

WAGNER LUIZ PEREIRA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES FITOTÓXICA E
ANTIPROLIFERATIVA DE ISOBENZOFURAN-1(3H)-ONAS C-3
FUNCIONALIZADAS**

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
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P436s
2013

Pereira, Wagner Luiz, 1987-

Síntese e avaliação das atividades fitotóxica e antiproliferativa de isobenzofuran-1(3H)-onas C-3 funcionalizadas / Wagner Luiz Pereira. – Viçosa, MG, 2013. xviii, 152f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Róbson Ricardo Teixeira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Síntese orgânica. 2. Isobenzofuranonas. 3. Fitotoxinas.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica.
II. Título.

CDD 22. ed. 547

WAGNER LUIZ PEREIRA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES FITOTÓXICA E
ANTIPROLIFERATIVA DE ISOBENZOFURAN-1(3H)-ONAS C-3
FUNCIONALIZADAS**

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

APROVADA: 20 de Fevereiro de 2013.

Luiz Cláudio de Almeida Barbosa

João Paulo Viana Leite

Antônio Jacinto Demuner
(Coorientador)

Elson Santiago Alvarenga
(Coorientador)

Róbson Ricardo Teixeira
(Orientador)

Dedico essa dissertação primeiramente àquele que é o caminho a verdade e a vida, Deus.

Depois aos meus pais José Luiz e Graça por zelarem de todas as formas possíveis por mim.

E aos meus irmãos Wander e Kélen pela amizade, companheirismo e pela alegria de tê-los como irmãos.

AGRADECIMENTOS

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

Ao professor Róbson Ricardo Teixeira (Departamento de Química – UFV), por toda amizade, dedicação, boa vontade e incentivo na orientação desse trabalho.

Ao professor Cláudio Pereira Jordão (Departamento de Solos – UFV), pela amizade, pela orientação na graduação e por me dar suporte para ingressar no programa de pós-graduação em agroquímica da UFV.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida.

Aos amigos (as) de laboratório Angélica Faleiros, Marcus Vinícius, Francielle da Silva, Armanda Júlio, Poliana Gazolla, Ângela Maria, Fabíola Suelen e Deborah Campos, pela colaboração coletiva e grande amizade que faz do grupo de pesquisa do professor Róbson uma verdadeira família tornando assim, as dificuldades mais fáceis de serem superadas e o trabalho mais agradável de ser executado.

Ao professor Sérgio Antônio e todo seu grupo de pesquisa, pela amizade e disponibilidade em ajudar sempre que solicitado.

Aos amigos do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), por toda colaboração.

Aos amigos do Curso de Química e Pós-graduação em Agroquímica da UFV. Em especial aos amigos José Flávio, Danilo de Castro, Milene Lopes, Jorge Luiz e Monize Feijó não só pela amizade e momentos

agradáveis de convivência, mas também por serem sempre solícitos quando precisei.

Ao professor Giuseppe Forlani (Universidade de Ferrara - Itália) e a seu grupo de pesquisa pelos ensaios de inibição do transporte fotossintético de elétrons.

Ao professor Gustavo Costa Bressan (Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa - Viçosa) e a seu grupo de pesquisa pelos ensaios de atividade antiproliferativa.

Ao doutorando Fabrício Marques de Oliveira (Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa - Viçosa) pelos cálculos computacionais de correlação de estrutura-atividade.

A professora Silvana Guilard (Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia - Uberlândia).

A todos os professores do Departamento de Química da UFV, em especial aos professores Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, Antonio Jacinto Demuner e Elson Santiago Alvarenga, por compartilhar conhecimento e pela dedicação em ministrar as disciplinas do programa de pós-graduação em agroquímica da UFV que ajudaram me qualificar a estar apto à defesa desta dissertação.

A todos os funcionários Técnico-administrativos do Departamento de Química da UFV, muitos dos quais colocaram a disposição infraestrutura de seus laboratórios e seus serviços nas análises que ajudaram na elucidação e identificação dos compostos sintetizados nesse trabalho.

Aos familiares e todos os amigos que, mesmo de forma indireta, também contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ESQUEMAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
ANEXOS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO 1	1
1.1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	8
1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
CAPÍTULO 2	13
2.1. INTRODUÇÃO.....	13
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.2.1. Generalidades Metodológicas.....	25
2.2.2. Procedimentos Sintéticos.....	27
2.2.2.1. Síntese da 3-(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-enil)isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (16).....	27
2.2.2.2. Síntese da 3-(2,6-diidroxifenil)isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (17).....	28
2.2.2.3. Síntese da 3-(2,6-diacetoxifenil)isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (18).....	30
2.2.2.4. Síntese da 3-(2-hidroxi-4-metil-6-oxocicloex-1-enil)isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (19).....	31
2.2.2.5. Síntese da 3-(2,6-diidroxil-4-metilfenil)isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (20).....	32
2.2.2.6. Síntese da 3-(2,6-diacetoxil-4-metilfenil)isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (41).....	33
2.2.2.7. Síntese da 3-(2-hidroxi-4-isopropil-6-oxocicloex-1-enil)isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (22).....	34
2.2.2.8. Síntese da 3-(2,6-diidroxil-4-isopropilfenil)isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (23).....	35
2.2.2.9. Síntese da 3-(2,6-diacetoxil-4-isopropilfenil)isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (24).....	36
2.2.2.10. Síntese da 3-(2-hidroxi-4,4-dimetil-6-oxocicloex-1-enil)isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (25).....	37
2.2.2.11. Síntese da 2-(1,3-diidro-3-oxo-1-isobenzofuranil)1 <i>H</i> -indano-1,3(2 <i>H</i>)-diona (26).....	39

2.2.2.12. Síntese da 3-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (27).....	40
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
2.4. CONCLUSÕES	71
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
CAPÍTULO 3	77
3.1. INTRODUÇÃO.....	77
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
3.2.1. Avaliação da atividade fitotóxica das isobenzofuranonas 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26 e 27 sobre o crescimento radicular das espécies <i>Cucumis sativus</i> e <i>Sorghum bicolor</i>	82
3.2.2. Avaliação do efeito dos compostos 16-27 sobre o transporte de elétrons da fotossíntese.....	83
3.2.2.1. Isolamento de cloroplastos.....	83
3.2.2.2. Avaliação do efeito dos compostos 16-27 sobre o transporte de elétrons basal da fotossíntese.....	84
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
3.3.1. Avaliação da atividade fitotóxica sobre sorgo e pepino.....	85
3.3.2. Avaliação da atividade fitotóxica sobre o transporte de elétrons.....	91
3.8. CONCLUSÕES.....	99
3.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
CAPÍTULO 4	104
4.1. INTRODUÇÃO.....	104
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	109
4.2.1. Avaliação da atividade antiproliferativa.....	109
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	110
4.3.1. Descrição dos resultados dos ensaios de avaliação da atividade antiproliferativa.....	110
4.3.2. Relação estrutura-atividade e cálculos <i>in silico</i> de propriedades físico-químicas das substâncias 16 a 27 e do ácido fitalaldeídico.....	114
4.4. CONCLUSÕES.....	123
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

	Página
1 Exemplos de metabólitos secundários que se tornaram efetivos fármacos.....	2
2 Bialafos e o herbicida sintético glifosato.....	4
3 Análogos sintéticos da leptosperona.....	5
4 Estrobilurinas naturais e um análogo sintético.....	6
5 Fármaco utilizado no tratamento da tirosinemia hepatorenal tipo I.....	7
6 Estrutura do 1,8-cineol e seu derivado a cinmetilina.....	8

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2

1 Exemplos de heterociclos biologicamente ativos.....	14
2 Estrutura básica de uma isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona.....	14
3 Exemplos selecionados de isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-onas bioativas....	15
4 Estruturas das substâncias sintetizadas e objeto de investigação desse trabalho.....	24
5 Espectro no Infravermelho (ATR) do Composto 25.....	44
6 Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CD ₃ OD) do composto 25.....	45
7 Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) do composto 25.....	46
8 Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CD ₃ OD) do composto 25.....	47
9 Mapa de contornos HSQC da substância 25.....	48
10 Mapa de contornos HMBC da substância 25.....	49
11 Mapa de contornos HMBC (parcial) da substância 25.....	50
12 Deslocamentos químicos de ¹³ C, em ppm relativo ao TMS, para a 5,5-dimetilcicloexano-1,3-diona (dimedona).....	51
13 Representação ORTEP-3 do composto	54
14 Empacotamento das moléculas b.....	55
15 Espectro no infravermelho (ATR) do composto 22.....	58
16 Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CD ₃ OD) do composto 22.....	59
17 Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CD ₃ OD) do composto 22.....	60
18 Espectro no infravermelho (ATR) do composto 23.....	63
19 Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) do composto 23.....	64
20 Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) do composto 23.....	65
21 Espectro no infravermelho (ATR) do composto 24.....	68
22 Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) do composto 24.....	69
23 Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) do composto 24.....	70

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 3

1 Estruturas de alguns herbicidas.....	78
2 Distribuição percentual de vendas de agroquímicos no Brasil por classe.....	79
3 Efeito das substâncias 22, 23 e do herbicida comercial (glifosato) sobre o crescimento radicular de pepino (<i>C. sativus</i>).....	88

4	Efeito das substâncias 22, 23, 26 e do herbicida comercial (Glifosato) sobre o crescimento radicular de sorgo (<i>S. bicolor</i>).....	91
5	Esquema Z da fotossíntese.....	95
6	A estrutura da ATP sintase e a síntese de ATP.....	97
7	Influência da isobenzofuranona 17 sobre o transporte de elétrons basal e desacoplado.....	99

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 4

1	Tipos de câncer mais incidentes, projetados para 2012, na população brasileira.....	105
2	Estrutura de alguns quimioterápicos empregados no tratamento do câncer.....	107
3	Estrutura das isobenzofuranonas 28 e 29 sintetizadas a partir de ácidos anacárdicos de diferentes grupos substituintes R.....	108
4	Estruturas de isobenzofuranonas testadas contra algumas linhagens celulares tumorais.....	108
5	Perfil de dose-resposta dos compostos 23 (A), 18 (B), 21 (C) e controle positivo VP16 (D) na viabilidade de células K562 e U937.....	114

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE ESQUEMAS DO CAPÍTULO 2

	Página
1 Exemplo de uma anelação de Hauser.....	18
2 Proposta mecanística para a anelação de Hauser apresentada no Esquema 1.....	18
3 Síntese de isocromanonas a partir da isobenzofuranona (12).....	19
4 Proposta mecanística da síntese da 6-metoxiisobenzofura-1(3 <i>H</i>)-ona (13) a partir do ácido 3-metoxibenzóico.....	19
5 Síntese de isobenzofuranonas via reação de ciclocarbonilação de adutos de Baylis-Hillman.....	20
6 Síntese de isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-onas segundo metodologia descrita por LANDGE <i>et al</i> (2008).....	21
7 Proposta mecanística para a formação da 3-(2-oxo-2-feniletil)isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (15).....	22
8 Síntese de isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-onas via condensação/lactonização em meio básico.....	23
9 Rota sintética envolvida na preparação dos compostos 16 a 27.....	42
10 Proposta mecanística para a síntese do composto 22.....	56
11 Proposta mecanística da obtenção do composto 23 por aromatização de 22.....	61
12 Proposta mecanística para a síntese do composto 24.....	66

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2

	Página
1 Comparação entre os dados de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) do composto 25 obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura.....	53
2 Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) do composto 25 obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura.....	53
3 Comprimentos de ligação do fragmento O-C-C-C-O das moléculas a e b.....	54
4 Interações entre as moléculas b, relacionadas por centros de inversão.....	55

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 3

1 Efeito das substâncias 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26 e 27 sobre o crescimento radicular de pepino.....	87
2 Efeito das substâncias 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26 e 27 sobre o crescimento radicular de sorgo.....	90
3 Avaliação <i>in vitro</i> do efeito de isobenzofuran-1(3H)-onas 16-27 sobre a redução do ferricianeto de potássio na presença de cloroplastos isolados de folhas de <i>Spinacia oleracea</i>	94

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 4

1 Efeitos inibitórios (%) dos compostos 16 a 27 e do ácido fitalaldeídico sobre a viabilidade de células K562.....	111
2 Efeitos inibitórios (%) dos compostos 16 a 27 e do ácido fitalaldeídico sobre a viabilidade de células U937.....	112
3 Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) obtidos para as linhagens de células K562 e U937 tratadas com os compostos 23, 18 e 21 e controle positivo etoposídeo (VP-16).....	113
4 Propriedades <i>drug-likeness</i> previstas e riscos de toxicidade dos compostos 16 a 27, do ácido fitalaldeídico e do etoposídeo calculados pelo software Osiris.....	117
5 Cálculos de <i>drug-likeness</i> dos compostos 16 a 27, do ácido fitalaldeídico e do etoposídeo usando o software Molinspiration.....	121

ANEXO

Página

1. ESPECTROS.....	128
-------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
PTSA	Ácido para-toluenossulfônico
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfônico
EtOAc	Acetato de etila
Å	Angström
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia gasosa/Espectrometria de massas
DBU	Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
NCy ₂ Me	Diciclohexilmetilamina
LDA	Diisopropilamido de lítio
DMSO	Dimetil sulfóxido
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Dupleto duplo
δ	Deslocamento químico
DBU	Diazobicycloundeceno
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetil sulfóxido deuterado
ESI-MS	Espectrometria de massas por ionização por <i>electrospray</i>
VP-16	Etoposídeo
Hz	Hertz
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
DIBAL	Hidreto de diisobutilalumínio
IV	Infravermelho
m/m	Massa/massa
m/v	Massa/volume
MHz	Megahertz

m	Multiplete
CD ₃ OD	Metanol deuterado
DMAP	4-N,N-dimetilaminopiridina
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
P.A.	Para análise
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
R _f	Fator de retenção
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
ART	Reflectância Total Atenuada
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
T _f	Temperatura de fusão
ATP	Trifosfato de adenosina
v/v	Volume/volume

RESUMO

PEREIRA, Wagner Luiz, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2013. **Síntese e avaliação das atividades fitotóxica e antiproliferativa de isobenzofuran-1(3H)-onas C-3 funcionalizadas.** Orientador: Róbson Ricardo Teixeira. Co-Orientadores: Antônio Jacinto Demuner e Elson Santiago Alvarenga.

O presente trabalho teve por meta a síntese e a avaliação da atividade fitotóxica de uma série de isobenzofuran-1(3H)-onas (fitalidas) tendo como estrutura-modelo o metabólito secundário conhecido como ácido crifonétrico. A rota sintética escolhida para a síntese das fitalidas envolveu reações de condensação, de aromatização e processos de acetilação. Os compostos sintetizados foram completamente caracterizados, utilizando-se a espectroscopia no IV, de RMN de ^1H e de ^{13}C (1D), técnicas bidimensionais HMBC, HSQC, além da espectrometria de massas. A 3-(2-hidroxi-4,4-dimetil-6-oxocicloex-1-enil)isobenzofuran-1(3H)-ona teve sua estrutura cristalina investigada por difração de raios-X. As isobenzofuran-1(3H)-onas foram avaliadas *in vitro* no tocante à habilidade em interferirem ou não no transporte de elétrons, dirigido pela luz, da água para o oxidante não-biológico ferricianeto de potássio. Os resultados obtidos mostraram que, dentre 12 compostos submetidos à avaliação da atividade biológica, quatro foram completamente inativos. Quatro outros análogos reduziram a taxa de transporte de elétrons dirigido pela luz, na concentração de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os outros quatro compostos foram capazes de significativamente aumentar a taxa de transporte de elétrons. No tocante aos efeitos inibitórios, a fitalida 2-(3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-1-il)1H-indano-1,3(2H)-diona foi aquela que apresentou o melhor resultado sendo capaz de inibir a taxa de transporte de

elétrons em 56%. O aumento da taxa de transporte de elétrons observado para quatro das isobenzofuranonas avaliadas foi relacionado ao efeito desacoplador desses compostos. Além disso, foi realizada uma avaliação *in vivo* do efeito fitotóxico dos compostos sintetizados sobre o crescimento radicular e da parte aérea de plântulas de pepino (*Cucumis sativus*) e sorgo (*Sorghum bicolor*). A substância 3-(2,6-diidroxi-4-isopropilfenil)isobenzofuran-1(3*H*)-ona proporcionou uma inibição superior a 70% do crescimento do caule do sorgo, na concentração de 1 mmol L⁻¹, resultado que foi comparável aos 75% de inibição obtido com o herbicida comercial (glifosato), usado como controle, para essa mesma cultura. Considerando-se a existência de exemplos descritos na literatura de isobenzofuran-1(3*H*)-onas C-3 funcionalizadas que apresentam efeitos citotóxicos contra diferentes linhagens de células tumorais, realizou-se uma avaliação das atividades antiproliferativas das fitálicas contra as linhagens de células tumorais K562 (leucemia mielóide) e U937 (linfoma). Duas das isobenzofuranonas sintetizadas apresentaram valores de IC₅₀ de suas atividades antiproliferativas, contra a linhagem K562, inferiores ao do fármaco comercial etoposídeo (VP-16). As favoráveis propriedades físico-químicas e farmacocinéticas determinadas *in silico* para as isobenzofuranonas investigadas nesse trabalho apontam para a possibilidade de utilização desses compostos como protótipos que podem ser explorados na busca por novos agentes quimioterápicos.

ABSTRACT

PEREIRA, Wagner Luiz, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Synthesis and evaluation phytotoxic and antiproliferative activities of isobenzofuran-1(3H)-ones C-3 functionalized.** Adviser: Róbson Ricardo Teixeira. Co-Advisers: Antônio Jacinto Demuner and Elson Santiago Alvarenga.

The present investigation aimed to synthesize a series of isobenzofuran-1(3H)-ones (phthalides) structurally similar to the secondary metabolite cryptonectric acid. The substances were prepared via condensation, aromatization and acetylation reactions. The identity of the synthesized compounds were confirmed based on IR, ¹H and ¹³C NMR (1D), HMBC and HSQC 2D experiments and MS analyses. The structure of 3-(2-hydroxy-4,4-dimethyl-6-oxo-cyclohexen-1-yl)isobenzofuran-1(3H)-one was also investigated by X-ray analysis. The isobenzofuran-1(3H)-ones was evaluated *in vitro* as the ability to interfere with light-driven reduction of ferricyanide by isolated spinach chloroplasts. Among the twelve evaluated compounds, four were completely inactive in interfering with photosynthetic electron. Other four phthalides were found to inhibit the basal rate. In this case, the most active derivative 2-(3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-1-yl)-1H-indene-1,3(2H)-dione inhibited the basal electron transport by 56%. The other derivatives acted as uncouplers. The phthalides were also evaluated *in vivo* as the ability to interfere with the radical growth of cucumber (*Cucumis sativus*) and sorghum (*Sorghum bicolor*). 3-(2,6-dihydroxy-4-isopropylphenyl)-isobenzofuran-1(3H)-one caused more than 70% inhibition of *Sorghum bicolor* shoot elongation. This effect was comparable to the 75% inhibition caused by commercial herbicide glyphosate on the same species.

Considering the existence of examples described in the literature isobenzofuran-1(3*H*)-ones C-3 functionalized showing cytotoxic effects against different tumor cell lines, the antiproliferative activity of the twelve isobenzofuranones were evaluated against the cell lines U937 (lymphoma) and K562 (myeloid leukemia). Two isobenzofuranones were more effective in inhibiting proliferation of K562 cells and presented IC₅₀ lower than etoposide (VP-16) used as positive control in the experiments. The *in silico* favorable drug-like parameters predicted suggest that the isobenzofuranones prepared in this work possess good physicochemical properties that qualify them as promising candidates for future studies.

CAPÍTULO 1

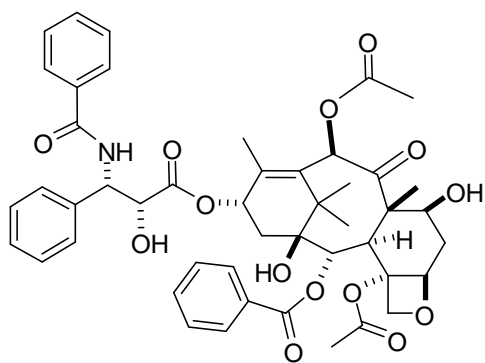
FÁRMACOS E AGROQUÍMICOS A PARTIR DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

1.1. Introdução

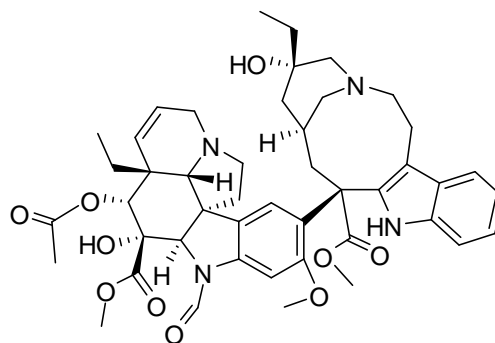
Os produtos naturais ou metabólitos secundários são fantásticos reservatórios de substâncias que vêm sendo explorados como fonte de novos agentes terapêuticos (CRAGG *et al.*, 1997; BUTLER, 2004; KOEHN e CARTER, 2005; NEWMAN e CRAGG, 2007; NEWMAN e CRAGG, 2012). Diversos são os exemplos descritos na literatura que suportam essa afirmativa, alguns são apresentados na Figura 1 (p.2).

O taxol é uma droga antineoplásica isolada da casca do teixo do pacífico (*Taxus brevifolia*), que possui atividade contra vários tipos de câncer incluindo

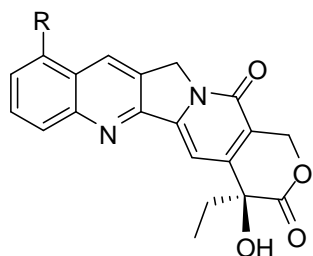
melanoma, câncer de ovário, leucemia e câncer de mama (PELTIER *et al.*, 2006).



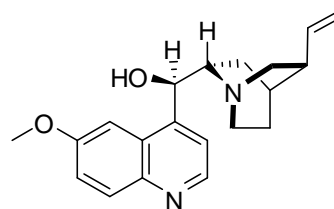
Taxol



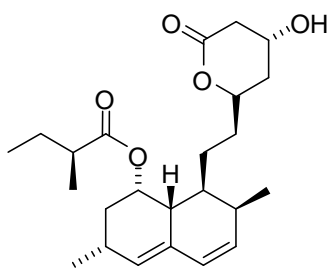
Vincristina



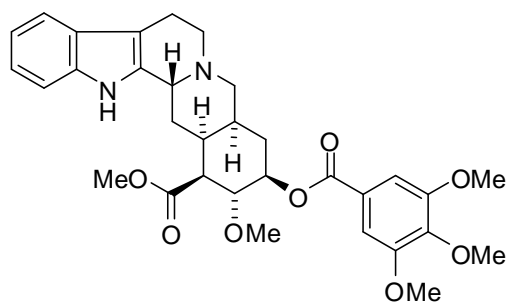
R = H (20(S)-camptotecina)
R = NO₂ (Rubicetan)



Quinina



Lovastatina



Reserpina

Figura 1 – Exemplos de metabólitos secundários que se tornaram efetivos fármacos.

Outro quimioterápico de origem natural utilizado no tratamento do câncer é a vincristina, isolado da vinca rósea (*Catharanthus roseus*), que integra o grupo de alcalóides de origem vegetal (CASADO *et al.*, 2007).

O 20(S)-camptotecina é um alcalóide isolado de uma árvore chinesa (*Camptotheca acuminata*) que inicialmente não teve utilidade farmacológica por ser muito tóxico ao homem. No entanto, uma pequena modificação na sua estrutura tornou-o mais solúvel em água, mais seguro e ativo no tratamento de tumores. Assim surgiu o rubitecan, 9-nitro-20(S)-camptotecina (Figura 1, p.2), uma droga prescrita no tratamento do câncer de cólon, reto, pulmão e ovário (SCHÖFFSKI *et al.*, 2002).

Extraído da *Cinchona L.* (um gênero de aproximadamente 40 espécies da família Rubiaceae) a quinina (Figura 1, p.2) também é um alcalóide de origem vegetal com atividade farmacológica possuindo ação antitérmica, antimalárica e analgésica (SANTOS, 2012).

Como dois últimos exemplos de fármacos oriundos de produtos naturais mencionam-se a lovastatina (Figura 1, p.2), empregada para redução de taxas de colesterol no sangue e a reserpina (Figura 1, p.2), uma droga sedativa e anti-hipertensiva.

Os metabólitos secundários também vêm sendo explorados para a obtenção de novos agroquímicos. Por exemplo, o bialafos (Figura 2, p.4) é uma fitotoxina de origem microbiana obtida da fermentação do *Streptomyces higroscopicus* e atualmente comercializado no Japão como um herbicida denominado Herbiace[®]. O bialafos é o primeiro produto de fermentação que foi utilizado na produção de um herbicida comercial (DREW, 1977). Vale ressaltar

que o glifosato (Figura 2, p.4), componente ativo do herbicida mais vendido no mundo, o Roundup[®], teve a sua síntese inspirada no bialafos.

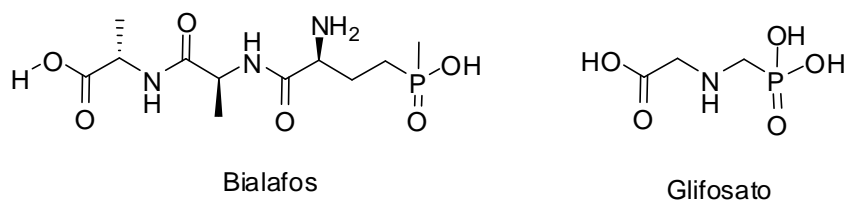


Figura 2 – Bialafos e o herbicida sintético glifosato.

O aleloquímico leptospernona (Figura 3, p.5), excretado da planta *Callistemon citrinus*, foi a fonte de inspiração para o desenvolvimento de dois novos agroquímicos que são amplamente utilizados para o controle de plantas daninhas. Ensaio de avaliação de sua atividade fitotóxica demonstraram que a leptospernona é capaz de inibir o crescimento de plantas daninhas, mas apenas de maneira moderada. Entretanto, a estrutura dela foi modificada pela empresa Stauffer (agora Syngenta). O que se observou foi que a substituição do grupo alquila da leptospernona por um grupo arila resultou na diminuição da atividade herbicida. No entanto, notou-se que a adição de grupos retiradores de elétrons na posição *orto* do anel aromático resultou na melhoria da atividade herbicida do composto. Por fim, verificou-se que a adição concomitante de grupos retiradores de elétrons nas posições *orto* e *para* do grupo arila potencializou ainda mais a atividade herbicida. Foi assim que surgiram a sulcotriona e a mesotriona (Figura 3, p.5), componentes ativos dos herbicidas CALLISTO[®] e MIKADO[®], respectivamente (HÜTER, 2011).

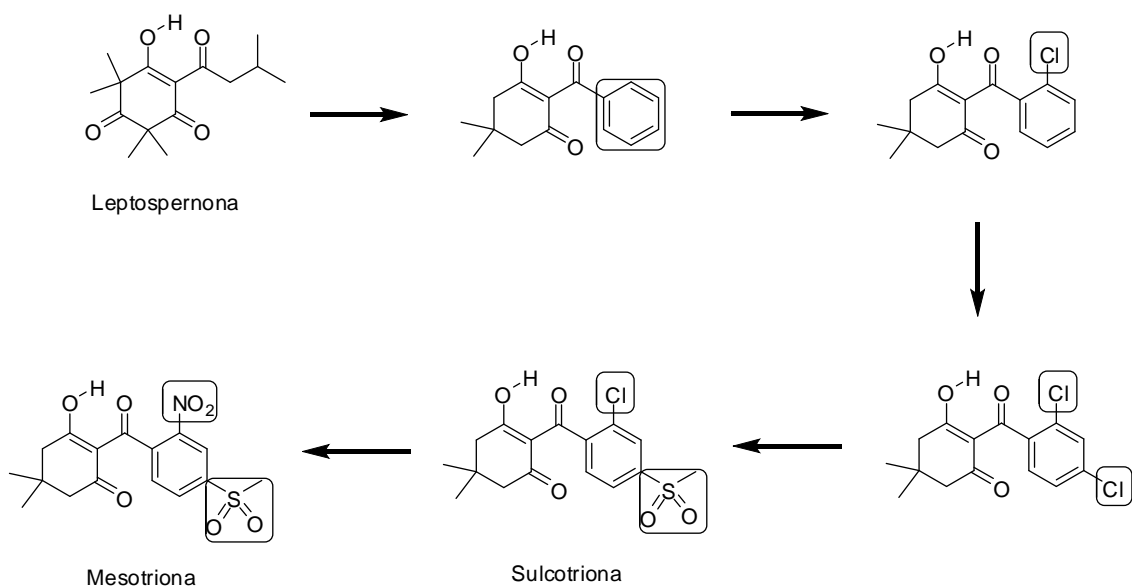


Figura 3 – Análogos sintéticos da leptospernona (adaptado de HÜTER *et al*, 2011).

Outro exemplo de desenvolvimento de agroquímicos inspirado em metabólitos secundários corresponde aos fungicidas pertencentes à classe das estrobilurinas. A estrobilurina **A** e a estrobilurina **B** (Figura 4, p.6) foram isoladas do basidiomiceto *Strobilurus tenacellus* (ANKE *et al.*, 1977). Estes compostos apresentaram significativa atividade fungicida em testes biológicos laboratoriais. No entanto, ensaios biológicos conduzidos em casa de vegetação com as estrobilurinas **A** e **B** mostraram que elas possuem baixa atividade fungicida atribuída às suas foto-instabilidades (BARBOSA, 2004). Interessado no grande potencial fungicida das estrobilurinas, a indústria agroquímica centrou esforços em sintetizar compostos com estruturas análogas as estrobilurinas **A** e **B** que fossem estáveis quando submetidas à presença de luz. Mais de 50.000 análogos foram sintetizados, principalmente em laboratórios de indústrias concorrentes, e mais de 1.000 patentes foram registradas (HÜTER, 2011). Dentre os compostos sintetizados a azoxystrobina (Figura 4, p.6) comercializado pela Syngenta, é ativo contra um grande número

de fungos e apresenta baixa toxicidade para mamíferos. Essa estrobilurina, em alguns casos, pode ser aplicada em quantidades tão baixas quanto 100 g por hectare (BARBOSA, 2004).

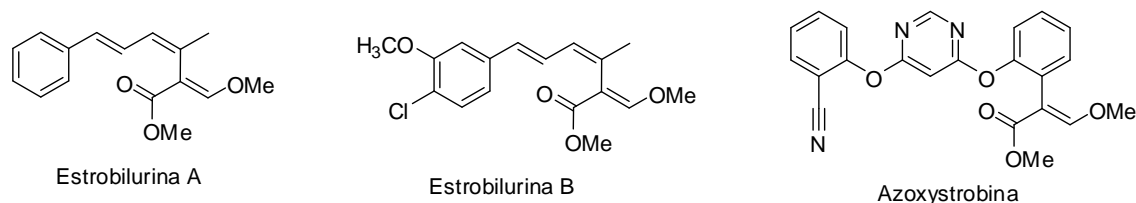
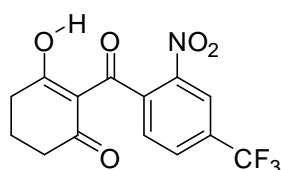


Figura 4 – Estrobilurinas naturais e um análogo sintético.

A possibilidade de obtenção de novos produtos comerciais a partir de metabólitos secundários não é a única similaridade existente entre a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos e agroquímicos. De fato, as investigações objetivando a descoberta de novos agroquímicos e fármacos apresentam semelhanças em vários aspectos. As abordagens descritas para a pesquisa e desenvolvimento por novos agroquímicos são similares àquelas empregadas para os fármacos (SHORT, 2005; DELANEY *et al.*, 2006; DUKE, 2010; SWANTON *et al.*, 2011). Os parâmetros físico-químicos utilizados para avaliar a possibilidade de uma molécula ser um bom agroquímico ou fármaco são muito similares (LIPINSKI *et al.*, 1997; TICE, 2001). Os 20 tipos de substituintes e cadeias laterais mais comumente encontrados nos fármacos são também encontrados nos agroquímicos e com a mesma frequência (DELANEY *et al.*, 2006). Outra analogia refere-se ao fato de que os químicos envolvidos na descoberta de agroquímicos e fármacos adquirem reagentes dos mesmos fornecedores, lançam mão de reações químicas similares para a síntese de substâncias de interesse e consultam literaturas comparáveis. Além disso, os

agroquímicos e fármacos atuam sobre alvos moleculares que são idênticos ou bastante similares (SWANTON *et al.*, 2011).

Devido às similaridades descritas anteriormente, não é surpreendente que um agroquímico ou análogos de uma classe particular de agroquímicos possuam propriedades de interesse para serem empregados como fármaco. É o caso da nitisinona (Figura 5), composto no qual o grupo $-SO_2CH_3$ da mesotriona (Figura 3) é substituído por um grupo $-CF_3$. Enquanto a mesotriona possui atividade herbicida, a nitisinona é prescrita no tratamento de uma séria e rara doença hereditária, a tirosinemia hepatorenal tipo I (TH-1) (LAROCHELLEA *et al.*, 2012). A nitisinona também está sendo estudada para o tratamento do Mal de Parkinson, tendo sido inclusive patenteada para essa finalidade (DOE *et al.*, 2006).



Nitisinona

Figura 5 – Fármaco utilizado no tratamento da tirosinemia hepatorenal tipo I.

Outro composto de origem natural que possui atividade herbicida e que também possui ação terapêutica é o 1,8-cineol (Figura 6, p.8). A elevada volatilidade apresentada por esse monoterpeneo, extraído como componente majoritário do óleo essencial de várias espécies de plantas, preclui o uso do 1,8-cineol diretamente como herbicida. Este problema foi contornado com a introdução do grupo benziloxi na estrutura básica do 1,8-cineol dando origem a cinmetilina, um herbicida seletivo no controle de gramíneas em plantações de arroz (DUKE e OLIVA, 2004). O 1,8-cineol também é comercializado como

medicamento com ação analgésica, antitérmica, expectorante, fluidificante e anti-séptica das diversas afecções do trato respiratório, tais como asma brônquica, bronquites, faringites, amigdalites e tratamento sintomático das gripes e resfriados (EUCALIPTOL, 2012).

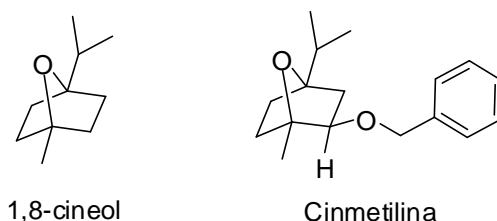


Figura 6 – Estrutura do 1,8-cineol e seu derivado a cinmetilina.

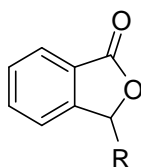
1.2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Na busca de novos compostos que possam resultar na melhoria da qualidade de vida da sociedade, pode-se mencionar a estratégia que está centrada na utilização de metabólitos secundários como estruturas modelo. Nesse contexto, diversas isobenzofuran-1(3*H*)-onas (fitalidas) de origem natural e funcionalizadas na posição C-3 do anel isobenzofuranona possuem, como será abordado adiante (capítulo 2, seção 2.1.), uma variada gama de bioatividades que as qualificam como modelos que podem ser explorados na descoberta e desenvolvimento de novos agroquímicos e fármacos.

Considerando as similaridades existentes entre a descoberta e desenvolvimento de fármacos e agroquímicos, pode-se dizer que a pesquisa voltada para a busca de novos agroquímicos oferece também a oportunidade para a descoberta de novos fármacos que podem ser úteis no tratamento de várias patologias como, por exemplo, o câncer.

No que diz respeito aos agroquímicos é notável a grande importância que os herbicidas possuem. Estes são indispensáveis para se elevar a produtividade agrícola a fim de suprir a contínua elevação da demanda mundial por alimentos. E entre os fármacos de maior importância em nossa sociedade, atualmente estão os que possuem ação antiproliferativa, pois hoje o câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo.

Assim, descreve-se nesse trabalho a síntese, caracterização e a avaliação das atividades fitotóxica e antiproliferativa de um grupo isobenzofuran-1(3*H*)-onas apresentando a seguinte estrutura geral



sendo R = grupos alicíclicos e aromáticos.

As substâncias foram sintetizadas tendo como estrutura modelo a fitotoxina natural conhecida como ácido crifonétrico, **5** (Capítulo 2, Figura 3, p.15).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BARBOSA, L.C.A. Os pesticidas o homem e o meio ambiente. Viçosa: UFV, 2004. 215 p.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug Discovery. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

- CASDO, P.; VILLAR, P.Z.; DEL VALLE, E.; CAMPA, C.M.; LAZO, P.S.; RAMOS, S. Vincristine regulates the phosphorylation of the antiapoptotic protein HSP27 in breast cancer cells. *Cancer Letters*, v. 247, p. 273-282, 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-477, 2007.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, v. 60, p. 52-60, 1997.
- 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.
- DOE, J. E.; Sturgess, N. C.; Travis, K. Z. Use of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzyl)-1,3-cyclohexanedione in the treatment of Parkinson's disease. Syngenta AG, WO2006090177, 2006.
- DREW, S.W. Effect of Primary Metabolites on Secondary Metabolism. *Annual Review of Microbiology*, v. 31, p. 343-356, 1977.
- DUKE, S.O. Herbicide and pharmaceutical relationships. *Weed Science*, v. 58, p. 334-339, 2010.
- DUKE, S. O.; OLIVA, A. *Mode of action of phytotoxic terpenoids*. In: MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; MOLINILLO, J. M. G.; CUTLER, H. G. (Ed.). *Allelopathy – Chemistry and mode of action of allelochemicals*. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 201-216.

EUCALIPTOL. Bula disponível em:

<<http://www.bulas.med.br/bula/5998/eucaliptol.htm>>. Acesso em: novembro de 2012.

HÜTER, O.F. Use of natural products in the crop protection industry. *Phytochem Rev*, v. 10, p. 185-194, 2011.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 206-220, 2005.

LAROCHELLEA, J.; ALVAREZB, F.; BUSSIÈRESB, J.F.; CHEVALIERB, I.; DALLAIREB, L.; DUBOISB, J.; FAUCHERB, F.; FENYVESC, D.; GOODYERD, P.; GRENIERE, A.; HOLMEF, E.; LAFRAMBOISEE, R.; LAMBERTB, M.; LINDSTEDTF, S.; MARANDAG, B.; MELANÇOND, S.; MEROUANIB, A.; MITCHELLD, J.; PARIZEAULTA, G.; PELLETIERH, L.; PHANB, V.; RINALDOH, P.; SCOTT, C.R.; SCRIVERD, C.; MITCHELL, G.A. Effect of nitisinone (NTBC) treatment on the clinical course of hepatorenal tyrosinemia in Québec. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 107, p. 49-54, 2012.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. S. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Review*, v. 23, p. 3-25, 1997.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, p. 311-335, 2012.

- PELTIER, S.; OGER, J. M.; LAGARCE, F. R.; COUET, W.; ENHANCED, J. P. B. Oral Paclitaxel Bioavailability After Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules. *Pharmaceutical Research*, Vol. 23, No. 6, 2006.
- SANTOS, N. P.; PINTO, A. C.; “A Mata é sua Farmácia” – A pesquisa de plantas brasileiras para o combate de doenças tropicais no século XIX; *Revista Virtual de Química.*, v. 4, p. 162-172, 2012.
- SCHÖFFSKI, P.; HERR, A.; VERMORKEN, J. B.; VAN DEN BRAND, J.; BEIJNEN, J. H.; ROSING, H.; VOLK, J.; GANSER, A.; ADANK, S.; BOTMA, H. J.; WANDERS, J. Clinical phase II study and pharmacological evaluation of rubitecan in non-pretreated patients with metastatic colorectal cancer-significant effect of food intake on the bioavailability of the oral camptothecin analogue. *European Journal of Cancer*, v. 38, p. 807-813, 2002.
- SHORT, P. L. Growing agrochemical r & d. *Chemical and Engineering News*, v. 83, p.19-22, 2005.
- 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.
- TICE, C. M. Selecting the right compounds for screening: does Lipinski’s rule of 5 for pharmaceuticals apply to agrochemicals? *Pest Management Science*, v. 57, p. 3-16, 2001.

CAPÍTULO 2

SÍNTESE DE ISOBENZOFURAN-1-(3*H*)-ONAS C-3 FUNCIONALIZADAS

2.1. INTRODUÇÃO

Compostos cíclicos contendo um elemento diferente de carbono são denominados de heterocíclicos. Essas substâncias desempenham papel importante em diversas áreas do conhecimento científico, incluindo na pesquisa e desenvolvimento de fármacos e agroquímicos. A Figura 1 (p.14) contém estruturas de diversos fármacos e agroquímicos comerciais possuindo anéis heterocíclicos.

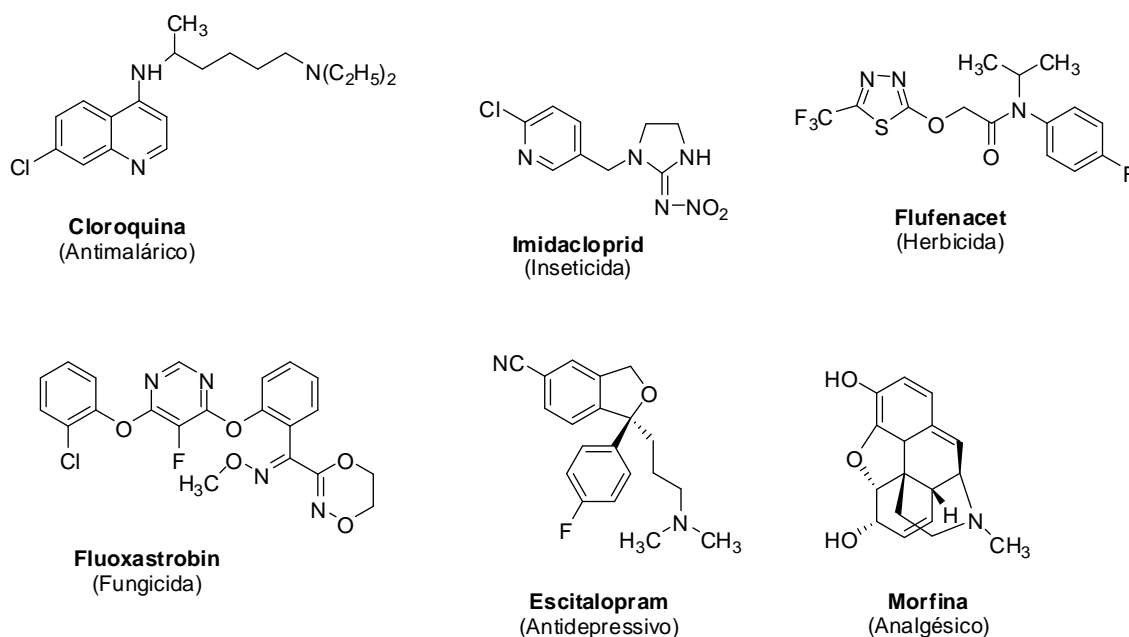


Figura 1 – Exemplos de heterociclos biologicamente ativos.

Dentre as diferentes classes de heterocíclicos, as isobenzofuran-1(3*H*)-onas ou fitalidas possuem como característica estrutural a presença de um anel benzênico fundido a um anel γ -lactônico (Figura 2).

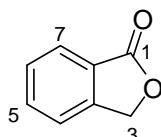


Figura 2 – Estrutura básica de uma isobenzofuran-1(3*H*)-ona.

Essas substâncias têm despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo devido, em parte, à gama de atividades biológicas que elas apresentam. Por exemplo, o ácido micofenólico (**1**), uma fitalida natural contendo um anel aromático altamente funcionalizado (Figura 3, p.15), é encontrada em várias espécies de fungo do gênero *Penicillium* spp e exibe atividades antibacteriana (GALLAGHER *et al.*, 1987), antifúngica (ABRAHAM, 1945) e antiviral (WILLIAMS *et al.*, 1968). Atualmente esta substância está sendo muito utilizada como uma droga imunossupressora para prevenir

rejeição em transplante de órgãos (CELLCEPT, 2012). Devido a sua importância, várias sínteses totais e formais foram descritas na literatura tendo esta isobenzofuranona como alvo sintético (BIRCH e WRIGHT, 1969; CANONICA *et al.*, 1972; DANHEISER *et al.*, 1986; PATTERSON, 1993; PLÉ *et al.*, 1997; ZÚÑGA, e LUCAS, 1998; ZÚÑGA *et al.*, 2003).

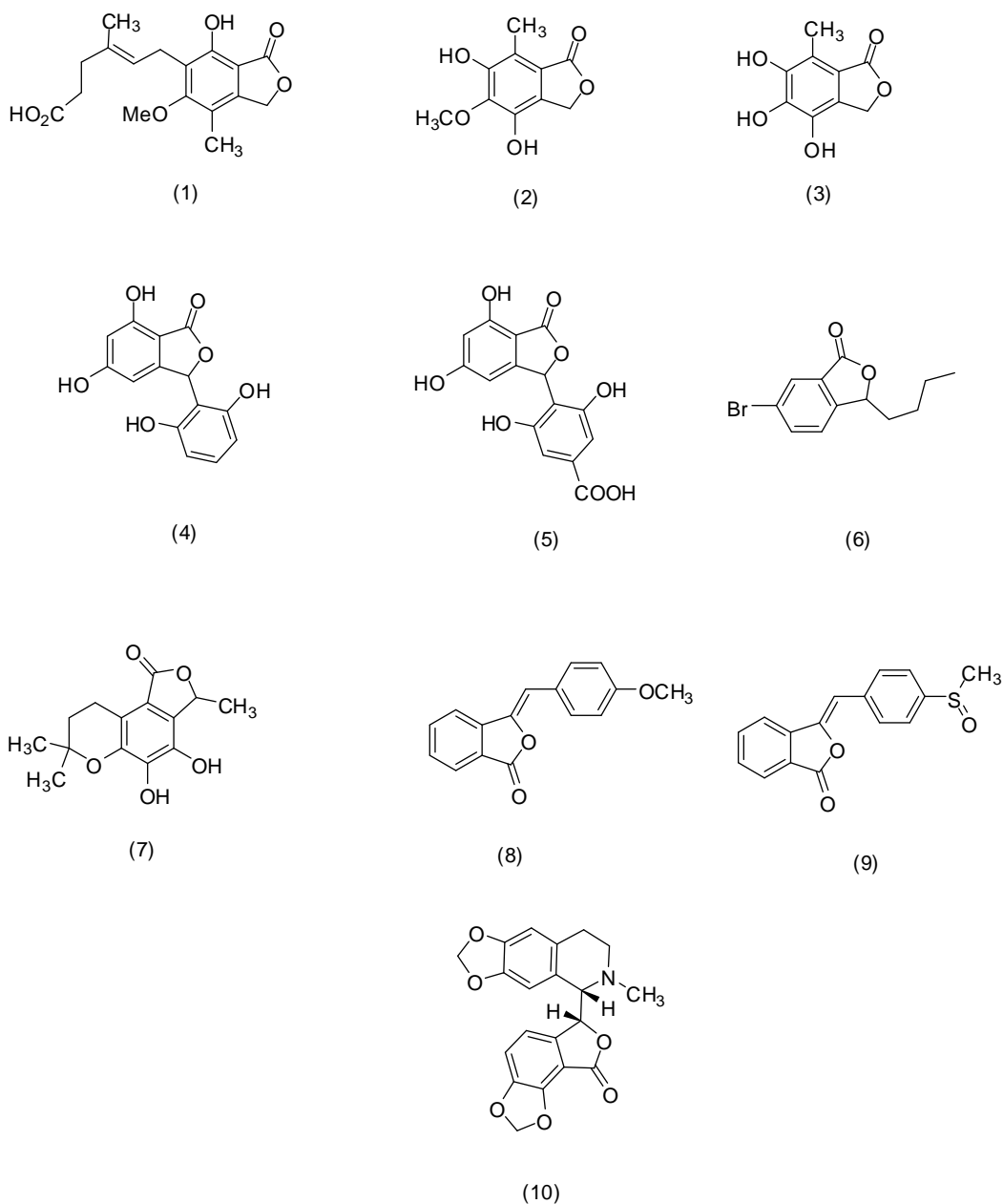


Figura 3 – Exemplos selecionados de isobenzofuran-1(3H)-onas bioativas.

