

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM
NOVO ANÁLOGO AROMÁTICO DO ESTRIGOL**

ANDRÉ JOSÉ ARAÚJO GABRIEL

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM
NOVO ANÁLOGO AROMÁTICO DO ESTRIGOL**

ANDRÉ JOSÉ ARAÚJO GABRIEL

sob a orientação do professor

Dr. MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA

*Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de*
Mestre em Ciências
Área de concentração em
Química Orgânica

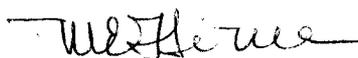
Seropédica, Rio de Janeiro
Setembro, 1999

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM NOVO
ANÁLOGO AROMÁTICO DO ESTRIGOL**

por

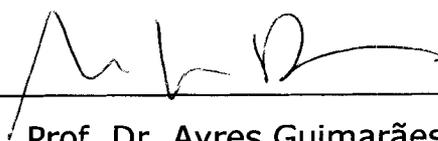
ANDRÉ JOSÉ ARAÚJO GABRIEL

APROVADA EM: 23/09/1999.



Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima - Presidente

(DEQUIM- UFRRJ)



Prof. Dr. Ayres Guimarães Dias

(UERJ)



Prof. Dr. João Batista Neves da Costa

(DEQUIM - UFRRJ)



Profa Dra. Rosane Nora Castro - Suplente

(DEQUIM - UFRRJ)

***Agradeço este trabalho a Deus,
e o dedico aos meus pais
Leandro e Idalma
e minhas irmãs Andréa e Adriana.***

***A glória dos lutadores é a honra do serviço,
e a sua auréola o suor do dever.***

Amélia Rodrigues

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marco Edilson Freire de Lima por ter concedido-me a oportunidade de trabalho, pela orientação e pelas sempre úteis sugestões na execução deste projeto.

À professora Rosane Nora Castro pela presença constante, pelo estímulo, sugestões, amizade e por ter aceito o convite de participar da banca examinadora.

Ao professor João Batista Neves da Costa pela ajuda na execução de parte deste trabalho e por ter aceito o convite de participar da banca examinadora.

Ao professor Ayres Guimarães Dias, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, por ter aceito o convite de participar da banca examinadora.

Aos professores Mário Geraldo de Carvalho, Áurea Echevarria, Carlos Maurício Sant'Anna, Anselmo Alpande e Leonor Leon pelas aulas ministradas no mestrado e pelo conhecimento transmitido.

À professora Sônia Regina de Souza pela execução dos testes biológicos de *Lactuca sativa* L. e pelo conhecimento transmitido.

À aluna de doutorado Tânia Silva pela execução dos testes de *Artemia salina*, Leach.

À pesquisadora Vivian Rumjanek e à aluna Clarice Clark, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela execução dos testes de atividade antitumoral.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade oferecida e à CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários do Departamento de Química da UFRRJ: Áurea Tatagiba, Fábio, Conceição, Maurício, Osmar, Reginaldo e Eli.

Ao Olegário Fernandes pela ajuda inestimável e amizade.

Aos amigos Ana Paula, Roberto, Frances, Andressa, Janaína, Lucilene, Cristina, Heloísa, Paulo, Denise, Raquel, Margareth, Edson, Dari, Astrid, Cássia, Jadier, Clara, Juracy e Helena por muito a agradecer: a ajuda, o apoio, o companheirismo e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

À minha grande amiga de todos os dias Rosane Fontes por ter proporcionado momentos muito felizes e por ser tão especial.

À Andréa Luzia pelo carinho, apoio e por nossa amizade eterna.

Aos meus imprescindíveis amigos de Minas. por terem sempre compreendido a ausência e por incentivarem-me mesmo de longe.

A DEUS por ter sempre a agradecer.

BIOGRAFIA

André José Araújo Gabriel nasceu em 30 de julho de 1972 na cidade de Além Paraíba, M.G., filho de Leandro Gabriel e Idalma de Araújo Gabriel.

Graduou-se em Engenharia Química no ano de 1997 pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Durante a graduação trabalhou com pesquisa de catalisadores de zeólitas, foi monitor da disciplina Métodos matemáticos, no Instituto de Engenharia e bolsista de iniciação científica do CNPq, no Instituto de Ciências Exatas.

SUMÁRIO

Índice de espectros e cromatogramas	xii
Índice de esquemas	xv
Índice de figuras	xvii
Índice de tabelas e gráficos	xix
Abreviaturas e símbolos	xxi
Resumo	xxiii
Abstract	xxiv
Capítulo 1 - Introdução	
1.1 - Interação alelopática e mecanismo haustoria	
1.2 - Estrigol: um sinalizador químico para a germinação	
1.3 - As estrigolactonas	
1.4 - Aplicações do estrigol	
1.4.1 - Uso como herbicida	10
1.4.2 - Análogos e compostos relacionados ao estrigol	13
1.4.3 - Sementes com dormência	24
1.5 - Mecanismo de ação	
1.5.1 - Mecanismo de estímulo biológico	26
1.5.2 - Mecanismo de estímulo químico	28
1.6 - Sínteses do estrigol	32
1.7 - Atividade citotóxica/antitumoral das lactonas α,β -insaturadas	35
Capítulo 2 - Objetivos	41
Capítulo 3 - Resultados e discussão	
3.1 - Metodologia sintética	45
3.2 - Obtenção do isosafrol 53	48
3.3 - Obtenção da indanona 52	50
3.4 - Obtenção do ceto-éster 51	56
3.5 - Obtenção da lactona 51	60
3.6 - Obtenção do enol 49	65
3.7 - Obtenção do bromobutenolídeo 32	75

3.8 - Obtenção do análogo aromático do estrigol 48	80
3.9 - Separação dos epímeros de 48	86
3.10 - Teste da estabilidade do análogo 48 em solução aquosa	87
3.11 - Obtenção dos derivados alquílicos de 49	88
3.12 - Resultados dos testes biológicos	
3.12 - Ensaio de germinação com sementes de <i>Lactuca sativa</i> L.	89
3.12 - Ensaio de letalidade sobre <i>Artemia salina</i> , Leach	92
Capítulo 4 - Conclusão	94
Capítulo 5 - Materiais e Métodos	
5.1 - Especificação de materiais e equipamentos	96
5.2 - Parte experimental	
5.2.1 - Preparação do 6,7-metilenodioxo-propenilbenzeno 53	99
5.2.2 - Preparação da 2-metil-(5,6-metilenodioxo)-indanona 52	101
5.2.3 - Preparação da (2-metil-2-metilenocarboxietil-5,6-metilenodioxo)-indanona 51	104
5.2.4 - Preparação do 3a-metil-6,7-metilenodioxo-2(3H)indano-furanona 50	107
5.2.5 - Preparação do 3a-metil-3-metilideno-9Z-hidroxi-6,7-metilenodioxo-2-indanofuranona 49	110
5.2.6 - Preparação do 2-bromo-4-metilbut-3-en-2-ídeo 32	113
5.2.7 - Preparação do [3a-metil-3-eten-9E-(4'-metilbut-4'-en-2'-ídeo)-6,7-metilenodioxo]-2-indanofuranona 48	114
5.2.8 - Separação dos diastereoisômeros do novo análogo 48	116
5.2.9 - Preparação de (3a-metil-3-metilideno-9E-metoxi-tetra-6,7-metilenodioxo)-2-indanofuranona 80 e (3a-metil-3-metilideno-9E-etoxi-6,7-metilenodioxo)-2-indanofuranona 81	120
5.3 - Testes biológicos	
5.3.1 - Ensaio de germinação com sementes de <i>Lactuca Sativa</i> , L.	125
5.3.2 - Ensaio de citotoxicidade com <i>Artemia Salina</i> , Leach	126
Referências bibliográficas	128
Espectros e cromatogramas	144

ÍNDICE DE ESPECTROS E CROMATOGRAMAS

Espectro 1: Espectro de IV para o isosafrol 53	145
Espectro 2: Espectro de RMN ¹ H para o isosafrol 53 em CDCl ₃	146
Espectro 3: Expansão do espectro de RMN ¹ H para o isosafrol 53	147
Espectro 4: Experimento de HOMOCOSY para o isosafrol 53 em CDCl ₃	148
Espectro 5: Espectro de RMN ¹³ C totalmente desacoplado para o isosafrol 53 em CDCl ₃	149
Espectro 6: Espectro de RMN ¹³ C e DEPT com $\phi = 90^\circ$ e $\phi = 135^\circ$ para o isosafrol 53 em CDCl ₃	150
Espectro 7: Experimento de HETCOR para o isosafrol 53 em CDCl ₃	151
Espectro 8: Espectro de massas para o isosafrol 53	152
Espectro 9: Espectro de IV para a indanona 52	153
Espectro 10: Espectro de RMN ¹ H para a indanona 52 em CDCl ₃	154
Espectro 11: Expansão do espectro de RMN ¹ H para a indanona 52	155
Espectro 12: Espectro de RMN ¹³ C totalmente desacoplado para a indanona 52 em CDCl ₃	156
Espectro 13: Espectro de massas para a indanona 52	157
Espectro 14: Espectro de IV para o ceto-éster 51	158
Espectro 15: Espectro de RMN ¹ H para o ceto-éster 51 em CDCl ₃	159
Espectro 16: Expansão do espectro de RMN ¹ H para o ceto-éster 51	160
Espectro 17: Espectro de RMN ¹³ C totalmente desacoplado para o ceto-éster 51 em CDCl ₃	161
Espectro 18: Espectro de massas para o ceto-éster 51	162
Espectro 19: Espectro de IV para a lactona 50	163
Espectro 20: Espectro de RMN ¹ H para a lactona 50 em CDCl ₃	164
Espectro 21: Espectro de RMN ¹³ C totalmente desacoplado para a lactona 50 em CDCl ₃	165
Espectro 22: Espectro de massas para a lactona 50	166
Espectro 23: Espectro de IV para o enol 49	167

Espectro 24: Espectro de RMN ¹ H para o enol 49 em DMSO-d ₆	168
Espectro 25: Experimento de HOMOCOSY para o enol 49 em DMSO-d ₆	169
Espectro 26: Espectro de RMN ¹³ C totalmente desacoplado para o enol 49 em DMSO-d ₆	170
Espectro 27: Espectro de RMN ¹³ C e DEPT com $\phi = 90^\circ$ e $\phi = 135^\circ$ para o enol 49 em DMSO-d ₆	171
Espectro 28: Experimento de HETCOR para o enol 49 em DMSO-d ₆	172
Espectro 29: Espectro de massas para o enol 49	173
Espectro 30: Espectro de IV para o bromobutenolídeo 32	174
Espectro 31: Espectro de RMN ¹ H para o bromobutenolídeo 32 em CDCl ₃ .	175
Espectro 32: Espectro de IV para o análogo 48	176
Espectro 33: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) para o análogo 48 (mistura em C2') em CDCl ₃	177
Espectro 34: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz) para o análogo 48 (mistura em C2') em CDCl ₃	178
Espectro 35: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) para o análogo 48 (<i>DI</i>) em CDCl ₃	179
Espectro 36: Espectro de RMN ¹³ C (50,3 MHz) para o análogo 48 (<i>DI</i>) em CDCl ₃	180
Espectro 37: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) para o análogo 48 (<i>DII</i>) em CDCl ₃	181
Espectro 38: Espectro de RMN ¹³ C (50,3 MHz) totalmente desacoplado para o análogo 48 (<i>DII</i>) em CDCl ₃	182
Espectro 39: Experimento de HOMOCOSY para o análogo 48 em CDCl ₃	183
Espectro 40: Experimento de HETCOR para o análogo 48 em CDCl ₃	184
Espectro 41: Espectro de UV para o análogo 48 em metanol	185
Espectro 42: Espectro de massas para o análogo 48	186
Espectro 43: Espectro de IV para o enol metilado 80	187
Espectro 44: Espectro de RMN ¹ H para o enol metilado 80 em CDCl ₃	188
Espectro 45: Espectro de RMN ¹³ C totalmente desacoplado para o enol metilado 80 em CDCl ₃	189

Espectro 46: Experimento de nOe para o enol metilado 80 em CDCl ₃	190
Espectro 47: Espectro de massas para o enol metilado 80	191
Espectro 48: Espectro de IV para o enol etilado 81	192
Espectro 49: Espectro de RMN ¹ H para o enol etilado 81 em CDCl ₃	193
Espectro 50: Espectro de RMN ¹³ C totalmente desacoplado para o enol etilado 81	194
Espectro 51: Espectro de massas para o enol etilado 81	195
Cromatograma 1: Análogo 48 em coluna C ₈ e fase móvel acetonitrila- água (45:55)	196
Cromatograma 2: Análogo 48 em coluna C ₁₈ e fase móvel metanol- água (70:30)	197
Cromatograma 3: Análogo 4-8 em coluna de sílica e fase móvel hexano- acetato de etila (65 a 75%)(coluna analítica)	198
Cromatograma 4: Análogo 4-8 em coluna de sílica e fase móvel hexano- acetato de etila (65 a 75%) (coluna semipreparativa)	199

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1:	Mecanismo de ação molecular proposto para a atividade do estrigol e seus análogos	30
Esquema 2:	Seqüência para obtenção do estrigol a partir do intermediário lactônico 30	34
Esquema 3:	Exemplos de obtenção de moléculas complexas a partir do safrol	42
Esquema 4:	Novo análogo aromático 48 obtido a partir do safrol 44	44
Esquema 5:	Análise retrossintética para o análogo, aromático 48 a partir do safrol 44	47
Esquema 6:	Reação de isomerização do safrol 44 catalisada por base	49
Esquema 7:	Reação de construção do esqueleto do tipo indanona a partir do substrato 54	51
Esquema 8:	Tentativa de obtenção do esqueleto do indanônico 56 a partir do safrol 44 usando o complexo do tipo π -alilpaládio	51
Esquema 9:	Formação do intermediário de Vielsmeyer-Haack 57	52
Esquema 10:	Mecanismo proposto para a formação da indanona 52	54
Esquema 11:	Conformações dos intermediários formados a partir da reação do isosafrol 53 com o reativo de VH 57	55
Esquema 12:	Reação de alquilação na obtenção do ceto-éster 51	59
Esquema 13:	Proposta de mecanismo para a lactonização do ceto-éster 51	63
Esquema 14:	Reação de abertura da lactona 71, dando somente o produto <i>trans</i>	64
Esquema 15:	Formação do produto de formilação da lactona 50	66
Esquema 16:	Possível mecanismo para a interconversão tautomérica do composto 49 com formação de ligação hidrogênio	70
Esquema 17:	Proposta mecanística para a formação, do radical 75	72

	aromático na reação de formação do bromobutenolídeo 32	
Esquema 18:	Metodologia sintética proposta por Johnson <i>et al.</i> para a obtenção do butenolídeo 74	77
Esquema 19:	Obtenção do butenolídeo partir da α -metil- γ -butirolactona	77
Esquema 20:	Obtenção do bromobutenolídeo 32 proposta por Mangnus <i>et al</i>	78
Esquema 21:	Obtenção do novo análogo aromático 48	80
Esquema 22:	Proposta de mecanismo para a formação dos enolatos 49a e 49b	82
Esquema 23:	Fragmentação do análogo 48 para formação do pico base (m/z 97)	83
Esquema 24:	Seqüência sintética desenvolvida para a obtenção do novo análogo aromático do estrigol 48	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura do (+)-estrigol 1, com a estereoquímica do composto natural assinalada	4
Figura 2:	Estrutura do sorgolactona 2, isolada do exudato de raízes do sorgo	6
Figura 3:	Estrutura da sorgoleona 3 e da diidrosorgoleona 4	8
Figura 4:	Estruturas propostas para o alectrol 5	9
Figura 5:	Compostos relacionados ao anel A do estrigol ativos na germinação de <i>Orobanche ramosa</i>	15
Figura 6:	Compostos relacionados ao anel D do estrigol utilizados na germinação de <i>Striga asiatica</i>	16
Figura 7:	Estrutura do compostos do tipo GR, análogos do estrigol	17
Figura 8:	Estrutura do estrigol mostrando a ponte metileneoxi (quadrado) e o grupamento carbonila lactônica conjugado com porção etileno (círculo)	18
Figura 9:	Estrutura da 3-oxibutenolídeo-metileneindalinona	18
Figura 10:	Obtenção do Nijmegen 1 (15) a partir da ftaloil-glicina(114)	19
Figura 11:	Estrutura de algumas lactonas sesquiterpênicas	20
Figura 12:	Estrutura dos compostos do tipo germacranolídeos e eudesmanolídeos, estudados quanto a germinação de sementes de <i>Striga asiatica</i>	22
Figura 13:	Estrutura do ácido giberelínico	25
Figura 14:	Estrutura dos análogos 25 e 26	29
Figura 15:	Modelo estrutural para o esqueleto básico dos compostos estimulantes de germinação de sementes	32
Figura 16:	Síntese de Sih e cols. para o estrigol	33
Figura 17:	Indutor de Feringa com o sinton quiral (butenolídeo) e	35

um outro indutor de quiralidade usado em síntese assimétrica do estrigol

- Figura 18:** Estrutura de algumas lactonas sesquiterpênicas que apresentam atividade citotóxica/antitumoral 38
- Figura 19:** Estrutura do 17-acetilacuminólídeo 42a e acuminólídeo 42b 39
- Figura 20:** Estrutura das β -alcoxi- α -metileno- γ -butirolactonas 43a e 43b 40
- Figura 21:** Compostos do tipo pirroloquinolinas, preparadas a partir do safrol 43
- Figura 22:** Tautomerismo ceto-enólico da porção β -dicarbonílica para os intermediários 49 e 73 69
- Figura 23:** Possibilidade de tautomerismo ceto-enólico para a porção lactônica do intermediário 49 75
- Figura 24:** Atribuições de RMN ^1H para o bromobutenólídeo 32 79
- Figura 25:** Experimento de nOe para o derivado alquílico 80 89

ÍNDICE DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1:	Principais espécies do gênero <i>Striga</i> e <i>Orobanche</i>	3
Tabela 2:	Variação do calor de formação com ângulo diedro do intermediário na forma aldeídica 73 e na forma enólica 49.	73
Tabela 3:	Valores de calor de formação obtidos por modelagem molecular	74
Tabela 4:	Atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C para o isosafrol 53 em CDCl_3	100
Tabela 5:	Atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C para a indanona 52 em CDCl_3	103
Tabela 6:	Atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C para o ceto-éster 51 em CDCl_3	106
Tabela 7:	Atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C para a lactona 50 em CDCl_3	109
Tabela 8:	Atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C para o enol 49 em DMSO-d_6	112
Tabela 9:	Atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C para o epímero <i>DI</i> do análogo 48 em CDCl_3	118
Tabela 10:	Atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C para o epímero <i>DII</i> do análogo 48 em CDCl_3	119
Tabela 11:	Atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C para o enol metilado 80 em CDCl_3	122
Tabela 12:	Atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C para o enol etilado 81 em CDCl_3	124
Tabela 13:	Ensaio utilizados nos testes de germinação de alface	126
Gráfico 1:	Gráfico de energia versus ângulo diedro ϕ_1 do tautômero 73	72

Gráfico 2:	Gráfico de energia <i>versus</i> ângulo diedro ϕ_1 do tautômero 49	72
Gráfico 3:	Resultados de germinação de <i>Lactuca sativa</i> L. (alface) com solução recém-preparada do análogo 48	91
Gráfico 4	Resultados de germinação de <i>Lactuca sativa</i> L. (alface) com solução do análogo 48 estocada de uma semana	91

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CCF	Cromatografia em Camada Fina
CCP	Cromatografia em Camada Preparativa
CG-EMIE	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas por impacto de elétrons
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cols.	colaboradores
eV	elétons-volt
Δ	aquecimento
δ	deslocamento químico
d	dubleto (ou sinal duplo)
dd	duplo dubleto (ou duplo sinal duplo)
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
di	<i>diâmetro interno</i>
DIPA	diisopropilamina
DL ₅₀	dose letal a 50%
DMF	dimetilformamida
FT	Transformada de Fourier
HETCOR	<i>HETeronuclear shift CORrelation</i>
HOMOCOSY	<i>HOMOnuclear CORrelated SpectroscopY</i>
IGF	interconversão de grupos funcionais
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento em hertz
LDA	diisopropilamideto de lítio
m	múltiplo
m/z	relação massa sobre carga
NBS	N-bromosuccinimida

nOe	<i>Nuclear Overhauser effect</i>
Pág.	página
p.e.	ponto de ebulição
p.f.	ponto de fusão
PPA	ácido polifosfórico
ppm	partes por milhão
Rf	fator de retenção
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
S	singleto (ou sinal simples)
t	triplete
T.A.	Temperatura ambiente
THF	tetraidrofurano
TMS	trimetilsilano
totalm.	totalmente
Tr	tempo de retenção
UV	Ultra-violeta
V.H.	Vielsmeyer-Haack
v/v	volume por volume

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a síntese de um novo análogo aromático do estrigol **48**, tendo como produto de partida o safrol **44**; assim como a avaliação preliminar de sua atividade biológica no estímulo à germinação de sementes de *Lactuca sativa*, L. e de sua toxidez frente ao bioensaio de *Artemia salina*, Leach.

Através da reação de isomerização do alibenxeno **44**, e posterior ciclização com o reagente de Vielsmeyer-Haack, obteve-se o intermediário-chave com esqueleto do tipo indanona **52**. Na reação subsequente com base e formação de enolato, obteve-se o ceto-éster **51**, pela adição de uma porção metilencarboxietil. Através de redução seletiva e posterior ciclização resultou na γ -lactona **50**, e a formilação desta possibilitou a obtenção do intermediário β -dicarbonílico enol-éter **49**. Por estudos de modelagem molecular e análise dos dados espectrométricos obtidos, pôde-se observar o tautomerismo ceto-enólico e atribuir a estereoquímica Z para a ligação dupla deste produto. O acoplamento, através de reação de O-alkilação do enol-éter **49** com o bromobutenolídeo **32** resultou na mistura de epímeros do novo análogo aromático do estrigol **48**, com rendimento global de 20%. Os dois diastereoisômeros em C2' foram separados por CLAE semipreparativo em fase normal.

Os testes preliminares visando a atuação no estímulo de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*, L.) demonstraram que o análogo **48** possui atividade biológica promissora e a partir do bioensaio com *Artemia salina* Leach observou-se que sua toxicidade é baixa.

ABSTRACT

This work reports the synthesis of a new strigol aromatic analogue 48. The analogue was synthesized from natural safrole 44 and preliminary evaluation of its biological activity concerning to stimulation of lettuce seeds growing and its toxicity obtained in *Artemia salina*, Leach test was described.

Reaction of isomerization of safrole 44 and further cyclization using Vielsmeyer-Haack reactant produced the key intermediate indanone 52. Subsequent base-catalysed reaction and production of an enolate led to keto-ester 51. This species produced lactone 50 by a selective reduction and further cyclization. Formylation of this intermediate produced the enol-ether 49. Molecular modelling and analysis of the spectrometric data made possible to observe keto-enolic tautomerism and the Z stereochemistry of this product. A coupling by O-alkylation of the enol-ether using bromobutenolide 32 yielded a mixture of epimers of the new aromatic analogue 48 with an overall yield of 20%. Diastereomers were separated by semipreparative HPLC in normal phase.

Preliminary tests to evaluate biological activity showed good results concerning the growth of lettuce seeds (*Lactuca sativa* L.) and the test with *Artemia salina*, Leach demonstrated its low toxicity.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 - INTERAÇÃO ALELOPÁTICA E MECANISMO HAUSTORIA

Define-se a alelopatia como o mecanismo químico de defesa desenvolvido por plantas, ou mais amplamente, pode-se dizer que é toda interação bioquímica entre plantas de todos os tipos, e até mesmo a interação destas com microorganismos. Modernamente, considera-se este termo para a interação existente entre as plantas superiores. As moléculas envolvidas neste processo, chamadas substâncias alelopáticas ou toxinas, são produtos tipicamente de metabolismo secundário e, em sua maioria, compostos de baixo peso molecular e de estruturas relativamente simples.

Uma das formas de interação aleopática desenvolvida por plantas ocorre através de mecanismos de intrusão, criando-se a habilidade de atacar outras plantas e sobrevivendo através destas, sendo chamado este mecanismo de haustoria. Tais parasitas passam a nutrir-se dos metabólitos da planta hospedeira, não sobrevivendo sem este parasitismo. São dependentes dos produtos de metabolismo primário (carboidratos, aminoácidos e outros), mas não dos produtos de metabolismo secundário da hospedeira, tendo suas rotas biossintéticas de terpenóides, flavonóides e outros.¹

Espécies angiospermas do gênero *Striga* (*witchweed*) e *Orobanche* (*broomrapes*) são exemplos de plantas que desenvolvem-se através do mecanismo haustoria e provocam danos às plantações de diversas regiões tropicais do planeta (Tabela 1. pág 3).² Sementes destas espécie utilizam sinalizações químicas de substâncias exaladas por raízes da planta hospedeira para germinarem e manterem a ponte haustorial, nutrindo-se a partir da ligação com a planta hospedeira, até mesmo na fase adulta.

Tabela 1 - Principais espécies do gênero *Striga* e *Orobanche*²

Nome	Hospedeiros típicos
<i>Striga</i>	
<i>S. hermonthica</i> , Benth.	Sorgo, milho
<i>S. lutea</i> , Lour (ou <i>S. asiatica</i> , Kuntze)	Arroz, milho
<i>S. orobanchoides</i> , Benth.	Graminae em geral, tabaco
<i>Orobanche</i>	
<i>O. crenata</i> , Forsk.	Feijão e outros legumes
<i>O. herdaræ</i> , Duby	Hera
<i>O. ramosa</i> , L.	Tomate, tabaco, alface
<i>O. minor</i> , Sm.	Trevo
<i>O. ludoviciana</i> , Nutt.	Tomate
<i>O. cernua</i> , Loefl. (ou <i>O. cumana</i> , Wallr.)	Tabaco, girassol

1.2 - **ESTRIGOL: UM SINALIZADOR QUÍMICO PARA A GERMINAÇÃO**

O primeiro estimulante de germinação a ser conhecido foi o estrigol 1 (Figura 1), um sesquiterpeno obtido de exudatos de raízes de algodão (*Gossypium hirsutum*, L.),³ um falso hospedeiro para as espécies do gênero *Striga* e *Orobanche*, mas que estimulam o seu

crescimento *in vitro*. Este composto possui atividade a concentrações muito pequenas, sendo relatado valores de atividade com doses na faixa de 10^{-11} M, e por isso possui potencial utilização no controle de ervas daninhas parasitas, podendo ser aplicado no solo antes que seja feita uma plantação.³ As sementes dos parasitas germinariam e teriam um tempo de vida limitado, visto não poderem manter a ponte haustorial com a planta hospedeira.

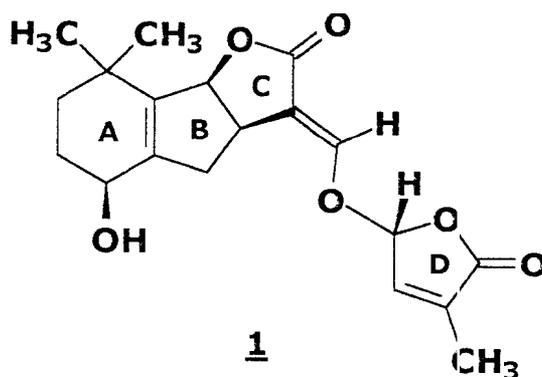


Figura 1 - Estrutura do (+)-estrigol, com a estereoquímica do composto natural assinalada.

O isolamento deste primeiro sinalizador químico utilizado na germinação de sementes parasitas foi descrito em 1966.³ Sua estrutura foi totalmente elucidada em 1972,⁴ através de técnicas de cristalografia de raio X e sua configuração absoluta foi determinada em 1985,⁵ como

mostrada na Figura 1. Não é reportado na literatura a função deste produto de metabolismo secundário para a planta hospedeira.

1.3 - AS ESTRIGOLACTONAS

As sementes das diversas espécies de *Striga*, *Orobanche* e *Alectra* respondem diferentemente ao estímulo do estrigol. Com este dado, pôde-se constatar que outros compostos poderiam fazer também o papel de sinalizadores químicos para a germinação e manutenção do parasitismo. Do estudo extensivo de exudatos de plantas hospedeiras, foram descobertos outros compostos. Tais compostos, posteriormente denominados estrigolactonas, possuem o esqueleto principal semelhante, apresentando uma porção do tipo indeno, um anel γ -lactônico, outro do tipo butenolídeo e diferindo na presença de substituintes e no estado de oxidação.

C) estrigol pode ser isolado de raízes de algodão, um falso hospedeiro haustorial, porém é muito difícil conseguí-lo a partir de raízes de plantas hospedeiras genuínas. Usando-se CLAE preparativa foi possível detectar a sua presença nestas plantas.⁶ Esta técnica tornou-se uma ferramenta útil para a identificação de outras estrigolactonas,

juntamente com o estudo da atividade biológica de frações isoladas do exudato de raízes.

A partir de estudos com *Sorghum bicolor* (L.) cv. Haygrazer foram identificadas pela primeira vez outras estrigolactonas.⁶ Estudos com exudatos de raízes desta espécie culminaram na descoberta de um novo estimulante de *Striga Asiática* e *Striga Hermonthica*, denominada sorgolactona 2 (Figura 2).⁶

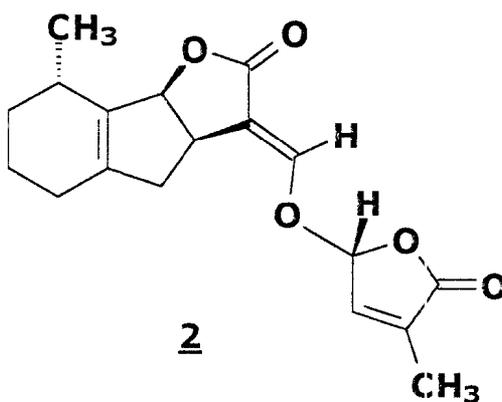


Figura 2 - Estrutura do sorgolactona 2, isolada do exudato de raízes do sorgo.⁶

Outros compostos isolados do exudato de *Sorghum bicolor*, moléculas do tipo 2,5-dimetoxi-benzoquinona, foram considerados mensageiros químicos para a manutenção do parasitismo (indutores haustoriais).⁷

As sementes de *Striga asiática* uma vez germinadas sobrevivem por menos de duas semanas na ausência da planta hospedeira e como são dependentes desta, se as sementes estiverem muito longe, a parasita não sobrevive. Outros tipos de sinalizadores também participam deste processo (Figura 3, pág. 8), proporcionando um aumento da distância da raiz da hospedeira em que as sementes poderão germinar e iniciar o parasitismo. Estes sesquiterpenos podem acumular-se no solo e proporcionar a manutenção da ponte haustorial, sendo os primeiros a serem detectados a partir de plantas hospedeiras.⁸ Testes com sementes utilizando a sorgoleona 3 pura não proporcionam o estímulo da germinação, e posteriormente foi observado que a atividade biológica aumentava na presença da mistura de 3 e 4. Estudos têm tentado demonstrar que estes compostos viabilizam o estímulo de germinação de sementes a uma distância mais longa. No sorgo (*Sorghum bicolor*), estes estimulantes do tipo benzoidroquinonas substituídas 3 e 4, obtidas a partir de seu exudato, são facilmente oxidados a quinonas inativas. A instabilidade química da sorgoleona 3 e a sua baixa solubilidade em água limitariam a área efetiva de atividade, uma condição que é ideal para a germinação e propagação das ervas daninhas próximas à hospedeira.⁹

Por fim, os dados da literatura sobre estes sinalizadores 3 e 4 não são conclusivos acerca de suas atividades. Embora fosse sugerido que estes compostos sejam responsáveis por um dos tipos de sinalização química, a manutenção da ponte haustorial, trabalhos posteriores não encontraram resultados semelhantes para o comportamento destas moléculas frente a germinação de espécies parasitas.¹⁰

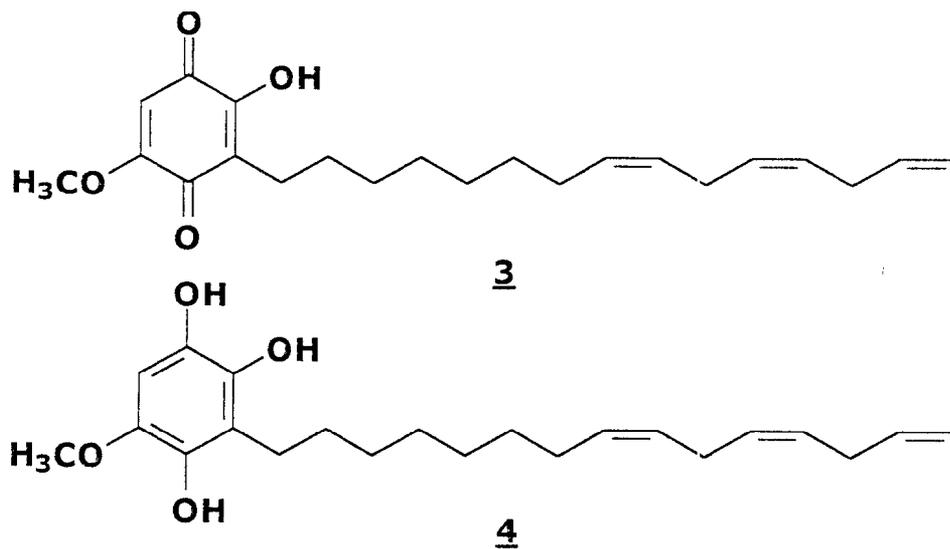


Figura 3 - Estrutura da sorgoleona 3 e da diidrosorgoleona 4.

Dos exudatos de raízes de espécies do gênero *Alectra* foi isolado um novo tipo de estrigolactona, denominado alectrol.¹¹ Porém sua estrutura não foi desvendada inambigüamente, sendo proposto as duas

estruturas 5a e 5b, mostradas na Figura 4. Este composto também se mostrou ativo na germinação de sementes de *Alectra vogelii* e *Striga gesnerioides*.¹²

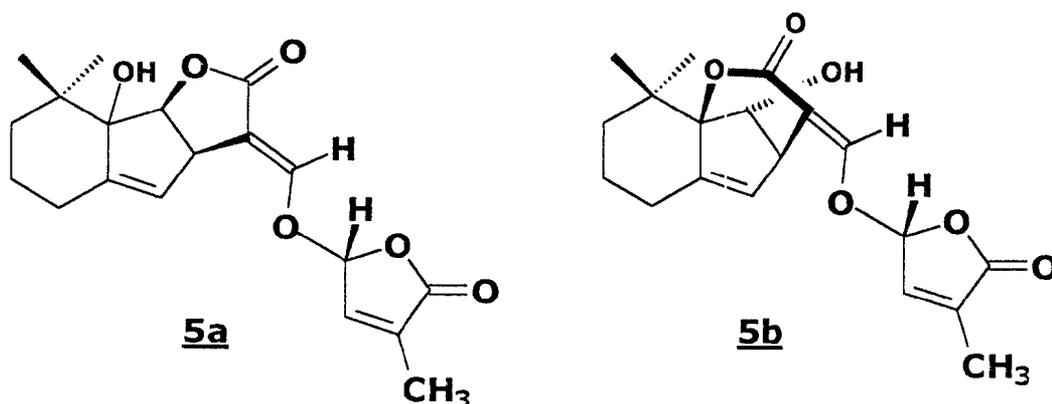


Figura 4 - Estruturas propostas para o alectrol 5.

As plantas hospedeiras de *Striga sp* produzem vários compostos que estimulam a germinação como o estrigol 1, sorgolactona 2, sorgoleona 3 e alectrol 5.¹³ Porém, algumas espécies hospedeiras, como *Zea mays*, L. (milho), *Panicum miliacum*, L. (*proso millet*) apresentam maior quantidade de estrigol, enquanto o *Sorghum bicolor*, L. Moench. (sorgo) produz uma quantidade muito pequena de estrigol.¹⁴ Há de se notar também que o estrigol, a sorgolactona e o alectrol promovem o estímulo de germinação de sementes de *Orobanche sp*, de *Striga sp* e *Alectra sp*, todavia, as atividades relativas em comparação com o estrigol são diferentes para cada espécie, indicando uma interação

específica entre os estimulantes de germinação e seus receptores em cada tipo de semente.¹⁵

Nos últimos anos muita atenção vem sendo dada ao isolamento e identificação de estimulantes de germinação de *Striga* a partir de exudatos de raízes de plantas hospedeiras. O estrigol e moléculas correlatas ao estrigol foram encontrados em exudatos de raízes de espécies filogeneticamente divergentes. Apesar de algumas poucas tentativas, o potencial de cultura de raízes para a produção de estimulantes de germinação de *Striga* permanece muito pouco explorado, o que seria uma alternativa de se obter maiores quantidades destes compostos, não visando o seu uso comercial, mas sim a caracterização de todos os componentes presentes em seus exudatos.¹⁶

1.4 - APLICAÇÕES DO ESTRIGOL

1.4.1 - USO COMO HERBICIDA

As ervas daninhas que desenvolvem o mecanismo haustoria para sobreviverem constituem sérias ameaças às principais plantações de alimentos no planeta, principalmente nas regiões, mais pobres. Pode-se

citar que *Striga hermonthica* (Del.) Benth e *Striga asiática* (L.) Kuntze são as espécies mais danosas para plantações de cereais enquanto *Striga gesnerioides* (Willd) Vatke é o parasita que mais oferece dano em culturas de leguminosas.¹⁴

As perdas em plantações infestadas com estas plantas podem chegar a 100%.¹⁷ Estratégias de controle são custosas, como o uso de etileno diretamente no solo para estimular a germinação de sementes.¹⁸ A partir disso, uma maneira eficiente e mais acessível vem sendo buscada na tentativa de se erradicar tal problema.

As sementes de *Striga* e *Orobanche* são pequenas (aproximadamente 0,25mm de diâmetro) e são facilmente deslocadas pelo vento, por pássaros ou misturadas a sementes de plantações. A espécie *Striga hermonthica* foi introduzida acidentalmente em 1956 no Estado da Virginia do Norte, E.U.A.. A partir de então foi feito um controle rigoroso da erva daninha para que não houvesse a infestação no restante do país, tendo-se em alguns anos o controle da praga.²

A espécie *Orobanche minor* produz cerca de 50.000 sementes por florada. Tais sementes podem permanecer no solo em dormência de 10 a 15 anos.²

As espécies de *Striga* também são prodigiosas produtoras de sementes. Tais sementes possuem viabilidade prolongada e requerem

tratamentos especiais para germinarem. A germinação depende da exposição a um estimulante de germinação exógeno. Na natureza este estimulante provém do exudato de raízes de plantas hospedeiras e não hospedeiras. Todavia, vários compostos sintéticos e outros compostos naturais podem também induzir a germinação de *Striga*, como o etileno exógeno.¹⁹ Têm-se feito tentativas de se usar o estrigol ou análogos sintéticos na germinação destas ervas daninhas em condições de campo.

A compreensão dos mecanismos bioquímicos envolvidos na germinação de *Striga* levou ao desenvolvimento de estratégias de controle assim como melhor utilização das medidas disponíveis. Duas das medidas mais promissoras de controle são a produção de espécies resistentes e o processo de germinação suicida.

No processo denominado germinação suicida, seria introduzido no solo a ser cultivado o estimulante haustorial, promovendo a germinação do parasita, porém seu desenvolvimento estaria limitado, posto não haver a planta hospedeira para oferecer os metabólitos necessários ao seu desenvolvimento até a fase adulta, levando-o à morte. Erradicado a presença das sementes das pragas, o plantio estaria livre do parasitismo.⁹

1.4.2 - ANÁLOGOS E COMPOSTOS RELACIONADOS AO ESTRIGOL

Os exudatos de raízes produzem quantidades muito pequenas de estrigol e de outras estrigolactonas. Por isso, a pesquisa na área da síntese total mostrou-se uma ferramenta útil para a obtenção destes compostos para posteriores estudos de atividade biológica. As sínteses totais propostas para o estrigol^{20,21} requerem um bom número de passos, dependendo da rota sintética utilizada, e há também relatadas as sínteses que pudessem ser usadas em escalas maiores^{22,23} objetivando o uso em condições de campo.

Através de estudos dos grupamentos farmacofóricos presentes no estrigol foram avaliados diversos tipos de moléculas, análogas ou correlatas, que apresentassem um bom perfil de atividade na germinação de sementes. Com a melhor compreensão do mecanismo de ação das estrigolactonas,^{10,24} a proposição para análogos que possuam um esqueleto básico que mantenham a atividade biológica vem sendo uma alternativa na obtenção de compostos mais ativos, oriundos de rotas sintéticas mais viáveis.

A pesquisa envolvendo o estudo de atividade destas moléculas pode ser dividida em 3 partes: obtenção de análogos estruturais,

estudos de fragmentos visando obter o conhecimento dos grupos farmacofóricos e estudo de compostos relacionados.

A partir dos dados de atividade biológica pôde-se constatar que a estrutura completa do estrigol não é necessária para a atividade, até análogos mais simples são capazes de iniciar a germinação.³

Com o interesse de se utilizar compostos com estruturas mais simplificadas e que tivessem igualmente uma rota sintética mais simples, foi feito um estudo de moléculas do tipo terpenóides alifáticos monocíclicos na avaliação da estimulação de sementes, podendo-se constatar a atuação do anel A na atividade. Os compostos ativos possuíam estruturas do tipo trimetilcicloexeno, ou muito semelhantes e contendo grupos ésteres (Figura 5, pág. 15), tendo um perfil de atividade 40% de germinação de sementes de *Orobanche ramosa* (*broomrape*).⁹

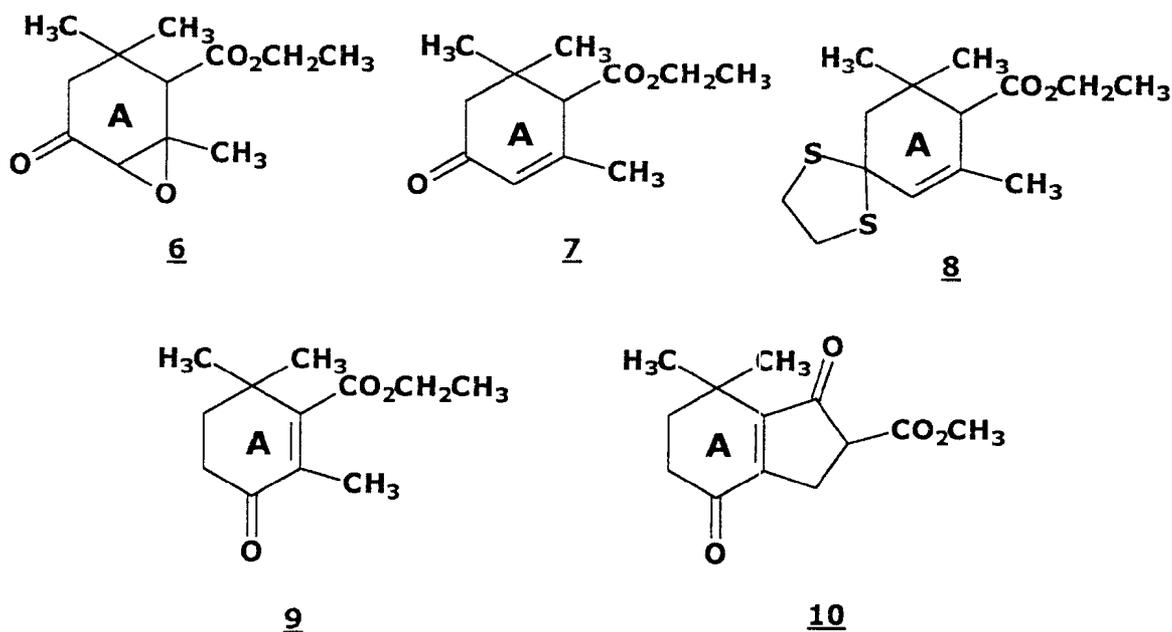


Figura 5 - Compostos relacionados ao anel A do estrigol, ativos na germinação de *Orobanche ramosa*.

Em outra tentativa de se obter um composto ativo que possuísse uma estrutura mais simples, testou-se a atividade de vários butenolídeos (análogos ao anel D do estrigol, Figura 6). Alguns destes compostos foram testados com sementes de *Striga asiatica* (*witchweed*) em séries de diluição na faixa de concentração do estrigol. O alicoxibutenolídeo 11g demonstrou atividade comparável ao estrigol (de 30 a 60% de germinação na faixa de 10^{-6} a 10^{-11} M). Porém, de maneira geral, estes análogos são menos efetivos na germinação de semente de que os análogos com vários anéis, além de serem instáveis em meio alcalino e degradarem facilmente quando estocados.²⁵

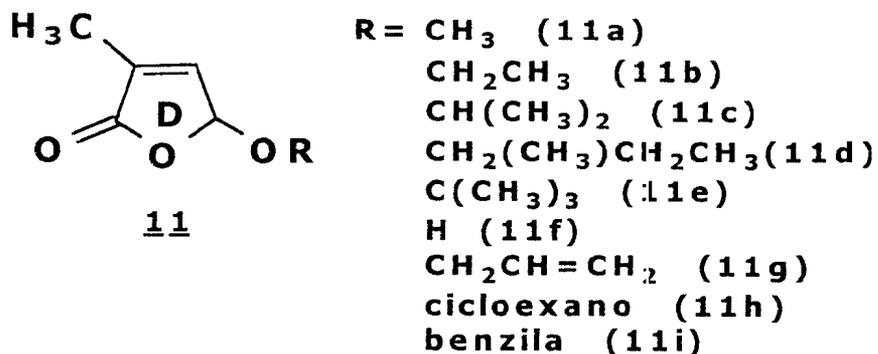


Figura 6 - Compostos relacionados ao anel D do estrigol utilizados na germinação de *Striga asiatica*.

Muitos análogos foram sintetizados com estrutura similar ao estrigol, chamado compostos GR (Figura 7). Os compostos GR5, GR7, GR18, GR24 e GR28 são análogos com 2, 3 e 4 anéis que possuem maior interesse. O GR18 é um isômero do GR24 com o anel aromático (e a dupla ligação) localizada em um carbono depois da junção com a lactona (anel C).

O composto GR24 possui uma boa atividade como estimulante de germinação, tendo este análogo um perfil de atuação próximo do estrigol e sendo considerado o composto padrão para testes.²⁶ Sua síntese é muito mais simples que a do estrigol.²⁷ Estudos de uma molécula com o esqueleto similar ao análogo GR24, com os substituintes 5-hidroxila e 8-metila no anel aromático, mostraram que não há alteração significativa na sua atividade.^{28,29}

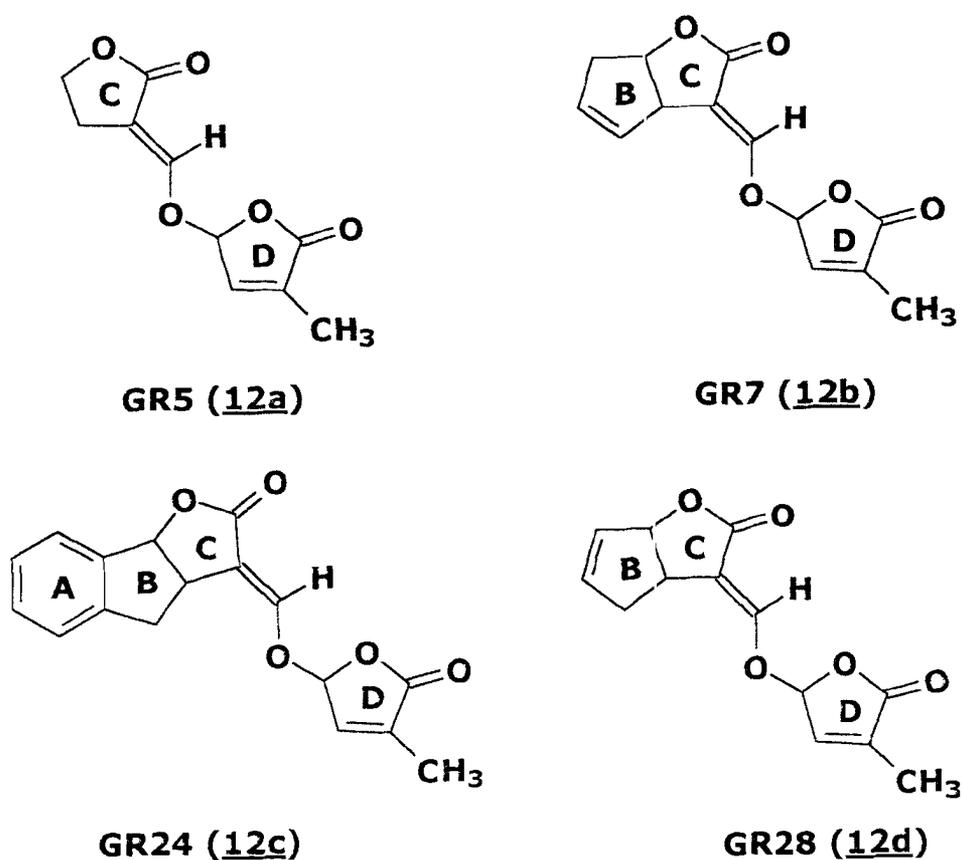


Figura 7 - Estrutura do compostos do tipo GR, análogos do estrigol.

As similaridades estruturais dos compostos GR com o estrigol que merecem nota incluem a estrutura do anel do tipo butenolídeo (anel D no estrigol) ligado a uma γ -lactona (anel C no estrigol) por uma ponte metileneoxi (Figura 8).³⁰ Outros compostos foram sintetizados para conhecer a importância destas duas estruturas no perfil de atividade biológica.

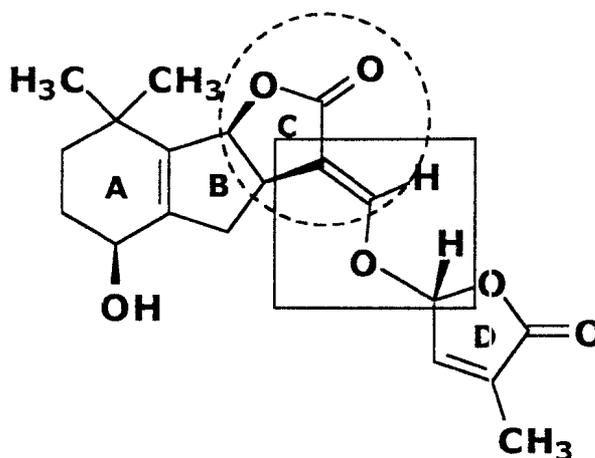


Figura 8 - Estrutura do estrigol mostrando a ponte metileneoxi (quadrado) e o grupamento carbonila lactônica conjugado com porção etileno (círculo).

Com o objetivo de se ter compostos que fossem mais estáveis em meio alcalino, a porção lactona do anel C foi substituída por uma lactama (Figura 9). Este análogo 13 demonstrou-se estável frente a pH 8,5-9,0 porém seu perfil de atividade não foi satisfatório.²⁹

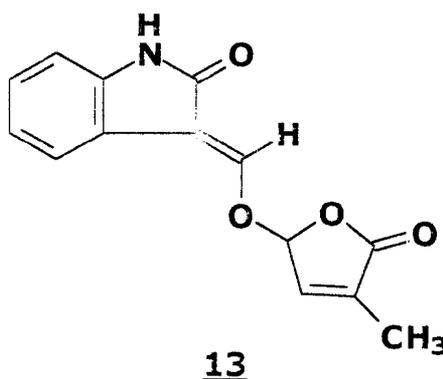


Figura 9 - Estrutura da 3-oxibutenolídeo-metileneindalinona.

Foi encontrado na literatura a síntese de um derivado do estrigol a partir da *N*-ftaloilglicina 14, chamado Nijmegen 1 (Figura 10, composto 15), que contém somente um centro quiral no C2' do anel D. Este composto foi idealizado de uma maneira que contivesse as características essenciais para a atividade biológica.¹² Testes com *Striga hermonthica* e *Orobanche crenata* demonstraram que este composto possui um bom perfil de atividade biológica e a vantagem de ser preparado em apenas duas etapas²⁷, porém é bem menos ativo que o GR24.³¹

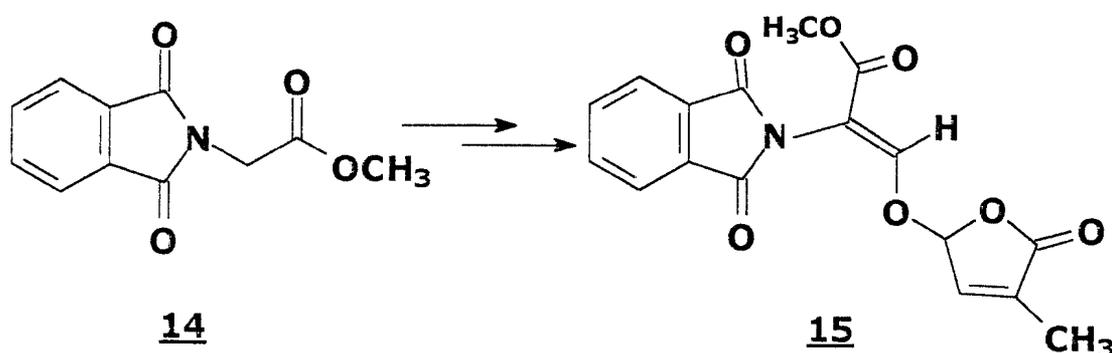


Figura 10 - Obtenção do Nijmegen 1 (15) a partir da ftaloilglicina (14).

