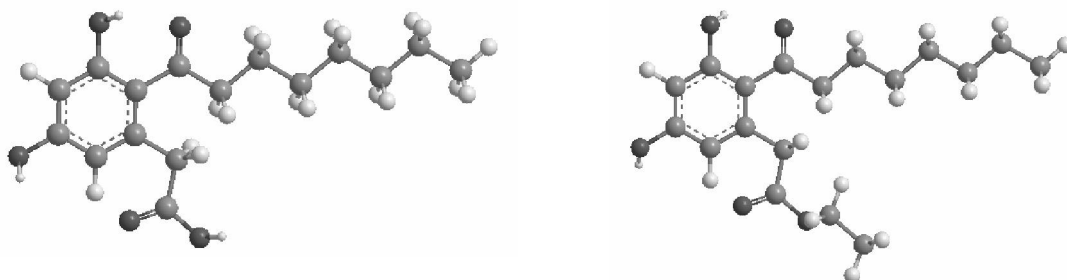
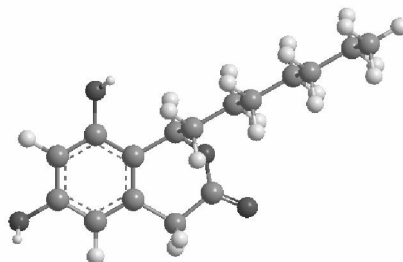


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO - NÍVEL DE MESTRADO EM QUÍMICA



**Síntese total e avaliação biológica das citosporonas A-C:
Octacetídeos com potencial propriedade pesticida**



Charles Eduardo Mrozinski Zamberlam

Orientador: Prof. Dr. Adilson Beatriz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Curso de Mestrado em Química, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Campo Grande-MS
2009

Agradecimentos

Ao meu pai, que sempre se mostrou preocupado em minha formação, passando sua experiência de vida, suas lições, seus ensinamentos. Meu pai é o grande responsável pela pessoa que sou hoje, ele ajudou a construir a minha vida. Tudo que aprendi hoje devo a ele. Quando eu for pai um dia, já tenho em quem me espelhar. Pai, obrigado por tudo!

À minha mãe, que sempre conversou comigo nas horas difíceis, dando-me calma e tranquilidade para minhas decisões. Com sua ternura e amor de mãe, sempre esteve ao meu lado. Obrigado, mãe!

À minha amada namorada Aline, a pessoa mais incrível que já conheci, soube me entender e me apoiar sempre, a cada dia de convivência, sendo muito mais do que uma companheira para mim. Te amo, meu anjo!

Ao meu padrasto Elton, meu amigo, um confidente, um irmão. Em você, eu vi o sucesso virar realidade, eu vi que o homem é capaz de construir e seguir seu próprio caminho. Tudo é questão de força de vontade. Não tenho palavras para descrever o quanto você me ensinou ao longo desses anos.

Ao meu irmão, Arthur, que conseguiu fazer com que eu me sentisse criança mais uma vez, com nossos 14 anos de diferença! Por causa dele, descobri como é bom ter um irmão. Arthur, sucesso para você!

Aos meus amigos, que se mostraram presentes para conversar, tomar um tereré, jogar tênis, contar piadas...

Aos demais familiares, meus e da Aline, que fazem parte de uma só família maravilhosa e na qual eu me sinto muito bem, sempre em casa.

À todos os meus amigos e colegas da faculdade, que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores, por seus ensinamentos e, principalmente, por suas amizades.

Ao meu orientador, Dr. Adilson, pela confiança, pelas lições de laboratório, segredos da Química, e principalmente pela amizade e dedicação ao longo de tantos anos de trabalho na pesquisa. Desejo muito sucesso para você!

Aos colegas de bancada do laboratório, Felícia, Ricardo.

Ao aluno de Iniciação Científica, hoje mestrando, Alisson, pela grande contribuição prestada na realização desse trabalho de pesquisa. Muito sucesso para você!

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Química, pela imensa colaboração. Sem suas funções, seria impossível a realização de um trabalho científico.

À Profa. Dra. Neli K. Honda, do Laboratório de Pesquisas 2 do Departamento de Química, pela execução do ensaio com a enzima tirosinase e também pela atenção e profissionalismo demonstrados com nossa pesquisa.

À Profa. Dra. Maria Rita Marques, do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Morfofisiologia do CCBS, pelos testes de atividade alelopática.

Ao Prof. Dr. Antônio Pancrácio de Souza, pela realização dos testes de atividade inseticida.

À Profa. Dra. Neusa Maria Mazzaro Somera, por aceitar o convite de participar da banca examinadora deste trabalho e pela excelente educadora que é, não só para mim, mas para todos a sua volta.

Ao Prof. Dr. Carlos Kleber Zago de Andrade (UnB – Brasília), por aceitar prontamente o convite de participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Denis Pires de Lima, pelo educador que é, pela amizade no laboratório e por aceitar o convite de participar da banca examinadora deste trabalho.

Á todos que me ajudaram chegar até aqui, meus sinceros agradecimentos.

Índice geral

Item	Página
<u>Índice de tabelas</u>	VI
<u>Índice de figuras</u>	IX
<u>Índice de esquemas</u>	XII
<u>Índice de substâncias</u>	XIV
<u>Índice de espectros</u>	XX
<u>Resumo</u>	XXIV
<u>Abstract</u>	XXV
<u>Abreviaturas e símbolos</u>	XXVI
<u>1. Introdução</u>	1
1.1. Os Lipídeos Fenólicos	1
1.1.1. Os Lipídeos Resorcinólicos	3
1.2. As Citosporonas, uma nova classe de lipídeos resorcinólicos não-isoprênicos	8
1.2.1. A primeira síntese da citosporona E (20)	9
1.2.2. A segunda síntese da citosporona E (20)	13
1.2.3. As funções biológicas da citosporona B (17)	16
1.2.3.1. A citosporona B (17) aumenta o nível de glicose no sangue	17
1.2.3.2. A citosporona B (17) induz apoptose celular	18
1.2.3.3. A citosporona B (17) inibe a proliferação de células cancerígenas e o crescimento tumoral	18
1.2.3.4. A importância da síntese da citosporona B (17)	19
1.2.4. A Citosporona A (16), um herbicida natural	19
1.2.4.1. A importância da síntese da citosporona A (16)	20
1.2.5. A importância da síntese da citosporona C (18)	21
1.3. Atividades biológicas	21
1.3.1. Atividade alelopática – ensaio de inibição da germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. (alface)	21
1.3.2. Atividade anti-tirosinase	22
1.3.3. Atividade inseticida	23
1.3.3.1. Mosquito da dengue (<i>Aedes aegypti</i>)	23

Item	Página
1.3.3.2. Gorgulho-do-milho (<i>Sitophilus zeamais</i>)	25
1.4. Agroquímicos: agentes bioativos, do laboratório para o campo e para a cidade	26
<u>2. Objetivos</u>	28
<u>3. Resultados e discussão</u>	29
3.1. Proposta de síntese de uma nova citosporona	29
3.1.1. Síntese do ácido octanóico (26)	31
3.2. Síntese de uma nova citosporona	33
3.2.1. Acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxibenzóico (21)	33
3.2.2. Desmetilação total do (<i>Z</i>)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (27)	40
3.3. Proposta de síntese das Citosporonas A (16), B (17) e C (18)	41
3.4. Síntese da citosporona A (16)	44
3.4.1. Acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxifenil acético (30)	44
3.4.1.1. Desmetilação do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33)	54
3.4.2. Desmetilação total do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31)	58
3.4.3. Esterificação da citosporona A (ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16))	63
3.4.4. Redução da citosporona A (ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16))	66
3.5. Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-HPLC)	70
3.6. Atividades biológicas	77
3.6.1. Atividade alelopática sobre sementes de <i>Lactuca sativa</i> L.	77
3.6.2. Atividade inibitória da enzima tirosinase	82
3.6.2.1. Em solução	82
3.6.2.2. Em camada delgada	84
3.6.3. Atividade inseticida sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i>	86
3.6.4. Atividade inseticida sobre <i>Sitophilus zeamais</i> (gorgulho-do-milho)	
<u>4. Parte experimental</u>	89
4.1. Material e métodos	89
4.2. Procedimentos experimentais (síntese)	90

Item	Página
4.2.1. Ácido octanóico (procedimento 1)	90
4.2.2. Ácido octanóico (procedimento 2) [MAHMOOD <i>et al</i>, 1999]	90
4.2.3. (<i>Z</i>-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (27)	91
4.2.4. (<i>Z</i>-3-heptilideno-4,6-diidroxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (29)	92
4.2.5. Ácido 2-(3,5-dimetoxi-2-octanoilfenil) acético (31) + 33 + 35	93
4.2.6. Ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil) acético (36)	95
4.2.7. Citosporona A (16)	96
4.2.8. Citosporona B (17)	97
4.2.9. Citosporona C (18)	97
4.3. Procedimentos experimentais (atividades biológicas)	98
4.3.1. Atividade alelopática – ensaio de inibição da germinação e do crescimento de sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. (alface)	98
4.3.2. Atividade inibitória da enzima tirosinase	99
4.3.2.1. Em solução	99
4.3.2.2. Em camada delgada	100
4.3.3. Atividade inseticida sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i>	101
4.3.4. Atividade inseticida sobre <i>Sitophilus zeamais</i>	102
<u>5. Conclusão</u>	103
<u>6. Referências</u>	105
<u>7. Seção de espectros</u>	108
7.1. Ácido octanóico (26)	108
7.2. (<i>Z</i>-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (27)	111
7.3. Ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31)	117
7.4. Ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33)	122
7.5. 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35)	129
7.6. Ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil) acético (36)	135
7.7. Ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16)	141
7.8. Acetato de 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) etila (17)	145
7.9. 1-heptil-6,8-diidroxi-1<i>H</i>isocromen-3(4<i>H</i>)-ona (18)	149

Índice de tabelas

Número da tabela	Título da tabela	Página
1	Atividade antibiótica para as citosporona D (19) e E (20) [BRADY <i>et al</i>, 2000]	9
2	Atividade antibiótica para a citosporona E ((<i>rac</i>)-20, (<i>R</i>)-20 e (<i>S</i>)-20) [OHZEKI e MORI, 2003]	12
3	Atividade antibiótica para a citosporona E ((<i>rac</i>)-20) com bactérias Gram-negativas [HALL <i>et al</i>, 2005]	15
4	Atividade antibiótica para a citosporona E ((<i>rac</i>)-20) com bactérias Gram-positivas [HALL <i>et al</i>, 2005]	15
5	Efeito da citosporona B (17) sobre o crescimento de tumores em ratos [ZHAN <i>et al</i>, 2008]	19
6	Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o ácido octanóico (26). O espectro de RMN de ¹H foi obtido a 300 MHz e de ¹³C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (CHCl₃) foi usado como referência interna.	33
7	Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para (<i>Z</i>)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (27). O espectro de RMN de ¹H foi obtido a 300 MHz e de ¹³C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (CHCl₃) foi usado como referência interna.	39
8	Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31). O espectro de RMN de ¹H foi obtido a 300 MHz e de ¹³C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (CHCl₃) foi usado como referência interna.	47
9	Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33). O espectro de RMN de ¹H foi obtido a 300 MHz e de ¹³C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (CHCl₃) foi usado como referência interna.	49

Número da tabela	Título da tabela	Página
10	Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ($^1J, ^2J, ^3J, ^4J$) observadas para o ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil)acético (33) nos experimentos bidimensionais HSQC (1J e HMBC ($^2J, ^3J, ^4J$). O sinal residual do solvente (CHCl_3) foi usado como referência interna.	50
11	Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (MeOH) foi usado como referência interna.	52
12	Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ($^1J, ^2J, ^3J, ^4J$) observadas para 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) nos experimentos bidimensionais HSQC (1J e HMBC ($^2J, ^3J$). O sinal residual do solvente (MeOH) foi usado como referência interna.	53
13	Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil)acético (36). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (MeOH) foi usado como referência interna.	57
14	Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ($^1J, ^2J, ^3J, ^4J$) observadas para o ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil)acético (36) nos experimentos bidimensionais HSQC (1J e HMBC ($^2J, ^3J, ^4J$). O sinal residual do solvente (MeOH) foi usado como referência interna.	58
15	Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil)acético (16). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (MeOH) foi usado como referência interna.	61
16	Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o acetato de 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil)etila (17). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (CHCl_3) foi usado como referência interna.	65

Número da tabela	Título da tabela	Página
17	Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o 1-heptil-6,8-diidróxi-1-<i>H</i>isocromen-3(4<i>H</i>)-ona (18). O espectro de RMN de ¹H foi obtido a 300 MHz e de ¹³C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (MeOH) foi usado como referência interna.	68
18	Resultado da análise em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE)	71
19	Resultados do teste de atividade alelopática (composto 27)	77
20	Resultados dos testes de atividade inibitória da enzima tirosinase para os compostos 31, 35 e 27	83
21	Mortandade (%) de adultos de <i>Sitophilus zeamais</i> em grãos de trigo tratados com amostra	87
22	Substâncias submetidas ao teste de atividade alelopática e suas concentrações	99

Índice de figuras

Número da figura	Título da figura	Página
1	Estrutura básica de um fenol	2
2	Exemplos de lipídeos fenólicos derivados de unidades isoprênicas e não-isoprênicas	2
3	Estruturas de diidrofenóis, poliidrofenóis e ácidos fenólicos precursores de lipídeos fenólicos	3
4	5-alkilresorcinóis	4
5	Lipídeos resorcinólicos presentes na casca do fruto da manga (<i>Alternaria alternata</i>)	4
6	Constituintes do líquido da castanha do caju (LCC)	5
7	As citosporonas A-E (16-20)	8
8	Estrutura química da gentamicina	9
9	Estrutura química do Itraconazol®	12
10	Modelo molecular para o receptor nuclear Nur77 e suas interações com a molécula de citosporona B (17) [ZHAN <i>et al</i>, 2008]	16
11	Efeito do tratamento da citosporona B (17) sobre o nível de glicose sanguínea em ratos silvestres [ZHAN <i>et al</i>, 2008]	17
12	Mosquito <i>Aedes aegypti</i>, transmissor do vírus da dengue	24
13	Gorgulho-do-milho (<i>Sitophilus zeamais</i>)	25
14	Análise da reatividade e orientação da acilação de Friedel-Crafts para o ácido 3,5-dimetoxibenzóico (21)	30
15	Semelhanças estruturais entre a citosporona 24 e as citosporonas E (20) e C (18)	31
16	Cromatografia em camada delgada da reação de oxidação do <i>n</i>-octanol (25)	32

Número da figura	Título da figura	Página
17	Cromatografia em camada delgada da reação de acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxibenzóico (21)	34
18	Distâncias calculadas entre o hidrogênio olefinico e os hidrogênios da metoxila aromática mais próxima para os diastereoisômeros <i>cis</i> e <i>trans</i> da enol lactona 27	36
19	Correlações observadas no experimento NOE para a enol lactona <i>cis</i> (27)	37
20	Conformações do intermediário hidroxilado 22.2, precursor da formação da enol lactona <i>cis</i> 27	38
21	Estrutura e nome (IUPAC) do composto 27	38
22	Subprodutos da acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxibenzóico (21)	40
23	Análise da reatividade e orientação da acilação de Friedel-Crafts para o ácido 3,5-dimetoxifenil acético (30)	43
24	Cromatografia em camada delgada da reação de acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxifenilacético (30)	45
25	Diferenças dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para os anéis aromáticos dos produtos 31 e 32	46
26	Propostas estruturais para o produto B	48
27	Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (2J , 3J , 4J) observadas no experimento bidimensional HMBC para o ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33)	49
28	Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (2J , 3J) observadas no experimento bidimensional HMBC para 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35)	52
29	Cromatografia em camada delgada da reação de desmetilação do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33)	54

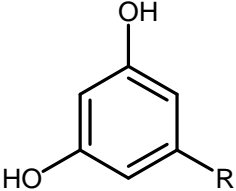
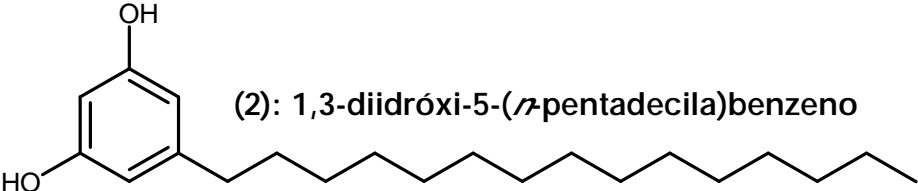
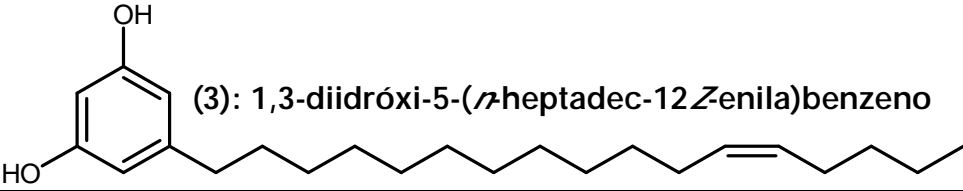
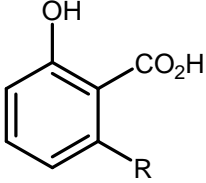
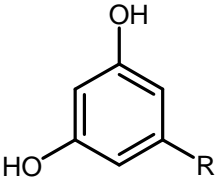
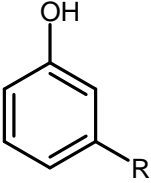
Número da figura	Título da figura	Página
30	Diferenças dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para os anéis aromáticos da citosporona A (16) e do seu isômero sintético (36)	56
31	Correlações ^1H x ^{13}C (2J, 3J, 4J) observadas no experimento bidimensional HMBC para o ácido 2-(3,5-diidróxi-4-octanoilfenil) acético (36)	57
32	Cromatografia em camada delgada da reação de desmetilação total do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31)	59
33	Deslocamentos químicos (ppm) observados para os hidrogênios aromáticos da citosporona A (16) e do seu precursor sintético (31)	60
34	Exemplos de sinais importantes, não observados nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C, relativos ao tautômero da citosporona A (16.1)	62
35	Cromatografia em camada delgada da reação de esterificação da citosporona A (16)	63
36	Cromatografia em camada delgada da reação de redução da citosporona A (16)	66
37	Substâncias analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE)	70
38	Ordem teórica da eluição dos compostos analisados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE)	76
39	Concentração mínima inibitória para 50% das sementes (IC_{50}) dos produtos 31 e 16	81
40	Separação de cargas iônicas para a citosporona A (16) e o produto 31	81
41	Foto da placa cromatográfica com os resultados da ação das substâncias 16, 17, 27, 31 e 35 e do ácido ascórbico sobre a atividade da enzima tirosinase	85

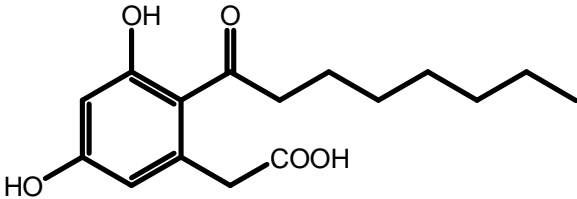
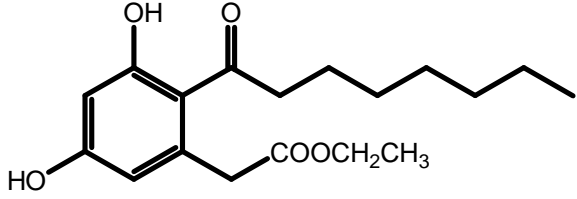
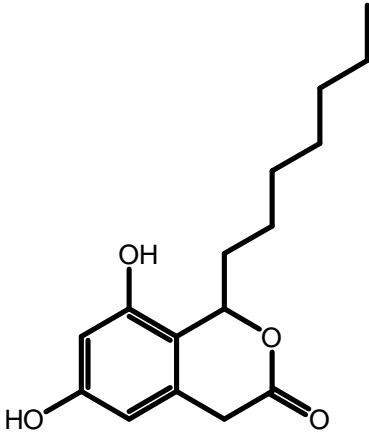
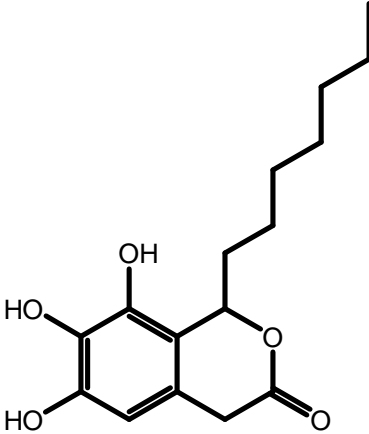
Índice de esquemas

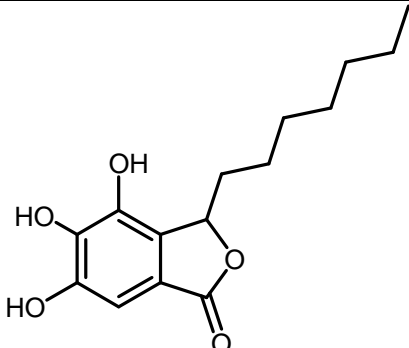
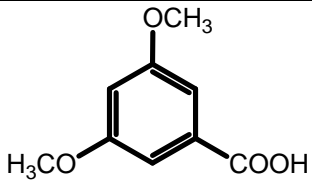
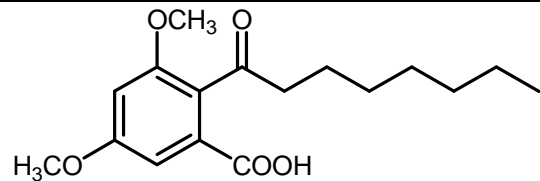
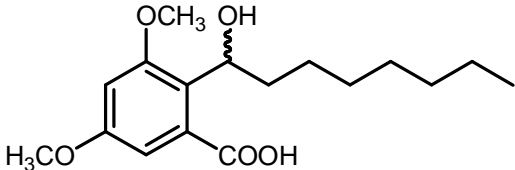
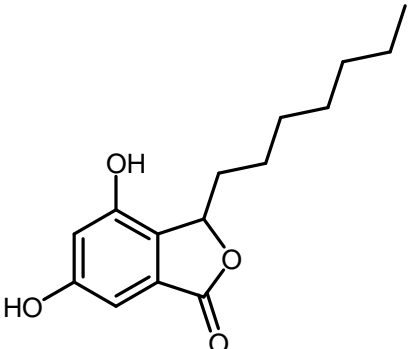
Número do esquema	Título do esquema	Página
1	Biossíntese de ácidos graxos saturados livres e policetídeos	6
2	Biossíntese de alquilresorcinóis e ácidos alquilresorcinólicos	7
3	Síntese racêmica da citosporona E (20) [OHZEKI e MORI, 2003]	10
4	Síntese da <i>S</i>-citosporona E (<i>S</i>-20) [OHZEKI e MORI, 2003]	11
5	Síntese da oxazolina D, um intermediário na síntese da citosporona E (20) [HALL <i>et al</i>, 2005]	13
6	Síntese racêmica da citosporona E (20) [HALL <i>et al</i>, 2005]	14
7	O tautomerismo natural da citosporona A (16)	20
8	Biossíntese da melanina, catalisada pela enzima tirosinase	23
9	Proposta de síntese de uma nova citosporona (24)	29
10	Métodos de oxidação do <i>n</i>-octanol (25)	32
11	Resultado teórico da acilação de Friedel-Crafts para o ácido 3,5-dimetoxibenzóico (21)	34
12	Mecanismo da reação de acilação de Friedel-Crafts para o ácido 3,5-dimetoxibenzóico (21)	35
13	Formação da enol lactona 27	36
14	Desmetilação total do (<i>Z</i>)-3-heptilideno-4,6- dimetoxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (27)	41
15	Proposta de síntese da citosporona A (16)	42
16	Proposta de síntese das citosporonas B (17) e C (18)	44


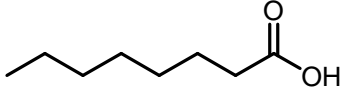
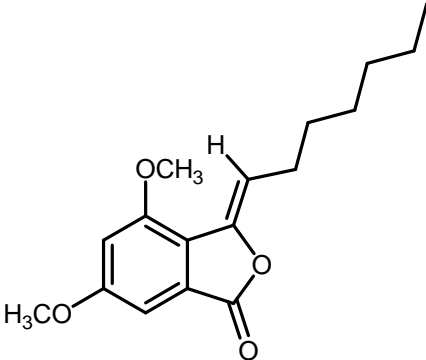
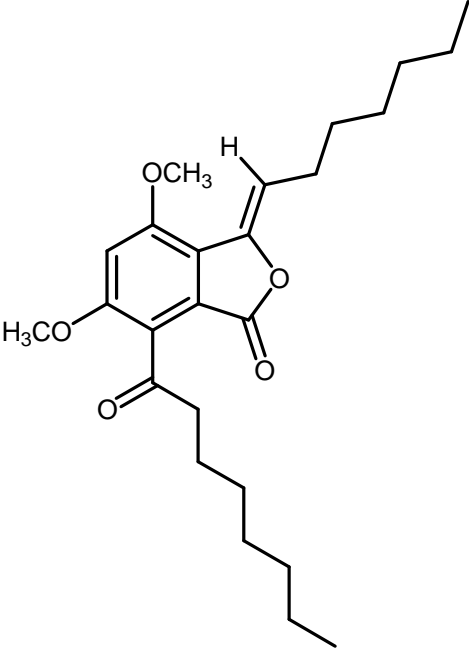
Número do esquema	Título do esquema	Página
17	Resultado teórico da acilação de Friedel-Crafts para o ácido 3,5-dimetoxifenil acético (30)	45
18	Mecanismo de formação do composto 35	51
19	Resultado teórico da desmetilação do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33)	54
20	Mecanismo da reação de desmetilação do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33)	55
21	Resultado teórico da desmetilação total do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31)	59
22	Deslocamento observado no equilíbrio tautomérico da citosporona A (16)	62
23	Reação de esterificação da citosporona A (16)	63
24	Mecanismo da reação de esterificação da citosporona A (16)	64
25	Reação de redução da citosporona A (16)	66
26	Mecanismo da reação de redução da citosporona A (16)	67
27	Reações catalisadas pela enzima tirosinase	83

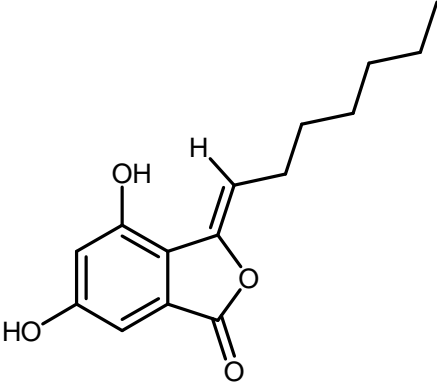
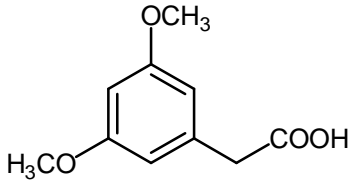
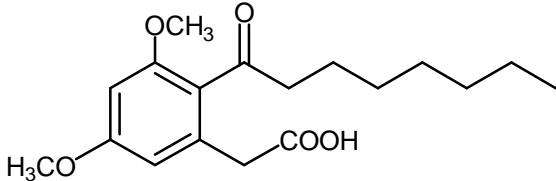
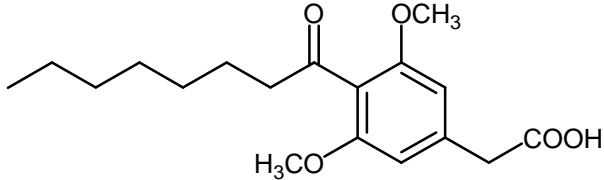
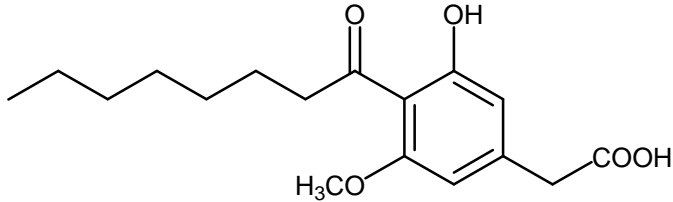
Índice de substâncias

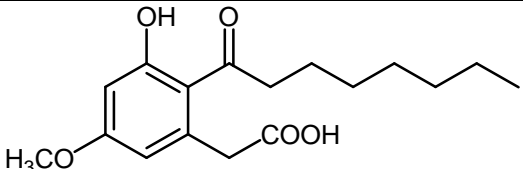
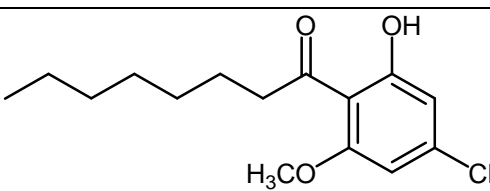
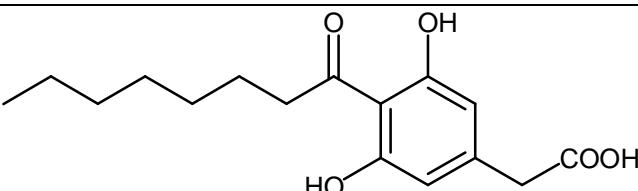
Substância	Páginas
 <p>(1): 5-alkilresorcinóis</p>	<p>1a, R = -CH₃ (metil) 1b, R = -C₂H₅ (etil) 1c, R = -C₃H₇ (propil) 1d, R = -C₄H₉ (butil) 1e, R = -C₅H₁₁ (pentil) 1f, R = -C₆H₁₃ (hexil) 1g, R = -C₇H₁₅ (heptil) 1h, R = -C₈H₁₇ (octil) 1i, R = -C₉H₁₉ (nonil)</p> <p style="text-align: right;">3 e 4</p>
 <p>(2): 1,3-diidróxi-5-(<i>n</i>-pentadecila)benzeno</p>	4
 <p>(3): 1,3-diidróxi-5-(<i>n</i>-heptadec-12Z-enila)benzeno</p>	4
 <p>(4-7): ácido anacárdico</p>	<p>(4): R = 8Z, 11Z, 14-Pentadecatrienila (5): R = 8Z, 11Z-Pentadecadienila (6): R = 8Z-Pentadecenila (7): R = Pentadecila</p> <p style="text-align: right;">4 e 5</p>
 <p>(8-11): cardol</p>	<p>(8): R = 8Z, 11Z, 14-Pentadecatrienila (9): R = 8Z, 11Z-Pentadecadienila (10): R = 8Z-Pentadecenila (11): R = Pentadecila</p> <p style="text-align: right;">4 e 5</p>
 <p>(12-15): cardanol</p>	<p>(12): R = 8Z, 11Z, 14-Pentadecatrienila (13): R = 8Z, 11Z-Pentadecadienila (14): R = 8Z-Pentadecenila (15): R = Pentadecila</p> <p style="text-align: right;">4 e 5</p>

Substância	Páginas
 (16): citosporona A	8, 19, 20, 28, 40-44, 53-56, 58-67, 69-71, 73-77, 79-81, 84-88, 96-99, 103, 104 e 141-144
 (17): citosporona B	8, 16-19, 41, 43, 44, 63-65, 70, 71, 74-76, 84-88, 97, 103, 104 e 145-148
 (18): citosporona C	8, 16, 19, 21, 29-31, 41, 43, 44, 66, 69, 97, 103 e 149-152
 (19): citosporona D	8 e 9

Substância	Páginas
 <p>(20): citosporona E</p>	8-15 e 29-31
 <p>(21): ácido 3,5-dimetoxibenzóico</p>	29, 30, 33-35, 39-43, 91 e 104
 <p>(22): ácido 3,5-dimetóxi-2-octanoilbenzóico</p>	29, 30, 34-36, 39, 40 e 42
 <p>(23): ácido 2-(1-hidroxiocetil)-3,5-dimetoxibenzóico</p>	29 e 30
 <p>(24): 3-heptil-4,6-diidroxiisobenzofurano-1(3H)-ona</p>	29-31, 33, 40 e 41

Substância	Páginas
 (25): <i>n</i> -octanol	31, 32 e 90
 (26): ácido octanóico	31-34, 44-46, 90 e 108-110
 (27): (<i>Z</i>)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3 <i>H</i>)-ona	35-42, 54, 70, 71, 73, 76, 77, 82-88, 91-93, 99, 103, 104 e 111-116
 (28): (<i>Z</i>)-3-heptilideno-4,6-dimetoxi-7-octanoilisoisobenzofurano-1(3 <i>H</i>)-ona	39 e 40

Substância	Páginas
 <p>(29): (Z)-3-heptilideno-4,6-dihidroisobenzofurano-1(3H)-ona</p>	40, 41, 54, 92 e 93
 <p>(30): ácido 3,5-dimetoxifenil acético</p>	42-45, 47, 50, 53, 93 e 103
 <p>(31): ácido 2-(3,5-dimetoxi-2-octanoilfenil) acético</p>	42-48, 53, 58-61, 70-72, 75-88, 93, 96, 99, 103, 104 e 117-121
 <p>(32): ácido 2-(3,5-dimetóxi-4-octanoilfenil) acético</p>	45, 46 e 48
 <p>(33): ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético</p>	48-51, 53-56, 58, 93-95, 103 e 122-128

Substância	Páginas
 (34): ácido 2-(2-octanoil-3-hidróxi-5-metóxi-fenil) acético	48
 (35): 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil) octan-1-ona	51, 53, 70, 71, 73, 75, 76, 82-88, 93-95, 103, 104 e 129-134
 (36): ácido 2-(3,5-diidróxi-4-octanilfenil) acético	54-58, 95, 96, 103 e 135-140

Índice de espectros

Número do espectro	Título do espectro	Página
1	RMN de ^1H do ácido octanóico (26) em CDCl_3	108
2	RMN de ^{13}C do ácido octanóico (26) em CDCl_3	109
3	DEPT-135° do ácido octanóico (26) em CDCl_3	110
4	RMN de ^1H do (<i>Z</i>-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (27) em CDCl_3	111
5	RMN de ^{13}C do (<i>Z</i>-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (27) em CDCl_3	112
6	DEPT-135° do (<i>Z</i>-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (27) em CDCl_3	113
7	NOE 2D do (<i>Z</i>-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (27) em CDCl_3	114
8	Ampliação do NOE 2D do (<i>Z</i>-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (27) em CDCl_3, na região de hidrogênios aromáticos (6,75 ppm) e hidrogênios das metoxilas (3,90 ppm)	114
9	Infravermelho do (<i>Z</i>-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (27) em pastilha de KBr	115
10	Espectro de Massas do (<i>Z</i>-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3<i>H</i>)-ona (27)	116
11	RMN de ^1H do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31) em CDCl_3	117
12	RMN de ^{13}C do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31) em CDCl_3	118
13	DEPT-135° do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31) em CDCl_3	119
14	Infravermelho do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31) em pastilha de KBr	120

Número do espectro	Título do espectro	Página
15	Espectro de Massas do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31)	121
16	RMN de ^1H do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em CDCl_3	122
17	RMN de ^{13}C do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em CDCl_3	123
18	DEPT-135° do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em CDCl_3	124
19	HSQC do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em CDCl_3	125
20	HMBC do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em CDCl_3	126
21	Ampliação do HMBC do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em CDCl_3 , na região de hidrogênios aromáticos (6,40 ppm)	127
22	Infravermelho do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em pastilha de KBr	128
23	RMN de ^1H do 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) em CD_3OD	129
24	RMN de ^{13}C do 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) em CD_3OD	130
25	DEPT-135° do 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) em CD_3OD	131
26	HSQC do 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) em CD_3OD	132
27	HMBC do 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) em CD_3OD	133
28	Infravermelho do 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) em pastilha de KBr	134

Número do espectro	Título do espectro	Página
29	RMN ¹ H do ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil) acético (36) em CD ₃ OD	135
30	RMN ¹³ C do ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil) acético (36) em CD ₃ OD	136
31	DEPT-135° do ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil) acético (36) em CD ₃ OD	137
32	HSQC do ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil) acético (36) em CD ₃ OD	138
33	HMBC do ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil) acético (36) em CD ₃ OD	139
34	Infravermelho do ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil) acético (36) em pastilha de KBr	140
35	RMN ¹ H do ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16) em CD ₃ OD	141
36	RMN ¹³ C do ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16) em CD ₃ OD	142
37	DEPT-135° do ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16) em CD ₃ OD	143
38	Infravermelho do ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16) em pastilha de KBr	144
39	RMN ¹ H do acetato de 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) etila (17) em CDCl ₃	145
40	RMN ¹³ C do acetato de 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) etila (17) em CDCl ₃	146
41	DEPT-135° do acetato de 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) etila (17) em CDCl ₃	147
42	Infravermelho do acetato de 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) etila (17) em pastilha de KBr	148

Número do espectro	Título do espectro	Página
43	RMN ¹ H do 1-heptil-6,8-diidroxi-1 <i>H</i> isocromen-3(4 <i>H</i>)-ona (18) em CD ₃ OD	149
44	RMN ¹³ C do 1-heptil-6,8-diidroxi-1 <i>H</i> isocromen-3(4 <i>H</i>)-ona (18) em CD ₃ OD	150
45	DEPT-135° do 1-heptil-6,8-diidroxi-1 <i>H</i> isocromen-3(4 <i>H</i>)-ona (18) em CD ₃ OD	151
46	Infravermelho do 1-heptil-6,8-diidroxi-1 <i>H</i> isocromen-3(4 <i>H</i>)-ona (18) em pastilha de KBr	152

Resumo

A busca incessante de novos agentes químicos bioativos mais eficientes e menos agressivos ao homem e ao meio ambiente requer o desenvolvimento e a aplicação de metodologias da Síntese Orgânica, visando o preparo desses agentes no laboratório e na indústria. Muitos desses produtos são encontrados na própria natureza, e outros são baseados em moléculas naturais. Compostos fitotóxicos, como a citosporona A (**16**), foram isolados de fungos endofíticos. Essa substância (**16**) é um exemplo de inibidor da germinação de sementes, com uma concentração inibitória de apenas 3 µg/mL, para 50% das sementes. Ela foi isolada a partir do fungo *Phoma sp.*, em 1985, e foi novamente reportada como metabólito secundário dos fungos *Diaporthe sp.* e *Cytospora sp.*, em 2000. Outras quatro substâncias de estruturas semelhantes, as citosporonas B (**17**), C (**18**), D (**19**) e E (**20**) também foram isoladas a partir desses dois últimos fungos. Segundo os autores, as citosporonas D (**19**) e E (**20**) foram igualmente ativas contra as bactérias *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli* e o fungo *C. albicans*. Uma fonte recente demonstra que a citosporona B (**17**) apresenta diversas funções biológicas e pode ser um importante agente terapêutico no tratamento de diversas doenças. Com esses dados fornecidos pela literatura, estamos interessados na síntese das citosporonas A (**16**), B (**17**) e C (**18**). A partir de reagentes comerciais (ácido 3,5-dimetoxifenilacético (**30**)) e com a etapa chave da acilação de Friedel-Crafts, para a inserção de um grupo octanoíla no anel aromático, seguido de uma simples desmetilação total do intermediário, foi obtida a citosporona A (**16**) com bom rendimento global. A partir dela, as citosporonas B (**17**) e C (**18**) foram preparadas por esterificação e redução, respectivamente, ambas com altos rendimentos. A metodologia da acilação de Friedel-Crafts foi aplicada ao ácido 3,5-dimetoxibenzóico (**21**), e o produto principal formado é um intermediário na síntese de uma nova citosporona (**24**), um análogo da citosporona E (**20**). Os intermediários e subprodutos obtidos foram submetidos a testes de atividade alelopática, com sementes de *Lactuca sativa* L., inseticida, com larvas de *Aedes aegypti*, e inibitória da enzima tirosinase, a fim de avaliar especialmente o potencial pesticida dos produtos.

A metodologia empregada para o preparo das citosporonas mostrou-se eficiente e os resultados obtidos para as avaliações biológicas são bastante promissores. Os dados mostram que intermediários sintéticos já apresentam atividade alelopática e inibitória da enzima tirosinase. Os métodos de síntese orgânica e avaliações biológicas realizadas serão discutidos ao longo desse trabalho.

Abstract

The incessant search for new bioactive chemical agents, more effective and less aggressive to the people and to the environment, requires the promotion and application of Organic Synthesis methodologies, aiming the preparation of these agents in the lab and in the industry. Many of these products can be found in the nature and other are based on natural molecules. Phytotoxic compounds, such as cytosporone A (**16**), were isolated from endophytic fungi. This substance (**16**) is an example of inhibitor of seeds germination, with inhibitory concentration equal to 3 µg/mL for 50% of seeds. It was isolated from the fungus *Phoma sp.*, in 1985, and was reported once again as secondary metabolite of the fungi *Diaporthe sp.* and *Cytospora sp.*, in 2000. Other four similar substances, cytosporones B (**17**), C (**18**), D (**19**) and E (**20**), were also isolated from these two last fungi. According to the authors, the cytosporones D (**19**) and E (**20**) were equally active against the bacterias *S. aureus*, *E. faecalis* and *E. coli* and the fungus *C. Albicans*. A recent article reports that cytosporone B (**17**) has many biological functions and can be an important therapeutic agent on the treatment of human diseases. Based on these information, we are interested on the synthesis of cytosporones A (**16**), B (**17**) and C (**18**). Starting from commercial reagents (3,5-dimethoxyphenylacetic acid (**30**)) with Friedel-Crafts acylation as key step, for the insertion of an octanoyl group in the aromatic ring, followed by a total demethylation of this intermediate, we prepared cytosporone A (**16**) with high global yield. Esterification and reduction steps of cytosporone A (**16**) produced cytosporones B (**17**) and C (**18**), respectively, both with high yield. The Friedel-Crafts acylation methodology was applied to 3,5-dimethoxybenzoic acid (**21**) and the main product of this reaction is an intermediate in the synthesis of a new cytosporone (**24**), a cytosporone E (**20**) analogue. The intermediates and main products were submitted to biological tests, such as allelopathic activity against *Lactuca sativa* L. seeds, insecticide with *Aedes aegypti* larvae and inhibition of tyrosinase enzyme activity, to the assessment of pesticide potential of the products.

The employed methodology to prepare of the cytosporones was efficient and the results of biological tests are promising. These first results demonstrate that intermediates and main products have allelopathic activity and inhibit activity of tyrosinase enzyme. The synthetic organic methods and biological tests will be discussed in this present work.

Abreviaturas e símbolos

: deslocamento químico

CCD: cromatografia em camada delgada

d: dubleto

dd: duplo dubleto

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DMSO: dimetil sulfóxido

DMSO-d₆: dimetil sulfóxido deuterado

EM: Espectrometria de Massas

HMBC: heteronuclear multiple-bond connectivity

HSQC: heteronuclear single quantum coherence

Hz: Hertz

IV: infravermelho

J: constante de acoplamento

L-DOPA: L-3,4-diidroxifenilalanina

m: multiplete

MHz: megahertz

NOE: Nuclear Overhauser Effect

ppm: partes por milhão

q: quarteto

qt: quinteto

RMN de ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13

RMN de ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

s: singleto

sl: singleto largo

t: tripleto

As demais abreviaturas e símbolos encontram-se com seus respectivos significados ao longo do texto.

Introdução

1. Introdução

A Química Orgânica tem acompanhado o desenvolvimento científico e tecnológico do homem, ao longo de suas histórias. Primeiro porque a evolução da Química como ciência depende, em grande parte, dos avanços da tecnologia humana e suas aplicações no campo científico; e segundo porque o progresso da vida humana na Terra, no que diz respeito à saúde, bem-estar e boa alimentação, é um reflexo direto dos benefícios que a Química Orgânica cria e reproduz em larga escala para todos nós. Enfim, o homem precisa da Química Orgânica para sua própria sustentabilidade.

Inserida nesse contexto, a síntese orgânica constitui uma das áreas mais importantes da Química Orgânica. Apenas como exemplo, até o ano de 2003, 85% dos fármacos terapêuticos eram de origem totalmente sintética (fonte: www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1702, 28/01/09). E praticamente todos os produtos agroquímicos, as substâncias utilizadas no combate às diversas pragas agrícolas, são produzidas em laboratório. As últimas cinco décadas foram um marco para os químicos orgânicos sintéticos, os quais foram capazes de preparar importantes moléculas de elevada complexidade estrutural, aquirais, racêmicas ou enantiomericamente puras, através da aplicação de metodologias químicas inovadoras, com o uso de catalisadores metálicos, reagentes quirais, entre outras especiarias químicas.

Diversos compostos biologicamente ativos de uso difundido em nossa sociedade são produzidos em laboratório, porém foram consumados a partir de moléculas de produto natural de origem vegetal, animal ou microbiana. A natureza é uma fonte inesgotável de substâncias biologicamente ativas [BARBOSA *et al.*, 2001]. Nesse contexto, a síntese, a purificação e a caracterização química, biológica e estrutural de novas substâncias bioativas provenientes da fauna e flora brasileiras são valiosas, uma vez que a própria evolução tratou de selecionar um vastíssimo espectro de substâncias com potencial de defender a saúde humana ou animal e a agricultura.

1.1. Os Lipídeos Fenólicos

Fenóis são descritos na literatura como metabólitos secundários de plantas. Neste grupo de substâncias, há fenóis simples, polifenóis e seus derivados. De maneira geral, um fenol, por sua definição química, é uma substância cuja molécula possui um anel aromático com um substituinte hidróxi (-OH), podendo conter outros derivados funcionais [KOZUBEK e TYMAN, 1999], como mostra a figura 1.

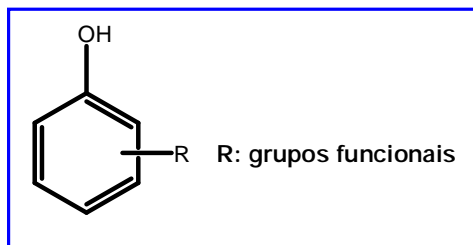


Figura 1: Estrutura básica de um fenol

Entre os fenóis simples de origem natural, há uma série de derivados classificados como lipídeos fenólicos ou fenóis de cadeia longa. Os lipídeos fenólicos são compostos derivados de policetídeos [DESZCZ e KOZUBEK, 2000], podendo ser derivados de unidades isoprênicas (-tocoferol – Vitamina E) e não-isoprênicas (1-hidroxi-3-(pentadec-8Z-enil) benzeno) [KOZUBEK e TYMAN, 1999] (figura 2).

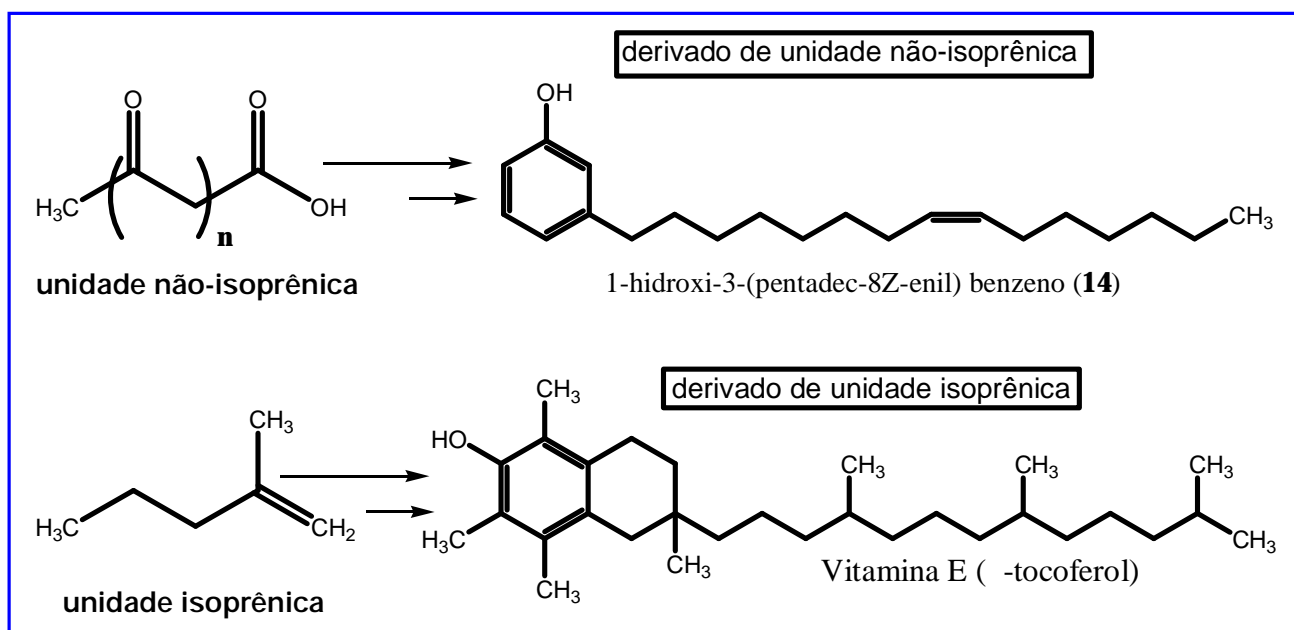


Figura 2: Exemplos de lipídeos fenólicos derivados de unidades isoprênicas e não-isoprênicas

Os lipídeos fenólicos originados de unidades não-isoprênicas são relativamente incomuns e podem ser considerados, por simplificação, como ácidos graxos cuja carboxila foi substituída pelo anel hidroxibenzeno. Dessa maneira, eles podem ser derivados de mono e diidroxifenóis (catecol, resorcinol e hidroquinona) ou poliidrofenóis (1,2,4-triidroxifenol), e ainda de ácidos fenólicos, ácidos 6-alkil-2-hidroxibenzóicos (ácidos anacárdicos) e ácidos 6-alkil-2,4-diidroxibenzóicos (ácidos resorcinólicos) [KOZUBEK e TYMAN, 2005], como mostra a figura 3.

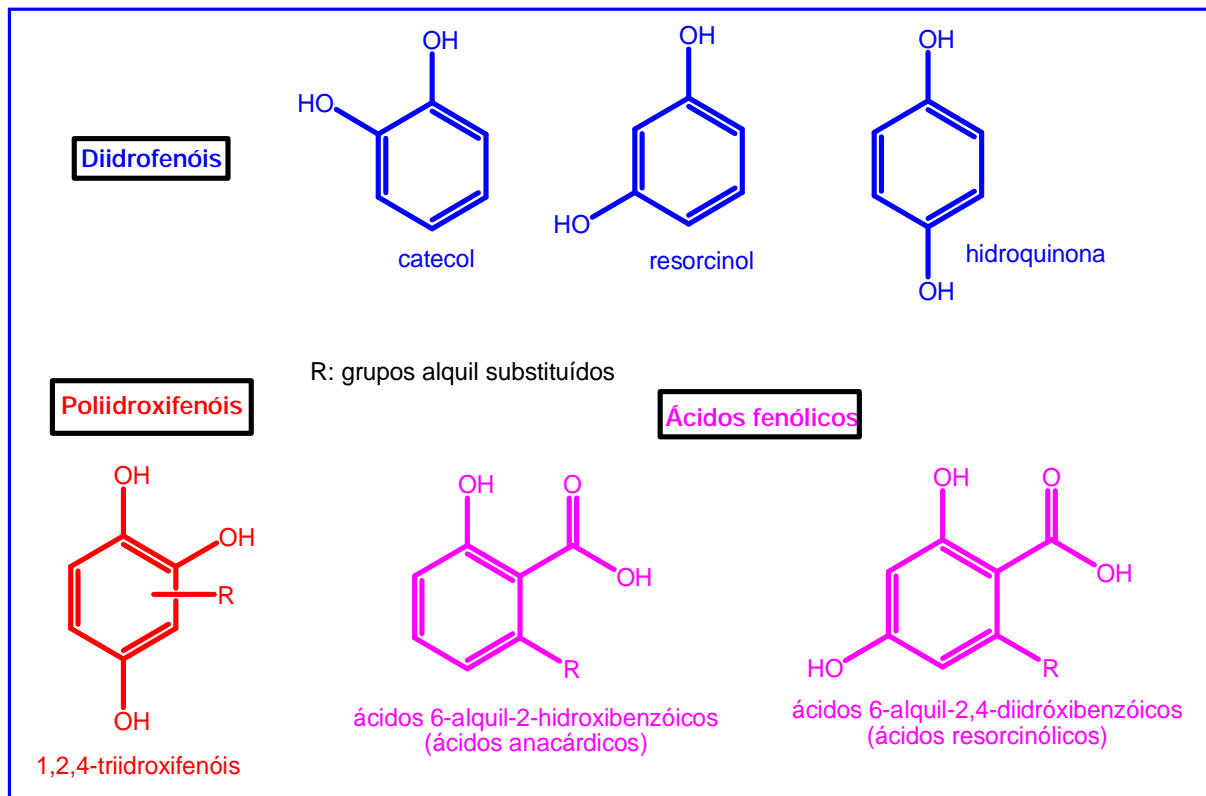


Figura 3: Estruturas de diidrofenois, poliidrofenois e ácidos fenólicos precursores de lipídeos fenólicos

1.1.1. Os Lipídeos Resorcinólicos

Nas últimas décadas, vários pesquisadores de diferentes áreas têm dado atenção especial aos compostos fenólicos biologicamente ativos, que compreendem um grupo heterogêneo do metabolismo secundário de plantas, sendo encontrados também em microrganismos, como fungos e bactérias. Dentre estes, os lipídeos resorcinólicos têm sido objeto de estudos interdisciplinares devido às suas propriedades bioativas. Trabalhos recentes demonstram que esses compostos apresentam atividades bactericida, moluscicida, herbicida, fungicida e antitumoral [ALONSO *et al*, 1997; KOZUBEK e TYMAN, 1999].

Quatro substâncias obtidas em nosso trabalho contêm em suas estruturas o anel de resorcinol e uma cadeia lateral de oito carbonos. Classificam-se, portanto, como lipídeos resorcinólicos.

Do líquen *Protousnea* spp., por exemplo, foram isolados 5-alkilresorcinóis (figura 4) identificados como compostos formados durante o processo de extração. Entre os alkilresorcinóis, foram isolados, 5-propilresorcinol (**1c**) e seu derivado metoxilado 3-metóxi-5-hidróxi-1-propilbenzeno. O primeiro mostrou forte atividade anti-tirosinase, enquanto que o segundo não mostrou qualquer efeito [KINOSHITA *et al*, 1994]. A elongação da cadeia alquílica, de metil ao nonil, em 5-alkilresorcinóis (**1a-i**) resulta em um

aumento da atividade anti-tirosinase. Portanto, o comprimento da cadeia alquílica nos derivados resorcinólicos afeta sua atividade anti-tirosinase [MATSUBARA *et al*, 1997].

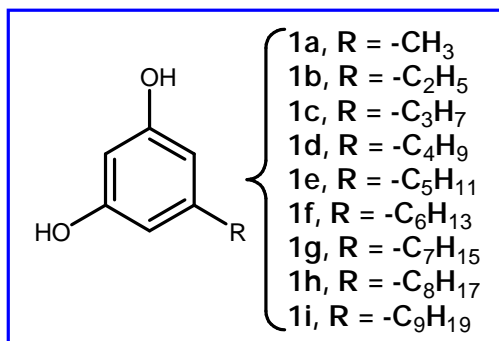


Figura 4: 5-alkilresorcinóis

Na casca do fruto da manga (*Alternaria alternata*), foram isolados os lipídeos **2** e **3**, representados na figura 5. Segundo os autores, a presença destas substâncias está diretamente relacionada à inibição da atividade fúngica na casca do fruto, o que já constitui em uma atividade biológica, uma proteção natural da planta contra a ação de microrganismos externos [COJOCARU *et al*, 1986; DROBY *et al*, 1987].

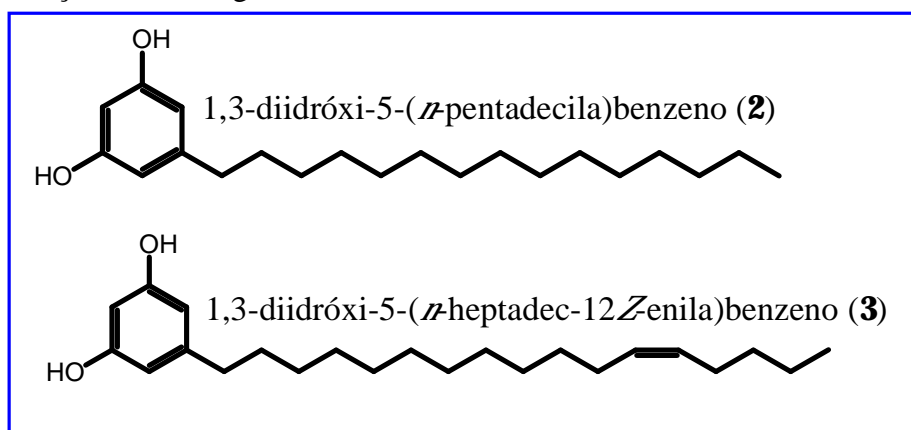


Figura 5: Lipídeos resorcinólicos presentes na casca do fruto da manga (*Alternaria alternata*)

Outra importante fonte natural de lipídeos fenólicos é o cajueiro (*Anacardium occidentale*), uma planta bem desenvolvida no Brasil e no cerrado de Mato Grosso do Sul. Na casca da castanha do caju, existe um óleo viscoso, denominado líquido da castanha do caju *in natura*, ou LCC, constituído de: 60 a 65% de ácido anacárdico (**4-7**), 15 a 20% de cardol (**8-11**), 10% de cardanol (**12-15**) e traços de metil cardol. A diferença entre estas estruturas está resumida ao anel aromático da molécula, sendo que cada unidade aromática contém uma cadeia lateral de 15 carbonos, saturada ou com uma, duas ou três ligações duplas não conjugadas, com estereoquímica *cis*. São, pelo menos, 12 substâncias (lipídeos resorcinólicos e /ou fenólicos) diferentes [KOZUBEK e TYMAN, 1999] (figura 6).

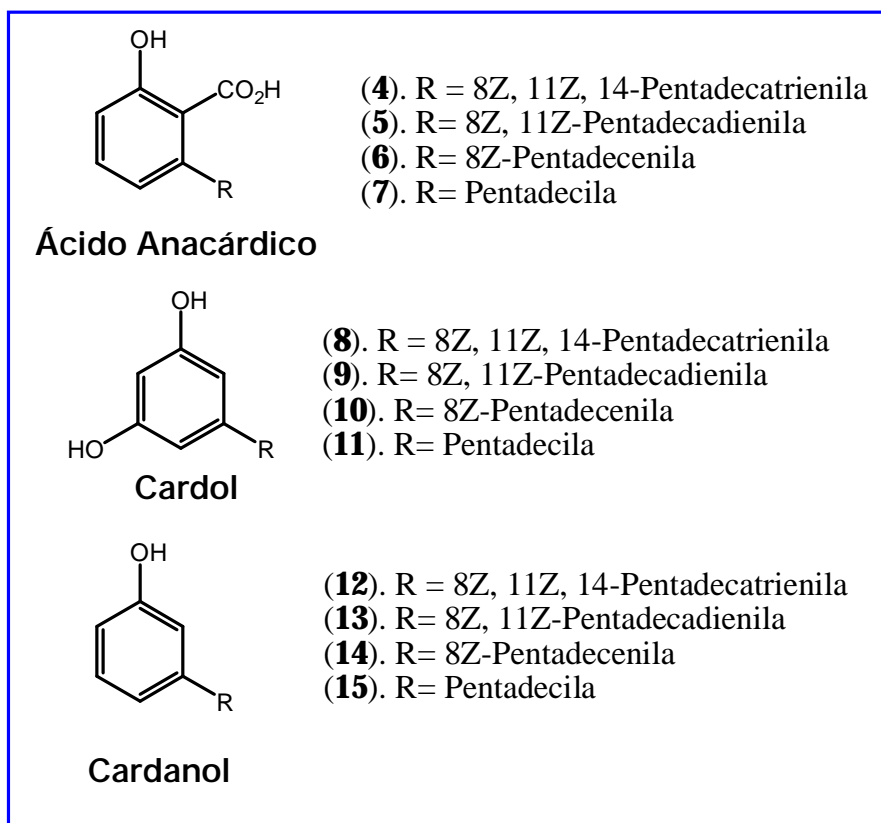


Figura 6: Constituintes do líquido da castanha do caju (LCC)

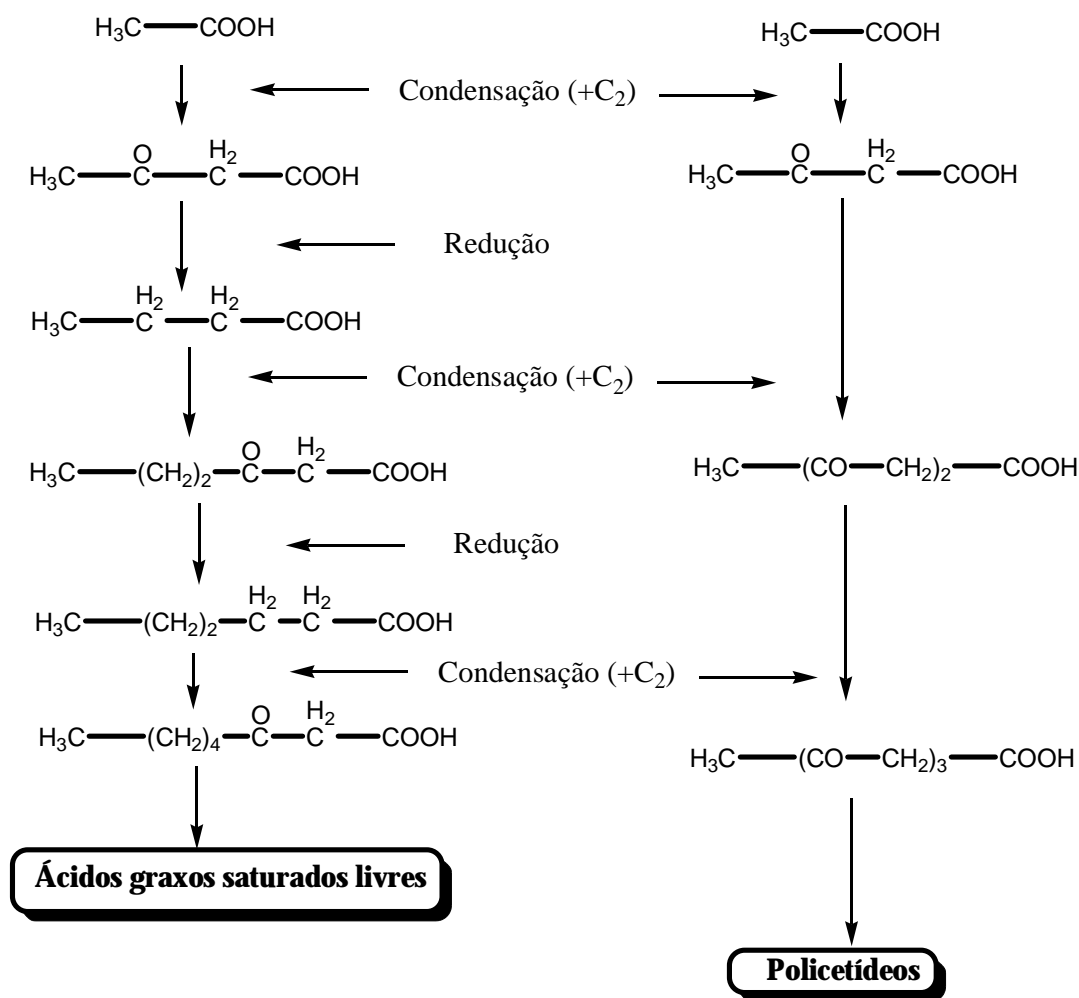
O LCC mais comumente encontrado, no entanto, apresenta uma constituição bem diferente do LCC bruto (*in natura*): 60 a 65% de cardanol (**12-15**), 15 a 20% de cardol (**8-11**) e 10% de materiais poliméricos [KUMAR *et al*, 2002]. Esta é a composição do LCC técnico, obtido na torrefação da castanha de caju, processo que provoca a descarboxilação térmica do ácido anacárdico a cardanol. Daí a predominância de cardanol na composição deste tipo de LCC [PARAMASHIVAPPA *et al*, 2001; KOZUBEK e TYMAN, 2005].

Vários estudos demonstram que estes compostos apresentam atividade bactericida sobre cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* [TYMAN e VISANI, 1997; MUROI e KUBO, 1996], além de propriedades moluscicida [SULLIVAN *et al*, 1982], antimicrobiana [Ref 1: KUBO *et al*, 1993] e antitumoral [Ref. 2: KUBO *et al*, 1993]. Possuem ainda atividade antimicrobiana para *Streptococcus mutans*, o microrganismo causador da cárie dental. Pesquisas visando a utilização do ácido anacárdico (**4-7**) em produtos de higiene oral estão sendo desenvolvidas [KOZUBEK e TYMAN, 1999].

As substâncias que constituem o líquido da castanha do caju (LCC) são importantes não somente pelas suas bioatividades, mas também pela grande aplicação comercial encontrada. O LCC técnico é usado na fabricação de importantes produtos industriais como o cimento [MENON *et al*, 1985], pinturas e vernizes como principais aplicações na indústria de polímeros [PARAMASHIVAPPA *et al*, 2001] e é

também uma resina altamente resistente à ação da acidez de óleos minerais, ácidos e bases [KNOP e SCHEIB, 1979].

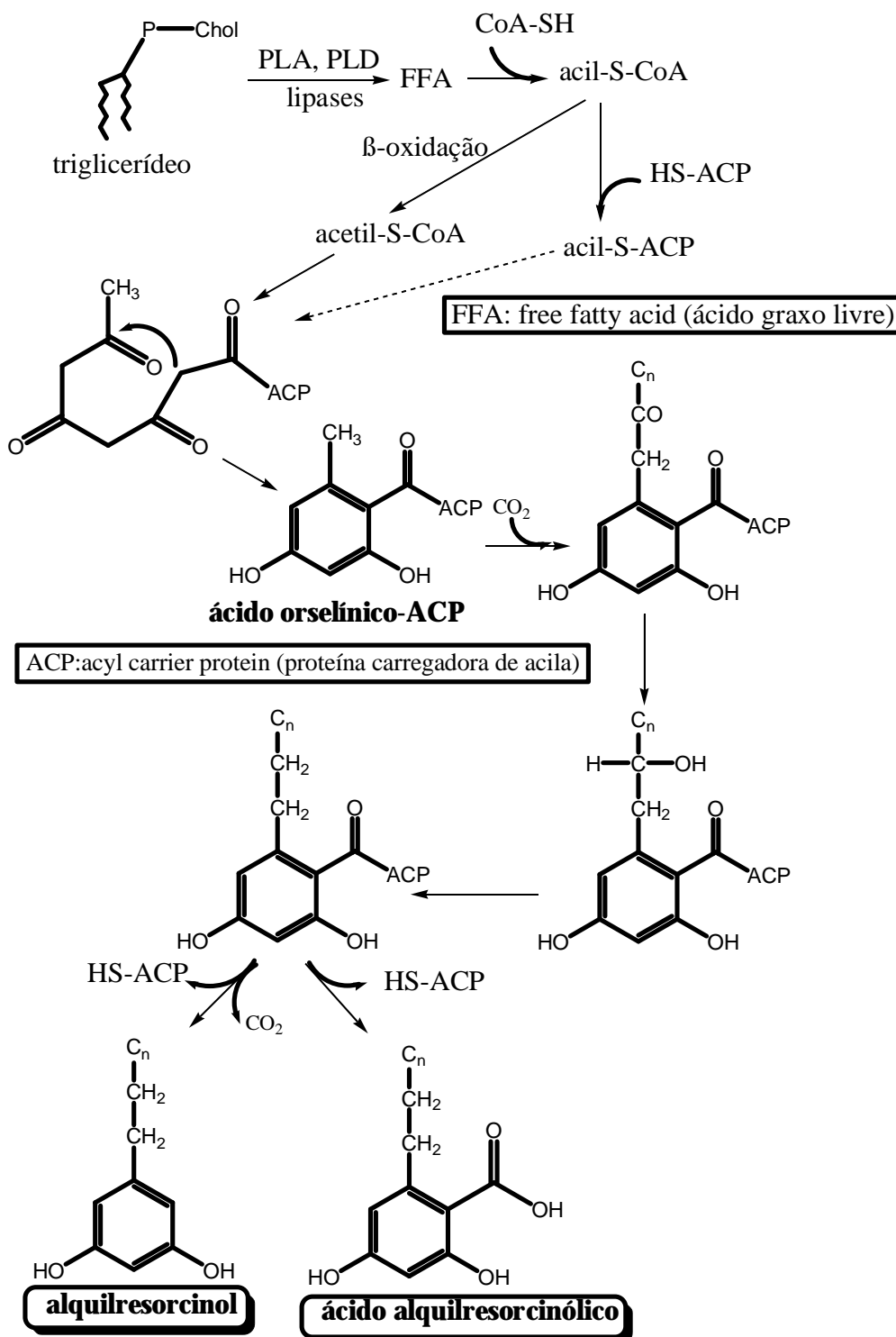
A biossíntese de lipídeos resorcinólicos ocorre nas células através da via acetogênica ou policetídic, postulada há mais de cem anos. Os compostos chamados de policetídeos são provenientes de cadeias policetometilênicas, $-(\text{CH}_2\text{-CO})_m-$, e portanto há uma grande semelhança entre a biossíntese de ácidos graxos e policetídeos, porque em ambos os casos a formação de longas cadeias lineares ocorre pela adição de diversas unidades de dois carbonos, derivados de ácido acético e formas ativas de acetil-S-CoA e malonil-S-CoA [KOZUBEK e TYMAN, 1999]. Para os policetídeos, não há etapas de redução, conforme mostra o esquema 1.



Esquema 1: Biossíntese de ácidos graxos saturados livres e policetídeos

A formação da estrutura anelar a partir de poli- -cetoácidos ocorre através de condensação intramolecular, em razão dos seus grupos metilênicos (potencialmente nucleófilos) e grupos carbonila (potencialmente eletrófilos). A biossíntese de alquilresorcinóis requer ainda a alongação da cadeia lateral

seguida de descarboxilação, para formar esta cadeia com um número ímpar de carbonos [KOZUBEK e TYMAN, 1999]. Enzimas do tipo lipase transformam os triglicerídeos em ácidos graxos livres, conforme mostra o esquema 2.



Esquema 2: Biossíntese de alquilresorcinóis e ácidos alquilresorcinólicos

1.2. As Citosporonas, uma nova classe de lipídeos resorcinólicos não-isoprênicos

Em 2000, pesquisadores norte-americanos isolaram e identificaram cinco novos octacetídeos a partir de dois tipos de fungos endofíticos: *Cytospora* sp. (CR200) e *Diaporthe* sp. (CR146). Os fungos foram coletados em tecidos das plantas *Conocarpus erecta* e *Forsteronia spicata*. Essas novas substâncias provenientes de fungos foram caracterizadas por cristalografia de raio-X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), e nomeadas de **citosporonas A (16)**, **B (17)**, **C (18)**, **D (19)** e **E (20)** [BRADY *et al.*, 2000]. Elas apresentam notável semelhança estrutural, e possivelmente são produzidas a partir das mesmas rotas biossintéticas (figura 7).

