

GUILHERME CARVALHO GERALDO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FITOTÓXICA DE
ANÁLOGOS AO ALTERNARIOL**

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
2008**

GUILHERME CARVALHO GERALDO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FITOTÓXICA DE ANÁLOGOS
AO ALTERNARIOL**

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

APROVADA: 25 de Setembro de 2008.

Prof^a. Célia Regina Álvares Maltha
(Co-orientadora)

Prof. Elson Santiago de Alvarenga

Prof. Gaspar Diaz Muñoz

Prof. Róbson Ricardo Teixeira

Prof. Antônio Jacinto Demuner
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me sustentado durante mais esta jornada, trazendo toda provisão necessária no tempo devido.

Aos meus pais Olívio Antônio Geraldo e Maria Madalena Marx Carvalho Geraldo, à minha irmã Jaqueline e meu sobrinho Henrique, e toda minha família por todo amor, carinho, compreensão, apoio e dedicação.

À Ana Paula, minha namorada, pelo carinho, pelo incentivo nas horas difíceis e pela paciência comigo.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Química pela oportunidade.

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

Ao professor Antônio Jacinto Demuner pela orientação e amizade.

Ao professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa pela co-orientação, atenção e, principalmente, pelo incentivo e motivação que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), José Luiz, pela amizade e assistência sempre que solicitada.

Ao professor Giuseppe Forlani, da Universidade de Ferrara, Itália, pela realização dos ensaios biológicos para avaliação da atividade fitotóxica.

Aos colegas e amigos do LASA, Cássia, Cleber, Fabrício, Filipe, Flaviano, Fred, Jodieh, Keylla, Léo, Raphael, Ricardo Montanari, Róbson, Rosemeire, Ulisses, Vânia e Patrícia pela atenção, amizade e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos companheiros de projeto, Cleiton, Karla e Larisse pela amizade e pelo auxílio. Sem vocês este trabalho não seria a mesma coisa.

Aos meus amigos, Luis Gustavo, Rodrigo (Sheik), Filipe, Paulinho, Maressinha, Adélia, Isabela, Clayton e demais amigos do grupo de convivência pela sincera amizade e pelas orações.

E a todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Guilherme Carvalho Geraldo, filho de Olívio Antônio Geraldo e Maria Madalena Marx Carvalho Geraldo, nasceu em Ubá, Minas Gerais, em 08 de fevereiro de 1984.

Em 2002, ingressou no Curso de Licenciatura e Bacharelado em Química na Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se em Outubro de 2006.

Durante este período, foi bolsista por dois anos do programa de Bolsas do CNPq, em que desenvolveu pesquisas na área de Química dos Produtos Naturais.

Em Outubro de 2006 ingressou no programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química Orgânica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de dissertação em setembro de 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A natureza como fonte inspiradora na busca por novos agroquímicos	2
1.2. Análogos ao alternariol	7
1.3. Rota sintética	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1. Técnicas experimentais	13
2.1.1. Cromatografia em camada delgada	13
2.1.2. Separações cromatográficas em coluna	13
2.1.3. Temperatura de fusão	13
2.2. Técnicas espectroscópicas	13
2.2.1. Infravermelho	13
2.2.2. Ressonância magnética nuclear	14
2.2.3. Espectrometria de massas	14
2.3. Procedimentos sintéticos	14
2.3.1. Síntese do 2-bromo-4,6-dimetoxibenzaldeído [47]	14
2.3.2. Procedimento geral para a síntese de biarilas pelo acoplamento de Suzuki	16
2.3.3. Procedimento geral para a reação de oxidação utilizando clorito de sódio (NaClO ₂)	26
2.3.4. Procedimento geral para a reação de desproteção e ciclização	36
2.4. Ensaio biológicos	46

2.4.1. Avaliação do efeito dos compostos 64 , 65 e 68 sobre o transporte de elétrons da água para o acceptor não-biológico $K_3[Fe(CN)_6]$, em cloroplastos isolados de espinafre	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1. Síntese do 2-bromo-4,6-dimetoxibenzaldeído [47]	48
3.2. Síntese das biarilas pelo acoplamento de Suzuki	55
3.3. Síntese dos ácidos carboxílicos pela oxidação com $NaClO_2$	65
3.4. Síntese dos análogos ao alternariol	72
3.5. Ensaio biológicos	82
3.5.1. Avaliação do efeito dos compostos 64 , 65 e 68 sobre o transporte de elétrons da água para o acceptor não-biológico $K_3[Fe(CN)_6]$, em cloroplastos isolados de espinafre	82
4. CONCLUSÕES	86
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE ABREVEATURAS

Ac	Grupo acetil
AcOEt	Acetato de Etila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia gasosa/Espectrometria de massas
δ	Deslocamento químico
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto ou dupleto duplo
ddd	Duplo duplo dupleto
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
HETCOR	Heteronuclear Correlation
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento escalar
m	Multiplete
MHz	Megahertz
m/v	Massa/volume
m/z	Relação massa/carga dos fragmentos do EM
OTf	Grupo triflato
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis(trifenilfosfina)paládio (0)
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
t	Triplete
td	Triplete duplo
T _f	Temperatura de fusão
<i>t</i> -BuOH	Álcool <i>tert</i> -butílico
THF	Tetraidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

RESUMO

GERALDO, Guilherme Carvalho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2008. **Síntese e avaliação da atividade fitotóxica de análogos ao alternariol**. Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Co-Orientadores: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Célia Regina Álvares Maltha.

O alternariol é uma lactona aromática produzida por espécies fúngicas fitopatogênicas dos gêneros *Nimbya* e *Alternaria*. Estas espécies são conhecidas por causarem necroses foliares ocasionando a morte da planta, inclusive de espécies de plantas daninhas como *Alternanthera philoxeroides*. Acredita-se que parte da fitotoxicidade destes fungos esteja associada à produção deste composto, podendo estar presentes também outros metabólitos secundários. O presente trabalho teve por objetivos sintetizar análogos ao alternariol e avaliar a atividade fitotóxica dos mesmos. Para a síntese destes foram utilizados dois tipos de aldeídos aromáticos (2-bromo-4,6-dimetoxibenzaldeído, obtido por formilação de Vilsmeier, e 2-bromobenzaldeído) que foram acoplados com diversos ácidos borônicos através da reação de acoplamento de Suzuki. As biarilas resultantes foram oxidadas com clorito de sódio (NaClO_2) para obtenção dos ácidos carboxílicos correspondentes, que foram tratados com tribrometo de boro (BBr_3) para a desproteção dos grupos hidroxilas com conseqüente ciclização e formação do anel lactônico dos análogos ao alternariol. Desta forma foram obtidos oito novos compostos: 7,9-diidroxi-2-metil-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona (34,5%), 2-cloro-7,9-diidroxi-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona (55,0%), 3-fluoro-7,9-diidroxi-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona (48,5%), 2-fluoro-7,9-diidroxi-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona (69,0%), 2-metil-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona (79,0%), 2-cloro-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona (93,5%), 3-fluoro-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona (97,2%), 2-fluoro-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona (93,3%). Os compostos sintetizados foram caracterizados, utilizando-se espectroscopia no IV, espectrometria de massas, espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , além de técnicas bidimensionais de RMN como HETCOR. Para a avaliação da atividade fitotóxica foram testadas apenas três substâncias (7,9-diidroxi-2-metil-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona, 2-cloro-7,9-diidroxi-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona e 2-metil-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona) em

virtude da indisponibilidade de cloroplastos frescos na Itália na época em que os demais compostos foram sintetizados. As três substâncias foram avaliadas por meio da chamada reação de Hill, que mede a capacidade que determinados compostos tem de inibir o transporte de elétrons em uma fotossíntese *in vitro*, tendo o ferricianeto de potássio como o aceptor não-biológico de elétrons. Para isto, foram utilizados cloroplastos, intactos, isolados de folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*). Dentre as substâncias testadas, duas delas tiveram resultados de inibição bastante expressivos, no qual 2-cloro-7,9-diidroxi-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona e 7,9-diidroxi-2-metil-6*H*-benzo[*c*]cromen-6-ona apresentaram valores de IC₅₀ iguais a 7,2 e 22,8 μM, respectivamente.

ABSTRACT

GERALDO, Guilherme Carvalho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, september, 2008. **Synthesis and phytotoxic activity evaluation of alternariol analogues**. Adviser: Antônio Jacinto Demuner. Co-Advisers: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa and Célia Regina Álvares Maltha.

Alternariol is an aromatic lactone produced by fungal phytopathogenic species of *Nimbya* and *Alternaria*. These species are known to cause leaf necrosis that generate the death of the plant, including species of weeds like *Alternanthera philoxeroides*. It's believed that the phytotoxicity of these fungi is associated with the production of this compound and may also be present other secondary metabolites. This present work had as objective the synthesis and the phytotoxic activity evaluation of alternariol analogues. Two kinds of aromatic aldehydes were used to these synthesis (2-bromo-4,6-dimethoxybenzaldehyde, obtained by Vilsmeier formylation, and 2-bromobenzaldehyde) that were coupled with various boronic acids by the Suzuki coupling reaction. The resulting biaryls were oxidized with sodium chlorite (NaClO_2) to obtain the corresponding carboxylic acids that were treated with boron tribromide (BBr_3) to remove the hydroxyl protection with consequent cyclization and formation of the lactonic ring of the alternariol analogues. Eight new compounds were obtained: 7,9-dihydroxy-2-methyl-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-one (34.5%), 2-chloro-7,9-dihydroxy-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-one (55.0%), 3-fluoro-7,9-dihydroxy-6*H*-benze[*c*]chromen-6-one (48.5%), 2-fluoro-7,9-dihydroxy-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-one (69.0%), 2-methyl-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-one (79.0%), 2-chloro-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-one (93.5%), 3-fluoro-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-one (97.2%) and 2-fluoro-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-one (93.3%). The synthesized compounds were characterized using spectroscopy IV, mass spectrometry, ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy, as well as bidimensional NMR techniques like HETCOR. The phytotoxic activities of only three substances were evaluated (7,9-dihydroxy-2-methyl-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-one, 2-chloro-7,9-dihydroxy-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-one and 2-methyl-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-one), due the unavailability of fresh chloroplasts in Italy at the time when the other compounds were synthesized. The three substances were evaluated using the Hill reaction in

vitro, which measures the ability of certain compounds to inhibit photosynthetic electron transport, using potassium ferricyanide as the non-biological electron acceptor. For this, intact chloroplasts, isolated from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*) were used. Among all the tested substances, two of them had very expressive inhibition results: 2-chloro-7,9-dihydroxy-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-one and 7,9-dihydroxy-2-methyl-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-one showed IC_{50} values of 7.2 and 22.8 μ M, respectively.

1. INTRODUÇÃO

As modernas técnicas de controle das pragas têm proporcionado milagrosas mudanças na agricultura. Antes do surgimento da química orgânica sintética, os agricultores tinham que lutar contra insetos, doenças e plantas daninhas utilizando ferramentas que eram pouco eficientes ou até mesmo inadequadas. Insetos e herbívoros se alimentavam das plantações reduzindo os rendimentos das colheitas, as doenças atacavam as culturas e as plantas daninhas competiam com as culturas de interesse. Os produtores sempre perdiam uma considerável parte de suas lavouras para as pragas durante as etapas de produção, estoque e distribuição (WHEELER, 2002).

Com o passar dos anos, a agricultura mundial cresceu em produtividade e também em área cultivada, isso devido a um grande uso de fertilizantes, maquinário e melhoramento genético. Porém, os principais responsáveis por este aumento foram os chamados agentes de controle químico, ou simplesmente agroquímicos (herbicidas, fungicidas, nematicidas, entre outros), que também sofreram grandes evoluções. Muitas moléculas novas surgiram, com características físico-químicas e funcionalidades diferenciadas; e comportamentos ambientais diferentes, com grandes alterações nos perfis toxicológicos e ecotoxicológicos, fruto dos avanços tecnológicos e pressões dos ambientalistas (ARMAS *et al.*, 2005).

O contínuo aumento da população mundial fez com que a otimização dos processos agrícolas se tornasse de suma importância, já que uma quantidade cada vez maior de alimentos deveria ser produzida em espaços cada vez mais restritos (LEIN *et al.*, 2004).

Dentre as pragas que contribuem para a diminuição de produtividade nas lavouras, as plantas daninhas, juntamente com insetos e nematóides, estão entre os maiores responsáveis por perdas no setor agrário. Elas competem com as culturas de interesse por água, luz e nutrientes, além de abrigarem muitos patógenos, e até mesmo dificultarem ou inviabilizarem a colheita. De modo geral, a competição ou interferência originada pela presença de plantas daninhas nas lavouras resulta em prejuízos qualitativos e quantitativos à produção agrícola (FERRI e VIDAL, 2003).

Estima-se que, nas regiões tropicais, as plantas daninhas provoquem reduções de produção que variam de 30 a 40% (LORENZI, 1991) e que, em média, cerca de 20 a 30% do custo de produção de uma lavoura se deve aos gastos no controle das plantas daninhas (SILVA e SILVA, 2007).

Porém, mesmo havendo no mercado um grande número de compostos para o controle de muitas pragas (plantas daninhas, insetos, fungos e outros), existe ainda uma demanda muito grande por novos produtos, uma vez que os organismos sujeitos a estes produtos podem desenvolver resistência a tais compostos. Com isso, esses passam a ser menos efetivos e muitas vezes perdem totalmente a atividade (BARBOSA, 2004). Inclusive no Brasil, já há alguns casos constatados e relatados de plantas daninhas resistentes a alguns herbicidas (LORENZI, 2006). Isso se deve principalmente ao uso indiscriminado dos agroquímicos, que além de acarretar problemas relacionados à resistência de certos organismos, podem trazer danos ao meio ambiente (MOREIRA *et al.*, 2005).

O efeito e a magnitude decorrentes do uso de agroquímicos no ambiente dependem basicamente dos processos de transferências e transformações que ocorrem em cada compartimento do sistema solo-água-plantas-atmosfera (PRIMEL *et al.*, 2005). Do ponto de vista ambiental, a crescente utilização destes insumos químicos poderá acarretar consequências muito graves, como por exemplo, a contaminação de água potável, que atualmente é uma grande preocupação mundial. Esta preocupação se dá em virtude de muitos destes insumos acabarem atingindo a água, seja por lixiviação, resíduos de embalagens vazias, lavagem de equipamentos de aplicação ou até mesmo efluentes de indústrias de agroquímicos (TROVÓ *et al.*, 2005).

1.1. A natureza como fonte inspiradora na busca por novos agroquímicos

As plantas constituem uma fonte quase que inesgotável de substâncias potencialmente ativas e, portanto, devem ser consideradas como matéria-prima, para a descoberta de novas moléculas e para o desenvolvimento de novos compostos ativos (SIMÕES *et al.*, 2001).

As plantas sintetizam compostos químicos essenciais ao seu desenvolvimento a partir dos nutrientes, da água e da luz que recebem. De acordo com VON POSER & MENTZ (2003), os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos: Os metabólitos primários (lipídeos, protéidos e glicídios), essenciais a todos os seres vivos e com funções bem definidas e os metabólitos secundários, compostos que geralmente apresentam estruturas complexas, baixa massa molar, encontrados em concentrações relativamente baixas e em grupos distintos de plantas. Esses últimos são produzidos com finalidades distintas como mecanismos de defesa ou ainda meio de atração de polinizadores em determinadas plantas. Sendo assim, estes compostos perfazem uma gama de substâncias com estruturas e funções completamente distintas. Isso faz desta classe de subprodutos uma das maiores fontes de compostos com potenciais atividades biológicas.

Porém, não só os metabólitos secundários produzidos por plantas têm sido estudados. A partir da década de 80 os microrganismos fitopatogênicos começaram a ser melhor estudados, descobrindo-se diversas substâncias com atividade herbicida (VISCHETTI e ESPOSITO, 1999). As toxinas produzidas por fungos fitopatogênicos assumiram considerável importância devido ao seu envolvimento em diversas doenças de plantas, prejudicando seriamente algumas plantas de interesse agrícola e florestal (TRINGALI, 2001).

Microrganismos como fungos e bactérias têm se mostrado como uma das fontes mais ricas e promissoras de novos compostos com atividade fitotóxica e reguladora do crescimento de plantas (KIMURA *et al.*, 1998, 2002; PILLMOOR, 1998; VYVYAN, 2002).

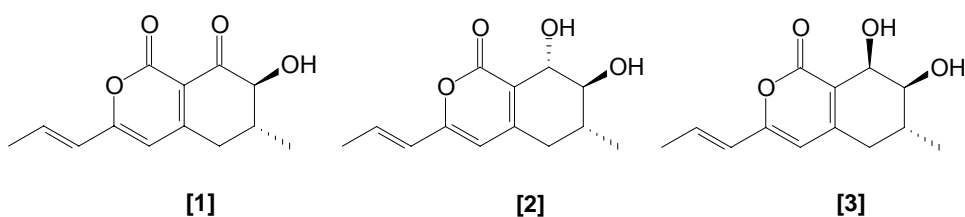
Estes compostos fitotóxicos isolados dos microrganismos possuem uma natureza química muito variada, podendo ser encontrados compostos com baixa massa molecular (pironas, compostos aromáticos e seus derivados, terpenos, aminoácidos, lactonas, compostos bicíclicos e tricíclicos, e outros) (LARSEN *et al.*, 2003; LIEBERMANN *et al.*, 1997, 2000; NUSSBAUM *et al.*, 1999), e de alta massa molecular (proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos). Dentre estas classes de compostos são enquadrados novos fungicidas, fitotoxinas, reguladores do crescimento de plantas e também micotoxinas.

A espécie fúngica *Nimbya alternantherae*, segregado por SIMMONDS (1995) do gênero *Alternaria*, é um patógeno muito agressivo que causa uma doença muito severa à *Alternanthera philoxeroides* (planta herbácea da família Amaranthaceae) que se tornou uma invasora muito prejudicial em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil (BARRETO e TORRES, 1999). Devido à patogenicidade deste fungo, um interesse muito grande foi despertado no estudo deste gênero (bem como o gênero *Alternaria*) com o intuito de buscar novos compostos com potencial atividade herbicida.

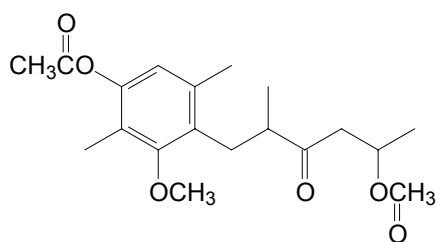
As espécies do gênero *Alternaria* são responsáveis pela contaminação e deterioração de várias frutas frescas como limão, laranja, morango, uva e muitas outras frutas cítricas. TOURNAS e KATSOUZAS (2005), em seus estudos, concluíram que espécies deste gênero são encontradas em aproximadamente 8% da produção mundial de morangos.

Com relação a estes dois gêneros de fungos fitopatogênicos, uma série de trabalhos da literatura têm sido publicado no tocante ao isolamento e a identificação de várias fitotoxinas.

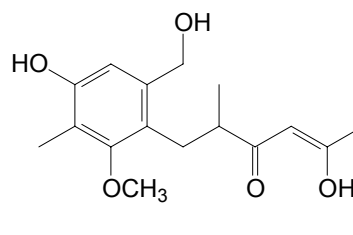
SOLFRIZZO *et al.* (2004), isolaram fitotoxinas de *Alternaria radicina* que atacam cenouras provocando lesões e manchas negras na raiz. Estas fitotoxinas foram chamadas de Radicinina [1], Radicinol [2] e epi-Radicinol [3].



O fungo patogênico *Alternaria tagetica* infecta severamente a calêndula, causando manchas necróticas nas folhas, talos, pétalas e em alguns casos pode até matar a planta. Este fungo produz duas fitotoxinas chamadas de tagetolona [4] e tagetenolona [5] (ÂNGULO *et al.*, 2001).

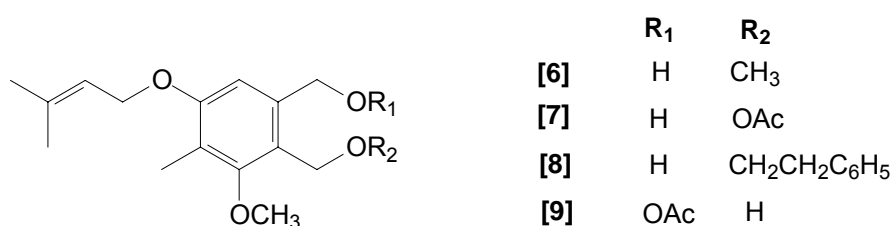


[4]

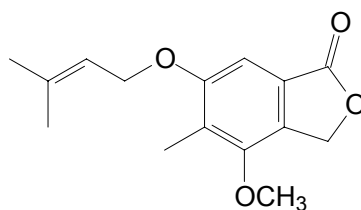


[5]

ÂNGULO *et al.* (2002), em trabalho subsequente, descrevem o isolamento das fitotoxinas 8-zinniol metil éter [6], 8-zinniol acetato [7], 8-zinniol-2-(fenil)-etil éter [8] e o 7-zinniol acetato [9].



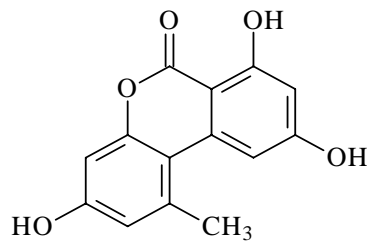
O 6-(3',3'-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metilftalídeo) [10], isolado de *Nimbya alternatherae*, apresentou atividade fitotóxica, causando 100% de inibição na síntese de ATP a uma concentração de 206 mmol L⁻¹, com valor de IC₅₀ de 66 μM (DEMUNER *et al.*, 2006; VEIGA, 2004).



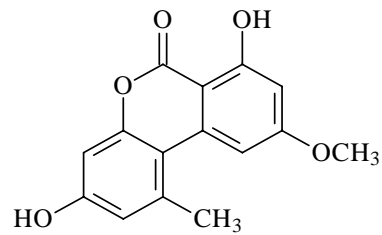
[10]

Duas micotoxinas conhecidas como alternariol [11] e éter metílico do alternariol [12] têm sido bastante estudadas, isto porque estas toxinas com bastante freqüência têm sido encontradas em algumas frutas cítricas como limão, laranja, uva, maçã e principalmente o tomate, sendo produzidas por diversas espécies do gênero *Alternaria*, bem como do gênero *Nimbya* (MOTTA *et al.*, 2000; ROMERO *et al.*, 2005). Também há relatos da ocorrência destas micotoxinas em outras plantas que não são consideradas

cítricas, como por exemplo, em girassóis que são extremamente importantes na produção de óleos comestíveis (POZZI, *et al.*, 2005).



[11]



[12]

Normalmente estas duas substâncias são as responsáveis pelo aparecimento das manchas foliares que caracterizam a contaminação de determinadas plantas pelo fungo do gênero *Alternaria*. Num estágio avançado de infecção, há a chamada necrose foliar que acaba provocando a morte da planta. Na Figura 1 pode-se observar a morfologia de um fungo do gênero *Alternaria*, bem como uma infecção foliar provocado pelo mesmo.

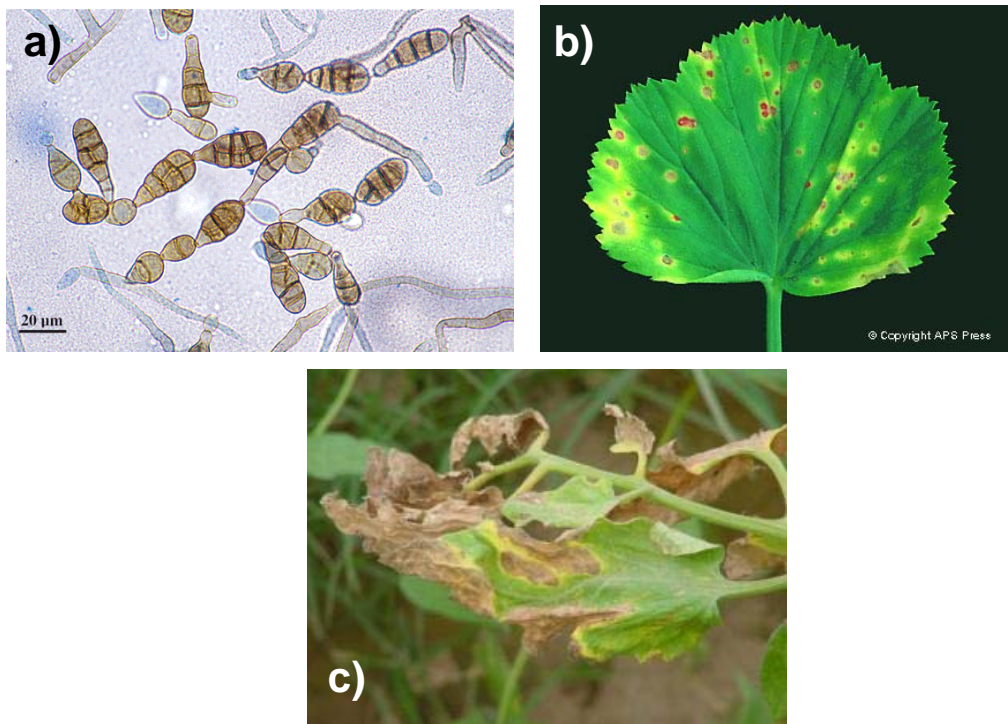


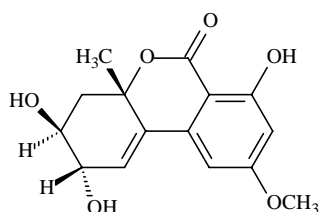
Figura 1 - a) Morfologia do fungo *Alternaria alternata*, b) Infecção foliar causada por *Alternaria alternata* em estágio inicial, c) Necrose foliar causada por *Alternaria alternata*.

Sabendo-se que estes compostos têm sua parcela de atuação nos processos de infecção foliar e que estes fungos atacam algumas espécies de plantas daninhas, é bastante provável que estas toxinas possam apresentar atividade herbicida.

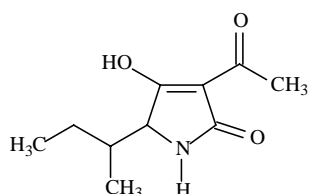
1.2. Análogos ao alternariol

Fungos são bastante conhecidos como produtores de metabólitos secundários que mostram uma grande variedade de atividades biológicas. Porém, vários grupos de fungos ainda permanecem inexplorados, podendo ser uma fonte de novos produtos naturais bioativos.

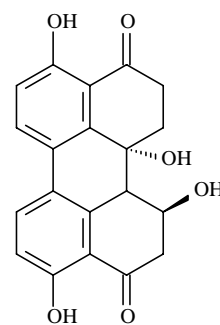
LI e YOSHIZAWA (2000) reportaram pela primeira vez a ocorrência de micotoxinas de *Alternaria* em trigo na China. Além do alternariol [11] e do éter metílico do alternariol [12], foram isolados outros 3 compostos, sendo um deles com estrutura bastante semelhante ao de [11] e [12]. Os compostos altenueno [13], ácido tenuazônico [14] e altertoxina - I [15] são apresentados abaixo.



[13]

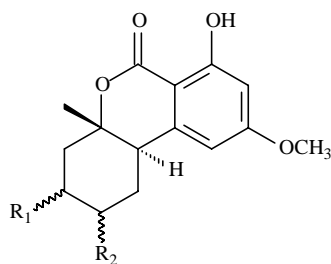


[14]



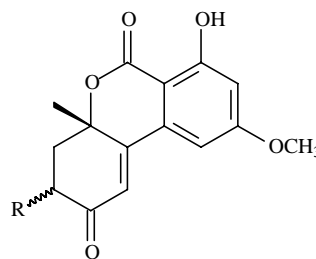
[15]

JIAO e colaboradores (2006) isolaram 7 compostos de uma espécie fúngica de água doce ainda desconhecida. Sabe-se apenas que esta nova espécie é pertencente à família dos Tubeufiaceae. Dentre as 7 substâncias isoladas, 4 delas eram novos derivados do altenueno (diidroaltenueno A [16] e B [17], desidroaltenueno A [18] e B [19]) e 5 compostos já conhecidos ([20] a [24]). Após esta descoberta, recentemente um grupo de pesquisadores propuseram a síntese total da molécula do desidroaltenueno B, que possui atividade antibacteriana (SOORUKRAM *et al.*, 2008).



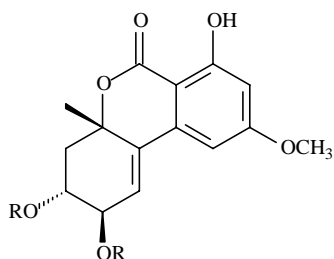
[16] $R_1 = \beta\text{-OH}$ $R_2 = \beta\text{-OH}$

[17] $R_1 = \beta\text{-OH}$ $R_2 = \alpha\text{-OH}$



[18] $R = \alpha\text{-OH}$

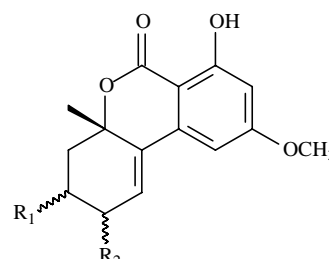
[19] $R = \beta\text{-OH}$



[20] $R = \text{H}$

[21] $R = p\text{-bromobenzoil}$

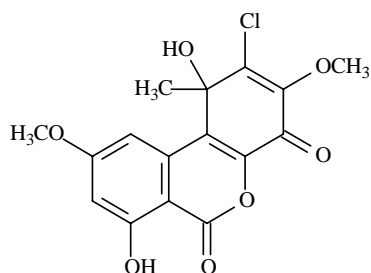
[22] $R = p\text{-N,N-dimetilaminobenzoil}$



[23] $R_1 = \beta\text{-OH}$ $R_2 = \alpha\text{-OH}$

[24] $R_1 = \beta\text{-OH}$ $R_2 = \beta\text{-OH}$

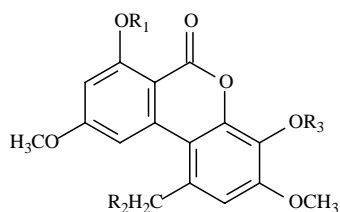
SAKURAI *et al.* (2003) isolaram um composto análogo ao alternariol denominado TMC-264 [25]. Esta substância foi isolada de um fungo (*Phoma sp.* TC1674). Em estudos biológicos posteriores, estes pesquisadores mostraram que o TMC-264 é um poderoso agente antialérgico.



[25]

Embora a maior parte das substâncias análogas ao alternariol sejam sintetizadas por fungos propriamente ditos, ainda há outros organismos capazes de produzir compostos desta natureza. É o caso dos chamados líquens, que são organismos simbióticos compostos por um fungo (micobionte) e um parceiro fotossintético (fotobionte), que pode ser uma cianobactéria e/ou uma alga verde. TANAHASHI *et al.* (2003) demonstraram que culturas de líquens do gênero *Graphis*, sob condições

de estresse osmótico, têm a capacidade de produzir substâncias que nunca haviam sido detectadas em líquens, mas são estruturalmente relacionadas a metabólitos de fungos. Estes compostos encontram-se mostrados abaixo ([26] – [37]).



