

ÂNGELA MARIA ALMEIDA LIMA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E FUNGICIDA DE
ISOBENZOFURANONAS E DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO**

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
2014**

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

T

L732s
2014
Lima, Ângela Maria Almeida, 1989-
Síntese e avaliação das atividades citotóxica e fungicida de
isobenzofuranonas e de derivados do ácido cinâmico / Ângela
Maria Almeida Lima. – Viçosa, MG, 2014.
xvi, 130f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Robson Ricardo Teixeira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Síntese orgânica. 2. Isobenzofuranonas. 3. Ácido
cinâmico. 4. Citotóxicas. 5. Fungicidas. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547

ÂNGELA MARIA ALMEIDA LIMA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E FUNGICIDA DE
ISOENZOFURANONAS E DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO**

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

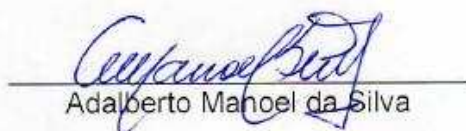
APROVADA: 26 de Fevereiro de 2014.



Sérgio Oliveira de Paula



Marcelo Henrique dos Santos



Adalberto Manoel da Silva



Márcio José da Silva



Róbson Ricardo Teixeira
(Orientador)

***Dedico essa dissertação a Deus.
À minha querida mãe.
Aos meus irmãos.
Aos meus amigos.
E a todos que sempre torceram por mim.***

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

À minha amada mãe pelo carinho, apoio e exemplo. Agradeço do fundo do coração por acreditar e me incentivar a perseguir os meus sonhos e além de tudo isso, por me dar a base necessária para que eu pudesse chegar até aqui.

Os meus sinceros e carinhosos agradecimentos ao meu orientador professor Róbson Ricardo Teixeira, pela extrema paciência e boa vontade em esclarecer todas as minhas dúvidas pois não foram poucas. Por dividir comigo seus conhecimentos e sua experiência. Agradeço também principalmente pela confiança em me acolher no seu grupo de pesquisa e pela oportunidade que você me deu de crescimento profissional e pessoal.

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

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

A todos os meus amigos de São João do Oriente, Governador Valadares e Caratinga por torcerem por mim.

À minha querida amiga Michelle por toda ajuda nesse tempo que trabalhamos juntas, pela sua meiguice e colaboração.

Às amigas de todas as horas, Maria Cecília, Angélica Faleiros e Eugenia Sánchez, pela grande amizade, carinho, apoio e por fazerem dos meus dias mais felizes.

Aos amigos (as) e colegas do grupo de pesquisa, Marcus Vinícius, Adalberto, Francielle da Silva, Poliana Gazolla, Deborah Campos e Lívia, por toda amizade, força e colaboração coletiva.

Aos colegas Juliana Simões, Thiago Lage e Wagner Pereira, pelo carinho, boa vontade e disponibilidade de esclarecimento de dúvidas quando mais precisei, e aos demais colegas do laboratório de Química Supramolecular e Biomimética, por todos os favores prontamente prestados, pelo convívio divertido e alegre nestes dois anos.

Aos professores do Departamento de Química da UFV, pelos ensinamentos que foram valiosos para enriquecimento dos meus conhecimentos.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para o êxito deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

BIOGRAFIA

Ângela Maria Almeida Lima, filha de José Roberto de Lima e Maria Aparecida de Almeida Lima, nasceu em São João do Oriente, Minas Gerais, em 14 de abril de 1989.

Em 2000 ingressou no Centro Universitário de Caratinga (UNEC), onde concluiu o curso de Licenciatura Plena em Química em dezembro de 2010.

Em março de 2012 ingressou na Universidade Federal de Viçosa no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Agroquímica, tendo como área de concentração Síntese de Agroquímicos, defendendo dissertação em fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ESQUEMAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
ANEXO	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv

CAPÍTULO 1

NOVOS FÁRMACOS E AGROQUÍMICOS DE ORIGEM NATURAL.....	1
1.1 - INTRODUÇÃO	1
1.2 - ÁCIDO CINÂMICO E ISOBENZOFURAN-1(3H)-ONAS	8
1.2.1 - ÁCIDO CINÂMICO	8
1.2.2 - ISOBENZOFURAN-1(3H)-ONAS	10
1.3 - OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	13
1.4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

CAPÍTULO 2

SÍNTESE DE ISOBENZOFURANOS E DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO.....	24
2.1 - INTRODUÇÃO	24
2.2 - MATERIAL E MÉTODOS	27
2.2.1 Generalidades Metodológicas	27
2.2.2 - Procedimentos Sintéticos.....	28
2.2.2.1 - Síntese da 6-metoxiisobenzofuran-1(3H)-ona (1).....	28
2.2.2.2 - Síntese da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona (2).....	30
2.2.2.3 - Síntese do cinamato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila (3).....	31
2.2.2.4 - Síntese do 2,3-dibromo-3-fenil propanoato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila (4).....	32
2.2.2.5 - Síntese do 3-fenil propanato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila (5).....	34
2.2.2.6 - Síntese do ácido 2,3-dibromo-3-fenilpropanóico (6).....	35
2.2.2.7 - Síntese do ácido 3-fenilpropanóico (7).....	36
2.2.2.8 - Síntese do ácido 4-metoxibenzóico (8).....	37
2.2.2.9 - Síntese da 5-metoxiisobenzofuran-1(3H)-ona (9).....	39
2.2.2.9 - Síntese do bis-(4-metoxibenzoato) de metileno (10).....	40
2.2.2.10 - Síntese da 5-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona (11).....	41
2.2.2.11 - Síntese do cinamato de fenila (12).....	42

2.2.2.12 - Síntese do 2,3-dibromofenilpropanoato de fenila (13).....	44
2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
2.4 - CONCLUSÕES	86
2.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO E DAS ISOBENZOFURANONAS.....	89
3.1 - INTRODUÇÃO	89
3.2 - MATERIAL E MÉTODOS	92
3.2.1 - Avaliação da atividade citotóxica	92
3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
3.3.1 - Descrição dos resultados dos ensaios de avaliação da atividade citotóxica	95
3.4 - CONCLUSÕES	94
3.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO E DAS ISOBENZOFURANONAS.....	99
4.1 - INTRODUÇÃO	98
4.2 - MATERIAL E MÉTODOS	104
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
4.4 - CONCLUSÕES	107
4.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
CONCLUSÃO GERAL.....	110
PERSPECTIVAS.....	110

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Fármacos derivados de produtos naturais utilizadas no tratamento do câncer.	2
Figura 2 - Outros produtos naturais (e análogos sintéticos) empregados como fármacos.....	3
Figura 3 - Estruturas dos herbicidas bialafos e fosfinotricina.	3
Figura 4 - Estrutura do alcalóide sabadilla.	4
Figura 5 - Estruturas dos monoterpenos 1,8-cineol e 1,4-cineol.	5
Figura 6 - Estruturas das estrobilurinas naturais.	5
Figura 7 - Exemplos de estrobilurinas sintéticas.	6
Figura 8 - Exemplos de semelhanças na estrutura química de fármacos e agroquímicos.....	7
Figura 9 - Estrutura do ácido cinâmico.....	8
Figura 10 - Exemplos de derivados do ácido cinâmico bioativos.	9
Figura 11 - Substâncias heterocíclicas bioativas.....	11
Figura 12 - Exemplos de isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-onas bioativas.....	12
Figura 13 - Estrutura do núcleo isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona.	12
Figura 14 - Isobenzofuranonas isoladas a partir do fungo <i>Cephalosporium</i> sp. AL031.....	12

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Estruturas dos compostos sintetizados nesse trabalho.	26
Figura 2 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 1.	49
Figura 3 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 1.....	50
Figura 4 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 1.	51
Figura 5 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 2.	55
Figura 6 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto 2.....	56
Figura 7 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto 2.....	57
Figura 8 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 3.	62
Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 3.....	63
Figura 10 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 3.	64
Figura 11 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 4.....	67
Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 4.....	68
Figura 13 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 4.....	69
Figura 14 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 6.....	72
Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto 6.	73
Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto 6.....	74
Figura 17 - Etapas envolvidas no processo de hidrogenação catalítica de um alceno catalisada por paládio.....	75
Figura 18 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 7.....	77
Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto 7.....	78
Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto 7.....	79
Figura 21 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 10.....	83
Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 10.....	84
Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 10.....	85

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Estruturas de derivados do ácido cinâmico avaliadas contra diferentes linhagens de células tumorais.	91
Figura 2 - Isobenzofuranonas testadas contra as linhagens de células tumorais U937 e K562.	92
Figura 3 - Estruturas dos compostos 3 e 4.	95

CAPÍTULO 4

Figura 1 - Aspecto de folha de batatas infectadas por requeima (<i>Phytophthora infestans</i>).	102
Figura 2 - Estruturas das fitalidas antifúngicas 17 e 18.	103
Figura 3 - Estrutura do derivado do ácido cinâmico contendo atividade antifúngica.	104
Figura 4 - Efeito das substâncias 1-7, 9, e 10 e do ácido cinâmico comercial (AC) sobre a inibição do crescimento dos esporângios de <i>Phytophthora infestans</i> nas concentrações 0,2 (C1); 0,4 (C2); 0,8 (C3) $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	106

LISTA DE ESQUEMAS

CAPÍTULO 2

Esquema 1 - Análise retossintética para a preparação dos derivados do ácido cinâmico e de isobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-onas.....	25
Esquema 2 - Reações envolvidas na preparação dos compostos 1-5.....	45
Esquema 3 - Proposta mecanística para a obtenção da isobenzofuran-(3 <i>H</i>)-ona 1.....	47
Esquema 4 - Proposta mecanística para a obtenção da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona (2).....	52
Esquema 5 - Proposta mecanística para a formação do composto 3.....	58
Esquema 6 - Adição de bromo a um alceno.....	64
Esquema 7 - Rota sintética empregada na preparação dos compostos 6 e 7.....	69
Esquema 8 - Rota sintética para a síntese do composto 11.....	79
Esquema 9 - Rota sintética empregada na preparação dos compostos 12-13.....	81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Comparação entre os dados de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto 2 obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura 54

Tabela 2 - Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto 2 obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura 54

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) obtidos para a linhagem de célula melanona B16 tratadas com os compostos 1-7, 9, 10 e ácido cinâmico..... 95

ANEXO

ESPECTROS	112
-----------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

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

RESUMO

LIMA, Ângela Maria Almeida, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2014. **Síntese e avaliação das atividades citotóxica e fungicida de isobenzofuranonas e de derivados do ácido cinâmico**
Orientador: Róbson Ricardo Teixeira. Co-Orientadores: Gustavo Costa Bressan e Antônio Jacinto Demuner.

Os derivados do ácido cinâmico assim como as isobenzofuranonas são classes de compostos que apresentam um amplo espectro de bioatividades e devido a isso, vêm atraindo a atenção de vários grupos de pesquisa. O presente trabalho teve por objetivo sintetizar uma série de isobenzofuranonas e de derivados do ácido cinâmico visando a avaliação de suas atividades fungicida e citotóxica. A metodologia empregada para a obtenção desses compostos consistiu em reações de *orto*-alquilação, processos de adição à ligação dupla e reações de acoplamento. Os compostos sintetizados foram caracterizados via espectroscopia no IV e espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C . As substâncias sintetizadas **1-7**, **9** e **10** foram avaliadas em relação às suas habilidades em interferirem na germinação do esporângio do oomiceto *Phytophthora infestans*. Os resultados obtidos mostraram que todos os compostos avaliados apresentaram efeitos inibitórios contra o crescimento do esporângio em todas as concentrações testadas. Considerando-se exemplos descritos na literatura de isobenzofuranonas e de derivados do ácido cinâmico que apresentam efeitos citotóxicos contra diferentes linhagens de células tumorais, realizou-se também uma avaliação da atividade citotóxica desses mesmos compostos contra a linhagem de célula tumoral melanoma (B16). Dentre os compostos avaliados, dois derivados do ácido cinâmico reduziram a viabilidade celular da linhagem melanoma (B16), tendo se destacado o composto **4**, o qual foi capaz de inibir em mais de 90% a viabilidade celular. Devido à sua atividade, pode-se

dizer que as substâncias sintetizadas e avaliadas neste trabalho são potencialmente ativas e podem ser explorados como estruturas-modelo na busca por novos fármacos e agroquímicos.

ABSTRACT

LIMA, Ângela Maria Almeida, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Synthesis, cytotoxicity, and fungicide activity of isobenzofuranones and cinnamic acid derivatives.** Advisor: Róbson Ricardo Teixeira. Co-Advisers: Gustavo Costa Bressan and Antônio Jacinto Demuner.

Isobenzofuranones and cinnamic acid derivatives are groups of structurally diverse compounds presenting various bioactivities. These compounds have attracted the attention of several research groups due to in part to their biological active profiles. The present investigation was aimed to synthesize a set of isobenzofuranones and cinnamic acid derivatives and evaluate their cytotoxic and fungicide activities. To prepare the compounds, *orto*-alkylation, additions to double bonds and coupling reactions were utilized. The identity of the synthesized compounds was confirmed upon IR and one-dimensional NMR (^1H and ^{13}C) analyses. The compounds **1-7**, **9** e **10** were evaluated as the ability to interfere with germination of oomycete *Phytophthora infestans*. It was found that all of the evaluated compounds are capable of significantly interfering with germination at all of the concentrations used in the bioassays. Considering previous reports in the literature about cytotoxicity of either isobenzofuranones and cinnamic acid derivatives, the chemicals **1-7**, **9** e **10** had also their cytotoxicity evaluated against melanoma (B16) cancer cell line. Two cinnamic acid derivatives were capable of significantly interfering with cell viability, being compound **4** the most active one. In view of the results, it is suggested that the compounds synthesized and biologically evaluated in this work can be considered attractive as models for further development of new agrochemicals and pharmaceuticals.

CAPÍTULO 1

NOVOS FÁRMACOS E AGROQUÍMICOS DE ORIGEM NATURAL

1.1 - INTRODUÇÃO

A natureza sempre despertou a curiosidade dos químicos. Investigando as plantas, os animais e os micro-organismos, eles vêm encontrando diversas substâncias interessantes e úteis, sendo essa atividade denominada de Química de Produtos Naturais (BAKER *et al.*, 2007).

Os produtos naturais vêm sendo explorados, desde os primórdios da medicina, para o tratamento de diversas doenças que acometem os seres humanos (KOEHN e CARTER, 2005; PINHATTI, 2010; JUNIOR e BOLZANI, 2006; NEWMAN e CRAGG, 2007). Com os contínuos avanços da Química, Farmacologia e Biologia molecular, bem como a introdução de novos ensaios bioquímicos, tem sido possível a identificação de um número crescente de substâncias com propriedades terapêuticas entre as diversas classes de produtos naturais (FILHO e YUNES, 1998; NASCIUTTI, 2012). A literatura é rica em exemplos que podem ser empregados para suportar essa afirmativa.

Conforme descrito por COSTA-LOTUFO e co-autores (2010) estima-se que 60% dos fármacos introduzidos na terapêutica do câncer nas últimas décadas são de origem natural, dentre eles a podofitaloxina (LIMA *et al.*, 2005), a camptotecina, o etoposídeo, a trabectedina, a ixabepilona, e o topotecano, Figura 1, p.2 (PINTO *et al.*, 2002; BAILLY, 2009).

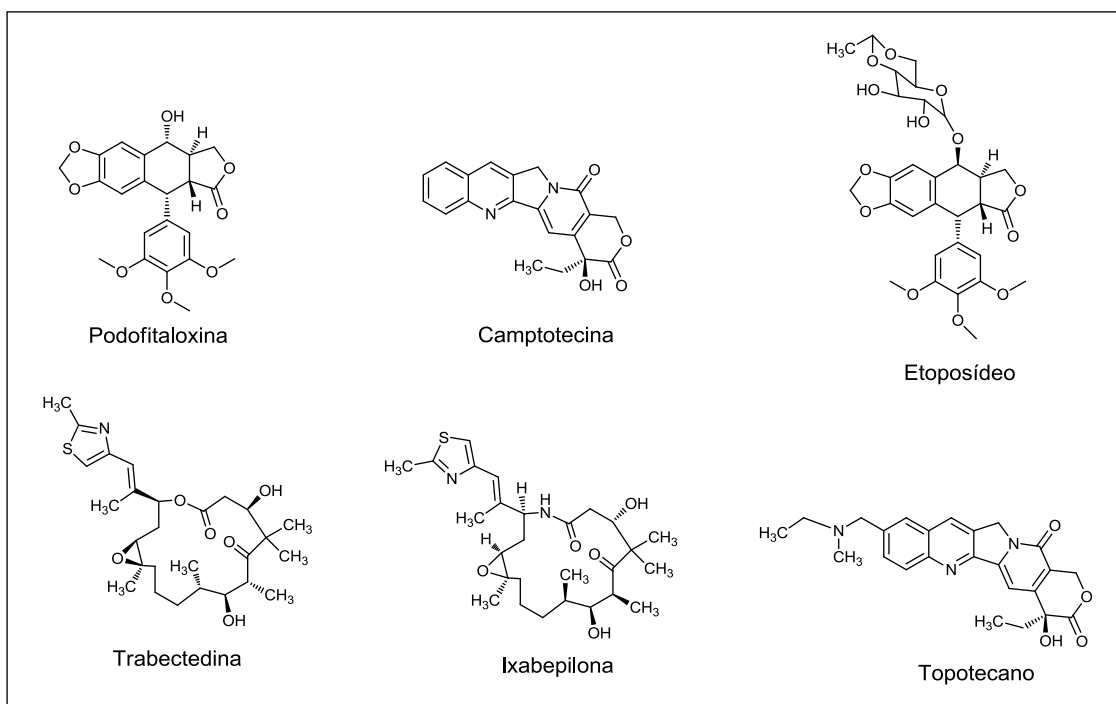


Figura 1 - Fármacos derivados de produtos naturais utilizadas no tratamento do câncer.

Outro exemplo importante de substância natural e de grande utilidade terapêutica é a quinina (Figura 2, p.3), extraída de espécies vegetais do gênero *Cinchona*, conhecida por apresentar atividade antitêrmica, antimalárica e analgésica. A mefloquina (Figura 2, p.3), um fármaco de origem sintética inspirado na estrutura da quinina, também apresenta pronunciada atividade antimalárica (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

O ácido acetilsalicílico (Figura 2, p.3), o primeiro fármaco de origem sintética e lançado pela Bayer em 1897, foi inspirado na estrutura da salicina, um glicosídeo natural isolado da *Salix alba*. O ácido acetilsalicílico é amplamente utilizado como analgésico e antiinflamatório (COSTA, 2009).

A lovastatina (Figura 2, p.3) é um fármaco que pertence à classe das estatinas e foi isolada do fungo *Aspergillus terreus*, sendo muito empregada no tratamento de doenças cardiovasculares.

Como um último exemplo de fármaco de origem natural menciona-se a galantamina, um alcalóide proveniente de várias espécies vegetais da família Amaryllidaceae que é empregado para o tratamento de Mal de Alzheimer (JUNIOR *et al.*, 2004; CASADO *et al.*, 2007; GUIMARÃES, 2009; SANTOS, 2012).

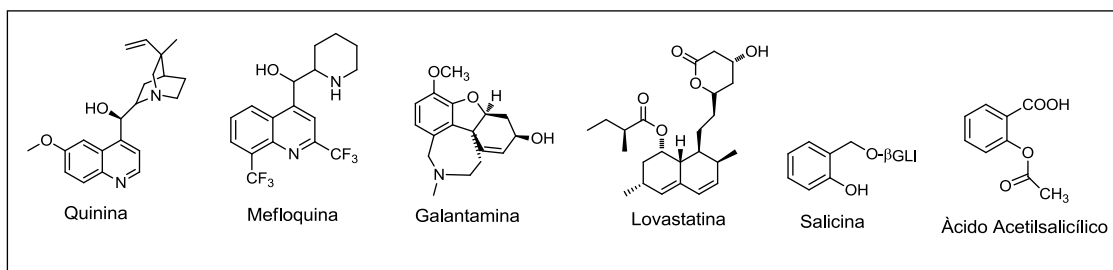


Figura 2 - Outros produtos naturais (e análogos sintéticos) empregados como fármacos.

Os produtos naturais têm contribuído não somente para a descoberta de novos fármacos, mas também vêm sendo utilizados como modelos para o desenvolvimento de novos agroquímicos, fato este que pode ser corroborado a partir de exemplos descritos na literatura (PINTO-ZEVALLOS e ZARBIN, 2013).

O bialafos e a fosfinotricina (Figura 3), por exemplo, são dois compostos herbicidas desenvolvidos a partir de produtos naturais isolados de bactérias (VYVYAN, 2002).

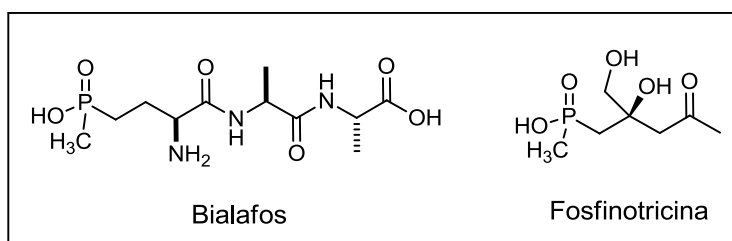


Figura 3 - Estruturas dos herbicidas bialafos e fosfinotricina.

O bialafos é uma fitotoxina de origem microbiana obtida a partir da fermentação da bactéria *Streptomyces higroscopicus*. Corresponde ao primeiro

produto proveniente de fermentação bacteriana utilizado na produção de um herbicida comercial e que atualmente esta sendo vendido no Japão com o nome de Herbiace[®] (VYVYAN, 2002). A fosfinotricina também apresenta atividade herbicida e é obtida a partir da fermentação da *Saccharothrix* SP. ST-888 (KIMURA *et al.*, 1995; FIELDS, 1998).

A sabadilla (Figura 4) é um alcalóide derivado das sementes de plantas da espécie *Chenopodium officinale*, disponível comercialmente desde 1970. Esse alcalóide tem sido utilizado como um inseticida pelos povos nativos da América do Sul e Central (DAYAN *et al.*, 2009).

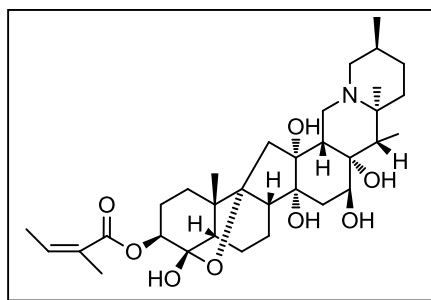


Figura 4 - Estrutura do alcalóide sabadilla.

Os cineóis são monoterpenos voláteis encontrados normalmente entre os componentes de óleos essenciais de diversas espécies de plantas tais como *Laurus nobilis* L., *Salvia spp.*, *Eucalyptus spp.*, e são frequentemente utilizados para o controle de diversas espécies de plantas daninhas. Dentro dessa classe de monoterpenos mencionam-se o 1,8-cineol e 1,4-cineol (Figura 5, p.5). O 1,8-cineol além de apresentar importantes propriedades terapêuticas é considerado um dos aleloquímicos fitotóxicos mais potentes e abundantes extraído de *Artemisia spp.* O 1,4-cineol é, geralmente, encontrado nas mesmas fontes naturais onde o 1,8-cineol está presente; porém a concentração do primeiro é geralmente menor. Salienta-se que efeitos fitotóxicos também são descritos para o 1,4-cineol (ROMAGNI *et al.*, 2000).

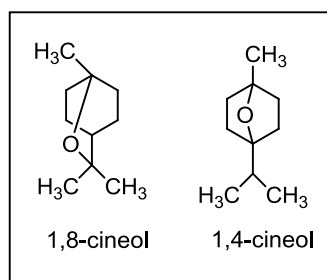


Figura 5 - Estruturas dos monoterpenos 1,8-cineol e 1,4-cineol.

Como um último exemplo de agroquímicos provenientes de produtos naturais cita-se os fungicidas pertencentes à classe das estrobilurinas.

As estrobilurinas são consideradas uma importante classe de fungicidas derivadas do ácido β -metóxi acrílico (BARTLETT *et al.*, 2002). A estrobilurina A foi o primeiro fungicida descrito pertencente a essa classe de compostos e isolada do basidiomiceto *Strobilurus tenacellus*. Muitas outras estrobilurinas foram isoladas e caracterizadas, sendo elas nomeadas em ordem alfabética: B, C, D, E, F, etc, Figura 6 (ANKE *et al.*, 1977).

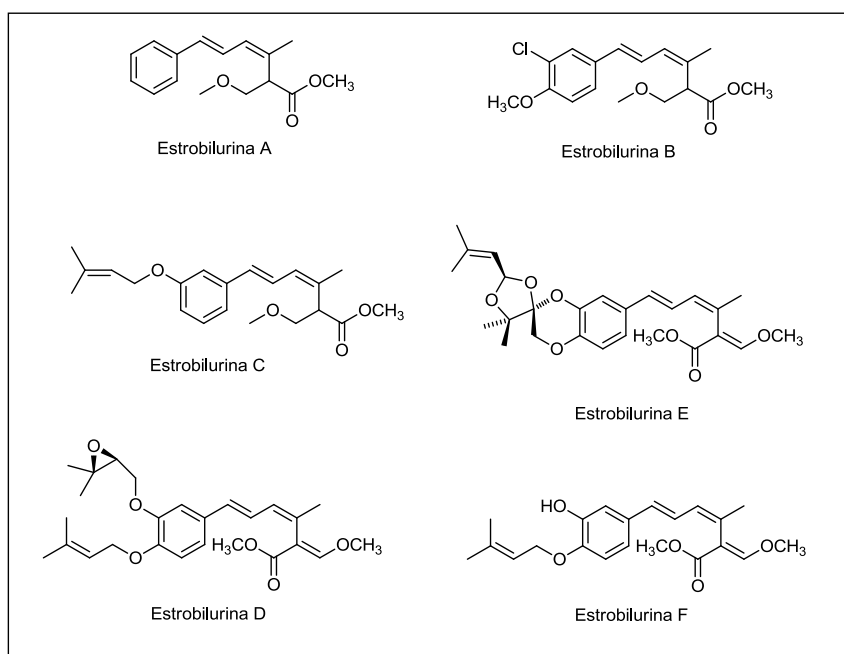


Figura 6 - Estruturas das estrobilurinas naturais.

Embora apresentasse atividade fungicida em testes laboratoriais, ensaios biológicos em casa de vegetação demonstraram que as estrobilurinas eram completamente inativas em termos de atividade antifúngica. Tal fato foi atribuído à fotoinstabilidade das substâncias naturais. Mais tarde, essas mesmas estrobilurinas naturais foram utilizadas como fonte de inspiração para a produção de várias outras de origem sintética, mais estáveis, com potente atividade fungicida e baixa toxicidade para mamíferos. A Figura 7 contém dois exemplos de estrobilurinas de origem sintética (SOUZA, 2008).

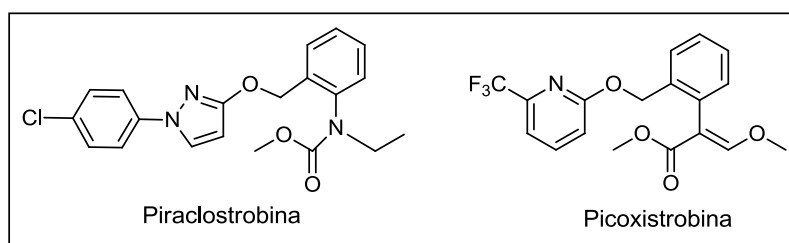


Figura 7 - Exemplos de estrobilurinas sintéticas.

Conforme descrito anteriormente, uma estratégia que pode ser usada na busca por novos fármacos e agroquímicos consiste em explorar o vasto reservatório de substâncias disponíveis na natureza. Todavia, essa não é a única semelhança existente entre as pesquisas que visam descobrir e desenvolver novos fármacos e agroquímicos.

De acordo com a literatura, os 20 tipos de substituintes e cadeias laterais usualmente encontrados nos fármacos são também encontrados nos agroquímicos e com a mesma frequência. Além disso, os parâmetros físico-químicos utilizados para avaliar a possibilidade de uma molécula ser um bom agroquímico ou fármaco são também muito parecidos (DUKE, 2010). Em alguns casos, os sítios de atuação de um fármaco e de um agroquímico podem ser os mesmos. Outro aspecto que deve ser mencionado é que os químicos

envolvidos na descoberta de agroquímicos e fármacos adquirem reagentes dos mesmos fornecedores, utilizam reações químicas similares para a síntese dos compostos de interesse e consultam literaturas semelhantes.

Levando-se em consideração as similaridades descritas anteriormente, não é incomum encontrar na literatura um agroquímico ou análogos de uma classe particular de agroquímicos que também estejam sendo utilizados com fins terapêuticos (DELANEY *et al.*, 2006). Na Figura 8 encontram-se alguns exemplos de substâncias que suportam essa afirmativa.

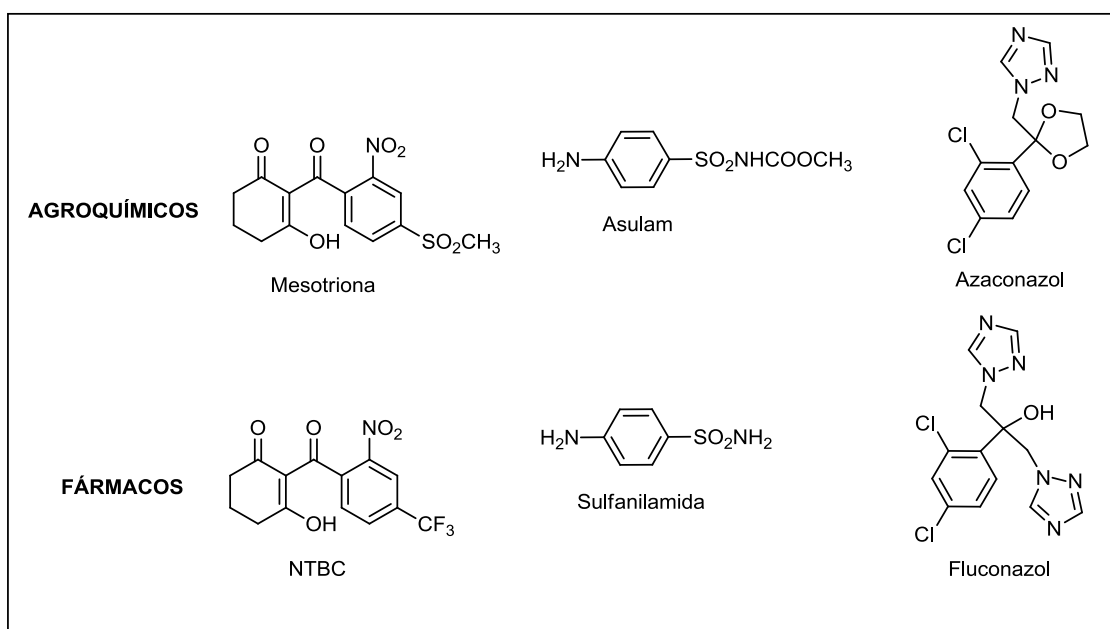


Figura 8 - Exemplos de semelhanças na estrutura química de fármacos e agroquímicos.

A nitisinona (NTBC) possui uma estrutura química muito semelhante à da mesotriona. O que as diferenciam é a substituição do grupo -SO₂CH₃ da mesotriona pelo grupo -CF₃ da nitisinona. Enquanto a mesotriona possui atividade herbicida, a nitisinona vem sendo utilizada no tratamento de uma doença hereditária rara, a tirosinemia hepatorenal tipo I (TH-1) e inclusive foi

patenteada para o tratamento da doença de Parkinson (HALL *et al.*, 2001; BEAUDEGNIES *et al.*, 2009; LAROCHELLEA *et al.*, 2012).

O asulam (figura 8, p. 7), é um agroquímico utilizado como herbicida e a sulfanilamida (figura 8, p. 7), é considerada um fármaco que atua inibindo competitivamente reações enzimáticas envolvendo o ácido *p*-aminobenzóico (PABA). A diferença estrutural entre eles baseia-se na substituição do grupo -SO₂NHCOOCH₃ do asulam pelo grupo -SO₂NH₂ na sulfanilamida (BROWN, 1962).

Como último exemplo menciona-se o azaconazol e o fluconazol (figura 8, p. 7), pertencentes ao grupo dos fungicidas triazólicos. Eles são utilizados tanto como fármaco bem como fungicida agrícola e atuam inibindo a síntese de esteróides em fungos-alvo. O fluconazol sendo um produto farmacêutico, foi patenteado primeiramente para uso agrícola (SWANTON *et al.*, 2011).

1.2 - ÁCIDO CINÂMICO E ISOBENZOFURAN-1(3H)-ONAS

1.2.1 - ÁCIDO CINÂMICO

O ácido cinâmico consiste em um ácido carboxílico aromático de ocorrência natural cuja estrutura molecular é normalmente encontrada na forma *trans*. Ele pertence ao grupo das auxinas, hormônios vegetais responsáveis por regular o crescimento e a diferenciação celular, e alguns de seus derivados desempenham um importante papel na defesa da planta contra o ataque de pragas (NIERO, 2010).

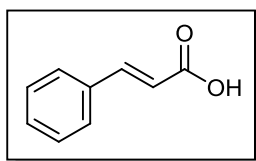


Figura 9 - Estrutura do ácido cinâmico.

Derivados do ácido cinâmico (Figura 10) são encontrados no café, na maçã, frutos cítricos, cereais, entre outras fontes (CLIFFORD, 1999) e apresentam um amplo espectro de importantes atividades biológicas. Por exemplo, seus derivados exibem atividades antioxidante (KIM *et al.*, 2006; HUSSAIN *et al.*, 2014), antibacteriana (THEODOROU *et al.*, 1987; CHIRIAC *et al.*, 2005), antitumoral (EKMEKCIOGLU *et al.*, 1998), antifúngica (SADEGH *et al.*, 2013), antimalárica (KANAANI e GINSBURG, 1992), efeito citotóxico contra várias linhagens de células tumorais (LEE *et al.*, 2003) e efeitos fitotóxicos (LEE *et al.*, 2006; DELLAGREGA *et al.*, 2008, ABE *et al.*, 2012; NISHIKAWA *et al.*, 2013).

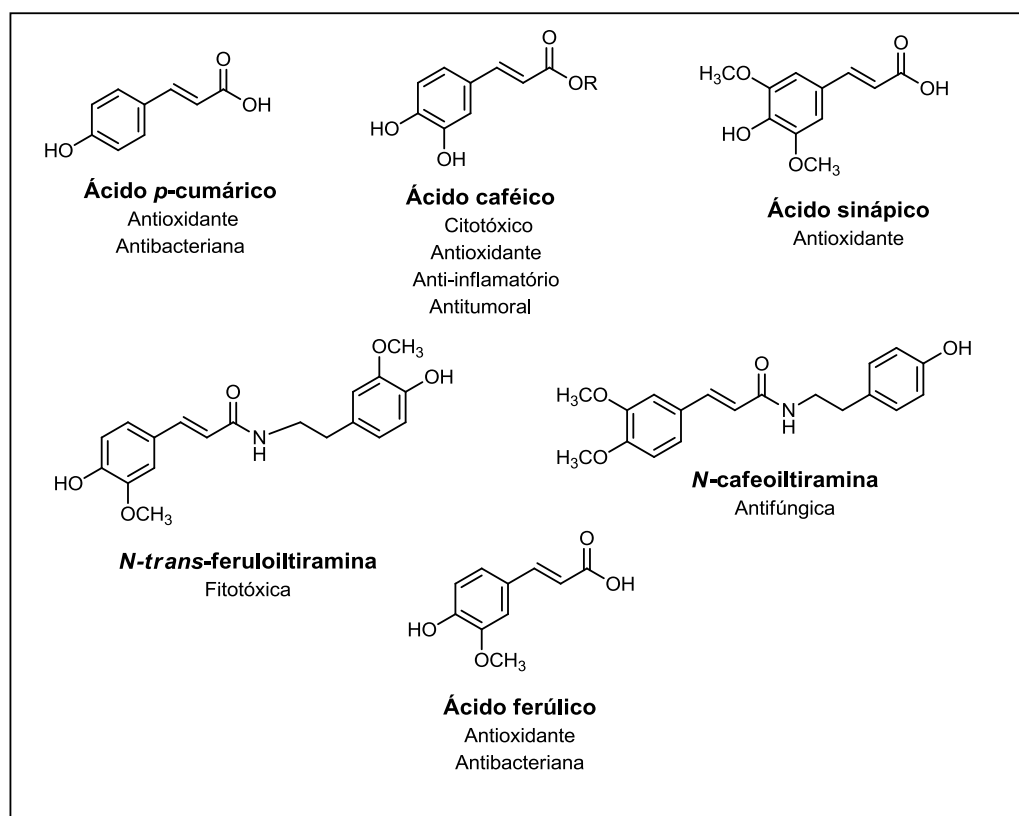


Figura 10 - Exemplos de derivados do ácido cinâmico bioativos.

O estudo científico publicado por LIU e colaboradores (1995 apud EKMEKCIOGLU *et al.*, 1998) demonstrou que derivados do ácido cinâmico

exibem uma acentuada atividade contra tumores malignos humanos, como o melanoma, glioblastoma e adenocarcinoma da próstata e do pulmão. Também foi demonstrado que esses compostos possuem baixa toxicidade em ratos e coelhos o que favorece seu uso na prevenção e tratamento do câncer.

Cumprido ressaltar que compostos fenólicos são metabólitos secundários de ampla ocorrência nas plantas (WU *et al.*, 2001) e são normalmente consumidos na alimentação. Conforme descrito na literatura, essas substâncias desempenham um papel importante em diversas áreas da química, incluindo na pesquisa e no desenvolvimento de novos fármacos e agroquímicos (MILES, 2005). Nos últimos anos foram realizadas investigações que suportam o papel desses compostos contra prevenção de várias doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas entre outras (JIA *et al.*, 2006). Dentre esses compostos fenólicos bioativos encontram-se os derivados do ácido cinâmico (REIGOSA *et al.*, 1999; BLUM *et al.*, 1991; CHAN *et al.*, 1986).

1.2.2 - ISOBENZOFURAN-1(3H)-ONAS

Os compostos de natureza heterocíclica, compostos cíclicos que contém em sua estrutura um heteroátomo, são de grande relevância em química. Entre outros aspectos, essas substâncias apresentam uma vasta série de bioatividades, tais como antiviral, antitumoral, antifúngica, antimicrobiana, herbicida, inseticida entre outras (MELO *et al.*, 2006). Na Figura 11 (p.11) estão apresentadas diversas estruturas de compostos heterocíclicos e suas atividades biológicas relacionadas.

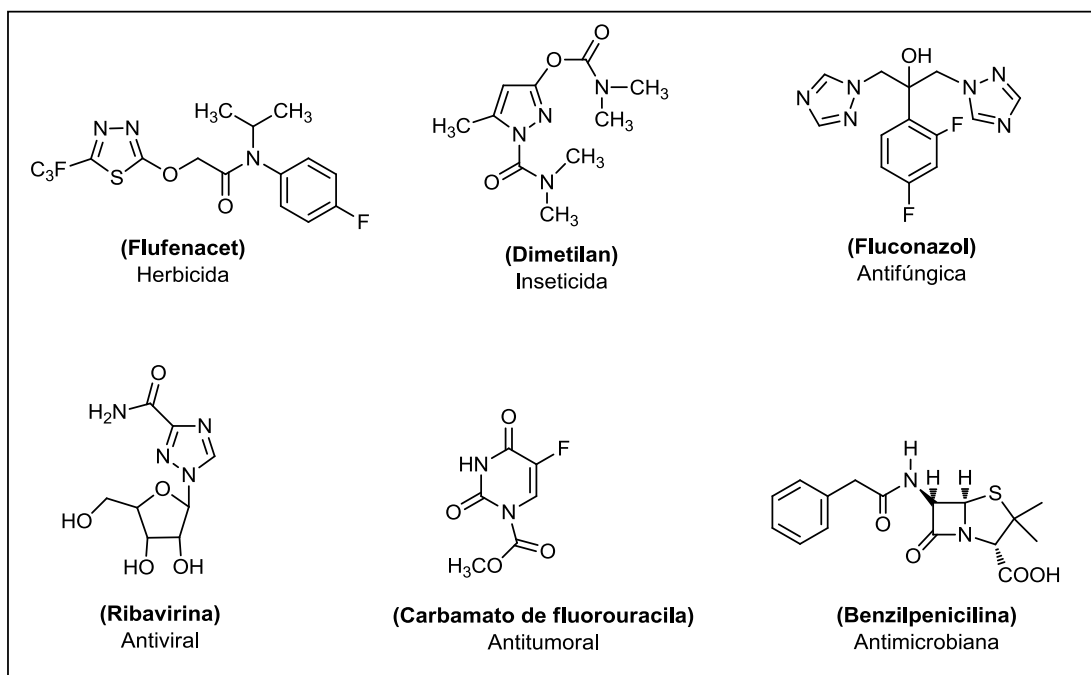


Figura 11 - Substâncias heterocíclicas bioativas.