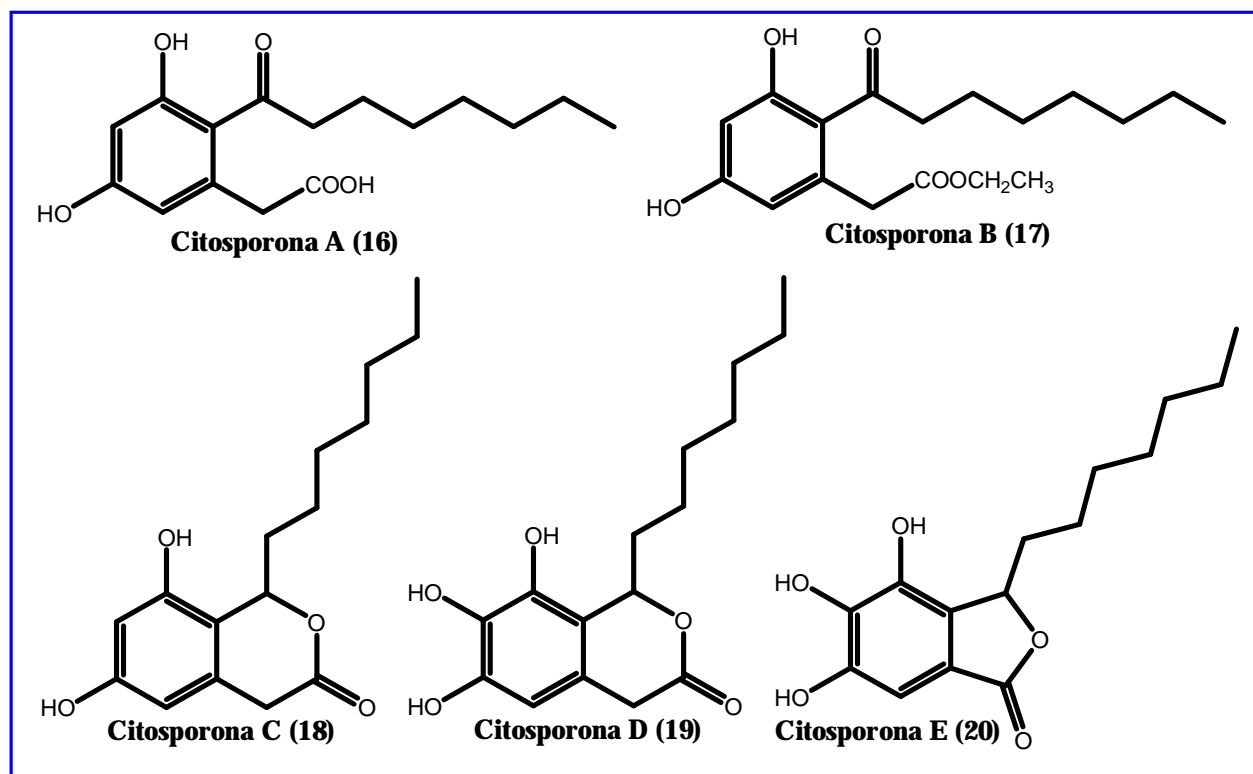


Figura 7: As citosporonas A-E (16-20)

As citosporonas D (19) e E (20) apresentaram atividade bactericida para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, além de atividade fungicida para *Candida albicans*, enquanto a citosporona C (18) não foi ativa contra estes microrganismos. A presença de uma terceira hidroxila fenólica na estrutura das citosporonas D (19) e E (20) foi considerado fator determinante para estas atividades biológicas, pois a citosporona C (18) contém apenas duas hidroxilas fenólicas e não inibiu o desenvolvimento destes microrganismos [BRADY *et al.*, 2000]. O método empregado para os testes foi a diluição direta e o controle positivo utilizado foi o antibiótico gentamicina (tabela 1), cuja estrutura química está representada na figura 8.

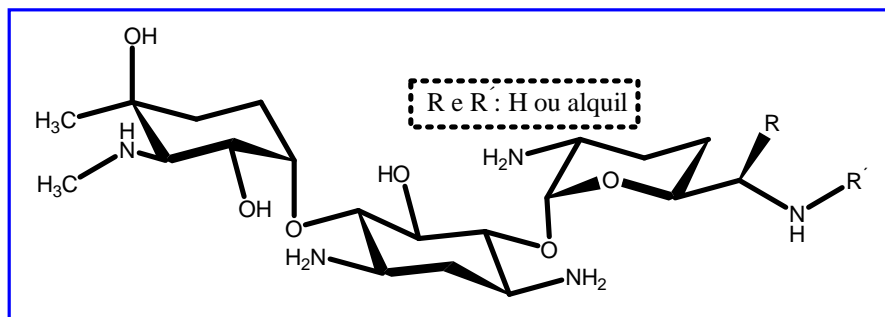


Figura 8: Estrutura química da gentamicina

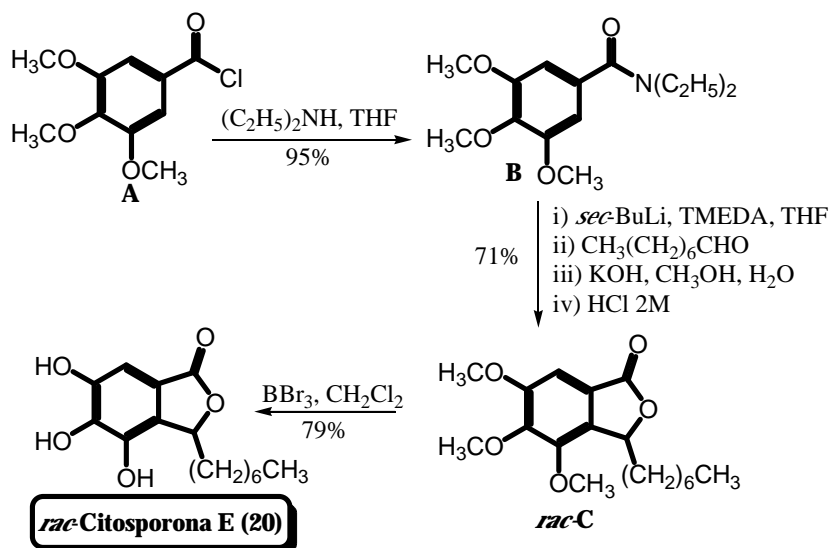
Tabela 1: Atividade antibiótica para as citosporona D (19) e E (20) [BRADY *et al*, 2000]

Concentração mínima inibitória (CMI) em µg/mL			
Fungo (f) e Bactérias (b)	Citosporona D (19)	Citosporona E(20)	Gentamicina (controle)
<i>Candida albicans</i> (f)	4	4	>128
<i>Staphylococcus aureus</i> (b)	8	8	2
<i>Enterococcus faecalis</i> (b)	8	8	16
<i>Escherichia coli</i> (b)	64	64	2

Estes resultados de atividade antibiótica logo despertaram o interesse científico pela síntese da citosporona E (20). Na busca por novos agentes antibióticos, a primeira síntese desta molécula ocorreu em 2003, quando uma dupla de cientistas japoneses, Ohzeki e Mori, preparou em laboratório a forma racêmica da citosporona E (20), bem como os seus enantiômeros puros, alegando que Brady e colaboradores haviam isolado dos fungos *Diaporthe* sp. e *Cytospora* sp. somente a forma racêmica da substância.

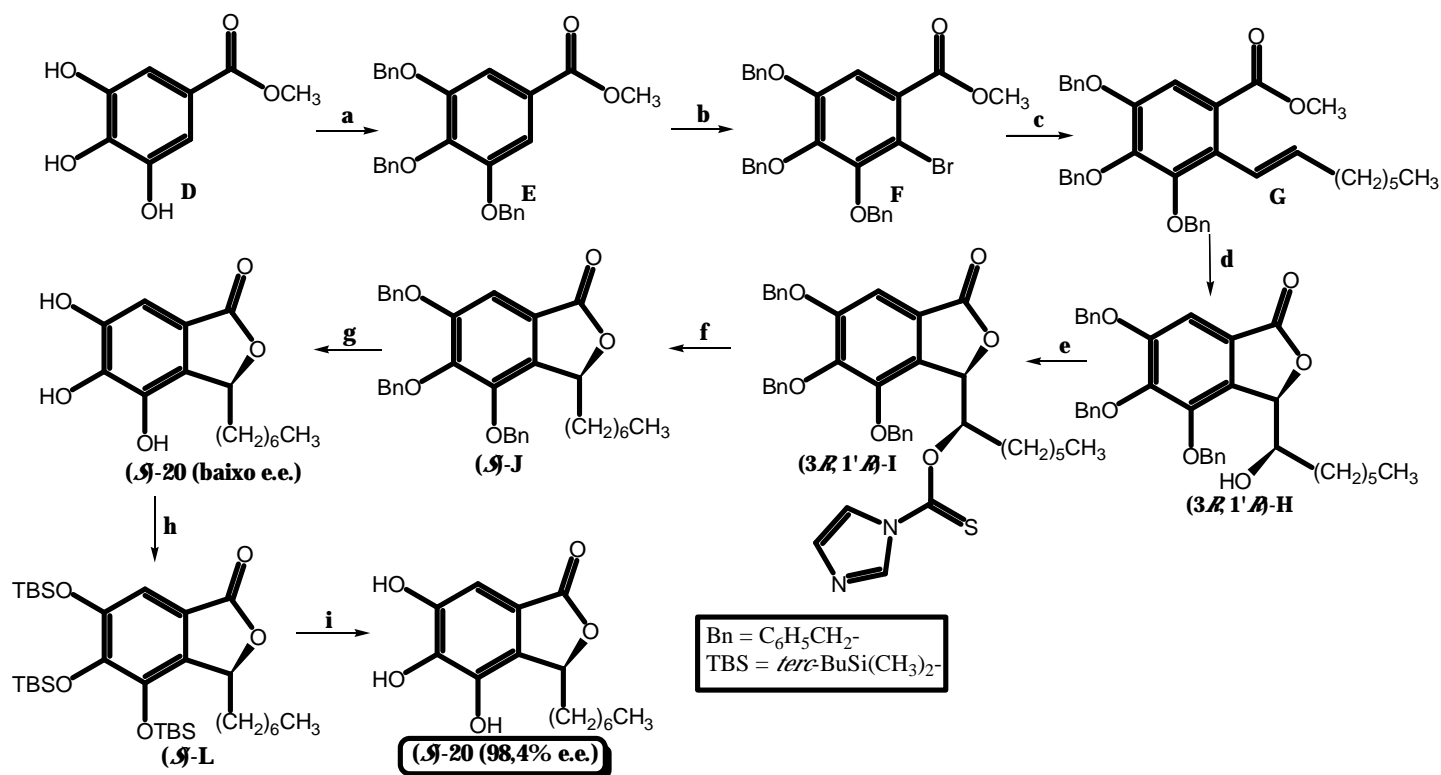
1.2.1. A primeira síntese da citosporona E (20)

Para a síntese racêmica da citosporona E (20), o cloreto de ácido **A** foi convertido na amida **B** com dietilamina em tetraidrofurano (THF). A amida **B** foi tratada com *sec*-butil-lítio na presença de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TMEDA) e reagiu com octanal. Posterior tratamento com base (KOH) em metanol, água e solução aquosa de ácido clorídrico forneceu o racemato **C**. A reação de desmetilação total com brometo de boro em diclorometano foi a etapa final para a síntese da citosporona E (20) racêmica [OHZEKI e MORI, 2003]:



Esquema 3: Síntese racêmica da citosporona E (20) [OHZEKI e MORI, 2003]

Por outro lado, a síntese assimétrica da citosporona E (20) foi mais difícil do que havia sido planejado, porque reações intermediárias, cujos produtos deveriam ser enantiomericamente puros, através do uso de reagentes quirais comerciais, forneceram baixos graus de excesso enantiomérico. Este problema foi evidenciado na reação de dihidroxilação assimétrica do intermediário **G** com AD-mix-[®], etapa que forneceu apenas 45% de excesso enantiomérico. Além disso, os intermediários quirais **H**, **I**, e **J** não demonstraram nenhuma cristalização, dificultando ainda mais o processo de obtenção de produtos enantiomericamente puros. Felizmente, verificou-se que os enantiômeros do derivado da citosporona E (20) cujas hidroxilas estavam protegidas por grupos *tert*-butildimetilsilila (TBS) poderiam ser facilmente separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna preparativa Chiralcel[®] OD [OHZEKI e MORI, 2003]:



Reagentes: a) BnBr, K_2CO_3 , DMF (96%), b) NBS, DMF (96%), c) $(\Delta)\text{-CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CHB}(\text{OH})_2$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 , $\text{C}_6\text{H}_6/\text{EtOH}$ (5:1) (71% de **G** e 19% de recuperação de **F**), d) AD-mix-[®], $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}_2$, *tert*-BuOH/ H_2O (1:1) (54% de (3*R*,1'*R*)-**H** e 46% de recuperação de **G**), e) 1,1-tiocarbonildiimidazol, CH_2Cl_2 (quantitativo), f) $(n\text{-Bu})_3\text{SnH}$, AIBN, tolueno (90%), g) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$, EtOAc (92%), h) TBSCl, imidazol, DMF (98%), i) (i) Separação por CLAE, (ii) HCl 4M/EtOH (1:5) (40% de (S)-**20** e 58% de recuperação de (S)-**L**)

Esquema 4: Síntese da Scitosporena E (S-20) [OHZEKI e MORI, 2003]

Para a preparação do enantiômero (*R*)-**20** da citosporona E, foi utilizada a mesma rota sintética a partir do intermediário **G**. Em seguida, as três amostras disponíveis, a mistura racêmica e os dois enantiômeros puros da citosporona E (**20**), foram submetidas a testes de atividade biológica com quatro cepas de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, duas cepas de *Aspergillus fumigatus* e *Asp. Flavus* (tabela 2). O controle positivo utilizado foi o Itraconazol[®], cuja estrutura química está representada na figura 9 [OHZEKI e MORI, 2003].

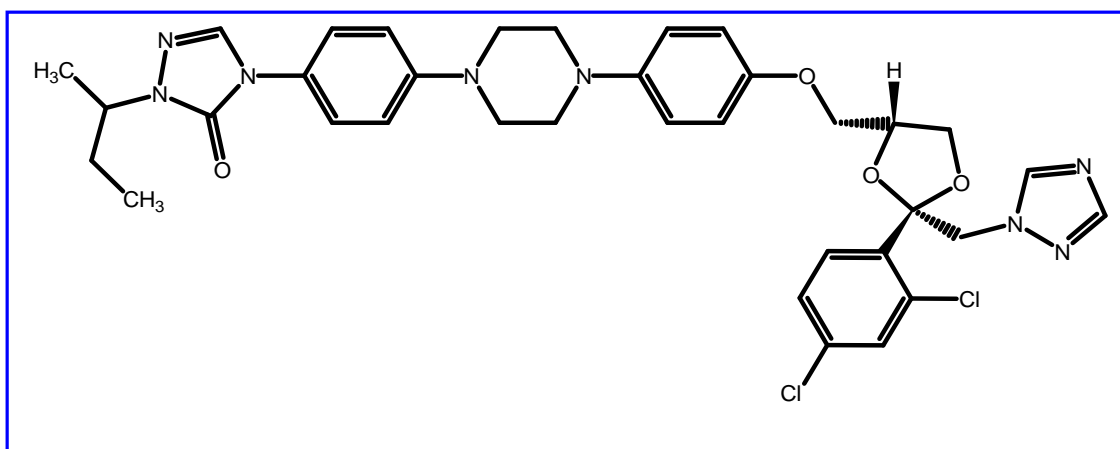


Figura 9: Estrutura química do Itraconazol®

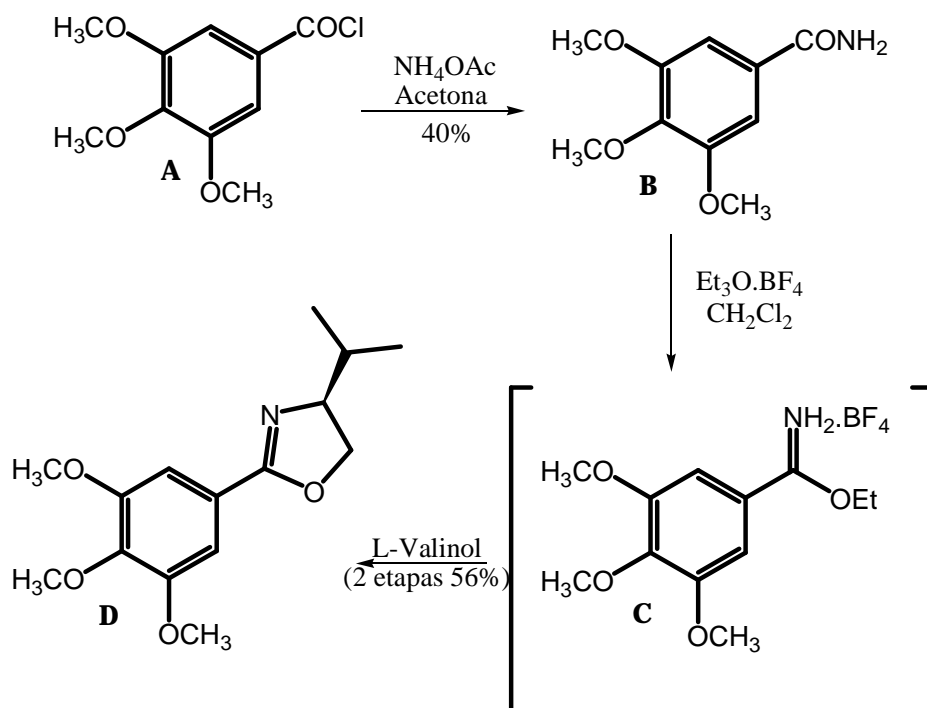
Tabela 2: Atividade antibiótica para a citosporona E ((*rac*)-**20**, (*R*)-**20** e (*S*)-**20**) [OHZEKI e MORI, 2003]

Microrganismos	Concentração mínima inibitória do crescimento (CMI) em µg/mL			
	(<i>rac</i>)- 20	(<i>S</i>)- 20	(<i>R</i>)- 20	Itraconazol®
<i>Candida albicans</i> ATCC24433	>8	>8	>8	0,125
<i>Candida albicans</i> SANK51486	>8	>8	>8	0,031
<i>Candida albicans</i> TIMM3164	8	8	8	0,25
<i>Candida albicans</i> TIMM3164	>8	>8	>8	1
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC90018	>8	>8	>8	0,125
<i>Candida glabrata</i> ATCC90030	4	4	4	1
<i>Candida krusei</i> ATCC6258	8	8	8	0,25
<i>Candida tropicalis</i> ATCC750	>8	>8	>8	0,5
<i>Cryptococcus neoformans</i> TIMM1855	>8	>8	>8	0,25
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC26430	>8	>8	>8	0,25
<i>Aspergillus fumigatus</i> SANK10569	>8	>8	>8	0,25
<i>Aspergillus flavus</i> SANK18497	>8	>8	>8	0,5

Apesar do fato da citosporona E (**20**) já ter sido relatada como um forte agente antibiótico [BRADY *et al*, 2000], as amostras sintéticas deste trabalho foram fracamente ativas contra os microrganismos testados, em comparação com o controle positivo utilizado. A estereoquímica no carbono 3 (C-3) de **20** não influencia a atividade antibiótica, pois os resultados encontrados foram absolutamente iguais, tanto para o racemato ((*rac*)-**20**) como para os enantiômeros puros ((*S*)-**20** e (*R*)-**20**) desta substância. A bioatividade da citosporona E (**20**) não depende da configuração absoluta do carbono quiral da molécula [OHZEKI e MORI, 2003].

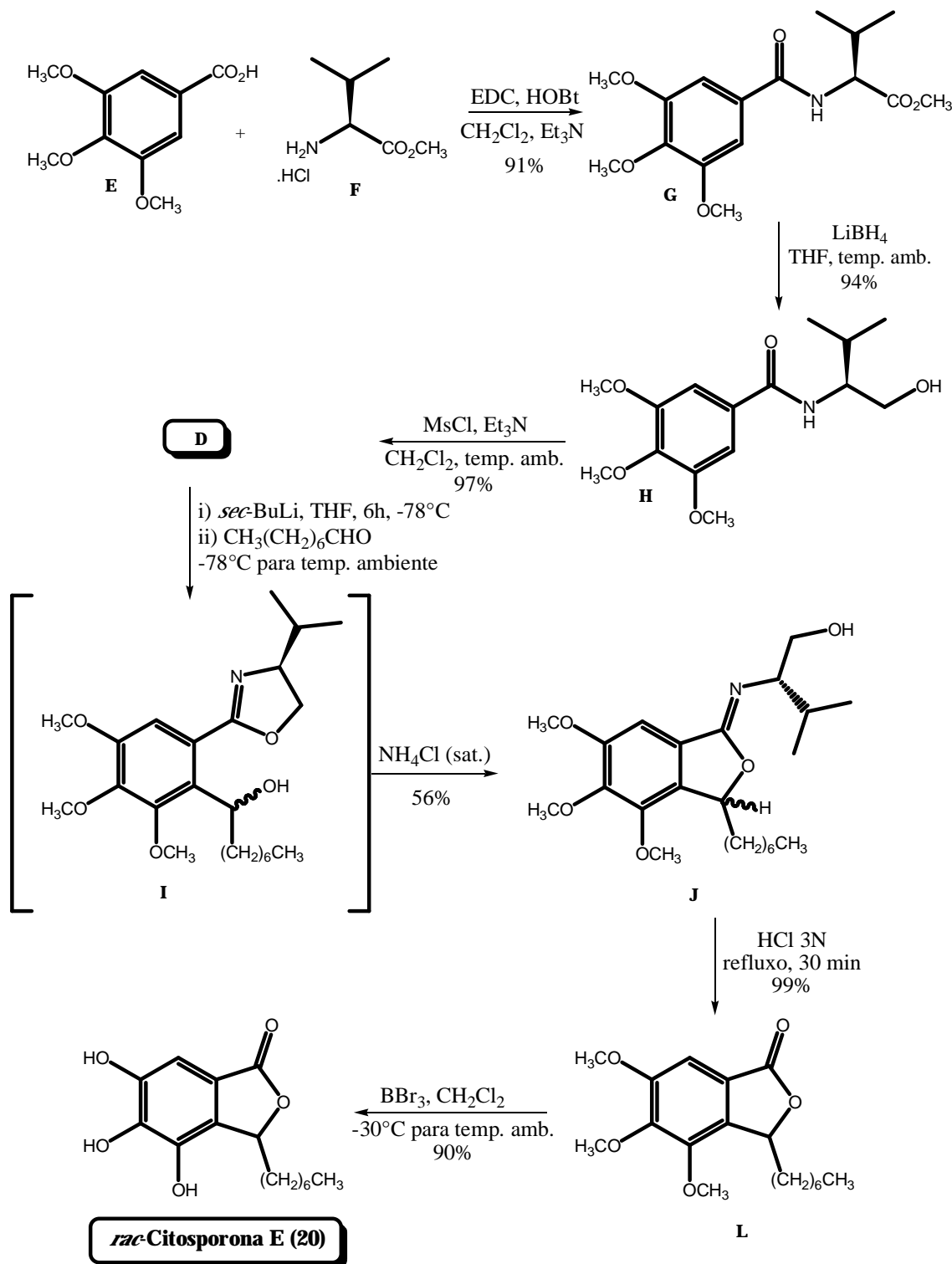
1.2.2. A segunda síntese da citosporona E (20)

A segunda síntese da citosporona E (**20**) ocorreu dois anos depois, em 2005. Pesquisadores norte-americanos desenvolveram uma nova síntese racêmica desta substância, gerando, portanto, somente o racemato da mesma. Esta síntese é baseada no uso do reagente de Meyers para *orto*-alquilação de oxazolinas aromáticas quirais, sendo esta a etapa-chave da síntese para formar o esqueleto ftálico da citosporona E (**20**). Inicialmente, a formação da oxazolina aromática foi feita através do éster imidato **C**. O cloreto de ácido **A** reagiu com acetato de amônio para formar a amida **B**, a qual foi tratada com o reagente de Meerwein ($\text{Et}_3\text{O} \cdot \text{BF}_4$) para formar o intermediário **C**. Na última etapa, a reação com L-valinol rendeu a oxazolina quiral **D** (esquema 5) [HALL *et al*, 2005].



Esquema 5: Síntese da oxazolina D, um intermediário na síntese da citosporona E (20) [HALL *et al*, 2005]

Com um rendimento global de apenas 29%, obtido na síntese em questão, a preparação da oxazolina **D** foi revisada e planejada de maneira diferente. Então, o ácido aromático **E** foi acoplado com o éster metílico de L-valina **F** para produzir o éster **G**. A redução do éster gerou o álcool **H**, cuja ciclização com cloreto de mesila e trietilamina produziu a oxazolina **D** (esquema 6). O rendimento global dessas três etapas foi de 83%, quase três vezes maior do que o rendimento obtido na primeira síntese da oxazolina **D** [HALL *et al*, 2005]



Esquema 6: Síntese racêmica da citosporona E (20) [HALL *et al*, 2005]

Com o intermediário **D** preparado, foi finalmente realizada a *orto*-alquilação de Meyers com *sec*-butil-lítio à baixa temperatura e com adição de *n*-octanal. Posterior tratamento com solução aquosa de cloreto de amônio rearranjou o intermediário **I** para uma mistura equimolar dos diastereoisômeros da

imina lactona **J**. Nesse caso, métodos mais eficientes seriam estudados para aumentar o rendimento dessa etapa e promover a sua diastereosseletividade. A hidrólise ácida e a reação de desmetilação total com brometo de boro em diclorometano foram as etapas finais para a segunda síntese racêmica da citosporona E (**20**) [HALL *et al*, 2005]. Os sinais observados nos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) coincidem com os dados do produto natural. O rendimento global desta síntese, que partiu do ácido aromático **E**, foi de 41%.

Em seguida, a amostra sintética de citosporona E, na sua forma racêmica ((*rac*)-**20**) foi submetida a testes de atividade biológica com bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* e *Citrobacter freundii*) e bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis*). Foi utilizado o método da medida do halo de inibição em disco (tabelas 3 e 4) [HALL *et al*, 2005].

Tabela 3: Atividade antibiótica para a citosporona E ((*rac*)-20**) com bactérias Gram-negativas [HALL *et al*, 2005]**

Bactérias Gram-negativas	Diâmetro da zona de inibição (mm \pm 1mm)		
	μg de Citosporona E (20) por disco:		
	40	60	80
<i>Escherichia coli</i> 25922	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	0	0	0
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (silvestre)	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i> 8090	0	0	0

Tabela 4: Atividade antibiótica para a citosporona E ((*rac*)-20**) com bactérias Gram-positivas [HALL *et al*, 2005]**

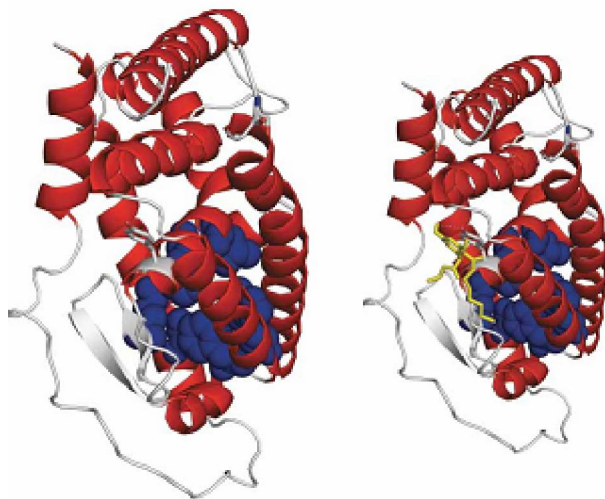
Bactérias Gram-positivas	Diâmetro da zona de inibição (mm \pm 1mm)		
	μg de Citosporona E (20) por disco:		
	40	60	80
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433	10mm	11mm	10mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	13mm	13mm	13mm
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228	13mm	14mm	14mm
<i>Bacillus subtilis</i> (silvestre)	12mm	12mm	11mm

Concluiu-se que, ao contrário do que foi relatado inicialmente [BRADY *et al*, 2000], a citosporona E (**20**) não foi ativa contra as bactérias Gram-negativas, mas apresentou atividade antibiótica para as bactérias Gram-positivas, nas três concentrações testadas [HALL *et al*, 2005].

1.2.3. As funções biológicas da citosporona B (17)

Recentemente, um grupo de pesquisadores chineses usou modelos computacionais para descobrir que a citosporona B (17) é um ligante fisiológico natural do receptor nuclear órfão Nur77. A molécula da citosporona C (18) também foi testada como um ligante natural do receptor nuclear Nur77, mas não apresentou interações favoráveis com o sítio de ligação. Este receptor nuclear tem importantes funções em diversos processos biológicos, no entanto um ligante natural ainda não havia sido identificado. A citosporona B (17) liga-se especificamente ao sítio de ligação do Nur77 e estimula a sua atividade para os genes alvo, incluindo o *Nr4a1*, que contém vários elementos responsáveis por permitir a auto-regulação positiva pela citosporona B (17). Dessa forma, várias funções biológicas foram alteradas positivamente, graças à ação desta molécula no organismo [ZHAN *et al*, 2008].

Foi utilizado um modelo molecular da estrutura cristalina do receptor Nur77 para analisar as suas interações com a molécula da citosporona B (17). Quando a molécula está exatamente no sítio de ligação, observa-se uma ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila do aminoácido Tyr453. A longa cadeia alquílica constitui interações hidrofóbicas com os resíduos hidrofóbicos que estão alinhados na superfície do sítio de ligação do Nur77 (figura 10). Por essa razão, este modelo molecular revelou que o aminoácido Tyr453 está na superfície de um bolso, enquanto os seis resíduos hidrofóbicos, responsáveis por interferir na interação do ligante, estão enterrados dentro desse bolso [ZHAN *et al*, 2008].



A primeira figura mostra a estrutura do sítio de ligação do receptor Nur77. Em cinza, está a estrutura do aminoácido Tyr453. A segunda figura mostra as interações da citosporona B (em amarelo) sobre o sítio de ligação do Nur77. Resíduos hidrofóbicos estão marcados em azul. O modelo foi baseado na mais nova estrutura cristalina do Nur77 (código PDB: 2QW4)

Figura 10: Modelo molecular para o receptor nuclear Nur77 e suas interações com a molécula de citosporona B (17) [ZHAN *et al*, 2008]

1.2.3.1. A citosporona B (17) aumenta o nível de glicose no sangue

O receptor Nur77 eleva as concentrações de glicose no sangue aumentando a expressão do gene gluconeogênico [PEI *et al*, 2006]. Se a citosporona B (17) é um ligante natural deste receptor, espera-se que essa molécula também exerça algum efeito nos níveis de glicose no sangue. Para analisar esta função biológica particular, foram testados os níveis de glicose no sangue em ratos silvestres e outros criados em laboratório. Depois de 16 horas sob atividade física, o nível de glicose no sangue em ratos silvestres caiu para 3,2mM. No entanto, o tratamento com a citosporona B (17) elevou o nível de glicose para 11,4mM nos primeiros 30 minutos e estabilizou-o até a concentração inicial depois de 300 minutos. Para os ratos criados em cativeiro, o aumento no nível de glicose foi menor: de 3,7mM para 5,8mM [ZHAN *et al*, 2008].

Como a insulina atua para reduzir os níveis de glicose no sangue, foi investigado se a citosporona B (17) tem um efeito antagônico à insulina. Em ratos tratados somente com insulina, o nível de glicose no sangue caiu a um terço do nível inicial em trinta minutos, como esperado. No entanto, em ratos tratados com insulina e citosporona B (17), não houve queda no nível de glicose sanguínea, mostrando que os padrões de expressão dos genes gluconeogênicos correlacionados com a concentração de glicose alteram-se em ratos co-tratados com citosporona B (17) e insulina (figura 11) [ZHAN *et al*, 2008].

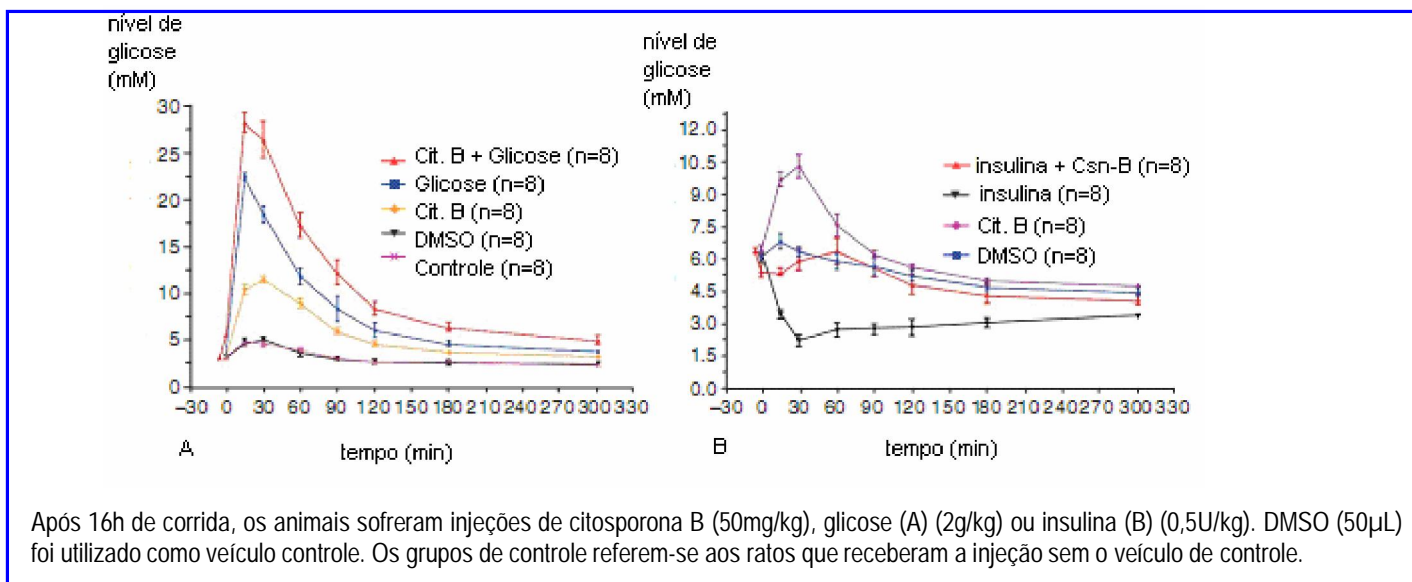


Figura 11: Efeito do tratamento da citosporona B (17) sobre o nível de glicose sanguínea em ratos silvestres [ZHAN *et al*, 2008]

1.2.3.2. A citosporona B (17) induz apoptose celular

Sabe-se que o receptor Nur77 age na indução de apoptose celular, um tipo de auto-destruição celular que ocorre de forma ordenada e demanda energia para a sua execução. Por isso, a citosporona B (17) também foi submetida ao teste de indução de apoptose em células cancerígenas. De fato, a molécula estudada promoveu atividade pró-apoptótica em células gástricas cancerígenas (BGC-823). Foi observado que 63,5% das células tratadas com citosporona B (17) sofreram apoptose em 48 horas. Tal indução de apoptose por esta molécula está intimamente relacionada com a atividade do receptor Nur77, pois a introdução de siRNA neste receptor provocou uma redução de 2,5 vezes na apoptose induzida [ZHAN *et al*, 2008].

Verificou-se também a localização sub-celular do receptor Nur77 em resposta ao estímulo de citosporona B (17). Em 70% das células tratadas, o receptor foi encontrado nas mitocôndrias. Em células que não receberam o tratamento, o receptor nuclear encontra-se exclusivamente no núcleo em 90% destas células. Ou seja, a citosporona B (17) induz a apoptose celular através da re-localização do Nur77 a partir do núcleo para a mitocôndria [ZHAN *et al*, 2008].

1.2.3.3. A citosporona B (17) inibe a proliferação de células cancerígenas e o crescimento tumoral

A ação apoptótica da citosporona B (17), através da ligação com o receptor nuclear Nur77, induziu o estudo de sua atividade anti-câncer em células e tumores. Ensaios com o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio) indicaram que a substância estudada inibiu a proliferação de células gástricas humanas cancerígenas (BGC-823) e células humanas de câncer do cólon (SW620) com mais de 70% de inibição. Porém, o efeito foi moderado em células humanas de câncer de pulmão (H1299) e células humanas do hepatoma (HepG2), com uma inibição ligeiramente maior do que 40%. O efeito foi menor ainda em fibroblastos de rato (NIH3T3), células humanas sadias do fígado (HL-7702) e hepatoblastos (ME-Hep4) de fígado de rato. Portanto, existe um efeito seletivo da citosporona B (17) em células cancerígenas [ZHAN *et al*, 2008].

Para o estudo em tumores, células de câncer do estômago (BGC-823) foram injetadas em ratos. Depois de uma semana, foi dado o início ao tratamento com citosporona B (17), numa dosagem de 13mg/kg, duas vezes por semana. Após quatro semanas de tratamento, os tumores foram removidos para a análise de peso. Paralelamente, outros dois grupos de ratos foram tratados de maneiras diferentes: um grupo recebeu as células cancerígenas contendo siRNA e o receptor Nur77 (si-Nur77) e o outro grupo

recebeu as células com siRNA controle (si-Ctrl) com alterações em dois nucleotídeos. Na amostra normal, verificou-se uma inibição do peso tumoral da ordem de 41,6%. Porém, no grupo de ratos (si-Nur77) administrados com siRNA e o receptor Nur77, a inibição foi de apenas 10,2%, enquanto no grupo de controle (si-Ctrl) esta inibição chegou a 43,6% (tabela 5) [ZHAN *et al*, 2008].

Tabela 5: Efeito da citosporona B (17) sobre o crescimento de tumores em ratos [ZHAN *et al*, 2008]

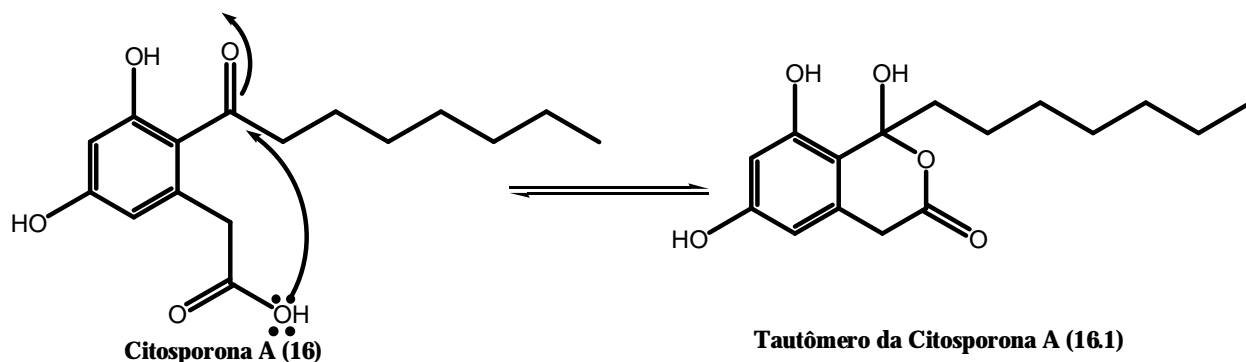
Grupos de ratos	Peso do tumor (g)	Inibição (%)
Nur77; Ctrl	1,86 ± 0,34	
Nur77; Citosporona-B	1,09 ± 0,26	41,6 ($P=0,003$)
si-Nur77; Ctrl	1,77 ± 0,27	
Si-Nur77; Citosporona-B	1,59 ± 0,20	10,2 ($P=0,251$)
si-Ctrl; Ctrl	1,95 ± 0,26	
si-Ctrl; Citosporona-B	1,10 ± 0,20	43,6 ($P=0,002$)

1.2.3.4. A importância da síntese da citosporona B (17)

Zhan e seus colaboradores realizaram diversos outros testes e estudaram com detalhes as funções biológicas da citosporona B (17), isolada, nesse trabalho, do fungo *Dothiorella* sp. Inicialmente, quando as citosporonas foram relatadas pela primeira vez como novos octacetídeos isolados de fungos endofíticos [BRADY *et al*, 2000], nenhuma função ou atividade biológica foi descrita para esta molécula, mas agora podemos enumerar diversas aplicações médicas e terapêuticas, como para o tratamento de hipoglicemia e combate ao câncer, e imaginar a citosporona B (17) como um possível novo candidato a protótipo de fármacos. Diante de tantas aplicações biológicas estudadas, e cuja eficiência foi demonstrada por Zhan e colaboradores, a citosporona B (17) tornou-se um alvo da química orgânica sintética e despertou o nosso interesse pela sua síntese, ainda não relatada na literatura.

1.2.4. A Citosporona A (16), um herbicida natural

Em 1985, pesquisadores russos já haviam isolado a citosporona A (16) de um fungo fitopatogênico, do gênero *Phoma* sp. Nesse estudo, foi descrito também o possível equilíbrio tautomérico da molécula de citosporona A (16). Sua estrutura contendo uma carbonila de cetona (caráter eletrofílico) espacialmente próxima a um grupo carboxila (cuja hidroxila é nucleofílica) favorece a ciclização e forma um anel de lactona de seis membros, semelhante à citosporona C (18). O par de elétrons livres do oxigênio da hidroxila adiciona-se ao carbono da carbonila e as duas formas tautoméricas ficam em equilíbrio natural (esquema 7) [VOBLIKOVA *et al*, 1985].



Esquema 7: O tautomerismo natural da citosporona A (16)

O estudo dos fatores que alteram o crescimento e a germinação de plantas mostrou que a citosporona A (**16**) é um potente inibidor desse processo em baixas concentrações: 3µg/mL. Esta concentração inibe a germinação de 50% das sementes, o que representa uma potencial ação herbicida. Como foi isolada de um fungo fitopatogênico coletado em uma macieira, os autores associaram a citosporona A (**16**) ao mecanismo de infecção e morte da planta [VOBLIKOVA *et al*, 1985].

1.2.4.1. A importância da síntese da citosporona A (16)

A bioatividade da citosporona A (**16**) naturalmente requer estudos mais específicos, tais como a realização de testes de atividade alelopática, inseticida e ensaios com a enzima tirosinase. Esses testes biológicos serão realizados no sentido de investigar a potencial ação pesticida de nossos produtos sintéticos. Para isso, estamos interessados também na síntese da citosporona A (**16**), fato inédito na literatura. Esta substância pode ser um novo herbicida natural, possivelmente de baixo impacto negativo ao meio ambiente e facilmente degradável. Este estudo justifica-se pelo importante mercado agrícola do estado de Mato Grosso do Sul, responsável pela produção de oito milhões de toneladas de grãos (fonte: Companhia Nacional de Abastecimento – Conab).

Os herbicidas e outros agrotóxicos comumente utilizados são danosos não somente às pragas agrícolas, mas também ao homem e ao meio ambiente, muitas vezes devido ao uso desenfreado destas substâncias na natureza. Por isso, herbicidas baseados em produtos naturais podem representar uma classe alternativa de novos agroquímicos, com sínteses mais rápidas, eficientes e baratas, atendendo aos padrões da Química Fina, e cujos produtos sejam potencialmente menos tóxicos à natureza.

1.2.5. A importância da síntese da citosporona C (18)

Embora a citosporona C (18) não tenha sido relatada como agente antibiótico no primeiro estudo das citosporonas A-E (16-20) [BRADY *et al*, 2000], é importante verificar se ela apresenta outros tipos de atividades biológicas, inseridas no programa de objetivos do presente trabalho: atividades inibitória da enzima tirosinase, alelopática e inseticida sobre *Aedes aegypti*. Não há dados na literatura sobre tais ensaios biológicos para a citosporona C (18), nem sobre a sua síntese. Portanto, temos interesse em realizar a primeira síntese total da citosporona C (18) e proceder a sua avaliação biológica, para a elaboração de um trabalho inédito.

1.3. Atividades biológicas

Com os produtos obtidos em nosso trabalho de síntese, planejamos realizar os seguintes testes biológicos, visando justamente o estudo do potencial pesticida das moléculas.

1.3.1. Atividade alelopática – ensaio de inibição da germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface)

Em um ecossistema, as plantas competem constantemente por recursos, tais como: luz, água, macro e micro-nutrientes. Na competição por estes recursos, muitas delas têm adotado várias estratégias químicas para adquirir maior proporção destas fontes disponíveis. Dentro de um contexto geral, a estratégia associada com a produção de compostos químicos por uma planta é denominada alelopatia, a qual representa uma competição química e pode ser usada tanto pela fauna terrestre quanto aquática. Agentes alelopáticos ou aleloquímicos são os compostos químicos aos quais é associada a atividade alelopática. Uma vez liberados para o meio ambiente pelas plantas doadoras, os compostos alelopáticos entram em contato com as plantas receptoras por um mecanismo muito sutil e difícil de determinar corretamente, devido aos sintomas produzidos pelas plantas. Os fatores são freqüentemente secundários na natureza e influenciam os processos fisiológicos e biológicos. Basicamente, reconhece-se que os agentes alelopáticos podem afetar as seguintes funções [YUNES e CALIXTO, 2001]:

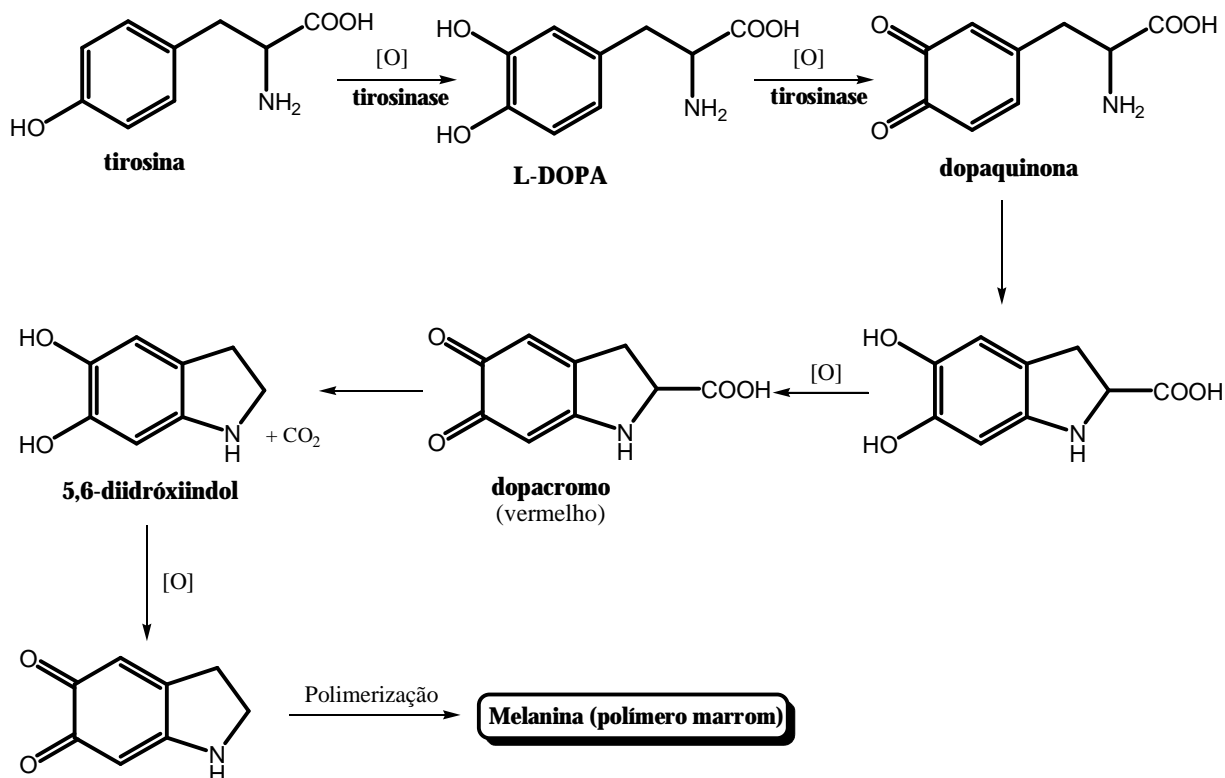
- a) absorção de nutrientes;
- b) regulação do crescimento;
- c) fotossíntese;
- d) respiração;

- e) permeabilidade da membrana;
- f) síntese protéica e
- g) atividade enzimática.

Para determinar se um composto possui atividade alelopática, é necessário realizar um bioensaio. E o bioensaio mais usado para testar a atividade alelopática é a inibição, ou, algumas vezes, a estimulação da germinação de sementes de espécies silvestres ou de culturas, visto que o agente alelopático pode influenciar tanto positiva como negativamente nas funções biológicas ou fisiológicas da planta. Avaliam-se neste experimento os comprimentos da radícula e do hipocótilo. O teste de atividade alelopática é fundamental para avaliar se um composto químico pode apresentar atividade herbicida. Produtos naturais são uma fonte atrativa de aleloquímicos e, conseqüentemente, modelos de herbicidas naturais [YUNES e CALIXTO, 2001].

1.3.2. Atividade anti-tirosinase

A tirosinase é uma enzima presente tanto em animais como em vegetais, e tem papel fundamental em algumas funções biológicas. Apresenta dois tipos de atividades: a monofenolase catalisa a *orto*-hidroxilação, e a difenolase catalisa a oxidação de difenóis a quinonas. Em animais, a enzima catalisa a etapa limitante na biossíntese de melanina: faz a hidroxilação de L-tirosina à 3,4-diidróxi-L-fenilalanina (L-DOPA) e subseqüente oxidação à dopaquinona, dentro dos melanócitos. A dopaquinona resultante sofre um rearranjo rápido e espontâneo conduzindo a dopacromo e finalmente ao polímero melanina (esquema 8).



Esquema 8: Biossíntese da melanina, catalisada pela enzima tirosinase

O processo de biossíntese da melanina é um dos fatores mais importantes que determinam a cor da pele e do cabelo de mamíferos e a formação da cutícula dos insetos. Alterações na rota biossintética têm papel importante em hiperpigmentação local como, por exemplo, os distúrbios da pele melasma, efelídeo e lentigo. Compostos inibidores da biossíntese de melanina podem ser úteis não somente em produtos cosméticos como agentes branqueadores da pele, mas também como medicamentos para distúrbios de pigmentação e no controle de insetos [MATSUBARA *et al*, 1997]. Como a enzima tirosinase age também na formação do exoesqueleto dos insetos, é possível que o agente químico com atividade específica anti-enzimática seja inclusive um inseticida.

1.3.3. Atividade inseticida

1.3.3.1. Mosquito da dengue (*Aedes aegypti*)

O Brasil é um país essencialmente tropical, quente e úmido na maior parte do ano e em quase todas as regiões, e está sujeito a doenças típicas de estações chuvosas, como a dengue. A dengue já se tornou um dos mais graves problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que entre 50 e 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países, de todos os

continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue.

No Brasil, o mosquito vetor *Aedes aegypti* foi reintroduzido em 1976 e o avanço da doença não conseguiu ser controlado com os métodos tradicionalmente empregados no combate às doenças transmitidas por vetores. Programas essencialmente centrados no combate químico, com baixíssima ou mesmo nenhuma participação da comunidade, sem integração intersetorial e com pequena utilização do instrumental epidemiológico mostraram-se incapazes de conter um vetor com altíssima capacidade de adaptação ao novo ambiente criado pela urbanização acelerada e pelos novos hábitos (fonte: www.saude.gov.br; 23/10/08).

A dengue é uma doença infecciosa, aguda e de curta duração, de gravidade variável, podendo ser fatal na ausência de tratamento. É causada por um arbovírus, do gênero *Flavivírus* (tipos 1, 2, 3 e 4). No Brasil, circulam os vírus do tipo 1, 2 e 3. O vírus 3 está presente desde dezembro de 2000 e foi isolado em janeiro de 2001, no Rio de Janeiro [NOGUEIRA *et al*, 2001]. A doença é transmitida através da picada do mosquito *Aedes aegypti*, portador do vírus da dengue (figura 12). As epidemias geralmente ocorrem no verão, durante ou imediatamente após os períodos chuvosos, porque o mosquito precisa de água limpa e parada para pôr seus ovos. A transmissão da dengue é mais comum em cidades. Também pode ocorrer em áreas rurais, mas é incomum em locais com altitudes superiores a 1200 metros.



Figura 12: Mosquito *Aedes aegypti*, transmissor do vírus da dengue

Com nossas amostras sintéticas, os testes serão realizados diretamente com as larvas do mosquito *Aedes aegypti*, para verificar, dessa forma, as suas atividades larvicidas. Um agente larvicida elimina o mosquito em sua etapa inicial de vida, ao contrário dos inseticidas dispersados pelos veículos popularmente conhecidos como “fumacê”, letais para o inseto adulto e inofensivos para os criadouros.

1.3.3.2. Gorgulho-do-milho (*Sitophilus zeamais*)

Atualmente, entre algumas das pragas agrícolas existentes, o gorgulho-do-milho (*Sitophilus zeamais*) destaca-se como uma das mais importantes associadas aos grãos armazenados no Brasil (figura 13). O inseto possui grande número de hospedeiros, elevado potencial biótico, capacidade de penetração na massa de grãos e possibilidade de infestação tanto no campo como nas unidades de armazenamento, ocasionando danos principalmente aos grãos de milho, arroz e trigo [GALLO *et al*, 2002]. Os prejuízos são diversos: redução severa do peso dos grãos, depreciação do valor comercial do produto e redução do seu valor nutricional, atuando ainda como agente disseminador de fungos, favorecendo a deterioração do produto armazenado, em razão do aumento da umidade e da temperatura da massa de grãos, devido ao próprio metabolismo dos insetos [POTENZA *et al*, 2004].



Figura 13: Gorgulho-do-milho (*Sitophilus zeamais*)
à esquerda (detalhe); à direita (orifícios no grão)

O uso de inseticidas de origem vegetal tem direcionado as pesquisas atuais com relação ao controle de pragas de grãos armazenados. Os produtos químicos disponíveis no mercado agrícola para esse tipo de controle são utilizados indiscriminadamente e acumulam resíduos tóxicos nos grãos que, por fim, chegam até a mesa do consumidor. Por isso, é fundamental a pesquisa e a síntese de novos inseticidas naturais.

1.4. Agroquímicos: agentes bioativos, do laboratório para o campo e para a cidade

Herbicidas e inseticidas são dois tipos de agroquímicos, pesticidas ou defensivos agrícolas. O decreto 4074, de 4 de janeiro de 2002, em seu artigo 1º, inciso IV define os agroquímicos como:

“Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Os herbicidas, produtos destinados a eliminar ou impedir o crescimento de ervas daninhas a uma cultura majoritária, respondem por metade (50%) do mercado mundial de agroquímicos [MARTINS, 2000]. Isso ocorre porque foram produzidos herbicidas não-seletivos, ou seja, que atacam qualquer planta concorrente à cultura. Além disso, os herbicidas são mais utilizados em culturas como a soja e o milho, que apresentaram um crescimento significativo de suas áreas plantadas nas últimas décadas [VELASCO e CAPANEMA, 2006]. Já os inseticidas representam 25% do mercado mundial de agroquímicos. Mas o caminho a ser percorrido para uma simples molécula identificada com alguma atividade biológica e que possa ser um princípio ativo de um agroquímico é bastante longo. O setor de agroquímicos é fortemente regulado. As maiores preocupações dizem respeito à preservação da saúde humana e do meio ambiente, por meio de medidas para evitar a contaminação do solo e da água. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), embora sem força impositiva, vem liderando diversos acordos internacionais, propondo e recomendando normas e padronizações de uso e de impacto ambiental para os agroquímicos [VELASCO e CAPANEMA, 2006]. Portanto, se existe tanta regulação no setor, é devido a uma série de motivos. Até meados de 1960, não havia sequer o controle da toxicidade dos novos agroquímicos incorporados ao mercado, produzidos sem nenhum controle regulatório. O diclorodifeniltricloroetano (DDT), um organoalogenado, foi aclamado como agroquímico universal e tornou-se rapidamente o mais utilizado dos novos produtos sintéticos antes mesmo que seus efeitos ambientais fossem estudados e conhecidos [VELASCO e CAPANEMA, 2006]. Hoje se sabe que o DDT é altamente cancerígeno e pode afetar os sistemas nervoso e reprodutor, e seu uso já foi banido em diversos países do mundo, inclusive no Brasil.

Portanto, existe uma rápida necessidade na agricultura para o desenvolvimento de pesticidas sintéticos mais eficazes e seguros. Produtos naturais são uma excelente alternativa para pesticidas sintéticos no sentido de que reduzem impactos negativos à saúde humana e ao meio ambiente [CLARK e OHKAWA, 2005]. Nem todos os produtos naturais são absolutamente atóxicos. Seria um grande erro afirmar isso, embora a toxicidade seja também uma medida relativa. Mas é fato que produto natural é, sim, biodegradável. Produtos sintéticos são estranhos na natureza e podem permanecer ativos por muitos anos. Isso deve ser um marco científico da Química Verde, pois a biodegradabilidade de produtos naturais oferece grandes vantagens em relação aos agroquímicos sintéticos tradicionais, diminuindo impactos negativos à natureza. Outra vantagem dos biopesticidas é a sua especificidade em seus alvos, o que mantém o equilíbrio natural dos ecossistemas.

Objetivos

2. Objetivos

O presente trabalho teve como principais objetivos os seguintes itens:

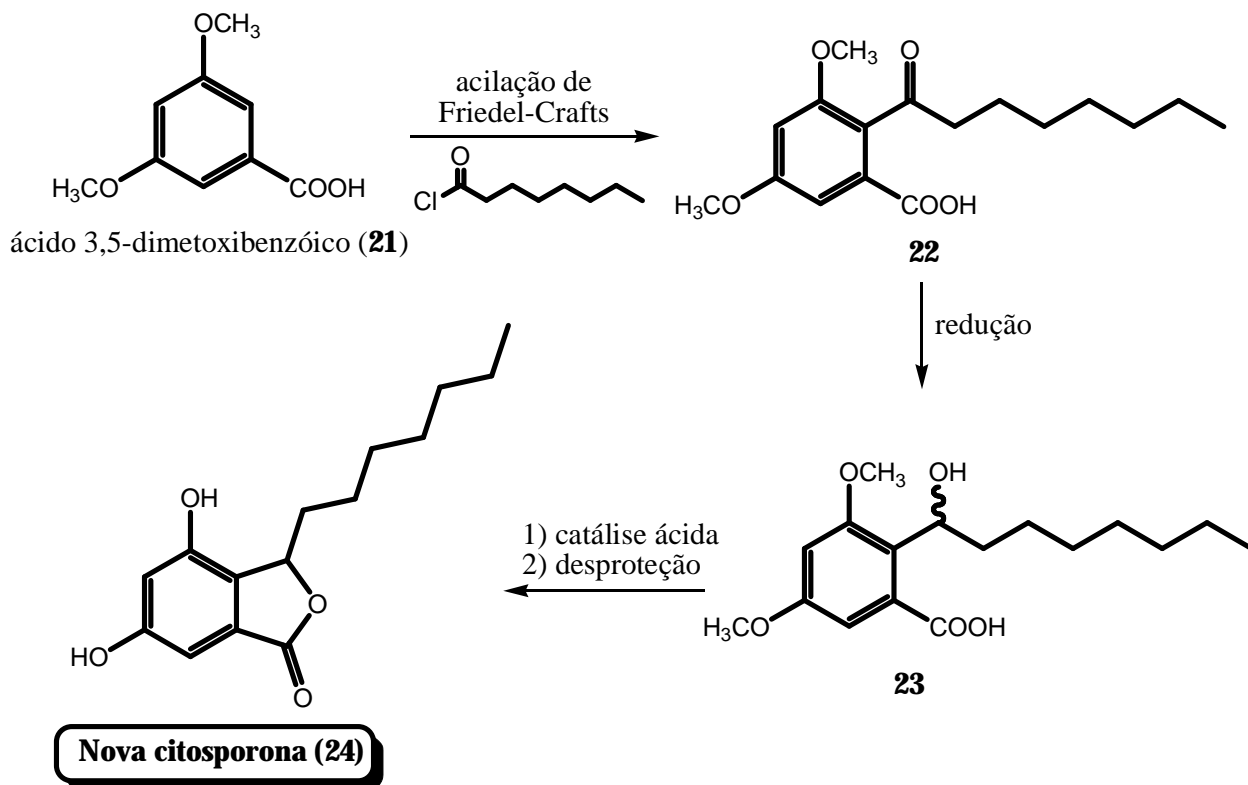
- Elaborar métodos eficientes para a preparação das citosporonas A (**16**), B (**17**) e C (**18**).
- Sintetizar novas citosporonas potencialmente bioativas.
- Avaliar as atividades de alelopatia, inseticida sobre *Aedes aegypti* e inibitória da enzima tirosinase, visando justamente o estudo do potencial pesticida dessas substâncias.
- Inovar na área de agroquímicos.

Resultados e Discussão

3. Resultados e discussão

3.1. Proposta de síntese de uma nova citosporona

Inicialmente, foi planejada a preparação de compostos estruturalmente análogos às citosporonas C (**18**) e E (**20**), uma nova citosporona, através de uma rota de síntese rápida, simples e de baixo custo (esquema 9).



Esquema 9: Proposta de síntese de uma nova citosporona (**24**)

A partir do ácido 3,5-dimetoxibenzóico (**21**), um reagente comercial barato, planejou-se inserir o grupo octanoíla no anel aromático através de uma reação de acilação de Friedel-Crafts, um tipo de substituição eletrofílica aromática. Essa acilação é a etapa chave da síntese proposta. Analisando a estrutura do substrato **21**, observam-se as possibilidades da ocorrência da acilação sob os aspectos de orientação e reatividade. As metoxilas ativam diretamente o anel aromático para reações de substituição eletrofílica, pois doam elétrons por efeito de ressonância, e orientam a substituição nas posições *orto* e *para*, devido ao mesmo efeito. A carboxila, por sua vez, retira elétrons do anel aromático por ressonância e diminui a sua reatividade para substituições eletrofílicas. A orientação de grupos desativantes em reações dessa classe é para posições *meta*, porém elas encontram-se ocupadas, embora o poder orientador da

carboxila seja bem menor do que das metoxilas. A acilação, portanto, certamente ocorrerá nas posições ativadas pelas metoxilas. A figura 14 resume esses efeitos estereoeletrônicos.

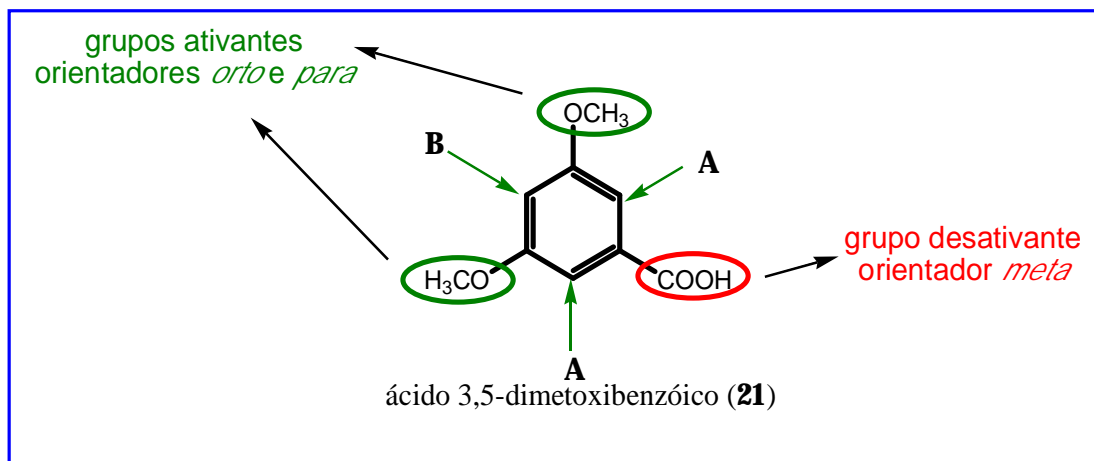


Figura 14: Análise da reatividade e orientação da acilação de Friedel-Crafts para o ácido 3,5-dimetoxibenzoico (21**)**

Diante da análise acima, conclui-se que o substrato **21** possui duas posições **A** equivalentes e uma segunda posição **B** que podem sofrer a reação de substituição eletrofílica aromática. O produto esperado **22** é resultado da acilação na posição **A**. Como existem duas dessas posições, é provável que a acilação ocorra em maior proporção justamente neste sítio reacional, mas também é possível que a reação ocorra na posição **B**. Logo, temos dois produtos possíveis para a reação em questão.

Com o grupo octanoíla inserido na posição desejada, a posterior redução do intermediário **22** gera o álcool correspondente **23**, em sua forma racêmica, que passa ainda pelas etapas de catálise ácida e desproteção para produzir a citosporona **24**.

A estrutura da molécula natural da citosporona natural E (**20**) é semelhante à estrutura da citosporona sintética **24**. A diferença encontra-se unicamente na presença de uma terceira hidroxila fenólica na molécula natural, considerada a região molecular responsável pela sua atividade biológica [BRADY *et al*, 2000]. A citosporona **24** apresenta apenas duas unidades de hidroxilas fenólicas, característica estrutural herdada do material de partida desta proposta sintética, o ácido 3,5-dimetoxibenzoico (**21**).

Outra semelhança notável existe entre as estruturas da citosporona **24** e da citosporona C (**18**). Pode-se afirmar que a citosporona C (**18**) é um homólogo da citosporona **24**, pois a diferença entre as moléculas está no tamanho do anel lactônico: 6 e 5 átomos, respectivamente. A figura 15 mostra as semelhanças entre essas três estruturas químicas.

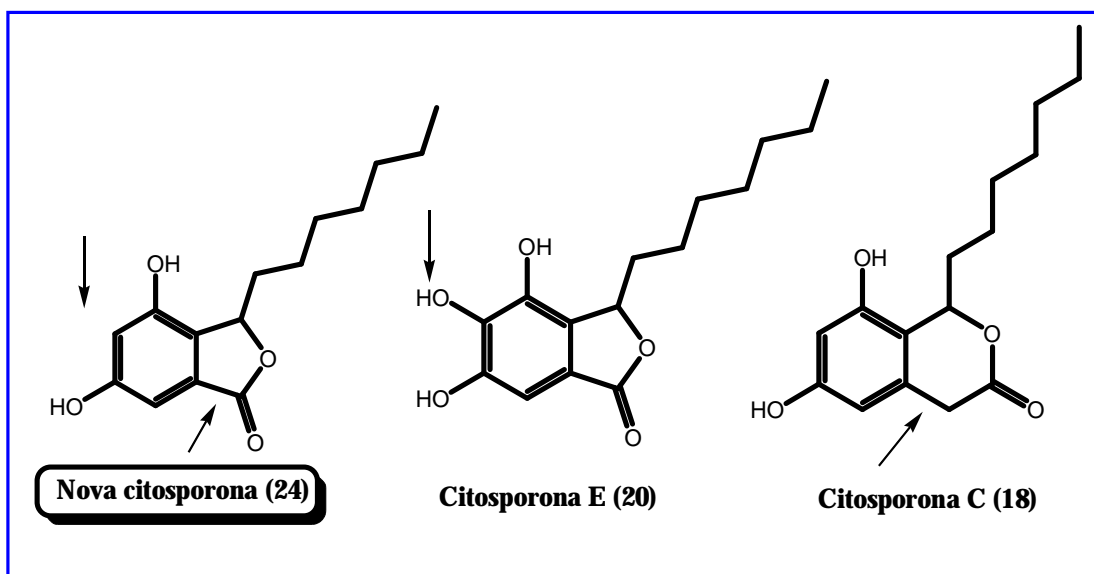


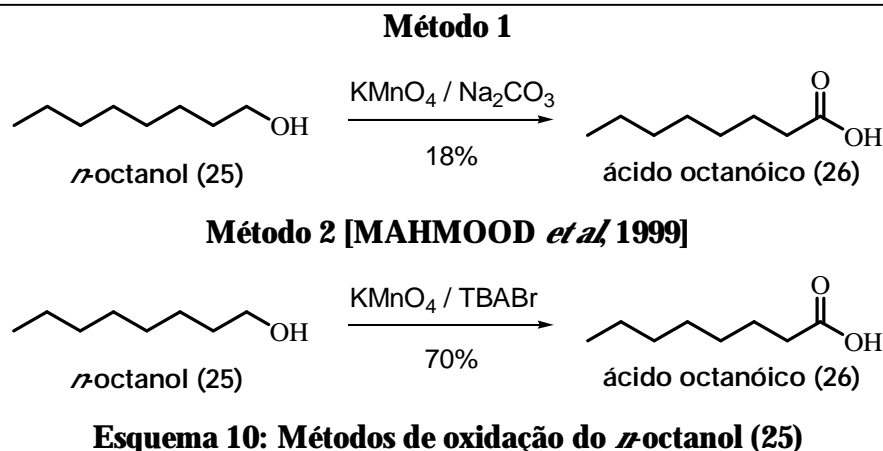
Figura 15: Semelhanças estruturais entre a citosporona 24 e as citosporonas E (20) e C (18)

Seguindo a proposta sintética, para a acilação de Friedel-Crafts, preparamos antes o ácido octanóico, através da oxidação do álcool octílico (25) com solução aquosa de permanganato de potássio (KMnO₄).

3.1.1. Síntese do ácido octanóico (26)

O ácido octanóico (26) foi preparado a partir da oxidação do álcool octílico (*n*-octanol) (25) através de dois diferentes métodos oxidativos: 1) em solução aquosa de permanganato de potássio (KMnO₄) e carbonato de sódio (Na₂CO₃) e 2) em solução aquosa de permanganato de potássio (KMnO₄) e brometo de tetrabutilamônio (TBABr), através de metodologia adaptada [MAHMOOD *et al.*, 1999]. O TBABr é um catalisador de transferência de fase, utilizado neste caso para aumentar a solubilidade de álcoois de cadeia longa em água, agindo como um surfactante.

O primeiro método forneceu um rendimento de apenas 18%. Com o uso do transferidor de fase, o rendimento aumentou em mais de três vezes (70%). Há um aumento considerável no rendimento porque o sal utilizado eleva as interações intermoleculares entre o *n*-octanol (25) e o solvente (água), melhorando assim a sua solubilidade, que é de apenas 0,05g/100mL água. Uma vez solubilizado, o álcool sofre o processo de oxidação a ácido carboxílico (esquema 10).



A reação foi acompanhada através de cromatografia em camada delgada (CCD), que mostrou a formação gradativa do ácido octanóico (**26**). O produto é mais polar que o álcool **25** e apresenta um fator de retenção menor (figura 16).

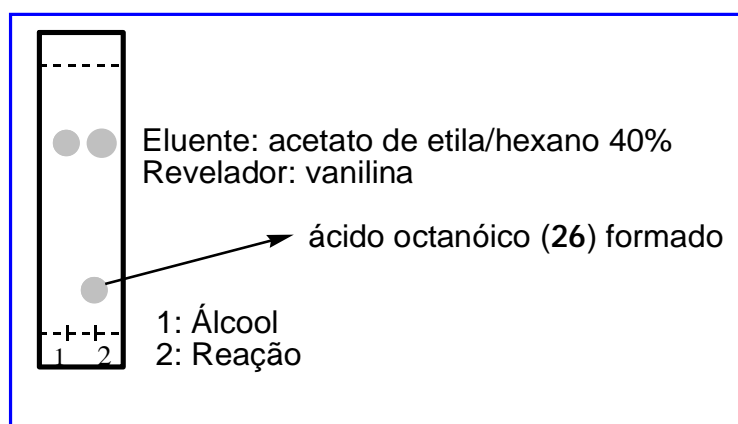
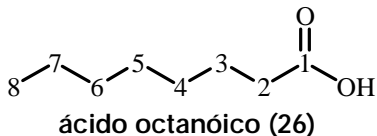


Figura 16: Cromatografia em camada delgada da reação de oxidação do *n*-octanol (25)

Nos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), há sinais característicos que comprovam a oxidação do carbono carbinólico do *n*-octanol (**25**). Para o espectro de RMN de ^1H (Espectro 1), há um sinal de tripleto em δ_{H} 2,38 ppm, aproximadamente, relativo aos hidrogênios metilênicos do carbono- do ácido carboxílico **26**. Para o espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 2), o sinal do carbono da carboxila em δ_{C} 179,2 ppm é outra evidência de ocorrência da oxidação desejada. A ausência dos sinais relativos ao álcool **25** indica um bom grau de pureza do ácido octanóico (**26**). A tabela 6 mostra os valores de deslocamentos químicos observados para este produto.