[26] $R_1 = R_2 = R_3 = H$

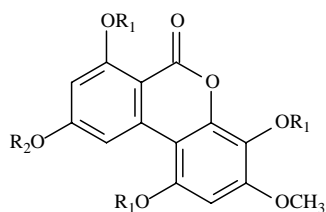
[27] $R_1 = CH_3, R_2 = R_3 = H$

[28] $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$

[29] $R_1 = R_3 = Ac, R_2 = H$

[30] $R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = Ac$

[31] $R_1 = R_3 = Ac, R_2 = OAc$

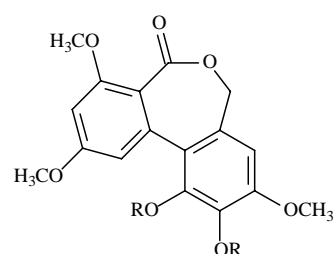


[32] $R_1 = H, R_2 = CH_3$

[33] $R_1 = R_2 = H$

[34] $R_1 = Ac, R_2 = CH_3$

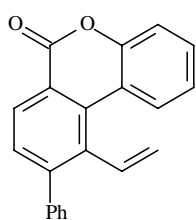
[35] $R_1 = R_2 = Ac$



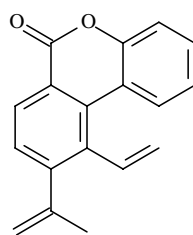
[36] $R = H$

[37] $R = Ac$

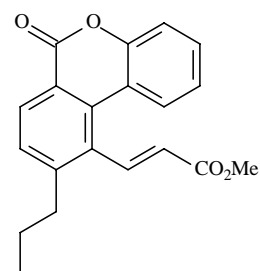
De acordo com as informações da literatura, a maior parte dos compostos apresentando estruturas análogas ao alternariol são de origem natural, sendo produzidos por fungos. Todavia, recentemente têm sido descritos alguns trabalhos de síntese de análogos desta classe de compostos, como é o caso de algumas dibenzo[*b,d*]piran-6-onas sintetizadas utilizando reações de acoplamento de Sonogashira – benzenação produzindo compostos como os mostrados a seguir ([38] – [40]) (KAWASAKI e YAMAMOTO, 2002). Segundo HUSSAIN *et al.* (2007) derivados desta mesma classe de compostos também foi sintetizada por meio de reações de ciclização [3+3] (compostos 41 e 42).



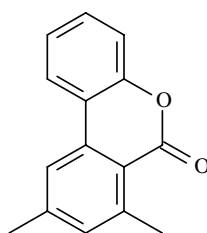
[38]



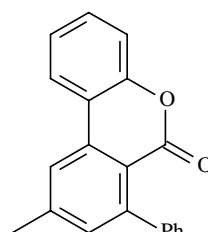
[39]



[40]

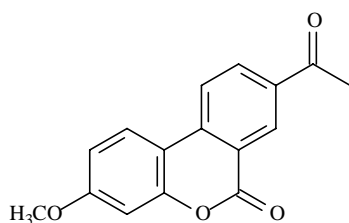


[41]

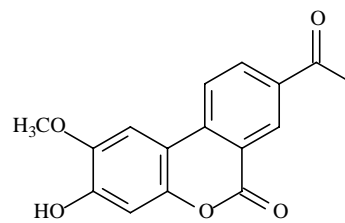


[42]

SCHMIDT e colaboradores (2003) sintetizaram dois compostos ([43] e [44]) análogos ao alternariol, que apresentaram atividades como inibidores de proliferação de células endoteliais. Estes compostos apresentam significativo valor no tratamento de tumores sólidos, uma vez que estes impedem o processo de angiogênese (mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes).

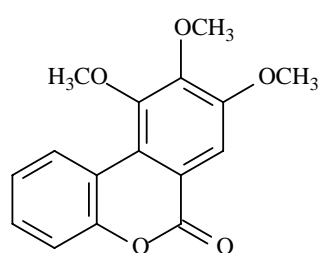


[43]

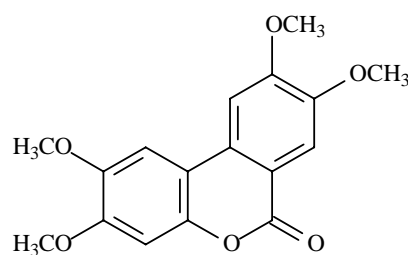


[44]

Para a formação do anel lactônico existente nas benzopiranosas novas metodologias também foram desenvolvidas. Segundo THASANA *et al.* (2007) esta ciclização pode ser realizada via reações de acoplamento C-O_{carboxílico} catalisadas por sais de cobre (I) e irradiação de microondas. A partir desta metodologia foram sintetizadas as benzopiranosas [45] e [46] com rendimentos satisfatórios.



[45]

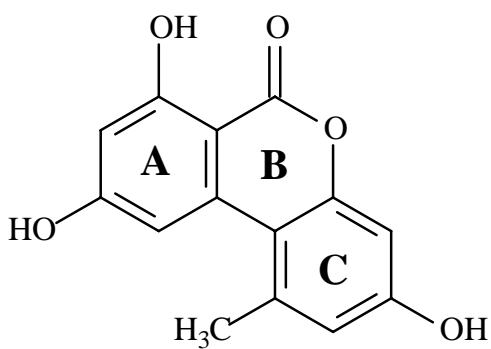


[46]

Considerando que nenhuma avaliação ampla das atividades biológicas de análogos ao alternariol [11] foi descrita na literatura, objetivou-se neste trabalho a síntese e a avaliação da potencial atividade fitotóxica de uma série de substâncias análogas a este composto. Sendo assim, considerando a estrutura da molécula do alternariol pode-se notar que esta

apresenta 3 anéis (A, B e C), que podem ser modificados para a obtenção de novos análogos.

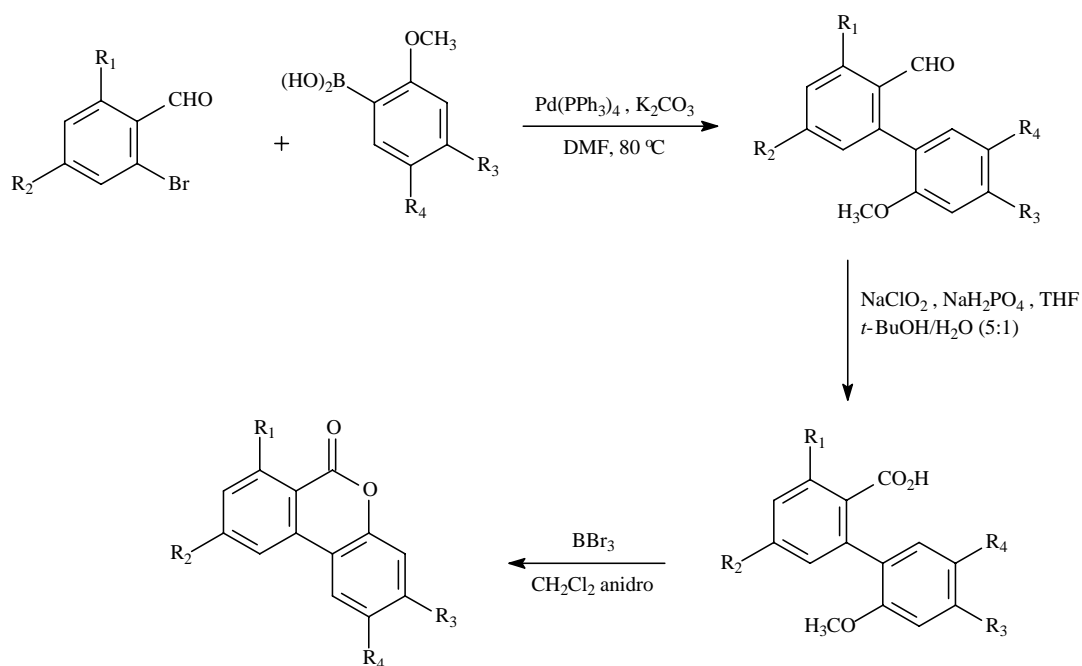
Na presente investigação, foram realizadas modificações nos anéis A e C do alternariol para a obtenção de diferentes análogos.



[11]

1.3. Rota sintética

No desenvolvimento deste trabalho, os análogos ao alternariol foram sintetizados conforme as três etapas mostradas no Esquema 1.



R_1	R_2	R_3	R_4
OCH_3	OCH_3	H	CH_3
OCH_3	OCH_3	H	Cl
OCH_3	OCH_3	F	H
OCH_3	OCH_3	H	F
H	H	H	CH_3
H	H	H	Cl
H	H	F	H
H	H	H	F

Esquema 1 - Rota sintética utilizada na síntese dos análogos ao alternariol.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Técnicas experimentais

2.1.1. Cromatografia em camada delgada

Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram preparadas placas de sílica (sílica-gel 60G – F254 com indicador de fluorescência) com 0,25 mm de espessura, por meio de uma mistura de sílica-gel/água (1:2 m/v). Em algumas situações foram utilizadas placas POLYGRAM-UV₂₅₄ 0,20 mm MACHEREY – NAGEL (20 x 20 cm).

As placas de CCD foram reveladas com solução etanólica de ácido fosfomolibdico (12g de $2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 20\text{MoO}_3 \cdot 48\text{H}_2\text{O}$ em 250 mL de etanol) ou solução aquosa de permanganato de potássio (KMnO_4 (6g) + K_2CO_3 (20g) + 5% $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ (5 mL) + água (300 mL), após terem sido observadas sob lâmpada de ultravioleta ($\lambda = 254$ e 365 nm) (CASEY *et al.*, 1990).

2.1.2. Separações cromatográficas em coluna

Para a purificação por cromatografia em coluna, utilizou-se sílica-gel 60 (70–230 mesh) e sílica-gel 60 (230-400 mesh), como fase estacionária.

2.1.3. Temperatura de fusão

As temperaturas de fusão, não corrigidas, foram determinadas em um aparelho MQAPF-301.

2.2. Técnicas espectroscópicas

2.2.1. Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos por meio de pastilhas de KBr ou CsI contendo 1% (m/m) do composto, ou no caso de

compostos oleosos ou líquidos, como filmes em placa de NaCl, em espectrômetro PERKIN ELMER FTIR 1000 (Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa - UFV).

2.2.2. Ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C) foram obtidos em um espectrômetro MERCURY de 300 MHz no Departamento de Química da UFV. Utilizaram-se como solventes deuterados: clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e dimetilsulfóxido ($\text{DMSO} - d_6$), e TMS como padrão interno de referência ($\delta = 0$).

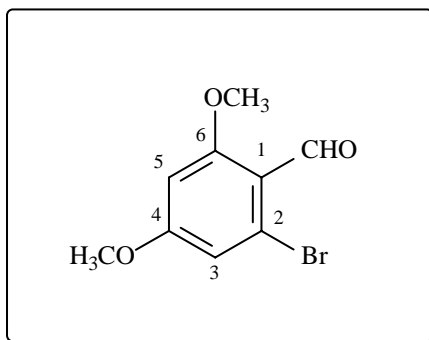
2.2.3. Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos em um equipamento CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A, do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) do Departamento de Química da UFV, via inserção direta no espectrômetro de massas, utilizando-se as seguintes condições:

- Temperatura do detector: $250\text{ }^\circ\text{C}$, variação de temperatura: $40\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até $60\text{ }^\circ\text{C}$ e $80\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até $300\text{ }^\circ\text{C}$.

2.3. Procedimentos sintéticos

2.3.1. Síntese do 2-bromo-4,6-dimetoxibenzaldeído [47]



A um balão bitubulado (25 mL), conectado a um condensador, adicionou-se uma solução de 1-bromo-3,5-dimetoxibenzeno (0,300 g; 1,38 mmol) em DMF (3 mL). O sistema foi resfriado a 0 °C em banho de gelo, aguardando-se aproximadamente 15 minutos para que a solução atingisse equilíbrio térmico. Em seguida, adicionou-se lentamente POCl₃ (0,32 mL; 3,48 mmol). Após esta adição, substituiu-se o banho de gelo por banho de glicerina e a mistura foi aquecida a 100 °C por 4 horas.

Com o término da reação, a mistura foi vertida em banho de gelo e deixada em repouso durante a noite. O precipitado formado foi filtrado em funil de placa sinterizada sendo lavado com três porções de 15 mL de água destilada gelada. O sólido amarelo formado foi recristalizado com uma mistura de hexano/acetato de etila 3:1 (v/v), levando a formação de cristais amarelados em forma de agulha (0,248 g; 1,01 mmol; 73,1% de rendimento).

Dados referentes ao composto [47]:

T_f: 87,4 – 88,2 °C

CCD: R_f = 0,34 (hexano/acetato de etila 10:1 v/v)

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3078, 3002, 2966, 2935, 2870, 2833, 2784, 1683, 1594, 1451, 1422, 1202, 822.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 3,84 (s, 3H, 6-OCH₃); 3,86 (s, 3H, 4-OCH₃); 6,40 (d, 1H, J_{5,3}=2,4, H-5); 6,75 (d, 1H, J_{3,5}=2,4, H-3); 10,28 (s, 1H, CHO).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 56,13 (6-OCH₃); 56,37 (4-OCH₃); 98,41 (C-5); 111,71 (C-3); 117,02 (C-1); 127,83 (C-2); 163,81 (C-6); 164,68 (C-4); 189,56 (CHO).

EM, m/z (%): 244 (M⁺, C₉H₉O₃Br, 59); 246 (M+2, 55); 243 (51); 245 (54); 229 (45); 200 (25); 148 (81); 86 (57); 84 (98); 63 (52); 51 (100).

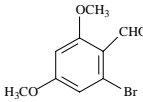
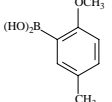
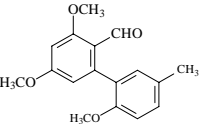
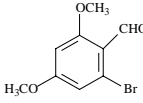
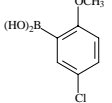
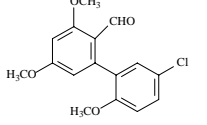
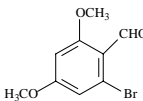
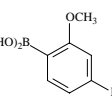
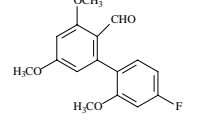
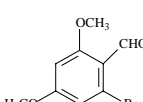
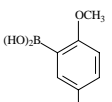
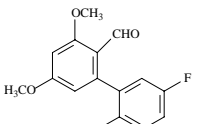
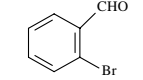
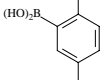
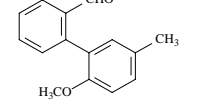
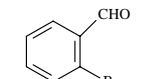
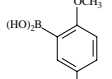
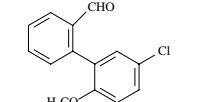
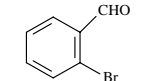
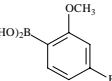
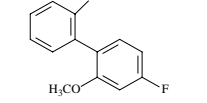
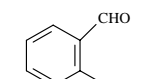
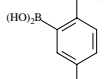
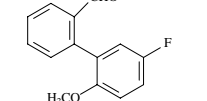
2.3.2. Procedimento geral para a síntese de biarilas pelo acoplamento de Suzuki

Em um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL), acoplado a um condensador, adicionou-se uma solução do 2-bromo-4,6-dimetoxibenzaldeído [47] em DMF. Em seguida, foram adicionados o ácido borônico juntamente com K_2CO_3 e $Pd(PPh_3)_4$, sendo este último o catalisador da reação. A mistura reacional foi mantida sob constante agitação à temperatura de 80 °C por um período de aproximadamente 24 horas.

Com o término da reação, a mistura foi vertida sobre solução saturada de NH_4Cl (20 mL) e extraída com acetato de etila (3 x 30 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi lavada com água destilada (5 x 30 mL) para a retirada do excesso de dimetilformamida. Em seguida, a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo obtido nas reações foi submetido à por cromatografia em coluna de sílica gel.

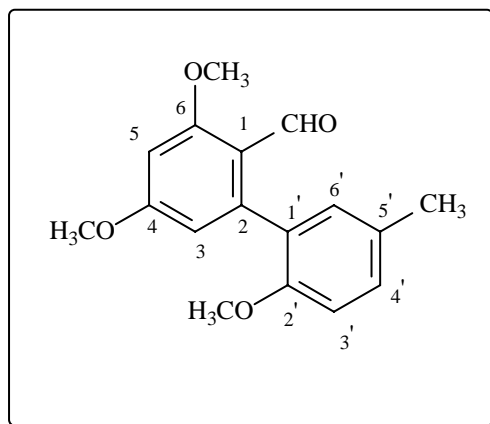
Esta mesma metodologia foi utilizada para a síntese das biarilas **48 - 51 e 52 – 55**, quando utilizou-se o 2-bromobenzaldeído (Tabela 1).

Tabela 1 – Quantidades de reagentes usados no preparo das biarilas **48** –
55

Aldeído (g ; mmol)	Ácido borônico (g ; mmol)	DMF (mL)	K ₂ CO ₃ (g ; mmol)	Pd(PPh ₃) ₄ (g ; mmol)	Produto / [código]	Rendimento (mg ; %)
 (0,245 ; 1,00)	 (0,498 ; 3,00)	15	(0,198 ; 2,00)	(0,115 ; 0,10)	 [48]	(193,9 ; 68,0)
 (2,000 ; 8,16)	 (4,565 ; 24,5)	40	(2,250 ; 16,3)	(0,943 ; 0,82)	 [49]	(1889 ; 75,5)
 (0,700 ; 2,85)	 (0,727 ; 4,27)	20	(0,564 ; 5,70)	(0,165 ; 0,14)	 [50]	(412,4 ; -) *
 (0,400 ; 1,63)	 (0,555 ; 3,26)	10	(0,450 ; 3,26)	(0,188 ; 0,16)	 [51]	(337,1 ; 71,2)
 (0,836 ; 4,52)	 (0,501 ; 3,02)	10	(0,858 ; 6,20)	(0,158 ; 0,14)	 [52]	(643 ; 94,4)
 (0,425 ; 2,30)	 (0,428 ; 2,30)	10	(0,635 ; 4,60)	(0,266 ; 0,23)	 [53]	(213 ; 37,6)
 (0,296 ; 1,60)	 (0,544 ; 3,2)	15	(0,442 ; 3,20)	(0,185 ; 0,16)	 [54]	(256,8 ; 69,9)
 (0,350 ; 1,89)	 (0,645 ; 3,78)	10	(0,522 ; 3,78)	(0,218 ; 0,19)	 [55]	(420,2 ; -) *

* Os produtos não puderam ser purificados, não apresentando rendimento.

- Dados referentes ao composto 4,6-dimetoxi-2-(5-metil-2-metoxifenil)benzaldeído [48]



Característica: Sólido amarelo, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com as misturas de solventes: hexano/AcOEt 20:1, hexano/AcOEt 15:1, hexano/ AcOEt 10:1 e hexano/ AcOEt 1:1 v/v.

T_f: 119,5 – 120,3 °C

CCD: R_f = 0,20 (hexano/acetato de etila 1:1 v/v)

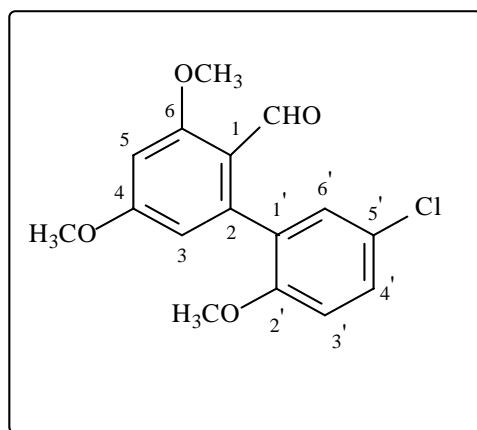
IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3005, 2922, 2853, 2771, 1677, 1599, 1571, 1499, 1470, 1425, 1235, 1220, 1147, 872, 816.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 2,32 (t, 3H, $J_{5\text{-CH}_3, 6'}=J_{5\text{-CH}_3, 4'}=0,6$, 5'-CH₃); 3,70 (s, 3H, 2'-OCH₃); 3,87 (s, 3H, 6-OCH₃); 3,93 (s, 3H, 4-OCH₃); 6,39 (d, 1H, $J_{5,3}=2,4$, H-5); 6,45 (d, 1H, $J_{3,5}=2,4$, H-3); 6,81 (d, 1H, $J_{3',4'}=8,4$, H-3'); 7,02 (dd, 1H, $J_{6',4'}=2,4$, $J_{6',5\text{-CH}_3}=0,6$, H-6'); 7,16 (ddd, 1H, $J_{4',3'}=8,4$, $J_{4',6'}=2,4$, $J_{4',5\text{-CH}_3}=0,6$, H-4'); 9,85 (s, 1H, H-1).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ : 20,70 (5'-C_H3); 55,80 (6-OCH₃ e 2'-OCH₃); 56,15 (4-OCH₃); 98,06 (C-3); 108,25 (C-5); 110,63 (C-1 e C-3'); 128,36 (C-5'); 130,08 (C-4' e C-1'); 131,32 (C-6'); 146,15 (C-2); 154,48 (C-2'); 162,30 (C-6); 164,46 (C-4) e 190,66 (CHO).

EM, m/z (%): 286 (M^+ , $C_{17}H_{18}O_4$, 10); 255 (100); 240 (7).

- Dados referentes ao composto 4,6-dimetoxi-2-(5-cloro-2-metoxifenil)benzaldeído [49]



Característica: Sólido amarelo, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com as misturas de solventes: hexano/ AcOEt 10:1, hexano/ AcOEt 5:1, hexano/ AcOEt 1:1 e hexano/ AcOEt 1:2 v/v.

T_f : 127,7 – 128,7 °C

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

IV (Filme, NaCl, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{max}$: 3005, 2940, 2840, 2769, 1684, 1594, 1570, 1492, 1450, 1205, 1030, 809.

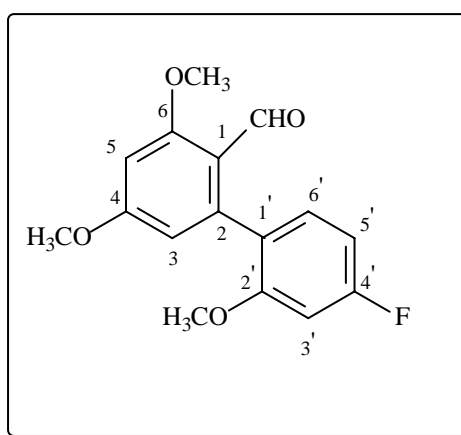
RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 3,70 (s, 3H, 2'-OCH₃); 3,87 (s, 3H, 6-OCH₃); 3,93 (s, 3H, 4-OCH₃); 6,34 (d, 1H, $J_{5,3}$ = 2,4, H-5); 6,48 (d, 1H, $J_{3,5}$ = 2,4, H-3); 6,83 (d, 1H, $J_{3',4'}$ = 8,7, H-3'); 7,17 (d, 1H, $J_{6',4'}$ = 2,4, H-6'); 7,30 (dd, 1H, $J_{4',3'}$ = 8,7, $J_{4',6'}$ = 2,4, H-4'); 9,97 (s, 1H, CHO).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ : 55,87 (2'-OCH₃); 56,05 (6-OCH₃); 56,19 (4-OCH₃); 98,32 (C-3); 108,42 (C-5); 111,84 (C-3'); 117,55 (C-1); 125,68 (C-

5'); 129,13 (C-4'); 130,05 (C-6'); 130,89 (C-1'); 143,49 (C-2); 155,32 (C-2'); 162,92 (C-6); 164,62 (C-4); 189,70 (CHO).

EM, m/z (%): 306 (M⁺, C₁₆H₁₅O₄Cl, 4); 308 (M+2, 1); 277 (34); 275 (100); 260 (6).

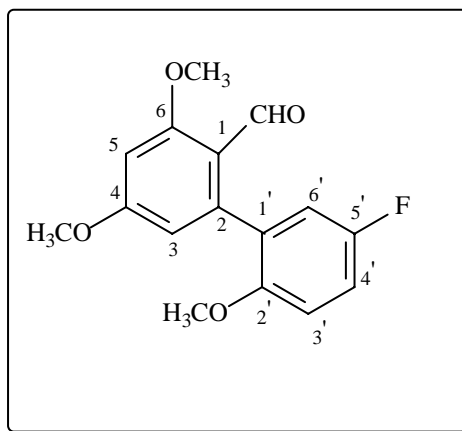
- **Dados referentes ao composto 4,6-dimetoxi-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)benzaldeído [50]**



Apesar do aldeído de partida **47** ser o agente limitante desta reação, ela não foi levada até o seu término. Uma análise por CCD revelou que o aldeído de partida **47** apresentou o mesmo fator de retenção (R_f) que o produto desejado **50**. Porém, a mancha observada para cada um destes compostos se mostrou com coloração distinta, sendo a primeira amarela e a segunda, azulada. Desta forma, à medida que o produto **50** formava-se, a mancha azulada cobria a mancha amarela do material de partida, fazendo com que a visualização do final da reação não fosse possível.

Deste modo, a biarila resultante do acoplamento de Suzuki permaneceu contaminada com uma pequena fração do material de partida, não sendo possível sua separação. Assim, utilizou-se o produto não purificado na etapa subsequente.

- Dados referentes ao composto **4,6-dimetoxi-2-(5-fluoro-2-metoxifenil)benzaldeído [51]**



Característica: Sólido amarelo, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com as misturas de solventes: hexano/ AcOEt 10:1, hexano/ AcOEt 5:1 e hexano/ AcOEt 1:1 v/v.

T_f: 105,8 – 106,6 °C

CCD: R_f = 0,28 (hexano/acetato de etila 1:1 v/v)

IV (Filme, NaCl, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3002, 2941, 2839, 2772, 1686, 1595, 1499, 1459, 1210, 1159, 1033.

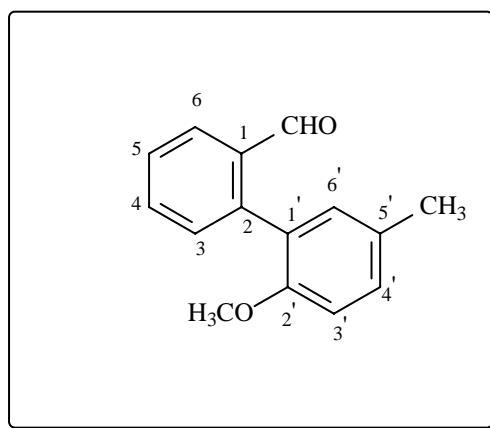
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 3,69 (s, 3H, 2'-OCH₃); 3,87 (s, 3H, 6-OCH₃); 3,93 (s, 3H, 4-OCH₃); 6,35 (d, 1H, J_{5,3} = 2,4, H-5); 6,50 (d, 1H, J_{3,5} = 2,4, H-3); 6,83 (dd, 1H, J_{3',4'} = 9,0, J_{3',F} = 4,5, H-3'); 6,93 (dd, 1H, J_{6',4'} = 3,0, J_{6',F} = 8,4, H-6'); 7,04 (ddd, 1H, J_{4',3'} = 9,0, J_{4',F} = 8,1, J_{4',6'} = 3,0, H-4'); 9,95 (s, 1H, CHO).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ : 55,86 (6-OCH₃); 56,19 (4-OCH₃); 56,26 (2'-OCH₃); 98,23 (C-3); 108,33 (C-5); 111,48 (d, J_{C,F} = 8,3, C-3'); 115,35 (d, J_{C,F} = 22,4, C-4'); 117,29 (d, J_{C,F} = 23,8, C-6'); 117,47 (C-2); 130,36 (d, J_{C,F}

= 7,7, C-1'); 143,87 (C-1); 152,57 (d, $J_{C,F} = 2,2$, C-2'); 156,99 (d, $J_{C,F} = 238$, C-5'); 162,79 (C-6); 164,58 (C-4); 189,88 (CHO).

EM, m/z (%): 290 (M^+ , $C_{16}H_{15}O_4F$, 3); 259 (100); 244 (7).

- Dados referentes ao 2-(2-metoxi-5-metilfenil)benzaldeído [52]



Característica: Óleo incolor, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com as misturas de solventes: hexano/ AcOEt 7:1, hexano/ AcOEt 5:1 e hexano/ AcOEt 1:1 v/v.

CCD: $R_f = 0,46$ (hexano/acetato de etila 1:1 v/v)

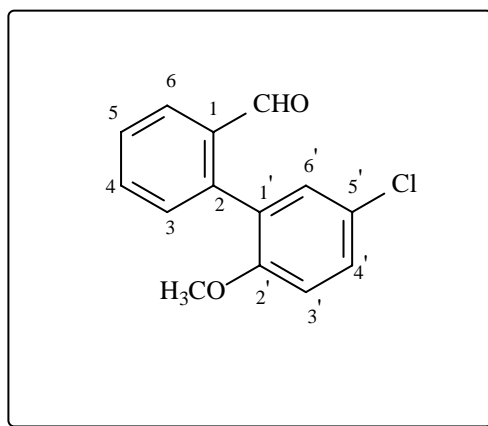
IV (Filme, NaCl, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{max}$: 3061, 3008, 2926, 2839, 2750, 1694, 1598, 1503, 1254, 1235, 1035, 1023, 809, 772, 744.

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J /Hz), atribuição): 2,36 (t, 3H, $J_{5'-CH_3,6'} = J_{5'-CH_3,4'} = 0,6$, 5'- CH_3); 3,71 (s, 3H, 2'- OCH_3); 6,87 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8,1$, H-3'); 7,11 (dd, 1H, $J_{6',4'} = 2,1$, $J_{6',5'-CH_3} = 0,6$, H-6'); 7,21 (ddd, 1H, $J_{4',3'} = 8,1$, $J_{4',6'} = 2,1$, $J_{4',5'-CH_3} = 0,6$, H-4'); 7,36 (ddd, 1H, $J_{6,5} = 7,5$, $J_{6,4} = 1,5$, $J_{6,CHO} = 0,6$, H-6); 7,47 (ddd, 1H, $J_{4,3} = 7,8$, $J_{4,5} = 7,5$, $J_{4,6} = 1,5$, H-4); 7,64 (td, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 7,5$, $J_{5,3} = 1,5$, H-5); 7,99 (ddd, 1H, $J_{3,4} = 7,8$, $J_{3,5} = 1,5$, $J_{3,6} = 0,6$, H-3); 9,80 (d, 1H, $J_{CHO,6} = 0,6$, CHO).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ : 20,68 ($5'\text{-CH}_3$); 55,71 ($2'\text{-OCH}_3$); 110,82 (C-3'); 126,75 (C-5'); 126,76 (C-3); 127,89 (C-5); 130,50 (C-4'); 131,40 (C-6'); 132,30 (C-6); 133,89 (C-4); 134,21 (C-2); 142,20 (C-1); 154,66 (C-2'); 193,04 (CHO).

EM, m/z (%): 226 (M^+ , $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_2$, 35); 227 (M+1, 6); 195 (100); 165 (20).

- Dados referentes ao 2-(5-cloro-2-metoxifenil)benzaldeído [53]



Característica: Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com as misturas de solventes: hexano/ AcOEt 10:1, hexano/ AcOEt 5:1 e hexano/ AcOEt 1:1 v/v.