O estudo recente publicado por HUANG e colaboradores (2012) descreve o isolamento das isobenzofuranonas **2** e **3** (Figura 3, p.15), apresentando significativas atividades antioxidante, a partir do extrato EtOAc obtido da fermentação do fungo *Cephalosporium* sp. AL031.

Diversas isobenzofuran-1(3*H*)-onas possuem funcionalização na posição C-3 do núcleo isobenzofuranona e também apresentam notáveis e variadas atividades biológicas. A isopestacina (**4**) (Figura 3, p.15), isolada a partir do fungo *Pestalotiopsis microspora* (STROBEL *et al.*, 2002), possui significativa atividade antifúngica.

O estudo da composição química do extrato EtOAc obtido do fungo *Cryphonectria parasitica* (Murr.) cultivado em MPGA (MALT-PEPTONE-GLUCOSE-AGAR), resultou no isolamento de vários metabólitos secundários dentre eles o ácido crifonétrico (**5**) (Figura 3, p.15). Isolado como o componente majoritário (mais de 20%) do extrato EtOAc (ARNONE *et al.*, 2002), este ácido apresenta comprovada atividade fitotóxica, sendo capaz de inibir completamente o crescimento de sementes de tomate na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A formação de trombos arteriais, devido a ativação de plaquetas, pode ser evitada com a administração de uma classe de medicamentos denominados antiplaquetários. Testes realizados em ratos sugerem que a isobenzofuranona **6** (Figura 3, p.15) tem potencial para ser utilizado como antiplaquetário (MA *et al.*, 2012).

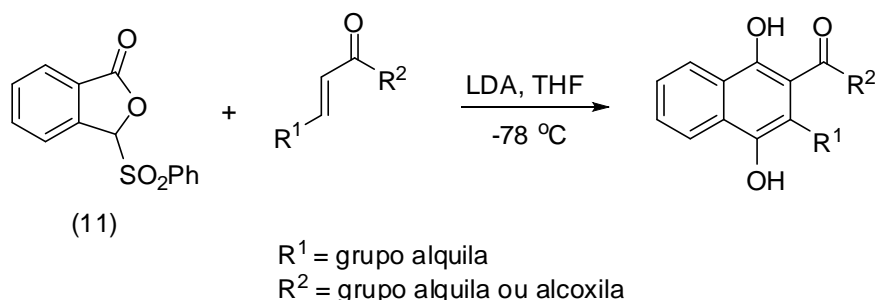
A isobenzofuranona tricíclica fuscinarina (**7**) (Figura 3, p.15) foi isolada do fungo *Oidiodendron griseum* e apresenta atividade contra o vírus HIV causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), uma doença que

aflige milhões de pessoas ao redor do mundo e que ainda não possui cura. (YOGANATHAN *et al.*, 2003).

ZAMILPA e colaboradores (2005) descreveram efeitos ansiolíticos induzidos por fitalidas contendo grupos alquilideno ligados à posição C-3 do núcleo isobenzofuranona. Os compostos **8** e **9** (Figura 3, p.15) mostraram ter potencial para o desenvolvimento de novos agentes ansiolíticos¹.

Como um último exemplo de isobenzofuranona C-3 funcionalizada e bioativa mencionam-se o anticonvulsivante bicuculina (**10**) (HUNG *et al.*, 1981), Figura 3, p.15.

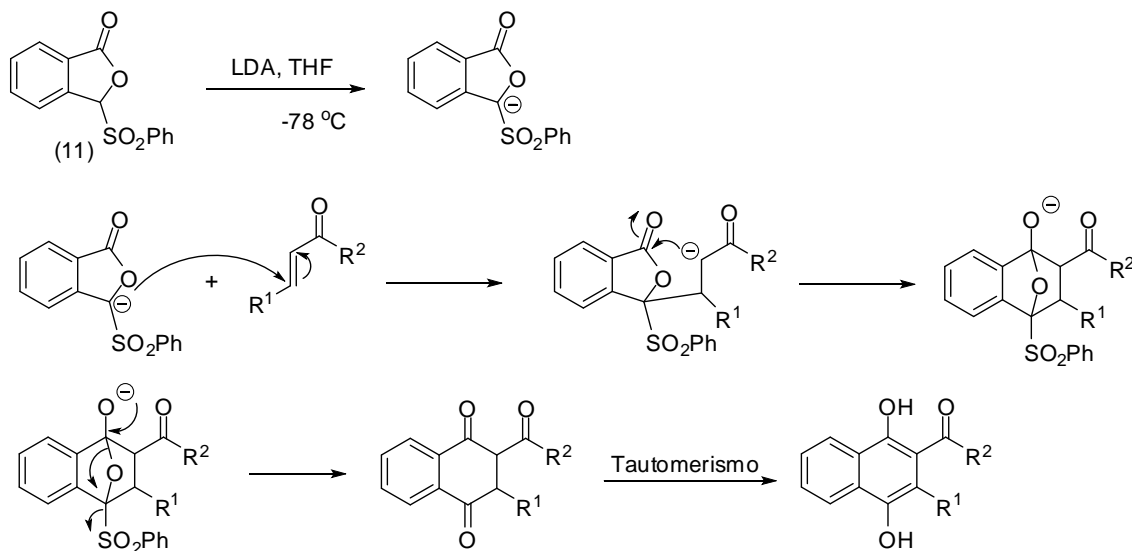
Além de apresentarem importantes atividades biológicas, as isobenzofuran-1(3*H*)-onas são sinteticamente úteis. Na reação conhecida como anelação de Houser, carbânions oriundos de isobenzofuranonas funcionalizadas na posição C-3 reagem com compostos contendo ligações múltiplas polarizadas (como compostos carbonilados α,β -insaturados) ou ativadas (como no caso do benzino) dando origem a produtos de anelação do tipo naftol ou naftoquinona (MAL e PAHARI, 2007). No Esquema 1 (p.18) encontra-se um exemplo da anelação de Houser.



Esquema 1 – Exemplo de uma anelação de Hauser.

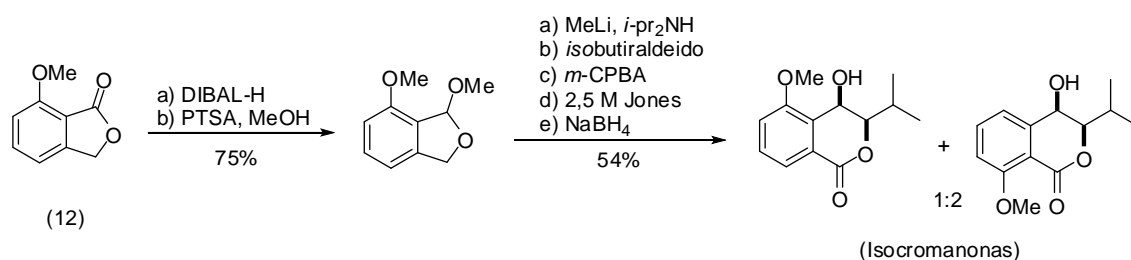
¹ Ansiolíticos são fármacos utilizados para diminuir a ansiedade e a tensão que em pequenas doses, recomendadas pelos médicos, normalmente não causam danos físicos ou mentais ao paciente.

O tratamento da isobenzofuranona **11** com LDA resulta na formação do correspondente carbânion que, então, reage com compostos carbonilados α,β -insaturados via adição de Michael levando à formação de compostos fenólicos. Uma proposta mecanística para a reação exemplificada é mostrada no Esquema 2 (MAL e PAHARI, 2007).



Esquema 2 – Proposta mecanística para a anelação de Hauser apresentada no Esquema 1.

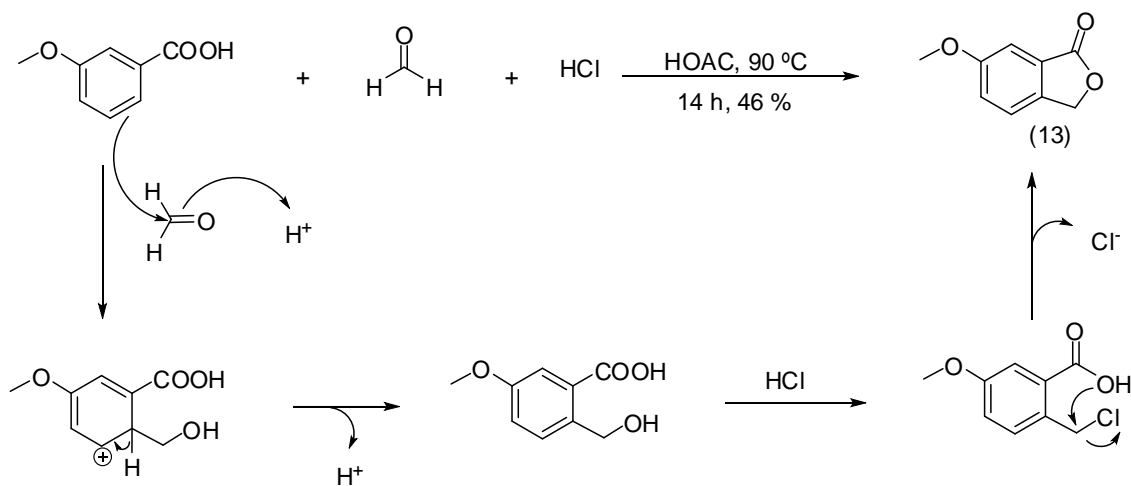
Isocromanonas são farmacóforos presentes em um número elevado de produtos naturais com potencial terapêutico. EGAN e co-autores (2011) demonstraram que a isobenzofuranona (**12**) ao ser reduzida com DIBAL e tratada com PTSA em metanol gera o correspondente acetal com bom rendimento (75% para as duas etapas). Este, por sua vez, pode ser convertido em isocromanonas pela sequência de reações explicitadas no Esquema 3.



Esquema 3 – Síntese de isocromanonas a partir da isobenzofuranona **12**.

O espectro de propriedades biológicas bem como a utilidade sintética das isobenzofuran-1(3*H*)-onas têm motivado o desenvolvimento de metodologias para a preparação desses heterociclos. Alguns exemplos dessas metodologias serão descritas a seguir.

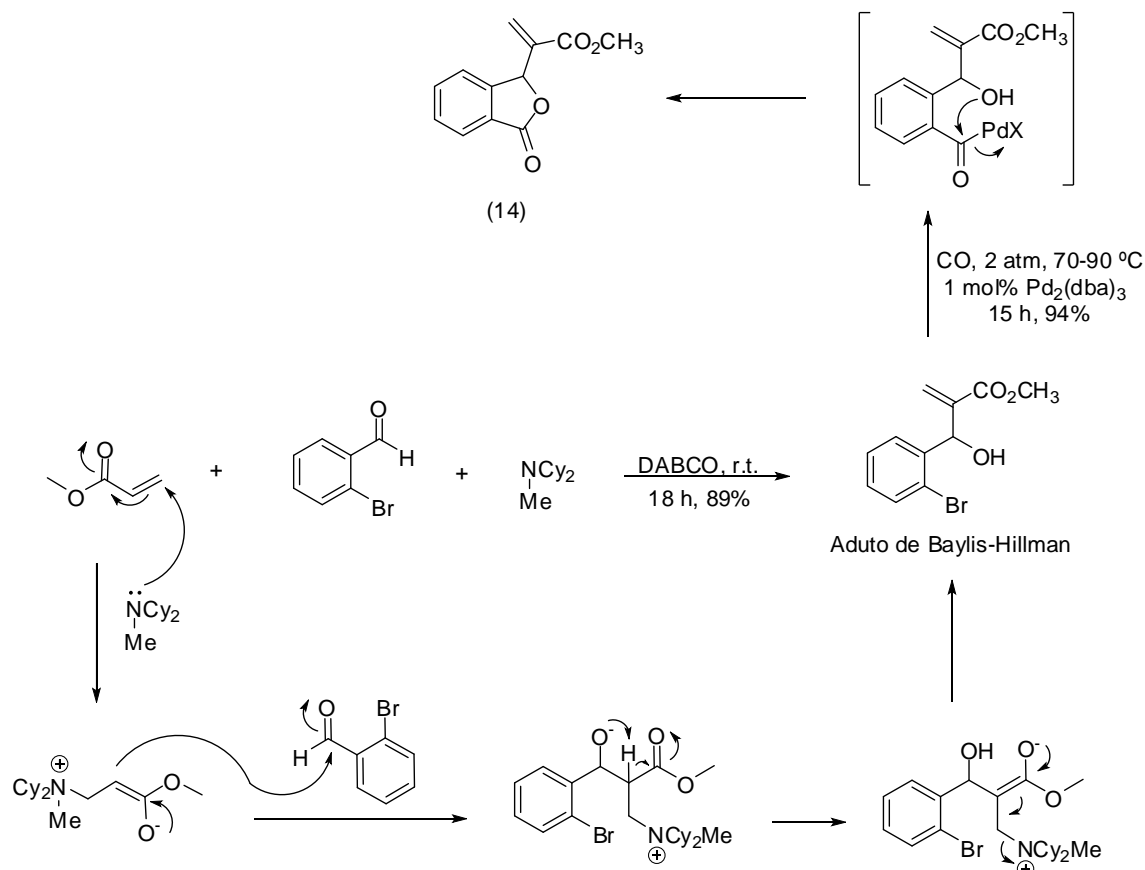
NAPOLETANO e colaboradores (2001) utilizaram a reação de clorometilação do ácido 3-metoxibenzóico para sintetizar a 6-metoxiisobenzofura-1(3*H*)-ona (**13**) com 46 % de rendimento (Esquema 4).



Esquema 4 - Proposta mecanística da síntese da 6-metoxiisobenzofura-1(3*H*)-ona (**13**) a partir do ácido 3-metoxibenzóico.

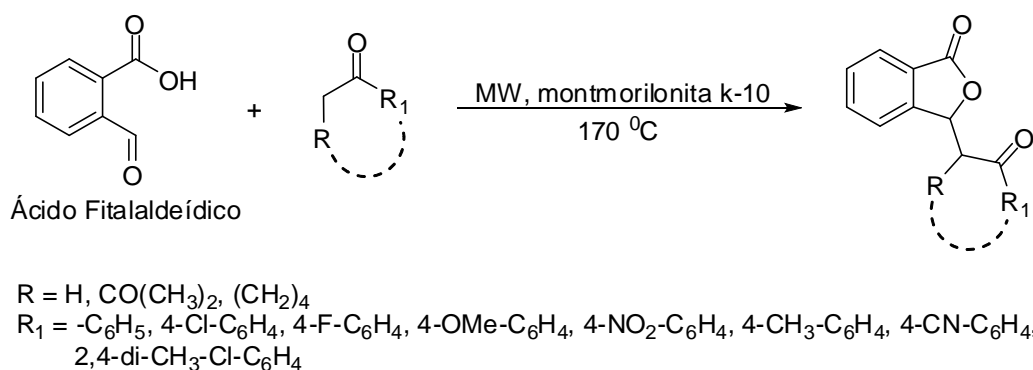
Na metodologia descrita por COELHO e colaboradores (2006), isobenzofuran-1(3*H*)-onas contendo grupos alquilideno ligados à posição C-3, foram preparadas a partir de adutos de Baylis-Hillman. Neste caso, os adutos

sofrem um processo de ciclocarbonilação, catalisado por paládio, resultando na formação das correspondentes isobenzofuranonas. No exemplo apresentado no Esquema 5, a fitalida (**14**) foi obtida com 94% de rendimento após o processo de ciclocarbonilação do aduto de Baylis-Hillman.



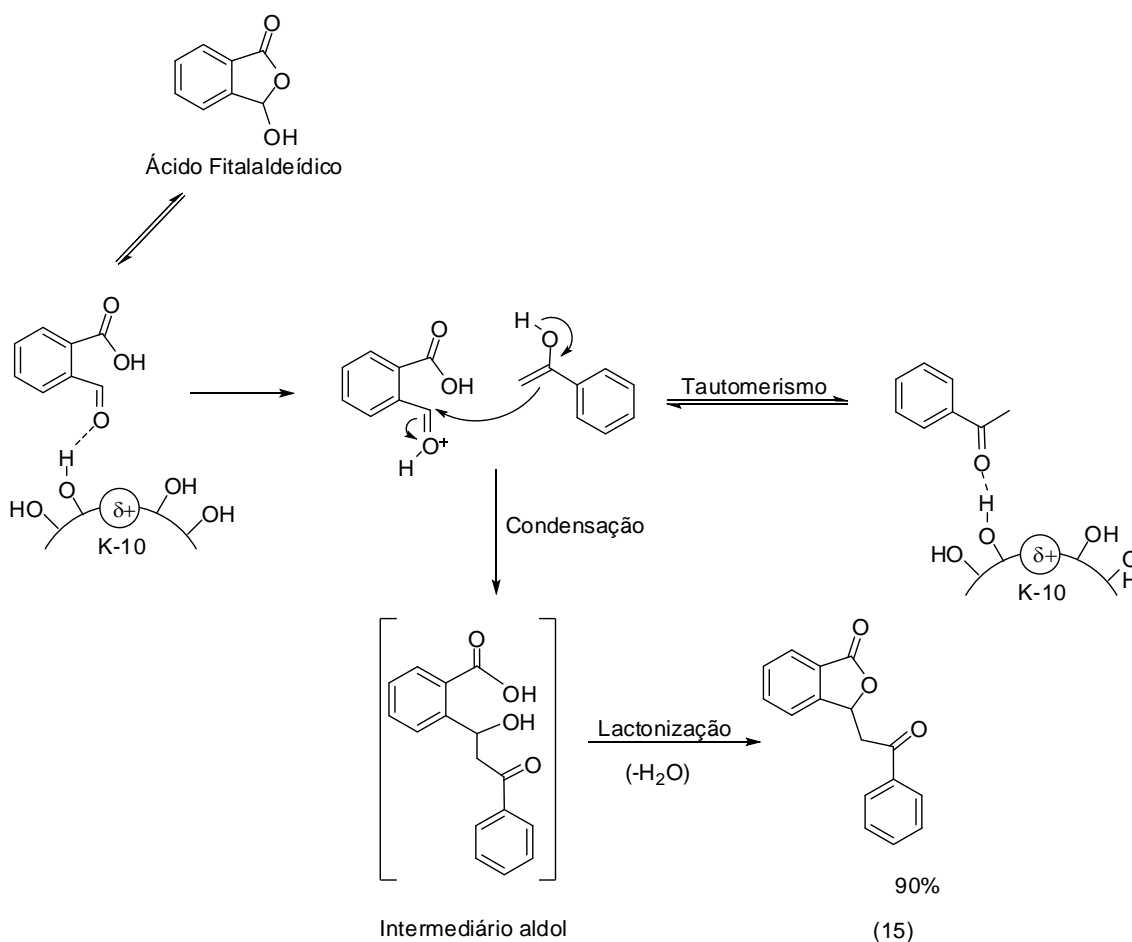
Esquema 5 – Síntese de isobenzofuranonas via reação de ciclocarbonilação de adutos de Baylis-Hillman.

O processo de condensação/lactonização entre ácido fitalaldeídico e diferentes cetonas (aril metil cetonas e cetonas cíclicas), é uma metodologia que fornece isobenzofuran-1(3*H*)-onas C-3 funcionalizadas com excelentes rendimentos (90-98%). Essa metodologia reportada por LANDGE e colaboradores (2008) utiliza aquecimento por micro-ondas e montmorilonita K-10 (disponível comercialmente) como catalisador (Esquema 6).



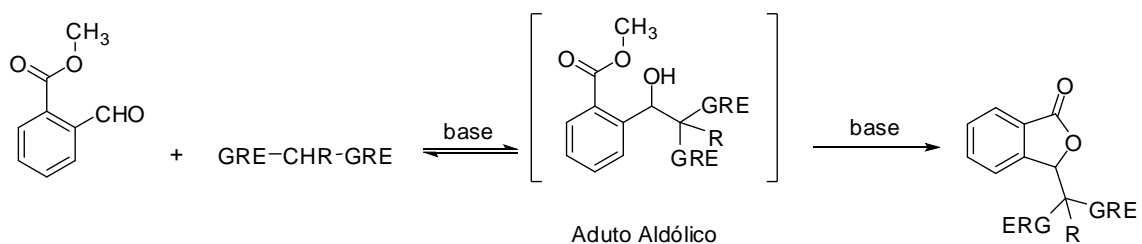
Esquema 6 – Síntese de isobenzofuran-1(3*H*)-onas segundo metodologia descrita por LANDGE *et al* (2008).

No Esquema 7 (p.22) está representada a proposta mecanística para a formação da 3-(2-oxo-2-feniletíl)isobenzofuran-1(3*H*)-ona (**15**) segundo a metodologia de LANDGE *et al* (2008).



Esquema 7 – Proposta mecanística para a formação da 3-(2-oxo-2-feniletil)isobenzofuran-1(3H)-ona (**15**).

Enquanto a síntese de isobenzofuranonas descrita por LANDGE e co-autores (2008) ocorre em condições ácidas, DI MOLA e colaboradores (2012) reportaram a obtenção de várias fitalidas em condições básicas. Nesse caso, compostos contendo grupos metilenos ativos são condensados com 2-formil benzoato de metila, na presença de K_2CO_3 , dando origem aos correspondentes adutos aldólicos que não foram isolados. Subsequente processo de lactonização resulta na formação de isobenzofuran-1(3H)-onas C-3 funcionalizadas (Esquema 8, p.23).



GRE = Grupo retirador de elétrons

Esquema 8 – Síntese de isobenzofuran-1(3*H*)-onas via condensação/lactonização em meio básico.

Descreve-se nesse capítulo a síntese e a caracterização estrutural de uma série de isobenzofuran-1(3*H*)-onas contendo grupos alicíclicos e aromáticos ligados ao átomo de carbono 3 do núcleo isobenzofuranona. (Figura 4, p.24). Essas substâncias foram preparadas com vistas à avaliação de suas atividades fitotóxica e antiproliferativa.

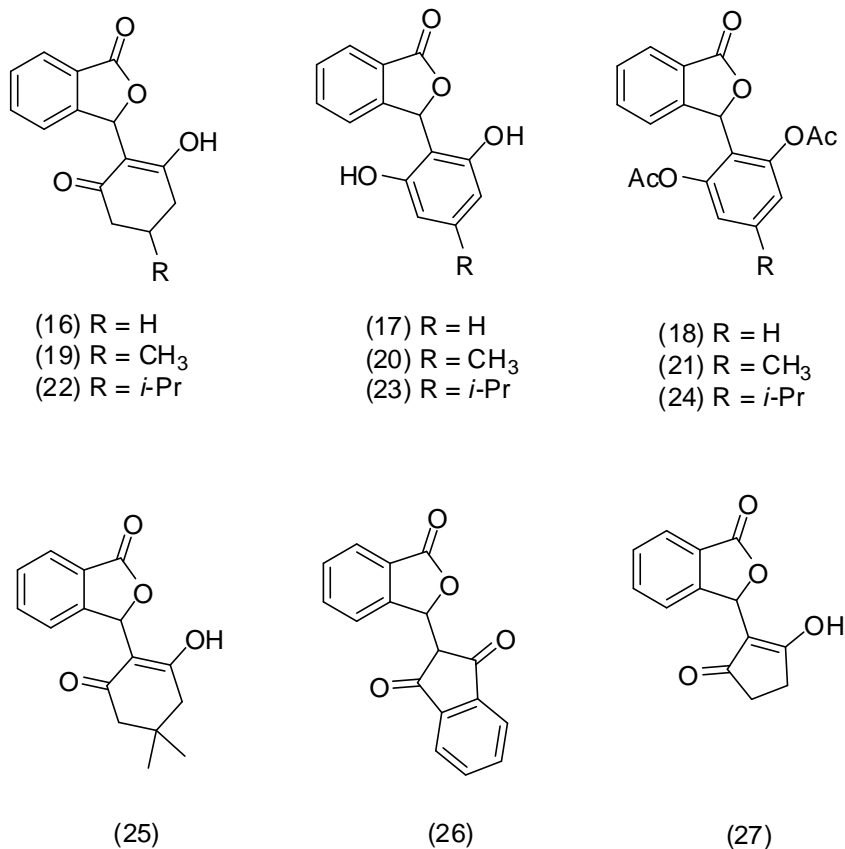


Figura 4 - Estruturas das substâncias sintetizadas e objeto de investigação desse trabalho.

O estudo da avaliação da fitotoxicidade *in vivo* dos compostos da Figura 4 foi motivado pelo efeito fitotóxico descrito na literatura para o ácido crifonétrico (ARNONE *et al.* 2002) (Figura 3, estrutura **5**, p.15).

A descrição na literatura de efeitos citotóxicos, contra diferentes linhagens de células tumorais (LOGRADO *et al.* 2010), apresentados por isobenzofuran-1(3*H*)-onas contendo grupos alquila ligados ao carbono 3 motivou a avaliação das atividades antiproliferativas das fitalidas **16** a **27** contra linhagens de células de linfoma e leucemia mielóide.

A literatura também descreve efeitos *in vitro* de isobenzofuranonas sobre o transporte de elétrons fotossintético (DEMUNER *et al.*, 2006; PEREIRA,

2012). Dentro desse contexto, as substâncias **16** a **27** também foram avaliadas com respeito aos seus efeitos sobre o transporte de elétrons da fotossíntese.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Generalidades Metodológicas

Na síntese dos compostos foram utilizados reagentes de grau P.A.

As substâncias diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), cicloexano-1,3-diona, 5-metil-cicloexano-1,3-diona, 5-isopropilcicloexano-1,3-diona, 5,5-dimetilcicloexano-1,3-diona, 1*H*-indano-1,3(2*H*)-diona, ciclopentano-1,3-diona, ácido fitalaldeídico foram adquiridas comercialmente (Sigma Aldrich). Estes compostos foram utilizados sem qualquer purificação prévia. Acetonitrila, anidrido acético, clorofórmio, acetato de mercúrio, ácido acético, ácido clorídrico, acetato de sódio, sal dissódico do ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), dimetil sulfóxido e tiosulfato de sódio foram adquiridos da Vetec.

A secagem da acetonitrila foi feita colocando-a sob agitação com sílica gel e, depois de filtrado, adicionando-se hidreto de cálcio ao solvente. A mistura foi mantida sob refluxo por 5 horas. Após este período, o solvente foi recolhido e armazenado em um frasco âmbar contendo peneira molecular 4Å (PERRIN E AMAREGO, 1994).

A secagem do clorofórmio foi realizada adicionando-se sulfato de sódio anidro ao solvente. A mistura foi mantida sob refluxo por 6 horas. Após este período, o solvente foi recolhido e armazenado em um frasco âmbar contendo peneira molecular 4Å (PERRIN E ARMAREGO, 1994).

As análises por CCD foram realizadas empregando-se placas cromatográficas de sílica-gel impregnadas sobre alumínio (espessura de 250 μm). As separações cromatográficas em coluna foram feitas utilizando-se

sílica-gel (70-230 mesh), como fase estacionária. Os solventes utilizados como eluentes foram usados sem prévia purificação.

As placas de CCD após eluição foram observadas em uma câmara contendo luz ultra-violeta.

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

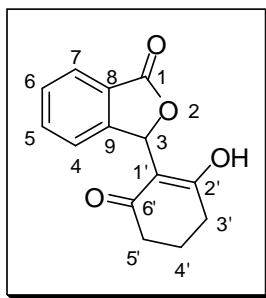
Os espectros no infravermelho (IV) foram adquiridos empregando-se a técnica reflectância total atenuada (ATR) em equipamento Varian 660-IR com acessório GladiATR.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 400, 300 e 200 MHz) e de carbono (RMN de 100, 75, 50 MHz) foram obtidos em espectrômetros VARIAN MERCURY 300 (Departamento de Química – UFV) e AVANCE DRX 400 e DPX 200 (Departamento de Química – UFMG). Utilizou-se como solventes deuterados clorofórmio (CDCl_3) metanol (CD_3OD) e dimetilsulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$). As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro micrOTOF – QII Brucker, sendo os compostos analisados por espectrometria de massas de alta resolução/ionização por *eletrospray* (ESI-MS). Os espectros foram adquiridos em modo positivo, portanto os valores observados estão na forma de $[\text{M}+\text{H}]^+$. As amostras foram preparadas dissolvendo-se os compostos em acetonitrila contendo 1% de ácido fórmico.

2.2.2. Procedimentos sintéticos

Síntese da 3-(2-hidroxi-6-oxocicloex-1-enil)isobenzofuran-1(3H)-ona (**16**)



(**16**)

O procedimento descrito a seguir foi baseado no trabalho publicado por MAL *et al.* (2007).

A um balão de fundo redondo (50 ml) foram adicionados cicloexano-1,3-diona (0,891 g; 7,95 mmol) em acetonitrila (10,0 ml) e DBU (1,06 ml; 7,10 mmol) sob agitação magnética a temperatura ambiente. Após 5 minutos foi adicionado ácido fitalaldeídico (1,07 g; 7,10 mmol) à solução que, então foi mantida em agitação sob refluxo por um período de 7 horas. A reação foi finalizada com adição de HCl 10% v/v (10 ml) e acetato de etila (100 ml). A fase orgânica foi separada e lavada com água (2 x 20 ml) e solução aquosa saturada de cloreto de sódio (10 ml), seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida. A substância **16** foi purificada por recristalização em acetato de etila e obtida como um sólido branco com 64% de rendimento (1,12 g; 4,60 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,20$ (acetato de etila).

$T_f = 217,5-218,0$ °C (T_f literatura: 219-220 °C; MAL *et al.*, 2007).

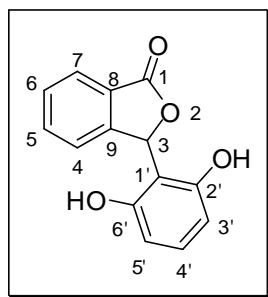
IV (ART) $\bar{\nu}_{\max}$: 3200-2000 (banda larga), 2960, 2917, 2887, 1758, 1565, 1380, 1281, 1056, 1025, 944.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1,83–1,91 (m, 2H; H-4'), 2,26–2,45 (m, 4H; H-3'/H-5'), 6,59 (s, 1H; H-3), 7,30 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz; H-4), 7,50 (dd, 1H, $J = 7,6; 7,2$ Hz; H-5), 7,65 (dd, 1H, $J = 7,6; 7,2$ Hz; H-6), 7,78 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-7).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 20,1 (C-4'); 32,9 (C-3'/C-5'); 74,3 (C-3); 109,1 (C-1'); 121,4 (C-4); 124,2 (C-6); 126,4 (C-8); 128,0 (C-7); 133,6 (C-5); 150,7 (C-9); 170,7 (C-1).

ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_4$: 245,0814; encontrado: 245,0840.

Síntese da 3-(2,6-diidroxifenil)isobenzofuran-1(3H)-ona (**17**)



(17)

O procedimento descrito a seguir foi baseado no trabalho publicado por MAL *et al.* (2007).

A um balão de fundo redondo (50 ml) foi adicionado o composto **16** (0,477 g; 1,95 mmol) em AcOH (20,0 ml) juntamente com $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (1,90 g; 5,93 mmol) e NaOAc (0,481 g; 5,86 mmol). Após agitação da mistura sob refluxo por 5 horas, foi adicionada solução aquosa de HCl 6 mol L^{-1} (5 ml) à mistura que, foi então, agitada por mais 15 minutos. A mistura foi filtrada sobre

uma camada de celite e ao filtrado foi adicionado acetato de etila (60 ml). A fase orgânica foi separada e lavada com água (2 x 20 ml), solução aquosa saturada de cloreto de sódio (10 ml) e solução de EDTA 0,196 mol.L⁻¹ (2 x 15 mL), seca (Na₂SO₄) e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel eluída com hexano-acetato de etila (1:3 v/v). O composto **17** foi obtido como um sólido branco (0,320 g; 1,32 mmol) com 68% de rendimento.

Característica: sólido branco.

CCD: R_f = 0,70 (hexano-acetato de etila 1:3 v/v).

T_f = 238,6-239,8 °C (**T_f literatura:** 239-240 °C; MAL *et al.*, 2007).

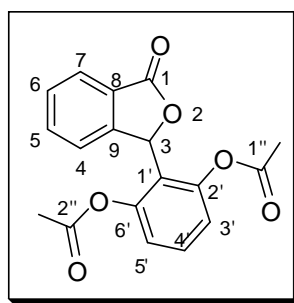
IV (ART) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3470 (banda larga), 3296, 1712, 1614, 1469, 1011, 945, 715, 587.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃/DMSO-*d*₆) δ : 6,29 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H-3'/H-5'); 6,92 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, H-4'); 7,02 (s, 1H; H-3); 7,31 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz; H-4); 7,47 (t, 1H, *J* = 7,6 Hz; H-5); 7,59 (t, 1H, *J* = 7,2 Hz; H-6); 7,81 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz; H-7).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃/DMSO-*d*₆) δ : 75,6 (C-3); 106,9 (C-3'/C-5'); 108,6 (C-1'); 121,8 (C-4); 124,2 (C-7); 127,2 (C-8); 127,9 (C-6); 130,2 (C-4'); 133,3 (C-5); 151,1 (C-9); 157,5 (C-2'/C-6'); 171,5 (C-1).

ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO *m/z* [M+H]⁺: Calculado para C₁₄H₁₁O₄: 243,0657; encontrado: 243,0658.

Síntese da 3-(2,6-diacetoxifenil)isobenzofuran-1(3H)-ona (**18**)



(**18**)

A um balão de fundo redondo (25 ml) foi adicionado o composto **17** (0,109 g; 0,450 mmol) em CHCl_3 (5,00 ml) juntamente com Ac_2O (0,160 ml; 1,62 mmol), Et_3N (1,42 ml; 1,03 mmol) e uma quantidade catalítica de DMAP (0,005 g; 0,0450 mmol). A solução resultante foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por 12 horas. Após este período, o solvente foi removido sob pressão reduzida. O composto **18** foi purificado por recristalização em acetato de etila, sendo obtido como um sólido branco (0,0640 g; 0,200 mmol) com 44% de rendimento.

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,54$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

$T_f = 175,9\text{-}177,8\text{ }^\circ\text{C}$ (T_f literatura: $172\text{-}173\text{ }^\circ\text{C}$; MAL *et al.*, 2007).

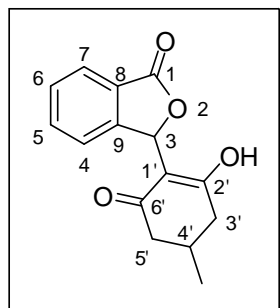
IV (ART) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 1756, 1611, 1465, 1369, 1285, 1170, 1023, 975.

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,01 (s, 6H; CH_3); 6,85 (s, 1H; H-3); 7,12 (d, 2H, $J = 8,2$; H-3'/H-5'); 7,25 (d, 1H, $J = 8,0$; H-4); 7,49–7,79 (m, 3H; H-4'/H-5'/H-6); 7,95 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz; H-7).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ : 22,0 (CH_3); 76,0 (C-3); 122,3 (C-3'/C-5'); 123,2 (C-4); 124,4 (C-1'); 126,6 (C-7); 127,3 (C-8); 131,1 (C-6); 132,5 (C-4'); 136,5 (C-5); 150,7 (C-9); 151,6 (C-2'/C-6'); 170,5 (C-1''/C-2''); 172,5 (C-1).

ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$: Calculado para $C_{18}H_{15}O_6$, 327,0869; encontrado, 327,0848.

Síntese da 3-(2-hidroxi-4-metil-6-oxocicloex-1-enil)isobenzofuran-1(3H)-ona (**19**)



(**19**)

Este composto foi obtido como um sólido branco (0,305 g; 1,20 mmol) com 68% de rendimento a partir do ácido fitalaldeídico (0,274 g; 1,83 mmol), DBU (1,80 ml; 12,4 mmol) e 5-metil-ciclohexano-1,3-diona (0,219 g; 1,74 mmol), seguindo o mesmo procedimento descrito para a preparação de **16**.

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,50$ (acetato de etila).

$T_f = 189,2-191,6$ °C (T_f literatura: 119-120 °C; MAL *et al.*, 2007).

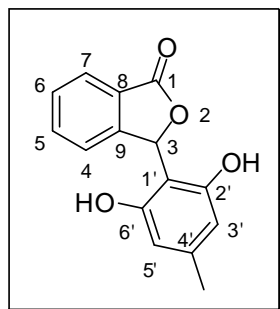
IV (ART) $\bar{\nu}_{max}$: 3100-2050 (banda larga), 2960, 2917, 2886, 1757, 1564, 1380, 1281, 1060, 944, 740.

RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,08 (d, 3H, $J = 5,2$; \underline{CH}_3); 2,10–2,58 (m, 4H; H-3'/H-4'/H5'); 6,69 (s, 1H; H-3); 7,31 (d, 1H, $J = 7,6$; H-4); 7,50 (t, 1H, $J = 7,4$; H-5); 7,65 (t, 1H, $J = 7,4$; H-6); 7,81 (d, 1H, $J = 7,6$; H-7).

RMN de ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 20,8 (\underline{CH}_3); 29,3 (C-3'/C-5'); 42,0 (C-4'); 73,6 (C-3); 110,5 (C-1'); 122,4 (C-4); 125,5 (C-6); 127,9 (C-8); 129,3 (C-7); 135,0 (C-5); 152,1 (C-9); 174, (C-1); 189,5 (C-2').

ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$: Calculado para $C_{15}H_{15}O_4$: 259,2772; encontrado: 259,0984.

Síntese da 3-(2,6-diidroxifenil)isobenzofuran-1(3*H*)-ona (**20**)



(**20**)

Este composto foi obtido como um sólido amarelo palha (0,178 g; 0,69 mmol) com 70% de rendimento por meio da aromatização de **19** (0,252 g; 0,98 mmol), seguindo o mesmo procedimento descrito para a preparação de **17**.

Característica: sólido amarelo palha.

CCD: $R_f = 0,82$ (hexano-acetato de etila 1:3 v/v).

$T_f = 228-231$ °C ($T_{f \text{ literatura}} = 238-239$ °C; MAL *et al.*, 2007).

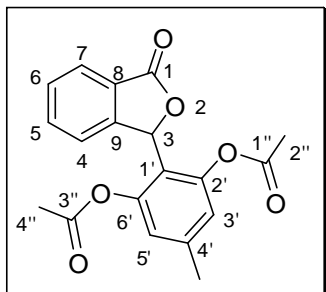
IV (ART) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3579, 3201 (banda larga), 2924, 2853, 1721, 1618, 1595, 1305, 1046, 951, 733.

RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3/DMSO-d_6$) δ : 1,94 (s, 3H; CH_3); 5,94 (s, 2H; H-3'/H-5'); 6,81 (s, 1H; H-3); 7,11 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz; H-4); 7,20–7,39 (m, 2H; H-5 e H-6); 7,62 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz; H-7).

RMN de ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3/DMSO-d_6$) δ : 22,5 (CH_3); 77,2 (C-3); 106,9 (C-3'/C-5'); 109,1 (C-1'); 123,2 (C-4); 125,4 (C-7); 128,5 (C-8); 129,0 (C-6); 134,4 (C-4'); 141,9 (C-5); 152,6 (C-9); 158,3 (C-2'/C-6'); 173,2 (C-1).

ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$: Calculado para $C_{15}H_{13}O_4$: 256,2534; encontrado: 257,0880.

Síntese da 3-(2,6-diacetoxi-4-metilfenil)isobenzofuran-1(3*H*)-ona (**21**)



(21)

Este composto foi obtido como um sólido (0,043 g; 0,13 mmol) amarelo palha com 33% de rendimento via acetilação de **20** (0,100 g; 0,39 mmol), seguindo o mesmo procedimento descrito para a preparação de **18**.

Característica: sólido amarelo palha.

CCD: $R_f = 0,83$ (hexano-acetato de etila 1:2 v/v).

$T_f = 171,5-172,3$ °C.

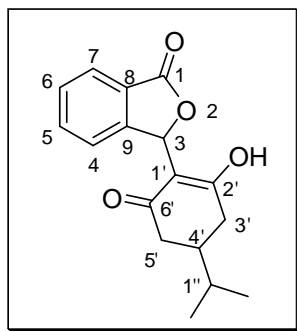
IV (ART) $\bar{\nu}_{max}$: 2925, 2855, 1758, 1621, 1172, 1040, 974, 892, 738.

RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 1,99 (sl, 6H; H-2''/H-4''); 2,31 (s, 3H; CH_3); 6,78 (s, 1H; H-3); 6,94 (s, 2H; H-3'/H-5'); 7,23 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz; H-4); 7,58–7,76 (m, 2H, H-5/H-6); 7,93 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz; H-7).

RMN de ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 22,0 (C-2''/C-4''); 22,3 (CH_3); 76,0 (C-3); 119,3 (C-3'/C-5'); 123,6 (C-4); 124,4 (C-1'); 126,5 (C-7); 127,3 (C-8); 131,1 (C-6); 136,4 (C-4'); 142,9 (C-5); 150,8 (C-9); 151,4 (C-2'/C-6'); 170,6 (C-1''/C-3''); 172,0 (C-1).

ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$: Calculado para $C_{19}H_{17}O_6$: 341,3347; encontrado: 341,1030.

Síntese da 3-(2-hidroxi-4-isopropil-6-oxocicloex-1-enil)isobenzofuran-1(3H)-ona
(22)



(22)

Este composto foi obtido como um sólido branco (1,326 g; 4,63 mmol) com 69% de rendimento a partir do ácido fitalaldeídico (1,002 g; 6,68 mmol), DBU (1,06 ml; 7,1 mmol) e 5-isopropilcicloexano-1,3-diona (1,090 g; 7,07 mmol), seguindo o mesmo procedimento descrito para a preparação de **16**.

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,08$ (hexano-acetato de etila 1:2 v/v).

$T_f = 176,7-177,8$ °C.

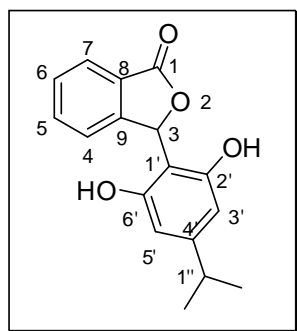
IV (ART) $\bar{\nu}_{\max}$: 3000-2100 (banda larga), 2961, 2874, 2360, 1757, 1555, 1466, 1370, 1342, 1253, 1210, 1063, 948, 728.

RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ : 0,94 (d, 6H, $J = 6,9$ Hz; $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1,57–1,67 (m, 1H; $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1,83–1,96 (m, 1H; H-4'); 2,22–2,51 (m, 4H; H-3' e H-5'); 6,68 (s, 1H; H-3); 7,31 (dd, 1H, $J = 7,5$; $J = 0,9$ Hz; H-4), 7,50 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz; H-5), 7,64 (td, 1H, $J = 7,5$; $J = 1,2$ Hz, H-6), 7,80 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz; H-7).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ 18,7 (-CH(CH₃)₂), 31,7 (-CH(CH₃)₂), 36,8 (C-3'/C-5'), 39,5 (C-4'), 75,3 (C-3), 109,4 (C-1'), 121,4 (C-4), 124,4 (C-7), 126,8 (C-8), 128,2 (C-6), 139,9 (C-5), 151,0 (C-9), 172,9 (C-1), 189,4 (C-2').

ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z [M+H]⁺: Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_4$: 287,1283; encontrado: 287,1260.

Síntese da 3-(2,6-diidroxil-4-isopropilfenil)isobenzofuran-1(3H)-ona (**23**)



(**23**)

Este composto foi obtido obtido como um óleo, extremamente viscoso, laranja (0,220 g; 0,77 mmol) com 73% de rendimento por meio da aromatização de **22** (0,301 g; 1,05 mmol), seguindo o mesmo procedimento descrito para a preparação de **17**.

Característica: óleo laranja.

CCD: $R_f = 0,44$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

IV (ART) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3305 (banda larga), 2959, 2924, 2870, 2159, 1726, 1621, 1596, 1433, 1034, 732.

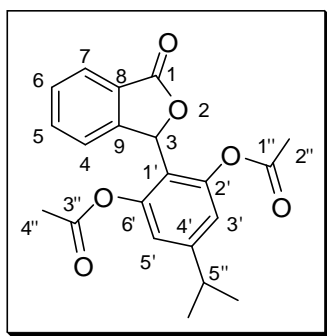
RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ : 1,17 (d, 6H, $J = 6,9$ Hz; CH_3); 2,68 (hept, 1H, $J = 6,9$ Hz; H-1''); 6,17 (s, 2H; H-3'/H-5'); 7,02 (s, 1H; H-3); 7,30 (dd, 1H,

$J = 7,5$, $J = 0,9$ Hz; H-4); 7,49 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz; H-5); 7,63 (td, 1H, $J = 7,5$, $J = 1,2$ Hz; H-6); 7,82 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz; H-7).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ 22,9 ($\underline{\text{CH}_3}$); 34,2 ($\text{C}1''$); 76,8 (C-3); 104,6 (C-3'/C-5'); 105,8 (C-1'); 121,8 (C-4); 124,1 (C-6); 127,0 (C-8); 128,0 (C-7); 133,7 (C-5); 151,8 (C-9); 152,3 (C-4'); 157,6 (C-2'/C-6'); 173,3 (C-1).

ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_4$: 285,1127; encontrado: 285,1116.

Síntese da 3-(2,6-diacetoxi-4-isopropilfenil)isobenzofuran-1(3H)-ona (**24**)



(24)

Este composto foi obtido como um sólido (0,166 g; 0,45 mmol) cristalino com 78% de rendimento por acetilação de **23** (0,166 g; 0,58 mmol), seguindo o mesmo procedimento descrito para a preparação de **18**.

Característica: sólido cristalino.

CCD: $R_f = 0,81$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

$T_f = 157,5$ - $158,1$ °C.

IV (ART) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 2963, 2930, 2870, 1756, 1620, 1366, 1288, 1179, 1030, 973, 739.

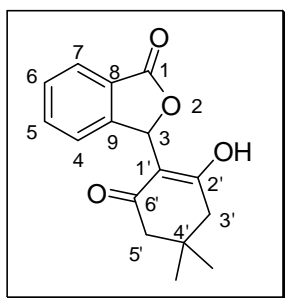
RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) δ (J/Hz): 1,17 (d, 6H, $J = 6,8$; $\underline{\text{CH}_3}$); 1,99 (sl, 6H; H-2''/H-4''); 2,83–2,96 (m, 1H, H-5''); 6,78 (s, 1H; H-3); 7,01 (s, 2H; H-

3'/H-5'); 7,26 (d, 1H, $J = 7,4$; H-4); 7,58–7,76 (m, 2H; H-5/H-6); 7,93 (d, 1H, $J = 7,4$; H-7).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) δ 22,1 (C-2''/C-4''); 25,0 (CH_3); 34,8 (C-5''); 76,0 (C-3); 119,6 (C3'/C-5'); 121,1 (C-4); 124,5 (C-1'); 126,5 (C-7); 127,3 (C-8); 131,1 (C-6); 136,4 (C-4'); 150,7 (C-5); 151,5 (C-9); 153,6 (C-2'/C-6'); 170,5 (C-1''/C-3''); 172,0 (C-1).

ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_6$: 369,1338; encontrado: 369,1418.

Síntese da 3-(2-hidroxi-4,4-dimetil-6-oxocicloex-1-enil)isobenzofuran-1(3*H*)-ona
(25)



(25)

O procedimento descrito a seguir foi baseado no trabalho publicado por MAL *et al.* (2007).

A um balão de fundo redondo (25 ml) foi adicionado 5,5-dimetilcicloexano-1,3-diona (500 mg; 3,57 mmol) em clorofórmio (5 ml) e DBU (0,53 ml; 3,57 mmol) sob agitação magnética a temperatura ambiente. Após 5 minutos foi adicionado ácido fitalaldeídico (495 mg; 3,30 mmol) à solução que, então fora colocada em agitação a temperatura ambiente por um período de 5 horas. A reação foi finalizada com adição de HCl 10% (10 ml) e diluída em de

acetato de etila (100 ml). A fase orgânica foi separada e lavada com água (2 x 20 ml) e solução saturada (10 ml) de cloreto de sódio (NaCl), seca (Na₂SO₄) e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por recristalização em acetato de etila e obtido como um sólido branco com 95% de rendimento (850 mg; 3,12 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: R_f = 0,10 (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

T_f = 212,1-213,0 °C (**T_f literatura:** 208-210 °C; MAL *et al.*, 2007).

IV (ART) $\bar{\nu}_{\max}$: 3200-2400 (banda larga), 2962, 2934, 2884, 1763, 1569, 1382, 1321, 1121, 1059, 942, 738.

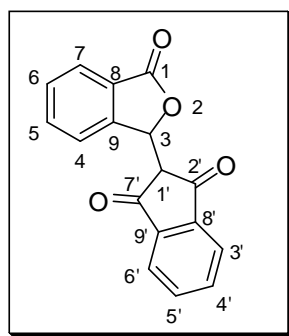
RMN de ¹H (200 MHz, CD₃OD) δ (J/Hz): 1,09 (sl, 6H; -CH₃); 2,35 (sl, 4H; H-3' e H-5'); 6,70 (s, H-3); 7,31 (d, 1H; J = 7,4 Hz; H-4); 7,50 (t, 1H; J = 7,4 Hz; H-5); 7,66 (t, 1H, J = 7,6 Hz; H-6); 7,81 (d, 1H, J = 7,4 Hz; H-7).

RMN de ¹³C (50 MHz, CD₃OD) δ : 28,2 (-CH₃); 32,8 (C-4'); 76,3 (C-3); 109,7 (C-1'); 122,3 (C-4); 125,5 (C-6); 127,9 (C-8); 129,3 (C-7); 135,0 (C-5); 152,1 (C-9); 174,0 (C-1); 188,8 (C-2').

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ : 27,1 (-CH₃); 31,8 (C-4'); 46,5 (C-3'/C-5'); 75,2 (C-3); 108,7 (C-1'); 121,2 (C-4); 124,5 (C-6); 126,9 (C-8); 128,2 (C-7); 133,9 (C-5); 151,1 (C-9); 172,9 (C-1).

ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z [M+H]⁺: Calculado para C₁₆H₁₇O₄: 273,1127; encontrado: 273,1124.

Síntese da 2-(3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-1-il)1*H*-indano-1,3(2*H*)-diona (**26**)



(**26**)

O procedimento descrito a seguir foi baseado no trabalho publicado por MAL *et al.*, (2007).

A um balão de fundo redondo (25 ml) foi adicionado 1*H*-indano-1,3(2*H*)-diona (0,490 g; 3,35 mmol) em clorofórmio (5 ml) e DBU (0,53 ml; 3,57 mmol) sob agitação magnética a temperatura ambiente. Após 5 minutos foi adicionado ácido fitalaldeídico (0,459 g; 3,06 mmol) à solução que, então fora colocada em agitação sob refluxo por um período de 5 horas. A reação foi finalizada com adição de HCl 10% (10 ml) e diluída em de acetato de etila (100 ml). A fase orgânica foi separada e lavada com água (2 x 20 ml) e solução saturada (10 ml) de cloreto de sódio (NaCl), seca (Na₂SO₄) e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por recristalização em acetato de etila e obtido como um sólido marron com 69% de rendimento (0,587 g; 2,11 mmol).

Característica: sólido marron.

CCD: R_f = 0,10 (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

T_f = 214,0-215,3 °C, (**T_f literatura:** 216-217 °C); MAL *et al.*, 2007).

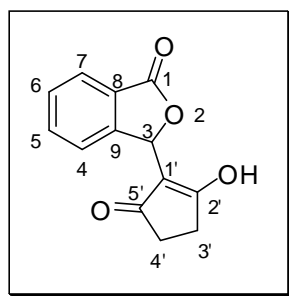
IV (ART) $\bar{\nu}_{\max}$: 3068, 2922, 1770, 1741, 1702, 1266, 1221, 1054, 999, 939, 733.

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$) δ (J/Hz): 4,12 (d, 1H, $J = 2,4$; H-1'); 6,20 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz; H-3); 7,57–8,12 (m, 8H; H-4/H-5/H-6/H-7/H-3'/H-4'/H-5'/H-6').

RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$) δ 55,0 (C-1'); 77,3 (C-3); 124,2 (C-4); 123,1 (C-3'); 123,6 (C-6'); 125,3 (C-7); 125,8 (C-6); 129,5 (C-8); 134,4 (C-4'/C-5'); 136,1 (C-5); 142,1 (C-8'); 142,5 (C-9'); 147,4 (C-9); 169,4 (C-1); 194,9 (C-2'); 196,3 (C-7').

ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_4$: 279,0657; encontrado: 279,0665.

Síntese da 3-(2-hidroxi-5-oxociclopent-1-enil)isobenzofuran-1(3H)-ona (**27**)



(**27**)

Este composto foi obtido como um sólido branco (0,4475 g; 1,94 mmol) com 53% de rendimento a partir do ácido fitalaldeídico (0,533 g; 3,55 mmol), DBU (0,56 ml; 3,70 mmol) e ciclopentano-1,3-diona (0,357 g; 3,64 mmol), seguindo o mesmo procedimento descrito para a preparação de **26**.

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,10$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

T_f = 203,6-205,2 °C.

IV (ART) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3100-2050 (banda larga), 2987, 2930, 2366, 2339, 1763, 1648, 1557, 1368, 1281, 1048, 963, 781.

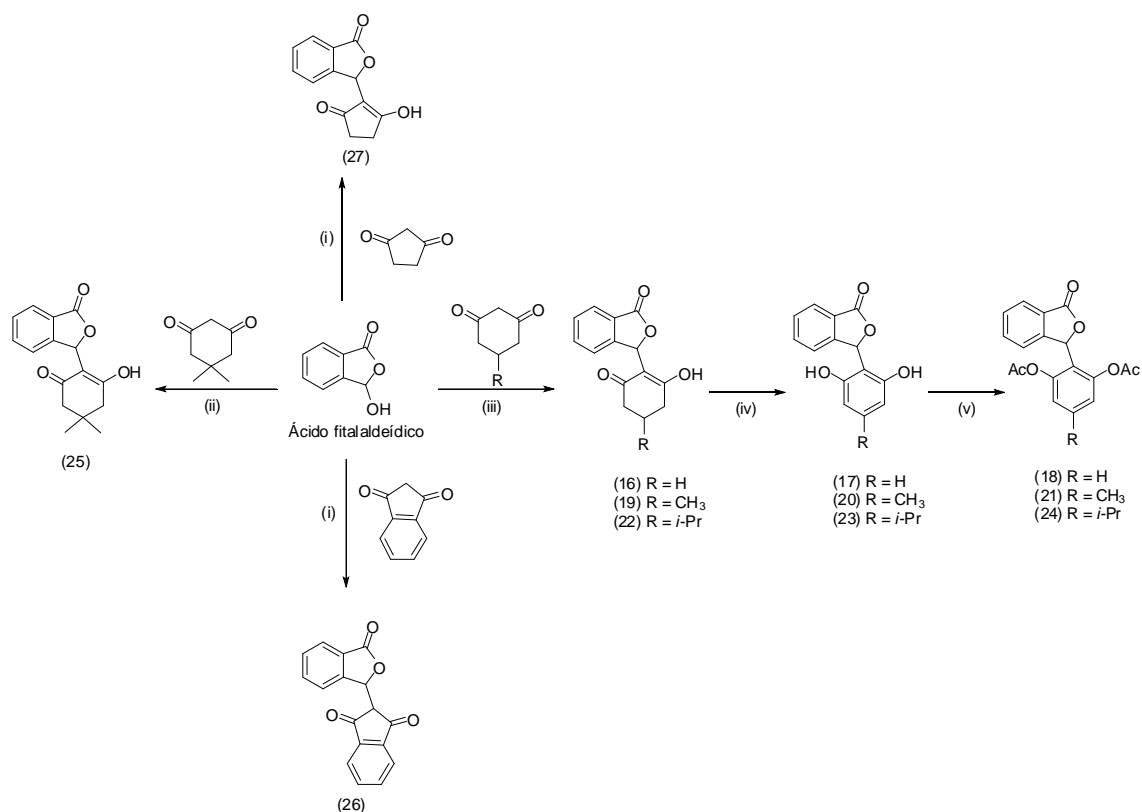
RMN de ^1H (200 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ (J/Hz): 2,27 (sl, 4H; H-3'/H-4'); 6,07 (s, 1H; H-3); 7,11 (d, 1H, J = 7,4; H-4); 7,23–7,44 (m, 2H; H-5/H-6); 7,62 (d, 1H, J = 7,4; H-7).

RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ : 31,8 (C-3'/C-4'); 74,5 (C-3); 112,6 (C-1'); 123,3 (C-4); 126,0 (C-6); 127,5 (C-8); 129,7 (C-7); 134,9 (C-5); 150,1 (C-9); 172,2 (C-1).

ESI-MS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_4$: 231,0657; encontrado: 231,0672.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos investigados neste trabalho, **16** a **27** (Figura 4, p.24), foram sintetizados de acordo com a sequência de reações que é mostrada no Esquema 9 (p.42). Assim, a condensação do ácido fitalaldeídico com diferentes compostos 1,3-dicarbonilados disponíveis comercialmente, na presença de DBU, deu origem aos compostos **16**, **19**, **22**, **25**, **26** e **27** (MAL *et al.*, 2007). Os compostos fenólicos, **17**, **20**, **23**, foram preparados por aromatização mediada por $\text{Hg}(\text{OAc})_2/\text{NaOAc}$ (OLIVER *et al.*, 1990). O tratamento dos compostos **17**, **20** e **23** com $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMAP}$ resultaram na obtenção dos derivados acetilados **18**, **21** e **24**. As isobenzofuranonas obtidas foram caracterizadas via espectroscopia no IV e de RMN, bem como espectrometria de massas de alta resolução. As informações espectroscópicas e espectrométricas obtidas são apresentadas na Seção 2.2.2. (p. 27 a 41).



Esquema 9 – Rota sintética envolvida na preparação dos compostos **16** a **27**. Condições de reação: (i) DBU, CHCl₃, refluxo; (ii) DBU, CHCl₃, temperatura ambiente; (iii) DBU, CH₃CN, refluxo; (iv) Hg(OAc)₂, NaOAc, CH₃COOH, refluxo; (v) DMAP, Ac₂O, Et₃N, CHCl₃, temperatura ambiente.

O desenvolvimento do projeto de pesquisa vinculado a esta dissertação teve início com a síntese da isobenzofuran-1(3*H*)-ona (**25**). Esse composto foi obtido com 95% de rendimento via reação de condensação, promovida por DBU, entre a 4,4-dimetilcicloexano-1,3-diona (dimedona) e o ácido fitalaldeídico.

No espectro IV de **25** (Figura 5, p.44) pode-se facilmente observar bandas em 2962, 2934 e 2884 cm⁻¹ atribuídas aos estiramentos de ligação C-H para carbonos com hibridização sp³. A banda em 1763 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento do grupo carbonila enquanto que aquela observada em 1569 cm⁻¹

é devida ao estiramento C=C. A banda larga em 3200-2400 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento do grupo OH. Conforme descrito por BARBOSA (2007), o estiramento do grupo OH da forma enólica de β -dicetonas geralmente corresponde a uma banda larga na faixa de absorção de 2700-2500 cm⁻¹ e cuja posição depende da concentração da solução.

No espectro de RMN de ¹H (Figura 6, p. 45) do composto **25** pode-se observar um simpleto em δ_H 1,09, integrado para 6 átomos de hidrogênio, que foi atribuído aos grupos metila presentes na estrutura de **25**. O outro simpleto observado em δ_H 2,35, integrado para 4 átomos de hidrogênio foi atribuído aos átomos H-3' e H-5'. O simpleto em δ_H 6,70 (integrado para um átomo de hidrogênio) corresponde à H-3. Com base nas atribuições para esses átomos de hidrogênio e considerando as correlações observadas no mapa de contornos HSQC (Figura 7, p.48) foram feitas as atribuições para os átomos de carbono apresentando os seguintes deslocamentos químicos: δ_C 27,1 (-CH₃); δ_C 46,5 (C-3'/C-5') e δ_C 75,2 (C-3).

No espectro de RMN de ¹³C (75 MHz) não se observa o sinal para os átomos C-2'/C-6' (Figura 7, p.46). A causa mais provável para este fato está relacionada ao longo tempo de relaxação para o átomo C-2'. Tendo em vista esta possibilidade, obteve-se outro espectro de RMN de C-13 (50 MHz, Figura 8, p.47) para a substância **25**, porém utilizando-se um intervalo de tempo maior entre os pulsos (parâmetro d2). Conforme pode ser observado no espectro da Figura 8 (p.47), o sinal para os átomos C-2'/C-6' é agora observado em δ_C 188,8.

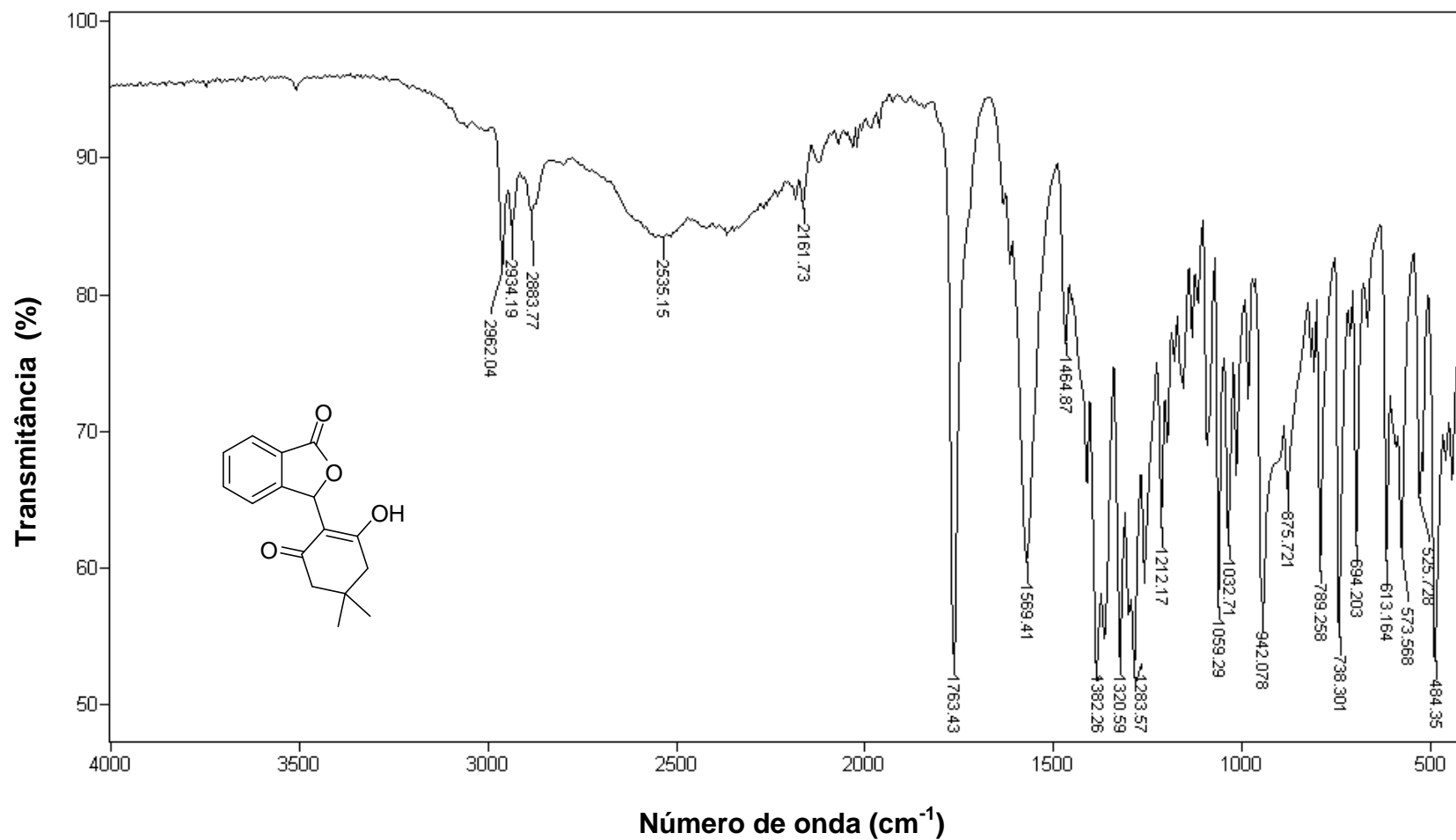


Figura 5 – Espectro no Infravermelho (ATR) do Composto 25.

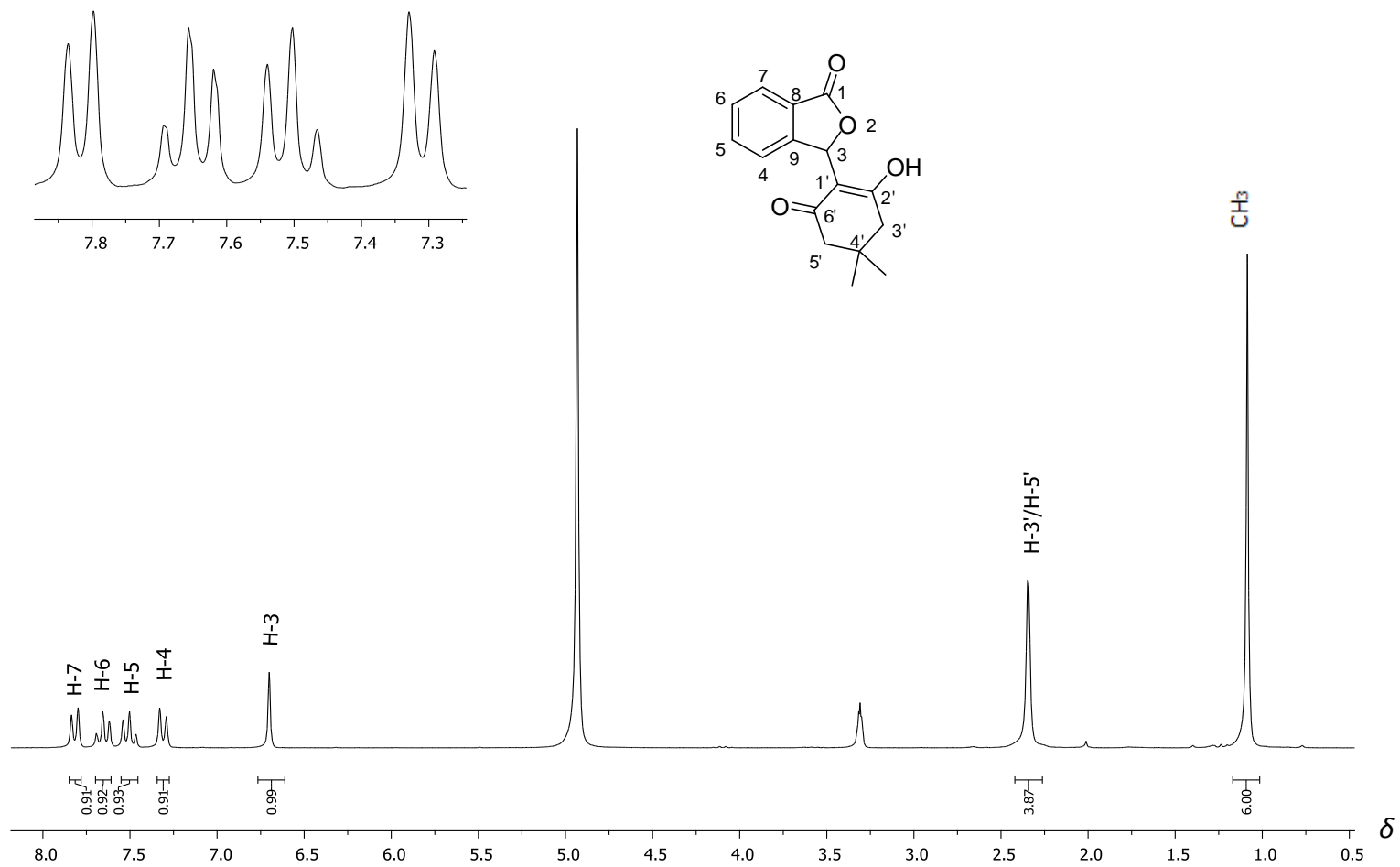


Figura 6 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) do composto **25**.

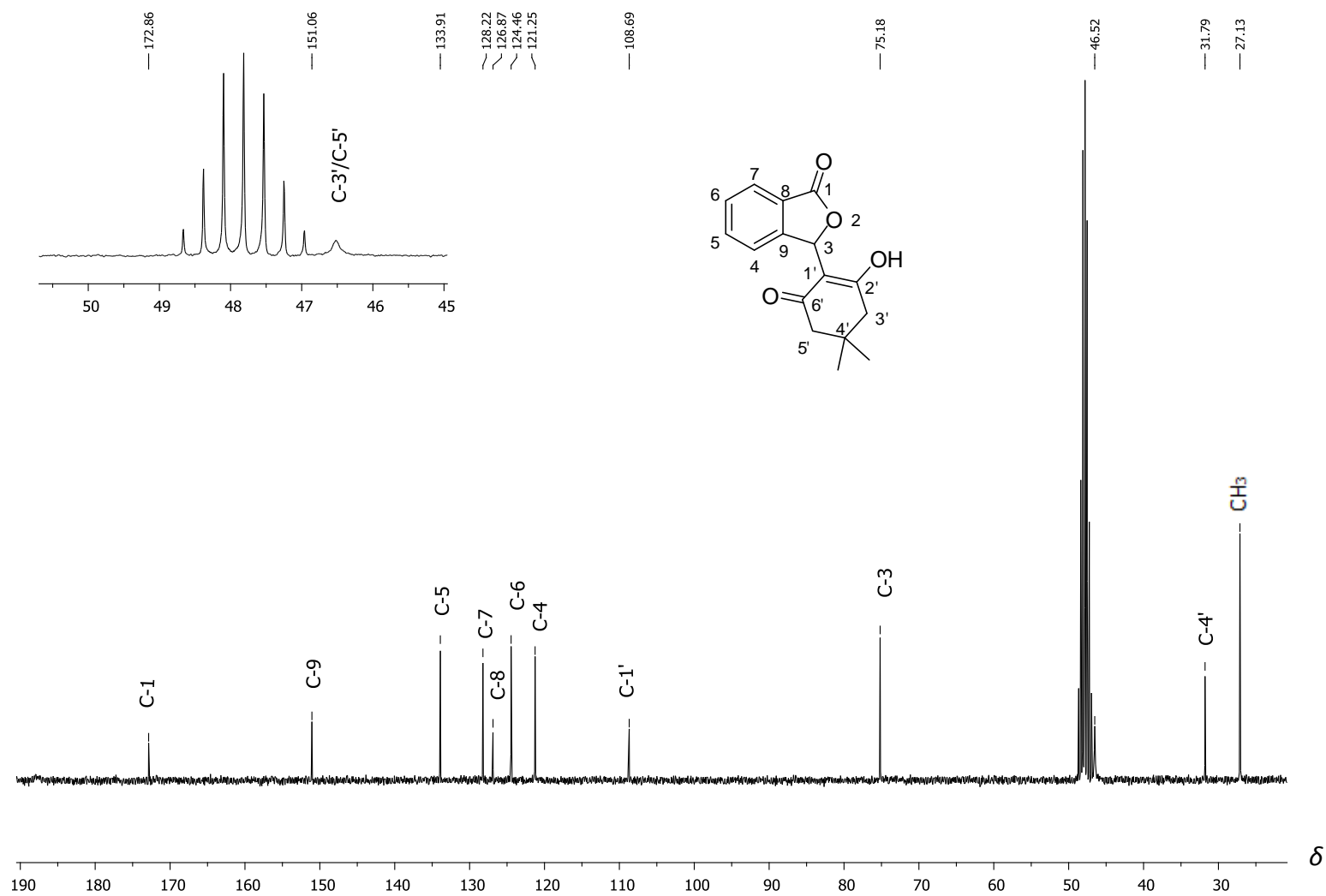


Figura 7 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto **25**.

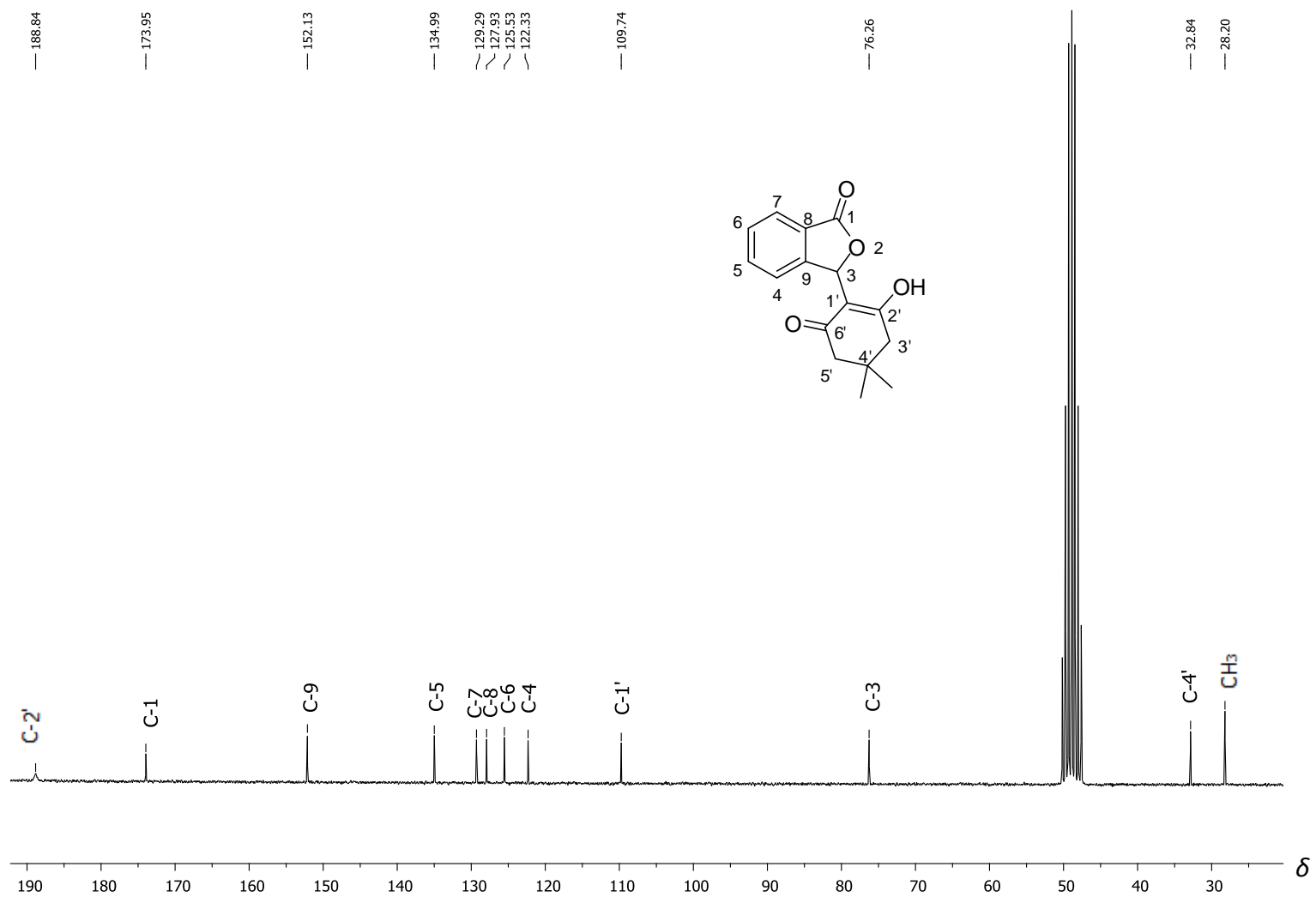


Figura 8 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) do composto **25**.

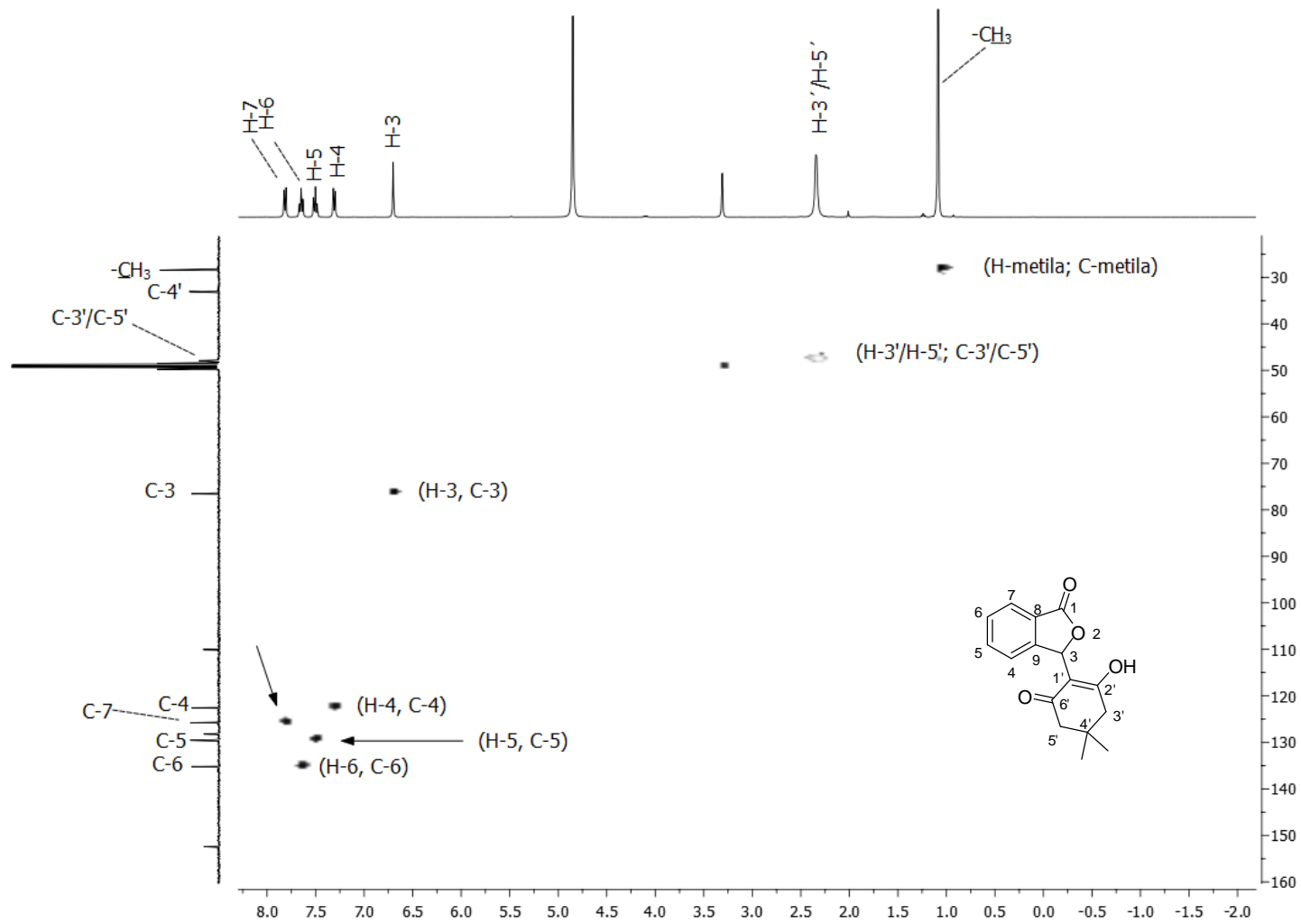


Figura 9 – Mapa de contornos HSQC da substância **25**.

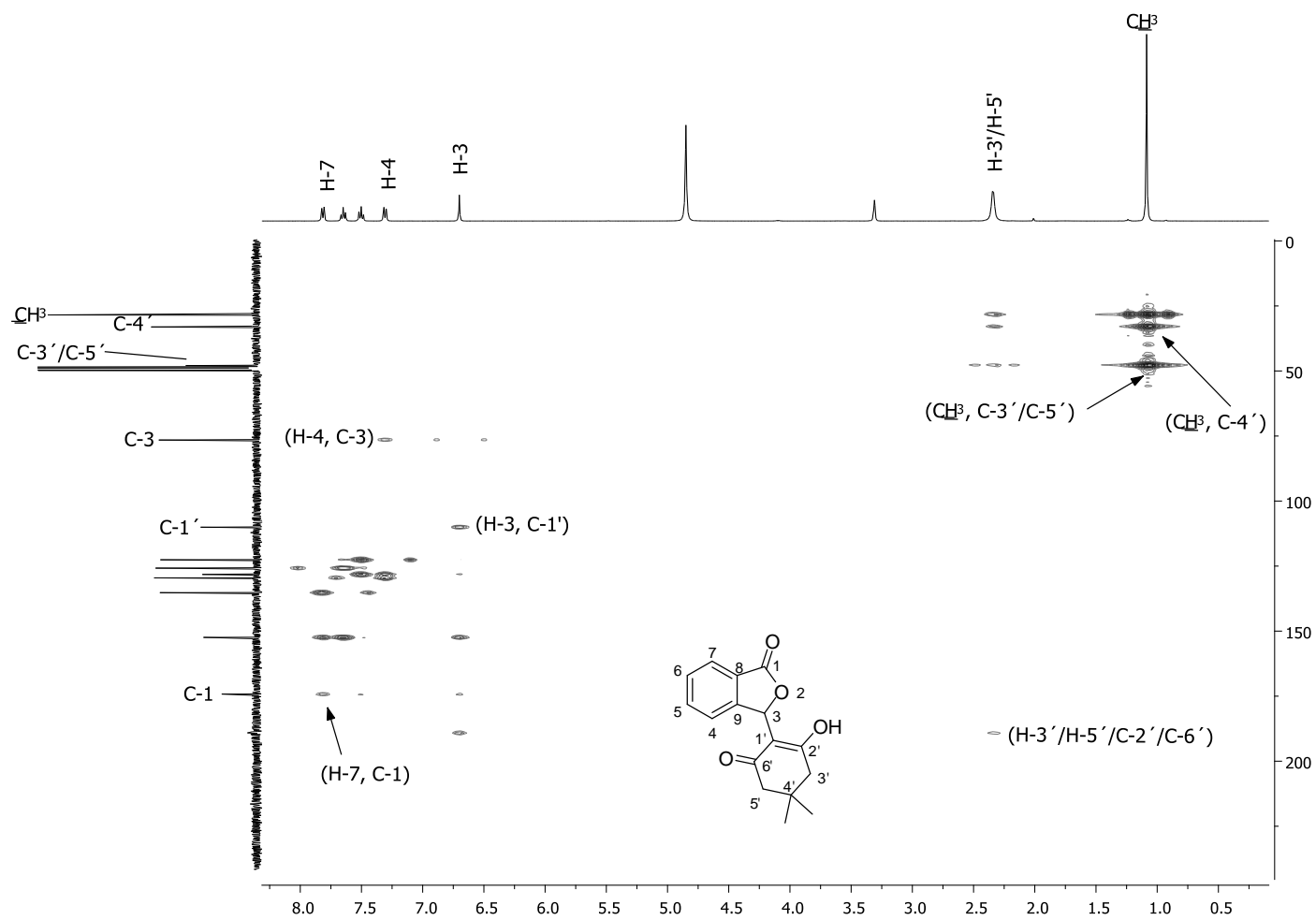


Figura 10 – Mapa de contornos HMBC da substância **25**.

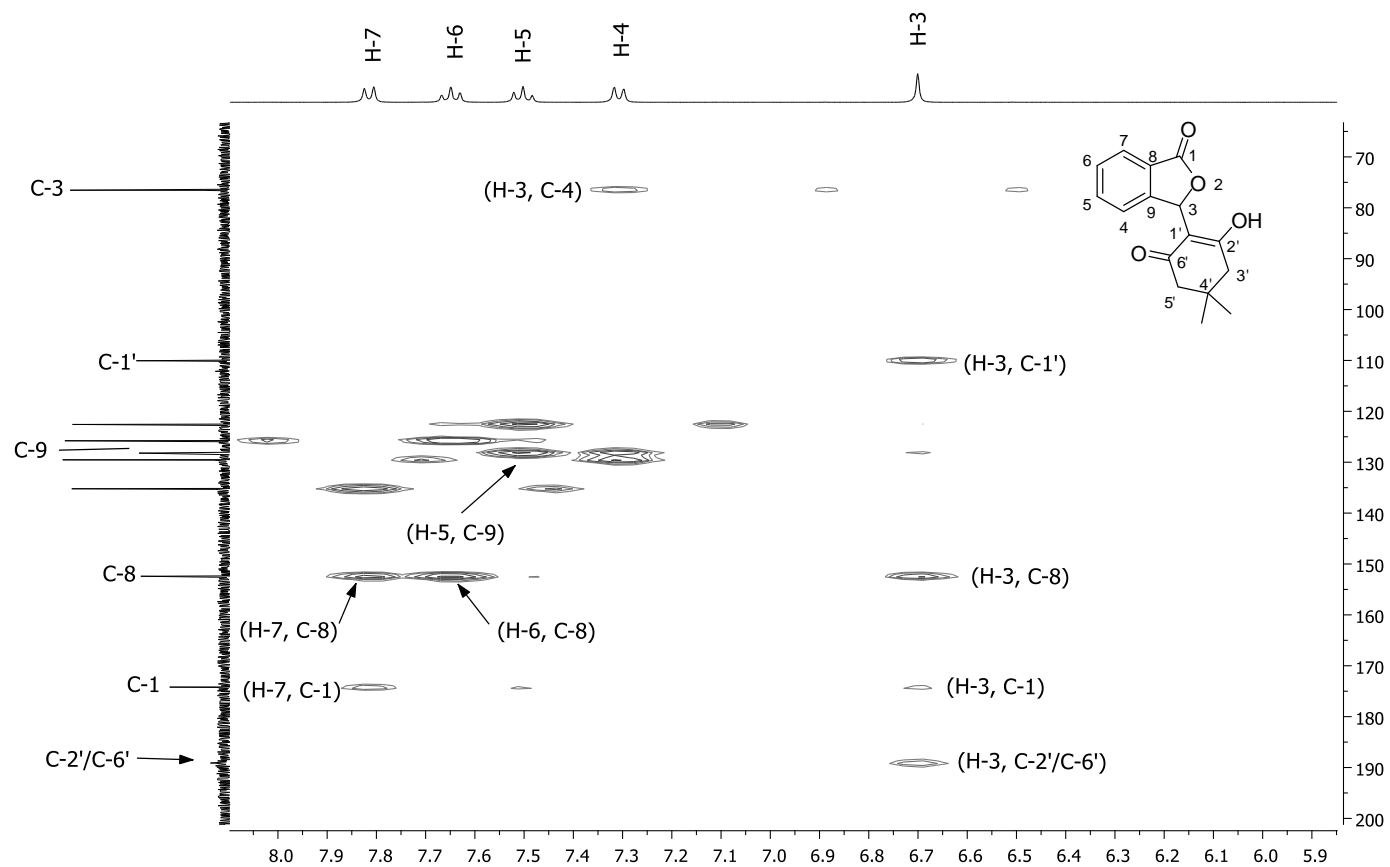


Figura 11 – Mapa de contornos HMBC (parcial) da substância **25**.

Considerando o espectro de RMN de ^{13}C da Figura 8 (p.47), o sinal em δ_{C} 188,8 foi atribuído ao átomo de carbono carbonílico C-2'. É importante destacar que o deslocamento químico observado para os átomos de carbono C-2'/C-6' está em acordo com a literatura (CLERC e SIMON, 1989) conforme mostrado na Figura 12.

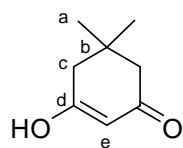
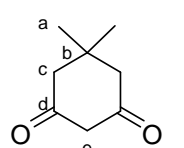
	Enol	Cetona
	(a) 28,3	28,3
	(b) 32,8	31,0
	(c) 46,2	54,2
	(d) 191,1	203,6
	(e) 103,3	57,3

Figura 12 – Deslocamentos químicos de ^{13}C , em ppm relativo ao TMS, para a 5,5-dimetilcicloexano-1,3-diona (dimedona).

Os dados do experimento bidimensional HMBC² foram de grande utilidade para a atribuição de outros sinais no espectro de RMN de ^{13}C . Por exemplo, foi observada uma correlação entre o átomo H-3 (δ_{H} 6,70) e o sinal em δ_{C} 110,1 que foi atribuído ao átomo de carbono C-1' (Figura 10, p.49). O duplete observado em δ_{H} 7,31 foi atribuído a H-4 uma vez que foi observada uma correlação entre este hidrogênio e o átomo C-3 (δ_{C} 76,6). A atribuição para H-7 foi feita com base na correlação observada no mapa de contornos HMBC entre o duplete em δ_{H} 7,81 foi atribuído a H-7 e o sinal do átomo de carbono carbonílico C-1 (Figura 10, p.49). A correlação entre os sinais em δ_{H}

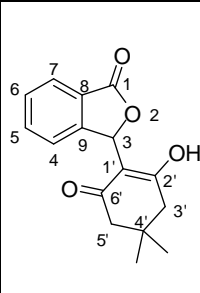
² Os dados de HSQC e HMBC foram adquiridos em instrumento AVANCE DRX 400 (Departamento de Química – UFMG) e os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono, neste caso, são descritos na seção 2.2.2 p. 38 e 39.

7,81 e o sinal em δ_C 128,2 levou à atribuição do sinal de carbono ao átomo C-8. Esta atribuição foi confirmada observando-se a correlação existente entre H-3 e o referido sinal para C-8 (Figura 11, p.50). O tripleto em δ_H 7,66 correlaciona-se no mapa de contornos HMBC com o sinal correspondente ao átomo C-8. Assim, este tripleto foi atribuído à H-6 e, conseqüentemente, o tripleto em δ_H 7,50 foi relacionado ao átomo H-5. A correlação observada entre o tripleto correspondente a H-5 e o sinal em δ_C 128,2 permitiu a atribuição deste último sinal ao átomo C-9. De posse das atribuições dos sinais para H-4, H-5, H-6 e H-7 e do mapa de contornos HSQC (Figura 9, p.48), confirmou-se as atribuições para os átomos C-4 (δ_C 122,6), C-6 (δ_C 135,2), C-5 (129,5) e C-7 (125,8).

Cabe salientar que os dados de RMN de 1H e ^{13}C estão em completo acordo com aqueles descritos na literatura no tocante à estrutura de **25**. Nas Tabelas 1 e 2 (p.53) são apresentados os dados espectroscópicos de RMN determinados experimentalmente neste trabalho em comparação com os dados descritos na literatura por MAL e colaboradores (2007).

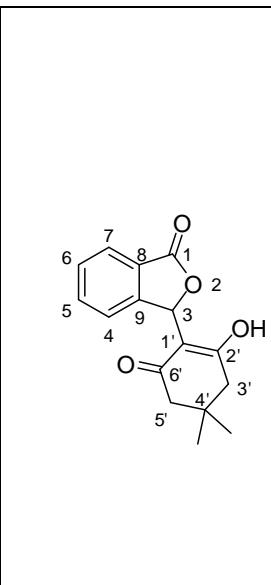
O ESI-MS de alta resolução forneceu a massa exata $[M+H]^+$ de 273,1131, compatível com a fórmula molecular esperada para o composto **25** ($C_{16}H_{16}O_4$).

Tabela 1 – Comparação entre os dados de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) do composto **25** obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura.

	δ	δ^*	J	J*	Mult.	Mult.*	Atribuição
	1,09	0,98	---	---	sl	s	$2\times\text{CH}_3$
	2,35	2,22	---	---	sl	s	H-3' e H-5'
	6,70	6,60	---	---	s	s	H-3
	7,31	7,19	7,4	7,3	d	d	H-4
	7,50	7,38	7,4	7,3	t	t	H-5
	7,66	7,53	7,6	7,3	t	t	H-6
	7,81	7,71	7,4	7,3	d	d	H-7

*Valores descritos na literatura (Mal, *et al*, 2007): RMN de ^1H (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6+\text{CDCl}_3$).

Tabela 2 – Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) do composto **25** obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura.

	δ	δ^*	Atribuição
	28,2	28,0	CH_3
	32,8	31,7	C-4'
	---	46,7	C-3'/C-5'
	76,3	74,5	C-3
	109,7	108,4	C-1'
	122,3	121,2	C-4
	125,5	124,3	C-6
	127,9	126,7	C-8
	129,3	127,9	C-7
	135,0	133,5	C-5
	152,1	150,6	C-9
	174,0	171,5	C-1
	188,8	185,9	C-2'

*Valores descritos na literatura (Mal, *et al*, 2007): RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6+\text{CDCl}_3$).

A estrutura da fitalida **25** também foi investigada por difração de raios-X.

O composto **25** cristaliza no sistema triclinico, grupo espacial $P\bar{1}$ com duas moléculas por unidade assimétrica (Figura 13).

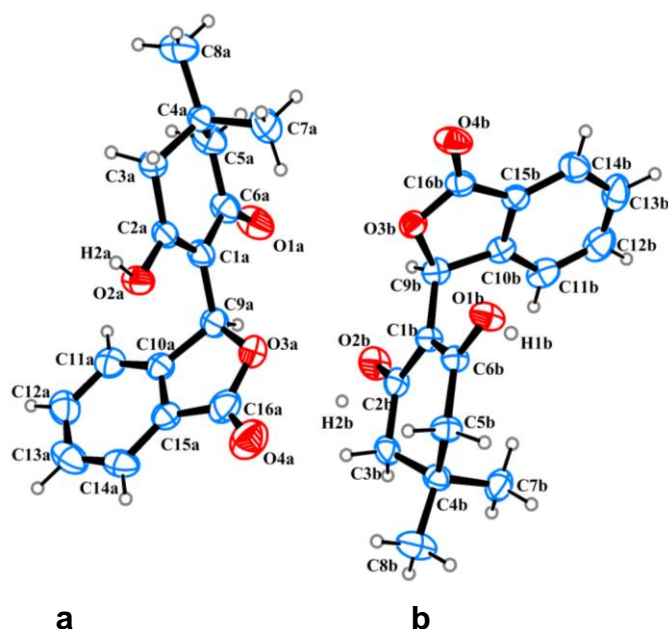


Figura 13 - Representação ORTEP-3 do composto **25**.

