catalyst-free conditions. **RSC Advances**, v. 4, 2014.
- [58] BAKTHADOSS, M.; SIVAKUMAR, G. Highly stereo and chemoselective synthesis of tetra and pentacyclic frameworks using Solid-State Melt Reaction (SSMR). **Tetrahedron Letters**, v. 55, 2014.
- [59] DEBAJYOTI, B.; SARMAH, M. M.; DOMMARAJU, Y.; PRAJAPATI, D. Microwave-promoted efficient synthesis of spiroindenotetrahydropyridine derivatives via a catalyst- and solvent-free pseudo one-pot five-component tandem Knoevenagel/aza-Diels—Alder reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 55, 2014.
- [60] BALALAIIE, S.; AZIZIAN, J.; SHAMELI, A.; BIJANZADEH, H. R. Trifluoroethanol as an efficient reaction media for the synthesis of pyran skeleton through domino Knoevenagel—hetero-Diels—Alder reaction with non-activated alkynes. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 12, 2015.
- [61] PARMAR, N. J.; LABANA, B. M.; BARAD, H. A.; KANT, R.; GUPTA, V. K. An efficient domino Knoevenagel/hetero-Diels—Alder route to some novel thiochromenoquinoline-fused polyheterocycles, **Monatshefte für Chemie**, v. 145, 2014.
- [62] ELINSON, M. N.; GORBUNOV, S. V.; VERESHCHAGIN, A. N.; NASYBULLIN, R. F.; GOLOVESHKIN, A. S.; BUSHMARINOV, I. S.; EGOROV, M. P. Chemical and electrocatalytic cascade cyclization of salicylaldehyde with three molecules of malononitrile: “one-pot” simple and efficient way to the chromeno[2,3-b]pyridine scaffold. **Tetrahedron**, v. 70, 2014.
- [63] HO, T. L. **Tandem Organic Reactions**, John Wiley & Sons Ltd: New York, USA, 1992.
- [64] CHEN, C.; YANG, H.; CHEN, J.; ZHANG, R.; GUO, L.; GAN, H.; SONG, B.; ZHU, W.; HUA, L.; HOU, Z. One-pot tandem catalytic synthesis of  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated nitriles from alcohol with nitriles in aqueous phase. **Catalysis Communications**, v. 47, 2014.
- [65] SHARMA, N.; SHARMA, A.; SHARD, A.; KUMAR, R.; SAIMA; SINHA. A. K. Pd-Catalyzed Orthogonal Knoevenagel/Perkin Condensation—Decarboxylation—Heck/Suzuki

Sequences: Tandem Transformations of Benzaldehydes into Hydroxy-Functionalized Antidiabetic Stilbene–Cinnamoyl Hybrids and Asymmetric Distyrylbenzenes. **Chemistry – A European Journal**, v. 17, 2011.

[66] MARCACCINI, S.; PEPINO, R.; POZO, M. C.; BASURTO, S.; GARCÍA-VALVERDE, M.; TORROBA, T. One-pot synthesis of quinolin-2-(1H)-ones via tandem Ugi–Knoevenagel condensations. **Tetrahedron Letters**, v. 45, 2004.

[67] KESHAVARZIPOUR, F.; TAVAKOL, H. The synthesis of coumarin derivatives using choline chloride/zinc chloride as a deep eutectic solvent. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 13, 2016.

[68] REYNOLDS, G. A.; DREXHAGE, K. H. New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp pumped dye lasers. **Optics Communications**, v. 13, 1975.

[69] KERI, R. S.; PATIL, M.; PATIL, S.A.; BUDAGUMPI, S. Recent progress in the drug development of coumarin derivatives as potent antituberculosis agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, 2015.

[70] DOSHI, J. M.; TIAN, D.; XING, C. Structure–Activity Relationship Studies of Ethyl 2-Amino-6-bromo-4-(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethyl)-4H-chromene-3-carboxylate (HA 14–1), an Antagonist for Anti-apoptotic Bcl-2 Proteins To Overcome Drug Resistance in Cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, 2006.

[71] REDDY, N. S.; MALLIREDDIGARI, M. R.; COSENZA, S.; GUMIREDDY, K.; BELL, S. C.; REDDY, E.P.; REDDY, M. V. R. Synthesis of new coumarin 3-(N-aryl) sulfonamides and their anticancer activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, 2004.

[72] GUPTA, J. K.; SHARMA, P. K.; DUDHE, R.; CHAUDHARY, A.; SINGH, A.; VERMA, P. K.; MONDAL, S. C.; YADAV, R. K.; KASHYAP, S. Analgesic study of novel pyrimidine derivatives linked with coumarin moiety. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, 2012.

[73] PATEL, R. V.; KUMARI, P.; RAJANI, D. P.; CHIKHALIA, K. H. Synthesis of coumarin-based 1,3,4-oxadiazol-2-ylthio-N-phenyl/benzothiazolyl acetamides as antimicrobial and antituberculosis agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, 2013.

[74] NASAB, M. J.; KIASAT, A. R. Designing bifunctional acid–base mesoporous organosilica nanocomposite and its application in green synthesis of 4H-chromen-4-yl phosphonate derivatives under ultrasonic irradiation. **Microporous Mesoporous Mater**, v. 223, 2016.

[75] ORTIZ-BUSTOS, J.; FAJARDO, M.; DEL HIERRO, I.; PÉREZ, Y. Versatile titanium dioxide nanoparticles prepared by surface-grown polymerization of polyethylenimine for photodegradation and catalytic C–C bond forming reactions. **Molecular Catalysis**, v. 475, 2019.

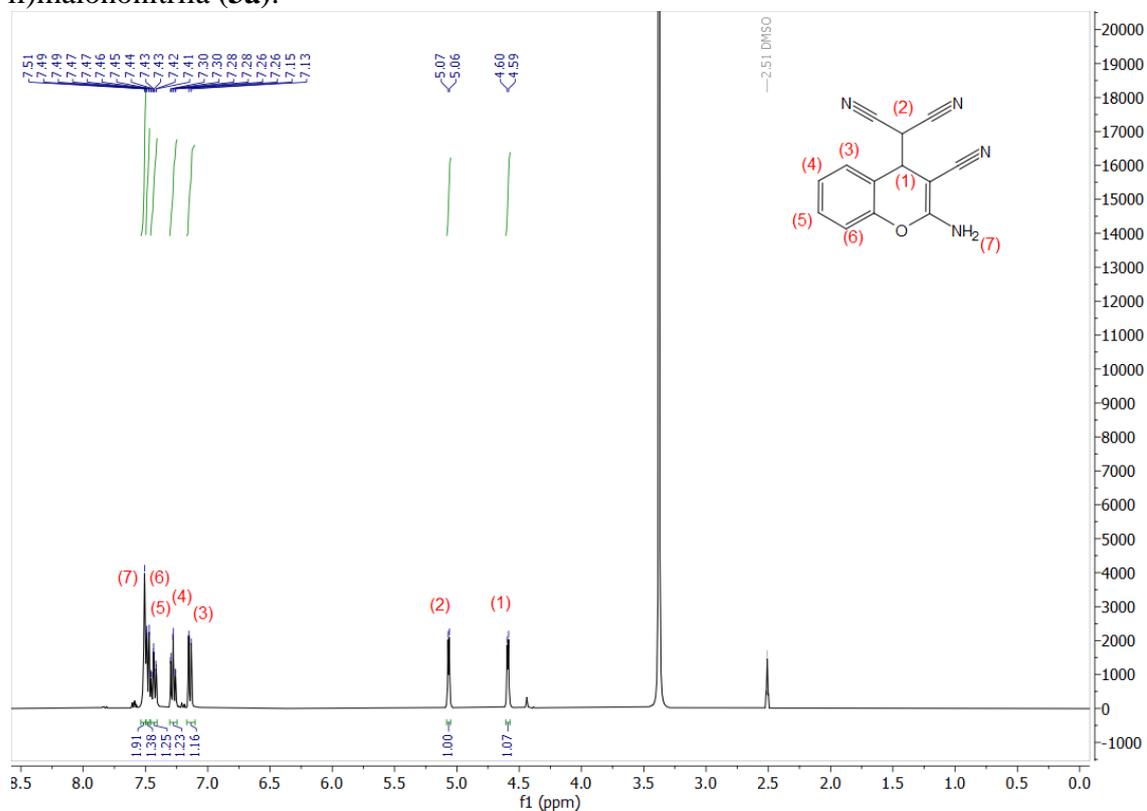
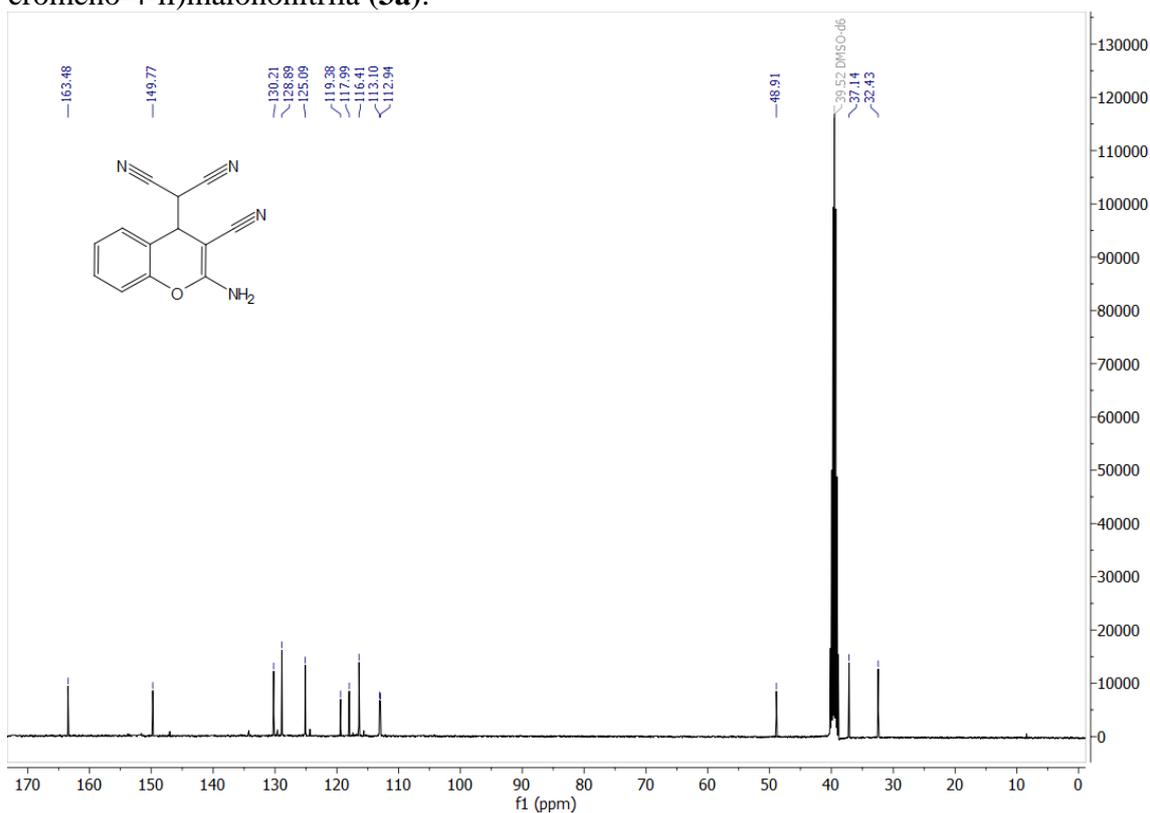
[76] BANERT, K.; BOCHMANN, S.; IHLE, A.; PLEFKA, O.; TAUBERT, F.; WALTHER, T.; KORB, M.; RÜFFER, T.; LANG, H. Synthesis with Perfect Atom Economy: Generation of Furan Derivatives by 1,3-Dipolar Cycloaddition of Acetylenedicarboxylates at Cyclooctynes. **Molecules**, v. 19, 2014.

