

Eduarda das Graças Rodrigues Fernandes

**SÍNTESE E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE XANTONAS,
XANTONOLIGNÓIDES E DETERMINAÇÃO DA
ACTIVIDADE BIOLÓGICA**

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

1996

Eduarda das Graças Rodrigues Fernandes

SÍNTESE E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE XANTONAS,
XANTONOLIGNÓIDES E DETERMINAÇÃO DA
ACTIVIDADE BIOLÓGICA

FACULDADE DE FARMÁCIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 96/02/26
Reo. 2994
Cota P.164-618(24)

Pasta 164
2994

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

1996

**SÍNTESE E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE XANTONAS,
XANTONOLIGNÓIDES E DETERMINAÇÃO DA
ACTIVIDADE BIOLÓGICA**

Parte A

Síntese e Elucidação Estrutural de Xantonas e
Xantonolignóides.

Parte B

Determinação da Actividade Biológica.

Parte B₁ - Avaliação da Actividade Anti-hepatotóxica da
trans-Kielcorina, *trans*-Isokielcorina B e Respectivas
Xantonas Precursoras.

Parte B₂ - Avaliação da Actividade Inibidora Sobre a
Monoamina Oxidase por Xantonas Mono- e Di-substituídas.

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Química
Farmacêutica apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto

Orientador:

Professora Doutora Madalena Maria da Magalhães Pinto

Ao Félix

Este trabalho teve o apoio financeiro da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT) e foi realizado no Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia (C.E.Q.O.F.F.) da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam das publicações/comunicações seguintes:

Publicações

1-Eduarda G. R. Fernandes, Madalena M. M. Pinto, "SYNTHESIS AND STUDY OF XANTHONOLIGNOIDS WITH POTENTIAL ANTIHEPATOTOXIC PROPERTIES", *Revista das 1^{ières} Conférences Européenes du Groupement des Pharmacochimistes de L'Arc Atlantique, Bordeaux*, 1992.

2-Eduarda Fernandes, Félix Carvalho, Fernando Remião, Maria Lourdes Bastos, Madalena Pinto, Otto Gottlieb, "3,4-DIHYDROXY-2-METHOXYXANTHONE AND *trans*-KIELCORIN PROTECT ISOLATED RAT HEPATOCYTES AGAINST *tert*-BUTYLHYDROPEROXIDE-INDUCED TOXICITY", *Human & Experimental Toxicology*, 1995, 14, 760.

3-Eduarda R. Fernandes, Félix D. Carvalho, Fernando G. Remião, Maria Lourdes Bastos, Madalena M. Pinto, Otto R. Gottlieb, "HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF XANTHONES AND XANTHONOLIGNOIDS AGAINST *tert*-BUTYLHYDROPEROXIDE-INDUCED TOXICITY IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES - COMPARISON WITH SILYBIN", *Pharm. Res.*, 1995, 12, 11.

Comunicações

1-Eduarda G. R. Fernandes, Madalena M. M. Pinto, "SYNTHESIS AND STUDY OF XANTHONOLIGNOIDS WITH POTENTIAL ANTIHEPATOTOXIC PROPERTIES", no 1^{ières} Conférences Européenes du

Groupement des Pharmacochimistes de L'Arc Atlantique, Bordeaux, França, 28-31 de Setembro, 1992 (comunicação em painel).

2-Eduarda G. R. Fernandes, Madalena M. M. Pinto, "SYNTHESIS OF XANTHONES AND XANTHONOLIGNOIDS WITH POTENTIAL HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY", no 7th Fechem Conference on Heterocycles in Bio-Organic Chemistry, Santiago de Compostela, Espanha, 26-29 de Setembro, 1993 (comunicação em painel).

3-Eduarda G. R. Fernandes, Madalena M. M. Pinto, Ulrike Thull, Bernard Testa, "SYNTHESIS OF XANTHONE DERIVATIVES WITH MONOAMINE OXIDASE INHIBITOR ACTIVITY", no XIV Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, Aveiro, Portugal, 5-8 de Abril, 1994 (comunicação em painel).

4-Eduarda G. R. Fernandes, Madalena M. M. Pinto, "SYNTHESIS OF 1,4-BENZODIOXANES WITH POTENTIAL HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY", no XIV Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, Aveiro, Portugal, 5-8 de Abril, 1994 (comunicação em painel).

5-Madalena M. M. Pinto, Eduarda G. R. Fernandes, Francisco A. M. Silva, Ulrike Thull, Bernard Testa, "SYNTHESIS OF MONO AND DISUBSTITUTED XANTHONE DERIVATIVES WITH MONOAMINE OXIDASE INHIBITOR ACTIVITY", no XIIIth International Symposium on Medicinal Chemistry, Paris, França, 19-23 de Setembro, 1994 (comunicação em painel).

6-Eduarda G. R. Fernandes, Madalena M. M. Pinto, Artur M. S. Silva, José A. S. Cavaleiro, "TOTAL SYNTHESIS, STRUCTURAL DETERMINATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF KIELCORINS B", no XIIIth International

Symposium on Medicinal Chemistry, Paris, França, 19-23 de Setembro, 1994 (comunicação em painel).

7-Eduarda Fernandes, Félix Carvalho, Fernando Remião, Maria Lourdes Bastos, Madalena Pinto, Otto Gottlieb, "PROTECTIVE ACTIVITY OF XANTHONIC DERIVATIVES AGAINST *tert*-BUTYLHYDROPEROXIDE-INDUCED TOXICITY IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES", na XXVª Reunião da Sociedade Portuguesa de Farmacologia, Coimbra, 5-6 de Dezembro, 1994 (comunicação oral).

8-Eduarda Fernandes, Félix Carvalho, Fernando Remião, Maria Lourdes Bastos, Madalena Pinto, Otto Gottlieb, "3,4-DIHYDROXY-2-METHOXYXANTHONE AND *trans*-KIELCORIN PROTECT ISOLATED RAT HEPATOCYTES AGAINST *tert*-BUTYLHYDROPEROXIDE-INDUCED TOXICITY", no British Toxicology Society Spring Meeting, York, 27-29 de Março, 1995 (comunicação em painel).

9-Eduarda Fernandes, Félix Carvalho, Fernando Remião, Maria Lourdes Bastos, Madalena Pinto, Otto Gottlieb, "PROTECTION OF ISOLATED RAT HEPATOCYTES AGAINST *tert*-BUTYLHYDROPEROXIDE-INDUCED TOXICITY BY XANTHONIC DERIVATIVES", no European Research Conference on "Mechanisms of Toxicity" Aghia Pelaghia, Creta, Grécia, 29 de Setembro a 4 de Outubro, 1995 (comunicação em painel).

Índice Geral

Agradecimentos.....	xv
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xix
Résumé.....	xxi
Abreviaturas/Símbolos.....	xxiii

Introdução

1. Considerações gerais.....	3
2. Enquadramento e objectivos do trabalho.....	5
3. Estrutura de apresentação da dissertação.....	7

Parte A

SÍNTESE E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE XANTONAS E XANTONOLIGNÓIDES

I - Introdução

1. Preâmbulo.....	11
1.1. Xantonas.....	11
1.1.1. Biossíntese.....	13

1.1.2. Significado quimiosistemático e quimioecológico.....	13
1.1.3. Actividade biológica.....	14
1.2. Xantonolignóides.....	16
1.2.1. Evolução cronológica.....	16
1.2.2. Biossíntese.....	22
1.2.3. Actividade biológica.....	23

II - Resultados e Discussão

1. Introdução.....	28
2. Síntese de xantonolignóides.....	28
2.1. Obtenção da <i>trans</i> -kielcorina B (16) e <i>trans</i> -isokielcorina B (17).....	28
2.2. Mecanismo proposto para a formação da <i>trans</i> -kielcorina B (16) e <i>trans</i> -isokielcorina B (17).....	39
2.3. Mecanismo proposto para a formação do álcool desidrodiconiferílico (19).....	44
3. Síntese de xantonas mono-substituídas.....	46
3.1. Obtenção da 2-metoxixantona (22) e 2-hidroxixantona (23).....	46
3.2. Obtenção da 3-metoxixantona (26) e 3-hidroxixantona (27).....	46
3.3. Obtenção da 4-metoxixantona (33) e 4-hidroxixantona (34).....	47
4. Elucidação estrutural dos compostos sintetizados.....	50
4.1. 1,2,3-Trimetoxibenzeno (2).....	50
4.2. Cloreto de 2-metoxibenzoílo (4).....	51
4.3. 2-Hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5).....	52

4.4. Elucidação estrutural de xantonas.....	57
4.4.1. 3,4-Dimetoxixantona (6), 4-hidroxi-3-metoxixantona (7) e 3-hidroxi-4-metoxixantona (8).....	60
4.4.2. 2-Carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (10) e 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (11).....	67
4.4.3. 2-Formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9), 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12), 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14).....	75
4.5. <i>trans</i> -Kielcorina B (16) e <i>trans</i> -isokielcorina B (17).....	86
4.6. Fenilcumarano (18) e álcool desidrodiconiferílico (19).....	102
4.7. 2-Hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25).....	102
4.8. Ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32).....	106
4.9. 2-Metoxixantona (22), 2-hidroxixantona (23), 3-metoxixantona (26), 3-hidroxixantona (27), 4-metoxixantona (33), e 4-hidroxixantona (34).....	110
5. Caracterização por RMN da <i>trans</i> -kielcorina (35).....	118
III - Conclusões.....	125
IV - Parte Experimental	
1. Métodos gerais, instrumentos e materiais utilizados.....	130
2. Síntese da <i>trans</i> -kielcorina B (16) e <i>trans</i> -isokielcorina B (17).....	132
2.1. Obtenção do 1,2,3-trimetoxibenzeno (2).....	132
2.2. Obtenção do cloreto de 2-metoxibenzoílo (4).....	132
2.3. Obtenção da 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5).....	133
2.4. Obtenção da 3,4-dimetoxixantona (6).....	135

2.5. Obtenção da 4-hidroxi-3-metoxixantona (7).....	136
2.6. Obtenção da 3-hidroxi-4-metoxixantona (8).....	137
2.7. Obtenção da 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9).....	138
2.8. Obtenção da 2-carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (10).....	139
2.9. Obtenção da 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (11).....	140
2.10. Obtenção da 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12).....	142
2.11. Obtenção da 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13).....	143
2.12. Obtenção da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14).....	144
2.13. Obtenção da <i>trans</i> -kielcorina B (16) e <i>trans</i> -isokielcorina B (17).....	145
2.13.1. Fenilcumarano (18)	148
2.13.2. Álcool desidrodiconiferílico (19).....	149
3. Síntese da 2-metoxixantona (22).....	150
3.1. Obtenção da 2-hidroxi-2',5-dimetoxibenzofenona (21).....	150
3.2. Obtenção da 2-metoxixantona (22).....	151
4. Síntese da 2-hidroxixantona (23).....	152
5. Síntese da 3-metoxixantona (26).....	153
5.1. Obtenção da 2-hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25).....	153
5.2. Obtenção da 3-metoxixantona (26).....	155
6. Síntese da 3-hidroxixantona (27).....	156
7. Síntese da 4-metoxixantona (33).....	157
7.1. Obtenção do sal sódico do ácido 2-clorobenzóico (29).....	157
7.2. Obtenção do sal sódico do 2-metoxifenol (31).....	157
7.3. Obtenção do ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32).....	158
7.4. Obtenção da 4-metoxixantona (33).....	159
8. Síntese da 4-hidroxixantona (34).....	160
V - Bibliografia.....	161

Parte B**DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE BIOLÓGICA****B₁-AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTI-HEPATOTÓXICA DA
trans-KIELCORINA, *trans*-ISOKIELCORINA B E RESPECTIVAS
XANTONAS PRECURSORAS.****I - Introdução**

1. Preâmbulo.....	176
1.1. Toxicidade do <i>terc</i> -butil-hidroperóxido.....	179
1.2. Funções da glutaciona reduzida.....	184

II - Parte Experimental

1. Materiais utilizados.....	189
2. Animais.....	189
3. Isolamento dos hepatócitos de rato.....	190
3.1. Procedimento cirúrgico.....	191
3.2. Sistema de perfusão.....	191
3.3. Perfusão do fígado e isolamento dos hepatócitos.....	193
4. Incubação dos hepatócitos.....	194
5. Determinação da viabilidade dos hepatócitos isolados.....	195
5.1. Exclusão do azul de tripano.....	196
5.2. Libertação de desidrogenase láctica para o meio extracelular.....	197

6. Determinação dos níveis de glutathiona reduzida.....	199
7. Determinação dos níveis de glutathiona oxidada.....	199
8. Determinação da extensão da peroxidação lipídica.....	200
9. Análise estatística.....	201
III - Resultados.....	203
IV - Discussão.....	216
V - Conclusões.....	220

**B₂ -AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE INIBIDORA SOBRE A
MONOAMINA OXIDASE POR XANTONAS MONO- E DI-
SUBSTITUÍDAS.**

I - Introdução	
1. Preâmbulo.....	225
1.1. A monoamina oxidase.....	226
II - Resultados e Discussão.....	230
III - Conclusões.....	234
Bibliografia.....	236

Agradecimentos

A realização deste trabalho, apesar do seu carácter individual, teria sido impossível sem a colaboração e estímulo de várias pessoas. Desta forma, gostaria de expressar o meu agradecimento e gratidão:

À Prof. Doutora Madalena Maria de Magalhães Pinto, manifesto um sincero agradecimento pela amizade e formação científica que sempre me proporcionou desde o início da minha actividade no Laboratório de Química Orgânica. Pela orientação que permitiu a realização deste trabalho, expresso também o mais vivo reconhecimento.

À Prof. Doutora Maria de Lourdes Bastos quero manifestar a minha profunda admiração e reconhecimento, pela forma como me recebeu no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia e por todo o apoio e estímulo que sempre me concedeu.

Ao Prof. Doutor Anake Kijjoa do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, pelo auxílio no domínio das técnicas de RMN, o meu sincero obrigado

Ao Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pela realização de trabalhos na área de RMN e ainda pelo valioso apoio na interpretação de diversos espectros, o meu sincero obrigado.

Ao Dr. Félix Carvalho e Dr. Fernando Remião, agradeço a disponibilidade e o precioso auxílio que me dispensaram, na realização do estudo de anti-hepatotoxicidade dos compostos testados.

À Prof. Doutora Maria Fernanda M. B. de Mesquita agradeço a sua disponibilidade, a atenção com que me escutou, as sugestões e o entusiasmo com que sempre me apoiou.

Ao Dr. Queirós de Oliveira são devidos os meus agradecimentos pela realização dos espectros de massa.

À Dra. Fernanda Roleira e Dr. Francisco Silva, agradeço a ajuda prestada, a dedicação e todo o apoio que me concederam durante a realização deste trabalho.

A todos os que trabalham no Laboratório de Química Orgânica, pelo apoio e colaboração, o meu muito obrigado.

A todos quantos trabalham no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia a minha expressão de estima e apreço pela forma como sempre me receberam.

À Firma - Neofarmacêutica agradeço a cedência da amostra de silibina.

Por fim, a homenagem aos meus Pais e ao Félix, a quem dedico este trabalho, sem os quais tudo teria sido mais difícil, senão impossível...

Resumo

Parte A: Síntese e elucidação estrutural de xantonas e xantonolignóides.

Ao longo desta dissertação apresenta-se a síntese biomimética da *trans*-kielcorina B (16), obtida por acoplamento oxidativo da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona* (14) com o álcool coniferílico (15), na presença de carbonato de prata. Desta reacção além da *trans*-kielcorina B (16) resultou também a *trans*-isokielcorina B* (17) bem como dois dímeros do álcool coniferílico, o fenilcumarano (18) e o álcool desidrodiconiferílico (19).

No sentido de obter a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona* (14), bloco construtor para a síntese da *trans*-kielcorina B (16), realizou-se a síntese de várias xantonas: 3,4-dimetoxixantona (6), 4-hidroxi-3-metoxixantona* (7), 3-hidroxi-4-metoxixantona (8), 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona* (9), 2-carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona* (10), 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona* (11), 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona* (12) e 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona* (13).

Com o objectivo de avaliar a actividade inibidora da monoamina oxidase (MAO) foram sintetizadas por processos anteriormente descritos as seguintes xantonas mono-substituídas: 2-metoxixantona (22), 2-hidroxixantona (23), 3-metoxixantona (26), 3-hidroxixantona (27), 4-metoxixantona (33) e 4-hidroxixantona (34).

A caracterização dos compostos sintetizados foi efectuada através de estudos espectroscópicos, nomeadamente RMN de ^1H e ^{13}C , estudos bidimensionais de correlação espectroscópica homonuclear (COSY, COSYLR) e heteronuclear (HETCOR), efeito nuclear de Overhauser (NOE, NOESY) e INEPT selectivo.

*Compostos não descritos anteriormente.

Parte B: Determinação da actividade biológica.

Neste trabalho foi feito o estudo da actividade anti-hepatotóxica dos xantonolignóides *trans*-kielcorina (1) e *trans*-isokielcorina B (2), bem como dos respectivos precursores 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4), contra a toxicidade induzida pelo *terc*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP) em hepatócitos isolados de rato. Os parâmetros avaliados para determinar a actividade anti-hepatotóxica foram a viabilidade celular, níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e peroxidação lipídica.

Os resultados obtidos demonstraram que os xantonolignóides e as respectivas xantonas precursoras exibem actividade anti-hepatotóxica *in vitro* contra a toxicidade induzida pelo *t*-BHP.

Nas concentrações estudadas (0,025; 0,050; 0,100 e 0,200 mM), os compostos referidos diminuem a depleção de GSH e formação de GSSG, a peroxidação lipídica e a morte celular provocada pelo *t*-BHP na concentração de 1,0 mM, durante 30 minutos.

Nestas concentrações, a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) foram mais eficazes quanto à actividade anti-hepatotóxica comparativamente com a *trans*-kielcorina (1) e *trans*-isokielcorina B (2) respectivamente.

A silibina (5) foi testada nas mesmas condições e mostrou ser menos eficaz do que os outros compostos, na protecção das células contra a perda da viabilidade celular e peroxidação lipídica.

São apresentados os resultados do estudo da actividade inibidora da monoamina oxidase (MAO) das xantonas mono e di-substituídas. Este estudo revelou que estas xantonas apresentam capacidade de inibir quer a MAO-A quer a MAO-B.

Abstract**Part A: Synthesis and structural elucidation of xanthenes and xanthonolignoids.**

In this PhD thesis a biomimetic synthesis of *trans*-kielcorin B (16), obtained by oxidative coupling of 2,3-dihydroxy-4-methoxyxanthone* (14) with coniferyl alcohol (15) in the presence of silver carbonate is presented. From this reaction resulted not only *trans*-kielcorin B (16) but also *trans*-isokielcorin B* (17) as well as two dimmers of coniferyl alcohol: phenylcoumaran (18) and dehydrodiconiferyl alcohol (19).

With the purpose to obtain 2,3-dihydroxy-4-methoxyxanthone* (14), a building block for the synthesis of *trans*-kielcorin B* (16), various xanthenes were synthesised: 3,4-dimethoxyxanthone (6), 4-hydroxy-3-methoxyxanthone* (7), 3-hydroxy-4-methoxyxanthone (8), 2-formyl-3-hydroxy-4-methoxyxanthone (9), 2-carboxy-3-hydroxy-4-methoxyxanthone (10), 3-acetoxy-2-carboxy-4-methoxyxanthone (11), 3-benzyloxy-2-formyl-4-methoxyxanthone (12) and 3-benzyloxy-2-hydroxy-4-methoxyxanthone (13).

In order to determine monoamine oxidase (MAO) inhibitor activity, the following monosubstituted xanthenes were synthesised: 2-methoxyxanthone (22), 2-hydroxyxanthone (23), 3-methoxyxanthone (26), 3-hydroxyxanthone (27), 4-methoxyxanthone (33) and 4-hydroxyxanthone (34), using methods previously described.

The characterization of the synthesised compounds was performed by modern analytical techniques, specially by NMR spectroscopic methods, namely ^1H and ^{13}C , homonuclear spectroscopic correlation bidimensional studies (COSY, COSYLR) and heteronuclear (HETCOR), nuclear Overhauser effect (NOE, NOESY) and selective INEPT.

*Compounds not previously described.

Part B: Biological activity evaluation.

In this study the anti-hepatotoxic activity of the xanthonolignoids *trans*-kielcorin (1), *trans*-isokielcorin B (2), as well as of their respective precursors 3,4-dihydroxy-2-methoxyxanthone (3) and 2,3-dihydroxy-4-methoxyxanthone (4) was evaluated against *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHT)-induced toxicity in freshly isolated rat hepatocytes. The evaluation of the anti-hepatotoxic activity was performed by measuring cell viability, reduced and oxidized glutathione and lipid peroxidation.

The results obtained in this study, showed that the xanthonolignoids and the respective xanthone precursors exhibit *in vitro* anti-hepatotoxic activity against *t*-BHP-induced toxicity.

In the studied concentrations (0.025, 0.050, 0.100 and 0.200 mM) the referred compounds diminish the GSH depletion, GSSG formation, lipid peroxidation and cell mortality induced by *t*-BHP at the concentration of 1,0 mM for 30 min.

Using these concentrations 3,4-dihydroxy-2-methoxyxanthone (3) and 2,3-dihydroxy-4-methoxyxanthone (4) were more effective in what concern to their anti-hepatotoxic activity when compared to *trans*-kielcorin (1) and *trans*-isokielcorin B (2), respectively.

Silybin (5) was tested in the same experimental conditions and showed to be less effective than the other compounds in protecting against loss of cell viability and lipid peroxidation.

The results of the monoamine oxidase (MAO) inhibitor activity study for the mono and di-substituted xanthones are presented. This study revealed that these xanthones show inhibitor capacity for MAO-A and MAO-B.

Résumé

Part A: Synthèse et elucidation structural des xanthones et xanthonolignoids.

Au long de cette dissertation on presente la synthèse biomimétique de la *trans*-kielcorin B (16) obtenue par accouplement oxydative de la 2,3-dihydroxy-4-methoxyxanthone* (14) avec l'alcool coniferilique (15) en presence du carbonate d' argent. De cette réaction obtient, aussi la *trans*-isokielcorin B* (17) et deux dimères de l'alcool coniferilique, le fenylicoumarane (18) et l'alcool dehydroconiferilique (19).

Pour aboutir la 2,3-dihydroxy-4-methoxyxanthone* (14), bloque constructeur pour la synthèse de la *trans*-kielcorin B (16), on a realizé la synthèse de plusieurs xanthones: 3,4-dimethoxyxanthone (6), 4-hydroxy-3-methoxyxanthone* (7), 3-hydroxy-4-methoxyxanthone (8), 2-formyl-3-hydroxy-4-methoxyxanthone (9), 2-carboxy-3-hydroxy-4-methoxyxanthone (10), 3-acetoxy-2-carboxy-4-methoxyxanthone (11), 3-benzyloxy-2-formyl-4-methoxyxanthone (12) et 3-benzyloxy-2-hydroxy-4-methoxyxanthone (13).

Pour déterminer la activité inhibitoire de la monoamine oxidase (MAO), les xanthones suivants on été sinthetisées selon des techniques mises au point précédement: 2-methoxyxanthone (22), 2-hydroxyxanthone (23), 3-methoxyxanthone (26), 3-hydroxyxanthone (27), 4-methoxyxanthone (33) et 4-hydroxyxanthone (34).

Les structures ont été établies sur la base de techniques modernes, spécialement par études de spectroscopie NMR, notamment ^1H et ^{13}C , correlacion homonucleaire (COSY, COSYLR) et heteronucleaire (HETCOR), effect nucleair de Overhauser (NOE, NOESY) et selective INEPT.

*Composés jamais décrites jusqu'au present.

Part B: Évaluation de l'activité biologique.

Dans cette étude l'activité anti-hepatotoxique des xanthonolignoids *trans*-kielcorin (1), *trans*-isokielcorin B (2), et aussi de leurs respectif précurseurs 3,4-dihydroxy-2-methoxyxanthone (3) et 2,3-dihydroxy-4-methoxyxanthone (4) a été évalué contre la toxicité induite par le *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) dans les hépatocytes isolées du rat. L'évaluation de l'activité anti-hepatotoxique a été faite à travers de la détermination de la viabilité des hépatocytes, de la glutathione réduite (GSH) et oxydée (GSSG), et de la peroxydation lipidique.

Les résultats obtenus dans cet étude, on démontré que les xanthonolignoids et leurs respectif xanthones précurseurs montrent une activité anti-hepatotoxique *in vitro* contre la toxicité induite par le *t*-BHP.

Dans les concentrations étudiées (0.025, 0.050, 0.100 et 0.200 mM) les composés décrits on diminué la déplétion de la GSH, la formation de la GSSG, la peroxydation lipidique et la mortalité cellulaire induite pour le *t*-BHP dans la concentration de 1.0 mM en 30 min.

Dans ces concentrations la 3,4-dihydroxy-2-methoxyxanthone (3) et la 2,3-dihydroxy-4-methoxyxanthone (4) ont été plus effectifs dans ce qu'il concerne à leur activité anti-hepatotoxique par rapport, à la *trans*-kielcorin (1) et *trans*-isokielcorin B (2), respectivement.

Silybin (5) a été testé dans les mêmes conditions expérimentales et a montré être moins effectif que les autres composés testés dans ce qui concerne leur protection contre la perdre de la viabilité cellulaire et la peroxydation lipidique.

Les résultats des études de l'activité inhibitoire de la monoamine oxydase (MAO) pour les xanthones mono et di-substituées sont présentées. Cet étude a révélé que ces xanthones sont capables d'inhiber la MAO-A et la MAO-B.

Abreviaturas

Ac	Grupo acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
AMCPB	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzóico
AMP	Monofosfato de adenosina
aq.	Aquoso
Ar	Grupo aromático
<i>t</i> -BHP	<i>terc</i> -Butil-hidroperóxido
Bu	Grupo butilo
BzCl	Cloreto de benzilo
CC	Cromatografia em coluna
CCF	Cromatografia em camada fina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
conc.	Concentrado
COSY	"Correlation spectroscopy"
COSYLR	"Long range correlation spectroscopy"
dec.	Decomposição
DEPT	"Distortionless Enhancement by Polarization Transfer"
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ED ₅₀	Dose eficaz para 50% do efeito total
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis (β-aminoetiléter) N,N,N',N'-tetraacético
EM	Espectrometria de massa
Exp.	Parte experimental
Fig.	Figura
GSH	Glutationa reduzida

GSSG	Glutationa oxidada
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfónico
HETCOR	"Heteronuclear correlation"
HMBC	"Heteronuclear multiple bond correlation"
	Constante de acoplamento otimizada para J= 5 Hz
HMTA	Hexametilenotetramina
HPLC	"High Performance Liquid Chromatography"
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% da actividade total
INEPT	"Insensitive nuclei enhanced by polarization transfer"
	O INEPT selectivo foi realizado efectuando irradiações protónicas com J= 7-8 Hz
int. rel.	Intensidade relativa
IUPAC	"International Union of Applied Chemistry"
IV	Infravermelho
LDH	Desidrogenase láctica
lit.	Literatura
M ⁺	Ião molecular
MAO	Monoamino oxidase
MAO-A	Monoamina oxidase tipo A
MAO-B	Monoamina oxidase tipo B
Me	Grupo metilo
MeOH	Metanol
NAD ⁺	Forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotido
NADH	Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotido
NADP ⁺	Forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NADPH	Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotido fosfato

NOE	"Nuclear Overhauser effect"
NOESY	"Nuclear Overhauser and exchange spectroscopy"
OMe	Grupo metoxilo
p.	Página
Pd/C	Paládio/carvão
PF	Ponto de fusão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear protónica
r.p.m.	Rotações por minuto
TBARS	Substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico
TDA-1	tris [2-(2-Metoxietoxi)etil]amina
Tris	tris-(Hidroximetil)aminometano
UI	Unidades Internacionais
UV	Ultravioleta

Símbolos

J	Constante de acoplamento, em Hertz
δ	Desvio químico, em ppm
s	Singuleto
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
dt	Duplo tripleto
m	Multiplete
t	Triplete
ν	Número de onda, em cm^{-1}
m/e	Relação massa/carga
Rf	Factor de retenção

Introdução

Introdução

1. Considerações gerais.....	3
2. Enquadramento e objectivos do trabalho.....	5
3. Estrutura de apresentação da dissertação.....	7

I - Introdução

1. Considerações gerais

Os medicamentos podem ser considerados como uma das descobertas mais importantes do século XX, já que a vida do ser humano se encontra relacionada, em maior ou menor grau, com estes produtos desde o seu nascimento até à sua morte [1].

Muitos dos agentes terapêuticos modernos têm sido obtidos a partir de plantas medicinais [2]. De facto, as primeiras drogas foram as de origem natural, extraídas principalmente de plantas superiores, e destinavam-se à terapia de doenças infecciosas [2,3]. A medicina popular tem tido um profundo impacto no desenvolvimento da medicina moderna, muito embora essa contribuição não tenha sido durante muito tempo devidamente reconhecida no ensino das ciências da saúde e entre o público em geral [2,3].

Até meados dos anos 70 existiu um grande interesse da indústria farmacêutica na utilização de plantas como fontes de novos medicamentos. No entanto, os compostos naturais são normalmente obtidos em pequena quantidade, quer por razões inerentes às necessidades metabólicas das plantas quer devido aos processos de isolamento e separação [4].

Com o desenvolvimento dos métodos de síntese, o aparecimento de técnicas instrumentais, a aplicação da informática, assim como o desenvolvimento da biologia molecular foi possível obter um grande número de compostos com estruturas para as quais se poderia prever uma potencial utilização farmacológica. A aplicação de todas estas metodologias também veio ajudar a compreender a acção, o

metabolismo e a toxicidade dos fármacos, conhecer a estrutura dos receptores e em muitos casos a estabelecer a relação entre a estrutura química de um fármaco e a sua acção biológica [1,5,6].

Os problemas no futuro da Química Farmacêutica provavelmente não serão técnicos. As metodologias sintéticas são cada vez mais rápidas e sofisticadas. A determinação estrutural, quer por métodos directos quer por predição, irá permitir a elucidação e interpretação das interacções fármaco-receptor e a síntese de agentes mais específicos e selectivos [5].

Dentro de algum tempo os dados completos do genoma humano estarão disponíveis, e isto, irá em princípio, definir os alvos para os medicamentos do séc. XXI. Para a Química Farmacêutica as soluções da sequência de aproximadamente 100.000 genes humanos e da forma de enrolamento das proteínas irá tornar disponível os alvos tridimensionais correspondentes. A partir destes alvos serão desenvolvidos os respectivos fármacos [5].

A Química Farmacêutica é, assim, o campo das ciências farmacêuticas que aplica os conhecimentos da Química e da Biologia à criação do conhecimento que conduz à introdução de novos agentes terapêuticos [2]. Tendo em conta a situação actual do desenvolvimento das ciências, o químico farmacêutico deve não apenas ser um químico orgânico competente, mas também possuir conhecimento básico nas ciências biológicas, especialmente em Bioquímica, Farmacologia e Toxicologia [2].

2. Enquadramento e objectivos do trabalho

Este trabalho integra-se na área da Química Farmacêutica e tem como objectivo principal a síntese e caracterização estrutural de produtos naturais e avaliação da actividade biológica.

Em 1982, no Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto foi isolado um composto a partir de *K. coriaceae* o qual foi tentativamente identificado como kielcorina B [7,8]. Uma vez que a quantidade então isolada não foi suficiente para uma elucidação estrutural completa, um dos objectivos deste trabalho foi o de obter kielcorina B (Parte A) em quantidade suficiente para caracterização estrutural inequívoca deste composto.

O planeamento da síntese total da kielcorina B envolveu síntese clássica de xantonas e síntese biomimética de xantonolignóides (Parte A). Este planeamento teve como referência o trabalho já realizado por outros elementos do grupo para a obtenção da kielcorina [8-10].

As xantonas e os xantonolignóides estão representados de uma forma significativa em alguns extractos de plantas nomeadamente em espécies de *Kielmeyra* e *Hypericum* [8, 11-18], que têm sido utilizadas em medicina popular no tratamento e prevenção de doenças hepáticas [19,20].

Além disso as semelhanças estruturais e electrónicas entre as xantonas e xantonolignóides com a silibina (Parte B₁), composto natural já bem conhecido e utilizado clinicamente no tratamento de várias doenças hepáticas [22] (existem no mercado Português dois medicamentos que contêm este composto na sua composição:

Legalon® e Chologutt® [23]), levaram a prever que estes compostos poderiam contribuir para a actividade hepatoprotectora apresentada pelos extractos citados.

Foi já demonstrado, que algumas xantonas exibiam actividade anti-hepatotóxica *in vivo*: a mangostina e a mangiferina, xantonas de *Garcinia mangostana* Linn. (Guttiferae) e de *Canscora decussata* Schult (Gentianaceae) respectivamente, bem como a xantona mangostina-3,6-di-O-glucosido [21] apresentam actividade protectora contra a necrose hepática provocada pelo tetracloreto de carbono em ratinhos [21].

Neste sentido, o objectivo do trabalho corresponde também à avaliação da actividade anti-hepatotóxica, *in vitro*, de xantonolignóides e respectivas xantonas precursoras (Parte B₁).

Uma outra vertente do trabalho científico que tem vindo a ser realizado pelo grupo de trabalho do Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia da Universidade do Porto é a síntese de xantonas [7, 9, 10, 24-26] e estudo da actividade inibidora da monoamina oxidase [27].

Uma vez que durante a síntese total da kielcorina B (Parte A) foram obtidos vários derivados xantónicos, alguns destes compostos foram também estudados quanto à sua actividade inibidora da MAO (Parte B₂). Os resultados obtidos foram um estímulo para a síntese de derivados xantónicos mono-substituídos num anel aromático (Parte A), tendo como objectivo a respectiva avaliação da relação estrutura-actividade inibidora da MAO (Parte B₂).

3. Estrutura de apresentação da dissertação

A apresentação dos resultados obtidos durante o trabalho de investigação encontra-se dividida em:

Parte A - Síntese e elucidação estrutural de xantonas e xantonolignóides.

Esta parte é constituída por introdução, resultados/discussão, conclusões, parte experimental e bibliografia.

Parte B - Determinação da actividade biológica:

Parte B₁ - Avaliação da actividade anti-hepatotóxica da *trans*-kielcorina, *trans*-isokielcorina B e respectivas xantonas precursoras.

Esta parte é constituída por introdução, parte experimental resultados, discussão e conclusões.

Parte B₂ - Avaliação da actividade inibitória sobre a monoamina oxidase por xantonas mono- e di-substituídas.

Esta parte é constituída por introdução, resultados/discussão e conclusões.

Bibliografia.

Parte A

**SÍNTESE E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE XANTONAS E
XANTONOLIGNÓIDES**

Introdução

I - Introdução

1. Preâmbulo.....	11
1.1. Xantonas.....	11
1.1.1. Biossíntese.....	13
1.1.2. Significado quimiossistemático e quimioecológico.....	13
1.1.3. Actividade biológica.....	14
1.2. Xantonolignóides.....	16
1.2.1. Evolução cronológica.....	16
1.2.2. Biossíntese.....	22
1.2.3. Actividade biológica.....	23

I - Introdução

1. Preâmbulo

Esta parte do trabalho inclui a síntese e elucidação estrutural de xantonas e xantonolignóides. O trabalho realizado incidiu fundamentalmente na síntese clássica de xantonas e síntese biomimética de xantonolignóides.

O objectivo principal da Parte A desta dissertação, como já foi referido, é orientado para a síntese de xantonolignóides. Como as xantonas são os respectivos precursores estruturais, tanto *in vivo* como *in vitro*, no que se refere à síntese biomimética realizada, o desenvolvimento sequencial do trabalho, foi iniciado pela síntese destes compostos. Embora de modo sucinto refere-se a nomenclatura, a biossíntese e acções biológicas de xantonas e xantonolignóides.

Os dados espectroscópicos obtidos na caracterização estrutural dos compostos sintetizados podem ser um contributo importante para a obtenção de um banco de dados, os quais podem constituir um pilar auxiliar para a caracterização rápida de xantonas e xantonolignóides.

1.1. Xantonas

As xantonas são compostos do tipo heterocíclico. O composto mais simples, representado pela estrutura (I₁) (Fig. 1, p. 12), é designado por xantona e corresponde quimicamente à dibenzo- γ -pirona [18]. A natureza química dos substituintes e a sua localização no núcleo

xantónico é muito variada, se considerarmos no seu conjunto os compostos naturais, os compostos obtidos por síntese total e por modificação molecular [28, 29].

A primeira xantona foi isolada em 1821, a partir de *Gentiana luteae* designada de gentisina (I_2) [18, 28]. Até à data muitas dezenas de xantonas têm sido isoladas de plantas superiores, principalmente nas famílias Guttiferae e Gentianaceae [18, 28-31], bem como de líquenes [9, 18], fungos [9, 18, 29] e fetos [18, 29].

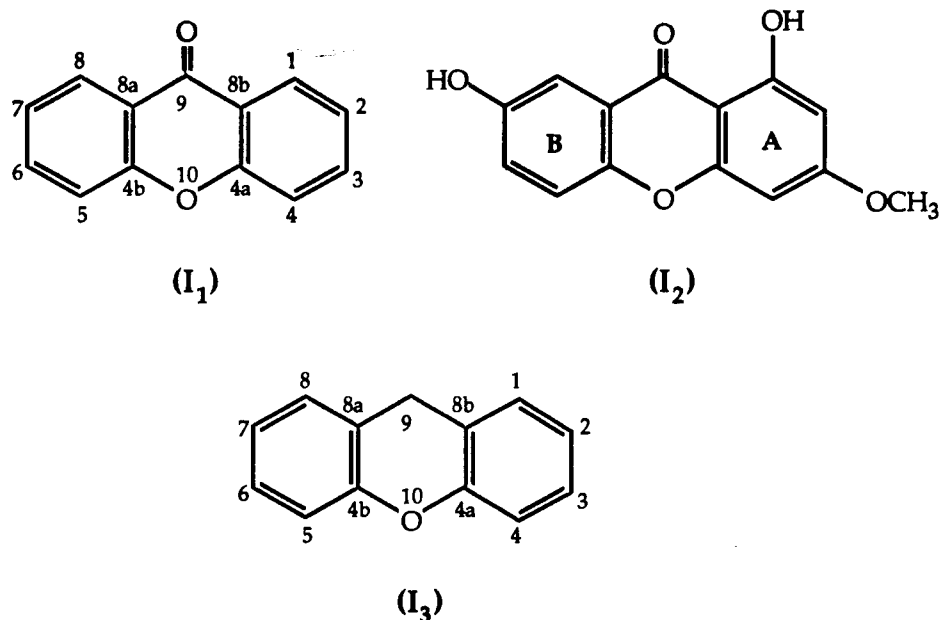


Fig. 1. Estrutura da xantona (I_1), gentisina (I_2) e xanteno (I_3).

O sistema de numeração indicado em (I_1) (Fig. 1), o qual será usado ao longo do trabalho, é uma adaptação da numeração do xanteno (I_3) [32]¹.

Tendo em conta os trabalhos relacionados com a elucidação estrutural de xantonas, por RMN de ¹³C, verifica-se que a numeração atribuída aos átomos de carbono quaternários é variável [33, 34]. A

¹ A numeração destes sistemas heterocíclicos é uma excepção em relação à numeração sistemática de heterocíclicos [32].

numeração de Frahm *et al.* [34] indicada em (I₁) (Fig. 1, p. 12), foi a adoptada neste trabalho.

O nome trivial de xantona, acrescido da indicação da posição e natureza dos substituintes, é vulgarmente usado na designação destes compostos.

1.1.1. Biossíntese

A biossíntese de xantonas em plantas superiores está bem determinada seguindo a via acetato-xiquimato [28, 29, 31, 35]. Em determinado tipo de organismos, nomeadamente fungos e líquenes, o padrão de oxigenação das xantonas é diferente o que levou a propôr para a sua génese a via poliacetato [28, 29, 31, 36].

No caso das xantonas simples oxigenadas, provenientes de plantas superiores, os átomos de carbono são normalmente numerados de acordo com uma convenção biossintética [29]. O anel A (carbonos 1-4) indica a origem da via acetato (muitas vezes caracterizado por uma dioxigenação 1,3-) e o anel B (carbonos 5-8) proveniente da via ácido xiquímico, contém caracteristicamente grupos hidroxilo em C(5) e/ou C(7) (exemplo (I₂), Fig. 1, p. 12) [28, 29, 31].

1.1.2. Significado quimiosistemático e quimioecológico

A presença de xantonas em determinadas espécies no reino vegetal pode levar à eventual utilização destes compostos como marcadores sistemáticos [28, 36].

Através de uma correlação das estruturas destes metabolitos secundários com as espécies de plantas superiores e fungos que as produzem, é possível contribuir para uma classificação quimiosistemática [37, 38].

É de notar que com a aplicação desta metodologia, acentuadamente desenvolvida nos últimos anos, é possível resolver ambiguidades classificativas anteriormente existentes e que, com a classificação meramente morfológica se tinham mantido [39, 40].

A evolução de xantonas em Gentianaceae e Gutiferae pode ser traduzida pela variação do padrão oxidativo do núcleo xantónico [41, 42]. De facto, enquanto que alguns padrões de oxigenação de xantonas aparecem de uma forma uniforme nas Gutiferae outros padrões são restritos a certos grupos desta família [42].

A função das xantonas como metabolitos secundários, no organismo que as produz, está ainda pouco esclarecida. Poderá admitir-se que estes compostos servirão de mediadores nas interacções entre o organismo vegetal e o ambiente, embora a forma de actuação, em tais interacções ecológicas, não esteja ainda completamente definida [43].

1.1.3. Actividade biológica

Desde há muito tempo que os compostos do tipo xantónico despertaram o interesse de químicos, biólogos e farmacologistas devido principalmente à sua potencial actividade biológica. Os estudos de actividade realizados não se restringiram a compostos de origem natural, mas também a um grande número de derivados obtidos por síntese.

Entre as actividades descritas para estes núcleos heterocíclicos salienta-se a: actividade anti-psicótica [18, 28, 44, 45], depressora [28, 29, 46, 47] e estimulante do Sistema Nervoso Central [18, 44] bem como

acção anti-convulsivante [48]. Para alguns tipos de actividades referidas para o Sistema Nervoso Central não deverá ser alheio o facto destes compostos serem inibidores das enzimas metabolizadoras das aminas simpaticomiméticas, a MAO-A e MAO-B [18, 27, 35, 42, 49-52].

A actividade inibidora da MAO poderá estar também relacionada com os efeitos cardiovasculares observados para alguns tipos de xantonas, nomeadamente o efeito cardiotónico [29, 44, 53], o aumento da pressão sanguínea [29] e o controlo de arritmias cardíacas [53].

Outras enzimas para as quais se encontrou actividade inibidora induzida por alguns tipos de xantonas foram as 3',5'-AMP fosfodiesterases [54], as proteínas cínase vegetais dependentes do cálcio, as proteínas cínase animais dependentes do AMP-cíclico [55], as transcriptases reversas virais [29, 56], bem como a enzima conversora da angiotensina I [57].

Além disso, a actividade anti-microbiana foi também demonstrada para várias xantonas, como é o caso da actividade tuberculostática [18, 28, 31, 47], anti-malária [18], anti-fúngica e anti-bacteriana [29, 42, 58].

Os estudos de actividade que têm vindo a ser desenvolvidos sobre os derivados xantónicos levou ainda à descoberta de outras actividades biológicas e farmacológicas como por exemplo mutagénica [42], anti-inflamatória [18, 28, 42], colerética [18, 44], anti-pirética [18], anti-ulcerosa [18, 29], inibidora da agregação plaquetária [59, 60], antagonista dos receptores do leucotrieno B₄ [61], anti-oxidante [62-64], hipoglicemiante [18, 65], anti-alérgica [66, 67], broncodilatadora [31], bem como actividade herbicida [68]. Foram também encontradas várias xantonas citotóxicas que provaram ser anti-tumorais *in vivo* e *in vitro* [29, 42, 69, 70-74].

De acordo com as actividades referidas, verifica-se actualmente que a pesquisa de derivados xantónicos tem sido direccionada na optimização de compostos com potencial valor terapêutico [56, 59, 60].

1.2. Xantonolignóides

Os xantonolignóides são compostos naturais que resultam do acoplamento oxidativo de *ortho*-diidroxixantonas com unidades do tipo C₆-C₃ [9, 18, 29, 75] (Fig. 2, p. 17).

Tendo em conta os trabalhos relacionados com a elucidação estrutural de xantonolignóides naturais verifica-se que a numeração atribuída aos átomos de carbono varia conforme os autores [8, 16, 76-78]. O sistema de numeração indicado em (i) (Fig. 2), o qual será usado ao longo do trabalho, é uma adaptação da numeração indicada na literatura [13].

1.2.1 Evolução cronológica

Na cronologia do isolamento de compostos naturais, os xantonolignóides surgiram muito recentemente e as estruturas isoladas podem ser seguidas por análise da Fig. 2. O primeiro composto desta família foi isolado em 1969, a partir de espécies *kielmeyera* e designado por kielcorina (I₄), tendo sido inicialmente descrito como uma xantona 2,3,4-trioxigenada [79].

Mais tarde (1977) Castelão *et al.* [12] demonstraram que a kielcorina (I₄) correspondia a um composto de estrutura mais complexa que designaram por xantonolignóide.

Inicialmente atribuiu-se à kielcorina (I₄) a fórmula molecular C₂₄H₂₀O₈ e, após obtenção de dados de UV, IR, RMN de ¹H e de ¹³C e EM, foi considerada a seguinte fórmula molecular expandida: [C₁₃H₅O₄.OCH₃] . [C₉H₇(OH)₂OCH₃] [12].

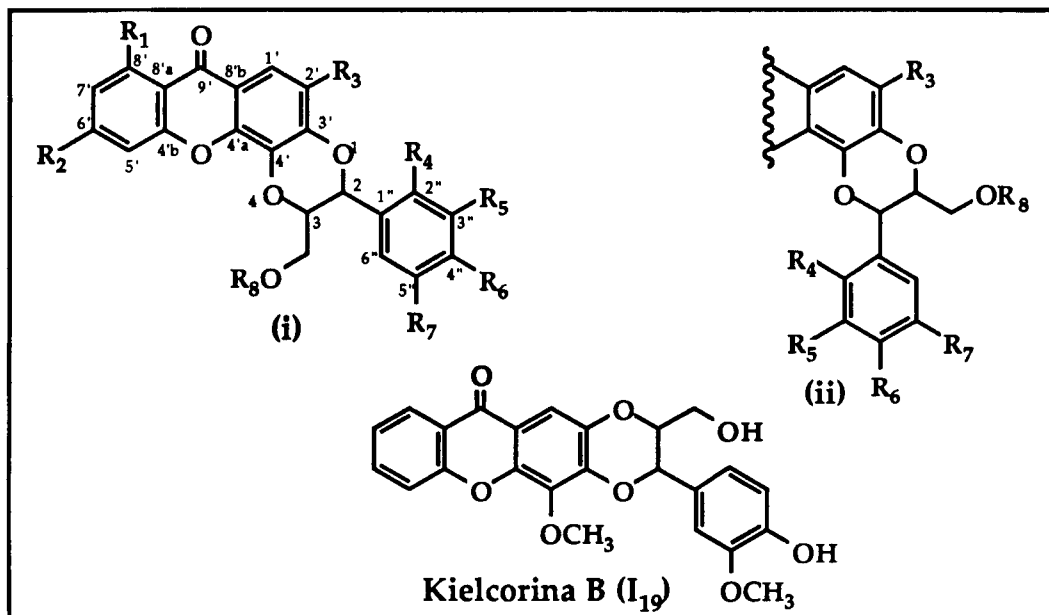


Fig. 2. Estruturas dos xantonolignóides isolados até ao momento.

Kielcorina (i) [12]: (I₄)	R ₁ =R ₂ =R ₄ =R ₇ =R ₈ =H R ₃ =R ₅ =OMe R ₆ =OH	Cadensina A (i/ii) [12]: (I₅)	R ₁ =R ₇ =OH R ₂ =R ₄ =R ₅ =R ₈ =H R ₃ =R ₆ =OMe
Cadensina B (i/ii) [12]: (I₆)	R ₁ =R ₇ =OH R ₃ =R ₄ =R ₆ =OMe R ₂ =R ₅ =R ₈ =H	Cadensina C (i) [82]: (I₉)	R ₁ =R ₆ =OH R ₂ =R ₄ =R ₈ =H R ₃ =R ₅ =R ₇ =OMe
Cadensina D (i) [15]: (I₁₀)	R ₁ =R ₂ =R ₄ =R ₈ =H R ₃ =R ₅ =R ₇ =OMe R ₆ =OH	Subalatina (i) [16]: (I₁₁)	R ₁ =R ₂ =R ₄ =R ₈ =H R ₃ =R ₆ =OH R ₅ =R ₇ =OMe
Isocadensina D (i) [77]: (I₁₂)	R ₁ =R ₃ =R ₅ =OMe R ₂ =R ₄ =R ₇ =R ₈ =H R ₆ =OH	Monoacetato de isocadensina D (i) [77]: (I₁₃)	R ₁ =R ₃ =R ₅ =OMe R ₂ =R ₄ =R ₇ =H R ₈ =Ac R ₆ =OH
Cadensina F (i) [77]: (I₁₄)	R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₇ =OMe R ₂ =R ₄ =R ₈ =H R ₆ =OH	6-Hidroxi-cadensina F (i) [77]: (I₁₅)	R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₇ =OMe R ₂ =R ₆ =OH R ₄ =R ₈ =H
Cadensina G (i) [77]: (I₁₆)	R ₁ =R ₂ =R ₆ =OH R ₃ =R ₄ =R ₈ =H R ₇ =R ₅ =OMe	6-Metoxi-kielcorina (i) [17]: (I₁₇)	R ₁ =R ₄ =R ₇ =R ₈ =H R ₂ =R ₃ =R ₅ =OMe R ₆ =OH
5'-Desmetoxi-cadensina G (i) [78] (I₁₈)	R ₁ =R ₂ =R ₆ =OH R ₃ =R ₄ =R ₇ =R ₈ =H R ₅ =OMe		

Para justificar esta expansão, contribuiu também o resultado da metilação da kielcorina (I_4), da qual resultou um éter monometílico, no qual se verificou existir ainda um hidroxilo acetilável. Através de um estudo de RMN de ^1H da kielcorina (I_4), do seu éter metílico e dos seus derivados mono e diacetilados, verificou-se que este grupo hidroxilo correspondia a um álcool primário [12].

Após análise dos dados de RMN de ^1H do acetato do éter metílico foi ainda possível estabelecer que o grupo CH_2OH se encontrava ligado a uma unidade Ar-CH-CH- , na qual os dois carbonos intervêm em ligações do tipo "éter" [12].

Neste estágio de análise foi possível considerar quatro estruturas 2,3,4-trioxixantónicas para a kielcorina (A, B, C e D) (Fig. 3).

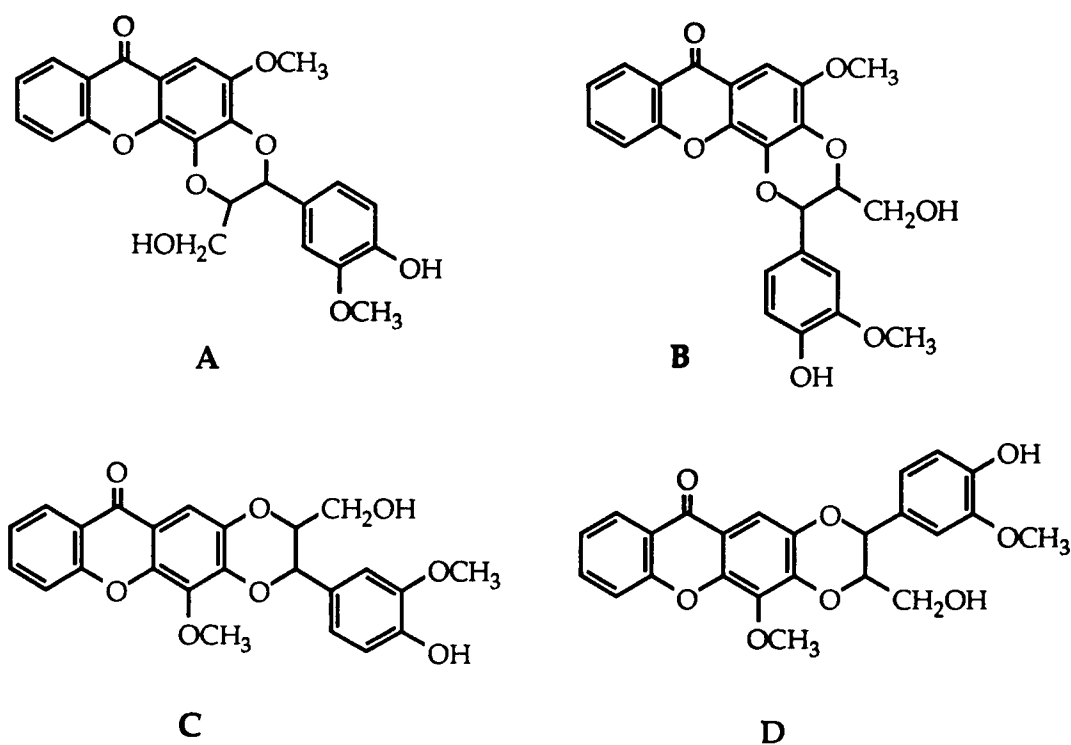


Fig. 3. Estruturas 2,3,4-trioxixantónicas para a kielcorina (A, B, C e D).

A redução do número de estruturas prováveis para duas (A e B), foi feita por comparação do espectro de massa da kielcorina (I_4) com

dois compostos modelo [80]. A estabilidade dos metoxilos, expressa em termos da estabilidade relativa dos picos M^{+} , $M^{+}-15$ e $M^{+}-30$, dos compostos modelo, quando comparadas com a kielcorina (I_4), excluiu a possibilidade da localização do grupo em C(4) metoxilo do núcleo xantónico [12, 80].

A relação *trans* dos prótons do anel benzodioxânico da kielcorina (I_4) foi deduzida a partir da respectiva constante de acoplamento ($J=8$ Hz) [12].

A localização do OH fenólico em *para* relativamente à cadeia lateral, resultou de um teste de Gibbs negativo [12, 81].

Na molécula da kielcorina (I_4) existem dois centros estereogénicos C(2) e C(3). Inicialmente concluiu-se que a configuração absoluta, determinada por comparação com a silibina, correspondia a 2S, 3S [12]. Posteriormente verificou-se que o valor determinado para a rotação específica da kielcorina (I_4) estava próximo dos limites fiduciários, admitindo-se que o produto natural seria opticamente inactivo e, portanto, formado por um racemato (2R, 3R)- e (2S, 3S)-3-hidroximetil-2-(4''-hidroxi-3''-metoxifenil)-5,6:3',4'-(2'-metoxixantona)-1,4-dioxano [13, 15].

Castelão *et al.* [12] propuseram ainda a fórmula estrutural para outros xantonolignóides naturais, as cadensinas A (I_5) e B (I_6), isoladas a partir de *Caraipa densiflora*. Embora a elucidação estrutural destes dois xantonolignóides fosse baseada em dados de UV, IV, RMN de 1H e de ^{13}C e EM [12] também não foi possível distinguir a qual dos regioisómeros correspondiam os compostos isolados, tal como aconteceu para a kielcorina (I_4).

