

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**“Preparação de Compostos Bioativos e Avaliação Biológica de
Substâncias Extraídas de Líquens”.**

Cleber Jackson Toledo

Orientadora: Profa. Dra. Rozanna Marques Muzzi

Co-orientadora: Profa. Dra. Neli. K. Honda

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química - Curso de Mestrado em Química, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química.

Campo Grande MS - 2003.

Agradecimentos

À Deus indiscutivelmente.

À minha tia Júlia Cesarina Toledo e a minha vó Emília Toledo, pessoas pelas quais tenho enorme gratidão.

À minha orientadora Profa. Dra. Rozanna Marques Muzzi que com muito sacrifício e determinação me auxiliou nesta caminhada cheia de obstáculos, sendo uma pessoa fundamental em vários momentos.

À minha co-orientadora Dra. Neli K. Honda, à qual tenho grande admiração e respeito.

A todos que contribuíram de maneira direta para a obtenção de resultados ou conclusão deste trabalho:

Ao doutorando Elias A. Severino pelo auxílio prestados.

À Dra. Maria Rita Marques do Laboratório de Morfofisiologia da UFMS, pela execução dos testes de atividade antifúngica.

Ao Dr. Artur Smania Júnior do Laboratório de Antibióticos da UFSC, pela execução dos testes de atividade antibacteriana.

Ao Acadêmico Alisson, pelo seu companheirismo, respeito e ajuda-mútua no desenvolvimento prático deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Priscila S. Cavalheri, Cristina, Márcia e a todos que lá estiveram.

A todos os colegas e amigos do curso de Mestrado em Química da UFMS: Núbia Fernanda, Carmen Adriana da Silva, Ana Francisca, Carmen Arruda, Cláuber D. Rodrigues, José de Anchieta S. Silva, Adriana E. Carvalho, Anderson Barison, Pedro G. Neto, Leandro Honório, Joyce Mara.

Aos meus mestres, que me proporcionaram novos conhecimentos :

Dr. Dênis P. de Lima pela amizade e auxílio.

Dra. Neuza Maria M. Somera, pessoa e profissional excepcional.

Dr. Walmir S. Garcez.

Dra Fernanda R. Garcez.

A todos os funcionários e técnicos do Departamento de Química da UFMS, em especial a:

Rosa Pereira Gonçalves, a Dona Rosa, do laboratório LP-2.

Luis Leonardo Viana, pela obtenção dos espectros de infra-vermelho e CG-EM.

Francisco C. Coelho, pela obtenção dos espectros de RMN.

Maria Otávia P. Vasco de Toledo e Celestino Gonçalves de Oliveira, pelo trabalho desenvolvido na Secretaria do Mestrado.

À família Gonçalves pelo apoio moral e pela confiança depositada em mim.

A CNPQ pela bolsa concedida.

A alguém que porventura eu tenha esquecido.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>CORRELAÇÕES ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA</i>	4
1.2	<i>COMPOSTOS LIQUÊNICOS</i>	6
1.3	<i>C-NUCLEOSÍDEOS</i>	9
2	OBJETIVOS	12
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1	OBTENÇÃO DO DEPSÍDEO ÁCIDO LECANÓRICO	13
3.2	PREPARAÇÃO DOS ORSELINATOS DE ALQUILA	16
3.2.1	ORSELINATO DE ETILA	16
3.2.2	ORSELINATO DE OCTILA	17
3.3	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DO ORSELINATO DE ETILA E SEUS DERIVADOS.	18
3.3.1	METOXILAÇÃO	18
3.3.2	BENZENOSSULFONAÇÃO.	21
3.4	PREPARAÇÃO DE <i>o</i>-DERIVADOS ORCINÓLICOS	22
3.4.1	METOXILAÇÃO	22
3.4.2	TENTATIVA DA MONODESMETOXILAÇÃO SELETIVA DO 3,5-DIMETÓXI-TOLUENO	24
3.4.3	INSERÇÃO DE GRUPOS SUBSTITUINTES (BENZENOSSULFONIL E TRIFLATO) NOS DERIVADOS DO ORCINOL	24
3.5	MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DO P-CRESOL	25
3.6	TENTATIVA DE ACOPLAMENTO DE HECK	26
3.7	ATIVIDADE CITOTÓXICA	30
3.8	ATIVIDADES ANTIBACTERIANA	34
3.9	ATIVIDADES FUNGITÓXICA	35
4	MATERIAL E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	37
5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	38
5.1	OBTENÇÃO DO ÁCIDO LECANÓRICO.	38
5.2	PREPARAÇÃO DO ORSELINATO DE ETILA	40
5.3	DERIVADOS DO ORSELINATO DE ETILA.	41
5.3.1	PREPARAÇÃO DO 2-HIDRÓXI-4-METÓXI-6-METILBENZOATO DE ETILA	41
5.3.2	PREPARAÇÃO DO 2,4-DIBENZENOSSULFONIL-ORCELINATO DE ETILA	42
5.3.3	PREPARAÇÃO DO 2,4-DIMETÓXI-6-METILBENZOATO DE ETILA	43
5.4	PREPARAÇÃO DO ORSELINATO DE OCTILA	44
5.5	DERIVADOS DO ORCINOL.	45
5.5.1	PREPARAÇÃO DO 3-METÓXI-5-HIDRÓXI-TOLUENO E DO 3,5-DIMETÓXI-TOLUENO.	45
5.5.2	PREPARAÇÃO DO 3,5-DIMETÓXI-TOLUENO.	46
5.5.3	PREPARAÇÃO DO 3-METÓXI, 5-BENZENOSSULFONIL-ORCINOL	47
5.6	DESMETILAÇÃO DO 3,5-DIMETÓXI-TOLUENO	48
5.7	PREPARAÇÃO DO 3-METÓXI-5-TRIFLUOROMETANOSSULFONIL-ORCINOL.	49
5.8	DERIVADOS DO CRESOL	50
5.8.1	PREPARAÇÃO DO 4-TRIFLUOROMETANOSSULFONIL-TOLUENO.	50

5.9	TENTATIVAS DE ACOPLAMENTO	51
5.9.1	ACOPLAMENTO COM CROTONALDEÍDO	51
5.9.2	ACOPLAMENTO COM 3,4-DI-HIDRO-2-H-PIRANO (DHP)	51
5.9.3	ACOPLAMENTO DE FURFURALDEÍDO COM 4-TRIFLUOROMETANOSSULFONIL-TOLUENO.	52
5.9.4	ACOPLAMENTO DE 2,3-DI-HIDROFURANO COM 1-TRIFLUOROMETANOSSULFONATO-3-METÓXI-5-METILBENZENO.	54
5.10	TESTE DA ARTEMIA SALINA (TAS).	55
5.10.1	CONCENTRAÇÕES TESTADAS NO TAS	55
5.11	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	58
5.11.1	CULTIVO DO FUNGO	58
5.12	TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.	59
5.13	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	59
6	CONCLUSÃO	62
7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	64

FIGURAS

FIGURA 1. DIFERENÇA ESTRUTURAL DO PENTOBABITAL E TIOPENTAL, QUE INFLUENCIA NO MECANISMO DA AÇÃO FARMACOLÓGICA ¹	2
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SÍTIO ATIVO DA TROMBINA ²	3
FIGURA 3. A) AS ESTRUTURAS GLOBAIS DAS COMBINAÇÕES INCLUÍDAS NO MQSAR (<i>MULTIVARIATE QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP</i>) DOS DADOS HISTÓRICOS. B) ESTRUTURAS PLANEJADAS PARA SÍNTESE ²	3
FIGURA 4. ESTRUTURAS DE ISÓSTEROS NÃO POLARES DE QUATRO BASES NATURAIS DO DNA.....	5
FIGURA 5. EXEMPLO DE UM DEPSÍDEO (ÁCIDO LECANÓRICO) E UMA DEPSIDONA (ÁCIDO FISÓDICO).	7
FIGURA 6. DEPSIDONA QUE APRESENTA ATIVIDADE INIBIDORA SOBRE HIV-INTEGRASE ¹⁰	7
FIGURA 7. RIBOFURANOSSES C–NUCLEOSÍDEOS.	9
FIGURA 8 TIPOS DE GLICOSÍDEOS.	10
FIGURA 9. ESTRUTURAS DO ÁCIDO LECANÓRICO E ATRANORINA.	13
FIGURA 10. CROMATOGRAFIA (CCD) DO EXTRATO ACETÔNICO DE GRUPOS DE LIQUENS AVALIADOS POR COMPARAÇÃO COM OS PADRÕES DE ÁCIDO LECANÓRICO (AL) E A ATRANORINA (A), ELUIDA COM: TOLUENO, ACETATO DE ETILA E ÁCIDO ACÉTICO NAS PROPORÇÕES DE 6:4:1 V/V/V RESPECTIVAMENTE. REVELADOR: METANOL, ÁCIDO SULFÚRICO E <i>P</i> -ANISALDEÍDO).	14
FIGURA 11. CROMATOGRAFIA (CCD) DO EXTRATO ACETÔNICO PARA AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS GRUPOS DE LIQUENS (ELUENTE: TOLUENO, ACETATO DE ETILA E ÁCIDO ACÉTICO NAS PROPORÇÕES DE 6:4:1 V/V RESPECTIVAMENTE. REVELADOR: METANOL, ÁCIDO SULFÚRICO E <i>P</i> -ANISALDEÍDO).	14
FIGURA 12. GRUPO ÉSTER PRESENTE NA ESTRUTURA DO ORCINOL.	32

TABELAS

TABELA 1. METOXILAÇÃO DO ORCINOL E AS VARIÁVEIS DA REAÇÃO.....	23
TABELA 2. CATALIZADORES, LIGANTES E BASES UTILIZADOS NO ACOPLAMENTO DE HECK.	28
TABELA 3. DERIVADOS DE ORSELINATO DE ETILA, DO ORCINOL E OUTROS FENÓIS TESTADOS COM <i>ARTEMIA SALINA</i> (TAS).....	30
TABELA 4. RELAÇÃO DA LC ₅₀ (PPM) COM A LC ₅₀ (µM) DOS COMPOSTOS TESTADOS COM <i>ARTEMIA SP</i> (TAS).	34
TABELA 5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ALGUNS DERIVADOS FENÓLICOS.....	34
TABELA 6. RESULTADO DA ATIVIDADE FUNGITÓXICA	36
TABELA 7. CONCENTRAÇÕES TESTADAS DO ORCINOL NO TAS.....	55
TABELA 8. CONCENTRAÇÕES TESTADAS DO 3-METÓXI-5-HIDRÓXI-TOLUENO NO TAS.....	56
TABELA 9. CONCENTRAÇÕES TESTADAS DO 3,5-DIMETÓXI-TOLUENO NO TAS.	56
TABELA 10. CONCENTRAÇÕES TESTADAS DO 3-BENZENOSSULFONIL-5-METÓXIL-TOLUENO TAS.....	56
TABELA 11. CONCENTRAÇÕES TESTADAS DO 2,4-DIBENZENOSSULFONATO-ORSELINATO DE ETILA NO TAS.	57
TABELA 12. CONCENTRAÇÕES TESTADAS DO 2,4-DIMETÓXI-6-METILBENZOATO DE ETILA NO TAS.	57
TABELA 13. CONCENTRAÇÕES TESTADAS DO 4- TRIFLUOROMETANOSSULFONIL-TOLUENO NO TAS.....	57

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
ADME	Absorção, Distribuição Metabolismo e Excreção.
APTR	Amino-pirazolo-triazina
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
ccd	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia Gasosa acomplada à Espectrometria de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
d	Dubleto
DEPT	Enriquecimento por Transferência de Polarização sem distorção
DMF	Dimetil formamida
DMS	Dimetil sulfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPP	1,3-bis(difenilfosfino)propano
EM	Espectro de Massas
GABA	É o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central
Hex	Hexano
INT	Iododinitrotetrazol
IV	Infravermelho
KOAc	Acetato de potássio
LC50	Concentração Letal para 50% dos indivíduos
m	Multiplete
MQSAR	Multivariate quantitative structure-activity relationship
q	Quarteto
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
RMN 13C	Ressonância Magnética Nuclear de 13C
RMN 1H	Ressonância Magnética Nuclear de 1H
s	Singleto
SAR	Structure Activity Relationship
t	Triplete
TAS	Teste de toxicidade frente a Artemia sp
TEBAB	brometo de tetrabutilamônio
TR	Transcriptase Reversa

Resumo

Neste trabalho foram preparados os derivados do orselinato de etila. Este resorcinol, por sua vez, foi obtido diretamente da alcoolise do ácido lecanórico extraído do líquen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.)Hale com rendimento de 13% do extrato liquênico.

As modificações no orselinato de etila se deram em suas hidroxilas fenólicas, o que permitiu produzir compostos benzenossulfonados, mono e dimetoxilados.

Derivados análogos também foram preparados à partir do orcinol, cuja estrutura é semelhante a do orselinato de etila só diferenciando deste pela ausência do grupo etil carboxilato. Todos os derivados preparados foram submetidos à avaliação das atividades citotóxica, antibacteriana (antibiótica) e fungitóxica. Os resultados obtidos foram analisados e formaram bons subsídios para avaliação da importância do grupo etil carboxila nas atividades testadas.

Os testes das atividades biológicas também contribuíram para o estudo do papel das hidroxilas fenólicas nesses processos.

Também foram feitas tentativas de acoplamento dos derivados trifluorometanossulfonílico do orcinol com olefinas, por reação de Heck, visando a obtenção de C-nucleosídeos.

ABSTRACT

Though alcoholysis of lecanoric acid, extracted from the lichen *Parmotrema tinctorum* (NYI) Hale, ethyl orselinate derivatives were obtained. Modification in their hydroxyl phenolic groups, resulted in benzenesulphonates, mono and dimethoxylated compounds.

In order to establish comparison of results, analogs derivatives from orcinol were prepared that have similar structures with ethyl orsellinates differing only by absence of the carboxylate group.

All prepared compounds were investigated regarding their cytotoxic activities against the microcrustacean *Artemia* sp, bactericid activities either against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Speraeospermuns*, antibiotic and fungitoxic activities. Overall results have shown the important role of the carbonyl group for the tested activities.

With the purpose of preparation of C-nucleosides with triflates derivatives of orcinol and glycol furanosides, through Heck Reaction, some procedures were tried without satisfactory results.

1 Introdução

A ação biológica das substâncias exógenas (substância externa ingerida) vem despertando interesse cada vez maior. Foi Emil Fisher quem formulou um modelo pioneiro, capaz de permitir uma racionalização dos efeitos das substâncias, exógenas ou não, no organismo. Este modelo, conhecido como “chave-fechadura”, contém um conceito fundamental que até hoje vigora. Fisher definiu que as moléculas dos compostos ativos no organismo seriam chaves, que interagiriam com macromoléculas do próprio organismo (bioreceptores) que seriam as fechaduras. Desta interação chave-fechadura teríamos a resposta farmacológica de substâncias endógenas. Embora seja antigo, o modelo de Fisher antecipava o conceito de complementaridade molecular que existe entre o fármaco e seu receptor. Desta forma, conhecendo, como se conhece, em quase todos os casos, a estrutura do fármaco (a chave) e sabendo-se quais grupos funcionais estão presentes poder-se-ia compor a topografia provável, aproximada, do bioreceptor (a fechadura). Portanto, onde na chave temos uma reentrância, na fechadura teremos uma protuberância, complementar e assim por diante¹.

Este raciocínio pode explicar a ação dos fármacos, ainda que de forma abreviada, desde que a quantidade adequada (dose) atinja os bioreceptores.

Os anestésicos gerais são um exemplo clássico de fármacos, que apresentam um mecanismo de ação que envolve a depressão inespecífica de biomembranas lípo-protéicas, elevando o limiar de excitabilidade celular ou a interação inespecífica com sítios hidrofóbicos de proteínas do sistema nervoso central, provocando perda da consciência. Neste caso específico, em que a complexação do fármaco com macromoléculas da biofase dá-se predominantemente através de interações de Van der Waals, a potência do fármaco está diretamente relacionada com a sua lipossolubilidade. Em alguns casos, a alteração das propriedades físico-químicas decorrentes de modificações estruturais de um fármaco pode alterar seu mecanismo de interação com a biofase. Um clássico exemplo encontra-se na classe dos anticonvulsivantes. O pentobarbital é estruturalmente específico e tem ação sobre o

¹ BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: ArtMed Editora Ltda., 2001.

receptor GABA ionóforo. A simples substituição de um átomo de oxigênio por um átomo de enxofre produz o tiopental, cuja lipossolubilidade é maior e tem ação anestésica inespecífica (**Figura 1**).

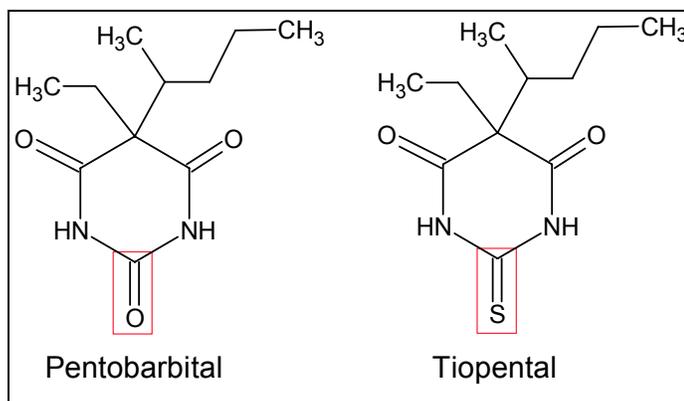


Figura 1. Diferença estrutural do pentobarbital e tiopental, que influencia no mecanismo da ação farmacológica¹.

Do ponto de vista qualitativo, o grau de afinidade e a especificidade da ligação da molécula com o sítio receptor são determinados por forças intermoleculares: eletrostáticas, de dispersão, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes. Em uma interação fármaco-receptor típica normalmente ocorre uma combinação dessas forças, sendo no entanto necessário estudá-las separadamente, de modo a reconhecer sua natureza e assim propor modelos para interações ligante/sítio receptor. Vários trabalhos na literatura relatam como os compostos (ligantes) interagem com os sítios ativos de enzimas em específico. Um exemplo é o estudo dos inibidores da trombina², uma enzima que apresenta um papel importante no processo de coagulação do sangue.

Neste trabalho os inibidores foram selecionados estatisticamente com auxílio de programa de computador que contém dados do sítio ativo específico da trombina e foram avaliados por prova biológica e estudos de estrutura-atividade subsequentes.

² LINUSSON, A.; GOTTFRIES, J.; OLSSON, T.; ÖRNSKOV, E.; OLESTAD, S.; NORDÉN, B.; WOLD, S. J. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. **44**, p. 3424-3439, 2001.

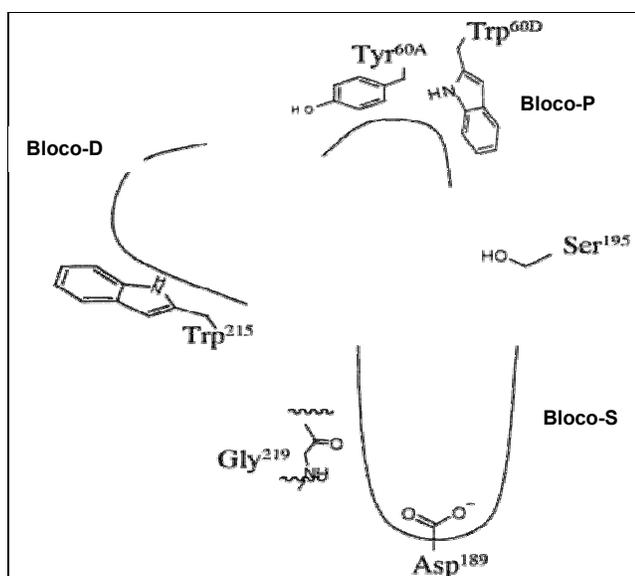


Figura 2. Representação esquemática do sítio ativo da Trombina².

A representação da **Figura 2** foi montada através dos resultados obtidos dos testes da enzima trombina com derivados de benzenossulfonatos.

Nos estudos de correlação entre estrutura química e atividade biológica, alguns trabalhos objetivam a elaboração de uma biblioteca, a partir da qual se obtenham dados que permitam desenvolver a síntese programada de um determinado composto que possivelmente irá possuir atividade biológica frente a uma enzima, bactéria ou mesmo vírus em estudo^{1,2} (Figura 3).

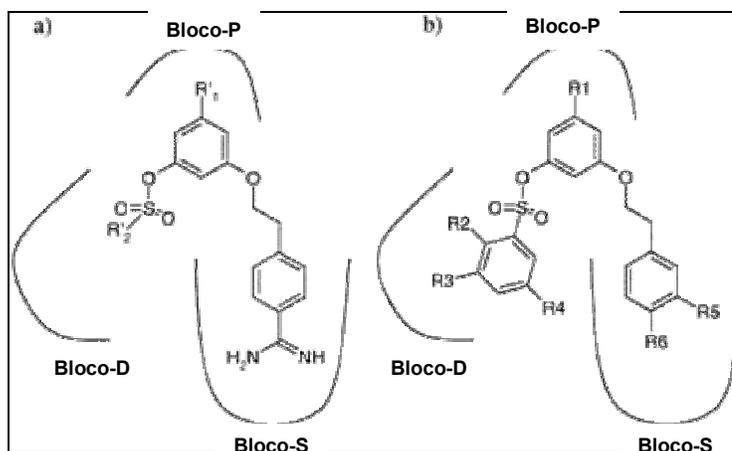


Figura 3. a) As estruturas globais das combinações incluídas no MQSAR (*multivariate quantitative structure-activity relationship*) dos dados históricos. b) Estruturas planejadas para síntese².

Com o auxílio de um modelo de sítio ativo é possível planejar e prever inibidores ou mesmo ativadores de enzimas.

1.1 **Correlações entre estrutura química e atividade biológica**

A relação estrutura química e a atividade farmacológica, incluindo planejamento de novas substâncias que possuam propriedades farmacológicas úteis, capazes de representar novos fármacos é estudado pela Química Medicinal. Esta tarefa complexa envolve uma multiplicidade de fatores responsáveis pela resposta terapêutica de um fármaco que precisa apresentar elevada eficácia, reflexo das propriedades farmacodinâmicas, aquelas que regem as interações responsáveis pelo reconhecimento molecular do fármaco pelo biorreceptor e resultam na resposta terapêutica desejada e farmacocinéticas, aquelas que governam os fatores de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco na biofase, resultando no perfil de biodisponibilidade, além de possuir reduzida toxidez.

Diversas modificações estruturais baseadas em estratégias racionais podem ser realizadas em um composto protótipo visando potencializar a sua atividade. Dentre essas estratégias estão as modificações de grupos funcionais³, a homologação e ramificação de cadeias carbônicas e o bioisosterismo.

A modificação de grupos funcionais em uma molécula é uma estratégia que visa o aprimoramento de diversos fatores inerentes à atividade, transporte ou distribuição. Dentre esses fatores a solubilidade é de importância fundamental, pois uma droga ativa que não seja suficientemente solúvel em água não poderia ser administrada, considerando a água como solvente. Devido a isso, grupos hidrofílicos podem ser inseridos na estrutura de tal droga e podem ser desativados metabolicamente após a sua administração.

Se uma droga não é absorvida e transportada para o alvo de ação em concentração suficiente, a alternativa é torná-la mais hidrofílica ou lipofílica, dependendo do local onde ocorrerá a ação dessa substância. Uma vez ocorrida a absorção ou a droga tenha atingido o alvo de ação, o grupo hidrofílico ou lipofílico é removido enzimaticamente.

³ AYER, W. A.; BROWNE, L. M.; LOVELL, S. H. *Phytochemistry*. v. 22, **10**, p. 2267-2271, 1983.

Além desses fatores a instabilidade também deve ser considerada, visto que uma droga pode ser rapidamente metabolizada e ser inativada antes que alcance o sítio ativo. A estrutura pode ser modificada para impedir o seu metabolismo até a chegada ao alvo de ação.

As alterações podem também ser conduzidas em determinados grupos funcionais da molécula visando a diminuição de sua toxicidade ou fazendo com que ela se converta na forma ativa somente no alvo de ação.

O bioisosterismo em suas primeiras aplicações como estratégia de modificação molecular de um protótipo, beneficiou-se enormemente da regra do hidreto, uma regra empírica, formulada em 1925⁴, que descrevia similaridades entre grupos que tinham o mesmo número de elétrons de valência, mas que podiam ter um número diferente de átomos. Mais tarde isósteros foram redefinidos como átomos, íons ou moléculas que possuíam camadas periféricas de elétrons idêntica⁵. Essas duas definições descrevem os bioisósteros clássicos.

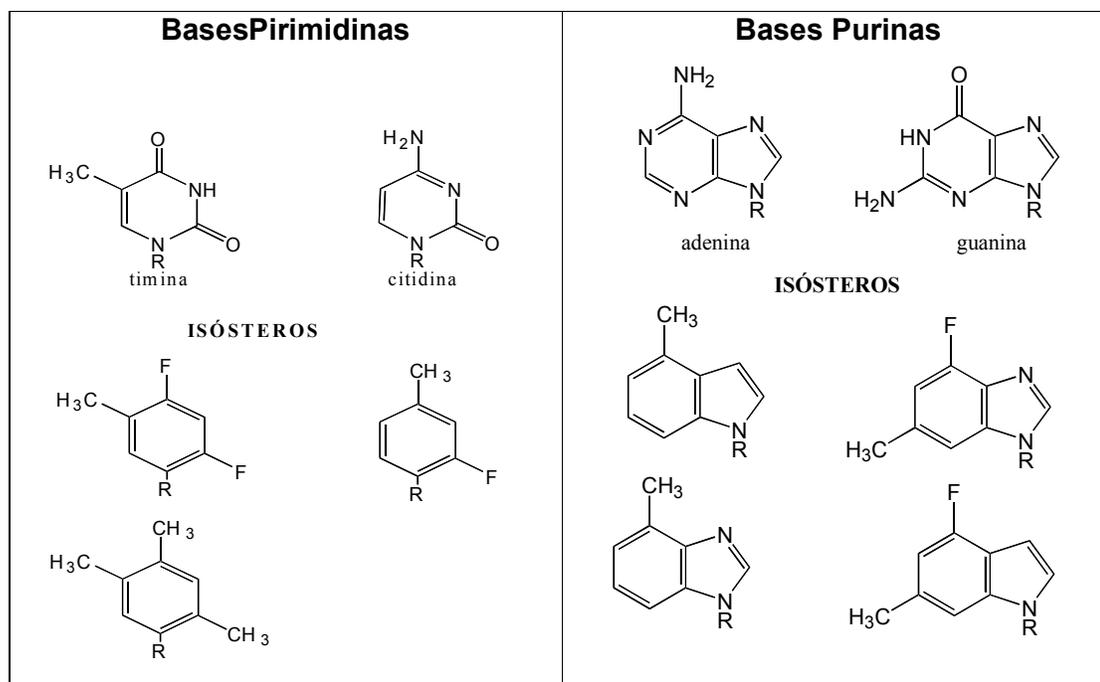


Figura 4. Estruturas de isósteros não polares de quatro bases naturais do DNA⁶.

⁴ GRIMM, H. G. Z. *Elektrochem* **31**, 474, 1925; GRIMM, H. G.Z. Z. *Elektrochem* **34**, 430, 1928. apud SILVERMAN, R.B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*; Academic Press, INC; San Diego, 1992, p.19.

⁵ ERLNMEYER, H. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **30**: 792, 1948 apud SILVERMAN, R.B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*; Academic Press, INC; San Diego, 1992, p17.

Os isósteros não naturais das bases nitrogenadas do DNA, **Figura 4**, quando submetidos a reação de acoplamento carbono-carbono com ribofuranosídeos produzem substâncias análogas sintéticas, com significativa importância como anti virais, anti - tumorais e agentes carcinogênicos⁶.

O emprego do bioisosterismo como estratégia de desenvolvimento de novos agentes bioativos permite que se antecipe uma comparável afinidade intrínseca entre duas substâncias bioisostéricas e, conseqüentemente, um potencial de atividade biológica similar. Entretanto, quando as substituições bioisostéricas são efetuadas em grupos funcionais envolvidos no farmacóforo de uma determinada substância, alterações envolvendo os processos de biotransformação podem ser de tal ordem, que modifiquem substancialmente a farmacocinética relativa dos bioisósteros¹. Portanto, embora alguns grupos envolvidos possam ser considerados bioisostéricos, a atividade relativa dos compostos resultantes se modifica drasticamente. Por esta razão, entre outras, uma substituição bioisostérica efetuada com sucesso em uma série não obrigatoriamente terá o mesmo êxito em uma outra série terapêutica.

1.2 **Compostos liquênicos**

Os líquens produzem metabólitos secundários, que na sua maioria são originados na rota do acetil-polimalonil. Essa rota conduz à formação de compostos alifáticos, como os ácidos graxos de cadeia longa e as substâncias aromáticas do tipo ácidos fenólicos⁷, os depsídeos e as depsidonas.

Os depsídeos apresentam dois anéis aromáticos unidos por uma ligação éster, já as depsidonas apresentam além da ligação éster, um heterociclo adicional, resultante de uma ligação éter geralmente entre os carbonos 2 e 5' (**Figura 5.**)

⁶ CHAUDURI, N. C., REN, R. X., E. T. Kool, *Synleth*, p. 341, 1997.

⁷ HONDA, N. K. *Química nova*. 22(6), p. 110-125, 1999.

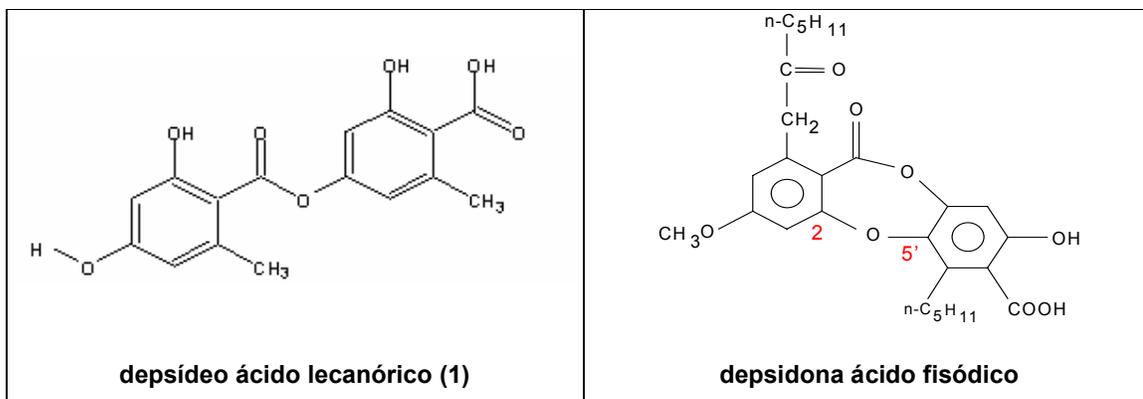


Figura 5. Exemplo de um depsídeo (ácido lecanórico) e uma depsidona (ácido fisódico).

Os compostos liquênicos têm sido estudados quanto a sua ocorrência, estrutura e potencial farmacológico.⁸

Muitos compostos liquênicos têm apresentado atividade antioxidante, antibacteriana, analgésica, antiinflamatória, anticancerígena, dentre outras^{8,9}.

Um estudo sobre atividade de depsídeos e depsidonas, extraídos de líquens ou sintetizados mostrou atividade inibidora sobre HIV-integrase¹⁰ (Figura 6).

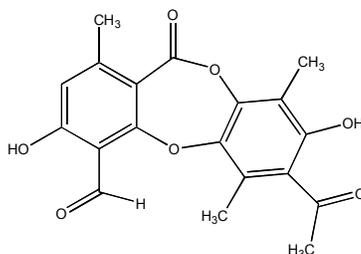


Figura 6. Depsidona que apresenta atividade inibidora sobre HIV-integrase¹⁰.

Outros trabalhos também relatam a identificação de grupos farmacofóricos que poderiam ser os responsáveis pela atividade biológica das substâncias estudadas¹¹.

O depsídeo ácido lecanórico (1), tem sido extraído de *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale em 10% de rendimento ou mais¹².

⁸ HYLANDS, P. J.; INGOLSDOTTIR, K. *Phytochemistry*, **24**, p. 127, 1985.

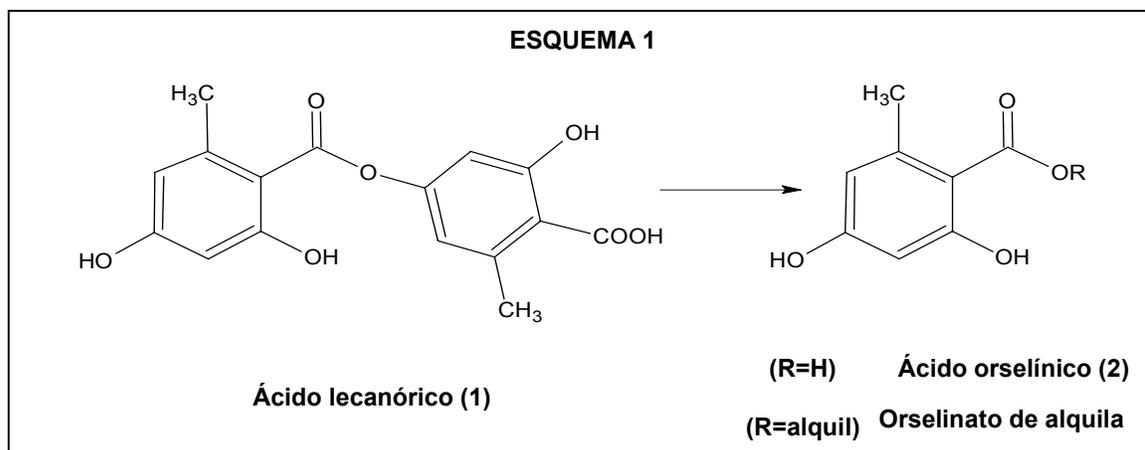
⁹ HIDALGO, M. E.; FERNANDEZ, E.; QUILHOT, W. LISSI, E., *Phytochemistry*, **37**, 1585, 1994.

¹⁰ NEAMATI, N., HONG, H., MAZUMDER, A., WANG, S., SUNDER, S., NICKCLAUS, M. C., MILNE, G. W. A., PROKSA, B.; POMMIER, Y. *J. Med. Chem.*, **40**, p. 942, 1997.