- [77] JACOB, R. G.; PERIN, G.; BOTTESELLE, G. V.; LENARDÃO, E. J. Clean and atom-economic synthesis of octahydroacridines: application to essential oil of citronella. **Tetrahedron Letters**, v. 44, 2003.
- [78] BAKTHADOSS, M.; KANNAN, D. A novel synthesis of tetra and pentacyclic quinolinopyran tethered pyrazole/coumarin scaffolds via a solid state melt reaction. **RSC Advances**, v. 4, 2014.
- [79] KUMAR, R. R.; PERUMAL, S.; MENÉNDEZ, J. C.; YOGEE SWARI, P.; SRIRAM, D. Antimycobacterial activity of novel 1,2,4-oxadiazole-pyranopyridine/chromene hybrids generated by chemoselective 1,3-dipolar cycloadditions of nitrile oxides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, 2011.
- [80] BRAHMACHARI, G.; BANERJEE, B. Facile and One-Pot Access to Diverse and Densely Functionalized 2-Amino-3-cyano-4 *H*-pyrans and Pyran-Annulated Heterocyclic Scaffolds via an Eco-Friendly Multicomponent Reaction at Room Temperature Using Urea as a Novel Organo-Catalyst. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, 2014.
- [81] EVDOKIMOV, N. M.; KIREEV, A. S.; YAKOVENKO, A. A.; ANTIPIN, M. Y.; MAGEDOV, I. V.; KORNIENKO, A. One-Step Synthesis of Heterocyclic Privileged Medicinal Scaffolds by a Multicomponent Reaction of Malononitrile with Aldehydes and Thiols. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72, 2007.
- [82] KULKARNI, M. A.; PANDIT, K. S.; DESAI, U. V.; LAD, U. P.; WADGAONKAR, P. P. Diethylamine: A smart organocatalyst in eco-safe and diastereoselective synthesis of medicinally privileged 2-amino-4H-chromenes at ambient temperature. *Comptes Rendus Chimie*, v. 16, 2013.
- [83] GONZÁLEZ-RODAL, D.; PALOMINO, G. T.; CABELLO, C. P.; PÉREZ-MAYORAL, E. Amino-grafted Cu and Sc Metal-Organic Frameworks involved in the green synthesis of 2-amino-4H-chromenes. Mechanistic understanding. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 323, 2021.
- [84] BHAT, S. I.; CHOUDHURY, A. R.; TRIVEDI, D. R. Condensation of malononitrile with salicylaldehydes and o-aminobenzaldehydes revisited: solvent and catalyst free synthesis of 4H-chromenes and quinolines. **RSC Advances**, v. 2, 2012.
- [85] ROUDIER, J. F.; FOUCAUD, A. A Convenient Synthesis of 4H-Chromenes. **Synthesis**, v. 1984, 1984.
- [86] ELINSON, M. N.; DOROFEEV, A. S.; FEDUCOVICH, S. K.; NASYBULLIN, R. F.; GORBUNOV, S. V.; NIKISHIN, G. I. Electrocatalytic chain transformation of salicylaldehydes and malononitrile into substituted 4H-chromenes. **Electrochemistry Communications**, v. 8, 2006.
- [87] ELINSON, M. N.; MEDVEDEV, M. G.; ILOVAISKY, A. I.; MERKULOVA, V. M.; ZAIMOVSKAYA, T. A.; NIKISHIN, G. I. Solvent-free cascade assembling of salicylic aldehydes and malononitrile: rapid and efficient approach to 2-amino-4H-chromene scaffold. **Mendeleev Communications**, v. 23, 2013.

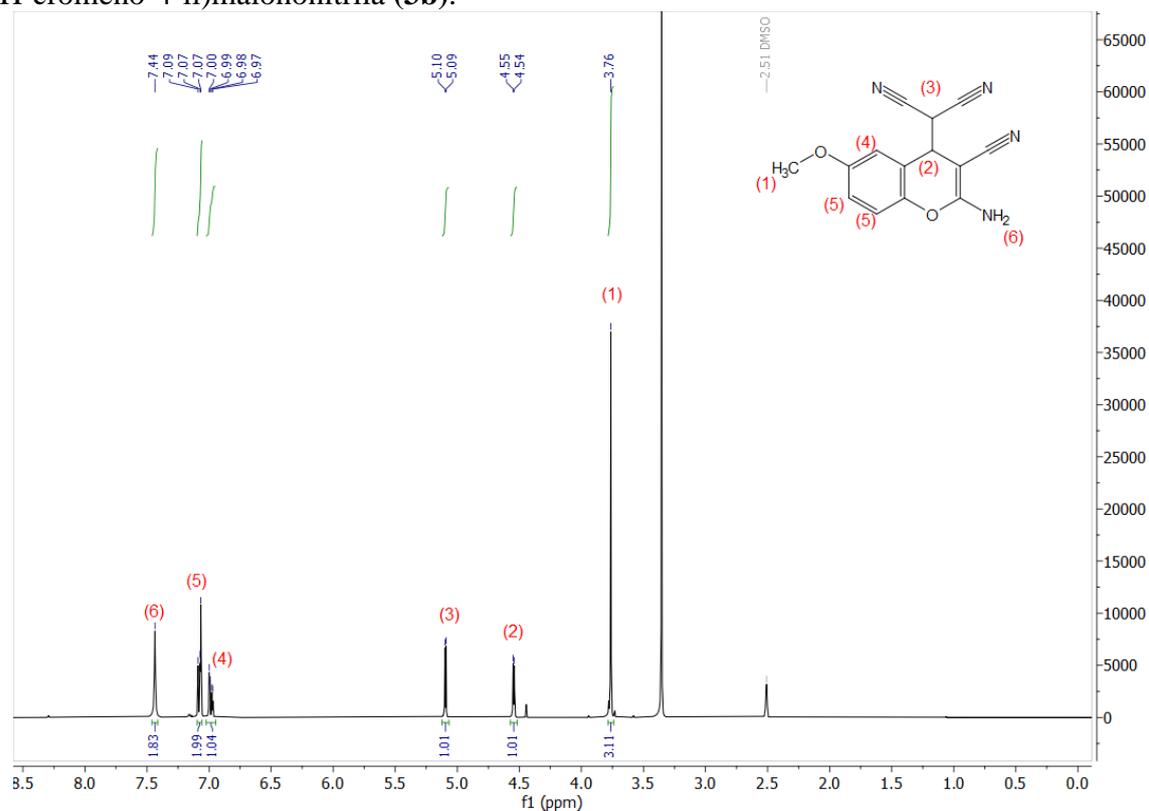
- [88] BUNCEL, E.; ESCADAS, R. A. **Solvent effects in chemistry**. John Wiley & Sons, 2015.
- [89] SUNDBERG, R. J.; CAREY, F. A. **Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanism**. Springer, New York, 2007.
- [90] PARKER, A. J. The effects of solvation on the properties of anions in dipolar aprotic solvents. **Quarterly Reviews, Chemical Society**, v. 16, 1962.
- [91] ISRAELACHVILI, J. N. Intermolecular and surface forces: revised third edition. **Academic press**, 2011.
- [92] OLIVEIRA, B. G.; LEITE, L. F. C. C. A quantum chemical study of red-shift and blue-shift hydrogen bonds in bimolecular and trimolecular methylhydrazine-hydrate complexes. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 915, 2009.
- [93] REICHARDT, C.; WELTON, T. **Solvents and solvent effects in organic chemistry**. John Wiley & Sons, 2011.
- [94] COSTA, P.; FERREIRA, V.; ESTEVES, P.; VASCONCELLOS, M.L.A.A. **Ácidos e bases em química orgânica**, Porto Alegre, Bookman, 2005.
- [95] ROSTAMI, A.; ATASHKAR, B.; GHOLAMI, H. Novel magnetic nanoparticles Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-immobilized domino Knoevenagel condensation, Michael addition, and cyclization catalyst. **Catalysis Communications**, v. 37, 2013.
- [96] XU, D.; LIU, Y.; SHI, S.; WANG, Y A simple, efficient and green procedure for Knoevenagel condensation catalyzed by [C 4 dabco][BF 4] ionic liquid in water. **Green Chemistry**, v. 12, 2010.
- [97] CLAYDEN, J.; GREEVES, N. J.; WARREN, S.; **Organic chemistry**. 2nd Ed. Oxford: Oxford University Press, 2012.
- [98] BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**, vol. 1, 4<sup>a</sup> ed., São Paulo: Pearson Prentice. Hall, 2006.
- [99] WANG, S.; LIN, J.; CUI, X.; LI, J.; HUANG, C. Controllable Synthesis of Two Isomers 4H-Chromene and 2,8-Dioxabicyclo[3.3.1]nonane Derivatives under Catalyst-Free Conditions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 86, 2021.
- [100] HEBERT, O.; DUBOUILH-BENARD, C.; CAMPOS, J. F.; BERTEINA-RABOIN, S.; FRUIT, C.; BESSON. T. Monitoring of Catalyst-Free Microwave-Assisted MCR-Type Synthesis of 2-Amino-3-cyano-4H-chromene **Derivatives Using Raman Spectrometry. Synthesis**, v. 54, 2022.
- [101] SAFARI, J.; HEYDARIAN, M.; ZARNEGAR, Z. Synthesis of 2-amino-7-hydroxy-4H-chromene derivatives under ultrasound irradiation: A rapid procedure without catalyst. **Arabian Journal of Chemistry**, 2013.
- [102] GANWIR, P.; BANDIVADEKAR, P.; KUDALE, P.; CHATURBHUIJ, G. U. Catalyst-free, one-pot expeditious synthesis of polyhydroquinolines and 2-amino-4H-chromenes. **Research on Chemical Intermediates**, v. 48, 2022.