Tabela 6: Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o ácido octanóico (26). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (CHCl_3) foi usado como referência interna.



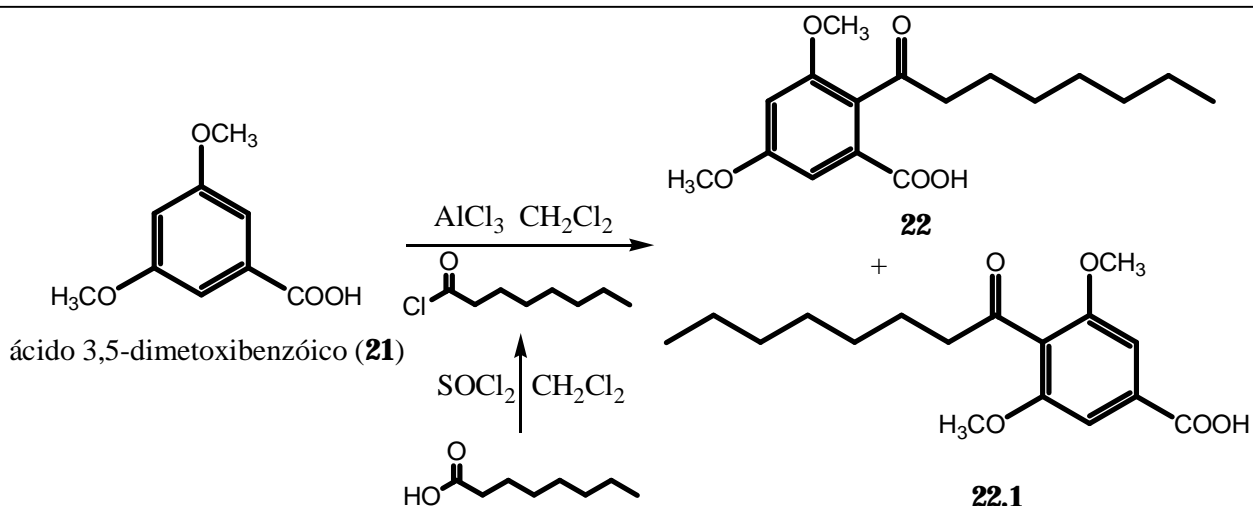
Posição	RMN ^{13}C (ppm)	DEPT-135°	RMN ^1H (ppm)	Multiplicidade
1	179,2	C	-	-
2	33,9	CH_2	2,38	t ($J= 6 \text{ Hz}, 2\text{H}$)
3	31,6	CH_2	1,67	qt ($J= 6 \text{ Hz}, 2\text{H}$)
4	29,0	CH_2	1,20 a 1,40	m (8H)
5	28,9	CH_2	1,20 a 1,40	m (8H)
6	24,7	CH_2	1,20 a 1,40	m (8H)
7	22,6	CH_2	1,20 a 1,40	m (8H)
8	14,0	CH_3	0,91	t ($J= 6,7 \text{ Hz}, 3\text{H}$)

3.2. Síntese de uma nova citosporona

Os reagentes necessários para a reação de acilação de Friedel-Crafts são cloreto de alumínio anidro (AlCl_3), cloreto de tionila (SOCl_2), e o ácido carboxílico **26**, o eletrófilo da reação, além do substrato aromático **21**. Apenas o ácido carboxílico **26** precisava ser preparado. Com todos os reagentes disponíveis e seguindo a proposta de síntese apresentada no esquema 9, foi efetuada a acilação de Friedel-Crafts com o ácido 3,5-dimetoxibenzóico (**21**).

3.2.1. Acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxibenzóico (21)

Conforme análise prévia feita na proposta de síntese da citosporona **24**, a etapa da acilação de Friedel-Crafts do substrato **21** pode gerar até dois produtos isoméricos, como mostra o esquema 11. O cloreto de octanoíla foi preparado no próprio balão da reação, com adição de cloreto de tionila (SOCl_2) ao ácido octanóico.



Esquema 11: Resultado teórico da acilação de Friedel-Crafts para o ácido 3,5-dimetoxibenzóico (21)

Porém, o perfil cromatográfico apresentado pela reação já demonstrava uma mistura de três produtos, pelo menos, além do substrato **21** e do ácido octanóico (**26**). Um desses produtos estava visivelmente mais concentrado, com um fator de retenção elevado, o que caracteriza uma molécula de baixa polaridade relativa (figura 17).

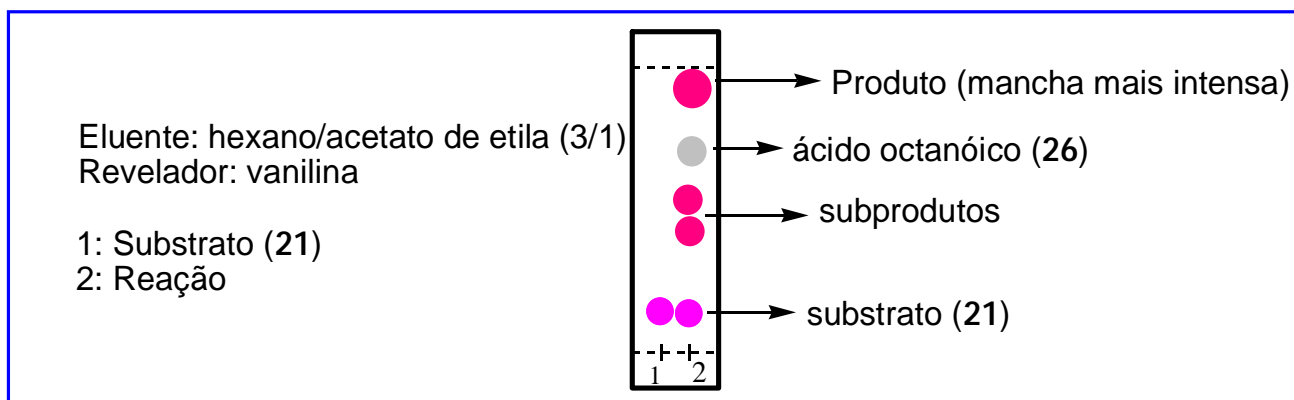
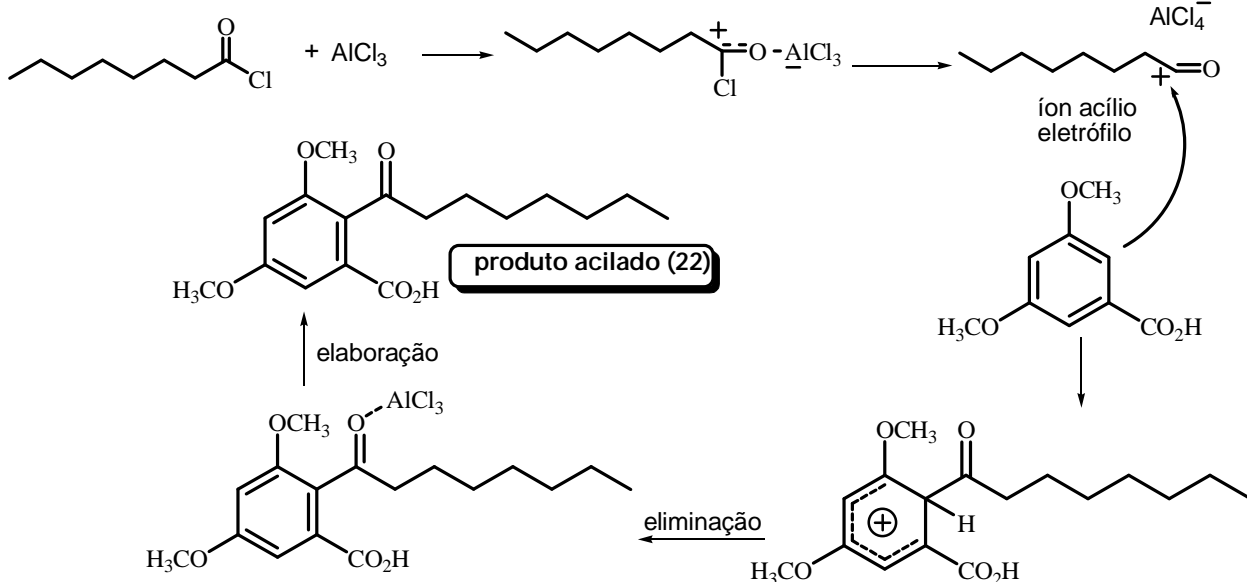


Figura 17: Cromatografia em camada delgada da reação de acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxibenzóico (21)

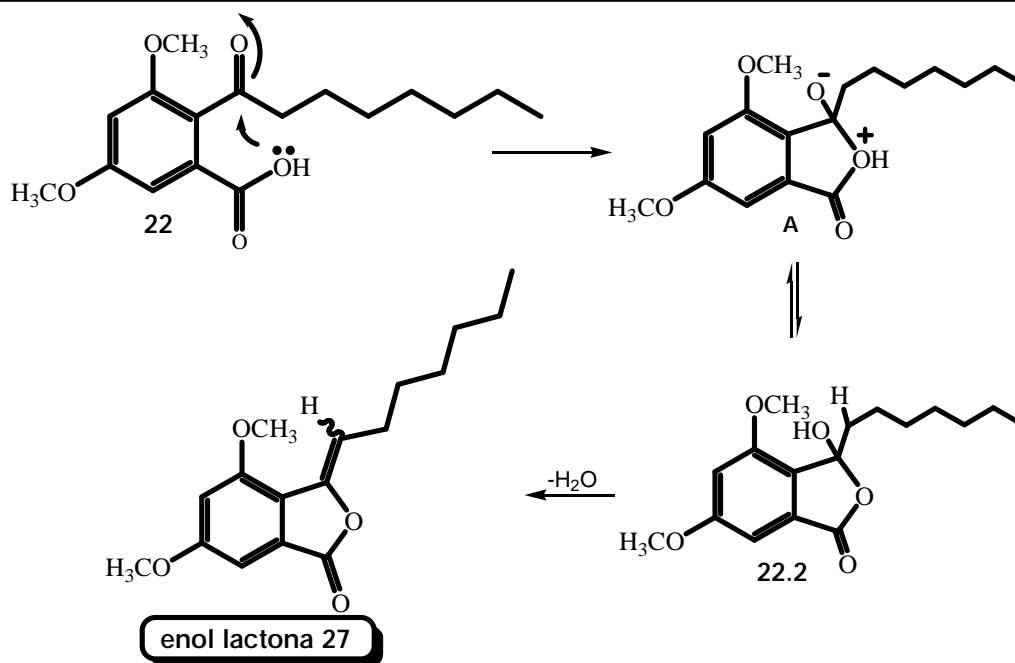
O mecanismo da reação de formação dos produtos acilados é o clássico mecanismo da reação de acilação de Friedel-Crafts. Inicialmente, o ácido de Lewis (AlCl_3) liga-se ao oxigênio da carbonila do cloreto de ácido e, após a eliminação do cloreto, é formado o eletrófilo da reação, o íon acílio. Na seqüência, o substrato aromático, rico em elétrons, ataca o carbono parcialmente positivo do íon acílio. No mecanismo abaixo, está representada a formação do produto **22**, somente, mas é nessa etapa que produtos isoméricos, como o **22.1**, podem também ser produzidos, dependendo da reatividade e orientação do anel aromático para substituições eletrofílicas (esquema 12) [MARCH e SMITH, 2001].



Esquema 12: Mecanismo da reação de acilação de Friedel-Crafts para o ácido 3,5-dimetoxibenzoico (21)

O anel aromático encontra-se deficiente de elétrons, nesse momento, porém a carga é deslocalizada através de formas de ressonância que constituem um híbrido estável. A eliminação de hidrogênio restitui o caráter aromático do anel, mas somente após a elaboração da reação o produto fica livre do ácido de Lewis.

Após a separação cromatográfica, o espectro de RMN de ^1H (Espectro 4) do principal produto (maior massa isolada) mostrou um sinal não esperado para os produtos da equação teórica: um tripleto em $\delta_{\text{H}} 5,77$ ppm, integrando para um (1), característico de hidrogênio olefínico. O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 5) mostrou também um sinal de carbono olefínico em $\delta_{\text{C}} 112,55$ ppm. Este produto apresentou baixa polaridade e foi o primeiro a ser eluído da coluna cromatográfica. Estes dados indicam a formação da enol-lactona **27**, através de um mecanismo de adição e eliminação a partir do produto acilado **22**. A adição intramolecular à carbonila é favorecida pela proximidade entre a hidroxila ácida e a carbonila do grupo acila inserido durante a reação, e o aquecimento (40°C) do processo auxilia a ocorrência de eliminação, como está demonstrado no esquema 13.



Esquema 13: Formação da enol lactona 27

A etapa de eliminação do intermediário hidroxilado **22.2**, mostrada no esquema acima, poderia formar os diastereoisômeros *cis* (*Z*) e *trans* (*E*) da enol lactona **27**. No entanto, somente um diastereoisômero foi identificado, o que qualifica a reação de eliminação como diastereoespecífica. Cálculos teóricos (programa Chem Draw 3D Ultra 8.0) indicam que o diastereoisômero *trans* (*E*) apresenta uma distância de 5,56Å entre o hidrogênio olefínico e o hidrogênio mais próximo da metoxila aromática, enquanto a forma *cis* (*Z*) mostra uma distância calculada de apenas 3,47Å para estes mesmos núcleos de hidrogênio (figura 18). Portanto, o efeito Overhauser Nuclear (NOE), relativo à interação de hidrogênios próximos no espaço, deve ocorrer somente com o diastereoisômero *cis* (*Z*).

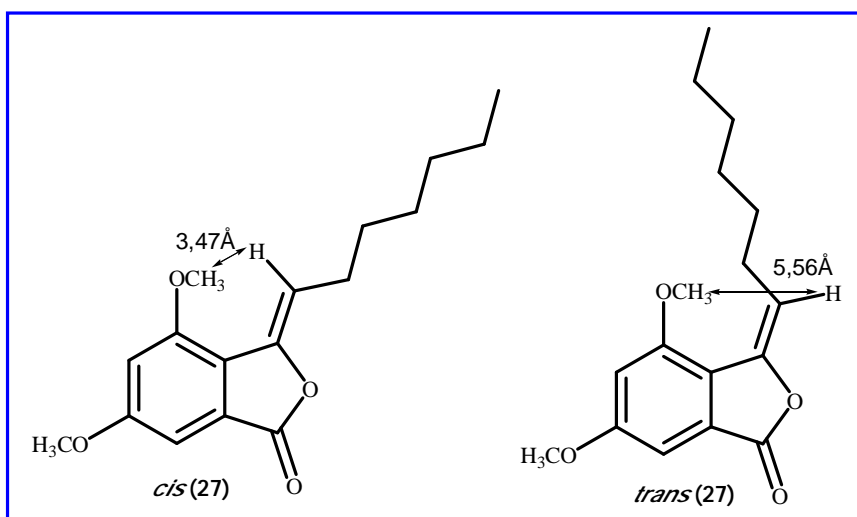


Figura 18: Distâncias calculadas entre o hidrogênio olefínico e os hidrogênios da metoxila aromática mais próxima para os diastereoisômeros *cis* e *trans* da enol lactona 27

O experimento de efeito Overhauser Nuclear (NOE) mostrou correlação espacial entre o único hidrogênio olefínico e a metoxila mais próxima da estrutura **27**, comprovando a estereoquímica *cis* (*Z*) e a formação exclusiva deste diastereoisômero (Figura 19). Outro fator que evidencia a síntese deste isômero é o deslocamento químico observado para o hidrogênio olefínico da molécula no espectro de RMN de ^1H (Espectro 4), em δ_{H} 5,77 ppm. Para o outro diastereoisômero, cálculos teóricos indicam que este hidrogênio é mais protegido e seu deslocamento químico, menor.

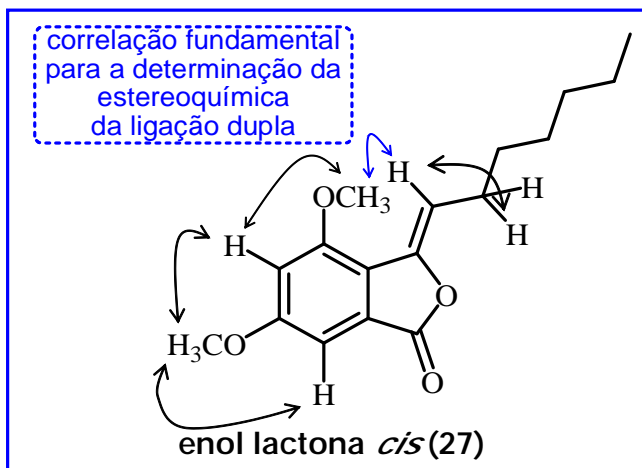


Figura 19: Correlações observadas no experimento NOE para a enol lactona *cis* (27**)**

A formação exclusiva deste diastereoisômero (*cis* **27**) pode ser resultado da conformação mais estável do intermediário hidroxilado **22.2** da reação (esquema 13), produto da adição à carbonila. Tal conformação é aquela na qual o grupo alquila está o mais afastado possível do anel aromático e da metoxila (**22.2-B**). Esta conformação, além de ser menos impedida estericamente, apresenta a configuração anti-periplanar (ângulo de 180°) entre a hidroxila e o hidrogênio a serem eliminados, uma exigência mecanística da reação de eliminação, e deve ser responsável pela estereoespecificidade da reação (figura 20). A análise tridimensional da conformação **22.2-A** mostra que ela também pode apresentar tal configuração anti-periplanar exigida pelo mecanismo da eliminação, mas como é menos estável por questões estéricas, ela provavelmente não existe, pois não foi detectada a formação do diastereoisômero *trans* **27**.

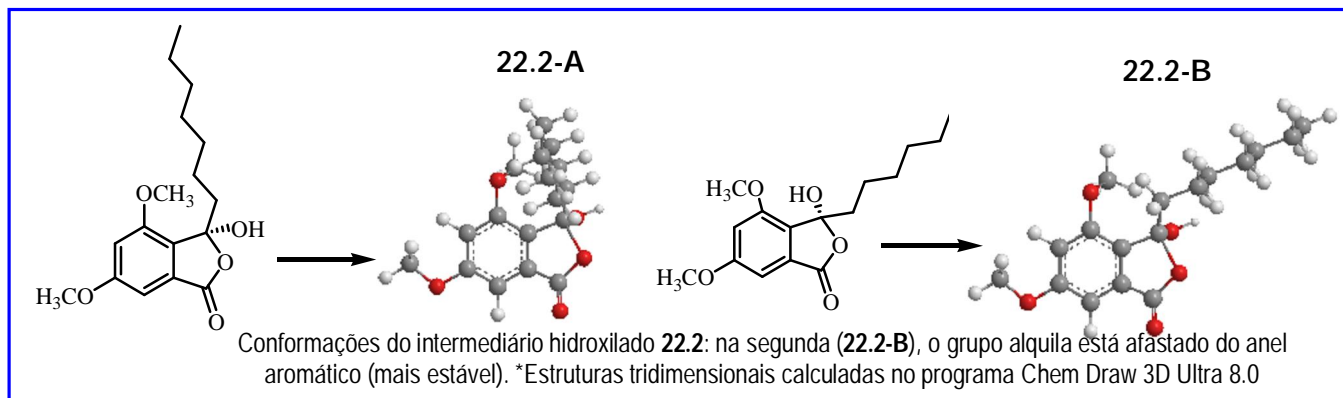


Figura 20: Conformações do intermediário hidroxilado 22.2, precursor da formação da enol lactona *cis*-27

Com este conjunto de dados, foi confirmada a estrutura do composto (*Z*)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (**27**), produzido com 93% de rendimento (figura 21).

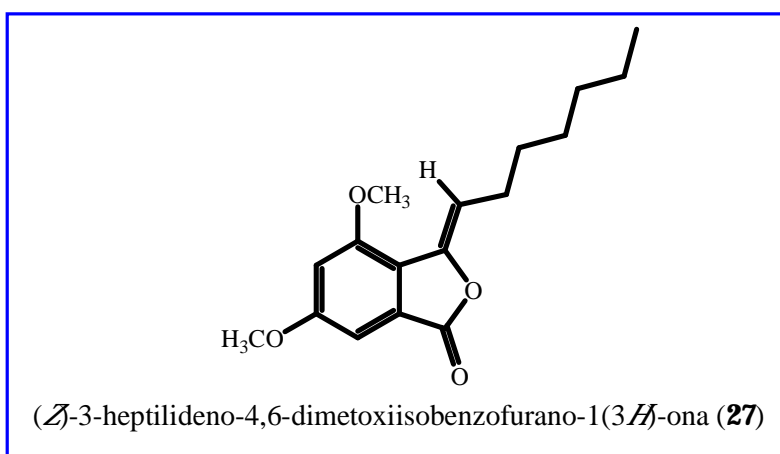
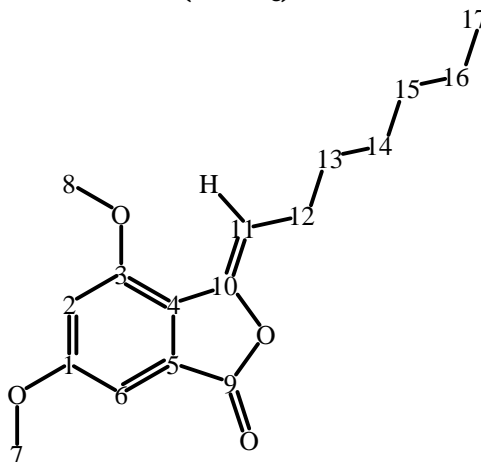


Figura 21: Estrutura e nome (IUPAC) do composto 27

Esta estrutura está de acordo com os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C , DEPT-135° e NOE (Espectros 4, 5, 6, 7 e 8). A análise do ponto de fusão e os espectros mostram que o composto está puro, devido à ausência de sinais de quaisquer outros subprodutos ou reagentes da acilação de Friedel-Crafts. A tabela 7 mostra os valores de deslocamento químico observados para o composto **27**.

Tabela 7: Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para (*Z*-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (27). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (CHCl_3) foi usado como referência interna.



(*Z*-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (27))

Posição	RMN ^{13}C (ppm)	DEPT-135°	RMN ^1H (ppm)	Multiplicidade
1	162,1	C	-	-
2	105,2	CH	6,67	d ($J= 3$ Hz, 1H)
3	155,4	C	-	-
4	121,7	C	-	-
5	127,2	C	-	-
6	98,2	CH	6,90	d ($J= 3$ Hz, 1H)
7	55,8	CH ₃	3,85	s (3H)
8	56,0	CH ₃	3,92	s (3H)
9	171,5	C	-	-
10	143,9	C	-	-
11	112,6	CH	5,77	t ($J= 9$ Hz, 1H)
12	31,9	CH ₂	2,42	q ($^1J= 9$ Hz, $^2J= 6$ Hz, 2H)
13	29,5	CH ₂	1,28 a 1,54	m (8H)
14	29,0	CH ₂	1,28 a 1,54	m (8H)
15	26,2	CH ₂	1,28 a 1,54	m (8H)
16	22,6	CH ₂	1,28 a 1,54	m (8H)
17	14,1	CH ₃	0,87	t ($J= 6$ Hz, 3H)

Da mesma coluna cromatográfica, foram isolados e identificados dois subprodutos da acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxibenzóico (**21**). Um dos compostos é a substância **22**, produto direto da reação de acilação e provável precursor sintético da enol lactona **27**, como foi apresentado no esquema 13. Este fato demonstra que uma pequena fração dos compostos acilados não sofreu os processos de adição e eliminação. O outro subproduto (**28**) é resultado de uma segunda acilação do composto **27**. A identificação desses compostos ampara o resultado da cromatografia em camada delgada (figura 17) desta

reação de acilação. Devido às semelhanças de polaridade e às baixas quantidades de massa, pois ambos foram formados com menos de 4% de rendimento cada, estes subprodutos não foram completamente separados um do outro. As estruturas químicas dos subprodutos desta reação estão representadas na figura 22.

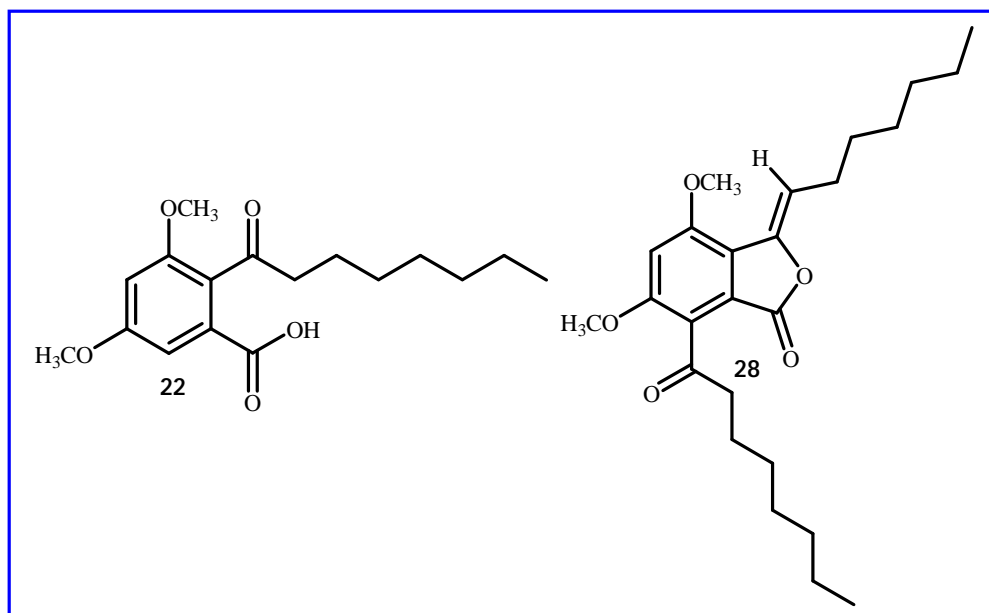


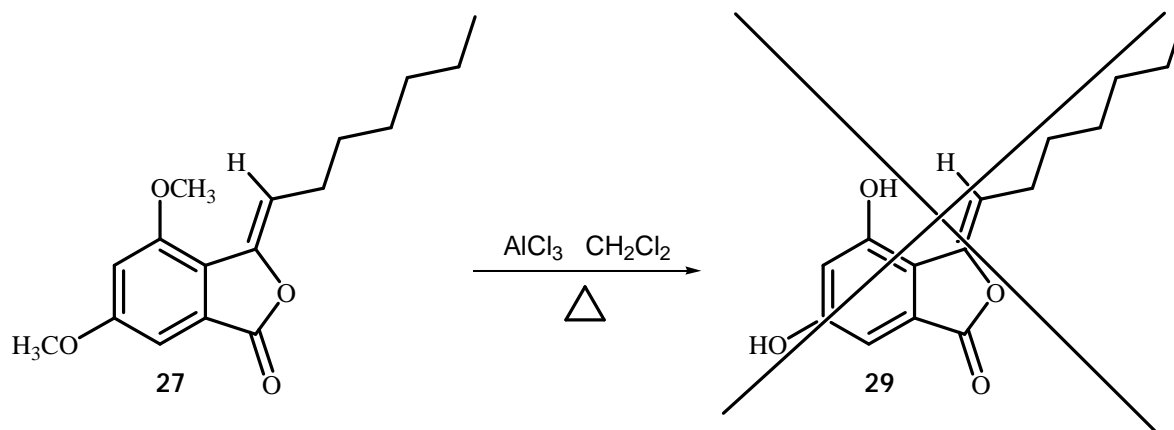
Figura 22: Subprodutos da acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxibenzóico (21)

Com o produto **27** em mãos, procedemos inicialmente uma reação de desmetilação total, a fim de gerar a unidade resorcinólica na molécula, etapa prevista na proposta de síntese da citosporona **24** (esquema 9), embora em seqüência diferente, para então testá-la em seus aspectos biológicos. Dessa forma, podemos produzir um novo lipídeo resorcinólico. O composto **27** foi submetido também a uma reação de redução com boridreto de sódio (NaBH_4). A idéia é reduzir a ligação dupla carbono-carbono do alceno, embora seja possível também reduzir a carbonila da lactona, na mesma reação.

3.2.2. Desmetilação total do (*Z*)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (27)

A tentativa de desmetilação do composto **27** foi realizada com cloreto de alumínio anidro (AlCl_3) em diclorometano (CH_2Cl_2), através de metodologia adaptada [MALI *et al.*, 1998], cujo mecanismo sugerido será discutido na síntese da citosporona A (**16**). Porém, após a extração da reação, não foi observada formação do produto resorcinólico **29** esperado, e nenhuma massa do substrato **27** foi recuperada (esquema 14). A desmetilação não procedeu para esta substância e acabou degradando-a, pois a

cromatografia em camada delgada não revelou sinal do substrato **27**, bem como não foram observados sinais relativos a esta estrutura nos espectros de RMN.



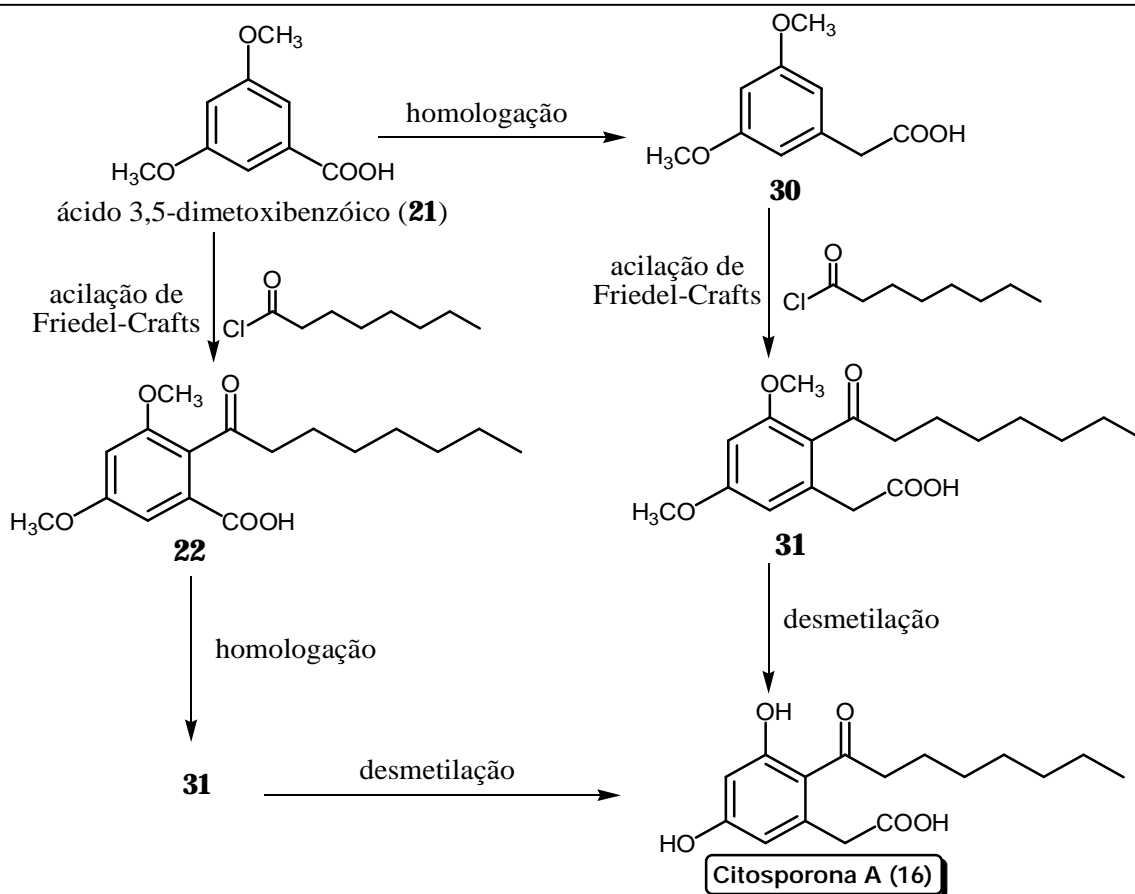
Esquema 14: Desmetilação total do (*Z*)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (**27**)

É possível que a ligação dupla carbono-carbono esteja interferindo neste mecanismo de desmetilação, por isso é conveniente realizar primeiro a etapa da redução dessa ligação dupla para então proceder a desmetilação com cloreto de alumínio. As reduções química e biológica do composto **27**, através de ensaios de biotransformação, foram estudadas em outro trabalho de pesquisa do nosso laboratório [SOUZA e BEATRIZ, 2008].

Por outro lado, futuramente, outras metodologias de desmetilação também serão aplicadas a este composto (**27**) em particular, como, por exemplo, o uso de brometo de boro (BBr_3). O objetivo é produzir uma unidade resorcinólica e manter a cadeia alquílica intacta, o que caracteriza um lipídeo resorcinólico. Caso o preparo da substância **29** seja feito com sucesso, a sua redução quimiosseletiva pode gerar uma citosporona sintética inédita (**24**).

3.3. Proposta de síntese das Citosporonas A (**16**), B (**17**) e C (**18**)

Seguindo uma rota química semelhante à utilizada na proposta de síntese da citosporona **24** (esquema 9), planejamos uma rota sintética visando inicialmente o preparo da molécula de citosporona A (**16**), a partir do ácido 3,5-dimetoxibenzóico (**21**). O esquema 15 mostra a inédita proposta de síntese da citosporona A (**16**), um produto natural com potencial ação herbicida jamais sintetizado em laboratório.



Esquema 15: Proposta de síntese da citosporona A (16)

A acilação de Friedel-Crafts do substrato **21** produziu, de fato, a estrutura **22**, porém com baixo rendimento (cerca de 4%), porque a molécula reagiu naturalmente, no próprio meio reacional, até o estado de enol lactona (**27**), através das etapas de adição à carbonila e eliminação, como foi demonstrado no esquema 13. Devido à formação de outro produto majoritário, esta primeira rota proposta para a síntese da citosporona A (**16**) foi abandonada.

Por outro lado, a homologação do ácido 3,5-dimetoxibenzoico (**21**) deve gerar o seu homólogo **30**. A acilação desta molécula produz o intermediário acilado **31**, importante precursor sintético da molécula-alvo. Observando a estrutura do substrato **30**, verificamos as possibilidades da ocorrência da acilação sob os aspectos de reatividade e orientação. As metoxilas ativam o anel aromático para reações de substituição eletrofílica, pois doam elétrons por efeito de ressonância, e orientam a reação para as posições *orto* e *para*, devido ao mesmo efeito. O principal efeito da homologação observado nesta estrutura é de afastar a carboxila do anel aromático em um átomo de carbono, impedindo a ressonância da sua carbonila com a unidade aromática da molécula. Dessa forma, a carboxila não pode retirar elétrons por ressonância. Logo,

não existe nenhum substituinte desativador para reações de substituição eletrofílica aromática (figura 23). Teoricamente, para reações dessa classe, o ácido 3,5-dimetoxifenil acético (**30**) seria mais reativo do que o ácido 3,5-dimetoxibenzóico (**21**).

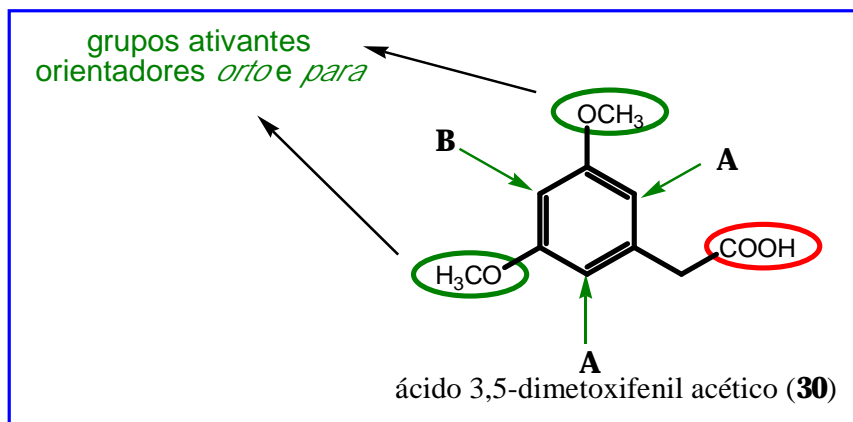
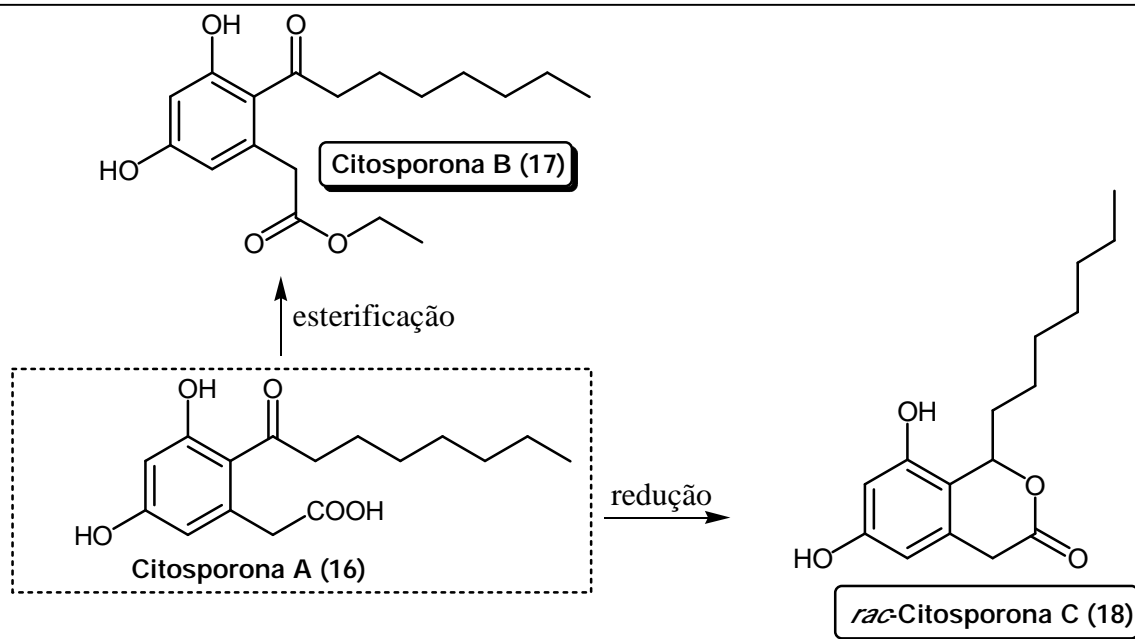


Figura 23: Análise da reatividade e orientação da acilação de Friedel-Crafts para o ácido 3,5-dimetoxifenil acético (30**)**

Diante da análise anterior, novamente conclui-se que o substrato **30** possui duas posições **A** equivalentes e uma segunda posição **B** que podem sofrer a reação de substituição eletrofílica aromática. O produto esperado **31**, precursor da citosporona A (**16**), é resultado da acilação na posição **A**. Como existem duas dessas posições, é provável que a acilação ocorra em maior proporção justamente neste sítio reacional, mas também é possível que a reação ocorra na posição **B**. Logo, temos dois produtos acilados possíveis para esta reação.

A simples desmetilação total do intermediário **31** deve produzir a citosporona A (**16**). Certamente, a etapa chave desta proposta sintética é a substituição eletrofílica aromática, a acilação de Friedel-Crafts, pois introduz o grupo octanoíla em um substrato aparentemente simples, tornando-o, em apenas uma reação, o precursor sintético da citosporona A (**16**). Com apenas três etapas, temos uma proposta simples para o preparo deste produto natural, cumprindo um dos principais objetivos do nosso trabalho.

A citosporona A (**16**), por sua vez, pode ser o material de partida para a síntese das citosporonas B (**17**) e C (**18**), através das seguintes reações químicas (esquema 16):



Esquema 16: Proposta de síntese das citosporonas B (17) e C (18)

A simples esterificação com etanol, em meio ácido, transforma o ácido carboxílico (**16**) em éster etílico (**17**). A redução da citosporona A (**16**), com um agente redutor, deve ser suficiente para promover a lactonização e produzir, de forma racêmica, a molécula da citosporona C (**18**).

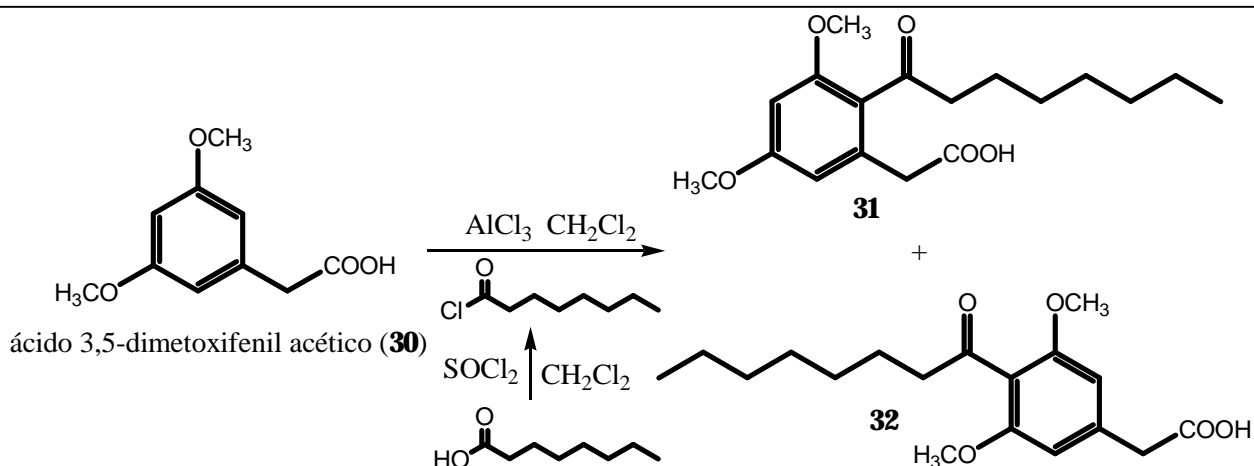
Em relação à proposta apresentada no esquema 15, é importante considerar que a homologação clássica é a reação de Arndt-Eistert [FREUND *et al*, 2000], que utiliza o reagente diazometano na segunda etapa deste processo. Diazometano é um gás amarelo, potencialmente tóxico e explosivo. Por isso, decidimos adquirir comercialmente o produto desta homologação, o ácido 3,5-dimetoxifenil acético (**30**).

3.4. Síntese da citosporona A (16)

Seguindo a proposta de síntese apresentada no esquema 15, foi utilizada novamente a metodologia da reação de acilação de Friedel-Crafts, na tentativa de produzir o intermediário acilado **31**, precursor sintético da citosporona A (**16**).

3.4.1. Acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxifenil acético (**30**)

Conforme análise feita na proposta de síntese da citosporona A (**16**), a acilação de Friedel-Crafts do substrato **30** pode gerar até dois produtos isoméricos. O cloreto de octanoíla foi novamente preparado no próprio balão da reação, com adição de cloreto de tionila (SOCl₂) ao ácido octanóico (**26**) (esquema 17).



Esquema 17: Resultado teórico da acilação de Friedel-Crafts para o ácido 3,5-dimetoxifenil acético (30)

No entanto, a cromatografia da reação aparentemente indicava apenas uma mancha de produto. Mas a mancha do substrato **30** sempre estava bem intensa, mesmo após refluxo exaustivo, o que poderia indicar a presença de um possível segundo produto, cuja polaridade era semelhante ao ácido 3,5-dimetoxifenil acético (**30**). Era observada também a mancha relativa ao ácido octanóico (**26**) (figura 24).

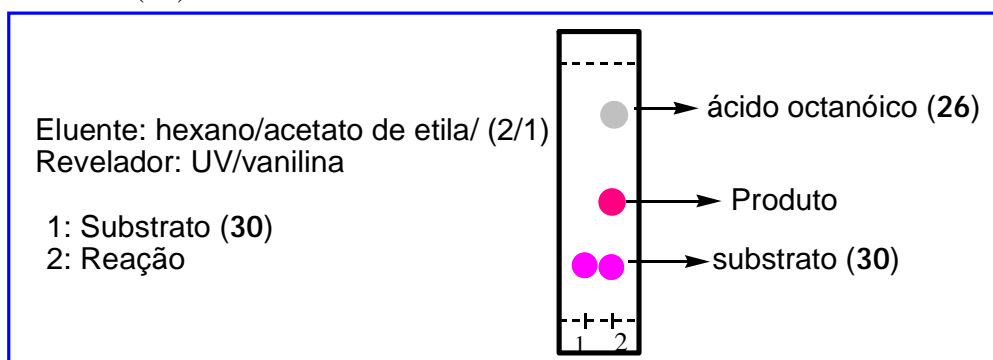


Figura 24: Cromatografia em camada delgada da reação de acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxifenilacético (30)

Após o processo de extração dos produtos da reação, uma segunda cromatografia (CCD) revelou uma nova mancha, de fator de retenção menor do que do substrato, indicando um possível subproduto de alta polaridade relativa. É provável que este subproduto tenha sido formado durante o processo de extração, ou estava em concentração baixa o suficiente para não ser detectado na primeira cromatografia, realizada no percurso da reação.

O mecanismo da reação de formação dos produtos acilados **31** e **32** é o mesmo apresentado no esquema 12, o mecanismo da acilação de Friedel-Crafts, catalisado por cloreto de alumínio anidro (AlCl_3). Para o ácido 3,5-dimetoxifenil acético (**30**), a reação ocorre da mesma maneira, gerando também dois produtos possíveis (**31** e **32**).

A separação cromatográfica do extrato desta reação revelou inicialmente a presença de ácido octanóico (**26**), cujo espectro de RMN de ^1H mostrava sinais de deslocamento químico muito semelhantes ao espectro padrão. A maior massa isolada foi relativa à segunda substância eluída da coluna. Seu espectro de RMN de ^1H (Espectro 11) mostrou um tripleto com deslocamento em ^1H 2,92 ppm, com integral dois (2), padrão de sinal típico de hidrogênios metilênicos homotópicos vizinhos a uma carbonila. Dois dubletos na região de hidrogênios aromáticos também foram observados, em ^1H 6,49 ppm e 6,42 ppm, cada um com integral um (1) e constante de acoplamento de 2 Hz, característico de hidrogênios aromáticos com acoplamento em *meta*. O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 12) mostrou, entre outros sinais, um pico em ^{13}C 41,5 ppm, possivelmente relativo ao carbono metilênico (CH_2) à carbonila. Um importante sinal deste espectro foi observado em ^{13}C 210,1 ppm (C), relativo a carbonila de cetona, comprovando que a acilação de Friedel-Crafts realmente ocorreu.

A simetria molecular da estrutura **32** não poderia fornecer dois sinais de hidrogênios aromáticos e seis sinais de carbonos aromáticos na RMN, por isso concluímos que o espectro em questão é relativo ao produto **31**, sendo este o produto principal da reação, exatamente como havia sido previsto (figura 25).

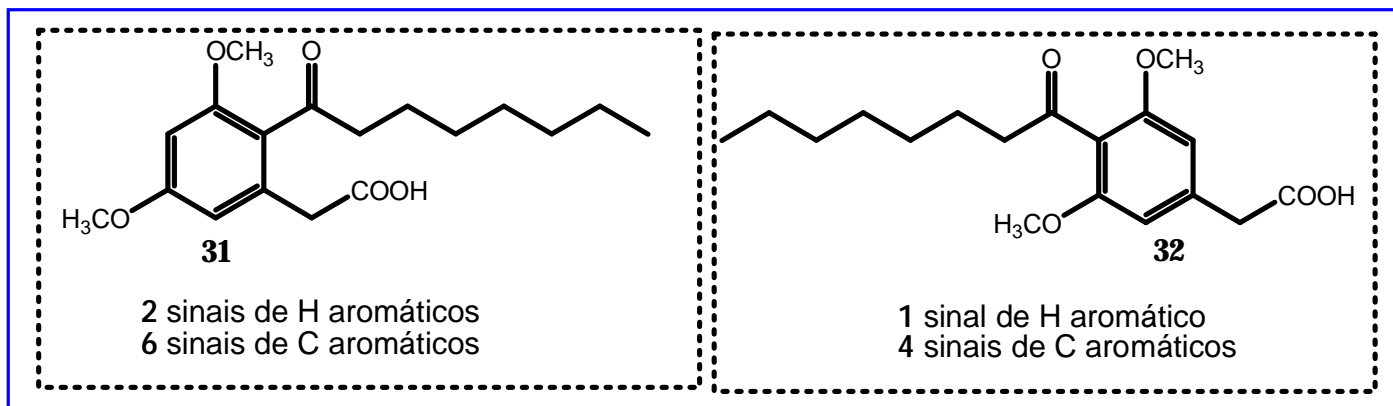
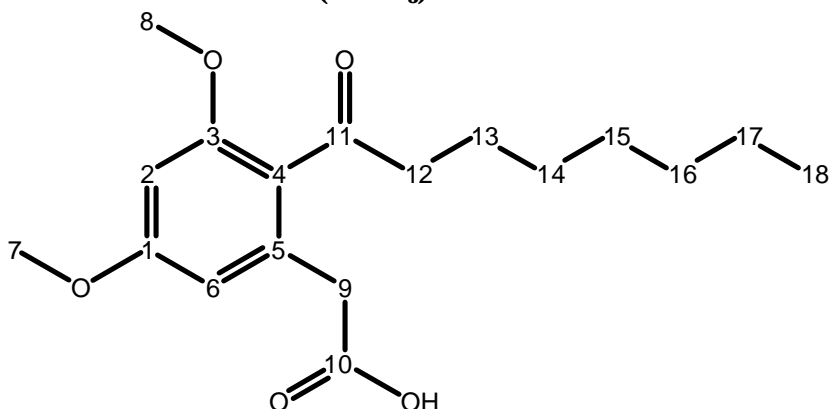


Figura 25: Diferenças dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para os anéis aromáticos dos produtos 31 e 32

A tabela 8 mostra todos os valores de deslocamento químico observados para o composto **31**.

Tabela 8: Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (CHCl_3) foi usado como referência interna.



ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31)

Posição	RMN ^{13}C (ppm)	DEPT-135°	RMN ^1H (ppm)	Multiplicidade
1	162,6	C	-	-
2	98,2	CH	6,42	d ($J= 2$ Hz, 1H)
3	159,9	C	-	-
4	122,7	C	-	-
5	135,4	C	-	-
6	107,6	CH	6,49	d ($J= 2$ Hz, 1H)
7	55,5*	CH ₃	3,83*	s (3H)
8	55,7*	CH ₃	3,85*	s (3H)
9	44,2	CH ₂	3,53	s (2H)
10	172,3	C	-	-
11	210,1	C	-	-
12	41,5	CH ₂	2,92	t ($J= 7$ Hz, 2H)
13	31,6	CH ₂	1,66	qt ($J= 7$ Hz, 2H)
14	29,3	CH ₂	1,21 a 1,39	m (8H)
15	29,0	CH ₂	1,21 a 1,39	m (8H)
16	24,7	CH ₂	1,21 a 1,39	m (8H)
17	22,6	CH ₂	1,21 a 1,39	m (8H)
18	14,1	CH ₃	0,88	t ($J= 7$ Hz, 3H)

*Devido à pequena diferença de deslocamento, é possível que estas atribuições possam estar trocadas (C7 x C8, H7 x H8).

Na seqüência da mesma coluna cromatográfica, foi identificado o substrato da reação, o ácido 3,5-dimetoxifenil acético (**30**), através de espectroscopia de RMN. Mesmo com o uso de reagentes em excesso estequiométrico e após refluxo exaustivo, cerca de 57% deste material foi recuperado. Embora a conversão tenha sido apenas razoável, o rendimento do produto **31** foi de 90%.

Uma análise mais detalhada e uma nova cromatografia em coluna revelaram que a mancha mais polar da cromatografia do extrato desta reação consiste em uma mistura de dois produtos de polaridades bem semelhantes (**B** e **C**). O espectro de RMN de ^1H (Espectro 16) do produto **B** apresentou dois sinais de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,49 ppm e 6,30 ppm, sendo ambos dubletos com constante de acoplamento de 2 Hz. Um singlete em δ_{H} 13,35 ppm foi atribuído a uma hidroxila fenólica que deve fazer ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila próxima. Apenas um sinal de metoxila foi observado, em δ_{H} 3,87 ppm. Já no espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 17), seis sinais de carbonos aromáticos foram detectados, além dos sinais da carbonila em δ_{C} 207,6 ppm e do carbono da única metoxila em δ_{C} 55,7 ppm. Estes e os demais sinais observados nos dois espectros de RMN sugerem que ocorreram a acilação e a desmetilação de uma das metoxilas.

A presença de uma hidroxila fenólica no produto **B** é possível porque o cloreto de alumínio anidro (AlCl_3), utilizado como catalisador da reação de acilação de Friedel-Crafts, pode agir também como reagente desmetilante, através de um mecanismo que será apresentado posteriormente. Neste caso, o reagente promoveu a desmetilação parcial da molécula.

Estas informações preliminares presumiram duas propostas estruturais possíveis para este produto **B** da reação (figura 26). Uma proposta é a molécula **32** monodesmetilada, que será numerada como substância **33**, dessa forma sem simetria estrutural. A outra proposta possível é o produto principal **31** monodesmetilado, que será numerado como estrutura **34**.

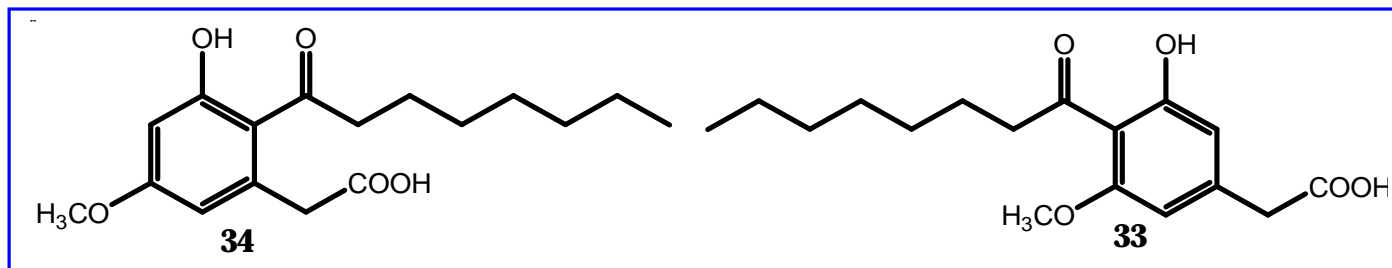
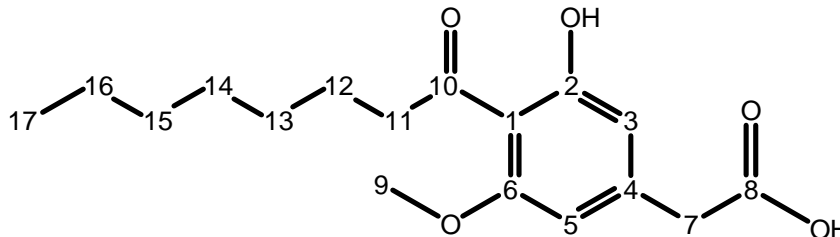


Figura 26: Propostas estruturais para o produto B

Estas duas estruturas apresentam espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C bem semelhantes, porém as correlações heteronucleares ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) à longa distância são diferentes. No espectro de HMBC (Espectros 20 e 21), as correlações fundamentais observadas foram do tipo 3J entre os dois hidrogênios aromáticos (δ_{H} 6,49 ppm e 6,30 ppm) e o carbono benzílico (CH_2) em δ_{C} 41,3 ppm (figura 27). Essas duas correlações só são possíveis para a estrutura **33**, porque, para a estrutura **34**, um dos hidrogênios aromáticos está a cinco ligações do carbono benzílico, e esta correlação provavelmente é inexistente ou apresenta uma constante de acoplamento muito baixa para ser detectada. Logo, o produto **B** tem a estrutura **33**.

Tabela 9: Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (CHCl_3) foi usado como referência interna.



ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33)

Posição	RMN ^{13}C (ppm)	DEPT-135°	RMN ^1H (ppm)	Multiplicidade
1	110,2	C	-	-
2	164,8	C	13,35 (OH)	s (1H)
3	111,8	CH	6,49	d ($J= 2$ Hz, 1H)
4	141,4	C	-	-
5	102,5	CH	6,30	d ($J= 2$ Hz, 1H)
6	161,3	C	-	-
7	41,3	CH_2	3,56	s (2H)
8	175,9	C	-	-
9	55,7	CH_3	3,87	s (3H)
10	207,6	C	-	-
11	44,9	CH_2	2,99	t ($J= 7$ Hz, 2H)
12	24,5	CH_2	1,61 a 1,66	m (2H)
13	29,4	CH_2	1,23 a 1,30	m (8H)
14	29,2	CH_2	1,23 a 1,30	m (8H)
15	31,7	CH_2	1,23 a 1,30	m (8H)
16	22,6	CH_2	1,23 a 1,30	m (8H)
17	14,1	CH_3	0,87	t ($J= 7$ Hz, 3H)

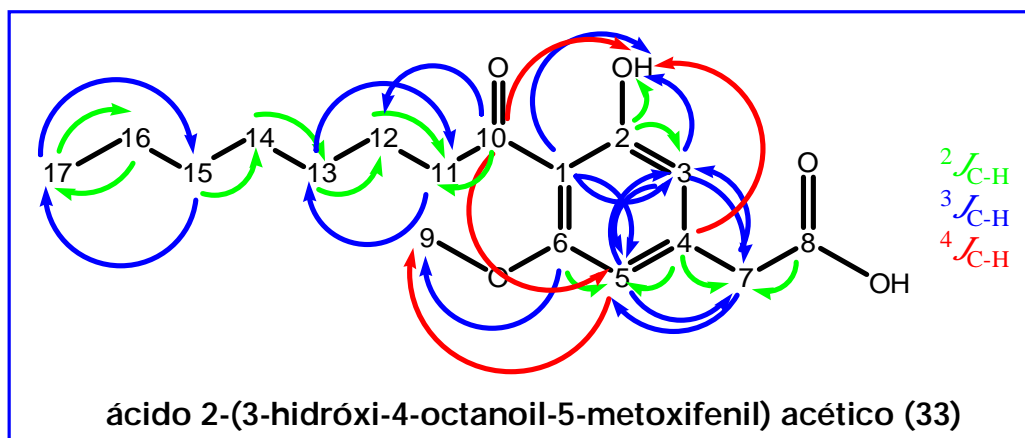


Figura 27: Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (2J , 3J , 4J) observadas no experimento bidimensional HMBC para o ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33)

Na tabela 10, estão descritas todas as correlações heteronucleares ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) observadas nos experimentos bidimensionais ($^1J(\text{HSQC})$, 2J , 3J e $^4J(\text{HMBC})$) para o composto **33** (Espectros 19, 20 e 21).

Tabela 10: Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (1J , 2J , 3J e 4J) observadas para o ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33**) nos experimentos bidimensionais HSQC (1J) e HMBC (2J , 3J e 4J). O sinal residual do solvente (CHCl_3) foi usado como referência interna.**

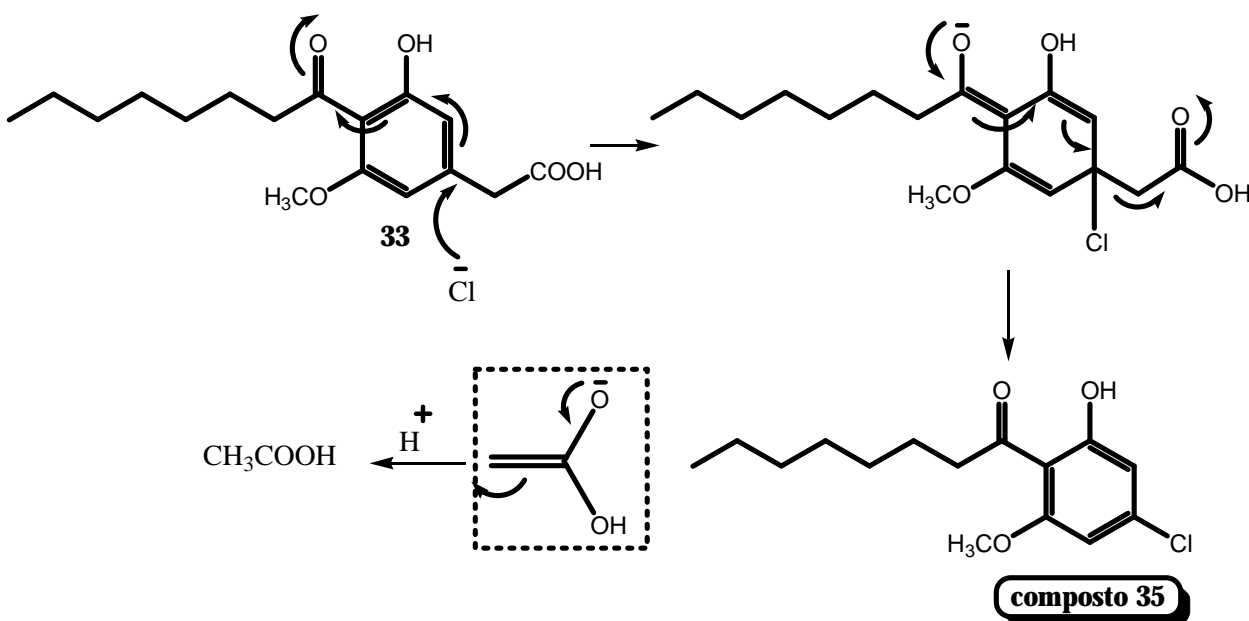
Posição	HSQC		H	HMBC		
	RMN ^{13}C (ppm)	RMN ^1H (ppm)		$^2J_{\text{C-H}}$	$^3J_{\text{C-H}}$	$^4J_{\text{C-H}}$
1	110,2	-	-	-	-	-
2	164,8	-	-OH	C2	C3, C1	C4, C10
3	102,5	6,30	H3	C2	C7, C5, C1	-
4	141,4	-	-	-	-	-
5	111,8	6,49	H5	C6, C4	C7, C3, C1	C10
6	161,3	-	-	-	-	-
7	41,3	3,56	H7	C4, C8	C3, C5	-
8	175,9	-	-	-	-	-
9	55,7	3,87	H9	-	C6	C5
10	207,6	-	-	-	-	-
11	44,9	2,99	H11	C10, C12	C13	-
12	24,5	1,61 a 1,66	H12	C13	C10	-
13	29,4	1,23 a 1,30	H13	C14	C11	-
14	29,2	1,23 a 1,30	H14	C15	-	-
15	31,7	1,23 a 1,30	H15	-	C17	-
16	22,6	1,23 a 1,30	H16	C17	-	-
17	14,1	0,87	H17	C16	C15	-

O produto **33** foi produzido com cerca de 5% de rendimento em todas as vezes que a reação de acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxifenilacético (**30**) foi realizada, exceto em uma, quando a reação foi feita em escala maior, com quantidades maiores de reagentes, seu rendimento foi de 30% nesta ocasião.

O produto **C**, por sua vez, não apresentou solubilidade em clorofórmio. Outro solvente deuterado precisava ser utilizado para realizar os experimentos de RMN, fundamentais na determinação estrutural de moléculas orgânicas. Em dimetilsulfóxido, houve certa solubilidade, porém os espectros de RMN não ficaram bem definidos. O produto **C** foi solúvel em metanol. Seu espectro de RMN de ^1H (Espectro 23) não apresentou o sinal relativo aos hidrogênios metilênicos do carbono benzílico, bem como o espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 24) não mostrou os sinais dos carbonos benzílico e da carboxila. Exceto a ausência desses sinais, os espectros do produto **C** eram bem semelhantes aos espectros do composto **33**.

No espectro de infravermelho (IV) do produto **C** (Espectro 28), não se observou a banda larga característica de grupo carboxila, entre 3400 e 2500cm^{-1} , aproximadamente, evidenciando que esta substância não continha mais o grupamento ácido. No entanto, não existia um terceiro sinal de hidrogênio ou carbono aromático do tipo CH, o que seria facilmente identificado pelo experimento de DEPT- 135° (Espectro 25). Além da acilação, houve uma substituição no carbono aromático que estava ligado ao grupo $-\text{CH}_2\text{COOH}$, por um átomo diferente de carbono ou hidrogênio e a desmetilação de uma das metoxilas da molécula.

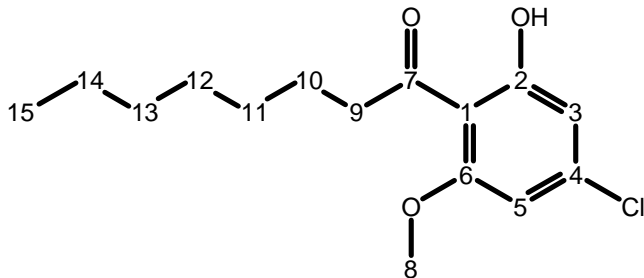
Como há ânions cloreto presentes no meio reacional, sugerimos a formação do produto **35** a partir do produto **33**, através do seguinte mecanismo de adição nucleofílica aromática, seguido de eliminação, resultando em uma substituição no anel aromático (esquema 18).



Esquema 18: Mecanismo de formação do composto 35

O poder retirador de elétrons que a carbonila do grupo acila exerce sobre o anel aromático favorece a ocorrência dessa reação, através deste mecanismo. O grupo $-\text{CH}_2\text{COOH}$ é eliminado na forma iônica e, em seguida, um próton é capturado para produzir ácido acético. Conforme o mecanismo proposto, este subproduto **35** só pode ser gerado na reação após a etapa da acilação. A tabela 11 mostra os deslocamentos químicos observados para o composto **35** e a figura 28 indica as correlações heteronucleares à longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (2J e 3J) observadas no experimento HMBC.

Tabela 11: Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (MeOH) foi usado como referência interna.



1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35)

Posição	RMN ^{13}C (ppm)	DEPT-135°	RMN ^1H (ppm)	Multiplicidade
1	111,3	C	-	-
2	162,0	C	-	-
3	111,7	CH	6,44	d ($J= 2$ Hz, 1H)
4	145,9	C	-	-
5	104,5	CH	6,50	d ($J= 2$ Hz, 1H)
6	162,0	C	-	-
7	209,6	C	-	-
8	55,5	CH ₃	3,87	s (3H)
9	44,6	CH ₂	2,96	t ($J= 7$ Hz, 2H)
10	24,7	CH ₂	1,50 a 1,65	m (2H)
11	29,2	CH ₂	1,20 a 1,40	m (8H)
12	29,0	CH ₂	1,20 a 1,40	m (8H)
13	31,6	CH ₂	1,20 a 1,40	m (8H)
14	22,5	CH ₂	1,20 a 1,40	m (8H)
15	14,3	CH ₃	0,85	t ($J= 7$ Hz, 3H)

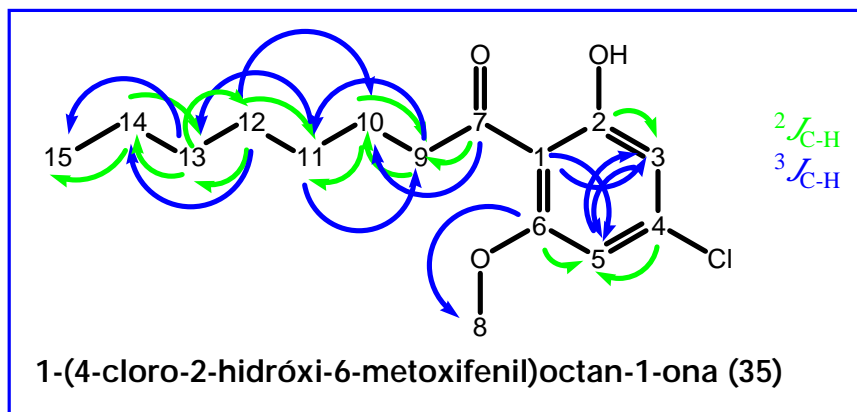


Figura 28: Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (2J e 3J) observadas no experimento bidimensional HMBC para 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35)

Na tabela 12, estão descritas todas as correlações heteronucleares ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) observadas nos experimentos bidimensionais ($^1\text{J}(\text{HSQC})$, $^2\text{J}, ^3\text{J}, ^4\text{J}(\text{HMBC})$) para o composto **35** (Espectros 26 e 27).

Tabela 12: Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ($^1\text{J}, ^2\text{J}, ^3\text{J}, ^4\text{J}$) observadas para 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35**) nos experimentos bidimensionais HSQC (^1J) e HMBC ($^2\text{J}, ^3\text{J}$). O sinal residual do solvente (MeOH) foi usado como referência interna.**

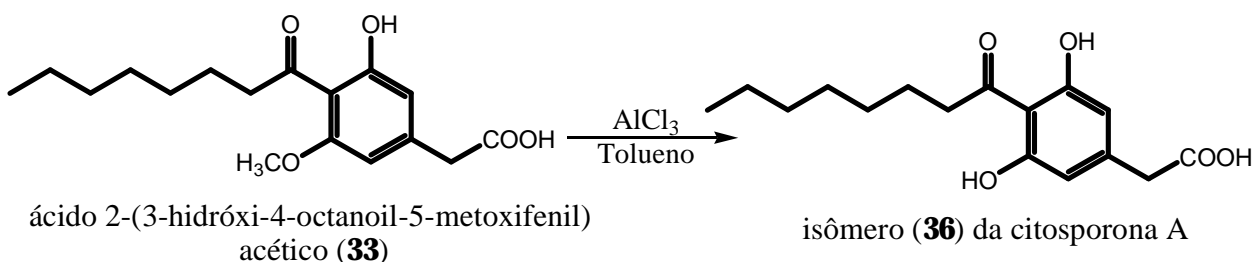
Posição	HSQC		H	HMBC	
	RMN ^{13}C (ppm)	RMN ^1H (ppm)		$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$
1	111,3	-	-	-	-
2	162,0	-	-	-	-
3	111,7	6,44	H3	C2	C5, C1
4	145,9	-	-	-	-
5	104,5	6,50	H5	C6, C4	C3, C1
6	162,0	-	-	-	-
7	209,6	-	-	-	-
8	55,5	3,90	H8	-	C6
9	44,6	2,99	H9	C7, C10	C11
10	24,7	1,55 a 1,70	H10	C9	C12, C7
11	29,2	1,20 a 1,40	H11	C10, C12	C9
12	29,0	1,20 a 1,40	H12	C13	-
13	31,6	1,20 a 1,40	H13	C14, C12	C11
14	22,5	1,20 a 1,40	H14	C13	C12
15	14,3	0,88	H15	C14	C13

O rendimento do produto **35** foi semelhante ao rendimento do produto **33**, seu precursor sintético na reação: 5% em todas as vezes que a reação de acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxifenil acético (**30**) foi realizada, exceto quando a reação foi feita em escala maior, com 30% de rendimento. Por alguma razão, nessa escala maior de reação, a acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxifenil acético (**30**) tem um rendimento de 60% para os compostos acilados **33** e **35** (30% cada), e o composto esperado **31**, precursor da citosporona A (**16**), torna-se apenas um produto secundário.

Antes de realizar a reação de desmetilação total da molécula **31** e, dessa forma, sintetizar a citosporona A (**16**), submetemos o composto **33**, subproduto da acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxifenil acético (**30**), a esta metodologia de desmetilação.