No cristal, há 2 moléculas independentes por unidade assimétrica (4 por cela unitária). As moléculas **a** e **b** correspondem à forma enólica da substância **25**. Na molécula **b** há uma deslocalização de elétrons no sistema conjugado carbonila-enol (Tabela 3).

Tabela 3- Comprimentos de ligação do fragmento O-C-C-C-O das moléculas **a** e **b**

Átomos	Molécula a Distância Å	Molécula b Distância Å
O2 – C2	1,338(4)	1,290(4)
C2 – C1	1,358(5)	1,393(4)
C1 – C6	1,444(5)	1,388(4)
C6 – O1	1,225(4)	1,283(4)

Os hidrogênios H1b e H2b estão sobre centros de inversão e estão ligados a dois átomos de oxigênio. Desta forma, as moléculas **b** formam uma rede bidimensional através de interações lineares O1b-H1b...O1b e O2b-H2b...O2b, na direção [101], com distâncias O–O de 2,505(4) Å e 2,520(5) Å respectivamente (Figura 14).

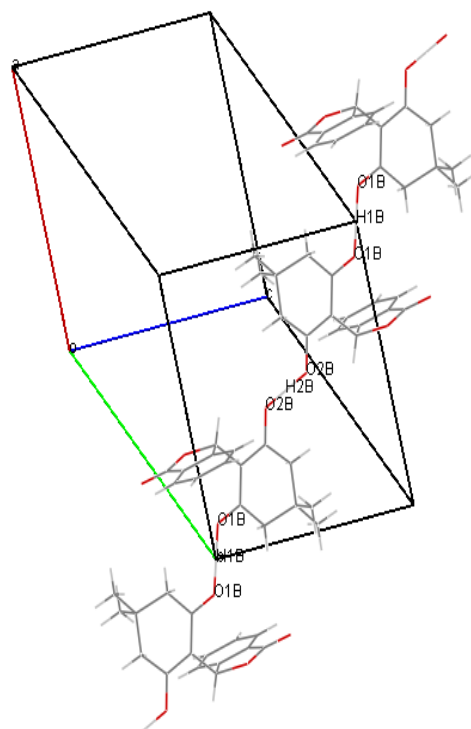


Figura 14 – Empacotamento das moléculas **b**.

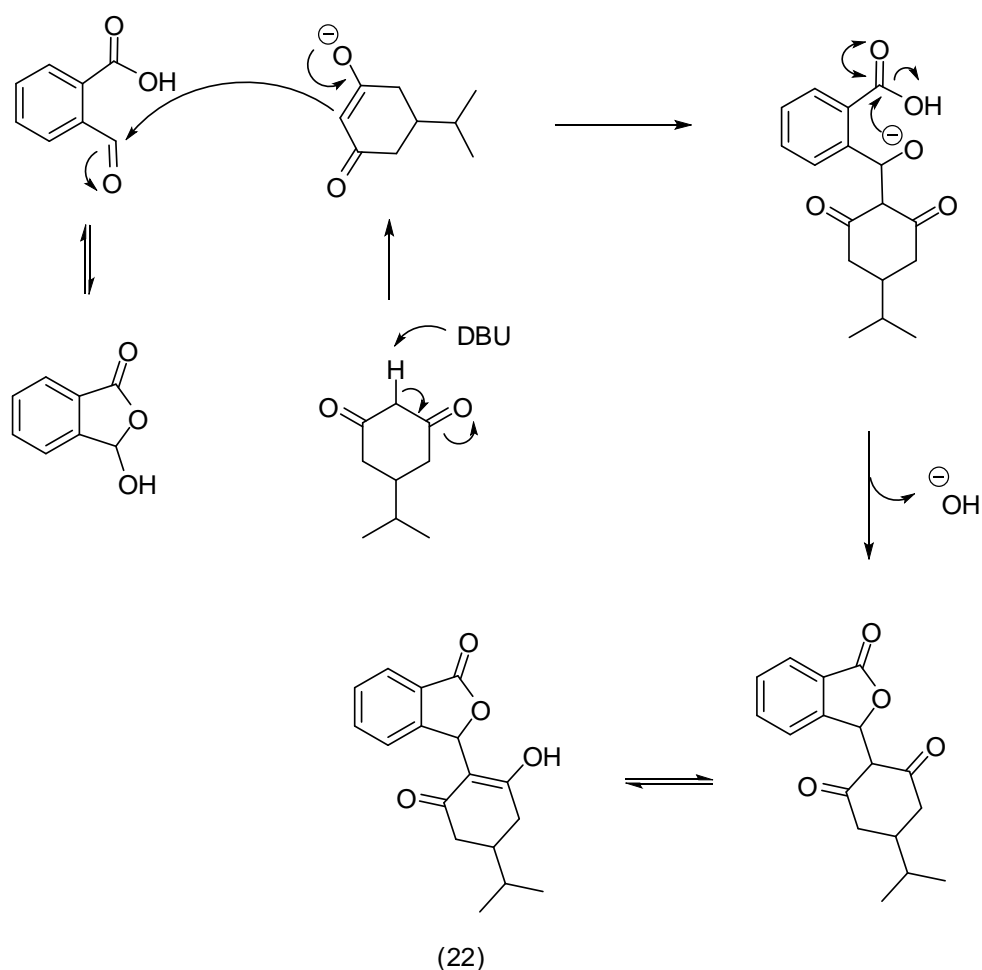
Entre as camadas das moléculas **b** ocorrem as interações ilustradas na Tabela 4 (as moléculas **a** se orientam em torno das **b**).

Tabela 4 - Interações entre as moléculas **b**, relacionadas por centros de inversão

Interações D-H...A	D-H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	<(DHA) (°)
O1b-H1b...O1b ⁱ	1.25	1.25	2.505(4)	180.0
O2b-H2b...O2b ⁱⁱ	1.26	1.26	2.520(5)	180.0

i = 2-x, 2-y, 2-z; ii = 3-x, 2-y, 3-z

Os produtos de condensação entre o ácido fitalaldeídico e os diferentes compostos 1,3-dicarbonilados foram obtidos com bons rendimentos (53-95%). No Esquema 10 está apresentada uma proposta mecanística para o processo de condensação entre o ácido fitalaldeídico e a 5-isopropilcicloexano-1,3-diona, resultando na formação da isobenzofuranona **22**.



Esquema 10 – Proposta mecanística para a síntese do composto **22**.

Ao observar o espectro no IV da fitalida **22** (Figura 15, p.58) foi possível observar bandas em 2960 cm^{-1} e em 2874 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$. Uma forte absorção em 1756 cm^{-1} foi atribuída a presença do grupo carbonila na estrutura desta substância. A banda 1585 cm^{-1} foi atribuída

ao estiramento das ligações C=C do anel aromático, enquanto a banda em 1253 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C-O. A banda larga em 2522 cm^{-1} foi relacionada ao estiramento do grupo OH.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 16, p.59), observou-se que os sinais dos 4 hidrogênios aromáticos estão compreendidos entre δ_{H} 7,31-7,81 e foram atribuídos como se segue: 7,31 (dd, 1H, $J = 7,6$, $J = 0,6$; H-4); 7,50 (t, 1H, $J = 7,4$; H-5); 7,65 (td, 1H, $J = 7,4$, $J = 1,0$; H-6); 7,81 (d, 1H, $J = 7,6$; H-7). O simpleto em δ_{H} 6,68 foi atribuído ao átomo H-3. O multiplete em δ_{H} 2,21–2,52 corresponde ao sinal referente aos 4 átomos de hidrogênio H-3' e H-5'. Em δ_{H} 1,80–1,99 tem-se um multiplete que foi associado ao átomo sinal H-4'. Um segundo multiplete pode ser notado em δ_{H} 1,52–1,68 e está relacionado ao sinal do H-1". Já o duplete integrado para 6 hidrogênios em δ_{H} 0,94, é referente à presença de dois grupos metilas em **22**.

O sinal do grupo carbonila do anel lactônico de **22** foi observado no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 17, p.60) em δ_{C} 172,4. O sinal para os átomos C-2'/C-6' foi observado em δ_{C} 188,4.

O ESI-MS de alta resolução forneceu a massa exata $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 287,1260, compatível com a fórmula molecular esperada para o composto **22** ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_4$).

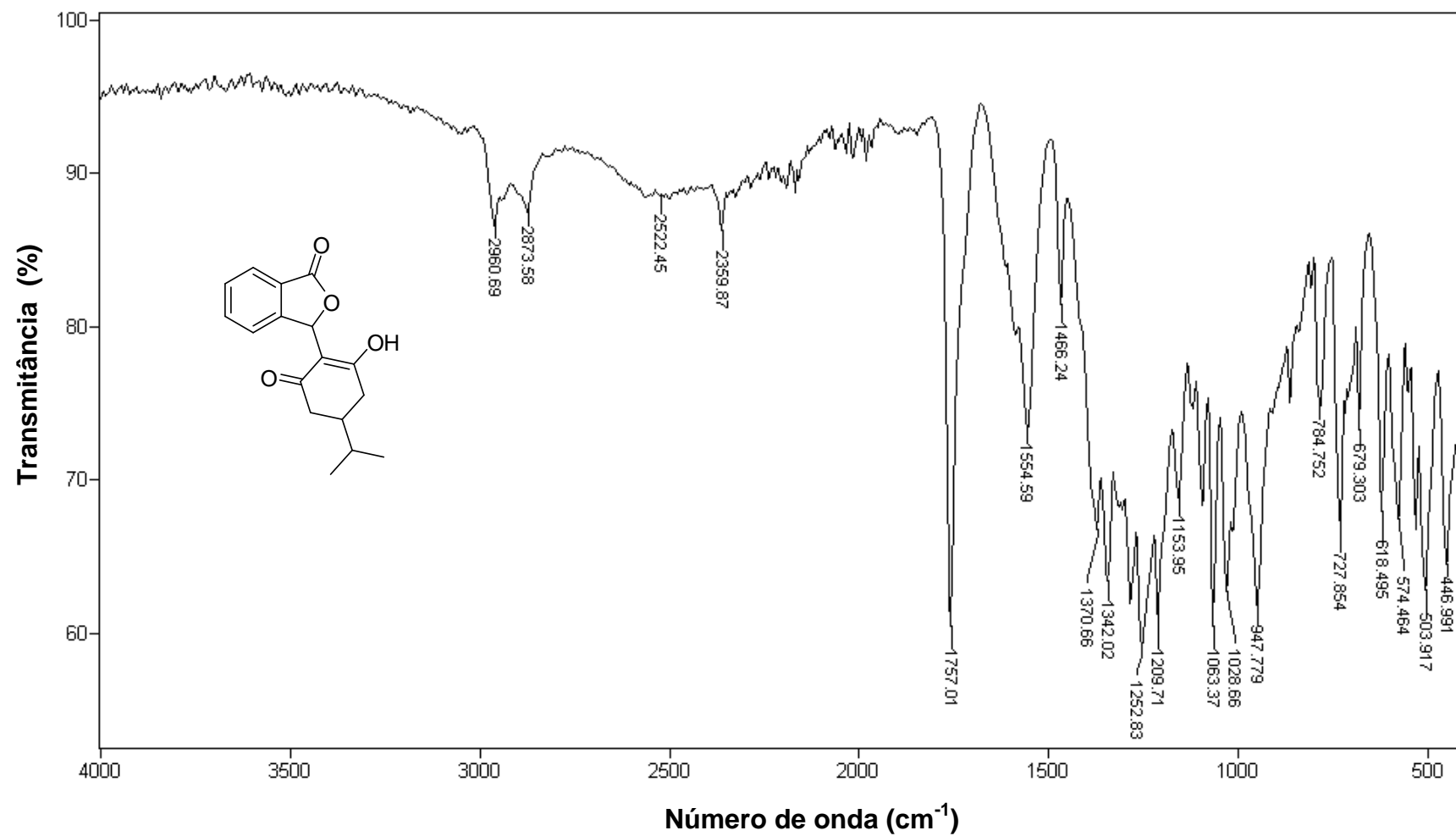


Figura 15 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **22**.

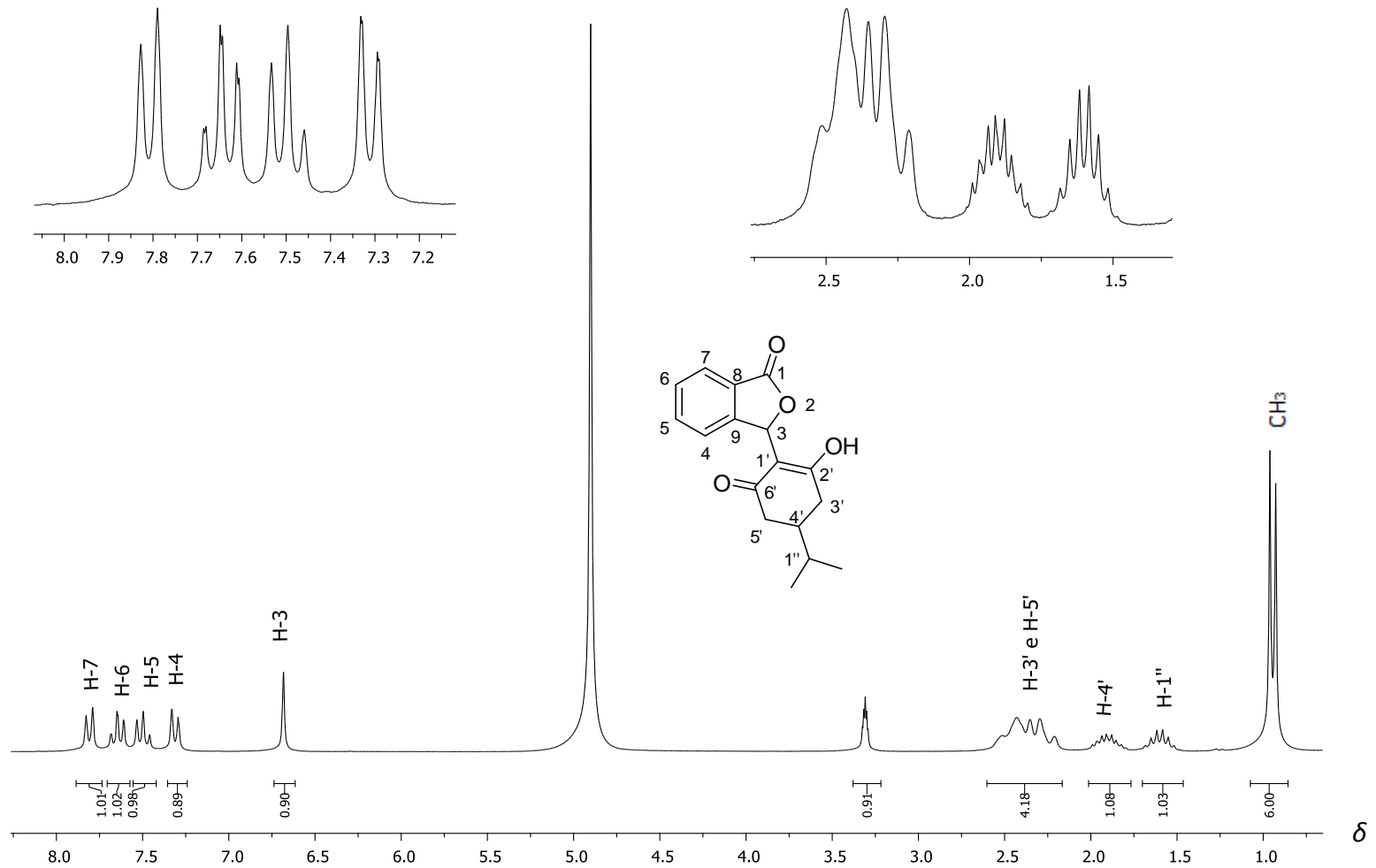


Figura 16 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) do composto **22**.

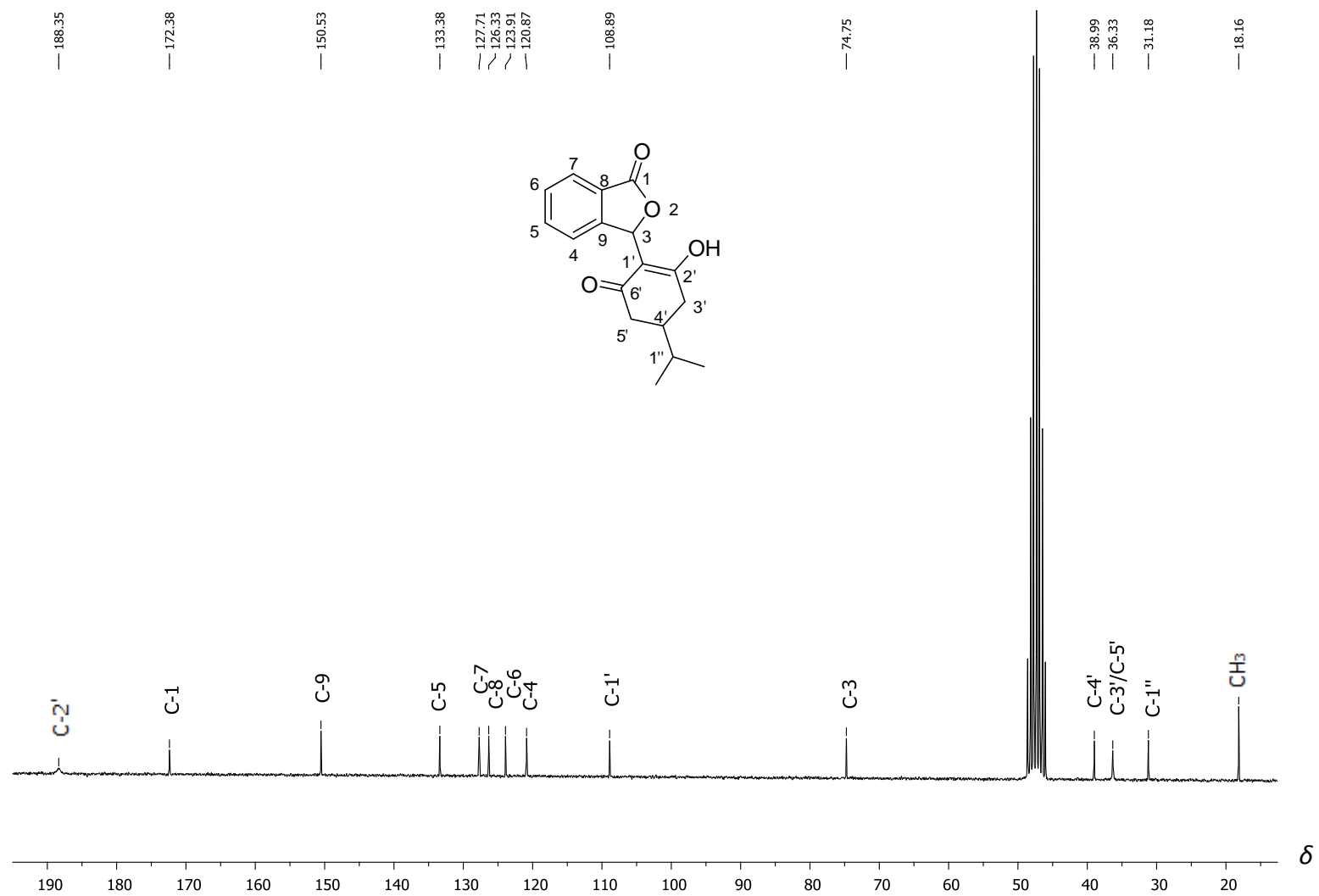
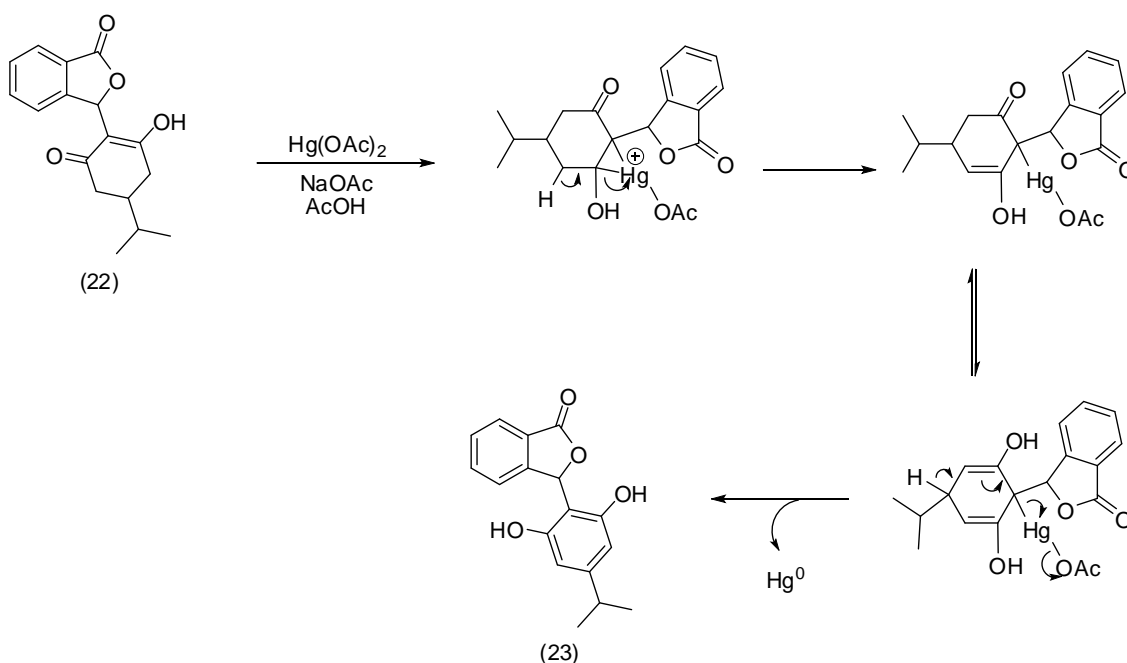


Figura 17 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) do composto **22**.

Os derivados fenólicos **17**, **20** e **23** (Esquema 9, p.42) foram sintetizados, respectivamente, a partir dos compostos **16**, **19** e **22** por meio do processo de aromatização mediado por $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ e NaOAc . No Esquema 11 tem-se uma proposta mecanística para a síntese do composto **23**, que foi obtido com 73% de rendimento após aromatização de **22** com acetato de mercúrio.



Esquema 11 – Proposta mecanística da obtenção do composto **23** por aromatização de **22**.

No espectro de IV do composto **23** (Figura 18, p.63), observa-se uma banda larga em 3305 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo O-H fenólico. Essa constatação já fornece uma evidencia experimental de que a reação de aromatização foi bem sucedida, pois essa é a diferença mais marcante entre o espectro no IV do composto **23** e **22** (que não possui bandas de estiramento O-H fenólico, Figura 15, p.58). As bandas em 2959 , 2924 e 2870 cm^{-1} são

devidas ao estiramento das ligações C_{sp^3} -H. A banda forte e intensa em 1726 cm^{-1} é devida ao estiramento do grupo carbonila do anel lactônico.

Em relação ao seu precursor **22**, o composto **23** possui dois hidrogênios aromáticos adicionais, H-3' e H-5', que no espectro de ^1H -RMN (Figura 19, p.64) foram observados como um simpleto (integrado para dois hidrogênios) em δ_{H} 6,17. O sinal dos hidrogênios do grupo metila aparece no espectro como um duplete, integrado para 6 átomos, em δ_{H} 1,17. Já o sinal do hidrogênio metínio do grupo isopropila foi observado como um hepteto em δ_{H} 2,68. O simpleto em δ_{H} 7,02 se deve ao sinal de H-3. Já os sinais compreendidos entre δ_{H} 7,30 e 7,82, com atribuição 7,30 (dd, 1H, $J = 7,5$, $J = 0,9$; H-4); 7,49 (t, 1H, $J = 7,2$; H-5); 7,63 (td, 1H, $J = 7,5$, $J = 1,2$; H-6); 7,82 (d, 1H, $J = 7,5$; H-7), são referentes aos 4 hidrogênios aromáticos presentes na estrutura de **23**.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 20, p.65) observa-se apenas um sinal de carbono carbonílico para o composto **23**, a do anel lactônico, em δ_{C} 173,3. Esse fato corresponde a mais uma evidencia experimental de que a aromatização de **22** foi bem sucedida.

O ESI-MS de alta resolução forneceu a massa exata $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 285,1116, compatível com a fórmula molecular esperada para o composto **23** ($\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4$).

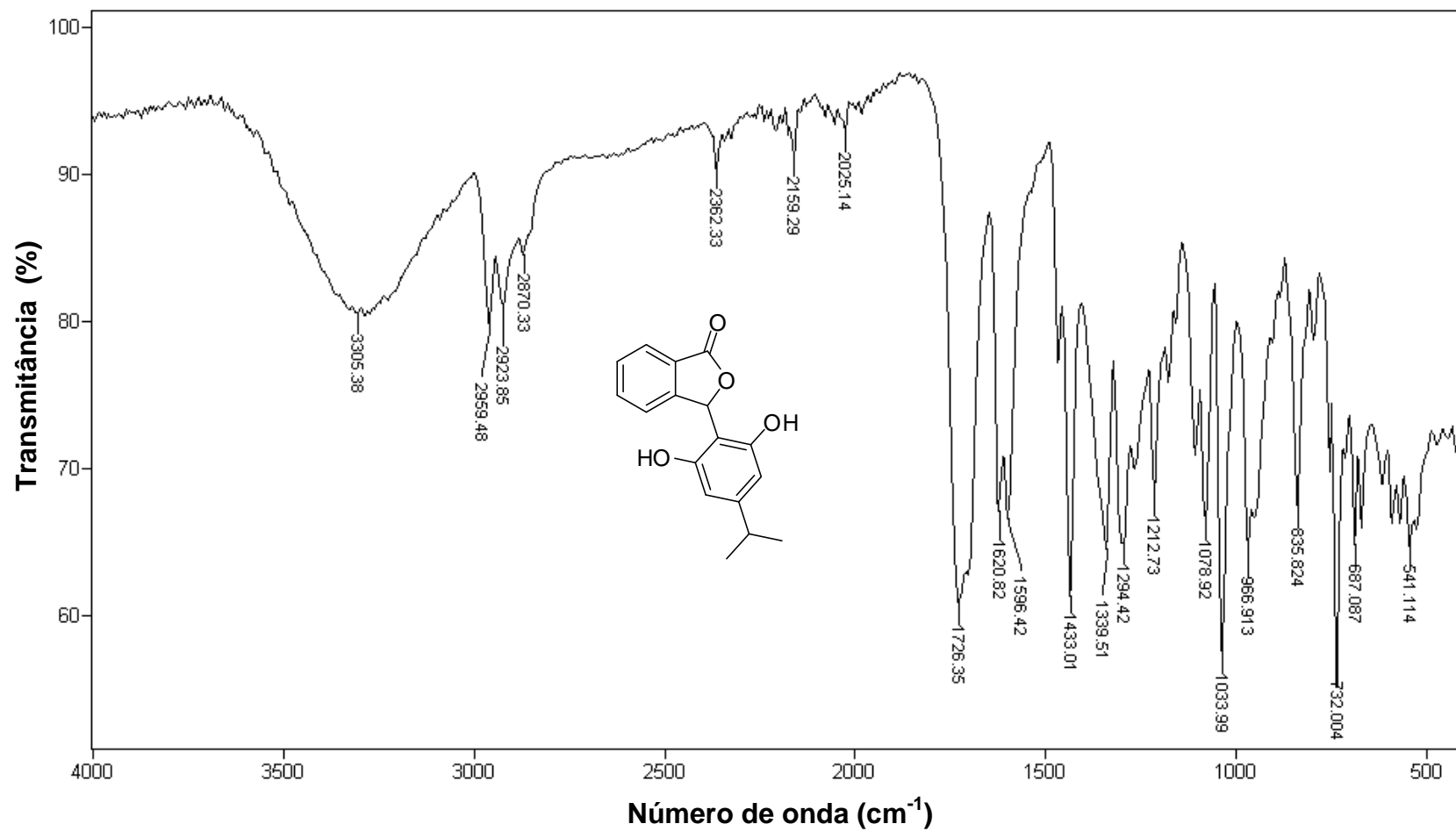


Figura 18 – Espectro no infravermelho (ATR) do composto 23.

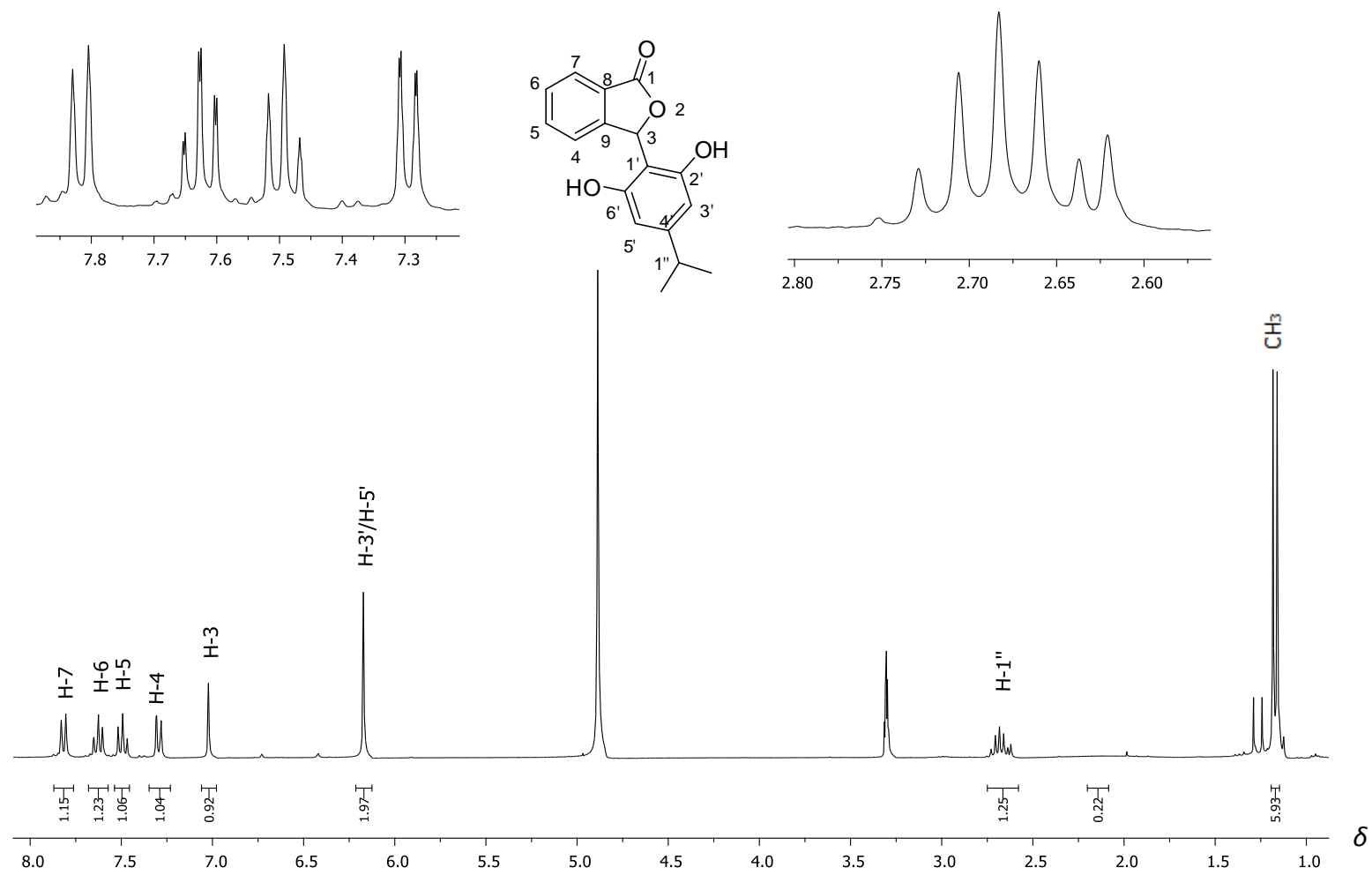


Figura 19 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto **23**.

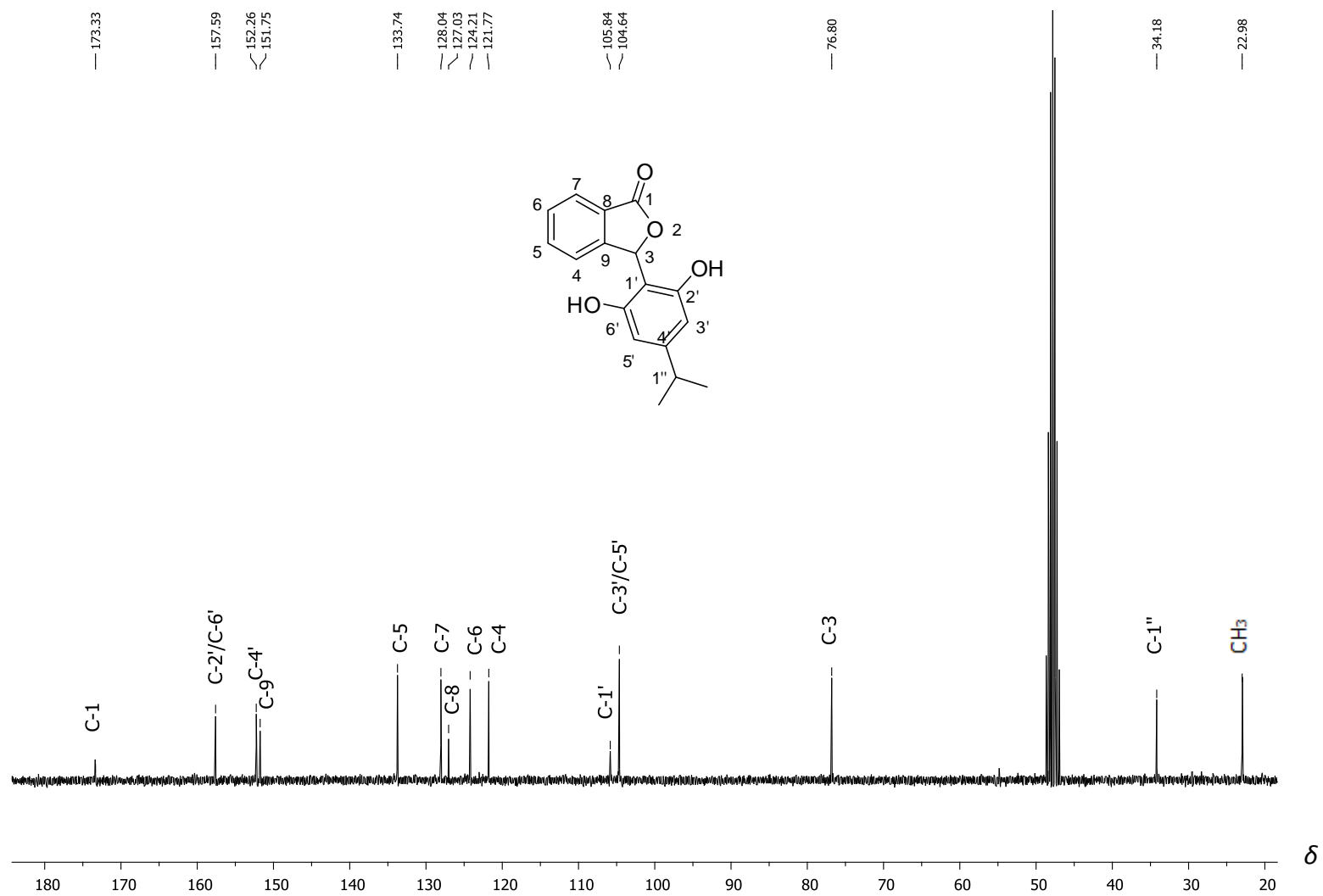
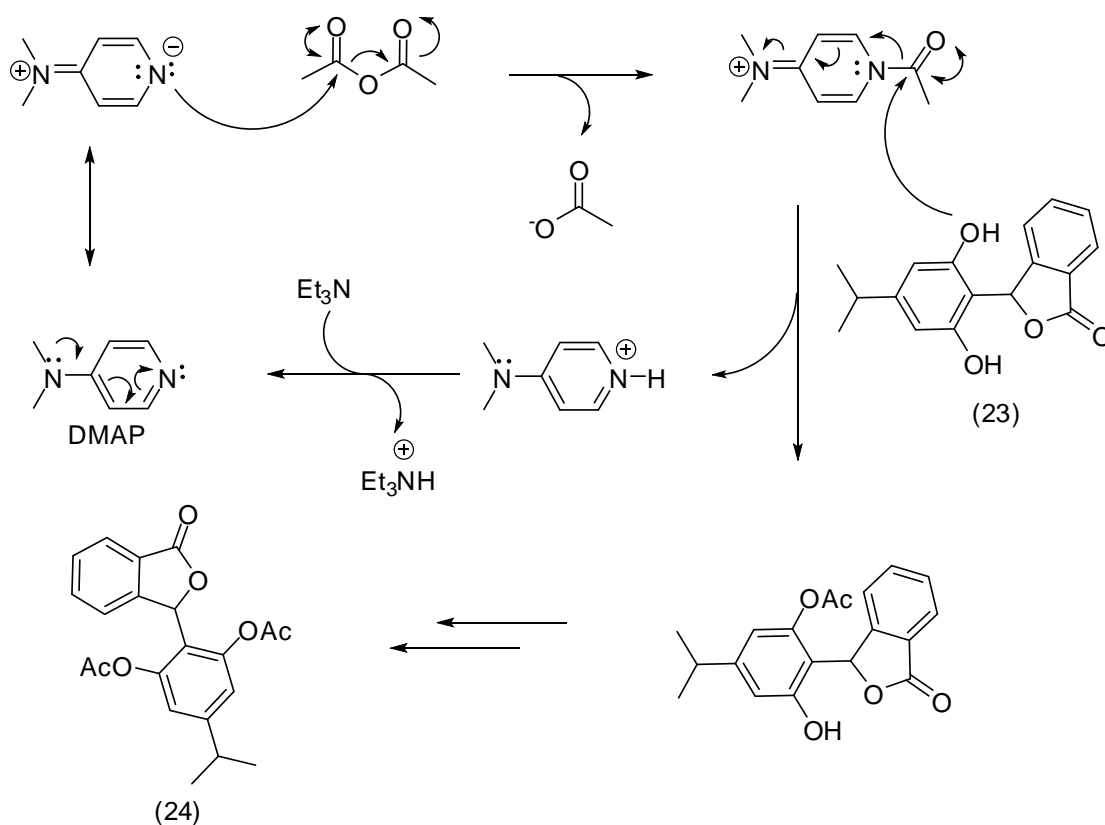


Figura 20 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto **23**.

Após a reação de acetilação do composto **23** (proposta mecanística no Esquema 12; COSTA *et al.*, 2003) com anidrido acético (Ac_2O) e quantidade catalítica de DMAP foi feita aquisição de um espectro no IV do material obtido. No espectro IV (Figura 21, p.68) é notável a ausência da banda característica de estiramento O-H de hidroxila que foi observada no espectro IV do composto **23** (Figura 18, p.63). Tal fato já é uma forte evidencia de que a reação se processou com sucesso formando o composto **24**. As bandas em 2963, 2930 e 2870 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento de ligações C-H de carbono sp^3 . A banda forte e intensa em 1726 cm^{-1} é devida ao estiramento de carbonila e a banda em 1179 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C-O.



Esquema 12 – Proposta mecanística para a síntese do composto **24**.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 22, p.69) do composto **24** observa-se um duplete em δ_{H} 1,17, integrado para 6 hidrogênios, referente às metilas do grupo isopropila. O simpleto largo em δ_{H} 1,99, integrado para 6 hidrogênios (H-2''/H-4''), é referente às duas metilas dos grupos acetilas. Em δ_{H} 2,83–2,96 tem-se um multiplete devido ao sinal de H-5'', enquanto que o simpleto em δ_{H} 6,68 está relacionado ao átomo H-3. Já os sinais apresentando deslocamento químico variando de δ_{H} 7,01 a 7,93 são devidos aos 6 hidrogênios aromáticos presentes no composto **24** sendo atribuídos como se segue: 7,01 (s, 2H; H-3'/H-5'); 7,26 (d, 1H, $J = 7,4$; H-4); 7,67 (m, 2H; H-5/H-6); 7,93 (d, 1H, $J = 7,4$; H-7).

Além de evidenciados, como já mencionado, no espectro no IV, a presença dos grupos carbonilas pôde ser confirmada pela inspeção do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 23, p.70). As carbonilas do grupo acetila foram observadas em δ_{C} 170,5, enquanto que a carbonila do anel lactônico forneceu um sinal em δ_{C} 172,0.

O ESI-MS de alta resolução confirma o sucesso da síntese de **24**, visto que a fórmula molecular esperada ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$) é compatível com a massa exata $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 369,1418 encontrada.

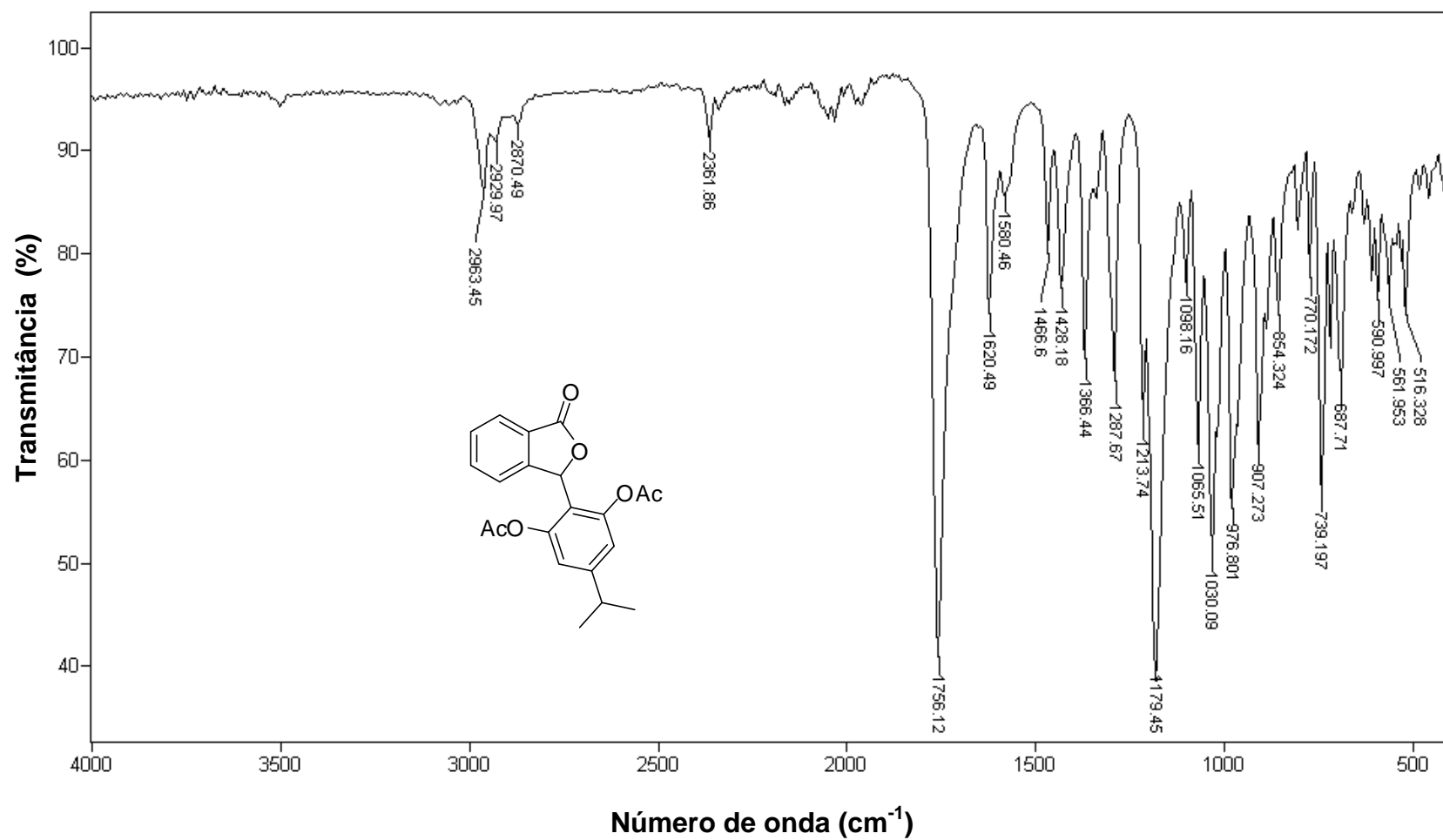


Figura 21 – Espectro no infravermelho (ATR) do composto 24.

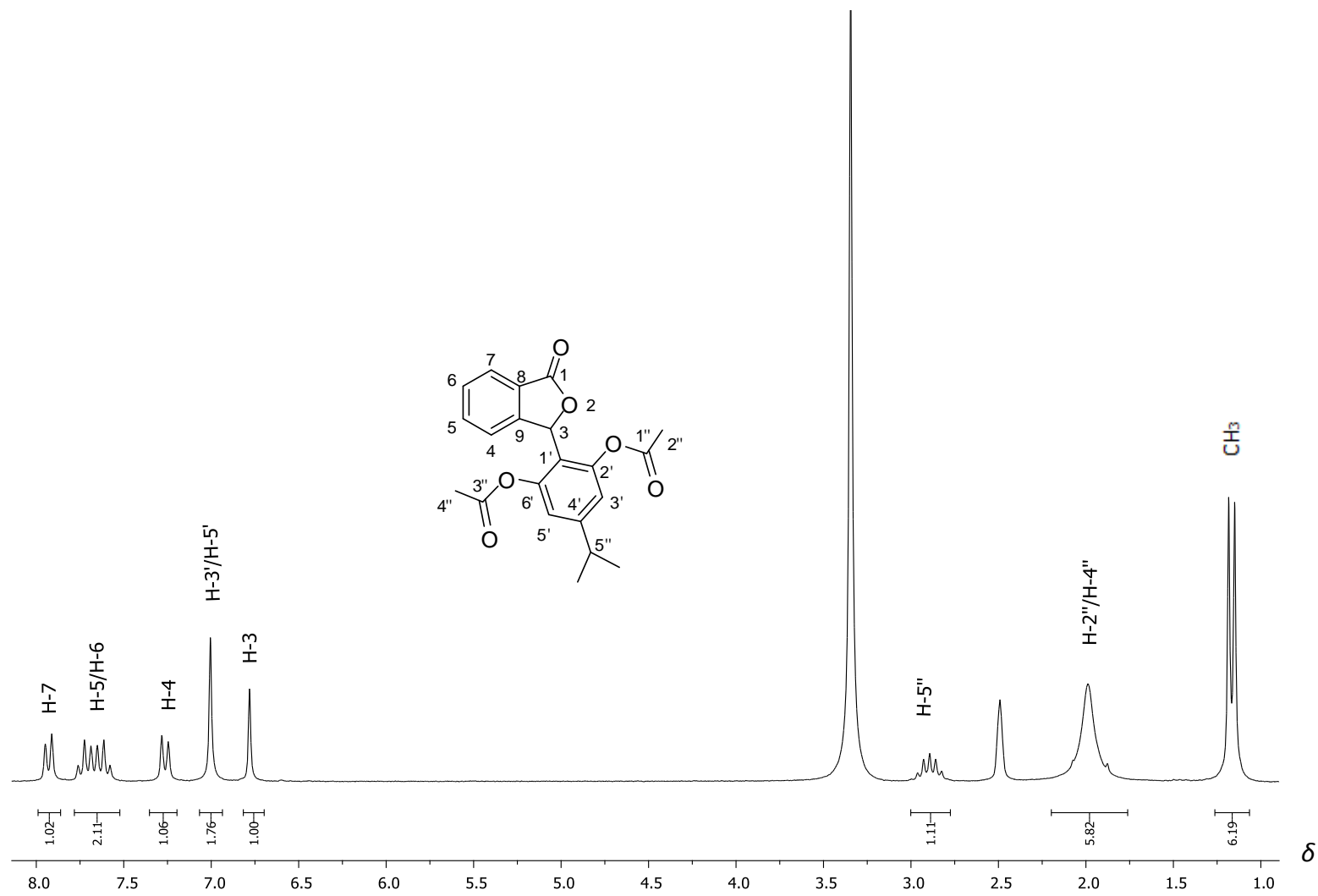


Figura 22 – Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) do composto **24**.