As lactonas sesquiterpênicas possuem um amplo espectro de atividade biológica incluindo citotoxicidade, atividade antineoplásica e inseticida. Alguns compostos desta classe (Figura 11) promovem a

germinação de sementes e foram estudados na germinação de sementes de *Striga* e *Orobanche* por causa da similaridade com o anel lactônico presente no estrigol.¹⁷

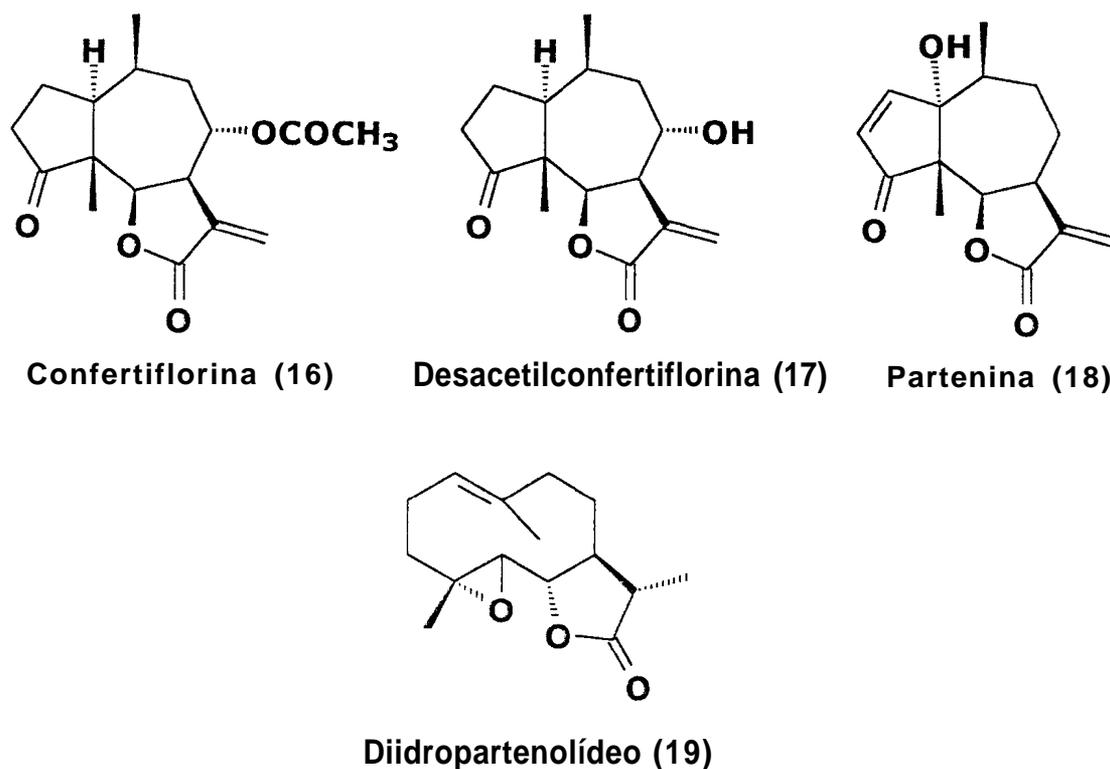


Figura 11 - Estrutura de algumas lactonas sesquiterpênicas.

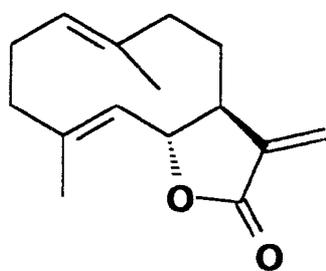
O estímulo à germinação de sementes de *Striga asiatica* pelo diidropartenolídeo 19 (Figura 11) ocorreu em valor comparável a atividade observada para o estrigol (70%) e alguns análogos sintéticos. Os outros compostos mostraram atividades mais baixas, e a

concentrações menores não apresentaram resposta de indução à germinação.

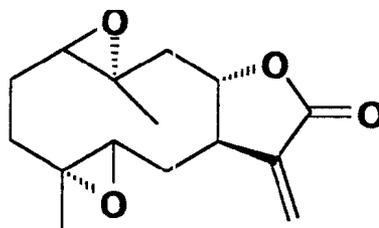
O diidropartenolídeo 19 ocorre em concentração bastante alta em *Ambrosia artemisifolia* (0,15% do peso seco) e pode ser isolada em grandes quantidades. Os resultados sugerem que este composto pode ser usado no controle de *Striga asiatica* e *Striga hermonthica* no estímulo à germinação de sementes na ausência de hospedeiro, como tem sido feito com o etileno e análogos de estrigol. Uma vantagem para o diidropartenolídeo é a ausência da porção butenolídeo e da ponte metileneoxi, aumentando sua estabilidade frente a hidrólise básica e permanência no solo e mantendo sua baixa toxidez.

Como o diidropartenolídeo 19 possui uma estrutura bastante diferente do estrigol, outros compostos semelhantes, do tipo germacranolídeos e eudesmanolídeos, naturais e sintéticos (Figura 12) foram estudados com o objetivo de determinar os requisitos estruturais para a atividade na germinação. Para os germacranolídeos estudados, observou-se a faixa de 40 a 65% de germinação, a baixas concentrações, mostrando que a conformação do anel em conjunção com a lactona, e não a presença de substituintes, que é importante na atividade.

GERMACRANOLÍDEOS

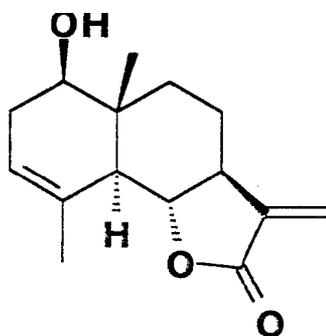


Costunolide (20)

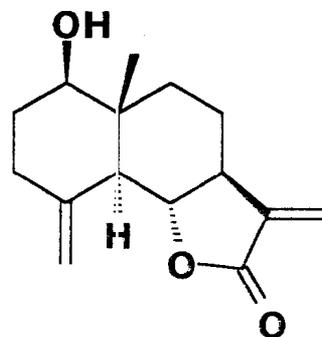


11,13-deidreerioline (21)

EUDESMANOLÍDEOS



Santamarina (22)



Reinosina (23)

Figura 12 - Estrutura dos compostos do tipo germacranolídeos e eudesmanolídeos, estudados quanto a germinação de sementes de *Striga asiatica*.

A mistura dos dois eudesmanolídeos santamarina 22 e reinosina 23 tiveram atividades semelhantes ao diidropartenolideio 19. O arranjo espacial destes eudesmanolídeos é bastante similar aos dos germacranolídeos. Comparando a estrutura da santamarina com o estrigol, nota-se a similaridade para o sistema de anéis ABC, tendo a

mistura de satamarina e reinosina uma resposta satisfatória à germinação de *Striga asiatica*.

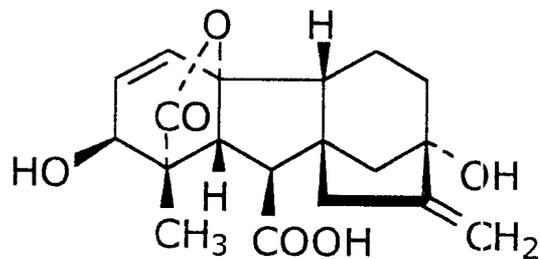
Estes produtos podem ser utilizados como fontes naturais no combate às pragas devido a quantidade apreciável em muitas plantas e pela distribuição bastante comum.³²

A partir dos dados de atividade biológica apresentado pelo estrigol e por alguns de seus análogos sugere-se que estas moléculas complexas são as que melhor iniciam a reação bioquímica envolvida no estímulo da germinação de espécies do gênero *Striga* e *Orobanchae*. As estrigolactonas não são consideradas apropriadas para o propósito de controle de ervas daninhas em condições de campo, devido a sínteses inviáveis economicamente. Por isso, vários estudos são feitos objetivando a obtenção de moléculas com uma estrutura mais simples e com boa resposta à germinação,²⁷ porém não há dúvida de que o estrigol ou seus análogos sejam muito mais ativos no estímulo da germinação do que estes outros compostos propostos (Figuras 5, 6, 9, 10, 11 e 12).

1.4.3 - SEMENTES COM DORMÊNCIA

Muitas sementes, além das sementes das ervas daninhas já citadas, possuem um mecanismo de sobrevivência através de dormência, como ocorre com a espécie *Avena fatua*, L. (aveia selvagem). A morfologia das sementes de *Avena fatua*, L., que é uma monocotiledônia e da *Striga asiatica*, uma dicotiledônia, difere consideravelmente, porém fisiologicamente estas duas sementes são semelhantes. As sementes com dormência de *Striga asiatica* e *Avena fatua* são induzidas à germinação por uma variedade de substâncias exógenas, tal como etileno e ácido giberetínico 24 (Figura 13).

O estudo da germinação com vários análogos do tipo GR (Figura 7, pág. 17) mostrou que estes compostos; possuem atividades semelhantes ao ácido giberelínico 24 (o qual possui subunidades estruturais que podem ser comparadas a estes análogos) pela indução de germinação de sementes com dormência de *Capsella bursa-pastoris*, L. (*shepherdspurse*) e *Lactuca sativa*, L. (alface).³³



24

Figura 13 - Estrutura do ácido giberelínico.

A ação estimulante na germinação de *Avena fatua* pelos análogos do tipo GR demonstra que estes, inicialmente desenvolvidos como estimulantes para sementes de ervas daninhas parasitárias, possuem atividade biorreguladora em sementes com dormência de monocotiledôneas e de dicotiledôneas.³⁴ Estes análogos possuem características ideais para o estímulo de germinação com o uso no campo:

- 1- atividade a baixa concentração;
- 2- razoável solubilidade em água;
- 3- segurança para o meio ambiente, por serem não-tóxicos e
- 4- habilidade para promoverem a germinação em espectro vasto de espécies, inclusive sementes com elevados tempos de dormência, afora as ervas daninhas.

1.5 - MECANISMO DE AÇÃO

1.5.1 - MECANISMO DE ESTIMULO BIOLÓGICO

O estrigol atua em níveis de concentrações muito baixos, sendo considerado um hormônio vegetal, mas não há estudos que comprovem este fato, embora sejam relatados outros dados que predizem sua atuação hormonal, como o comportamento de produzir picos de atividade estimulante a determinadas doses, ou em alguns casos, promovendo atividade inibitória.^{17,18}

As espécies do gênero *Striga* possuem dois níveis de reconhecimento do hospedeiro. Um em nível de germinação e outro associado ao desenvolvimento da ponte haustorial. Estas plantas começam seu comprometimento com o hospedeiro através da germinação, tendo o estrigol papel de estimulador, entre outros. O segundo nível começa após o início do alongamento radicalar das sementes, e a planta procura viabilizar a interação com o hospedeiro, por isso a distância em que ocorre a germinação do parasita ao hospedeiro é importante e pode ser controlada por outros sinalizadores, ainda não bem conhecidos, dando assim a complementação da ponte haustorial. Como descrito anteriormente, compostos do tipo

benzoquinonas (Figura 3, pág. 8) podem ter o papel de segundos sinalizadores.³⁵

O mecanismo através do qual o estrigol estimula a germinação de sementes de *Striga*, aparentemente, ocorre através do estímulo de biossíntese de etileno. Observou-se que o etileno endógeno possui atividade relevante no processo de germinação de sementes de *Striga hermonthica* e *Striga asiatica* quando tratadas com o análogo GR24 (Figura 7, pág. 17) e exudatos de raízes de sorgo. Posterior estudo mostrou que o estrigol estimula a biossíntese de etileno pelo aumento da capacidade de converter o seu precursor direto, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Estas conclusões foram obtidas em experimentos nos quais foi feita a adição de estrigol a sementes de *Striga asiatica*, comprovando-se que o percentual de etileno no meio aumentava de acordo com o aumento das concentrações de estrigol, e também pela adição de mistura de estrigol e ACC, observando-se neste caso que o percentual de germinação aumentava significativamente.

Sementes de *Striga sp* têm uma capacidade limitada de converter ACC, o precursor imediato de etileno, em etileno. O estrigol, e possivelmente outros estimulantes de germinação, impulsionam a ativação ou a síntese de EFE (*ethilene-forming enzyme*) e, conseqüentemente, a conversão de ACC em etileno. O etileno pode

acentuar a germinação, como em outros tipos de sementes, pela promoção do alongamento celular no período de iniciação do processo de germinação.

A indução ou a inibição de germinação de *Striga* através da manipulação da rota biossintética de etileno pode vir a ser um possível método de controle destas pragas.³⁶

1.5.2 - MECANISMO DE ESTÍMULO QUÍMICO

Através do estudo extensivo com modificações estruturais para o estrigol e seus análogos, fez-se a proposição de um mecanismo molecular para a atuação do estrigol.²⁴

A análise da bioatividade dos compostos GR (Figura 7, pág. 17), revelou que a parte farmacofórica da molécula de estrigol e seus análogos está presente nos anéis C e D destes. Em contraste com estas observações, há relatos^{9,30} de atividade alta para alguns análogos do anel A ou análogos do anel D, entretanto tais resultados não foram reprodutíveis.

Para os resultados de germinação obtidos³⁷ com o análogo GR24 modificado 25 (Figura 14), sem o anel C, tornou-se evidente que este anel não é essencial. Aparentemente uma estrutura possuindo uma 3-

metilfuranona conectada ao grupo éster carboxílico através de uma ligação enol-éter é suficiente para o bom desempenho da atividade.

Para se ter noção da importância da porção éster α,β -insaturada para a bioatividade, um composto foi preparado no qual esta dupla ligação foi reduzida (Figura 14, composto 26). Ensaios com *Striga hermonthica* e *Orobanche crenata* mostraram que a molécula 26 era totalmente inativa, concluindo-se que a dupla ligação enol-éter ligando os anéis C e D é essencial na atividade estimulatória.

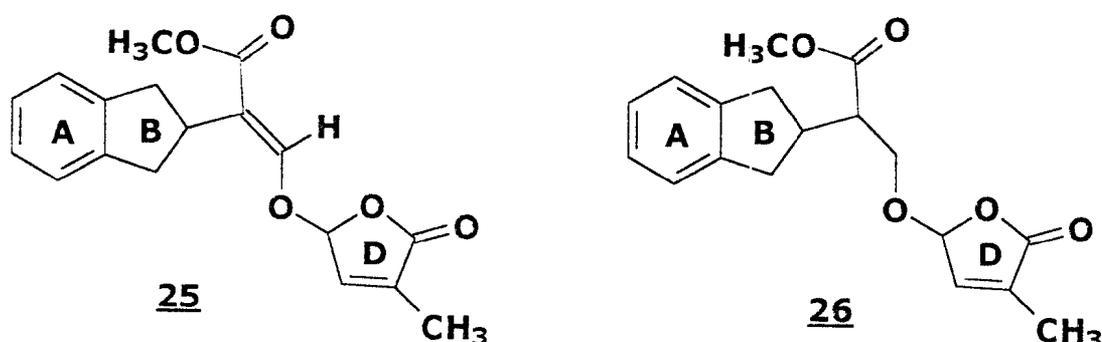
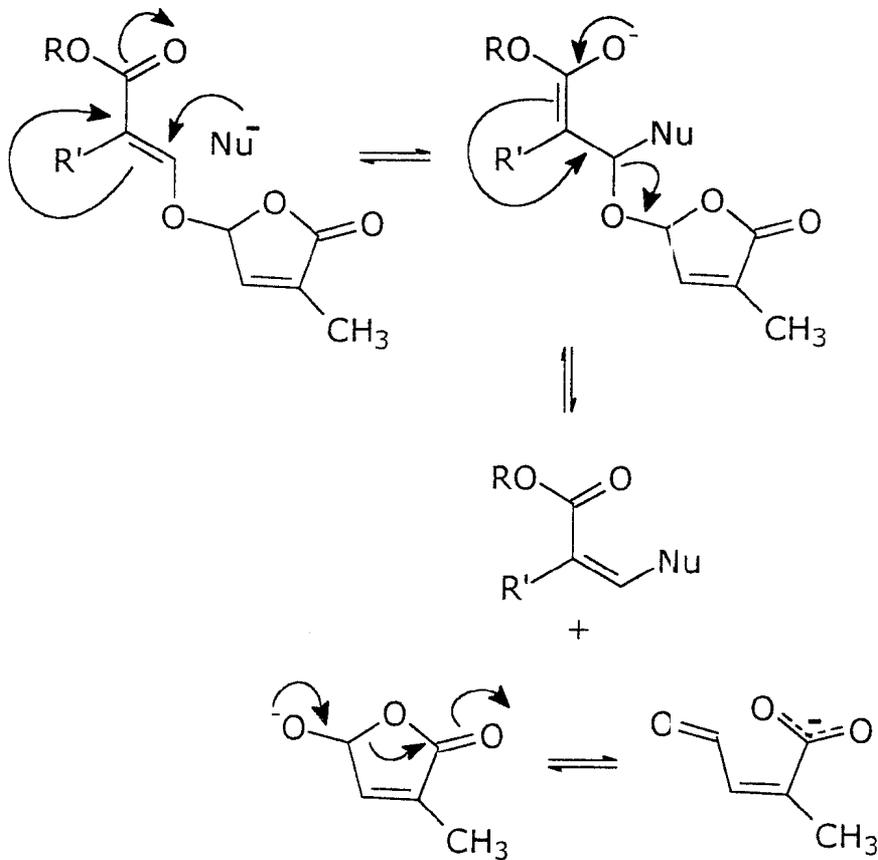


Figura 14 - Estrutura dos análogos 25 e 26.

O mecanismo molecular sugerido na literatura aponta para a importância desta ligação dupla do tipo enol-éter, envolvendo a adição de espécies nucleofílicas do tipo Michael presentes no sítio receptor (na semente), seguindo-se à subsequente eliminação do anel D, como mostra o Esquema 1. Neste mecanismo proposto, o anel D serve como

um grupo abandonador em um processo de adição-eliminação. Com isto pode-se supor que a parte ABC da molécula é covalentemente ligada ao receptor, ocorrendo assim uma mudança química que pode ser o passo inicial para a germinação. Este mecanismo explicaria a atividade biológica para todos os análogos do estrigol.¹⁰



Esquema 1 - Mecanismo de ação molecular proposto para a atividade do estrigol e seus análogos.

Outros experimentos comprovam este mecanismo. Através de reações do análogo GR24 com diversos nucleófilos (*p*-metoxibenzilamina, benziltiolato), obtém-se os respectivos compostos em que a porção butenolídeo é substituída, e a substituição do anel D por um bom grupamento abandonador (tosila, por exemplo), ou mesmo por compostos bastante similares ao butenolídeo, tornaram o composto inativo.³⁸ A troca do átomo de oxigênio da porção enol-éter por um grupamento metilênico (bioisótero do oxigênio)¹³ também torna o composto inativo.

A instabilidade do estrigol e seus análogos em meio alcalino também pode ser entendida através da proposta mostrada no Esquema 1. O íon hidróxido serve como um nucleófilo, ocorrendo a eliminação do anel D. Esta reação degradativa vai desativar o composto. Já em condições ácidas, esta quebra ocorre em menor grau.

Com todos estes resultados pode-se constatar que:

- 1) um estimulante de germinação em potencial deve ser capaz de sofrer uma reação do tipo adição-eliminação com um grupamento nucleofílico no sítio receptor, como mostrado no Esquema 1.
- 2) um modelo estrutural de estimulante (Figura 15) pode ser proposto. Ele deve conter o grupamento R' que tenha um arranjo espacial adequado e precisa conter um bom grupo abandonador L.

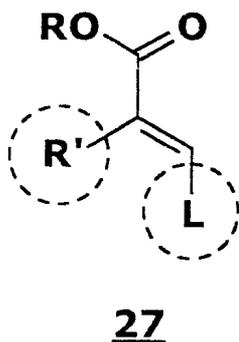


Figura 15 - Modelo estrutural para o esqueleto básico dos compostos estimulantes de germinação de sementes.²⁴

1.6 - SÍNTESES DO ESTRIGOL

Várias metodologias são descritas na literatura³⁹ para a construção da molécula de estrigol. A primeira abordagem sintética reporta de 1976 e outras foram publicadas com melhorias desta original proposta por Sih *et al.*⁴⁰ Nesta síntese, o autor utiliza como material de partida o citral 28, que é precursor do intermediário chave 29 (Figura 16), que já possui o sistema de três anéis ABC, presentes no produto natural.

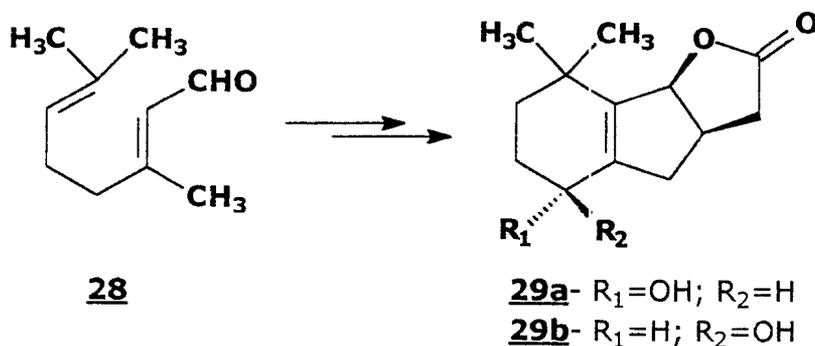
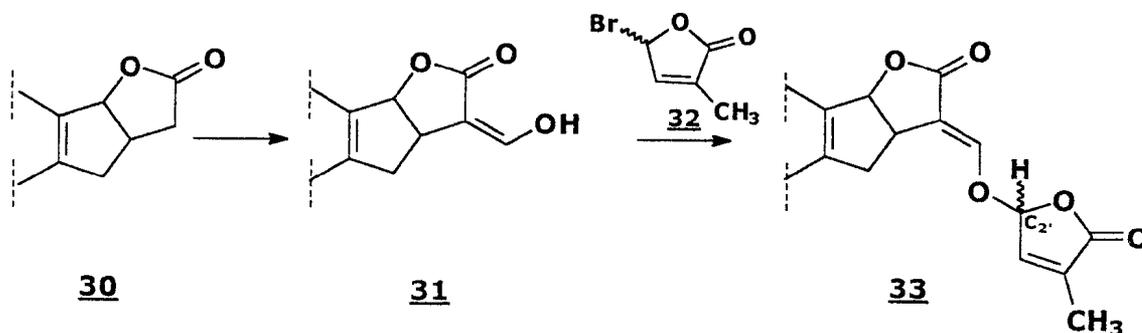


Figura 16 - Síntese de Sih e cols. para o estrigol.

Após a obtenção deste intermediário, a reação de formilação e junção com o bromobutenolideo 32 dá o estrigol 1 em um total de 9 etapas.

A abordagem clássica para a síntese do estrigol ocorre com a conversão do intermediário do tipo 30 (Esquema 2) no derivado hidroximetileno 31. Este, por sua vez reage com o composto bromolactona 32, dando uma mistura de 1 e numa relação diastereoisomérica de 1:1.



Esquema 2 - Seqüência para obtenção do estrigol a partir do intermediário lactônico 30.

Como já relatado, a influência da configuração no átomo de carbono C2' no anel D do estrigol possui influência na atividade biológica.¹⁵ Assim, há trabalhos na literatura que mostram a síntese assimétrica do estrigol. Tais sínteses enfrentam um duplo problema: a construção assimétrica da porção ABC e a junção do anel D de forma também assimétrica, por isso aumentando o número de etapas significativamente.

No primeiro relato visando a estereosseleção na síntese do estrigol usou-se o indutor de Feringa 33 (Figura 17)⁴¹ Um outro indutor reportado na literatura e que é igualmente útil na obtenção do anel D, esterosseletivamente, é mostrado também na Figura 17.^{42,43}

outros grupamentos carbonílicos α,β -insaturados e também pelo aumento do caráter lipofílico da molécula.⁴⁶

Uma grande quantidade de lactonas sesquiterpênicas citotóxicas foram isoladas através de estudos visando a descoberta de agentes antitumorais a partir de plantas.⁴⁶ Pode-se dizer-se que a maioria dos sesquiterpenos conhecidos com atividade citotóxica são lactonas α,β insaturadas e que a ligação α,β -etilênica é, em sua quase totalidade, exocíclica.

Um dos testes para a avaliação citotóxica das lactonas sesquiterpênicas é a reação com cisteína. Em contraste a α -metileno- γ -butirolactonas, que reagem rapidamente com cisteína formando adutos estáveis, as γ -lactonas α,β -insaturadas endocíclicas reagem mais lentamente com a cisteína e formam adutos instáveis.

Através dos testes biológicos e de modificação estrutural demonstrou-se que a porção α -metileno- γ -lactonas é o responsável pela potencial atividade. Observou-se também que compostos contendo grupamentos hidroxila ou grupos O-acila adjacentes ao α -metileno da γ -butirolactona aumentam a atividade perante a cisteína. A reatividade parece não ser afetada quando os compostos estudados possuem junção de lactonas *cis* ou *trans*.

Estudos feitos com estes compostos mostraram que o aumento da citotoxicidade ocorre com o aumento da lipofilicidade. Dos compostos em que se observou atividade *in vivo*, notou-se que estes podem conter em adição à porção α -metileno- γ -lactona, uma porção α -metileno- δ -lactona, uma porção éster presente na cadeia lateral ou ainda uma hidroxila ou o grupo O-acila adjacente ao CH_2 do grupo γ -lactona (Figura 18).

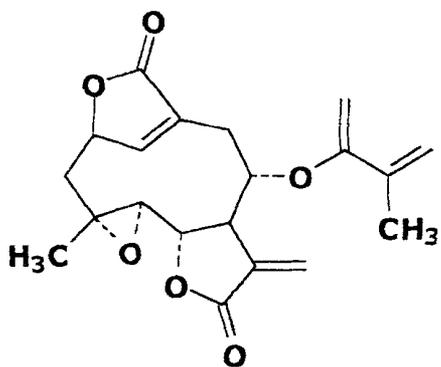
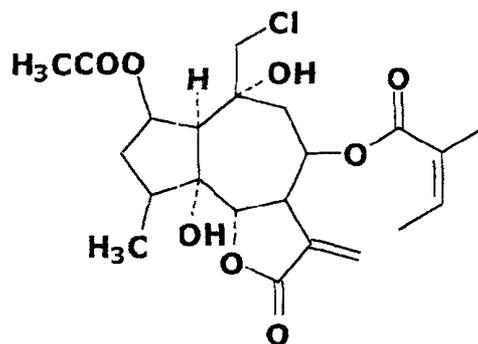
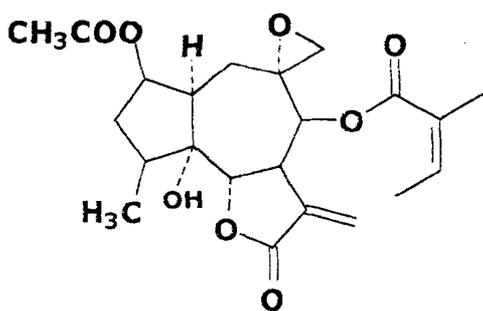
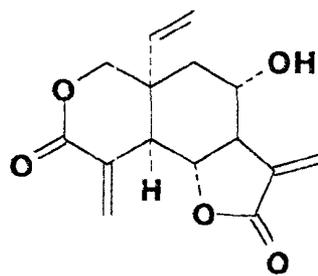
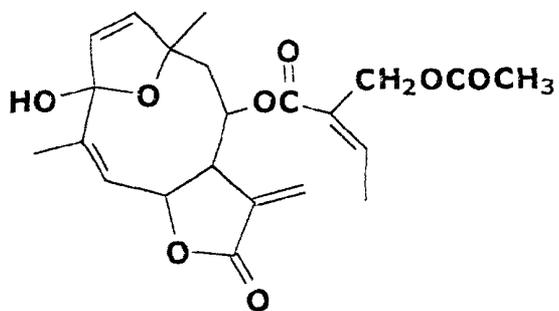
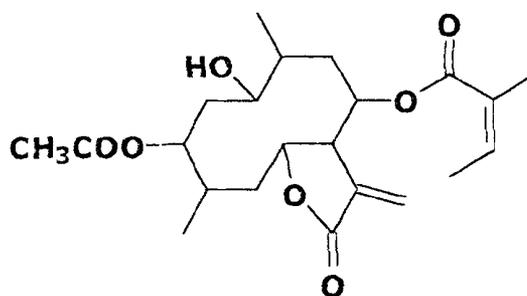
363738394041

Figura 18 - Estrutura de algumas lactonas sesquiterpênicas que apresentam atividade citotóxica/antitumoral.

Dois compostos com estruturas relacionadas ao estrigol foram descritos, os diterpenóides 42a e 42b (Figura 19), isolados de *Neouvaria acuminatissima* (Miq.) Airy Shaw, possuindo atividade inibitória do crescimento de células de câncer do pulmão humano (Lu1). Estes compostos possuem um esqueleto do tipo labdano contendo oxigênio com um anel do tipo γ -hidroxibutenolídeo.⁴⁷

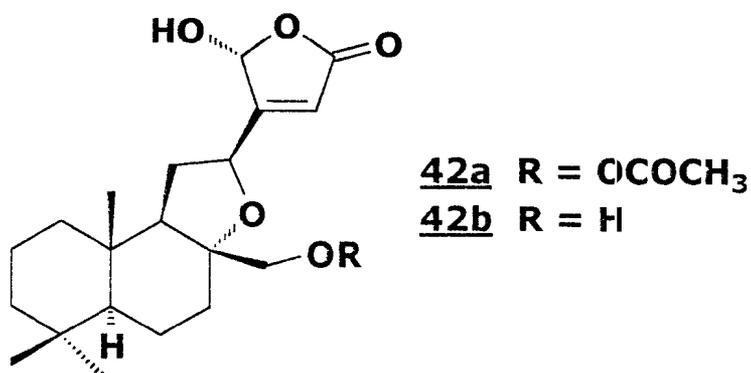
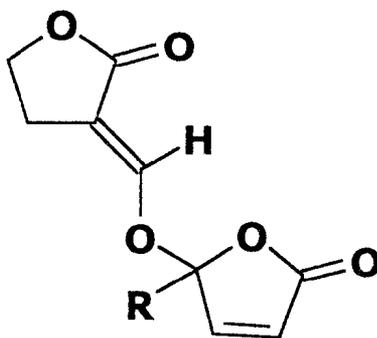


Figura 19 - Estrutura do 17-acetitacuminolídeo 42a e acuminolídeo 42b.

As β -alcoxi- α -metileno- γ -butirolactonas também podem ser consideradas moléculas com potencial atividade antitumoral. Os compostos 43a e 43b (Figura 20) mostraram significativa citotoxicidade contra células Hela em um teste preliminar na avaliação da potencial atividade anticancer de análogos do estrigol.⁴⁸



43a R = H

43b R = CH₃

Figura 20 - Estrutura das β -alcoxi- α -metileno- γ -butirolactonas 43a e 43b.

No levantamento bibliográfico realizado não foram encontrados outros estudo acerca da atividade citotóxica/antitumoral do estrigol e seus análogos.

CAPÍTULO 2 -OBJETIVOS

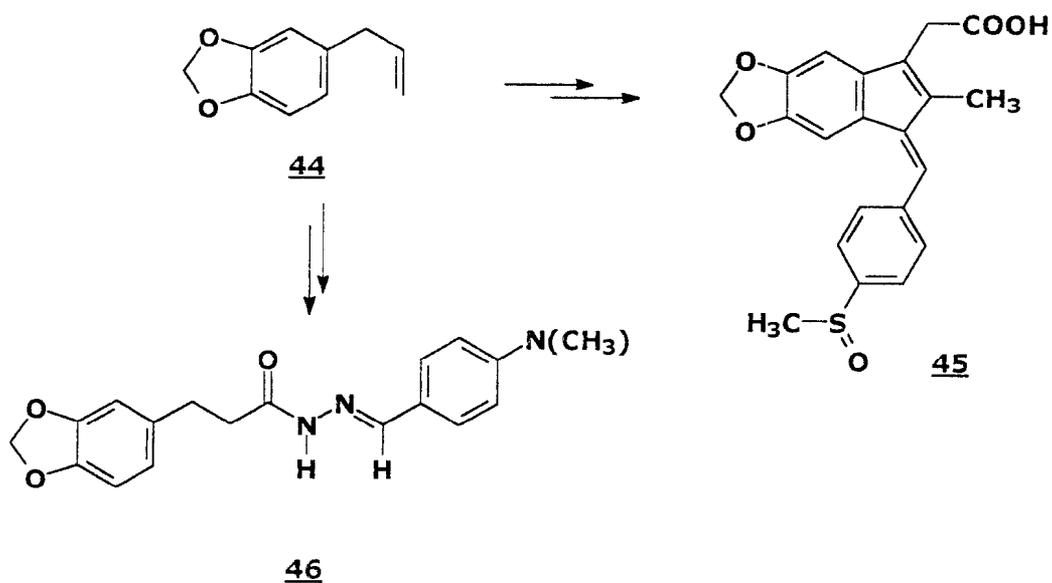
Levando-se em consideração a vasta pesquisa acerca do estrigol e compostos correlatos, a busca de novos análogos constitui-se como uma área promissora, já que ainda não foram relatados compostos que sejam viáveis para uso em condições de campo. Os dados disponíveis indicam os requisitos estruturais mínimos necessários a um bom perfil de atividade biológica.²⁴

O análogo GR24 (Figura 7, composto 12c, pág. 17) é considerado o composto que mais se aproxima ao perfil de atividade biológica exibida pelo produto natural 1 (Figura 1, pág. 4), sendo usado mundialmente como padrão para os testes de germinação das diversas espécies de *Striga* e *Orobancha*.¹⁵

A partir do óleo de sementes de Sassafras (*Ocotea pretiosa*, Benth) obtém-se em elevado rendimento (80%) o safrol 44 (Esquema 3). Pode-se destacar seu emprego na produção de aditivos para líquidos lubrificantes e composições sinérgicas para inseticidas.⁴⁹

Devido a importância econômica deste alilbenzeno natural, estudos vêm sendo feitos no sentido de se disponibilizar outras fontes vegetais para sua extração, principalmente de algumas espécies de Piper, abundantes na região amazônica.⁵⁰

Vários exemplos na literatura^{51,52} mostram a utilização deste produto natural na construção de moléculas mais complexas, de interesse acadêmico ou farmacológico, aumentando seu valor agregado (Esquema 3, compostos 45 e 46).



Esquema 3 - Exemplos de obtenção de moléculas complexas a partir do safrol.

Em trabalho anteriormente desenvolvido) em nosso laboratório foram obtidos compostos do tipo 47 (Figura 21), derivados do núcleo piroloquinolina, que tiveram o safrol 44 como precursor em suas sínteses. Estes derivados, devido às suas características *bis-eletrofilicas*, configuram-se como potenciais agentes antitumorais.⁵³

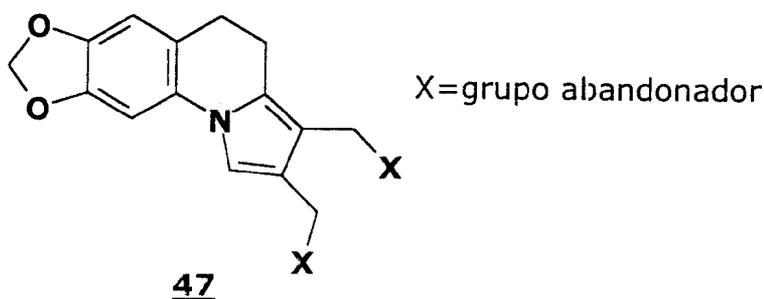
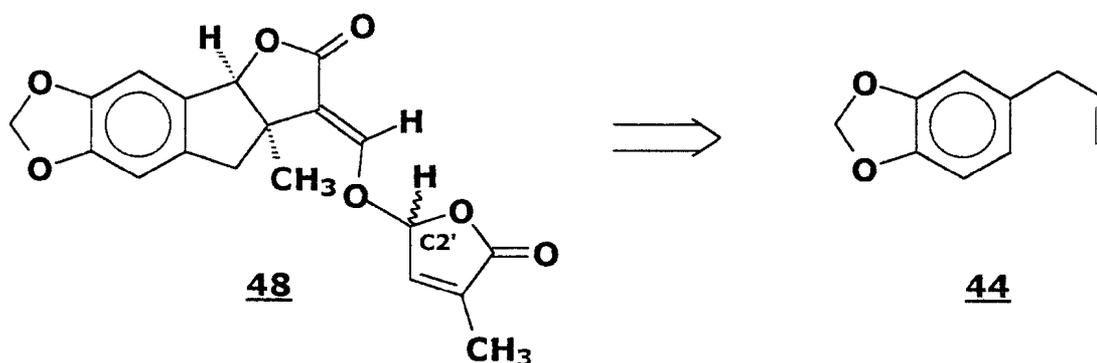


Figura 21 - Compostos do tipo piroloquinolinas, preparadas a partir do safrol.⁵³

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro tem por grande vocação a pesquisa na área agrobiológica. E na perspectiva de se realçar tal aspecto, foi feita a proposta da síntese de um novo análogo aromático do estrigol (Esquema 4, composto 48).⁵⁴ Esta molécula, pelas semelhanças estruturais com o composto GR24 (Figura 7, pág.17), pode ser considerado um potencial herbicida, o qual poderá ser testado posteriormente quanto a atividade germinatória de espécies do gênero *Striga* e *Orobanche*.



Esquema 4 - Novo análogo aromático 48 obtido a partir do safrol 44.

Propõe-se ainda neste trabalho, testar a atividade biológica do análogo 48, em um estudo preliminar de germinação de sementes⁵⁵ e o rastreamento quanto ao perfil de atividade citotóxica e antitumoral.

Considerou-se também a proposição de um método analítico de separação diastereoisomérica dos epímeros em C2' do produto final através de CLAE.⁵⁶

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

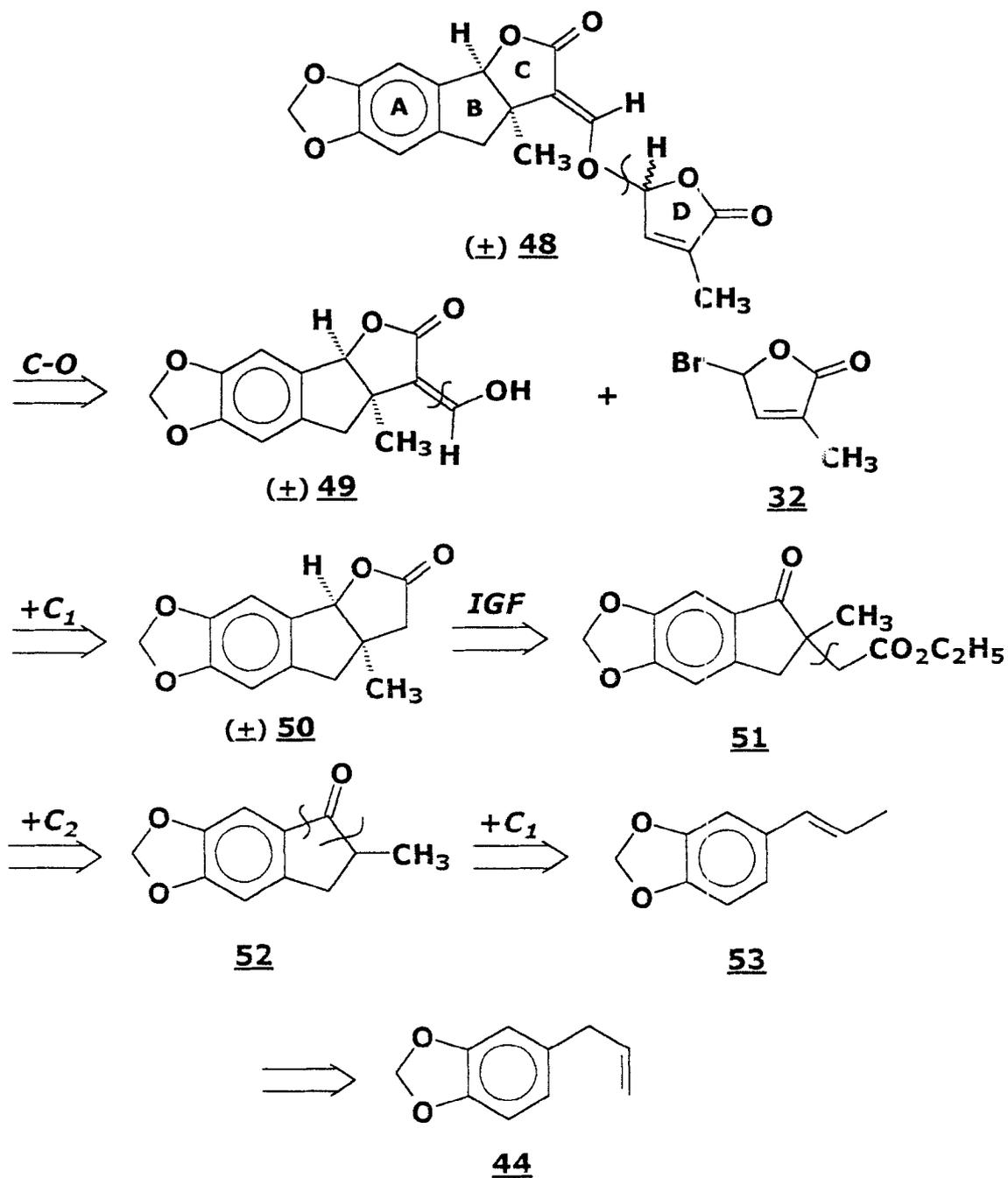
3.1 - METODOLOGIA SINTÉTICA

A metodologia sintética proposta para a obtenção do novo análogo do estrigol 48 foi traçada com base na análise retrossintética mostrada no Esquema 4 (pág. 47), tendo o safrol 44 como material de partida.

Na análise retrossintética mostrada vê-se que por desconexão da ligação C-O do éter de enol presente no produto final, evidencia-se como seu precursor direto o enol 49, através de uma reação de O-alkilação^{22,39b} com um eletrófilo adequado (a bromolactona 32). Por sua vez, por desconexão da ligação dupla exocíclica presente no

intermediário 49 chega-se à lactona 50, que fornece 49 através de uma reação de homologação de uma unidade de carbono.⁵⁷ A lactona 50 pode ser obtida a partir do intermediário 51, através de uma seqüência envolvendo interconversão de grupos funcionais (IGF), seguida de ciclização. Por desconexão da ligação carbono-carbono presente em 51, coloca-se em evidência a indanona 52 como precursora deste ceto-éster por homologação de duas unidades de carbono.⁵⁷ O intermediário 52 pode ser obtido a partir do derivado estirênico através de uma reação de ciclização envolvendo a cadeia lateral, com concomitante homologação de um átomo de carbono.⁵⁸ Por sua vez, o produto natural 44 é o precursor direto de 53, através de uma reação envolvendo isomerização da ligação dupla.⁵⁹

A bromolactona 32 é obtida pela reação de bromação alílica do butenolídeo correspondente com N-bromosuccinimida.⁶⁰



Esquema 5: Análise retróssintética para o análogo aromático **48** a partir do safrol **44**.

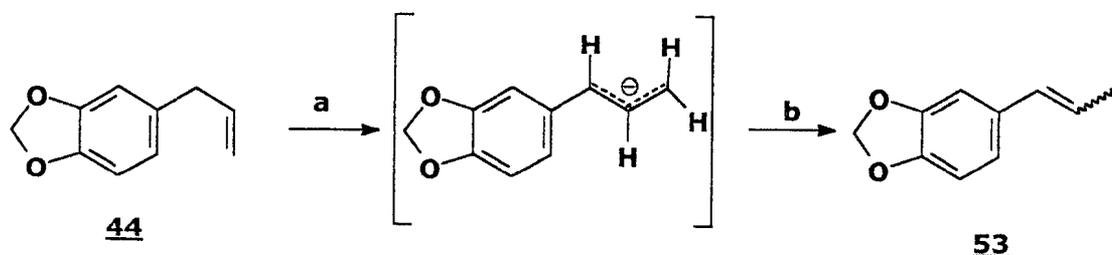
3.2 - OBTENÇÃO DO ISOSAFROL 53

A obtenção deste primeiro intermediário proposto na análise retrossintética, idealizada a partir do safrol 44 foi feita segundo metodologia originalmente descrita por Kaiser⁶¹ e utilizada posteriormente por Lima.⁵⁹ O safrol, mantido em um meio reacional básico, é isomerizado ao produto 53, o qual é obtido na sua forma pura após destilação com excelente rendimento. Esta reação de isomerização é favorecida devido à extensão de conjugação ocasionada pela transposição da ligação dupla das posições $\Delta^{3,4}$ para $\Delta^{1,2}$.

Vários métodos foram reportados recentemente para a obtenção do isosafrol 53. O interesse nesta molécula é grande devido à sua utilidade em sínteses de compostos mais complexos. Encontra-se na literatura a descrição do uso de irradiação de microondas nesta reação de isomerização, em sistemas com solventes ou em sua ausência.^{62,63} A vantagem descrita para estes casos é a diminuição do tempo de reação e possibilidade de uso em escalas maiores.

Outra alternativa disponível para a isomerização de 44 a 53 refere-se ao uso de supernucleófilos, como o reagente $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CO})_4$, em presença de cloreto de cobre.⁶⁴

Neste trabalho optou-se pela metodologia clássica, usando-se KOH/*n*-butanol sob refluxo, que além de simples, fornece o produto desejado com bons rendimentos (Esquema 6).



a. KOH, *n*-butanol, Δ , 6h; b. HCl 10%(v/v), 95%.

Esquema 6: Reação de isomerização do safrol 44 catalisada por base.⁵⁹

O produto isomerizado encontra-se em uma mistura de isômeros *cis-trans*, e a quantificação foi feita através de cromatografia gasosa, encontrando-se a relação de 20 e 80%, respectivamente para a mistura.

Tal mistura foi também observada no espectro de RMN de ^1H . Para a atribuição dos sinais foi utilizada as técnicas bidimensionais de HOMOCOSY e HETCOR (os espectros para o isosafrol encontram-se nas pág.145 a 152). E os assinalamentos descritos na tabela 4 (pág. 100) permitiram confirmar a estrutura do isosafrol 53.

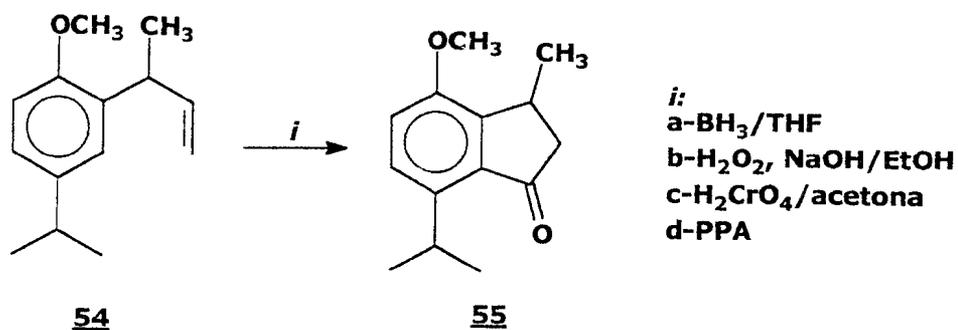
A reação de isomerização pode ser acompanhada por espectroscopia no UV. O surgimento de um máximo de absorção

adicional em 304 nm indica a migração da dupla ligação, com a extensão de conjugação do sistema de elétrons π .

3.3 - OBTENÇÃO DA INDANONA 52

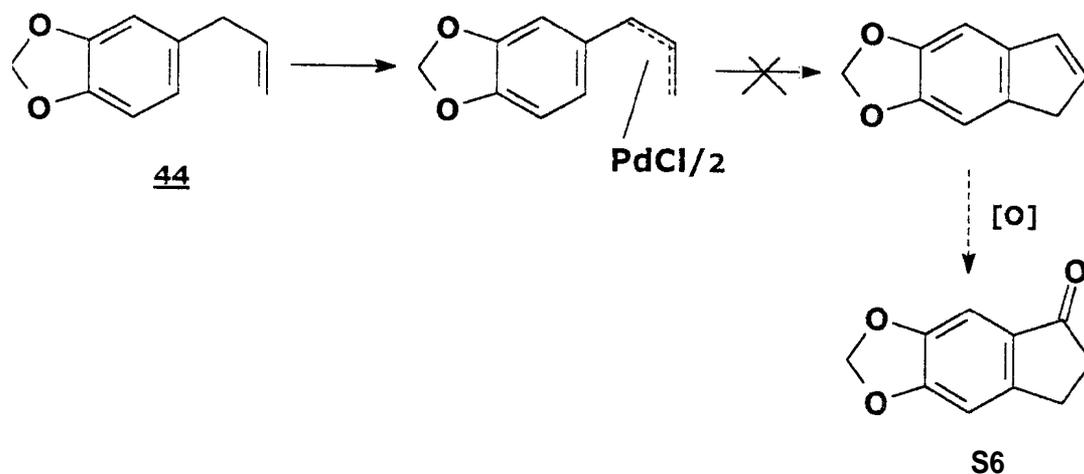
Como pode ser visto na análise retrossintética descrita (Esquema 5, pág. 47), uma vez obtido o isosafrol 53, a segunda etapa desta consiste na obtenção da indanona 52 (com formação do anel B do esqueleto análogo à molécula do estrigol).

Encontram-se na literatura trabalhos que descrevem a construção de esqueletos do tipo indanona utilizando como produto de partida compostos aromáticos com uma cadeia lateral insaturada na posição 1,2, como ocorre no safrol 44. O Esquema 7 mostra a alternativa clássica, envolvendo a conversão da dupla ligação alílica em uma unidade etilcarboxila com subsequente ciclização em quatro etapas, envolvendo uma acilação de Friedel-Crafts como etapa-chave.⁶⁵ Esta alternativa não parece ser, para o caso presentemente estudado, um método sintético atraente, devido ao grande número de etapas e aos baixos rendimentos relatados.



Esquema 7: Reação de construção do esqueleto do tipo indanona a partir do substrato 54.⁶⁵

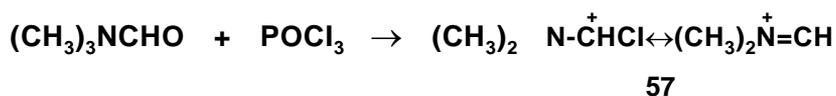
Uma provável alternativa para obtenção de intermediários do tipo indanona 56 foi testada por César em sua tese de mestrado,⁶⁶ usando complexos do tipo π -alilpaládio, que são eletrófilos úteis em reações nucleofílicas intramoleculares.⁶⁷ Contudo, os resultados obtidos não foram aplicáveis à obtenção do esqueleto do tipo indano (Esquema 8).



Esquema 8: Tentativa de obtenção do esqueleto do indanônico 56 a partir do safrol 44, usando o complexo do tipo π -alilpaládio.⁶⁶

Outra alternativa interessante, descrita originalmente por Witiak⁵⁸ e posteriormente modificada e otimizada por Lima⁵¹ foi a que se mostrou mais adequada à presente estratégia e os fundamentos teóricos da referida metodologia será descrita a seguir.

A reação de Vielsmeyer-Haack⁶⁸ é utilizada para a introdução de uma unidade aldeídica em sistemas aromáticos através de uma reação de substituição eletrofílica aromática, usando o reagente formado pela adição de POCl₃ à dimetilformamida (Esquema 9).

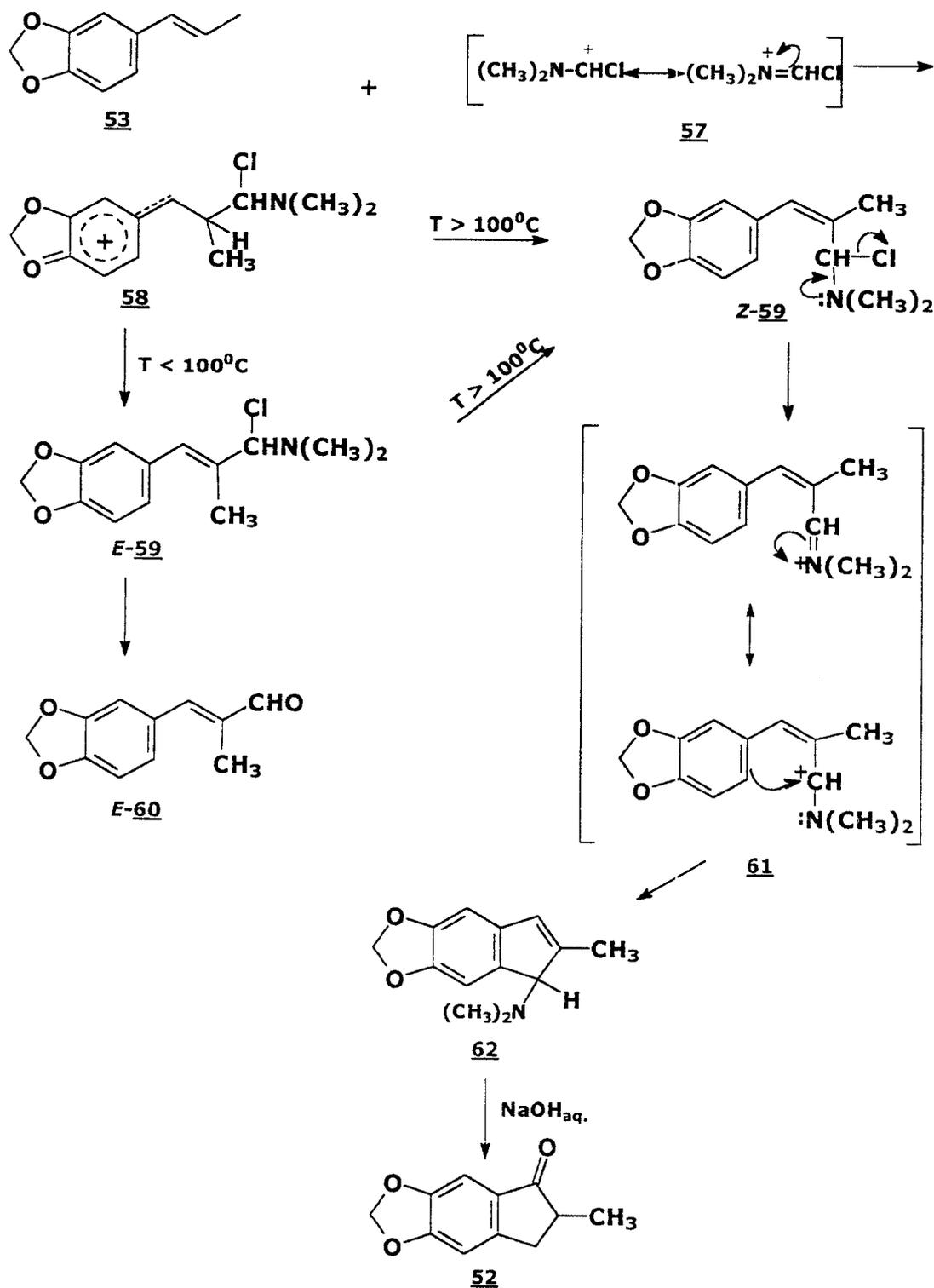


Esquema 9: Formação do intermediário de Vielsmeyer-Haack 57.⁶⁸

Witiak realizou um estudo extensivo sobre estirenos substituídos, objetivando a construção do anel indanona usando o reagente de V.H. Deste procedimento resulta o aminoindeno correspondente, que por hidrólise básica dá o composto desejado, como será visto adiante.