3.4.1.1. Desmetilação do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33)

O objetivo desta reação foi produzir um isômero de posição da citosporona A (**16**), e testar a eficiência do reagente cloreto de alumínio anidro (AlCl_3) como agente desmetilante. O solvente utilizado para a reação foi o tolueno, que apresenta um ponto de ebulição mais elevado do que o diclorometano: 110°C e 40°C , respectivamente. O diclorometano foi o solvente utilizado na tentativa de desmetilação da enol lactona **27**, que não formou o produto fenólico esperado (**29**). Para esta reação, teoricamente apenas um produto é possível, conforme mostrado no esquema 19.



Esquema 19: Resultado teórico da desmetilação do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (**33**)

Na cromatografia da reação, esta evidência foi logo verificada. Apenas duas manchas foram observadas na placa cromatográfica, uma delas possivelmente seria relativa ao produto fenólico (**36**), e a outra pertencia ao substrato da reação (**33**). O produto fenólico (**36**) é relativamente mais polar, devido à sua estrutura molecular que contém uma segunda hidroxila fenólica apta a realizar ligações de hidrogênio intermoleculares (figura 29).

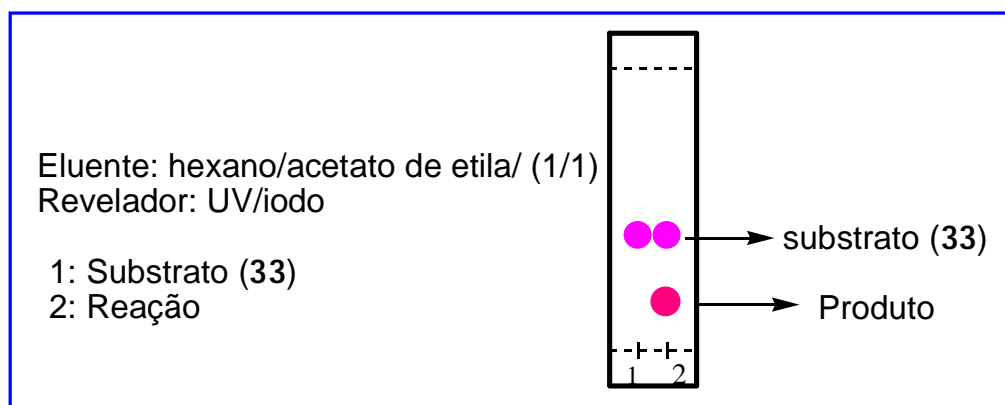
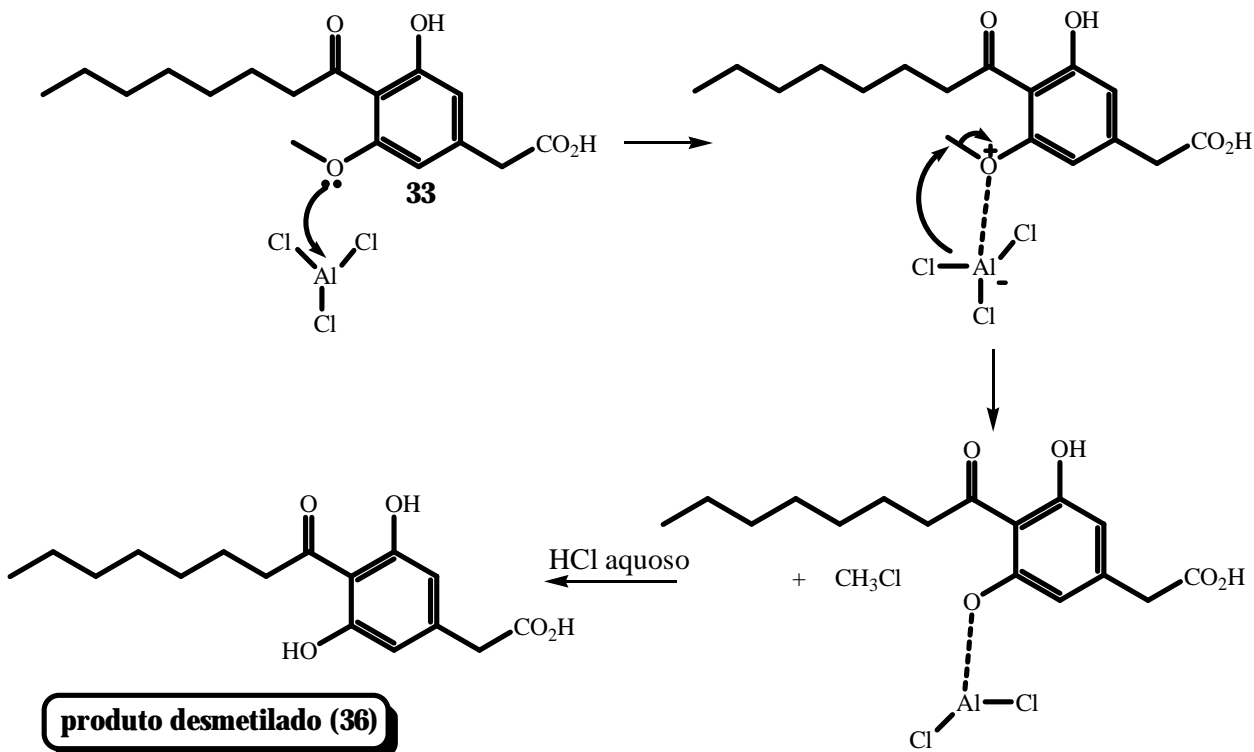


Figura 29: Cromatografia em camada delgada da reação de desmetilação do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (**33**)

O mecanismo para a formação do produto **36** é o mecanismo de desmetilação promovido pelo cloreto de alumínio (AlCl_3). O orbital vazio (d) do átomo de alumínio acomoda um par de elétrons do oxigênio, enquanto um dos átomos de cloro ataca o carbono da metila. Após a hidrólise ácida, o oxigênio está ligado a um átomo de hidrogênio, constituindo, portanto, uma hidroxila fenólica (esquema 20).



Esquema 20: Mecanismo da reação de desmetilação do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33**)**

O produto **36** desta reação de desmetilação é um isômero de posição da citosporona A (**16**), mas apresenta uma característica inerente: simetria molecular. Seu espectro de RMN de ^1H deve apresentar somente um sinal de hidrogênio aromático integrando para dois (2) hidrogênios, enquanto o espectro de RMN de ^{13}C deve mostrar apenas quatro sinais na região de carbonos aromáticos (figura 30). Conforme foi descrito na literatura [BRADY *et al.*, 2000], a citosporona A (**16**) apresenta dois sinais de hidrogênios aromáticos e seis sinais de carbonos aromáticos em seus espectros de RMN. Essa observação seria mais uma comprovação estrutural da molécula **33**, substrato desta reação de desmetilação, pois é uma evidência química de que a reação de acilação de Friedel-Crafts ocorreu naquela posição do anel aromático.

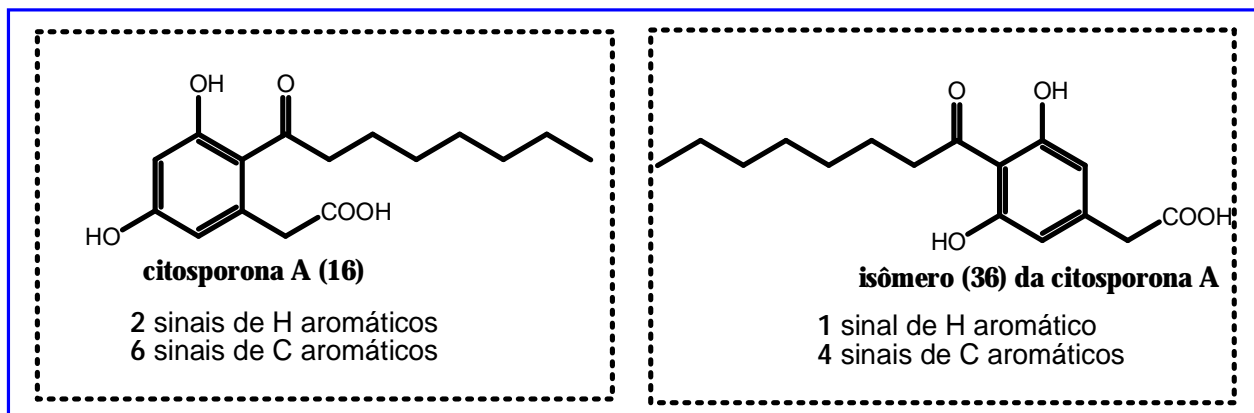
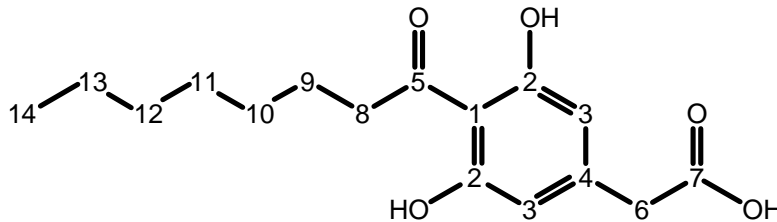


Figura 30: Diferenças dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para os anéis aromáticos da citosporona A (16) e do seu isômero sintético (36)

Após a separação cromatográfica, foi identificado o substrato **33** da reação, de acordo com seus espectros de RMN. Cerca de 22% da massa do substrato **33** foi recuperada. A segunda e última substância eluída da coluna não foi solúvel em clorofórmio. Para a análise de RMN, foi utilizado metanol deuterado. O espectro de RMN de ^1H (Espectro 29) mostrou, principalmente, um singlete em δ_{H} 6,31 ppm e integral para dois (2) núcleos de hidrogênio. O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 30) apresentou quatro sinais de carbonos aromáticos, além de um sinal em δ_{C} 209,3 ppm, relativo a uma carbonila de cetona, dois sinais de carbonos metilênicos (CH_2) em δ_{C} 42,1 ppm e 44,4 ppm, além de sinais de uma cadeia alquílica (tabela 13).

Estes dados sugerem a formação do produto esperado **36**, o isômero de posição da citosporona A (**16**). Correlações heteronucleares ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) auxiliaram na confirmação estrutural do produto desta reação (Espectros 32 e 33), como mostra a figura 31.

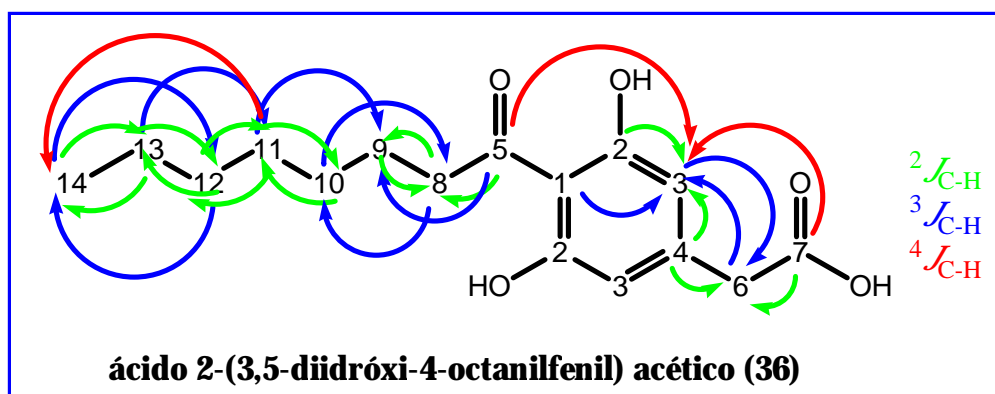
Tabela 13: Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o ácido 2-(3,5-diidróxi-4-octanoilfenil) acético (36). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (MeOH) foi usado como referência interna.



ácido 2-(3,5-diidróxi-4-octanoilfenil) acético (36)

Posição	RMN ^{13}C (ppm)	DEPT-135°	RMN ^1H (ppm)	Multiplicidade
1	110,1	C	-	-
2	163,4	C	-	-
3	109,4	CH	6,31	s (2H)
4	144,6	C	-	-
5	209,3	C	-	-
6	42,1	CH ₂	3,46	s (2H)
7	174,4	C	-	-
8	44,4	CH ₂	3,10	t ($J=7$ Hz, 2H)
9	25,8	CH ₂	1,67	qt ($J=7$ Hz, 2H)
10	30,3*	CH ₂	1,23 a 1,40	m (8H)
11	30,5*	CH ₂	1,23 a 1,40	m (8H)
12	32,9	CH ₂	1,23 a 1,40	m (8H)
13	23,7	CH ₂	1,23 a 1,40	m (8H)
14	14,4	CH ₃	0,91	t ($J=7$ Hz, 3H)

*Devido à pequena diferença de deslocamento, é possível que estas atribuições possam estar trocadas.



ácido 2-(3,5-diidróxi-4-octanoilfenil) acético (36)

Figura 31: Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (2J , 3J , 4J) observadas no experimento bidimensional HMBC para o ácido 2-(3,5-diidróxi-4-octanoilfenil) acético (36)

Na tabela 14, estão descritas todas as correlações heteronucleares ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) observadas nos experimentos bidimensionais ($^1\text{J}(\text{HSQC})$, ^2J , ^3J , $^4\text{J}(\text{HMBC})$) para o composto **36** (Espectros 32 e 33).

Tabela 14: Correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (^1J , ^2J , ^3J , ^4J observadas para o ácido 2-(3,5-diídrosi-4-octanoilfenil) acético (36**)) nos experimentos bidimensionais HSQC (^1J) e HMBC (^2J , ^3J , ^4J). O sinal residual do solvente (MeOH) foi usado como referência interna.**

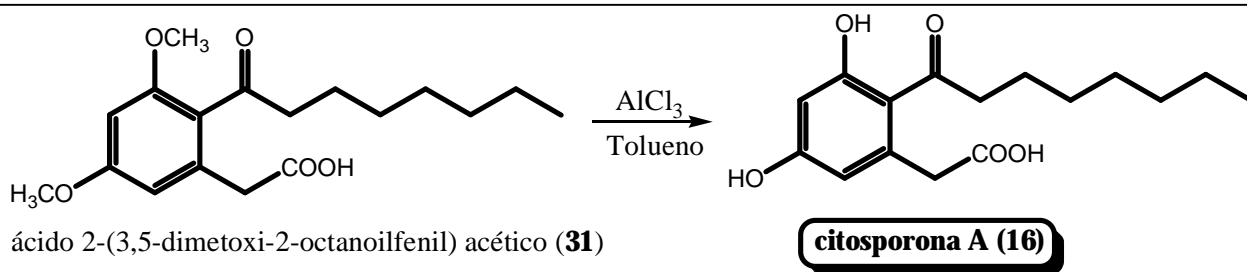
Posição	HSQC		H	HMBC		
	RMN ^{13}C (ppm)	RMN ^1H (ppm)		$^2\text{J}_{\text{C-H}}$	$^3\text{J}_{\text{C-H}}$	$^4\text{J}_{\text{C-H}}$
1	110,1	-	-	-	-	-
2	163,4	-	-	-	-	-
3	109,4	6,31	H3	C2, C4	C6, C1	C7, C5
4	144,6	-	-	-	-	-
5	209,3	-	-	-	-	-
6	42,1	3,46	H6	C4,C7	C3	-
7	174,4	-	-	-	-	-
8	44,4	3,10	H8	C5, C9	C10	-
9	25,8	1,67	H9	C8	C11, C5	-
10	30,3*	1,23 a 1,40	H10	C11	C8	-
11	30,5*	1,23 a 1,40	H11	C10, C12	C13	-
12	32,9	1,23 a 1,40	H12	C11, C13	C14	-
13	23,7	1,23 a 1,40	H13	C14, C12	-	-
14	14,4	0,91	H14	C13	C12	C11

O produto fenólico **36**, isômero da molécula natural de citosporona A (**16**), foi produzido com um rendimento de 37% nesta reação.

Em seguida, adotamos esta metodologia de desmetilação para o composto **31**, com o uso de cloreto de alumínio em tolueno, para sintetizar a molécula da citosporona A (**16**).

3.4.2. Desmetilação total do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (**31**)

Conforme a rota sintética proposta no esquema 15, o composto **31** é o precursor da citosporona A (**16**). Sua desmetilação total deve gerar o produto fenólico de interesse com bom rendimento. Mesmo com o baixo rendimento obtido na desmetilação do composto **33**, de apenas 37%, optamos por utilizar novamente o cloreto de alumínio anidro como agente desmetilante. Para esta reação, teoricamente somente um produto é possível, conforme mostra o esquema 21.



Esquema 21: Resultado teórico da desmetilação total do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31)

A cromatografia da reação indicou apenas uma mancha, de polaridade relativamente maior do que a mancha do substrato (**31**), quando comparadas na mesma placa cromatográfica. Caso esta mancha seja, de fato, relativa à citosporona A (**16**), a conversão do substrato ao produto foi muito alta ou quantitativa, pois não se observou a mancha relativa à substância **31**. A molécula da citosporona A (**16**) é mais polar porque apresenta duas hidroxilas fenólicas capazes de realizar ligações de hidrogênio intermoleculares. Portanto, a mancha observada na cromatografia da reação deve ser relativa ao produto desejado **16** (figura 32).

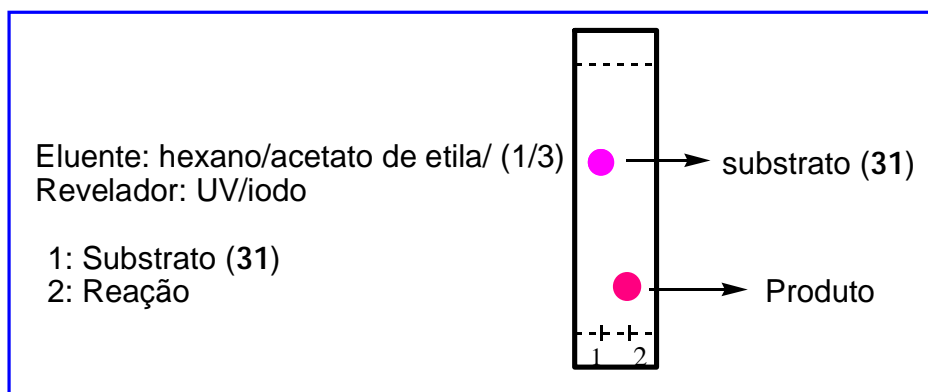


Figura 32: Cromatografia em camada delgada da reação de desmetilação total do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31)

O extrato da reação foi filtrado em sílica de baixa granulometria (0,040 mm a 0,063 mm), e a única substância eluída foi submetida às análises de RMN. Foi utilizado metanol deuterado para o preparo da amostra, pois não houve solubilidade em clorofórmio. Seu espectro de RMN de ^1H (Espectro 35) não mostrou os dois singletos em torno de $\delta_{\text{H}} 3,90$ ppm, relativos às metoxilas fenólicas presentes na estrutura do substrato **31**. Como é grande a semelhança entre as estruturas, os demais sinais foram observados sem alterações significativas de deslocamentos químicos, exceto os dois dubletos relativos aos hidrogênios aromáticos, que agora foram detectados em $\delta_{\text{H}} 6,26$ ppm e $6,22$ ppm, cada um com integral igual a um (1) e ambos com uma constante de acoplamento de 2 Hz. As hidroxilas doam elétrons por ressonância para o anel aromático e concentram cargas negativas nas posições *orto* e *para*, de maneira mais intensa do que as

metoxilas. Por isso, os hidrogênios aromáticos da citosporona A (**16**) estão mais blindados e apresentam um deslocamento químico menor do que os mesmos hidrogênios do substrato **31**, como demonstra a figura 33.

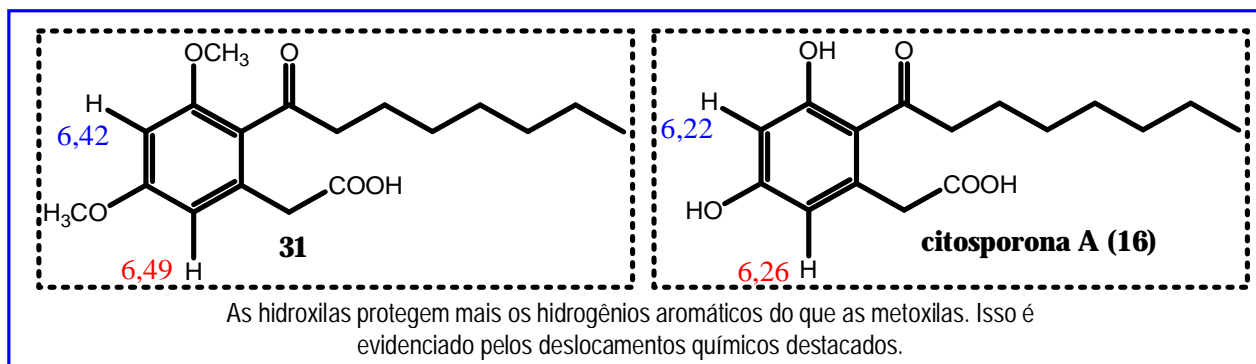
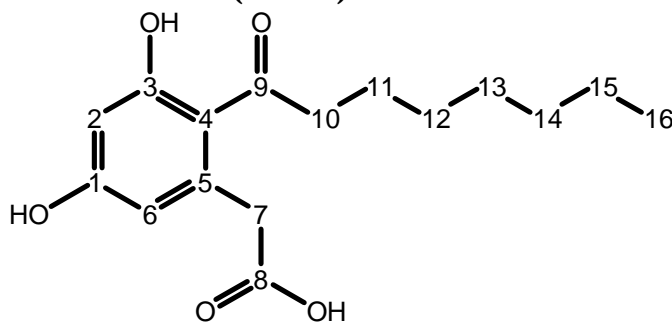


Figura 33: Deslocamentos químicos (ppm) observados para os hidrogênios aromáticos da citosporona A (16**) e do seu precursor sintético (**31**)**

Foram observados também um singlete em δ_{H} 3,56 ppm com integral igual a dois (2), um triplete em δ_{H} 2,92 ppm integrando para dois (2) hidrogênios e uma constante de acoplamento da ordem de 7 Hz e sinais relativos aos hidrogênios de uma cadeia alquílica, abaixo de δ_{H} 1,70 ppm. O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 36) não apresentou sinais relativos aos carbonos de metoxilas, evidenciando a ocorrência da desmetilação total, e todos os sinais relativos à estrutura da citosporona A (**16**) foram observados. Os espectros de RMN do produto desta reação estão de acordo com os dados fornecidos na literatura [BRADY *et al*, 2000] para a estrutura da citosporona A (**16**), cuja denominação, segundo as regras da IUPAC, é **ácido 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) acético**.

A tabela 15 mostra os deslocamentos químicos observados para o produto dessa reação de desmetilação. Com a análise completa dos dados físicos, foram confirmadas a estrutura do produto natural e a síntese pioneira da citosporona A (**16**).

Tabela 15: Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o ácido 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) acético (16). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (MeOH) foi usado como referência interna.



ácido 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) acético (16)

Posição	RMN ^{13}C (ppm)	DEPT-135°	RMN ^1H (ppm)	Multiplicidade
1	161,4	C	-	-
2	102,7	CH	6,22	d ($J= 2$ Hz, 1H)
3	159,8	C	-	-
4	121,4	C	-	-
5	137,3	C	-	-
6	111,6	CH	6,26	d ($J= 2$ Hz, 1H)
7	45,2	CH ₂	3,56	s (2H)
8	175,4	C	-	-
9	209,7	C	-	-
10	40,6	CH ₂	2,92	t ($J= 7$ Hz, 2H)
11	32,9	CH ₂	1,62	qt ($J= 7$ Hz, 2H)
12	30,4	CH ₂	1,25 a 1,45	m (8H)
13	30,3	CH ₂	1,25 a 1,45	m (8H)
14	25,6	CH ₂	1,25 a 1,45	m (8H)
15	23,7	CH ₂	1,25 a 1,45	m (8H)
16	14,4	CH ₃	0,90	t ($J= 7$ Hz, 3H)

O rendimento da reação de desmetilação total do ácido 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) acético (**31**), para a produção da citosporona A (**16**), foi de 90%. Considerando que pode ocorrer perda de material nos processos de extração e de purificação, é possível que este rendimento se aproxime de 100% (rendimento quantitativo). O cloreto de alumínio anidro (AlCl_3) mostrou ser um ótimo agente desmetilante para o substrato **31**, nesta metodologia empregada.

O tautomerismo da molécula de citosporona A (**16**), relatado inicialmente em sua referência original [VOBLIKOVA *et al.*, 1985], mostrado no esquema 7, não foi observado nos espectros de RMN, pois não há sinais relativos à estrutura do tautômero **16.1** (figura 34).

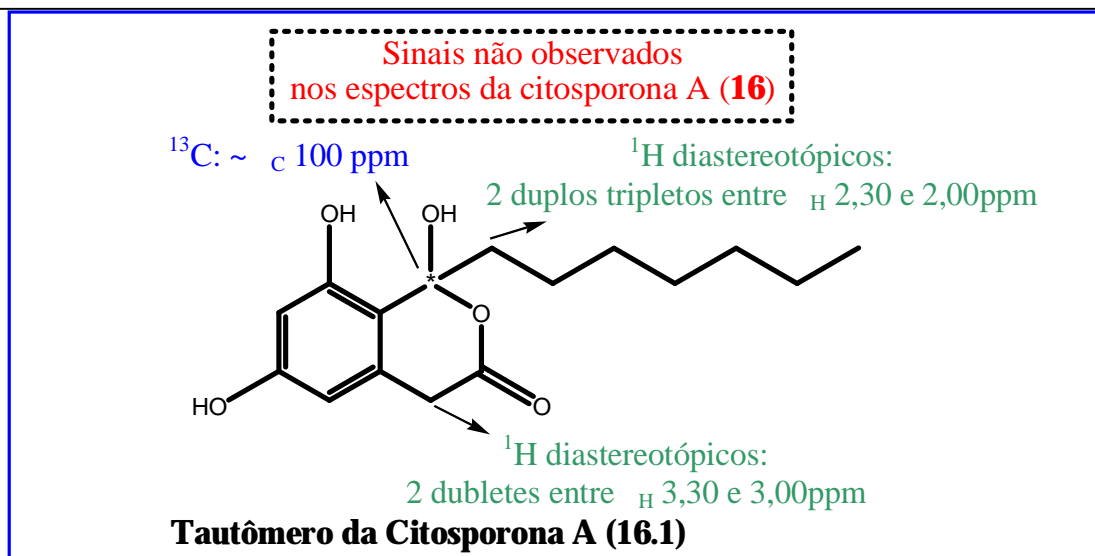
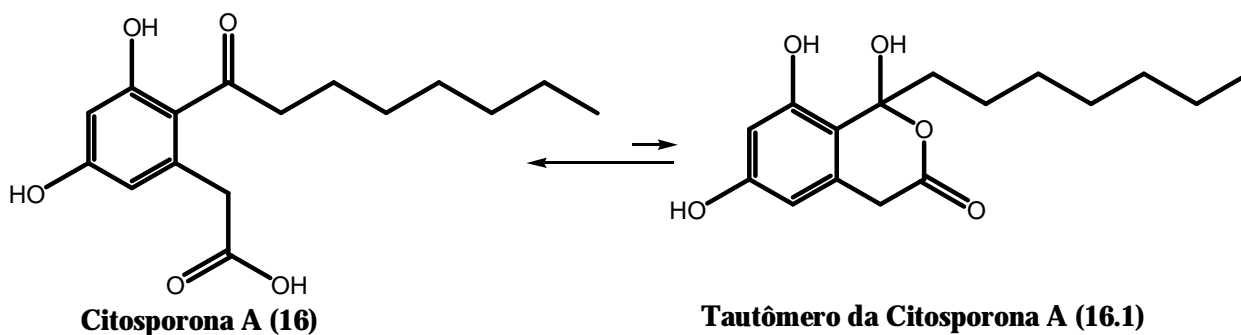


Figura 34: Exemplos de sinais importantes, não observados nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , relativos ao tautômero da citosporona A (16.1)

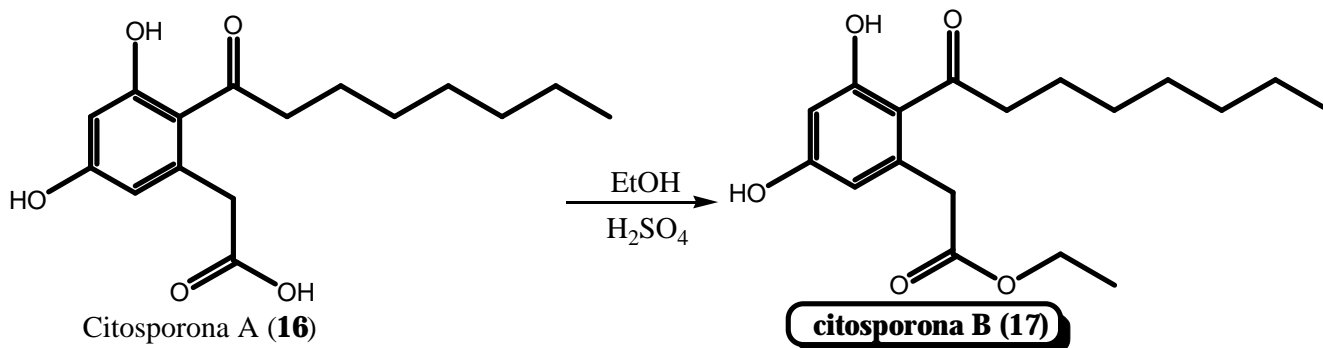
Por outro lado, esse tautomerismo natural da molécula de citosporona A (16) pode ter sido verificado na cromatografia em camada delgada, quando a placa cromatográfica foi eluída novamente. Após uma eluição, aparentemente somente uma mancha era observada através de luz ultravioleta. Mas após a segunda eluição, uma segunda mancha ligeiramente superior tornava-se visível. Essa segunda eluição aumenta a diferença dos fatores de retenção das moléculas e melhora a separação e a visualização de substâncias de polaridades próximas na placa cromatográfica. Além disso, a sílica da placa pode catalisar o processo de ciclização que forma o tautômero da citosporona A (16.1). Provavelmente devido à grande semelhança de polaridade observada, apenas uma mancha foi identificada na filtração em coluna cromatográfica do extrato da reação, sendo que sua análise por dados espectrais de RMN revelou somente os sinais da estrutura acíclica da citosporona A (16). Essa forma tautomérica deve ser bem mais estável no equilíbrio (esquema 22).



Esquema 22: Deslocamento observado no equilíbrio tautomérico da citosporona A (16)

3.4.3. Esterificação da citosporona A (ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16))

Seguindo a proposta apresentada no esquema 16, podemos agora utilizar a citosporona A (**16**), sintetizada através de apenas duas etapas e um rendimento global de cerca de 80%, para o preparo da citosporona B (**17**). Uma simples reação de esterificação do grupamento ácido da citosporona A (**16**), com etanol, deve produzir a substância de interesse (esquema 23).



Esquema 23: Reação de esterificação da citosporona A (16)

A cromatografia de camada delgada da mistura reagente mostrou apenas uma mancha de maior fator de retenção (Rf), uma característica típica de reações de esterificação, pois o produto (éster) é uma molécula menos polar do que o seu substrato, o ácido carboxílico (figura 35). A citosporona A (**16**) deve estabelecer ligações de hidrogênio intermoleculares de maneira mais intensa porque, além de suas hidroxilas fenólicas, ainda contabiliza uma carboxila, enquanto a molécula da citosporona B (**17**) apresenta a carboxila esterificada.

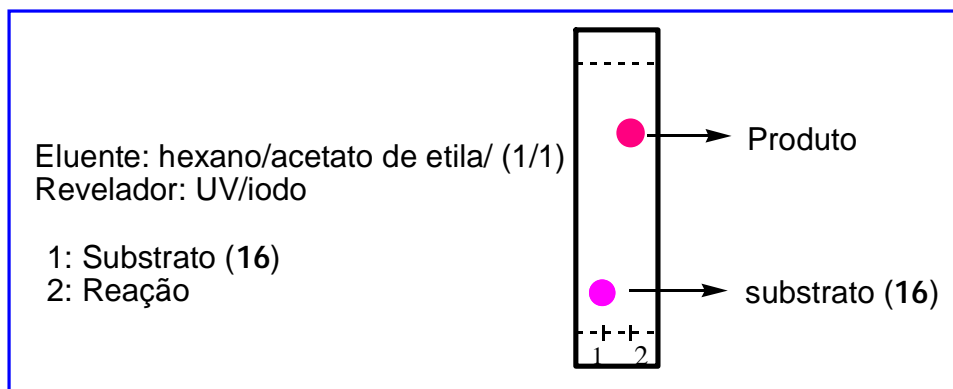
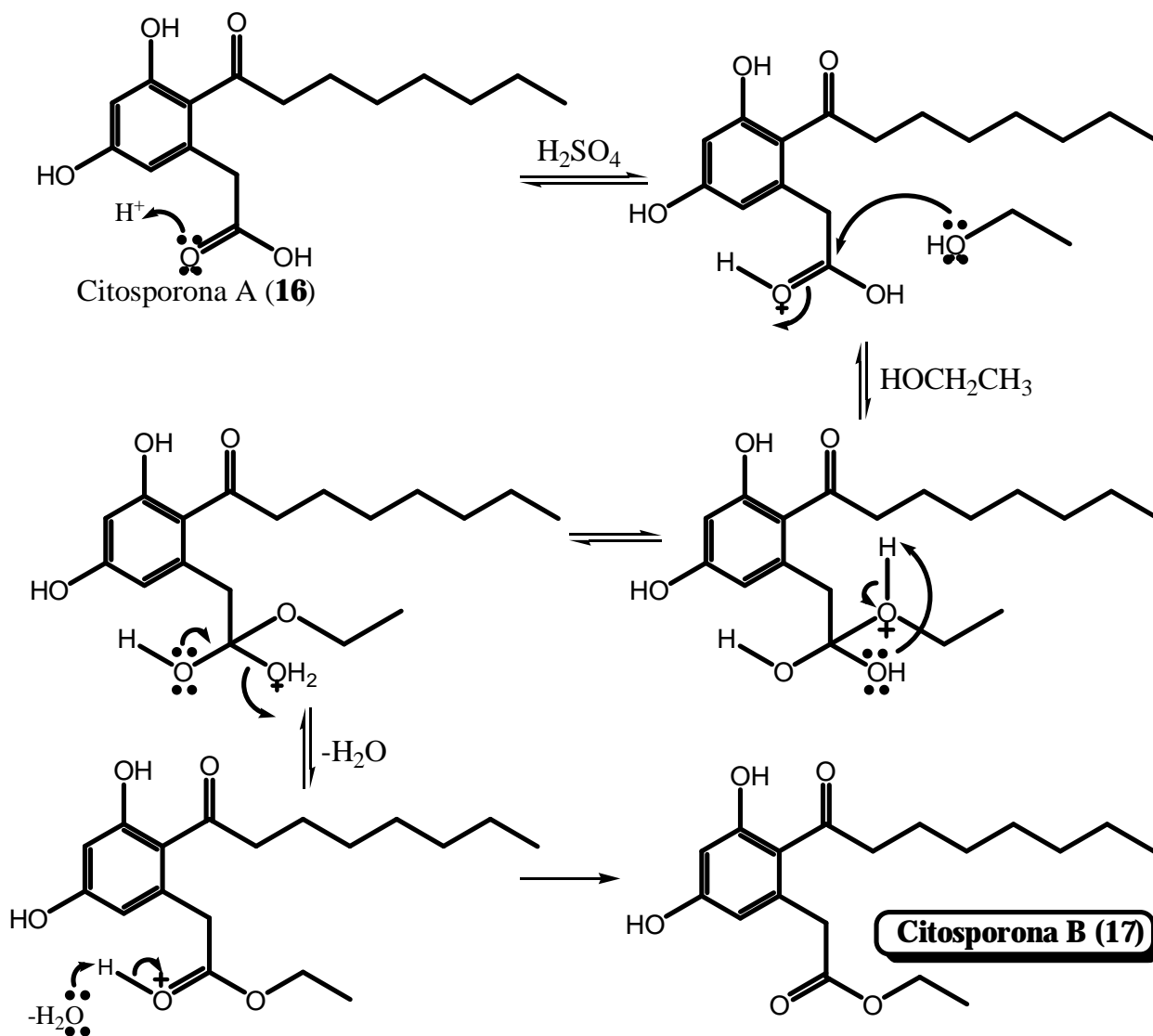


Figura 35: Cromatografia em camada delgada da reação de esterificação da citosporona A (16)

O mecanismo da reação de esterificação é clássico e amplamente conhecido na Química Orgânica [SOLOMONS e FRYHLE, 2002]. A esterificação catalisada por ácido ocorre da seguinte forma: o oxigênio da carbonila do substrato (**16**) liga-se a um próton (H^+), ativando esta carbonila para a etapa de adição nucleofílica. O solvente (etanol) ataca o carbono desta carbonila, através de um dos pares de

elétrons livres do seu oxigênio. Então, duas etapas sucessivas de eliminação de água e transferência de próton para uma base geram o éster (**17**).

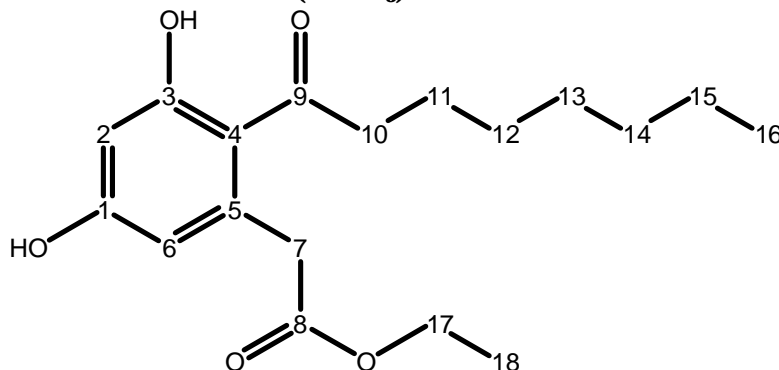


Esquema 24: Mecanismo da reação de esterificação da citosporona A (**16**)

Após a extração da reação, foi feita a análise do resíduo bruto por dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C , sem prévia purificação. O extrato foi bastante solúvel em clorofórmio. O espectro de RMN de ^1H (Espectro 39) mostrou um quarteto com uma constante de acoplamento da ordem de 7 Hz, em δ_{H} 4,18 ppm e integral dois (2). Este sinal deve ser relativo aos hidrogênios metilênicos do carbono vizinho () ao oxigênio. No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 40), o sinal deste mesmo carbono foi observado em δ_{C} 61,6 ppm, e o sinal de uma segunda metila foi verificado em torno de δ_{C} 14 ppm. Estes dois carbonos devem ser relativos ao grupo etila (éster) que agora está presente na molécula (**17**). Os demais sinais dos espectros são semelhantes aos sinais observados para a estrutura da citosporona A (**16**).

Os dados espectrais de RMN do produto desta reação (tabela 16) estão de acordo com os dados fornecidos na literatura [BRADY *et al*, 2000] para a estrutura da citosporona B (**17**), cuja denominação, segundo as regras da IUPAC, é **acetato de 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) etila**. Os dados físicos confirmam a primeira síntese da citosporona B (**17**).

Tabela 16: Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o acetato de 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) etila (17). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (CHCl_3) foi usado como referência interna.



acetato de 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) etila (17)

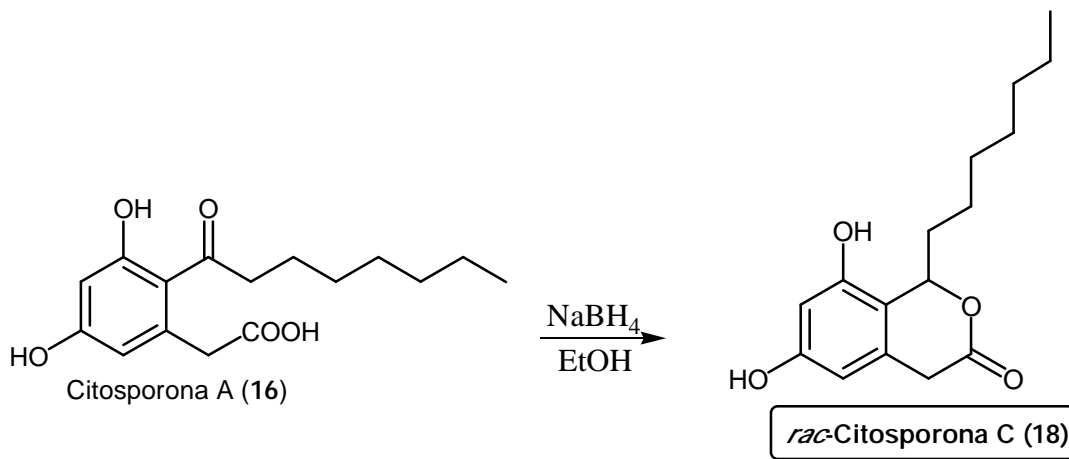
Posição	RMN ^{13}C (ppm)	DEPT-135°	RMN ^1H (ppm)	Multiplicidade
1	164,5	C	-	-
2	103,3	CH	6,25	sl (1H)
3	160,2	C	-	-
4	116,6	C	-	-
5	136,7	C	-	-
6	112,5	CH	6,27	sl (1H)
7	41,8*	CH ₂	3,82	s (2H)
8	171,3	C	-	-
9	206,7	C	-	-
10	43,4*	CH ₂	2,81	t ($J=7$ Hz, 2H)
11	31,7	CH ₂	1,60 a 1,72	m (2H)
12	29,2	CH ₂	1,15 a 1,34	m (11H)
13	29,1	CH ₂	1,15 a 1,34	m (11H)
14	24,3	CH ₂	1,15 a 1,34	m (11H)
15	22,6	CH ₂	1,15 a 1,34	m (11H)
16	14,1*	CH ₃	0,86	t ($J=7$ Hz, 3H)
17	61,6	CH ₂	4,18	q ($J=7$ Hz, 2H)
18	14,04*	CH ₃	1,15 a 1,34	m (11H)

*Devido à pequena diferença de deslocamento, é possível que estas atribuições possam estar trocadas (C7 x C10 e C16 x C18).

O rendimento da reação de esterificação da citosporona A (**16**) foi quantitativo, pois toda a massa de substrato foi convertida à citosporona B (**17**).

3.4.4. Redução da citosporona A (ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16))

Agora, podemos submeter a citosporona A (**16**) a uma reação de redução química com boridreto de sódio (NaBH_4) em etanol, para produzir a molécula da citosporona C (**18**), conforme a equação do esquema 25. Esta redução é simétrica, ou seja, o produto formado é, necessariamente, um racemato. Não há excesso enantiomérico de nenhum estereoisômero.



Esquema 25: Reação de redução da citosporona A (16)

A cromatografia em camada delgada da mistura reagente mostrou apenas uma mancha de maior fator de retenção (R_f), indicando a possível formação da molécula da citosporona C (**18**). O produto apresenta uma polaridade relativa menor porque não possui mais a carboxila livre. A presença de um anel de lactona na estrutura da citosporona C (**18**) justifica a diferença da polaridade entre as duas substâncias (figura 36).

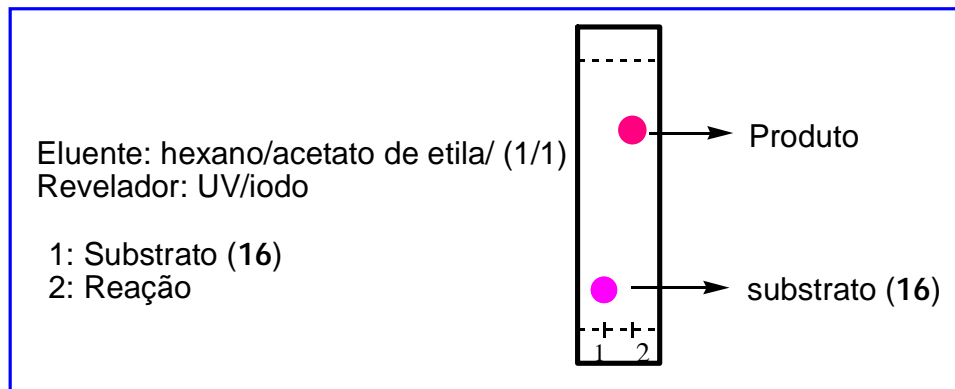
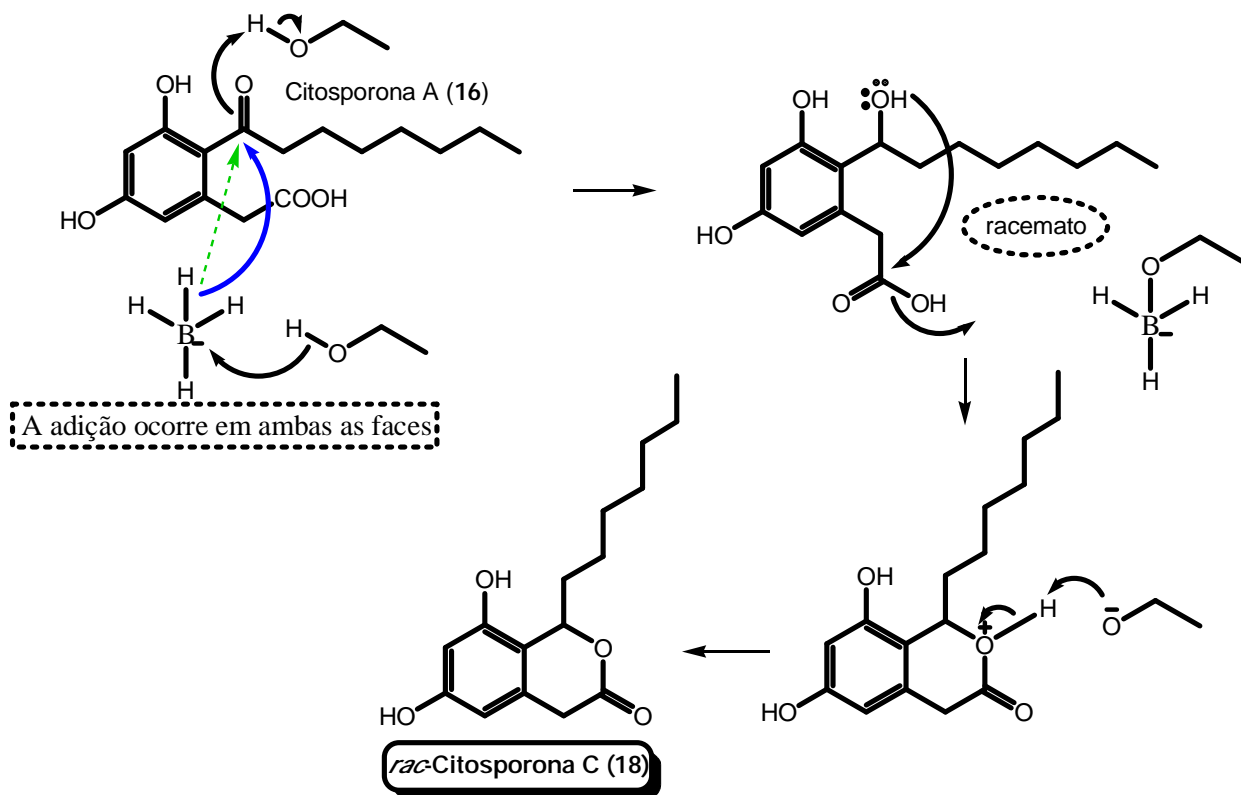


Figura 36: Cromatografia em camada delgada da reação de redução da citosporona A (16)

O mecanismo da redução consiste em uma adição nucleofílica à carbonila, na qual o ânion hidreto é o nucleófilo (esquema 26). Este reagente de redução não diferencia as faces enantiotópicas da carbonila da citosporona A (**16**), e a reação ocorre em ambas as faces de maneira equivalente, produzindo o racemato. Na seqüência, o átomo de oxigênio carregado negativamente ataca o carbono da carboxila e promove o processo de ciclização, formando o anel de lactona de seis membros. De fato, esta segunda etapa é uma esterificação da carboxila, pois a mesma passa ao estado de carbonila de um éster cíclico, uma lactona.

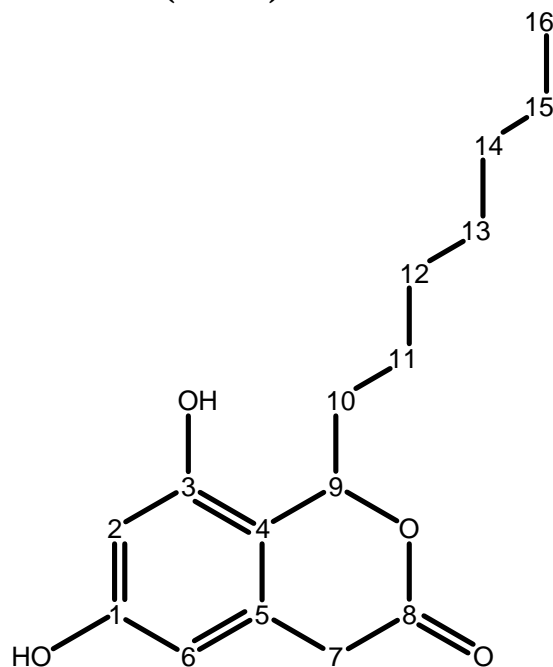


Esquema 26: Mecanismo da reação de redução da citosporona A (**16**)

O extrato da reação passou por uma filtração em sílica de baixa granulometria (0,040 mm a 0,063 mm), e a única substância eluída foi analisada através de dados de RMN. O espectro de RMN de ^1H (Espectro 43) mostrou um duplo dubleto com deslocamento em δ_{H} 5,57 ppm e integral igual a um (1), sinal possivelmente relativo ao hidrogênio do carbono quiral. Também foram observados dois dubletos entre δ_{H} 3,40 ppm e 3,80 ppm, cada um com integral um (1) e constante de acoplamento de 17 Hz, relativos aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos do carbono benzílico (C-7) da citosporona C (**18**). O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 44) mostrou um sinal de carbono metínico (CH) em δ_{C} 80,1 ppm, relativo ao carbono quiral ligado ao oxigênio. Não se observou sinal de carbonila de cetona. Esses dados somados aos demais sinais observados e outras análises realizadas confirmam a estrutura e a primeira síntese da citosporona C (**18**).

Os espectros de RMN do produto desta reação (tabela 17) estão de acordo com os dados fornecidos na literatura [BRADY *et al*, 2000] para a estrutura da citosporona C (**18**), cuja denominação, segundo as regras da IUPAC, é **1-heptil-6,8-diidroxi-1H-isocromen-3(4H)-ona**.

Tabela 17: Deslocamentos químicos (ppm) apresentados para o 1-heptil-6,8-diidroxi-1H-isocromen-3(4H)-ona (18**). O espectro de RMN de ^1H foi obtido a 300 MHz e de ^{13}C a 75 MHz. O sinal residual do solvente (MeOH) foi usado como referência interna.**



1-heptil-6,8-diidroxi-1H-isocromen-3(4H)-ona (18**)**

Posição	RMN ^{13}C (ppm)	DEPT-135°	RMN ^1H (ppm)	Multiplicidade
1	159,6	C	-	-
2	102,1	CH	6,22	sl (1H)
3	155,3	C	-	-
4	114,0	C	-	-
5	132,8	C	-	-
6	106,1	CH	6,13	sl (1H)
7	36,8	CH ₂	3,76 e 3,45	2 x d ($J= 19,5$ Hz, 1H)
8	169,1	C	-	-
9	80,1	CH	5,60	dd ($^1J= 8,2$ Hz, $^2J= 5,5$ Hz, 1H)
10	32,7	CH ₂	1,79 e 1,52	2 x m (1H)
11	30,7	CH ₂	1,19 a 1,42	m (10H)
12	30,3	CH ₂	1,19 a 1,42	m (10H)
13	30,2	CH ₂	1,19 a 1,42	m (10H)
14	26,7	CH ₂	1,19 a 1,42	m (10H)
15	23,7	CH ₂	1,19 a 1,42	m (10H)
16	14,4	CH ₃	0,90	t ($J= 7$ Hz, 3H)

*Devido à pequena diferença de deslocamento, é possível que estas atribuições possam estar trocadas.

É importante notar que o novo centro quiral localizado no carbono-9 altera a topicidade de todos os hidrogênios metilênicos (geminais) da molécula. Na estrutura da citosporona A (**16**), esses átomos de hidrogênio eram todos homotópicos e apresentavam o mesmo deslocamento químico, sem qualquer constante de acoplamento entre si. Mas, na citosporona C (**18**), tais hidrogênios, conectados ao mesmo núcleo de carbono, são diastereotópicos, apresentam diferentes deslocamentos químicos e podem acoplar entre si. Isso acontece devido ao novo e único centro quiral presente na estrutura do produto, que altera estericamente as faces da molécula. No entanto, este efeito provocado pelo carbono quiral diminui conforme aumenta a distância até ele. Por isso, apenas os hidrogênios ligados aos carbonos C-7 e C-10 mostram, de fato, diferentes deslocamentos químicos e acoplamentos geminais, embora todos os demais hidrogênios metilênicos também sejam diastereotópicos [PAVIA *et al*, 2001].

A citosporona C (**18**) foi sintetizada com 90% de rendimento, nesta reação.

3.5. Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-HPLC)

Além de análises por dados espectrais de RMN, algumas de nossas amostras sintéticas também foram injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (High Precision Liquid Chromatography-HPLC), com o objetivo de verificar, principalmente, o grau de pureza e o tempo de retenção no eluente selecionado. As substâncias analisadas foram as seguintes (figura 37):

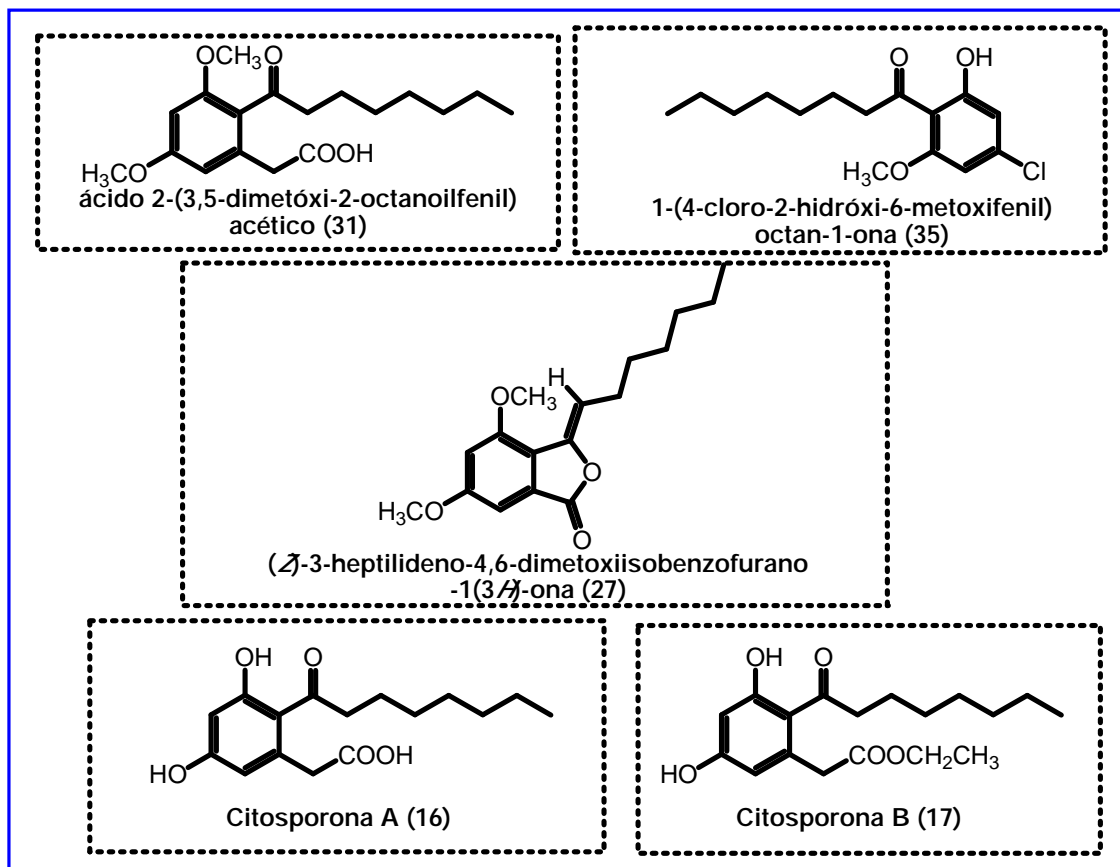
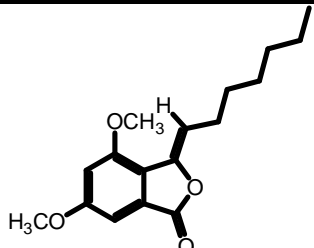
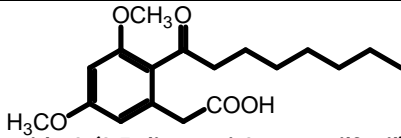
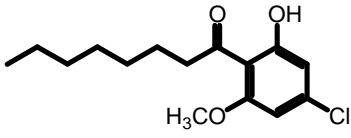
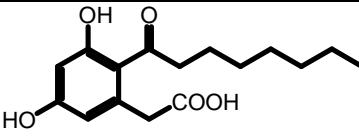
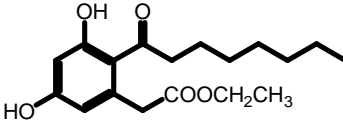
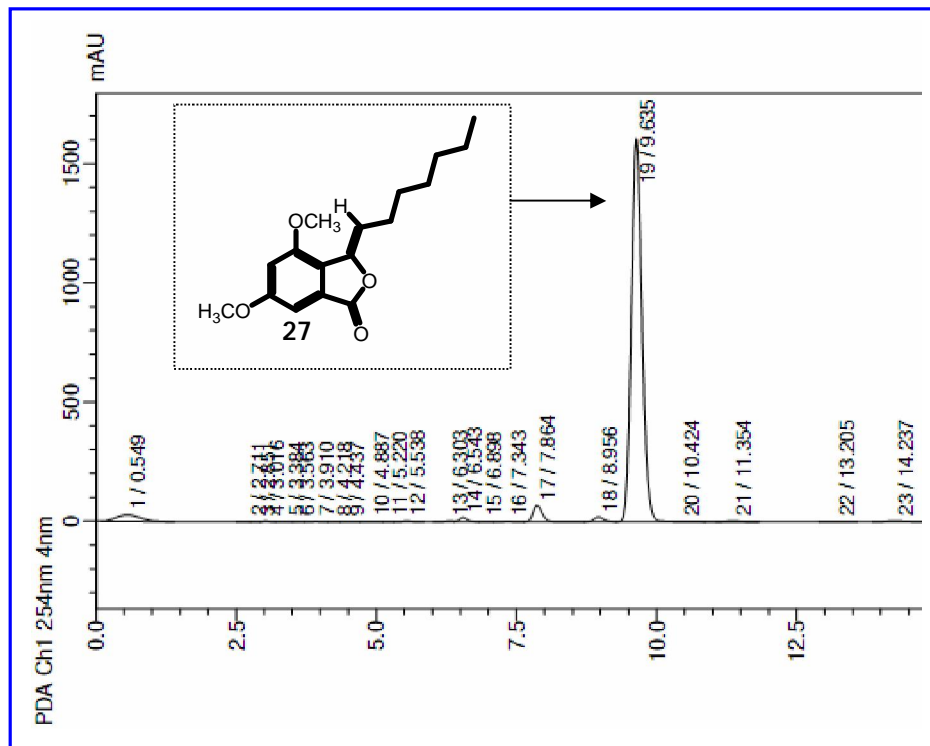


Figura 37: Substâncias analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE)

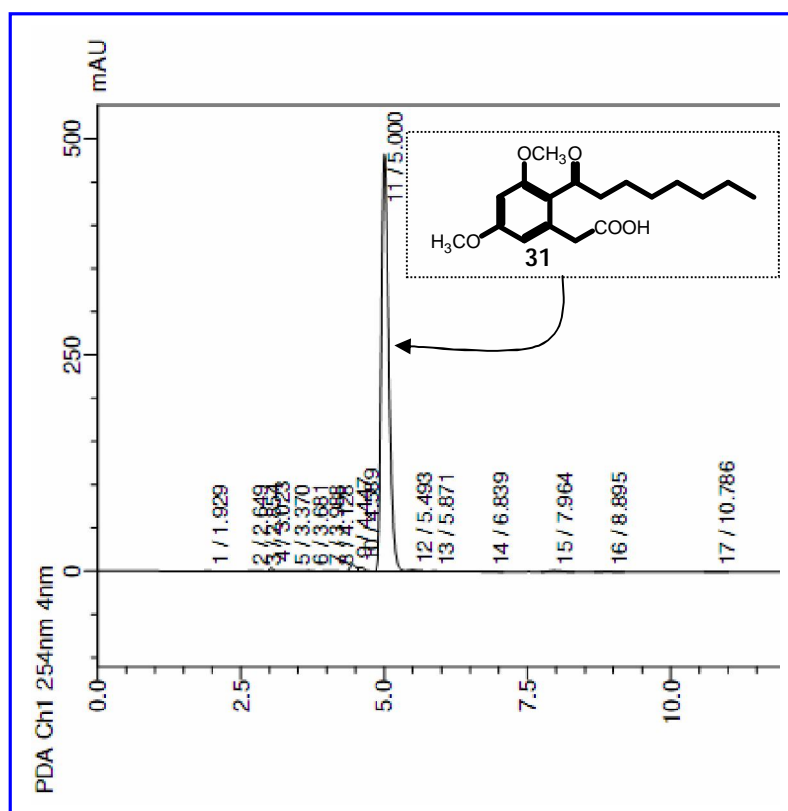
As cinco substâncias foram solubilizadas em solvente ultrapuro (grau HPLC), injetadas no cromatógrafo e eluídas com um sistema de solvente e fluxo iguais, para efeito de comparação do tempo de retenção em coluna de fase reversa. Esse tipo de coluna é constituído de longas cadeias de hidrocarbonetos, e apresentam baixo grau de polaridade. As cadeias carbônicas dessas colunas interagem com moléculas de baixa polaridade, principalmente por interações do tipo Forças de van der Waals. O resultado é que moléculas mais polares não interagem com os compostos da coluna de fase reversa e são eluídas primeiro, e moléculas de baixa polaridade são eluídas por último. Os resultados obtidos com esse experimento, para as substâncias acima, estão relatados na tabela 18 e os cromatogramas encontram-se logo na seqüência.

Tabela 18: Resultado da análise em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

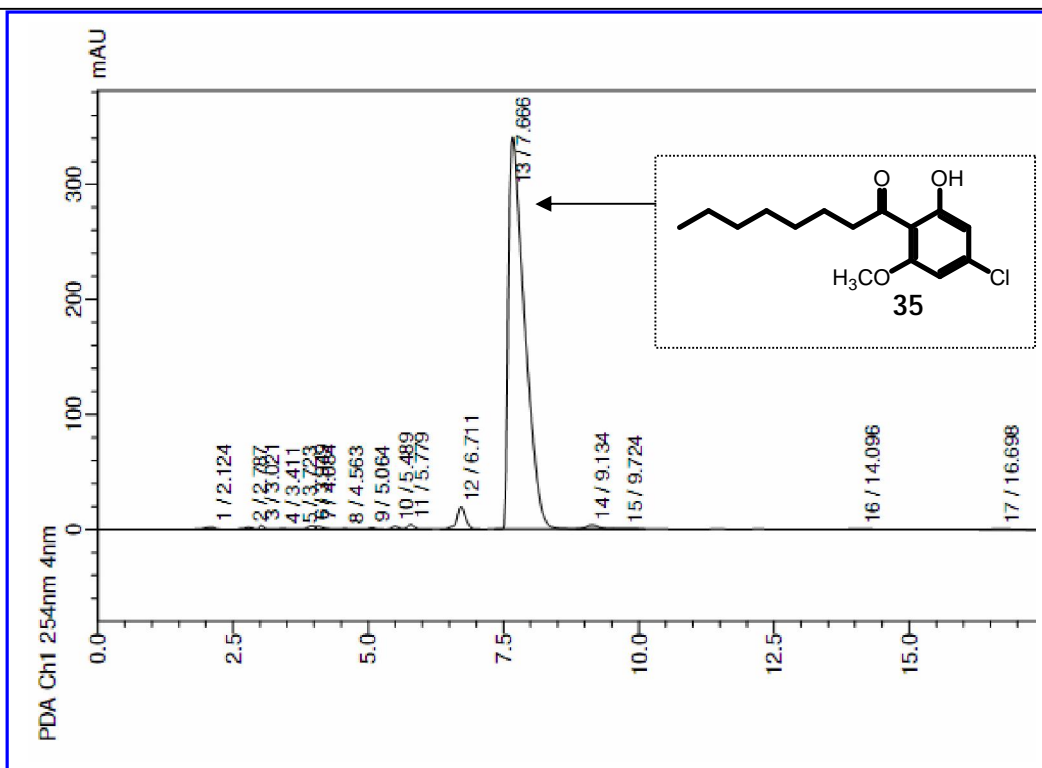
Substância	Eluente (V/V)	Fluxo (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Log P (polaridade relativa)	Tempo de retenção (min)
 (2Z)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3H)-ona (27)	MeOH/H ₂ O (90/10)	0,5	5	5,65±0,60	9,63
 ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil)acético (31)	MeOH/H ₂ O (90/10)	0,5	5	4,31±0,28	5,00
 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil) octan-1-ona (35)	MeOH/H ₂ O (90/10)	0,5	5	6,72±0,37	7,67
 Citosporona A (16)	MeOH/H ₂ O (90/10)	0,5	5	4,21±0,30	7,85
 Citosporona B (17)	MeOH/H ₂ O (90/10)	0,5	50	5,21±0,31	5,68



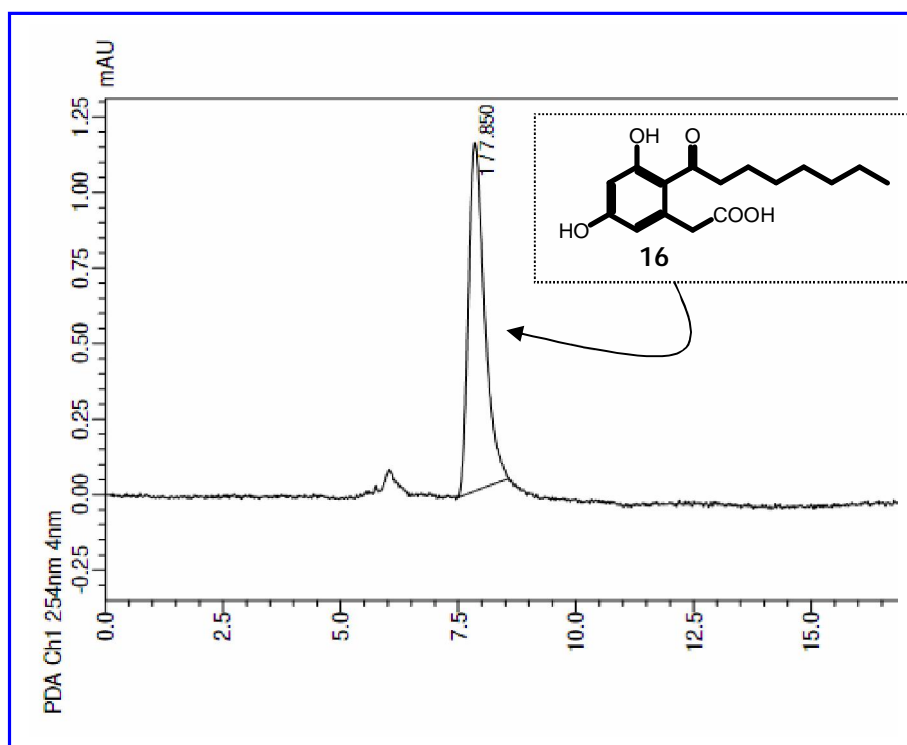
Cromatograma 1: Análise em HPLC (CLAE) do (Z)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3H)-ona (27)



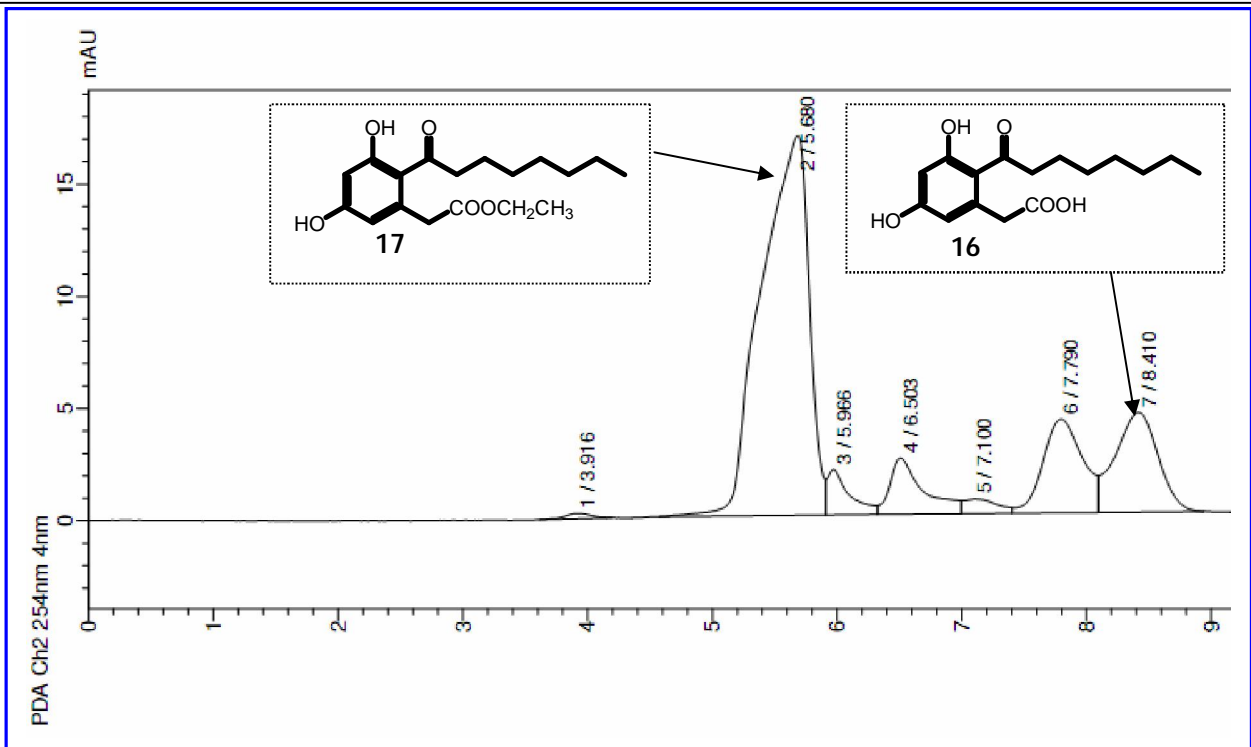
Cromatograma 2: Análise em HPLC (CLAE) do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31)



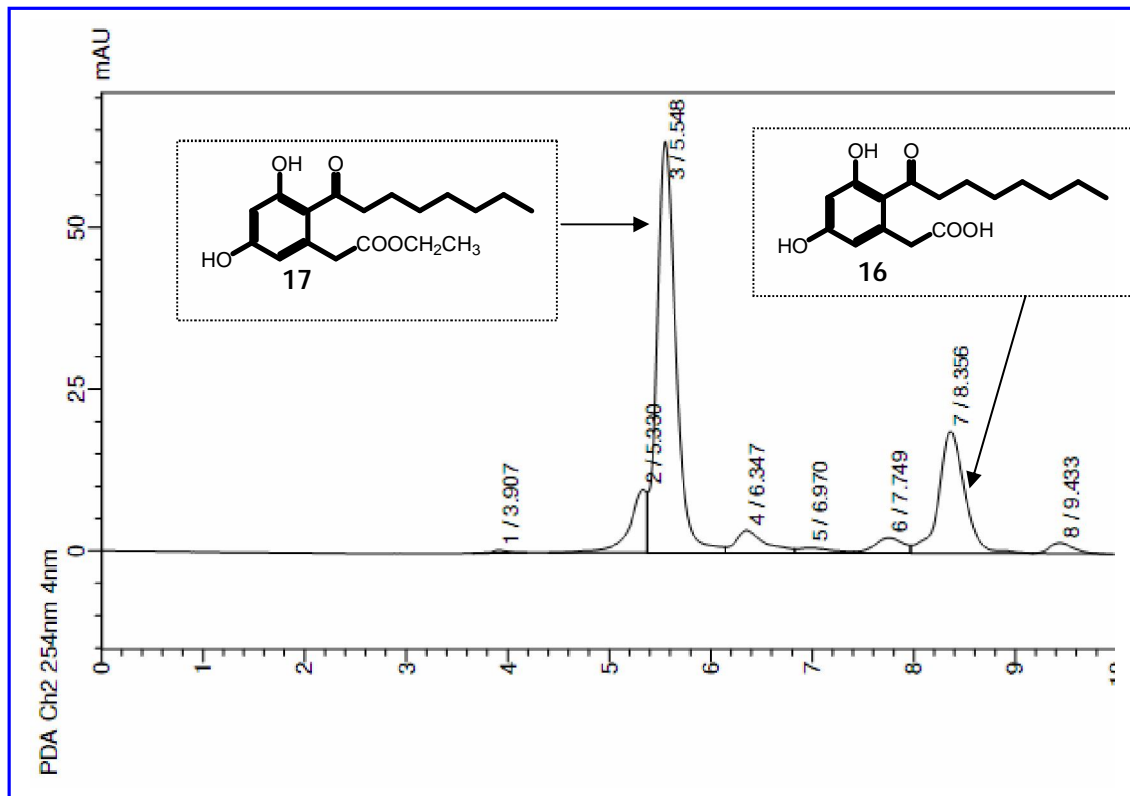
Cromatograma 3: Análise em HPLC (CLAE) do 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35)



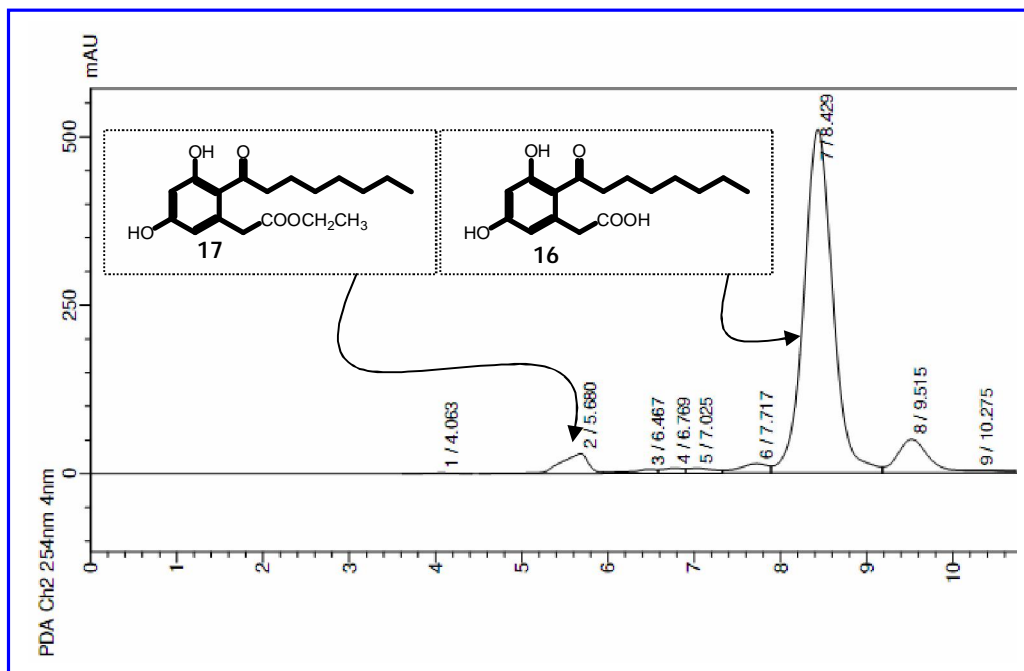
Cromatograma 4: Análise em HPLC (CLAE) do ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16)



Cromatograma 5: Análise em HPLC (CLAE) do acetato de 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) etila (17) – 1ª injeção



Cromatograma 6: Análise em HPLC (CLAE) do acetato de 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) etila (17) – 2ª injeção



Cromatograma 7: Análise em HPLC (CLAE) do acetato de 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) etila (17) – 3ª injeção

Com a molécula da citosporona B (**17**), aconteceu algo interessante durante a sua análise no cromatógrafo. Houve a hidrólise ácida do seu grupamento éster e a formação da citosporona A (**16**). Esta reação ocorreu porque a água utilizada no sistema de solvente contém ácido acético que, apesar de ser um ácido orgânico fraco, é capaz de catalisar a hidrólise e formar a carboxila. Foram feitas três injeções consecutivas da amostra de citosporona B (**17**) e claramente observou-se o decréscimo do pico principal e o aumento do pico relativo a citosporona A (**16**), como mostram os cromatogramas 5, 6 e 7.