- [103] FERREIRA, J. M. G. O. **Estudo da reação de Knoevenagel em condições eco-amigáveis visando às sínteses de compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ - insaturados e cumarinas**. 2021. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Química Orgânica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.
- [104] BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemical**, v. 4, 1996.
- [105] RAMACHARY, D. B.; CHOWDARI, N. S.; BARBAS, C. F. Organocatalytic Asymmetric Domino Knoevenagel/Diels–Alder Reactions: A Bioorganic Approach to the Diastereospecific and Enantioselective Construction of Highly Substituted Spiro[5,5]undecane-1,5,9-triones. **Angewandte Chemie**, v. 115, 2003.
- [106] ZHANG, Q. Y.; LIU, B. K.; CHEN, W. Q.; WU, Q.; LIN, X. F. A green protocol for synthesis of benzo-fused N,S-, N,O- and N,N-heterocycles in water. **Green Chemistry**, v. 10, 2008.
- [107] MEJÍA, S. M.; FLÓREZ, E.; MONDRAGÓN, F.; J. An orbital and electron density analysis of weak interactions in ethanol-water, methanol-water, ethanol and methanol small clusters. **Journal of Chemical Physics**, v. 136, 2012.
- [108] AKERLOF, G.; Dielectric constants of some organic solvent-water mixtures at various temperatures. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 54, 1932.
- [109] VAN LEEUWEN, M. E. Derivation of Stockmayer potential parameters for polar fluids. **Fluid Phase Equilib**, v. 99, 1994.
- [110] NISHI, N.; KOGA, K.; OHSHIMA, C.; YAMAMOTO, K.; NAGASHIMA, U.; NAGAMI, K. Molecular association in ethanol-water mixtures studied by mass spectrometric analysis of clusters generated through adiabatic expansion of liquid jets. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, 1988.
- [111] KOSOWER, E. M. The effect of solvent on spectra. I. A new empirical measure of solvent polarity: Z-values. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, 1958.
- [112] ATKINS, P.; PAULA, J.; KEELER, J. **Atkins' PHYSICAL CHEMISTRY**. 11. ed. Oxford, 2018.
- [113] KOLBE, B.; GMEHLING, J. Thermodynamic properties of ethanol+ water II. Potentials and limits of G E models. **Fluid phase equilibria**, v. 23, 1985.
- [114] BAKÓ, I.; PUSZTAI, L.; TEMLEITNER, L. Decreasing temperature enhances the formation of sixfold hydrogen bonded rings in water-rich water-methanol mixtures. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.
- [115] TEKIN, K.; HAO, N.; KARAGOZ, S.; RAGAUSKAS, A. J. Ethanol: A Promising Green Solvent for the Deconstruction of Lignocellulose. **ChemSusChem**. 2018.

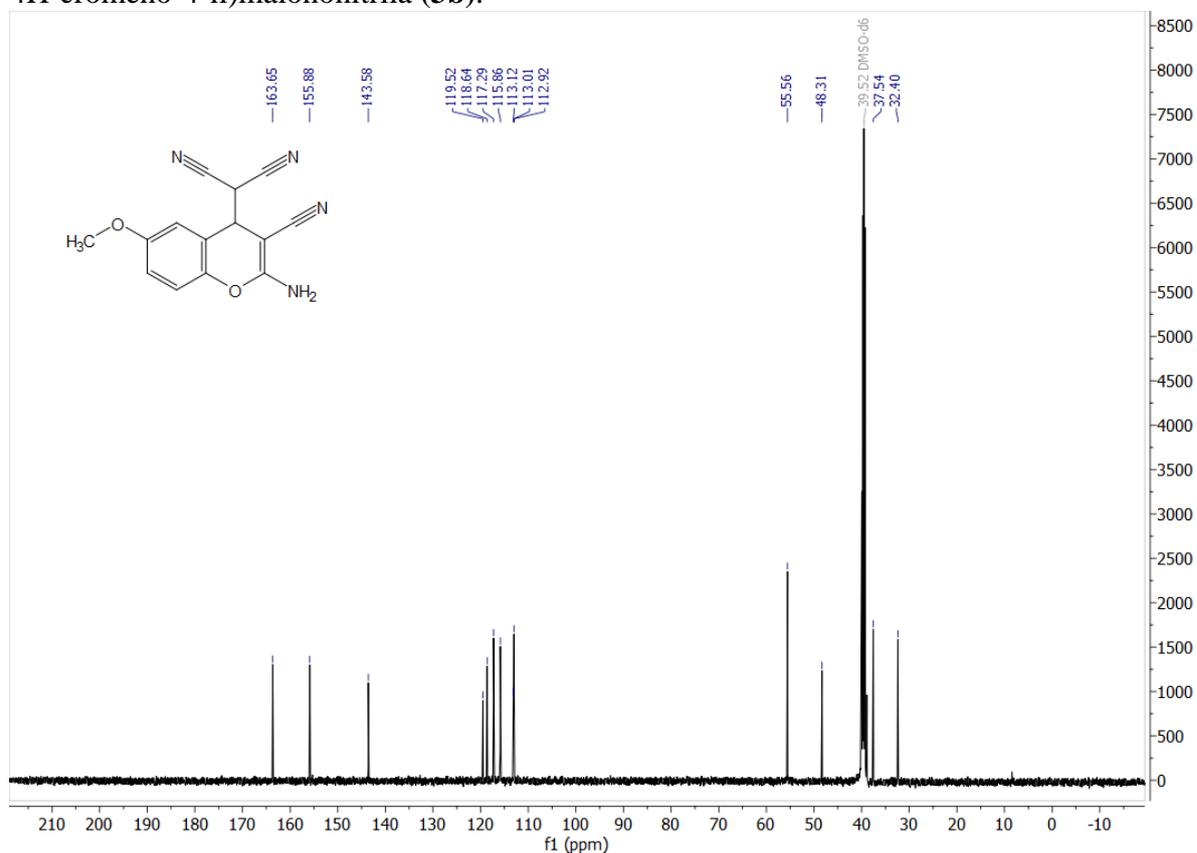
- [116] CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, 2007.
- [117] MCKENZIE, L. C.; HUFFMAN, L. M.; HUTCHISON, J. E.; ROGERS, C. E.; GOODWIN, T. E.; SPESSARD, G. O. Greener Solutions for the Organic Chemistry Teaching Lab: Exploring the Advantages of Alternative Reaction Media. **Journal of Chemical Education**, v. 86, 2009.
- [118] REZENDE, M. C.; MILLÁN, D. Theoretical substituent electrophilicities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, 2011.
- [119] CORREIA, C. R. D.; COSTA, P. R. R.; FERREIRA, V. F. Vinte e cinco anos de reações, estratégias e metodologias em Química Orgânica. **Química Nova**, v. 25, 2002.
- [120] SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 2002.
- [121] SOARES, B. G.; SOUZA, N. A.; PIRES, D. X. **Química Orgânica: Teoria e Técnicas de preparação, purificação e identificação de compostos orgânicos**, Guanabara: Rio de Janeiro, 1988.
- [122] KOCH, A.; TAMEZ, P.; PEZZUTO, J.; SOEJARTO, D. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, 2005.
- [123] KUMAR, R.; PEREIRA, R. S.; ZANETTI, C.; MINCIACCHI, V. R.; MERTEN, M.; MEISTER, M.; NIEMANN, J.; DIETZ, M. S.; RÜSSEL, N.; SCHNÜTGEN, F.; TAMAI, M.; AKAHANE, K.; INUKAI, T.; OELLERICH, T.; KVASNICKA, H. M.; PFEIFER, H.; NICOLINI, F. E.; HEILEMANN, H.; ETTEN, R. A. V.; KRAUSE, D. S. Specific, targetable interactions with the microenvironment influence imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 34, 2020.