Dentre os diversos compostos heterocíclicos conhecidos estão as isobenzofuran-1(3*H*)-onas (também denominadas de fitalidas), que constituem uma classe de substâncias que também possuem uma grande variedade de atividades biológicas incluindo atividades antioxidante (PAHARI *et al.*, 2004), antiplaquetária (MA *et al.*, 2012), anti-HIV (LIPKA *et al.*, 2005), antifúngica (STROBEL *et al.*, 2002), antiproliferativa (XIE *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2013a), efeito sobre o transporte de elétrons fotossintético (TEIXEIRA *et al.*, 2013b) e atividade fitotóxica (ARNONE *et al.*, 2002). Estruturas de fitalidas bioativas são apresentadas na Figura 12, p.12.

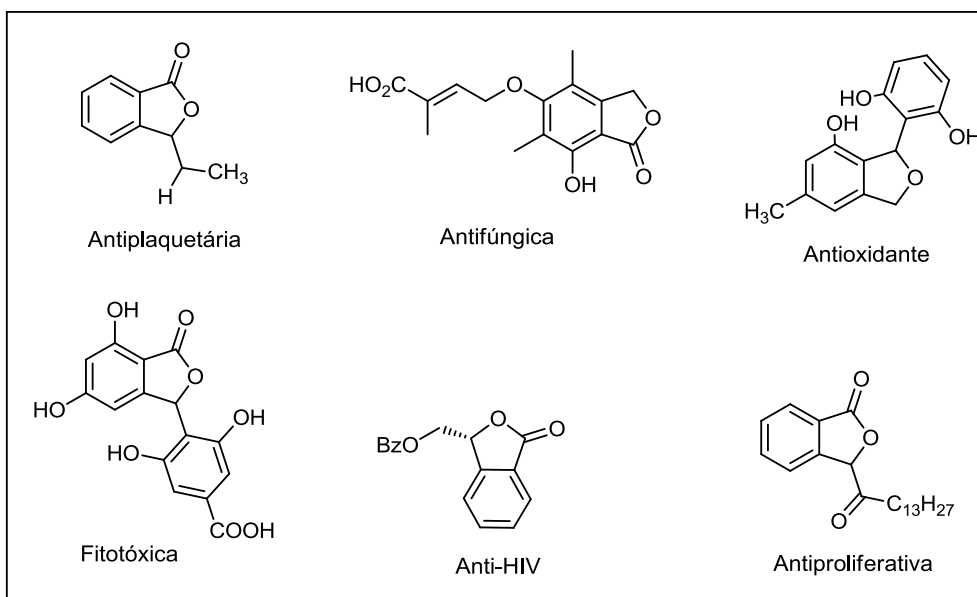


Figura 12 - Exemplos de isobenzofuran-1(3H)-onas bioativas.

As isobenzofuran-1(3H)-onas são caracterizadas estruturalmente na sua forma mais básica pela presença de um anel γ -lactônico fundido a um anel aromático (Figura 13).

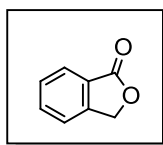


Figura 13 – Estrutura do núcleo isobenzofuran-1(3H)-ona.

As fitalidas podem ser de origem sintética ou natural. Com relação às isobenzofuranonas de origem natural, a grande maioria delas tem sido isolada a partir de diferentes espécies de fungos, como exemplificado na Figura 14 (LEE *et. al.*, 2007).

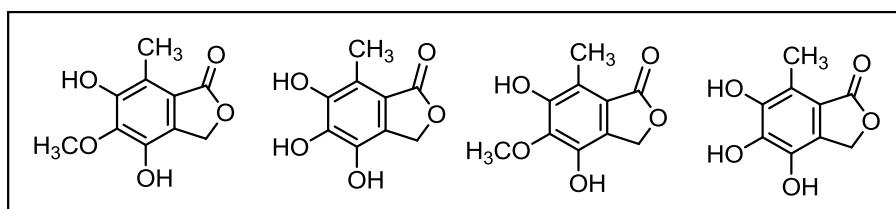


Figura 14 - Isobenzofuranonas isoladas a partir do fungo *Cephalosporium* sp. AL031.

1.3 - OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Os fungos são um importante problema na agricultura. Dentre as mais de 100.000 espécies de fungos descritas, cerca de 20.000 causam uma ou mais patologias em plantas. Os fungos causam cerca de 75% de todas as doenças infecciosas em plantas. Todas as culturas importantes estão sujeitas a uma ou mais doenças provocadas por fungos e que causam sérios prejuízos econômicos se não foram mantidas sob controle. Muitas vezes, 10 a 50 diferentes espécies de fungos podem causar doenças em uma única espécie de planta. Um aspecto importante é que todas as doenças causadas por fungos podem ser controladas ou substancialmente reduzidas com o uso de fungicidas.

Apesar de se encontrar no mercado um grande número de compostos utilizados para o controle dos mais diversos tipos de fungos, existe uma demanda crescente por novos produtos, uma vez que os fungos, assim como outros organismos, desenvolvem resistência a esses compostos devidos principalmente ao uso indiscriminado dos mesmos. Com isso, estes passam a ser menos efetivos e muitas das vezes perdem totalmente a atividade. Como consequência desse fato, pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de utilizarem substâncias oriundas de fontes naturais como modelos para o desenvolvimento de novos princípios ativos para controlar fungos fitopatogênicos. Dentro desse contexto, os derivados do ácido cinâmico e as isobenzofuranonas representam uma fonte de substâncias naturais bioativas que podem ser explorados na busca por novos compostos que sejam potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos agroquímicos.

Tendo em vista as similaridades existentes entre a descoberta e o desenvolvimento de fármacos e agroquímicos, pode-se dizer que a pesquisa voltada para a busca de novos agroquímicos oferece também a oportunidade para a descoberta de novos fármacos que podem ser úteis no tratamento de várias patologias como, por exemplo, o câncer. Essa doença atinge grande parte da população e por isso é muito importante que haja o empenho de pesquisadores no desenvolvimento de tratamentos mais efetivos e com menor impacto na qualidade de vida do paciente.

Por tanto, levando-se em consideração que compostos com aplicações agroquímicas também podem apresentar propriedades úteis para o desenvolvimento de novos fármacos, e considerando também que até o presente momento não existe na literatura nenhum estudo descrevendo a síntese dos derivados do ácido cinâmico contendo núcleos isobenzofuranonas em suas estruturas, buscou-se neste trabalho a síntese, caracterização estrutural e avaliação das atividades antifúngica e citotóxica de uma série de isobenzofuranonas e de derivados do ácido cinâmico com vista ao desenvolvimento de novos princípios ativos tanto para o controle de fungos fitopatogênicos quanto para a terapêutica do câncer.

1.4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; NISHIKAWA, K.; FUKUDA, H.; NAKANISHI, K.; TAZAWA, Y.; TANIGUCHI, T.; PARK, S.; HIRADATE, S.; FUJII, Y.; OKUDA, K.; SHINDO, M. Key structural features of cis-cinnamic acid as an allelochemical. *Phytochemistry*, v. 84, p. 56-67, 2012.

- ANKE, T.; OBERWINKLER, F.; STEGLICH, W.; SCHRAMM, G. The strobilurines-new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. *Journal of Antibiotics*, v. 30, p. 806-810, 1977.
- ARNONE, A.; ASSANTE, G.; NASINI, G.; STRADA, S.; VERCESI, A. Cryphonectric acid and other minor metabolites from a hypovirulent strain of *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 48-50, 2002.
- BAILLY, C. Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochemical Pharmacology*, v.77, p. 1447-1457, 2009.
- BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports*, v. 24, p. 1225-1244, 2007.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, v. 32, p. 679-688, 2009.
- BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBZANSKI, B. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, v. 58, p. 649-662, 2002.
- BEAUDEGNIES, R.; EDMUNDS, A. J. F.; FRASER, T. M.; HALL, R. G.; HAWKES, G. M.; SCHAETZER, J.; WENDEBORN, S.; WIBLEY, J. Herbicidal 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors - A review of the triketone chemistry story from a Syngenta perspective. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 4134-4152, 2009.
- BLUM, U.; WENTWORTH, T. R.; KLEIN, K; WORSHAM, A. D; KING, L. D.; GERIG, T. M.; LYU, S. W. Phenolic acid content of soils from wheat no till, wheat-conventional till, and fallow-conventional till soybean cropping systems. *Journal of Chemical Ecology*, v. 17, p. 1045-1068, 1991.

- BROWN, G. M. The biosynthesis of folic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 237, p. 536-540, 1962.
- CASADO, P.; VILLAR, P. Z.; DEL VALLE, E.; CAMPA, C. M.; LAZO, P. S.; RAMOS, S. Vincristine regulates the phosphorylation of the antiapoptotic protein HSP27 in breast cancer cells. *Cancer Letters*, v. 247, p. 273-282, 2007.
- COSTA, P. R. R. Produtos Naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com a ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. *Revista Virtual de Química*, v. 1, p. 58-66, 2009.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, v. 2, p. 47-58, 2010.
- CHAN, R. I. M; SAN, R. H. C.; STICH, H. F. Mechanism of inhibition of N-methyl-N-nitro-nitrosoguanidine-induced mutagenesis by phenolic compounds. *Cancer Letters*, v. 31 p. 27-34, 1986.
- CHIRIAC, C. I.; TANASA, F.; ONCIU, M. A novel approach in cinnamic acid synthesis: direct synthesis of cinnamic acids from aromatic aldehydes and aliphatic carboxylic acids in the presence of boron tribromide. *Molecules*, v. 10, p. 481-487, 2005.

- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, p. 362-372, 1999.
- DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 4022-4034, 2009.
- DELLAGREGA, M.; PURCARO, R.; PREVITERA, L.; ZARRELLI, A. Phenyl cinnamate derivatives from *Oxalis pes-caprae*. *Chemistry & Biodiversity*, v. 5, p. 2408-2414, 2008.
- DELANEY, J.; CLARKE, E.; HUGHES, D.; RICE, M. Modern agrochemical research: a missed opportunity for drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 11, p. 839-845, 2006.
- DUKE, S. O. Herbicide and pharmaceutical relationships. *Weed Science*, v. 58, p. 334-339, 2010.
- EKMEKCIOGLU, C.; FEYERTAG, J.; MARKTLY, W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. *Cancer letters*, v. 128, p. 137-144, 1998.
- FIELDS, S. C. Total Synthesis of (±)-Phosphonothrixin. *Tetrahedron letters*, v. 39, p. 6621-6624, 1998.
- FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, p. 99-105, 1998.
- GUIMARÃES, D. O. Produtos Naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em

- Caenorhabditis elegans*. 2009, 186p. Tese (Doutorado em Farmácia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- HALL, M. G.; WILKS, M. F.; PROVAN, W. M.; EKSBORG, S.; LUMHOLTZ, B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTBC (2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) and mesotrione, inhibitors of 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) following a single dose to healthy male volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, v. 52, p. 169-177, 2001.
- HUSSAIN, S. H.; LATIF, A.; COX, R. J.; SIMPSON, T, J.; ALI, M.; ARFAN, M.; UDDIN, G. Phytochemicals from the aerial parts of *Ligularia thomsonii* and their radical scavenging activity. *Phytochemistry Letters*, v. 7, p. 6-10, 2014.
- JIA, C.; KUDSK, P.; MATHIASSEN, S. K. Joint action of benzoxazinone derivatives and phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 1049-1057, 2006.
- JUNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S.; FURIAN, M. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. *Química Nova*, v. 27, p. 655-660, 2004.
- JUNIOR, C. V.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, p. 326-337, 2006.
- KANAANI, J., GINSBURG, H. Effects of cinnamic acid derivatives on in vitro growth of *Plasmodium falciparum* and on the permeability of the membrane of malaria-infected erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, p. 1102-1108, 1992.

- KIMURA, T.; NAKAMURA, K.; TAKAHASHI, E. Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. *The Journal of Antibiotics*, v. 48, p. 1130-1133, 1995.
- KIM, K. -H.; TSAO, R.; YANG, R.; CUI, S. W. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, v. 95, p. 466-473, 2006.
- KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 206-220, 2005.
- LAROCHELLEA, J.; ALVAREZB, F.; BUSSIÈRESB, J. F.; CHEVALIERB, I.; DALLAIREB, L.; DUBOISB, J.; FAUCHERB, F.; FENYVESC, D.; GOODYERD, P.; GRENIERE, A.; HOLMEF, E.; LAFRAMBOISEE, R.; LAMBERTB, M.; LINDSTEDTF, S.; MARANDAG, B.; MELANÇOND, S.; MEROUANIB, A.; MITCHELLD, J.; PARIZEAULTA, G.; PELLETIERH, L.; PHANB, V.; RINALDOH, P.; SCOTTT, C. R.; SCRIVERD, C.; MITCHELL, G. A. Effect of nitisinone (NTBC) treatment on the clinical course of hepatorenal tyrosinemia in Québec. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 107, p. 49-54, 2012.
- LEE, Y.; KUO, H.; CHU, C.; WANG, C.; LIN, W.; TSENG, T. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochemical Pharmacology*, v. 66, p. 2281-2289, 2003.
- LEE, J. G.; LEE, B. Y.; LEE, H. J. Accumulation of phytotoxic organic acids in reused nutrient solution during hydroponic cultivation of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Horticulturae*, v. 110, p. 119-128, 2006.

- LEE, N. H.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. Isolation of chromanone and isobenzofuran derivatives from a fungicolous isolate of *Epicoccum purpurascens*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 28, p. 877-879, 2007.
- LIMA, D. N.; VIZZOTO, L.; BARBOSA, A. M. J.; MARIANO, V. G.; BEATRIZ, A. Um método eficiente para isolamento e purificação da podofitaloxina a partir do extrato de podofilina e algumas transformações químicas sob irradiação de microondas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, p. 15-21, 2005.
- LIPKA, E.; VACCHER, M.; VACCHER, C.; LEN, C. Enantiomeric excess determination, purification and biological evaluation of (3S) and (3R) α , β -butenolide analogues of isobenzofuranone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, p. 501-504, 2005.
- MA, F.; GAO, Y.; QIAO, H.; HU, X.; CHANG, J. Antiplatelet activity of 3-butyl-6-bromo-1(3H)-isobenzofuranone on rat platelet aggregation. *Journal of Thrombosis Thrombolysis*, v. 33, p. 64-73, 2012.
- MELO, J. O. F.; DONNICI, C. L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, M. L. G.; CUNHA, A. C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. *Química Nova*, v. 29, p. 569-579, 2006.
- MILES, E. A.; ZOUBOULI, P.; CALDER, P. C. Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production. *Clinical Nutrition*, v. 24, p. 780-784, 2005.
- NASCIUTTI, P. R. Desenvolvimento de Novos Fármacos. Goiânia, 2012, 36p. Dissertação (Mestrado - Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-477, 2007.

- NIERO, E. L. O. Efeitos de ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanona humanos: avaliação do seu potencial antitumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultravioleta. 2010, 38p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NISHIKAWA, K.; FUKUDA, H.; ABE, M.; NAKANISHI, K.; TANIGUCHI, T.; NOMURA, T.; YAMAGUCHI, C.; HIRADATE, S.; FUJII, Y.; OKUDA, K.; SHINDO, M. Substituent effects of cis-cinnamic acid analogues as plant growth inhibitors. *Phytochemistry*, v. 96, p. 132-147, 2013.
- PAHARI, P.; SENAPATI, B.; MAL, D. Regiospecific synthesis os isopestacin, a naturally occurring isobenzofuranone antioxidant. *Tetrahedron Letters*, v. 45 p. 5109-5112, 2004.
- PINHATTI, A. V. Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de benzofenonas isoladas de *Hypericum carinatum* Griseb. 2010, 40p. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. *Química Nova*, v. 25, p. 45-61, 2002.
- PINTO-ZEVALLOS, D. M.; ZARBIN, P. H. G. A química na agricultura: perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. *Química Nova*, v. 36, p. 1509-1513, 2013.
- REIGOSA, M. J.; SOUTO, X. C.; GONZÁLEZ, L. Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regulation*, v. 28, p. 83-88, 1999.

- ROMAGNI, J. G.; ALLEN, S. N.; DAYAN, F. E. Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *Journal of Chemical Ecology*, v. 26, p. 303-313, 2000.
- SADEGHI, M.; ZOLFAGHARI, B.; SENATORE, M.; LANZOTTI, V. Antifungal cinnamic acid derivatives from Persian leek (*Allium ampeloprasum* Subsp. *Persicum*). *Phytochemistry Letters*, v. 6, p. 360-363, 2013.
- SANTOS, N. P.; PINTO, A. C. “A Mata é sua Farmácia” – A pesquisa de plantas brasileiras para o combate de doenças tropicais no século XIX. *Revista Virtual de Química*, v. 4, p. 162-172, 2012.
- SOUZA, C. F. Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina por cromatografia eletrocínética capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente. 2008, 172p. Dissertação (Mestrado em Química) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- STROBEL, G.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M.; FUNG, P. C. W.; CHAU, R. M. W. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*, v. 60, p. 179-183, 2002.
- SWANTON, C. J.; MASHHADI, H. R.; SOLOMON, K. R.; AFIFI, M. M.; DUKE, S. O. Similarities between the discovery and regulation of pharmaceuticals and pesticides: in support of a better understanding of the risks and benefits of each. *Pest Management Science*, v. 67, p. 790-797, 2011.
- TEIXEIRA, R. R.; BRESSAN, G. C.; PEREIRA, W. L.; FERREIRA, J. G.; DE OLIVEIRA, F. M.; THOMAZ, D. C. Synthesis and antiproliferative activity of

- C-3 functionalized isobenzofuran-1(3*H*)-ones. *Molecules*, v. 18, p. 1881-1896, 2013a.
- TEIXEIRA, R. R.; PEREIRA, W. L.; TOMAZ, D. C.; DE OLIVEIRA, F. M.; GIBERTI, S.; FORLANI, G. Synthetic analogues of the natural compounds cryphonectric acid interfere with photosynthetic machinery through two different mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 5540-5549, 2013b.
- THEODOROU, M. K.; GASCOYNE, D. J.; AKIN, D. E.; HARTLEY, R. D. Effect of phenolic acids and phenolics from plant cell walls on rumenlike fermentation in consecutive batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 1046-1050, 1987.
- VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, v. 58, p. 1631-1646, 2002.
- XIE, Z. P.; ZHANG, H. Y.; LI, F. C.; LIU, B.; YANG, S. X.; WANG, H. P.; PU, Y.; CHEN, Y.; QIN, S. A new isobenzofuranone derivative from a marine *Streptomyces* sp. *Chinese Chemical Letters*, v. 23, p. 941-944, 2012.
- WU, H.; HAIG, T.; PRATLEY, J.; LEMERLE, D.; AN MIN. Allelochemicals in wheat (*Triticum aestivum* L.): Variation of phenolic acids in shoot tissues. *Journal of Chemical Ecology*, v. 27, p. 125-135, 2001.

CAPÍTULO 2

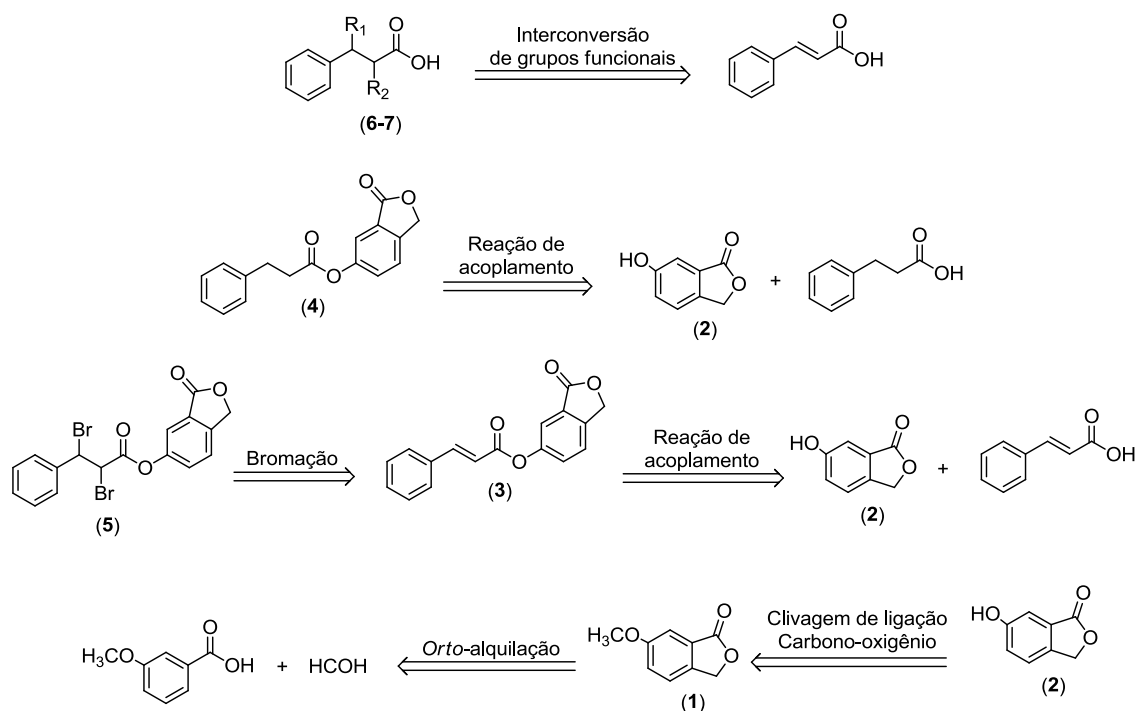
SÍNTESE DE ISOBENZOFURANONAS E DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO

2.1 - INTRODUÇÃO

No planejamento da síntese de compostos orgânicos, de maior ou menor complexidade, dois aspectos fundamentais necessitam ser levados em consideração: a formação de ligações carbono-carbono e a interconversão de grupos funcionais (DE SOUZA, 2010).

A interconversão de grupos funcionais domina a maior parte das rotas sintéticas para obtenção de moléculas-alvo. Serão descritas neste capítulo uma série de interconversões de grupos funcionais que foram utilizadas para a preparação de derivados do ácido cinâmico. No esquema 1 (p.25) esta representada a análise retrossintética para a obtenção dos derivados do ácido cinâmico.

De acordo com a retrossíntese, para que a formação dos derivados do ácido cinâmico fosse possível, o ácido 3-metoxibenzóico, disponível comercialmente, seria convertido na isobenzofuran-1(3*H*)-ona (**1**) via reação de *orto*-alquilação. A preparação do composto (**2**) seria realizada via desmetilação. A reação de acoplamento entre a substância (**2**) e o ácido cinâmico deveria resultar no éster (**3**) que, por sua vez, seria submetido a uma reação de bromação para a obtenção do seu derivado (**5**). Numa etapa subsequente, o composto (**2**) novamente sofreria uma reação de acoplamento resultando na formação do composto (**4**). E posteriormente, a preparação dos derivados do ácido cinâmico (**6-7**) seria alcançada via processos de adição.



Esquema 1- Análise retrosintética para a preparação dos derivados do ácido cinâmico e de isobenzofuran-1(3H)-onas.

Na Figura 1 (p.26), encontra-se representada as estruturas dos derivados do ácido cinâmico sintetizados. Além disso, são apresentadas ainda as estruturas dos intermediários sintéticos envolvidos na preparação dos derivados e de um diéster que foi isolado durante a preparação do composto **9**.

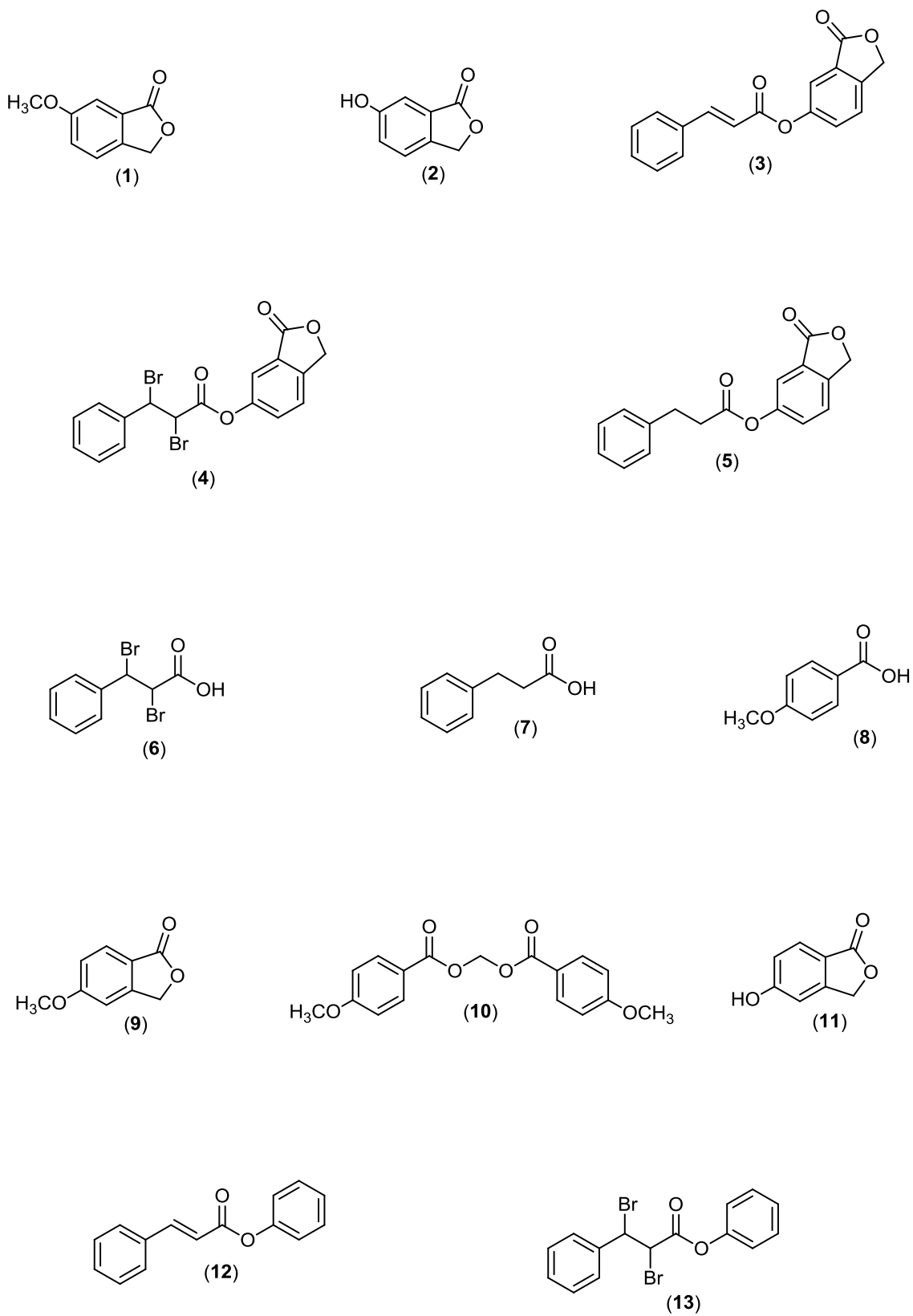


Figura 1 - Estruturas dos compostos sintetizados nesse trabalho.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Generalidades Metodológicas

Foram utilizados reagentes de grau P.A. para a síntese dos compostos.

Dibromometano (CH_2Br_2), solução de BBr_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em diclorometano, ácido 3-metoxibenzóico, acetato de paládio(II) ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$), *N,N*-dícicloexilcarbodiimida (DCC), 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina (DMAP), ácido cinâmico, clorito de sódio, ácido cítrico, CCl_4 , Pd/C, Br_2 , 4-metoxibenzaldeído e fenol foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) e utilizados sem prévia purificação. Acetona, ácido acético, ácido clorídrico, dimetilsulfóxido, diclorometano, cloreto de sódio, solução de formaldeído 37% m/v, fosfato diácido de sódio (NaH_2PO_4), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), bicarbonato de potássio (KHCO_3) e etanol foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

A secagem do diclorometano foi feita adicionando-se peneira molecular 4Å ao solvente. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 24 horas à temperatura ambiente e sob atmosfera de nitrogênio. Após este período, o solvente foi filtrado e armazenado em um frasco âmbar contendo peneira molecular 4Å e sob atmosfera de nitrogênio.

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

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

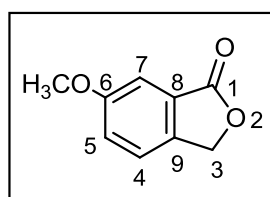
Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos empregando-se a técnica reflectância total atenuada (ATR) em equipamento Varian 660 com acessório GladiATR ou por meio de pastilhas de KBr, em espectrofotômetro PERKIN ELMER SPECTRUM 1000 (Departamento de Química - UFV).

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

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

2.2.2 - Procedimentos Sintéticos

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



(1)

A um balão de fundo redondo de 200 mL, contendo uma barra de agitação magnética, foram adicionados o ácido 3-metoxibenzóico (5,00 g; 32,9 mmol) juntamente com 3,50 mL de solução aquosa de formaldeído (37% m/v), 5,50 mL de HCl concentrado e 12,0 mL de ácido acético. A solução resultante

foi mantida sob agitação magnética à temperatura de 90 °C por 16 horas. Decorrido este período, a análise da mistura por CCD mostrou que o ácido 3-metoxibenzóico havia sido completamente consumido. O volume da solução foi, então, reduzido em evaporador rotativo e em seguida foi adicionada uma solução saturada de bicarbonato de potássio até pH aproximadamente 6. A fase aquosa resultante foi extraída com acetato de etila (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por recristalização utilizando como solvente acetona. O composto **1** foi obtido como um sólido branco em 80% de rendimento (4,31 g; 26,3 mmol).

Característica: sólido branco.

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

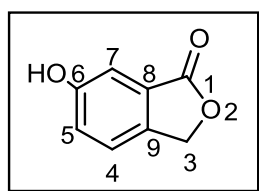
T_f: 118 - 119,5 °C (**T_f literatura:** 119 - 120 °C; NUMATA, 1968).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3481, 3086, 2954, 2849, 1754, 1620, 1277, 1247, 1055, 1019, 992, 726, 692, 546 cm⁻¹. (Espectro apresentado na figura 2, p. 48).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,86 (s, 3H; -OCH₃); 5,26 (s, 2H; H-3); 7,22-7,38 (m, 3H; H-4, H-5, H-7). (Espectro apresentado na figura 3, p. 49).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 55,7 (-OCH₃); 69,5 (C-3); 107,4 (C-7); 122,8 (C-5); 123,0 (C-4); 126,9 (C-8); 138,8 (C-9); 160,5 (C-6); 171,2 (C-1). (Espectro apresentado na figura 4, p. 50).

2.2.2.2 - Síntese da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona (**2**).



(**2**)

A um balão bitubulado de 250 mL, contendo uma barra de agitação magnética e sob atmosfera de nitrogênio, adicionaram-se o composto **1** (0,60 g; 3,65 mmol) juntamente com 30,0 mL de diclorometano anidro. A mistura resultante foi mantida sob agitação e resfriada em banho de gelo por 40 minutos. Em seguida foi adicionado a essa mistura 11,0 mL de solução 1,00 mol L⁻¹ de BBr₃ em diclorometano gota a gota. Após a adição, a mistura reacional foi mantida sob agitação por 6 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados à mistura reagente 15,0 mL de água destilada e observou-se a formação de um precipitado branco. A mistura resultante foi transferida para um funil de separação e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto **2** foi obtido como um sólido branco em 99% de rendimento (0,544 g; 3,63 mmol).

Característica: sólido branco.

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

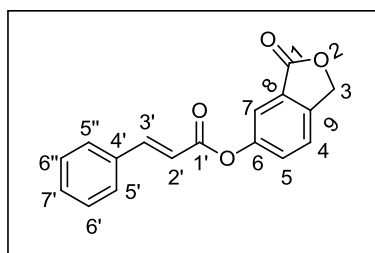
T_f: 197,1 - 198,7 °C (**T_f literatura:** 198 - 200 °C, NUMATA, 1968).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3215 (banda larga), 1722, 1599, 1505, 1449, 1227, 1193, 1055, 774, 539 cm⁻¹. (Espectro apresentado na figura 5, p. 54).

RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ : 5,26 (s, 2H; H-3); 7,16-7,18 (m, 2H; H-7/H-5); 7,40 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz; H-4). (Espectro apresentado na figura 6, p. 55).

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

2.2.2.3 - Síntese do cinamato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila (**3**).



(3)

A um balão de fundo redondo de 50 mL, foram adicionados 0,100 g de 6-hidroxiisobenzofuran(3*H*)-ona (**2**) (0,660 mmol), juntamente com 0,090 g (0,600 mmol) de ácido cinâmico, 0,136 g (0,660 mmol) de DCC, 0,007 g (0,060 mmol) de DMAP e 6,00 mL de diclorometano. A mistura reagente permaneceu sob agitação magnética por 5 horas à temperatura ambiente. Após o término da reação, a mistura reacional foi filtrada e lavada com solução aquosa de 10% m/v de ácido cítrico (2 x 8,00 mL), 6,00 mL de água destilada e 12,0 mL de solução saturada de NaCl. A fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 10,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando-se como eluente hexano-acetato de etila (3:1 v/v). O composto **3** foi obtido como um sólido branco em 82% de rendimento (0,138 g; 0,492 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: R_f: 0,30 (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

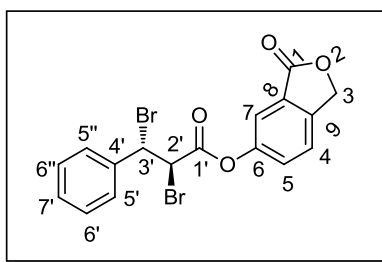
T_f: 171,9 - 172,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3074, 2928, 2852, 1755, 1725, 1633, 1577, 1481, 1451, 1158, 1138 cm⁻¹. (Espectro apresentado na figura 8, p. 61).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 5,33 (s, 2H; H-3); 6,64 (d, 1H, *J* = 16 Hz; H-2'); 7,43-7,72 (m, 8H; H-5'', H-5', H-7, H-6'', H-7', H-6', H-5, H-4); 7,90 (d, 1H, *J* = 16 Hz; H-3'). (Espectro apresentado na figura 9, p. 62).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 69,5 (C-3); 116,3 (C-2'); 118,8 (C-7); 123,1 (C-5); 127,2 (C-4); 128,2 (C-8); 128,4 (C-5', C-5''); 129,0 (C-6', C-6''); 131,0 (C-7'); 133,8 (C-4'); 143,6 (C-9); 147,6 (C-3'); 151,4 (C-6); 165,0 (C-1'); 170,1 (C-1). (Espectro apresentado na figura 10, p. 63).

2.2.2.4 - Síntese do 2,3-dibromo-3-fenil propanoato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila (**4**).



(**4**)

A um balão de fundo redondo de 25 mL, foram adicionados 0,100 g do composto **3** (0,356 mmol) e 6,00 mL de CCl₄. A esta mistura reacional foi adicionada, gota a gota, uma solução de bromo dissolvido em CCl₄ até o surgimento permanente de uma coloração avermelhada. A reação permaneceu sob agitação por 4 horas à temperatura ambiente. O término da reação foi

comprovado pelo consumo total do composto **3** verificado por CCD. Após este período foram adicionados 30,0 mL de solução de bicarbonato de sódio e a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por recristalização, utilizando-se como solvente hexano-acetato de etila (1:1 v/v). O composto **4** foi obtido como um sólido branco em 78% de rendimento (0,122 g; 0,278 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: R_f: 0,26 (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

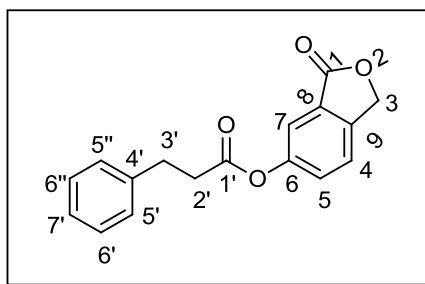
T_f: 148,7-149,5 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3002, 1753, 1622, 1483, 1450, 1309, 1255, 1218, 1113, 691, 599 cm⁻¹. (Espectro apresentado na figura 11, p. 66).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 5,07 (d, 1H, *J* = 12 Hz; H-2'); 5,36 (s, 2H; H-3); 5,46 (d, 1H, *J* = 12 Hz; H-3'); 7,39 - 7,79 (m, 8H; H-4, H-5, H-5', H-6', H-7', H-6'', H-5'', H-7). (Espectro apresentado na figura 12, p. 67).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 46,4 (C-3'); 50,4 (C-2'); 69,5 (C-3); 118,5 (C-7); 123,4 (C-5); 127,4 (C-4); 127,5 (C-8); 128,0 (C-5', C-5''); 129,0 (C-6', C-6''); 129,7 (C-7'); 136,9 (C-4'); 144,4 (C-9); 150,8 (C-6); 166,1 (C-1'); 169,8 (C-1). (Espectro apresentado na figura 13, p. 68).

2.2.2.5 - Síntese do 3-fenilpropanato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila (**5**).



(**5**)

A um balão de fundo redondo de 25 mL, contendo uma barra de agitação magnética foram adicionados 0,100 g (0,666 mmol) de 6-hidroxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**2**), 0,091 g (0,600 mmol) de ácido 3-fenilpropanóico (substância **7** cuja preparação é descrita a seguir), 0,136 g (0,666 mmol) de DCC e 0,007 g (0,060 mmol) de DMAP e 8,00 mL de diclorometano. A mistura reacional permaneceu sob agitação por 4 horas a temperatura ambiente. Após o termino da reação evidenciado via análise por CCD, a mistura resultante foi filtrada e lavada com uma solução aquosa 10% m/v de ácido cítrico (2 x 8,00 mL), água destilada (6,00 mL) e solução saturada de NaCl (12,0 mL). Em seguida a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 20,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por recristalização utilizando-se como solvente hexano e acetato de etila (1:1 v/v). O composto **5** foi obtido como um sólido branco em 82% de rendimento (0,139 g; 0,492 mmol).

Característica: sólido branco.

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

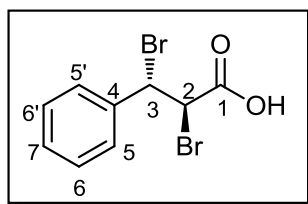
T_f: 118,7 - 119,9 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3074, 3024, 2928, 2848, 1752, 1626, 1272, 1234, 1130, 723, 691 cm^{-1} . (Espectro apresentado na figura 1, p. 112, anexos).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,93 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz; H-2'); 3,09 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz; H-3'); 5,30 (s, 2H; H-3); 7,23-7,58 (m, 8H; H-7, H-5', H-6', H-7', H-6'', H-5'', H-5, H-4). (Espectro apresentado na figura 2, p. 113, anexos).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 30,8 (C-3'), 35,8 (C-2'), 69,4 (C-3), 118,7 (C-7), 123,0 (C-5), 126,6 (C-7'), 128,3 (C-5', C-5''), 128,6 (C-6', C-6''), 139,7 (C-4'), 143,6 (C-9), 151,2 (C-6), 170,0 (C-1), 171,0 (C-1'). (Espectro apresentado na figura 3, p. 114).

2.2.2.6 - Síntese do ácido 2,3-dibromo-3-fenilpropanóico (**6**).



(**6**)

A um balão de fundo redondo de 25 mL, contendo uma barra de agitação magnética foram adicionados 0,100 g de ácido cinâmico (0,674 mmol) e 8,00 mL de CCl_4 . A esta mistura reacional foi adicionado gota a gota uma solução de bromo dissolvido em CCl_4 até o aparecimento permanente de uma coloração avermelhada. À reação permaneceu sob agitação por 5 horas à temperatura ambiente. O término da reação foi observado pelo consumo total do material de partida (ácido cinâmico), verificado por CCD. Em seguida adicionou-se 30,0 mL de água destilada e a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada

sob pressão reduzida. O composto **6** foi obtido como um sólido branco em 96% de rendimento (0,200 g; 0,649 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: R_f: 0,34 (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

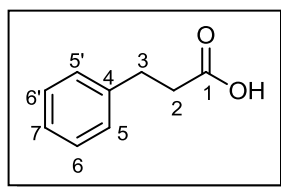
T_f: 195,5 - 197,4 °C (**T_f literatura:** 196 - 198 °C; BARNES e NETO, 1970).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3300-2500 (banda larga), 1713, 1496, 1454, 1429, 1317, 1297, 910, 691, 599 cm⁻¹. (Espectro apresentado na figura 14, p. 71).

RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ : 5,01 (d, 1H, *J* = 12 Hz; H-2); 5,37 (d, 1H, *J* = 12 Hz, H-3); 7,31 - 7,49 (m, 5H; H-5', H-6', H-7, H-6, H-5). (Espectro apresentado na figura 15, p. 72).

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ : 50,7 (C-2, C-3); 127,9 (C-5, C-5'); 128,4 (C-6, C-6'); 128,8 (C-7); 138,2 (C-4); 169,5 (C-1). (Espectro apresentado na figura 16, p. 73).

2.2.2.7 - Síntese do ácido 3-fenilpropanóico (**7**).



(**7**)

A um balão bitubulado de 50 mL contendo uma barra de agitação e sob atmosfera de hidrogênio foram adicionados 0,300 g de ácido cinâmico (2,02 mmol) e 0,620 g de Pd/C, juntamente com 8,00 mL de etanol. A mistura permaneceu sob agitação por 4 horas a temperatura ambiente. Decorrido esse período, a análise da mistura por CCD comprovou que o material de partida

havia sido completamente consumido. Posteriormente a mistura reacional foi filtrada através de coluna cromatográfica de sílica-gel utilizando-se como eluente uma mistura de hexano-acetato de etila (2:1 v/v) e concentrada sob pressão reduzida. O composto **7** foi obtido como um sólido branco em 93% de rendimento (0,284 g; 1,89 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: R_f : 0,37 (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

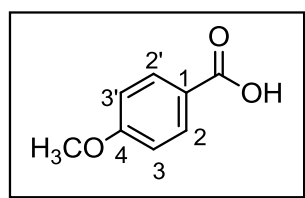
T_f : 43,3 - 44,0 °C (**$T_{f \text{ literatura}}$** : 47 - 49 °C; HOLMES e LIGHTNER, 1995).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3026 (banda larga), 2934, 1697, 1496, 1453, 1427, 1358, 1339, 1303, 1220, 1082, 701 cm^{-1} . (Espectro apresentado na figura 18, p. 76).

RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ : 2,58 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz; H-2); 2,90 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz; H-3); 7,13 - 7,28 (m, 5H; H-5', H-6', H-7, H-6, H-5). (Espectro apresentado na figura 19, p. 77).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ : 30,8 (C-3); 35,5 (C-2); 126,0 (C-7); 128,1 (C-5, C-5'); 128,2 (C-6, C-6'); 140,9 (C-4); 175,5 (C-1). (Espectro apresentado na figura 20, p. 78).

2.2.2.8 - Síntese do ácido 4-metoxibenzóico (**8**).



(**8**)

A um balão de fundo redondo de 100 mL contendo uma barra de agitação magnética foram adicionados 1,00 mL (8,22 mmol) de anisaldeído,

60,0 mL de DMSO, 2,30 g (24,6 mmol) de NaClO₂ dissolvido em 50,0 mL de água e 2,26 g (16,4 mmol) de NaH₂PO₄.H₂O dissolvido em 20,0 mL de água. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente. Após o término da reação, foram adicionados 20,0 mL de água destilada. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 50,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada a pressão reduzida. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando-se como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (2:1 v/v). O composto **8** foi obtido como um sólido branco em 70% de rendimento (0,870 g; 5,71 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: R_f: 0,38 (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

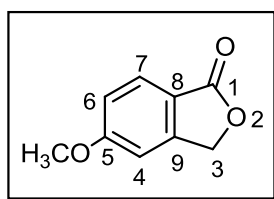
T_f: 183,7 - 184,4 °C (**T_f literatura:** 186 - 188 °C, IRFAN *et al.*, 2011).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 2983 (banda larga), 1686, 1603, 1577, 1516, 1299, 1262, 1167, 1106, 1026, 927, 845, 823 cm⁻¹. (Espectro apresentado na figura 4, p. 115, anexos).

RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ : 3,84 (s, 3H; -OCH₃); 6,97 (d, 2H, *J* = 9 Hz; H-3, H-3'); 7,96 (d, 2H, *J* = 9 Hz; H-2, H-2'). (Espectro apresentado na figura 5, p. 116, anexos).

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ : 54,5 (-OCH₃); 113,2 (C-3, C-3'); 122,5 (C-1); 131,4 (C-2, C-2'); 163,6 (C-4); 168,4 (COOH). (Espectro apresentado na figura 6, p. 117, anexos).

2.2.2.9 - Síntese da 5-metoxiisobenzofuran-1(3H)-ona (**9**).



(**9**)

Em um tubo selado de 40 mL contendo uma barra de agitação magnética, foram adicionados ácido 4-metoxibenzóico (**8**) (0,100 g; 0,657 mmol) e Pd(OAc)₂ (0,017 g; 0,065 mmol), juntamente com KHCO₃ (0,349 g; 1,971 mmol) e 8,00 mL de dibromometano. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 30 minutos e posteriormente foi mantida sob aquecimento a temperatura de 150 °C por 72 horas. Após esse período, foi observado através da análise por CCD que o ácido **8** havia sido completamente consumido. Em seguida essa mistura foi filtrada através de uma camada de celite, lavada com acetato de etila e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando-se como eluente uma mistura de hexano-acetato de etila (2:1 v/v). O composto **9** foi obtido como um sólido amarelo em 36% de rendimento (0,039 g; 0,237 mmol).

Característica: sólido amarelo.

CCD: R_f: 0,39 (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

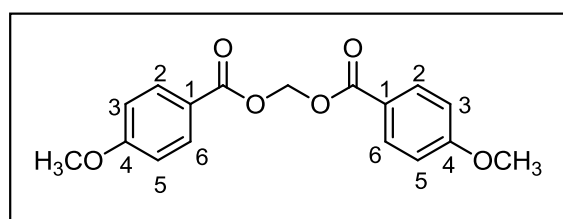
T_f: 110 - 111 °C (**T_f literatura:** 116-118 °C; LAROCK e FELLOWS, 1982).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3030, 2976, 2834, 1751, 1606, 1492, 1454, 1271, 1214, 1185, 1151, 772 cm⁻¹. (Espectro apresentado na figura 7, p. 118, anexos).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,89 (s, 3H; $-\text{OCH}_3$); 5,24 (s, 2H; H-3); 6,91 (s, 1H; H-4); 7,02 (dd, 1H, $J = 8,5$ e $J = 2,1$ Hz; H-6); 7,80 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz; H-7). (Espectro apresentado na figura 8, p. 119, anexos).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 56,0 ($-\text{OCH}_3$); 69,3 (C-3); 106,1 (C-4); 116,7 (C-6); 118,2 (C-8); 127,4 (C-7); 149,6 (C-9); 164,9 (C-5); 171,1 (C-1). (Espectro apresentado na figura 9, p. 120, anexos).

Durante o processo de purificação do composto **9**, uma segunda substância também foi isolada e correspondeu ao diéster *bis*-(4-metoxibenzoato) de metileno (**10**). O diéster foi obtido como um sólido branco, em 55% de rendimento (0,160 g; 0,975 mmol).



(10)

Característica: sólido branco.

CCD: R_f : 0,57 (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

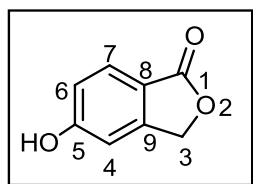
T_f : 110,9 - 111,6 °C (**$T_{f \text{ literatura}}$** : 112 - 113 °C; HOLMBERG e HANSEN, 1975).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3078, 3030, 2988, 2934, 2838, 1731, 1606, 1511, 1450, 1258, 1170, 1151, 1110, 985, 846, 769, 701, 611 cm^{-1} . (Espectro apresentado na figura 21, p. 82).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,85 (s, 6H; $-\text{OCH}_3$); 6,20 (s, 2H; $-\text{OCH}_2\text{O}-$); 6,92 (d, 4H, $J = 9$ Hz; H-3 e H-5); 8,04 (d, 4H, $J = 9$ Hz; H-2 e H-6). (Espectro apresentado na figura 22, p. 83).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 55,4 ($-\text{OCH}_3$); 79,6 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$); 113,6 (C-3, C-5); 121,2 (C-1); 132,1 (C-2, C-6); 163,8 (C-4); 164,9 ($-\text{CO}-$). (Espectro apresentado na figura 23, p. 84).

2.2.2.10 - Síntese da 5-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona (**11**).



(**11**)

A um balão bitubulado de 50,0 mL, contendo uma barra de agitação magnética e sob atmosfera de nitrogênio foi adicionado 0,350 g (2,13 mmol) de 5-metóxiisobenzofuran-1(3H)-ona (**9**) juntamente com 15,0 mL de diclorometano anidro. A mistura resultante foi mantida sob agitação e resfriada em banho de gelo por 40 minutos. Em seguida foi adicionado a essa mistura 12,0 mL de solução 1,00 mol L⁻¹ de BBr₃ em diclorometano gota a gota. Após a adição, a mistura reacional foi mantida sob agitação por 6 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados à mistura reagente 15,0 mL de água destilada e observou-se a formação de um precipitado branco. A mistura resultante foi transferida para um funil de separação e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 25,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto **11** foi obtido como um sólido amarelo em 98% de rendimento (0,319 g; 2,126 mmol).

Característica: sólido amarelo.

CCD: R_f: 0,28 (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

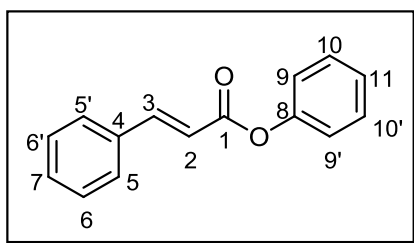
T_f: 226,0 - 227,9 °C (**T_f literatura:** 223 - 224 °C; LAROCK e FELLOWS, 1982).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3271 (banda larga), 1721,1604, 1489, 1468, 1433, 1273, 936 cm⁻¹. (Espectro apresentado na figura 10, p. 121, anexos).

RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OH) δ : 5,25 (s, 2H; H-3); 6,90-6,95 (m, 2H; H-4, H-6); 7,66 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz; H-7). (Espectro apresentado na figura 11, p. 122, anexos).

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OH) δ : 71,2 (C-3), 110,8 (C-6), 123,9 (C-4), 124,4 (C-7), 127,7 (C-9), 139,4 (C-8), 159,7 (C-5), 173,6 (C-1). (Espectro apresentado na figura 12, p. 123, anexos).

2.2.2.11 - Síntese do cinamato de fenila (**12**).



(**12**)

A um balão de fundo redondo de 50 mL, contendo uma barra de agitação magnética foram adicionados 0,258 g (2,75 mmol) de fenol, 0,370 g (2,50 mmol) de ácido cinâmico, 0,567 g (2,75 mmol) de DCC e 0,030 g (0,250 mmol) de DMAP e 12,0 mL de diclorometano. A mistura reacional permaneceu sob agitação por 6 horas a temperatura ambiente. Após o término da reação (determinado via análise por CCD) a mistura resultante foi filtrada e lavada com

uma solução aquosa de 10% m/v de ácido cítrico (2 x 6,00 mL), água destilada (5,00 mL) e solução saturada de NaCl (10,0 mL). Em seguida a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 15,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por recristalização utilizando-se como solvente etanol. O composto **12** foi obtido como um sólido branco em 82% de rendimento (0,460 g; 2,05 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: R_f: 0,56 (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

T_f: 73,9 - 75,3 °C (**T_f literatura:** 73,5 - 75,5 °C; SOVA *et al.*, 2006).

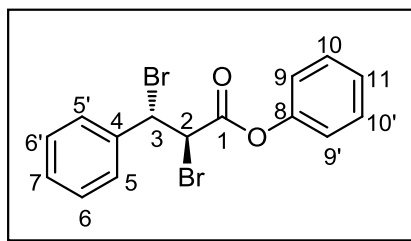
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3058, 1727, 1637, 1588, 1484, 1449, 1204, 1145, 910 cm⁻¹.

(Espectro apresentado na figura 13, p. 124, anexos).

RMN de ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ : 6,73 (d, 2H, *J* = 16 Hz; H-2); 7,14-7,68 (m, 10H; H-5, H-6, H-7, H-6', H-5', H-9, H-10, H-11, H-10', H-9'); 7,87 (d, 2H, *J* = 16 Hz; H-3). (Espectro apresentado na figura 14, p. 125, anexos).

RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ : 116,8 (C-2), 121,3 (C-9, C-9'), 125,4 (C-11), 128,0 (C-5, C-5'), 128,6 (C-6, C-6'), 129,0 (C-7), 130,4 (C-10, C-10'), 134,1 (C-4), 146,5 (C-3), 150,9 (C-8), 165,5 (C-1). (Espectro apresentado na figura 15, p. 126, anexos).

2.2.2.12 - Síntese do 2,3-dibromofenilpropanoato de fenila (**13**).



(13)

A um balão de fundo redondo de 25 mL, foram adicionados 0,100 g do composto **12** (0,445 mmol) e 6,00 ml de CCl₄. A esta mistura reacional foi adicionada, gota a gota, uma solução de bromo dissolvido em CCl₄ até o surgimento permanente de uma coloração avermelhada. A reação permaneceu sob agitação magnética a 40 °C por 8 horas. O término da reação foi determinado pelo consumo total do composto **12** verificado via análise por CCD. Após este período foram adicionados 15,0 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio e a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 20,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto **13** foi obtido como um sólido branco em 86% de rendimento (0,141 g; 0,367 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: R_f: 0,86 (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

T_f: 120,9 - 122,7 °C (**T_f literatura:** 122 - 123 °C; U MAYORUBHAGAN e PILLAI, 1994).

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3010, 1764, 1626, 1576, 1494, 1265, 1196, 695, 602 cm⁻¹.

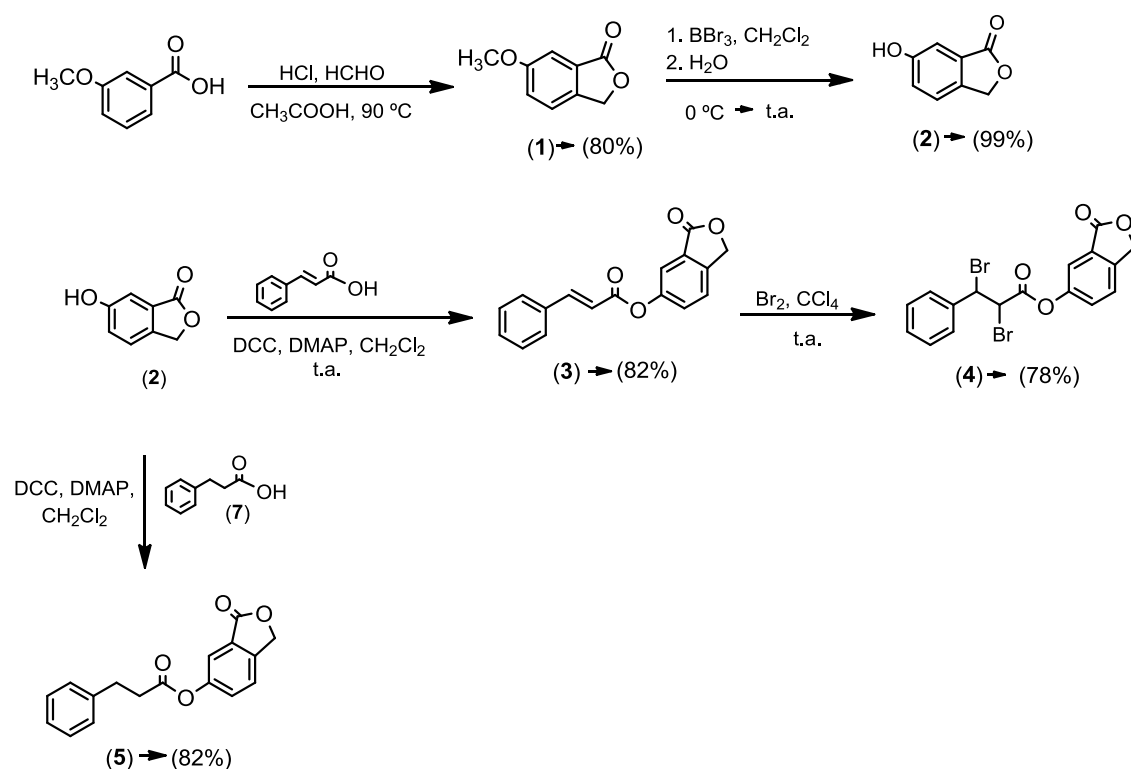
(Espectro apresentado na figura 16, p. 127, anexos).

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ : 5,01 (d, 1H, $J = 12$ Hz; H-2); 5,41 (d, 1H, $J = 12$ Hz; H-3); 7,43-7,15 (m, 10H; H-5, H-6, H-7, H-6', H-5', H-9, H-10, H-11, H-10', H-9'). (Espectro apresentado na figura 17, p. 128, anexos).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ : 46,7 (C-3); 50,5 (C-2); 120,9 (C-9, C-9'); 126,5 (C-11), 128,0 (C-5, C-5'); 128,9 (C-6, C-6'); 129,4 (C-7); 129,5 (C-10, C-10'); 137,2 (C-4); 150,2 (C-8); 166,4 (C-1). (Espectro apresentado na figura 18, p. 129, anexos).

2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos **1-5** foram sintetizados de acordo com a rota sintética apresentada no Esquema 2.

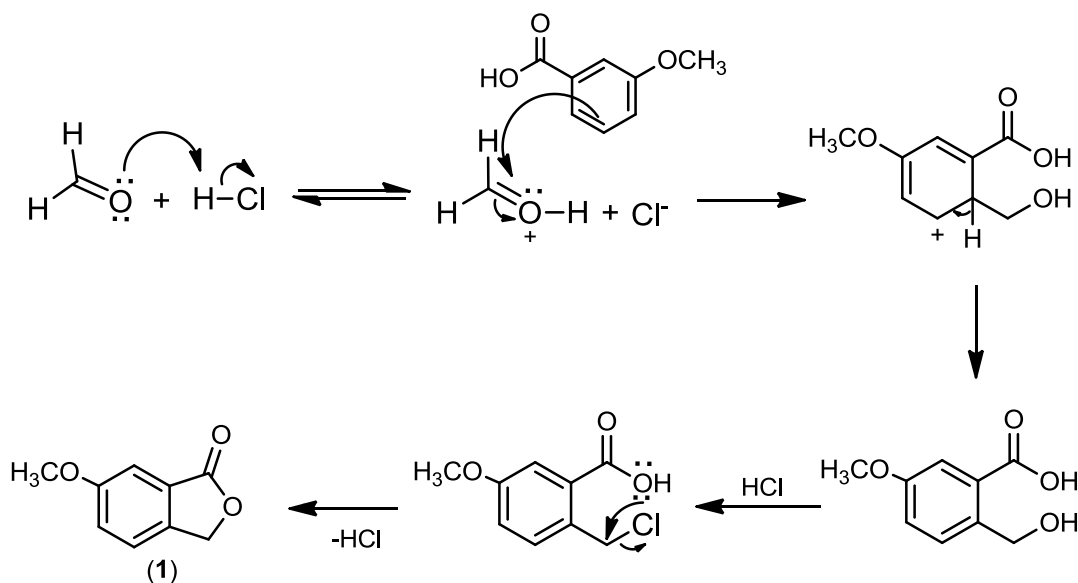


Esquema 2 - Reações envolvidas na preparação dos compostos **1-5**.

Assim, a reação de *orto*-alquilação do ácido 3-metoxibenzoico deu origem a isobenzofuran-1(3*H*)-ona **1**. O tratamento do composto **1** com BBr_3

levou a formação do derivado hidroxilado **2**. A reação de acoplamento entre a 6-hidroxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**2**) e o ácido cinâmico, na presença de dicitloexilcarbodiimida (DCC) e *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP), resultou na obtenção do éster **3**. Este éster, por sua vez, foi submetido a uma reação de bromação dando origem ao derivado **4**. A obtenção do éster **5** foi possível via reação de **2** com ácido 3-fenilpropanóico (**7**), na presença de dicitloexilcarbodiimida (DCC) e *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP). Uma vez sintetizadas, todas essas substâncias foram caracterizadas via espectroscopia de RMN e no IV e determinação de suas temperaturas de fusão. Os dados experimentais que caracterizam os compostos **1-5** estão descritos na seção 2.2.2 (p. 28 a 34).

De acordo com a rota sintética mostrada anteriormente no Esquema 2 (p. 45), a primeira etapa da síntese envolveu a reação de *orto*-alquilação do ácido 3-metoxibenzóico com o ácido clorídrico e uma solução aquosa de formaldeído 37% (m/v) na presença de ácido acético, resultando na obtenção da 6-metoxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**1**) como um sólido branco com 80% de rendimento. A formação dessa isobenzofuran-1(3*H*)-ona **1** a partir do ácido carboxílico pode ser racionalizada considerando-se o processo de clorometilação do ácido carboxílico (CLAYDEN *et al.*, 2001a) seguido da reação intramolecular entre o grupo carboxila e o grupo clorometila, conforme mostrado no Esquema 3.



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

No espectro de IV do composto **1** (Figura 2, p. 49) foi observada uma banda forte em 1754 cm^{-1} correspondente ao estiramento do grupo carbonila enquanto que banda em 3481 cm^{-1} corresponde à harmônica da mesma. As bandas em 2954 e 2849 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico de ligação C-H para carbonos com hibridização sp^3 . A banda intensa em 1277 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C-O, enquanto que aquelas observadas em 1620 e 3086 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos das ligações C=C e =CH de anel aromático, respectivamente.

No espectro de RMN de ^1H do composto **1** (Figura 3, p. 50), o simpleto observado em $\delta_{\text{H}} 3,86$ foi atribuído aos átomos de hidrogênios do grupo metoxila ($-\text{OCH}_3$). O simpleto em $\delta_{\text{H}} 5,26$ corresponde ao sinal referente aos dois hidrogênios metilênicos (H-3). Já o multipletto observado em $\delta_{\text{H}} 7,22-7,38$ e integrado para três átomos de hidrogênio foi atribuído aos hidrogênios aromáticos (H-4, H-5 e H-7) presentes na estrutura de **1**.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4, p. 51) observa-se o sinal em δ 55,7 correspondente ao grupo metoxila ($-\text{OCH}_3$) e o sinal em δ 69,5 foi associado ao carbono metilênico (C-3). Os sinais para cinco dos carbonos aromáticos foram observados em δ 107,4 (C-7), 122,8 (C-5), 123,0 (C-4), 126,9 (C-8) e 138,8 (C-9). O sinal em δ 160,5 corresponde ao átomo de carbono do anel aromático ligado diretamente ao grupo metoxila (C-6) enquanto que o sinal em δ 171,2 foi atribuído ao átomo de carbono carbonílico (C-1).

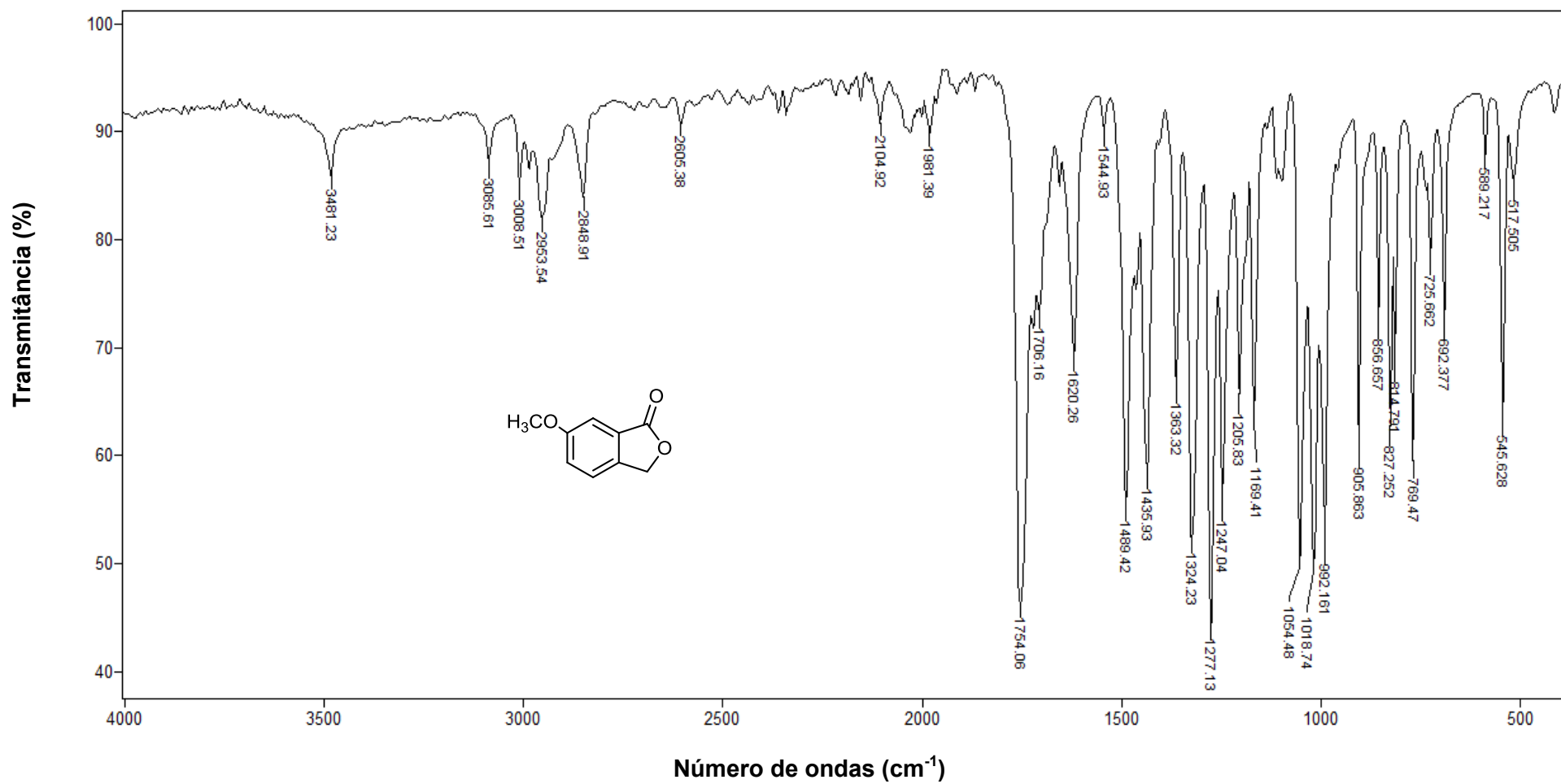


Figura 2 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 1.

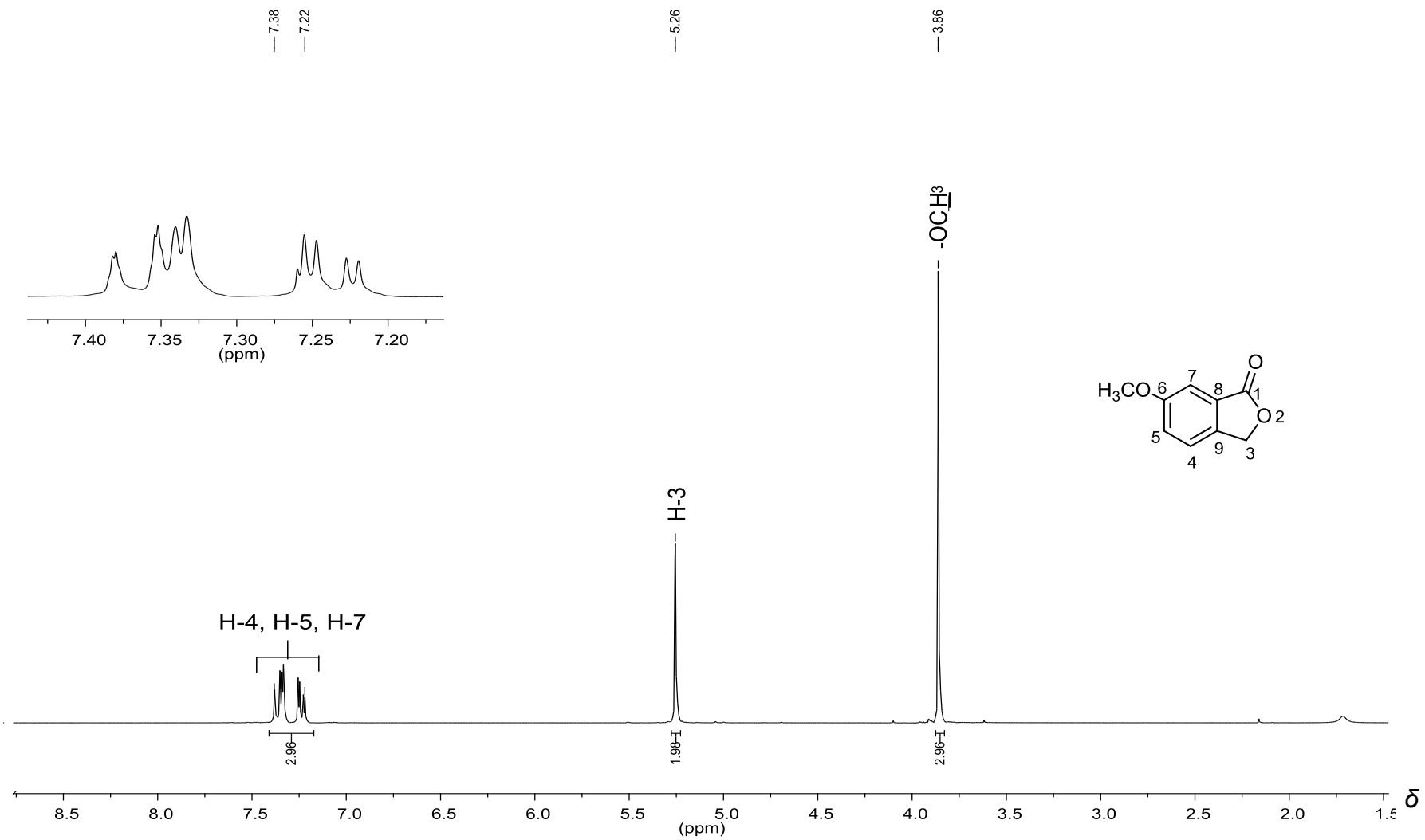


Figura 3 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **1**.

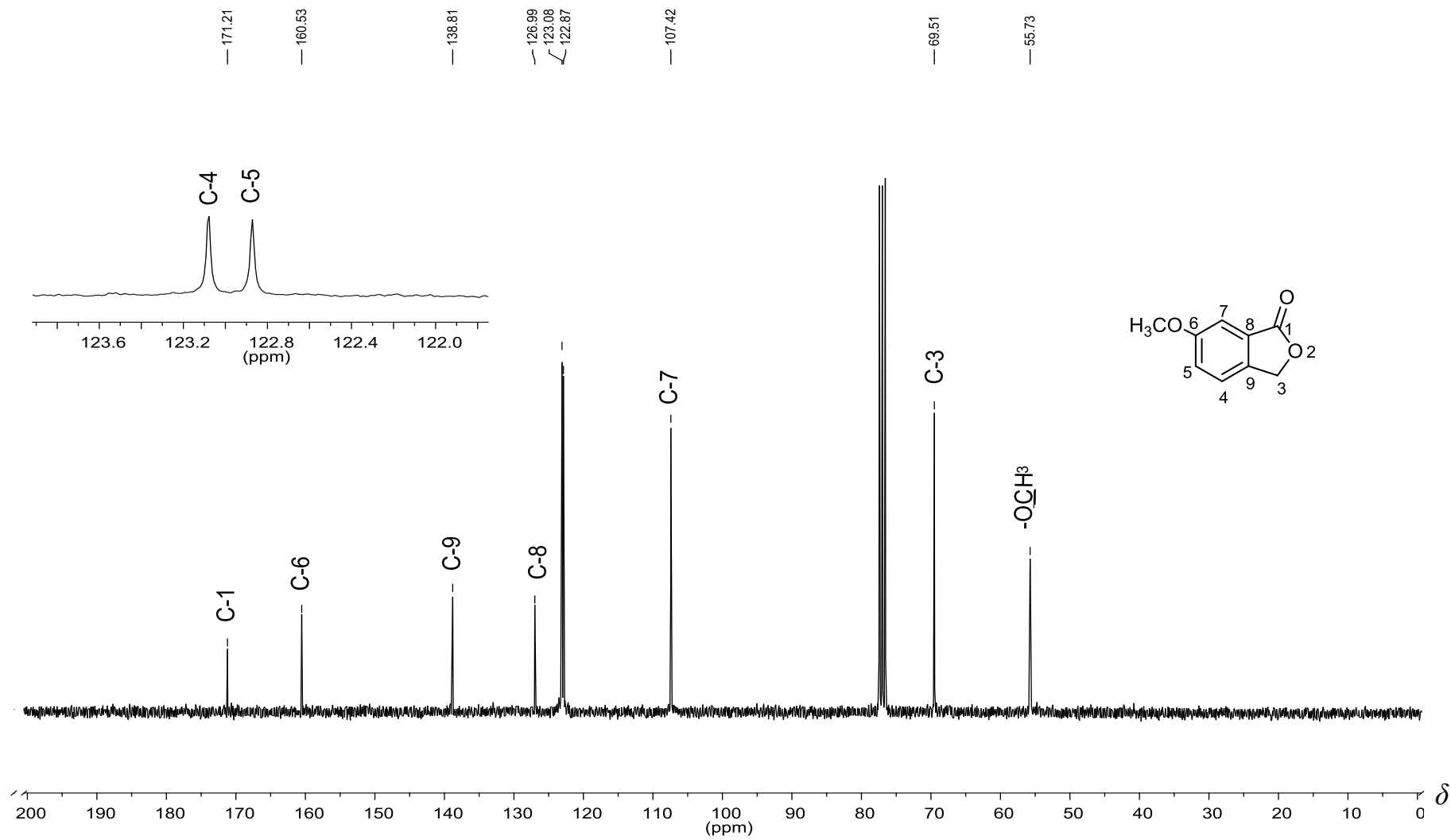
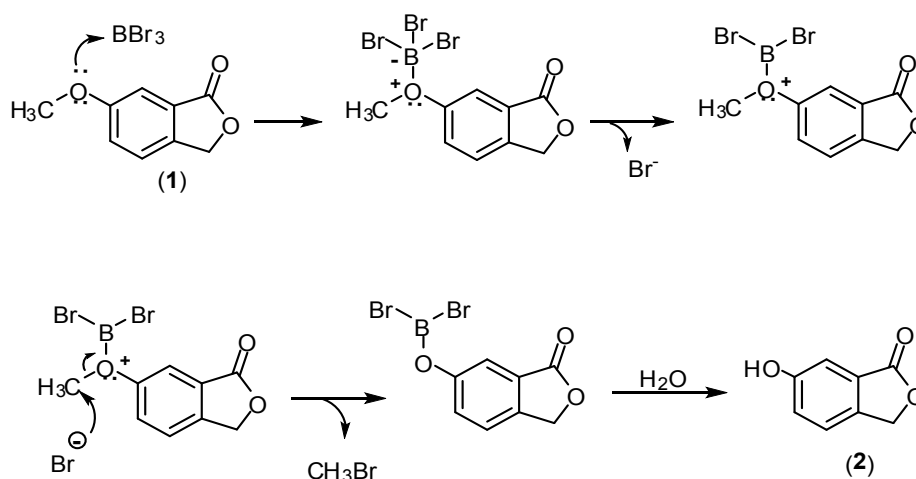


Figura 4 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **1**.

Uma vez sintetizada, a isobenzofuran-1(3*H*)-ona **1** foi tratada com BBr₃, resultando na formação da substância **2** como um sólido branco com 99% de rendimento. Cabe salientar que a desmetilação mediada por BBr₃ (tribrometo de boro) consiste em uma metodologia bastante eficaz e é amplamente utilizada para promover a clivagem de éteres (PASQUINI, *et al.*, 2012). No Esquema 4 está apresentada uma proposta mecanística para o processo de desmetilação do composto **1** resultando na formação da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**2**) (CLAYDEN *et al.*, 2001b).



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

Analisando o espectro no infravermelho do composto **2** (Figura 5, p. 55) observa-se a presença de uma banda larga em 3215 cm⁻¹ correspondente ao estiramento do grupo OH. A presença dessa banda larga correspondeu a uma evidência de que a reação de desmetilação foi bem sucedida, indicando assim que o composto **2** havia sido obtido com sucesso. A banda forte em 1722 cm⁻¹ corresponde ao estiramento da ligação C=O de éster. E as bandas em 1599 e

1505 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos da ligação C=C de anel aromático.

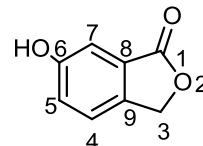
No espectro de RMN de ^1H do composto **2** (Figura 6, p. 56) o sinal para os átomos de hidrogênio ligados diretamente ao carbono sp^3 foram observados como um simpleto, integrado para dois hidrogênios em δ_{H} 5,26. O multiplete observado em δ_{H} 7,16-7,18, integrado para dois hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios (H-7 e H-5). O duplete em δ_{H} 7,40 (um hidrogênio) foi atribuído ao átomo H-4. Os hidrogênios H-7 e H-5 encontram-se mais blindados do que o átomo H-4 devido à presença do grupo hidroxila ligado ao carbono vizinho a esses hidrogênios. Esse grupo OH, devido à deslocalização de elétrons, provoca um aumento na densidade eletrônica nos átomos de carbono C-5 e C-7 resultando numa maior blindagem dos hidrogênios ligados a esses carbonos.

Com relação ao espectro de RMN de ^{13}C do composto **2** (Figura 7, p. 57), observa-se o sinal do grupo carbonila em δ_{C} 172,5. O sinal em δ_{C} 70,1 corresponde ao carbono sp^3 . O sinal em δ_{C} 158,6 foi atribuído ao carbono aromático ligado diretamente ao grupo hidroxila (C-6). Os demais sinais observados no espectro estão relacionados aos carbonos aromáticos restantes em δ_{C} 109,6 (C-7), 122,7 (C-5), 123,2 (C-4), 126,5 (C-8), 138,3 (C-9).

Cabe destacar que os dados das espectroscopias de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos neste trabalho para o composto **2** estão em completo acordo com dados descritos na literatura. Nas Tabelas **1** e **2** (p. 54) são apresentados os dados espectroscópicos de RMN determinados experimentalmente neste trabalho em comparação com os dados descritos na literatura por TEIXEIRA e colaboradores (2014).

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

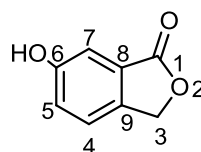
Atribuição	δ	δ^*	J	J^*	Mult.	Mult.*
H-3	5,26	5,25	-	-	s	s
H-7	7,18	7,18	-	-	m	m
H-5	7,16	7,15	-	-	m	m
H-4	7,40	7,39	9,0	9,0	d	d



*Valores descritos na literatura (TEIXEIRA *et al.*, 2014): RMN de ^1H (300 MHz, $\text{MeOH-}d_4$).

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

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



*Valores descritos na literatura (TEIXEIRA *et al.*, 2014): RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{MeOH-}d_4$).