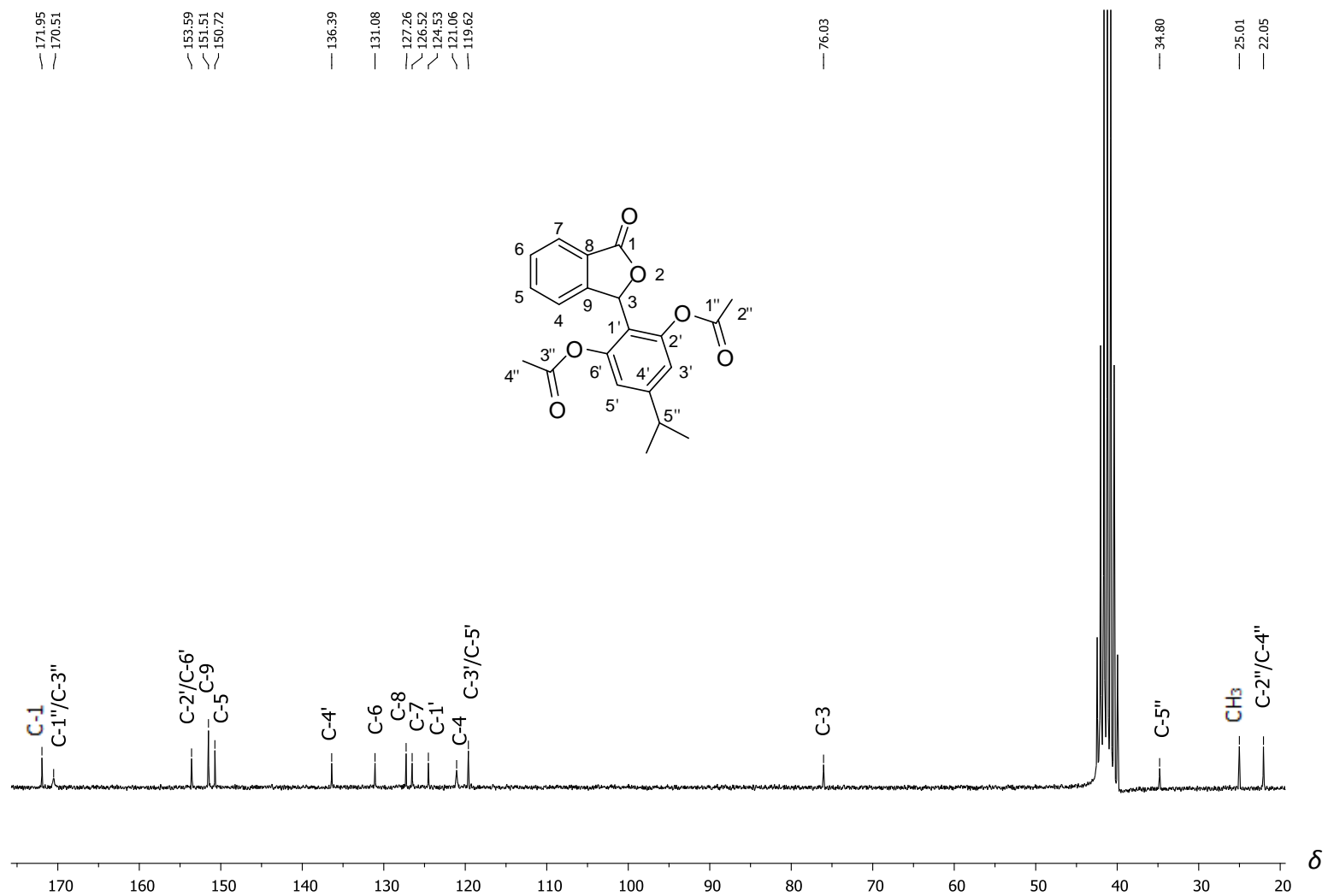


Figura 23 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **24**.

2.4. CONCLUSÕES

Descreveram-se neste capítulo as etapas envolvidas na preparação de doze isobenzofuran-1(3*H*)-onas contendo grupos alicíclicos e aromáticos ligados à posição C-3 do núcleo isobenzofuranona. Quatro dessas substâncias (**22**, **23**, **24** e **27**) não haviam sido previamente descritas na literatura. Os compostos foram preparados empregando-se reações de condensação, aromatização e acetilação que, de maneira geral, levaram à formação dos produtos esperados com rendimentos satisfatórios.

As doze isobenzofuran-1(3*H*)-onas sintetizadas foram completamente caracterizadas via espectroscopia no IV e de RMN, bem como espectrometria de massas. Técnicas bidimensionais (HMBC e HSQC) auxiliaram na atribuição de sinais dos espectros de RMN de hidrogênio e de carbono.

A investigação da estrutura cristalina de **25** mostrou características estruturas bem interessantes como a presença de dois tipos de moléculas independentes por unidade assimétrica. Em uma dessas moléculas, há uma deslocalização eletrônica no anel alifático da fitalida **25**.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E.P. The effect of mycophenolic acid on the growth of *Staphylococcus aureus* in heart broth. *Biochemical Journal*, v. 39, n. 5, p. 398-408, 1945.

ARNONE, A.; ASSANTE, G.; NASINI, G.; STRADA, S.; VERCESI, A. Cryphonectric acid and other minor metabolites from a hypovirulent strain of *Cryphonectria parasítica*. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 48-50, 2002.

- BARBOSA, L. C. A. *Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. Viçosa: Editora UFV, 2007, p. 81.
- BIRCH, A.J.; WRIGHT, J.J. A total synthesis of mycophenolic acid. *J. Chem. Soc., Chem. Commun*, v. 22, p. 2635-2644, 1969.
- CANONICA, L.; RINDONE, B.; SANTANIELLO, E.; SCOLASTICO, C. A total synthesis of mycophenolic acid, some analogues and some biogenetic intermediates. *Tetrahedron*, v. 28, n. 15, p. 4395-4404, 1972.
- CELLCEPT. Bula disponível em: <
<http://www.bulas.med.br/bula/4943/cellcept.htm>>. Acesso em: novembro de 2012.
- CLERC, P.; SIMON, S. *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds*. 2nd ed. Berlin and New York: Springer-Verlag, 1989.
- COELHO, F.; VERONESE, D.; PAVAM, C.H.; PAULA, V.I.; BUFFONB, R.; Palladium-catalyzed carbonylative cyclization of Baylis–Hillman adducts. An efficient approach for the stereoselective synthesis of 3-alkenyl phthalides. *Tetrahedron*, v. 62, p. 4563-4572, 2006.
- COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONSELLOS, M. *Substâncias Carboniladas e Derivados*. Editora Bookman, 2003. 412 p.
- DANHEISER, R.L.; GEE, S.K.; PEREZ, J.J. Total synthesis of mycophenolic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 108, n. 4, p. 806-810, 1986.
- DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; VEIGA, T. A. M.; BARRETO, R. W.; KING-DIAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B. Phytotoxic constituents from *Nimbya*

alternantherae. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 34, p. 790-795, 2006.

DI MOLA, A.; GROCE, G.; MORE, V.; De CAPRARIIS, P.; FILOSA, R.; MASSA, A. Active methylene compounds in a very effective approach to 3-substituted isobenzofuranones through tandem aldol/lactonization reactions. *Tetrahedron*, v. 68, p. 6146-6151, 2012.

GALLAGHER, J.A.; QUINN, C.M.; WHITTAKER, P.A. The action of mycophenolic acid on *Candida albicans*. *Biochemical Society Transaction*, v. 15, n. 2, p. 290, 1987.

HUANG, X.Z.; ZHU, Y.; GUAN, X.L. TIAN, K.; GUO, J.M.; WANG, H.B.; FU, G.M. A Novel Antioxidant Isobenzofuranone Derivative from Fungus *Cephalosporium* sp.AL031. *Molecules*, n. 17, p. 4219-4224, 2012.

HUNG, T.V.; MOONEY, B.A.; PRAGER, R.H.; TIPPETT, J.M. Central nervous system active compounds. VII. Phthalide synthesis by lithiation of alkoxyaromatics. *Aust. J. Chem.*, v. 34, p. 383-386, 1981.

LANDGE, S.; BERRYMAN, M.; TÖRÖK, B. Microwave-assisted solid acid-catalyzed one-pot synthesis of isobenzofuran-1(3H)-ones. *Tetrahedron Letters*, v. 49, p. 4505-4508, 2008.

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.
- MA, M.; GAO, Y.; QIAO, H.; HU, X.; CHANG, J. Antiplatelet activity of 3-butyl-6-bromo-1(3H)-isobenzofuranone on rat platelet aggregation. *J. Thromb Thrombolysis*, v. 33, p. 64-73, 2012.
- MAL, D.; PAHARI, P. Recent Advances in the House Annulation. *Chemical Reviews*, v. 107, p. 1892-1918, 2007.
- MAL, D.; PAHARI, P.; DE, S. R. Regiospecific synthesis of 3-(2,6-dihydroxyphenyl)phthalides: Application to the synthesis of isopestacin and cryphonectric acid. *Tetrahedron*, v. 63, p. 11781-11792, 2007.
- NAPOLETANO, M.; NORCINI, G.; PELLACINI, F. PELLACINI, F.; MARCHINI, F.; MORAZZONI, G.; FERLENGAB, P.; PRADELLA, L. Phthalazine PDE4 Inhibitors. Part 2: The Synthesis and Biological Evaluation of 6-Methoxy-1,4-disubstituted Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, n. 11, p. 33-37, 2001.
- OLIVER, J. E.; WILZER, K. R.; WATERS, R. M. Synthesis of 1-(2,6-Dihydroxyphenyl)-1-alkanones and Benzophenone by Aromatization of 2-Acyl-3-hydroxy-2-cyclohexene-1-ones with Mercuric Acetate. *Synthesis*, p. 1117-1119, 1990.
- PATTERSON, J.W. Total synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron*, v.49, n. 48, p. 4789-4798, 1993.

- PEREIRA, J.L. Síntese e Avaliação do Efeito Inibitório Sobre o Transporte de Elétrons da Fotossíntese de Derivados de Isobenzofuran-1(3H)-onas. DISSERTAÇÃO, Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 2012.
- PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, Oxford: Pergamon Press, 1998.
- PLÉ, P.A.; HAMON, A.; JONES, G. A convergent synthesis of Mycophenolic acid. *Tetrahedron*, v. 53, n. 9, p. 3395-3400, 1997.
- 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 *Pestalotiosis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*, v. 60, p. 170-183, 2002.
- WILLIAMS, R.H.; LIVELY, D.H.; DELONG, D.C.; CLINE, J.C.; SWEENEY, M.J.; POORE, G.A.; LARSEN, S.H. Mycophenolic acid: antiviral and antitumor properties. *J. Antibiot*, v. 21, p. 463-464, 1968.
- YOGANATHAN, K.; ROSSANT, C.; NG, S.; HUANG, Y.; BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. 10-methoxydihydrofusicin, fuscinarin, and fusicin, novel antagonists of the human CCR5 receptor from *Oidiodendron griseum*. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1116-1117, 2003.
- ZAMILPA, A.; RUIZ, M.H.; OLMO, E.; PÉREZ, J.L.L.; TORTORIELLO, J.; FELICIANO, A.S. Anxiolytic effects of benzalphthalides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 15, p. 3483-3486, 2005.
- ZÚÑGA, A.C.; LUCAS, A.G. A total synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron Letters*, v. 59, n.19, p. 2881-2882, 1998.

ZÚÑGA, A.C.; LUCAS, A.G.; DOMÍNGUES, M.M. Total synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron*, v. 59, n. 11, p.1989-1994, 2003.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FITOTÓXICA DAS ISOBENZOFURANONAS C-3 FUNCIONALIZADAS

3.1. Introdução

No século XVIII, Thomas Malthus alertava para o descompasso entre crescimento populacional e a produção de alimentos. Segundo Malthus, a população crescia em progressão geométrica enquanto que a produção de alimentos em progressão aritmética o que, inevitavelmente, levaria a uma escassez de alimentos (DUPÂQUIER, 2001). Ao longo dos anos, para suprir a crescente demanda por alimentos decorrente do aumento da população mundial, várias técnicas agrícolas vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas. Dentro desse contexto, merece destaque a utilização de agroquímicos

(também chamados de agrotóxicos), que pode ser apontada como um dos fatores responsáveis pelo aumento substancial na produção de alimentos.

“Popularmente chamados de defensivos agrícolas ou pesticidas, os agrotóxicos visam controlar seres vivos considerados indesejáveis em função da conservação de outros seres vivos, produtos ou do meio ambiente. Os agrotóxicos possuem em sua composição substâncias químicas tóxicas, denominadas ingredientes ativos, que interferem na atividade biológica normal dos seres vivos alvos de controle. O ingrediente ativo é o agente químico, físico ou biológico que confere eficácia aos agrotóxicos e afins” (IBAMA, 2010).

No Brasil, os herbicidas correspondem à classe de agroquímicos mais consumida (ANVISA, 2012). Tendo como finalidade controlar plantas daninhas, nas últimas duas décadas a utilização dos herbicidas vem crescendo continuamente na agricultura. Além do glifosato (Capítulo 1, Figura 2, p.4), outros exemplos representativos de herbicidas são o paraquat, o 2,4-diclorofenoxiacético também conhecido como (2,4-D), o ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA), a atrazina e o diuron (Figura 1).

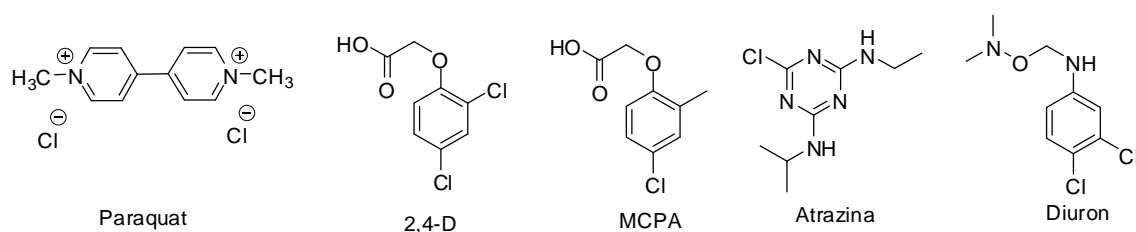


Figura 1- Estruturas de alguns herbicidas.

Os números evidenciam a importância dos herbicidas no setor agroquímico do Brasil. Segundo dados da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), em 2010/2011 a venda de herbicidas representou 45% dos agroquímicos comercializados em nosso país (Figura 2). A utilização dessa

classe de agroquímicos pode ser justificada pelo fato de que, se não mantidas sob controle, as plantas daninhas competem com as culturas por nutrientes, água e luz culminando em perda significativa da produtividade. Deve ser salientado que o emprego de herbicidas na agricultura apresenta como aspecto positivo a diminuição dos custos de produção.

Vendas de Produtos Formulados por Classe de Uso (kg) - Brasil (2º semestre de 2010 e 1º semestre de 2011)

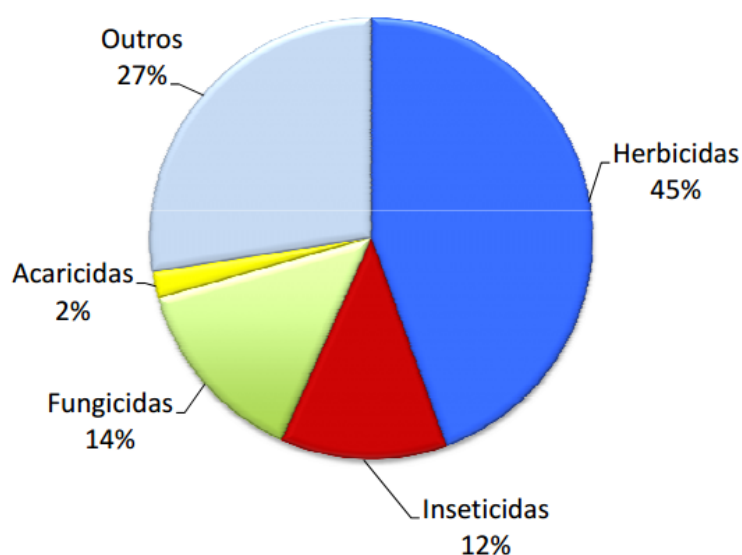


Figura 2- Distribuição percentual de vendas de agroquímicos no Brasil por classe. Fonte: Anvisa (2012).

Apesar do grande número de compostos disponíveis no mercado para o controle das mais diversas espécies de plantas consideradas daninhas, existe uma demanda crescente por novos herbicidas que sejam mais específicos; possam ser usados em doses tão baixas quanto possível, com reduzida ou nenhuma toxicidade de modo a minimizar os riscos de exposição para o homem e para os animais silvestres e domésticos; baixos impactos ambientais

e pouca persistência no ambiente (ambientalmente benignos). Outro aspecto que merece destaque é que novos produtos são requeridos para combater a resistência desenvolvida por plantas daninhas. A resistência pode ser entendida considerando-se a existência de um genótipo resistente em uma cultura, que inicialmente está com baixa frequência numa população. Este genótipo torna-se de ocorrência cada vez mais generalizada por um processo de seleção natural, o que faz com que os indivíduos sejam cada vez menos sensíveis aos agroquímicos. Os primeiros casos de resistência de plantas daninhas foram descritos na década de 1960. Estima-se que, hoje, existam 396 biótipos resistentes e 210 espécies (123 dicotiledôneas e 87 monocotiledôneas) de plantas daninhas que apresentem resistência a um ou mais herbicidas (DEVINE e SHUKLA, 2000; BECKIE, 2006; SILVA *et al.*, 2007; HEAP, 2013). Outro aspecto importante a considerar é a descoberta de novas plantas daninhas, havendo assim a necessidade do desenvolvimento de novos produtos para controlá-las.

Conforme descrito no Capítulo 1, metabólitos secundários vêm sendo explorados para pesquisa e desenvolvimento de novos agroquímicos, sendo descritos na literatura exemplos que atestam a viabilidade desta abordagem. Esse tipo de estratégia pode ser considerado atrativo por várias razões. Muitos produtos naturais biologicamente ativos são parcialmente solúveis na água e como uma consequência do processo de seleção natural, podem apresentar bioatividade em concentrações muito baixas. Além disso, o mecanismo de ação destes metabólitos sobre plantas daninhas é, muitas vezes, diferente dos herbicidas sintéticos. Estudos têm demonstrado a existência de casos em que os sítios moleculares de atuação de herbicidas naturais diferem

significativamente dos conhecidos sítios moleculares de atuação dos herbicidas sintéticos (DUKE *et al.*, 2000; DUKE *et al.*, 2005). A investigação desses novos mecanismos de ação de herbicidas naturais sobre as plantas daninhas é importante porque poderia resultar no planejamento racional de novas classes de herbicidas. Além do mais, herbicidas com novos sítios de ação são desejáveis para combater o rápido crescimento de plantas daninhas resistentes a herbicidas. Outra razão que poderia ser apontada em favor do uso de metabólitos secundários na busca por novos herbicidas é a possibilidade de obtenção de compostos que sejam ambientalmente benignos. Este último argumento se soma às constantes preocupações ligadas à preservação do meio ambiente.

Descreve-se neste capítulo os resultados referentes à avaliação da atividade fitotóxica das isobenzofuran-1(3*H*)-onas 16-27 (Capítulo 2, Figura 4, p.24). Conforme descrito anteriormente, esse estudo foi motivado pelo efeito fitotóxico descrito na literatura para o ácido crifonétrico (Capítulo 2, Figura 3, estrutura 5, p.15). O ácido crifonétrico foi a estrutura modelo que serviu de inspiração para a síntese das substâncias 16-27. De fato, vários dos compostos avaliados apresentam uma similaridade estrutural com esta fitotoxina natural. Os compostos foram sintetizados introduzindo-se diferentes grupos alicíclicos e aromáticos para que fosse possível uma avaliação do impacto da diversidade estrutural na atividade biológica.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Avaliação da atividade fitotóxica das isobenzofuranonas 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26 e 27 sobre o crescimento radicular das espécies *Cucumis sativus* e *Sorghum bicolor*

Soluções-estoque das isobenzofuranonas C-3 funcionalizadas sintetizadas nesse trabalho (Figura 4, Capítulo 2, p.24, exceto as substâncias 18, 21 e 24) nas concentrações de 0,125; 0,250; 0,500; 1,00; mmol L⁻¹ foram preparadas dissolvendo-se, em balão volumétrico, uma quantidade adequada destas substâncias em dimetil sulfóxido (DMSO) 0,5% v/v. O volume do balão foi então aferido com solução do tampão MES (ácido 2-morfolinoetanosulfônico; 0,02 mol L⁻¹, pH ~ 6,0), contendo 0,5% v/v de DMSO, também usado nas diluições. Para cada uma das concentrações, foram preparadas três placas de Petri recobertas com papel de germinação. Em seguida, 20 sementes de pepino (*C. sativus*) foram espalhadas uniformemente sobre cada placa de Petri, para então serem umidecidas uniformemente com 5 mL de solução. As placas foram seladas com fita crepe, envolvidas com papel alumínio e incubadas em câmara de germinação a 25 °C por 7 dias. Decorrido este período, o crescimento radicular foi avaliado por medição das radículas (caule e raiz) com régua graduada em milímetros e os resultados expressos em percentagem de crescimento comparado ao controle sendo considerada a média das medidas para cada unidade experimental (placa de Petri).

Para comparação, um herbicida comercial, o glifosato, foi utilizado no ensaio (controle positivo). Para tal, o produto comercial (Glifosato Plus Pikapau 480 g/l) foi diluído com o tampão MES de forma a obter a mesma concentração dos compostos avaliados e do DMSO. A preparação das placas de Petri e o

tempo de germinação foram análogos ao descrito para os compostos avaliados.

Como controle negativo, foi utilizado uma solução aquosa contendo MES e DMSO, mas isenta do composto avaliado. As percentagens de inibição (ou estimulação) foram calculadas em comparação com esse controle.

Experimentos de avaliação de fitotoxicidade dos compostos sintetizados nesse trabalho (Figura 4, Capítulo 2. p.24, com exceção das substâncias **18**, **21** e **24**), também foram realizados utilizando-se as espécies *S. bicolor* (sorgo) empregando-se a metodologia descrita anteriormente para a espécie *C. sativus* (pepino).

3.2.2. Avaliação do efeito dos compostos 16-27 sobre o transporte de elétrons da fotossíntese

3.2.2.1. Isolamento de cloroplastos

Cloroplastos fotossinteticamente ativos foram extraídos de folhas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.), obtidas em supermercados ou feiras livres. Para o processo de extração, folhas livres da nervura central e das extremidades basal e apical foram misturadas com uma solução-tampão 20 mmol L⁻¹ de *N*-tris(hidroximetil)metilglicina(tricina)-NaOH (pH = 8,0; 5 mL de solução/g de material vegetal), previamente resfriada em banho de gelo e contendo 10 mmol L⁻¹ de NaCl, 5 mmol L⁻¹ de MgCl₂ e 0,4 mol L⁻¹ de sacarose. Esse material foi homogeneizado em um liquidificador doméstico por 30 segundos. O material macerado foi filtrado através de gaze cirúrgica, e o filtrado, centrifugado a 4 °C (1 minuto, 500 g). O sobrenadante foi submetido a nova centrifugação (10 minutos, 1.500 g). Os cloroplastos, contidos no precipitado, foram então ressuspensos em uma solução não-tampoadada de

sacarose. A suspensão foi imediatamente diluída (proporção de 1:1) com uma solução tamponada de sacarose. A nova suspensão assim obtida foi mantida em banho de gelo e abrigada da luz, sendo utilizada logo após sua preparação. Para determinação do teor de clorofila, alíquotas dessa suspensão foram pipetadas e convenientemente diluídas com acetona 80% (v/v). Após diluição, medidas de absorvância foram feitas nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm. O conteúdo de clorofila foi calculado com base na fórmula de Arnon (HALL, 1980):

$$\text{Clorofila } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 20,2 (A_{645}) + 8,02 (A_{663})$$

3.2.2.2. Avaliação do efeito dos compostos 16-27 sobre o transporte de elétrons basal da fotossíntese

Alíquotas da suspensão de cloroplastos com 20 μg de clorofila foram incubadas a 24 °C em cubetas de 1 mL contendo solução tamponada de tricina-NaOH (pH = 8,0), 10 mmol L⁻¹ de NaCl, 5 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 0,2 mol L⁻¹ de sacarose e 1 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆]. A avaliação foi efetuada expondo-se a cubeta a uma luz saturante (800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A taxa de redução do ferricianeto foi medida a 420 nm a cada 30 segundos durante 10 minutos e contra um branco. Atividade foi calculada sobre a porção linear da curva, a partir de coeficiente de extinção molar de 1.000 M⁻¹ cm⁻¹.

As substâncias **16** a **27** foram dissolvidas em DMSO e diluídas com água, de modo a obter soluções cujos valores de concentração foram de 50, 100 e 200 mmol L⁻¹. A avaliação do efeito desses compostos, nas concentrações mencionadas sobre a reação de Hill, foi conduzida via adição desses compostos às suspensões de cloroplastos preparadas como descrito

no item **3.2.2.1** (p. 83). Para cada valor de concentração utilizado, os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem dos controles não-tratados.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Avaliação da atividade fitotóxica sobre sorgo e pepino

Tendo assegurado a obtenção dos compostos **16-27** conforme discutido no Capítulo 2, procedeu-se à avaliação de seus efeitos fitotóxicos. Uma das formas de se realizar uma análise preliminar da fitotoxicidade de substâncias consiste em avaliar seus efeitos sobre o crescimento radicular de espécies mais sensíveis. Nesses ensaios normalmente são utilizadas plantas que, em curto espaço de tempo apresentam respostas eficazes, mesmo na presença de baixa concentração do composto estudado. Dentre essas plantas destacam-se a *Latuca sativa* (alface), *Zea mais* (milho), *Sorghum bicolor* (sorgo) e *Cucumis sativus* (pepino) como sendo as mais utilizadas (BARUAH *et al.*, 1994).

Assim, optou-se por utilizar as espécies *Sorghum bicolor* (sorgo) e *Cucumis sativus* (pepino) para realização dos ensaios de avaliação da fitotoxicidade das substâncias sintetizadas. A escolha dessas espécies se deveu: i) à facilidade de aquisição de suas sementes; ii) ao fato de propiciarem uma avaliação da seletividade dos compostos testados sobre espécies de plantas monocotiledônea e dicotiledônea, representadas nos ensaios por sorgo e pepino respectivamente.

As isobenzofuran-1(3*H*)-onas **16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26 e 27** foram avaliadas no tocante aos seus efeitos sobre o crescimento do sistema radicular (caule e raiz) da espécie dicotiledônea *C. sativus* (pepino) e da monocotiledônea *S. bicolor*. As substâncias foram avaliadas em quatro

diferentes concentrações (0,125; 0,250; 0,500; 1,00 mmol L⁻¹) e os resultados são apresentados nas Tabelas 1 (p.87) e 2 (p.90). Os resultados mais significativos estão ainda apresentados na forma de gráficos nos quais os valores negativos indicam inibição do crescimento radicular e os positivos estimulação do crescimento. Para efeito de comparação, é apresentado ainda o efeito do herbicida comercial glifosato sobre as espécies testadas (controle positivo). As isobenzofuranonas **18**, **21** e **24** não tiveram seu potencial fitotóxico avaliado contra *C. sativus* e *S. bicolor* por não terem sido solúveis na formulação adotada para os ensaios.

Ao analisar as informações apresentadas na Tabela 1 (p.87) referentes ao efeito dos compostos **16**, **17**, **19**, **20**, **22**, **23**, **25**, **26** e **27** sobre o crescimento radicular de pepino, percebe-se que não há inibições tão significativas do crescimento radicular quanto às inibições obtidas com o herbicida comercial glifosato.

Na maior concentração, o glifosato proporcionou uma inibição de aproximadamente 30% no crescimento do caule e 76% de inibição do crescimento da raiz no ensaio de germinação com o pepino (Figura 3, p.88). Considerando o todo, caule e raiz, o melhor resultado obtido com os compostos foram os da substância **22** e **23**. Com respeito ao composto **22**, observou-se uma inibição máxima de aproximadamente 41% para o caule na concentração de 0,5 mol L⁻¹ e de 28% para a raiz na maior concentração. Já para a fitalida **23** na maior concentração encontrou-se uma inibição aproximadamente 25% enquanto que o crescimento da raiz foi inibido em 24% na concentração de 0,125 mol L⁻¹. Na Figura 3 (p.88) os resultados estão apresentados na forma de gráficos.

Tabela 1 – Efeito das substâncias **16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26** e **27** sobre o crescimento radicular de pepino

Composto	% de Crescimento*							
	Caule				Raiz			
	1 mol L ⁻¹	0,5 mol L ⁻¹	0,25 mol L ⁻¹	0,125 mol L ⁻¹	1 mol L ⁻¹	0,5 mol L ⁻¹	0,25 mol L ⁻¹	0,125 mol L ⁻¹
16	-22,39	-11,64	5,84	-5,75	21,51	24,06	25,64	5,02
17	-2,36	-8,45	8,20	59,27	-10,11	-7,04	-15,48	-1,40
19	-27,35	-5,12	-9,27	0,95	11,73	16,73	36,66	25,69
20	-1,87	5,37	-5,5	-2,07	8,21	-23,58	21,38	4,89
22	-17,88	-40,68	2,56	-7,79	-27,88	-13,19	6,85	-3,43
23	-25,47	-7,99	-15,76	-7,4	-15,12	-13,24	-13,24	-24,22
25	-22,08	10,41	-4,16	-10,55	4,39	13,4	6,41	9,95
26	-17,38	3,43	8,67	6,14	-2,37	11,77	-0,85	-1,27
27	5,94	-3,87	6,61	1,05	16	7,2	0,98	10,68
Glifosato	-28,99	-23,13	-32,92	-19,47	-76,13	-66,33	-52,70	-37,85

* As percentagem de crescimento são relativas ao controle.

Cabe salientar que as inibições do crescimento radicular observadas para o glifosato se mostraram decrescentes a medida que a concentração diminuiu, fato consistente com o esperado uma vez que a medida que a concentração do princípio ativo de um herbicida diminui decresce também a sua atividade. Isso indica que os experimentos foram conduzidos de maneira satisfatória e sob condições bem controladas.

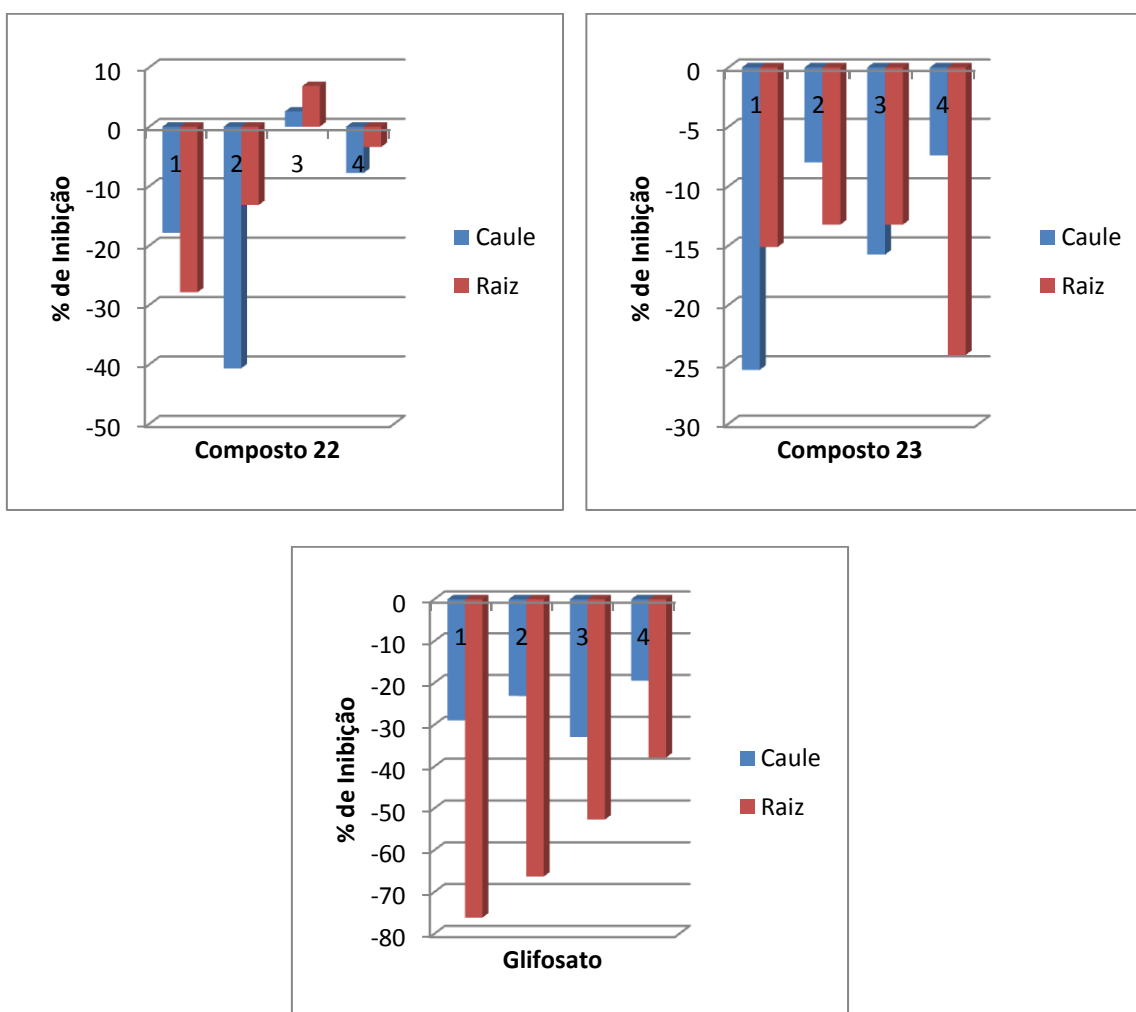


Figura 3 - Efeito das substâncias **22**, **23** e do herbicida comercial (glifosato) sobre o crescimento radicular de pepino (*C. sativus*). Os números 1, 2, 3 e 4 referem-se, respectivamente, às concentrações 1,00; 0,500; 0,250 e 0,125 mmol L⁻¹.

A análise dos dados da Tabela 2 (p.90) revela que as porcentagens de inibição para o crescimento radicular de sorgo foram mais significativas em relação aquelas observadas para o pepino (Tabela 1, p.87). De forma geral os compostos analisados mostraram uma maior tendência a inibir em detrimento ao estímulo do crescimento radicular da cultura de sorgo.

Considerando efeitos inibitórios, o efeito mais pronunciado foi observado para o composto **23** que inibiu o crescimento, respectivamente, do caule em 44% e da raiz em 70% (Figura 4, p.91) na concentração mais elevada. Esses resultados se aproximam daqueles encontrados para o herbicida comercial glifosato (aproximadamente 68% de inibição para o caule e 75% para a raiz). Outras substâncias que merecem ser destacadas são o composto **22** que proporcionou uma inibição na maior concentração de aproximadamente 31% para o caule e 51% para a raiz, e a isobenzofuranona **26**, com inibição máxima em torno de 53% para o caule e 60% para a raiz do sorgo.

Tabela 2 - Efeito das substâncias **16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26 e 27** sobre o crescimento radicular de sorgo

% de crescimento*								
Composto	Caule				Raiz			
	1 mmol L ⁻¹	0,5 mmol L ⁻¹	0,25 mmol L ⁻¹	0,125 mmol L ⁻¹	1 mmol L ⁻¹	0,5 mmol L ⁻¹	0,25 mmol L ⁻¹	0,125 mmol L ⁻¹
16	-8,45	-1,07	-6,94	-12,88	55,70	15,86	-0,71	35,61
17	-4,04	-5,62	6,29	16,67	-21,53	-33,76	3,66	-15,26
19	-10,17	-0,69	-15,47	-6,42	-63,68	-50,20	-55,01	-13,29
20	30,72	18,14	36,74	91,42	-4,17	-37,27	-17,81	2,92
22	-28,98	-30,90	-11,59	9,27	-50,61	10,84	-12,39	25,28
23	-44,03	-45,11	-37,27	-30,26	-70,34	-65,47	-63,09	-47,87
25	-34,35	-14,53	-22,36	-18,78	-54,48	41,44	46,41	-66,00
26	-53,24	-44,13	-43,17	-29,73	-59,62	-26,56	-29,41	-3,93
27	-18,18	-21,79	-13,72	-16,82	-24,67	-14,05	-23,74	-19,56
Glifosato	-67,53	-45,77	-6,91	-12,65	-75,47	-61,61	-34,63	-18,61

* As percentagem de crescimento são relativas ao controle.

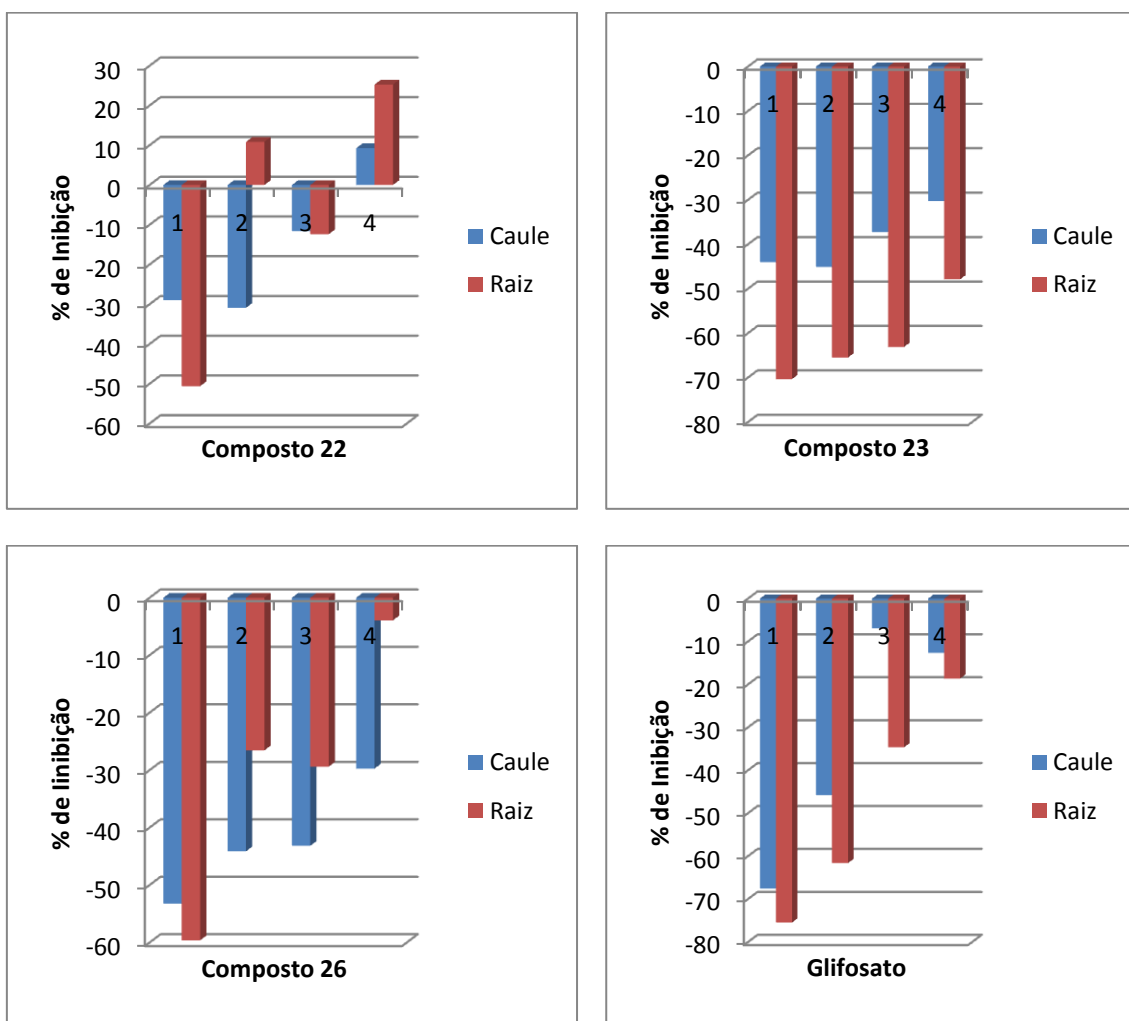


Figura 4 - Efeito das substâncias **22**, **23**, **26** e do herbicida comercial (Glifosato) sobre o crescimento radicular de sorgo (*S. bicolor*). Os números 1, 2, 3 e 4 referem-se, respectivamente, às concentrações 1,00, 0,500, 0,250 e 0,125 mmol L⁻¹.

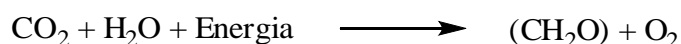
3.3.2. Avaliação da atividade fitotóxica sobre o transporte de elétrons

Outra forma de se mensurar a fitotóxicidade de uma substância é avaliar a sua capacidade de inibir o transporte de elétrons no processo fotossintético. Segundo a Encyclopedia Britanica do Brasil (12^a Edição, 1990) a fotossíntese pode ser definida como o processo de

“formação de carboidratos, a partir do dióxido de carbono e água, nas células clorofiladas de plantas verdes, sob a influência da luz, com desprendimento fotoquímico de oxigênio.”

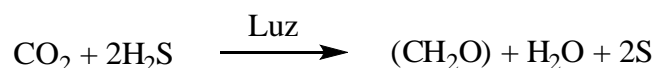
A fotossíntese é um processo muito mais complexo comparado à definição supracitada, devendo-se, portanto consultar a literatura especializada para maiores detalhes. Entretanto, alguns aspectos históricos interessantes referentes ao estudo e entendimento da fotossíntese são relevantes ao presente trabalho e serão abordados a seguir.

No século XVIII, o médico holandês Jan Ingenhousz propôs a primeira equação para o processo fotossintético, como representado pela equação a seguir (NÍCOLAS, 2011).



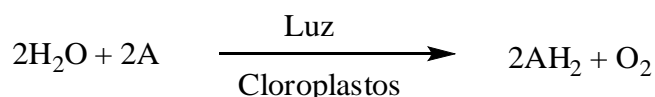
Contudo, Jan Ingenhousz, ainda que tenha dado uma importante contribuição no estudo da fotossíntese, errou ao afirmar que o oxigênio provinha da molécula de dióxido de carbono e não da água.

Já no século XX, ao observar que as bactérias sulfurosas não produziam oxigênio, Van Niel questionou a respeito da origem do oxigênio no processo fotossintético. Essas bactérias produzem carboidratos a partir do dióxido de carbono liberando enxofre (NÍCOLAS, 2011).



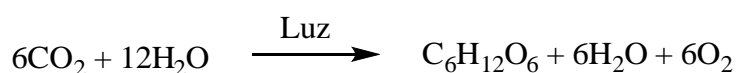
Assim, Van Niel por analogia propôs que na fotossíntese era a molécula de água que dava origem ao oxigênio e não a molécula de CO_2 como proposto por Jan Ingenhousz. Tal fato ficou devidamente comprovado em 1937 por meio experimentos conduzidos por Robert Hill. Ao isolar cloroplastos e irradiá-los

com luz na presença de água, Hill obteve oxigênio na ausência de gás carbônico (NELSON e COX, 2002) conforme mostrado pela seguinte equação, conhecida como equação de Hill



onde A é um receptor não natural de elétrons como por exemplo íons férricos, benzoquinona e corantes como o 2,6-diclorofenolindofenol (DCFIF).

Assim, em 1941, em experimentos conduzidos com elementos marcados radioativamente, uma equação genérica correta para a fotossíntese foi proposta (NÍCOLAS, 2011).



Um aspecto importante advindo dos estudos a respeito do processo fotossintético é que geralmente as substâncias que inibem a reação de Hill inibem a fotossíntese em plantas e podem ser consideradas como estruturas-modelo para o desenvolvimento de novos compostos para o controle de plantas daninhas (HANSCH e LEO, 1995).

No capítulo I mencionou-se que dentre várias atividades biológicas relacionadas às isobenzofuran-1(3*H*)-onas está a habilidade de interferir com o transporte de elétrons fotossintético (DEMUNER *et al.*, 2006; PEREIRA, 2013). Considerando esse fato, avaliou-se *in vitro* o efeito das isobenzofuran-1(3*H*)-onas **16** a **27** (Capítulo 2, Figura 4, p.24) sobre o transporte de elétrons fotossintético. Os resultados são apresentados na Tabela 3 (p.94).

Tabela 3 – Avaliação *in vitro* do efeito de isobenzofuran-1(3*H*)-onas **16-27** sobre a redução do ferricianeto de potássio na presença de cloroplastos isolados de folhas de *Spinacia oleracea*^a

Composto	50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	200 $\mu\text{mol L}^{-1}$
16	99,2 \pm 1,6	114,1 \pm 1,5	104,7 \pm 1,3
17	90,2 \pm 0,1	92,4 \pm 1,3	55,7 \pm 3,0
18	218,3 \pm 4,0	225 \pm 1,1	189,9 \pm 0,9
19	102,7 \pm 0,3	96,5 \pm 2,0	93,8 \pm 3,2
20	133,5 \pm 2,0	125,6 \pm 0,8	116,1 \pm 4,5
21	201,9 \pm 3,7	192,4 \pm 5,9	161,1 \pm 6,5
22	93,2 \pm 0,5	92,0 \pm 2,8	97,5 \pm 2,8
23	185,7 \pm 2,4	156,7 \pm 4,9	87,1 \pm 2,5
24	92,0 \pm 1,5	83,1 \pm 1,3	75,9 \pm 1,6
25	108,6 \pm 0,5	105,0 \pm 3,4	78,2 \pm 4,3
26	86,1 \pm 0,0	68,0 \pm 1,4	44,2 \pm 0,2
27	107,5 \pm 2,2	102,6 \pm 7,7	103,2 \pm 1,3
Ácido fitalaldeídico	114,3 \pm 2,9	108,4 \pm 1,5	100,2 \pm 0,7

^a Atividade determinada conforme metodologia descrita na Seção 3.2.2 (Material e Métodos, p.84).

