

DEBORAH CAMPOS TOMAZ

**SÍNTESE DE CINAMATOS CONTENDO O NÚCLEO
ISOBENZOFURANONA E PROSPECÇÃO DE BIOATIVIDADES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2015**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Tomaz, Deborah Campos, 1989-
T655s Síntese de cinamatos contendo o núcleo isobenzofuranona e
2015 prospecção de bioatividades / Deborah Campos Tomaz. - Viçosa, MG,
2015.

xi, 141f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Robson Ricardo Teixeira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Química orgânica. 2. Ácidos orgânicos. 3. Ácido cinâmico. 4.
Isobenzofuranona. 5. Fungicida. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-graduação em
Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547.637

DEBORAH CAMPOS TOMAZ

**SÍNTESE DE CINAMATOS CONTENDO O NÚCLEO
ISOBENZOFURANONA E PROSPECÇÃO DE BIOATIVIDADES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de Fevereiro de 2015.

Gustavo Costa Bressan

Elson Santiago de Alvarenga

Róbson Ricardo Teixeira
(Orientador)

***Dedico essa dissertação aos meus queridos pais, Antônio e
Neuza, que sempre me guiaram e incentivaram.
Ao meu irmão David, pela amizade, companheirismo e por ser
uma grande inspiração em minha vida.
Aos meus amigos.
E a todos que sempre torceram por mim.***

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais pelo carinho, apoio e exemplo. O agradecimento é pequeno diante da grandeza de vocês que sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis, com incondicional carinho e dedicação.

Ao meu querido irmão, companheiro e amigo para todos os momentos, que sempre me incentivou a prosseguir.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

Ao professor Róbson Ricardo Teixeira, pela dedicação, amizade, boa vontade, exacerbada paciência em atender às inúmeras dúvidas, por acalantar-me em momentos de aflição, e pelo incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

A todos os meus amigos e familiares de Ponte Nova, Vila Velha e Viçosa. Agradeço a todos pela torcida.

Ao professor Gustavo Costa Bressan (Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa - Viçosa) e ao seu grupo de pesquisa pela realização dos ensaios de citotoxicidade. Em particular, o meu agradecimento à doutoranda Graziela pelo apoio e esclarecimentos de dúvidas.

Às queridas Natália e Maria do Socorro por toda ajuda, amizade, esclarecimento de dúvidas e companheirismo durante a realização deste trabalho.

Aos amigos de todos os momentos Lívia, Michelle, Ângela e Wagner pela grande amizade, carinho, e disposição em prestar ajuda sempre que precisei. Vocês tornaram os meus dias muito mais especiais e felizes.

Aos amigos (as) e colegas do grupo de pesquisa, Adalberto, Poliana, Ana Paula e Lucas pela colaboração, amizade e por deixarem o ambiente de trabalho muito mais agradável e prazeroso.

Aos demais colegas do laboratório de Química Supramolecular e Biomimética, pela grande colaboração, por todos os favores prontamente prestados, pelo convívio divertido e alegre.

E a todos os amigos e familiares que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ESQUEMAS	vi
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1- NOVOS FÁRMACOS E AGROQUÍMICOS A PARTIR DE UMA ESTRUTURA MODELO	1
1.1 - Introdução.....	1
1.2 – Ácido Cinâmico e Isobenzofuranonas.....	6
1.3 – Objetivos do trabalho	8
CAPÍTULO 2- SÍNTESE DE CINAMATOS CONTENDO O NÚCLEO ISOENZOFURANONA.....	10
2.1 – Introdução	10
2.2 - Material e métodos	16
2.2.1 - Generalidades Metodológicas	16
2.2.2 - Procedimentos Sintéticos	17
2.2.2.1 - Síntese da 6-metoxiisobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona.....	17
2.2.2.1.1- Empregando aquecimento convencional (AC)	17
2.2.2.1.2 - Empregando irradiação de micro-ondas (IM)	18
2.2.2.2 - Síntese da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona.....	19
2.2.2.2.1 – Desmetilação do composto 1 empregando BBr ₃	20
2.2.2.2.2 – Desmetilação do composto 1 empregando HBr e irradiação de micro-ondas (IM)	20
2.2.2.3 - Síntese do ácido (<i>E</i>)-4-fluorocinâmico.....	22
2.2.2.3.1 - Empregando aquecimento convencional (AC)	22
2.2.2.3.2 - Empregando irradiação de micro-ondas (IM)	23
2.2.2.4 - Síntese do Ácido (<i>E</i>)-4-metoxicinâmico.....	26
2.2.2.5 - Síntese do Ácido (<i>E</i>)-3,4,5-trimetoxicinâmico.....	27
2.2.2.6 - Síntese do ácido (<i>E</i>)- 4-nitrocinâmico.....	28
2.2.2.7 - Síntese do ácido (<i>E</i>)-4-bromocinâmico	29
2.2.2.8 - Síntese do ácido (<i>E</i>)-4-clorocinâmico.....	30

2.2.2.9 - Síntese do (<i>E</i>)-3-(4-fluorofenil) propionato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila	31
2.2.2.9.1 Empregando aquecimento convencional (AC).....	31
2.2.2.9.2 Empregando irradiação de micro-ondas (IM).....	31
2.2.2.10 - Síntese do (<i>E</i>)-3-(4-metoxifenil) propionato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila	35
2.2.2.11 - Síntese do (<i>E</i>)-3-(3,4,5-trimetoxifenil) propionato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila	36
2.2.2.12 - Síntese do (<i>E</i>)-3-(4-nitrofenil) propionato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila	37
2.2.2.13 - Síntese do (<i>E</i>)-3-(4-bromofenil) propionato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila	38
do (<i>E</i>)-3-(4-clorofenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila.....	39
2.3 - Resultados e discussão.....	41
CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E FUNGICIDA DOS CINAMATOS CONTENDO O NÚCLEO ISOBENZOFURANONA.....	
	78
3.1 Introdução.....	78
3.2 Material e métodos	89
3.2.1 Avaliação da atividade citotóxica contra a linhagem HL60	89
3.2.1.1 Cultivo das células.....	89
3.2.1.2 Ensaio de citotoxicidade	89
3.2.2 Avaliação da atividade fungicida.....	90
3.3 Resultados e Discussão	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
ANEXOS.....	97
ESPECTROS.....	97

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Estruturas dos herbicidas bialafos e fosfotricina.....	2
Figura 2- Estrutura do alcalóide sabadilla.....	3
Figura 3- Estruturas dos monoterpenos 1,8-cineol e 1,4-cineol.....	4
Figura 4- Estruturas das estrobilurinas naturais.....	4

Figura 5- Exemplos de estrobilurinas sintéticas.....	5
Figura 6– Estrutura do ácido cinâmico.....	6
Figura7- Estrutura básica de uma isobenzofuranona.	8

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Localização da região de micro-ondas no espectro eletromagnético	10
Figura 2 - Estruturas dos compostos sintetizados nesse trabalho.....	15
Figura 3 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 1.....	45
Figura 4 - Espectro de massas do composto 2.....	45
Figura 5 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do composto 1.....	46
Figura 6 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) do composto 1.....	47
Figura 7 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 2	53
Figura 8 - Espectro de massas do composto 2.....	54
Figura 9 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do composto 2.....	55
Figura 10 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) do composto 2.....	56
Figura 11 - Estruturas dos compostos sarcodictylin A e lumenfantrina.	58
Figura 12 - Espectro no infravermelho (KBr) para o composto 3.....	63
Figura 13 - Espectro de massas do composto 3.....	64
Figura 14 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) para o composto 3 ...	65
Figura 15 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) para o composto 3	66
Figura 16 - Espectro no infravermelho (KBr) para o composto 9.....	72
Figura 17 - Espectro de massas do composto 9.....	73
Figura 18 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto 9	74
Figura 19 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto 9.....	75

LISTA DE ESQUEMAS

CAPÍTULO 2

Esquema 1 - Análise retróssintética para a preparação dos derivados do cinamatos contendo o núcleo isobenzofuranona.....	14
Esquema 2 - Reações envolvidas na preparação dos compostos 1-14.	41
Esquema 3 - Proposta mecanística para a obtenção da isobenzofuran-(3 <i>H</i>)-ona 1.....	42
Esquema 4 - Proposta mecanística para a obtenção da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (2).	48
Esquema 5 - Proposta mecanística para a obtenção da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (2)..	49
Esquema 6 - Etapas envolvidas na formação dos compostos 3-8.	59
Esquema 7 - Proposta mecanística para a formação do composto 9 a 14.....	68
Esquema 8 - Etapas envolvidas na formação dos compostos 3-8.....	69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Informações relativas às reações utilizadas para a preparação dos compostos 4 a 8.....	25
Tabela 2 - Informações relativas às reações utilizadas para a preparação dos compostos 10 a 14.....	34

Tabela 3 - Comparação entre os dados de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto 2 obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura.....	51
Tabela 4 - Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto 2 obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura.....	52
Tabela 5 - Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto 3 obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura.....	62

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 no Brasil.....	79
Tabela 2 - Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) obtidos para a linhagem de célula de leucemia HL60 tratadas com compostos derivados do ácido cinâmico 3 a 8 , derivados do ácido cinâmico contendo núcleo isobenzofuranona 9 , 11-14 e ácido cinâmico	92
ANEXOS - ESPECTROS	97

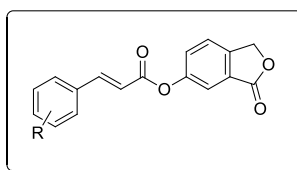
LISTA DE ABREVIATURAS

DCC	<i>N,N</i> -dicicloexilcarbodiimida
DMAP	4- <i>N,N'</i> -dimetilaminopiridina
Å	Angström
AC	Aquecimento Convencional
ATR	Reflectância Total Atenuada
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
δ	Deslocamento químico
Hz	Hertz
IM	Irradiação de micro-ondas
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
m	Multiplete
MHz	Megahertz
m/v	Massa/volume
P.A.	Para análise
ppm	Partes por milhão
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
T _f	Temperatura de fusão
v/v	Volume/volume

RESUMO

TOMAZ, Deborah Campos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. **Síntese de cinamatos contendo o núcleo isobenzofuranona e prospecção de bioatividades.** Orientador: Róbson Ricardo Teixeira.

O ácido cinâmico (e seus derivados) e as isobenzofuran-1(3*H*)-onas (fitalidas) constituem classes de compostos que apresentam diversas bioatividades de interesse farmacológico e agroquímico, dentre elas fungicida e citotóxica. Assim, o presente trabalho traçou como objetivos sintetizar uma série de cinamatos contendo o núcleo isobenzofuranona e avaliar suas atividades citotóxica e fungicida. Os compostos sintetizados apresentam a estrutura geral mostrada a seguir.



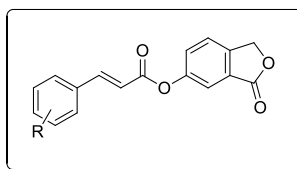
Para a preparação dos cinamatos, inicialmente utilizou-se o processo de *orto*-alquilação do ácido 3-metoxibenzoico para a síntese do composto 6-metoxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona. Esta isobenzofuranona, por sua vez, foi submetida a um processo de desmetilação para produzir o derivado hidroxilado 6-hidroxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona. Utilizando a reação de Knoevenagel, foram preparados os ácidos 4-fluorocinâmico, 4-metoxicinâmico, 3,4,5-trimetoxicinâmico, 4-nitrocinâmico, 4-bromocinâmico e 4-clorocinâmico, todos apresentando estereoquímica *E*, confirmado pela espectroscopia de RMN de hidrogênio, com relação à dupla ligação. Os ácidos foram obtidos com rendimentos variando entre 71% e 95% e as

reações foram realizados empregando tanto aquecimento convencional quanto irradiação de micro-ondas. Os cinamatos contendo o núcleo isobenzofuranona foram preparados via reação de Steglich entre os derivados do ácido cinâmico e a 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona. As reações foram realizadas empregando irradiação de micro-ondas e seis cinamatos inéditos foram obtidos com rendimentos variando de 54% a 76%. Os ensaios de avaliação de citotoxicidade contra a linhagem de célula tumoral promielocítica HL-60 revelaram que os ácidos 4-fluorocinâmico, 3,4,5-trimetoxicinâmico, 4-nitrocinâmico, 4-bromocinâmico e 4-clorocinâmico não foram capazes de inibir a viabilidade celular. Devido à baixa solubilidade em DMSO 0,4%, não foi possível avaliar o efeito citotóxico do (E)-3-(4-metoxifenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila. Com respeito aos demais cinamatos, os compostos acrilato de (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila e acrilato de (E)-3-(4-nitrofenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila foram capazes de inibir a viabilidade celular da linhagem HL-60 apresentando valores de IC₅₀ respectivamente iguais a 77,35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 41,67 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os demais cinamatos sintetizados não apresentaram atividade significativa contra a linhagem celular investigada. Os derivados do ácido cinâmico e os cinamatos foram também avaliados com relação ao halo de inibição do isolado do fungo *Phytophthora palmivora*. Os resultados obtidos mostraram porcentagens de inibição do crescimento da espécie fúngica variando entre 1,7% e 28,4%. O composto mais ativo contra a espécie fungica correspondeu ao ácido 4-fluorocinâmico.

ABSTRACT

TOMAZ, Deborah Campos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Synthesis of cinnamates containing isobenzofuranone nucleous and prospection of bioactivities.** Adviser: Róbson Ricardo Teixeira.

Cinnamic acid (and its derivatives) and isobenzofuran-1 (*3H*)- ones (phtalides) are a group of structurally diverse compounds presenting various bioactivites including fungicide and citotoxicity. The objectives of the present investigation were to synthetize and evaluate the cytotoxic and fungicide activities of a series of cinnamates presenting the general structure shown below.



The synthesis of the cinnamates was initiated by preparation of 6-methoxy isobenzofuran-1-(*3H*)-one. It was accomplished via *ortho alkylation* reaction of commercially available 3-methoxybenzoic acid. Then, the demethylation of 6-methoxy isobenzofuran-1-(*3H*)-one afforded the hidroxyolated derivative 6-hydroxy isobenzofuran-1-(*3H*)-one. By using Knoevenagel condensation, 4-fluorocinnamic acid, 4-methoxycinnamic acid, 3,4,5-methoxycinnamic acid, 4-bromocinnamic acid and 4-chlorocinnamic acid were prepared. The compounds presented *E* stereochemistry for the double bound as confirmed by hydrogen NMR spectroscopy. The carboxylic acids were carried out using conventional heating as well as microwave irradiation. The preparation of the cinnamates was possible via Steglich reaction between 6-hydroxy isobenzofuran-1-(*3H*)-one and the prepared cinnamic acid derivatives. The carboxylic acids were obtained with yields ranging from 71% to 95%. The

reactions were carried out using conventional heating as well as microwave irradiation and the new esters were obtained with 54% to 76% yield. The cytotoxic assays conducted with HL-60 cancer cell line revealed that the cinnamic acid derivatives were not capable of inhibiting cell viability. Due to its low solubility in DMSO 0,4%, it was not possible to assess the cytotoxicity of (E)-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl 3-(4-methoxyphenyl)acrylate. Concerning the cinnamates, the compounds (E)-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acrylate and (E)-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl 3-(4-nitrophenyl)acrylate did inhibit cell viability presenting IC₅₀ values equal to 77,35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 41,67 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectively. The antifungal activity was evaluated against *Phytophthora palmivora* by halo inhibition assay. The inhibition halo sizes were obtained using radial diffusion and dilution tests. It was found percentages of inhibition ranging from 1,7% to 28,4%. The most pronounced fungicide activity was associated with 4-fluorocinnamic acid.

CAPÍTULO 1

NOVOS FÁRMACOS E AGROQUÍMICOS A PARTIR DE UMA ESTRUTURA MODELO

1.1 - Introdução

A organização das nações unidas (ONU) projeta que no ano de 2050 a população mundial poderá atingir a impressionante marca de 9,2 bilhões de seres humanos. Uma importante questão está atrelada a este dado: como alimentar de maneira adequada este número de seres humanos? Não será possível expandir as terras agricultáveis na mesma proporção uma vez que isso resultaria em graves impactos ambientais. Para atender à segurança alimentar no futuro, a produção de alimentos deverá crescer substancialmente.¹

O aumento da produtividade agrícola exige, entre outros aspectos, o controle de uma variedade de pragas e doenças.² A técnica mais utilizada para o controle das mesmas consiste no uso de defensivos agrícolas, também denominados de agroquímicos ou pesticidas. Os herbicidas, fungicidas, inseticidas e nematicidas são as classes mais consumidas de agroquímicos no mundo.³

Para manter pragas e doenças abaixo do nível de dano econômico às culturas agrícolas, o homem vem buscando desenvolver agroquímicos que

¹ FOLEY, J. A.; RAMANKUTTY, N.; BRAUMAN, K. A.; CASSIDY, E. S.; GERBER, J. S.; JOHNSTON, M.; MUELLER, N. D.; O'CONNELL, C.; RAY, D. K.; WEST, P. C.; BENNETT, E. M.; CARPENTER, S. R.; HILL, J.; MONFREDA, C.; POLASKY, S.; ROCKSTROM, J.; SHEEHAN, J.; SIEBERT, S.; TILMAN, D.; ZAKS, D. P. Solutions for a cultivated planet. *Nature*, v. 478, p. 337-342, 2011.

² VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. O setor de agroquímicos, BNDES Setorial, Rio de Janeiro, v. 1, p. 69-96, 2006.

³ BARBOSA, L. C. A. Os Pesticidas, o homem e o meio ambiente. Editora UFV: Viçosa, 2004.

sejam mais específicos, que possam ser aplicados em concentrações cada vez menores e que causem baixo impacto ambiental. Dentro desse contexto, produtos naturais vêm sendo utilizados seja diretamente como agroquímicos ou ainda servindo de inspiração para a obtenção de novos agentes de controles de pragas e doenças. Vários exemplos estão disponíveis na literatura que corroboram este fato; alguns são brevemente discutidos a seguir.

Os compostos fosforados mostrados na Figura 1 são herbicidas desenvolvidos a partir de produtos naturais isolados de bactérias.⁴

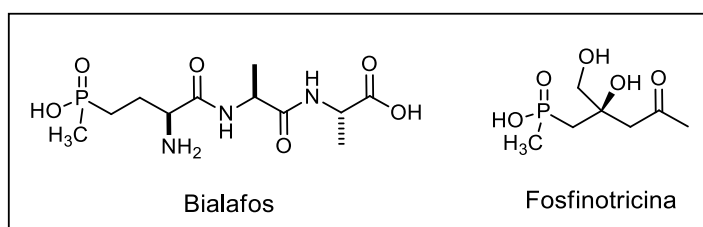


Figura 1 - Estruturas dos herbicidas bialafos e fosfinitricina.

O bialafos é uma fitotoxina de origem microbiana obtida a partir da fermentação da bactéria *Streptomyces higroscopicus*. Corresponde ao primeiro produto proveniente de fermentação bacteriana utilizado na produção de um herbicida comercial e que atualmente está sendo vendido no Japão com o nome de Herbiace®.⁴ A fosfinitricina também apresenta atividade herbicida e é obtida a partir da fermentação da *Saccharothrix* SP. ST-888.⁵

⁴ VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, v. 58, p. 1631-1646, 2002.

⁵ KIMURA, T.; NAKAMURA, K.; TAKAHASHI, E. Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. *The Journal of Antibiotics*, v. 14, p. 1130-1133, 1995.

O alcalóide sabadilla (Figura 2, pg. 3) é uma substância derivada das sementes de plantas da espécie *Choenocaulon officinale*. Esse alcalóide tem sido utilizado como um inseticida pelos povos nativos da América do Sul e Central.⁶

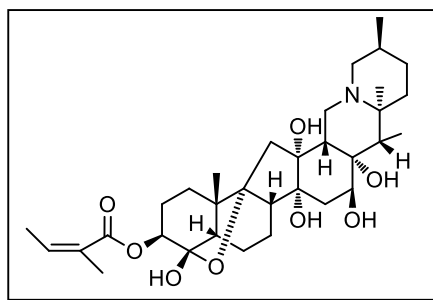


Figura 2- Estrutura do alcalóide sabadilla.

Os cineóis são monoterpenos voláteis encontrados normalmente entre os componentes de óleos essenciais de diversas espécies de plantas tais como *Laurus nobilis* L., *Salvia spp.*, *Eucalyptus spp.*, e são frequentemente utilizados para o controle de diversas espécies de plantas daninhas. Dentro dessa classe de monoterpenos mencionam-se o 1,8-cineol e 1,4-cineol (Figura 3, pg.4). O 1,8-cineol além de apresentar importantes propriedades terapêuticas é considerado um dos aleloquímicos fitotóxicos mais potentes e abundantes extraído de *Artemisia spp.* O 1,4-cineol é, geralmente, encontrado nas mesmas fontes naturais onde o 1,8-cineol está presente; porém a concentração do primeiro é geralmente menor. Salienta-se que efeitos fitotóxicos também são descritos para o 1,4-cineol.⁷

⁶ DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 4022-4034, 2009.

⁷ ROMAGNI, J. G.; ALLEN, S. N.; DAYAN, F. E. Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *Journal of Chemical Ecology*, v. 26, p. 303-313, 2000.

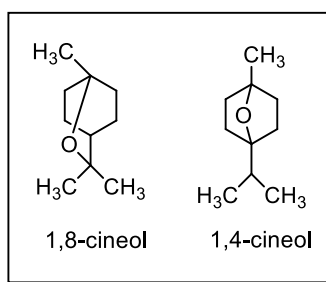
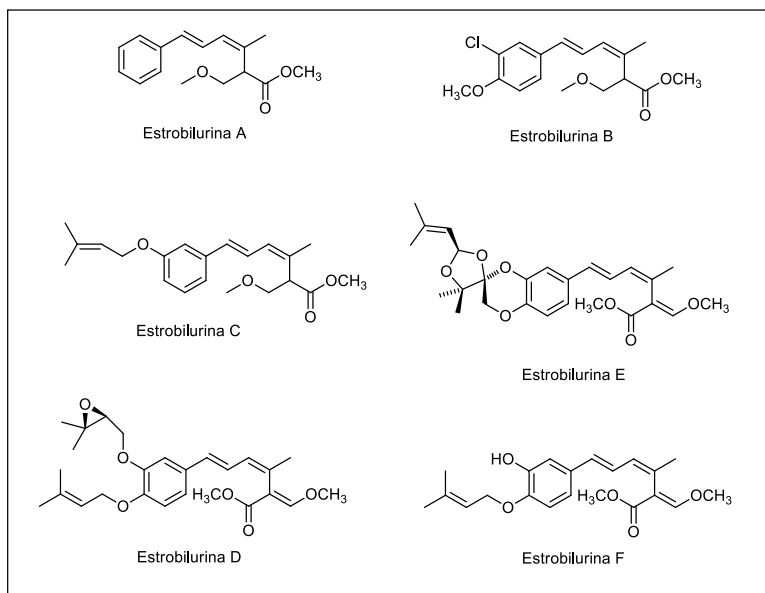


Figura 3 - Estruturas dos monoterpenos 1,8-cineol e 1,4-cineol.

Um exemplo importante com respeito à utilização de produtos naturais como estruturas-modelo para o desenvolvimento de novos agroquímicos corresponde à classe de fungicidas conhecidos como estrobilurinas.

As estrobilurinas correspondem a derivados do ácido β -metóxi acrílico. A estrobilurina A foi o primeiro fungicida descrito pertencente a essa classe de compostos e isolada do basidiomiceto *Strobilurus tenacellus*. Muitas outras estrobilurinas foram isoladas e caracterizadas, sendo elas nomeadas em ordem alfabética: B, C, D, E, F, etc, Figura 4.⁸



⁸ ANKE, T.; OBERWINKLER, F.; STEGLICH, W.; SCHRAMM, G. The strobilurines-new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. *Journal of Antibiotics*, v. 30, p. 806-810, 1977.

Figura 4 – Estruturas das estrobilurinas naturais.

Embora apresentassem atividade fungicida em testes laboratoriais, ensaios biológicos em casa de vegetação demonstraram que as estrobilurinas eram completamente inativas em termos de atividade antifúngica. Tal fato foi atribuído à fotoinstabilidade das substâncias naturais. Mais tarde, essas mesmas estrobilurinas naturais foram utilizadas como fonte de inspiração para a produção de várias outras de origem sintética, mais estáveis, com potente atividade fungicida e baixa toxicidade para mamíferos. A Figura 5 contém dois exemplos de estrobilurinas de origem sintética.⁹

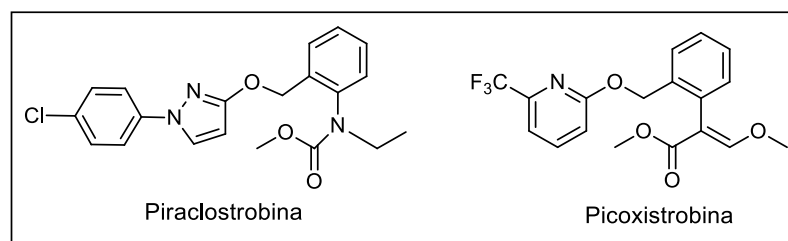


Figura 5- Exemplos de estrobilurinas sintéticas.

O controle de doenças de plantas tem sido uma preocupação constante na agricultura e um desafio para produtores e pesquisadores. Dentre os organismos fitopatogênicos, os fungos são responsáveis por cerca de 75% de todas as doenças infecciosas de plantas. Assim, todas as culturas importantes estão sujeitas a uma ou mais doenças causadas por

⁹ SOUZA, C. F. Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina por cromatografia eletrocinética capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente. Dissertação (Mestrado em Química) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 172p., 2008.

fungos. Estima-se que mais de 5.000 espécies de fungos são responsáveis por causarem danos às diversas culturas.¹⁰

Segundo RAVEN e colaboradores,¹⁰ mais de 70.000 espécies de fungos já foram identificadas até o presente momento e eventualmente outras cerca de 1.700 são descobertas a cada ano. O número total de espécies foi estimado em um milhão e quinhentos mil, colocando os fungos como o segundo maior reino, sendo superado apenas pelos insetos.

1.2 – Ácido Cinâmico e Isobenzofuranonas

O ácido cinâmico (Figura 6) consiste em um ácido aromático de ocorrência natural, proveniente de plantas superiores. A sua estrutura molecular é normalmente encontrada na forma *trans*. Ele pertence ao grupo das auxinas, hormônios vegetais responsáveis por regular o crescimento e a diferenciação celular, e alguns de seus derivados desempenham um importante papel na defesa da planta contra o ataque de microrganismos e insetos.¹¹

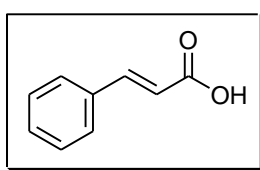


Figura 6– Estrutura do ácido cinâmico.

¹⁰ RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ª ed., 906p., 2001.

¹¹ NIERO, E. L. O. Tese: Efeitos de ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanona humanos: avaliação do seu potencial antitumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultravioleta. São Paulo, 39p., 2010.

Derivados do ácido cinâmico são encontrados em diversos produtos de origem vegetal como café, maçãs, frutos cítricos, cereais¹² e apresentam importantes bioatividades tais como antioxidante,¹³ antibacteriana¹⁴, fitotoxicidade,¹⁵ atividade antifúngica,^{13,14,16} além de efeitos citotóxicos contra várias linhagens de células tumorais.^{17,18,19}

Vários compostos de origem sintética e natural possuem em sua estrutura um anel γ -lactônico fundido a um anel de benzeno (Figura 7, pg.8). Essas substâncias, denominadas de isobenzofuranonas ou fitalidas, apresentam importantes atividades biológicas dentre elas antioxidante e

¹² CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, p. 362-372, 1999.

¹³ SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 749-767, 2012.

¹⁴ NARASIMHAN, B.; BELSARE, D.; PHARANDE, D.; MOURYA, V.; DHAKE, A. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, p. 827-834, 2004.

¹⁵ DELLAGREGA, M.; PURCARO, R.; PREVITERA, L.; ZARRELLI, A. Phenyl cinnamate derivatives from *Oxalis pes-caprae*. *Chemistry & Biodiversity*, v. 5, p. 2408-2414, 2008.

¹⁶ TAWATAM S.; TAIRA, S.; KOBAMOTO, N.; ZHU, J.; ISHIHARA, M.; TOYAMA, S. *Bioscience Biochemistry and Biotechnology*, v. 60, p. 909-910, 1996.

¹⁷ GRUNBERGER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER, K.; OLTZ, E. M.; EFROS, L.; CALDWELL, M.; ESTEVEZ, V.; NAKANISHI, K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Esperantia*, v. 44, p. 230-232, 1988.

¹⁸ KAMPA, M.; ALEXAKI, V.-I.; NOTAS, G.; NIFLI, A.-P.; NISTIKAKI, A.; HATZOGLOU, A.; BAKOGEORGOU, E.; KOUIMTZOGLOU, E.; BLEKAS, G.; BOSKOU, D.; GRAVANIS, A.; CASTANAS, E. Antiproliferative and apoptotic effects on selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research*, v. 6, p. R63-74, 2004.

¹⁹ LEE, Y.-J.; KUO, H.-C.; CHU, C.-Y.; WANG, C.-J.; LIN, W.-C.; TSENG, T.-H. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochemical Pharmacology*, v. 66, p. 2281-2289, 2003.

antifúngica,²⁰ efeito sobre o transporte de elétrons fotossintético,²¹ antiplaquetária,²² e atividade citotóxica.²³ Além de apresentarem importantes atividades biológicas, as isobenzofuran-1(3*H*)-onas são sinteticamente úteis.^{24,25}

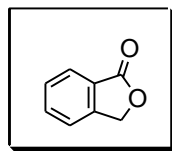


Figura 7 - Estrutura básica de uma isobenzofuranona.

1.3 – Objetivos do trabalho

Conforme descrito anteriormente, tanto o ácido cinâmico quanto composto pertencentes à classe das isobenzofuranonas apresentam atividade fungicida. No entanto, a literatura disponível não possui nenhum relato descrevendo derivados de ácido cinâmico contendo grupos

²⁰ STROBEL, G.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M.; FUNG, P. C. W.; CHAU, R. M. W. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*, v. 60, p. 179–183, 2002.

²¹ TEIXEIRA, R.R.; PEREIRA, W.L.; TOMAZ, D.C.; de OLIVEIRA, F.M.; GIBERTI, S.; FORLANI, G. Synthetic analogues of the natural compounds cryphonectric acid interfere with photosynthetic machinery through two different mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 5540-5549, 2013.

²² MA, M.; GAO, Y.; QIAO, H.; HU, X.; CHANG, J. Antiplatelet activity of 3-butyl-6-bromo-1(3*H*)-isobenzofuranone on rat platelet aggregation. *J. Thromb Thrombolysis*, v. 33, p. 64-73, 2012.

²³ LOGRADO, L. P. L.; SANTOS, C. O.; ROMEIRO, L. A. S.; COSTA, A. M.; FERREIRA, J. R. O.; CAVALCANTI, B. C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; DOS SANTOS, M. L. Synthesis and cytotoxicity screening of substituted isobenzofuranones designed from anacardic acids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 3480-3489, 2010.

²⁴ MAL, D.; PAHARI, P. Recent Advances in the House Annulation. *Chemical Reviews*, v. 107, p. 1892-1918, 2007.

²⁵ KARMAKAR, R.; PAHARI, P.; DIPAKRANJAN, M. Phthalides and phtalans: synthetic methodologies and their application in the total synthesis. *Chemical Review*, v. 114, p. 6213-6284.

isobenzofuranona em suas estruturas. Considerando as atividades fungicidas descritas tanto para derivados do ácido cinâmico quanto para isobenzofuranonas, buscou-se nesse trabalho a síntese e a avaliação das atividades fungicidas de cinamatos contendo o núcleo isobenzofuranona.

Considerando as similaridades existentes entre as pesquisas que objetivam desenvolvimento de novos fármacos e agroquímicos^{26,27,28}, buscou-se ainda neste trabalho a avaliação da atividade citotóxica dos cinamatos contendo o núcleo isobenzofuranona.

²⁶ SHORT, P. L. Growing agrochemical R & D. *Chemical and Engineering News*, v. 8, p. 19-22, 2005.

²⁷ DELANEY, J.; CLARKE, E.; HUGHES, D.; RICE, M. Modern agrochemical research: a missed opportunity for drug discovery? *Drug Discovery Today*, v. 11, p. 839-845, 2006.

²⁸ SWANTON, C. J.; MASHHADI, H. R.; SOLOMON, K. R.; AFIFI, M. M.; DUKE, S. O. Similarities between the discovery and regulation of pharmaceuticals and pesticides: in support of a better understanding of the risks and benefits of each. *Pest Management Science*, v. 67, p. 790-797, 2011.

CAPÍTULO 2

SÍNTESE DE CINAMATOS CONTENDO O NÚCLEO ISOBENZOFURANONA

2.1 – Introdução

No espectro de radiação eletromagnética, as chamadas micro-ondas possuem uma frequência que vai de 300 a 300.000 MHz e que corresponde a comprimentos de onda de 1 mm a 1 m. Conforme mostrado na Figura 1, a região de micro-ondas situa-se entre a região de infravermelho e ondas de rádio no espectro eletromagnético.²⁹

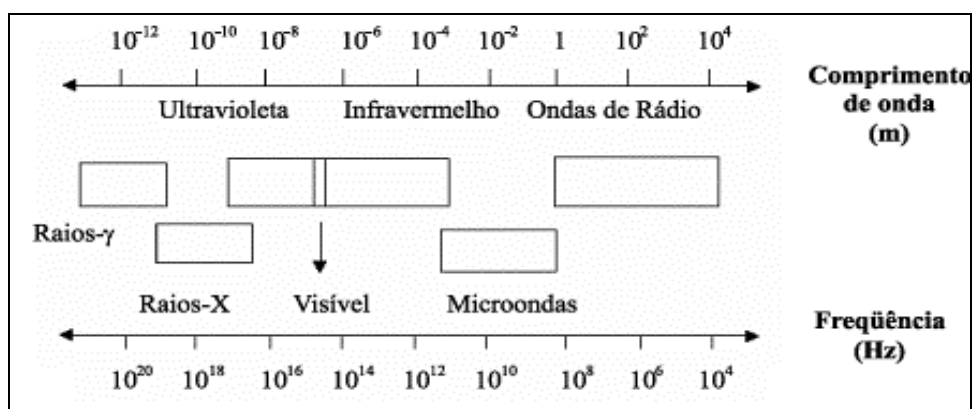


Figura 1- Localização da região de micro-ondas no espectro eletromagnético.

Fonte: SANSEVERINO, 2002.¹

O uso da radiação de micro-ondas em química analítica já é conhecido desde 1970 sendo ela utilizada, entre outros fins, para a digestão de amostras para análise elementar, para a extração de substâncias e para

²⁹ SANSEVERINO, A. M. Micro-ondas em síntese orgânica. *Química Nova*, v. 25, p. 660-667, 2002.

a desorção térmica de compostos.³⁰ No que tange à síntese orgânica, os primeiros relatos de reações orgânicas conduzidas em forno de micro-ondas datam de 1986. Dois trabalhos independentes, o primeiro publicado por Gedye e colaboradores³¹ e o outro por Giguere e colaboradores,³² descrevem notáveis reduções de tempo de reação para transformações conduzidas em frascos selados de teflon e em fornos de micro-ondas domésticos. Desde então, o número de publicações vinculadas à temática da utilização da radiação de micro-ondas em síntese orgânica vem aumentando continuamente. Assim, as micro-ondas tornaram-se um método alternativo ao tradicional método clássico de aquecimento por condução de calor.³³

As principais vantagens com respeito à utilização de micro-ondas sobre os aquecimentos convencionais (manta, chapas de aquecimento, banhos de óleo) para o químico orgânico sintético podem ser assim descritas:

i) as taxas de aquecimento em uma reação onde alguma substância (solvente ou um reagente) absorva micro-ondas são muito maiores que os convencionais;

³⁰ DAGANI, R. Molecular magic with microwaves. *Chemical & engineering News*, v. 75, p. 26-33, 1997.

³¹ GEDYE, R.; SMITH, F.; WESTAWAY, K.; ALI, H.; BALDISERA, L.; LABERGE, L.; ROUSELL, J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Letters*, v. 27, p. 279-282, 1986.

³² GIGUERE, R. J.; BRAY, T. L.; DUNCAN, S. M.; MAJETICH, G. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Letters*, v. 27, p. 4945-4948, 1986.

³³ KAPPE, C., O.; DALLINGER, D. The impact of microwave synthesis on drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, p. 51-63, 2005. de la HOZ, A.; DIAZ-ORTIZ, A.; MORENO, A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chemical Society Reviews*, v. 34, p. 164-178, 2005.

ii) possibilidade de maiores rendimentos, maior seletividade e menor decomposição térmica;

iii) o reator ou recipiente da reação pode ser transparente às micro-ondas; assim, energia é absorvida somente pelos reagentes ou solvente (ou até seletivamente por apenas um dos constituintes da reação);

iv) a energia é diretamente transferida para a amostra sem necessidade de contato físico com a fonte de aquecimento.

Desde a publicação dos trabalhos pioneiros de Gedye³¹ e Giguere³², tem sido demonstrado que diversas reações podem ser conduzidas sob irradiação de micro-ondas tais como a reação de Wittig, saponificação de ésteres, reações de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), reduções enzimáticas, entre outras.³⁴

O aquecimento dos materiais por micro-ondas é denominado de aquecimento dielétrico. Existem dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor. O primeiro deles é chamado rotação de dipolo, e relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido, as moléculas retornam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida para esta orientação destes dipolos é dissipada na forma de calor.^{34,35}

No segundo mecanismo, denominado de condução iônica, o calor é produzido via fricção, que acontece através da migração de íons dissolvidos

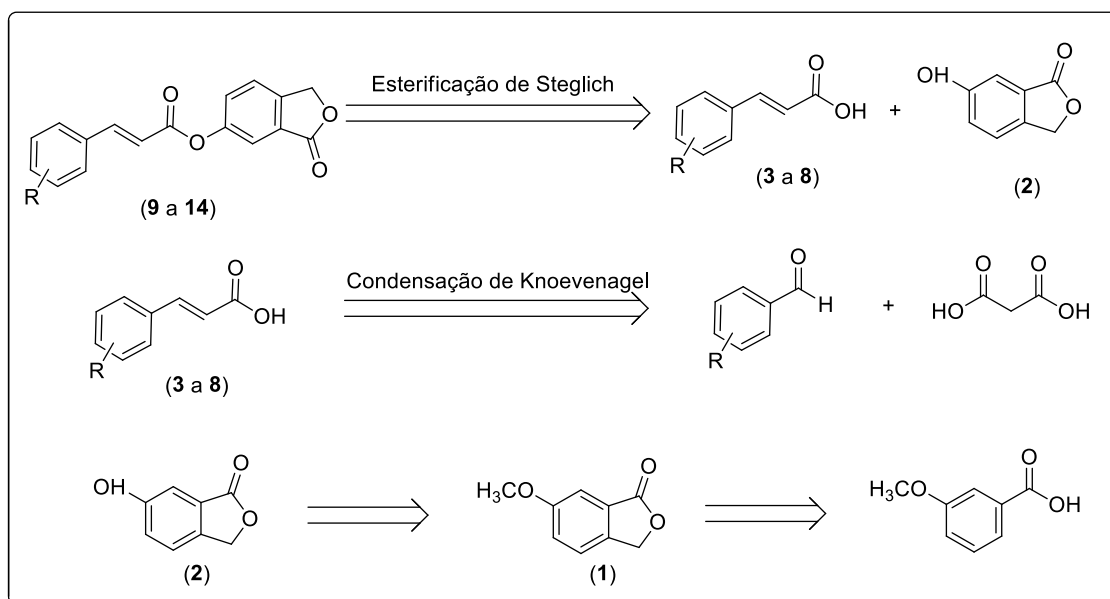
³⁴ SURATI, M. A.; JAUHARI, S.; DESAI, K. R. A brief review: microwave assisted organic reaction. *Archives of Applied Science Research*, v. 4, p. 645-661, 2012.

³⁵ KAPPE, C. O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, p.6250-6284.

quando estão sob a ação de um campo eletromagnético. Estas perdas dependem do tamanho, carga, condutividade dos íons dissolvidos e interação destes últimos com o solvente.^{30,35}

Cabe salientar que as reações conduzidas na presença de irradiação de micro-ondas podem ser processadas com ou na ausência de solventes.

Descrevem-se neste capítulo as etapas envolvidas na preparação de cinamatos e que apresentam na sua estrutura o núcleo isobenzofuranona. No Esquema 1 está representado a análise retrossintética para a obtenção dos cinamatos. De acordo com a retrossíntese, o ácido 3-metoxibenzoico, disponível comercialmente, corresponde ao composto de partida necessário à síntese dos cinamatos. A reação de *orto*-alquilação deste ácido resultaria na obtenção da isobenzofuran-1(3*H*)-ona **1**. O processo de desmetilação de **1** resultaria no derivado hidroxilado **2**. A condensação de Knoevenagel, entre diferentes aldeídos aromáticos e o ácido malônico, levaria à obtenção dos derivados do ácido cinâmico **3** a **8**. Por fim, a reação de esterificação de Steglich entre a substância **2** e os derivados do ácido cinâmico **3** a **8** resultaria na formação dos cinamatos **9** a **14**.



Esquema 1 - Análise retrosintética para a preparação do cinamatos contendo o núcleo isobenzofuranona.

Será descrita adiante a sequência de transformações que culminou na preparação de um grupo de cinamatos **9 a 14** cujas estruturas estão mostradas na Figura 2 (pg.15). Nesta Figura encontram-se ainda representadas as estruturas das isobenzofuranonas **1 e 2** bem como dos derivados do ácido cinâmico **3 a 8** que também foram preparados. Conforme será apresentado, a irradiação de micro-ondas foi de fundamental importância para que os cinamatos **9 a 14** pudessem ser obtidos com rendimentos satisfatórios. Serão também descritas comparações entre resultados obtidos empregando-se o aquecimento convencional e o aquecimento por micro-ondas na preparação dos derivados do ácido cinâmico **3 a 8**. O aquecimento por micro-ondas também foi utilizado como um método alternativo para promover a desmetilação de **2** (Figura 2, pg.15) e os resultados obtidos nesse caso também serão discutidos.

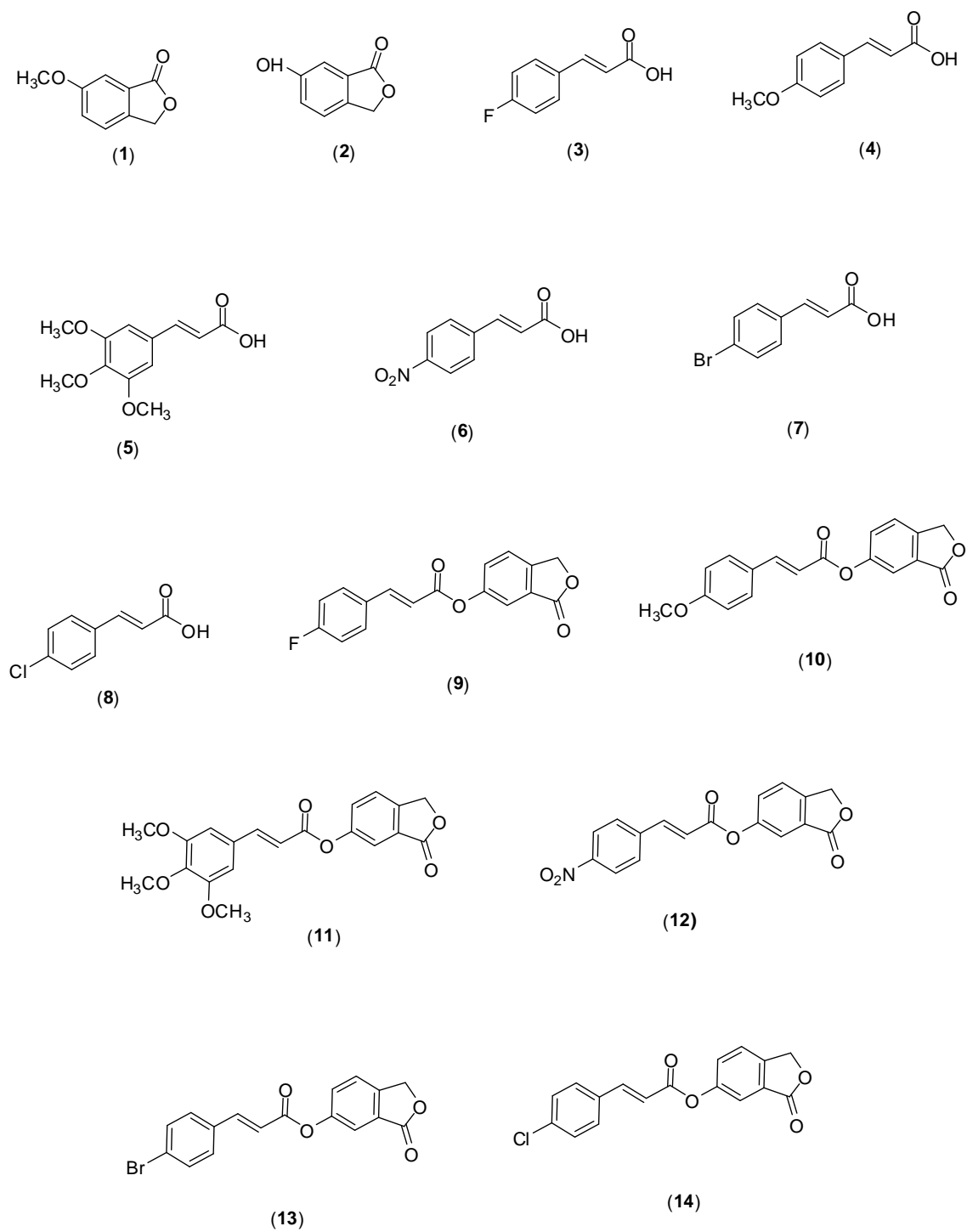


Figura 2 - Estruturas dos compostos sintetizados nesse trabalho.