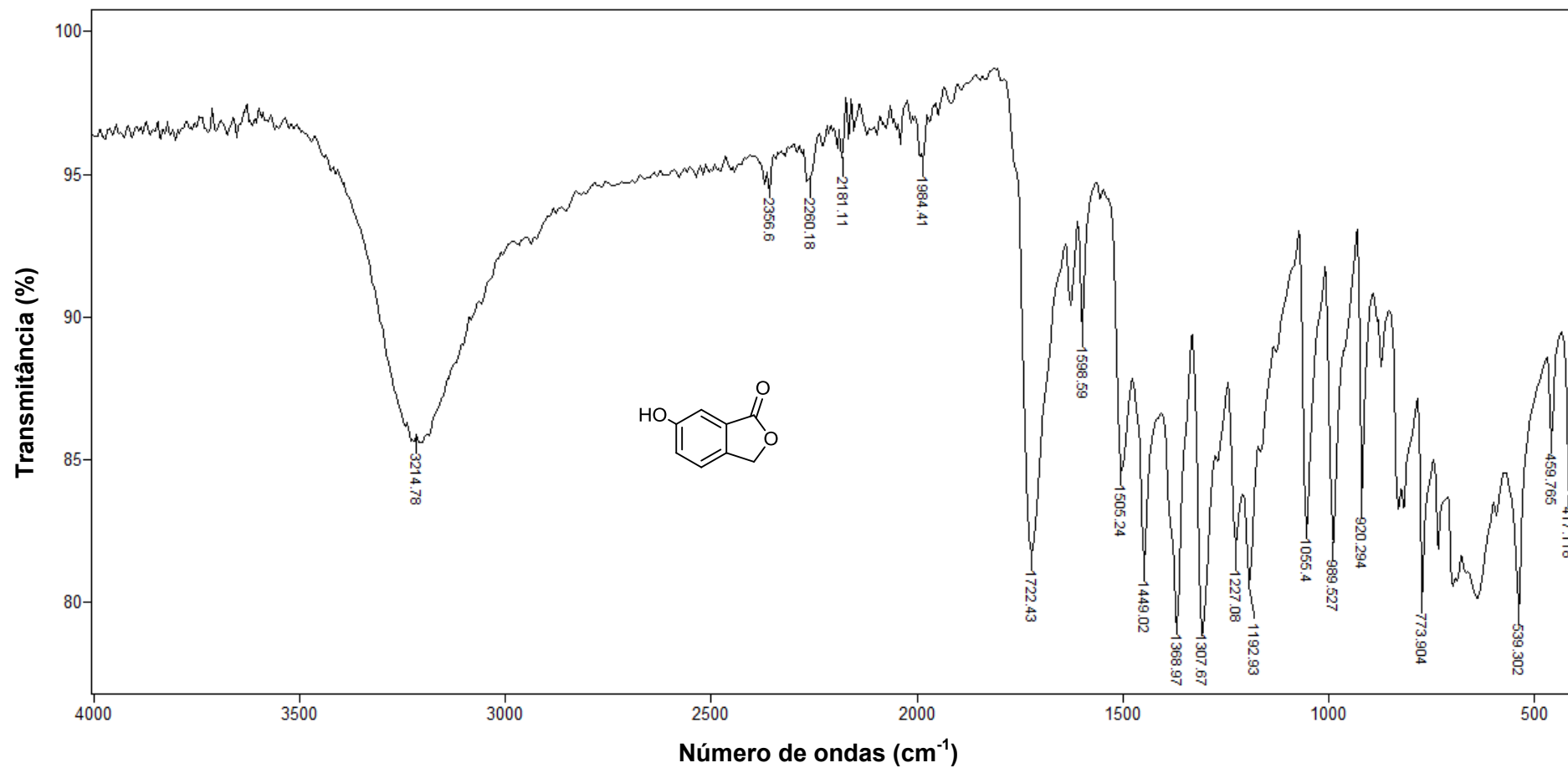


Figura 5 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 2.

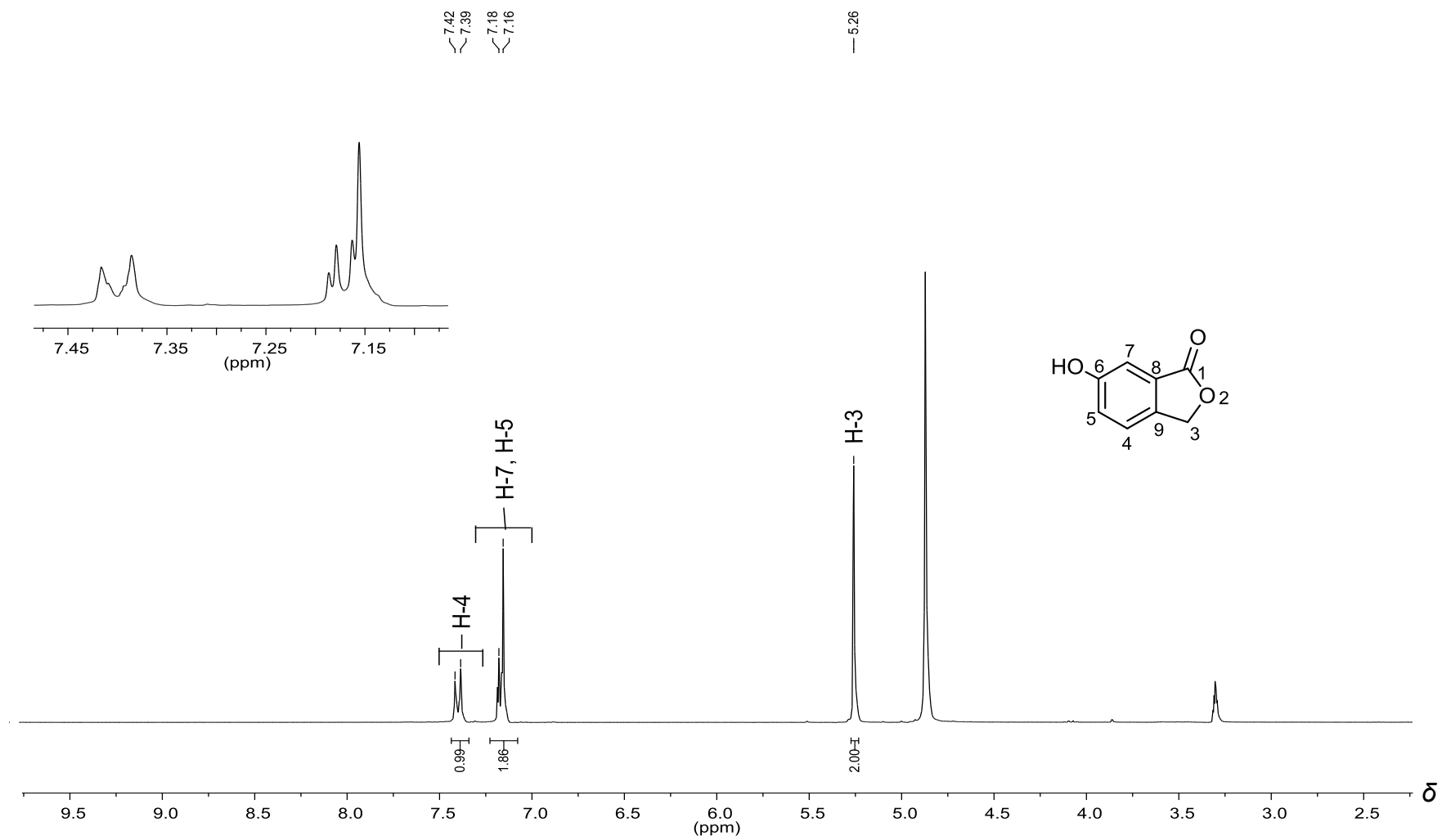


Figura 6 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto **2**.

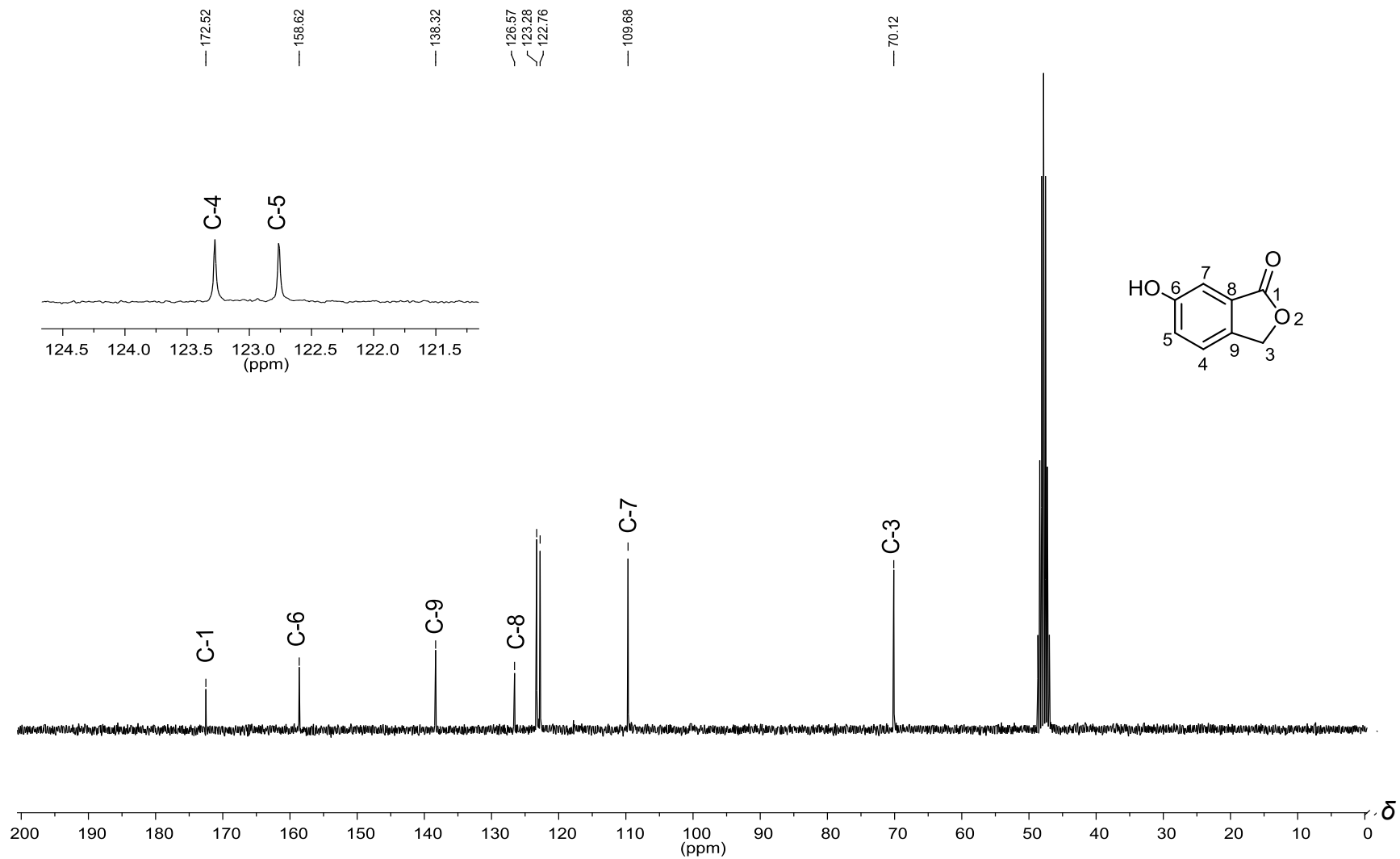
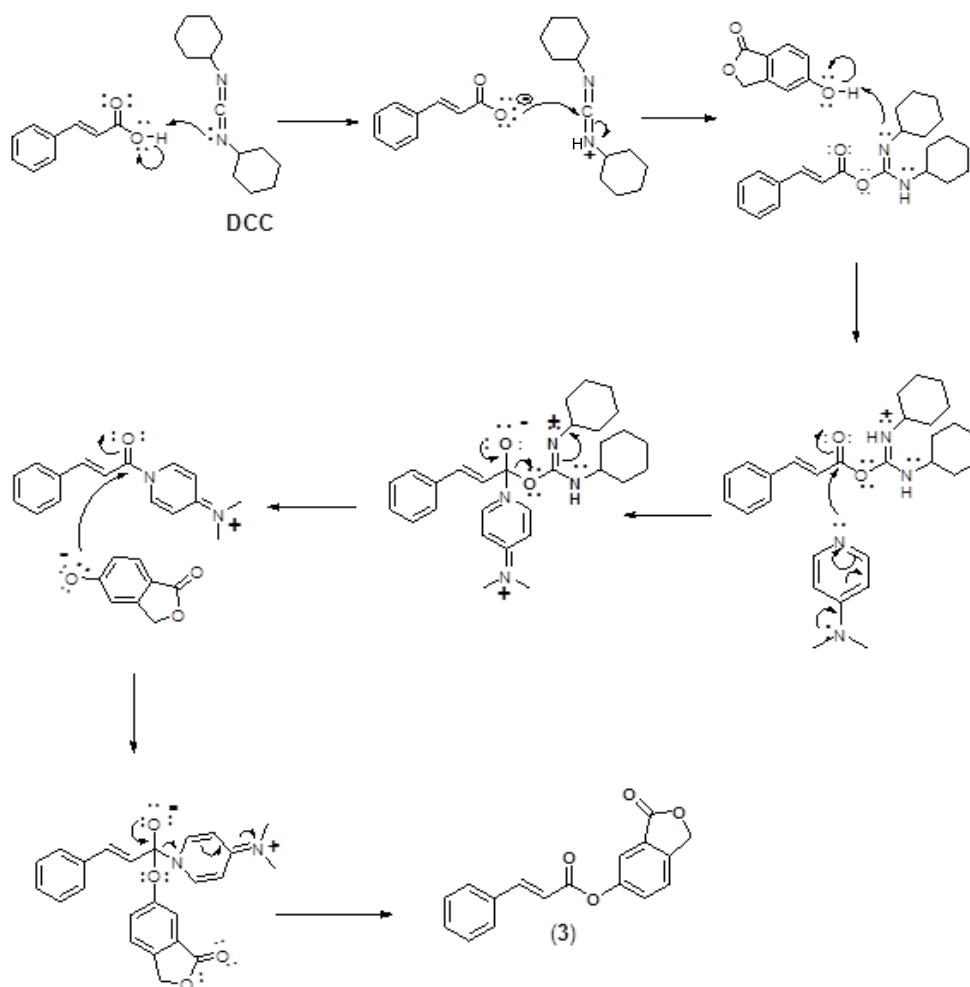


Figura 7 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto **2**.

A reação utilizada para a obtenção dos compostos **3** e **5** (esquema 2, p. 45) consistiu na esterificação entre um composto fenólico e um ácido carboxílico. Entre os vários métodos descritos na literatura para este tipo de reação, optou-se em utilizar neste trabalho a esterificação de Steglich. Esta metodologia foi descrita primeiramente por Wolfgang Steglich em 1978 (PASSO, 2012) e consiste em uma adaptação do método de obtenção de amidas utilizando DCC. A esterificação de Steglich utiliza como reagente de acoplamento a *N,N*-dicicloexilcarbodiimida (DCC) e a 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina como catalisador (ZWEIFEL e NANTZ, 2007). Esta reação ocorre geralmente em temperatura ambiente e utiliza diclorometano como solvente. Outro reagente de acoplamento que também é comumente empregado na esterificação de Steglich é a diisopropilcarbodiimida (DIC).

A aplicação da esterificação de Steglich permitiu a síntese dos derivados do ácido cinâmico contendo núcleos isobenzofuranonas **3** e **5** em condições suaves e em bons rendimentos. A substância **3** foi obtida como um sólido branco em 82% de rendimento após purificação em coluna de sílica gel. O composto foi resultante do acoplamento entre o ácido cinâmico e a isobenzofuranona **2** na presença de DCC. O Esquema 5 (p. 59) contém uma proposta mecanística que explica a obtenção de **3** via esterificação de Steglich. Conforme pode ser observado, o agente de acoplamento torna o grupo hidroxila da função ácido carboxílico um bom grupo abandonador, permitindo sua substituição.



Esquema 5 - Proposta mecanística para a formação do composto **3**.

As bandas intensas observadas em 1755 e 1725 cm^{-1} no espectro no IV do composto **3** (Figura 8, p. 62) foram atribuídas a presença dos grupos carbonila na estrutura de **3**. A banda de absorção em 3074 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ de anel aromático. As bandas em 1633, 1577, 1481 e 1451 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações de estiramento das ligações $\text{C}=\text{C}$ de anel aromático. E por fim, a banda em 2928 cm^{-1} foi relacionada ao estiramento da ligação C-H de carbono com hibridização sp^3 enquanto que a banda em 1138 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação O-C-C .

No espectro de RMN de ^1H do composto **3** (Figura 9, p. 63) observou-se um sinal em δ_{H} 5,33 na forma de um simpleto integrado para dois hidrogênios correspondente aos átomos de hidrogênios ligados ao carbono sp^3 . Um duplete em δ_{H} 6,64 integrado para um hidrogênio, referente ao átomo H-2' cuja constante de acoplamento apresentou valor igual a 16 Hz. Esse valor de constante de acoplamento é característico para átomos de hidrogênio numa relação *trans* em uma ligação dupla, confirmando assim a sua estereoquímica (PAIVA *et al.*, 2010). Observa-se ainda outro duplete em δ_{C} 7,90 correspondente ao hidrogênio H-3' também integrado para um hidrogênio e com constante de acoplamento $J_{\text{trans}} = 16$ Hz.

O hidrogênio H-3' apresenta um valor deslocamento químico maior em relação a H-2' devido à deslocalização de elétrons da ligação dupla com o grupo carbonila. Esse efeito eletrônico leva a uma diminuição da densidade eletrônica no átomo C-3', desblindando mais o hidrogênio H-3' em relação a H-2'. O multiplete em δ_{C} 7,43-7,72 foi atribuído aos oito átomos de hidrogênio aromáticos.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 10, p. 64) observamos os sinais correspondentes aos carbonos carbonílicos em δ_{C} 170,2 (C-1) e δ_{C} 165,0 (C-1'). O deslocamento químico atribuído a C-1 é similar aos valores dos deslocamentos químicos dos grupos carbonila dos compostos **1** e **2**. O sinal em δ_{C} 69,5 foi atribuído ao carbono com hibridização sp^3 . Os demais sinais correspondem aos carbonos aromáticos 143,6 (C-9), 127,2 (C-4), 123,1 (C-5), 151,4 (C-6), 118,8 (C-7), 128,2 (C-8), 133,8 (C-4'), 128,4 (C-5' e C-5''), 129,0 (C-6' e C-6''), 131,0 (C-7').

Conforme comentado anteriormente, o composto **5** também foi preparado a partir da reação de Steglich entre o ácido 3-fenilpropanóico (**7**) (vide síntese descrita adiante) e a isobenzofuranona **2** (Esquema 2, p. 45). Os espectros no IV, de RMN de ^1H e de ^{13}C apresentam muitas semelhanças com os correspondentes espectros da substância **3**. Deste modo, não será feita uma discussão detalhada dos dados espectroscópicos que foram utilizados para a caracterização do éster **5**. Os espectros referentes ao composto **5** são apresentados no anexo (p. 113-115) e a descrição dos dados espectroscópicos é apresentada na seção 2.2.2 (p. 34).

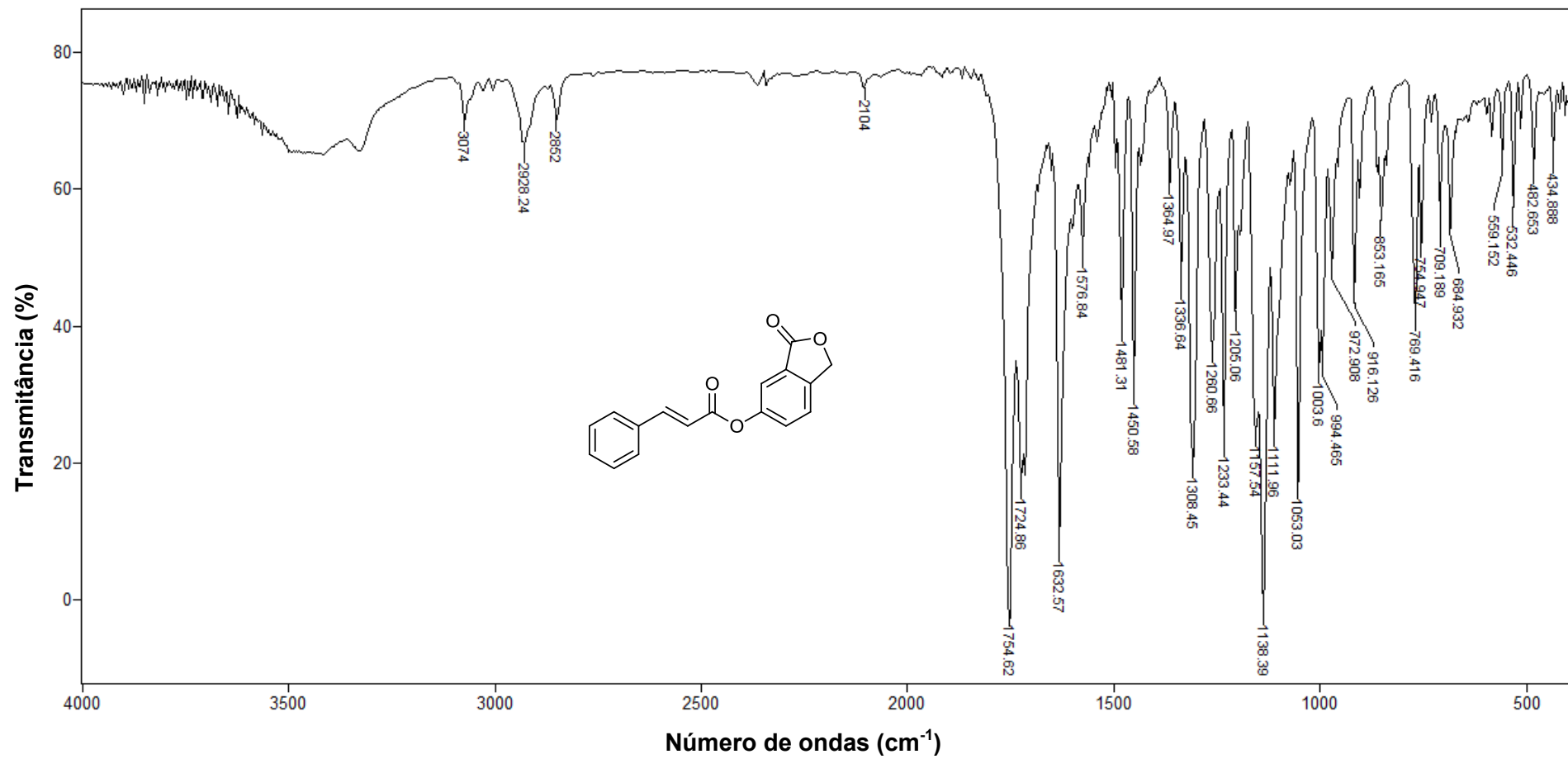


Figura 8 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 3.

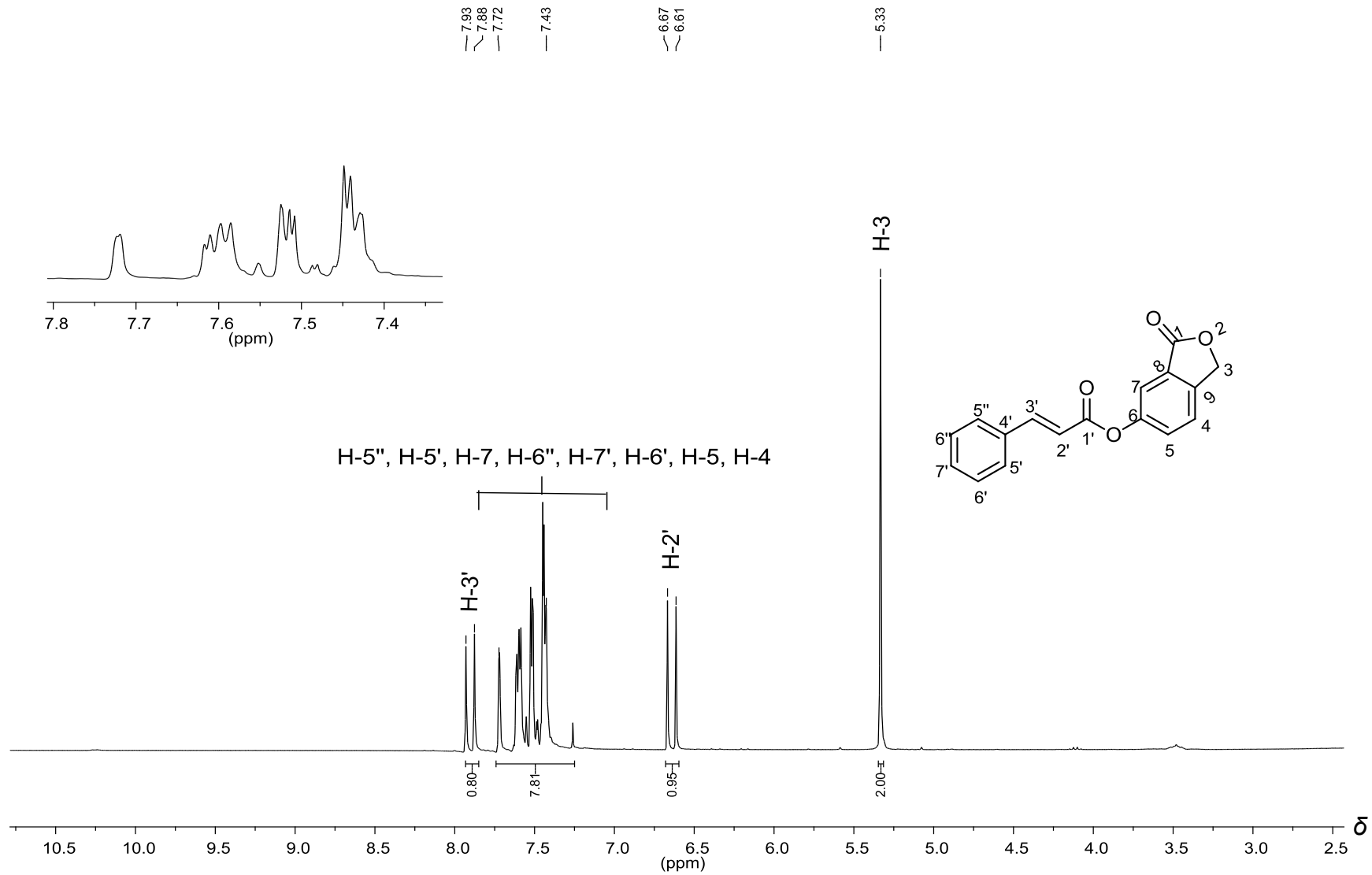


Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **3**.

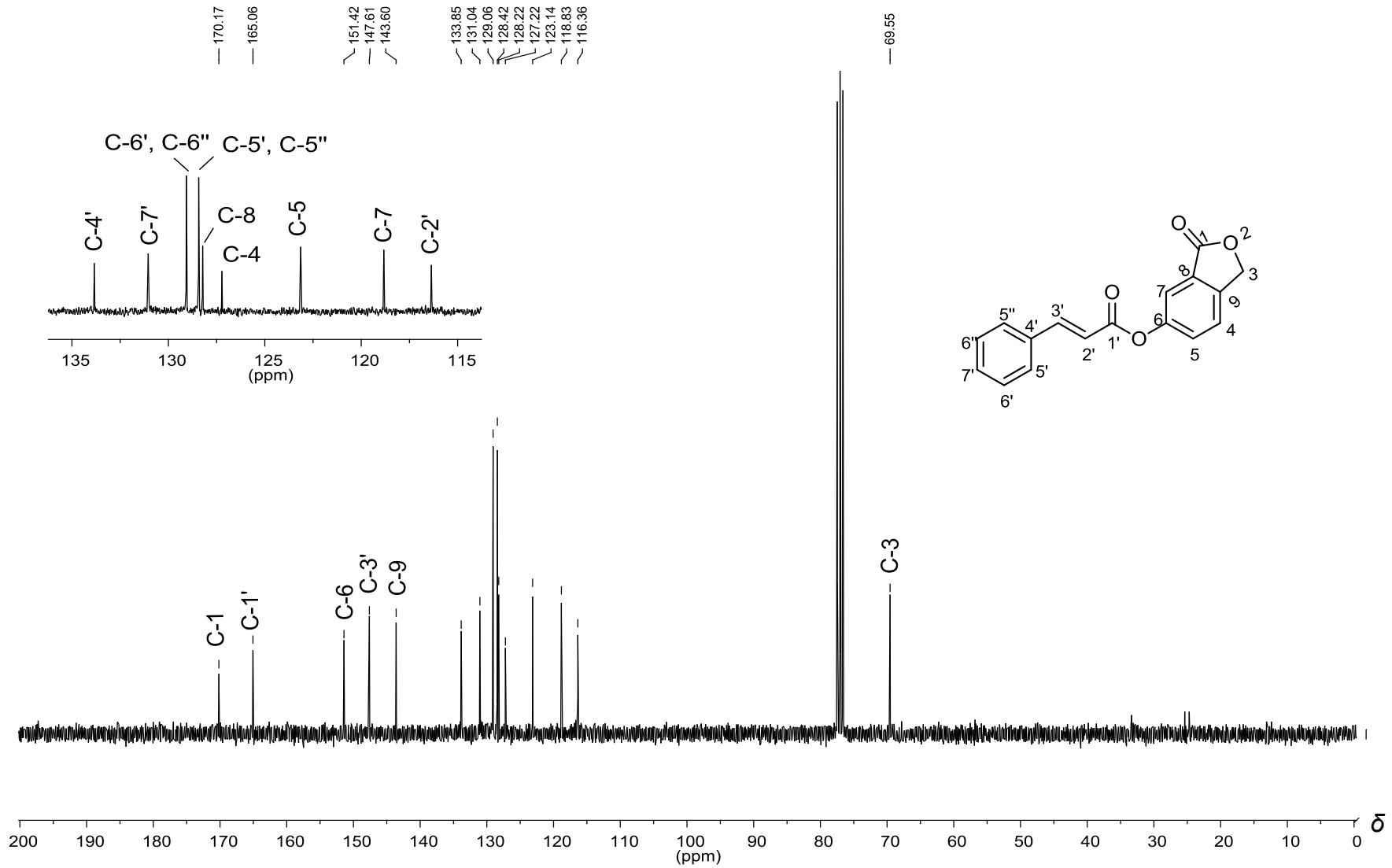
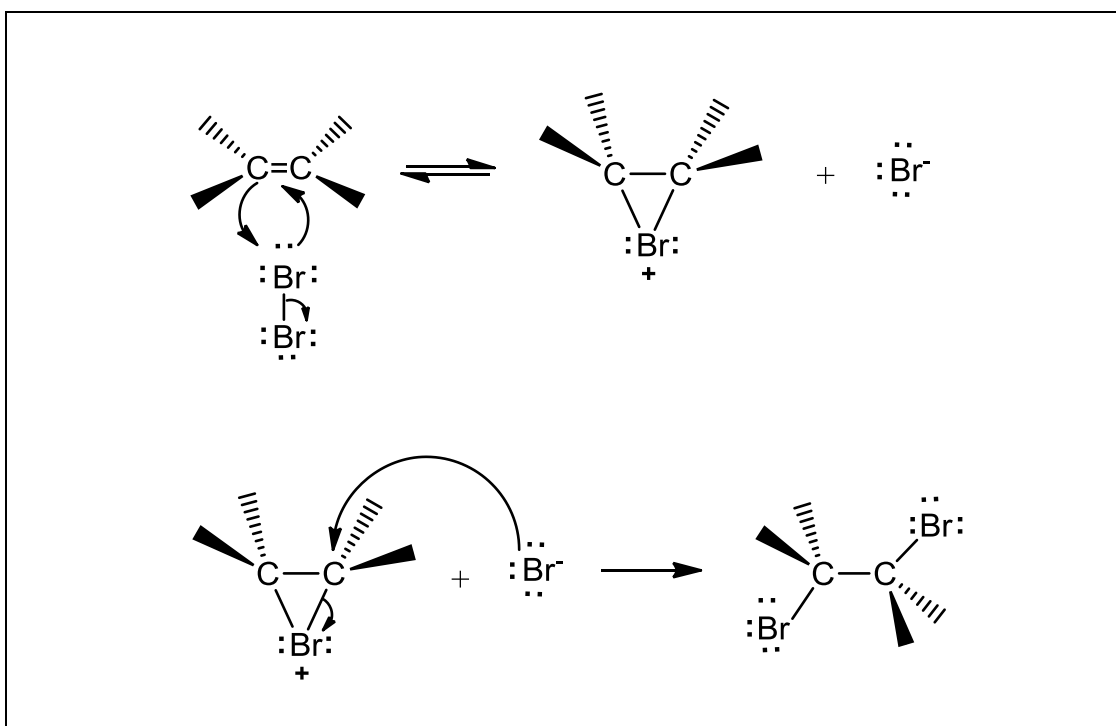


Figura 10 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **3**.

No Esquema 6, encontram representada as etapas envolvidas no processo de adição de Br₂ a um alceno. Essa reação corresponde a uma adição *anti* com o envolvimento de um íon bromônio cíclico como intermediário (SOLOMONS e FRYHLE, 2012). O composto **4** foi obtido como um sólido branco com 78% de rendimento a partir da reação de bromação do composto **3** (Esquema 2, p. 45) numa reação que pode ser racionalizada segundo este mecanismo.



Fonte: Solomons e Fryhle, 2012.

Esquema 6 - Adição de bromo a um alceno.

A banda intensa observada no espectro no infravermelho do composto **4** (Figura 11, p. 67) em 1753 cm⁻¹ corresponde ao estiramento do grupo carbonila. As bandas em 1622, 1483 e 1450 cm⁻¹ foram atribuídas aos estiramentos da ligação C=C de anel aromático enquanto que aquela observada em 3002 cm⁻¹ corresponde ao estiramento da ligação =CH também de anel aromático. A banda em aproximadamente 1218 cm⁻¹ foi relacionada ao

estiramento das ligações C-O. Os estiramentos das ligações C-Br resultam em bandas de absorção que foram observados em 692 cm^{-1} e 599 cm^{-1} .

O espectro de RMN do ^1H do composto **4** (Figura 12, p. 68) apresenta um simpleto em δ_{H} 5,36 correspondente aos hidrogênios ligados diretamente ao carbono metilênico sp^3 (H-3). Os sinais dos hidrogênios H-2' e H-3' foram observados como dois dupletos em δ_{H} 5,07 e 5,46, sendo cada um deles integrado para um hidrogênio respectivamente e apresentando valores de constantes de acoplamento $J = 12\text{ Hz}$. Os demais sinais observados em δ_{H} 7,39-7,79 foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos, (H-7, H-4, H-5, H-5', H-6', H-7', H-6'' e H-5'').

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 13, p. 69) os sinais dos carbonos ligados diretamente aos átomos de bromo foram observados em δ_{C} 46,4 (C-3') e δ_{C} 50,4 (C-2'). Os sinais em δ_{C} 166,1 (C-1') e δ_{C} 169,8 (C-1) foram atribuídos aos carbonos carbonílicos. Já o sinal para o carbono metilênico aparece em δ_{C} 69,5 (C-3). Os demais sinais correspondem aos carbonos dos anéis aromáticos 144,4 (C-9), 127,4 (C-4), 123,4 (C-5), 150,8 (C-6), 118,5 (C-7), 127,5 (C-8), 136,9 (C-4'), 128,0 (C-5', C-5), 129,0 (C-6', C-6), 129,7 (C-7').

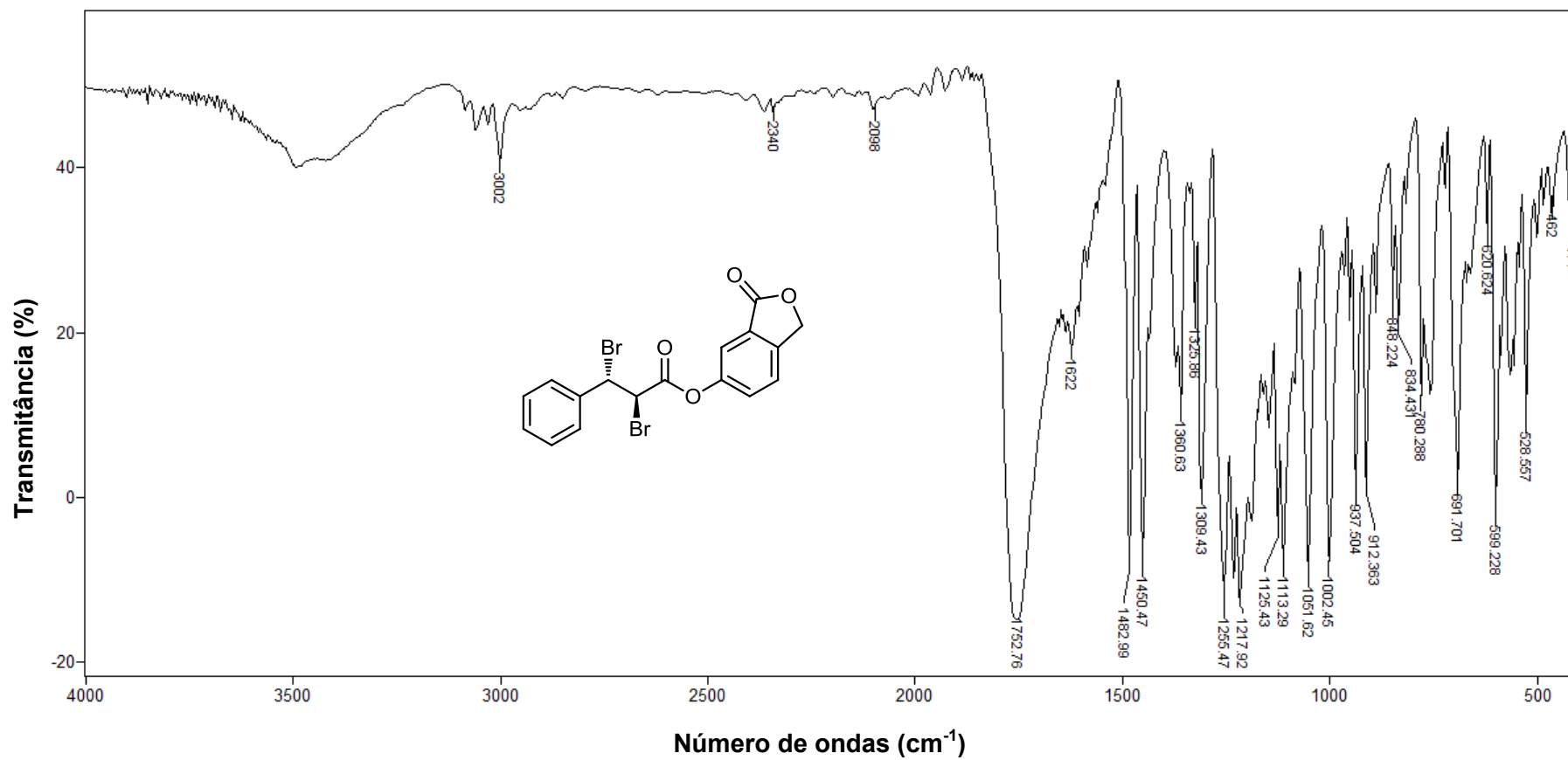


Figura 11 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 4.

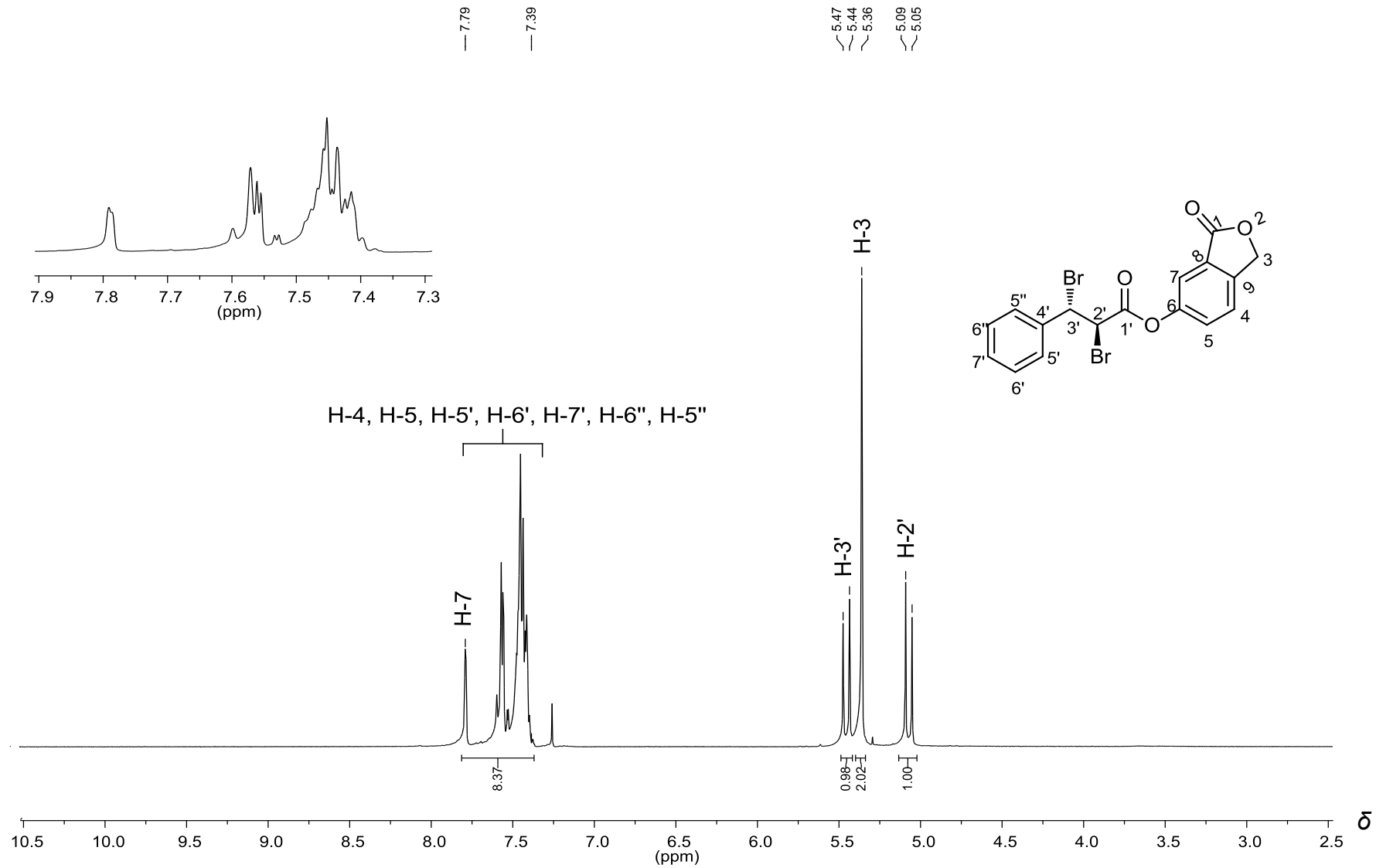


Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **4**.