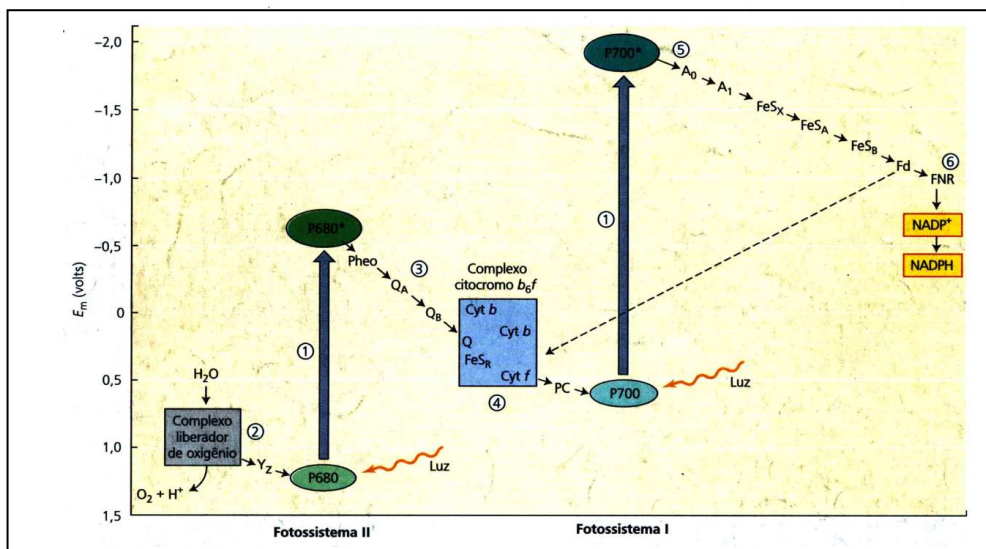
Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que, dentre os 13 compostos submetidos à avaliação da atividade fitotóxica, 4 substâncias (**17**, **24**, **25** e **26**) reduziram a taxa de transporte de elétrons basal, dirigida pela luz, na concentração de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os compostos mais ativos **17** e **26** reduziram o transporte de elétrons em, respectivamente, 44 e 56%.

Considerando os compostos sintetizados, as substâncias **16**, **19**, **22** e **27** não interferem no transporte de elétrons fotossintético. O mesmo é verdadeiro para o ácido fitalaldeídico, disponível comercialmente e que foi o precursor dos derivados sintéticos **16-27**.

Ainda com relação à Tabela 3 (p.94) é importante observar que os compostos **18**, **20**, **21** e **23** aumentaram a taxa de transporte de elétrons

dirigida da água, na presença de luz, para o aceptor não biológico ferricianeto de potássio. Esse efeito foi muito mais pronunciado para os derivados **18**, **21** e **23**. Substâncias que aumentam a taxa de transporte de elétrons da fotossíntese atuam como desacopladores (KROGMANN *et al.*, 1958).

A fotossíntese é um processo no qual a energia luminosa é convertida em energia química. A maneira pela qual essa transformação ocorre pode ser entendida analisando-se o Esquema Z da fotossíntese (Figura 5). Este esquema tornou-se a base para o entendimento do processo fotossintético nos organismos que produzem oxigênio. Durante a fotossíntese, elétrons oriundos da água são capturados pelo NADP^+ que é convertido em NADPH. Nesse processo, fotossistemas I e II operam conjuntamente e são ligados por uma cadeia transportadora de elétrons; toda essa maquinaria biológica é impulsionada pela luz. Salienta-se que nos organismos fotossintetizantes produtores de oxigênio a fotossíntese ocorre nos cloroplastos.



Fonte: TAIZ e ZEIGER (2006).

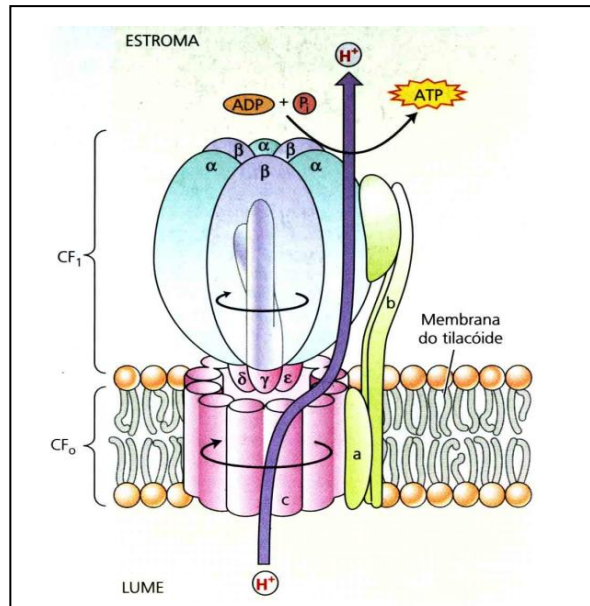
Figura 5 – Esquema Z da fotossíntese.

Conforme descrito anteriormente, a energia luminosa é utilizada para produção de NADPH durante a fotossíntese. Contudo, parte da energia luminosa capturada também é convertida em ATP. Como essa conversão é efetuada?

Atualmente é amplamente aceito que a produção de ATP ocorre via mecanismo quimiosmótico.

“O princípio básico da quimiosmose é que as diferenças na concentração de íons e as diferenças no potencial elétrico através das membranas são uma fonte de energia livre que pode ser utilizada pela célula. As diferenças no potencial químico de qualquer espécie molecular cujas concentrações não são as mesmas em lados opostos de uma membrana fornecem tal fonte de energia” (TAIZ e ZEIGER, 2006).

A Figura 6 mostra que o transporte de elétrons que ocorre durante a fotossíntese aumenta a concentração de H^+ no interior dos tilacóides dos cloroplastos. Assim, existe uma diferença de concentração de íons H^+ e, por consequência no potencial elétrico entre o interior dos tilacóides (chamado de lume) e o estroma. Esse gradiente eletroquímico é utilizado pela enzima ATP sintase para produção de ATP (Figura 6, p.97).



Fonte: TAIZ e ZEIGER (2006).

Figura 6 – A estrutura da ATP sintase e a síntese de ATP.

“Essa enzima consiste de duas partes: uma hidrofóbica ligada à membrana, chamada CF_0 , e uma porção que sai da membrana para dentro do estroma, chamada CF_1 . A CF_0 parece formar um canal através da membrana, pelo qual os prótons podem passar. A CF_1 é formada por vários peptídeos, incluindo três cópias de cada um dos peptídeos α e β arranjados alternadamente de forma similar aos gomos de uma laranja. Enquanto os sítios catalíticos estão localizados primariamente nos β -polipeptídeos, acredita-se que muitos outros peptídeos tenham uma função primeiramente de regulação. A CF_1 é a porção do complexo onde o ATP é “sintetizado”” (TAIZ e ZEIGER, 2006).

A produção de ATP, como discutida anteriormente, é chamada de fotofosforilação acíclica. Entretanto, sabe-se que há outro tipo de fluxo de elétrons induzido pela luz durante o processo de fotossíntese, que é denominado de fotofosforilação cíclica. Nesse caso, o fluxo de elétrons envolve apenas o fotossistema I (seta pontilhada, Figura 5, p.95), que é denominado cíclico porque o elétron ejetado do fotossistema I não é utilizado para redução do $NADP^+$. Ao contrário, conforme mostrado na Figura 5 (p.95) pela seta pontilhada, esse elétron retorna à vacância eletrônica do fotossistema I. Essa

via alternativa do fluxo de elétrons não leva à formação de NADPH ou oxigênio, mas é acompanhada de formação de íons H^+ a partir do complexo citocromo b_6f . Sabe-se, porém, que o transporte cíclico de elétrons é acompanhado da síntese de ATP. A formação de ATP pela fotofosforilação cíclica parece ocorrer quando a célula vegetal já está completamente suprida de NADPH e ainda requer ATP. Contudo, pouco é conhecido sobre a regulação dessa via cíclica (LENINGHER, 1991).

Como discutido anteriormente, a produção de ATP está acoplada ao transporte de elétrons da fotossíntese. Os desacopladores aumentam a taxa de transporte de elétrons da fotossíntese e inibem a síntese de ATP. Um dos mecanismos pelo qual os desacopladores inibem a síntese de ATP está relacionado à dissipação do gradiente de prótons, que é a força motriz responsável pela síntese de ATP, através da membrana durante a fotossíntese. Cloreto de amônio, alguns ácidos orgânicos e fenóis atuam desta maneira inibindo a síntese de ATP. Para tentar compensar a dissipação do gradiente de prótons, há um aumento na taxa de transporte de elétrons fotossintético. O fluxo de elétrons basal não é interrompido na presença de desacopladores. Alternativamente, os desacopladores podem interagir com porção CF_o - CF_1 da ATP sintase (Figura 6, p.97) inibindo atividade dessa enzima o que reflete também na inibição da síntese de ATP. Independente do mecanismo de atuação, conforme apresentando na Tabela 3, os compostos **18**, **20**, **21** e **23**, atuam como desacopladores e estimulam o fluxo de elétrons basal. Para demonstrar este efeito, determinou-se a influência do composto **18** sobre a taxa

de transporte de elétrons fotossintético na presença do desacoplador cloreto de amônio³.

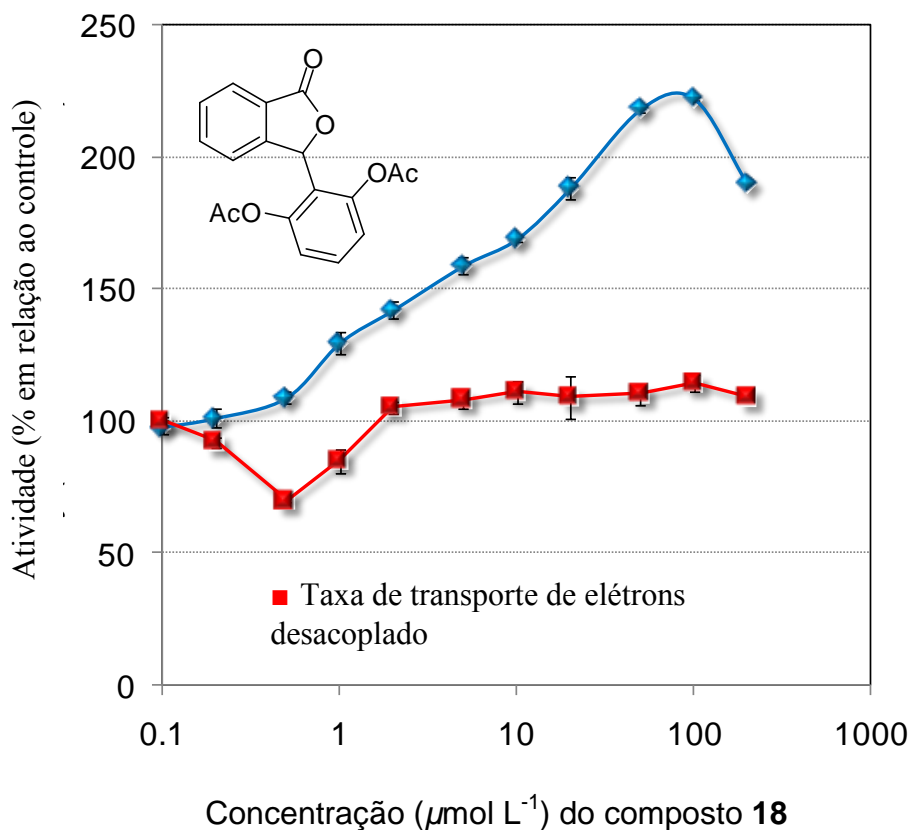


Figura 7 – Influência da isobenzofuranona **18** sobre o transporte de elétrons basal e desacoplado.

Conforme pode ser percebido na Figura 7, o composto **18** interfere com o fluxo de elétrons basal (curva em azul) mas o mesmo não afeta a taxa de transporte de elétrons desacoplada (linha vermelha).

³ Os experimentos envolvendo influência do composto **18** sobre o fluxo de elétrons desacoplado foram realizados empregando-se as condições descritas nos itens 3.2.2.1 e 3.2.2.2 mas na presença de cloreto de amônio.

3.4. CONCLUSÕES

A avaliação *in vitro* do efeito dos compostos **16-27** sobre o transporte de elétrons fotossintético mostrou que quatro das treze substâncias avaliadas é capaz de inibir o transporte de elétrons basal da fotossíntese, sendo que este efeito é mais pronunciado em concentrações acima de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Na maior concentração avaliada ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) o fluxo de elétrons foi diminuído em cerca de 50% para os compostos de maior atividade.

Outro grupo de isobenzofuranonas mostrou ser capaz de aumentar a taxa de transporte de elétrons, indicando que esses compostos atuam como desacopladores. Nenhum efeito foi observado sobre a taxa de transporte de elétrons quando os compostos foram avaliados em condições desacopladas. Do total de compostos sintetizados neste trabalho, quatro deles não apresentaram nenhum efeito sobre a fotossíntese *in vitro*. É interessante observar que, para os compostos ativos, pequenas variações na estrutura levaram a diferentes mecanismos de ação, conforme pode ser observado comparando-se as estruturas dos compostos **17** e **18**.

No tocante aos ensaios de avaliação de fitotoxicidade contra as espécies pepino e sorgo, um dos aspectos mais relevantes relaciona-se à seletividade observada. Observou-se que os efeitos inibitórios foram mais pronunciados sobre a espécie dicotiledônea (sorgo) quando comparado à espécie monocotiledônea (pepino). Seletividade é um dos aspectos mais importantes na pesquisa e desenvolvimento de novos agroquímicos.

É possível dizer que as substâncias sintetizadas e avaliadas nesse trabalho podem corresponder a estruturas-modelo que podem ser exploradas na busca por novos agentes de controle de plantas daninhas.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Vendas de produtos formulados por classe de uso – Brasil (2º semestre de 2010 e 1º semestre de 2011). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>>. Acesso em: novembro de 2012.

BARUAH, N.C.; SARMA, J.C.; SARMA, S.; SARMA, R.P. Seed germination and growth cadinenes from *Eupatorium adenophorum* Spreng. *J. Chem. Ecol.*, v. 20, p. 1885-1892, 1994.

BECKIE, H. J. Herbicide-resistant weeds: management tactics and practices. *Weed Technology*, v. 20, p.793-814, 2006.

DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; VEIGA, T. A. M.; BARRETO, R. W.; KING-DIAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B. Phytotoxic constituents from *Nimbya alternantherae*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 34, p. 790-795, 2006.

DEVINE, M. D.; SHUKLA, A. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protection*, v. 19, p. 881-889, 2000.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; KAGAN, I. A.; BAERSON, S. R. New herbicide target sites from natural compounds. In: Clark, J.M., OHKAWA, H. (Eds.). *ACS Symposium Series, 892. New discoveries in Agrochemicals*, 2005. p.151-160.

DUPÂQUIER, J. Malthus, Thomas Robert (1766–1834). *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences*, p. 9151-9156, 2001.

- ENCYCLOPEDIA BRITANICA DO BRASIL. *Encyclopedia Britanica do Brasil* Publicações Ltda; São Paulo – SP, 12ª Edição, 1990.
- GRESSEL, J. Evolving understanding of the evolution of herbicide resistance. *Pest Management Science*, v. 65, p. 1164-1173, 2009.
- HANSCH, C.; LEO, A. *Exploring QSAR- Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*. Washington, DC: ACS Professional Reference Book, 1995. 557 p.
- HEAP, I. International survey of herbicide resistant weeds. Disponível em <<http://www.weedscience.org>>. Acesso em: 20 Jan. 2013.
- KROGMANN, D. W.; JAGENDORF, A. T.; AVRON, M. Uncouplers of spinach chloroplast photosynthetic phosphorylation. *Plant physiology*, v. 34, p. 272-277, 1958.
- LEHNINGER, A. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1991. 725 p.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.
- NÍCOLAS, F. M. Uma síntese sobre aspectos da fotossíntese. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 11, n. 2, p. 10-14, 2011.
- PEREIRA, J. L. Síntese e Avaliação do Efeito Inibitório Sobre o Transporte de Elétrons da Fotossíntese de Derivados de Isobenzofuran-1(3H)-onas. DISSERTAÇÃO, Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 2012.

SILVA, A. A.; VARGAS, L.; FERREIRA, E. A. *Herbicidas: Resistência de plantas*. In: SILVA, A. A., SILVA, J. F. (Eds.). *Tópicos em manejo de plantas daninhas*. Editora UFV: Viçosa, 2007. p. 279-324.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719 p

VASCONCELOS, R.M.R.R.A.; DORFMAN, B.; BUYS, M.C.; REZENDE, J. A.; MORAES, K.O.C.; OLIVEIRA, R.P. *Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental*. Brasília: Ibama, 2010.

VENCIL, W.; GREY, T.; CULPEPPER, S. *Resistance of weeds to herbicides*. In: KORTEKAMP, A. (Ed.). *Herbicides and Environment*. Croatia: In Tech, 2011, p. 585-594.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DAS ISOBENZOFURANONAS C-3 FUNCIONALIZADAS

4.1. Introdução

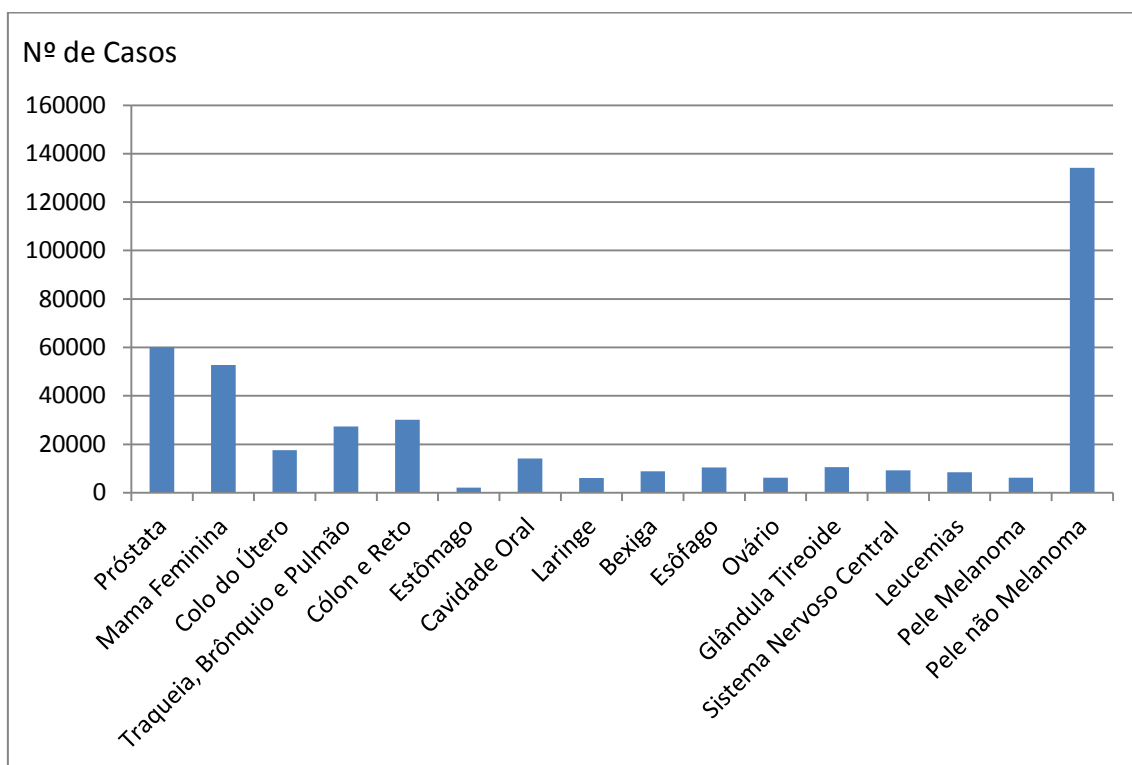
Segundo o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2011)

“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”.

No ano de 2008, estima-se que 7,6 milhões de pessoas ao redor do mundo morreram vítimas de câncer. De acordo com projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS), no período compreendido entre 2005 e 2015, 84

milhões de pessoas morrerão em decorrência desta doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). O câncer é a principal causa de mortes em países desenvolvidos e a segunda causa de mortes em países subdesenvolvidos.

No Brasil, estimativas para o ano de 2012 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011) apontavam para o surgimento de 518.510 novos casos de câncer. Estima-se que o câncer de pele não-melanoma (134 mil casos) seria o mais incidente na população brasileira, seguido pelo câncer de próstata (60 mil casos) e câncer de mama feminino (52 mil casos), Figura 1.



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2011). Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil.

Figura 1 – Tipos de câncer mais incidentes, projetados para 2012, na população brasileira.

Os três principais tipos de tratamento do câncer são a radioterapia, a cirurgia e a quimioterapia. No que tange à quimioterapia, são utilizados fármacos com o objetivo primário de destruir as células neoplásicas (células cancerígenas), preservando-se as células normais. Vários quimioterápicos já foram descobertos, citando-se como exemplos a cisplatina (comercialmente Platinil[®] ou Platinol[®]), a mitoxantrona (Novantrone[®]), o mitotano (Lysodren[®]), o etoposídeo (VP-16), a doxorrubicina (e seus congêneres), a procarbazina (Natulanar[®]) e o taxol[®], Figura 2. A busca por compostos cada vez mais eficientes no combate ao câncer é uma área de intensa pesquisa.

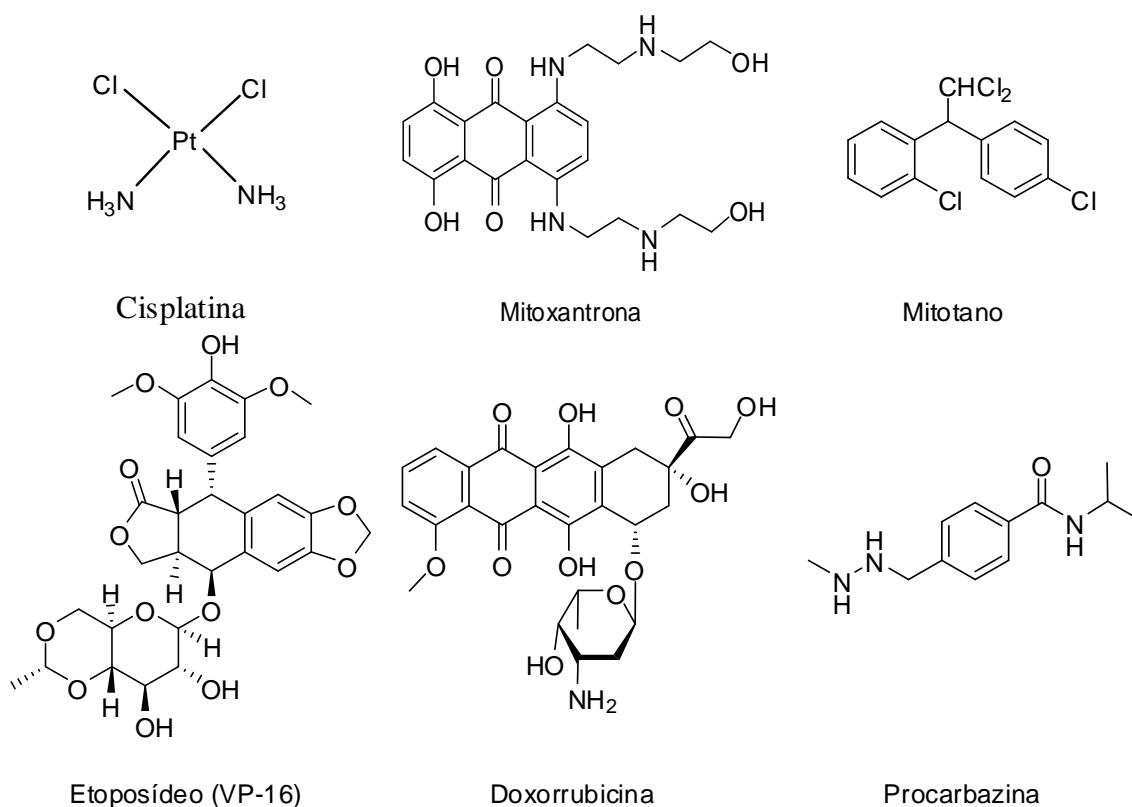
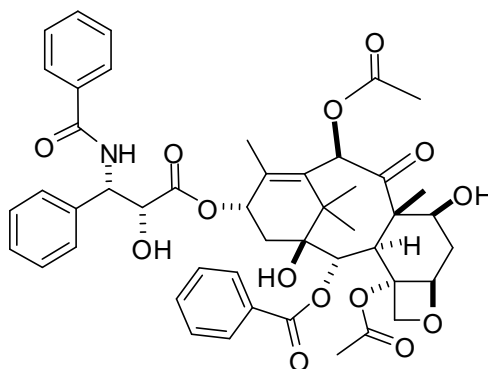


Figura 2 – cont.



Taxol

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

Conforme salientado anteriormente, as isobenzofuran-1(3*H*)-onas possuem diversas atividades biológicas. Na busca por novos fármacos que possam evitar o crescimento desordenado de células, ensaios de avaliação de atividade antiproliferativa vêm sendo realizados com isobenzofuranonas funcionalizadas na posição C-3. LOGRADO e colaboradores (2010) sintetizaram as isobenzofuranonas da Figura 3 (p.108) a partir de ácidos anacárdicos. As isobenzofuranonas **28** e **29** apresentaram significativa atividade antiproliferativa sobre três linhagens celulares de câncer humano. Em especial, **28** mostrou efeito antiproliferativo significativo contra células HL-60 (leucemia, IC_{50} 3,24 μ g mL⁻¹) e atividade moderada contra as linhagens celulares SF-295 (glioblastoma, IC_{50} 10,09 μ g mL⁻¹) e MDA-MB-435 (melanoma, IC_{50} 8,70 μ g mL⁻¹).

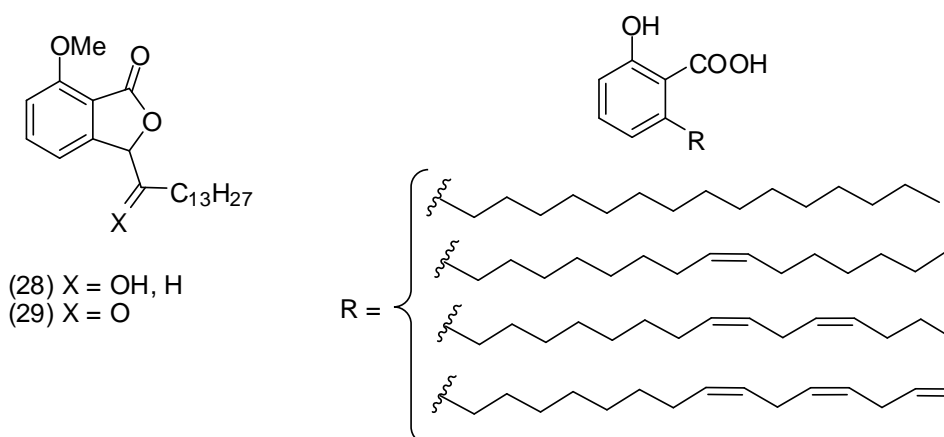


Figura 3 – Estrutura das isobenzofuranonas **28** e **29** sintetizadas a partir de ácidos anacárdicos de diferentes grupos substituintes R.

As substâncias da Figura 4 foram avaliadas por GE e colaboradores (2008) contra quatro linhagens de células tumorais SW1116 (câncer de cólon, IC_{50} 54,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para **30** e IC_{50} 60,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para **31**), K562 (leucemia mielóide, IC_{50} 21,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para **30** e IC_{50} 54,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para **31**), KB (carcinoma epitelial da boca, IC_{50} 29,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para **30** e IC_{50} 46,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para **31**) e HELA (carcinoma cervical, IC_{50} 35,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para **30** e IC_{50} 41,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para **31**).

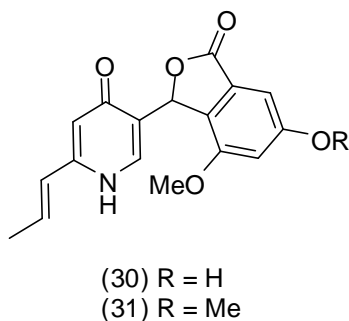


Figura 4 – Estruturas de isobenzofuranonas testadas contra algumas linhagens celulares tumorais.

Assim, considerando-se as atividades antiproliferativas de isobenzofuranonas C-3 funcionalizadas previamente descritas na literatura, realizou-se uma investigação do efeito antiproliferativo do ácido fitalaldeídico e das isobenzofuranonas sintetizadas neste trabalho (Figura 4, Capítulo 2, p.24), contra as linhagens celulares U937 (linfoma) e K562 (leucemia mielóide). Neste capítulo são descritos os resultados desse estudo.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Avaliação da atividade antiproliferativa

As linhagens de células humanas U937 (linfoma) e K562 (leucemia mielóide) foram adquiridas da ATCC (Rockville, MD, EUA). Elas foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St, Louis, EUA), suplementado com 10% soro fetal bovino (LGC, Campinas, Brasil), estreptomicina 100 µg/ml e 100 U/mL de penicilina, a 37 °C sob 5,0% de atmosfera de CO₂. Para avaliar a atividade antiproliferativa dos compostos **16** a **27**, as células U937 e K562 foram cultivadas em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) com uma densidade de 2,0 x 10⁴ células por poço em diferentes concentrações (0-100 µmol L⁻¹) dos compostos **16** a **27**, do ácido fitalaldeídico e do etoposídeo (VP-16, Figura 2, p.107). A viabilidade celular foi determinada por colorimetria pelo método modificado do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) ensaio (Sigma Aldrich, St, Louis, EUA). Após 24 e/ou 48 h, MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado aos poços (2 h, 37 °C), seguindo-se a remoção de uma solução de MTT e adição de 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, St, Louis, EUA), para solubilizar os cristais de formazan. As

absorvâncias foram medidas a 540 nm e cada análise foi realizada em quadruplicata.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Descrição dos resultados dos ensaios de avaliação da atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa das isobenzofuran-1(3*H*)-onas **16** a **27** e do ácido fitalaldeídico foi avaliada segundo o método MTT (MOSMAN, 1983) em colaboração com grupo de pesquisa do professor Gustavo Costa Bressan do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. 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 da célula viável, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas.

As isobenzofuranonas **16** a **27** e o ácido fitalaldeídico foram avaliadas em concentrações de 1, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em quadruplicata. Nesse caso, os experimentos foram analisados segundo suas médias de inibição. Os compostos **16** a **27** e o ácido fitalaldeídico foram biologicamente avaliados em relação a linhagens de célula U937 (linfoma) e K562 (leucemia mielóide), em comparação com DMSO (1%) e etoposídeo (VP-16, Figura 2, p.107). Os resultados encontrados são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Efeitos inibitórios^a (%) dos compostos **16** a **27** e do ácido fitalaldeídico sobre a viabilidade de células K562 (média ± SD; n = 4)

Compostos	1 $\mu\text{mol L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Ácido fitalaldeídico	44,16 ± 3,59	41,71 ± 1,01	26,71 ± 3,91
16	49,69 ± 0,68	45,85 ± 3,07	36,18 ± 1,00
17	37,71 ± 2,20	49,33 ± 4,70	56,82 ± 1,36
18	26,77 ± 0,99	56,10 ± 3,58	63,70 ± 0,21
19	31,42 ± 1,18	38,38 ± 3,04	38,54 ± 4,24
20	40,59 ± 2,47	44,32 ± 1,08	43,64 ± 3,85
21	37,88 ± 3,86	69,63 ± 0,92	80,05 ± 0,28
22	32,87 ± 3,20	23,93 ± 3,04	31,64 ± 2,93
23	20,33 ± 1,13	65,61 ± 2,42	77,73 ± 2,01
24	12,48 ± 3,57	54,56 ± 2,97	71,76 ± 3,73
25	39,87 ± 4,43	43,86 ± 1,92	49,38 ± 2,50
26	46,11 ± 4,1	45,9 ± 3,39	37,61 ± 0,38
27	20,64 ± 1,91	18,60 ± 2,65	21,84 ± 3,39

^a Inibição (%) após 48h de tratamento contínuo (n = 4), normalizado contra células K562 tratadas com 1% DMSO (n = 4),

Tabela 2 - Efeitos inibitórios^a (%) dos compostos **16** a **27** e do ácido fitalaldeídico sobre a viabilidade de células U937 (média ± SD; n = 4)

Compostos	1 $\mu\text{mol L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Ácido fitalaldeídico	28,00 ± 2,75	30,73 ± 2,12	28,81 ± 2,05
16	32,34 ± 1,93	28,58 ± 1,62	29,43 ± 2,76
17	25,57 ± 2,50	31,10 ± 3,53	29,86 ± 1,70
18	33,87 ± 0,92	61,33 ± 1,98	83,91 ± 0,92
19	20,38 ± 3,04	27,01 ± 3,68	24,72 ± 1,48
20	35,03 ± 2,05	27,03 ± 0,61	22,37 ± 1,13
21	36,63 ± 1,98	67,68 ± 1,77	90,78 ± 0,21
22	26,75 ± 2,12	45,31 ± 1,91	39,10 ± 0,92
23	11,64 ± 0,28	58,86 ± 2,62	90,82 ± 0,43
24	23,14 ± 3,19	25,46 ± 3,13	23,12 ± 3,43
25	24,33 ± 0,47	30,98 ± 1,04	34,14 ± 0,49
26	27,63 ± 0,92	31,85 ± 0,99	33,58 ± 2,71
27	5,72 ± 1,27	21,17 ± 1,48	29,29 ± 2,02

^a Inibição (%) após 48h de tratamento contínuo (n = 4), normalizado contra células U937 tratadas com 1% DMSO (n = 4).

Conforme pode ser percebido, após 48 horas de tratamento, os compostos **18**, **21** e **23** foram os mais eficazes na redução da viabilidade de ambas as linhagens de células testadas (Tabelas 1 e 2). O composto **24** também inibiu a proliferação, embora apenas individualmente, contra a

linhagem K562. Embora os valores de IC₅₀ obtidos para os compostos **18**, **21** e **23** sugerem um efeito moderado em células U937, uma forte atividade inibitória foi observada para os compostos **21** e **23** contra células K562 (IC₅₀ 1,71 e 2,79 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, Tabela 3 e Figura 5, p.114). Além disso, estas atividades inibitórias foram ainda superiores àquelas observadas para o etoposídeo (VP-16, Figura 2, p.107) (IC₅₀ 7,82 $\mu\text{mol L}^{-1}$), uma droga antineoplásica utilizada em vários tratamentos quimioterápicos, inclusive contra a leucemia.

Tabela 3 - Valores de IC₅₀ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)^a obtidos para as linhagens de células K562 e U937 tratadas com os compostos **18**, **21** e **23** e controle positivo etoposídeo (VP-16)

Linhagem de célula	Composto 18		Composto 21		Composto 23		Etoposídeo (VP16)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
K562	89,38	66,81	10,35	1,71	5,54	2,79	0,13	7,82
U937	67,93	71,39	59,8	46,63	64,22	62,97	1,31	0,60

^a IC₅₀: concentração dos compostos requerida para inibir 50% da viabilidade celular, determinada após 48h de tratamento contínuo (n = 4).

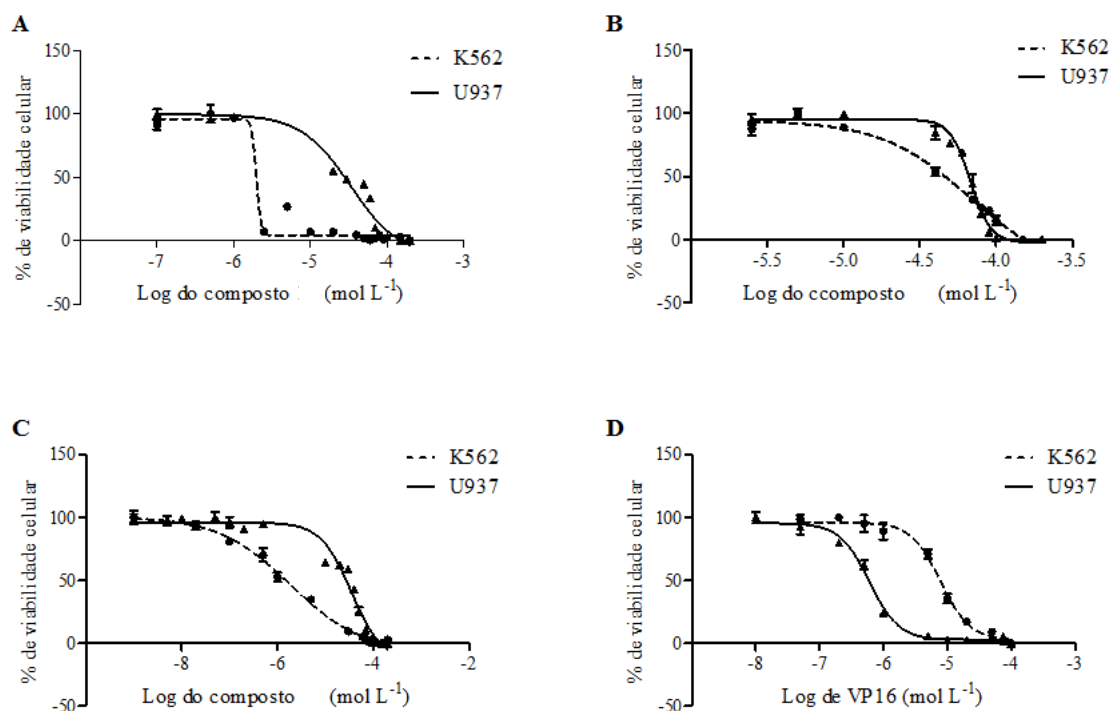


Figura 5 - Perfil de dose-resposta dos compostos **23** (A), **18** (B), **21** (C) e controle positivo VP16 (D) na viabilidade de células K562 e U937. Linhagens de célula K562 e U937 foram tratados por 48h com quantidades crescentes das substâncias indicadas. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata.

4.3.2. Relação estrutura-atividade e cálculos *in silico* de propriedades físico-químicas das substâncias 16 a 27 e do ácido fitalaldeídico

Considerando-se os bons resultados observados nos ensaios de avaliação de atividade antiproliferativa das isobenzofuranonas estudadas nesse trabalho e o potencial terapêutico dos compostos do tipo isobenzofuran-1(3*H*)-onas, cálculos computacionais foram realizados para determinação de parâmetros físico-químicos dos compostos **16** a **27** e do ácido fitalaldeídico. Esses parâmetros influenciam as propriedades farmacocinéticas, tais como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). A triagem foi

realizada para avaliar se as substâncias podem apresentar características de candidatos a fármacos com base na regra dos cinco de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 1997) e outros critérios relacionados descritos por Veber e colaboradores (VEBER *et al.*, 2002). Estas características, teoricamente, determinam se um composto apresenta boa absorção na membrana e permeabilidade através da mesma, umas das propriedades necessárias para tornar um medicamento ativo por via oral em seres humanos.

Os parâmetros moleculares analisados foram coeficiente de partição *n*-octanol/água ($\text{LogP} \leq 5$), o número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD ≤ 5), o número de receptores de ligação de hidrogênio (HBA ≤ 10), a massa molecular dos compostos ($\text{MM} \leq 500$), número de ligações capazes de sofrerem rotação ($\text{nRotb} < 10$) e a área de superfície polar ($\text{PSA} < 140 \text{ \AA}^2$). Os valores entre parênteses representam os valores ideais de acordo com Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 1997) e Veber (Veber *et al.*, 2002). Os parâmetros físico-químicos foram calculados usando os softwares Osiris Property Explorer (Tetko, 2005) e Molinspiration (MOLINSPIRATION CHENMINFORMATICS, 2012), ferramentas computacionais de uso livre que auxiliam na determinação de propriedades farmacocinéticas de candidatos a fármacos e vêm sendo utilizadas por diversos grupos de pesquisa (ALAFEEFY *et al.*, 2012; ALI *et al.*, 2012; MAHAJAN *et al.*, 2012; CHOCHAN *et al.*, 2010).

O software Osiris Property Explorer permite a avaliação de dados químicos e físico-químicos que influenciam as propriedades farmacocinéticas de uma substância. Os cálculos de toxicidade das substâncias e *drug-likeness*

realizados pelo software Osiris são baseados no método de fragmentos. O software pode calcular lipofilicidade, inferida a partir do valor de LogP, solubilidade em água, expresso como LogS, massa molecular, índices de *drug-likeness* e *drug-scores*. Elevada hidrofiliabilidade e, portanto, valores elevados de LogP, podem dificultar a absorção ou a penetração da substância. Além disso, o software Osiris calcula vários parâmetros das substâncias, como os riscos de toxicidade (mutagênico, irritante, carcinogênico e efeitos reprodutivos), *drug-likeness* e *drug-scores* (LIPINSKI, 2004; PROUDFOOT, 2012). Cálculos de LogP e massa molecular, bem como a área de superfície total polar (TPSA), número de ligações que podem sofrer rotação (nRotB), número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD), número de receptores de ligação de hidrogênio (HBA) e pontuações de bioatividade (JARRAHPOUR, 2012) podem também ser determinadas pelo software Molinspiration. As Tabelas 4 (p.117) e 5 (p.121) mostram os resultados dos cálculos baseados nestes pacotes computacionais.

Tabela 4 - Propriedades *drug-likeness* previstas e riscos de toxicidade dos compostos **16** a **27**, do ácido fitalaldeídico e do etoposídeo calculados pelo software Osiris

Composto	<i>Biodisponibilidade e Drug-Score</i>							Violações da Regra de Lipinski	<i>Riscos de Toxicidade^a</i>			
	cLogP	LogS	MM	HBD	HBA	<i>drug-likeness</i>	<i>drug-Score</i>		M	T	I	R
AC	0,64	-1,68	150,0	1	3	-4,65	0,49	0	-	-	-	-
16	1,78	-2,71	244,0	1	4	-6,63	0,46	0	-	-	-	-
17	2,55	-2,66	242,0	2	4	-4,26	0,46	0	-	-	-	-
18	3,10	-3,54	326,0	2	6	-6,34	0,40	0	-	-	-	-
19	1,98	-2,87	258,0	1	4	-3,61	0,46	0	-	-	-	-
20	2,87	-3,01	256,0	2	4	-5,25	0,44	0	-	-	-	-
21	3,41	-3,88	340,0	2	6	-7,52	0,38	0	-	-	-	-
22	2,78	-3,30	286,0	1	4	-4,20	0,43	0	-	-	-	-
23	3,65	-3,53	284,0	2	4	-6,33	0,39	0	-	-	-	-
24	4,19	-4,41	368,0	2	6	-8,59	0,32	0	-	-	-	-
25	2,25	-3,05	272,0	1	4	-3,58	0,45	0	-	-	-	-
26	2,32	-4,04	278,0	0	4	-4,12	0,41	0	-	-	-	-
27	1,29	-2,42	230,0	0	4	-3,95	0,48	0	-	-	-	-
Etoposídeo	0,53	-3,95	588,0	3	13	-0,28	0,39	2	-	-	-	-

AC, ácido fitalaldeídico; cLogP, lipofilicidade calculada; logS, logaritmo da solubilidade aquosa medida em mol,L⁻¹; MM, massa molecular; HBD, número de doadores de ligações de hidrogênio; HBA, número de receptores de ligações de hidrogênio; M, efeito mutagênico; T, efeito teratogênico; I, efeito irritante; R, efeito reprodutivo, ^aClassificados de acordo com: (-), nenhum efeito negativo; (±), efeito negativo médio; (+), efeito negativo

Um parâmetro utilizado para avaliar se uma substância poderá apresentar uma adequada absorção em sistemas biológicos é o valor de cLogP. Como indicativo de uma boa absorção, o valor de cLogP não deve ser superior a 5,0. Os valores de cLogP das isobenzofuranonas **16** a **27** e do ácido fitalaldeídico são maiores do que o valor do etoposídeo (VP-16), o que sugere que a hidrofobicidade dos derivados isobenzofuranonas é maior do que a do composto usado como controle positivo nos ensaios biológicos. Normalmente, as drogas que interagem com enzimas no interior do corpo humano possuem valores de LogP compreendidos entre 2 e 5 (TAMBUNAN, 2011). Nesse sentido, os compostos estudados apresentam valores dentro desta faixa (Tabelas 4 e 5).

Alertas de risco de toxicidade são uma indicação de que a estrutura de um composto pode ser prejudicial. A análise teórica dos riscos de toxicidade para estas séries usando o software Osiris revelou que todos os compostos examinados apresentaram potencial para não serem mutagênicos, carcinogênicos e irritantes, além de apresentarem potencial para não interferir na reprodução de mamíferos (Tabela 4). Estes compostos também foram avaliados como potenciais drogas através dos cálculos *drug-likeness*, mostrando valores negativos (entre -8,59 e -3,58, Tabela 4), indicando que os compostos **16** a **27** e do ácido fitalaldeídico não contêm fragmentos que estão frequentemente presentes em medicamentos comerciais (LIPINSKI, 2004; PROUDFOOT, 2012).

A solubilidade em água de um composto afeta significativamente a sua absorção bem como suas características de distribuição. Em geral, é desejável a obtenção de compostos que sejam solúveis no meio biológico. Um parâmetro para avaliar a solubilidade é LogS. Mais de 80% dos fármacos disponíveis no mercado possuem valores estimados de LogS superiores a -4 (ALAFEET *et al.*, 2012). No caso dos compostos **24** e **26**, os valores de LogS (-4,41 e -4,04, respectivamente) são mais baixos, em comparação com os outros na série (Tabela 4).

Valores de *drug-score* podem ser utilizados para avaliar o potencial global do composto que o qualifica como uma potencial droga. Os valores são a combinação de *drug-likeness*, o risco de toxicidade, e de alguns parâmetros físico-químicos, tais como o cLogP, solubilidade e de massa molecular (LIPINSKI, 2004; PROUDFOOT, 2012). Estes valores seriam utilizados para avaliar o potencial de um candidato a fármaco. Conforme pode ser observado na Tabela 4, os valores de *drug-score* dos compostos **16** a **27** e do ácido fitalaldeídico são comparáveis ou superiores em relação à droga comercial Etoposídeo (VP-16).

O número de aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) foi estimado considerando o número de átomos de nitrogênio e de oxigênio na estrutura química. O número de receptores de ligação de hidrogênio (HBD) correspondeu a soma dos átomos de hidrogênio ligados aos átomos de oxigênio e nitrogênio (LIPINSKI, 2004). Os valores destes parâmetros para os compostos **16** a **27** e do ácido fitalaldeídico estão dentro do limite estabelecido

pelas regras de Lipinski. Esta regra sugere que duas ou mais violações para um composto podem representar problemas de biodisponibilidade (LIPINSKI *et al.*, 2001). Todos os compostos da Tabela 5 apresentam ausência de violação da regra de Lipinski, ao contrário do Epotosideo (VP-16), que possui duas violações da regra.