T_f: 95,1 – 96,3 °C

CCD: R_f = 0,43 (hexano/acetato de etila 1:1 v/v)

IV (Filme, Csl , cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3065, 3008, 2941, 2842, 2750, 1697, 1597, 1495, 1255, 1025, 811, 771, 646.

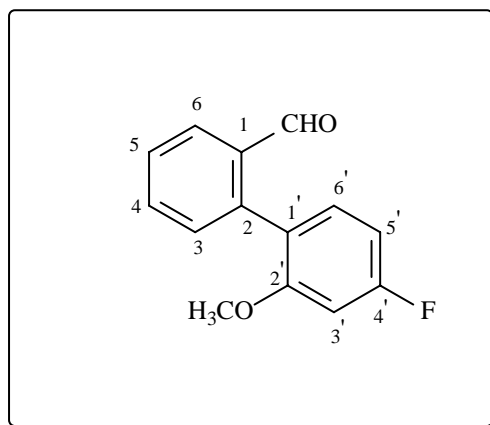
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 3,72 (s, 3H, $2'\text{-OCH}_3$); 6,90 (d, 1H, $J_{3',4'} = 9,0$, H-3'); 7,28 (d, 1H, $J_{6',4'} = 2,7$, H-6'); 7,33 (ddd, 1H, $J_{6,5} = 7,8$, $J_{6,4} = 1,5$,

$J_{6,CHO} = 0,6$, H-6); 7,37 (dd, 1H, $J_{4',3'} = 9,0$, $J_{4',6'} = 2,7$, H-4'); 7,50 (ddd, 1H, $J_{5,6} = 7,8$, $J_{5,4} = 7,5$, $J_{5,3} = 1,5$, H-5); 7,65 (td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3} = 7,5$, $J_{4,6} = 1,5$, H-4); 7,99 (ddd, 1H, $J_{3,4} = 7,5$, $J_{3,5} = 1,5$, $J_{3,6} = 0,6$, H-3); 9,78 (d, 1H, $J_{CHO,6} = 0,6$, CHO).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ : 55,98 (2'-OCH₃); 112,06 (C-3'); 126,19 (C-5'); 127,14 (C-3); 128,47 (C-5); 128,76 (C-1'); 129,76 (C-4'); 131,19 (C-6'); 131,21 (C-6); 134,03 (C-4); 134,16 (C-2); 140,43 (C-1); 155,41 (C-2'); 192,24 (CHO).

EM, m/z (%): 246 (M^+ , C₁₄H₁₁O₂Cl, 38); 248 (M+2, 13); 217 (33); 215 (100); 168 (24); 152 (25); 139 (26).

- Dados referentes ao 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)benzaldeído [54]



Característica: Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com as misturas de solventes: hexano/ AcOEt 15:1, hexano/ AcOEt 10:1, hexano/ AcOEt 5:1 e hexano/ AcOEt 1:1 v/v.

T_f: 68,7 – 70,0 °C

CCD: R_f = 0,40 (hexano/acetato de etila 1:1 v/v)

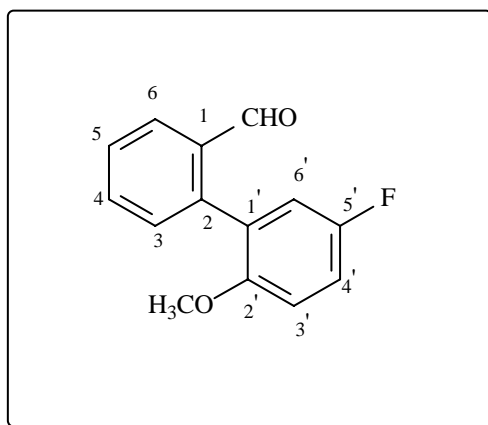
IV (KBr, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3066, 3008, 2940, 2839, 2749, 1690, 1597, 1507, 1449, 1279, 1192, 1151, 830, 765.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 3,73 (s, 3H, 2'-OCH₃); 6,71 (dd, 1H, $J_{3',F} = 10,8$, $J_{3',5'} = 2,4$, H-3'); 6,80 (td, 1H, $J_{5',F} = J_{5',6'} = 8,4$, $J_{5',3'} = 2,4$, H-5'); 7,24 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8,4$, $J_{6',F} = 6,6$, H-6'); 7,32 (ddd, 1H, $J_{6,5} = 7,8$, $J_{6,4} = 1,5$, $J_{6,\text{CHO}} = 0,6$, H-6); 7,49 (ddd, 1H, $J_{5,6} = 7,8$, $J_{5,4} = 7,5$, $J_{5,3} = 1,5$, H-5); 7,64 (td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3} = 7,5$, $J_{4,6} = 1,5$, H-4); 7,99 (ddd, 1H, $J_{3,4} = 7,5$, $J_{3,5} = 1,5$, $J_{3,6} = 0,6$, H-3); 9,77 (d, 1H, $J_{\text{CHO},6} = 0,6$, CHO).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ : 55,94 (2'-OCH₃); 99,29 (d, $J_{C,F} = 26,33$, C-3'); 107,74 (d, $J_{C,F} = 21,2$, C-5'); 122,94 (d, $J_{C,F} = 3,6$, C-1'); 127,09 (C-3); 128,15 (C-5); 131,53 (C-6); 132,34 (d, $J_{C,F} = 10,4$, C-6'); 134,02 (C-4); 134,27 (C-2); 141,104 (C-1); 157,93 (d, $J_{C,F} = 9,7$, C-2'); 164,12 (d, $J_{C,F} = 246$, C-4'); 192,62 (CHO).

EM, m/z (%): 230 (M^+ , $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{F}$, 44); 199 (100), 187 (18); 170 (21); 159 (23).

- Dados referentes ao 2-(5-fluoro-2-metoxifenil)benzaldeído [55]



Durante o processo de purificação, verificou-se que o produto resultante do homo-acoplamento do ácido borônico apresentou o mesmo fator de retenção (R_f) que o produto desejado [55]. Não foi possível a

purificação da biarila resultante do acoplamento de Suzuki. Desta forma, a purificação se deu na etapa seguinte.

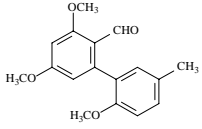
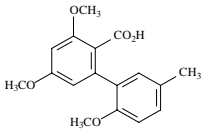
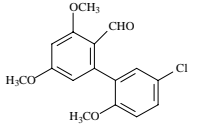
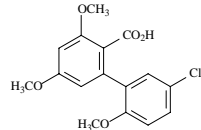
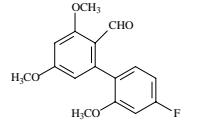
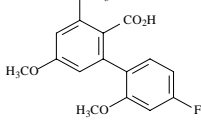
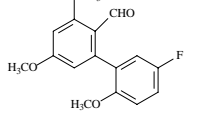
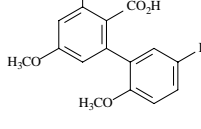
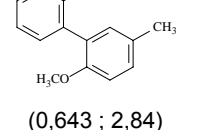
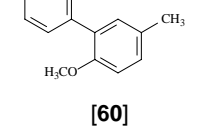
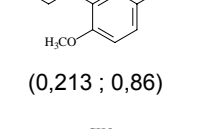
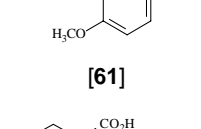
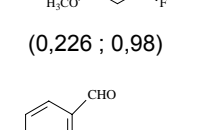
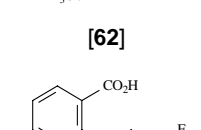
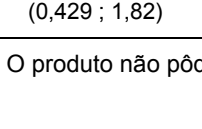
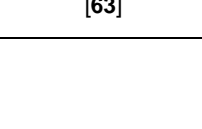
2.3.3. Procedimento geral para a reação de oxidação utilizando clorito de sódio (NaClO₂)

Em um balão de fundo redondo (50 mL) adicionou-se 15 mL de uma solução do aldeído a ser oxidado em *t*-BuOH/água (5:1 v/v). Em seguida foram adicionados NaH₂PO₄, NaClO₂ e THF, mantendo-se a mistura reacional sob agitação por um período de 3 horas.

Ao término da reação, os solventes foram evaporados e o resíduo foi extraído com CH₂Cl₂ (3 X 10 mL). Os extratos orgânicos foram combinados e a fase orgânica foi seca com MgSO₄, anidro filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi submetido a fracionamento em coluna de sílica gel.

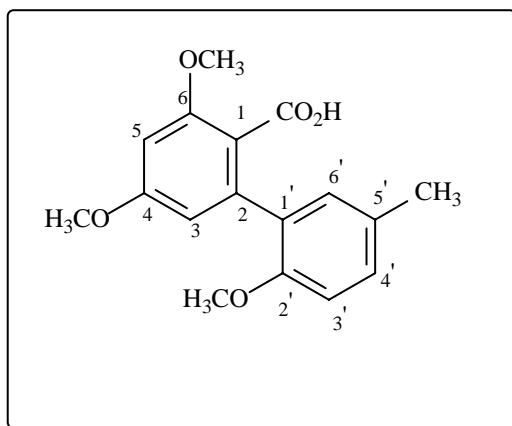
A tabela 2 apresenta as quantidades de reagentes utilizados nessas reações para a síntese de **56 - 63**.

Tabela 2 - Quantidades de reagentes usados no preparo dos ácidos 56 - 63

Aldeído (g; mmol)	NaClO₂ (g ; mmol)	NaH₂PO₄ (g ; mmol)	THF (mL ; mmol)	Produto / [Código]	Rendimento (mg ; %)
 (0,170 ; 0,594)	(0,43 ; 0,594)	(0,214 ; 1,78)	(0,50 ; 5,35)	 [56]	(145,7 ; -) *
 (0,602 ; 1,950)	(1,41 ; 15,60)	(0,702 ; 5,85)	(1,35 ; 17,55)	 [57]	(584,1 ; 92,2)
 (0,286 ; 0,98)	(0,709 ; 7,84)	(0,353 ; 2,94)	(0,68 ; 8,82)	 [58]	(212,6 ; 70,4)
 (0,250 ; 0,86)	(0,623 ; 6,88)	(0,310 ; 2,58)	(0,63 ; 7,74)	 [59]	(258,6 ; 98,3)
 (0,643 ; 2,84)	(2,05 ; 22,72)	(1,022 ; 8,52)	(2,01 ; 25,56)	 [60]	(420 ; 61,0)
 (0,213 ; 0,86)	(0,625 ; 6,91)	(0,311 ; 2,59)	(0,60 ; 7,77)	 [61]	(217,3 ; 95,8)
 (0,226 ; 0,98)	(0,710 ; 7,84)	(0,353 ; 2,94)	(0,68 ; 8,82)	 [62]	(226,8 ; 94,0)
 (0,429 ; 1,82)	(1,321 ; 14,6)	(0,658 ; 5,48)	(1,26 ; 16,4)	 [63]	(309,5 ; 68,9)

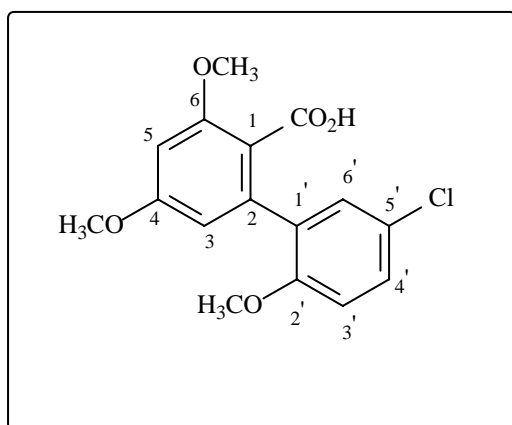
* O produto não pôde ser purificado, não apresentando rendimento.

- **Dados referentes ao ácido 4,6-dimetoxi-2-(5-metil-2-metoxifenil)benzóico [56]**



Após a etapa de purificação, verificou-se que o ácido carboxílico [56] ainda apresentava impurezas, que provavelmente possuíam o mesmo fator de retenção (R_f) que o material desejado. Este foi constatado por meio da inspeção do espectro de RMN de ^1H do composto 56, que mostrou a presença de sinais que não eram esperados para a substância 56. Sendo assim, optou-se por utilizar este material contaminado na etapa subsequente, tentando-se uma posterior purificação do novo produto.

- **Dados referentes ao ácido 4,6-dimetoxi-2-(5-cloro-2-metoxifenil)benzóico [57]**



Característica: Sólido branco.

T_f : 123,2 – 123,9 °C

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

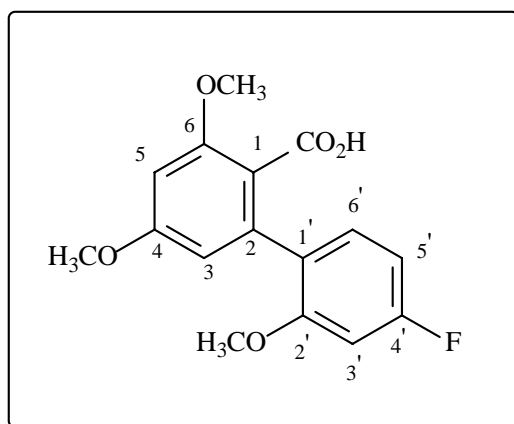
IV (Filme, NaCl, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{max}$: 3300-2500, 3005, 2940, 2841, 1692, 1599, 1493, 1249, 1031.

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 3,68 (s, 3H, 2'- OCH_3); 3,84 (s, 3H, 6- OCH_3); 3,92 (s, 3H, 4- OCH_3); 6,41 (d, 1H, $J_{5,3} = 2,4$, H-5); 6,52 (d, 1H, $J_{3,5} = 2,4$, H-3); 6,79 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8,7$, H-3'); 7,18 (d, 1H, $J_{6',4'} = 2,7$, H-6'); 7,26 (dd, 1H, $J_{4',3'} = 8,7$, $J_{4',6'} = 2,7$, H-4').

RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ : 55,79 (2'- OCH_3); 55,84 (6- OCH_3); 56,61 (4- OCH_3); 98,52 (C-3); 108,59 (C-5); 111,94 (C-3'); 113,98 (C-1); 125,58 (C-5'); 128,78 (C-6'); 129,77 (C-4'); 132,03 (C-1'); 141,06 (C-2); 155,06 (C-2'); 159,12 (C-6); 162,52 (C-4); 169,50 ($COOH$).

EM, m/z (%): 322 (M^+ , $C_{16}H_{15}O_5Cl$, 13); 324 ($M+2$, 4); 293 (35), 291 (100); 276 (15).

- **Dados referentes ao ácido 4,6-dimetoxi-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)benzóico [58]**



Característica: Sólido branco.

T_f: 172,0 – 173,2 °C

CCD: R_f = 0,29 (hexano/acetato de etila 1:2 v/v)

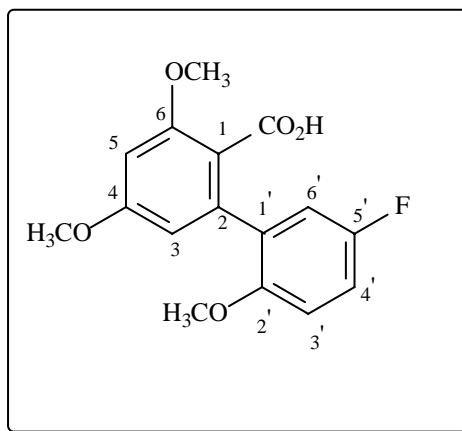
IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3500-2500, 3012, 2976, 2940, 2844, 1695, 1601, 1508, 1280, 1022, 829.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 3,68 (s, 3H, 2'-OCH₃); 3,84 (s, 3H, 6-OCH₃); 3,92 (s, 3H, 4-OCH₃); 6,42 (d, 1H, J_{5,3} = 2,4, H-5); 6,51 (d, 1H, J_{3,5} = 2,4, H-3); 6,61 (dd, 1H, J_{3',F} = 10,8, J_{3',5'} = 2,4, H-3'); 6,69 (td, 1H, J_{5',F} = J_{5',6'} = 8,4, J_{5',3'} = 2,4, H-5'); 7,15 (dd, J_{6',5'} = 8,4, J_{6',F} = 6,9, H-6').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ : 55,72 (2'-OCH₃); 55,77 (6-OCH₃); 56,56 (4-OCH₃); 98,17 (C-3); 99,27 (d, J_{C,F} = 25,7, C-3'); 107,11 (d, J_{C,F} = 21,2, C-5'); 108,81 (C-5); 114,43 (C-1); 126,21 (d, J_{C,F} = 3,4, C-1'); 130,76 (d, J_{C,F} = 9,8, C-6'); 141,31 (C-2); 157,57 (d, J_{C,F} = 9,8, C-2'); 158,98 (C-6); 162,34 (C-4); 163,98 (d, J_{C,F} = 244, C-4'); 169,83 (COOH).

EM, m/z (%): 306 (M⁺, C₁₆H₁₅O₅F, 19); 307 (M+1, 4); 275 (100); 260 (17).

- Dados referentes ao ácido 4,6-dimetoxi-2-(5-fluoro-2-metoxifenil)benzóico [59]



Característica: Sólido branco.

T_f: 117,6 – 118,8 °C

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

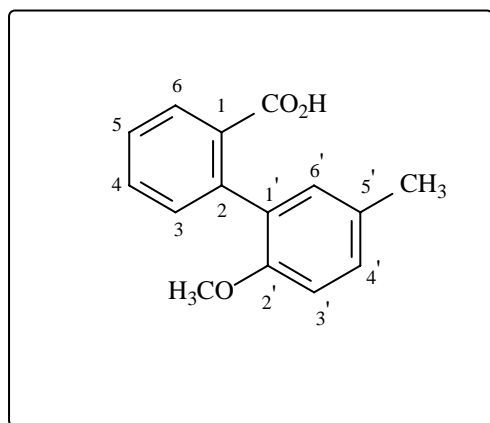
IV (Filme, NaCl, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3500- 2500, 3072, 3005, 2942, 2840, 1693, 1600, 1500, 1461, 1209, 1164, 1034.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 3,68 (s, 3H, 2'-OCH₃); 3,85 (s, 3H, 6-OCH₃); 3,93 (s, 3H, 4-OCH₃); 6,43 (d, 1H, J_{5,3} = 2,4, H-5); 6,52 (d, 1H, J_{3,5} = 2,4, H-3); 6,80 (dd, 1H, J_{3',4'} = 8,7, J_{3',F} = 4,5, H-3'); 6,96 (td, 1H, J_{4',3'} = J_{4',F} = 8,7, J_{4',6'} = 3,0, H-4'); 7,01 (dd, 1H, J_{6',F} = 8,1, J_{6',4'} = 3,0, H-6').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ : 55,82 (6-OCH₃); 56,11 (2'-OCH₃); 56,64 (4-OCH₃); 96,12 (C-1); 98,47 (C-3); 108,73 (C-5); 111,70 (d, J_{C,F} = 8,6, C-3'); 114,91 (d, J_{C,F} = 22,4, C-6'); 116,94 (d, J_{C,F} = 24,0, C-4'); 131,77 (d, J_{C,F} = 7,6, C-1'); 141,39 (C-2); 152,50 (d, J_{C,F} = 2,5, C-2'); 157,09 (d, J_{C,F} = 238, C-5'); 159,08 (C-6); 162,50 (C-4); 168,70 (COOH).

EM, m/z (%): 306 (M⁺, C₁₆H₁₅O₅F, 13); 307 (M+1, 2); 275 (100); 260 (16).

- Dados referentes ao ácido 2-(5-metil-2-metoxifenil)benzóico [60]



Característica: Sólido branco.

T_f: 162,9 – 165,0 °C

CCD: R_f = 0,32 (hexano/acetato de etila 1:1 v/v)

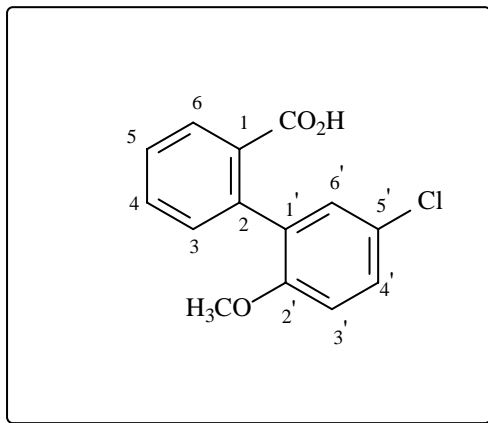
IV (Filme, NaCl, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3500-2500, 3060, 3002, 2924, 2834, 1690, 1599, 1503, 1296, 1279, 1251, 1237.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 2,35 (t, 3H, $J_{5'-CH_3, 4'} = J_{5'-CH_3, 6'} = 0,6$, 5'-CH₃); 3,68 (s, 3H, 2'-OCH₃); 6,77 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8,1$, H-3'); 7,09 (dd, 1H, $J_{6',4'} = 2,1$, $J_{6',5'-CH_3} = 0,6$, H-6'); 7,13 (ddd, 1H, $J_{4',3'} = 8,1$, $J_{4',6'} = 2,1$, $J_{4',5'-CH_3} = 0,6$, H-4'); 7,34 (ddd, 1H, $J_{6,5} = 7,8$, $J_{6,4} = 1,5$, $J_{6,3} = 0,6$, H-6); 7,40 (td, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 7,8$, $J_{5,3} = 1,5$, H-5); 7,57 (td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3} = 7,8$, $J_{4,6} = 1,5$, H-4); 7,92 (ddd, 1H, $J_{3,4} = 7,8$, $J_{3,5} = 1,5$, $J_{3,6} = 0,6$, H-3).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ : 20,80 (5'-CH₃); 55,34 (2'-OCH₃); 110,72 (C-3'); 127,30 (C-3); 129,60 (C-5); 129,98 (C-4'/C-5'); 130,27 (C-1'); 130,78 (C-6); 130,95 (C-2); 131,76 (C-6'); 132,47 (C-4); 139,27 (C-1); 154,26 (C-2'); 173,69 (COOH).

EM, m/z (%): 242 (M^+ ; $C_{15}H_{14}O_3$, 86); 243 ($M+1$, 14); 211 (100); 181 (37); 152 (31).

- **Dados referentes ao ácido 2-(5-cloro-2-metoxifenil)benzóico [61]**



Característica: Sólido branco.

T_f: 195,9 – 197,5 °C

CCD: R_f = 0,29 (hexano/acetato de etila 1:1 v/v)

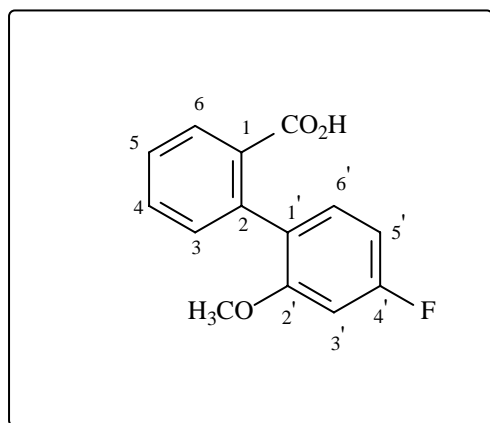
IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{max}$: 3500 – 2500, 3067, 3008, 2974, 1691, 1596, 1496, 1027, 813, 769.

RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 3,69 (s, 3H, 2'-OCH₃); 6,93 (d, 1H, $J_{3',4'}$ = 9,0, H-3'); 7,18 (d, 1H, $J_{6',4'}$ = 2,7, H-6'); 7,27 (ddd, 1H, $J_{6,5}$ = 7,5, $J_{6,4}$ = 1,5, $J_{6,3}$ = 0,6, H-6); 7,28 (dd, 1H, $J_{4',3'}$ = 9,0, $J_{4',6'}$ = 2,7, H-4'); 7,42 (td, 1H, $J_{5,6}$ = $J_{5,4}$ = 7,5, $J_{5,3}$ = 1,5, H-5); 7,57 (td, $J_{4,5}$ = $J_{4,3}$ = 7,5, $J_{4,6}$ = 1,5, H-4); 7,85 (ddd, 1H, $J_{3,4}$ = 7,5, $J_{3,5}$ = 1,5, $J_{3,6}$ = 0,6, H-3).

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD): δ : 54,70 (2'-OCH₃); 111,76 (C-3'); 125,16 (C-5'); 127,36 (C-3); 128,08 (C-5); 129,18 (C-6'); 129,28 (C-6); 131,02 (C-4'); 131,49 (C-4); 132,45 (C-1'); 132,69 (C-2); 137,71 (C-1); 155,44 (C-2'); 170,25 (COOH).

EM, m/z (%): 262 (M^+ , $C_{14}H_{11}O_3Cl$, 88); 264 ($M+2$, 28); 233 (33); 231 (100); 202 (27); 168 (50); 139 (44).

- Dados referentes ao ácido 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)benzóico [62]



Característica: Sólido branco.

T_f: 151,4 – 152,3 °C

CCD: R_f = 0,32 (hexano/acetato de etila 1:1 v/v)

IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{max}$: 3500-2500, 3084, 3006, 2980, 2944, 1689, 1603, 1506, 1449, 1153, 1031, 947, 840, 764.

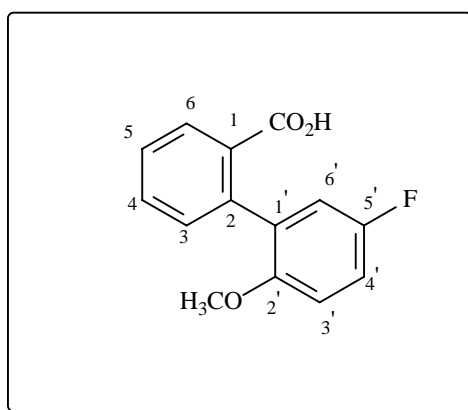
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 3,68 (s, 3H, 2'-OCH₃); 6,61 (dd, 1H, $J_{3',F} = 10,8$, $J_{3',5'} = 2,4$, H-3'); 6,74 (td, 1H, $J_{5',F} = J_{5',6'} = 8,4$, $J_{5',3'} = 2,4$, H-5'); 7,19 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8,4$, $J_{6',F} = 6,9$, H-6'); 7,30 (ddd, 1H, $J_{6,5} = 7,5$, $J_{6,4} = 1,5$, $J_{6,3} = 0,3$, H-6); 7,42 (td, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 7,5$, $J_{5,3} = 1,5$, H-5); 7,61 (td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3} = 7,5$, $J_{4,6} = 1,5$, H-4); 7,95 (ddd, 1H, $J_{3,4} = 7,5$, $J_{3,5} = 1,5$, $J_{3,6} = 0,3$, H-3).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ : 55,53 (2'-OCH₃); 99,20 (d, $J_{C,F} = 25,7$, C-3'); 107,32 (d, $J_{C,F} = 21,2$, C-5'); 126,39 (d, $J_{C,F} = 3,5$, C-1'); 127,55 (C-5);

130,27 (C-3); 130,61 (d, $J_{C,F} = 9,8$, C-6'); 130,64 (C-2); 131,82 (C-6); 132,69 (C-4); 138,65 (C-1); 157,55 (d, $J_{C,F} = 9,8$, C-2'); 163,63 (d, $J_{C,F} = 245$, C-4'); 173,55 (COOH).

EM, m/z (%): 246 (M^+ ; $C_{14}H_{11}O_3F$, 100); 245 ($M+1$, 15); 215 (97); 186 (52); 157 (40); 135 (86).

- Dados referentes ao ácido 2-(5-fluoro-2-metoxifenil)benzóico [63]



Característica: Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano/ AcOEt 3:1 v/v.

T_f: 141,7 – 142,9 °C

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

IV (Filme, NaCl, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{max}$: 3400 – 2500, 3068, 3002, 2941, 2837, 1691, 1596, 1499, 1251, 1179, 1033, 807, 731.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 3,67 (s, 3H, 2'-OCH₃); 6,79 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 9,3$, $J_{3',F} = 4,5$, H-3'), 7,00 (dd, 1H, $J_{6',F} = 8,1$, $J_{6',4'} = 3,3$, H-6'); 7,01 (ddd, 1H, $J_{4',3'} = 9,3$, $J_{4',F} = 8,1$, $J_{4',6'} = 3,3$, H-4'); 7,32 (ddd, 1H, $J_{6,5} = 7,5$, $J_{6,4} = 1,5$, $J_{6,3} = 0,6$, H-6); 7,44 (td, 1H, $J_{5,6} = J_{5,4} = 7,5$, $J_{5,3} = 1,5$, H-5); 7,60 (td, 1H, $J_{4,5} = J_{4,3} = 7,5$, $J_{4,6} = 1,5$, H-4); 7,85 (ddd, 1H, $J_{3,4} = 7,5$, $J_{3,5} = 1,5$, $J_{3,6} = 0,6$, H-3).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ : 55,85 ($2'\text{-OCH}_3$); 111,53 (d, $J_{\text{C,F}} = 8,6$, C-3'); 114,89 (d, $J_{\text{C,F}} = 22,3$, C-4'); 116,61 (d, $J_{\text{C,F}} = 24,0$, C-6'); 127,89 (C-5); 130,26 (C-3); 130,63 (C-2); 131,60 (C-6); 131,73 (C-1); 132,76 (C-4); 138,27 (d, $J_{\text{C,F}} = 3,3$, C-1'); 152,52 (d, $J_{\text{C,F}} = 1,7$, C-2'); 157,30 (d, $J_{\text{C,F}} = 237$, C-5'); 173,46 (COOH).

EM, m/z (%): 246 (M^+ , $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{F}$, 82); 245 ($\text{M}+1$, 12); 215 (100); 186 (38); 157 (28).

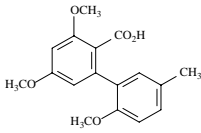
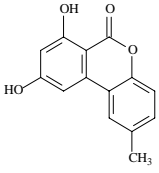
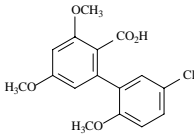
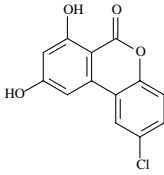
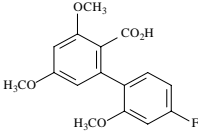
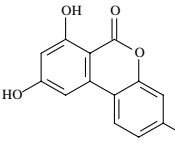
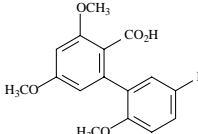
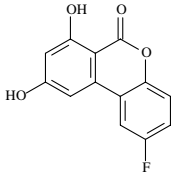
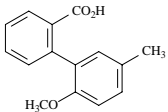
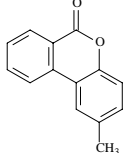
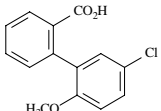
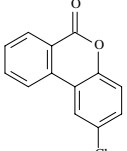
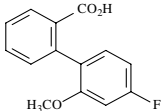
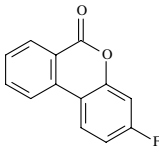
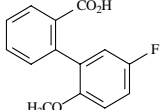
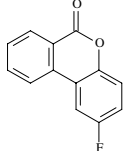
2.3.4. Procedimento geral para a reação de desproteção e ciclização

Em um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL), sob atmosfera de nitrogênio e a temperatura de 0°C , foi adicionada uma solução do ácido carboxílico desejado em diclorometano anidro. Em seguida foi adicionado lentamente uma solução $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de tribrometo de boro (BBr_3) em CH_2Cl_2 anidro observando-se uma mudança na coloração da mistura reacional passando-se a cor vermelha intensa. Após a adição, o banho de gelo foi retirado e o sistema foi mantido sob agitação magnética por um período de 24 horas à temperatura ambiente.

