

GRADO EN FARMACIA
TRABAJO DE FIN DE GRADO
CURSO 2017-2018

“SÍNTESIS DE FÁRMACOS: PREPARACIÓN DE LA
7-HIDROXI-4-METILCUMARINA”

Jorge Martín Cabrera

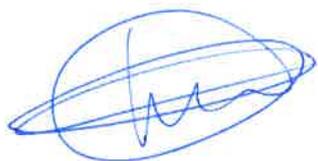
Tutores: Dr. Ignacio Antonio Jiménez Díaz
Dra. Lucía San Andrés Tejera

La Laguna, septiembre de 2018

La presente memoria de Trabajo de Fin de Grado ha sido realizada por el alumno Jorge Martín Cabrera, durante el Curso Académico 2017-2018 en las instalaciones del Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González" y bajo la tutorización de los profesores del Departamento de Química Orgánica, Dr. Ignacio Antonio Jiménez Díaz y Dra. Lucía San Andrés Tejera.

El trabajo se ha realizado bajo la modalidad de trabajo de investigación experimental dentro de lo contemplado en la normativa de Trabajo de Fin de Grado del Plan de Estudios del Grado en Farmacia. Con este trabajo el alumno demuestra que ha adquirido las competencias asociadas al Título.

La Laguna a 1 de septiembre de 2018



Fdo.: Ignacio Antonio Jiménez Díaz



Fdo.: Lucía San Andrés Tejera

ÍNDICE

SUMMARY.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
3.1 Síntesis de la 7-hidroxi-4-metilcumarina catalizada con ácido sulfúrico	6
3.2 Síntesis de la 7-hidroxi-4-metilcumarina catalizada con ácido <i>p</i> -toluensulfónico	6
3.3 Síntesis de la 7-hidroxi-4-metilcumarina catalizada con resinas iónicas (DOWEX®)	7
3.4. Técnicas espectroscópicas y espectrométricas	9
3.4.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)	9
3.4.2. Espectrometría de masas de baja y alta resolución (EM y EMAR).....	9
3.4.3. Espectroscopía infrarroja (IR)	9
3.4.4. Espectroscopía ultravioleta (UV)	10
3.4.5. Punto de fusión	10
3.5. Técnicas cromatográficas	10
3.5.1. Cromatografía en capa fina (CCF).....	10
3.5.2. Cromatografía en columna (CC)	10
3.6. Otras metodologías	10
3.6.1. Estufa	10
3.6.2. Microondas	10
3.6.3. Ultrasonido	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
5. CONCLUSIONES.....	14
6. BIBLIOGRAFÍA	15

SUMMARY

Natural products have been used to treat disease form thousands of years and they play an important role in drug discovery and development. Coumarin, the most abundant family of secondary metabolite, was first isolated from Tonka beans in 1820. They are an important class of heterocycles containing oxygen widely found in several plant families, essential oils, microorganisms and a few animal species. Coumarins are considered good examples of privileged structures with polycyclic heteroatomic systems that are capable to bind to multiple pharmacological targets, thus providing a viable starting point in the search for new drugs. The *2H*-chromen-2-one nucleus is the structural feature that is responsible for the privileged pharmacological actions of coumarins. Coumarin and its derivatives possess a remarkably broad spectrum of biological activities including anticoagulant, antinerurodegenerative, antioxidant, anticancer and antimicrobial activities.

7-Hidroxy-4methylcoumarin (hymecromone or 4-methylumbelliferone) is a coumarin derivative which has been use for more than thirty years for the treatment of functional and obstructive spasms of the biliary tract.

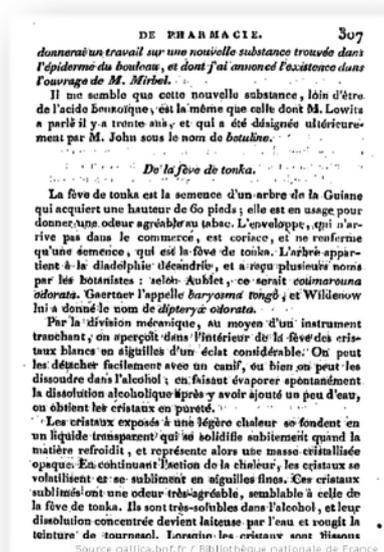
In this work hymecromone was synthesized from resorcinol and ethylacetoacetate via Pechmann reaction using *p*-toluenesulfonic acid as catalyst. This method offered several advantages over conventional method as high yields, short reaction times, easy handy reaction conditions and simple work-up.