2.2 - Material e métodos

2.2.1 - Generalidades Metodológicas

Foram utilizados reagentes de grau P.A. para as sínteses dos compostos. Piperidina, solução de BBr_3 1,0 mol L^{-1} em diclorometano, ácido 3-metoxibenzoico, ácido malônico, 4-fluorobenzaldeído, 4-metoxibenzaldeído, 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, 4-nitrobenzaldeído, 4-bromobenzaldeído, 4-clorobenzaldeído, *N,N*-dícicloexilcarbodiimida (DCC), 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina (DMAP), cloreto de sódio, ácido cítrico, foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) e utilizados sem prévia purificação. Acetona, ácido acético, ácido clorídrico, dimetilsulfóxido, metanol, acetato de etila, cloreto de sódio, solução de formaldeído 37% m/v, bicarbonato de sódio, bicarbonato de potássio e etanol foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se placas cromatográficas de sílica-gel impregnadas sobre alumínio. Após a eluição as placas de CCD foram observadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$) e reveladas com solução de permanganato de potássio (3 g de KMnO_4 , 20 g de K_2CO_3 , 5 mL de NaOH 5% m/v, 300 mL de água).

As separações em coluna cromatográfica foram realizadas usando-se sílica-gel (70-230 mesh), como fase estacionária. Os solventes utilizados como eluentes foram usados sem prévia purificação.

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos empregando-se a técnica reflectância total atenuada (ATR) em equipamento Varian 660 ou por

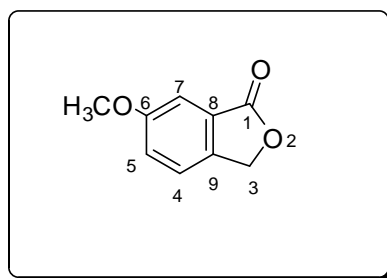
meio de pastilhas de KBr em espectrofotômetro PERKIN ELMER SPECTRUM 1000.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 300 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 75 MHz) foram obtidos em um espectrômetro VARIAN MERCURY 300. Foram utilizados como solventes o clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e dimetilsulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$) deuterados.

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF-302 e não foram corrigidas.

2.2.2 - Procedimentos Sintéticos

2.2.2.1 - Síntese da 6-metoxiisobenzofuran-1(3H)-ona



(1)

2.2.2.1.1- Empregando aquecimento convencional (AC)

A um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados o ácido 3-metoxibenzoico (5,00 g; 32,9 mmol) juntamente com 3,50 mL de solução aquosa de formaldeído (37% m/v), 5,50 mL de HCl concentrado e 12,0 mL de ácido acético. A solução resultante foi mantida sob agitação magnética à temperatura de 90 °C por 16 horas. Decorrido este período, a análise da mistura de reação por CCD mostrou que o ácido 3-metoxibenzoico havia sido completamente consumido. O volume da solução foi, então, reduzido

em evaporador rotativo e em seguida foi adicionada uma solução saturada de bicarbonato de potássio até pH aproximadamente 6. A fase aquosa resultante foi extraída com acetato de etila (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos. A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por recristalização utilizando como solvente acetona. O composto **1** foi obtido como um sólido branco com 80% de rendimento (4,31 g; 26,3 mmol).

2.2.2.1.2 - Empregando irradiação de micro-ondas (IM)

A um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados o ácido 3-metoxibenzoico (5,00 g; 32,9 mmol) juntamente com 3,50 mL de solução aquosa de formaldeído (37% m/v), 5,50 mL de HCl concentrado e 12,0 mL de ácido acético. O balão contendo a solução resultante foi inserido na cavidade do aparelho de micro-ondas. Para o aquecimento da mistura, utilizou-se o método pré-programado do aparelho CEM Discover System. O método consiste da utilização de refluxo, agitação magnética e irradiação da mistura de reação por vinte minutos utilizando a potência de 150 W. Decorrido este período, a análise da mistura de reação por CCD mostrou que o ácido 3-metoxibenzoico havia sido completamente consumido. O volume da solução foi, então, reduzido em evaporador rotativo e em seguida foi adicionada solução saturada de bicarbonato de potássio até pH aproximadamente 6. A fase aquosa resultante foi extraída com acetato de etila (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos. A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por recristalização utilizando

como solvente acetona. O composto **1** foi obtido como um sólido branco com 78% de rendimento (4,04 g; 24,6 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,31$ (hexano/acetato de etila 2:1 v/v).

T_f: 118,0-119,5 °C (**T_f literatura:** 119,0-120,0 °C).³⁶

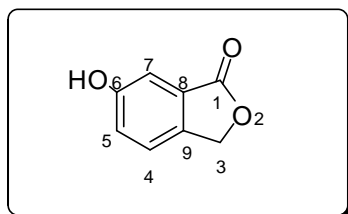
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3481, 3085, 2953, 2848, 1754, 1620, 1277, 1247, 1054, 1018, 992, 725, 692, 545 cm^{-1} . Espectro apresentado na Figura 3, pg. 44.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,86 (s, 3H; -OCH₃); 5,26 (s, 2H; H-3); 7,22-7,38 (m, 3H; H-4, H-5, H-7). Espectro apresentado na Figura 5, pg 46.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 55,7 (-OCH₃); 69,5 (C-3); 107,4 (C-7); 122,8 (C-5); 123,0 (C-4); 126,9 (C-8); 138,8 (C-9); 160,5 (C-6); 171,2 (C-1). Espectro apresentado na Figura.6 pg 47.

CG-MS m/z : 164 ([M]⁺, C₁₀H₁₀O₂). Espectro apresentado na Figura 4, pg 45.

2.2.2.2 - Síntese da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona



³⁶ NUMATA, A.; ONO, K.; IRIE, H.; UEO, S. Synthesis of pyrolysis products of bisdehydrodihydroenmein. I. Synthesis of 6-hydroxy-7-methylphthalide and 2-(hydroxymethyl)-6,6-dimethyl-5-oxo-1-cyclohexenecarboxylic acid lactone. *Yakugaku Zasshi*, v. 88, p. 1151-1162, 1968.

(2)

2.2.2.2.1 – Desmetilação do composto 1 empregando BBr₃

A um balão bitubulado de 250 mL adicionaram-se o composto **1** (0,600 g; 3,65 mmol) juntamente com 30,0 mL de diclorometano anidro. A mistura resultante foi mantida sob atmosfera de nitrogênio e resfriada em banho de gelo por 40 minutos. Em seguida foram adicionados a essa mistura 11,0 mL de solução 1,00 mol L⁻¹ de BBr₃ em diclorometano gota a gota. Após a adição, a mistura de reação foi mantida sob agitação por 6 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados à mistura de reação 15,0 mL de água destilada e observou-se a formação de um precipitado branco. A mistura resultante foi transferida para um funil de separação e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto **2** foi obtido como um sólido branco com 97% de rendimento (0,533 g; 3,56 mmol).

2.2.2.2.2 – Desmetilação do composto 1 empregando HBr e irradiação de micro-ondas (IM)

A um balão de 50,0 mL adicionaram-se o composto **1** (0,600 g; 3,65 mmol). Em seguida foram adicionados 7,00 mL de HBr (48% m/v). O balão contendo a solução resultante foi inserido na cavidade do aparelho de micro-ondas. Para irradiação da mistura, utilizou-se o método pré-programado do CEM Discover System. O método consiste da utilização de refluxo, agitação magnética e irradiação da mistura de reação por vinte minutos utilizando a

potência de 150 W. O volume da solução foi, então, reduzido em evaporador rotativo e em seguida foi adicionada solução saturada de bicarbonato de potássio até pH aproximadamente 6. A mistura resultante foi transferida para um funil de separação e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto **2** foi obtido como um sólido branco com 54% de rendimento (0,297 g; 1,98 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,26$ (hexano/acetato de etila 2:1 v/v).

T_f : 197,1-198,7 °C (**T_f literatura:** 198,0-200,0 °C).³⁶

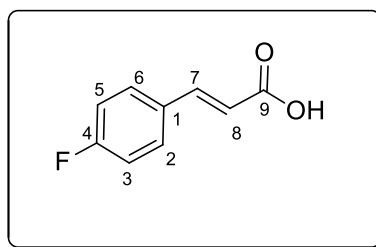
IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$: 3214 (banda larga), 1722, 1598, 1505, 1449, 1227, 1192, 1055, 773, 539 cm^{-1} . Espectro apresentado na Figura 7, pg. 53.

RMN de 1H (300 MHz, CD_3OD) δ : 5,25 (s, 2H; H-3); 7,15-7,18 (m, 2H; H-5, H-7); 7,40 (d, 1H, $J=9,0$ Hz; H-4). Espectro apresentado na Figura 9, pg. 55.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ : 70,1 (C-3); 109,6 (C-7); 122,7 (C-5); 123,2 (C-4); 126,5 (C-8); 138,3 (C-9); 158,6 (C-6); 172,5 (C-1). Espectro apresentado na Figura 10, pg. 56.

CG-MS m/z : 150 ($[M]^+$, $C_9H_8O_2$). Espectro apresentado na Figura 8, pg. 54.

2.2.2.3 - Síntese do ácido (*E*)-4-fluorocinâmico



(3)

Os procedimentos descritos a seguir foram baseados no trabalho publicado por KOO e colaboradores.³⁷

2.2.2.3.1 - Empregando aquecimento convencional (AC)

A um balão de fundo redondo (25,0 ml) foram adicionados ácido malônico (1,37 g; 13,2 mmol), 4-fluorobenzaldeído (0,830 g; 6,60 mmol) em piridina (5,00 ml). A mistura foi mantida sob agitação magnética por 5 minutos e após esse período, adicionou-se piperidina (1,00 mL; 13,00 mmol). A mistura resultante foi mantida em agitação sob refluxo por um período de 48 horas. Após este período a mistura foi, então, vertida em banho de gelo e adicionou-se lentamente 10,0 mL de solução de ácido clorídrico (1:1 v/v). A mistura resultante foi filtrada a vácuo em funil sinterizado. O resíduo foi lavado com porções de água gelada (4 x 5,00 mL).

³⁷ KOO, J.; FISH, M. S.; WALKER, G. N.; BLAKE, J. *Organic Syntheses*. Nova York: John Wiley & Sons. 1963, p. 35.

A substância **3** foi purificada por recristalização em etanol e obtida como um sólido branco com 93% de rendimento (1,01g; 6,14 mmol).

2.2.2.3.2 - Empregando irradiação de micro-ondas (IM)

A um balão de fundo redondo (25,0 ml) foram adicionados, ácido malônico (1,37 g; 13,2 mmol), 4-fluorobenzaldeído (0,830 g; 6,60 mmol) em piridina (5,00 ml). Adicionou-se então piperidina (1,00 mL; 13,0 mmol). O balão contendo a solução resultante foi inserido na cavidade do aparelho de micro – ondas. Utilizou-se o método pré-programado do equipamento CEM Discover System. O método consiste da utilização de refluxo, agitação magnética e irradiação da mistura de reação por vinte minutos utilizando a potência de 150 W. A mistura da reação foi então vertida em banho de gelo e adicionou-se lentamente 10,0 mL de ácido clorídrico (1:1 v/v). A mistura resultante foi filtrada a vácuo em funil sinterizado. O resíduo foi lavado com porções de água gelada (4 x 5,00 mL). A substância **3** foi purificada por recristalização em etanol e obtida como um sólido branco com 95% de rendimento (1,04 g; 6,27 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,30$ (hexano/acetato de etila 1:2 v/v).

T_f: 207,0-209,0 °C (**T_f literatura:** 208,0–210,0 °C).³⁸

IV (KBr) $\bar{\nu}$ _{max}: 3500-2200 (banda larga), 2980, 2600, 1688, 1625, 1227, 820.

Espectro apresentado na Figura 12, pg. 63.

³⁸ RASSCHAERT, A. W. J.; SLOOTMAEKERS, P. J. A re-examination of the selectivity in the Friedel-Crafts chalcone synthesis. *Bulletin de la Societe Chimique de Belgique*, v. 75, p. 459-465, 1966.

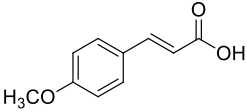
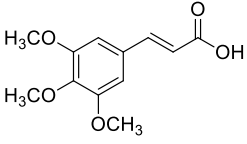
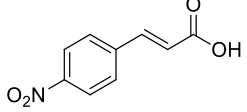
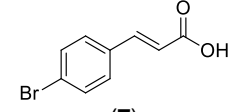
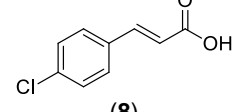
RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ : 6,44 (d, 1H, $J=15,9$ Hz; H-8); 7,14 (t, 2H, $J=8,7$ Hz; H-3, H-5); 7,68-7,63 (m, 3H, H-2, H-6, H-7). Espectro apresentado na Figura 14, pg. 65.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ : 115,5 (d, $J_{\text{C-F}}=21,8$ Hz; C-3, C-5); 117,9 (C-8); 129,9 (d, $J_{\text{C-F}}=8,3$ Hz; C-2, C-6); 130,0 (d, $J_{\text{C-F}}=3,8$ Hz; C-1); 143,4 (C-7); 163,8 (d, $J_{\text{C-F}}=248,3$ Hz; C-4); 168,6 (C-9). Espectro apresentado na Figura 15, pg. 66.

CG-MS m/z : 166 ($[\text{M}]^+$, $\text{C}_9\text{H}_7\text{FO}_2$). Espectro apresentado na Figura 13, pg. 64.

Os demais derivados do ácido cinâmico (**4 a 8**, Figura 2, pg.15) foram obtidos utilizando aquecimento convencional e irradiação por micro-ondas, aplicando-se os procedimentos descritos para a síntese do composto **3**. Na Tabela 1 estão apresentadas informações com respeito às quantidades das substâncias utilizadas nas reações de preparação dos ácidos, tempos de reação e rendimentos obtidos. Embora os rendimentos sejam próximos para cada derivado sintetizado, os tempos de reação foram substancialmente menores quando as reações foram realizadas em micro-ondas. Conforme discutido anteriormente, notável redução de tempo de reação é uma importante vantagem, em comparação ao aquecimento convencional, quando reações são realizadas na presença de radiação de micro-ondas.

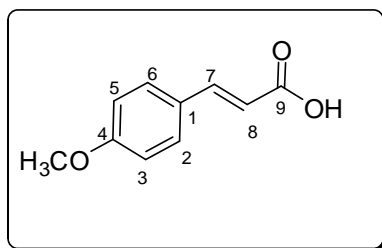
Tabela 1 – Informações relativas às reações realizadas para a preparação dos compostos 4 a 8

Composto	Ácido malônico massa (g); mmol; equivalentes	ArCHO massa (g); mmol; equivalentes	Piperidina massa (g); mmol; equivalentes	Tempo de reação		Rendimento (%)	
				AC (horas)	IM (minutos)	AC	IM
 (4)	(0,69; 6,60; 2,00)	(0,50; 3,30; 1,00)	(0,50; 6,50; 1,97)	24	15	84	87
 (5)	(0,69; 6,60; 2,00)	(0,70; 3,30; 1,00)	(0,50; 6,50; 1,97)	36	15	81	81
 (6)	(0,69; 6,60; 2,00)	(0,55; 3,30; 1,00)	(0,50; 6,50; 1,97)	48	20	79	71
 (7)	(0,69; 6,60; 2,00)	(0,66; 3,30; 1,00)	(0,50; 6,50; 1,97)	72	20	86	84
 (8)	(0,69; 6,60; 2,00)	(0,51 g; 3,30; 1,00)	(0,50; 6,50; 1,97)	72	20	74	77

Ar = 4 metoxifenila (4); 3,4,5 - trimetoxifenila (5); 4-nitrofenila (6); 4-bromofenila (7); 4-clorofenila (8). AC = aquecimento convencional; IM = irradiação de micro-ondas

.As estruturas dos compostos **4** a **8** estão em acordo com os dados espectroscópicos e espectrométricos descritos a seguir.

2.2.2.4 - Síntese do Ácido (*E*)-4-metoxicinâmico



(4)

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,35$ (hexano/acetato de etila 1:2 v/v).

T_f: 174,0–177,2 °C (**T_f literatura:** 173,0 –175,0 °C).³⁹

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3602, 2938, 2842, 1680, 1598, 1252, 826 cm^{-1} . Espectro apresentado na Figura 1, pg. 96.

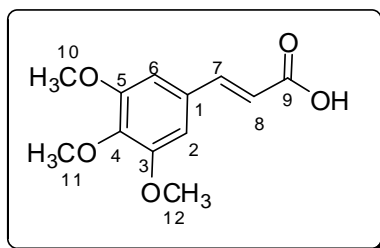
RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ : 3,83 (s, 3H, -OCH₃); 6,34 (d, 1H, $J=15,9$ Hz; H-8); 6,96 (d, 2H, $J=8,7$ Hz; H-3, H-5); 7,55 (d, 2H, $J=8,7$ Hz; H-2, H-6); 7,62 (d, 1H, $J=15,9$ Hz; H-7). Espectro apresentado na Figura 3, pg. 98.

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ : 54,5 (-OCH₃); 114,1 (C-3, C-5); 115,4 (C-8); 127,0 (C-1); 129,5 (C-2, C-6); 144,6 (C-7); 161,6 (C-4); 169,1 (C-9). Espectro apresentado na Figura 4, pg. 99.

³⁹ CHIRIAC, C. I.; TANASA, F.; ONCIU, M. New boron reagents for designed organic synthesis. 2 Cinnamic acids synthesis in the presence of sodium tetramethoxyborate-lithium chloride. *Revue Roumaine de Chimie*, v. 50, p. 627-631, 2005.

CG-MS m/z : 178 ($[M]^+$, $C_{10}H_{10}O_3$). Espectro apresentado na Figura 2, pg. 97.

2.2.2.5 - Síntese do Ácido (*E*)-3,4,5-trimetoxicinâmico



(5)

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,30$ (hexano-acetato de etila 1:2 v/v).

T_f: 215,3–219,0 °C (**T_f literatura:** 216,0 -217,0 °C).⁴⁰

IV (KBr) $\bar{\nu}_{max}$: 3134-2905 (banda larga), 2836, 2654, 1689, 1627, 1684, 1121, 827 cm^{-1} . Espectro apresentado na Figura 5, pg. 100.

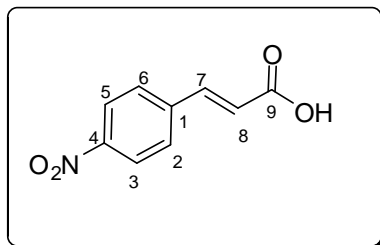
RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ : 3,78 (s, 3H, H-11); 3,87 (s, 6H, H-10, H-12); 6,42 (d, 1H, $J=16,2$ Hz; H-8); 6,92 (s, 2H; H-2, H-6); 7,60 (d, 1H, $J=16,2$ Hz; H-7). Espectro apresentado na Figura 7, pg. 102.

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ : 52,2 (C-10, C-12); 59,8 (C-11); 105,3 (C-2, C-6); 117,3 (C-8); 130,1 (C-1); 139,8 (C-4); 144,9 (C-7); 153,6 (C-3, C-5); 169,2 (C-9). Espectro apresentado na Figura 8, pg. 103.

⁴⁰ MACPHILLAMY, H. B.; DORFMAN, L.; HUEBNER, C. F., SCHLITTLER, E., ANDRÉ, A. S. Rauwolfia Alkaloids. XVIII. On the constitution of deserpidine and reserpine. *Journal of the American Chemical Society*, v. 77, p. 1071-1072, 1955.

CG-MS m/z : ($[M]^+$ 238, $C_{12}H_{14}O_5$). Espectro apresentado na Figura 6, pg. 101.

2.2.2.6 - Síntese do ácido (*E*)-4-nitrocinâmico



(6)

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,30$ (hexano/acetato de etila 2:1 v/v).

T_f: 284,3–285,9 °C (**T_f literatura:** 283,0-285,0 °C).⁴¹

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3100-2500 (banda larga), 1692, 1526, 1349, 847 cm^{-1} .

Espectro apresentado na Figura 9, pg. 104.

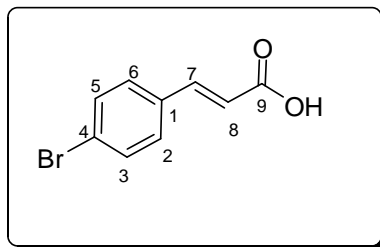
RMN de 1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 6,68 (d, 1H, $J=16,2$ Hz; H-8); 7,62-8,13 (m, 5H; H-2, H-6, H7, H-3, H-5). Espectro apresentado na Figura 11, pg. 106.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 124,1 (C-8); 124,3 (C-3,C-5); 129,7 (C-2,C-6); 141,2 (C-1), 141,6 (C-7); 148,4 (C-4); 167,3 (C-9). Espectro apresentado na Figura 12, pg. 107.

CG-MS m/z : ($[M]^+$ 194, $C_9H_7NO_4$). Espectro apresentado na Figura 10, pg. 105.

⁴¹ PÉREZ, T. M.; COMDOM, R. F. P.; MESA, M.; VÉLEZ, H. $KF-Al_2O_3$ catalysed synthesis of 3-phenyl-2-propenoic acids in dry media under microwave irradiation. *Journal of Chemical Research*, v. 4, p. 240-241, 2003.

2.2.2.7 - Síntese do ácido (*E*)-4-bromocinâmico



(7)

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,30$ (hexano/acetato de etila 2:1 v/v).

T_f: 264,0-265,0 °C (**T_f literatura:** 264,0–266,0 °C).⁴²

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 2970-2760 (banda larga), 1886, 1692, 1622, 1227, 814 cm^{-1} .

Espectro apresentado na Figura 13, pg. 108.

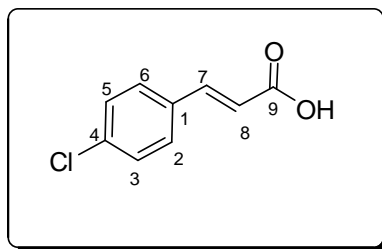
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6,49 (d, 1H, $J=16,1$ Hz; H-8); 7,43 (d, 2H, $J=8,3$ Hz; H-3, H-5); 7,54 (d, 2H, $J=16,1$ Hz; H-7); 7,65 (d, 1H, $J=8,3$ Hz; H-2, H-6). Espectro apresentado na Figura 15, pg. 110.

RMN de ^{13}C (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 120,7 (C-8); 129,7 (C-3, C-5); 130,3 (C-2, C-6); 133,6 (C-4); 135,0 (C-1); 143,0 (C-7); 167,6 (C-9). Espectro apresentado na Figura 16, pg. 111.

CG-MS m/z : ($[\text{M}]^+$ 226; 99%, $[\text{M}+2]^+$ 228; 98%, $\text{C}_9\text{H}_7\text{BrO}_2$). Espectro apresentado na Figura 14, pg. 109.

⁴² MIKROYANNIDIS, J. A.; SPILIOPOULOS, I. K.; KASIMIS, T. S.; KULKARNI, A. P.; JENEKHE, S. A. Synthesis, photophysics, and electroluminescence of conjugated poly (p-phenylenevinylene) derivatives with 1,3, 4-oxadiazoles in the backbone. *Macromolecules*, v. 36, p. 9295-9302, 2003.

2.2.2.8 - Síntese do ácido (*E*)-4-clorocinâmico



(8)

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,30$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

T_f: 241,2–242,0 °C (**T_f literatura:** 240,0 – 242,0 °C).⁴³

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 2928-2520 (banda larga), 1902, 1701, 1630, 1400, 821cm⁻¹.

Espectro apresentado na Figura 17, pg. 112.

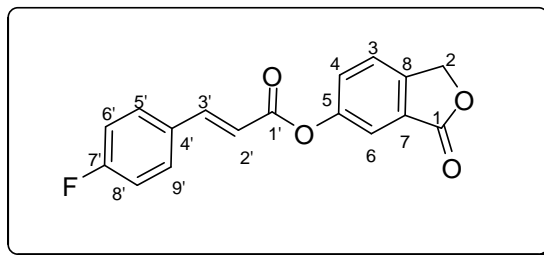
RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6,51 (d, 1H, $J=15,9$ Hz; H-8); 7,49-7,59 (m, 5H; H-2, H-6, H7, H-3, H-5). Espectro apresentado na Figura 19, pg. 114.

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ : 120,7 (C-8); 123,8 (C-4); 130,5 (C-3, C-5); 132,2 (C-2, C-6); 134,0 (C-1); 142,7 (C-7); 167,7 (C-9). Espectro apresentado na Figura 20, pg. 115.

CG-MS m/z : ([M]⁺ 182; 100%, [M+2]⁺ 184; 33%; C₉H₇ClO₂). Espectro apresentado na Figura 18, pg. 113.

⁴³ CHIEFARI, J.; GALANOPOULOS, S.; JANOWSKI, W. K.; KERR, D. I. B.; PRAGER, R. H. The synthesis of phosphonobaclofen, an antagonist of baclofen. *Australian journal of chemistry*, v. 40, p. 1511-1518, 1987.

2.2.2.9 - Síntese do (*E*)-3-(4-fluorofenil) propionato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila



(9)

2.2.2.9.1 Empregando aquecimento convencional (AC)

A um balão de fundo redondo de 25 mL, contendo uma barra de agitação magnética foram adicionados 0,166 g (1,00 mmol) de ácido (*E*)-4-fluorocinâmico (**3**), 0,300 g (2,00 mmol) da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**2**), 0,459 g (2,20 mmol) de DCC e 0,0247 g (0,200 mmol) de DMAP e 12,0 mL de dimetilformamida. A mistura de reação permaneceu sob agitação e refluxo por 120 horas. Após este tempo a mistura de reação foi filtrada e lavada com uma solução aquosa de 10% m/v de ácido cítrico (2 x 6,00 mL), água destilada (5,00 mL) e solução saturada de NaCl (10,0 mL). Em seguida a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 15,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por recristalização utilizando-se como solvente etanol. O composto **12** foi obtido como um sólido branco com 12% de rendimento (0,0358 g; 0,100 mmol).

2.2.2.9.2 Empregando irradiação de micro-ondas (IM)

A um balão de fundo redondo de 25 mL, contendo uma barra de agitação magnética foram adicionados 0,166 g (1,00 mmol) de ácido (*E*)-4-fluorocinâmico, 0,300 g (2,00 mmol) da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**2**), 0,459 g (2,20 mmol) de DCC e 0,0245 g (0,200 mmol) de DMAP e 12,0 mL de metanol. O balão contendo a solução resultante foi inserido na cavidade do aparelho de micro-ondas. Utilizou-se o método pré-programado do equipamento CEM Discover System para um sistema aberto com agitação magnética durante 40 minutos a uma potência de 200 W. Após este tempo a mistura resultante foi filtrada e lavada com uma solução aquosa de 10% m/v de ácido cítrico (2 x 6,00 mL), água destilada (5,00 mL) e solução saturada de NaCl (10,0 mL). Em seguida a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 15,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna. O composto **12** foi obtido como um sólido branco com 71% de rendimento (0,21158 g; 0,7 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,40$ (hexano/diclorometano/acetato de etila 3:2:1 v/v).

T_f: 189,1-193,6 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3026, 2932, 1767, 1740, 1636, 1238, 829 cm^{-1} . Espectro apresentado na Figura 16, pg 72.

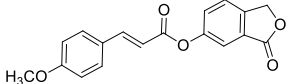
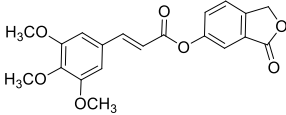
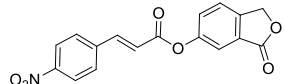
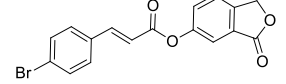
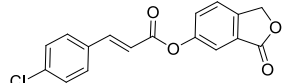
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 5,42 (s, 2H; H-2); 6,87 (d, 1H, $J=16,0$ Hz; H-2'); 7,30 (t, 2H, $J=9,0$ Hz, H-6', H-8'); 7,62 (dd, 1H, $J_1=8,4$ Hz; $J_2=2,1$ Hz, H-4); 7,60-7,60 (m, 2H; H-3', H-3); 7,87-7,92 (m, 3H; H-6,H-5',H-9'). Espectro apresentado na Figura 18, pg 74.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 70,5 (C-2); 116,5 (d, $J_{\text{C-F}}=21,8$; C-6', C-8'); 117,1 (d, $J=2,3$ Hz; C-2'); 118,4 (C-6); 124,7 (C-3); 126,8 (C-4); 128,8 (C-7); 130,9 (d, $J_{\text{C-F}}=3,1$ Hz; C-4'); 131,6 (d, $J_{\text{C-F}}=8,7$ Hz; C-5', C-9'); 145,1 (C-8); 146,1 (C-3'); 151,2 (C-5); 164,2 (d, $J_{\text{C-F}}=248,3$ Hz; C-7'); 165,7 (C-1'); 170,3 (C-1). Espectro apresentado na Figura 19, pg. 75.

*Este composto foi obtido com pureza satisfatória após purificação em coluna de sílica gel (3 colunas cromatográficas) empregando o eluente hexano/diclorometano/acetato de etila 3:2:1 v/v.

Na Tabela 2 estão apresentadas informações com respeito às quantidades das substâncias utilizadas nas reações de preparação dos ácidos, tempos de reação e rendimentos obtidos.

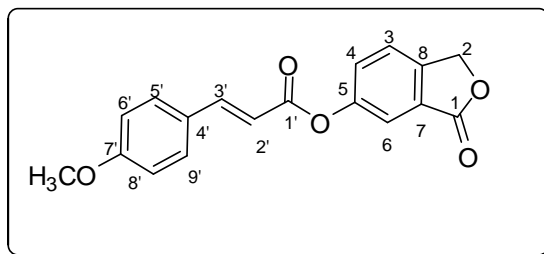
Tabela 2 – Informações relativas às reações realizadas para a preparação dos compostos **10** a **14**

Composto	ArCHO Massa (g), mmol, equivalentes	Isobenzofuranona 2 Massa (g), mmol, equivalentes	DCC Massa (g), mmol, equivalentes	DMAP Massa (g), mmol, equivalentes	Tempo (min)	Rendimento (%)
 (10)	(0,180; 1,00; 5,00)	(0,300; 2,00; 10,0)	(0,450; 2,20; 11,0)	(0,0200; 0,200; 1,00)	40	76
 (11)	(0,240; 1,00; 5,00)	(0,300; 2,00; 10,0)	(0,450; 2,20; 11,0)	(0,0200; 0,200; 1,00)	45	66
 (12)	(0,190; 1,00; 5,00)	(0,300; 2,00; 10,0)	(0,450; 2,20; 11,0)	(0,0200; 0,200; 1,00)	40	54
 (13)	(0,230; 1,00; 5,00)	(0,300; 2,00; 10,0)	(0,45; 2,20; 11,0)	(0,0200; 0,200; 1,00)	40	75
 (14)	(0,300; 1,00; 5,00)	(0,300; 2,00; 10,0)	(0,45; 2,20; 11,0)	(0,0200; 0,200; 1,00)	40	69 %

Ar = 4 – metoxifenila (**10**); 3,4,5 - trimetoxifenila (**11**); 4-nitrofenila (**12**); 4-bromofenila (**13**); 4-clorofenila (**14**).

DCC = dicioexilcarbodiimida, DMAP = 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina

2.2.2.10 - Síntese do (*E*)-3-(4-metoxifenil) propionato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila



(10)

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,35$ (hexano/diclorometano/acetato de etila 3:2:1 v/v).*

T_f: 244,0–247,1 °C.

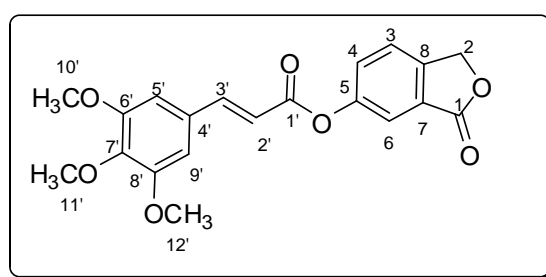
IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 2934, 2848, 1756, 1728, 1604, 1136, 822 cm^{-1} . Espectro apresentado na Figura 21, pg.116.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,81 (s, 3H; H-10'); 5,41 (s, 1H; H-2); 6,68 (d, 1H, $J=15,9$ Hz; H-2'); 7,00 (d, 2H, $J=8,7$ Hz; H-6', H-8'); 7,58-7,78 (m, 5H; H-3, H-4, H-6, H-5', H-9'); 7,84 (d, 1H, $J=15,9$ Hz; H-3'). Espectro apresentado na Figura 23, pg.118.

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 55,8 (C-10'); 70,2 (C-2); 55,7 (C-2'); 114,5 (C-2'); 115,0 (C-6', C-8'); 124,5 (C-3); 126,7 (C-4'); 126,9 (C-4); 128,9 (C-7); 130,9 (C-5', C-9'); 144,8 (C-8); 147,1 (C-3'); 151,5 (C-5); 162,1 (C-7'); 165,4 (C-1'); 170,2 (C-1). Espectro apresentado na Figura 24,5 pg.119.

* Este composto foi obtido com pureza satisfatória após purificação em coluna de sílica gel (2 colunas cromatográficas) empregando o eluente hexano/diclorometano/acetato de etila 3:2:1 v/v.

2.2.2.11 - Síntese do (*E*)-3-(3,4,5-trimetoxifenil) propionato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila



(11)

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,35$ (hexano/diclorometano/acetato de etila 3:2:1 v/v).*

T_f: 221,0-224,2 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3062, 2944, 2840, 1768, 1720, 1632, 1130, 838 cm^{-1} .

Espectro apresentado na Figura 25, pg.120.

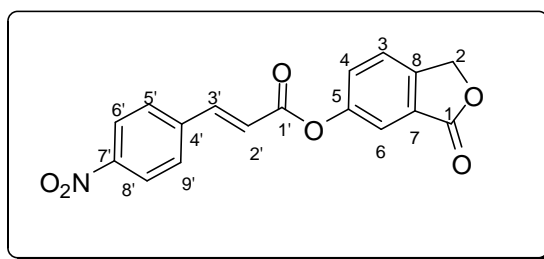
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 3,67 (s, 1H; H-11'); 3,90 (s, 1H; H-10', H-2'); 5,42 (s, 1H, H-2); 6,92 (d, 2H, $J=16,0$ Hz; H-2'); 7,17 (s, 2H; H-5', H-9'); 7,60-7,84 (m, 4H; H-3', H-3, H-4, H-6). Espectro apresentado na Figura 27, pg.122.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 56,6 (C-10',C-11'); 60,1 (C-11'); 70,0 (C-2); 106,6 (C-5,C-9); 116,3 (C-2'); 118,1 (C-6); 124,7 (C-3); 126,7 (C-4); 128,7

(C-7); 129,7 (C-4'); 140,2 (C-8); 145,0 (C-3'); 147,5 (C-7'); 151,2 (C-5); 153,5 (C-6',C-8'); 165,7 (C-1'); 170,3 (C-1). Espectro apresentado na Figura 28, pg.123.

* Este composto foi obtido com pureza satisfatória após purificação em coluna de sílica gel (3 colunas cromatográficas) empregando o eluente hexano/diclorometano/acetato de etila 3:2:1 v/v.

2.2.2.12 - Síntese do (*E*)-3-(4-nitrofenil) propionato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila



(12)

Característica: sólido amarelo.

CCD: R_f=0,40 (hexano/diclorometano/acetato de etila 3:2:1 v/v).*

T_f: 290,0–292,0 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3074, 2923, 2851, 1752, 1726, 1520, 1146, 842 cm⁻¹.

Espectro apresentado na Figura 29, pg.124.

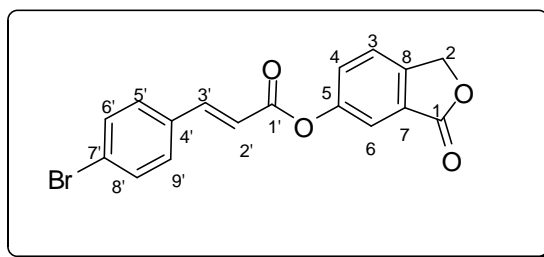
RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5,43 (s, 2H; H-2); 7,12 (d, 1H, *J*=16,2 Hz; H2'); 7,72-7,63 (m, 3H; H-3, H-4, H-6); 8,09 (d, 1H, *J*=16,2 Hz; H3'); 8,10

(d, 2H, $J=8,9$ Hz; H-5', H-9'); 8,27 (d, 2H, $J=8,9$ Hz; H-6', H-8'). Espectro apresentado na Figura 31, pg.126.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 70,3 (C-2); 118,20 (C-2'); 121,5 (C-6); 124,4 (C-6', C-8'); 124,7 (C-3); 126,6 (C-7); 128,7 (C-4); 130,1 (C-5', C-9'); 140,5 (C-8); 144,4 (C-4'); 145,2 (C-3'); 148,8 (C-7'); 151,3 (C-5); 164,6 (C-1'); 170,3 (C-1). Espectro apresentado na Figura 32, pg.127.

*Este composto foi obtido com pureza satisfatória após purificação em coluna de sílica gel (3 colunas cromatográficas) empregando o eluente hexano/diclorometano/acetato de etila 3:2:1 v/v.

2.2.2.13 - Síntese do (*E*)-3-(4-bromofenil) propionato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila



(13)

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,40$ (hexano/diclorometano/acetato de etila 3:2:1 v/v).*

T_f: 273,4-272,0 °C.

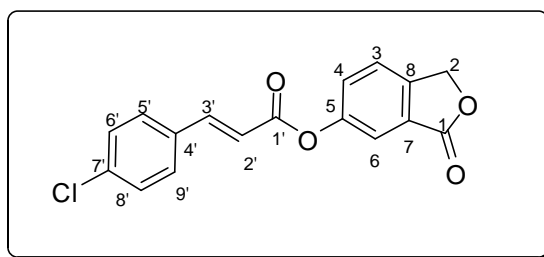
IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$. 3028, 2926, 2852, 1752, 1715, 1264, 811 cm^{-1} . Espectro apresentado na Figura 33, pg.128.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 5,42 (s, 2H; H-2); 7,94 (d, 1H, $J=16,1$ Hz; H-2'); 7,78-7,60 (m, 7H; H-3, H-4, H-6, H-5', H-6', H-8', H-9'); 7,86 (d, 1H, $J=16,1$ Hz; H-3'). Espectro apresentado na Figura 35, pg.130.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 70,1 (C-2); 118,1 (C-2'); 118,4 (C-6); 124,6 (C-7'); 124,8 (C-4); 126,7 (C-3); 128,7 (C-7); 130,9 (C-5', C-9'); 133,5 (C-6', C-8'); 133,5 (C-4'); 145,3 (C-8); 146,3 (C-3'); 151,2 (C-5); 165,4 (C-1'); 170,4 (C-1). Espectro apresentado na Figura 36, pg.131.

*Este composto foi obtido com pureza satisfatória após purificação em coluna de sílica gel (2 colunas cromatográficas) empregando o eluente hexano/diclorometano/acetato de etila 3:2:1 v/v.

do (*E*)-3-(4-clorofenil) acrilato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila



(14)

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f=0,26$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).*

T_f: 260,1-264,2 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3062, 3030, 2968, 2852, 1753, 1715, 1057, 816 cm⁻¹.

Espectro apresentado na Figura 37, pg.132.

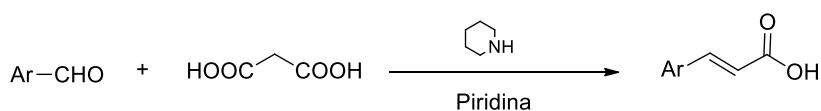
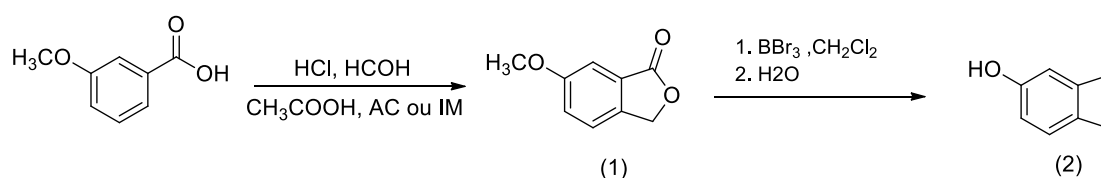
RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5,42 (s, 2H; H-2); 6,92 (d, 1H, *J*=15,9 Hz; H-2'); 7,51 (d, 2H, *J*=8,4 Hz; H-6', H-8'); 7,62 (dd, 1H; H-4, *J*₁=8,6 Hz; *J*₂=2,1 Hz; H-4); 7,69-7,75 (m, 3H; 2H; H-3, H-6); 7,83-7,91 (m, 3H, H-3', H-5, H-6'). Espectro apresentado na Figura 39, pg.134.

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 70,4 (C-2); 118,0 (C-2'); 118,4 (C-6); 124,7 (C-3); 126,7 (C-7); 128,6 (C-4); 129,4 (C-5', C-9'); 130,8 (C-6', C-8'); 133,1 (C-7'); 135,9 (C-4'); 145,0 (C-8); 146,2 (C-3'); 151,4 (C-5); 165,5 (C-1'); 170,5 (C-1). Espectro apresentado na Figura 40, pg.135.

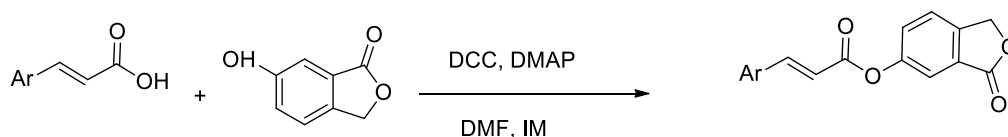
* Este composto foi obtido com pureza satisfatória após purificação em coluna de sílica gel (3 colunas cromatográficas) empregando o eluente hexano/diclorometano/acetato de etila 3:2:1 v/v.

2.3 - Resultados e discussão

Os compostos **1** a **14** sintetizados neste trabalho, foram preparados de acordo com a sequência de reações mostrada no Esquema 2.



- (3) Ar = 4 - fluorofenila
- (4) Ar = 4 - metoxifenila
- (5) Ar = 3,4,5 - trimetoxifenila
- (6) Ar = 4 - nitrofenila
- (7) Ar = 4 - bromofenila
- (8) Ar = 4 - clorofenila



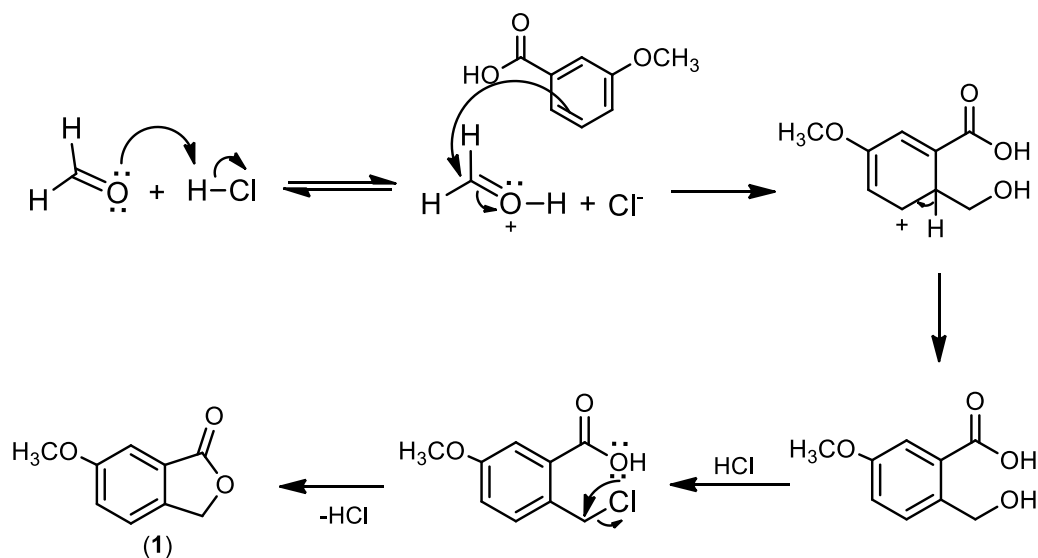
- (9) Ar = 4 - fluorofenila
- (10) Ar = 4 - metoxifenila
- (11) Ar = 3,4,5 - trimetoxifenila
- (12) Ar = 4 - nitrofenila
- (13) Ar = 4 - bromofenila
- (14) Ar = 4 - clorofenila

Esquema 2 - Reações envolvidas na preparação dos compostos **1-14**.