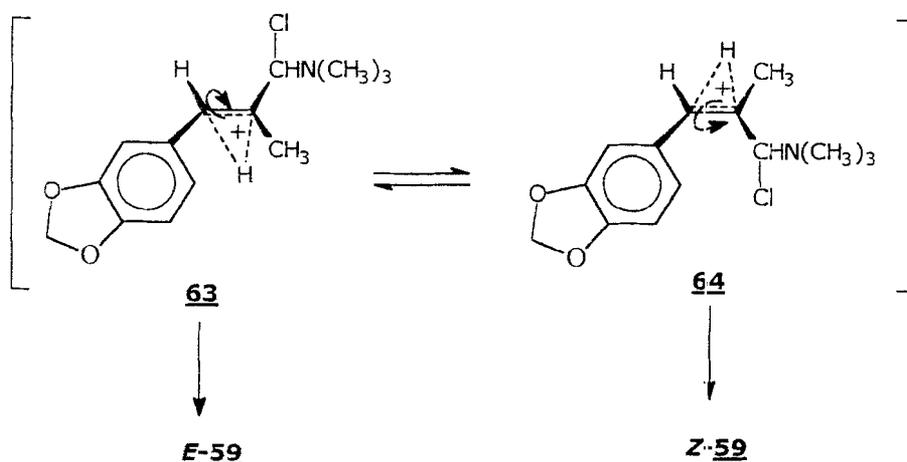
A reação do estireno substituído 53 com o reativo de V.H. resulta nos intermediários 59-E e 59-Z (Esquema 10). Observou-se a dependência da temperatura na obtenção destes produtos. Experimentos demonstraram que a reação mantida a temperaturas na faixa de 50°C produzem o aldeído 60 (Esquema 10), já que o intermediário preferencial, formado pelo controle cinético, tem

configuração *E* e a ciclização fica dificultada. Por isso, o autor conduziu as reações sob aquecimento e assim obteve os produtos de ciclização, pelo favorecimento do controle termodinâmico (geometria *Z* no intermediário 59). A temperaturas mais altas, na faixa de 100°C, o aminoindeno 62 (Esquema 10) tem sua formação favorecida.



Esquema 10: Esquema mostrando a formação da indanona **52**.^{51,58}

O mecanismo para a formação do aminoindeno 62 envolve o ataque eletrofílico do reagente de V.H. ao carbono β do estireno substituído, gerando um intermediário catiônico (63 ou 64, Esquema 11). A subsequente perda de um hidrogênio e formação do produto com estereoquímica *E* ou *Z* (o qual cicliza) depende da temperatura do meio. Do intermediário *E*, após hidrólise obtém-se o aldeído correspondente 60 e do intermediário *Z*, após também a etapa e hidrólise, obtém-se a indanona 52 com 47% de rendimento. Estudos posteriores usando o reativo de V.H. pré-aquecido (110-120° C) demonstraram ser este um método valioso no aumento do rendimento desta reação (ordem de 70%), contrastando com o menor rendimento descrito originalmente por Witiak.^{58,59} Neste trabalho utilizou-se esta metodologia, tendo-se conseguido reproduzir os rendimentos otimizados.



Esquema 11: Conformações dos intermediários formados a partir da reação do isosafrol 53 com o reativo de V.H. 57.

A indanona 52 foi caracterizada pelas técnicas usuais de análise. Para o espectro de RMN ^1H (pág. 154) nota-se o aparecimento de dois duplos dubletos em $\delta 3,25$ e $\delta 2,60$ ppm, para os hidrogênios na posição três, que apresentam acoplamento geminal ($J=17$ Hz) pela vizinhança ao novo centro assimétrico formado. O hidrogênio da posição dois é assinalado como um mutipletto que está coincidentemente na mesma região de um dos hidrogênios do carbono três, e pode ser melhor observado quanto ao seu deslocamento pela expansão mostrada no espectro da pág. 155. Observou-se a simplificação dos sinais atribuídos aos hidrogênios aromáticos para dois singletos em $\delta 7,07$ e $\delta 6,78$ ppm. No espectro de RMN de ^{13}C (pág. 156) nota-se o aparecimento de um sinal em $\delta 207,21$ ppm, característico de carbono carbonílico cetônico.

Este intermediário 52 é extremamente versátil, podendo ser utilizado em outras estratégias sintéticas.^{69,70}

3.4 - OBTENÇÃO DO CETO-ÉSTER 51

Dando prosseguimento à estratégia de síntese do novo análogo proposto, uma das etapas-chave é a obtenção do ceto-éster 51 (Esquema 5, pág. 47).

Uma das formas usuais de formação de ligação carbono-carbono utiliza a química de enolatos.⁷¹ A relativa acidez de hidrogênio na posição α a uma carbonila é explorada para a inserção de uma nova unidade carbônica, ao se tratar o composto com uma base e subsequente adição de um eletrófilo.

A acidez do hidrogênio α à carbonila varia de acordo com a substituição do carbono α . Grupamentos doadores de elétrons diminuem significativamente esta acidez, e para cada tipo de sistema a força da base deve ser considerada, para que se consiga deslocar o equilíbrio para formação do enolato. Diversos tipos de base podem ser utilizadas e são classificadas segundo sua força, tendo-se, por exemplo, como bases fortes o *t*-BuOK e LDA, entre outras. Estas duas bases oferecem a vantagem de serem impedidas estericamente e por isso agirem como nucleófilos fracos, evitando assim a formação de sub-produtos.⁷² Os hidretos metálicos (NaH, KH) mostram-se também bastante versáteis.^{73,74}

Como é extremamente útil, a química de enolatos é bastante estudada acerca dos fatores que influenciam na sua reatividade.⁷⁵ Deve-se notar que estas reações exigem condições anidras, já que a água é um ácido mais forte que o grupamento metilênico ativado e pode

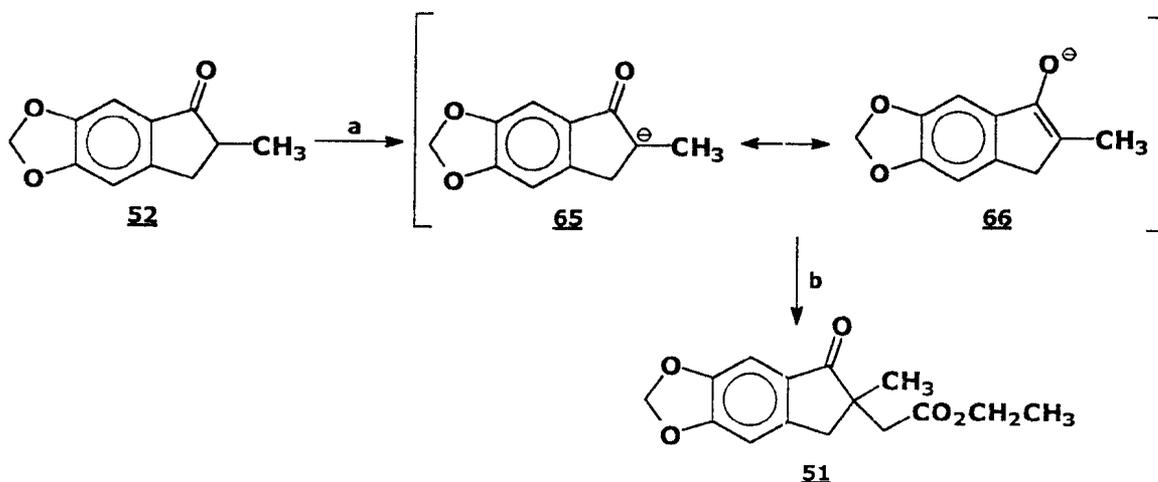
protonar o carbânion formado deslocando o equilíbrio para o sentido dos reagentes.

Para a enolização da indanona 52, inicialmente usou-se o disopropilamido de lítio (LDA), preparado a partir de *n*-BuLi e DIPA em THF sob condições anidras, atmosfera inerte e baixa temperatura. Porém, os resultados obtidos inicialmente não foram positivos, e após várias tentativas, só foi obtido o produto alquilado, o ceto-éster 51, modificando-se o experimental proposto⁷⁶ com o aumento do tempo reacional para 24 hs.⁷⁷ Mas os rendimentos não foram satisfatórios, permanecendo na faixa de 40%.

Com isso, após pesquisa na literatura^{57,73,78} propôs-se o uso de NaH como base tendo DMF como solvente, à temperatura de 65° C de aquecimento, em 21 horas de reação. Obteve-se então o ceto-éster 51 em melhores rendimentos, na ordem de 70%, após purificação em coluna *flash*.

Há de ser notado a vantagem da diminuição do trabalho de manipulação da base, já que o LDA deve ser recém-preparado, titulado e a reação deve ocorrer a baixa temperatura, Pelo maior número de manipulações, é mais susceptível à contaminação por umidade.

Após a formação do enolato, a C-alkilação com α -bromoacetato de etila permitiu a introdução do grupamento metilencarboxietil, gerando o ceto-éster 51 (Esquema 12).



a. NaH, DMF, 65°C, 1 hora, T.A.; b. BrCH₂CO₂CH₂CH₃, 1 dia, 65%.

Esquema 12: Reação de alquilação na obtenção do ceto-éster 51.

O intermediário 51 pôde ser caracterizado por espectroscopia no IV (Espectro 14, pág. 158) pelo aparecimento de uma segunda banda de absorção em 1730cm⁻¹, referente à carbonila do grupamento éster adicionado.

Já para o espectro de hidrogênio (pág. 159 e 160) foi observado dois dubletos, além dos já existentes para o anel indano, na região de δ 2,75 e δ 2,57 ppm, com $J_{\text{germinal}} \sim 16$ Hz e o desaparecimento do assinalamento do H _{α} , pela formação centro quaternário na posição dois.

O grupamento carboxietil pôde ser observado pelo quarteto em δ 4,0 ppm e o tripleto em δ 1,11 ppm. O assinalamento para o carbono em δ 171 ppm (Espectro 17, pág. 161) confirma a presença da carbonila do grupamento éster.

3.5 - OBTENÇÃO DA LACTONA 50

Após a introdução da unidade metilenocarboxietil, o próximo passo da estratégia sintética proposta consistiu na construção de um anel lactônico, correspondente à subunidade C do esqueleto básico do estrigol (análise retrossintética, esquema 5, pág. 47).

Inicialmente a obtenção deste anel foi proposta em duas etapas,⁶⁶ sendo a primeira etapa a redução seletiva da carbonila cetônica com NaBH_4 em etanol e a segunda etapa a hidrólise do éster em meio básico, usando THF como solvente e refluxo, com posterior acidificação. Tal método gera como único produto a lactona 50 desejada, porém há a desvantagem da inserção de uma etapa adicional na rota sintética, com conseqüente diminuição do rendimento global da reação ceto-éster lactona, que fica na faixa de 50%.

Pela consulta à literatura disponível,²⁸ propôs-se a reação de obtenção da lactona em uma só etapa a partir do ceto-éster 51. Foi feita a hidrólise da porção éster do composto 51 em meio básico, com subsequente reação de redução da carbonila cetônica com NaBH_4 e posterior acidificação, sendo todas estas reações executadas *one-pot*. O rendimento para esta transformação ficou em torno de 80%. Observou-se que somente uma pequena quantidade de lactona é formada logo após a acidificação da mistura reacional. Por isso aumentou-se o tempo após a adição de ácido. A lactona foi obtida com alto grau de pureza e não necessitou de nenhum método de purificação adicional.

Outros tipos de agentes redutores que promovem a IGF de sistemas semelhantes ao aqui estudado podem ser usados.

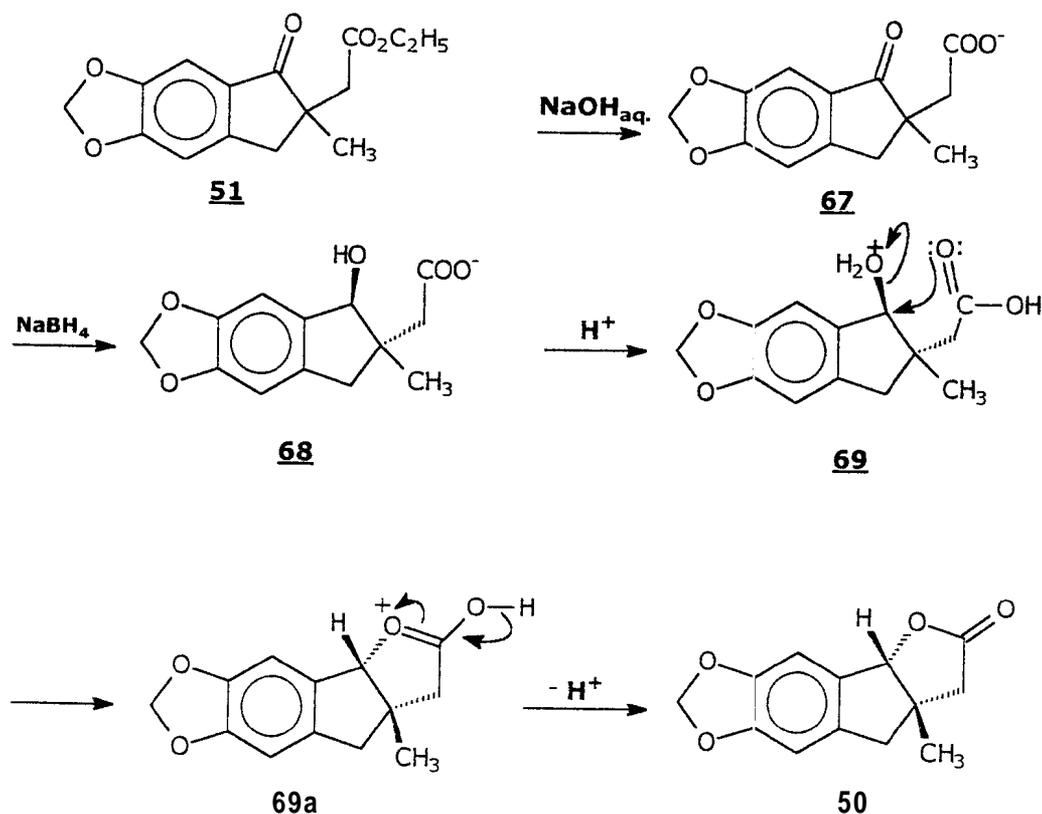
São relatados a hidrogenação catalítica com Pd/C^{40} ou a utilização de hidreto de diisobutilalumínio.²⁰ Porém os melhores resultados são obtidos com uso de NaBH_4 .

Quando da formação do álcool-éster, este muitas vezes lactonizava espontaneamente. Este dado é um indício de que o anel lactônico possui fusão *cis* com o anel ciclopentano.^{39b} Posterior estudo de nOe evidenciou a junção *cis* já esperada.

A primeira etapa para a formação do produto 50 ocorre com a redução de grupamento carbonílico à hidroxila, tendo a configuração

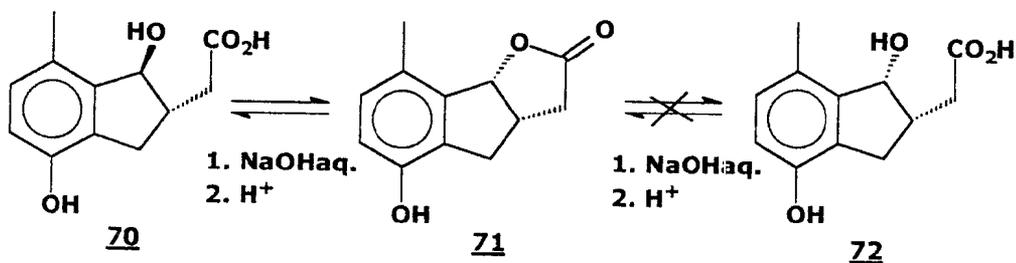
trans como principal isômero. House *et al.*⁷⁹ sugerem que esta estereoquímica relativa ocorre preferencialmente por causa da assistência do ânion carboxilato na transferência de hidreto, ocasionando a orientação deste para o mesmo lado em que se encontra a porção β -éster. Assim, o produto mais estável formado possui estereoquímica relativa *trans*, mantendo a estereoquímica do estado de transição.⁸⁰

A segunda etapa ocorre com a lactonização. A lactona 50 com estereoquímica relativa *trans* é formada através de um mecanismo intramolecular do tipo AA1, no qual ocorre a substituição nucleofílica da hidroxila protonada pelo oxigênio carboxílico, resultando na *cis-anelação* exclusivamente (Esquema 13). Já o álcool com estereoquímica relativa *cis* lactoniza espontaneamente.



Esquema 13: Proposta de mecanismo para a lactonização do ceto-éster **51**.⁸¹

Há descrito na literatura⁸¹ um experimento que justifica este mecanismo: a exposição do anel lactônico com junção *cis* de um sistema semelhante ao aqui descrito, a lactona **71**, em NaOH aquoso, seguida da acidificação da mistura a pH 3-4 provoca a abertura do anel resultando somente no *trans*-hidróxi-álcool **70** correspondente (Esquema 14).



Esquema 14: Reação de abertura da lactona 71, dando somente o produto *trans*.

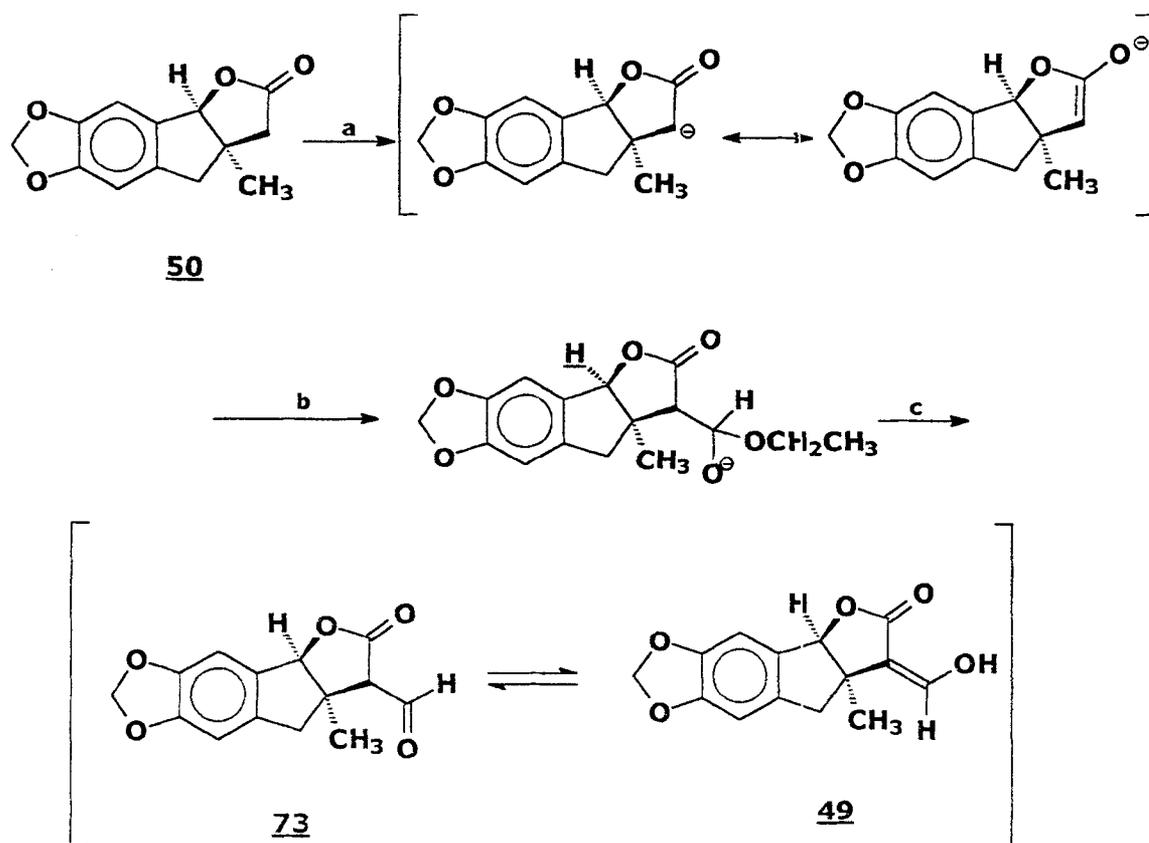
Os dados espectroscópicos confirmaram a formação da lactona 50. O espectro no IV (pág. 163) mostra uma banda de absorção em 1761cm^{-1} , característico de carbonila lactônica. Já no espectro de RMN de ^1H (pág. 164) aparecem dois pares de dubletos na região de $\delta 2,99$ - $2,76$ ppm e $\delta 2,63$ - $2,43$ ppm, pertencentes ao hidrogênios metilênicos diastereotópicos nas posições a ao centro quaternário (carbono 3a) da junção dos dois anéis de cinco membros. No espectro de ^{13}C (pág. 165) observa-se o aparecimento de um sinal em $\delta 176,30$ ppm para o carbono carbonílico da lactona, com o concomitante desaparecimento dos dois sinais de carbonos carbonílicos presentes no ceto-éster 51.

3.6 - OBTENÇÃO DO ENOL 49

Carbonilas de ésteres carboxílicos são um dos grupamentos ativantes mais importantes em síntese orgânica, no que diz respeito a química de enolatos.⁷¹

Mais uma vez usando a reatividade de um metileno em porção α a um grupamento carbonila para a formação de ligação carbono-carbono, obteve-se o enol 49, a partir da reação de enolização da lactona 50 usando-se como base *t*-BuOK em THF, seguida da adição de formiato de etila, como mostra o esquema 15. O produto de formilação foi obtido com rendimentos na faixa de 60% em alto grau de pureza.

Compostos β -dicarbonílicos possuem normalmente duas formas de equilíbrio tautoméricas (estruturas 73 e 49 do Esquema 15). A porcentagem da forma enólica nestes compostos é elevada devido à extensão de conjugação do sistema de elétrons π e pela formação de ligação hidrogênio intramolecular.⁸²



a. $t\text{-BuOK}$, THF, 25°C , 1h; b. $\text{HCO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, 2 dias; c. HCl 10%; 65%.

Esquema 15 - Formação do produto de formilação da lactona 50.

Observando-se o espectro no IV (pág. 167) do produto obtido, pode-se sugerir que há as duas formas tautômeras presentes no equilíbrio, para o composto em estado sólido. Há uma banda de absorção larga em 3404 cm^{-1} , mas não se pode prever se tal assinalamento confirma a formação de ligação hidrogênio

intramolecular. Uma banda de absorção em 2722 cm^{-1} dá indício da presença de carbonila aldeídica, porém só se tem uma banda de absorção em 1706 cm^{-1} que é atribuída à carbonila lactônica. A banda de absorção intensa em 1681 cm^{-1} é característica para a dupla C=C da porção enólica.

O enol 49 possui solubilidade muito baixa em CHCl_3 , ainda assim conseguiu-se realizar um espectro de RMN de ^1H para observar os assinalamentos do hidrogênio vinílico e da hidroxila neste solvente,⁸³ contudo, melhores espectros foram obtidos dissolvendo-se a amostra em $\text{DMSO-}d_6$.

Para a amostra pura esperava-se encontrar, em um solvente que não favorece o equilíbrio para a forma enólica, como o CDCl_3 , traços da porção aldeídica (sinal para o hidrogênio aldeídico, em torno de $\delta 9\text{ ppm}$). Porém, somente com espectros da amostra impura isso foi possível de se detectar, mas não poder-se-ia afirmar, sem ambigüidade, este assinalamento. E ainda esta vez não se conseguiu observar as duas formas tautoméricas.⁸⁴

Fez-se a tentativa de obter-se os espectros de ^1H e ^{13}C em acetona. Embora que para o espectro de ^{13}C tenha sido observado o aparecimento de um sinal em $\delta 206\text{ ppm}$, característico do carbono carbonílico de aldeído, não foi observado o sinal na região de $\delta 170\text{ ppm}$

para a carbonila de éster. No espectro de RMN de ^1H os sinais em $\delta 9,86$ e $\delta 7,55$ ppm sugerem o assinalamento para a forma aldeídica 73. Neste, não há nenhum assinalamento para a hidroxila. Devido a estes resultados serem pouco conclusivos, tais dados não foram considerados.

Os espectros de ^1H e ^{13}C , bem como os dos experimentos bidimensionais (HOMOCOSY e HETCOR) realizados em $\text{DMSO-}d_6$ mostram o composto na sua forma enólica. O assinalamento em $\delta 11,28$ ppm do espectro de ^1H (pág. 168) foi atribuído ao hidrogênio hidroxílico, e este deslocamento sugere a formação de ligação hidrogênio. É interessante notar neste espectro o acoplamento entre os hidrogênios em $\delta 11,28$ e $\delta 7,44$ ppm com $J=5,96$ Hz, o que sugere a formação de ligação hidrogênio intramolecular.

Poder-se-ia pensar na formação de ligação hidrogênio com o solvente, porém um experimento realizado fazendo-se quatro diluições da amostra para a ressonância de ^1H , observou-se que o assinalamento atribuído à hidroxila não mudava de posição. Com este dado, pôde-se afirmar que o composto 49 possui a forma enólica com formação de ligação hidrogênio, como mostrado na figura a seguir.

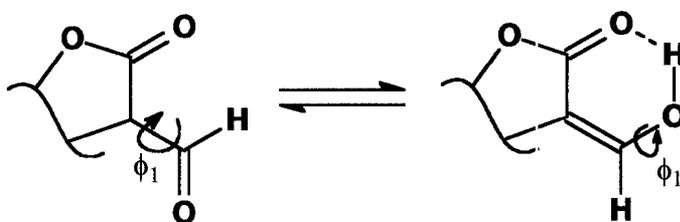
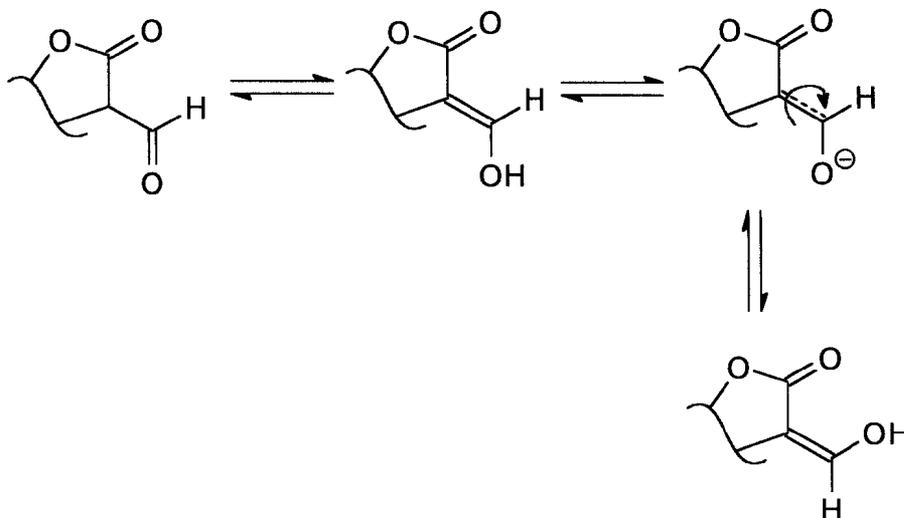


Figura 22 - Tautomerismo ceto-enólico da porção β -dicarbonílica para os intermediários 49 e 73.

Uma questão intrigante foi a proposição para a estereoquímica *Z* da ligação dupla enólica. Quando da reação de formilação, para a forma aldeídica, as duas carbonilas deveriam estar o mais distanciadas possível devido à repulsão eletrônica,^{39b} ou seja, em conformação *anti*. Para a formação do tautômero enólico, pensar-se-ia na estereoquímica *E* preferencialmente. E como a rotação livre da ligação dupla não é possibilitada, não é usual imaginar-se a conversão das formas *E* da forma aldeídica para a forma *Z* do enol. Um dado da literatura⁸⁵ aponta que este mecanismo de interconversão deve ser feito via formação de um ânion pela troca rápida de hidrogênio, possivelmente catalisada por traços de ácido ou de base (Esquema 16). Neste caso a ligação com caráter parcial de dupla facilitaria a rotação para a formação do isômero *Z*.



Esquema 16 - Possível mecanismo para a interconversão tautomérica do composto 49 com formação de ligação hidrogênio.⁸⁵

Para obtenção de mais dados que corroborassem os anteriormente descritos, foi feito um estudo preliminar de modelagem molecular para o composto 49 na forma aldeídica e na forma enólica, usando o pacote MOPAC 150, fazendo-se uso do Halmitoniano PM_3 por ser melhor parametrizado em estudos de ligação hidrogênio⁸⁶ e a palavra chave EF HESS como fator de acurácia.

Todos os cálculos foram realizados fazendo-se rotações de 20 graus ao ângulo diedro ϕ_1 (figura 22), tomando-se o cuidado de considerar as energias obtidas somente quando o gradiente fosse menor que 0,1.

Numa tentativa de se obter a barreira de energia nas conformações 49 e 73, onde a ligação hidrogênio é formada com o

oxigênio da carbonila, elaborou-se os gráficos de energia das formas tautoméricas do composto 49 (gráficos 1 e 2) e a tabela 2 mostra os valores das energias em função do ângulo diedro ϕ_1 .⁸⁷ Observando-se estes gráficos pode-se ver que as conformações propostas para o aldeído 73 (maior distanciamento possível para as carbonilas) e o enol 49 (hidroxila com formação de ligação hidrogênio com a carbonila lactônica) estão condizentes.

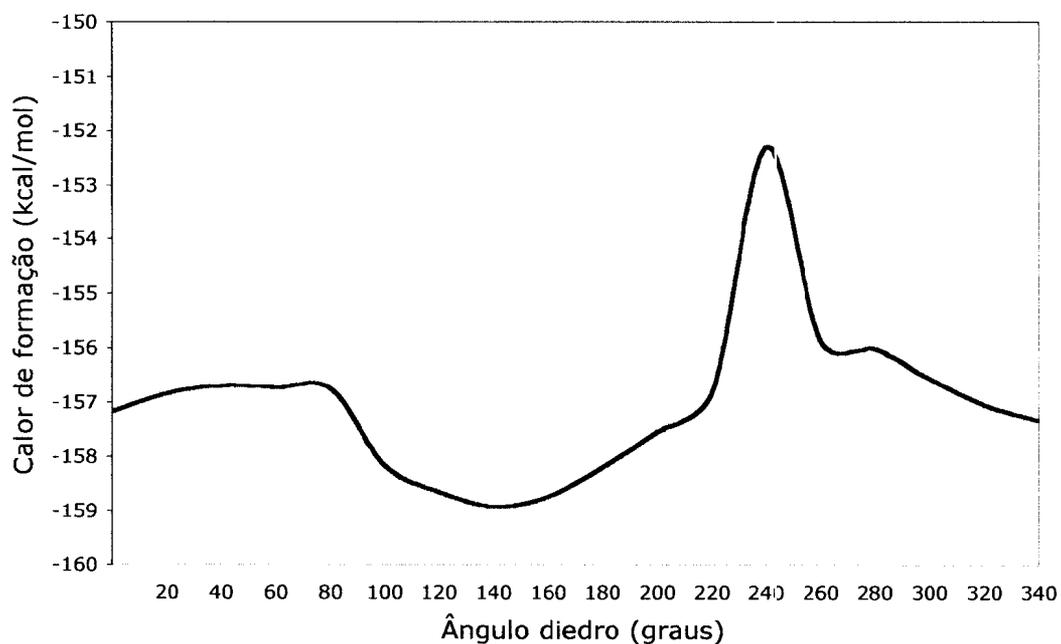
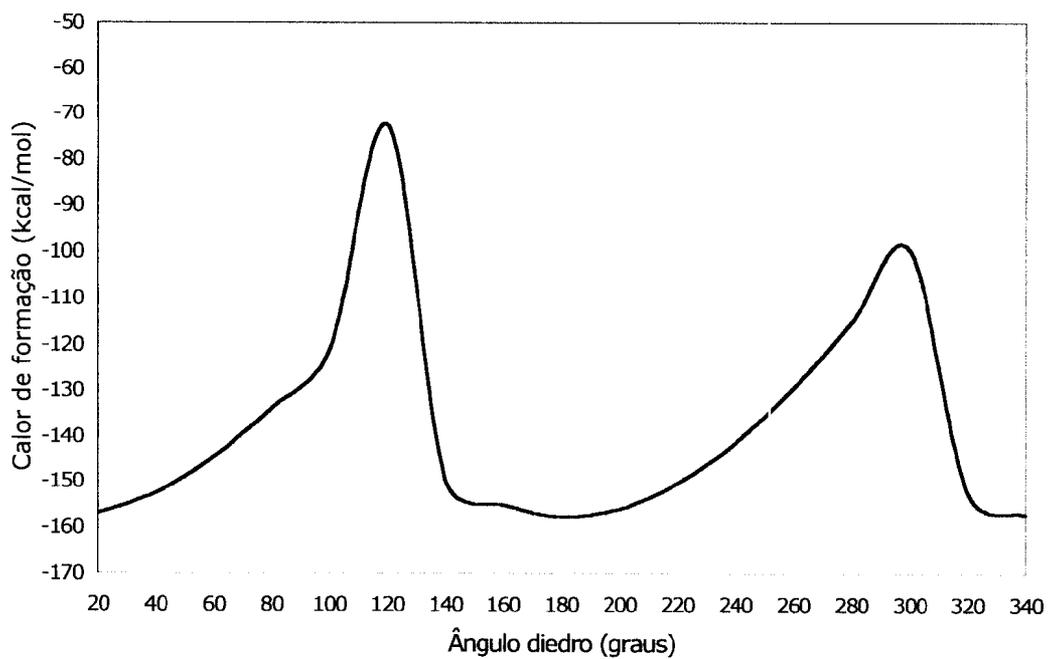
Forma aldeídica **73****Gráfico 1** - Gráfico de energia *versus* ângulo diedro ϕ_1 do tautômero **73**.*Forma enólica* **49****Gráfico 2** - Gráfico de energia *versus* ângulo diedro ϕ_1 do tautômero **49**.

Tabela 2 - Variação do calor de formação com ângulo diedro ϕ_1 do intermediário na forma aldeídica **73** e na forma enólica **49**.

Ângulo ϕ_1	Calor de formação (kcal/mol)	
	Aldeído 73	Enol 49
0	-157,1607	-158,6051
20	-156,8269	-157,0902
40	-156,6739	-152,4903
60	-156,7140	-144,6126
80	-156,7402	-133,8147
100	-158,1449	-120,9094
120	-158,6339	-72,564760
140	-158,9116	-149,8745
160	-158,7187	-155,1767
180	-158,1690	-158,6758
200	-157,5179	-156,0142
220	-156,7845	-150,4084
240	-152,2821	-141,2758
260	-155,8658	-129,2550
280	-156,0103	-115,0100
300	-156,5531	-99,7324
320	-157,0329	-152,4945
340	-157,3258	-157,1240

Tabela 3 - Valores de calor de formação obtidos por modelagem molecular.

	Calor de formação (kcal/mol)	Gnorm
Enol 49 com ligação hidrogênio	-158,60542	0,08955
Aldeído 73	-158,92508	0,0523
Enol 49 sem ligação hidrogênio	-153,49941	0,05897
Enol 49a com ligação hidrogênio	-141,17299	0,00950

Usando palavra chave **EF HESS=1**

A partir destes cálculos teóricos observa-se que as duas formas tautoméricas possuem calor de formação bastante próximos, diferindo somente de 0,32 kcal/mol (tabela 3). Com isso, conclui-se que ambas as formas contribuem igualmente para o equilíbrio ceto-enólico.

Na busca da confirmação da geometria Z proposta, foi feito o cálculo teórico para o calor de formação do enol sem ligação hidrogênio. Constatou-se que tal conformação possui menor estabilidade que o composto com ligação hidrogênio intramolecular. Com este dado, pode-se sugerir com maior precisão a estereoquímica Z para a forma enólica.

Uma terceira forma tautomérica, em que a ligação dupla enólica está deslocalizada para a porção lactônica, foi avaliada quanto à sua estabilidade para a contribuição do tautomerismo ceto-enólico do composto 49. De acordo com o cálculo teórico, e pela predição de que o tautomerismo enólico em compostos do tipo ésteres é pequeno, foi

encontrado um valor de calor de formação mais alto para esta forma (Figura 23, estrutura 49a).

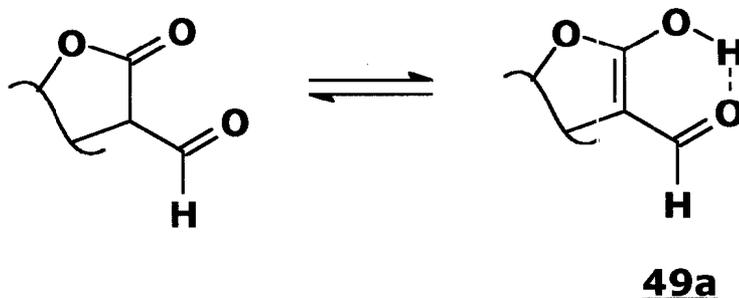


Figura 23 - Possibilidade de tautomerismo ceto-enólico para a porção lactônica do intermediário 49.

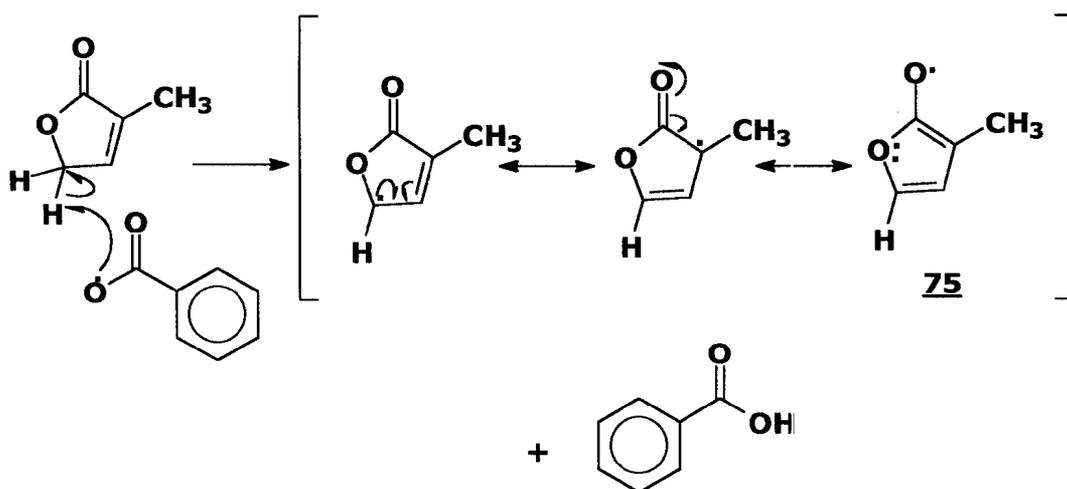
Embora haja vasta literatura para a construção de esqueletos de análogos ao estrigol, não são descritos dados relacionados para o tautomerismo em sistemas semelhantes.

3.7 - PREPARAÇÃO DO BROMOBUTENOLÍDEO 32

Pela análise retrossintética proposta (Esquema 5, pág. 47), vê-se a formação do análogo 48 a partir da junção do enol 49 com uma porção lactônica que representa o anel D. Para tal intento faz-se necessário um composto com características eletrofílicas para a reação

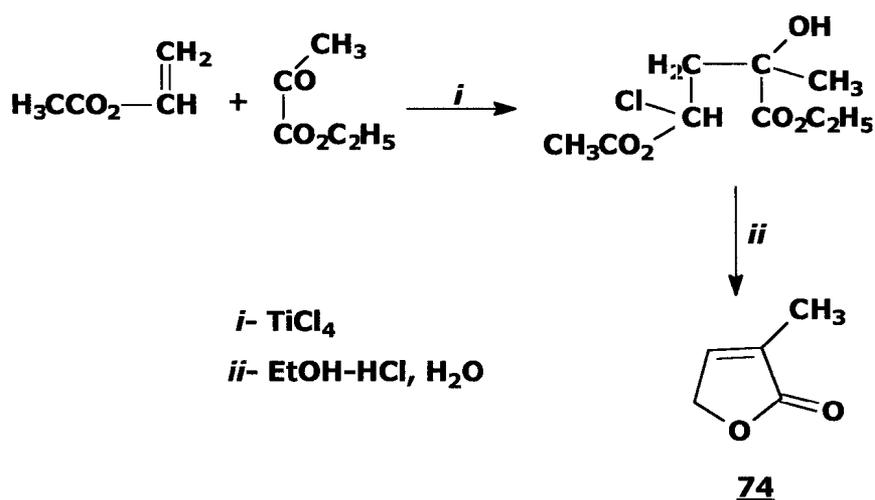
de acoplamento da porção ABC com o anel D. Por isso foi realizada a reação de bromação alílica do butenolídeo 74, para que tal funcionalização permitisse que esse composto agisse como um agente alquilante.

O método usual de bromação alílica envolve a utilização de NBS e um iniciador radicalar, como o peróxido de benzoíla.⁶⁰ A bromação alílica se dá exclusivamente no grupamento metilênico.^{39b} Como se trata de uma reação radicalar, a formação do radical 75 na posição metilênica é favorecida devido à possibilidade de formação de um intermediário reativo aromático, o que não ocorre com a formação do radical na metila alílica (Esquema 17).



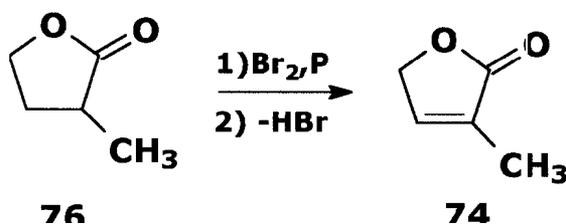
Esquema 17 - Proposta mecanística para a formação do radical 75 aromático na reação de formação do bromobutenolídeo 32.

Neste trabalho utilizou-se o butenolídeo obtido comercialmente (Aldrich Chemical Company, Inc.), há porém na literatura metodologias para a sua síntese. Johnson *et al.*²⁹ propuseram uma síntese prática do butenolídeo 74 a partir do acetato de vinila e do piruvato de etila na presença de tetracloreto de titânio seguido da ciclização (Esquema 18).



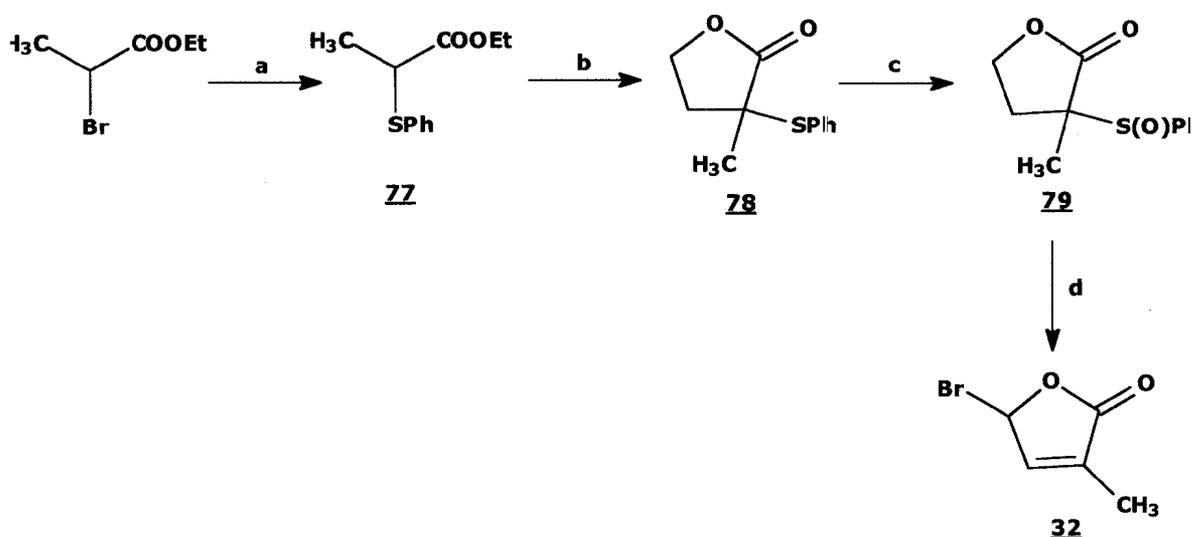
Esquema 18 - Metodologia sintética proposta por Johnson *et al.* para a obtenção do butenolídeo 74.²⁹

Outra forma de obtenção para o composto 74 vem da reação de bromação e debromação da α -metil- γ -butirolactona 76 (Esquema 19).²⁹



Esquema 19 - Obtenção do butenolídeo partir da α -metil- γ -butirolactona.²⁹

Mangnus *et al.*⁵⁷ sugeriram uma rota sintética para o bromobutenolídeo 32 partindo-se do α -bromopropionato de etila (Esquema 20). Ocorre na primeira etapa a substituição do bromo por um grupamento tiofenil. Este éster é então desprotonado com LDA e tratado com oxirano. Posterior acidificação do meio resulta no 4-hidroxi-2-(tiofenil)-butanoato, que sofre lactonização espontânea dando a lactona 78. A oxidação do átomo de enxofre em 78 ao correspondente sulfóxido 79 e subsequente eliminação do ácido fenilsufênico por termólise resulta no bromobutenolídeo 32.



a- PhSNa , EtOH b- 1- LDA/THF , 2- oxirano, 3- H^+ c- NaIO_4 , $\text{MeOH/H}_2\text{O}$, d- NBS , CCl_4

Esquema 20 - Obtenção do bromobutenolídeo 32 proposta por Mangnus *et al.*⁵⁷

A reação de bromação deve ser feita sobre pequenas quantidades, porque este produto degrada facilmente quando estocado.

Pelo espectro no IV (pág. 174), observou-se uma banda de absorção em 674 cm^{-1} , característica de produtos bromados. Em 1781 cm^{-1} e 1653 cm^{-1} , há o aparecimento de duas bandas de absorção atribuídas à carbonila e à ligação dupla carbono-carbono, respectivamente. No espectro de RMN¹H (pág. 175) observa-se o assinalamento para os três hidrogênios, todos acoplando entre si, comportamento característico de anéis heterocíclicos insaturados com átomo de oxigênio.⁴

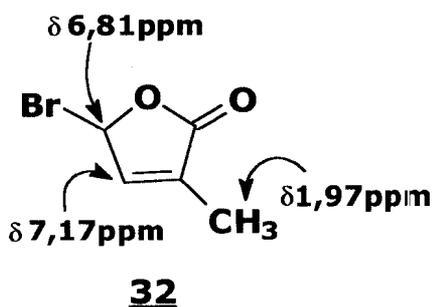
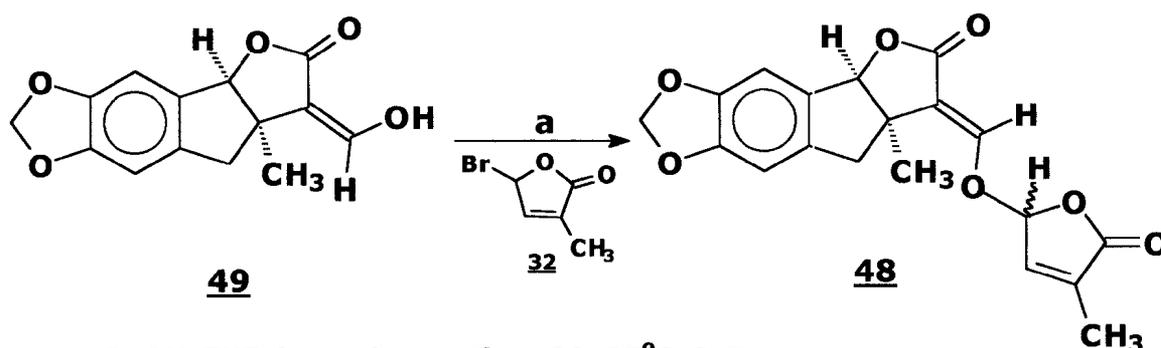


Figura 24 - Atribuições de RMN ¹H para o bromobutenolídeo 32.

3.8 - PREPARAÇÃO DA ANÁLOGO AROMÁTICO DO ESTRIGOL 48

Através de uma reação de O-alkilação, utilizando-se *t*-butóxido de potássio como base e o bromobutenolídeo 32 recém preparado como agente alquilante, obtém-se o análogo 48 a partir do enol 49, com rendimento de 50%, como uma mistura de epímeros em C2' (Esquema 21).



Esquema 21 - Obtenção do novo análogo aromático 48.

O composto 48 possui os quatro anéis presentes no análogo GR24 e adicionalmente um grupamento metila na posição 3a e uma ponte metilenodioxí nas posições 6,7.

O espectro no IV (pág. 176) mostra duas bandas de absorção para as carbonilas lactônicas. O valor em 1783 cm^{-1} pode ser atribuído à carbonila do anel D.

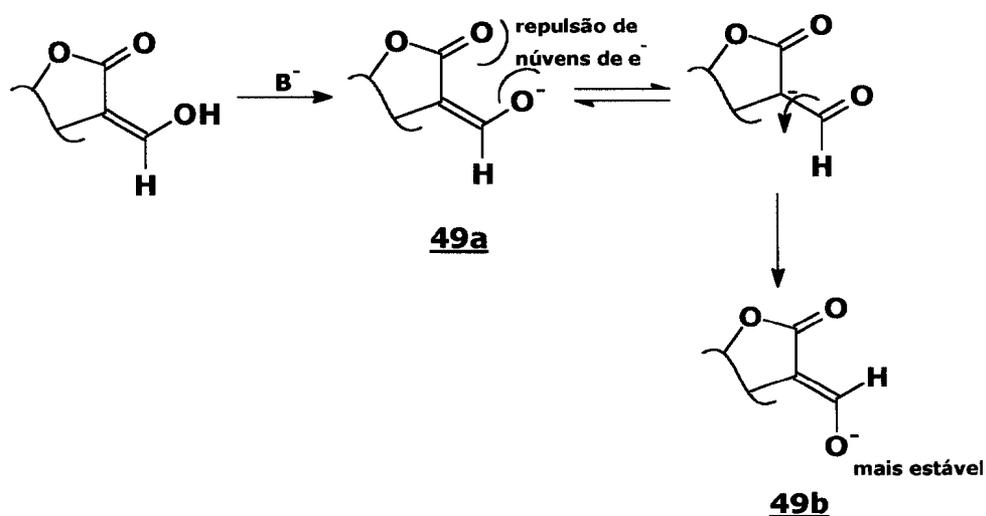
No composto natural 1 (Figura 1, pág. 4), é encontrado a geometria *E* para a ligação dupla exocíclica. O assinalamento do hidrogênio na porção enol-éter neste composto está em $\delta 7,42$ ppm, posicionamento em uma região mais baixa devido ao efeito do cone de desproteção oferecido pela anisotropia da carbonila lactônica na posição 2. Cassady *et al.*⁴⁸ fizeram o estudo dos valores de assinalamento para o hidrogênio nas geometrias *E* e *Z* da ligação dupla exocíclica de um sistema semelhante ao estrigol. Para a geometria *Z* o valor do deslocamento fica em torno de $\delta 6,8$ ppm.

Uma forma usada na literatura de se confirmar a geometria da ligação dupla enol-éter presentes nos análogos do estrigol é a comparação do deslocamento químico deste hidrogênio.^{20,28} Para o análogo 48 presentemente sintetizado, fez-se tal comparação e pode se confirmar a configuração *E* esperada. Tal estereoquímica ocorre devido a possibilidade do maior distanciamento dos dois átomos de oxigênio.⁵⁷

Como foi afirmado que a ligação dupla enol-éter do composto 49 possuía estereoquímica *Z* (com a formação de ligação hidrogênio), averiguou-se a mecanística para a formação da estereoquímica presente no análogo 48.

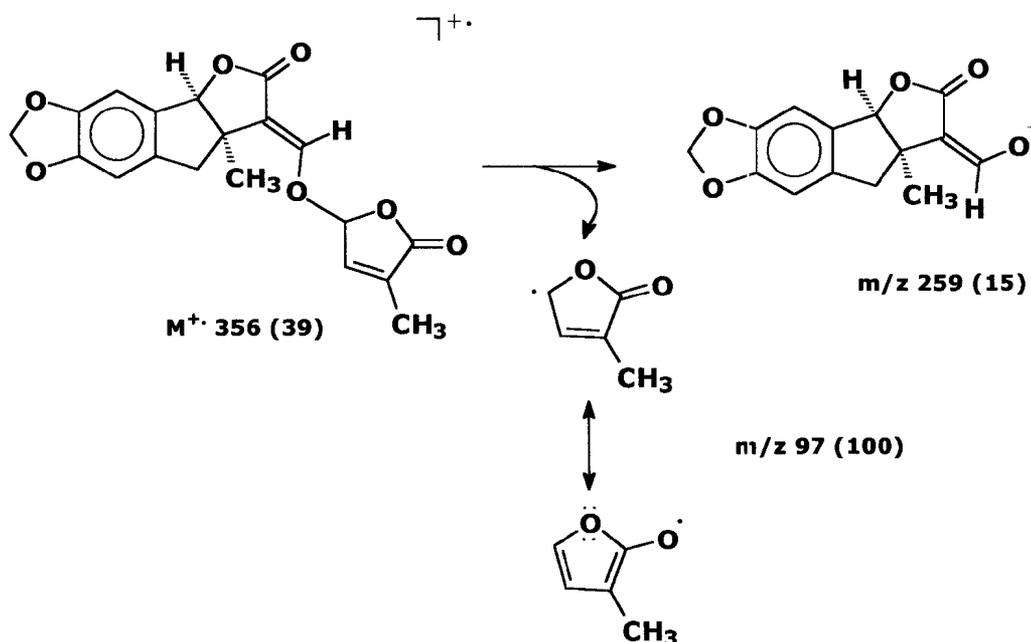
Estudos de modelagem molecular dos possíveis enolatos formados a partir do tratamento do enol com base (Esquema 22)

apontaram o enolato 49b (calor de formação de -201,20818 kcal/mol), como o composto mais estável. A inversão da configuração pode ser explicada supondo-se que, ao adicionar uma base, a formação da ligação simples entre o carbono do anel lactônico e o carbono da porção exocíclica permite a livre rotação com a possibilidade de se chegar a uma conformação mais estável, em que o oxigênio carregado negativamente está em posição *anti* à carbonila lactônica do anel C. Como o enolato mais estável assume estereoquímica *E*, o produto de alquilação também a possuirá.^{39b} Os valores para o calor de formação confirmam esta proposição, onde o enolato com estereoquímica *Z* possui calor de formação de -197,82390 kcal/mol, um valor adicional de 3,38 kcal/mol em relação ao enolato com estereoquímica *E*.