1. INTRODUCCIÓN

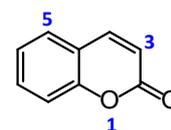
Las cumarinas son una familia de compuestos de origen natural o sintético constituidas por un anillo de benceno condensado a un anillo de α -pirona. Se conocen también como benzopironas y se producen de forma natural en plantas y microorganismos de los que se han aislado aproximadamente 1300 derivados de más de 800 especies. Las cumarinas se han aislado de plantas de la familia de las *Angiospermas*, tales como *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae* y *Umbelliferae*. El primer representante de esta familia, la cumarina, fue aislado por August Vogel en el año 1820 del haba de la Tonka (*Dipteryx odorata*) [1], [2] o comúnmente, *cumarú* que es de donde procede el nombre de esta familia de compuestos.



Semillas de Dipteryx odorata



Journal de Pharmacie, 1820



Cumarina
(2H-cromen-2-ona)

El esqueleto cumarínico se origina biosintéticamente partiendo de la *L*-fenilalanina que por pérdida de amoniaco da lugar al ácido *trans*-cinámico (Figura 1). Posteriormente una reacción de mono o dihidroxilación del ácido *trans*-cinámico conduce a la formación de los ácidos *trans*-hidroxicinámicos, que se isomerizan a los isómeros *E* o *cis*. Posterior ciclación de los mismos origina la cumarina o su 7-hidroxi derivado, la umbeliferona [2].

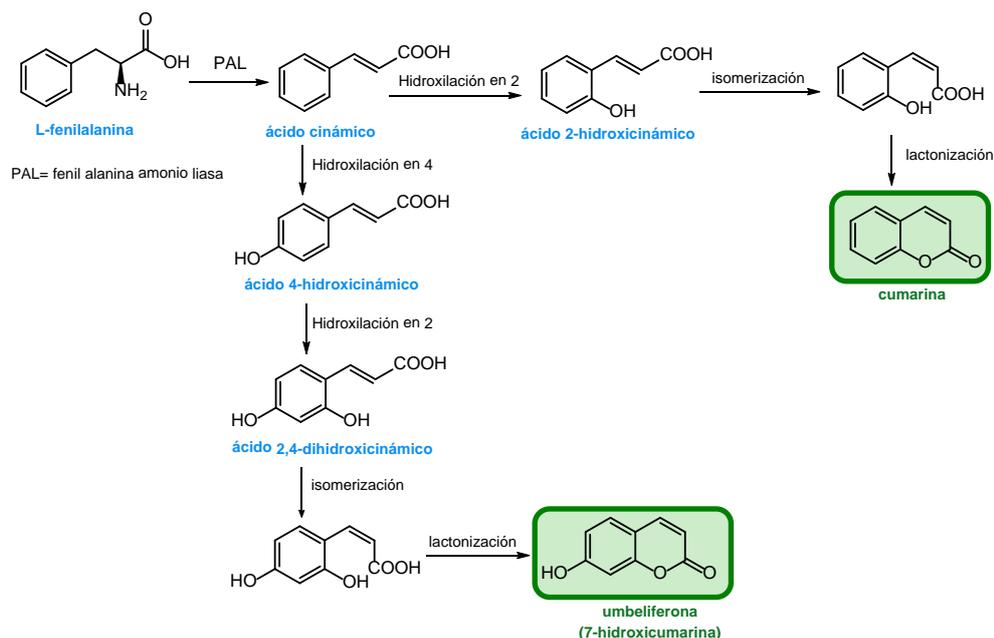
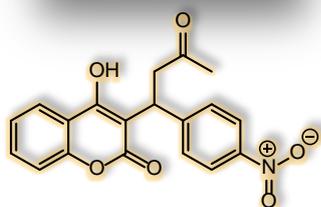
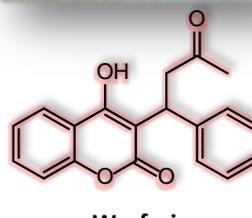


Figura 1. Esquema de la biosíntesis de cumarinas.