A orientação regiospecífica dos grupos 4-hidroxi-3-metoxifenilo e hidroximetilo da kielcorina (I_4) foi determinada através da abertura do anel dioxano, em meio alcalino e estudo por RMN dos principais produtos obtidos (I_7) e (I_8) (Fig. 4, p. 20) [13].

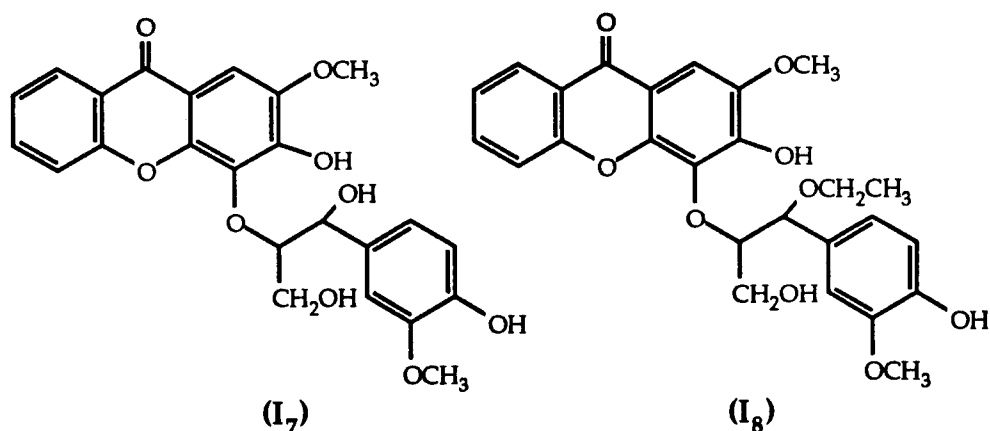


Fig. 4. Estruturas dos produtos obtidos através da abertura do anel dioxano da kielcorina (I₄) em meio alcalino.

A justificação mecanística para a hidrólise da ligação “éter benzílico” da kielcorina (I₄) foi estabelecida tendo em consideração as características do grupo fenólico localizado na posição *para* que, em meio alcalino, origina o respectivo ião (Fig. 5).

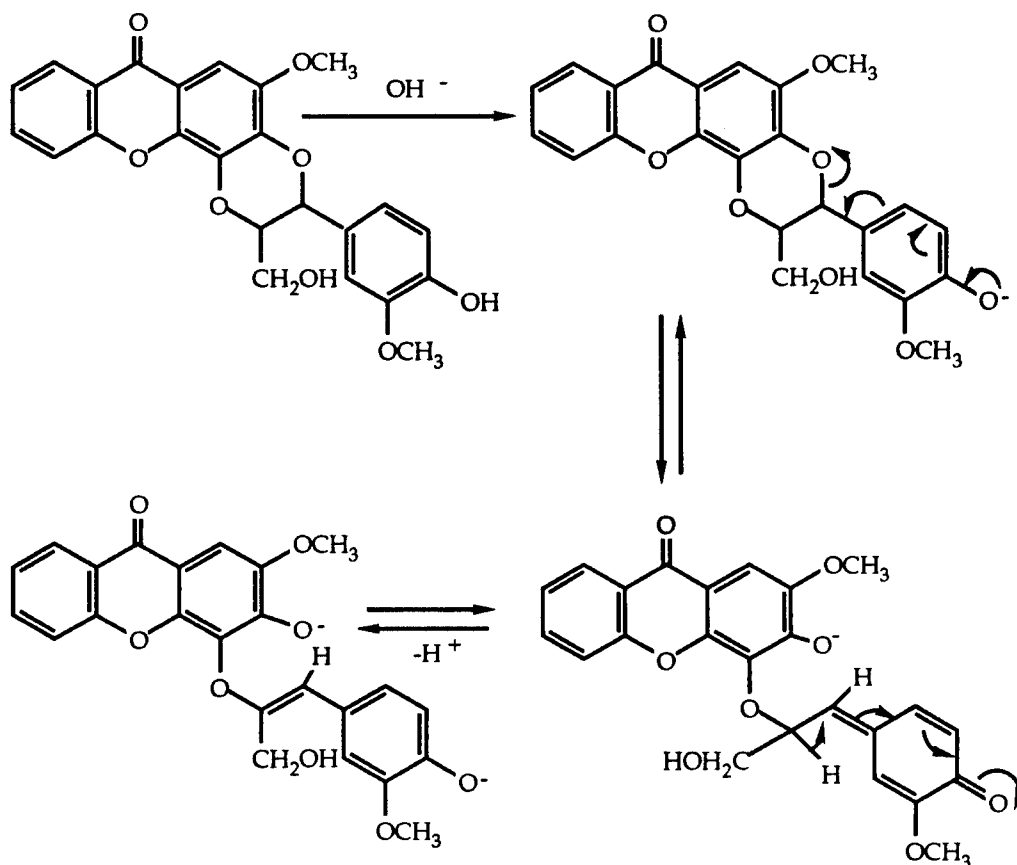


Fig. 5. Mecanismo da reacção de hidrólise da ligação “éter benzílico” da kielcorina (I₄).

Um facto que justificou esta hipótese foi o resultado obtido com o éter metílico da kielcorina que, nas mesmas condições reaccionais, não sofreu alteração [13].

A abertura do anel dioxano permitiu determinar a orientação regiospecífica dos substituintes localizados no anel dioxano nas posições C(2) e C(3), quando existe um grupo OH na posição *para* no substituinte fenilo.

Mais tarde Monache *et al.* (1983) [82] isolaram um quarto xantonolignóide, a cadensina C (I₉), a partir de *Vismia guaramirangae*. O quinto xantonolignóide, a cadensina D (hipercorina) (I₁₀) foi isolado por Cardona *et al.* (1986) [15], a partir de *Hypericum canariensis*. Chen M. -T. (1988) [16] isolou a subalatina (I₁₁) a partir de *Hypericum subalatum*. Abou-Shoer *et al.* (1989) [77] isolaram a isocadensina D (I₁₂), o monoacetato de isocadensina D (I₁₃), a cadensina F (I₁₄), a 6-hidroxicadensina F (I₁₅) e a cadensina G (I₁₆), a partir de *Psorospermum febrifugum*. Cardona *et al.* (1990) [17] isolaram a 6-metoxikielcorina (I₁₇) a partir de *Hypericum reflexum*. Recentemente Sia *et al.* (1995) [78] isolaram a 5'-desmetoxicadensina G (I₁₈) a partir de *Cratoxylum cochinchinense*.

Um isómero da kielcorina (I₄) foi tentativamente identificado como kielcorina B (I₁₉) a partir de *kielmeyra coriaceae* [7, 8]. A estrutura deste composto foi proposta com base em dados de RMN de ¹H [7, 8].

Até ao momento o único xantonolignóide natural sintetizado foi a kielcorina (I₄) tendo sido obtido por três vias diferentes [8, 75, 76]. Um outro xantonolignóide, a desmetoxikielcorina foi sintetizado [76] por um processo semelhante ao da síntese da kielcorina (I₄).

1.2.2 Biossíntese

A hipótese biogenética mais aceite para a formação dos xantonolignóides baseia-se no acoplamento oxidativo de um álcool cinamílico com uma *ortho*-diidroxixantona [18].

De acordo com o referido, considera-se que a biossíntese de kielcorina (**I₄**) e cadensina D (**I₁₀**) (Fig. 6) ocorre a partir da 3,4-diidroxixantona (**I₂₀**) por acoplamento oxidativo com o álcool coniferílico (**I₂₁**) e siringenina (**I₂₂**), respectivamente, da mesma forma que o postulado para a biossíntese de flavonolignanos e de cumarinolignóides [18].

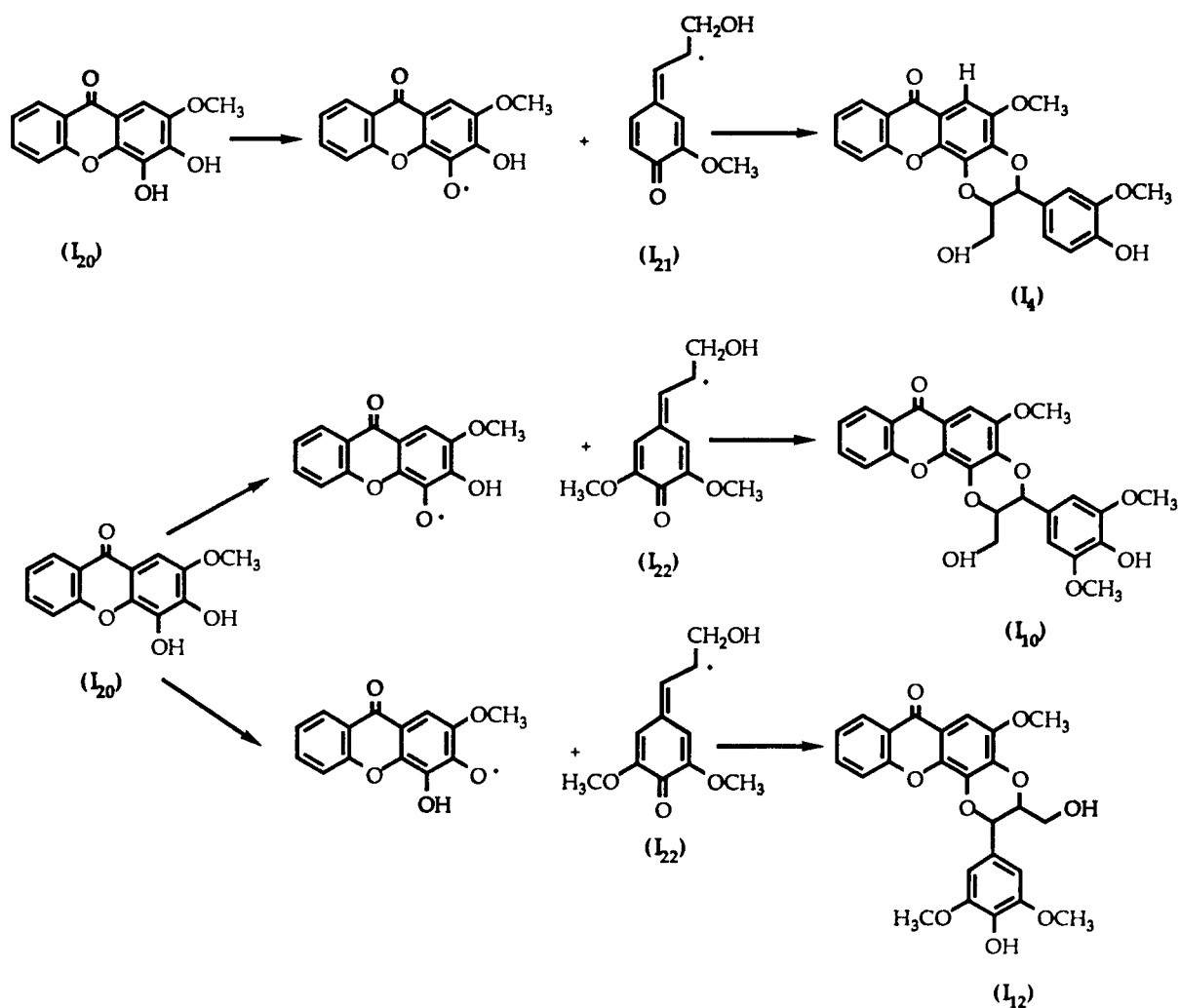


Fig. 6. Biossíntese da kielcorina (**I₄**), cadensina D (**I₁₀**) e isocadensina D (**I₁₂**).

1.2.3. Actividade biológica

Até ao momento o único estudo encontrado sobre actividade biológica de xantonolignóides foi a avaliação da actividade citotóxica [77].

Os resultados do estudo da actividade citotóxica dos compostos kielcorina (I₄), cadensina D (I₁₀), isocadensina D (I₁₂), monoacetato de isocadensina D (I₁₃), cadensina F (I₁₄) e cadensina G (I₁₆) evidenciam que estes compostos exibem um efeito pouco significativo contra células P-388 em cultura [77]. Os resultados de ED₅₀ obtidos na avaliação da actividade destes compostos contra as linhas celulares tumorais humanas A549 (carcinoma pulmonar humano), MCF-7 (carcinoma de mama) e HT-29 (adenocarcinoma do colon humano), indicaram que estes compostos possuem fraca actividade citotóxica [77] (Fig. 7, p. 24).

Uma unidade estrutural importante dos xantonolignóides corresponde ao núcleo 1,4-benzodioxânico. Este núcleo ocorre também em alguns metabolitos vegetais, destacando-se a silibina princípio activo de *silibum marianum* (L.) Gartn (*Compositae*) que apresenta actividade anti-hepatotóxica [83] (Parte B₁), bem como outros flavolignanós os quais apresentam também actividade anti-hepatotóxica [84-86].

Outros compostos obtidos por síntese contendo na sua estrutura o núcleo 1,4-benzodioxânico, têm sido estudados quanto à sua actividade biológica, tendo revelado resultados interessantes nomeadamente, acção bloqueadora α -adrenérgica [87-96], acção β -adrenérgica [97], actividade insecticida [98-101].

Composto	Actividade citotóxica		
	A ₅₄₉	ED ₅₀ (µg/ml)	
		MCF-7	HT-29
Kielcorina (I ₄)	3	>10	3
Cadensina D (I ₁₀)	>10	>10	>10
Isocadensina D (I ₁₂)	>10	>10	>10
Monoacetato de isocadensina D (I ₁₃)	4	>10	4
Cadensina F (I ₁₄)	>10	>10	>10
Cadensina G (I ₁₆)	3	>10	4x10 ⁻¹
A ₅₄₉ = carcinoma pulmonar humano MCF-7=carcinoma de mama HT-29=adenocarcinoma do colon humano			

Fig. 7. Dados de actividade citotóxica (ED₅₀) de alguns xantonolignóides naturais sobre linhas celulares tumorais [77].

Resultados e Discussão

II - Resultados e Discussão

1. Introdução.....	28
2. Síntese de xantonolignóides.....	28
2.1. Obtenção da <i>trans</i> -kielcorina B (16) e <i>trans</i> -isokielcorina B (17).....	28
2.2. Mecanismo proposto para a formação da <i>trans</i> -kielcorina B (16) e <i>trans</i> -isokielcorina B (17).....	39
2.3. Mecanismo proposto para a formação do álcool desidrodiconiferílico (19).....	44
3. Síntese de xantonas mono-substituídas.....	46
3.1. Obtenção da 2-metoxixantona (22) e 2-hidroxixantona (23).....	46
3.2. Obtenção da 3-metoxixantona (26) e 3-hidroxixantona (27).....	46
3.3. Obtenção da 4-metoxixantona (33) e 4-hidroxixantona (34).....	47
4. Elucidação estrutural dos compostos sintetizados.....	50
4.1. 1,2,3-Trimetoxibenzeno (2).....	50
4.2. Cloreto de 2-metoxibenzoílo (4).....	51
4.3. 2-Hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5).....	52
4.4. Elucidação estrutural de xantonas.....	57
4.4.1. 3,4-Dimetoxixantona (6), 4-hidroxi-3-metoxixantona (7) e 3-hidroxi-4-metoxixantona (8).....	60
4.4.2. 2-Carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (10) e 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (11).....	67
4.4.3. 2-Formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9), 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12), 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14).....	75
4.5. <i>trans</i> -Kielcorina B (16) e <i>trans</i> -isokielcorina B (17).....	86

4.6. Fenilcumarano (18) e álcool desidrodiconiferílico (19).....	102
4.7. 2-Hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25).....	102
4.8. Ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32).....	106
4.9. 2-Metoxixantona (22), 2-hidroxixantona (23), 3-metoxixantona (26), 3-hidroxixantona (27), 4-metoxixantona (33), e 4-hidroxixantona (34).....	110
5. Caracterização por RMN da <i>trans</i> -Kielcorina (35).....	118

II - Resultados e Discussão

1. Introdução

A gandosidade *versus* simplicidade das reacções que ocorrem na Natureza, no que se refere à regio e estereosselectividade, as condições reaccionais e rendimentos, foram um grande incentivo para o aparecimento de novas estratégias de síntese. Paralelamente aos trabalhos de síntese clássica apareceram na literatura trabalhos de síntese biomimética [10, 26].

A síntese clássica baseia-se na escolha de sintons e dos respectivos equivalentes sintéticos, podendo apresentar um elevado número de etapas e/ou exigindo muitas vezes condições reaccionais consideradas drásticas e com baixo rendimento [10, 26].

De um modo geral a síntese biomimética utiliza os mesmos precursores ou intermediários do composto a sintetizar, usados *in vivo* como material de partida. Revelam-se interessantes no que se refere à regioespecificidade e estereosselectividade, à redução do número de etapas e à utilização de condições suaves de reacção, nomeadamente de pH e temperatura [10, 26].

2. Síntese de xantonolignóides

2.1. Obtenção da *trans*-kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17)

Observando a molécula do xantonolignóide kielcorina B (16) (Fig. 8, p. 29), podemos considerar esta molécula constituída por dois sintons (1) e (2):

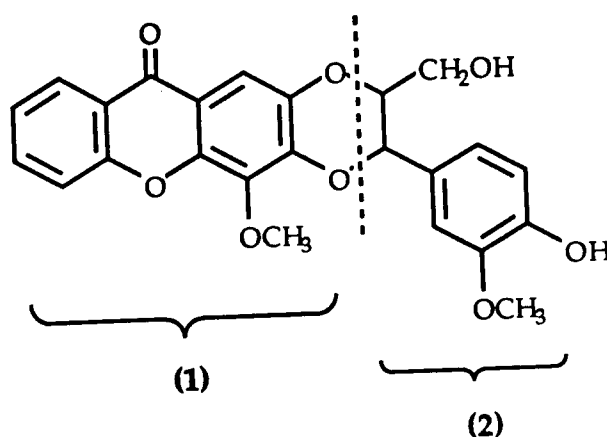


Fig. 8. Estrutura da Kielcorina B (16).

cujos equivalentes sintéticos correspondem à 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) e ao álcool coniferílico (15) (Fig. 9), respectivamente.

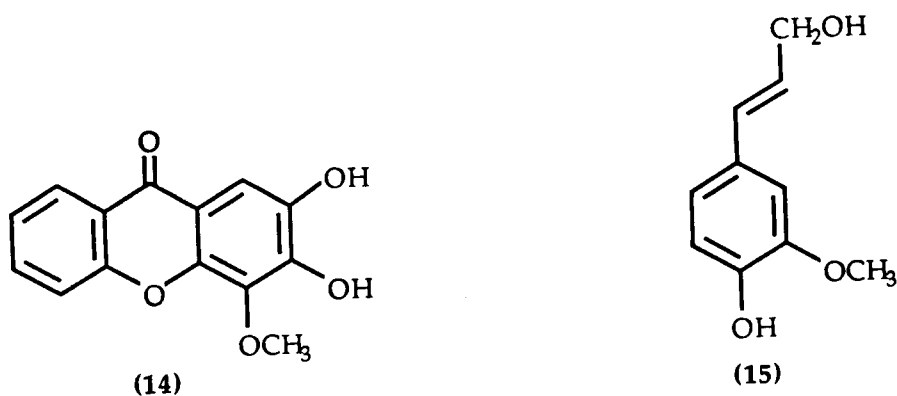


Fig. 9. Estruturas da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) e do álcool coniferílico (15).

Tendo em consideração a biossíntese prevista para a *trans*-kielcorina (35) [12], e a sua síntese biomimética [8], podemos admitir que o acoplamento oxidativo da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) com o álcool coniferílico (15), poderá corresponder a um caminho viável para

obtenção de kielcorina B (16).

Com esse objectivo, realizou-se a síntese total da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14), através de um processo de síntese clássica.

Nas Fig. 10-11, p. 36 e 37, são apresentadas as estratégias gerais para a síntese total da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14).

De acordo com dados descritos para a síntese de xantonas com o referido padrão de substituição [28, 102] usou-se o 1,2,3-trimetoxibenzeno (2) e o cloreto de 2-metoxibenzoílo (4) como blocos de partida.

O composto (2) foi obtido a partir do 1,2,3-triidroxibenzeno (1) por metilação total (Exp., p. 132) [7]. O decurso da reacção foi acompanhado por CCF, dando-se por terminada quando se verificou que já não existia no meio reaccional o composto inicial. Após purificação do produto bruto, identificou-se (p. 50) por IV e RMN de ^1H o 1,2,3-trimetoxibenzeno (2).

O cloreto de 2-metoxibenzoílo (4) foi obtido a partir do ácido 2-metoxibenzóico (3) (Exp., p. 132), usando como reagente halogenante o cloreto de tionilo em benzeno anidro [7]. O composto resultante foi caracterizado (p. 51) por IV, RMN de ^1H e EM, como sendo o cloreto de 2-metoxibenzoílo (4).

Depois de obtidos os dois blocos, (2) e (4), procedeu-se à respectiva condensação através de uma reacção de acilação de Friedel-Crafts (Exp., p. 133) [102] da qual resultou um óleo castanho que, controlado por CCF, mostrou ser constituído por vários produtos, com predomínio de um deles. Após purificação do produto bruto (Exp., p. 133), identificou-se (p. 52) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM a 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5).

A obtenção de benzofenonas como intermediários ciclizáveis para obter xantonas é muito comum. Estes intermediários podem ser

obtidos por acilação de Friedel-Crafts, à temperatura ambiente, de derivados metoxilados do benzeno, por um cloreto de benzóilo apropriado, na presença de cloreto de alumínio e éter anidro como solvente [102].

No caso da acilação ocorrer em posição adjacente a um grupo metoxilo, verifica-se a desmetilação selectiva a nível do grupo adjacente ao carbonilo dependendo o grau de desmetilação do tempo da reacção [7, 102]. No caso presente, ocorreu a desmetilação selectiva referida.

A ciclização da benzofenona (5) realizou-se em meio alcalino (Exp., p. 135) [102], obtendo-se um sólido, que após purificação, foi caracterizado (p. 60) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM como sendo a 3,4-dimetoxixantona (6).

A técnica utilizada corresponde a uma adaptação dos procedimentos experimentais descritos por outros autores [102], tendo sido modificada no que se refere, à quantidade de H_2O , MeOH e NaOH e ao tempo de reacção pois, nas quantidades referidas em [102], a benzofenona (5) não se dissolvia completamente. O tempo de reacção foi alterado de 5 horas e meia para 14 horas, tempo ao fim do qual se verificou que já não existia benzofenona (5) no meio reaccional. Com estas modificações da técnica conseguiu-se alterar o rendimento de 25% para 61%.

Na tentativa de obter a 3-hidroxi-4-metoxixantona (8), a partir da 3,4-dimetoxixantona (6) e procedeu-se a uma desmetilação com cloreto de alumínio (Exp., p. 136) [103, 104].

O composto resultante da reacção de desmetilação após purificação foi caracterizado (p. 60) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM. Através da análise dos dados espectroscópicos, verificou-se que este não correspondia à xantona pretendida, mas sim ao isómero 4-hidroxi-3-

metoxixantona (7).

Prosseguindo com o objectivo de obter a 3-hidroxi-4-metoxixantona (8), partiu-se da 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5) e procedeu-se ao fecho desta benzofenona na presença de piperidina (Exp., p. 137) [102, 105].

Desta reacção resultou uma mistura de compostos, como estava previsto com base em resultados descritos na literatura [105]. Após purificação, os compostos foram caracterizados (p. 60) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM como sendo a 3-hidroxi-4-metoxixantona (8), 4-hidroxi-3-metoxixantona (7) e a 3,4-dimetoxixantona (6), com rendimentos respectivamente 48%, 38% e 8% [104-106].

Uma vez obtida a 3-hidroxi-4-metoxixantona (8), esta foi submetida a uma formilação usando como agente formilante a hexametenotetramina (Exp., p. 138) [103].

A técnica usada corresponde a uma adaptação de procedimentos experimentais anteriormente descritos [103]. No presente trabalho a técnica foi modificada no que se refere ao tempo de reacção e à quantidade de hexametenotetramina adicionada. O tempo da reacção foi alterado de 8 horas para 33 horas, e adicionou-se mais 100% de hexametenotetramina ao longo do tempo de reacção. Com estas alterações conseguiu-se alterar o rendimento de 4% para 28%.

Após purificação do produto bruto, identificou-se (p. 75) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM a 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9).

Com o objectivo de obter a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14), realizou-se oxidação de Dakin [103, 107] da 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9). A reacção foi realizada na presença de hidróxido de tetrametilamónio a 10% (Exp., p. 139) [103] e o decurso da reacção foi controlado por CCF, dando-se por terminada quando se verificou que

já não existia no meio reaccional mais xantona inicial. O produto resultante da reacção foi purificado e caracterizado (p. 67) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM.

Após a análise dos espectros de IV, RMN de ^1H e ^{13}C (Exp., p. 139) verificamos que o composto obtido não correspondia ao composto pretendido, porque apresentava um grupo COOH em vez de um grupo OH no carbono C(2).

Para comprovar que o composto resultante da oxidação de Dakin não tinha dois grupos OH, realizou-se uma acetilação (Exp., p. 140) [7]. O produto resultante da reacção foi purificado e caracterizado (p. 67) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM, como sendo a 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (11).

Como não foi possível obter, através da oxidação de Dakin, a 2,3-diidroxí-4-metoxixantona (14), realizou-se a reacção de Baeyer-Villiger, [75, 108, 109] após protecção do grupo fenólico da 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9) por benzilação (Exp., p. 142) [75], obtendo-se a 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12).

O composto obtido após purificação, foi caracterizado (p. 75) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , e EM como sendo o composto pretendido.

A 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12) foi tratada com ácido *meta*-cloroperbenzóico em diclorometano, seguida de hidrólise com KOH do éster formado, dando origem à 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13) (Exp., p. 143) [75]. Este composto foi caracterizado (p. 75) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , e EM, como sendo o composto pretendido.

Seguidamente procedeu-se à desprotecção do grupo OH através de uma hidrogenação catalítica (Exp., p. 144) [75]. O produto resultante da hidrogenação foi purificado e caracterizado (p. 75) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , e EM, como sendo a 2,3-diidroxí-4-metoxixantona (14).

Após a síntese do derivado xantónico necessário para a obtenção,

da kielcorina B (16) e de acordo com a técnica descrita na literatura [110], procedeu-se ao acoplamento oxidativo da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) e álcool coniferílico (15) usando como agente oxidante o carbonato de prata (Exp., p. 145) (Fig. 12, p. 38).

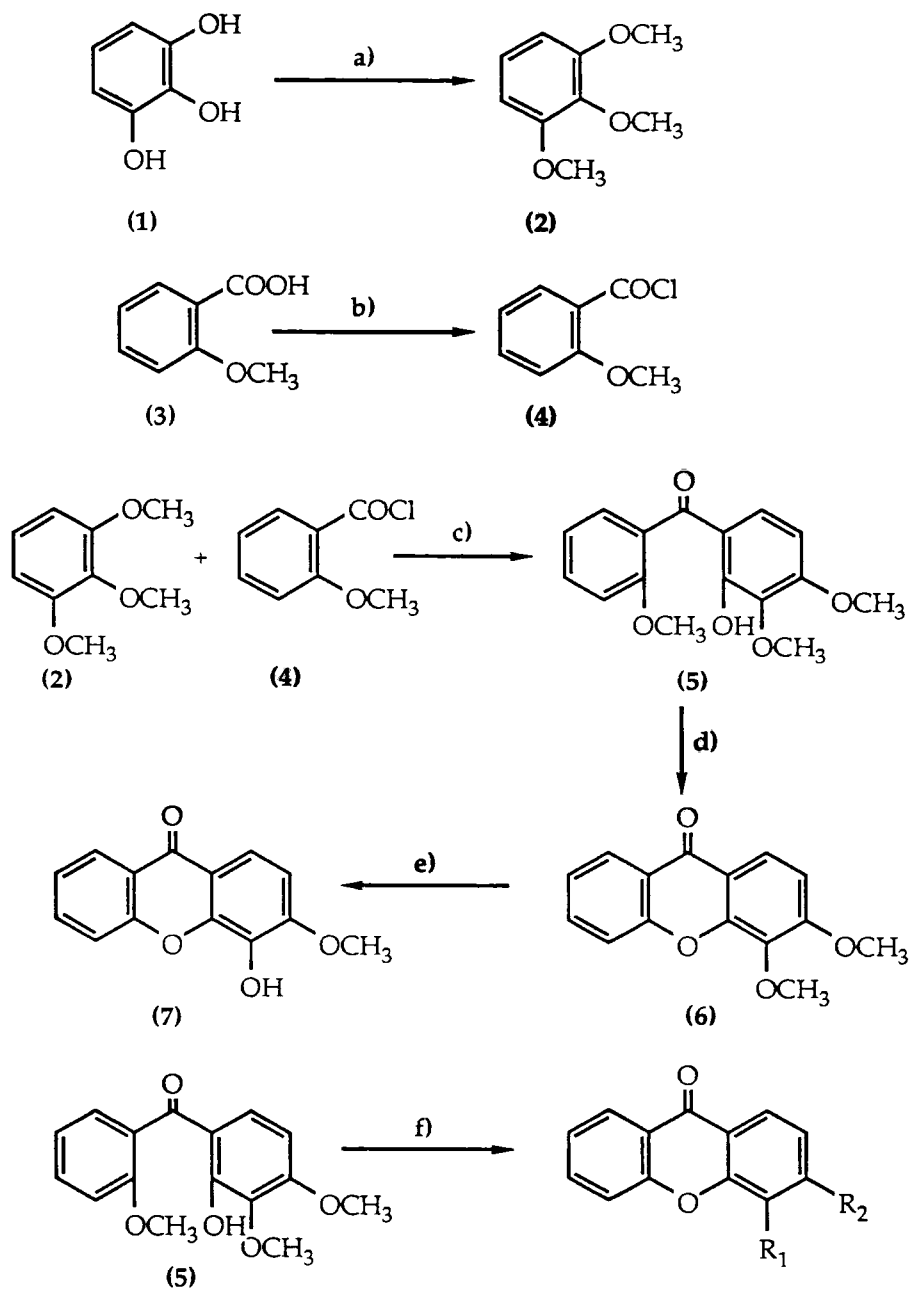
O produto bruto resultante do acoplamento oxidativo foi purificado por CC. Algumas das fracções obtidas foram seguidamente purificadas por TLC (Exp., p. 145), nas quais se identificou (p. 86) por IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e EM a *trans*-kielcorina B (16) (10 mg) e o regioisómero *trans*-isokielcorina B (17) (20 mg), bem como dois compostos resultantes do acoplamento oxidativo entre duas moléculas de álcool coniferílico (15): o fenilcumarano (18) e o álcool desidrodiconiferílico (19).

A escolha do agente oxidante para o acoplamento oxidativo recaiu sobre o carbonato de prata devido aos resultados obtidos por Antus *et al.* [110]. Nos casos estudados por estes autores, quando utilizavam como agente oxidante o carbonato de prata ou o óxido de prata, na presença de catecois e de álcool coniferílico, obtinham derivados 2-aril-1,4-benzodioxânicos e 3-aril-1,4-benzodioxânicos, sendo a proporção dos derivados 3-aril-1,4-benzodioxânicos maior que a dos 2-aril-1,4-benzodioxânicos. A proporção dos derivados 3-aril-1,4-benzodioxânico/2-aril-1,4-benzodioxânico é ligeiramente maior quando se utilizava como agente oxidante o carbonato de prata em vez do óxido de prata.

Também a percentagem de obtenção de isómeros *trans* e *cis* depende do agente oxidante escolhido, assim usando como agente oxidante o carbonato de prata ou o óxido de prata, o isómero que se obtem em maior quantidade é o isómero *trans*, aparecendo em menor quantidade o isómero *cis* [110, 111]. Utilizando como agente oxidante o hexacianoferrato de potássio (III) o isómero que se obtém em maior quantidade corresponde ao isómero *cis*, aparecendo em menor quantidade o isómero *trans* [110].

Outros autores [8] verificaram que do acoplamento oxidativo da 3,4-diidroxí-2-metoxixantona com a álcool coniferílico, na presença de óxido de prata como agente oxidante, resultou a *trans*-kielcorina e a *cis*-kielcorina, obtendo-se em maior quantidade o isómero *trans* [8].

Como o objectivo era obter a kielcorina B (16), e como este composto corresponde a um derivado 3-aril-1,4-benzodioxânico e ainda como todos os xantonolignóides naturais isolados até ao momento estão todos na configuração *trans* [12, 15-17, 78, 82], utilizou-se como agente oxidante o carbonato de prata.



a) Me₂CO anidra, K₂CO₃ anidro, Me₂SO₄, refluxo/24h.

b) SOCl₂, C₆H₆ anidro, refluxo.

c) Éter anidro, AlCl₃ anidro, temperatura ambiente/22h.

d) MeOH, H₂O, NaOH, refluxo, 14h.

e) C₆H₆, AlCl₃ anidro, 70°C/40 min.

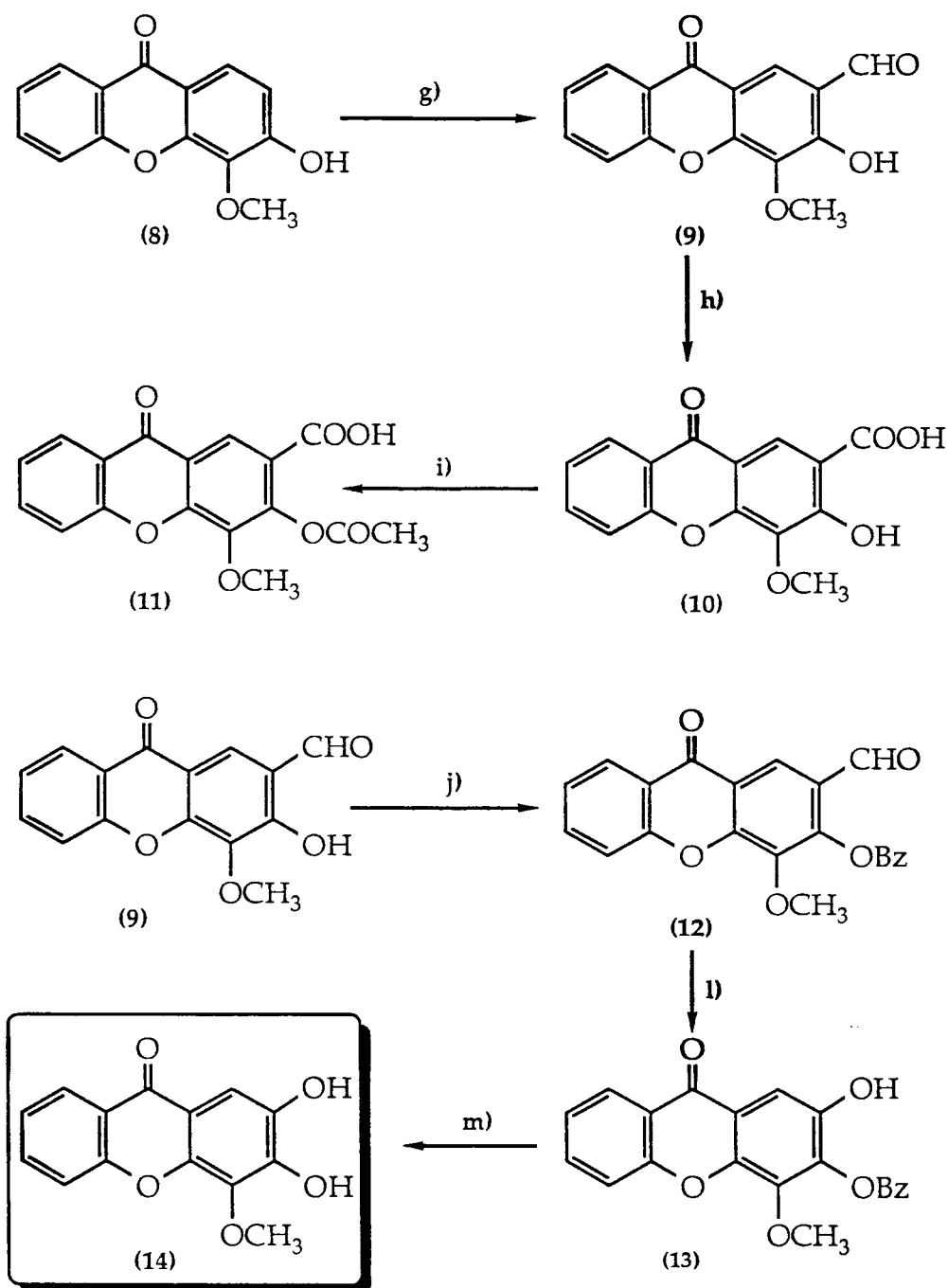
f) Piperidina, H₂O, refluxo/47h.

(6) R₁=OCH₃; R₂=OCH₃

(7) R₁=OH; R₂=OCH₃

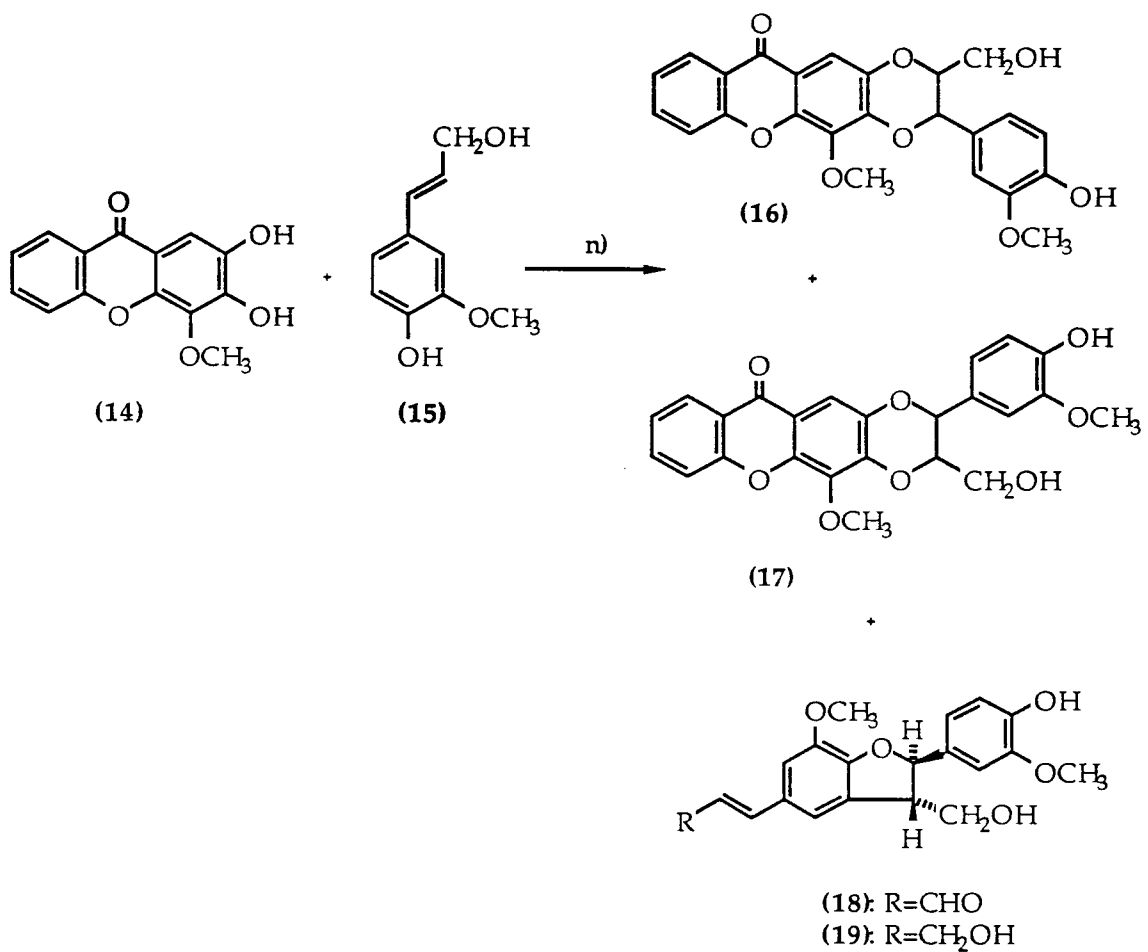
(8) R₁=OCH₃; R₂=OH

Fig. 10. Via reaccional para a obtenção dos intermediários (2, 4, 5, 6, 7 e 8).



g) 1º AcOH 96%, HMTA, 100°C/33h, 2º HCl 15%, refluxo/15min.
 h) Me₄NOH 10%, H₂O₂ 6%, 50°C/2h.
 i) (CH₃CO)₂O, C₅H₅N, temperatura ambiente/4 dias.
 j) DMF anidra, K₂CO₃ anidro, BzCl, 140°C/5h.
 l) 1º AMCPB, CH₂Cl₂, N₂, refluxo/6h, 2º KOH 10%, MeOH, CHCl₃, 90°C/20 min.
 m) Pd/C 10%, MeOH, H₂.

Fig. 11. Via reaccional para a obtenção dos intermediários (9, 10, 11, 12, 13 e 14).



n) C₆H₆, Me₂CO, AgCO₃, temperatura ambiente/3 dias.

Fig. 12. Via reaccional para a obtenção dos compostos (16 e 17).

2.2. Mecanismo proposto para a formação da *trans*-kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17)

Perante a análise dos resultados práticos obtidos, a hipótese mecanística proposta para a formação dos dois regioisómeros, *trans*-kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17) está indicada nas Fig. 13-14, p. 40 e 41.

Os resultados práticos sugerem que nas condições reacionais usadas, os dois radicais fenóxido possíveis para a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) têm diferente estabilidade. Sendo o mais estável nestas condições reacionais, o radical fenóxido que deu origem a *trans*-isokielcorina B (17), formando-se assim este regioisómero em maior quantidade (20 mg).

O radical fenóxido da xantona que originou a *trans*-kielcorina B (16), nas condições reacionais usadas, é o radical menos estável, formando-se assim menor quantidade deste regioisómero (10 mg).

O mecanismo proposto para a formação dos dois regioisómeros *trans*-kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17), (Fig. 13 e Fig. 14, p. 40 e 41), ocorre através de um acoplamento do tipo O- β dos radicais resultantes da oxidação, tanto da xantona como do álcool coniferílico, através da formação de uma unidade semiquinónica. Seguidamente a unidade semiquinónica sofre um ataque nucleofílico intramolecular do hidroxilo fenólico, formando-se assim o anel dioxano [112].

Após obtenção da *trans*-kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17) foi realizado um estudo computacional sobre a estabilidade dos dois radicais fenóxido possíveis para a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) (derivado xantónico utilizado na síntese da *trans*-kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17)) e para a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (derivado xantónico utilizado na síntese da *trans*-kielcorina e *cis*-kielcorina [8]) em determinada conformação (Fig. 15, p. 42), comparativamente com o radical do α -tocoferol.

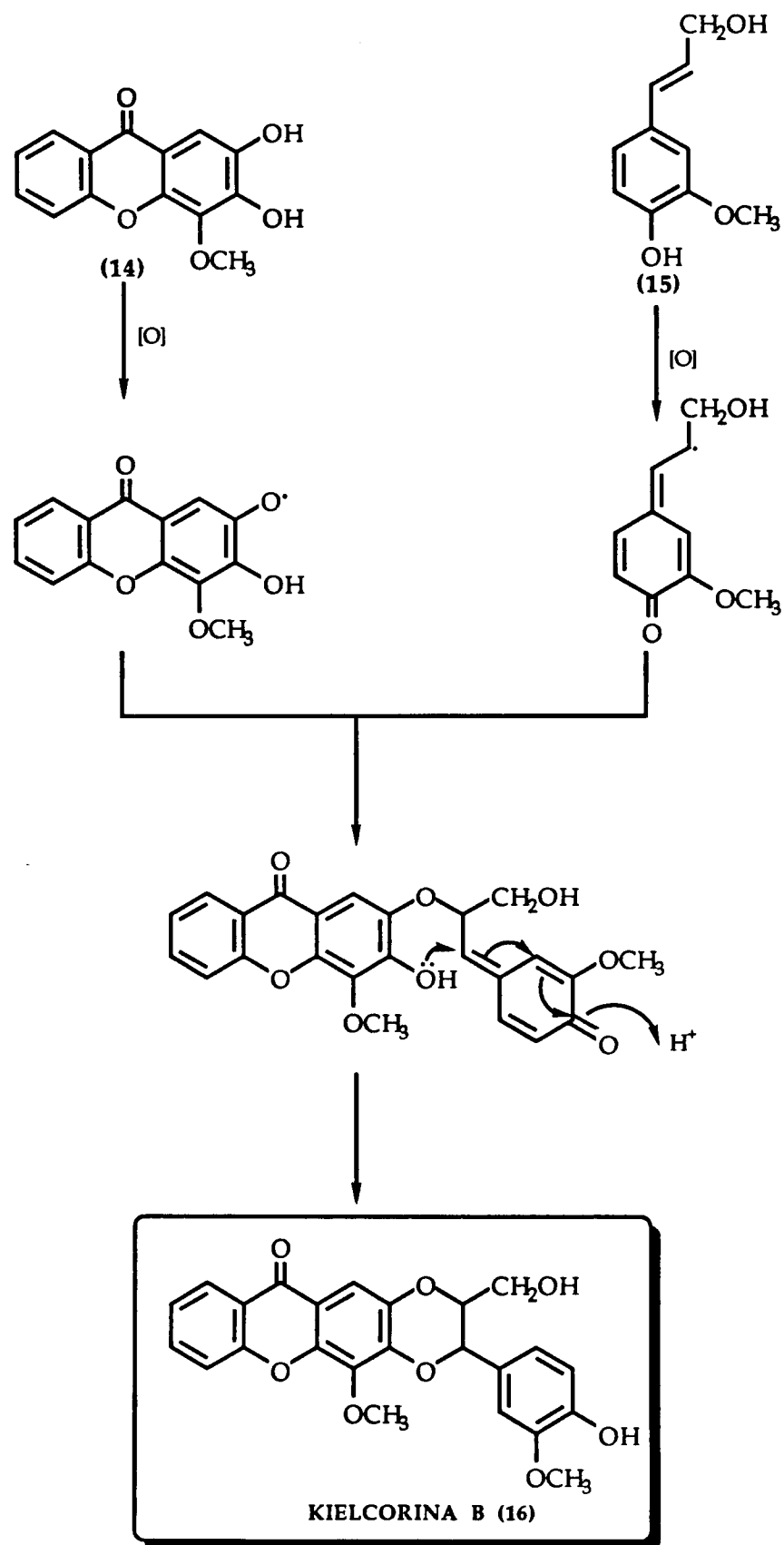


Fig. 13. Mecanismo proposto para a obtenção da kielcorina B (16).

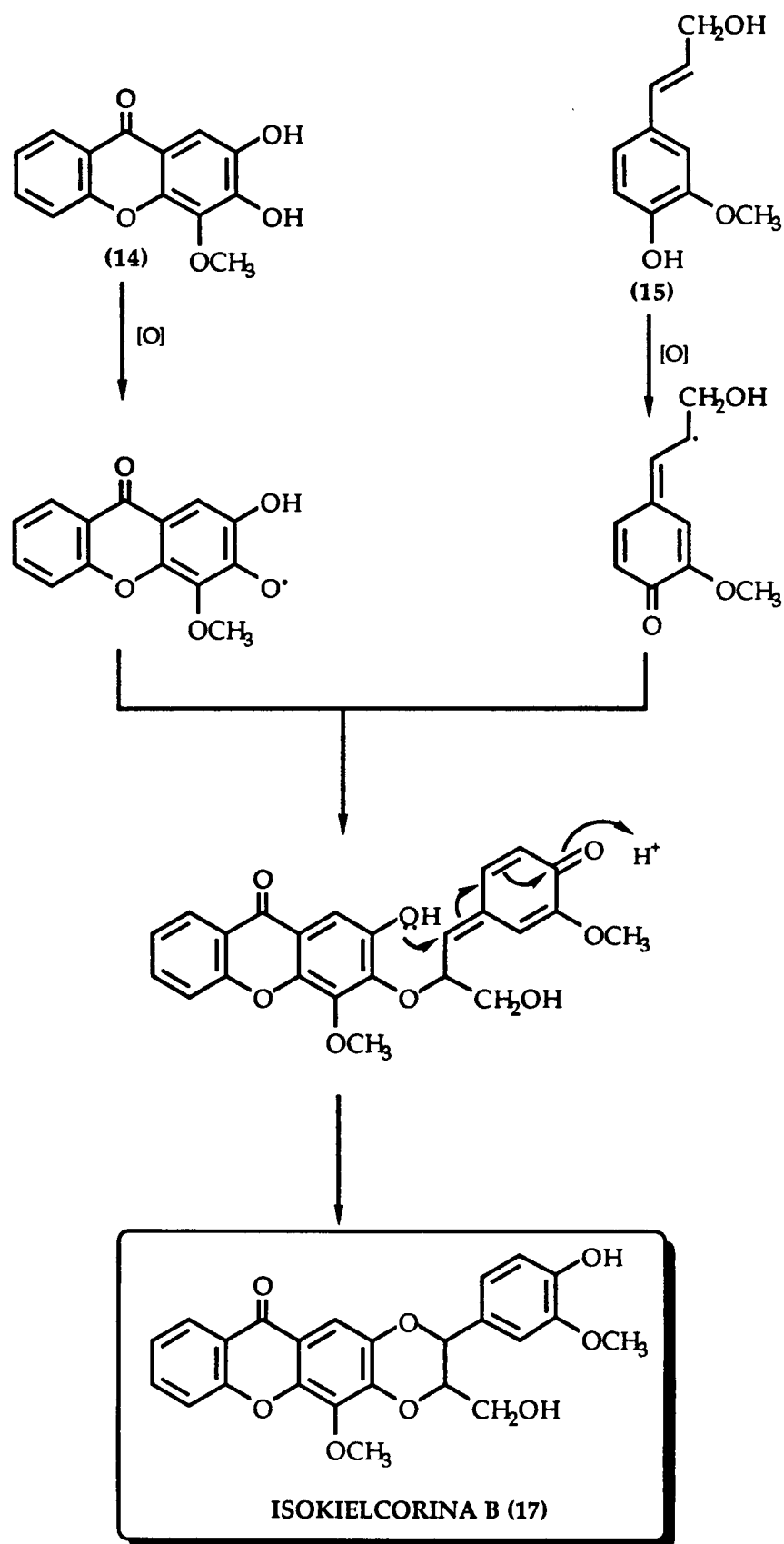
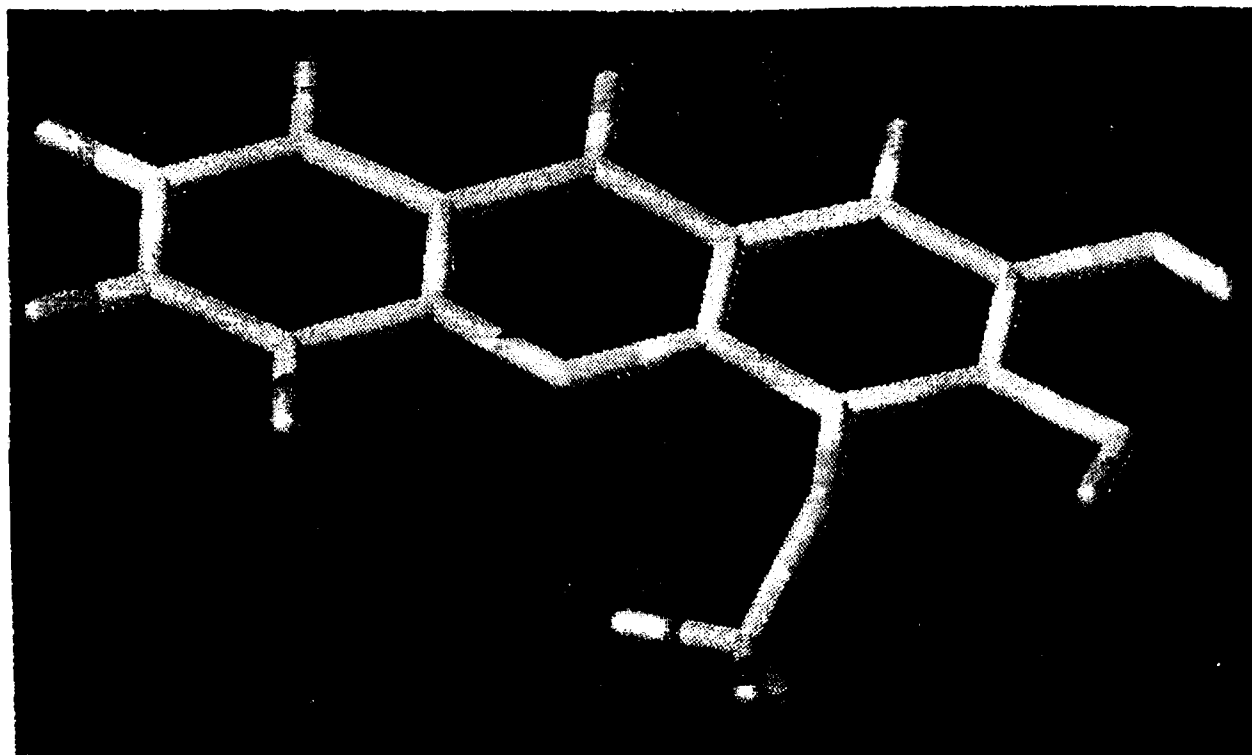
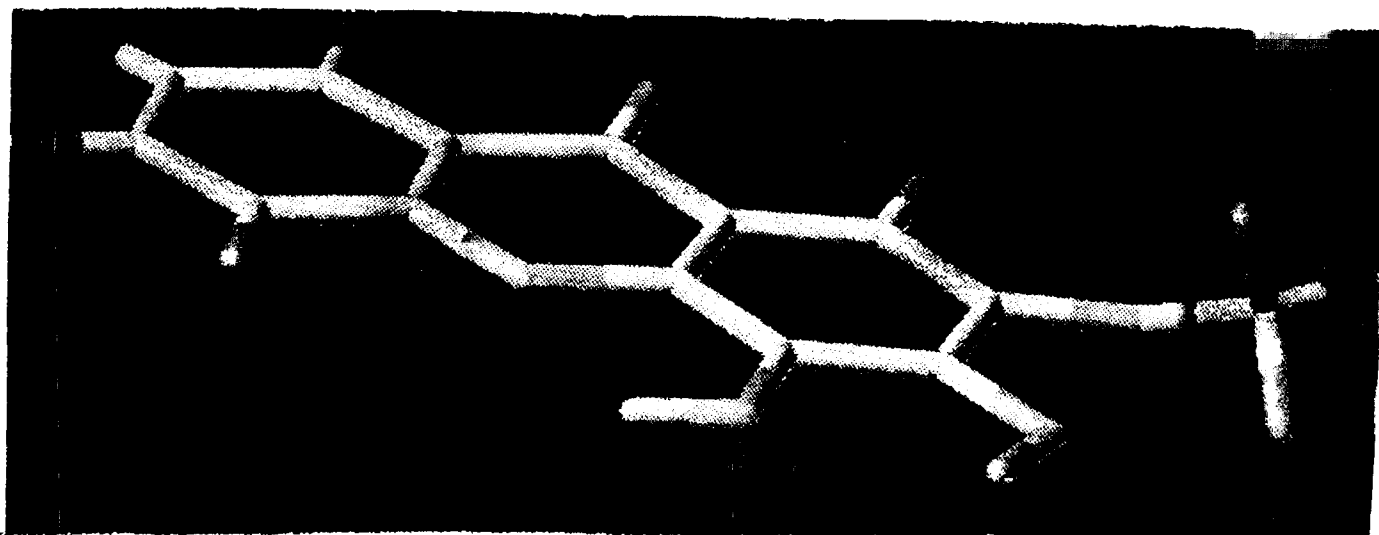


Fig. 14. Mecanismo proposto para a obtenção da isokielcorina B (17).