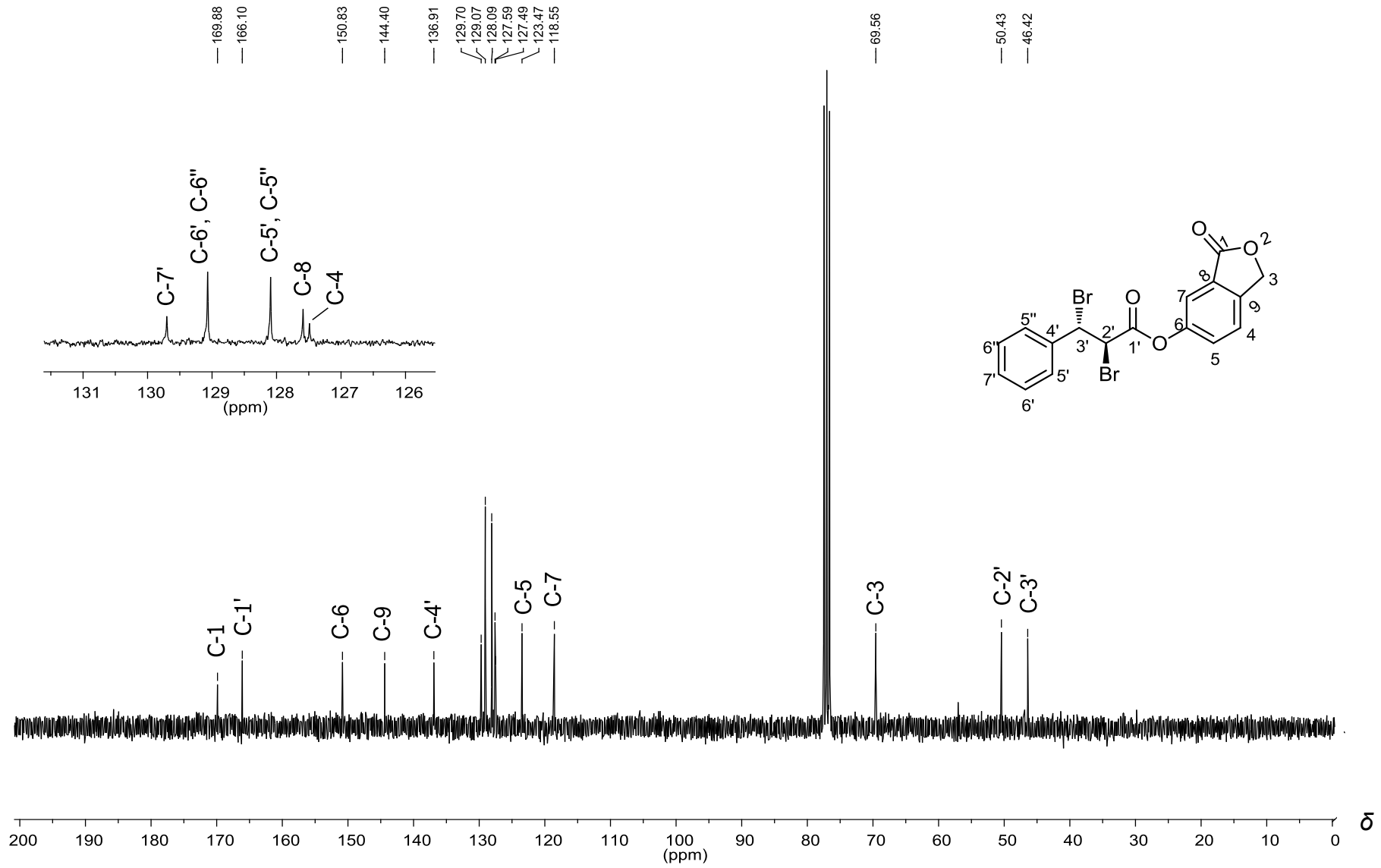
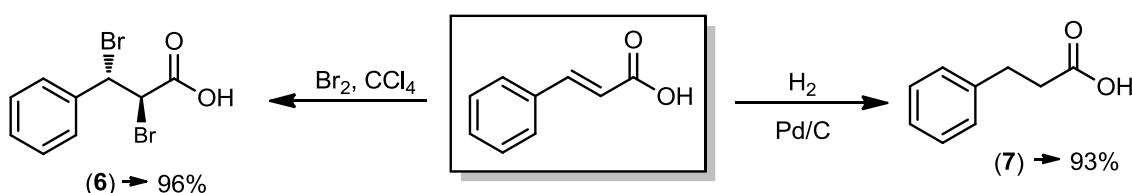


Figura 13 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **4**.

Conforme descrito na literatura, o ácido cinâmico e seus derivados são substâncias com amplo espectro de bioatividades, fato este que pode ser comprovado com base nos vários exemplos apresentados no Capítulo 1 desta dissertação. Nesse sentido, foram preparados os derivados **6** e **7** com 96% e 93% de rendimentos, respectivamente, de modo que fosse possível comparar as bioatividades de derivados do ácido cinâmico contendo núcleos isobenzofuranona com as bioatividades de derivados que não possuam essa unidade estrutural.



Esquema 7 - Rota sintética empregada na preparação dos compostos **6** e **7**.

No espectro no infravermelho do composto **6** (Figura 14, p. 72) observa-se uma banda larga sobreposta por volta de 3300-2500 atribuída ao estiramento da ligação OH da função ácido carboxílico. As bandas em 691 e 559 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento da ligação C-Br (faixa geral). Essa informação forneceu evidência de que a bromação do ácido cinâmico havia ocorrido com sucesso. As bandas observadas em 1496, 1454 e 1429 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos da ligação C=C de anel aromático enquanto que a banda intensa em 1713 cm^{-1} refere-se ao estiramento do grupo carbonila.

No espectro de RMN de 1H (Figura 15, p. 73) os dupletos em δ_H 5,01 e δ_H 5,37, integrado cada um para um hidrogênio e apresentando $J = 12$ Hz,

foram associados aos hidrogênios H-2 e H-3, respectivamente. O multiplete em δ_H 7,31-7,49, integrado para 5 átomos de hidrogênios, corresponde aos hidrogênios aromáticos.

O sinal do grupo carbonila do composto **6** foi observado em δ_C 169,5 no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 16, p. 74). Os sinais para os carbonos ligados diretamente aos dois átomos de bromos encontram-se sobrepostos em δ_C 50,7 (degenerescência acidental). Os sinais para os outros carbonos aromáticos foram observados em δ_C 138,2 (C-4), 128,8 (C-7), 128,4 (C-6, C-6') e 127,9 (C-5, C-5').

De acordo com a literatura e apresentado na Figura 17 (p. 75), a primeira etapa do processo de hidrogenação de um alceno, catalisado por paládio, refere-se à adsorção do hidrogênio à superfície do catalisador metálico. Em seguida a ligação H-H é quebrada e substituída por duas novas ligações fracas metal-hidrogênio. Posteriormente, a colisão do alceno com a superfície do catalisador vizinho ao hidrogênio adsorvido causa adsorção do mesmo provocando a quebra da ligação dupla do alceno e formando eventualmente duas novas ligações carbono-metal. Numa etapa subsequente ocorre a transferência dos átomos de hidrogênio aos carbonos que faziam parte da ligação C=C sendo essa a etapa determinante da velocidade do processo de hidrogenação. Após essa etapa de transferência dos átomos de hidrogênio, ocorre a liberação do alceno a partir da superfície metálica. O processo de adição ocorre de maneira *sin*, pois embora os átomos de hidrogênios não sejam transferidos simultaneamente, os mesmos adicionam-se à mesma face da ligação dupla (DIAS, *et al.*, 2012).

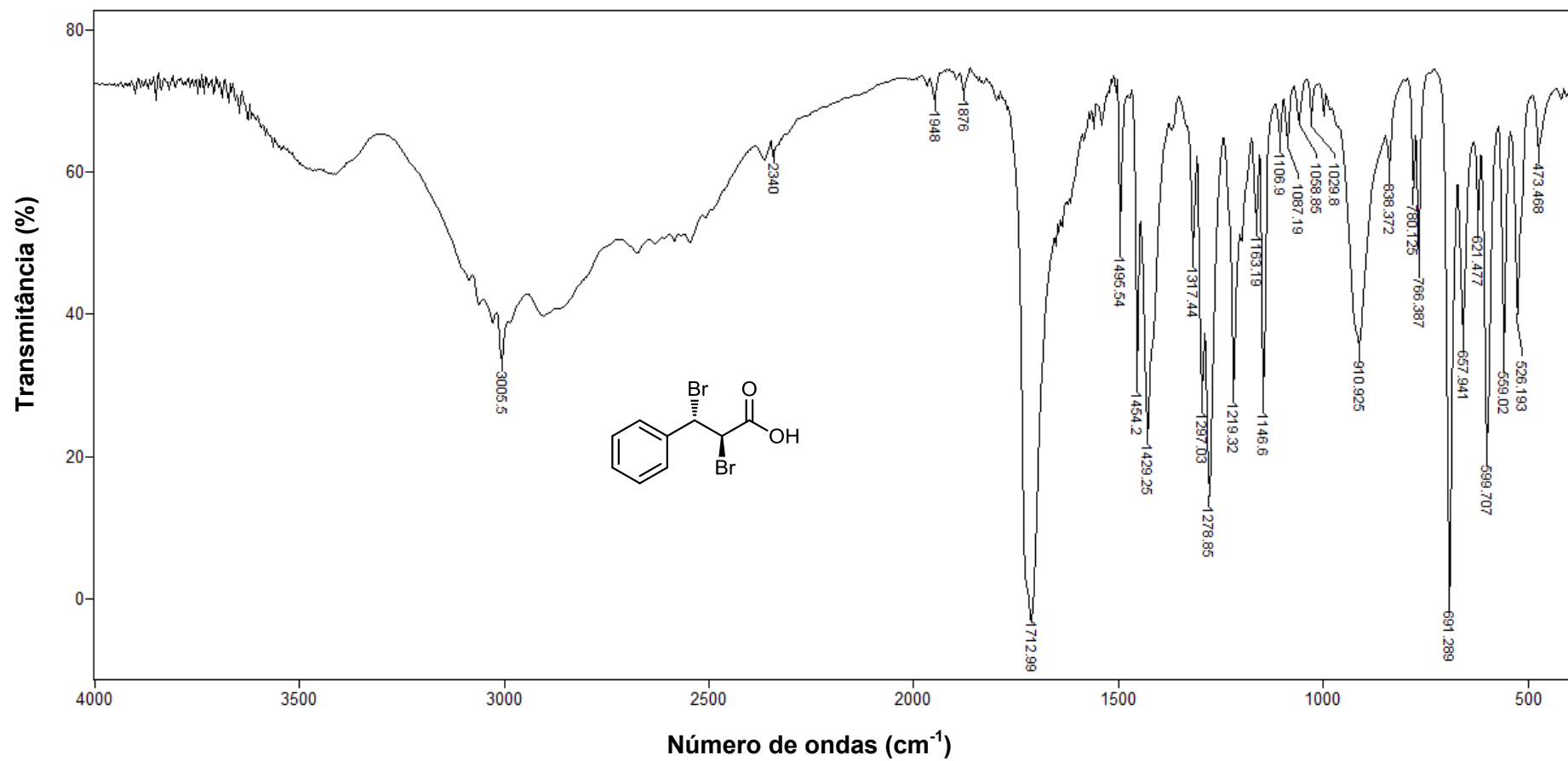


Figura 14 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 6.

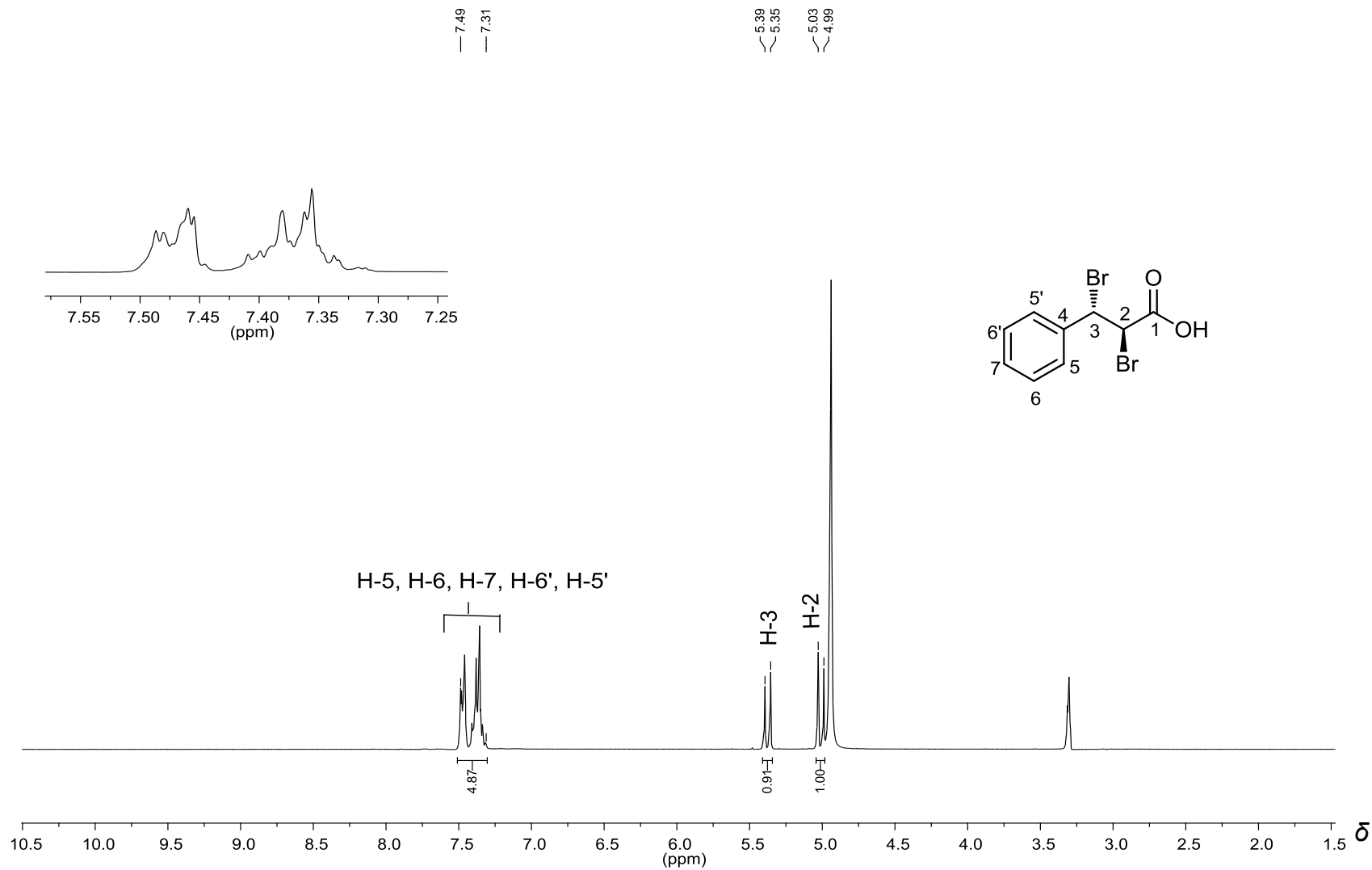


Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto **6**.

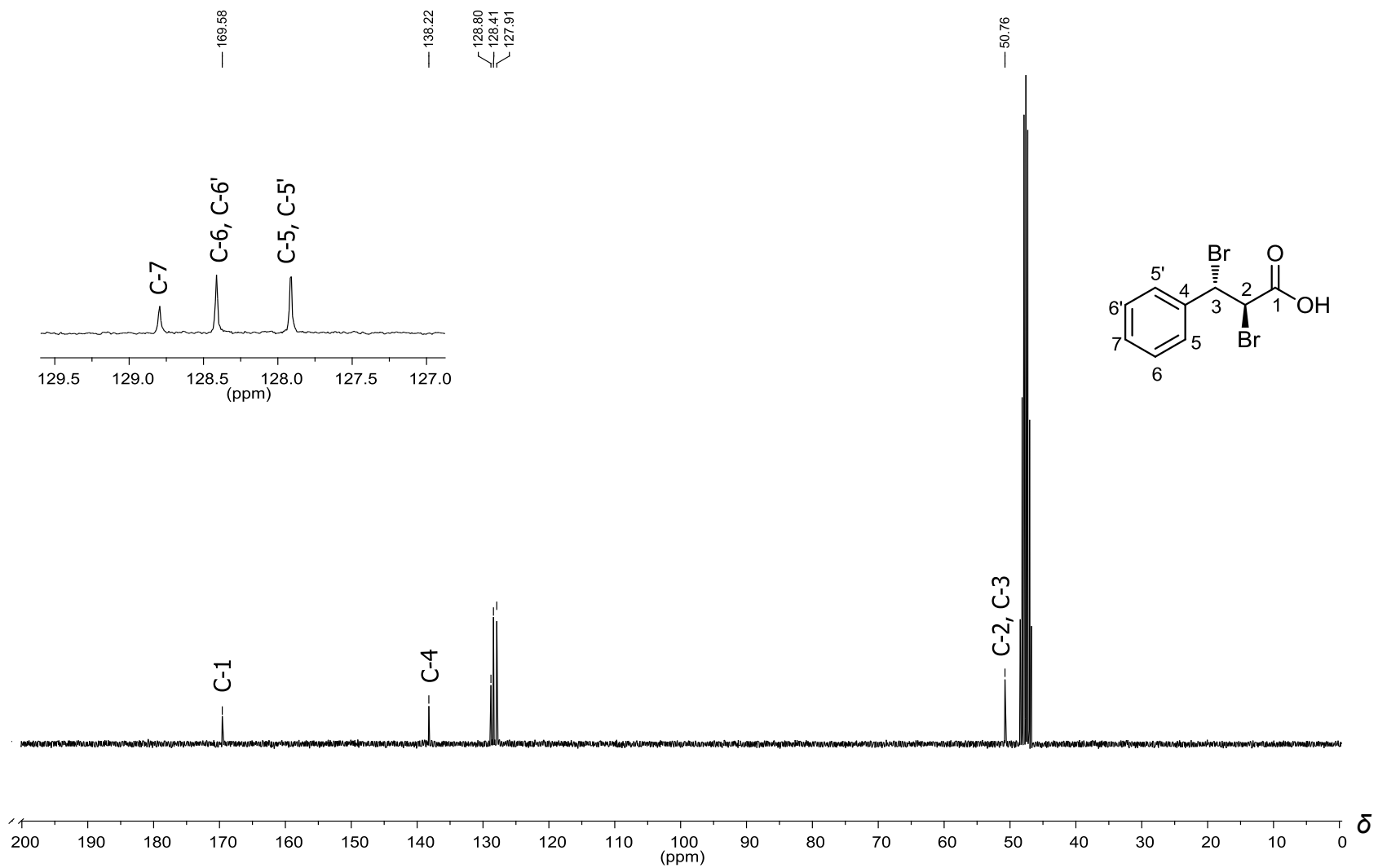
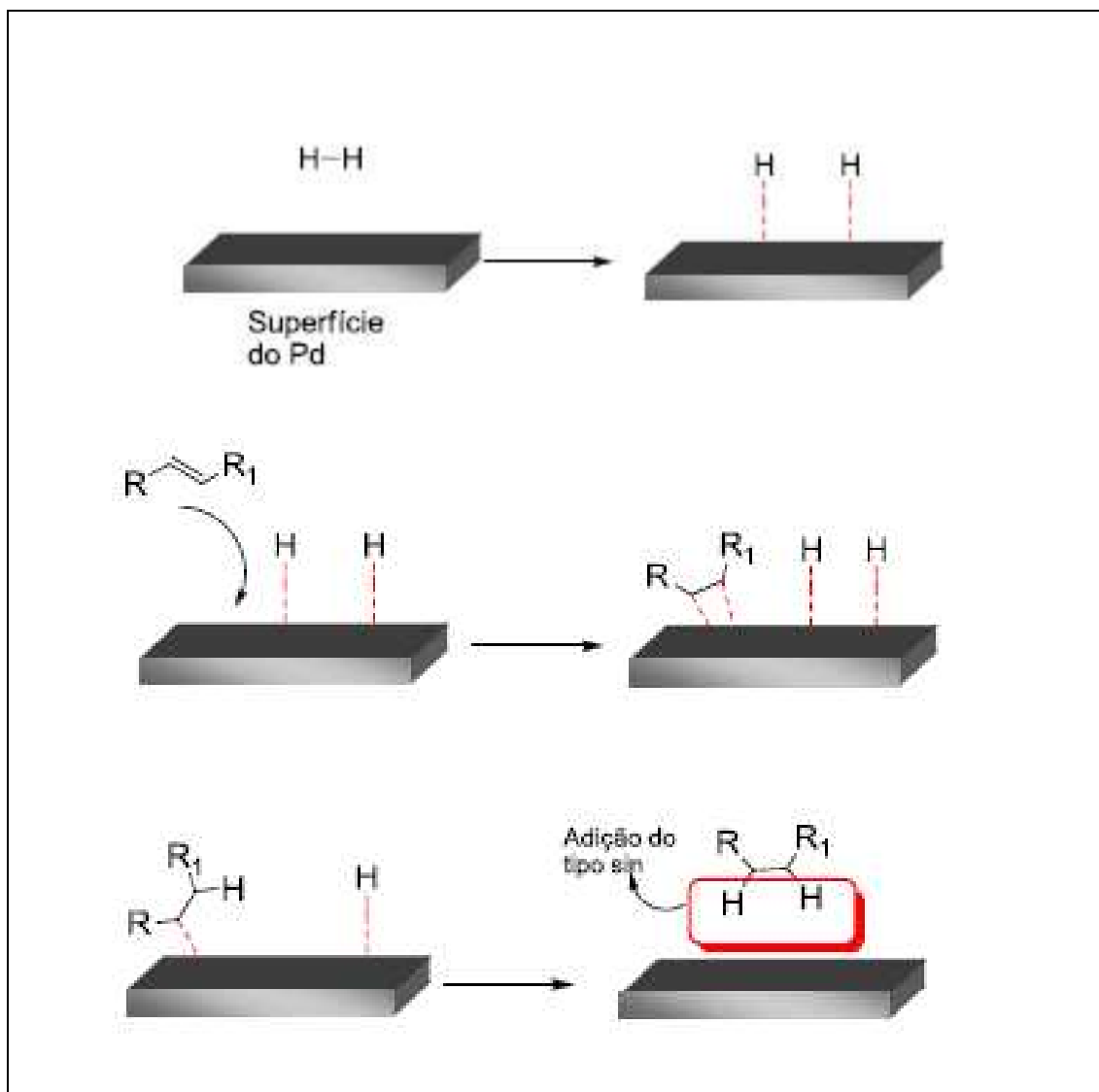


Figura 16 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto **6**.



Fonte: DIAS *et al.*, 2012.

Figura 17 - Etapas envolvidas no processo de hidrogenação de um alceno catalisado por paládio.

A hidrogenação do ácido cinâmico catalisada por Pd/C resultou na obtenção do derivado **7** (Esquema 7, p. 70). A banda larga observada em 3026 cm^{-1} no espectro de infravermelho de **7** (Figura 18, p. 77) indicou a presença do grupo hidroxila da função ácido carboxílico. Já a banda intensa em 1697 cm^{-1} foi atribuída ao grupo carbonila. As bandas em 1496 , 1453 e 1427 cm^{-1} correspondem aos estiramentos da ligação $C=C$ de anel aromático enquanto

que a banda em 2934 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento assimétrico da ligação C-H dos grupos CH_2 .

No espectro de RMN de ^1H do composto **7** (Figura 19, p. 78) foram observados sinais para os átomos de hidrogênios aromáticos em $\delta_{\text{H}} 7,28\text{-}7,13$ (H-5, H-6, H-7, H-6', H-5') como um multipletto. O tripleto em $\delta_{\text{H}} 2,58$ ($J = 7,8$ Hz) e integrado para dois hidrogênios, foi atribuído ao átomo de hidrogênio H-2. Observa-se ainda nesse mesmo espectro outro tripleto em $\delta_{\text{H}} 2,90$ ($J = 7,7$ Hz), também integrado para dois hidrogênios e atribuído ao átomo de hidrogênio H-3.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **7** (Figura 20, p. 79) observou-se o sinal em $\delta_{\text{C}} 175,5$ referente ao grupo carbonila do ácido carboxílico. Os sinais para os átomos de carbono de anel aromático encontram-se $\delta_{\text{C}} 140,9$ (C-4), $128,2$ (C-6,C-6'), $128,1$ (C-5,C-5') e $126,0$ (C-7). Os demais sinais correspondem aos átomos de carbono C-2/C-3 com hibridização sp^3 , observados no espectro em $\delta_{\text{C}} 35,5$ e $30,8$ respectivamente.

Em vista da similaridade existente entre os espectros no IV e de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **9** e **11** (Esquema 8, p. 80) com os respectivos **1** e **2** (Esquema 2, p. 45), não será feita uma discussão minuciosa dos dados espectroscópicos que foram utilizados para caracteriza-los. Os espectros referentes ao composto **9** e **11** são apresentados nos anexos (figuras 7-12, p. 119-124) e a descrição dos dados espectroscópicos é apresentada na seção 2.2.2 (p. 39 e 41).

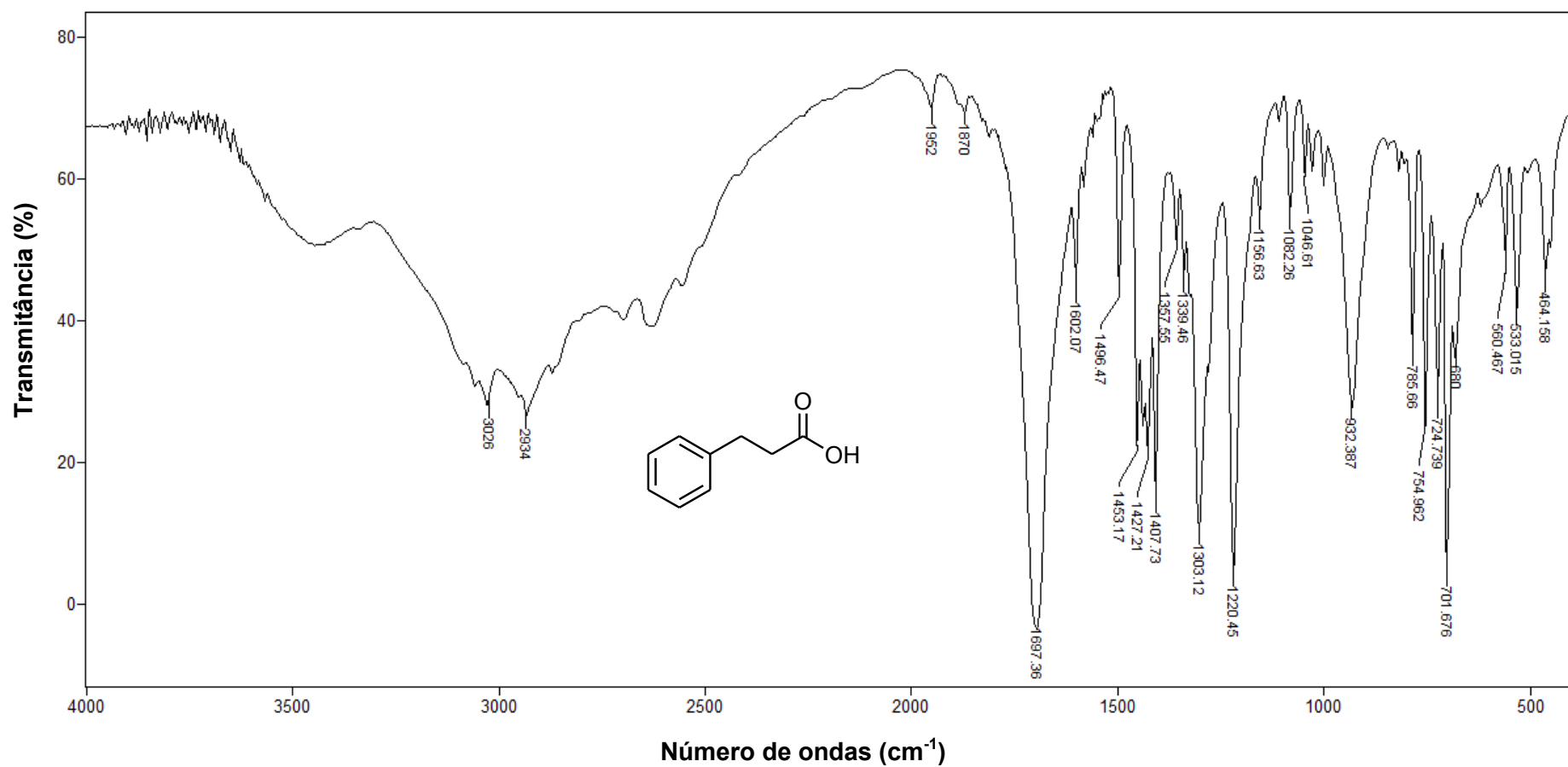


Figura 18 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 7.

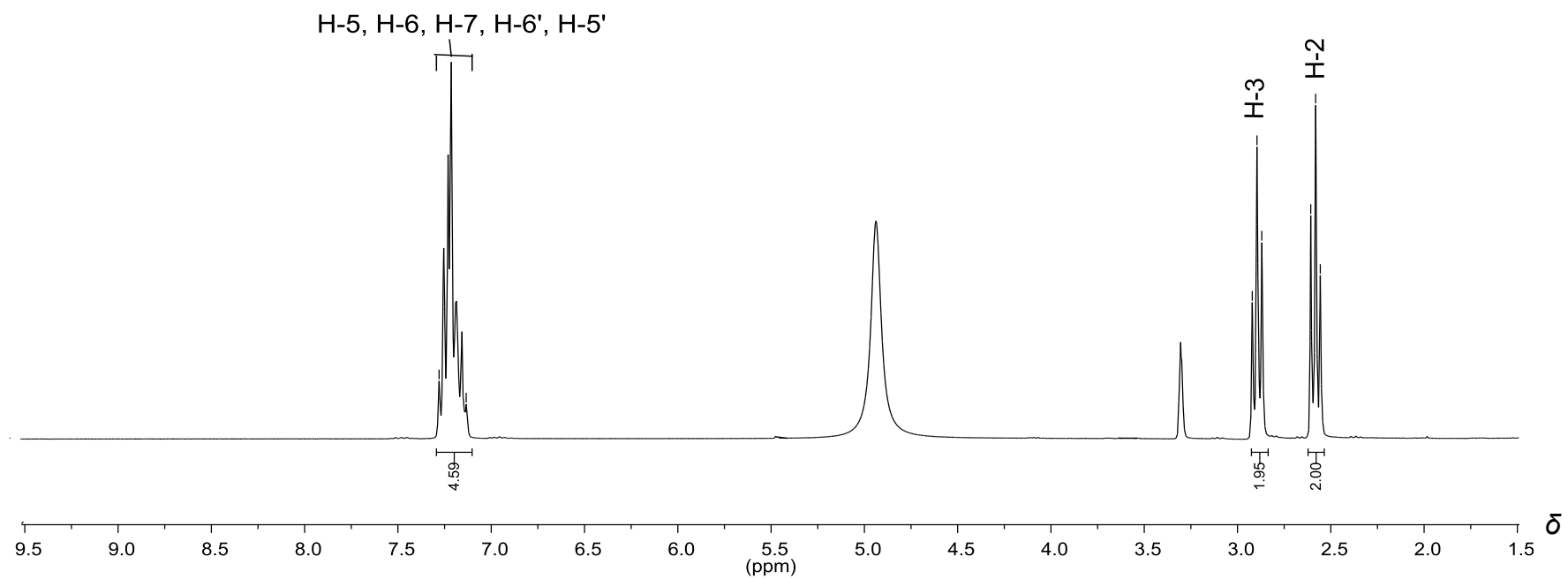
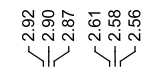
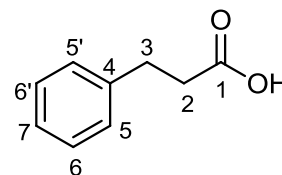
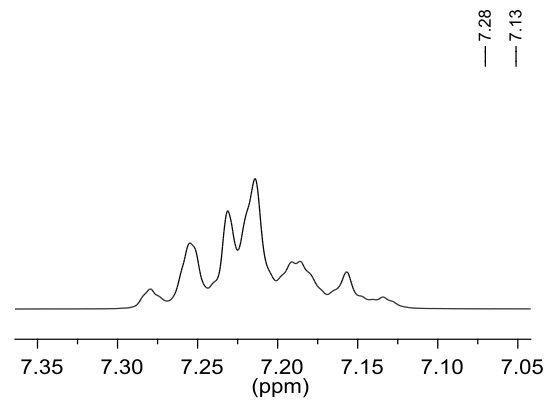


Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto **7**.

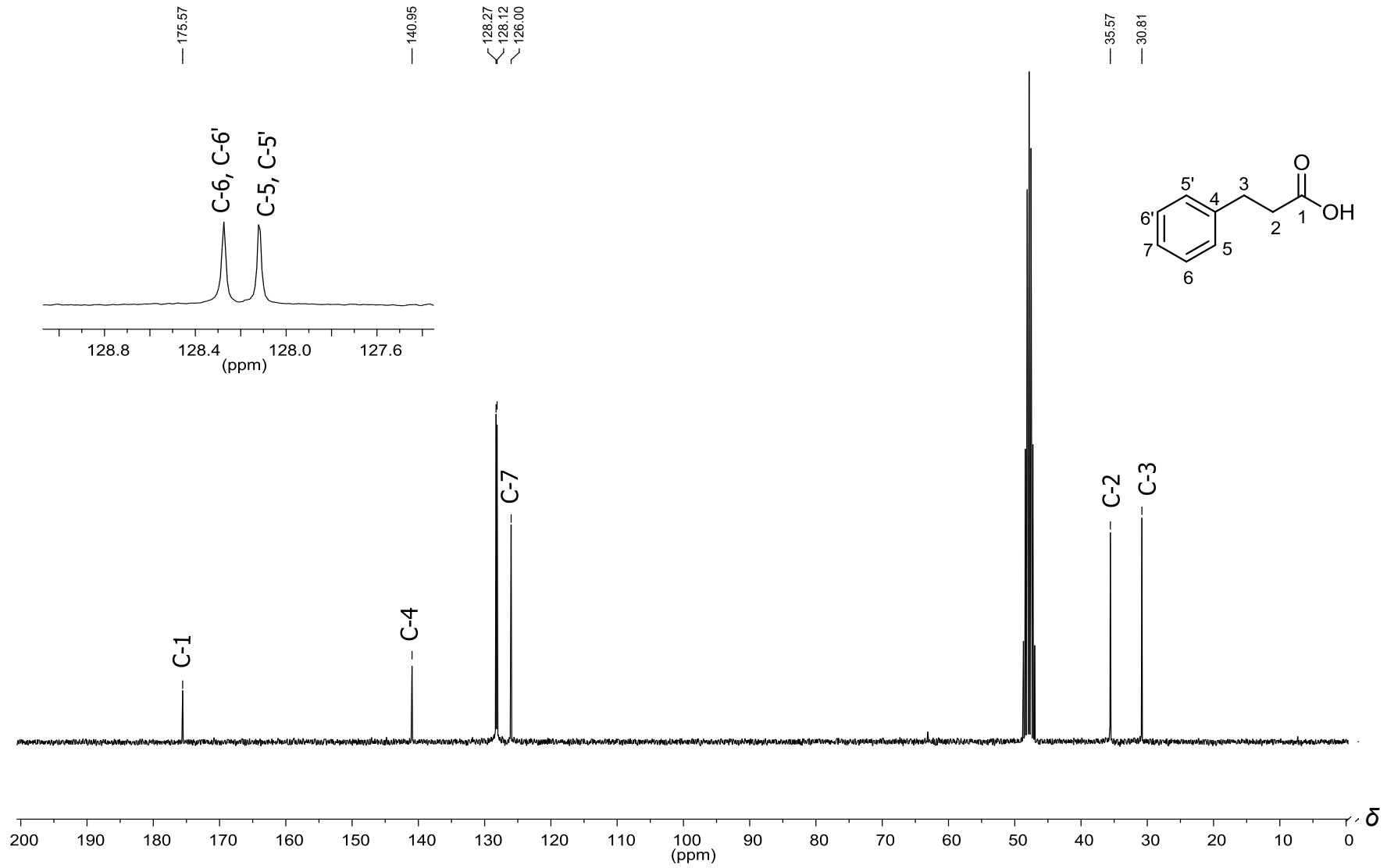
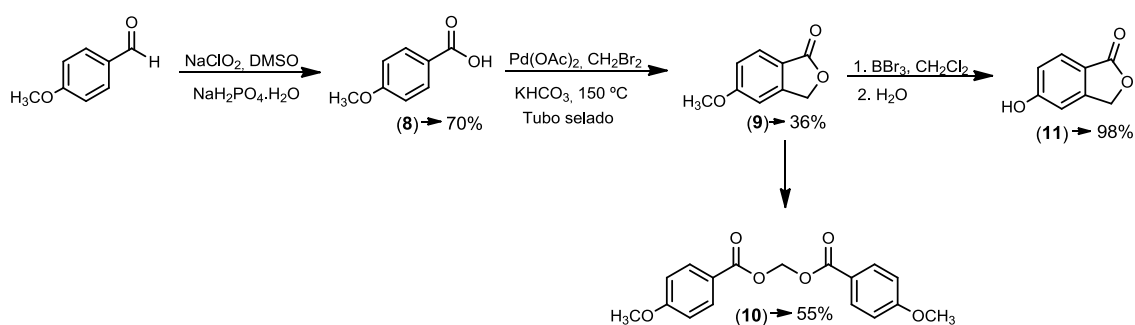


Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto 7.

No Esquema 8 está representada a rota sintética empregada para a síntese da 5-hidróxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (**11**). Assim, a oxidação do anisalaldeído com clorito de sódio resultou na formação do ácido 4-metoxibenzóico (**8**) com bom rendimento (70%). A descrição dos dados espectroscópicos de **8** é apresentada na seção 2.2.2 (p. 37) e os espectros utilizados na caracterização desta substância estão nos Anexos (p. 116 a 118).

Subsequentemente, a reação de *orto*-alquilação, catalisada por Pd(OAc)₂, entre o ácido 4-metoxibenzóico (**8**) e o dibromometano (CH₂Br₂) forneceu a isobenzofuranona metoxilada (**9**) (ZHANG *et al.*, 2009). Durante o processo de purificação de **9**, o composto *bis*-(4-metoxibenzoato) de metileno (**10**) também foi isolado, (Esquema 8). Considerando as condições da reação utilizadas para a síntese da substância **9**, o diéster **10** resultou do processo de substituição nucleofílica bimolecular entre dibromometano (CH₂Br₂) e o carboxilato do ácido 4-metoxibenzóico **8**. O diéster **10** foi obtido como um sólido branco em 55% de rendimento após purificação em coluna de sílica gel. A desmetilação de **9** com BBr₃ resultou em **11**.