De acordo com a rota sintética mostrada acima no Esquema 2, a primeira etapa da síntese envolveu a reação de *orto*-alquilação do ácido 3-metoxibenzoico, resultando na obtenção da 6-metoxiisobenzofuran-1(3H)-ona (**1**) como um sólido branco após recristalização em acetona. A reação

de preparação do composto **1** foi realizada empregando-se aquecimento convencional bem como irradiação de micro-ondas. Rendimentos similares foram obtidos para os tratamentos (80% de rendimento utilizando aquecimento convencional e 78% utilizando irradiação de micro-ondas). No entanto, enquanto que para o aquecimento convencional a reação levou 16 horas para o seu término, no caso da irradiação de micro-onda, o processo foi realizado em 20 minutos irradiando-se a mistura de reação com potência de 150 W.

A formação da isobenzofuran-1(3*H*)-ona **1** a partir do ácido carboxílico pode ser racionalizada considerando-se o processo de clorometilação do ácido carboxílico seguido da reação intramolecular entre o grupo carboxila e o grupo clorometila,⁴⁴ conforme mostrado no Esquema 3.



Esquema 3 - Proposta mecanística para a obtenção da isobenzofuran-(3*H*)-ona **1**.

⁴⁴ CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Organic Chemistry. Oxford University Press: United Kingdom, Chapter 22, p. 575, 2001.

No espectro de IV do composto **1** (Figura 3, pg. 44) foi observada uma banda intensa em 1754 cm^{-1} correspondente ao estiramento do grupo carbonila enquanto que banda em 3481 cm^{-1} corresponde à harmônica da mesma. As bandas em 2953 e 2848 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico de ligação C-H para carbonos com hibridização sp^3 . A banda intensa em 1277 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C-O, enquanto que aquelas observadas em 1620 e 3085 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos das ligações C=C e =CH de anel aromático, respectivamente.

No espectro de massas de baixa resolução da Figura 4 (pg. 45) observa-se um pico em m/z 164 e que está em acordo com a massa molecular de **1** ($C_9H_8O_2$).

No espectro de RMN de 1H do composto **1** (Figura 5, pg. 46) o simpleto observado em δ_H 3,86 foi atribuído aos átomos de hidrogênio do grupo metoxila ($-OCH_3$). O simpleto em δ_H 5,26 corresponde ao sinal referente aos hidrogênios metilênicos. Já o multiplete observado em δ_H 7,22-7,38 e integrado para três átomos de hidrogênio foi atribuído aos hidrogênios aromáticos (H-4, H-5 e H-7) presentes na estrutura de **1**.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6, pg. 47) observa-se o sinal em δ_C 55,7 correspondente ao grupo metoxila ($-OCH_3$) e o sinal em δ_C 69,5 foi associado ao carbono metilênico (C-3). Os sinais para cinco dos carbonos aromáticos foram observados em δ_C 107,4 (C-7), 122,8 (C-5), 123,0 (C-4), 126,9 (C-8) e 138,8 (C-9). O sinal em δ_C 160,5 corresponde ao átomo de carbono do anel aromático ligado diretamente ao grupo metoxila (C-6)

enquanto que o sinal em δ_c 171,2 foi atribuído ao átomo de carbono carbonílico (C-1).

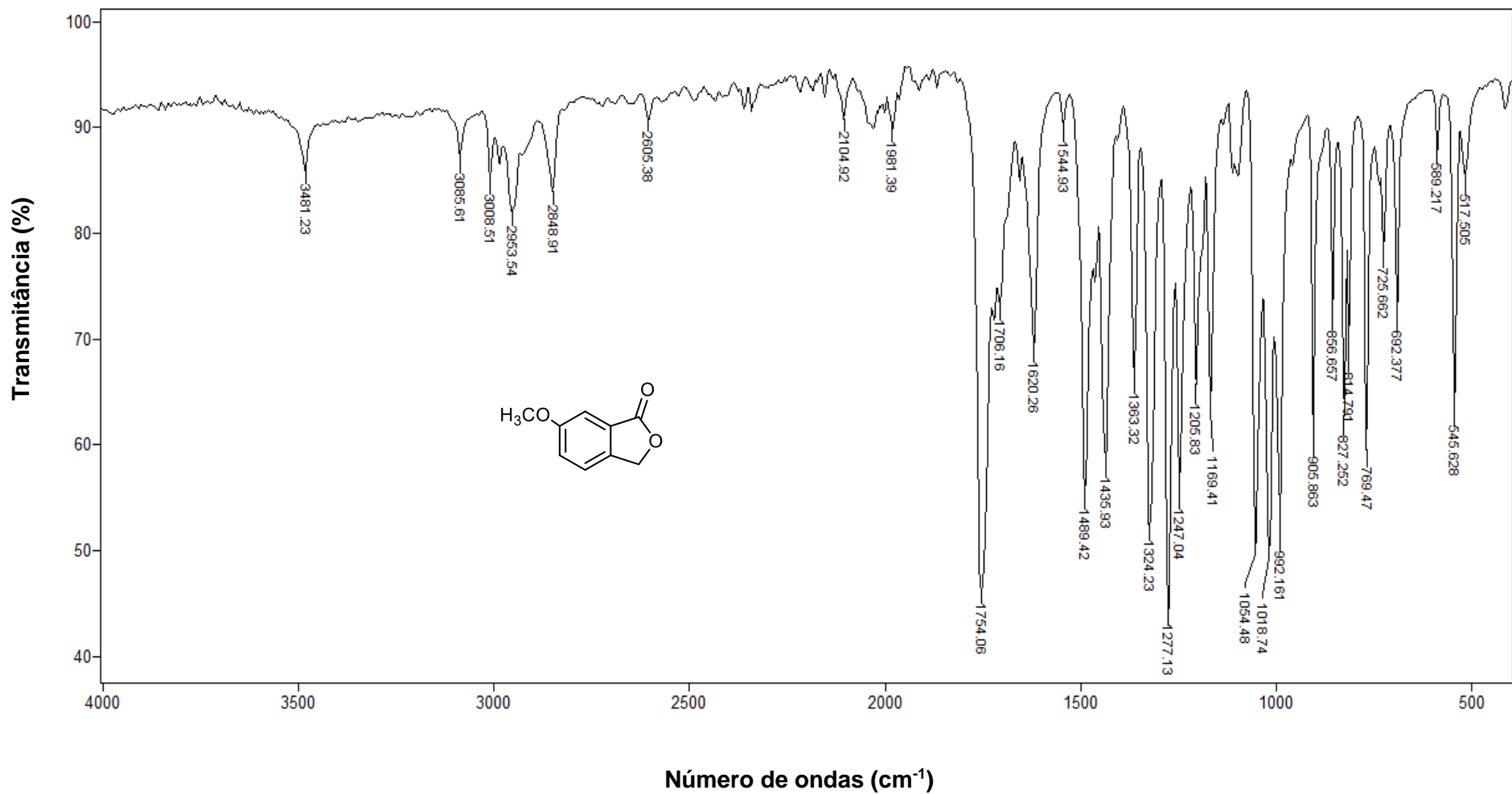


Figura 3 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 1.

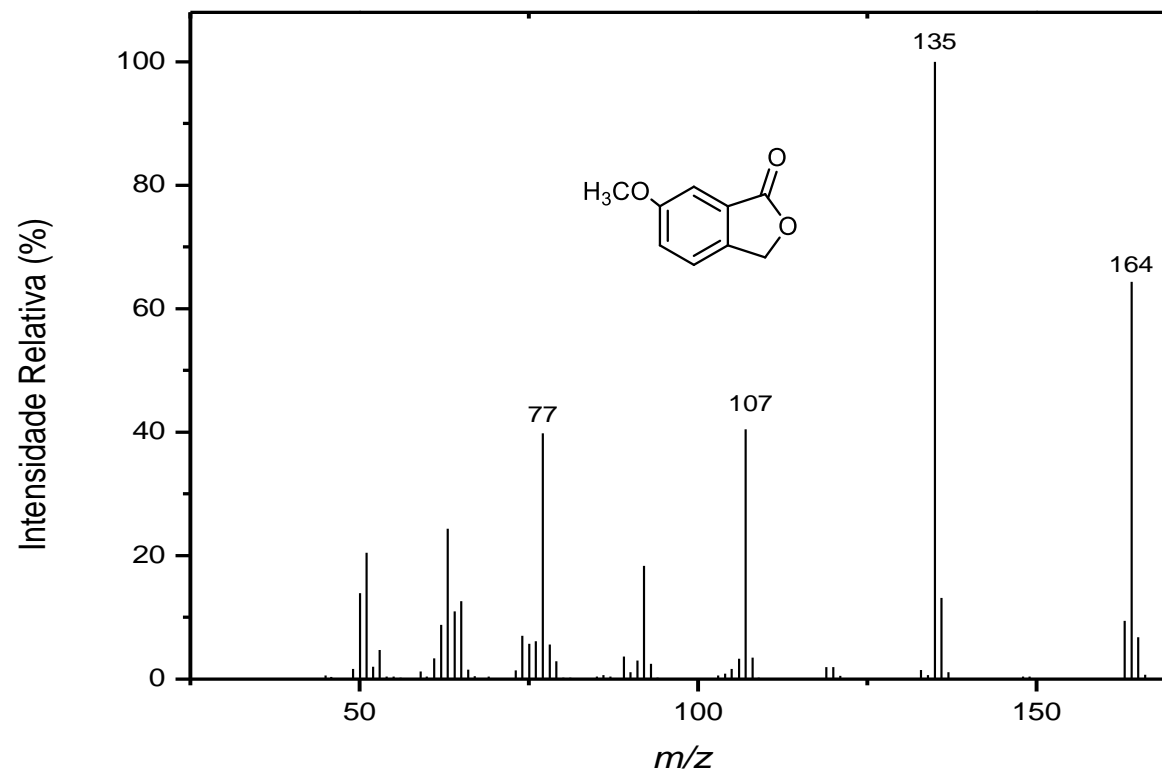


Figura 4 - Espectro de massas do composto 2.

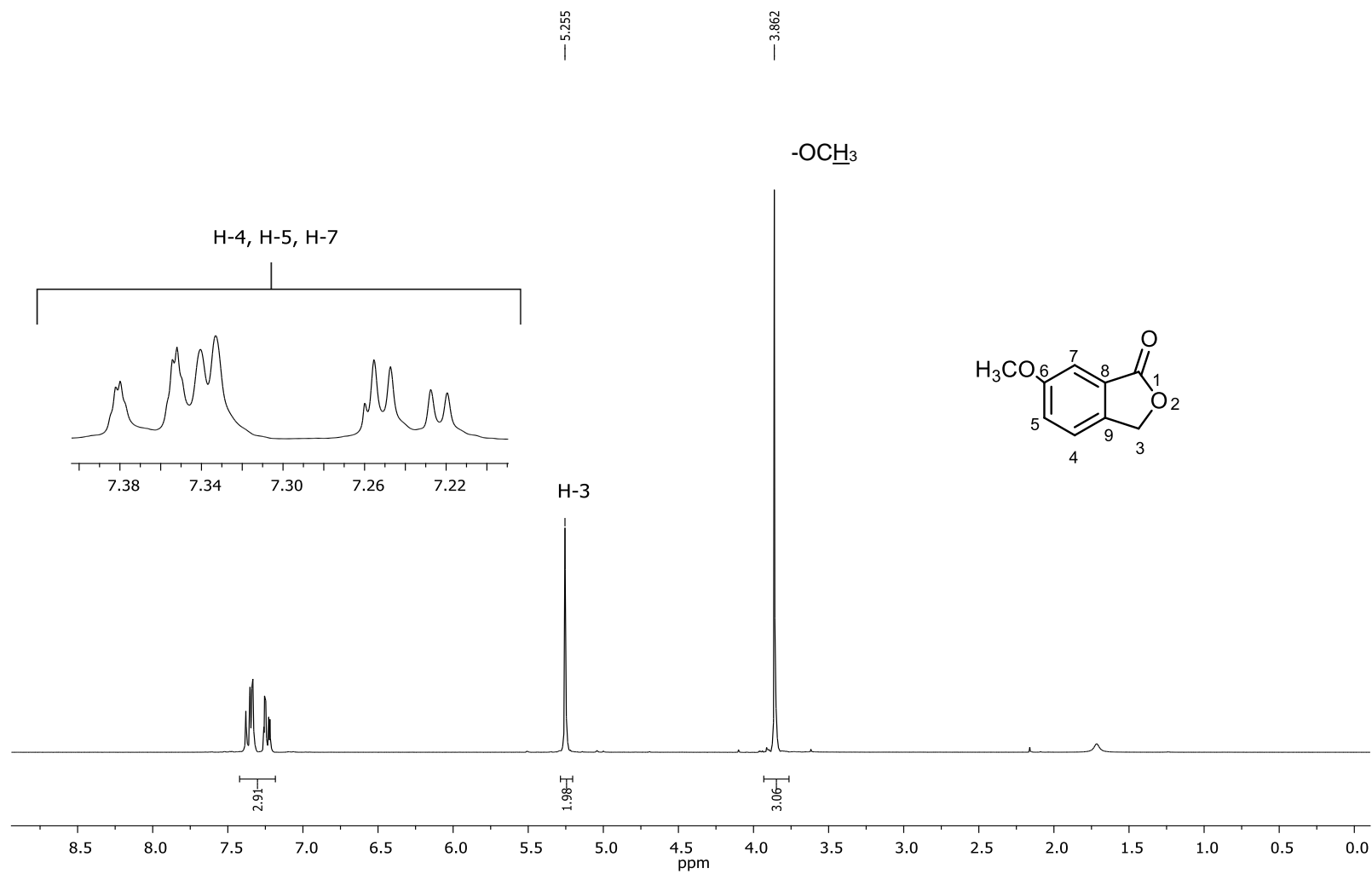


Figura 5 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto 1.

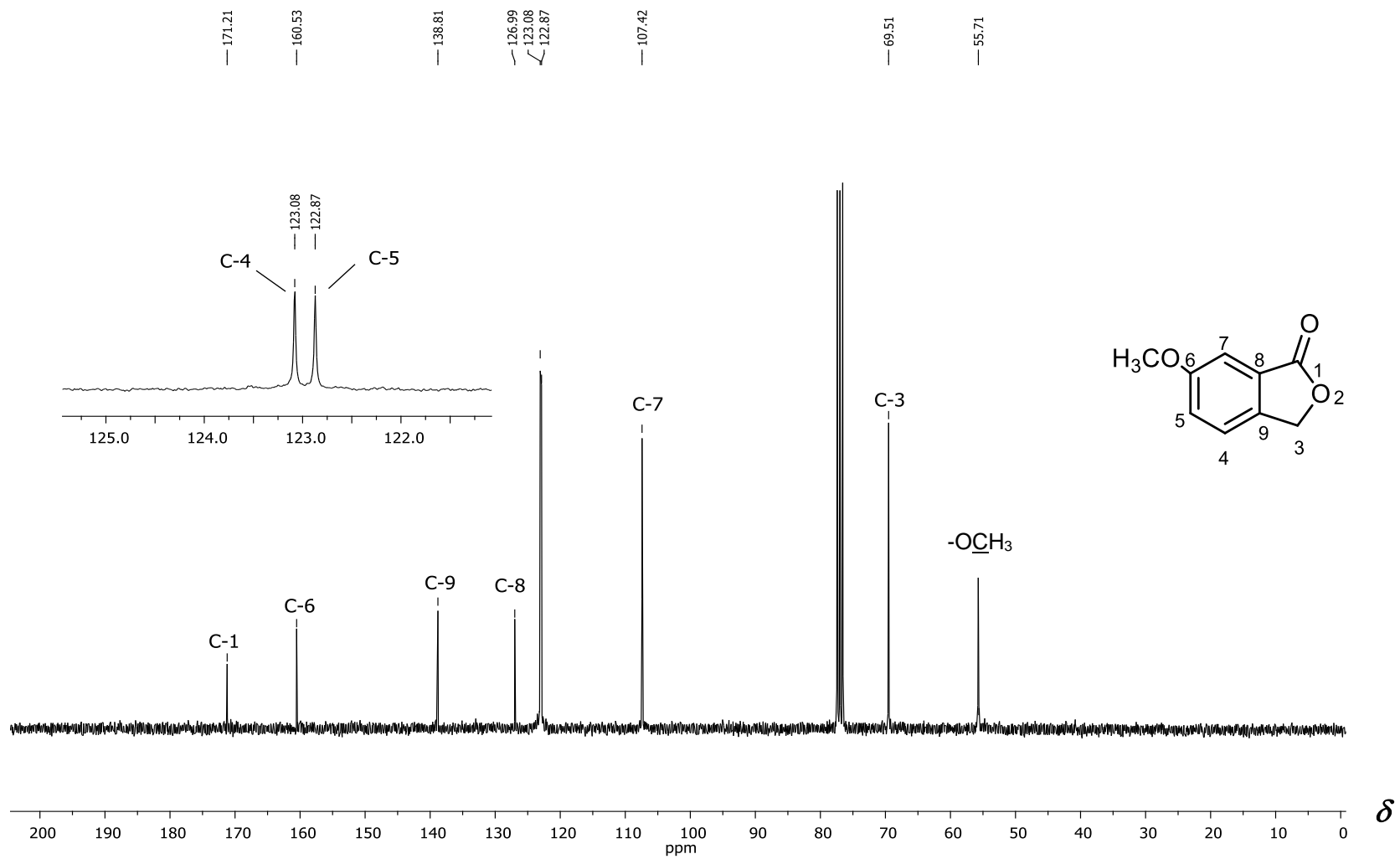
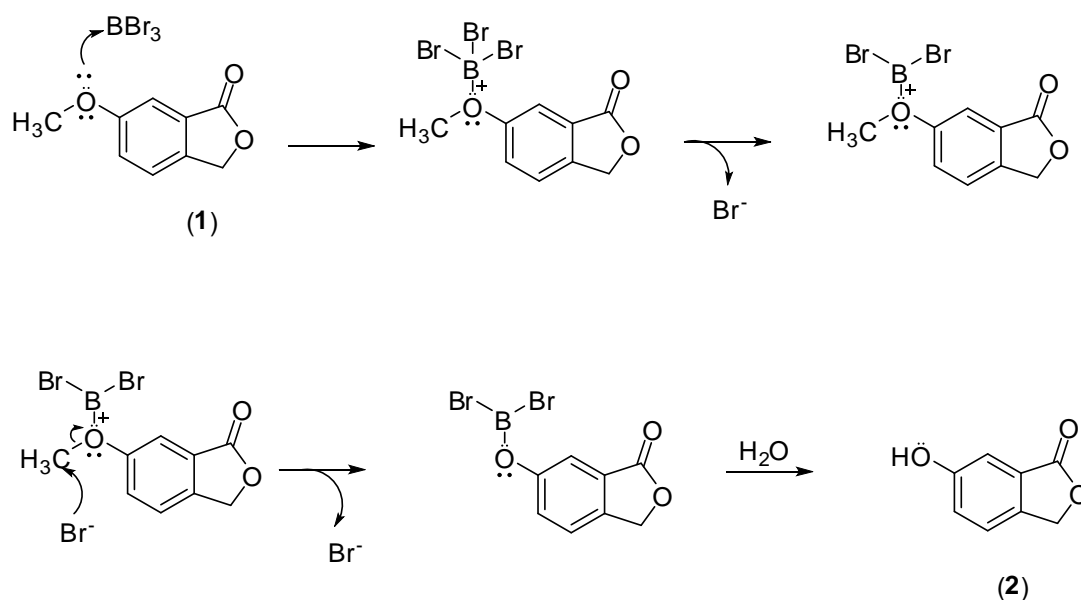


Figura 6 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 1.

Uma vez obtida, a conversão da isobenzofuran-1(3*H*)-ona **1** no derivado hidroxilado **2**, com 99% de rendimento, foi realizada via tratamento de **1** com BBr₃. Salieta-se que a desmetilação mediada por BBr₃ (tribrometo de boro) consiste em uma metodologia bastante eficaz e é amplamente utilizada para promover a clivagem de éteres.⁴⁵ No Esquema 4 está apresentada uma proposta mecanística para o processo de desmetilação do composto **1** utilizando-se BBr₃, resultando na formação da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**2**).⁴⁶



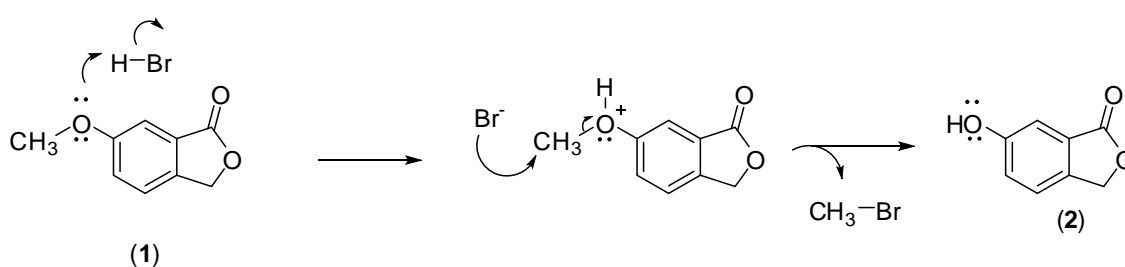
Esquema 4 - Proposta mecanística para a obtenção da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**2**).

⁴⁵ PASQUINI, C.; CONIGLIO, A.; BASSETI, M. Controlled dealkylation by BBr₃: efficient synthesis of *para*-alkoxy-phenols. *Tetrahedron Letters*, v. 53, p. 6191-6194, 2012.

⁴⁶ CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Organic Chemistry. Oxford University Press: United Kingdom, 2001, Chapter 17, p. 434.

Apesar de bastante eficiente para promover a clivagem de éteres metílicos, o BBr_3 apresenta como desvantagem o seu custo elevado sendo ainda um reagente que requer cuidados especiais durante sua manipulação. Considerando estes fatos, buscou-se uma metodologia alternativa para promover a desmetilação do composto **1**. Optou-se pela utilização do HBr (48% m/v). Cabe destacar que dentre as metodologias descritas na literatura para promover a clivagem de éteres, a utilização de HBr data de 1898.⁴⁷ O processo de desmetilação de **1**, na presença de HBr , foi realizado sob irradiação de micro-ondas, obtendo-se o rendimento de 54% irradiando a mistura de reação com uma potência de 150 W durante 20 minutos. Tentativas de clivagem de **2** com HBr utilizando aquecimento convencional foram infrutíferas.

No Esquema 5 está apresentada uma proposta mecanística para o processo de desmetilação do composto **1** utilizando-se HBr , resultando na formação da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**2**).



Esquema 5 - Proposta mecanística para a obtenção da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**2**).

Analisando o espectro no infravermelho do composto **2** (Figura 7, pg.53) observa-se a presença de uma banda larga em 3214 cm^{-1}

⁴⁷ Jr. Burwell, R. L. The cleavage of ethers. *Chemical Reviews*, v. 54, p.622-630, 1954.

correspondente ao estiramento do grupo OH. A presença dessa banda larga correspondeu a uma evidência de que a reação de desmetilação foi bem sucedida, indicando assim que o composto **2** havia sido obtido com sucesso. A banda forte em 1722 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C=O de éster. As bandas em 1598 e 1505 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos da ligação C=C de anel aromático.

O Espectro de massas (Figura 8, pg.54) apresentou o pico em m/z 150 (pico do íon molecular), compatível com a fórmula do composto **2** ($\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3$).

No espectro de RMN de ^1H do composto **2** (Figura 9, pg.55) o sinal para os átomos de hidrogênio ligados diretamente ao carbono sp^3 foram observados como um simpleto, integrado para dois hidrogênios em δ_{H} 5,26. O multiplete observado em δ_{H} 7,16-7,19, integrado para dois hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios (H-7 e H-5). O duplete em δ_{H} 7,40 (um hidrogênio) foi atribuído ao átomo H-4. Os hidrogênios H-7 e H-5 encontram-se mais blindados do que o átomo H-4 devido à presença do grupo hidroxila ligado ao carbono vizinho a esses hidrogênios. Esse grupo OH, devido à deslocalização de elétrons, provoca um aumento na densidade eletrônica nos átomos de carbono C-5 e C-7 resultando numa maior blindagem dos hidrogênios ligados a esses carbonos.

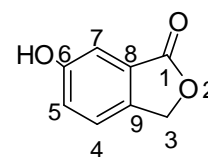
Com relação ao espectro de RMN de ^{13}C do composto **2** (Figura 10, pg.56), observa-se o sinal do grupo carbonila em δ_{C} 172,5. O sinal em δ_{C} 70,1 corresponde ao carbono sp^3 . O sinal em δ_{C} 158,6 foi atribuído ao carbono aromático ligado diretamente ao grupo hidroxila (C-6). Os demais sinais observados no espectro estão relacionados aos carbonos aromáticos

restantes em δ 109,6 (C-7), 122,7 (C-5), 123,2 (C-4), 126,5 (C-8), 138,3 (C-9).

Cabe destacar que os dados das espectroscopias de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos neste trabalho para o composto **2** estão em completo acordo com dados descritos na literatura. Nas Tabelas **3** e **4** (pg. 52) são apresentados os dados espectroscópicos de RMN determinados experimentalmente neste trabalho em comparação com os dados descritos na literatura.⁴⁸

Tabela 3 - Comparação entre os dados de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto **2** obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura

Atribuição	δ	δ^*	J	J^*	Mult.	Mult.*
H-3	5,26	5,25	-	-	s	s
H-7	7,18	7,18	-	-	m	m
H-5	7,16	7,15	-	-	m	m
H-4	7,40	7,39	9,0	9,0	d	d

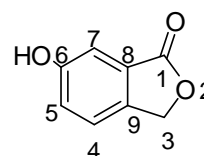


*Valores descritos na literatura (TEIXEIRA *et al.*, 2014): RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD).

⁴⁸ TEIXEIRA, R. R.; PEREIRA, J. L.; DA SILVA, S. F.; GUILARDI, S.; PAIXÃO, D. A.; ANCONI, C. P. A.; DE ALMEIDA, W. B.; ELLENA, J.; FORLANI, G. Synthesis, characterization and phytotoxic activity of hydroxylated isobenzofuran-1(3H)-ones. *Journal of Molecular Structure*, v. 1061, p. 61-68, 2014.

Tabela 4 - Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto **2** obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura

Atribuição	δ	δ^*
C-1	172,5	172,5
C-3	70,1	70,1
C-4	123,2	123,3
C-5	122,7	122,8
C-6	158,6	158,6
C-7	109,6	109,7
C-8	126,5	126,6
C-9	138,3	138,8



*Valores descritos na literatura (TEIXEIRA *et al.*, 2014): RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD).

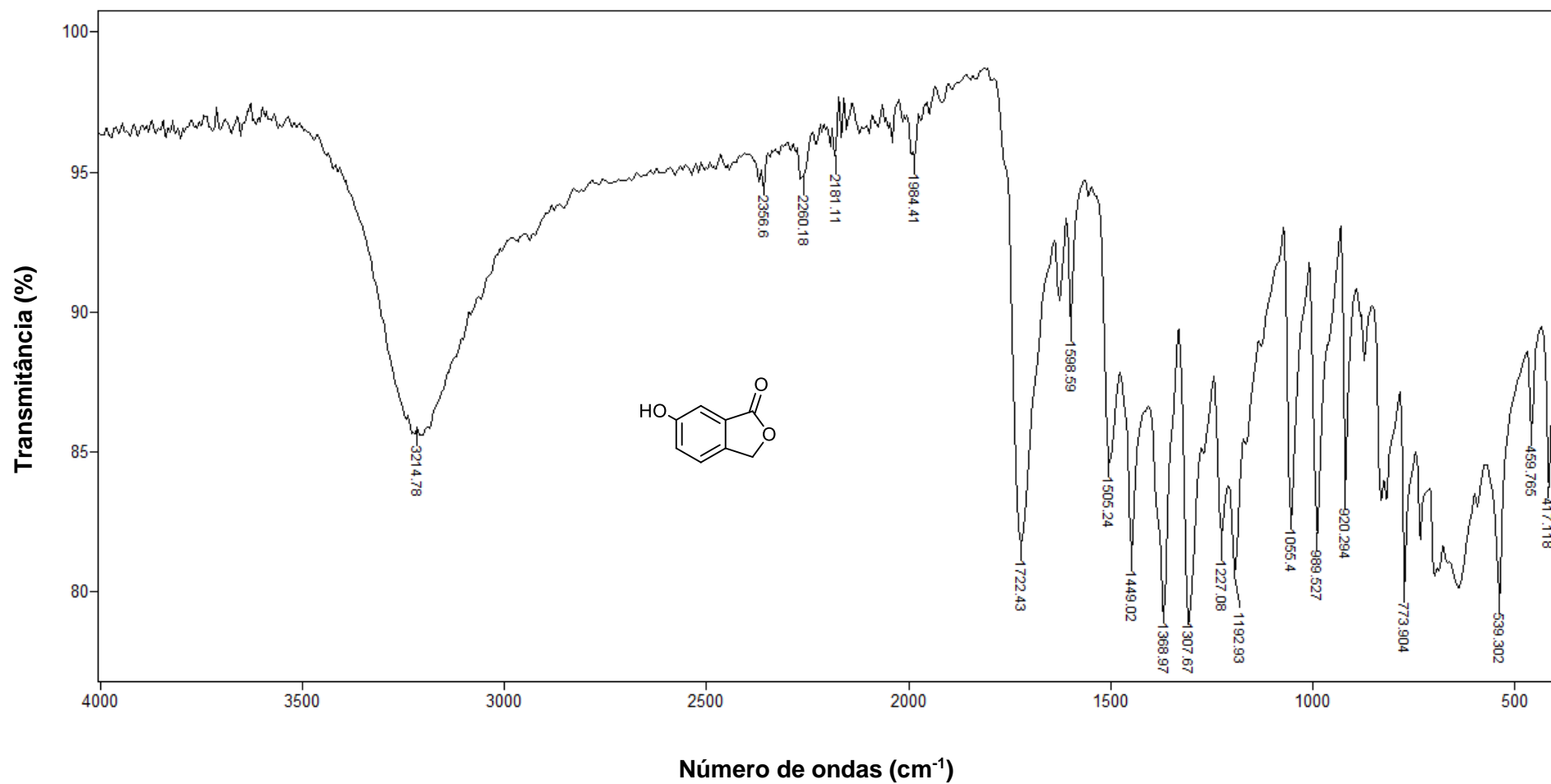


Figura 7 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 2.

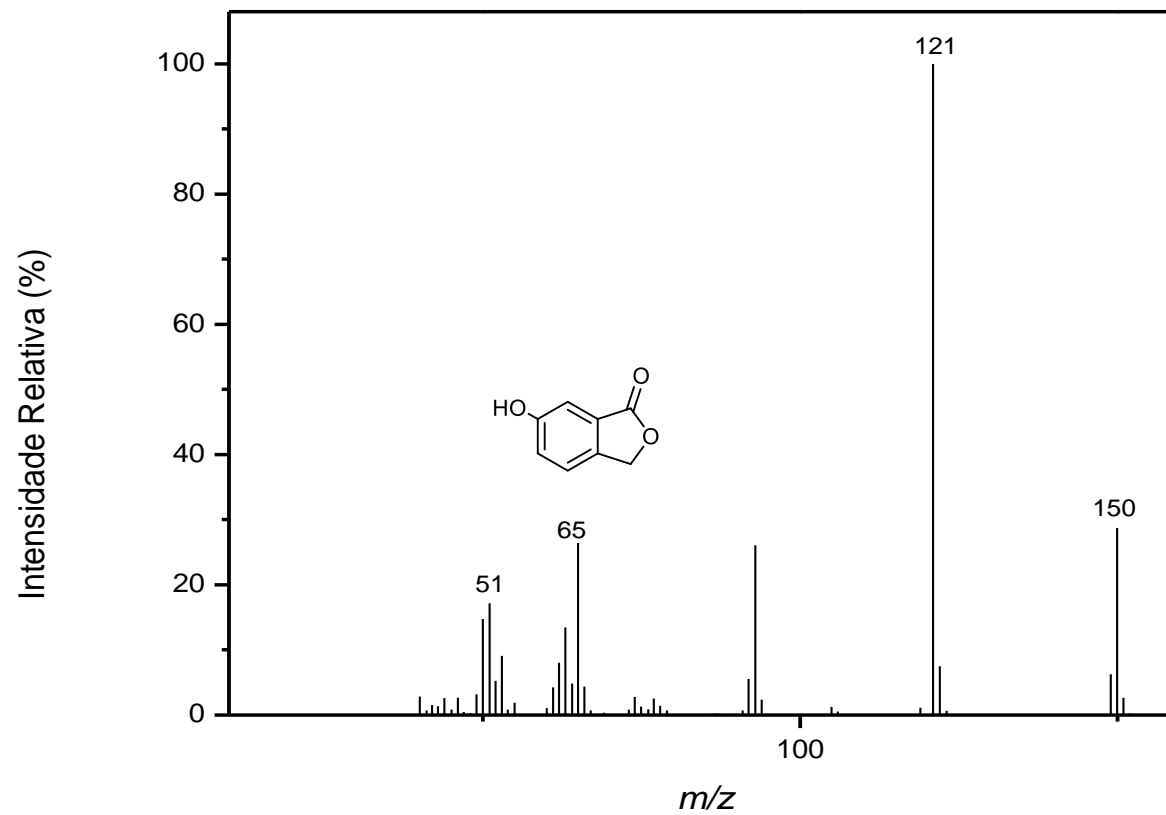


Figura 8 - Espectro de massas do composto 2.

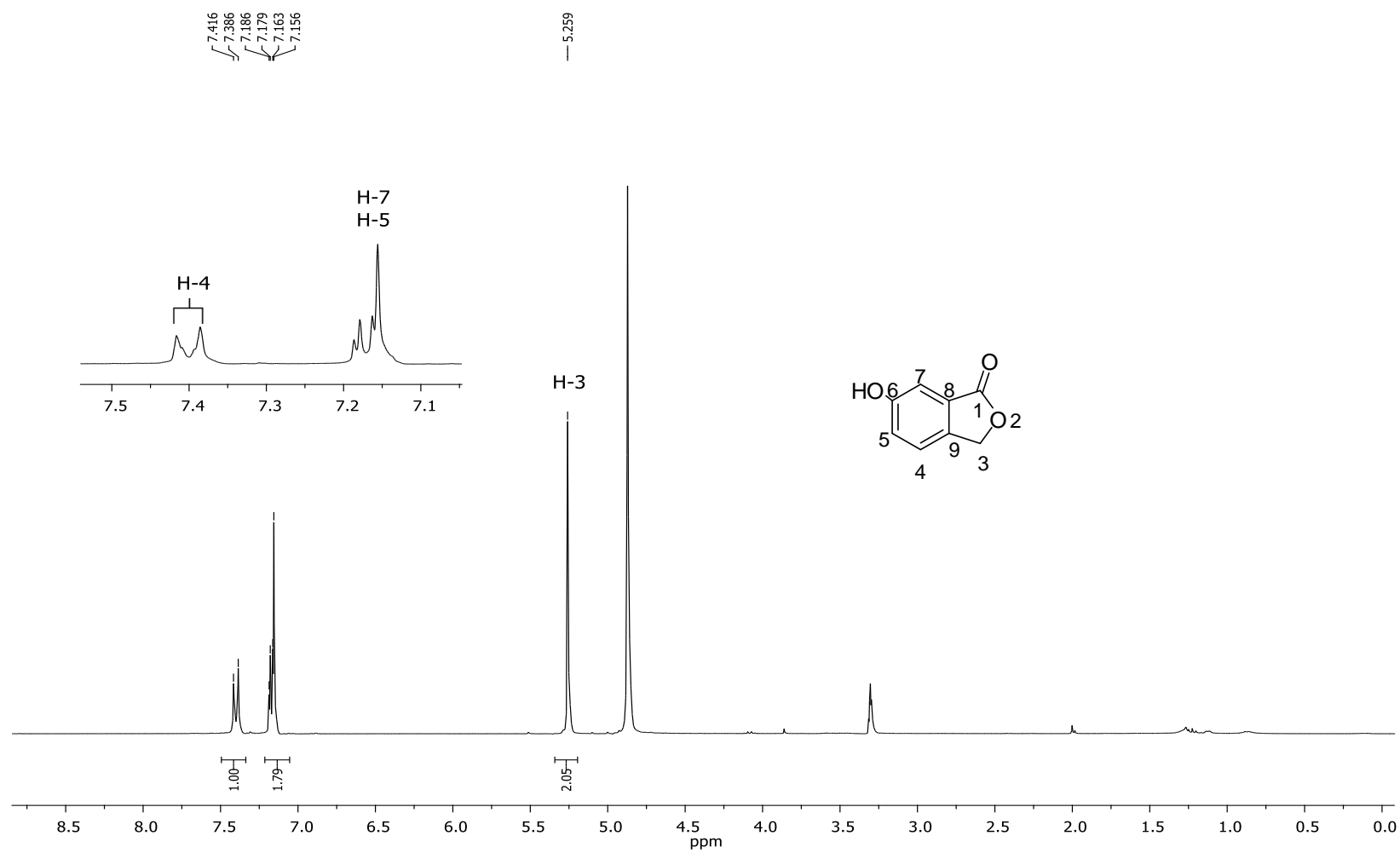


Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto 2.

δ

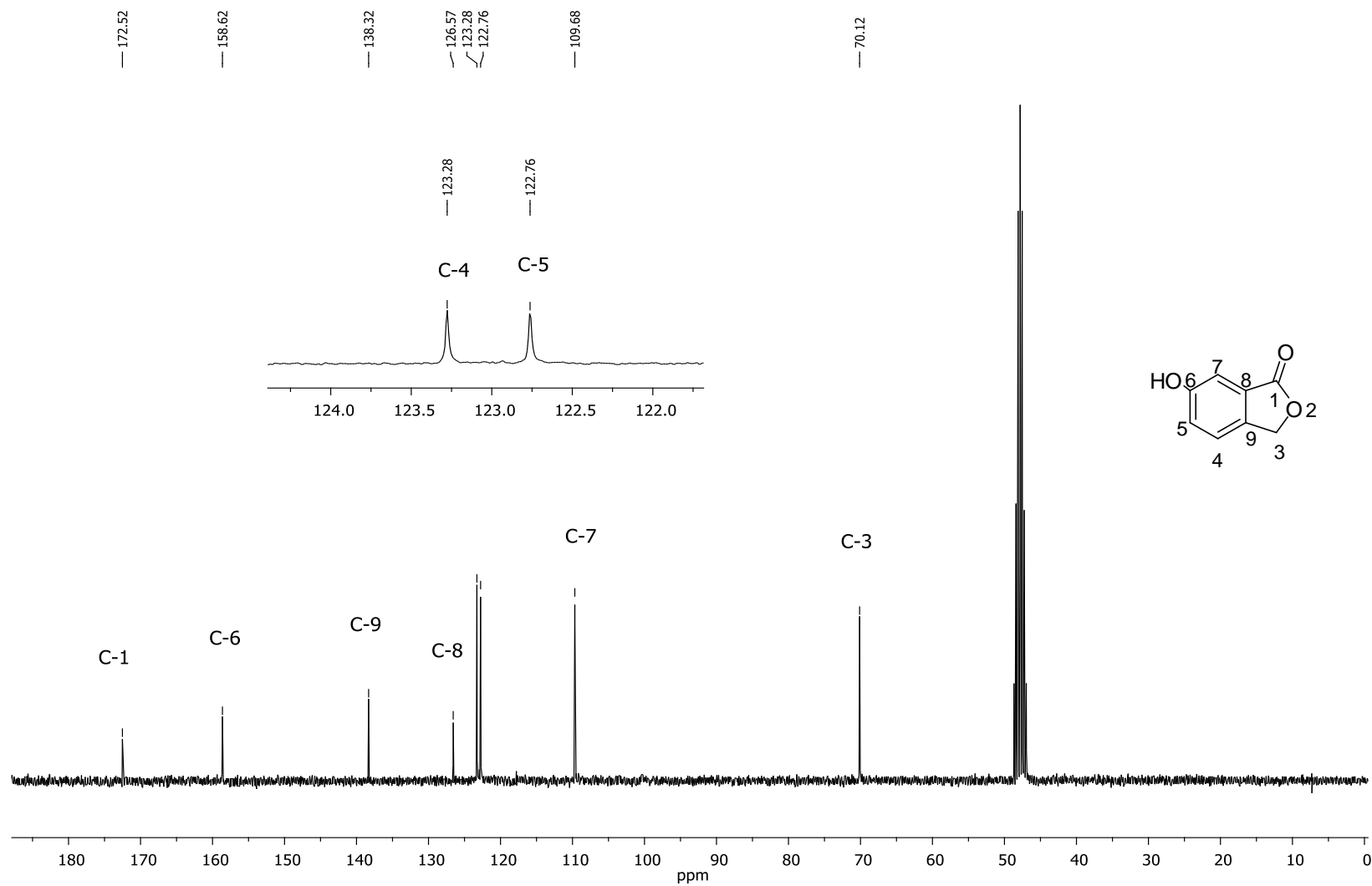


Figura 10 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto **2**.

Conforme mostrado no Esquema 1 (pg.13), o plano sintético para obtenção dos cinamatos contendo o núcleo isobenzofuranona requer a condensação entre derivados do ácido cinâmico e a isobenzofuranona **2**. Assim, buscou-se a preparação de derivados do ácido cinâmico contendo diferentes substituintes ligados ao anel benzênico desses derivados.

A reação utilizada para a obtenção dos compostos **3** a **8** consistiu na condensação de Knoevenagel. Esta metodologia foi descrita primeiramente por Emil Knoevenagel em 1894 e corresponde à reação entre compostos dicarbonilados e aldeídos ou cetonas, na presença de uma base fraca resultando em compostos α,β -insaturados ou compostos relacionados.⁴⁹ Vários são os exemplos da literatura onde a reação de Knoevenagel teve papel importante como na síntese do diterpeno sarcodictyin A, que possui atividade antitumoral,⁵⁰ e na síntese da lumenfantrina que possui atividade antimalárica (

Figura 11, pg.58).⁵¹

⁴⁹KÜRTI, L.; CZAKÓ, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis: Background and*

Detailed Mechanisms. Pennsylvania. Elsevier, 2005. p.595.

⁵⁰ NICOLAU, K. C.; XU, J. Y.; Kim, S.; OHSHIMA, T.; HOSOKAWA, S.; PFEFFERKORN, J. Synthesis of the tricyclic core of eleutherobin and sarcodictyins and total synthesis of Sarcodictyin A. *Journal of the American Chemical Society*, v.119, p. 11353-11354, 1997

⁵¹BEUTLER, U.; FUENFSCHILLING, P., C.; STEINKEMPER, A. An improved manufacturing process for the antimalaria drug coartem. *Organic Process Research & Development*, v.11, p. 341–345, 2007.

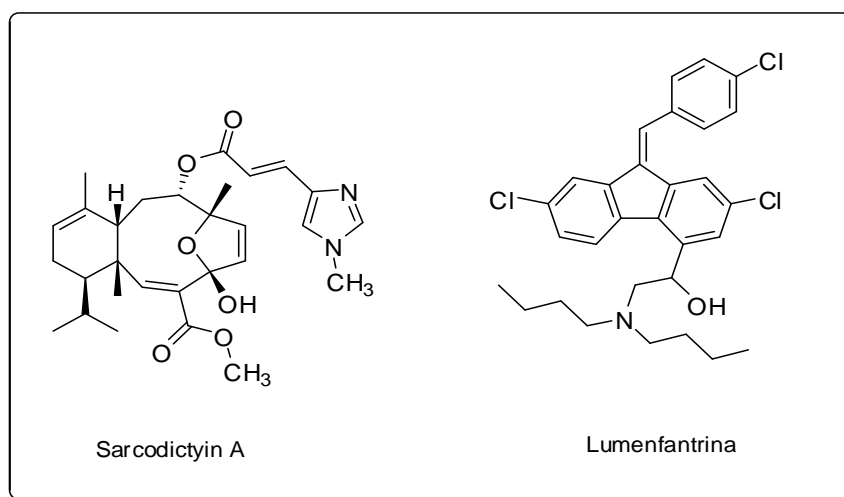
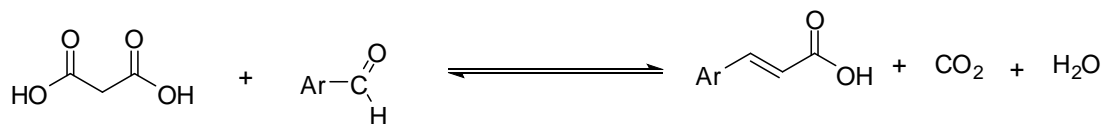
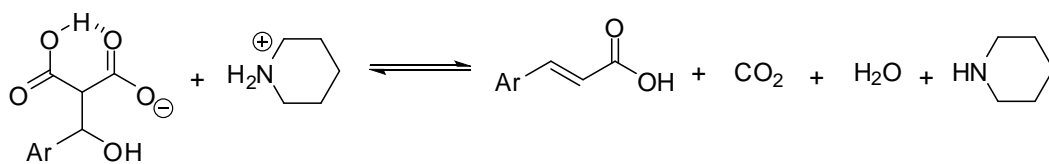
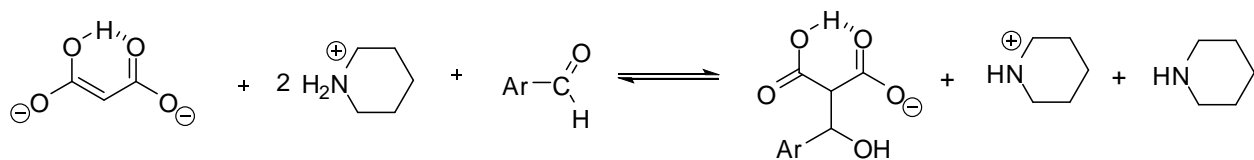
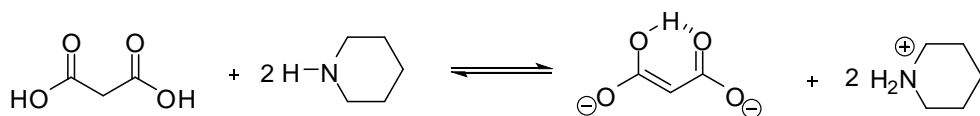


Figura 11 – Estruturas dos compostos sarcodictyln A e lumenfantrina.