Las propiedades bioquímicas, farmacológicas y terapéuticas de las cumarinas dependen en gran medida de la naturaleza de los sustituyentes presentes en el esqueleto base de benzopirona [3]. Sobre la estructura base de la cumarina se pueden introducir sustituyentes de distinta naturaleza, lo que lleva a que existan cumarinas que pueden ser utilizadas con diversas finalidades como aditivos alimentarios, perfumes, cosméticos, productos agroquímicos o bien como fármacos. A nivel farmacológico las cumarinas presentan interés como anticoagulantes [2], [4], antiinflamatorios [5], antioxidantes [6], antivirales [7] y antibacterianos [8]. Dos de los fármacos más representativos son el acenocumarol (Sintrom®) y la warfarina (Aldocumar) derivados sintéticos de las cumarinas con acción anticoagulante en patologías con valvulopatías o fibrilación auricular.

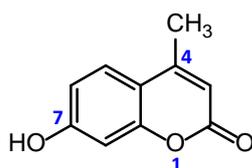


Acenocumarol



Warfarina

La 7-hidroxi-4-metilcumarina o himecromona es un medicamento que posee doble acción: colerética promoviendo la producción de bilis por las células del hígado y espasmolítica actuando en las vías biliares. Actualmente se emplea para el tratamiento de desórdenes en la piel como eccemas y psoriasis combinada con radiación ultravioleta. Sin embargo es una cumarina que no presenta actividad como anticoagulante.



7-Hidroxi-4-metilcumarina
(4-Metilumbeliferona o Himecromona)

El aislamiento de las cumarinas como productos naturales no es fácil y por eso se han descrito diversas metodologías para su síntesis. La reacción de Pechmann es el método más utilizado para llevar a cabo la síntesis de cumarinas ya que los materiales de partida son sencillos (fenoles y β -cetoésteres) y los rendimientos de la reacción son altos. Sin embargo, esta metodología necesita el uso de catalizadores ácidos homogéneos como ácido sulfúrico, ácido trifluoroacético o pentóxido de fósforo, que presentan problemas de corrosión, son de difícil separación del medio de reacción, en ausencia de disolvente se requieren tiempos de reacción largos y generan problemas medioambientales. Se hace necesaria la búsqueda de métodos alternativos que permitan reducir el impacto medioambiental y el ahorro energético.

2. OBJETIVOS

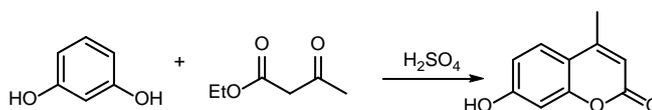
El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Grado está orientado a la optimización de un método alternativo para sintetizar la 7-hidroxi-4-metilcumarina, con el propósito de poder incorporar la metodología a la docencia de prácticas de laboratorio de la asignatura de Química Farmacéutica II de tercer curso del Grado en Farmacia.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Desarrollo de una metodología sintética para la preparación de la 7-hidroxi-4-metilcumarina o himecromona haciendo uso de la reacción de Pechman.
- Uso de métodos sintéticos de bajo coste, que reduzcan del impacto medioambiental y de ahorro energético.
- Desarrollo de procedimientos óptimos para el aislamiento del producto de reacción.
- Elucidación estructural del producto final, 7-hidroxi-4-metilcumarina.
- Estudio de aquellas cuestiones suscitadas durante el desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Síntesis de la 7-hidroxi-4-metilcumarina catalizada con ácido sulfúrico



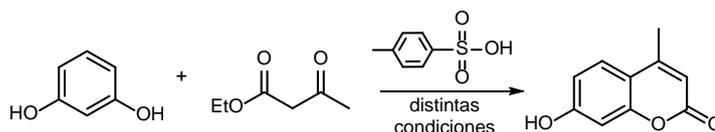
En un matraz de fondo redondo de 50 mL se colocó ácido sulfúrico concentrado (distintas cantidades, ver **Tabla 1**) y bajo agitación magnética se enfrió en un baño de agua-hielo hasta que la temperatura alcanzó los 5 °C.

En un vial de 10 mL se preparó una disolución de resorcinol (1,1 g , 10 mmol) en acetoacetato de etilo (1,3 mL, 10 mmol), calentando en un baño de agua en caso necesario. Esta disolución se añadió, gota a gota, al ácido sulfúrico, controlando que la temperatura de la mezcla no superase los 10 °C. Terminada la adición se continuó la agitación durante 30 minutos más a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió sobre 50 g de hielo triturado, obteniéndose un sólido con aspecto de laca correspondiente al 7-hidroxi-4-metilcumarina que se filtró a presión reducida. El producto se disolvió usando una disolución fría de hidróxido sódico 1 N. Seguidamente el pH de esta disolución se llevó hasta 2 por adición de pequeñas porciones de ácido clorhídrico 6 N. El precipitado de 7-hidroxi-4-metilcumarina se filtró a presión reducida y el producto fue purificado mediante cristalización de etanol caliente.