Esquema 22 - Proposta de mecanismo para a formação dos enolatos 49a e 49b.

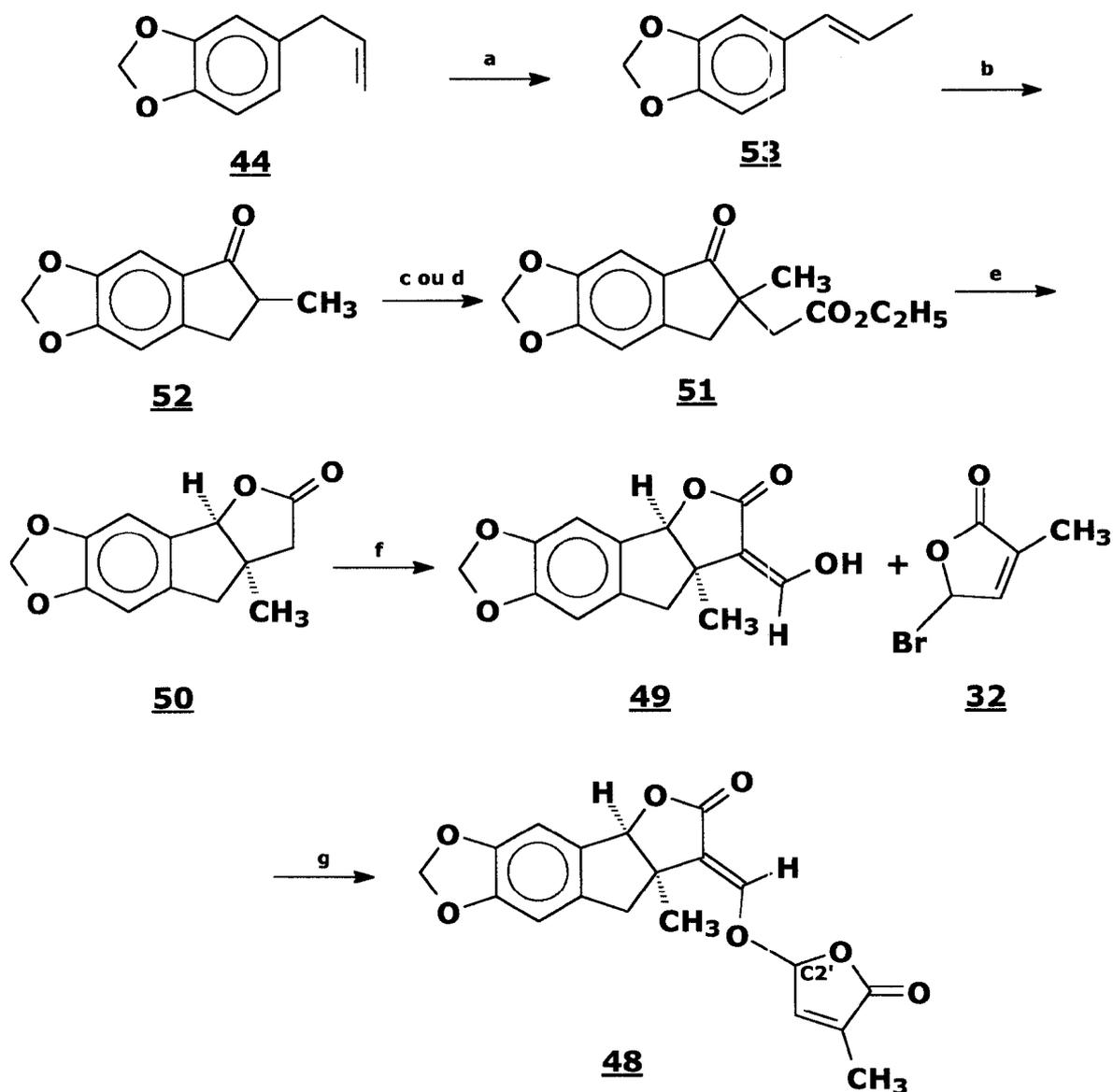
Não foi possível obter-se o espectro de massas do análogo 48 usando-se a técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, já que a amostra se apresentou instável frente às condições de análise. A técnica da inserção direta da amostra possibilitou a obtenção do espectro de alta resolução. Como relatado por Cook *et al.*,³ a fragmentação principal resulta na quebra da ligação do enol-éter com o anel butenolídeo, sendo esta fragmentação responsável pelo pico base, o que também foi observado no caso do novo análogo 48 (Esquema 23).



Esquema 23 - Fragmentação do análogo 48 para formação do pico base ($m/z 97$).

A quantificação dos epímeros em C2' formados foi feita através de análise em CLAE da mistura reacional bruta, obtendo-se uma relação diastereoisomérica de 1:1.

A seguir é mostrado o esquema geral desenvolvido para a obtenção do novo análogo aromático do estrigol 48.



a. KOH, *n*-butanol, Δ , 6h; 95% **b.** POCl₃, DMF, 0° C, então 110°C, isosafrol **53**, 110°C, 3h, OH⁻, 1 noite; 70% **c.** LDA, THF, -78°C, BrCH₂CO₂CH₂CH₃, -78 → 20°C, 1 dia; 45% **d.** NaH, DMF, 65°C, 1 dia; 65% **e.** NaOH/H₂O, 3h, 25°C, NaBH₄, 2 dias, H⁺, 1 noite; 80% **f.** *t*-BuOK, THF, 25°C, 1h, HCO₂CH₂CH₃, 2 dias; 60% **g.** *t*-BuOK, THF, bromobutenolídeo **32**, 25°C, 2 dias; 50%.

Esquema 24 - Seqüência sintética desenvolvida para a obtenção do novo análogo aromático do estrigol **48**.

3.9 - SEPARAÇÃO DOS EPÍMEROS DE 48⁸⁸

Encontra-se na literatura relatos sobre a atividade biológica de moléculas com o esqueleto básico do estrigol, mostrando que a mesma está relacionada intrinsecamente à estereoquímica do composto. Assim, apesar de se tratar de uma síntese racêmica, a investigação acerca da separação dos epímeros é relevante, principalmente porque ao se traçar uma estratégia assimétrica, tais problemas já se encontrariam solucionados.

Os epímeros formados na última etapa da rota sintética possuem valores de *R_f* em CCF muito próximos. Por isso não foi possível a sua separação por coluna cromatográfica ou por CCP. A técnica de recristalização também não mostrou-se eficiente. O uso de CLAE semipreparativa foi então proposto.

Inicialmente testou-se a o uso de colunas analíticas de fase reversa (C₈ e C₁₈) e sistema isocrático de eluição como fase móvel MeOH/água e CH₃CN/água. Porém tal metodologia não mostrou-se eficiente na separação dos diastereoisômeros (Cromatogramas 1 e 2, págs. 196 e 197).

A outra alternativa proposta foi o uso de coluna analítica de fase normal (sílica) com gradiente de eluição, utilizando como fase móvel

mistura de hexano-acetato de etila. Após o acerto das condições em coluna analítica para as análises quali e quantitativas, foi realizada a separação em coluna semipreparativa.

O método mostrou-se eficiente na separação dos dois epímeros do análogo 48.⁵⁶ O diastereoisômero de menor tempo de retenção foi denominado *DI* e o de maior tempo de retenção de *DII*.

Neste estágio não foi possível a realização da atribuição da estereoquímica relativa em C2' para cada diastereoisômero.

3.10 - TESTE DA ESTABILIDADE DO ANÁLOGO 48 EM SOLUÇÃO AQUOSA

Um dos ensaios biológicos foi feito utilizando solução aquosa do análogo solubilizado em acetona. Para avaliar a sua estabilidade nestas condições foram realizados análises de CLAE e de UV das amostras estocadas durante 15 e 120 dias.

A partir da comparação dos espectros de UV e dos cromatogramas obtidos para tais amostras, com os mesmos de amostras não submetidas à solução aquosa e preparadas recentemente,

pôde-se observar que o análogo 48 comportou-se bem neste meio, não sofrendo nenhum processo de degradação.

Nos cromatogramas somente haviam dois picos correspondentes aos epímeros do análogo 48 e pela análise dos espectros de UV, observou-se que os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ (e $\epsilon_{\text{máx}}$) permaneceram inalterados.

3.11 - OBTENÇÃO DOS DERIVADOS ALQUÍLICOS DE 49

Para verificar a estereoquímica da ligação dupla da porção enol-éter presente no produto final, foi feita a alquilação do enol 49 com CH_3I . Esta reação mostrou-se ser altamente seletiva para o isômero desejado E (observado pelo deslocamento do hidrogênio da ligação dupla enol éter), sendo este o único produto detectado.^{40,48} Fez-se a tentativa de irradiar a metoxila presente neste composto, porém o experimento de nOe não foi conclusivo acerca do posicionamento desta.

Para se confirmar a junção dos anéis B e C foi irradiado o hidrogênio em 3b, notando-se um nOe na metila em 10 de 7% (Espectro 46, pág. 190), confirmando a junção esperada *cis* (Figura 25).

Os hidrogênios α e β diastereotópicos no carbono 4 foram diferenciados irradiando-se a metila 10. Para o dubleto em $\delta 2,92$ ppm

foi caracterizado o H_{α} (nOe de 3%) e para o dubleto em δ 3,35 ppm foi atribuído ao H_{β} .

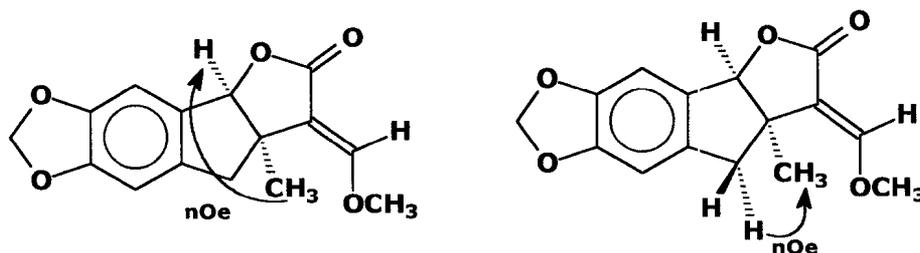


Figura 25 - Experimento de nOe para o derivado alquílico 80.

O composto enol etilado 81, obtido a partir da alquilação do enol com iodeto de etila foi sintetizado visando analisar a sua atividade citotóxica.

3.12 - RESULTADOS DOS TESTES BIOLÓGICOS

3.12.1 - ENSAIOS DE GERMINAÇÃO COM SEMENTES DE *Lactuca Sativa*, L.

Este teste preliminar serviu para ter-se um perfil da atuação do novo análogo aromático do estrigol 48 no estímulo à germinação de sementes. É reportado que sementes de alface também possuem um

tempo de dormência e por isso esta espécie pode dar um bom prenúncio da atividade da molécula estudada.^{25,33}

Para os dois ensaios realizados com o análogo 48 foram usados a acetona como solvente para solubilização em água, visto este solvente ser o que menos influencia na atividade.³⁰

O ensaio B foi feito com soluções armazenadas em uma semana. Pode-se notar que os resultados obtidos para este ensaio apresentam % menores de germinação, o que poderia indicar o início da decomposição do composto 48 em solução aquosa, porém tal hipótese foi descartada devido aos resultados dos testes de hidrólise analisados por CLAE. Os tratamentos dois e três, que receberam somente acetona e água, apresentaram a menor porcentagem de germinação (como pode ser visto nos gráficos a seguir), o que sugere uma interferência da acetona no processo de germinação. Apesar disso, os dados obtidos indicam que o novo análogo 48 parece suplantar o efeito nocivo da acetona, já que os ensaios quatro e cinco apresentam maior porcentagem de germinação. Este conjunto de dados demonstram a potencial atividade desta molécula na estimulação de germinação de sementes.

Pelos gráficos mostrados a seguir pode-se ver a maior porcentagem de germinação quando o análogo 48 estava presente (ensaios quatro e cinco para os dois experimentos;).

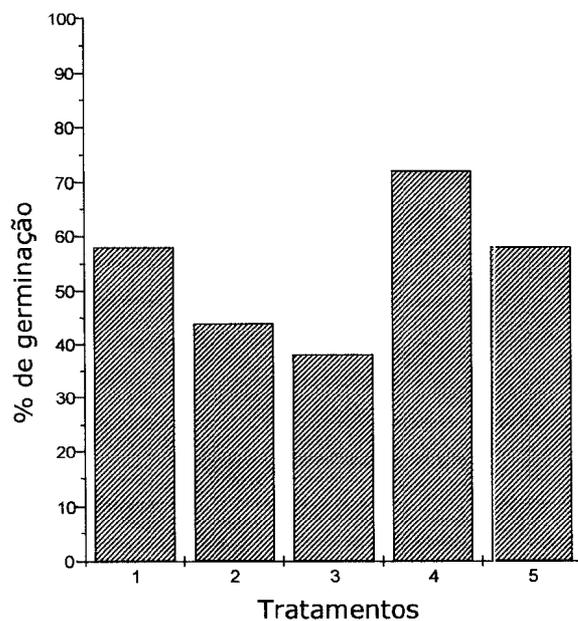


Gráfico 3 -Resultados de germinação de *Lactuca sativa* L. (alface) com solução do análogo **48** recém-preparada.

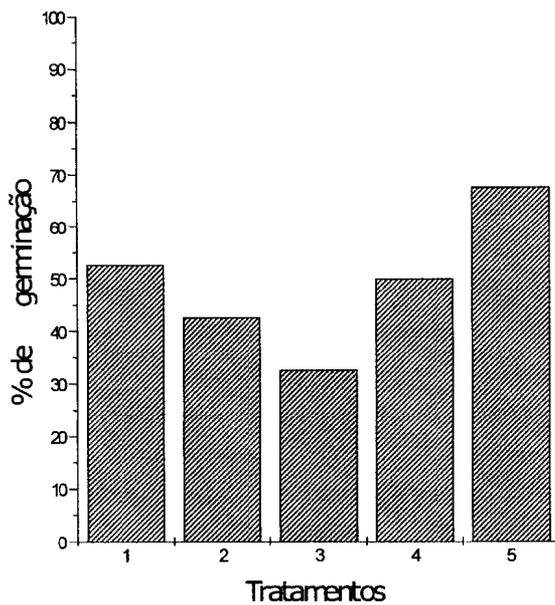


Gráfico 4 -Resultados de germinação de *Lactuca sativa* L. (alface) com solução do análogo **48** estocada de uma semana.

3.12.2 - ENSAIOS DE LETALIDADE SOBRE *Artemia Salina*, Leach.

Os novo análogo 48 e os intermediários lactona 50, enol 49 e enol etilado 81 foram submetidos ao bioensaio de avaliação da letalidade sobre larvas de *Artemia salina*, Leach.⁸⁹ Trata-se de um bioensaio de baixo custo, e que por não exigir técnicas assépticas tem o seu uso extremamente difundido, principalmente na área de química de produtos naturais, sendo que encontra-se também exemplos de sua utilização na avaliação preliminar de substâncias de origem sintética e semi-sintética.^{89a,c} Uma análise comparativa dos resultados descritos na literatura sobre a avaliação da atividade biológica de inúmeras substâncias submetidas a bioensaios tanto com o modelo *Artemia salina* e também sobre linhagens de células tumorais humanas, mostra, em muitos casos, uma correlação positiva entre os dois testes,^{89c} sendo porém que muitas vezes tal correlação não sucede, tendo moléculas que podem ser antitumorais, porém não citotóxicas.

As lactonas α,β -insaturadas geralmente possuem atividade citotóxica e/ou antitumoral.⁴⁶ Para o novo análogo sintetizado, vislumbrou-se este perfil de atividade. Porém para o teste com *Artemia salina* não se observou toxicidade em concentrações a 500 μ L, não sendo possível a obtenção da DL₅₀.

Foi proposto então avaliar a influência da presença da cadeia α,β -insaturada no esqueleto básico do análogo 48.⁴ Assim foram testados os intermediários 50, que não possui a porção insaturada, o enol 49, que possui a porção metileneoxi e o enol etilado 81, com a uma porção éter etílico e o análogo 48 com o anel lactônico D. Para esta série não foi possível detectar valores de DL_{50} com as doses testadas (valor máximo de 500 μ L), mostrando que para este tipo de moléculas a atividade tóxica não é relevante, o que não descarta a possibilidade de atividade antitumoral, visto que uma atividade não está intrinsecamente ligada a outra.

Para o estrigol é relatado a sua baixa toxidez, sendo este comportamento positivo para o uso no solo (processo de germinação suicida).²⁴ Com o resultado de citotóxidez do análogo 48 pôde ser visto o comportamento semelhante, ressaltando a viabilidade do uso deste novo análogo como herbicida.

CAPÍTULO 4 - CONCLUSÃO

Foi estudada a síntese de um novo análogo aromático do estrigol, tendo a proposta sintética se mostrado exequível para a obtenção deste composto, num total de 6 etapas com o rendimento global de cerca de 20 %.

A utilização de CLAE semipreparativa foi útil na separação dos epímeros em C2', tendo o uso de coluna de sílica a forma mais eficiente de separação.

Os resultados preliminares da avaliação da atividade biológica sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*, L.) foram positivos, demonstrando que o novo análogo aromático do estrigol 48 possui um perfil promissor para o uso como estimulante de germinação de sementes de *Striga* sp e *Orobancha* sp.

Não foi encontrado para o análogo 48 e os intermediários 49, 50 e 81 atividade tóxica no bioensaio sobre *Artemia salina* Leach. Estes intermediários, assim como o produto final, encontram-se em fase de avaliação de suas atividades antitumorais sobre algumas linhagens de células, no laboratório de Imunologia de Tumores no Departamento de Bioquímica Médica da UFRJ.

Os testes de avaliação de atividade biológica já realizados e os que se encontram em andamento referem-se à mistura de epímeros em C2'. Tendo em mãos os dois epímeros buscaremos repetir os testes separadamente.

CAPÍTULO 5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 - ESPECIFICAÇÃO DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os solventes utilizados para reações, extrações e colunas cromatográficas possuíam grau analítico das seguintes marcas: Merck, Grupo Química, Riedel e Vetec, sendo que os solventes utilizados nas reações foram submetidos aos seguintes tratamentos:⁹⁰

DMF- destilação de CaH_2 , estocado sobre peneira molecular;

THF- destilação na presença de Na^0 , benzofenona (como indicador) e utilização imediata.

O safrol utilizado foi obtido por destilação (p.e.= 234°C) do óleo de Sassafras (*Ocotea pretiosa*, Benth).

O hidreto de sódio em dispersão a 50% de óleo mineral foi usado sem tratamento prévio.

A remoção dos solventes foi feita em um evaporador rotatório Fisatom modelo 550.

Para cromatografia em coluna à pressão atmosférica utilizou-se como adsorvente sílicagel 60 Merck, com partículas de 35-70 mesh (0,063-0,200mm) e para cromatografia em coluna *flash*, como adsorvente sílicagel 60 Vetec com partículas de 240-400 mesh (0,04-0,063 mm).

Para CCF, utilizou-se placas de alumínio Kiessel Gel 60 F 254, 0,2mm de espessura Merck-Darmstadt, reveladas em lâmpada UV com comprimento de onda à 254 nm.

A determinação do ponto de fusão foi realizada em um aparelho Buchi 510 e os mesmos não foram corrigidos.

Os espectros na região de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer modelo 1600 FT, utilizando-se filme em células de NaCl ou patilhas de KBr e tendo-se os valores de número de onda medidos em cm^{-1} .

Os espectros de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50,3 MHz) foram obtidos em um espectrômetro Bruker AC-200 e os espectro de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) foram obtidos em um espectrômetro

Inova 500 Varian, utilizando-se como solventes CDCl_3 , acetona- d_6 , DMSO- d_6 e TMS como referência interna, tendo os valores de deslocamento químico (δ) medidos em ppm e as constantes de acoplamento (J) medidas em Hertz.

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo gasoso CGAR-EM modelo HP-5890, quadripolo, 70 eV. O espectro de massas de alta resolução foi obtido em um espectrômetro Autospect Micromass-EBE-High Resolution.

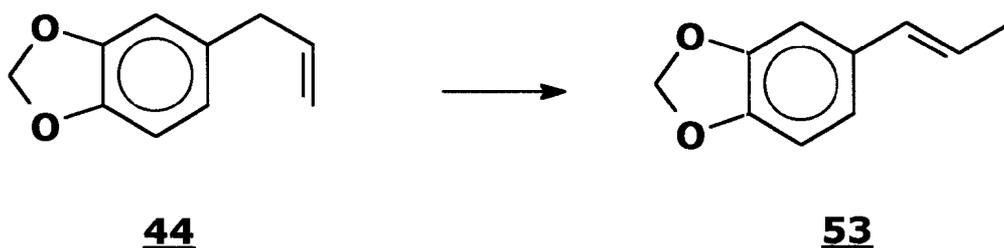
Os espectros na região de UV-visível foram obtidos em um espectrofotômetro DMS-80-Varian.

As análises por CLAE foram feitas em um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-10AS, com detetor LIV-visível SPD-10A e integrador CR6-A Cromatophac, com colunas analíticas Supelcosil LC-8, Supelcosil LC-Si e ODS Shimadzu (C_{18}), todas possuindo 25 mm x 4,6 mm di x 5 μm .

5.2 - PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1 - Preparação do 6,7-metilenodioxi-propenilbenzeno

(*isosafrol*)^{59,61}



Em um balão de 125 mL de capacidade, equipado com condensador de refluxo e agitador magnético foram adicionados 10 g (62 mmol; 9,1 mL) de safrol 44 e 50 mL (150 mmol) de uma solução 3N de KOH em *n*-butanol. O meio reacional foi mantido sob agitação, à temperatura de refluxo, por aproximadamente 3 horas.

Após o término da reação, evidenciado por CCF (eluído em hexano-acetato de etila 85%), a mistura reacional foi neutralizada com solução aquosa 10% (v/v) de HCl e a fase orgânica foi lavada sucessivamente com água destilada e solução aquosa de NaCl. Obteve-se então 9,5g (8,65 mL, 95%) de isosafrol 53 por destilação sob pressão reduzida, na forma de um líquido incolor.

p.e.: 232-234° C (lit:232-234° C Aldrich Chemical Company, Inc.)

IV (filme): 3022,1; 2889,3; 1605,9; 1495,4; 1442,6; 1353,7; 1246,3; 1192,6; 1099,6; 1041,0; 962,3; 937,8; 862,6; 818,3 cm^{-1}

UV (acetato de etila): $\lambda_{\text{máx.}}$ (abs) 264 nm (0.766); 304 nm (0.336).

CG/EMIE (70 eV) t_r = 5,123 min e 5,867 min m/z (int. rel.):

162(M^+ , 100%); 147 (2%); 131 (44%); 119 (4%); 104(53%); 91(11%); 78 (31%); 77(35,5%); 63 (22%); 51 (27%).

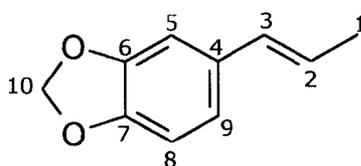
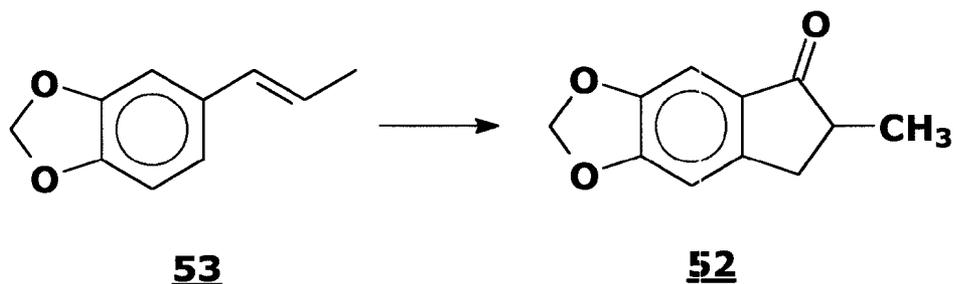


Tabela 4 - Atribuições de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para o isosafrol **53** em CDCl_3 .

C	^1H (δ, ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ, ppm)
1	1,83(dd, 3H, J=1,36 e 6,42)	18,24
2	6,29(dd, 1H, J=1,39 e 16,45)	130,44
3	6,08(dd, 1H, J=6,46 e 16,30)	123,75
4	-	132,34
5	6,86 (s, 1H)	105,18
6	-	146,38
7	-	147,80
8	6,76 (s, 1H)	108,92
9	6,72 (s, 1H)	119,96
10	5,91 (s, 2H)	100,79

Os espectros de ^1H e ^{13}C encontram-se nas páginas 146 e 149.

5.2.2 - Preparação da 2-metil-(6,7-metilenodioxi)-indanona^{58,59}



Em um balão bitubulado de 25 mL de capacidade, equipado com condensador de refluxo, agitador magnético e septo de borracha, contendo 5,2 mL (66,6 mmol) de DMF seco, mantido sob atmosfera de argônio, foram adicionados lentamente, mantendo-se o sistema sob banho de gelo, 1,2 mL (12,96 mmol) de POCl_3 (recém destilado). Após terminada a adição, o sistema foi levado à temperatura ambiente, com agitação magnética permanente, e então imerso em um banho de óleo estabilizado na faixa de temperatura entre 110-120°C, quando foram adicionados 1,5 g (9,26 mmol, 1,37 mL) de isosafrol 53, sendo o meio reacional mantido por 3 horas sob agitação. Após o término da reação (acompanhado por CCF) o meio reacional foi deixado atingir a temperatura ambiente, sendo logo após vertido sobre gelo picado. Em seguida, a mistura foi transferida para um funil de separação onde a fase aquosa ácida foi extraída por três vezes com 10 mL de éter etílico.

A fase aquosa foi levada a pH 10 pela adição de solução aquosa 7N de hidróxido de sódio e deixada sob agitação durante a noite, à temperatura ambiente, em um balão de fundo redondo. Após esse tempo, o produto foi extraído da fase aquosa básica quatro vezes com 15 mL de clorofórmio. As fases orgânicas reunidas (clorofórmio) foram lavadas com água destilada e solução aquosa saturada de cloreto de sódio, e em seguida secas sobre sulfato de sódio anidro, seguindo-se a evaporação do solvente, fornecendo 3,4g de um óleo viscoso de coloração castanho escuro. Este produto bruto foi purificado por filtração em coluna de sílica gel eluída com mistura de hexano e acetato de etila a 7%, gerando 1,2g (70%) da indanona 52 na forma de um sólido amarelo claro.

p.f.: 64-65 °C (lit: 63-63.5 °C)⁵⁸

IV (KBr): 2967,9; 2908,6; 1688,8; 1608,8; 1493,8; 1375,2; 1320,1; 1293,2; 1258,8; 1152,2; 1029,7; 936,2; 853,0; 807 cm⁻¹.

CG/EMIE (70 eV) tr = 4.898 min m/z (int. rel.): 190 (M⁺ 69,56%); 175 (100%); 162 (7,82%); 147 (17,39%); 131 (11,01%); 103 (16,81%); 89 (7,24%); 77 (18,84%); 63 (15,94%); 51 (17,39%).

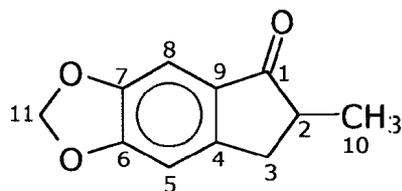
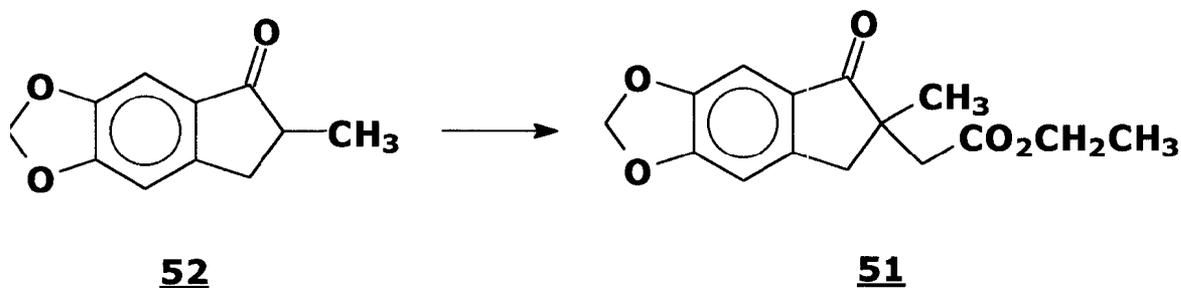


Tabela 5 - Atribuições de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a indanona **52** em CDCl_3 .

C	^1H (δ, ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ, ppm)
1	-	207,20
2	2,61-2,58 (m, 1H)	42,20
3	3,24 (dd, 1H, J = 16,57 e 7,13) 2,61-2,58 (m, 1H)	34,70
4	-	130,53
5	6,69 (s, 1H)	102,16
6	-	148,01
7	-	150,74
8	7,24 (s, 1H)	105,42
9	-	154,06
10	1,18 (d, 3H, J=7,29)	16,36
11	5,96 (s, 2H)	101,99

Os espectros de ^1H e ^{13}C encontram-se nas páginas 154 e 156.

5.2.3 - Preparação da (2-metil-2-metilenocarboxietil-6,7-metilenodioxi)-indanona^{57,73}



Em um balão de 25 mL de capacidade, equipado com agitador magnético e septo de borracha, foi feita uma suspensão de 0,172 g (3,57 mmol) de NaH 50 % (disperso em óleo mineral) em 10 mL de DMF. Ao conteúdo deste balão, mantido sob atmosfera inerte, foi adicionada uma solução de 0,452 g (2,37 mmol) da indanona 52 em 5 mL de DMF seco e o mesmo foi mantido sob agitação a 65° C por 1 hora; quando adicionou-se 0,53 mL (4,74 mmol, 0,079 g) de α -bromo acetato de etila, mantendo-se ainda a agitação e aquecimento por 1 hora. Após o término da reação (acompanhado por CCF), o sistema foi desligado e o balão foi resfriado em banho de gelo, quando foram adicionados 10 mL de água, seguida de extração por 3 vezes com 10 mL de éter etílico. A fase orgânica foi tratada com 10 mL de água, seguida de 10 mL de solução saturada de NaCl e seca sobre Na₂SO₄ anidro. Após

a evaporação do solvente o produto bruto obtido foi purificado em uma coluna *flash*, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila a 7%. Foram obtidos 0,320 g (60%) do ceto-éster 51 na forma de um óleo viscoso de coloração amarelada.

IV (filme): 2972,7; 2921,1; 1729,7; 1701,2; 1610,9; 1469,4; 1373,5; 1314,8; 1268,9; 1229,3; 1034,6; 976,2; 936,4; 869,9; 805,6 cm^{-1} .

CG/EMIE (70 eV) tr = 9.092 min m/z (int. rel.): 276 (M^+ ,36,36%); 231 (13,63%); 188(100%); 175 (4,54%); 145 (11,36%); 115 (13,36%); 102(9,09%); 77 (9,09%); 51(6,81%).

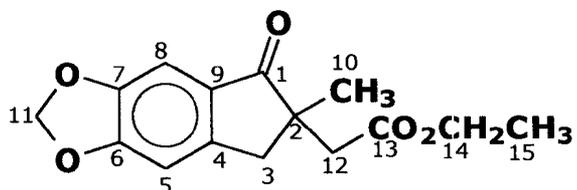
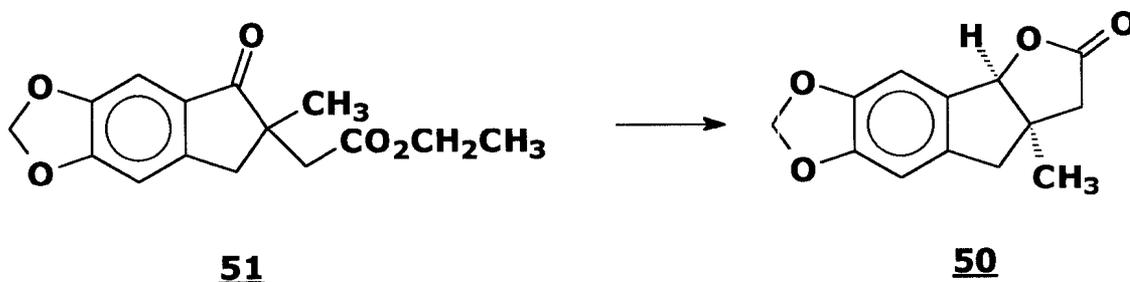


Tabela 6 - Atribuições de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para o ceto-éster **51** em CDCl_3 .

C	^1H (δ, ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ, ppm)
1	-	207,02
2	-	46,95
3	3,17 (d, 1H, J = 17,00) 2,80 (d, 1H, J= 17,00)	39,91
4	-	129,42
5	6,77 (s, 1H)	102,55
6	-	148,04
7	-	149,46
8	7,01 (s, 1H)	105,55
9	-	154,19
10	1,18 (s, 1H)	13,63
11	6,05 (m, 2H)	101,97
12	2,75 (d, 1H, J = 16,16) 2,57 (d, 1H, J= 16,16)	41,43
13	-	171,02
14	4,00 (q, 2H, J = 6,70)	60,20
15	1,11 (t, 3H, J = 6,92)	24,63

Os espectros de ^1H e ^{13}C encontram-se nas páginas 159 e 161.

5.2.4 - Preparação do 3a-metil-6,7-metilenodioxi-2(3H) indano-furanona²⁸



Em um balão de 125 ml de capacidade, equipado com agitador magnético, foi feita uma solução de 1,62 g (6,98 mmol) do ceto-éster 51 em 24 mL de uma solução 1N de NaOH em uma mistura de metanol:água (50:50 v/v). O meio reacional foi mantido sob agitação por 3 horas. Após esse período foram adicionado 0,360 g (9,51 mmol) de boridreto de sódio, sendo o meio reacional mantido sob agitação, a temperatura ambiente, por 65 horas. Após esse tempo, abaixou-se a temperatura do sistema para 0° C e adicionou-se ácido clorídrico concentrado, gota a gota até pH 2, sendo esse meio, após chegar a temperatura ambiente, mantido sob agitação por 8 horas. Após esse tempo, observou-se a formação de um precipitado branco, o qual foi filtrado, seco e pesado, gerando 1,39 g (80 %) da lactona 50 sob a forma de um sólido branco. O produto obtido apresentou grau de pureza

elevado (avaliado por CCF e por técnicas espectrométricas) sendo utilizado na etapa subsequente sem purificação prévia.

p.f.:139-141 °C

IV (KBr,cm⁻¹): 2967,5; 2928,2; 2856,1; 1761,6; 1614,7; 1481,1; 1329,1; 1268,6; 1203,4; 1162,9; 1039,5; 989,0; 942,2; 880,6; 852,8.

CG/EMIE (70 ev) tr = 14.074 min m/z (int. rel.): 232 (M⁺ 47,2%); 203 (2,7%); 188 (16,6%); 173 (100%); 143 (19,42%); 129 (11,1%); 115 (44,4%); 89 (8,3%); 77 (19,41%); 51 (22,2%).

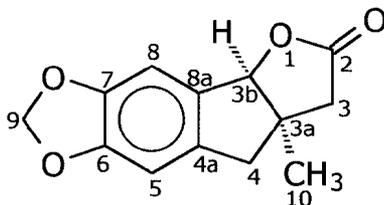
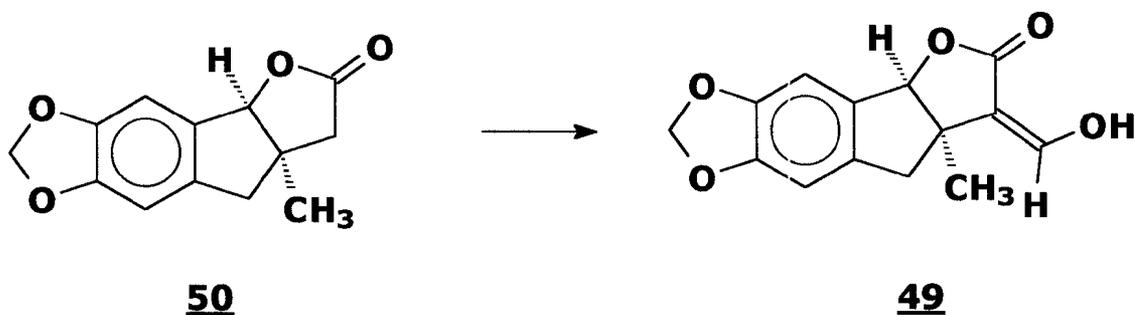


Tabela 7 - Atribuições de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para a lactona **50** em CDCl_3 .

C	^1H (δ, ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ, ppm)
2	-	176,27
3	2,95 (d, 1H, J = 16,12) 2,80 (d, 1H, J= 16,12)	44,27
3a	-	46,61
3b	5,28 (s, 1H)	92,82
4	2,59 (d, 1H, J = 17,74) 2,48 (d, 1H, J= 17,73)	42,54
4a	-	131,15
5	6,62 (s, 1H)	105,11
6	-	147,42
7	-	149,40
8	6,82 (s, 1H)	105,92
8a	-	135,83
9	5,94 (m, 2H)	101,34
10	1,38 (s, 3H)	24,64

Os espectros de ^1H e ^{13}C encontram-se nas páginas 164 e 165.

5.2.5 - Preparação do 3a-metil-3-metilideno-11Z-hidroxi-6,7-metilenodioxi-2-indanofuranona⁹¹



Em um balão de 25 ml de capacidade, equipado com agitador magnético e septo de borracha, contendo uma solução de 0,35 g (3,02 mmol) de *tert*-butóxido de potássio em 7mL de THF seco, mantida sob atmosfera inerte e à temperatura de 0°C, foram adicionados 0,50 g (2,16 mmol) da lactona **50** em 5 mL de THF: seco. A agitação foi mantida, à temperatura ambiente, por 30 minutos quando o sistema foi novamente resfriado a 0° C e foi adicionado, lentamente, 0,3 mL (3,6 mmol, 0,0275g) de formiato de etila. Este sistema foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 48 horas, e após esse tempo todo o THF foi removido em evaporador rotatório, sendo então adicionados ao meio reacional 20 mL de diclorometano, observando-se a precipitação de um sólido branco, que após filtrado e lavado novamente com diclorometano, forneceu 0,307 g (65%) do enol **49**. O produto

obtido apresentou grau de pureza adequado (avaliado por CCF e por técnicas espectrométricas) sendo utilizado na etapa subsequente sem purificação prévia.

p.f.:172-174 °C

IV (KBr): 3426,2; 2964,9; 2932,8; 2859,4; 2733,7; 1877,1; 1761,6; 1680,2; 1612,0; 1478,5; 1422,5; 1319,2; 1262,0; 1180,0; 1146,1; 1087,6; 939,8; 874,7; 840,8 cm^{-1} .

CG/EMIE (70 eV) tr = 11.015 min *m/z* (int. rel.): 260 (M^+ 56,2%); 231 (35,6%); 214 (21,8%); 187 (100%); 157 (37,5%); 129 (78,1%); 115 (43,7%); 89 (15,6%); 77 (34,3%); 51 (45,6%).

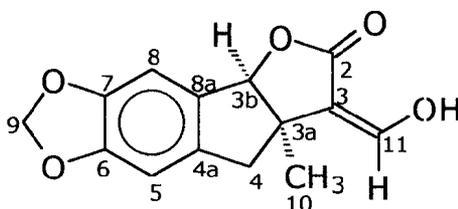
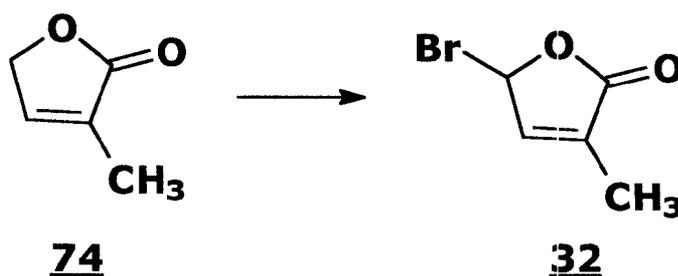


Tabela 8 - Atribuições de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para o enol **49** em DMSO-d_6 .

C	^1H (δ, ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ, ppm)
2	-	172,03
3	-	110,08
3a	-	47,72
3b	5,30 (s, 1H)	90,48
4	3,30 (d, H_β , J = 16,48) 2,86 (d, H_α , J = 16,66)	43,29
4a	-	132,33
5	6,76 (s, 1H)	104,96
6	-	146,99
7	-	148,94
8	6,88 (s, 1H)	105,52
8a	-	136,31
9	5,98 (m, 2H)	101,33
10	1,43 (s, 3H)	23,78
11	7,45 (s, 1H)	154,13
OH	11,34	-

Os espectros de ^1H e ^{13}C encontram-se nas páginas 168 e 170.

5.2.6 - Preparação do 2-bromo-4-metilbut-3-en-2-ídeo^{39b}



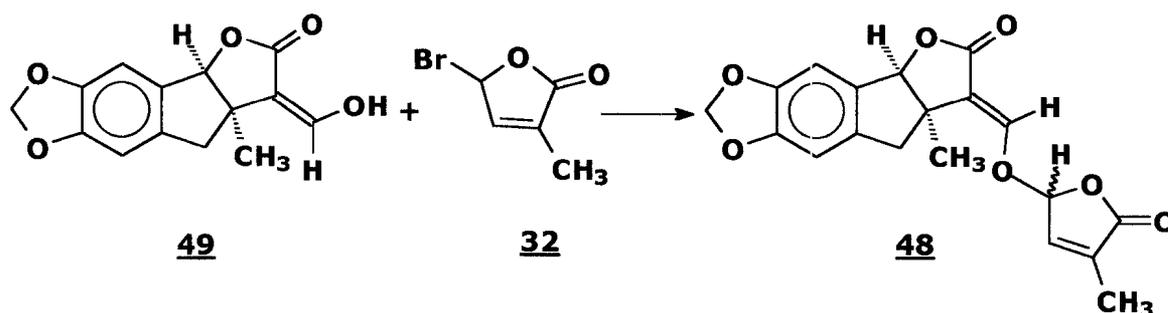
Em um balão bitubulado de 50 mL de capacidade equipado com condensador de refluxo, agitador magnético e septo de borracha foram adicionados 1 g (0,88 mL) do butenólídeo 74 (Aldrich Chemical Company, Inc.), 55 mL de CCl_4 , 0,0102 g de peróxido de benzoíla e 2 g de NBS. Este sistema, após garantir que toda a atmosfera foi trocada por argônio, foi colocado em um banho de aquecimento, mantendo-se sob refluxo por cerca de 90 minutos. Após o término da reação (evidenciada por CCF), o meio reacional foi resfriado até a temperatura ambiente e a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se 2,5 g de um óleo escuro. Após purificação em coluna de sílicagel eluída com diclorometano, foram obtidos 1,46 g (81%) da lactona bromada 32 na forma de um óleo levemente amarelado.

IV (filme): 3101,3; 3000,9; 2927,6; 1775,2; 16,53,9; 1442,3; 1317,0; 1212,6; 1185,2; 1040,8; 952,5; 674,7 cm^{-1} .

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7,17 (1H, quinteto, $J=1,6$ Hz); 6,81 (1H, quinteto, $J=1,6$ Hz); 1,97 (3H, t, $J=1,6$ Hz) ppm.

(Os espectros de ^1H e IR encontram-se nas páginas 174 e 175)

5.2.7 - Preparação do [3a-metil-3-eten-11E-(4'' metilbut-4'en-2'-lídeo)-6,7-metilenodioxi]-2-indanofuranona⁹¹



Em um balão de 25 mL de capacidade equipado com agitador magnético e septo de borracha, contendo uma solução de 0,12 g (0,46 mmol) do enol **49** em 5 mL de THF seco, mantida sob atmosfera inerte, foram adicionados 0,072 g (0,64 mmol) de *tert*-butóxido de potássio em 2 mL de THF seco. Este meio reacional foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por meia hora, quando foi então adicionado 0,114 g (0,64 mmol) do bromobutenolídeo **32** (recém preparado), tendo sido mantida a agitação por mais 48 horas. Após esse tempo, quando

observou-se que todo o enol foi consumido (acompanhado por CCF), adicionou-se 10 mL de água destilada e diclorometano (1:1) e a seguir seguiu-se ao procedimento de extração do meio reacional, adicionando-se 5 mL de diclorometano, repetidamente por 3 vezes. As fases orgânicas reunidas foram então secas sob sulfato de sódio e todo o solvente foi removido em evaporador rotatório, gerando 0,08 g de um óleo castanho escuro. O produto bruto obtido foi então cromatografado em uma coluna de sílica gel eluída com diclorometano, gerando 0,06 g (50%) de um sólido amarelo, que após a caracterização através de técnicas convencionais de análise, foi identificado como sendo o composto 48.

p.f.: 200-220° C (para a mistura de epímeros).

massa exata: 356,0896 (calculado); 356,08955 (encontrado).

IV (KBr): 3065,9; 2961,5; 2924,9; 1783,5; 1746,7; 1675,5; 1616,2; 1477,1; 1320,1; 1261,8; 1207,7; 1168,1; 1138,1; 1032,1; 990,0; 957,1 cm^{-1} .

UV (metanol) : $\lambda_{\text{máx}}$ (abs) 206 nm (0,83); 236 nm (0,477); 293 nm (0,2).

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 7,415 (m, 1H, J=,4 Hz); [6,96-6,86] (m, 1H); [6,86][6,85] (s, 1H); [6,60][6,59] (s, 1H); [6,16-6,15] (m, 1H);

[5,97- 5,96][5,96-5,95] (m, 2H); 5,36 (s, 1H); [3,32] [2,95] (d, J=17 Hz); [2,26] (d, 3H, J=1,5 Hz); [1,53][1,52] (s, 3H) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 171,21 (C=O); 170,178 (C=O); 151,20 (C=); 149,56 (C); 147,46 (C); 140,99 (C=); 136,00 (C=); 135,92 (C); 131,11 (C); 117,29 (C=); 105,67 (CH); 104,66 (CH); 102,12 (CH); 100,75 (CH_2); 92,16 (CH); 48,23 (C); 43,89 (CH_2); 24,43 (CH_3); 10,60 (CH_3) ppm.

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 356 (M^+ 34%); 297 (1%); 259 (15%); 213 (41%); 187 (24%); 129 (9%); 97 (100%).

5.2.8 - Separação dos diastereoisômeros do novo análogo 48⁸⁸

Para quantificar a relação diastereoisomérica dos produtos obtidos na reação anteriormente descrita, bem como separar os diastereoisômeros formados, foram feitas várias injeções de amostras do análogo 48 em CLAE, utilizando colunas analíticas de fase reversa (C_{18} e C_8), variando-se os sistemas de solvente (metanol-água e acetonitrila-água); e colunas em fase normal, com fase móvel hexano-acetato de etila.

A injeção do produto bruto de reação em coluna analítica de sílica forneceu a quantificação dos diastereoisômeros em C2'.

A mistura de epímeros 48 foi separada por CLAE semipreparativa em coluna de sílica (250 mm x 10 mm di x 5 μ m) utilizando como fase móvel hexano-acetato de etila em um sistema de gradiente de eluição variando de 65 a 75% de hexano, com fluxo de 6 mL/minuto e detetor UV à 293 nm, gerando duas frações principais: os diastereoisômeros ***DI*** e ***DII***.

Isômero de menor tempo

de retenção (DI):

p.f.: 214-215 °C

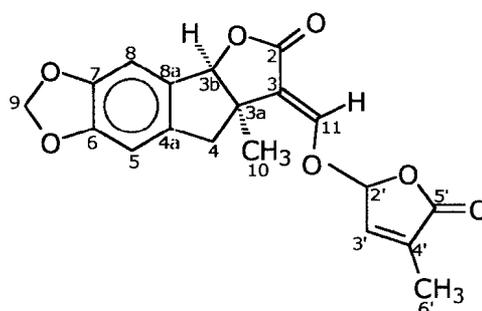


Tabela 9 - Atribuições de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para o epímero DI em CDCl_3 .

C	^1H (δ, ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ, ppm)
2	-	171,20
3	-	117,45
3a	-	48,29
3b	5,32 (s, 1H)	92,24
4	3,27 (d, H_β , J = 16,63) 2,90 (d, H_α , J = 16,62)	44,10
4a	-	131,18
5	6,55 (s, 1H)	104,81
6	-	147,53
7	-	149,62
8	6,80 (s, 1H)	105,74
8a	-	135,95
9	5,92 (m, 2H)	101,43
10	1,49 (s, 3H)	23,95
11	7,40 (s, 1H)	151,14
2'	6,15 (s, 1H)	100,76
3'	6,94 (m, 1H)	140,91
4'	-	136,03
5'	-	171,21
6'	2,00 (d, 3H, J = 1,48)	10,75

Isômero de maior tempo

de retenção (DII):

p.f.: 226-227 °C

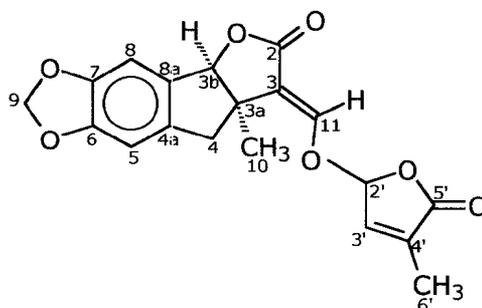
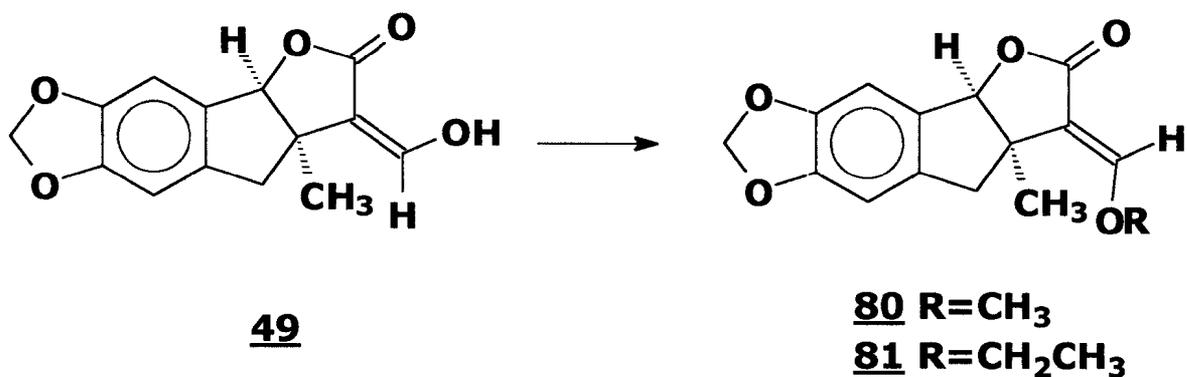


Tabela 10 - Atribuições de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para o epímero **DII** em CDCl_3 .

C	^1H (δ, ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ, ppm)
2	-	171,13
3	-	117,48
3a	-	48,29
3b	5,34 (s, 1H)	92,19
4	3,31 (d, H_β , J = 16,54) 2,93 (d, H_α , J = 16,52)	43,97
4a	-	131,36
5	6,57 (s, 1H)	104,71
6	-	147,58
7	-	149,65
8	6,83 (s, 1H)	105,89
8a	-	135,94
9	5,93 (m, 2H)	101,47
10	1,49 (s, 3H)	23,93
11	7,38 (s, 1H)	150,93
2'	6,12 (m, 1H)	100,64
3'	6,95 (m, 1H)	140,85
4'	-	136,08
5'	-	170,22
6'	2,02 (d, 3H, J = 1,56)	10,61

5.2.9 - Preparação de (3a-metil-3-metiliden-11E-metoxi-tetra-6,7-metilenodioxi)-2-indanofuranona e (3a-metil-3-metiliden-11E-etoxi-6,7-metilenodioxi)-2-indanofuranona (Derivados alquílicos do enol 49)⁹¹



Procedimento para a obtenção do derivado metilado 80:

Em um balão de 10 mL de capacidade, equipado com agitador magnético e septo de borracha, foi feita uma solução de 0,12 g (0,46mmol) do enol 49 em 4 mL de THF seco, mantida sob atmosfera inerte, sendo a seguir adicionados 0,1 g (0,89 mmol) de *tert*-butóxido de potássio em 2 mL de THF seco. Este meio reacional foi mantido sob agitação a temperatura ambiente por meia hora, quando foi então adicionado 0,07 mL (0,160g) de iodeto de metila, tendo sido mantida a agitação por mais 20 horas. Após esse tempo, quando observou-se que

todo o enol foi consumido (acompanhado por CCF), adicionou-se 10 ML de água destilada e diclorometano (1:1) e a seguir seguiu-se ao procedimento de extração do meio reacional, adicionando-se 5 mL de diclorometano, repetidamente por 3 vezes. As fases orgânicas reunidas foram então secas sob sulfato de sódio e todo o solvente foi removido em evaporador rotatório, obtendo-se 0,130 g de um óleo castanho escuro. O produto bruto obtido foi então cromatografado em uma coluna de sílica gel eluída com diclorometano, obtendo-se 0,091 g (72%) do derivado metilado 80 na forma de um sólido amarelo.

p.f.:200-202°C

IV (KBr): 2971,1; 2940,3; 2883,8; 1731,0; 1661,7; 1478,1; 1451,7; 1369,2; 1324,4; 1260,8; 1216,3; 1132,0; 1092,7; 1060,0; 1038,5; 984,7; 810,1 cm^{-1} .

CG/EMIE (70 eV) tr = 8,242 min m/z (int. rel.): 274 (M^+ 100%); 245 (14%); 215 (83%); 200 (24%); 163 (9%); 157 (9%); 129 (20%); 102 (9%); 77 (20%); 51 (24%).