(*)



(**)

Fig. 15. Representação das estruturas conformacionais das xantonas 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (*) e 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (**).

Este estudo foi realizado pelo grupo do Prof. Bernard Testa, Universidade de Lausanne, Suíça e o programa utilizado foi o "AM1 Calculations Performed Work MOPHC Program".

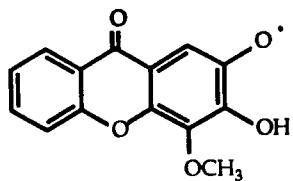
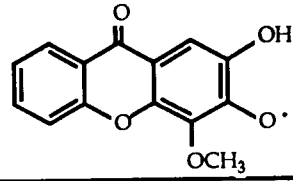
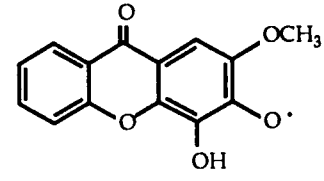
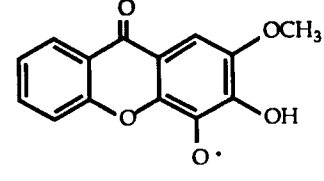
Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 1, p. 44). No caso da 2,3-diidroxí-4-metoxixantona (14) estão de acordo com os resultados práticos obtidos, ou seja, o radical fenóxido mais estável desta xantona é o radical que deu origem à *trans*-isokielcorina B (17), este apresenta uma energia de 5,4 Kcal/mol, correspondendo o menos estável ao radical que deu origem à *trans*-kielcorina B (16), o qual apresenta uma energia de 6,4 Kcal/mol.

Como a diferença de energia entre os dois radicais não é muito significativa (6,4-5,4=1,0 Kcal/mol), isto pode ajudar a compreender o facto de na prática se terem formado os dois regioisómeros.

No caso da 3,4-diidroxí-2-metoxixantona os resultados deste estudo também estão de acordo com os resultados práticos descritos na literatura [8] ou seja, o radical fenóxido mais estável desta xantona é o radical que deu origem à *trans*-kielcorina pois apresenta uma energia de 2,8 Kcal/mol enquanto que o radical fenóxido a partir do qual se formaria a *trans*-isokielcorina apresenta uma energia de 5,1 Kcal/mol.

Como a diferença de energias dos dois radicais fenóxido é significativa (5,1-2,8=2,3 Kcal/mol), isto pode ajudar a compreender o facto de na prática não se ter formado a *trans*-isokielcorina, pois um dos radicais fenóxido é muito mais estável que o outro.

Tabela 1. Dados teóricos de energia dos radicais fenóxido da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona e 3,4-diidroxi-2-metoxixantona obtidos por estudo computacional (relativamente ao radical α -tocoferilo).

Radical fenóxido	Energia
	E=6,4 kcal/mol
	E=5,4 kcal/mol
	E=5,1 kcal/mol
	E=2,8 kcal/mol

2.3. Mecanismo proposto para a formação do álcool desidrodiconiferílico (19)

O mecanismo proposto para a formação do álcool desidrodiconiferílico (19), Fig. 16, p. 45, ocorre através do acoplamento de dois radicais resultantes da oxidação do álcool coniferílico (15), através da formação de um intermediário quinonóide que, seguidamente, sofre um ataque nucleofílico intramolecular do hidroxilo fenólico, formando-se assim o anel benzofurano [113].

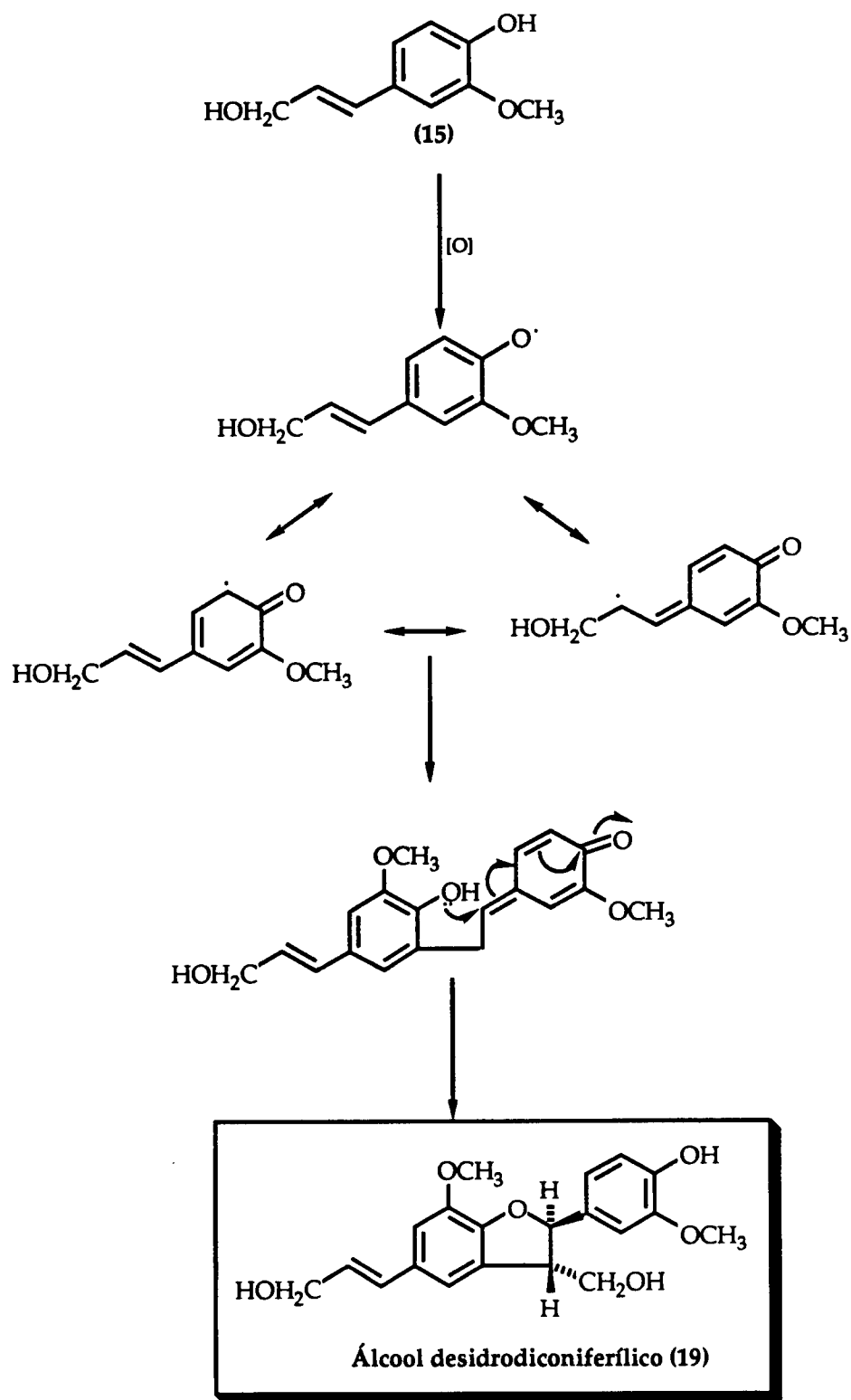


Fig. 16. Mecanismo proposto para a formação do álcool desidrodiconiferílico (19).

3. Síntese de xantonas mono-substituídas

Nas Fig. 17-18, p. 48 e 49, são apresentadas as estratégias gerais para a síntese das xantonas mono-substituídas apresentadas neste trabalho.

3.1. Obtenção da 2-metoxixantona (22) e 2-hidroxixantona (23)

A condensação do cloreto de 2-metoxibenzoílo (4) (Exp., p. 132) com o 1,4-dimetoxibenzeno (20) (Exp., p. 150) [102], através da reacção de Friedel-Crafts, deu origem a um produto o qual foi usado sem purificação posterior na reacção seguinte pois, verificou-se por CCF que a 2-hidroxi-2',5-dimetoxibenzofenona (21) pretendida era o produto mais representado.

A ciclização do produto bruto da reacção anterior, em meio alcalino (Exp., p. 151) [102] deu origem a um sólido que após purificação foi caracterizado (p. 110) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , e EM, como sendo a 2-metoxixantona (22).

A reacção de desmetilação da 2-metoxixantona (22) foi realizada na presença de cloreto de alumínio (Exp., p. 152) [114]. O produto resultante foi purificado e caracterizado (p. 110) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , e EM, como sendo a 2-hidroxixantona (23).

3.2. Obtenção da 3-metoxixantona (26) e 3-hidroxixantona (27)

A condensação do cloreto de 2-metoxibenzoílo (4) (Exp., p. 132) com o 1,3-dimetoxibenzeno (24), através da reacção de Friedel-Crafts [60] (Exp., p. 153), deu origem a um produto que após purificação foi

caracterizado por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , e EM como sendo a 2-hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25) pretendida.

A ciclização da 2-hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25) em meio alcalino (Exp., p. 155) [102], deu origem à 3-metoxixantona (26).

A reacção de desmetilação da 3-metoxixantona (26) foi realizada na presença de piperidina (Exp., p. 156) [102]. O produto resultante foi purificado e caracterizado (p. 110) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , e EM, como sendo a 3-hidroxixantona (27).

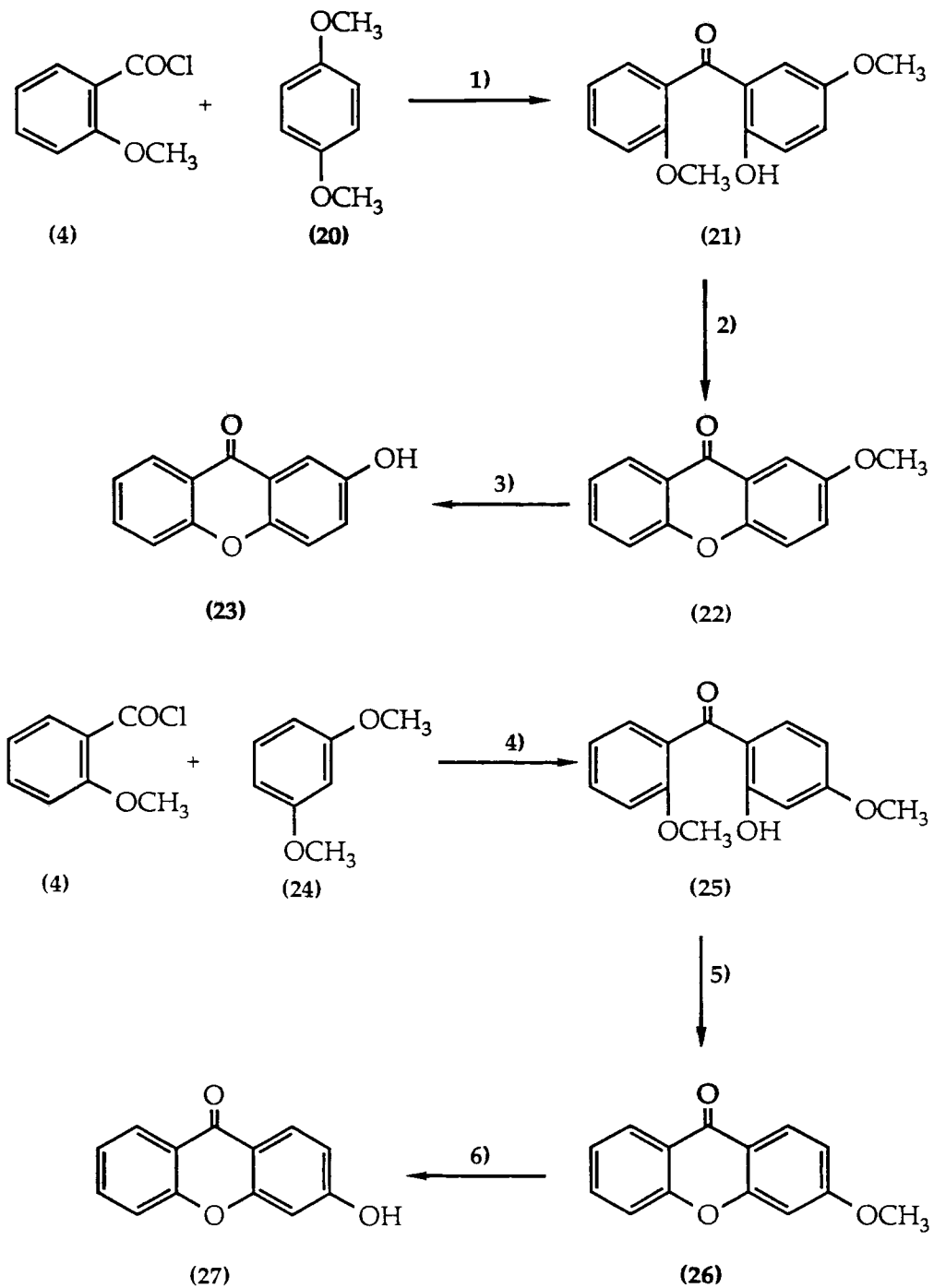
3.3. Obtenção da 4-metoxixantona (33) e 4-hidroxixantona (34)

Para obter a 4-metoxixantona (33) prepararam-se os sais sódicos (Exp., p. 157) do ácido 2-clorobenzóico (28) e do 2-metoxifenol (30).

A condensação do sal sódico do ácido 2-clorobenzóico (29) e do sal sódico do 2-metoxifenol (31) ocorreu em dioxano anidro, através da reacção de Ullmann [70, 114] (Exp., p. 158). O produto resultante desta síntese foi purificado e caracterizado (p. 106) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , e EM, como sendo o ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32).

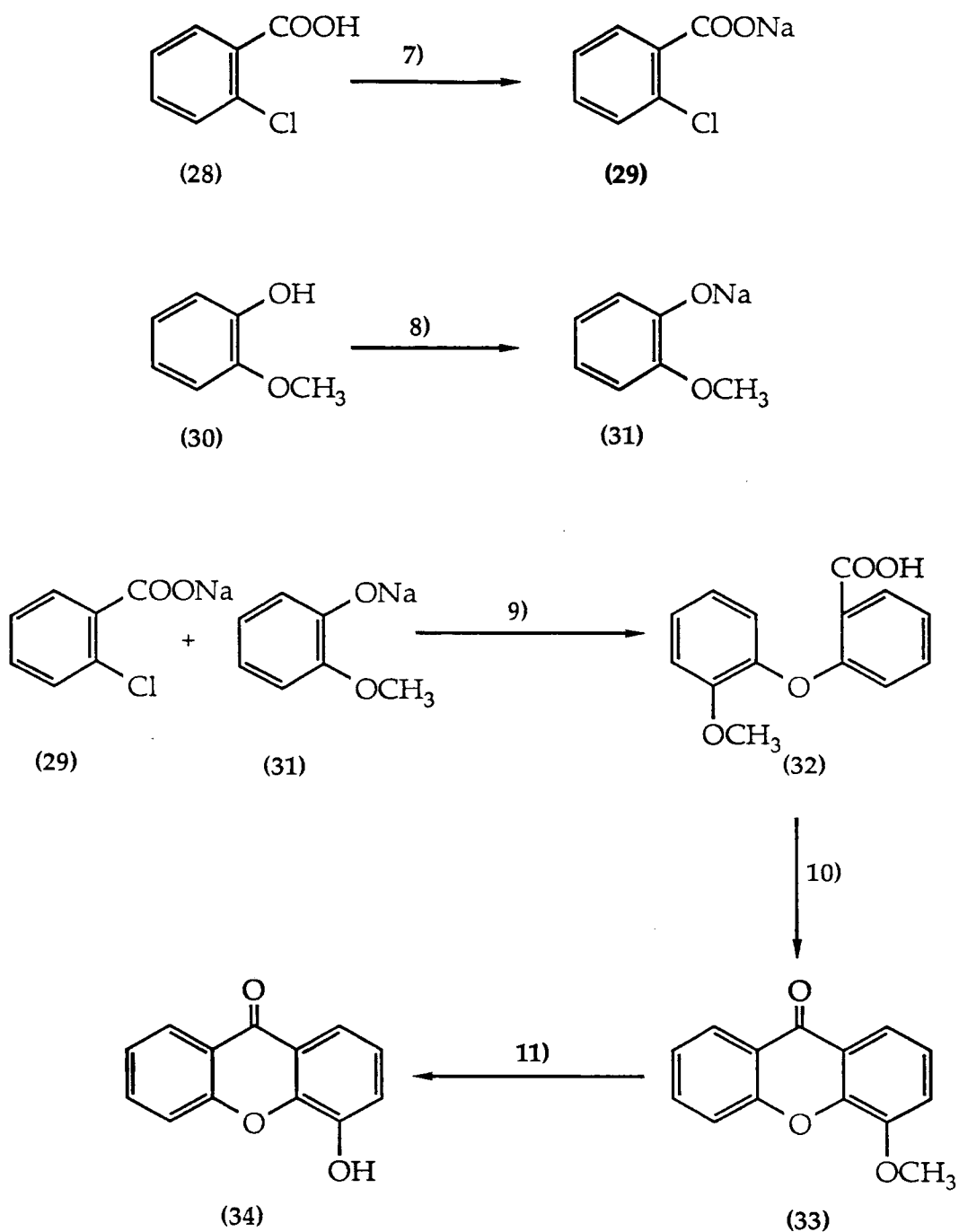
Da reacção do ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32) com o cloreto de acetilo e ácido sulfúrico conc. (Exp., p. 159) [115] resultou um produto que após purificação foi caracterizado (p. 110) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , e EM, como sendo a 4-metoxixantona (33).

A reacção de desmetilação da 4-metoxixantona (33) foi realizada na presença de cloreto de alumínio (Exp., p. 160) [114]. O produto resultante foi purificado e caracterizado (p. 110) por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , e EM, como sendo a 4-hidroxixantona (34).



- 1) Éter anidro, AlCl_3 anidro, temperatura ambiente/44h.
 2) MeOH , H_2O , NaOH , refluxo/22h.
 3) C_6H_6 anidro, AlCl_3 anidro, refluxo/3h.
 4) Éter anidro, AlCl_3 anidro, temperatura ambiente/16h.
 5) MeOH , H_2O , NaOH , refluxo/25h.
 6) Piperidina, H_2O , refluxo/60h.

Fig. 17. Via reaccional para a obtenção dos compostos (21, 22, 23, 25, 26 e 27).



7) NaOH 1N, MeOH, éter.
 8) NaOH 1N, MeOH, éter.
 9) Dioxano anidro, CuCl, TDA-1, N₂, refluxo/48h.
 10) MeCOCl, H₂SO₄ conc., temperatura ambiente/10 min.
 11) C₆H₆ anidro, AlCl₃ anidro, refluxo/7h.

Fig. 18. Via reaccional para a obtenção dos compostos (29, 31, 32, 33 e 34).

4. Elucidação estrutural dos compostos sintetizados

4.1. 1,2,3-Trimetoxibenzeno (2)

A estrutura do composto (2) foi estabelecida por IV e RMN de ^1H (Exp., p. 132).

Os dados de IV do 1,2,3-trimetoxibenzeno (2) evidenciam a transformação pretendida (OH para OCH_3), devido à ausência da banda ($3360\text{-}3230\text{ cm}^{-1}$), característica de vibrações de estiramento da ligação OH, presente no espectro do 1,2,3-triidroxibenzeno (1), e ao aparecimento da banda de absorção (1255 cm^{-1}) característica de vibrações de estiramento da ligação O-CH_3 , [116].

As diferenças mais significativas dos espectros de RMN de ^1H do 1,2,3-triidroxibenzeno (1) e 1,2,3-trimetoxibenzeno (2) (Tabela 2), correspondem aos desvios químicos dos prótons dos grupos OH e OCH_3 . A ausência no espectro do composto (2) dos dois singletos a δ 8,75 (2H) e δ 8,04 (1H), e o aparecimento de dois singletos a δ 3,76 (6H) e 3,66 (3H) confirmam a transformação pretendida.

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H do 1,2,3-triidroxibenzeno (1) (DMSO-d_6 , 300 MHz) e do 1,2,3-trimetoxibenzeno (2).

H	δ	
	(1)	(2)
H-C(4) e (6)	6,24 (2H, <i>dd</i> , $J=8,3; 0,6$)	6,64 (2H, <i>d</i> , $J=8,5$)
H-C(5)	6,42 (1H, <i>dd</i> , $J=8,3; 7,3$)	6,98 (1H, <i>dd</i> , $J=8,5; 8,1$)
1-, 3-OH	8,75 (2H, <i>s</i>)	
2-OH	8,04 (1H, <i>s</i>)	
1-, 3-OCH ₃		3,76 (6H, <i>s</i>)
2-OCH ₃		3,66 (3H, <i>s</i>)

4.2. Cloreto de 2-metoxibenzoílo (4)

A estrutura do composto (4) foi estabelecida por IV, RMN de ^1H e EM (Exp., p. 132).

Os dados de IV do cloreto de 2-metoxibenzoílo (4) evidenciam a transformação pretendida (COOH para COCl), devido à ausência da banda de absorção característica das vibrações de estiramento da ligação OH do ácido carboxílico ($3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$), presente no espectro do ácido 2-metoxibenzóico (3), e pelo deslocamento da banda de absorção característica de vibrações de estiramento da ligação CO de 1669 cm^{-1} para 1780 cm^{-1} [117].

As diferenças mais significativas dos espectros de RMN de ^1H do ácido 2-metoxibenzóico (3) e cloreto de 2-metoxibenzoílo (4) estão representadas na Tabela 3, nomeadamente a ausência do sinal do próton do grupo COOH , a δ 10,00 no espectro do cloreto de 2-metoxibenzoílo (4) que também confirma a transformação pretendida.

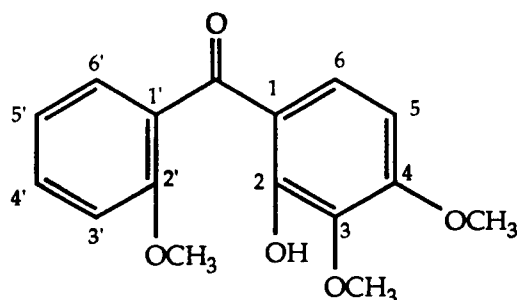
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H do ácido 2-metoxibenzóico (3) (CDCl_3 , 300 MHz) e do cloreto de 2-metoxibenzoílo (4).

H	(3)	δ	(4)
H-C(3)	7,05 (1H, <i>d</i> , J=8,6)		6,96-6,88 (2H, <i>m</i>)
H-C(4)	7,55 (1H, <i>ddd</i> , J=8,6; 7,1; 1,9)		7,47 (1H, <i>ddd</i> , J=7,9; 7,3; 1,7)
H-C(5)	7,09 (1H, <i>ddd</i> , J=7,6; 7,1; 1,6)		6,96-6,88 (2H, <i>m</i>)
H-C(6)	8,12 (1H, <i>dd</i> , J=7,6; 1,0)		7,95 (1H, <i>dd</i> , J=7,9; 1,7)
COOH	10,00 (1H, <i>s</i>)		
2- OCH_3	4,05 (3H, <i>s</i>)		3,78 (3H, <i>s</i>)

O espectro de massa do composto (4) apresenta o pico molecular a m/e 170 u.m.a.. A relação de intensidades dos picos $[M]^+$ e $[M+2]^+$ de aproximadamente 3:1 confirma a existência de um átomo de cloro neste composto [118-120].

4.3. 2-Hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5)

A estrutura do composto (5) foi estabelecida por IV, RMN de ^1H e EM (Exp., p. 133).



(5)

Os dados obtidos por espectrofotometria no IV para a 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5) estão indicados na Tabela 4, p. 53. O espectro deste composto apresenta bandas de absorção características de vibrações de estiramento das ligações, OH, CO e C=C de anel aromático para compostos desta natureza [25, 61, 121].

Tabela 4. Dados de IV da 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5).

Grupos	ν	(5)
OH		3450
C=O		1625
C=C(Ar)		1600
C=C(Ar)		1500
C=C(Ar)		1465

Os dados de RMN de ^1H da 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5) estão evidenciados na Tabela 5, p. 54. No espectro de RMN de ^1H identificam-se dois singletos a δ 3,86 (3H) e δ 3,74 (6H), correspondentes aos prótons de três grupos OCH_3 , e um singlete a δ 12,18 que corresponde ao próton do grupo OH .

Os desvios químicos correspondentes aos prótons dos anéis aromáticos foram assinalados com base na multiplicidade dos sinais, constantes de acoplamento e em experiências de RMN bidimensional, COSY homonuclear.

No entanto, estas técnicas de RMN não permitiram determinar de uma forma inequívoca qual é o desvio químico do próton H-C(3') e H-C(6'). A atribuição dos valores de δ foi efectuada tendo em conta que o próton H-C(6') está mais desprotegido que o próton H-C(3'), devido ao efeito de ressonância e anisotrópico do grupo carbonilo que se fazem sentir no H-C(6'). Desta forma, o sinal a maior δ foi atribuído ao próton H-C(6') [25, 122].

A mesma situação surge no caso dos prótons H-C(4') e H-C(5'), o sinal a maior δ foi atribuído ao próton H-C(4'), devido ao facto de este próton estar mais desprotegido pelo efeito de ressonância do grupo carbonilo localizado em *para* [25, 122].

Em relação aos prótons H-C(5) e H-C(6) o sinal a maior δ foi atribuído ao próton H-C(6), devido ao facto de este próton estar mais desprotegido pelo efeito de ressonância e anisotrópico do grupo carbonilo.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H da 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5).

H	δ (5)
H-C(5)	6,65 (1H, <i>d</i> , J=9,1)
H-C(6)	7,01 (1H, <i>d</i> , J=9,1)
H-C(3')	7,19 (1H, <i>d</i> , J=8,5)
H-C(4')	7,53 (1H, <i>ddd</i> , J=8,5; 7,0; 1,7)
H-C(5')	7,08 (1H, <i>ddd</i> , J=7,6; 7,0; 0,8)
H-C(6')	7,30 (1H, <i>dd</i> , J=7,6; 1,7)
<u>OH</u>	12,18 (1H, <i>s</i>)
3- e 2'-OCH ₃	3,74 (6H, <i>s</i>)
4-OCH ₃	3,86 (3H, <i>s</i>)

Os dados de RMN de ^{13}C evidenciados na Tabela 6, p. 56 apresentam valores de desvio químico que estão de acordo com estrutura proposta para este composto.

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(5), C(6), C(3'), C(4'), C(5') e C(6') foram efectuados através de um estudo bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear (HETCOR; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$).

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos, C(3), C(4), C(1') e C(2') foram efectuados através de INEPT selectivo (Fig. 19, p. 55), assim:

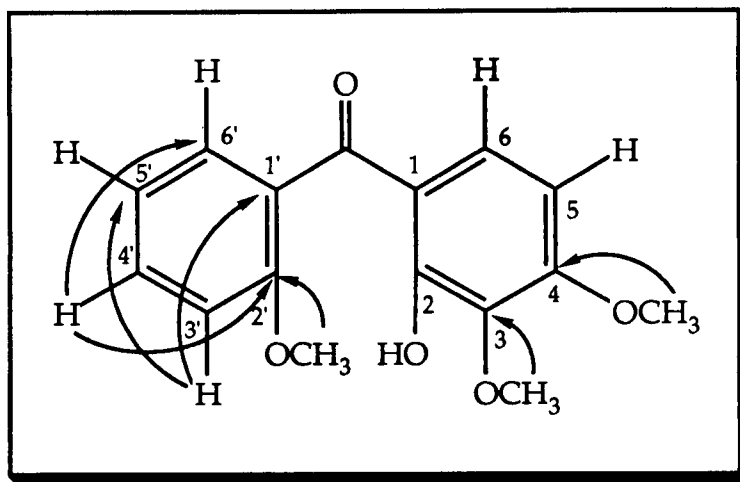


Fig. 19. Dados do INEPT selectivo do composto (5).

-irradiando o H-C(3'), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(5') e C(1');

-irradiando o H-C(4'), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(2') e C(6');

-irradiando os prótons do grupo OCH_3 δ 3,86 (3H) observa-se um aumento, com intensidade diferente, dos sinais correspondentes aos carbonos C(4), C(3) e C(2'). Observa-se um aumento mais significativo do sinal correspondente ao carbono C(4), do que ao dos sinais correspondentes aos carbonos C(2') e C(3);

-irradiando os prótons do grupo OCH_3 δ 3,74 (6H) observa-se um aumento dos sinais, com intensidade diferente, correspondentes aos carbonos C(4), C(3) e C(2'). Observou-se um aumento mais significativo dos sinais correspondentes aos carbonos C(2') e C(3), do que o sinal correspondente ao carbono C(4).

Atribuiu-se o sinal a maior δ ao carbono C(2') porque este se encontra mais desprotegido que o C(3) [123].

Os desvios químicos dos átomos de carbonos C(1) e C(2) correspondem a 115,3 e 156,1 respectivamente, estes foram atribuídos por exclusão e tendo em consideração que o C(2) está mais desprotegido que o C(1). Desta forma o sinal a maior δ foi atribuído ao C(2).

Tabela 6. Dados de RMN de ^{13}C da 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5).

C	δ	(5)
C(1)	115,3	
C(2)	156,1	
C(3)	135,6	
C(4)	158,7	
C(5)	104,0	
C(6)	129,9	
C(1')	127,6	
C(2')	155,8	
C(3')	111,9	
C(4')	131,8	
C(5')	120,5	
C(6')	128,2	
$\underline{\text{C}}=\text{O}$	200,3	
3-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	59,9	
4-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	56,2	
2'-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$	55,6	

4.4. Elucidação estrutural de xantonas

Todas as xantonas sintetizadas neste trabalho são unicamente substituídas num anel aromático, e foram caracterizadas por IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e EM.

Uma vez que não existem substituintes num dos anéis aromáticos, começamos a caracterização estrutural de xantonas pelo assinalamento dos desvios químicos de todos os prótons e carbonos ligados a átomos de hidrogénio, do anel aromático não substituído.

Os desvios químicos correspondentes aos prótons do anel aromático não substituído de todas as xantonas, foram assinalados com base na multiplicidade dos sinais, constantes de acoplamento e com experiências de RMN bidimensional, COSY homonuclear.

Estas técnicas de RMN não permitiram determinar de forma inequívoca qual é o desvio químico do próton H-C(5) e H-C(8). A atribuição dos valores de δ foi efectuada tendo em conta que o próton H-C(8) está mais desprotegido que o próton H-C(5), devido ao efeito de ressonância e anisotrópico do grupo carbonilo que se faz sentir no H-C(8). Desta forma, o sinal a maior δ foi atribuído ao próton H-C(8) [122].

A mesma situação surge no caso dos prótons H-C(6) e H-C(7), o sinal a maior δ foi atribuído ao próton H-C(6), devido ao facto de este próton estar mais desprotegido pelo efeito de ressonância do grupo carbonilo [122].

Após análise comparativa dos resultados de RMN de ^1H (Tabelas 8, 11, 14 e 27, p. 61, 69, 77, 112 e 113) verificamos que, os sinais correspondentes aos prótons do anel aromático não substituído das diferentes xantonas aparecem com multiplicidade e desvios químicos característicos (Fig. 20, p. 58), de tal modo que:

- O sinal correspondente ao H-C(8) aparece, como um duplo duplete (*dd*), a δ entre 8,13-8,20, valores de δ mais elevados do que o

H-C(5), devido aos efeitos de ressonância e anisotrópicos do grupo carbonilo;

- O sinal correspondente ao H-C(7) aparece, de um modo geral, como um duplo duplo duplete (*ddd*), a δ entre 7,43-7,54;

- O sinal correspondente ao H-C(6) aparece, como um duplo duplo duplete (*ddd*), a δ entre 7,80-7,93, valores de δ mais elevados do que o H-C(7), devido ao efeito de ressonância do grupo carbonilo que está localizado na posição *para* relativamente a este próton;

- O sinal correspondente ao H-C(5) aparece, como um duplo duplete (*dd*) ou duplete, a δ entre 7,61-7,78.

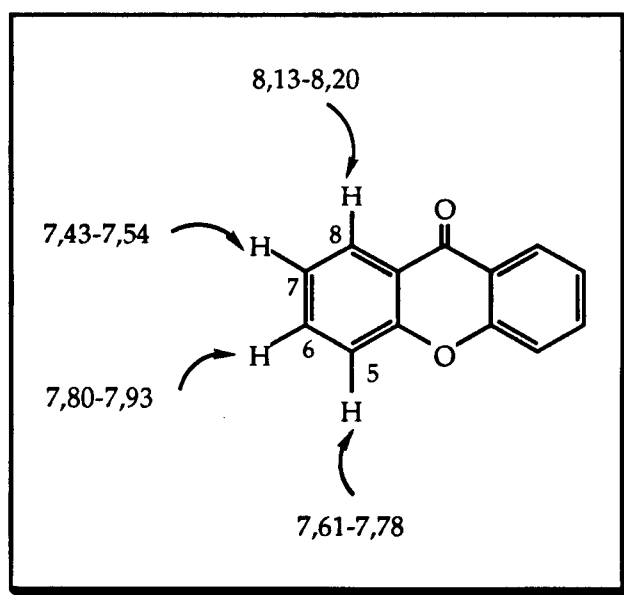


Fig. 20. Dados de RMN de ^1H dos prótons H-C(5), H-C(6), H-C(7) e H-C(8) das xantonas apresentadas neste trabalho.

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(8), C(7), C(6) e C(5), foram efectuados com auxílio de uma experiência

bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear (HETCOR, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$).

Após análise comparativa dos resultados de RMN de ^{13}C (Tabelas 9, 12, 15 e 28, p. 65, 72, 81 e 119) verificamos que, os sinais correspondentes aos carbonos C(8), C(7), C(6) e C(5) das diferentes xantonas aparecem com desvios químicos característicos (Fig. 21), de tal modo que:

-O sinal correspondente ao C(8) aparece a δ entre 125,8-126,1.

-O sinal correspondente ao C(7) aparece a δ entre 124,0-125,3.

-O sinal correspondentes ao C(6) aparece a δ entre 134,9-135,7, com maior δ que os átomos de carbono C(8), C(7) e C(5), devido ao já referido efeito de ressonância do grupo carbonilo.

-O sinal correspondente a C(5) aparece a δ entre 117,9-118,6.

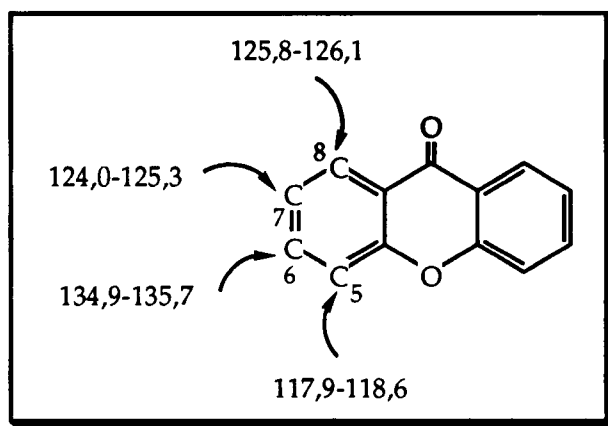


Fig. 21. Dados de RMN de ^{13}C dos carbonos C(5), C(6), C(7) e C(8) das xantonas apresentadas neste trabalho.

4.4.1. 3,4-Dimetoxixantona (6), 4-hidroxi-3-metoxixantona (7) e 3-hidroxi-4-metoxixantona (8).

A estrutura destes compostos foi estabelecida por IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , e EM (Exp., p. 135, 136 e 137).

Os dados obtidos por espectrofotometria no IV para a 3,4-dimetoxixantona (6), 4-hidroxi-3-metoxixantona (7) e 3-hidroxi-4-metoxixantona (8) estão indicados na Tabela 7. Os espectros destes compostos apresentam bandas de absorção características de vibrações de estiramento das ligações, OH, CO e C=C de anel aromático para compostos desta natureza [24, 60].

Tabela 7. Dados de IV da 3,4-dimetoxixantona (6), 4-hidroxi-3-metoxixantona (7) e 3-hidroxi-4-metoxixantona (8).

Grupos	(6)	ν (7)	(8)
OH		3250	3220
C=O	1660	1630	1640
C=C(Ar)	1605	1605	1595
C=C(Ar)	1510	1465	1470
C=C(Ar)	1455	1450	1450

Da análise dos dados de RMN de ^1H dos compostos (6), (7), e (8), evidenciados na Tabela 8, p. 61, verifica-se que:

No espectro do composto (6) aparecem dois singuletos a δ 3,97 e δ 3,92, que correspondem aos prótons do grupo OCH_3 .

Nos espectros dos compostos (8) e (7) aparece um sinal a δ 10,79 e δ

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H da 3,4-dimetoximetoxixantona (6), 4-hidroxi-3-metoxixantona (7) e 3-hidroxi-4-metoxixantona (8).

H	(6)	δ (7)	(8)
H-C(1)	7,94 (1H, <i>d</i> , J=9,0)	7,68 (1H, <i>d</i> , J=9,0)	7,80 (1H, <i>d</i> , J=8,9)
H-C(2)	7,26 (1H, <i>d</i> , J=9,0)	7,19 (1H, <i>d</i> , J=9,0)	7,00 (1H, <i>d</i> , J=8,9)
H-C(5)	7,69 (1H, <i>d</i> , J=8,1)	7,65 (1H, <i>dd</i> , J=8,3; 1,0)	7,69 (1H, <i>dd</i> , J=8,1; 1,0)
H-C(6)	7,85 (1H, <i>ddd</i> , J=8,1; 7,5; 1,7)	7,84 (1H, <i>ddd</i> , J=8,3; 7,6; 1,7)	7,84 (1H, <i>ddd</i> , J=8,1; 7,6; 1,7)
H-C(7)	7,47 (1H, <i>dd</i> , J=7,9; 7,5)	7,44 (1H, <i>ddd</i> , J=7,8; 7,6; 1,0)	7,46 (1H, <i>ddd</i> , J=7,7; 7,6; 1,0)
H-C(8)	8,16 (1H, <i>dd</i> , J=7,9; 1,7)	8,16 (1H, <i>dd</i> , J=7,8; 1,7)	8,16 (1H, <i>dd</i> , J=7,7; 1,7)
3-OH			10,79 (1H, <i>s</i>)
4-OH		9,66 (1H, <i>s</i>)	
3-OCH ₃	3,97 (3H, <i>s</i>)	3,96 (3H, <i>s</i>)	
4-OCH ₃	3,92 (3H, <i>s</i>)		3,92 (3H, <i>s</i>)

9,66 respectivamente, que correspondem ao próton dos grupos OH . No composto (8) o valor de δ 10,79 foi atribuído ao próton do grupo OH em posição *para* relativamente ao grupo carbonilo.

Nos espectros dos três compostos aparecem dois dupletos correspondentes aos prótons H-C(2) e H-C(3).

Os valores de δ dos sinais correspondentes aos prótons do anel aromáticos não substituído das três xantonas não diferem significativamente.

Os espectros de RMN de ^{13}C (Tabela 9, p. 65) obtidos para a 3,4-dimetoxixantona (6) 4-hidroxi-3-metoxixantona (7) e 3-hidroxi-4-metoxixantona (8) apresentam valores de desvio químico que estão de acordo com as estruturas propostas para estes compostos.

Os valores correspondentes aos desvios químicos dos átomos de carbono do anel aromático não substituído das três xantonas não diferem significativamente nos três espectros. No entanto, diferenças significativas foram encontradas nos valores dos deslocamentos químicos correspondentes aos carbonos do anel aromático substituído.

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(1), C(2), OCH_3 foram efectuados através de um estudo bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear (HETCOR; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$).

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(3), C(4), C(4a), C(4b), C(8a) e C(8b) foram efectuados através de INEPT selectivo (Fig. 22, p. 63), assim:

-irradiando o H-C(8), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4b) e C(9);

-irradiando o H-C(2), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4) e C(8b);

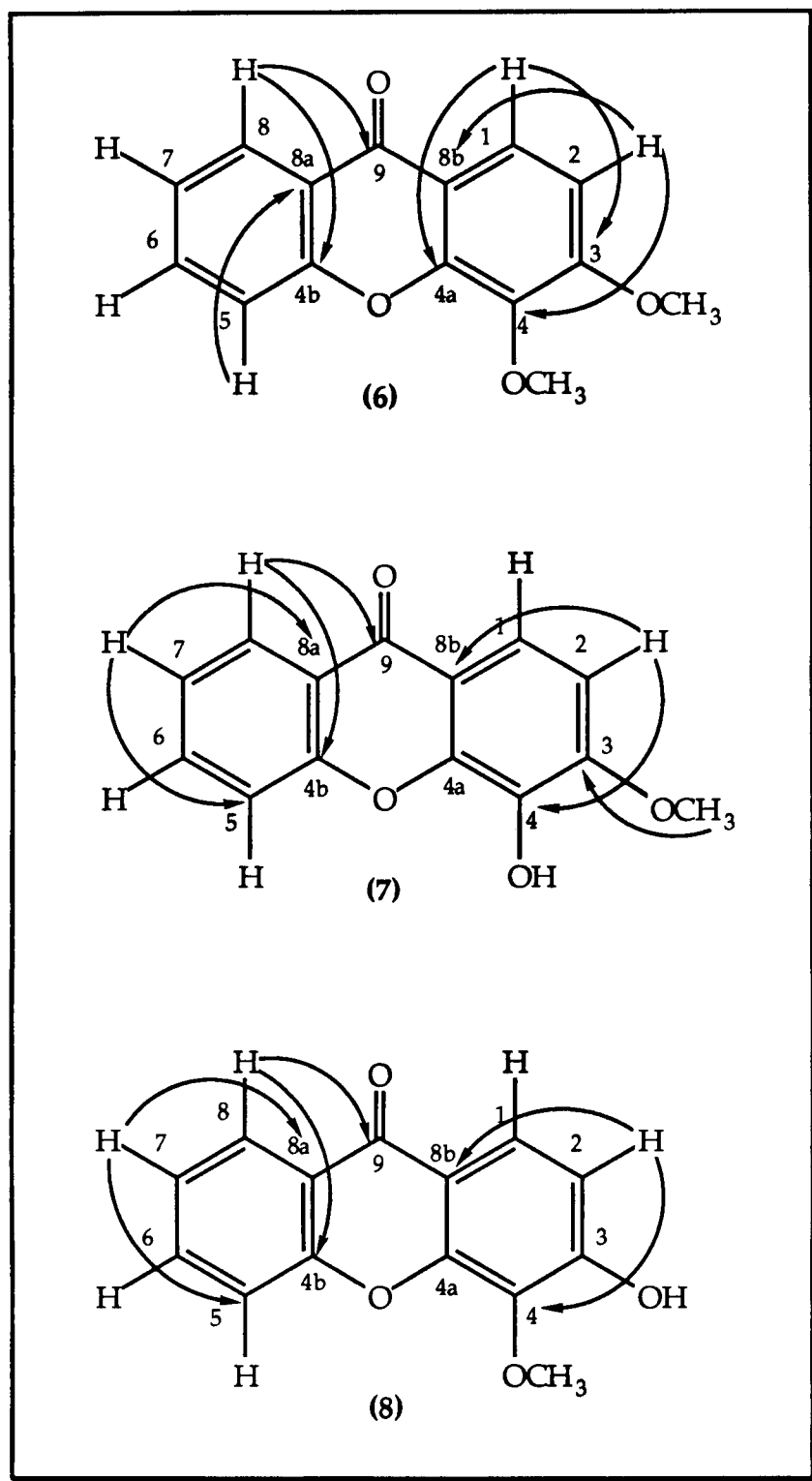


Fig. 22. Dados do INEPT selectivo dos compostos (6), (7) e (8).

-nos compostos (8) e (7), irradiando o H-C(7) observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(8a) e C(5);

-no composto (6), irradiando o H-C(5) observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(8a);

-no composto (7), irradiando os prótons do grupo OCH_3 observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(3), sendo assinalado por exclusão o sinal correspondente ao carbono C(4a);

-no composto (6), irradiando o H-C(1) observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4a) e C(3), os sinais dos carbonos C(3) e C(4a) foram atribuídos por comparação com os resultados obtidos para a xantona (7);

-no composto (8), os sinais dos carbonos C(3) e C(4a) foram atribuídos por comparação com os resultados obtidos para a xantona (7).

O espectro de massa do composto (7) apresenta o pico molecular a m/e 242 u.m.a. Na Fig. 23, p. 66, apresenta-se a sequência interpretativa dos fragmentos mais representativos para o composto (7), os quais estão de acordo com a estrutura proposta.

Tabela 9. Dados de RMN de ^{13}C da 3,4-dimetoxixantona (6), 4-hidroxi-3-metoxixantona (7) e 3-hidroxi-4-metoxixantona (8).

C	(6)	δ (7)	(8)
C(1)	121,7	116,3	121,6
C(2)	109,7	109,0	114,1
C(3)	157,5	152,5	156,3
C(4)	135,9	134,1	134,6
C(4a)	149,9	145,5	150,7
C(4b)	155,6	155,7	155,5
C(5)	118,2	118,1	118,2
C(6)	135,2	135,1	135,0
C(7)	124,4	124,1	124,3
C(8)	125,9	126,0	125,9
C(8a)	120,8	120,8	120,9
C(8b)	115,9	115,9	114,8
C(9)	175,3	175,6	175,0
3-OCH ₃	56,1	56,4	
4-OCH ₃	60,9		60,9

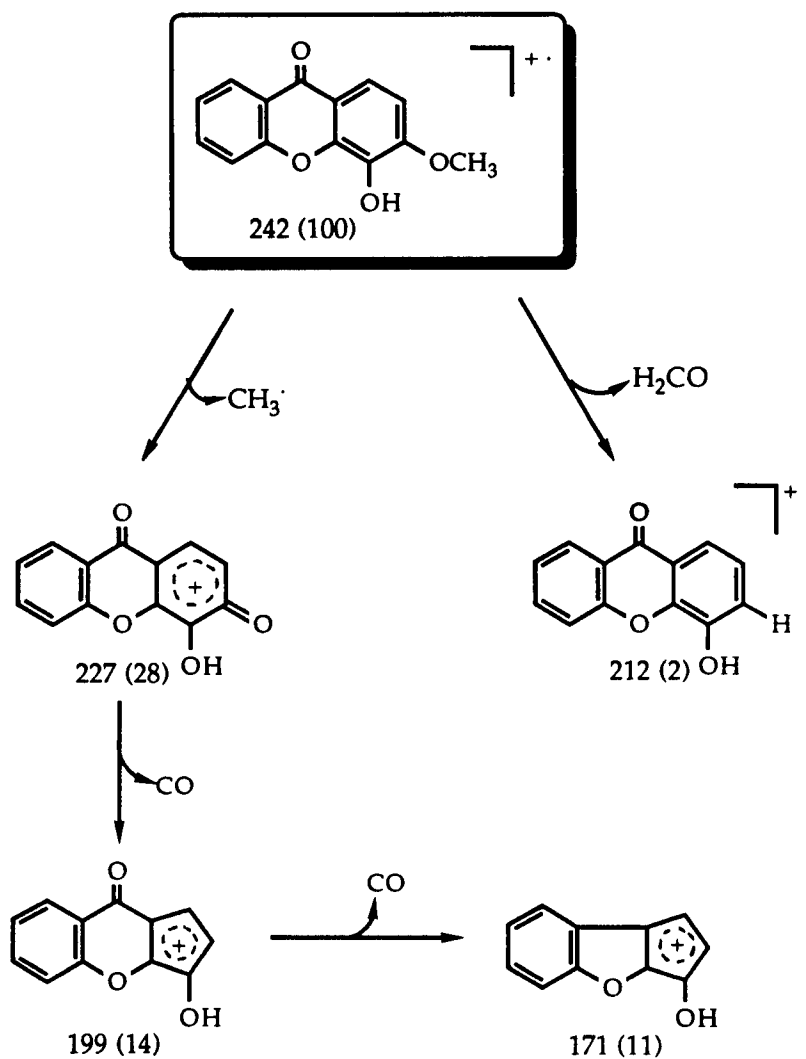


Fig. 23. Representação da sequência interpretativa dos fragmentos de massa mais representativos para o composto (7).

4.4.2. 2-Carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (10), 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (11).

A estrutura destes compostos foi estabelecida por IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , e EM (Exp., p. 139 e 140).

Os dados obtidos por espectrofotometria no IV para a 2-carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (10) e 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (11) estão indicados na Tabela 10, p. 68. Os espectros dos compostos apresentam bandas de absorção características de vibrações de estiramento das ligações, CO e C=C de anel aromático para compostos desta natureza [24, 60].

Da análise dos espectros no IV dos compostos (10) e (11) pode deduzir-se a existência do grupo COOH através das bandas de absorção 1680 cm^{-1} e 1725 cm^{-1} respectivamente, características de vibrações de estiramento da ligação CO do grupo ácido [124].

No espectro do composto (11) pode deduzir-se a existência do grupo OCOCH₃ através da banda de absorção 1765 cm^{-1} , característica das vibrações de estiramento da ligação C=O do grupo OCOCH₃ [125].

Tabela 10. Dados de IV da 2-carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (10) e 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (11).

Grupos	ν (10)	(11)
COOH	1680	1725
OCOCH ₃		1765
C=O	1635	1640
C=C(Ar)	1600	1600
C=C(Ar)	1485	1480
C=C(Ar)	1465	1470

Da análise de dados de RMN de ^1H dos compostos (10) e (11), evidenciados na Tabela 11, p. 69, verifica-se que:

Nos espectros dos compostos (10) e (11) aparece um singuleto a δ 3,96 e δ 3,97 respectivamente, que corresponde aos prótons do grupo OCH_3 e um singuleto a δ 8,39 e δ 8,41 respectivamente, que corresponde ao próton H-C(1).

No espectro do composto (10) aparece um singuleto a δ 8,24 que corresponde ao próton do grupo OH .

No espectro do composto (11) aparece um singuleto a δ 1,91 que corresponde aos prótons do grupo OCOCH_3 .

Os valores de δ dos sinais correspondentes aos prótons do anel aromático não substituído das duas xantonas não diferem significativamente.

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H da 2-carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (**10**) e 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (**11**).

H	δ	
	(10)	(11)
H-C(1)	8,39 (1H, s)	8,41 (1H, s)
H-C(5)	7,67 (1H, d, J=7,9)	7,70 (1H, d, J=7,8)
H-C(6)	7,86 (1H, ddd, J=7,9; 7,6; 1,6)	7,87 (1H, ddd, J=7,8; 7,6; 1,7)
H-C(7)	7,48 (1H, dd, J=7,7; 7,6)	7,49 (1H, dd, J=7,7; 7,6)
H-C(8)	8,15 (1H, dd, J=7,7; 1,6)	8,16 (1H, dd, J=7,7; 1,7)
3-OH	8,24 (1H, s)	
3-OCOCH ₃		1,91 (3H, s)
4-OCH ₃	3,96 (3H, s)	3,97 (3H, s)

Os espectros de RMN de ^{13}C (Tabela 12, p. 72) obtidos para a 2-carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (**10**), 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (**11**) apresentam valores de desvio químico que estão de acordo com as estruturas propostas para estes compostos.

Os valores correspondentes aos desvios químicos dos átomos de carbono do anel aromático não substituído das duas xantonas não diferem significativamente. No entanto diferenças significativas foram encontradas nos valores dos desvios químicos correspondentes aos carbonos do anel aromático substituído.

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(1), OCH₃ e OCOCH₃ foram efectuados através de um estudo bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear (HETCOR; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$).

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(2),

C(3), C(4), C(4a), C(4b), C(8a), C(8b) e $\underline{\text{C}}\text{OOH}$ foram efectuados através de INEPT selectivo (Fig. 24), assim:

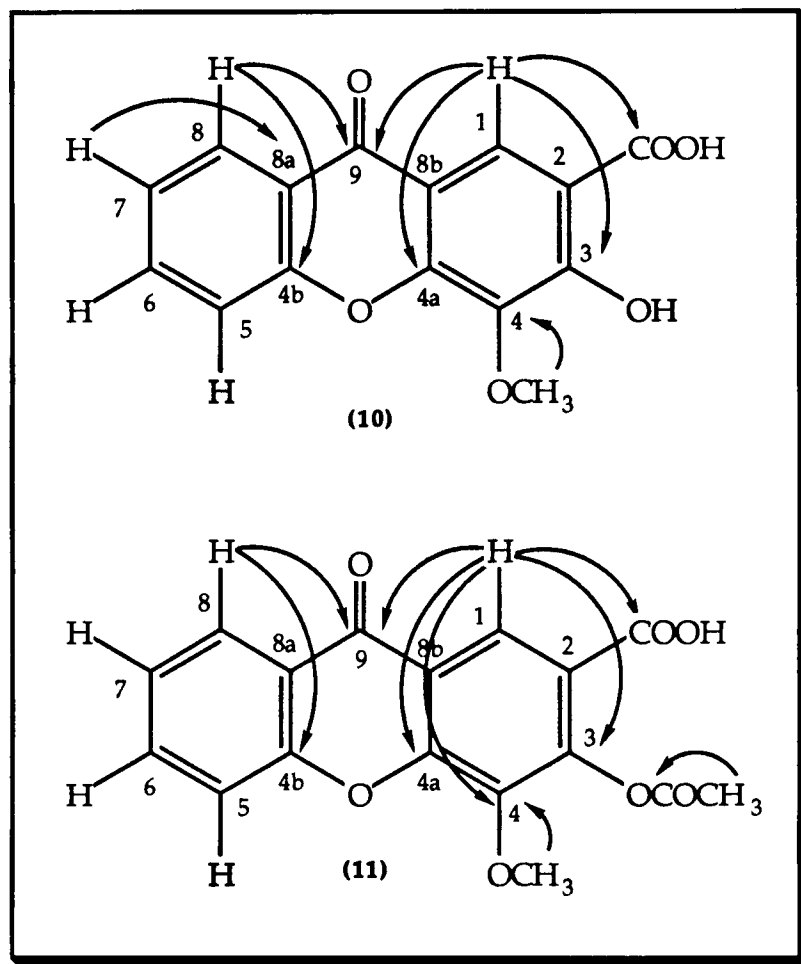


Fig. 24. Dados do INEPT selectivo dos compostos (10) e (11).

-irradiando o H-C(8), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4b) e C(9);

-irradiando os prótons do grupo OCH_3 , observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(4);

-irradiando o H-C(1), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(3), C(9), C(4a) e $\underline{\text{C}}\text{OOH}$;

-no composto (10), irradiando o H-C(7) observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(8a), ficando assim por atribuir os sinais dos carbonos C(2) e C(8b).

-no composto (11), irradiando o H-C(1) com $J=1-2$ Hz, observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4) e C(3). Irradiando os prótons do grupo OCOCH_3 , observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono OCOCH_3 . Ficando assim por atribuir o sinal do C(2), C(8a) e C(8b). Ao carbono C(8a) foi atribuído o desvio químico 120,8 por comparação com o desvio químico do C(8a) da xantona (10).

Os espectros de EM dos compostos (10) e (11) apresentam o pico molecular a m/e 286 u.m.a. e m/e 328 u.m.a. respectivamente.

Nas Fig. 25 e Fig. 26, p. 73 e 74, apresenta-se a sequência interpretativa dos fragmentos mais representativos dos dois compostos os quais estão de acordo com as estruturas propostas.