A aplicação da condensação de Knoevenagel permitiu a síntese dos derivados do ácido cinâmico sob aquecimento convencional assim como irradiação de micro-ondas, levando a formação dos produtos com estereoquímica *trans*, apresentando rendimentos sinteticamente úteis. As substâncias **3** a **8** foram obtidas com rendimentos variando entre 71 e 95%. Os compostos resultaram da reação entre diferentes aldeídos aromáticos e o ácido malônico. O Esquema 6 (pg.59) as etapas envolvidas na conversão dos aldeídos aromáticos e do ácido malônico nos correspondentes ácidos **3** a **8**.



Ar = 4 - metoxifenila (**4**); 3,4,5 - trimetoxifenila (**5**); 4-nitrofenila (**6**); 4-bromofenila (**7**); 4-clorofenila (**8**).

Esquema 6 – Etapas envolvidas na formação dos compostos **3-8**.

Dentre os ácidos sintetizados, o composto **3** foi obtido com rendimentos de 93% (aquecimento convencional) e 95% (irradiação de microondas) após recristalização em etanol. No espectro IV do composto **3** (Figura 12, pg. 63) a banda de absorção entre 3060-2538 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação OH do grupo carboxila. A banda em 1690 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento do grupo carbonila enquanto que aquela observada em 1627 cm^{-1} é devida ao estiramento C=C. A banda em 1228 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento assimétrico de =C-O e a banda em 828 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular fora do plano de C-H.

No espectro de massas (Figura 13, pg 64) o pico em m/z 166 corresponde ao pico do íon molecular e está em acordo com a fórmula molecular do composto **3** ($\text{C}_9\text{H}_7\text{FO}_2$).

Com respeito ao espectro de RMN de ^1H do composto **3** (Figura 14, pg 65) observou-se um sinal em δ_{H} 6,44 na forma de um duplete integrado para um hidrogênio correspondente ao átomo de hidrogênio H-8 cuja constante de acoplamento apresentou valor igual a 15,9 Hz. Esse valor de constante de acoplamento é característico para átomos de hidrogênio numa relação *trans* em uma ligação dupla, confirmando assim a sua estereoquímica.⁵² O tripleto em δ_{H} 7,14, cuja constante de acoplamento apresentou valor igual a 8,7 Hz, foi atribuído aos átomos H-3, H-5. Esse valor da constante de acoplamento é característico para o acoplamento *orto* de hidrogênios em anéis aromáticos substituídos⁵³. O multiplete em δ_{H} 7,63-

⁵² PAVIA, D. L. LAMPMAN, G. M. KRIZ, G. S. VYVYAN, J. R. Introdução a espectroscopia. 4ª ed. São Paulo: Editora Cengage Learning, 2010. 687p.

⁵³ CLERCK, P.; SIMON, S. Tables of spectral data for structure determination of organic compounds. Berlin, 1989, p-H245.

7,68 integrado para quatro hidrogênios está associado aos átomos H-7, H-6 e H-2.

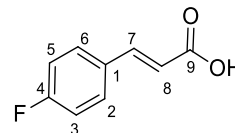
O hidrogênio H-7 apresenta um valor deslocamento químico maior em relação a H-8 devido à deslocalização de elétrons da ligação dupla com o grupo carbonila. Esse efeito eletrônico leva a uma diminuição da densidade eletrônica no átomo C-7 e consequente desblindagem de H-7 em relação a H-8.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 15, pg. 66) observa-se o sinal correspondentes ao grupo carbonila em δ 168,6 (C-9) . O duplete em δ 163,8 ($J=248,3$ Hz) correspondente ao carbono ligado diretamente ao átomo de flúor. Devido ao efeito indutivo retirador de elétrons exercido pelo flúor, esse átomo de carbono encontra-se mais desblindado se comparado aos demais átomos de carbono do anel aromático, o que justifica o maior valor de deslocamento químico observado. Os sinais em δ 117,9 e 143,4 correspondem aos carbonos C-7 e C-8 respectivamente. Os demais sinais correspondem aos carbonos aromáticos em δ 130,0 (d, $J=3,8$ Hz; C-1); 129,9 (d, $J=8,4$ Hz; C-2/C-6); 115,5 (d, $J=21,8$ Hz; C-3/C-5). Ressalta-se que o valores de acoplamento estão de acordo com os valores descritos na literatura.^{43,54} Na Tabela 5 (pg. 62) são apresentados os valores de constante de acoplamento C-F determinados experimentalmente neste trabalho em comparação com os dados descritos na literatura.^{52,53,54}

⁵⁴ KOUTENTIS, P., A.; RESS, W., C. Reaction of Herz salts with malononitrile: a general route to (6H-1,2,3-benzodithiazol-6-ylidene) malononitriles. *Journal of the Chemical Society*. 2002, p. 315–319.

Tabela 5 - Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto **3** obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura

Atribuição	δ	J	J^*	Mult.	Mult.*
C-1	130,0	3,8 Hz	3,2 Hz	d	d
C-2/C-6	129,9	8,3 Hz	7,8 Hz	d	d
C-3/C-5	115,5	21,8 Hz	21 Hz	d	d
C-4	163,8	248,3 Hz	245,1 Hz	d	d



*Valores descritos na literatura^{7,8} para os valores de acoplamento C-F.

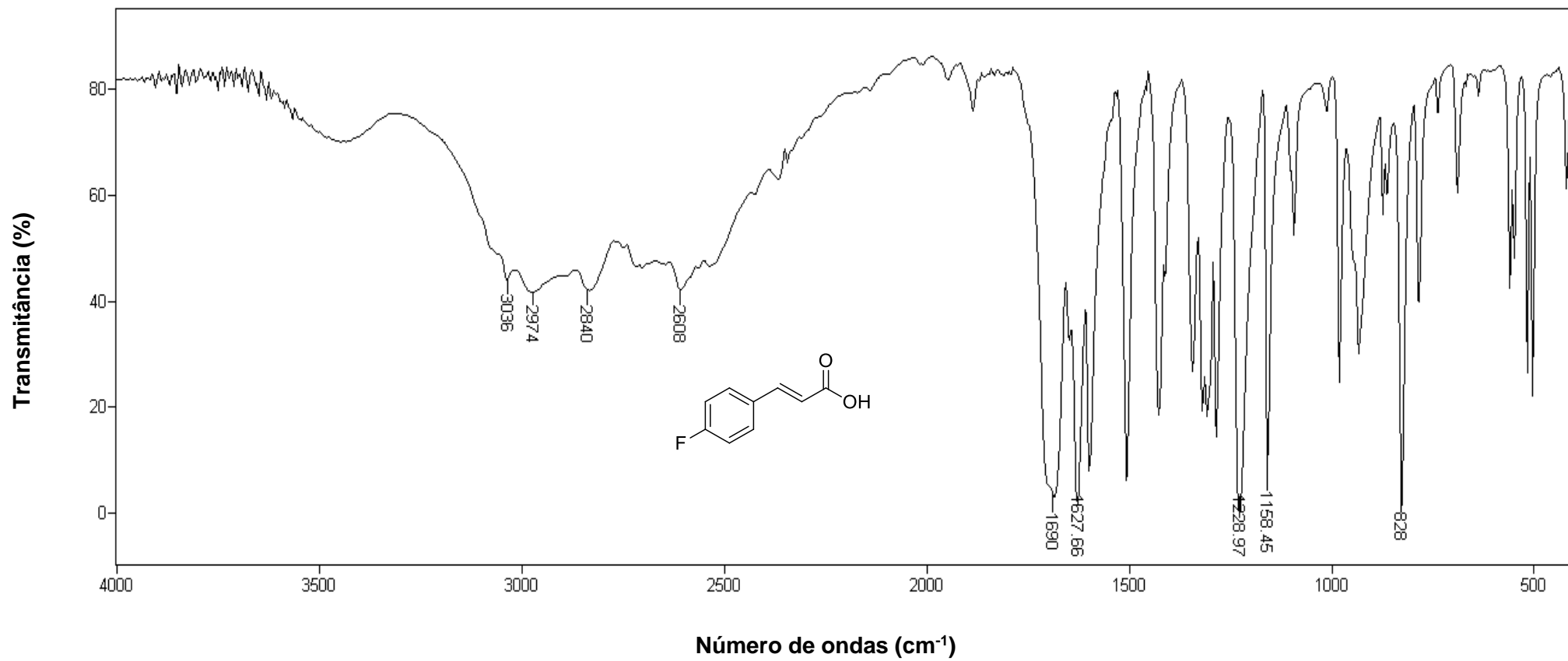


Figura 12 - Espectro no infravermelho (KBr) para o composto 3.

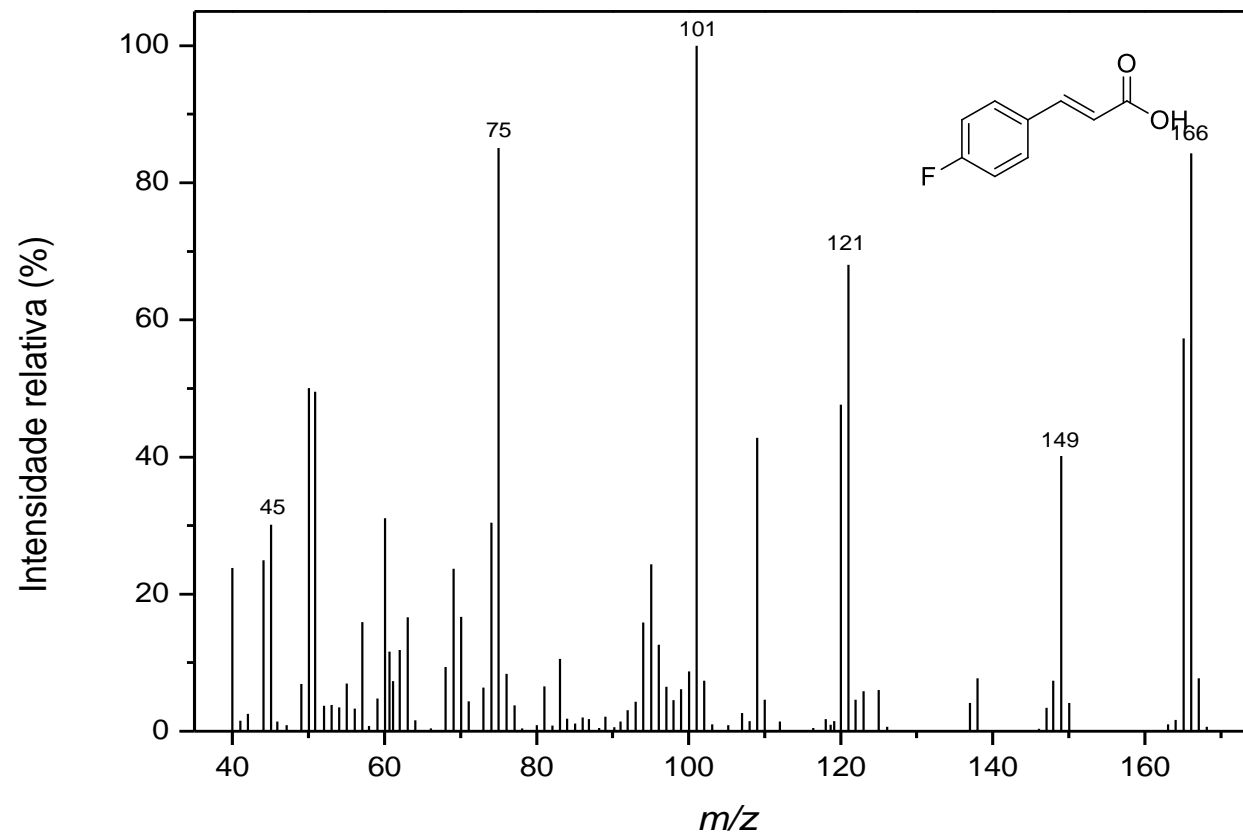


Figura 13 - Espectro de massas do composto 3.

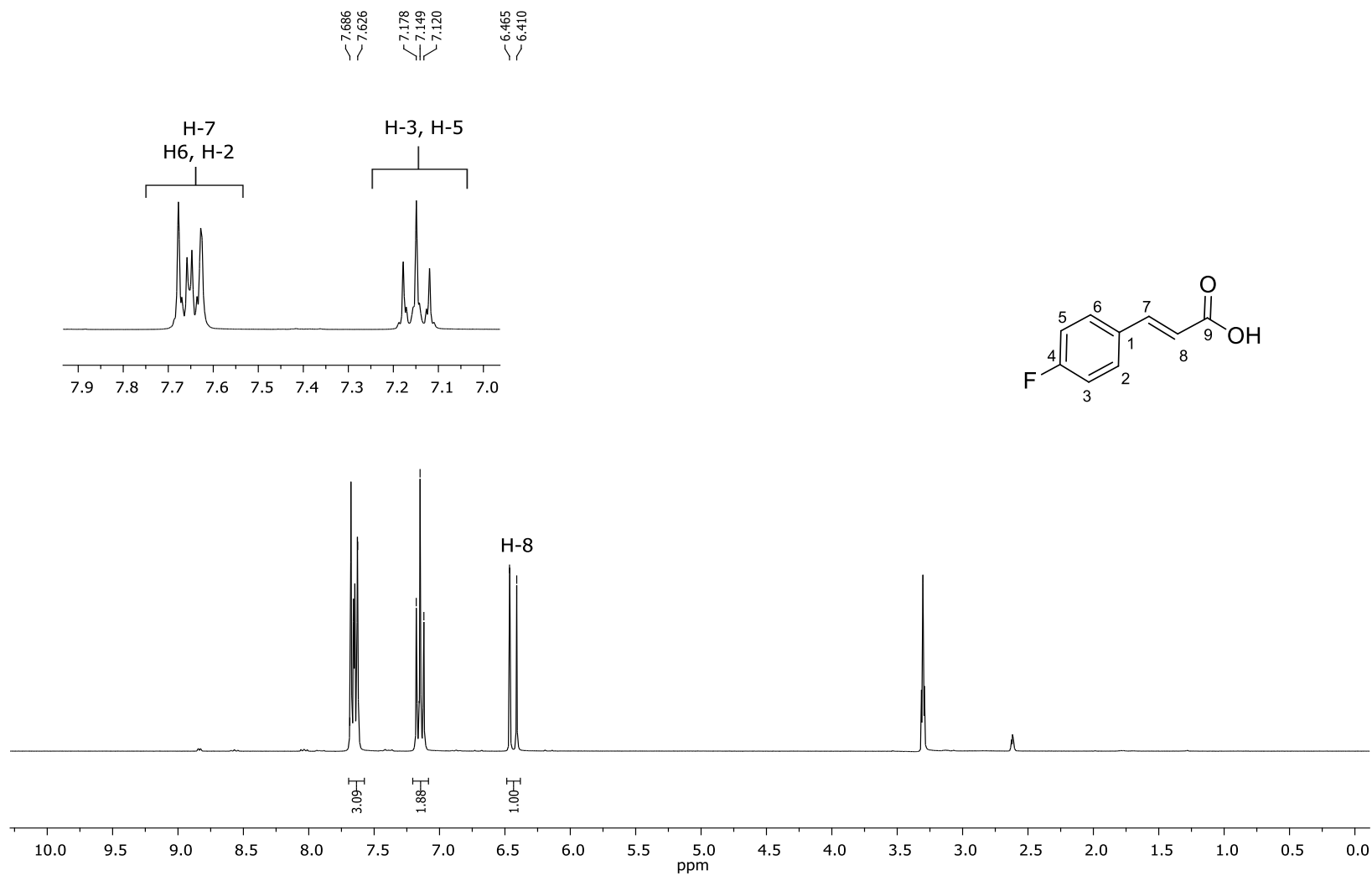


Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) para o composto **3**.

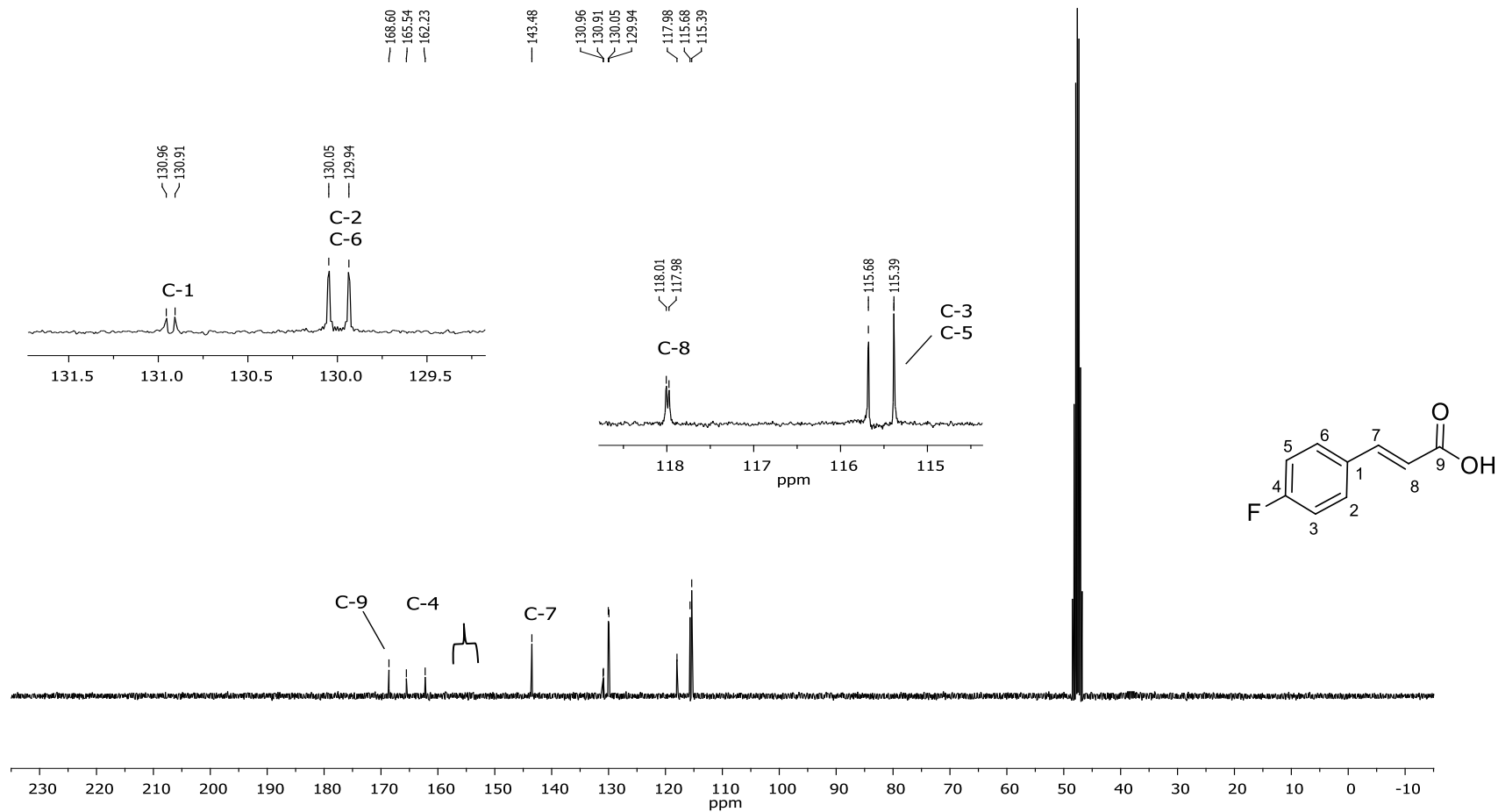


Figura 15 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) para o composto **3**.

Tendo assegurada a preparação dos compostos **2** e **3** a **8** (Figura 1, pg. 57), buscou-se a síntese dos derivados do ácido cinâmico contendo o núcleo isobenzofuranona **9** a **14** (Figura 1, pg. 57). Para este fim, empregou-se a reação de esterificação de Steglich. Esta metodologia foi descrita primeiramente por Wolfgang Steglich em 1978⁵⁵ e consiste em uma adaptação do método de obtenção de amidas utilizando DCC. A esterificação de Steglich utiliza como reagente de acoplamento a *N,N*-dicicloexilcarbodiimida (DCC) e a 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina como catalisador (ZWEIFEL e NANTZ, 2007).⁵⁶ Esta reação ocorre geralmente em temperatura ambiente e utiliza diclorometano como solvente. Outro reagente de acoplamento que também é comumente empregado na esterificação de Steglich é a diisopropilcarbodiimida (DIC).

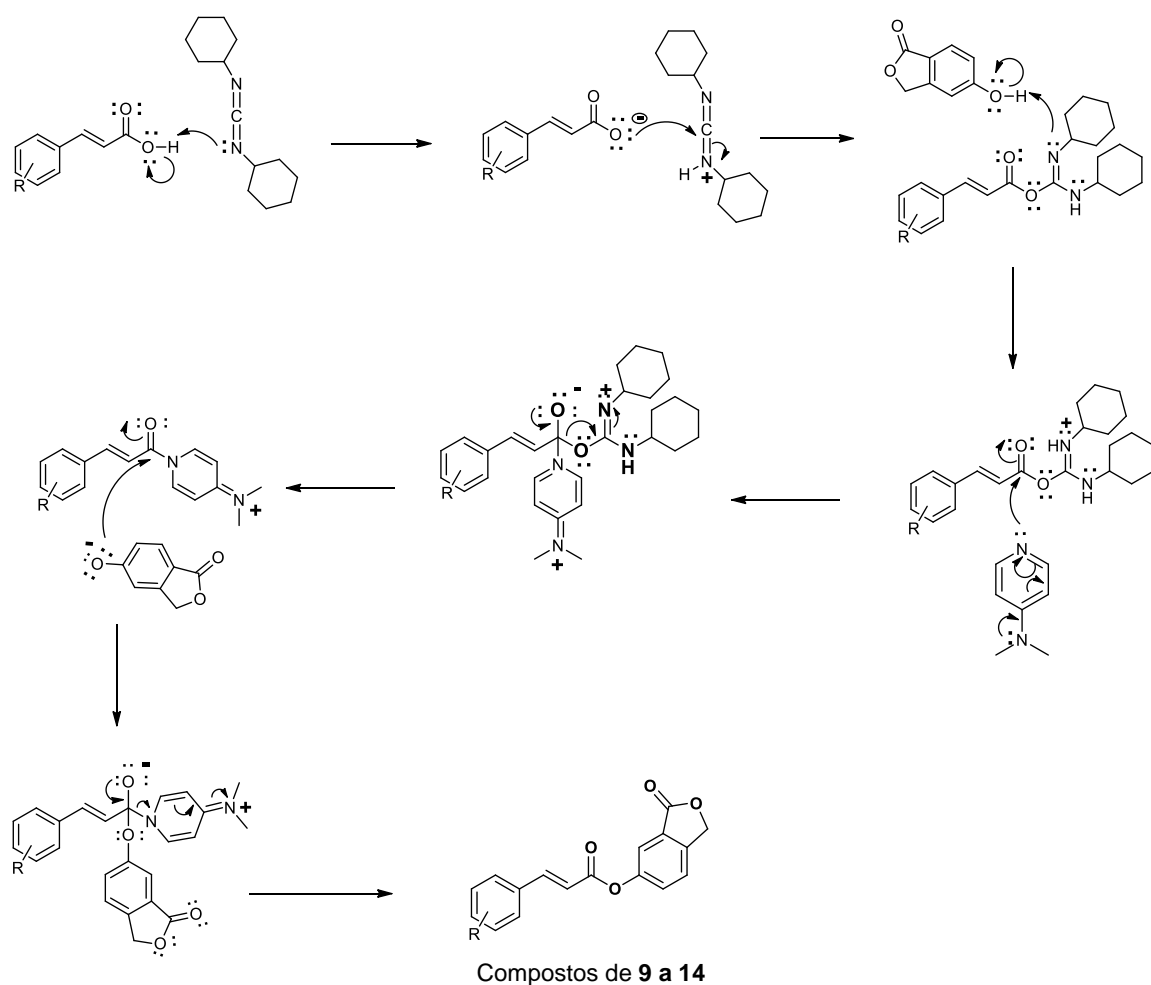
Inicialmente, buscou-se a preparação do composto **9** empregando-se aquecimento convencional (banho de glicerina). A reação de Steglich entre a isobenzofuranona **2**, ácido fluorocinâmico (**3**) e DCC, realizada em DMF sob condições de refluxo, resultou na obtenção do composto **9** com 12% de rendimento após 120 horas de reação. Tentativas de elevar o rendimento alterando-se as condições de reação (por exemplo, aumento da concentração do ácido e aumento da quantidade de DCC) não resultaram em aumento da eficiência do processo. Entretanto, a utilização de irradiação de micro-ondas resultou na obtenção dos derivados **9** a **14** com rendimentos

⁵⁵ PASSO, J. A. Síntese e caracterização de novos polímeros liquid-cristalinos de cadeia lateral derivados do heterocíclico 2-isoxazolínico 3,5-dissubstituído. 2012, 215p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

⁵⁶ ZWEIFEL, M., H., NANTZ, M., H. Modern organic synthesis: An introduction, W. H. Freeman and Company, New York, 2007, 477p.

variando de 54% a 76% e com tempos de reação variando de 40-45 minutos (Tabela 2, pg. 34).

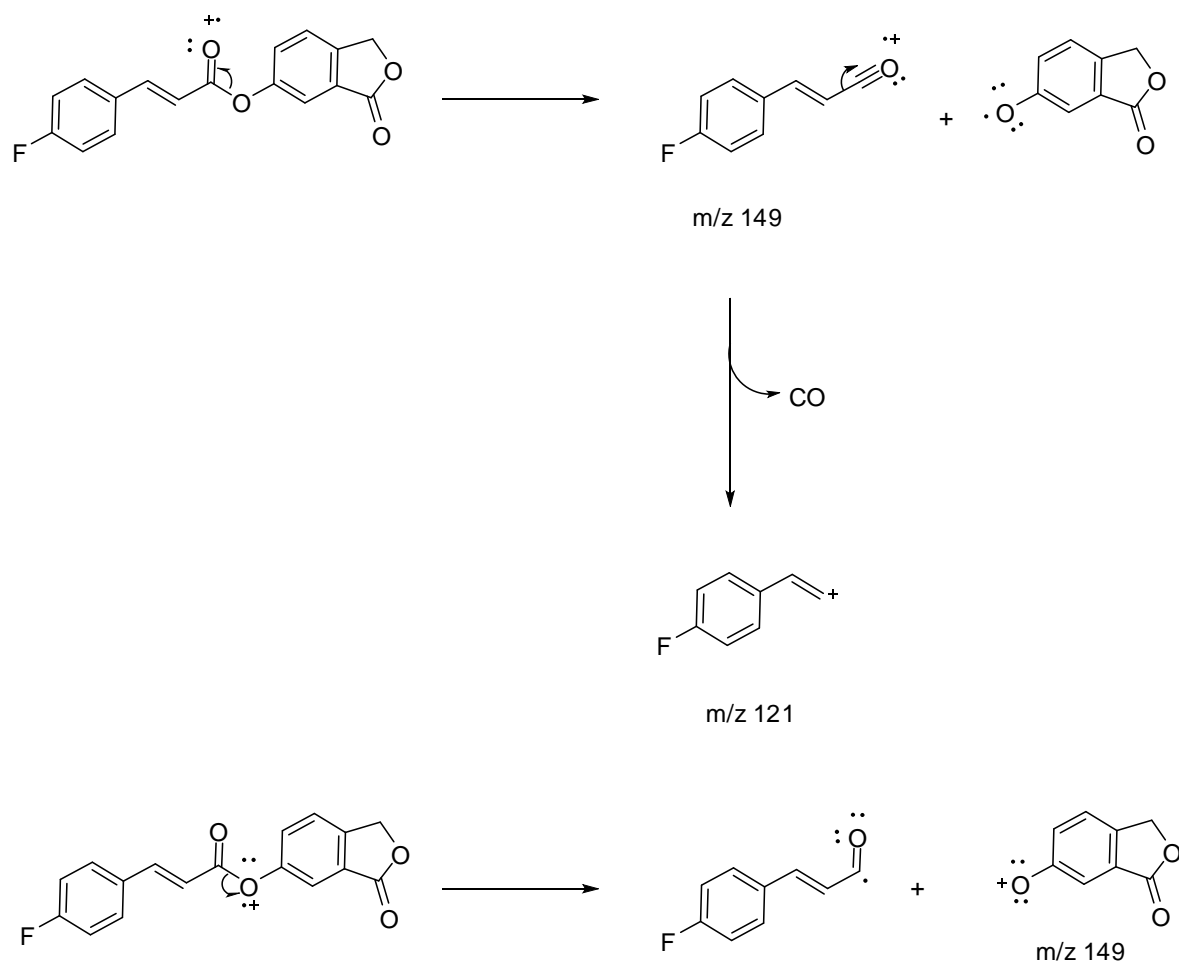
O Esquema 7 contém uma proposta mecanística que explica a obtenção de **9** a **14** via esterificação de Steglich. Conforme pode ser observado, o agente de acoplamento torna o grupo hidroxila da função ácido carboxílico um bom grupo abandonador, permitindo sua substituição.



- (9) Ar = 4 - fluorofenila
- (10) Ar = 4 - metoxifenila
- (11) Ar = 3,4,5 - trimetoxifenila
- (12) Ar = 4 - nitrofenila
- (13) Ar = 4 - bromofenila
- (14) Ar = 4 - clorofenila

Esquema 7 - Proposta mecanística para a formação do composto **9** a **14**.

A substância **9** foi obtida com rendimento de 71% após purificação em coluna de sílica gel. No Espectro de massas de **9** (Figura 17, pg. 63) não foi observado o pico do íon molecular fato este que pode estar relacionado à rápida clivagem das ligações α ao grupo carbonila (Esquema 8).



Esquema 8 – Proposta de algumas fragmentações do composto **9**.

No espectro IV do composto **9** (Figura 16, pg. 62). A banda de absorção em 3026 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ de anel aromático. A banda de absorção em 2932 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$. As bandas em 1777 e 1740 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento do grupo carbonila enquanto que aquela

observada em 1636 cm^{-1} é devida ao estiramento C=C. A banda em 1238 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento assimétrico de =C-O-C e a banda em 829 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular fora do plano de C-H.

No espectro de RMN de ^1H do composto **9** (Figura 18, pg. 64) observou-se um sinal em δ_{H} 5,42 na forma de um singleto integrado para um hidrogênio correspondente ao átomo de hidrogênio H-2. O duplete em δ_{H} 6,87, correspondente ao hidrogênio H-2', apresentou constante de acoplamento igual a 16 Hz. Esse valor de constante de acoplamento é característico para átomos de hidrogênio numa relação *trans* em uma ligação dupla, confirmando assim a estereoquímica da dupla ligação entre C-2'e C-3'.⁵¹ Um tripleto em δ_{H} 7,30 cuja constante de acoplamento apresentou valor igual a 9,0 Hz integrado para dois hidrogênios, referente aos átomos H-6',H-8'. Esse valor da constante de acoplamento é característico para o acoplamento de hidrogênios *orto* em anéis aromáticos substituídos.⁵² O sinal para o átomo de hidrogênio H-4 do núcleo isobenzofuranona foi observado como um duplo duplete em δ_{H} 7,62. O multiplete em δ_{H} 7,60-7,60 integrado para três hidrogênios foi atribuído aos átomos H-3' e H-3.⁵² Já o multiplete em δ_{H} 7,87-7,92, integrado para três átomos de hidrogênio, hidrogênio corresponde ao átomo H-4 da porção isobenzofuranona. Um multiplete em δ_{H} 7,87-7,92 integrado para quatro hidrogênios, referente aos átomos H-6, H-5'e H-9'.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19, pg. 65) os sinais correspondentes aos grupos carbonila foram observados em δ_{C} 170,3 (C-1) e 165,7 (C-1'). O duplete em δ_{C} 164,2 (C-7') corresponde ao átomo de carbono ligado diretamente ao átomo de flúor. Por efeito indutivo, esse

átomo de carbono encontra-se mais desblindado se comparado aos demais átomos de carbono do anel aromático, o que justifica o maior valor de deslocamento químico. Os sinais relativos aos carbonos aromáticos em δ_c 116,5; 131,6 e 130,9 correspondem aos carbonos C-6', C-8', C-5',C-9', e C-4' respectivamente. Os sinais em δ_c 117,1 (C-2') e 146,1 (C-3') correspondem aos carbonos da porção alifática da molécula. Os demais sinais correspondem à porção isobenzofuranona em δ_c 70,5 (C-2); 118,4 (C-6); 124,7 (C-3); 126,8 (C-4); 128,8 (C-7); 145,1 (C-8) e 151,2 (C-5).

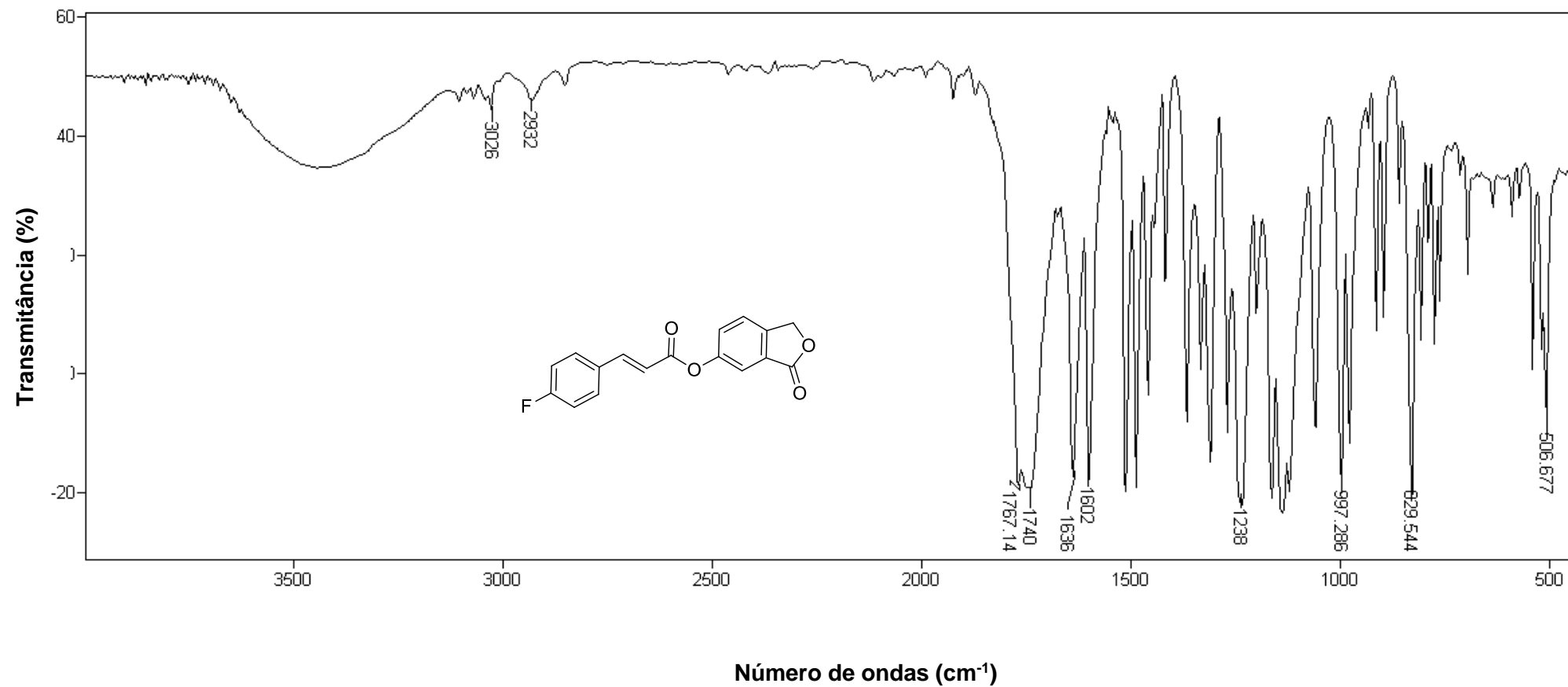


Figura 16 - Espectro no infravermelho (KBr) para o composto 9.

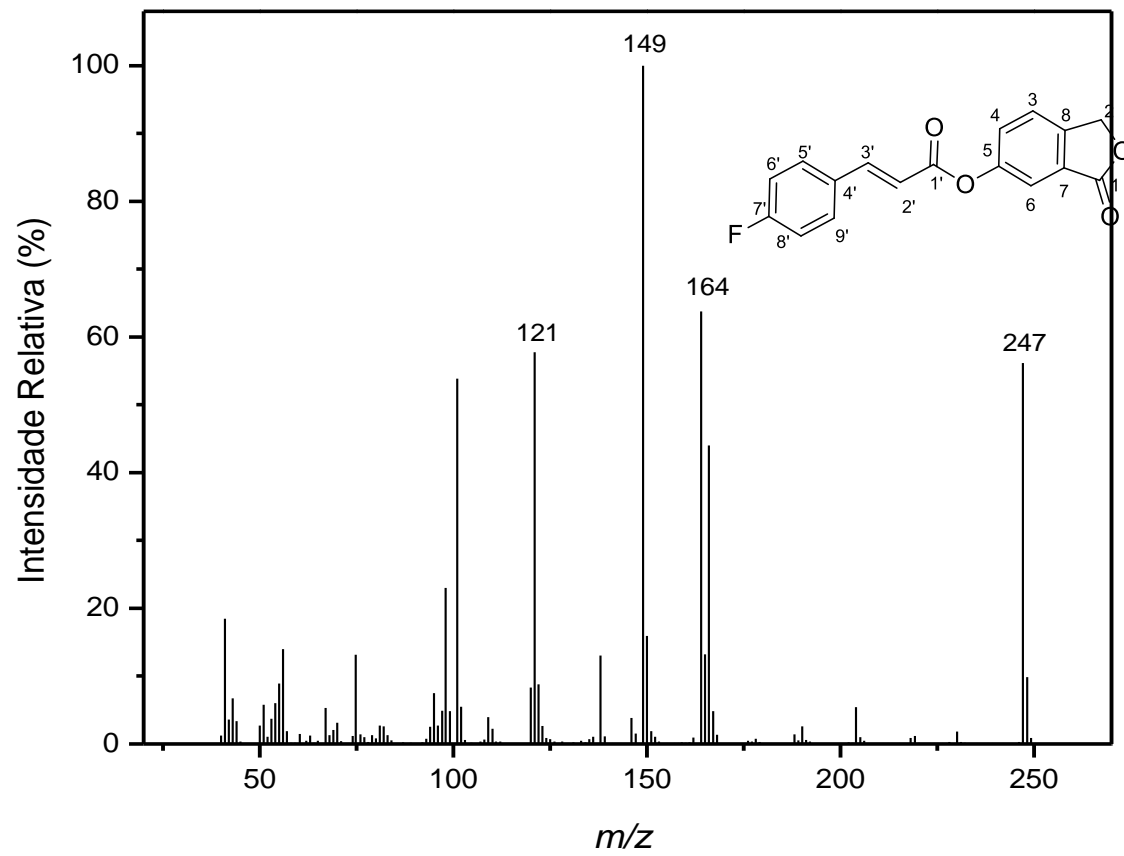


Figura 17 - Espectro de massas do composto 9.

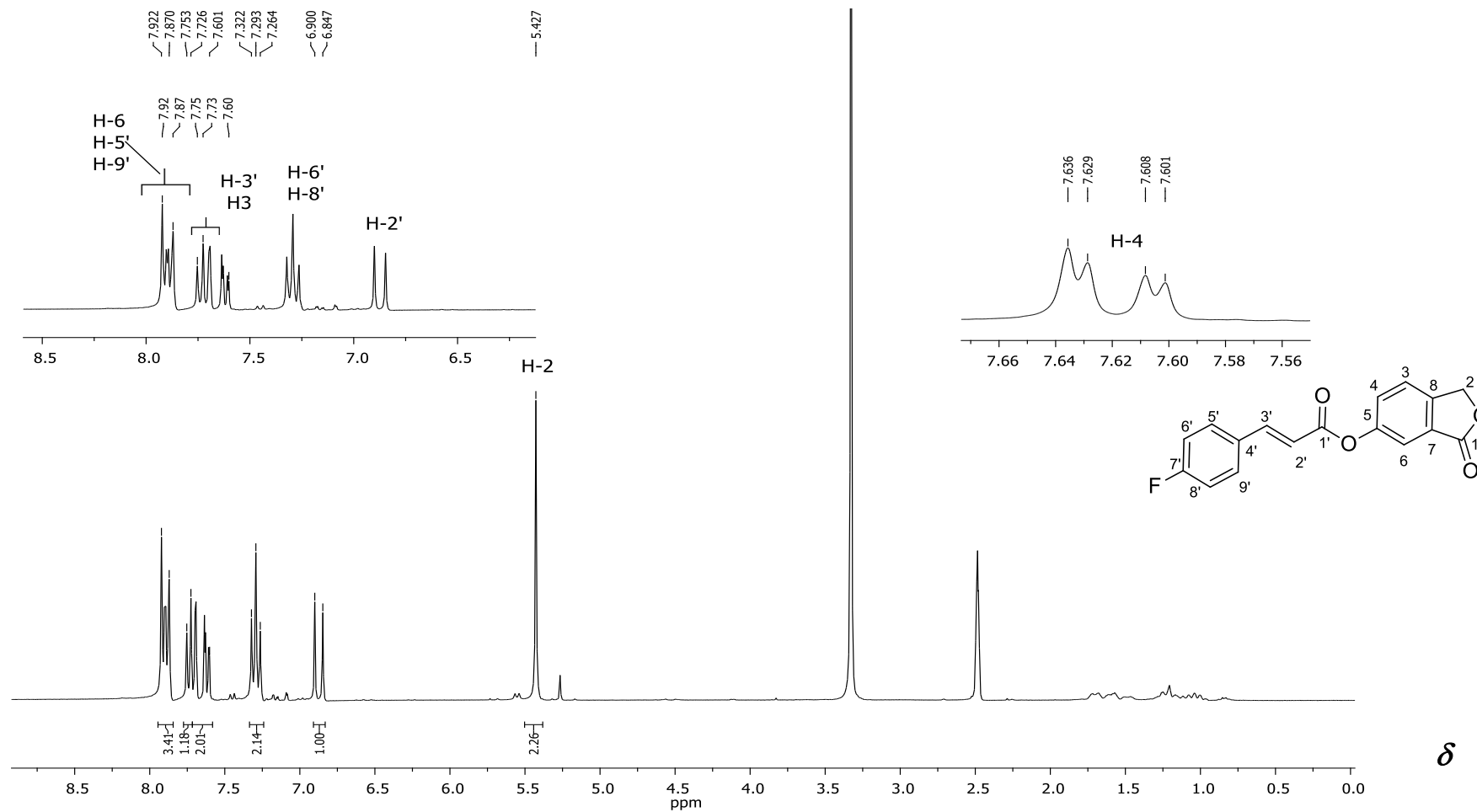


Figura 18 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **9**.