Os resultados observados mostraram ainda que o tempo de retenção não depende somente da polaridade relativa. O cálculo da polaridade relativa é um cálculo teórico feito através de programas computacionais (ACD Labs LogP dB) e leva em consideração fatores lipofílicos e hidrofílicos da molécula para medir, de maneira aproximada, seu grau de polaridade. Os resultados estão expressos na tabela como logaritmo de P (Log P) sugere que a citosporona A (**16**) tenha o menor tempo de retenção dentre todos os compostos analisados, pois é a substância mais polar (menor LogP). Mas não é o que foi observado. A citosporona B (**17**) e os compostos **35** e **31** apresentaram tempo de retenção na coluna menor em relação a citosporona A (**16**), embora sejam substâncias menos polares. A ordem crescente de eluição esperada, de acordo com os cálculos teóricos da polaridade relativa (Log P) era a seguinte (figura 38):

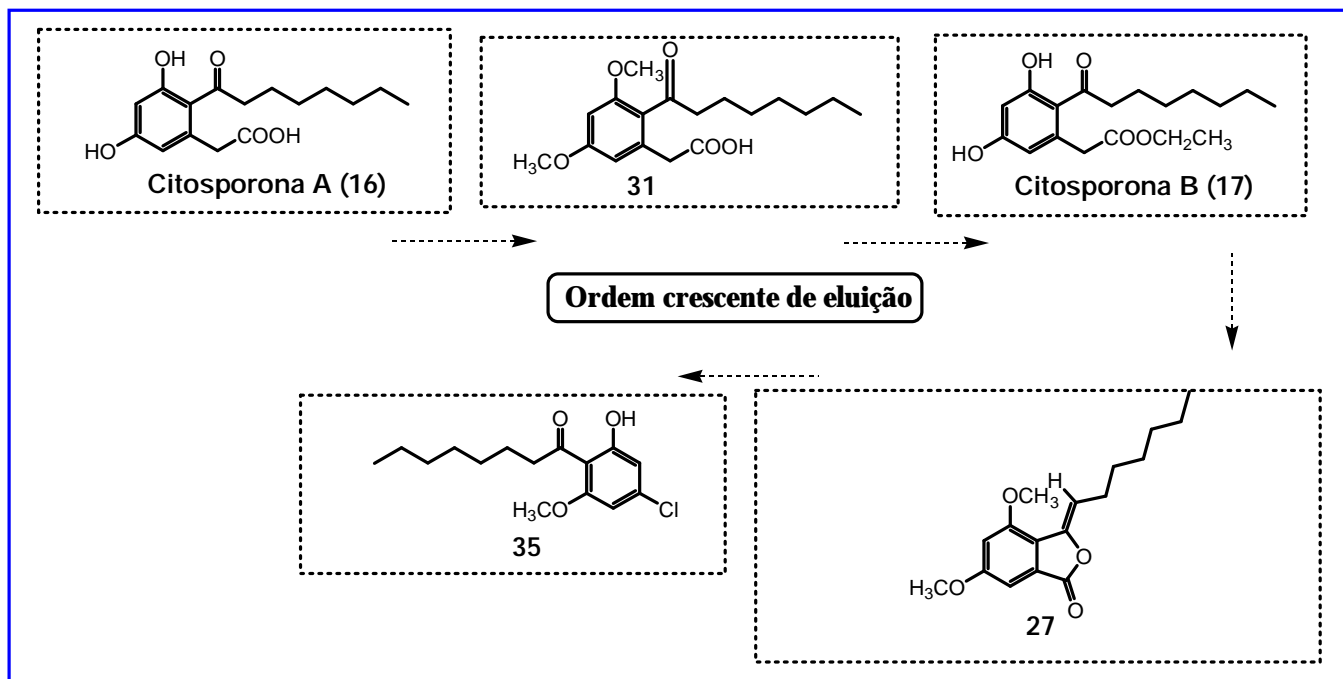


Figura 38: Ordem teórica da eluição dos compostos analisados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE)

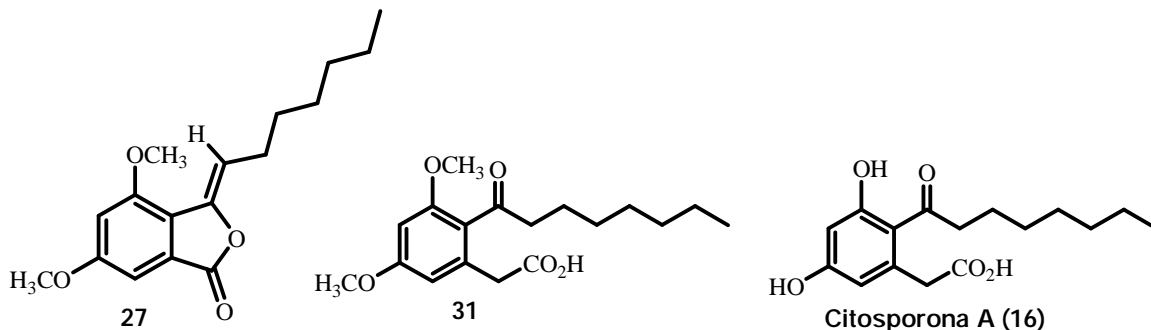
Porém, a ordem observada de eluição, também em ordem crescente foi **31<17<35<16<27**. Provavelmente, há outras interações e propriedades moleculares que interferem no comportamento dessas substâncias na coluna de fase reversa do cromatógrafo, tais como a massa molecular e o tamanho das cadeias carbônicas, que estão intimamente relacionadas com a lipofilicidade das moléculas. Esses resultados sugerem que a polaridade relativa não é a única propriedade molecular importante a ser observada nas análises em colunas de fase reversa.

Em relação à pureza, todas as amostras caracterizavam-se por um bom grau de pureza, o que pode ser constatado através dos cromatogramas apresentados.

3.6. Atividades biológicas

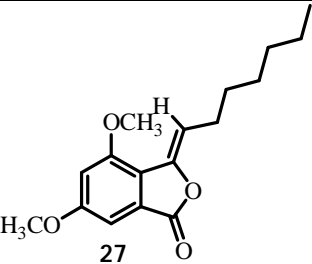
3.6.1. Atividade alelopática sobre sementes de *Lactuca sativa* L.

Foram realizados testes para verificar a ação dos compostos **27**, **31** e a citosporona A (**16**) sobre a germinação das sementes e o desenvolvimento de plântulas de *Lactuca sativa* L. (alface). Foi avaliado o número de sementes germinadas, em relação aos controles, durante três dias e após este período foi realizada a medida das radículas e hipocótilos das plântulas cujas sementes germinaram.



Nos ensaios de germinação, o composto **27** apresentou capacidade de inibição moderada no primeiro dia, porém foi ineficiente na inibição nos segundo e terceiro dias (tabela 19). Tais resultados sugerem que este composto não é inibidor, mas sim retardador da germinação. Esta mesma substância apresentou atividade baixa de inibição do crescimento da radícula, mas inibiu substancialmente o crescimento do hipocótilo, podendo ser um alvo em potencial de herbicidas inibidores do crescimento da parte aérea de plantas invasoras.

Tabela 19: Resultados do teste de atividade alelopática (composto 27)

Substância	Concentração testada (mg/mL)	%inibição germinação das sementes (3 dias)	Tamanho raiz primária (mm)	Tamanho hipocótilo (mm)
Cafeína (padrão)	6	1º dia: 100 2º dia: 100 3º dia: 100	0	0
	5	1º dia: 40 2º dia: 10 3º dia: 8	17	2

O composto **31** causou 100% de inibição da germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. na concentração de 5 mg/mL (gráfico 2). Posteriormente foram realizados testes em três concentrações menores (2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL e 0,625 mg/mL), para determinar a concentração mínima inibitória da germinação (gráficos 1 e 2).

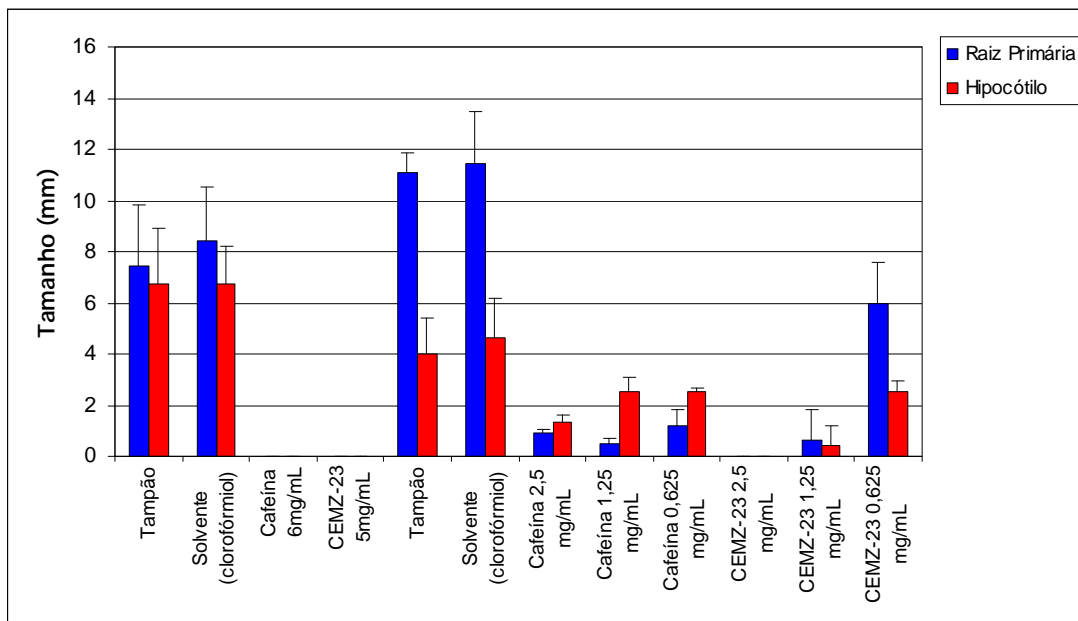


Gráfico 1: Comprimento das radículas e hipocótilos de plântulas de *L. sativa* L. tratadas com diferentes concentrações do composto 31

*o código CEMZ-23 corresponde à amostra relativa ao produto 31.

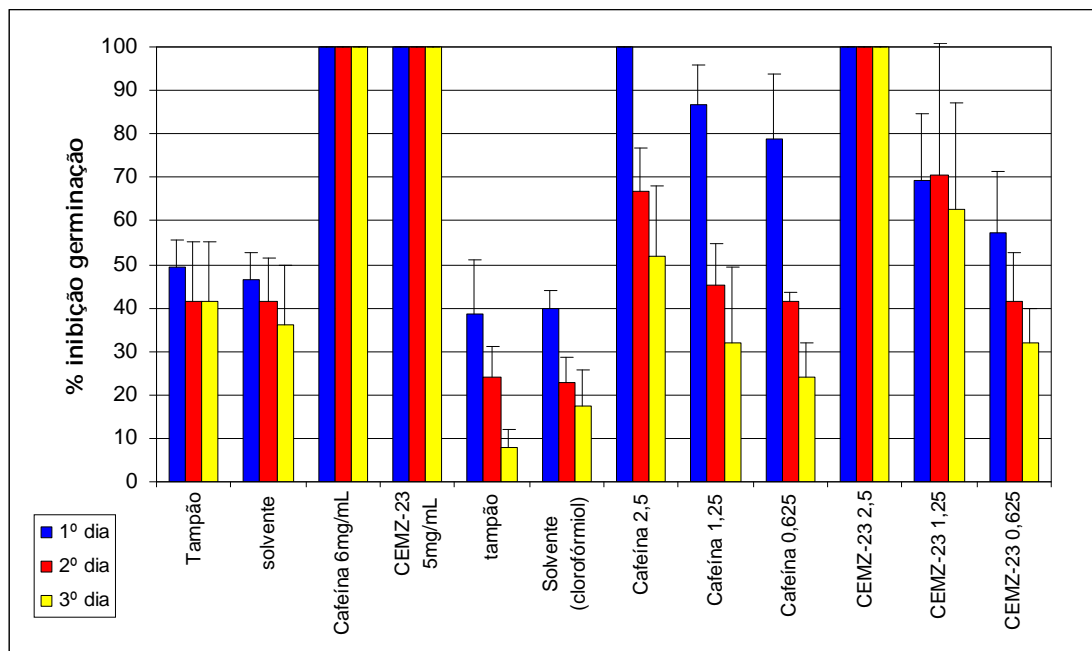


Gráfico 2: Porcentagem de inibição da germinação de sementes de *L. sativa* L. do composto 31 em diferentes concentrações

*o código CEMZ-23 corresponde à amostra relativa ao produto 31.

Observou-se que na concentração de 2,5 mg/mL o composto **31** também causou 100% de inibição, enquanto que nas concentrações de 1,25 mg/mL e 0,625 mg/mL houve 67% e 43% de inibição da germinação, respectivamente. Nos ensaios para verificar a ação do composto **31** sobre o desenvolvimento de hipocótilos e radículas de *Lactuca sativa* L., verificou-se que somente na concentração de 1,25 mg/mL, houve uma redução no tamanho da radícula de 94%, como também uma redução de 89% no tamanho do hipocótilo. Na concentração de 0,625 mg/mL, o composto **31** foi razoavelmente ativo sobre os crescimentos da radícula (46% inibição) e do hipocótilo (38% de inibição).

O produto **31**, um precursor na síntese da citosporona A (**16**), tem uma massa molecular de 322 g/mol. Um cálculo aproximado indica que o valor de sua concentração mínima inibitória para inibir a germinação de 50% das sementes (IC_{50}) é de 2,48 mM. Estes resultados mostram que a substância **31** apresenta alta atividade alelopática sobre a germinação de sementes, bem como sobre o desenvolvimento de radículas ($IC_{50} = 2,11$ mM) e hipocótilos ($IC_{50} = 2,55$ mM). A título de comparação, o herbicida comercial acetocloro[®] apresenta uma IC_{50} de 10^{-5} M para a germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. [CAZAR *et al.*, 2005]. Embora com uma atividade bem menor do que o produto comercial citado, pelos resultados obtidos, o composto **31** é um candidato a princípio ativo de herbicidas pós-semeadura. Sua atividade pode ser potencializada através de modificações estruturais simples, como a neutralização do grupo ácido e a produção do sal de ácido carboxílico, para melhorar a sua solubilidade em água, um fator que afeta diretamente a atividade alelopática.

A citosporona A (**16**) foi submetida à avaliação de atividade alelopática, através da mesma metodologia. Como seu precursor sintético, o produto **31**, mostrou uma atividade considerável sobre a germinação das sementes de alface e sobre o crescimento da radícula e do hipocótilo, além do registro de atividade alelopática da citosporona A (**16**) na literatura [VOBLIKOVA *et al.*, 1985], as concentrações testadas foram 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL e 0,312 mg/mL (gráficos 3 e 4). Além disso, estendeu-se o período de contagem das sementes germinadas, para uma melhor avaliação do tempo de ação deste composto sobre o processo de germinação.

A citosporona A (**16**) foi mais ativa sobre a germinação do que a cafeína nas concentrações de 1,25 mg/mL e 0,625 mg/mL, nos três primeiros dias de testes (65% e 54% de inibição, respectivamente). Porém esta eficácia diminuiu nos dias subsequentes (gráfico 3). Do mesmo modo, a citosporona A (**16**) inibiu substancialmente o crescimento da raiz primária e do hipocótilo (gráfico 4). Nas concentrações de 1,25 mg/mL e 0,625 mg/mL, a amostra foi ativa na inibição do crescimento do hipocótilo (85% e 52%, respectivamente) e mostrou atividade ainda superior para a raiz primária (94% e 88%, respectivamente),

em comparação com a substância padrão, a cafeína. A inibição dos crescimentos do hipocótilo (23%) e da raiz primária (45%) foi observada mesmo na concentração mais baixa testada, de 0,312 mg/mL.

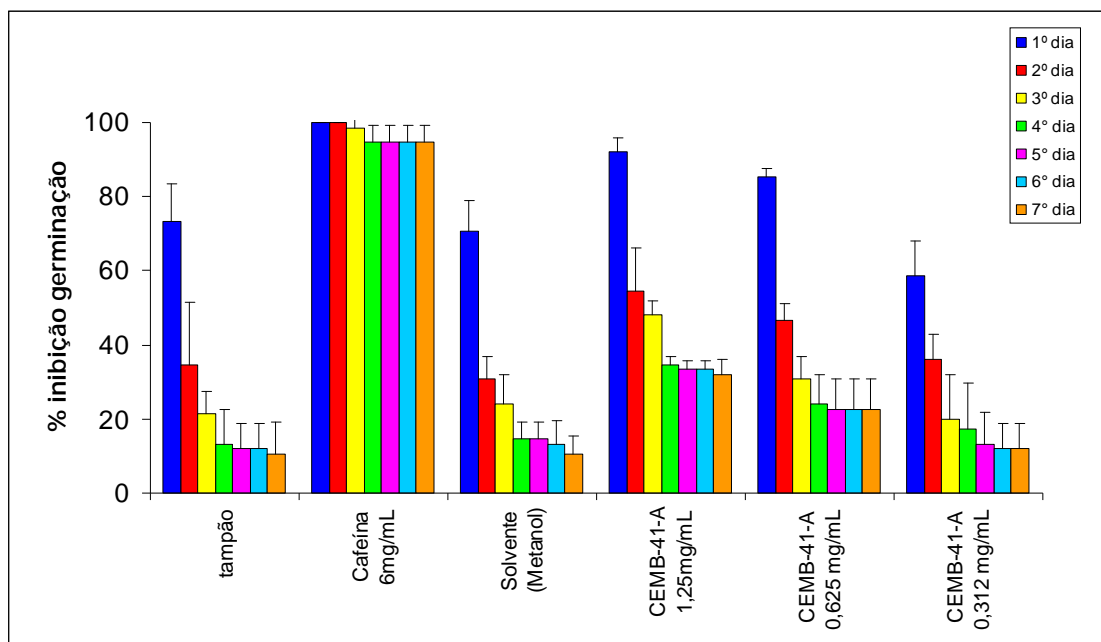


Gráfico 3: Porcentagem de inibição da germinação de sementes de *L. sativa* L. da citosporona A (16)

*o código CEMB-41-A corresponde à amostra relativa ao produto 16

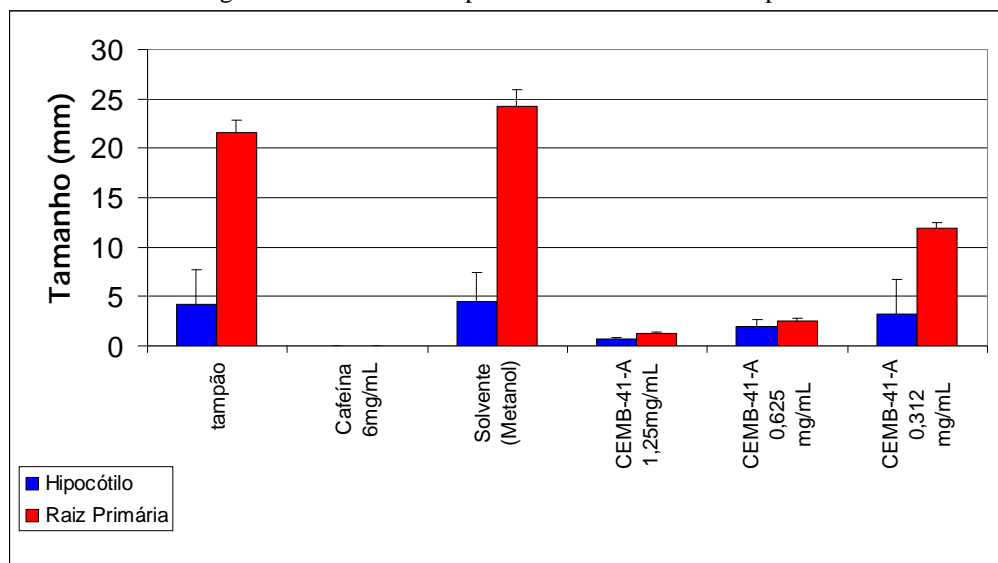


Gráfico 4: Comprimento da radícula e hipocótilo de plântulas de *L. sativa* L. tratadas com diferentes concentração de citosporona A (16)

*o código CEMB-41-A corresponde à amostra relativa ao produto 16

Diante desses resultados, e sabendo que a citosporona A (16) tem uma massa molecular de 294 g/mol, um cálculo aproximado indica que sua concentração mínima inibitória para 50% das sementes (IC₅₀) é de 2,04 mM, ou seja, esta substância foi mais ativa do que o produto 31, seu precursor na rota sintética. Tais dados são suficientes para afirmar que as hidroxilas fenólicas têm função importante neste

tipo de atividade biológica, pois a única diferença estrutural entre os produtos **16** e **31** é o par de hidroxilas fenólicas no lugar das metoxilas, respectivamente (figura 39). Assim como a substância **31**, a citosporona A (**16**) também é um excelente candidato a herbicida pós-semeadura.

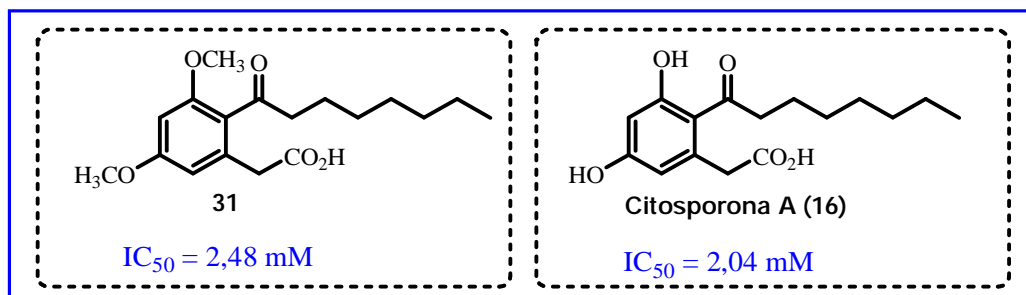


Figura 39: Concentração mínima inibitória para 50% das sementes (IC₅₀) dos produtos 31 e 16

Há evidências científicas de que moléculas cujas estruturas químicas apresentem alguma separação de cargas iônicas com distância da ordem de 0,5 nm demonstram atividade alelopática, como o ácido indolacético, o ácido fenilacético e o agroquímico 2,4-D [PORTER e THIMANN, 1965]. Esta separação de cargas é observada também na estrutura química do produto **31** e da citosporona A (**16**), de maneira semelhante, como se observa na figura 40.

A separação das cargas parece ser uma característica em comum entre diversas moléculas com poder de atividade alelopática, fator igualmente observado nas estruturas de **16** e **31**. O receptor biológico responsável do vegetal deve aceitar moléculas com essa característica, e dessa forma elas interferem no desenvolvimento da planta. Nossas duas amostras apresentam essa separação de cargas de forma muito semelhante ao ácido fenilacético, porém o grupo acila presente nas estruturas da citosporona A (**16**) e do produto **31** aumenta a concentração da carga positiva localizada no anel aromático, por ressonância.

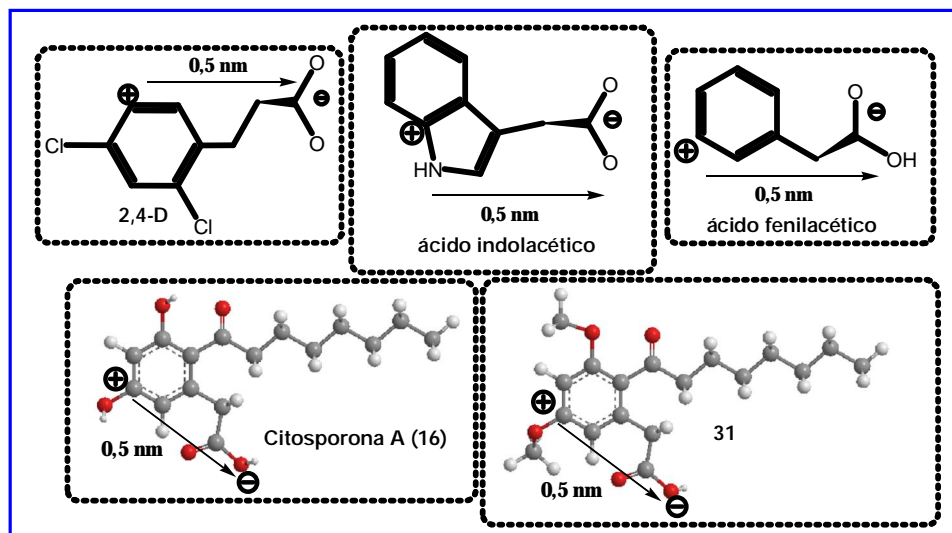


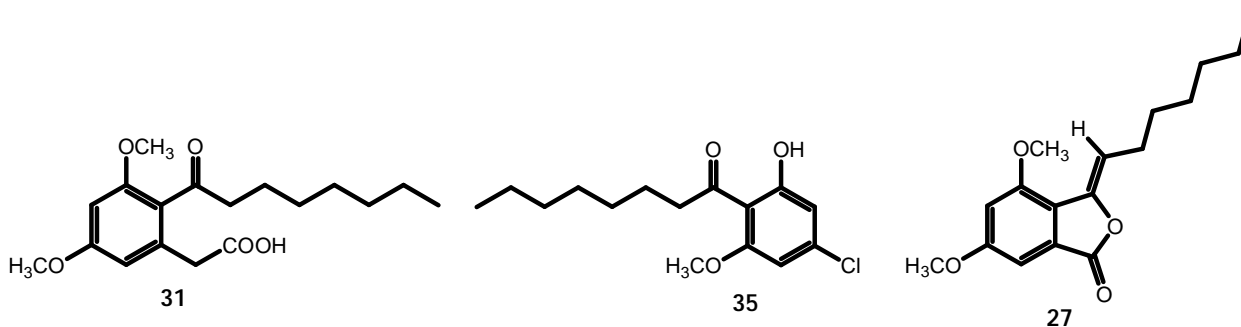
Figura 40: Separação de cargas iônicas para a citosporona A (16) e o produto 31

*Estruturas tridimensionais calculadas no programa Chem Draw 3D Ultra 8.0

3.6.2. Atividade inibitória da enzima tirosinase

3.6.2.1. Em solução

Os compostos **27**, **31** e **35** foram testados frente à enzima tirosinase, para avaliar o potencial de inibição da atividade enzimática de cada uma dessas amostras. A enzima tirosinase está relacionada, por exemplo, com a formação do exoesqueleto de insetos e catalisa uma das etapas da biossíntese da melanina, substância responsável pela pigmentação da pele [MATSUBARA *et al*, 1997], entre outras funções biológicas importantes.



As amostras foram solubilizadas em água:Tween 20 (90:10, V:V), sistema no qual somente a enol lactona **27** permaneceu insolúvel, mesmo após intensa agitação e aquecimento. Após a adição de tampão fosfato, L-DOPA e solução da enzima tirosinase (em tampão fosfato) ao meio reacional (esquema 27), foram realizadas as leituras das absorvâncias no espectrômetro. O gráfico 5 mostra as leituras obtidas:

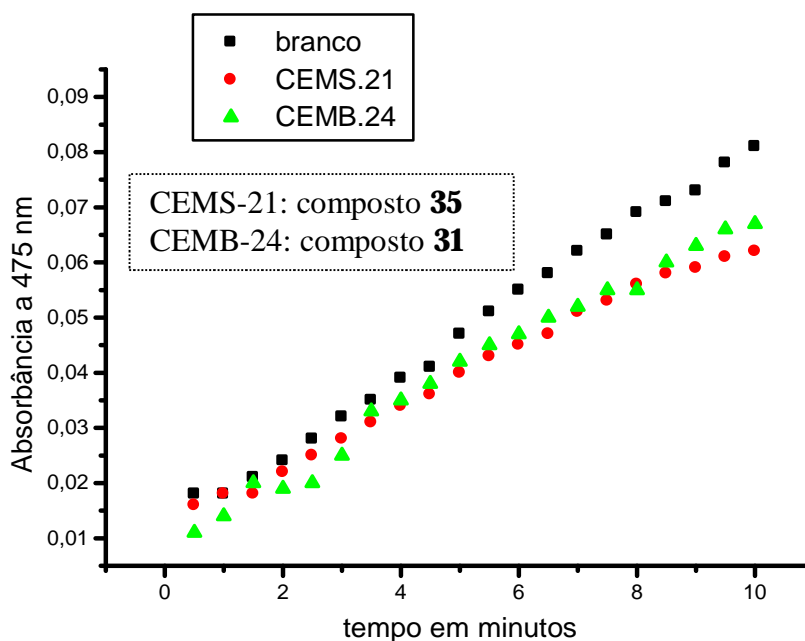
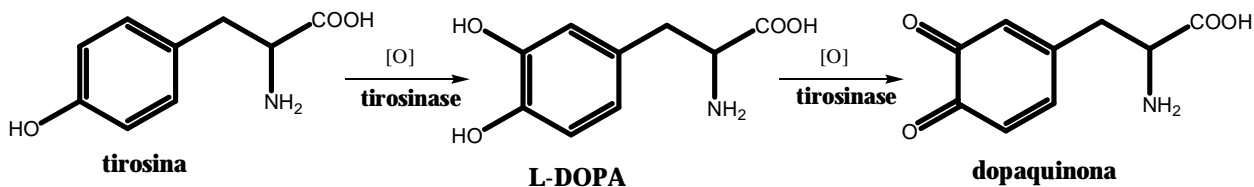


Gráfico 5: Leituras de absorvância para os compostos 31 e 35 para a avaliação da atividade inibitória da enzima tirosinase

A absorvância reduzida em relação ao valor do branco, no gráfico, significa que está ocorrendo a inibição na atividade da enzima, pois o produto da reação catalisada pela tirosinase (dopaquinona) é convertido a dopacromo, e este torna a solução mais escura. Portanto, onde não existe inibidor algum, a absorvância deve aumentar, exatamente como ocorre com a linha do branco.



Esquema 27: Reações catalisadas pela enzima tirosinase

*a dopaquinona sofre um rearranjo a dopacromo, tornando a solução escurecida

O percentual de inibição é calculado segundo a fórmula $(A_{\text{branco}} - A_{\text{inibidor}})/A_{\text{branco}} * 100\%$, considerando a absorvância do branco e das amostras após 10 minutos de reação. Na tabela 20, encontram-se os resultados.

Tabela 20: Resultados dos testes de atividade inibitória da enzima tirosinase para os compostos 31, 35 e 27

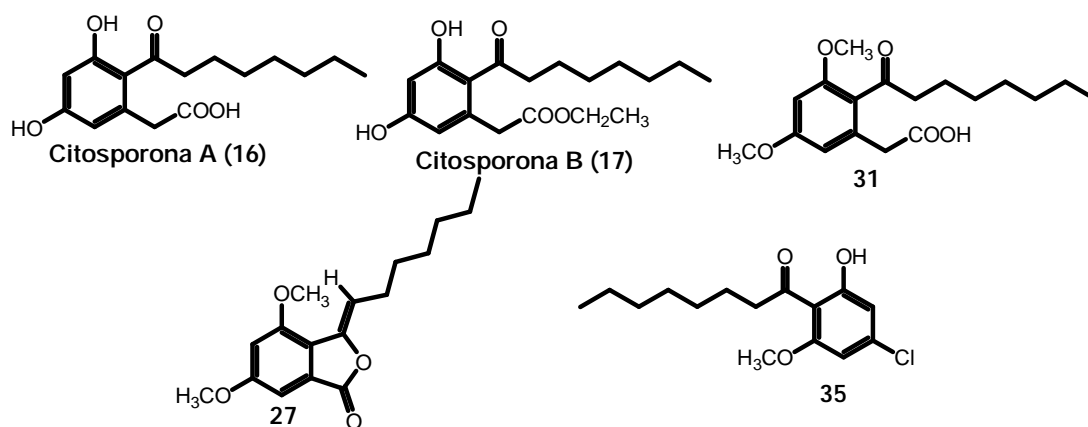
Substância	Concentração final testada (mM)	Inibição da atividade enzimática (%)
 31	1	15,85
 35	1	20,73
 27	Insolúvel nesse sistema de solvente	Impossível determinar

As amostras apresentaram uma inibição moderada da atividade da enzima tirosinase, na concentração testada de 1 mM. O composto **35** foi ligeiramente mais ativo do que o composto **31**.

3.6.2.2. Em camada delgada

Como não houve solubilidade para a enol lactona **27** no solvente água:Tween 20 (90:10, V:V), devido ao seu baixo grau de polaridade e alto fator lipofílico, foi providenciada uma metodologia alternativa para esta avaliação biológica, em cromatografia de camada delgada. Neste caso, cada amostra poderia ser solubilizada em um solvente apropriado, desde que esse solvente fosse volátil o bastante para não interferir na avaliação do teste e na visualização dos halos formados na placa cromatográfica.

Além do composto **27**, as citosporonas A (**16**) e B (**17**) e os compostos **31** e **35** foram testados frente à enzima tirosinase em cromatografia de camada delgada (CCD). A substância utilizada como controle positivo foi o ácido ascórbico, que possui conhecida atividade inibitória da enzima tirosinase [ROS *et al.*, 1993].



Os resultados observados na placa cromatográfica estão mostrados na figura 41. Na primeira coluna, estão os pontos de aplicação correspondentes aos brancos: água, clorofórmio, acetato de etila e metanol, nessa seqüência, de cima para baixo. Na segunda coluna, estão os números das cinco amostras testadas. Nas cinco colunas seguintes (3^a a 7^a), estão os pontos de aplicação das amostras, com uma massa aplicada específica (10 µg a 0,75 µg) e na última coluna, as cinco aplicações do ácido ascórbico (controle).

	Amostras (n°)					Massa aplicada (µg) controle
	Branco	10	5	2,5	1,25	
H ₂ O	31					1,10
CHCl ₃	16					2,20
	27					4,40
AcOEt	35					8,80
MeOH	17					17,6

Figura 41: Foto da placa cromatográfica com os resultados da ação das substâncias 16, 17, 27, 31 e 35 e do ácido ascórbico sobre a atividade da enzima tirosinase

A reação observada na placa cromatográfica é a oxidação de L-DOPA a dopaquinona, catalisada pela enzima tirosinase (esquema 27). A solução de L-DOPA é incolor, porém a dopaquinona sofre rearranjo a dopacromo e este apresenta uma certa coloração, por isso a placa cromatográfica fica escurecida. Os halos claros observados na placa são as regiões onde a oxidação não procedeu, pois há uma substância que impediu a ação catalítica da enzima. Ou seja, o halo claro indica que a substância é inibidora da atividade da enzima tirosinase.

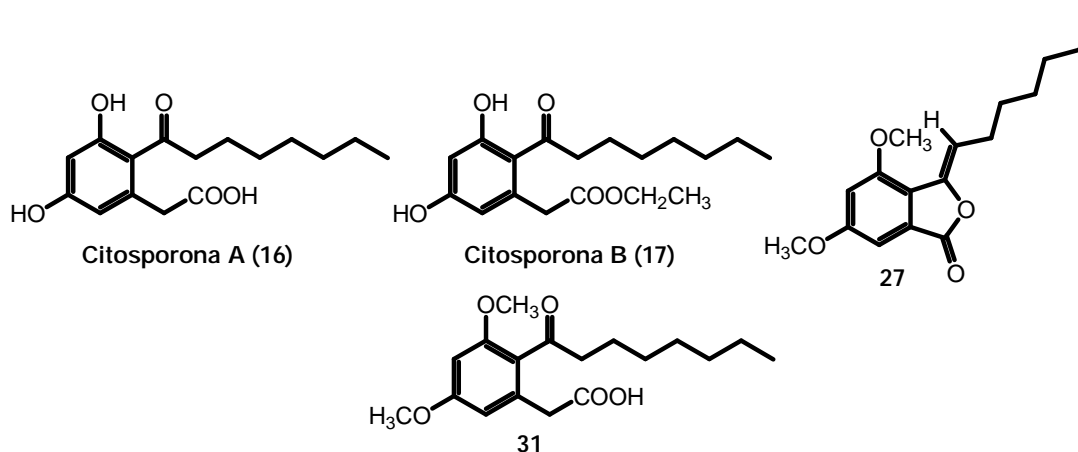
Observando primeiro as manchas do ácido ascórbico, utilizado como controle positivo, nota-se que ele inibe a ação da enzima com 17,6 µg de aplicação mas não inibe com uma massa menor do que 8,80 µg, portanto o ácido ascórbico inibiu a atividade da enzima tirosinase em concentração maior do que 8,80 µg e menor ou igual que 17,6 µg. Entre as amostras, exceto o composto **35**, todas inibiram a atividade enzimática nas cinco concentrações aplicadas (10 µg, 5µg, 2,5 µg, 1,25 µg e 0,75 µg).

No teste realizado em solução, o composto **35** havia mostrado atividade inibitória de 20,73% na concentração de 1 mM, mas não foram observados halos claros nos seus pontos de aplicação no teste em CCD. Uma possível explicação para isso é que o solvente utilizado na solubilização do composto **35**, o metanol, tenha interferido na ação inibitória da amostra através do seu halo de difusão na placa.

Estão sendo realizados estudos específicos para uma melhor compreensão das correlações estrutura química – atividade inibitória da enzima tirosinase. Fatores como o tamanho da cadeia alquílica e a disposição das hidroxilas ou metoxilas no anel aromático podem ser importantes para o entendimento de como essas substâncias agem na inibição da atividade enzimática.

3.6.3. Atividade inseticida sobre larvas de *Aedes aegypti*

Os compostos **27** e **31** e as citosporonas A (**16**) e B (**17**) foram testados sobre larvas do mosquito transmissor da dengue, o *Aedes aegypti*.



Nenhum desses compostos interferiu significativamente no desenvolvimento das larvas do mosquito, na concentração testada de 0,012 mg/mL. O composto **31** provocou a morte de cerca de 3% das larvas e as citosporonas A (**16**) e B (**17**) foram fatais para 0,63% e 1,25% das larvas, respectivamente.

Esta pequena mortandade não indica, necessariamente, que esses compostos não tenham atividade inseticida sobre as larvas de *Aedes aegypti*, mas é suficiente para afirmar que esta atividade inseticida é pequena em baixas concentrações. Os larvicidas comerciais apresentam uma toxicidade intensa para as larvas do mosquito transmissor da dengue em concentração bem baixa e este teste procurou comparar esta concentração com o poder tóxico das amostras testadas.

3.6.4. Atividade inseticida sobre *Sitophilus zeamais* (gorgulho-do-milho)

Os compostos **27**, **31**, e **35** e as citosporonas A (**16**) e B (**17**) foram testados sobre o inseto adulto *Sitophilus zeamais*, uma praga agrícola comum conhecida como gorgulho-do-milho. Os resultados encontram-se na tabela 21.

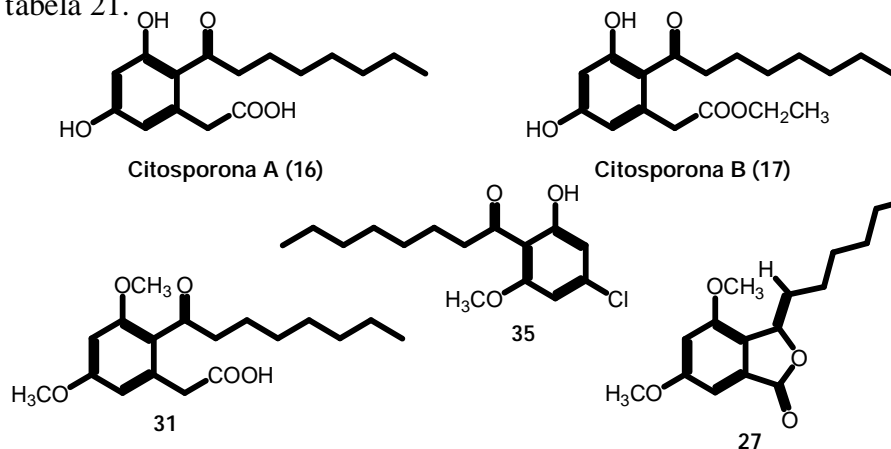
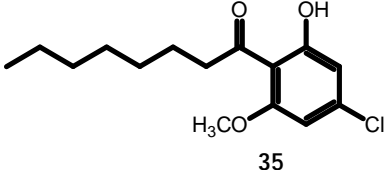
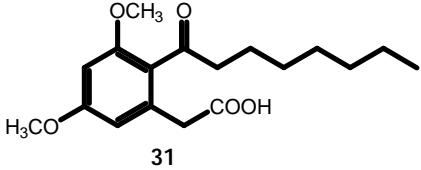
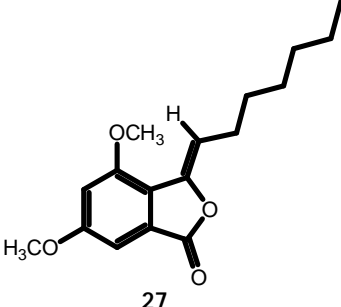


Tabela 21: Mortalidade (%) de adultos de *Sitophilus zeamais* em grãos de trigo tratados com amostras

Substância	Mortalidade/Dia	
	5°	10°
 35	12,0 (a)	17,0 (a)
 31	7,50 (b)	5,5 (c)
 27	4,0 (c)	11,5 (b)
Controle	0,5 (d)	1,0 (d)

Médias seguidas pela mesma letra não diferiram uma da outra pelo teste de Tukey em 5% de significância.

Para a metodologia empregada, os lipídeos fenólicos (citosporonas A (**16**) e B (**17**)) não apresentaram efeito inseticida relevante e só foi registrada mortalidade de adultos a partir do quinto dia, por isso a tabela 21 mostra os resultados dos dias 5 e 10, somente. Por outro lado, os compostos **27** e **31** apresentaram um baixo efeito sobre o inseto testado, e o composto **35** foi razoavelmente ativo, sendo fatal para cerca de 17% dos insetos no décimo dia.

Como esse teste implica na pulverização dos grãos de trigo com as amostras solubilizadas em um solvente adequado, é possível que a baixa atividade seja decorrente da falta de permeabilidade das amostras sobre a superfície do trigo. É evidente que, uma vez comprovada a possível atividade inseticida dos compostos testados, essas substâncias passarão por um processo de formulação industrial, o qual destina-se a melhorar os aspectos físicos dos princípios ativos de misturas inseticidas, como solubilidade em água e conseqüente permeabilidade na planta e/ou no inseto, estabilidade térmica, entre outros fatores importantes.

Parte Experimental

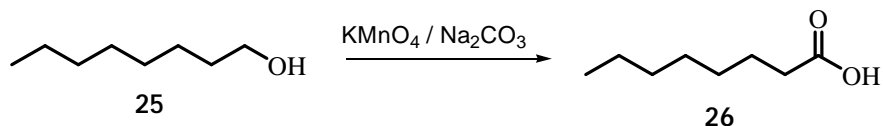
4. Parte experimental

4.1. Material e métodos

- Os solventes utilizados foram: éter etílico, acetato de etila, hexano, diclorometano, metanol, clorofórmio e tolueno. Eles foram evaporados à pressão reduzida em rotavapor Fisaton 802D. Os solventes tratados e recuperados foram destilados no próprio laboratório e outros foram adquiridos das marcas Merck, Synth, Dinâmica e Chemco.
- Os principais reagentes utilizados foram: *n*-octanol, permanganato de potássio, carbonato de sódio, cloreto de alumínio anidro, cloreto de tionila, ácido 3,5-dimetoxibenzóico, ácido 3,5-dimetoxifenil acético, brometo de tetrabutilamônio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico concentrado, ácido sulfúrico concentrado, cloreto de sódio, boridreto de sódio, álcool etílico anidro e sulfato de magnésio. Todos eles foram adquiridos comercialmente de diversas empresas do setor de produtos químicos, como Acros, Synth e Merck.
- Todas as amostras e reagentes foram pesados na balança BG-100 Gehaka com precisão 0,0001.
- Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em 300 MHz e de ^{13}C em 75 MHz em espectrômetro Bruker AVANCE DPX-300 do Departamento de Química da UFMS. As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 , CD_3OD ou DMSO-d_6 e os deslocamentos químicos foram registrados em valores de (ppm) e as constantes de acoplamento foram expressas em Hertz (Hz). Os sinais foram caracterizados como: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), m (multiplete), q (quarteto) e qt (quinteto).
- As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram feitas em cromatofolhas em alumínio e sílica gel 60 F₂₅₄, de tamanhos variados, em geral com 1 cm de base e 4 cm de altura. Para a visualização dos componentes, foi utilizada uma lâmpada ultravioleta (254 e 366 nm), mergulho em solução de vanilina e aquecimento a 100°C ou no vapor de iodo (I₂).
- As colunas cromatográficas foram preparadas com gel de sílica 60 (0,040 – 0,063 mm) da Merck. Os eluentes utilizados foram misturas de hexano, acetato de etila e diclorometano, em proporções variadas, dependentes das polaridades relativas das substâncias a serem separadas.
- Os programas computacionais usados foram: ChemDraw Ultra 8.0 e ACD Labs LogP dB, para nomear as substâncias de acordo com a nomenclatura IUPAC e realizar cálculos teóricos diversos. ACD Labs 1D (e 2D) NMR Manager e ACD Labs UV-IR Manager, para o processamento de espectros de RMN e IV.
- O cromatógrafo líquido utilizado tem a bomba modelo Shimadzu LC6-AD.

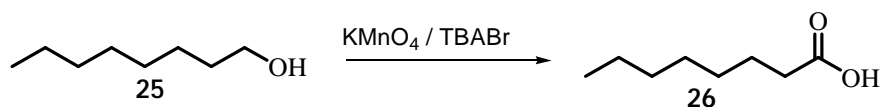
4.2. Procedimentos experimentais (síntese)

4.2.1. Ácido octanóico (procedimento 1)



Em um balão de fundo redondo, uma massa de 4,0 g (31,0 mmol) de álcool *n*-octílico foi misturada com 6,6 mL de solução aquosa contendo 2,0 g (18,9 mmol) de carbonato de sódio (Na₂CO₃). Então, um volume de 121,8 mL de solução aquosa contendo 10,3 g (65,2 mmol) de permanganato de potássio (KMnO₄) foi adicionado ao meio. A reação prosseguiu à baixa temperatura (4°C), sobre um banho de gelo e água, por 4 horas, com agitação constante. Depois, a reação prosseguiu à temperatura ambiente. Após 12 horas, a mistura foi filtrada. O líquido filtrado foi coberto com éter etílico em um funil de separação, e a fase etérea (orgânica) foi descartada. Este procedimento removeu o álcool que não reagiu, já que o ácido estava na forma de sal carboxílico e encontrava-se na fase aquosa. A fase aquosa foi acidificada com ácido sulfúrico diluído, para então ser extraída com éter etílico (3x40,0 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio (MgSO₄), filtrada e concentrada no rota-evaporador. Rendimento: 800 mg, 18%, líquido transparente levemente amarelado. Dados espectrais: RMN de ¹H) _H(300 MHz, CDCl₃): 2,38 (t, *J* = 6 Hz, 2H); 1,67 (qt, *J* = 6 Hz, 2H); 1,20 a 1,40 (m, 8H) e 0,91 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H). RMN de ¹³C) _C(75 MHz, CDCl₃): 179,2 (C); 33,9 (CH₂); 31,6 (CH₂); 29,0 (CH₂); 28,9 (CH₂); 24,7 (CH₂); 22,6 (CH₂) e 14,0 (CH₃).

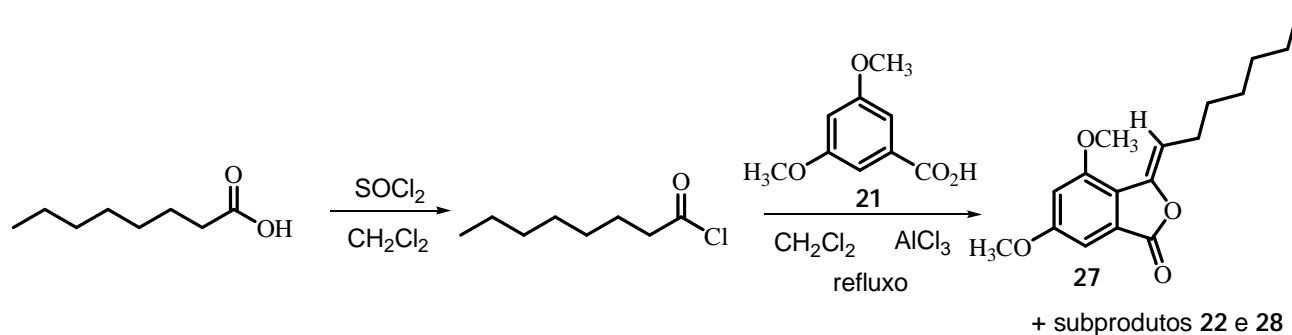
4.2.2. Ácido octanóico (procedimento 2) [MAHMOOD *et al*, 1999]



Uma massa de 4,0 g (31,0 mmol) de álcool *n*-octílico foi misturada com 79,0 mg (0,25 mmol) de brometo de tetrabutilamônio (TBABr) em um balão com 50,0 mL de água, adaptado a um condensador. A mistura foi aquecida até 70°C, sob agitação. Então, 50,0 mL de uma solução aquosa contendo 6,8 g (43,23 mmol) de permanganato de potássio (KMnO₄) foi adicionada em alíquotas de 10%, por um período de 2 horas e 30 minutos. A reação permaneceu sob aquecimento (70°C) e agitação por 4 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), com eluente acetato de etila/hexano (40/100), revelado em vanilina. Após esse período, deixou-se o balão esfriar. A mistura foi filtrada em celite, preferencialmente sob pressão reduzida, lavando-se o sólido com água morna (60°C). Extraíu-se

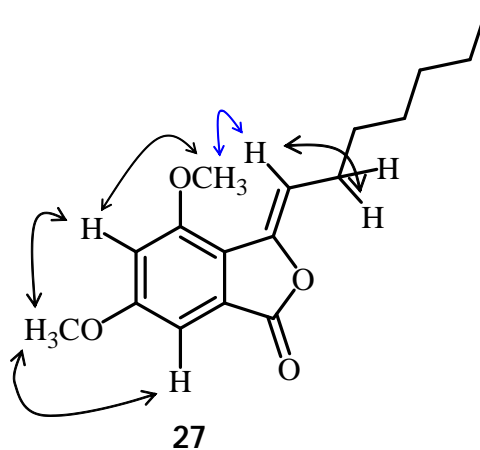
com éter etílico e a fase orgânica, contendo o álcool que não reagiu, foi descartada. A fase aquosa foi acidificada até pH 1, com ácido sulfúrico concentrado, e extraída com éter etílico. A fase orgânica foi lavada com água destilada e secada com sulfato de magnésio anidro (MgSO_4). Após a filtração, removeu-se o solvente orgânico no rota-evaporador. Rendimento: 3,0 g, 70%, líquido transparente levemente amarelado.

4.2.3. (*Z*)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (**27**)



Formação do cloreto de ácido: em um balão com 7,5 mL de diclorometano seco, foram adicionados 356,0 mg (2,47 mmol) de ácido octanóico, e 0,36 mL (4,94 mmol) de cloreto de tionila (SOCl_2). A mistura foi agitada e aquecida sob refluxo por 4 horas. Após o resfriamento, o solvente foi evaporado. Nesse caso, na equalização da pressão, utilizou-se um tubo secante para evitar a entrada de umidade do ar. Então, um volume de 9,4 mL de diclorometano seco foi adicionado ao balão, onde se encontrava o cloreto de ácido formado. Acilação de Friedel-Crafts: para uma solução de 300 mg (1,65 mmol) de **21** em 7,0 mL de diclorometano seco, foi adicionado uma massa de 660 mg (4,94 mmol) do cloreto de alumínio anidro (AlCl_3), seguido da adição da solução do cloreto de ácido em diclorometano no balão da reação, que deve estar sobre um banho de gelo e água. Então, a mistura foi agitada por 6 horas, à temperatura ambiente. Tratou-se a mistura com 20,0 mL de HCl 18%. A solução resultante foi extraída com acetato de etila. O extrato foi lavado com hidróxido de sódio (NaOH) 5%, água destilada, solução aquosa de cloreto de sódio e finalmente secado com sulfato de magnésio anidro (MgSO_4). Após a filtração, os solventes foram evaporados e o produto purificado em coluna cromatográfica com sílica de baixa granulometria (0,040 mm a 0,063 mm), com eluente 6/1 (hexano/acetato de etila). Material de partida recuperado: 189,0 mg. Rendimento: 160,0 mg, 93%, cristal branco. Ponto de fusão: 85°C. Dados espectrais: RMN de ^1H) $_{\text{H}}$ (300 MHz, CDCl_3): 6,90 (d, $J=3$ Hz, 1H); 6,67 (d, $J=3$ Hz, 1H); 5,77 (t, $J=9$ Hz, 1H); 3,92 (s, 3H); 3,85 (s, 3H); 2,42 (q, $J=9$ Hz e 6 Hz, 2H); 1,28 a 1,54 (m, 8H) e 0,87 (t, $J=6$ Hz, 3H). RMN de ^{13}C) $_{\text{C}}$ (75 MHz, CDCl_3): 171,5 (C); 162,1 (C); 155,4 (C); 143,9 (C); 127,2 (C); 121,7 (C); 112,6 (CH); 105,2 (CH); 98,2

(CH); 56,0 (CH₃); 55,8 (CH₃); 31,9 (CH₂); 29,5 (CH₂); 29,0 (CH₂); 26,2 (CH₂); 22,6 (CH₂) e 14,1 (CH₃).
RMN NOE 2D) correlações observadas (300 MHz, CDCl₃):

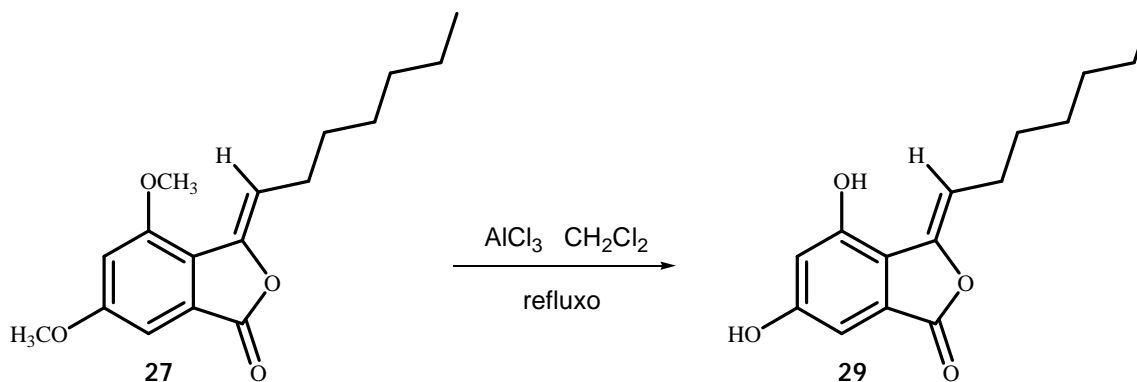


Correlações ¹H x ¹H NOE 2D

IV (máx (cm⁻¹)): 3014; 2954; 2923; 2852; 1772; 1760; 1683; 1620; 1596; 1506; 1326; 1157 e 1035.

Pastilha de KBr. EM (*m/z*): fórmula molecular calculada C₁₇H₂₂O₄; [M⁺ = 290]; [M⁺ - C₅H₁₁ = 219].

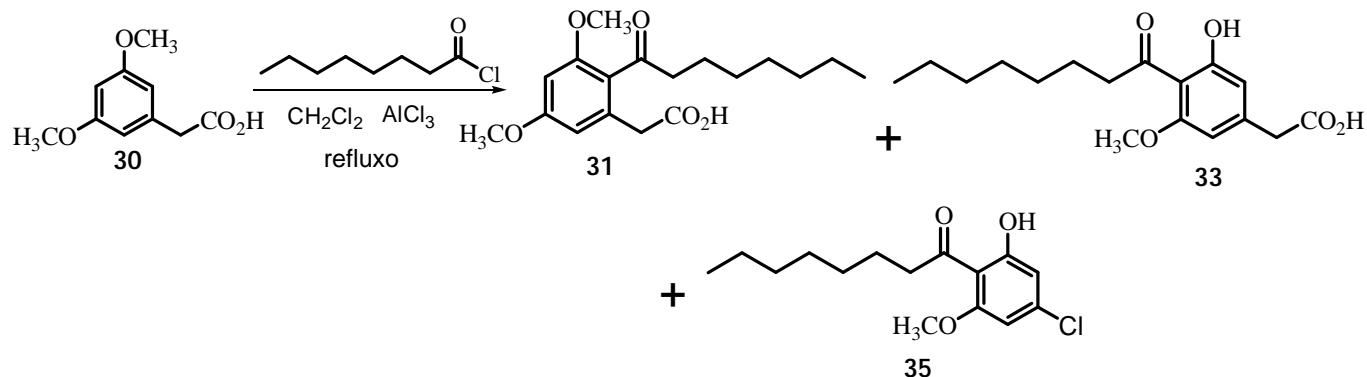
4.2.4. (*Z*-3-heptilideno-4,6-diidroxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (29)



Em um balão com condensador e tubo secante, uma massa de 20,0 mg (0,069 mmol) do substrato **27** foi solubilizada em 10,0 mL de diclorometano anidro. Então, 133,0 mg (0,996 mmol) de AlCl₃ anidro foi adicionado ao balão e a mistura permaneceu sob agitação e refluxo por sete horas, com acompanhamento por cromatografia em camada delgada (CCD), com eluente hexano/acetato de etila (2/1), revelado em iodo. A reação foi seguida com adição de gotas de água gelada e solução diluída de HCl. Extraiu-se com acetato de etila (3x20,0 mL). O extrato orgânico foi lavado com água, solução saturada de cloreto de sódio e secado com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄). Após a filtração, os solventes foram evaporados e o

produto analisado por RMN. Os espectros mostraram que não houve formação alguma do produto **29** e ainda ocorreu a degradação da enol lactona **27**.

4.2.5. Ácido 2-(3,5-dimetoxi-2-octanoilfenil) acético (**31**) + **33** + **35**

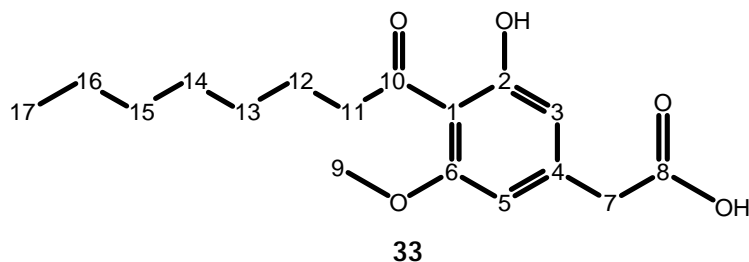


Formação do cloreto de ácido: em um balão com 3,5 mL de diclorometano seco, foram adicionados 165,0 mg (1,148 mmol) de ácido octanóico, e 0,17 mL (2,296 mmol) de cloreto de tionila (SOCl_2). A mistura foi agitada e aquecida sob refluxo por 4 horas. Após o resfriamento, o solvente foi evaporado. Nesse caso, na equalização da pressão, utilizou-se um tubo secante para evitar a entrada de umidade do ar. Então, um volume de 4,4 mL de diclorometano seco foi adicionado ao balão, onde se encontrava o cloreto de ácido formado. Acilação de Friedel-Crafts: para uma solução de 150,0 mg (0,765 mmol) de **30** em 4,0 mL de diclorometano seco, foi adicionado uma massa de 306,0 mg (2,296 mmol) do cloreto de alumínio anidro (AlCl_3), seguido da adição da solução do cloreto de ácido em diclorometano no balão da reação, que deve estar sobre um banho de gelo e água. Então a mistura foi agitada a temperatura ambiente, com acompanhamento por cromatografia em camada delgada (CCD), com eluente acetato de etila/hexano (1/1), revelado em luz ultravioleta e vanilina. Tratou-se a mistura com 10,0 mL de HCl 18%. A solução resultante foi extraída com acetato de etila. O extrato foi lavado com água destilada, solução aquosa de cloreto de sódio e finalmente secado com sulfato de magnésio anidro (MgSO_4). Após a filtração, os solventes foram evaporados e o produto purificado em coluna cromatográfica com sílica de baixa granulometria (0,040 mm a 0,063 mm), com eluente 6/3/1 (hexano/acetato de etila/diclorometano). Material de partida recuperado: 86,0 mg.

a) produto **31**: 95,0 mg, 90%, cristal branco levemente amarelo, ponto de fusão: 74°C. Dados espectrais: RMN de ^1H) $_{\text{H}}$ (300 MHz, CDCl_3): 6,49 (d, $J=2$ Hz, 1H); 6,42 (d, $J=2$ Hz, 1H); 3,85 (s, 3H); 3,83 (s, 3H); 3,53 (s, 2H); 2,92 (t, $J=7$ Hz, 2H); 1,66 (qt, $J=7$ Hz, 2H); 1,39 a 1,21 (m, 8H) e 0,88 (t, $J=7$ Hz, 3H). RMN de ^{13}C) $_{\text{C}}$ (75 MHz, CDCl_3): 210,1 (C); 172,3 (C); 162,6 (C); 159,9 (C); 135,4 (C); 122,7

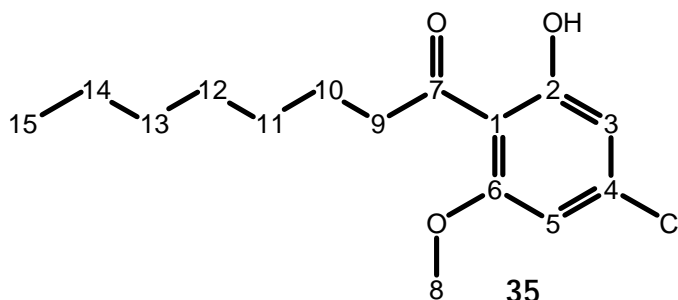
(C); 107,6 (CH); 98,2 (CH); 55,7 (CH₃); 55,5 (CH₃); 44,2 (CH₂); 41,5 (CH₂); 31,6 (CH₂); 29,3 (CH₂); 29,0 (CH₂); 24,7 (CH₂); 22,6 (CH₂) e 14,1 (CH₃). IV (máx (cm⁻¹)): 3002; 2950; 2918; 2850; 1706; 1652; 1598; 1456; 1313; 1161; 1087 e 846. Pastilha de KBr. EM (*m/z*): fórmula molecular calculada C₁₈H₂₆O₅; [M⁺ - 2 = 320]; [M⁺ - C₇H₁₅ = 223]; [M⁺ - C₇H₁₅ - CO = 195];]; [M⁺ - C₇H₁₅ - CO - OH = 178].

b) produto **33**: 5,0 mg, cristal vermelho opaco, ponto de fusão: 93°C. Dados espectrais: RMN de ¹H_H(300 MHz, CDCl₃): 13,35 (s, 1H); 6,49 (d, *J* = 2 Hz, 1H); 6,30 (d, *J* = 2 Hz, 1H); 3,87 (s, 3H); 3,56 (s, 2H); 2,99 (t, *J* = 7 Hz, 2H) 1,66 a 1,61 (m, 2H); 1,30 a 1,23 (m, 8H) e 0,87 (t, *J* = 7 Hz, 3H). RMN de ¹³C_C(75 MHz, CDCl₃): 207,6 (C); 175,9 (C); 164,8 (C); 161,3 (C); 141,4 (C); 111,8 (CH); 110,2 (C); 102,5 (CH); 55,7 (CH₃); 44,9 (CH₂); 41,3 (CH₂); 31,7 (CH₂); 29,4 (CH₂); 29,2 (CH₂); 24,5 (CH₂); 22,6 (CH₂) e 14,1 (CH₃). RMN HMQC (CDCl₃) correlações importantes observadas ¹H x ¹³C: H₃ x C₃; H₅ x C₅; H₇ x C₇; H₉ x C₉; H₁₁ x C₁₁; H₁₂ x C₁₂; H₁₃ x C₁₃; H₁₄ x C₁₄; H₁₅ x C₁₅; H₁₆ x C₁₆ e H₁₇ x C₁₇. RMN HMBC (CDCl₃) correlações importantes observadas ¹H x ¹³C: H_{OH} x (C₁, C₃, C₄, C₂ e C₁₀); H₃ x (C₇, C₁, C₅ e C₂); H₅ x (C₁₀, C₁, C₇, C₃, C₄ e C₆); H₇ x (C₄, C₈, C₃ e C₅); H₉ x (C₆ e C₅); H₁₁ x (C₁₀, C₁₂ e C₁₃); H₁₂ x (C₁₃ e C₁₀); H₁₃ x (C₁₄ e C₁₁); H₁₄ x (C₁₅); H₁₅ x (C₁₇); H₁₆ x (C₁₇) e H₁₇ x (C₁₆ e C₁₅).



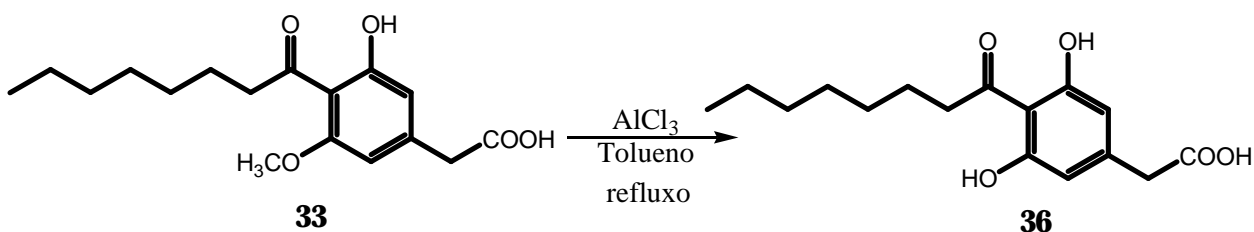
IV (máx (cm⁻¹)): 3413; 2952; 2923; 2852; 1726; 1627; 1569; 1423; 1224 e 1108. Pastilha de KBr.

c) produto **35**: 5,0 mg, pó branco, ponto de fusão: 124°C. Dados espectrais: RMN de ¹H_H(300 MHz, CD₃OD): 6,50 (d, *J* = 2 Hz, 1H); 6,40 (d, *J* = 2 Hz, 1H); 3,87 (s, 3H); 2,96 (t, *J* = 7 Hz, 2H) 1,65 a 1,50 (m, 2H); 1,40 a 1,20 (m, 8H) e 0,85 (t, *J* = 7 Hz, 3H). RMN de ¹³C_C(75 MHz, CD₃OD): 209,6 (C); 162,0 (C); 145,9 (C); 111,7 (CH); 111,3 (C); 104,5 (CH); 55,5 (CH₃); 44,6 (CH₂); 31,6 (CH₂); 29,2 (CH₂); 29,0 (CH₂); 24,7 (CH₂); 22,5 (CH₂) e 14,3 (CH₃). RMN HMQC (CD₃OD)) correlações importantes observadas ¹H x ¹³C: H₃ x C₃; H₅ x C₅; H₁₀ x C₁₀; H₉ x C₉; H₈ x C₈; H₁₁ x C₁₁; H₁₂ x C₁₂; H₁₃ x C₁₃; H₁₄ x C₁₄ e H₁₅ x C₁₅. RMN HMBC (CD₃OD)) correlações importantes observadas ¹H x ¹³C: H₃ x (C₂, C₅ e C₁); H₅ x (C₆, C₄, C₃ e C₁); H₈ x (C₆); H₉ x (C₇, C₁₀ e C₁₁); H₁₀ x (C₉, C₁₂ e C₇); H₁₁ x (C₁₀, C₁₂ e C₉); H₁₂ x (C₁₃); H₁₃ x (C₁₄, C₁₂ e C₁₁); H₁₄ x (C₁₃ e C₁₂) e H₁₅ x (C₁₄ e C₁₃).



