

**MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE  
FRENTE À LARVAS DE *ARTEMIA SALINA* DE FUROCUMARINAS  
ISOLADAS DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII***

**GISELLE VIANA DE ALMEIDA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
AGOSTO - 2006

**MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE  
FRENTE À LARVAS DE *ARTEMIA SALINA* DE FUROCUMARINAS  
ISOLADAS DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII***

**GISELLE VIANA DE ALMEIDA**

Monografia apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do grau de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Carlos Roberto Ribeiro Matos  
Co-Orientador: Prof<sup>a</sup>. Leda Mathias

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
AGOSTO - 2006

**MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE  
FRENTE À LARVAS DE *ARTEMIA SALINA* DE FUROCUMARINAS  
ISOLADAS DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII***

**GISELLE VIANA DE ALMEIDA**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Ivo José Curcino Vieira – LCQUI- CCT-UENF

---

Prof. Dr. Edimilson José Maria – LCQUI- CCT-UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Mathias – LCQUI- CCT-UENF  
(Co-Orientadora)

---

Prof. Dr. Carlos Roberto Ribeiro Matos – LCQUI- CCT-UENF  
(Orientador)

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>IV</b>
<b>RESUMO:</b> .....	<b>VI</b>
<b>AGRADECIMENTOS:</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS:</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS:</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO:</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA:</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 - CUMARINAS</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 – CUMARINAS ISOLADAS DA ESPÉCIE <i>BROSIMUM GAUDICHAUDII</i></b> .....	<b>5</b>
<b>2.3 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS CUMARINAS</b> .....	<b>6</b>
<b>2.4 - FUROCUMARINAS E FOTOTOXICIDADE</b> .....	<b>9</b>
<b>2.5 - SÍNTESE DE CUMARINAS</b> .....	<b>11</b>
<b>2.6 - BIOENSAIO DE LETALIDADE COM <i>ARTEMIA SALINA</i></b> .....	<b>12</b>
<b>3. OBJETIVOS:</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2- OBJETIVOS GERAIS:</b> .....	<b>14</b>
<b>3.3 – MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL</b> .....	<b>14</b>
<b>4. SEÇÃO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>16</b>
<b>4.1 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
<b>4.1.1 - Procedimentos Gerais</b> .....	<b>16</b>
<b>4.1.2 - Reagentes e Solventes</b> .....	<b>16</b>
<b>4.1.3 - Cromatografia</b> .....	<b>16</b>
<b>4.1.4 - Dados Físicos</b> .....	<b>16</b>
<b>4.2 – EXTRAÇÃO DAS CUMARINAS NATURAIS</b> .....	<b>17</b>
<b>4.3 – DESCRIÇÃO DAS ETAPAS DE SÍNTESES DESENVOLVIDAS DURANTE O TRABALHO</b> .	<b>17</b>
<b>4.3.1 – Síntese do 5-hidroxi-psoraleno</b> .....	<b>17</b>
<b>4.3.2 – Síntese do 8-hidoxi-psoraleno</b> .....	<b>18</b>
<b>4.3.3 – Oxidação do 5-hidroxi-psoraleno com sal de Fremmy [(KO<sub>3</sub>S)<sub>2</sub>NO] ...</b>	<b>19</b>
<b>4.3.4 – Oxidação do 8-hidroxi-psoraleno com sal de Fremmy [(KO<sub>3</sub>S)<sub>2</sub>NO] ..</b>	<b>21</b>
<b>4.3.6 – Oxidação do Bergapteno natural com Nitrato Cérico Amoniacal -</b> <b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> - (CAN)</b> .....	<b>21</b>
<b>4.4 - BIOENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM <i>ARTEMIA SALINA</i></b> .....	<b>22</b>
<b>4.4.1 - Preparo da Solução de Água do Mar Artificial</b> .....	<b>22</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>24</b>
<b>5.1 - MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS FUROCUMARINAS</b> .....	<b>24</b>

	V
<b>5.1.1 – Síntese do 5-hidroxipsoraleno.....</b>	<b>24</b>
<b>5.1.2 – Síntese do 8-hidroxipsoraleno.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1.3 – Oxidação do 5-hidroxipsoraleno com sal de Fremmy.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1.4 – Oxidação do 8-hidroxipsoraleno com sal de Fremmy.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1.5 – Oxidação do Bergapteno natural com Nitrato Cérico Amoniacal- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> - (CAN): .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2 - BIOENSAIO DE LETALIDADE COM <i>ARTEMIA SALINA</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>40</b>

**RESUMO:**

Neste trabalho foi destacada a importância das cumarinas devido ao fato dessa classe de substâncias apresentarem diversas atividades biológicas, dentre as quais podemos citar a atividade antibacteriana, farmacológicas, ação vasodilatadora, espasmolítica, anticoagulante, enzimática e fotossensibilizante.

O trabalho foi realizado em duas partes experimentais distintas. Na primeira parte, foram utilizadas como matéria prima o Bergapteno (isolado da espécie *Brosimum gaudichaudii*) e o 8-metoxipsoraleno. Modificações estruturais foram realizadas nessas moléculas com o objetivo de obter as funções fenólicas e quinônicas. O bergapteno e o 8-metoxipsoraleno foram oxidados com sal de Fremmy, resultando na função quinônica com bons rendimentos. O tratamento do bergapteno com nitrato cérico amoniacal, outro agente oxidante usado, conduziu a oxidação do anel furânico. A segunda parte do trabalho foi testar a citotoxicidade das furocumarinas naturais e modificadas quimicamente utilizando-os para o bioensaio de letalidade com larvas de *Artemia salina* Leach.

**AGRADECIMENTOS:**

Agradeço inicialmente a Deus por me dar força para superar todos os obstáculos em minha vida e por tudo que ele tem me proporcionado.

Aos meus pais, meu namorado e a todos os meus familiares, pelo apoio e incentivo durante a graduação.

Ao Professor Carlos Roberto Ribeiro Matos, pela sua dedicação como orientador, pela sua paciência e amizade.

Aos Professores Leda Mathias e Edmilson pela contribuição para meu crescimento acadêmico.

Aos companheiros do laboratório, pelos conselhos, cooperação e compreensão.

**LISTA DE ABREVIATURAS:**

DMF – N,N-dimetilformamida

DMSO – Dimetil Sulfóxido

CAN - Nitrato Cérico Amoniacal -  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$

IV – Infravermelho

CG-EM - cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

RMN  $^{13}\text{C}$  – Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN  $^1\text{H}$  – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Sal de Fremy - Nitrodisulfonato de potássio

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

GMPc - Guanosina monofosfato cíclico



## LISTA DE FIGURAS:

<b>Figura 1</b> – Estrutura de fármacos obtidos de fontes naturais.....	<b>1</b>
<b>Figura 2</b> – Pilocarpina .....	<b>2</b>
<b>Figura 3</b> – Quinina como protótipo da mefloquina .....	<b>3</b>
<b>Figura 4</b> – Obtenção do Cromoglicato de sódio a partir da quelina .....	<b>5</b>
<b>Figura 5</b> - Classificação de cumarinas .....	<b>7</b>
<b>Figura 6</b> - Anticoagulantes cumarínicos .....	<b>8</b>
<b>Figura 7</b> – Cumarinas bioativas .....	<b>10</b>
<b>Figura 8</b> – Cicloaductos de furocumarinas com base púrica timina .....	<b>12</b>
<b>Figura 9</b> – Síntese de Cumarina .....	<b>12</b>
<b>Figura 10</b> – Síntese do desidropsoraleno .....	<b>14</b>
<b>Figura 11</b> – Proposta de modificação estrutural do bergapteno .....	<b>15</b>
<b>Figura 12</b> – Quinonas bioativas .....	<b>18</b>
<b>Figura 13</b> - Formação do Cloridrato de piridina .....	<b>18</b>
<b>Figura 14</b> - Síntese do 5-hidroxi-psoraleno .....	<b>19</b>
<b>Figura 15</b> - Síntese do 8-hidroxi-psoraleno .....	<b>20</b>
<b>Figura 16</b> - Oxidação do 5-hidroxi-psoraleno com sal de Fremmy $[(\text{KO}_3\text{S})_2\text{NO}]$ ..	<b>21</b>
<b>Figura 17</b> - Oxidação do 8-hidroxi-psoraleno com sal de Fremmy $[(\text{KO}_3\text{S})_2\text{NO}]$ ..	<b>22</b>
<b>Figura 18</b> - Oxidação do Bergapteno natural com Nitrato Cérico Amoniaco .....	<b>24</b>
<b>Figura 19</b> – Proposta de mecanismo para a síntese do 5-hidroxipsoraleno .....	<b>25</b>
<b>Figura 20</b> – Proposta de fragmentação do 5-hidroxipsoraleno .....	<b>25</b>
<b>Figura 21</b> – CG-EM do 5-Hiróxipsoraleno .....	<b>27</b>
<b>Figura 22</b> - Espectro na região do infravermelho do 5-hidroxipsoraleno .....	<b>28</b>
<b>Figura 23</b> – CG-EM do 8-Hiróxipsoraleno .....	<b>29</b>
<b>Figura 24</b> – Espectro na região do infravermelho do 8-hidroxipsoraleno .....	<b>29</b>
<b>Figura 25</b> – Proposta de mecanismo para a oxidação do 5-hidroxipsoraleno .....	<b>30</b>
<b>Figura 26</b> – Espectro de massas do p-psoralenoquinona .....	<b>30</b>
<b>Figura 27</b> – Proposta mecanística de fragmentação da p-psoralenoquinona .....	<b>31</b>
<b>Figura 28</b> – CG-EM do p-psoralenoquinona .....	<b>31</b>
<b>Figura 29</b> – Formação da função 1,4-quinona a partir de um substrato dimetoxilado .....	<b>32</b>

<b>Figura 30</b> – Síntese da $\beta$ -Lapachona .....	<b>32</b>
<b>Figura 31</b> – CG-EM do produto da oxidação com o CAN .....	<b>32</b>
<b>Figura 32</b> – Proposta de fragmentação do 3'-hidroxi-5-metoxi-2'-nitrooxi-2',3'-desidropsoraleno .....	<b>33</b>
<b>Figura 33</b> – Técnica de inserção direta para o produto da oxidação com o CAN .....	<b>33</b>
<b>Figura 34</b> – Possível produto da oxidação do bergapteno com CAN .....	<b>34</b>
<b>Figura 35</b> – Espectro de Infravermelho do Possível produto da oxidação do bergapteno com CAN .....	<b>35</b>
<b>Figura 36</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da oxidação do bergapteno com CAN .....	<b>36</b>
<b>Figura 37</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da oxidação do bergapteno com CAN .....	<b>37</b>

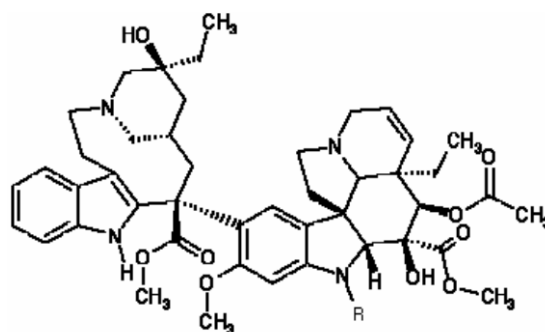


## 1. INTRODUÇÃO:

A humanidade vem utilizando plantas medicinais com fins terapêuticos desde o início de sua história. O conhecimento de plantas alucinógenas pelos ameríndios que as utilizavam em seus ritos pagãos, bem como das propriedades afrodisíacas de diversas poções preparadas a partir de distintas espécies vegetais acompanha o homem a milênios (Barreiro & Fraga, 2001).

Até a década de 1960 houve predominância do uso de medicamentos de origem vegetal. Após esse período, devido aos avanços ocorridos na indústria farmacêutica, a fitoterapia cedeu lugar às drogas de origem sintética (Barreiro & Fraga, 2001).

Atualmente na terapêutica moderna os fármacos de origem sintética correspondem a 85% do total. Considerando ainda aqueles oriundos de processos de hemi-síntese, como muitos antibióticos, este percentual pode superar os 85% mencionados. Entretanto muitos fármacos ainda são obtidos de fontes naturais devido sua complexidade estrutural ou ainda devido a desvantagem econômica da síntese total. Neste contexto podem ser citadas a vincristina e vimblastina (figura 1), fármacos eficientes, amplamente empregados no tratamento de leucemia. Estes fármacos são obtidos de fontes naturais pela Eli Lilly, que processa cerca de 8000 kg de flores da *Vinca rosea* anualmente (Barreiro & Fraga, 2001).

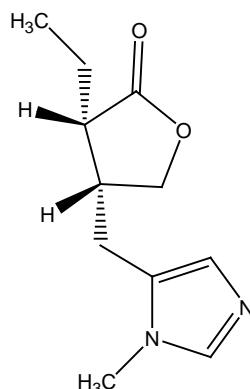


R = H, Vincristina

R = CHO, Vimblastina

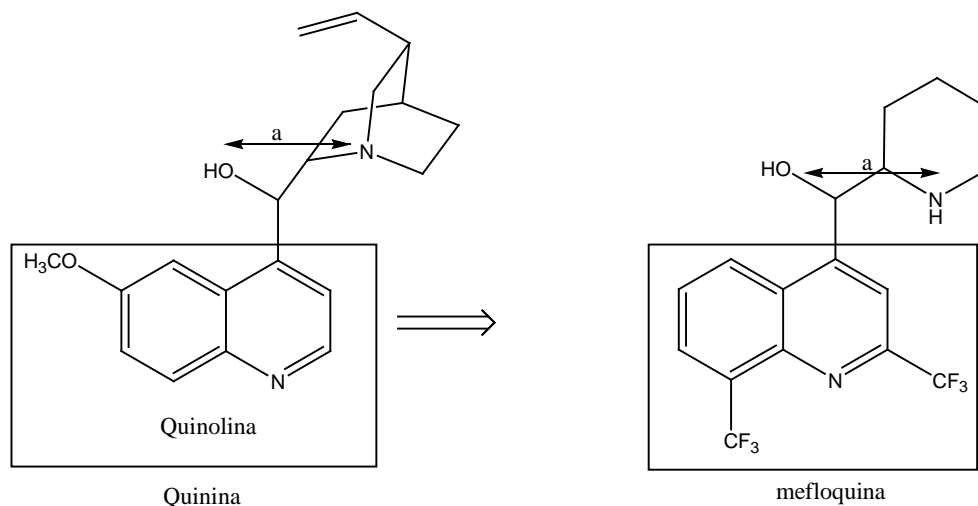
**Fig. 1** – Estrutura de fármacos obtidos de fontes naturais

Outro medicamento obtido de fonte natural que merece destaque é a pilocarpina, obtido de forma extrativa do jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*) (figura 2). A indústria Merck mantém uma fazenda de 3.500 hectares, localizada em Barra da Corda, no estado Maranhão para o cultivo jaborandi (www.merck.com.br, acesso em 02/08/2006).