¹¹ MAKHIJA, T.M.; KULKARNI, V. M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **10**, p. 1483–1497, 2002

¹² AHMANN, G. B.; MATHEY, A., *The bryologist*, **70**, 93, 1967

A hidrólise do ácido lecanórico fornece duas unidades do ácido orselínico, assim como a sua alcoólise fornece uma unidade do orselinato correspondente e uma unidade do ácido orselínico (ESQUEMA 1).



O ácido orselínico, assim como seus correspondentes orselinatos também têm sido estudados quanto seu potencial farmacológico, apresentando atividade fungitóxica e citotóxica¹³.

Devido às atividades biológicas que os depsídeos apresentam, assim como os grupos presentes no anel benzênico de suas estruturas, os orselinatos de alquila são potenciais unidades aglicais na síntese de nucleosídeos.

Uma das linhas de pesquisa em Fitoquímica do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) tem identificado ácidos liquênicos, na forma de depsídeos ou depsidonas, isolados de espécies liquênicas encontradas na região sul-matogrossense¹³.

Transformações nos grupos funcionais dessas substâncias têm sido realizadas, visando incrementar ou diminuir atividades biológicas (como ação antitumoral ou eventual toxicidade).

Devido a facilidade de obtenção, por via sintética¹⁴ ou por extração de líquens, o ácido lecanórico tornou-se a substância de escolha para estudos do presente trabalho.

¹³ HONDA, N. K., "Líquens do Mato Grosso do Sul - Estudo químico e avaliação da atividade biológica", Tese de Doutorado, IQ-UNESP, Araraquara, SP, 1997.

¹⁴ KC^A, S. K.; MÜLLER, K. *Eur. J. Med. Chem.* **35**, p. 405-411, 2000.

1.3 C-nucleosídeos

A descoberta do antibiótico Formicina^{15,16} e o reconhecimento deste como um C - nucleosídeo isômero de adenosina despertou grande interesse por este grupo de substâncias em meados de 1960. A atenção foi focalizada sobre C-nucleosídeos como um importante agente biológico para aplicações terapêuticas.

C-nucleosídeos naturais e seus análogos sintéticos constituem uma importante classe de compostos orgânicos, tendo aplicação como antivirais, antitumorais e agentes carcinogênicos¹⁷. A descoberta de vários ribofuranoses C-nucleosídeos, como pseudoridina, showdomicina, formicina (**Figura 7**) tem sido relatada na literatura¹⁸.

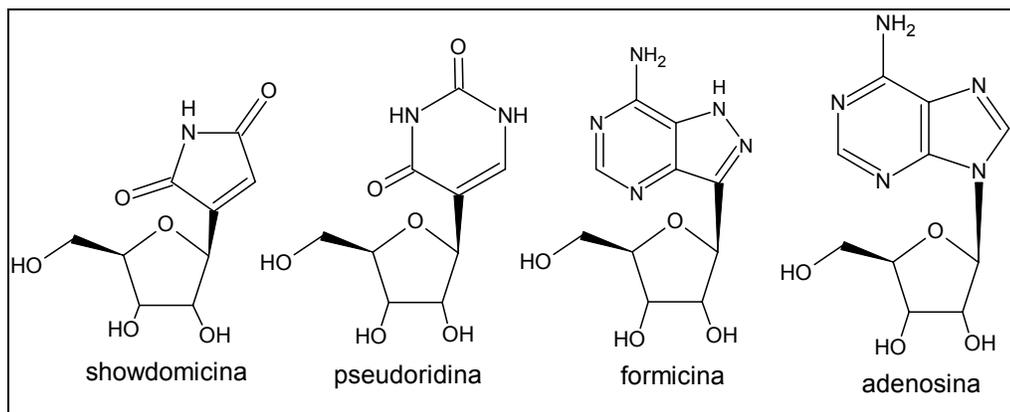


Figura 7. Ribofuranoses C-nucleosídeos.

Muitos desses compostos são ativos como antibióticos e agentes antitumorais.

A ausência de um oxigênio entre o carboidrato e o grupo arila resulta em grande estabilidade dos C-glicosídeos quando comparados com os O-glicosídeos (**Figura 8**).

¹⁵ HORI, M.; ITO, E.; TAKITA, T.; KOYAMA, Y.; TAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H. *J. Antibiot.*, **17A**, p. 96-99, 1964.

¹⁶ AIZAWA, S.; HIDAKA, T.; OTAKE, N.; YONEHARA, H.; INOSE, K.; IGARASHI, N.; SUZUKI, S. *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 375-376, 1965.

¹⁷ DAVES, G. D. Jr., *Acc. Chem. Res.*, **23**, 261-266, 1990.

¹⁸ JARAMILLO, C.; KNAPP, S., *Synthesis*. p. 1-20, 1994.

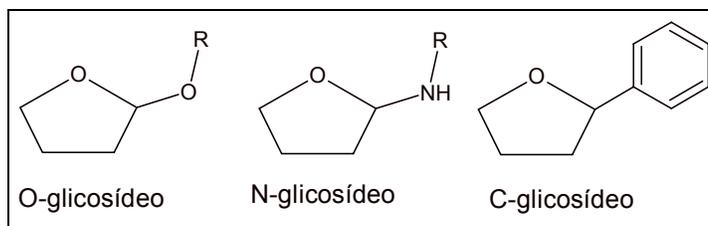


Figura 8 Tipos de glicosídeos.

Os O-glicosídeos são propensos à hidrólise ácida, visto que a ligação glicosídica é parte de um acetal. Por outro lado, a síntese de C-glicosídeos e em especial os de C-aril glicosídeos, não requer a formação de acetal, mas sim a formação de uma ligação carbono - carbono, que do ponto de vista sintético é mais trabalhosa. Acredita-se que C-aril glicosídeos conectam-se ao DNA para formar um complexo estável frente à ácidos e hidrólises enzimática, contribuindo bastante para a sua atividade antibiótica¹⁴.

Vários nucleosídeos sintéticos são análogos de N-nucleosídeos naturais, por exemplo, a formicina e APTR (amino-pirazolo-triazina) são análogos da adenosina. A APTR apresentou importante propriedade antitumoral e antileucêmica¹⁴.

Alguns nucleosídeos inibidores da enzima transcriptase reversa (TR) do HIV-1 são N-nucleosídeos. Esta classe de compostos tem sido usada na terapia anti HIV-1 TR e é responsável pela alta atividade antiretrovira¹⁹. Apesar do número de inibidores HIV-1 TR avaliados pelo uso clínico e a eficácia destes compostos em regime de combinação, a exposição de pacientes à longo prazo às drogas, muitas vezes resultam no desenvolvimento de resistência viral ou toxicidade à longo prazo. O aparecimento de vírus resistente às drogas é uma inevitável consequência da exposição prolongada de HIV-1 na terapia antiretroviral. Por esta razão, têm sido envidados esforços para identificar novos agentes com atividades contra a resistência viral de HIV-1 e com um perfil de toxicidade tolerante à droga¹⁵.

A eficácia de um nucleosídeo análogo depende de vários fatores, incluindo a bioviabilidade oral, avanço celular, o anabolismo intracelular para derivados trifosfato, a habilidade para competir com nucleosídeos naturais por substratos de TR e ainda uma baixa resistência do vírus¹⁵.

¹⁹ RANDO, R. F.; NGUYEN-BA, N. *Drug Discovery Today*. **5**, p. 465-476, 2000.

A extraordinária atividade biológica de tais C-nucleosídeos tem inspirado químicos orgânicos a planejar e tentar a síntese de C-nucleosídeos não naturais para o estudo da relação estrutura – atividade. Assim, grande número de C-nucleosídeos contendo ou não substituintes heteroaromáticos, tais como pirróis, furanos e tiofenóis, piridinas, quinolinas, imidazóis, pirazóis e tiazóis têm sido sintetizados^{20,21}. O interesse por tais C-nucleosídeos não naturais tem sido realçado pela possibilidade de aplicação na síntese de um ácido nucléico, no estudo de interações RNA – proteínas, e com investigações espectroscópicas para elucidação da dinâmica do DNA¹⁴.

²⁰ POSTEMA, M. H. D. *Tetrahedron*. **43**, 40, 8545-8599, 1992.

²¹ CABRI, W.; CANDIANI, I.; BEDESCHI, A. *J. Org. Chem.* **56**, p. 5796-5800 1991./ CABRI, W.; CANDIANI, I.; BEDESCHI. *J. Org. Chem.* **58**, 7421-7426, 1993.

2 Objetivos

Considerando a significativa atividade biológica apresentada pelos orselinatos de alquila o presente trabalho teve por objetivo a realização de transformações químicas nos grupos funcionais do esqueleto de orselinatos, visando a preparação de compostos com atividade biológica, como citotóxica, antibacteriana (antibiótica) e fungitóxica. Também objetivamos levantar subsídios para o estudo do papel do grupo carbonila e hidroxila nas atividades biológica testadas.

Outro objetivo foi pesquisar uma metodologia eficiente para a preparação de c-nucleosídeos onde a unidade aglial seja um orselinato de alquila.

3 Resultados e Discussão

3.1 Obtenção do Depsídeo ácido lecanórico

O líquen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.)Hale é uma das espécies biossintetizadoras dos depsídeos ácido lecanórico e atranorina⁷ (**Figura 9**).

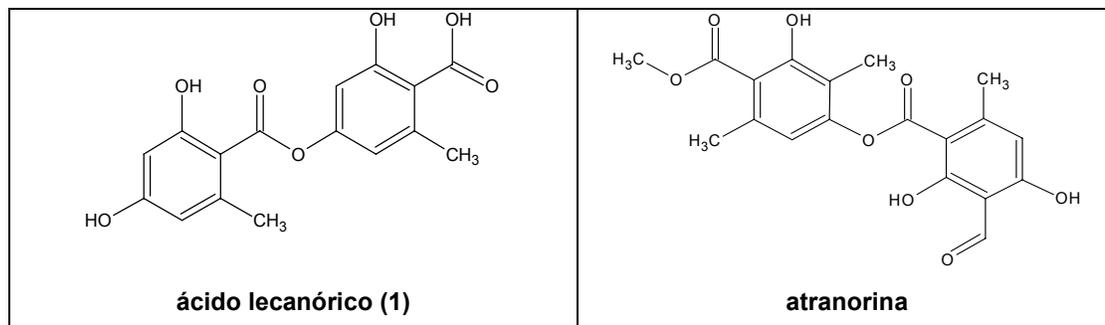


Figura 9. Estruturas do ácido lecanórico e atranorina.

O líquen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.)Hale utilizado neste trabalho foi coletado na região de Piraputanga no Mato Grosso do Sul e passou por um tratamento de limpeza prévio visando a retirada do material aderido ao talo líquênico.

Após a limpeza do talo líquênico, as amostras do líquen foram avaliadas quanto à composição química. Para isso, os líquens foram separados por grupos, respeitando as características morfológicas do material em análise.

Dados relativos apenas à análise morfológica muitas vezes não elucidam a identificação de um dado espécime, mas aliados às informações obtidas sobre a provável composição química do espécime em estudo, podem conduzir a uma identificação mais segura.

De cada grupo, foram retirados alguns pedaços que foram fragmentados e colocados em solvente para extração a quente. Os extratos foram submetidos a análise para determinação da composição química em uma placa de cromatográfica de camada fina (**Figura 10**).

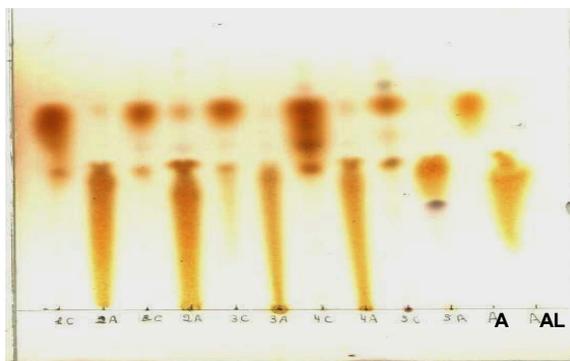


Figura 10. Cromatografia (ccd) do extrato acetônico de grupos de líquens avaliados por comparação com os padrões de ácido lecanórico (AL) e a atranorina (A), eluída com: Tolueno, acetato de etila e ácido acético nas proporções de 6:4:1 v/v/v respectivamente. Revelador: Metanol, ácido sulfúrico e *p*-anisaldeído).

As amostras foram aplicadas com os padrões do ácido lecanórico e da atranorina, gentilmente cedidos pela Professora Dr^a Neli K. Honda do Laboratório de Pesquisa (LP-2) do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Os resultados demonstraram que nem todos os grupos possuíam a mesma composição química. Sendo assim, foram reunidos apenas os grupos de líquens que apresentaram em sua composição ambos, o ácido lecanórico e a atranorina.

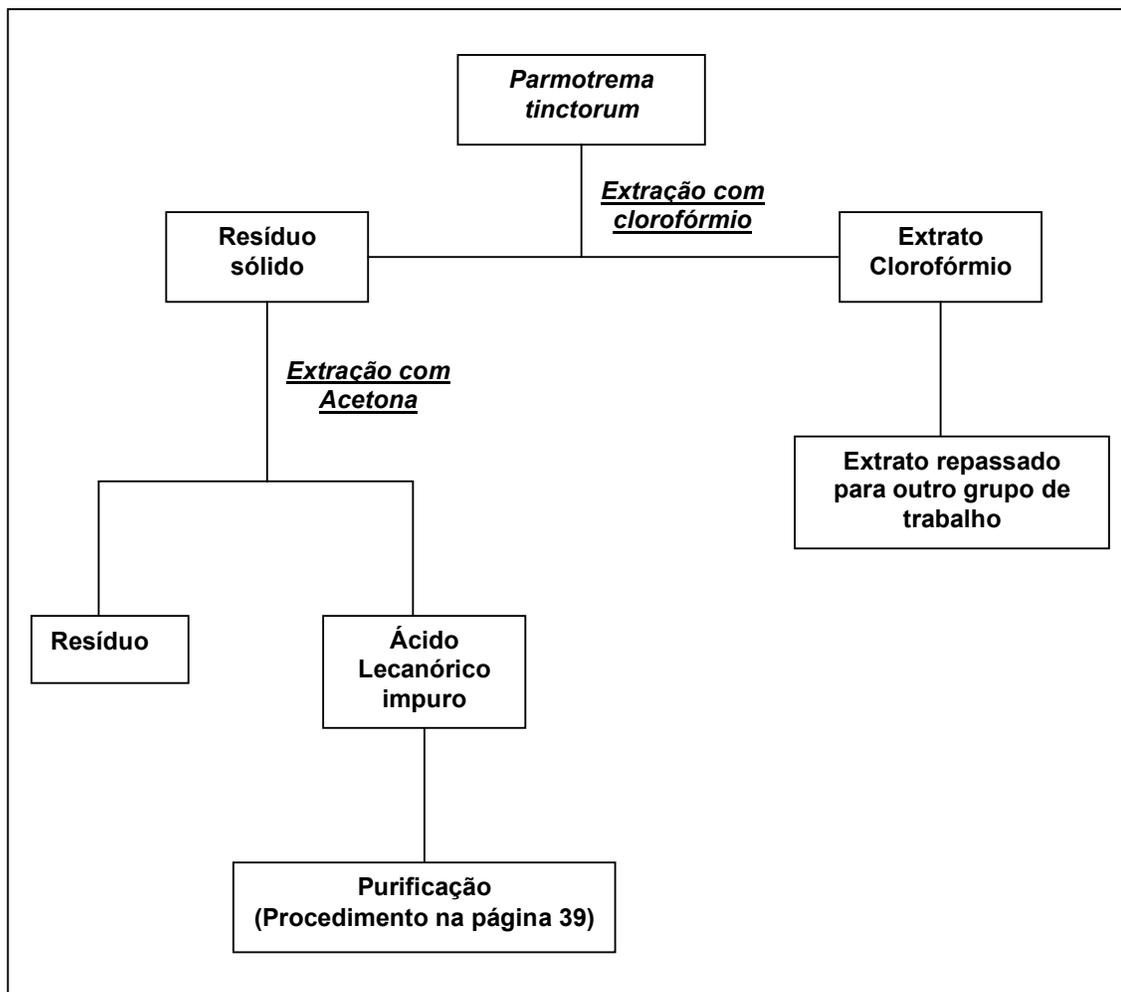
Dessa forma, tentamos garantir somente líquens da espécie *Parmotrema tinctorum* (Nyl.)Hale, de onde extraímos o ácido lecanórico, que por sua vez, utilizamos para as modificações químicas (**Figura 11**).



Figura 11. Cromatografia (ccd) do extrato acetônico para avaliação da composição química dos grupos de líquens (Eluente: Tolueno, acetato de etila e ácido acético nas proporções de 6:4:1 v/v respectivamente. Revelador: Metanol, ácido sulfúrico e *p*-anisaldeído).

Todas as amostras que apresentaram a mesma composição química foram então agrupadas para extração seqüencial com clorofórmio e acetona. Abaixo, o fluxograma demonstra resumidamente o procedimento para a obtenção e purificação do ácido lecanórico¹².

Fluxograma – Resumo da extração e purificação do Ácido Lecanórico.



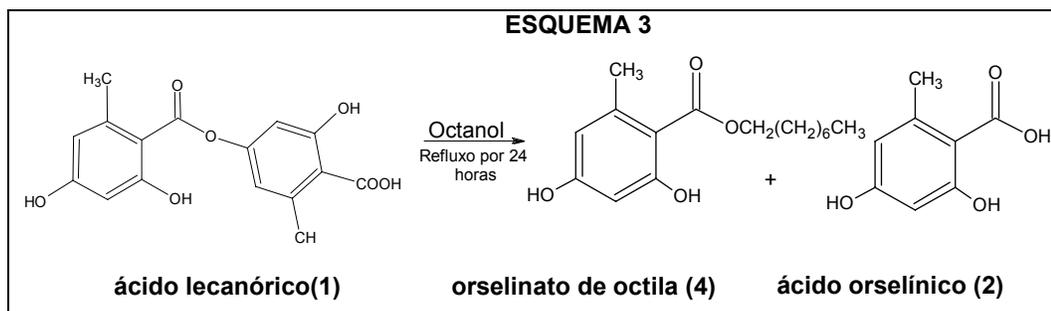
Após a obtenção do ácido lecanórico, este foi submetido às modificações químicas e posterior avaliação da atividade biológica.

O procedimento **detalhado** da extração e purificação do ácido lecanórico está descrito na página 38.

3.2.2 Orselinato de Octila

Foi observado que o aumento da lipofilicidade, principalmente devido à homologação da cadeia carbônica em orselinatos de alquilas, causa um incremento na atividade biológica²². Testes anteriores da atividade biológica da série homóloga do orselinato de metila ao orselinato de hexila permitiu previsões das atividades biológicas dos orselinatos de heptila. Dessa forma, sintetizamos o orselinato de octila já preparado, para que se pudesse verificar as previsões referentes à atividade citotóxica, obtidas por cálculos estatísticos de correlação estrutura atividade e também comparar tais resultados com os obtidos nos testes de atividades biológicas com os compostos preparados neste trabalho.

A síntese do orselinato de octila foi semelhante à preparação do orselinato de etila, porém houve a substituição do álcool etílico pelo álcool octílico. O tempo de reação foi de 24 horas, tempo em que a mistura reacional foi deixada em aquecimento (ESQUEMA 3).



Após o desaparecimento do material de partida a reação foi interrompida e o octanol destilado sob pressão reduzida (P.E. é de 195,3°C à 760mmHg). Contudo, não foi possível retirar todo o octanol da mistura reacional.

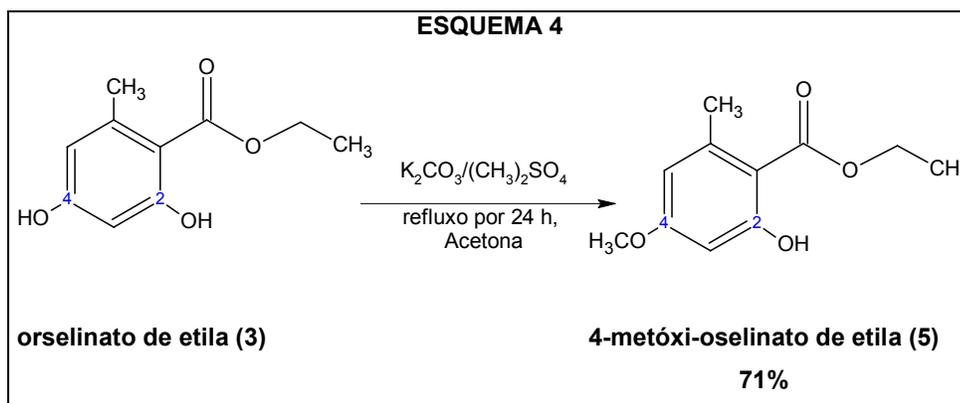
O resíduo foi então, submetido à purificação em coluna *flash*, de onde foi obtida uma massa igual a 192,5 mg do produto bruto, porém ainda observamos que este continha contaminação por octanol.

²² GOMES, A. T. "*Depsídeos bioativos de líquens - isolamento e modificação estrutural*", Dissertação de Mestrado. DQI-UFMS. Campo Grande, MS, 2001.

3.3 Modificações estruturais do orselinato de etila e seus derivados.

3.3.1 Metoxilação

A metoxilação do orselinato de etila produziu um único produto identificado como 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila (ESQUEMA 4).

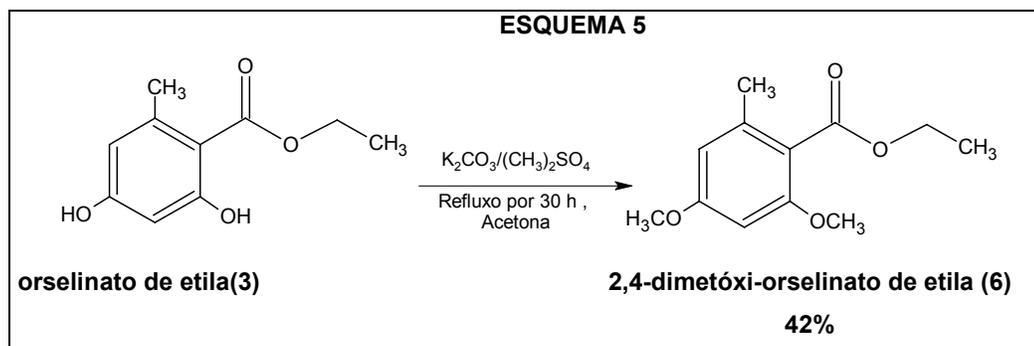


A metoxilação do orselinato de etila foi feita para substituímos a hidroxila da posição 2, que poderia interferir na reação de acoplamento de Heck.

Na hidroxila da posição 4 seria adicionado um grupo abandonador que durante a realização do acoplamento de Heck, daria lugar a um grupo glicil, formando assim um C-nucleosídeo.

Contudo, a reação resultou na metoxilação da hidroxila da posição 4 e não da posição 2. Dessa forma, uma alternativa sintética foi proposta, que consistiu numa dimetoxilação seguida de desmetilação seletiva da hidroxila 4, o qual não foi produzido. Dessa forma a dimetoxilação do orselinato de etila produziu um único composto identificado como o 2,4-dimetóxi-orselinato de etila (6). Tentamos,

inicialmente, uma reação do composto dimetoxilado **6** com dimetil sulfato, segundo método descrito na literatura²³ (ESQUEMA 5).



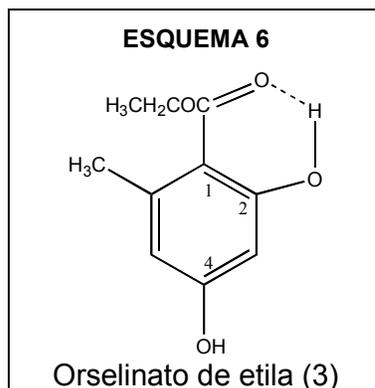
É importante ressaltar que os produtos monometoxilado e o dimetoxilado do orselinato de etila foram obtidos com o mesmo reagente (dimetil sulfato), mas com diferenças no procedimento experimental.

O derivado 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila (5) foi obtido através da metoxilação direta do orselinato de etila com dimetil sulfato, sob refluxo na proporção de 3 equivalentes de dimetil sulfato para 1 equivalente de orselinato de etila²⁴. A reação foi conduzida por 24 horas sob refluxo em acetona, sendo o produto purificado por coluna cromatográfica, com um rendimento de 71%. A identificação deste composto realizou-se por análise de espectros de RMN de ¹H, ¹³C e espectro de Massa (M-8).

Já na preparação do 2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila, o procedimento experimental foi semelhante, mas com maior quantidade de reagente dimetil sulfato (5,3 equivalente), do que na preparação do derivado monometóxilado. Outro aspecto importante é que tempo de reação, que também foi maior (30 horas), pois a introdução de um grupo protetor na posição 2 do orselinato de etila requer condições mais drásticas, devido a uma possível ponte de hidrogênio intramolecular que estaria protegendo a hidroxila desta posição (ESQUEMA 6).

²³ BARBIER, M.; DEVYS, M. *Synthetic communications*, **22**(19), 2757-2762, 1992.

²⁴ ELIX, J. A.; JIANG, H.; WARDLAW, J. H. *J. Chem.*, **43**, 1745 – 1758, 1990.



Isto também poderia explicar por que na monometoxilação, o produto obtido é sempre o 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila e não o 2-metóxi-orselinato de etila ou uma mistura com o produto dimetoxilado.

Portanto, para que fosse possível a formação do derivado dimetoxilado do orselinato de etila foram adicionados 5 equivalentes da base (K_2CO_3). A reação foi conduzida até que a análise cromatográfica por ccd, eluida com hexano/acetato de etila 7:3 (v/v), indicasse o consumo total do material de partida. O tempo de reação foi de aproximadamente 30 horas de refluxo em acetona e produziu um único produto com rendimento de 42% do derivado 2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila (6), sendo este identificado por espectros de RMN de 1H , ^{13}C e Massa (M-8).

O composto 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila apresentou R_f menor do que o orselinato de etila, isso pode ser explicado pelo fato da carboxila estar impedida formando a ponte de hidrogênio existente com a hidroxila da posição 2, que além de dificultar reações com esta hidroxila, também compromete a interação da carboxila e da própria hidroxila com suporte de sílica da placa cromatográfica.

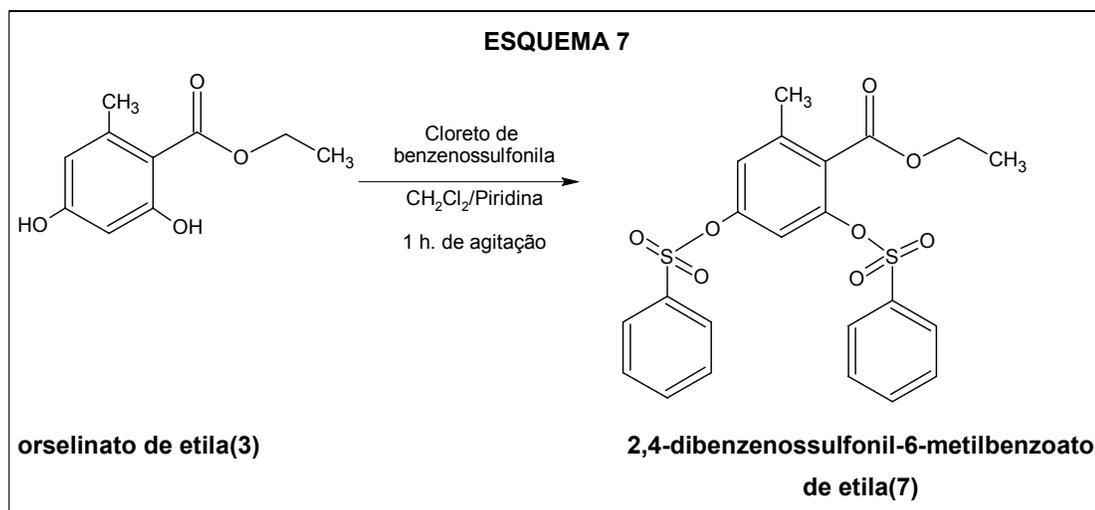
3.3.2 Benzenossulfonação.

A benzenossulfonação do orselinato de etila foi feita, inicialmente, para que o benzenossulfonato resultante servisse como substrato na reação de acoplamento de Heck.

Alguns autores relatam métodos de acoplamento de unidades aglicais com grupos de saída na forma de benzenossulfonatos. Como tais substâncias podem ser preparadas diretamente de hidroxilas fenólicas, foram então escolhidas para servir de substrato nas reações com as unidades glicais.

Outro fato importante, relatado anteriormente, é que benzenossulfonatos derivados do orcinol apresentam significativa atividade farmacológica².

A reação do orselinato de etila com cloreto de benzenossulfonila resultou na formação de um único produto com R_f menor do que a do orselinato de etila e foi identificado como 2,4-dibenzenossulfonil-6-metilbenzoato de etila, cujo rendimento foi de 64%. A identificação deste composto foi realizado através das análises de espectros de RMN ¹H e ¹³C (ESQUEMA 7).



A introdução de benzenossulfonila como substituintes nas hidroxilas fenólicas de **(3)** fez com que a carboxila do grupo éster ficasse livre da ponte de hidrogênio entre a hidroxila da posição 2 e a carboxila do éster 2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila aumentando a interação da molécula com grupos polares da sílica na placa cromatográfica, indicando um R_f menor do que o do material de partida.

Comparada com as outras reações de proteção das hidroxilas fenólicas, esta apresentou um dos menores tempos de reação que foi de 1 (uma) hora.

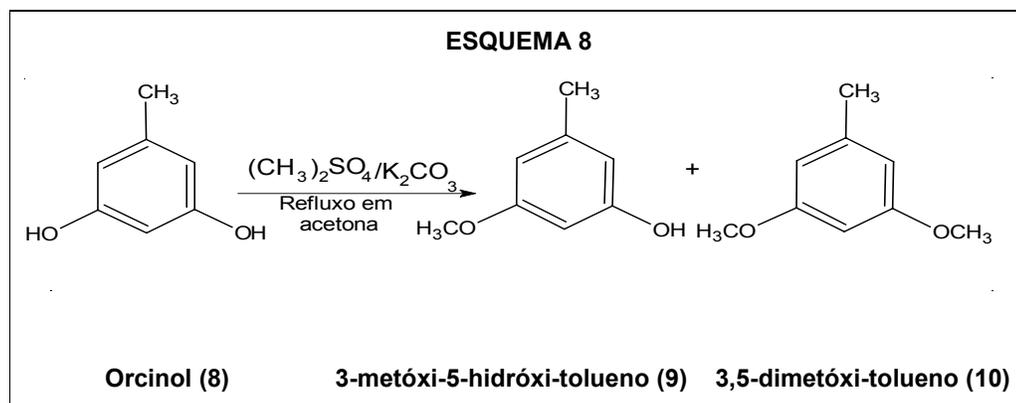
3.4 Preparação de o-derivados orcinólicos

Uma outra substância também estudada em nosso trabalho foi o orcinol. Esperávamos uma boa comparação das atividades biológicas apresentada por essa substância à despeito da ausência do grupo carboxila no orcinol e seus derivados, devido a semelhança da estrutura deste com o orselinato de etila (3). Portanto as respostas conseguidas com a série dos orcinóis poderia dar bons indícios da influência do grupo carboxila na atividade biológica.

3.4.1 Metoxilação

O objetivo principal da metoxilação era conseguirmos um procedimento experimental que produzisse como produto majoritário o 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno (9), ao qual seria adicionado um grupo benzenossulfonato para a posterior tentativa de acoplamento com um glical (acoplamento de Heck).

Quando o orcinol (8) foi tratado com dimetil sulfato, observamos a formação de dois produtos o 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno (9) e 3,5-dimetóxi-tolueno (10), ESQUEMA 8 .



A análise dos resultados obtidos na reação de metoxilação do orcinol mostrou que a proporcionalidade 9/10 depende da quantidade de dimetil sulfato utilizado e do tempo da reação (Tabela 1).

Várias tentativas da reação de metoxilação do orcinol foram feitas (Tabela 1) objetivando melhorar o rendimento para posterior adição de um grupo substituinte no substrato aglicol.

Tabela 1. Metoxilação do orcinol e as variáveis da reação

Experimento	8 (mmol)	K ₂ CO ₃ (g)	Me ₂ SO ₄ (mmol)	Tempo (horas)	Rendimento (%)		
					9	10	8
A	8,46	6,43	8,46	24	17	33	7,0
B	8,10	6,40	8,46	12	22	22,7	30,
C	16,1	12,2	33,8	18	8,0	60	3,0
D	8,48	6,43	25,4	14	-	76	-

Em todas as tentativas o produto majoritário foi o 3,5-dimetóxi-tolueno (10), porém a maior quantidade do 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno(9) foi conseguida com as condições do experimento B (Tabela 1), onde temos um rendimento de 21,5% do orcinol monometoxila.

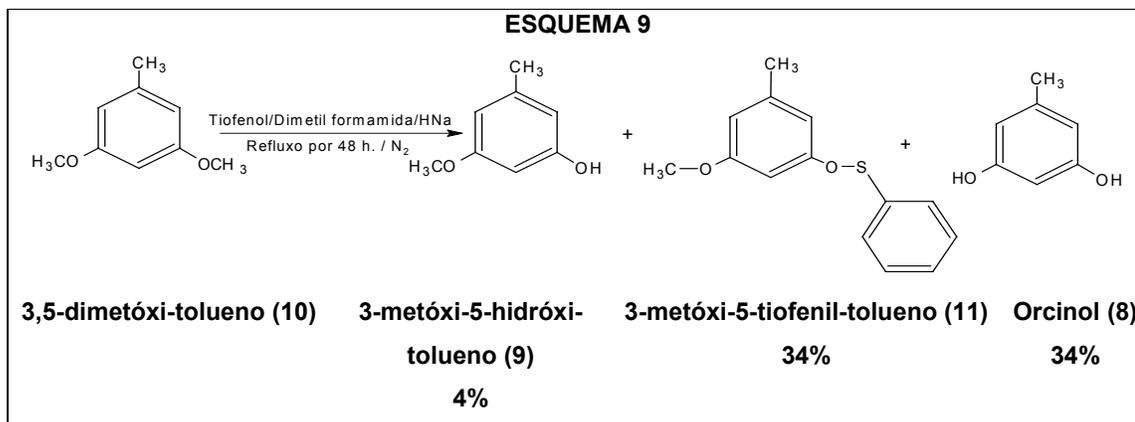
Quando utilizamos grande excesso de dimetil sulfato (experimento D, 3 equivalente) na reação de metoxilação produzimos apenas um produto, o qual foi identificado como sendo o 3,5-dimetóxi-tolueno (10) em um rendimento de 76%.