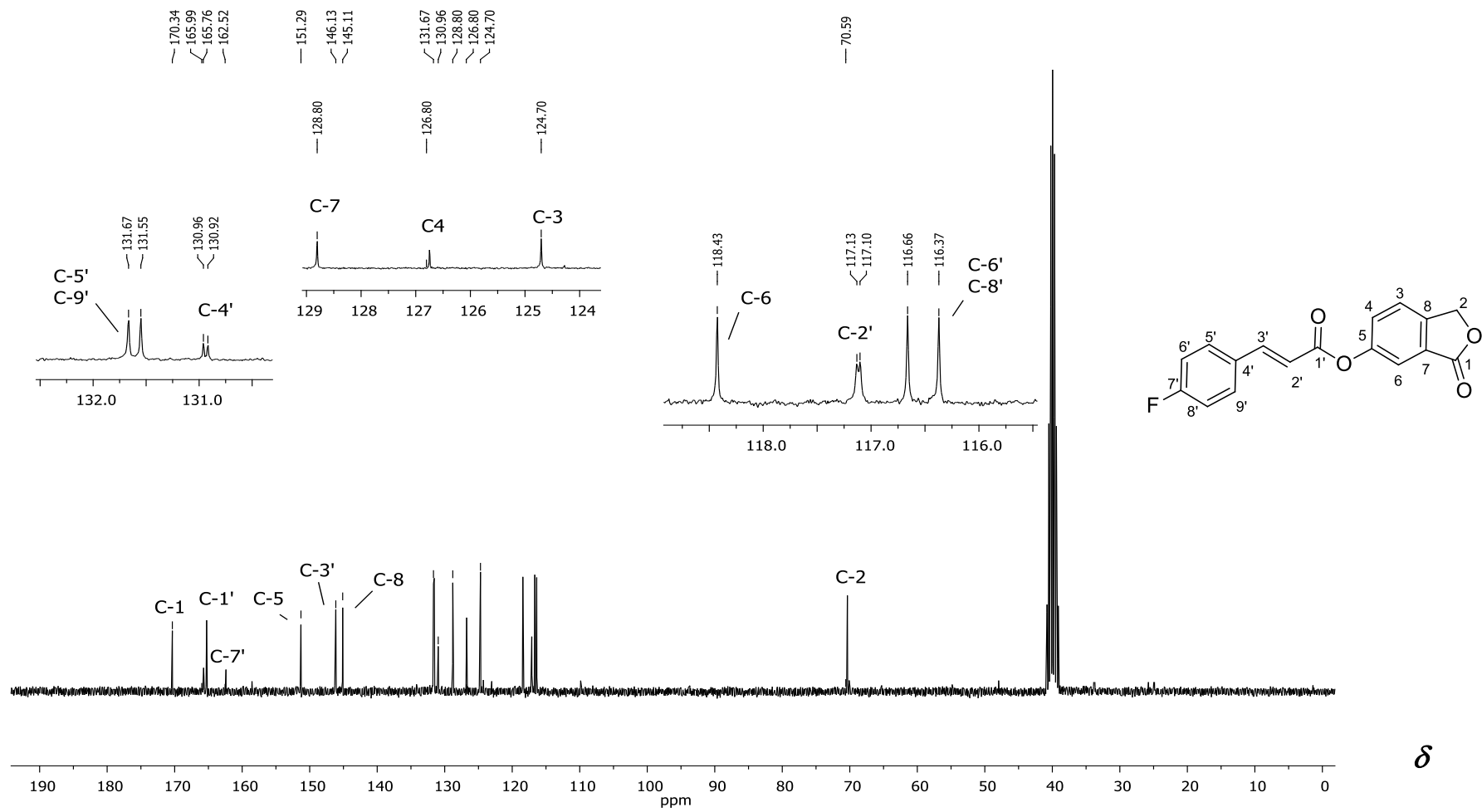


Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) para o composto 9.

Os compostos **10** a **14** também foram preparados a partir da reação de Steglich entre um derivado do ácido cinâmico **4** a **8** (vide síntese descrita na seção 2.2.2) e a isobenzofuranona **2** (Esquema 1, pg. 13). Os espectros no IV, de RMN de ^1H e de ^{13}C apresentam muitas semelhanças com os correspondentes espectros da substância **9**. Deste modo, não será feita uma discussão detalhada dos dados espectroscópicos que foram utilizados para a caracterização dos ésteres. Os espectros referentes ao composto são apresentados no anexo e a descrição dos dados espectroscópicos é apresentada na seção 2.2.2 (pg. 17).

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E FUNGICIDA DOS CINAMATOS CONTENDO O NÚCLEO ISOBENZOFURANONA

3.1 Introdução

As doenças acometem o homem desde tempos imemoriais. O contínuo avanço da ciência permitiu que fossem desenvolvidos tratamentos adequados para diversas patologias humanas. Entretanto, muitas doenças ainda representam um grande desafio para a humanidade como, por exemplo, o câncer.

Conforme definido pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) em sua página na internet:

“Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo”.⁵⁷

No ano de 2014, estima-se que 8,2 milhões de pessoas ao redor do mundo morreram vítimas de câncer.⁵⁸ De acordo com projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS) o número de novos casos deve crescer em 70%.⁵⁹

Os dados de 2014 revelaram que neste ano surgiram aproximadamente 14 milhões de novos casos de câncer no mundo. Desse

⁵⁷ INCA, < www.inca.gov.br>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2015.


⁵⁸ World Health Organization, < www.who.int/en/ >. Acesso em: 15 de Janeiro de 2015.

⁵⁹ DE MARTEL, C.; FERLAY, J., FRANCESCHI, S., VIGNAT, J., BRAY, F., FORMAN, D., PLUMMER, M. I. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*, v. 13, p. 607-615, 2012.

total, 7,4 milhões correspondiam à população masculina (53%) e 6,7 milhões à população feminina (47%).⁶⁰

No Brasil, segundo as estimativas relatadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), foram estimados para 2014 o surgimento de aproximadamente 294 mil novos casos de câncer. Dentre esses novos casos, os que mais atingem a população masculina são os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto e esôfago enquanto que na população feminina os mais frequentes são os cânceres de pele, mama, colo do útero, cólon e reto, pulmão e estômago, como mostra a Tabela 1.⁶¹

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 no Brasil

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%		Cólon e Reto	17.530	6,4%	
Cólon e Reto	15.070	5,0%		Colo do Útero	15.590	5,7%	
Estômago	12.870	4,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%	
Cavidade Oral	11.280	3,7%		Glândula Tíreoide	8.050	2,9%	
Esôfago	8.010	2,6%		Estômago	7.520	2,7%	
Laringe	6.870	2,3%		Corpo do Útero	5.900	2,2%	
Bexiga	6.750	2,2%		Ovário	5.680	2,1%	
Leucemias	5.050	1,7%		Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%	
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%		Leucemias	4.320	1,6%	

Os três principais tipos de tratamento do câncer são a radioterapia, a cirurgia e a quimioterapia, sendo a quimioterapia a alternativa mais comumente utilizada.

No tratamento quimioterápico, são utilizados fármacos com o objetivo primário de destruir as células neoplásicas (células cancerígenas),

⁶⁰ Cancer Research UK, < www.cancerresearchuk.org>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2015.

⁶¹ American Cancer Society, < www.cancer.org>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2015.

preservando-se as células normais. Os medicamentos quimioterápicos podem ser divididos em vários grupos com base em suas estruturas químicas, mecanismos de ação e interação com outros medicamentos.⁵ Atualmente existem diversos medicamentos empregados no tratamento de câncer e tumores que afetam as células em diferentes fases do ciclo celular. Os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida (comercialmente Cytosan[®], Figura 1) atuam se ligando ao DNA de modo a impedir a separação dos dois filamentos na dupla hélice espiralar, fenômeno este indispensável para a replicação. Os alquilantes afetam as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico.⁶² Outro tipo de alquilante são as nitrosouréias, que atuam inibindo a reparação do DNA, citando-se como exemplo a carmustina (BCNU) e lomustina (CCNU), (Figura 1).^{57,62}

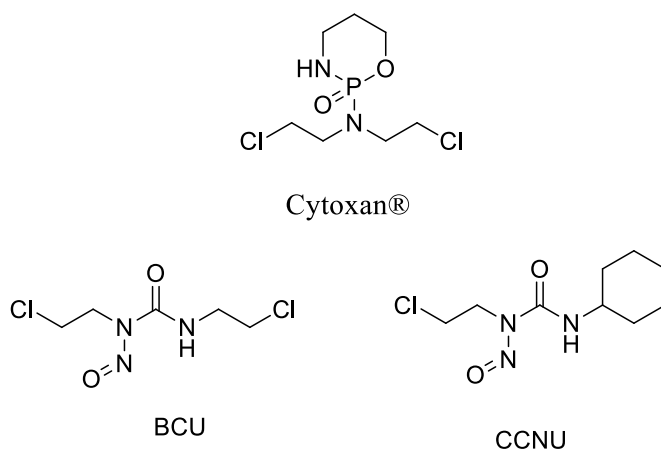


Figura 1 - Estrutura de alguns agentes alquilantes.

Há ainda os antimetabólitos como, por exemplo a capecitabina (comercialmente Xeloda[®], Figura 2, pg.80), que afetam as células inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e do RNA. Deste modo,

⁶² ZHANG, Y. *Encyclopedia of global health*. Londres: Sage Publications, v.1, 2288 p., 2008.

impedem a multiplicação e função normais da célula.⁵⁷ Os antibióticos (como a doxorubicina, comercialmente Adriamycin®, Figura 2, pg. 80), constituem um grupo de substâncias com estrutura química variada que atuam de forma não específica sobre o ciclo celular. E por último, os inibidores mitóticos, como o docetaxel (comercialmente Taxotere®, Figura 2, pg. 80) que podem paralisar a mitose na metáfase, devido à sua ação sobre a proteína tubulina, interferindo dessa forma, na dinâmica dos microtúbulos e interrompendo a divisão celular.⁶²

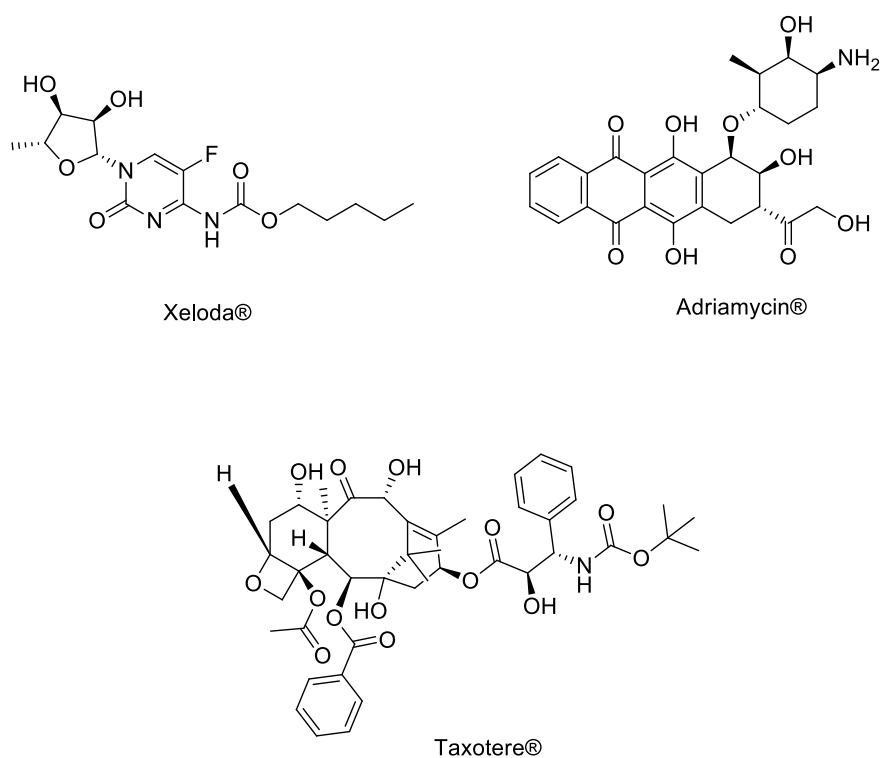


Figura 2 - Estrutura de alguns quimioterápicos empregados no tratamento do câncer.

Embora importantes avanços tenham sido obtidos com respeito ao tratamento quimioterápico do câncer, os medicamentos que se destinam a esta finalidade apresentam problemas importantes relacionados ao seu uso dentre eles os efeitos colaterais (diarréia, vômito, fraqueza, queda de cabelo, tonteadas e etc), a falta de especificidade para células tumorais, além de

serem considerados tóxicos para células normais. Além disso, à ineficiência dos fármacos em relação aos diferentes tipos de câncer, bem como o aumento do aparecimento de linhagens resistentes a estes medicamentos aspectos também bastante preocupantes (CHABNER e ROBERTS, 2005).⁶³ Considerando este cenário, é de relevância a busca por novas drogas que venham a suplantar os problemas relacionados com os quimioterápicos atualmente empregados no tratamento do câncer.

Na busca por quimioterápicos alternativos para o tratamento do câncer, compostos contendo o núcleo isobenzofuranona vêm sendo investigados. Por exemplo, Li e colaboradores (2015) isolaram uma série de substâncias do extrato metanólico do fungo *Hericium erinaceus*, dentre elas as isobenzofuranonas mostradas na Figura 3. As isobenzofuranonas exibiram significativa atividade antiproliferativa contra a linhagem HL60, apresentando valores de IC₅₀ iguais a 4,10 µmol L⁻¹ e 4,13 µmol L⁻¹, respectivamente.⁶⁴

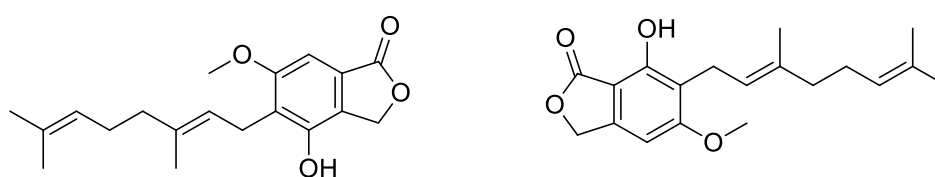


Figura 3 - Estrutura das isobenzofuranonas isoladas do extrato metanólico de *Hericium erinaceus*.

⁶³ CHABNER, B. A.; ROBERTS JR, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews*, v. 5, p. 65-72, 2005.

⁶⁴ LI, W., Zhou, W., KIM, E. J., SHIM, S. H., KANG, H. K., KIM, Y. H. . Isolation and identification of aromatic compounds in Lion's Mane Mushroom and their anticancer activities. *Food Chemistry*, v.170, p. 336-342, 2015.

Naik e colaboradores sintetizaram diversos derivados (36 derivados no total) tendo como estrutura modelo a noscapina. Os derivados apresentaram valores de IC_{50} entre 1,2 e 56,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ medidos sobre CEM, linhagem celular linfoblastoide T humana.⁶⁵ Na Figura 4 a seguir são apresentadas as estruturas da estrutura modelo noscapina e seu derivado clorado, de maior atividade observada apresentando $IC_{50}=1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$.

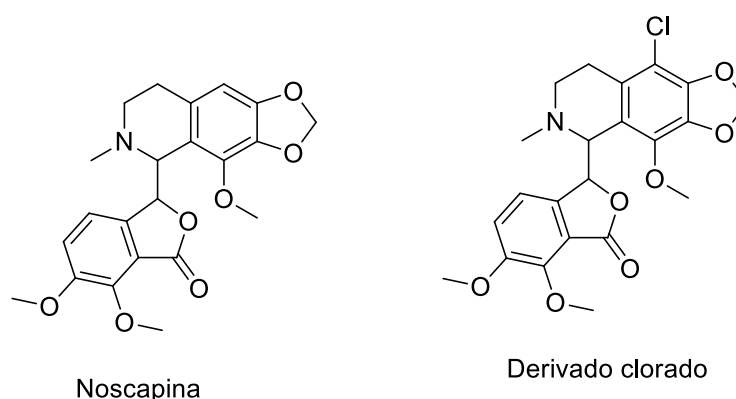
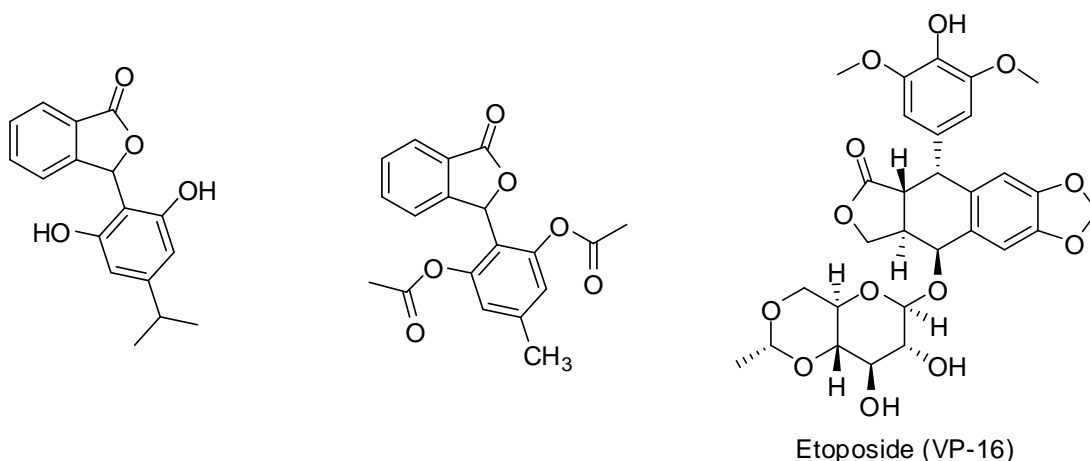


Figura 4 - Estrutura da isobenzofuranona utilizada como estrutura modelo e seu derivado de maior atividade observada.

Teixeira e colaboradores avaliaram doze isobenzofuran-1(3H)-onas, funcionalizadas com porções aromáticas e alicíclicas na posição C-3 do núcleo isobenzofuranona, contra as linhagens de células de leucemia K562 e U937. Dentre os compostos avaliados, foi encontrado que as isobenzofuranonas mostradas na Figura 5 (pg. 83) foram mais ativas contra a linhagem K562 do que o etoposídeo (VP16), uma droga utilizada no tratamento da leucemia.⁶⁶

⁶⁵ NAIK, P. K.; SANTOSHI, S.; JOSHI, H. C. Noscapinoids with anti-cancer activity against human acute lymphoblastic leukemia cells (CEM): a three dimensional chemical space pharmacophore modeling and electronic feature analysis. *Journal of molecular modeling*, v.18, p.307-318, 2012.

⁶⁶ Teixeira, R. R.; Bressan, G. C.; Pereira, W. L.; Ferreira, J. G.; de Oliveira, F. M.; Thomaz, D. C. Synthesis and antiproliferative activity of C-3 functionalized isobenzofuran-1(3H)-ones. *Molecules*, v. 18, p. 1881-1896, 2013.



$$IC_{50} = 2.79 \mu\text{mol L}^{-1}$$

$$IC_{50} = 1.71 \mu\text{mol L}^{-1}$$

$$IC_{50} = 7.06 \mu\text{mol L}^{-1}$$

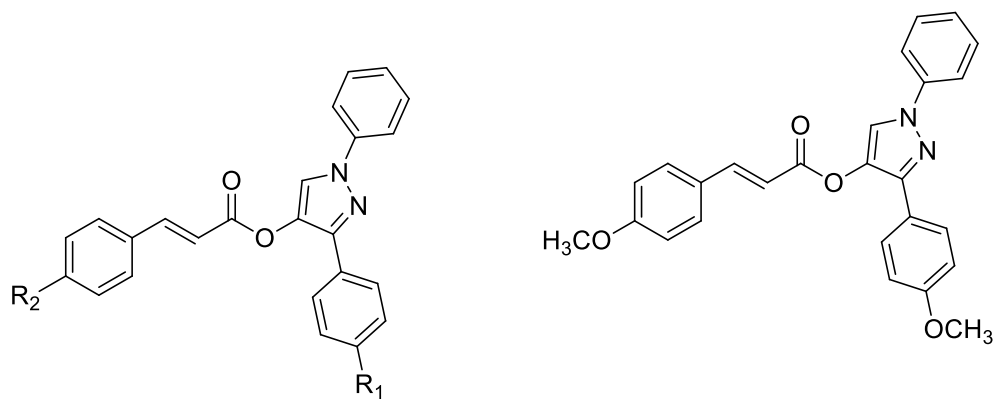
Figura 5 – Estruturas de duas isobenzofuranonas descritas no trabalho de Teixeira e colaboradores (2013) e do etoposídeo (VP-16).

Diversos são os relatos na literatura de derivados do ácido cinâmico apresentando citotoxicidade.⁶⁷ Em um trabalho recente, Zhang e colaboradores (2014) sintetizaram derivados do ácido cinâmico e testaram atividade inibitória enzimática sobre EFGR e HER-2, assim como também, a atividade antiproliferativa sobre diferentes linhagens de células tumorais. Em particular, o derivado metoxilado (R_1 e $R_2 = \text{OCH}_3$, Figura 6, pg. 84) apresentou atividade inibitória contra o fator de crescimento do receptor epidérmico (EFGR) com $IC_{50}=0,21 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $IC_{50}=1,08 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a enzima HER-2.

Com relação à atividade antiproliferativa, em que foi medida a inibição de crescimento das linhagens celulares MCF-7 e B16-F10, os valores de IC_{50} foram de $0,30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de $0,44 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.⁶⁸

⁶⁷ DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agentes – a review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 1672-1703, 2013.

⁶⁸ ZHANG, W. M., XING, M., ZHAO, T. T., REN, Y. J., YANG, X. H., YANG, Y. S., LV, P.,-C.; ZHU, H., L. Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of cinnamic acid derivatives with pyrazole



(R₁)=H, F, Cl, Br, CH₃, OCH₃

(R₂)=H, F, Cl, Br, CH₃, OCH₃

Figura 6 - Estrutura geral dos derivados do ácido cinâmico investigados por Zhang e colaboradores e do derivado que apresentou maior atividade antiproliferativa e inibitória enzimática.

De grande importância para o homem também são as doenças que atacam as culturas agrícolas. Conforme já salientado, é necessário que a produtividade agrícola seja continuamente aumentada para atender à demanda de alimentos decorrente do progressivo aumento populacional. Para que isso seja possível, o homem deve manter sobre controle uma variedade de doenças provocadas nas culturas por fungos, bactérias e vírus. Se não mantidas sobre controle, estas doenças podem levar a expressivas perdas de rendimento das culturas agrícolas. Um exemplo que pode ser usado para corroborar esta afirmativa é a doença conhecida como vassoura-de-bruxa, provocada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, que diminuiu significativamente a produção de cacau, especialmente no estado da Bahia, o maior produtor de cacau do continente americano. A doença foi identificada no sul da Bahia em 1989. Só na década de 1990 a produção de

moieties as novel anticancer agents. *Royal Society of Chemistry Advances*, v. 4, p. 37197-37207, 2014.

cacau por ano caiu de 320,5 mil toneladas para 191,1 mil toneladas, uma redução de quase metade somente por conta desta doença. Se não forem tomadas medidas de controle, a vassoura-de-bruxa pode provocar redução na produção de 90%.^{69,70,71}

Produtos vegetais e plantas são afetados por um grande número de agentes patogênicos e dentre estes se destacam os fungos. A utilização de fungicidas (controle químico) é o método mais comumente utilizado para o controle de fungos fitopatogênicos. Embora tratamentos com fungicidas sejam um componente-chave no controle das doenças provocadas por fungos, a utilização destes agentes de controle sempre leva a questionamentos com respeito a i) seus efeitos tóxicos sobre os seres humanos, animais, microorganismos não-alvo e organismos benéficos; ii) o impacto ambiental resultante da utilização dos fungicidas; iii) o problema de aparecimento de resistência. Todas estas importantes questões estimulam a indústria agroquímica e a academia a buscarem compostos que sejam cada vez mais específicos, que sejam eficientes em concentrações cada vez menores e que causem baixo ou nenhum impacto ambiental. Buscam-se

⁶⁹ KILARU, A., BAILEY, B. A., HASENSTEIN, K. H. (2007). *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves *FEMS microbiology letters*, v. 274, n. , p. 238-244, 2007.

⁷⁰ RINCONES, J., SCARPARI, L. M., CARAZZOLLE, M. F., MONDEGO, J. M., FORMIGHIERI, E. F., BARAU, J. G., COSTA, G., G., L.; CARRARO, BRENTANI, D., M.; H., P., BOAS, L., A., VILAS; OLIVEIRA, B., V. DE; SAPHA, M.; DIAS, R.; CASCARDO, J., M.; AZEVEDO, R., A.; MEINHARDT, L., W.; PEREIRA, G. A. . Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Molecular plant-microbe interactions*, v.21, p. 891-908, 2008

⁷¹ GARCIA, O.; MACEDO, J. A.; TIBÚRCIO, R.; ZAPAROLI, G.; RINCONES, J.; BITTENCOURT, L. M.; CEIRA, G. O.; MICHELI, F.; GESTEIRA, A.; MARIANO, A. C.; SCHIVIANATO, M. A.; MEDRANO, F. J.; MEINHARDT, L. W.; PEREIRA, G. A.; CASCARDO, J. C. In vitro screening and chemometrics analysis on a series ofazole derivatives with fungicide activity against *moniliophthora perniciosa*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, p. 510-519, 2010.

ainda compostos que apresentem mecanismos de ação diferentes dos fungicidas já existentes; esta é uma importante característica para suplantar o problema de evolução de resistência pelos fungos aos fungicidas.⁷²

Dentre desse contexto o ácido cinâmico (e seus derivados) bem como as isobenzofuran-1(3*H*)-onas vêm sendo explorados como possíveis *scaffolds* na busca por novos agentes químicos de controle de fungos e que possam atender aos requisitos previamente descritos. Por exemplo, as isobenzofuranonas (*E*)-3-butilidenoftalida e (*Z*)-3-butilidenoftalida (Figura 7) foram isoladas da espécie vegetal *Angelica sinensis* por Wedge e colaboradores (2008) e apresentam ação antifúngica contra três espécies do gênero *Colletotrichum*.⁷³

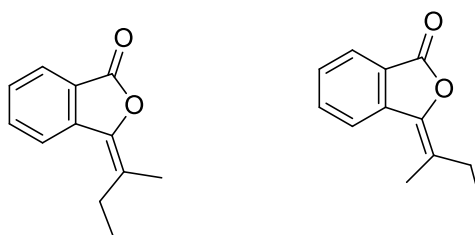


Figura 7 - Estruturas das fitalidas antifúngicas isoladas da espécie vegetal *Angelica sinensis*.

Korošec e colaboradores (2013) demonstraram que os derivados do ácido cinâmico apresentados na Figura 8 (pg. 87) possuem significativa atividade antifúngica contra os fungos patogênicos *Cochliobolus lunatus*, *Aspergillus niger* e *Pleurotus ostreatus*. Os resultados da avaliação da

⁷² CARISSE, O. *Fungicides*. Acesso livre: Intech, 548p, 2010.

⁷³ WEDGE, D. E., KLUN, J. A., TABANCA, N., DEMIRCI, B., OZEK, T., BASER, K. H. C., LIU, Z.; ZHANG, S.; CANTRELL, C.; ZHANG, J. Bioactivity-guided fractionation and GC/MS fingerprinting of *Angelica sinensis* and *Angelica archangelica* root components for antifungal and mosquito deterrent activity. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, p.464-470, 2008.

atividade antifúngica podem ser assim descritos. Os compostos I e II Figura 8 (pg. 87) foram os mais ativos contra a espécie *Cochliobolus lunatus* (75% de inibição do crescimento da espécie). Já os compostos III, IV, V e VI foram os mais ativos contra *Aspergillus niger* e *Pleurotus ostreatus*, apresentando valores de porcentagem de inibição do crescimento das espécies variando entre 70 e 75%.⁷⁴

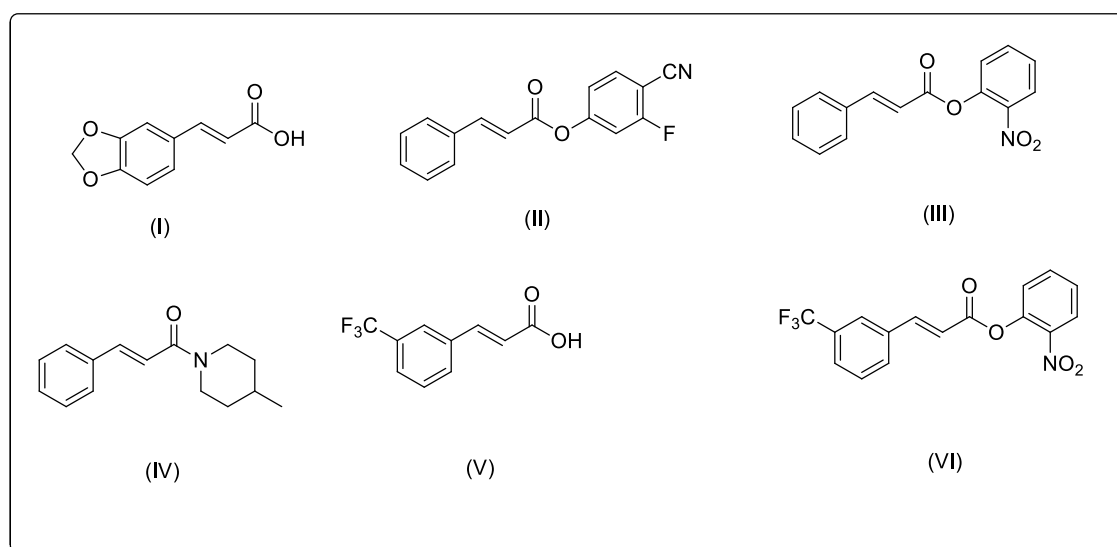


Figura 8 - Estrutura de derivados do ácido cinâmico que apresentam atividade antifúngica descritos Korošec e colaboradores (2014).

Assim, levando-se em conta os diferentes relatos na literatura de isobenzofuranonas e derivados do ácido cinâmico apresentando tanto atividade contra linhagens de células tumorais quanto atividade antifúngica, testes de avaliação destas atividades para os compostos **3 a 14** (Figura 2,

⁷⁴ KOROŠEĆ, B.; SOVA, M.; TURK, S.; KRAŠEVEC, N.; NOVAK, M.; LAH, L.; STOJAN, J.; PODOBNIK, B.; BERNE, S.; ZUPANEC, N.; BUNC, M.; GOBEC, S.; KOMEL, R. Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). *Journal of applied microbiology*, v.116, p. 955-966, 2014.

pg. 15) foram realizados. Os resultados dos ensaios biológicos serão descritos neste capítulo.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Avaliação da atividade citotóxica contra a linhagem HL60

3.2.1.1 Cultivo das células

Células de linhagem de leucemia HL60 foram cultivadas no Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) da UFV. Todo o procedimento de cultivo foi realizado em condições assépticas, em capela de fluxo laminar com lâmpada ultravioleta e utilizando material estéril e descartável. A cultura celular HL60 foi mantida em meio RPMI 1640, pH 7,4 (Gibco, Invitrogen, CA, USA) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB 10%; LGC, Campinas, Brasil), penicilina 100 UmL⁻¹ e estreptomicina 100 µg mL⁻¹ a 37 °C sob tensão de 5% de CO₂.

3.2.1.2 Ensaio de citotoxicidade

As células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 5 x 10⁴ células/100 mL/poço em meio RPMI 1640 (10% SFB) por 24 horas. Em seguida, os compostos **3 a 9**, **11 a 14** foram adicionados em diferentes concentrações (200; 150; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µmol L⁻¹) e as células incubadas a 37 °C sob tensão de 5% de CO₂ por 48 horas. Após o período de incubação, foram adicionado 10 µl de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT); 5 mg mL⁻¹ em cada poço, e as células foram incubadas a 37 °C por 3 horas. Posteriormente as placas foram centrifugadas e o meio foi removido. Em seguida, adicionaram-se 100

μL de DMSO em cada poço e a placa foi incubada por 20 minutos a 37 °C. A absorbância foi detectada em comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro. Cada análise foi realizada em triplicata e os resultados foram normalizados considerando as culturas sem adição de composto (0,4% DMSO). Foram determinados a média e o desvio-padrão. Os valores de IC₅₀ foram calculados usando o software GraphPad Prism versão 5.0.

3.2.2 Avaliação da atividade fungicida

Nesta avaliação utilizou-se um isolado de *Phytophthora palmivora*, responsável por infectar diferentes espécies de plantas ornamentais, culturas hortícolas e culturas agrícolas⁷⁵, cedido pela Clínica de Doenças de Plantas/UFV.

O isolado de *P. palmivora* foi disposto em placas de Petri contendo meio V8 clarificado/ágar⁷⁶ e mantido no escuro, a temperatura constante de 25 °C por sete dias. Ao fim deste período, foram retirados fragmentos de 2,5 mm nas bordas das colônias para a montagem do experimento.

A parcela experimental correspondeu a uma placa de Petri contendo meio V8 clarificado/ágar, sobre o qual se dispôs um disco de micélio (2,5 mm de diâmetro) a 20 mm de um disco de papel (5 mm de diâmetro) embebido com solução em teste. As placas foram deixadas em câmara de crescimento por quatro dias sob temperatura constante de 25 °C.

⁷⁵ E., Ribeiro. *Phytophthora diseases worldwide*. St Paul: American Phytopathological Society Press, 562p., 1996.

⁷⁶ Singleton, L. L., Mihail, J. D., & Rush, C. M. *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 265p., 1992.

Os compostos **3** a **14** (Figura 2, pg. 15) foram solubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido) e as concentrações foram ajustadas de modo a permitir a avaliação das concentrações 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Para efeitos comparativos, testou-se ainda o fungicida dimetomorfe (50%), derivado do ácido cinâmico, como controle positivo na dose indicada pelo Ministério da Agricultura (MAPA), visando o controle de *Phytophthora infestans* no tomateiro⁷⁷ e, dois controles negativos, água e DMSO.

3.3 Resultados e Discussão

Os compostos **3** a **9**, **11** a **14** (Figura 2, pg. 15) assim como o ácido cinâmico comercial foram submetidos a ensaios biológicos para a avaliação de suas atividades citotóxica contra a linhagem de leucemia HL60. As atividades citotóxicas dos compostos foram avaliadas segundo o método MTT. O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal amarelo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para o produto de cor azul formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria e no citoplasma da célula viável, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células metabolicamente ativas. O ensaio de viabilidade celular utilizando o MTT baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase, que só estaria ativa em células metabolicamente ativas (viáveis).⁷⁸ A linhagem celular foi tratada com diferentes concentrações dos compostos (200; 150; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$), por 48 horas. Os

⁷⁷AGROFIT, < extranet.agricultura.gov.br >. Acesso em: 10 de Fevereiro de 2015.

⁷⁸ MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

testes foram realizados em triplicata e os resultados de IC₅₀ obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 2 - Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) obtidos para a linhagem de célula de leucemia HL60 tratadas com compostos derivados do ácido cinâmico **3** a **8**, derivados do ácido cinâmico contendo núcleo isobenzofuranona **9**, **11-14** e ácido cinâmico

Composto	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Ácido cinâmico
IC ₅₀ μmol L ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	*	77,35	41,67	-	-	-

IC₅₀: Concentração dos compostos requerida para inibir 50% da viabilidade celular, determinada após 48 horas de tratamento contínuo.

(-): Compostos que não tiveram efeito citotóxico contra a linhagem de leucemia HL60; (*): Composto não foi solúvel em (0,4 % DMSO).

Dentre os compostos avaliados, tanto o ácido cinâmico quanto os derivados **3** a **8** não apresentaram atividade citotóxica contra a linhagem celular avaliada. Devido à limitada solubilidade do composto **10** em DMSO 0,4%, sua atividade não pode ser determinada. Dentre os cinados **9**, **11-14** avaliados, os compostos **11** e **12** foram capazes de inibir a viabilidade celular e apresentaram valores viáveis de IC₅₀ para estudos futuros em ensaios de citotoxicidade frente a outros tipos de linhagens celulares. Deve ser observado que o composto que apresentou maior atividade apresenta um forte grupo retirador de elétrons (-NO₂) ligado ao anel aromático da porção arilideno do composto **12**.

As substâncias **3** a **14**, foram avaliadas com relação ao halo de inibição do isolado do fungo *Phytophthora palmivora*, responsável por afetar importantes culturas como mamão, coco, abacaxi, cacau e pimenta preta.⁷⁶ As substâncias supracitadas foram avaliadas em quatro diferentes

concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). A variável considerada para interpretação dos resultados foi o halo de inibição, ou seja, a distância entre as extremidades do micélio e do disco de papel, cuja mensuração foi realizada quatro dias após a instalação do experimento. Os valores foram submetidos ao Teste de Tukey a 5% de significância (Tabela para verificar a existência de diferença significativa entre os resultados, utilizando-se para tanto o programa estatístico ASSISTAT®). Os resultados estão apresentados na Figura 8.

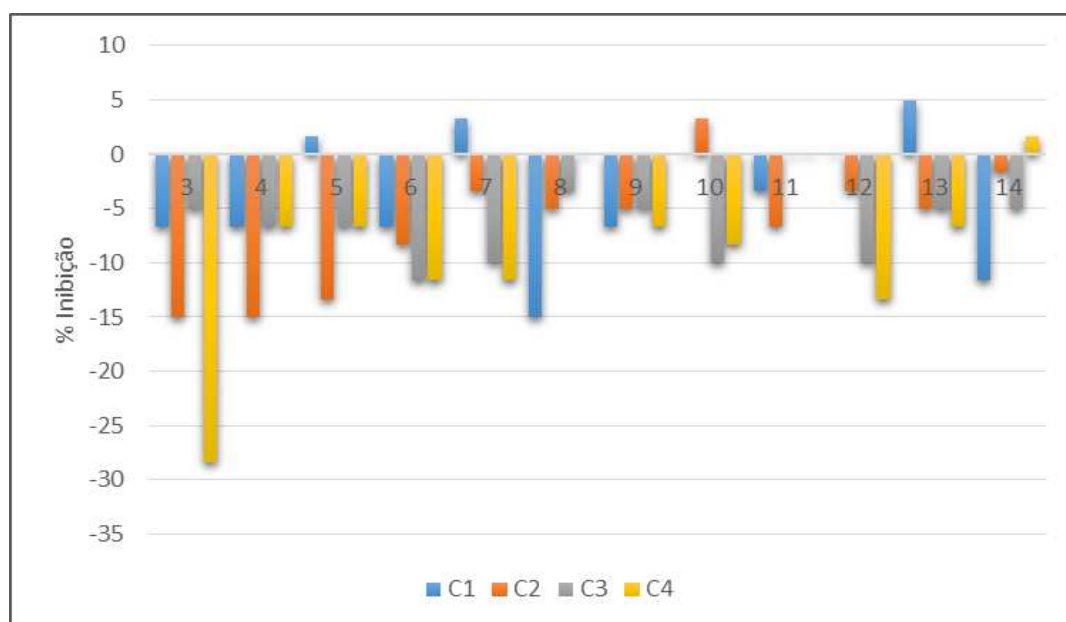


Figura 9 - Efeito das substâncias **3** a **14** sobre o halo de inibição de *Phytophthora infestans* nas concentrações 0,2 (C1); 0,4 (C2); 0,6 (C3) e 0,8 (C4) $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

Conforme pode ser observado na Figura 8, os compostos avaliados apresentaram halo de inibição entre 1,7% e 28,4%. Dentre os compostos supracitados, merece destaque a substância **3** que apresentou porcentagem de inibição igual a 28,4% para a concentração de 0,8 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ igual a 28,4%.

Com respeito aos cinamatos contendo o núcleo isobenzofuranona, o composto mais ativo correspondeu ao derivado nitrado **12** que apresentou cerca de 15% de inibição na maior concentração.. Vale ressaltar que o fungicida comercial (dimetomorfe), derivado do ácido cinâmico, apresentou percentual de inibição igual a 95,0 %.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram sintetizadas quatorze substâncias, sendo que os cinamatos **9** a **14** ainda não foram descritos na literatura. Os compostos foram preparados empregando-se reações de *orto*-alquilação, reações de condensação (condensação de Knoevenagel) e processos de acoplamento (reação de Steglich) que, de modo geral, levaram à formação das substâncias com bons rendimentos.

Os cinamatos sintetizados foram submetidos a testes de avaliação de suas citotoxicidades contra a linhagem promielocítica (HL-60). Dentre os compostos avaliados, dois deles (substâncias **11** e **12**) foram capazes de reduzir a viabilidade celular. Embora os valores de IC₅₀ determinados para esta atividade (77,35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o composto **11** e 41,67 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o composto **12**) possam ser considerados como relacionados a efeitos citotóxicos moderados, eles são encorajadores. Isso porque há a possibilidade de que modificações estruturais futuras possam resultar em compostos mais ativos. Estas possibilidades incluem tanto alterações estruturais na dupla insaturação (via processos de adição) da porção arilideno bem como a síntese de novos compostos contendo outros substituintes ligados ao anel benzênico da porção arilideno. Outro fato que merece ser destacado é que o núcleo isobenzofuranona tem papel importante na citotoxicidade dos cinamatos. Isso porque todos os derivados do ácido cinâmico foram inativos nos testes de avaliação de citotoxicidade. No entanto, o acoplamento do núcleo isobenzofuranona aos derivados do

ácido cinâmico produziu dois compostos com moderada citotoxicidade contra a linhagem celular investigada.

No que tange aos ensaios de avaliação da atividade fungicida, os cinamatos foram pouco efetivos contra a espécie avaliada. Porém, a substância **12** apresentou cerca de 15% de inibição da atividade fungicida. Este resultado também aponta para a possibilidade de que modificações estruturais possam produzir compostos com melhoria da atividade antifúngica.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras, os resultados alcançados nos ensaios de avaliação de citotoxicidade com respeito aos cinamatos contendo núcleos isobenzofuranonas apontam para a possibilidade de avanços do trabalho vinculado a esta dissertação sintetizando-se novos derivados que apresentem variação estrutural seja no anel benzênio seja na ligação dupla da porção arilideno. Novos estudos também podem ser realizados avaliando-se o efeito destes compostos contra outras linhagens celulares. Além disso, estudos envolvendo a influencia de formulações dos compostos mais promissores com respeito à citotoxicidade, correspondem a outra possibilidade que pode ser explorada.

Com respeito aos ensaios fungicidas, uma avaliação mais ampla das atividades dos compostos sintetizados contra diferentes espécies de fungos é de relevância para que se possa ter um balanço da viabilidade dos

cinamatos contendo núcleos isobenzofuranonas como um possível *scaffold* a ser explorado visando a obtenção de novos agentes de controle de fungos.

ANEXOS
ESPECTROS

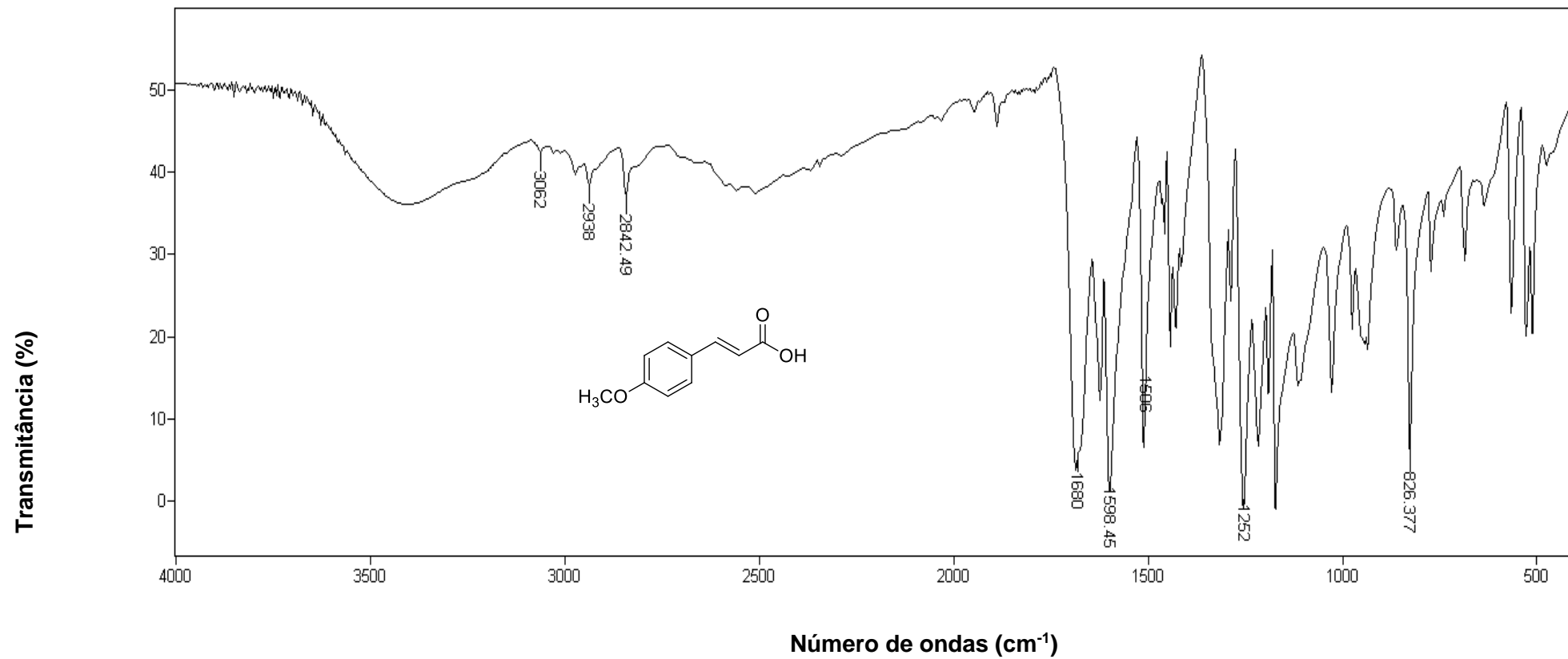


Figura 1 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 4.