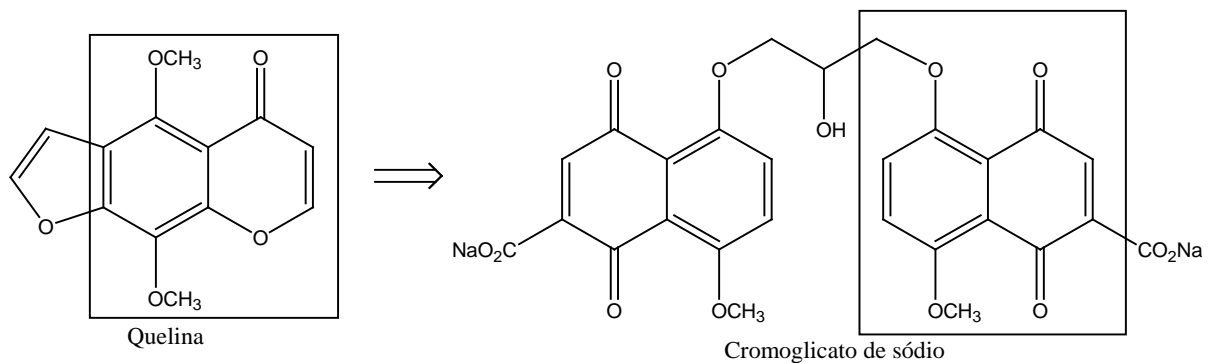
**Fig. 2 – Pilocarpina**

A grande diversidade estrutural encontrada nas distintas classes de produtos naturais, tais como, flavonóides, isoflavonóides, ligninas, neolignanas, glicosídeos, cumarinas, furocumarinas, quinonas, alcalóides, entre outras, representam fontes inesgotáveis de modelos originais, que possibilitam o uso de produtos naturais como protótipo para novos medicamentos. Por exemplo, a quinina, um dos componentes da *Cinchona officinalis*, conhecida pelos índios americanos por sua propriedade antitérmica, foi o composto protótipo para a descoberta de antimaláricos mais potentes, como a mefloquina (figura 3).



**Fig. 3 – Quinina como protótipo da mefloquina**

Podemos citar como protótipo natural, a quelina, um benzofurano isolado da *Ammi visnaga* que levou a descoberta do cromoglicato de sódio, aprovado para o uso clínico no tratamento de asma alérgica. (figura 4)



**Fig. 4** – Obtenção do Cromoglicato de sódio a partir da quelina

Modificações efetuadas na estrutura de substâncias naturais constitui umas das estratégias para a manipulação do potencial biológico. No presente trabalho utilizou-se como matéria-prima cumarinas extraídas da espécie *Brosimum gaudichaudii*, com o intuito de efetuar modificações estruturais, uma estratégia para a manipulação do potencial biológico.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA:

### 2.1 - Cumarinas

As cumarinas são consideradas fitoalexinas pois são produzidas pelas plantas quando são lesadas ou em resposta ao ataque de organismo bióticos.

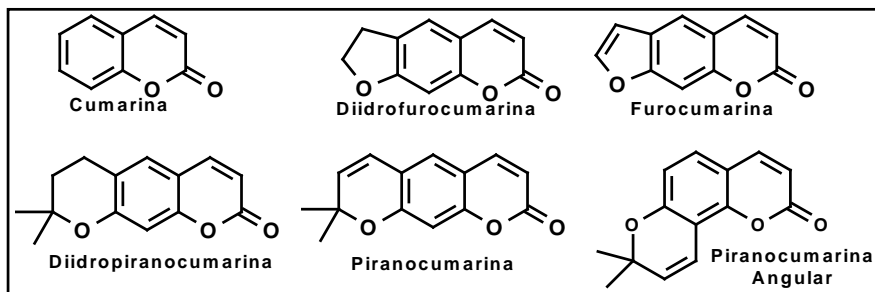
Cumarinas devem seu nome de classe a “cumaru”, o nome vernacular de tonka bean (*Dipteryx odorata* Willd., Fabaceae), da qual a cumarina foi isolada em 1820 (Bruneton, 1999).

Cumarinas pertencem a um grupo de substâncias conhecidas como benzopironas, todas as quais consistem de um anel benzênico ligado a uma pirona (figura 5). Cumarinas e outros membros da família das cumarinas são benzo- $\alpha$ -pironas, enquanto os outros principais membros do grupo das benzopironas – os flavonóides – contem o grupo  $\gamma$ -pirona (Keating & O’Kennedy, 1997):

Cumarinas também são encontradas na natureza em combinações com açúcar.

As cumarinas são classificadas de acordo com o tipo de substituinte ligado a sua estrutura base, podendo ser :

- simples – podem apresentar os grupos hidroxila, metila ou alquila ligados em sua estrutura.
- furocumarinas – possuem um anel furano ligado ao núcleo cumarínico, podendo ser divididos em lineares e angulares, dependendo da posição da substituição do anel furano. Dentre as furocumarinas mais comuns podemos citar a furocumarina e a diidrofurocumaina (Figura 5).
- piranocumarinas – são compostos análogos as furocumarinas, porém contendo um anel pirano ao invés do anel furano. A piranocumarinas, diidropiranocumarina e piranocumarinas angular (Figura 5) são alguns exemplos dessa classe (Ojala, 2001).



**Fig. 5 - Classificação de cumarinas**

Muitas cumarinas simples possuem odor característico, destacando-se a cumarina que foi amplamente utilizada como aromatizante em alimentos industrializados, no entanto, com base em dados sobre toxicidade hepática verificada em ratos, a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) a classificou como substância tóxica, passando a considerar sua adição em alimentos como adulteração (Federal Register, v. 19, p. 1239, 03/1954), posteriormente tal uso também foi banido na Europa. Por outro lado, devido as vantagens decorrentes do odor acentuado, estabilidade e baixo custo, a cumarina continua sendo amplamente utilizadas nas indústrias de produtos de limpeza e cosméticos (Goodman & Gilman, 1991).

## 2.2 – Cumarinas Isoladas da Espécie *Brosimum Gaudichaudii*

A espécie *Brosimum gaudichaudii* é conhecida popularmente como “mamica de cadela”, “apê do sertão” e “amoreira do mato”, tem como habitat preferencialmente a região do cerrado, principalmente entre os estados do Piauí, Ceará, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Goiás e São Paulo, (Berg, 1972; Correa e Pena, 1984; Silva, 1984).

O uso da espécie é reconhecido na medicina popular, onde suas raízes são usadas para tratamento do vitiligo e o pó obtido da raspagem das raízes como aromatizante (Lima e Ribeiro, 1967; Pozetti, 1969).

Até o momento, além de *B. gaudichaudii*, apenas duas espécies do gênero foram investigadas fitoquimicamente: *B. rubescens* Taubert (*B. paraense* Huber) conhecido popularmente como “muirapiranga” (região Amazônica) e “palo de



sangue” (Peru), cujo cerne da madeira contém xantiletina (primeira cumarina isoprenilada isolada de Moraceae) em grande quantidade além de outras cumarinas como 7-dimetilsuberosina, brosiparina, brosiprenina e luvangentina (Braz-Filho et al., 1970, 1971 e 1972). Também foram isolados dessa espécie outras classes de substâncias, tais como adutos do tipo Diels-Alder de chalconas-prenilcumarinas (Shirota et al., 1997 e 1998): e *B. acutifolium* conhecido popularmente como “mureré”, do qual foram isoladas flavanas. Cita-se a utilização desta espécie na região Amazônica como agente antiinflamatório e antireumático (Torres, 1997).

Do ponto de vista fitoquímico, a espécie destaca-se pela produção de cumarinas, especialmente furocumarinas, substâncias que apresentam efeito fotossensibilizante, sendo portanto muito utilizadas para o tratamento do vitiligo, confirmando o uso popular (Dean, 1963; Lima e Ribeiro, 1967).

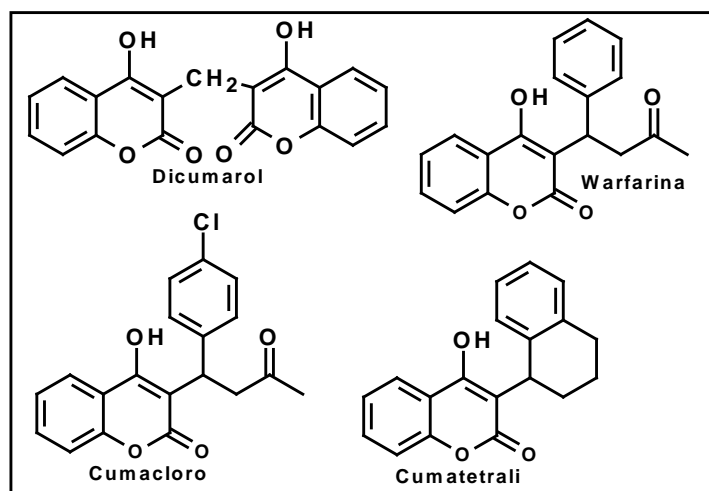
No extrato de raízes de *B. gaudichaudii* foi evidenciada a presença de bergapteno (Lima e Ribeiro, 1967), psoraleno (Pozetti, 1969; Vilegas et. al., 1993 b), (+)-(2'S,3'R)-3'-hidroximarmesina (Vilegas et. al., 1993), gaudichaudina, xantiletina e luvangetina (Vieira et al, 1999; Monteiro et al.,2002). O estudo fitoquímico dos frutos também constatou a presença de bergapteno e psoraleno (Pozetti e Bernardi, 1971).

### **2.3 – Atividade Biológica das Cumarinas**

Diversas atividades biológicas e farmacológicas são atribuídas as cumarinas, dentre elas citamos a atividade antibacteriana, vasodilatadora, espasmolítica, anticoagulante, enzimática e fotossensibilizante.

No início do século XX, o trevo doce foi plantado nas planícies de Dakota e Canadá, porque florescia em solos pobres e substituía o milho na silagem. Em 1924, Schofield relatou um distúrbio hemorrágico no gado, até então desconhecida, causado pela ingestão da silagem do trevo-doce estragado (*Melilotus officinalis* Lam.). A substância responsável por esta ação anticoagulante foi identificada por Campbell e Link, em 1939, como biidroxycumarina (dicumarol) (Figura 6), que atua interferindo na coagulação do sangue, causando a redução

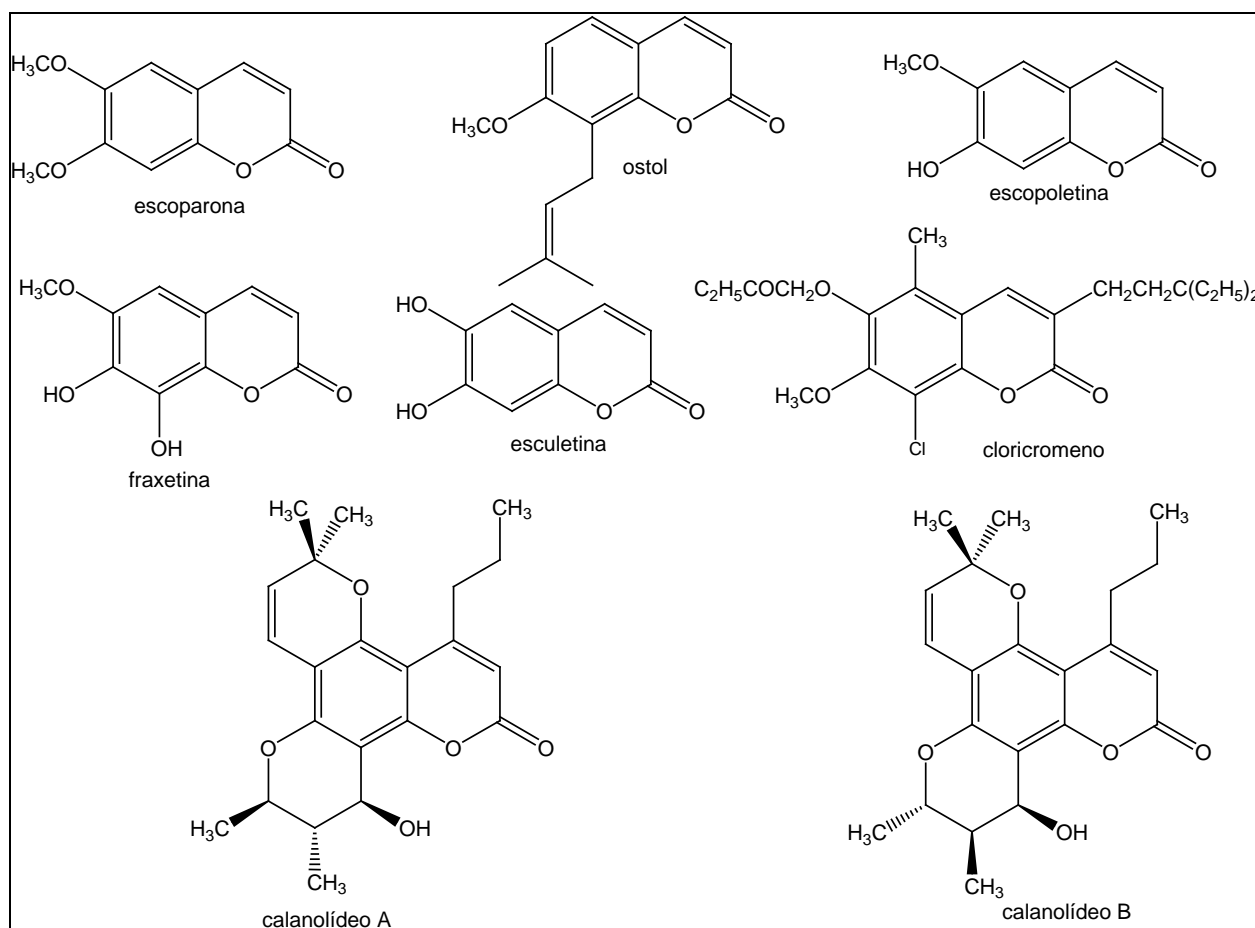
tóxica da protrombina plasmática (Goodman & Gilman, 1991). Esse foi o primeiro fármaco com essa ação por via oral e constitui um modelo para o desenvolvimento de uma classe de anticoagulantes com núcleo básico da 4-hidróxi-cumarina, do qual derivam importantes fármacos como a warfarina, entre outros (Hardman e Limbird, 1996). A Warfarina racêmica (Figura 6) foi amplamente utilizada como rodenticida, inicialmente pensou-se que a warfarina seria tóxica ao homem, mas em 1951, um homem sobreviveu a uma tentativa de suicídio, ingerindo doses elevadas e repetidas de um rodenticida que continha warfarina. Em 1954 foi relatado o uso do dicumarol em pacientes com infarto do miocárdio, o que levou ao uso excessivo do medicamento (Goodman & Gilman, 1991). Sais de Warfarina tem sido aplicados para fins terapêuticos no homem como agentes antitrombóticos (Katzung, 1984).