Estes resultados podem ser discutidos estatisticamente, pois à medida que a quantidade de moléculas monometoxiladas aumenta no meio reacional, aumenta também a probabilidade destas moléculas reagirem novamente pelo reagente dimetil sulfato havendo a produção do composto dimetoxilado em maior quantidade.

Como a reação de metoxilação do orcinol apresentou o produto não desejado dimetilado, optamos por metilação total do orcinol com posterior desmetilação seletiva.

3.4.2 Tentativa da monodesmetoxilação seletiva do 3,5-dimetóxi-tolueno

Foi tentada a monodesmetoxilação seletiva de uma das metoxilas do 3,5-dimetóxi-tolueno (10), para então, prosseguirmos com a adição de um grupo substituinte (benzenossulfonila ou triflato) na hidroxila livre. Os produtos da reação de desmetoxilação foram o 3-metóxi-5-tiofenil-tolueno (11), 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno (9) além do orcinol totalmente desmetoxilado. Os compostos foram isolados por coluna cromatográfica eluída com Hexano/Acetato de Etila 7/3 v/v e analisados por RMN ^{13}C , ^1H e Massa. Sendo que o composto 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno (9) foi obtido em pequena quantidade (4%).

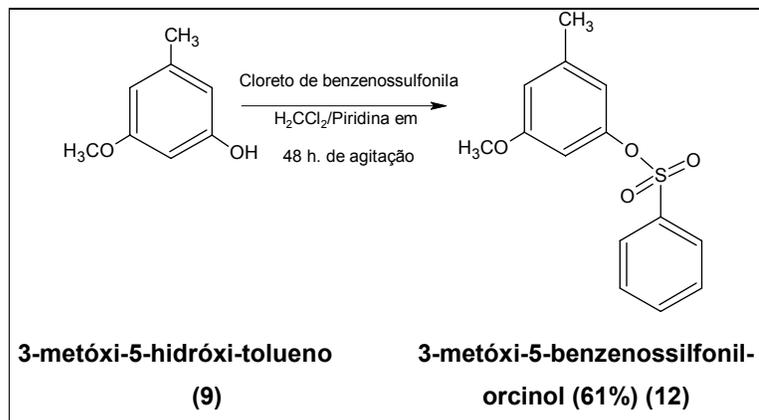


3.4.3 Inserção de grupos substituintes (Benzenossulfonil e triflato) nos derivados do orcinol

A introdução de grupos substituintes, como por exemplo, benzenossulfonila e triflato, foram tentadas no derivado do orcinol, 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno (9).

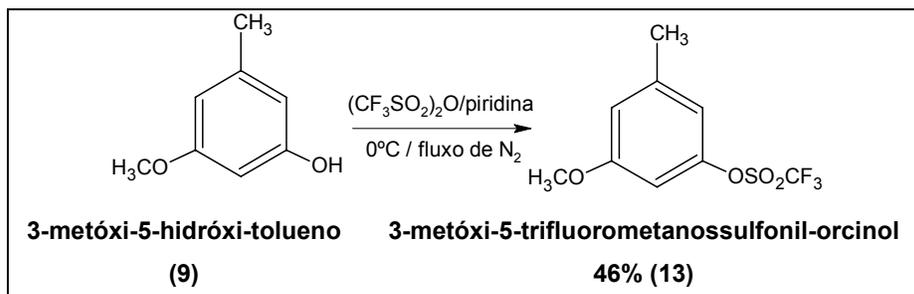
O 3-benzenossulfonil-5-metóxi-tolueno (12) foi obtido como descrito na parte experimental pela reação de 9 com um rendimento de 61%. Porém, como o R_f do produto coincidiu com o do material de partida na CCD, foi necessária uma análise por CG Massa e elucidação dos espectros de RMN H¹ e C¹³ do produto reacional.

ESQUEMA 10



Outro produto também foi obtido através da reação de **9** com o anidrido trifílico, formando assim o 3-metóxi-5-trifluorometanossulfonil-orsinol (**13**) com rendimento de 46%. A sua identificação realizou-se por análises de espectros de RMN ^{13}C e ^1H e infravermelho.

ESQUEMA 11

3.5 Modificações estruturais do p-cresol²⁵

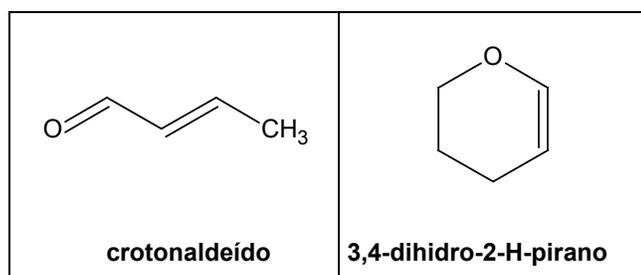
Resolvemos utilizar o p-cresol, por apresentar uma estrutura química mais simples do que o orselinato de etila e orcinol e ao mesmo tempo possuir os grupos funcionais pertencentes aos dois compostos de interesse. Dessa forma 4-trifluorometanossulfonil-tolueno (**14**) seria um bom modelo para os testes iniciais do acoplamento com a unidade glicil (ESQUEMA 12).

²⁵ ECHAVARREN, A.; STILLE, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, p. 5478-5486, 1987.

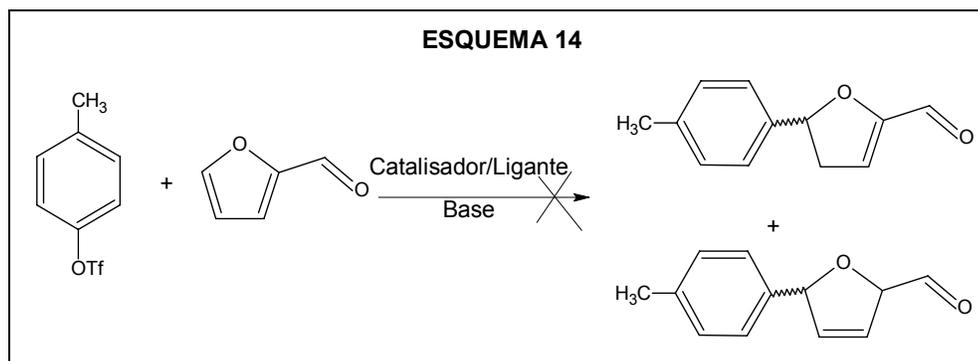
Para este teste, seguimos o método definido por Jeffery²⁷, porém com algumas modificações em determinados pontos da reação, como por exemplo, o tipo de olefina, temperatura e tempo de reação.

Foram feitas duas tentativas, das quais não obtivemos resultados satisfatórios, devido a precipitação de paládio no meio reacional, o que prejudica a ação do metal paládio em catalizar o acoplamento carbono-carbono na reação de Heck. Nas duas reações foram usados o iodo benzeno como grupo aril substituído, porém a olefina foi diferenciada para os dois processos (ESQUEMA).

ESQUEMA 13



Dando continuidade aos nossos estudos, tentamos, então, estabelecer condições da reação de acoplamento, utilizando como unidade aglial não um iodeto mais um triflato. O derivado do p-cresol foi escolhido para o teste (ESQUEMA).



Em todos os métodos foram utilizados 4-trifluorometanossulfonil-tolueno, como substrato, e furfural aldeído como olefina glicial. No método 1 utilizamos brometo de tetrabutilamônio (Bu_4NBr) como ligante, o qual foi substituído por 1,3-bis(difenilfosfina)propano (DPPP) no método 2. Os dois métodos apresentaram as mesmas características, tais como, precipitação do paládio e coloração escura do

²⁷ JEFFERY, T.; DAVID, M. *Tetrahedron Letters*. **35**, p. 5751-5754. 1998

meio reacional. Além do que, em nenhuma das reações obtivemos o produto de acoplamento esperado.

Já o método 3 apresentou a formação de alguns produtos, porém sem a possibilidade de podermos isolá-los devido a uma mistura complexa de compostos (várias manchas na placa ccd). No método 3 foram utilizados N,N diisopropilamina como base e Pd₂(dba)₃.dba como catalisador. Por causa da pequena quantidade em massa obtido, e da complexidade da mistura, não foi possível o isolamento e identificação dos mesmos (Tabela 2).

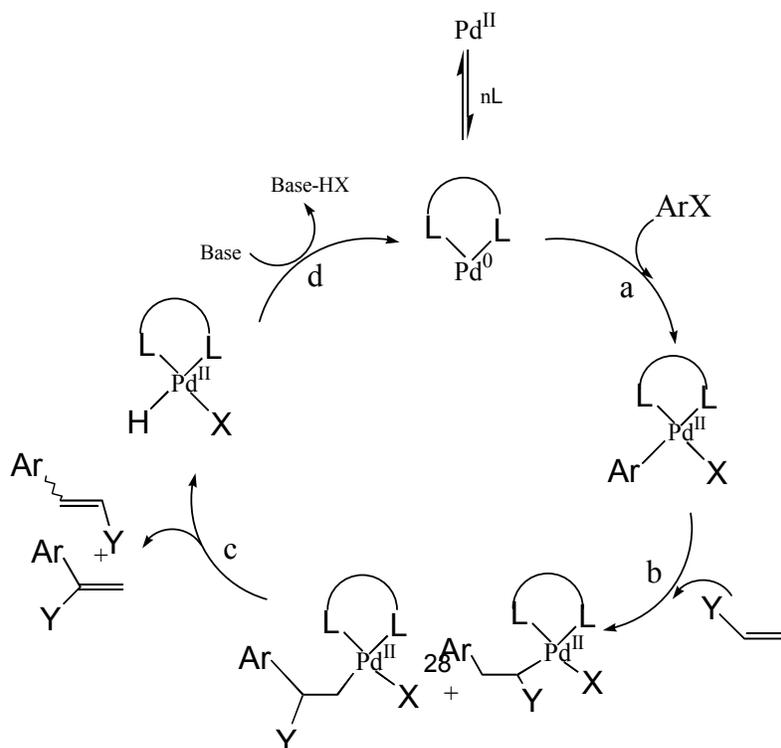
Tabela 2. Catalisadores, ligantes e bases utilizados no acoplamento de Heck.

Método	Catalisador	Ligante	Base	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (horas)
1	Pd(OAc) ₂	Bu ₄ NBr	KOAc	DMF	60-70	24
2	Pd(OAc) ₂	DPPP	KOAc	DMF	60-70	24
3	Pd ₂ (dba) ₃ .dba	-	N,N diisopropilamina	DMF	65	6

As condições reacionais requeridas para o acoplamento.

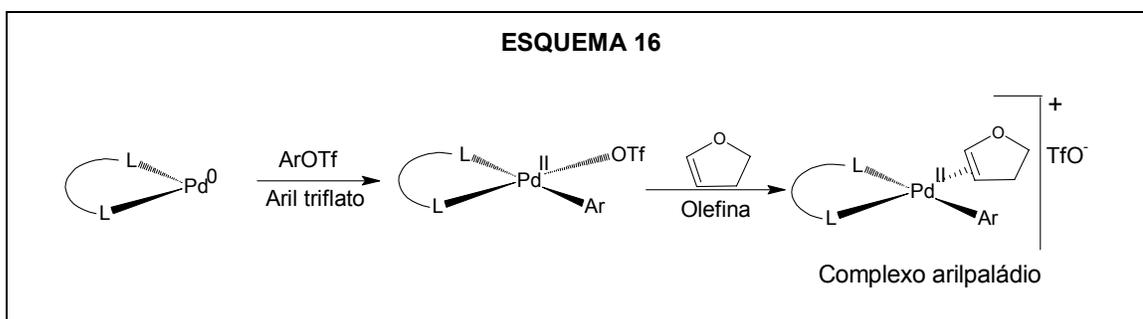
Para podermos explicar os problemas enfrentados no acoplamento carbono-carbono proposto neste trabalho, devemos inicialmente entender o processo do ciclo catalítico do paládio na reação de Heck (ESQUEMA 15).

ESQUEMA 15



Podemos observar no ciclo catalítico, apresentado acima, que para iniciar o processo de acoplamento é necessário o metal paládio no estado de oxidação zero. Esta espécie é produzida “in situ” com o auxílio de um grupo ligante bidentado, que transfere seus elétrons para o Pd^{2+} .

Na etapa a do ciclo o Pd^0 faz inserção oxidativa na ligação Ar-x, passando a Pd^{2+} . A adição oxidativa forma um complexo quadrado planar, que por sua vez, favorece a aproximação do sistema π da olefina com o do metal favorecida pela diminuição do impedimento estérico por cima e por de baixo do plano de coordenação (ESQUEMA 16).



Na próxima etapa uma molécula de alceno é coordenado (etapa b). Tanto o alceno quanto o grupo aril adotam a orientação cis, influenciados principalmente pela presença do ligante bidentado. O alceno inserido na ligação σ -arilpaládio forma um complexo arilpaládio com um estado transição de quatro-centros (ESQUEMA).

Depois da cis-adição do alceno, a reação prossegue com a cis-eliminação de uma espécie hidro-paládio redutiva, que em presença de uma base, regenera o paládio(0), que poderá novamente participar de uma nova reação de acoplamento.

O bom desempenho, em termos de velocidade de reação e rendimento, descrito na literatura²¹ observado para a arilação de olefinas heterossustituídas catalizada por paládio, pode estar relacionado com a alta estabilidade do correspondente complexo de paládio(0) e a uma maior eficiência do ciclo catalítico, que facilita a etapa de adição oxidativa, por causa do aumento da densidade de carga no complexo do metal de paládio(0).

Outro aspecto importante é utilização de aril triflato no acoplamento de Heck, considerado como bom grupo de saída, o que também favorece a formação de produtos acoplados e a regeneração do paládio no ciclo catalítico.

Contudo, as reações de acoplamento relatadas neste trabalho, apresentaram a precipitação do metal de paládio no meio reacional, o que impediu o desempenho do ciclo catalítico demonstrado no ESQUEMA 16.

3.7 Atividade citotóxica

Muitos compostos naturais ou modificados novos são caracterizados e não são submetidos a avaliação de testes de atividade biológica. Suas propriedades biológicas podem permanecer durante muitos anos desconhecidas. Isso se deve, em parte, a dificuldades de realização de ensaios biológicos em laboratórios de Química de Produtos Naturais. A pesquisa por atividades farmacológicas específicas, por exemplo, a atividade antineoplásica, emprega bioensaios de alto custo e a pesquisa por atividades específicas, em geral, sobrepõem outras atividades interessantes que não são detectadas.

O teste de atividade citotóxica sobre *Artemia sp*, um micro-crustáceo de água salgada, é uma excelente opção para uma varredura prévia de compostos que podem ser potencialmente ativos e usados para testes mais refinados de atividade biológica específica. Isso se deve ao baixo custo da técnica, ao pequeno tempo de execução e utilização de pequenas quantidades de material.

Na tabela mostrada abaixo estão resumidos os resultados dos testes realizados com a *Artemia sp*, utilizado como uma indicação preliminar de potencial atividade biológica.

Os dados obtidos à partir dos ensaios biológicos foram lançados no programa PROBITOS²⁸ para obtenção de suas respectivas concentrações letais.

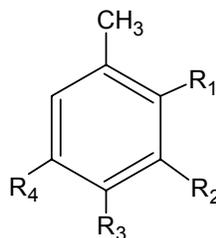


Tabela 3. Derivados de orselinato de etila, do orcinol e outros fenóis testados com *artemia salina* (TAS).

²⁸ FINNEY, D.J. *Probit Analysis* 3rd. Cambridge University Press, Cambridge, 1971.

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	LC ₅₀ [*] (µM)	LogP ^{**}
orcinol(8)	H	OH	H	OH	650±126,9	1,22±0,21
3-metóxi-5-hidróxi-tolueno(9)	H	OCH ₃	H	OH	931,3±10,8	1,98±0,22
3,5-dimetóxi-tolueno(10)	H	OCH ₃	H	OCH ₃	2039,62±32,2	2,39±0,23
3-benzenossulfonil-5-metóxil-tolueno(12)	H	φSO ₂	H	CH ₃	223,4±22,1	3,43±0,32
3-tiofenol-5-metóxil-tolueno(11)	H	φS	H	OCH ₃	≥270	5,20±0,44
Orselinato de etila(3)	COOEt	OH	H	OH	495 ± 36 ^{***}	2,91±0,33 ^{***}
4-metóxi-orselinato de etila(5)	H	H	H	CH ₃	93 ± 45 ^{***}	3,42 ± 0,34 ^{***}
2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila(6).	COOEt	OCH ₃	H	OCH ₃	456,7±96,9	2,87±0,33
2,4-dibenzenossulfonil-6-metilbenzoato de etila(7)	COOEt	φSO ₂	H	φSO ₂	>625,37	4,94±0,44
4-trifluormetanossulfonato(14)	H	H	OSO ₂ CF ₃	H	1435,05±45	3,41±0,75

*Valores obtidos com 95% de confiança usando o programa PROBITOS²⁸.

**Valores obtidos com 95% de confiança usando o programa ACD LogP.

***Valores obtidos da literatura²².

Foram testados alguns derivados do orcinol e do orselinato de etila, dentre eles, o 3-metóxi-5-orcinol(9), 3,5-dimetóxi-tolueno(10) e o 3-benzenossulfonil-5-metóxil-tolueno (12). Com relação ao composto 2,4-dibenzenossulfonil-6-metilbenzoato de etila (7) não podemos ser conclusivo, pois durante os testes não conseguimos solubilizar totalmente este composto em meio aquoso nas concentrações acima de 625,37µM.

Outros compostos também apresentaram baixa solubilidade em meio aquoso, porém este problema foi amenizado quando usamos 1% de dimetil sulfóxido (DMSO) na solução teste. Com a utilização de DMSO foi necessário fazermos um branco com 1% de DMSO.

É importante destacar que o 3-benzenossulfonil-5-metóxil-tolueno (12) apresentou a maior atividade citotóxica em relação aos demais derivados do orcinol. Já a substância que apresentou a menor atividade foi o 3,5-dimetóxi-tolueno (10).

Outro fato importante é a relação da atividade citotóxica com a hidroxila livre nos derivados do orcinol, ou seja, à medida que há um impedimento das hidroxilas do orcinol é observada a diminuição na atividade biológica. Os resultados mostram

também a grande influência do grupo benzenossulfonila quando substituímos uma das hidroxilas do orcinol por este substituinte.

De acordo com estudos anteriores²², os derivados do orselinato de etila também têm sua atividade citotóxica relacionada a uma das hidroxilas livre. Porém, ao substituir as duas hidroxilas livres do orselinato de etila pelo grupo benzenossulfonila observamos uma queda na atividade contra *artemia sp*, quando comparado com o próprio orselinato de etila e com 4-metóxi-6-metilbenzoato de etila (5).

Podemos notar na Tabela 3 a importância do grupo carboxila inserido no esqueleto base do orcinol. A sua presença aumenta a atividade citotóxica, fazendo com que o valor da LC_{50} vá de 650 μ M a 495 μ M. Aumenta também o valor do log P, modificando assim o comportamento químico e bioquímico do composto.

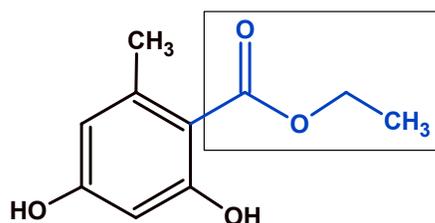


Figura 12. Grupo éster presente na estrutura do orcinol.

Se compararmos os derivados do orcinol e do orselinato de etila, levando em conta a estrutura base do orcinol, fica evidente a participação do grupo carboxila no sítio da atividade citotóxica.

A diferença dos valores da LC_{50} tornam-se maiores, quando analisamos os derivados fenólicos que apresentam uma das hidroxilas metoxilada, como é o caso do 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno que apresenta um LC_{50} de 931,3 μ M e do 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila com um LC_{50} de 93 μ M. Novamente temos a forte influência da carboxila no aumento da atividade citotóxica. Contudo, a hidroxila então metoxilada causa efeitos diferentes nas moléculas de 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno e de 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila.

Ao compararmos o orselinato de etila com seu derivado monometoxilado notamos que este último apresentou um aumento na atividade biológica contra *Artemia salina*. Porém, o derivado monometoxilado do orcinol teve sua atividade

citotóxica diminuída pelo bloqueio de uma das hidroxilas em relação ao próprio orcinol.

O sucesso no desenvolvimento de novos fármacos requer não apenas estudos de otimização das interações ligante receptor, como também é preciso que o fármaco atinja seu alvo². Assim por não apresentarem a biodisponibilidade adequada, muitos compostos candidatos a fármacos que são bastante ativos *in vitro*, apresentam-se inativos *in vivo*. Assim, recomenda-se considerar os parâmetros ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) já no início do planejamento. Sabe-se que a distribuição de um composto tem relação direta com sua lipossolubilidade, podendo esta ser expressa por seu coeficiente de partição, logP.

Para cada composto, os valores de logP foram calculados pelo programa ACD-logP. Podemos dizer que o logP pode também ser um parâmetro de análise da atividade citotóxica, pois como é observado na Tabela 1 os derivados do orcinol apresentam maior atividade biológica quanto menor é o logP. Porém a forte influência do grupo benzenossulfonila em um dos derivados do orcinol elevou o logP e a atividade citotóxica. As hidroxilas fenólicas influenciam na atividade por serem possíveis grupos farmacofóricos assim como o substituinte benzenossulfonila.

Tabela 4. Relação da LC₅₀ (ppm) com a LC₅₀ (µM) dos compostos testados com *Artemia sp* (TAS).

Substância	LC ₅₀ * (ppm)	LC ₅₀ * (µM)	LogP**
orcinol(8)	80,7±15,8	650±126,9	1,22±0,21
3-metóxi-5-hidróxi-tolueno(9)	128,67±10,8	931,3±78	1,98±0,22
3,5-dimetóxi-tolueno(10)	310,5±4,9	2039,62±32,2	2,39±0,23
3-benzenossulfonil-5-metóxil-tolueno(12)	62,2±6,1	223,4±22,1	3,43±0,32
2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila(5)	19,5±9,5	93 ± 45***	3,42 ± 0,34***
2,4-dibenzenossulfonil-6-metilbenzoato de etila(7)	298	>625,37	4,94±0,44
3-tiofenil-5-metóxi-tolueno(11)	66,4	≥270	5,20±0,44
2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila(6)	102,4±21,8	456,7±96,9	3,40±0,33
4-trifluorometanossulfonil-tolueno(14)	344,7±108,2	1435,05±450	3,41±0,75
Orselinato de etila(3)	97,1±7,1	495 ± 36	2,91 ± 0,33

*Valores obtidos com 95% de confiança usando o programa PROBITOS²⁸.

**Valores obtidos com 95% de confiança usando o programa ACD LogP.

*** Valores obtidos da literatura²².

3.8 Atividades antibacteriana

As substâncias foram qualitativamente testadas com as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 5. Atividade antibacteriana de alguns derivados fenólicos

Substância	Bactéria		
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
orselinato de etila	10 mm	12 mm	11 mm
2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila	11 mm	12 mm	11 mm
2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila	X	X	X
3-metóxi-5-hidróxi-tolueno	09 mm	11 mm	10 mm
orcinol	09 mm	X	08 mm
3,5-dimetóxi-tolueno	11 mm	X	10 mm
3-benzenossulfonil-5-metóxil-tolueno	X	X	09 mm
4-trifluorometanossulfonil-tolueno	09 mm	X	X
p-cresol	11 mm	11 mm	11 mm
Amicacina	25 mm	27 mm	22 mm
Imipenem	32 mm	4 5mm	14 mm

Diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano, em milímetros.

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário / UFMS conforme descrito na página 59.

Outro teste bacteriano também foi realizado, porém para a determinação da contração inibitório mínima (CIM). Estes testes foram conduzidos pelo Laboratório de Antibiótico do Departamento de Microbiologia da UFSC²⁹.

Para este ensaio foram testadas 4 bactérias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonas campestris vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum*.

Os resultados demonstraram atividade antimicrobiana em concentrações igual ou acima de 1000 µg/mL para os compostos: orcinol, 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno e 3,5-dimetóxi-tolueno.

As substâncias testadas não apresentaram resultado positivo frente às bactérias testadas em concentração abaixo de 1000µg/mL, porém podemos notar, que neste caso, a presença de hidroxila livre ou mesmo impedida, não exerce influência sobre a atividade frente estas bactérias.

3.9 Atividades fungitóxica

Os ensaios biológicos foram realizados com o fungo *Cladosporium sphaerospermum* Penzig e foram testadas as substâncias 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno, 3,5-dimetóxi-tolueno, 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila, 2,4-dibenzenossulfonil-6-metilbenzenoato de etila, 2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila, 3-tiofenil-5-metóxi-tolueno, 3-benzenossulfonil-5-metóxi-tolueno.

A avaliação da atividade fungitóxica foi feita observando-se ou não o aparecimento de zonas de inibição do desenvolvimento do fungo.

O procedimento deste teste está descrita na página 58 em procedimentos experimentais.

²⁹ SMANIA, A. JR. *et al.* Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineu*. *J. Ethnopharm.* **45**, 177-181, 1995.

Tabela 6. Resultado da atividade fungitóxica

Substâncias	Atividade	LogP
3-metóxi-5-hidróxi-tolueno	-	1.98±0.22
3,5-dimetóxi-tolueno	-	2.39±0.23
3-trifluorometanossulfonil-5-metóxi-tolueno	-	4.97±0.68
3-benzenossulfonil-5-metoxi-tolueno	10 µg	3.43±0.32
3-tiofenil-3-metoxi-tolueno	50 µg	5.20±0.49
Orselinato de etila	50 µg	2.91±0.33
2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila	-	3.42±0.34
2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila	10 µg	2.87±0.33

Os compostos 2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila e 3-benzenossulfonil-5-metóxi-tolueno apresentaram inibição na concentração de 10 µg. Os demais compostos foram ativos na concentração de 50 µg, com exceção do 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno, 3,5-dimetóxi-tolueno, 3-trifluorometanossulfonil-5-metóxi-tolueno e 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila, os quais não apresentaram atividade fungitóxica.

A atividade citotóxica apresenta comportamentos diferentes dependendo do grupo funcional presente na estrutura da molécula em análise.

Devido a grande variação de comportamento não podemos afirmar a influência de um determinado grupo funcional em específico. Para tanto, é necessário uma análise mais detalhada a respeito da estrutura e os fatores que poderiam estar influenciando no sítio da atividade em questão.

4 Material e Equipamentos Utilizados

Para o processo de isolamento e purificação do depsídeo ácido lecanórico foram utilizados clorofórmio e acetona grau PA (Carlo Erba ou Chemco) purificados por destilação no laboratório LP2 do departamento de Química da UFMS. Para isolamento e purificação dos derivados dos compostos fenólicos e dos derivados do orselinato de etila foram utilizados hexano e acetado de etila grau P.A (Chemco ou Merck) com purificação prévia em destilação.

Na preparação de derivados dos compostos fenólicos e do orselinato de etila foram utilizados reagentes P.A (Producta, Aldrich e Merck) com purificações prévia^{30,31}.

Nas separações cromatográficas foram utilizados:

- Gel de sílica 230-400 mesh (Merck) para cromatografia em coluna.
- Placas cromatográficas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck).

A revelação dos cromatogramas em placa foi feita empregando-se solução de metanol e ácido sulfúrico 90:10 seguida de aquecimento, ou p-anisaldeído seguida de aquecimento, ou sulfato cério. Em todas as revelações a placa cromatográfica era inicialmente colocada em câmara de iodo e só depois de sublimado é que a placa era empregada com as soluções anteriores.

Foram utilizados os seguintes programas computacionais: **PROBITOS** para a análise dos resultados obtidos nos ensaios de atividade citotóxica em *Artemia salina*, **ACD-LogP** para a determinação do logP das substâncias testadas.

Os espectros de RMN ¹H (300 MHz), ¹³C (75 MHz) e DEPT 135 foram registrados em espectrômetro Bruker Advance DPX-300. Os solventes deuterados usados foram de procedência Aldrich.

Os espectros de massas de alguns derivados fenólicos foram obtidos por CG-EM no Departamento de Química da UFMS em aparelho Shimadzu QP 5000.

O ponto de fusão do 2-hidróxi-4-metóxi-orselinato de etila foi obtido em aparelho modelo UNI-498.

³⁰ VOGEL, A. I., "Vogel's Textbook of practical organic chemistry", 5^o Ed, Longman, 1989

³¹ PERRIN, D. D., ARMAREGO, W. L. F., PERRIN, D. R., "Purification of Laboratory Chemicals", 3^o Ed., Pergamon Press, Oxford, 1988

5 Procedimentos experimentais

5.1 Obtenção do ácido Lecanórico.

O líquen *Parmotrema tinctorum* foi coletado na região de Piraputanga no Mato Grosso do Sul e passou por um tratamento de limpeza prévio visando a retirada do material aderido ao talo liquênico.

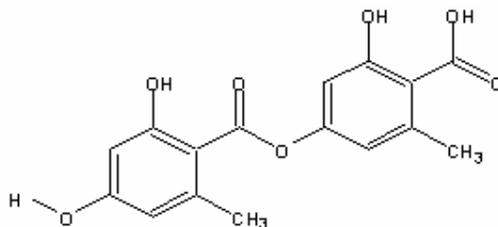
Após a limpeza do talo liquênico, as amostras do líquen foram avaliadas quanto à composição química. Para isso, os líquens foram separados por grupos, respeitando as características morfológicas do material em análise.

De cada amostra, retirou-se um pequeno fragmento que foi triturado, tratado com acetona sob aquecimento em chapa elétrica, até ebulição. Cada micro-extrato obtido foi filtrado, seco e cromatografado em camada fina de sílica.

Todas as amostras que demonstraram a mesma composição química foram então agrupadas (35,79 g) e trituradas em gral de porcelana. O pó obtido foi extraído exaustivamente e seqüencialmente com clorofórmio e acetona em aparelho de Soxhlet.

O depsídeo atranorina foi obtido no extrato clorofórmico com um rendimento bruto de 2,11%, o qual não foi utilizado neste trabalho.

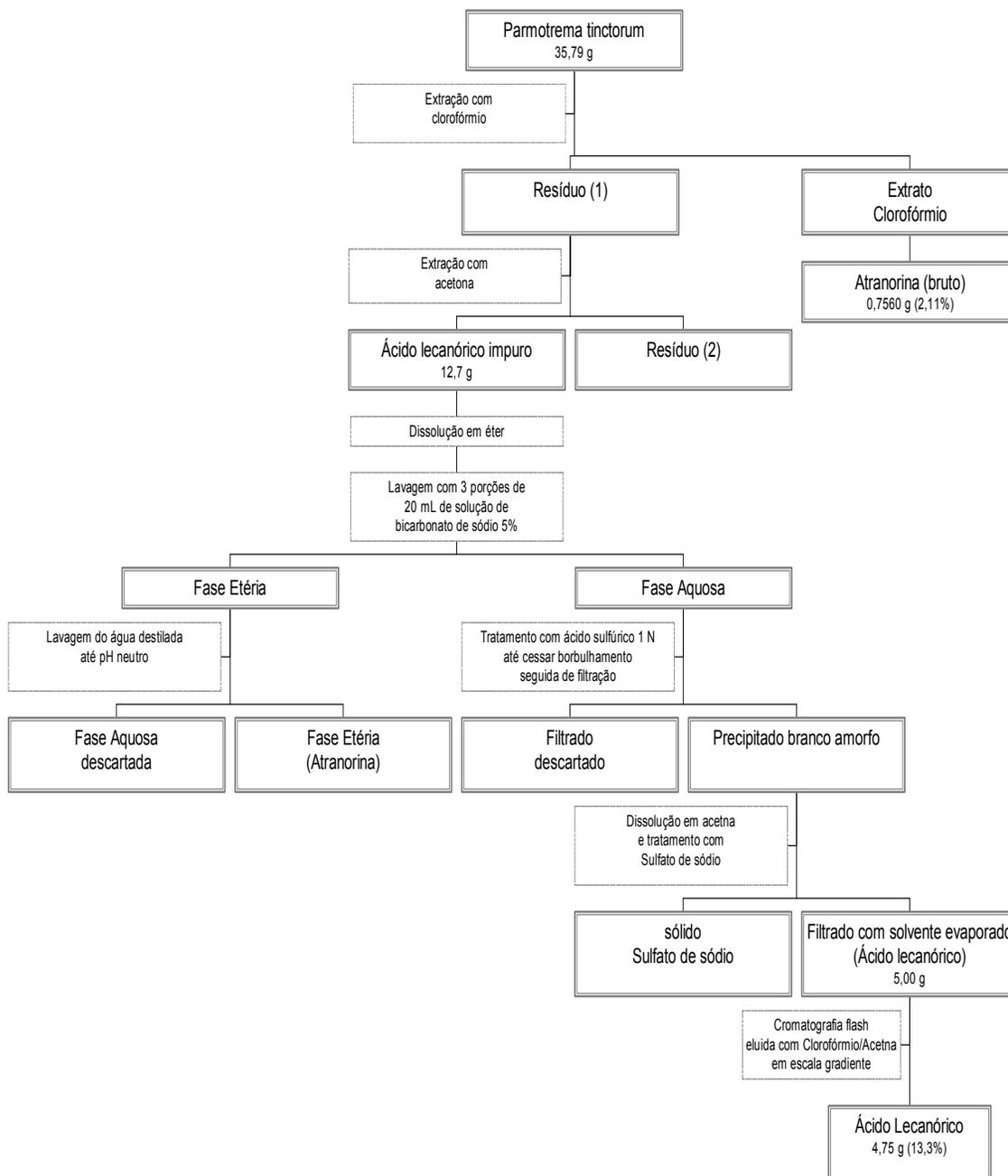
Após a exaustiva extração com clorofórmio o resíduo foi colocado no Soxhlet para extração com acetona. A purificação do ácido lecanórico foi conduzida inicialmente com a evaporação do extrato acetônico, dissolvido em éter e tratado com solução de bicarbonato de sódio a 5%. Adicionou-se a fase aquosa uma solução de ácido sulfúrico 1N até precipitação completa do ácido lecanórico.