Esquema 8 - Rota sintética para a síntese do composto **11**.

Com respeito ao diéster **10**, no espectro no infravermelho (Figura 21, p. 83) foi observada uma banda intensa em 1731 cm⁻¹ correspondente ao grupo carbonila. A banda em 1258 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento da ligação C-O.

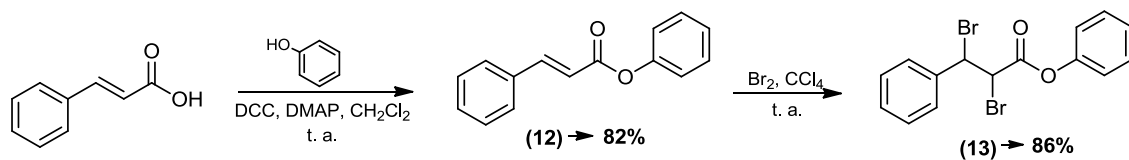
As bandas em 1606, 1511, 1450 cm^{-1} foram associadas aos estiramentos das ligações C=C do anel aromático. As bandas em 2838 e 2934 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação CH do carbono sp^3 . E as bandas em 3078, 3030 e 2988 cm^{-1} correspondem aos estiramentos da ligação =CH de anel aromático.

No espectro de RMN de ^1H do diéster **10** (Figura 22, p. 84), o sinal correspondente aos hidrogênios dos grupos metoxila foram observados como um simpleto em δ_{H} 3,85 e integrado para seis hidrogênios. O simpleto em δ_{H} 6,20 e integrado para dois átomos de hidrogênio, foi atribuído aos átomos de hidrogênio do grupo metileno ($-\text{OCH}_2\text{O}-$). E os demais sinais em 6,92 (d, 4H, $J = 9,0$ Hz; H-3, H-5); e 8,04 (d, 4H, $J = 9,0$ Hz; H-2, H-6), correspondem a um padrão característico de anéis aromáticos com substituintes numa relação *orto*.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **10** (Figura 23, p. 85), o sinal referente aos grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$) foi observado em δ_{C} 164,9, enquanto que o sinal para o carbono metilênico ($-\text{OCH}_2\text{O}-$) foi observado em δ_{C} 79,6. O sinal para os grupos metoxila foi observado em δ_{C} 55,4. E os sinais correspondentes aos carbonos aromáticos foram atribuídos em δ_{C} 113, 6 (C-3, C-5); 121, 2 (C-1); 132,1 (C-2, C-6); 163, 8 (C-4).

Por razões não compreendidas, a tentativa de acoplamento da substância **11** com o ácido cinâmico, via reação de Steglich, mostrou-se infrutífera. A análise da mistura reacional via CCD evidenciou a formação de uma mistura bastante complexa a partir da qual não seria possível qualquer tentativa de purificação de substâncias.

Tendo como objetivo comparar a atividade de derivados do ácido cinâmico contendo apenas anéis de benzeno com aqueles derivados contendo núcleos isobenzofuranonas, foi realizada a síntese dos compostos **12** e **13** (Esquema 9).



Esquema 9 - Rota sintética empregada na preparação dos compostos **12-13**.

Utilizando transformações muito similares àquelas descritas no Esquema 2 (p. 45), os compostos **12** e **13** foram sintetizados em rendimentos de 82 e 86% respectivamente. A descrição dos dados espectroscópicos dos mesmos se encontra na seção 2.2.2 (p. 42 e 44) e os espectros referentes são apresentados no anexo (Figuras 13 a 18, p.125 a 130).

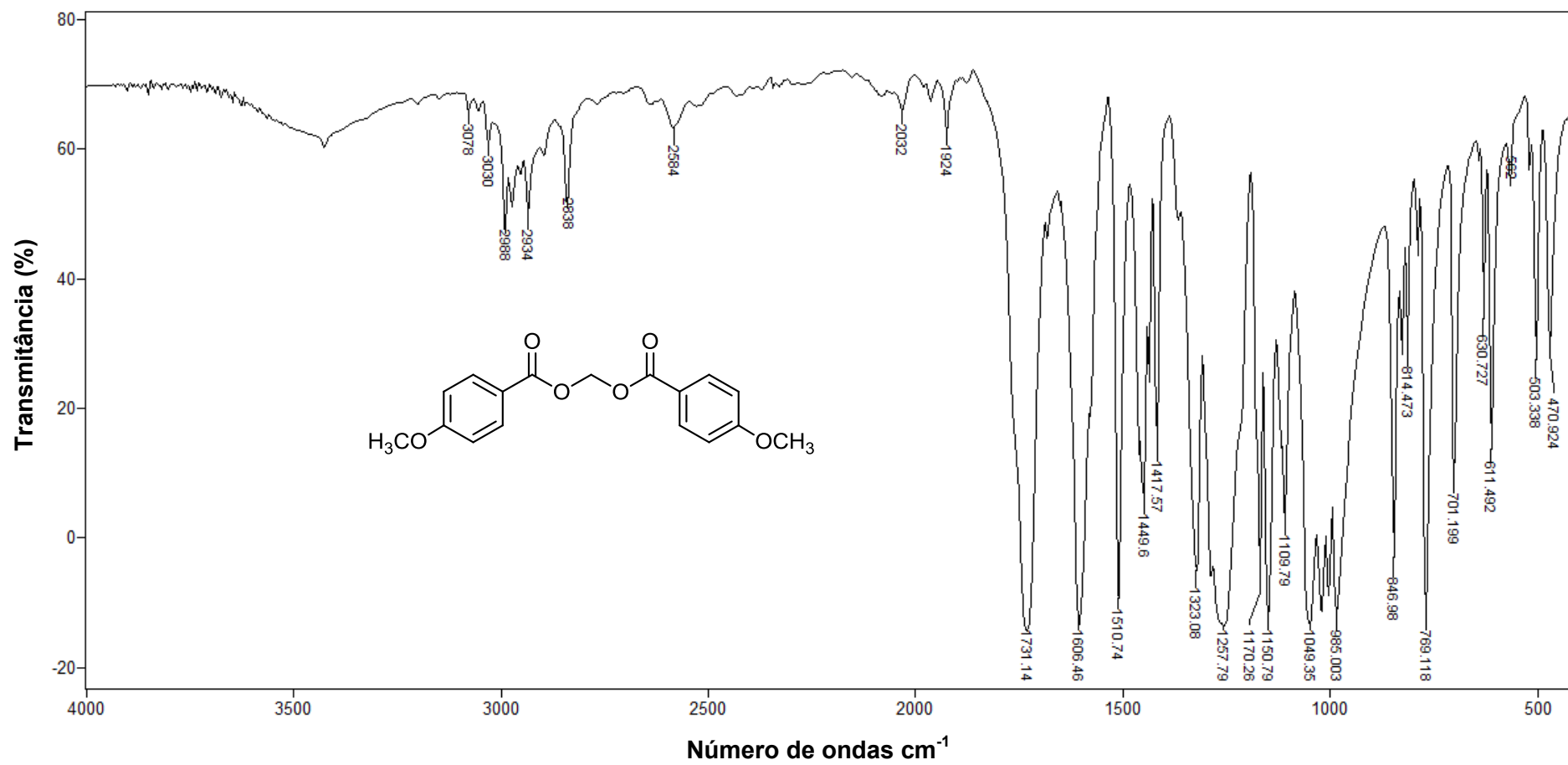


Figura 21 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 10.

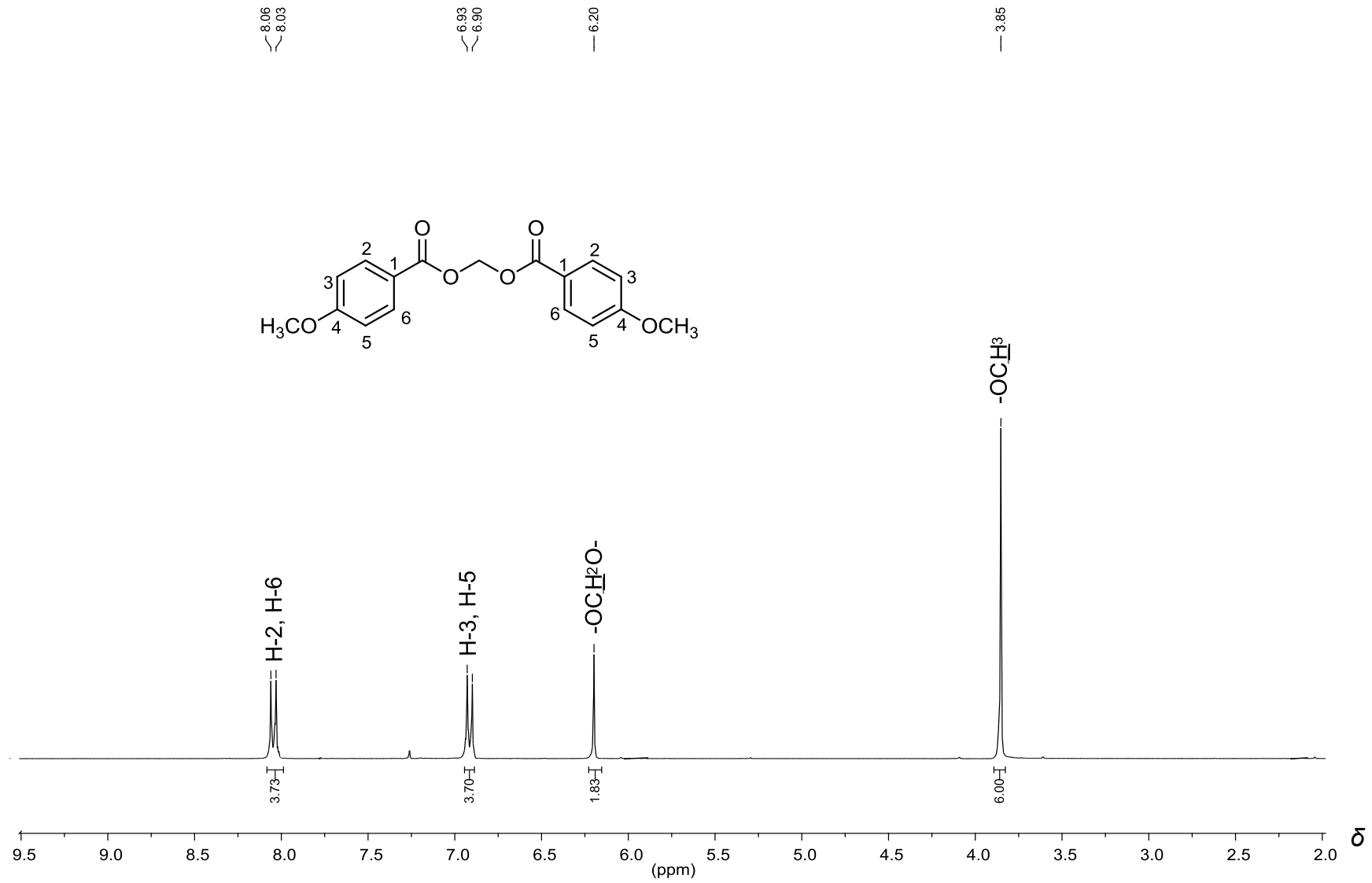


Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **10**.

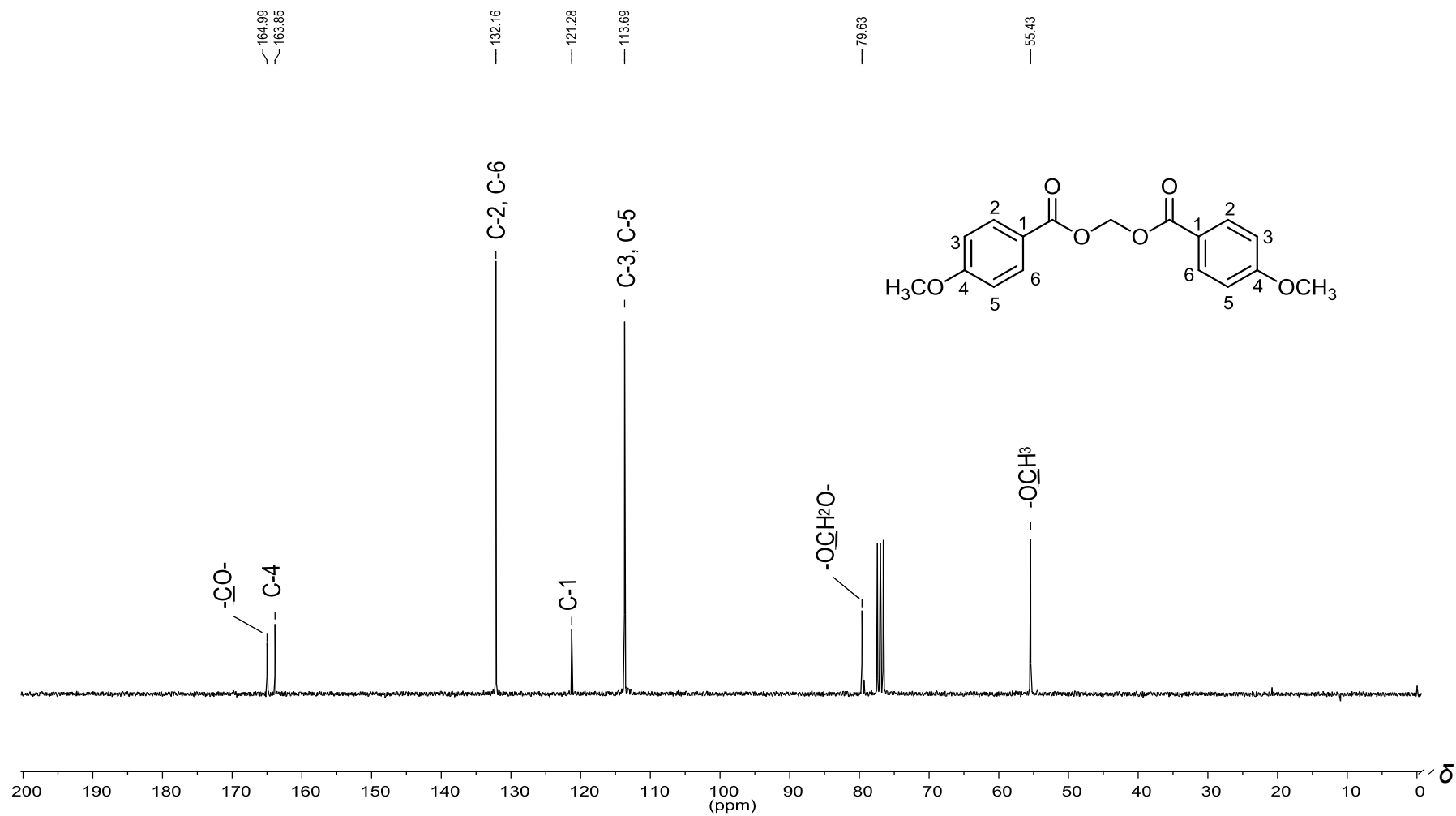


Figura 23 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **10**.

2.4 - CONCLUSÕES

Descreveram-se neste capítulo as etapas envolvidas na obtenção de uma série de derivados do ácido cinâmico e isobenzofuran-1(3*H*)-onas. Foram sintetizadas 13 substâncias, sendo três delas inéditas, que tiveram suas estruturas confirmadas por meio da espectroscopia no infravermelho e de RMN. Para a síntese dessas substâncias, foram utilizadas metodologias como reações de *orto*-alquilação de ácidos benzóicos, adições à ligação dupla e reações de acoplamento o que permitiu, de um modo geral, que os compostos sintetizados fossem obtidos com rendimento sinteticamente úteis.

2.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNES, R. A.; NETO, A. C. The Friedel-Crafts reaction with 2,3-dibromo-3-phenylpropionic acid. *Journal organic of chemistry*, v. 35, p. 4259-4261, 1970.

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

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

DE SOUZA, M. V. N. Estudo da síntese orgânica baseado em substâncias bioativas. Editora Átomo: Campinas, São Paulo, 2010, Capítulo 4, p. 99.

- DIAS, F. R. F.; FERREIRA, V. F.; CUNHA, A. C. Uma visão dos diferentes tipos de catálise em síntese orgânica. *Revista Virtual de Química*, v. 4 (6), p. 840-871, 2012.
- HOLMEBERG, K.; HANSEN, B. Methylene diesters of carboxylic acid from dichloromethane. *Tetrahedron Letters*, v. 27, p. 2303-2306, 1975.
- HOLMES, D. L.; LIGHTNER, D. A. Synthesis and acidity constants of ^{13}C -labelled mono and dipyrrole carboxylic acids. $\text{P}k_a$ from ^{13}C -NMR. *Tetrahedron*, v. 51, p. 1607-1622, 1995.
- IRFAN, M.; GLASNOV, T. N.; KAPPE, C. O. Continuous flow ozonolysis in a laboratory scale reactor. *Organic Letters*, v. 13, p. 984-987, 2011.
- LAROCK, R. C.; FELLOWS, C. A. Synthesis of aromatic carbonyl compounds via thallation-carbonylation of arenes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 104, p. 1900-1907, 1982.
- NUMATA, A.; ONO, K.; IRIE, H.; UEO, S. Synthesis of pyrolysis products of bisdehydrodihydroenmein. I. Synthesis of 6-hydroxy-7-methylphthalide and 2-(hydroxymethyl)-6,6-dimethyl-5-oxo-1-cyclohexenecarboxylic acid lactone. *Yakugaku Zasshi*, v. 88, p. 1151-1162, 1968.
- PAVIA, D. L. LAMPMAN, G. M. KRIZ, G. S. VYVYAN, J. R. Introdução a espectroscopia. 4ª ed. São Paulo: Editora Cengage Learning, 2010. 687p.
- PASSO, J. A. Síntese e caracterização de novos polímeros líquido-cristalinos de cadeia lateral derivados do heterocíclico 2-isoxazolinico 3,5-dissubstituído. 2012, 215p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

- PASQUINI, C.; CONIGLIO, A.; BASSETI, M. Controlled dealkylation by BBr_3 : efficient synthesis of para-alkoxy-phenols. *Tetrahedron Letters*, v. 53, p. 6191-6194, 2012.
- SOLOMONS T. W. G.; FRYHLE, C. B. Química Orgânica. Editora: LTC, Rio de Janeiro, v. 1, 10ª Edição, 2012.
- SOVA, M.; PERDIH, A.; MIHA, K.; KRISTAN, K.; RIZNER, T. L.; SOLMAJER, T.; GOBEC, S. Flavonoids and cinnamic acid esters as inhibitors of fungal 17β -hydroxysteroid dehydrogenase: a synthesis, QSAR and modelling study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 7404-7418, 2006.
- TEIXEIRA, R. R.; PEREIRA, J. L., DA SILVA, S. F.; GUILARDI, S.; PAIXÃO, D. A.; ANCONI, C. P. A.; DE ALMEIDA, W. B.; ELLENA, J.; FORLANI, G. Synthesis, characterization and phytotoxic activity of hydroxylated isobenzofuran-1(3H)-ones. *Journal of Molecular Structure*, v. 1061, p. 61-68, 2014.
- UMAYORUBHAGAN, V.; PILLAI, A. R. Synthesis of 2-amino-5-aryl-4-oxo-4,5-dihydrothiazole. *Asian Journal of Chemistry*, v. 6, p. 999-1001, 1994.
- ZWEIFEL, G. S.; NANTZ, M. H. Modern Organic Synthesis: An Introduction. Printed in the United States of America: New York, 2007, chapter 3, p. 79.
- ZHANG, Y.-H.; SHI, B.-F.; YU, J.-Q. Palladium(II)-catalyzed *ortho* alkylation of benzoic acids with alkyl halides. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 48, p. 6097-6100, 2009.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO E DAS ISOBENZOFURANONAS

3.1 - INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que atinge milhões de pessoas e representa um grave problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento, além de constituir uma das principais causas de morte ao redor do mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que dentro de 20 anos o número de mortes poderá aumentar significativamente de 6 milhões para 10 milhões (WHO, 2002).

De acordo com dados estatísticos, em 2002 surgiram 10 milhões de novos casos de câncer no mundo (WHO, 2002). Desse total, 5,3 milhões correspondiam à população masculina e 4,7 milhões à população feminina. Em decorrência desse aumento de novos casos, morreram cerca de 6,2 milhões (3,5 milhões de homens e 2,7 milhões de mulheres), correspondendo a 12% do total de mortes por todas as causas (INCA, 2003). Em 2008, a incidência mundial de novos casos aumentou para 12,4 milhões e em contrapartida o número de mortes por câncer também sofreu um acréscimo de 7,6 milhões (INCA, 2009).

No Brasil, segundo as estimativas relatadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), estão previstas para 2014 o surgimento de aproximadamente 580.000 novos casos de câncer (INCA, 2013). Dentre esses novos casos, os que mais atingem a população masculina são os cânceres de próstata, pulmão,

cólon e reto e esôfago enquanto que na população feminina os mais frequentes são os cânceres de pele, mama, colo do útero, cólon e reto, pulmão e estômago (FACINA, 2011).

A quimioterapia, também conhecida como quimioterapia antineoplásica, é um dos métodos mais utilizados para o tratamento do câncer, consistindo na utilização de compostos químicos denominados quimioterápicos (DE ARAUJO, 2012).

O tratamento quimioterápico contra o câncer apresenta diversos problemas dentre os quais se destacam os efeitos colaterais como diarreia, vômito, fraqueza, queda de cabelo, tonteados e etc. Outro problema associado ao uso desses medicamentos consiste na sua não especificidade para células tumorais, além de serem considerados tóxicos para células normais. Além disso, à ineficiência dos fármacos em relação aos diferentes tipos de câncer, bem como o aumento do aparecimento de linhagens resistentes a estes medicamentos são também bastante preocupantes (CHABNER e ROBERTS, 2005). Diante disso, a busca por novas moléculas potencialmente úteis e mais eficazes para o tratamento desta patologia continua despertando grande interesse por parte dos pesquisadores.

Conforme descrito no Capítulo 1 desta dissertação, existem atualmente diversos compostos oriundos de fontes naturais que estão sendo utilizados como agentes quimioterápicos no tratamento contra o câncer (PINTO *et al.*, 2002). Os derivados do ácido cinâmico assim como as isobenzofuranonas devido ao seu amplo espectro de bioatividades estão entre esses compostos. Segundo a literatura, os mesmos vem demonstrando apresentar resultados bastante promissores nos ensaios citotóxicos contra células cancerígenas.

Na busca por novos fármacos que possam ser utilizados para inibir o crescimento desordenado de células, ensaios de avaliação de atividade citotóxica vêm sendo realizados com os derivados do ácido cinâmico e as isobenzofuranonas.

A atividade citotóxica dos derivados do ácido cinâmico (ácido cafeico e ferúlico, Figura 1) foram avaliadas por KAMPA e colaboradores (2004) contra as células de carcinoma mamário humano (T47D). Estas substâncias apresentaram significativa atividade citotóxica sobre esta linhagem de câncer com destaque para o ácido cafeico que mostrou um melhor efeito de inibição sobre a proliferação da célula cancerígena ($IC_{50} = 2,17 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$).

NAM e colaboradores (2001) isolaram o cafeato de metila (Figura 1) a partir da planta *Notopterygium incisum*. Esta substância apresentou significativa citotoxicidade ($IC_{50} = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$) contra várias linhagens de células cancerígenas dentre elas o melanoma murino (B16), câncer de cólon (HCT116) e o carcinoma epidermóide (A431).

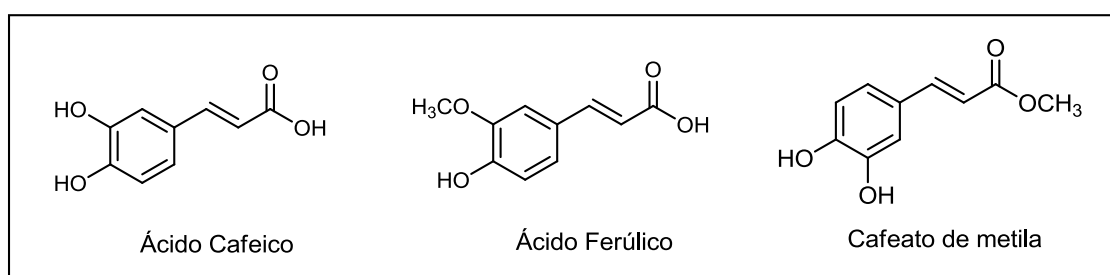


Figura 1 - Estruturas de derivados do ácido cinâmico avaliados contra diferentes linhagens de células tumorais.

Tendo o ácido crifonétrico como estrutura modelo, TEIXEIRA e colaboradores (2013) sintetizaram uma série de isobenzofuranonas C-3 funcionalizadas. Em especial, as isobenzofuranonas (**14-16**, Figura 2, p. 92) foram as que apresentaram significativa atividade antiproliferativa contra as

linhagens de células U937 (linfoma) e K562 (leucemia mielóide). Os compostos **14** e **16** exibiram os melhores resultados de inibição contra células K562 (IC_{50} 1,71 e 2,79 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente), enquanto que um efeito moderado foi observado para os compostos **14-16** em células U937.

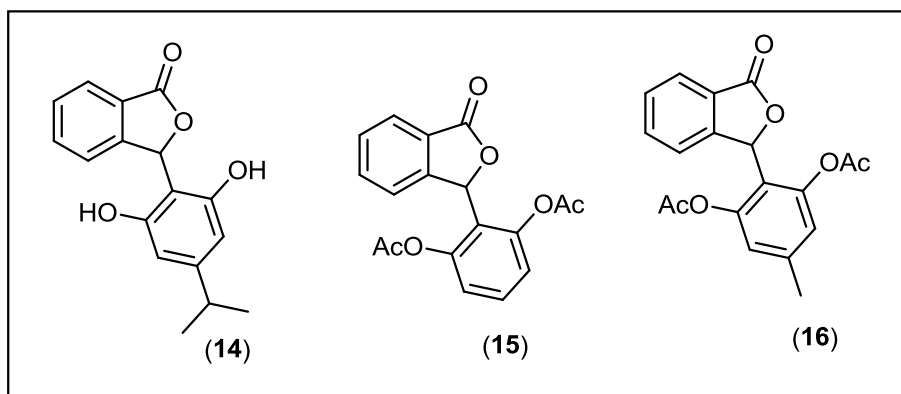


Figura 2 - Isobenzofuranonas testadas contra as linhagens de células tumorais U937 e K562.

Dentro desse contexto e considerando as atividades citotóxicas dos derivados do ácido cinâmico já descritos na literatura, descrevem-se neste capítulo a avaliação do efeito citotóxico dos compostos **1-7**, **9** e **10**, bem como do ácido cinâmico comercial contra a linhagem de célula tumoral melanoma B16.

3.2 - MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 - Avaliação da atividade antiproliferativa

A linhagem de melanoma (B16) foi mantida em meio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, CA, USA) suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB) (LGC, Campinas, Brasil), penicilina 100 U mL^{-1} e estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$. As células foram mantidas a 37 °C sob tensão de 5% de CO_2 . O subcultivo foi realizado semanalmente para a manutenção dos estoques celulares. Inicialmente o meio foi removido da placa de células confluentes e

lavadas com tampão fosfato de sódio 10 mmol L^{-1} contendo $\text{NaCl } 140 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ } 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 2,7 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7,4 (PBS 1X). Em seguida, as células foram incubadas com uma solução de tripsina-EDTA (Cultilab, Campinas, Brasil), 1 mL em cada placa de 60 x 10 mm. A seguir, as células foram ressuspensas em meio e transferidas (aproximadamente 1×10^5 células) para uma nova placa contendo meio RPMI enriquecido com 10% SFB, previamente equilibrado a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. O meio foi substituído no dia seguinte ao subcultivo, e também a cada 3 dias. Para os ensaios de viabilidade celular, inicialmente as células B16 foram removidas da garrafa de cultivo utilizando solução de tripsina-EDTA (Cultilab, Campinas, Brasil), lavadas com PBS 1X pH 7,4 estéril, centrifugadas e suspensas em meio RPMI, pH 7,4 acrescido de 10% de SFB. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) na concentração de 5×10^3 células/100 mL/poço em meio RPMI com adição de 10% de SFB, por 24 horas para completa aderência à placa. Posteriormente, os compostos foram adicionados as placas de 96 poços, em diferentes concentrações (200; 100; 50; 10; 0,1; 0,01; 0,001; $0,0001 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e incubados a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ sob tensão de 5% de CO_2 por um período de 48 horas. Ao final do período de incubação foi adicionado 10 mL de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (5 mg mL^{-1}) em cada poço, e as células incubadas por 2 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Subsequentemente, o meio foi removido e adicionado 100 μL de DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) para solubilização dos cristais de formazan e incubado por 20 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente, a absorbância foi detectada em comprimento de onda de 540 nm no espectrofotômetro (Thermo, Multiscan GO). Cada análise foi realizada em

quadruplicata e os resultados foram normalizados considerando as culturas tratadas sem adição dos compostos (0,4 % de DMSO). Foram determinadas as médias das repetições e determinados os desvios-padrão. Os valores de IC₅₀ foram calculados usando o software GraphPad Prism versão 5.0.

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 - Descrição dos resultados dos ensaios de avaliação da atividade citotóxica

Os compostos **1-7**, **9** e **10** (Figura 1, Capítulo 2, p. 26) assim como o ácido cinâmico comercial foram submetidos a ensaios biológicos para a avaliação de suas atividades citotóxicas contra a linhagem de melanoma (B16). As atividades citotóxicas dos compostos foram avaliadas segundo o método MTT. O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal amarelo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para o produto de cor azul formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria e no citoplasma da célula viável, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células metabolicamente ativas. O ensaio de viabilidade celular utilizando o MTT baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase, que só estaria ativa em células metabolicamente ativas (viáveis) (MOSMANN, 1983; BERNAS E DOBRUCKI, 2002). A linhagem celular foi tratada com diferentes concentrações dos compostos (200, 100, 50, 10, 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 $\mu\text{mol L}^{-1}$), por 48 horas. Esses testes foram realizados em quadruplicata e os resultados de IC₅₀ obtidos são apresentados na Tabela 1(p. 95).

Tabela 1 - Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) obtidos para a linhagem de célula melanona B16 tratadas com os compostos **1-7**, **9**, **10** e ácido cinâmico

Compostos	1	2	3	4	5	6	7	9	10	Ácido cinâmico
IC ₅₀ μmol L ⁻¹	-	-	54,14	13,66	-	-	-	-	-	-

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

(-) Compostos não tiveram efeito citotóxico contra a linhagem estudada.

Conforme apresentado na Tabela 1, nenhuma das isobenzofuranonas avaliadas nem o diéster **10** apresentaram efeitos sobre a viabilidade celular da linhagem de célula melanona (B16). O ácido cinâmico comercial também não apresentou nenhum efeito. Entretanto, a conversão do ácido cinâmico em derivados contendo núcleos isobenzofuranona resultou em dois derivados (compostos **3** e **4**, Figura 3) com significativos efeito citotóxicos contra melona (B16), sendo o derivado dibromado **4** o mais efetivo (IC₅₀ = 13,66 μmol L⁻¹).

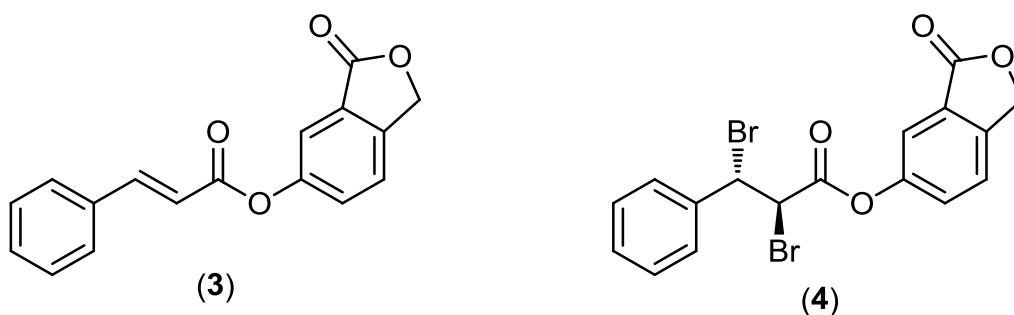


Figura 3 - Estruturas dos compostos **3** e **4**.

3.4 - CONCLUSÕES

Os ensaios de avaliação da citotoxicidade dos compostos **1-7**, **9** e **10** e do ácido cinâmico comercial contra a linhagem de célula melanona (B16) demonstraram que duas substâncias apresentaram efeitos significativos sobre

a viabilidade celular da linhagem celular investigada. Dentre elas, o composto **4** (Figura 3, p. 95) mostrou ser bastante efetivo inibindo em mais de 90% a proliferação de células de melanoma. Diante desses resultados, pode-se concluir que o derivado do ácido cinâmico **4** representa uma estrutura-modelo que pode ser explorada na busca por novos agentes quimioterápicos para o tratamento do melanoma.

3.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNAS, T.; DOBRUCKI, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, v. 47, p.236-242, 2002.
- CHABNER, B. A.; ROBERTS JR, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews*, v. 5, p. 65-72, 2005.
- DE ARAUJO, M. E. M. B. Avaliação das atividades antioxidante e antiproliferativa da rutina e seus produtos obtidos por hidrólise enzimática. 2012, 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de São Francisco, Bragança Paulista, 2012.
- FACINA, T. Estimativa 2012 - Incidência de câncer no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 57, p. 557, 2011.
- INCA (Instituto Nacional de Câncer). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em http://www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=11. Acesso em: 03 Fev. 2014.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). Estimativas 2010 – Incidência de câncer no Brasil. Disponível em

http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2009/lancamento_estimativa_2010. Acesso em 03 Fev. 2014.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). Estimativas 2014. Disponível em http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014.

Acesso em 03 Fev. 2014.

KAMPA, M.; ALEXAKI, V.; NOTAS, G.; NIFLI, A.; NISTIKAKI, A.; HATZOGLOU, A.; BAKOGEORGOU, E.; KOUIMTZOGLOU, E.; BLEKAS, G. BOSKOU, D.; GRAVANIS, A.; CASTANAS, E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolics acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research*, v. 6, p. R63-R74, 2004.

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

NAM, N.; YOU, Y.; KIM, Y.; HONG, D.; KIM, H.; ZUN AHN, B. Synthesis of certain 3-aryl-2-propenoates and Evaluation of their cytotoxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, p. 1173-1176, 2001.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. *Química Nova*, v. 25, p. 45-61, 2002.

SILVA, R. C. F. Cuidados paliativos oncológicos: Reflexões sobre uma proposta inovadora na atenção à saúde. 2004, 104. Dissertação (Mestrado

em Ciências). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca , Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

TEIXEIRA, R. R.; BRESSAN, G. C.; PEREIRA, W. L.; FERREIRA, J. G.; DE OLIVEIRA, F. M.; THOMAZ, D. C. Synthesis and antiproliferative activity of C-3 functionalized isobenzofuran-1(3*H*)-ones. *Molecules*, v. 18, p. 1881-1896, 2013.

WHO (World Health Organization), 2002. National cancer control programmes: policies and managerial guidelines. 2nd ed. Geneva: WHO.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO E DAS ISOBENZOFURANONAS

4.1 - INTRODUÇÃO

Atualmente a Organização das Nações Unidas (ONU) estima que existem 7,2 bilhões de pessoas e que este número será de 8,2 bilhões em 2025 e deverá alcançar 9,2 bilhões de habitantes em 2050 (ONU). Vários desafios decorrentes desse aumento populacional terão de ser enfrentados, sendo um deles o aumento da produtividade agrícola para nutrir de maneira adequada o maior número de seres humanos.

O aumento da produtividade agrícola exige, entre outros aspectos, o controle de uma variedade de pragas e doenças (VELASCO e CAPANEMA, 2006). A técnica mais utilizada para o controle das mesmas consiste no uso de defensivos agrícolas, também denominados de agroquímicos. Os herbicidas, fungicidas, inseticidas e nematicidas são as classes mais consumidas de agroquímicos no mundo (BARBOSA, 2004).

O controle de doenças de plantas tem sido uma preocupação constante na agricultura e um desafio para produtores e pesquisadores. Conforme descrito no Capítulo 1 desta dissertação, os fungos são responsáveis por cerca de 75% de todas as doenças infecciosas de plantas. Assim, todas as culturas importantes estão sujeitas a uma ou mais doenças causadas por fungos. Estima-se que mais de 5.000 espécies de fungos são responsáveis por causarem danos às diversas culturas (RAVEN *et al.* 2001).

Segundo RAVEN e colaboradores (2001), mais de 70.000 espécies de fungos já foram identificadas até o presente momento e eventualmente outras cerca de 1.700 são descobertas a cada ano. O número total de espécies foi estimado em um milhão e quinhentos mil, colocando os fungos como o segundo maior reino, sendo superado apenas pelos insetos.

Existem descritos na literatura vários exemplos de doenças importantes de plantas que trouxeram sérios prejuízos à agricultura. Dentre elas, cita-se uma das mais destrutivas denominada requeima da batata. Essa doença ocorre no Brasil e em outras partes do mundo, principalmente em regiões produtoras de batata onde as condições de temperatura e umidade relativa são favoráveis ao desenvolvimento da espécie causadora da doença (KIMATI *et al.*, 1997).

A requeima da batata é causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans* (TRENTI *et al.*, 2009). Oomicetos são uma classe de organismos filamentosos, unicelulares, que se assemelham morfológicamente a fungos. *P. infestans*, que também ataca o tomateiro, pode dizimar uma lavoura de batata em pouco tempo se as condições agroclimáticas forem favoráveis ou se medidas adequadas de controle não forem empregadas (TOFOLI *et al.*, 2013).

A requeima foi considerada a mais devastadora das doenças de plantas da história da humanidade. Em meados do século XIX, ela dizimou completamente a produção de batata que consistia na principal base da alimentação da população europeia. Inesperadamente, essa doença se espalhou por todos os lugares da Europa, especialmente na Irlanda, trazendo consigo consequências catastróficas como pobreza, fome, mortes e um grande número de migrações (RISTAINO, 2002; MIZUBUTI e MAFFIA, 2006). Diante

dessa catástrofe, muitos pesquisadores realizaram extensas pesquisas com o objetivo de descobrirem a principal causa dessa doença. Alguns pesquisadores até conseguiram associar a requeima com um fungo, mas foi De Bary ao se dedicar com afinco ao estudo desse mal e, com um método de inoculação convincente, que conseguiu reproduzir através de vários testes, a doença em folhas e tubérculos. Ao completar seu estudo, De Bary denominou o patógeno de *Phytophthora infestans* sendo a palavra *Phytophthora* constituída pelos radicais phyto = planta e phthora = destruidor (DE MOURA, 2002).

A requeima afeta toda a parte aérea da planta da batata bem como seus tubérculos (BATISTA *et al.*, 2006). Seus sintomas são caracterizados no início do estágio pelo aparecimento de diversas manchas nas folhas da batateira apresentando coloração verde clara ou escura. Sob condições agroclimáticas favoráveis e com o passar do tempo, estas se tornam negras, necróticas e irregulares. À medida que estes sintomas avançam, observa-se também sob condições de alta umidade, na parte inferior, a formação de um anel de esporulação ao redor das lesões, formado por esporângios e esporangióforos do patógeno, cujo aspecto é de coloração branco-acinzentado e aveludado. Enquanto que no tubérculo da batata podem ocorrer machas marrom sobre a sua epiderme (KIMATI *et al.*, 1997; ZAMBOLIN *et al.*, 2000 apud DUARTE, 2009), Figura 1, p. 101.



- Campo de batata.

A



- Sintomas de requeima em folhas.

B



- Anel de esporulação formado por *P. infestans*.

C



- Aspecto destrutivo da requeima.

D

Fonte: TOFOLI *et. al.*, 2013.

Figura 1 - Aspecto de folhas de batatas infectadas por requeima (*Phytophthora infestans*).

Conforme descrito na literatura, a cultura da batata é muitas vezes afetada por diferentes patógenos, principalmente por fungos, causando efeitos danosos tanto à parte aérea da planta quanto aos seus tubérculos. Por este motivo, os fungicidas são constantemente empregados e necessários nas lavouras dessa cultura, principalmente por ser o método de controle mais seguro e eficaz e, portanto, essencial contra patógenos como *Phytophthora infestans* que requerem para seu controle várias aplicações de fungicidas em um único cultivo (LOPES, 2011).