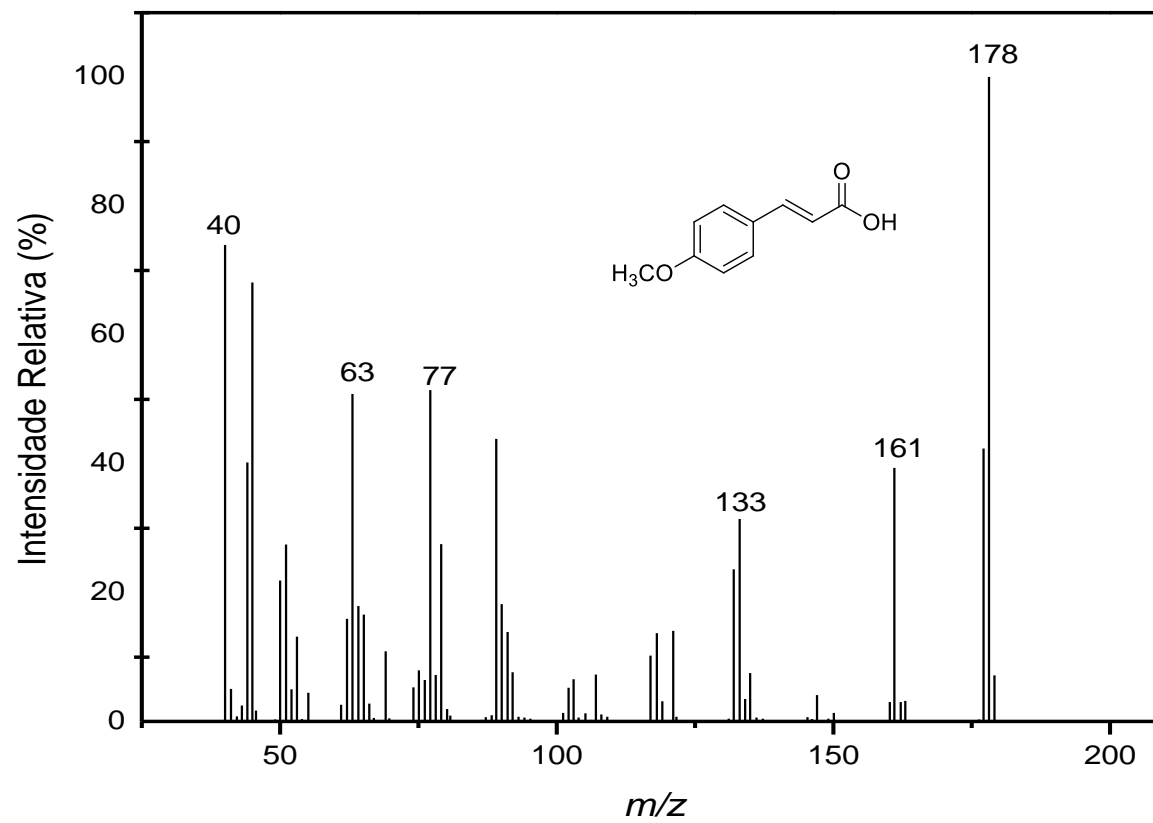


Figura 2 - Espectro de Massas do composto 4.

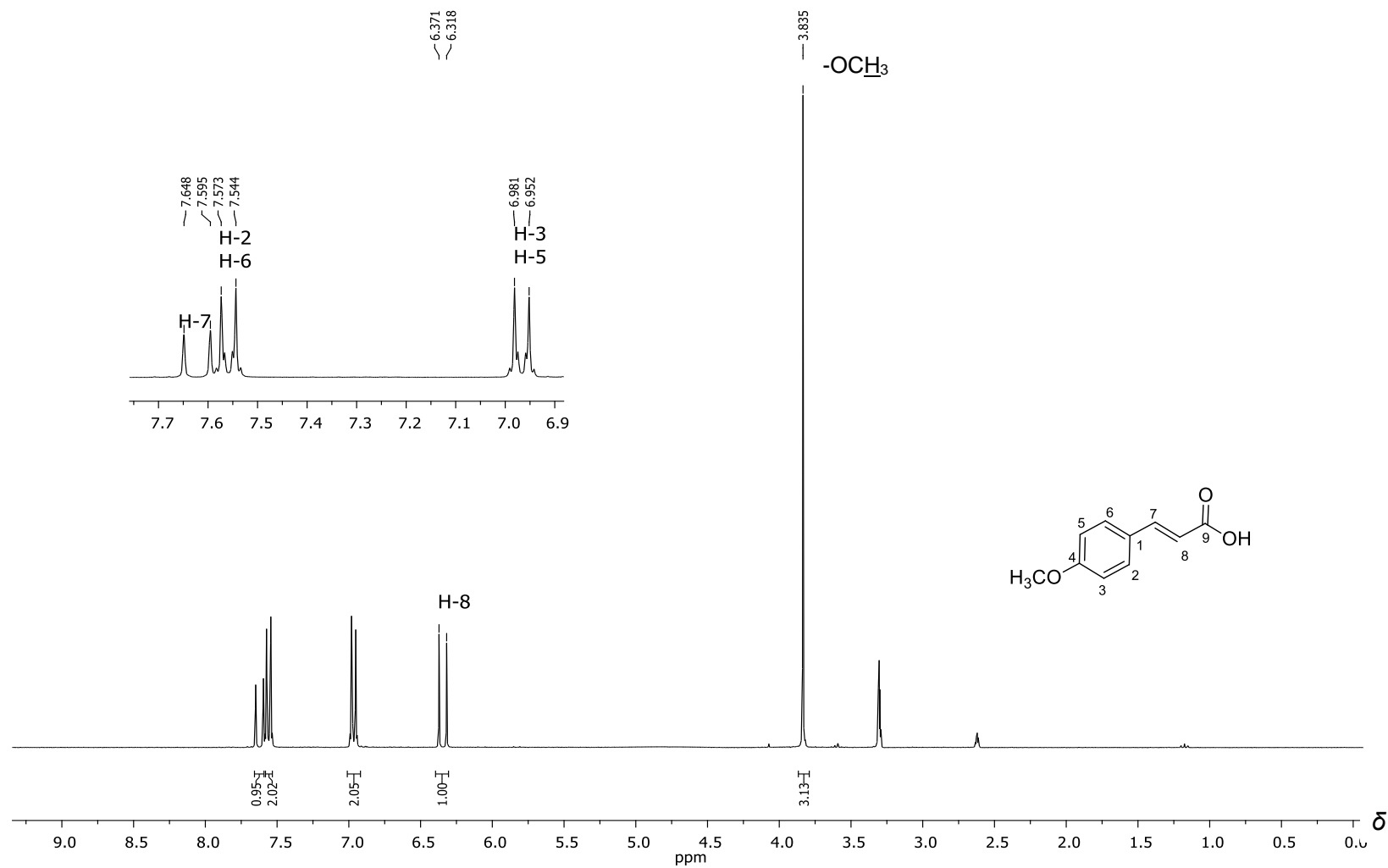


Figura 3 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) do composto **4**.

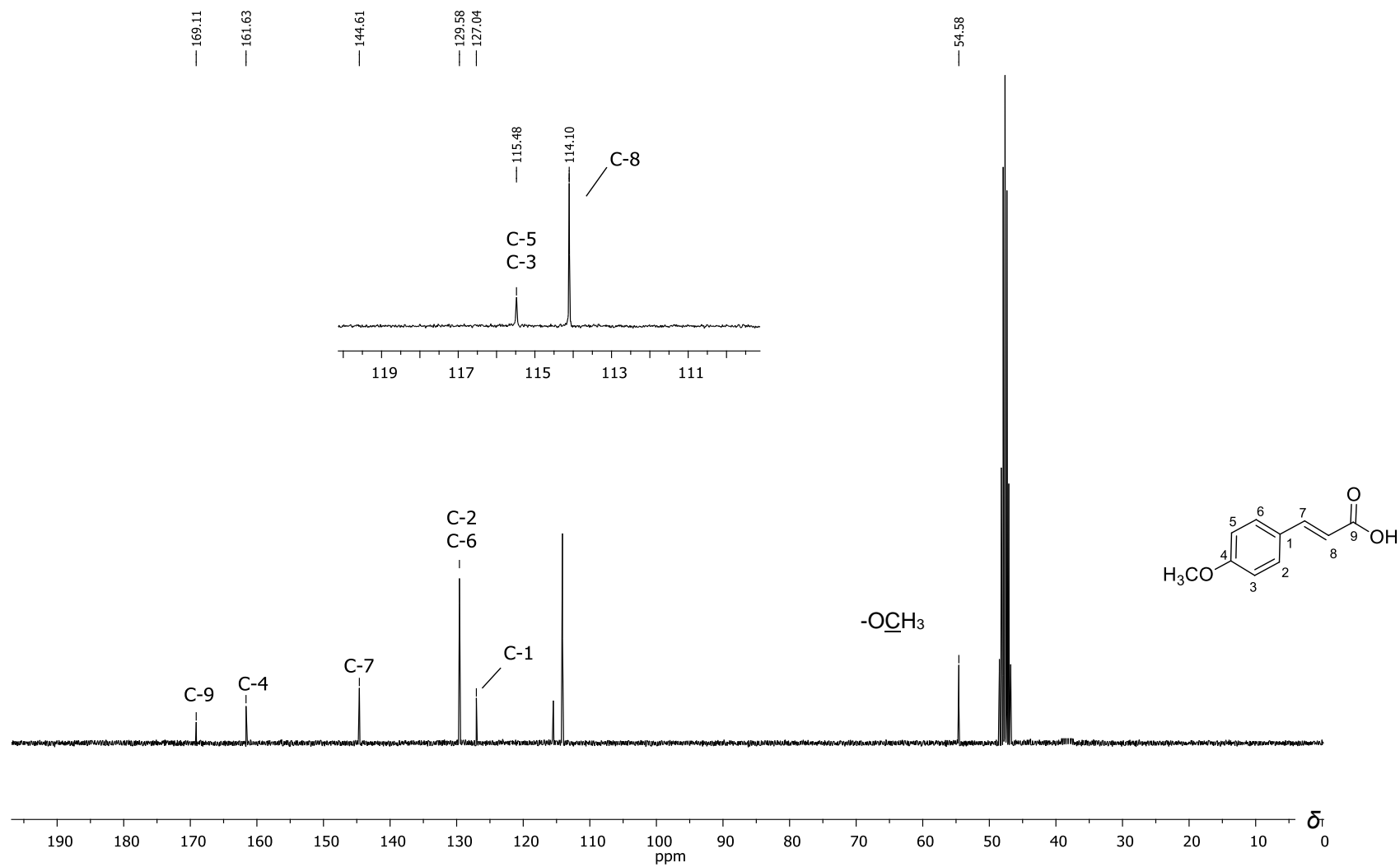


Figura 4 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) do composto 4.

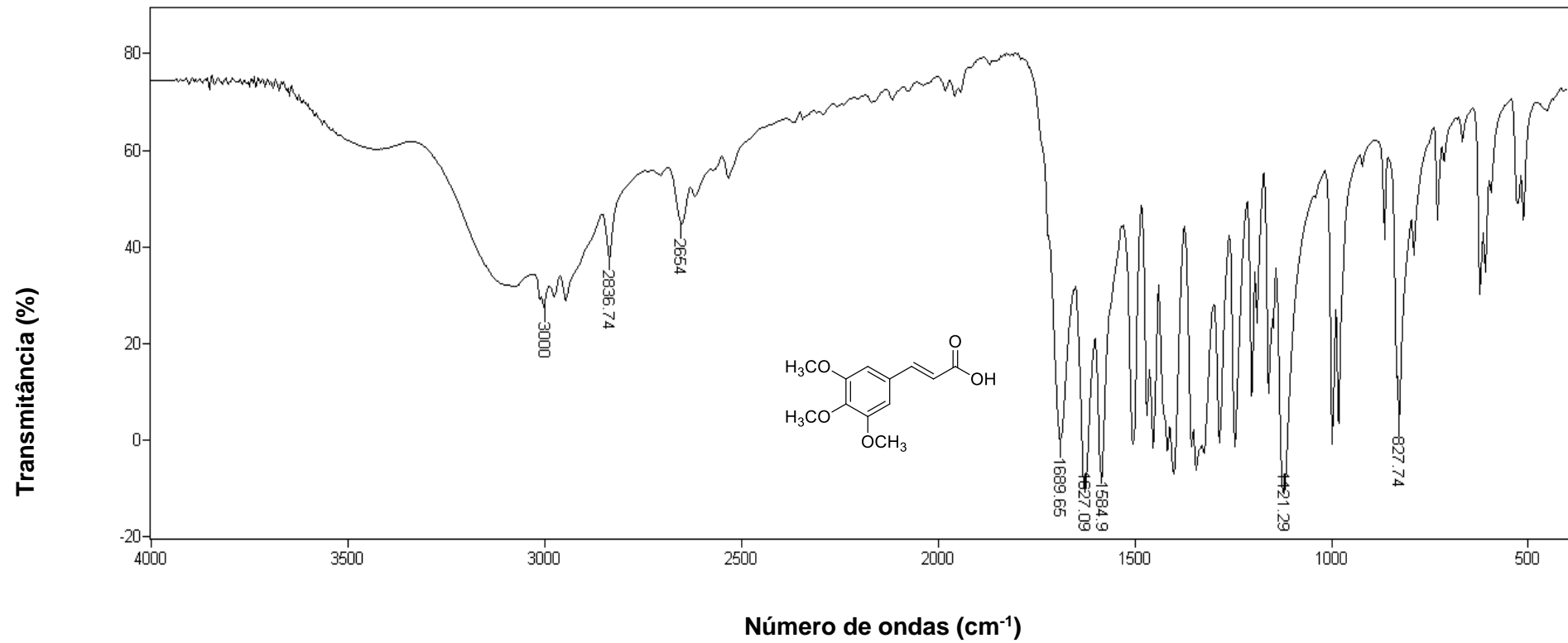


Figura 5 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 5.

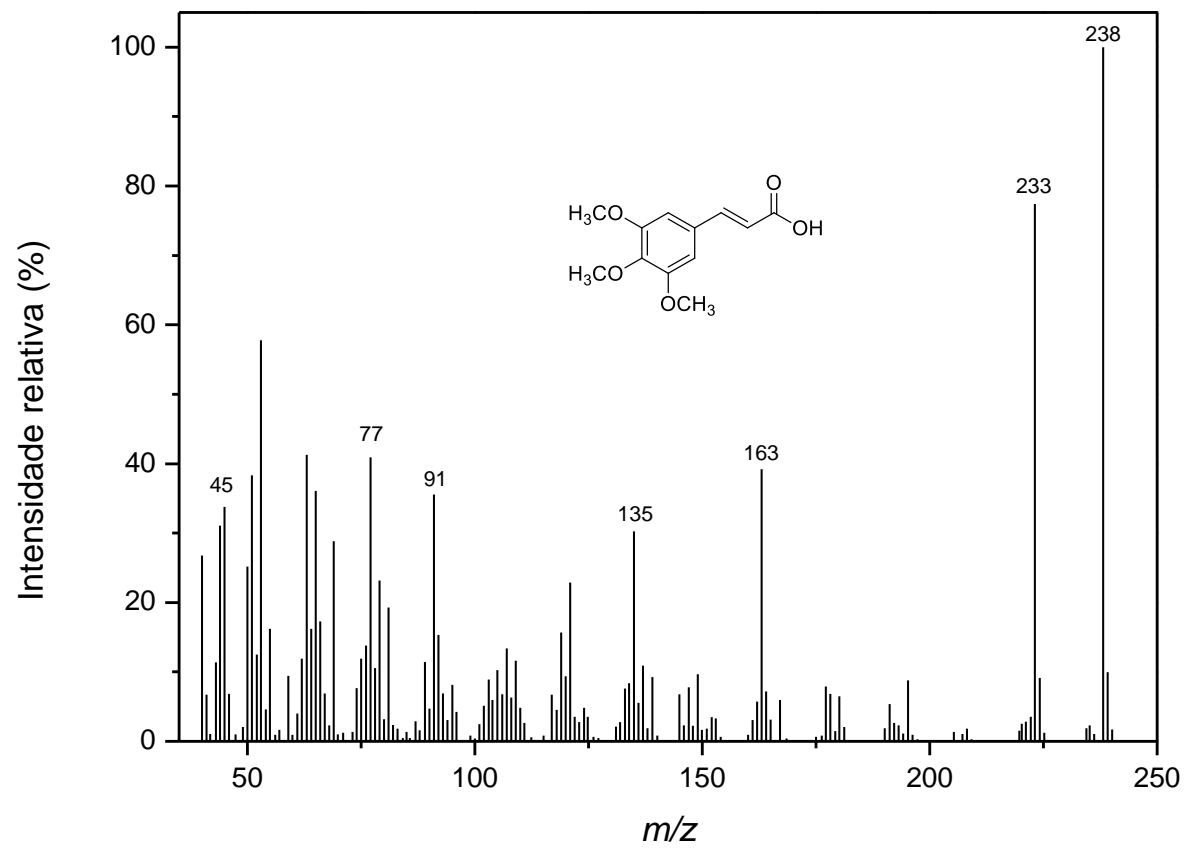


Figura 6 - Espectro de massas do composto 5.

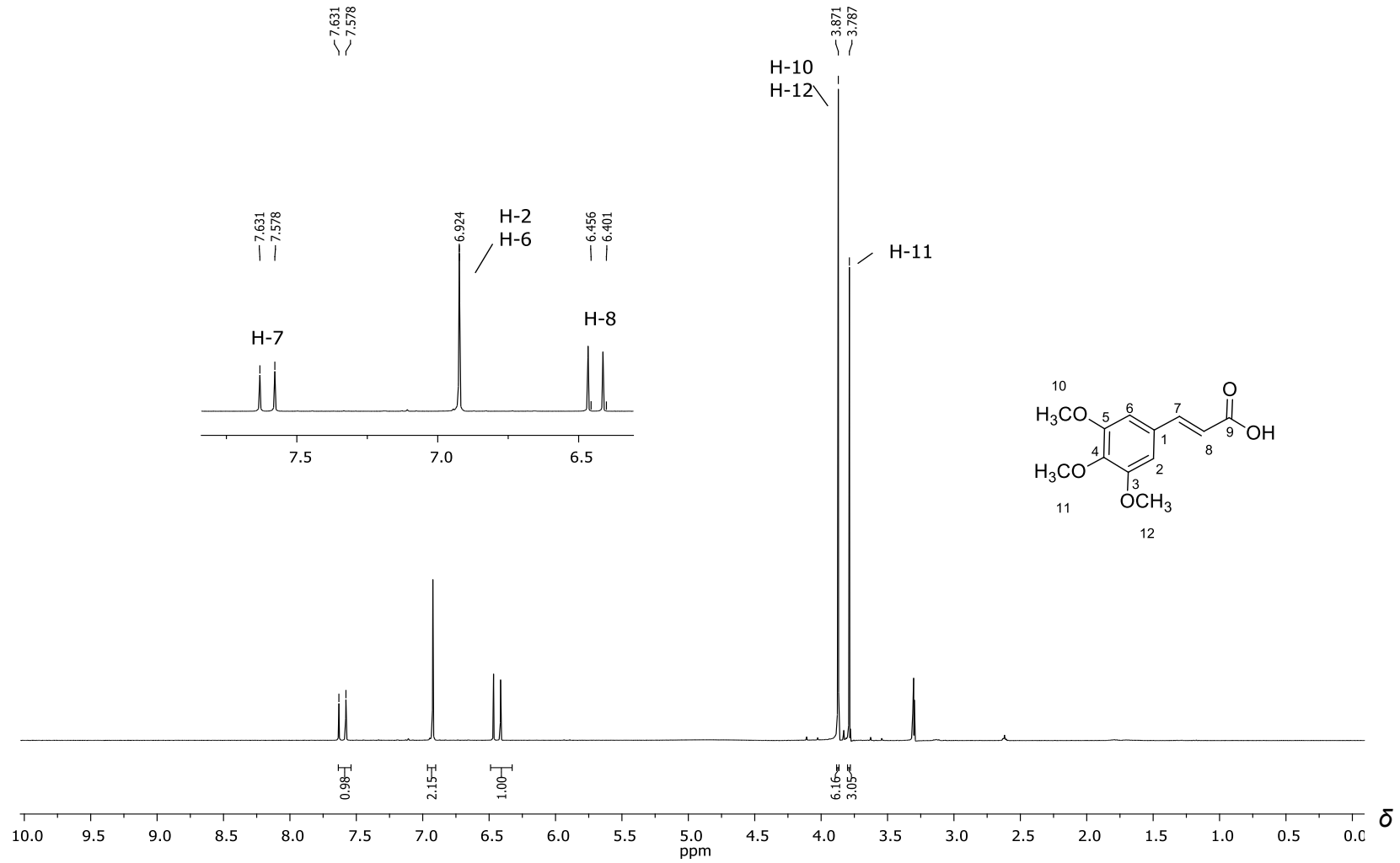


Figura 7 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) para o composto **5**.

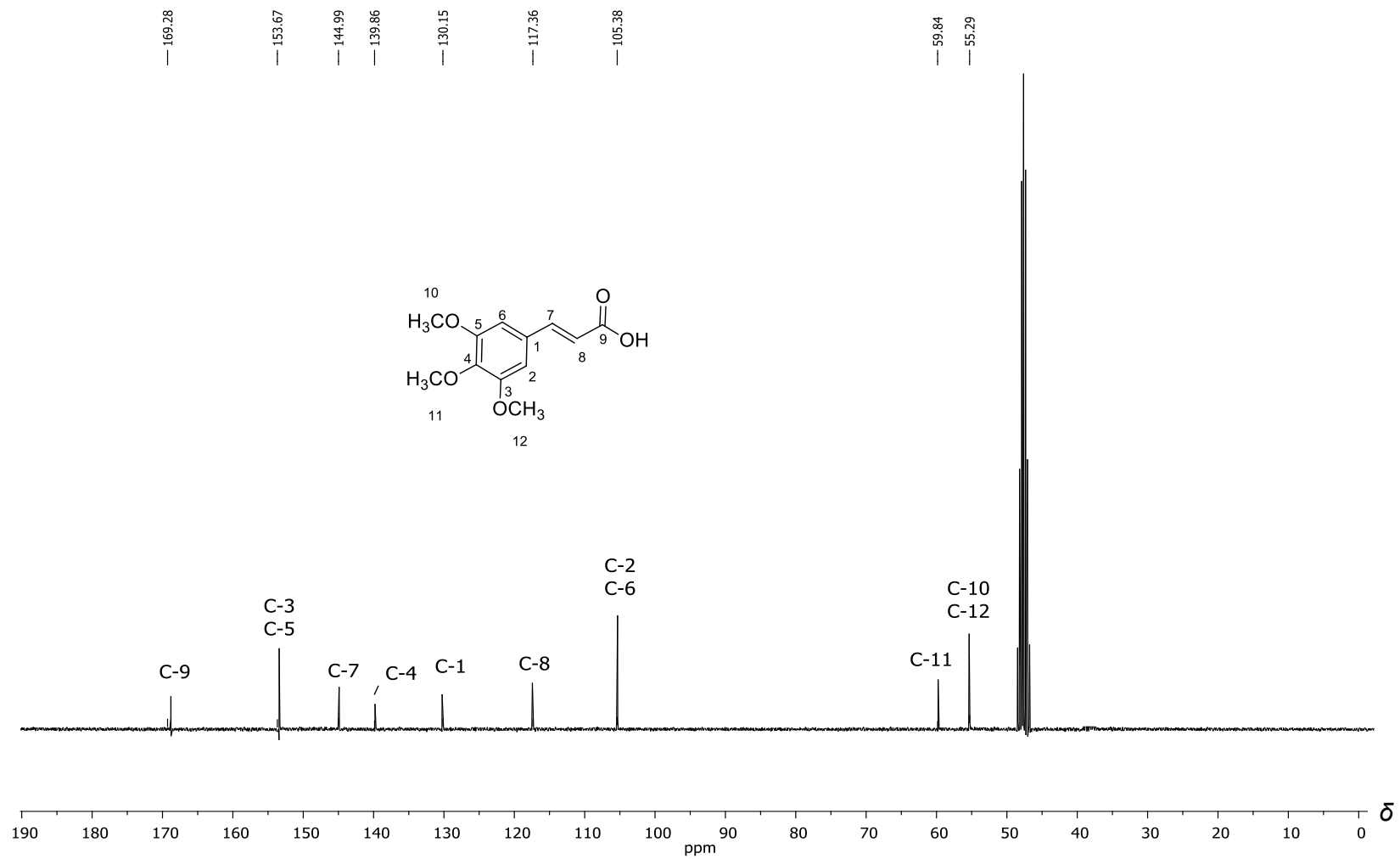


Figura 8 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz; DMSO-*d*₆) para o composto 5.

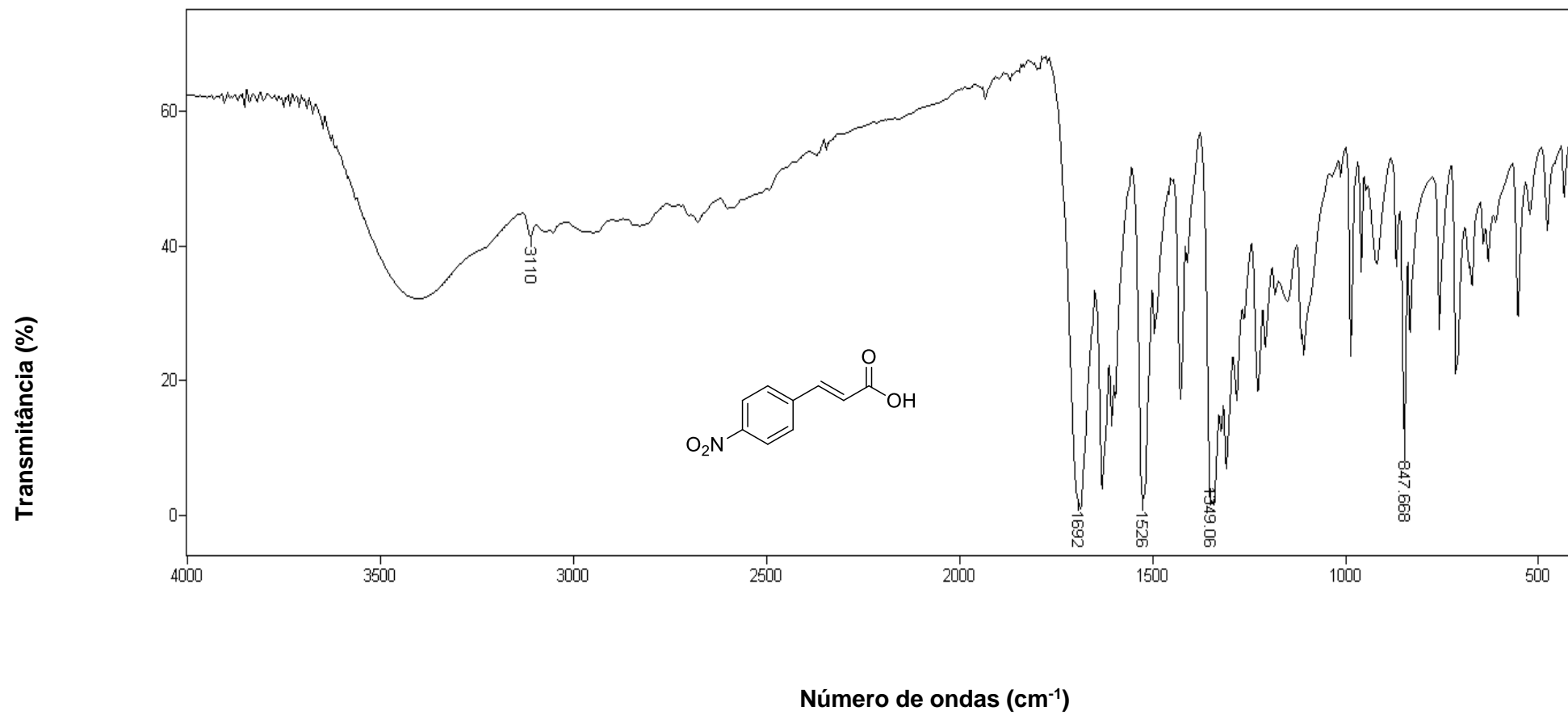


Figura 9 - Espectro no infravermelho (KBr) para o composto 6.

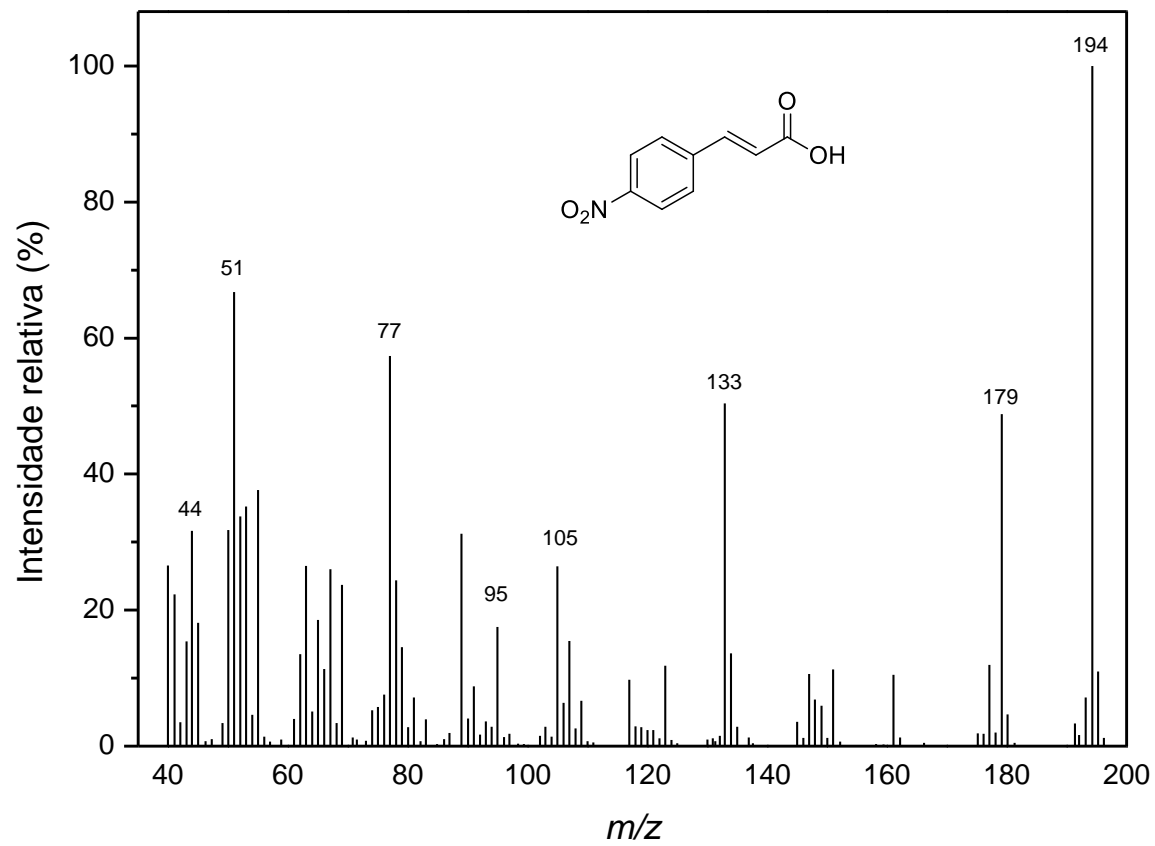


Figura 10 - Espectro de massas do composto 6.

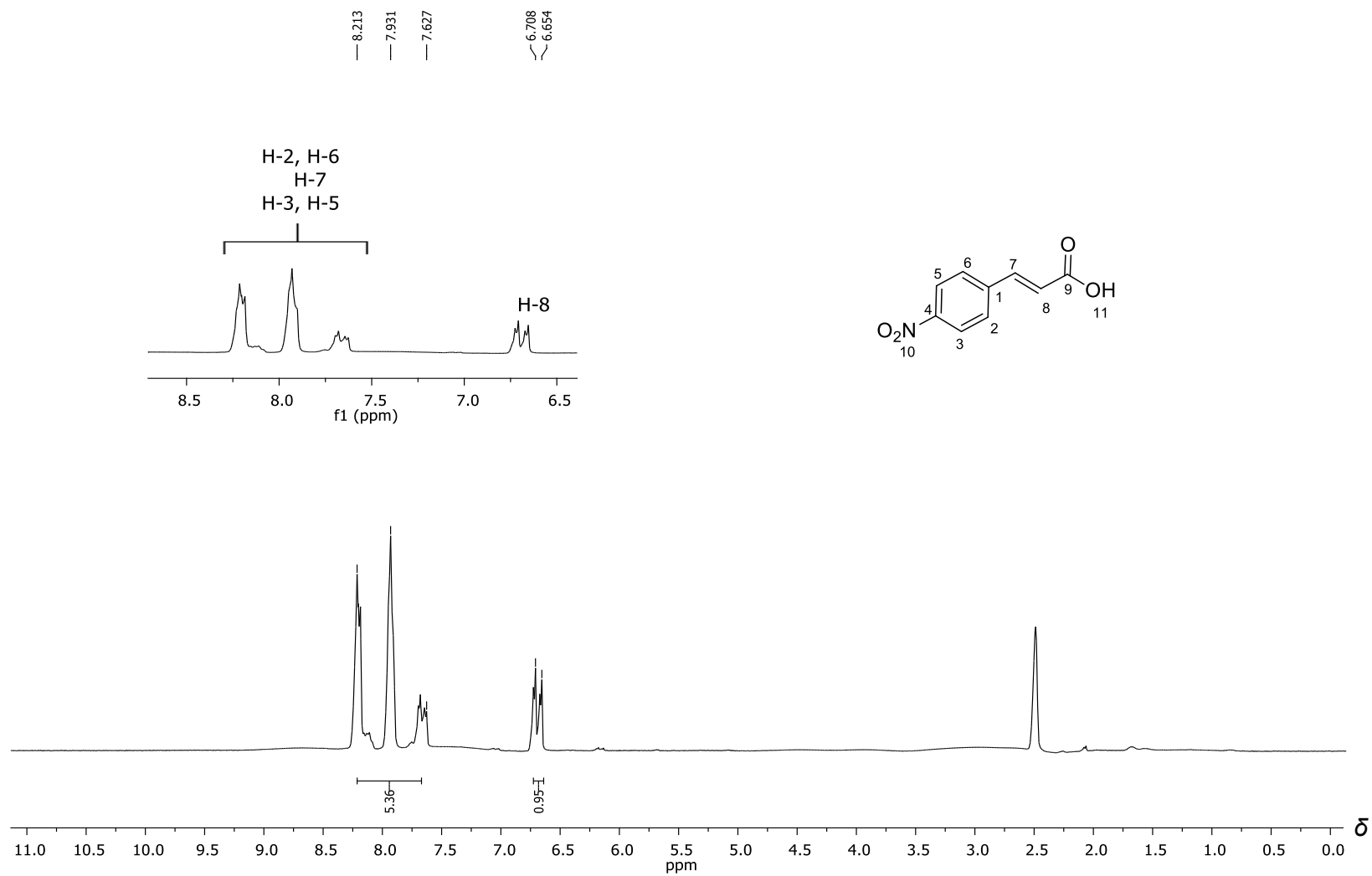


Figura 11 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz; DMSO-*d*₆) do composto **6**.

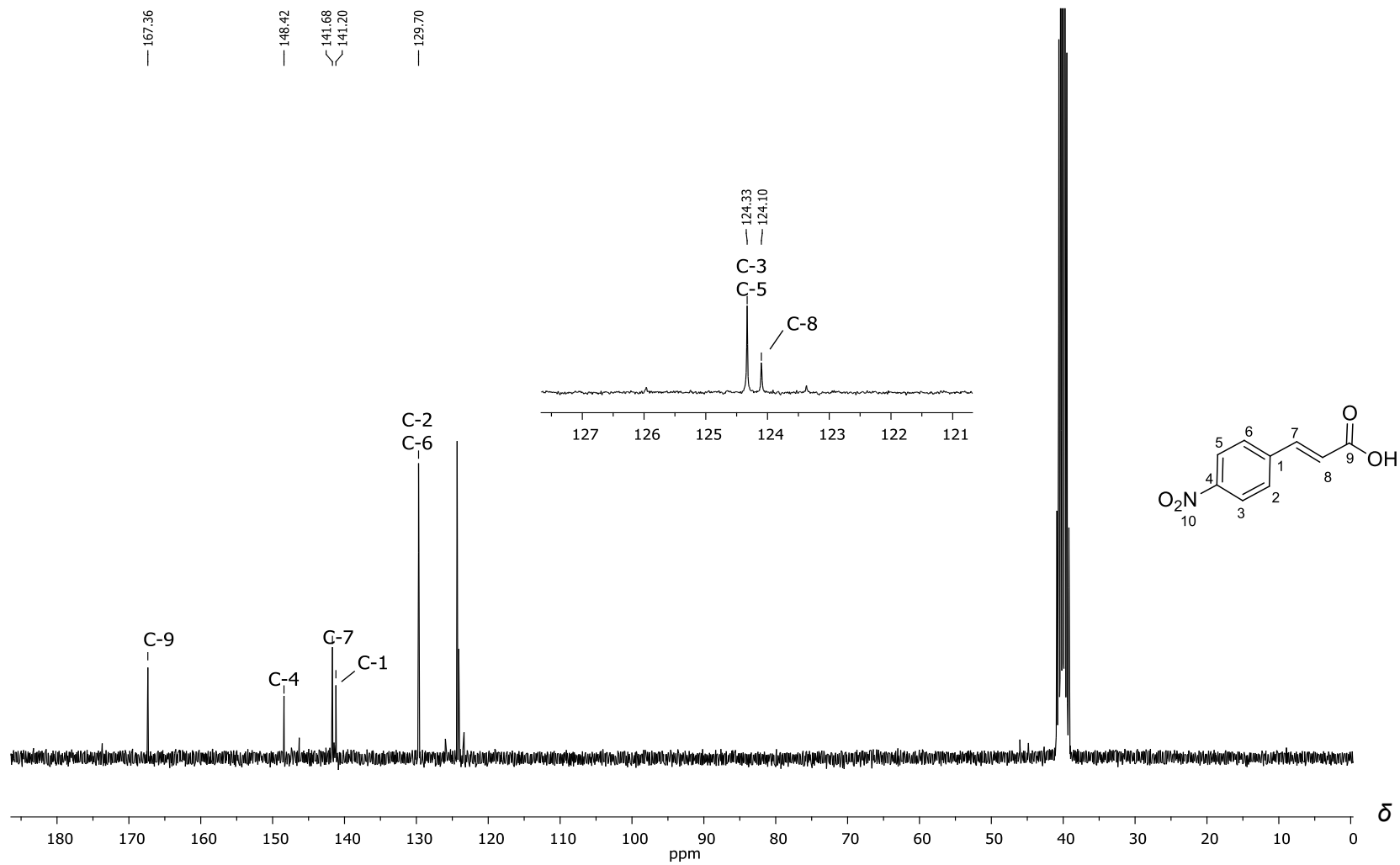


Figura 12 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) do composto **6**.

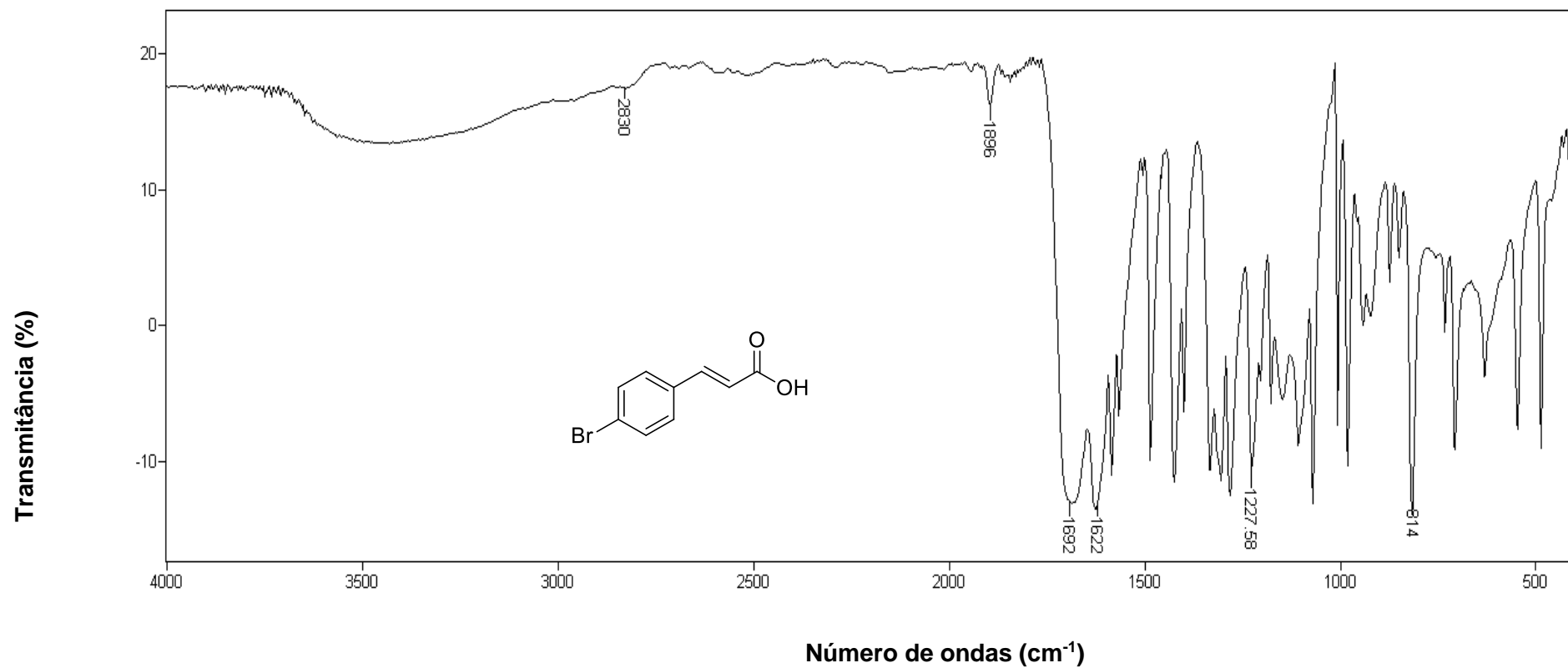


Figura 13 - Espectro no infravermelho (KBr) para o composto 7.

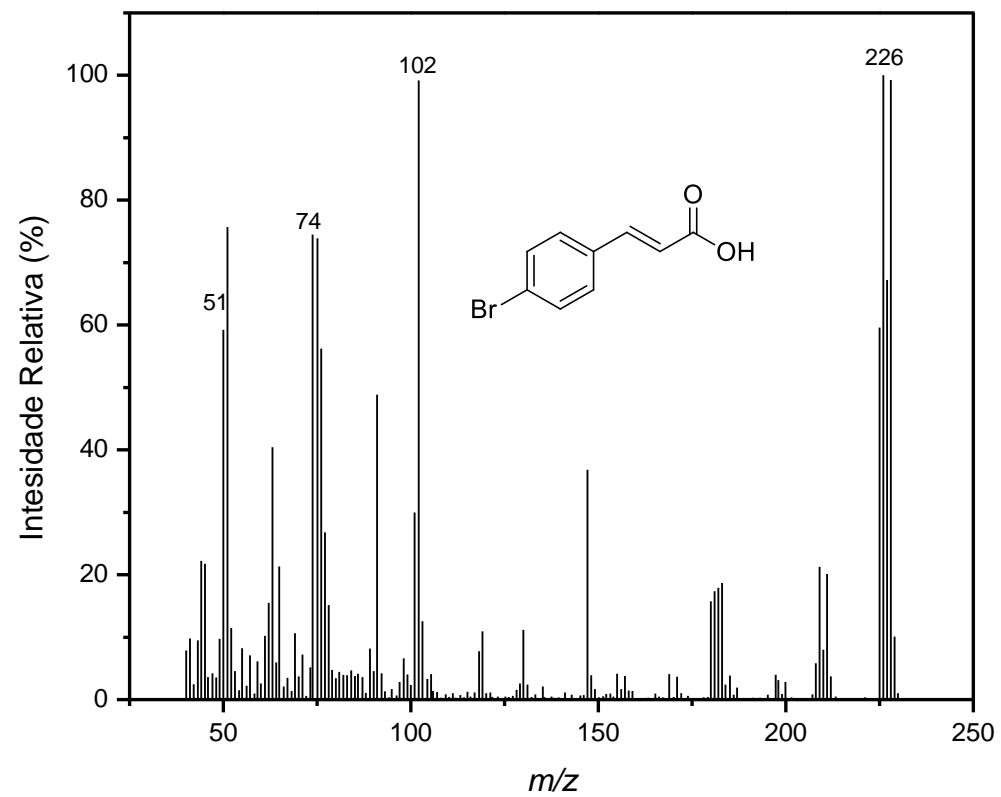


Figura 14 - Espectro de massas do composto 7.