ácido lecanórico (1)

O precipitado branco-amorfo obtido foi dissolvido em éter etílico, e o extrato tratado com sulfato de sódio anidro. Após evaporação do éter, o material foi submetido a cromatografia de coluna flash, eluída com clorofórmio/acetona em escala gradiente. Obtivemos 4,75 g (13,3%) de ácido lecanórico puro.

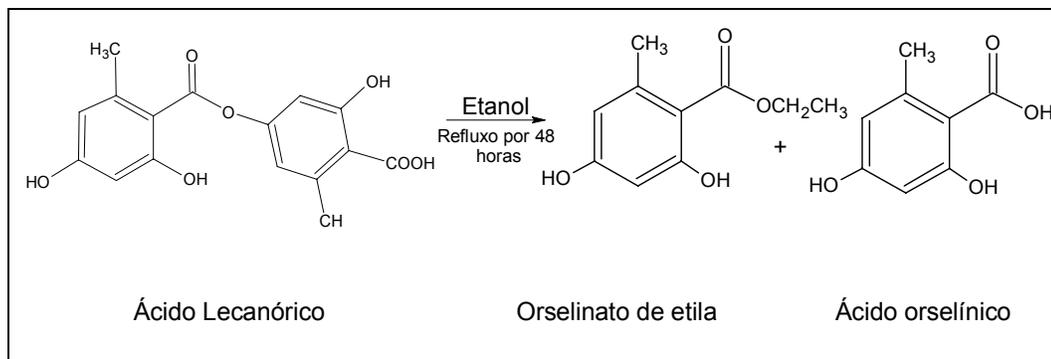
O resumo esquemático da purificação do ácido lecanórico encontra-se no fluxograma abaixo:



O ácido lecanórico foi confirmado por espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e infravermelho (em anexo).

5.2 Preparação do orselinato de etila

Esquema 2



Num balão de 500 mL colocou-se 1,7042 g (5,36 mmol) de ácido lecanórico para reagir com aproximadamente 250 mL de etanol seco. Deixou-se em refluxo por aproximadamente 48 horas.

O produto bruto foi purificado por cromatografia flash utilizando como eluente $\text{HCCl}_3/\text{Acetona}$ 98:2 v/v com polaridade crescente.

O rendimento do produto obtido foi de 68% (0,7191 g) de orselinato de etila.

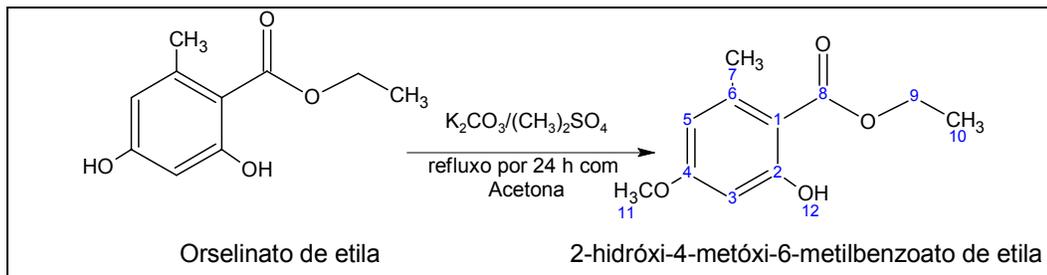
RMN ^1H ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, δ ppm): 1,38 (t, 3H, CH_3); 2,47 (s, 3H, 7- CH_3); 4,38 (q, 2H, CH_2); 6,22-6,23 (m, 2H, ArH); 9,13 (s, 1H, 4-OH); 11,72 (s, 1H, 2-OH). (*Espectro VIII*)

RMN ^{13}C ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, δ ppm): 14,42 (CH_3); 24,39 (7- CH_3); 61,88 (CH_2); 101,62 (5-C); 144,40 (6-C); 112,29 (3-C); 105,39 (1-C); 163,18 (4-C); 166,40 (2-C); 172,55 (8-COO). (*Espectro IX*)

5.3 Derivados do Orselinato de Etila.

5.3.1 Preparação do 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila

Esquema 4



Em um balão de 100 mL colocou-se 52,9 mg (0,27 mmol) de orselinato de etila, 0,8 mL de dimetil sulfato (102,2 mg; 0,81 mmol), 260 mg (1,88 mmol) de carbonato de potássio, 7 mL de acetona e 3 mL de dimetilformamida. A mistura reacional foi deixada sob agitação e refluxo por aproximadamente 24 horas.

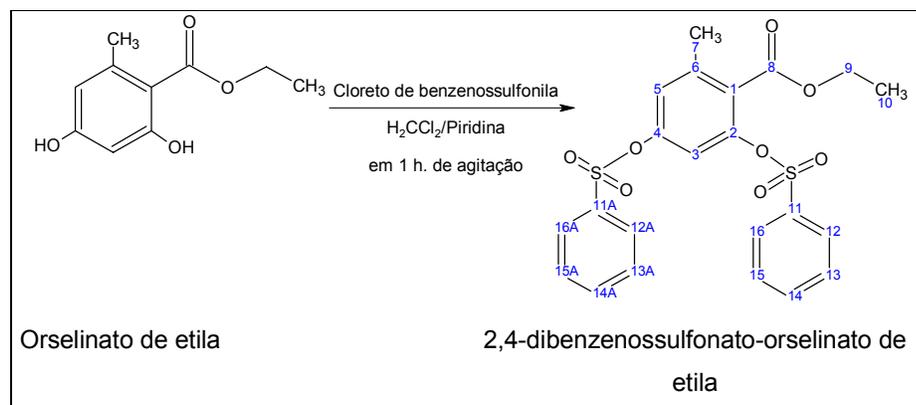
Houve formação de apenas um produto, o qual foi extraído do meio reacional por tratamento com água destilada (3 x 25 mL) e em seguida o solvente orgânico foi evaporado com o auxílio de um rotaevaporador. Obteve-se um sólido branco de ponto de fusão 72-73°C. O rendimento do produto obtido foi de 71,3% (40,2 mg) de 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila.

RMN ¹H (CDCl₃, δ ppm): 1,34 (t, 3H, CH₃); 2,42 (s, 3H, CH₃); 3,72 (s, 3H, CH₃); 4,31 (q, 2H, CH₂); 6,2-6,26 (m, 2H, φ); 11,8 (s, 1H, OH).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ ppm): 14,1 (10-C); 24,4 (7-C); 55,2 (11-CH₃); 61,2 (9-C); 111,1 (5-C); 143,1 (6-C); 98,7 (3-C); 105,3 (1-C); 165,6 (4-C); 163,8 (2-C); 171,752 (8-COO).

5.3.2 Preparação do 2,4-dibenzenossulfonil-orselinato de etila

Esquema 7



Para uma quantidade de 0,1045 g (0,533 mmol) de orselinato de etila foram adicionados 3 mL de diclorometano, 0,11 mL de piridina (195,6 mg; 2,47 mmol) e 0,2 mL (276,8 mg; 1,57 mmol) de cloreto de benzenossulfonila.

A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora.

A extração do produto foi feita com água (30 mL) e com clorofórmio (3 x 50 mL).

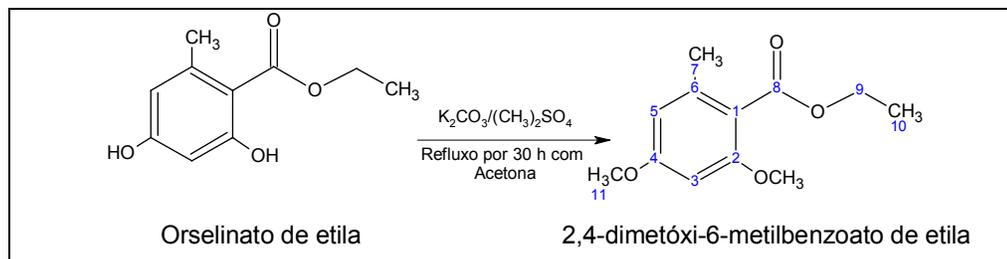
Houve a formação de um único produto com polaridade maior do que a do orselinato de etila. O rendimento deste Produto foi de 0,1000 g (64,2%).

RMN ^1H (CDCl_3 , δ ppm): 1,23 (t, 3H, CH_3); 2,19 (s, 3H, CH_3); 6,70 (q, 2H, CH_2); 6,42-7,76(ArH)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ ppm): 13,94 (10- CH_3); 19,66 (7- CH_3); 61,64 (9- CH_2); 113,83 (5-C); 122,51; 126,62 (12-C e 16-C); 128,11; 129,17 (13-C e 15-C); 134,50 (14-C); 139,75; 146,62 (6-C); 149,48; 164,53 (8-COO).

5.3.3 Preparação do 2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila

Esquema 5



Para uma quantidade de 219,6 mg (1,04 mmol) de orselinato de etila foram adicionados em um balão de 100 mL onde adicionou-se 0,90 mL (672,2 mg; 5,33 mmol) de dimetil sulfato (DMS), 784,2 mg (5,67 mmol) de carbonato de potássio, 45 mL de acetona anidro. A mistura reacional foi deixada em agitação e refluxando por aproximadamente 30 horas. Após o término da reação o K_2CO_3 foi filtrado e lavado com acetona. A fase orgânica (filtrado) foi evaporada à pressão reduzida e o resíduo da reação foi lavado com água (50 mL) para eliminar o excesso de dimetil sulfato (3-5 minutos em agitação). A extração foi feita com acetato de etila (25 mL x 2), lavado com água e seco com Na_2SO_4 . Novamente, a fase orgânica foi evaporado sob pressão reduzida produzindo 105,5 mg (0,47 mmol) de 2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila. A massa do produto obtido representa a 42% de rendimento.

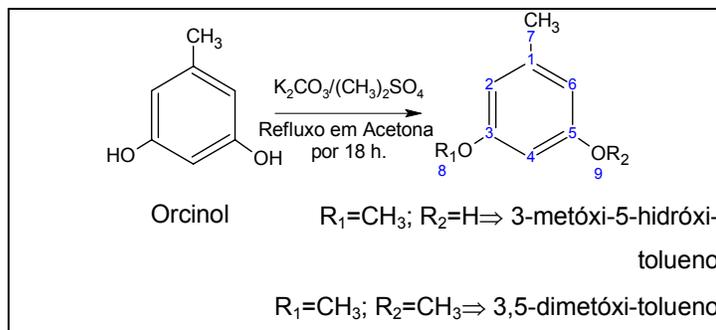
RMN 1H ($CDCl_3$, δ ppm): 1,35 (t, 3H, 10- CH_3); 2,28 (s, 3H, 7- CH_3); 3,76 (s, 3H, 12- CH_3O); 3,78 (s, 3H, 11- CH_3O); 4,35 (q, 2H, 9- CH_2); 6,28(s, 1H, 5-Ar), 6,30 (s, 1H, 3-Ar).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, δ ppm): 14,25 (10- CH_3); 19,81 (7- CH_3); 55,30 (12- CH_3O); 55,84 (11- CH_3O); 60,87 (9-Ar); 96,19 (3-Ar); 116,75 (5-Ar); 106,61 (1-Ar); 137,98 (6-Ar); 158,10 (4-Ar); 161,23 (2-Ar); 168,16 (8-COO).

5.5 Derivados do orcinol.

5.5.1 Preparação do 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno e do 3,5-dimetóxi-tolueno.

Esquema 8



Em um balão de 250 mL colocou-se 2,00 g (16,1 mmol) de orcinol, 3,2 mL de dimetil sulfato (33,83 mmol), 12,2 g de carbonato de potássio e 100 mL de acetona. A mistura reacional foi deixada sob agitação e refluxo por aproximadamente 18 horas.

Após o término da reação, esta foi tratada com HCl 10%. A fase aquosa foi separada da fase orgânica por meio de um funil de separação. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e evaporado sob pressão reduzida para a remoção do solvente. A análise por CCD (eluente: Hex/AcOEt; 7:3 v/v) indicou a formação de dois produtos, que foram isolados por coluna de sílica flash em eluente hex/AcOEt 7:3 v/v. Foram obtidos 1,4650 g (59,8%) de 3,5-dimetóxi-tolueno e 0,1710 g (7,68%) de 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno.

3-metóxi-5-hidróxi-tolueno (7,68% de rendimento)

RMN ^1H (CDCl_3 , δ ppm): 2,24 (s, 3H, 3- CH_3); 2,4 (s, 3H, 5- OCH_3)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ ppm): 21,6 (MeAr); 55,2 (MeO); 160,7 (C-OH)

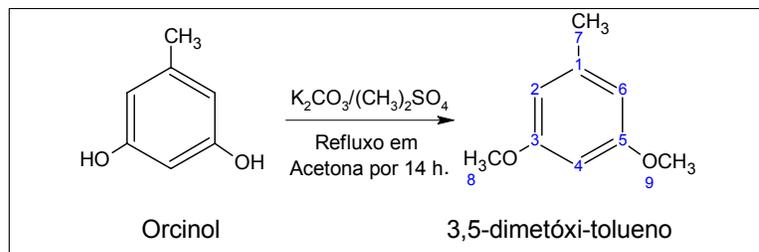
3,5-dimetóxi-tolueno (59,8% de rendimento)

RMN ^1H (CDCl_3 , δ ppm): 2,31(s, 3H, CH_3); 3,77(s, 6H, CH_3); 6,35(m, 3H, Ar).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ ppm): 21,71(MeAr); 55,1(MeO); 97,43(C-6); 106,99(C-2, 4); 140,10(C-2), 160,64(C-1, 5).

5.5.2 Preparação do 3,5-dimetóxi-tolueno.

Esquema 16



Em um balão de 250 mL colocou-se 1.0800 g (8,7 mmol) de orcinol, 2,4 mL (25,4 mmol) de dimetilssulfato, 6,60 g de carbonato de potássio em 55 mL de acetona. A mistura reacional foi deixada em agitação e refluxando por aproximadamente 14 horas.

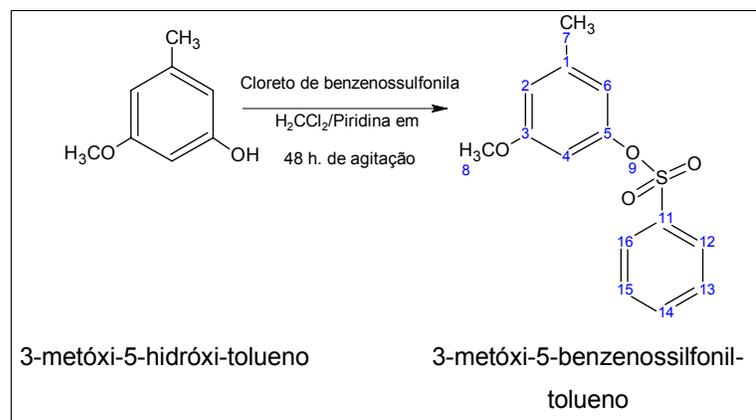
A mistura reacional foi tratada com HCl 10%. A fase aquosa foi separada da fase orgânica por meio de um funil de separação. Em seguida, a fase orgânica foi seca com MgSO_4 e colocada no rota evaporador para a remoção do solvente. O rendimento do produto foi de 75,6% (0,9981 g; 6,6 mmol) de 3,5-dimetóxi-tolueno.

RMN ^1H (CDCl_3 , δ ppm): 2,31(s, 3H, CH_3); 3,77(s, 6H, CH_3); 6,35(m, 3H, Ar).

(Espectro XV em anexo)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ ppm): 21,71 (MeAr); 55,1 (MeO); 97,43 (C-6); 106,99 (C-2 e 4); 140,10 (C-2), 160,64 (C-1 e 5). (Espectro XVI em anexo)

5.5.3 Preparação do 3-metóxi-5-benzenossulfonyl-tolueno



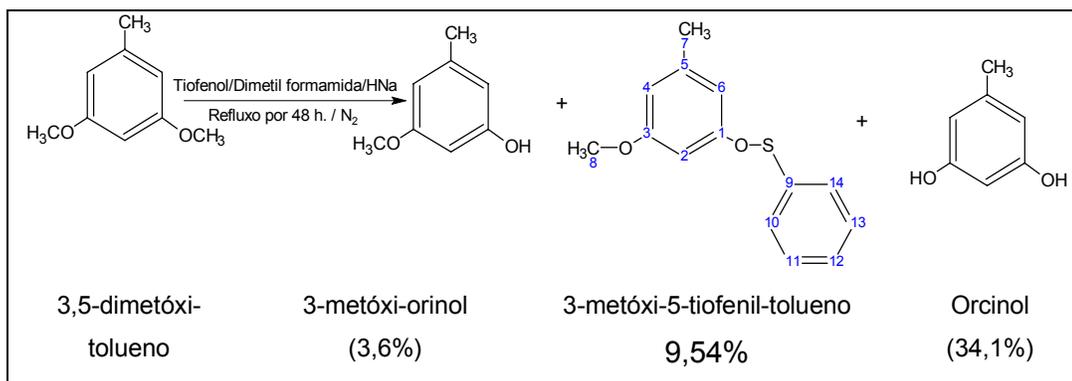
Foram adicionados a um balão de 100 mL 182,1mg (1,33 mmol) de 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno, 0,3 mL (418,6 mg; 2,37 mmol) de cloreto de benzenossulfonila e 0,2 mL (187,5 mg; 2,37 mmol) de piridina em 45 ml de Cl_2CH_2 . A mistura reacional foi agitada a t.a. por 48 horas. Foram obtidos 223,5 mg (61%) de um sólido com P.F. igual a 50-52 °C e identificado com 3-metóxi-5-benzenossulfonil-tolueno.

RMN ^1H (CDCl_3 , δ ppm): 2,2(s, 3H, CH_3); 3,63(s, 3H, CH_3); 6,18-8,93(m, 26H, Ar).
(Espectro XVII em anexo)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ ppm): 19,27(MeAr); 53,18(MeO); 102,86(C-2); 111,68 e 112,93(C-4,6); 139,49(C-5). (Espectro XVIII em anexo)

5.6 Desmetilação do 3,5-dimetóxi-tolueno

ESQUEMA 9



Em um balão de 3 bocas foram adicionados 250 mL de dimetil formamida (DMF) seco, 246 mg de hidreto de sódio (60%) formando uma dispersão oleosa. A suspensão foi agitada sob atmosfera de nitrogênio seco e resfriada com banho de gelo, enquanto uma solução de 0,51 mL (550 mg; 0,5 mmol) de tiofenol em 4 mL de dimetil formamida (DMF) seco foram adicionados vagarosamente sobre a mistura reacional por um período de 20 minutos.

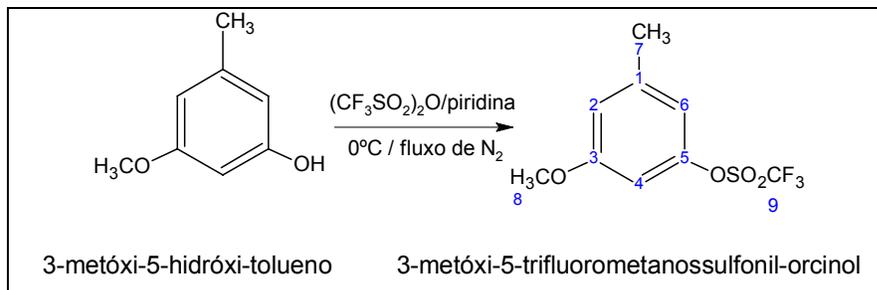
O banho de gelo foi removido e a agitação prosseguiu por mais 10 minutos. Uma solução de 380 mg (2,50 mmol) de 3,5-dimetóxi-tolueno em 3 mL de dimetil formamida (DMF) foram adicionados de uma só vez e a mistura foi então deixada em refluxo sob nitrogênio por 48 horas. A mistura foi resfriada adicionando-se uma porção de água gelada (50 mL) e extraída com duas porções (2 x 50 mL) de éter de petróleo, o qual foi descartado. A fase aquosa foi acidificada com HCl 4M gelado até pH neutro. Em seguida a reação foi extraída com três porções de éter (3 x 50 mL). Os extratos etérios foram combinados e lavados com 50 ml de solução saturada de NaCl e seco com MgSO₄. Após a evaporação do solvente em rotaevaporador o material residual foi purificado em cromatografia flash eluída com hexano/acetato de etila 7:3 (v/v) obtendo-se 105,6 mg (34,1%) de orcinol e 58,7 mg (9,54%) do 3-tiofenil-5-metóxi-tolueno. O 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno também foi obtido, porém em pequena quantidade (12,4 mg; 3,6%).

RMN ¹H (CDCl₃, δ ppm): 2,33 (s, 3H, CH₃); 3,73(s, 3H, CH₃O); 6,25 – 6,41 (m, 3H, Ar); 6,94 – 7,42 (m, 5H, Ar). (*Espectro XXIII*)

RMN ¹³C (CDCl₃, δ ppm): 21,36 (C7); 56,13 (C8); 97,42 (C2); 109,87 (C6); 124,47 (C4); 125,45 (C10 e C12); 128,66 (C9 e C13); 138,46 (C5); 146,59 (C11); 157,75(C3); 162,11 (C1).

5.7 Preparação do 3-metóxi-5-trifluorometanossulfonil-orsinol.

ESQUEMA 11



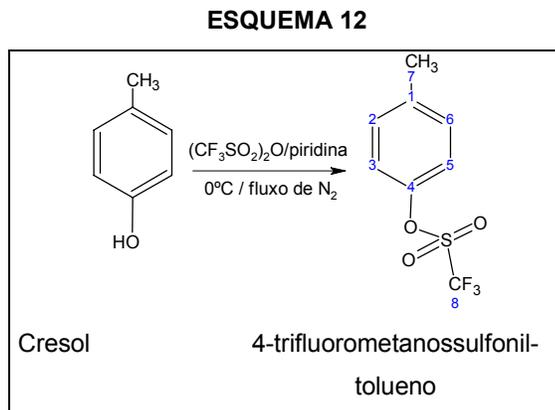
Adicionou-se em um balão de duas bocas, equipado com condensador de refluxo e “peixinho” para agitação magnética, 210,0 mg (1,52 mmol) de 3-metóxi-5-metil-orsinol em 3 mL de piridina seca e tratada²⁹. O material ficou sob fluxo de N₂ e agitação por aproximadamente 5 minutos. Após este procedimento, resfriou-se o sistema de reação, com banho de gelo, e adicionou-se lentamente 0,3 mL (476,5 mg; 169 mmol) de anidrido trifluorometanossulfônico. Em seguida, depois que todo anidrido trifluorometanossulfônico foi adicionado, deixou-se a mistura reacional sob fluxo de N₂ e agitação em banho de gelo, até quando retirou-se o gelo e manteve-se a agitação (overnight)

A reação foi extraída adicionando-se água destilada e acetato de etila, sendo que a fase orgânica foi tratada com MgSO₄ e evaporado sob pressão reduzida. Foram obtidos 166,10 mg (0,61 mmol) de 3-metóxi-5trifluorometanossulfonil-orsinol correspondente a 46,3% de rendimento.

O produto foi identificado por espectros de RMN de ¹H e ¹³C.

5.8 Derivados do cresol

5.8.1 Preparação do 4-trifluorometanossulfonyl-tolueno.



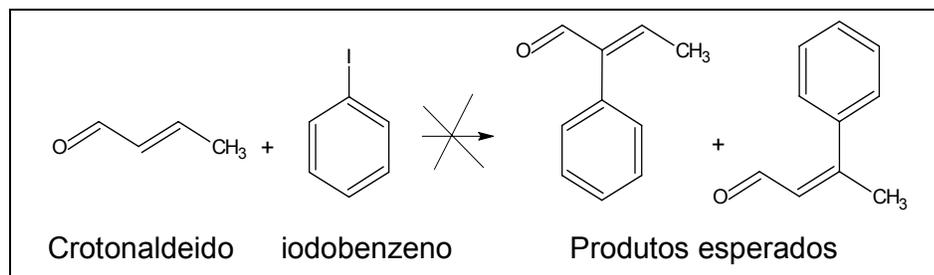
Em um balão de 50mL foram adicionados, sob atmosfera de N₂ e agitação, p-cresol (1g, 9,25 mmol), piridina (4 mL), e peneira molecular 4 Ångstrons. Após 6 horas de agitação a mistura reacional foi resfriada em banho de gelo e adicionou-se trifluorometanosulfônico anidro (1,8 mL, 10,7 mmol) gota a gota. A reação foi mantida à 0°C com agitação e fluxo de N₂ por 5 minutos, em seguida elevou-se a temperatura do sistema até a temperatura ambiente, na qual deixou-se por 25 horas sob agitação e fluxo de N₂. Foram adicionados então ao meio reacional 50 mL de água e extraído com éter etílico (3x25 mL). As fases etéreas foram combinadas e a solução resultante foi lavada com H₂O (20 mL), HCl 10% (2x20 mL), H₂O (20 mL) e solução saturada de NaCl (20 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro e concentrada em rotaevaporador. O resíduo foi purificado em coluna flash com eluente hexano/AcOEt (7:3)v/v. O rendimento foi de 51,45% (1,1427 g, 4,76 mmol) 4-trifluorometanossulfonyl-tolueno.

RMN H¹ (CDCl₃, δ ppm): 2,35 (s, 3H, CH₃); 7,1 – 7,5 (m, 4H, Ar)

RMN C¹³ (CDCl₃, δ ppm): 20,8 (C₇); 116,6 (C₄); 120,9 (C₃, C₅); 130,3 (C₂, C₆); 138,5 (C₁); 147,6 (q, C₈).

5.9 *Tentativas de Acoplamento*5.9.1 *Acoplamento com crotonaldeído*

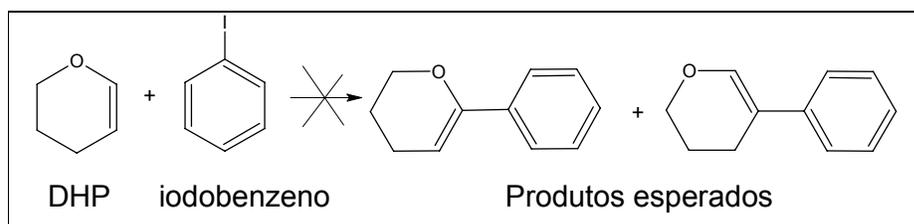
ESQUEMA 18



Em um balão de 100 mL foram adicionados iodeto de benzeno e 1,5 mL acetonitrila com 10% de água, sob agitação colocou-se 0,11 mL (141,8 mg; 2,00 mmol) de crotonaldeído, 345,5 mg (2,5 mmol) de K_2CO_3 , 26,2 mg (0,1 mmol) de trifetilfosfina (Ph_3P), 322,4 mg (1,00 mmol) de brometo de tetrabutilamônio e 11,22 mg (0,05 mmol) de $Pd(OAc)_2$. Deixou-se por aproximadamente 1 hora sob agitação em temperatura de 40-55 °C. A extração foi feita com água e HCl 10%, onde a fase orgânica foi evaporada e seca sob vácuo. Os produtos não foram formados devido à precipitação do paládio no meio reacional, o que também dificultou a visualização das manchas na placa de cromatografia de camada delgada.

5.9.2 *Acoplamento com 3,4-dihidro-2-H-pirano (DHP)*

ESQUEMA 19

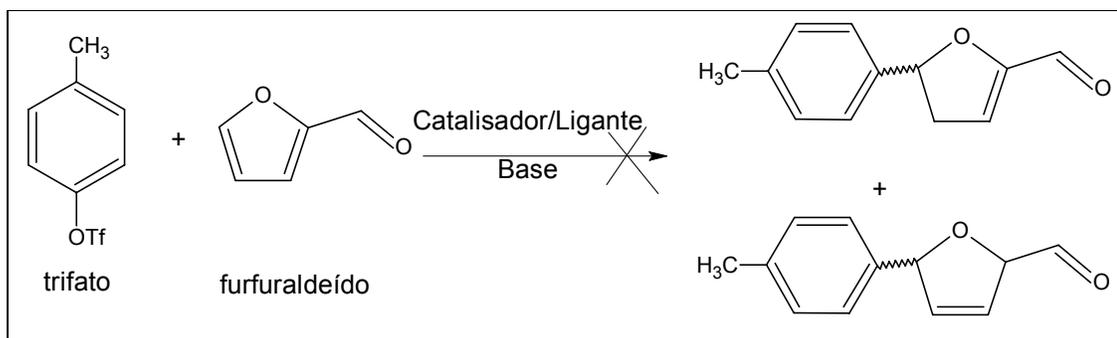


Em um balão de 100 mL foram adicionados iodeto de benzeno e 1,5 mL acetonitrila com 10% de água, sob agitação colocou-se 72,0 mg (2,00 mmol) de 3,4-dihidro-2-H-pirano, 348,0 mg (2,50 mmol) de K_2CO_3 , 26,5 mg (0,10 mmol) de Ph_3P ,

326,5 mg (1,00 mmol) de brometo de tetrabutilamônio e 13,5 mg (0,05 mmol) de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$. Deixou-se por aproximadamente 19 hora sob agitação em temperatura ambiente. A extração foi feita com água e HCl 10%, onde a fase orgânica foi evaporado e seca sob vácuo. Durante a reação podemos observar, através da cromatografia de camada delgada, algumas manchas com Rfs diferentes aos dos materiais de partida. Contudo, não foi possível separarmos os produtos, pois tínhamos várias manchas de cor laranja com Rfs muito próximos uns dos outros, dificultando uma possível separação dos mesmos.

5.9.3 Acoplamento de furfuraldeído com 4-trifluorometanosulfonil-tolueno.

ESQUEMA 14



5.9.3.1 Método 1

Em um balão 50 mL com agitador magnético, sob atmosfera de N_2 , foram adicionados 0,38 mL (442 mg; 4,6 mmol) de furfuraldeído, 14,83 mg de brometo de tetrabutilamônio (Bu_4NBr) (0,046mmol), 120 mg de KOAc (1,225 mmol) e 5,5 mg de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,245 mmol) em 3mL de dimetil formamida (DMF), o balão foi mergulhado em banho de óleo a 60-70°C e só então foi adicionado na mistura 110,5mg de 4-trifluorometanosulfonil-tolueno (0,46 mmol). O aquecimento foi mantido por 4 horas, em seguida a mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente em overnight. Durante todo o período várias análises por ccd indicavam que o material

de partida não estava sendo consumido. Houve o aparecimento de muitas manchas a baixo ao do material de partida (possível degradação).

5.9.3.2 Método 2

Em um balão 50 mL com agitador magnético, sob atmosfera de N₂, foram adicionados 0,40 mL (465,3 mg; 4,84 mmol) de furfuraldeído, 13,2 mg (0,03 mmol) de DPPP, 128 mg (1,225 mmol) de KOAc, 23,1mg (0,103 mmol) de Pd(OAc)₂ e 395 mg (1,225 mmol) de TEBAB em 3,5 mL de DMF. O balão foi mergulhado em banho de óleo a 60-70°C e só então foi adicionado na mistura 114,5 mg (0,48 mmol) de 4-trifluorometanosulfonil-tolueno. O aquecimento foi mantido por 6 horas, em seguida a mistura foi deixada sob agitação à temperatura ambiente em overnight. Durante todo o período várias análises por ccd indicavam que o material de partida não estava sendo consumido e estava em processo de degradação.

5.9.3.3 Método 3

Em um balão 50mL com agitador magnético, sob atmosfera de N₂, foram adicionados 0,5 mL (442 mg; 4,6 mmol) de furfuraldeído, 1,57 mL (1,82 mg; 19 mmol) de N,N diisopropilamina, 8,35 mg (0,015 mmol) de Pd₂(dba)₃.dba e 395mg (1,225 mmol) de TEBAB em 3,5 mL de DMF com peneira molecular 4 Ångstrons. O balão foi mergulhado em banho de óleo a no máximo 65°C e só então foi adicionado na mistura 110,4mg (0,46 mmol) de 4-trifluorometanosulfonil-tolueno. O aquecimento foi mantido por 6 horas, em seguida a reação ficou sob agitação à temperatura ambiente em overnight. A mistura reacional foi deixada em aquecimento (65°C no máximo) por mais 7 horas ao dia nos próximos 3 dias seguintes. O produto formado foi extraído com éter de petróleo o qual filtrou-se através de celite, obtendo um líquido de cor vermelho. O filtrado foi purificado por cromatografia flash Éter de petróleo / AcOEt 15%. Não foi possível isolarmos o produto devido a pequena quantidade de material formado. As primeiras frações (1 – 20) foram colocadas juntas e em seguida analisadas em espectro de RMN de H¹ e C¹³, da qual não foi obtida nenhuma resposta.

5.9.4 *Acoplamento de 2,3-dihidrofurano com 1-trifluorometanossulfonato-3-metóxi-5-metilbenzeno.*

Foram adicionados em um balão de 3 bocas 166,1 mg (0,65 mmol) de 1-trifluorometanossulfonato-3-metóxi-5-metilbenzeno em 5 mL de dimetilformamida (DMF) sob fluxo de N₂ e com agitação, seqüencialmente adicionou-se 0,1 mL (0,780 mmol) de trietilamina, 0,3 mL (227,5 mg; 3,25 mmol) de 2,3-dihidrofurano, 7,2 mg (0,04 mmol) de neocuproina e 7,2 mg (0,033 mmol) de acetato de paládio (Pd(OAc)₂). A mistura reacional foi agitada por aproximadamente 25 horas com uma temperatura de 80 °C. A reação foi deixada em overnight e o aquecimento foi desligado, o qual foi religado no dia seguinte.

A extração foi feita com acetato de etila e logo em seguida lavou-se com água destilada. O material resultante apresentou apenas uma mancha na cromatografia ccd, sendo posteriormente identificada como 1-trifluorometanossulfonato-3-metóxi-5-metilbenzeno (material de partida) e apresentou uma massa igual a 135,3 mg (81,5% de rendimento) do material de partida recuperado.