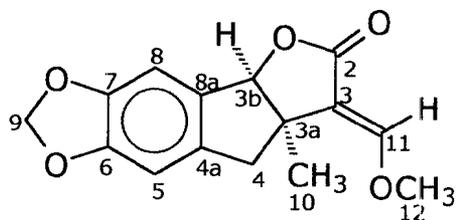


Tabela 11 - Atribuições de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para o enol metilado **80** em CDCl_3 .

C	^1H (δ, ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ, ppm)
2	-	172,15
3	-	112,81
3a	-	46,34
3b	5,30 (s, 1H)	91,73
4	3,33 (d, H_β , J = 16,52) 2,90 (d, H_α , J = 16,52)	43,82
4a	-	131,80
5	6,57 (s, 1H)	104,67
6	-	147,34
7	-	149,37
8	6,83(s, 1H)	105,77
8a	-	136,18
9	5,92 (s, 2H)	101,28
10	1,49 (s, 3H)	23,97
11	7,19 (s, 1H)	157,64
12	3,87(s, 3H)	62,24

Os espectros de ^1H e ^{13}C encontram-se nas páginas 188 e 189.

O mesmo procedimento foi utilizado para a obtenção do derivado etilado **81**, pela reação de 0,1 g (0,4 mmol) do enol **49**, 0,09 g de *tert*-butóxido de sódio, 0,04 mL (0,078g) de iodeto de etila e 6 mL de THF seco, obtendo-se 0,074 g (67%) do composto **81** na forma de um sólido amarelo.

p.f.:150-151⁰ C

IV (KBr): 2970,7; 2880,4; 1727,2; 1662,2; 1475,8; 1319,9; 1263,2; 1201,6; 1132,9; 1093,5; 1054,7; 982,5; 935,1; 810,4 cm⁻¹.

CG/EMIE (70 eV) t_r = 15,742 min m/z (int. rel.): 288 (M⁺ 100%); 259 (12,5%); 229 (17%); 201 (23%); 173 (37,5%); 157 (12,5%); 115 (25%); 99 (8%); 77 (17%); 51 (14%).

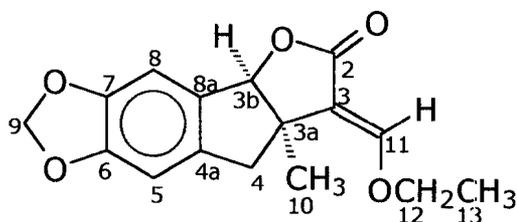


Tabela 12 - Atribuições de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) para o enol etilado **81** em CDCl_3 .

C	^1H (δ, ppm, J, Hertz)	^{13}C (δ, ppm)
2	-	172,36
3	-	112,48
3a	-	48,27
3b	5,27 (s, 1H)	91,68
4	3,30 (d, H_β , J = 16,42) 2,88 (d, H_α , J = 16,55)	43,80
4a	-	131,83
5	6,54 (s, 1H)	104,65
6	-	147,28
7	-	149,31
8	6,79 (s, 1H)	105,75
8a	-	136,18
9	5,69 (m, 2H)	101,26
10	1,47 (s, 3H)	23,96
11	7,24 (s, 1H)	156,43
12	4,05 (q, 2H, J = 7,08)	71,06
13	1,32 (t, 3H, J = 7,09)	15,30

Os espectros de ^1H e ^{13}C encontram-se nas páginas 193 e 194.

5.3 - TESTES BIOLÓGICOS

5.3.1 - ENSAIOS DE GERMINAÇÃO COM SEMENTES DE *Lactuca Sativa*, L.²⁶

A solução estoque foi preparada adicionando-se 10 mL de acetona a 10 mg do análogo 48, completando-se o volume com 100 mL de água desmineralizada. As soluções para os testes foram obtidas a partir da diluição da solução estoque em água desmineralizada até as concentrações desejadas.⁵⁷

As sementes de alface foram repetidamente lavadas com água, etanol 70% por um minuto, hipoclorito de sódio por cinco minutos e com água estéril.

Foram feitos dois ensaios de germinação (ensaios A e B),³³ onde dez sementes de alface foram colocadas em placas de petri com papel de filtro. As placas receberam 100 mL das soluções dos tratamentos 1, 2, 3, 4 e 5, em quatro repetições (Tabela 13). Os tratamentos 1, 2 e 3 são os ensaios de controle, sendo que no tratamento (3) há mais acetona do que no tratamento (2). Os ensaios foram feitos na ausência de luz e cinco dias depois as sementes germinadas foram contadas, sendo feita

a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, para obter-se a porcentagem de germinação dos ensaios.

Tabela 13: Ensaios utilizados nos testes de germinação de alface.

Tratamentos	Ensaio A	Ensaio B
1	Água	Água
2	Água+Acetona	Água+Acetona
3	Água+Acetona	Água+Acetona
4	Água+Acetona + 0,1µg análogo/L	Água+Acetona + 10 µg análogo/L
5	Água+Acetona + 10 µg análogo/L	Água+Acetona + 1000 µg análogo/L

5.3.2 - ENSAIOS DE LETALIDADE SOBRE *Artemia Salina*, Leach⁸⁹

O teste de citotoxicidade geral foi realizado no Laboratório de Ensaios Biológicos do Departamento de Química da UFRuralRJ. As ovas de *Artemia salina*, Leach, obtidas comercialmente, foram deixadas eclodir em água do mar artificial, e após 48 horas as larvas foram coletadas para utilização, mantendo-se cerca de 10 animais por tubo de ensaio. As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) e numa solução de água e polivinilpirrolidona (PVP). Os ensaios foram realizados em quadruplicata a cinco concentrações diferentes, além do ensaio controle, contendo a mesma concentração de DMSO e PVP. A

dose letal de 50% (DL_{50}) foi determinada a partir do gráfico de percentual de animais vivos contra o *log* da dose ensaiada.

Referências Bibliográficas

- 1- Harbone, J. B. Introduction to ecological chemistry (4^o edição) Academic Press, 1993.
- 2- Edwards, W.G.H. Phytochemical ecology – Annual proceedings of the phytochemical society n^o 8. Editado por J. B. Harbone Academic Press, 1972.
- 3- Cook, C.E.; Whichard, L.P.; Turner, B.; Wall, M.E. .Germination of witchweed (*Striga lutea*, Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* **154**, 1189-1190, 1966.
- 4- Cook, C.E.; Whichard, L.P.; Turner, B.; Wall, M.E. .Germination stimulants. II. The structure of strigol - a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea*, Lour.) *J. Am. Chem. Soc.* **94**(17), 6198-6199, 1972.

- 5- Brooks, D.W.; Bevinakatti, H.S.; Powell, D.R. The absolute structure of (+)-strigol *J. Org. Chem.* **50**, 3779-3781, 1985.
- 6- Hauck, C.; Müller, S.; Schildknecht, H. A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor*, a genuine host plant *J. Plant Physiol.* **139**, 474-478, 1992.
- 7- Chang, M.; Netzly, D.H.; Butler, L.G.; Lynn, D.G. Chemical regulation of distance: Characterization of the first natural host germination stimulant for *Striga asiatica* *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7858-7860, 1986.
- 8- Weerasuriya, Y.; Siame, B.A.; Hess, D.; Ejeta, G.; Butler, L.G. Influence of conditions and genotype on the amount of *Striga* germination stimulants exuded by roots of several host crops *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1492-1496, 1993.
- 9- Vail, S.L.; Dailey, O.D.; Blanchard, E.J.; Pepperman, A.B.; Riopel, J.L. Terpenoids precursors of strigol as seed germination stimulants of broomrape (*Orobancha ramosa*) and witchweed (*Striga asiatica*) *J. Plant Growth Regul.* **9**, 77-83, 1990.
- 10- Wigchert, S.; Zwanenburg, B. A critical account on the inception of *Striga* seed germination *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1320-1325, 1999.
Revisão.

- 11-Mori, K.; Matsui, J.; Bando, M.; Kido, M.; Takeuchi, Y. Synthetic disproof against the structure proposed for alectrol, the germination stimulant from *Vigna unguiculata* *Tetrahedron Letters* **39**, 6023-6026, 1998.
- 12-Wigchert, S.; Kuiper, E.; Boelhouwer, G.J. *et al* Dose-response of seeds of the parasitic weeds *Striga* and *Orobancha* toward the synthetic germination stimulants GR24 and Nijmegen 1 *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1705-1710, 1999.
- 13-Thuring, J.W.J.F.; Nefkens, G.H.L.; Zwanenburg, B. Synthesis and biological evaluation of the strigol analogue carba-GR24 *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1409-1414, 1997.
- 14-Siame, B.A.; Weerasuriya, Y.; Wood, K.; Ejeta, G.; Butler, L.G. Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plants *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1486-1491, 1993.
- 15-Bergmann, C.; Wegmann, K.; Frischmuth, K. *et al*. Stimulation of *Orobancha crenata* seeds germination by (+)-strigol and structural analogues. Dependence on constitution and configuration of the germination stimulations. *J. Plant Physiol.* **142**, 338-342, 1993.
- 16-Ma, Y.; Babiker, A.G.T.; Ali, I.A.; Sugimoto, Y.; Inanaga, S. *Striga hermonthica* (Del.) Benth germination stimulant(s) from

- Minispermum dauricum* (DC.) root culture *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3355-3359, 1996.
- 17-Fischer, N.H.; Weidenhamer, J.D.; Bradow, J.M. Dihidroparthenolide and other sesquiterpene lactones stimulate witchweed germination *Phytochemistry*, **28**(9), 2315-2317, 1989.
- 18-Rugutt, J.K; Rugut, K. Stimulation of *Striga hermonthica* seed germination by 11 β ,13-dihidroparthenolide *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4845-4849, 1997.
- 19-Babiker, A.G.T.; Ejeta, G.; Butler, L.G.; Woodson, W.R. Ethylene biosynthesis and strigol-induced germination of *Striga asiatica* *Physiologia Plantarum* **88**, 359-365, 1993.
- 20-MacAlpine, G.A.; Raphael, R.A.; Shaw, A.; Taylor, A.W.; Wild, H. Synthesis of the germination stimulant (\pm)-strigol *J.C.S. Chem. Comm.* **20**, 834-835, 1974.
- 21-Berlage, U.; Schimidt, J.; Peters, U.; Welzel, P. A formal total synthesis of (\pm)-strigol *Tetrahedron Letters* 28(27), 3091-3094, 1987.
- 22-Brooks, D.W.; Kennedy, E.; Bevinakatti, H.S. Strigol: total synthesis and preparation of analogs. *ACS Symposium series* **268**, 437-444, 1985.

- 23-Brooks, D.W.; Bevinakatti, H.S.; Kennedy, E.; Hathaway, J. Practical total synthesis of (\pm)-strigol. *J. Org. Chem.* **50**, 628-632, 1985.
- 24-Mangnus, E.M.; Zwanenburg, B. Tentative molecular mechanism for germination stimulation of *Striga* and *Orobanch*e seeds by strigol and its synthetics analogues *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1066-1070, 1992.
- 25-Pepperman, A.B.; Bradow, J.M. Strigol analogs as germination regulators in weeds and crop seeds *Weed Science* **36**, 719-725, 1988.
- 26-Mangnus, E.M.; Stommen, P.L.A.; Zwanenburg, B. A standardized bioassay for evaluation of potential germination stimulants for seeds of parasitic weeds *J. Plant Growth Regul.* **11**, 91-98, 1992.
- 27-Nefkens, G.H.L; Thuring, J.W.J.F; Beenackers, M.F.M.; Zwanenburg, B. Synthesis of a phtaloyglycine-derived strigol analogue and its germination stimulatory activity toward seeds of parasitic weeds *Striga hermonthica* and *Orobanch*e *crenata* *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2273-2277, 1997.
- 28-Kendall, P.M.; Johnson, J.V.; Cook, C.E. Synthetic route to an aromatic analogue of strigol *J. Org. Chem.* **44**, 1421-1424, 1979.
- 29-Johnson, A.W.; Gowda, G.; Hassanali, A. *et al.* The preparation of synthetic analogues of strigol *J. Chem. Soc. Perkin Tans. 1* **6**, 1734-1743, 1981.

- 30-Pepperman, A.B.; Connick Jr, W.J.; Vail, S.L. *et al.* Evaluation of precursors and analogs of strigol as witchweed (*Striga asiatica*) seed germination stimulants *Weed Science* **30**, 561-566, 1982.
- 31-Thuring, J.W.J.F.; van Gaal, A.A.M.A.; Hornes, S.J. Synthesis and biological evaluation of strigol analogues modified in the enol ether part *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 767-774, 1997.
- 32-Fischer, N.H.; Weidenhamer, J.D.; Riopel, J.L.; Quijano, L.; Menelaou, M.A. Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structure-activity study *Phytochemistry*, **29**(8), 2479-2483, 1990.
- 33-Bradow, J.M.; Connick Jr, W.J.; Pepperman, A; Wartelle, L.H. Germination stimulation in wild oats (*Avena fatua* L.) by synthetic strigol analogs and gibberellic acid. *J. Plant Growth Regul.* **9**, 35-41, 1990.
- 34-Bradow, J.M.; Connick Jr, W.J.; Pepperman, A.B. Comparison of the seed germination effects of synthetic analogs of strigol, gibberellic acid, cytokinins, and other plants growth regulators. *J. Plant Growth Regul.* **7**(4), 227-239, 1988.
- 35-Chang, M.; Lynn, D.G. The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *Journal of Chemical Ecology* **12**(2), 561-579, 1986.

- 36-Babiker, A.G.T.; Ejeta, G.; Butler, L.G.; Woodson, W.R.; Ethylene biosynthesis and strigol-induced germination of *Striga asiatica* *Physiologia Plantarum* **88**, 359-365, 1993.
- 37-Mangnus, E.M.; van Vliet, A.; Vandenput, D.A.L; Zwanenburg, B. Structural modifications of strigol analogues. Influence of the B and C rings on the bioactivity of the germination stimulant GR24 *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1222-1229, 1992.
- 38-Thuring, J.W.J.F.; Bitter, H.H.; Kok, M.M. *N*-Phtaloyglycine-derived strigol analogues. Influence of the D-ring on seed germination activity of the parasitic weeds *Striga hermonthica* and *Orobanche crenata* *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2284-2290, 1997.
- 39-a) Samson, E.; Frischmuth, K.; Berlage, U. *et al* Synthesis of (+)-strigol, (+)-4'-epi-strigol, and their enantiomers *Tetrahedron* **47**, 1411-1416, 1991.
- b) Macalpine, G.A.; Raphael, R.A.; Shaw, A.; Taylor, A.W.; Wild, H. Synthesis of the germination stimulant (\pm)-strigol *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **4**, 410-416, 1976.
- 40-Heather, J.B.; Mittal, R.S.D.; Sih, C. Synthesis of the witchweed seeds germination stimulant (+)-strigol *J. Am. Chem. Soc.* **98**(12), 3661-3669, 1976.

- 41-a) Frischmuth, K.; Marx, A.; Petrowitsch, T.; Welzel, P. *et al.* Strigol synthetic studies: the first synthetic approach that allows control of C2' configuration *Tetrahedron Letters* **35**(28), 4973-4976, 1994.
- b) Frischmuth, K.; Müller, D.; Welzel, P. Strigol synthetic studies: the of stereocontrol at C2' *Tetrahedron* **54**, 3401-3412, 1998.
- c) Röhrig, S.; Hennig, L.; Findeisen, M.; Welzel, P. Attempted stereocontrol at C2' of strigol-type compounds by a Michael reaction/elimination approach *Tetrahedron* **54**, 3413-3438, 1998.
- 42- Röhrig, S.; Hennig, L.; Findeisen, M.; Welzel, P. Use of Winterfeldt's template to control the C-2' configuration in the synthesis of strigol-type compounds *Tetrahedron* **54**, 3439-3456, 1998.
- 43- Thuring, J.W.J.F.; Nefkens, G.H.L.; Schaafstra, R.; Zwanenburg, B. Asymmetric synthesis of a D-ring synthon for strigol analogues and its application to the synthesis of all four stereoisomers of germination stimulant GR7 *Tetrahedron* **51**(17), 5047-5056, 1995.
- 44- Schörer, J. Welzel, P. Asymmetric synthesis of a key synthetic precursor for (+)-strigol and sorgolactone *Tetrahedron* **50**, 6839-6858, 1994.
- 45- Thuring, J.W.J.F.; Nefkens, G.H.L.; Zwanenburg, B. Asymmetric synthesis of all stereoisomers of the strigol analogue GR24. Dependence of absolute configuration on stimulatory activity of

- Striga hermontica* seed *Orobanche crenata* *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2278-2283, 1997.
- 46-Kupchan, S.M.; Eakin, M.A.; Thomas, A.M. Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones *J. Med. Chem.* **14**(12), 1147-1152, 1971.
- 47-Kinghorn, A.D.; Farnsworth, N.R.; Beecher, C.W.W. Novel strategies for plant-derived anticancer agents *International Journal of Pharmacognosy* **33**(suplemento), 48-58, 1995.
- 48-Cassady, J.M; Howie, G.A. Synthesis and stereochemistry of dilactones related to strigol *J.C.S. Chem. Comm.* **13**, 512-512, 1974.
- 49-Ayad, H.M. Eur. Pat. Appl. EP 917756.
- 50- Maia, J.G.S.; Silva, M.L.; Luz, A.I.R. *et al.* Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol *Química Nova* **10**(3), 200, 1987.
- 51-Barreiro, E.J; Lima, M.E.F. The synthesis and anti-inflammatory properties of a new sulindac analogue synthesized from natural safrole *Journal of Pharmaceutical Sciences* **81**(12), 1219-1222, 1992.
- 52-Violante, F.A.; Câmara, C.A.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M. Síntese de novas indolil-N-acilidrazonas, planejadas racionalmente como agentes analgésicos a partir do safrol *22ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química* livro de resumos-MD054, 1999.

- 53-Fraguas Neto, M.R. Utilização do safrol na síntese de derivados do núcleo pirroloquinolina, potencialmente úteis como antineoplásicos. *Tese de mestrado*, ICE-UFRRJ, Rio de Janeiro, 1997.
- 54-Gabriel, A.J.A.; Lima; M.E.F. Synthesis of a new analogue of strigol from safole *8th Brazilian Meeting On Organic Synthesis* PS-144, 1998.
- 55-Gabriel, A.J.A.; Silva, F.C.; Souza, S.R.; Rodrigues, F.S.; Lima, M.E.F. Síntese e avaliação da atividade biológica de um novo análogo aromático do estrigol *22^a Reunião da Sociedade Brasileira de Química* livro de resumos-MD068, 1999.
- 56-Gabriel, A.J.A.; Lima; M.E.F.; Castro, R.N. Separação e quantificação dos epímeros de um novo análogo dos estrigol por cromatografia líquida de alta eficiência *10^o Encontro Nacional de Química Analítica* livro de resumos-CE032, 1999.
- 57-Mangnus, E.M.; Dommerholt, F.; Jong, R.L.P.; Zwanenburg, B. Improved synthesis of strigol analogue GR24 and evaluation of the biological activity of its diastereomers *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1230-1235, 1992.
- 58-Witiak, D.T.; Williams, D.R.; Kokodkar, S.V. Vielsmeier-Haack cyclizations. Synthesis of 2-substituted 3-dimethylamino-5,6-methylenedioxyindenes and the corresponding indanones *J. Org. Chem.* **39**(9), 1242-1247, 1974.

- 59-Lima; M.E.F. Síntese e avaliação farmacológica de novos análogos do sulindac, *Tese de mestrado*, I.Q.- UFRJ, Rio de Janeiro, 1989.
- 60-Löffler, A.; Norris, F.; Taub, W.; Svanholt, K.L.; Dreiding, A.S. Thermische lactonisierung von estern γ -brom- α,β -ungesättigter carbonsäuren zu Δ^α -butenoliden. Direkte γ -bromierung von α,β -ungesättigten säuren *Helvetica Chimica Acta* **53**(2), 403-417, 1970.
- 61-Kaiser, E.; Domba, E.; Skibbe, M. Base-catalyzed rearrangements of allylphenols and haloallylphenols *J. Org. Chem.* **27**, 2931-2933, 1962.
- 62-Salmoria, G.V.; Dalloglio, E.L.; Zucco, C. Isomerization of safrole and eugenol under microwave irradiation *Synthetic Communications* **27**(24) 4335-4340, 1997.
- 63-Thach, L.N.; Hanh, D.L.; Hiep N.B. et al. Further improvements in isomerization of olefins in solvent-free conditions *Synthetic Communications* **23**(10) 1379-1384, 1993.
- 64-Reddy M.R., Periasamy M. Isomerization of 1-Alkenes using the $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{Co})_4/\text{CuCl}$, and $\text{Na}_2\text{Fe}_4/\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ reagentes systems *Journal of organometallic chemistry* **491**(1-2) 263-266,1995.
- 65-Barreiro, E.J.; Coelho, F.A.S.; Costa, P.R.R.; Greene, A. E.; Serra, A.A. Síntese total de um sesquiterpeno natural isolado de *Anlysia*

- brasiliense*. Síntese enantioespecífica do (+)-brasilenol *Química Nova* **12**(3) 230-238, 1989.
- 66-César; M.A.F. Síntese e avaliação farmacológica de novo isómero do loxoprofeno a partir do safrol, *Tese de mestrado*, I.Q.-UFRJ, Rio de Janeiro, 1990.
- 67-Carey, F.A; Sundberg, R.J. in: *Advanced Organic Chemistry Part B: Reactions and Synthesis* (3^o edição) Plenum Press, 414-418, 1993.
- 68-March, J. in: *Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanism and Structure* (4^o edição) John Willey and sons, 542-543, 1992.
- 69-Hughes, D.L.; Dolling, U.H.; Ryan, K.M.; Schoenewaldt, E.F.; Grabowski, E.J.J. Efficient catalytic asymmetric alkylations. 3. A kinetic and mechanistic study of the enantioselective phase-transfer methylation of 6,7-dichloro-5-methoxy-2-phenyl-1-indanone *J. Org. Chem.* **52**, 4745-4752, 1987.
- 70-Witiak, D.T.; Hassan, A.M.; Del Vecchio, F.R. *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of indanpropionic acids as uterine relaxants *J. Med. Chem.* **27**, 1215-1219, 1984.
- 71-Jackman, L.M.; Lange, B.C. Structure and reactivity of alkali metal enolates *Tetrahedron* **33**, 2737-2769, 1977. Revisão.

- 72-Groenewegen, P.; Kallenberg, H.; van der GEN, A. Aldehyde enolates II: direct alkylation of aldehyde anions *Tetrahedron Letters* **5**, 491-494, 1978.
- 73-Green, N.; LaForge, F.B. The employment of sodium hydride as a condensing agent *J. Org. Chem.* **70**, 2287-2288, 1948.
- 74-Brown, C. A. Potassium hidride, a highly active new hidride reagent. Reactivity, applications, and techniques in organic and organometallic reactions *J. Org. Chem.* **39**(26),3913-3918, 1974.
- 75-d'Angelo, J. Ketones Enolates: Regiospecific preparations and synthetic uses *Tetrahedron* **32**, 2979-2990, 1976. Revisão.
- 76-Ribeiro, L.P. Estudo de métodos de preparação estereosseletiva de enolatos quirais *Seminário de doutorado*, IQ-DQO-UFRJ, 1992.
- 77-Oliveira, D.J.; Coelho, F. Approach to the total synthesis of natural sweetener (+)-monatin and derivatives *8th Brazilian Meeting on Organic Synthesis*, 1998 (PS-075).
- 78-Soloway, S.B.; LaForge, F.B The synthesis of some β -keto esters *J. Org. Chem.* **69**, 2677-2678, 1947.
- 79-House, H.O.; Babad, H.; Toothill, R.B.; Noltes, A.W. The stereochemical effect of a carboxyl function on the reduction of ketones with sodium borohydride *J. Org. Chem.* **27**, 4141-4146, 1962.

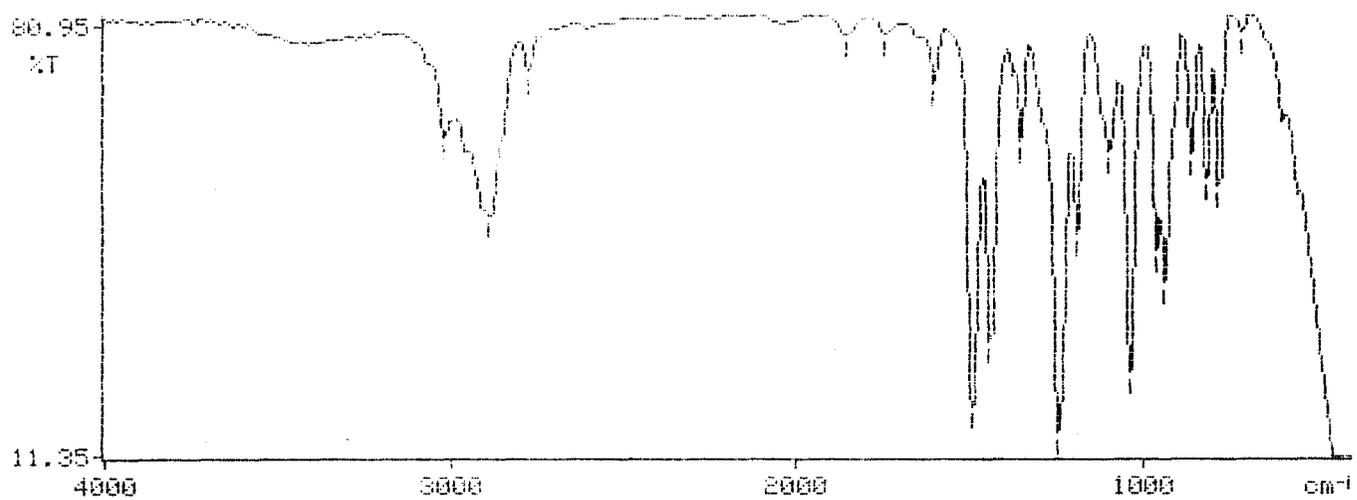
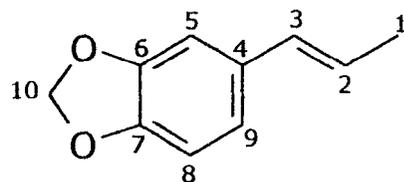
- 80-a) Dauben, W.G.; Fonken, G.J.; Noyce, D.S. The stereochemistry of hydride reductions *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2579-2582, 1956.
- b) Wigfield, D.C. Stereochemistry and mechanism of ketone reductions by hydride reagents *Tetrahedron* **35**, 449-462, 1979.
Revisão.
- 81-Kádas, I.; Árvai, G.; Töke, L. *et al* A simple method for preparation of various 1-oxo-hydrindene-2-acetic and propionic acids. Valuable precursor of strigol and analogues *Tetrahedron* **50**(9), 2895-2906, 1994.
- 82-Drexler, E.J.; Field, K.W. An NMR study of keto-enol tautomerism in β -dicarbonyl compounds *Journal of Chemical Education* **53**(6), 392-393, 1976.
- 83-Frischmuth, K.; Samson, E.; Kranz, A.; Welzel, P.; Meuer, H.; Sheldrick, W.S. Routes to derivatives of strigol (the witchweed germination factor) modified in the 5-position *Tetrahedron* **47**(47), 9793-9806, 1991.
- 84-Shapet'ko, N.N.; Radushnova, I.L.; Bogachev, Y.; Berestova, S.S. ^1H and ^{13}C NMR study of the enol-enolic tautomerism of some cyclic β -ketoaldehydes *Organic Magnetic Resonance* **7**, 540-543, 1975.

- 85-Perrin, C.L.; Kim, Y. Symmetry of the hydrogen bond in malonaldehyde enol in solution *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 12641-12645, 1998.
- 86-Rios, M.A; Rodrigues, J. Semiempirical study of compounds with O-H-O intramolecular hydrogen bond *Journal of Computational Chemistry* **13**(7), 860-866, 1992.
- 87-Costa, J.B.N. Obtenção e caracterização de fosforiluréias visando a formação de complexos com metais de transição *Tese de Doutorado* IQ-UFRJ. Rio de Janeiro, 1996.
- 88-Connick Jr, W.J.; Pepperman Jr, A.B. Preparation, isolation, and high performance liquid chromatographic separation of diastereomers of a strigol analogue *J. Agric. Food Chem.* **29**, 984-986, 1981.
- 89-a) Mclaughlin, J.L. In: *Methods in Plant Biochemistry*, Hostettmann, K. (Ed.); Academic Press; London vol. 6, pág. 1 1991.
- b) Sam, T.W. In: *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination*; Colegate, S.M.; Molyneux, R.J. (Eds.); CRC Press, pág. 441, 1993.
- c) Lima, D.P.; Beatriz, A.; Ramos, A.A.; Siqueira, J.M. *et al.* Transformações químicas do (+)-10 β ,14-diol-*Allo*-aromandrendano, isolado de *Luguetia grabirsiscula* R.E. Fries (ANNONACEAE) e avaliação biológica de alguns derivados obtidos *Química Nova* **20**, 616, 1997.

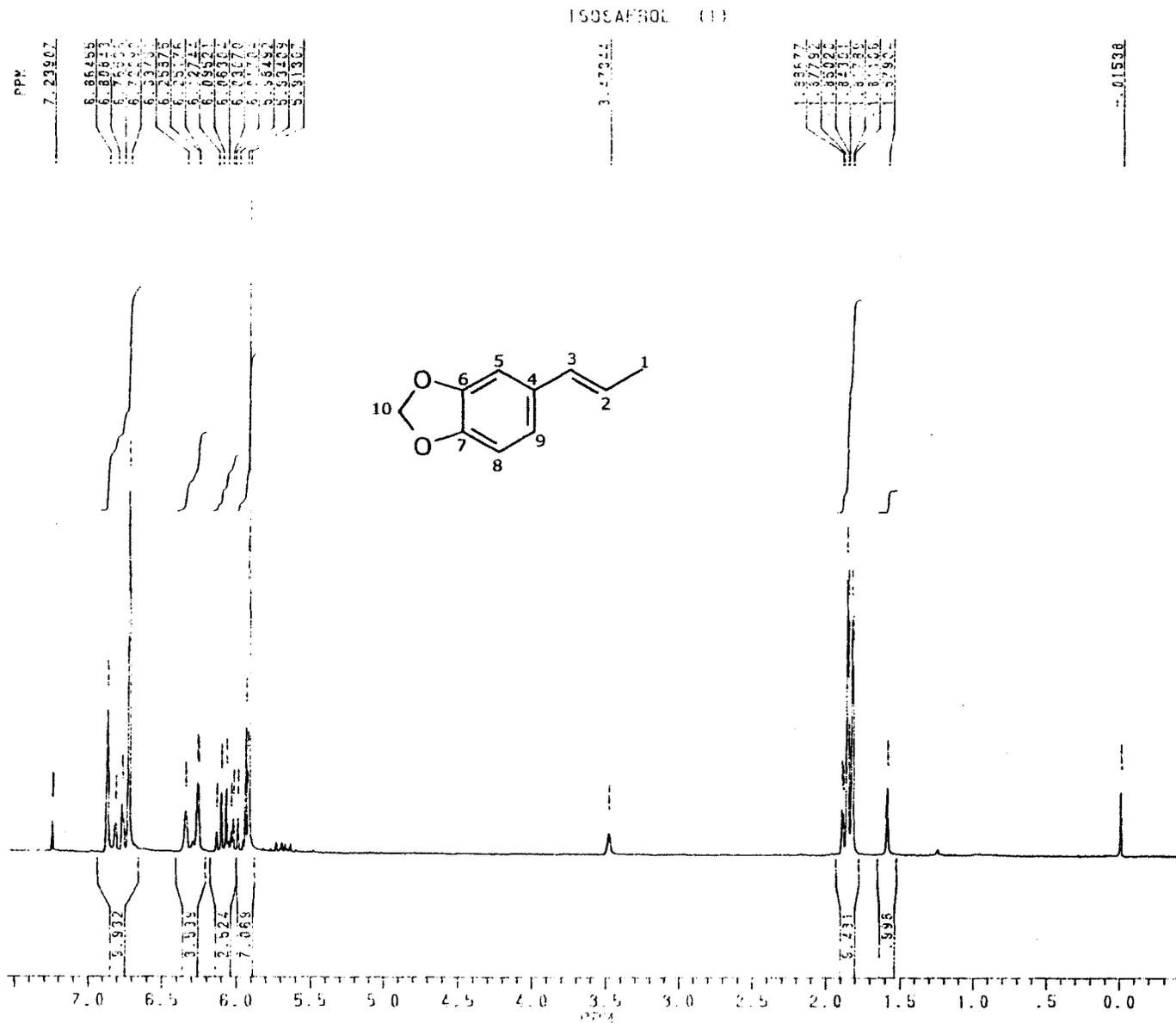
90-Perrin, D.D.; Armarego, W.L.F.; Perrin, D.R. Purification of Laboratory Chemicals, Pergamon Press, 1966.

91-Mangnus, E.M.; Zwanenburg, B. Synthesis, structural characterization, and biological evaluation of all four enantiomers of strigol analogue GR7 *J. Agric. Food Chem.* **40**, 697-700, 1992.

Espectros e Cromatogramas



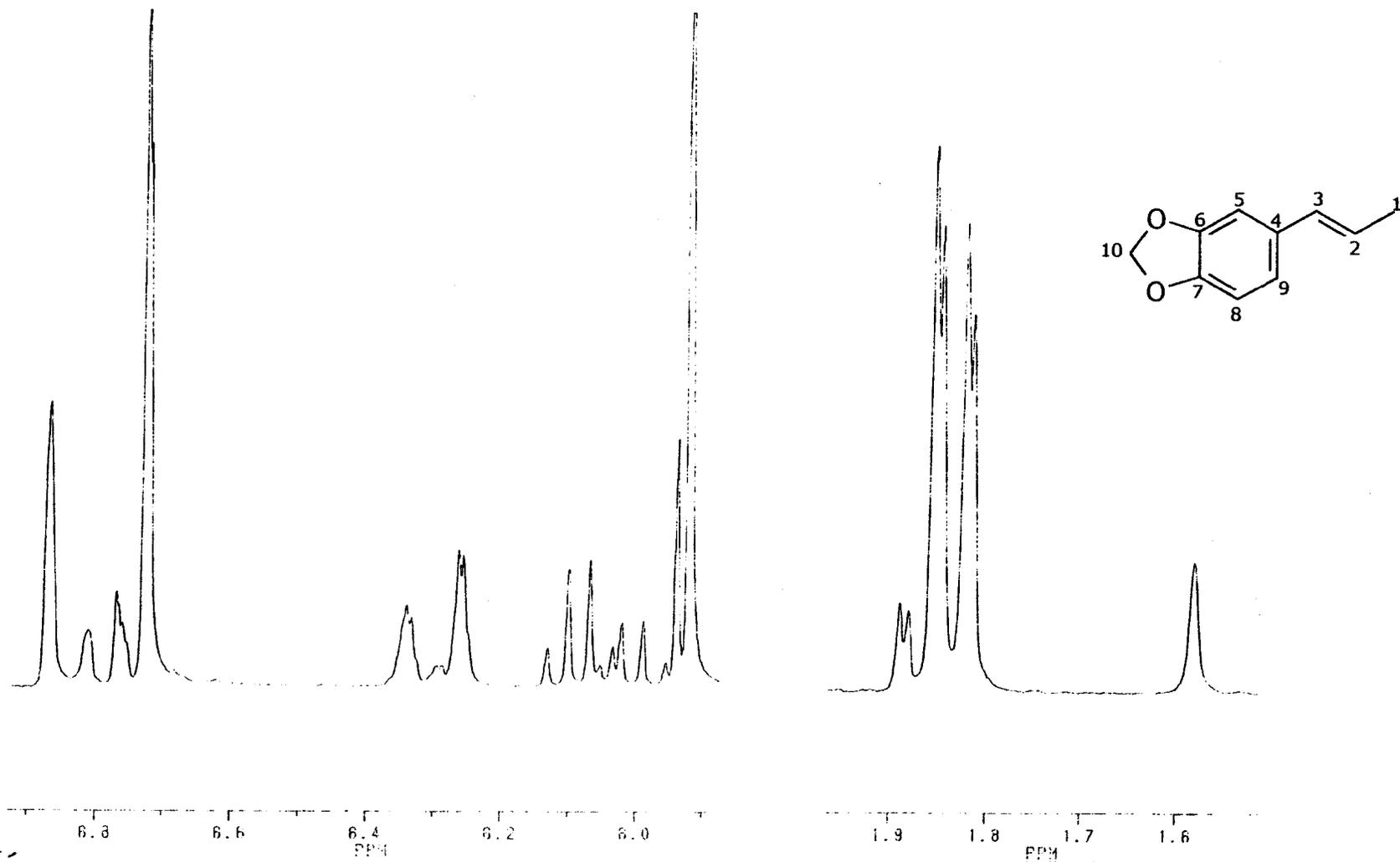
Spectro 1: Espectro de IV para o isosafrol 53.



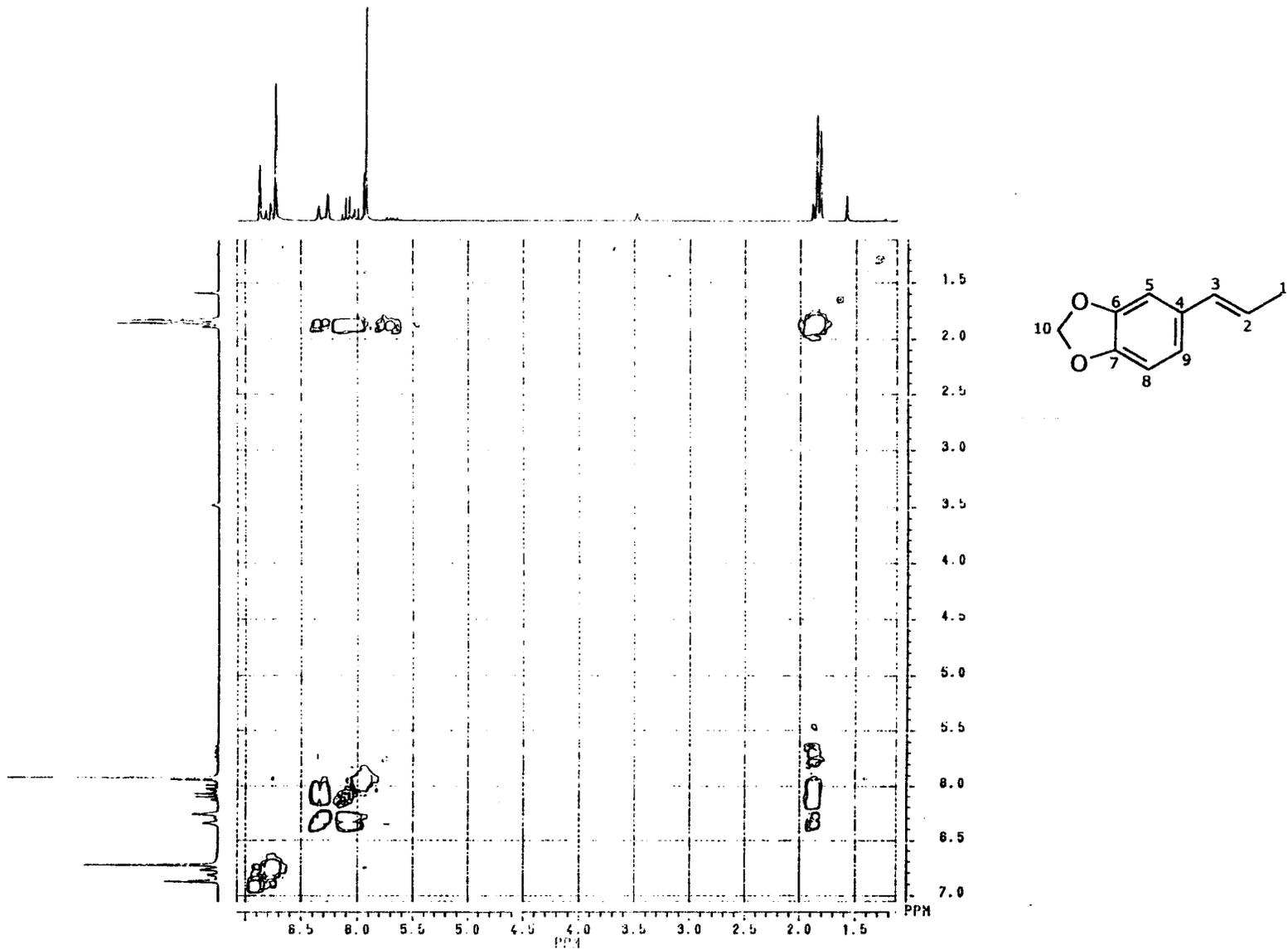

 ANDRE7.712
 DATE 9-7-94

CF	200.133
CY	80.1300000
Q1	3100.000
S1	16384
TD	8192
SW	1907.964
HZ/P1	237
FW	2.0
RD	1.000
AQ	2.114
RG	20
NS	16
TE	297
IN	2500
Q2	1570.000
DP	632.00
LB	0.0
GB	0.0
CX	24.00
CY	0.0
F1	7.543F
F2	-429P
HZ/CM	66.476
PPM/CM	332
SR	2345.13

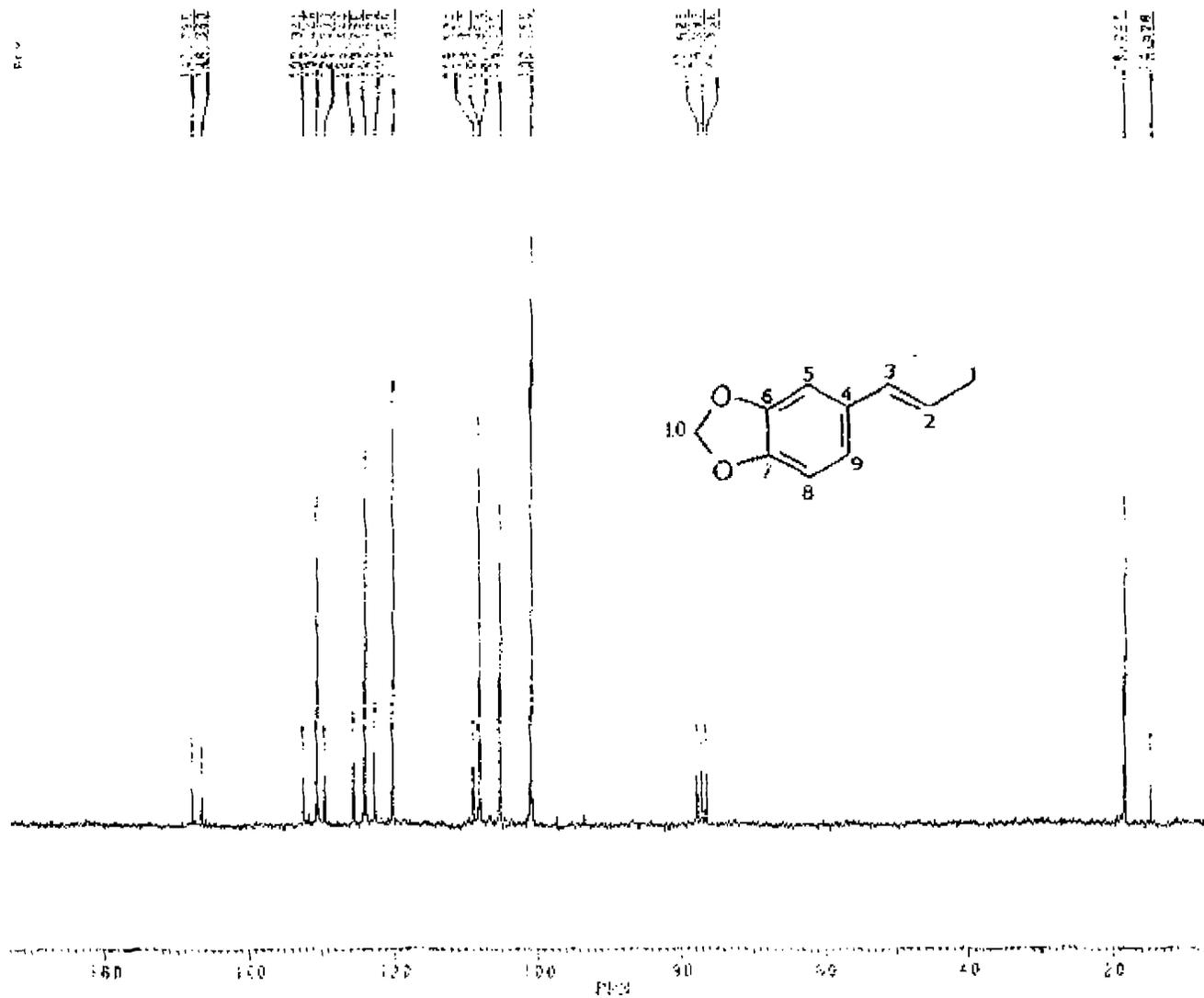
Espectro 2: Espectro de RMN¹H para o isosafrol 53 em CDCl₃.



Spectro 3: Expansão do espectro de RMN¹H para o isosafrol 53.

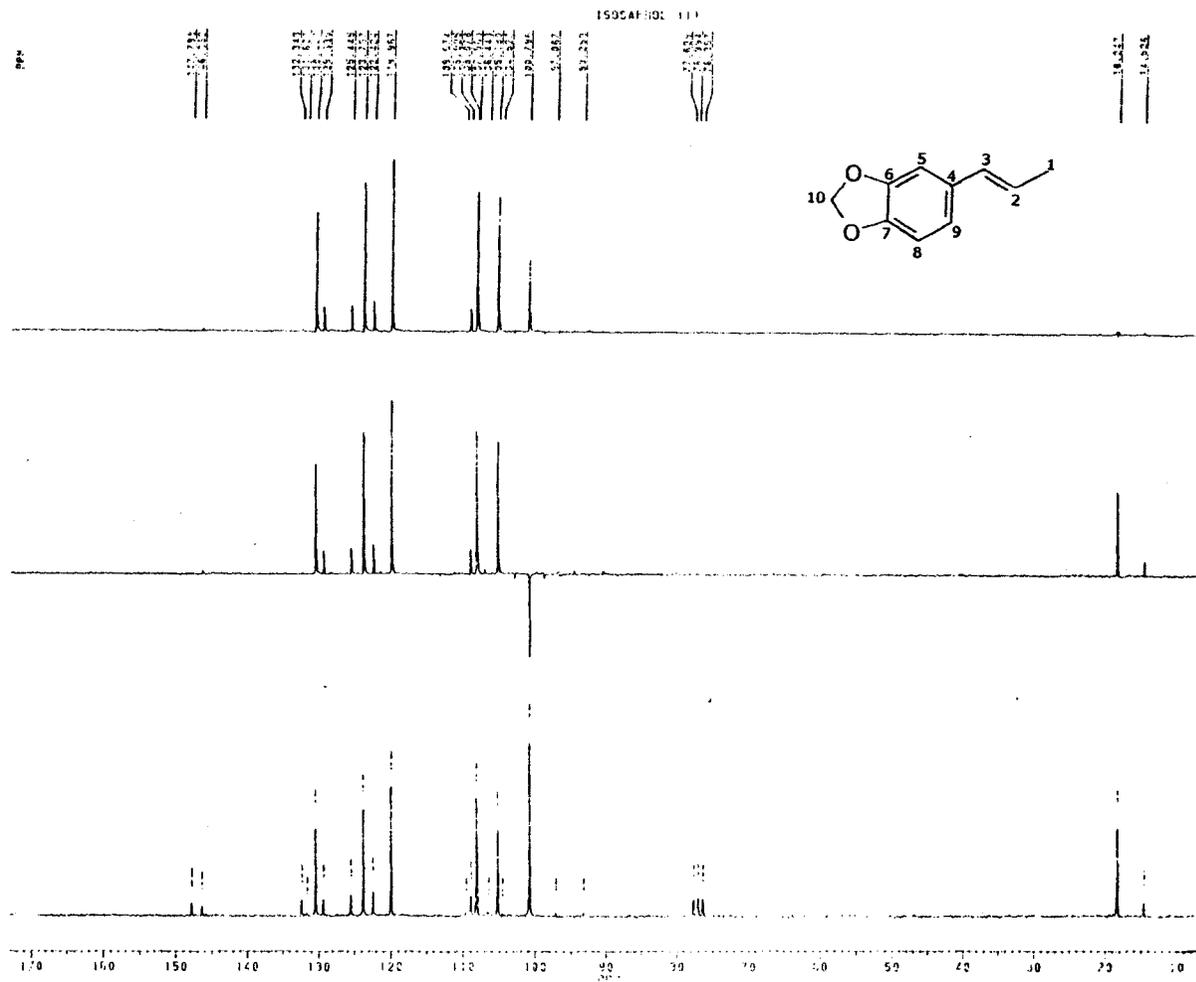


Espectro 4: Experimento de HOMOCOSY para o isosafrol 53 em CDCl₃.

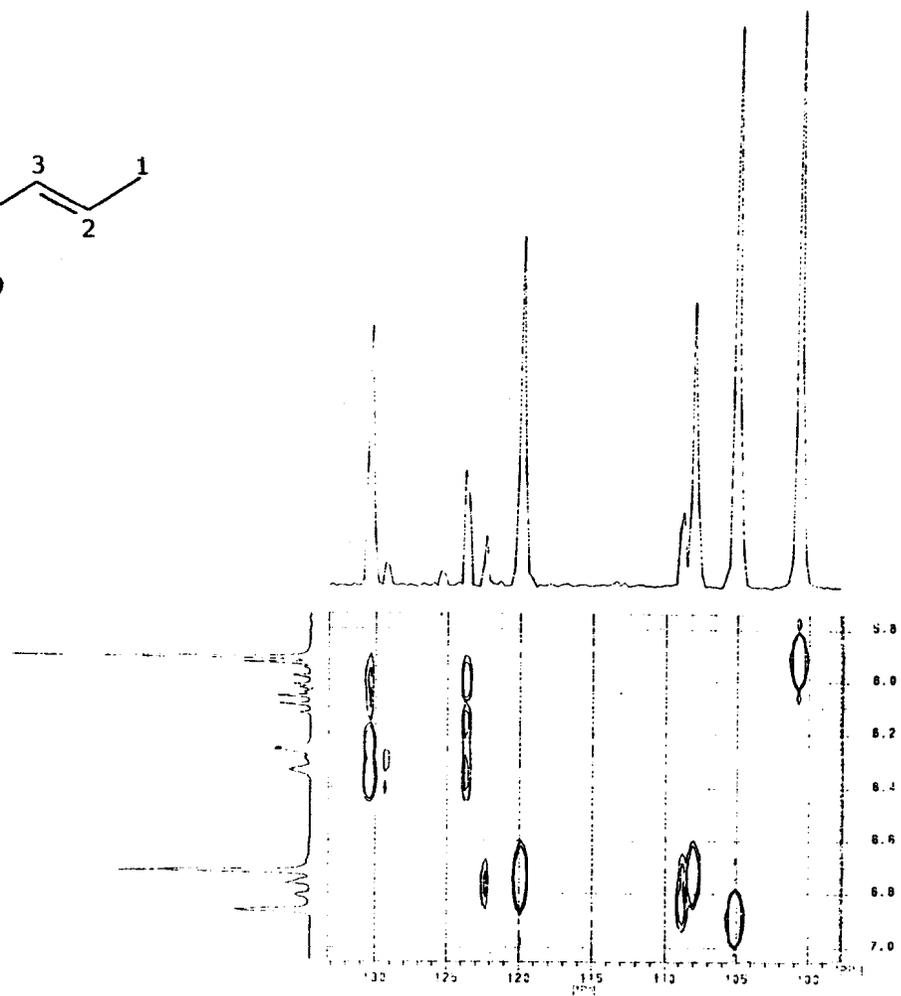
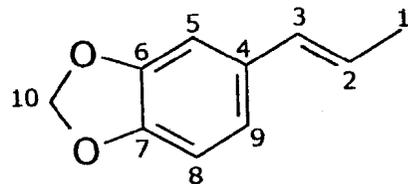


~~XXXX~~
 ANDET. 733
 AU PROG:
 F0WCDISC. 40
 DATE 8-7 88
 SE 80.020
 SF 50.3210000
 OF 1500.000
 SI 6334
 FJ 16344
 SN 12500.000
 HZ/P: 1.528
 PH 8.0
 PD 0.0
 AQ 0.0
 SD 238.655
 NS 802
 TE 247
 FW 15700
 DZ 1570.000
 ST 20.000
 LB 2.000
 GB 0.0
 EX 24.00
 CY 0.0
 FI 122.8178
 LZ 6.2600
 HZ/04 308.140
 HZ/00 6.844
 HZ 3076.64

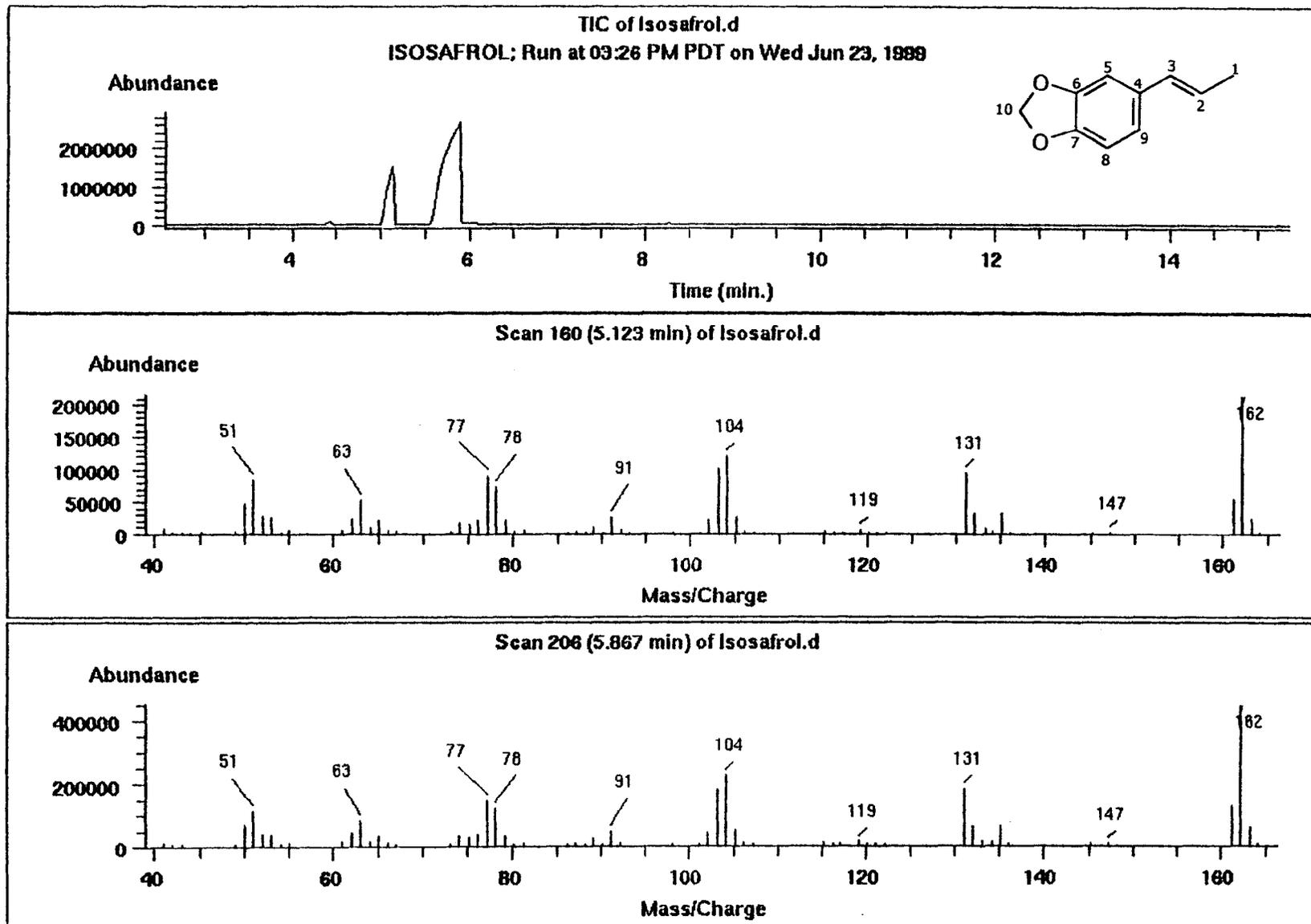
Espectro 5: Espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado para o isosafrol 53 em CDCl_3 .