**Fig. 6** - Anticoagulantes cumarínicos

A escoparona (6,7-dimetóxicumarina) (figura 7), isolada da planta chinesa *Artemísia scoparia* Waldst. et Kit. (Asteraceae), apresentam diversas atividades imunossupressora, relaxante vascular, hipolipidêmica e hipotensora (Hoult e Payá, 1996). O ostol (7-metóxi-8-[3-metilpent-2-enil]cumarina) (figura 7) é uma das substâncias ativas isoladas de *Angélica pubescens* Maxim. (Apiaceae), cujos extratos provocam, em cães, uma resposta hipotensora de curta duração após injeção intravenosa (Hoult e Payá, 1996). A mesma substância inibiu a agregação plaquetária e demonstrou atividade relaxante da musculatura lisa e cardíaca,

possivelmente devido a inibição de enzimas cAMP-e cGMP-fosfodiesterases e do influxo de cálcio (Neuhaus-Carlisle et al., 1997). A atividade antiespasmódica de alguns extratos vegetais de espécies de *viburnum* (Caprifoliaceae) tem sido atribuída ao teor de escopoletina (figura 7) e outras cumarinas (Robbers et al., 1996). Do mesmo modo diversas diidrofurano-cumarina diidropiranocumarinas, isoladas de plantas da família Apiaceae, mostraram atividades vasodilatadoras, espasmolítica e antitrombótica. Propriedades semelhantes também foram relatadas para uma cumarina sintética denominada cloricromeno (figura 7) (Thastrup et al., 1983; 1985).



**Fig. 7 – Cumarinas bioativas**

Cumarinas contendo grupos diidroxilados em posição orto como a fraxetina (7,8-diidróxi-6-metoxi-cumarina) (figura 7), esculetina (6,7-diidroxí-cumarina) (figura 7) e 4-metil-esculetina (6,7-di-hidróxi-4-metilcumarina) (figura 7), são poderosos inibidores da peroxidação lipídica, além de eliminarem o ânion radical superóxido e quelarem íons ferro. Essas propriedades as tornaram substâncias de interesse como antioxidantes, de possível aplicação na prevenção de doenças causadas por radicais livres (Martín-Aragón et al., 1996).

Recentemente, algumas cumarinas com atividade anti-HIV foram identificadas a partir de fontes vegetais, por exemplo, podemos citar o calanolídeo-A e a calanolídeo-B (figura 7), isolados das folhas de uma árvore de floresta tropical, *Calophyllum lanigenum* Miq. var. *austrocoriaceum* (Guttiferae), encontrada na Malásia. Essas substâncias inibiram a replicação *in vitro* do HIV-1, provavelmente por inibição da atividade enzimática da DNA-polimerase dependente de DNA e da DNA-polimerase dependente de RNA presentes nos vírus (Vlietinck et al., 1998).

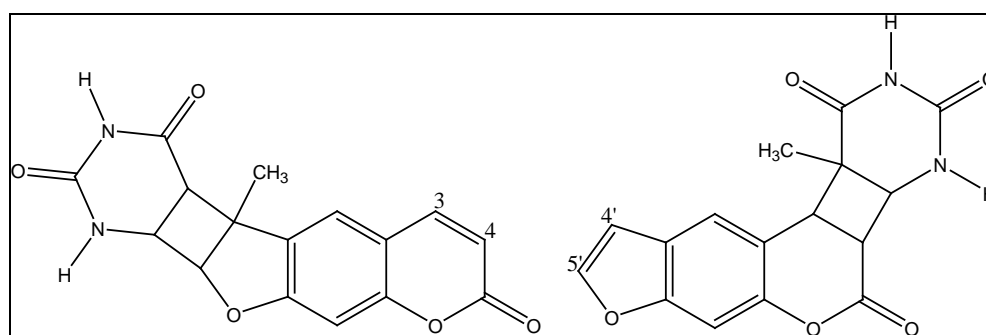
As cumarinas, devido a sua atividade vasodilatadora, podem ser utilizadas no tratamento da impotência masculina. Para ocorrer ereção, as artérias do pênis precisam dilatar para aumentar o fluxo de sangue. As cumarinas ostol, imperatoxina, xantonina e isopimpinlina em conjunto exibiram propriedades relaxadoras em *corpus cavernosus* de coelhos com endotélio intacto, essas substâncias foram isoladas de frutos de *Cnidium monnieri* (L.) Cusson, uma planta chinesa usada na impotência masculina (Chiou et al., 2001).

## 2.4 - Furocumarinas e Fototoxicidade

As furocumarinas são utilizadas desde épocas mais remotas para o tratamento de doenças da pele, tais como psoríase, hanseníase, vitiligo, leucodermina, micoses, dermatites e eczemas (Diawara e Trumble, 1997). Entretanto o uso terapêutico dessas substâncias está relacionado à incidência

crecente de câncer de pele, o que lhes confere toxicidade. Por isso, sua utilização necessita de uma avaliação risco-benefício rigorosa.

As furocumarinas, como a maioria das cumarinas, são substâncias que absorvem fortemente energia na região do ultravioleta (UV) e, por isso, são altamente reativas sob a incidência de luz. A faixa de comprimento de onda para essa fotorreatividade situa-se entre 300 a 400 nm (UVA). Após absorver um fóton, as furocumarinas formam um estado triplete excitado, que pode reagir com moléculas, tais como as bases pirimídicas ou com o oxigênio no estado fundamental, resultando na formação do oxigênio singlete ou oxirradicais tóxicos como os radicais superóxido e hidróxi. Essas moléculas podem reagir com DNA, RNA, proteínas e lipídios, ocasionando injúria das células que os contêm. As furocumarinas ligam-se as bases pirimídicas do DNA (figura 8), causando mutações citoplasmáticas. Essa capacidade das furocumarinas de reagirem quando fotoativas, com os blocos construtores do organismo vivo, constitui a base para a compreensão da sua toxicidade para mamíferos, insetos, vírus, bactérias, fungos e até mesmo para outras plantas (Diawara e Trumble, 1997).



**Fig. 8** – Cicloaductos de furocumarinas com base púrica timina

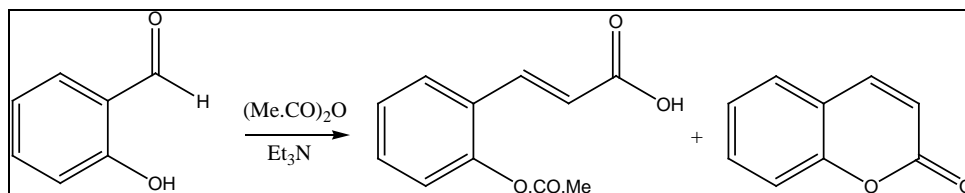
A manifestação mais comum da toxicidade das furocumarinas em mamíferos é a fitofotodermatite, uma reação epidérmica caracterizada por erupções bolhosas, hiperpigmentação, eritema e formação de vesículas. Elas alcançam a pele por contato direto com vegetais que as contêm (frutas cítricas por exemplo) ou por ingestão. A reação da Fototoxicidade depende da concentração

dos compostos cumarínicos existentes no vegetal em questão, e também da hipersensibilidade individual (Diawara e Trumble, 1997).

A ação de furocumarinas sobre a pele, quando esta é submetida à ação de raios ultravioleta, pode ser utilizada para o tratamento de enfermidades cutâneas, o uso tópico ou oral é acompanhado pela exposição controlada a radiação ultravioleta como forma de induzir a repigmentação da pele. A terapia UVPA foi introduzida para o tratamento de várias dermatoses como a psoríase, micoses, urticária, eczemas e outras. A furocumarina mais utilizada é o metoxisaleno (8-metoxi-psoraleno), embora o trioxisaleno (trimetilpsoraleno) seja também empregado. A terapia consiste na ingestão da furanocumarina na dose única de 20 a 40 mg, seguida de irradiação da pele com luz UVA (320 a 380 nm) ou luz solar após 2 horas. A exposição à luz UVA pode ser inicialmente rápida (10 a 15 minutos) e progressivamente prolongada. Os resultados esperados são geralmente obtidos após 20 sessões. O tratamento localizado é possível, entretanto deve ser conduzido com muita precaução e acompanhado por um especialista, devido ao reconhecido potencial carcinogênico da terapia (Groot et al., 1994) e considerando os potenciais efeitos adversos, tais como catarata, degeneração actínica da pele (Diawara e Trumble, 1997). A grande desvantagem da foto quimioterapia são os inúmeros efeitos colaterais produzidos, tais como eritema, formação de bolhas, náuseas, prurido, dor de cabeça e depressão, o que provoca descontinuidade no tratamento. A terapia PUVA é contra-indicada para mulheres grávidas e crianças, em caso de desordens cutâneas agravadas pela luz, e em casos de insuficiência renal e cardíaca (Lindelöf et al., 1991).

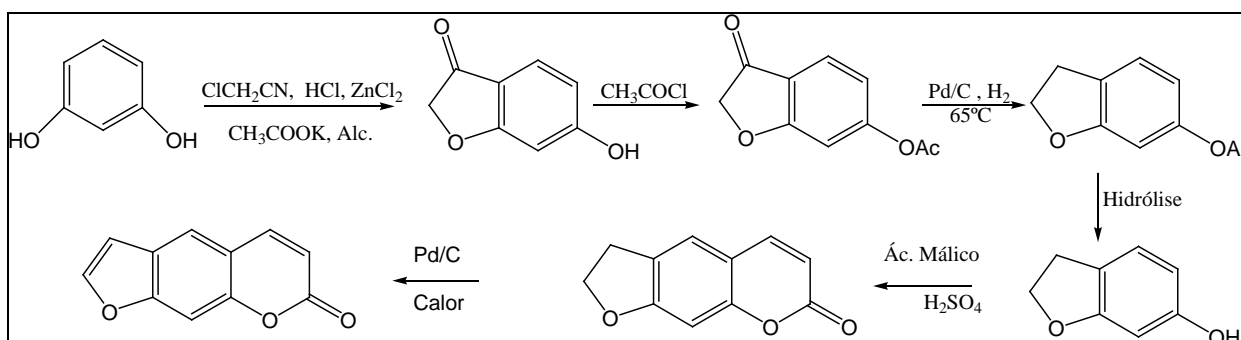
## 2.5 - Síntese de Cumarinas

O método mais tradicional para a síntese de cumarinas é via reação de Perkin entre o aldeído salicílico e anidrido acético na presença de base, obtendo ácidos cinâmicos *trans* e *cis* (Figura 9). O isômero *cis* sofre ciclização em meio ácido formando cumarina (Vogel, 1989).



**Fig. 9 - Síntese de Cumarina**

Na literatura são encontrados vários métodos de síntese de psoraleno, como exemplo pode ser citada a síntese realizada por Horning & Reisner (1948) que utiliza como material de partida o 1,3-dihidroxibenzeno (Figura 10).



**Fig.10 - Síntese do desidropsoraleno**

## 2.6 - Bioensaio de Letalidade com *Artemia salina*

Embora seja importante o estudo fitoquímico e sintético das substâncias orgânicas, é de grande importância a investigação da atividade biológica das substâncias através de testes preliminares, como por exemplo o bioensaio com larvas de *Artemia salina* Leach (TAS) (Homans & Fuchs, 1970).

A *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento para peixes, seus ovos podem ser facilmente encontrados em lojas de piscicultura. A praticidade e a simplicidade que envolvem o bioensaio, seu baixo custo, rapidez e o fato de não exigir técnicas assépticas, são fatores que favorecem sua utilização sistemática dentro de um laboratório de pesquisa (Homans & Fuchs, 1970).

O método foi proposto por McLaughlin como ensaio simples para a determinação da DL<sub>50</sub> (Dose Letal) ( $\mu\text{g/mL}$ ) de substâncias puras e extratos brutos (McLaughlin et. al., 1982 e 1995). A técnica baseia-se no princípio da toxicidade que as substâncias bioativas apresentam em altas doses. Deste modo, a mortalidade *in vivo* de organismos de maior simplicidade na escala zoológica pode indicar a bioatividade de novas substâncias. A literatura cita que várias substâncias bioativas foram testadas com *Artemia salina*, mostrando boa correlação entre citotoxicidade larval e atividade biológica (Homans & Fuchs, 1970).



### 3. OBJETIVOS:

#### 3.1- Objetivos Específicos:

O presente trabalho tem como objetivos realizar modificações estruturais em furocumarinas visando a síntese de *para*-psoralenoquinona, utilizando como material de partida o bergapteno isolado da *Brosimum gaudichaudii* e o 8-metoxipsoraleno comercial, avaliar a citotoxicidade e/ou fotocitotoxicidade das furocumarinas naturais e modificadas quimicamente frente a larvas de *Artemia salina* Leach.

#### 3.2- Objetivos Gerais:

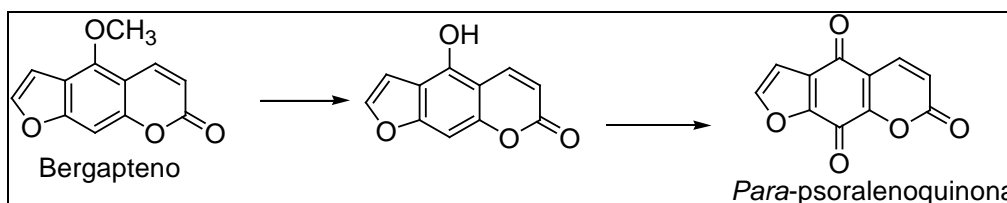
Aprendizado de pesquisa bibliográfica, trabalho em laboratório e uso de seus equipamentos básicos.

Adaptação da metodologia descrita na literatura para situações concretas encontradas no laboratório.

Aprendizado de técnicas de síntese orgânica e técnicas usuais de purificação e identificação de substâncias orgânicas.

#### 3.3 – Modificação Estrutural

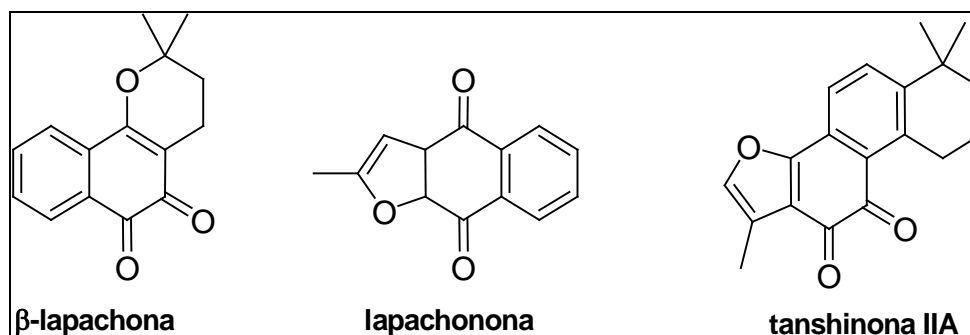
Dentro das diversas modificações possíveis nas moléculas de psoraleno, inicialmente foi proposto a transformação do bergapteno em *para*-psoralenoquinona (Figura 11).



**Fig. 11** – Proposta de modificação estrutural do bergapteno

A justificativa da síntese do *p*-psoralenoquinona, a partir de furocumarinas, baseia-se no fato de que um grande número de moléculas contendo a função quinônica desempenham um papel vital na bioquímica de células vivas, apresentando atividades biológicas relevantes como a ação antimicrobiana e citostática. Tais atividades biológicas são devidas a atuação dessas moléculas como potentes inibidores de transporte de elétrons; como agente intercalante de DNA; agente de alquilação biorredutiva e como produtores de oxigênio radicalar. Outro mecanismo possível de ação de quinonas envolve a enzima topoisomerase. Um bom exemplo é a  $\beta$ -lapachona (figura 12), isolada de *Tabebuia* sp. (Bignoniaceae) a qual apresenta potente inibição das enzimas topoisomerase I e transcriptase reversa (Lima, 2002).