Tabela 12. Dados de RMN de ^{13}C da 2-carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (10) e 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (11).

C	δ (10)	(11)
C(1)	123,7	123,7
C(2)	112,4*	112,4*
C(3)	159,6	159,4
C(4)	135,2	135,2
C(4a)	152,9	152,9
C(4b)	155,6	155,5
C(5)	118,4	118,4
C(6)	135,7	135,7
C(7)	124,9	124,9
C(8)	126,1	126,1
C(8a)	120,9	120,8
C(8b)	113,9*	113,9*
C(9)	175,2	175,2
2-COOH	171,2	171,2
3-OCOCH ₃		172,1
3-OCOCH ₃		21,1
4-OCH ₃	60,9	60,9

* Estes valores podem ser interconvertíveis em cada coluna vertical

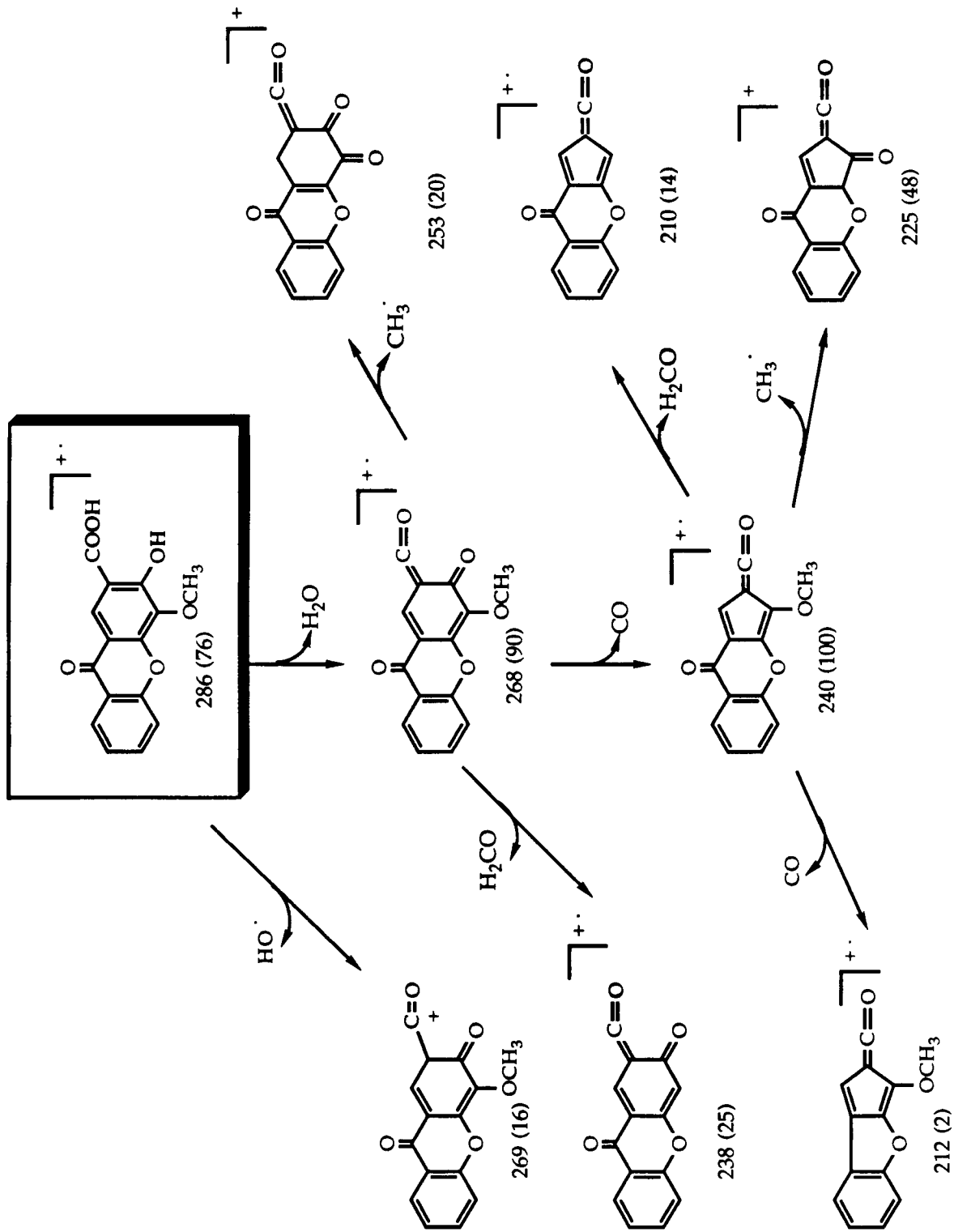


Fig. 25. Sequência interpretativa dos fragmentos de massa mais representativos do composto (10).

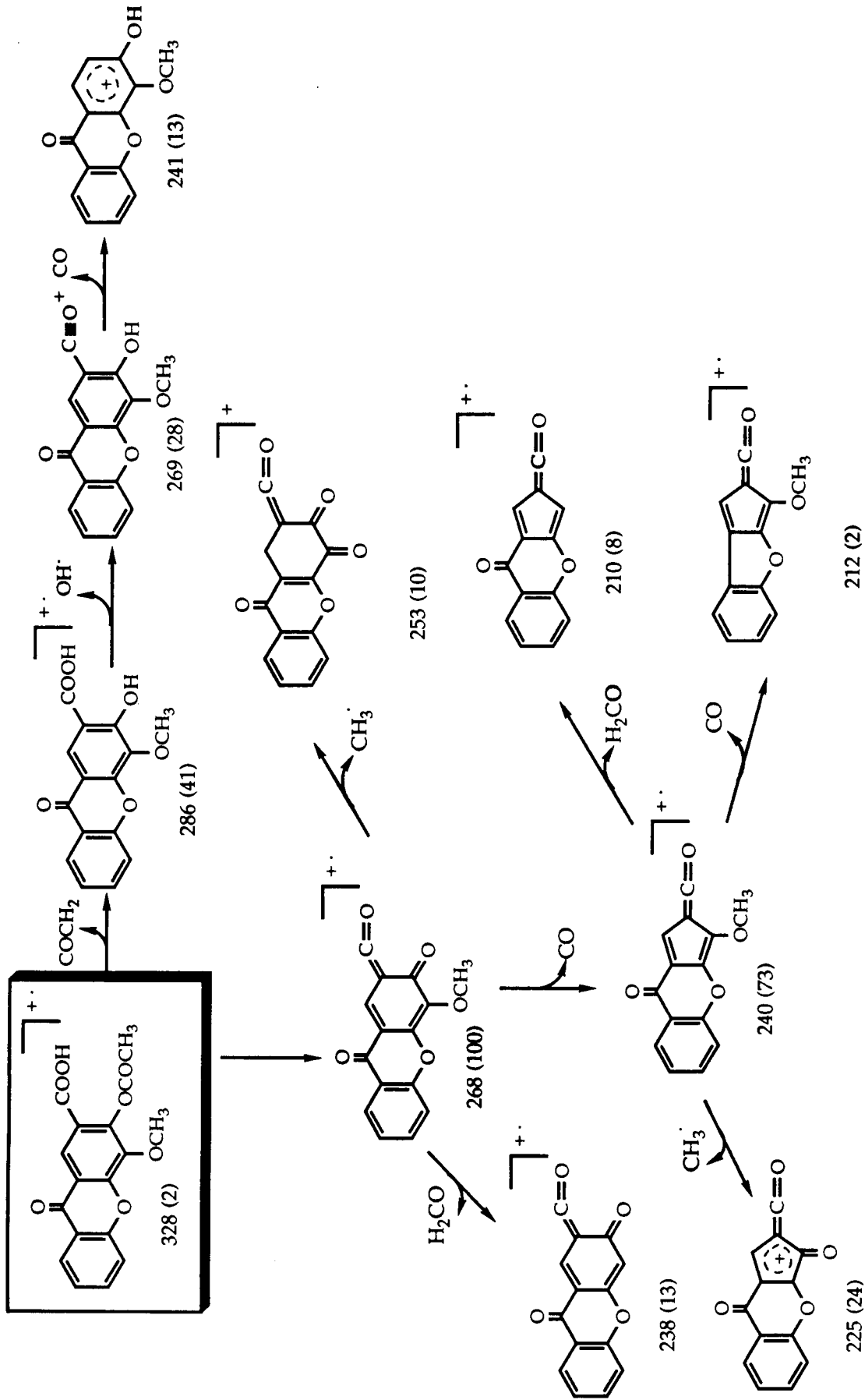


Fig. 26. Representação da sequência interpretativa dos fragmentos de massa mais representativos para o composto (11).

4.4.3. 2-Formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9), 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12) 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14).

A estrutura destes compostos foi estabelecida por IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , e EM (Exp., p. 138, 142, 143 e 144).

Os dados obtidos por espectrofotometria no IV para a 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9), 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12) 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) estão indicados na Tabela 13, p. 76. Os espectros dos compostos apresentam bandas de absorção características de vibrações de estiramento das ligações, CO e C=C de anel aromático para compostos desta natureza [24, 60].

Da análise dos espectros no IV dos compostos (9) e (12) pode deduzir-se a existência do grupo CHO através das bandas de absorção 1740 cm^{-1} e 1695 cm^{-1} respectivamente, características das vibrações de estiramento da ligação CO do grupo CHO [124].

Relativamente aos compostos (9), (13) e (14) os espectros apresentam uma banda de absorção característica de vibrações de estiramento da ligação OH enquanto que, nos espectros do composto (12) esta banda não está presente.

Tabela 13. Dados de IV da 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9), 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12) 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14).

Grupos	(9)	(12)	(13)	(14)
CHO	1740	1695		
OH	3450		3380	3350
C=O	1660	1670	1660	1610
C=C(Ar)	1610	1600	1605	1610
C=C(Ar)	1480	1480	1480	1480
C=C(Ar)	1465	1440	1460	1465

Da análise de dados de RMN de ^1H dos compostos (9), (12), (13), e (14), evidenciados na Tabela 14, p. 77, verifica-se que:

Nos espectros dos compostos (12) e (13) aparece um singuleto a δ 5,42 e δ 5,24 respectivamente, que correspondem aos prótons benzílicos, e um multiplete a δ 7,37-7,44 e δ 7,32-7,41 respectivamente, que correspondente aos prótons H-C(3'), (4') e (5') do grupo benziloxilo.

No espectro do composto (13) aparece um sinal a δ 10,32 que corresponde ao próton do grupo OH .

Nos espectros de cada um dos compostos está presente um singuleto a δ 3,99; δ 4,12; δ 3,93 e δ 3,92 que corresponde aos prótons dos grupos OCH_3 .

Nos espectros dos compostos (9) e (12) aparece um singuleto a δ 10,30 e 10,15 respectivamente, que corresponde ao próton do grupo CHO .

Os valores de δ dos sinais correspondentes aos prótons do anel aromático não substituído das quatro xantonas não diferem significativamente.

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H da 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9), 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12), 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13) e 2,3-dihidroxi-4-metoxixantona (14).

H	δ			
	(9)	(12)	(13)	(14)
H-C(1)	8,30 (1H, s)	8,24 (1H, s)	7,35 (1H, s)	7,27 (1H, s)
H-C(5)	7,73 (1H, d, J=8,2)	7,78 (1H, dd, J=8,1; 0,8)	7,66 (1H, d, J=7,9)	7,66 (1H, d, J=7,9)
H-C(6)	7,89 (1H, ddd, J=8,2; 7,4; 1,5)	7,93 (1H, ddd, J=8,1; 7,3; 1,6)	7,83 (1H, ddd, J=7,9; 7,4; 1,7)	7,80 (1H, ddd, J=7,9; 7,6; 1,6)
H-C(7)	7,50 (1H, dd, J=7,8; 7,4)	7,54 (1H, ddd, J=7,7; 7,3; 0,8)	7,44 (1H, dd, J=8,0; 7,4)	7,43 (1H, dd, J=7,7; 7,6)
H-C(8)	8,16 (1H, dd, J=7,8; 1,5)	8,18 (1H, dd, J=7,7; 1,6)	8,13 (1H, dd, J=8,0; 1,7)	8,14 (1H, dd, J=7,7; 1,6)
H-C(2') e (6')		7,50 (2H, dd, J=7,6; 1,9)	7,50 (2H, d, J=6,5)	
H-C(3'), (4') e (5')		7,44 - 7,37 (3H, m)	7,41 - 7,32 (3H, m)	
2-CHO	10,30 (1H, s)	10,15 (1H, s)		
OH	10,51 (1H, s)		10,32 (1H, s)	
3-OCH ₂ Ar		5,42 (2H, s)	5,24 (2H, s)	
4-OCH ₃	3,99 (3H, s)	4,12 (3H, s)	3,93 (3H, s)	3,92 (3H, s)

Os espectros de RMN de ^{13}C (Tabela 15, p. 81) obtidos para a 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9), 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12), 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) apresentam valores de desvio químico que estão de acordo com as estruturas propostas para estes compostos.

Os valores correspondentes aos desvios químicos dos átomos de carbono do anel aromático não substituído das quatro xantonas não diferem significativamente. No entanto diferenças significativas foram encontradas nos valores dos deslocamentos químicos correspondentes aos carbonos do anel aromático substituído.

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(1), OCH_3 e C(4') foram efectuados através de um estudo bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear (HETCOR; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$).

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(2) C(3), C(4), C(4a), C(4b), C(8a) e C(8b) foram efectuados através de INEPT selectivo (Fig. 27, p. 79), assim:

-irradiando o H-C(8), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4b) e C(9);

-irradiando os prótons do grupo OCH_3 , observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono ao C(4);

-no composto (9), irradiando o H-C(7) observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(8a) e C(5). Irradiando o próton do grupo CHO , observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(2). Irradiando o H-C(1) (afecta também o próton H-C(8)), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(3), C(4a), C(4b), C(9) e CHO .

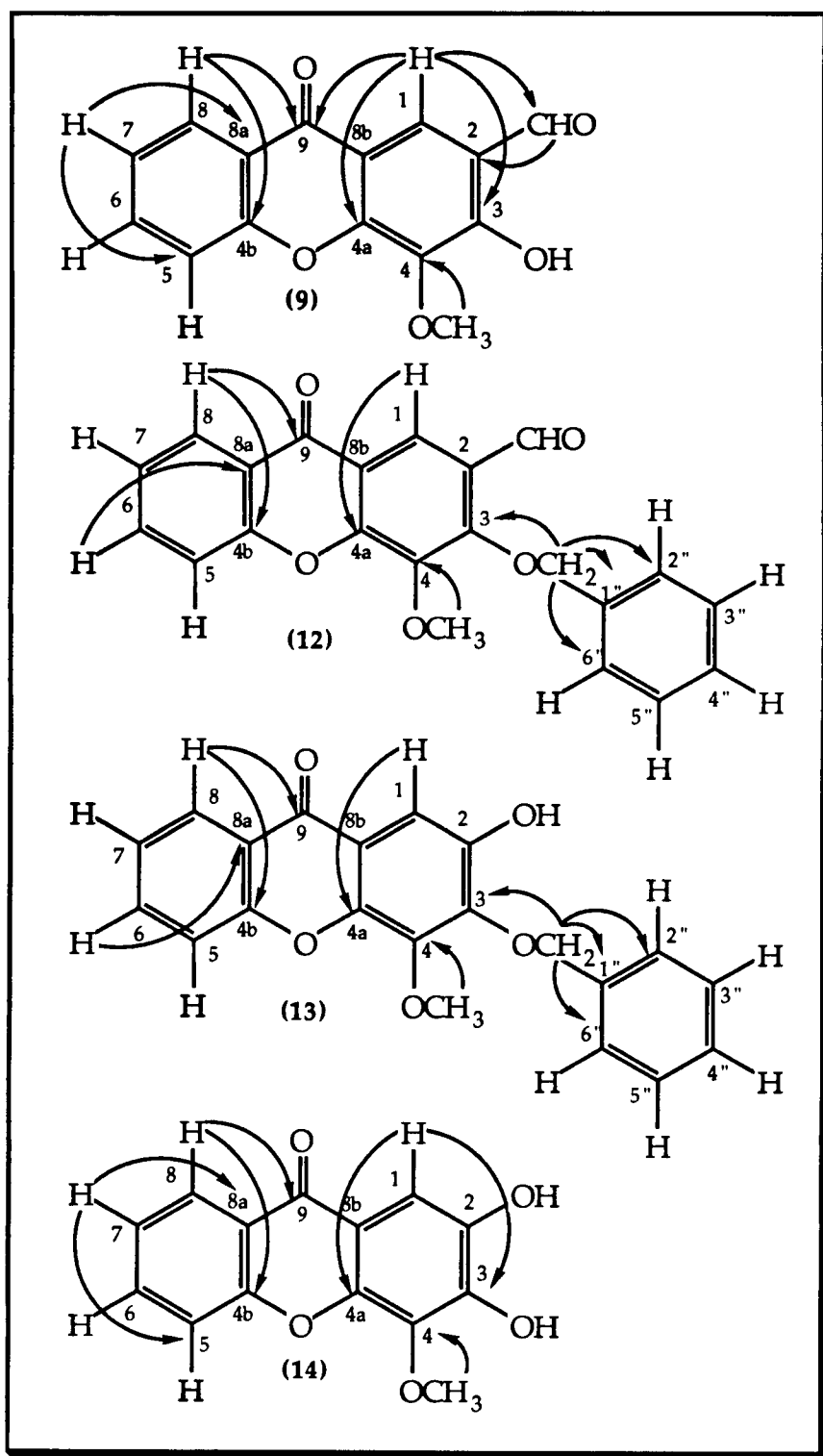


Fig. 27. Dados de INEPT selectivo dos compostos (9), (12), (13) e (14).

Os sinais dos carbonos C(3) e C(4a) foram atribuídos com base nos resultados obtidos para a xantona (7), sendo atribuído por exclusão o sinal do carbono C(8b).

-nos compostos (12) e (13), irradiando os prótons benzílicos OCH_2Ar observa-se um aumento do sinais correspondentes aos carbonos C(3), C(1'), C(2'), C(6'). Irradiando o H-C(6) com $J=1-2$ Hz, observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(8a). Irradiando o H-C(1) observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(4a). Os desvios químicos dos carbonos C(2) e C(8b) foram atribuídos tendo em consideração que o carbono C(2) está mais desprotegido que o carbono C(8b). Sendo assim, o sinal a maior δ foi atribuído ao C(2) [33, 34].

-no composto (14), irradiando o H-C(1) observa-se um aumento de um só sinal a δ 144,9 e não um aumento de dois sinais como seria de esperar, que corresponderiam ao C(4a) e C(3). Como se verifica apenas o aumento de apenas um sinal, podemos concluir que C(4a) e C(3) apresentam o mesmo valor de desvio químico. Irradiando o H-C(7), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(8a) e C(5). O assinalamento dos sinais dos carbonos C(2) e C(8b) foram atribuídos tendo em consideração que o C(2) está mais desprotegido que o C(8b). Desta forma, o sinal a maior δ foi atribuído ao C(2) [33, 34].

Os espectros de massa dos compostos (9), (12), (13) e (14) apresentam o pico molecular a m/e 270, 360, 348 e 258 u.m.a. respectivamente.

Nas Fig 28-31, p. 82, 83, 84 e 85, apresenta-se a sequência interpretativa dos fragmentos mais representativos destes compostos os quais alicerçam a estrutura proposta.

Tabela 15. Dados de RMN de ^{13}C da 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9), 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12), 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14).

C	δ			
	(9)	(12)	(13)	(14)
C(1)	123,3	120,9	104,5	103,4
C(2)	120,6	125,8	144,3	144,1
C(3)	157,7	157,4	146,6	144,9
C(4)	135,4	141,2	142,0	135,3
C(4a)	153,7	154,3	148,3	144,9
C(4b)	155,4	155,5	155,7	155,4
C(5)	118,4	118,6	118,6	118,2
C(6)	135,7	136,1	135,4	134,5
C(7)	125,0	125,3	124,5	124,0
C(8)	126,0	126,1	126,1	125,8
C(8a)	120,8	120,9	120,7	120,7
C(8b)	114,9	118,1	117,4	113,9
C(9)	175,1	175,5	175,6	174,8
2-CHO	190,8	188,6		
3-OCH ₂ Ar		76,3	74,5	
C(1')		136,1	137,4	
C(2'), C(6')		128,9	128,5	
C(3'), C(5')		128,7	128,7	
C(4')		128,7	128,5	
4-OCH ₃	61,5	61,9	61,9	61,0

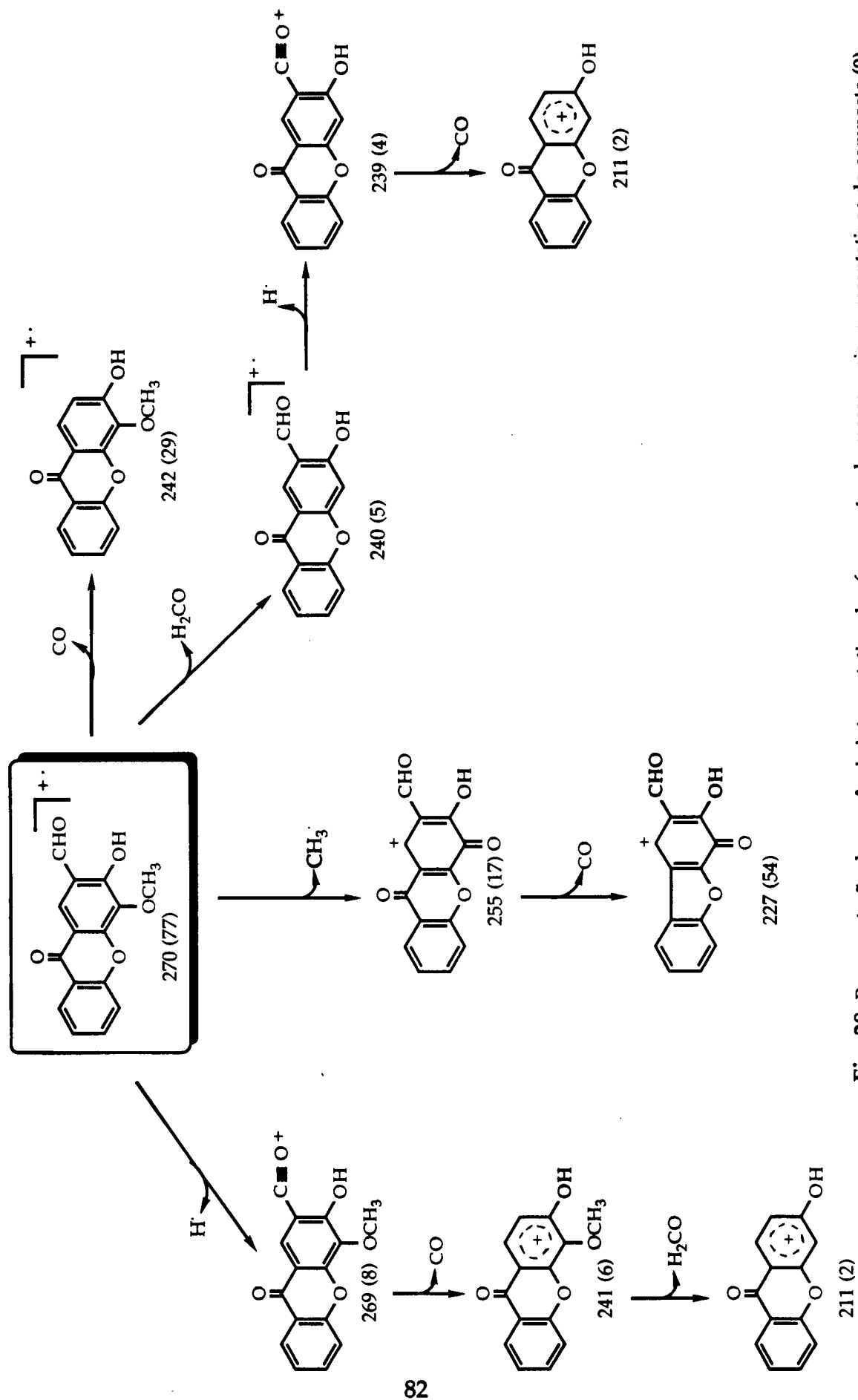


Fig. 28. Representação da sequência interpretativa dos fragmentos de massa mais representativos do composto (9).

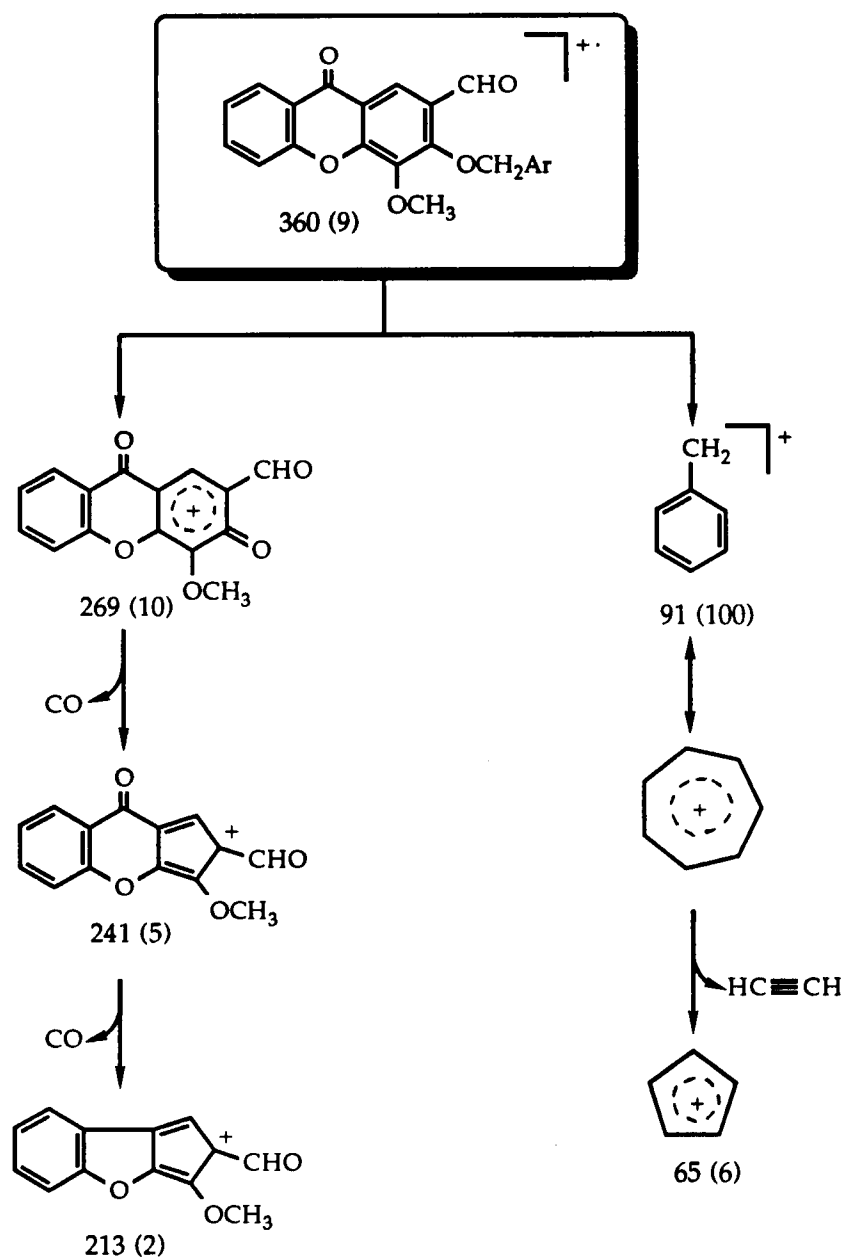


Fig. 29. Representação da seqüência interpretativa dos fragmentos de massa mais representativos para o composto (12).

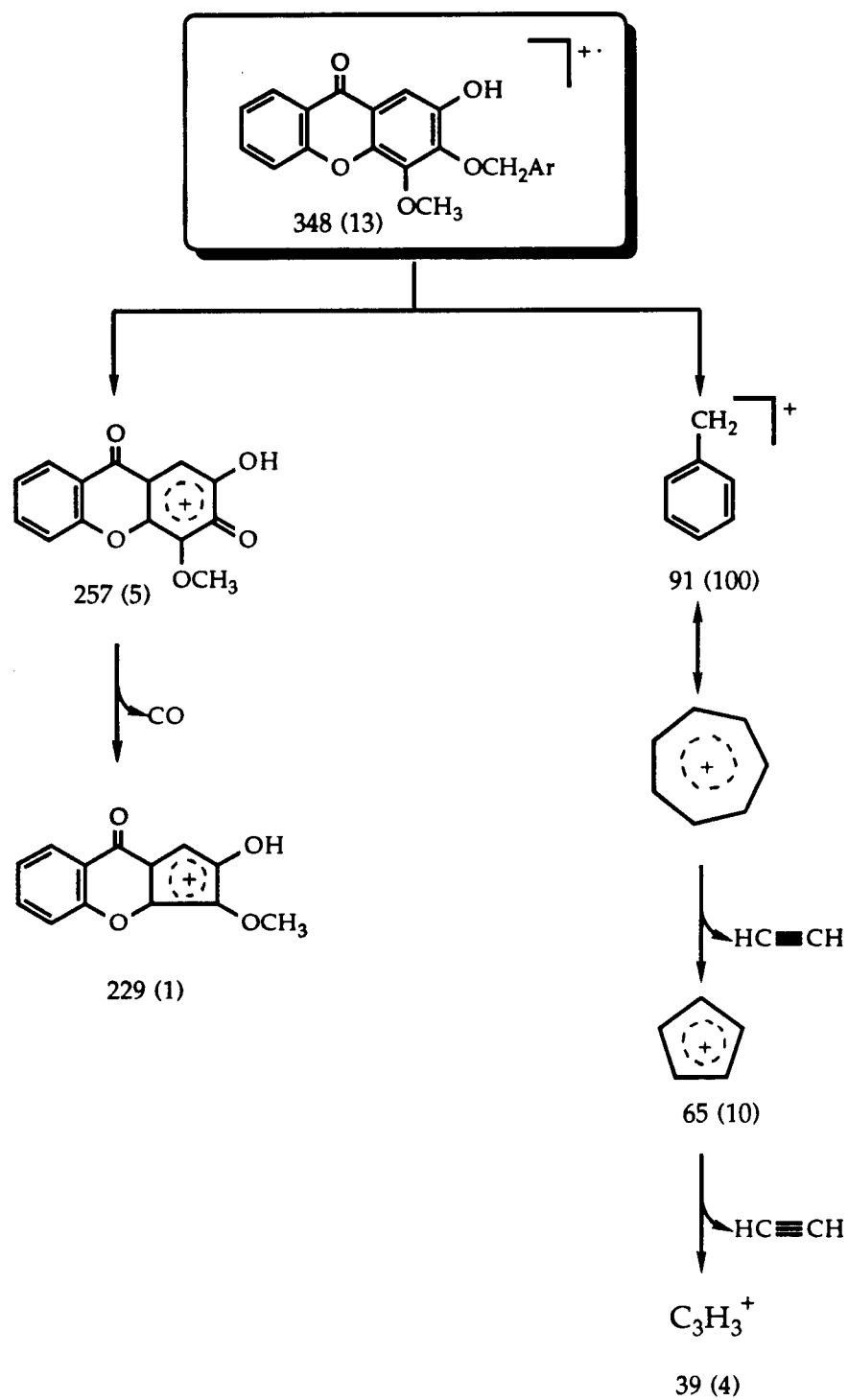


Fig. 30 . Representação da sequência interpretativa dos fragmentos de massa mais representativos para o composto (13).

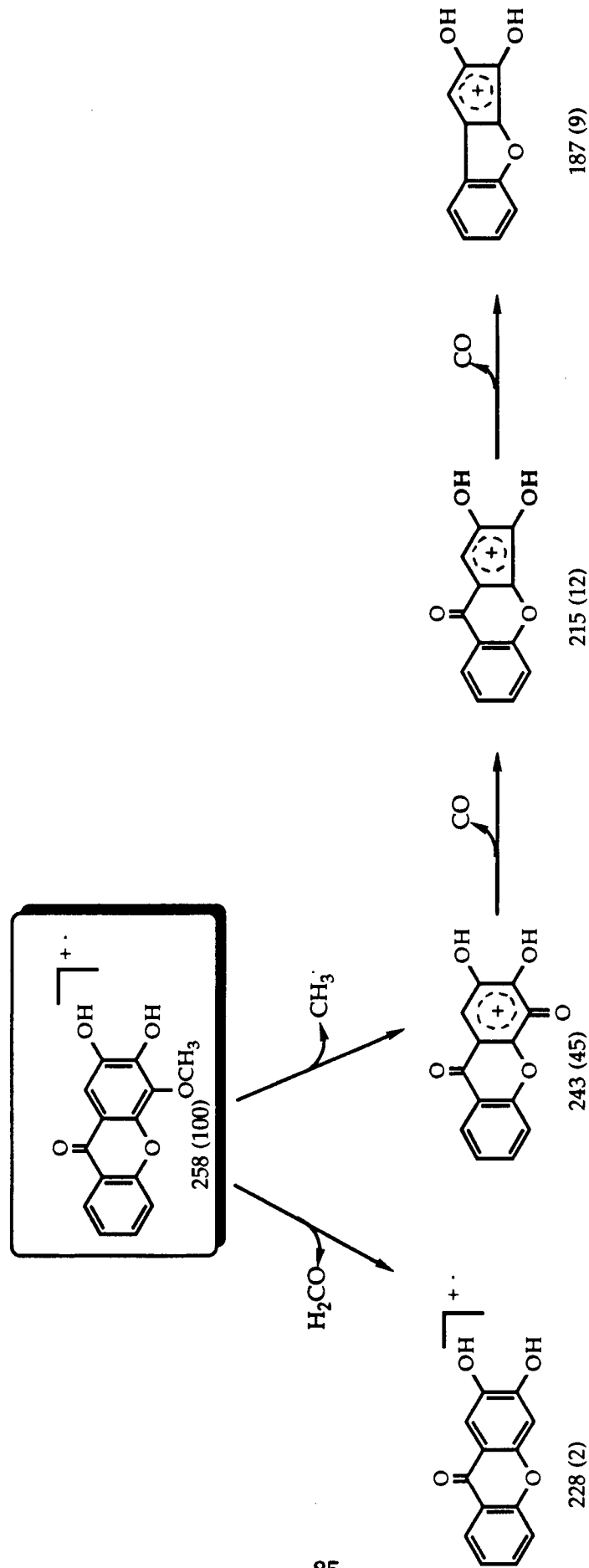


Fig. 31. Representação da sequência interpretativa dos fragmentos de massa mais representativos para o composto (14).

4.5. *trans*-Kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17)

A estrutura dos compostos (16) e (17) foi estabelecida por IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , e EM (Exp., p. 145).

Os dados obtidos por espectrofotometria no IV para estes compostos estão indicados na Tabela 16. Os espectros apresentam bandas de absorção características de vibrações de estiramento das ligações, OH, CO e C=C de anel aromático para compostos desta natureza [12, 15, 75, 77].

Tabela 16. Dados de IV da *trans*-kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17).

Grupos	ν	
	(16)	(17)
OH	3432	3427
C=O	1640	1653
C=C(Ar)	1610	1606
C=C(Ar)	1516	1516
C=C(Ar)	1460	1456

Da análise comparativa dos dados de RMN de ^1H dos compostos (16) e (17), Tabela 17, p. 87, com os dos precursores: 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) (Tabela 14, p. 77) e álcool coniferílico (15) [126], verificamos que nos espectros dos compostos (16) e (17) aparecem sinais a valores de δ semelhantes aos sinais do espectro da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) e do álcool coniferílico (15), apresentando diferenças significativas a $\delta \simeq 5,2$ e $\delta \simeq 4,5$.

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H da *trans*-kielcorina B (natural) (DMSO- d_6 , 300 MHz) [8], *trans*-kielcorina B (16) e da *trans*-isokielcorina B (17).

H	<i>trans</i> -kielcorina B (natural)	δ (16)	(17)
H-C(2)	4,14 (m)	4,40 (1H, m)	5,13 (1H, d, J=8,0)
H-C(3)	5,12 (d, J=7)	5,24 (1H, d, J=8,3)	4,53 (1H, m)
H-C(1')	7,22 (s)	7,51 (1H, s)	7,46 (1H, s)
H-C(5')	7,69 (dd, J=9; 2)	7,80 (1H, d, J=8,1)	7,80 (1H, d, J=8,4)
H-C(6')	7,86 (td, J=9; 2)	7,95 (1H, ddd, J=8,1; 7,4; 1,5)	7,95 (1H, td, J=7,6; 1,5)
H-C(7')	7,49 (td, J=7; 2)	7,57, (1H, dd, J=7,7; 7,4)	7,56 (1H, dd, J=7,6; 7,2)
H-C(8')	8,21 (dd, J=7; 2)	8,27 (1H, d, J=7,7)	8,26 (1H, dd, J=7,2; 1,5)
H-C(2'')	7,07 (s)	7,19 (1H, s)	7,16 (1H, d, J=1,6)
H-C(5'')	6,84 (d, J=7)	6,93 (1H, d, J=8,1)	6,92 (1H, d, J=7,7)
H-C(6'')	6,91 (dd, J=9; 2)	7,03 (1H, d, J=8,1)	7,00 (1H, dd, J=7,7; 1,6)
4'-OCH ₃	3,87 (s)	4,05 (3H, s)	4,12 (3H, s)
3''-OCH ₃	3,79 (s)	3,88 (3H, s)	3,88 (3H, s)
4''-OH	9,26 (s)	9,39 (1H, s)	9,35 (1H, s)
CH ₂ OH		3,57 (2H, m)	3,78 (2H, m)

Nos compostos (16) e (17) a atribuição dos desvios químicos correspondentes aos prótons foi realizada com base na multiplicidade dos sinais, constantes de acoplamento e em experiências de RMN bidimensional, COSY homonuclear e COSYLR.

A atribuição dos desvios químicos correspondentes aos prótons dos grupos 4'-OCH₃ e 3''-OCH₃ foi realizada após um estudo bidimensional de correlação espectroscópica homonuclear a longa distância (COSYLR). No espectro COSYLR do composto (16) verificou-se que os prótons correspondentes ao δ 3,88 acoplam com o próton H-C(2''), enquanto que os prótons correspondentes ao δ 4,05 não acoplam com nenhum próton. Estes resultados permitiram concluir que o δ 3,88 corresponde aos prótons do grupo OCH₃ que se encontra em C(3''), enquanto que o δ 4,05 corresponde aos prótons do grupo OCH₃ que se encontra em C(4').

No caso do composto (17) verificou-se que, os prótons correspondentes ao δ 3,88 acoplam com o próton H-C(2''), enquanto que os prótons correspondentes ao δ 4,12 não acoplam com nenhum próton. Estes resultados permitem concluir que o δ 3,88 corresponde aos prótons do grupo OCH₃ que se encontra em C(3'') enquanto que o δ 4,12 corresponde aos prótons do grupo OCH₃ que se encontra em C(4').

No entanto, as técnicas de RMN utilizadas não permitiram determinar de uma forma inequívoca quais os desvios químicos dos prótons H-C(5') e H-C(8'). Este problema foi resolvido tendo em conta que o próton H-C(8') está mais desprotegido que o próton H-C(5'), devido ao efeito de ressonância e anisotrópico do grupo carbonilo que se faz sentir no H-C(8'). Desta forma, o sinal a maior δ foi atribuído ao próton H-C(8').

A mesma situação surge no caso dos prótons H-C(6') e H-C(7'), o sinal a maior δ foi atribuído ao próton H-C(6'), devido ao facto de este próton estar mais desprotegido pelo efeito de ressonância do grupo

carbonilo.

Da análise comparativa dos dados de RMN de ^1H , evidenciados na Tabela 17, p. 87, verifica-se que os valores de δ dos compostos (16) e (17) apenas mostram diferenças significativas para os prótons H-C(2) e H-C(3).

O valor das constantes de acoplamento do H-C(2) e H-C(3) dos compostos (16) e (17) correspondem a 8,3 e 8,0 Hz respectivamente. A grandeza destes valores permitiu concluir que estes prótons se encontram na configuração *trans* [12, 13].

Esta configuração foi confirmada através de um estudo de efeito nuclear de Overhauser (NOE). No composto (16) irradiando o H-C(2) δ 4,40 observa-se um aumento (4%) da intensidade dos sinais correspondentes aos prótons H-C(2'') δ 7,19 e H-C(6'') δ 7,03 não se observando qualquer efeito no sinal do próton H-C(3). Irradiando o H-C(3) não se observa qualquer efeito no H-C(2). Estes resultados só são compatíveis com a estrutura numa configuração *trans* [127].

No caso do composto (17) irradiando o H-C(2) δ 5,13 observa-se um aumento (1%) da intensidade dos sinais correspondentes aos prótons H-C(2'') δ 7,16 e H-C(6'') δ 7,00, não se observando qualquer efeito no sinal do próton H-C(3). Irradiando o H-C(3) não se observa qualquer efeito no H-C(2). Estes resultados só são compatíveis com a estrutura numa configuração *trans* [127].

Da análise comparativa dos dados de RMN de ^{13}C , evidenciados na Tabela 18, p. 95, verifica-se que os valores de δ dos compostos (16) e (17) apenas mostram diferenças significativas para os carbonos C(2) e C(3).

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(2), C(3), C(1'), C(5'), C(6'), C(7'), C(8'), C(2''), C(5'') e C(6'') dos dois compostos foram efectuados através de um estudo bidimensional de correlação

espectroscópica heteronuclear (HETCOR; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$).

Os assinalamentos dos carbonos dos grupos $3''\text{-OCH}_3$ e $4'\text{-OCH}_3$ foram efectuados através de um estudo bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear (HETCOR; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) e COSYLR.

No caso do composto (16) os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos, $\text{C}(1'')$, $\text{C}(3'')$, $\text{C}(4'')$, $\text{C}(4')$, $\text{C}(4'\text{b})$ e $\text{C}(8'\text{a})$ foram efectuados através de INEPT selectivo (Fig. 32) assim:

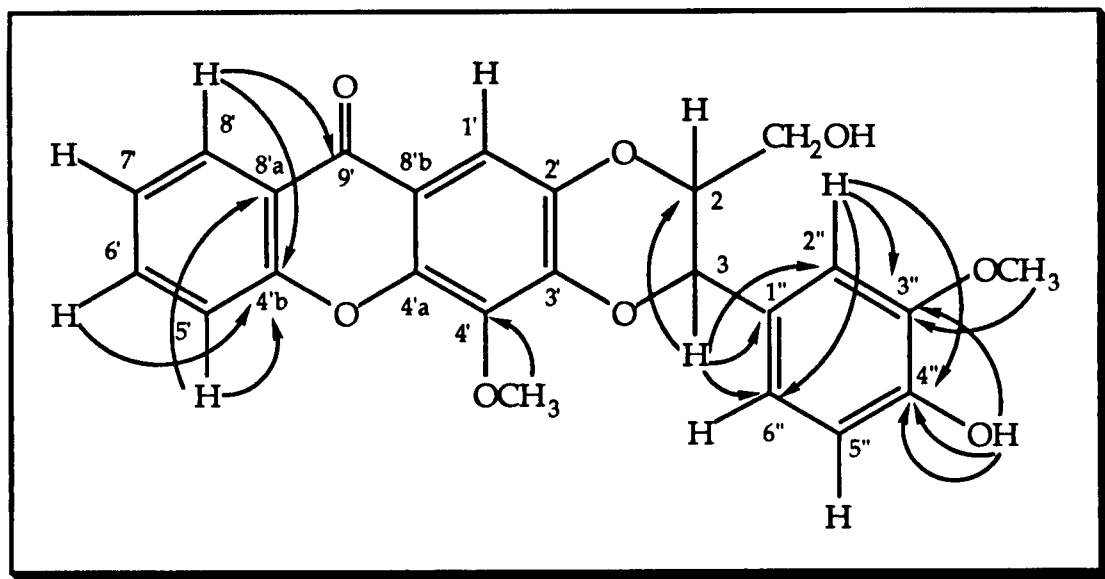


Fig. 32. Dados de INEPT selectivo do composto (16).

-irradiando o $\text{H-C}(3)$, observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos $\text{C}(1'')$, $\text{C}(2'')$ e $\text{C}(6'')$;

-irradiando o $\text{H-C}(2'')$, observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos $\text{C}(3'')$, $\text{C}(4'')$ e $\text{C}(6'')$;

-irradiando o próton do grupo Ar-OH , observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos $\text{C}(3'')$ e $\text{C}(4'')$;

-irradiando o próton do grupo OH com $J=1-2$ Hz, observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono $\text{C}(4'')$;

-irradiando o $\text{H-C}(8')$, observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos $\text{C}(9')$ e $\text{C}(4'b)$;

-irradiando o $\text{H-C}(6')$, observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono $\text{C}(4'b)$;

-irradiando o $\text{H-C}(5')$, observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos $\text{C}(4'b)$ e $\text{C}(8'a)$;

-irradiando os prótons do grupo $3''\text{-OCH}_3$, observa-se um aumento dos sinais correspondente ao carbono $\text{C}(3'')$;

-irradiando os prótons do grupo $4'\text{-OCH}_3$, observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono $\text{C}(4')$.

O assinalamento do sinal do carbono CH_2OH foi efectuado através da técnica de DEPT 135°.

O desvio químico do $\text{C}(8'b)$ foi atribuído tendo em consideração os dados de RMN de ^{13}C da *trans*-kielcorina (35) (Tabela 30, p. 124), ficando assim, por atribuir os seguintes δ 141,6; 144,1 e 144,7 correspondendo estes aos carbonos $\text{C}(2')$, $\text{C}(3')$ e $\text{C}(4'a)$.

Na tentativa de resolver esta situação irradiou-se simultaneamente os prótons $\text{H-C}(1) + \text{H-C}(7)$ e observou-se um aumento dos sinais correspondentes aos seguintes desvios químicos:

144,1 este δ pode corresponder ao carbono C(3') ou C(4'a).

144,7 este δ pode corresponder ao carbono C(3') ou C(4'a).

120,5 este δ corresponde ao carbono C(8'a) (já estava atribuído).

175,0 este δ corresponde ao carbono C(9') (já estava atribuído).

Desta forma o δ a 141,6 foi atribuído por exclusão ao carbono C(2'), ficando por atribuir o δ do C(3') e C(4'a).

No caso do composto (17) os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos, C(3) C(4'), C(1''), C(3''), C(4'') e C(4'b) foram efectuados através de INEPT selectivo (Fig. 33) assim:

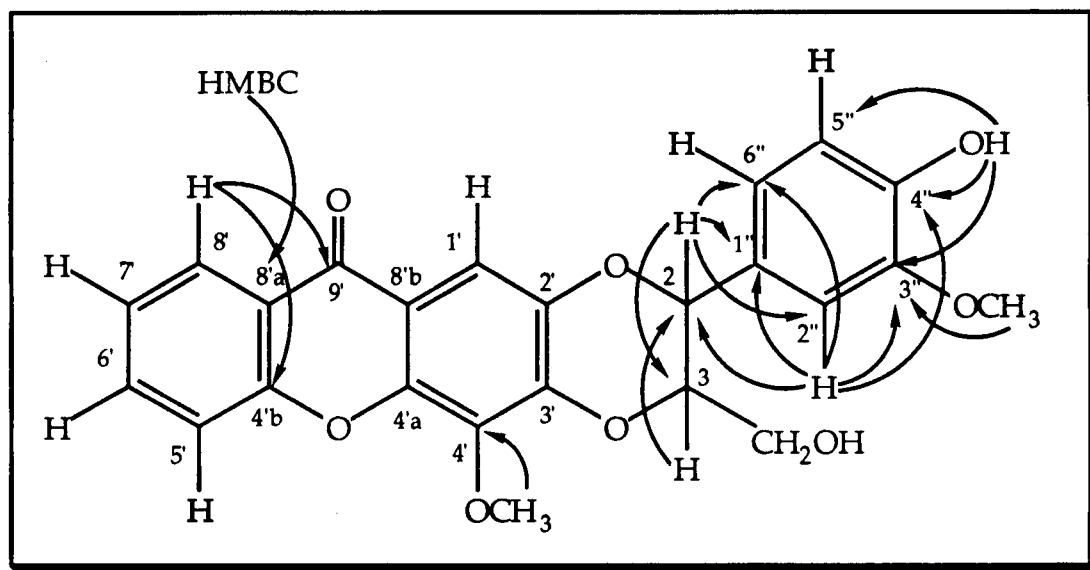


Fig. 33. Dados de INEPT selectivo e HMBC do composto (17).

-irradiando o H-C(2), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(3), C(1''), C(2'') e C(6'');

-irradiando o H-C(3), observa-se um aumento do sinal

correspondente ao carbono C(2);

-irradiando o H-C(2''), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(1''), C(3''), C(4''), C(6'') e C(3);

-irradiando o próton do grupo Ar-OH observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(3''), C(4'') e C(5'');

-irradiando o H-C(8'), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(9) e C(4'b);

-irradiando os prótons do grupo 3''-OCH₃, observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(3'');

-irradiando os prótons do grupo 4'-OCH₃, observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(4').

O assinalamento do sinal do carbono C(8'a) foi efectuado por HMBC.

O assinalamento do sinal do carbono CH₂OH foi efectuado através da técnica de DEPT 135°.

O desvio químico do C(8'b) foi atribuído tendo em consideração os dados de RMN de ¹³C da *trans*-kielcorina (35) (Tabela 30, p. 124), ficando assim, por atribuir os seguintes δ 141,6; 144,1 e 144,8 correspondendo estes aos carbonos C(2'), C(3') e C(4'a).

Na tentativa de resolver esta situação irradiou-se simultaneamente os prótons H-C(1) + H-C(7) e observou-se um

aumento dos sinais correspondentes aos seguintes desvios químicos:

144,1 este δ pode corresponder ao carbono C(3') ou C(4'a).

144,8 este δ pode corresponder ao carbono C(3') ou C(4'a).

120,5 este δ corresponde ao carbono C(8'a) (já estava atribuído).

175,0 este δ corresponde ao carbono C(9') (já estava atribuído).

Desta forma o δ a 141,6 foi atribuído por exclusão ao carbono C(2'), ficando por atribuir o δ do C(3') e C(4'a).

Perante os dados espectroscópicos analisados concluímos que, os compostos (16) e (17) correspondem a dois xantonolignóides, ambos na configuração *trans*, cujas estruturas possíveis são:

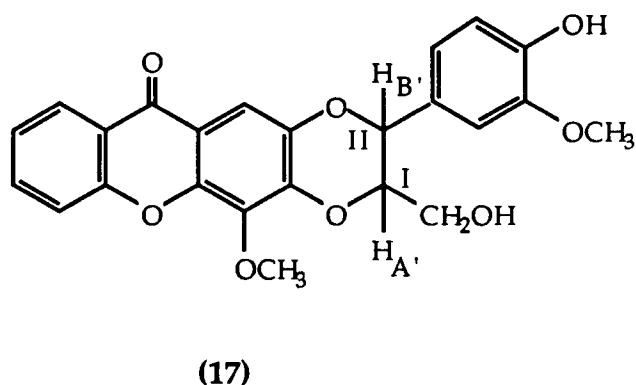
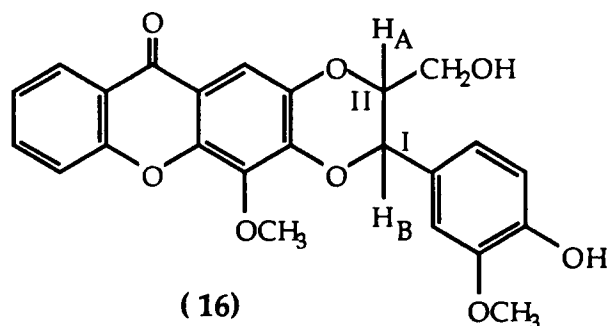
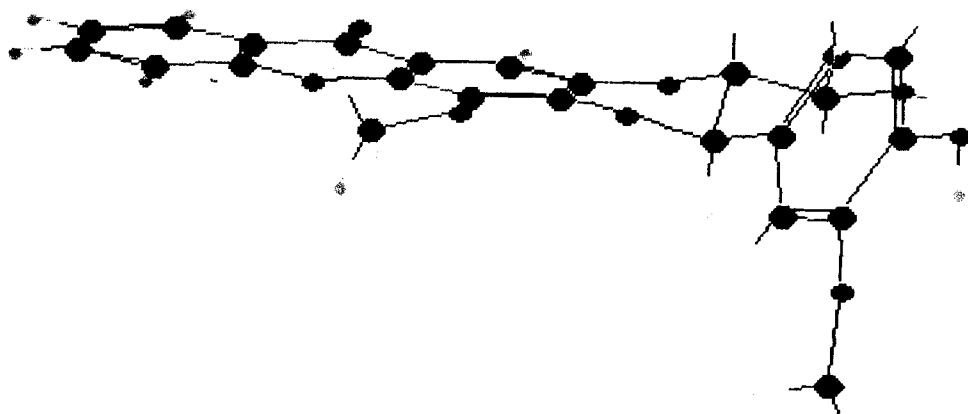


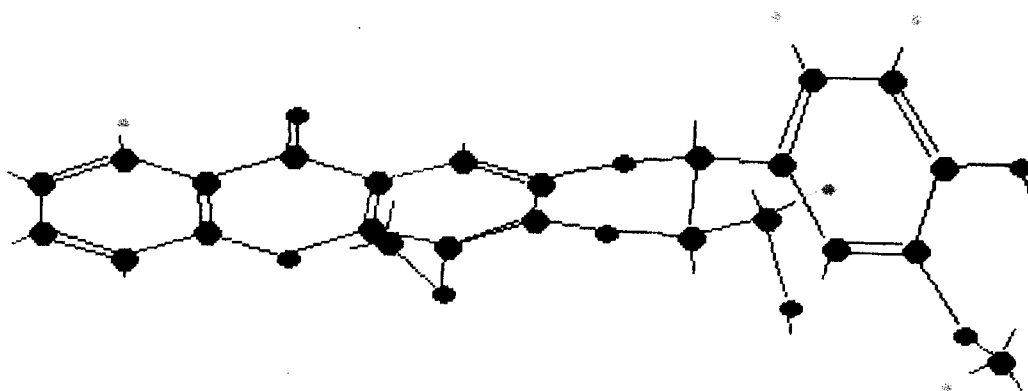
Tabela 18. Dados de RMN de ^{13}C da *trans*-kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17).

C	δ	
	(16)	(17)
C(2)	77,8	75,6
C(3)	76,9	78,9
C(1')	105,4	105,5
C(2')	141,6	141,6
C(3')	144,1*	144,1*
C(4')	136,1	136,1
C(4'a)	144,7*	144,8*
C(4'b)	155,6	155,6
C(5')	118,3	118,3
C(6')	135,1	135,1
C(7')	124,3	124,3
C(8')	125,9	125,9
C(8'a)	120,5	120,5
C(8'b)	114,8	114,8
C(9')	175,0	175,0
C(1'')	126,7	126,8
C(2'')	111,7	111,7
C(3'')	147,8	147,7
C(4'')	147,3	147,2
C(5'')	115,4	115,4
C(6'')	120,7	120,7
4'-OCH ₃	61,3	61,3
CH ₂ OH	60,0	59,9
3''-OCH ₃	55,7	55,7

*Estes valores podem ser interconvertíveis em cada coluna vertical



(16)¹



(17)¹

¹Estruturas modelizadas (programa CHEM X) dos compostos (16) e (17) que apresentam um mínimo de energia para as conformações indicadas. As estruturas foram modelizadas no vácuo. Nos modelos a correspondência das cores aos átomos é a seguinte:

vermelho \Leftrightarrow oxigénio
verde \Leftrightarrow carbono
amarelo \Leftrightarrow hidrogénio

Os desvios químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do H_A , C_A , H_B e C_B do composto (16) tal como dos $\text{H}_{A'}$, $\text{C}_{A'}$, $\text{H}_{B'}$ e $\text{C}_{B'}$ do composto (17) permitiram identificar a *trans*-kielcorina B e a *trans*-isokielcorina B.