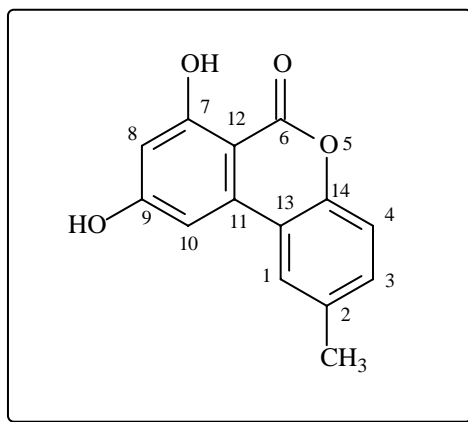
Com o término da reação, uma porção de 0,5 mL de metanol foi adicionado lentamente (aproximadamente 3 minutos) ao sistema até que não houvesse mais desprendimento de gás e que todo precipitado formado fosse novamente dissolvido. Em seguida os solventes foram evaporados e o resíduo foi extraído com acetato de etila (3 x 15 mL). Os extratos orgânicos foram combinados e a fase orgânica resultante foi seca com MgSO_4 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi submetido a fracionamento em coluna de sílica gel.

A tabela 3 apresenta as quantidades de reagentes utilizados nessas reações.

Tabela 3 - Quantidades de reagentes usados no preparo dos análogos **64** - **71**

Ácido carboxílico (g; mmol)	DCM anidro (mL)	BBr ₃ (mL ; mmol)	Produto / [Código]	Rendimento (mg ; %)
 (0,145 ; 0,48)	5	(3,84 ; 1,92)	 [64]	(38,7 ; 34,5)
 (0,500 ; 1,55)	10	(12,4 ; 6,20)	 [65]	(224,0 ; 55,0)
 (0,112 ; 0,37)	5	(2,90 ; 1,46)	 [66]	(43,7 ; 48,5)
 (0,196 ; 0,64)	5	(5,13 ; 2,56)	 [67]	(109,0 ; 69,0)
 (0,254 ; 1,05)	10	(6,0 ; 3,0)	 [68]	(174,0 ; 79,0)
 (0,150 ; 0,57)	5	(2,0 ; 1,0)	 [69]	(123,2 ; 93,5)
 (0,150 ; 0,61)	5	(2,0 ; 1,0)	 [70]	(126,8 ; 97,2)
 (0,150 ; 0,61)	5	(2,0 ; 1,0)	 [71]	(121,6 ; 93,3)

- Dados referentes ao 7,9-diidroxi-2-metil-6H-benzo[*c*]cromen-6-ona [64]



Característica: Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano/ AcOEt 7:1 v/v.

T_f: 281,8 - 283,1 °C

CCD: R_f = 0,40 (hexano/acetato de etila 1:1 v/v)

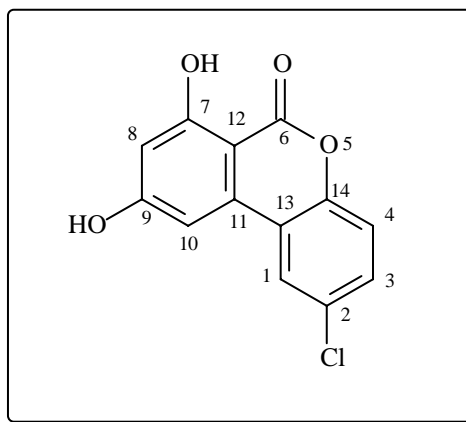
IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3222, 3130, 2925, 1641, 1587, 1510, 1456, 1209, 1172.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (*J*/Hz), atribuição): 2,39 (s, 3H, 2-CH₃); 6,44 (d, 1H, *J*_{8,10} = 2,4, H-8); 7,13 (d, 1H, *J*_{10,8} = 2,4, H-10); 7,28 (d, 1H, *J*_{4,3} = 8,4, H-4); 7,35 (dd, 1H, *J*_{3,4} = 8,4, *J*_{3,1} = 2,1, H-3); 7,92 (d, 1H, *J*_{1,3} = 2,1, H-1); 11,34 (simpleto alargado, 2H, 7-OH / 9-OH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆): δ : 20,01 (2-CH₃); 97,75 (C-12); 100,15 (C-10); 102,08 (C-8); 116,55 (C-4); 116,84 (C-13); 123,18 (C-1); 131,29 (C-3); 134,01 (C-2); 136,15 (C-11); 147,70 (C-14); 163,11 (C-7); 163,90 (C-6); 165,42 (C-9).

EM, m/z (%): 242 (M⁺, C₁₄H₁₀O₄, 100); 243 (M+1, 16); 214 (13); 213 (18).

- Dados referentes ao 2-cloro-7,9-diidroxi-6H-benzo[*c*]cromen-6-ona [65]



Característica: Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano/ AcOEt 5:1 v/v.

T_f: Maior que 295 °C

CCD: R_f = 0,49 (Hexano/acetato de etila 1:1 v/v)

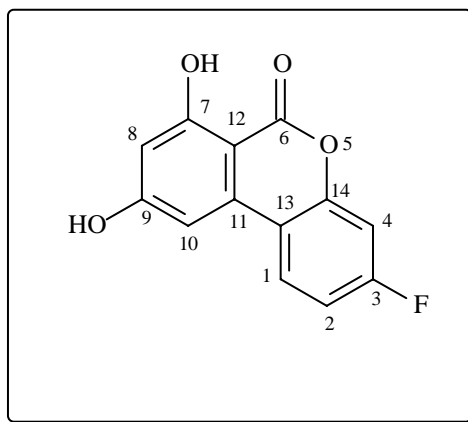
IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3395, 3086, 1678, 1570, 1457, 1410, 1090.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 6,45 (d, 1H, $J_{8,10} = 2,1$, H-8); 7,13 (d, 1H, $J_{10,8} = 2,1$, H-10); 7,37 (d, 1H, $J_{4,3} = 9,0$, H-4); 7,53 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9,0$, $J_{3,1} = 2,4$, H-3); 8,14 (d, 1H, $J_{1,3} = 2,4$, H-1); 11,17 (s, 2H, 7-OH / 9-OH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆): δ : 98,85 (C-12); 102,13 (C-8); 103,89 (C-1); 119,91 (C-4); 120,15 (C-2); 124,13 (C-10); 130,02 (C-13); 131,28 (C-3); 136,07 (C-11); 149,43 (C-14); 164,13 (C-9); 164,41 (C-7); 166,62 (C-6).

EM, m/z (%): 262 (M⁺, C₁₃H₇O₄Cl, 100); 264 (M+2, 32); 234 (16); 171 (12); 113 (18).

- Dados referentes ao 3-fluoro-7,9-diidroxi-6H-benzo[*c*]cromen-6-ona [66]



Característica: Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano/ AcOEt 5:1 v/v.

T_f: maior que 295 °C

CCD: R_f = 0,42 (hexano/acetato de etila 1:1 v/v)

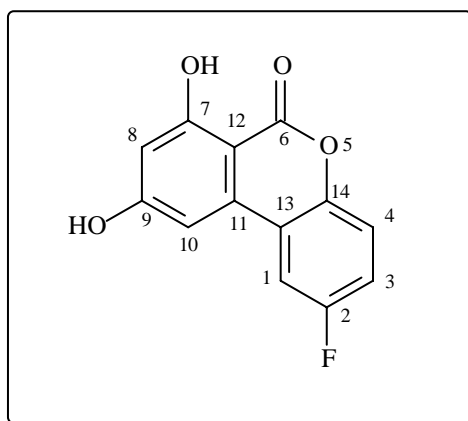
IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3450, 3239, 1673, 1607, 1465, 1293, 1207, 1192, 1156.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (*J*/Hz), atribuição): 6,42 (d, 1H, *J*_{8,10} = 2,1, H-8); 7,08 (d, 1H, *J*_{10,8} = 2,1, H-10); 7,23 (td, 1H, *J*_{2,1} = *J*_{2,F} = 8,7, *J*_{2,4} = 2,7, H-2); 7,34 (dd, 1H, *J*_{4,F} = 9,3, *J*_{4,2} = 2,7, H-4); 8,16 (dd, 1H, *J*_{1,2} = 8,7, *J*_{1,F} = 6,0, H-1); 11,14 (s, 2H, 7-OH / 9-OH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆): δ : 98,44 (C-12); 101,38 (C-10); 103,21 (C-8); 105,30 (d, *J*_{C,F} = 25,7, C-4); 113,47 (d, *J*_{C,F} = 22,3, C-2); 115,37 (C-11); 126,60 (d, *J*_{C,F} = 9,8, C-1); 136,77 (d, *J*_{C,F} = 2,8, C-13); 151,70 (d, *J*_{C,F} = 12,6, C-14); 163,57 (d, *J*_{C,F} = 247, C-3); 164,21 (C-9); 164,53 (C-7); 166,66 (C-6).

EM, m/z (%): 246 (M^+ , $C_{13}H_7O_4F$, 100); 247 ($M+1$, 13); 218 (19); 133 (28).

- **Dados referentes ao 2-fluoro-7,9-diidroxi-6H-benzo[*c*]cromen-6-ona [67]**



Característica: Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano/ AcOEt 5:1 v/v.

T_f: maior que 295 °C

CCD: R_f = 0,41 (hexano/acetato de etila 1:1 v/v)

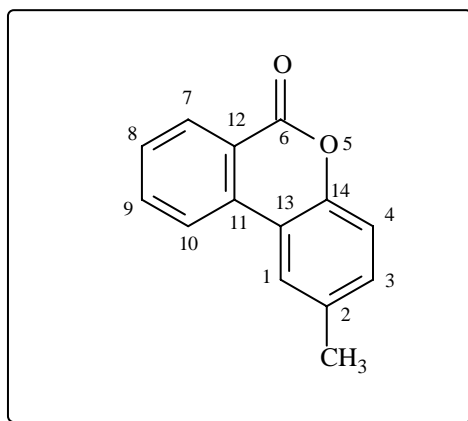
IV (KBr, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{max}$: 3445, 3301, 1676, 1579, 1467, 1185, 1102, 691.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (*J*/Hz), atribuição): 6,48 (d, 1H, $J_{8,10} = 1,8$, H-8); 7,17 (d, 1H, $J_{10,8} = 1,8$, H-10); 7,36 – 7,52 (m, 2H, H-4/H-3); 8,02 (dd, 1H, $J_{1,F} = 9,6$, $J_{1,3} = 2,4$, H-1); 11,08 (s, 1H, 9-OH); 11,27 (s, 1H, 7-OH).

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆): δ : 98,83 (C-12); 102,26 (C-10); 103,88 (C-8); 110,67 (d, $J_{C,F} = 24,6$, C-1); 118,84 (d, $J_{C,F} = 24,6$, C-3); 119,98 (d, $J_{C,F} = 7,4$, C-4/C-11); 136,54 (d, $J_{C,F} = 4,1$, C-13); 147,14 (d, $J_{C,F} = 2,0$, C-14); 159,61 (d, $J_{C-F} = 239$, C-2); 164,19 (C-9); 164,69 (C-7); 166,55 (C-6).

EM, m/z (%): 246 (M^+ , $C_{13}H_7O_4F$, 100); 247 ($M+1$, 13); 218 (21); 133 (35).

- Dados referentes ao 2-metil-6H-benzo[c]cromen-6-ona [68]



Característica: Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano/ AcOEt 10:1 v/v.

T_f: 125,2 – 126,5 °C

CCD: R_f = 0,26 (hexano/acetato de etila 7:1 v/v)

IV (Filme, NaCl, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3030, 2954, 2920, 2852, 1730, 1606, 1495, 1266, 1072, 1037, 807, 768.

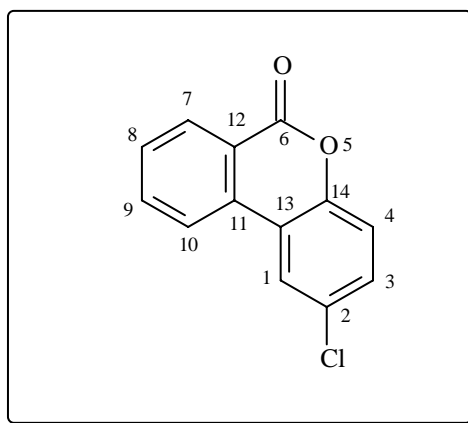
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J /Hz), atribuição): 2,45 (s, 3H, 2-CH₃); 7,24 (d, 1H, $J_{4,3} = 8,4$, H-4); 7,27 (dd, 1H, $J_{3,4} = 8,4$, $J_{3,1} = 1,2$, H-3); 7,56 (ddd, 1H, $J_{8,7} = 7,8$, $J_{8,9} = 7,2$, $J_{8,10} = 1,5$, H-8); 7,80 (ddd, 1H, $J_{9,10} = 7,8$, $J_{9,8} = 7,2$, $J_{9,7} = 1,5$, H-9); 7,82 (d, $J_{1,3} = 1,2$, H-1); 8,10 (ddd, 1H, $J_{7,8} = 7,8$, $J_{7,9} = 1,5$, $J_{7,10} = 0,6$, H-7); 8,39 (ddd, 1H, $J_{10,9} = 7,8$, $J_{10,8} = 1,5$, $J_{10,7} = 0,6$, H-10).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ : 21,35 (2-CH₃); 117,71 (C-4); 117,86 (C-11); 121,51 (C-12); 121,82 (C-10); 122,96 (C-8); 128,92 (C-3); 130,79 (C-7);

131,57 (C-1); 134,32 (C-13); 134,95 (C-9); 135,05 (C-2); 149,59 (C-14);
161,59 (C-6).

EM, m/z (%): 210 (M^+ , $C_{14}H_{10}O_2$, 100); 211 ($M+1$, 15); 181 (50); 152 (29),
76 (53).

- Dados referentes ao 2-cloro-6H-benzo[c]cromen-6-ona [69]



Característica: Sólido branco.

T_f: 174,8 – 176,4 °C

CCD: R_f = 0,27 (Hexano/acetato de etila 5:1 v/v)

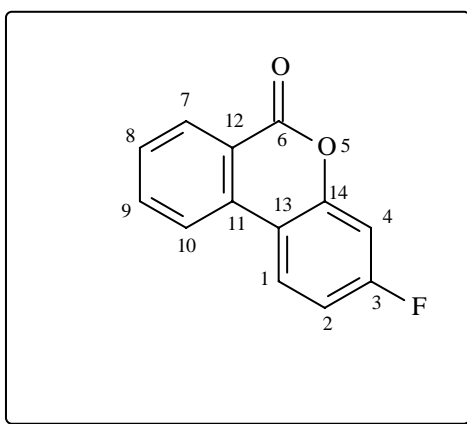
IV (Filme, Csl, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3084, 3068, 1747, 1604, 1484, 1265, 1067,
1035, 811, 766, 712, 680.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 7,32 (d, 1H, $J_{4,3} = 8,7$, H-4); 7,44 (dd, 1H, $J_{3,4} = 8,7$, $J_{3,1} = 2,4$, H-3); 7,64 (td, 1H, $J_{8,7} = J_{8,9} = 7,8$, $J_{8,10} = 1,5$, H-8); 7,86 (td, 1H, $J_{9,8} = J_{9,10} = 7,8$, $J_{9,7} = 1,5$, H-9); 8,03 (d, 1H, $J_{1,3} = 2,4$, H-1); 8,07 (duplete alargado, 1H, $J_{7,8} = 7,8$, H-7); 8,42 (dd, 1H, $J_{10,9} = 7,8$, $J_{10,8} = 1,5$, H-10).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ : 119,45 (C-4); 119,65 (C-2); 121,51 (C-13); 122,04 (C-7); 122,87 (C-1); 129,86 (C-8); 130,31 (C-11); 130,61 (C-3); 131,00 (C-10); 133,85 (C-12); 135,30 (C-9); 149,94 (C-14); 160,85 (C-6).

EM, m/z (%): 230 (M^+ , $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{O}_2\text{Cl}$, 100); 231 ($\text{M}+1$, 16); 232 ($\text{M}+2$, 32); 204 (13); 202 (41); 139 (63); 69 (61).

- Dados referentes ao 3-fluoro-6H-benzo[c]cromen-6-ona [70]



Característica: Sólido branco.

T_f: 150,5 – 152,0 °C

CCD: R_f = 0,30 (hexano/acetato de etila 5:1 v/v)

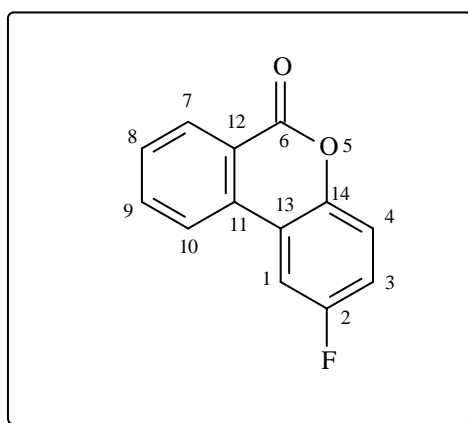
IV (Filme, Csl , cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3072, 1752, 1607, 1456, 1274, 1155, 1098, 875, 763, 712, 680.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 7,08 (td, 1H, $J_{2,F} = J_{2,1} = 8,4$, $J_{2,4} = 2,4$, H-2); 7,09 (dd, 1H, $J_{4,F} = 8,4$, $J_{4,2} = 2,4$, H-4); 7,58 (ddd, 1H, $J_{8,7} = 8,1$, $J_{8,9} = 7,5$, $J_{8,10} = 1,5$, H-8); 7,83 (ddd, 1H, $J_{9,10} = 8,1$, $J_{9,8} = 7,5$, $J_{9,7} = 1,5$, H-9); 8,04 (ddd, 1H, $J_{7,8} = 8,1$, $J_{7,9} = 1,5$, $J_{7,10} = 0,6$, H-7); 8,05 (dd, 1H, $J_{1,2} = 8,4$, $J_{1,F} = 7,2$, H-1); 8,39 (ddd, 1H, $J_{10,9} = 8,1$, $J_{10,8} = 1,5$, $J_{10,7} = 0,6$, H-10).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ : 105,36 (d, $J_{\text{C,F}} = 25,1$, C-4); 112,67 (d, $J_{\text{C,F}} = 22,3$, C-2); 114,86 (d, $J_{\text{C,F}} = 2,9$, C-13); 120,69 (C-11); 121,74 (C-7); 124,58 (d, $J_{\text{C,F}} = 9,8$, C-1); 129,01 (C-8); 130,94 (C-10); 134,50 (C-12); 135,31 (C-9); 152,41 (d, $J_{\text{C,F}} = 12,0$, C-14); 161,05 (C-6); 163,70 (d, $J_{\text{C,F}} = 250$, C-3).

EM, m/z (%): 214 (M^+ , $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{O}_2\text{F}$, 100); 215 ($\text{M}+1$, 14); 186 (63); 157 (54); 69 (38).

- Dados referentes ao 2-fluoro-6H-benzo[c]cromen-6-ona [71]



Característica: Sólido branco.

T_f: 148,3 – 149,4 °C

CCD: R_f = 0,31 (hexano/acetato de etila 5:1 v/v)

IV (Filme, CsI , cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3062, 1724, 1600, 1496, 1182, 1073, 873, 817, 764, 712, 681.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ (multiplicidade, integração, constante de acoplamento (J/Hz), atribuição): 7,19 (ddd, 1H, $J_{3,4} = 9,0$, $J_{3,\text{F}} = 7,5$, $J_{3,1} = 3,0$, H-3); 7,35 (dd, 1H, $J_{4,3} = 9,0$, $J_{4,\text{F}} = 4,5$, H-4); 7,63 (ddd, 1H, $J_{8,7} = 8,1$,

$J_{8,9} = 7,5$, $J_{8,10} = 1,5$, H-8); 7,72 (dd, 1H, $J_{1,F} = 9,0$, $J_{1,3} = 3,0$, H-1); 7,85 (ddd, 1H, $J_{9,10} = 8,1$, $J_{9,8} = 7,5$, $J_{9,7} = 1,5$, H-9); 8,03 (ddd, 1H, $J_{7,8} = 8,1$, $J_{7,9} = 1,5$, $J_{7,10} = 0,6$, H-7); 8,42 (ddd, 1H, $J_{10,9} = 8,1$, $J_{10,8} = 1,5$, $J_{10,7} = 0,6$, H-10).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ : 109,04 (d, $J_{C,F} = 24,6$, C-1); 117,98 (d, $J_{C,F} = 24,1$, C-3); 119,54 (d, $J_{C,F} = 8,6$, C-4); 121,48 (C-11); 122,14 (C-7); 129,82 (C-8/C-12); 130,97 (C-10); 134,16 (d, $J_{C,F} = 2,9$, C-13); 135,23 (C-9); 147,62 (d, $J_{C,F} = 2,7$, C-14); 159,53 (d, $J_{C,F} = 245$, C-2); 161,05 (C-6).

EM, m/z (%): 214 (M^+ , $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{O}_2\text{F}$, 100); 215 ($\text{M}+1$, 14); 186 (58); 157 (51); 69 (29).

2.4. Ensaios biológicos

2.4.1. Avaliação do efeito dos compostos **64**, **65** e **68** sobre o transporte de elétrons da água para o acceptor não-biológico $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, em cloroplastos isolados de espinafre

Alguns dos compostos sintetizados foram enviados à Università degli Studi di Ferrara - Itália, no Laboratorio di Fisiologia e Biochimica Vegetale onde o professor Giuseppe Forlani submeteu os análogos **64**, **65** e **68** a ensaios biológicos para avaliar o potencial efeito destes compostos sobre o transporte de elétrons em cloroplastos isolados de espinafre.

Cloroplastos fotossinteticamente ativos foram isolados de folhas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.) adquiridas em supermercados ou feiras livres. O material vegetal, livre da nervura central e extremidades apical e basal, foi misturado em tampão de N-tris(hidroximetil)metilglicina (tricina)-NaOH 20 mmol L⁻¹ (pH 8,0; 5 mL de solução/g de material vegetal) contendo 10 mmol L⁻¹ de NaCl, 5 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 0,4 mol L⁻¹ de sacarose, sendo que o sistema encontrava-se previamente resfriado. Em seguida, este material foi homogeneizado por 30 s em um liquidificador.

O homogenato foi filtrado através de uma gaze cirúrgica, e o filtrado foi centrifugado a 4 °C por 1 min a 500 g. O sobrenadante foi

posteriormente centrifugado por 10 min a 1500 g. Os cloroplastos foram inchados osmoticamente pela resuspensão em tampão desprovido de sacarose. A suspensão foi imediatamente diluída na proporção 1:1 (v/v) em tampão contendo sacarose, mantida em gelo no escuro, e usada logo após preparação. Após a diluição adequada com acetona 80% v/v, a absorbância de cada amostra foi determinada a 645 e 663 nm, e a quantidade de clorofila foi calculada pela fórmula de Arnon (HALL, 1980):

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

A taxa de transporte de elétrons na fotossíntese foi medida pela redução de ferricianeto exposto à luz. Alíquotas da suspensão de cloroplastos com 20 μg de clorofila foram incubadas a 24 °C em cubetas de 1 mL contendo tampão de tricina-NaOH 20 mmol L⁻¹ (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]. O ensaio foi iniciado pela exposição à luz saturada (800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a taxa de redução de ferricianeto foi medida a 420 nm em intervalos de 30 s por 10 min e comparada com um branco. A atividade foi calculada sobre a porção linear da curva, a partir de coeficiente de extinção molar de 1000 M⁻¹cm⁻¹. Sob as condições adotadas o valor para controle não tratado foi 65,8 ± 2,0 nmol de ferricianeto reduzido s⁻¹ (mg de clorofila)⁻¹.

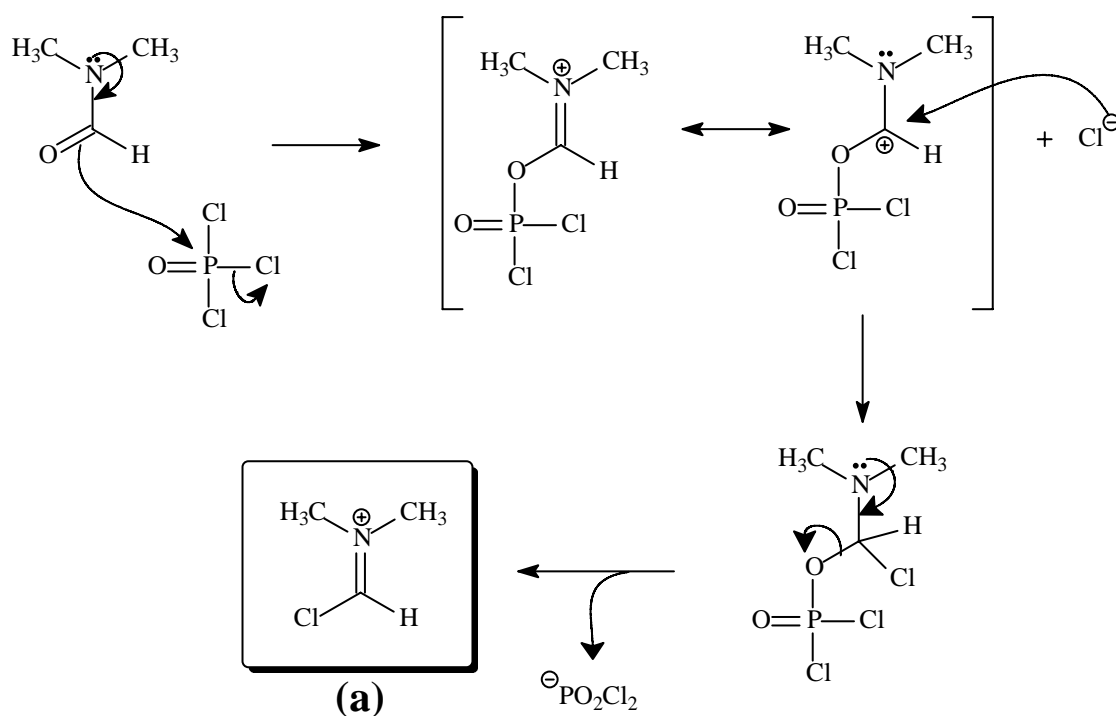
Para cada composto foi preparada uma solução 50 mmol L⁻¹ em DMSO, que foi posteriormente diluída com água. A partir dessas soluções estoques, foram preparadas soluções nas concentrações de 5, 10, 20, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese do 2-bromo-4,6-dimetoxibenzaldeído [47]

A primeira etapa no desenvolvimento deste trabalho consistiu na síntese do 2-bromo-4,6-dimetoxibenzaldeído [47] por meio da formilação de Vilsmeier, utilizando a dimetilformamida (DMF) e cloreto de fosforila (POCl_3) (SARGENT, 1982; KOCH *et al.*, 2005). O aldeído foi obtido como um sólido cristalino com rendimento de 73%.

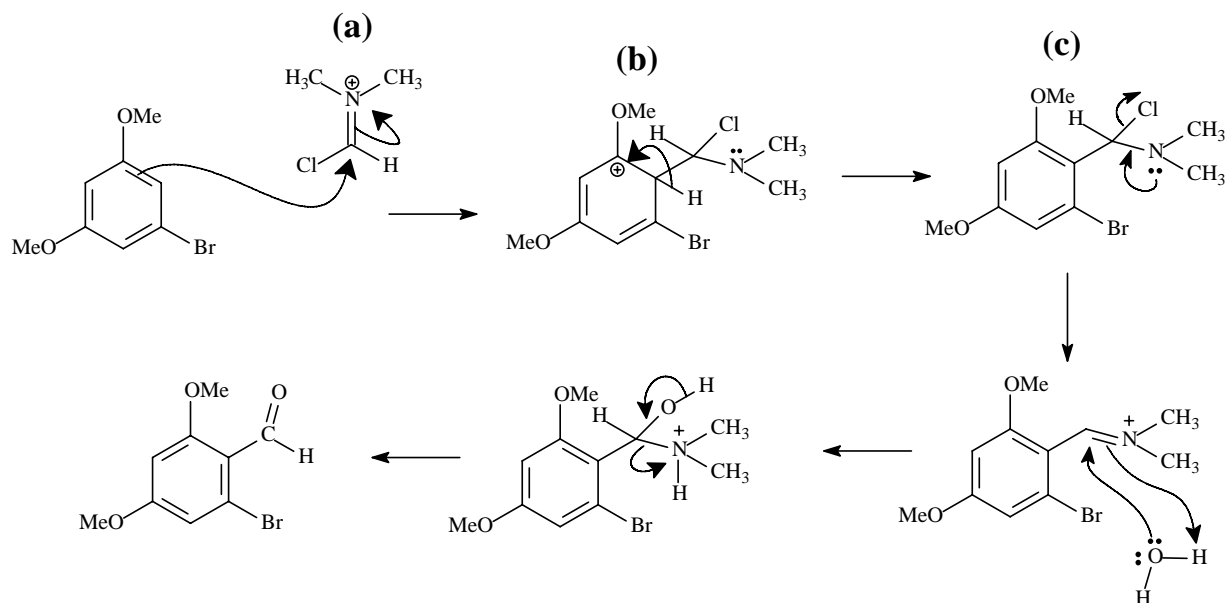
Na reação de Vilsmeier, o agente formilante é gerado *in situ* por meio da reação entre DMF e POCl_3 , levando a formação do cátion **(a)** pela liberação do íon $[\text{PO}_2\text{Cl}_2]^-$, conforme mostrado no Esquema 2.



Esquema 2 - Geração do agente formilante.

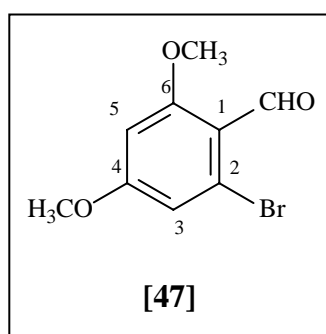
O cátion **(a)** (um eletrófilo) recebe dois elétrons do sistema π do anel aromático do 1-bromo-3,5-dimetoxibenzeno (rico em elétrons) levando à formação do íon arênio **(b)** substituído na posição do anel aromático vizinho ao bromo, uma vez que esta é a posição menos impedida espacialmente (Esquema 3)

Na etapa seguinte, o íon arênio perde um próton restabelecendo a aromaticidade, resultando na formação do composto **(c)**, que na etapa de elaboração é hidrolisado dando origem ao aldeído desejado (Esquema 3).



Esquema 3 - Proposta mecanística para a síntese do aldeído **[47]**.

Uma descrição detalhada do processo de caracterização deste composto será apresentada a seguir.



No espectro no IV do composto **47** (Figura 2), observa-se uma intensa banda de absorção em 1683 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo carbonila do aldeído aromático.