Na literatura há relatos de quinonas contendo anel furânico, tais como tanshinona IIA e lapachonona (figura 12) (Bruneton, 1995). Tanshinonas são quinonas presentes na *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae), uma planta muito utilizada clinicamente na medicina chinesa no tratamento de distúrbios coronarianos, cerebrovasculares e infecção causada por hepatite viral. Estudos realizados por Sairafianpour em 2001 demonstraram que essas substâncias apresentam atividades citotóxica, leishimanicida e antimalarial (Sairafianpour 2001).



**Fig. 12** – Quinonas bioativas

## **4. SEÇÃO EXPERIMENTAL**

### **4.1 – Materiais e Métodos**

#### **4.1.1 - Procedimentos Gerais**

A agitação do meio reacional foi efetuada através de barra magnética recoberta com teflon.

A remoção dos solventes foi realizada em evaporador rotativo Fisatom, submetendo-se o material resultante a um sistema acoplado à bomba de alto vácuo para remoção do solvente residual.

#### **4.1.2 - Reagentes e Solventes**

Muitos dos reagentes e solventes de grau P. A. foram utilizados sem prévia purificação.

#### **4.1.3 - Cromatografia**

As análises por cromatografia em camada fina (CCD) foram efetuadas em cromato folhas de alumínio com sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), com espessura de 0,2 mm. As manchas foram visualizadas por radiação com luz ultravioleta.

Utilizamos para purificação de amostras sintetizadas a cromatografia de coluna, empregando sílica gel 60 Merck (70-230 mesh).

#### **4.1.4 - Dados Físicos**

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em Espectrômetro SHIMADZU FTIR - 8300, utilizando filme sobre pastilha de cloreto de potássio (KBr) e os valores para as absorções foram referidos em número de onda, utilizando como unidade o centímetro recíproco (cm<sup>-1</sup>).

O espectro de ressonância magnética nuclear foi obtido em uma radio frequência de 399 MHz para RMN  $^1\text{H}$ . Os solventes utilizados para dissolver as amostras foram: clorofórmio deuterado e acetona deuterada. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram apresentados em partes por milhão (ppm).

## **4.2 – Extração das Cumarinas Naturais**

As cumarinas bergapteno e psoraleno, utilizadas como material de partida para algumas modificações estruturais nesse trabalho, foram obtidas em misturas através dos extratos em diclorometano e metanol da casca e da madeira da raiz da espécie *Brosimum gaudichaudii trecul.* (Moraceae) (Monteiro et al, 1999).

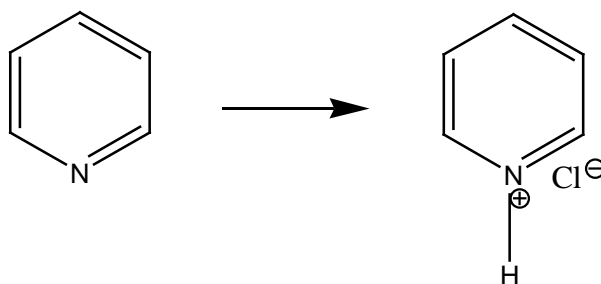
## **4.3 – Descrição das etapas de sínteses desenvolvidas durante o trabalho**

No presente trabalho foram realizadas sínteses utilizando como material de partida o bergapteno isolado da espécie *Brosimum gaudichaudii* e o 8-metoxipsoraleno obtido comercialmente para a obtenção do 5-hidroxipsoraleno, 8-hidroxipsoraleno, parapsoralenoquinona, diidroxipsoraleno.

### **4.3.1 – Síntese do 5-hidroxi-psoraleno**

#### **4.3.1.1 - Reação de obtenção do cloridrato de piridina**

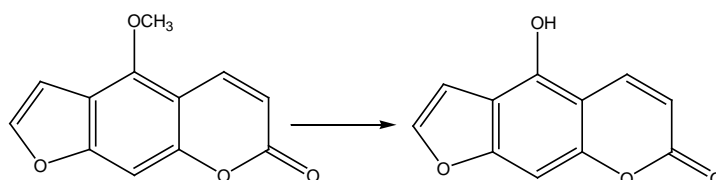
Foi transferido 8 mL de piridina (0,1 mmol) previamente destilada para um balão de fundo redondo, adicionado lentamente 8,3 mL (0,1 mmol) de ácido clorídrico (HCl) com o auxílio de um funil de adição com equalizador de pressão, o sistema foi mantido em banho de gelo. O sal obtido foi seco por aquecimento brando.



**Fig. 13** - Formação do Cloridrato de piridina

#### 4.3.1.1 - Reação de obtenção do 5-hidroxi-psoraleno

Em um banho de óleo mineral a temperatura de 200°C, 250 mg de bergapteno (0,86 mmol) foi fundido com 1,34 g de cloridrato de piridina, sob agitação constante durante 25 minutos a partir do início do refluxo. A essa mistura foi adicionando 35 mL de solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) 1 mol/L ainda quente. A mistura foi filtrada a vácuo e os cristais recolhidos foram secos por 4 horas num dessecador sob pressão e posteriormente recristalizado com acetona quente e água, sendo obtidos cristais amarelos que foram recolhidos por filtração a vácuo. A fase aquosa proveniente da filtração foi extraída com 3 partes de 20 mL de diclorometano, seca com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e concentrado num rotaevaporador.

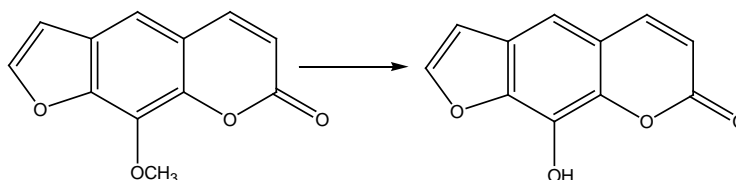


**Fig. 14** - Síntese do 5-hidroxi-psoraleno

#### 4.3.2 – Síntese do 8-hidroxi-psoraleno

Em um banho de óleo mineral com temperatura a 200°C, 250 mg (0,86 mmol) de 8-metóxi-psoraleno foi fundido com 1,34 g de cloridrato de piridina, sob agitação constante durante 25 minutos após o início do refluxo. A essa mistura foi

adicionando 35 mL de solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) 1 mol/L ainda quente. A mistura foi filtrada a vácuo e os cristais recolhidos foram secos por 4 horas num dessecador sob pressão e posteriormente recristalizado com acetona quente e água, sendo obtidos cristais amarelos que foram recolhidos por filtração a vácuo. A fase aquosa proveniente da filtração foi extraída com 3 partes de 20 mL de diclorometano, seca com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e concentrado num rotaevaporador.



**Fig. 15** - Síntese do 8-hidroxi-psoraleno

### 4.3.3 – Oxidação do 5-hidroxi-psoraleno com sal de Fremmy $[(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8)_2\text{NO}]$

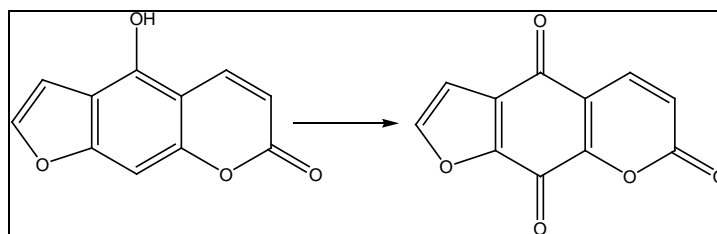
#### 4.3.3.1 - Reação de obtenção do sal de Fremmy - $[(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8)_2\text{NO}]$

Em um Becker de 1L foi adicionado 25 mL de solução aquosa de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 5 mol/L, foi acrescentado 50 g de gelo e 25 mL de solução aquosa de bissulfito de sódio ( $\text{NaHSO}_3$ ) 35% m/v, seguido de 5 mL de ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). O sistema foi mantido em banho de gelo e sob agitação constante; a reação completou-se entre 2-3 minutos, caracterizando-se pelo escurecimento da solução. Foi acrescentado a mistura 6,3 mL de solução concentrada de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), e gotejado lentamente 50 mL de solução aquosa de permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) 0,2 mol/L, deixando reagir por 1 hora em banho de gelo. O precipitado de óxido de manganês obtido foi filtrado a vácuo e a solução filtrada foi mantida em banho de gelo. Uma alíquota de 10 a 15 mL da solução filtrada foi misturada a igual volume de solução saturada de cloreto de potássio (KCl) e reservado em banho de gelo para precipitar o sal de fremmy que irá auxiliar a precipitação do restante da solução principal. A maior porção da solução filtrada foi mantida sob forte agitação adicionando, gota a gota,

62,5 mL de solução saturada de cloreto de potássio (KCl) durante 45 minutos, mantendo sempre o resfriamento. A suspensão preparada à parte foi adicionada a esta solução até a formação do precipitado no volume da solução. O cristal laranja foi coletado por filtração a vácuo, sendo lavado com solução saturada de cloreto de potássio amoniacal (cerca de 5% v/v de hidróxido de amônio), 2 vezes com metanol amoniacal (cerca de 5% v/v de hidróxido de amônio), e finalmente com acetona. Somente depois de todas essas lavagens o líquido é filtrado. O sólido laranja obtido foi espalhado em vidro de relógio para evaporar a acetona por 15 minutos. Os cristais obtidos foram armazenados num dessecador com óxido de cálcio e carbonato de amônio, em pratos separados para manter uma atmosfera amoniacal.

#### 4.3.3.2 - Reação de Oxidação do 5-hidroxi-psoraleno

Foi solubilizado 100 mg de 5-hidroxi-psoraleno (0,46 mmol) na menor quantidade possível de DMF e a esta, adicionado uma solução preparada utilizando 16,5 g de sal de Fremmy e 9 mL de água, acrescentando 0,018 g de fosfato monobásico de potássio ( $K_2H_2PO_4$ ), deixando reagir por 30 minutos à temperatura ambiente e sob agitação constante. O produto obtido foi extraído utilizando e 3 partes de 20 mL de diclorometano, seco com sulfato de sódio anidro ( $Na_2SO_4$ ) e concentrado num rotaevaporador.



**Fig. 16** - Oxidação do 5-hidroxi-psoraleno com sal de Fremmy  $[(KO_3S)_2NO]$

#### 4.3.4 – Oxidação do 8-hidroxi-psoraleno com sal de Fremmy $[(\text{K}\text{O}_3\text{S})_2\text{NO}]$

100 mg de 8-hidroxipsoraleno (0,46 mmol) foram solubilizados na menor quantidade possível de dimetilformamida (DMF) e a esta, adicionado uma solução preparada utilizando 16,5 g de sal de Fremmy e 9 mL de água, acrescentando 0,018 g de fosfato monobásico de potássio ( $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ), deixando reagir por 30 minutos à temperatura ambiente e sob agitação constante. O produto obtido foi extraído utilizando e 3 partes de 20 mL de diclorometano, seco com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e concentrado num rotaevaporador.

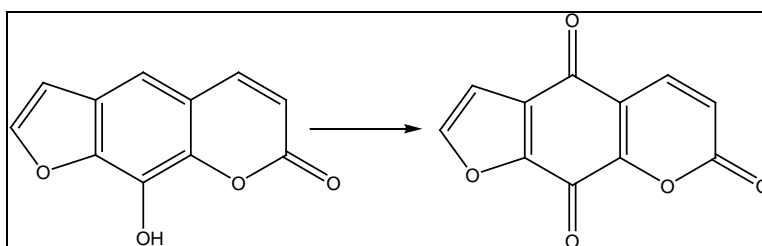
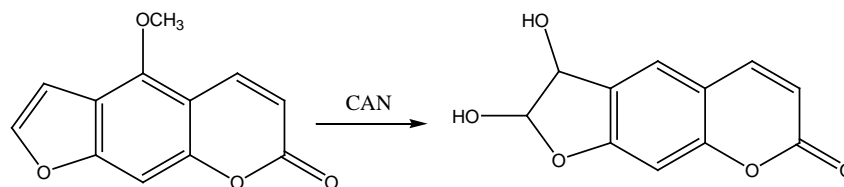


Fig. 17 - Oxidação do 8-hidroxi-psoraleno com sal de Fremmy  $[(\text{K}\text{O}_3\text{S})_2\text{NO}]$

#### 4.3.6 – Oxidação do Bergapteno natural com Nitrato Cérico Amoniacal - $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ - (CAN)

Em um balão de fundo redondo foi solubilizado 100 mg de bergapteno (0,462 mmol) em 20 mL de solução de acetonitrila em água (4:1), matendo o sistema a temperatura ambiente e sob agitação constante. Foi gotejada lentamente ao sistema uma solução preparada com 1,37g de CAN e 2,2 mL de água, deixando reagir por 30 minutos. Observando-se a mudança na coloração de amarelo para vermelho a reação se completa. A reação foi isolada por extração utilizando 20 mL de água destilada e 3 partes de 20 mL de diclorometano, o material extraído foi lavado com 20 mL de solução saturada de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), seco com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e concentrado num rotaevaporador.





**Fig. 18** - Oxidação do Bergapteno natural com Nitrato Cérico Amoniacal

#### 4.4 - Bioensaio de citotoxicidade em *Artemia salina*

O teste de letalidade com *Artemia salina* foi realizado segundo metodologia proposta por McLaughlin (MacLaughlin et al., 1995).

Trata-se de um ensaio simples para determinação da dose letal DL<sub>50</sub> (µg/mL) de substâncias naturais (bergapteno e psoraleno) e das substâncias modificadas quimicamente. Foram utilizadas amostras de substâncias puras naturais e quimicamente modificadas.

##### 4.4.1 - Preparo da Solução de Água do Mar Artificial

A solução foi preparada usando os seguintes sais nas respectivas massas para um litro de solução; NaCl (24g), CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (1,5g), KBr (0,1g), KCl (0,7g), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4,0g), NaHCO<sub>3</sub> (0,2g) e MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (11,0g).

##### 4.4.2 - Metodologia

Os ovos de *A. salina* foram colocados em água do mar artificial ao abrigo da luz para eclodir por 48 horas.

Para cada ensaio foram solubilizadas 20 mg de cada substância, em 5 mL de uma solução preparada com H<sub>2</sub>O e DMSO na proporção 3:2. Preparada a solução, foram transferidas alíquotas nas concentrações: 50, 100, 200, 300 e 500 µL para tubos de ensaio, sendo usados quatro tubos para cada concentração. Foram adicionadas entre 12 a 15 larvas em cada tubo de ensaio e completado o

volume de 5 mL com água do mar artificial. Após 24 horas em presença de luz, foi realizada a contagem dos indivíduos vivos e mortos.

No controle negativo (branco) foi preparado 5 mL solução contendo H<sub>2</sub>O e DMSO na proporção 3:2 e transferidas alíquotas nas concentrações: 50, 100, 200, 300 e 500 µL para tubos de ensaio, em quaduplicata e completado o volume de 5 mL com solução de água do mar artificial.

O dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) foi utilizado como controle positivo. 20 mg de dicromato de potássio foi dissolvido em preparado 5 mL solução contendo H<sub>2</sub>O e DMSO na proporção 3:2 e transferidas alíquotas nas concentrações: 50, 100, 200, 300 e 500 µL para tubos de ensaio, em quaduplicata e completado o volume de 5 mL com solução de água do mar artificial.

O mesmo procedimento foi repetido utilizando-se 20 mg de cada produto de reação e cada ensaio foi realizado no mínimo duas vezes.