Tabla 1. Reacción de resorcinol y acetoacetato de etilo con H₂SO₄.

Resorcinol		Acetoacetato de etilo		H ₂ SO ₄		Condiciones de reacción	Rendimiento 7-hidroxi-4-metilcumarina (%)
(g)	(mmol)	(mL)	(mmol)	(mL)	(mmol)		
1,1	10,0	1,3	10,0	10,0	187,6	T ^a amb 30 min	76,6
1,1	10,0	1,3	10,0	2,0	37,5	T ^a amb 30 min	92,5

3.2 Síntesis de la 7-hidroxi-4-metilcumarina catalizada con ácido *p*-toluensulfónico

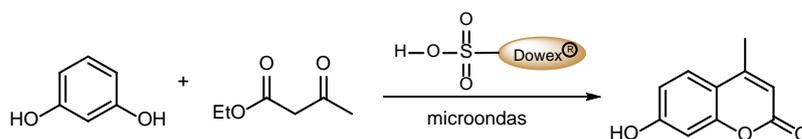


En un elernmeyer de 25 mL se preparó una disolución de resorcinol (1,1 g; 10,0 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico (1,9 g; 10,0 mmol) en acetoacetato de etilo (1,3 mL, 10,0 mmol). La mezcla se sometió a diferentes condiciones (ver **Tabla 2**). Finalizado el tiempo de reacción, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 10 mL de agua. El precipitado de 7-hidroxi-4-metilcumarina obtenido se filtró a presión reducida y se purificó por cristalización de etanol caliente.

Tabla 2. Reacción de resorcinol y acetoacetato de etilo con ácido *p*-tonuensulfónico.

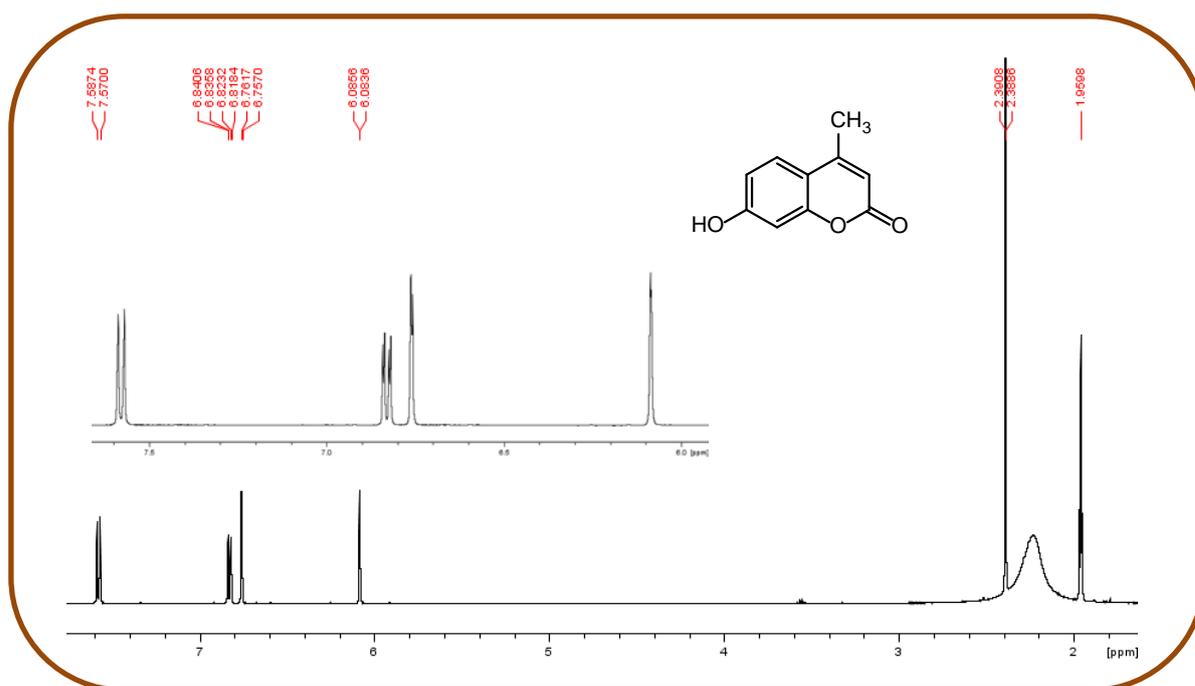
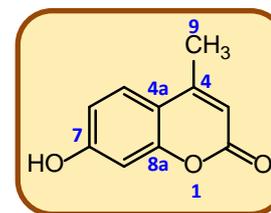
Resorcinol		Acetoacetato de etilo		<i>p</i> -TsOH		Condiciones de reacción	Rendimiento 7-hidroxi-4-metilcumarina (%)
(g)	(mmol)	(mL)	(mmol)	(g)	(mmol)		
1,1	10,0	1,3	10,0	1,9	10,0	Estufa 90°C 30 min	93,6
1,1	10,0	1,3	10,0	1,9	10,0	Ultrasonido 10 min	53,4
1,1	10,0	1,3	10,0	1,9	10,0	Microondas 15 seg	98,0
1,1	10,0	1,3	10,0	0,194	1,0	Estufa 90°C 30 min	95,6
1,1	10,0	1,3	10,0	0,194	1,0	Microondas 15 seg	92,7
1,1	10,0	1,3	10,0	0,038	0,2	Estufa 90°C 30 min	56,0
1,1	10,0	1,3	10,0	0,038	0,2	Microondas 15 seg	56,4