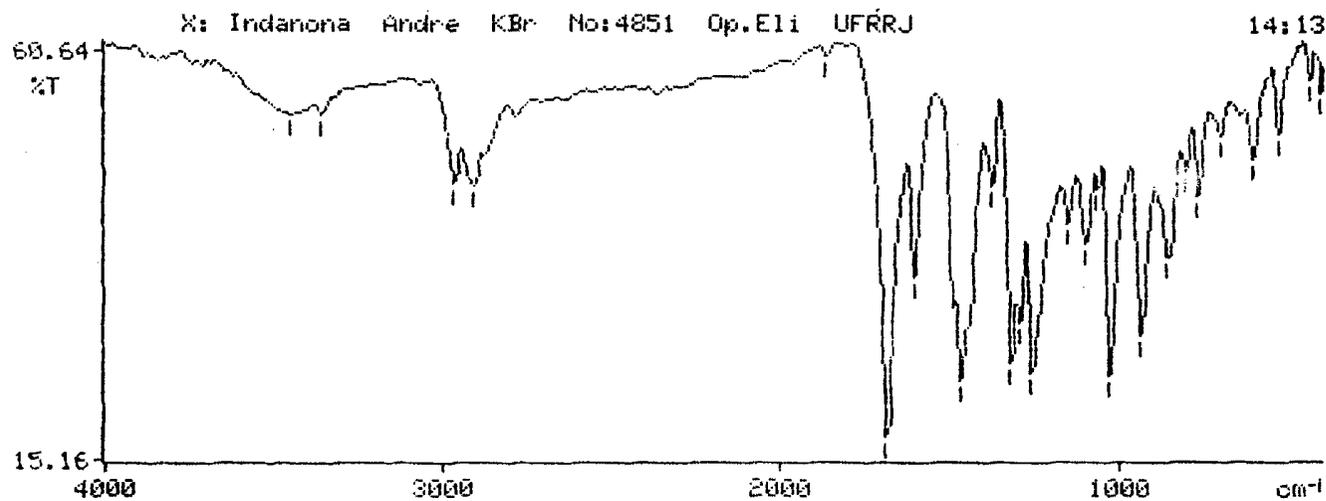
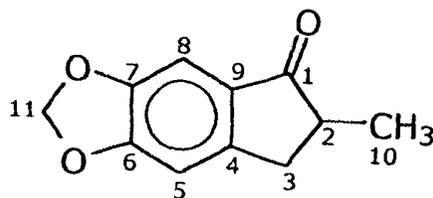
Espectro 6: Espectro de RMN¹³C e DEPT com $\phi = 90^\circ$ e $\phi = 135^\circ$ para o isosafrol 53.



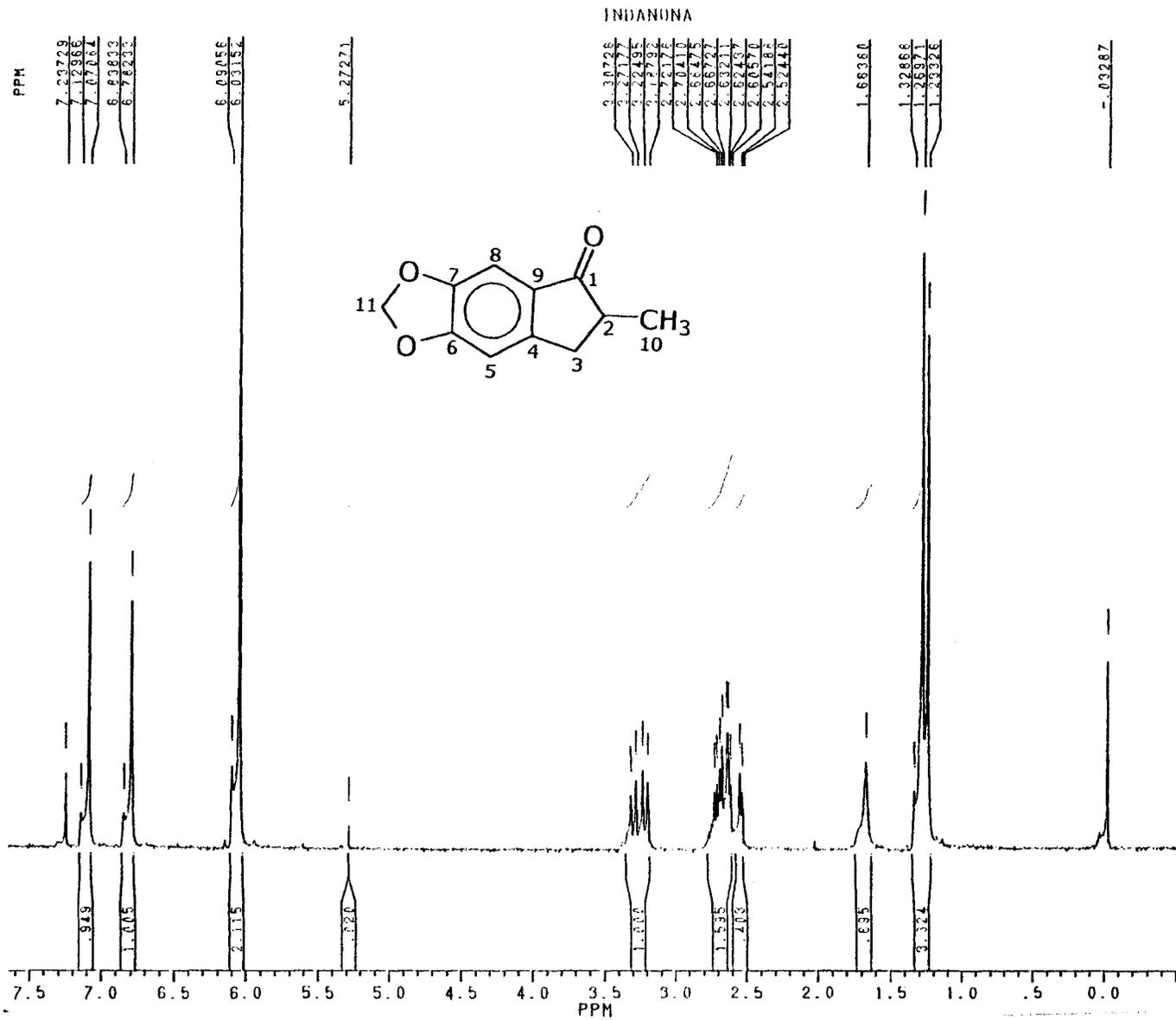
Spectro 7: Experimento de HETCOR para o isosafrol 53 em CDCl₃.



Espectro 8: Espectro de massas para o isosafrol 53.



Espectro 9: Espectro de IV para a indanona 52.




 ANDRE8.061
 DATE 28-8-99

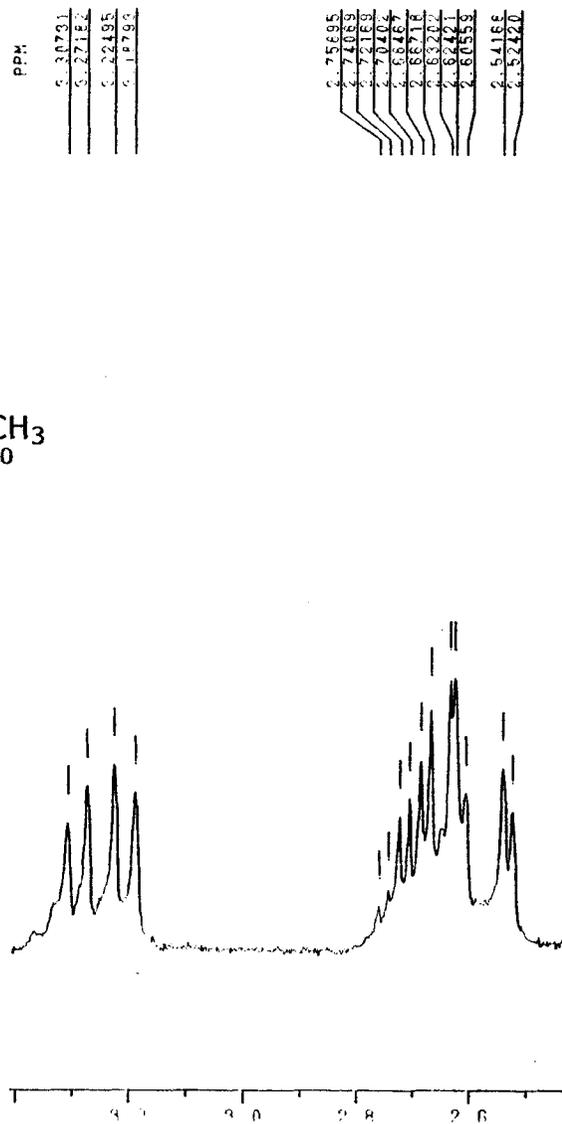
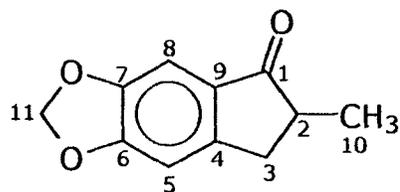
SF 200.132
 SY 80.1300000
 O1 3100.000
 SI 16384
 TD 8192
 SW 2049.180
 HZ/PT .250

PW 2.0
 RD 0.0
 AQ 1.999
 RC 40
 NS 16
 TE 297

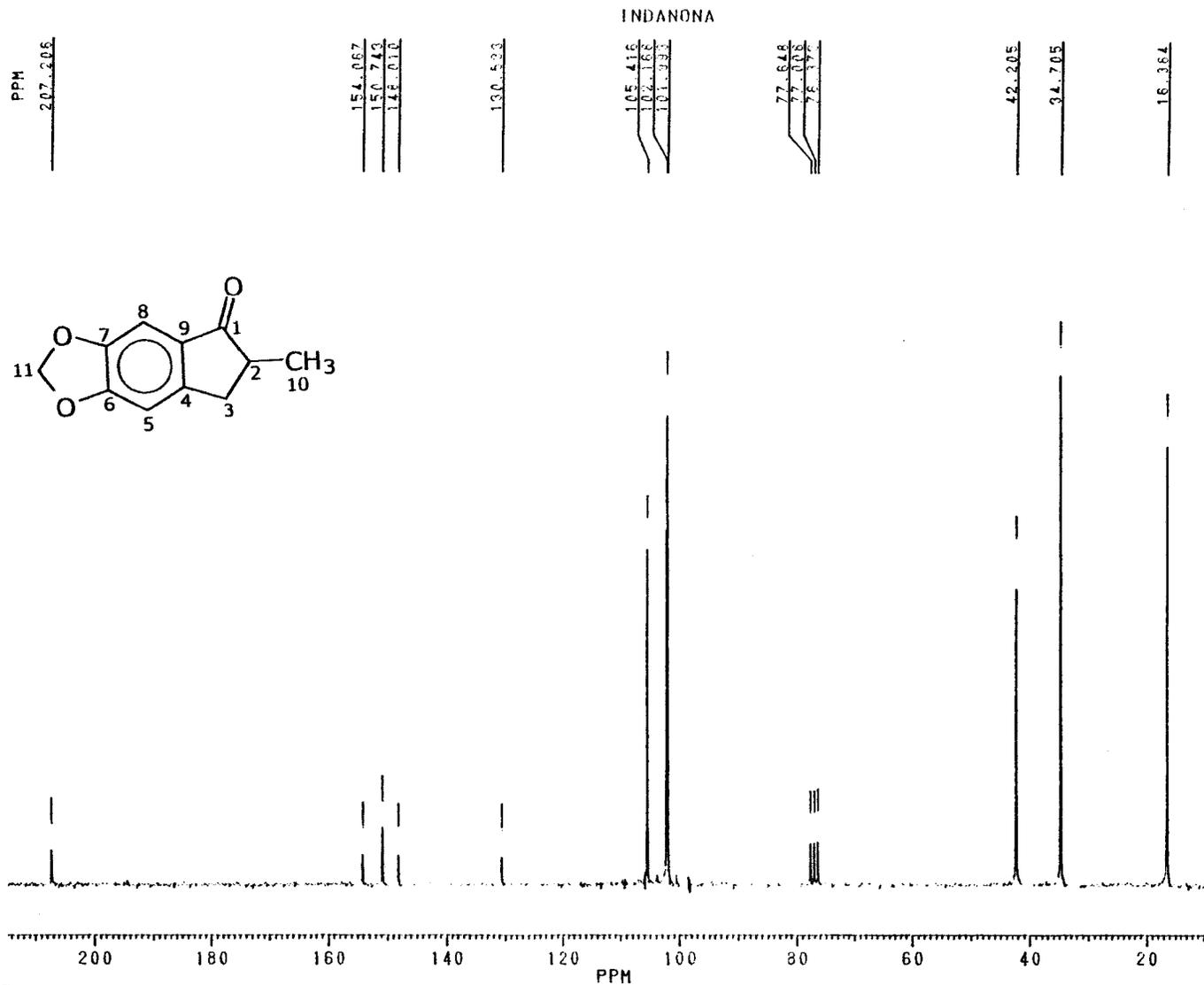
FW 2600
 D2 1570.000
 DP 63L PD

LB 0.0
 GB 0.0
 CX 24.00
 CI 0.0
 F1 7.640P
 F2 -5.09P
 HZ/CM 67.956
 PPM/CM .340
 SR 2344.69

Espectro 10: Espectro de RMN¹H para a indanona 52 em CDCl₃.



Espectro 11: Expansão do espectro de RMN¹H para a indanona 52.



BRUKER

ANDRE8.070
AU PROC:
POWCDISC.AU
DATE 28-8-99

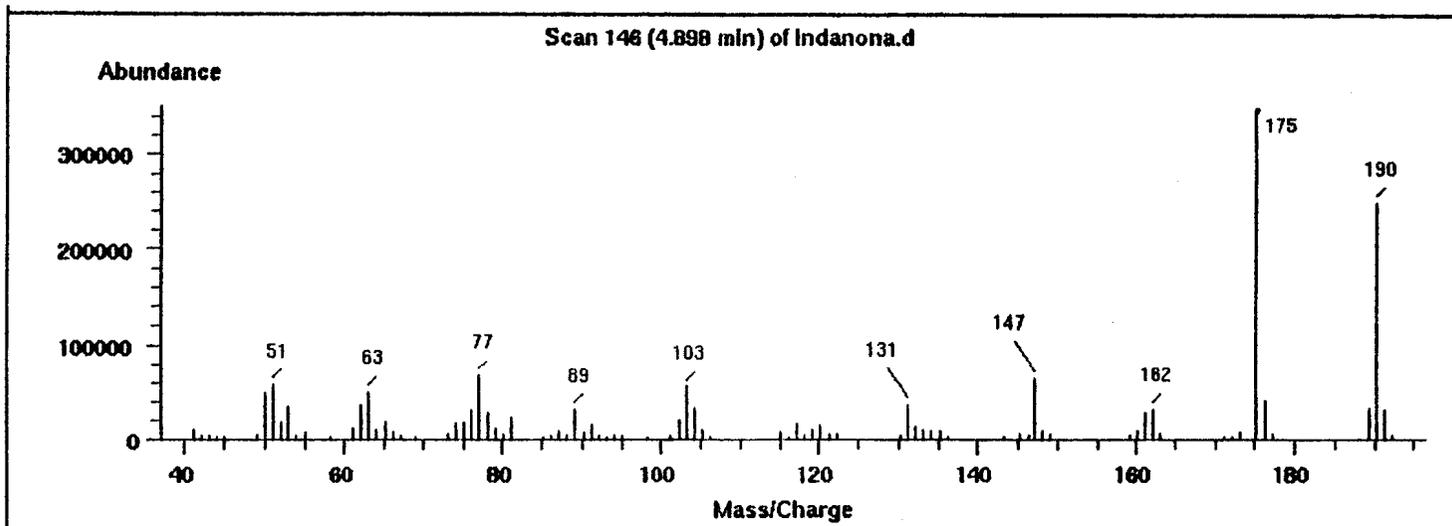
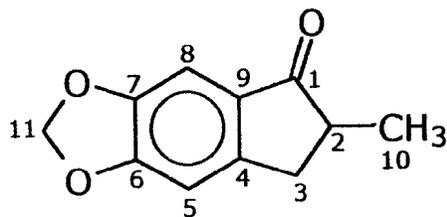
SF 50.323
SI 50.3270000
OI 1800.000
SI 16384
TD 16384
SW 12500.000
HZ/PT 1.526

PW 6.5
RD 0.0
AQ 655
RC 200
NS 1655
TE 297

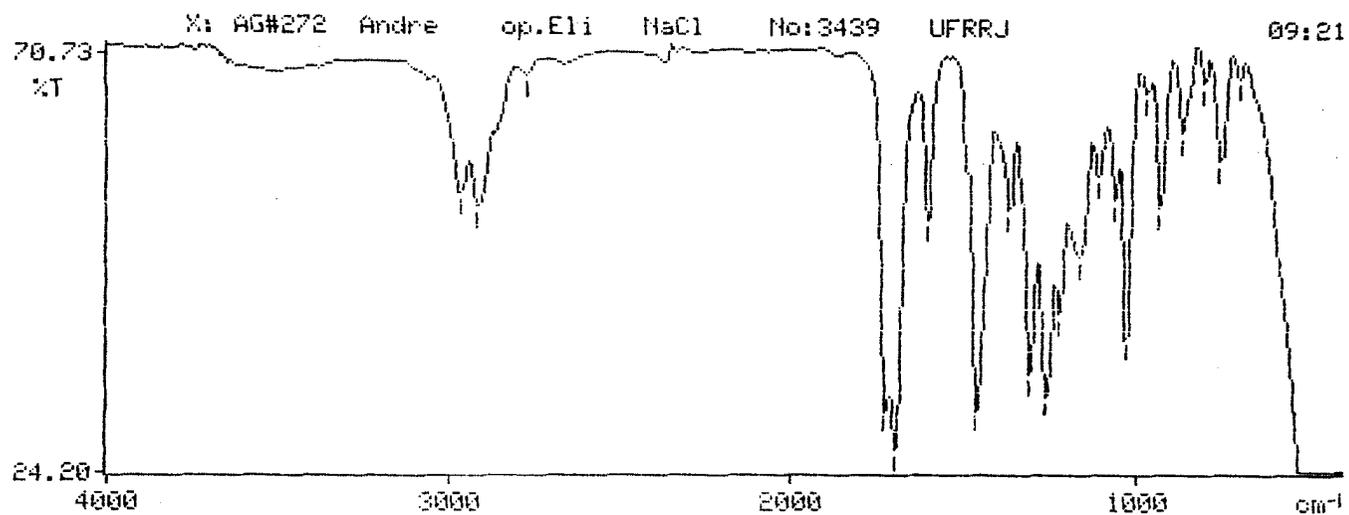
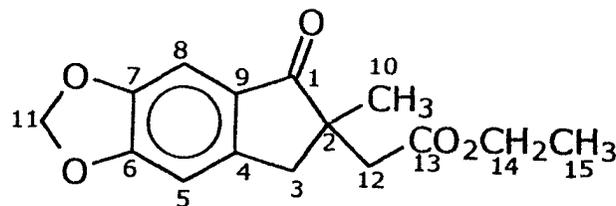
FW 15700
O2 1570.000
DP 20H DO

LB 2.000
GB 0.0
CX 24.00
CI 0.0
F1 214.599P
F2 7.958P
HZ/CM 433.286
PPM/CM 8.610
SR -3675.54

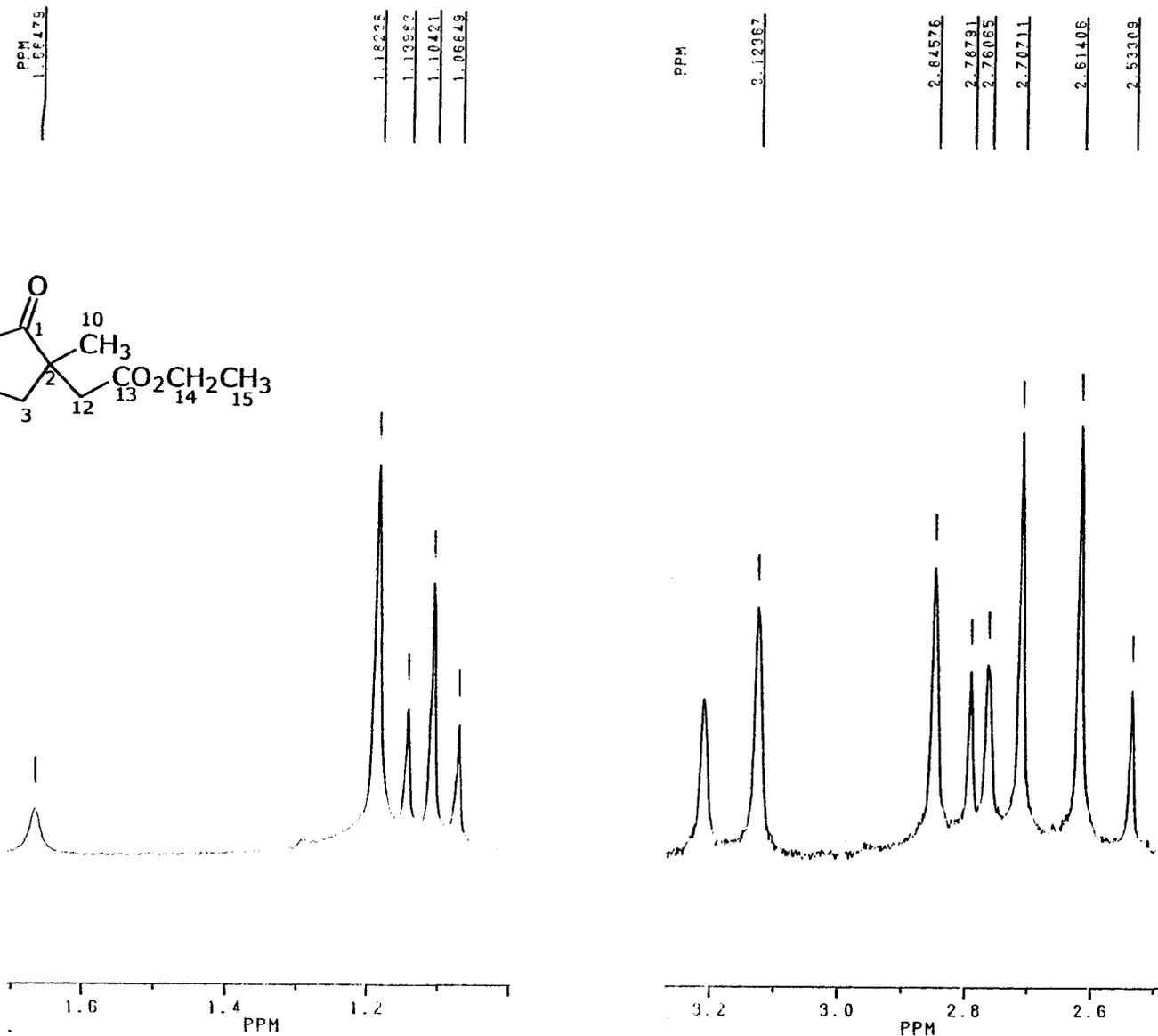
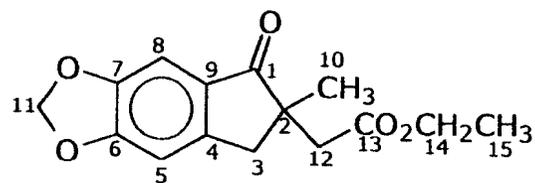
Espectro 12: Espectro de RMN¹³C totalmente desacoplado para a indanona 52 em CDCl₃.



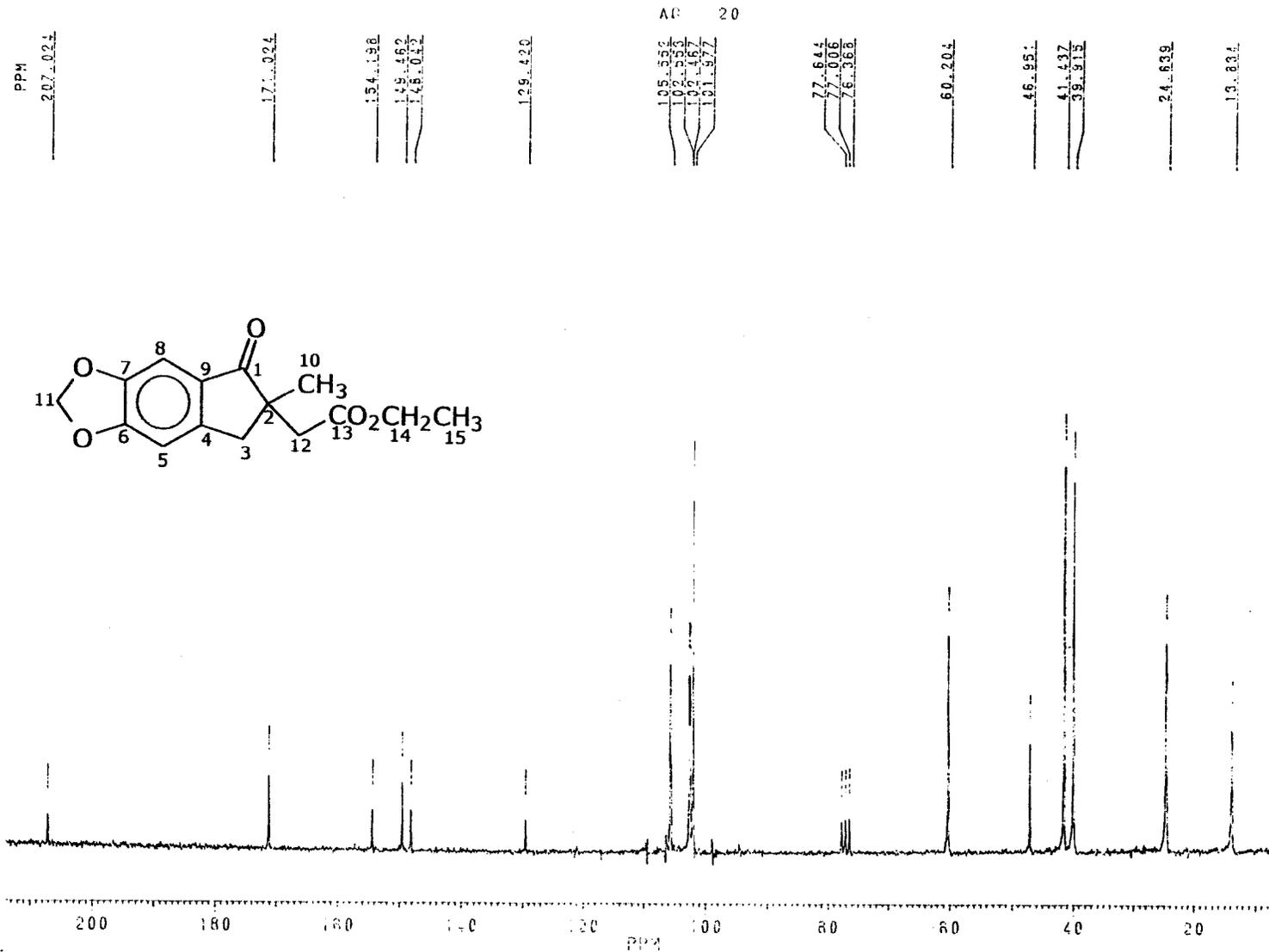
Espectro 13: Espectro de massas para a indanona 52.



Espectro 14: Espectro de IV para o ceto-éster 51.



Espectro 16: Expansão do espectro de RMN¹H para o ceto-éster 51.



~~BRUKER~~

UFRRJ.374
 AU PROC:
 PWDG:SC.AU
 DATE 1-12-97

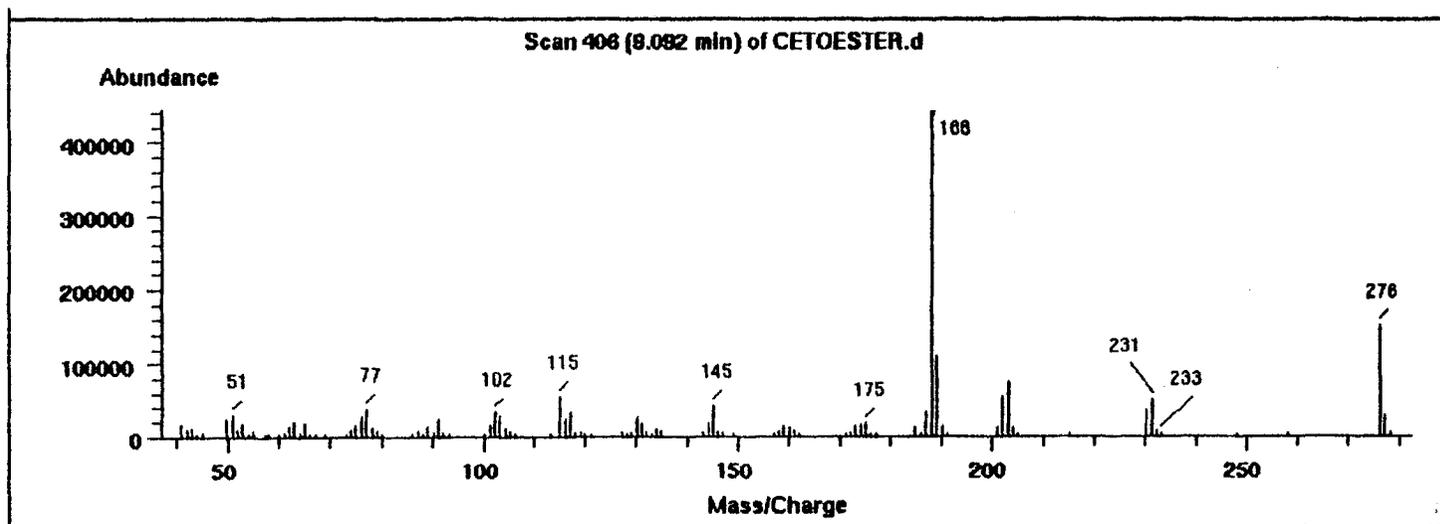
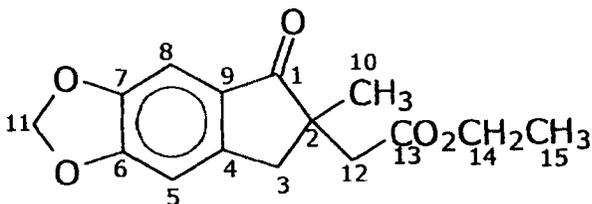
SI 50.323
 SY 50.327000
 DI 1800.000
 SI 16384
 TO 16384
 SW 12500.000
 HZ/P 1.526

PR 6.5
 RD 0.0
 AO 0.655
 RG 200
 NS 517
 TE 297

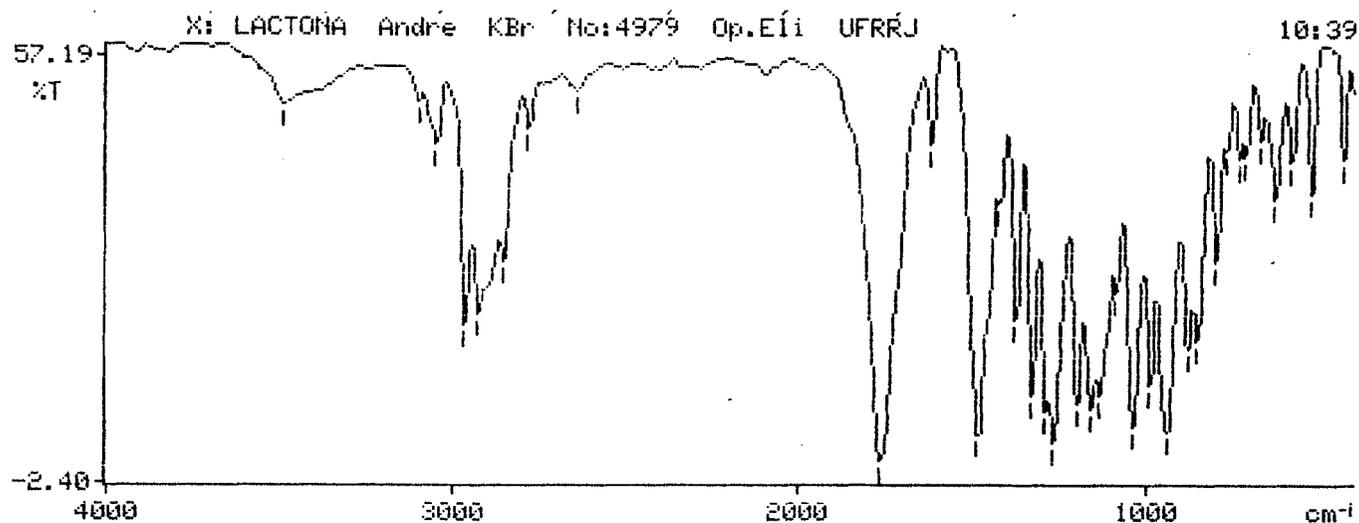
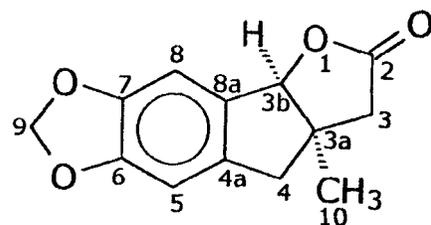
FW 15700
 D2 1570.000
 DP 20H 00

LR 2.000
 GR 0.0
 CX 26.00
 CY 0.0
 FI 213.780P
 F2 6.169P
 FZ/CM 101.834
 PRZ/CM 7.985
 SR -3674.02

Espectro 17: Espectro de RMN¹³C totalmente desacoplado para o ceto-éster 51 em CDCl₃.

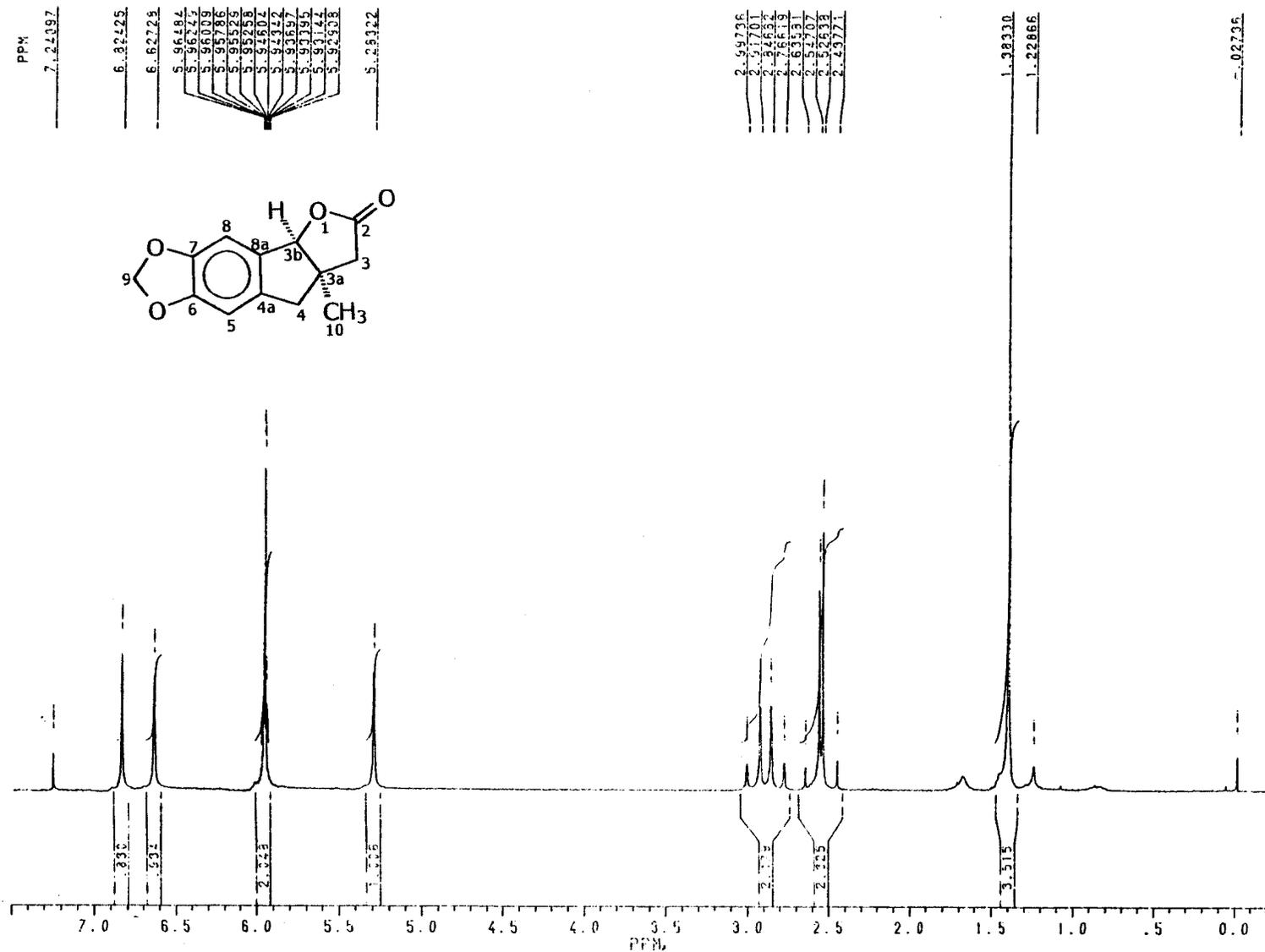


Espectro 18: Espectro de massas para o ceto-éster 51.



Espectro 19: Espectro de IV para a lactona 50.

LACTONA



BRUKER

MARCOB.109
DATE 5-8-98

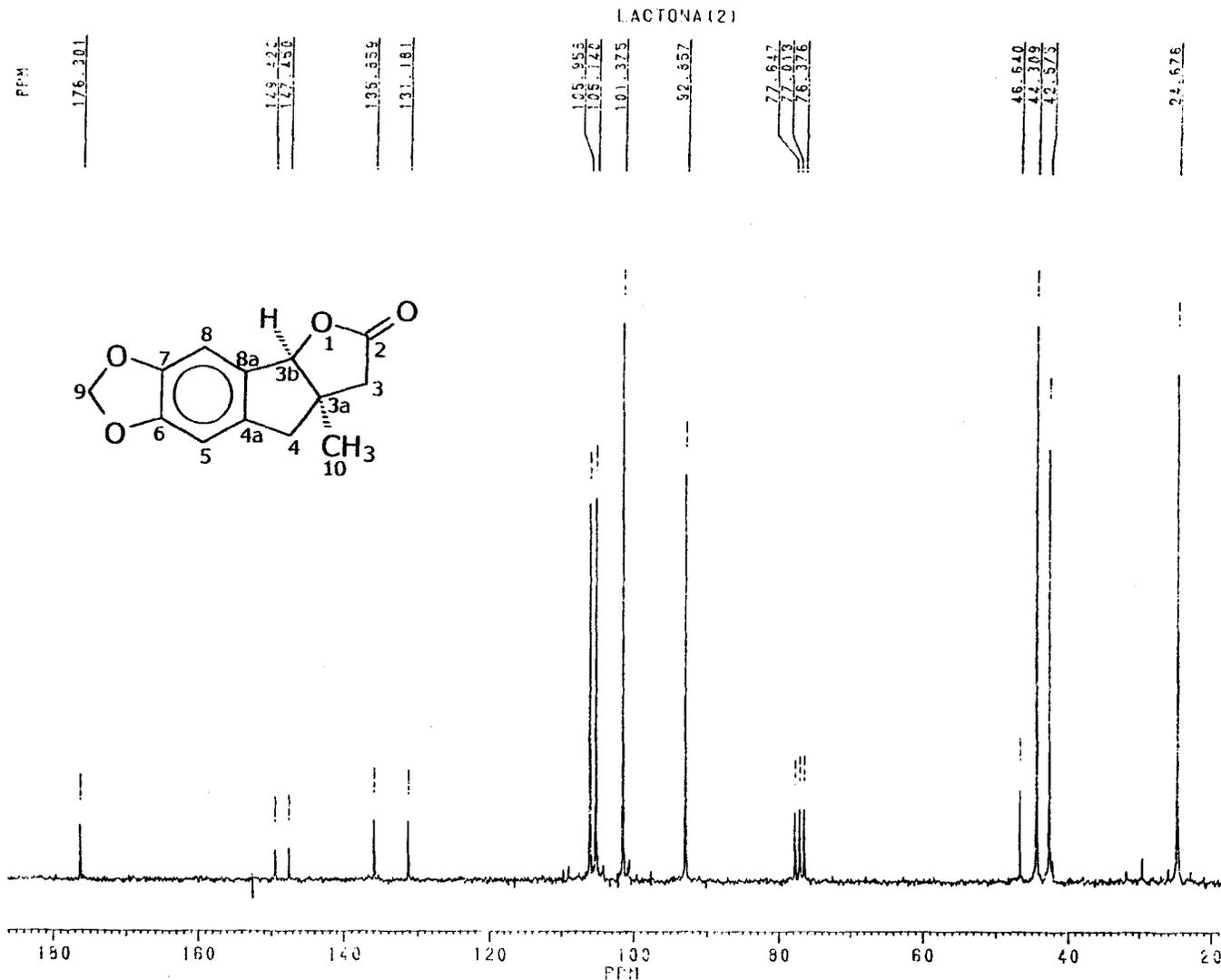
SF 200.132
SY 80.1300000
OI 3100.000
SI 16384
TD 8192
SW 1908.397
HZ/PT .233

PW 2.0
RD 1.000
AQ 2.146
RG 20
NS 8
TE 297

FW 2400
O2 1570.000
DP 63L 70

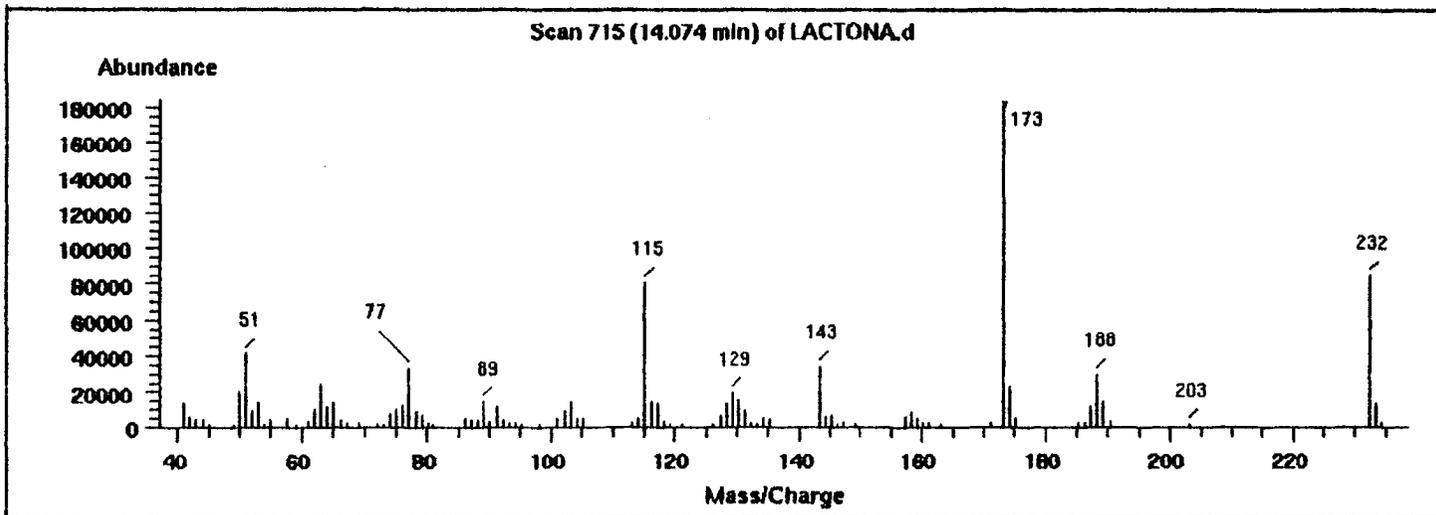
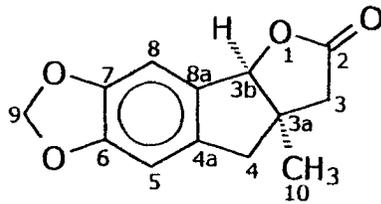
LB 0.0
GB 0.0
CX 27.00
CY 0.0
F1 7.498P
F2 -.256P
HZ/CM 57.472
PPM/CM .287
SR 2345.10

Espectro 20: Espectro de RMN¹H para a lactona 50 em CDCl₃.

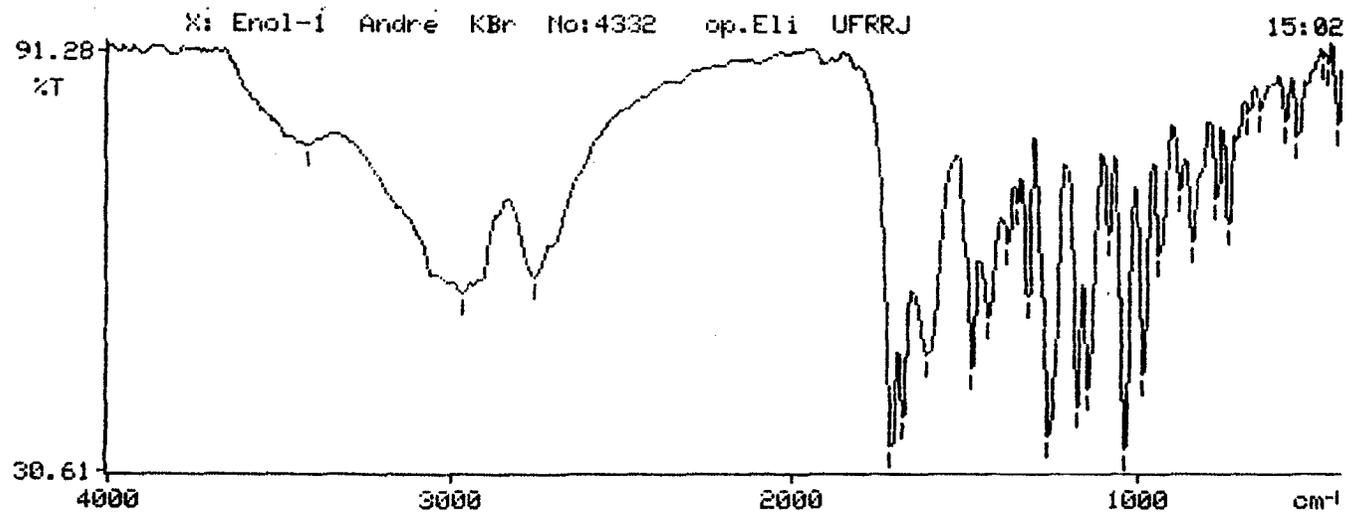
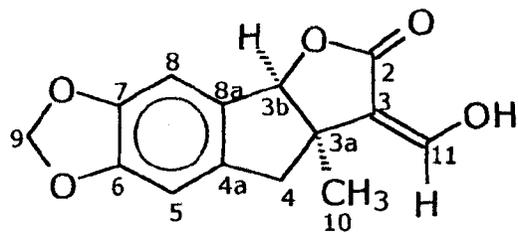


ANDRE3.450
 AU PROG:
 FQWGD:50.AU
 DATE 22-3-99
 SF 50.323
 SY 50.3270000
 O1 1800.000
 S1 16384
 T0 16384
 SW 12500.000
 HZ/P1 1.526
 PW 6.5
 RD 0.0
 AQ .655
 RG 200
 NS 2517
 TE 297
 FW 15700
 O2 1570.000
 DP 20H 00
 LB 2.000
 GB 0.0
 CX 24.00
 CY 0.0
 F1 186.127F
 F2 17.327F
 HZ/CM 353.940
 PPM/CM 7.033
 SR -3677.07

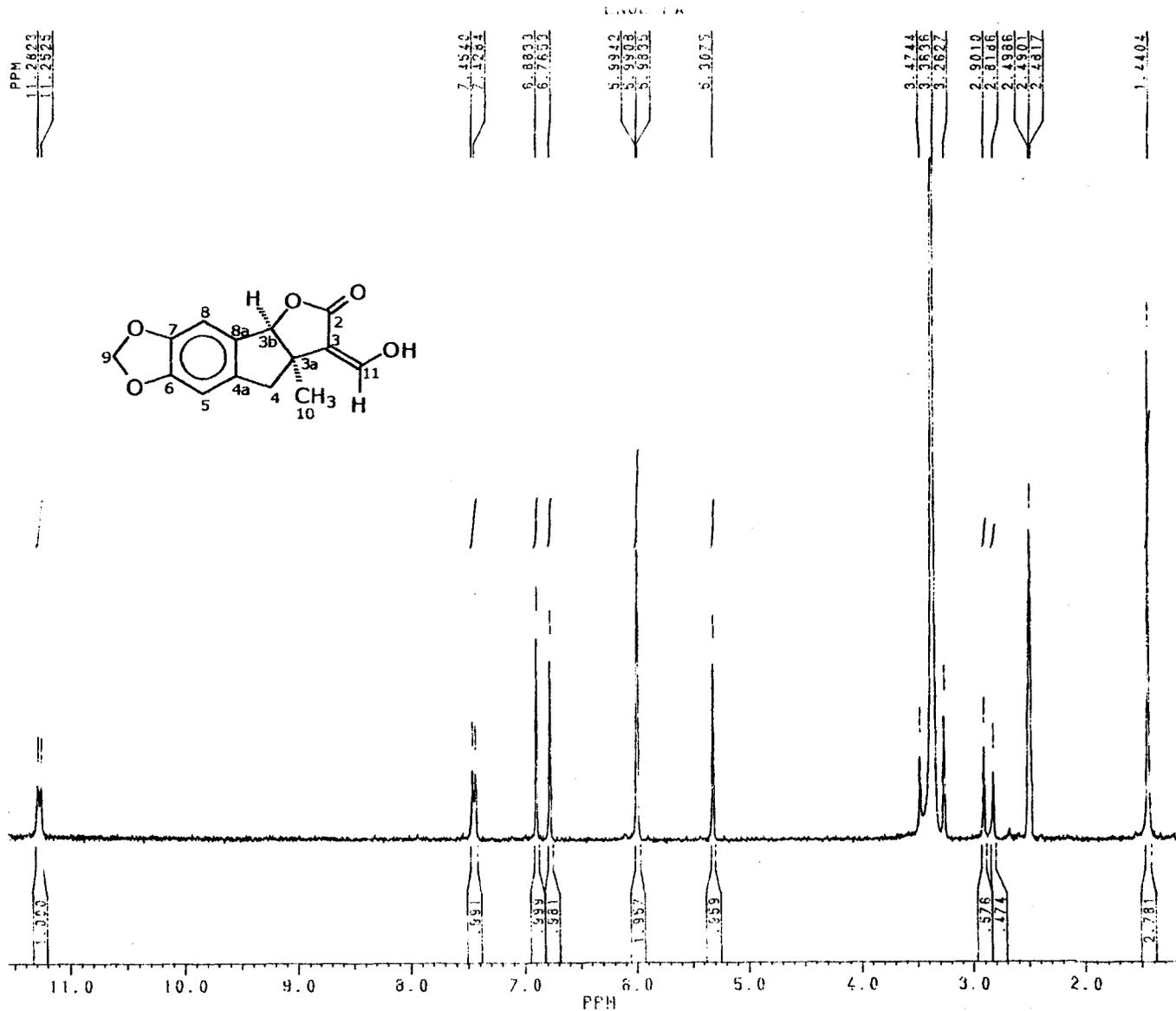
Espectro 21: Espectro de RMN¹³C totalmente desacoplado para a lactona 50 em CDCl₃.



Espectro 22: Espectro de massas para a lactona 50.