Os dados obtidos foram analisados pelo programa Probit para análise estatística e determinação dos valores de DL<sub>50</sub>. Valores de DL<sub>50</sub> ≤ 30 são considerados muito ativos para substâncias puras.

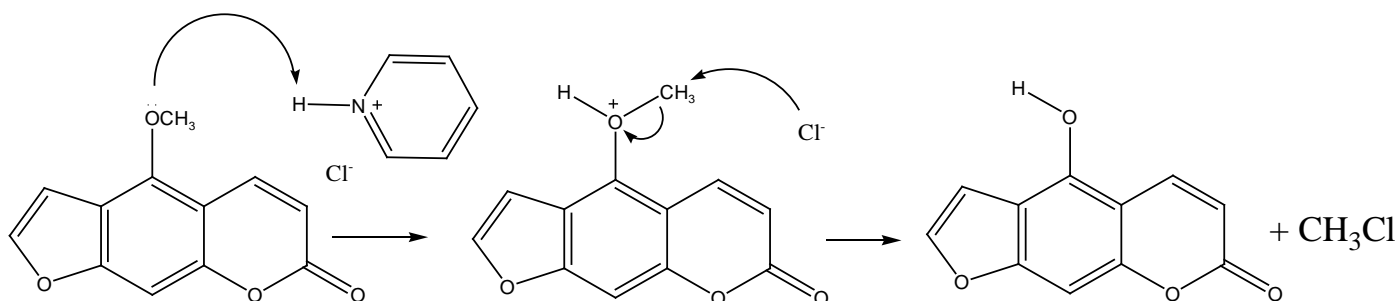
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 - Modificação Estrutural das Furocumarinas

#### 5.1.1 – Síntese do 5-hidroxipsoraleno

Conforme o planejamento de síntese descrito a síntese se inicia com a clivagem do éter metílico do bergapteno. O bergapteno foi submetida ao aquecimento com cloridrato de piridina, conforme o método descrito por Silver & Trogler (1995). O rendimento da reação foi aproximadamente 75%.

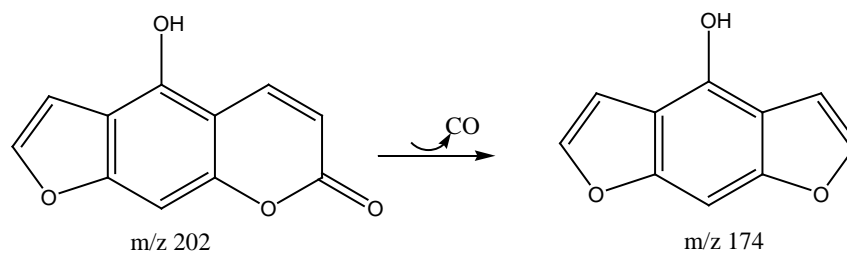
Um mecanismo plausível para esta reação baseia-se na protonação do oxigênio do éter metílico pelo cloridrato de piridina seguido de substituição nucleofílica, no carbono metílico, pelo íon cloreto, funcionando assim o 5-hidroxipsoraleno como grupo de saída.



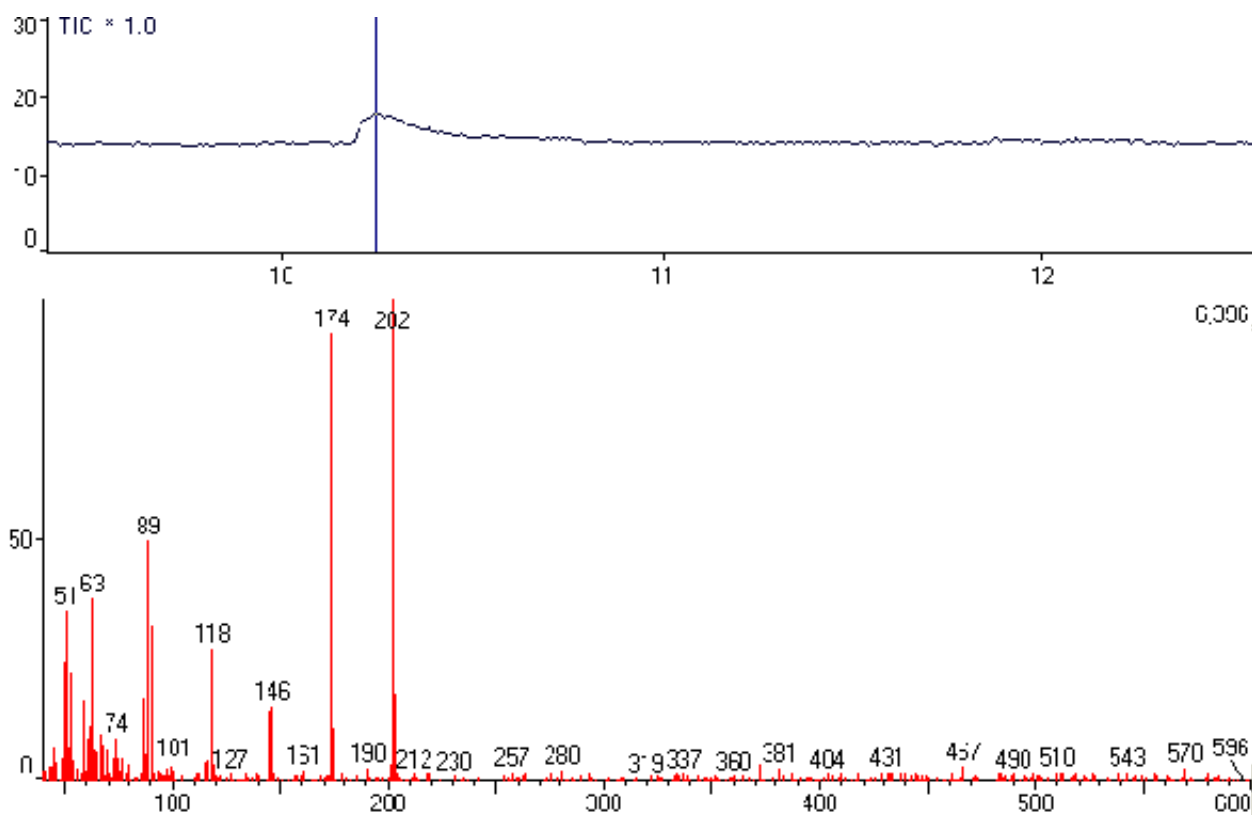
**Fig. 19** – Proposta de mecanismo para a síntese do 5-hidroxipsoraleno

Os produtos obtidos foram caracterizados através da interpretação dos respectivos espectros na região do infravermelho (IV) e por cromatografia gasosa acoplada espectrômetro de massas (CG-EM).

A análise por espectrometria de massas exibiu o íon molecular de massa  $m/z = 202$ , confirmando o peso molecular calculado para o composto, além de um fragmento referente a perda de CO entre outros sinais.

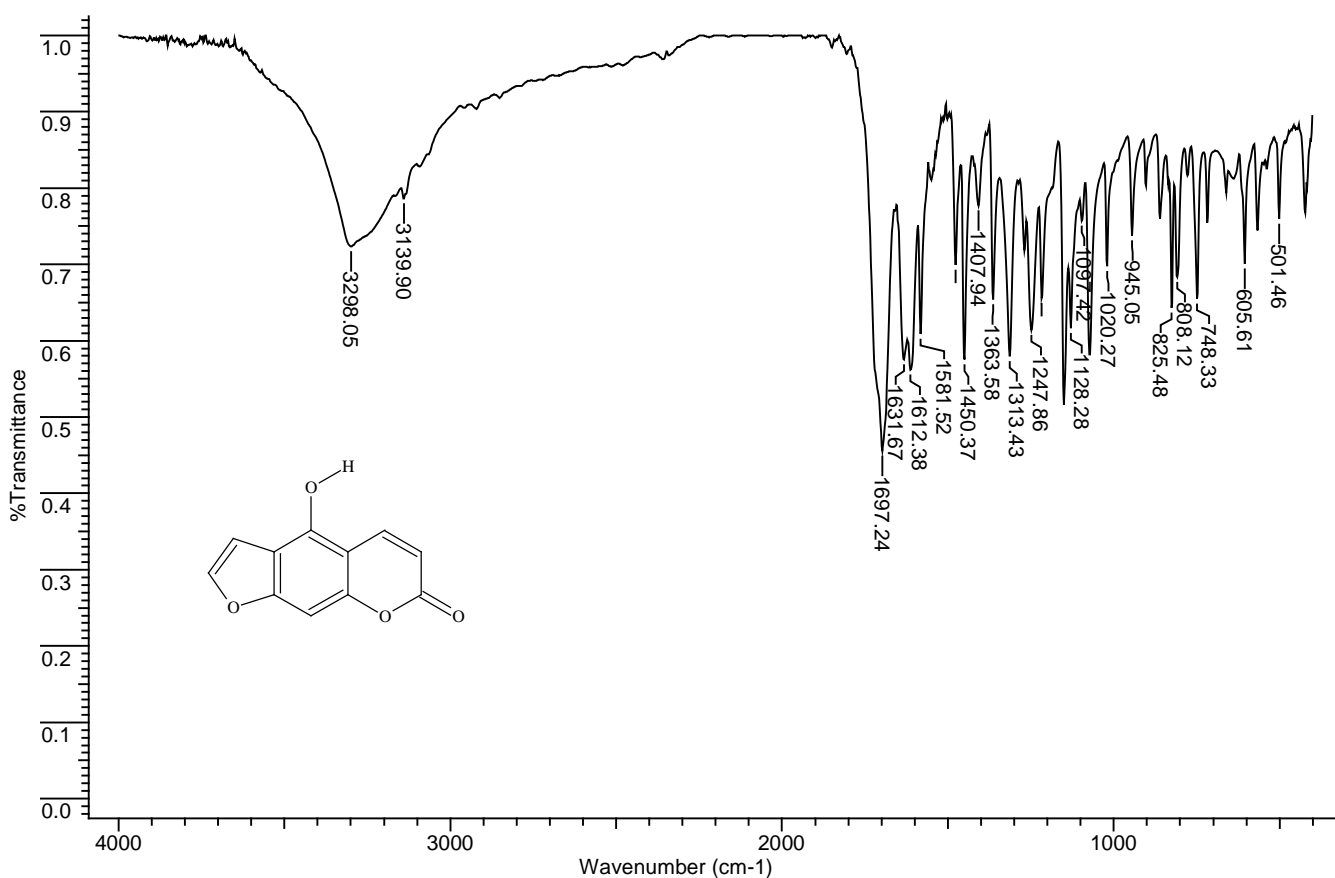


**Fig. 20** – Proposta de fragmentação do 5-hidroxipsoraleno



**Fig. 21** - CG-EM do 5-hidroxipsoraleno

O espectro de infravermelho apresenta entre outros sinais, uma banda em  $1697\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação axial C=O da lactona, e uma banda em  $3298\text{ cm}^{-1}$  típico de deformação axial de O-H fenólico.