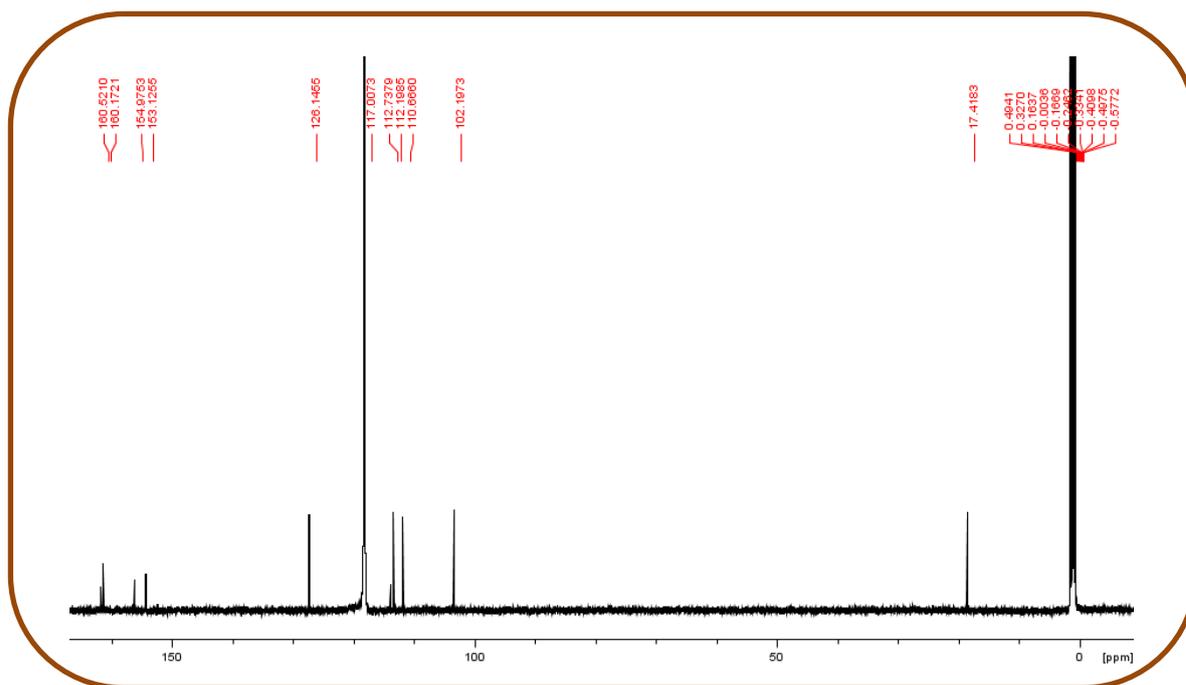
3.3 Síntesis de la 7-hidroxi-4-metilcumarina catalizada con resinas iónicas (DOWEX®)



En un vaso de precipitado de 25 mL se preparó una disolución de resorcinol (1,1 g, 10,0 mmol) en acetoacetato de etilo (1,3 mL, 10,0 mmol). A la disolución se adicionó 0,2 g de la resina intercambiadora DOWEX® 50WX8-200 y la mezcla se calentó en el microondas durante 25 segundos. Seguidamente la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió 5 ml de acetato de etilo. Se filtró y se concentró en el rotavapor, obteniéndose 0,27 g de 7-hidroxi-4-metilcumarina (Rendimiento=15,3 %).