Comparando os desvios químicos do próton H_A e carbono C_A do composto (16) com o próton $\text{H}_{A'}$ e carbono $\text{C}_{A'}$ do composto (17) verificamos que:

multiplicidade dos prótons do anel benzodioxânico	(16)		(17)	
	C_A	H_A	$\text{C}_{A'}$	$\text{H}_{A'}$
<i>m</i>	77,8	4,40	78,9	4,53
<i>d</i>	C_B 76,9	H_B 5,24	$\text{C}_{B'}$ 75,6	$\text{H}_{B'}$ 5,13

- os desvios químicos do próton $\text{H}_{A'}$ e do carbono $\text{C}_{A'}$ aparecem a valores de δ maiores do que H_A e C_A , respectivamente, o que leva a concluir que estão mais desprotegidos. Entre as duas posições (I e II) possíveis para o próton $\text{H}_{A'}$ e carbono $\text{C}_{A'}$ a posição na qual estão mais desprotegidos é na posição I devido ao o efeito de ressonância exercido pelo grupo carbonilo. Sendo assim podemos concluir que o próton $\text{H}_{A'}$ e o carbono $\text{C}_{A'}$ se encontram na posição I no composto (17) e o próton H_A e carbono C_A na posição II no composto (16).

Fazendo o mesmo raciocínio para o próton $\text{H}_{B'}$ e carbono $\text{C}_{B'}$ do composto (17) relativamente ao próton H_B a carbono C_B do composto (16) verificamos que:

- os desvios químicos do próton H_B e do carbono C_B aparecem a valores de δ a maior do que os de $\text{H}_{B'}$ e $\text{C}_{B'}$ que leva a concluir que estão mais desprotegidos. Entre as duas posições possíveis (I e II) para este próton H_B e carbono C_B a posição na qual estão mais desprotegidos

é na posição I devido ao o efeito de ressonância exercido pelo grupo carbonilo. Sendo assim podemos concluir que o próton H_B e do carbono C_B se encontram na posição I no composto (16) e o próton $H_{B'}$ e o carbono $C_{B'}$ na posição II no composto (17).

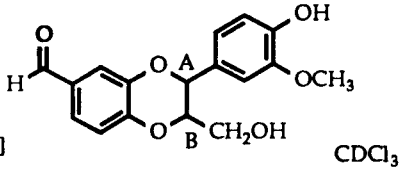
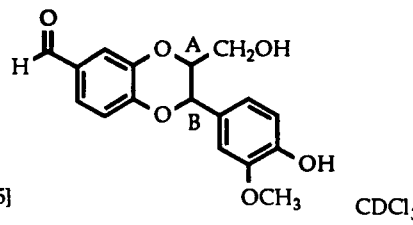
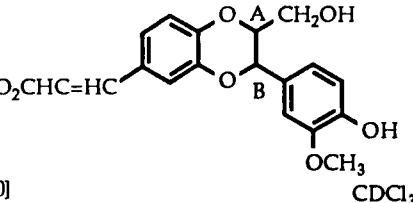
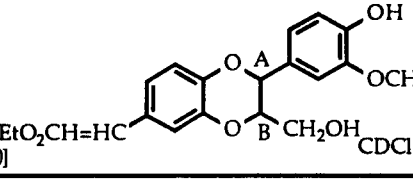
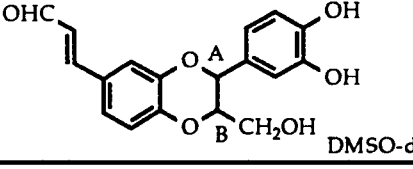
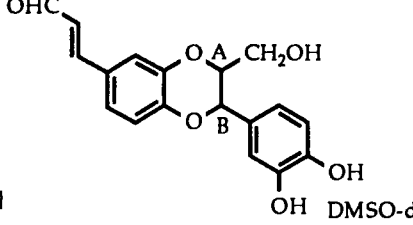
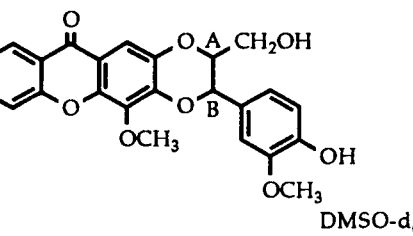
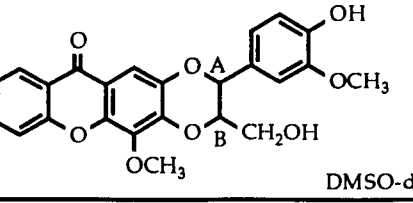
A análise dos desvios químicos de RMN de 1H e ^{13}C do H-C(2), C(2), H-C(3) e C(3) permitiu identificar a *trans*-kielcorina B (16) e a *trans*-isokielcorina B (17). Estas conclusões estão de acordo com os resultados obtidos com compostos modelo (Tabela 19, p. 99), e que possuem um anel 1,4-benzodioxânico com substituintes da mesma natureza em C(2) e C(3).

Da análise dos dados da Tabela 19, verificamos que, para todos os compostos isômeros, os desvios químicos do próton e carbono, que se encontram na posição equivalente à posição I dos compostos (16) e (17), apresentam valores de desvio químico maior do próton e carbono que se encontram na posição equivalente à posição II.

Um aspecto a referir é que os dados descritos na literatura sobre elucidação estrutural de compostos deste tipo são muito escassos, daí a dificuldade para encontrar dados de compostos modelo para comparação.

Os espectros de massa dos compostos (16) e (17) apresentam o ião molecular a m/e 436 u.m.a. e uma fragmentação comum aos dois compostos. Nas Fig 34 e Fig. 35, p. 100 e 101, apresenta-se a sequência interpretativa dos fragmentos mais representativos para os dois compostos. Após análise dos espectros de EM dos dois compostos verificamos que a fragmentação difere apenas na relação de intensidade dos picos e o pico base. No composto (16) o pico base corresponde ao ião molecular a m/e 436 u.m.a. No composto (17) o pico base corresponde a m/e 180 u.m.a.

Tabela 19. Comparação de δ dos prótons (A e B) e carbonos (A e B) do anel benzodioxânico de compostos modelo com os δ da kielcorina B (16) e isokielcorina B (17).

COMPOSTO	$^1\text{H(A)}$	$^{13}\text{C(A)}$	$^1\text{H(B)}$	$^{13}\text{C(B)}$
 <p>[145] CDCl_3</p>	4,96 (<i>d</i> , $J=8$)	—	4,0-4,1 (<i>m</i>)	—
 <p>[145] CDCl_3</p>	4,0-4,1 (<i>m</i>)	—	5,04 (<i>d</i> , $J=8$)	—
 <p>[110] CDCl_3</p>	4,08 (<i>m</i>)	78,56	4,98 (<i>d</i> , $J=8,1$)	76,33
 <p>[110] CDCl_3</p>	4,98 (<i>d</i> , $J=8,2$)	76,60	4,09 (<i>m</i>)	78,18
 <p>[85] DMSO-d_6</p>	4,85, (<i>d</i> , $J=8$)	75,7	4,14 (<i>m</i>)	78,8
 <p>[85] DMSO-d_6</p>	4,07 (<i>m</i>)	78,1	4,87 (<i>d</i> , $J=8$)	76,1
 <p>DMSO-d_6</p>	4,40 (<i>m</i>)	77,8	5,24 (<i>d</i> , $J=8,3$)	76,9
 <p>DMSO-d_6</p>	5,13 (<i>d</i> , $J=8,0$)	75,6	4,53 (<i>m</i>)	78,9

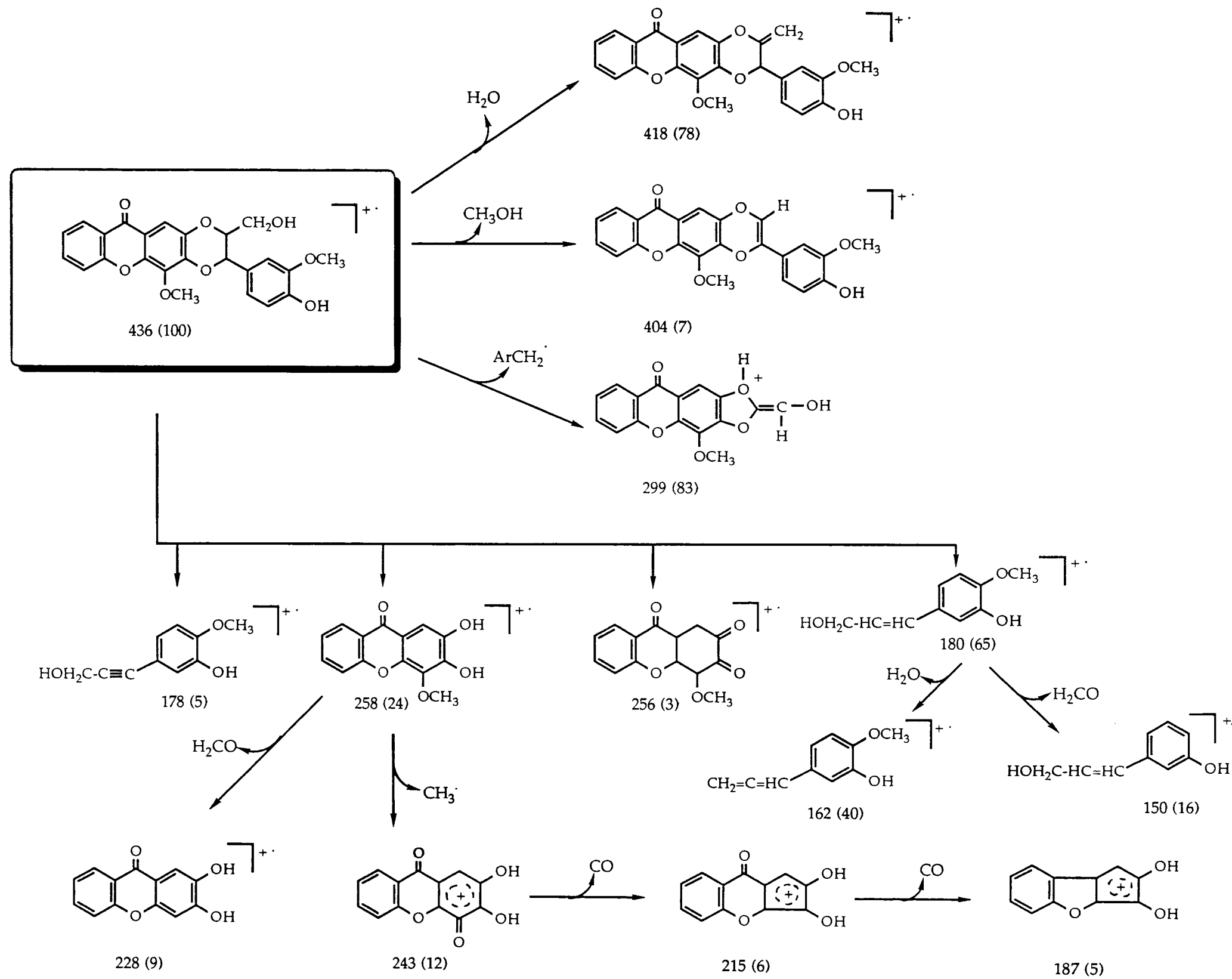


Fig. 34. Representação da sequência interpretativa dos fragmentos de massa mais representativos para o composto (16).

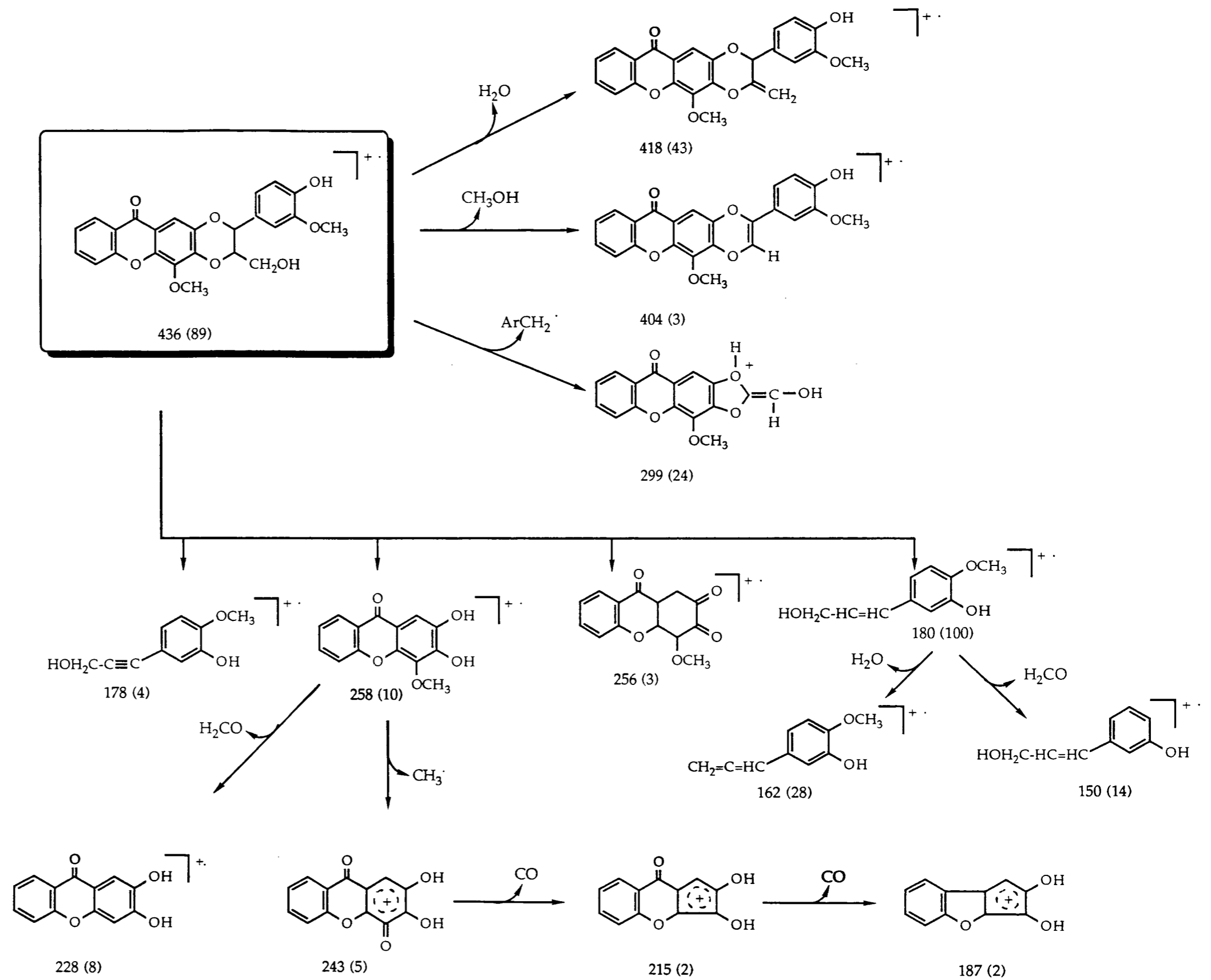
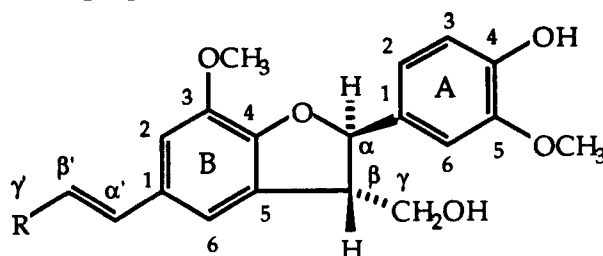


Fig. 35. Representação da sequência interpretativa dos fragmentos de massa mais representativos para o composto (17).



4.6. Fenilcumarano (18) e álcool desidrodiconiferílico (19)

A estrutura dos compostos (18) e (19) foi estabelecida por IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM (Exp., p. 148 e 149).



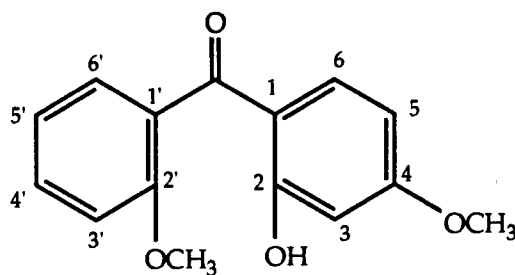
(18): R=CHO

(19): R=CH₂OH

Os dados espectroscópicos obtidos estão de acordo com os da literatura [128]. A numeração adoptada para os átomos de carbono destas moléculas foi a descrita em [128].

4.7. 2-Hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25)

A estrutura do composto (25) foi estabelecida por IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM (Exp., p. 153).



(25)

Os dados obtidos por espectrofotometria no IV para a 2-hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25) estão indicados na Tabela 20, p. 103. O

espectro do composto apresenta bandas de absorção características de vibrações de estiramento das ligações, OH, CO e C=C de anel aromático para compostos desta natureza [25, 61, 121].

Tabela 20. Dados de IV da 2-hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25).

Grupos	ν	(25)
OH		3432
C=O		1620
C=C(Ar)		1489
C=C(Ar)		1462
C=C(Ar)		1439

Os dados de RMN de ^1H do composto (25) estão evidenciados na Tabela 21, p. 104. No espectro deste composto aparecem dois singletos a δ 3,83 (3H) e δ 3,73 (3H), que correspondem aos prótons dos dois grupos OCH_3 , e um singuleto a δ 12,48 que corresponde ao próton do grupo OH .

Os desvios químicos correspondentes aos prótons dos anéis aromáticos foram assinalados com base na multiplicidade dos sinais, constantes de acoplamento e em experiências de RMN bidimensional, COSY homonuclear.

Como já foi referido para o composto (5), p. 52, estas técnicas de RMN não permitiram determinar de uma forma inequívoca qual é o desvio químico do próton H-C(3') e H-C(6'). Este problema pode ser resolvido tendo em conta que o próton H-C(6') está mais desprotegido que o próton H-C(3') devido ao efeito de ressonância e anisotrópico do

grupo carbonilo que se faz sentir no H-C(6'). Desta forma, o sinal a maior δ foi atribuído ao protão H-C(6').

A mesma situação surge no caso dos protões H-C(4') e H-C(5'), o sinal a maior δ foi atribuído ao protão H-C(4'), devido ao facto de este protão estar mais desprotegido pelo efeito de ressonância do grupo carbonilo.

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H da 2-hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25).

H	δ (25)
H-C(3)	6,55 (1H, <i>d</i> , J=2,4)
H-C(5)	6,47 (1H, <i>dd</i> , J=8,9; 2,4)
H-C(6)	7,15 (1H, <i>d</i> , J=8,9)
H-C(3')	7,19 (1H, <i>d</i> , J=8,1)
H-C(4')	7,53 (1H, <i>ddd</i> , J=8,1; 7,5; 1,7)
H-C(5')	7,08 (1H, <i>t</i> , J=7,5)
H-C(6')	7,30 (1H, <i>dd</i> , J=7,5; 1,7)
2-OH	12,48 (1H, <i>s</i>)
4-OCH ₃	3,83 (3H, <i>s</i>)
2'-OCH ₃	3,73 (3H, <i>s</i>)

O espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 22, p. 106) obtido para a 2-hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25) apresenta valores de desvio químico que estão de acordo com a estrutura proposta para este composto.

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(3) C(5), C(6), C(3') C(4'), C(5') e C(6') foram efectuados através de um

estudo bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear (HETCOR; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$).

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(1), C(2), C(4), C(1') e C(2') foram efectuados através de INEPT selectivo (Fig. 36), assim:

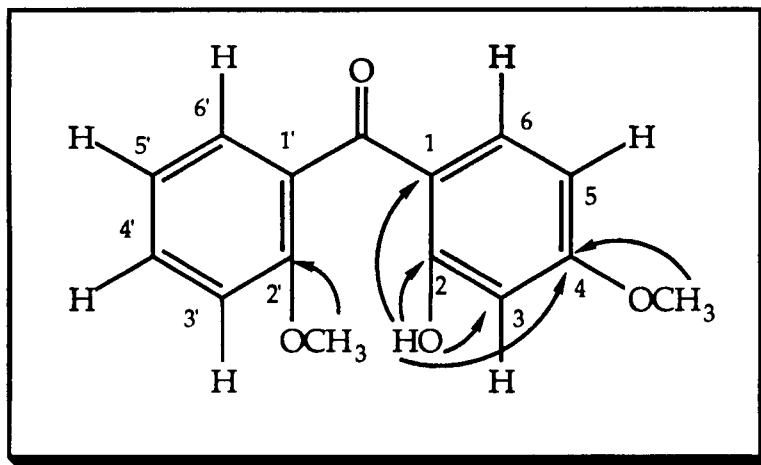


Fig. 36. Dados de INEPT selectivo do composto (25).

-irradiando o protão do grupo OH , observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(1), C(2) e C(3);

-irradiando os protões do grupo OCH_3 (δ 3,83), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4) e C(2');

-irradiando os protões do grupo OCH_3 (δ 3,73), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4) e C(2');

-irradiando o protão do grupo OH com $J=1-2$ Hz, observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(4);

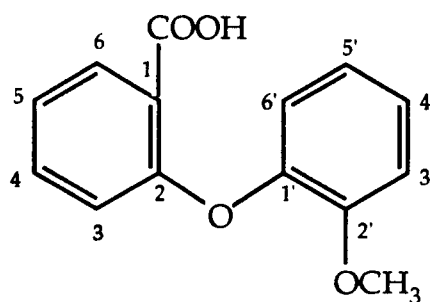
O assinalamento do desvio químico do átomo de carbono C(1') foi atribuído por exclusão.

Tabela 22. Dados de RMN de ^{13}C da 2-hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25).

C	δ (25)
C(1)	113,9
C(2)	164,6
C(3)	100,8
C(4)	166,1
C(5)	107,7
C(6)	135,2
C(1')	127,5
C(2')	155,8
C(3')	111,9
C(4')	131,8
C(5')	120,5
C(6')	128,2
$\text{C}=\text{O}$	199,7
4-O CH_3	55,9
2'-O CH_3	55,6

4.8. Ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32)

A estrutura do composto (32) foi estabelecida por IV, RMN de ^1H e ^{13}C e EM (Exp., p. 158).



(32)

Os dados obtidos por espectrofotometria no IV para do ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32) estão indicados na Tabela 23.

Da análise do espectro no IV deste composto pode deduzir-se a existência do grupo COOH através da banda de absorção 1690 cm^{-1} , característica das vibrações de estiramento da ligação CO do grupo ácido [124]. Verifica-se também a presença de bandas de absorção características de vibrações de estiramento das ligações C=C de anel aromático [129].

Tabela 23. Dados de IV da ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32).

Grupos	ν (32)
COOH	1690
C=C(Ar)	1603
C=C(Ar)	1498
C=C(Ar)	1463

Os dados de RMN de ^1H do composto (32) estão evidenciados na Tabela 24, p. 108. No espectro do composto (32) aparece um singuletos a δ 3,68 (3H) que corresponde aos protões dos grupo OCH_3 .

Os desvios químicos correspondentes aos protões dos dois aneis aromáticos foram assinalados com base na multiplicidade dos sinais, constantes de acoplamento e em experiências de RMN bidimensional, COSY homonuclear.

Tabela 24. Dados de RMN de ^1H do ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32).

H	δ (32)
H-C(3)	6,60 (1H, <i>d</i> , J=7,8)
H-C(4)	7,39 (1H, <i>ddd</i> , J=7,8; 7,6; 1,8)
H-C(5), (3') e (4')	7,18-7,07 (3H, <i>m</i>)
H-C(6)	7,73 (1H, <i>dd</i> , J=7,7; 1,8)
H-C(5') e (6')	6,95-6,85 (2H, <i>m</i>)
2'-OCH ₃	3,68 (3H, <i>s</i>)

O espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 25, p. 110) obtido para o ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32) apresenta valores de desvio químico que estão de acordo com a estrutura proposta para este composto.

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(3) C(4), C(5), C(6), C(3'), C(4'), C(5'), C(6') e OCH₃ foram efectuados através de um estudo bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear (HETCOR; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$).

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(1) C(2), C(1'), C(2') e COOH foram efectuados através de INEPT selectivo (Fig. 37, p. 109), assim:

-irradiando os prótons do grupo OCH₃, observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(2');

-irradiando H-C(6), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos COOH e C(2);

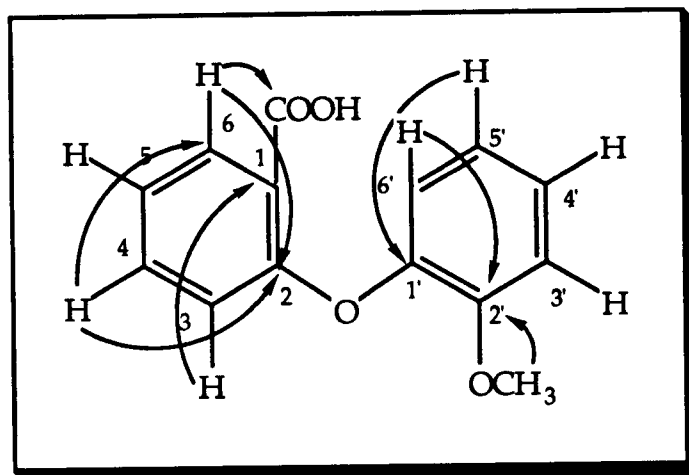


Fig. 37. Dados de INEPT selectivo do composto (32).

-irradiando H-C(4), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(6) e C(2);

-irradiando H-C(3), observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(1);

-irradiando H-C(5') e H-C(6'), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(1') e C(2').

Tabela 25. Dados de RMN de ^{13}C do ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32).

C	δ (32)
C(1)	122,9
C(2)	157,0
C(3)	117,6
C(4)	134,1
C(5)	123,2
C(6)	131,9
C(1')	144,6
C(2')	151,5
C(3')	114,1
C(4')	126,3
C(5')	122,0
C(6')	121,5
1-COOH	168,0
2'-OCH ₃	56,4

4.9. 2-Metoxixantona (22), 2-hidroxixantona (23), 3-metoxixantona (26) 3-hidroxixantona (27), 4-metoxixantona (33) e 4-hidroxixantona (34)

A estrutura destes compostos foi estabelecida por IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , e EM (Exp., p. 151, 152, 155, 156, 159 e 160).

Os dados obtidos por espectrofotometria no IV para a 2-metoxixantona (22), 2-hidroxixantona (23), 3-metoxixantona (26) 3-hidroxixantona (27), 4-metoxixantona (33) e 4-hidroxixantona (34) estão indicados na Tabela 26, p. 111. Os espectros dos compostos apresentam bandas de absorção características de vibrações de estiramento das

ligações, OH, CO, C=C de anel aromático para compostos desta natureza [24, 60].

Tabela 26. Dados de IV da 2-metoxixantona (22), 2-hidroxixantona (23), 3-metoxixantona (26), 3-hidroxixantona (27), 4-metoxixantona (33) e 4-hidroxixantona (34).

Grupos	(22)	(23)	(26)	^v (27)	(33)	(34)
OH		3220		3130		3191
C=O	1650	1615	1651	1617	1660	1640
C=C(Ar)	1614	1600	1613	1568	1601	1588
C=C(Ar)	1489	1481	1462	1483	1497	1502
C=C(Ar)	1467	1462	1434	1455	1468	1460

Da análise de dados de RMN de ¹H dos compostos (22), (26), e (33), evidenciada na Tabela 27, p. 112 e 113, verifica-se que:

Nos espectros dos compostos (22), (26), e (33) aparece em cada um singuleto a δ 3,87, 3,93 e 3,99 respectivamente, correspondentes aos prótons dos grupos OCH₃.

Nos espectros dos compostos (23), (27) e (34) aparece um sinal δ 10,00 11,00 e δ 10,50, respectivamente, que correspondem ao próton dos grupos OH.

No composto (27) o grupo OH está na posição *para* em relação ao grupo carbonilo, este próton está mais desprotegido, devido ao efeito de ressonância do grupo carbonilo, deste modo aparece a valor de δ maior.

Os valores de δ dos sinais correspondentes aos prótons do anel aromático não substituído das seis xantonas não diferem significativamente.

Tabela 27. Dados de RMN de ^1H da 2-metoxixantona (22), 2-hidroxixantona (23), 3-metoxixantona (26) e 3-hidroxixantona (27).

H	δ			
	(22)	(23)	(26)	(27)
H-C(1)	7,54 (1H, <i>d</i> , J=3,2)	7,48 (1H, <i>d</i> , J=3,0)	8,10 (1H, <i>d</i> , J=8,9)	8,04 (1H, <i>d</i> , J=8,6)
H-C(2)			7,05 (1H, <i>dd</i> , J=8,9; 2,4)	6,91 (1H, <i>dd</i> , J=8,6; 2,2)
H-C(3)	7,47 (1H, <i>dd</i> , J=9,1; 3,2)	7,32 (1H, <i>dd</i> , J=9,0; 3,0)		
H-C(4)	7,63 (1H, <i>d</i> , J=9,1)	7,56 (1H, <i>d</i> , J=9,0)	7,16 (1H, <i>d</i> , J=2,4)	6,88 (1H, <i>d</i> , J=2,2)
H-C(5)	7,64 (1H, <i>dd</i> , J=8,2; 1,0)	7,63 (1H, <i>dd</i> , J=8,2; 0,9)	7,63 (1H, <i>d</i> , J=8,0)	7,61 (1H, <i>d</i> , J=8,2)
H-C(6)	7,86 (1H, <i>ddd</i> , J=8,2; 7,4; 1,7)	7,85 (1H, <i>ddd</i> , J=8,2; 7,6; 1,7)	7,85 (1H, <i>ddd</i> , J=8,0; 7,6; 1,7)	7,82 (1H, <i>ddd</i> , J=8,2; 7,6; 1,7)
H-C(7)	7,46 (1H, <i>ddd</i> , J=7,7; 7,4; 1,0)	7,45 (1H, <i>ddd</i> , J=8,0; 7,6; 0,9)	7,47 (1H, <i>dd</i> , J=7,7; 7,6)	7,44 (1H, <i>dd</i> , J=7,9; 7,6)
H-C(8)	8,18 (1H, <i>dd</i> , J=7,7; 1,7)	8,19 (1H, <i>dd</i> , J=8,0; 1,7)	8,17 (1H, <i>dd</i> , J=7,7; 1,7)	8,15 (1H, <i>dd</i> , J=7,9; 1,7)
<u>OH</u>		10,00 (1H, <i>s</i>)		11,00 (1H, <i>s</i>)
<u>OCH₃</u>	3,87 (3H, <i>s</i>)		3,93 (3H, <i>s</i>)	

Tabela 27 (continuação). Dados de RMN de ^1H da 4-metoxixantona (33) e 4-hidroxixantona (34).

H	δ	
	(33)	(34)
H-C(1)	7,73 (1H, <i>dd</i> , J=7,9; 1,4)	7,61 (1H, <i>dd</i> , J=7,8; 1,8)
H-C(2)	7,40 (1H, <i>t</i> , J=7,9)	7,26 (1H, <i>t</i> , J=7,8)
H-C(3)	7,52 (1H, <i>dd</i> , J=7,9; 1,4)	7,34 (1H, <i>dd</i> , J=7,8; 1,8)
H-C(4)		
H-C(5)	7,72 (1H, <i>d</i> , J=8,1)	7,73 (1H, <i>dd</i> , J=8,0; 0,8)
H-C(6)	7,88 (1H, <i>dt</i> , J=8,1; 1,6)	7,88 (1H, <i>ddd</i> , J=8,0; 7,6; 1,6)
H-C(7)	7,49 (1H, <i>dd</i> , J=8,0; 7,8)	7,48 (1H, <i>ddd</i> , J=7,8; 7,6; 0,8)
H-C(8)	8,20 (1H, <i>dd</i> , J=8,0; 1,6)	8,19 (1H, <i>dd</i> , J=7,8; 1,6)
OH		10,51 (1H, <i>s</i>)
OCH_3	3,99 (3H, <i>s</i>)	

Os espectros de RMN de ^{13}C (Tabela 28, p. 119) obtidos para a 2-metoxixantona (22), 2-hidroxixantona (23), 3-metoxixantona (26), 3-hidroxixantona (27), 4-metoxixantona (33) e 4-hidroxixantona (34) apresentam valores de desvio químico que estão de acordo a estrutura proposta para estes compostos.

Os valores correspondentes aos deslocamentos químicos dos átomos de carbono do anel não substituído das seis xantonas não diferem significativamente. No entanto, foram encontradas diferenças significativas nos valores dos desvios químicos correspondentes aos carbonos do anel aromático substituído.

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos ligados a átomos de hidrogénio, foram efectuados através de um estudo bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear (HETCOR; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$).

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos quaternários foram efectuados através de INEPT selectivo (Fig. 38 - 43, p. 114, 115, 116, 117 e 118), assim:

-no caso das xantonas (22), (26), e (33) irradiando os prótons do grupo OCH_3 observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono onde se encontra ligado o grupo OCH_3 .

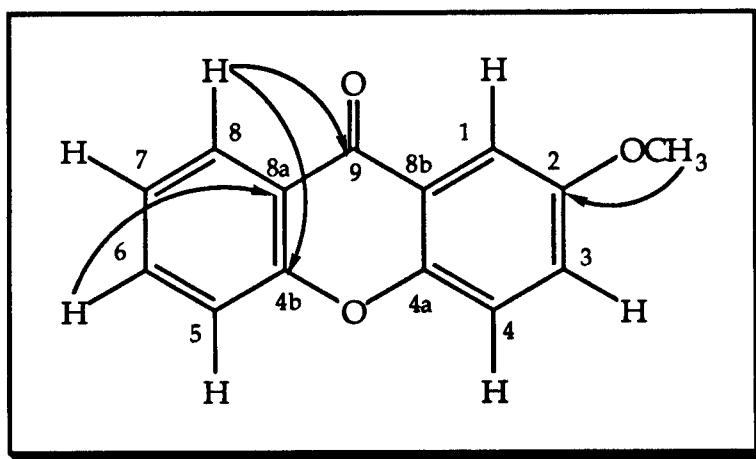


Fig. 38. Dados de INEPT selectivo do composto (22).

-no composto (22), irradiando o H-C(6) com $J=1-2$ Hz, observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(8a). Irradiando o H-C(8), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4b) e C(9). Os sinais dos carbonos correspondentes ao C(4a) e C(8b) foram atribuídos tendo em consideração que o C(4a) está mais desprotegido que o C(8b). Desta forma, o sinal a maior δ foi atribuído ao C(4a) [33].

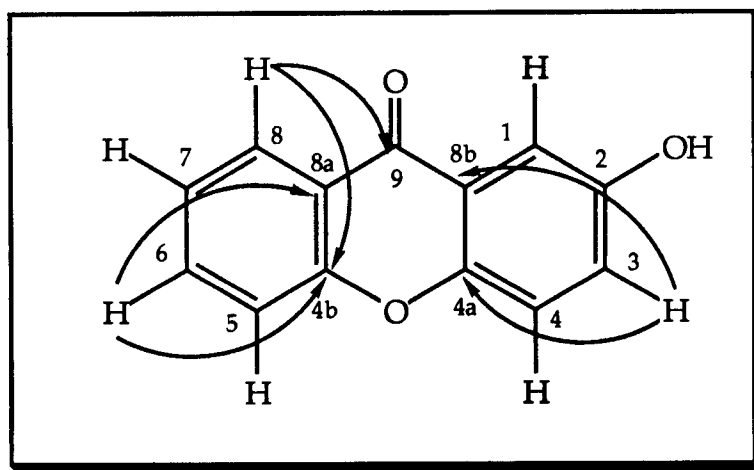


Fig. 39. Dados de INEPT selectivo do composto (23).

-no composto (23), irradiando o H-C(3) com $J=1-2$ Hz, observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(8b). Irradiando o H-C(3), observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(4a). Irradiando o H-C(6) com $J=1-2$ Hz, observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(8a). Irradiando o H-C(6) observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(4b). Irradiando o H-C(8), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4b) e C(9). O assinalamento do sinal do carbono C(2) foi efectuado por exclusão.

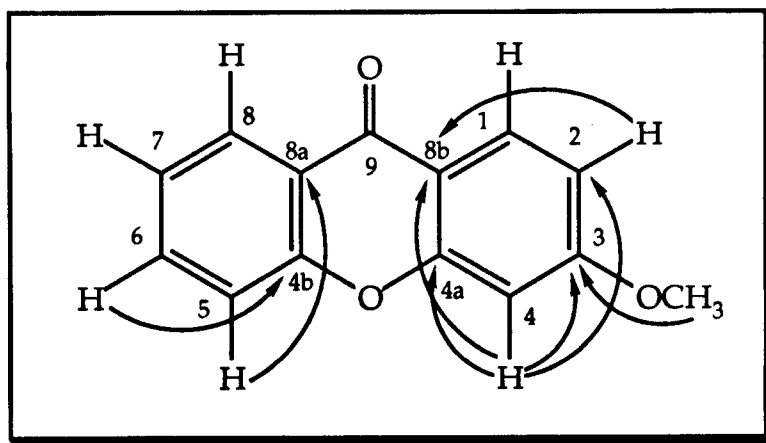


Fig. 40. Dados de INEPT selectivo do composto (26).

-no composto (26), irradiando o H-C(4) (afecta também o sinal do H-C(2)) observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(3), C(2), C(8b) e C(4a). Irradiando o H-C(5) observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(8a). Irradiando o H-C(6) observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(4b).

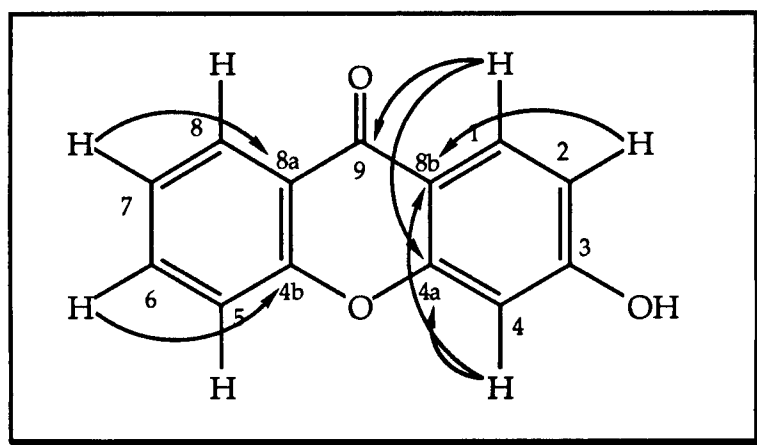


Fig. 41. Dados de INEPT selectivo do composto (27).

-no composto (27), irradiando o H-C(2) e H-C(4) observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(8b) e C(4a).

Irradiando H-C(1) observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4a) e C(9). Irradiando o H-C(7) observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(8a). Irradiando o H-C(6) observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(4b). O assinalamento do sinal correspondente ao carbono C(3) foi efectuado por exclusão.

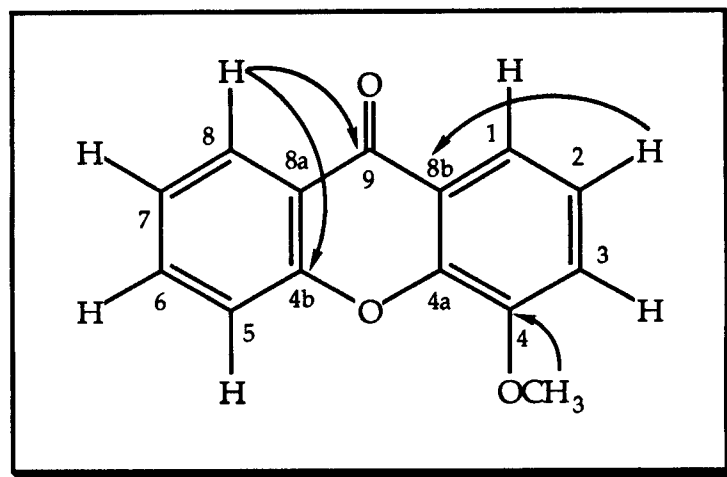


Fig. 42. Dados de INEPT selectivo do composto (33).

-no composto (33), irradiando o H-C(2) observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(8b). Irradiando o H-C(8) observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4b) e C(9). Os desvios químicos correspondentes aos C(4a) e C(8a), foram atribuídos tendo em consideração que o C(4a) está mais desprotegido que o C(8a). Desta forma, o sinal a maior δ foi atribuído ao C(4a) [33].

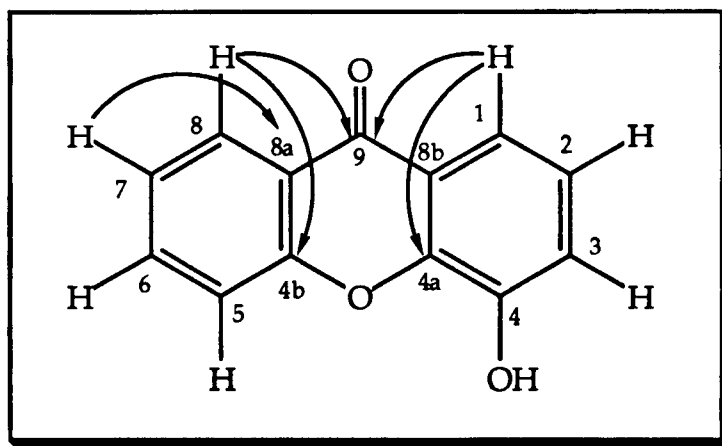


Fig. 43 Dados de INEPT selectivo do composto (34).

-no composto (34), irradiando o H-C(1) observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(9) e C(4a). Irradiando o H-C(7) observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(8a). Irradiando o H-C(8), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(4b) e C(9). Os desvios químicos dos carbonos C(4) e C(8b) foram atribuídos tendo em consideração que o C(4) está mais desprotegido que o C(8b). Desta forma, o sinal a maior δ foi atribuído ao C(4) [33].

5. Caracterização estrutural por RMN da *trans*-kielcorina (35)

Paralelamente aos estudos de RMN que realizados para a *trans*-Kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17) foram realizados os mesmos estudos para a *trans*-kielcorina (35), uma vez que os únicos dados descritos na literatura de RMN correspondem a dados de RMN de ^1H e ^{13}C [12, 7].

Os dados de RMN de ^1H estão apresentados na Tabela 29, p. 121, a atribuição dos desvios químicos correspondentes aos prótons foi realizada com base na multiplicidade dos sinais, constantes de

Tabela 28. Dados de RMN de ^{13}C da 2-metoxixantona (22), 2-hidroxixantona (23), 3-metoxixantona (26), 3-hidroxixantona (27), 4-metoxixantona (33) e 4-hidroxixantona (34).

C	δ					
	(22)	(23)	(26)	(27)	(33)	(34)
C(1)	105,7	108,5	127,6	128,0	116,4	115,2
C(2)	155,7	153,9	113,7	114,2	124,0	124,1
C(3)	124,7	124,6	165,0	164,0	116,4	120,2
C(4)	119,8	119,5	100,6	102,1	148,4	146,7
C(4a)	150,3	149,2	157,6	157,6	145,8	145,2
C(4b)	155,5	155,6	155,6	155,6	155,4	155,4
C(5)	118,2	118,2	117,9	117,9	118,4	118,3
C(6)	135,4	135,2	135,1	134,9	135,5	135,4
C(7)	124,2	124,0	124,4	124,2	124,5	124,3
C(8)	126,0	125,9	125,9	125,9	125,9	126,0
C(8a)	120,5	120,4	121,2	121,2	121,9	120,9
C(8b)	121,5	121,7	114,9	114,0	121,0	122,2
C(9)	175,8	175,9	174,9	174,8	176,0	176,2
OCH ₃	55,7		56,2		56,2	

acoplamento e em experiências de RMN bidimensional, COSY homonuclear.

O valor da constante de acoplamento do H-C(2) e H-C(3) corresponde a 7,8 Hz. A grandeza deste valor permite concluir que estes prótons se encontram na configuração *trans* [12, 13].

Esta configuração foi confirmada, tal como no caso da *trans*-kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17), através de um estudo de efeito nuclear de Overhauser (NOE). Irradiando o H-C(3) δ 4,41 observa-se um aumento de 2% da intensidade do sinal a δ 7,06 correspondente ao próton H-C(2'') e um aumento de 3% da intensidade do sinal a δ 6,91 correspondendo ao próton H-C(6''), não se observando qualquer efeito no sinal correspondente ao próton H-C(3). Estes resultados só são compatíveis com a estrutura numa configuração *trans*.

Os dados de RMN de ^{13}C estão apresentados na Tabela 30, p. 124, a atribuição dos desvios químicos correspondentes aos átomos carbonos foi realizada da seguinte forma:

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos C(2), C(3), C(1'), C(5'), C(6'), C(7'), C(8'), C(2''), C(5''), C(6''), 2'-OCH₃, e 3''-OCH₃ foram efectuados através de um estudo bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear (HETCOR; $^1\text{H}/^{13}\text{C}$).

Os assinalamentos dos sinais correspondentes aos carbonos, C(2'), C(3'), C(4'), C(4'a), C(4'b), C(8'a), C(8'b), C(1'') e C(3''), foram efectuados através de INEPT selectivo (Fig. 44, p. 122), assim:

Tabela 29. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) *trans*-kielcorina (35).

H	(35)
H-C(2)	5,08 (1H, <i>d</i> , J=7,8)
H-C(3)	4,41 (1H, <i>m</i>)
H-C(1')	7,20 (1H, <i>s</i>)
H-C(5')	7,68 (1H, <i>d</i> , J=8,1)
H-C(6')	7,85 (1H, <i>ddd</i> , J=8,1; 7,1; 1,7)
H-C(7')	7,48 (1H, <i>dd</i> , J=7,7; 7,1)
H-C(8')	8,20 (1H, <i>dd</i> , J=7,7; 1,6)
H-C(2'')	7,06 (1H, <i>d</i> , J=1,7)
H-C(5'')	6,83 (1H, <i>d</i> , J=8,1)
H-C(6'')	6,91 (1H, <i>dd</i> , J=8,1; 1,7)
2'-OCH ₃	3,86 (3H, <i>s</i>)
3''-OCH ₃	3,78 (3H, <i>s</i>)
4''-OH	9,29 (1H, <i>s</i>)
CH ₂ OH	5,14 (2H, <i>m</i>)

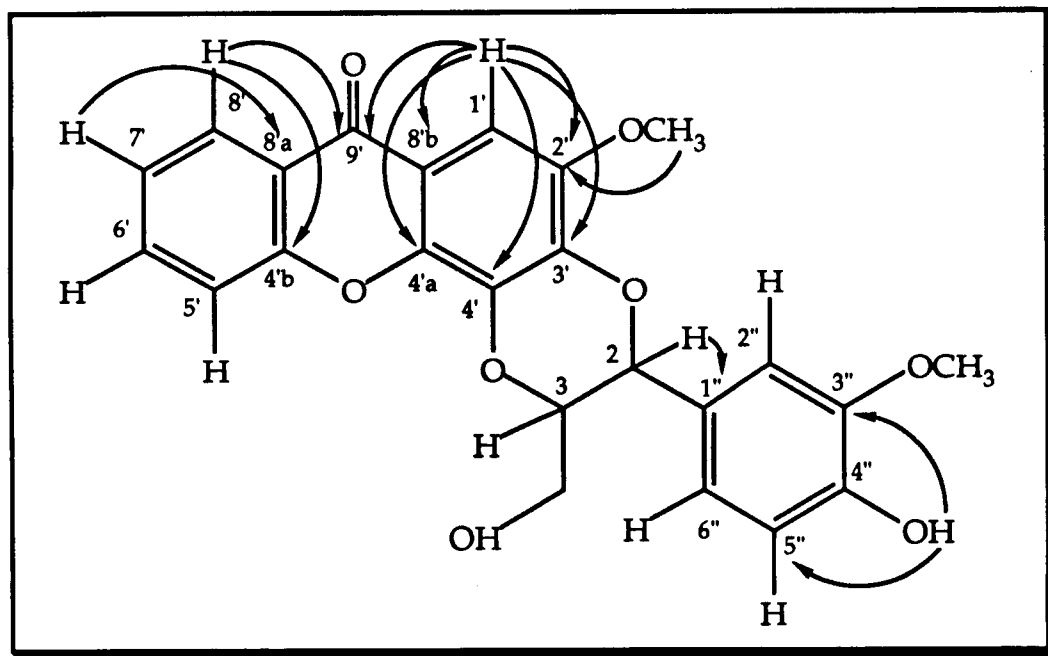


Fig. 44. Dados de INEPT selectivo do composto (35).

-irradiando o H-C(1'), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(9'), C(3') e C(4'a);

-irradiando o próton do grupo Ar-OH, observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(3'') e C(5'');

-irradiando o H-C(8'), observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(9') e C(4'b);

-irradiando o H-C(2), observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(1'');

-irradiando o H-C(7'), observa-se um aumento do sinal correspondente ao carbono C(8'a);

-irradiando o H-C(1') com $J=1-2$ Hz, observa-se um aumento dos

sinais correspondentes aos carbonos C(2'), C(4') e C(8'b);

-irradiando os prótons do grupo 2'-OCH₃, observa-se um aumento dos sinais correspondentes aos carbonos C(2').

O assinalamento do sinal do carbono CH₂OH foi efectuado através da técnica de DEPT 135°.

O desvio químico do C(4'') foi atribuído por exclusão.

Da comparação dos dados de RMN de ¹H da kielcorina (35) descritos [7, 12] com os obtidos neste estudo verificou-se que, os dados obtidos estão de acordo com os descritos.

Da comparação dos dados de RMN de ¹³C da kielcorina (35) descritos [7, 12] com os obtidos neste estudo verificou-se que, na literatura os desvios químicos atribuídos aos carbonos C(2) e C(3) se encontram trocados, sendo os valores obtidos neste estudo para C(2) δ 76,5 e para C(3) δ 77,9 e não o inverso. Como os desvios químicos dos átomos de carbono dos xantonolignóides isolados até ao momento, foram atribuídos com base nos dados descritos para a kielcorina, um aspecto a ter em consideração é a probabilidade dos desvios químicos dos referidos carbonos também estarem trocados.

Tabela 30. Dados de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 300 MHz) da *trans*-kielcorina (35).

C	δ (35)
C(2)	76,5
C(3)	77,9
C(1')	96,5
C(2')	145,9
C(3')	139,7
C(4')	132,6
C(4'a)	141,4
C(4'b)	155,4
C(5')	118,2
C(6')	135,0
C(7')	124,4
C(8')	126,0
C(8'a)	120,8
C(8'b)	114,0
C(9')	174,9
C(1'')	126,6
C(2'')	112,1
C(3'')	147,7
C(4'')	147,4
C(5'')	115,5
C(6'')	120,9
2'-OCH ₃	55,8
CH ₂ OH	59,9
3''-OCH ₃	55,8

Conclusões

III - Conclusões

A síntese biomimética da *trans*-kielcorina B (16), planeada no início deste trabalho, foi realizada com sucesso. Desta síntese resultou também um novo isómero da *trans*-kielcorina B (16) - a *trans*-isokielcorina B (17), bem como dois dímeros do álcool coniferílico.

Dos resultados obtidos a partir do estudo computacional sobre a estabilidade dos dois radicais fenóxido possíveis para a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) e para a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona, comparativamente com o radical do α -tocoferol, concluiu-se que o radical fenóxido mais estável da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) é o radical que deu origem à *trans*-isokielcorina B (17) e o da 3,4-diidroxi-2-metoxixantona é o radical fenóxido que deu origem à *trans*-kielcorina (35).

Refere-se ainda a síntese e caracterização estrutural de várias xantonas obtidas durante a síntese total da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14).

Sintetizou-se e caracterizou-se através de estudos espectroscópicos, nomeadamente de RMN, uma série de xantonas mono-substituídas em três posições possíveis do mesmo anel aromático, cujos substituintes correspondem a grupos metoxilo e hidroxilo. Verificou-se que em alguns casos os dados de RMN de ^{13}C não coincidiam com os anteriormente descritos na literatura e obtidos por metodologia menos apuradas. Os compostos obtidos podem ser importantes para correlacionar a actividade inibidora da MAO com a natureza e posicionamento dos substituintes no núcleo xantónico.

Da caracterização estrutural da *trans*-kielcorina (35), através de estudos espectroscópicos de RMN, verificou-se que os dados de RMN de ^1H estão de acordo com os descritos na literatura [7, 12], o mesmo não acontecendo com os dados de RMN de ^{13}C .

Parte Experimental

IV - Parte Experimental

1. Métodos gerais, instrumentos e materiais utilizados.....	130
2. Síntese da <i>trans</i> -kielcorina B (16) e <i>trans</i> -isokielcorina B (17).....	132
2.1. Obtenção do 1,2,3-trimetoxibenzeno (2).....	132
2.2. Obtenção do cloreto de 2-metoxibenzoílo (4).....	132
2.3. Obtenção da 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5).....	133
2.4. Obtenção da 3,4-dimetoxixantona (6).....	135
2.5. Obtenção da 4-hidroxi-3-metoxixantona (7).....	136
2.6. Obtenção da 3-hidroxi-4-metoxixantona (8).....	137
2.7. Obtenção da 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9).....	138
2.8. Obtenção da 2-carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (10).....	139
2.9. Obtenção da 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (11).....	140
2.10. Obtenção da 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12).....	142
2.11. Obtenção da 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13).....	143
2.12. Obtenção da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14).....	144
2.13. Obtenção da <i>trans</i> -kielcorina B (16) e <i>trans</i> -isokielcorina B (17).....	145
2.13.1. Fenilcumarano (18).....	148
2.13.2. Álcool desidrodiconiferílico (19).....	149
3. Síntese da 2-metoxixantona (22).....	150
3.1. Obtenção da 2-hidroxi-2',5-dimetoxibenzofenona (21).....	150
3.2. Obtenção da 2-metoxixantona (22).....	151
4. Síntese da 2-hidroxixantona (23).....	152
5. Síntese da 3-metoxixantona (26).....	153
5.1. Obtenção da 2-hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25).....	153

5.2. Obtenção da 3-metoxixantona (26).....	155
6. Síntese da 3-hidroxixantona (27).....	156
7. Síntese da 4-metoxixantona (33).....	157
7.1. Obtenção do sal sódico do ácido 2-clorobenzóico (29).....	157
7.2. Obtenção do sal sódico do 2-metoxifenol (31).....	157
7.3. Obtenção do ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32).....	158
7.4. Obtenção da 4-metoxixantona (33).....	159
8. Síntese da 4-hidroxixantona (34).....	160

1. Métodos gerais, instrumentos e materiais utilizados

1.1. Os critérios de pureza adoptados foram a nitidez e constância do PF e a observação de uma única mancha em CCF, fazendo variar a fase móvel.