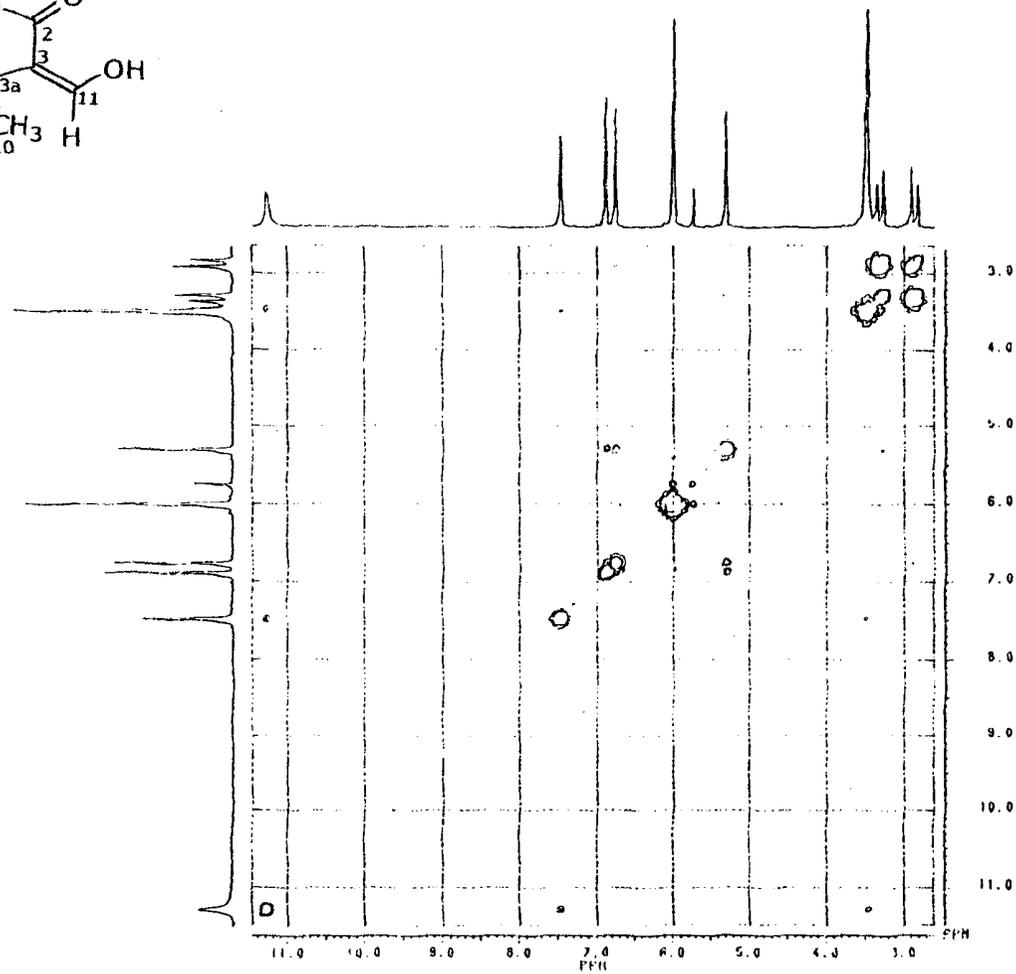
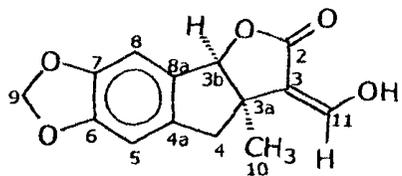


Espectro 23: Espectro de IV para o enol 49.

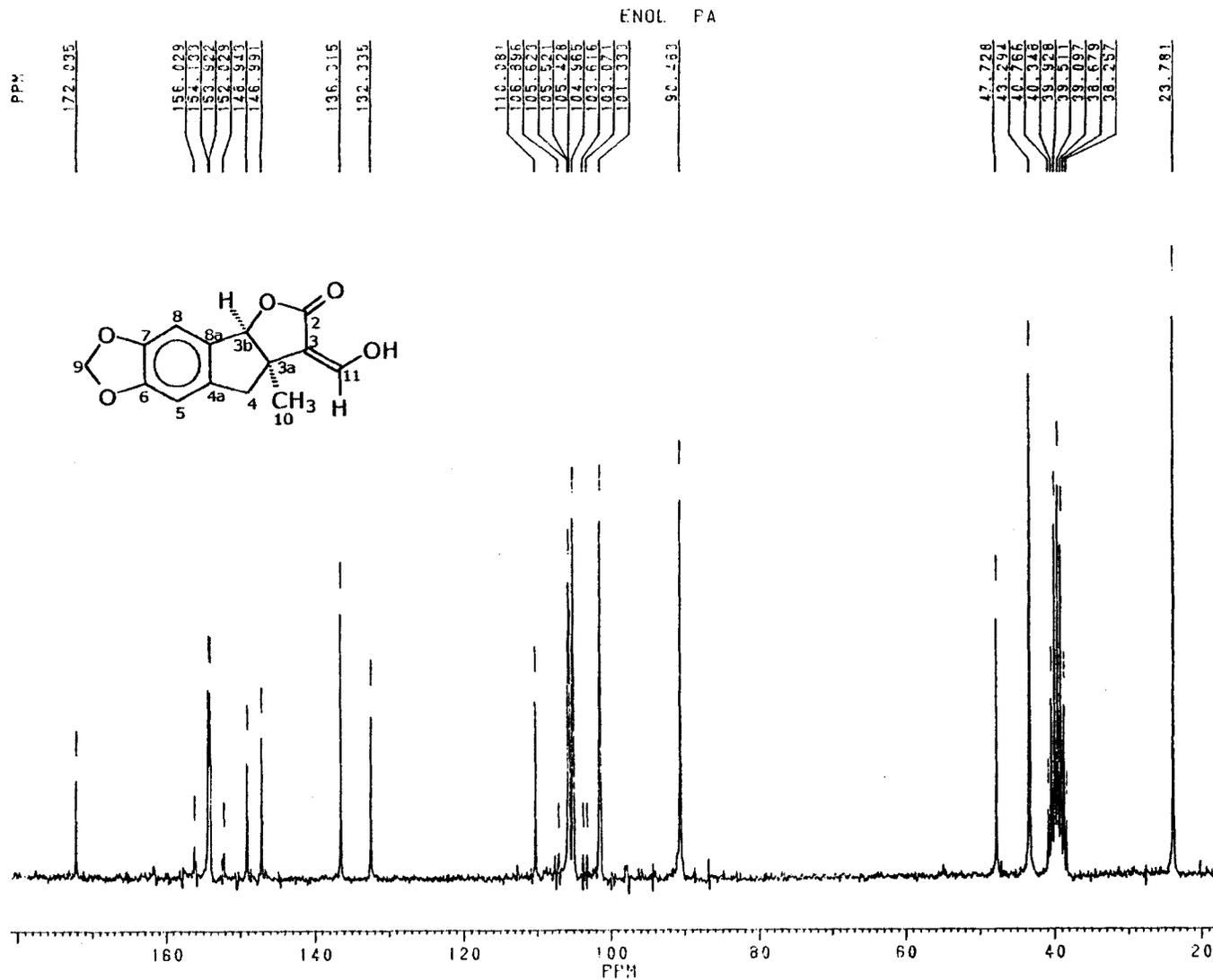



 ANDREJ. J68
 DATE 5-3-99
 SF 200.133
 SY 80.1300000
 OI 4400.000
 SI 6384
 TD 8192
 SW 2762.431
 HZ/PI 337
 PW 2.0
 RD 1.000
 AQ 1.483
 RG 20
 NS 8
 TE 297
 FW 3500
 Q2 1570.000
 DP 63L 00
 LB 0.0
 GB 0.0
 CX 24.00
 CY 0.0
 F1 11.553P
 I2 1.148P
 HZ/CM 86.762
 PPM/CM 434
 SR 3290.98

Spectro 24: Espectro de RMN¹H para o enol 49 em DMSO-d₆.



Espectro 25: Experimento de HOMOCOSY para o enol 49 em DMSO-d₆.



ANDRE3.408
AU PROG:
POWCD:SC.AU
DATE 11-3-99

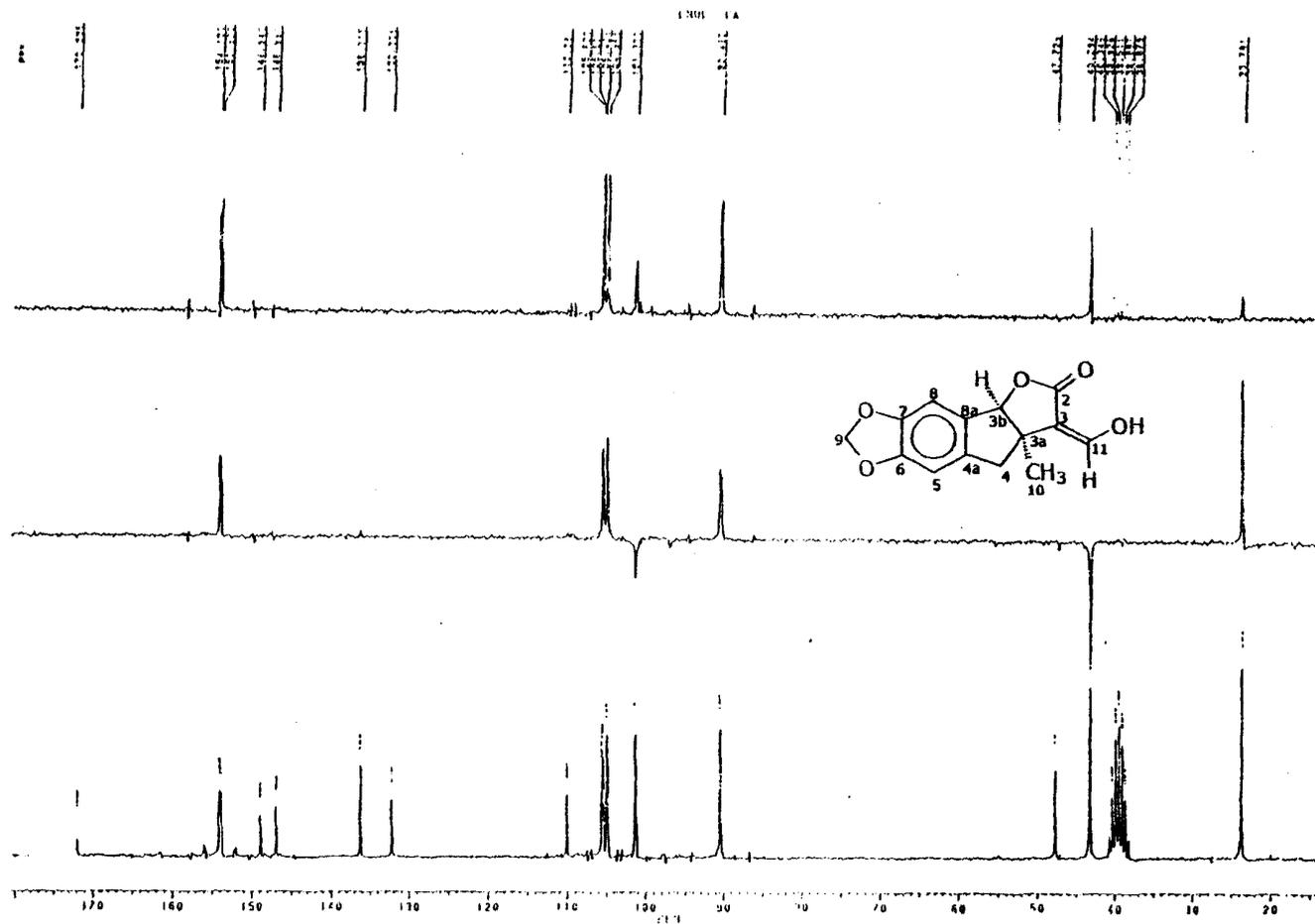
SF 50.324
SY 50.3270000
OI 1800.000
SI 16384
TD 16384
SW 12500.000
HZ/FI 1.526

PW 6.5
RD 0.0
AQ .655
RG 200
NS 3521
TE 297

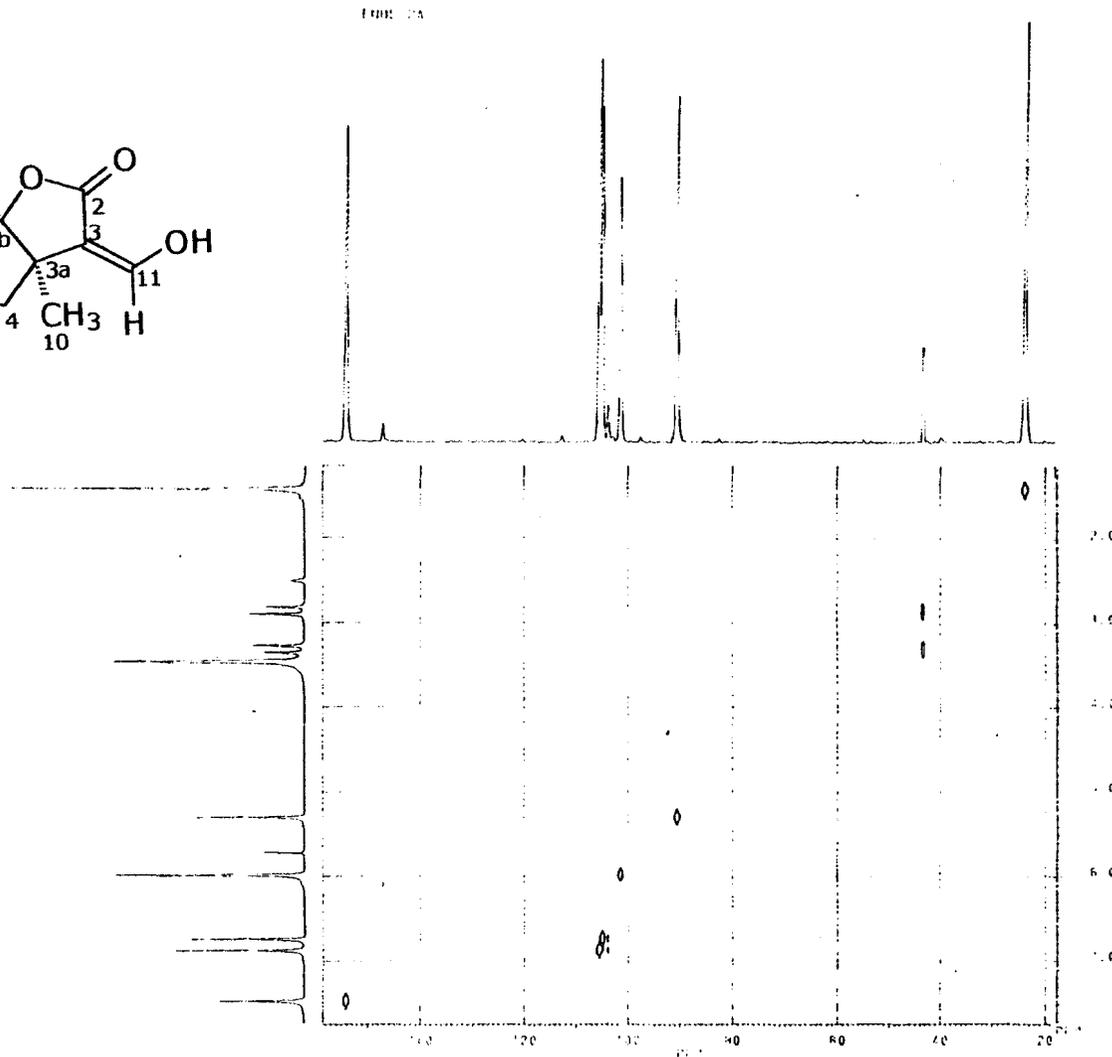
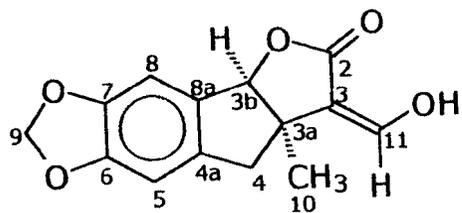
FW 15700
O2 1570.000
DP 20H DC

LR 2.000
GB 0.0
CX 24.00
CY 0.0
F1 180.919P
F2 16.971P
HZ/CM 343.768
PFM/CM 6.831
SR -3424.17

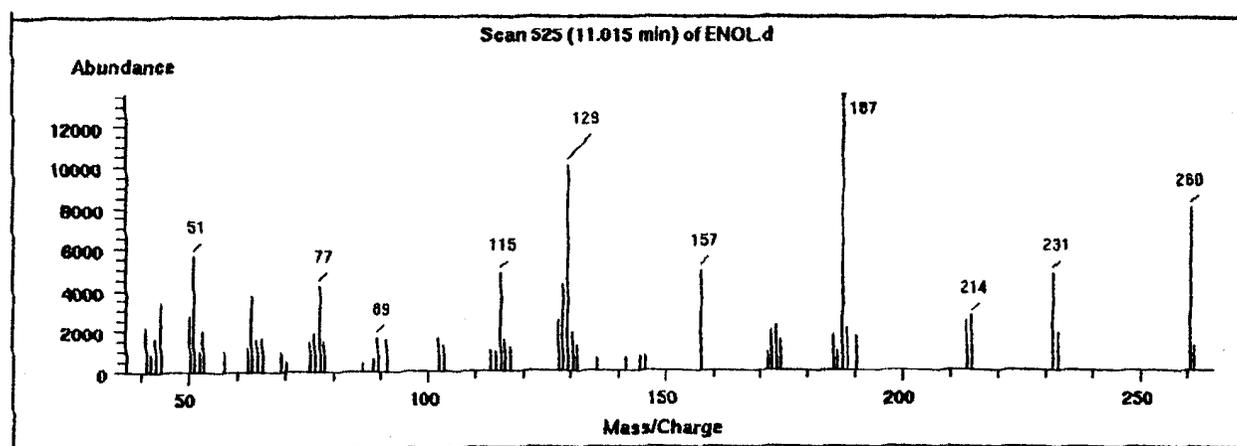
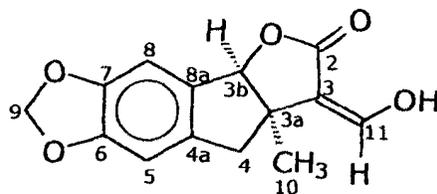
Espectro 26: Espectro de RMN¹³C totalmente desacoplado para o enol 49 em DMSO-d₆.



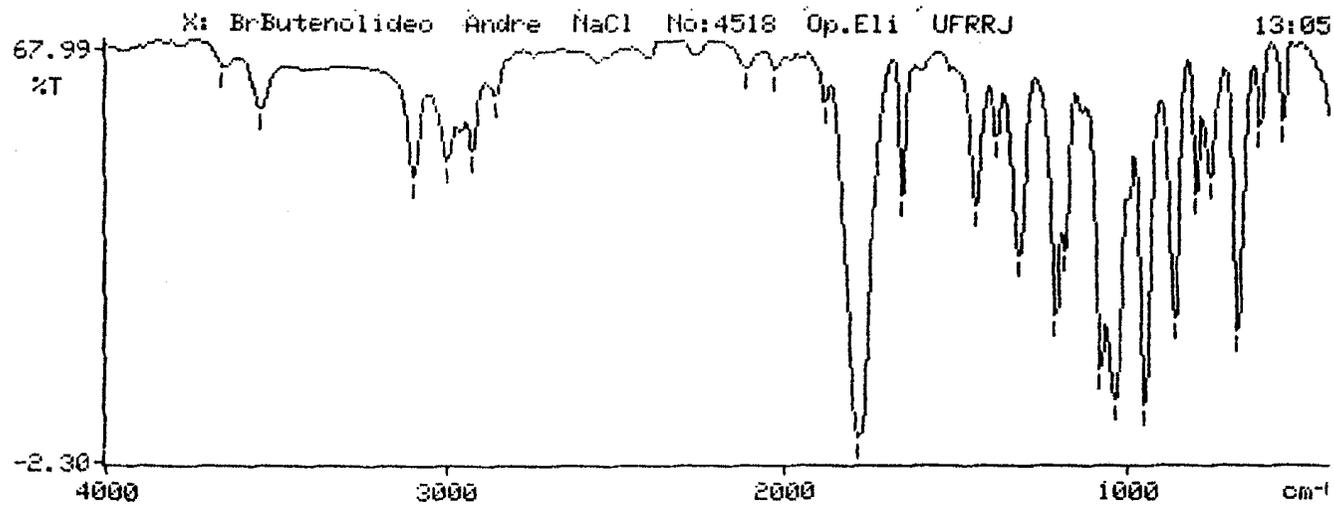
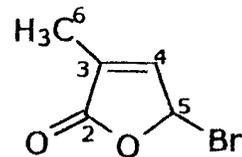
Espectro 27: Espectro de RMN^{13}C e DEPT com $\phi = 90^\circ$ e $\phi = 135^\circ$ para o enol 49 em DMSO-d_6 .



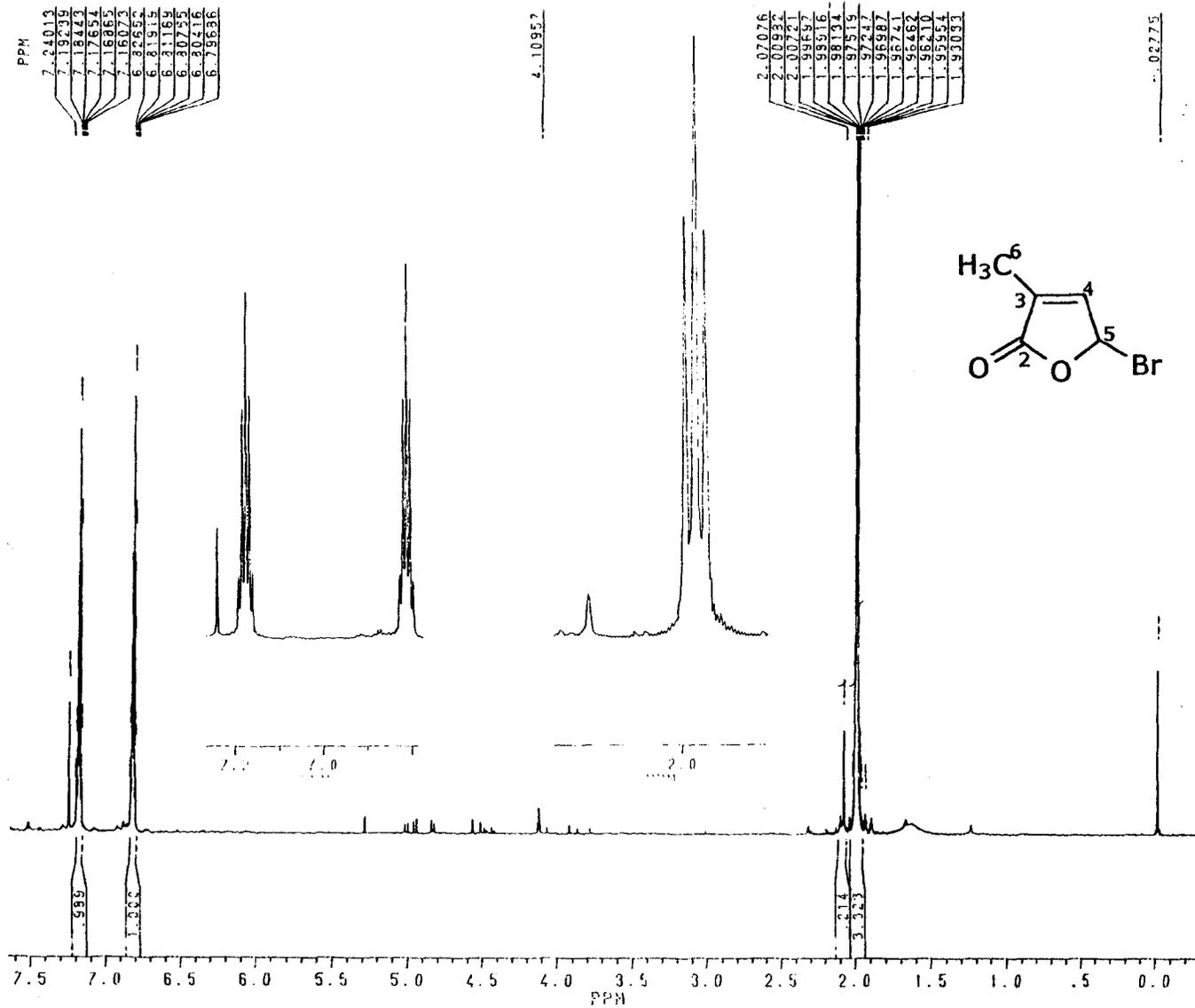
Spectro 28: Experimento de HETCOR para o enol 49 em DMSO-d₆.



Espectro 29: Espectro de massas para o enol 49.



Espectro 30: Espectro de IV para o bromobutenolídeo 32.



7.34013
7.29235
7.18442
7.17654
7.16862
7.16072
6.82652
6.81915
6.81169
6.80755
6.80416
6.79636

4.10952

2.07076
2.00932
2.00721
1.99697
1.99516
1.98134
1.97519
1.97217
1.96987
1.96771
1.96462
1.96240
1.95934
1.95033

0.02775



ANDRE1.048
DATE 11-1-99

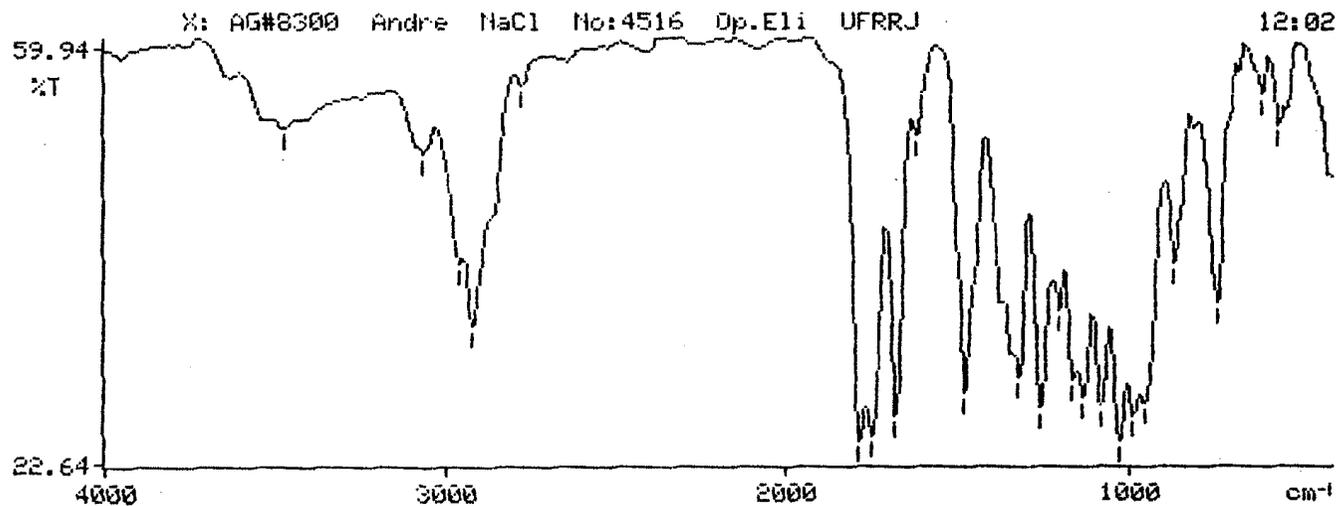
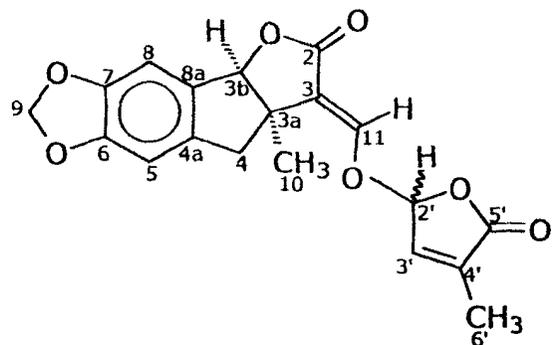
SF 200.132
SY 80.1300000
OI 3100.000
SI 16384
TD 8192
SW 2127.660
HZ/PI .260

PW 2.0
RD 1.000
AQ 1.925
RC 40
NS 64
TE 297

FW 2700
O2 1570.000
D2 63L PD

LB 0.0
GB 0.0
CX 24.00
CY 0.0
F1 7.6441
F2 -.3291
HZ/CM 66.479
PPM/CM .332
SR 2344.76

Espectro 31: Espectro de RMN¹H para o bromobutenolídeo 32.



Espectro 32: Espectro de IV para o análogo 48.

Rodrigo, cdcl3, abr19rcrclH

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

File: abr19rcrclH

INOVA-500 "nmr0un"

PULSER SEQUENCE

Pulse 30.3 degrees

Acq. time 4.000 sec

Width 8000.0 Hz

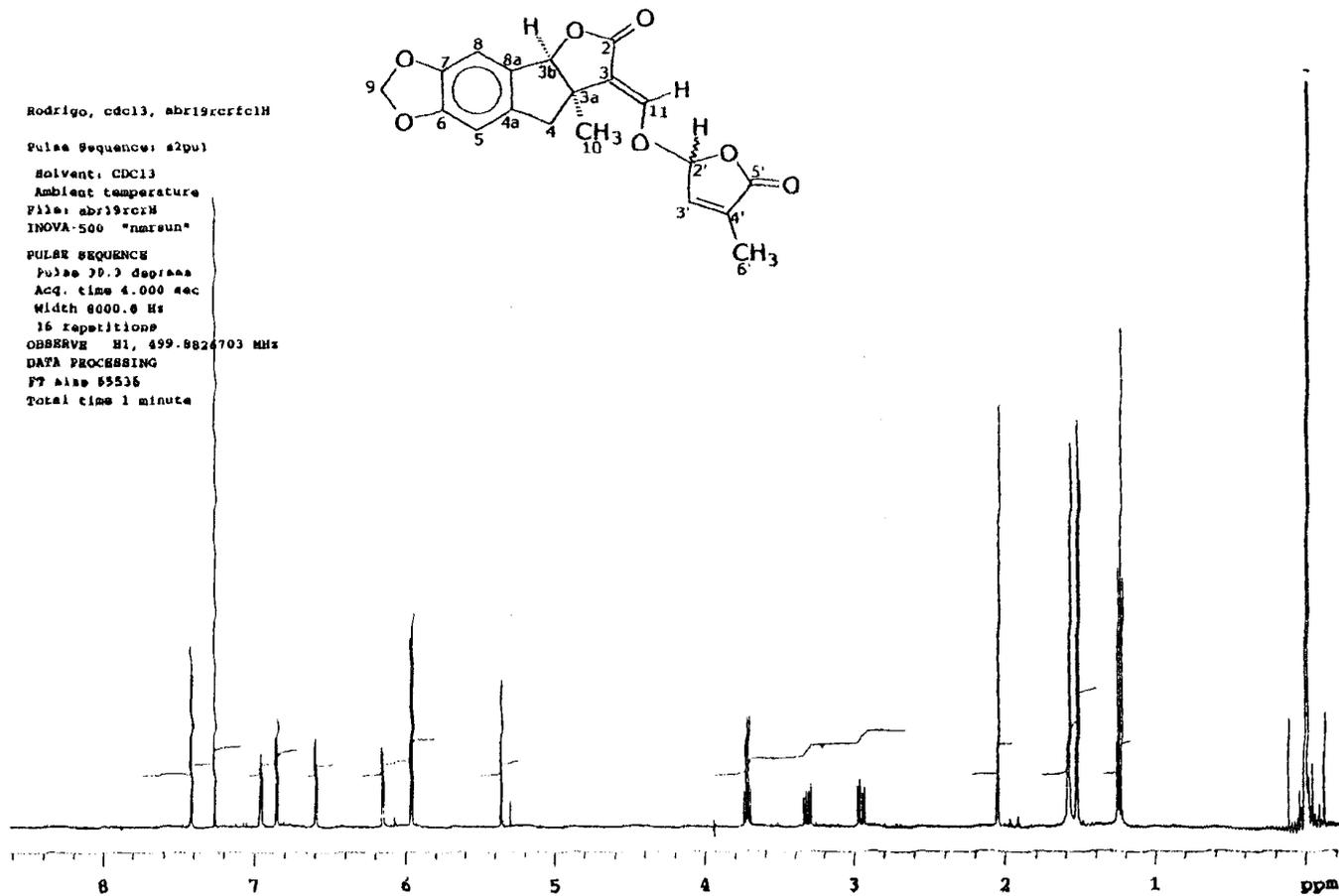
16 repetitions

OBSERVE H1, 499.8826703 MHz

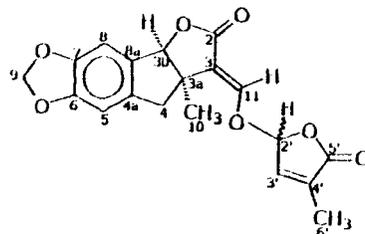
DATA PROCESSING

F2 file 05536

Total time 1 minute



Espectro 33: Espectro de RMN¹H (500 MHz) para o análogo 48 (mistura em C2') em CDCl₃.



Rodrigo RCM-FCI abr19rcrc

Pulse Sequence: s1pul

Solvent: CDCl₃
 Ambient temperature
 File: abr19rcrc
 INOVA-500 "narsun"

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 2.000 sec
 Pulse 41.5 degrees
 Acq. time 0.800 sec
 Width 20000.0 Hz
 10570 repetitions

OBSERVE C13, 75.4519951 MHz

DECOUPLE H1, 300.0680576 MHz

Power 41 dB
 continuously on

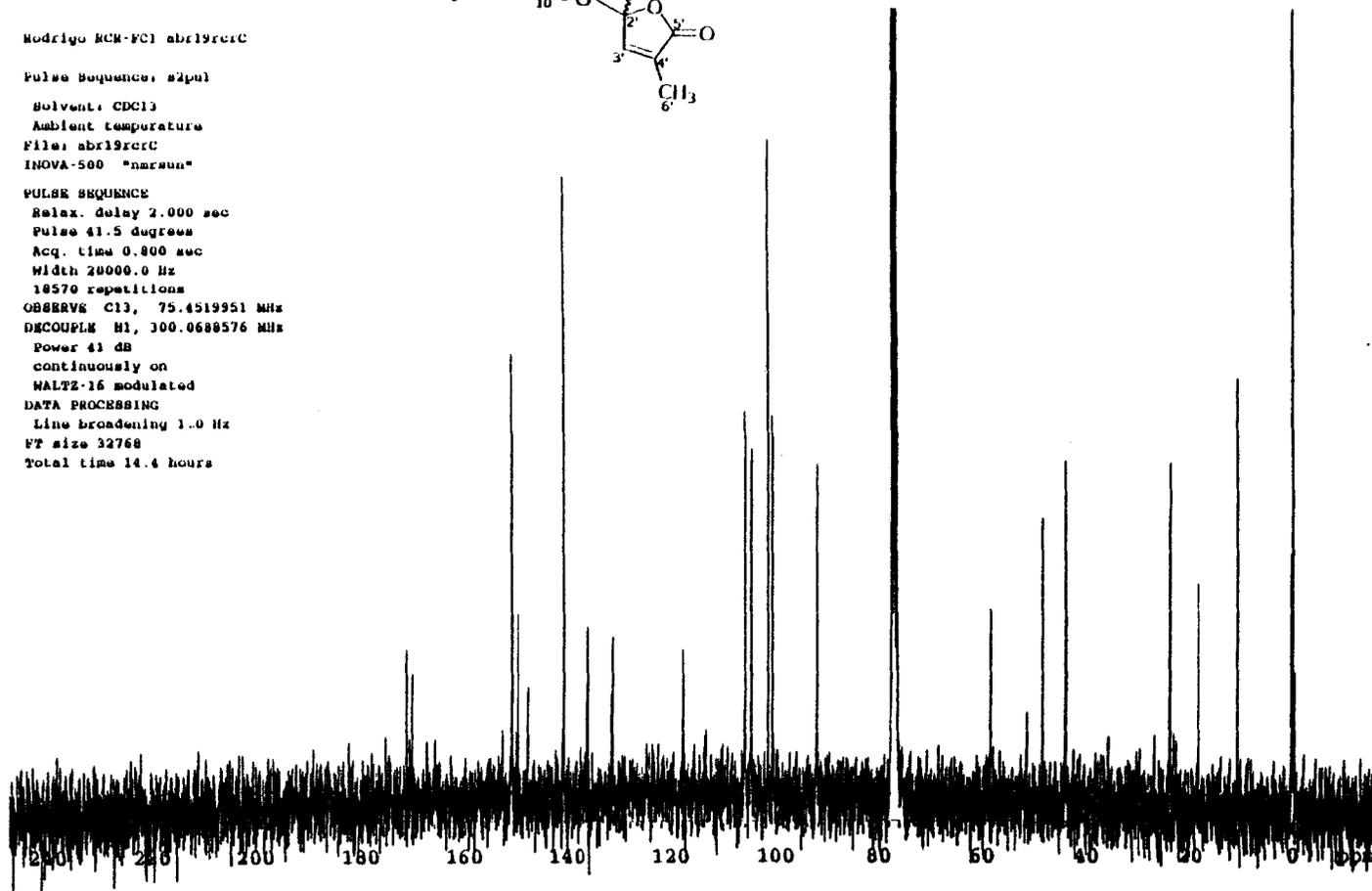
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

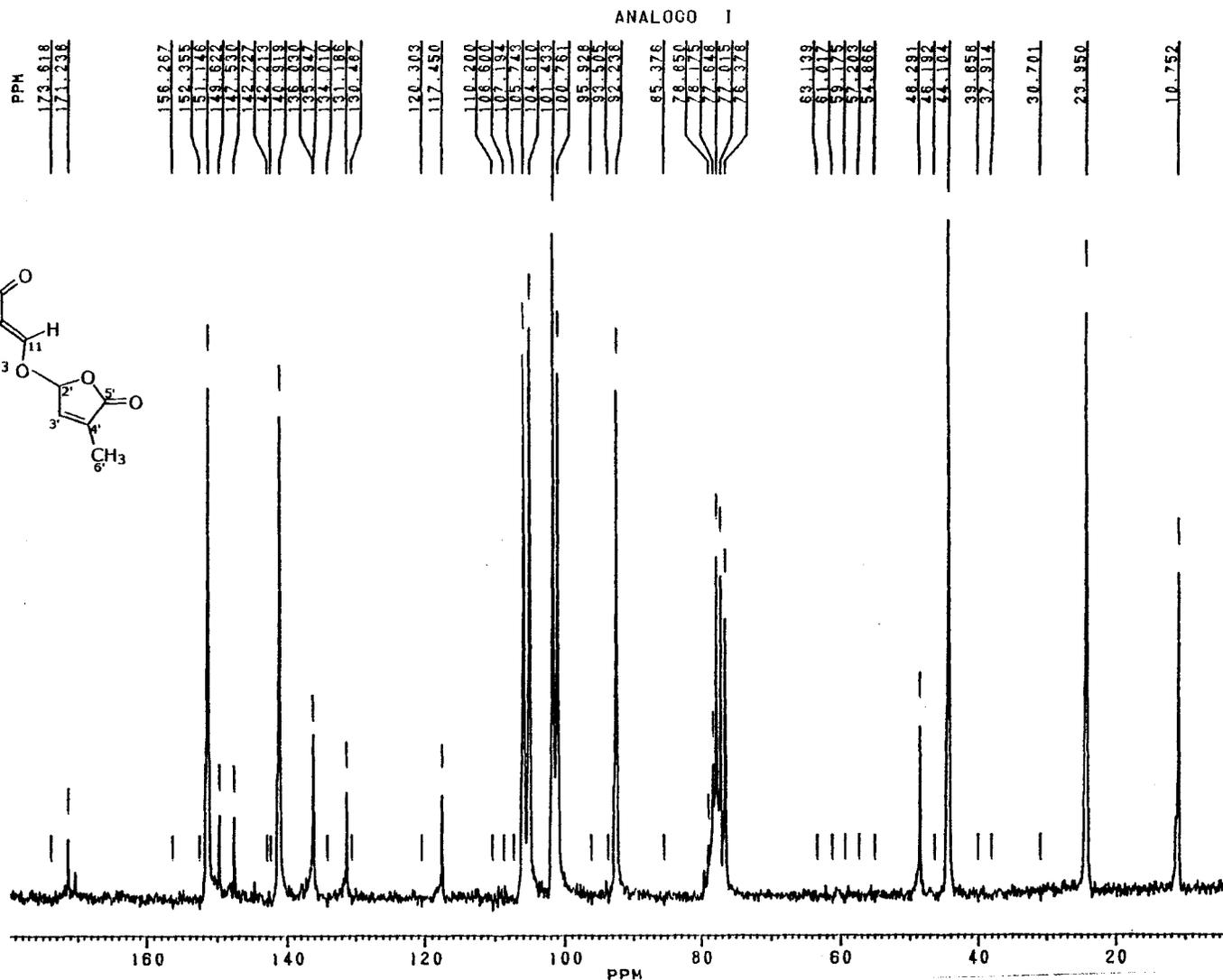
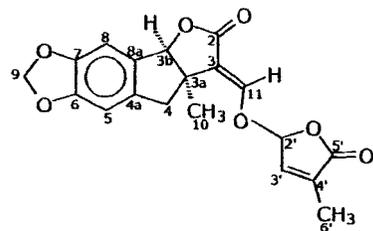
Line broadening 1.0 Hz

FT size 32768

Total time 14.4 hours



Espectro 34: Espectro de RMN¹³C (125 MHz) para o análogo 48 (mistura em C2') em CDCl₃.

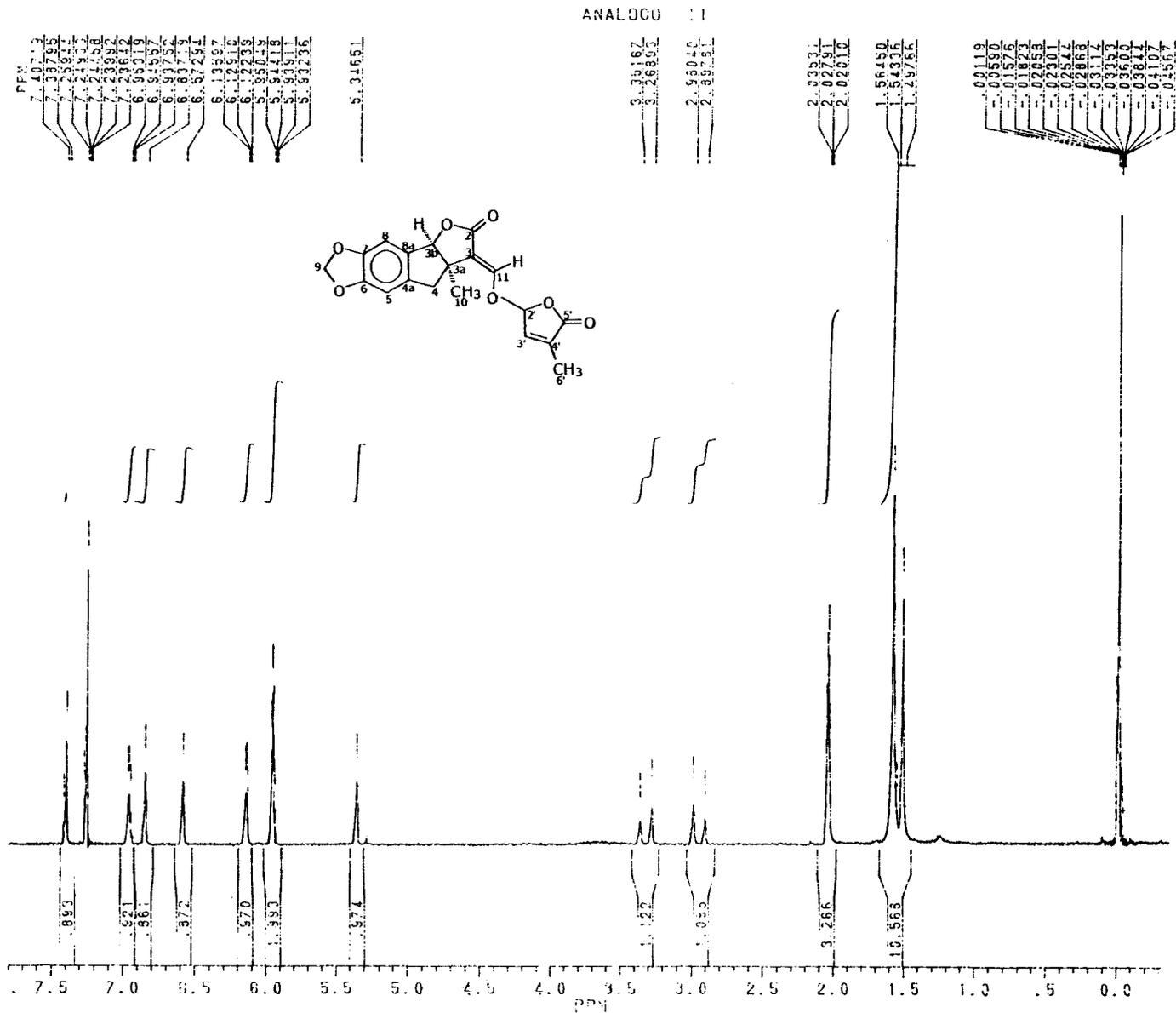


ANDREB.701
 AU PRDG:
 POWD!SC.AU
 DATE 11-6-99

SF 50.323
 SY 50.327000
 O1 1800.000
 SI 16384
 TD 16384
 SW 12500.000
 HZ/PT 1.528

PW 6.5
 RD 0.0
 AQ .655
 P

Espectro 36: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz) para o análogo 48 (DI) em CDCl₃.



~~BRUKER~~

ANDRE7.719
DATE 10-7-99

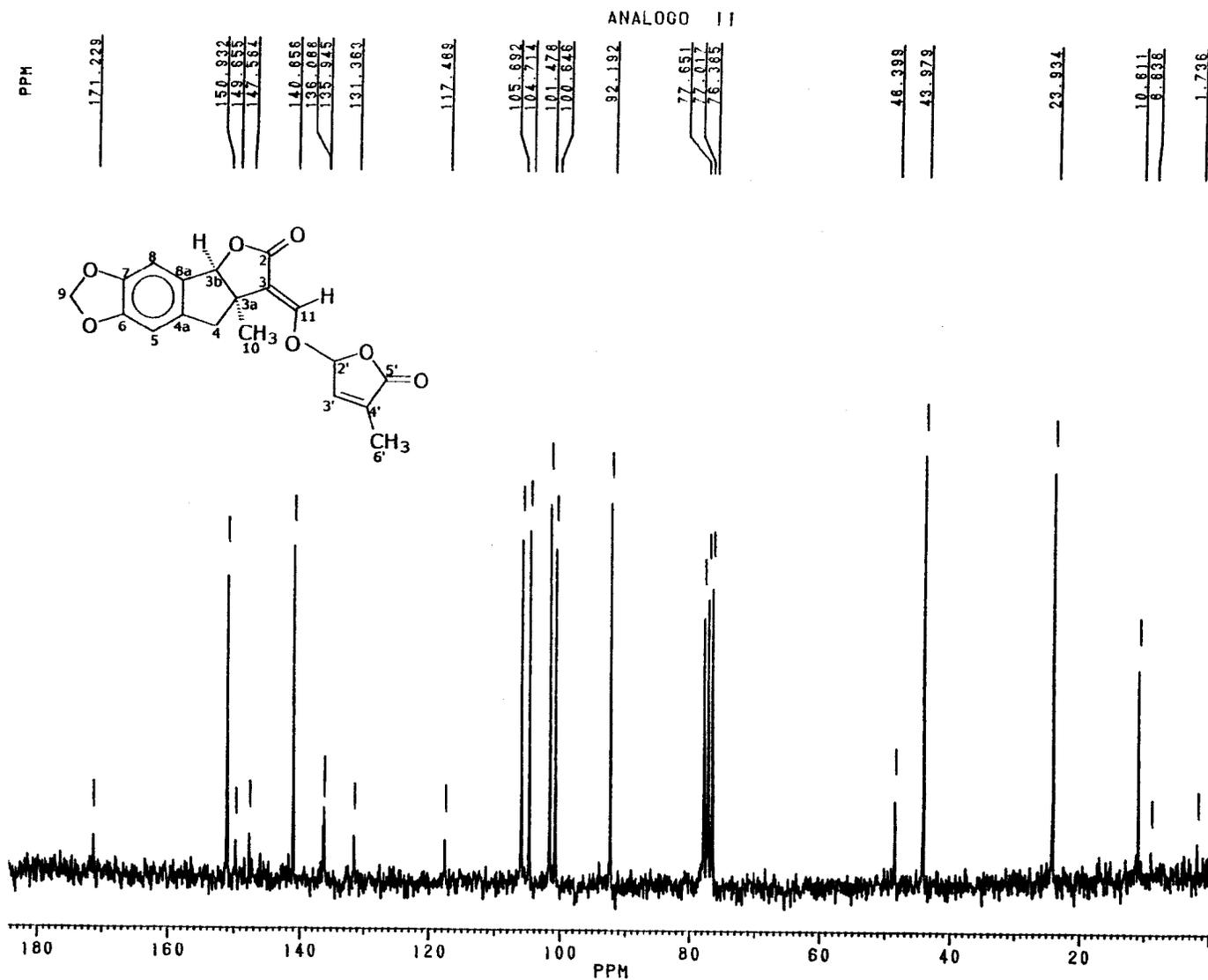
SF 200.132
SY 80.1303000
OI 3100.000
SI 16334
TD 8192
SW 1076.285
HZ/P1 1.241

PW 2.0
RD 1.000
AQ 2.073
RC 160
NS 128
TE 297

FW 2500
O2 1570.000
DP 601 P0

LB 0.0
GB 0.0
CX 24.00
CY 0.0
F1 7.797P
F2 -380P
HZ/CM 68.182
PPH/CM 1.341
SR 2344.86

Espectro 37: Espectro de RMN¹H (200 MHz) para o análogo 48 (DII) em CDCl₃.