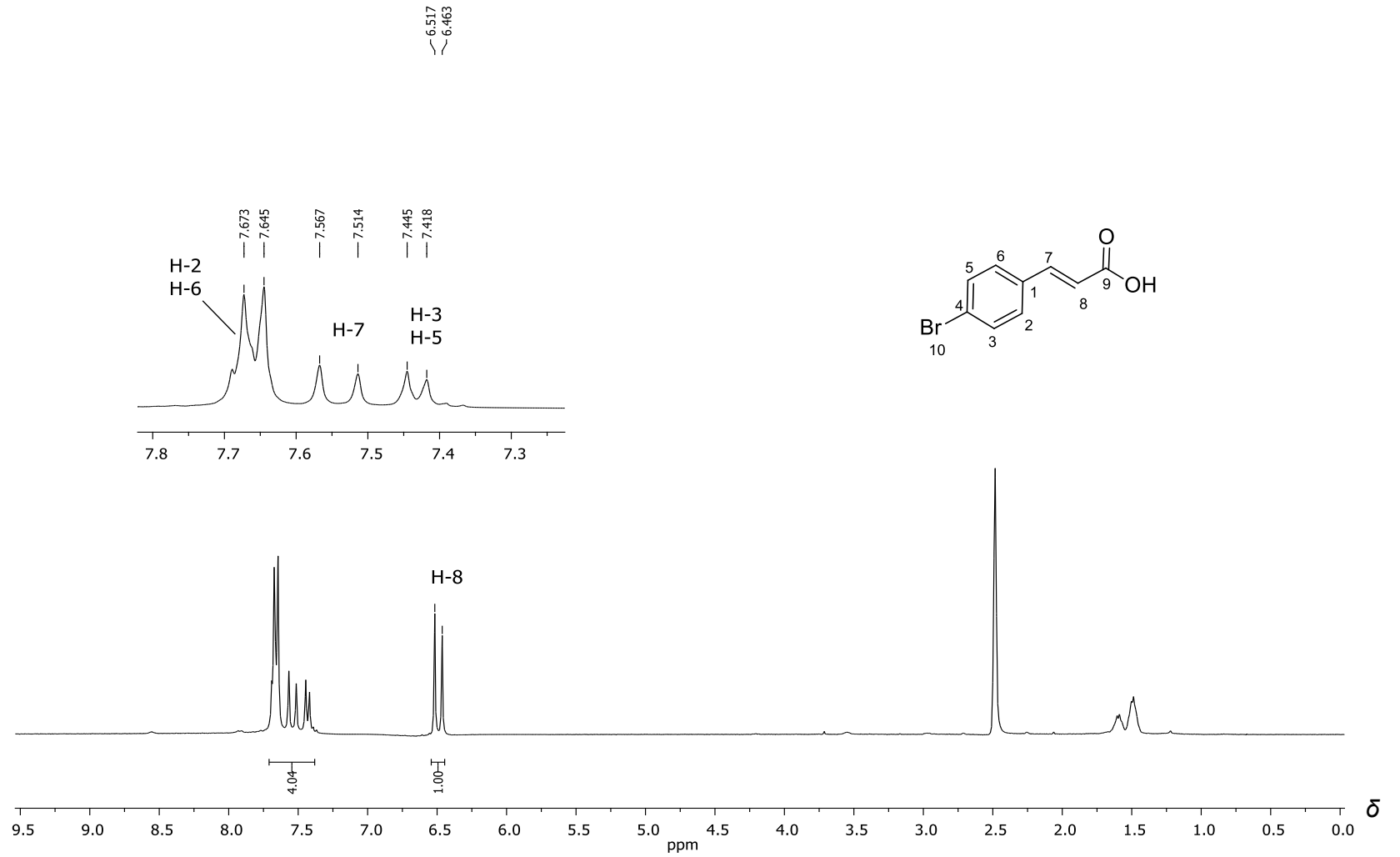


Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) do composto 7.

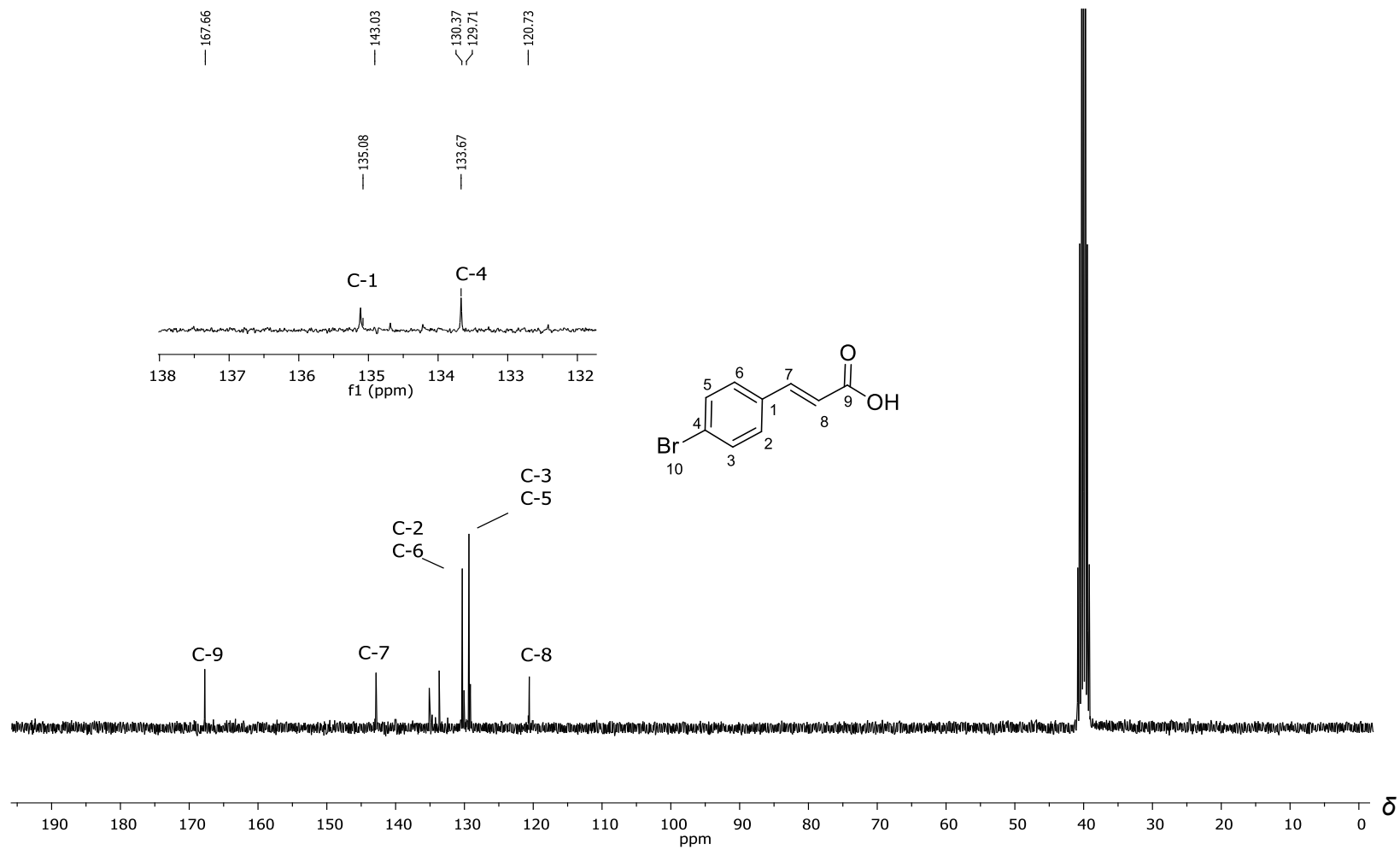


Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) do composto 7.

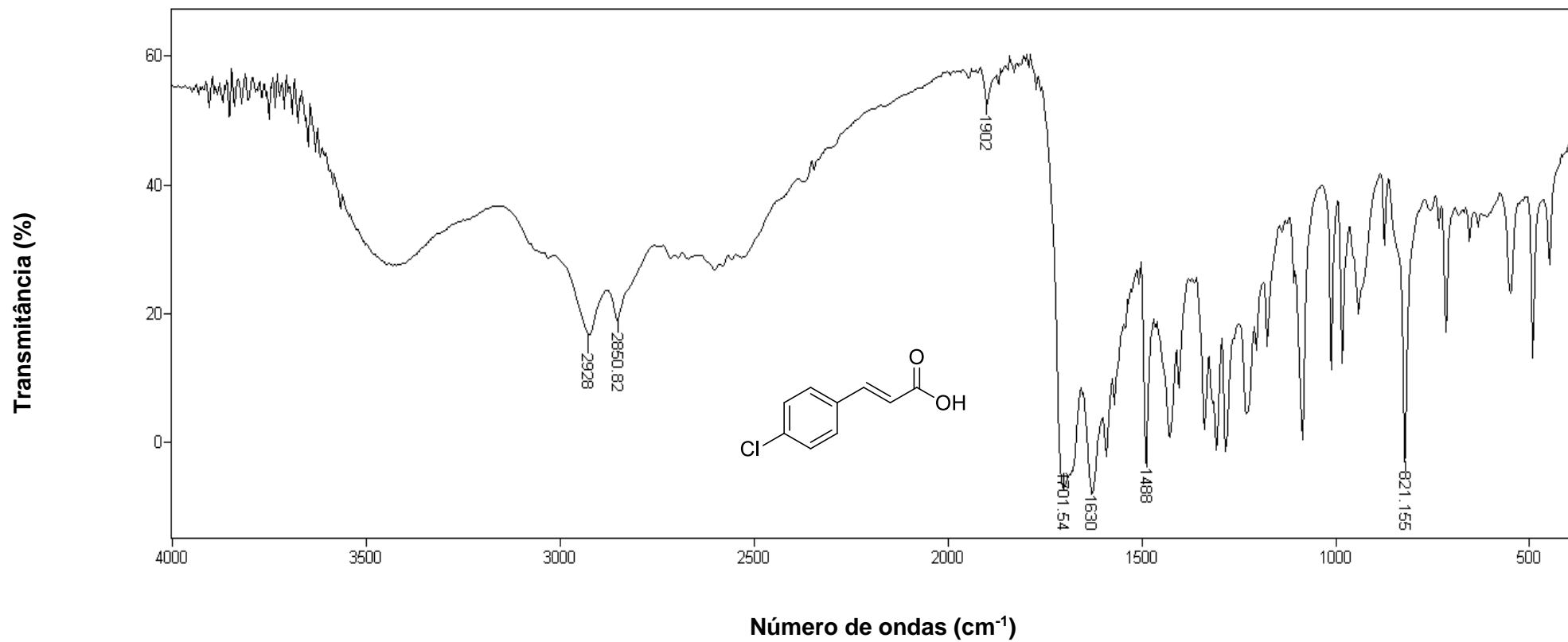


Figura 17 - Espectro no infravermelho (KBr) para o composto 8.

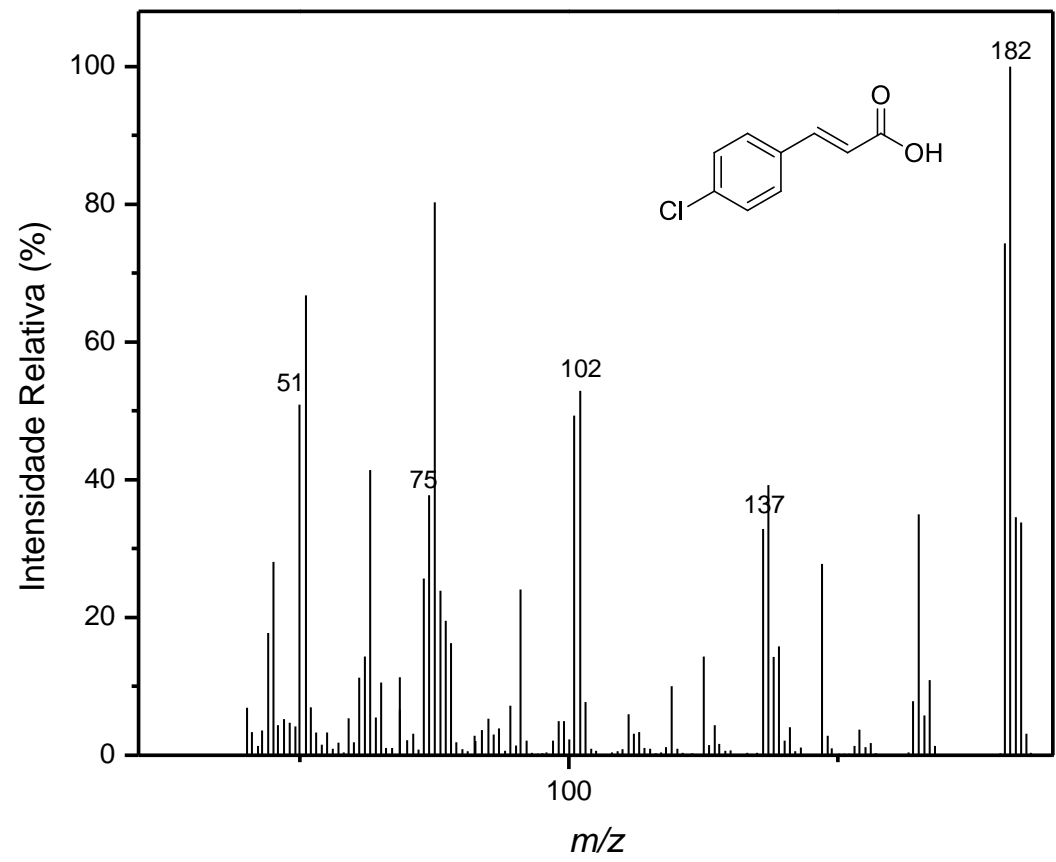


Figura 18 - Espectro de massas do composto 8.

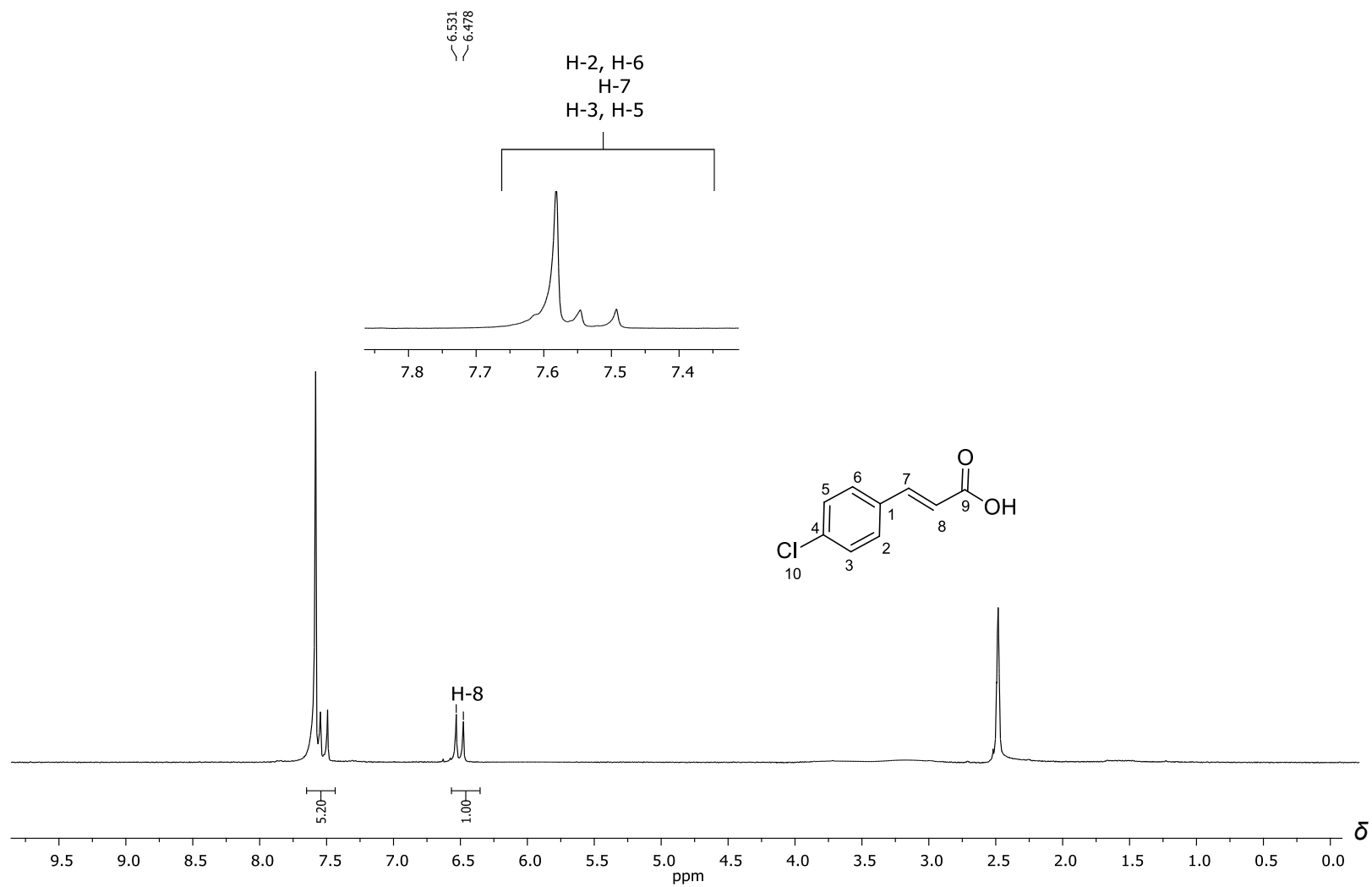


Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) para o composto **8**.

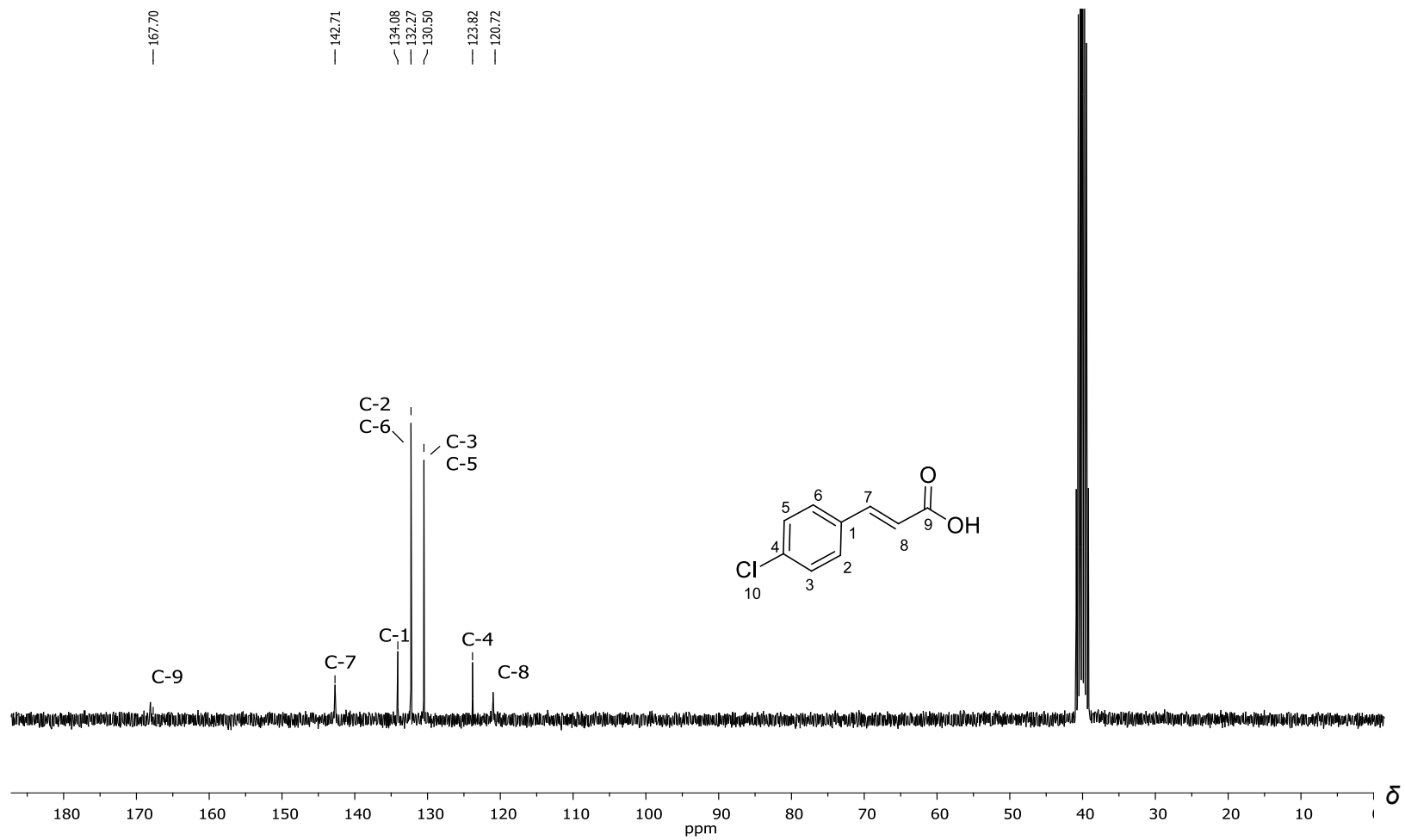


Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) do composto **8**.

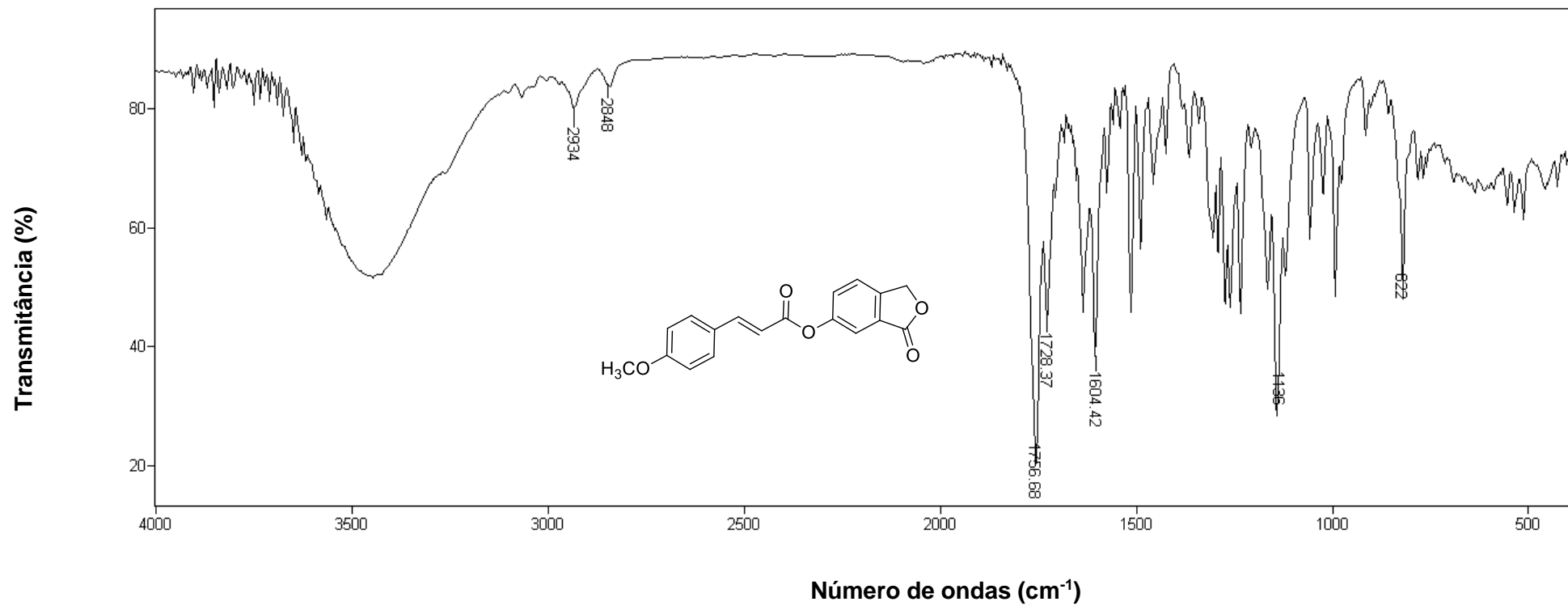


Figura 21 - Espectro no infravermelho (KBr) para o composto 10.

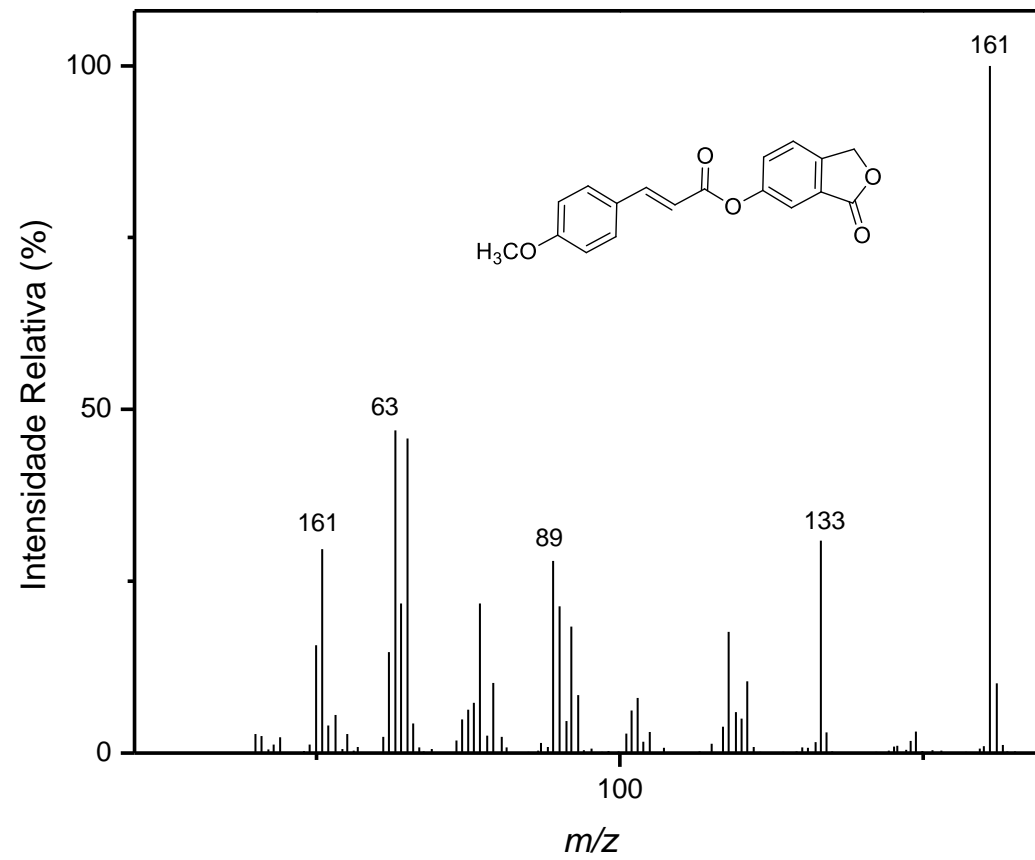


Figura 22 - Espectro de massas do composto **10**.

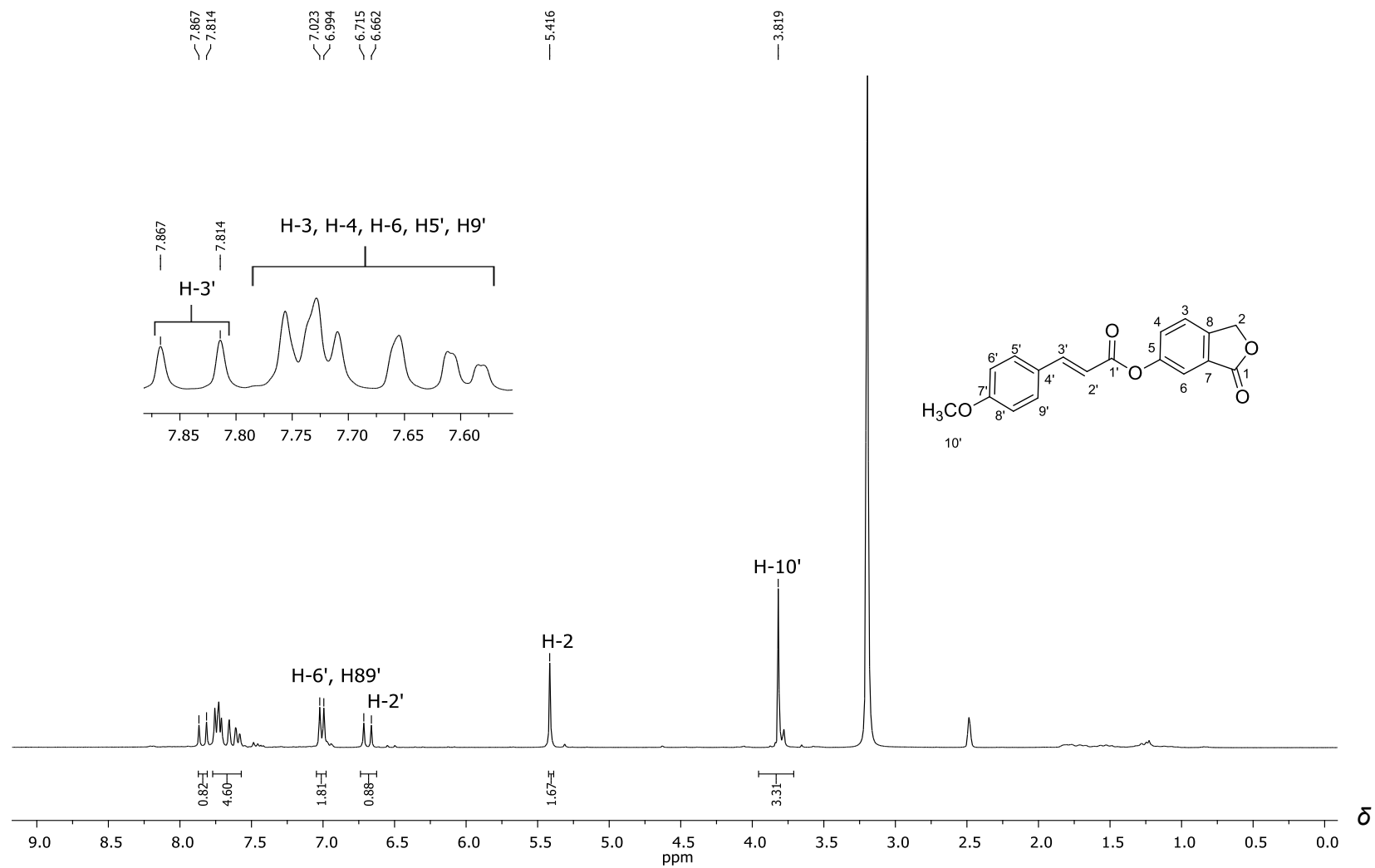


Figura 23 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz; DMSO-*d*₆) do composto **10**.

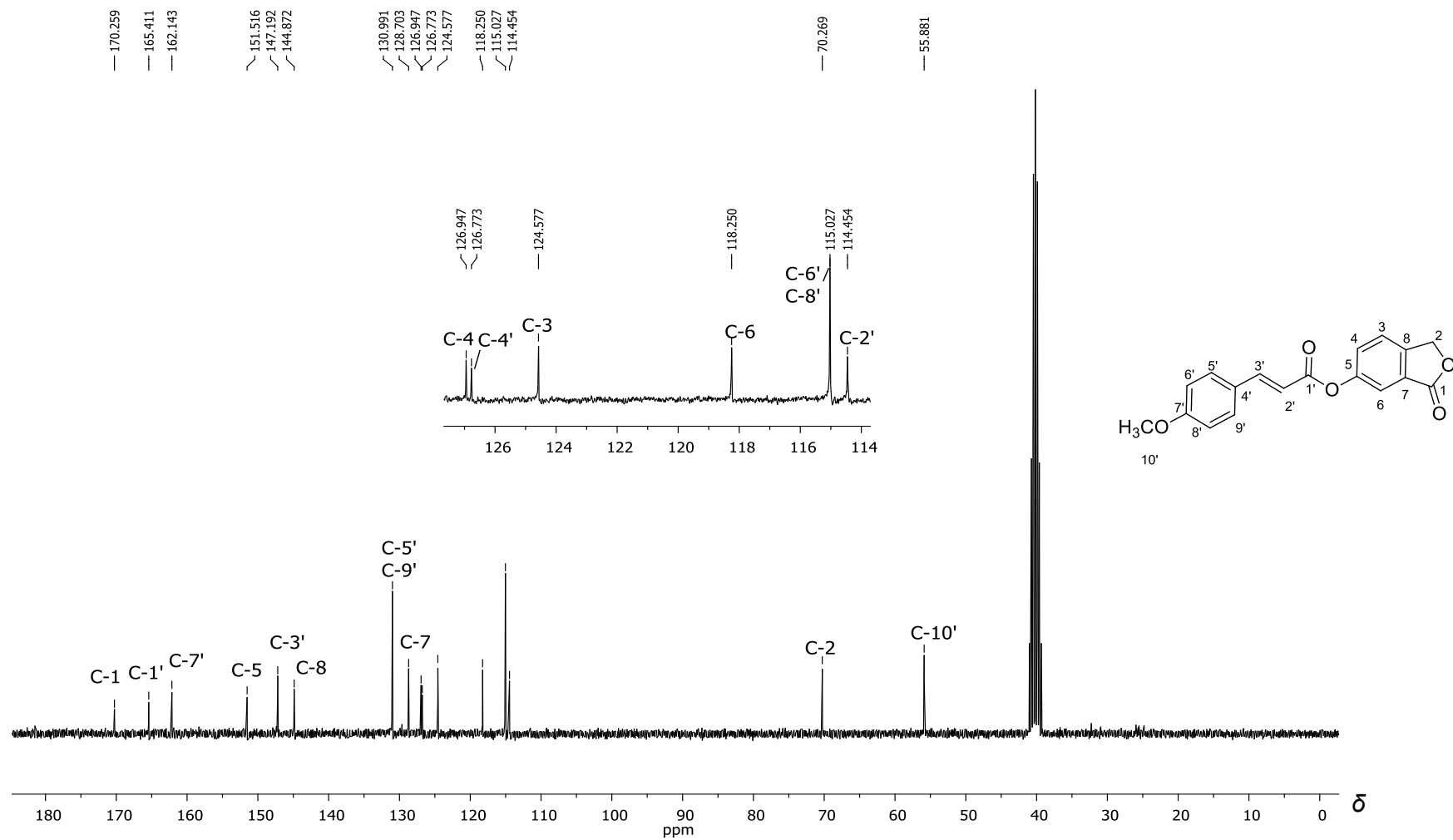


Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) do composto **10**.

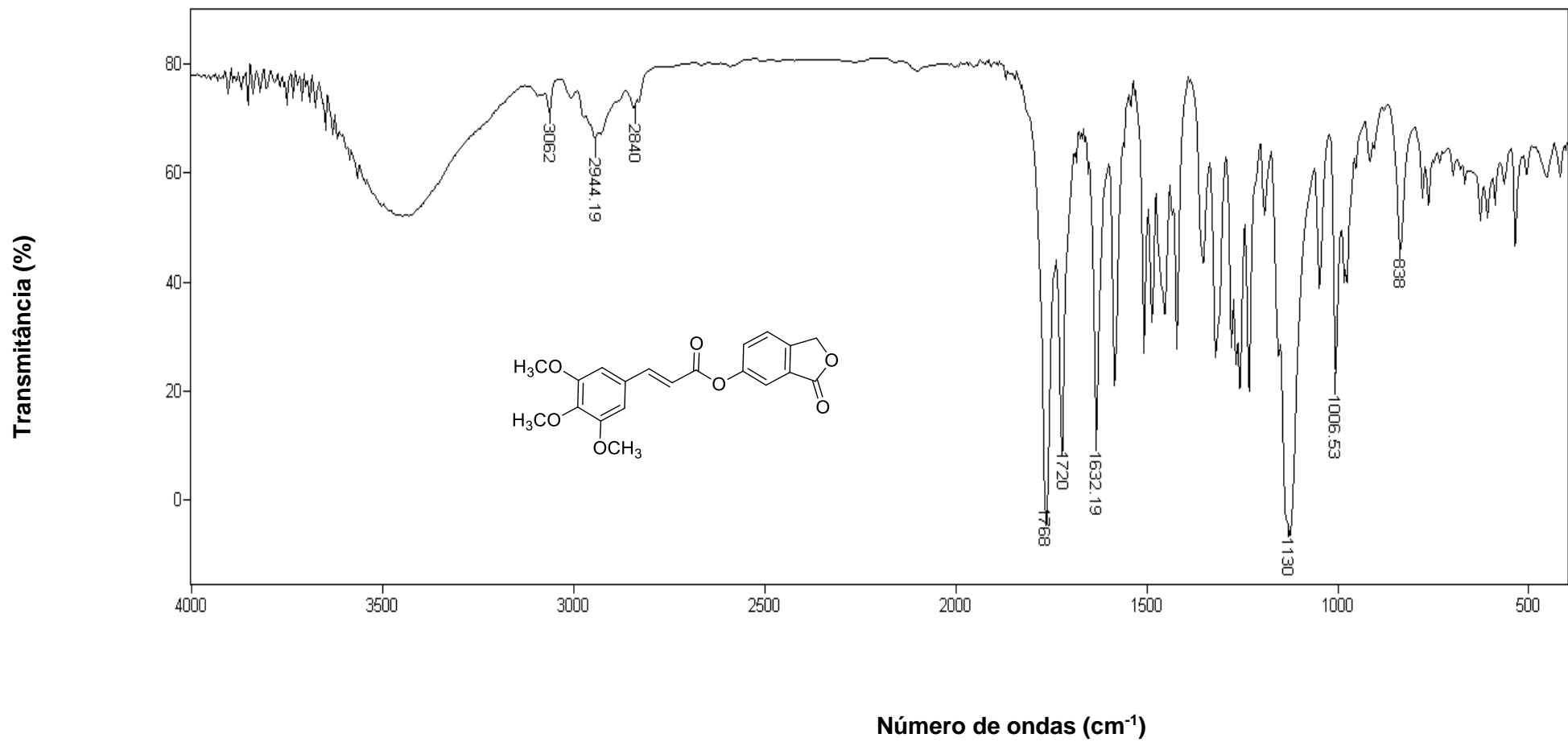


Figura 25 - Espectro no infravermelho (KBr) para o composto 11.

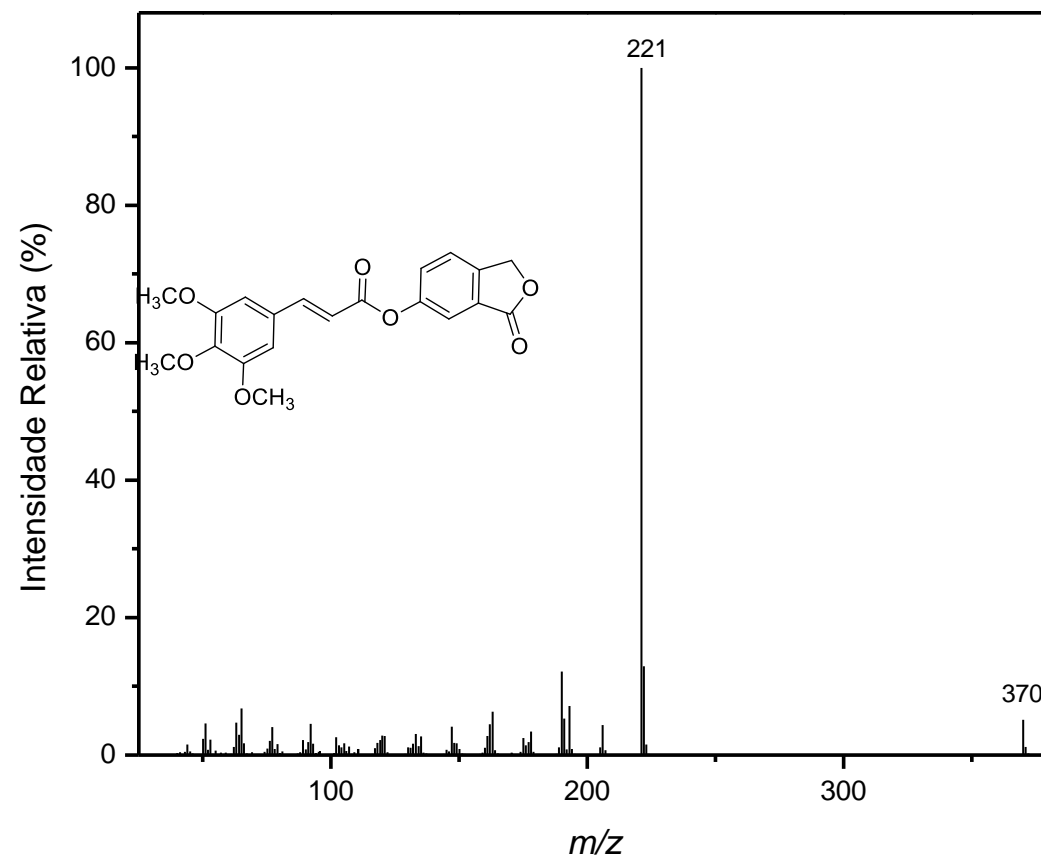


Figura 26 - Espectro de massas do composto 11.

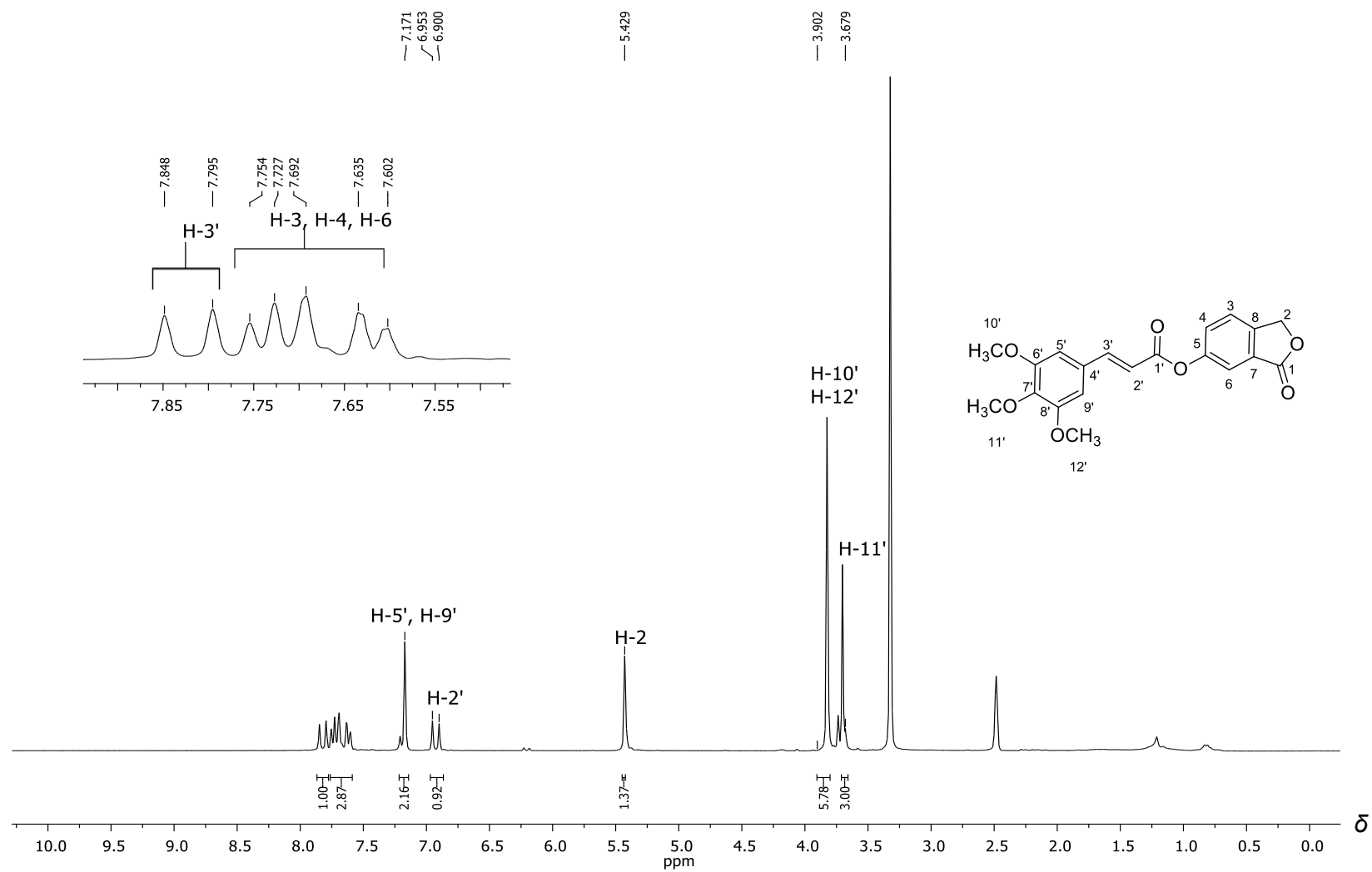


Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) do composto **11**.