1.2. Os pontos de fusão foram determinados em microscópio de Köfler e não foram corrigidos.

1.3. Nas purificações por CC usou-se como fase estacionária gele de sílica 60 (0,2-0,5 mm, Merck). As fases móveis usadas são referidas em cada síntese, mencionando no caso de mistura de solventes a proporção volumétrica dos vários componentes.

1.4. A evolução das reacções foi acompanhada por CCF usando como fase estacionária gele de sílica 60 (GF254, Merck) com uma espessura de 0,25 mm. As cromatografias preparativas foram realizadas com a fase estacionária referida anteriormente e com espessura de 0,50 mm. As fases móveis são referidas em cada síntese, mencionando no caso de mistura de solventes a proporção volumétrica dos vários componentes.

1.5. As revelações cromatográficas foram efectuadas por acção da luz ultravioleta de 254 e 366 nm e/ou vapores de iodo.

1.6. A verificação da pureza dos reagentes foi efectuada por análise comparativa dos valores experimentais de PF e IV e os descritos na literatura.

1.7. Os solventes foram evaporados com auxílio de pressão reduzida, usando um evaporador rotativo "Büchi".

1.8. Os espectros no infravermelho foram registados em espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo 257 ou num espectrofotómetro ATI Mattson Genesis Series FTIR. Utilizaram-se

pastilhas de brometo de potássio (Uvasol, Merck) contendo aproximadamente 1% de amostra, ou filmes entre pastilhas de cloreto de sódio.

1.9. Os espectros de massa foram registados em espectrómetro Hitachi Perkin-Elmer, RMU-6M (impacto electrónico) e foram referidos em m/e (% dos fragmentos).

1.10. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram efectuados em aparelho Bruker AMX 300.

No caso dos espectros de protão indica-se o desvio químico (δ , ppm), o número de protões, a multiplicidade e a(s) constante(s) de acoplamento (J, Hz).

No caso dos espectros de carbono indica-se o desvio químico (δ , ppm).

Os solventes usados para RMN foram CDCl_3 (Stohler Isotope Chemicals) e DMSO-d_6 (Uvasol, Merck), com grau de deuteração superior a 99,0%.

1.11. As pesagens foram efectuadas em balança Mettler AE 163.

1.12. Os solventes e reagentes utilizados foram produtos *pro analysi* ou "para síntese", das firmas Merck, Aldrich e Sigma.

1.13. Os solventes (éter etílico e benzeno) foram desidratados com fita de sódio e depois destilados sobre sódio metálico usando a benzofenona como indicador. O processo foi acelerado com auxílio de ultra-sons [130-133].

1.14. O cloreto de tionilo foi purificado antes da utilização de acordo com a técnica descrita em [134].

1.15. O ácido *meta*-cloroperbenzóico foi purificado antes da utilização de acordo com a técnica descrita em [135].

2. Síntese da *trans*-kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17)

2.1. Obtenção do 1,2,3-trimetoxibenzeno (2)

[7]

Dissolveu-se o 1,2,3-triidroxibenzeno (1) (10,0 g, 79 mmol) em acetona anidra (150 ml). Adicionou-se à solução o carbonato de potássio anidro (30,1 g, 218 mmol) e, seguidamente o sulfato de metilo (12 ml, 126 mmol). Aqueceu-se a refluxo, com agitação magnética, durante 24 horas. Após reacção, filtrou-se a suspensão, lavou-se o resíduo com acetona e evaporou-se o solvente. O resíduo obtido foi dissolvido em éter etílico (100 ml), e lavado sucessivamente com hidróxido de sódio a 5% (3 x 70 ml) e água (3 x 50 ml). Após desidratação com sulfato de sódio anidro evaporou-se o solvente obtendo-se um resíduo oleoso, castanho escuro. O resíduo foi purificado por CC (gele de sílica, clorofórmio). As fracções contendo predominantemente o 1,2,3-trimetoxibenzeno (2) foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo foi cristalizado do metanol aq., obtendo-se cristais brancos de 1,2,3-trimetoxibenzeno (2) (6,9 g, 52%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, clorofórmio/éter do petróleo 8:2).

PF: 39-40 °C, (lit. [136], 47 °C, etanol aq.).

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 1600, 1475, 1300, 1255, 1170, 1110, 1000, 775, 735.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 6,64 (2H, *d*, J=8,5 Hz, H-C(4) e H-C(6)), 6,98 (1H, *dd*, J=8,5; 8,1 Hz, H-C(5)), 3,76 (6H, *s*, OCH₃), 3,66 (3H, *s*, OCH₃).

2.2. Obtenção do cloreto de 2-metoxibenzoílo (4)

[7]

Dissolveu-se o cloreto de tionilo (10 ml, 16,4 g, 138 mmol) em

benzeno anidro (17 ml) e aqueceu-se a solução a refluxo. Seguidamente adicionou-se o ácido 2-metoxibenzóico (**3**) (10,0 g, 66 mmol) em porções de cerca de 1 g, intervaladas de 20 minutos. Após a última adição juntou-se ao meio reaccional cloreto de tionilo (15 ml) e manteve-se o aquecimento durante 30 minutos. Após a reacção, evaporou-se o solvente e o excesso de reagente obtendo-se um resíduo oleoso amarelado o qual foi usado, sem purificação posterior, na reacção seguinte (11,0 g, 98%).

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (NaCl): 1780, 1600, 1480, 1435, 1285, 1260, 1165, 1020, 860, 755.

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ : 7,95 (1H, *dd*, J=7,9; 1,7 Hz, H-C(6)), 7,47 (1H, *ddd*, J=7,9; 7,3; 1,7 Hz, H-C(4)), 6,96-6,88 (2H, *m*, H-C(3) e H-C(5)), 3,78 (3H, *s*, OCH₃).

Os dados de RMN de ¹H obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [7].

EM: 170 (7, [M]⁺), 135 (100), 136 (7), 120 (3), 92 (16), 78 (5), 77 (32), 64 (5), 63 (7), 51 (5), 50 (4).

2.3. Obtenção da 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (**5**) [102]

Dissolveu-se o cloreto de 2-metoxibenzoílo (**4**) (9,2 g, 54 mmol) e o 1,2,3-trimetoxibenzeno (**2**) (10,0 g, 60 mmol) em éter etílico anidro (435 ml) e adicionou-se, rapidamente, o cloreto de alumínio anidro (29,0 g, 219 mmol). A mistura reaccional foi mantida à temperatura ambiente, com agitação magnética, durante 22 horas. Após evaporação do solvente obteve-se um resíduo viscoso o qual foi vertido em gelo picado (200 g). A suspensão obtida foi acidificada com ácido clorídrico a 10% e extraída com benzeno (3 x 100 ml). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com água (3 x 100 ml) e desidratadas com sulfato de magnésio anidro. O resíduo oleoso obtido, após evaporação do

solvente, foi purificado por CC (gele de sílica, éter do petróleo (60-80 °C)/clorofórmio em várias proporções). As fracções contendo predominantemente a benzofenona pretendida (5) foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo foi cristalizado do éter do petróleo (60-80 °C)/clorofórmio obtendo-se cristais levemente amarelados de 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5) (10,1 g, 65%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, clorofórmio/éter do petróleo 4:6 e éter do petróleo/acetato de etilo/ácido fórmico 8:2:0,1).

PF: 120-121 °C.

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3450, 1625, 1600, 1500, 1465, 1450, 1440, 1420, 1340, 1290, 1275, 1250, 1100, 980, 800, 750.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 12,18 (1H, s, OH), 7,53 (1H, ddd, J=8,5; 7,0; 1,7 Hz, H-C(4')), 7,30 (1H, dd, J=7,6; 1,7 Hz, H-C(6')), 7,19 (1H, d, J=8,5 Hz, H-C(3')), 7,08 (1H, ddd, J=7,6; 7,0; 0,8 Hz, H-C(5')), 7,01 (1H, d, J=9,1 Hz, H-C(6)), 6,65 (1H, d, J=9,1 Hz, H-C(5)), 3,86 (3H, s, OCH₃), 3,74 (6H, s, OCH₃).

Os dados de RMN ¹H obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [60].

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 200,3 (C=O), 158,7 C(4), 156,1 C(2), 155,8 C(2'), 135,6 C(3), 131,8 C(4'), 129,9 C(6), 128,2 C(6'), 127,6 C(1'), 120,5 C(5'), 115,3 C(1), 111,9 C(3'), 104,0 C(5), 59,9 (OCH₃), 56,2 (OCH₃), 55,6 (OCH₃).

EM: 290 (3, [M+2]⁺), 289 (18, [M+1]⁺), 288 (100, [M]⁺), 287 (4), 273 (6), 270 (5), 258 (17), 257 (94), 255 (5), 242 (5), 241 (3), 227 (3), 213 (5), 182 (3), 181 (31), 180 (39), 179 (9), 165 (12), 153 (6), 152 (56), 151 (15), 149 (5), 148 (3), 144 (8), 138 (4), 137 (33), 136 (10), 135 (78), 134 (4), 131 (4), 123 (8), 122 (8), 121 (18), 120 (17), 115 (8), 109 (6), 108 (4), 107 (5), 105 (4), 95 (7), 94 (4), 93 (6), 92 (20), 79 (4), 78 (5), 77 (33), 76 (5), 75 (3), 67 (4), 66 (4), 65 (8), 64 (6), 63 (8), 53 (7).

2.4. Obtenção da 3,4-dimetoxixantona (6)

[102]

Dissolveu-se a 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5) (176,1 mg, 0,61 mmol) numa mistura de metanol (3 ml), água (2 ml) e hidróxido de sódio (0,6 g). Aqueceu-se a refluxo, com agitação magnética, durante 14 horas. Após repouso durante uma noite, no frigorífico, formou-se um sólido cristalino que foi separado por filtração, lavado com metanol e seco. O sólido foi recristalizado do metanol, obtendo-se cristais brancos de 3,4-dimetoxixantona (6) (95,0 mg, 61%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/acetato de etilo 7:3).

PF: 156-158 °C (lit. [137, 138], 158-159 °C, éter do petróleo).

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 1660, 1605, 1510, 1455, 1290, 1225, 1090, 750, 690.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 8,16 (1H, *dd*, J=7,9; 1,7 Hz, H-C(8)), 7,94 (1H, *d*, J=9,0 Hz, H-C(1)), 7,85 (1H, *ddd*, J=8,1; 7,5; 1,7 Hz, H-C(6)), 7,69 (1H, *d*, J=8,1 Hz, H-C(5)), 7,47 (1H, *dd*, J=7,9; 7,5 Hz, H-C(7)), 7,26 (1H, *d*, J=9,0 Hz, H-C(2)), 3,97 (3H, *s*, 3-OCH₃), 3,92 (3H, *s*, 4-OCH₃).

Os dados de RMN ¹H obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [60].

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 175,3 C(9), 157,5 C(3), 155,6 C(4b), 149,9 C(4a), 135,9 C(4), 135,2 C(6), 125,9 C(8), 124,4 C(7), 121,7 C(1), 120,8 C(8a), 118,2 C(5), 115,9 C(8b), 109,7 C(2), 60,9 (4-OCH₃), 56,1 (3-OCH₃).

Os dados de RMN ¹³C obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [60], excepto a atribuição efectuada para C(3) e C(4b), os quais estão descritos com valores de δ trocados entre si.

EM: 258 (2, [M+2]⁺), 257 (18, [M+1]⁺), 256 (100, [M]⁺), 242 (8), 241 (43), 214 (4), 213 (24), 185 (5), 170 (16), 139 (3), 128 (4), 114 (11), 113 (3), 76 (6).

2.5. Obtenção da 4-hidroxi-3-metoxixantona (7)

[103]

Dissolveu-se a 3,4-dimetoxixantona (6) (500,2 mg, 2 mmol) em benzeno anidro (40 ml) e adicionou-se, rapidamente, o cloreto de alumínio anidro (783,2 mg, 6 mmol). A mistura foi aquecida a 70 °C, com agitação magnética, durante 40 minutos. Após reacção adicionou-se ao meio reaccional ácido clorídrico 5N (100 ml), e extraíu-se com éter etílico (3 x 80 ml). As fases éteres foram reunidas e extraídas com carbonato de sódio a 10% (3 x 100 ml). As fases aquosas alcalinas foram reunidas e acidificadas com ácido clorídrico conc.. O sólido formado foi separado por centrifugação, lavado com água e seco. Recristalizou-se do clorofórmio obtendo-se cristais brancos de 4-hidroxi-3-metoxixantona (7) (170,1 mg, 36%).

A fase éterea inicial, após extracção com o carbonato de sódio a 10%, foi lavada com água (3 x 80 ml) e desidratada com sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente, recuperou-se o material de partida (6) que não reagiu (206 mg).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/acetato de etilo 7:3 e 5:5).

PF: 194-196 °C.

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3250, 1630, 1605, 1465, 1450, 1330, 1280, 1225, 1080, 900, 750.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 9,66 (1H, s, 4-OH), 8,16 (1H, dd, J=7,8; 1,7 Hz, H-C(8)), 7,84 (1H, ddd, J=8,3; 7,6; 1,7 Hz, H-C(6)), 7,68 (1H, d, J=9,0 Hz, H-C(1)), 7,65 (1H, dd, J=8,3; 1,0 Hz, H-C(5)), 7,44 (1H, ddd, J=7,8; 7,6; 1,0 Hz, H-C(7)), 7,19 (1H, d, J=9,0 Hz, H-C(2)) 3,96 (3H, s, 3-OCH₃).

RNM ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 175,6 C(9), 155,7 C(4b), 152,5 C(3), 145,5 C(4a), 135,1 C(6), 134,1 C(4), 126,0 C(8), 124,1 C(7), 120,8 C(8a), 118,1 C(5), 116,3 C(1), 115,9 C(8b), 109,0 C(2), 56,4 (3-OCH₃).

EM: 244 (2, [M+2]⁺), 243 (17, [M+1]⁺), 242 (100, [M]⁺), 228 (4), 227 (28), 213 (3), 199 (14), 171 (11), 121 (4), 115 (9).

2.6. Obtenção da 3-hidroxi-4-metoxixantona (8)

[102]

Dissolveu-se a 2-hidroxi-2',3,4-trimetoxibenzofenona (5) (5,3 g, 18 mmol) em piperidina (64 ml, 65 mmol) e água (53 ml). A mistura reaccional foi aquecida a refluxo, com agitação magnética, durante 47 horas. Adicionou-se à mistura reaccional ácido clorídrico 4N (200 ml) e extraíu-se com diclorometano (3 x 100 ml). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com água (3 x 100 ml) e desidratadas com sulfato de magnésio anidro. O sólido acinzentado obtido (4,5 g) após evaporação do solvente foi controlado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo (40-60 °C)/ acetato de etilo 5:5), verificando-se predominantemente a presença das xantonas (6), (7) e de outro composto. O resíduo foi purificado por CC (gele de sílica, éter do petróleo (60-80 °C)/acetato de etilo em várias proporções), em fracções de 20 ml.

As fracções 20-24, as quais continham predominantemente a xantona (6), foram reunidas. Após evaporação do solvente, obteve-se a 3,4-dimetoxixantona (6) (390 mg, 8%) (Exp., p. 135).

As fracções 32-41, as quais continham predominantemente um outro composto foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo foi recristalizado do clorofórmio, obtendo-se cristais brancos de 3-hidroxi-4-metoxixantona (8) (2,1 g, 48%).

As fracções 45-52, as quais continham predominantemente a xantona (7), foram reunidas. Após evaporação do solvente obteve-se a 4-hidroxi-3-metoxixantona (7) (1,7 g, 38%) (Exp., p. 136).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/acetato de etilo 7:3 e 5:5).

PF: 221-222 °C (lit. [137], 220-221 °C, éter do petróleo, lit. [138], 218-220 °C, acetona).

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3220, 1640, 1595, 1470, 1450, 1435, 1340, 1230, 1200, 1070, 1020, 745, 690.

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10,79 (1H, *s*, 3-OH), 8,16 (1H, *dd*, $J=7,7; 1,7$ Hz, H-C(8)), 7,84 (1H, *ddd*, $J=8,1; 7,6; 1,7$ Hz, H-C(6)), 7,80 (1H, *d*, $J=8,9$ Hz, H-C(1)), 7,69 (1H, *dd*, $J= 8,1; 1,0$ Hz, H-C(5)), 7,46 (1H, *ddd*, $J=7,7; 7,6; 1,0$ Hz, H-C(7)), 7,00 (1H, *d*, $J=8,9$ Hz, H-C(2)), 3,92 (3H, *s*, 4-OCH $_3$).

Os dados de RMN ^1H obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [137].

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,47 MHz) δ : 175,0 C(9), 156,3 C(3), 155,5 C(4b), 150,7 C(4a), 135,0 C(6), 134,6 C(4), 125,9 C(8), 124,3 C(7), 121,6 C(1), 120,9 C(8a), 118,2 C(5), 114,8 C(8b), 114,1 C(2), 60,9 (4-OCH $_3$).

EM: 244 (2, $[\text{M}+2]^+$), 243 (15, $[\text{M}+1]^+$), 242 (100, $[\text{M}]^+$), 228 (16), 227 (76), 213 (4), 200 (3), 199 (18), 171 (14), 121 (6), 115 (13), 114 (4).

2.7. Obtenção da 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9) [103]

Dissolveu-se a 3-hidroxi-4-metoxixantona (8) (703,2 mg, 3 mmol) e a hexametilenotetramina (2,8 g, 20 mmol) em ácido acético a 96% (62 ml). A mistura reaccional foi aquecida a 100 $^\circ\text{C}$, com agitação magnética, durante 33 horas. Após reacção adicionou-se à mistura reaccional ácido clorídrico a 15% (40 ml) e aqueceu-se a refluxo, durante 15 minutos. A mistura reaccional foi vertida em gelo picado (100 g) e deixou-se em repouso, no frigorífico, durante 24 horas. O produto formado (550 mg) foi separado por filtração, lavado com água e seco.

O controlo analítico do produto bruto efectuado por CCF (gele de sílica, acetato de etilo), revelou a presença do produto de partida e de outro composto. O produto foi purificado por CC (gele de sílica, éter do petróleo (40-60 $^\circ\text{C}$) e acetato de etilo em várias proporções).

Com a fase móvel (éter do petróleo/acetato de etilo 7:3) foram obtidas as fracções as quais continham o produto de partida. Estas foram reunidas e o solvente evaporado, recuperando-se a 3-hidroxi-4-metoxixantona (8) (162 mg).

Com a fase móvel (éter do petróleo/acetato de etilo 5:5) foram obtidas as fracções que continham outro composto. Estas foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo foi recristalizado do acetato de etilo, obtendo-se cristais ligeiramente amarelados de 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (**9**) (223,3 mg, 28%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/acetato de etilo 7:3 e 5:5).

PF: 215-218 °C.

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3450, 1740, 1660, 1610, 1480, 1465, 1385, 1335, 1280, 1130, 950, 740.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 10,30 (1H, s, 2-CHO), 10,51 (1H, s, 3-OH), 8,30 (1H, s, H-C(1)), 8,16 (1H, dd, J=7,8; 1,5 Hz, H-C(8)), 7,89 (1H, ddd, J=8,2; 7,4; 1,5 Hz, H-C(6)), 7,73 (1H, d, J=8,2 Hz, H-C(5)), 7,50 (1H, dd, J=7,8; 7,4 Hz, H-C(7)), 3,99 (1H, s, 4-OCH₃).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 190,8 (CHO), 175,1 C(9), 157,7 C(3), 155,4 C(4b), 153,7 C(4a), 135,7 C(6), 135,4 C(4), 126,0 C(8), 125,0 C(7), 123,3 C(1), 120,8 C(8a), 120,6 C(2), 118,4 C(5), 114,9 C(8b), 61,5 (OCH₃).

EM: 272 (2, [M+2]⁺), 271 (13, [M+1]⁺), 270 (77, [M]⁺), 269 (8), 256 (5), 255 (17), 252 (2), 243 (5), 242 (29), 241 (6), 240 (5), 239 (4), 228 (9), 227 (54), 225 (5), 224 (21), 211 (2), 199 (9), 194 (2), 183 (1), 171 (10), 131 (4), 125 (17), 124 (5), 123 (3), 88 (11), 85 (62), 83 (100), 82 (4), 77 (6), 76 (7), 63 (5).

2.8. Obtenção da 2-carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (**10**) [103]

Dissolveu-se a 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (**9**) (400,1 mg, 1,5 mmol) em hidróxido de tetrametilamónio a 10% (70 ml). Adicionou-se à solução peróxido de hidrogénio a 6% (8 ml, 14 mmol). A mistura reaccional foi aquecida a 50 °C, com agitação magnética,

durante 2 horas. Após reacção, acidificou-se a mistura com ácido sulfúrico a 20% ocorrendo a formação de um sólido. A suspensão obtida foi filtrada e o sólido lavado com água e seco. Recristalizou-se do metanol, obtendo-se cristais amarelo claro de 2-carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (**10**) (265,0 mg, 63%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, acetato de etilo, diclorometano/éter etílico 8:2 e clorofórmio/acetona/ácido fórmico 5:5:0,1).

PF: 245-250 °C.

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 1680, 1635, 1600, 1485, 1465, 1415, 1450, 1350, 1280, 1210, 1120, 1065, 880, 760.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 8,39 (1H, s, H-C(1)), 8,24 (1H, s, 3-OH), 8,15 (1H, dd, J=7,7; 1,6 Hz, H-C(8)), 7,86 (1H, ddd, J=7,9; 7,6; 1,6 Hz, H-C(6)), 7,67 (1H, d, J=7,9 Hz, H-C(5)), 7,48 (1H, dd, J=7,7; 7,6 Hz, H-C(7)), 3,96 (3H, s, 4-OCH₃).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 175,2 C(9), 171,2 (2-COOH), 159,6 C(3), 155,6 C(4b), 152,9 C(4a), 135,7 C(6), 135,2 C(4), 126,1 C(8), 124,9 C(7), 123,7 C(1), 120,9 C(8a), 118,4 C(5), 113,9¹ C(8b), 112,4¹ C(2) 60,9 (4-OCH₃).

EM: 288 (2, [M+2]⁺), 287 (12, [M+1]⁺), 286 (76, [M]⁺), 269 (16), 268 (90), 267 (16), 254 (7), 253 (20), 242 (5), 241 (15), 240 (100), 239 (52), 238 (25), 226 (9), 225 (48), 212 (2), 211(5), 210 (14), 194 (4), 182 (2), 169 (5), 141 (6), 134 (9), 126 (4), 125 (4), 121 (3), 120 (4), 114 (8), 113 (34), 105 (7), 104 (5), 93 (3), 92 (5), 91 (3), 77 (13), 76 (11), 63 (10), 53 (11).

2.9. Obtenção da 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (**11**)

[7]

Dissolveu-se a 2-carboxi-3-hidroxi-4-metoxixantona (**10**) (65,3 mg, 0,23 mmol) em anidrido acético (8 ml) e piridina (10 gotas). A mistura

¹Estes valores podem ser interconvertíveis

reaccional foi deixada em repouso, durante 4 dias, à temperatura ambiente. A solução foi vertida em gelo picado (50 g) e a suspensão obtida extraída com clorofórmio (3 x 50 ml). As fases orgânicas foram reunidas, extraídas com ácido clorídrico a 10 %, até eliminação completa da piridina residual, lavadas com água (3 x 50 ml) e desidratadas com sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente obteve-se um resíduo sólido. O produto foi cristalizado do éter do petróleo (40-60 °C)/etanol obtendo-se cristais amarelo claro de 3-acetoxi-2-carboxi-4-metoxixantona (11) (63,1 mg, 84%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, acetato de etilo).

PF: 192-196 °C.

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 1765, 1725, 1640, 1600, 1480, 1470, 1370, 1320, 1270, 1190, 1050, 900.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 8,41 (1H, *s*, H-C(1)), 8,16 (1H, *dd*, J=7,7; 1,7 Hz, H-C(8)), 7,87 (1H, *ddd*, J=7,8; 7,6; 1,7 Hz, H-C(6)), 7,70 (1H, *d*, J=7,8 Hz, H-C(5)), 7,49 (1H, *dd*, J=7,7; 7,6 Hz, H-C(7)), 3,97 (3H, *s*, 4-OCH₃), 1,91 (3H, *s*, OCOCH₃).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 175,2 C(9), 172,1 (OCOCH₃), 171,2 (COOH), 159,4 C(3), 155,5 C(4b), 152,9 C(4a), 135,7 C(6), 135,2 C(4), 126,1 C(8), 124,9 C(7), 123,7 C(1), 120,8 C(8a), 118,4 C(5), 113,9² C(8b), 112,4² C(2), 60,9 (4-OCH₃), 21,1 (OCOCH₃).

EM: 328 (2, [M]⁺), 314 (4), 287 (7), 286 (41), 282 (4), 270 (5), 269 (28), 268 (100), 267 (11), 254 (9), 253 (10), 242 (5), 241 (13), 240 (73), 239 (27), 238 (13), 227 (3), 226 (7), 225 (24), 212 (2), 211 (4), 210 (8), 182 (2), 170 (4), 134 (12), 113 (17), 97 (14), 83 (20).

²Estes valores podem ser interconvertíveis

2.10. Obtenção da 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12) [75]

Dissolveu-se a 2-formil-3-hidroxi-4-metoxixantona (9) (1,6 g, 6 mmol) em dimetilformamida anidra (60 ml) [139]. Adicionou-se à solução o carbonato de potássio anidro (2,9 g, 21 mmol) e o cloreto de benzilo (1,3 ml, 1,4 g, 11 mmol). A mistura reaccional foi aquecida a 140 °C, com agitação magnética, durante 5 horas. Após arrefecimento a solução foi vertida em gelo picado (100 g). O sólido formado foi separado por filtração, lavado com água e seco. Recristalizou-se do metanol/clorofórmio obtendo-se cristais amarelos de 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12) (1,2 g, 55%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/acetato de etilo 5:5, 8:2 e clorofórmio).

PF:165-168 °C.

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 1695, 1670, 1600, 1480, 1460, 1440, 1310, 1280, 1260, 1220, 905, 790, 745, 695.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 10,15 (1H, *s*, 2-CHO), 8,24 (1H, *s*, H-C(1)), 8,18 (1H, *dd*, J=7,7; 1,6 Hz, H-C(8)), 7,93 (1H, *ddd*, J=8,1; 7,3; 1,6 Hz, H-C(6)), 7,78 (1H, *dd*, J=8,1; 0,8 Hz, H-C(5)), 7,54 (1H, *ddd*, J=7,7; 7,3; 0,8 Hz, H-C(7)), 7,50 (2H, *dd*, J=7,6; 1,9 Hz, H-C(2') e H-C(6')), 7,44-7,36 (3H, *m*, H-C(3'), H-C(4') e H-C(5')), 5,42 (2H, *s*, 3-OCH₂Ar), 4,12 (3H, *s*, 4-OCH₃).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 188,6 (2-CHO), 175,5 C(9), 157,4 C(3), 155,5 C(4b), 154,3 C(4a), 141,2 C(4), 136,1 C(1'), 136,1 C(6), 128,9 C(2') e C(6'), 128,7 C(3') e C(5'), 128,7 C(4'), 126,1 C(8), 125,8 C(2), 125,3 C(7), 120,9 C(1), 120,9 C(8a), 118,6 C(5), 118,1 C(8b), 76,3 (3-OCH₂Ar), 61,9 (OCH₃).

EM: 362 (1, [M+2]⁺), 361 (3, [M+1]⁺), 360 (9, [M]⁺), 332 (3), 331 (3), 270 (3), 269 (10), 268 (4), 241 (5), 170 (4), 114 (4), 113 (3), 92 (8), 91 (100), 65 (6).

2.11. Obtenção da 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13) [75]

Dissolveu-se a 3-benziloxi-2-formil-4-metoxixantona (12) (314,2 mg, 0,9 mmol) e o ácido *meta*-cloroperbenzóico (226,1 mg, 1,3 mmol) em diclorometano (20 ml). A mistura foi aquecida a refluxo, em atmosfera de azoto, durante 6 horas. Após arrefecimento, o solvente foi evaporado obtendo-se um resíduo amarelo. O produto foi dissolvido em acetato de etilo (40 ml) e extraído sucessivamente com hidrogenocarbonato de sódio a 5% (3 x 20 ml), água (3 x 20 ml) e com uma solução saturada de cloreto de sódio (3 x 20 ml). Após evaporação do acetato de etilo obteve-se um óleo amarelo. O óleo foi dissolvido numa mistura de hidróxido de potássio a 10% (2 ml), metanol (38 ml) e clorofórmio (10 ml). A mistura reaccional foi aquecida a 90 °C, com agitação magnética, durante 20 minutos. A solução foi vertida em gelo (100 g), acidificada com ácido clorídrico a 10% e extraída com acetato de etilo (3 x 80 ml). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com água (2 x 80 ml) e desidratadas com sulfato de sódio anidro. O óleo amarelo obtido, após evaporação do solvente, foi cristalizado do éter do petróleo (60-80 °C)/clorofórmio, obtendo-se cristais, ligeiramente amarelos, de 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13) (352,1 mg, 83%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/acetato de etilo 6:2 e clorofórmio).

PF: 152-155 °C.

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3380, 1660, 1605, 1480, 1460, 1370, 1275, 1140, 1080, 885, 750, 690.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 10,32 (1H, *s*, 2-OH), 8,13 (1H, *dd*, J=8,0; 1,7 Hz, H-C(8)), 7,83 (1H, *ddd*, J=7,9; 7,4; 1,7 Hz, H-C(6)), 7,66 (1H, *d*, J=7,9 Hz, H-C(5)), 7,50 (2H, *d*, J=6,5 Hz, H-C(2') e H-C(6')), 7,44 (1H, *dd*, J=8,0; 7,4 Hz, H-C(7)), 7,41-7,29 (3H, *m*, H-C(3'), H-C(4') e H-C(5')), 7,35 (1H, *s*, H-C(1)), 5,24 (2H, *s*, 3-OCH₂-Ar), 3,93 (3H, *s*, 4-OCH₃).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 175,6 C(9), 155,7 C(4b), 148,3 C(4a),

146,6 C(3), 144,3 C(2), 142,0 C(4), 137,4 C(1'), 135,4 C(6), 128,7 C(3') e C(5'), 128,5 C(2') e C(6') 128,5 C(4') 126,1 C(8), 124,5 C(7), 120,7 C(8a), 118,6 C(5), 117,4 C(8b), 104,5 C(1), 74,5 (OCH₂Ar), 61,9 (OCH₃).

EM: 350 (1, [M+2]⁺), 349 (3, [M+1]⁺), 348 (13 [M]⁺), 320 (4), 258 (8), 257 (5), 243 (4), 229 (1), 214 (3), 102 (6), 92 (14), 91 (100), 77 (3), 76 (4), 65 (10), 63 (4), 39 (4).

2.12. Obtenção da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14)

[75]

Adicionou-se o catalizador Pd/C (10%) (20,3 mg) a metanol (21 ml). Após saturação com H₂ adicionou-se à suspensão uma solução de 3-benziloxi-2-hidroxi-4-metoxixantona (13) (115,1 mg, 0,33 mmol) em metanol (20 ml). Procedeu-se à hidrogenação até não se verificar mais consumo de H₂. Após reacção, a suspensão foi filtrada, o resíduo foi lavado com metanol. Da evaporação do filtrado resultou um óleo amarelo o qual foi cristalizado do clorofórmio/éter do petróleo (40-60 °C) obtendo-se cristais amarelos de 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (14) (63,1 mg, 74%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, clorofórmio/metanol/ácido fórmico 5:5:0,1, metanol e acetona/metanol 6:4).

PF: 218-220 °C dec.

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3350, 1610, 1590, 1480, 1465, 1340, 1240, 1130, 1080, 890, 750.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 8,14 (1H, *dd*, J=7,7; 1,6 Hz, H-C(8)), 7,80 (1H, *ddd*, J=7,9; 7,6; 1,6 Hz, H-C(6)), 7,66 (1H, *d*, J=7,9 Hz, H-C(5)), 7,43 (1H, *dd*, J=7,7; 7,6 Hz, H-C(7)), 7,27 (1H, *s*, H-C(1)), 3,92 (3H, *s*, 4-OCH₃).

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,47 MHz) δ : 174,8 C(9), 155,4 C(4b), 144,9 C(3) e C(4a), 144,1 C(2), 135,3 C(4), 134,5 C(6), 125,8 C(8), 124,0 C(7), 120,7 C(8a), 118,2 C(5), 113,9 C(8b) 103,4 C(1), 61,0 (4-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

EM: 260 (3, [M+2] $^{+\cdot}$), 259 (17, [M+1] $^{+\cdot}$), 258 (100, [M] $^{+\cdot}$), 243 (45), 228 (2), 225 (7), 215 (12), 187 (9), 129 (5), 122 (18), 121 (5), 120 (4), 113 (9), 105 (24), 102 (5), 94 (6), 83 (4), 77 (22).

2.13. Obtenção da *trans*-kielcorina B (16) e *trans*-isokielcorina B (17) [110]

Dissolveu-se a 2,3-diidroxí-4-metoxixantona (14) (700,3 mg, 2,7 mmol) e o álcool coniferílico (15) (565,8 mg, 3,1 mmol) em benzeno (23 ml) e acetona (26 ml). Adicionou-se à solução carbonato de prata (1,1 g, 3,8 mmol). A suspensão resultante foi mantida à temperatura ambiente, com agitação magnética, ao abrigo da luz, durante 3 dias. A reacção foi terminada quando se verificou, por CCF (gele de sílica, clorofórmico/metanol 30:1), que já não existia álcool coniferílico (15) no meio reaccional. A mistura reaccional foi filtrada e o solvente evaporado. O resíduo obtido foi purificado por CC (Tabela 31, p. 146), fracções de 20 ml. O solvente de cada fracção foi evaporado e o resíduo retomado com acetona. As fracções foram controladas por CCF (gele de sílica, clorofórmio/metanol 30:1), reunindo-se as que apresentavam composição semelhante (Tabela 31, p. 146, Grupos 1-15).

Tabela 31. Resultados da purificação por CC do produto bruto da reacção 2.13.

Grupo	Fase móvel	Peso (mg)	Compostos
1	hexano	---	---
2	hexano/CHCl ₃ (9:1)	---	---
3	hexano/CHCl ₃ (8:2)	---	---
4	hexano/CHCl ₃ (7:3)	---	---
5	hexano/CHCl ₃ (6:4)	---	---
6	hexano/CHCl ₃ (5:5)	---	---
7	hexano/CHCl ₃ (4:6)	---	---
8	hexano/CHCl ₃ (3:7)	118 mg	<i>trans</i> - isokielcorina B (17) <i>trans</i> -kielcorina B (16) e outros não identificados.
9	hexano/CHCl ₃ (2:8)	50 mg	fenilcumarano (18)
10	CHCl ₃		
11	CHCl ₃ /Me ₂ CO (9:1)	48 mg	álcool desidrodi- coniferílico (19)
12	CHCl ₃ /Me ₂ CO (8:2)	120 mg	não identificados
13	CHCl ₃ /Me ₂ CO (5:5)	210 mg	não identificados
14	Me ₂ CO	185 mg	não identificados
15	MeOH	411 mg	não identificados

A fracção correspondente ao grupo 8, foi purificada por CCF preparativa (gele de sílica, clorofórmio/metanol 30:1. Os produtos correspondentes às duas manchas foram extraídos do gele de sílica com acetona. Após eliminação do solvente, a mancha de R_f 0,53 foi identificada como a *trans*-isokielcorina B (17) (20 mg) e a mancha de R_f 0,44 como a *trans*-kielcorina B (16) (10 mg).

***trans*-Kielcorina B (16)**

PF: 232-236 °C

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3427, 1653, 1606, 1516, 1456, 1381, 1329, 1265, 1217, 1128, 1095, 1030, 804.RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 9,39 (1H, s, 4''-OH), 8,27 (1H, d, J=7,7 Hz, H-C(8')), 7,95 (1H, ddd, J=8,1; 7,4; 1,5 Hz, H-C(6')), 7,80 (1H, d, J=8,1 Hz, H-C(5')), 7,57 (1H, dd, J=7,7; 7,4 Hz, H-C(7')), 7,51 (1H, s, H-C(1')), 7,19 (1H, s, H-C(2'')), 7,03 (1H, d, J=8,1 Hz, H-C(6'')), 6,93 (1H, d, J=8,1 Hz, H-C(5'')), 5,24 (1H, d, J=8,3 Hz, H-C(3)), 4,40 (1H, m, H-C(2)), 4,05 (3H, s, 4'-OCH₃), 3,88 (3H, s, 3''-OCH₃), 3,57 (2H, m, CH₂OH).RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 175,0 C(9'), 155,6 C(4'b), 147,8 C(3''), 147,3 C(4''), 144,7³ C(4'a), 144,1³ C(3'), 141,6 C(2'), 136,1 C(4'), 135,1 C(6'), 126,7 C(1''), 125,9 C(8'), 124,3 C(7'), 120,7 C(6''), 120,5 C(8'a), 118,3 C(5'), 115,4 C(5''), 114,8 C(8'b), 111,7 C(2''), 105,4 C(1'), 77,8 C(2), 76,9 C(3), 61,3 (4'-OCH₃), 60,0 (CH₂OH), 55,7 (3''-OCH₃).EM: 438 (6, [M+2]⁺), 437 (27, [M+1]⁺), 436 (100, [M]⁺), 418 (78), 419 (22), 406 (14), 405 (8), 404 (7), 403 (12), 300 (18), 299 (83), 283 (12), 269 (36), 258 (24), 256 (3), 243 (12), 228 (9), 215 (6), 187 (5), 181 (11), 180 (65), 179 (7), 178 (5), 163 (8), 162 (40), 161 (20), 157 (21), 152 (7), 151 (10), 150 (16), 149 (10), 147 (17), 142 (40), 138 (10), 137 (74), 131 (11), 127 (12), 124 (33), 119 (21), 101 (12), 97 (18), 91 (27), 84 (19), 83 (25), 81 (29), 76 (17), 71 (29), 69 (70), 58 (27), 57 (64).***trans*-Isokielcorina B (17)**

PF: 108-110 °C

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3432, 1640, 1610, 1516, 1460, 1382, 1332, 1263, 1101, 1032, 803.RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 9,35 (1H, s, 4''-OH), 8,26 (1H, dd, J=7,2; 1,5 Hz, H-C(8')), 7,95 (1H, dt, J=7,6; 1,5 Hz, H-C(6')), 7,80 (1H, d,³Estes valores podem ser interconvertíveis

$J=8,4$ Hz, H-C(5')), 7,56 (1H, *dd*, $J=7,6$; 7,2 Hz, H-C(7')), 7,46 (1H, *s*, H-C(1')), 7,16 (1H, *d*, $J=1,6$ Hz, H-C(2'')), 7,00 (1H, *dd*, $J=7,7$; 1,6 Hz, H-C(6'')), 6,92 (1H, *d*, $J=7,7$ Hz, H-C(5'')), 5,13 (1H, *d*, $J=8,0$ Hz, H-C(2)), 4,53 (1H, *m*, H-C(3)), 4,12 (3H, *s*, 4'-OCH₃), 3,88 (3H, *s*, 3''-OCH₃), 3,78 (2H, *m*, CH₂OH).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 175,0 C(9'), 155,6 C(4'b), 147,7 C(3''), 147,2 C(4''), 144,8⁴ C(4'a), 144,1⁴ C(3'), 141,6 C(2'), 136,1 C(4'), 135,1 C(6'), 126,8 C(1''), 125,9 C(8'), 124,3 C(7'), 120,7 C(6''), 120,5 C(8'a), 118,3 C(5'), 115,4 C(5''), 114,8 C(8'b), 111,7 C(2''), 105,5 C(1'), 78,9 C(3), 75,6 C(2), 61,3 (4'-OCH₃), 59,9 (CH₂OH), 55,7 (3''-OCH₃).

EM: 438 (5, [M+2]⁺), 437 (24, [M+1]⁺), 436 (89, [M]⁺), 418 (43), 419 (12), 406 (8), 405 (6), 404 (3), 403 (6), 300 (5), 299 (24), 270 (5), 269 (23), 258 (10), 257 (5), 256 (3), 255 (9), 254 (5), 243 (5), 228 (8), 225 (5), 215 (2), 187 (2), 181 (19), 180 (100), 178 (4), 179 (9), 163 (6), 162 (28), 161 (13), 157 (18), 152 (11), 151 (12), 150 (14), 149 (10), 147 (10), 138 (12), 137 (82), 135 (5), 131 (9), 125 (6), 124 (46), 119 (14), 91 (20), 77 (14), 65 (10), 55 (13).

2.13.1 Fenilcumarano (18)

A fracção correspondente ao grupo 9, foi purificada por CCF preparativa (gele de sílica, clorofórmio/metanol 30:1). O composto correspondente à mancha de R_f inferior foi extraído do gele de sílica com acetona. Após eliminação do solvente obteve-se um óleo que foi identificado como fenilcumarano (18) (18 mg).

IV: ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3433, 2962, 2926, 1659, 1650, 1594, 1261, 1121, 1100, 801.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 9,65 (1H, *d*, $J=7,7$ Hz, H-C(γ')), 7,42 (1H, *d*, $J=15,8$ Hz, H-C(α')), 7,14 (1H, *s*, H-C(-6')), 7,05 (1H, *s*, H-C(2')), 6,90 (3H, *s*, H-C(2), (6), (5)), 6,61 (1H, *dd*, $J=15,8$; 7,7 Hz, H-C(β')), 5,70 (1H, *s*, OH-C(γ)), 5,65 (1H, *d*, $J=7,2$ Hz, H-C(α)), 3,61 (1H, *dd*, $J=12,4$; 5,9 Hz, H-

⁴Estes valores podem ser interconvertíveis

C(β)), 3,86 (3H, *s*, 3'-OCH₃), 3,80 (3H, *s*, 3-OCH₃), 3,77-3,69 (2H, *m*, H-C(γ)).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75,47 MHz) δ : 193,6 (CHO), 153,1 C(α'), 151,5 C(4'), 146,8 C(3), 146,0 C(4), 144,8 C(3'), 132,2 C(1), 129,1 C(1'), 128,2 C(5'), 126,5 C(β'), 118,2 C(6'), 112,2 C(2'), 119,5 C(6), 114,5 C(5), 108,7 C(2), 89,0 C(α), 63,9 C(γ), 56,0 (3-OCH₃), 56,1 (3'-OCH₃), 53,0 C(β).

Os dados de RMN de ¹H e ¹³C obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [128].

EM: 358 (1, [M+2]⁺), 357 (6, [M+1]⁺), 356 (23, [M]⁺), 339 (9), 338 (35), 327 (4), 326 (18), 325 (5), 323 (14), 306 (5), 181 (3), 165 (5), 151 (6), 137 (12), 101 (12), 83 (23), 82 (19), 71 (100), 59 (25).

2.13.2 Álcool desidrodiconiferílico (19)

A fracção correspondente ao grupo 11, foi purificada por cristalização de éter do petróleo (60-80 °C)/clorofórmio, originando cristais amarelo claro, que foram identificados como álcool desidrodiconiferílico (19) (35 mg).

PF: 146-150 °C (lit. [128], 164-165 °C).

IV ν max (cm⁻¹) (KBr): 3381, 3353, 1611, 1518, 1497, 1464, 1330, 1275, 1221, 1144, 1119, 1032, 960, 810.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 9,06 (1H, *s*, OH-C(4)), 6,94 (1H, *s*, H-C(2)) 6,93 (1H, *s*, H-C(6)), 6,90 (1H, *s*, H-C(5)), 6,75 (2H, *s*, H-C(2') e H-C(6')), 6,46 (1H, *d*, J=16,0 Hz, H-C(α')), 6,21 (1H, *dt*, J=15,8; 5,3, Hz, H-C(β')), 5,45 (1H, *d*, J=6,7 Hz, H-C(α)), 5,05 (1H, *s*, HO-C(γ')), 4,81 (1H, *s*, HO-C(γ)), 4,08 (2H, *s*, H-C(γ')), 3,79 (3H, *s*, 3'-OCH₃), 3,74 (3H, *s*, 4-OCH₃), 3,71-3,26 (2H, *m*, H-C(γ)), 3,45 (1H, *m*, H-C(β))

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 147,6 C(4'), 147,1 C(5), 146,4 C(4), 143,7 C(3'), 132,3 C(1), 130,5 C(1'), 129,5 C(α'), 129,0 C(5'), 128,0 C(β'), 118,6

C(2), 115,0 C(3), 115,3 C(6'), 110,2 C(6), 110,3 C(2'), 87,3 C(α), 62,9 C(γ), 61,7 C(γ), 55,7 (OCH₃), 55,6 (OCH₃), 53,0 C(β).

Os dados de RMN de ¹H e ¹³C obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [128].

EM: 360 (3, [M+2]⁺), 359 (20, [M+1]⁺), 358 (84, [M]⁺), 343 (9), 342 (24), 340 (7), 339 (7), 329 (20), 328 (12), 327 (10), 326 (29), 325 (10), 324 (8), 310 (11), 309 (12), 308 (10), 279 (7), 265 (5), 241 (100), 151 (12), 137 (29), 115 (8), 77 (10).

3. Síntese da 2-metoxixantona (22)

3.1. Obtenção da 2-hidroxi-2',5-dimetoxibenzofenona (21) [102]

Dissolveu-se o cloreto de 2-metoxibenzoílo (4) (11,6 g, 68 mmol) (Exp., p. 132) e o 1,4-dimetoxibenzeno (20) (10,0 g, 72 mmol) em éter etílico anidro (680 ml). Adicionou-se, rapidamente, o cloreto de alumínio anidro (22,7 g, 170 mmol). A mistura reaccional foi mantida à temperatura ambiente, com agitação magnética, durante 44 horas. Após evaporação do solvente obteve-se um resíduo viscoso o qual foi vertido em gelo picado (200 g). A suspensão obtida foi acidificada com ácido clorídrico a 10% e extraída com benzeno (3 x 100 ml). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com água (2 x 100 ml) e desidratadas com sulfato de magnésio anidro. Após evaporação do solvente obteve-se um resíduo oleoso de cor amarela-acastanhada. Este produto foi usado, sem purificação posterior, na reacção seguinte pois, verificou-se por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/clorofórmio 8:2), que a benzofenona pretendida (21) era o produto mais representado, pois a xantona obtida em 3.2 corresponde à 2-metoxixantona.

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica,

éter do petróleo/clorofórmio 8:2 e éter do petróleo/éter etílico/ácido fórmico 5:5:0,09).

3.2. Obtenção da 2-metoxixantona (22)

[102]

Dissolveu-se o produto bruto da reacção descrita em 3.1. (2,0 g) numa mistura de metanol (17 ml), água (12 ml) e hidróxido de sódio (3,6 g). A mistura reaccional foi aquecida a refluxo, com agitação magnética, durante 22 horas. Após repouso durante uma noite, no frigorífico, formou-se um sólido. A suspensão foi filtrada e o sólido obtido lavado com metanol e seco. O produto foi purificado por CC (gele de sílica, éter do petróleo (40-60 °C) e clorofórmio em várias proporções). As fracções contendo predominantemente a xantona (22) foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo foi cristalizado do metanol obtendo-se cristais brancos de 2-metoxixantona (22) (508 mg).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/clorofórmio 8:2 e 5:5).

PF: 128-129 °C (lit. [140], 129-131 °C, lit. [82], 128-130 °C).

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 1650, 1614, 1489, 1467, 1317, 1212, 1142, 1024, 761.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 8,18 (1H, *dd*, J=7,7; 1,7 Hz, H-C(8)), 7,86 (1H, *ddd*, J=8,2; 7,4; 1,7 Hz, H-C(6)), 7,64 (1H, *dd*, J=8,2; 1,0 Hz, H-C(5)), 7,63 (1H, *d*, J=9,1 Hz, H-C(4)), 7,54 (1H, *d*, J=3,2 Hz, H-C(1)), 7,47 (1H, *dd*, J=9,1; 3,2 Hz, H-C(3)), 7,46 (1H, *ddd*, J=7,7; 7,4; 1,0 Hz, H-C(7)), 3,87 (3H, *s*, 2-OCH₃).

Os dados de RMN ¹H obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [68, 82].

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 175,8 C(9), 155,7 C(2), 155,5 C(4b), 150,3 C(4a), 135,4 C(6), 126,0 C(8), 124,7 C(3), 124,2 C(7), 121,5 C(8b), 120,5 C(8a), 119,8 C(4), 118,2 C(5), 105,7 C(1), 55,7 (OCH₃).

Os dados de RMN ^{13}C obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [33].

EM: 228 (2, $[\text{M}+2]^+$), 227 (16, $[\text{M}+1]^+$), 226 (100, $[\text{M}]^+$), 225 (27), 224 (3), 212 (6), 211 (36), 197 (13), 196 (19), 183 (6), 168 (4), 156 (3), 155 (26), 140 (1), 139 (8), 127 (20), 126 (7), 113 (10), 107 (6), 102 (1), 101 (7), 80 (5), 78 (8), 77 (5), 76 (8), 63 (15), 62 (5).

4. Síntese da 2-hidroxixantona (23)

[114]

Dissolveu-se a 2-metoxixantona (22) (300,0 mg, 1,3 mmol) em benzeno anidro (23 ml) e adicionou-se, rapidamente, o cloreto de alumínio anidro (3,2 g, 24 mmol). A mistura foi aquecida a refluxo, com agitação magnética, durante 3 horas. Após reacção acidificou-se a mistura reaccional com ácido clorídrico conc. e adicionou-se água (80 ml). A solução aquosa foi extraída com éter etílico (3 x 50 ml). As fases orgânicas foram reunidas e extraídas com hidróxido de sódio a 5% (3 x 80 ml). As fases aquosas alcalinas foram reunidas e acidificadas com ácido clorídrico a 20 % e extraídas com acetato de etilo (3 x 100 ml). As fases orgânicas foram reunidas lavadas com água (2 x 100 ml) e desidratadas com sulfato de magnésio anidro. Após evaporação do solvente obteve-se um sólido amarelado que foi recristalizado do metanol obtendo-se cristais brancos de 2-hidroxixantona (23) (243 mg, 86%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/clorofórmio 8:2 e 5:5).

PF: 202-205 °C (lit.[140], 241 °C, lit. [115], 242 °C, lit. [82], 240-241 °C).

IV ν_{max} (cm^{-1}) (kBr): 3220, 1615, 1600, 1481, 1462, 1341, 1232, 762.

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10,00 (1H, s, 2-OH), 8,19 (1H, dd, $J=8,0$; 1,7 Hz, H-C(8)), 7,85 (1H, ddd, $J=8,2$; 7,6; 1,7 Hz, H-C(6)), 7,63 (1H, dd, $J=8,2$; 0,9 Hz, H-C(5)), 7,56 (1H, d, $J=9,0$ Hz, H-C(4)), 7,48 (1H, d,

$J=3,0$ Hz, H-C(1)), 7,45 (1H, *ddd*, $J=8,0$; 7,6; 0,9 Hz, H-C(7)), 7,32 (1H, *dd*, $J=9,0$; 3,0 Hz, H-C(3)).

Os dados de RMN ^1H obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [82].

RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75,47 MHz) δ : 175,9 C(9), 155,6 C(4b), 153,9 C(2), 149,2 C(4a), 135,2 C(6), 125,9 C(8), 124,6 C(3), 124,0 C(7), 121,7 C(8b), 120,4 C(8a), 119,5 C(4), 118,2 C(5), 108,5 C(1).

Os dados de RMN ^{13}C obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [33, 34], excepto a atribuição efectuada para o C(8a) e C(8b), os quais estão descritos com valores de δ trocados entre si.

EM: 214 (2, $[\text{M}+2]^+$), 213 (15, $[\text{M}+1]^+$), 212 (100, $[\text{M}]^+$), 184 (8), 155 (5), 128 (5), 127 (6), 106 (4), 92 (4).

5. Síntese da 3-metoxixantona (26)

5.1. Obtenção da 2-hidroxi-2',4-dimetoxibenzofenona (25) [60]

Dissolveu-se o cloreto de 2-metoxibenzoílo (4) (11,2 g, 66 mmol) (Exp., p. 132) e o 1,3-dimetoxibenzeno (24) (9,5 ml, 10,0 g, 72 mmol) em éter etílico anidro (445 ml). Adicionou-se, rapidamente, o cloreto de alumínio anidro (27,8 g, 208 mmol). A mistura resultante foi mantida à temperatura ambiente, com agitação magnética, durante 16 horas. Após evaporação do solvente obteve-se um resíduo viscoso o qual foi vertido em gelo picado (200 g). A suspensão obtida foi acidificada com ácido clorídrico a 10% e extraída com benzeno (3 x 100 ml). As fases orgânicas foram reunidas lavadas com água (3 x 100 ml) e desidratadas com sulfato de magnésio anidro. Após evaporação do solvente obteve-se um resíduo oleoso de cor amarela.

Este produto foi usado sem purificação posterior na reacção seguinte pois, verificou-se por CCF (gele de sílica, clorofórmio/éter do

petróleo (40-60 °C) 5:5), que a benzofenona pretendida (25) correspondia ao produto mais representado.

Para a caracterização do composto uma parte do produto bruto foi submetido a purificação por CC (gele de sílica, clorofórmio/éter do petróleo (40-60 °C), em várias proporções). As fracções contendo predominantemente a benzofenona pretendida foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo foi recristalizado de clorofórmio/éter do petróleo (40-60 °C) obtendo-se cristais amarelo claro da 2-hidroxi-2',4'-dimetoxibenzofenona (25).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/clorofórmio 8:2 e éter do petróleo/éter etílico/ácido fórmico 5:5:0,09).

PF: 83-86 °C.

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3432, 1620, 1489, 1462, 1439, 1369, 1334, 1253, 1199, 1160, 1122, 1103, 1022, 918, 833, 748.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 12,48 (1H, *s*, OH), 7,53 (1H, *ddd*, J=8,1; 7,5; 1,7 Hz, H-C(4')), 7,30 (1H, *dd*, J=7,5; 1,7 Hz, H-C(6')), 7,19 (1H, *d*, J=8,1 Hz, H-C(3')), 7,15 (1H, *d*, J=8,9 Hz, H-C(6)), 7,08 (1H, *t*, J=7,5 Hz, H-C(5')), 6,55 (1H, *d*, J=2,4 Hz, H-C(3)), 6,47 (1H, *dd*, J=8,9; 2,4 Hz, H-C(5)), 3,83 (3H, *s*, OCH₃), 3,73 (3H, *s*, OCH₃).

Os dados de RMN ¹H obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [60].

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 199,7 (C=O), 166,1 C(4), 164,6 C(2), 155,8 C(2'), 135,2 C(6), 131,8 C(4'), 128,2 C(6'), 127,5 C(1'), 120,5 C(5'), 113,9 C(1), 111,9 C(3'), 107,7 C(5), 100,8 C(3), 55,9 (4-OCH₃), 55,6 (2'-OCH₃).

EM: 260 (0,4, [M+2]⁺), 259 (3, [M+1]⁺), 258 (17, [M]⁺), 257 (5), 243 (5), 228 (14), 227 (100), 225 (5), 151 (7), 138 (4), 135 (11), 123 (1), 115 (4), 107 (2), 108 (8), 105 (2), 92 (5), 77 (9).