Dentro deste contexto, conclui-se que os fungicidas exercem papel importante para o controle efetivo de diversas doenças de plantas. A busca por novas classes de fungicidas com variados modos de ação, mais efetivos, apresentando maior seletividade, e que causem um menor impacto ambiental, é uma área de intensa pesquisa na indústria agroquímica. Conforme descrito no Capítulo 1, uma abordagem que vem sendo utilizada na busca por novos agentes para controlar fungos fitopatogênicos consiste em utilizar substâncias oriundas de fontes naturais como modelos para o desenvolvimento de novos princípios ativos. Nesse sentido, o ácido cinâmico (e seus derivados) e as isobenzofuran-1(3*H*)-onas representam fontes de substâncias naturais bioativas que podem ser explorados na busca por novos compostos que sejam potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos fungicidas.

As isobenzofuranonas **17** e **18** (Figura 2), foram isoladas a partir do fungo de cultura do trigo denominado de *Sterile Dark*, por TAKAHASHI e colaboradores (2005). As mesmas foram submetidas a ensaios biológicos para a avaliação de suas atividades antifúngicas contra os fungos *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* e *Cladosporium herbarum*. A substância **17** apresentou significativa atividade contra *G. graminis* var. *tritici* (50 µg) e *C. herbarum* (5 µg), respectivamente. Enquanto o composto **18** mostrou inibição somente contra o fungo *Cladosporium herbarum* (50 µg).

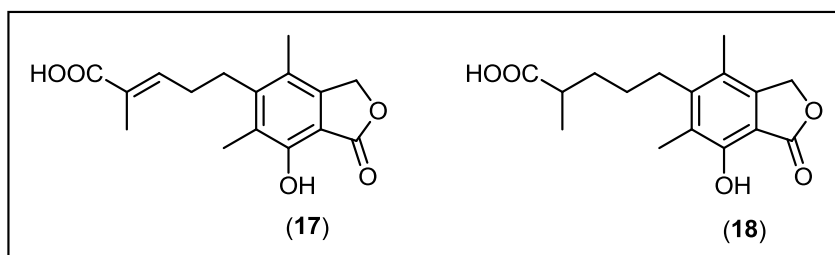


Figura 2 - Estruturas das fitoalidas antifúngicas **17** e **18**.

BISOGNO e colaboradores (2007) sintetizaram uma série de derivados do ácido cinâmico. Dentre esses diversos derivados, o composto **19** (Figura 3) foi considerado o mais ativo em termos de atividade antifúngica, apresentando uma acentuada atividade antifúngica contra o fungo *Aspergillus niger* (MIC = 1,95 µg mL⁻¹) e moderada atividade contra os fungos *Aspergillus terreus* (MIC = 31,25 µg mL⁻¹) e *Aspergillus flavus* (MIC = 62, 50 µg mL⁻¹).

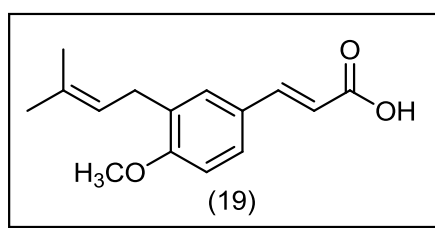


Figura 3 - Estrutura do derivado do ácido cinâmico contendo atividade antifúngica.

Considerando as atividades antifúngicas descritas na literatura tanto para isobenzofuranonas bem como para derivados do ácido cinâmico, avaliou-se a potencialidade das substâncias **1-7** e **9-10** sintetizadas neste trabalho de atuarem como inibidores dos esporângios do oomiceto *Phytophthora infestans*.

4.2 - MATERIAL E MÉTODOS

As substâncias **1-7** e **9-10** (Figura 1, p. 26), sintetizadas conforme descrito na seção 2.2.2 do Capítulo 2, foram submetidas a testes biológicos para avaliar seus efeitos como inibidores da germinação de esporângios do oomiceto *P. infestans*. Os ensaios foram realizados segundo metodologia descrita a seguir.

Esporângios de *Phytophthora infestans* foram retirados, por inundação, de colônias crescidas em meio de ervilha ágar em placas de Petri mantidas a

18 °C durante 20 dias. Da suspensão de esporângios uma alíquota de 5 µL foi transferida para lâminas de microscopia. Sobre a suspensão de esporângios foi adicionada alíquota de 5 µL das soluções dos compostos **1-7** e **9-10** previamente solubilizados em 5 µL de DMSO. As soluções dos compostos foram devidamente ajustadas de modo a permitir a avaliação das concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8 µg µL⁻¹ (tratamentos). Foram utilizados dois controles: 5 µL de água esterilizada e 5 µL de solução de DMSO. As lâminas foram mantidas em câmara úmida constituída por caixas plásticas (11 cm de comprimento x 11 cm de largura x 3 cm de altura) forradas com papel filtro umedecido. Para evitar o contato da lâmina com o papel umedecido, as lâminas foram colocadas sobre suportes de vidro. As caixas plásticas contendo as lâminas foram transferidas para incubadoras a 5 °C por 30 min. Após esse período, as lâminas foram imediatamente transferidas para incubadoras a 18 °C e mantidas por 8 h no escuro. Após este período, a germinação dos esporângios foi paralisada pela adição de uma gota de lactofenol. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Uma lâmina contendo as combinações suspensão de esporângios e compostos ou controles foi considerada como uma unidade experimental.

A germinação direta (formação de tubo germinativo) e indireta (liberação de zoósporos) foi determinada pela contagem de 100 esporângios ao microscópio (40x). Estimou-se a percentagem de germinação direta e indireta em cada unidade experimental.

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As substâncias **1-7**, **9** e **10** além do ácido cinâmico comercial foram avaliadas no tocante às suas habilidades em interferirem na germinação do esporângio do oomiceto *P. infestans*, responsável pela doença popularmente conhecida como “requeima da batata”. As substâncias supracitadas foram avaliadas em três diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,8 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$) e os resultados estão apresentados na Figura 4.

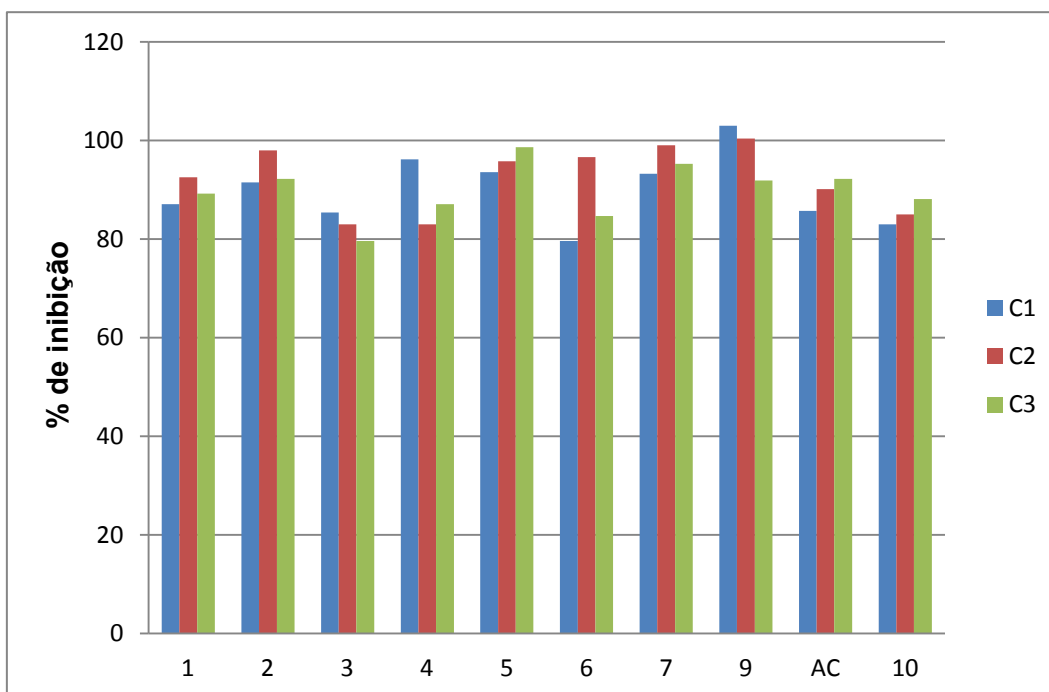


Figura 4 - Efeito das substâncias **1-7**, **9**, e **10** e do ácido cinâmico comercial (AC) sobre a inibição do crescimento dos esporângios de *Phytophthora infestans* nas concentrações 0,2 (C1); 0,4 (C2); 0,8 (C3) $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$.

Conforme pode ser observado na Figura 4, todos os compostos avaliados apresentaram significativos efeitos inibitórios contra o crescimento do esporângio em todas as concentrações testadas. Nessas mesmas concentrações, os compostos **1**, **2**, **5**, **7** e **9** derivados do ácido cinâmico (Figura 1, p. 26) apresentaram porcentagens de inibição igual ou superiores quando

comparado ao composto comercial ácido cinâmico. Dentre os compostos supracitados, merecem destaque a substância **5** (porcentagens de inibição para as concentrações 0,2; 0,4; 0,8 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ respectivamente iguais a 94, 96 e 99%) e o composto **7** (porcentagens de inibição para as concentrações 0,2; 0,4; 0,8 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ respectivamente iguais a 93, 99 e 95%).

Com respeito às isobenzofuranonas testadas, destaca-se a substância **9** cuja inibição da germinação dos esporângios correspondeu a 100% nas concentrações de 0,2 e 0,4 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

4.4 - CONCLUSÕES

No presente trabalho demonstrou-se que derivados do ácido cinâmico bem como isobenzofuranonas foram efetivos em inibir a germinação de esporângios de *Phytophthora infestans*. Simples modificações estruturais, a saber, hidrogenação produziram derivados (compostos **5** e **7**) que foram mais efetivos em inibir a germinação de *P. infestans*. A inclusão de um núcleo isobenzofuranona na estrutura do ácido cinâmico também produziu derivados capazes de inibir o processo de germinação dos esporângios, com destaque para a substância **5**. Isobenzofuranonas, que foram empregadas como intermediários para a síntese de derivados do ácido cinâmico contendo grupos isobenzofuranonas, também apresentaram pronunciada bioatividade. Em particular, a isobenzofuranona **9** apresentou maior eficiência entre todos os compostos avaliados.

Diante desses resultados conclui-se que as substâncias sintetizadas e avaliadas neste trabalho são atrativas como possíveis estruturas-modelo com o

objetivo de serem exploradas na busca por novos agentes para o controle de germinação de esporângios de *Phytophthora infestans*.

4.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, L. C. A. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Viçosa: Editora UFV, 2004, 215 p.

BATISTA, D. C.; LIMA, M. A.; HADDAD, F.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Validation of decision support systems for tomato early blight and potato late blight, under Brazilian conditions. *Crop Protection*, v. 25, p. 664-670, 2006.

BISOGNO, F.; MASCOTI, L.; SANCHEZ, C.; GARIBOTTO, F.; GIANNINI, F.; KURINA-SANZ, M.; ENRIZ, R. Structure-antifungal activity relationship of cinnamic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 10635-10640, 2007.

DE MOURA, R. M. Relembrando Anton de Bary e sua obra fitopatológica. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 337-343, 2002.

DUARTE, H. S. S. Resistência de cultivares de batata à requeima. 2009, 61p. Dissertação (Mestrado). Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2009.

KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L. F. A.; REZENDE, J. A. M. Manual de fitopatologia, vol. 2: Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1997, 706p.

LOPES, E. C. P. Efeitos fisiológicos de fungicidas no crescimento, produtividade e pós-colheita de batata (*Solanum tuberosum* L.). 2011, 84p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Pós-graduação em

- Agronomia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava-PR, 2011.
- MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. Introdução à Fitopatologia. Viçosa: Editora UFV, 2006, 190p.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Department of Economy and Social Affairs/Population Division. Population News Letter Number 87 - June 2009.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S. E. Biologia Vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ª ed., 2001, 906p.
- REIS, A. Comunicado Técnico 78 - Requeima: doença destrutiva e comum ao tomateiro e à batateira. Brasília, 2010.
- TAKAHASHI, K.; KOSHINO, H.; NARITA, Y.; YOSHIHARA, T. Novel antifungal compounds produced by *Sterile Dark*, an unidentified wheat Rhizosphere fungus. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 69, p. 1018-1020, 2005.
- TOFOLI, J. G. Ação de fungicidas e indutores de resistência no controle da requeima e pinta preta na cultura da batata. 2011, 176p. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- TRENTIN, G.; HELDWEIN, A. B.; STRECK, L.; MAASS, G. F.; RADONS, S. Z.; TRENTIN, R. Controle da requeima em batata cv. 'Asterix' como base para modelos de previsão da doença. *Ciência Rural*, v. 39, p. 393-399, 2009.
- VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L. O Setor de Agroquímicos. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, nº 24, p. 69-96, 2006.

CONCLUSÃO GERAL

Foram sintetizados neste trabalho 13 substâncias, sendo que três delas (**3**, **4** e **5**) ainda não haviam sido descritas na literatura. Os compostos foram preparados empregando-se reações de *orto*-alquilação, acoplamento e adição à ligação dupla que, de modo geral, levaram a formação de substâncias com bons rendimentos. Os testes para avaliação da atividade fungicida realizados com os compostos (**1-7**, **9** e **10**) mostraram que todos foram capazes de inibir a germinação dos esporângios de *P. infestans*. No que se refere aos testes de avaliação de citotoxicidade dos mesmos compostos, apenas duas substâncias (**3** e **4**) apresentaram atividades contra a linhagem de célula melanona B16.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras, os resultados alcançados no teste de avaliação de citotoxicidade com os derivados de ácido cinâmico contendo núcleos isobenzofuranonas, apontam para a possibilidade de avanços do trabalho vinculado a esta dissertação sintetizando-se novos derivados que apresentem variação estrutural no anel de benzeno da porção propenoato do ácido cinâmico. Novos estudos também podem ser realizados com respeito ao impacto de diferentes formulações dos derivados de ácido cinâmico com núcleo isobenzofuranonas sobre a viabilidade celular de células de melanoma. Além disso, estudos *in vivo* podem ser ainda realizados para determinar a viabilidade de utilização destes compostos como possíveis novos quimioterápicos contra o câncer.

Com relação à atividade fungicida dos compostos (**1-7**, **9** e **10**), testes em casa de vegetação deverão ser realizados para avaliar o efeito dos

compostos no que tange ao desenvolvimento da requeima da batata em plantas inoculadas com *P. infestans*.

E por fim, como não foi possível até o presente momento avaliar as atividades fungicida e citotóxica dos compostos **11-13** sintetizados neste trabalho, tem-se como perspectiva futura realizar-se ensaios biológicos dos mesmos para a avaliação das atividades supracitadas.

ANEXOS
ESPECTROS

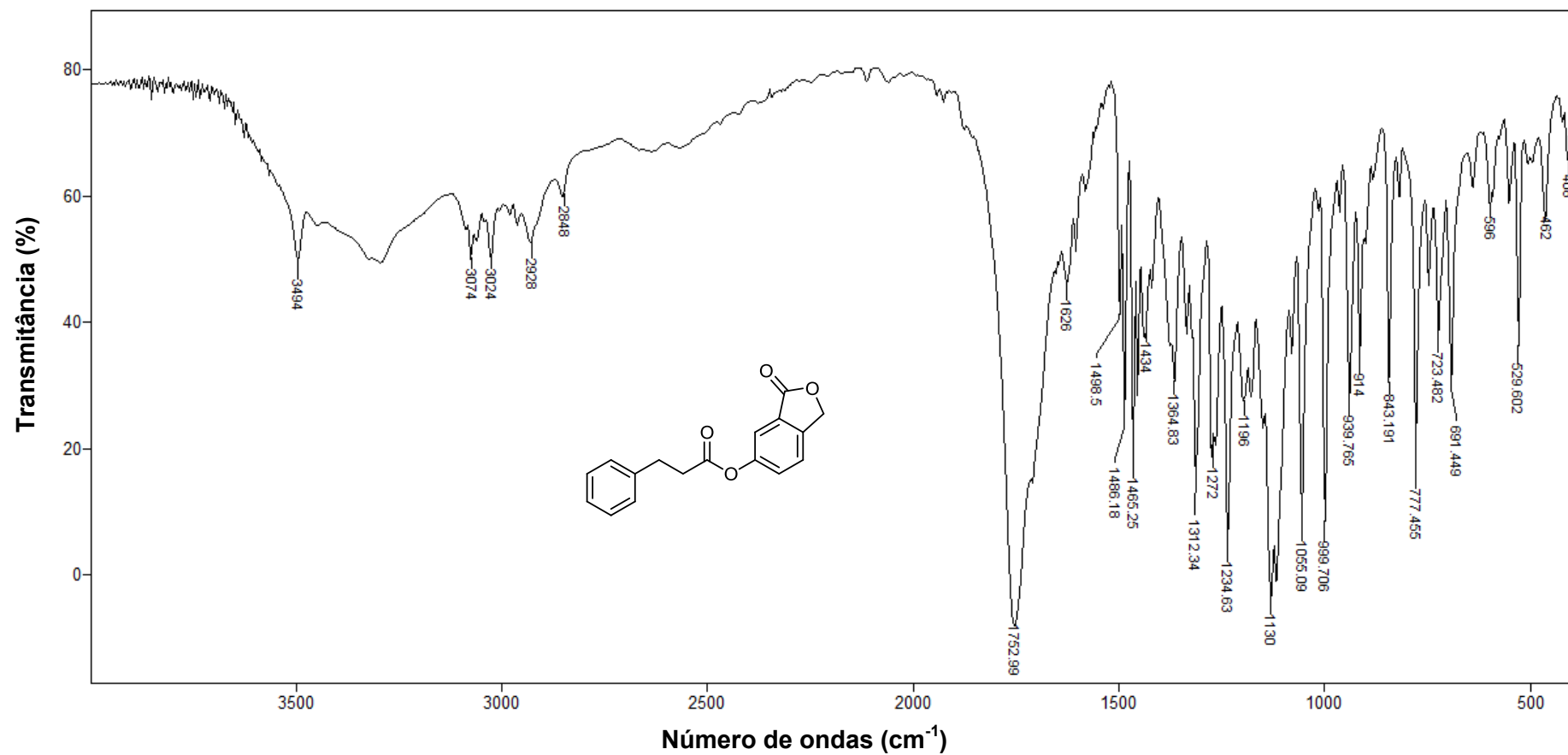


Figura 1 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 5.

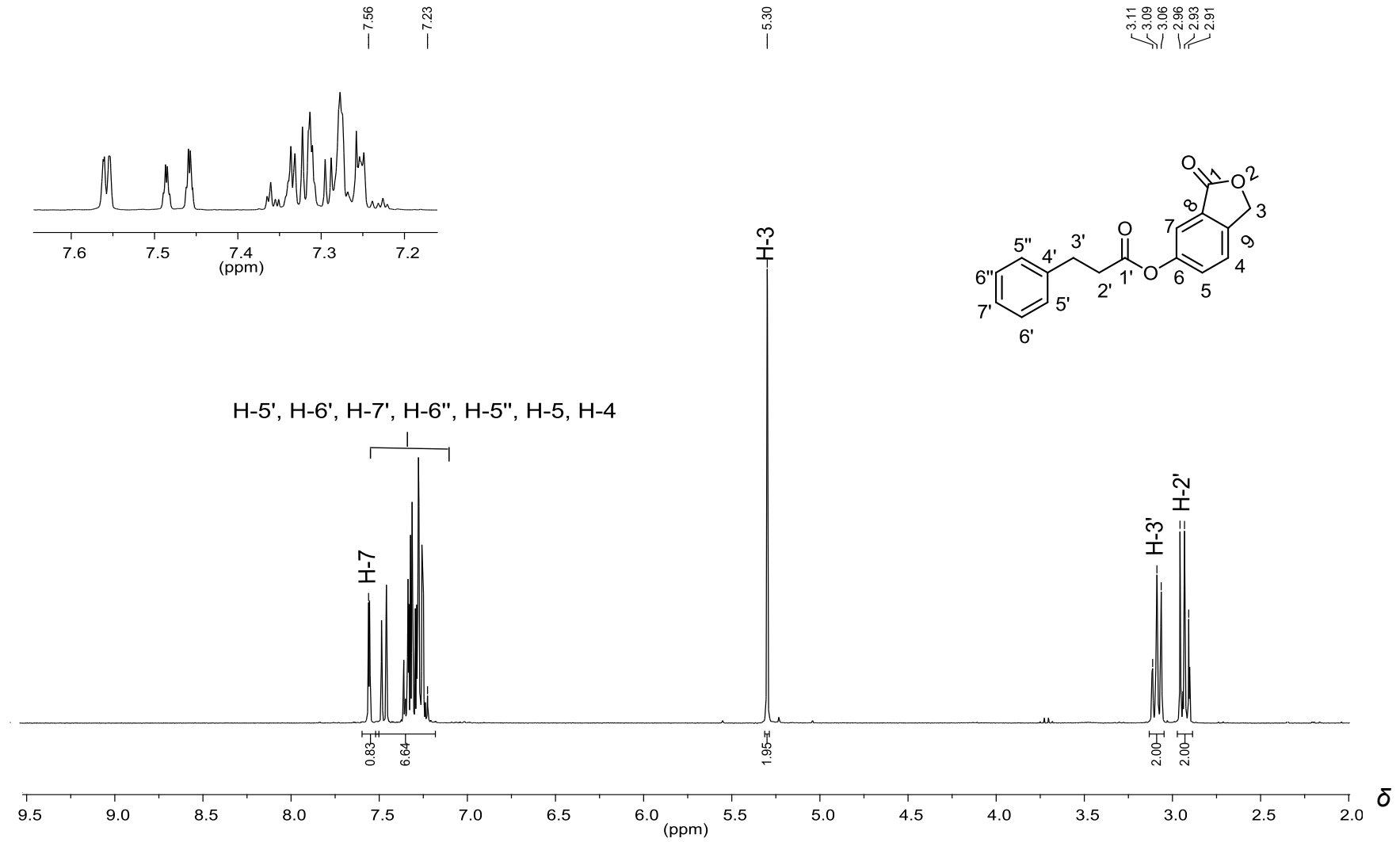


Figura 2 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **5**.

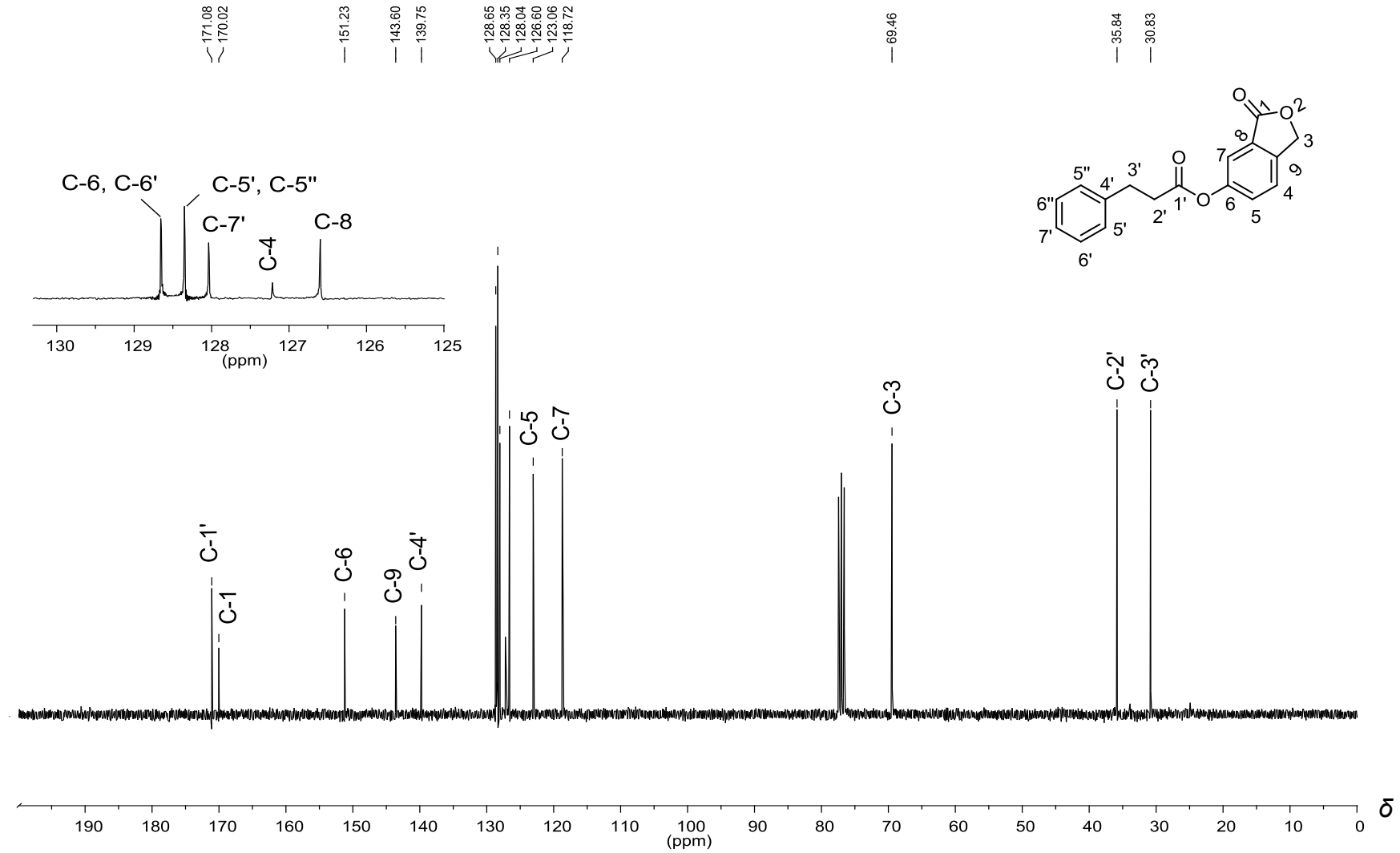


Figura 3 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl₃) do composto **5**

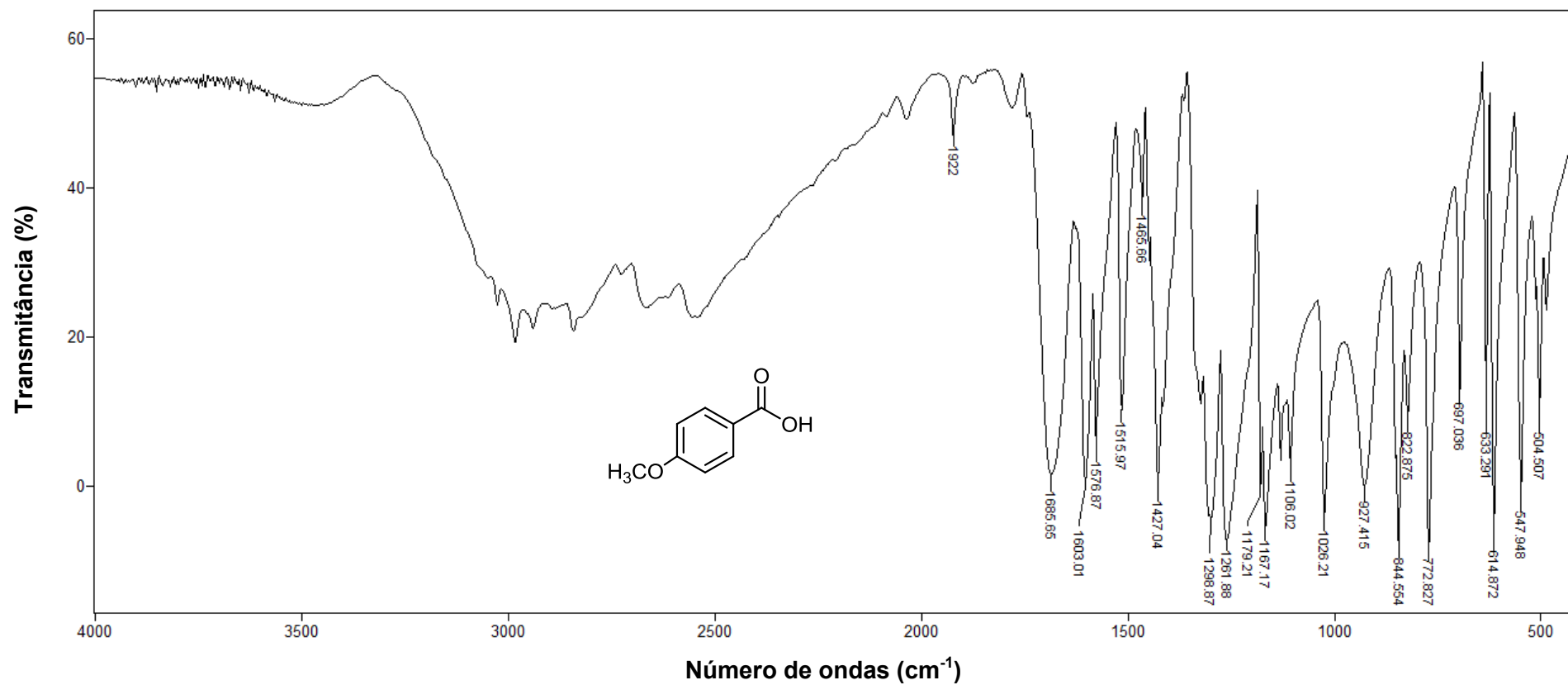


Figura 4 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 8.

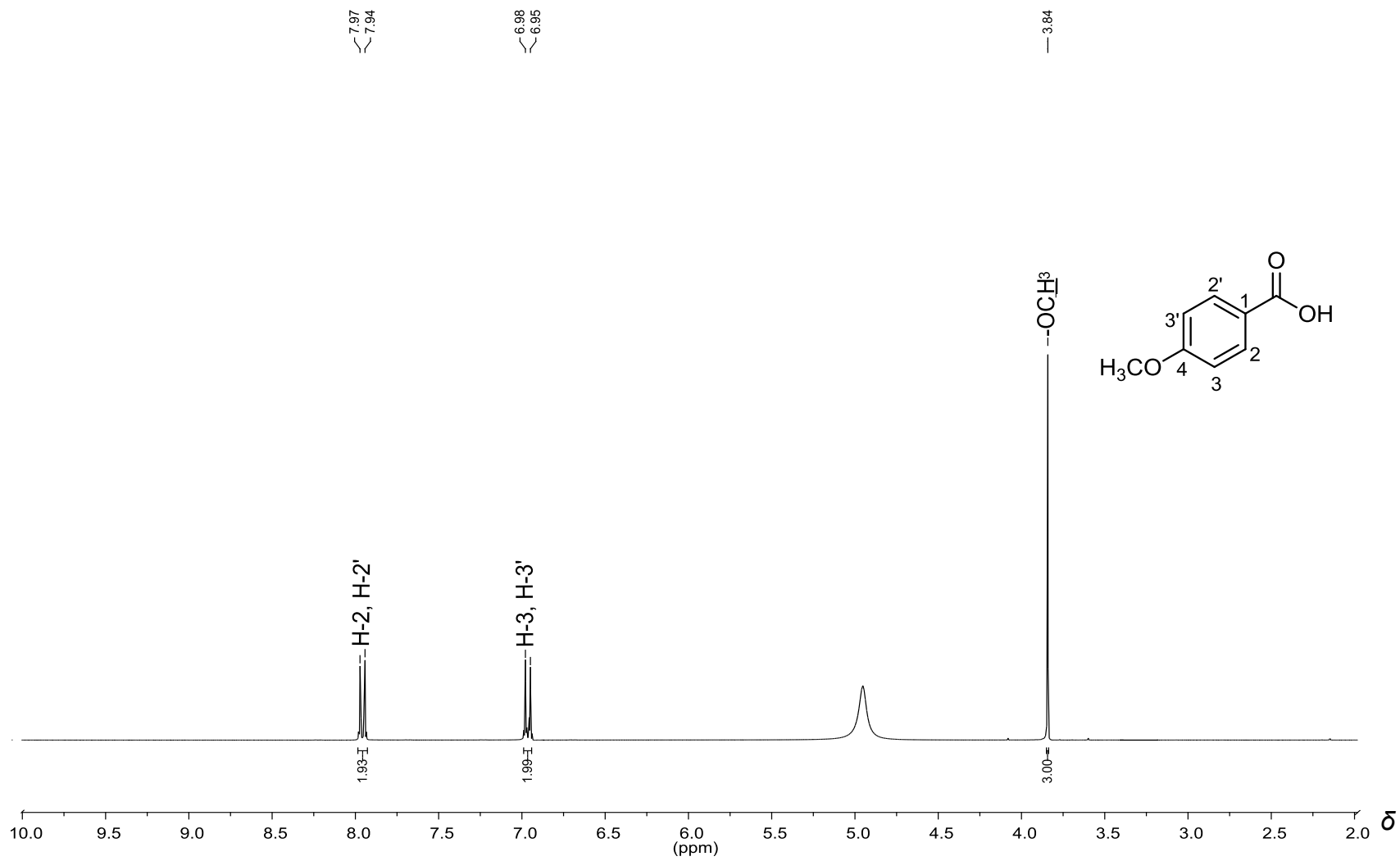


Figura 5 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto **8**.

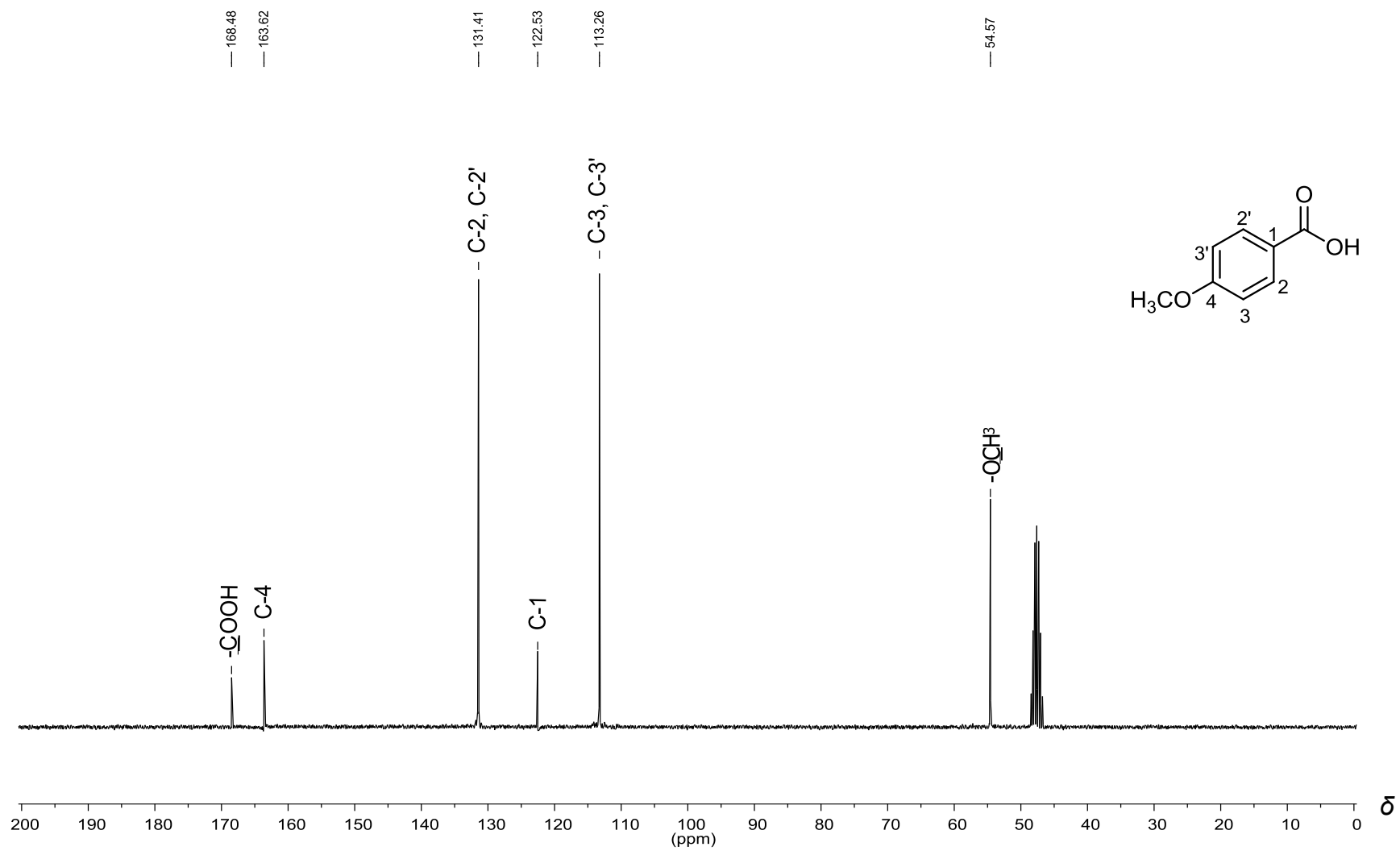


Figura 6 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto **8**.

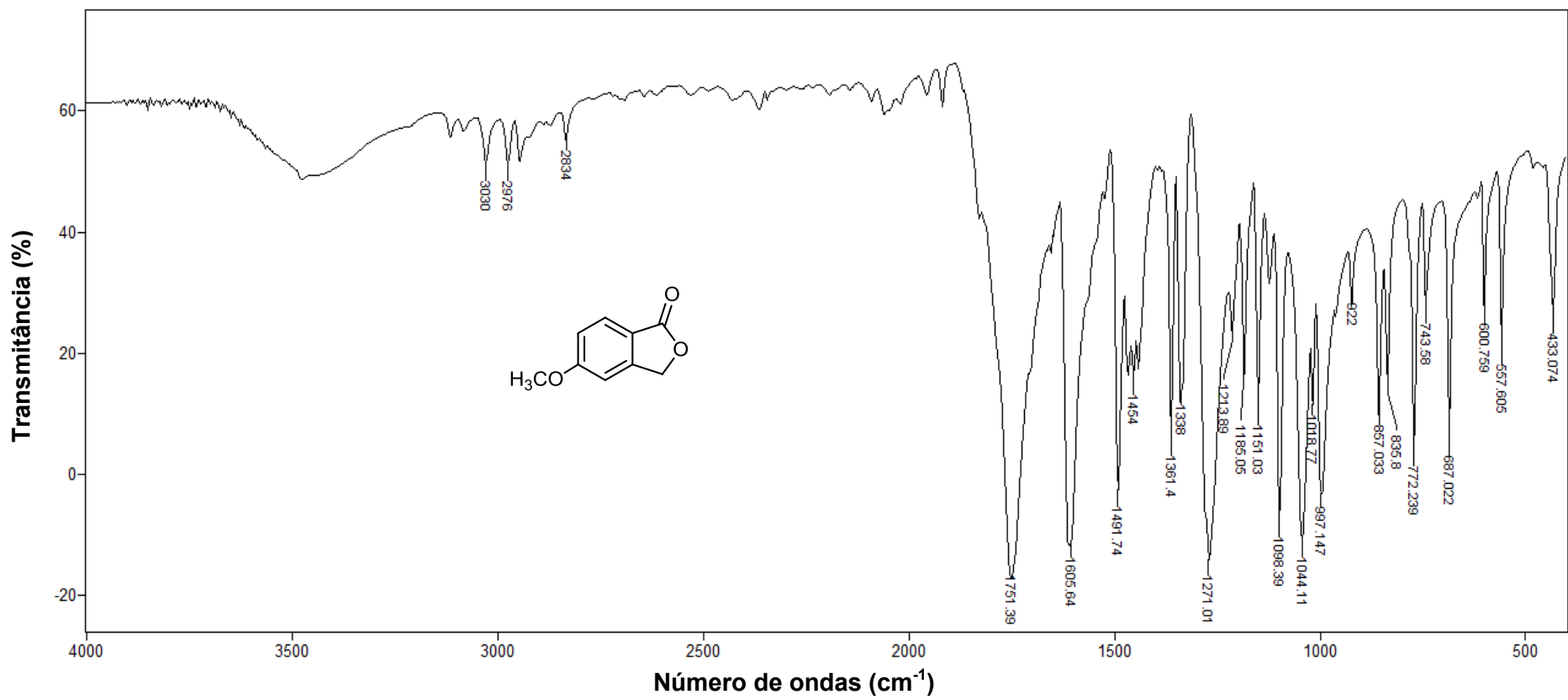


Figura 7 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 9.