APÊNDICE A – RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ **Figura 23** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de (2-Amino-3-ciano-4H-cromeno-4-il)malononitrila (**3a**).**Figura 24** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ ) de (2-Amino-3-ciano-4H-cromeno-4-il)malononitrila (**3a**).

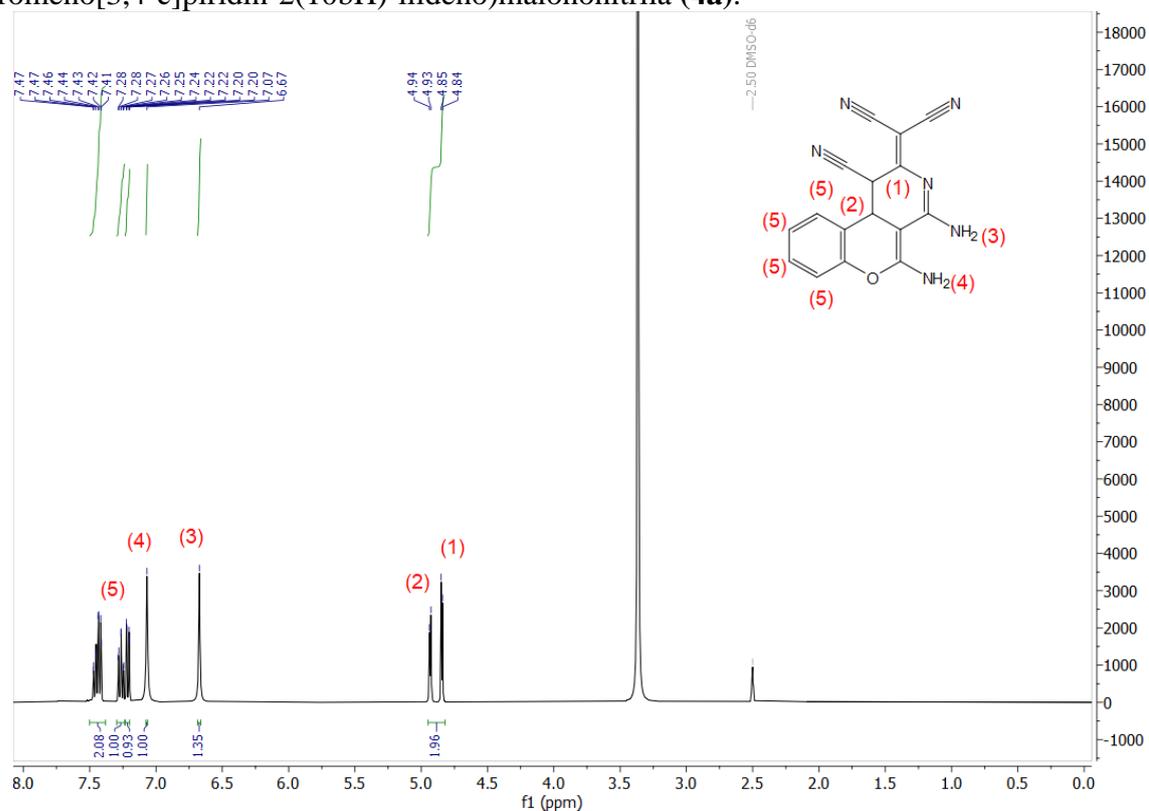
**Figura 25** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(2-amino-3-ciano-6-metoxi-4H-cromeno-4-il)malononitrila (**3b**).



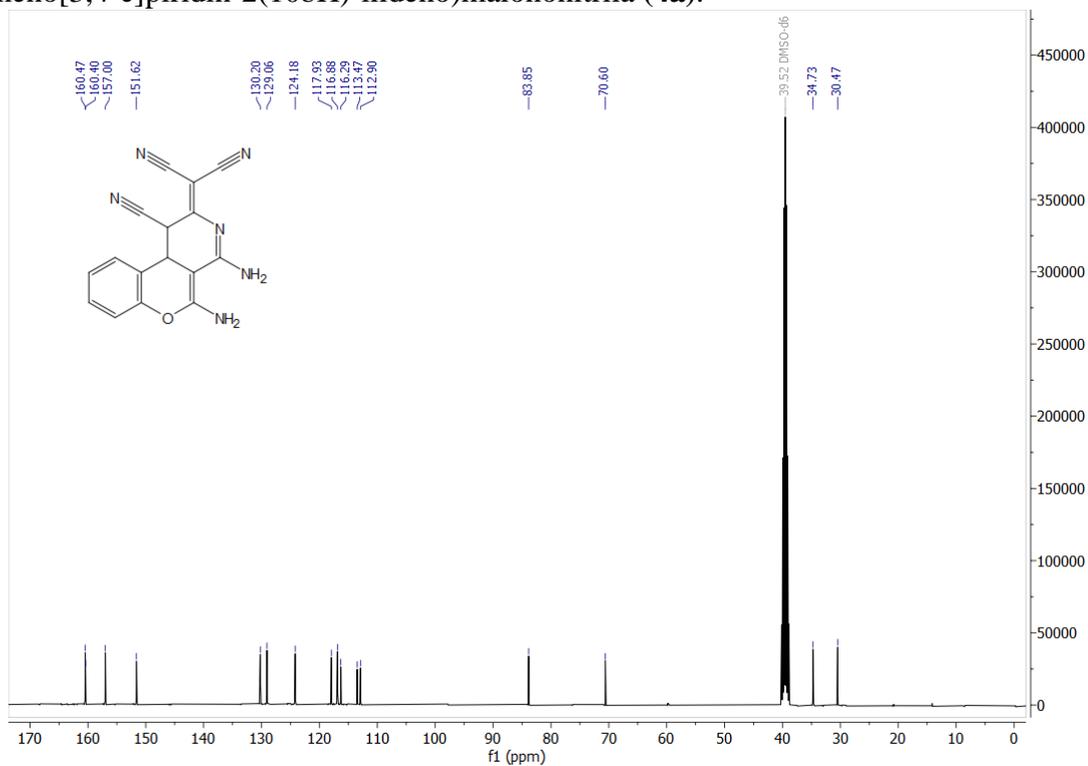
**Figura 26** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(2-amino-3-ciano-6-metoxi-4H-cromeno-4-il)malononitrila (**3b**).



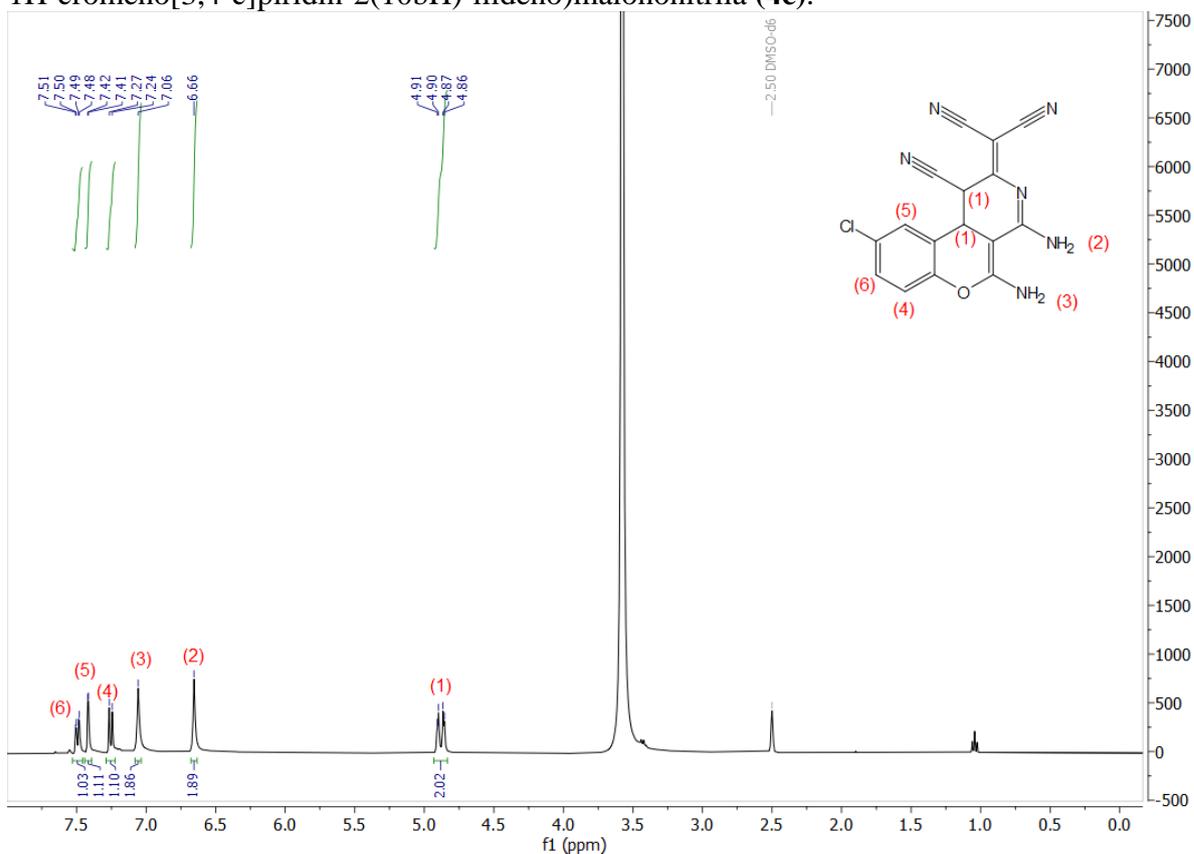
**Figura 27** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4a**).