5.2. Obtenção da 3-metoxixantona (26)

[102]

Dissolveu-se o produto bruto da reacção descrita em 5.1. (15,1 g) numa mistura de metanol (132 ml), água (94 ml) e hidróxido de sódio (27 g). A mistura reaccional foi aquecida a refluxo, com agitação magnética, durante 25 horas. Após repouso durante uma noite, no frigorífico, formou-se um sólido que foi separado por filtração, lavado com metanol e seco. O produto foi purificado por CC (gele de sílica, éter do petróleo/clorofórmio em várias proporções). As fracções contendo o composto predominante foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo foi cristalizado do metanol originando cristais brancos de 3-metoxixantona (26) (3,8 g).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/clorofórmio 5:5 e clorofórmio).

PF: 126-128 °C (lit. [141], 130-132 °C, [142], 128-130 °C, [60] 116-117 °C).

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 1651, 1613, 1462, 1434, 1321, 1259, 1099, 1015, 829, 760.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 8,17 (1H, *dd*, J=7,7; 1,7 Hz, H-C(8)), 8,10 (1H, *d*, J=8,9 Hz, H-C(1)), 7,85 (1H, *ddd*, J=8,0; 7,6; 1,7 Hz, H-C(6)), 7,63 (1H, *d*, J=8,0 Hz, H-C(5)), 7,47 (1H, *dd*, J=7,7; 7,6 Hz, H-C(7)), 7,16 (1H, *d*, J=2,4 Hz, H-C(4)), 7,05 (1H, *dd*, J=8,9; 2,4 Hz, H-C(2)), 3,93 (3H, *s*, 3-OCH₃).

Os dados de RMN ¹H obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [60].

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 174,9 C(9), 165,0 C(3), 157,6 C(4a), 155,6 C(4b), 135,1 C(6), 127,6 C(1), 125,9 C(8), 124,4 C(7), 121,2 C(8a), 117,9 C(5), 114,9 C(8b), 113,7 C(2), 100,6 C(4), 56,2 (3-OCH₃).

Os dados de RMN ¹³C obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [143].

EM: 228 (2, [M+2]⁺), 227 (19, [M+1]⁺), 226 (100, [M]⁺), 225 (7), 211 (1), 197 (11), 196 (6), 183 (18), 168 (8), 155 (12), 140 (1), 139 (6), 127 (10), 126 (4), 102 (1), 99 (4), 77 (4), 63 (11).

6. Síntese da 3-hidroxi-xantona (27)

[102]

Dissolveu-se a 3-metoxixantona (26) (1,0 g, 4 mmol) em piperidina (20 ml, 17,2 g, 202 mmol) e água (20 ml). A mistura reaccional foi aquecida a refluxo, com agitação magnética, durante 60 horas. Após reacção a solução foi vertida em ácido clorídrico 4N (150 ml), e extraída com acetato de etilo (3 x 100 ml). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas sucessivamente com ácido clorídrico 2N (3 x 100 ml), água (3 x 100 ml) e desidratadas com sulfato de magnésio anidro. Após evaporação do solvente obteve-se um resíduo sólido amarelo. Este resíduo foi recristalizado do metanol obtendo-se cristais ligeiramente amarelados de 3-hidroxi-xantona (27) (200 mg, 21%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/clorofórmio 5:5 e clorofórmio).

PF: 194-197 °C (lit. [60], 241-242 °C).

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3130, 1617, 1568, 1483, 1455, 1316, 1160, 1114, 750.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 11,00 (1H, s, 3-OH), 8,15 (1H, dd, J=7,9; 1,7 Hz, H-C(8)), 8,04 (1H, d, J=8,6 Hz, H-C(1)), 7,82 (1H, ddd, J=8,2; 7,6; 1,7 Hz, H-C(6)), 7,61 (1H, d, J=8,2 Hz, H-C(5)), 7,44 (1H, dd, J=7,9; 7,6; Hz, H-C(7)), 6,91 (1H, dd, J=8,6; 2,2 Hz, H-C(2)), 6,88 (1H, d, J=2,2 Hz, H-C(4)).

Os dados de RMN ¹H obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [60].

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 174,8 C(9), 164,0 C(3), 157,6 C(4a), 155,6 C(4b), 134,9 C(6), 128,0 C(1), 125,9 C(8), 124,2 C(7), 121,2 C(8a), 117,9 C(5), 114,2 C(2), 114,0 C(8b), 102,1 C(4).

Os dados de RMN ¹³C obtidos estão de acordo com os descritos na literatura [34].

EM: 214 (2, [M+2]⁺), 213 (16, [M+1]⁺), 212 (100, [M]⁺), 211 (6), 184 (14), 155 (6), 128 (7), 127 (5), 92 (14).

7. Síntese da 4-metoxixantona (33)

7.1. Obtenção do sal sódico do ácido 2-clorobenzóico (29)

Dissolveu-se o ácido 2-clorobenzóico (28) (1,0 g, 6 mmol) em hidróxido de sódio a 1N (6,4 ml). Adicionou-se metanol (20 ml) e éter etílico até precipitação. O sólido branco formado foi separado por filtração, lavado com éter etílico/metanol (95:5) e seco em estufa a 40 °C, durante 24 horas, obtendo-se o sal sódico do ácido 2-clorobenzóico (29) (1,1 g, 97%).

PF: 270-275 °C.

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3396, 1586, 1554, 1401, 1045, 739.

7.2. Obtenção do sal sódico do 2-metoxifenol (31)

Dissolveu-se o 2-metoxifenol (30) (0,9 ml, 1,0 g, 8 mmol) em hidróxido de sódio a 1N (8,0 ml). Adicionou-se metanol (20 ml) e éter etílico até precipitação. O sólido branco formado foi separado por filtração, lavado com éter etílico/metanol (95:5) e seco em estufa a 40 °C, durante 24 horas, obtendo-se o sal sódico do 2-metoxifenol (31) (1,2 g, 100%).

PF>300 °C

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 1585, 1489, 1450, 1284, 1250, 1211, 1172, 1115, 1022, 848, 728.

7.3. Obtenção do ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32)

[70, 114]

A mistura do sal sódico do ácido 2-clorobenzóico (29) (1,1 g, 6 mmol) e do sal sódico do 2-metoxifenol (31) (1,0 g, 7 mmol) foi suspensa em dioxano anidro (20 ml). A esta suspensão foram adicionados cloreto de cobre (62 mg, 0,6 mmol) e TDA-1 (0,2 ml, 0,2 g, 0,6 mmol). A mistura resultante foi aquecida a refluxo, em atmosfera de azoto, durante 48 horas. Após reacção o excesso de solvente foi evaporado e o resíduo obtido foi vertido sobre água (30 ml) e filtrado. O filtrado foi acidificado com ácido clorídrico 2N e extraído com acetato de etilo (3 x 60 ml). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com água (2 x 50 ml) e desidratadas com sulfato de sódio anidro. O produto (155 mg) foi purificado por CCF preparativa (gele de sílica, éter do petróleo/éter etílico/ácido fórmico 40:60:1). Após extracção com acetona obteve-se um resíduo oleoso. Recristalizou-se do acetato de etilo obtendo-se cristais brancos de ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32) (135 mg, 9%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/ éter etílico/ácido fórmico 4:6:0,1).

PF: 111-114 °C.

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 1690, 1667, 1603, 1498, 1463, 1306, 1260, 1222, 1159, 760, 744.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 7,73 (1H, *dd*, J=7,7; 1,8 Hz, H-C(6)), 7,39 (1H, *ddd*, J=7,8; 7,6; 1,8 Hz, H-C(4)), 7,18-7,07 (3H, *m*, H-C(3'), H-C(4') e H-C(5')), 6,95-6,85 (2H, *m*, H-C(5') e H-C(6')) 6,60 (1H, *d*, J=7,8 Hz, H-C(3)), 3,68 (3H, *s*, OCH₃).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 168,0 (COOH), 157,0 C(2), 151,5 C(2'), 144,6 C(1'), 134,1 C(4), 131,9 C(6), 126,3 C(4'), 123,2 C(5), 122,9 (1), 122,0 C(5'), 121,5 C(6'), 117,6 C(3), 114,1 C(3'), 56,4 (OCH₃).

EM: 246 (1, [M+2]⁺), 245 (5, [M+1]⁺), 244 (30, [M]⁺), 135 (9), 128 (4), 124 (20), 122 (11), 121 (100), 120 (5), 110 (3), 109 (9), 92 (12).

7.4. Obtenção da 4-metoxixantona (33)

[114, 115]

Dissolveu-se o ácido 2-(2'-metoxi)fenoxibenzóico (32) (183 mg, 0,8 mmol) em cloreto de acetilo (2,5 ml) e adicionou-se ácido sulfúrico conc. (0,05 ml). A mistura reaccional foi mantida à temperatura ambiente, com agitação magnética, durante 10 minutos. O excesso de cloreto de acetilo foi evaporado e o resíduo obtido foi vertido em gelo picado (80 g) e extraído com clorofórmio (3 x 30 ml). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas sucessivamente com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio (3 x 20 ml), hidróxido de potássio a 10% (3 x 20 ml), água (3 x 20 ml), e desidratadas com sulfato de magnésio anidro. Após evaporação do solvente obteve-se um resíduo sólido, o qual foi cristalizado do clorofórmio/hexano originando cristais brancos de 4-metoxixantona (33) (138 mg, 81%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/ éter etílico/ácido fórmico 4:6:0,1).

PF: 173-176 °C (lit. [144], 174-175 °C).

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 2929, 1660, 1601, 1497, 1468, 1448, 1340, 1280, 1232, 1075, 750.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 8,20 (1H, *dd*, J=8,0; 1,6 Hz, H-C(8)), 7,88 (1H, *dt*, J=8,1; 1,6 Hz, H-C(6)), 7,73 (1H, *dd*, J=7,9; 1,4 Hz, H-C(1)), 7,72 (1H, *d*, J=8,1 Hz, H-C(5)), 7,52 (1H, *dd*, J=7,9; 1,4 Hz, H-C(3)), 7,49 (1H, *dd*, J=8,0; 7,8 Hz, H-C(7)), 7,40 (1H, *t*, J=7,9 Hz, H-C(2)), 3,99 (3H, *s*, 4-OCH₃).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 176,0 C(9), 155,4 C(4b), 148,4 C(4), 145,8 C(4a), 135,5 C(6), 125,9 C(8), 124,5 C(7), 124,0 C(2), 121,9 C(8a), 121,0 C(8b), 118,4 C(5), 116,4 C(3), 116,4 C(1), 56,2 (4-OCH₃).

EM: 228 (3, [M+2]⁺), 227 (26, [M+1]⁺), 226 (100, [M]⁺), 212 (13), 211 (81), 183 (7), 168 (1), 157 (3), 156 (3), 155 (23), 140 (1), 139 (5), 127 (14), 126 (5), 113 (6), 107 (3), 102 (1), 101 (5), 77 (4), 76 (5), 63 (6), 58 (4), 51 (6).

8. Síntese da 4-hidroxixantona (34)

[114]

Dissolveu-se a 4-metoxixantona (33) (80,9 mg, 0,4 mmol) em benzeno anidro (6,1 ml) e adicionou-se, rapidamente, o cloreto de alumínio anidro (848 mg, 6 mmol). A mistura foi aquecida a refluxo, com agitação magnética, durante 7 horas. Após reacção acidificou-se a mistura reaccional com ácido clorídrico conc. e adicionou-se água (70 ml). A solução foi extraída com éter etílico (3 x 50 ml). As fases éteres foram reunidas e extraídas com hidróxido de sódio a 5% (3 x 40 ml). As fases aquosas alcalinas foram reunidas, acidificadas com ácido clorídrico a 20% e extraídas com clorofórmio (3 x 150 ml). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com água (2 x 200 ml) e desidratadas com sulfato de magnésio anidro. Após evaporação do solvente obteve-se um resíduo sólido amarelado, o qual foi recristalizado do clorofórmio/hexano, originando cristais brancos de 4-hidroxixantona (34) (44,7 mg, 59%).

O controlo cromatográfico foi efectuado por CCF (gele de sílica, éter do petróleo/ éter etílico/ácido fórmico 4:6:0,1).

PF: 234-236 °C (lit. [140], 230-233 °C, lit. [115], 245-246 °C).

IV ν_{\max} (cm⁻¹) (kBr): 3191, 1640, 1588, 1502, 1480, 1460, 1353, 1290, 1225, 1102, 1033, 753.

RMN ¹H (DMSO-d₆, 300 MHz) δ : 10,51 (1H, s, 4-OH), 8,19 (1H, dd, J=7,8; 1,6 Hz, H-C(8)), 7,88 (1H, ddd, J=8,0; 7,6; 1,6 Hz, H-C(6)), 7,73 (1H, dd, J= 8,0; 0,8 Hz, H-C(5)), 7,61 (1H, dd, J=7,8; 1,8 Hz, H-C(1)), 7,48 (1H, ddd, J=7,8; 7,6; 0,8 Hz, H-C(7)), 7,34 (1H, dd, J=7,8; 1,8 Hz, H-C(3)), 7,26 (1H, t, J=7,8 Hz, H-C(2)).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 75,47 MHz) δ : 176,2 C(9), 155,4 C(4b), 146,7 C(4), 145,2 C(4a), 135,4 C(6), 126,0 C(8), 124,3 C(7), 124,1 C(2), 122,2 C(8b), 120,9 C(8a), 120,2 C(3), 118,3 C(5), 115,2 C(1).

Os dados de RMN ¹³C obtidos estão de acordo com os descritos na

literatura [33, 34], excepto a atribuição efectuada para o C(2) e C(7), os quais estão descritos com valores de δ trocados entre si.

EM: 214 (2, [M+2]⁺), 213 (15, [M+1]⁺), 212 (100, [M]⁺), 211 (4), 184 (12), 155 (4), 128 (7), 127 (6), 106 (4), 102 (4), 92 (4), 83 (5), 64 (4), 63 (4), 59 (16).

Bibliografia

V - Bibliografia

- [1] "Introducción a la Química Farmacéutica" Ed. C. Avendaño, Interamericana McGraw-Hill, Nueva York, 1993, p. 31.
- [2] A. Korolkovas, J. H. Burckhalter, "Química Farmacêutica", Guanabara Dois S. A., Rio de Janeiro, 1982, p. 3.
- [3] A. Burger, "Burger's Medicinal Chemistry, Part 1, The Basis of Medicinal Chemistry", Ed. M. E. Wolf, fourth edition, John Wiley & Sons, New York, 1980, p. 1.
- [4] A. Korolkovas, J. H. Burckhalter, "Química Farmacêutica", Guanabara Dois S. A., Rio de Janeiro, 1982, p. 47.
- [5] "Perspectives in Medicinal Chemistry" Eds. B. Testa, E. Kyburz, W. Fuhrer, R. Giger, Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, 1993, p. 1.
- [6] "Foundations of Molecular Pharmacology, Volume 1, Medicinal and Pharmaceutical Chemistry", Ed. J. B. Stenlake, The Athlone Press, London, 1979.
- [7] M. M. M. Pinto, "Contribuição para o estudo estrutural de kielcorinas obtidas por síntese", Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1982.
- [8] M. M. M. Pinto, A. A. L. Mesquita, O. R. Gottlieb, *Phytochemistry*, 1987, 26, 2045.
- [9] M. M. M. Pinto, *Rev. Port. Farm.*, 1987, 37, 3.
- [10] M. M. M. Pinto, M. F. M. Borges, *Rev. Port. Farm.*, 1989, 39, 39.
- [11] O. R. Gottlieb, A. A. L. Mesquita, T. J. Nagem, *Phytochemistry*, 1971, 10, 2253.
- [12] J. F. Castelão Jr., O. R. Gottlieb, R. A. Lima, A. A. L. Mesquita, *Phytochemistry*, 1977, 16, 735.
- [13] H. Nielsen, P. Arends, *Phytochemistry*, 1978, 17, 2040.
- [14] M. L. Cardona, E. Seoan, *Phytochemistry*, 1982, 21, 2759.

- [15] M. L. Cardona, M. I. Fernandez, J. R. Pedro, E. Seoane, R. Vidal, J. *Nat. Prod.*, 1986, 49, 95.
- [16] M.-T. Chen, *Heterocycles*, 1988, 27, 2589.
- [17] M. L. Cardona, I. Fernández, J. R. Pedro, A. Serrano, *Phytochemistry*, 1990, 29, 3003.
- [18] S. Mandal, P. C. Das, P. C. Joshi, *J. Indian Chem Soc.*, 1992, 69, 611.
- [19] T. Cecchini, "Enciclopedia de las hierbas y de las plantas medicinales", Editorial De Vecchi, S.A., Barcelona, 1980, p. 239.
- [20] Oliveira Feijão R., "Medicina pelas plantas", 9ª Edição, Livraria Progresso Editora, Lisboa, 1986, p. 178.
- [21] D. Shankaranarayan, C. Gopalakrishnan, L. Kameswaran, S. Arumugam, *Mediscope*, 1979, 22, 65.
- [22] "Martindale, The Extra Pharmacopoeia", Ed. J. E. F. Reynolds, twenty-eighth edition, The Pharmaceutical Press, London, 1982.
- [23] Simposium Terapêutico, "Enciclopédia de Especialidades Farmacêuticas Portuguesas", edições Simposium, 1995, p. 149 e p. 435.
- [24] M. M. Pinto, J. Polónia, *Helv. Chim. Acta*, 1974, 57, 286.
- [25] M. M. M. Pinto, *Rev. Port. Farm.*, 1987, 37, 13.
- [26] M. F. M. B. Mesquita, "Síntese de produtos naturais com potencial actividade biológica e obtenção de derivados", Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1994.
- [27] U. Thull, S. Kneubuhler, B. Testa, M. F. M. Borges, M. M. M. Pinto, *Pharm. Res.*, 1993, 10, 1187.
- [28] M. Afzal, J. M. Al-Hassan, *Heterocycles*, 1980, 14, 1173.
- [29] G. J. Bennett, H. -H. Lee, *Phytochemistry*, 1989, 28, 967.
- [30] G. H. Stout, W. J. Balkenhol, *Tetrahedron*, 1960, 25, 1947.
- [31] M. U. S. Sultanbawa, *Tetrahedron*, 1980, 36, 1465.
- [32] "Nomenclature of Organic Chemistry-Sections A, B, C, D, E, F and

H", International Union of Pure and Applied Chemistry-Organic Division, Ed. J. Rigaudy, S. P. Klesney, Pergamon Press, London, 1979.

[33] P. W. Westerman, S. P. Gunasekera, M. Uvais, S. Sultanbawa, R. Kazlauskas, *Org. Magn. Reson.*, 1977, 9, 631.

[34] A. W. Frahm, R. K. Chaudhuri, *Tetrahedron*, 1979, 35, 2035.

[35] O. Suzuki, Y. Katsumata, M. Oya, V. M. Chari, B. Vermes, H. Wagner, K. Hostettmann, *Planta Med.*, 1981, 42, 17.

[36] C. M. A. M. Rezende, O. R. Gottlieb, *Biochem. Syst.*, 1973, 1, 111.

[37] J. A. Elix, H. -M. Chappell, H. Jiang, *The Bryologist*, 1991, 94, 304.

[38] J. A. Elix, C. E. Crook, *The Bryologist*, 1992, 95, 52.

[39] O. R. Gottlieb, *Phytochemistry*, 1972, 11, 1537.

[40] G. Burkhardt, W. Schild, H. Becker, M. Grubert, *Phytochemistry*, 1992, 31, 543.

[41] O. R. Gottlieb, "Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology", Ed. O. R. Gottlieb, Springer-Verlag, Berlin, 1982.

[42] K. Hostettmann, M. Hostettmann, Xanthonas. In: "Methods in Plant Biochemistry", Eds. P. M. Dey, J. B. Harborne, Academic Press, London, 1989, p. 493.

[43] S. Ghosal, P. V. Sharma, D. K. Jaiswal, *J. Pharm. Sci.*, 1978, 67, 55.

[44] S. K. Bhattacharya, S. Ghosal, R. K. Chaudhuri, A. K. Sanyal, *J. Pharm. Sci.*, 1972, 61, 1838.

[45] S. Ghosal, P. V. Sharma, R. K. Chaudhuri, S. K. Bhattacharya, *J. Pharm. Sci.*, 1975, 64, 80.

[46] S. Ghosal, P. V. Sharma, R. K. Chaudhuri, *J. Pharm. Sci.*, 1974, 63, 1287.

[47] S. Ghosal, R. K. Chaudhuri, *J. Pharm. Sci.*, 1975, 64, 889.

[48] S. Ghosal, P. V. Sharma, R. K. Chaudhuri, S. K. Bhattacharya, *J. Pharm. Sci.*, 1973, 62, 926.

- [49] O. Suzuki, Y. Katsumata, M. Oya, V. M. Chari, R. Klapfenberger, H. Wagner, K. Hostettmann, *Planta Med.*, 1980, 39, 19.
- [50] D. Schaufelberger, K. Hostettmann, *Planta Med.*, 1988, 219.
- [51] U. Thull, B. Testa, *Biochem. Pharm.*, 1994, 47, 2307.
- [52] L. Rocha, A. Marston, M. A. C. Kaplan, H. Stoeckli-Evans, U. Thull, B. Testa, K. Hostettmann, *Phytochemistry*, 1994, 36, 1381.
- [53] A. Chiarini, A. Rampa, A. Bisi, R. Budriesi, P. Valenti, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 1992, 42(I), 797.
- [54] A. Beretz, M. Joly, J. C. Stoclet, R. Anton, *Planta Med.*, 1979, 36, 193.
- [55] W. Jinsart, B. Ternai, D. Buddhasukh, G. M. Polya, *Phytochemistry*, 1992, 31, 3711.
- [56] C. -C. Chang, C. -N. Lin, J. -Y Lin, *Antiviral Res.*, 1992, 19, 119.
- [57] C.-H. Chen, J.-Y. Lin, *J. Nat. Prod.*, 1992, 55, 691.
- [58] P. Pattalung, W. Thongtheeraparp, P. Wiriyachitra, W. C. Taylor, *Planta Med.*, 1994, 60, 365.
- [59] C. -N. Lin, S. -S. Liou, F.-N. Ko, C. -M. Teng, *J. Pharm. Sci.*, 1992, 81, 1109.
- [60] C. -N. Lin, S. -S. Liou, F.-N. Ko, C. -M. Teng, *J. Pharm. Sci.*, 1993, 82, 11.
- [61] W. T. Jackson, R. J. Boyd, L. L. Froelich, D. M. Gapinski, B. E. Mallett, J. S. Sawyer, *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 1726.
- [62] H. Minami, M. Kinoshita, Y. Fukuyama, M. kodama, T. Yoshizawa, M. Sugiura, K. Nakagawa, H. Tago, *Phytochemistry*, 1994, 36, 501.
- [63] H. Minami, E. Takahashi, Y. Fukuyama, M. Kodama, T. Yoshizawa, K. Nakagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 1995, 43, 347.
- [64] S. Ashida, S. F. Noguchi, T. Suzuki, *JAOCS*, 1994, 71, 1095.
- [65] P. Basnet, S. Kadota, M. Shimizu, T. Namba, *Planta Med.*, 1994, 60, 507.

- [66] W. D. Jones, Jr., W. L. Albrecht, N. L. Munro, K. T. Stewart, *J. Med. Chem.*, 1977, 20, 595.
- [67] A. C. Barnes, P. W. Hairsine, S. S. Matharu, P. J. Ramm, J. B. Taylor, *J. Med. Chem.*, 1979, 22, 413.
- [68] J. L. Charlton, V. A. Sayeed, K. Koh, W. F. Lau, *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38, 1719.
- [69] R. A. Finnegan, K. E. Merkel, J. K. Patel, *J. Pharm. Sci.*, 1973, 62, 483.
- [70] G. W. Rewcastle, G. J. Atwel, B. C. Baguley, S. B. Calveley, W. A. Denny, *J. Med. Chem.*, 1989, 32, 793.
- [71] G. J. Atwell, G. W. Rewcastle, B. C. Baguley, W. A. Denny, *Panta Med.*, 1990, 33, 1375.
- [72] G. W. Rewcastle, G. J. Atwell, B. D. Palmer, P. D. W. Boyd, B. C. Baguley, W. A. Denny, *Panta Med.*, 1991, 34, 491.
- [73] G. W. Rewcastle, G. J. Atwell, B. C. Baguley, M. Boyd, L. L. Thomsen, L. Zhuang, W. A. Denny, *J. Med. Chem.*, 1991, 34, 2864.
- [74] M. Abou-Shoer, F. E. Boettner, C.-J. Chang, J. M. Cassady, *Phytochemistry*, 1988, 27, 2795.
- [75] H. Tanaka, M. Ishihara, K. Ichino, N. Ohiwa, K. Ito, *Chem. Pharm. Bull.*, 1989, 37, 1916.
- [76] R. A. Vishwakarma, R. S. Kapil, S. P. Popli, *Indian J. Chem.*, 1986, 25B, 1021.
- [77] M. Abou-Shoer, A. -A. Habib, C. -J. Chang, J. M. Cassady, *Phytochemistry*, 1989, 28, 2483.
- [78] G.-L. Sia, G. J. Bennett, L. J. Harrison, K.-Y. Sim, *Phytochemistry*, 1995, 38, 1521.
- [79] O. R. Gottlieb, A. A. L. Mesquita, E. M. Silva, M. T. Melo, *Phytochemistry*, 1969, 8, 665.
- [80] R. A. Lima, O. R. Gottlieb, *Phytochemistry*, 1972, 11, 2307.
- [81] A. A. L. Mesquita, D. B. Corrêa, O. R. Gottlieb, M. T. Magalhães,

Anal. Chim. Acta, 1968, 42, 311.

[82] F. D. Monache, M. M. Mac-Quhae, G. D. Monache, G. B. M. Bettolo, R. A. Lima, *Phytochemistry*, 1983, 22, 227.

[83] H. Tanaka, M. Shibata, K. Ohira, K. Ito, *Chem. Pharm. Bull.*, 1985, 33, 1419.

[84] S. Antus, E. Baitz-Gács, A. Gottsegen, T. Kovács, J. Szunyog, T. S. Tóth, H. Wagner, *Liebigs Ann. Chem.*, 1993, 105.

[85] H. Tanaka, I. Kato, Z. Ito, *Chem. Pharm. Bull.*, 1987, 35, 3603.

[86] G. Vogel, "New Natural Products and Plant Drugs With Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity", Ed. H. Wagner and P. Wolff, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1977, p. 249.

[87] W. L. Nelson, J. E. Wennerstrom, *J. Med. Chem.*, 1977, 20, 880.

[88] H. Kapur, D. R. Mottram, P. N. Green, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1978, 30, 295.

[89] H. Kapur, D. R. Mottram, *Biochem. Pharmacol.*, 1978, 27, 1879.

[90] H. Kapur, P. N. Green, D. R. Mottram, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1979, 31, 188.

[91] W. L. Nelson, M. L. Powell, *J. Med. Chem.*, 1979, 22, 1125.

[92] C. B. Chapleo, P. L. Myers, R. C. M. Butler, J. C. Doxey, A. G. Roach, C. F. C. Smith, *J. Med. Chem.*, 1983, 26, 823.

[93] P. Venturelli, M. C. Menziani, M. Cocchi, F. Fanelli, P. G. De Benedetti, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 1992, 276, 327.

[94] W. Quaglia, M. Pignini, S. K. Tayebati, A. Piergentili, M. Giannella, G. Marucci, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 1520.

[95] W. Quaglia, M. Pignini, S. K. Tayebati, A. Piergentili, M. Giannella, G. Marucci, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 1520.

[96] M. R. Stillings, C. B. Chapleo, R. C. M. Butler, J. A. Davis, C. D. England, M. Myers, P. L. Myers, N. Tweddle, A. P. Welbourn, J. C. Doxel, C. F. C. Smith, *J. Med. Chem.*, 1985, 28, 1054.

- [97] L. Lalloz, V. Loppinet, *J. Med. Chem.*, 1981, 24, 994.
- [98] S. Yamauchi, F. Ishibashi, E. Taniguchi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1992, 56, 1760.
- [99] S. Yamauchi, E. Taniguchi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1992, 56, 1751.
- [100] H. Gotanda, S. Yamauchi, F. Ishibashi, E. Taniguchi, *Bosci. Biotech. Biochem.*, 1993, 57, 884.
- [101] H. Gotanda, S. Yamauchi, R. Takeya, *J. Fac. Kyushu Univ.*, 1993, 37, 349.
- [102] A. J. Quillinan, F. Scheinmann, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1973, 1329.
- [103] O. R. Gottlieb, A. A. L. Mesquita, G. G. Oliveira, M. T. Melo, *Phytochemistry*, 1970, 9, 2535.
- [104] O. R. Gottlieb, A. A. L. Mesquita, T. J. Nagem, G. G. Oliveira, *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, 1970, 42, 121.
- [105] B. Jackson, H. D. Locksley, I. Moore, F. Scheinmann, *J. Chem. Soc. (C)*, 1968, 2579.
- [106] O. R. Gottlieb, A. A. L. Mesquita, T. J. Nagem, M. P. Ferreira, *Rev. Latinoamer. Quím.*, 1974, 5, 140.
- [107] O. R. Gottlieb, A. A. L. Mesquita, G. G. Oliveira, M. T. Melo, *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, 1970, 42, 117.
- [108] I. M. Godfrey, M. V. Sargent, J. A. Elix, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1974, 1353.
- [109] Y. Naito, M. Sugiura, Y. Yamaura, C. Fukaya, K. Yokoyama, Y. Nakagawa, T. Ikeda, M. Senda, T. Fujita, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, 39, 1736.
- [110] S. Antus, E. Baitz-Gães, R. Bauer, A. Gottsegen, O. Seligmann, H. Wagner, *Liebigs Ann. Chem.*, 1989, 1147.
- [111] A. Arnoldi, A. Arnone, L. Merlini, *Heterocycles*, 1984, 22, 1537.

- [112] L. Merlini, A. Zanarotti, *Tetrahedron Letters*, 1975, 42, 3621.
- [113] S. Antus, R. Bauer, A. Gottsegen, O. Seligmann, H. Wagner, *Liebigs Ann. Chem.*, 1987, 357.
- [114] R. A. Finnegan, P. L. Bachman, *J. Pharm. Sci.*, 1965, 54, 633.
- [115] R. A. Finnegan, J. K. Patel, *J. Chem. Soc., Perkin I*, 1972, 1896.
- [116] R. M. Silverstein, G. C. Bassler, T. C. Morrill, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", fifth edition, John Wiley & Sons, INC, Singapura, 1991, p. 112.
- [117] B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith, A. T. Tatchell, "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry", fifth edition, Longman Scientific & Technical, United Kingdom, 1989, p. 1419.
- [118] O. R. Gottlieb "Introdução à Espectrometria de Massa das Substâncias Orgânicas" Ed. O. R. Gottlieb, Directoria de Bibliografia e Documentação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1970, p. 32.
- [119] *idem, ibid* [116], p. 34.
- [120] J. Seibl, "Espectrometria de Massa", Alhambra, Madrid, 1973, p. 22.
- [121] S. Gil, M. Parra, V. Sanz, A. Tortajada, *J. Nat. Prod.* 1988, 51, 339.
- [122] D. Barraclough, H. D. Locksley, F. Sheinmann, M. T. Magalhães, O. R. Gottlieb, *J. Chem. Soc. (B)*, 1970, 603.
- [123] "Carbon-13 NMR of Flavonoids" Ed. P. K. Agrawal, Elsevier, Amsterdam, 1989.
- [124] *idem, ibid* [117], p. 1418.
- [125] *idem, ibid* [117], p. 1419.
- [126] S. Quideau, J. Ralph, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, 1108.
- [127] A. M. S. Silva, "Síntese e Caracterização Estrutural de Flavonoides e Compostos Afins", Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, 1993.
- [128] S. Quideau, J. Ralph, *Holzforchung*, 1994, 48, 12.

- [129] *idem, ibid* [117], p. 1415.
- [130] S. Müller, R. R. Schmidt, *Helv. Chim. Acta*, 1993, 76, 616.
- [131] Y. Carrière, J. G. Millar, J. N. Mcneil, D. Miller, E. W. Underhill, *J. Chem. Ecol.*, 1988, 14, 947.
- [132] *idem, ibid* [117], p. 120.
- [133] H. S. P. Rao, *J. Chem. Educ.*, 1988, 65, 931.
- [134] *idem, ibid* [117], p. 466.
- [135] O. Botolini, S. Campestrini, F. Di Furia, G. Modena, *J. Org. Chem.*, 1987, 52, 5093.
- [136] "Dictionary of Organic Compounds", fifth edition, Chapman and Hall, London, 1982.
- [137] S. P. Gunasekera, M. U. S. Sultanbawa, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1975, 22, 2215.
- [138] S. P. Gunasekera, S. Ramachandran, S. Selliah, M. U. S. Sultanbawa, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1975, 2447.
- [139] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, "Purification of Laboratory Chemicals", third edition, Pergamon Press, Oxford, 1992, p. 157.
- [140] J. E. Atkinson, J. R. Lewis, *J. Chem. Soc. (C)*, 1969, 281.
- [141] A. A. Goldberg, A. H. Wragg, *J. Chem. Soc.*, 1958, 4227.
- [142] A. A. Goldberg, A. H. Wragg, *J. Chem. Soc.*, 1958, 4234.
- [143] R. K. Chaudhuri, F. Zymalkowski, A. W. Frahm, *Tetrahedron*, 1978, 34, 1837.
- [144] J. I. Okogun, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1976, 21, 2241.
- [145] H. Tanaka, I. Kato, Z. Ito, *Chem. Pharm. Bull.*, 1987, 35, 3603.

Parte B

DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE BIOLÓGICA

Parte B₁

**AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTI-HEPATOTÓXICA DA *trans*-
KIELCORINA, *trans*-ISOKIELCORINA B E RESPECTIVAS
XANTONAS PRECURSORAS.**

Introdução

I - Introdução

1. Preâmbulo.....	176
1.1. Toxicidade do <i>terc</i> -butil-hidroperóxido.....	179
1.2. Funções da glutathiona reduzida.....	184

I - Introdução

1. Preâmbulo

A pesquisa de agentes anti-hepatotóxicos tem sido desenvolvida essencialmente em produtos naturais obtidos a partir de plantas utilizadas em medicina popular [1]. A silimarina (mistura dos flavolignanós: silibina, siliadina e silicristina) ou o seu componente mais activo, a silibina, obtidos da planta *Silybum marianum* são talvez os compostos mais estudados quanto ao seu efeito anti-hepatotóxico [2-6]. Devido à actividade manifestada são utilizados na profilaxia e tratamento de várias doenças hepáticas [7]. É de notar que a silibina (5) (Fig. 1, p. 178) pode considerar-se um dos poucos compostos com acção anti-hepatotóxica perante a ingestão do fungo *Amanita phalloides* [2].

Algumas plantas das famílias Guttiferae e Gentianaceae têm sido também utilizadas em medicina popular no tratamento e prevenção de doenças hepáticas, entre outras aplicações medicinais [8, 9], mas tanto quanto se sabe, a natureza do(s) composto(s) responsável(eis) pela actividade a nível hepático é ainda desconhecida.

Uma vez que as xantonas e os xantonolignóides se encontram representados de uma forma significativa nos extractos, nomeadamente das espécies *Kielmeyra* e *Hypericum* [10-14] será de ter em conta a possibilidade de estes compostos apresentarem actividade a nível hepático.

Estudos realizados *in vivo* com as xantonas: mangostina e mangiferina, compostos isolados de *Garcinia mangostana* Linn. (Guttiferae) e de *Canscora decussata* Schult (Gentianaceae) respectivamente, bem como a xantona mangostina-3,6-di-O-glucosido demonstraram que estes compostos apresentam actividade protectora

contra a necrose hepática provocada pelo tetracloreto de carbono em ratinhos [15].

Considerando ainda as semelhanças estruturais e electrónicas entre as xantonas e xantonolignóides com a silibina (5), pareceu ser de grande interesse estudar estes compostos no que respeita a actividade anti-hepatotóxica. Neste sentido, foram efectuados ensaios para avaliar a actividade protectora contra a toxicidade induzida pelo *t*-BHP em hepatócitos isolados de rato, dos xantonolignóides *trans*-kielcorina (1) e *trans*-isokielcorina B (2) bem como dos seus precursores 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) (Fig. 1).

A silibina (5) foi testada nas mesmas condições experimentais com a finalidade de servir de controlo positivo.

A incubação dos hepatócitos isolados de rato com o *t*-BHP resulta numa acentuada morte celular, que é precedida pela depleção de glutationa intracelular e por peroxidação lipídica, que pode ser evitada por anti-oxidantes e sequestradores de radicais livres [16, 17].

A avaliação da capacidade anti-hepatotóxica da *trans*-kielcorina (1), *trans*-isokielcorina B (2), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4), contra a toxicidade induzida por este hidroperóxido orgânico, foi realizada através das determinações de viabilidade celular, níveis de GSH, GSSG e peroxidação lipídica.

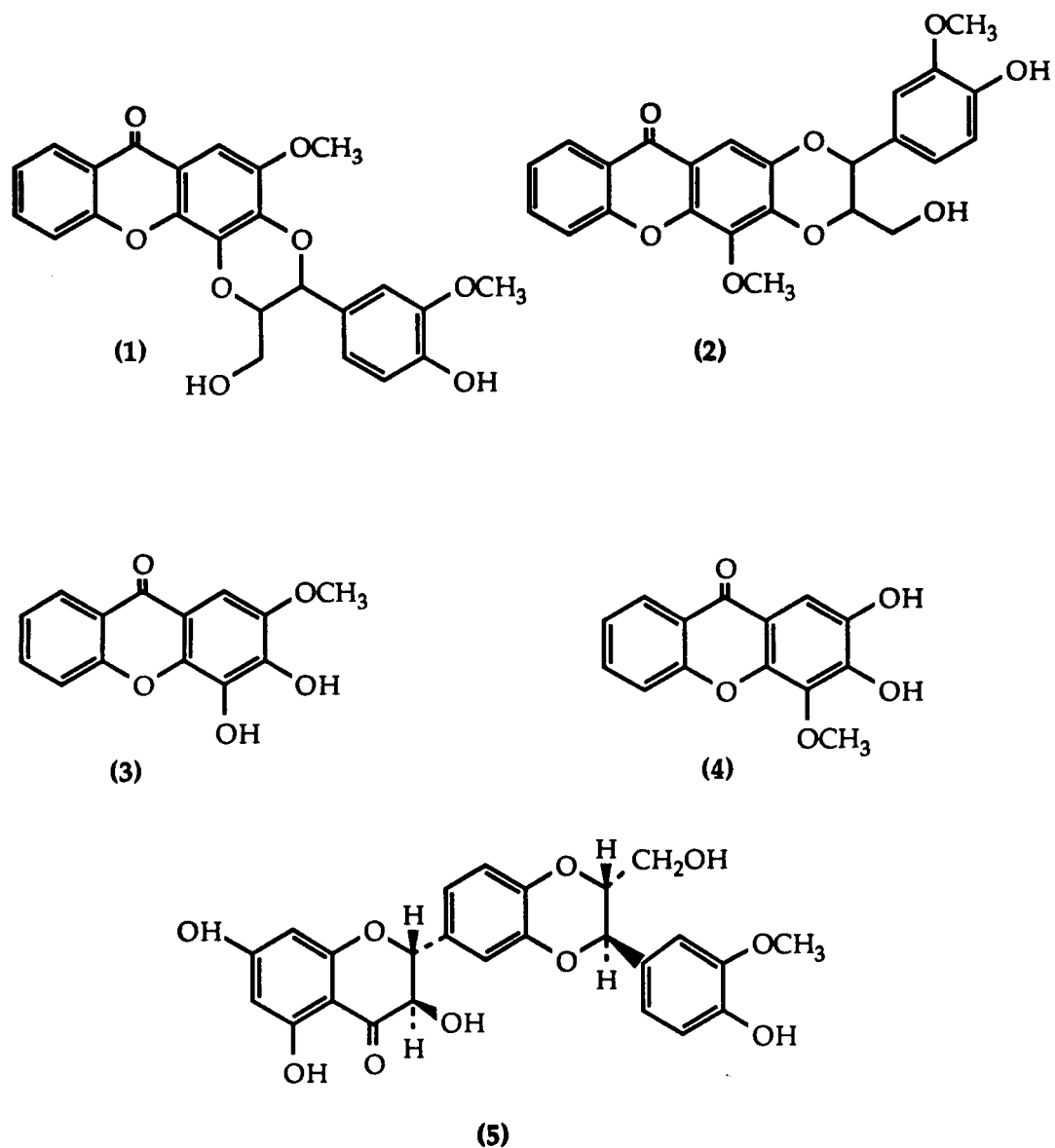


Fig. 1. Estruturas dos xantonolignóides *trans*-kielcorina (1) e *trans*-isokielcorina B (2), das xantonas 3,4-diidroxí-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxí-4-metoxixantona (4) bem como do flavolignano silibina (5).

2. Toxicidade do *terc*-butil-hidroperóxido

O *t*-BHP é um peróxido orgânico análogo aos hidroperóxidos lipídicos de cadeia curta gerados durante o metabolismo celular normal e também como resposta ao ataque oxidativo por xenobióticos [18]. A utilização deste composto para induzir experimentalmente a toxicidade tem sido comum em estudos de actividade anti-hepatotóxica [17, 19, 20].

Um aspecto importante da hepatotoxicidade induzida pelo *t*-BHP é a sua redução pela peroxidase da glutatona que o converte no álcool correspondente, com consumo de GSH que se oxida e forma GSSG [21, 22] (Fig. 2). A GSSG formada é subseqüentemente reduzida a GSH pela redutase da glutatona, causando a oxidação do NADPH a NADP⁺, formando assim um sistema fechado (ciclo redox) (Fig. 2) [23].

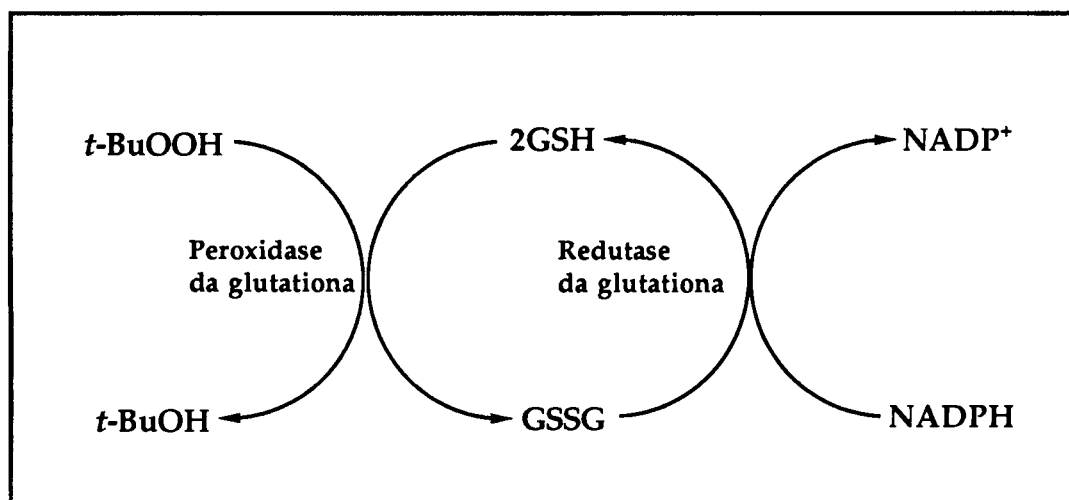


Fig. 2. Representação esquemática da conversão do *t*-BHP no seu álcool correspondente por acção da peroxidase da glutatona + GSH e redução da GSSG por acção da redutase da glutatona + NADPH.

Após intensa exposição ao *t*-BHP a capacidade celular para reduzir a GSSG pela redutase da glutatona ou a regeneração de NADPH poderão ser insuficientes, levando à acumulação de GSSG e de NADP⁺. O aumento da razão GSSG/GSH e da oxidação do NADPH podem ser considerados sinais de stress oxidativo [21, 22, 24]. À situação de stress oxidativo seguem-se geralmente distúrbios na homeostase do cálcio, peroxidação lipídica e oxidação de grupos sulfidrilos proteicos [25-27]. Assim, uma depleção profunda da GSH intracelular induzida pelo *t*-BHP precede os danos celulares, que podem resultar em peroxidação lipídica, oxidação e inactivação proteica, com consequente perda de viabilidade celular [16].

Outro aspecto da toxicidade do *t*-BHP tem a ver com a sua transformação nos radicais livres peroxilo e alcoxilo [28]. Esta transformação pode ser mediada pelo sistema enzimático citocromo P-450, ou catalizada pelos iões ferroso e férrico (Fig. 3, p. 181) [28-29].

O organismo possui defesas naturais contra a acção nefasta destes compostos de grande reactividade, nomeadamente a GSH, que ao sequestrar os radicais livres se transforma no radical tiilo, e a vitamina E que se transforma no radical α -tocoferilo (Fig. 3). Por sua vez, o radical α -tocoferilo pode ser regenerado a vitamina E pela GSH e o radical tiilo pode dimerizar formando a GSSG [30, 31] (Fig. 3). No entanto, se a produção de radicais livres ultrapassar a capacidade de defesa das células, estes passam a atacar macromoléculas intracelulares, nomeadamente lípidos, originando fenómenos nefastos como por exemplo a peroxidação lipídica.

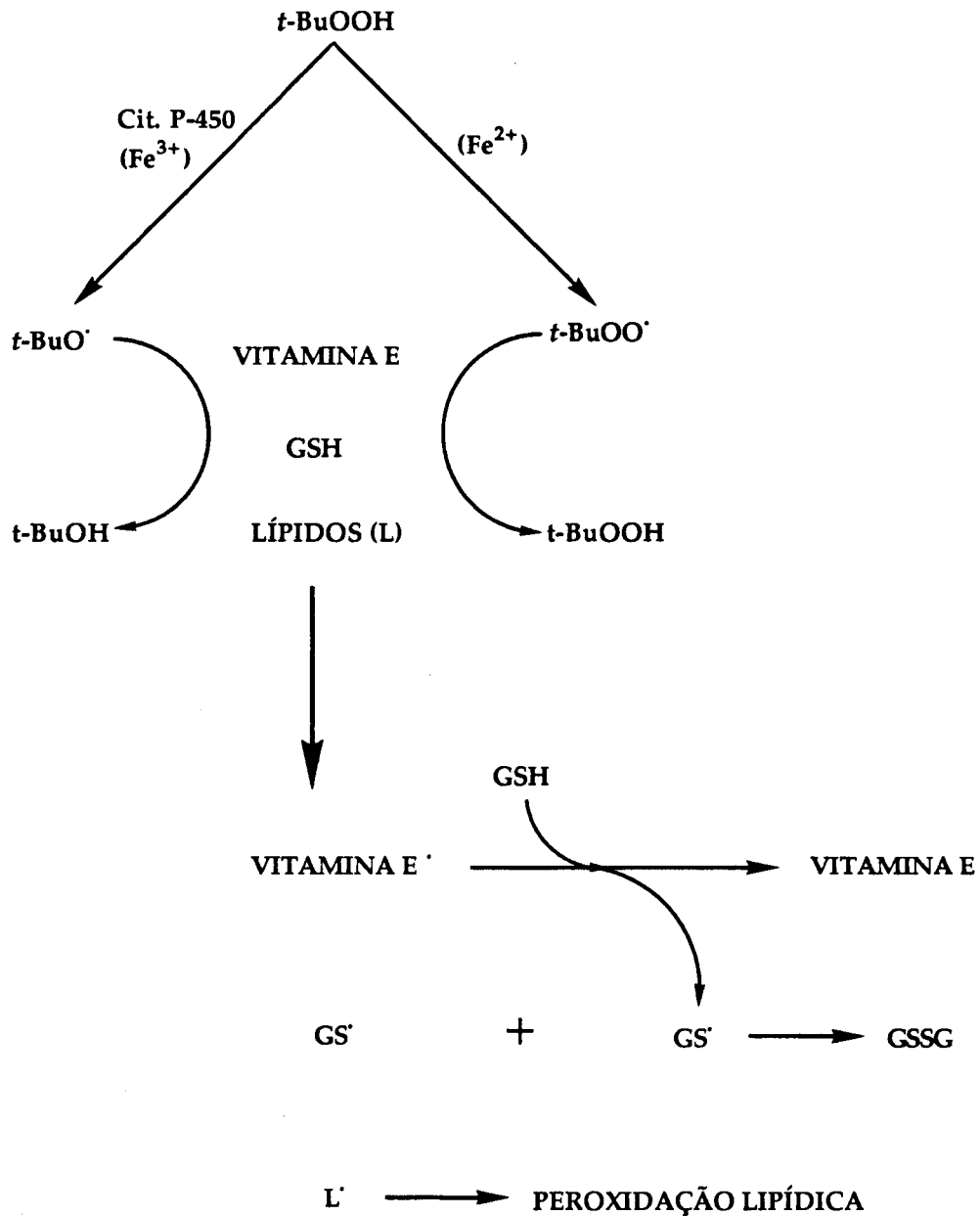


Fig. 3. Representação esquemática da conversão do *t*-BHP nos respectivos radicais livres, alcóxido e peróxido, bem como o efeito destes radicais a nível da vitamina E, GSH e lípidos.

O processo de peroxidação lipídica consiste em três fases: iniciação, propagação e finalização (Fig. 4, p. 182) [32, 33].

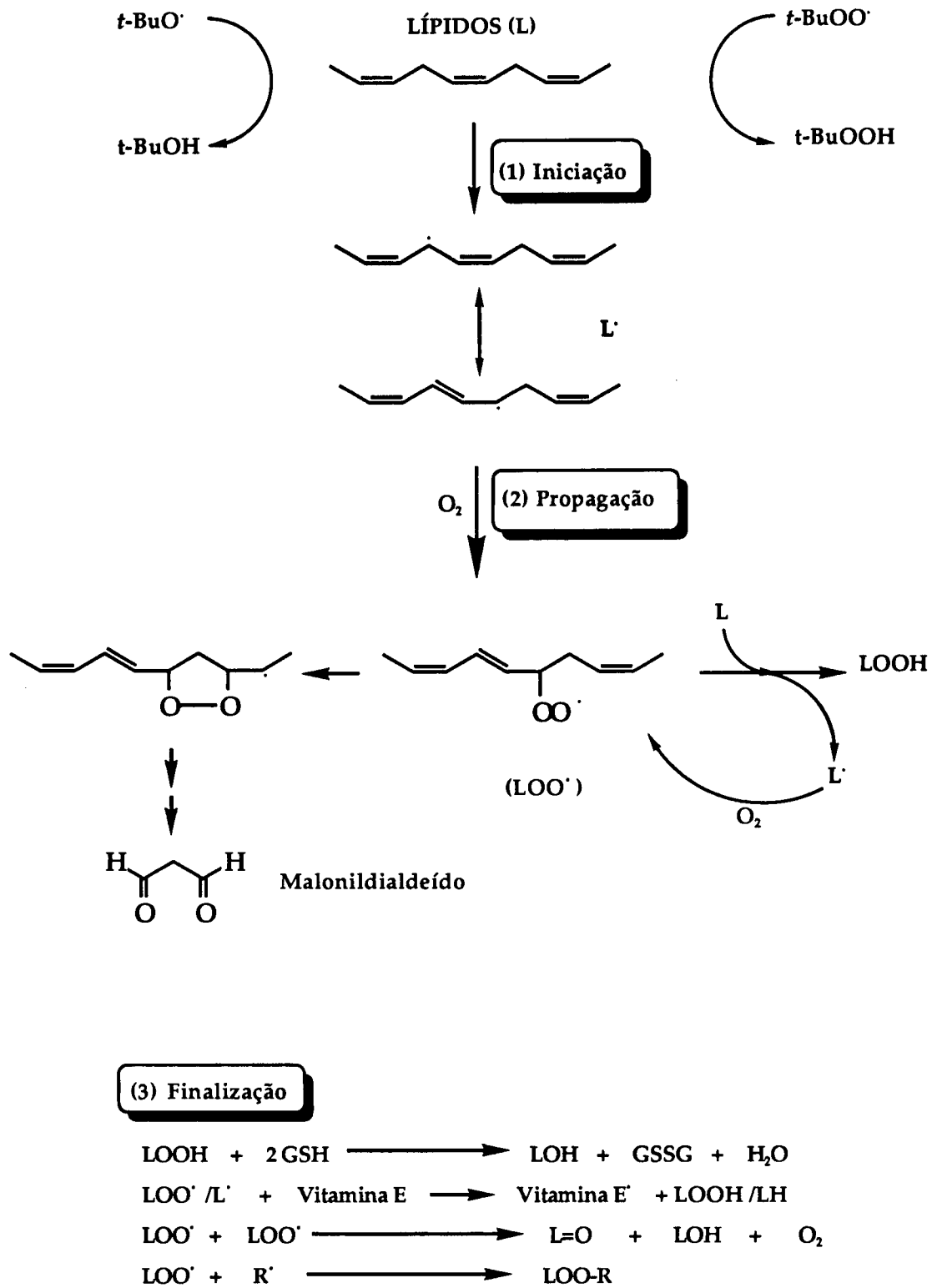


Fig. 4. Representação esquemática das etapas e dos radicais livres envolvidos no processo de peroxidação lipídica induzida pelo *t*-BHP.

Iniciação - O primeiro passo da iniciação da peroxidação lipídica a partir de um ácido gordo poliinsaturado (L) é o ataque por um radical livre ($R\cdot$) capaz de retirar um dos átomos de hidrogénio duplamente alílicos de um átomo de carbono situado entre duas ligações duplas (Fig. 4) [34]. Assim, qualquer composto que reaja com estes radicais livres iniciadores, sem gerar radicais reactivos, pode ser considerado um anti-oxidante que actua por inibição da iniciação.

Propagação - Do ataque do radical livre a um ácido gordo poliinsaturado (L) resulta um composto (RH) e um radical pentadienilo deslocalizado ($L\cdot$), que pode reagir rapidamente com oxigénio molecular para formar o radical peroxilo ($LOO\cdot$) (Fig. 4). Este último radical abstrai de novo um átomo de hidrogénio a um ácido gordo poliinsaturado, formando o correspondente hidroperóxido lipídico ($LOOH$) e um novo radical ($L\cdot$). Este processo propaga-se cíclica e continuamente, uma vez que estão constantemente a formar-se radicais lipídicos ($L\cdot$).

A formação de endoperóxidos lipídicos a partir de ácidos gordos poliinsaturados, contendo pelo menos três ligações duplas metilénicas interruptas, pode levar à formação de malonildialdeído como produto de degradação (Fig. 4). A quantificação do malonildialdeído tem sido por isso utilizada para determinar o índice de peroxidação lipídica.

Finalização - O fim do processo ocorre quando há uma condensação de radicais ou a intervenção das defesas anti-oxidantes enzimáticas e não enzimáticas (Fig. 4) [32-34].

Os danos membranares resultantes da peroxidação lipídica podem interferir com fenómenos de transdução, reconhecimento celular, transporte, manutenção do potencial de membrana e metabolismo, levando também à perda de viabilidade celular [33].

3. Funções da glutathiona reduzida

A GSH (N-(N-L- γ -glutamil-L-cisteinil) glicina) (Fig. 5) é o tiol não proteico mais importante nos organismos vivos e encontra-se presente em quase todas as células dos mamíferos, onde a sua concentração intracelular é relativamente alta (entre 0,5 e 10 mM) [30, 35] sendo o fígado o órgão mais rico neste tripéptido [30, 36, 37].