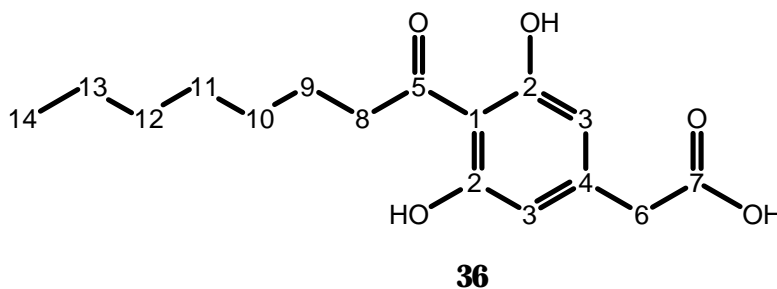
IV (máx (cm⁻¹)): 3407; 2948; 2925; 1627; 1596; 1577; 1421; 1392; 1230 e 1105. Pastilha de KBr.

4.2.6. Ácido 2-(3,5-diidróxi-4-octanoilfenil) acético (36)



Em um balão com condensador e tubo secante, uma massa de 41,9 mg (0,136 mmol) do substrato **35** foi solubilizada em 15,0 mL de tolueno anidro. Então 262,0 mg (1,963 mmol) de AlCl₃ anidro foi adicionado ao balão e a mistura permaneceu sob agitação e refluxo por sete horas, com acompanhamento por cromatografia em camada delgada (CCD), com eluente acetato de etila/hexano (2/1), revelado em iodo. A reação foi seguida com adição de gotas de água gelada e solução diluída de HCl. Extraíu-se com acetato de etila. O extrato orgânico foi lavado com água, solução saturada de cloreto de sódio e secado com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄). Após a filtração, os solventes foram evaporados e o produto purificado em coluna cromatográfica com sílica de baixa granulometria (0,040 mm a 0,063 mm), com eluente 1/1 (hexano/acetato de etila). Material de partida recuperado: 8,9 mg. Rendimento: 11,6 mg, 37%, cristal branco avermelhado, ponto de fusão: 73°C a 77°C. Dados espectrais: RMN de ¹H) _H(300 MHz, CD₃OD): 6,31 (s, 2H); 3,46 (s, 2H); 3,10 (t, *J* = 7 Hz, 2H); 1,67 (qt, *J* = 7 Hz, 2H); 1,40 a 1,23 (m, 8H) e 0,91 (t, *J* = 7 Hz, 3H). RMN de ¹³C) _C(75 MHz, CD₃OD): 209,3 (C); 174,4 (C); 163,4 (C); 144,6 (C); 110,1 (C); 109,4 (CH); 44,4 (CH₂); 42,1 (CH₂); 32,9 (CH₂); 30,5 (CH₂); 30,3 (CH₂); 25,8 (CH₂); 23,7 (CH₂) e 14,4 (CH₃). RMN HMQC (CD₃OD)) correlações importantes observadas ¹H x ¹³C: H₃ x C₃; H₆ x C₆; H₈ x C₈; H₉ x C₉; H₁₀ x C₁₀; H₁₁ x C₁₁; H₁₂ x C₁₂; H₁₃ x C₁₃ e H₁₄ x C₁₄. RMN HMBC (CD₃OD)) correlações importantes observadas ¹H x ¹³C: H₃ x (C₂, C₄, C₆, C₁, C₇ e C₅); H₆ x (C₄, C₇ e C₃); H₈ x (C₅,

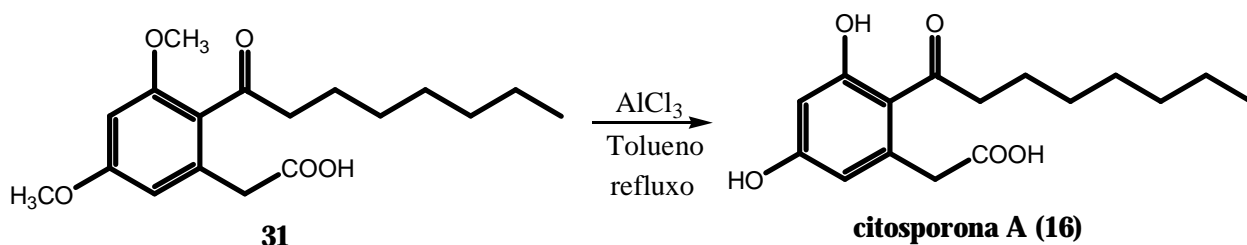
C₉ e C₁₀); H₉ x (C₈, C₁₁ e C₅); H₁₀ x (C₁₁ e C₈); H₁₁ x (C₁₀, C₁₂ e C₁₃); H₁₂ x (C₁₁, C₁₃ e C₁₄); H₁₃ x (C₁₄ e C₁₂) e H₁₄ x (C₁₂, C₁₃ e C₁₁).



IV (máx (cm⁻¹)): 3409; 3249; 2952; 2921; 2852; 1714; 1697; 1637; 1581; 1429; 1232 e 1066.

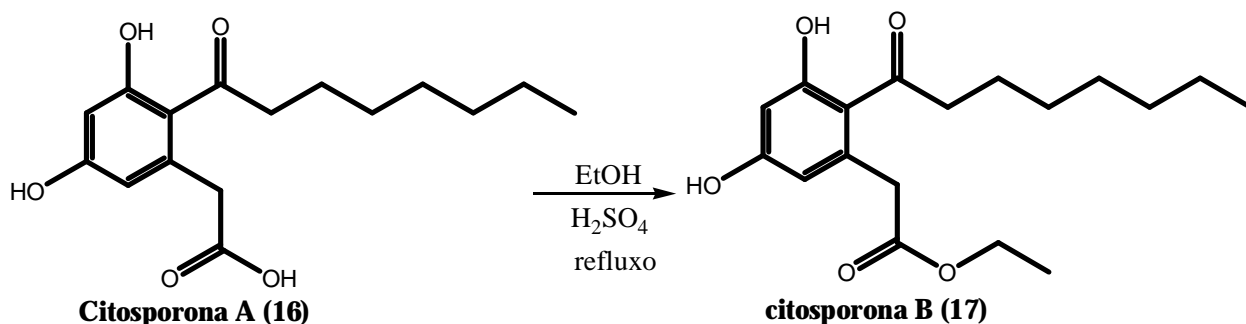
Pastilha de KBr.

4.2.7. Citosporona A (16)



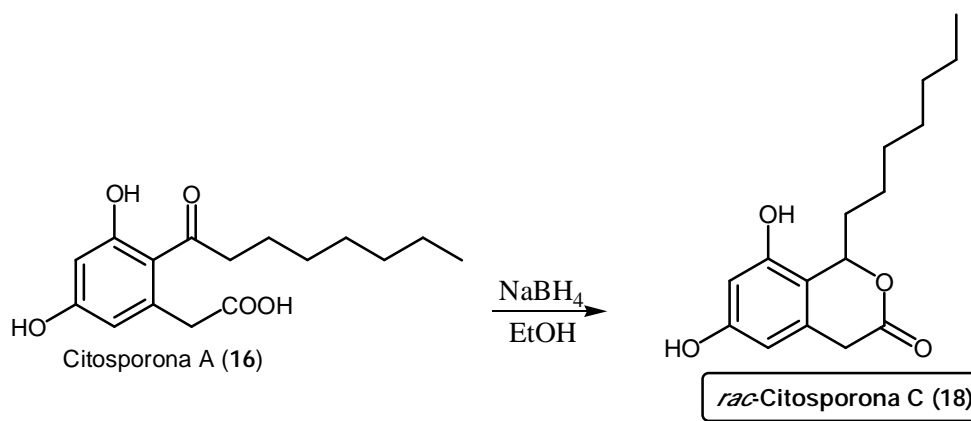
Em um balão com condensador e tubo secante, uma massa de 40,0 mg (0,124 mmol) do substrato **31** foi solubilizada em 10,0 mL de tolueno anidro. Então 239,0 mg (1,786 mmol) de AlCl₃ anidro foi adicionado ao balão e a mistura permaneceu sob agitação e refluxo por sete horas, com acompanhamento por cromatografia em camada delgada (CCD), com eluente acetato de etila/hexano (2/1), revelado em iodo. A reação foi seguida com adição de gotas de água gelada e solução diluída de HCl. Extraiu-se com acetato de etila. O extrato orgânico foi lavado com água, solução saturada de cloreto de sódio e secado com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄). Após a filtração, os solventes foram evaporados e o produto purificado em coluna cromatográfica com sílica normal, com eluente 1/1 (hexano/acetato de etila). Rendimento: 33 mg, 90%, cristal branco, ponto de fusão: 109°C a 113°C. Dados espectrais: RMN de ¹H_H(300 MHz, CD₃OD): 6,26 (d, *J*= 2 Hz, 1H); 6,22 (d, *J*= 2 Hz, 1H); 3,56 (s, 2H); 2,92 (t, *J*= 7 Hz, 2H); 1,62 (qt, *J*= 7 Hz, 2H); 1,45 a 1,25 (m, 8H) e 0,90 (t, *J*= 7 Hz, 3H). RMN de ¹³C_C(75 MHz, CD₃OD): 209,7 (C); 175,4 (C); 161,4 (C); 159,8 (C); 137,3 (C); 121,4 (C); 111,6 (CH); 102,7 (CH); 45,2 (CH₂); 40,6 (CH₂); 32,9 (CH₂); 30,4 (CH₂); 30,3 (CH₂); 25,6 (CH₂); 23,7 (CH₂) e 14,4 (CH₃). IV (máx (cm⁻¹)): 3394; 2954; 2923; 2854; 1650; 1593 e 1110. Pastilha de KBr.

4.2.8. Citosporona B (17)



Em um balão com tubo secante, uma massa de 22,9 mg (0,078 mmol) do substrato **16** foi solubilizada em 10,0 mL de etanol anidro, seguido da adição de uma gota de ácido sulfúrico concentrado. A mistura reacional permaneceu sob agitação e refluxo por uma hora, com acompanhamento por cromatografia em camada delgada (CCD), com eluente acetato de etila/hexano (1/1), revelado em luz ultravioleta e iodo. Para a extração, 20,0 mL de diclorometano foi adicionado. O extrato orgânico foi lavado com água destilada (4x10,0 mL), solução aquosa de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) e secado com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄). Após a filtração, o solvente foi evaporado. Rendimento: 24 mg, aproximadamente quantitativo (100%), sólido marrom, ponto de fusão: 38°C. Dados espectrais: RMN de ¹H) _H(300 MHz, CDCl₃): 6,27 (sl, 1H); 6,25 (sl, 1H); 4,18 (q, *J*= 7 Hz, 2H); 3,82 (s, 2H); 2,81 (t, *J*= 7 Hz, 2H); 1,72 a 1,60 (m, 2H); 1,34 a 1,15 (m, 11H) e 0,86 (t, *J*= 7 Hz, 3H). RMN de ¹³C) _C(75 MHz, CDCl₃): 206,7 (C); 171,3 (C); 164,5 (C); 160,2 (C); 136,7 (C); 116,6 (C); 112,5 (CH); 103,3 (CH); 61,6 (CH₂); 43,4 (CH₂); 41,8 (CH₂); 31,7 (CH₂); 29,2 (CH₂); 29,1 (CH₂); 24,3 (CH₂); 22,6 (CH₂); 14,1 (CH₃) e 14,0 (CH₃). IV (_{máx} (cm⁻¹)): 3255; 2954; 2923; 2854; 1708; 1612; 1573; 1261 e 1157. Pastilha de KBr.

4.2.9. Citosporona C (18)



Em um balão com tubo secante, uma massa de 10,4 mg (0,035 mmol) do substrato **16** foi solubilizada em 5,0 mL de etanol anidro. Então uma massa de 2,5 mg (0,061 mmol) de boridreto de sódio (NaBH₄) foi adicionada ao balão da reação e a mistura permaneceu sob agitação por 24 horas, à temperatura ambiente, com acompanhamento por cromatografia em camada delgada (CCD), com eluente acetato de etila/hexano (1/1), revelado em luz ultravioleta e iodo. A elaboração da reação ocorreu com a adição de uma gota de ácido clorídrico concentrado (37%) e 10,0 mL de água destilada. O produto foi extraído com clorofórmio (3x20,0 mL), lavado com água destilada (2x20,0 mL) e a fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro (MgSO₄). Após a filtração, o solvente foi evaporado e o produto purificado em coluna cromatográfica com sílica de baixa granulometria (0,040 mm a 0,063 mm) e eluente hexano/acetato de etila (2/1). Rendimento: 8,8 mg, 90%, óleo amarelado. Dados espectrais: RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD): 6,22 (sl, 1H); 6,13 (sl, 1H); 5,60 (dd, ¹J = 8,2 Hz, ²J = 5,5 Hz, 1H); 3,76 (d, J = 19,5 Hz, 1H); 3,45 (d, J = 19,5 Hz, 1H); 1,79 (m, 1H); 1,52 (m, 1H); 1,42 a 1,19 (m, 8H) e 0,90 (t, J = 7 Hz, 3H). RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD): 169,1 (C); 159,6 (C); 155,3 (C); 132,8 (C); 114,0 (C); 106,1 (CH); 102,1 (CH); 80,1 (CH); 36,8 (CH₂); 32,7 (CH₂); 30,7 (CH₂); 30,3 (CH₂); 30,2 (CH₂); 26,7 (CH₂); 23,7 (CH₂) e 14,4 (CH₃). IV (máx (cm⁻¹)): 3375; 2923; 2854; 1735; 1716; 1650; 1458 e 1091. Pastilha de KBr.

4.3. Procedimentos experimentais (atividades biológicas)

4.3.1. Atividade alelopática – ensaio de inibição da germinação e do crescimento de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface)

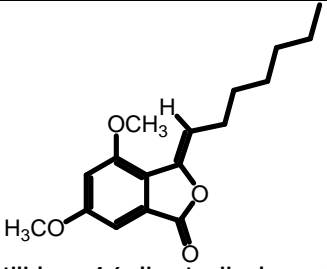
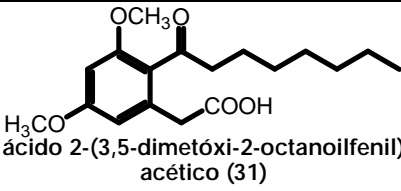
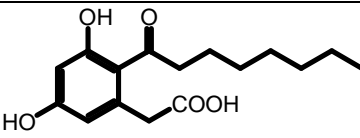
Os ensaios de atividade alelopática foram realizados pela bióloga Carla Braga Leite, no Laboratório de Bioquímica Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Rita Marques.

Cerca de 25 sementes de *L. sativa* foram colocadas em placas de Petri contendo discos de papel de filtro umedecidos com as soluções-teste ou os respectivos controles. Como controle positivo foi utilizada cafeína, de comprovada atividade inibitória de germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas [DOBREMEZ *et al*, 1995]. Soluções tampão preparadas em osmolaridades apropriadas foram consideradas os controles negativos [DOBREMEZ *et al*, 1995]; [MACIAS *et al*, 1994]. Os resultados ficam expressos como percentagem de inibição de germinação em relação aos controles. Para os bioensaios utilizou-se placas de Petri previamente autoclavadas contendo papel de filtro, sobre os quais

foram vertidos 2 mL das soluções-teste dissolvidas nos solventes apropriados, em diferentes concentrações. Em seguida, 25 sementes de *L. sativa* ou *A. cepa* foram colocadas em cada placa, e posteriormente umedecidas com 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,025M pH 6,0. Os experimentos foram mantidos em câmara tipo BOD (modelo MA 415/S Marconi) a 20°C e fotoperíodo de 12 h. Foram feitas contagens das sementes germinadas nos dias 1, 2 e 3 após a semeadura. Três dias após a protusão radicular foram feitas medidas da radícula e do hipocótilo com papel milimetrado. As medidas continuaram sendo feitas durante mais 3 dias. Todos os testes foram realizados com quatro repetições. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protusão de raiz, conforme as Regras de Análise de Sementes (Brasil, 1992).

As substâncias foram testadas nas seguintes concentrações (tabela 22):

Tabela 22: Substâncias submetidas ao teste de atividade alelopática e suas concentrações

Substâncias	Concentrações	
	mg/mL	mmol/L (mM)
 (Z)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3H)-ona (27)	5	17,24
 ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil)acético (31)	5 2,5 1,25 0,625	15,53 7,76 3,88 1,94
 Citosporona A (16)	1,25 0,625 0,312	4,25 2,12 1,06

A cafeína foi utilizada como padrão positivo e testada em concentrações que variaram de 6 mg/mL até 0,625 mg/mL, dependendo da atividade das substâncias testadas.

4.3.2. Atividade inibitória da enzima tirosinase

4.3.2.1. Em solução

Este ensaio foi realizado pelo aluno Thiago Inácio B. Lopes no Laboratório de Pesquisas 2, do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a supervisão da Profa. Dra. Neli Kika Honda.

Condições de Reação:

- 1,5 mL de tampão fosfato pH 6,8;
- 0,2 mL de amostra (10 mM) em Tween 20 10%;
- 0,1 mL de L-DOPA 0,3%;
- 0,2 mL de enzima tirosinase (solução de 90 µg/mL em tampão fosfato pH 6,8).

O sistema reacional foi montado à temperatura ambiente, e as medidas de absorvância foram feitas em 475 nm, utilizando o espectrofotômetro SP 220 – Spectrum, em intervalos de 30 segundos. Com os resultados obtidos, plotou-se o gráfico de absorvância por tempo (em minutos).

O percentual de inibição foi calculado segunda a fórmula: $(A_{\text{branco}} - A_{\text{inibidor}})/A_{\text{branco}} * 100\%$, considerando a absorvância do branco e das amostras após 10 minutos de reação.

Dados da enzima: enzima tirosinase Sigma EC 1.14.18.1 from Mushroom. Uma unidade = A_{280} de 0,001 por minuto a pH 6,5 a 25°C, 3 mL de reação contendo L-tirosina 6.680 unidades/mg sólido.

4.3.2.2. Em camada delgada

Este ensaio foi realizado pelo aluno Luiz Fabrício Gardini Brandão, no Laboratório de Pesquisas 2, do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a supervisão da Profa. Dra. Neli Kika Honda.

Para os ensaios, uma massa de 1 mg de cada amostra foi solubilizada em 1 mL de solvente apropriado. Em seguida, foram preparadas quatro diluições aritméticas (1:1) de cada amostra com a finalidade de detectar a sua respectiva concentração inibitória mínima. Um volume de 10 µL de cada concentração foi aplicado em uma placa de sílica Merck (60 F₂₅₄) previamente tamponada com tampão fosfato pH 5. Assim, para cada amostra, foram aplicadas massas de 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,75 µg.

Aplicou-se também 10 µL de cada solvente para servir de branco e ácido ascórbico (solubilizado em água) para ser o controle positivo, pois já é conhecida a sua propriedade de inibição da enzima tirosinase [ROS *et al*, 1993]. As massas do ácido ascórbico aplicadas foram 17,6; 8,80; 4,40; 2,20 e 1,10 µg.

A placa de sílica foi deixada na capela até a evaporação completa dos solventes, para então ser borrifada com solução de tirosinase (0,01% m/V em água) e, dois minutos depois, com solução de L-dopa (0,3% m/V em água). A quantificação da atividade da enzima foi realizada, resultando em 1470 unidades de atividade por miligrama de enzima. Após borrifar a solução de L-DOPA, foi feita a observação da placa até 30 minutos, sendo constatada uma ótima visualização aos 25 minutos.

Dados da enzima: enzima tirosinase Sigma EC 1.14.18.1 T3824-250KU from mushroom, 5370 unidades / mg.

4.3.3. Atividade inseticida sobre larvas de *Aedes aegypti*

Os testes de atividade inseticida foram realizados pelo Dr. Antônio Pancrácio de Souza, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Para os testes, os ovos de *Aedes aegypti* foram coletados no campo, conforme metodologia adaptada [GOMES *et al*, 2006]. Foram utilizadas armadilhas de oviposição (ovitampa) que consistem de recipiente plástico, preto-fosco, com capacidade de 700 mL. Cada armadilha recebeu aproximadamente 350 mL de infusão diluída 10% da gramínea *Panicum maximum*, e uma palheta de madeira (3 x 13 x 0,5 cm), presa verticalmente por clips, como substrato de oviposição. Estas foram colocadas em locais previamente conhecidos pela coleta da espécie *A. aegypti* em Campo Grande-MS.

Os testes inseticidas foram conduzidos segundo padrão da Organização Mundial da Saúde [WHO, 1981]. Para os testes inseticidas, foram preparadas as diluições em água destilada na concentração de 0,012 mg/mL. Os compostos a serem testados devem apresentar um bom grau de polaridade para que fiquem diluídos homogeneamente na água. Esta concentração é utilizada em testes inseticidas porque é a mesma do inseticida temefós, cujo efeito é de até 98% sobre larvas de terceiro e quarto ínstar [CARVALHO *et al*, 2004].

Preparadas as diluições e controle, estas foram divididas em copos de plástico com capacidade de 300 mL. Em cada copo (réplica), foram colocadas de 20 a 25 larvas em terceiro para o quarto estágio. Foram utilizadas quatro réplicas para o controle e oito para os compostos.

A mortalidade foi verificada após 24h. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas ou que apresentavam tremores ou rigidez foram consideradas como mortas. Todas as larvas sobreviventes aos testes não foram utilizadas novamente para fins de avaliação biológica.

A percentagem de mortalidade é corrigida pela fórmula de Abbott quando a mortalidade de larvas no controle atingir entre cinco e 20%. Os testes são desconsiderados quando a mortalidade ficar acima de 20% ou o número de pupas chegar a 10%.

Análise estatística: os resultados dos ensaios foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando evidenciada diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade de erro, foi efetuada a complementação da análise através da comparação entre médias pelo teste de Tukey.

4.3.4. Atividade inseticida sobre *Sitophilus zeamais*

A metodologia utilizada foi adaptada da literatura [SOUZA *et al*, 2006]. Os grãos de trigo foram pulverizados em capela de fluxo laminar com pulverizador acoplado a uma bomba de vácuo, com as substâncias ou compostos cedidos diluídos nos solventes mais compatíveis. Foram conduzidos testes preliminares para se avaliar o efeito inseticida somente dos solventes sobre os insetos. Foi observado que se o trigo fosse deixado por cerca de 72 horas em estufa a 38°C após a pulverização dos solventes utilizados (metanol, etanol, clorofórmio, hexano), os insetos não eram afetados na sua sobrevivência. A temperatura de 38°C foi utilizada porque preserva as características naturais dos compostos químicos.

Após a secagem por 72 horas a 38°C, o trigo foi acondicionado em caixas plásticas circulares (6 cm de diâmetro e 2,1 cm de altura), totalizando 10 g de trigo por recipiente, além da testemunha apenas com trigo não tratado. Em cada recipiente foram liberados 20 adultos não sexados de *S. zeamais*, com idade entre dez e vinte dias. As avaliações foram feitas ao primeiro, segundo, quinto e décimo dia, contando-se o número de insetos mortos e descartando-os. As parcelas foram organizadas segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, com dez repetições para cada tratamento. Para efeito de análise os dados foram cumulativos desde o primeiro até ao décimo dia.

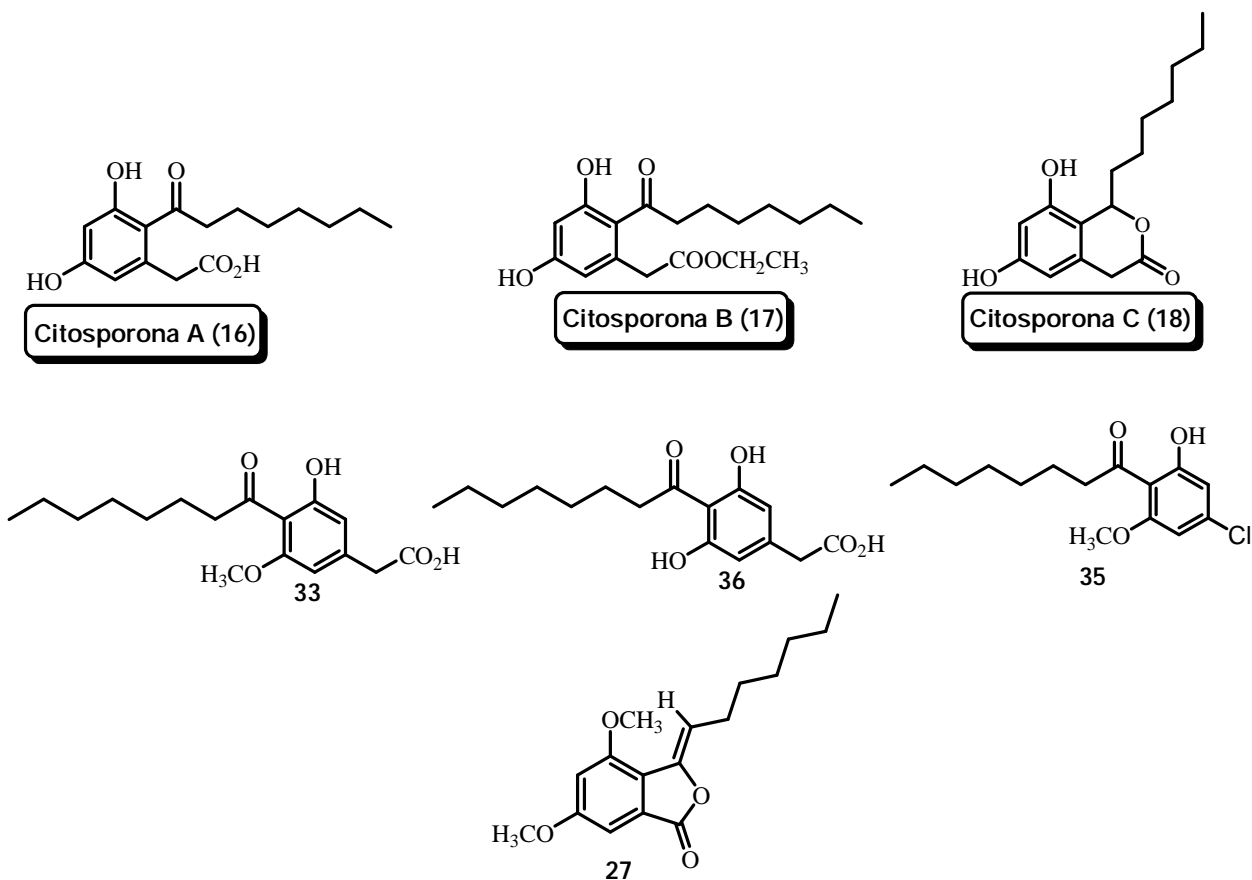
Conclusão

5. Conclusão

Os principais objetivos deste trabalho de pesquisa foram alcançados com sucesso. Foi planejada e realizada a síntese da citosporona A (**16**), em apenas duas etapas simples: a acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxifenil acético (**30**), que forma o intermediário-chave **31** e mais dois subprodutos (**33** e **35**), e a desmetilação total do composto **31**, com um rendimento global de 81%, aproximadamente. A partir da citosporona A (**16**), outras duas substâncias importantes foram preparadas: a citosporona B (**17**), produzida pela esterificação da citosporona A (**16**), com rendimento quantitativo e a citosporona C (**18**), produto de redução do grupo carbonila de cetona da citosporona A (**16**), seguida de lactonização, com 90% de rendimento.

Esta é a primeira vez que está sendo relatada a síntese total desses três produtos naturais. Estudos anteriores com esses compostos foram realizados a partir de amostras isoladas de fontes naturais (fungos).

A reação de acilação de Friedel-Crafts gerou os subprodutos **33** e **35**. Desmetilação de **33** produziu o composto **36**, um isômero da citosporona A (**16**), o qual ainda será submetido a ensaios biológicos e posterior estudo da correlação estrutura química-atividade biológica.



Um intermediário avançado (**27**) para sínteses de novas citosporonas foi preparado com alto rendimento (93%), o qual foi sintetizado pela reação de acilação de Friedel-Crafts do ácido 3,5-dimetoxibenzóico (**21**) com cloreto de octanoíla.

Os compostos **27** e **31** e a citosporona A (**16**) foram submetidos ao teste de avaliação de atividade alelopática em sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). O composto **27** apresentou baixa atividade sobre a germinação das sementes e sobre os crescimentos da radícula e do hipocótilo, mas o composto **31** e a citosporona A (**16**) foram bastante ativos nesses fatores de avaliação, tendo ambos atividades comparáveis ao controle utilizado, a cafeína. O composto **31** apresentou concentração inibitória de 2,48 mM para 50% das sementes, enquanto a citosporona A (**16**) inibiu esse mesmo percentual em uma concentração de 2,04 mM.

Os compostos **27**, **31** e **35** e as citosporonas A (**16**) e B (**17**) foram avaliados sobre a enzima tirosinase, responsável por catalisar etapas biossintéticas da formação do exoesqueleto de insetos e da melanina, que pigmenta a epiderme dos mamíferos. No teste preliminar feito em solução, apenas os compostos **31** e **35** foram avaliados e ambos mostraram inibição da atividade enzimática. Na concentração de 1 mM, eles inibiram a atividade da enzima em 15,9% e 20,7%, respectivamente. No teste realizado em camada delgada de sílica, verificou-se que os demais compostos também inibem a atividade da enzima tirosinase, até a menor concentração aplicada, de 0,75 µg. Este resultado em camada delgada só não foi constatado para o composto **35**, devido ao problema da difusão na placa do solvente utilizado, que interferiu na visualização do resultado.

Por último, os compostos **31** e **27** e as citosporonas A (**16**) e B (**17**) também foram testadas sobre larvas do mosquito *Aedes aegypti*, transmissor do vírus da dengue. Na metodologia utilizada, o composto **31** provocou a morte de cerca de 3% das larvas e as citosporonas A (**16**) e B (**17**) foram fatais para 0,63% e 1,25% das larvas, respectivamente. Esses resultados mostram que as amostras são pouco ativas sobre as larvas do mosquito *Aedes aegypti* na concentração testada (0,012 mg/mL).

Nesse trabalho, as substâncias de interesse, dentre elas três produtos naturais, foram preparadas rápida e efetivamente, ou seja, em poucas etapas de reação e com rendimentos altos, acima de 80%. Os resultados das avaliações biológicas sugerem que os compostos **31** e a citosporona A (**16**) sejam protótipos para o planejamento de novos herbicidas baseados em produtos naturais. As citosporonas A (**16**) e B (**17**) e os compostos **31**, **35** e **27** mostraram atividade inibitória da enzima tirosinase e podem ser alvos de estudos para agentes inseticidas e/ou anti-melanomas.

Referências

6. Referências

- 1) ALONSO, E.; RAMÓN, D. J.; YUS, M. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 417.
- 2) BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, M. L.; DEMUNER, A. J.; DA SILVA, A. A.; PEREIRA R. de C.; *Quím. Nova* **2001**, *24*, 751.
- 3) BRADY, S. F.; WAGENAAR, M. M.; SINGH, M. P.; JANSO, J. E.; CLARDY, J. *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 4043-4046.
- 4) CARVALHO, M. S. L.; CALDAS, E. D. C.; DEGALLIER, N.; VILARINHOS, P.T.R.; SOUZA, L. C. K. R.; YOSHIZAWA, M. A. C.; KNOX, M. B.; OLIVEIRA, C. *Rev. Saúde Pública*, **2004**, *38*(5), 623-9.
- 5) CAZAR, M. E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN G.; ASTUDILLO, L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2005**, *21*, 1067-1075.
- 6) CLARK, J. M.; OHKAWA, H. ACS symposium series 892, **2005**.
- 7) COJOCARU, M.; DROBY, S.; GLOTTER, E.; GOLDMAN, A.; GOTTLIEB, H. E.; JACOBY, B. PRUSKY, D. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1093.
- 8) DESZCZ, L.; KOZUBEK, A. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2000**, *241*.
- 9) DOBREMEZ, J-F.; GALLET, C. & PELISSIER, F. *La Recherche*, **1995**, *26*, 912.
- 10) DROBY, S.; PRUSKY, D.; JACOBY, B.; GOLDMAN, A. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, **1987**, *30*, 285.
- 11) FREUND, E.; VITALI, F.; LINDEN, A. *Helvetica Chimica Acta*, **2000**, *83*, 2572-2579.
- 12) GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **2002**. Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- 13) GOMES, A. S.; SCIAVICO, C. J. DE SÁ; EIRAS, Á. E. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *39*(4), 327-332, jul-ago, **2006**.
- 14) HALL, J. D.; DUNCAN-GOLD, N. W.; SIDDIQI, N. A.; KELLY, N. J.; HOEFERLIN, L. A.; MORRISON, S. J.; WYATT, J. K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2005**, *13*, 1409-1413.

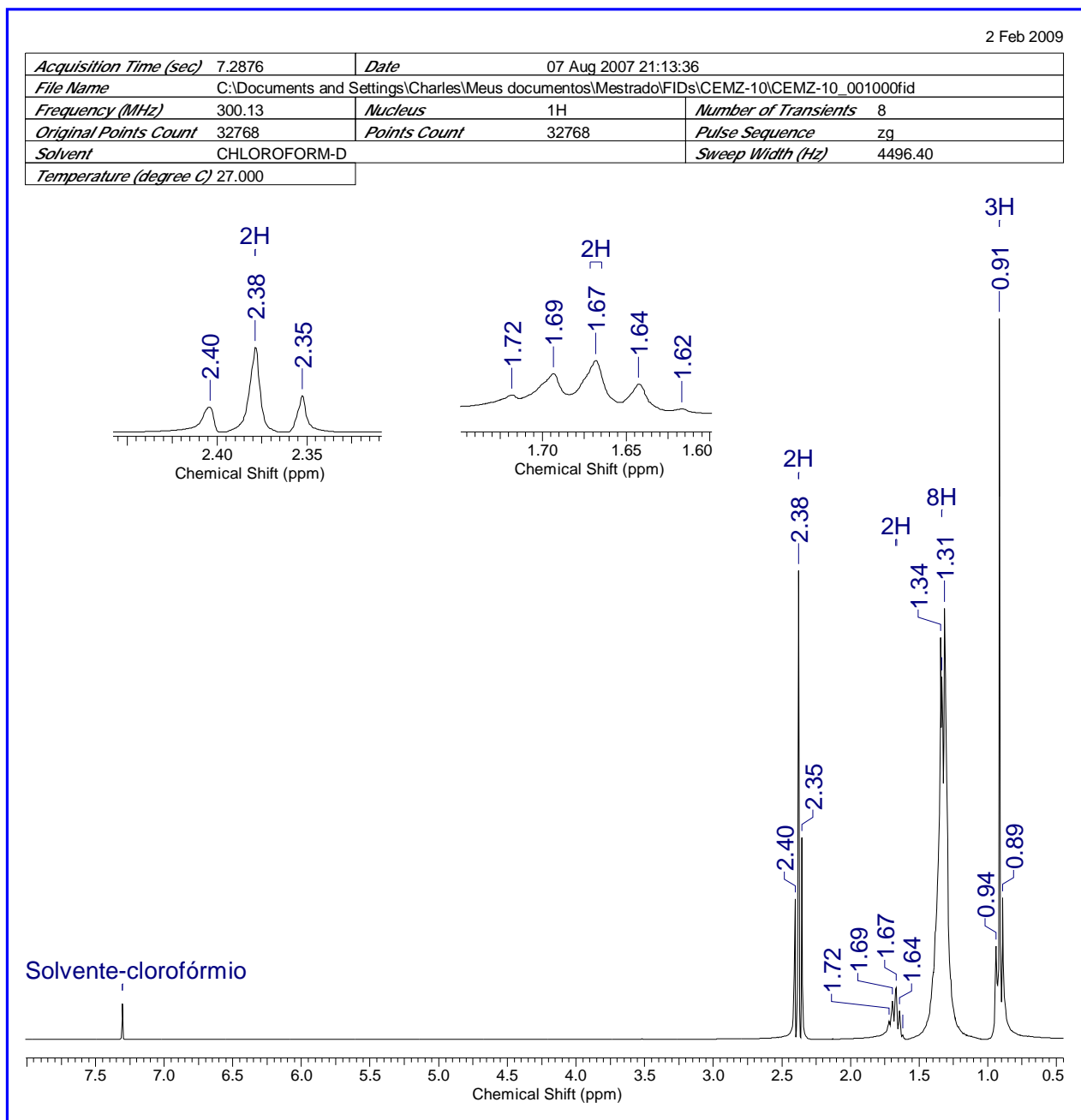
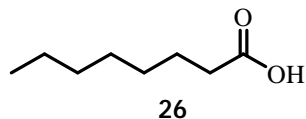
- 15) KINOSHITA, K.; MATSUBARA, H.; KOYAMA, K.; TAKAHASHI, K.; YOSHIMURA, I.; YAMAMOTO, Y.; MIURA, Y.; KINOSHITA, Y.; KAWAI, K.I.; *J. Hattori Bot. Lab.* **1994**, *76*, 227.
- 16) KOZUBEK, A.; TYMAN, J. H. P. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1.
- 17) KOZUBEK, A.; TYMAN, J. H. P. Atta-ur-Rahman, Karachi, **2005**, *30*, 111.
- 18) KNOP, W.; SCHEIB, A. Springer Velag, Berlin, Germany, **1979**.
- 19) ¹KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M.; YAMAGIWA, Y.; MERA, H.; TOKUSHIMA, H.; OHTA, S.; KAMIKAWA, T. *J. Agric. Food. Chem.*, **1993**, *41*, 1016.
- 20) ²KUBO, I.; OCHI, M.; VIEIRA, P. C.; KOMATSU, S. *J. Agric. Food. Chem.*, **1993**, *41*, 1012.
- 21) KUMAR, P.; PARAMASHIVAPPA, R.; VITHAYATHIL, P. J.; SUBBA RAO, P. V.; SRINIVASA RAO, A. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2002**, *50*, 4705.
- 22) MACIAS, F. A.; SIMONET, A. M.; ESTEBAN, M. D. *Phytochemistry*, **1994**, *36*, 1369-1379.
- 23) MAHMOOD, A.; ROBINSON, G. E.; POWELL, L. *Organic Process Research & Development*, **1999**, *3*, 363-364.
- 24) MALI, R. S.; BABU, K. N. *Journal of Organic Chemistry*, **1998**, *63*, 2488.
- 25) MARCH, J.; SMITH, M. B. *Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structures*, 5ª edição, **2001**, 712-714.
- 26) MARTINS, P. R. Campinas: Instituto de Filosofia e Ciências Humanas/Unicamp, **2000** (Tese de Doutorado em Ciências Sociais).
- 27) MATSUBARA, H.; KINOSHITA, K.; KOYAMA, K.; TAKAHASHI, K.; YOSHIMURA, Y.; YAMAMOTO, Y.; MIURA, Y.; KINOSHITA, Y. *J. Hattori Bot. Lab.*, **1997**, *83*, 179.
- 28) MENON, A. R. R.; PILLAI, C. K. S.; SUDHA, J. D.; MATHEW, A. G. *J. Sci. Ind. Res.*, **1985**, *44*, 324-338, 2381-2383.
- 29) MUROI, H.; KUBO, I. *J. Appl. Bacteriol.*, **1996**, *80*, 387.
- 30) NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; FILIPPIS, A. M.; PEREIRA, M. A.; SCHATZMAYR, H. G. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2001**, *96*, 925-926.
- 31) OHZEKI, T.; MORI, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2003**, *67*, 12, 2584-2590.
- 32) PARAMASHIVAPPA, R.; PHANI KUMAR, P.; VITHAYATHIL, P. J.; SRINIVASA RAO, A. *J. Agric. Food. Chem.*, **2001**, *49*, 2548-2551.

- 33) PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *Introduction to Espectroscopy*, 3rd edition, **2001**.
- 34) PEI, L. *et al. Nat. Med.*, **2006**, *12*, 1048-1055.
- 35) PORTER, W. L.; THIMANN, K. V. *Phytochemistry*, **1965**, *4*, 229-243.
- 36) POTENZA, M. R.; ARTHUR, V.; FELICIO, J. D.; ROSSI, M. H.; NAKAOKA SAKITA, M.; SILVESTRE, D. de F.; GOMES, D. H. P. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **2004**, *71*, 477-484.
- 37) ROS, J. R.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. *Biochem J*, **1993**, *295*, 309-312.
- 38) SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. *Química Orgânica*, 7^a edição, **2002**, volume 2, 100.
- 39) SOUZA, A. M.; BEATRIZ, A. Trabalho de monografia, **2008**, CCBS-UFMS.
- 40) SOUZA, A.P., ITO, F.M.; BEATRIZ, A. MARQUES, M.R., LIMA, D.P., PETRONI, J.M., CAPUTO, B.A., CANHETE, G.M. XXI Congresso Brasileiro de Entomologia. Resumo. Recife, Agosto, 2006.
- 41) SULLIVAN, J. T.; RICHARDS, C. S.; LLOYD, H. A.; KRISHA, G. *Planta Med.*, **1982**, *44*, 175-177.
- 42) TYMAN, J. H. P.; VISANI, N. *Chem. Phys. Lipids*, **1997**, *85*, 157.
- 43) VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, **2006** *24*, 69-96.
- 44) VOBLIKOVA, V. D.; KOBRINA, N. S.; GERASIMOVA, N. M.; PAVLOVA, Z. N.; DEM'YANOVA, G.F.; MURYGINA, V.P.; VOLOSOVA, L.I.; MUROMTSEV, G.S. *Khim.Prir.Soedin*. **1985**, 387-391.
- 45) WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides: report of the WHO Expert Committee on Resistance of Vectors and Reservoirs of Diseases to Pesticides. Geneva; **1981**.
- 46) YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Chapecó, Argos, **2001**.
- 47) ZHAN, Y.; DU, X.; CHEN, H.; LIU, J.; ZHAO, B.; HUANG, D.; LI, G.; XU, Q.; ZHANG, M.; WEIMER, B. C.; CHEN, D.; CHENG, Z.; ZHANG, L.; LI, Q.; LI, S.; ZHENG, Z.; SONG, S.; HUANG, Y.; YE, Z.; SU, W.; LIN, S.; SHEN, Y.; WU, Q. *Nature Chemical Biology*, **2008**, Advance Online Publication.
- 48) Site: www.cgee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=1702, acessado em 28/01/09.
- 49) Site: www.saude.gov.br; acessado em 23/10/08.

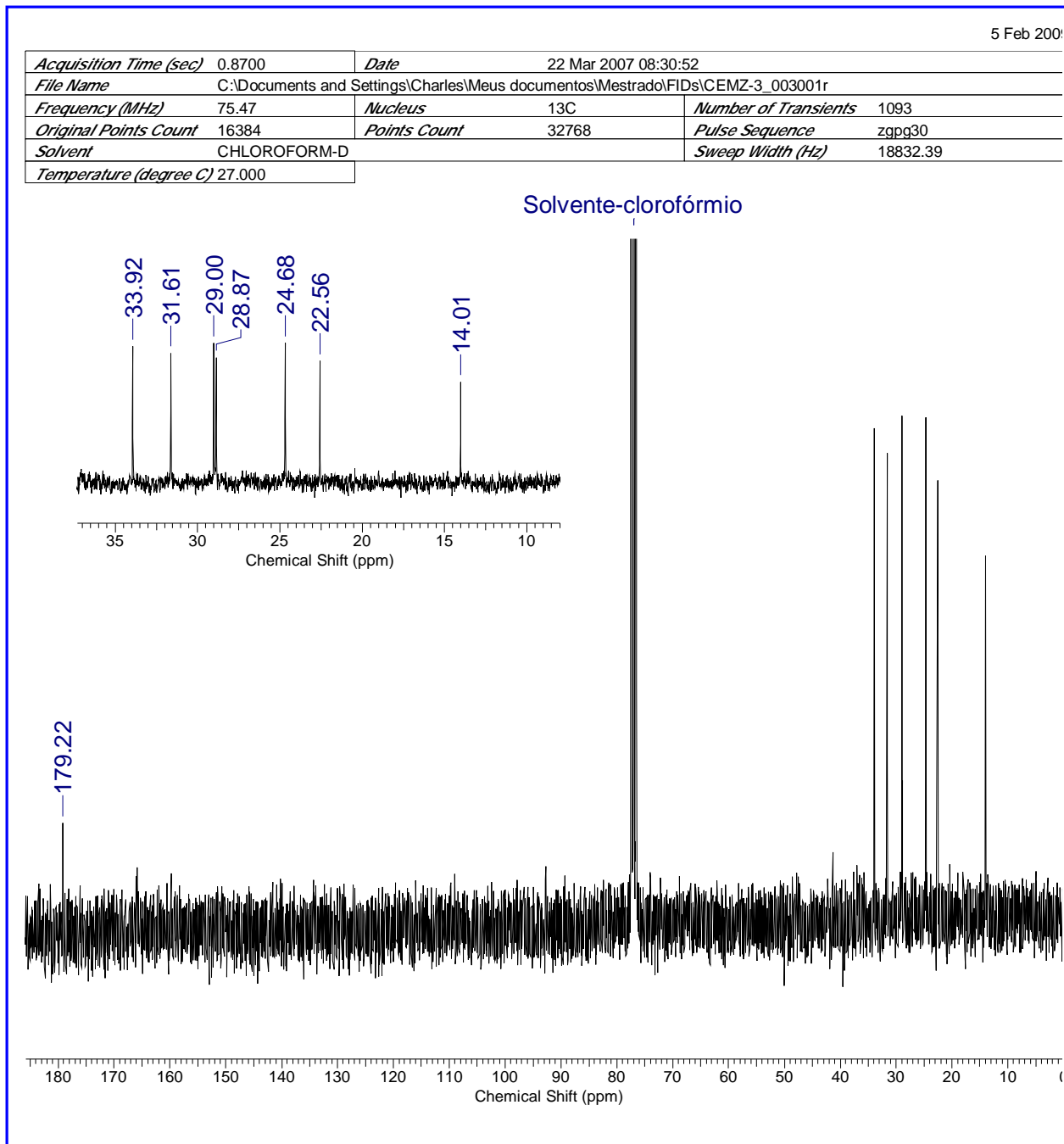
Seção de Espectros

7. Seção de espectros

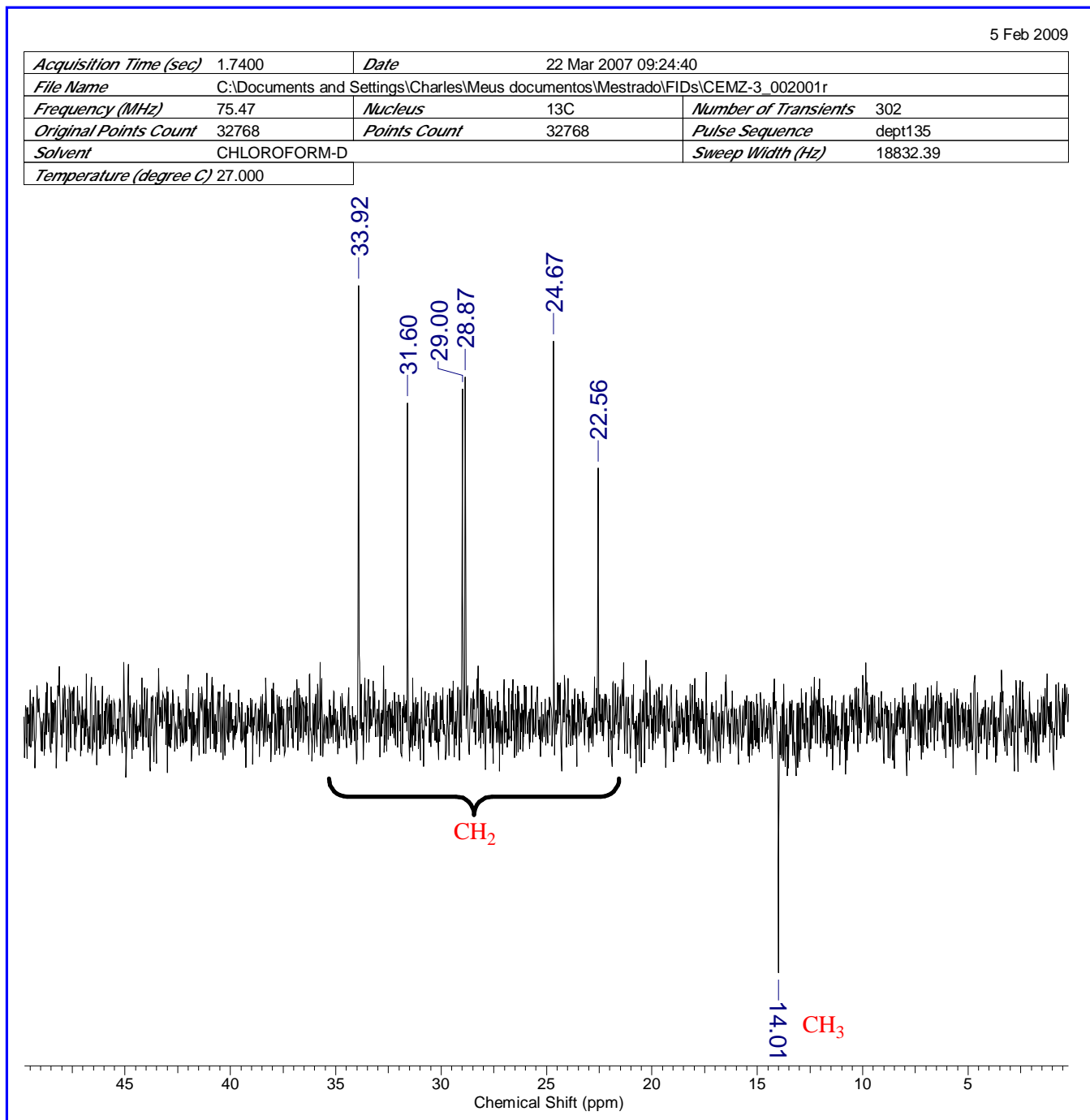
7.1. Ácido octanóico (26)



Espectro 1: RMN de ^1H do ácido octanóico (26) em CDCl_3

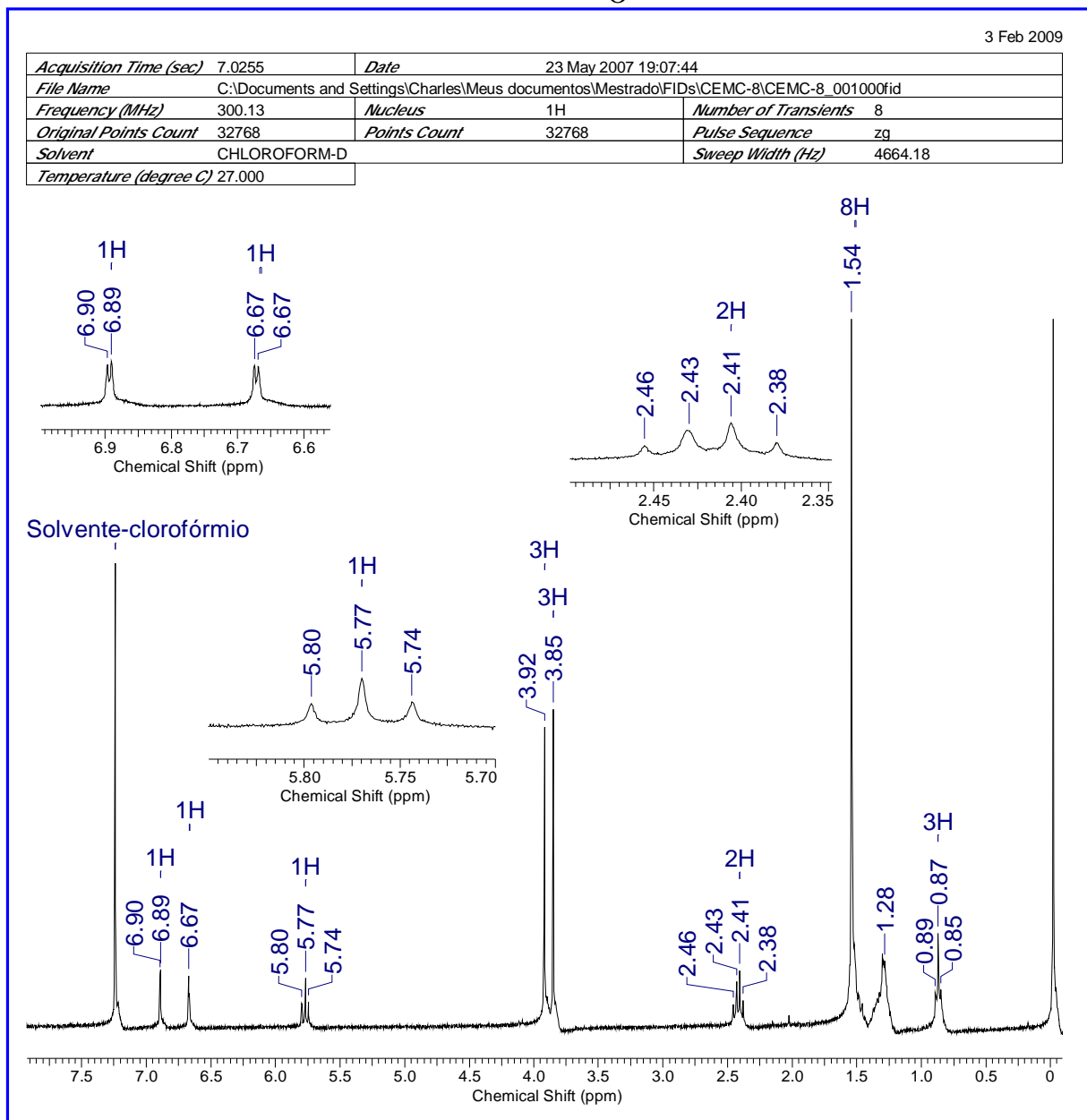
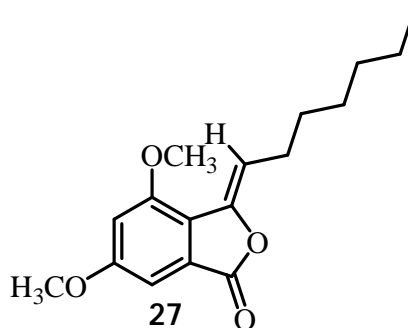


Espectro 2: RMN de ^{13}C do ácido octanóico (26) em CDCl_3

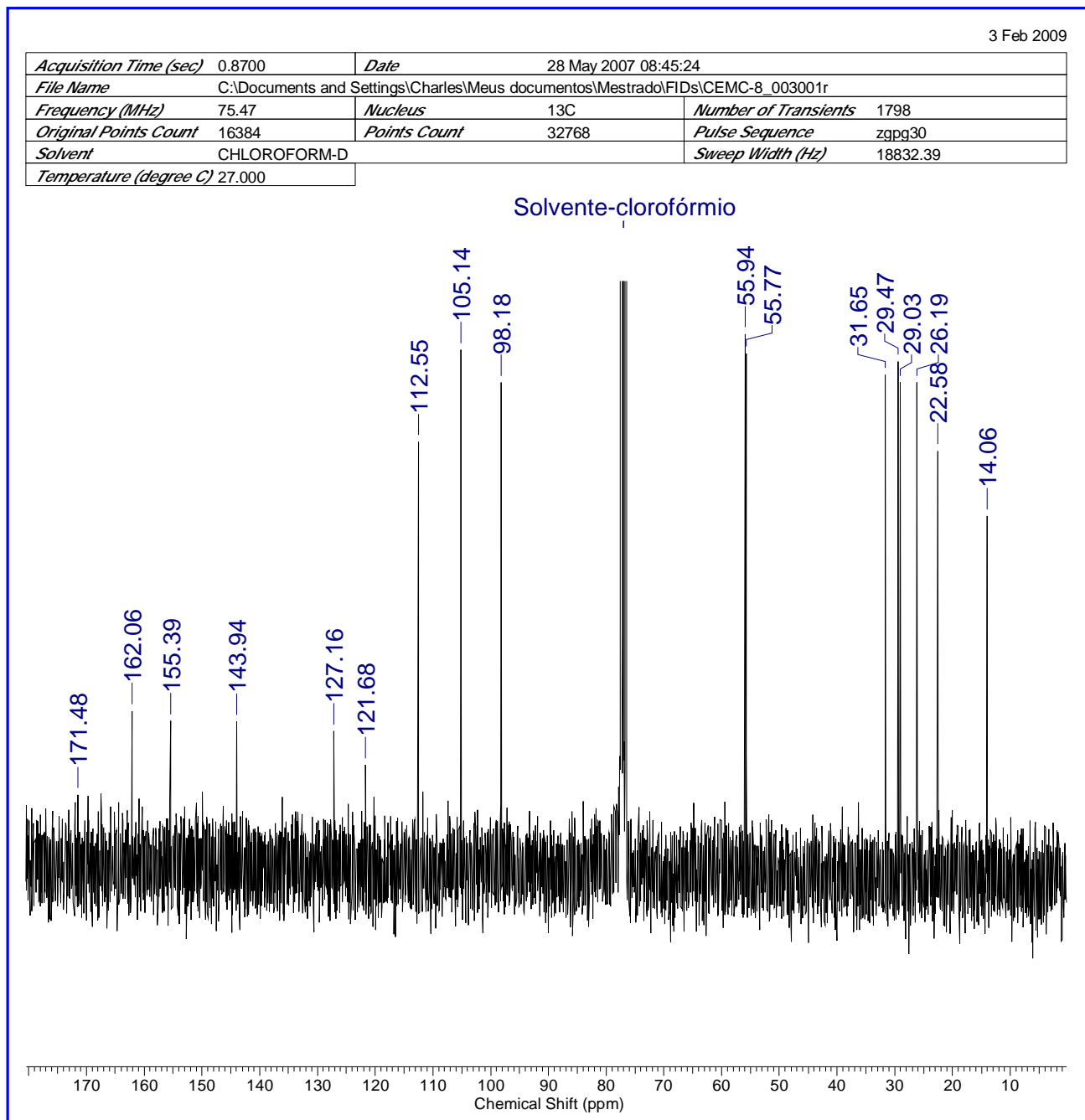


Espectro 3: DEPT-135° do ácido octanóico (26) em CDCl₃

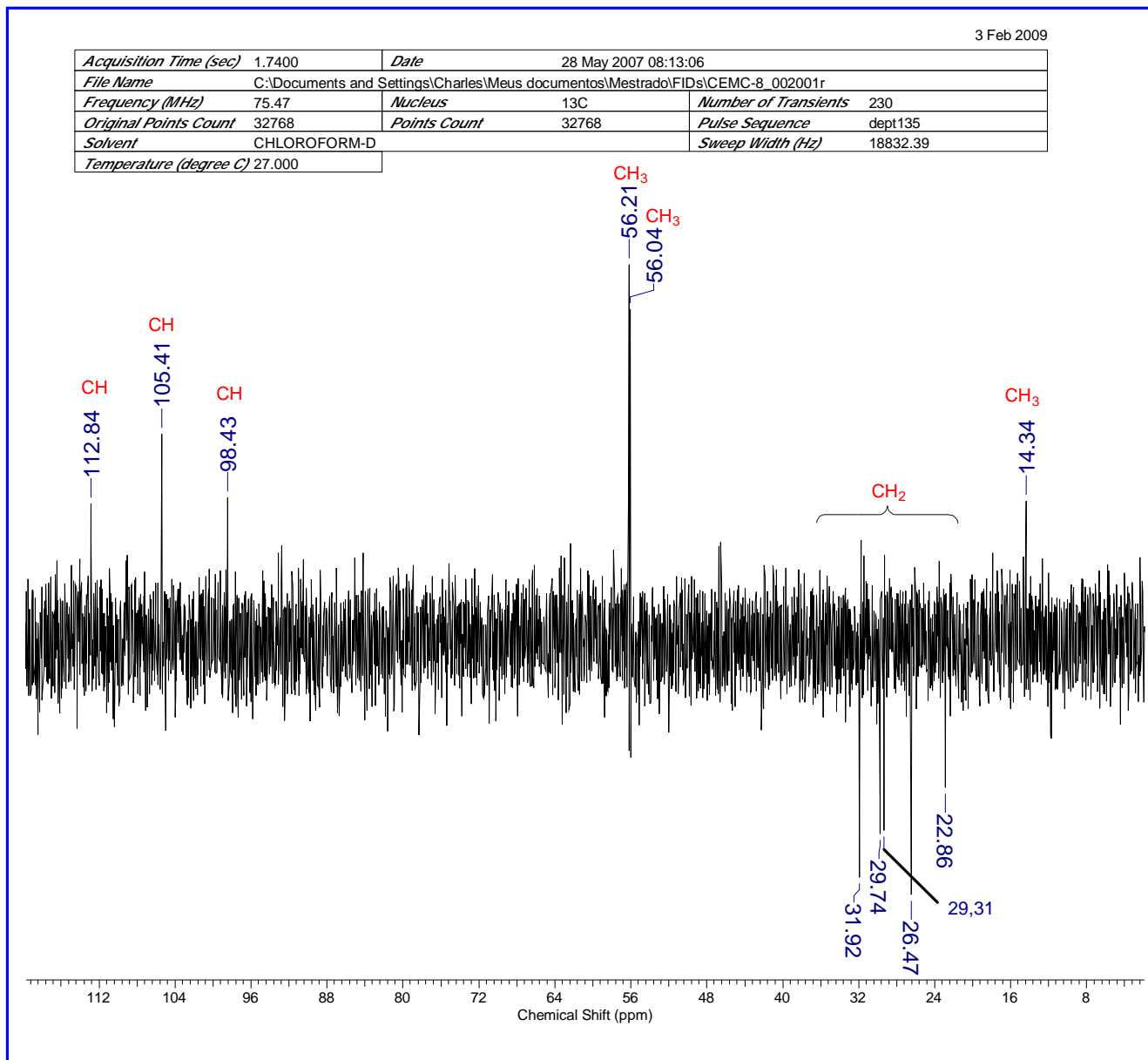
7.2. (*Z*)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (27)



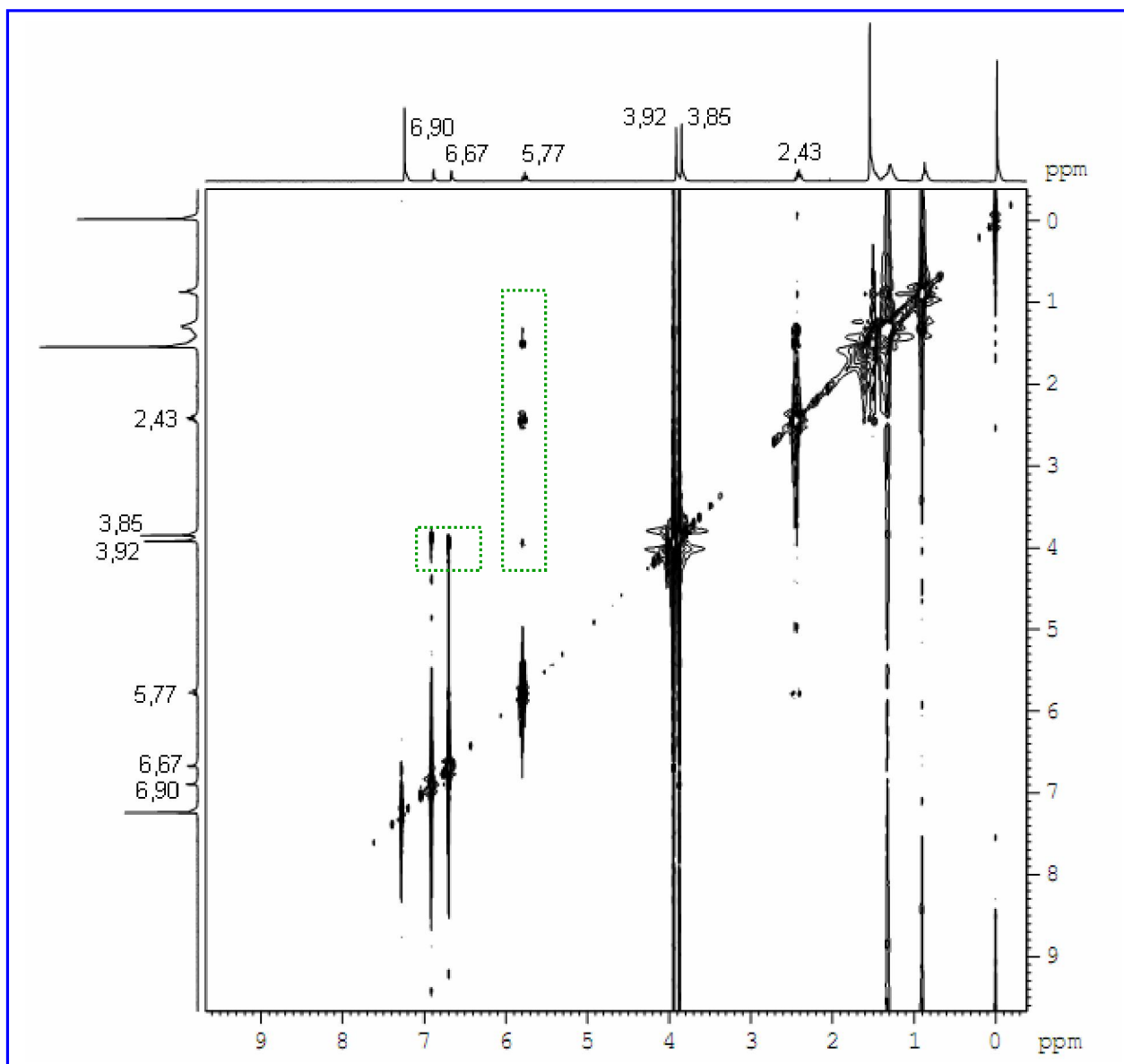
Espectro 4: RMN de ¹H do (*Z*)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (27) em CDCl₃



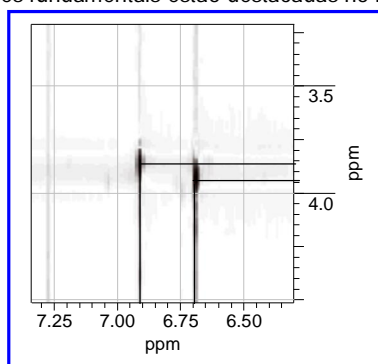
Espectro 5: RMN de ^{13}C do (*Z*)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (27) em CDCl_3



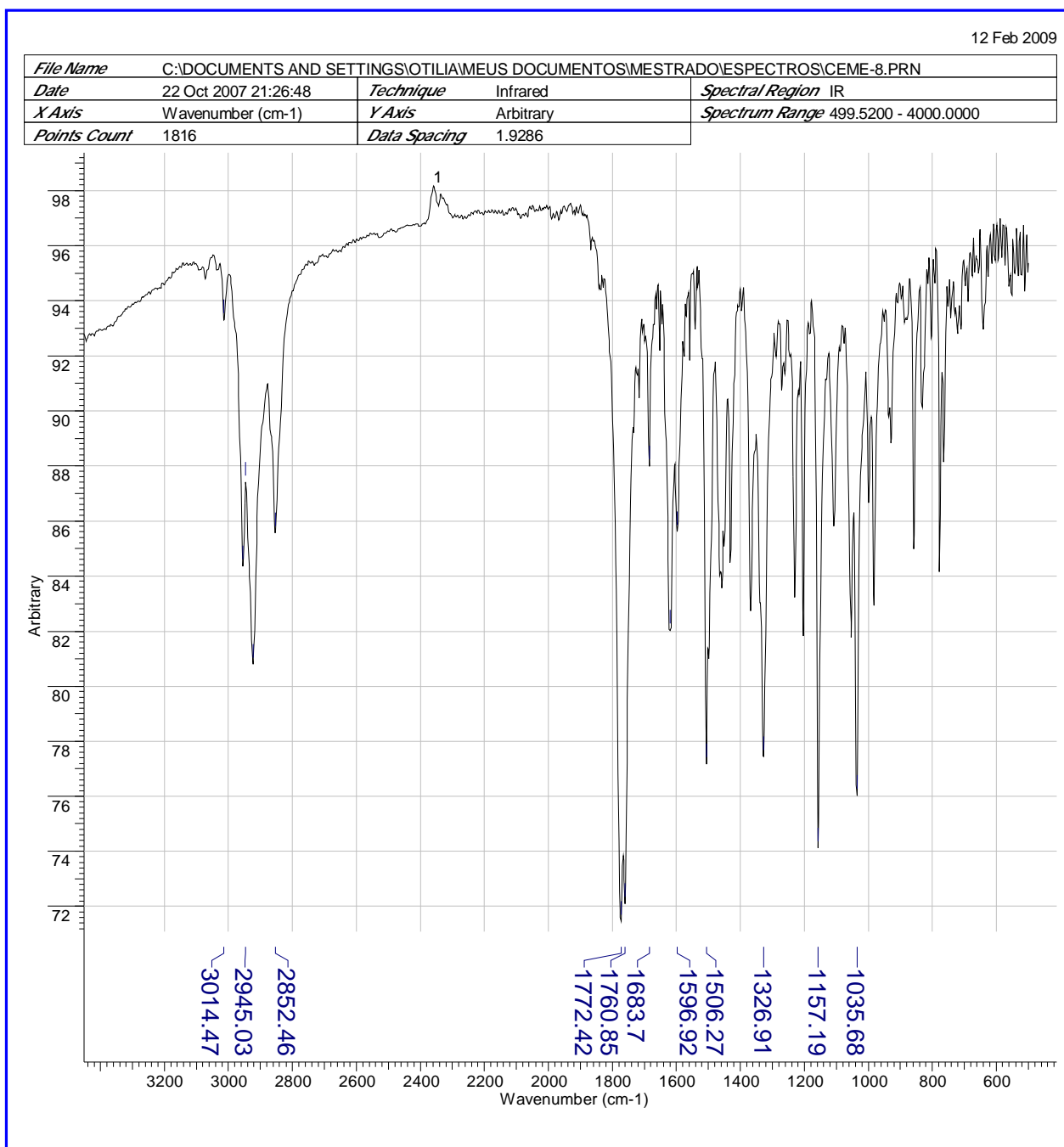
Espectro 6: DEPT-135° do (*Z*)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (27) em CDCl₃