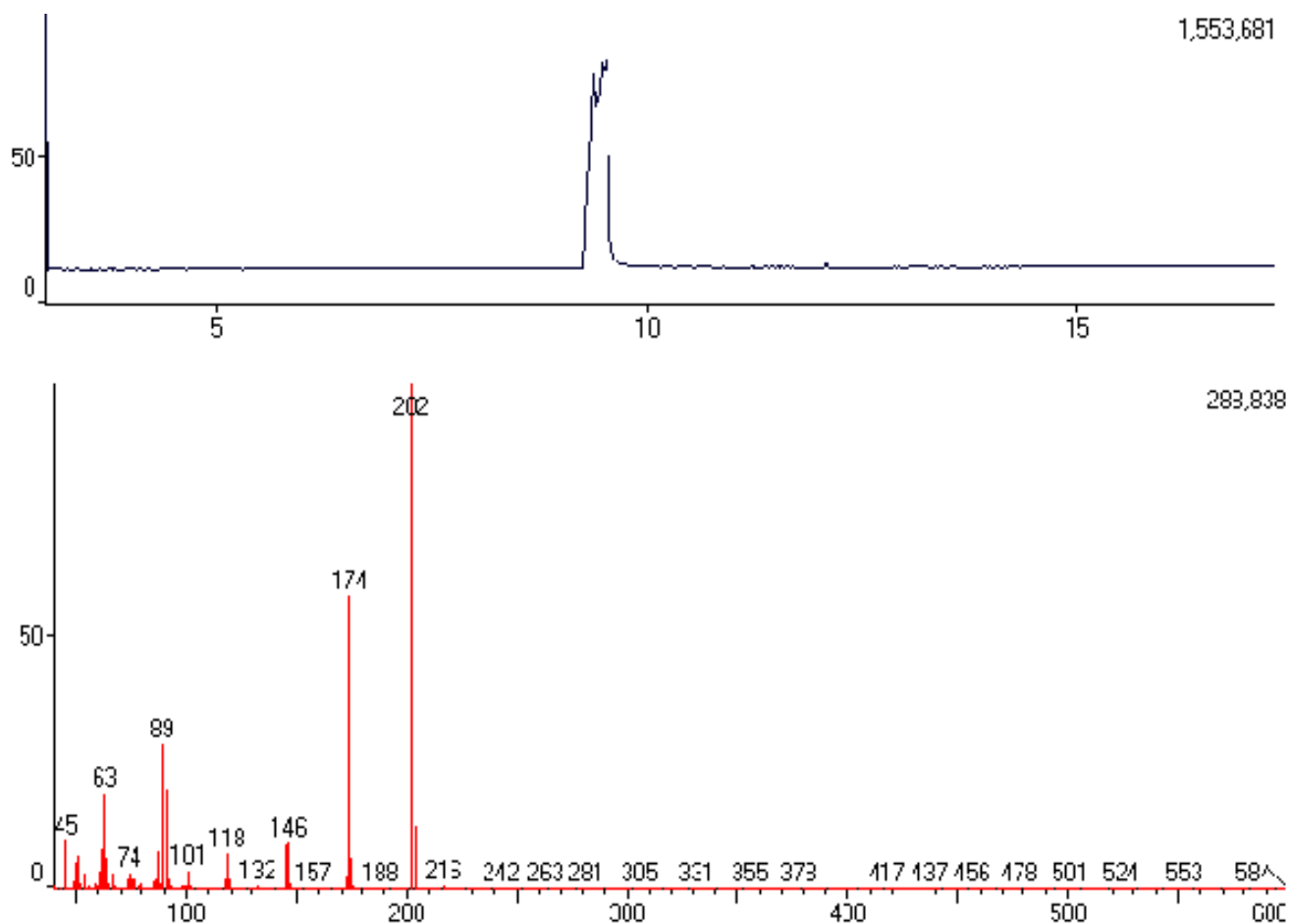


**Fig. 22-** Espectro na região do infravermelho do 5-hidroxipsoraleno

### 5.1.2 – Síntese do 8-hidroxipsoraleno

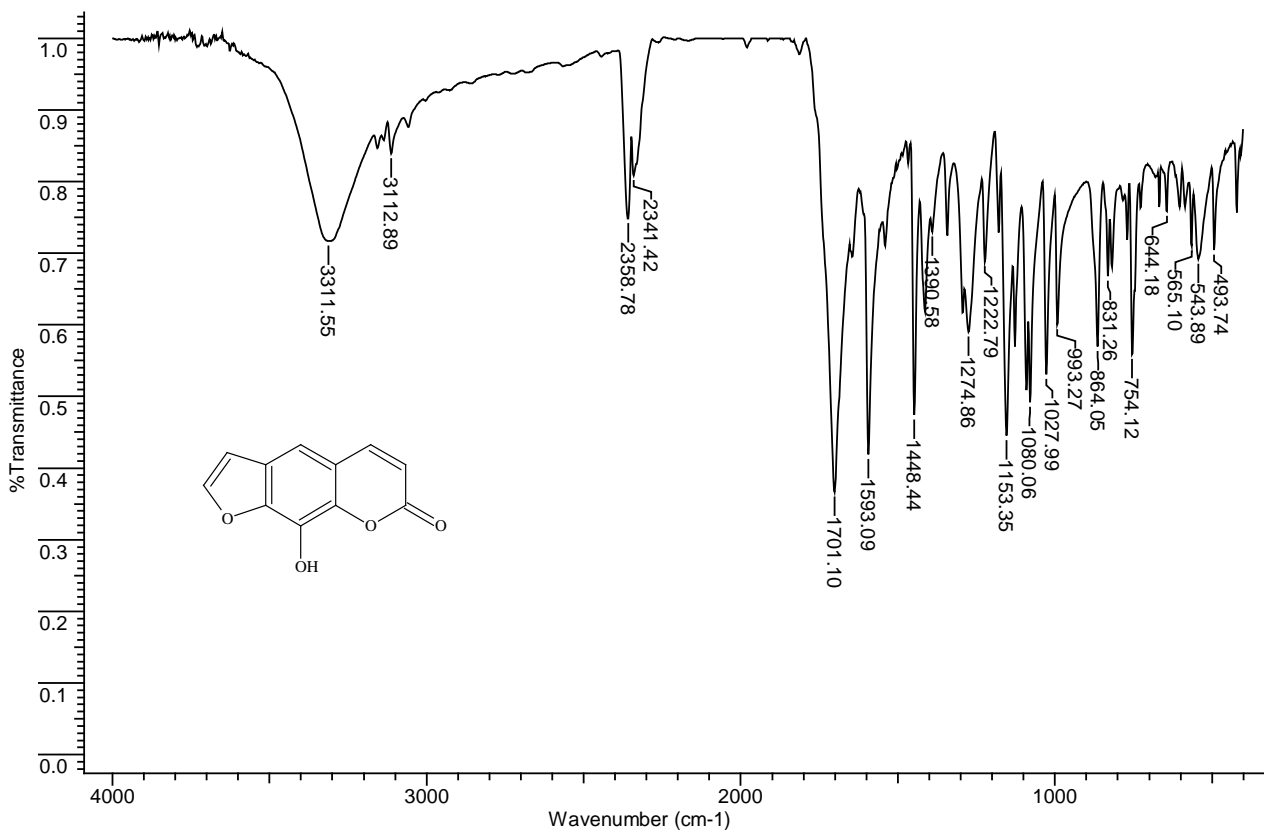
A reação do 8-hidroxipsoraleno obtido de modo similar ao 5-hidroxipsoraleno. O rendimento da reação foi de aproximadamente 75%.

A estrutura do produto foi confirmada através do espectro de massas, exibindo o íon molecular de massa  $m/z = 202$ , destacando também o fragmento  $m/z = 174$  pela perda de CO.



**Fig. 23** – CG-EM do 8-hidroxipsoraleno

Analisando o espectro de infravermelho podemos destacar como os principais sinais, uma banda em  $1701\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação axial C=O da lactona e outra em  $3311\text{ cm}^{-1}$  típico de deformação axial de O-H fenólico.

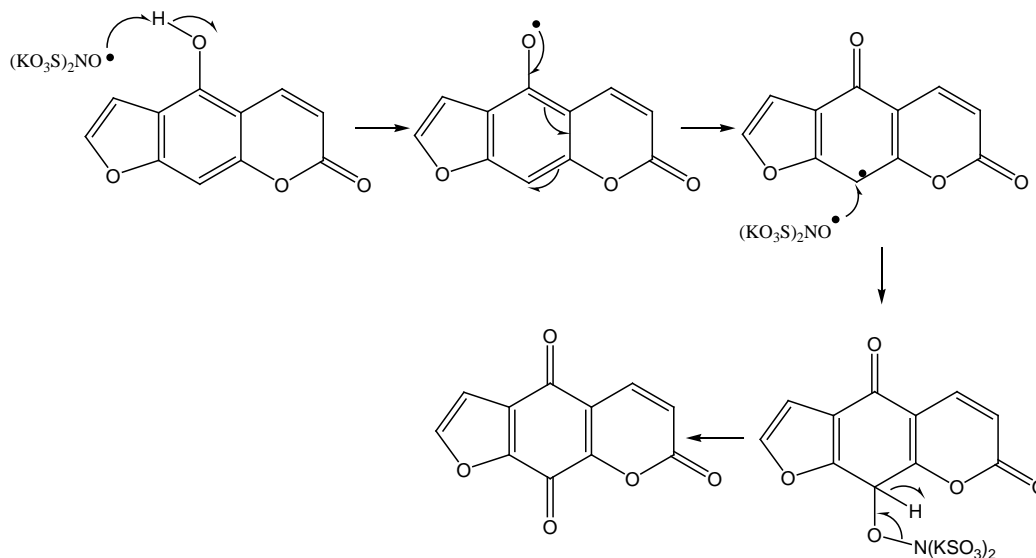


**Fig. 24** – Espectro na região do infravermelho do 8-hidroxipsoraleno

### 5.1.3 – Oxidação do 5-hidroxipsoraleno com sal de Fremmy

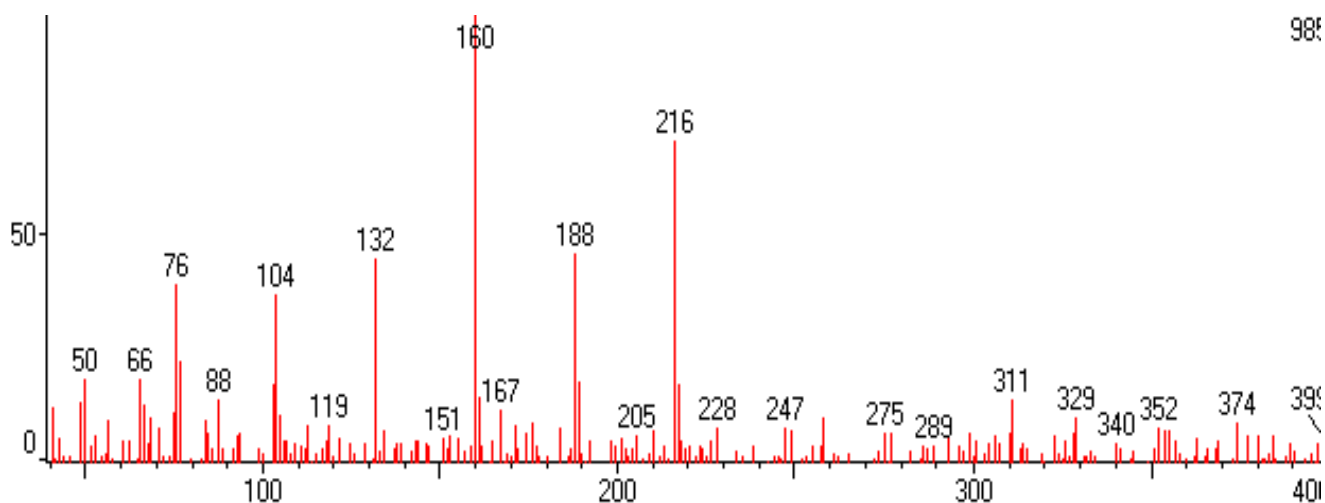
O tratamento do 5-hidroxipsoraleno com o sal de fremmy por 10 horas deu origem a um sólido amarelo-alaranjado, em rendimento quantitativo.

O mecanismo da reação foi proposto por Teuber (Smith,1994). Ocorre uma transferência de elétrons do sal de Fremmy para o fenol gerando uma espécie radicalar, o radical formado reage com o excesso de sal de Fremmy, conduzindo a formação da quinona pela perda do hidrogênio  $\alpha$ .



**Fig. 25** – Proposta de mecanismo para a oxidação do 5-hidroxi-psoraleno

O produto obtido foi caracterizado por CGEMS, sendo confirmado pela presença do íon molecular de massa  $m/z = 216$ , podemos destacar o fragmento  $m/z = 160$ , 188 e 132 que não aparece no espectro do material de partida, indicando a possível perda de 2 moléculas de CO.



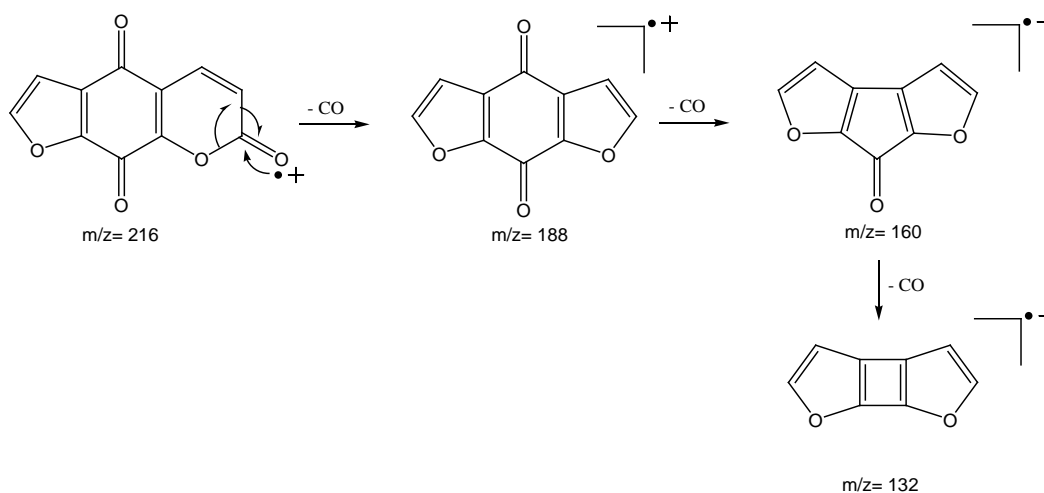
**Fig. 26** – Espectro de massas da p-psoralenoquinona



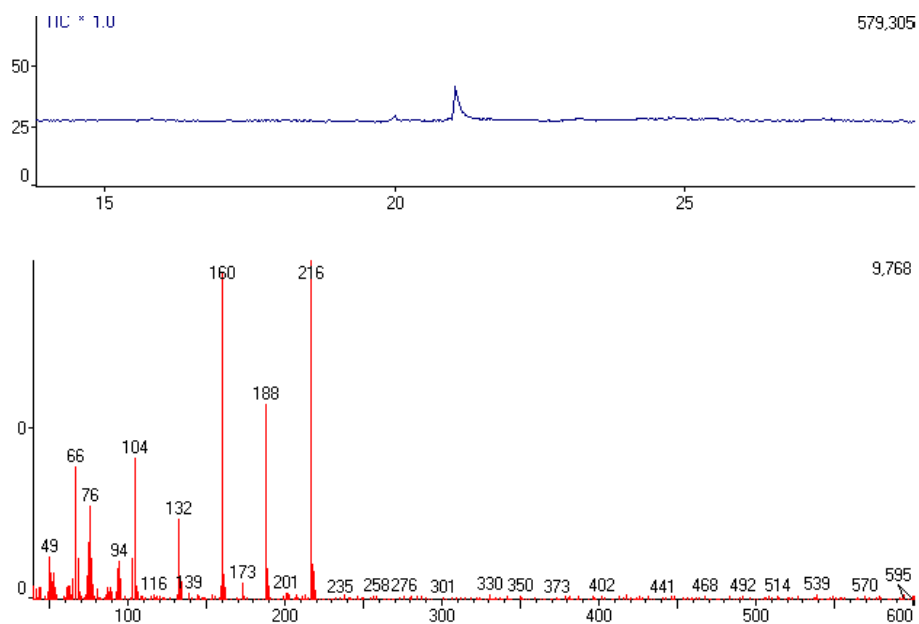
### 5.1.4 – Oxidação do 8-hidroxipsoraleno com sal de Fremmy

O 8-hidroxipsoraleno foi submetido a reação com sal de Fremmy por 48 horas obtendo cristais amarelo-alaranjados, com rendimento quantitativo.

A análise do produto obtido por CG-EMS confirma a obtenção da *p*-psoralenoquinona pela presença do íon molecular  $m/z=216$ . Podemos destacar os fragmentos  $m/z = 188$ ,  $m/z = 160$  e  $m/z = 132$  justificando a perda sucessiva de CO característico da função cetona em anéis aromáticos.



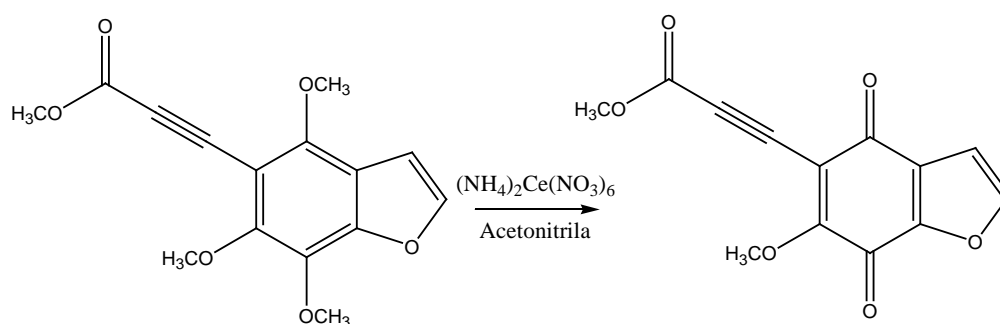
**Fig. 27** – Proposta mecanística de fragmentação da *p*-psoralenoquinona



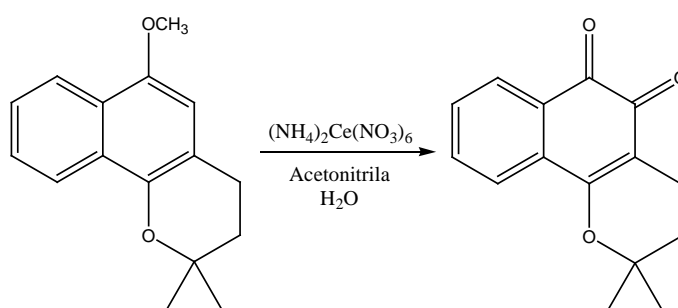
**Fig. 28** – CG-EM da *p*-psoralenoquinona

### 5.1.5 – Oxidação do Bergapteno natural com Nitrato Cérico Amoniacal- $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ - (CAN):

Nitrato Cérico Amoniacal é um reagente bastante versátil empregado em reações de oxidação. A literatura descreve o uso deste reagente na transformação de fenol e seus derivados metoxilados em quinonas. Como exemplos podem ser citados a formação da função 1,4-quinona a partir de um substrato dimetoxilado (figura 29) (Reed & Moore, 1988), outro exemplo é a síntese de  $\beta$ -lapachona realizada por Alves e colaboradores (figura 30) (1999).