ANDRE7.724
AU PROG:
POWCDISC.AU
DATE 10-7-99

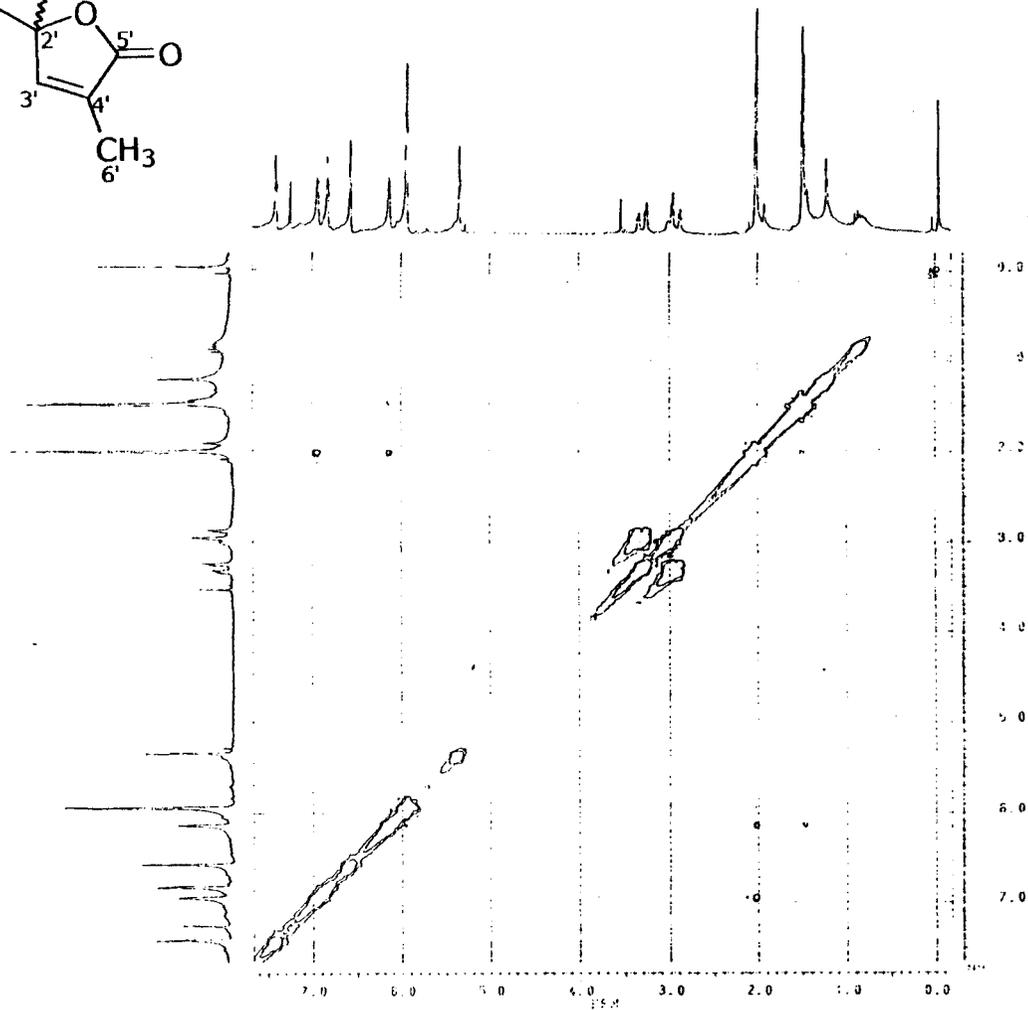
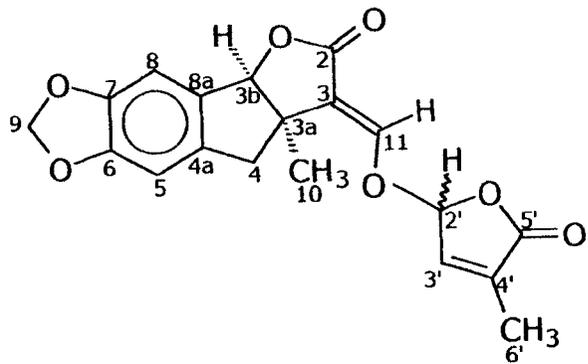
SF 50.323
SY 50.3270000
OI 1800.000
SI 16384
TD 16384
SW 12500.000
HZ/PT 1.526

PW 6.5
RD 0.0
AO .655
RG 200
NS 3079
TE 297

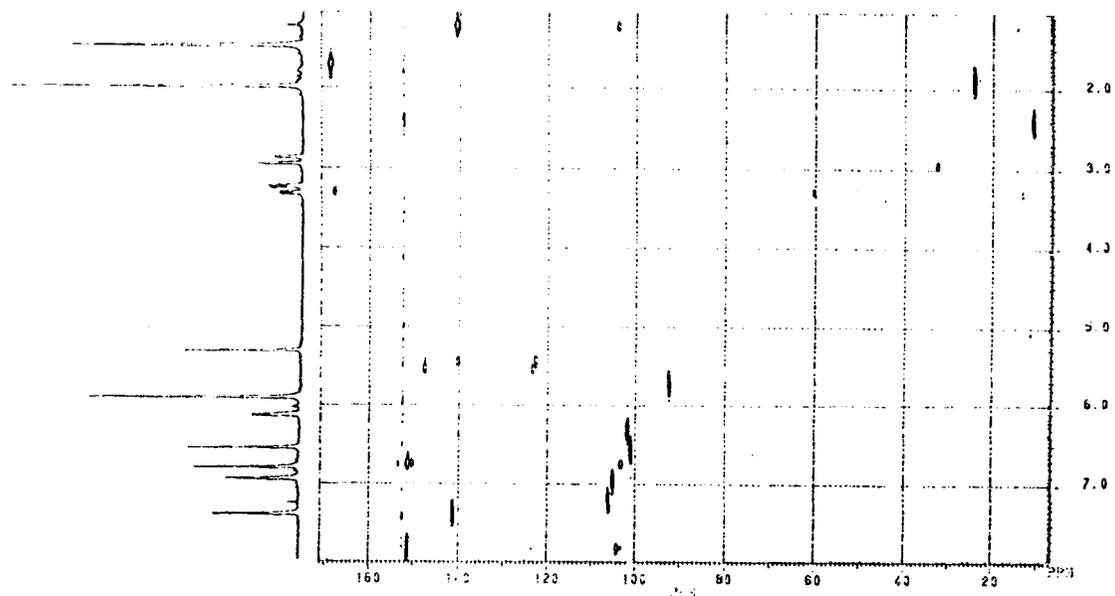
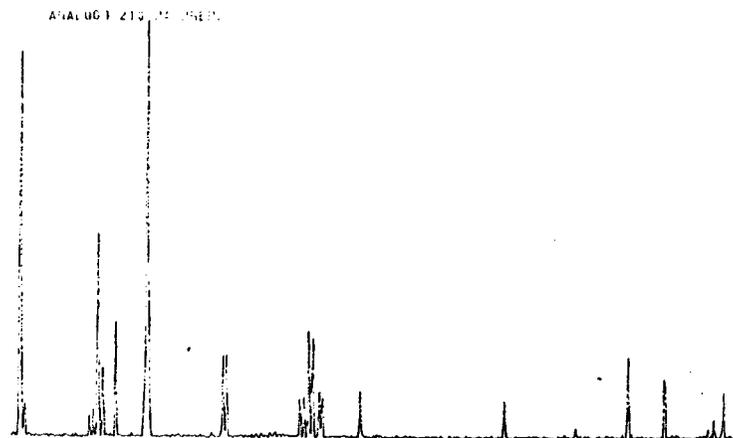
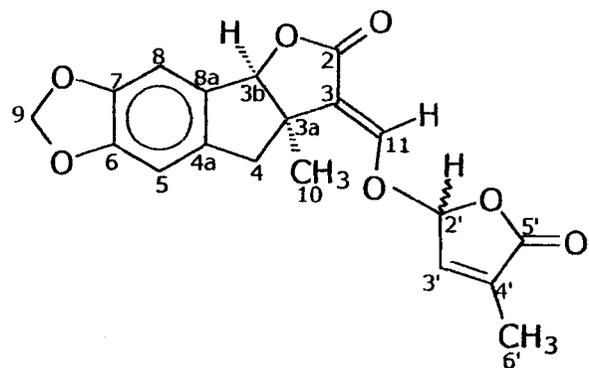
FW 15700
OZ 1570.000
DP 20H D0

LB 2.000
GB 0.0
CX 24.00
CY 0.0
F1 184.247P
F2 -.077P
HZ/CM 386.492
PPM/CM 7.680
SR -3681.65

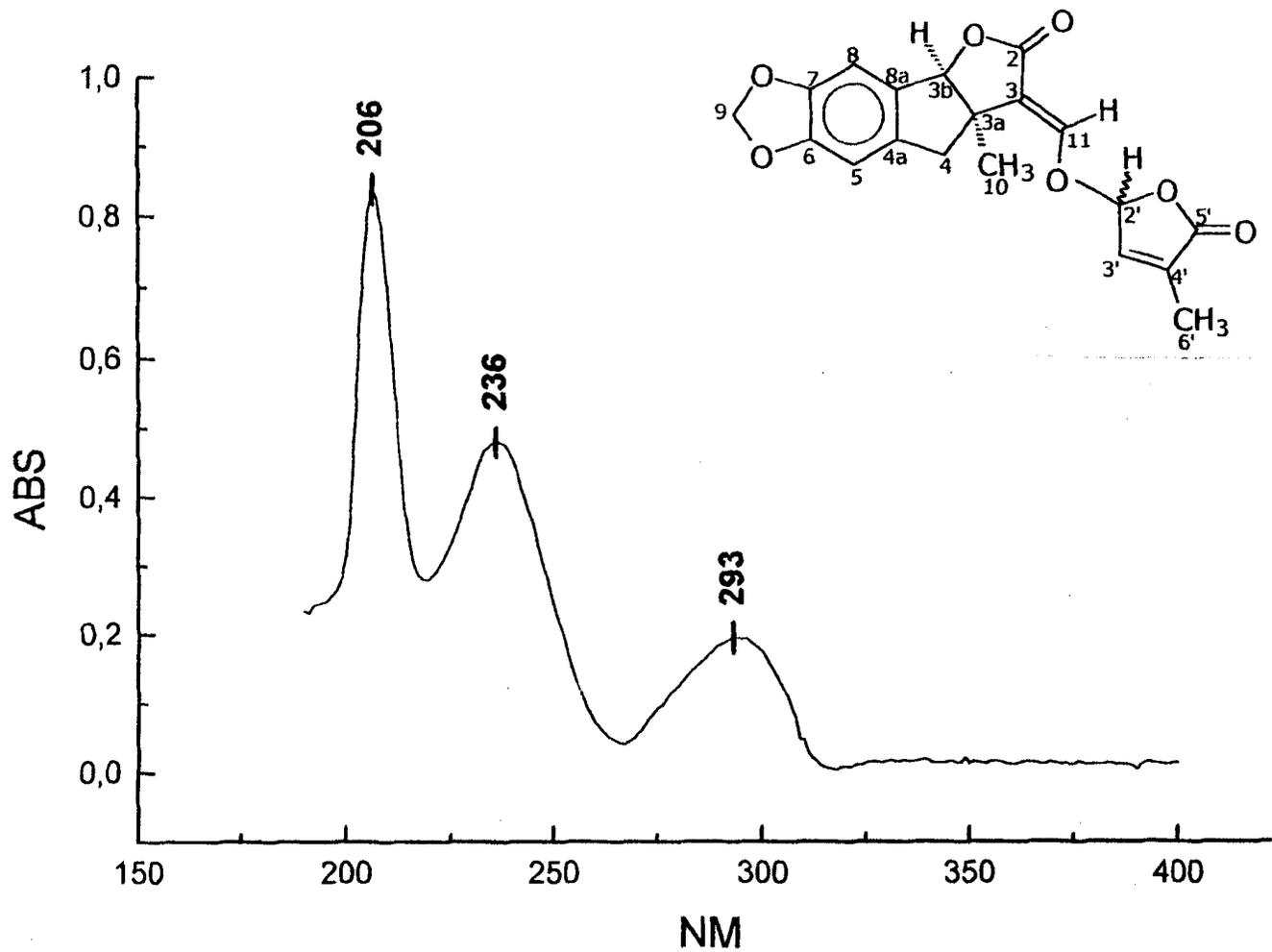
Espectro 38: Espectro de RMN¹³C (50,3 MHz) totalm. desacoplado para o análogo 48 (DII) em CDCl₃.



Espectro 39: Experimento de HOMO-COSY para o análogo 48 em CDCl_3 .

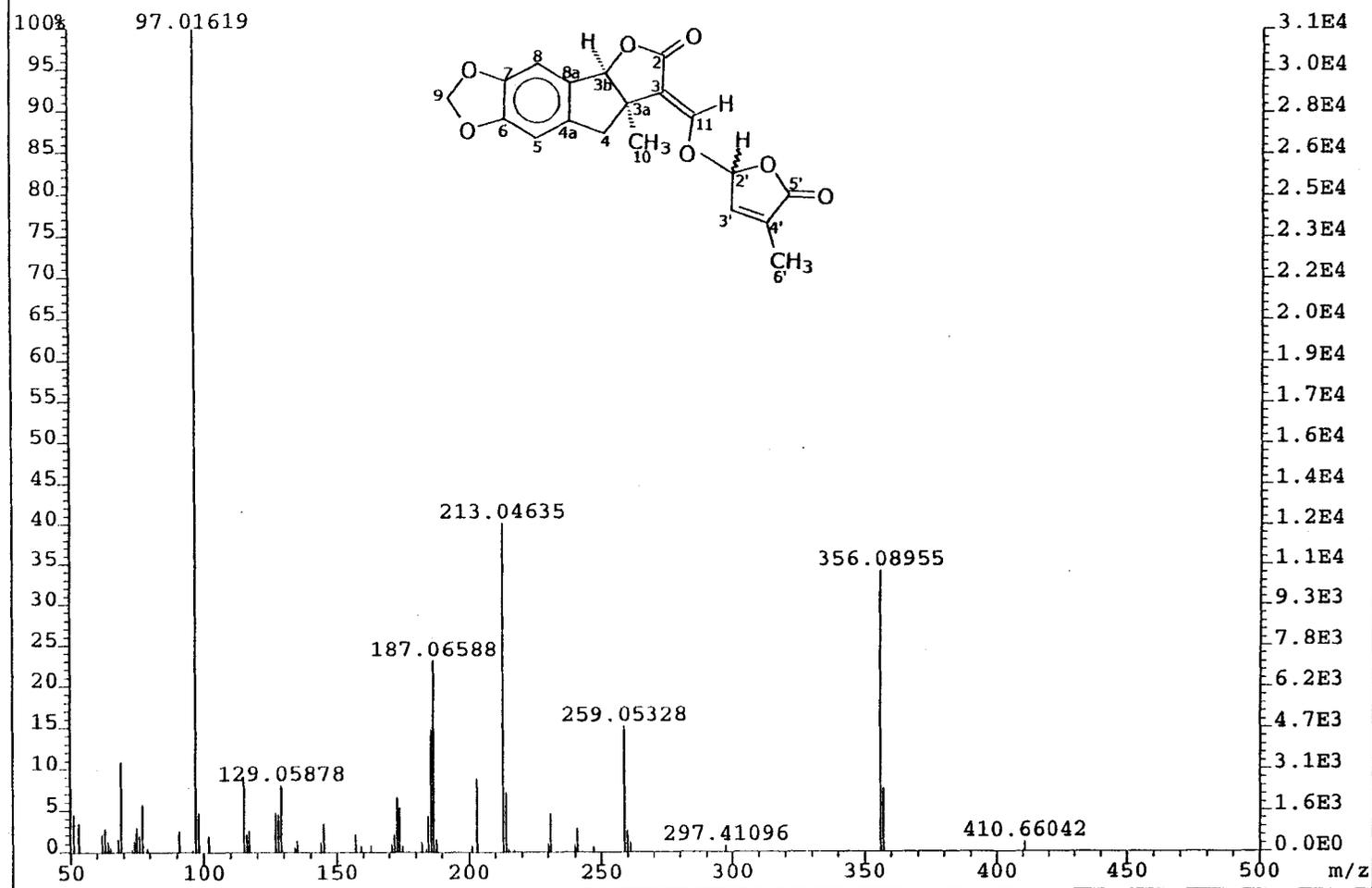


Espectro 40: Experimento de HETCOR para o análogo **48** em CDCl_3 .

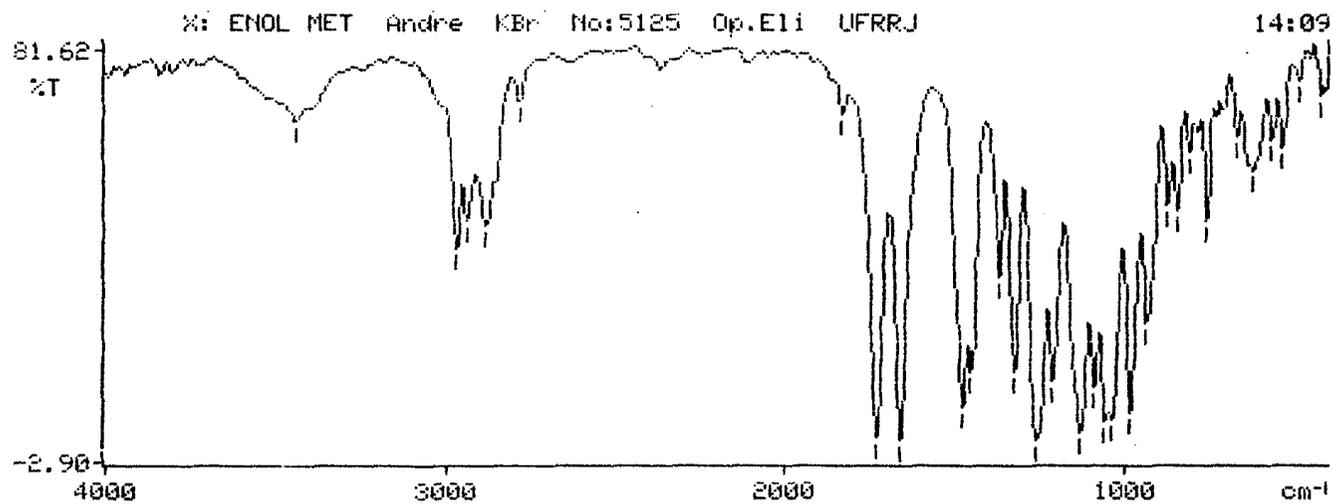
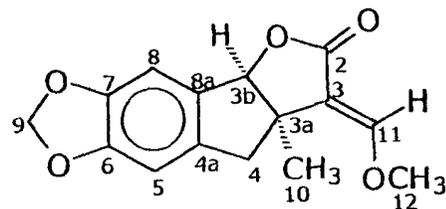


Espectro 41: Espectro de UV para o análogo 48 em metanol.

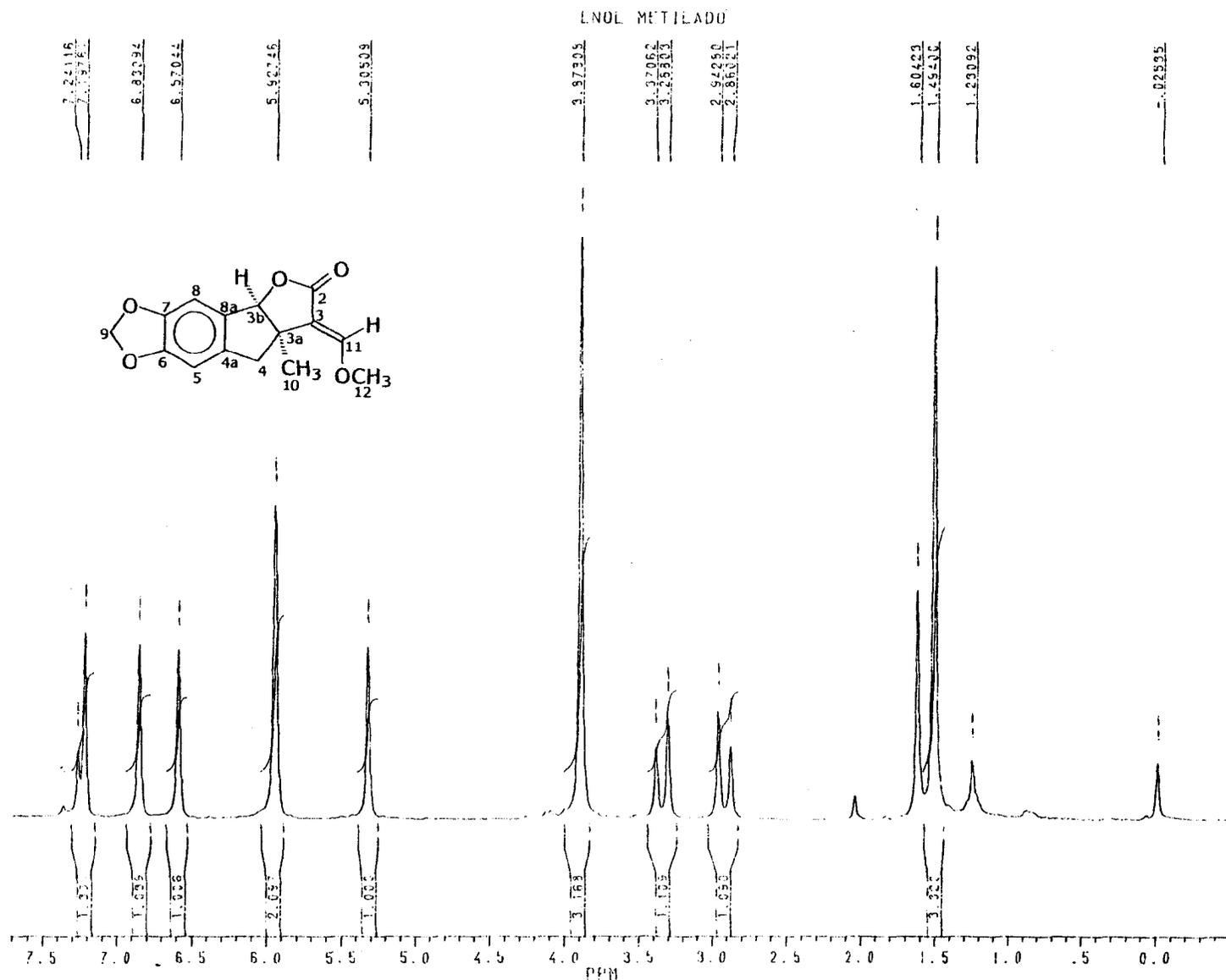
File:MAR30A Ident:735 Acq:30-MAR-1999 14:01:42 +1:32:21 Cal:MAR30B
AutoSpec EI+ Magnet BpI:31077 TIC:121142 Flags:HALL



Espectro 42: Espectro de massas para o análogo 48.



Espectro 43: Espectro de IV para o enol metilado 80.



~~BRUKER~~

MARCO7.073
DATE 29-7-98

SF 200.132
SY 80.1300000
OI 3000.000
SI 16384
TD 8192
SW 3676.471
HZ/PT 443

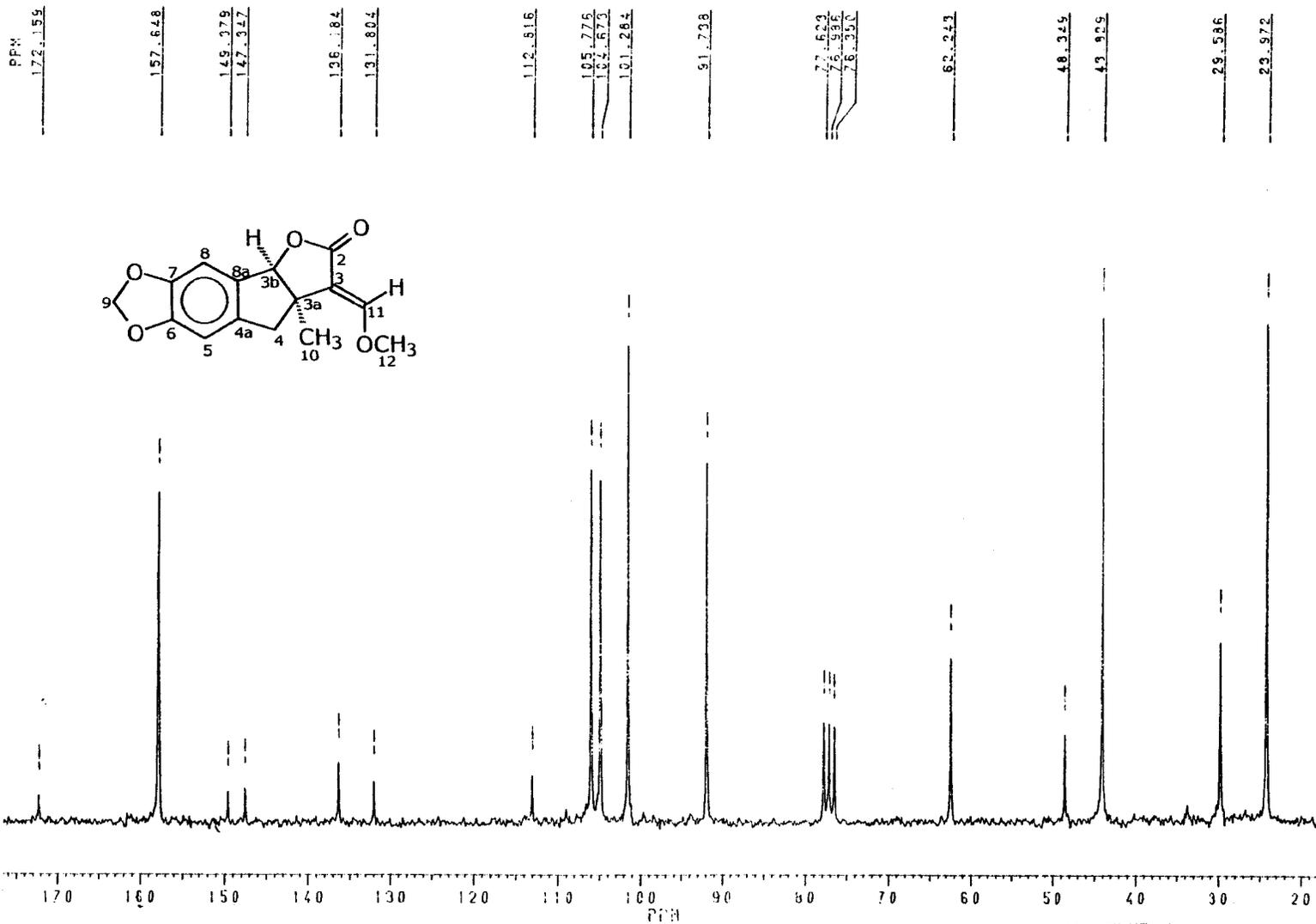
PW 2.0
RD 1.000
AD 1.114
RG 40
NS 8
TE 297

FW 4600
OZ 1570.000
DP 63L PD

LB 3.000
GB 0.0
CX 27.00
CY 0.0
F1 8.043P
F2 -557P
HZ/CM 63.745
PPH/CM 319
SR 2344.50

Espectro 44: Espectro de RMN¹H para o enol metilado 80 em CDCl₃.

ENOL METILADO



MAR08.274
 AU PROC:
 POWD/SC AU
 DATE 25-8-98

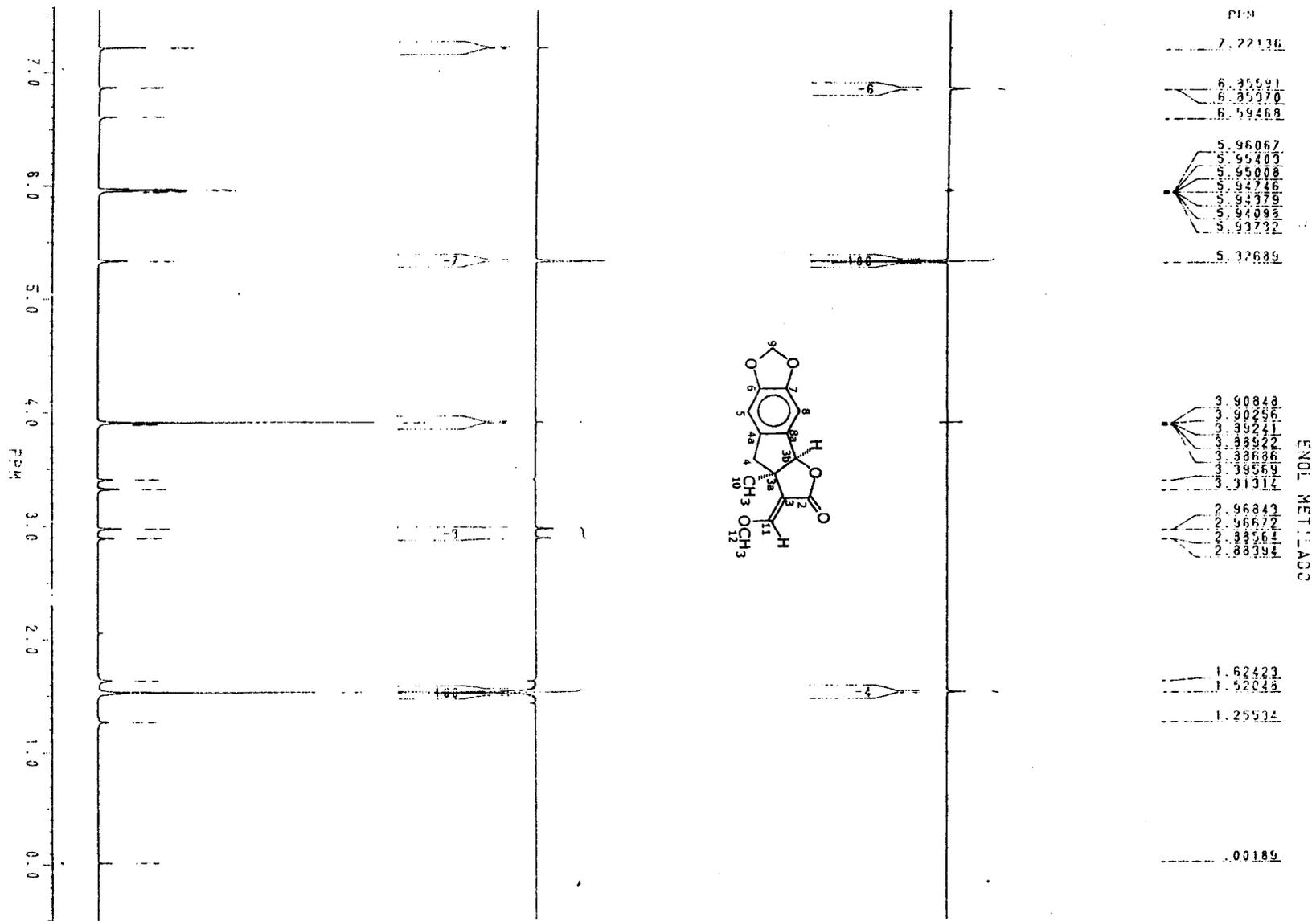
GF 50.323
 EY 50.3270000
 OI 1800.000
 SI 16384
 TD 16384
 SW 12500.000
 FZ/PI 1.526

PW 6.5
 RD 0.0
 AD .655
 RC 200
 NS 2660
 TE 297

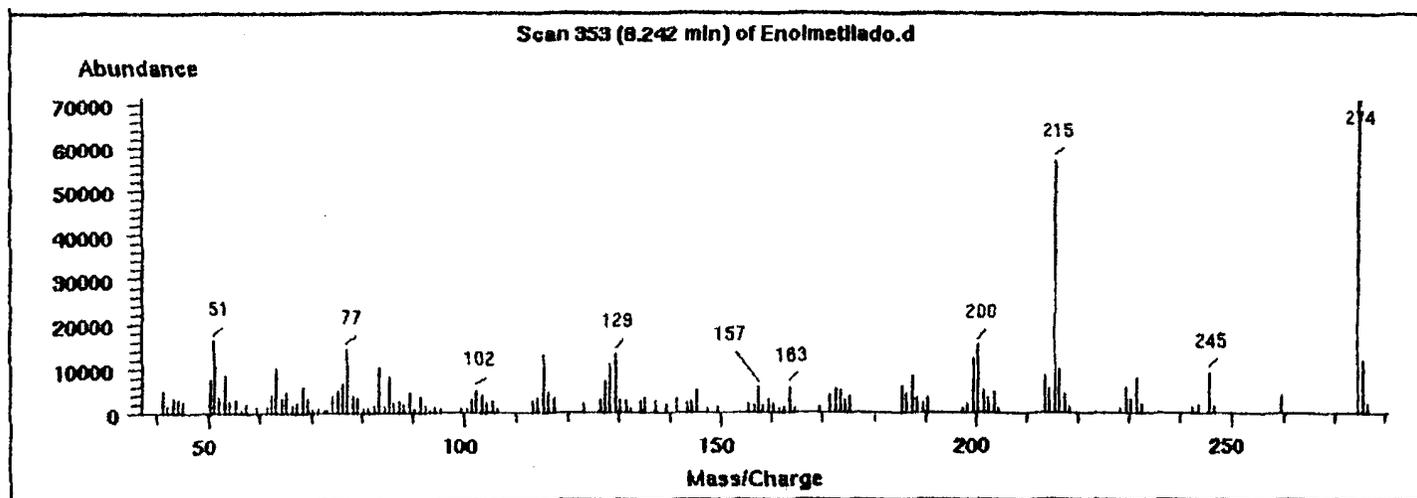
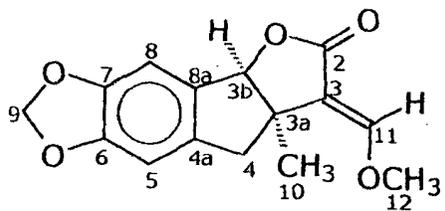
IW 15700
 OZ 1570.000
 DP 20H PD

LB 4.000
 CB 0.0
 CX 27.00
 CY 0.0
 F1 176.576P
 F2 17.661P
 HZ/CM 296.190
 PPM/CM 5.886
 SR -3678.59

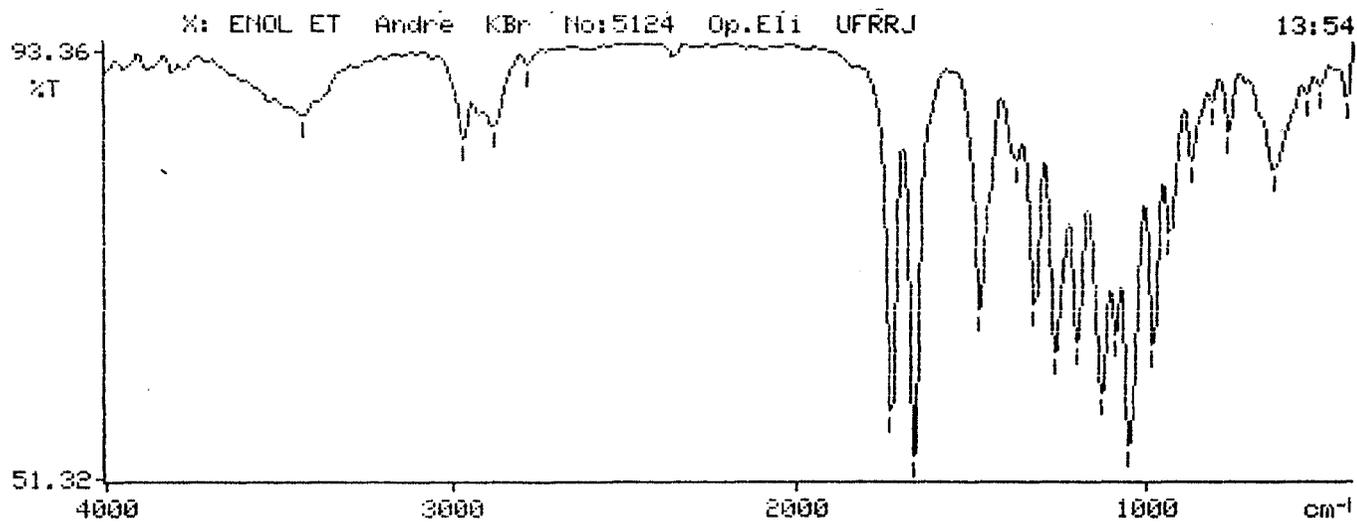
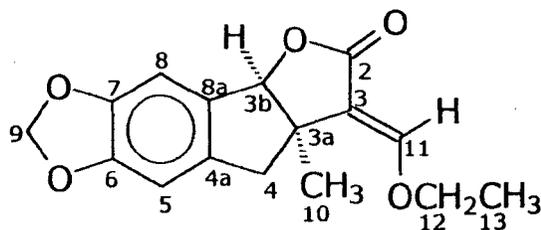
Espectro 45: Espectro de RMN¹³C totalmente desacoplado para o enol metilado 80 em CDCl₃.



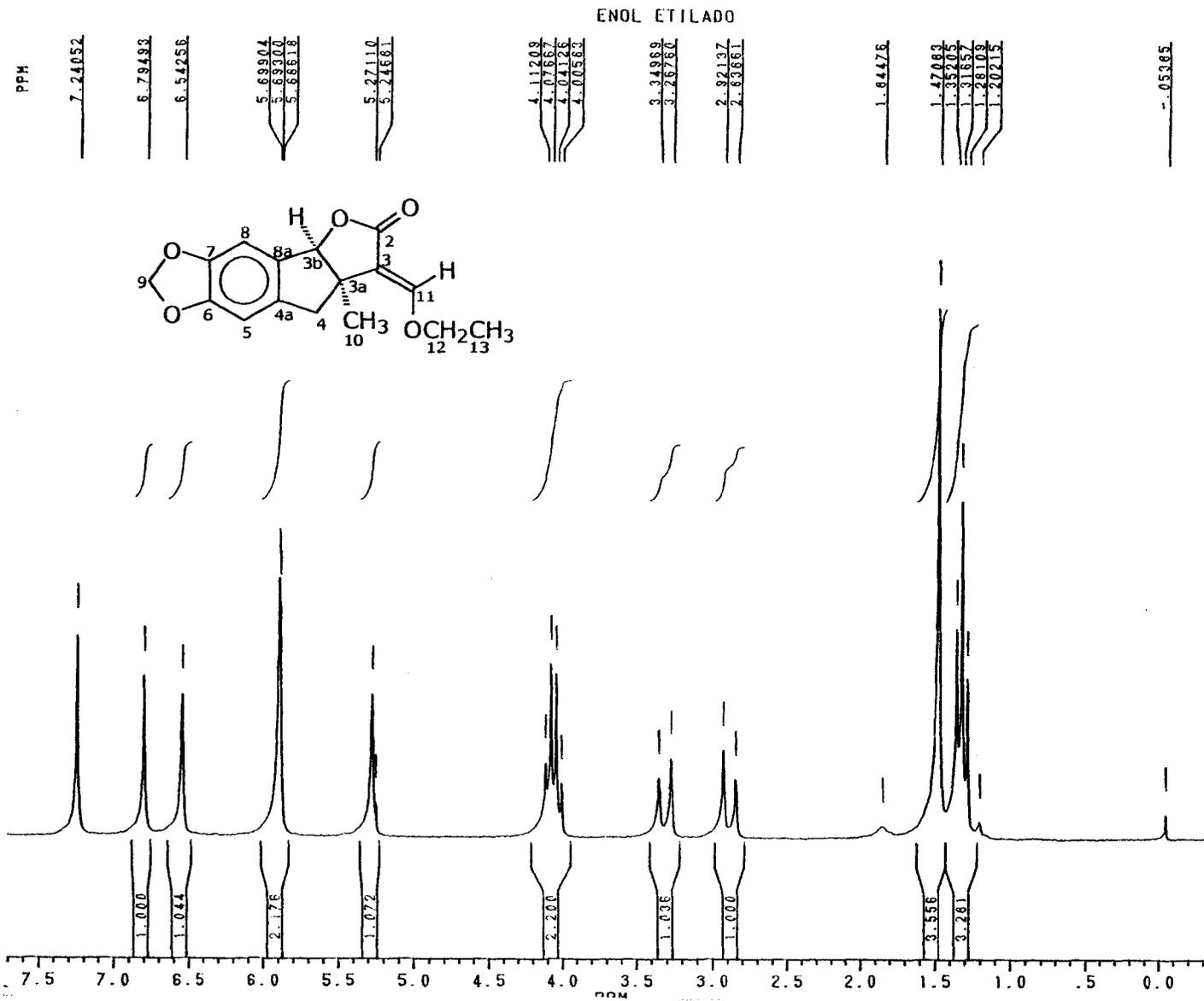
Spectro 46: Experimento de nOe para o enol metilado 80 em CDCl₃.



Espectro 47: Espectro de massas para o enol metilado 80.



Espectro 48: Espectro de IV para o enol etilado 81.




 ANDRE7.728
 DATE 13-7-99

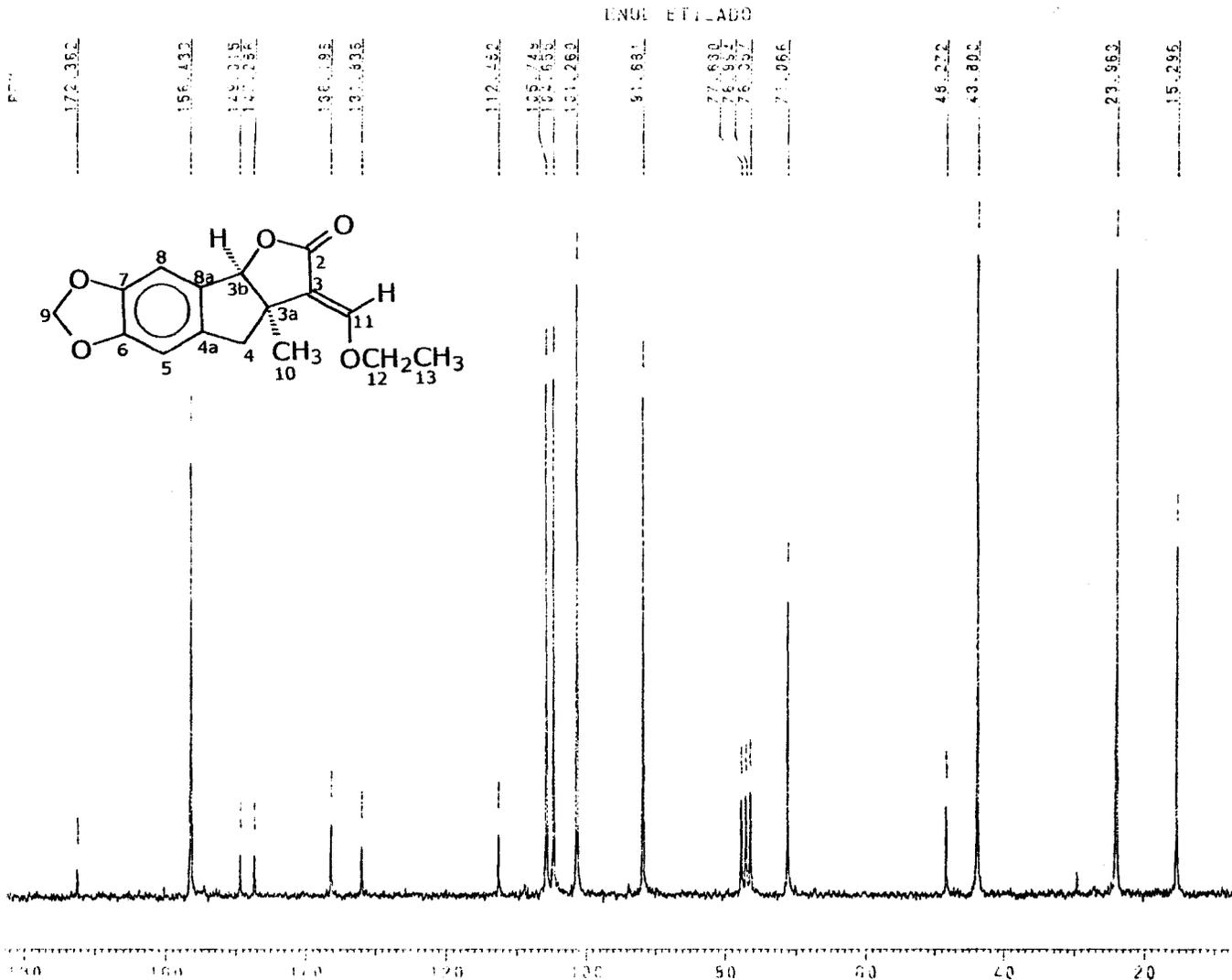
SF 200.132
 SY 80.1300000
 O1 3100.000
 S1 16384
 TD 8192
 SW 1984.127
 HZ/PT .242

PW 2.0
 RD 1.000
 AQ 2.064
 RG 10
 NS 8
 TE 297

FW 2500
 O2 1570.000
 DP 63L PO

LB 0.0
 GB 0.0
 CX 25.00
 CY 0.0
 F1 7.697P
 F2 -.357P
 HZ/CM 64.474
 PPM/CM .322
 SR 2347.13

Espectro 49: Espectro de RMN¹H para o enol etilado 81 em CDCl₃.



~~BRUKER~~

ANDRE7.727
 AU PROG:
 POWD:SC AU
 DATE 13-7-99

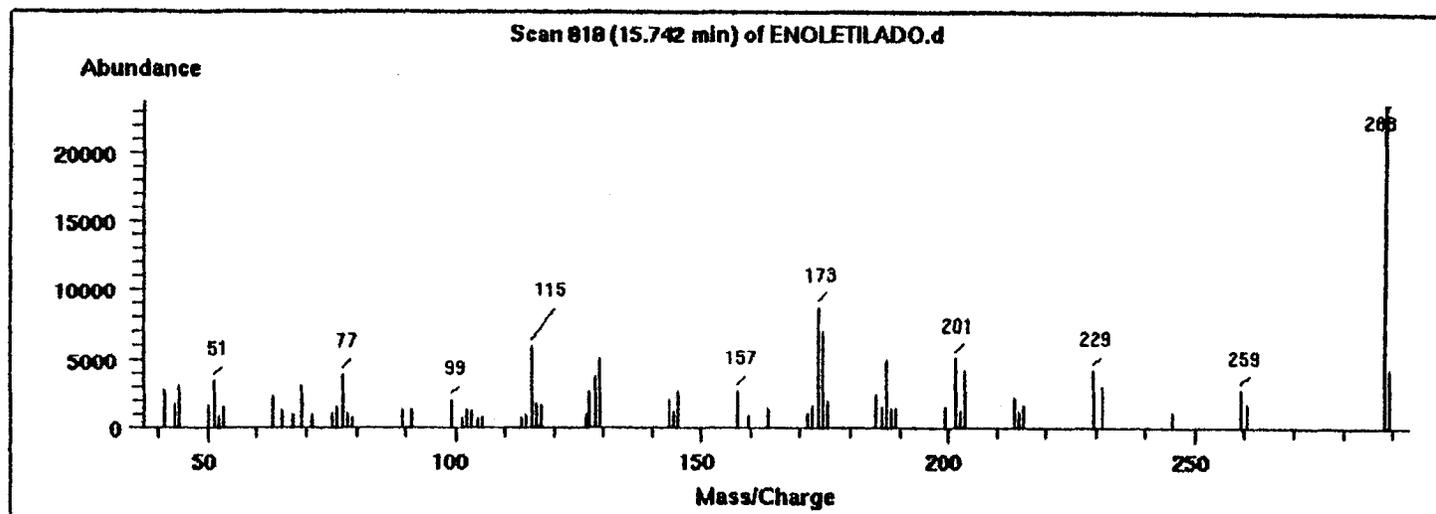
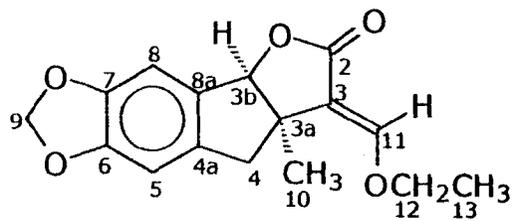
SF 50.323
 SY 50.3270000
 O1 1800.000
 SI 16394
 TD 16384
 SW 12500.000
 HZ/PT 1.526

PW 6.5
 PD 0.0
 AQ .655
 RG 200
 NS 4605
 TE 297

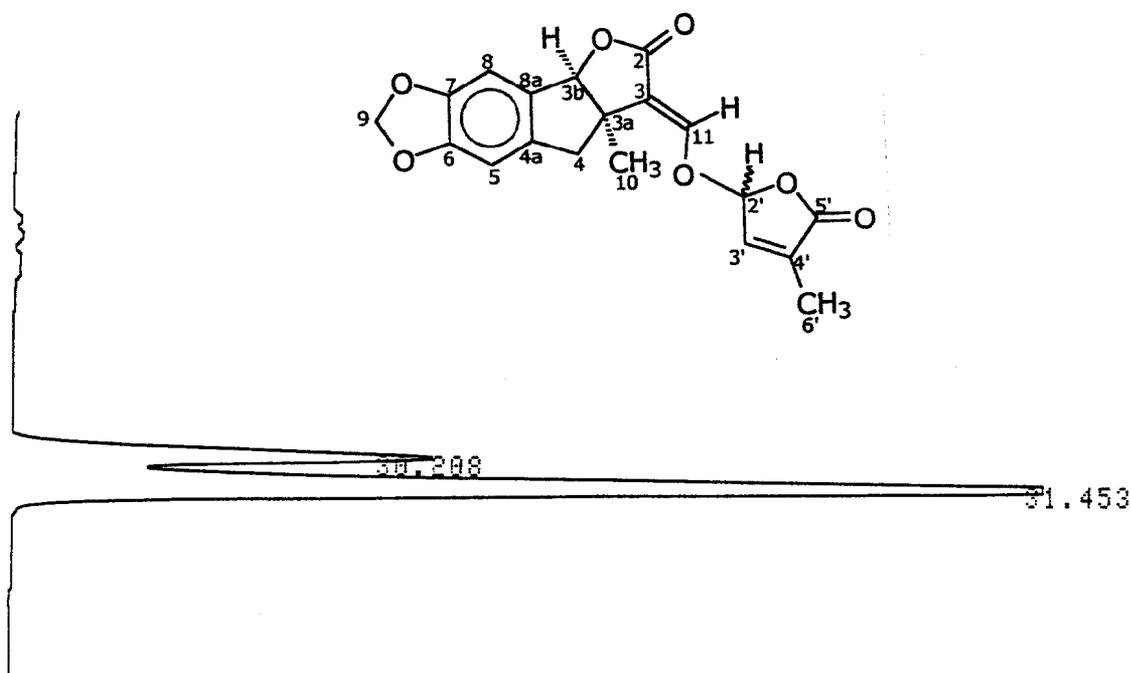
FW 15700
 O2 1570.000
 DP 20H 00

LB 2.000
 GB 0.0
 CX 24.00
 CY 0.0
 F1 192.642P
 F2 6.078P
 HZ/CM 370.216
 PPM/CM 7.357
 SR -3677.07

Espectro 50: Espectro de RMN¹³C totalmente desacoplado para o enol etilado 81.



Espectro 51: Espectro de massas para o enol etilado 81.

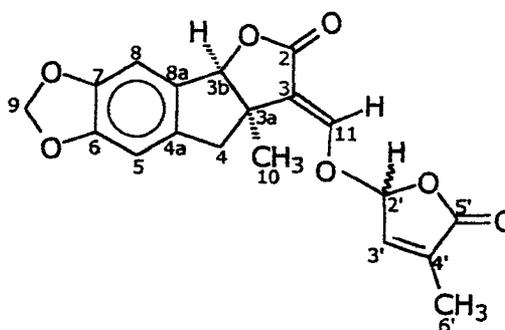


CHROMATOPAC C-R6A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 1415

FILE 0
 METHOD 41

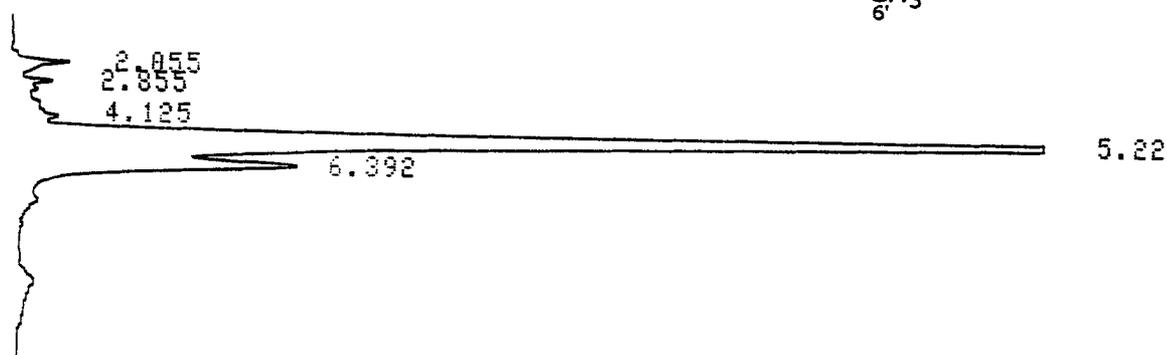
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.387	23329			4.0925	
2	30.208	136722			23.9846	
3	31.453	409992	V		71.9229	
TOTAL		570043			100	

Cromatograma 1: Análogo 48 em coluna C₈ e fase móvel acetonitrila-água (45:55); com fluxo de 0,5 mL/min.; UV a 236 nm e injeção de 5µL de amostra diluída em acetonitrila. (coluna de 25 mm x 4,6 mm di x 5 µm).



START
22/03/25

00:25:08



CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 987

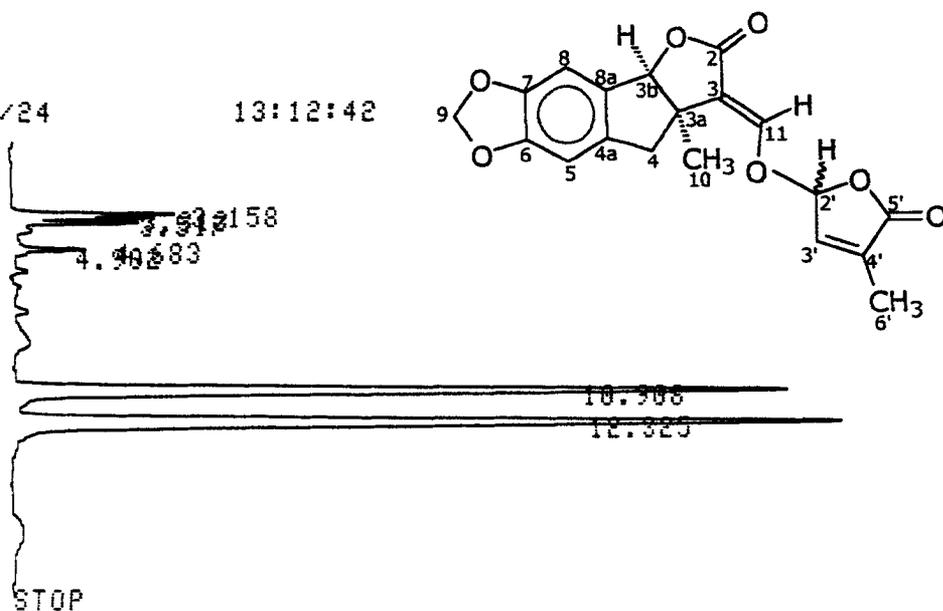
FILE 0
METHOD 41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.055	6350			1.3771	
2	2.855	1895			0.4109	
3	5.22	384498			83.3835	
4	6.392	68377	V		14.8285	
TOTAL		461120			100	

Cromatograma 2: Análogo 48 em coluna C₁₈ e fase móvel metanol-água (70:30); com fluxo de 0,5 mL/min.; UV a 254 nm e injeção de 5µL de amostra diluída em metanol. (coluna de 25 mm x 4,6 mm di x 5 µm).

START
99/06/24

13:12:42

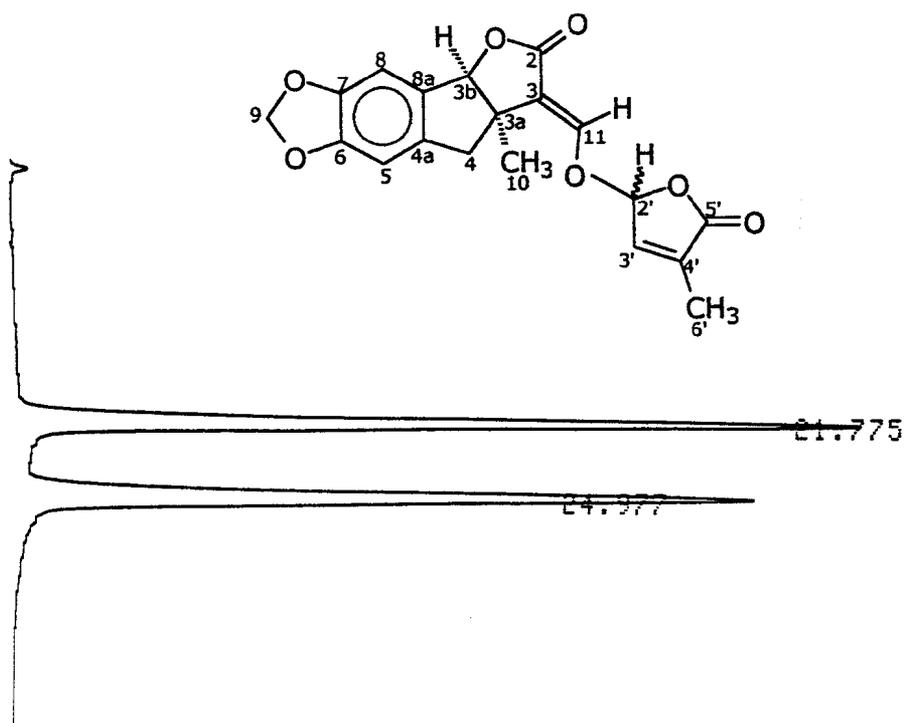


CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 8
REPORT NO 1530

FILE 0
METHOD 41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.158	10968			3.8746	
2	3.313	5839	V		2.0626	
3	3.517	6408	V		2.2636	
4	4.683	3781			1.3357	
5	10.908	118333			41.8019	
6	12.325	137751	V		48.6616	
TOTAL		283088			100	

Cromatograma 3: Análogo 48 em coluna de sílica e fase móvel hexano-acetato de etila, com % de hexano variando de 65 a 75%; fluxo de 0,9 mL/min.; UV a 293 nm e injeção de 4 μ L de amostra diluída em acetato de etila. (coluna analítica de 25 mm x 4,6 mm di x 5 μ m).



CHROMATOPAC C-R6A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 1451

FILE 0
 METHOD 41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	21.775	186832			49.9179	
2	24.977	187446			50.082	
TOTAL		374278			100	

Cromatograma 4: Análogo 48 em coluna de sílica e fase móvel hexano-acetato de etila, com % de hexano variando de 65 a 75%; fluxo de 6,0 mL/min.; UV a 293 nm e injeção de 200 µL de amostra diluída em acetato de etila/diclorometano. (coluna semipreparativa de 250 mm x 10 mm di x 5 µm).