A estrutura do composto, bem como o grau de pureza em que foi obtido pôde ser confirmada pelos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN de ^1H da substância **47** é apresentado na Figura 3. O sinal em $\delta = 10,28$ foi atribuído ao átomo de hidrogênio do grupo formil (-

CHO). Com relação aos átomos de hidrogênio aromáticos foram observados dois dupletos em $\delta = 6,40$ e $\delta = 6,75$ (ambos com $J = 2,4$ Hz), respectivamente. Estes sinais são esperados para compostos aromáticos tetrassubstituídos e que possuam seus átomos de hidrogênio aromáticos em posição *meta*. Os sinais dos átomos de hidrogênio dos grupos metoxila foram observados em $\delta = 3,84$ e $\delta = 3,86$, sendo atribuídos conforme cálculos teóricos de deslocamento químico (Figura 3).

No espectro de RMN de ^{13}C do aldeído **47**, foram observados 9 sinais conforme seria esperado (Figura 4), sendo o sinal do grupo carbonila (-CHO) observado em $\delta = 190,86$. Este sinal confirma a formação do produto desejado.

No espectro de massas (Figura 5) observou-se a presença dos picos em m/z 244 ($[\text{M}^+]$) e m/z 246 ($[\text{M}+2]$) com intensidades relativas de 59 e 56 %, respectivamente, que confirmam a presença do elemento bromo na estrutura do composto **47**.

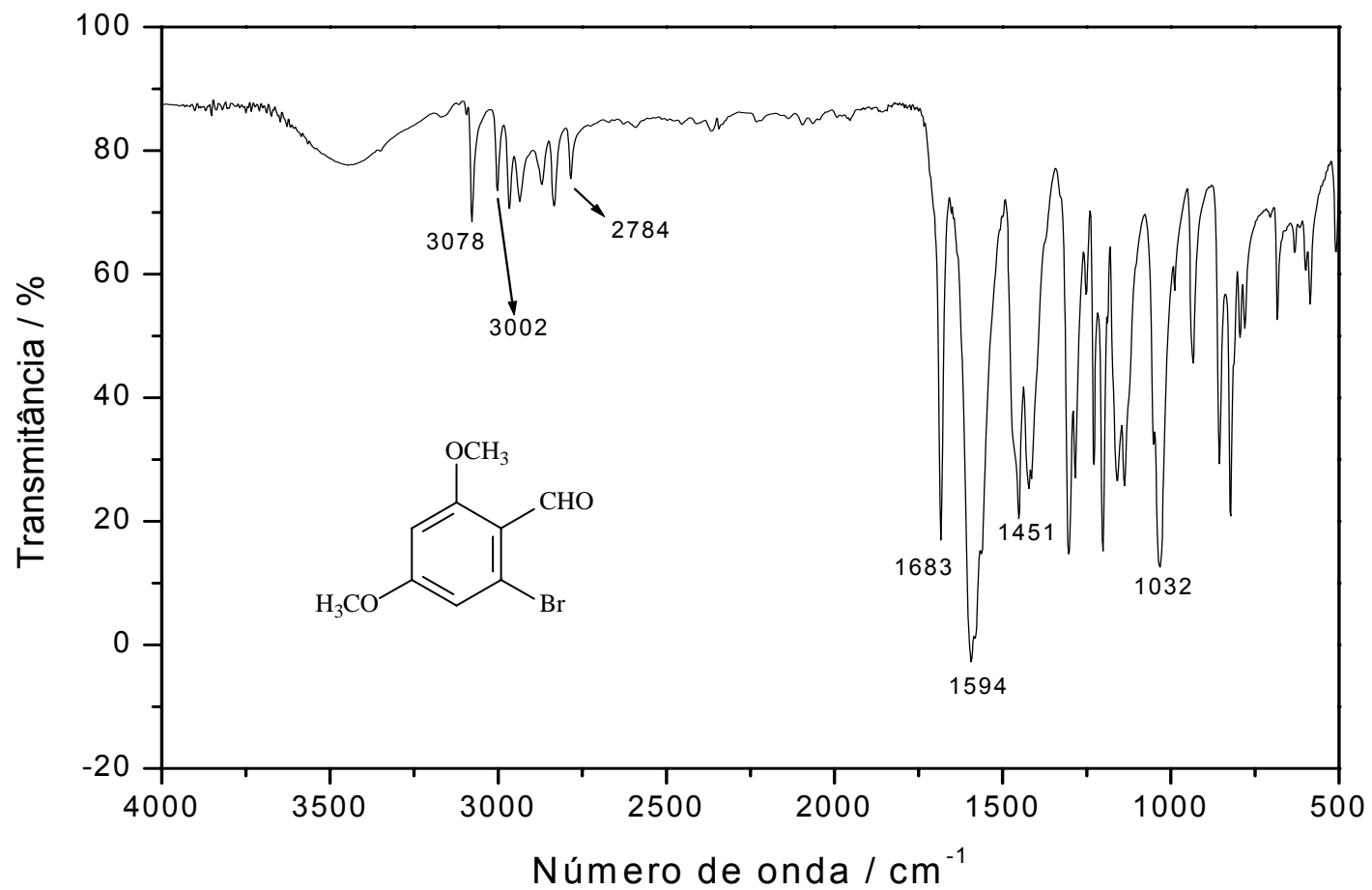


Figura 2 - Espectro no infravermelho do composto **47**.

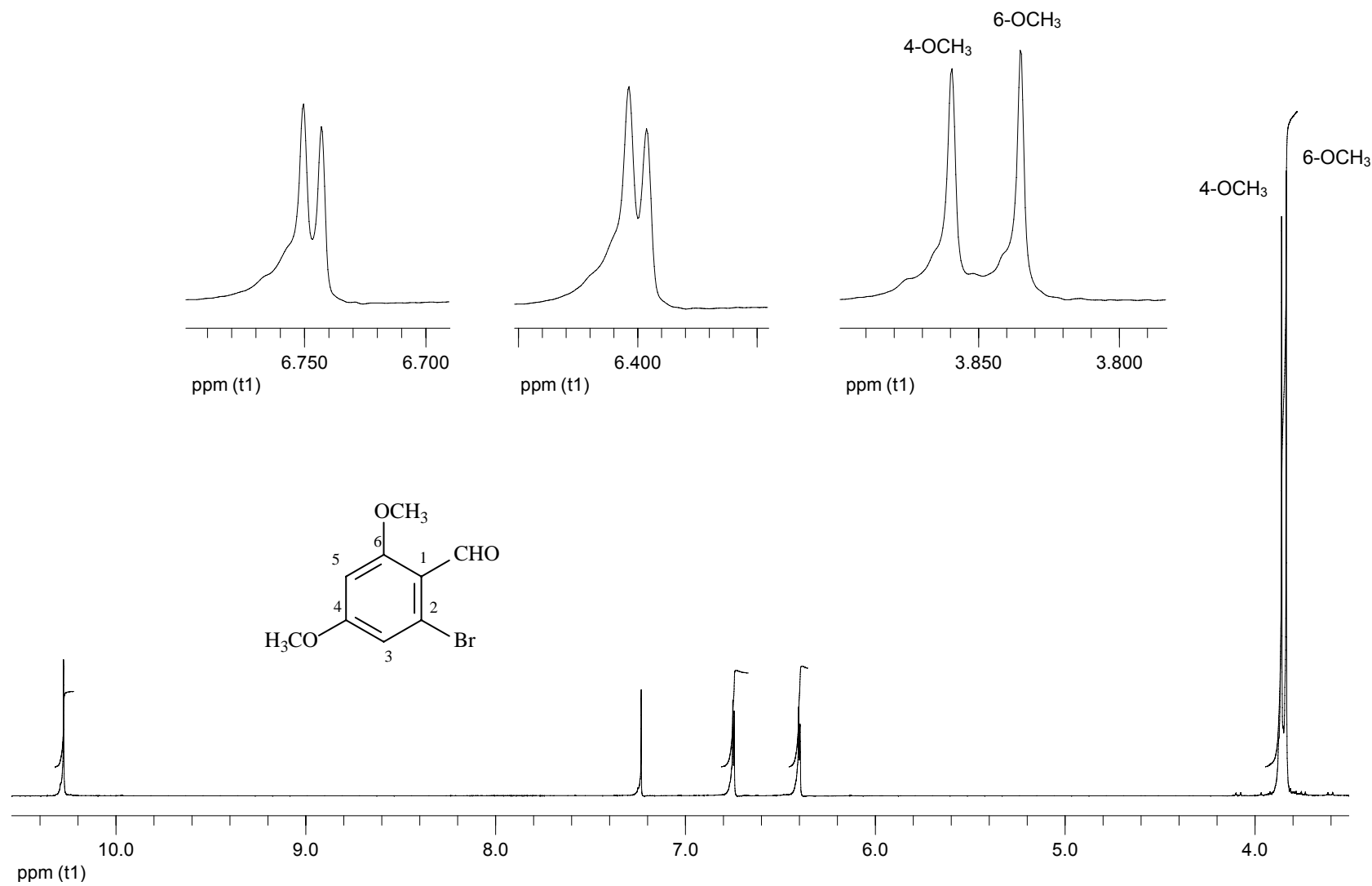


Figura 3 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **47**.

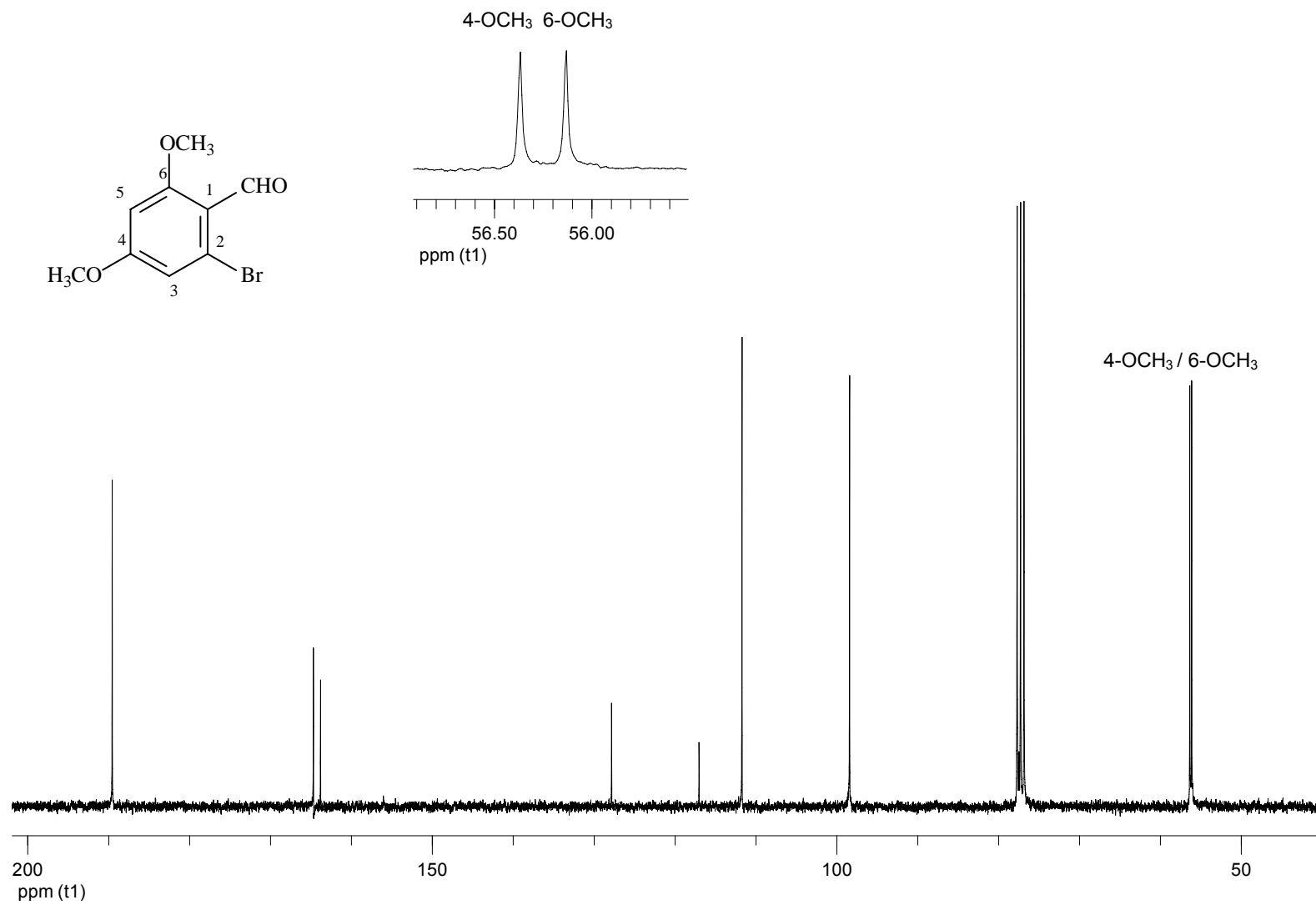


Figura 4 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **47**.

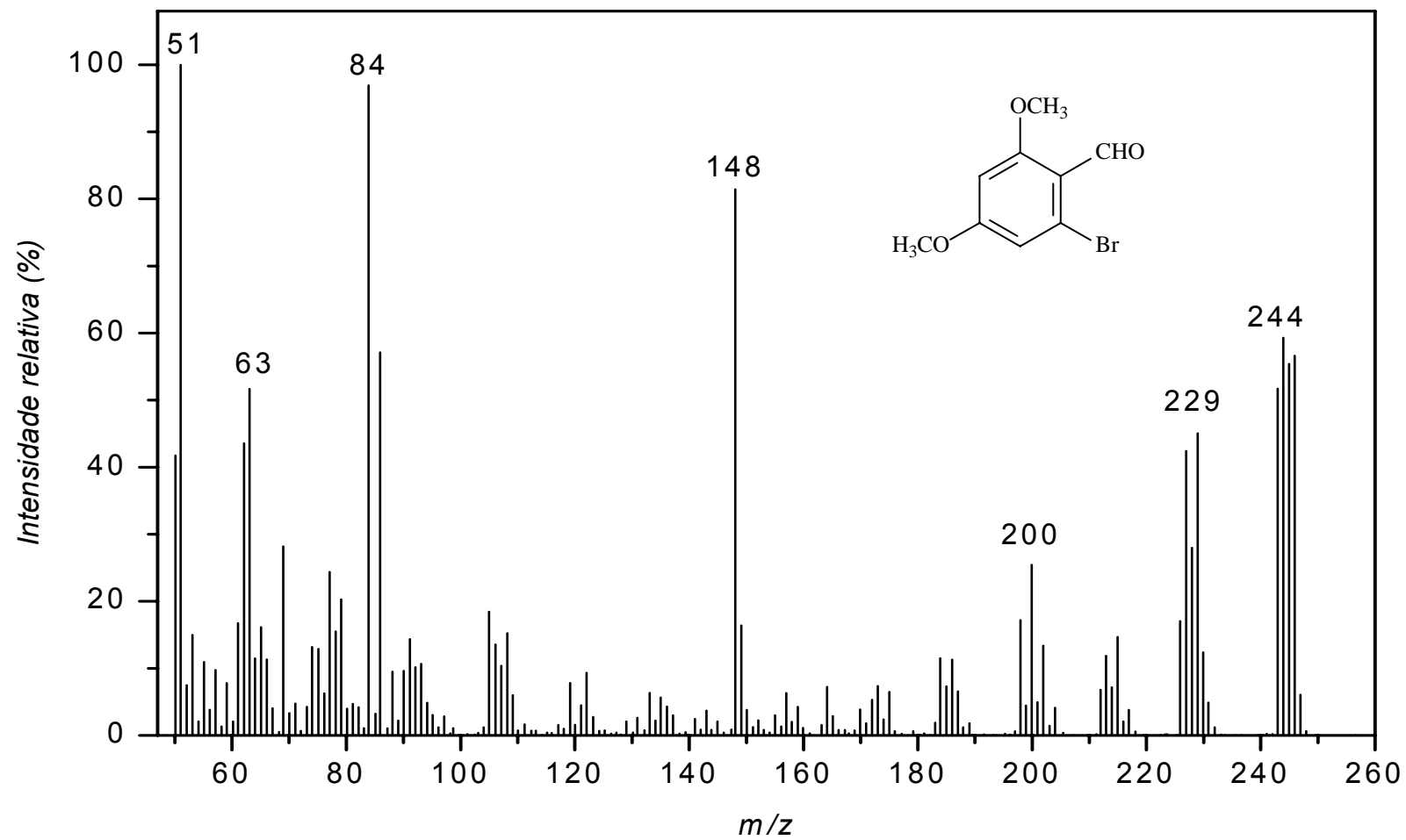
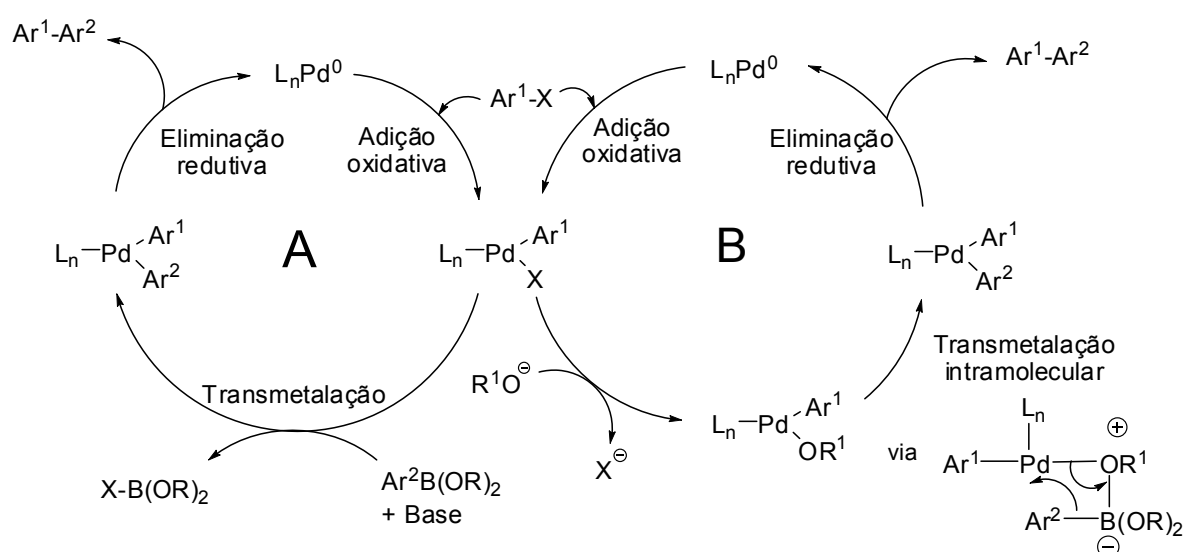


Figura 5 - Espectro de massas do composto 47.

3.2. Síntese das biarilas pelo acoplamento de Suzuki

Na síntese das biarilas descritas neste trabalho, utilizou-se a reação de acoplamento de Suzuki entre um haleto de arila e um ácido borônico. Esta reação ocorre na presença de um catalisador de paládio (0), neste caso $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, em meio básico (K_2CO_3), perfazendo um ciclo catalítico que passa por uma etapa de adição oxidativa, seguida de uma transmetalção e por fim uma eliminação redutiva levando à formação da biarila (Esquema 4) (MARTIN & BUCHWALD, 2008; SUZUKI, 2002).

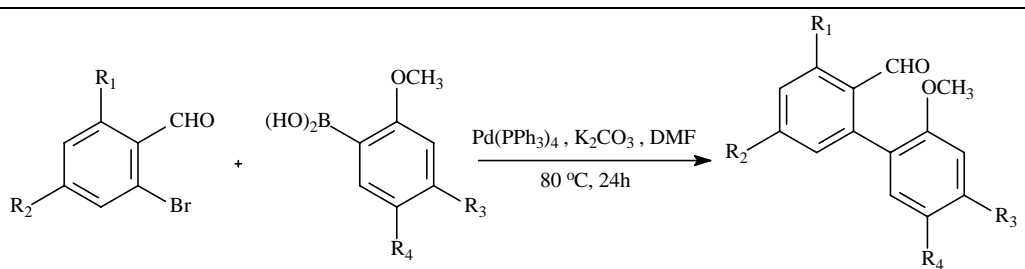


Esquema 4 - Ciclo catalítico para a síntese de biarilas por acoplamento de Suzuki.

Além do K_2CO_3 , outras bases poderiam ter sido usadas. Até o presente momento, a literatura coloca a escolha das bases como sendo ainda empírica e não há nenhuma regra estabelecida para esta escolha. Tem se proposto que o papel da base é facilitar o processo de transmetalção do ácido borônico pela formação de boronatos mais reativos na interação com o centro metálico (caminho A) ou ainda propõe-se que a base possa deslocar o haleto da esfera de coordenação do complexo de paládio facilitando uma transmetalção intramolecular (caminho B) (MARTIN & BUCHWALD, 2008).

A Tabela 4 a seguir apresenta as biarilas sintetizadas bem como os rendimentos que foram obtidos.

Tabela 4 - Biarilas sintetizadas

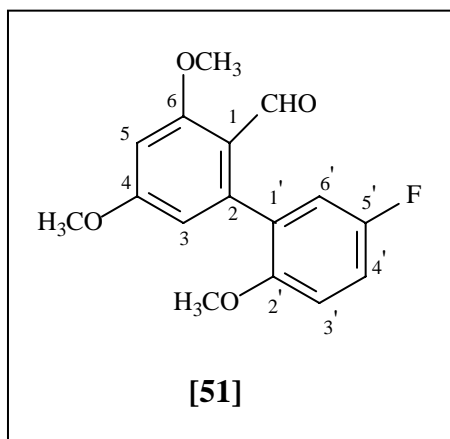


R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Produto	Rendimento (%)
OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	[48]	68,0
OCH ₃	OCH ₃	H	Cl	[49]	75,5
OCH ₃	OCH ₃	F	H	[50]	-
OCH ₃	OCH ₃	H	F	[51]	71,2
H	H	H	CH ₃	[52]	94,4
H	H	H	Cl	[53]	37,6
H	H	F	H	[54]	69,9
H	H	H	F	[55]	-

Embora alguns dos ácidos borônicos utilizados também possam ser considerados haletos de arila (por possuírem átomos de cloro ou flúor em suas estruturas), não foram observados acoplamentos entre as próprias moléculas de ácido borônico (auto-acoplamento). Este fato pode ser explicado pela ordem de reatividade dos haletos, que a literatura apresenta como sendo $I > OTf > Br \gg Cl > F$ (MIYAURA e SUZUKI, 1995). Sendo assim, a reação de acoplamento ocorreu apenas entre o ácido borônico e o brometo de arila e não entre moléculas de ácido borônico que continham átomos de cloro ou fluor em sua estrutura.

Em todas as reações de acoplamento, os compostos foram preparados segundo uma mesma metodologia sintética (KOCH *et al.*, 2005), sendo posteriormente isolados da mistura reagente, purificados por cromatografia em coluna de sílica gel e caracterizados por espectroscopia no Infravermelho, RMN de ¹H e de ¹³C. Experimentos bidimensionais HETCOR auxiliaram nas atribuições dos sinais de ¹³C e espectrometria de massas.

O primeiro composto sintetizado foi a substância **51**. Uma descrição detalhada do processo de caracterização deste composto será apresentada a seguir, fazendo menção as outras estruturas deste grupo de compostos.



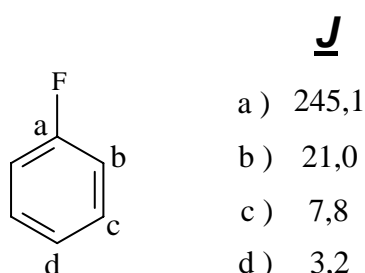
No espectro no IV do composto **51** (Figura 6), observou-se uma intensa banda de absorção em 1686 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo carbonila do aldeído aromático. Nos demais compostos *orto*-metoxilados esta banda de absorção foi observada próxima a 1686 cm^{-1} . No caso das biarilas **52** – **55** esta banda de absorção foi observada numa faixa de frequência maior (de 5 a 15 cm^{-1}) variando de $1690\text{-}1697\text{ cm}^{-1}$. A ausência dos grupamentos metoxílicos em posição *orto* à carbonila contribuem para o aumento dos valores de absorção, pois não há mais o efeito doador de elétrons por ressonância, que enfraquecia a ligação C=O (BARBOSA, 2007; SOCRATES, 1994).

Com relação ao espectro de RMN de ^1H da substância **51** (Figura 7), foram observados 9 sinais, conforme esperado. O sinal correspondente ao hidrogênio ligado ao grupo formil ($-\text{CHO}$) foi observado em $\delta = 9,95$, sendo que nas demais biarilas sintetizadas os deslocamentos químicos foram próximos a este valor. As metoxilas apresentaram-se em $\delta = 3,69$, $3,87$ e $3,93$, correspondendo, respectivamente, a $2'\text{-OCH}_3$, 6-OCH_3 e 4-OCH_3 . Os dois sinais observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 7) em $\delta = 6,35$ (d, $J = 2,4$, 1H; H-5) e $\delta = 6,50$ (d, $J = 2,4$, 1H; H-3) correspondem a um padrão que é característico de anéis aromáticos tretrassubstituídos e que possuem dois átomos de hidrogênio em posição *meta*. Sendo assim, estes átomos

de hidrogênio correspondem àqueles pertencentes ao anel que contem o grupo aldeído.

Como mostrado anteriormente, a substância **51** apresenta em sua estrutura um átomo de flúor ligado a um dos anéis aromáticos. Pelo fato do ^{19}F possuir número de spin igual a $\frac{1}{2}$, há um desdobramento dos sinais em função do acoplamento entre hidrogênio e flúor, obedecendo à mesma regra de multiplicidade. Este acoplamento se dá concomitantemente aos já esperados entre hidrogênios aromáticos e em geral apresentam constantes de acoplamento maiores que as de H-H (SILVERSTEIN *et al.*, 2000). O duplo duplete observado em $\delta = 6,83$ apresentou valores de constante de acoplamento iguais a 9,0 e 4,5 Hz, sendo estes valores atribuídos ao acoplamento entre H-H em *orto* e H-F em *meta* respectivamente, sendo este sinal atribuído ao átomo de hidrogênio H-3'. Da mesma forma, o sinal do átomo de hidrogênio H-6' também se mostrou como um duplo duplete ($\delta = 6,93$), porém com $J_{6',4'} = 3,0$ e $J_{6',\text{F}} = 8,4$ Hz. Já H-4' apresentou-se como duplo duplo duplete com $J_{4',3'} = 9,0$, $J_{4',\text{F}} = 8,1$ e $J_{4',6'} = 3,0$ Hz.

Similar ao que ocorreu no espectro de RMN de ^1H do composto **51**, alguns sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C sofreram desdobramentos devido à presença do átomo de flúor na molécula. Neste caso, as constantes de acoplamento entre os átomos de flúor e carbono apresentam valores próximos aos mostrados no Esquema 5 (PRETSCH *et al.*, 1989).



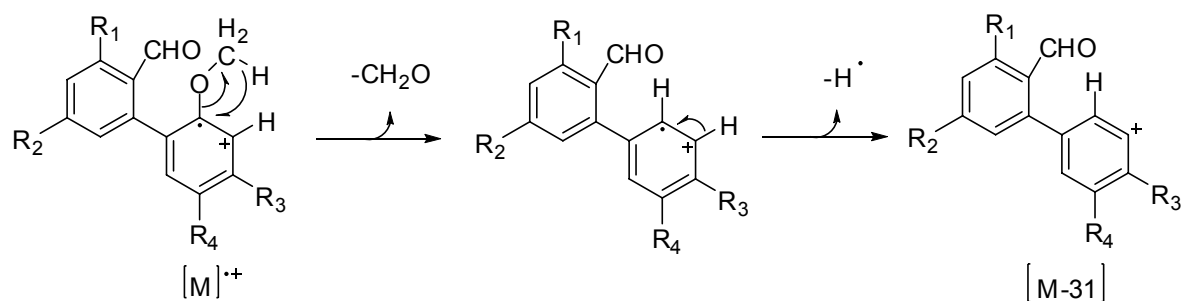
Esquema 5 – Valores para constantes de acoplamento carbono-flúor.

Os seis sinais em $\delta = 111,48$ (d, $J_{\text{C},\text{F}} = 8,3$ Hz, C-3'), $\delta = 115,35$ (d, $J_{\text{C},\text{F}} = 22,4$ Hz, C-4'), $\delta = 117,29$ (d, $J_{\text{C},\text{F}} = 23,8$ Hz, C-6'), $\delta = 130,36$ (d, $J_{\text{C},\text{F}} = 7,7$ Hz, C-1'), $\delta = 152,57$ (d, $J_{\text{C},\text{F}} = 2,2$ Hz, C-2') e $\delta = 156,99$ (d, $J_{\text{C},\text{F}} = 238$ Hz, C-5') no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 8) apareceram desdobrados

na forma de dupletos, evidenciando a presença do flúor em um dos anéis aromáticos. Estes sinais foram atribuídos em função dos valores das constantes de acoplamento C-F, bem como com auxílio da técnica de RMN bidimensional HETCOR (Figura 9). O sinal observado em $\delta = 189,88$ foi atribuído ao grupo carbonila do aldeído aromático.

O espectro de massas da substância **51** (Figura 10) apresentou um pico em m/z igual a 290, que é compatível com a fórmula molecular do composto $C_{16}H_{15}O_4F$.

Nos espectros de massas das biarilas de um modo geral são observadas poucas fragmentações, onde o pico do íon molecular (M^+) é pouco intenso. Porém, para todos os produtos de acoplamento, o pico $[M-31]$ é o pico base, correspondendo à perda de uma metoxila. Esta corresponde à única fragmentação expressiva para estes compostos, uma vez que os mesmos são bastante estáveis (compostos aromáticos). No Esquema 6 é mostrada esta fragmentação (SILVERSTEIN *et al.*, 2000).



Esquema 6 - Fragmentações das biarilas obtidas pelo acoplamento de Suzuki.