Tabela 5 - Cálculos de *drug-likeness* dos compostos **16** a **27**, do ácido fitalaldeídico e do etoposídeo usando o software Molinspiration

Composto	Cálculos pelo Molinspiration					Cálculos da Pontuação de Bioatividade ^a					
	cLogP	TPSA ^b	NONI ^c	Volume	nRotB	GPCRL	ICM	KI	NRL	PI	EI
AC	0,895	46,533	1	126,015	0	-0,59	-0,04	-1,12	-0,62	-0,95	0,14
16	1,741	63,604	1	211,979	1	-0,60	-0,30	-1,40	-0,42	-0,68	-0,11
17	3,016	66,761	2	205,442	1	-0,29	-0,42	-0,31	-0,20	-0,56	-0,17
18	2,183	100,903	2	243,409	3	-0,01	-0,34	-0,18	-0,01	-0,25	-0,08
19	1,982	63,604	1	228,566	1	-0,58	-0,41	-1,35	-0,32	-0,60	-0,14
20	3,416	66,761	2	222,003	1	-0,29	-0,49	-0,30	-0,17	-0,56	-0,21
21	2,584	100,903	2	259,970	3	-0,04	-0,41	-0,21	-0,01	-0,27	-0,14
22	3,483	63,604	1	261,955	2	-0,39	-0,29	-1,15	-0,14	-0,35	-0,08
23	4,48	66,761	2	255,392	2	-0,13	-0,37	-0,20	0,03	-0,37	-0,11
24	3,647	100,903	2	293,359	4	0,03	-0,32	-0,19	0,08	-0,17	-0,07
25	2,394	63,604	1	244,803	1	-0,50	-0,39	-1,31	-0,27	-0,66	-0,20
26	2,394	60,447	0	233,259	1	-0,12	-0,35	-0,54	-0,05	-0,45	0,09
27	0,652	60,447	0	195,554	1	-0,26	-0,20	-0,85	-0,27	-0,49	0,04
^d Etop	0,698	160,861	3	493,508	5	0,18	-0,48	-0,38	-0,33	0,12	0,30

AC, ácido fitalaldeídico; ^a GPCRL: Ligante GPCR; ICM: Canal Modulador Iônico; KI: Inibidor de Quinase; NRL: Ligante de Receptor Nuclear; PI: Inibidor de Protease; EI: Inibidor de Enzima, ^b TPSA: Área de Superfície Polar Total, ^c NONI: número de interações OH–NH, ^d Etop: Etoposídeo

Além de LogP, a área total de superfície polar (TPSA) é um descritor importante para a previsão das propriedades de transporte de uma substância, incluindo a absorção intestinal, permeabilidade da monocamada das células Caco-2, e penetração na barreira sangue-cérebro (CLARK, 1999; ERTL *et al.*, 2000). Este parâmetro foi calculado utilizando o software Molinspiration com base na soma das superfícies pertencente a átomos polares (geralmente oxigênio, nitrogênio e hidrogênio) (JARRAHPOUR, 2012). Compostos com $TPSA \geq 140 \text{ \AA}^2$ tendem a apresentar baixa biodisponibilidade oral e $TPSA \leq 61 \text{ \AA}^2$ tendem para uma boa biodisponibilidade (CLARK, 1999). Considerando os valores de TPSA, espera-se que os compostos **16** a **27** e do ácido fitalaldeídico (Tabela 5) apresentem adequada biodisponibilidade, com base na faixa aceitável. No entanto, deve ser mencionado que $TPSA \leq 140 \text{ \AA}^2$ é um critério necessário, mas não suficiente para que uma substância possua apropriada biodisponibilidade.

O número de ligações capazes de sofrer rotação é um parâmetro topológico simples associado à flexibilidade molecular. Tem-se observado que este é um importante descritor quando se leva em conta a biodisponibilidade oral de drogas (VEBER *et al.*, 2002). Os compostos **18**, **21** e **24** apresentam uma maior flexibilidade entre os compostos testados com $nRotB = 3, 3, \text{ e } 4$, respectivamente, ao passo que a droga comercial Etoposídeo (VP-16) apresentou um valor igual a 5 (Tabela 5).

A bioatividade de todos os 13 compostos e do Etoposídeo (VP-16) foram analisados sob diferentes receptores normais do corpo humano, com seis critérios de atividade de drogas sendo observadas: atividade do ligante de GPCR, modulação de canais iônicos, inibição da atividade da quinase,

atividade de ligante de receptor nuclear, inibição da atividade de protease, e a atividade de inibição da enzima. Quanto maior o valor da atribuição numérica, melhor a probabilidade de uma molécula ser ativa. Os resultados destes parâmetros são apresentados (Tabela 5). Como o etoposídeo, todos os compostos estudados apresentam valores numéricos negativos para modulador de canal iônico e inibidor da quinase. Nas outras categorias, os valores para algumas isobenzofuranonas foram positivos.

4.4. CONCLUSÕES

Os ensaios de avaliação das atividades antiproliferativas das isobenzofuranonas **16** a **27** e do ácido fitalaldeídico contra duas linhagens de celulares, leucemia mielóide e linfoma, mostraram que duas substâncias (**21** e **23**) apresentaram valores de IC₅₀ de suas atividades inferiores ao do fármaco comercial etoposídeo (VP-16) para as células K562 (leucemia mielóide). Considerando a significativa atividade antiproliferativa apresentada por estas substâncias bem como as favoráveis propriedades físico-químicas determinadas *in silico*, pode-se dizer que as isobenzofuranonas investigadas correspondem a protótipos que podem ser explorados na busca por novos agentes quimioterápicos. Este aspecto é de relevância considerando que os quimioterápicos atualmente utilizados no tratamento do câncer são, frequentemente, citotóxicos e não específicos.

Embora nenhuma correlação direta foi encontrada entre as propriedades físico-químicas dos derivados isobenzofuranona e a atividade antiproliferativa, algumas generalizações podem ser feitas. Por exemplo, a presença do grupo acetila ligado ao anel benzênico dos compostos **17**, **18**, **20**, **21**, **23**, e **24** parece aumentar a atividade biológica. Como tendência geral, a ligação de grupos

alicíclicos ao núcleo isobenzofuranona produziu compostos com baixa ou moderada atividade antiproliferativa na concentração mais elevada (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Há uma aparente correlação entre os valores de cLogP com a atividade antiproliferativa destes compostos, uma vez que os compostos mais ativos possuem valores cLogP na faixa de 3,1-4,19. Os outros compostos apresentam valores inferiores de lipofilicidade.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAFEEFY, A. M.; ALGASOUMI, S. I.; ASHOUR, A. E.; MASAND, V.; AL-JABERR, N. A.; HADDA, T. B.; MOHAMED, M. A. Quinazoline-etyrphostin as a new class of antitumor agents, molecular properties prediction, synthesis and biological testing. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, p. 133-140, 2012.
- ALI, P.; MESHAM, J.; SHEIKH, J.; TIWARI, V.; DONGRE, R.; HADDA, T. B. Predictions and correlations of structure activity relationship of some aminoantipyrene derivatives on the basis of theoretical and experimental ground. *Medicinal Chemistry Research*, v. 21, p. 157-164, 2012.
- CHOHAN, Z. H.; SUMRRA, S. H.; YOUSOUFI, M. H.; HADDA, T. B. Metal based biologically active compounds: Design, synthesis, and antibacterial/antifungal/cytotoxic properties of triazole-derived Schiff bases and their oxovanadium(IV) complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 2739-2745, 2010.
- CLARK, D. E. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 1. Prediction of Intestinal Absorption. *Journal of Pharmacy Science*, v. 88, p. 807-814, 1999.

- ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, p. 3714-3717, 2000.
- GE, H. M.; SHEN, Y.; ZHU, C. H.; TAN, S. H.; DING, H.; SONG, Y. C.; TAN, R.X. Penicidones A–C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. *Phytochemistry*, v. 69, p. 571-576, 2008.
- JARRAHPOUR, A.; FATHI, J.; MIMOUNI, M.; HADDA, T. B.; SHEIKH, J.; CHOHAN, Z.; PARVEZ, A. Petra, Osiris and molinspiration (POM) together as a successful support in drug design: antibacterial activity and biopharmaceutical characterization of some azo Schiff bases. *Medicinal Chemistry Research*, v. 21, p. 1984-1990, 2012.
- LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today Technologies*, v.1, p. 337-341, 2004.
- LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Review*, v. 23, p. 3-25, 1997.
- LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Review*, v. 46, p. 3-26, 2001.
- 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

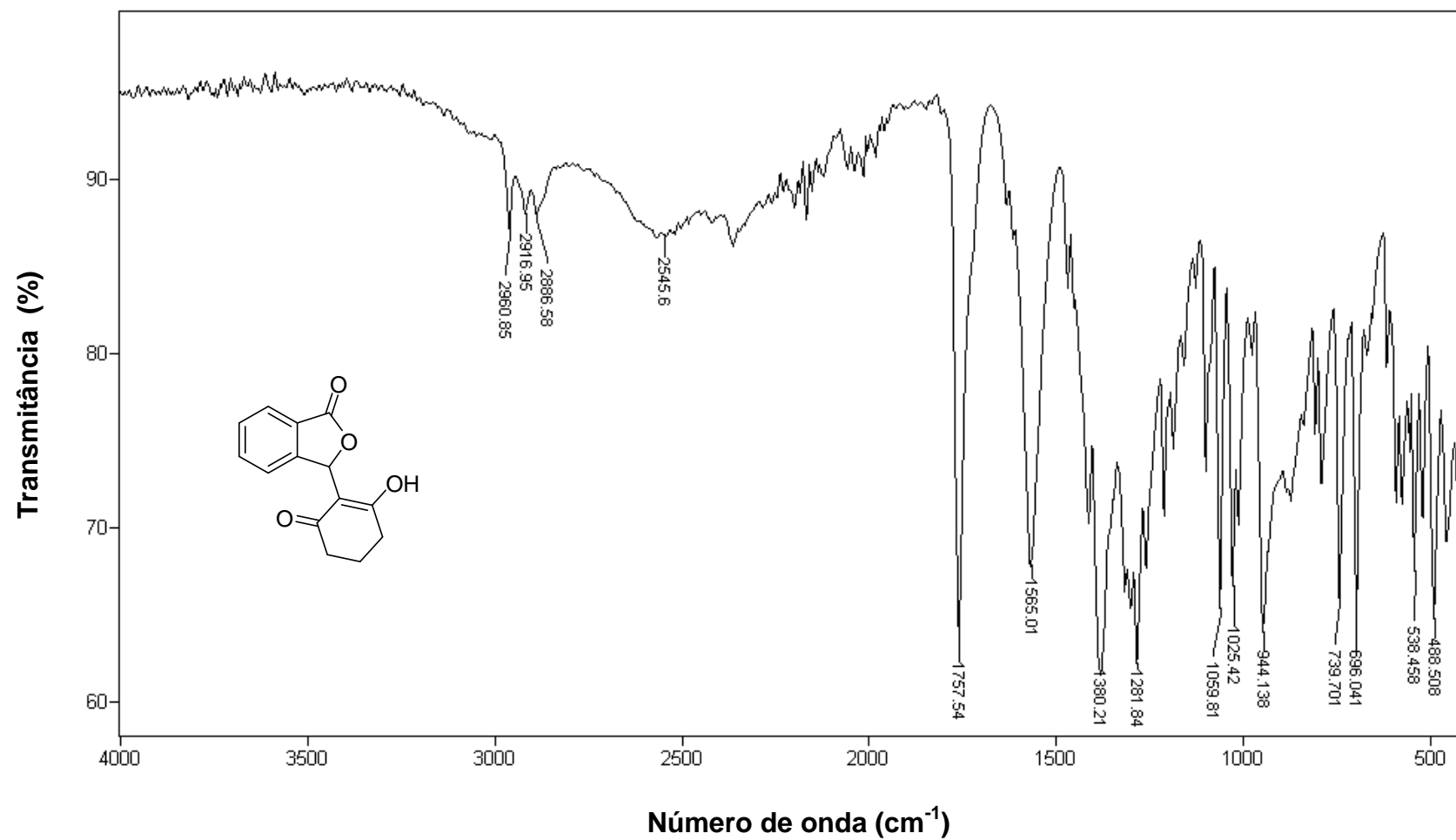
- cytotoxicity screening of substituted isobenzofuranones designed from anacardic acids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 3480-3489, 2010.
- MAHAJAN, D. T.; MASAND, V. H.; PATIL, K. N.; HADDA, B. T.; JAWARKAR, R. D.; THAKUR, S. D.; RASTIJA V. CoMSIA and POM analyses of anti-malarial activity of synthetic prodiginines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, p. 4827-4835, 2012.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2011). Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: outubro de 2012.
- MOLINSPIRATION CHENMINFORMATICS 2012. Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score. Disponível em: <<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>>. Acesso em: agosto de 2012.
- 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.
- PROUDFOOT, R. Drugs, leads, and drug-likeness: an analysis of some recently launched drugs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 12, p. 1647-1650, 2012.
- TETKO, I. V. Computing chemistry on the web. *Drug Discovery Today*, v. 10, p. 1497-1500, 2005.
- TAMBUNAN, U. S. F.; BRAMANTYA, N.; PARIKESIT, A. A. In silico modification of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) as potential inhibitor

for class II histone deacetylase (HDAC). *BMC Bioinformatics* 12 (Suppl 13):S23, 2011.

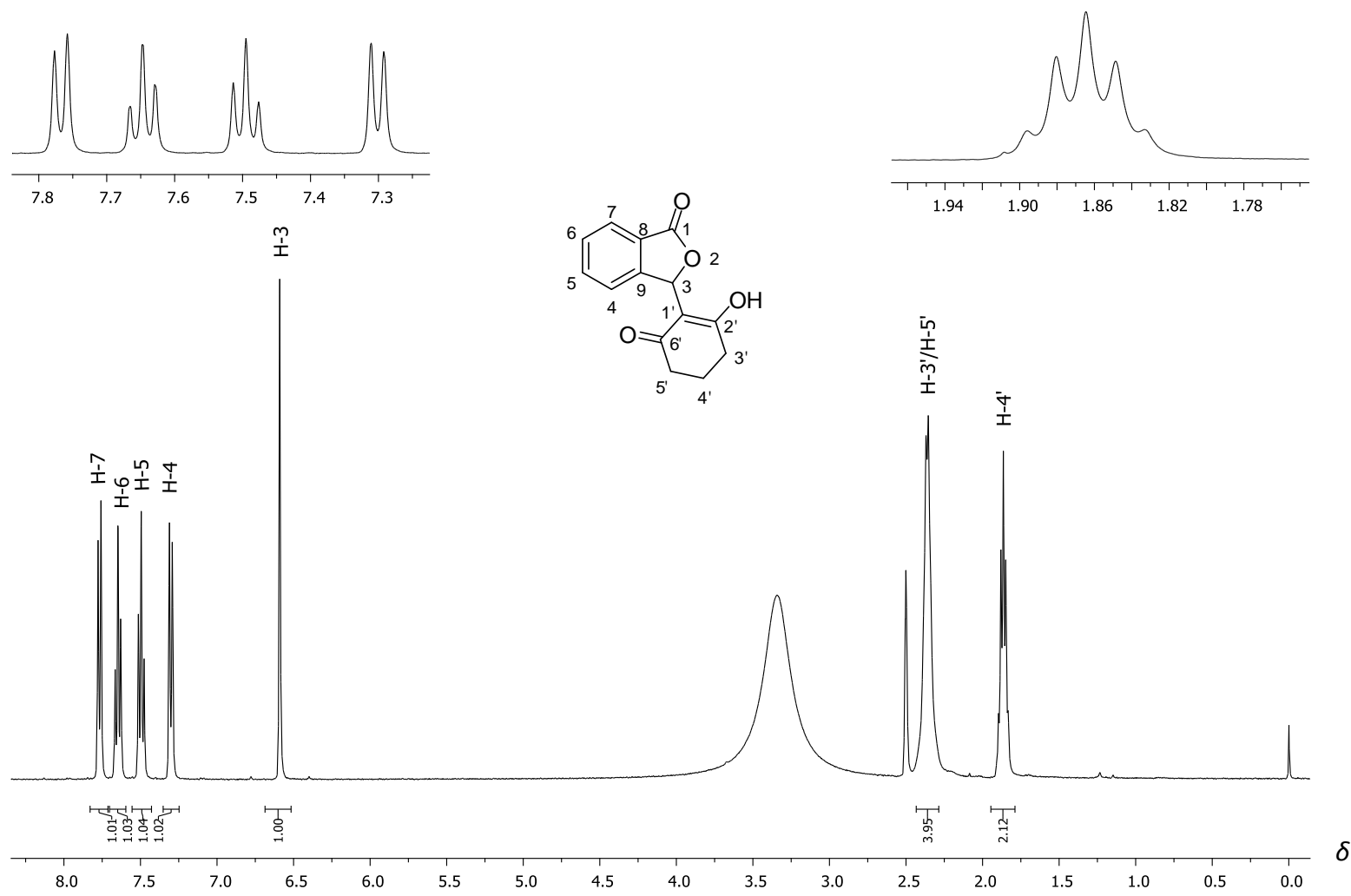
VEBER, D.F.; JOHNSON, S.R.; CHENG, H.Y.; SMITH, B.R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 2615-2623. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: setembro de 2012.

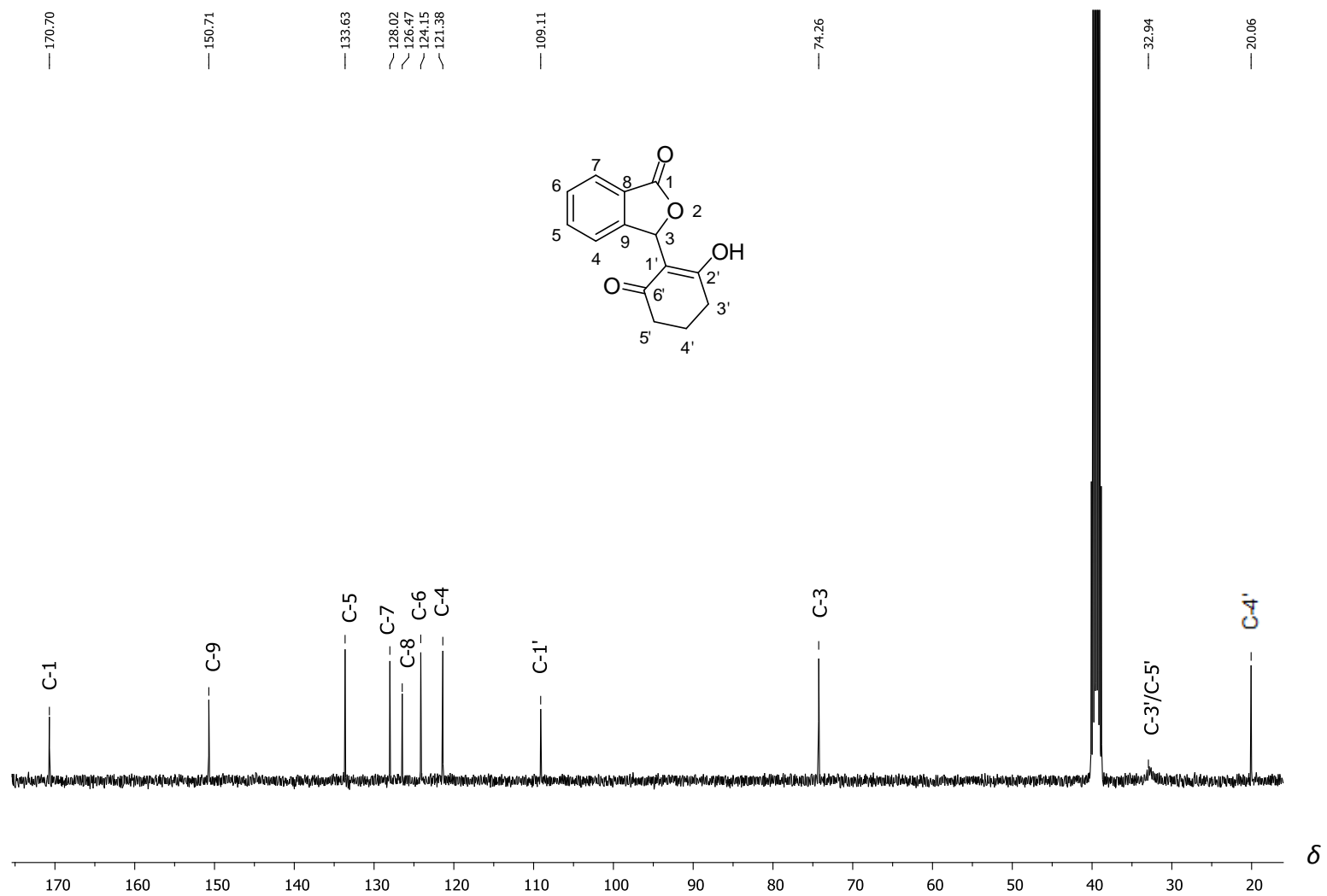
ANEXO 1
ESPECTROS



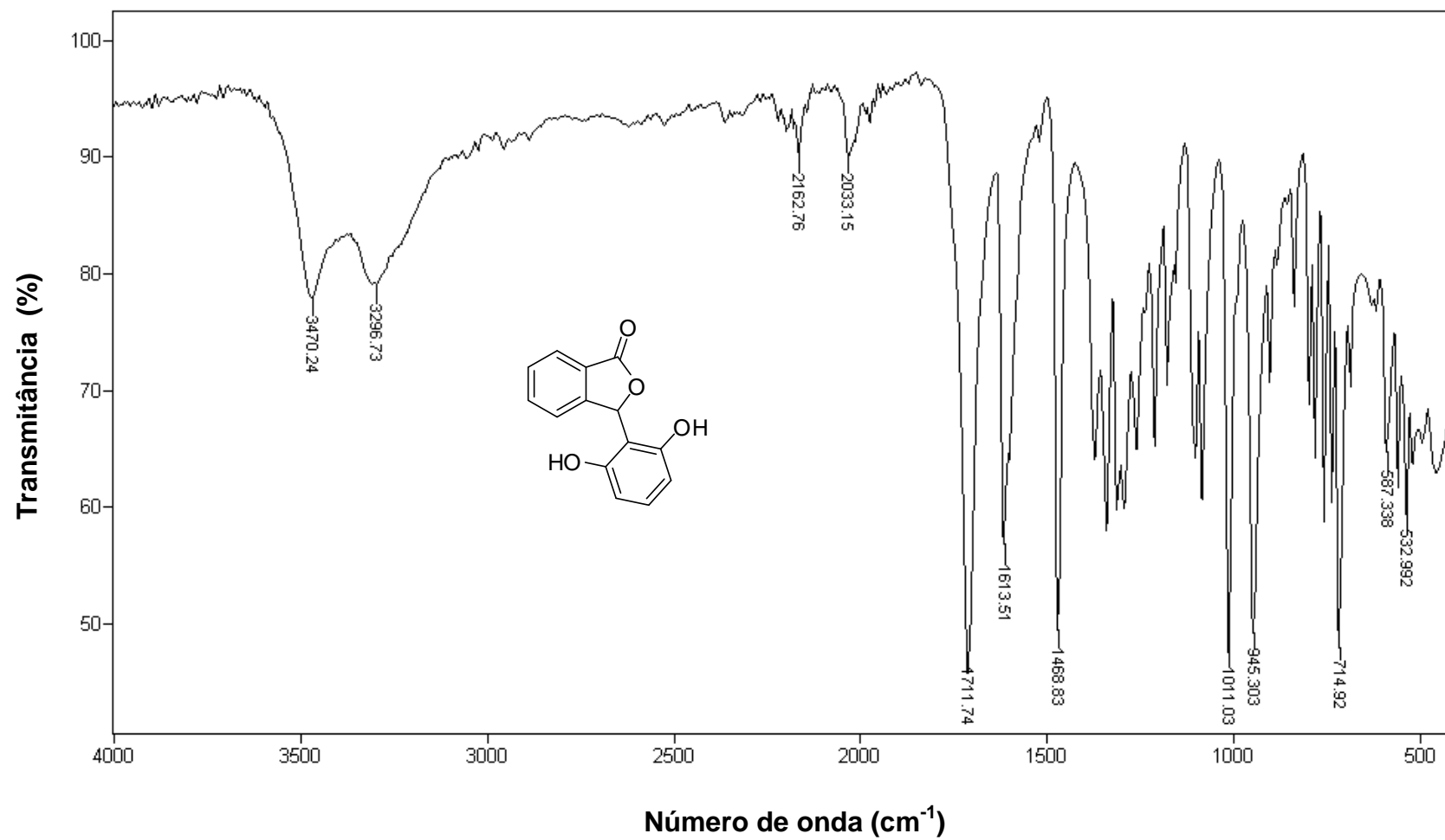
Espectro no Infravermelho (ATR) do Composto **16**.



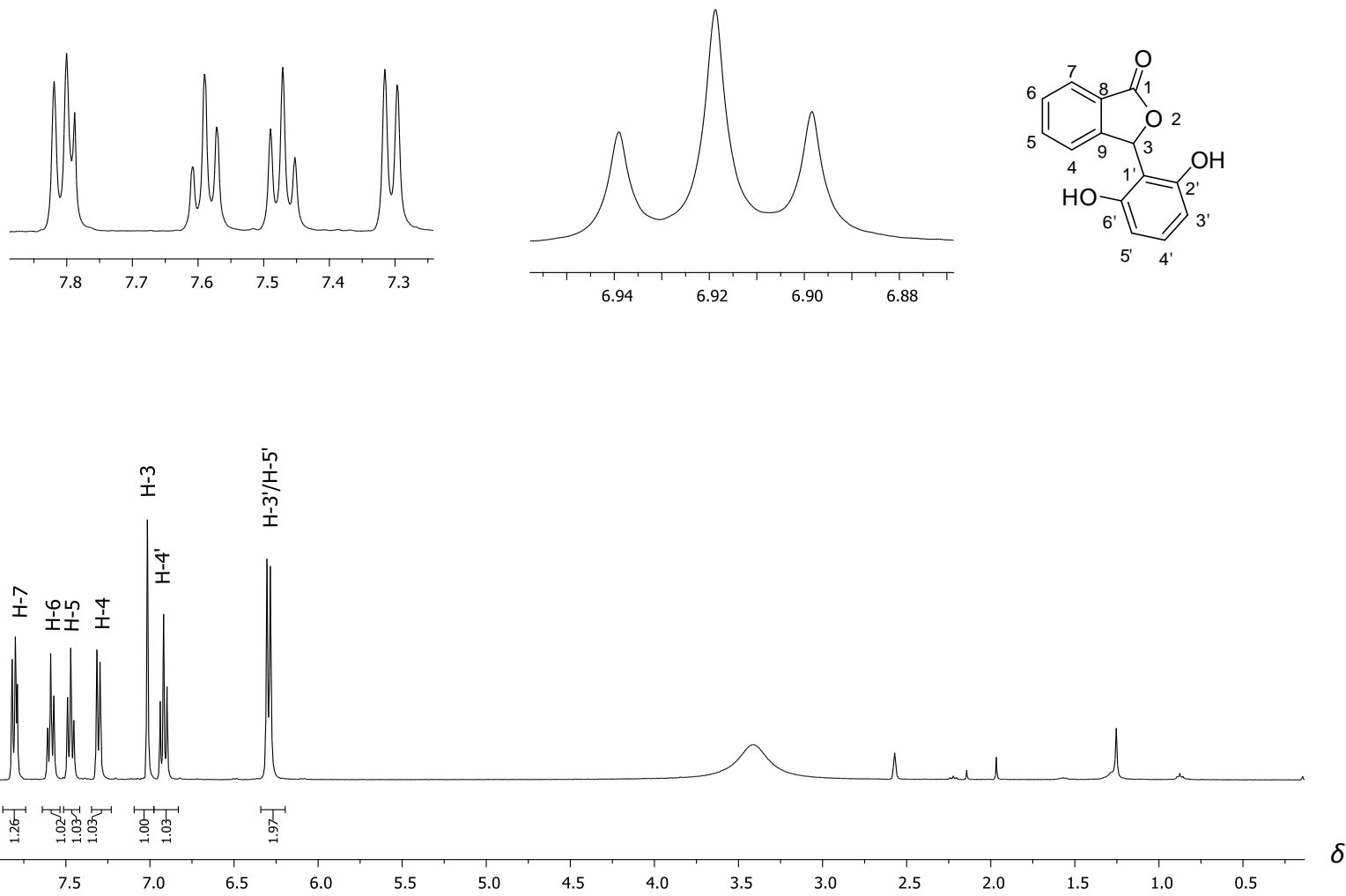
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) do composto **16**.



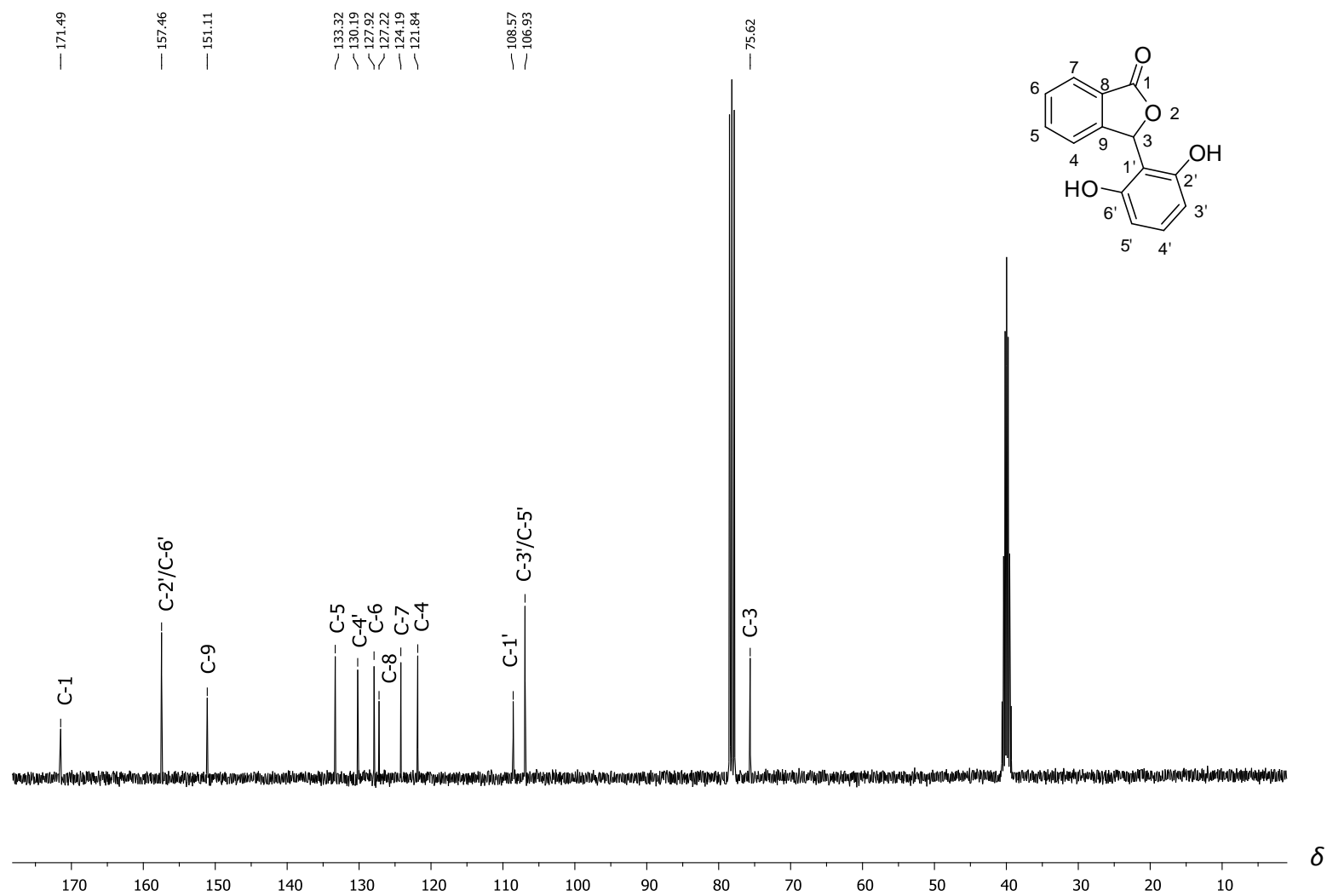
Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) do composto 16.



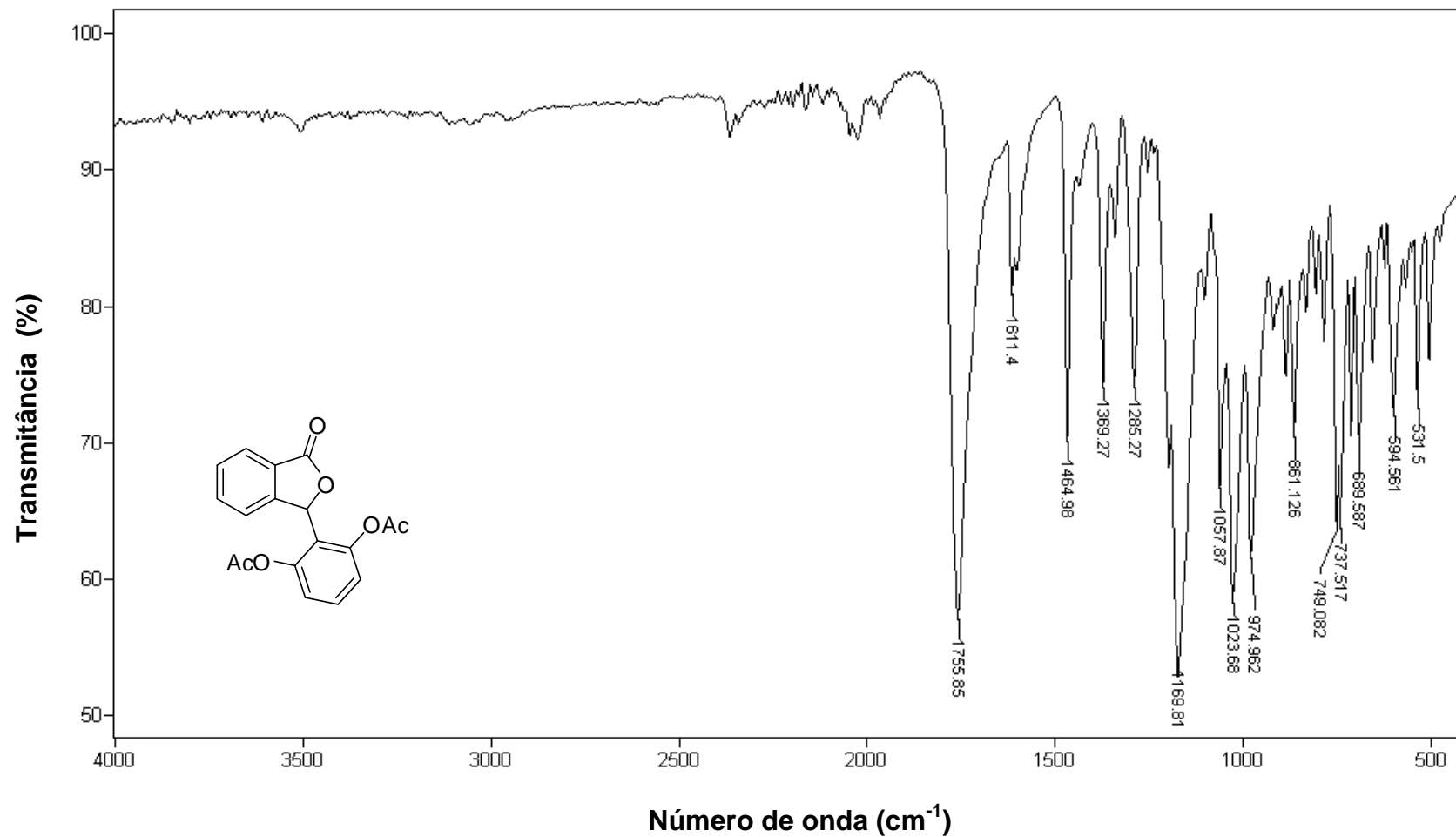
Espectro no Infravermelho (ATR) do Composto **17**.



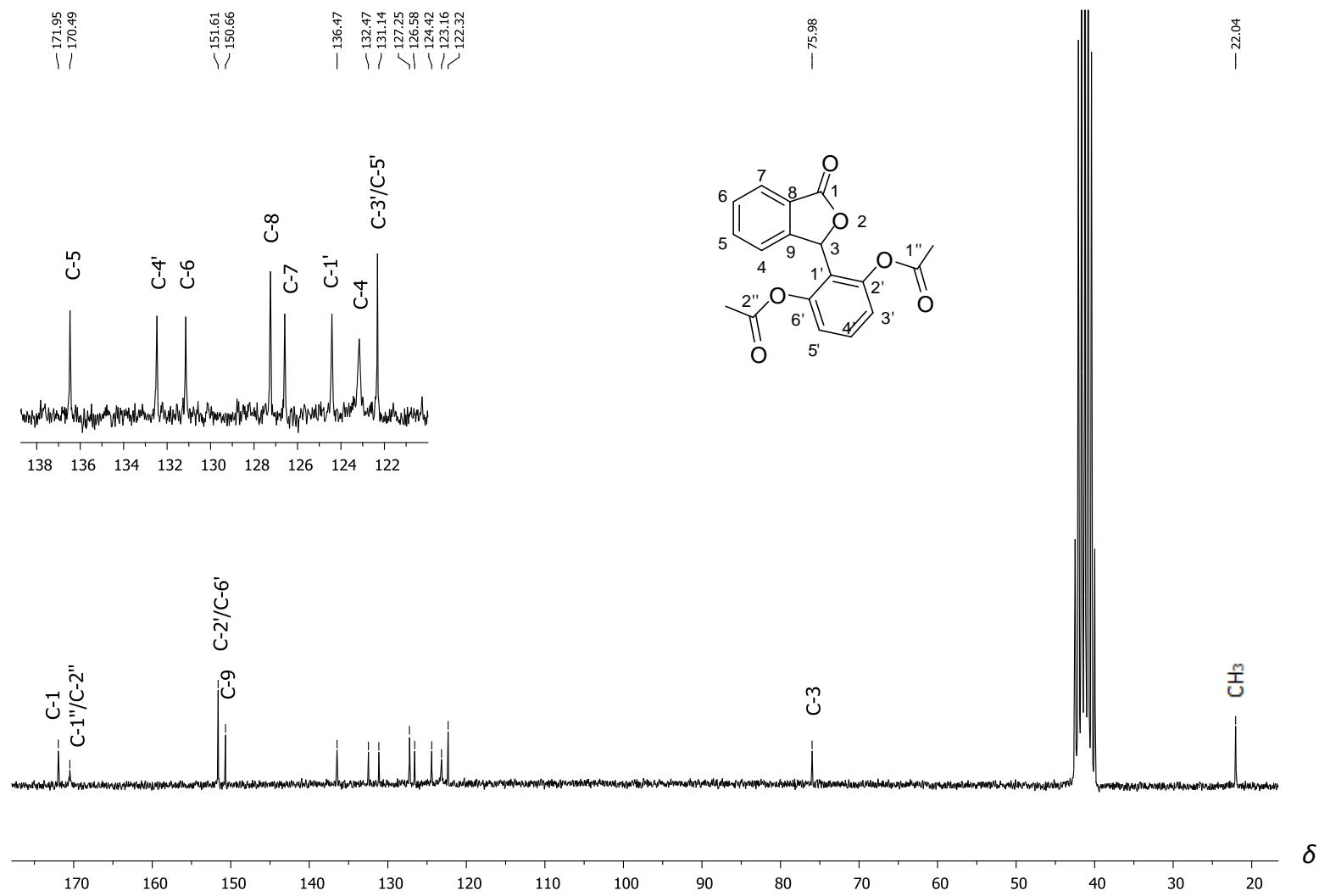
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$) do composto 17.



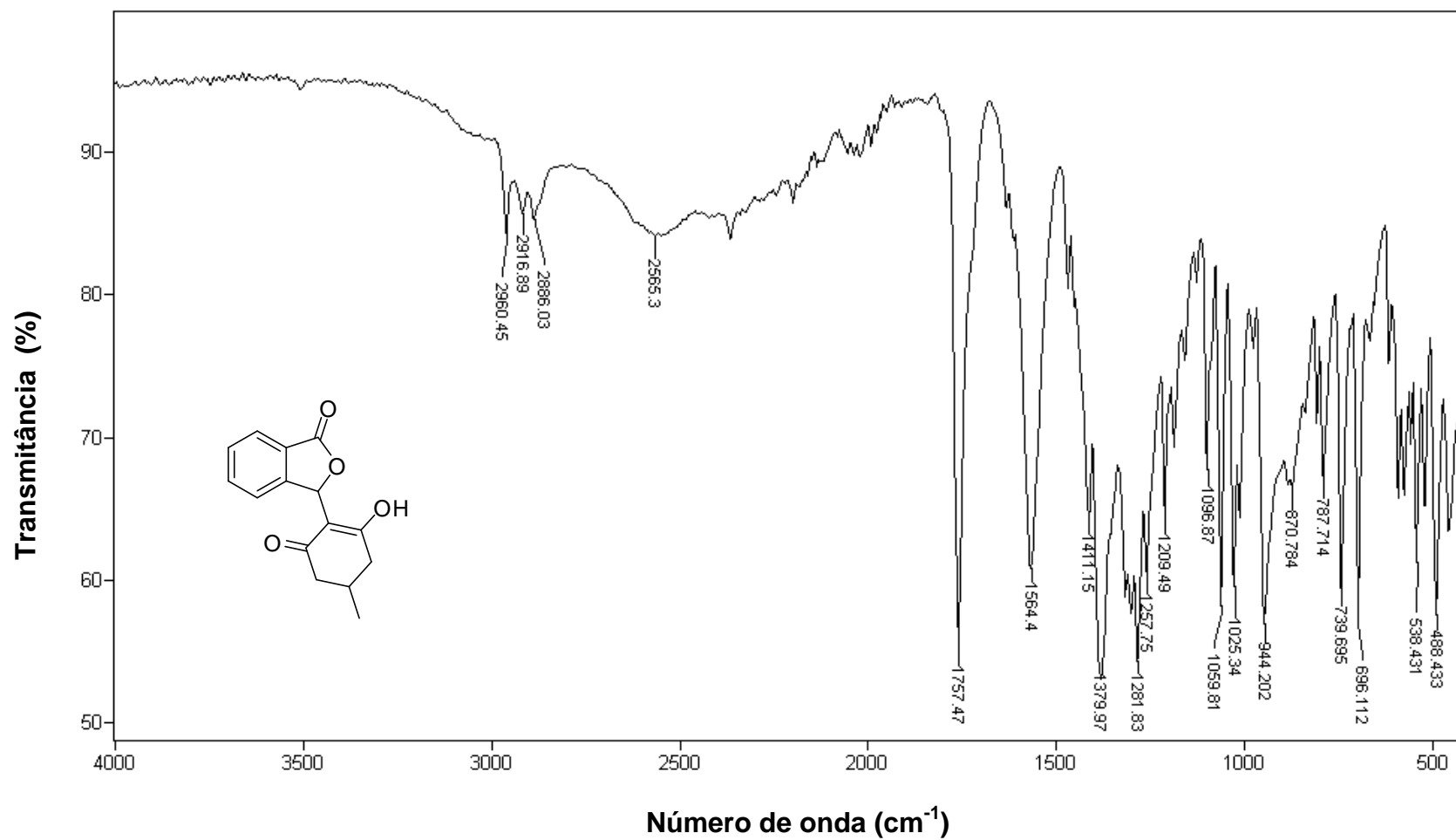
Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$) do composto 17.



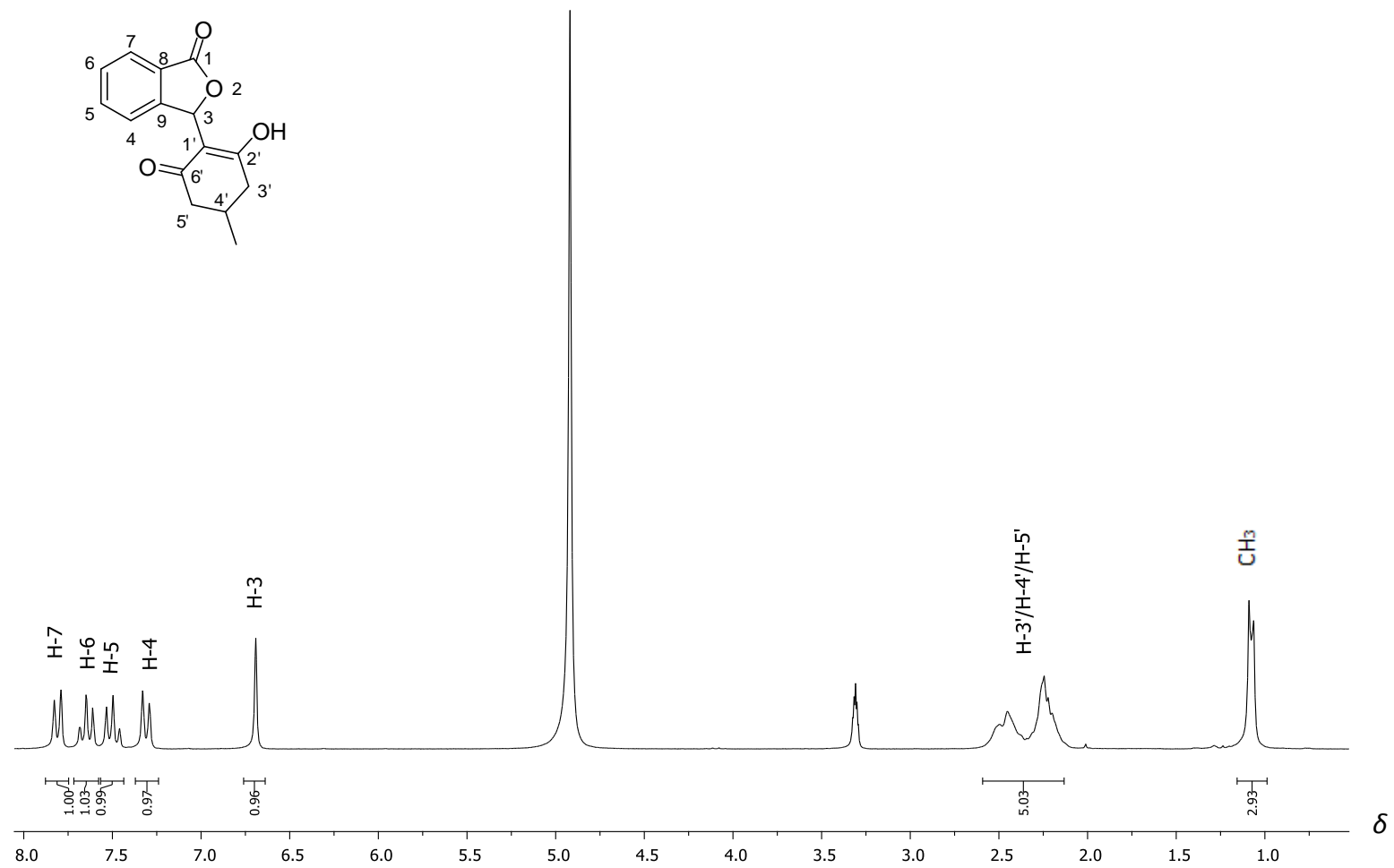
Espectro no Infravermelho (ATR) do Composto **18**.