5.10 *Teste da Artemia Salina (TAS).*

Para os testes biológico foi preparada solução de sal-marinho na concentração de 38 g/L. Os ovos de *Artemia sp*, adquiridos comercialmente em lojas de aquaristas, foram adicionados à solução de sal-marinho, mantido em uma cuba de vidro grande. O sistema foi mantido iluminado com lâmpada de 60W e sob aeração com bomba de oxigênio própria para aquário.

Após a eclosão dos ovos com 48 horas, 10 larvas (em média) foram colocadas em pequenos frascos de vidro de boca larga contendo uma concentração específica da substância teste num volume final de 3mL. Os testes foram conduzidos em triplicata para cada diluição, branco e padrão. Como substância padrão foi utilizado sulfato de atropina nas concentrações de 1500 ppm, 1250 ppm, e 1000 ppm. Os dados obtidos à partir dos ensaios biológicos foram lançados no programa PROBITOS²⁸ para obtenção de suas respectivas concentrações letais.

5.10.1 Concentrações testadas no TAS

Para cada composto, foram inicialmente testadas concentrações em intervalos indefinidos, objetivando uma avaliação prévia. Após a análise desta varredura prévia foram testadas concentrações próximas a LC₅₀ determinado pelo programa probitos, no intervalo da varredura prévia.

Portanto, as tabelas mostradas abaixo contém as concentrações testadas para cada composto analisado neste trabalho.

Tabela 7. Concentrações testadas do orcinol no TAS.

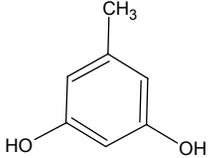
Conc (ppm)	Conc (µM)	Estrutura
508	4092,3	 <p>Fórmula Molecular = C₇H₈O₂ Massa Molecular = 124,137 Composição = C(67.73%) H(6.50%) O(25.78%)</p>
254	2046,2	
152,4	1227,7	
68	547,8	
50,8	409,2	
8,84	71,2	
4,46	35,9	
3,4	27,4	

Tabela 8. Concentrações testadas do 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno no TAS.

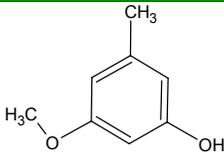
Conc (ppm)	Conc (µM)	Estrutura
688	4979,589	 <p>Fórmula Molecular = C₉H₁₀O₂ Massa Molecular = 138,164 Composição = C(69.54%) H(7.30%) O(23.16%)</p>
344	2489,795	
206,4	1493,877	
140	1013,289	
105	759,9664	
91	658,6376	
68,8	497,9589	

Tabela 9. Concentrações testadas do 3,5-dimetóxi-tolueno no TAS.

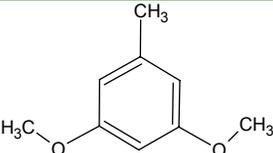
Conc (ppm)	Conc (µM)	Estrutura
672	4415,533	 <p>Fórmula Molecular = C₉H₁₂O₂ Massa Molecular = 152,190 Composição = C(71.03%) H(7.95%) O(21.03%)</p>
336	2207,767	
201,6	1324,66	
202	1327,288	
70,7	464,5509	
67,2	441,5533	
54,5	358,105	
40,4	265,4577	

Tabela 10. Concentrações testadas do 3-benzenossulfonil-5-metóxi-tolueno TAS.

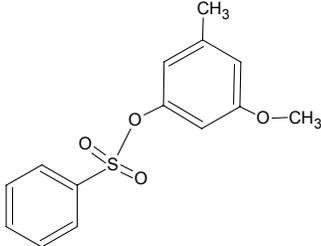
Conc (ppm)	Conc (µM)	Estrutura
248	891,0446	<p>1-benzenossulfonato-3-metóxi-5-metilbenzeno</p>  <p>Fórmula Molecular = C₁₄H₁₄O₄S Massa Molecular = 278,325 Composição = C(60.42%) H(5.07%) O(22.99%) S(11.52%)</p>
148,8	534,6268	
92	330,5488	
69	247,9116	
59,8	214,8567	
49,6	178,2089	

Tabela 11. Concentrações testadas do 2,4-dibenzenossulfonato-orselinato de etila no TAS.

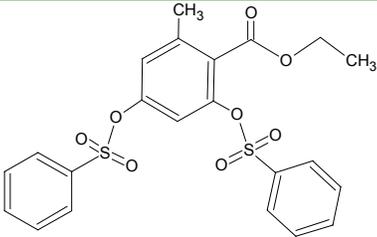
Conc (ppm)	Conc (μM)	Estrutura
298	625,3659	 <p>Fórmula Molecular = $C_{22}H_{20}O_8S_2$ Massa Molecular = 476.521 Composição = C(55.45%) H(4.23%) O(26.86%) S(13.46%)</p>
178,8	375,2196	
59,6	125,0732	

Tabela 12. Concentrações testadas do 2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila no TAS.

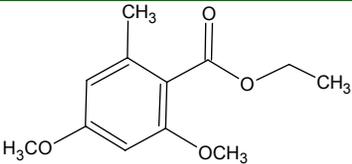
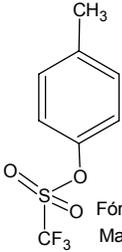
Conc (ppm)	Conc (μM)	Estrutura
520	2318,3	 <p>Fórmula Molecular = $C_{12}H_{16}O_4$ Massa Molecular = 224.253 Composição = C(64.27%) H(7.19%) O(28.54%)</p>
260	1159,2	
156	695,5	
52	231,8	

Tabela 13. Concentrações testadas do 4- trifluorometanossulfonil-tolueno no TAS.

Conc (ppm)	Conc (μM)	Estrutura
536	2231,5	 <p>Fórmula Molecular = $C_8H_7F_3O_3S$ Massa Molecular = 240.201 Composição = C(40.00%) H(2.94%) F(23.73%) O(19.98%) S(13.35%)</p>
268	1115,7	
160	666,1	
53,6	223,1	

5.11 *Atividade antifúngica*

5.11.1 Cultivo do fungo

O fungo *Cladosporium sphaerospermum* Penzig foi cultivado em meio BDA a 28 °C, na ausência de luz até a esporulação adequada. A manutenção dos inóculos foi feita em água destilada estéril, segundo a referência bibliográfica³².

Foram realizados testes de bioautografia utilizando o 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno, 3,5-dimetóxi-tolueno, 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila, 2,4-dibenzenossulfonil-6-metilbenzenoato de etila, 2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila, 3-tiofenil-5-metóxi-tolueno, 3-benzenossulfonil-5-metóxi-tolueno. Foram preparadas soluções dessas substâncias e aplicadas (em volumes variáveis, necessários para obtermos as concentrações de 100, 50 e 10 µg de massa) sobre placa cromatográfica (Merck) de alumínio coberto de sílica, com dimensões de 20 x 20 cm ou 20 x 16 cm. Foram avaliadas as concentrações de 100, 50 e 10 µg para todos os compostos citados acima.

As placas foram nebulizadas com uma suspensão de esporos do fungo *Cladosporium sphaerospermum* na concentração de $4,87 \times 10^7$ esporos/mL em solução nutriente contendo glicose e incubadas em câmara úmida por 48 horas, na ausência de luz e em estufa a aproximadamente 30 °C³³.

A avaliação da atividade fungitóxica foi feita observando-se ou não o aparecimento de zonas de inibição do desenvolvimento do fungo.

Os testes de atividade antifúngica foram realizados sob a orientação da Profa Dra. Maria Rita Marques no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Morfofisiologia da UFMS.

³² FIGUEIREDO, M.B. & Pimentel, C.P. *Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da seção do Instituto Biológico*. Summa Phytopatologica 1(4), 299-302, 1975.

³³ HoMANS, A.L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances; J. Chromat. 51, 327-329, 1970.

5.12 **Teste de atividade antimicrobiana**³⁴.

As substâncias foram testadas com as bactérias *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Um inóculo bacteriano foi preparado com 3-5 colônias em caldo Muller-Hilton e em seguida foi incubado por 5 horas a 37 °C. Após esse período, o inóculo foi diluído em solução salina 0,45% (1/100) e semeado, com o auxílio de swab estéril em placas de Petri contendo ágar Muller-Hilton com sangue de carneiro a 5% [*Staphylococcus aureus* (Gram-negativa ATCC 25923)] e sem sangue [(*Echerichia coli* (Gram-positiva ATCC 25922)] e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa ATCC 27853).

As amostras foram solubilizadas em DMSO a uma concentração de 5 mg/mL e aplicadas em discos de papel de filtro autoclavados (espessura 0,38 mm e diâmetro 6 mm) com pipeta automática de 20 L. Na mesma placa foram colocados discos com DMSO com os antibióticos: Amicacina e Imipenen. Após 24 horas de incubação a 37°C a atividade foi avaliada através da medida do halo de inibição (mm).

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário / UFMS pelas estagiárias Fernanda Pais Reis (Acadêmica de Farmácia-Bioquímica) e Andressa Bolzan (Acadêmica de Farmácia-Bioquímica) sob orientação das professoras: Gisele Silva Lima Moreira e Nádia Cristina Pereira Carvalho.

5.13 **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Uma massa de 4 mg da substância a ser testada foi solubilizada em 200 µL de DMSO. Adicionou-se 1800 µL de caldo Müller-Hinton e fez-se diluições sucessivas a partir desse tubo e da adição de 1 mL de ágar Müller-Hinton em cada um dos tubos subseqüentes. Esses sistemas foram aquecidos em banho-maria à 56 °C. As concentrações obtidas nos tubos foram as seguintes: 1000 ; 500 ; 250 ; 125 ; 62,5 ; 46,87 ; 31,25 ; 15,63 e 7,8 µg/mL respectivamente.

³⁴ MURRAY, B. R. Medical Microbiology. Guanabara Koogar S.A. St. Louis, 3th ed., 2000.

A placa de micro-diluição foi preparada através da distribuição de 200 µL desses meios juntamente com 5 µL de inóculo com a bactéria e 20 µL de solução de iododinitrotetrazole (INT) a 0,2 % ou 1 % para cada um dos orifícios da placa.

As bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas campestris vesicatoria* foram testadas em duplicata nas oito concentrações descritas.

A incubação foi feita a 34,5 °C com as placas de micro-diluição sendo envolvidas em rolopac®. O crescimento da bactéria foi evidenciado com o uso do corante INT e a leitura foi feita 18 horas após a incubação

A atividade antibacteriana foi realizada pelo Prof^o. Dr. Artur Smania Júnior no Laboratório de Antibióticos da UFSC em Florianópolis.

Conclusão

6 Conclusão

O ácido lecanórico foi isolado do líquen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.)Hale com rendimento de 13% do extrato liquênico.

A alcoolise deste composto com etanol produziu o orselinato de etila, ao qual foram feitas modificações nos seus grupos funcionais.

Foram testadas várias condições de reação para a obtenção de C-nucleosídeo, via reações de Heck, onde não foi possível a obtenção dos produtos desejados.

Derivados análogos também foram preparados a partir do orcinol.

Todas as substâncias preparadas foram submetidas a ensaio de atividade biológica.

Todas as substâncias preparadas foram avaliadas quanto à atividade citotóxica sobre o microcrustáceo *Artemia sp.*, atividade antibacteriana e fungitóxica.

A série dos derivados do orcinol apresentou atividade citotóxica decrescente com a metoxilação das hidroxilas. Podemos concluir que há uma participação direta das hidroxilas com sítio receptor deste sistema biológico. Contudo, se tivermos um grupo benzenossulfonato em uma das hidroxilas do orcinol, observaremos um aumento significativo na atividade citotóxica.

Na série dos derivados do orselinato de etila a maior atividade citotóxica foi apresentada pelo 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila (**4**).

O 2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila (**5**) apresentou praticamente a mesma atividade do orselinato de etila (**3**).

Fazendo um estudo de SAR, podemos concluir que a presença de um grupo etil carboxilato na estrutura base do orcinol pode ter contribuído para o aumento na atividade citotóxica, quando comparamos as estruturas do orcinol e do orselinato de etila.

Todas as substâncias foram ativas quanto à atividade antibacteriana, apresentando atividade moderada, em comparações com os padrões utilizados, com a exceção da substância 2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila (**5**), que não apresentou atividade contra as três bactérias testadas. De todas substâncias avaliadas observou-se a atividade inibitória frente a *E. coli* e *P. aeruginosa*.

O ensaio de atividade fungitóxica indicou inibição do fungo fitopatogênico *Cladosporium shaerospermum* nas diferentes concentrações testadas.

Os compostos 2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila e 3-benzenossulfonil-5-metóxi-tolueno apresentaram inibição na concentração de 10 µg. Os demais compostos foram

CONCLUSÃO

ativos na concentração de 50 µg, com exceção do 3-metóxi-5-hidróxi-tolueno, 3,5-dimetóxi-tolueno, 3-metóxi-5-trifluorometanossulfonil-orcinol e 2-hidróxi-4-metóxi-6-metilbenzoato de etila, os quais não apresentaram atividade fungitóxica.

Pelos resultados obtidos, pode-se dizer que as substâncias testadas são promissores agentes tóxicos e antimicrobianos.

As substâncias obtidas, fora enviadas para avaliação da atividade antitumoral, o qual não foi concluído até o término deste trabalho.

7 Referência Bibliográfica

1. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: ArtMed Editora Ltda., 2001.
2. LINUSSON, A.; GOTTFRIES, J.; OLSSON, T.; ÖRNSKOV, E., OLESTAD, S.; NORDÉN, B.; WOLD, S. J. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. **44**, p. 3424-3439, 2001.
3. AYER, W. A.; BROWNE, L. M.; LOVELL, S. H. *Phytochemistry*. v. **22**, **10**, p. 2267-2271, 1983.
4. GRIMM, H. G. Z. *Elektrochem* **31**, 474, 1925; GRIMM, H. G.Z. Z. *Elektrochem* **34**, 430, 1928. apud SILVERMAN, R.B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*; Academic Press, INC; San Diego, 1992, p.19.
5. ERLLENMEYER, H. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **30**: 792, 1948 apud SILVERMAN, R.B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*; Academic Press, INC; San Diego, 1992, p17.
6. CHAUDURI, N. C., REN, R. X., E. T. Kool, *Synleth*, p. 341, 1997.
7. HONDA, N. K. *Química nova*. **21(6)**, p. 110-125, 1998.

8. HYLANDS, P. J.; INGOLSDOTTIR, K. *Phytochemistry*, **24**, p. 127, 1985.
9. HIDALGO, M. E., FERNANDEZ, E., QUILHOT, W. LISSI, E., *Phytochemistry*, **37**, 1585, 1994.
10. NEAMATI, N., HONG, H., MAZUMDER, A., WANG, S., SUNDER, S., NICKCLAUS, M. C., MILNE, G. W. A., PROKSA, B.; POMMIER, Y. *J. Med. Chem.*, **40**, p. 942, 1997.
11. MAKHIJA, T.M.; KULKARNI, V. M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **10**, p. 1483 –1497, 2002
12. AHMANN, G. B.; MATHEY, A., *The bryologist*, **70**, 93, 1967
13. HONDA, N. K., "Líquens do Mato Grosso do Sul - Estudo químico e avaliação da atividade biológica", Tese de Doutorado, IQ-UNESP, Araraquara, SP, 1997.
14. KC^A, S. K.; MÜLLER, K. *Eur. J. Med. Chem.* **35**, p. 405-411, 2000.
15. HORI, M.; ITO, E.; TAKITA, T.; KOYAMA, Y.; TAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H. *J. Antibiot.*, **17A**, p. 96-99, 1964.

16. AIZAWA, S.; HIDAKA, T.; OTAKE, N.; YONEHARA, H.; INOSE, K.; IGARASHI, N.; SUZUKI, S. *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 375-376, 1965.
17. DAVES, G. D. Jr., *Acc. Chem. Res.*, **23**, 261-266, 1990.
18. JARAMILLO, C.; KNAPP, S., *Synthesis*. p. 1-20, 1994.
19. RANDO, R. F.; NGUYEN-BA, N. *Drug Discovery Today*. **5**, p. 465-476, 2000.
20. POSTEMA, M. H. D. *Tetrahedron*. **43**, 40, 8545-8599, 1992.
21. CABRI, W.; CANDIANI, I.; BEDESCHI, A. *J. Org. Chem.* **56**, p. 5796-5800 1991./ CABRI, W.; CANDIANI, I.; BEDESCHI. *J. Org. Chem.* **58**, 7421-7426, 1993.
22. GOMES, A. T. "*Depsídeos bioativos de líquens - isolamento e modificação estrutural*", Dissertação de Mestrado. DQI-UFMS. Campo Grande, MS, 2001.
- BARBIER, M.; DEVYS, M. *Synthetic communications*, **22**(19), 2757-2762, 1992.
23. ELIX, J. A.; JIANG, H.; WARDLAW, J. H. *J. Chem.*, **43**, 1745 – 1758, 1990.

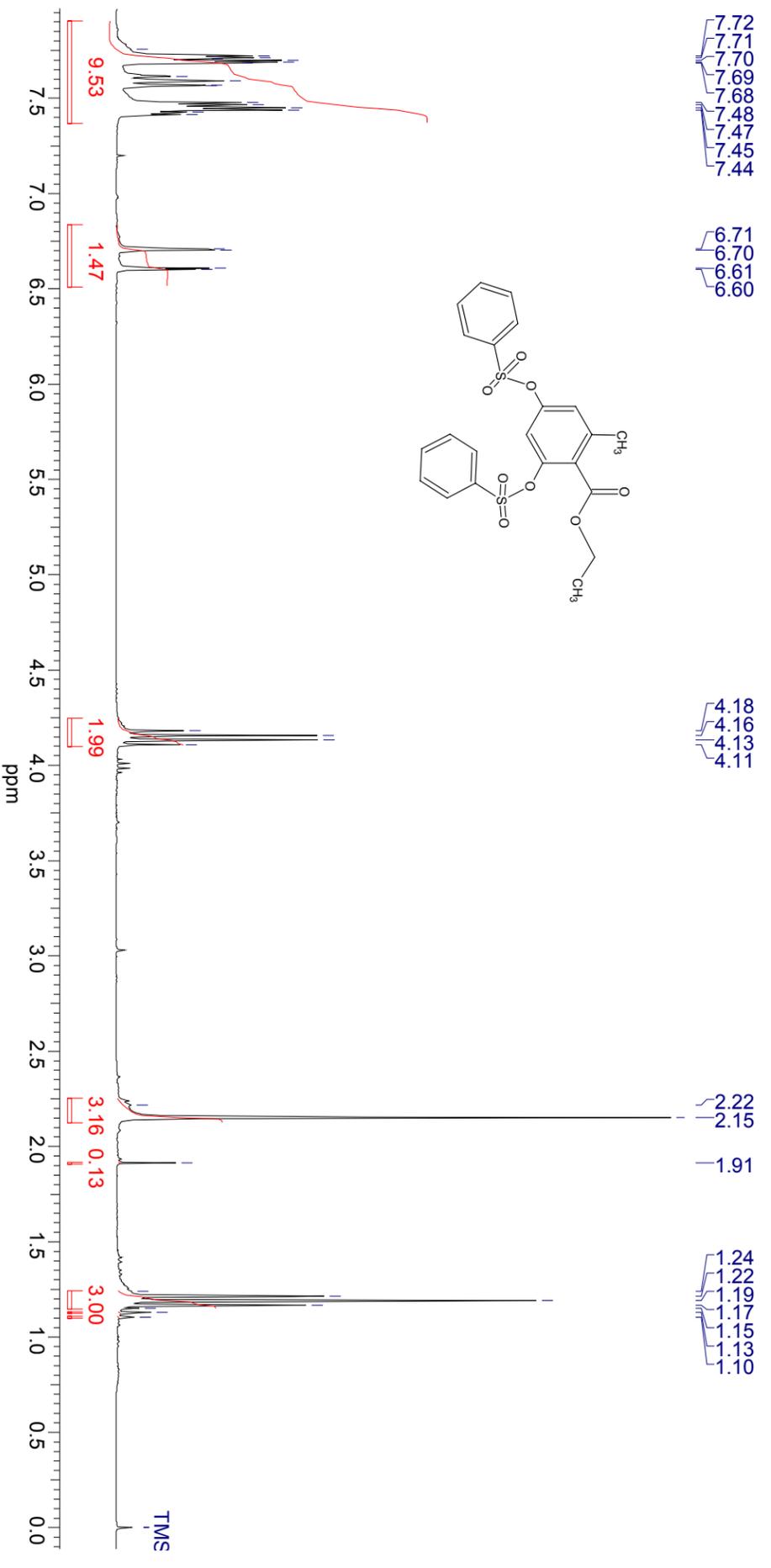
24. ECHAVARREN, A.; STILLE, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, p. 5478-5486, 1987.
25. STANG, P. J.; HANACK, M.; SUBRAMANIAN, L. R. *Synthesis*. p. 85-126, 1982.
26. JEFFERY, T.; DAVID, M. *Tetrahedron Letters*. **35**, p. 5751-5754. 1998
27. Finney, D.J. *Probit Analysis* 3rd. Cambridge University Press, Cambridge, 1971.
28. VOGEL, A. I., "Vogel's Textbook of practical organic chemistry", 5^o Ed, Longman, 1989
29. PERRIN, D. D., ARMAREGO, W. L. F., PERRIN, D. R., "*Purification of Laboratory Chemicals*", 3^o Ed., Pergamon Press, Oxford, 1988
30. FIGUEIREDO, M.B. & Pimentel, C.P. *Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da seção do Instituto Biológico*. *Summa Phytopatologica* 1(4), 299-302, 1975.
31. HoMANS, A.L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances; *J. Chromat.* **51**, 327-329, 1970.

32. MURRAY, B. R. Medical Microbiology. Guanabara Koogar S.A. St. Louis, 3th ed., 2000.

Expectros de RMN

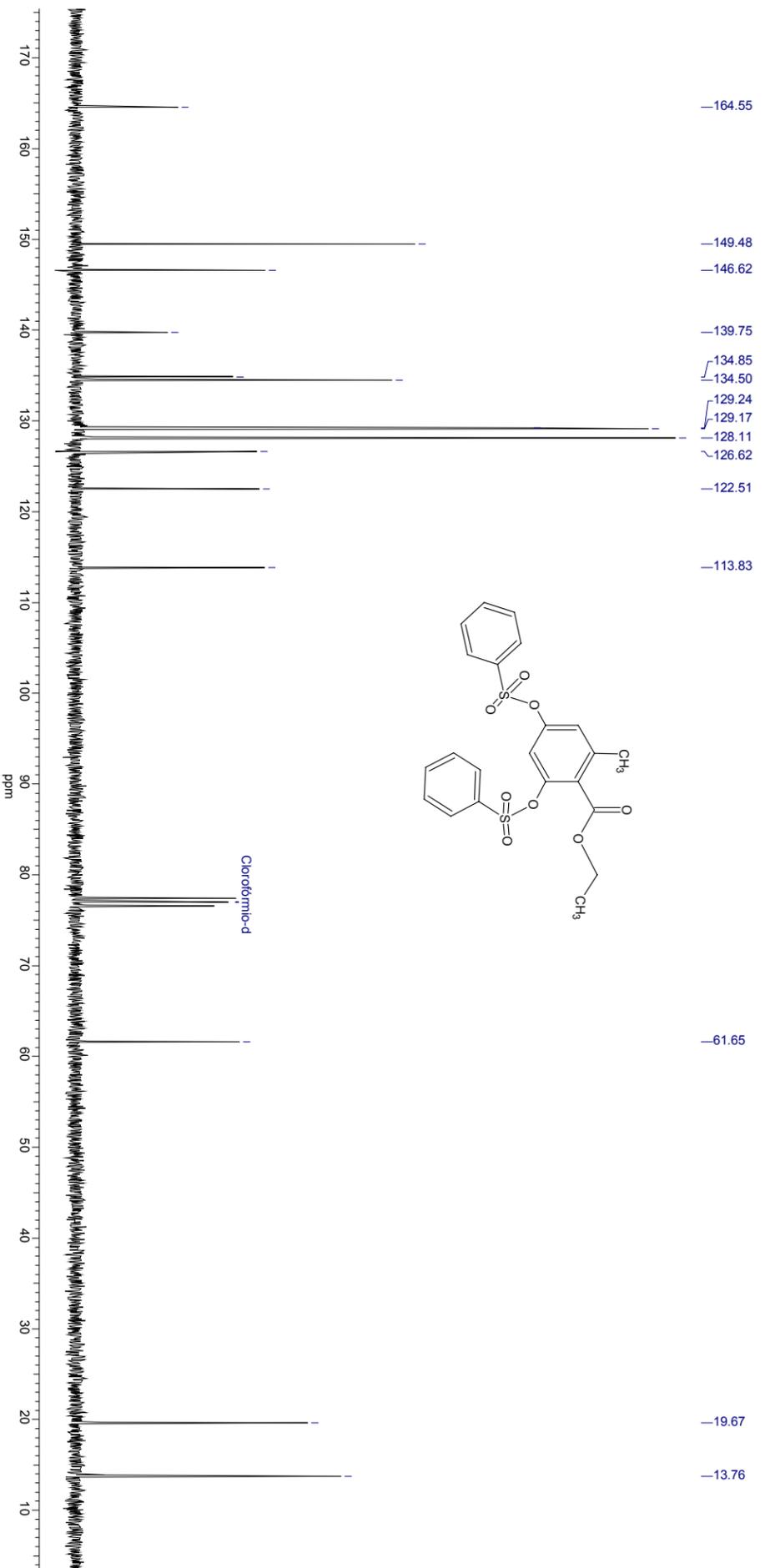
^1H 300 MHz e ^{13}C 75 MHz

7.1 Nome	7.2 RM	7.3 Frequência (MHz)	7.4 Solvente
2,4-dibenzenossulfonil-orselinato de etila	7.6 ¹ H	300.00	Clorofórmio deuterado

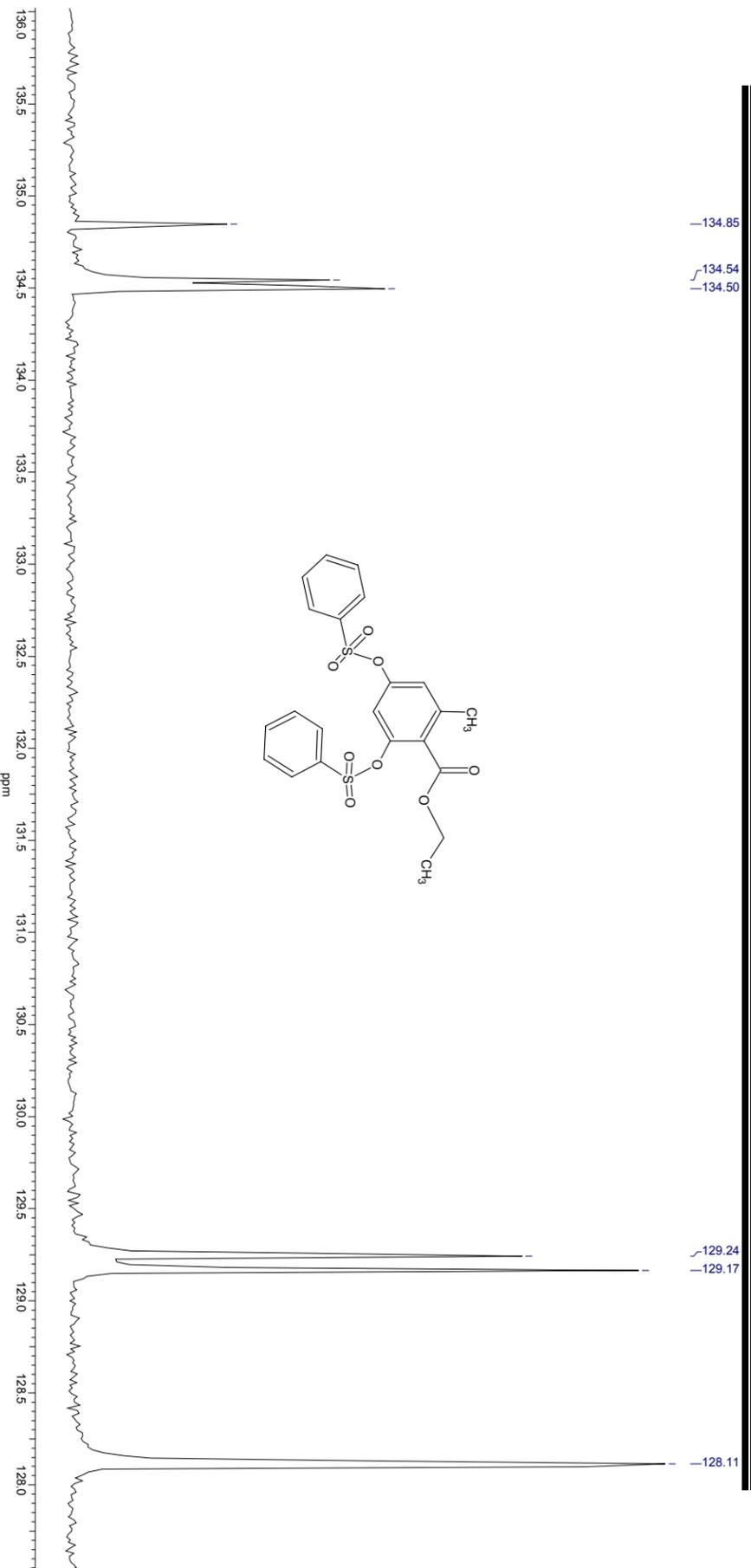


LXX

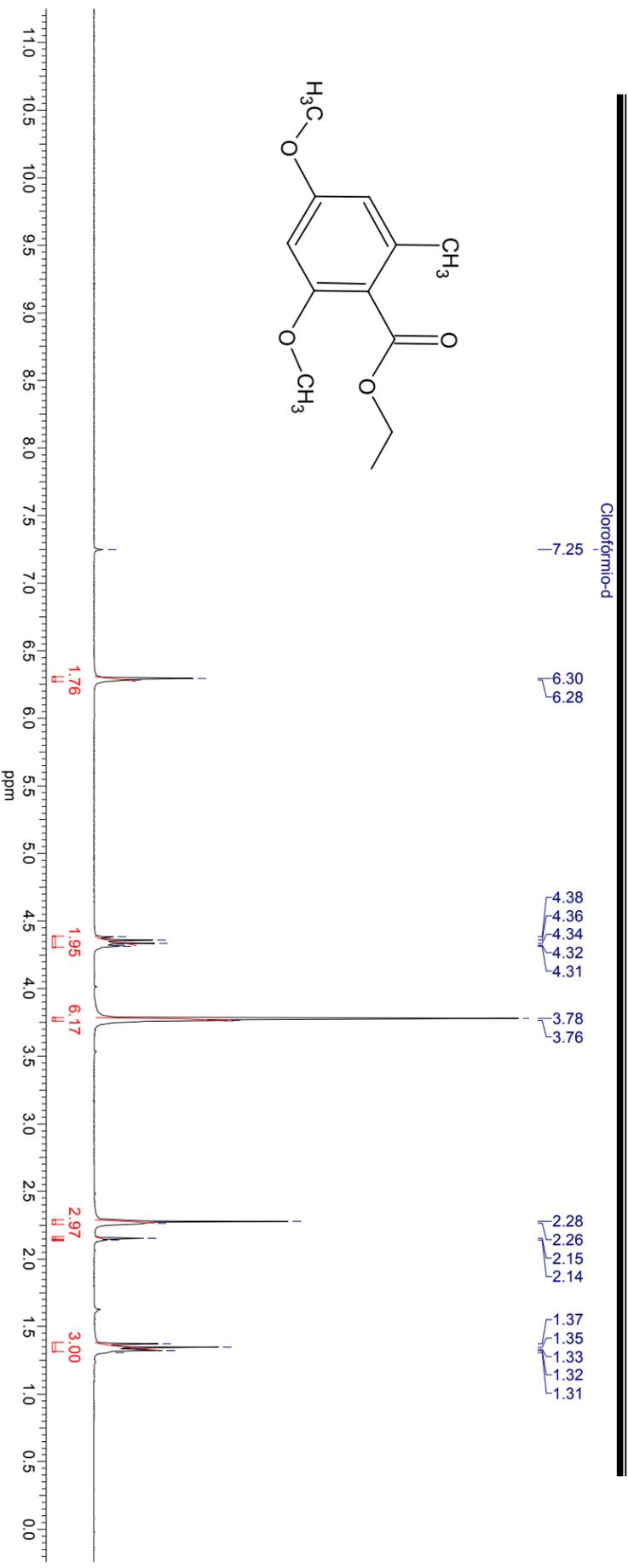
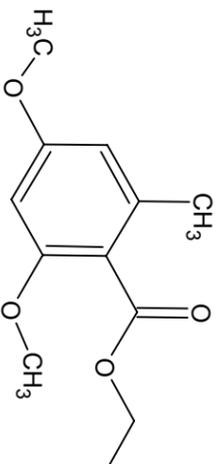
7.9 Nome	7.10 RM	7.11 Frequência (MHz)	7.12 Solvente
7.13 2,4-dibenzenossulfonil-orselinato de etila	7.14 ¹³C	7.15 75.00	7.16 Clorofórmio deuterado