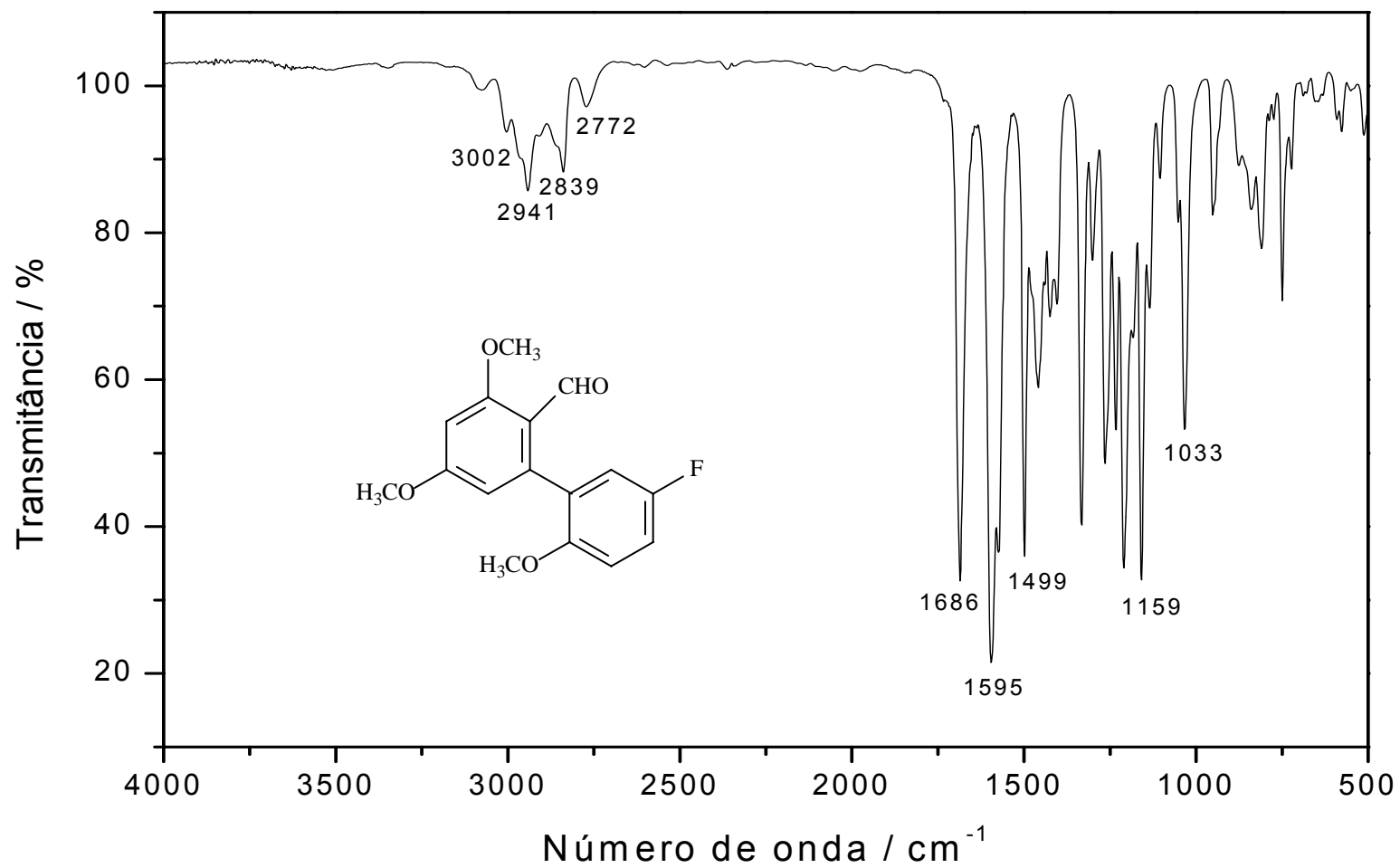


Figura 6 - Espectro no infravermelho do composto **51**.

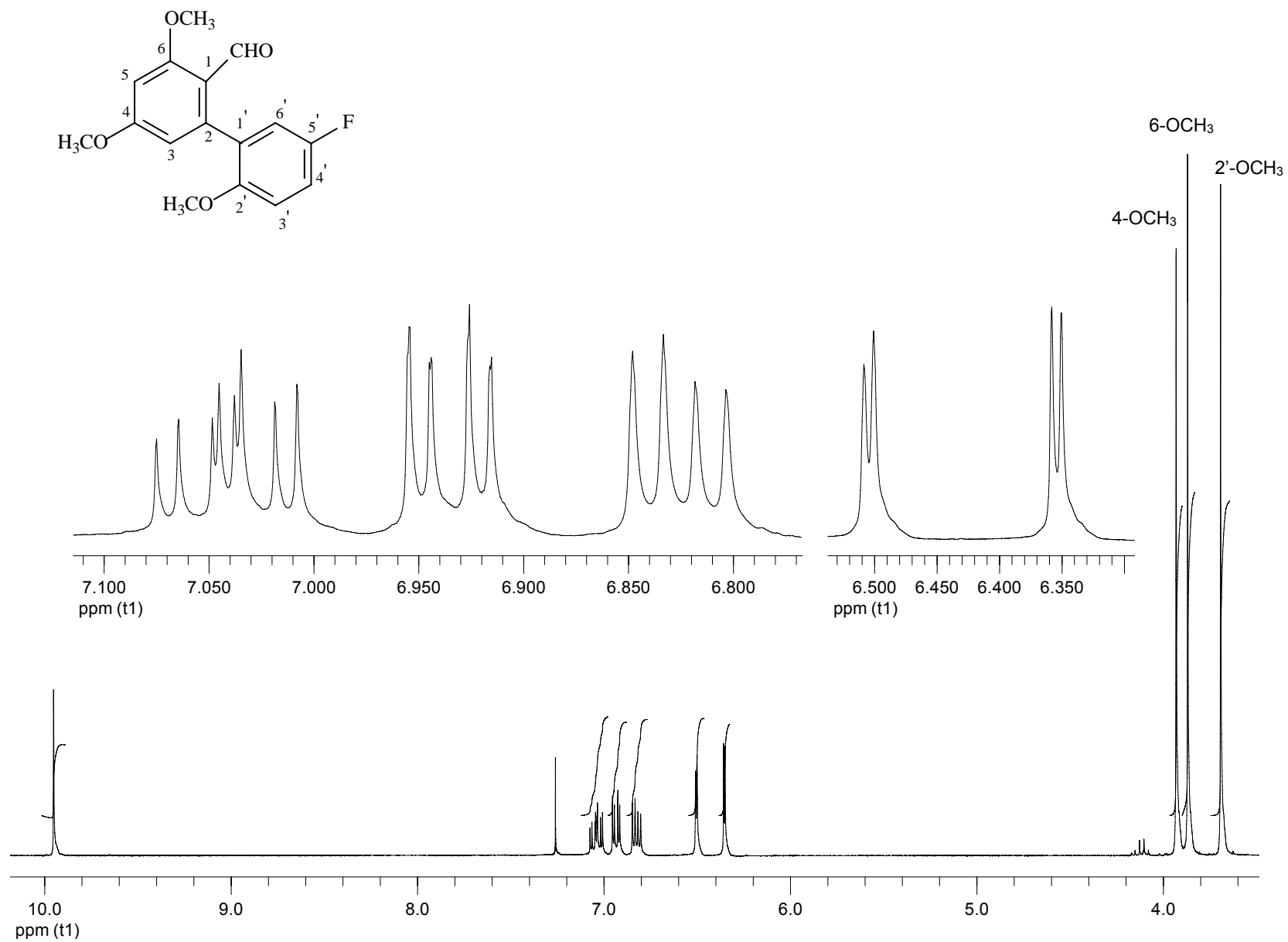


Figura 7 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **51**.

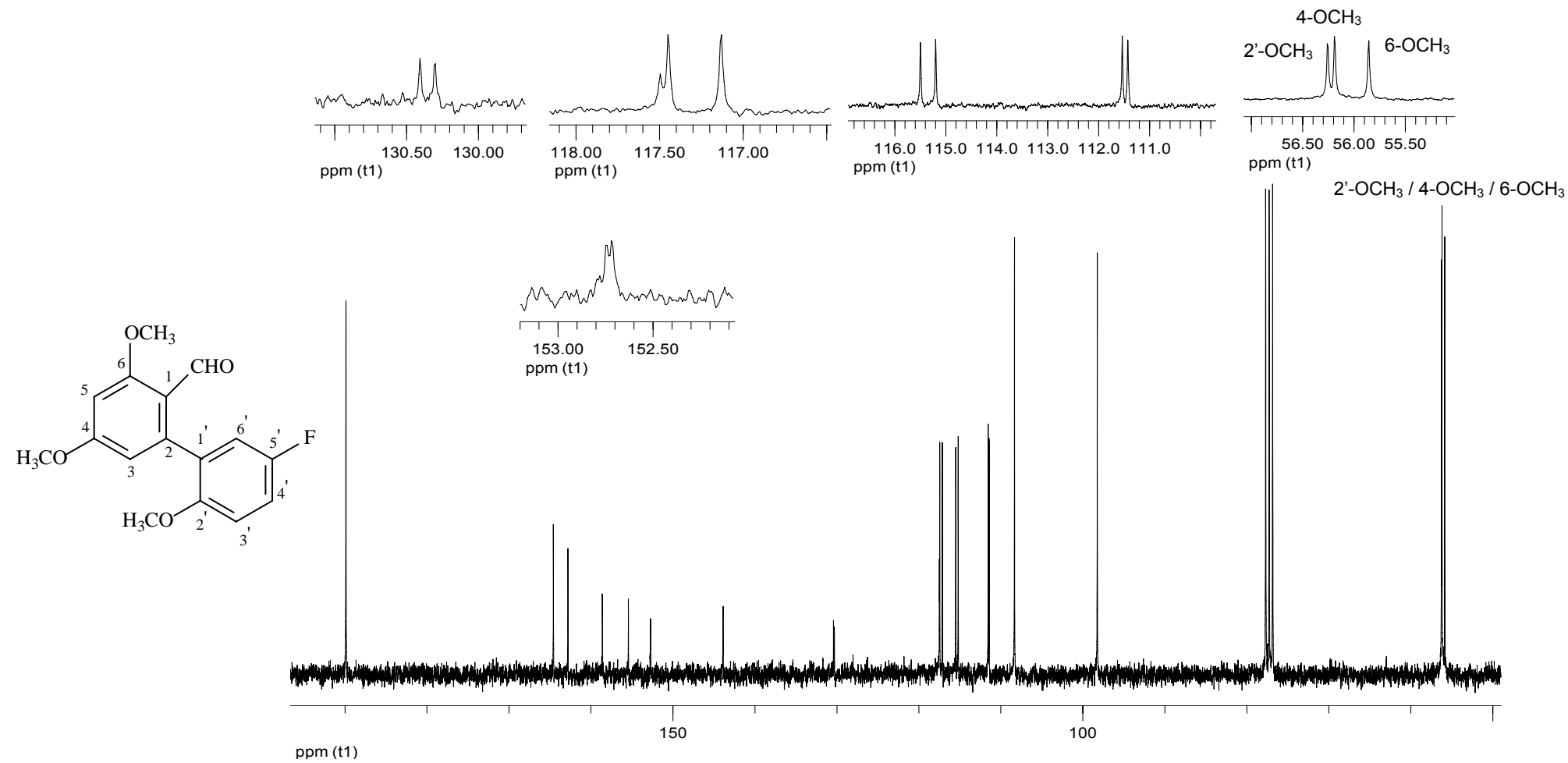


Figura 8 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 51.

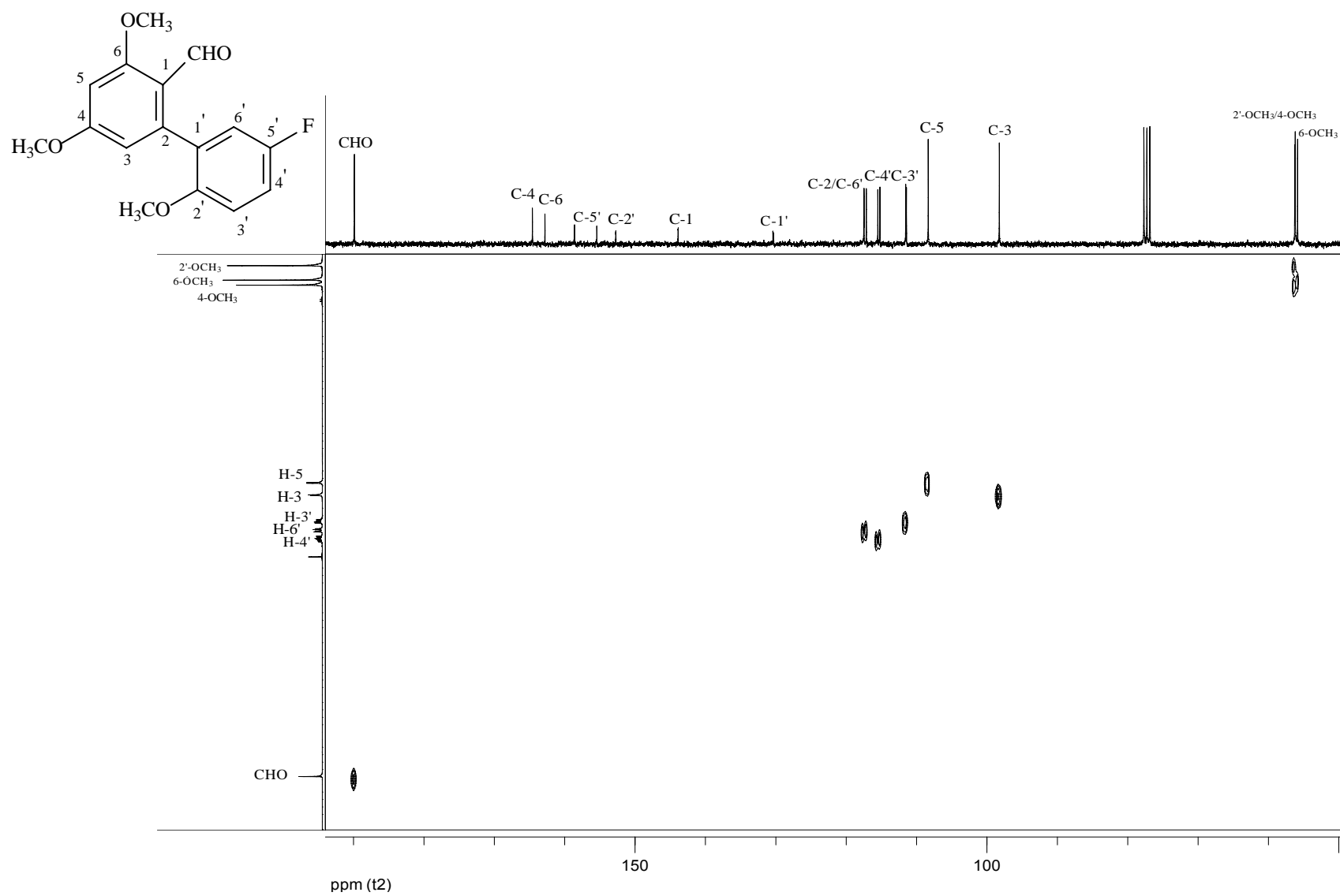


Figura 9 - Mapa de contornos HETCOR do composto 51.

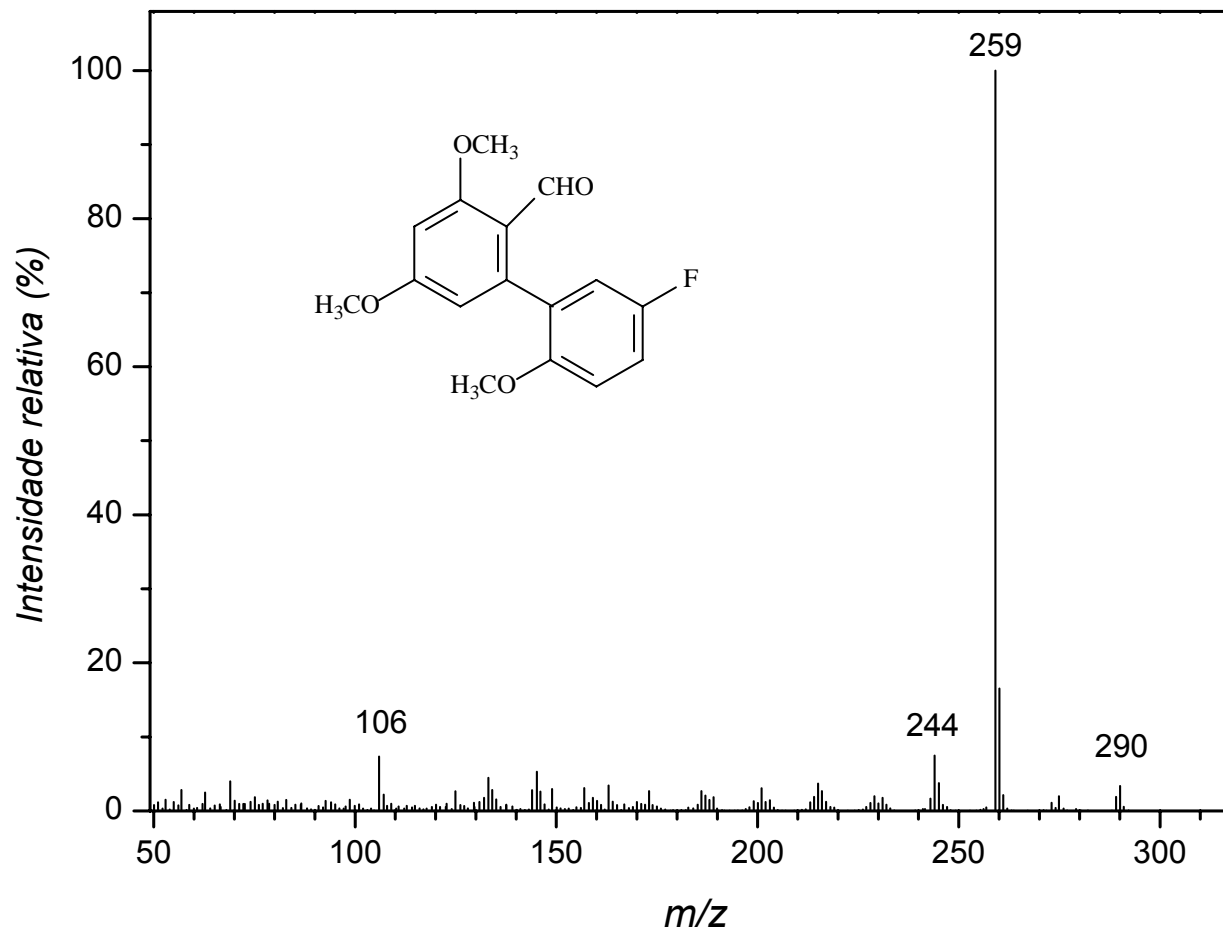


Figura 10 - Espectro de massas do composto **51**.

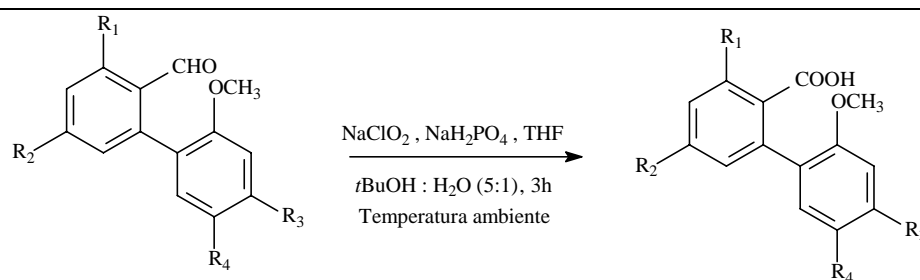
3.3. Síntese dos ácidos carboxílicos pela oxidação com NaClO₂

Para síntese dos ácidos carboxílicos, utilizou-se uma reação de oxidação com clorito de sódio (NaClO₂) na presença de NaH₂PO₄ e THF por um período médio de 3 horas. Esta metodologia foi adaptada a partir das chamadas condições de Kraus, onde o 2-metilbut-2-eno, que tem a função de capturar o cloro formado no meio reacional, foi substituído por THF para que este desempenhasse a mesma função (KOCH *et al.*, 2005; KRAUS e TASCHNER, 1980).

As reações de oxidação dos aldeídos aos ácidos carboxílicos correspondentes foram conduzidas utilizando-se uma mistura de solventes mais polares, *t*-BuOH : H₂O (5:1 v/v), para manter ácido carboxílico em solução e evitar deste modo sua precipitação. Desta maneira, a extração líquido-líquido, durante o processo de elaboração, torna-se mais eficiente, garantindo-se uma maior quantidade do produto desejado na fase orgânica.

Na Tabela 5 apresenta-se as estruturas dos ácidos carboxílicos sintetizados bem como os rendimentos obtidos.

Tabela 5 - Ácidos carboxílicos sintetizados via oxidação com NaClO₂

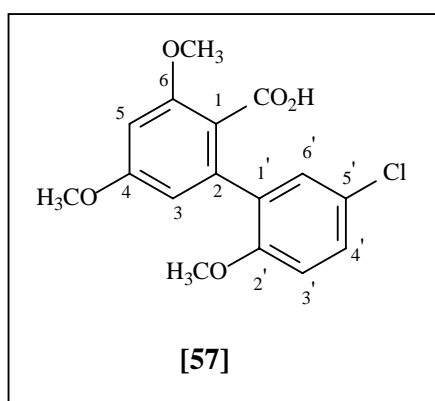


R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Produto	Rendimento (%)
OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	[56]	-
OCH ₃	OCH ₃	H	Cl	[57]	92,2
OCH ₃	OCH ₃	F	H	[58]	70,4
OCH ₃	OCH ₃	H	F	[59]	98,3
H	H	H	CH ₃	[60]	61,0
H	H	H	Cl	[61]	95,8
H	H	F	H	[62]	94,0
H	H	H	F	[63]	68,9

Para todas as reações de oxidação os produtos foram obtidos como sólidos brancos com rendimentos satisfatórios, chegando-se a alcançar 98,3% para o composto **59**. Nesta etapa observou-se a formação de um único produto, de forma que apenas quando foram utilizados materiais de partida impuros (aldeídos **50** e **55**) fez-se necessário purificação dos produtos de oxidação por cromatografia em coluna.

Em todas as reações de oxidação, os ácidos foram preparados segundo a mesma metodologia sintética (KOCH *et al.*, 2005), sendo posteriormente purificados, quando necessário, por cromatografia em coluna de sílica gel e caracterizados por espectroscopia no Infravermelho, RMN de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de massas.

Para exemplificar a caracterização dos ácidos obtidos escolheu-se a substância **57**.



Dentre as técnicas espectroscópicas para caracterização dos compostos orgânicos, a espectroscopia no infravermelho é bastante apropriada para a identificação de ácidos carboxílicos, apresentando uma banda de absorção muito característica. Esta se apresenta como uma banda de absorção bastante alargada (aproximadamente $3500\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$, banda de estiramento -OH) devida a uma associação muito forte, por meio de ligações de hidrogênio, entre as moléculas de ácido. O formato desta banda é bastante típico de ácidos carboxílicos, facilitando, assim, a identificação desse tipo de grupo funcional (BARBOSA, 2007).

No caso da substância **57** e dos demais ácidos sintetizados, esta banda de absorção foi observada no intervalo de frequências de $3500\text{ - }2500\text{ cm}^{-1}$ (Figura 11). Ainda com relação à espectroscopia no infravermelho, observou-se uma banda bastante intensa em 1692 cm^{-1} atribuída ao estiramento de carbonila do ácido carboxílico. Nos demais

compostos esta banda não apresentou grandes variações sendo observadas entre 1689 e 1695 cm^{-1} .

Com relação ao espectro de RMN de ^1H da substância **57** (Figura 12), foram observados 8 sinais, dos 9 esperados. Este fato se deve ao não aparecimento do sinal de hidrogênio do grupo carboxílico ($-\text{COOH}$), pois a formação de dímeros entre as moléculas de ácido (forte associação intermolecular) faz com que este hidrogênio não seja detectado (PRETSCH *et al.*, 1989; SILVERSTEIN *et al.*, 2000).

Os sinais dos grupos metoxila foram observadas em $\delta = 3,68$, 3,84 e 3,92, correspondendo, respectivamente, a 2'-OCH₃, 6-OCH₃ e 4-OCH₃, atribuídos por meio de cálculos de deslocamento químico. Os dois sinais observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 12) em $\delta = 6,41$ (d, $J = 2,4$, 1H; H-5) e $\delta = 6,52$ (d, $J = 2,4$, 1H; H-3) mostram que em um dos anéis aromáticos há dois átomos de hidrogênio em posição *meta*. Os três sinais observados no espectro de RMN de ^1H em $\delta = 6,79$ (d, $J = 8,7$, 1H; H-3'), $\delta = 7,18$ (d, $J = 2,7$, 1H; H-6') e $\delta = 7,26$ (dd, $J = 8,7$ e 2,7, 1H; H-4') correspondem a um padrão que é característico de anéis aromáticos 1,2,4-trissubstituídos.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 13), foram observados 16 sinais conforme esperado, sendo o sinal em $\delta = 169,50$ atribuído ao átomo de carbono do grupo carbonila do ácido carboxílico ($-\text{CO}_2\text{H}$), enquanto que os sinais em $\delta = 55,79$, $\delta = 55,84$ e $\delta = 56,61$, foram atribuídos aos grupos metoxila 2'-OCH₃, 6-OCH₃ e 4-OCH₃, respectivamente, com auxílio de cálculos de deslocamento químico. Os sinais em $\delta = 98,52$ e $\delta = 108,59$ foram atribuídos aos átomos de carbono C-3 e C-5, respectivamente.

O espectro de massas da substância **57** (Figura 14) apresentou um pico em m/z igual a 322, que é compatível com a fórmula molecular do composto $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{Cl}$. Neste espectro ainda observa-se a presença dos picos em m/z 322 ($[\text{M}^+]$) e em m/z 324 ($[\text{M}+2]$) com intensidades relativas de 13 e 4 %, respectivamente. A intensidade destes sinais estão em acordo com a presença do átomo de cloro na estrutura do composto.

Assim como nos espectros de massas das biarilas, neste também se observa a presença do pico $[\text{M}-31]$ como pico base, correspondendo à perda de uma metoxila.

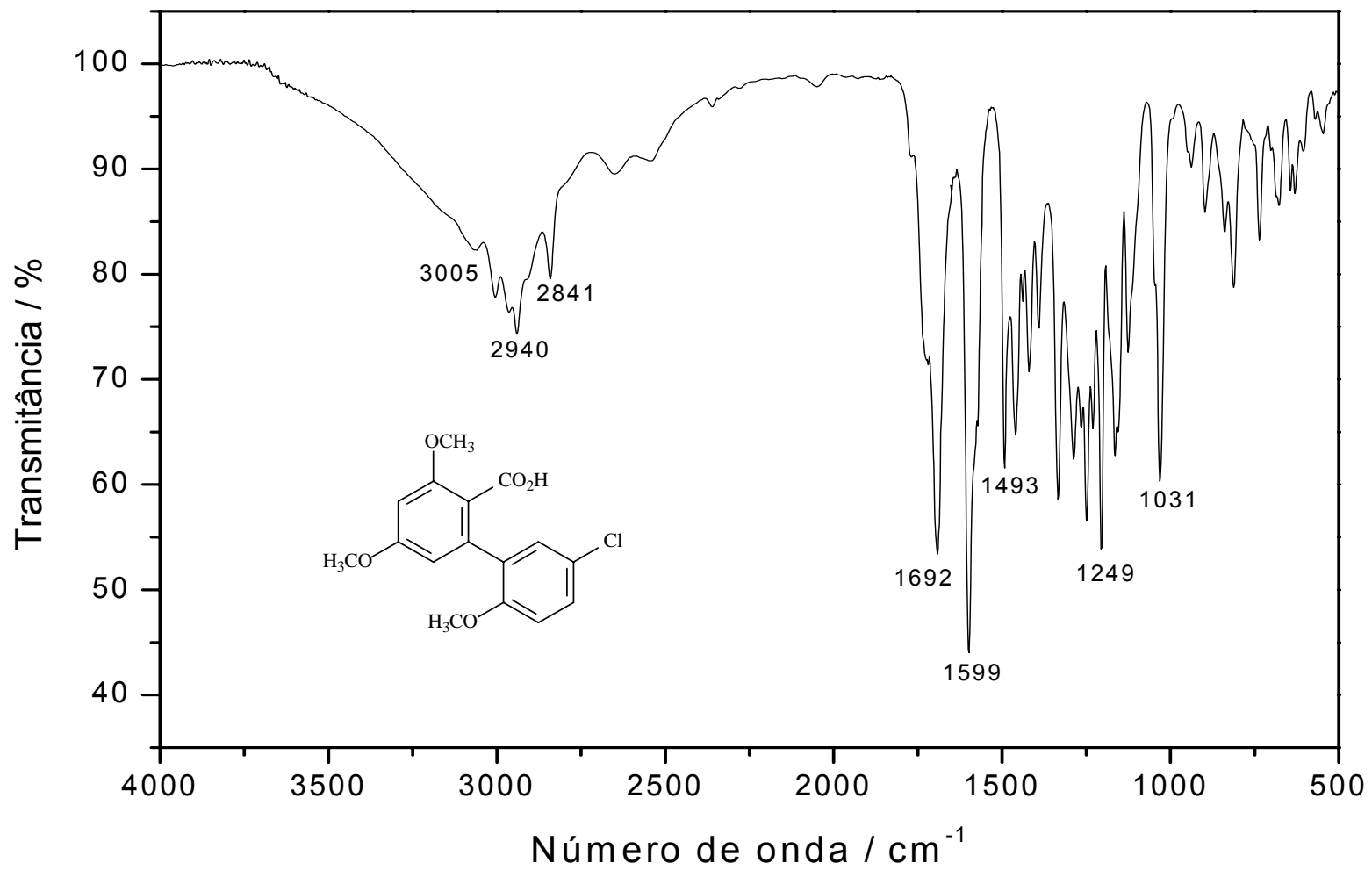


Figura 11 - Espectro no infravermelho do composto **53**.

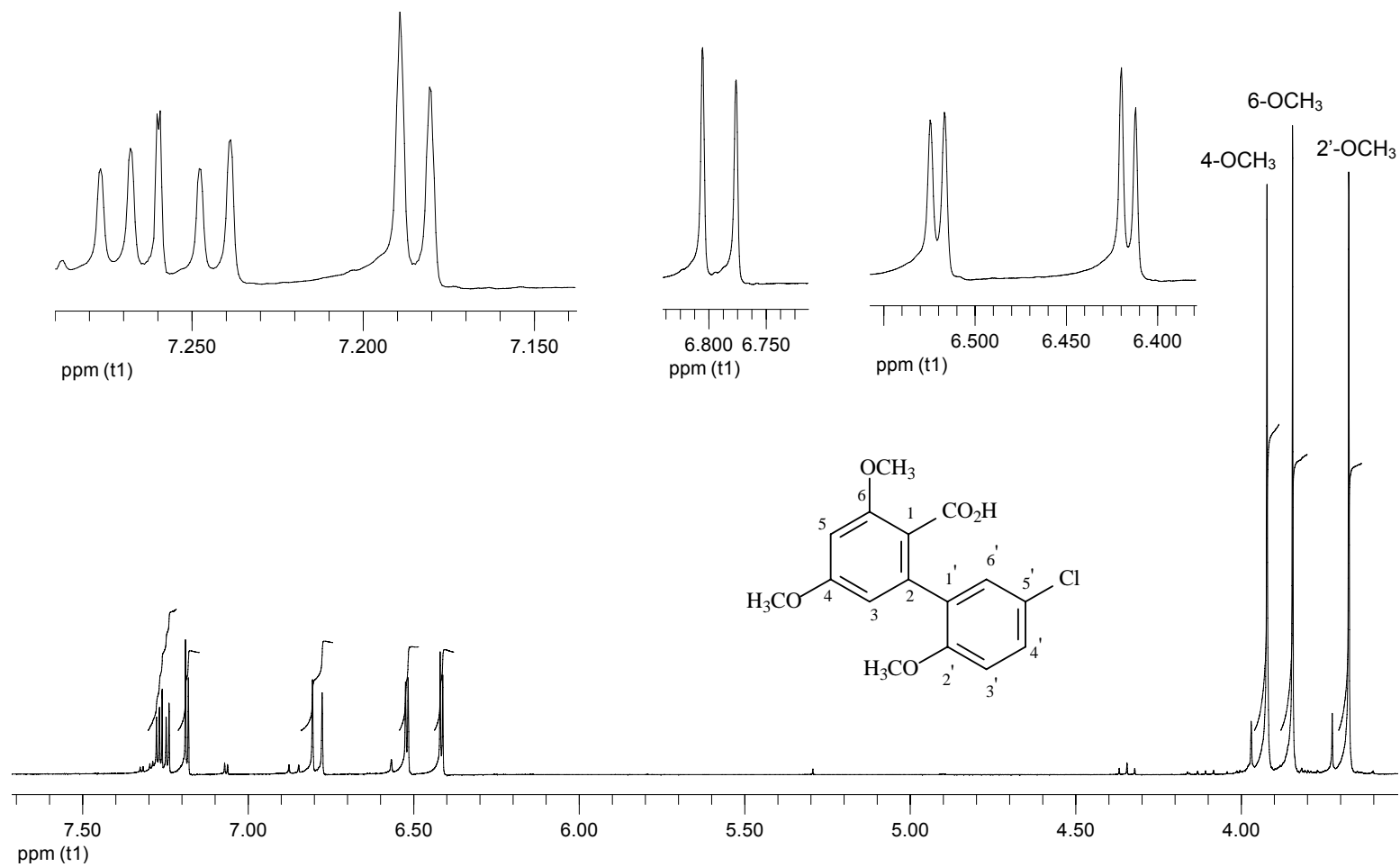


Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **53**.