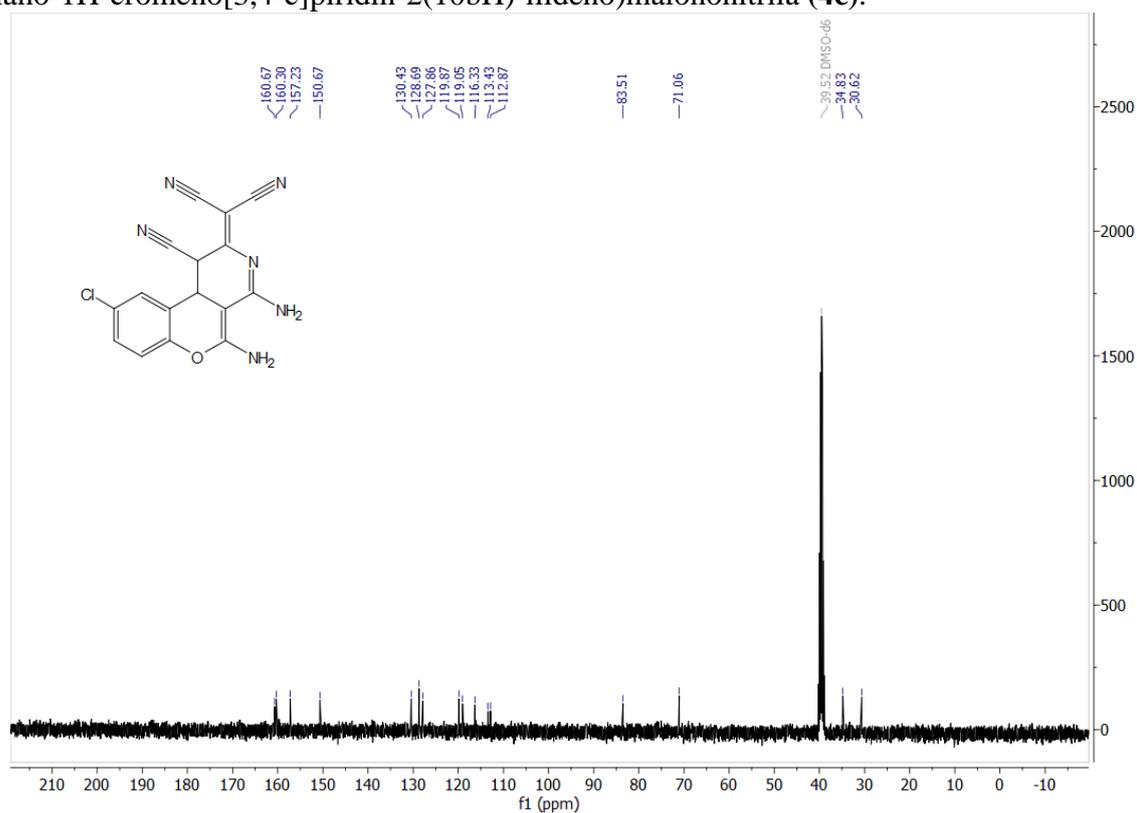
**Figura 28** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4a**).



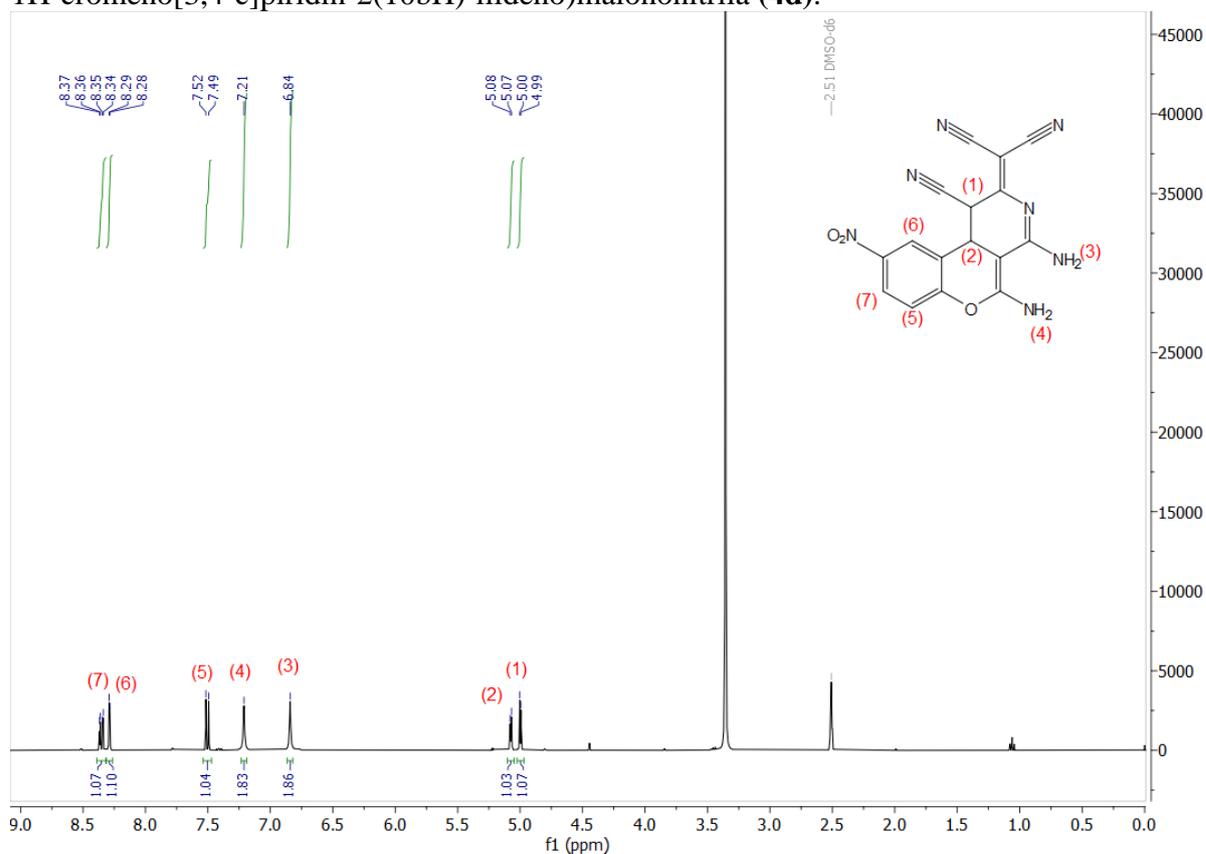
**Figura 29** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de 2-(4,5-diamino-9-cloro-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4c**).



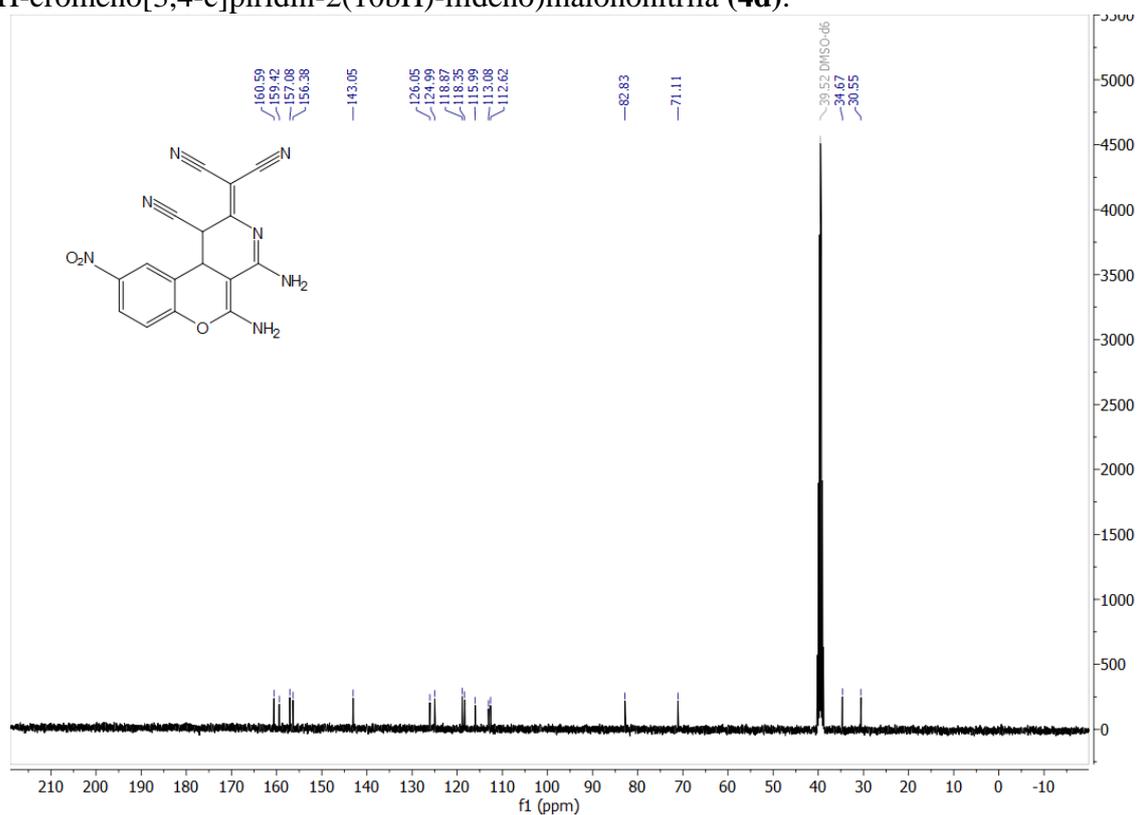
**Figura 30** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de 2-(4,5-diamino-9-cloro-1-ciano-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4c**).