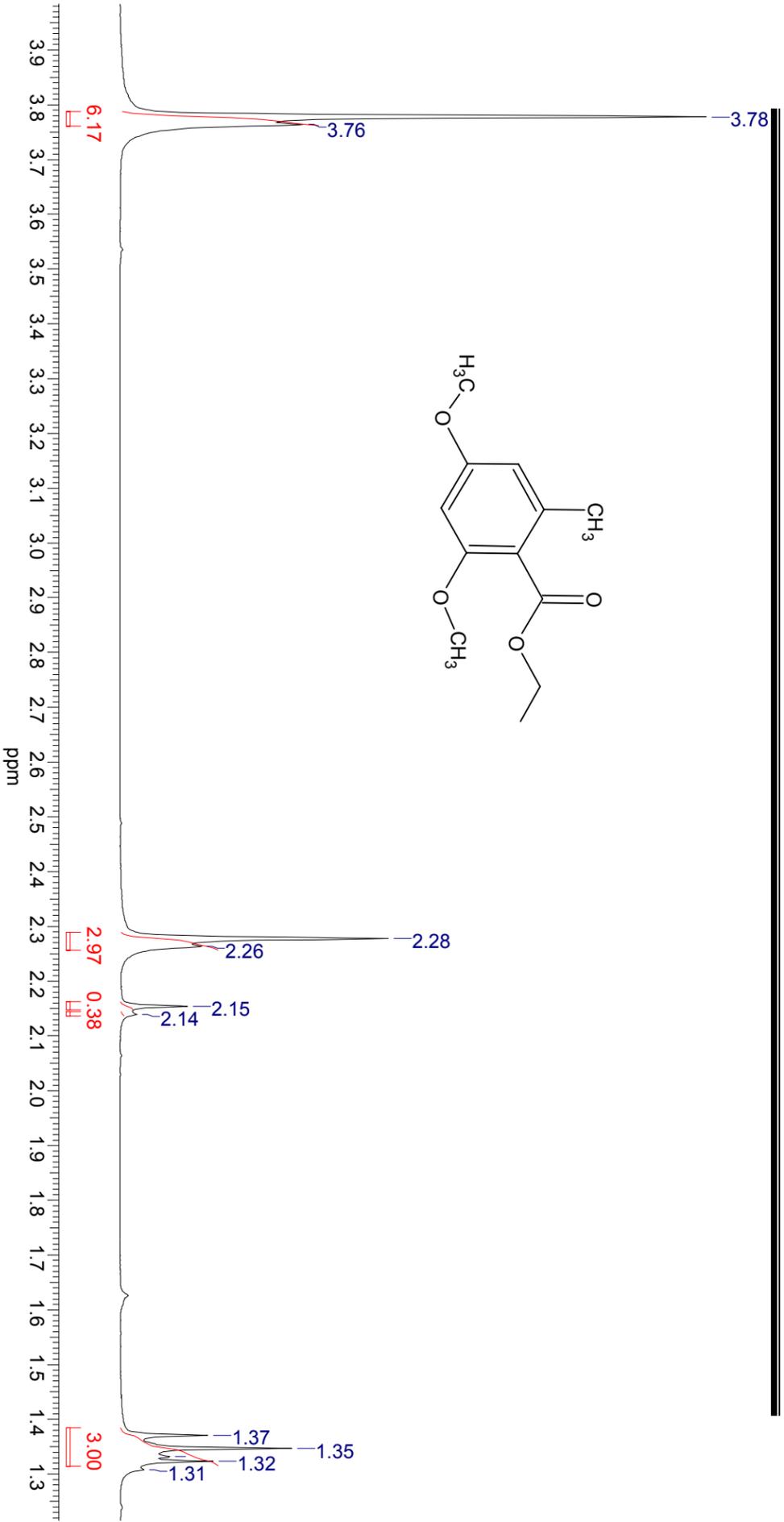
7.17 Nome	7.18 RM	7.19 Frequência (MHz)	7.20 Solvente
7.21 2,4-dibenzenossulfonil-orselinato de etila	7.22 13C	7.23 75.00	7.24 Clorofórmio deuterado
7.25	7.26	7.27	7.28



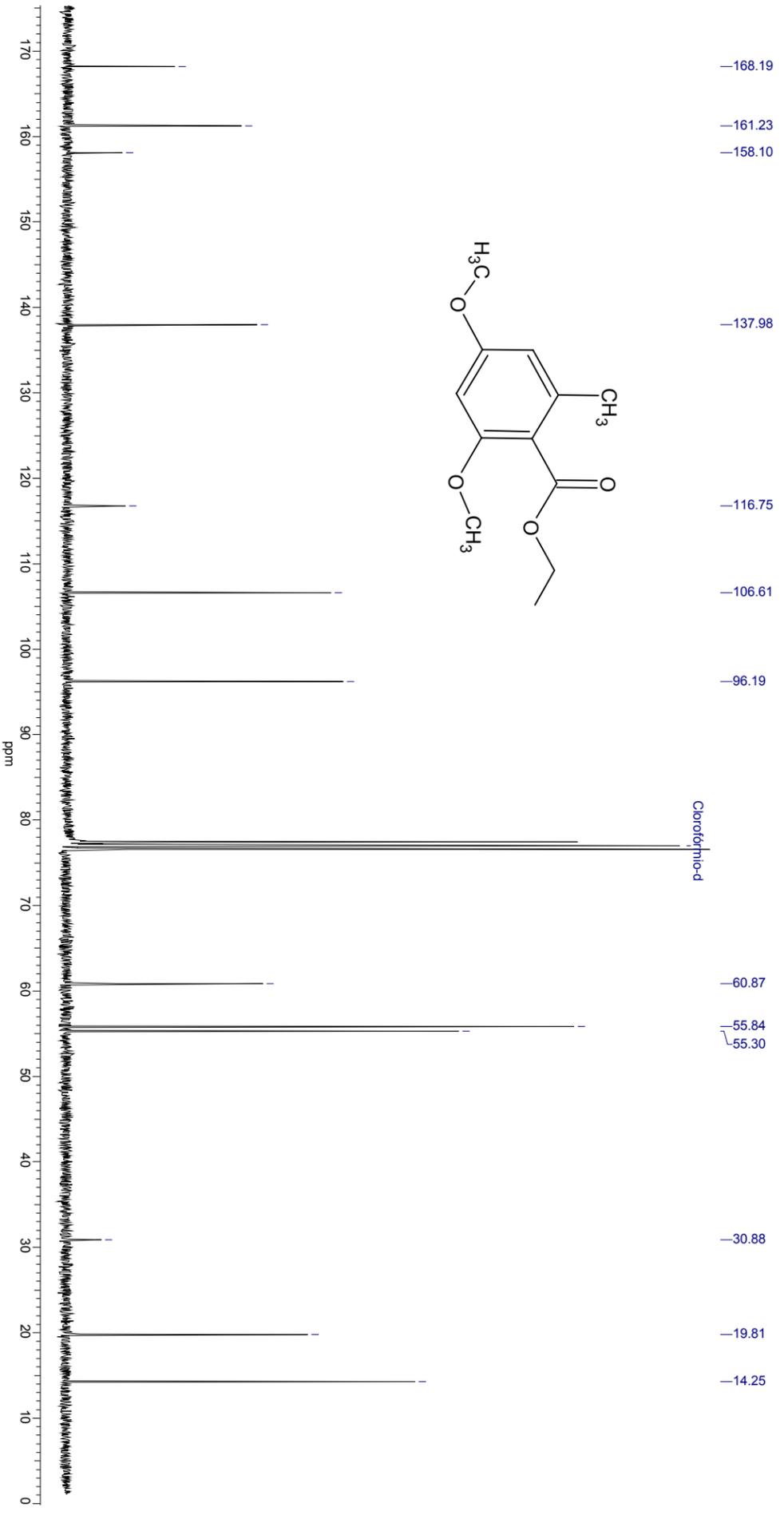
7.29 Nome	7.30 RM	7.31 Frequência (MHz)	7.32 Solvente
7.33 2,4-dimetóxi-orselinato de etila	7.34 1H	7.35 300.00	7.36 Clorofórmio deuterado



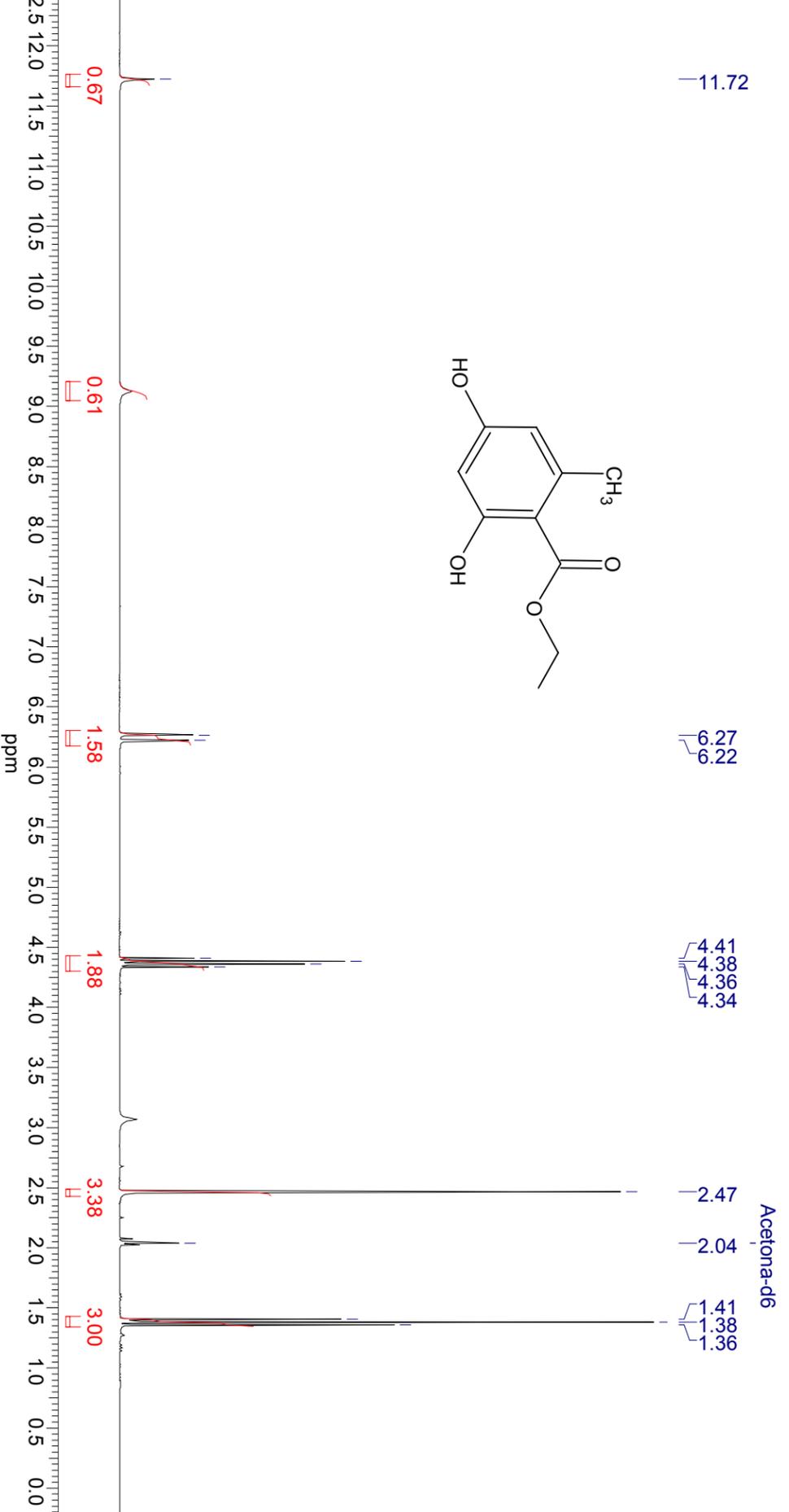
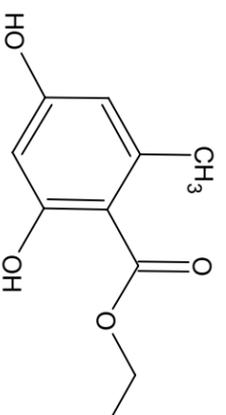
7.37 Nome	7.38 RM	7.39 Frequência (MHz)	7.40 Solvente
2,4-dimetóxi-orselinato de etila	N	300.00	Clorofórmio deuterado



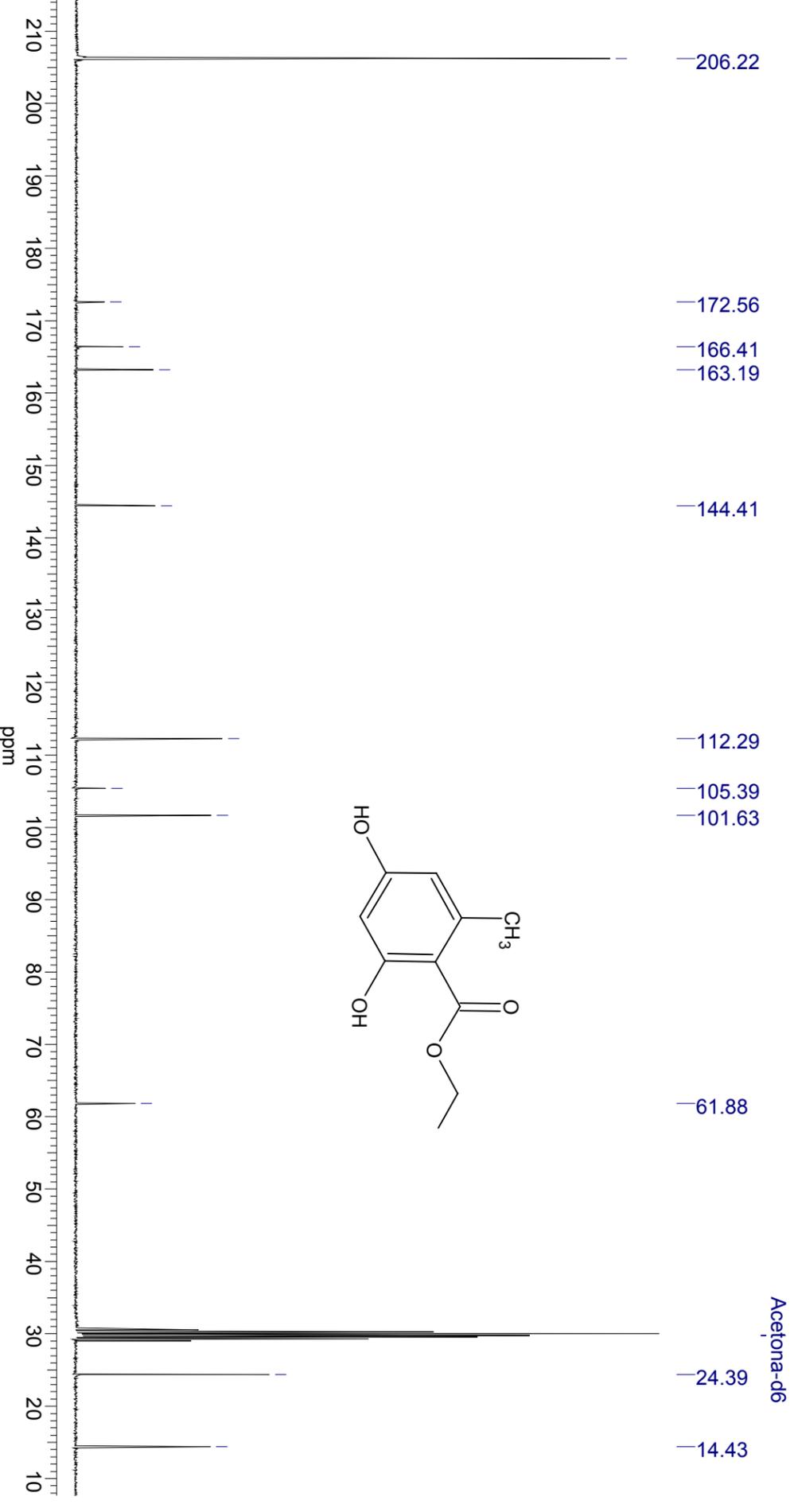
7.45 Nome	7.46 RM	7.47 Frequência (MHz)	7.48 Solvente
7.49 2,4-dimetóxi-orselinato de etila	7.50 ¹³C	7.51 75.00	7.52 Clorofórmio deuterado



7.53 Nome	7.54 RM	7.55 Frequência (MHz)	7.56 Solvente
Orselinato de etila	1H	300.00	Clorofórmio deuterado

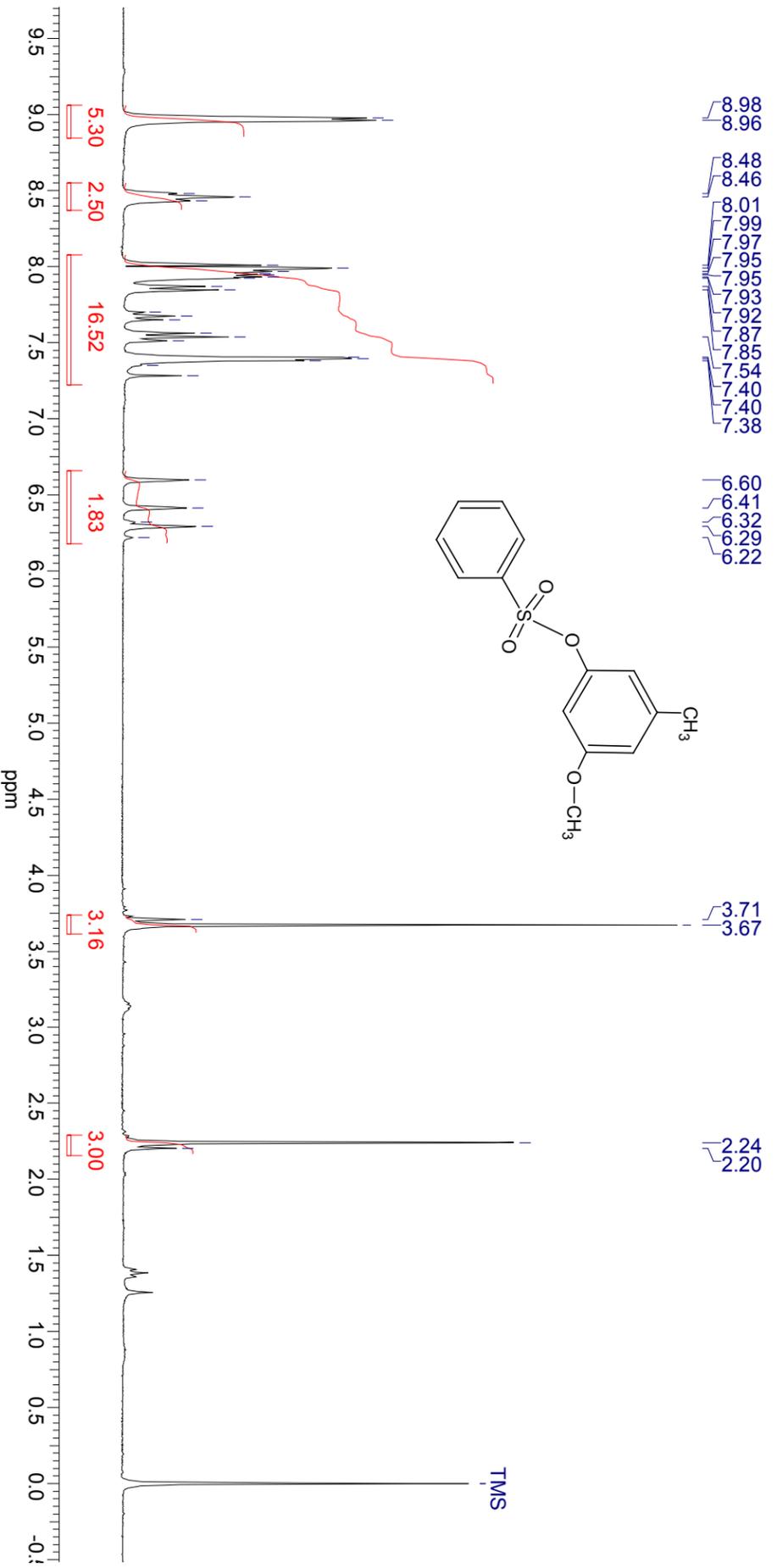


7.61 Nome	7.62 RM	7.63 Frequência (MHz)	7.64 Solvente
Orselinato de etila	13C	75.00	Acetona-d6



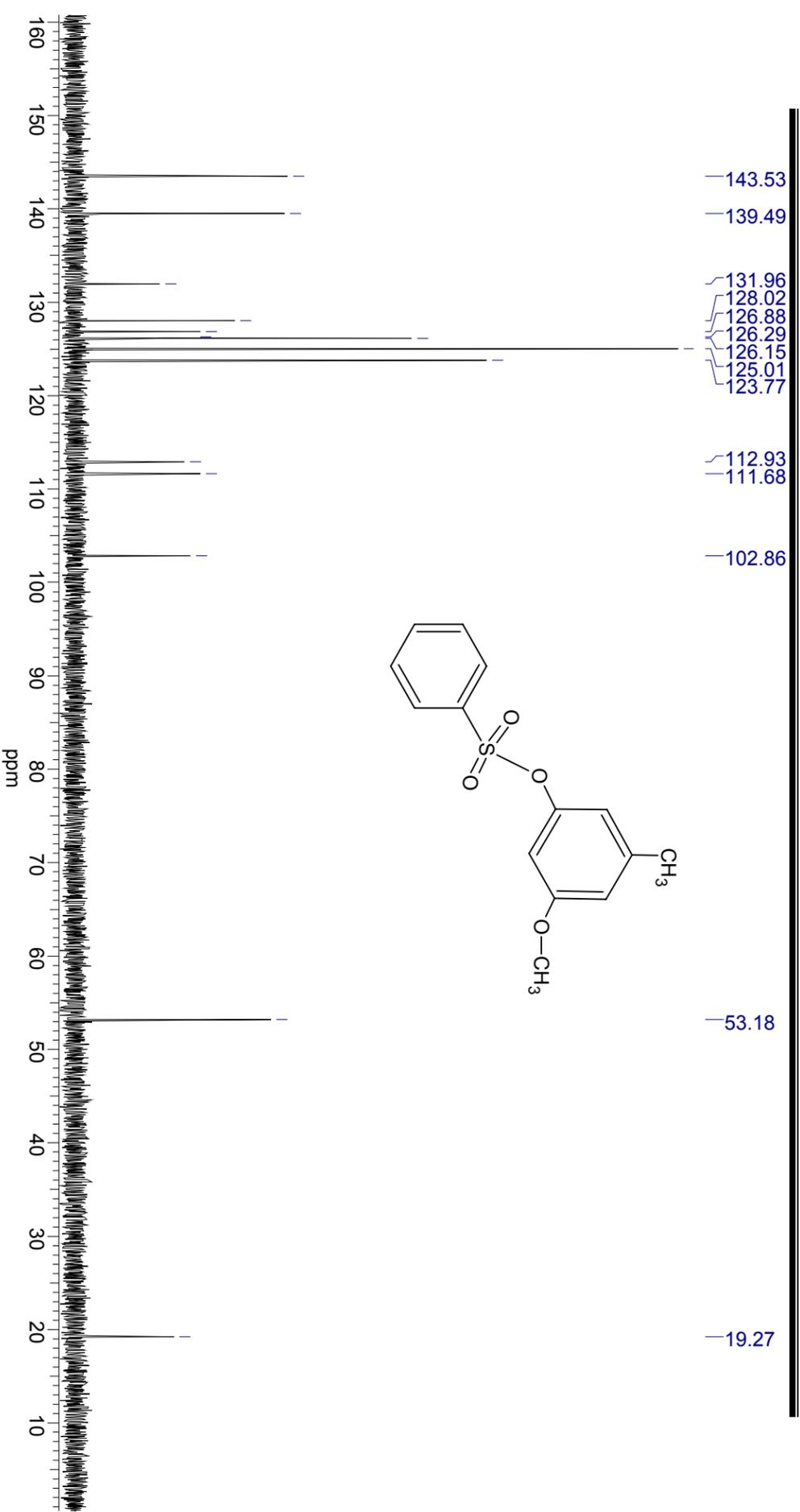
LXXVII

7.69 Nome	7.70 RM	7.71 Frequência (MHz)	7.72 Solvente
7.73 3-metóxi-5-benzenossulfonil-<i>o</i>-cinoil	7.74 1H	7.75 300.00	7.76 Clorofórmio deuterado

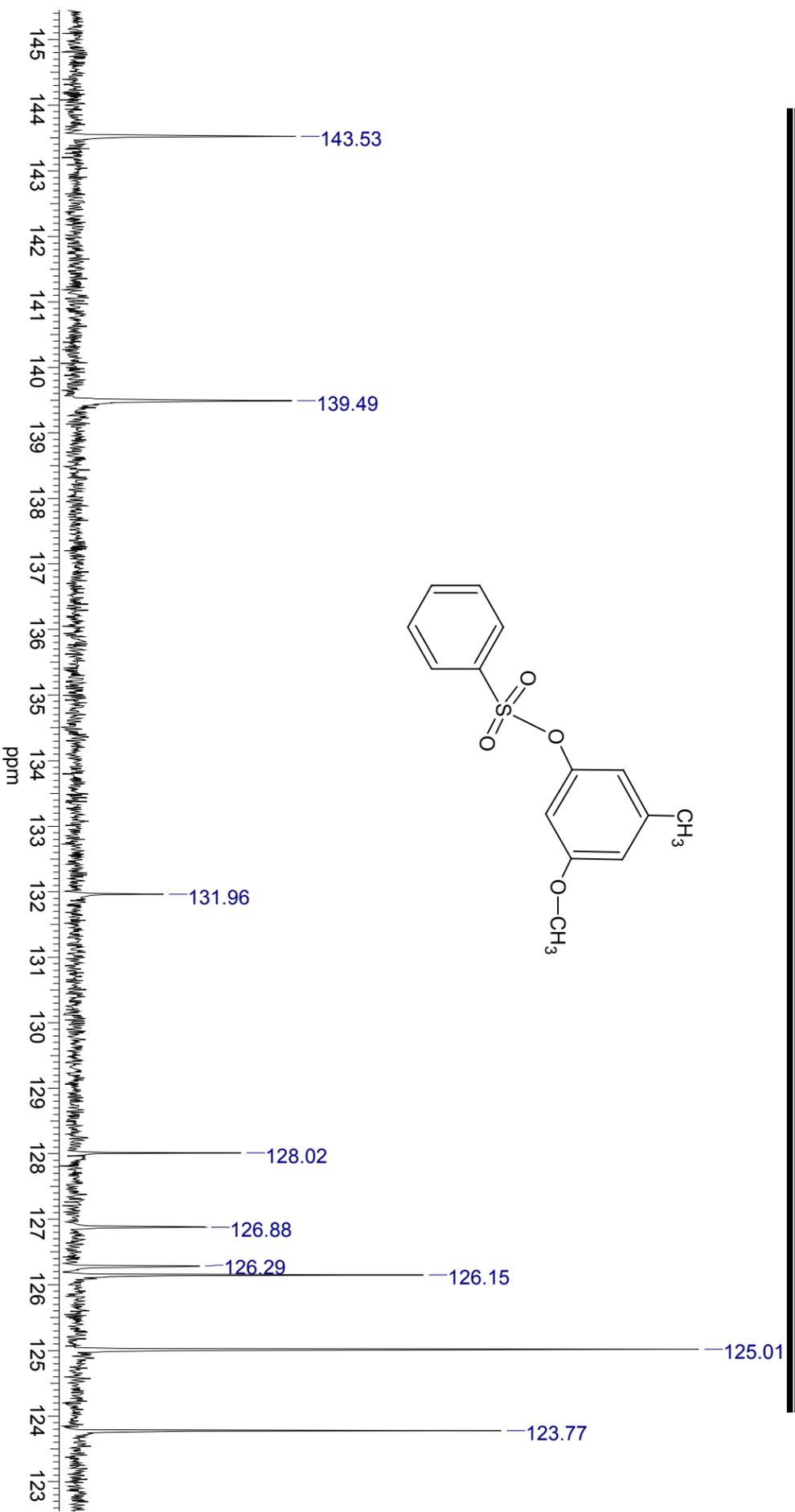
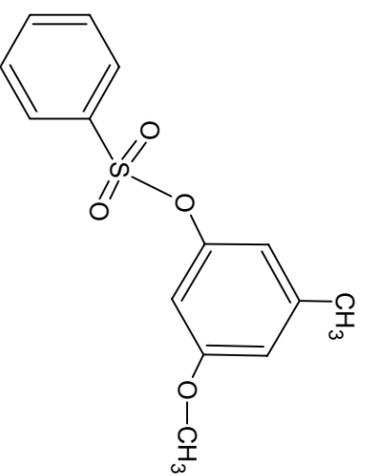


LXXVIII

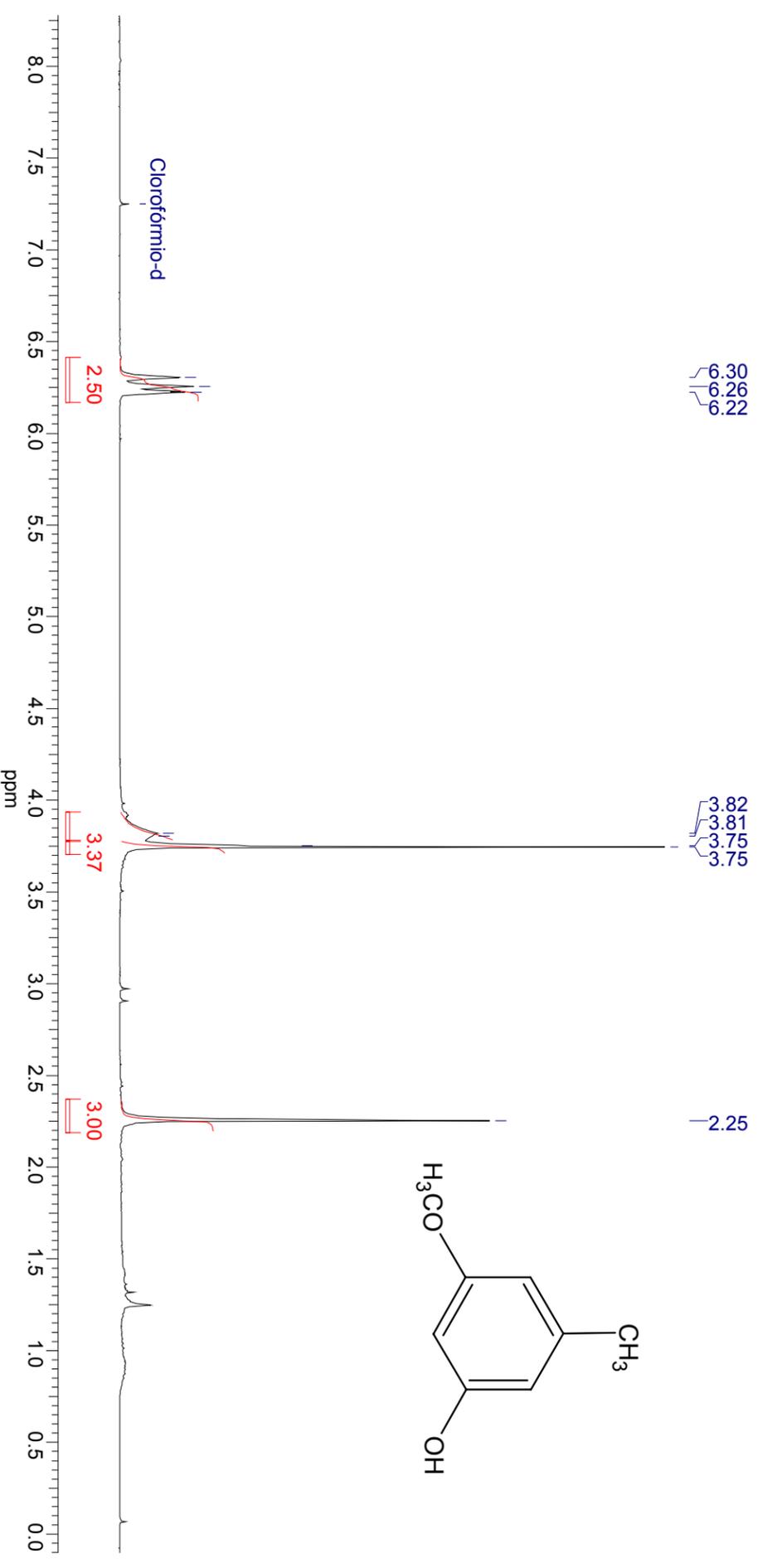
7.77 Nome	7.78 RM	7.79 Frequência (MHz)	7.80 Solvente
7.81 3-metóxi-5-benzenossulfonil-orcinol	N	75.00	Clorofórmio deuterado



7.85 Nome	7.86 RM	7.87 Frequência (MHz)	7.88 Solvente
3-metóxi-5-benzenossulfonil-<i>o</i>-cinoil	7.90	75.00	Clorofórmio deuterado