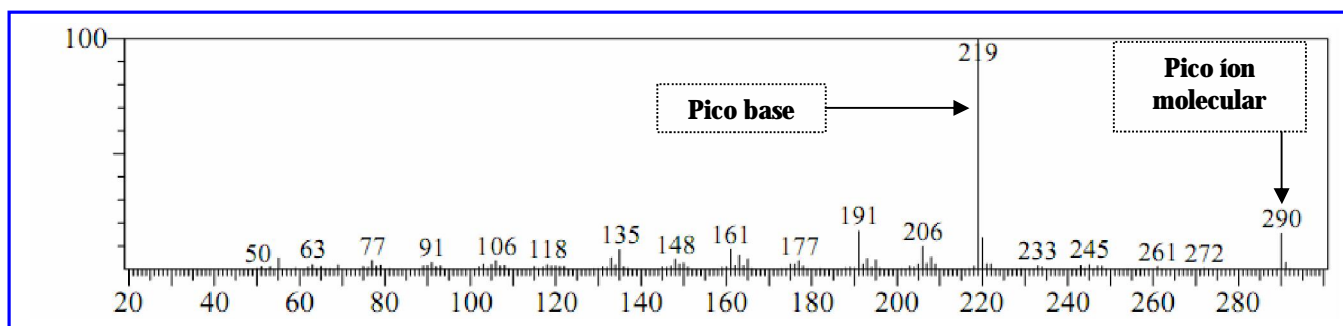
Espectro 7: NOE 2D do (*Z*-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (27) em CDCl₃
– as correlações fundamentais estão destacadas no retângulo



Espectro 8: Ampliação do NOE 2D do (*Z*-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3*H*)-ona (27) em CDCl₃, na região de hidrogênios aromáticos (6,75 ppm) e hidrogênios das metoxilas (3,90 ppm)

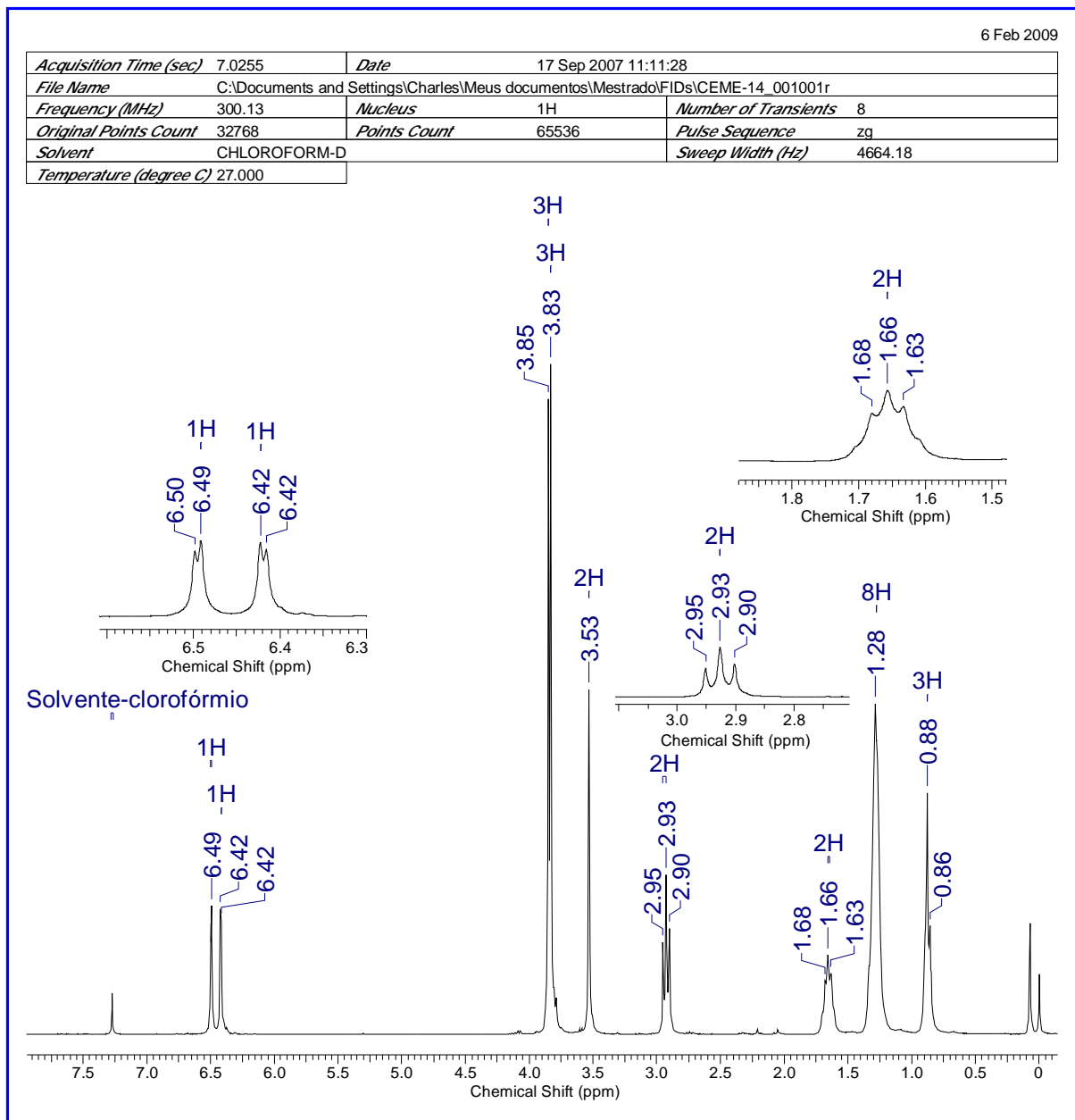
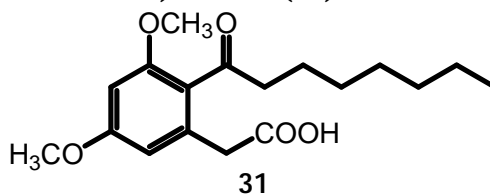


Espectro 9: Infravermelho do (*Z*)-3-heptilideno-4,6-dimetoxisobenzofurano-1(3*H*)-ona (27) em pastilha de KBr

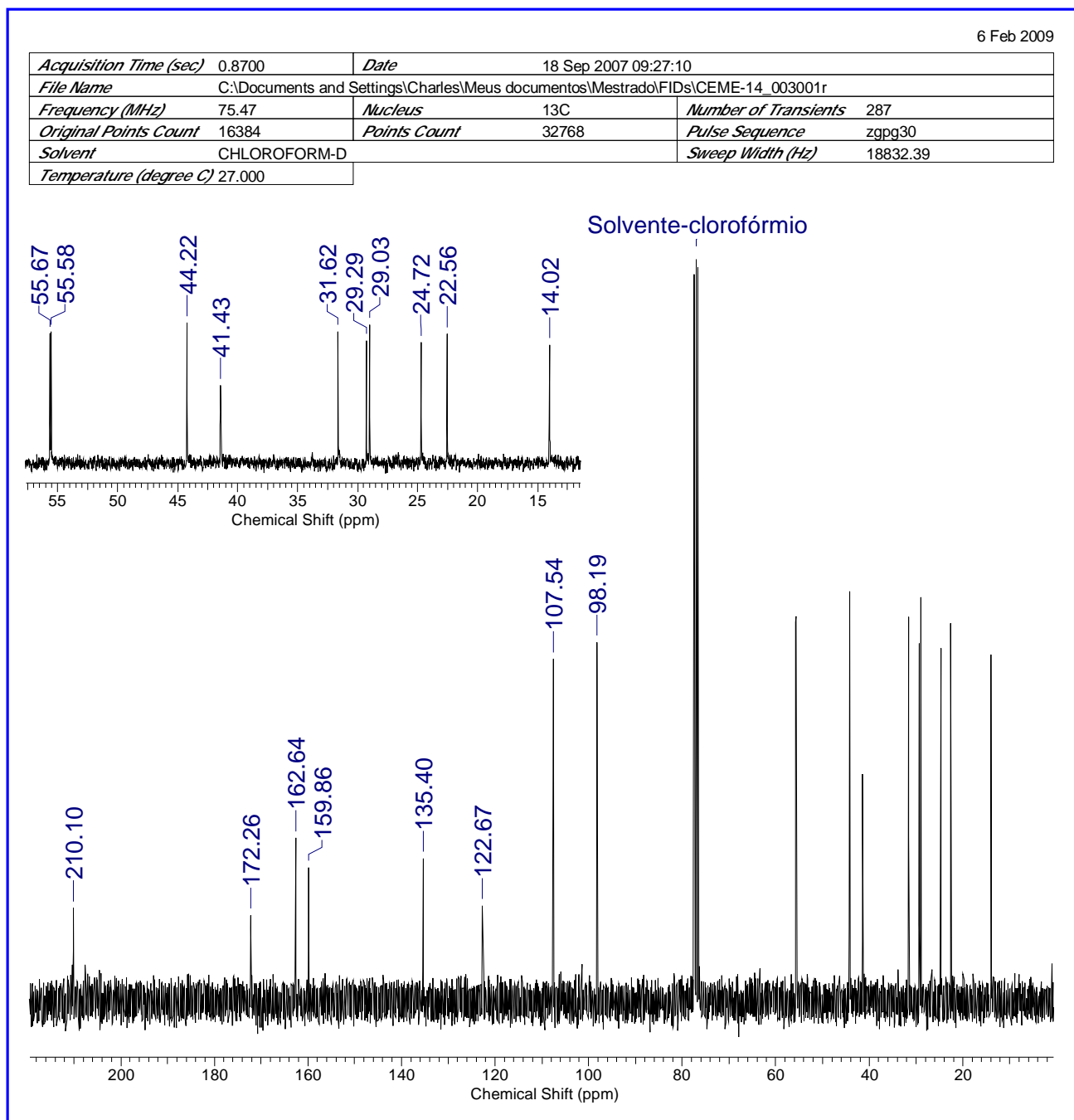


Espectro 10: Espectro de Massas do (Z)-3-heptilideno-4,6-dimetoxiisobenzofurano-1(3H)-ona (27)

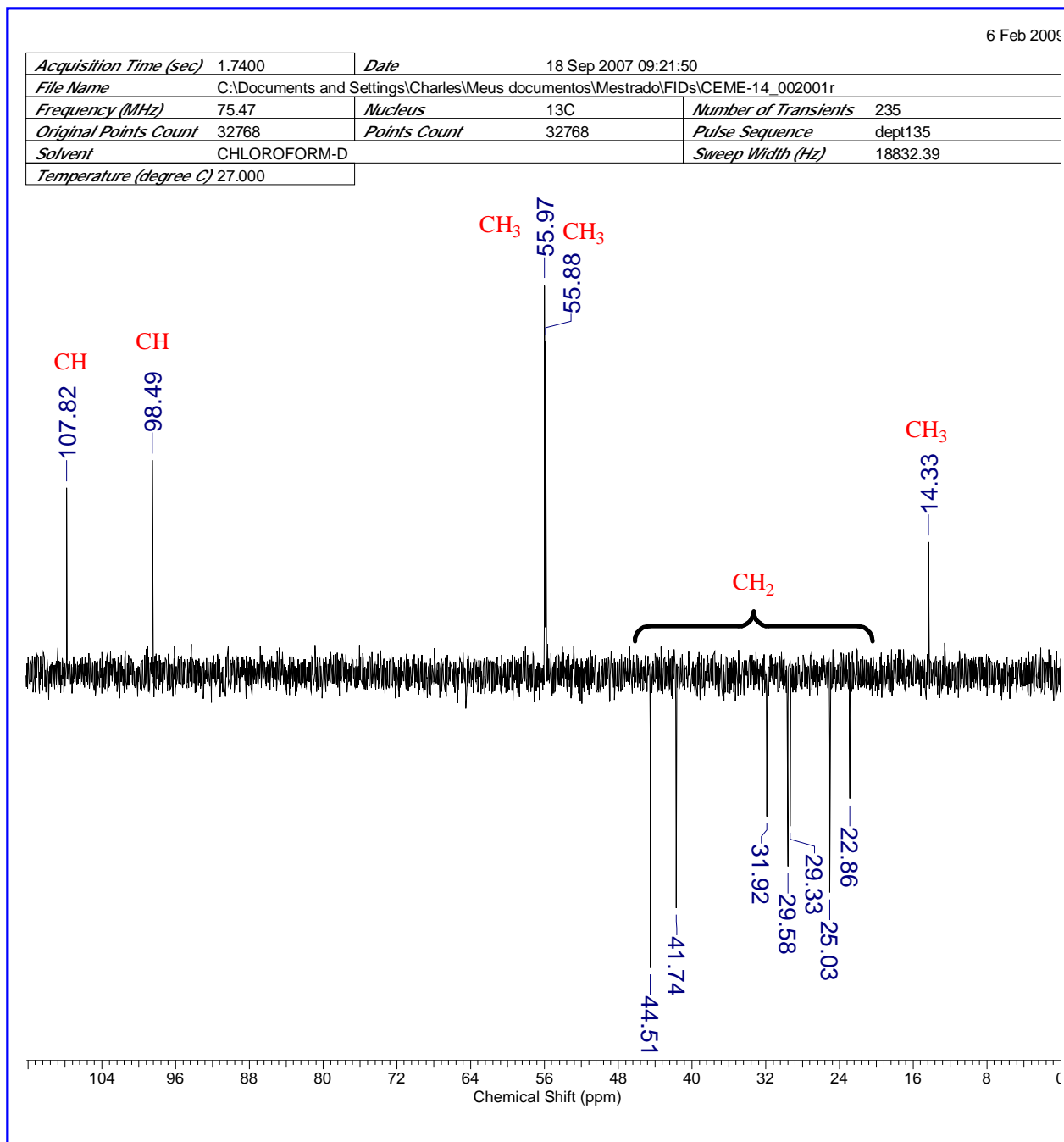
7.3. Ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31)



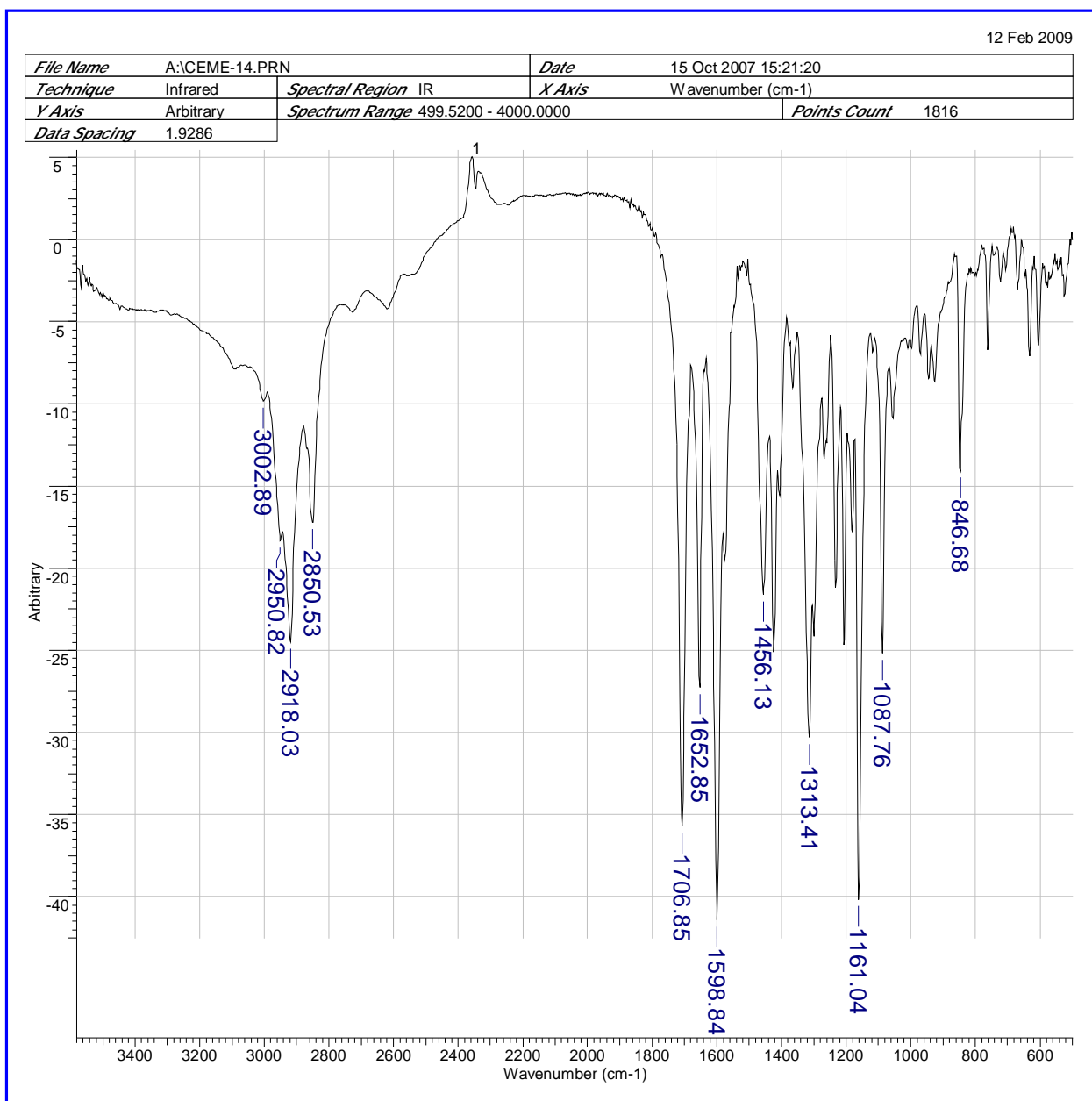
Espectro 11: RMN de ¹H do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31) em CDCl₃



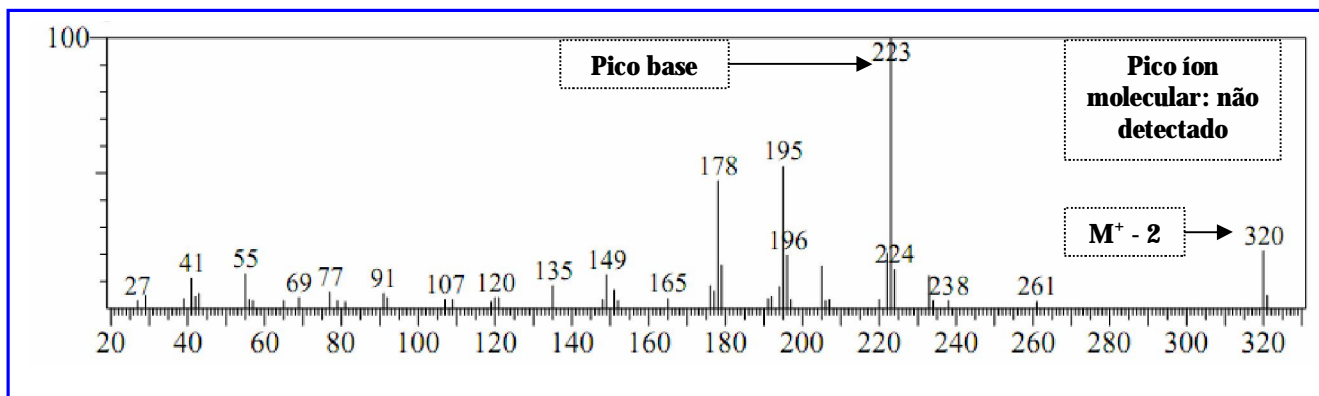
Espectro 12: RMN de ^{13}C do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31) em CDCl_3



Espectro 13: DEPT-135° do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31) em CDCl_3

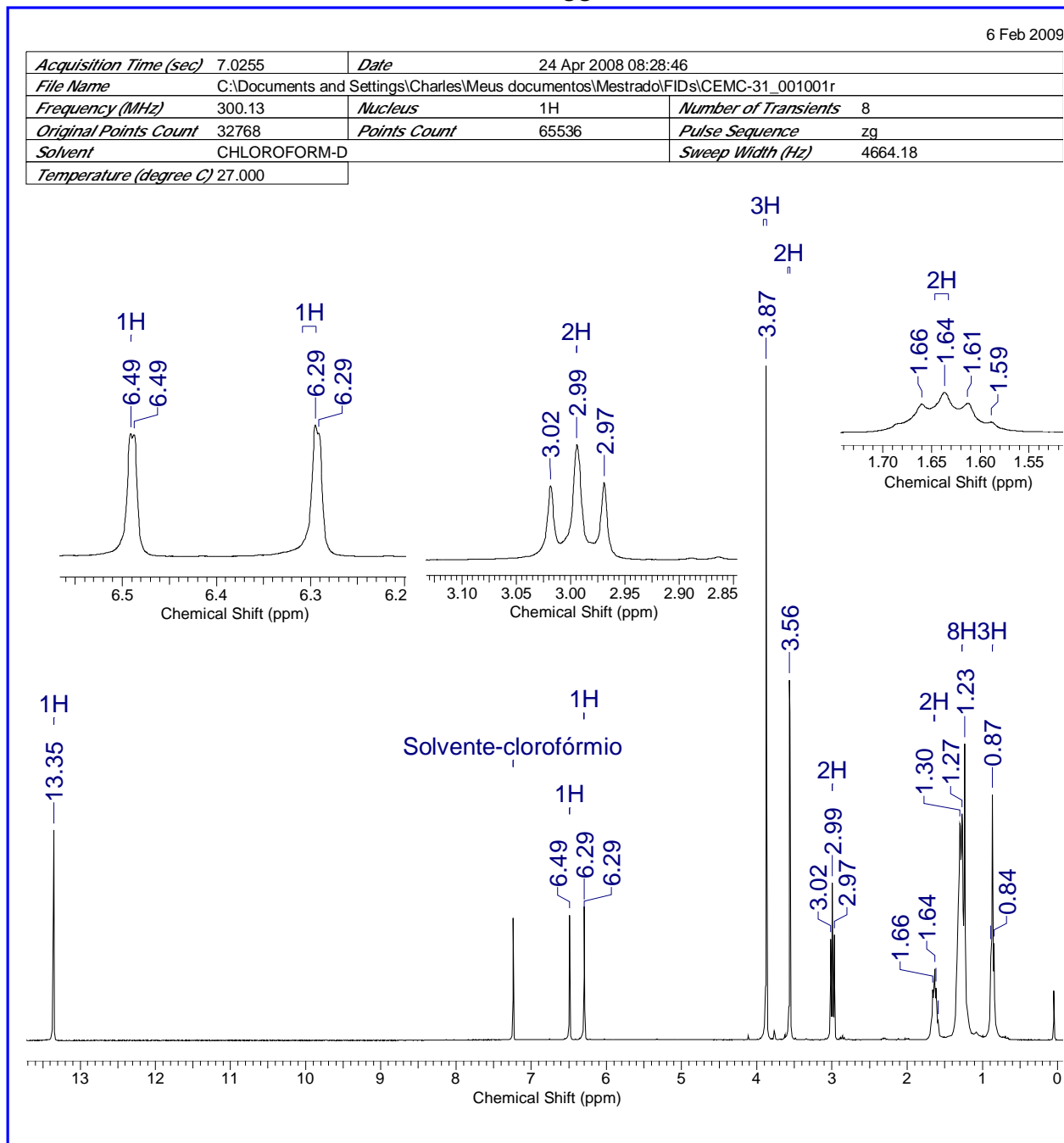
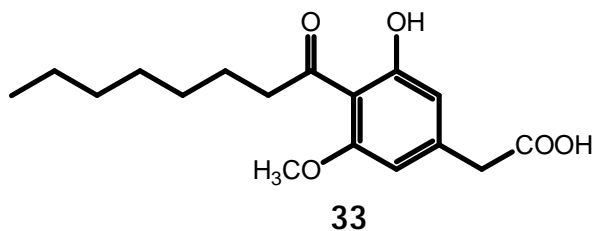


Espectro 14: Infravermelho do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31) em pastilha de KBr



Espectro 15: Espectro de Massas do ácido 2-(3,5-dimetóxi-2-octanoilfenil) acético (31)

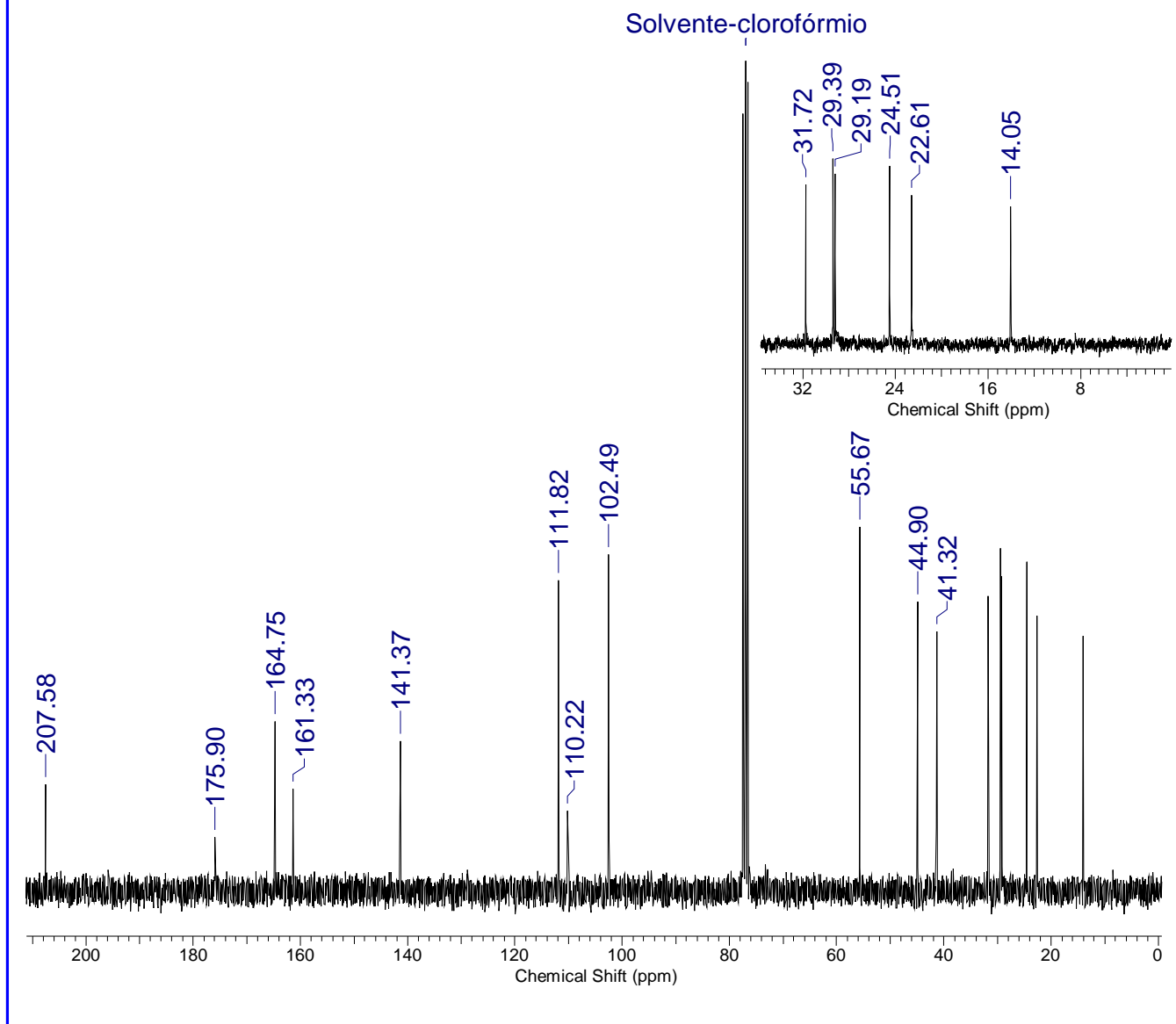
7.4. Ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33)



Espectro 16: RMN de ^1H do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em CDCl_3

8 Feb 2009

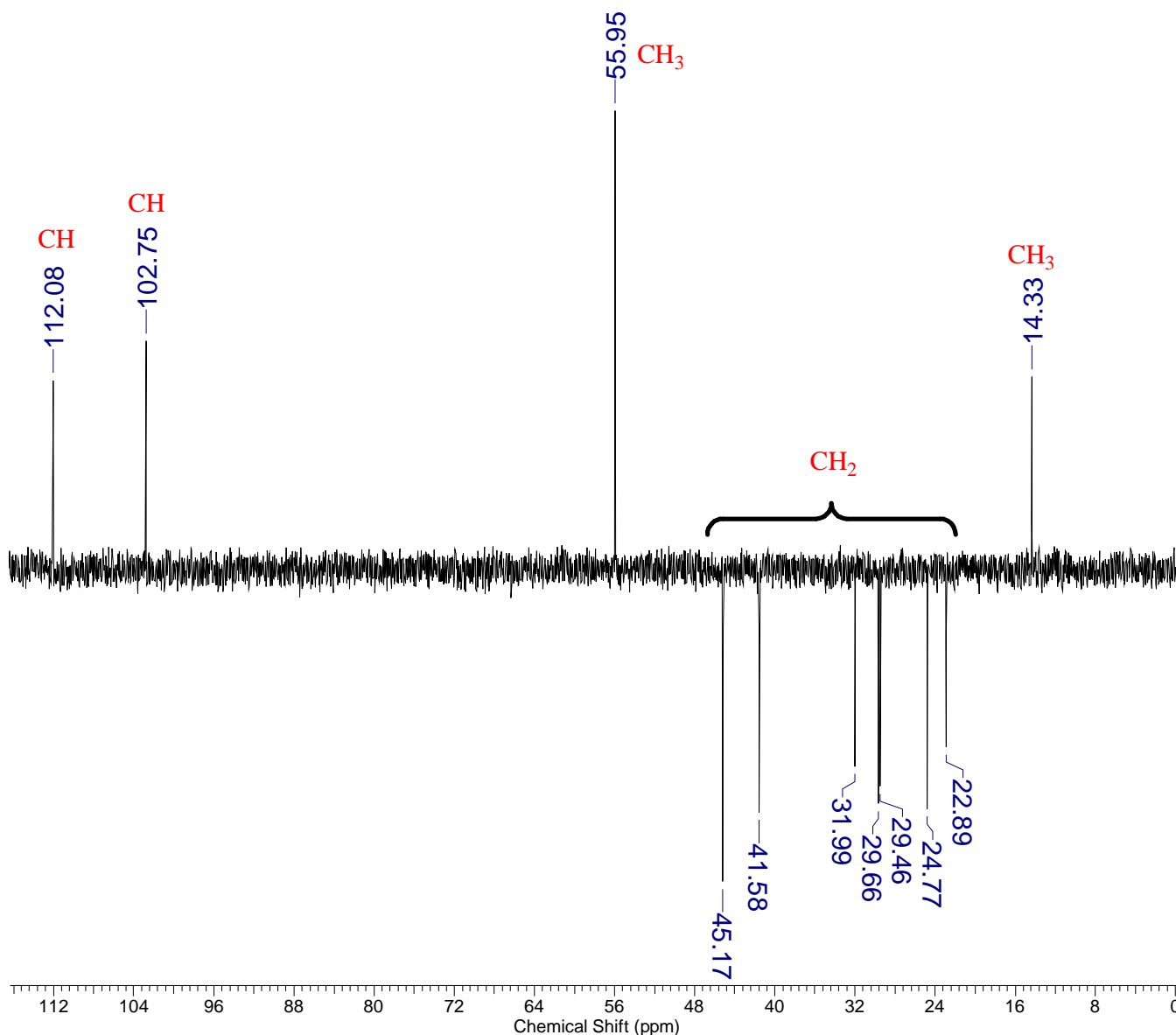
Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	28 Apr 2008 10:15:40		
File Name	C:\Documents and Settings\Charles\Meus documentos\Mestrado\FIDs\CEMC-31_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	1298
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39		
Temperature (degree C)	27.000				



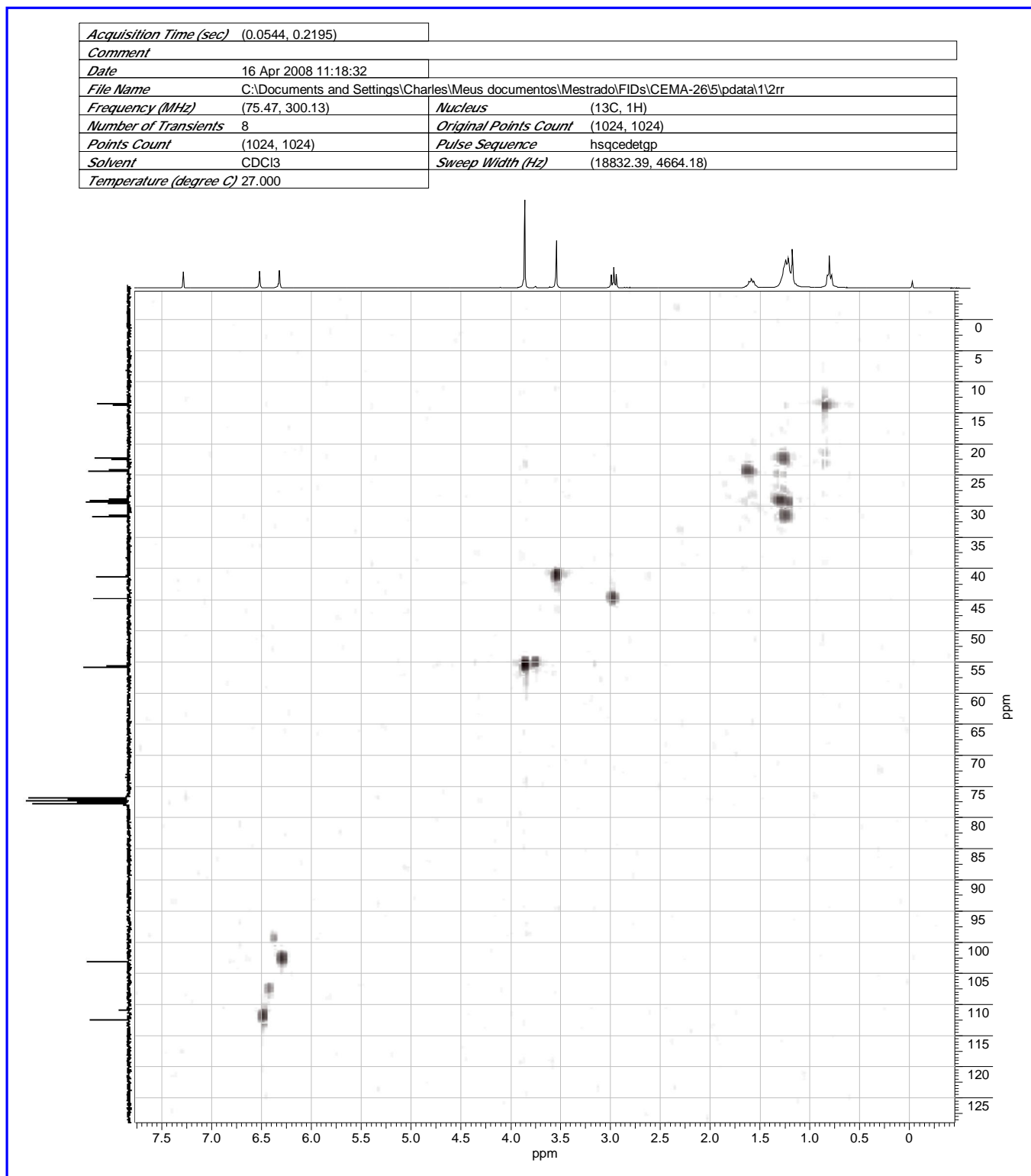
Espectro 17: RMN de ^{13}C do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em CDCl_3

8 Feb 2009

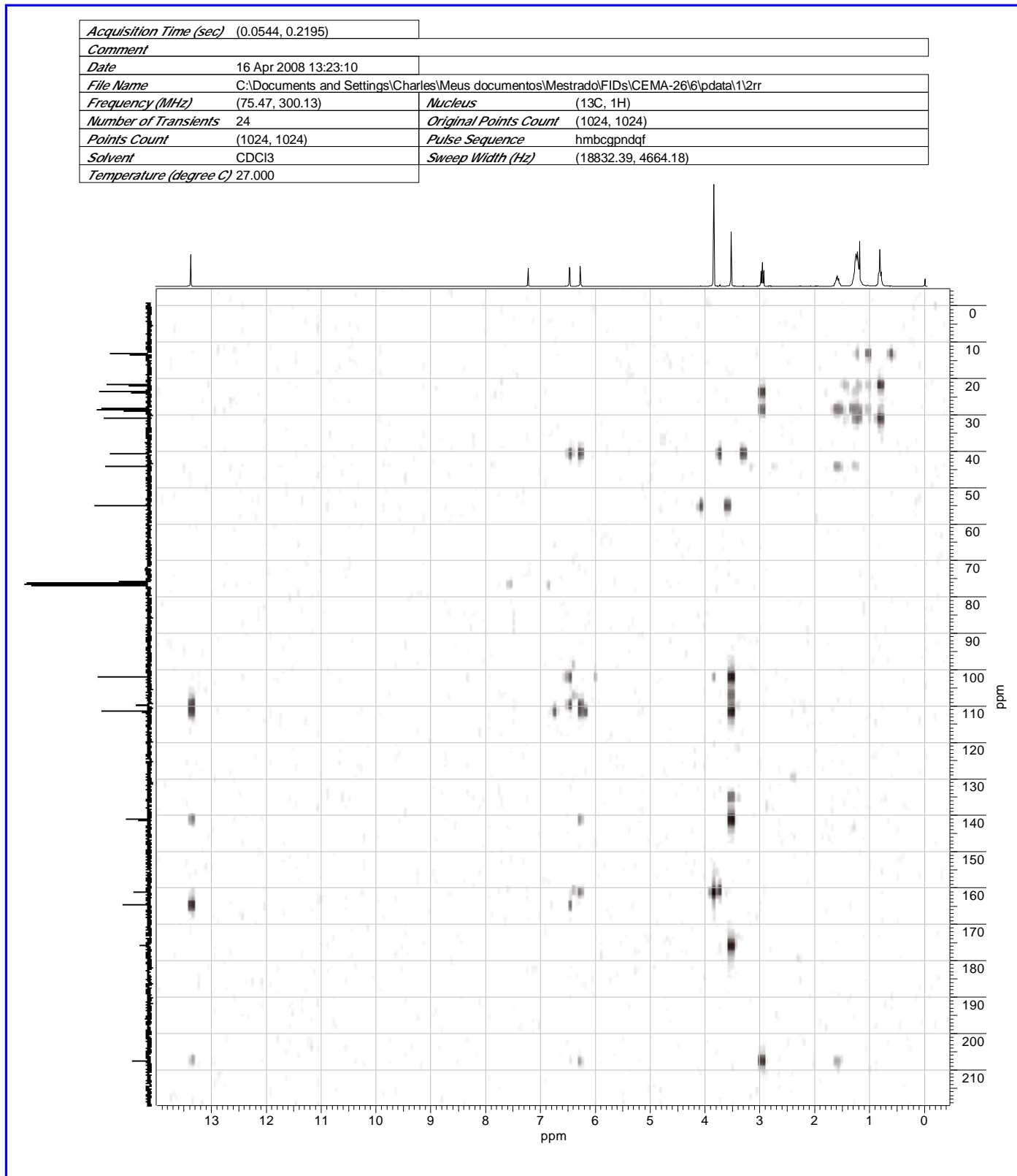
Acquisition Time (sec)	1.7400	Date	28 Apr 2008 10:13:34		
File Name	C:\Documents and Settings\Charles\Meus documentos\Mestrado\FIDs\CEMC-31_002001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	300
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	dept135
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39		
Temperature (degree C)	27.000				



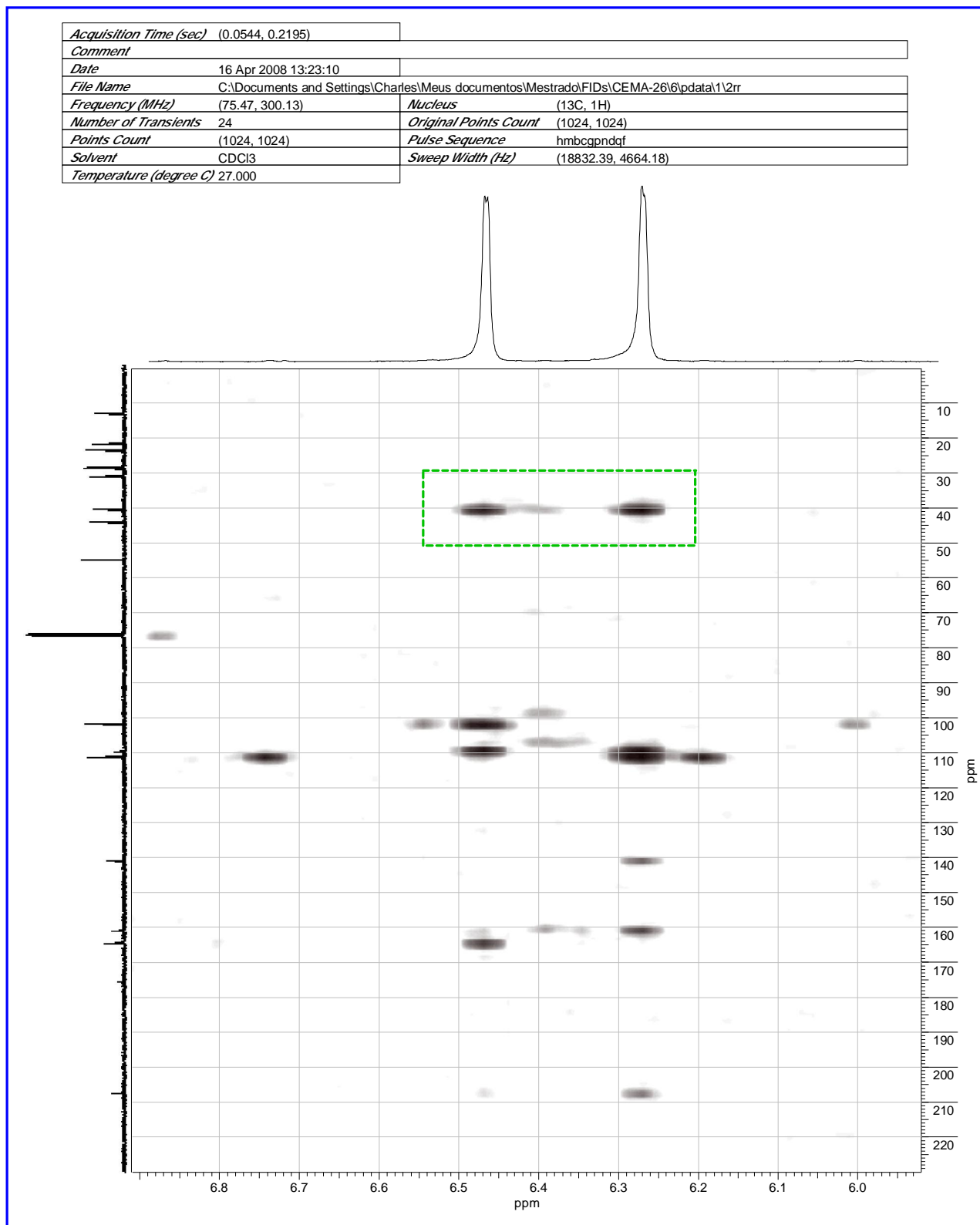
Espectro 18: DEPT-135° do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em CDCl₃



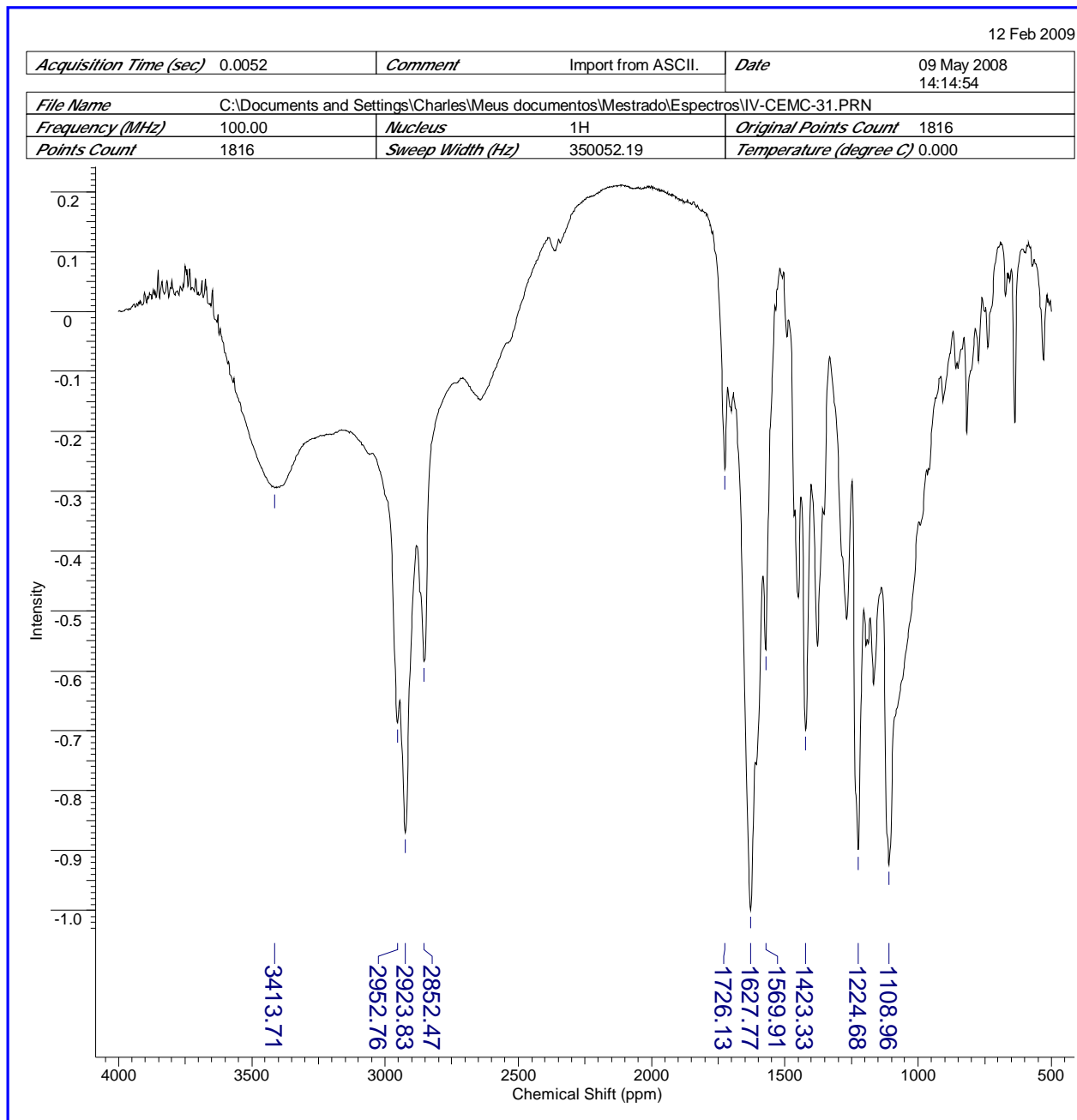
Espectro 19: HSQC do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em CDCl₃



Espectro 20: HMBC do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em CDCl₃

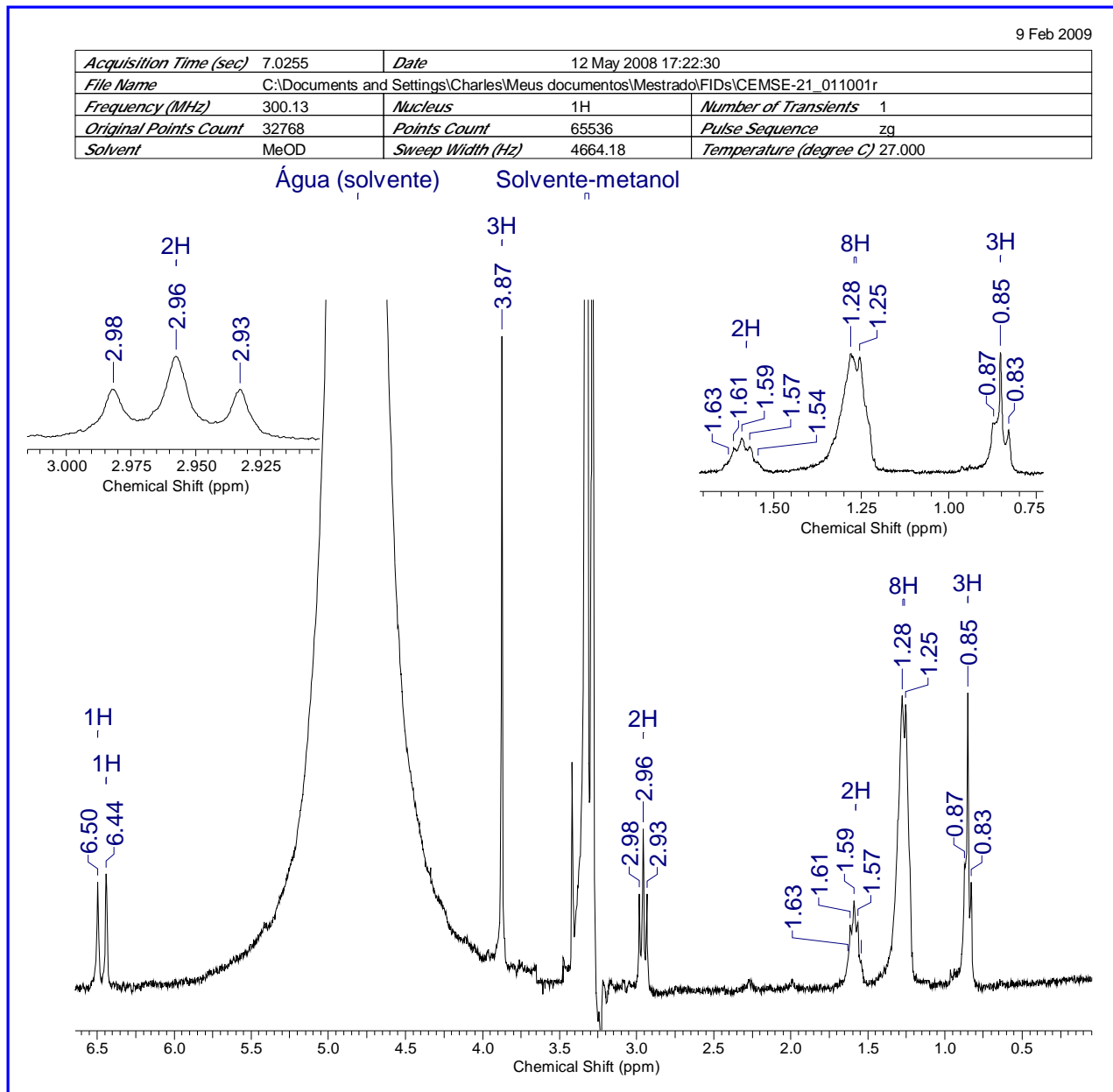
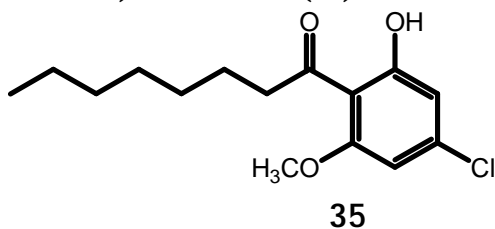


Espectro 21: Ampliação do HMBC do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em CDCl₃, na região de hidrogênios aromáticos (6,40 ppm) – as correlações fundamentais para a elucidação estrutural estão destacadas no retângulo

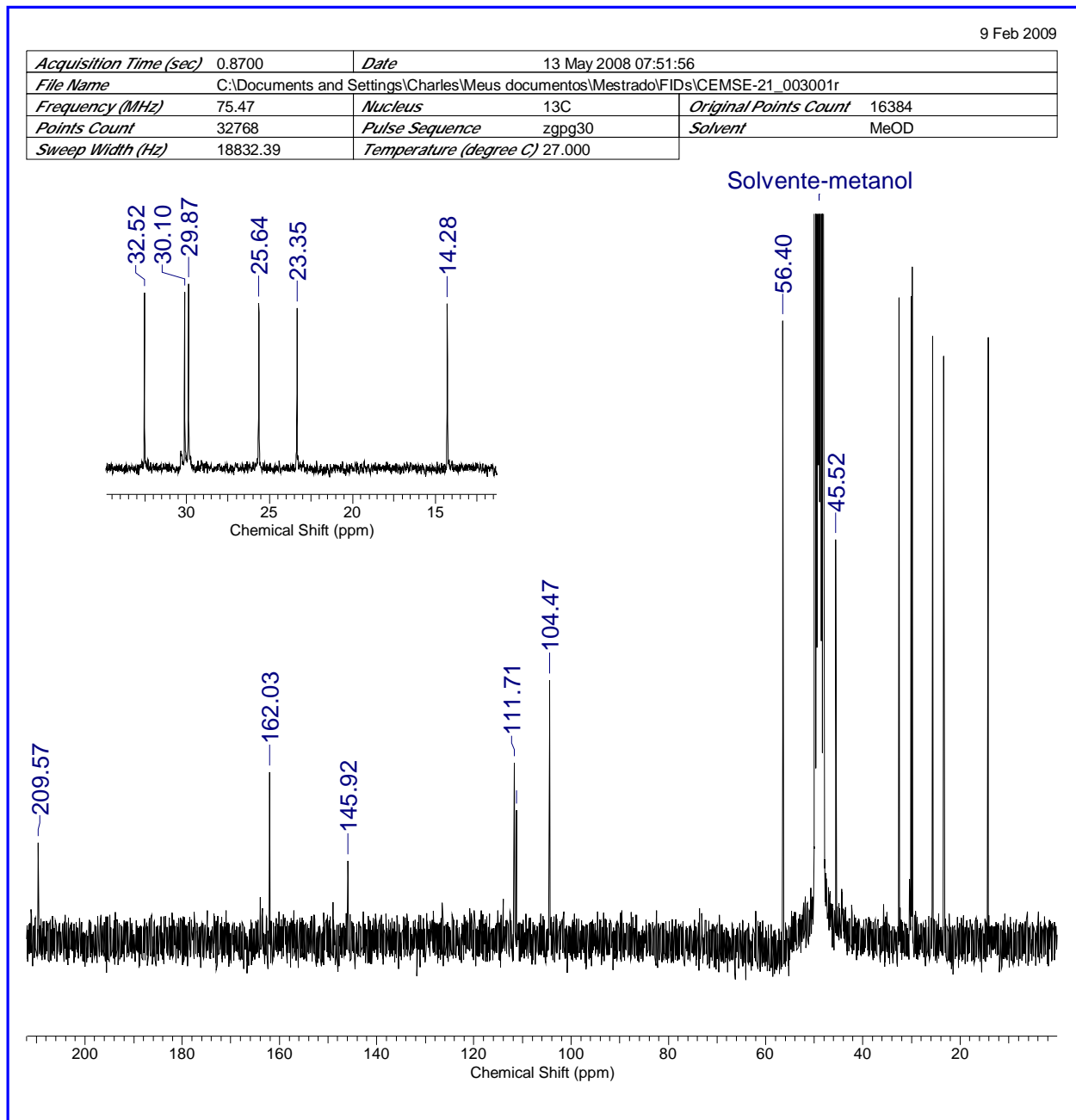


Espectro 22: Infravermelho do ácido 2-(3-hidróxi-4-octanoil-5-metoxifenil) acético (33) em pastilha de KBr

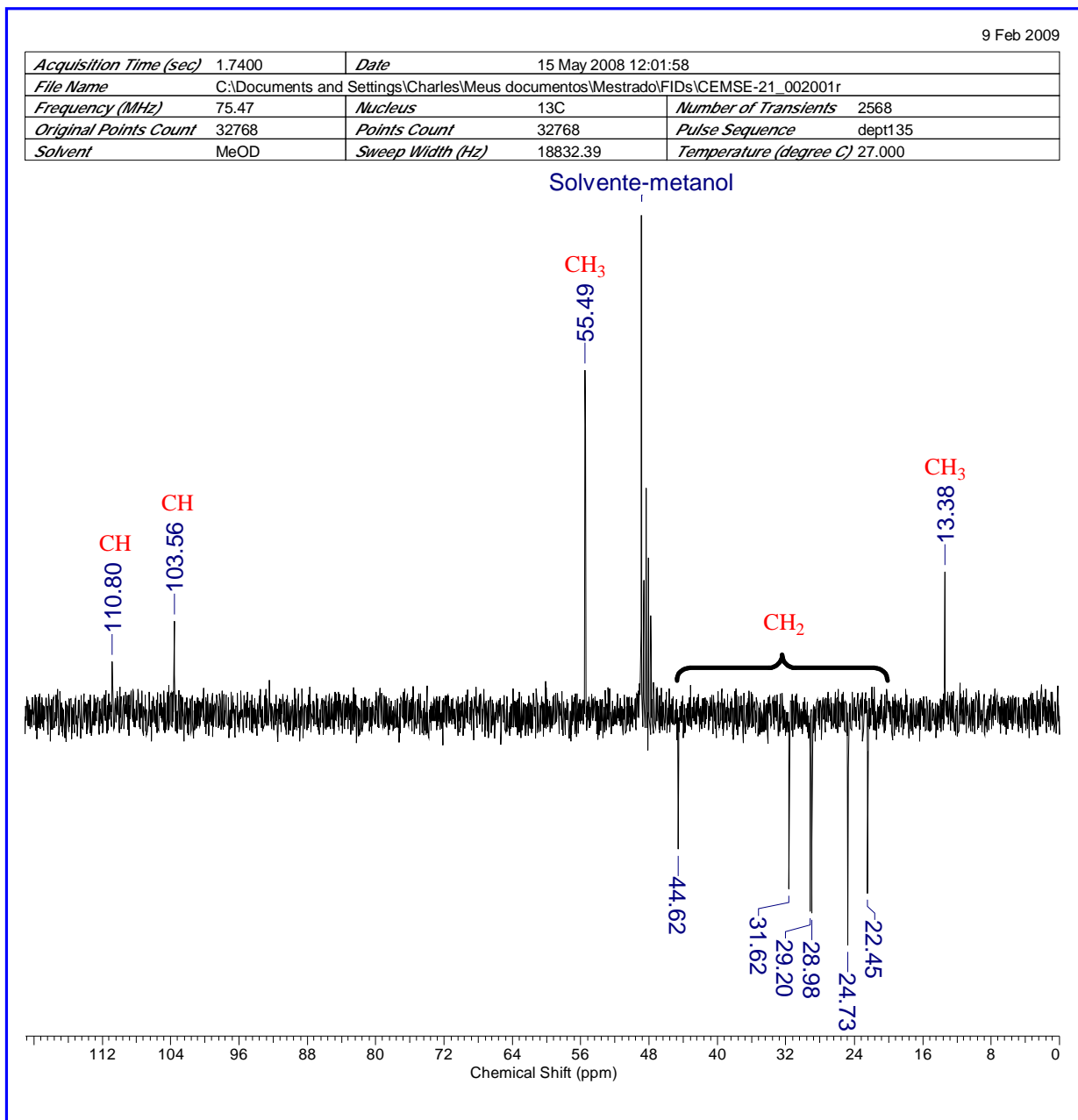
7.5. 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35)



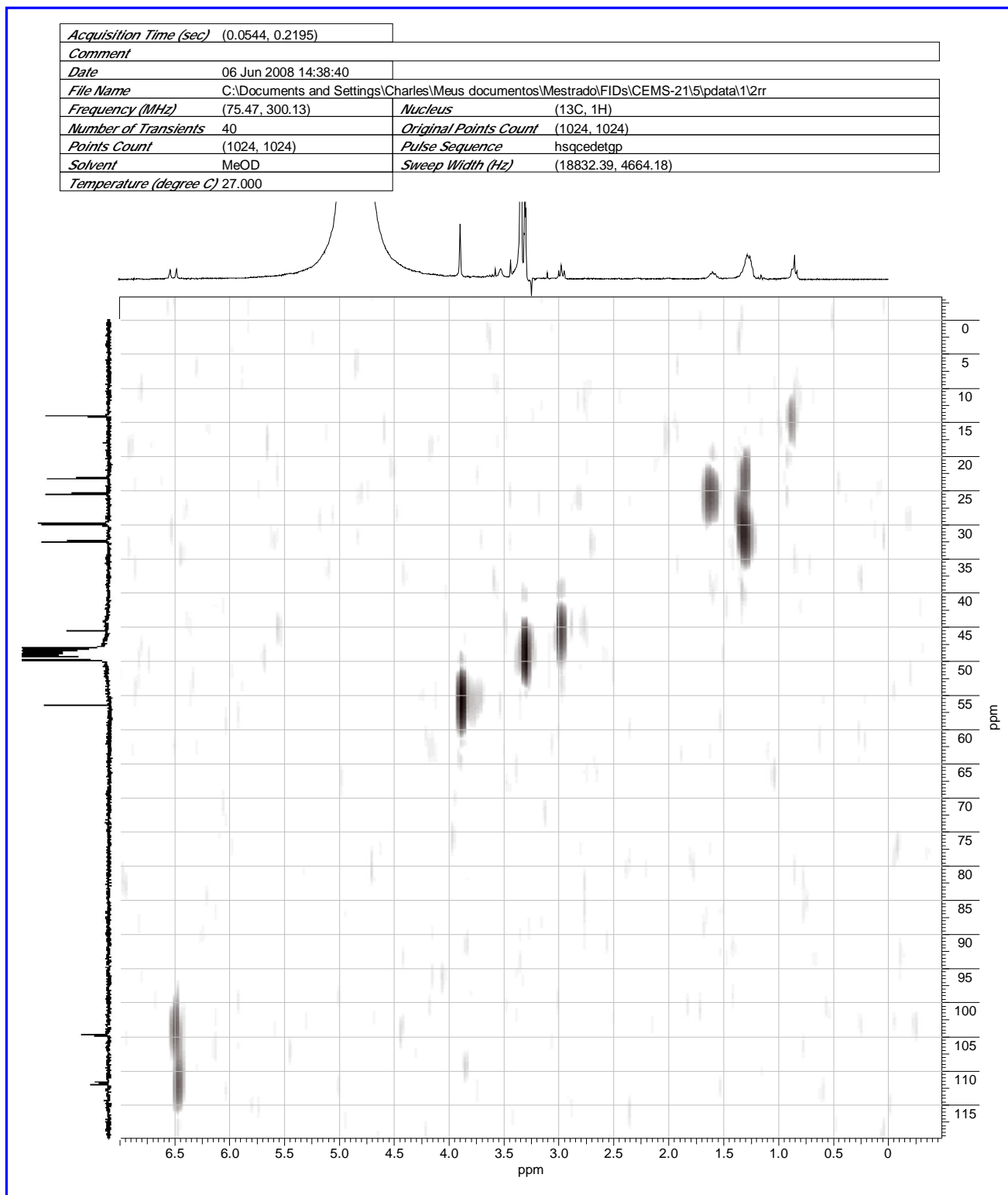
Espectro 23: RMN de ¹H do 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) em CD₃OD



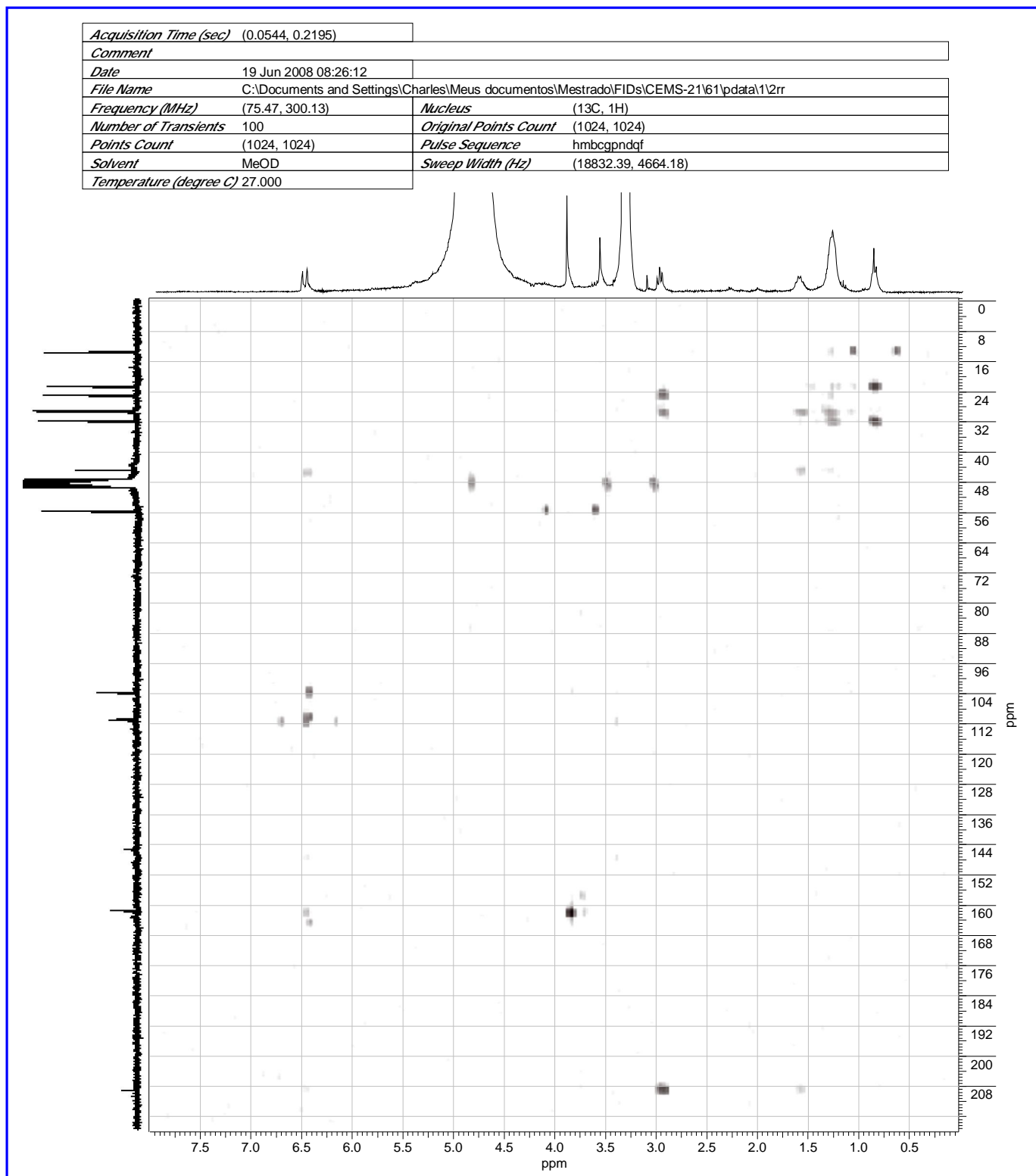
Espectro 24: RMN de ^{13}C do 1-(4-cloro-2-hidr3xi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) em CD_3OD



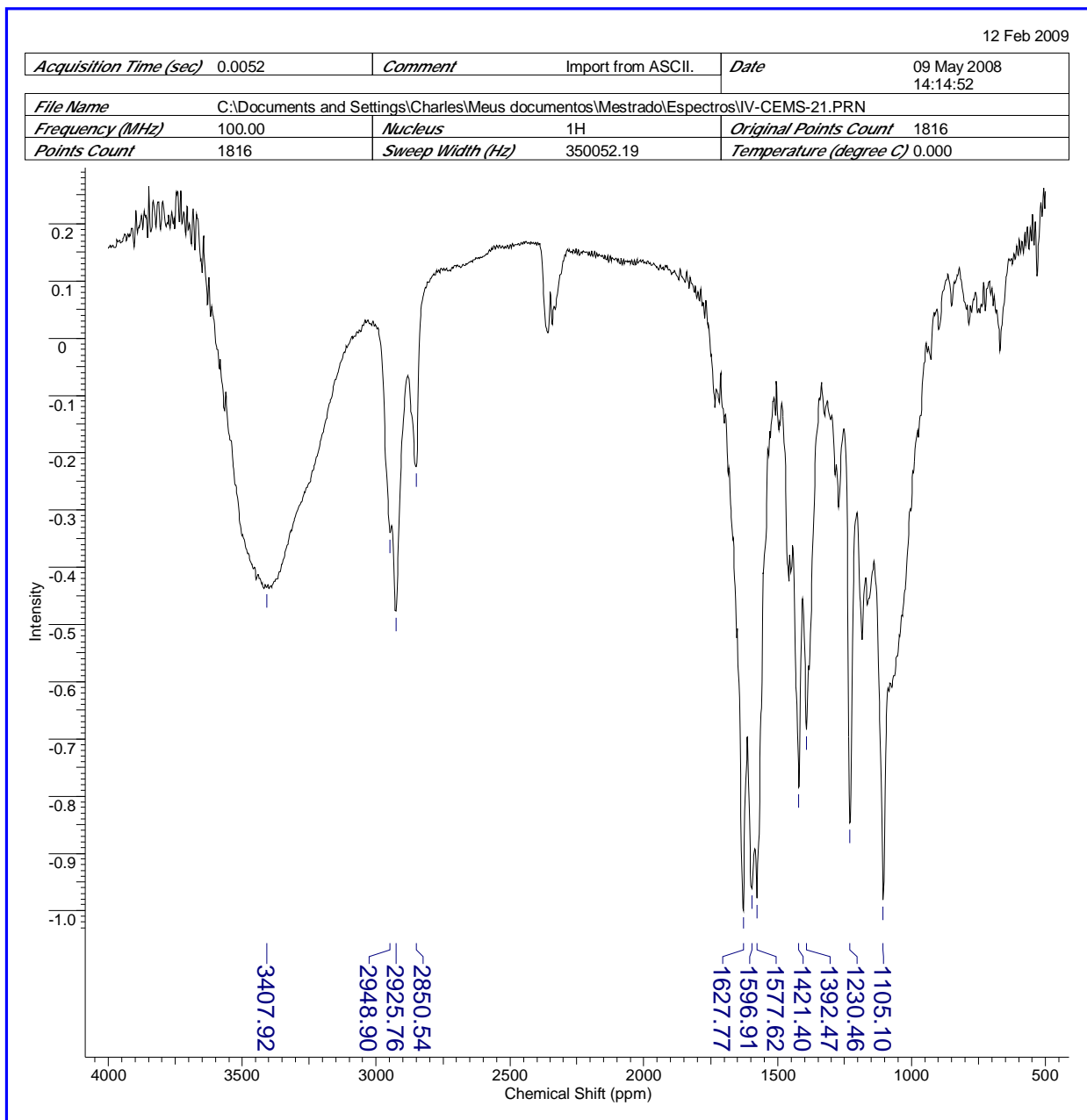
Espectro 25: DEPT-135° do 1-(4-cloro-2-hidr3xi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) em CD₃OD



Espectro 26: HSQC do 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) em CD₃OD