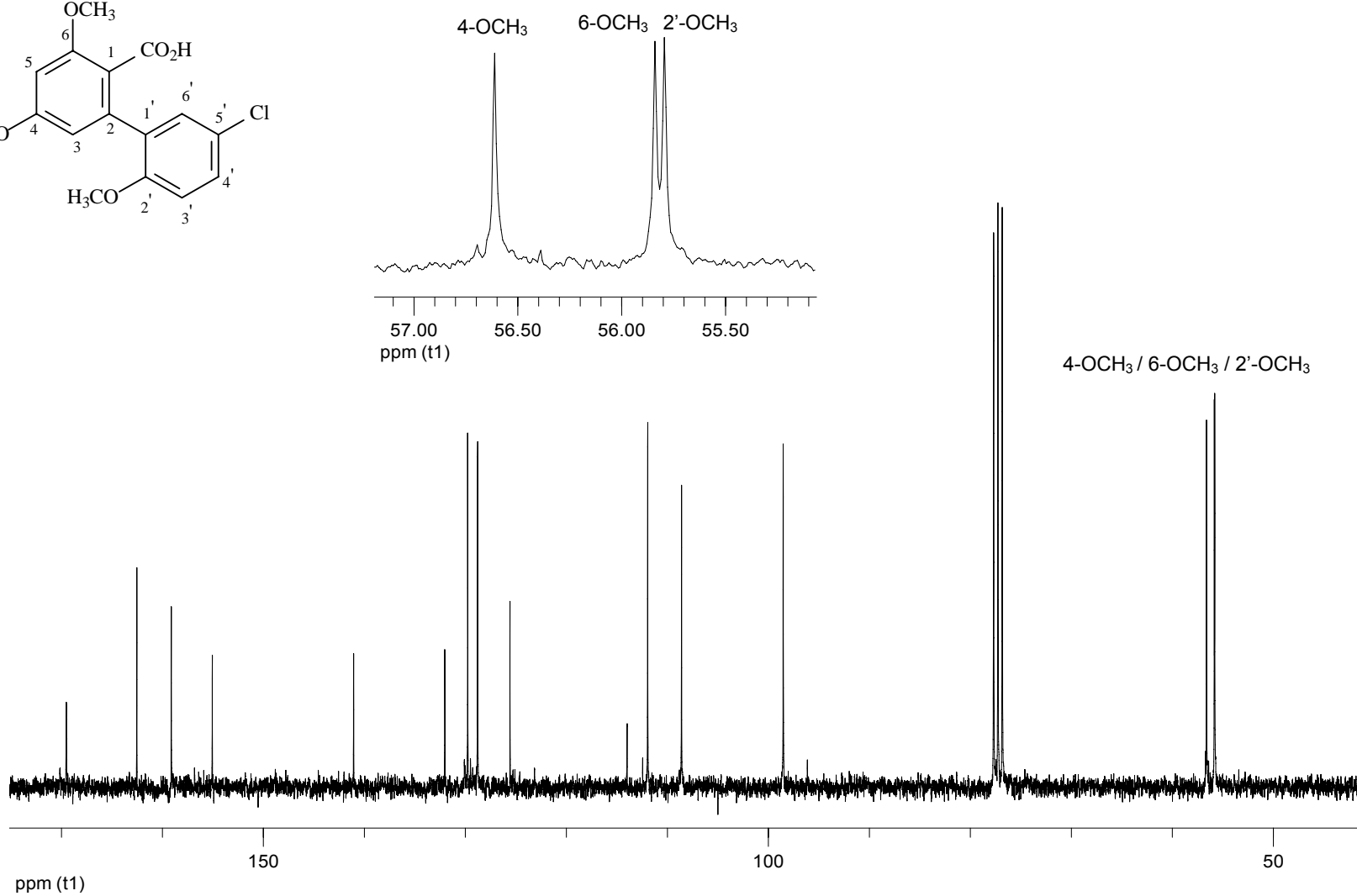
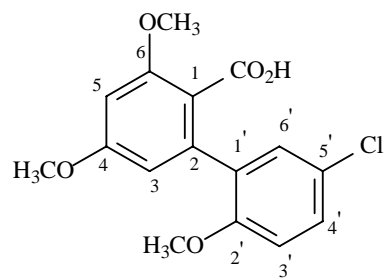


Figura 13 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **53**.

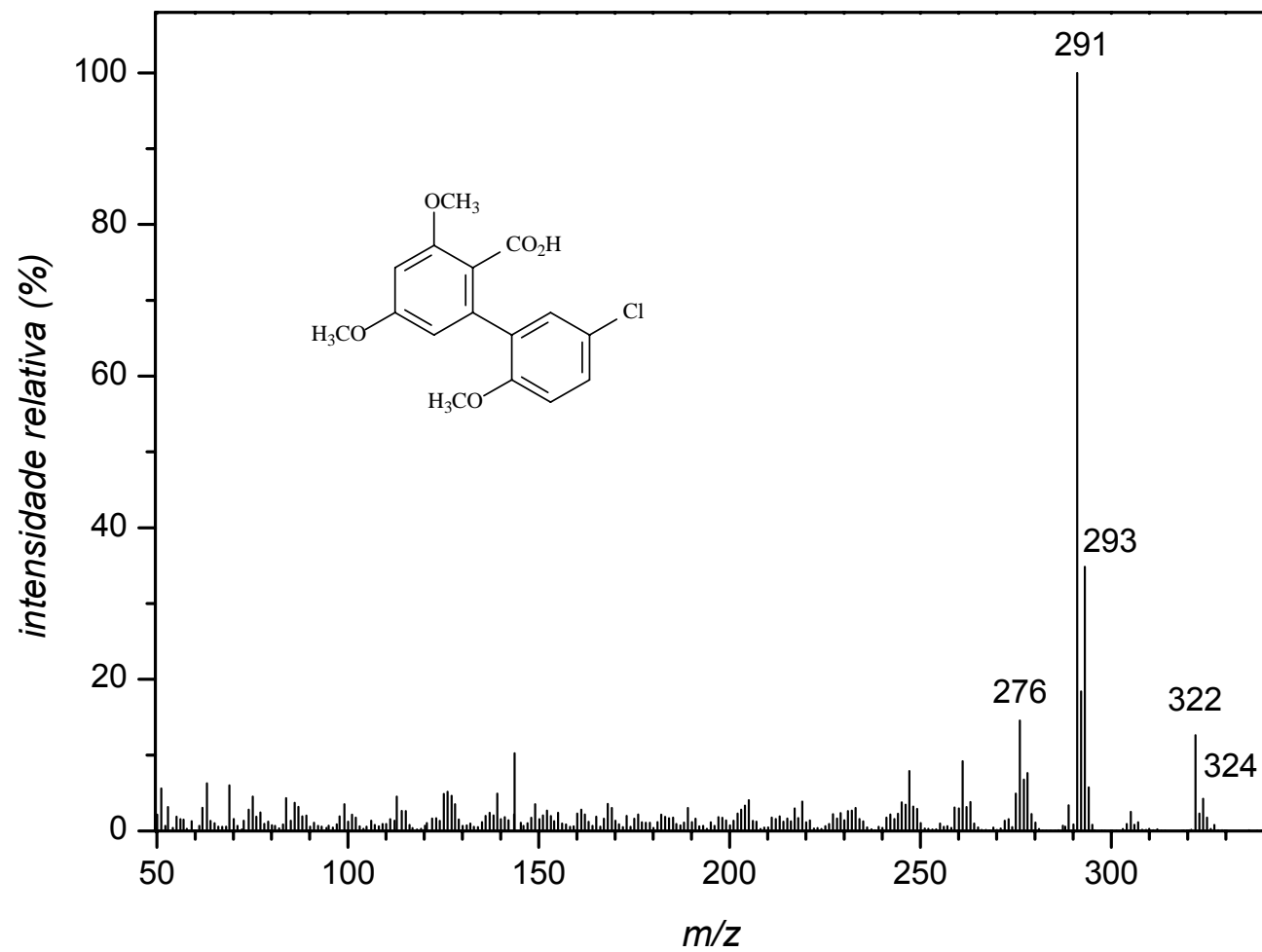
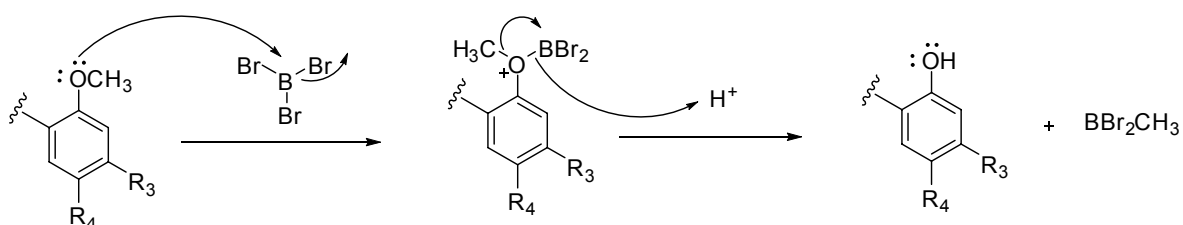


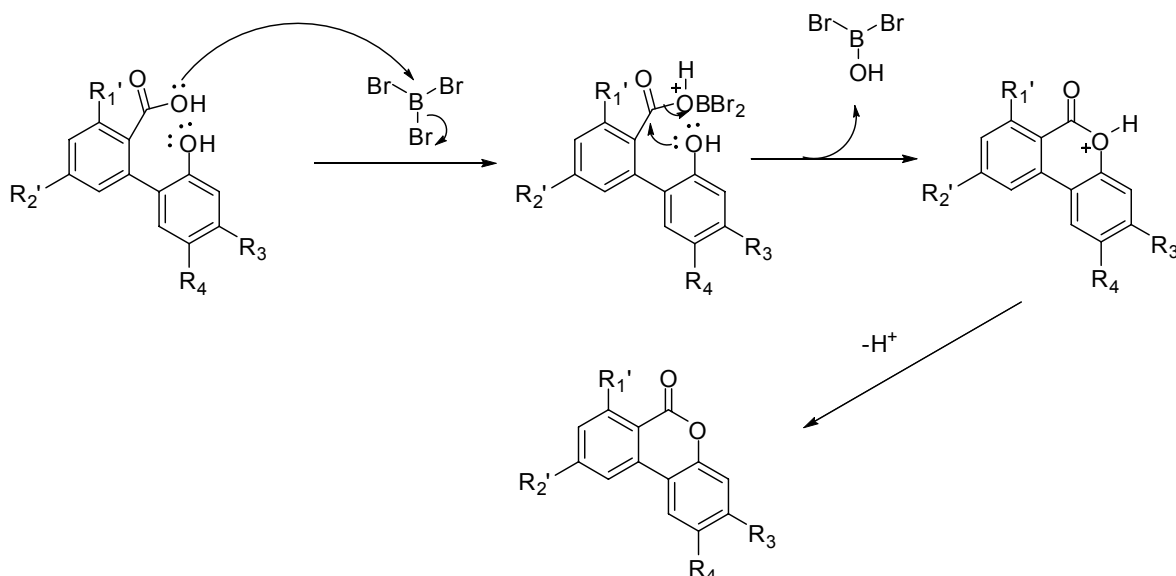
Figura 14 - Espectro de massas do composto **53**.

3.4. Síntese dos análogos ao alternariol

Na etapa final da síntese dos análogos ao alternariol, os ácidos formados na etapa anterior foram submetidos a uma reação de desproteção dos grupos hidroxila, presentes na forma de metoxilas, na presença de um ácido de Lewis, o tribrometo de boro (BBr_3). A reação de formação do anel lactônico (Esquema 8) se dá quando a metoxila do anel C é desprotegida, conforme mostra o Esquema 7. Esta ciclização é promovida pelo excesso do ácido de Lewis (BBr_3) no meio reacional. Neste caso, há as duas reações ocorrendo paralelamente para a formação dos análogos ao alternariol (Esquemas 7 e 8) (KANAKAM *et al.*, 1990; KOCH *et al.*, 2005).



Esquema 7 - Proposta mecanística para a reação de desproteção dos grupos hidroxila.



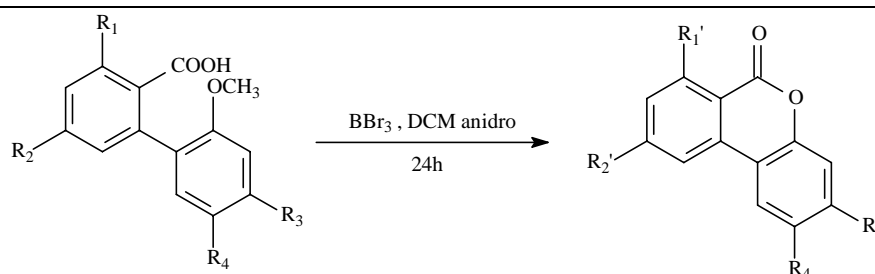
Esquema 8 - Proposta mecanística para a formação do anel lactônico dos análogos ao alternariol (reação de ciclização).

Durante a reação de desproteção das hidroxilas (Esquema 7), o próton (H^+) responsável pela etapa de formação da hidroxila propriamente

dita é proveniente da dissociação do ácido carboxílico presente no outro anel da molécula e também proveniente do próprio processo de elaboração, sendo oriundo do metanol adicionado para consumir o excesso de BBr_3 .

A Tabela 6 apresenta os ácidos sintetizados bem como os rendimentos obtidos nas reações.

Tabela 6 - Análogos ao alternariol sintetizados



R_1	R_2	R_1'	R_2'	R_3	R_4	Produto	Rendimento (%)
OCH_3	OCH_3	OH	OH	H	CH_3	[64]	34,5
OCH_3	OCH_3	OH	OH	H	Cl	[65]	55,0
OCH_3	OCH_3	OH	OH	F	H	[66]	48,5
OCH_3	OCH_3	OH	OH	H	F	[67]	69,0
H	H	H	H	H	CH_3	[68]	79,0
H	H	H	H	H	Cl	[69]	93,5
H	H	H	H	F	H	[70]	97,2
H	H	H	H	H	F	[71]	93,3

Em todas as reações de desproteção e ciclização os produtos foram obtidos como sólidos brancos. Com relação aos rendimentos obtidos, pode-se observar que os compostos mais polares (os que possuem grupamentos hidroxila) apresentaram rendimentos inferiores comparados aos demais. Este fato pode ser explicado devido a formação de produtos secundários nestas reações. Neste caso, pelo fato dos materiais de partida possuírem dois grupos metoxila (além daquele que participa do processo de ciclização), há a possibilidade de formação de produtos que tenham apenas um desses grupos metoxila desprotegido enquanto que o outro não. Desta forma temos a formação do análogo desejado juntamente com o éter metílico correspondente, sendo necessária uma purificação posterior por

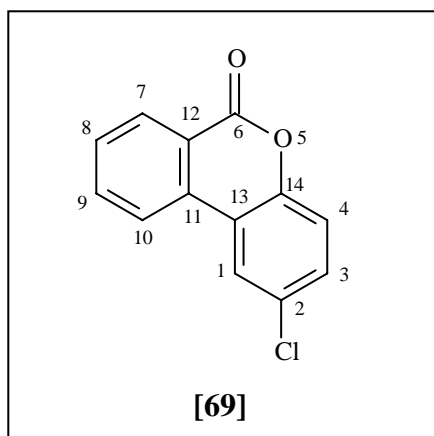
meio de cromatografia em coluna. Porém, estes metil éteres obtidos foram isolados na forma de isômeros com mesmo fator de retenção (R_f), de forma que não houve a possibilidade de identificação dos mesmos.

Outro fator que pode ter influenciado nestes rendimentos é a própria eficiência de extração do composto em um sistema de extração líquido-líquido, pois sendo estes compostos bastante polares há a possibilidade que uma pequena parte deste material possa ficar na fase aquosa, contribuindo, assim, para a diminuição dos rendimentos.

Ainda com relação aos compostos mais polares, na determinação das temperaturas de fusão destes materiais foram observadas limitações. A aparelhagem disponível para a determinação destes valores provia aquecimento até uma temperatura máxima de 300 °C e para que o instrumento não fosse levado ao seu limite, resolveu-se aquecer até um máximo de 295 °C. Porém a esta temperatura, com exceção do composto **64** (T_f : 281,8 - 283,1 °C), os demais compostos não fundiram. Desta forma na descrição das temperaturas de fusão destas substâncias na seção Materiais e Métodos incluiu-se apenas a informação de que a fusão ocorreria em temperaturas superiores a 295 °C. Segundo dados da literatura, o alternariol sofre fusão entre 345 e 350 °C (KANAKAM *et al.*, 1990). Desta forma, espera-se que os análogos também apresentem temperaturas de fusão semelhantes a esta.

Em todas as reações de desproteção e ciclização, os análogos foram preparados segundo a mesma metodologia sintética otimizada (KOCH *et al.*, 2005), sendo posteriormente purificados, quando necessário, por cromatografia em coluna de sílica gel e caracterizados. Experimentos bidimensionais HETCOR auxiliaram nas atribuições dos sinais de ^{13}C .

O processo de caracterização do análogo **69** será descrito a seguir. Os demais compostos foram todos devidamente caracterizados baseados nas técnicas espectroscópicas descritas anteriormente.



No espectro no IV do composto **69** (Figura 15), observou-se uma banda de estiramento do grupo carbonila da δ -lactona em 1747 cm^{-1} . No caso dos análogos a este composto (que não possuem hidroxilas), os valores de absorção desta carbonila foram observados em uma faixa entre 1724 e 1752 cm^{-1} . Já com relação aos análogos hidroxilados, estes valores de absorção foram observados em uma faixa de número de ondas bem menor ($1641 - 1678\text{ cm}^{-1}$). Esta drástica redução se deve, além do efeito doador de elétrons por ressonância do grupo $-\text{OH}$, principalmente a formação de ligação de hidrogênio intramolecular, que enfraquece ainda mais a ligação $\text{C}=\text{O}$ (BARBOSA, 2007).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 16) não foi observado o sinal referente ao grupo metoxila presente no ácido carboxílico **61**, evidenciando, assim, que a hidroxila foi desprotegida com concomitante ciclização com o grupo carboxila vizinho, resultando na formação do anel lactônico. Neste espectro foram observados sete sinais, sendo que os sinais em $\delta = 7,32$ (d, $J = 8,7$, 1H), $7,44$ (dd, $J = 8,7$ e $2,4$, 1H) e $8,03$ (d, $J = 2,4$, 1H) foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-4, H-3 e H-1, respectivamente. Já os sinais em $\delta = 7,64$ (td, $J = 7,8$ e $1,5$, 1H), $7,86$ (td, $J = 7,8$ e $1,5$, 1H); $8,07$ (duplete alargado, $J = 7,8$, 1H) e $8,42$ (dd, $J = 7,8$ e $1,5$, 1H) foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-8, H-9, H-7 e H-10, respectivamente.

Com relação aos compostos hidroxilados, no espectro de RMN de ^1H foram ainda observados os sinais relativos aos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila. Estes se apresentaram como sinais mais alargados (em $\delta = 11,00$, aproximadamente).

No espectro de ^{13}C (Figura 17) o sinal em $\delta = 160,85$ foi atribuído ao átomo de carbono do grupo carbonila do anel lactônico. Esta informação aliada à ausência do sinal do grupo metoxila, fornecem uma forte evidência espectroscópica de que o anel lactônico realmente havia sido formado.

Com relação aos demais sinais, a atribuição foi possível com o auxílio da técnica de RMN bidimensional HETCOR (Figura 18).

O espectro de massas da substância **69** (Figura 19) apresentou um pico de valor de m/z igual a 230, que é compatível com a fórmula molecular do composto $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{O}_2\text{Cl}$.

Diferentemente dos espectros de massas mostrados até o momento, nos análogos sintetizados o pico base é coincidente com o pico do íon molecular, uma vez que não há mais a presença de metoxilas nestas moléculas. Neste espectro observou-se a presença dos picos em m/z 230 ($[\text{M}^+]$) e em m/z 232 ($[\text{M}+2]$) com intensidades relativas de 100 e 32 % respectivamente. Esta observação nos permite inferir sobre a presença de um átomo de cloro na molécula, devido as intensidades observadas.

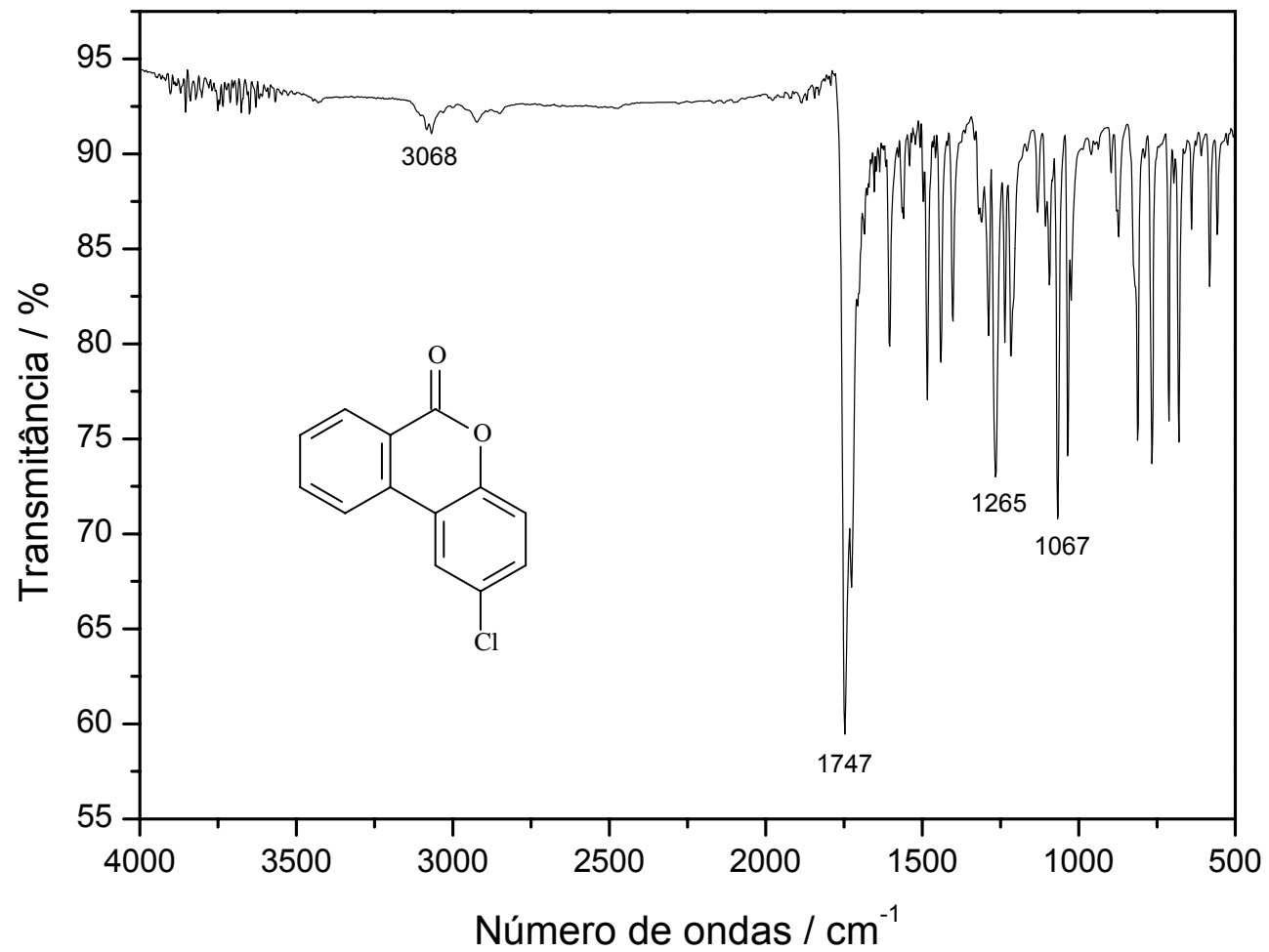


Figura 15 - Espectro no infravermelho do composto **69**.

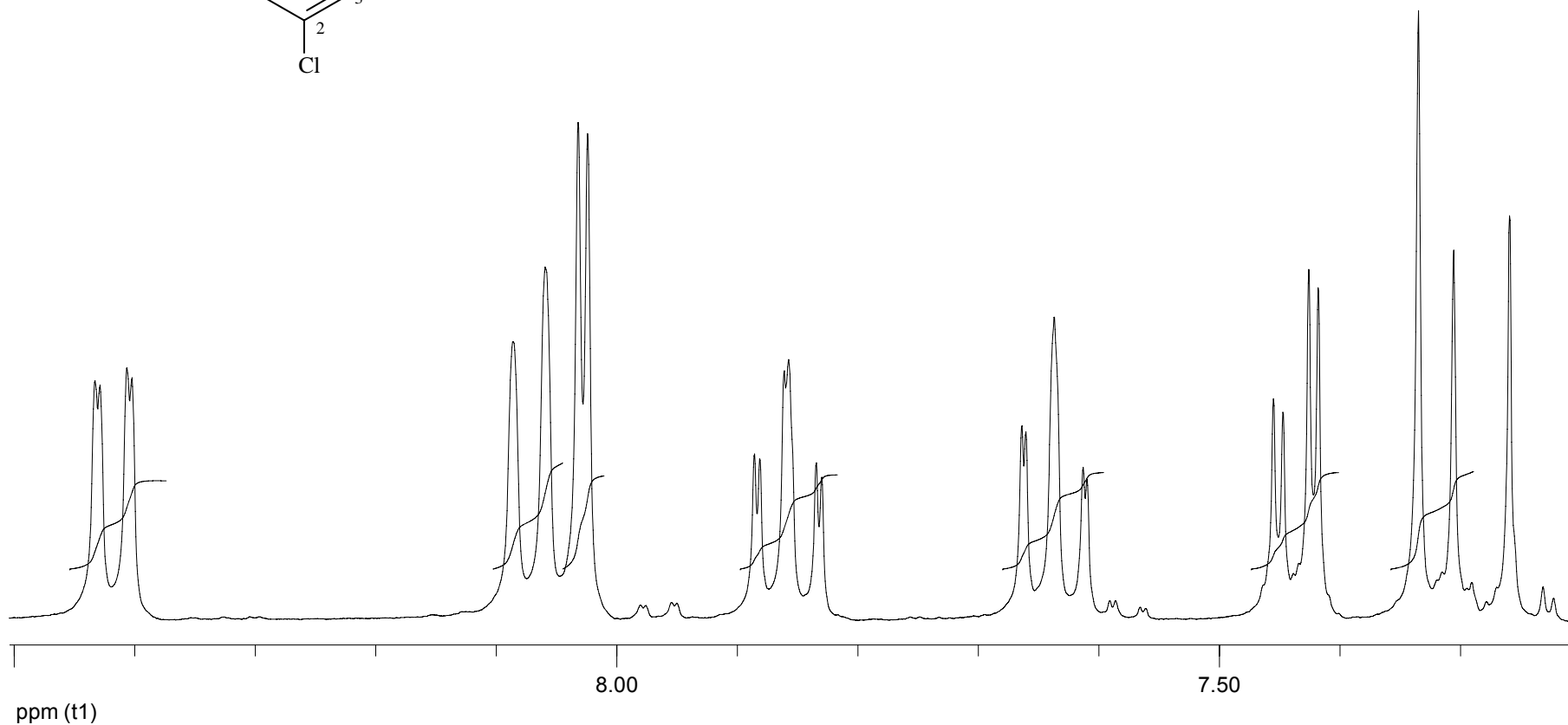
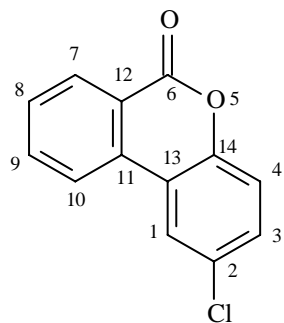


Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **69**.

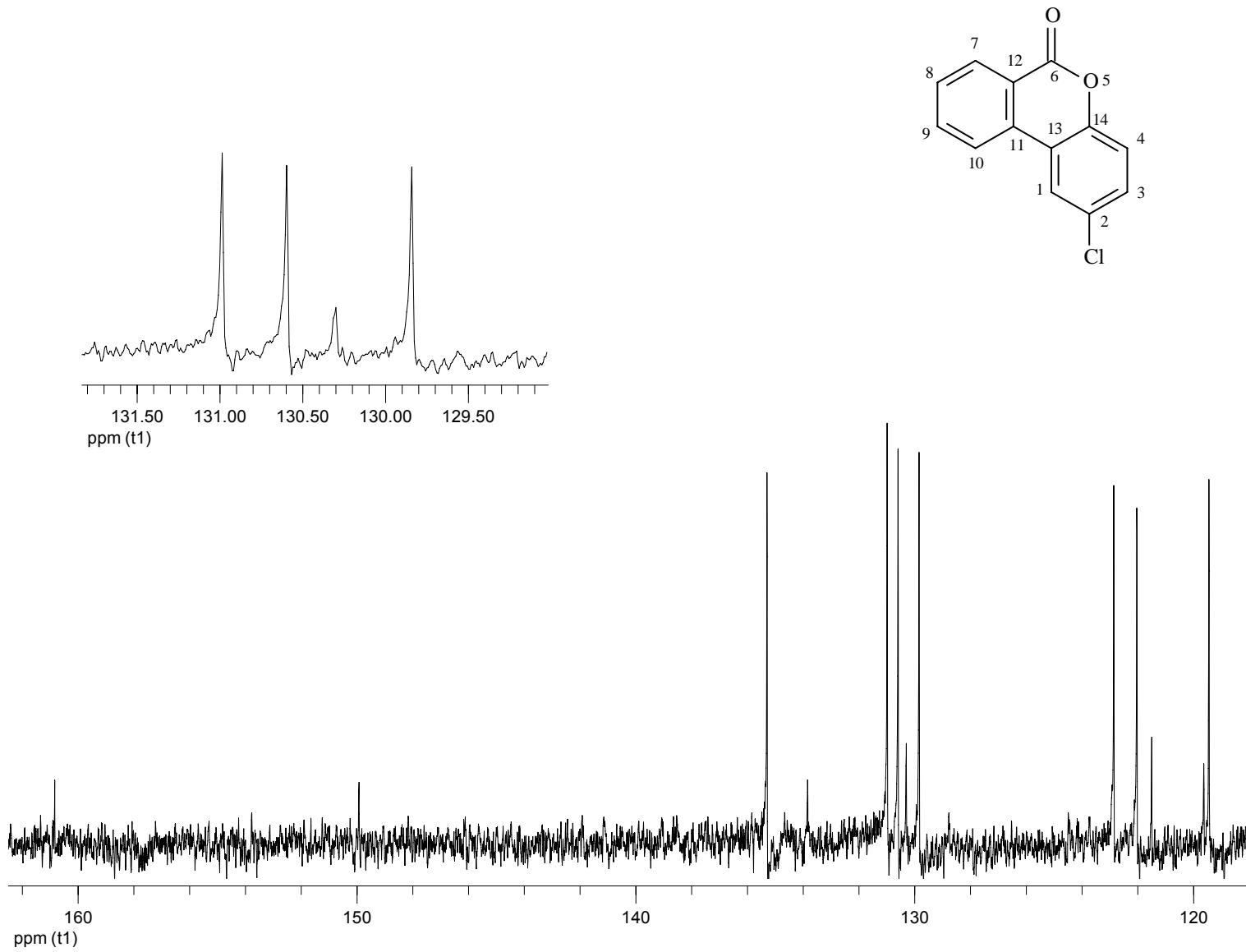


Figura 17 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **69**.