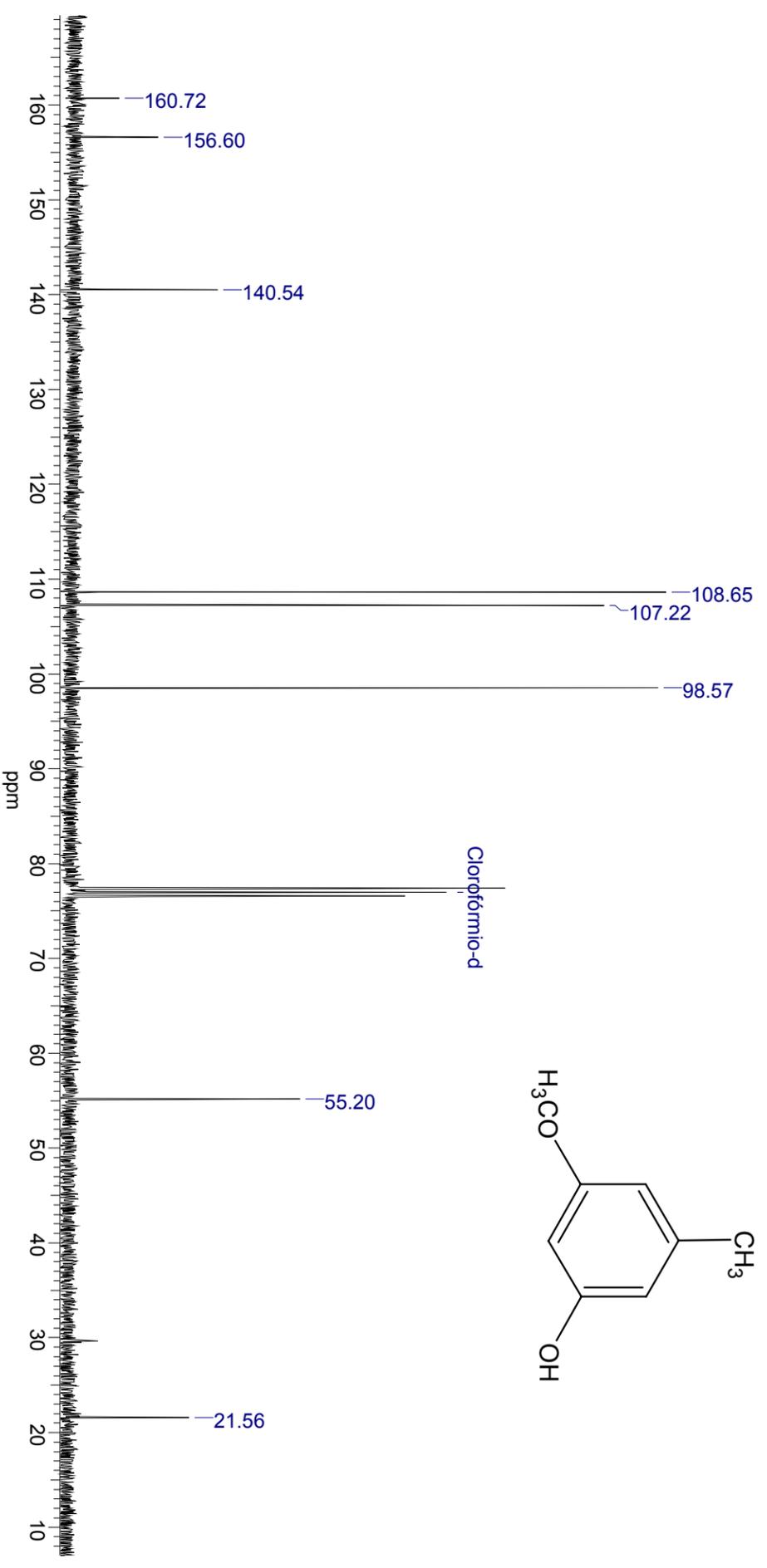


7.93 Nome	7.94 RM	7.95 Frequência (MHz)	7.96 Solvente
3-metóxi-orcinol	1H	300.00	Clorofórmio deuterado



LXXXI

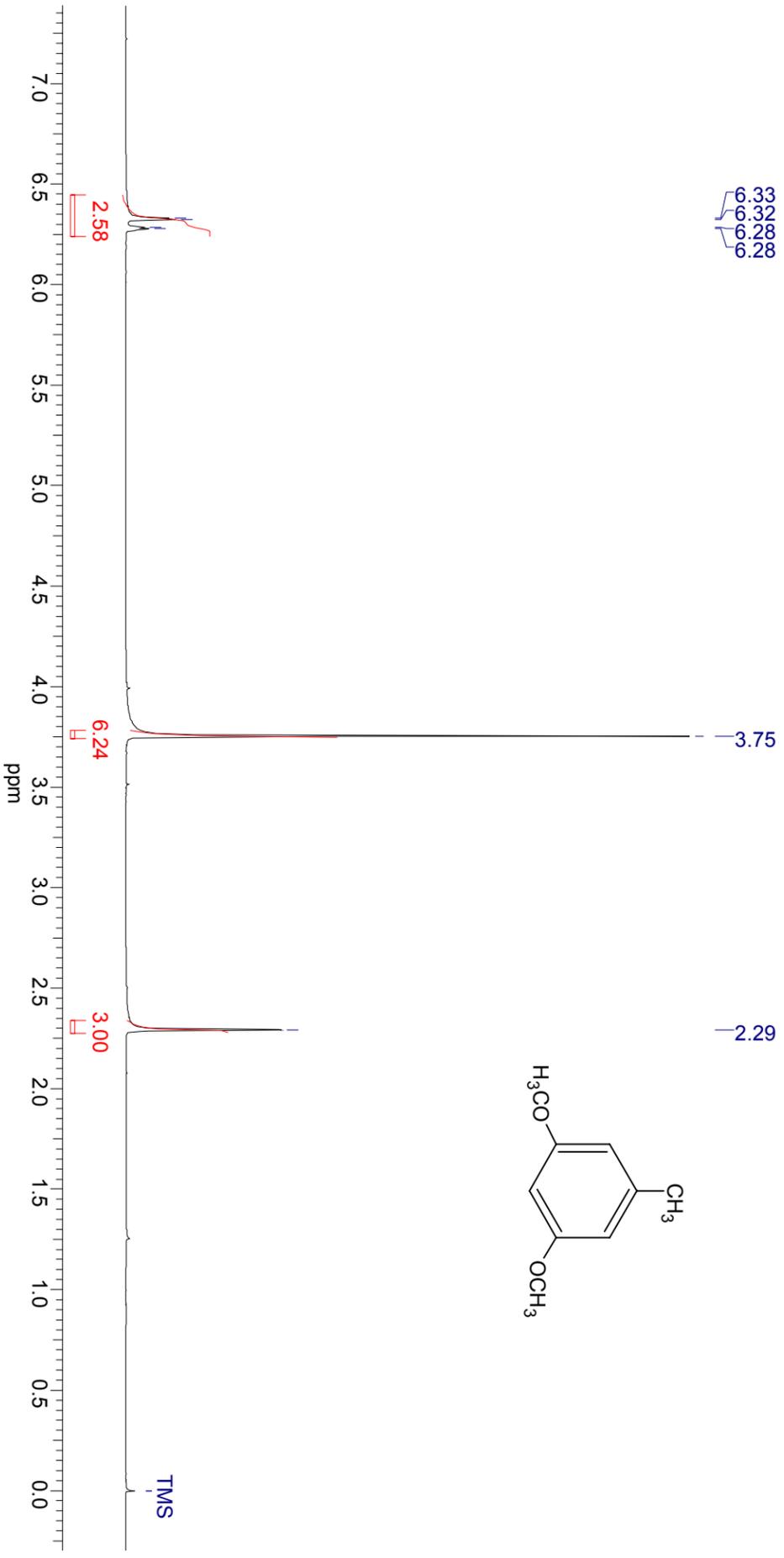
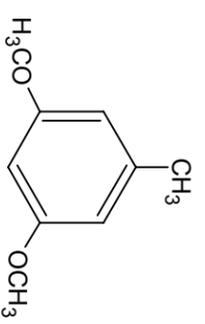
7.101 Nome	7.102 RM	7.103 Frequência (MHz)	7.104 Solvente
3-metóxi-orcinol	N	75.00	Clorofórmio deuterado



LXXXII

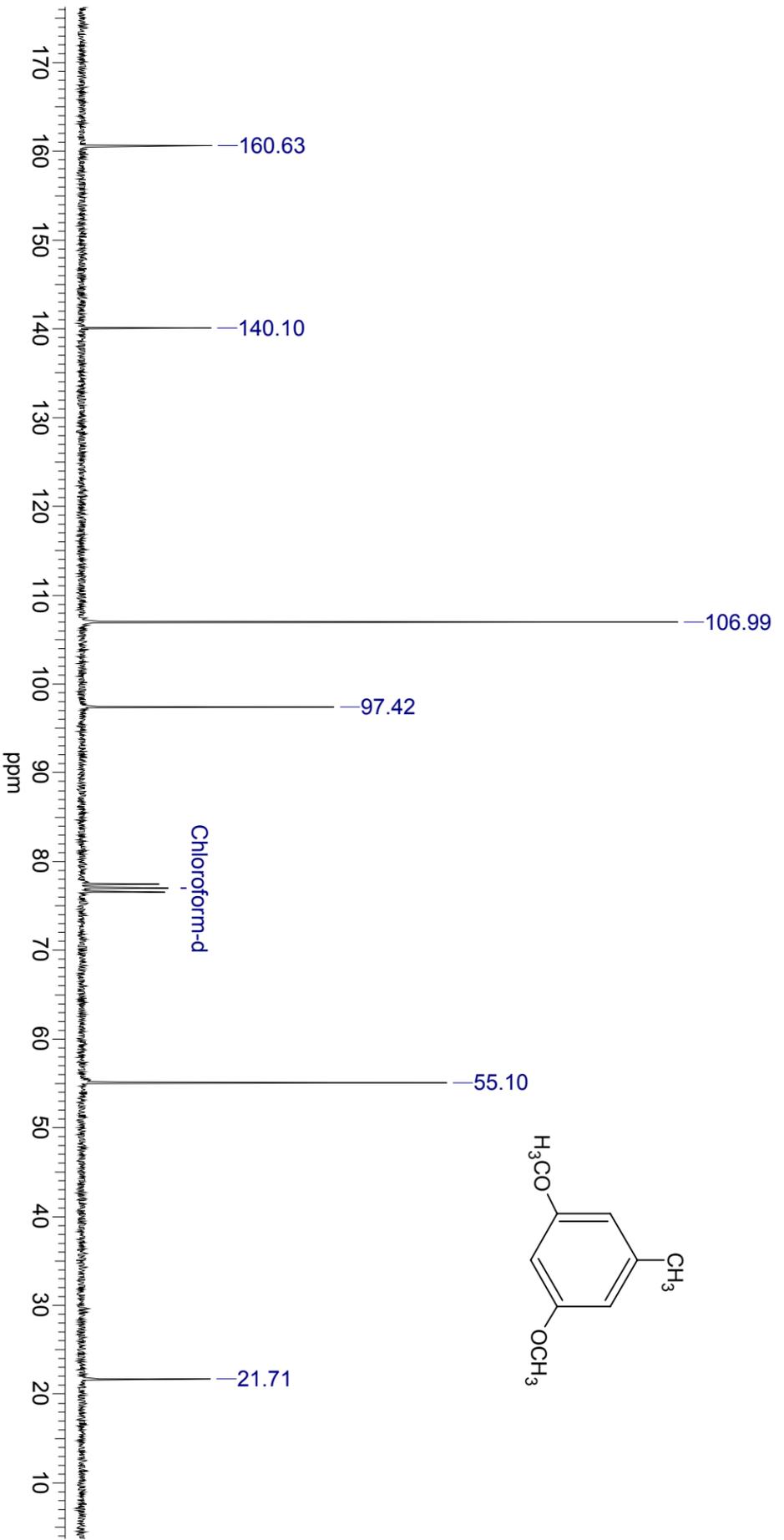
7.109 Nome	7.110 RM	7.111 Frequência (MHz)	7.112 Solvente
3,5-dimetóxi-orcinol	1H	300.00	Clorofórmio deuterado

3.333
3.282
3.069
2.29

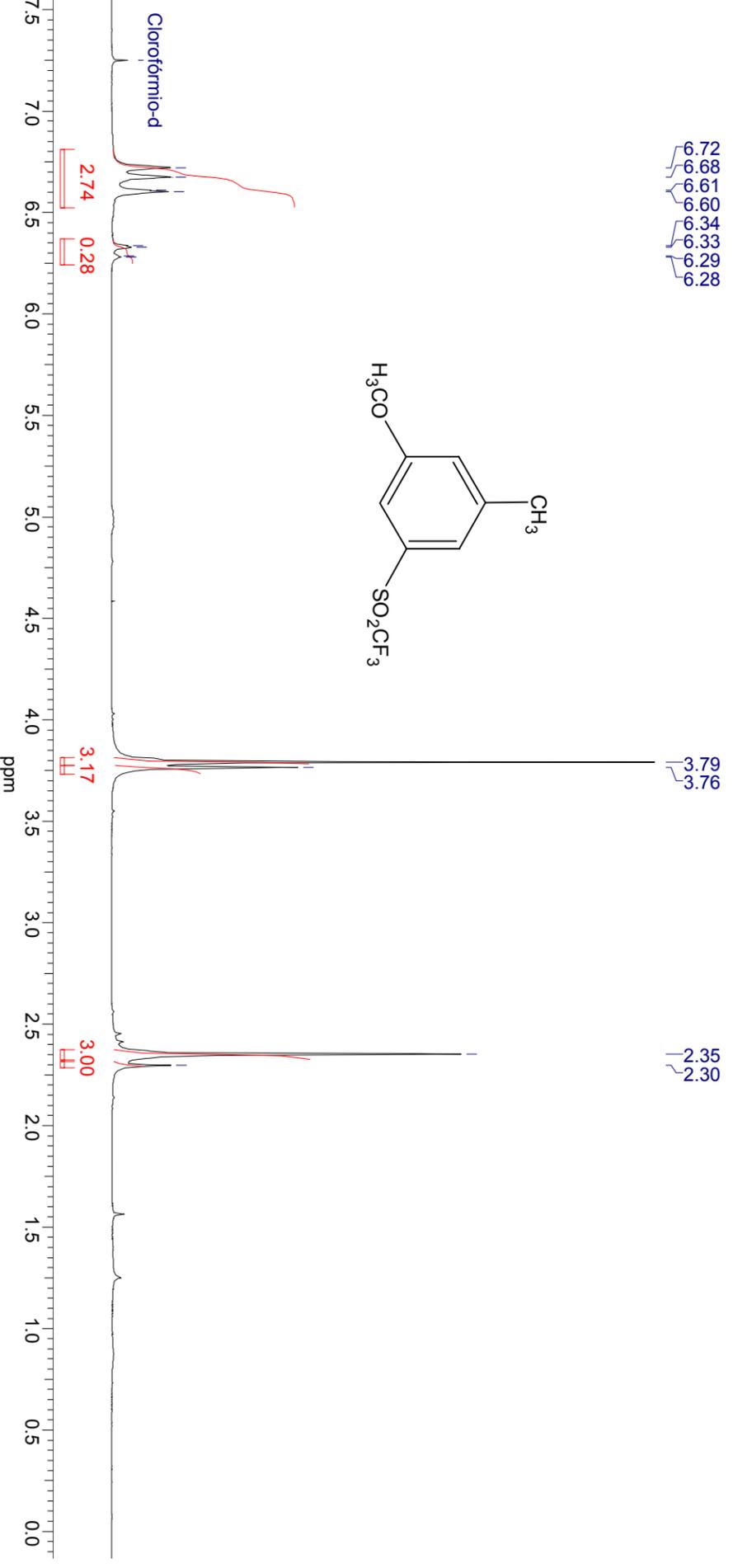


LXXXIII

7.117 Nome	7.118 RM	7.119 Frequência (MHz)	7.120 Solvente
3,5-dimetóxi-orcinol	1H	75.00	Clorofórmio deuterado

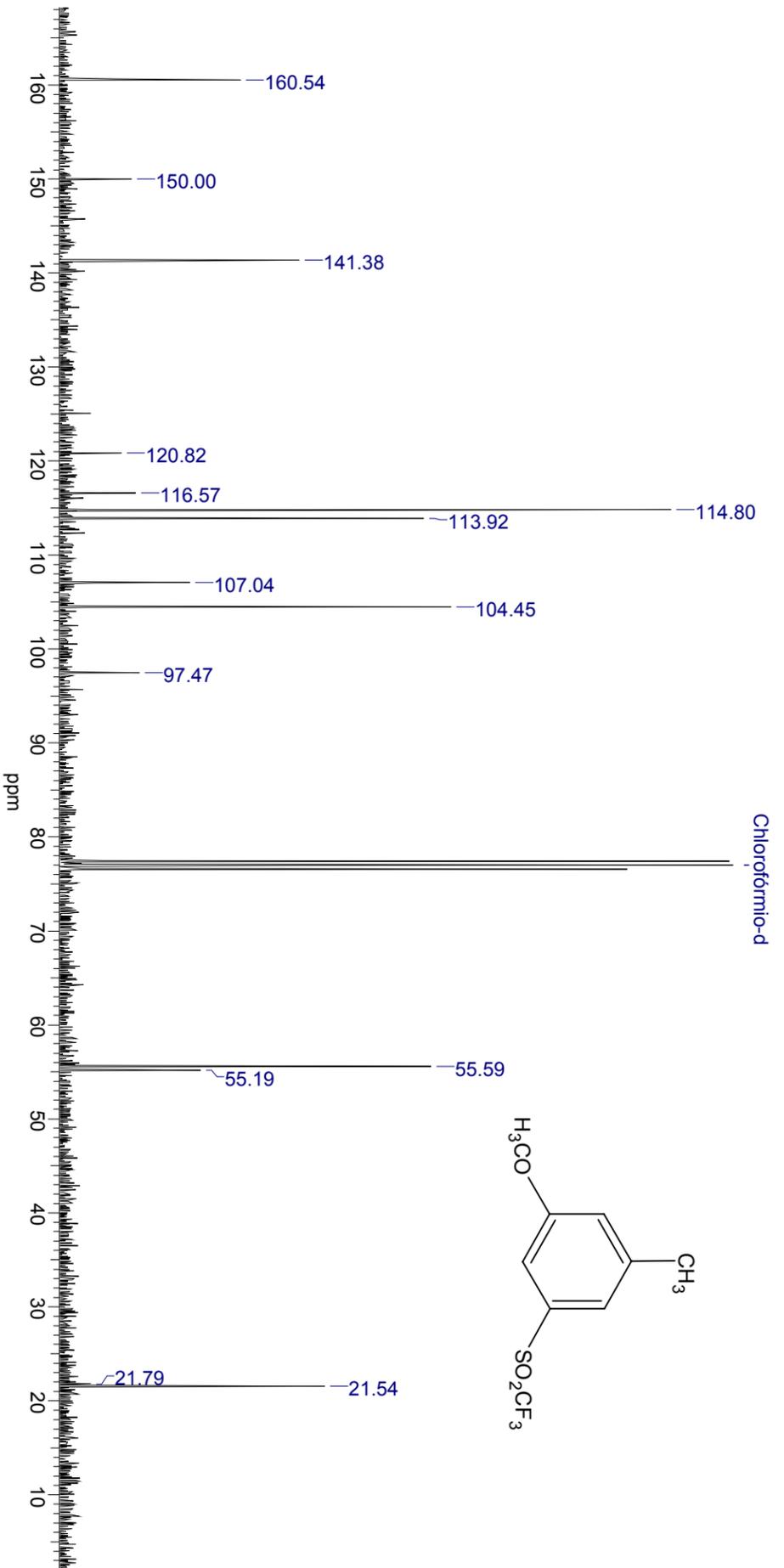


7.125 Nome	7.126 RM	7.127 Frequência (MHz)	7.128 Solvente
	N		
7.129 3-trifluorometonossulfoni-5-metóxi-orcinol	7.130 1H	7.131 300.00	7.132 Clorofórmio deuterado



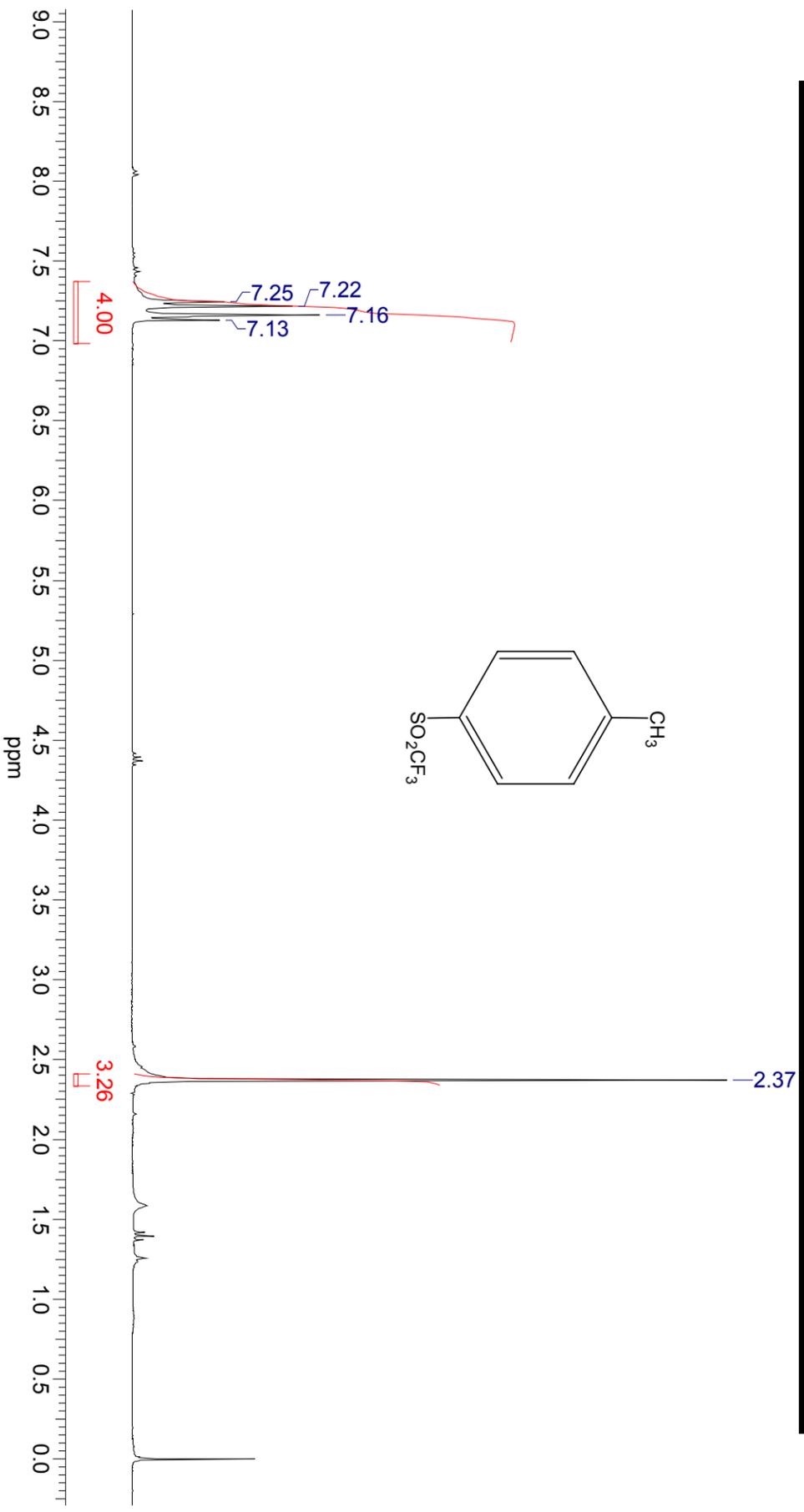
LXXXV

7.133 Nome	7.134 RM	7.135 Frequência (MHz)	7.136 Solvente
7.137 3-trifluorometonossulfoni-5-metóxi-orcinol	7.138 ¹³ C	7.139 75.00	7.140 Clorofórmio deuterado



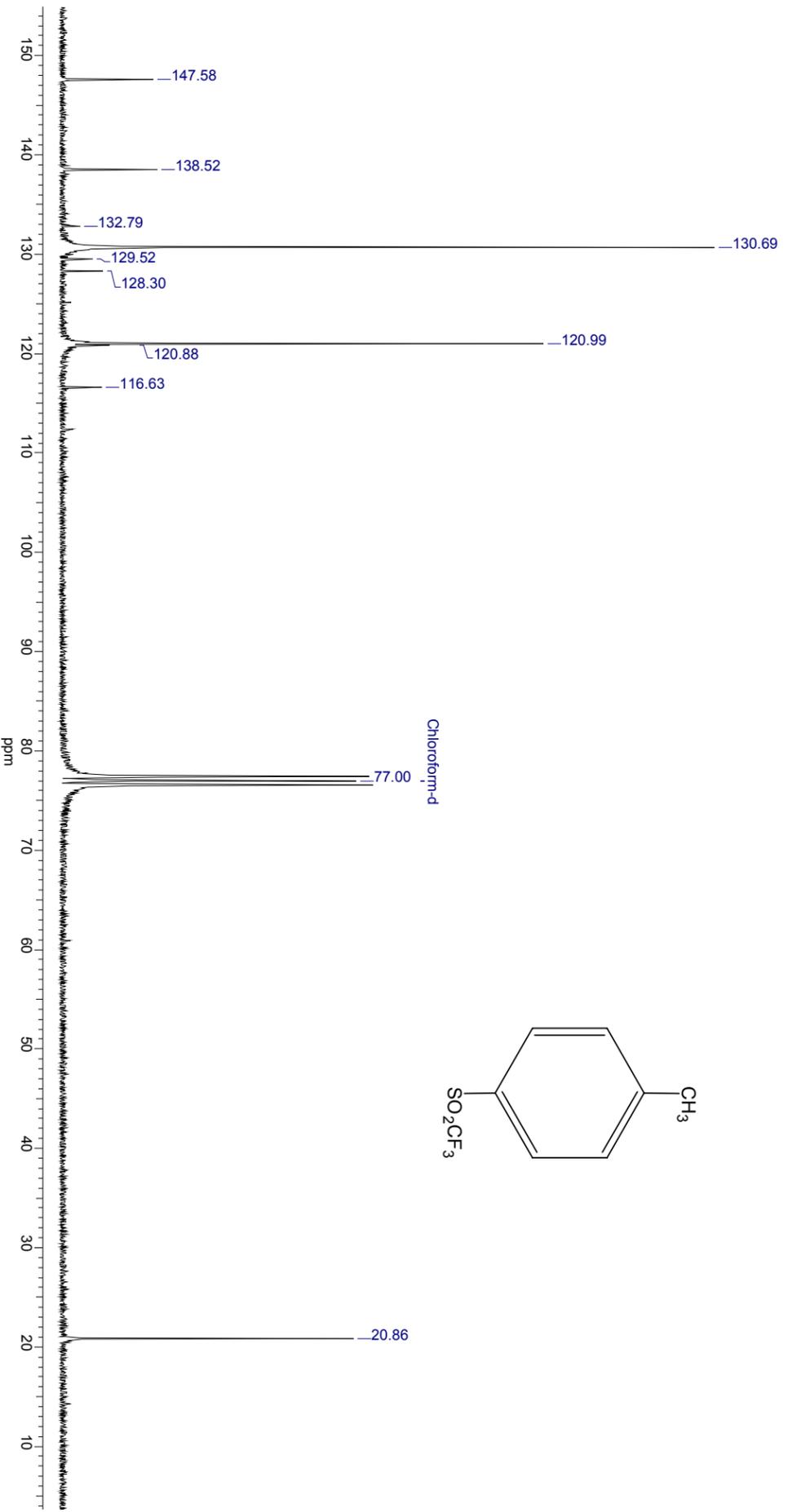
LXXXVI

7.141 Nome	7.142 RM	7.143 Frequência (MHz)	7.144 Solvente
7.1454-trifluorometanosulfonil-tolueno	<i>N</i>	300.00	Clorofórmio deuterado



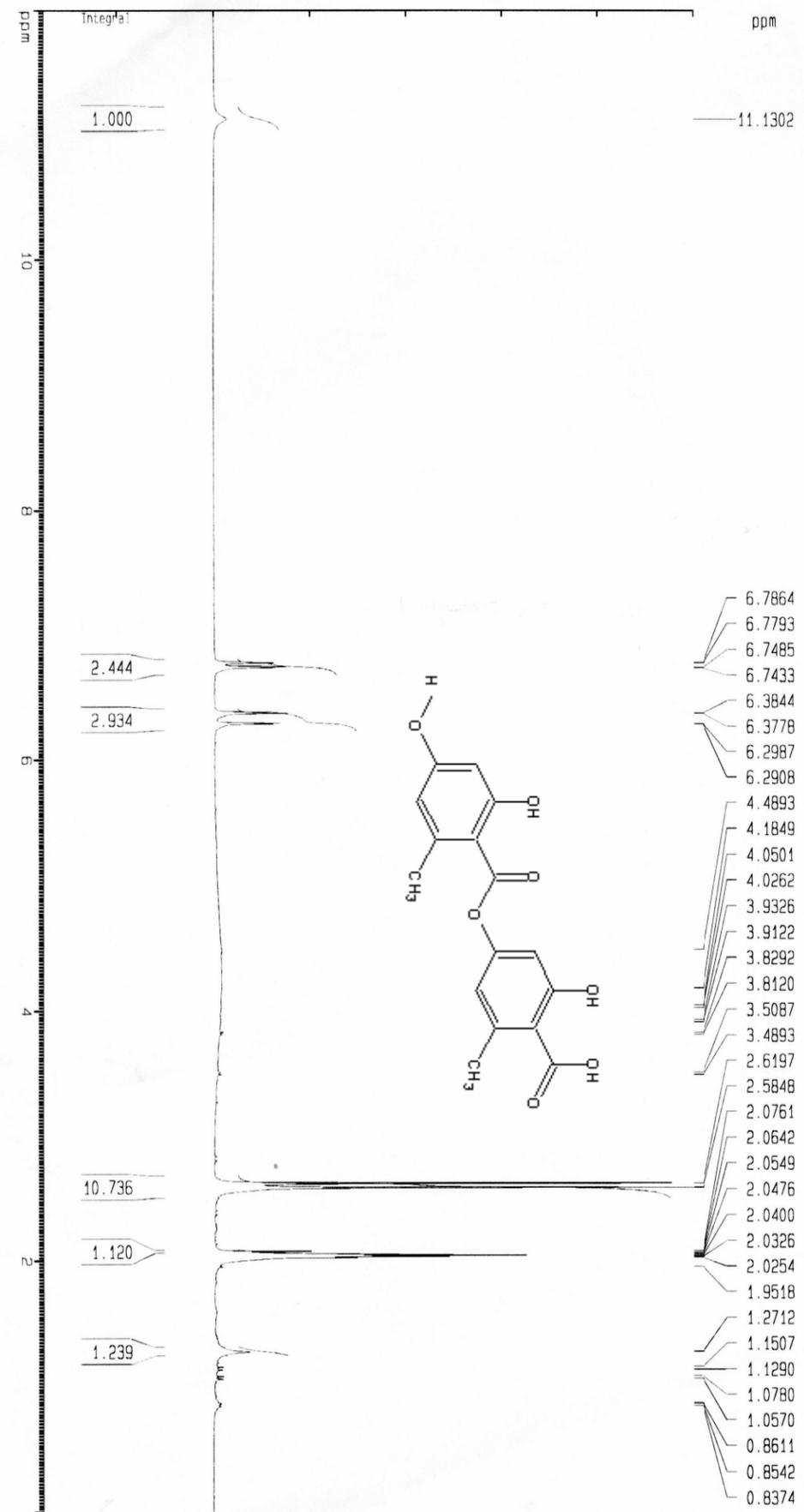
LXXXVII

7.149 Nome	7.150 RM	7.151 Frequência (MHz)	7.152 Solvente
7.153 4-trifluorometonossulfoni-tolueno	7.154 ¹³ C	7.155 75.00	7.156 Clorofórmio deuterado



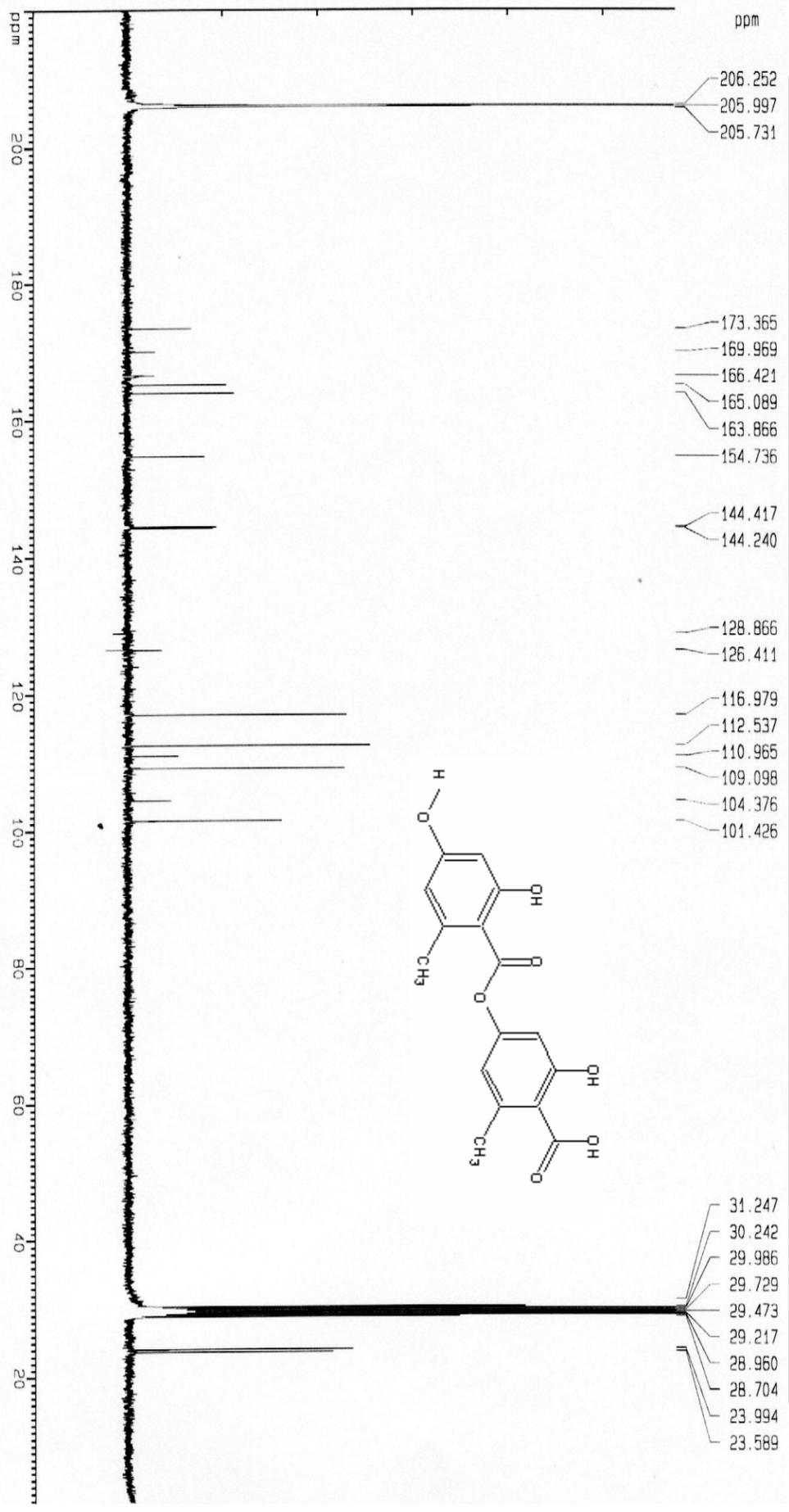
LXXXVIII

7.157 Nome	7.158 RM	7.159 Frequência (MHz)	7.160 Solvente
7.161 Ácido Lecanótrico	N	7.162 1H	7.163 300.00
			7.164 acetona deuterado