7-Hidroxi-4-metilumarina (himecromona)	
Datos físicos y espectroscópicos	<p>Punto de fusión : 188-190 °C</p> <p>UV(EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$: 236, 337 nm</p> <p>IR(película) $\nu_{\text{máx}}$: 3501 (O-H), 3114 (=C-H), 2983 (C-H), 1672 (C=O), 1607 (C=C) cm^{-1}</p>
Resonancia Magnética Nuclear	<p>RMN ^1H (CD_3CN, 500 MHz) δ: 2.39 (3H, d, $J=1.2$ Hz, Me-8), 6.08 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-3), 6.76 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-8), 6.83 (1H, dd, $J=2.3, 8.7$ Hz, H-6), 7.58 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-5).</p> <p>RMN ^{13}C (CD_3CN, 125 MHz) δ: 17.4 (c, C-9), 102.2 (d, C-8), 110.7 (d, C-3), 112.2 (d, C-6), 112.7 (s, C-4a), 126.1 (d, C-5), 153.1 (s, C-4), 155.0 (s, C-8a), 160.2 (s, C-7), 160.5 (s, C-2).</p>
Espectrometría de Masas	<p>EM (IE) m/z (%): 176 [M]⁺ (100), 148 (81), 120 (11), 91 (14)</p> <p>EM (alta resolución) (IE) m/z: Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$ [M]⁺: 176.0473, observado 176.0491</p>

Espectro de RMN ^1H de la himecromona

Espectro de RMN ^{13}C de la himecromona

3.4. Técnicas espectroscópicas y espectrométricas

3.4.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN se realizaron en un espectrofotómetro Bruker Advance 600 (600 MHz para ^1H y 150 MHz para ^{13}C). Los productos se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl_3) y acetona deuterada (Acetona- d_6) con tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. En los experimentos de RMN ^1H , la multiplicidad de las señales se indica por las abreviaturas: (s) singlete, (d) doblete y (m) multiplete; y en los experimentos de ^{13}C RMN: (c) CH_3 , (t) CH_2 , (d) CH y (s) C.

3.4.2. Espectrometría de masas de baja y alta resolución (EM y EMAR)

Los espectros de masas, tanto de baja como de alta resolución, fueron realizados en un espectrómetro LCT Premier XE Micromass Electrospray Spectrometer.

3.4.3. Espectroscopía infrarroja (IR)

El espectro de IR fue registrado en un espectrofotómetro FT-IR Bruker, modelo IFS 55, utilizando disolución del compuesto en cloroformo seco sobre una pastilla de cloruro de sodio. Los valores se expresan en cm^{-1} .

3.4.4. *Espectroscopía ultravioleta (UV)*

El espectro de UV fue registrado en un espectrofotómetro Jasco V-560. El producto se disolvió en etanol y se colocó en una celda de cuarzo de 1 mL de volumen y con un paso de luz de 10 mm. Los valores de longitud de onda se expresan en nm.

3.4.5. *Punto de fusión*

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de la marca Bibby Stuart, modelo SMP10. Los datos se expresan en grados centígrados.

3.5. **Técnicas cromatográficas**

3.5.1. *Cromatografía en capa fina (CCF)*

Las cromatografías en capa fina se realizan sobre cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice tipo G de 0,25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel Sil G/UV₂₅₄. La visualización de los productos sobre las placas se realiza con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm y pulverizando con óleum (H₂O:H₂SO₄:AcOH, 4:1:20) con posterior calentamiento a 120 °C.

3.5.2. *Cromatografía en columna (CC)*

En la realización de columnas cromatográficas (húmedas) se emplea gel de sílice fina de 0,063–0,200 mm de diámetro, de la empresa Macherey-Nagel. La gel de sílice se suspende en el eluyente y se compacta con una bomba de baja presión. La muestra se puede aplicar adsorbida en gel de sílice de 0,2-0,5 mm de diámetro.

3.6. **Otras metodologías**

3.6.1. *Estufa*

Las reacciones realizadas mediante calentamiento con estufa se realizaron en un aparato marca SELECTA, modelo Contern 2000201.