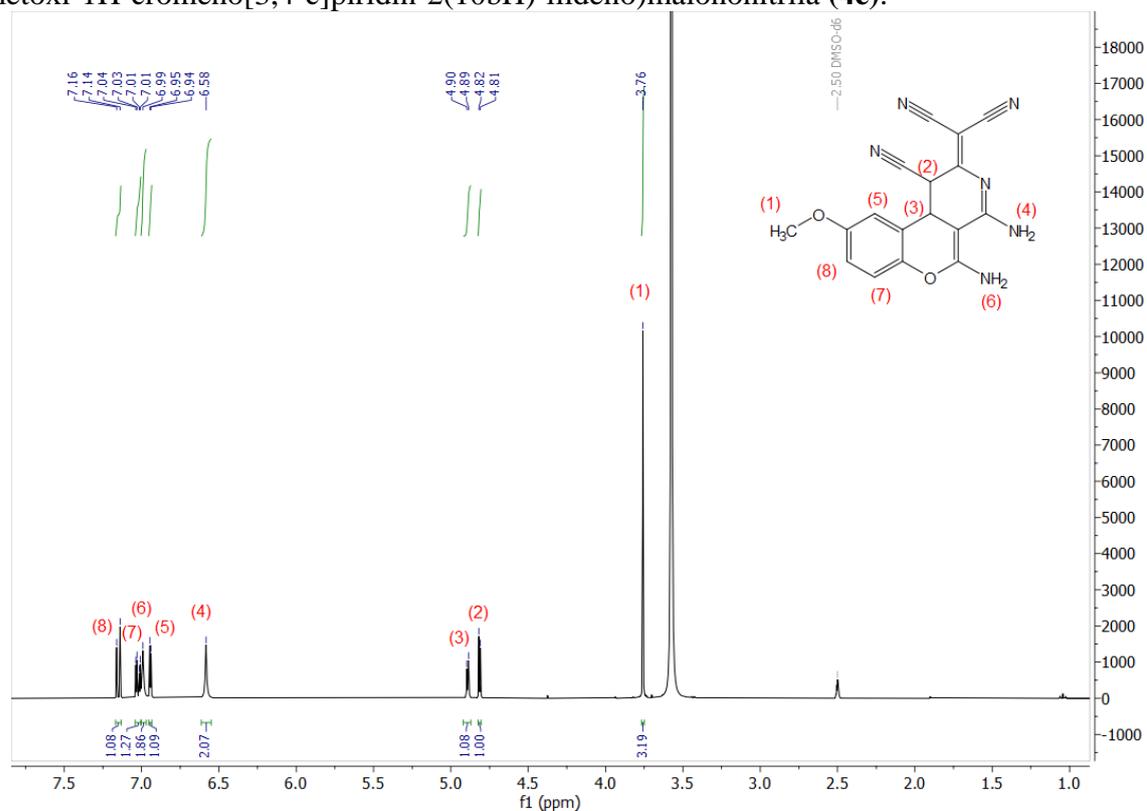
**Figura 31** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-9-nitro-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4d**).



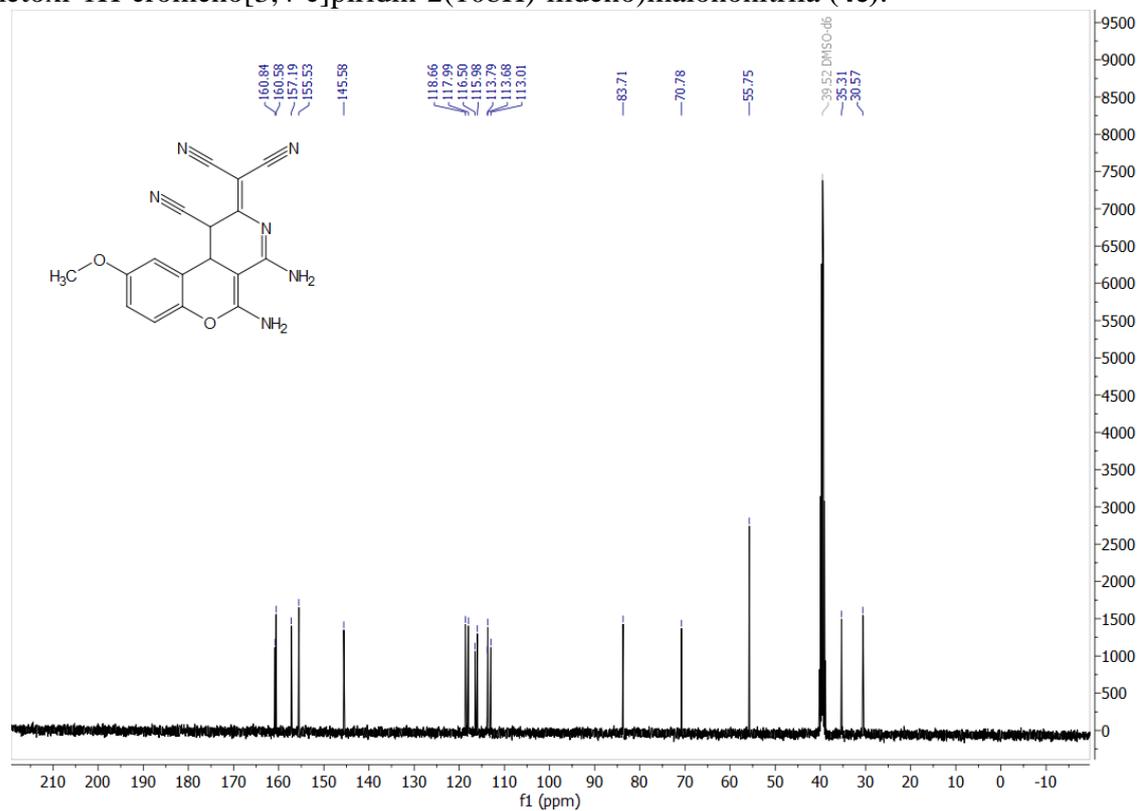
**Figura 32** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-9-nitro-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4d**).



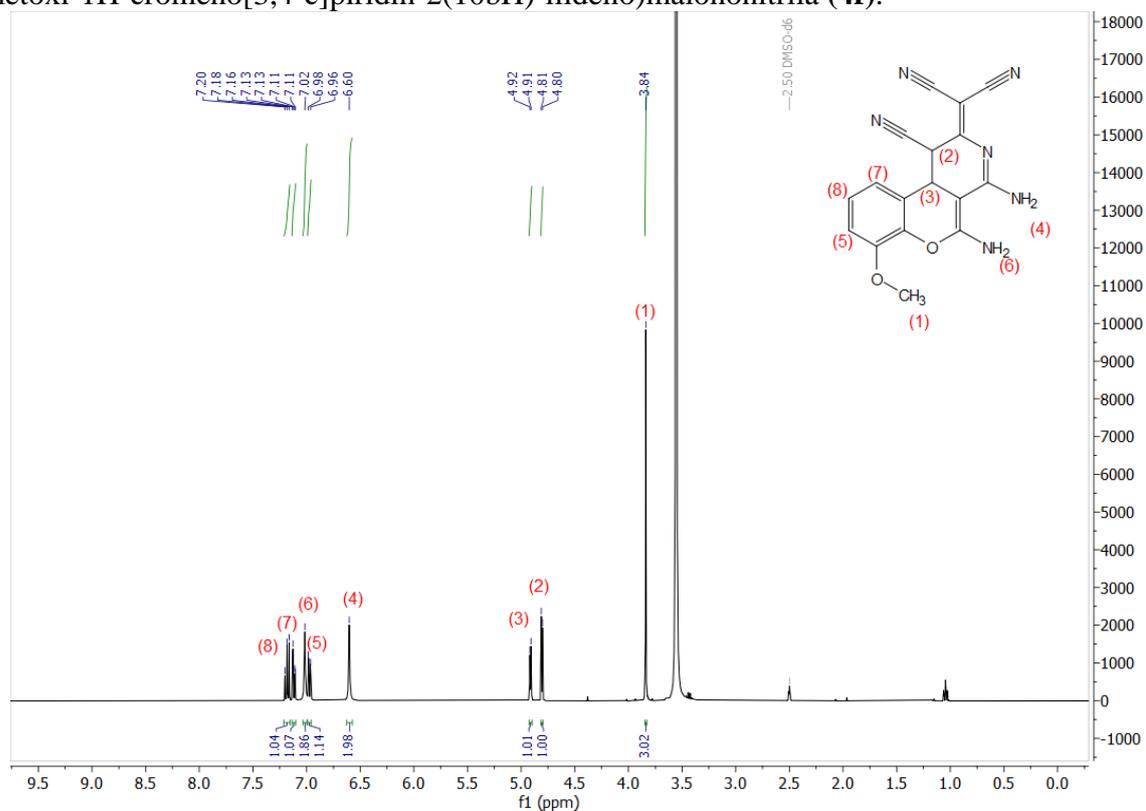
**Figura 33** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-9-metoxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4e**).