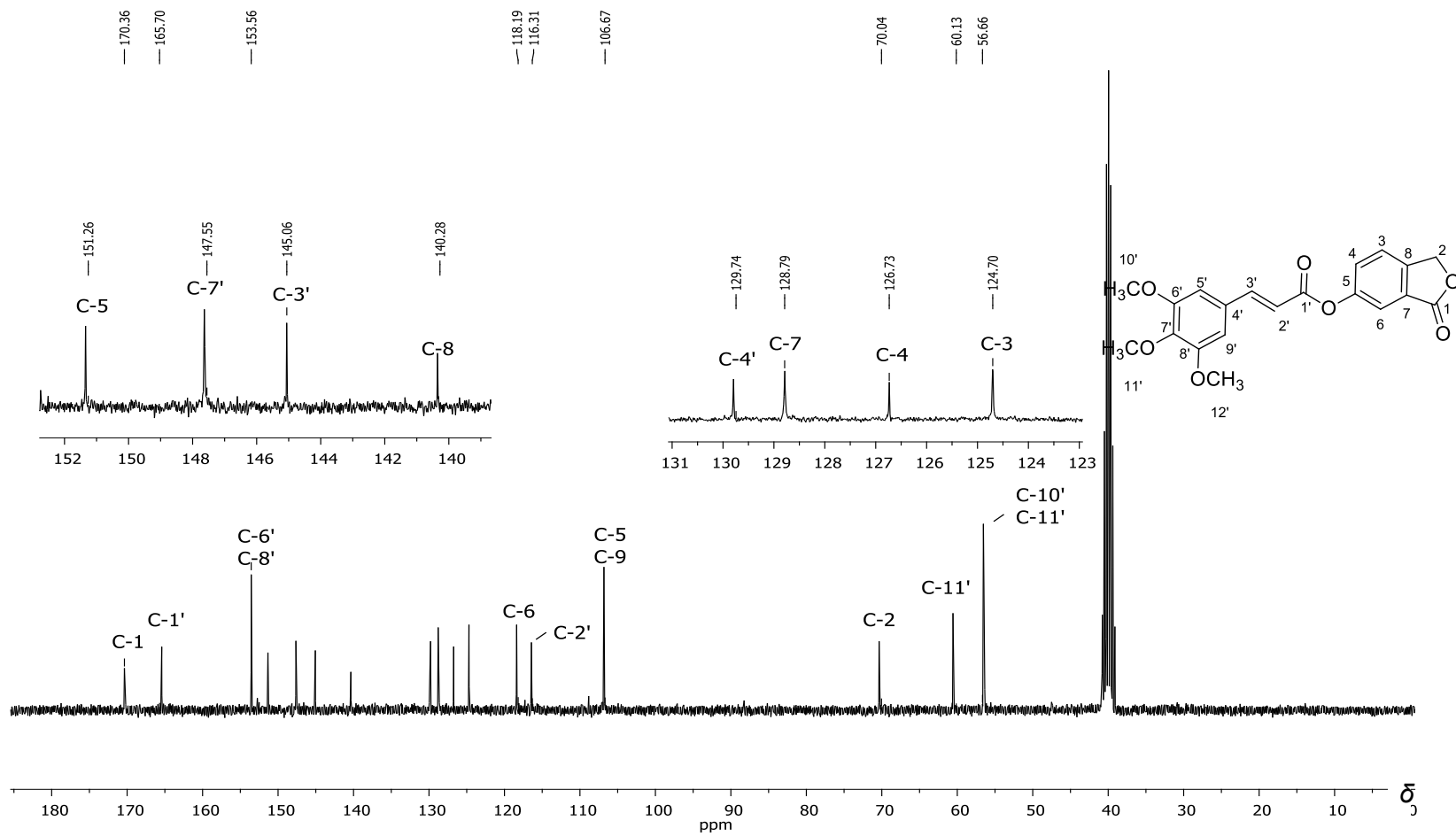


Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) do composto **11**.

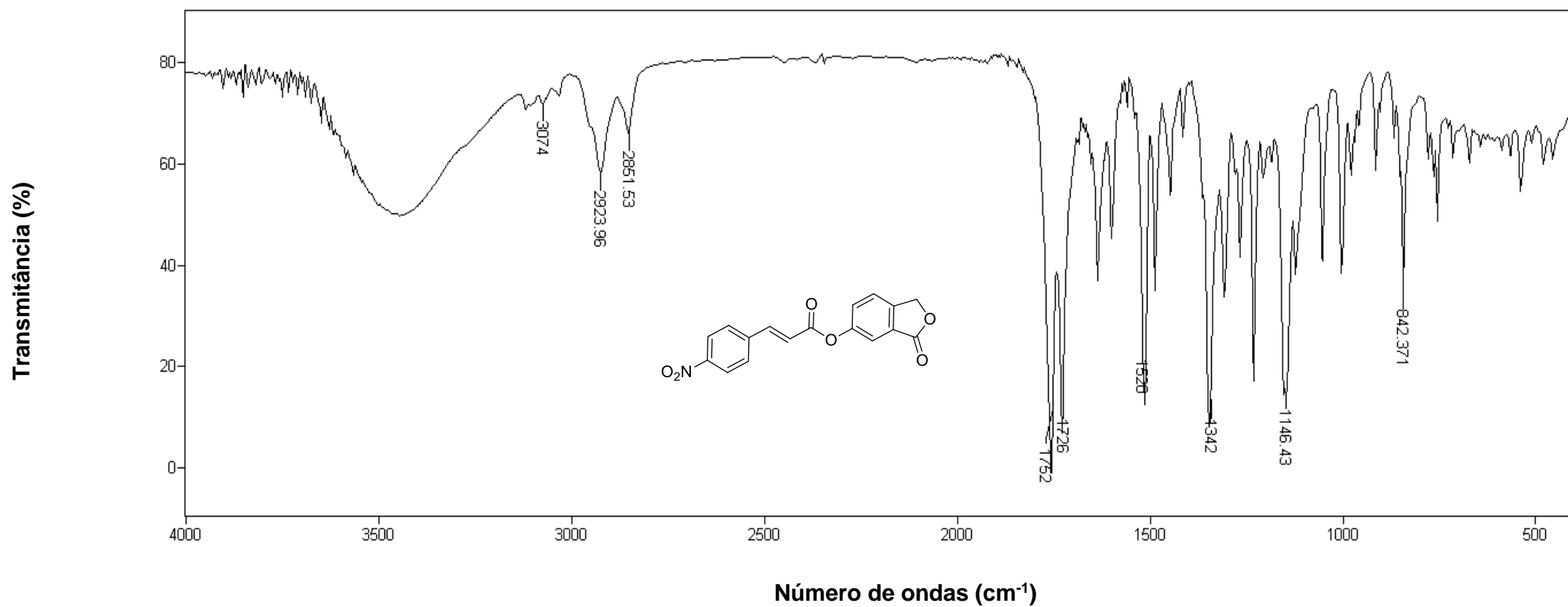


Figura 29 - Espectro no infravermelho (KBr) para o composto 12.

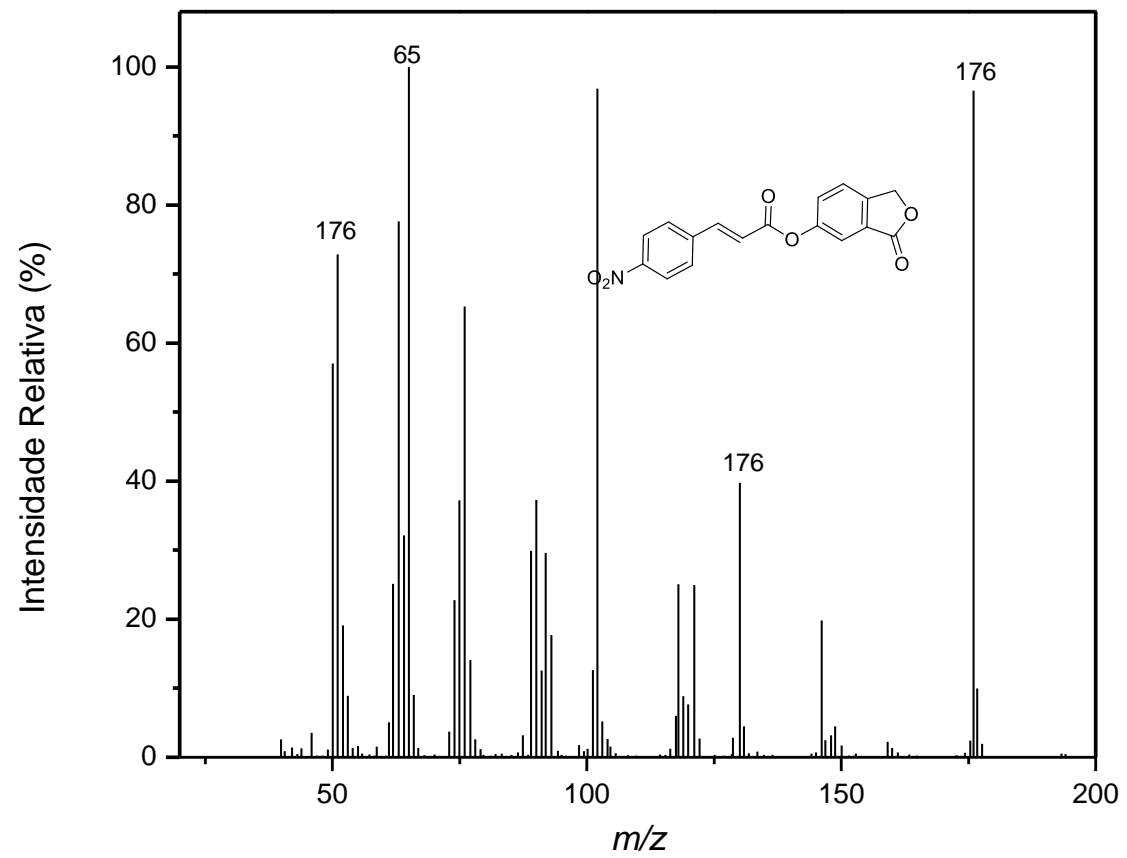


Figura 30 - Espectro de massas do composto **12**.

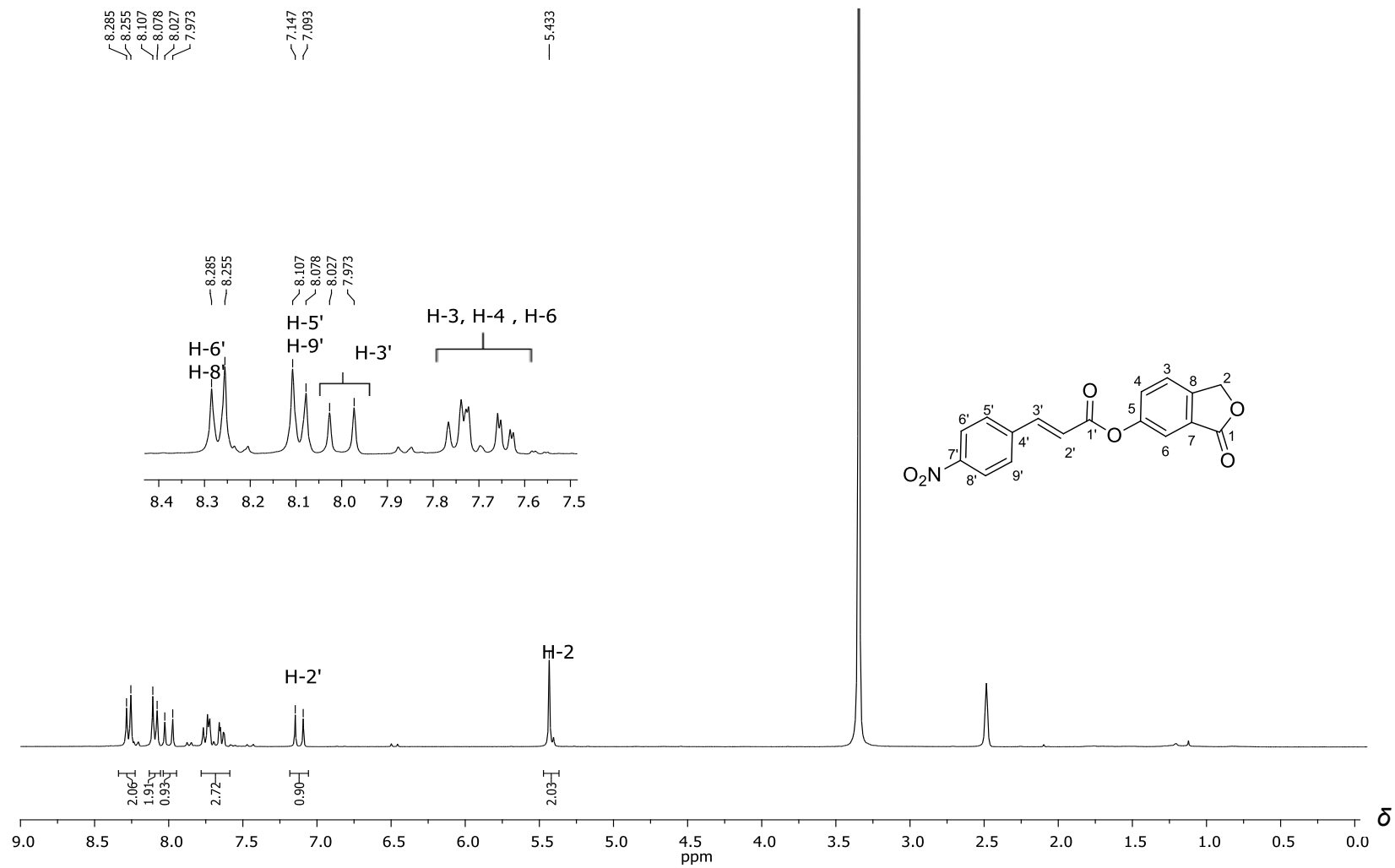


Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$) do composto **12**.

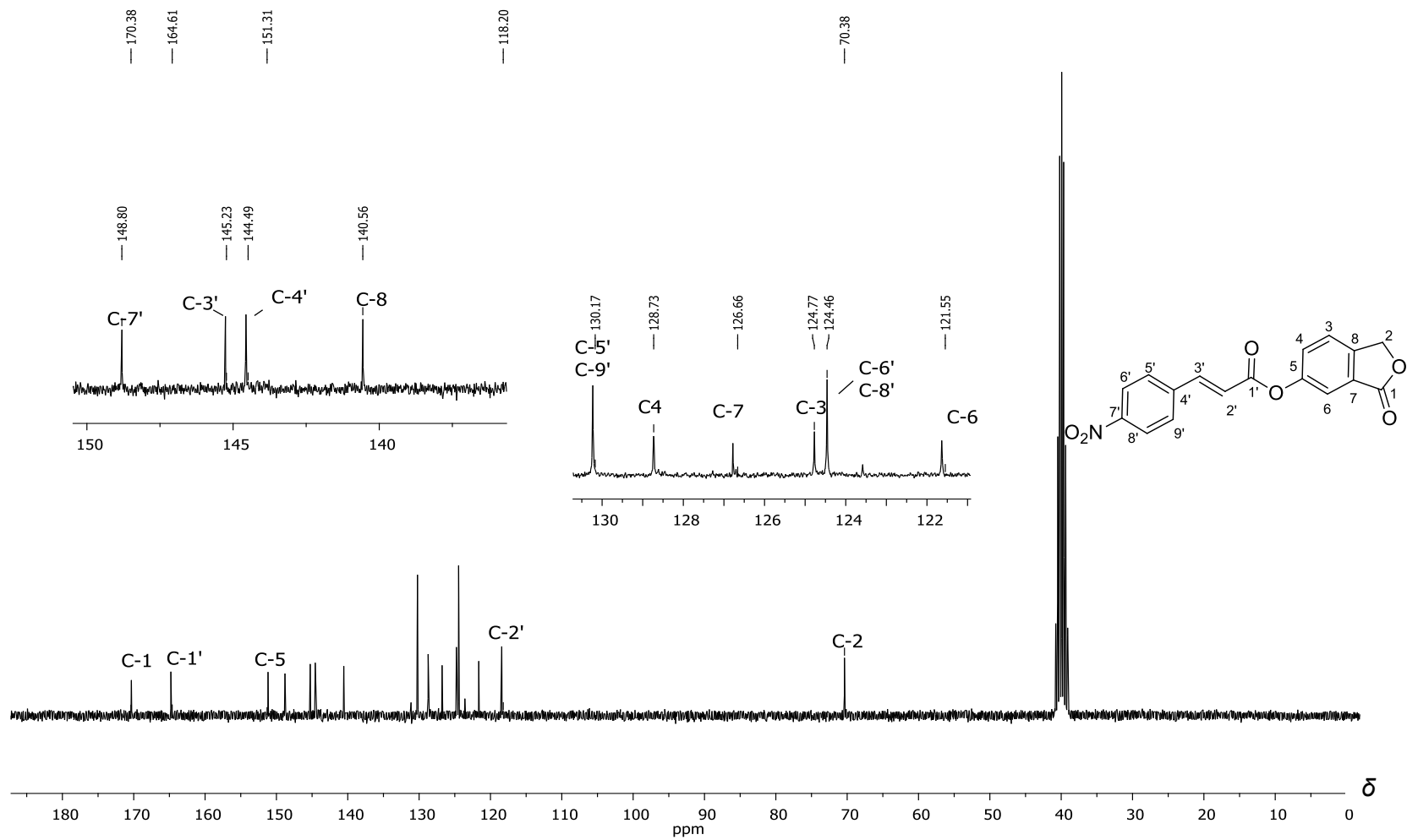


Figura 32 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz; DMSO-*d*₆) do composto 12.

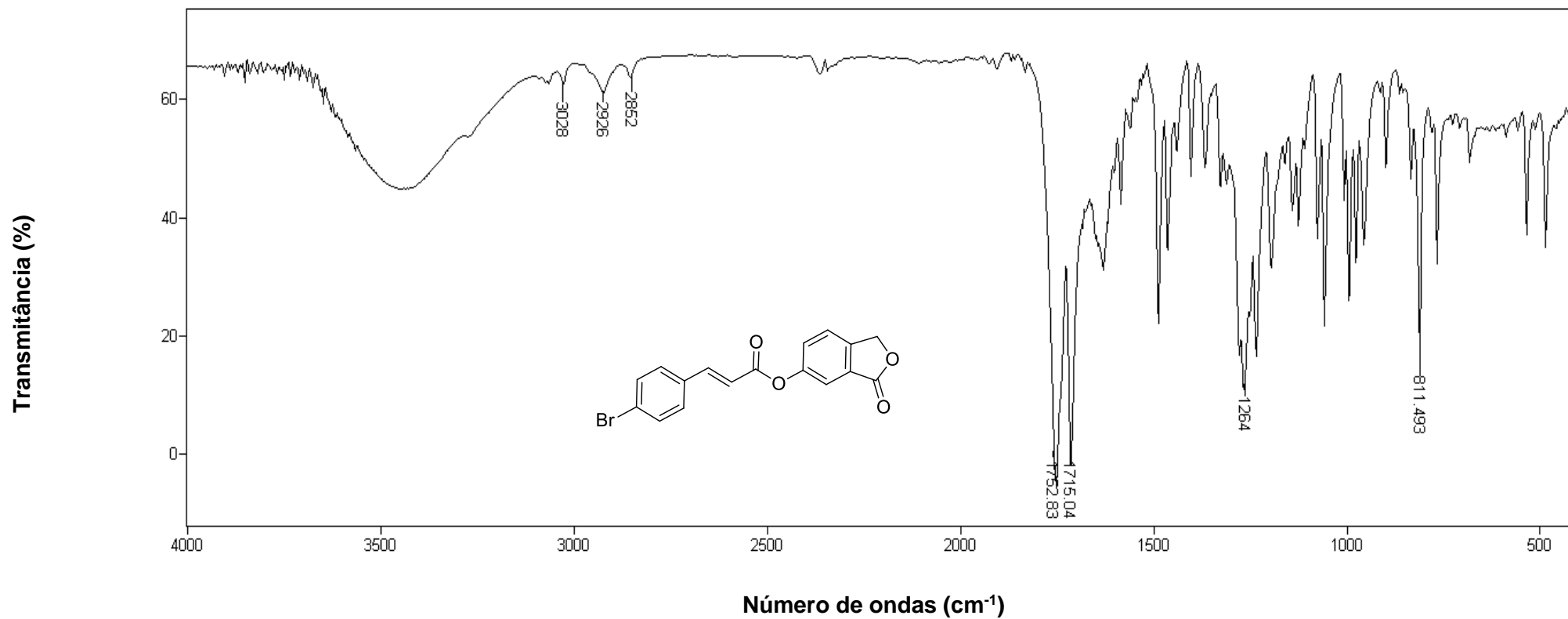


Figura 33 - Espectro no infravermelho (KBr) para o composto 13.

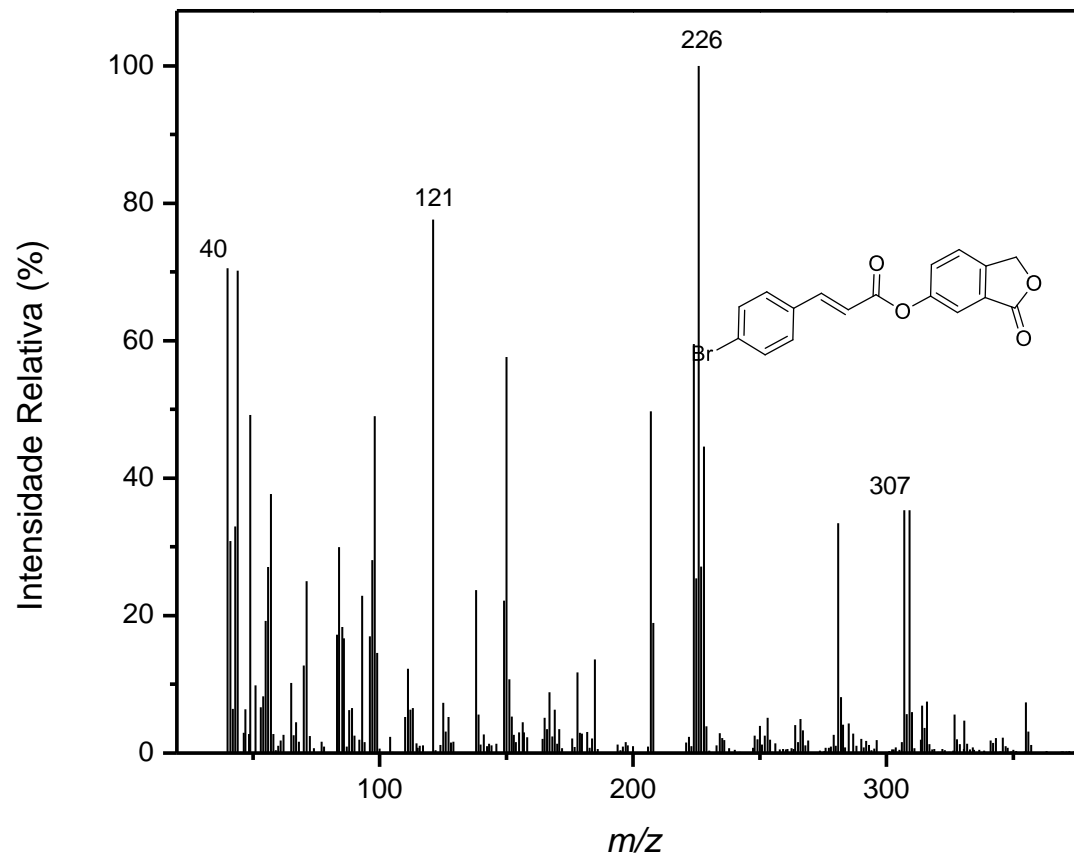


Figura 34 - Espectro de massas do composto **13**.

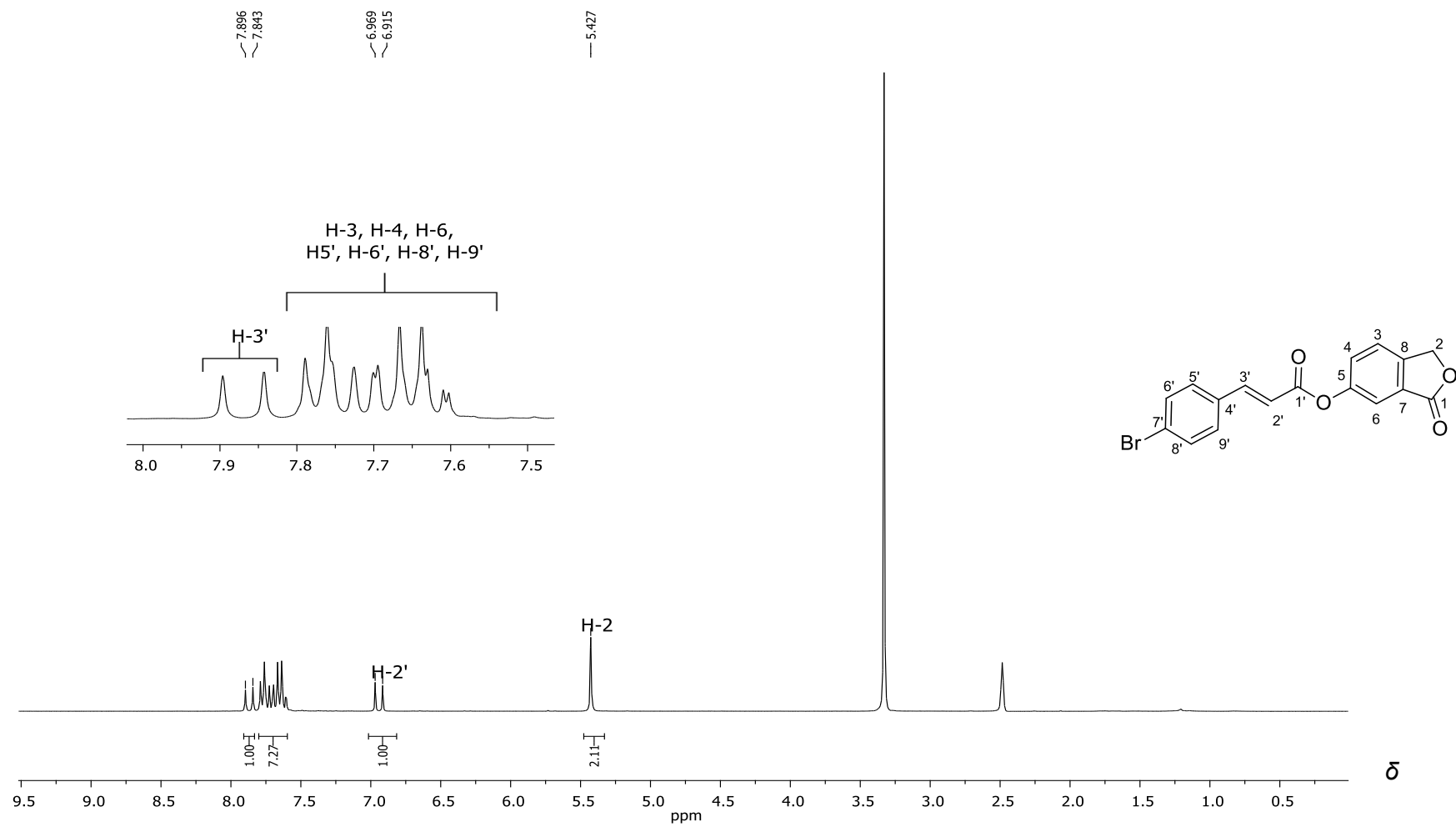


Figura 35 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz; DMSO-*d*₆) do composto **13**.

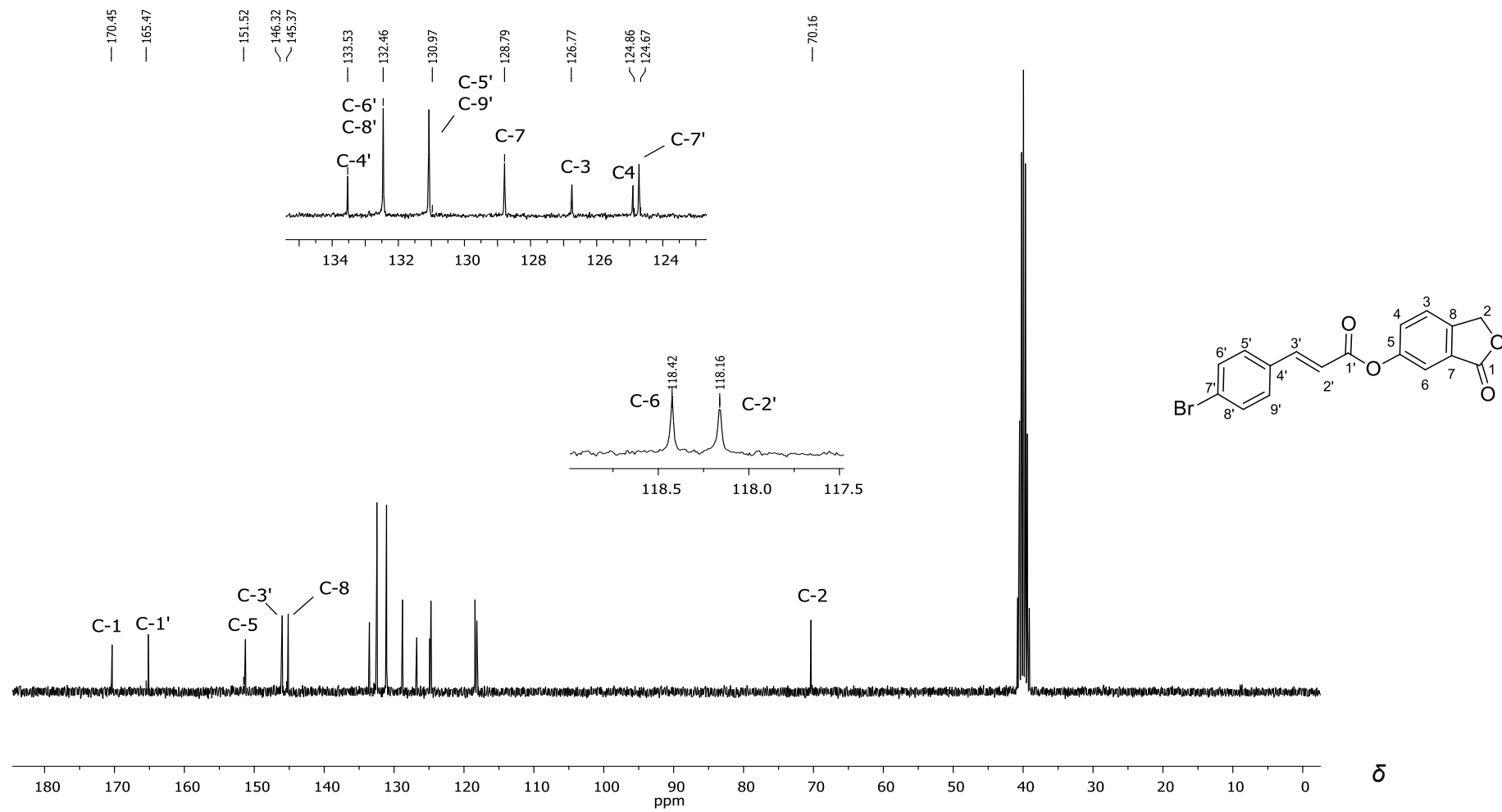


Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) do composto **13**.

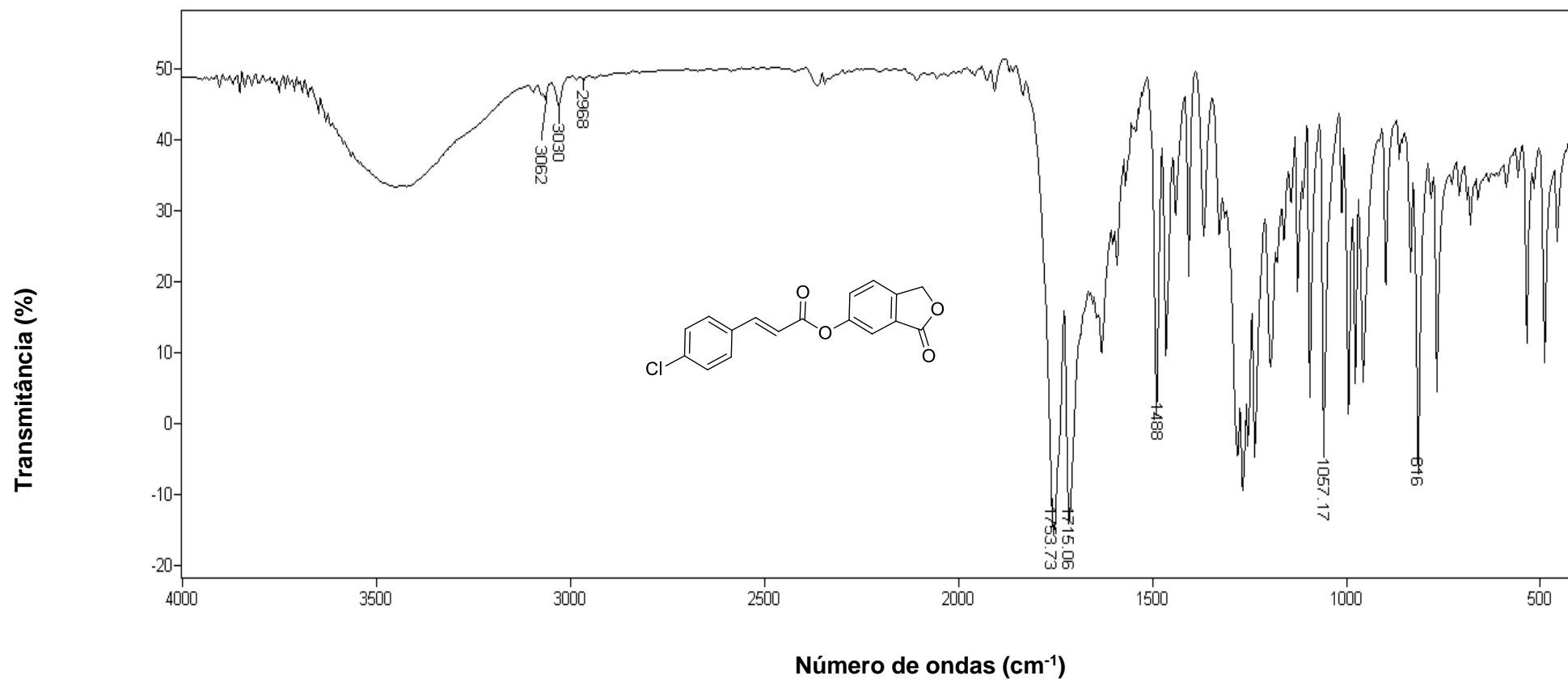


Figura 37 - Espectro no infravermelho (KBr) para o composto 14.

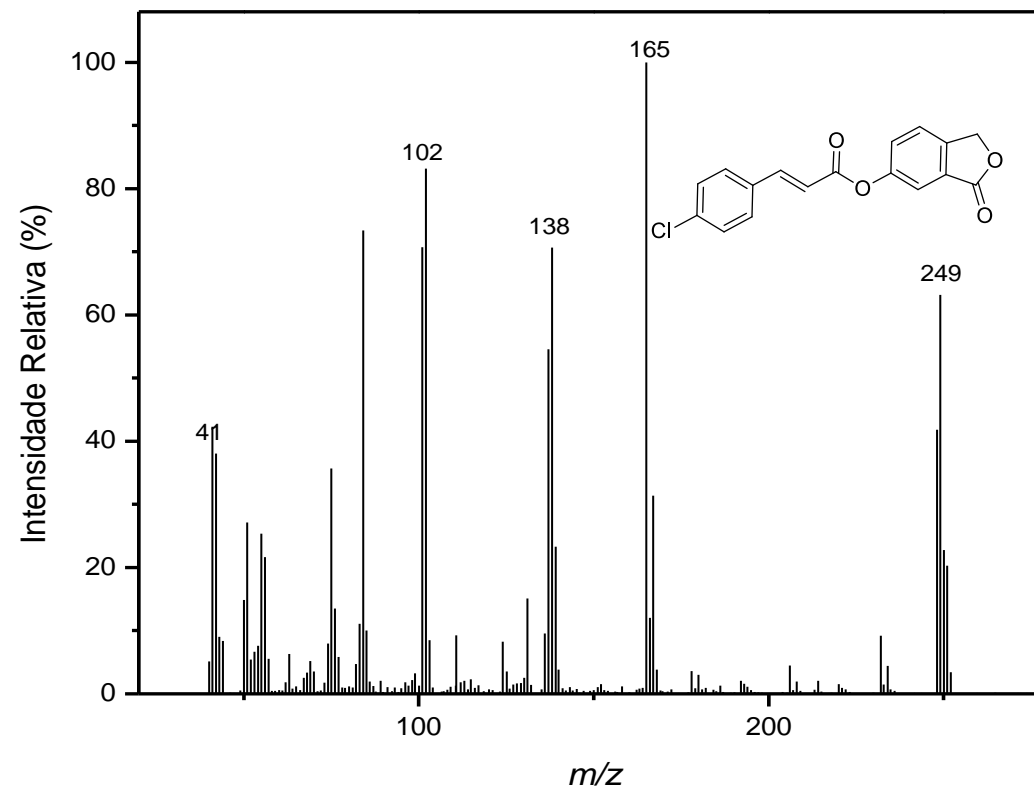


Figura 38 - Espectro de massas do composto **14**.

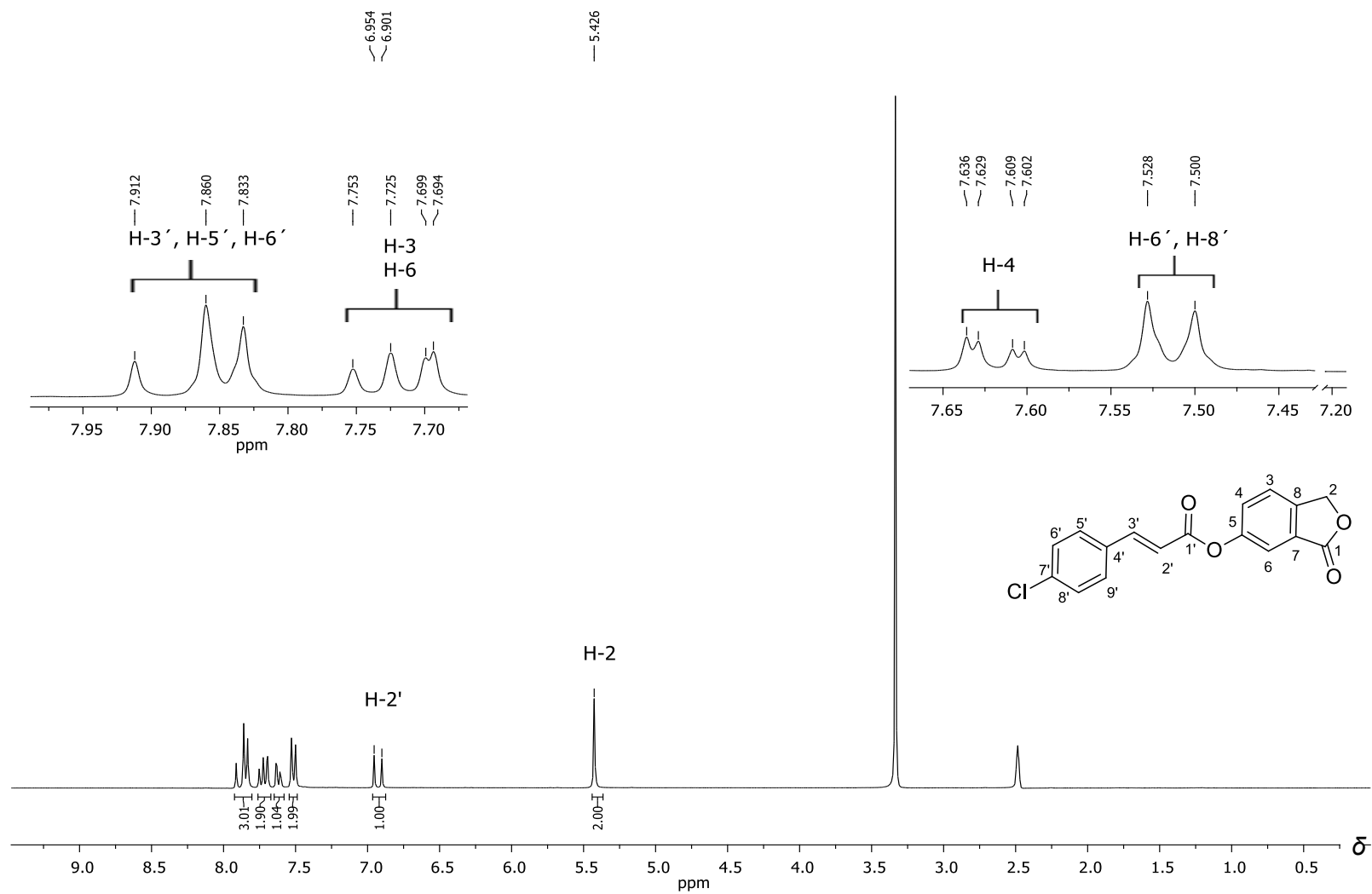


Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) do composto **14**.

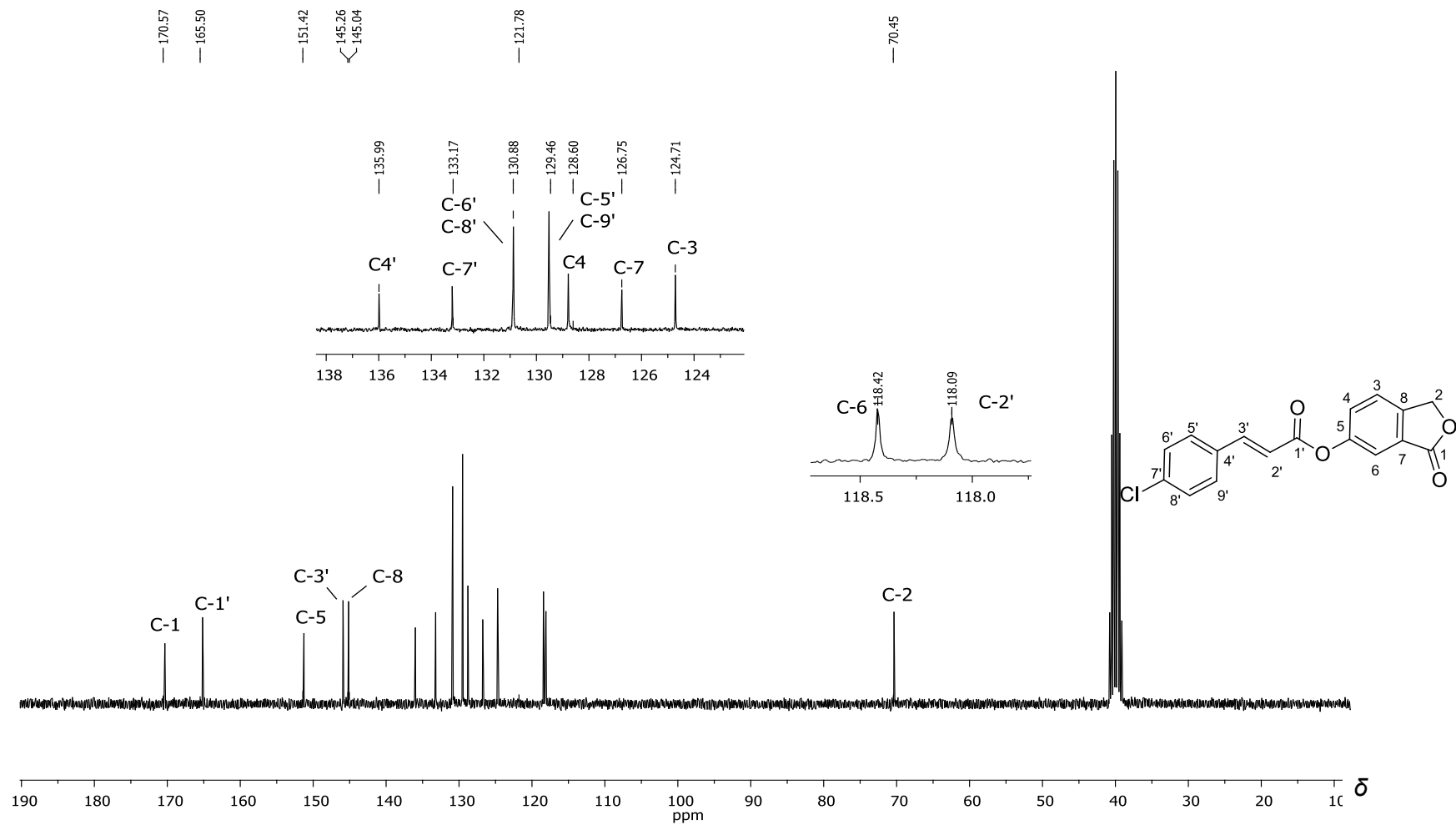


Figura 40 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) do composto