**Fig. 29** – Formação da função 1,4-quinona a partir de um substrato dimetoxilado



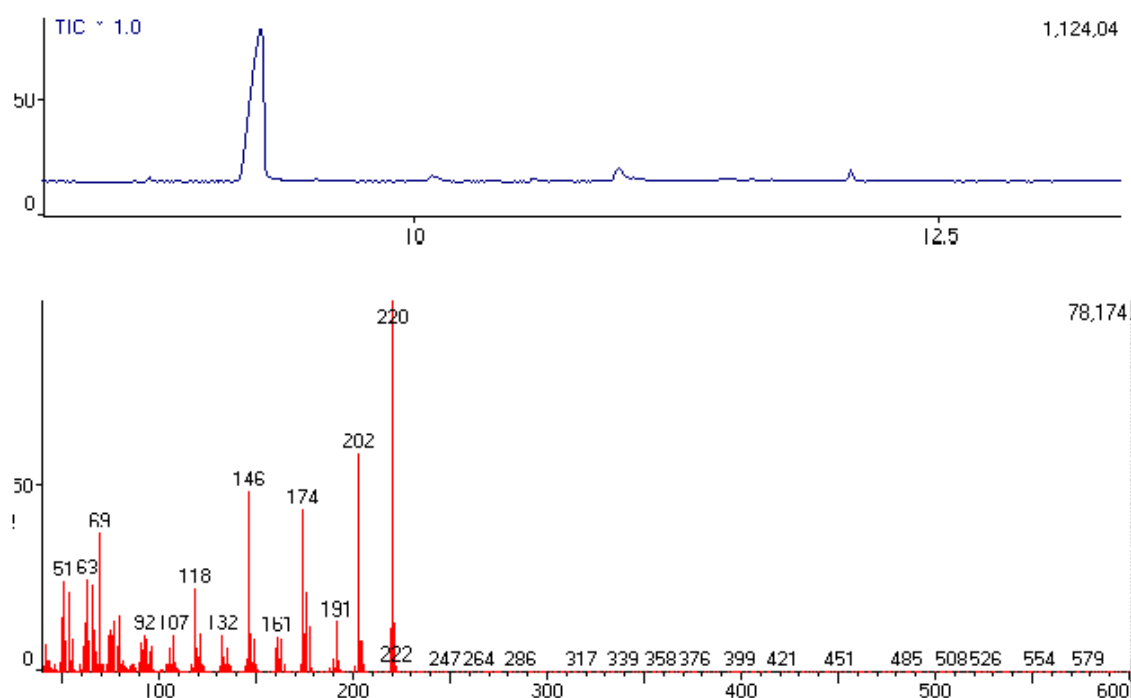
**Fig. 30** – Síntese de  $\beta$ -lapachona

Submetendo o bergapteno as mesmas condições reacionais descritas por Alves e colaboradores (1999), foi verificado que após 30 minutos de reação o bergapteno havia sido consumido completamente. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna com sílica gel, utilizando como eluente uma solução

de clorofórmio e acetato de etila 5% submetido a análise de (IV), RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).

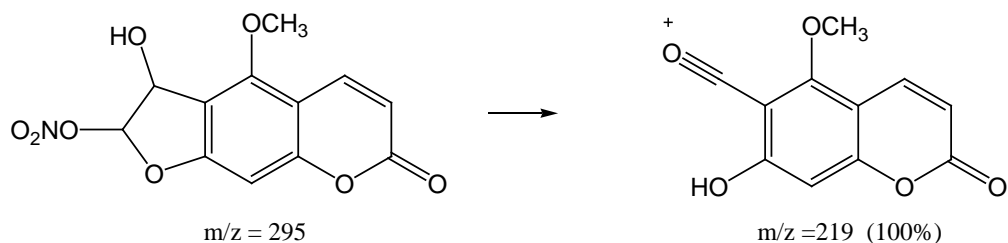
Os dados obtidos das análises espectroscópicas indicam que a quinona pretendida não foi obtida, entretanto ocorreu a oxidação do anel furânico.

A análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas demonstrou a instabilidade do produto nas condições empregadas, pois o íon molecular  $m/z=220$  encontrado é incompatível com os dados de RMN. Provavelmente ocorre clivagem do anel furânico.

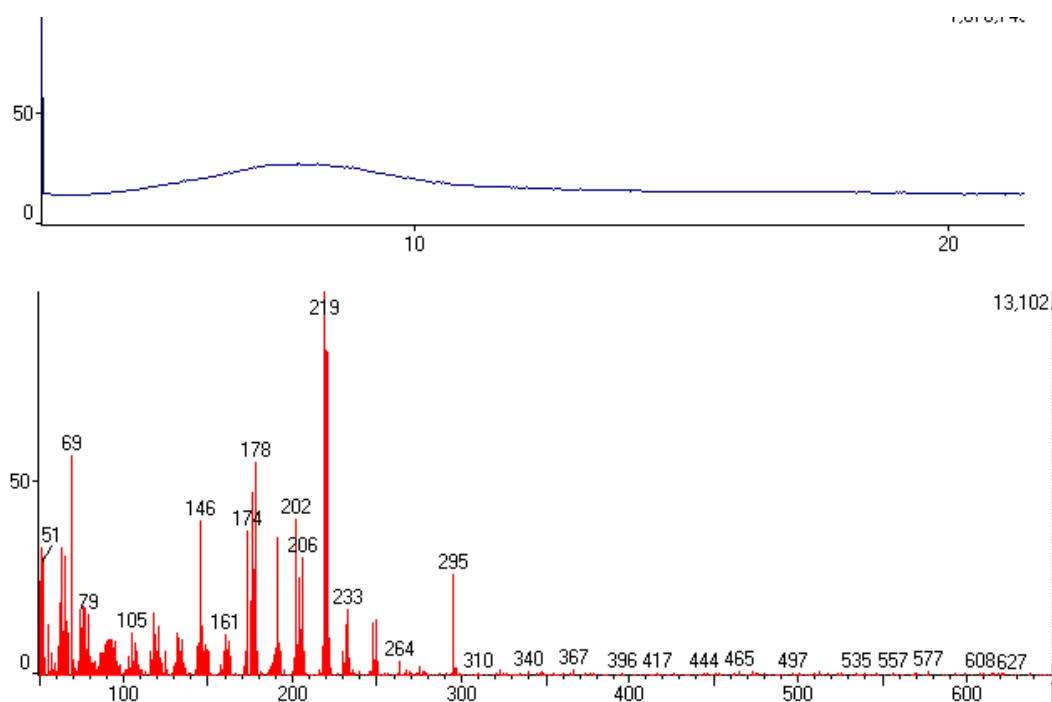


**Fig. 31 - CG-EM do produto de oxidação com CAN**

Utilizando a técnica de inserção direta obteve-se um espectro de massas com íon molecular ímpar ( $m/z=295$ ) corroborando para a presença do nitrato na molécula. A presença do fragmento principal  $m/z=219$  pode ser justificada pela abertura do anel desidrofurano.

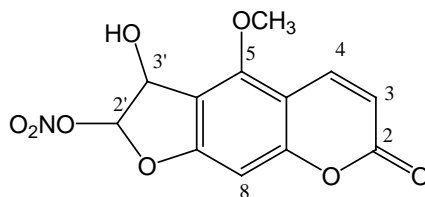


**Fig. 32** – Proposta de fragmentação do 3'-hidroxi-5-metoxi-2'-nitrooxi-2',3'-desidropsoraleno



**Fig. 33** - Técnica de inserção direta para o produto da oxidação com CAN

Para caracterizar de forma definitiva o produto, seriam necessárias técnicas mais brandas de ionização, tipo eletrospray ou análise elementar. Uma proposta razoável da estrutura do produto é o 3'-hidroxi-5-metoxi-2'-nitrooxi-2',3'-desidropsoraleno.

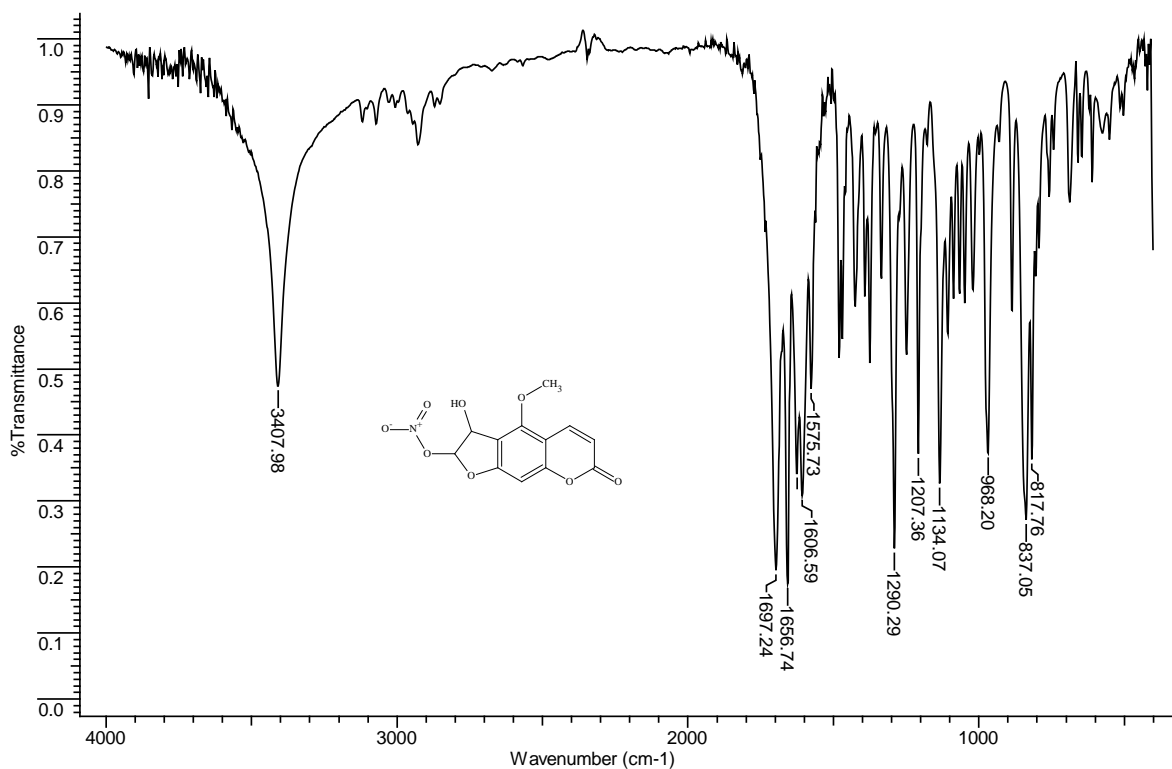


3'-hidroxi-5-metoxi-2'-nitrooxi-2',3'-desidropsoraleno

**Fig. 34** – Possível produto da oxidação do bergapteno com CAN

Tentativas de oxidação nas mesmas condições com as moléculas de psoraleno e 8-metoxipsoraleno, foram infrutíferas, provavelmente a metoxila na posição 5 favorece a reação doando elétrons para o sistema furânico.

O espectro de IV apresenta absorção em  $3408\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída a deformação axial O-H de álcool. Na região de  $1697\text{ cm}^{-1}$  destaca-se a presença de carbonila lactônica. As absorções fortes em  $1656\text{ cm}^{-1}$ ,  $1290\text{ cm}^{-1}$  e  $837\text{ cm}^{-1}$  podem indicar a presença da função nitrato, pois segundo Silverstein (2000), nitratos apresentam deformação axial de N-O do grupo  $\text{NO}_2$  assimétrica entre  $1660\text{ cm}^{-1}$  e  $1625\text{ cm}^{-1}$  e a simétrica entre  $1300\text{ cm}^{-1}$  e  $1255\text{ cm}^{-1}$ , na região entre  $870\text{ cm}^{-1}$  e  $833\text{ cm}^{-1}$  é observado a deformação axial das ligações  $\pi$  de N-O. Estes sinais não são encontrados no espectro do material de partida.



**Fig. 35** – Espectro de Infravermelho do Possível produto da oxidação do bergapteno com CAN

O espectro de RMN <sup>1</sup>H do produto obtido apresenta entre outros sinais um singlete em 4,35 ppm integrando para 3 hidrogênios que pode ser atribuído a presença da metoxila. O espectro de RMN <sup>13</sup>C desacoplado confirma a presença de metoxila com o sinal em δ 59,3 ppm, o sinal em δ 73,4 é típico de C-H ligado a hidroxila.