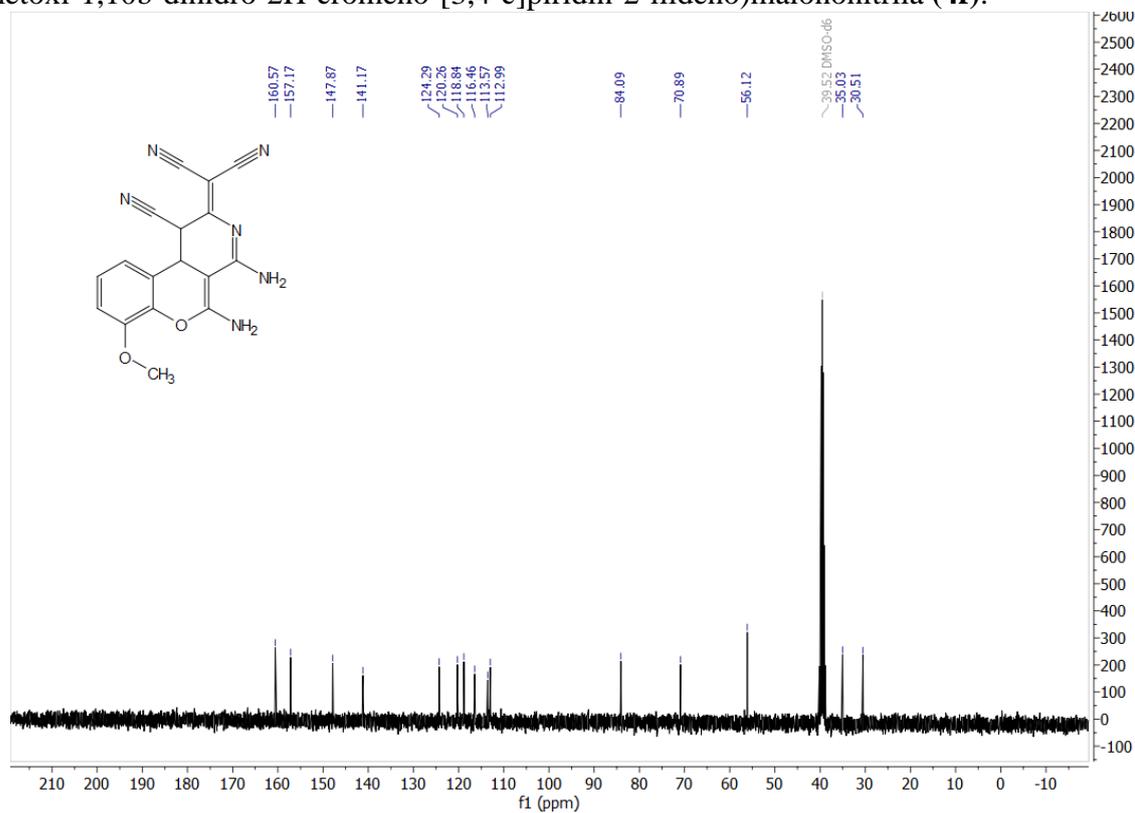
**Figura 34** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-9-metoxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4e**).



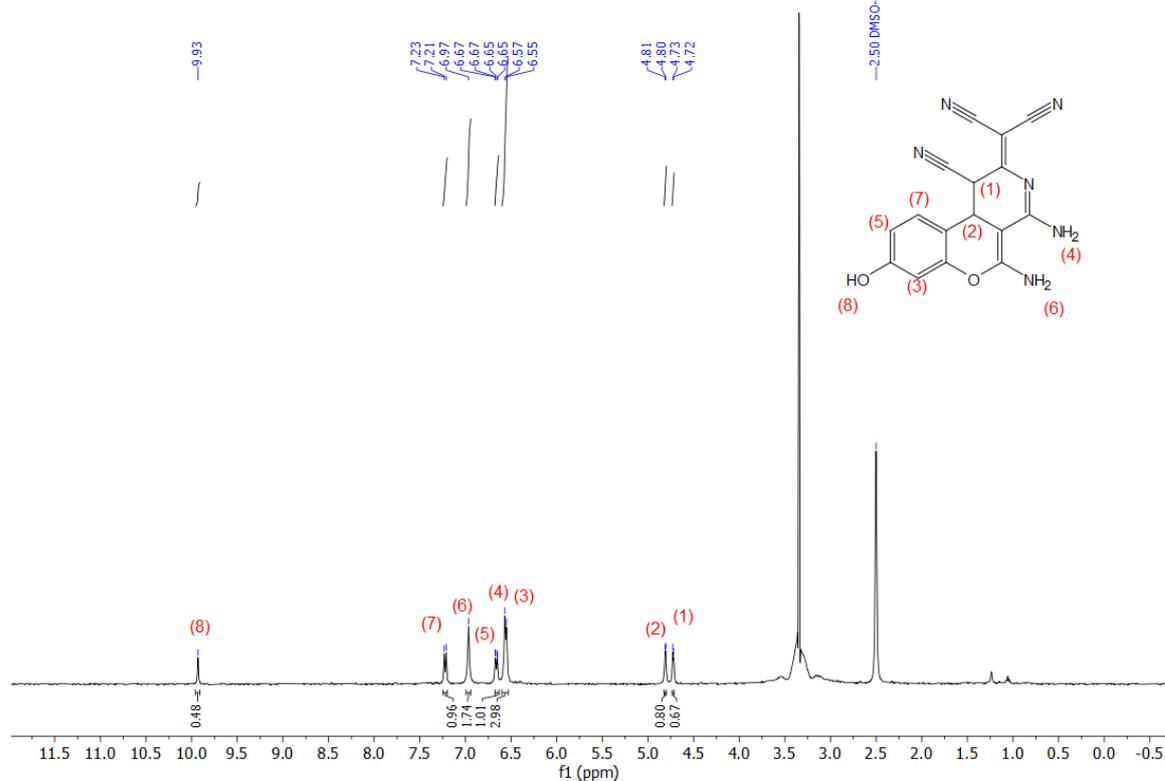
**Figura 35** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-7-metoxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4f**).



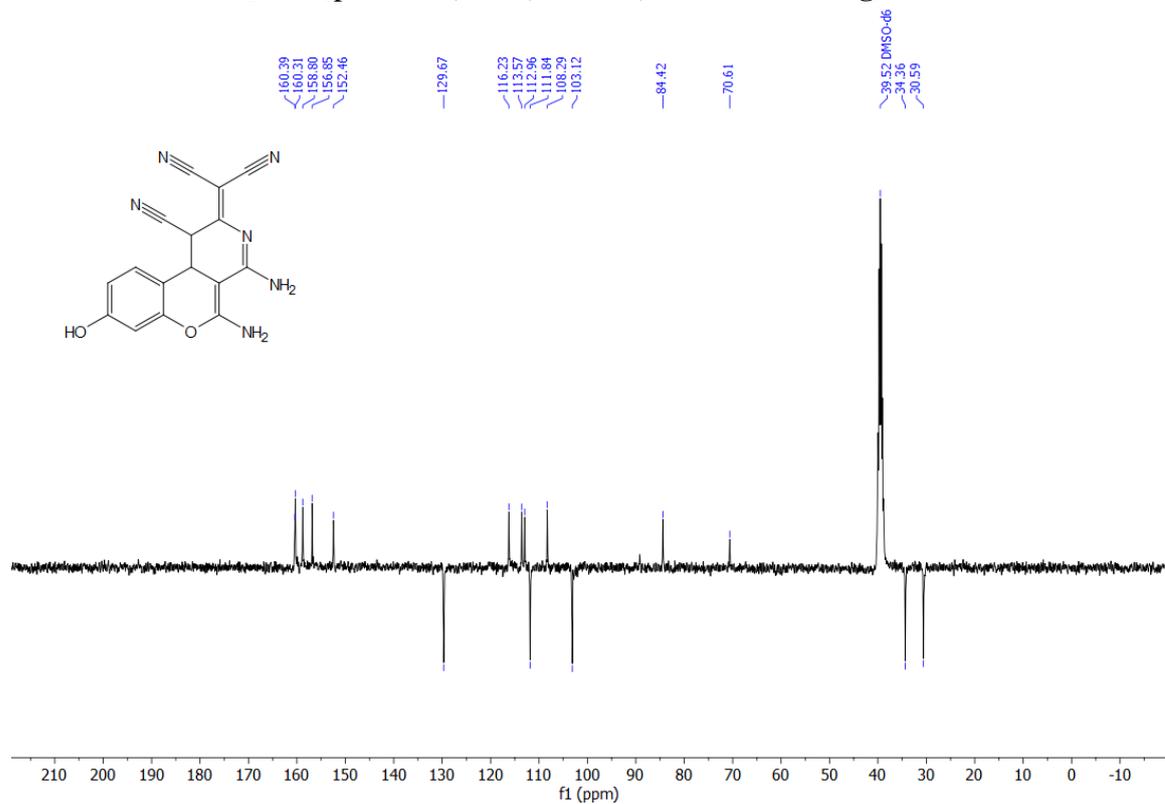
**Figura 36** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de (4,5-Diamino-1-ciano-7-metoxi-1,10b-dihidro-2H-cromeno-[3,4-c]piridin-2-ilideno)malononitrila (**4f**).