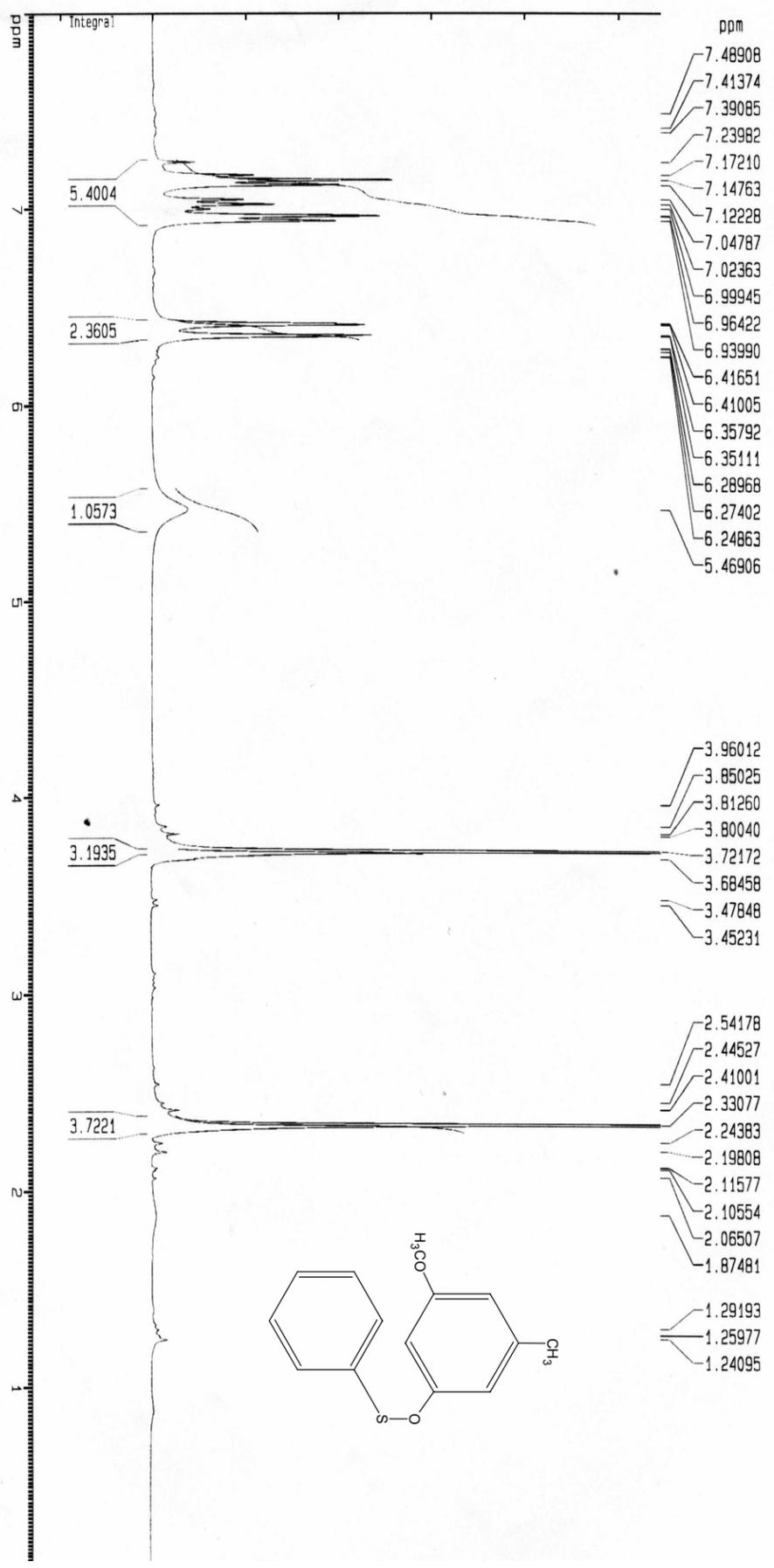
LXXXIX

7.165 Nome **7.166 RM** 7.167 Frequência (MHz) 7.168 Solvente
 N
 7.169 Ácido Lecanórico **7.170 1H** 7.171 **75.00** 7.172 **acetona deuterado**



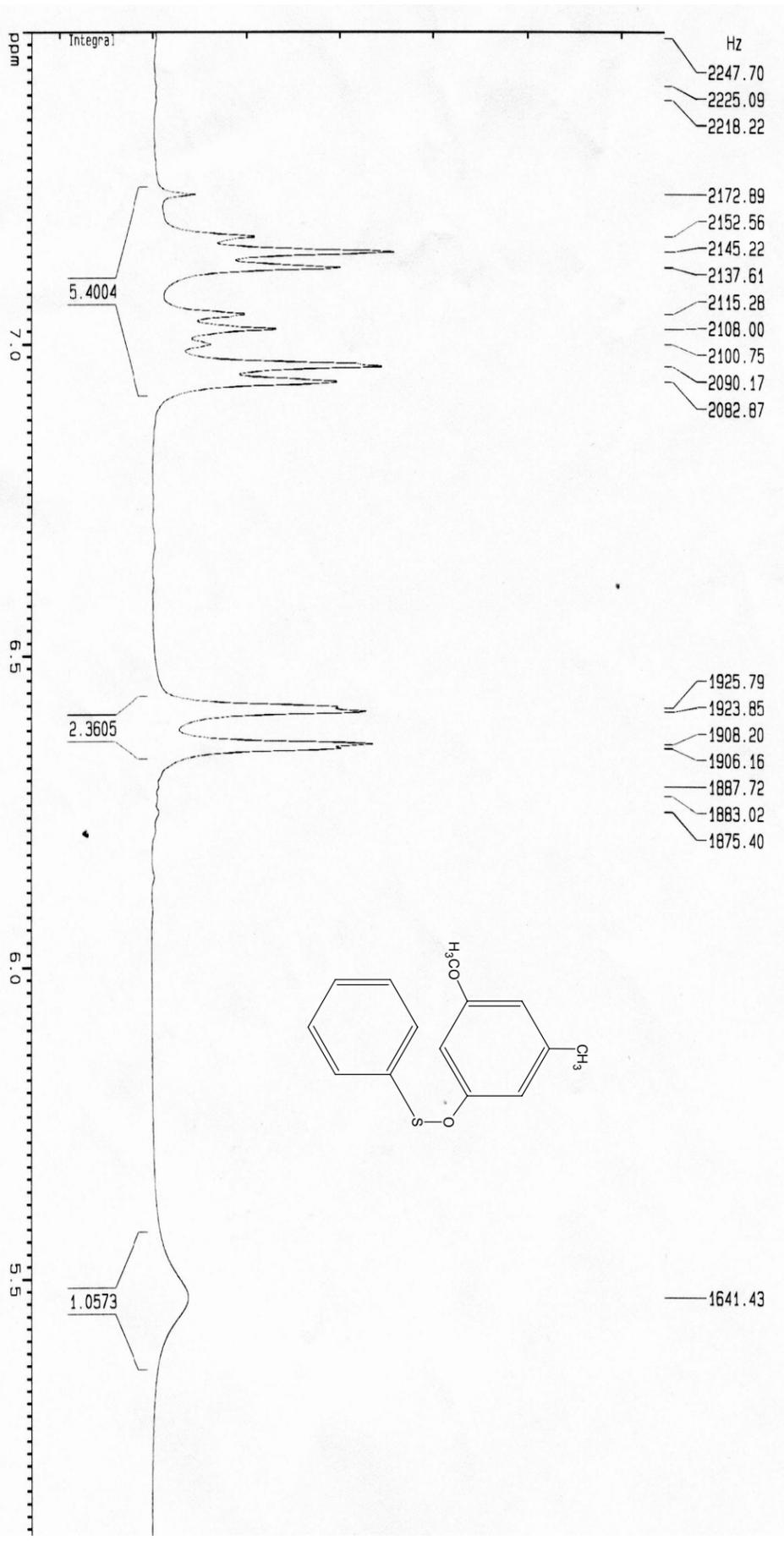
XC

7.173 Nome **7.174 RM** 7.175 Frequência (MHz) **7.176 Solvente**
N
 7.177 Ácido Lecanótico **7.178 1H** 7.179 **75.00** **7.180 cloroformio**
deuterado



XCI

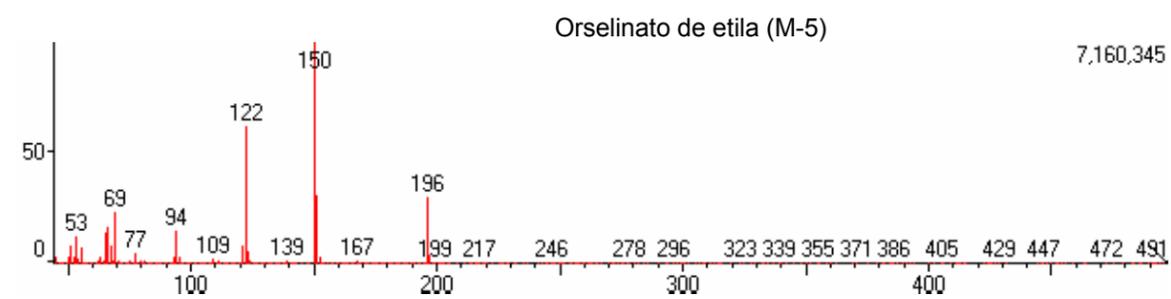
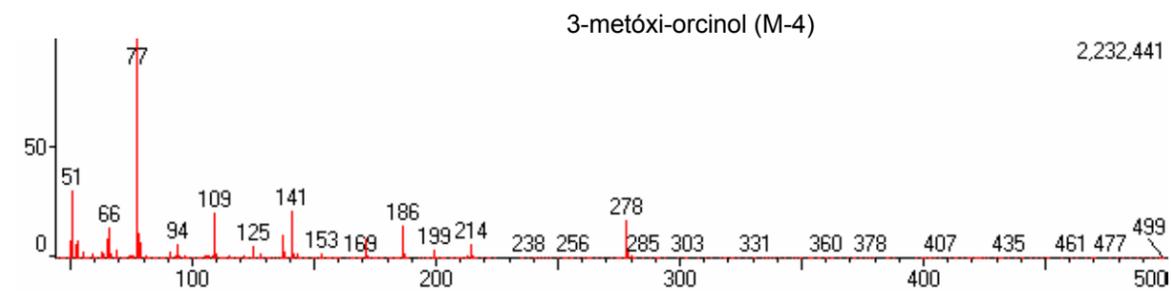
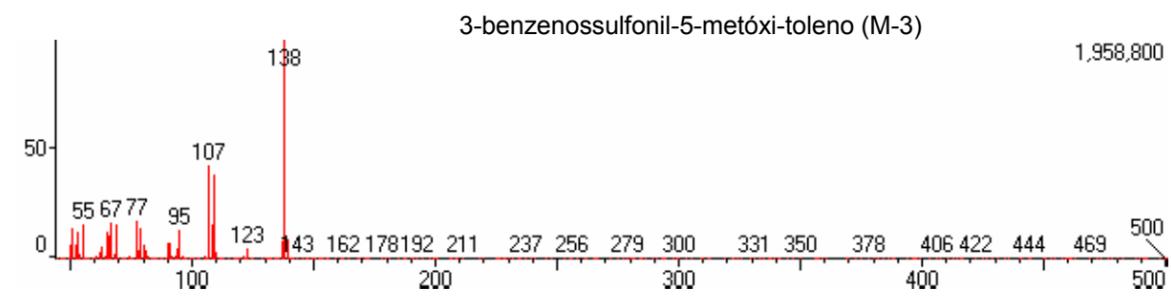
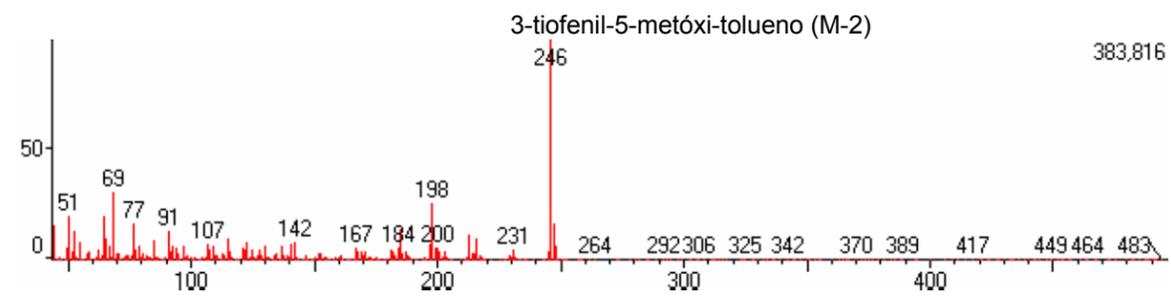
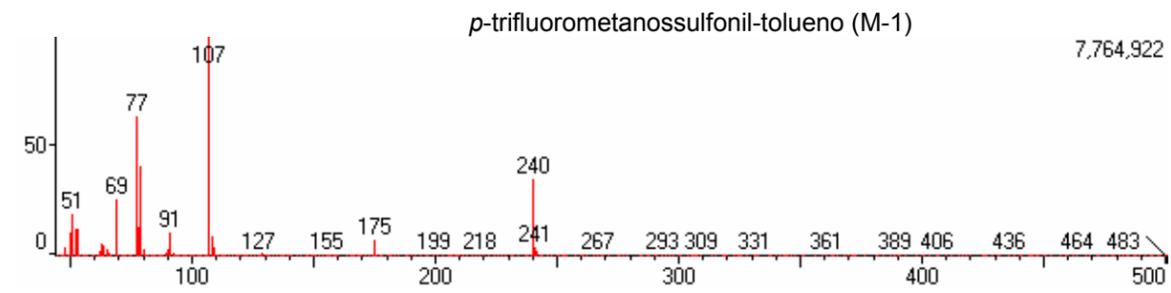
7.181 Nome	7.182 RM	7.183 Frequência (MHz)	7.184 Solvente
7.1853-tiofenil-5-metóxi-orcinol	<i>N</i>	7.186 1H	7.188 cloroformio deuterado



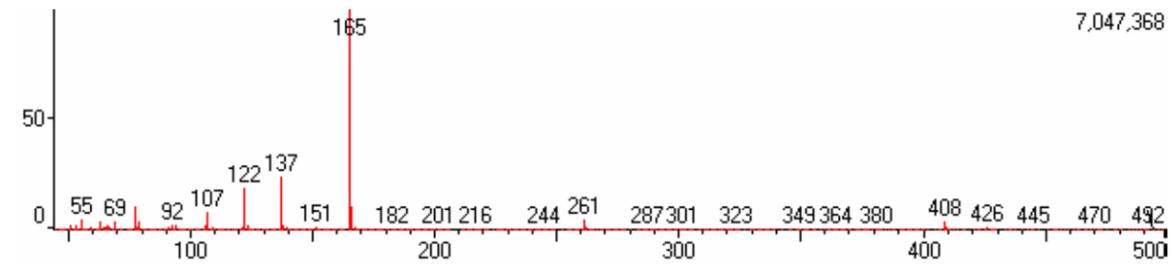
XCII

Espectros de massa

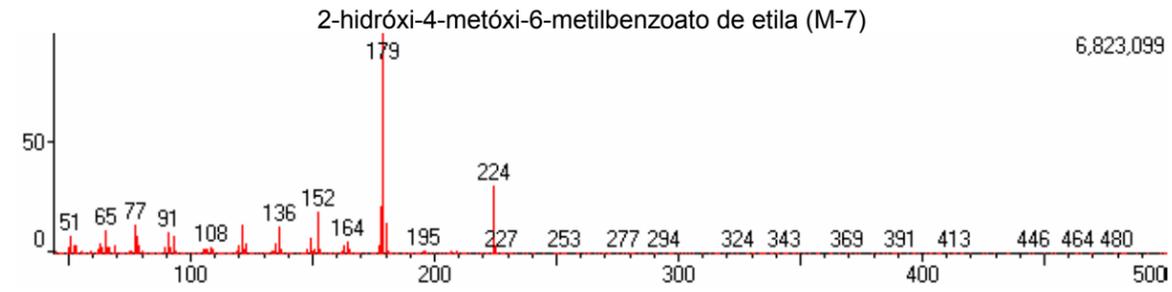
1 Baixa Resolução



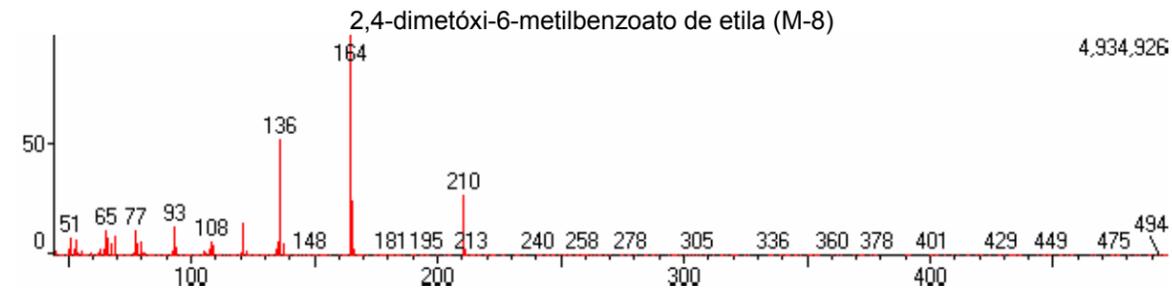
Ácido orselínico (M-6)



7,047,368



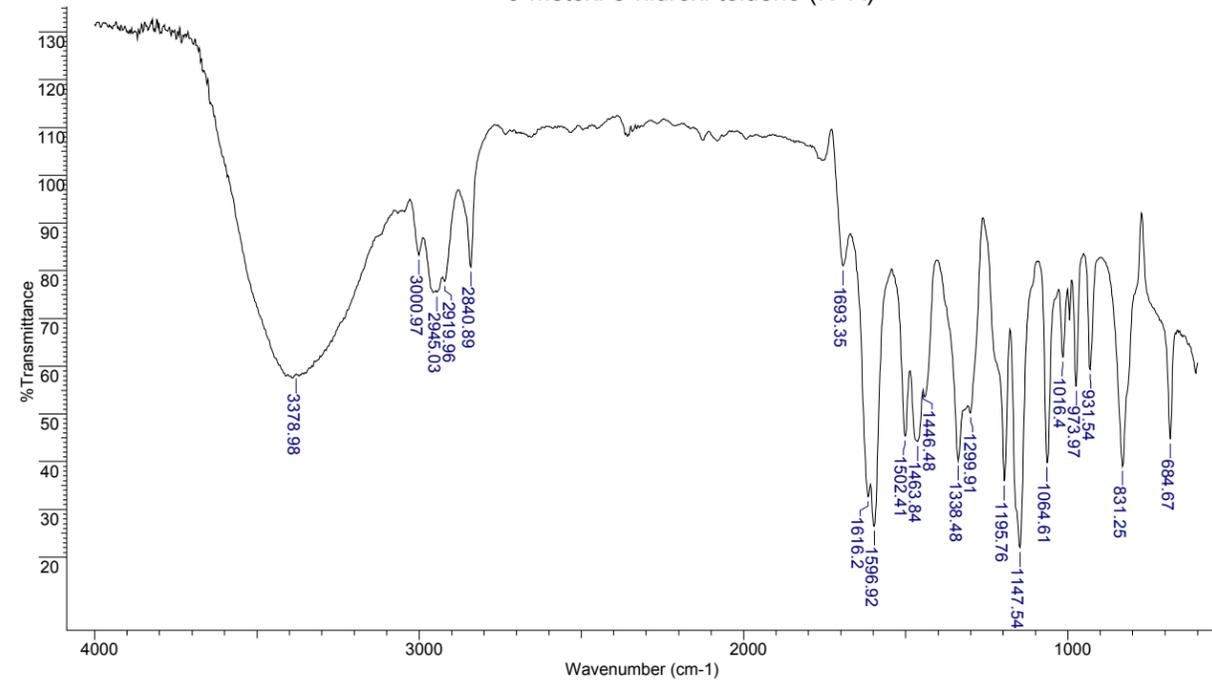
6,823,099



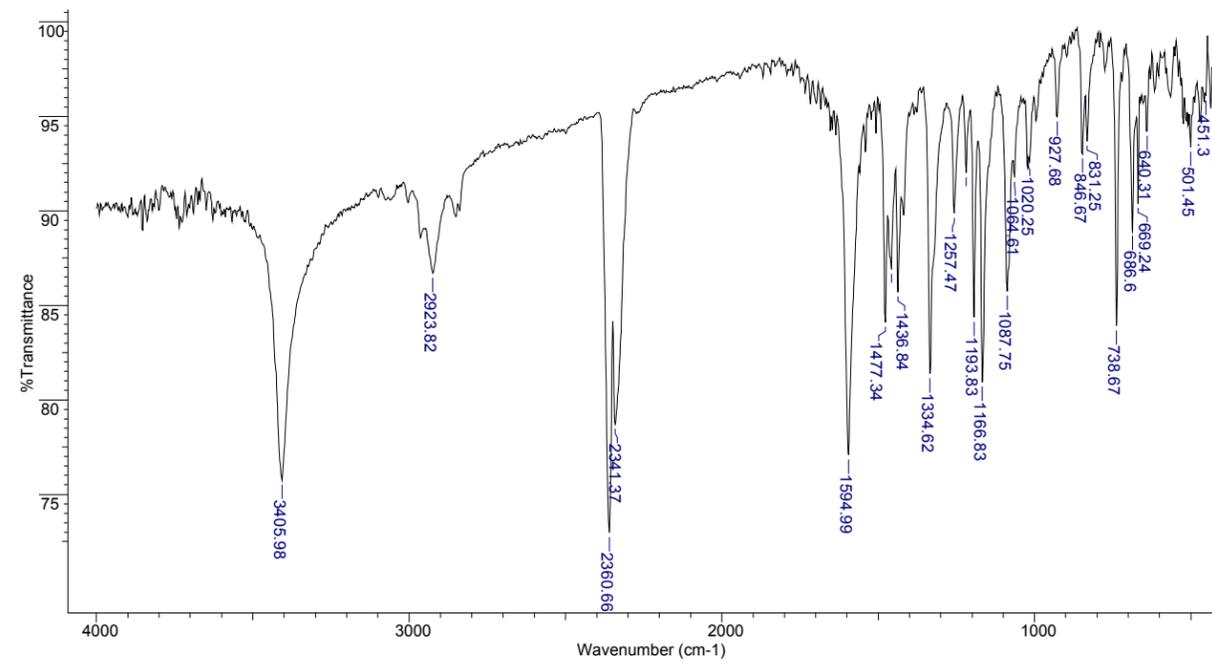
4,934,926

Espectros de Infravermelho

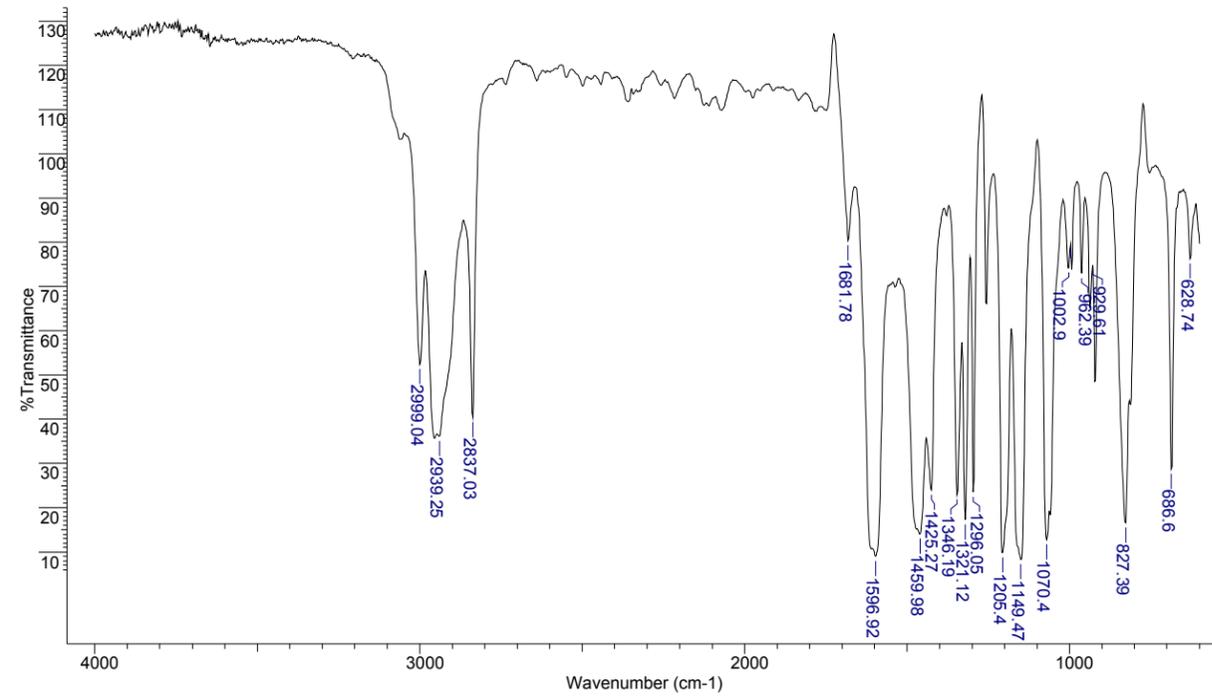
3-metóxi-5-hidróxi-tolueno (IV-A)



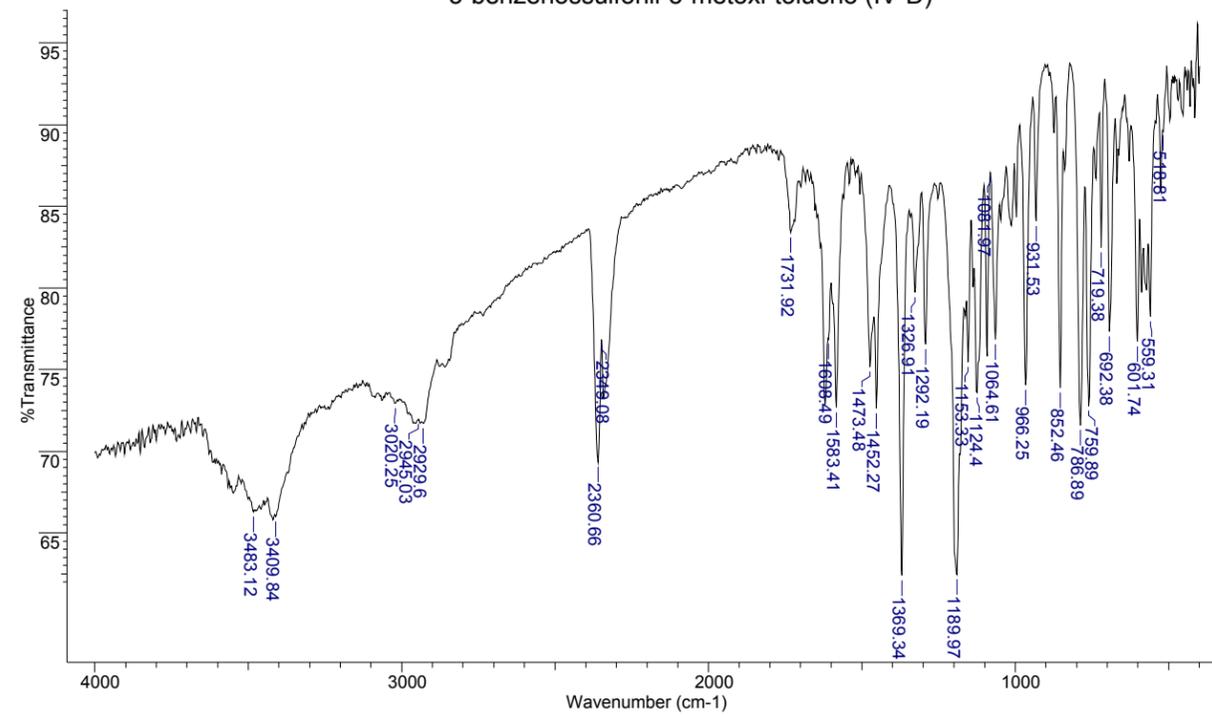
3-tiofenil-5mertóxi-tolueno (IV-B)



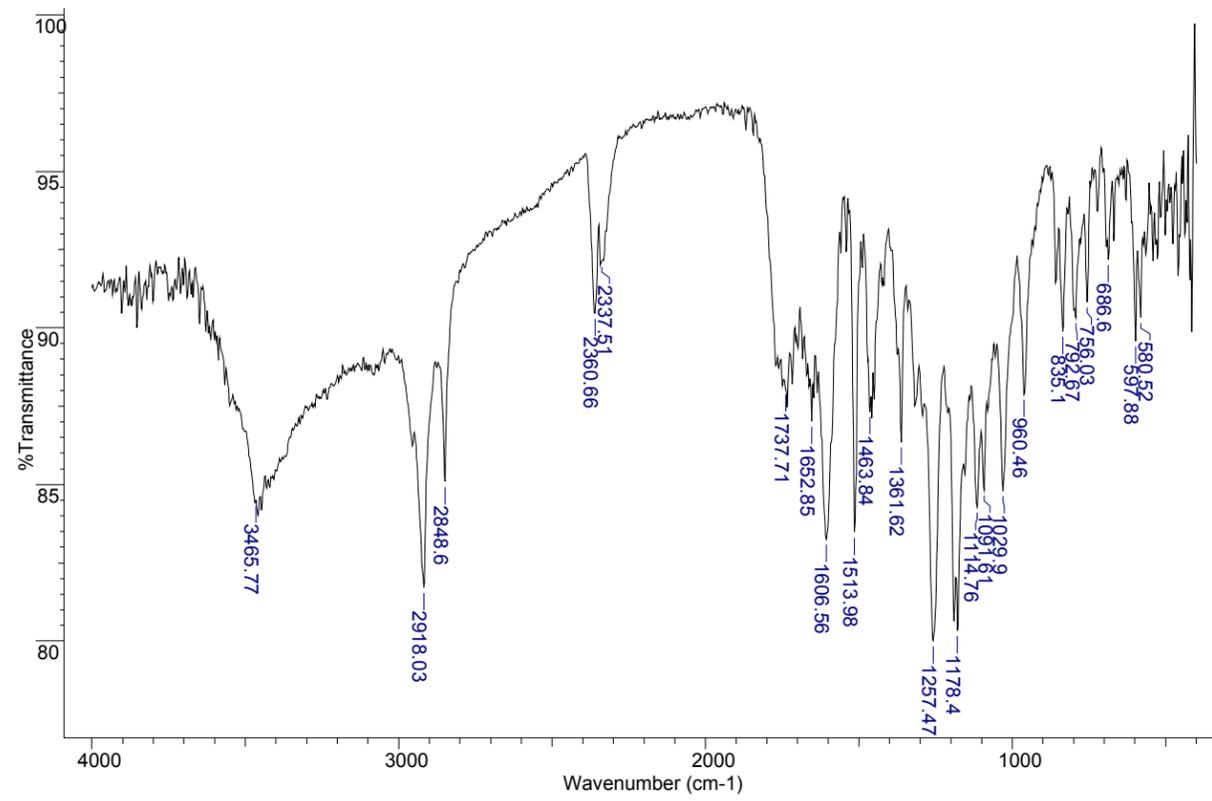
2,4-dimetóxi-6-metilbenzoato de etila (IV-C)



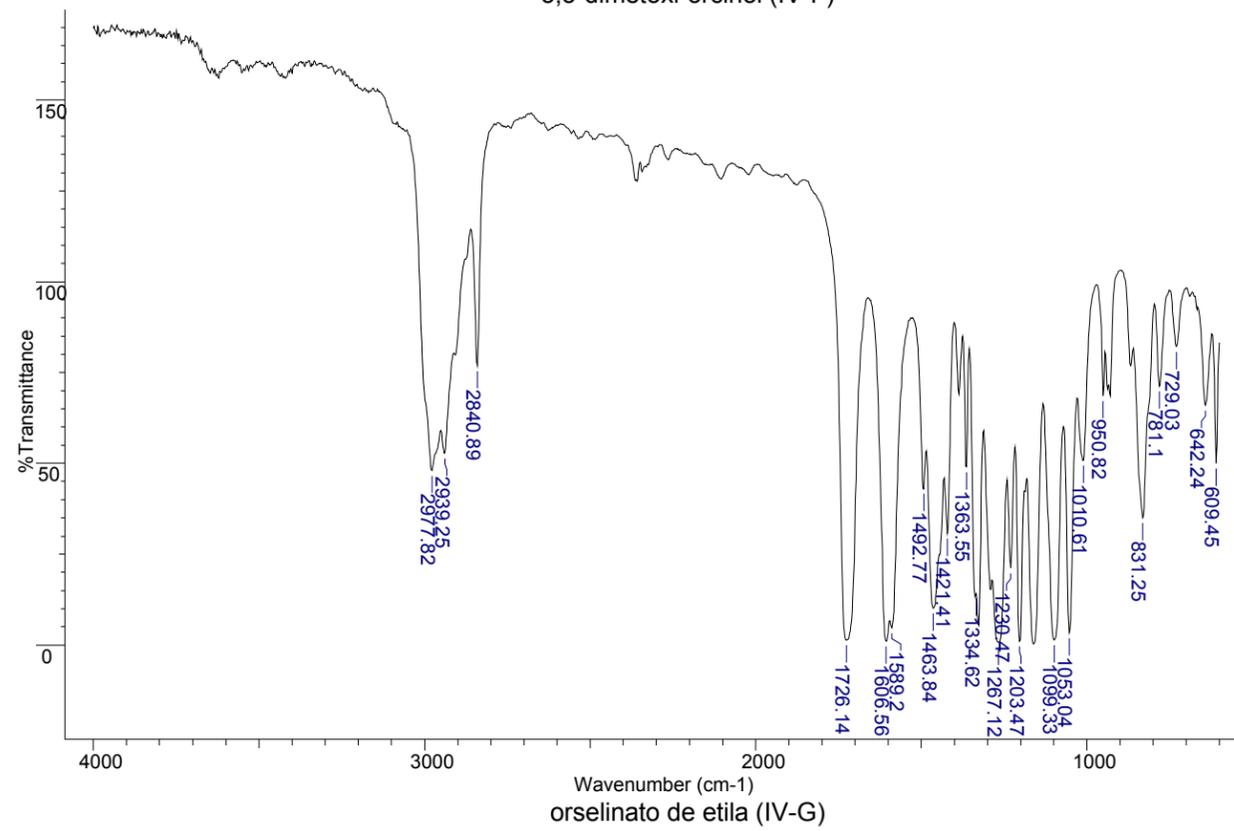
3-benzenossulfonil-5-metóxi-tolueno (IV-D)



3-trifluormetanossulfonil-5-metóxi-Tolueno (IV-E)



3,5-dimetóxi-orsinol (IV-F)



orselinato de etila (IV-G)