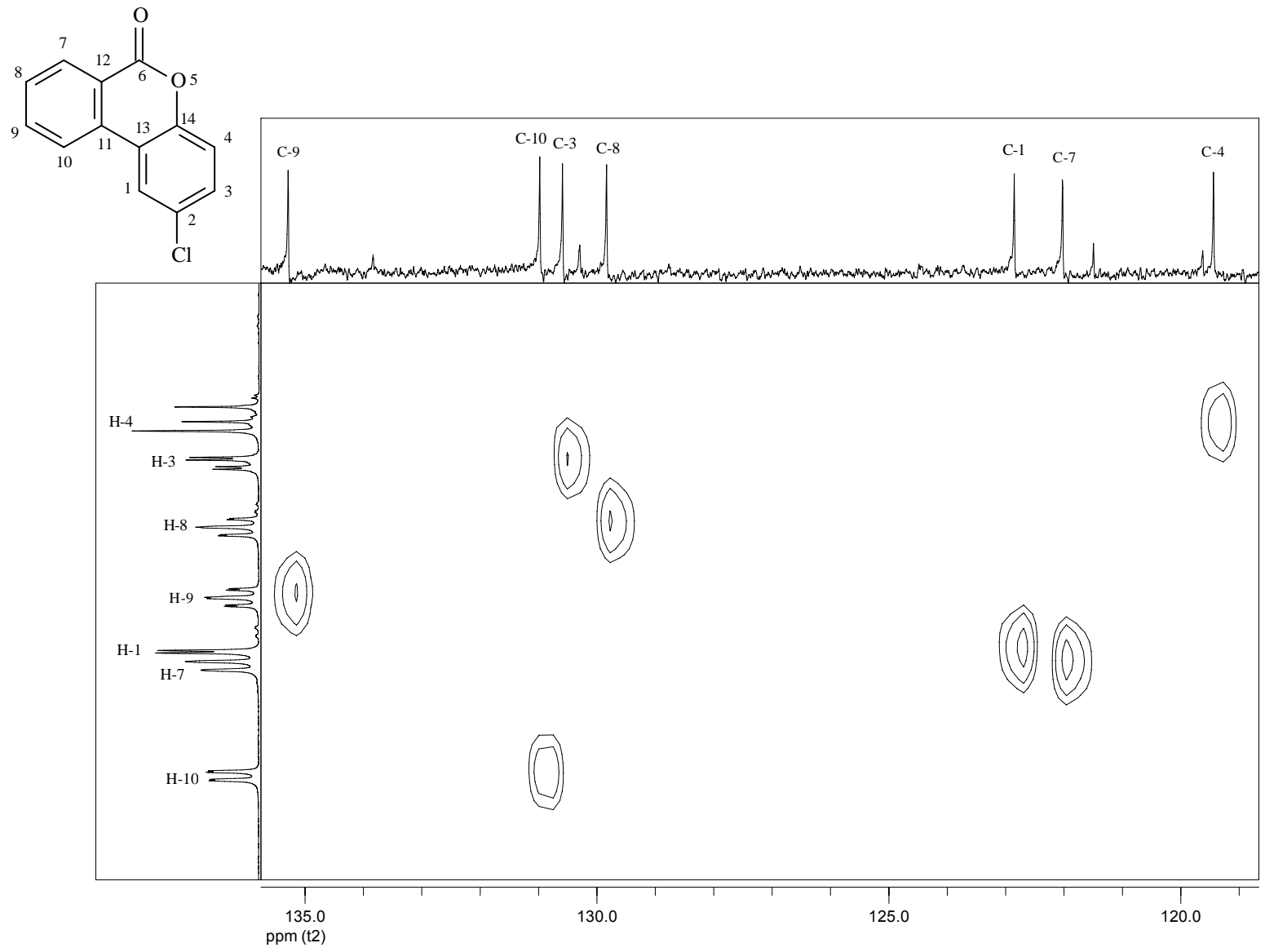


Figura 18 - Mapa de contornos HETCOR do composto **69**.

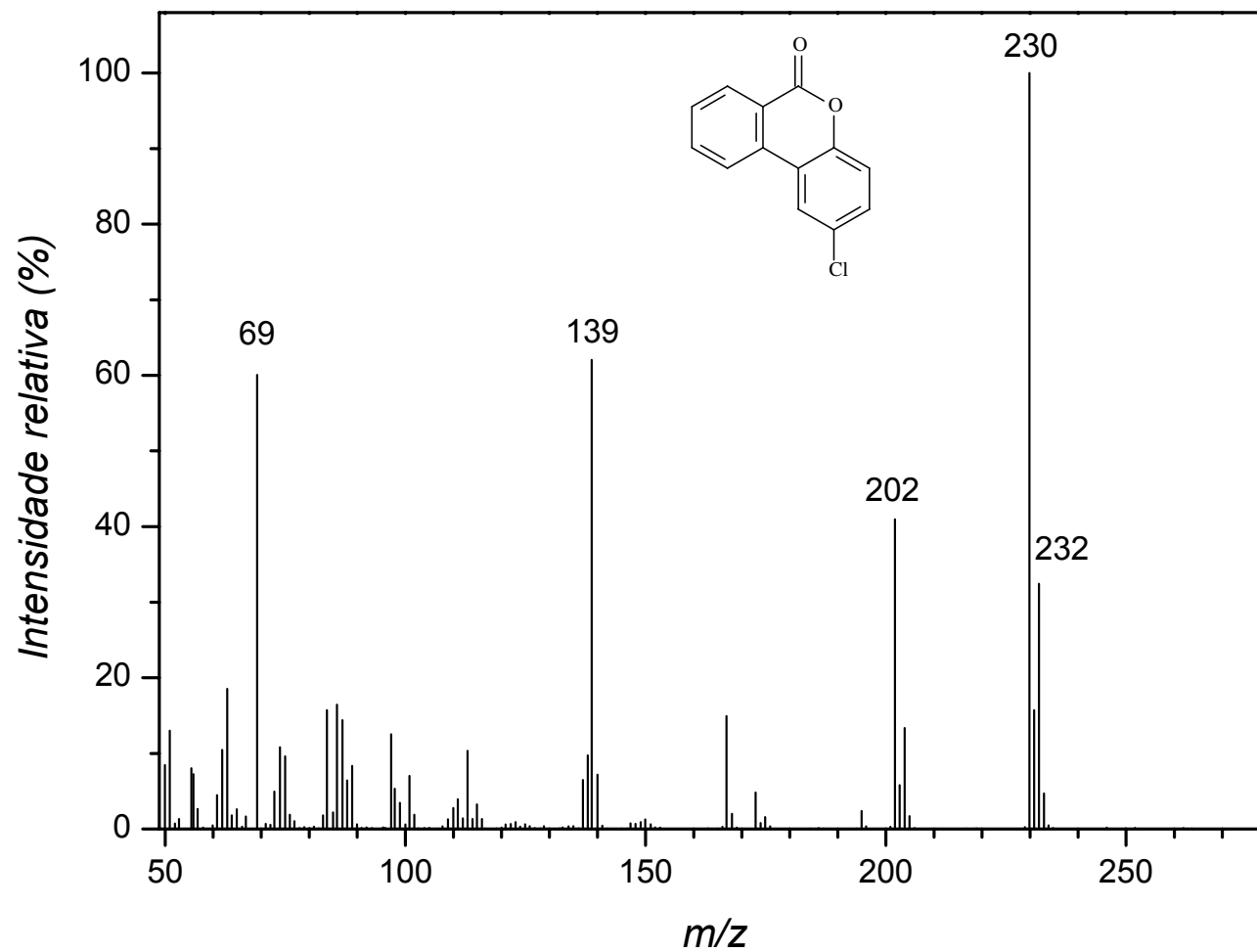


Figura 19 - Espectro de massas do composto **69**.

3.5. Ensaio biológico

3.5.1. Avaliação do efeito dos compostos **64**, **65** e **68** sobre o transporte de elétrons da água para o acceptor não-biológico $K_3[Fe(CN)_6]$, em cloroplastos isolados de espinafre

Para verificar a influência dos análogos ao alternariol quanto à inibição do transporte de elétrons no fotossistema II da fotossíntese, foram avaliados os compostos **64**, **65** e **68**. As demais substâncias não foram testadas em virtude das datas em que elas haviam sido sintetizadas. Nestas datas não havia a disponibilidade de cloroplastos na Itália em função do inverno rigoroso que dificulta o crescimento de espinafre. Porém estes compostos serão avaliados futuramente.

Os ensaios foram realizados utilizando cloroplastos frescos, fotossinteticamente ativos, isolados de folhas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.). Para o composto mais ativo (**65**) foram testadas as concentrações de 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para a substância **64** com atividade menor, foram utilizadas as concentrações de 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Já para o caso do composto menos ativo (**68**) o ensaio foi realizado nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos nos ensaios biológicos para estes 3 compostos encontram-se mostrados nas Figuras 20 a 22.

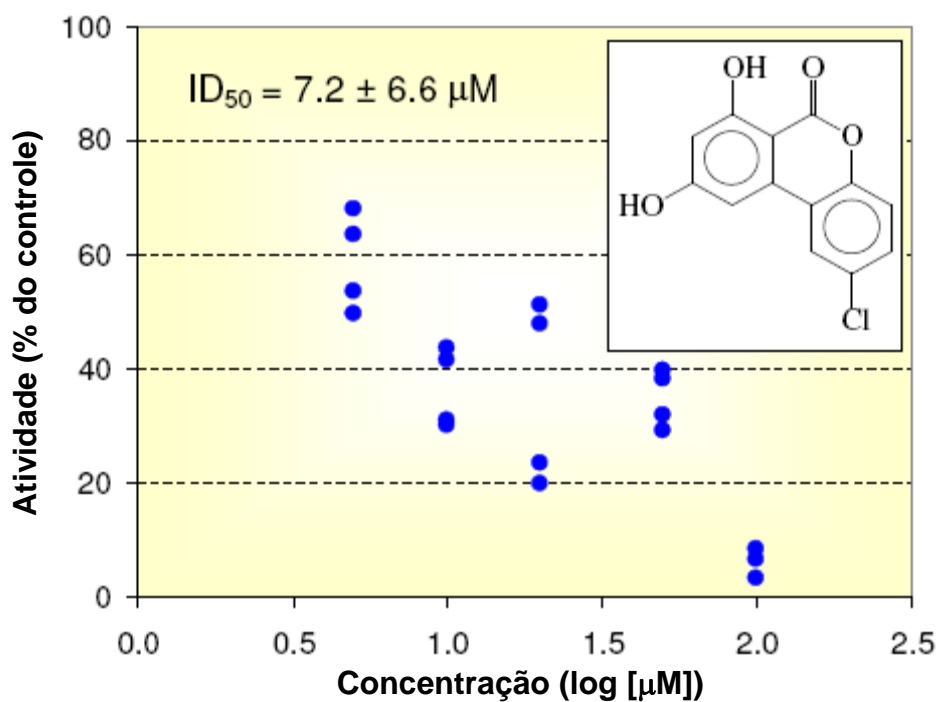


Figura 20 - Efeito do composto **65** sobre o transporte de elétrons em cloroplastos de espinafre.

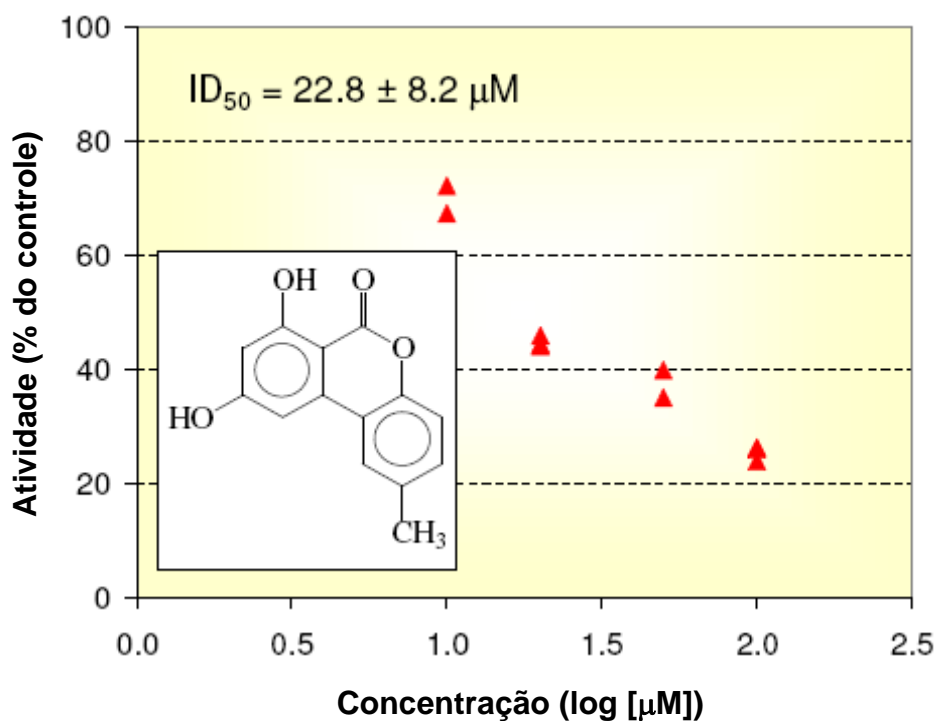


Figura 21 - Efeito do composto **64** sobre o transporte de elétrons em cloroplastos de espinafre.

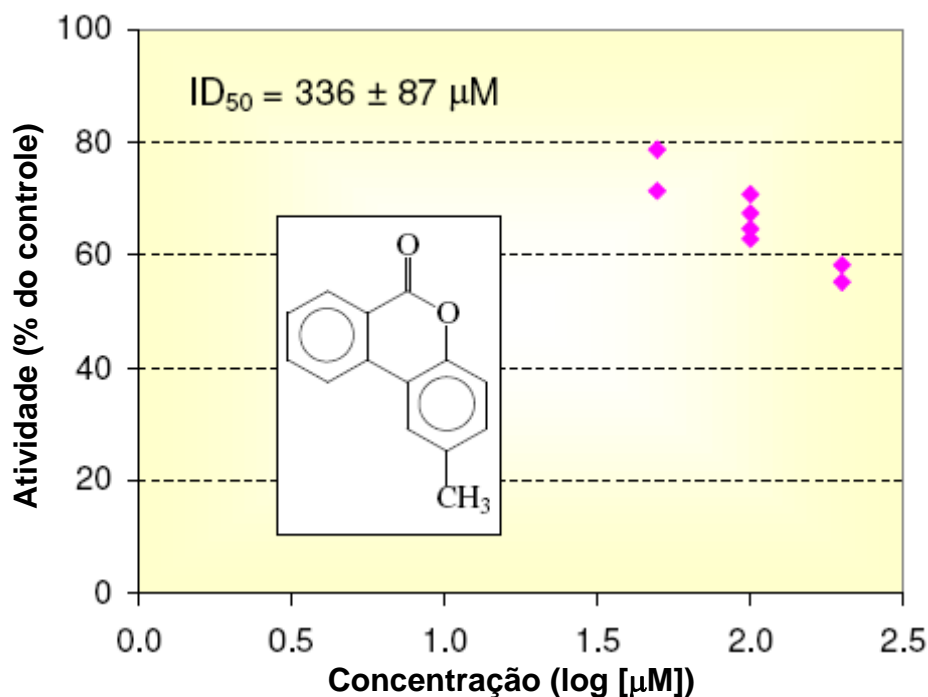


Figura 22 - Efeito do composto **68** sobre o transporte de elétrons em cloroplastos de espinafre.

De acordo com os gráficos apresentados anteriormente, observou-se que duas das substâncias testadas (**64** e **65**) apresentaram excelentes atividades de inibição da taxa de transporte de elétrons no fotossistema II da fotossíntese em relação ao controle (DIURON). Para estes compostos foram observados valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da taxa de transporte de elétrons) da ordem de 22,8 ± 8,2 μM para [**64**] e 7,2 ± 6,6 μM para [**65**], mostrando que para estas substâncias a atividade inibitória é bastante promissora.

Observando a Figura 20, podemos verificar que, na concentração de 5 μM, o compostos **65** provoca uma inibição superior a 40%. Já a uma concentração de 100 μM, observa-se uma inibição quase que 100% do transporte de elétrons na reação de Hill. Nesta mesma concentração o composto **64** (Figura 21) apresentou uma taxa de inibição próxima a 80%.

Ainda com relação às Figuras 20 a 22, podemos ressaltar alguns pontos relevantes. Inicialmente, nota-se claramente que a presença de grupos retiradores de elétrons parece favorecer a atividade biológica, uma vez que a atividade do composto **65** (composto contendo cloro) é cerca de 3 a 4 vezes maior que **64**. Outro fator importante a ser abordado é a questão

da solubilidade dos compostos nos ensaios, onde os melhores resultados observados foram para os dois compostos mais polares (substâncias contendo grupamentos hidroxila). Este fator parece ter uma influência marcante na atividade, pois comparando os compostos **64** e **68**, podemos perceber que as estruturas dos mesmos são bastante semelhantes, enquanto que as atividades biológicas observadas foram bastante distintas. O que difere estes dois compostos é a presença das hidroxilas em **64**, que lhe conferem maior solubilidade em solventes polares como a água que é utilizada na reação de Hill. A maior polaridade de uma substância é uma característica importante quando se fala em meio biológicos, uma vez que os mesmos são predominantemente aquosos, o que facilitaria a movimentação destas moléculas por estes meios.

Um outro ponto importante a ser salientado é que em todos os casos parece haver uma resposta da atividade biológica em função da concentração, ou seja, à medida que se aumenta a concentração utilizada, maior foi a atividade observada. Pela visualização dos gráficos de inibição do transporte de elétrons (Figuras 20 a 22) podemos notar uma linearidade nesta relação, porém os gráficos foram plotados com escala logarítmica no eixo das abscissas (eixo x), desta forma a relação observada é na verdade exponencial.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, certamente contribuirão para a compilação de dados sobre a atividade biológica de análogos ao alternariol, uma vez que, poucos estudos têm sido feitos nesta área, principalmente no que diz respeito ao processo de inibição da síntese de ATP nos cloroplastos por inibição do transporte de elétrons no fotossistema II da fotossíntese.

A rota sintética utilizada para a síntese dos análogos ao alternariol mostrou-se eficiente, pois nesse trabalho foram sintetizados oito compostos ([64] – [71]), sendo que em todas as etapas sintéticas foram obtidos rendimentos satisfatórios, com exceção da etapa de síntese dos análogos mais polares (substâncias 64 – 67), que geralmente resultou na formação de alguns subprodutos.

Algumas das substâncias sintetizadas foram submetidas a ensaios biológicos (compostos 64, 65 e 68), para avaliar a potencial atividade herbicida, e verificou-se que dois dos três compostos avaliados apresentaram inibição significativa sobre o transporte de elétrons no fotossistema II da fotossíntese, evidenciando a potencialidade desta classe de compostos. Estes resultados mostraram que a presença de grupamentos polares, bem como substituintes retiradores de elétrons, potencializa a atividade biológica destas substâncias.

Dentre os compostos testados, o que mostrou maior inibição no transporte de elétrons foi o composto 65, com IC₅₀ (concentração mínima necessária para inibir 50%) igual a 7,2 μmol L⁻¹.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÂNGULO, M. M. G.; SOSA, K. G.; GONZÁLEZ, F. A.; EROSA, F. E.; LAMAS, G. D.; RODRÍGUEZ, L. M. P.; Tagetolone and Tagetenolone: Two phytotoxic polyketides from *Alternaria tagetica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1228-1232, 2001.

ÂNGULO, M. M. G.; SOSA, K. G.; GONZÁLEZ, F. A.; EROSA, F. E.; LAMAS, G. D.; RODRÍGUEZ, L. M. P. Natural Zinniol derivatives from *Alternaria tagetica*. Isolation, synthesis and structure-activity correlation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1053-1058, 2002.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; AMÂNCIO, A. V.; CORREA, R. M. L.; GUERCIO, M. A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, v. 28, p. 975-982, 2005.

BARBOSA, L. C. A. **Os Pesticidas o Homem e o Meio Ambiente**. Viçosa: Editora UFV, 2004, 215p.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora UFV, 2007, 189p.

BARRETO, R. W.; TORRES, A. N. L. *Nimbya alternantherae* and *Cercospora alternantherae*: Two new records of fungal pathogens on *Alternanthera philoxeroides* (alligatorweed) in Brazil, **Australian Plant Pathology**, v. 28, p. 103-107, 1999.

CASEY, M.; LEONARD, J.; LYGO, B.; PROCTER, G. **Advanced Practical Organic Chemistry**. Chapman and Hall, New York, 1990, 264p.

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.

FERRI, M. V. W.; VIDAL, R. A. Controle de plantas daninhas com herbicidas cloroacetamidas em sistemas convencional e de semeadura direta. **Planta Daninha**, v. 21, p. 131-136, 2003.

HALL, D. O. **Fotossíntese**. São Paulo: EPU, 1980. 89p.

HUSSAIN, I.; NGUYEN, V. T. H.; YAWER, M. A.; DANG, T. T.; FISCHER, C.; REINKE, H.; LANGER, P. Synthesis of Dibenzo[*b,d*]pyran-6-ones Based on [3 + 3] Cyclizations of 1,3-Bis(silyl enol ethers) with 3-Silyloxy-2-en-1-ones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, p. 6255 – 6258, 2007.

JIAO, P.; GLOER, J. B.; CAMPBELL, J.; SHEARER C. A. Altenuene Derivatives from an Unidentified Freshwater Fungus in the Family Tubeufiaceae. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 612 - 615, 2006.

KANAKAM, C. C.; MANI, N. S.; RAO, G. S. R. S. Synthesis based on Cyclohexadienes: Part 4. Novel Synthesis of the 6-Aryl-2,4-dimethoxybenzoates. Alternariol and Methyl Trimethylaltenusin. **Journal of Chemical Society: Perkin Transactions 1**, p. 2233-2237, 1990.

KAWASAKI, T.; YAMAMOTO, Y. Synthesis of 6*H*-Dibenzo[*b,d*]pyran-6-ones from Aryl 3-Bromopropenoates via a Sequential One-Pot Procedure Using the Sonogashira Coupling – Benzannulation Reaction. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 5138 – 5141, 2002.

KIMURA, Y.; MISUNO, T.; SHIMADA, A.; KAWANO, T. Penidienone, a plant growth regulators produced by the fungus *Penicillium sp.*, no 13. **Phytochemistry**, v. 47, p. 323-325, 1998.

KIMURA, Y.; SHIMADA, A.; KUSANO, M.; YOSHII, K.; MORITA, A.; NISHIBE, M.; FUJIOKA, S.; KAWANO, T. Myxostiolide, myxostiol and clavatoic acid, plant growth regulators from the fungus *Myxotrichum stipitatum*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 621-623, 2002.

KRAUS, G. A.; TASCHNER, M. J. Model Studies for the Synthesis of Quassinoids. 1. Construction of the BCE Ring System. **Journal of Organic Chemistry**, v. 45, p. 1175-1176, 1980.

KOCH, K.; PODLECH, J.; PFEIFFER, E.; MATZLER, M. Total Synthesis of Alternariol. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 3275-3276, 2005.

LARSEN, T. O.; PERRY, N. B.; ANDERSEN, B. Infectopyrone, a potential mycotoxins from *Alternaria infectoria*. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 4511-4513, 2003.

LEIN, W.; BORNKE, F.; REINDL, A.; EHRHARDT, T.; STITT, M.; SONNEWALD, U. Target-based discovery of novel herbicides. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 219-225, 2004.

LI, F.; YOSHIZAWA, T. Alternaria Mycotoxins in Weathered Wheat from China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2920 - 2924, 2000.

LIEBERMANN, B.; ELLINGER, R.; GÜNTHER, W.; IHN, W.; GALLANDER, H. Tricycloalternarenes produced by *Alternaria alternata* to ACTG-toxins. **Phytochemistry**, v. 46, p. 297-303, 1997.

LIEBERMANN, B.; NUSSBAUM, R. P.; GÜNTHER, W. Bicycloalternarenes produced by the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 987-992, 2000.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 1991, 440p.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas**. 6.ed., Nova Odessa: Editora Plantarum, 2006, 339p.

MARTIN, R.; BUCHWALD, S. L. Palladium-Catalyzed Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions Employing Dialkylbiaryl Phosphine Ligands. **Accounts of Chemical Research**, 2008. DOI: 10.1021/ar800036s

MIYAURA, N.; SUZUKI, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. **Chemical Reviews**, v. 95, p. 2457-2483, 1995.

MOREIRA, M. A. B.; ZARBIN, P. H. G.; CORACINI, M. D. A. Feromônios associados aos coleópteros-praga de produtos armazenados. **Química Nova**, v. 28, p.472-477, 2005.

NUSSBAUM, R. P.; GÜNTHER, W.; HEINZE, S.; LIEBERMANN, B. New tricycloalternarenes produced by the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 593-599, 1999.

PILLMOOR, J. B. Carbocyclic coformycin: a case study of the opportunities and pitfalls in the industrial search for new agrochemicals from nature. **Pesticide Science**, v. 52, p. 75-80, 1998.

POZZI, C. R.; BRAGHINI, R.; ARCARO, J. R. P.; ZORZETE, P.; ISRAEL, A. L. M.; POZAR, I. O.; DENUCCI, S.; CORREA, B. Mycoflora and occurrence of Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether in Brazilian sunflower from sowing to harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5824-5828, 2005.

PRETSCH, E.; SIMON, W.; SEIBL, J.; CLERC, T. **Tables of Spectral data for structure determination of organic compounds**, 2. ed., Berlin: Springer-Verlag, 1989.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. O.; MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na Região Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, v. 28, p. 605–609, 2005.

ROMERO, S. M.; COMERIO, R. M.; LARUMBE, G.; RITIENI, A.; VAAMONDE, G. PINTO, V. F. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 43-49, 2005.

SAKURAI, M.; NISHIO, M.; YAMAMOTO, K.; OKUDA, T.; KAWANO, K.; OHNUKI, T. TMC-264, a Novel Antiallergic Heptaketide Produced by the Fungus *Phoma sp.* TC 1674. **Organic Letters**, v. 5, p. 1083 – 1085, 2003.

SARGENT, M. V. Depsidone Synthesis. Part 21. A New Synthesis of Grisa-2',5'-diene-3,4'-diones. **Journal of Chemical Society: Perkin Transactions 1**, p. 403-411, 1982.

SCHMIDT, J. M.; TREMBLAY, G. B.; PAGÉ, M.; MERCURE, J.; FEHER, M.; DUNN-DEFAULT, R.; PETER, M. G.; REDDEN, P. R. Synthesis and Evaluation of a Novel Nonsteroidal-Specific Endothelial Cell Proliferation Inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 1289 – 1292, 2003.

SILVA, A. A.; SILVA, J. F. **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa: Editora UFV, 2007, 365p.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 6 ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2000, 460p.

SIMMONDS, E. G. *Alternaria* themes and variations (112-144). **Mycotaxon**, v. 55, p. 475-525, 1995.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3^a ed. Porto alegre; Florianópolis: UFRGS; UFSC, 2001. 833p.

SOCRATES, G. **Infrared characteristic group frequencies**, 2. ed. New York: John Wiley, 1994. 249 p.

SOLFRIZZO, M.; VITTIN, C.; GIROLAMO, A.; VISCONTI, A.; LOGRIECO, A.; FANIZZI, F. P.; Radicinols and Radicinin Phytotoxins Produced by *Alternaria radicina* on Carrots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.3655-3660, 2004.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica - Vol. 1**, 8 ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005, 766 p.

SOORUKRAM, D.; QU, T.; BARRETT, A. G. M. Four-Component Benzyne Coupling Reactions: A Concise Total Synthesis of Dehydroaltenuene B. **Organic Letters**, v. 10, p. 3833 – 3835, 2008.

SUZUKI, A. Cross-Coupling reactions via organoboranes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 653, p. 83-90, 2002.

TANAHASHI, T.; TAKENAKA, Y.; NAGAKURA, N.; HAMADA, N. 6*H*-Dibenzo[*b,d*]pyran-6-one derivatives from the cultured lichen mycobionts of *Graphis ssp.* And their biosynthetic origin. **Phytochemistry**, v. 62, p. 71 – 75, 2003.

THASANA, N.; WORAYUTHAKARN, R.; KRADANRAT, P.; HOHN, E.; YOUNG, L.; RUCHIRAWAT, S. Copper(I)-Mediated and Microwave-Assisted C_{Aryl}-O_{Carboxylic} Coupling: Synthesis of Benzopyranones and Isolamellarin Alkaloids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, p. 9379 – 9382, 2007.

TOURNAS, V. H.; KATSODAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 11-17, 2005.

TRINGALI, C. **Phytotoxins from fungi, pathogenic for agrarian, forestall and weddy plants**. In: Bioactive Compounds from Natural Sources – Isolation, characterization and biological properties. London, 2001, cap. 12, p. 475 – 525.

TROVÓ, A. G.; VILLA, R. D.; NOGUEIRA, R. F. P. Utilização de reações Foto-Fenton na prevenção de contaminações agrícolas. **Química Nova**, v. 28, p. 847–851, 2005.

VEIGA, T. A. M. **Isolamento e avaliação da fitotoxicidade de constituintes químicos de *Nymphaea alternantherae***. Viçosa-MG: Dissertação UFV (Mestrado em agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, 2004. 80p.

VISCHETTI, C.; ESPOSITO, A. Degradation and transformation of a potential natural herbicide in three soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3901-3904, 1999.

VON POSER, G. L.; MENTZ, L. A. **Diversidade biológica e sistemas de classificação**. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. – Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS; Ed. UFSC; 2003. 833 p.

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

WHEELER, W. B. Role of research and regulation in 50 years of pest management in agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4151-4155, 2002.