3.6.2. *Microondas*

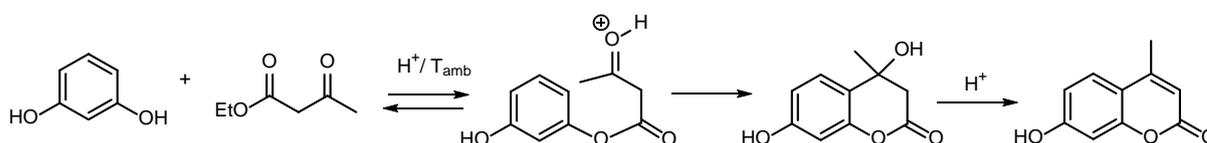
Las reacciones realizadas mediante irradiación de microondas se hicieron en un aparato marca LG modelo MS-2027C a una potencia de 1200 w.

3.6.3. *Ultrasonido*

Las reacciones realizadas con ultrasonido fueron hechas en un aparato marca Selecta Fuse (A):Z de 100 w.

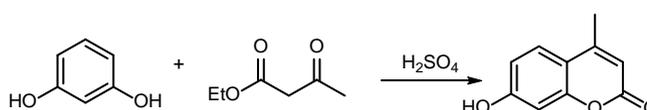
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La 7-hidroxi-4-metilcumarina se preparó haciendo uso de la reacción de Pechman a partir del resorcinol y acetoacetato de etilo (**Esquema 1**).



Esquema 1

En primer lugar se realizó la reacción de Pechman por el método tradicional [9] usando un catalizador inorgánico como el ácido sulfúrico (**Esquema 2, Tabla 1**).

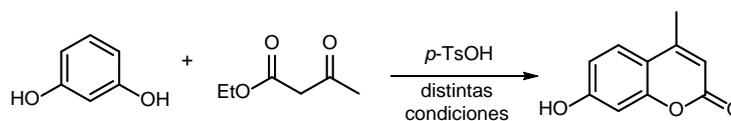


Esquema 2

Tabla 1. Reacción de resorcinol y acetoacetato de etilo con H₂SO₄.

Resorcinol		Acetoacetato de etilo		H ₂ SO ₄		Condiciones de reacción	Rendimiento 7-hidroxi-4-metilcumarina (%)
(g)	(mmol)	(mL)	(mmol)	(mL)	(mmol)		
1,1	10,0	1,3	10,0	10,0	187,6	T ^a amb 30 min	76,6
1,1	10,0	1,3	10,0	2,0	37,5	T ^a amb 30 min	92,5

Seguidamente se llevaron a cabo dos metodologías alternativas al método tradicional anterior de la reacción de Pechman. En el primer método se utilizó como agente catalizador un ácido orgánico, ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH). Para intentar optimizar las condiciones de reacción ésta se llevó a cabo de dos maneras diferentes: una usando cantidades estequiométricas de ácido *p*-TsOH y otra con cantidades catalíticas de dicho ácido (**Esquema 3, Tabla 2**). Se consiguen obtener buenos resultados en condiciones más suaves que cuando se usa el ácido sulfúrico como catalizador.

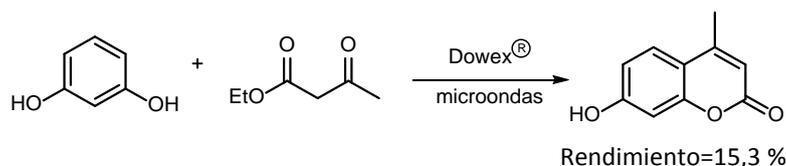


Esquema 3

Tabla 2. Reacción de resorcinol y acetoacetato de etilo con ácido *p*-tonuensulfónico.

Resorcinol		Acetoacetato de etilo		<i>p</i> -TsOH		Condiciones de reacción	Rendimiento 7-hidroxi-4-metilcumarina (%)
(g)	(mmol)	(mL)	(mmol)	(g)	(mmol)		
1,1	10,0	1,3	10,0	1,9	10,0	Estufa 90°C 30 min	93,6
1,1	10,0	1,3	10,0	1,9	10,0	Ultrasonido 10 min	53,4
1,1	10,0	1,3	10,0	1,9	10,0	Microondas 15 seg	98,0
1,1	10,0	1,3	10,0	0,194	1,0	Estufa 90°C 30 min	95,6
1,1	10,0	1,3	10,0	0,194	1,0	Microondas 15 seg	92,7
1,1	10,0	1,3	10,0	0,038	0,2	Estufa 90°C 30 min	56,0
1,1	10,0	1,3	10,0	0,038	0,2	Microondas 15 seg	56,4

En el segundo método alternativo se usaron condiciones de catálisis heterogénea para llevar a cabo la reacción de Pechman. Para ello se empleó una resina con carácter ácido, Dowex[®] 50WX8-200. Esta resina, de fácil manipulación, tiene como característica estructural la presencia de un grupo sulfónico capaz de transferir un protón y permite realizar la reacción en ausencia de disolvente (**Esquema 4**). Sin embargo el rendimiento de esta reacción no fue bueno.