**Figura 37** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-8-hidroxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4g**).

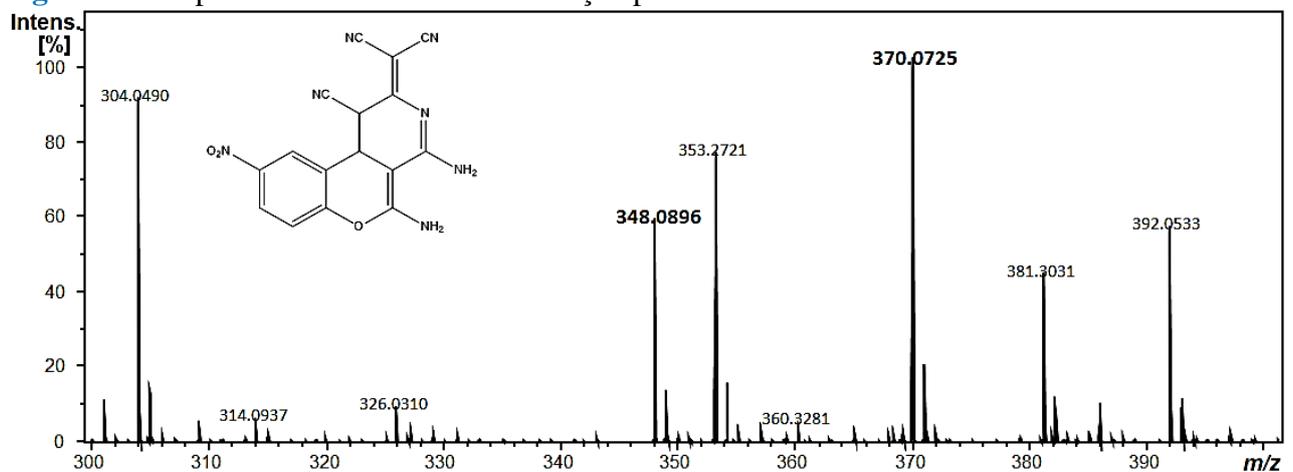


**Figura 38** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ ) de 2-(4,5-diamino-1-ciano-8-hidroxi-1H-cromeno[3,4-c]piridin-2(10bH)-ilideno)malononitrila (**4g**).



## APÊNDICE B – Espectros de Massa de Alta Resolução

Figura 39 - Espectro de massa de alta resolução para o 2-aminocromeno 4d.



Espectro 40 - Espectro de massa de alta resolução para o 2-aminocromeno 4e.

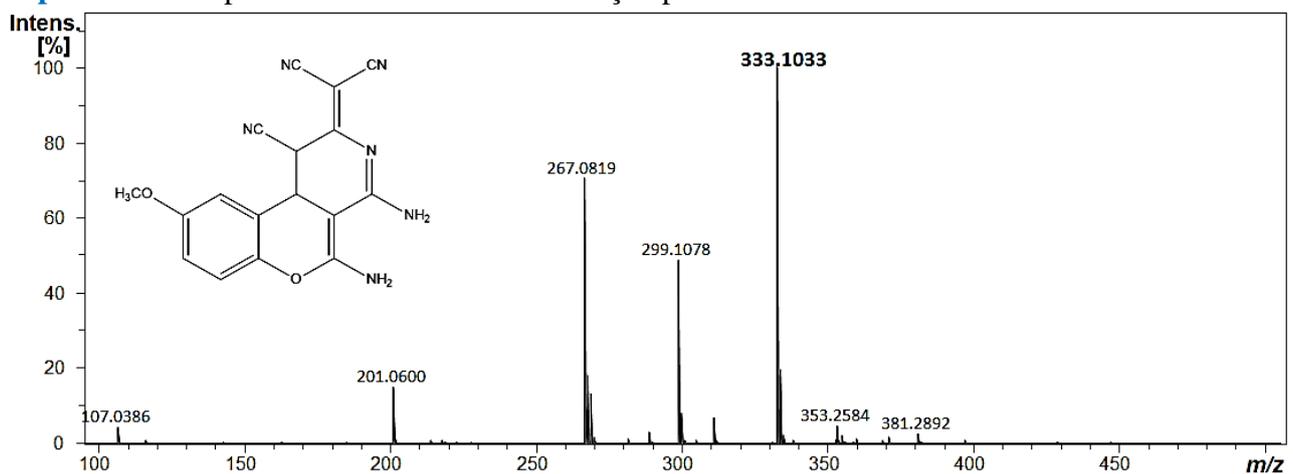
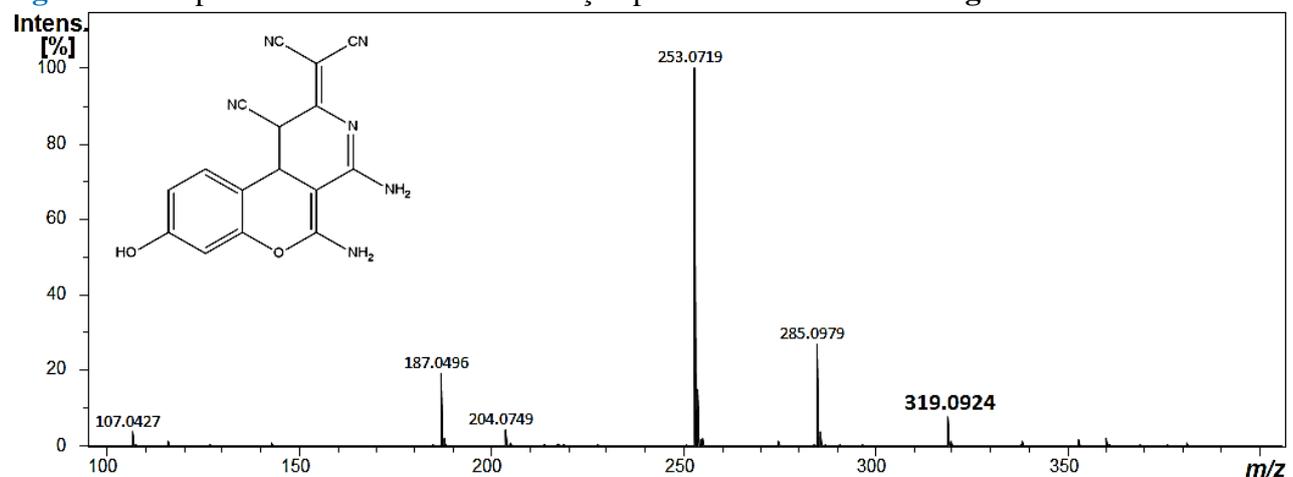
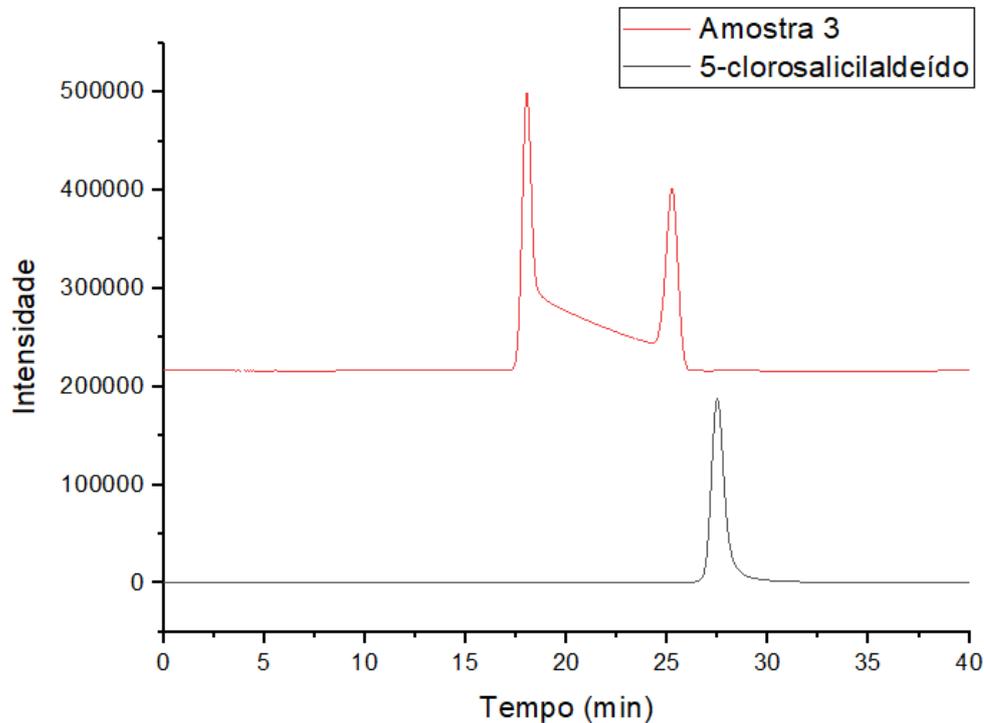


Figura 41 - Espectro de massa de alta resolução para o 2-aminocromeno 4g.



## APÊNDICE C - Cromatogramas

**Figura 42** - Cromatograma comparando tempos de retenção de uma amostra da reação com 5-clorosalicilaldeído e malononitrila (1:2) (amostra 3) e reagente (5-clorosalicilaldeído).



**Figura 43** - Cromatograma comparando tempos de retenção de uma amostra da reação com 5-nitrosalicilaldeído e malononitrila (1:2) (amostra 4) e reagente (5-nitrosalicilaldeído).