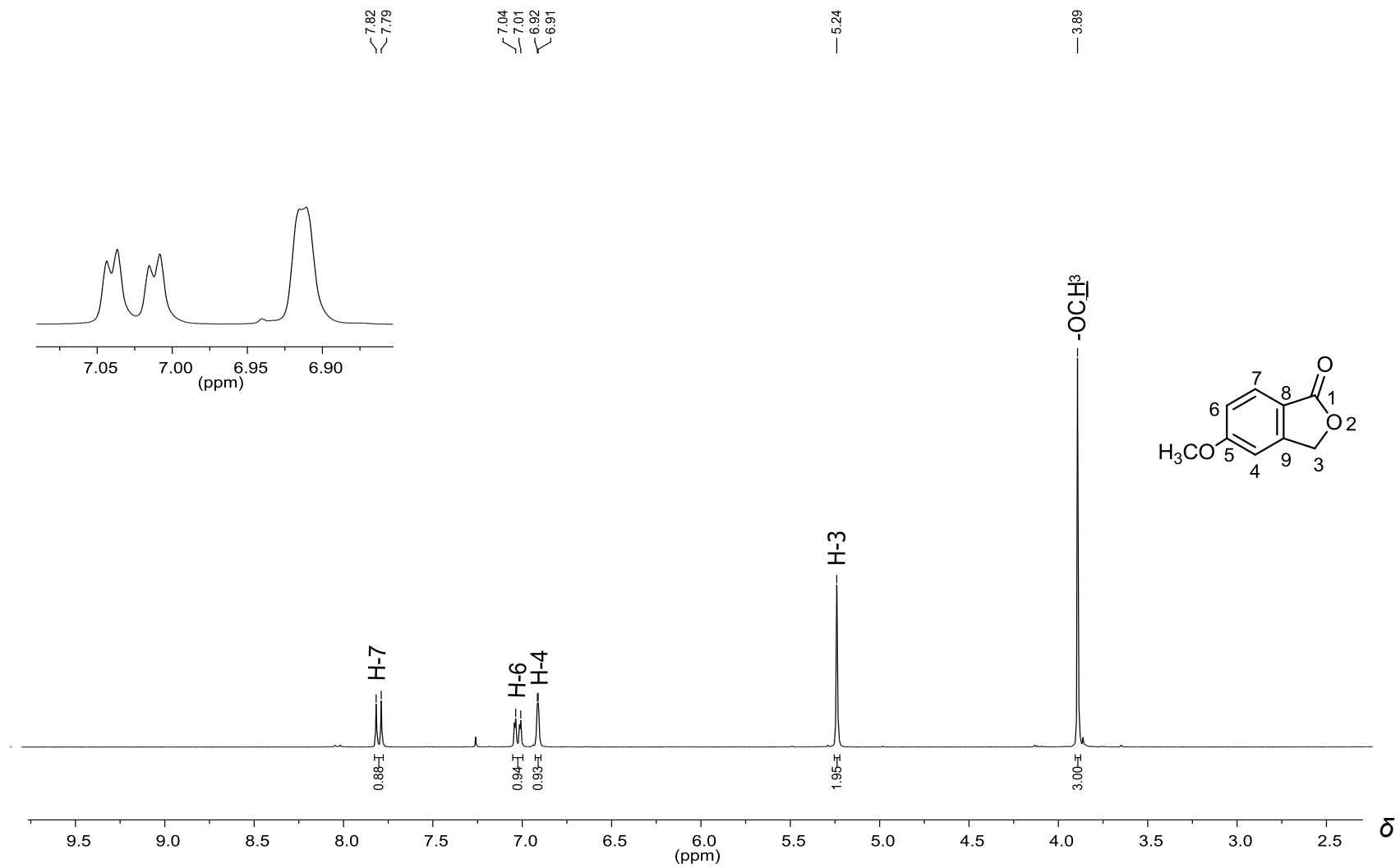


Figura 8 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **9**.

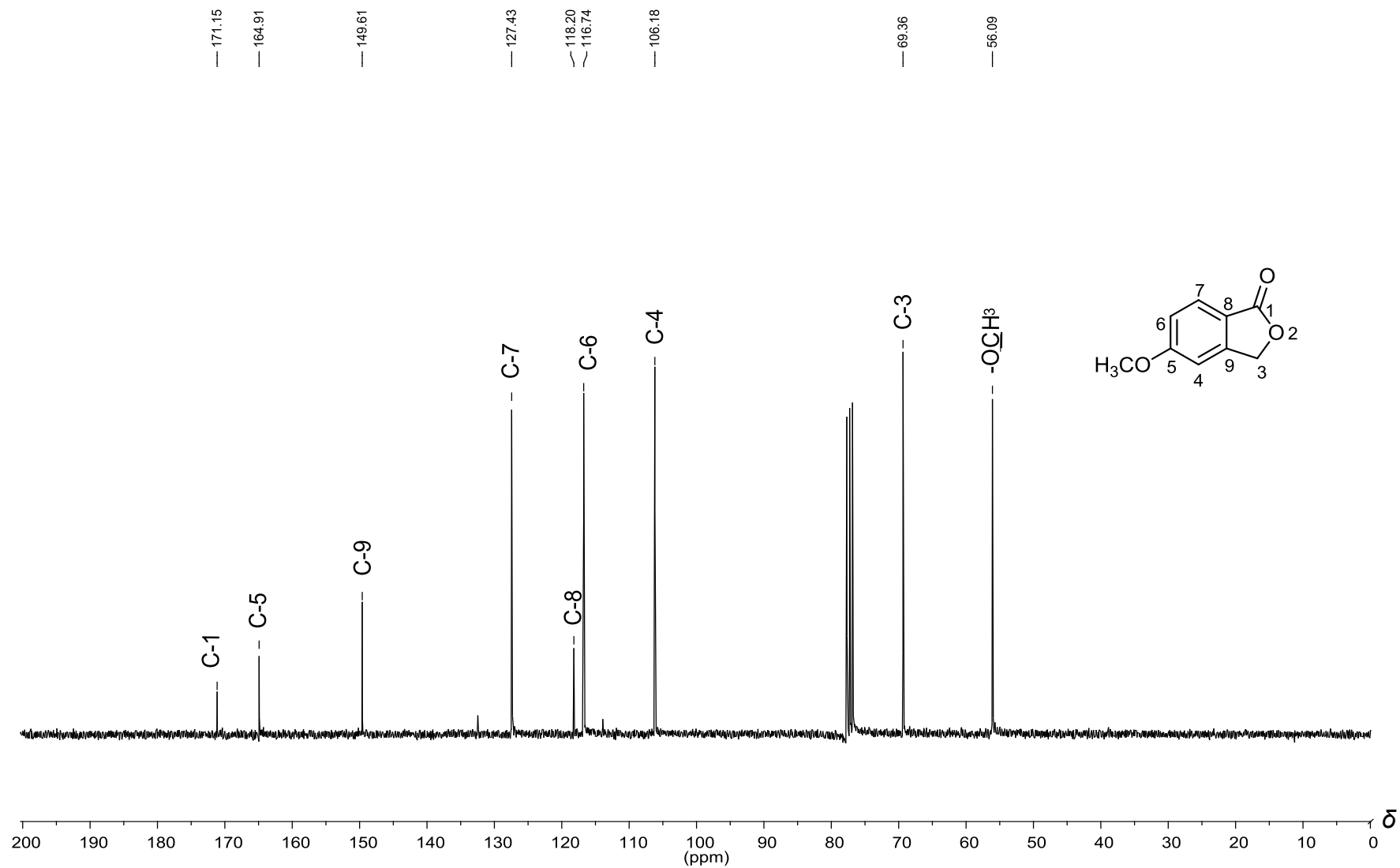


Figura 9 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **9**.

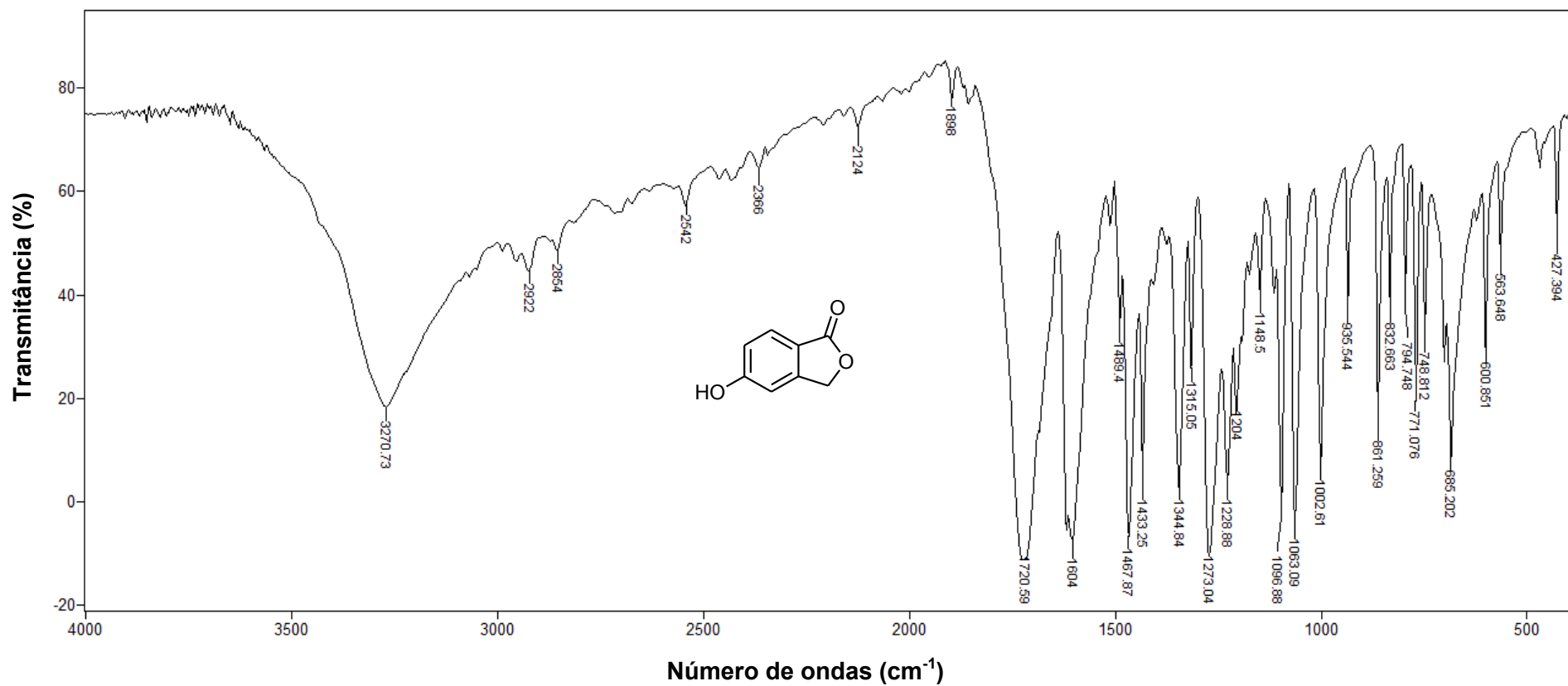


Figura 10 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 11.

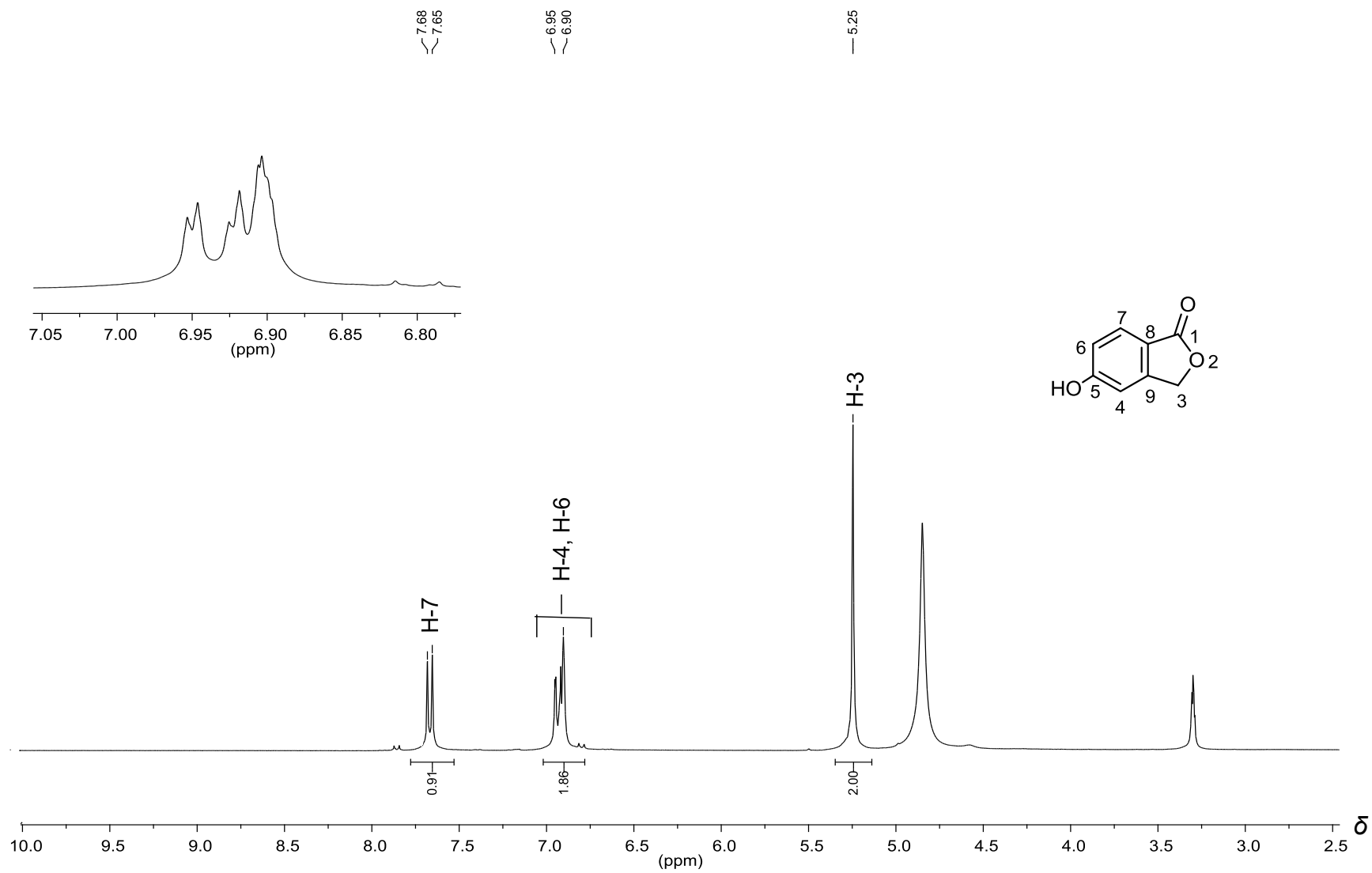


Figura 11 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto **11**.

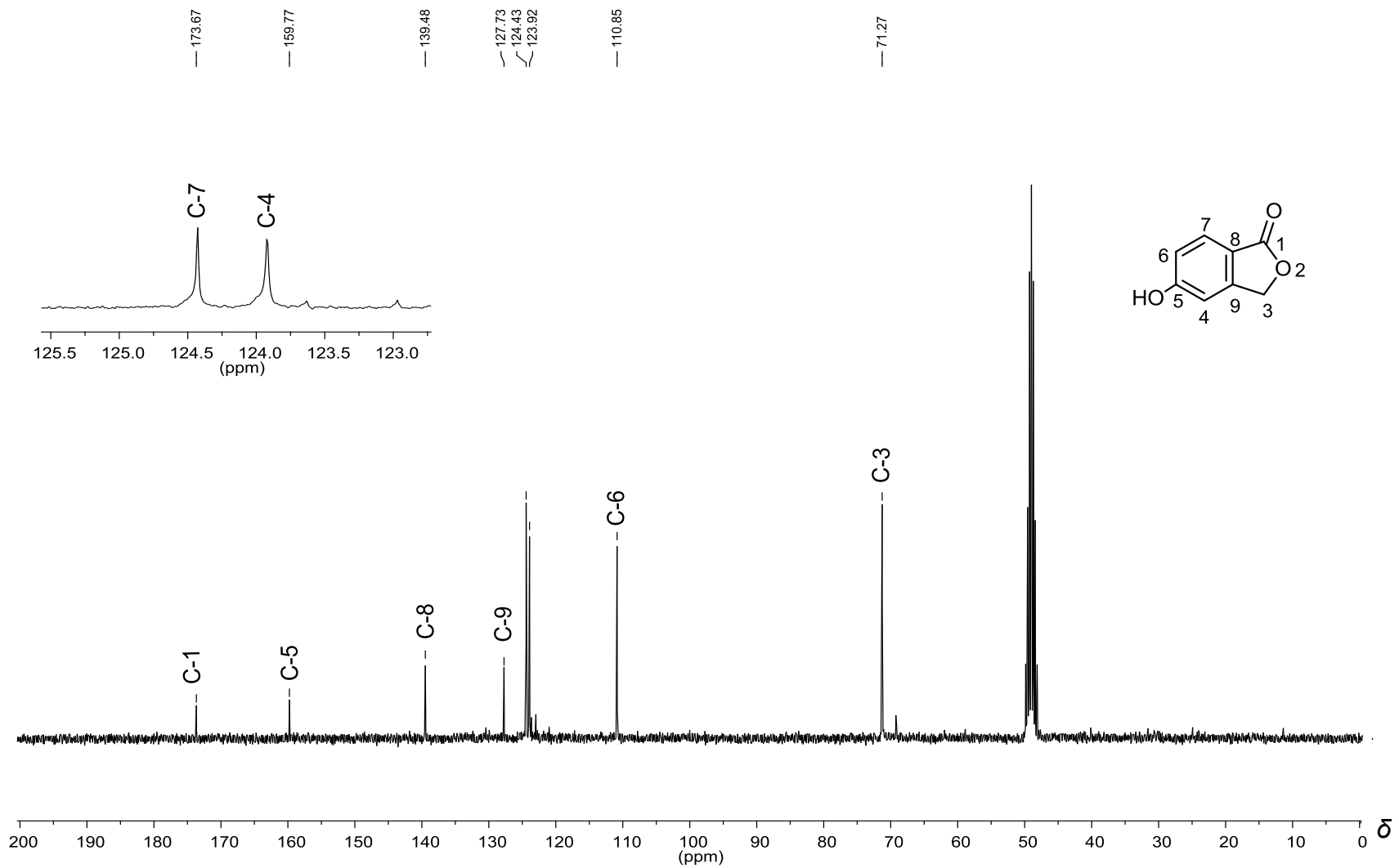


Figura 12 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **11**.

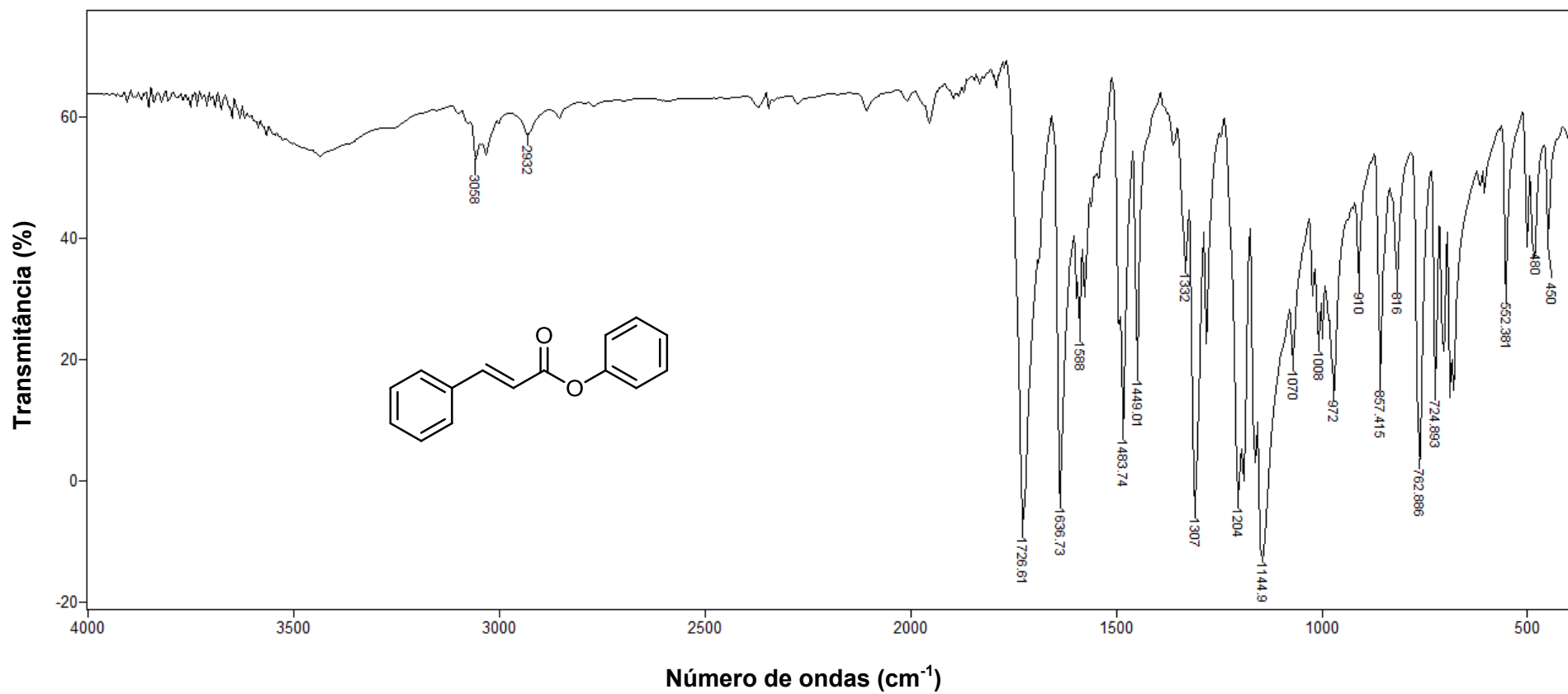


Figura 13 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 12.

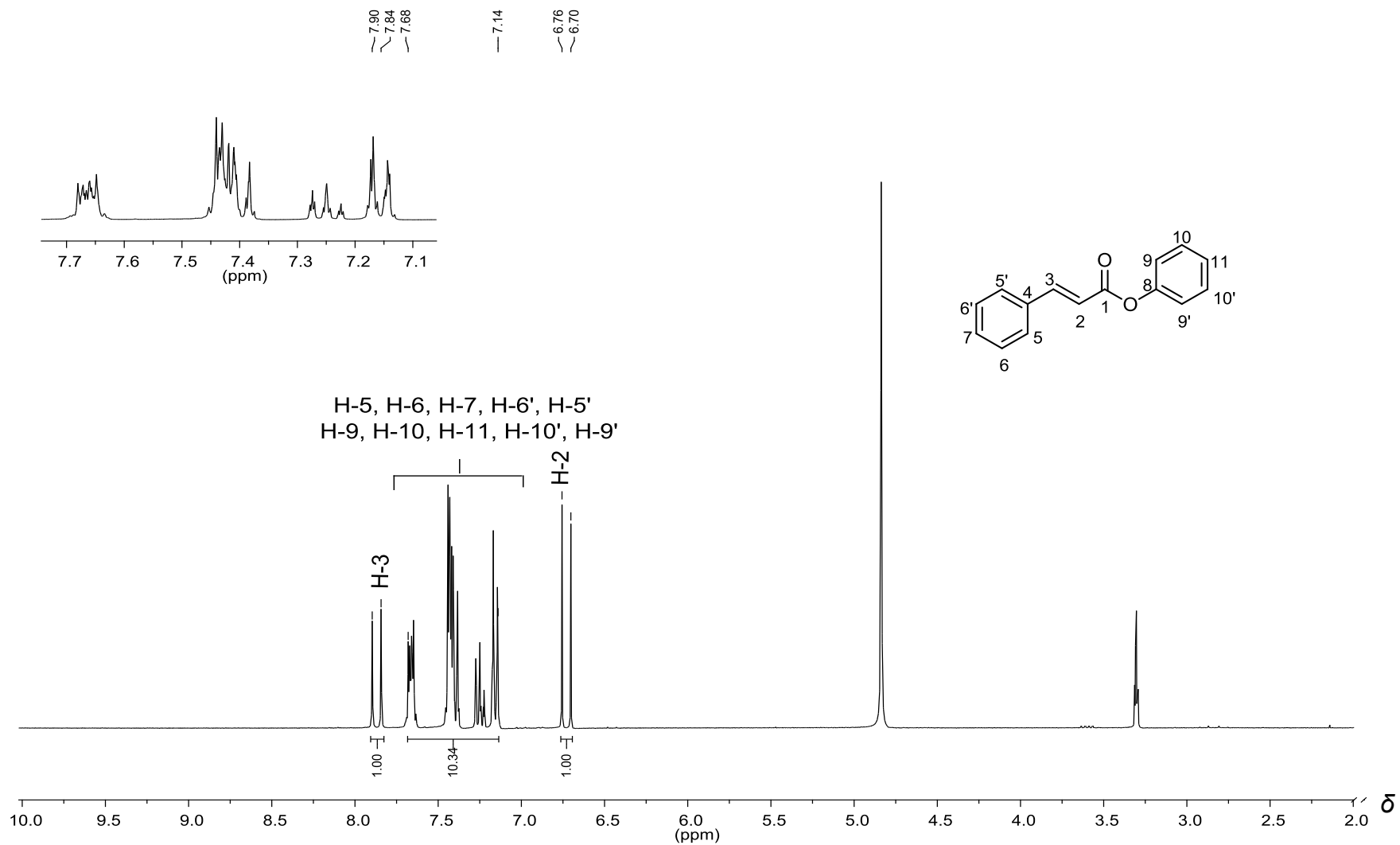


Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto **12**.

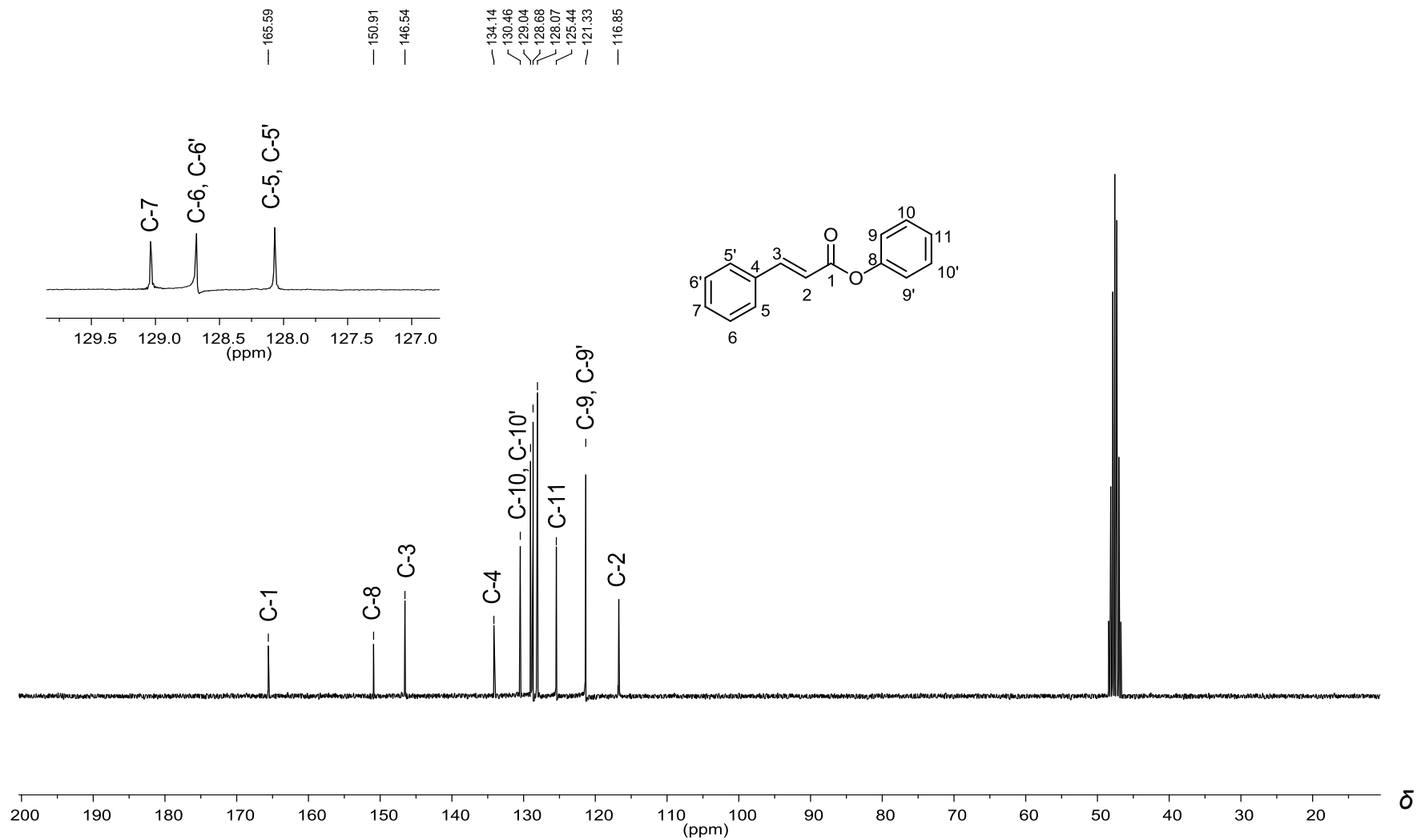


Figura 15 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto **12**.

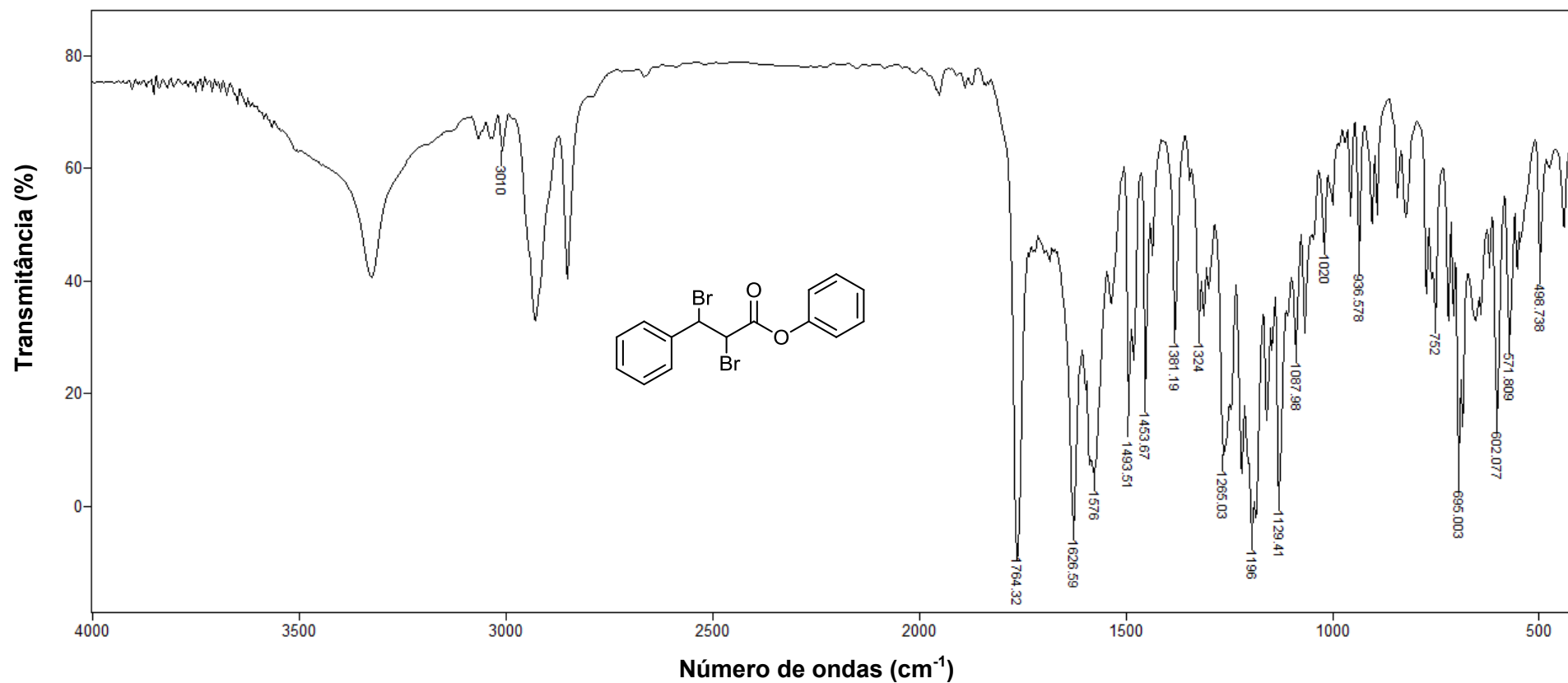


Figura 16 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto 13.

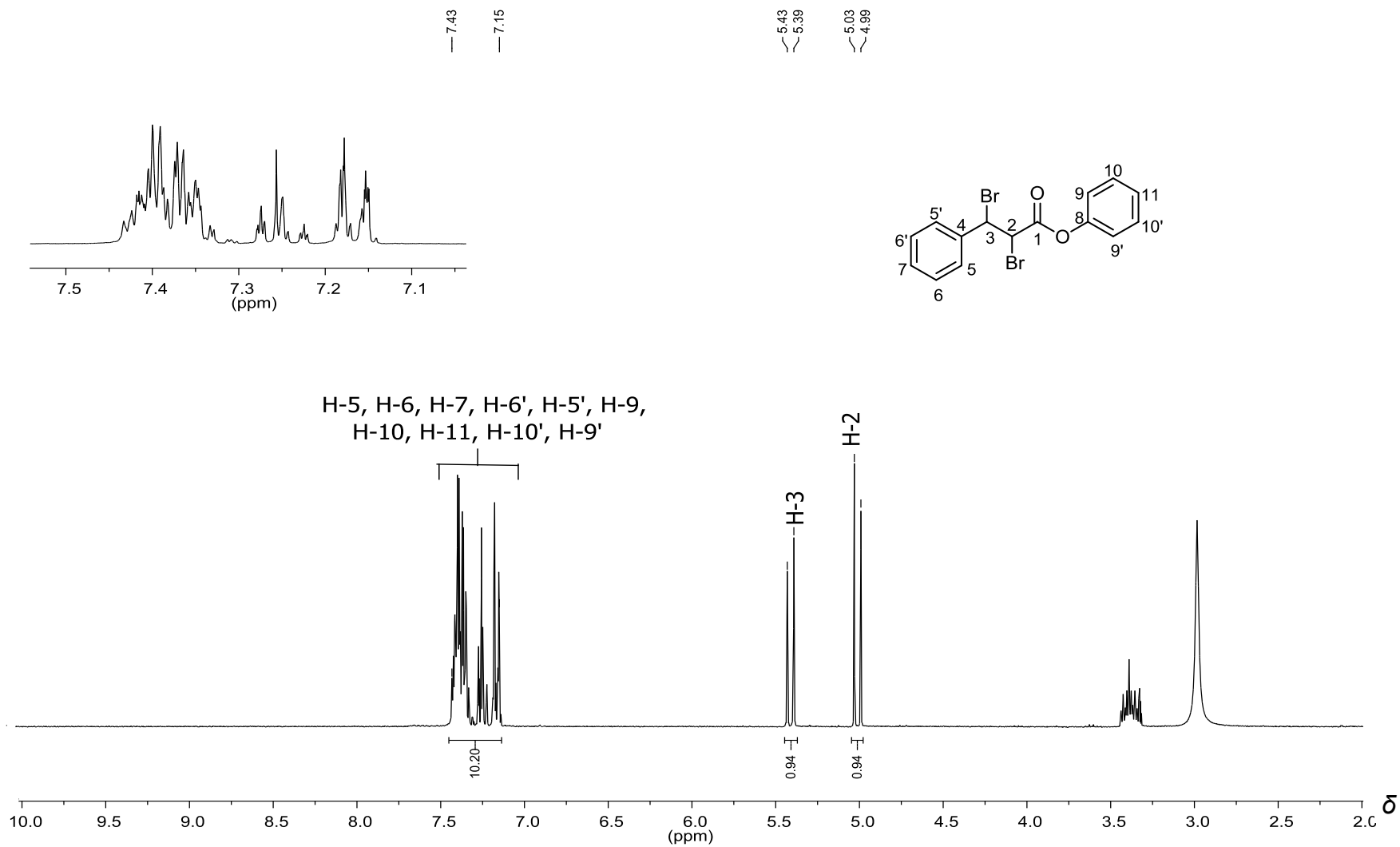


Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto **13**.

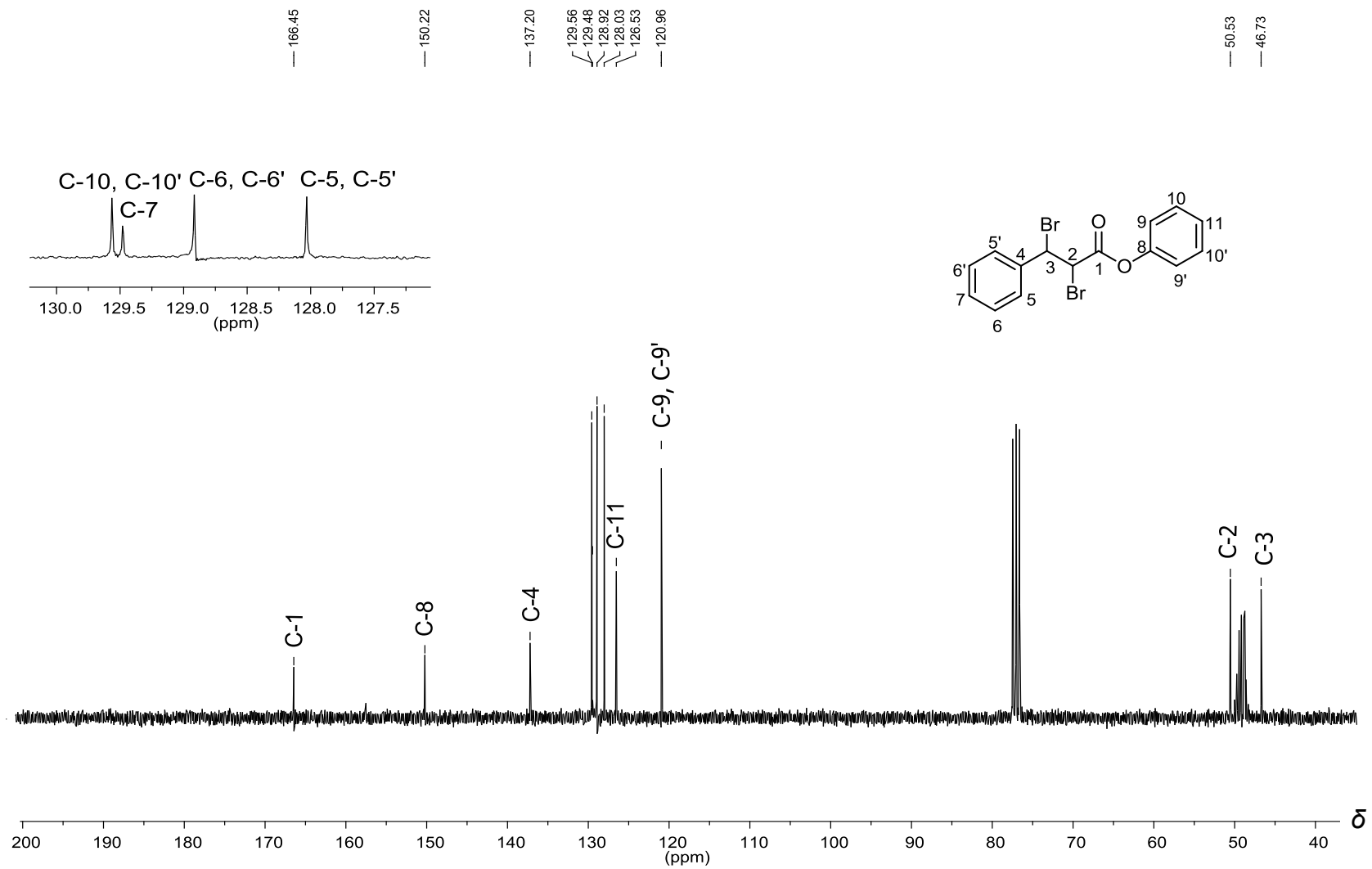


Figura 18 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto **13**.