Esquema 4

El análisis de los resultados obtenidos mostró que el primer método alternativo a la reacción de Pechman tradicional con ácido sulfúrico es el más eficiente por las siguientes razones:

1. Se obtienen mejores rendimientos.
2. Se consigue sustituir el uso del ácido sulfúrico por un catalizador ácido orgánico sólido más fácil de manipular.
3. Se simplifica el proceso de aislamiento del producto de reacción, himecromona y se consigue eliminar el uso de las disoluciones de sosa y de ácido clorhídrico.
4. De las distintas técnicas empleadas en esta segunda metodología destacan los resultados obtenidos cuando se usa calentamiento con microondas o con estufa.
5. Se logran obtener rendimientos por encima del 90% usando cantidades catalíticas del catalizador.

5. CONCLUSIONES

Del desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado podemos concluir lo siguiente:

- a. El método óptimo para la obtención de la 7-hidroxi-4-metilcumarina es la reacción de Pechman empleando ácido *p*-TsOH en cantidades catalíticas.
- b. La técnica de laboratorio más efectiva para la obtención de la 7-hidroxi-4-metilcumarina fue el calentamiento con horno microondas ya que supone un ahorro considerable de tiempo y a su vez energético.
- c. Como conclusión final desde el punto de vista práctico las metodologías empleadas permiten la preparación de la 7-hidroxi-4-metilcumarina con buenos rendimientos, facilidad en el tratamiento de las mezclas de reacción, un bajo coste y la disminución de residuos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A.Vogel. "De l'existence de l'acide benzoïque dans la fève de tonka et dans les fleurs de mélilot". *Journal de Pharmacie* **1820**, 6: 305–309.
- [2] Thiago Moreira Pereira, Daiana Portella Franco, Felipe Vitorio, Arthur Eugen Kümmerle. "Coumarin Compounds in Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Years". *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2018**, 18: 124-148.
- [3] Tiziana Pivetta, Elisa Valletta, Giulio Ferino, Francesco Isaia, Alessandra Pani, Sarah Vascellari, Carlo Castellano, Francesco Demartin, Maria Grazia Cabiddu, Enzo Cadoni. "Novel coumarins and related copper complexes with biological activity: DNA binding, molecular docking and in vitro antiproliferative activity". *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2017**, 177: 101–109.
- [4] Toru Maruyama, Masaki Otagiri, Stephen G. Schulman. "Binding characteristics of coumarin anticoagulants to human α 1-acid glycoprotein and human serum albumin". *International Journal of Pharmaceutics*. **1990**, 59: 137-143.
- [5] Liu Zeng Chen, Wei Wei Sun, Li Bo, Jie Quan Wang, Cheng Xiu, Wen Jian Tang, Jing Bo Shi, Hai Pin Zhou, Xin Hua Liu. "New arylpyrazoline-coumarins: Synthesis and anti-inflammatory activity" *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 138: 170–181.
- [6] Belma Zengin Kurt, Isil Gazioglu, Nur Ozten Kandas and Fatih Sonmez. "Synthesis, Anticholinesterase, Antioxidant, and Anti-Aflatoxic Activity of Novel Coumarin Carbamate Derivatives". **2018**, 3:3978-3983.
- [7] Mohd. Zaheen Hassan, Hasnah Osman, Mohamed Ashraf Ali, Mohamed Jawed Ahsan. "Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents". *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 123:236–255.
- [8] Yang Hu, Yufeng Shen, Xiaohu Wu, Xiao Tu, Gao-Xue Wang. "Synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives containing imidazole skeleton as potential antibacterial agents". *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 143: 958–969.
- [9] Arthur I. Vogel, Brian S. Furniss Antony, J. Hannaford Peter, W. G. Smith Austin, R. Tatchell. "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry". Longman Scientific & Technical, England, 5th edition. **1989**.