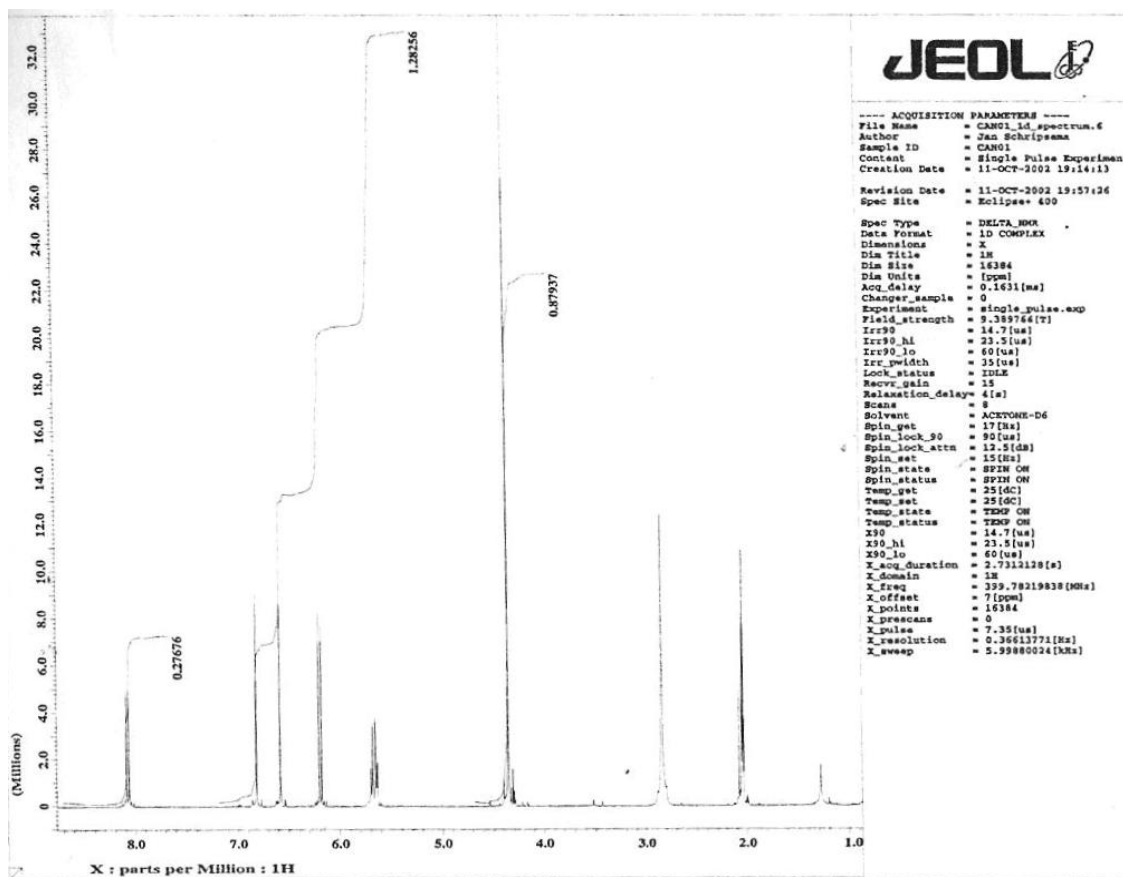
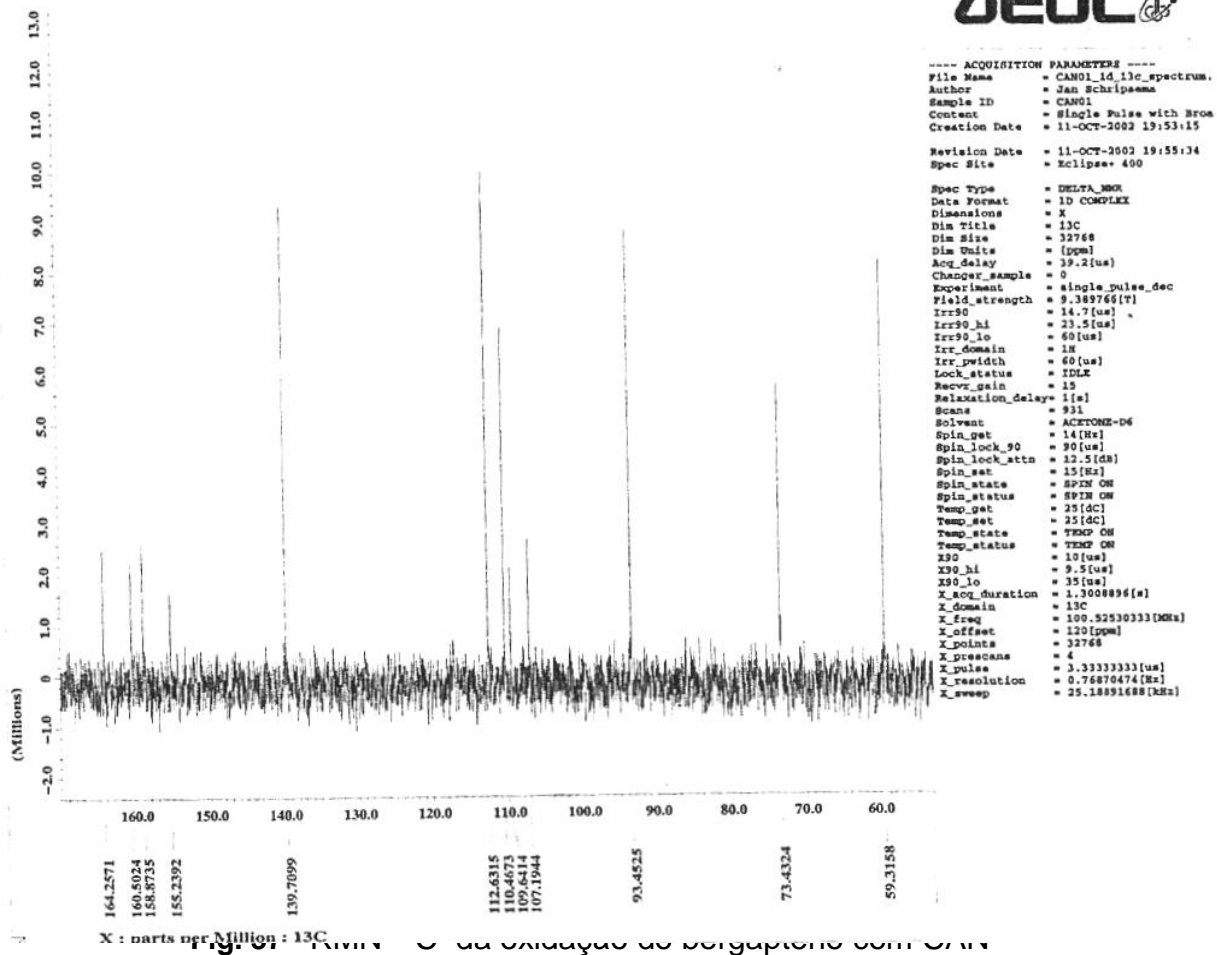


Fig. 36 - RMN  $^1\text{H}$  400 MHz (acetona D6) da oxidação do bergapteno com CAN



## 5.2 - Bioensaio de letalidade com *Artemia salina*



O bioensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* seguiu a metodologia proposta por Mc Laughlin. Utilizamos o programa estatístico Probit de análise para obtenção da DL<sub>50</sub> (µg/mL).

Ao realizar os testes de citotoxicidade foi encontrada a dificuldade em solubilizar o bergapteno. Das moléculas analisadas, a mais ativa foi o psoraleno, pois a concentração de 50 µg/mL foi suficiente para matar totalmente as artemias, portanto este teste deverá ser repetido em menores concentrações a fim de calcular a DL<sub>50</sub>. A integridade do anel furânico é importante para a citotoxicidade dos psoralenos.

Substâncias	DL <sub>50</sub> (µg/mL)
psoraleno	Inferior a 50
5-metóxi-psoraleno (bergapteno)	285,12
8-metóxi-psoraleno	102,78
5-hidróxi-psoraleno	209,19
8-hidróxi-psoraleno	215,27
3'-hidroxi-5-metoxi-2'-nitrooxi-2',3'-desidropsoraleno	Não apresentou atividade

**Tabela 1** - de Resultados obtidos no teste de letalidade frente às larvas de *Artemia salina*

## 6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir com este trabalho que o reagente de Fremmy foi eficiente na formação da *p*-psoralenoquinona, principalmente utilizando como substrato o 8-metoxipsoraleno.

A reação do bergapteno com CAN conduziu a oxidação do anel furânico, o mesmo não ocorreu com o psoraleno, nem com o 8-metoxipsoraleno, nas condições empregadas.

Os testes de citotoxicidade frente às larvas de *artemia salina* demonstrou que o psoraleno é mais ativos que os demais substratos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Alves, G.B.C.; Lopes, R.S.C.; Lopes, C.C. e Snieckus V. Two Expedient Sy of b-Lapachone. Synthesis, Nº. 11. Thieme Stuttgart. New York., p. 1875-1877, 1999.
- Barreiro, E. J. ; Fraga C.A. M. As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. Porto Alegre: Artmed editora, 2001.
- Braz-Filho, R.; Magalhães, A. F.; Gottlieb, O. R.; *Coumarins from Brosimum rubescens. Phytochemistry*, 11, 1972, p. 3307-3310.
- Braz-Filho, R.; Magalhães, A. F.; Gottlieb, O. R.; A Química das Moráceas Brasileiras II-Brosiprenina e outras Cumarinas do *Brosimum rubescens. Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 43 (3/4), p. 585-586, 1971.
- Braz-Filho, R.; Magalhães, A. F.; Gottlieb, O. R.; A Química das Moráceas Brasileiras I-Novas Cumarinas do *Brosimum paraence. Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 42 (Suplemento), p. 139-142, 1970.
- Bruneton, J., Pharmacognosy, *Phytochemistry*, Medicinal Plants. France: Technique & Documentation-Lavoisier, 1995.
- Chiou, W. F.; Huang, Y. L., Chen, C. F.; Chen, C.C.; Vasorelaxing Effect of Coumarins from *Cnidium Monnieri* on Rabbit Corpus Cavernosum. *Planta Médica*, v. 67, p. 282-284, 2001.
- Dean, F.M.,. Naturally Occurring Oxygen Ring Compounds. Butterworths. London. p. 661,1963.
- Dewick, P. M.; A Biosynthetic Approach, Medicinal Natural Products, John Wiley & Sons Ltda, p. 466, 1997.
- Diawara, M. M.; Trumble, J. T.; Linear Furanocoumarins. In: Félix D`Mello, J. P., (ed). *Handbook of Plant and Fungal Toxicans*. Boca Raton: CRC, 1997.
- Ferracin, J. R., *Estudo Fitoquímico de Hortia arborea: Uma Contribuição à Quimiosistemática de Cupariaceae*. Tese (Mestrado) Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Paulo – SP, p. 135, 1992.
- Goodman, S. L.; Gilman, A. G.; As Bases Farmacológicas da Terapêutica, Sétima Edição, p. 552, Editora Guanabara, 1987.

- Groot, A. C.; Weyland, J. W.; Nater, J. P. (ed); Unwanted Effects of Cosmetics and drugs used in Dermatology. Amsterdam, p. Elsevier (18), p. 295-327, 1994.
- Hardman, J. G.; Limbird, L. E. (ed), Goodman & Gilman's. The Pharmacological basis of Therapeutics, ed. 9, New York: Mc Graw Hill, 1996
- Homans, A.L.; Fuchs, A., Direct Bioautography on Thin-Layer Chromatograms as a Method for Detecting Fungitoxic Substances. *J. Chromatogr.*, p. 51,327-329, 1970.
- Horning, E. C.; Reisner, D. B. Furocoumarins: Synthesis of 2,3-Dihydropsoralene, *Journal of the American Chemical Society* 70 (11): 3619-3620, 1948.
- Hoult, J. R. S.; Payá, M.; Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutical Potential. *Gen. Pharmacol.*, v. 27, p. 713-722, 1996.
- Katzung, B. G., *Farmacologia Básica e Clínica*, 2ª Edição, Editora Guanabara Koogan S. A, p. 992, 1984.
- Lima, N. M. F.; Correia, C. S.; Ferraz, A. L.; Pinto A. V.; Pinto, M. C. R. F.; Santana, A. E. G.; Goulart, M. O. F., Molluscicidal Hydroxynaphthoquinones and Derivates: Correlation Between Their Redox Potentials and Activity Against *Biomphalaria glabrata*. *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (6), p. 822-829, 2002.
- Lima, O.A. e Ribeiro, O.; A Ocorrência de Bergapteno na *Moraceae* *Brosimum gaudichaudii* Terc. *Anais da Associação Brasileira de Química – XXVI*, 1967.
- Lindelöf, B.; Sigurgeirsson, B.; Tegner, E.; Larkö, O.; Johannesson, A.; Berne, B.; Christensen, O. B.; Andersson, T.; Törngren, M.; Molin, L.; Nylander-Lundquist, E.; Emtestam, L.; PUVA and Cancer: A Large-Scale epidemiological study. *Lancet*, v. 338, p. 91-93, 1991.
- Martín-Aragón, S.; Benedí, J.; Villar, A.; Oxygen Active Species-scavenger Properties of Coumarins. *Phytother. res.*, v. 10, p. S75-S78, 1996.
- McLaughlin, J. L.; Colman-Saizarbitoria, T. e Anderson J.E. Tres Bioensayos Simples para Químicos de Productos Naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, p. 18,13-18, 1995.

- McLaughlin, J. L.; Meyer, B. N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B. e Nichols, D.E., Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, p. 45, 31-34, 1982.
- Monteiro, V. F. F.; Mathias, L.; Vieira, I. J. C.; Schripsema, J.; Braz-Filho, R., Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 13 (2): 281-287, 2002.
- Monteiro, V. F. F., *Estudo Fitoquímico de Brosimum Gaudichaudii Trécul.* (Moraceae). Tese (Mestrado) Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ, p. 30-36, 1999.
- Ojala, T., Biological Screening of Plant Coumarins, Division of Pharmacognosy, Department of Pharmacy of Faculty of Science of the University of Helsinki, p. 13-14, 2001.
- Pozzet, G. L. Contribuição ao Estudo Químico do *Brosimum Gaudichaudii Trécul.*, *Revista da Faculdade Farmácia e Odontologia de Araraquara*, 3 (2), p. 215-223, 1969.
- Reed, M. W.; Moore, H. W. Efficient synthesis of furochromone and furocoumarin natural products (khellin, pimpinellin, isophellopterin) by thermal rearrangement of 4-furyl-4-hydroxycyclobutenones. *Journal of Organic Chemistry*, 53 (18), 4166-71, 1988.
- Robbers, J. E.; Tyler, V. E.; Speedie, M. K.; *Pharmacognosy & Pharmacobiotechnology*. New York: William & Wilkim, 1996.
- Sairafianpour, M.; Christensen, J.; Staerk, D.; Budnik, B. A.; Kharazmi, A.; Bagherzadeh, K.; Jaroszewski, J. W., Leishmanicidal, Antiplasmodial, and Citotoxic Activity of Novel Diterpenoid 1,2-quinones from *Perovskia Abrotanoides*: New Source of Tanshinones, *J. of Nat. Prod.*, 64 (11), p. 1398-1403, 2001.
- Silver, G. C.; Trogler, W. C.; Efficient Cleavage of DNA by Iron(II) Triazacyclononane Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 3983-3993, 1995.

- Shirota, O.; Takizawa, K.; Sekita, S.; Satake, T.; Antiandrogenic natural Diels-Alder Adducts from *Brosimum rubescens*. *Journal of Natural Products*, 60, p. 997-1002, 1997.
- Shirota, O.; Sekita, S.; Hirayama, Y.; Hayashi, T.; Ynagawa, T.; Satake, M.; Two Chalcone-Pprenylcoumarin Diels-Alder Adducts from *Brosimum rubescens*. *Phytochemistry*, 47, p. 1381-1385, 1998.
- Silverstain, R. M.; Webster, F. X.; Identificação Espectométrica de Compostos Orgânicos, ed. 6, Editora LTC, Rio de Janeiro p. 97-98, 2000.
- Smith, M. B.; Organic Synthesis, Mc-Graw-Hill, p. 255-257, 1994.
- Thastrup, O.; Knudsen, J. B.; Lemmich, J.; Winther, K. Inhibition of Human Platelet aggregation by dihydropyrano- and dihydrofuranocoumarins: A New Class of cAMP-phosphodiesterase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, v. 34, p. 2137-2140, 1985.
- Thastrup, O.; Fjalland, B.; Lemmich, J.; Coronary vasodilatory, spasmolytic and cAMP-phosphodiesterase inhibition properties of dihydropyrano- and dihydrofuranocoumarins. *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, v. 52, p. 246-253, 1983.
- Torres, S. L.; Monteiro, J. C. M.; Arruda, M. S. P.; Muller, A. H.; Arruda, A. C.; Two Flavans from *Brosimum acutifolium*. *Phytochemistry*, 44 (2), p. 347-349, 1997.
- Vieira, I. J. C.; Mathias, L.; Monteiro, V. F. F.; Braz-Filho, R.; Rodrigues-Filho, E., A new coumarin from *Brosimum gaudichaudii*. *Nat. Prod. Lett.*, 13 (1): 47-52, 1999.
- Vilegas, J. H. Y.; Lanças, F. M.; Vilegas, W.; Pozetti, G. L.; Off-line supercritical fluid extraction – high resolution gas chromatography applied to the study of Moraceae species. *Phytochemical Analysis*, 4: 230-234, 1993a.
- Vilegas, W.; Pozetti, G. L.; Vilegas, J. H. Y.; Coumarins from *Brosimum gaudichaudii*. *J. Nat. Prod.*, 56 (3) : 416-417, 1993b.
- Vlietinck, J. A.; De Bruine, T.; Apers, S.; Pieters, L. A.; Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection, *Planta Médica*, v. 64, p. 97-109, 1998.

Vogel, A. I.; Textbook of Organic Chemistry, ed. 5, Prentice Hall, London, p. 1160-1162, 1989.