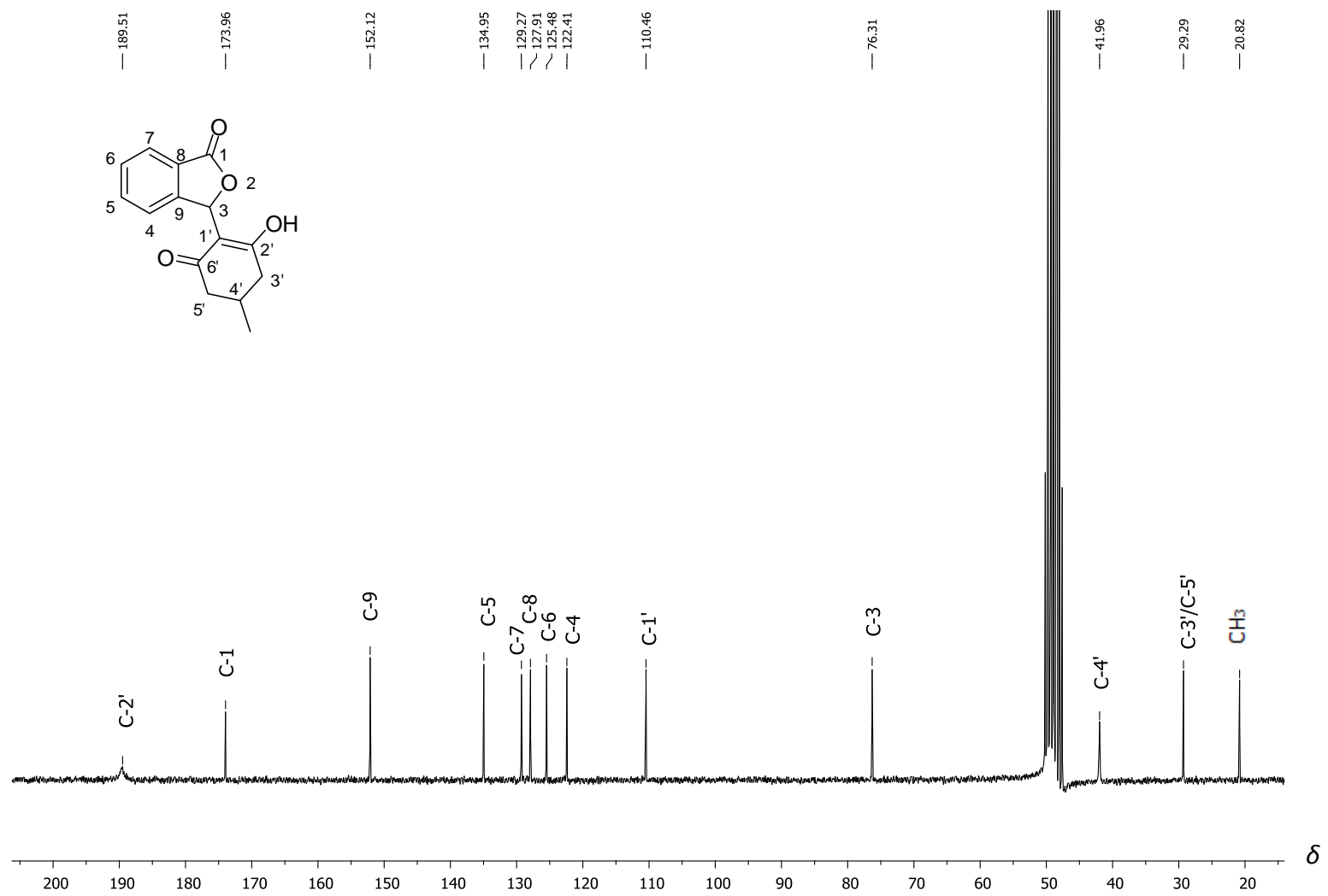
Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO) do composto 18.



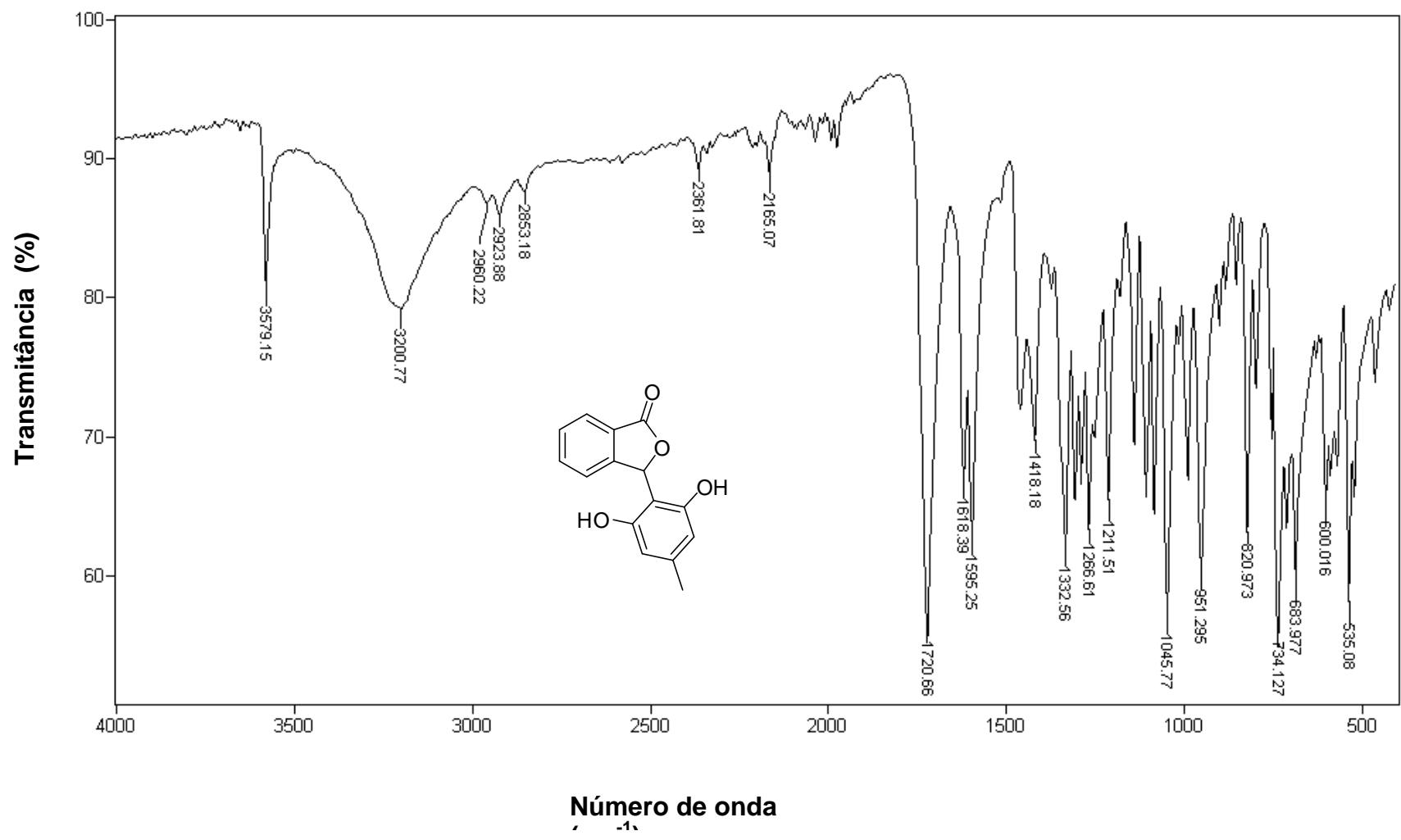
Espectro no Infravermelho (ATR) do Composto 19.



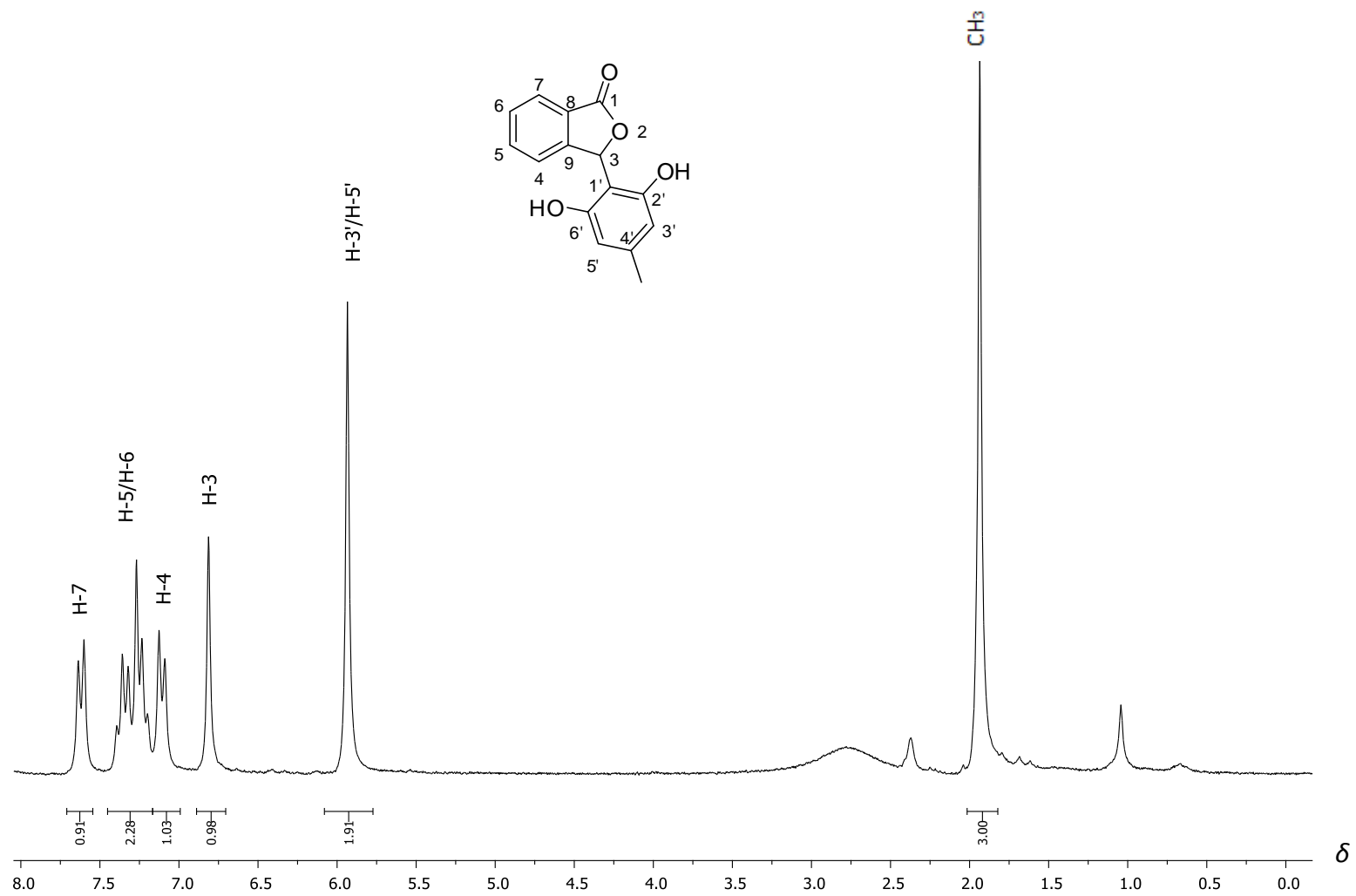
Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) do composto **19**.



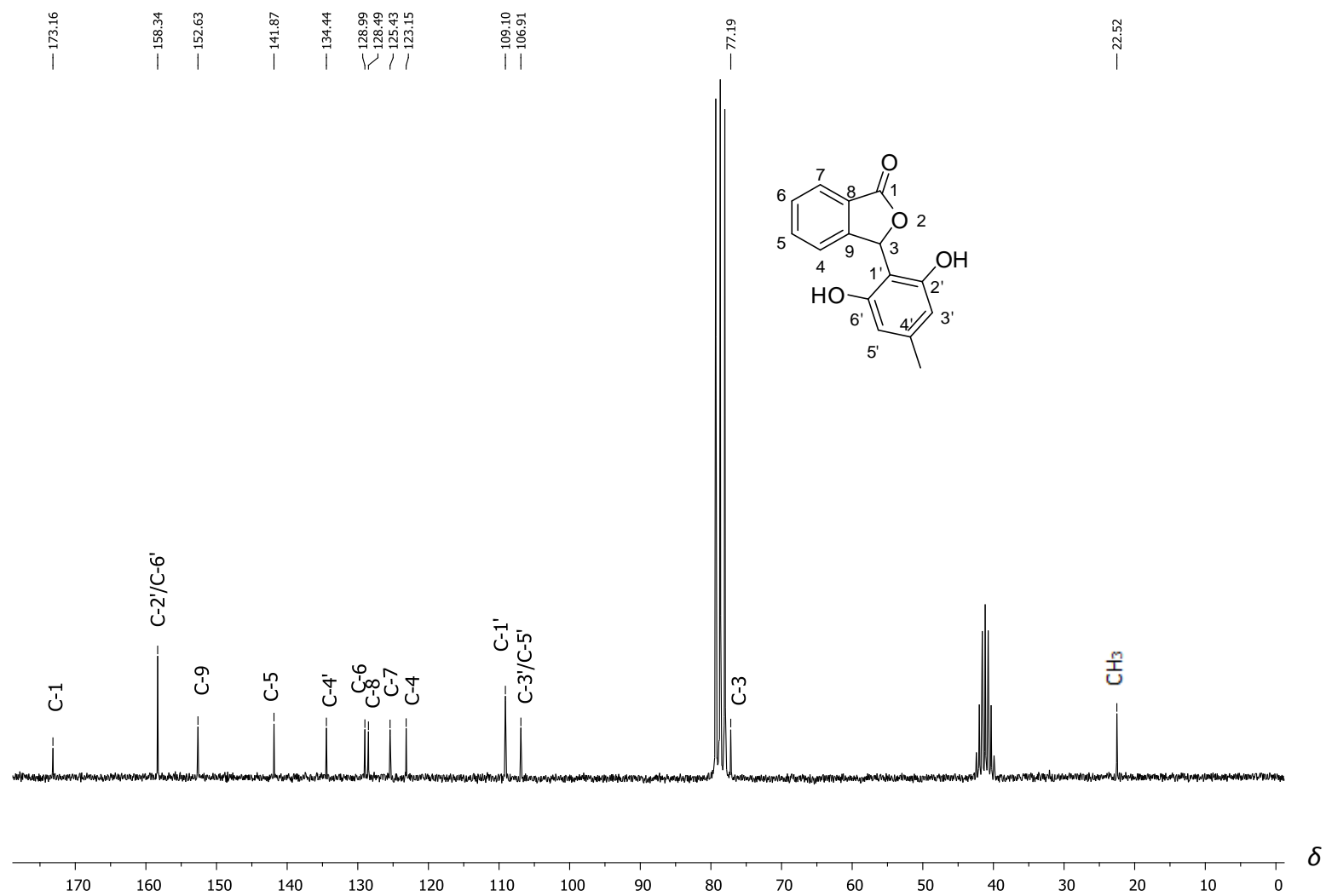
Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) do composto **19**.



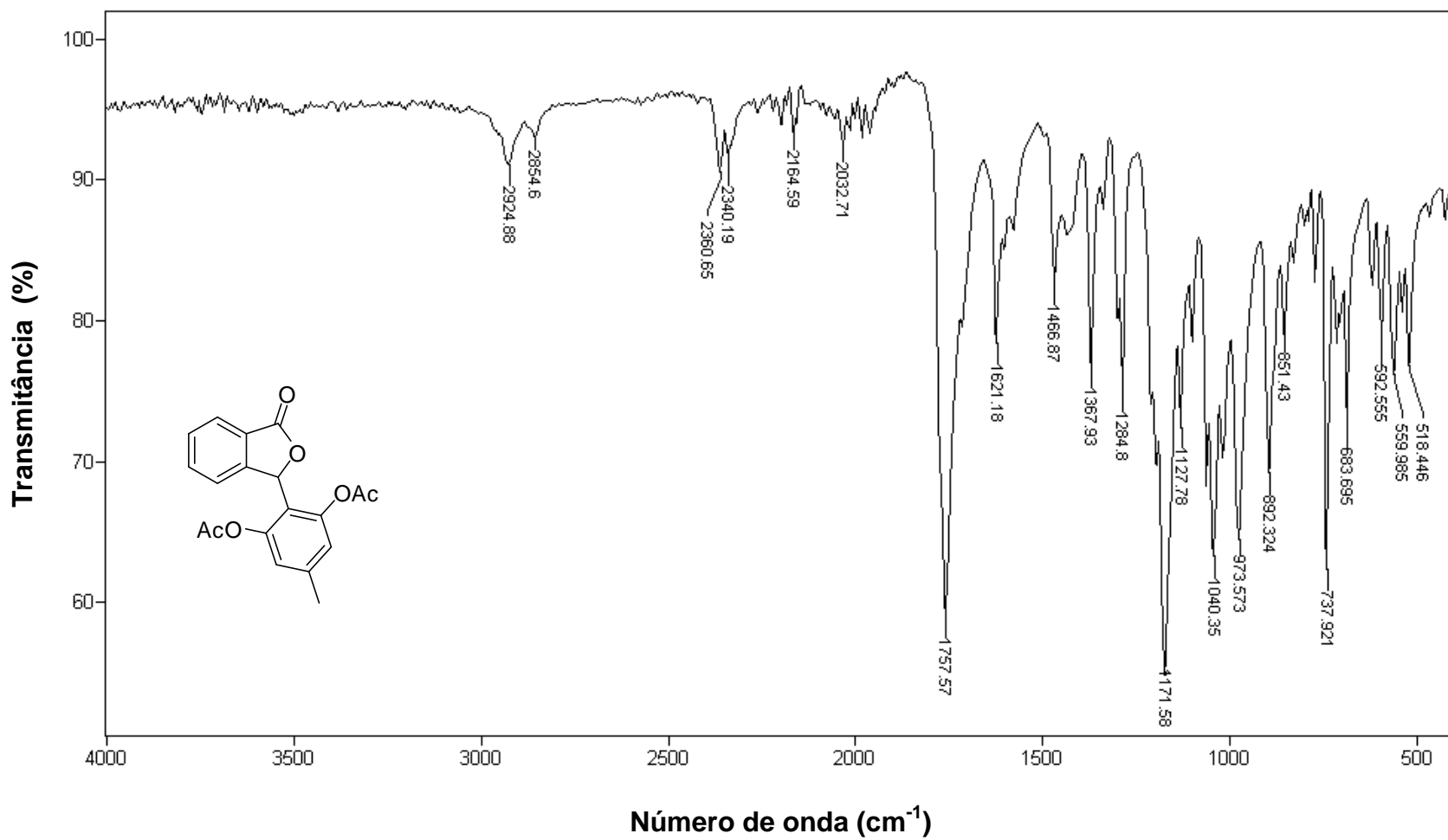
Espectro no Infravermelho (ATR) do Composto **20**.



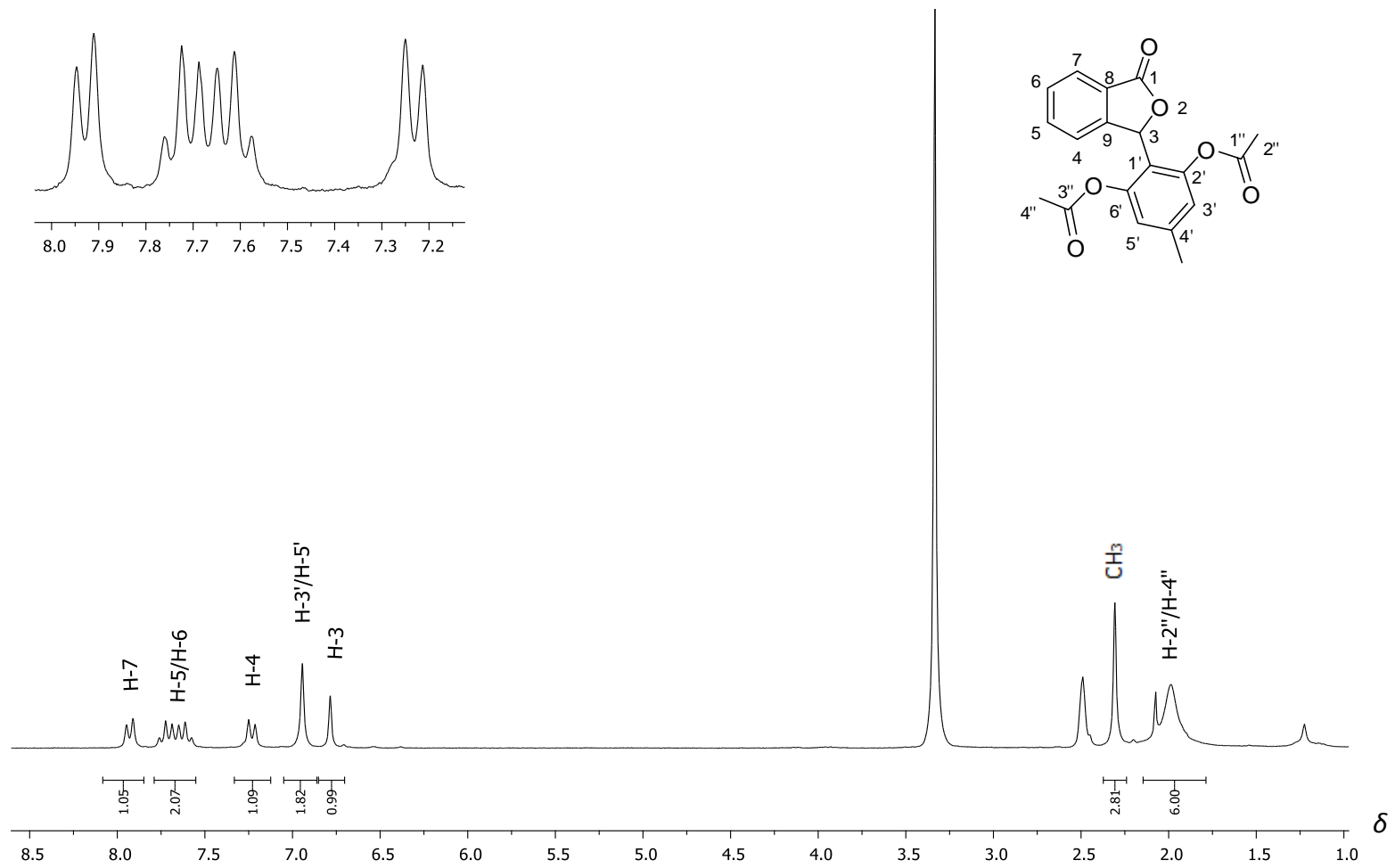
Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃/DMSO) do composto **20**.



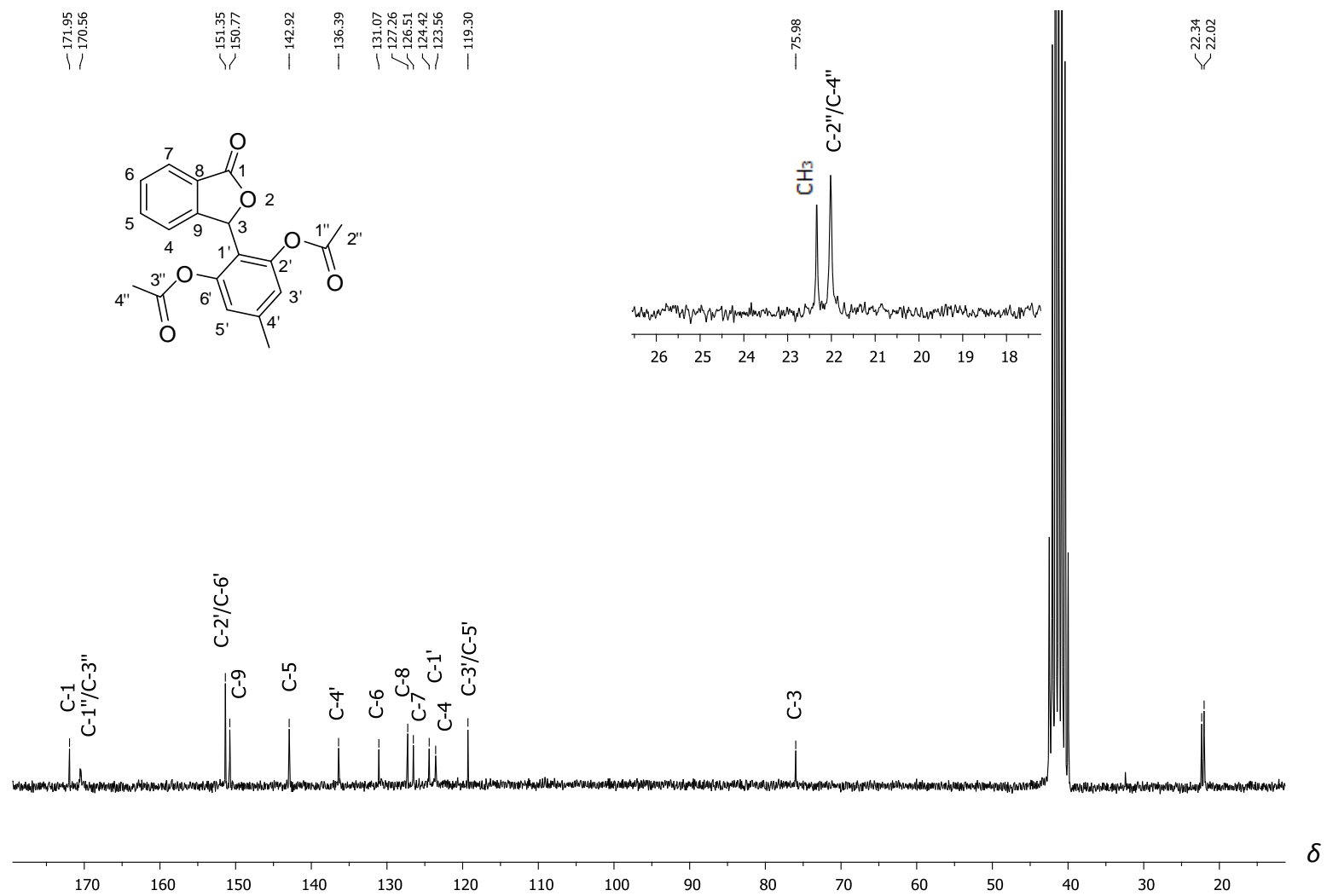
Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$) do composto **20**.



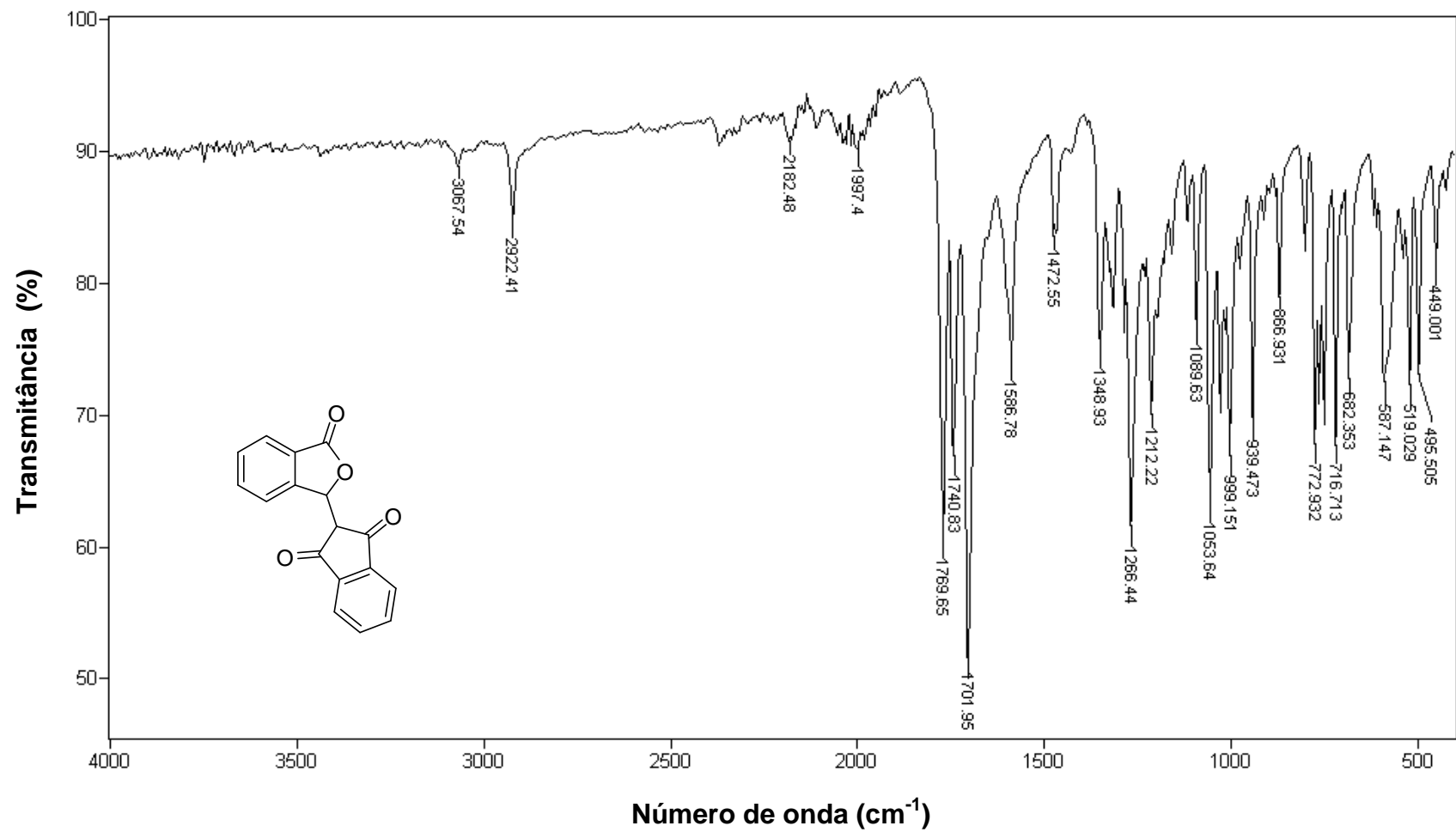
Espectro no Infravermelho (ATR) do Composto **21**.



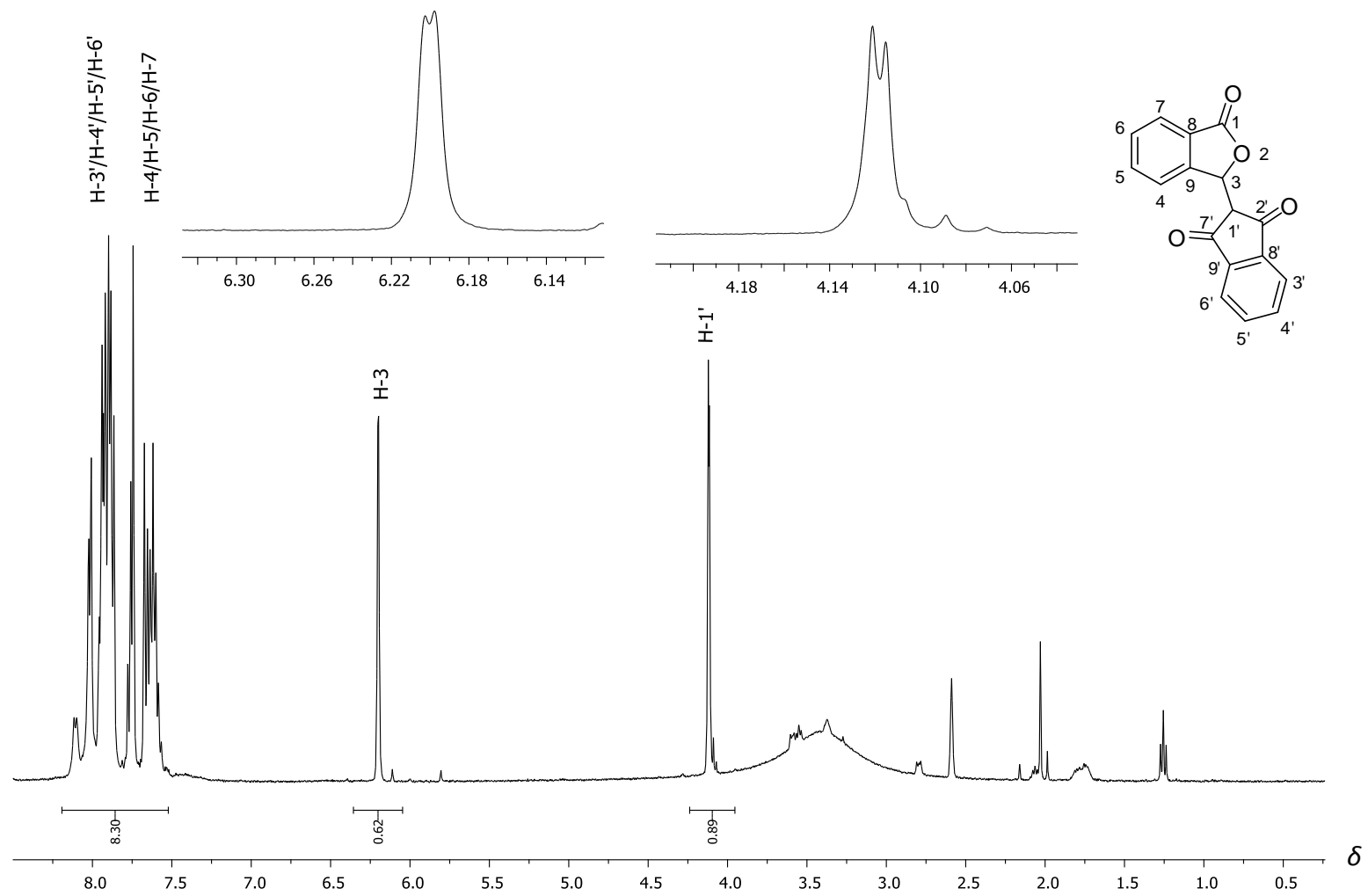
Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **21**.



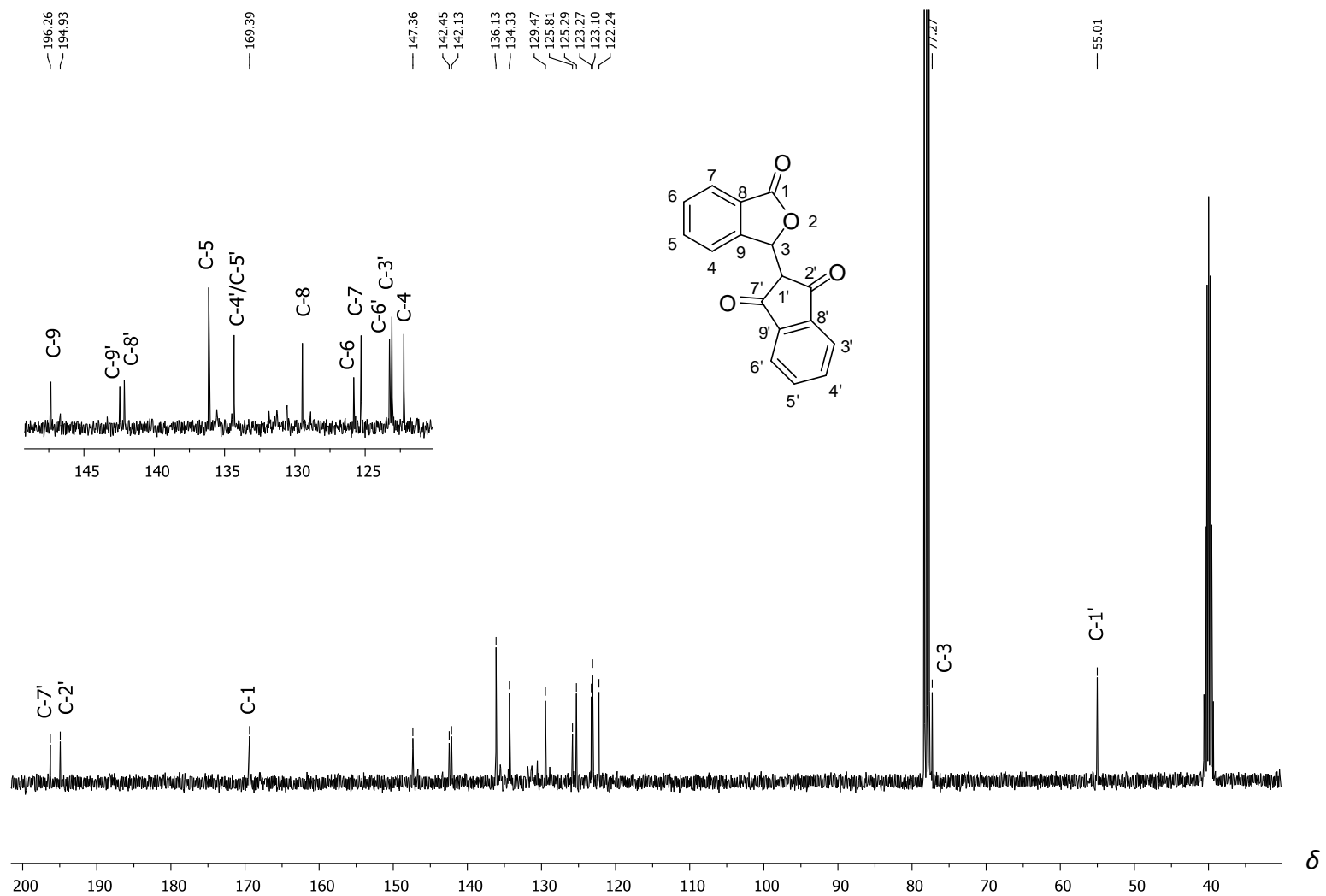
Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **21**.



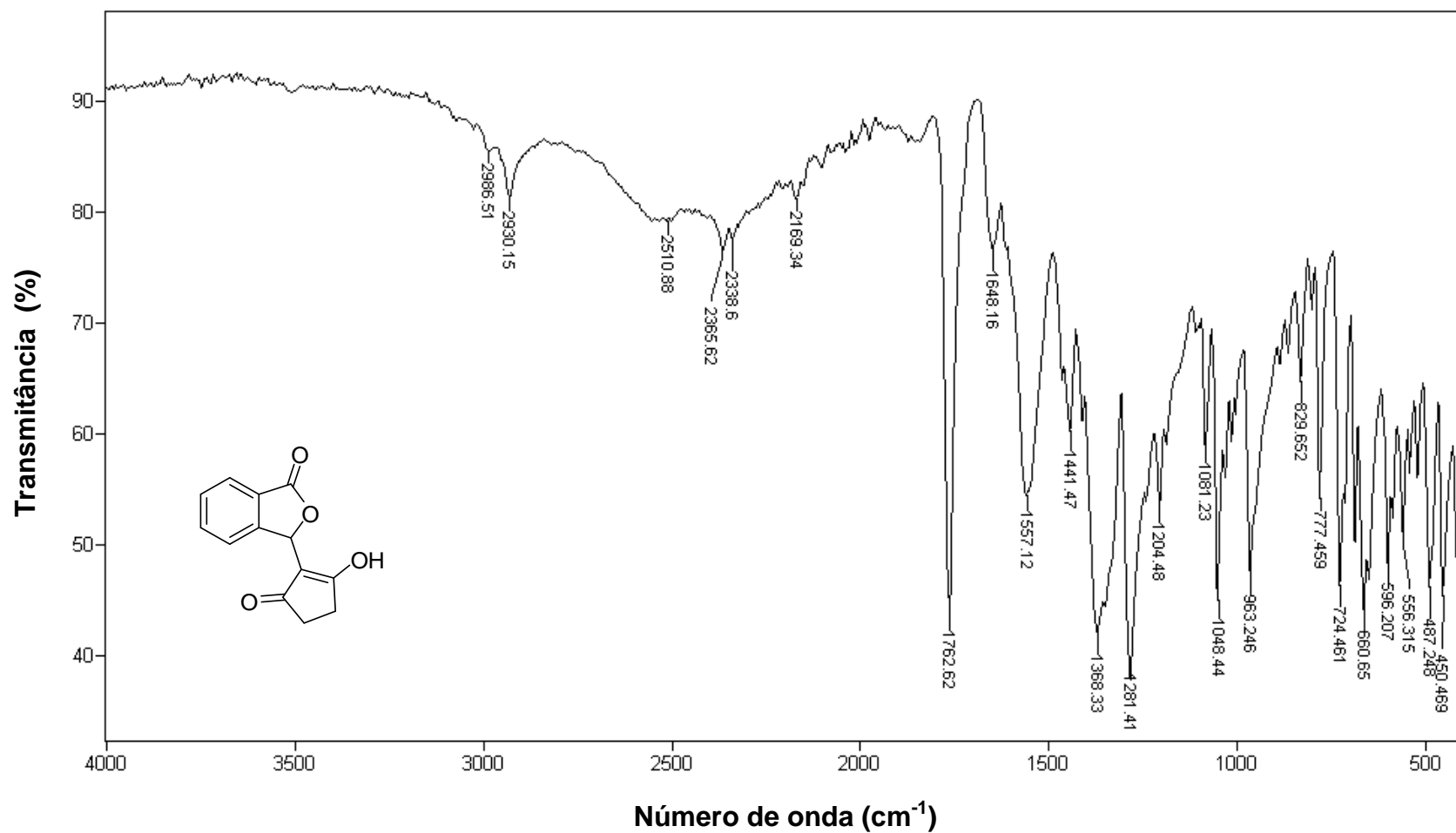
Espectro no Infravermelho (ATR) do Composto **26**.



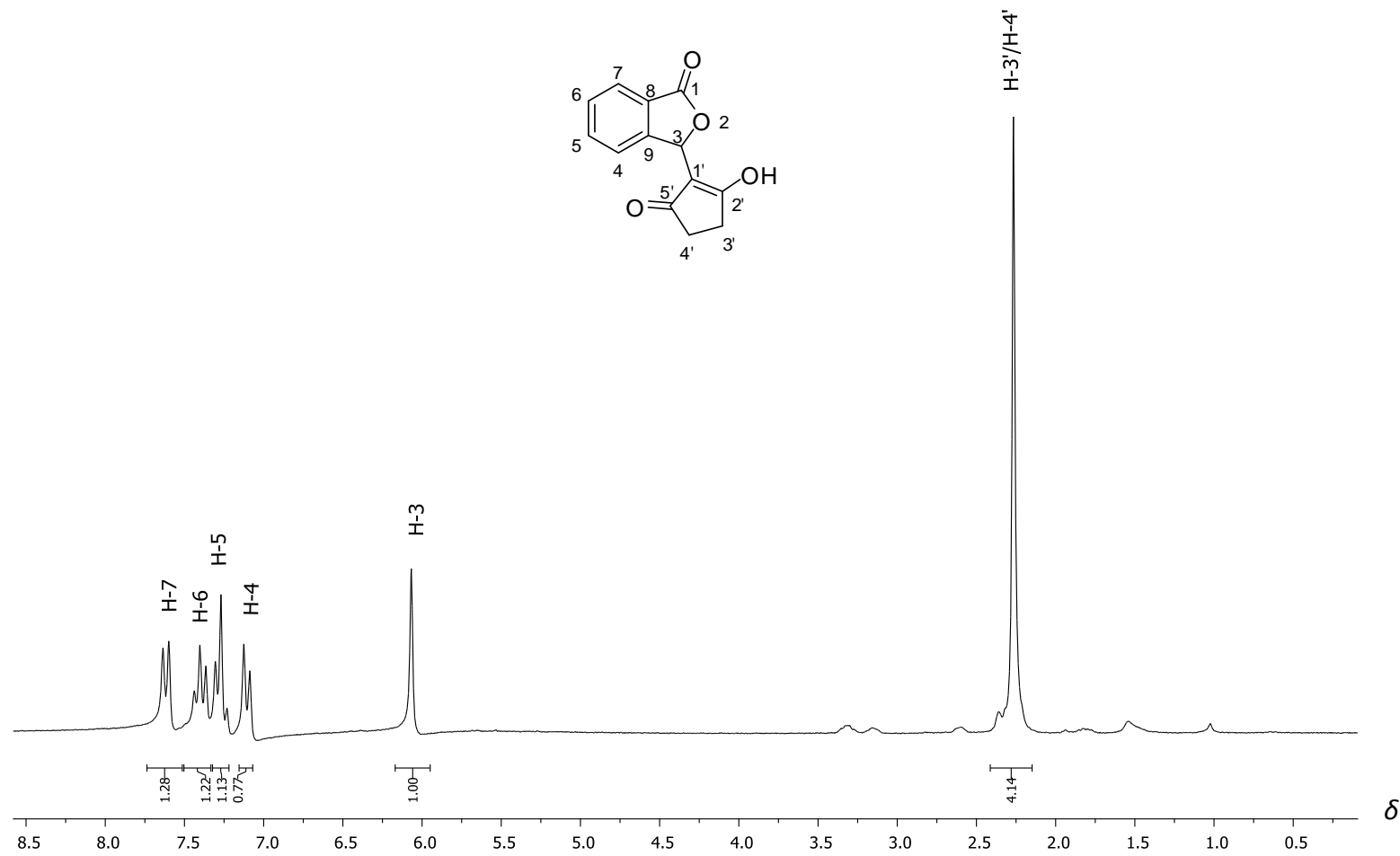
Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$) do composto **26**.



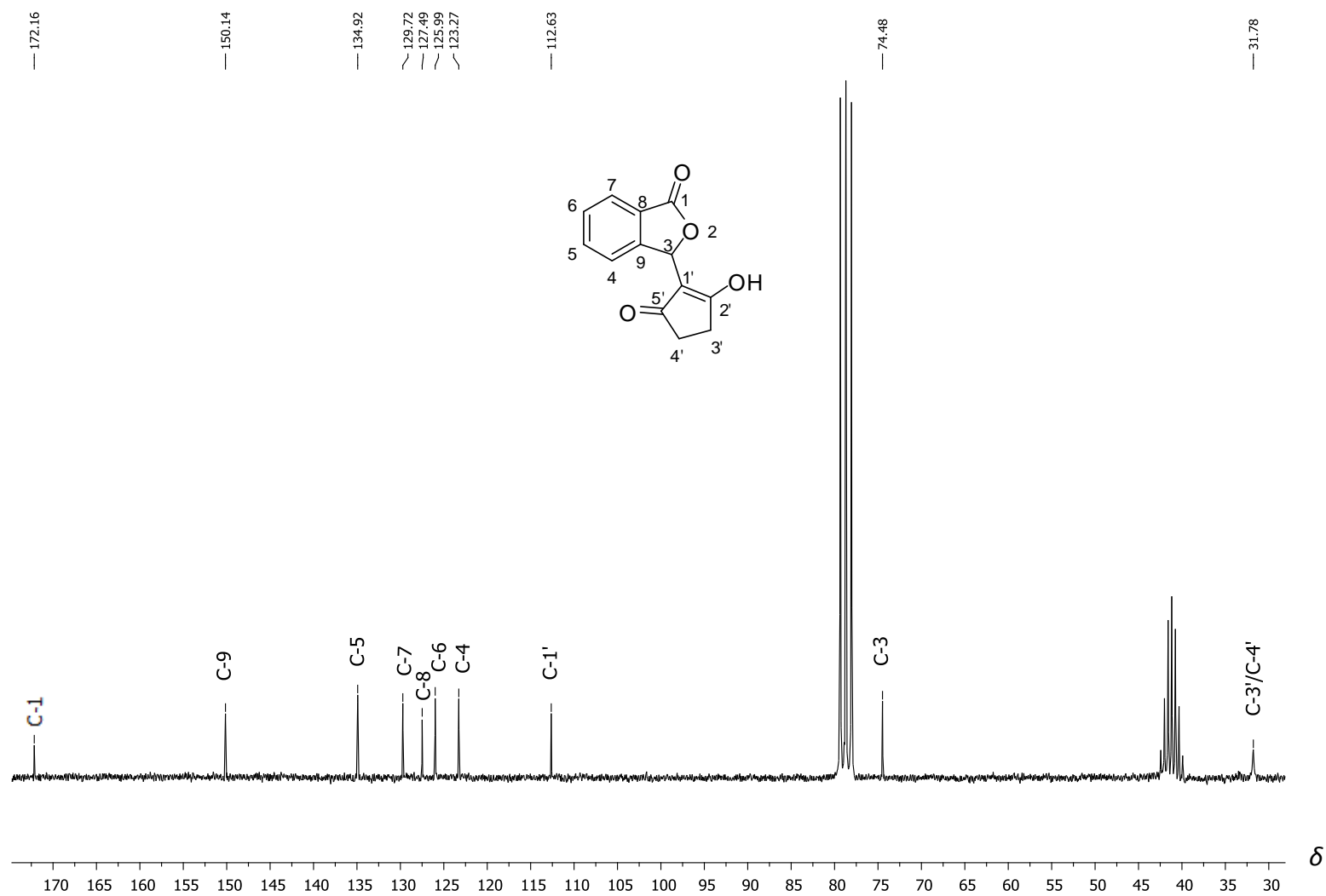
Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$) do composto **26**.



Espectro no Infravermelho (ATR) do Composto **27**.



Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃/DMSO) do composto 27.



Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$) do composto **27**.