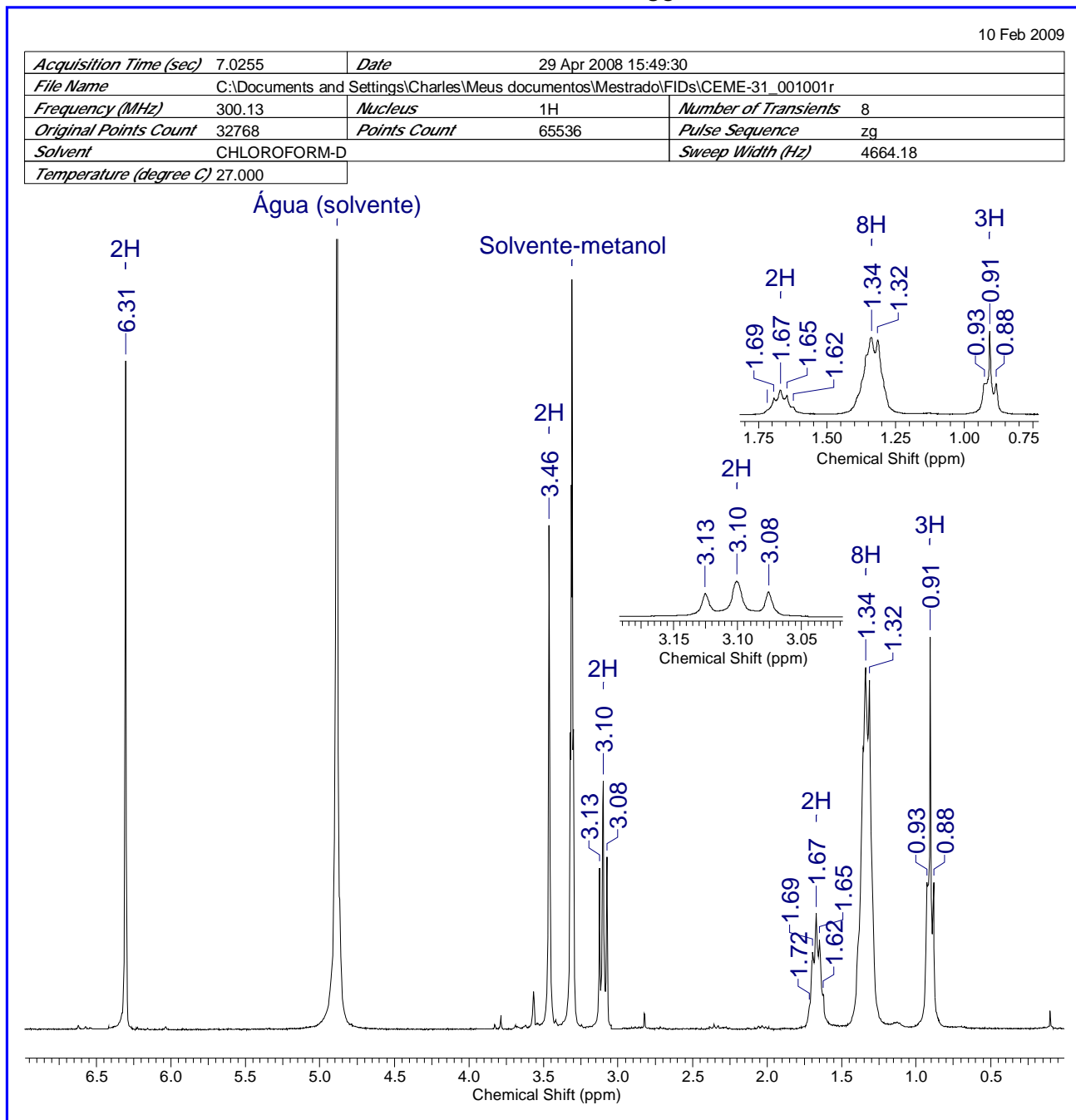
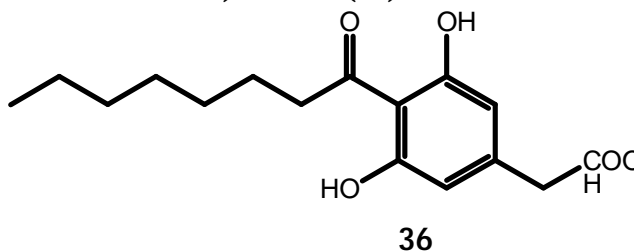


Espectro 27: HMBC do 1-(4-cloro-2-hidr3xi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) em CD₃OD

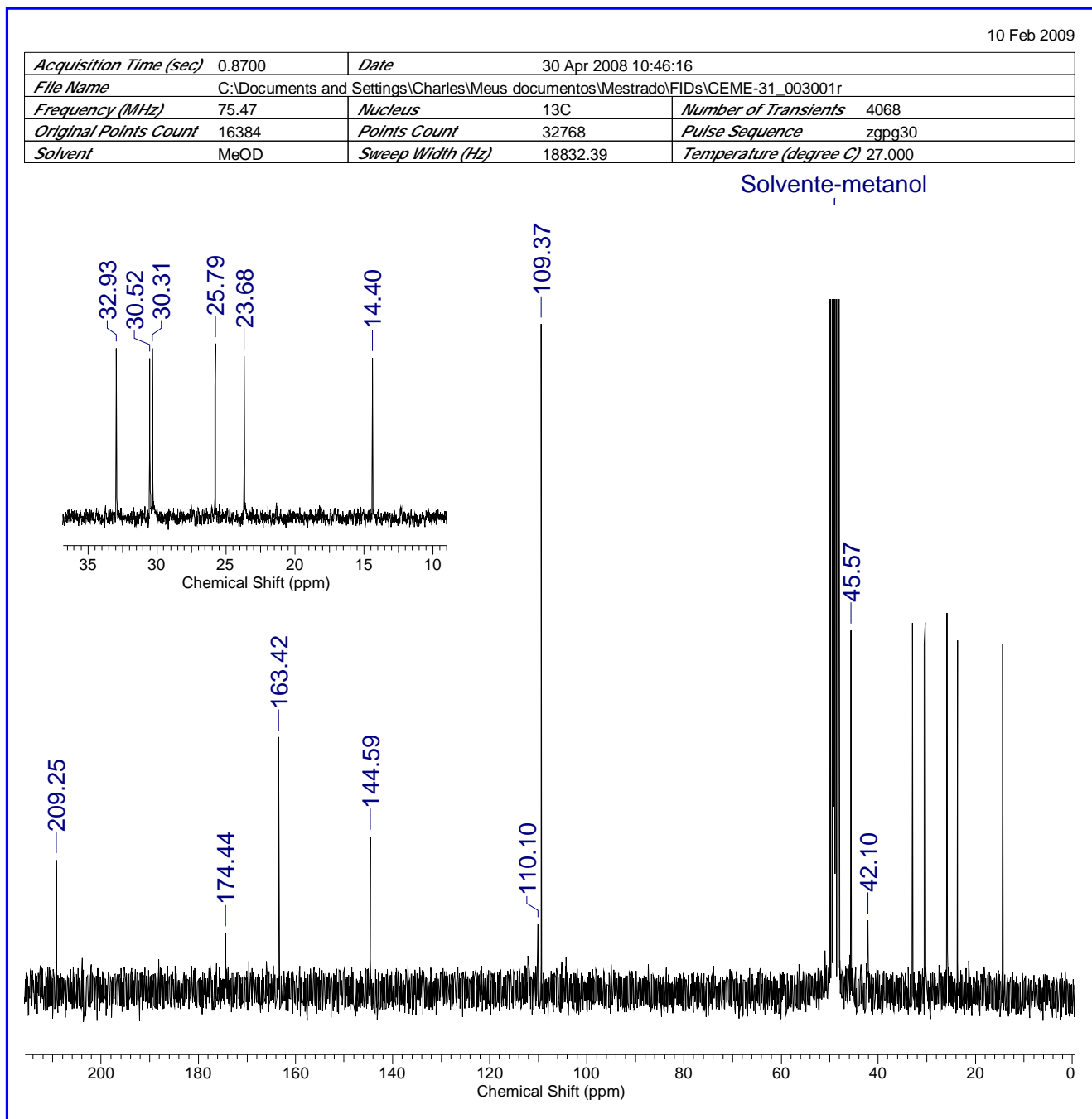


Espectro 28: Infravermelho do 1-(4-cloro-2-hidróxi-6-metoxifenil)octan-1-ona (35) em pastilha de KBr

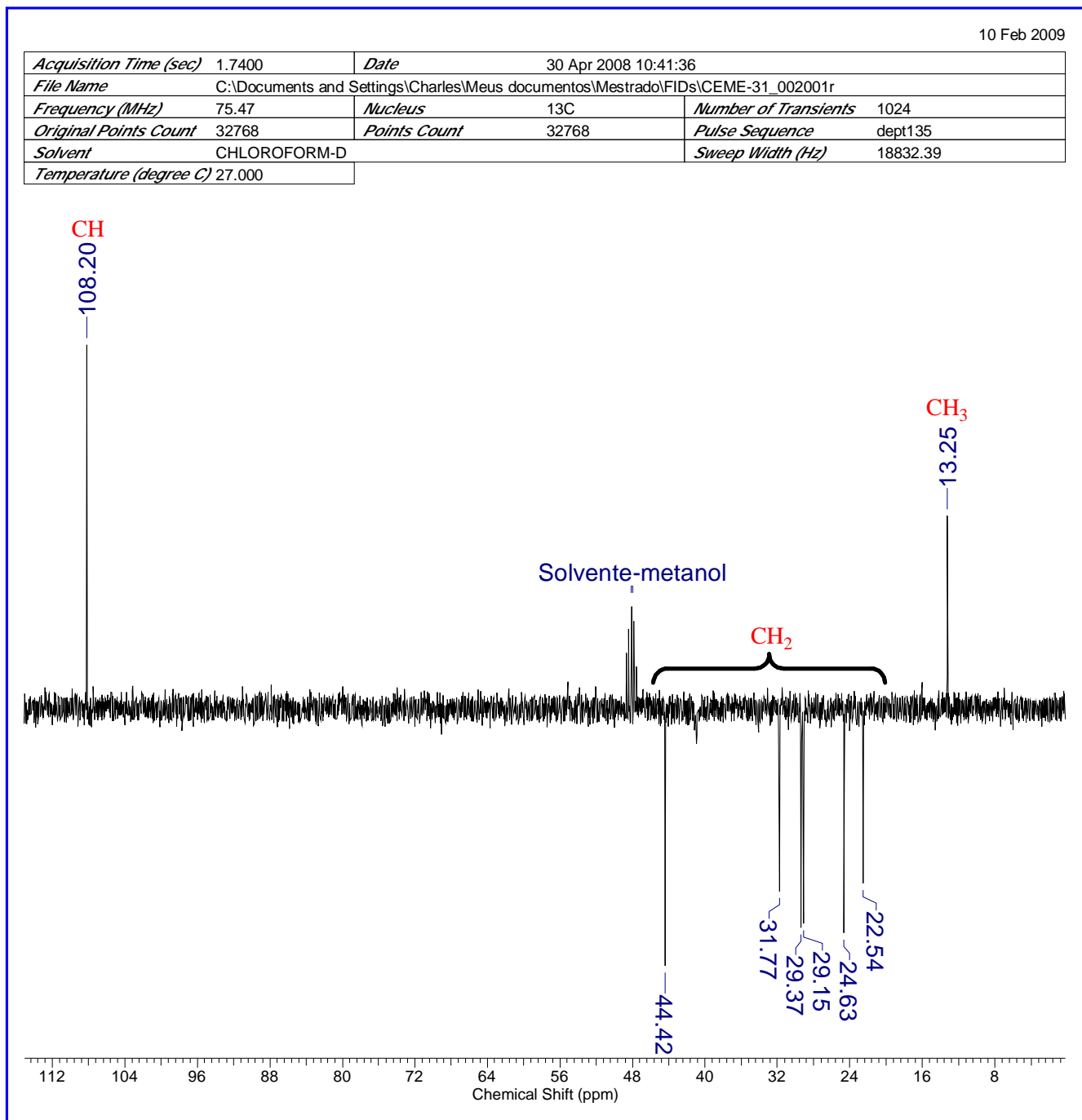
7.6. Ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil) acético (36)



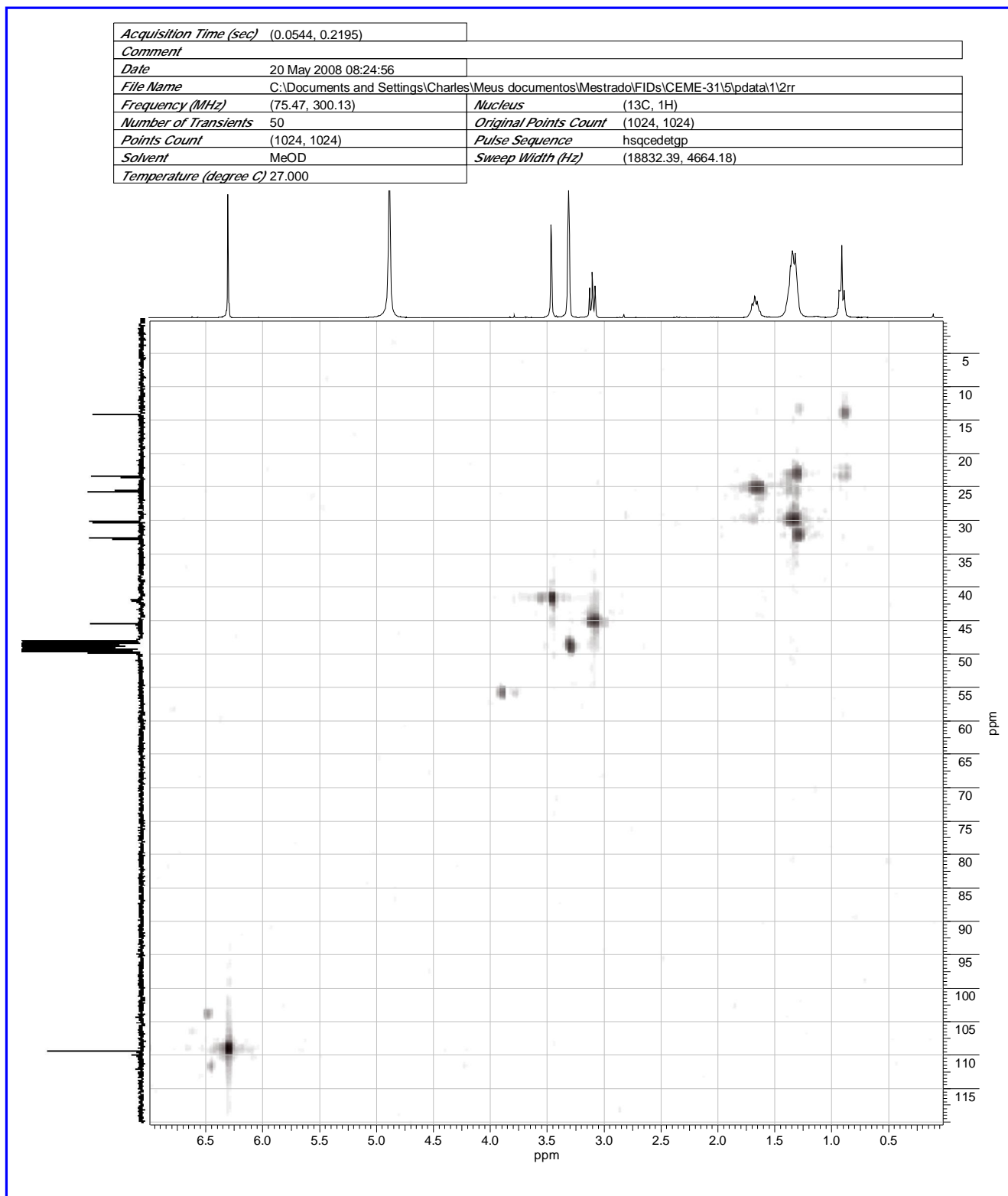
Espectro 29: RMN ¹H do ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil) acético (36) em CD₃OD



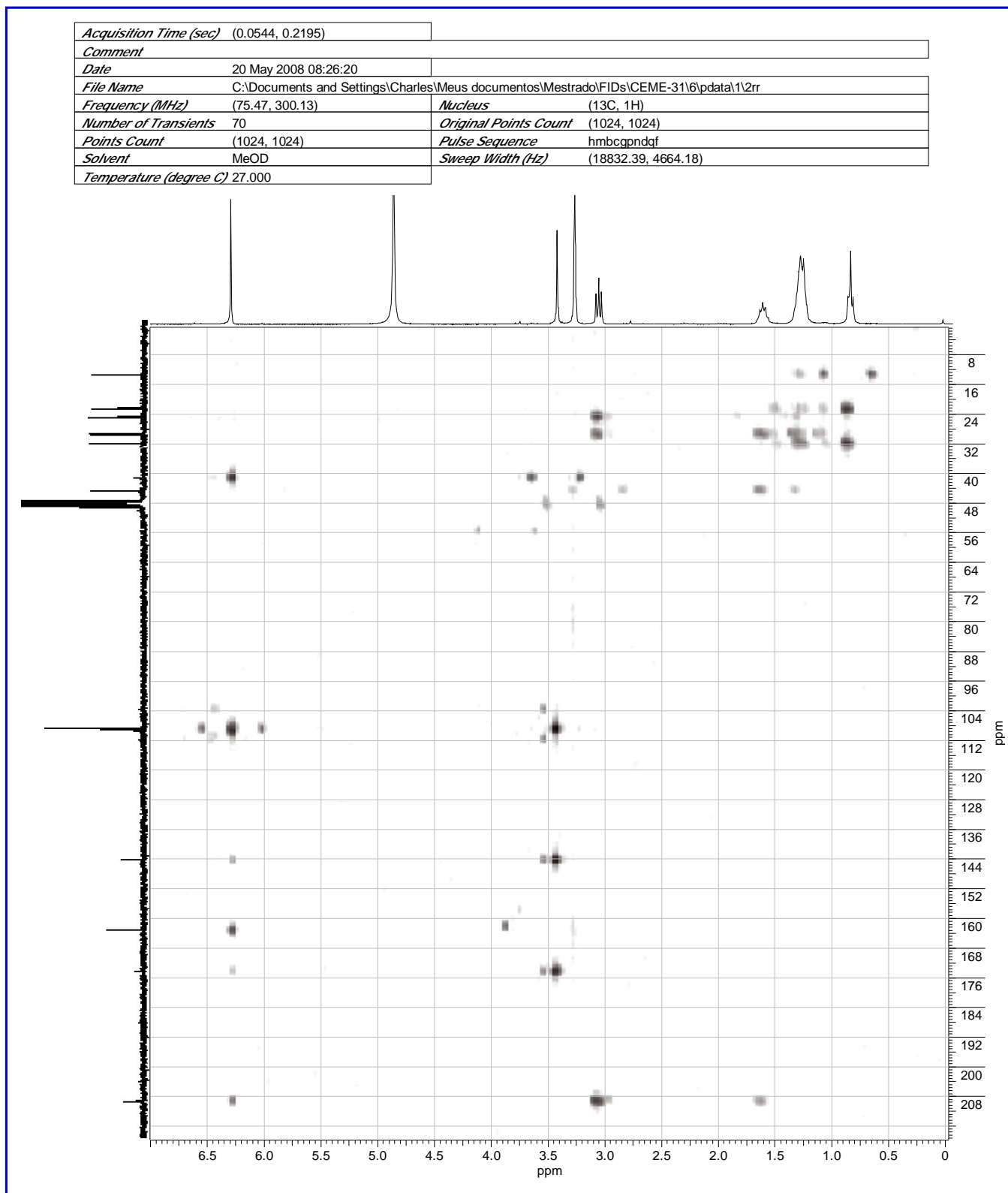
Espectro 30: RMN ¹³C do ácido 2-(3,5-di-hidróxi-4-octanoilfenil) acético (36) em CD₃OD



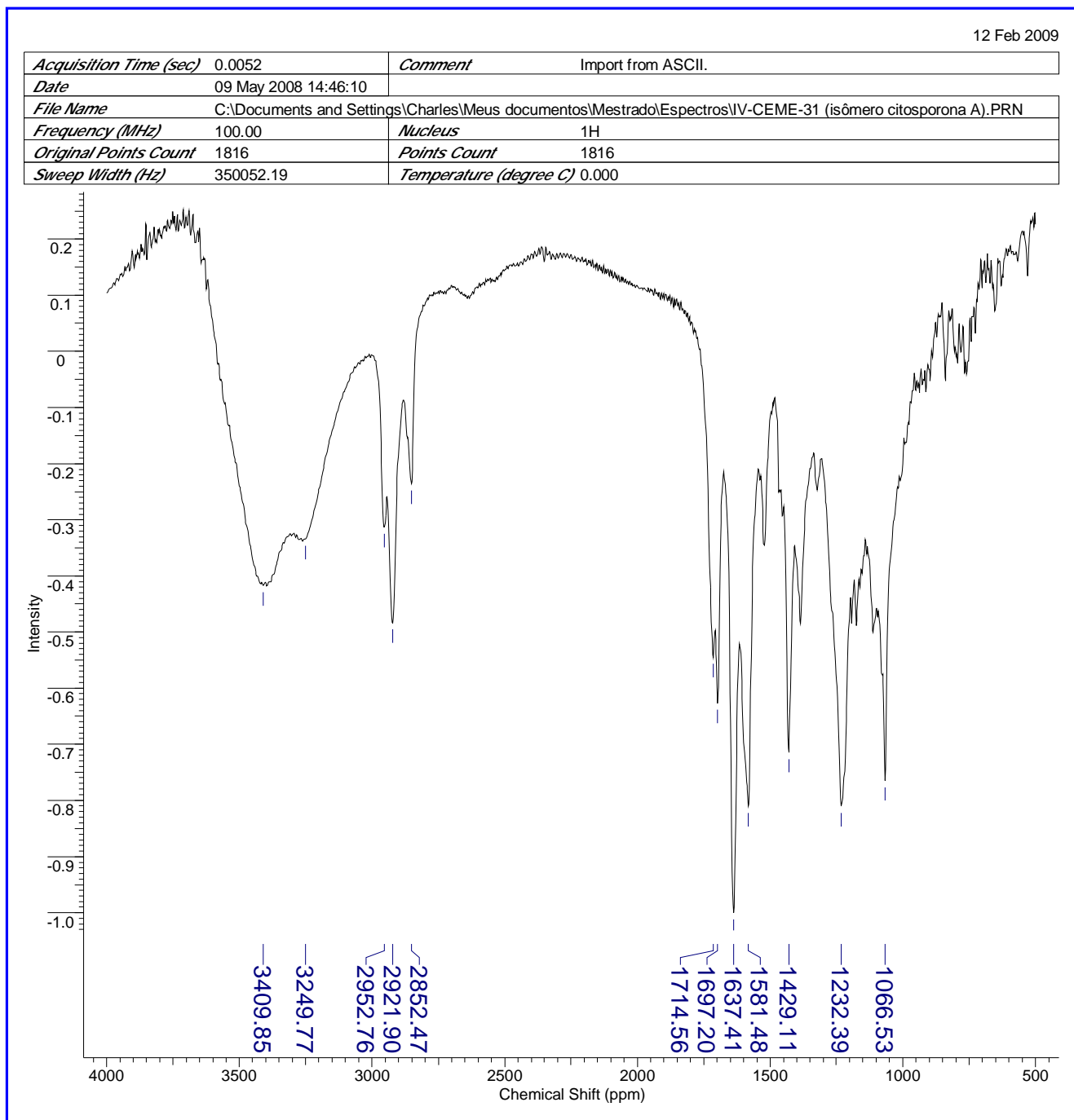
Espectro 31: DEPT-135° do ácido 2-(3,5-diidróxi-4-octanoilfenil) acético (36) em CD₃OD



Espectro 32: HSQC do ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil) acético (36) em CD₃OD

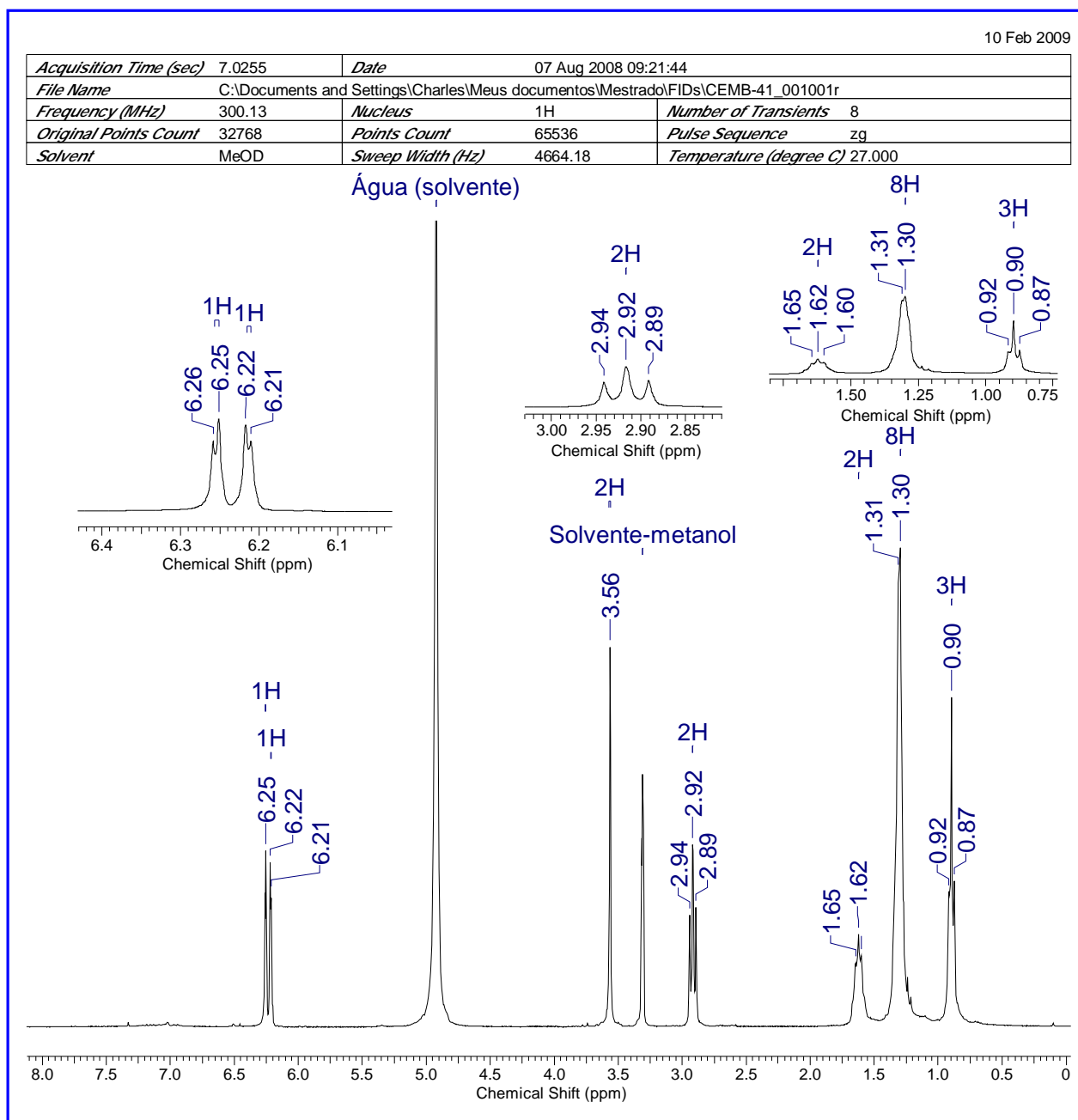
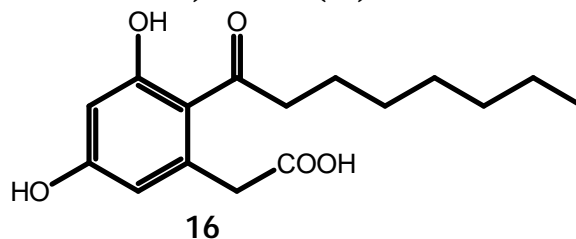


Espectro 33: HMBC do ácido 2-(3,5-diidróxi-4-octanoilfenil) acético (36) em CD₃OD

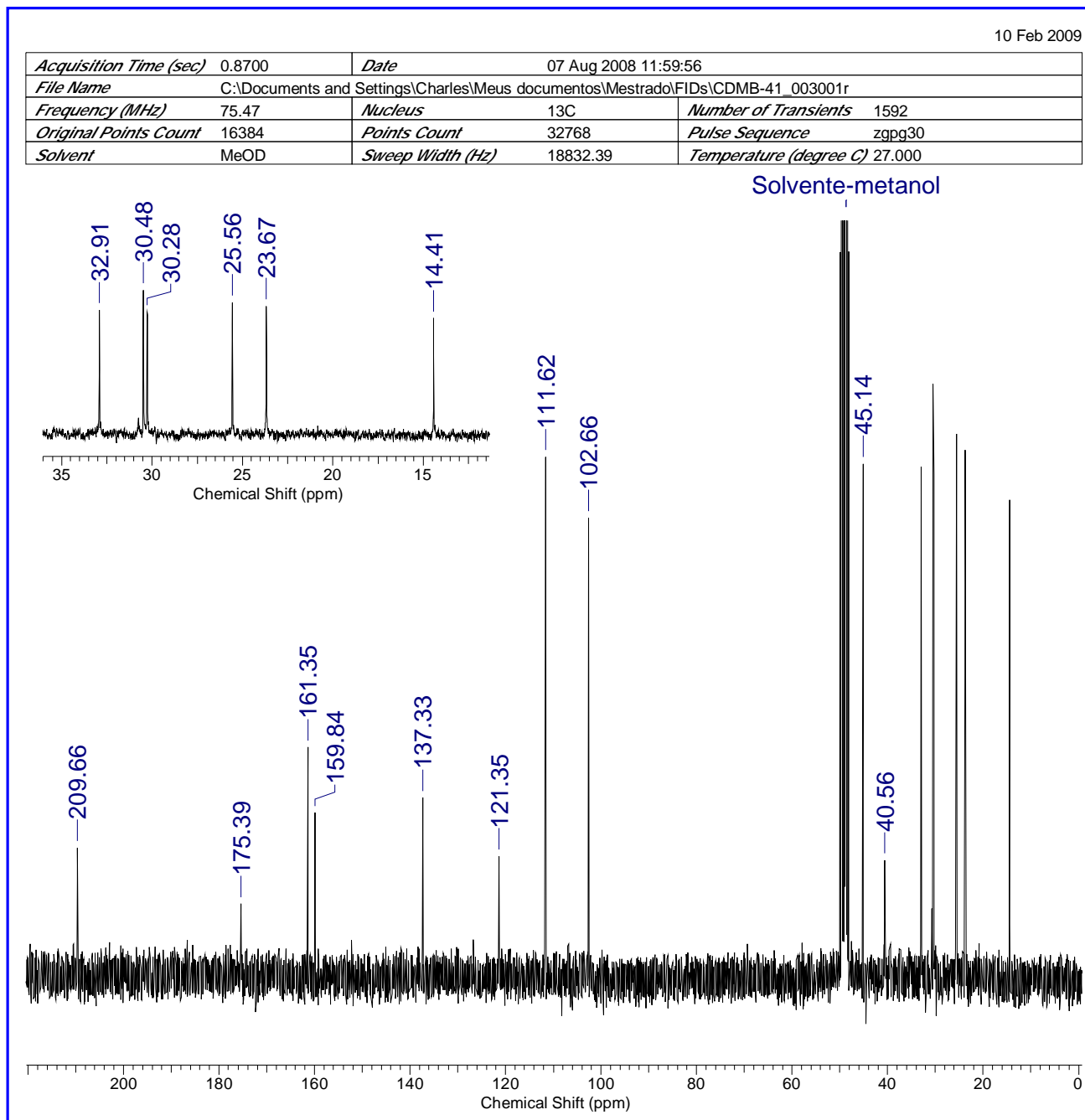


Espectro 34: Infravermelho do ácido 2-(3,5-diidroxi-4-octanoilfenil) acético (36) em pastilha de KBr

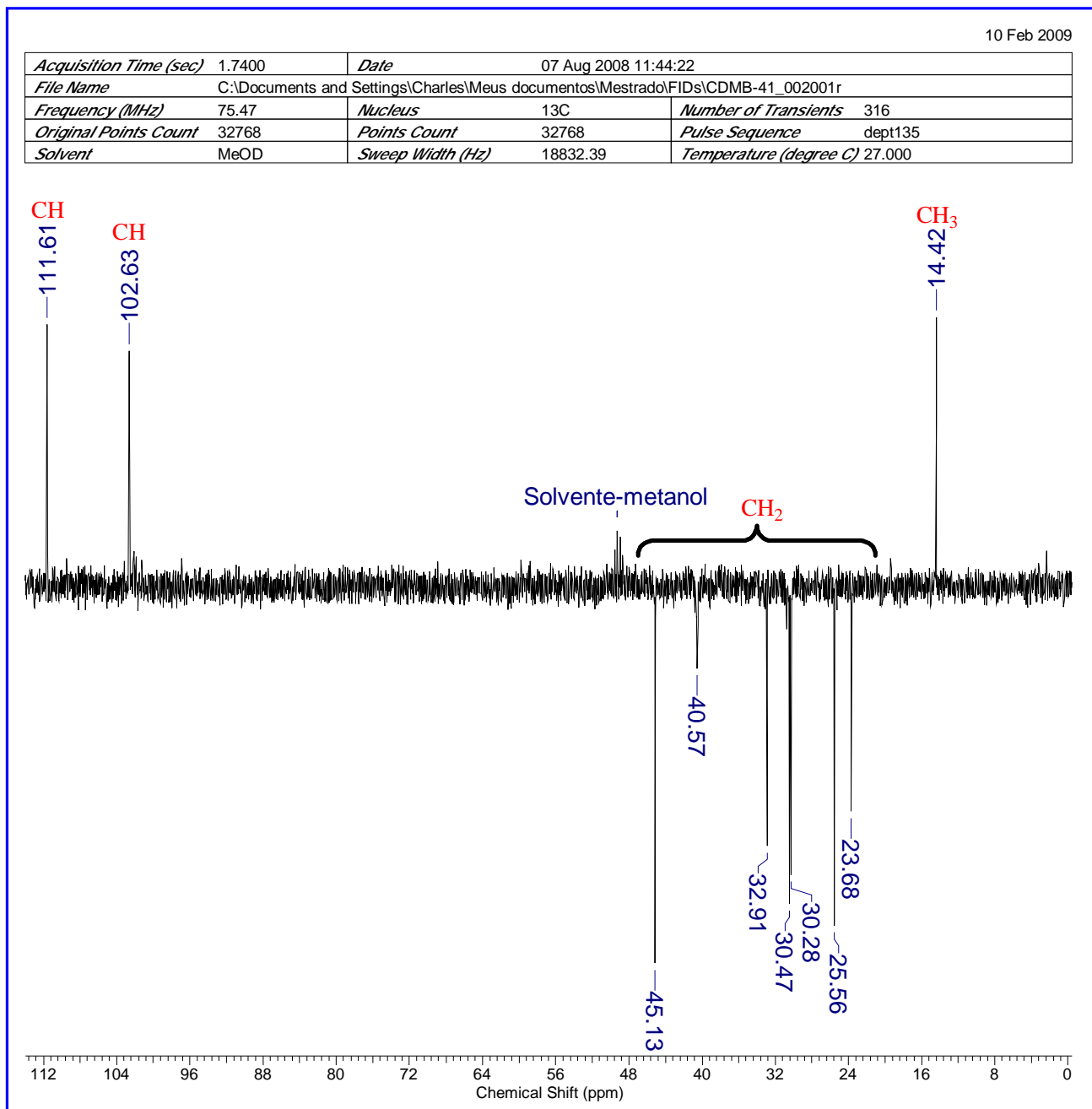
7.7. Ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16)



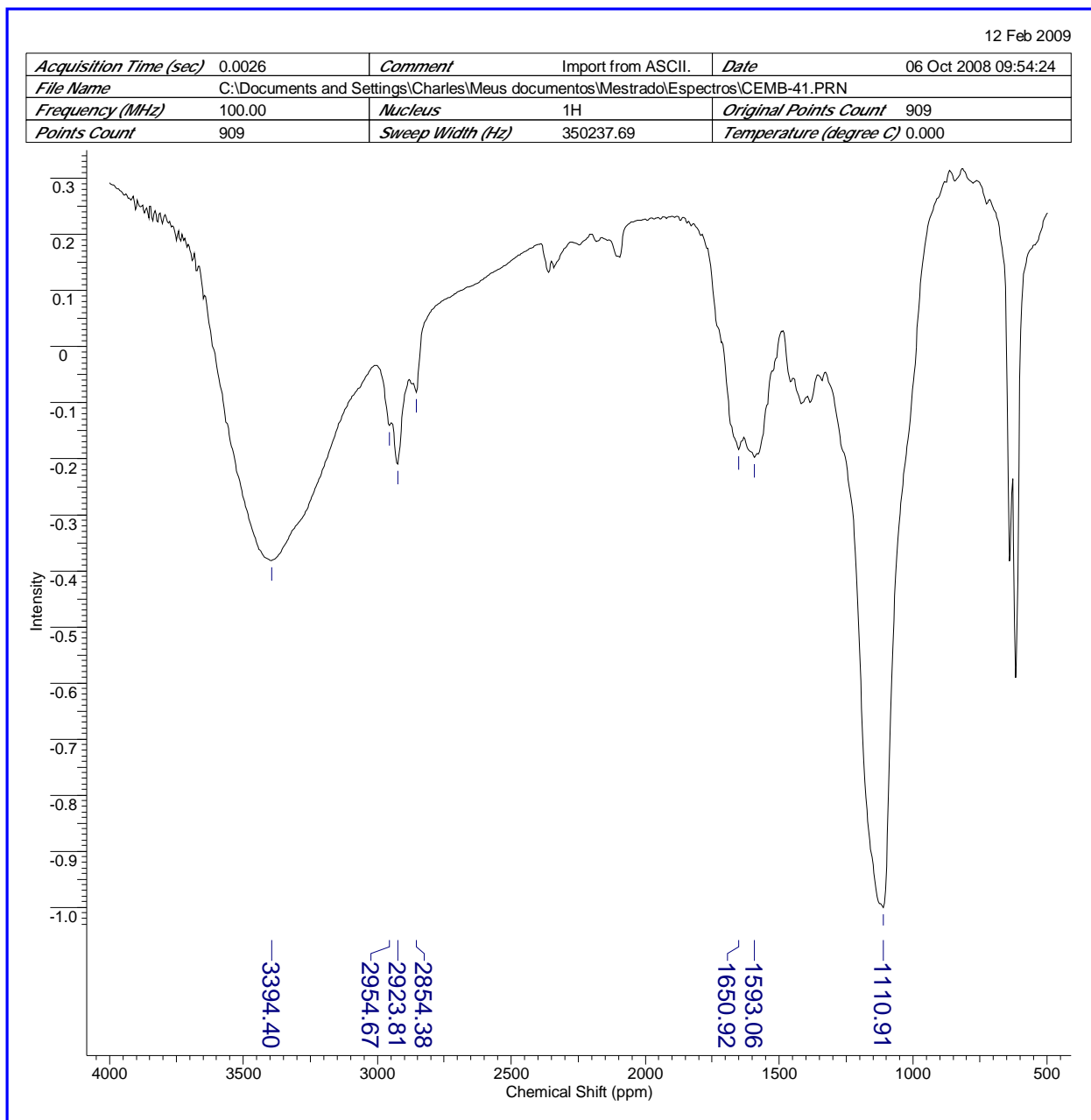
Espectro 35: RMN ¹H do ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16) em CD₃OD



Espectro 36: RMN ¹³C do ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16) em CD₃OD

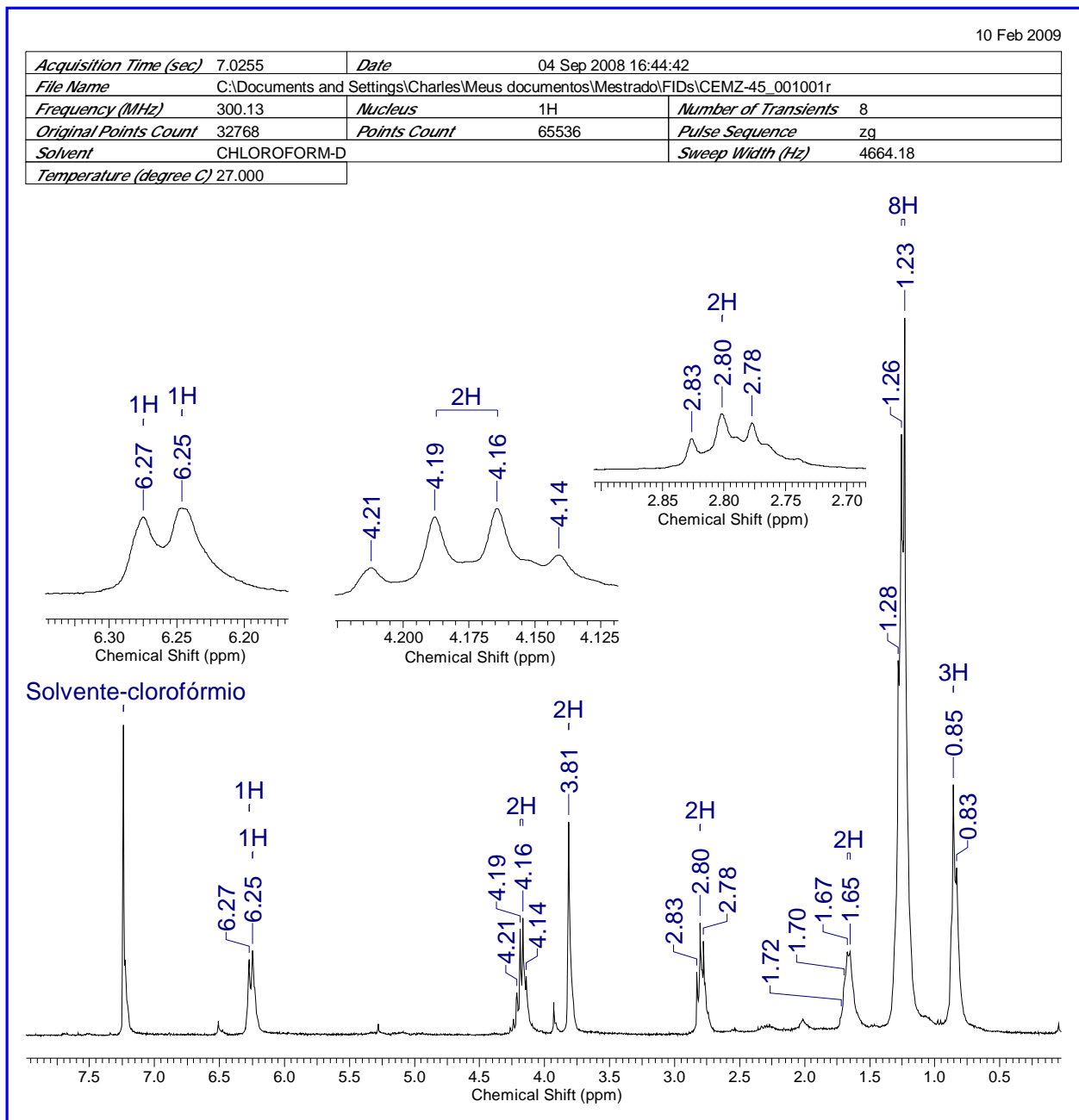
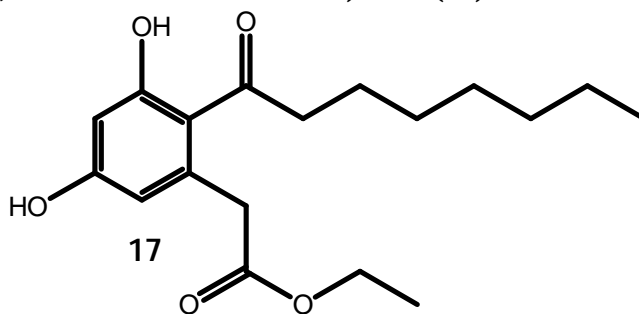


Espectro 37: DEPT-135° do ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16) em CD₃OD



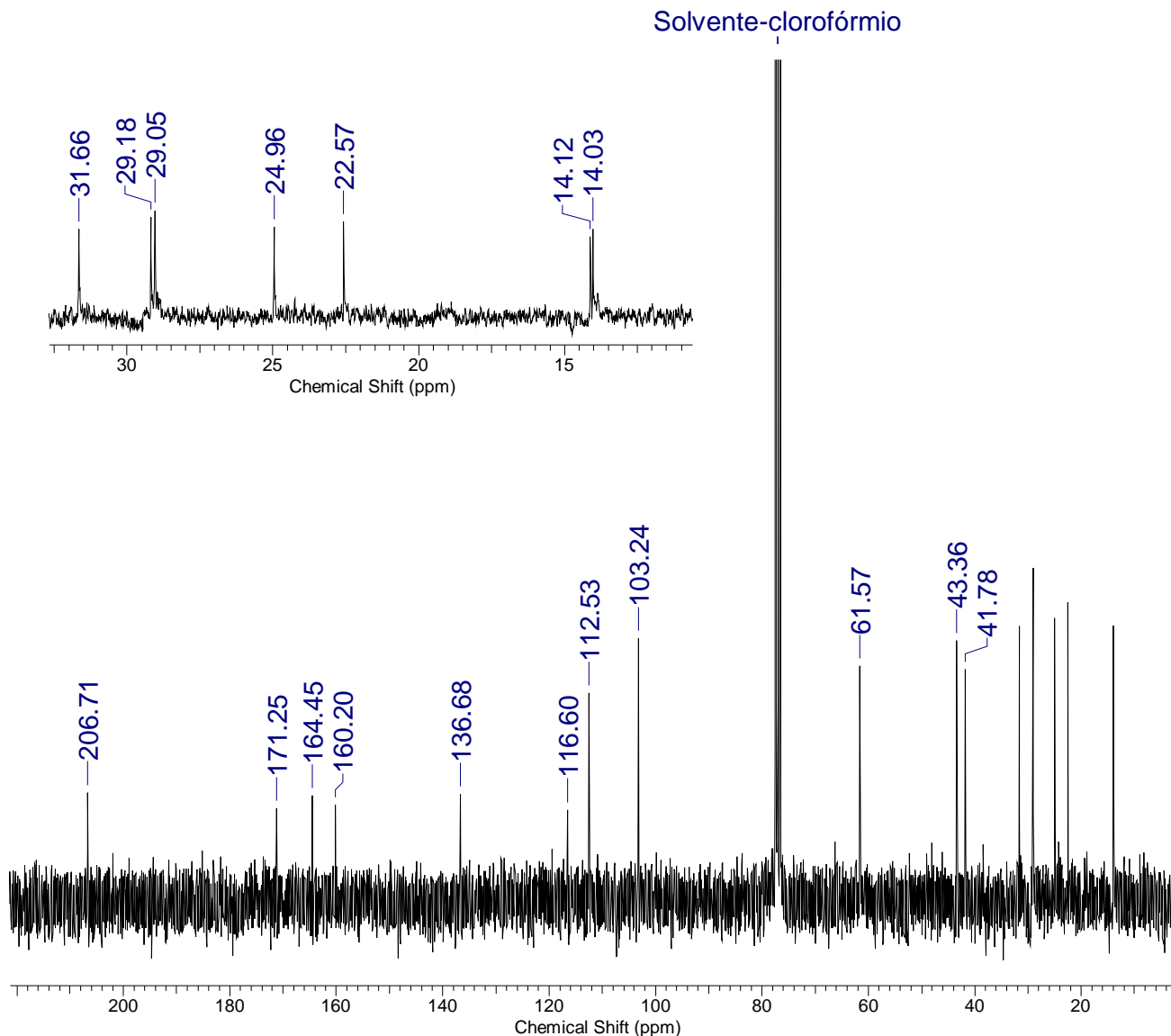
Espectro 38: Infravermelho do ácido 2-(3,5-diidroxi-2-octanoilfenil) acético (16) em pastilha de KBr

7.8. Acetato de 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) etila (17)



10 Feb 2009

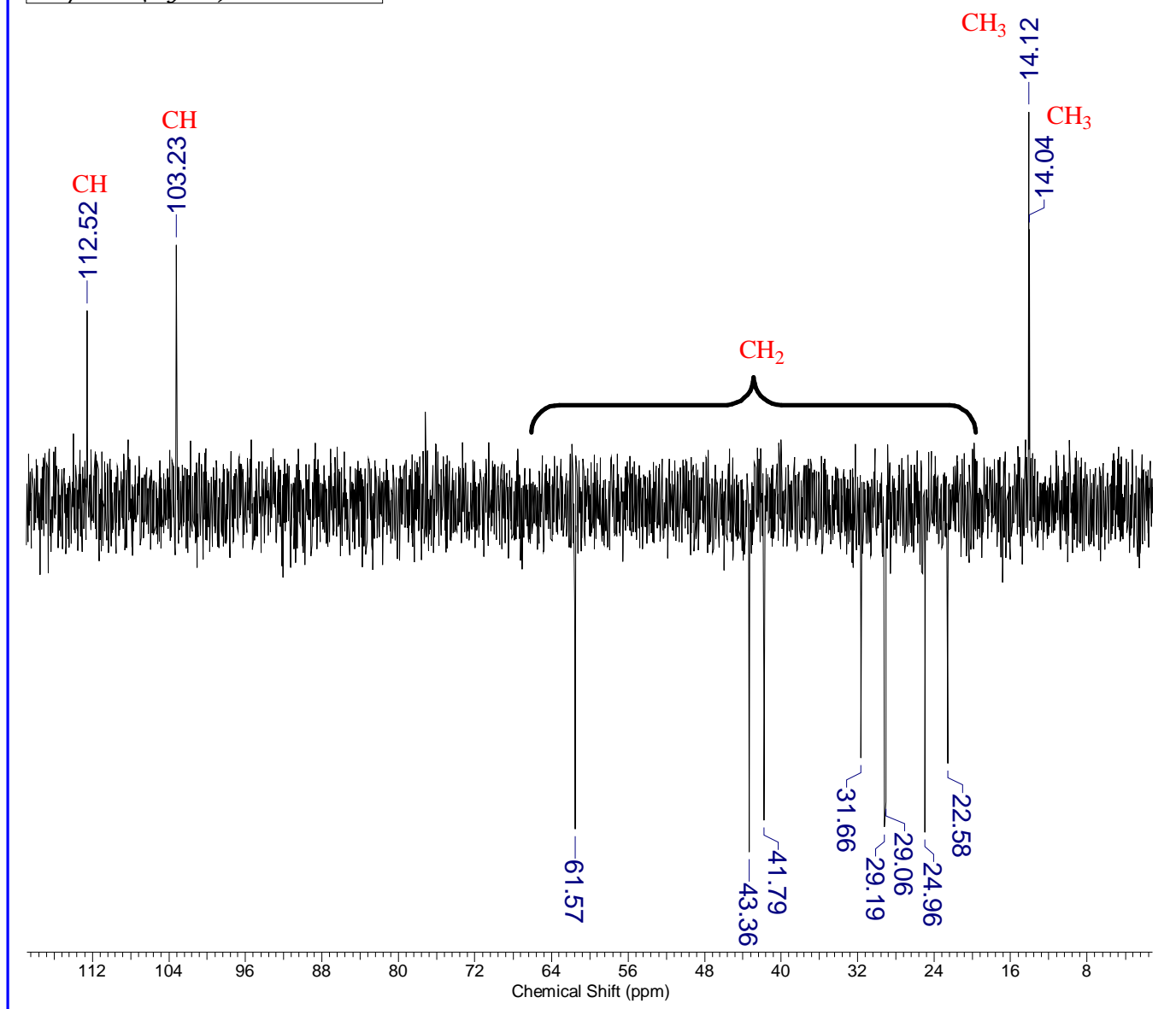
Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	08 Sep 2008 09:39:28		
File Name	C:\Documents and Settings\Charles\Meus documentos\Mestrado\FIDs\CEMZ-45_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	2108
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39		
Temperature (degree C)	27.000				



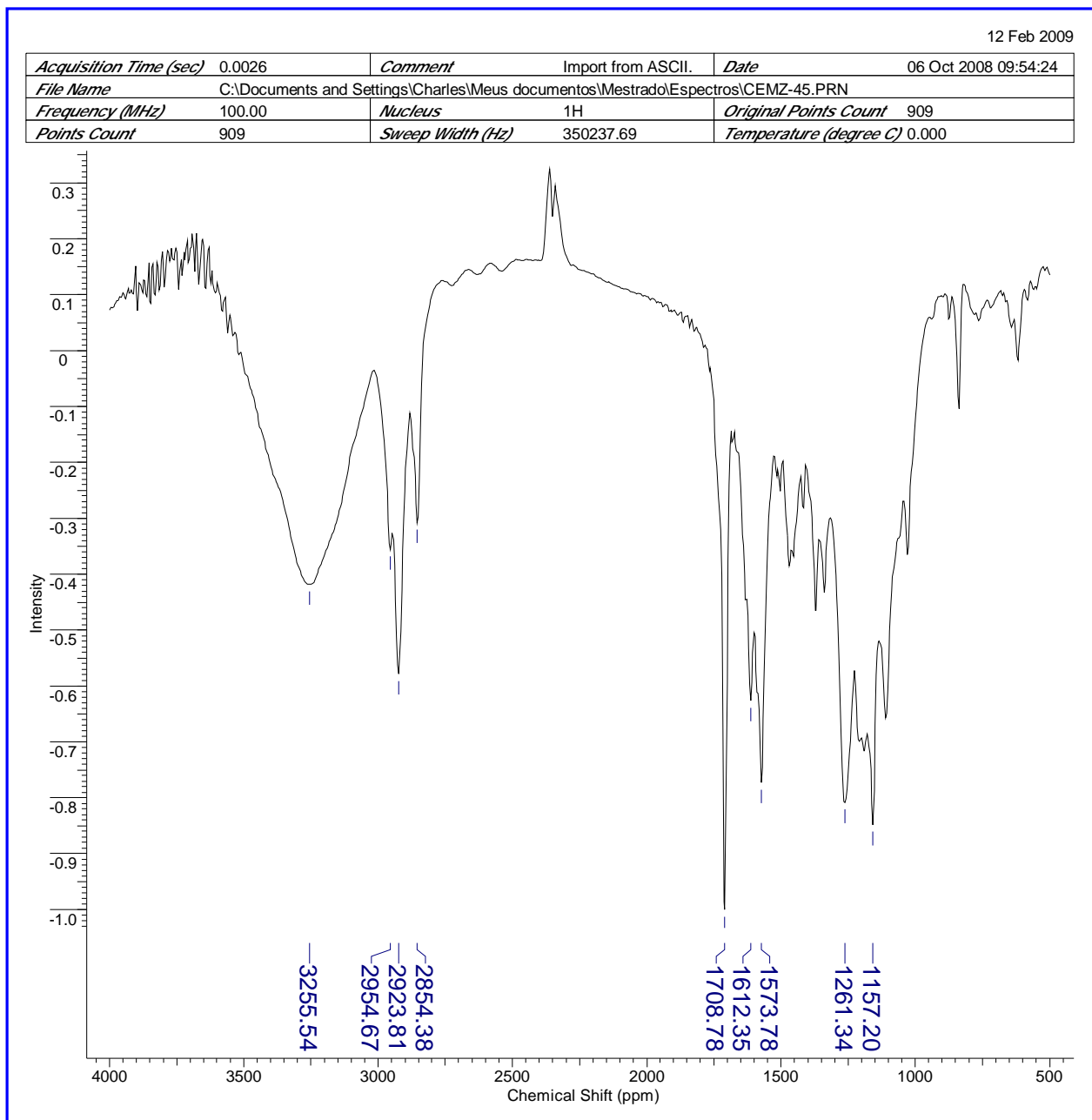
Espectro 40: RMN ¹³C do acetato de 2-(3,5-di-hidróxi-2-octanoilfenil) etila (17) em CDCl₃

10 Feb 2009

Acquisition Time (sec)	1.7400	Date	08 Sep 2008 09:04:02		
File Name	C:\Documents and Settings\Charles\Meus documentos\Mestrado\FIDs\GEMZ-45_002001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	597
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	dept135
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39		
Temperature (degree C)	27.000				

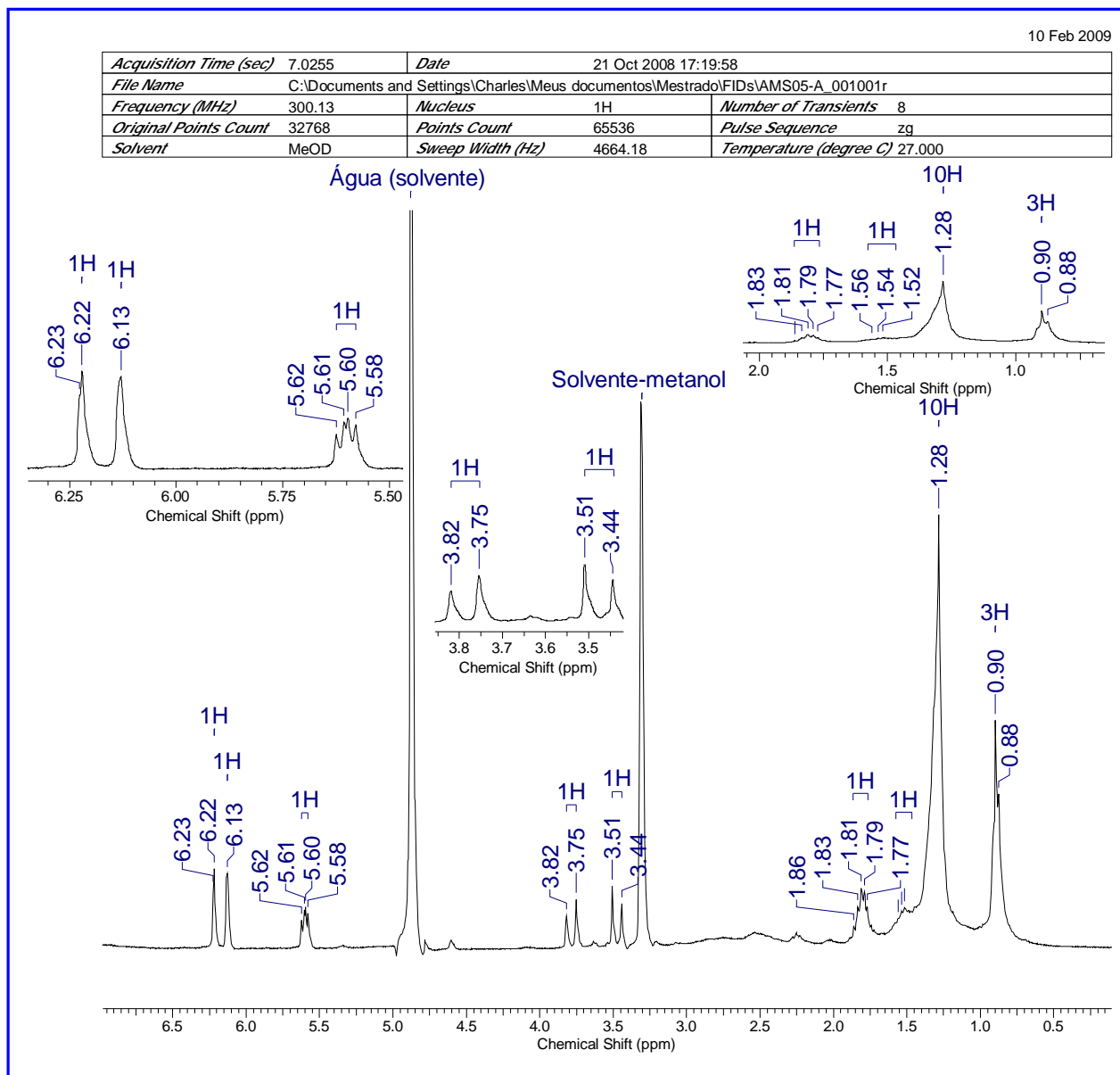
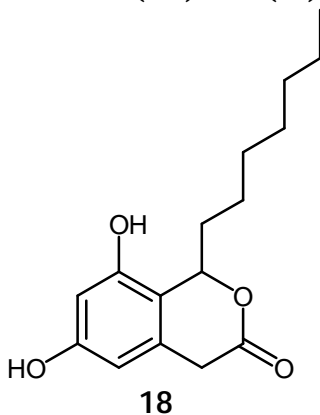


Espectro 41: DEPT-135° do acetato de 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) etila (17) em CDCl₃



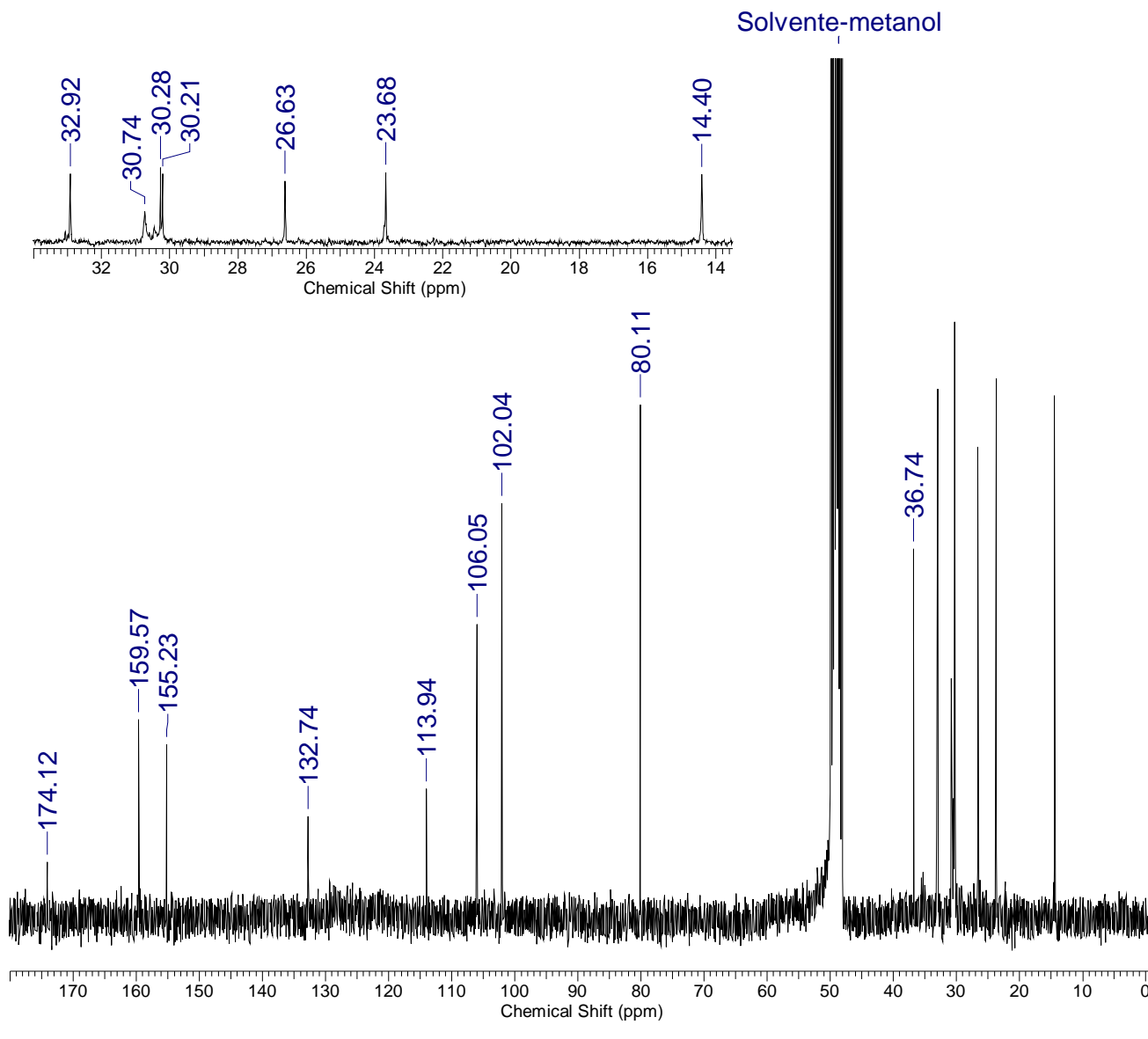
Espectro 42: Infravermelho do acetato de 2-(3,5-diidróxi-2-octanoilfenil) etila (17) em pastilha de KBr

7.9. 1-heptil-6,8-diidróxi-1H-isocromen-3(4H)-ona (18)

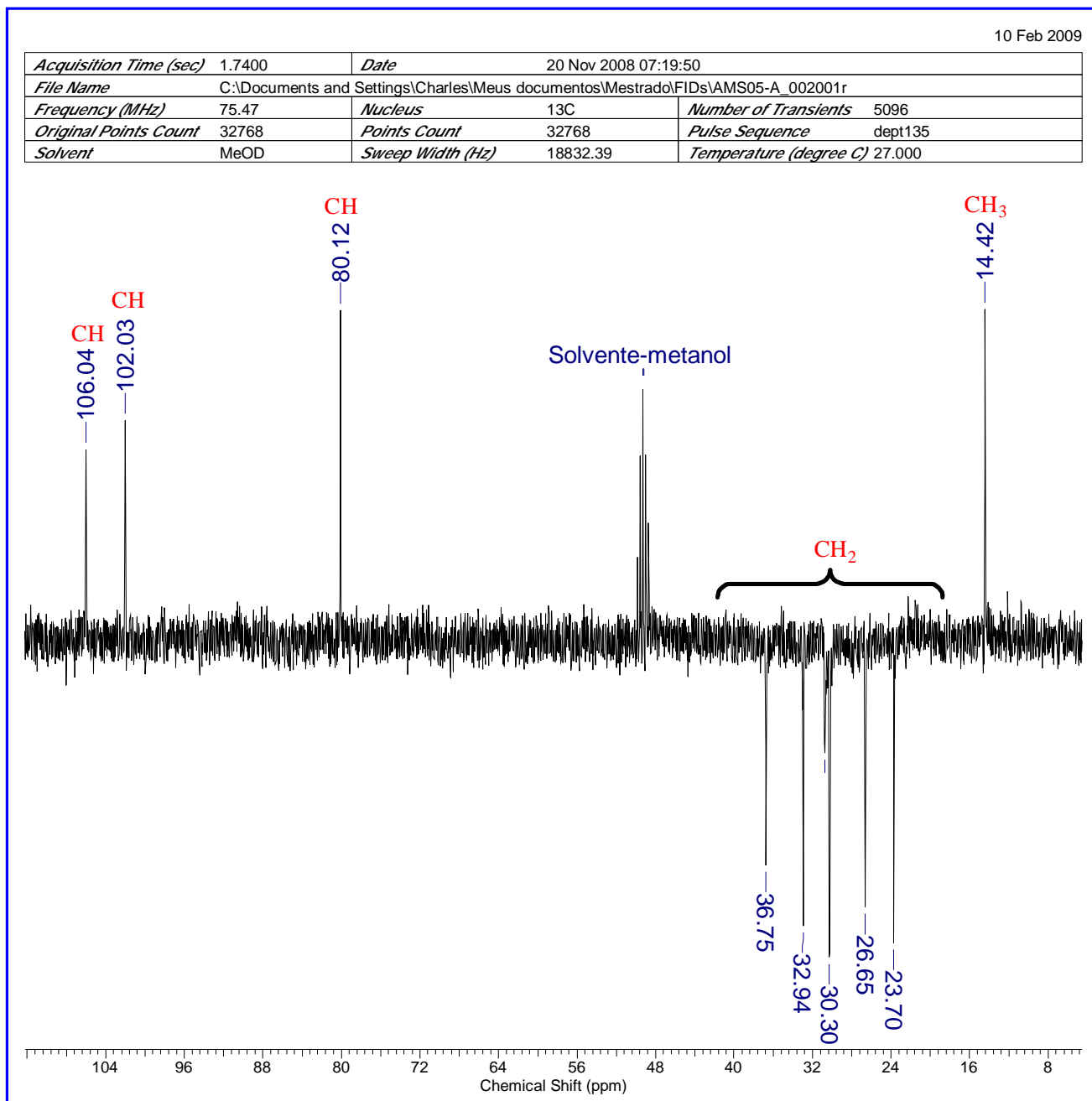


10 Feb 2009

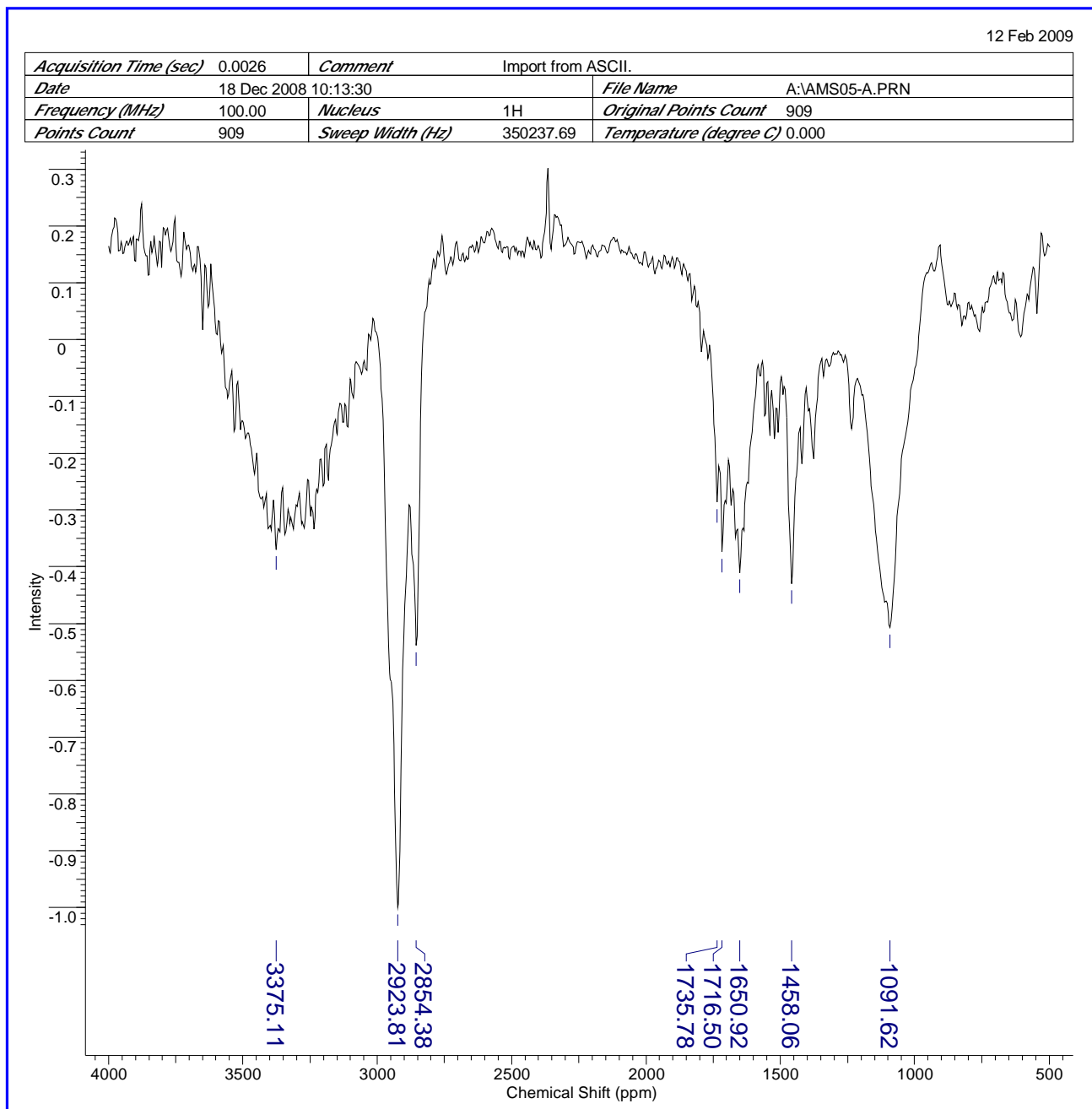
Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	20 Nov 2008 07:22:14		
File Name	C:\Documents and Settings\Charles\Meus documentos\Mestrado\FIDs\AMS05-A_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	32392
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	MeOD	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



Espectro 44: RMN ¹³C do 1-heptil-6,8-diidroxi-1H-isocromen-3(4H)-ona (18) em CD₃OD



Espectro 45: DEPT-135° do 1-heptil-6,8-diidroxi-1H-isocromen-3(4H)-ona (18) em CD₃OD



Espectro 46: Infravermelho do 1-heptil-6,8-diidroxi-1H-isocromen-3(4H)-ona (18) em pastilha de KBr