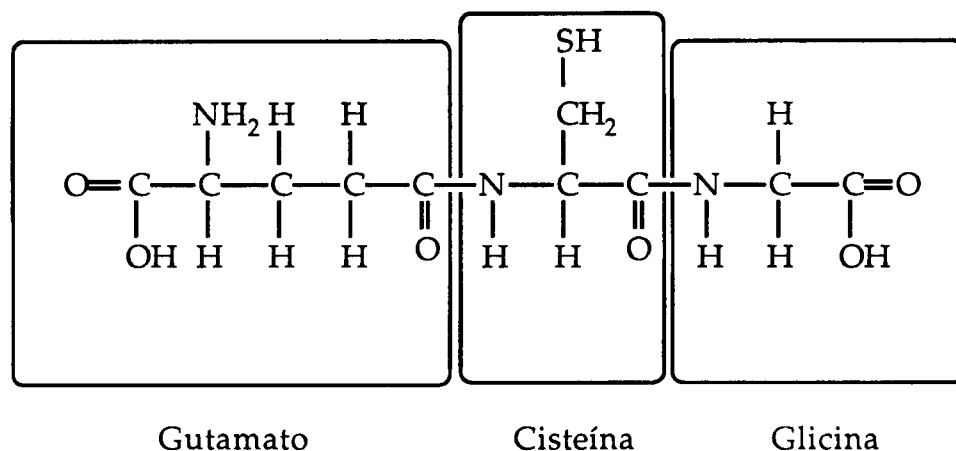


Fig. 5. Estrutura química da glutathiona reduzida

Trata-se de um tripéptido linear, pouco comum devido à ligação entre o grupo amina do resíduo de cisteína e o grupo carboxilo ligado ao átomo de carbono γ do ácido glutâmico, que o torna resistente à degradação pelas peptidases, excepto pela γ -glutamyltranspeptidase, situada especialmente em algumas membranas celulares, nomeadamente nos rins, pâncreas, intestinos e fígado [23, 38].

Em virtude da sua reactividade devida ao grupo SH presente no resíduo de cisteína, a GSH tem um papel importante na manutenção da homeostase celular e na protecção contra vários agressores celulares:

-Tem a capacidade de reagir com radicais livres, formando o radical livre GS \cdot , o qual por sua vez dimeriza e forma a GSSG, que pode ser então regenerada a GSH pela redutase da glutathiona utilizando o

NADPH como dador de H [30].

-Contribui para a manutenção do equilíbrio sulfidrilo-dissulfureto proteico e do potencial redox celular através da sua acção anti-oxidante. Este potencial é essencial para a funcionalidade de certas proteínas, nomeadamente enzimas, como as ATPases dependentes do Ca^{2+} , que funcionam como bombas de cálcio ligadas à membrana citoplasmática e microsomal e que mantêm controlados os níveis plasmáticos de Ca^{2+} livre [22, 36].

-Funciona como sequestrador nucleofílico de vários compostos e dos seus metabolitos, através de mecanismos químicos e enzimáticos, ligando-se covalentemente a centros electrofílicos [22, 36, 39].

-É responsável pela destruição de hidroperóxidos (H_2O_2 e ROOH) mediada pela peroxidase da glutathione [22,40].

-Funciona como reservatório não tóxico e não rapidamente oxidável de cisteína [35].

-Actua como cofactor de várias reacções bioquímicas e participa na biossíntese de vários compostos endógenos, nomeadamente, das prostaglandinas, dos leucotrienos e dos estrogénios catecólicos [36].

-Durante a síntese de DNA, a GSH é necessária para a redução de glutarredoxina, que por sua vez fornece electrões à redutase do ribonucleotido [35].

-Está envolvida na regeneração da vitamina E e na inibição da peroxidação lipídica [31].

O catabolismo do *t*-BHP origina espécies reactivas que levam à perda da homeostase da glutathione, perda esta que precede a

diminuição de viabilidade celular. Assim, um composto capaz de manter a concentração de GSH dentro de níveis fisiológicos, apesar do ataque do *t*-BHP, poderá evitar a morte celular e funcionará como anti-hepatotóxico.

Parte Experimental

II - Parte Experimental

1. Materiais utilizados.....	189
2. Animais.....	189
3. Isolamento dos hepatócitos de rato.....	190
3.1. Procedimento cirúrgico.....	191
3.2. Sistema de perfusão.....	191
3.3. Perfusão do fígado e isolamento dos hepatócitos.....	193
4. Incubação dos hepatócitos.....	194
5. Determinação da viabilidade dos hepatócitos isolados.....	195
5.1. Exclusão do azul de tripano.....	196
5.2. Libertação de desidrogenase láctica para o meio extracelular.....	197
6. Determinação dos níveis de glutathiona reduzida.....	199
7. Determinação dos níveis de glutathiona oxidada	199
8. Determinação da extensão da peroxidação lipídica.....	200
9. Análise estatística.....	201

II - Parte experimental

1. Materiais utilizados

A colagenase (tipo II), *terc*-butil-hidroperóxido, albumina sérica bovina (fracção V), ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanossulfónico, glutatona reduzida, redutase da glutatona (EC 1.6.4.2), forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotido fosfato, forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotido, ácido pirúvico, tris-(hidroximetil)aminometano, ácido etilenoglicol-bis (β -aminoetiléter) N,N,N',N'-tetraacético e ácido 2-tiobarbitúrico, são produtos da marca SIGMA.

Os ácidos cloroacético e perclórico, metanol e todos os restantes reagentes químicos são produtos da marca MERCK.

Os solventes usados em HPLC têm grau de pureza "Lichrosolv" e são produtos da marca MERCK. A água usada na fase móvel foi purificada com resinas de troca iónica.

Todos os produtos usados que não constam da lista anterior são de qualidade *pro analysi*.

A silibina foi oferecida pela firma MADAUS A. G. (Alemanha) através da sua representante em Portugal - Neo-Farmacêutica.

2. Animais

Utilizaram-se ratos Wistar (machos) de 200 a 250 g de peso. Os animais tiveram livre acesso à água e alimentos, e foram mantidos a uma temperatura ambiente de 20 ± 5 °C e humidade compreendida entre 40 a 60 %.

Os procedimentos cirúrgicos ocorreram sempre entre as 9 e as 10 horas.

3. Isolamento dos hepatócitos de rato

O isolamento dos hepatócitos foi executado segundo o método de Moldéus *et al.* [41]. Este baseia-se na perfusão do fígado com colagenase, após remoção do Ca^{2+} , através de uma preperfusão com um agente quelante, em sistema de recirculação, num rato anestesiado.

Utilizam-se quatro soluções tamponadas em sequência: A, B, C e D:

Solução A: Tampão de Hank modificado, pH 7,4 (NaCl, 8,00 g; KCl, 0,40 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,20 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g; KH_2PO_4 , 0,06 g; NaHCO_3 , 2,10 g, por litro) ao qual se adicionou 0,6 mM EGTA e 0,67% de albumina.

Solução B: Tampão de Hank modificado, mas sem albumina e EGTA, com 0,05% de colagenase e 0,12% de CaCl_2 .

Solução C: Tampão Krebs-Henseleit com Hepes, pH 7,4 (NaCl, 6,97 g; KCl, 0,36 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,30 g; KH_2PO_4 , 0,16 g; NaHCO_3 , 2,43 g; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,38 g e HEPES, 3,0 g, por litro), ao qual se adicionou 1% de albumina.

Solução D: Tampão Krebs-Henseleit com HEPES.

Todas as soluções foram arejadas com uma mistura gasosa constituída por 95% O_2 e 5% CO_2 , e a temperatura estabilizada a 37 °C antes de serem utilizadas. Esta mesma mistura gasosa foi também usada durante a perfusão do fígado e incubação dos hepatócitos.

3.1. Procedimento cirúrgico

a) Os ratos foram anestesiados com éter etílico, sendo depois colocados em decúbito dorsal numa placa de dissecação, onde os membros foram convenientemente imobilizados.

b) Abriu-se a cavidade abdominal com uma incisão em forma de V, começando na base do abdómen e estendendo-se até um pouco acima do diafragma.

c) Expôs-se a veia porta hepática deslocando-se as vísceras para a direita. Passaram-se dois fios de algodão sob a veia porta, fez-se uma pequena incisão neste vaso a cerca de 1 cm do fígado, e enfiou-se rapidamente uma cânula através da qual gotejava a **solução A** e cujo fluxo foi regulado (cerca de 1 a 2 gotas por segundo), dando-se assim o início da perfusão *in situ*.

3.2. Sistema de perfusão

Na Fig. 13 está representado o sistema utilizado para perfundir o fígado com as soluções tamponadas e gaseificadas com uma mistura de 95% O₂ e 5% CO₂.

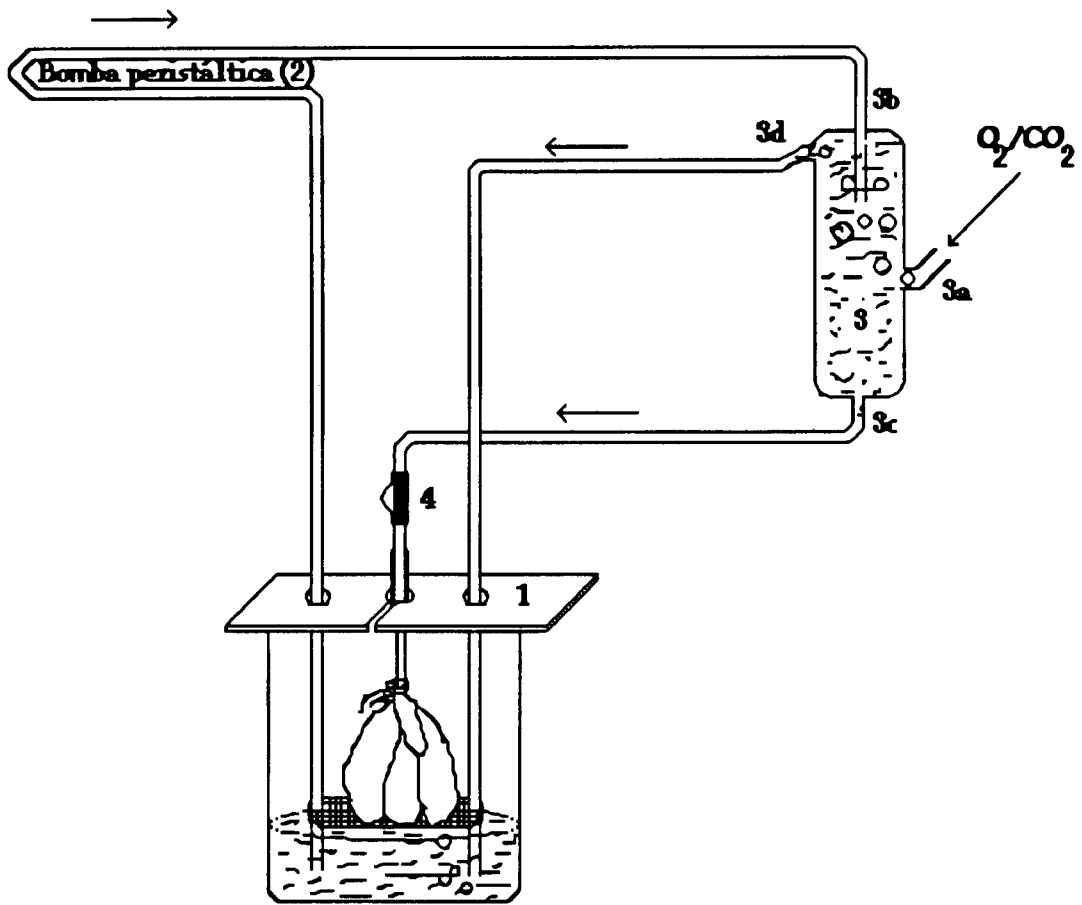


Fig. 13. Esquema do sistema de perfusão utilizado no isolamento dos hepatócitos de rato - adaptado de [42].

Este sistema é constituído por:

-um suporte (1) onde se colocam dois tubos que permitem a entrada e saída do líquido nutritivo do goblé, aquando da reperfusão, e a cânula com o fígado.

-uma bomba peristáltica (2) que permite a circulação das soluções de perfusão.

-um reservatório (3) situado a cerca de 50 cm de altura, com cerca de 10 cm de comprimento e 1,5 cm de largura, com quatro aberturas:

a) uma abertura (3a) para a entrada da mistura gasosa, cuja pressão é regulada por um manómetro de pressão.

b) uma abertura (3b) para a entrada da solução de perfusão.

c) uma abertura (3c) para a saída da solução de perfusão, ligada a um tubo que possui um regulador de fluxo (4) e uma cânula.

d) uma abertura (3d), para a saída da mistura gasosa e solução de perfusão em excesso, que retorna ao goblé inicial, no caso de o débito desta solução ser superior à velocidade de perfusão do fígado.

3.3. Perfusão do fígado e isolamento dos hepatócitos

Após o início da perfusão *in situ* transferiu-se o fígado para um goblé que continha a **solução A**, e manteve-se a perfusão durante 5 minutos.

Após este período, deixou-se sair completamente a **solução A** do reservatório de oxigenação, interrompeu-se o fluxo e deslocou-se o suporte (1) com a cânula e o fígado para um goblé que continha a **solução B**. Ajustou-se novamente o fluxo para 1 a 2 gotas por segundo e continuou-se a perfusão durante 10 a 12 minutos, até o fígado perder a sua plasticidade quando é pressionado levemente.

No final deste tempo, retirou-se o fígado da cânula e colocou-se na **solução C** (50 ml, à temperatura ambiente) num boião de polietileno.

Rompeu-se a membrana que reveste o fígado e dispersaram-se as células hepáticas com agitação suave.

A suspensão obtida foi filtrada por um filtro de poliamida para dois tubos de centrífuga de 50 ml. Centrifugou-se durante 1 minuto a

200 r.p.m. e aspirou-se o sobrenadante.

Seguidamente, os tubos foram cheios com solução D e agitados levemente para lavar as células. Repetiu-se mais duas vezes a lavagem, centrifugação e aspiração do sobrenadante.

No final, mediu-se o volume de células e determinou-se o número de hepatócitos obtidos e a viabilidade inicial, pelo método de exclusão do azul de tripano [43].

Nos estudos realizados, o rendimento do isolamento variou entre 200 e 400 milhões de hepatócitos por fígado. A viabilidade no início das experiências situou-se entre os 85 e 95%.

4. Incubação dos hepatócitos

As células ($1,0 \times 10^6$ células /ml num volume total de 1,0 ml) foram distribuídas por 14 frascos e pré-incubadas durante 60 minutos em solução D, em banho termostatado a 37 °C, com agitação (cerca de 90 oscilações por minuto), em frascos de 10 ml rolhados. Os frascos foram arejados com uma mistura gasosa constituída por, 95% O₂ e 5% CO₂ e humidificada, sempre que eram abertos.

Após o período de pré-incubação, juntou-se em cada frasco 10 µl de composto a testar dissolvido em DMSO de modo que a cada suspensão celular correspondesse um composto em determinada concentração. Para além dos compostos a testar, em cada experiência existiram sempre dois controlos aos quais se adicionou, nesta fase, apenas DMSO.

Numa série de experiências os compostos testados foram a silibina (5), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e *trans*-kielcorina (1) dissolvidos

em DMSO, nas concentrações de 0,025; 0,050; 0,100 e 0,200 mM.

Noutra série de experiências, os compostos testados foram a silibina (5), a 2,3-diidroxí-4-metoxixantona (4) e a *trans*-isokielcorina B (2), também dissolvidos em DMSO e nas mesmas concentrações que os compostos anteriores.

Passados cinco minutos da adição dos compostos a testar, ou apenas de DMSO, adicionou-se a todos os frascos 10 µl de *t*-BHP dissolvido em Krebs numa concentração final de 1,0 mM na suspensão celular, excepto num dos frascos controlo, no qual apenas foi adicionado 10 µl de Krebs.

Após 30 minutos de incubação com *t*-BHP, retiraram-se alíquotas de suspensão celular de cada frasco para determinação da viabilidade celular pelos métodos da exclusão do azul de tripano e determinação da LDH libertada para o meio extracelular, bem como para a determinação dos níveis de GSH, GSSG e extensão da peroxidação lipídica.

5. Determinação da viabilidade dos hepatócitos isolados

Os hepatócitos viáveis são aqueles que possuem morfologia normal, membrana plasmática íntegra, e funções bioquímicas dinâmicas. Na prática, quando se pretende determinar a viabilidade, o que geralmente se avalia é a integridade da membrana plasmática. Esta integridade foi avaliada pelos métodos:

- Exclusão do corante azul de tripano.
- Determinação da LDH libertada para o meio extracelular.

5.1. Exclusão do azul de tripano

O azul de tripano é um corante orgânico azul [44] que é excluído pelos hepatócitos que possuem as respectivas membranas intactas, enquanto que as células com membranas danificadas o incluem rapidamente. Este corante tem carga negativa e é excluído pelos hepatócitos como resultado de uma manutenção do potencial de membrana [45, 46]. A perda deste potencial, devido a danos celulares, permite a penetração do azul de tripano. Para que a inclusão se efectue não é exigida a existência de danos em grande extensão uma vez que, geralmente, as membranas plasmáticas das células coradas aparecem frequentemente intactas quando vistas ao microscópio electrónico [47].

A exclusão do azul de tripano é o método de escolha para a determinação da integridade das células na suspensão inicial. Não existem dúvidas de que até ao momento constitui o processo mais simples e rápido para a determinação de danos celulares e, como primeira aproximação, a proporção de células mortas pode ser determinada contando o número de células coradas e relacionando-as com o número total de células por contagem em câmara de Neubauer [43].

Para a determinação inicial do número de células isoladas e viabilidade da suspensão celular, adicionaram-se 40 µl da suspensão celular a 360 µl de solução a 4% de azul de tripano em tampão fosfato pH 7,4. Deixou-se em repouso, num banho de gelo, durante 2 minutos. Ao final deste tempo, fez-se a contagem ao microscópio óptico, na área central nos dois lados da câmara de Neubauer.

Após a contagem das células, estas foram diluídas com solução D até à concentração de $1,0 \times 10^6$ células/ml.

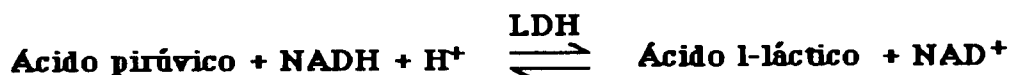
Para a determinação da viabilidade, após esta diluição das células, a solução de azul de tripano e a suspensão celular foram misturadas em proporções iguais (0,1 ml/0,1 ml) e não 0,04 ml/0,36 ml

(células/corante) como se fez inicialmente.

Para calcular a % de viabilidade celular, dividiu-se o número de células viáveis pelo número total de células (viáveis + não viáveis) e multiplicou-se por 100.

5.2. Determinação da LDH libertada para o meio extracelular

A LDH (EC 1.1.1.28) é uma enzima que intervém no último passo da glicólise anaeróbica, catalizando a redução reversível do ácido pirúvico a ácido láctico:



Localiza-se quase inteiramente no citoplasma das células e o seu uso na medição da integridade celular tem algumas vantagens sobre a técnica da exclusão do azul de tripano [48].

Em contraste com a avaliação pela exclusão do azul de tripano, não tem importância a possível ocorrência de lise celular, uma vez que se pode fazer uma estimativa exacta de danos celulares mesmo que as células danificadas se tenham desintegrado. Assim, apesar das células desintegradas terem desaparecido, a LDH correspondente a estas células encontra-se no sobrenadante e, sendo mensurável, traduz a extensão da viabilidade celular [48].

Além disso, são evitados os problemas estatísticos que aparecem com a técnica da exclusão do azul de tripano e que são devidos ao pequeno número de células que são examinadas.

A medição de LDH não deve ser utilizada para a determinação do grau de danos celulares na suspensão inicial uma vez que, durante a obtenção dos hepatócitos isolados, as células são submetidas a várias lavagens, durante as quais se perde a LDH libertada pelas células danificadas [49].

A quantidade desta enzima na suspensões celulares foi determinada medindo a diminuição da absorção óptica a 340 nm, quando o NADH é oxidado a NAD⁺.

1. Determinação da LDH extracelular:

Retiraram-se 200 µl de cada suspensão celular para um "eppendorf" e centrifugou-se a 6000 r.p.m. durante 10 segundos. Transferiu-se o sobrenadante para outro "eppendorf" e manteve-se entre 0 e 4 °C até ao doseamento de LDH.

2. Determinação da LDH total:

Retiraram-se 100 µl de cada suspensão celular para um "eppendorf" e adicionou-se um volume igual de Triton X-100 a 1% . Centrifugou-se a 6000 r.p.m. durante 10 segundos. Transferiu-se o sobrenadante para outro "eppendorf" e manteve-se entre 0 e 4 °C até ao doseamento de LDH.

3. Análise cinética da LDH:

Transferiu-se 1,4 ml da solução de ácido pirúvico (3,75 mg de piruvato de sódio em 100 ml de tampão de fosfatos pH 7,5) e 50 µl da solução de NADH (6,66 mg de NADH.3H₂O em 1 ml de tampão de fosfatos pH 7,5), para um tubo de ensaio, adicionaram-se 50 µl de amostra, preparada em 1 e 2, e homogeneizou-se.

Registou-se a variação da absorvência a 340 nm em espectrofotómetro Shimadzu 160, determinando-se assim a velocidade de desaparecimento do NADH com leituras de 10 em 10 segundos durante 1 minuto.

Os resultados foram expressos em termos da % de LDH libertada (quantificada no sobrenadante), correspondendo a LDH total (100%) à que é obtida após lise total das células.

6. Determinação dos níveis de glutathiona reduzida

A determinação dos níveis de GSH foi realizada por HPLC com detecção electroquímica após precipitação das suspensões celulares com ácido perclórico [50].

1. Retiraram-se 100 μ l de cada suspensão celular para um "eppendorf", adicionaram-se 900 μ l de ácido perclórico (concentração final de 5%) e centrifugou-se durante 5 minutos a 6000 r.p.m..
2. Filtrou-se o sobrenadante por um filtro de 0,45 μ m, e injectou-se 100 μ l de cada amostra num sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução com Detector Electroquímico.

7. Determinação dos níveis de glutathiona oxidada

A determinação dos níveis de GSSG foi realizada por HPLC com detecção electroquímica, após incubação das amostras com redutase da glutathiona e NADPH, seguida de precipitação com ácido perclórico. Efectuou-se assim, a medição da glutathiona total (GSH+GSSG), sendo a GSSG determinada por cálculo, subtraindo-se a GSH à glutathiona total [50].

1. Retiraram-se 100 μ l de cada suspensão celular para um "eppendorf", adicionaram-se 900 μ l da mistura Tris / L-serina / Na-borato pH 7,4 (concentração final de 50 mM / 25 mM / 50 mM), e congelaram-se as amostras a -80 °C.
2. As amostras foram descongeladas e desintegradas com um

homogeneizador Politron, na velocidade máxima, durante 1 minuto (verificou-se a eficácia da desintegração através do microscópio óptico).

Retiraram-se alíquotas de 500 μl , às quais se adicionou redutase da glutathiona e NADPH nas concentrações finais de 6 UI e 0,2 mM respectivamente. A determinação do tempo necessário de incubação foi realizado por espectrofotometria, medindo-se a quantidade necessária de NADPH e enzima, bem como o tempo necessário de incubação para que todo o GSSG se pudesse transformar em GSH.

3. Após a incubação com a enzima e NADPH, durante 2 minutos, precipitaram-se as amostras com ácido perclórico (concentração final de 5%). Filtrou-se o sobrenadante por um filtro de 0,45 μm , e injectou-se 100 μl de cada amostra num sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução com Detector Electroquímico determinando-se assim a glutathiona total.

8. Determinação da extensão da peroxidação lipídica

A extensão da peroxidação lipídica foi quantificada com base na formação de substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico [17, 51].

1. Retiraram-se 250 μl de cada suspensão celular para um "ependorf" e adicionaram-se 500 μl de ácido tricloroacético a 10%.

2. O precipitado foi centrifugado durante 20 segundos a 6000 r.p.m..

3. Retiraram-se 500 μl de sobrenadante ao qual se adicionou igual volume de ácido tiobarbitúrico a 1%.

4. A mistura foi aquecida durante 10 minutos em banho de água à ebulição.

5. Após arrefecimento, foi feita a leitura da absorvência a 535 nm num espectrofotómetro Shimadzu 160.

9. Análise estatística

Os resultados apresentam-se sob a forma de médias \pm erros padrão. As diferenças significativas entre os controlos e as células tratadas apenas com *t*-BHP foram determinadas pelo teste *t* de Student. As diferenças significativas entre as células tratadas com *t*-BHP e *t*-BHP + composto em estudo foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$.



Resultados

III - Resultados

A incubação dos hepatócitos isolados de rato com *t*-BHP 1,0 mM, durante 30 minutos, causou:

Perda da viabilidade celular expressa pela diminuição da percentagem de células que excluem o azul de tripano (Fig. 6, p. 207 e Tabela 1, p. 214) e pelo aumento de LDH no meio extracelular (Fig. 7, p. 208 e Tabela 1, p. 214).

Peroxidação lipídica, expressa pelo aumento de substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Fig. 8, p. 209 e Tabela 1, p. 214).

Depleção do conteúdo de GSH (Fig. 9, p. 210 e Tabela 1, p. 214).

Aumento na formação de GSSG (Fig. 10, p. 211 e Tabela 1, p. 214).

Aumento da razão GSSG/GSH (Fig. 11, p. 212 e Tabela 1, p. 214).

Depleção do conteúdo de glutathiona total (GSH + GSSG) (Fig. 12, p. 213 e Tabela 1, p. 214).

A incubação dos hepatócitos isolados de rato com *trans*-kielcorina (1), *trans*-isokielcorina B (2), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3), 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) e silibina (5) nas concentrações de 0,025; 0,050; 0,100 e 0,200 mM protegeu os hepatócitos contra os efeitos tóxicos do *t*-BHP, como se pode verificar nos resultados da exclusão de azul de tripano pelas células, libertação de LDH, produção de TBARS e da alteração homeostase da glutathiona (Fig. 6 - 12).

A hepatoprotecção observada para estes cinco compostos foi dependente da concentração, de um modo geral, para todos os parâmetros determinados (com excepção da glutathiona total na qual não se observou qualquer efeito significativo).

A 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) atenuaram a perda de viabilidade celular em todas as concentrações estudadas (Fig. 6 e 7). A protecção obtida com a 3,4-

diidroxido-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxido-4-metoxixantona (4) foi sempre significativamente maior que a protecção obtida pela silibina (5), a qual manifesta protecção apenas nas duas concentrações mais elevadas, no que respeita à exclusão de azul de tripano (Fig. 6), ou nas três concentrações mais elevadas no que respeita à libertação de LDH (Fig. 7).

A *trans*-Kielcorina (1) apresenta uma protecção significativa da viabilidade celular nas três concentrações mais elevadas, sendo este composto mais eficaz que a silibina (5) nas concentrações de 0,050 e 0,100 mM (Fig. 6 e 7).

A *trans*-isokielcorina B (2) apresenta uma protecção significativa da viabilidade celular nas três concentrações mais elevadas (Fig. 6 e 7), sendo também este composto mais eficaz que a silibina (5) nestas três concentrações (Fig. 6 e 7).

A protecção das células demonstrada na viabilidade celular foi significativamente maior para a 3,4-diidroxido-2-metoxixantona (3) do que para a *trans*-kielcorina (1) a 0,050 e 0,100 mM (Fig. 6 e 7). Este efeito foi também significativamente maior para a 2,3-diidroxido-4-metoxixantona (4) do que para a *trans*-isokielcorina B (2) a 0,025 e 0,050 mM (Fig. 6). Quando os hepatócitos foram protegidos com 3,4-diidroxido-2-metoxixantona (3) e com 2,3-diidroxido-4-metoxixantona (4) a 0,050, 0,100 e 0,200 mM, a protecção da viabilidade celular alcançou um patamar próximo dos valores controlo.

Curiosamente, a protecção da viabilidade celular pela 3,4-diidroxido-2-metoxixantona (3) foi semelhante à obtida pela 2,3-diidroxido-4-metoxixantona (4), embora o efeito da *trans*-isokielcorina B (2) tenha sido significativamente maior do que o efeito da *trans*-kielcorina (1) a 0,200 mM ($p \leq 0,05$) (Fig. 7).

A diminuição da peroxidação lipídica (Fig. 8) por acção da silibina (5), *trans*-isokielcorina B (2), 2,3-diidroxido-4-metoxixantona (4) e 3,4-

diidroxí-2-metoxixantona (3) foi significativa para todas as concentrações estudadas, bem como para a *trans*-kielcorina (1) para as três concentrações mais elevadas. Na presença de 0,100 e 0,200 mM de 3,4-diidroxí-2-metoxixantona (3) e de 2,3-diidroxí-4-metoxixantona (4) a quantidade de TBARS encontrada nas suspensões celulares foi semelhante aos níveis do controlo.

A protecção obtida pela 2,3-diidroxí-4-metoxixantona (4) e 3,4-diidroxí-2-metoxixantona (3) contra a peroxidação lipídica provocada pelo *t*-BHP, foi semelhante para os dois compostos, em todas as concentrações. Este efeito foi significativamente mais pronunciado do que o efeito da silibina (5) nas três concentrações mais elevadas para a 3,4-diidroxí-2-metoxixantona (3) e em todas as concentrações para a 2,3-diidroxí-4-metoxixantona (4). Além disso, a diminuição da peroxidação lipídica pela 3,4-diidroxí-2-metoxixantona (3) e pela 2,3-diidroxí-4-metoxixantona (4), foi significativamente maior do que pela *trans*-kielcorina (1) e *trans*-isokielcorina B (2) respectivamente, nas três concentrações mais elevadas.

A diminuição da peroxidação lipídica pela *trans*-kielcorina (1) e pela *trans*-isokielcorina B (2) foi semelhante para as concentrações de 0,025, 0,050 e 0,100 mM, mas a 0,200 mM a *trans*-isokielcorina B (2) foi significativamente mais eficaz do que o seu isómero. Esta protecção foi também semelhante entre a *trans*-kielcorina (1) e a silibina (5) em todas as concentrações estudadas, embora significativamente mais pronunciada para a *trans*-isokielcorina B (2) do que para a silibina (5) a 0,025 e 0,200 mM.

O *t*-BHP induziu depleção celular de GSH (Fig. 9), aumento da formação de GSSG (Fig. 10), e aumento da razão GSSG/GSH (Fig. 11). Estes efeitos diminuíram significativamente, quando as células foram incubadas com silibina (5), *trans*-kielcorina (1), *trans*-isokielcorina B (2), 3,4-diidroxí-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxí-4-metoxixantona (4).

Não obstante os diferentes efeitos protectores encontrados para a

viabilidade celular e para a peroxidação lipídica, o efeito sobre os níveis de GSH foi semelhante para todos os compostos em todas as concentrações estudadas, nunca atingindo os valores controlo. A silibina (5) e a *trans*-kielcorina (1) na concentração 0,025 mM e a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) nas concentrações 0,025 e 0,050 mM não tiveram qualquer efeito sobre a depleção de GSH induzida pelo *t*-BHP (Fig. 9).

O aumento da formação de GSSG induzido pelo *t*-BHP foi também evitado significativamente por quase todos os compostos, com excepção da 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) a 0,025 mM (Fig. 10). A *trans*-isokielcorina B (2) mostrou ser mais eficaz quando comparada com a *trans*-kielcorina (1) a 0,100 e 0,200 mM e quando comparada com a silibina (5) a 0,200 mM. Parece ser também interessante o facto de a *trans*-isokielcorina B (2) e o seu precursor 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) terem evitado a formação de GSSG quase completamente nas duas concentrações mais elevadas.

A protecção obtida pelos compostos estudados, que contrariam a depleção de GSH e a formação de GSSG induzida pelo *t*-BHP reflecte-se na razão GSSG/GSH (Fig. 11). Este efeito foi significativo para todos os compostos em todas as concentrações estudadas. A *trans*-isokielcorina B (2) e a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) mostraram ser tendencialmente mais eficazes do que a *trans*-kielcorina (1) e a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3). Os efeitos da silibina (5) foram semelhantes aos obtidos para os outros compostos em todas as concentrações excepto a 0,025 mM, onde foi menos eficaz que a *trans*-isokielcorina B (2). A 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) foi significativamente mais eficaz que a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) nas concentrações 0,025 e 0,050 mM.

Apesar da glutatona total (GSH + GSSG) ter sido depletada significativamente pelo *t*-BHP, de $29,32 \pm 1,17$ para $23,99 \pm 1,13$ $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,0001$) (Fig. 12), todos os compostos estudados foram ineficazes em evitar este efeito em qualquer das concentrações testadas.

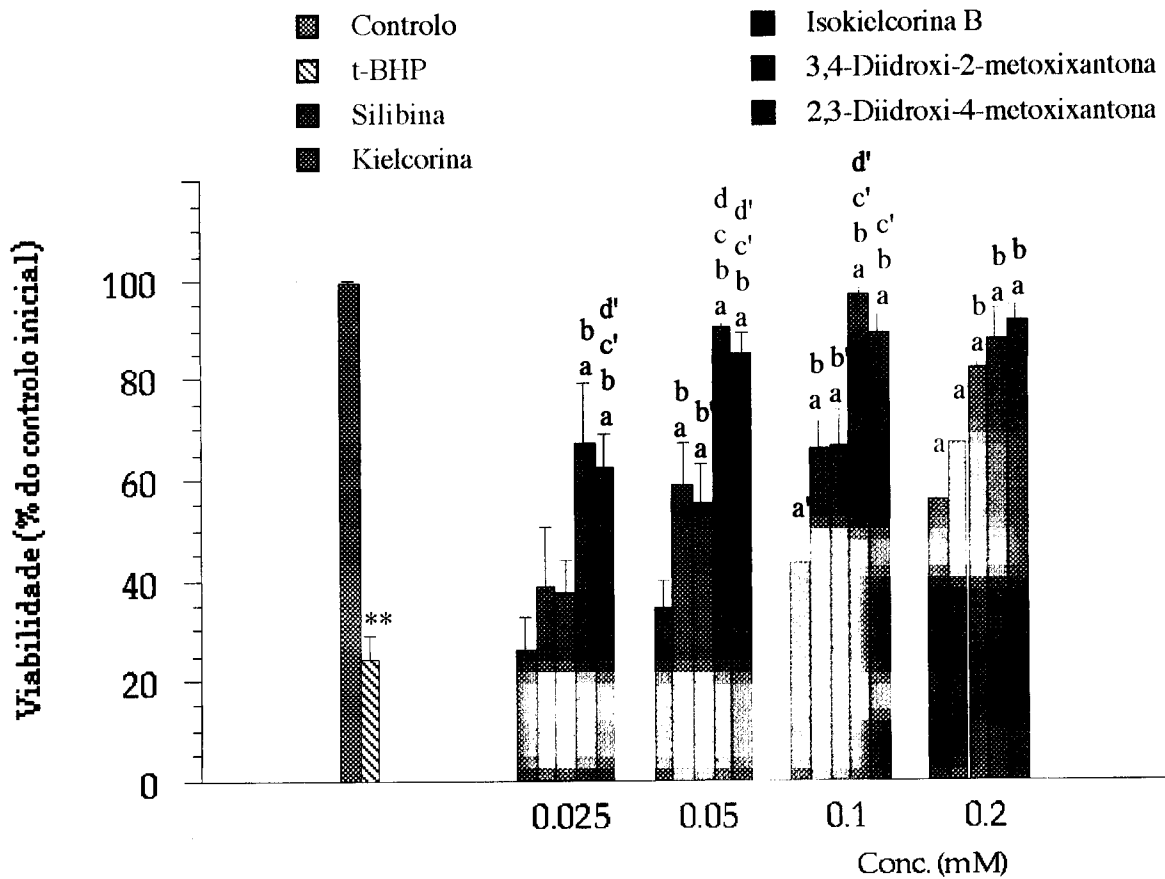


Fig. 6. Efeito da silibina (5), *trans*-kielcorina (1), *trans*-isokielcorina B (2), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) na viabilidade celular, expressa pela exclusão de azul de tripano pelos hepatócitos isolados de rato, após 30 minutos de exposição ao *t*-BHP (médias \pm erros padrão). $n=4$ ou 8 ; $**p \leq 0,0001$ (entre o controlo e as células expostas ao *t*-BHP); a $p < 0,01$ e a' $p < 0,05$ (quando comparados com as células apenas expostas ao *t*-BHP); b $p < 0,01$, b' $p < 0,05$ [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP + silibina (5))]; c $p < 0,01$, c' $p < 0,05$ [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP + *trans*-kielcorina (1))]; d $p < 0,01$, d' $p < 0,05$ [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP + *trans*-isokielcorina B (2))].

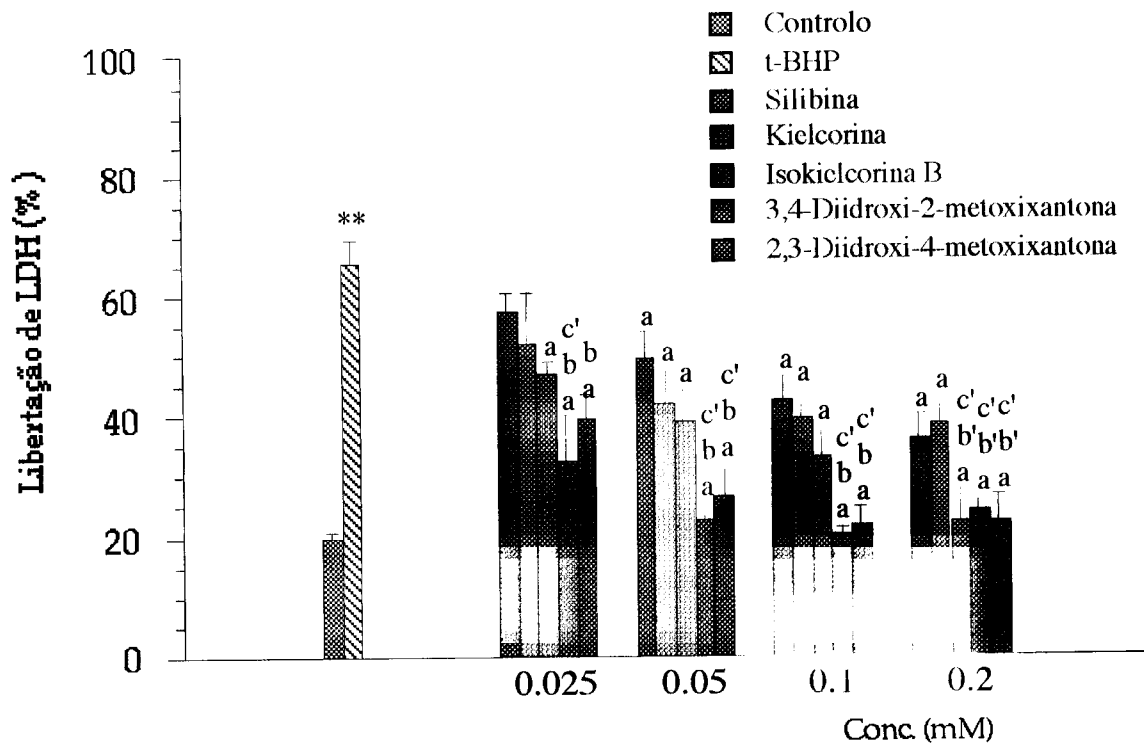


Fig. 7. Efeito da silibina (5), *trans*-kielcorina (1), *trans*-isokielcorina B (2), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) na viabilidade celular, expressa pela libertação de LDH pelos hepatócitos isolados de rato após 30 minutos de exposição ao *t*-BHP (médias ± erros padrão). n=4 ou 8; **p≤0,0001 (entre o controlo e as células expostas ao *t*-BHP); ^a p<0,01 (quando comparados com células expostas apenas ao *t*-BHP); ^b p<0,01, ^{b'} p<0,05 [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP +silibina (5))]; ^c p<0,01, ^{c'} p<0,05 [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP + *trans*-kielcorina (1))].

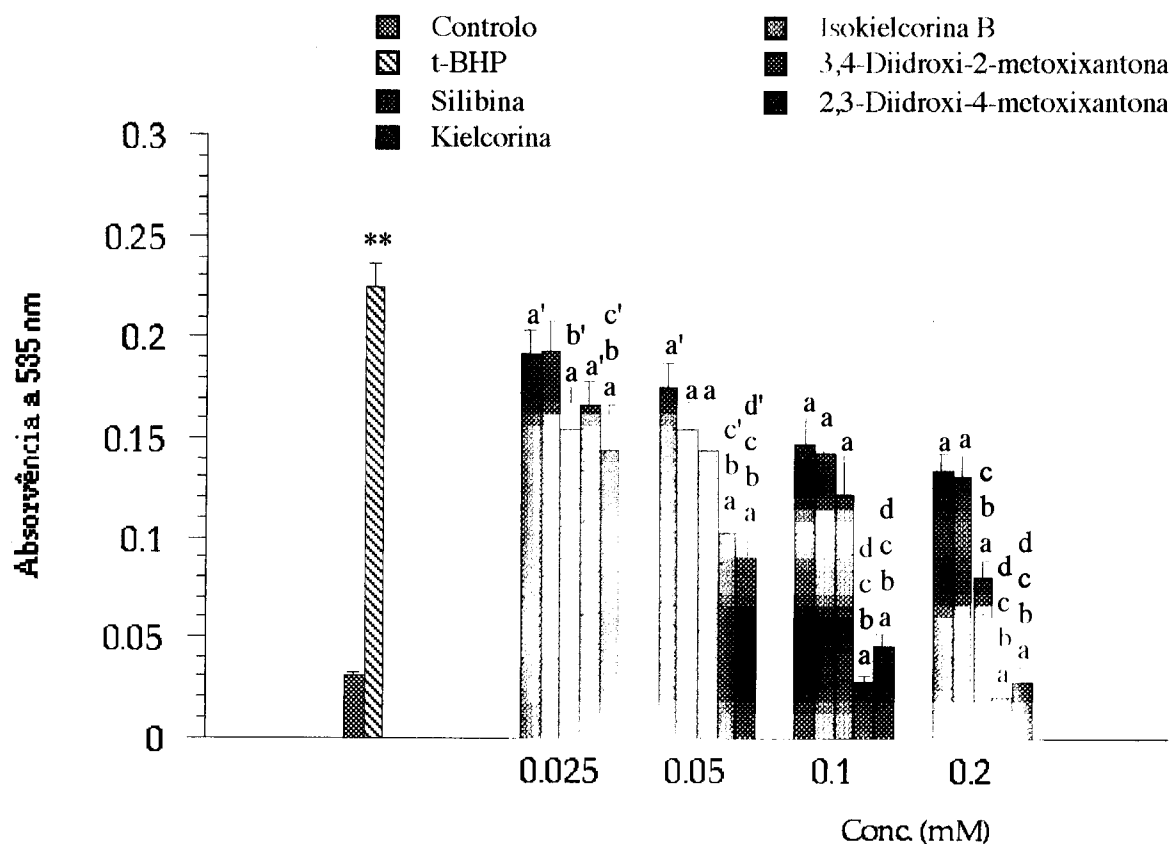


Fig. 8. Efeito da silibina (5), *trans*-kielcorina (1), *trans*-isokielcorina B (2), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) na formação de substâncias reactivas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) pelos hepatócitos isolados de rato, após 30 minutos de exposição ao *t*-BHP (médias±erros padrão). n=4 ou 8; **p<0,0001 (entre o controlo e as células expostas ao *t*-BHP); a p<0,01 e a' p<0,05 (quando comparados com células expostas apenas a *t*-BHP); b p<0,01, b' p<0,05 [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP +silibina (5))]; c p<0,01, c' p<0,05 [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP + *trans*-kielcorina (1))]; d p<0,01, d' p<0,05 [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP + *trans*-isokielcorina B (2))].

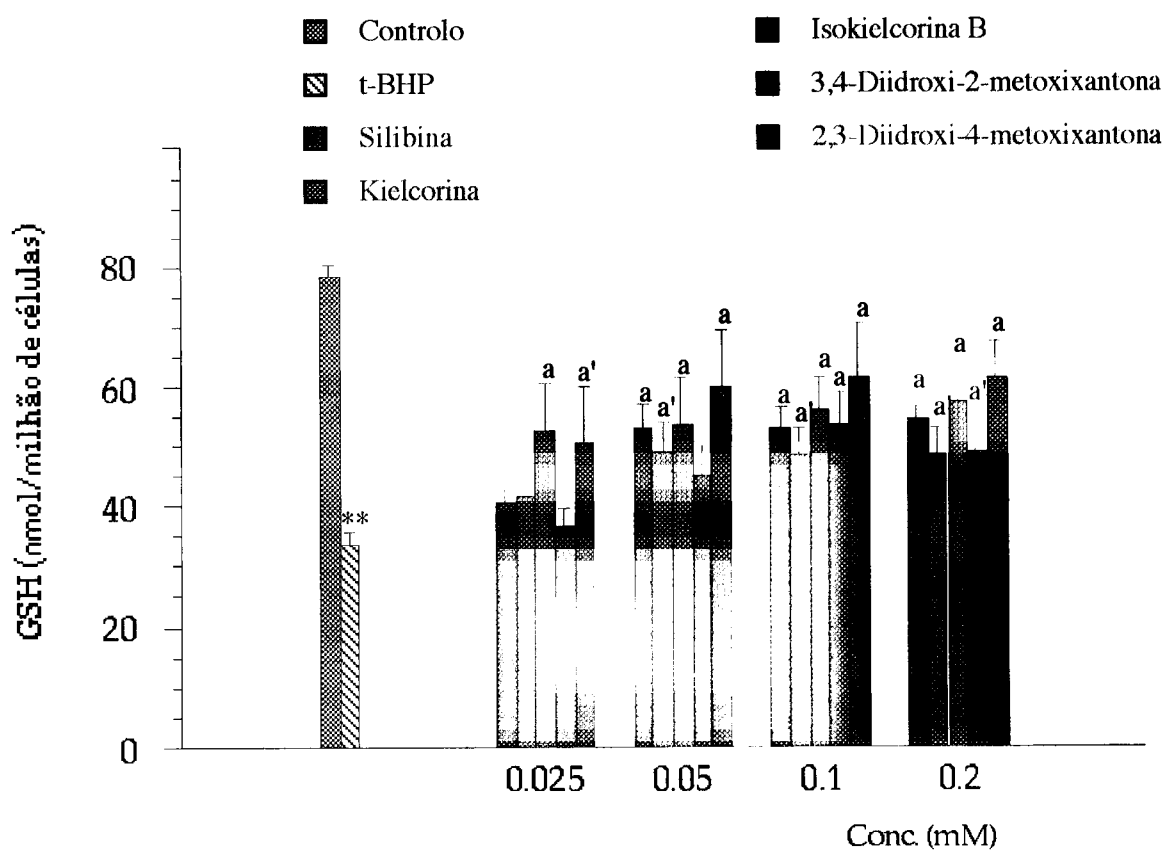


Fig. 9. Efeito da silibina (5), *trans*-kielcorina (1), *trans*-isokielcorina B (2), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) no conteúdo de GSH em hepatócitos isolados de rato após 30 minutos de exposição ao *t*-BHP (médias±erros padrão). n=4 ou 8; **p<0,0001 (entre o controlo e as células expostas ao *t*-BHP); a p<0,01 e a' p<0,05 (quando comparados com células expostas apenas ao *t*-BHP).

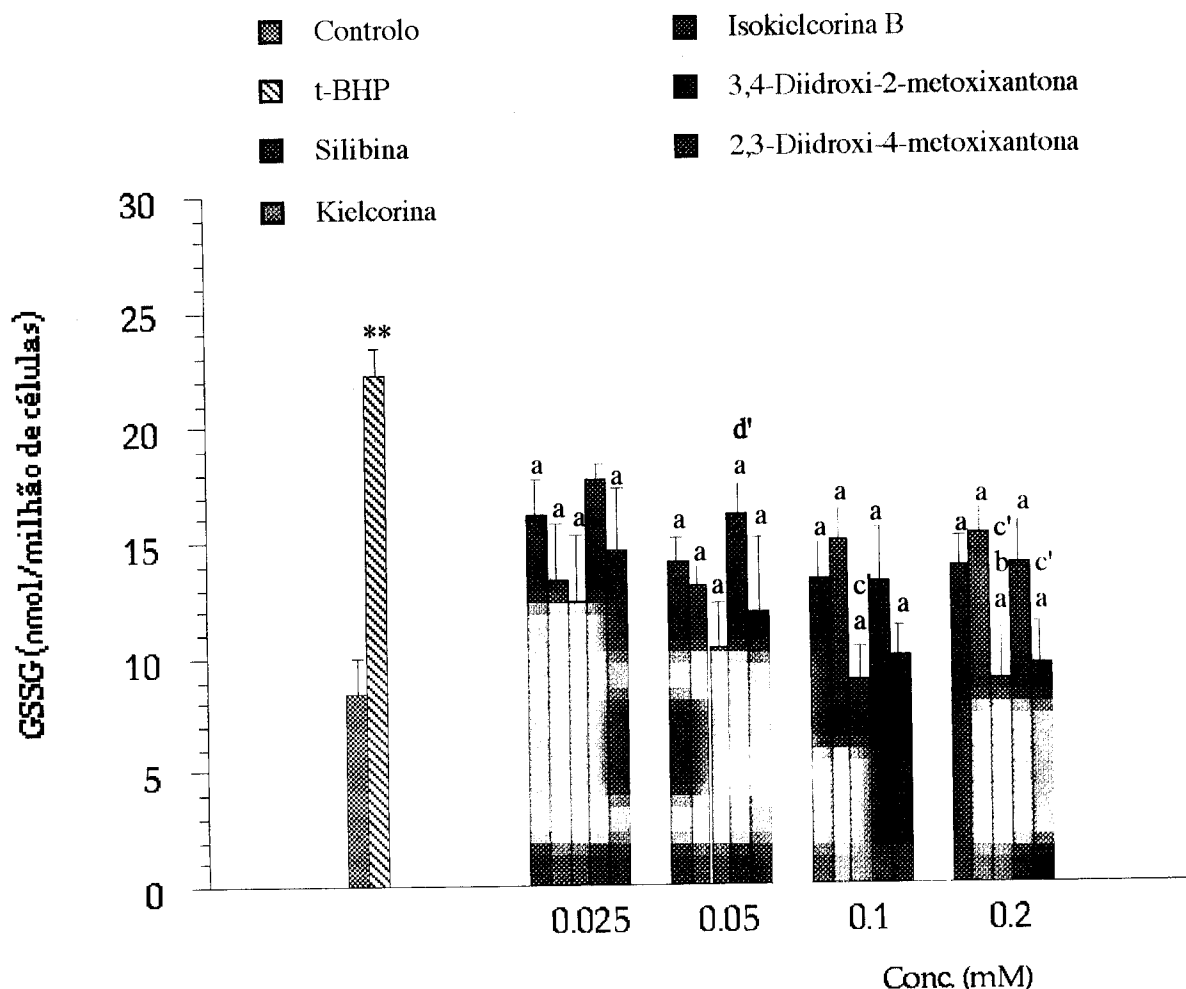


Fig. 10. Efeito da silibina (5), *trans*-kielcorina (1), *trans*-isokielcorina B (2), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) na formação de GSSG em hepatócitos isolados de rato após 30 minutos de exposição ao *t*-BHP (médias±erros padrão). n=4 ou 8; **p≤0,0001 (entre o controlo e as células expostas ao *t*-BHP); a p<0,01 (quando comparados com células expostas apenas ao *t*-BHP), a' p<0,05 [quando comparadas com células expostas a (*t*-BHP +silibina (5))]; b' p<0,05 [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP + *trans*-kielcorina (1))]; c' p<0,05 [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP + *trans*-isokielcorina B (2))].

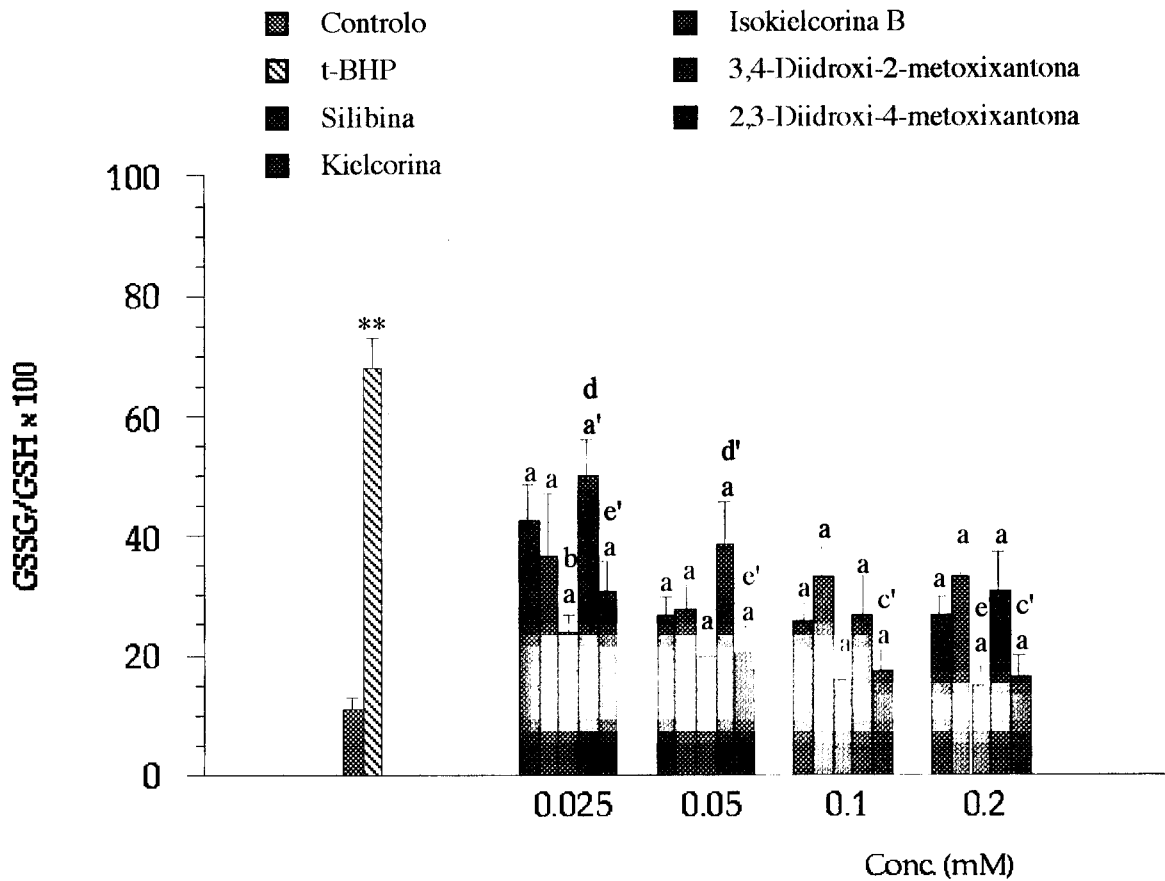


Fig. 11. Efeito da silibina (5), *trans*-kielcorina (1), *trans*-isokielcorina B (2), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) na razão GSSG/GSH x 100 em hepatócitos isolados de rato após 30 minutos de exposição ao *t*-BHP (médias±erros padrão). n=4 ou 8; **p<0,0001 (entre o controlo e as células expostas ao *t*-BHP); a p<0,01 e a' p<0,05 (quando comparados com células expostas apenas a *t*-BHP); b p<0,01, [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP +silibina (5))]; c' p<0,05 [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP + *trans*-kielcorina (1))]; d p<0,01, d' p<0,05 [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP + *trans*-isokielcorina B (2))]; e' p<0,05 [quando comparados com células expostas a (*t*-BHP + 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3))].

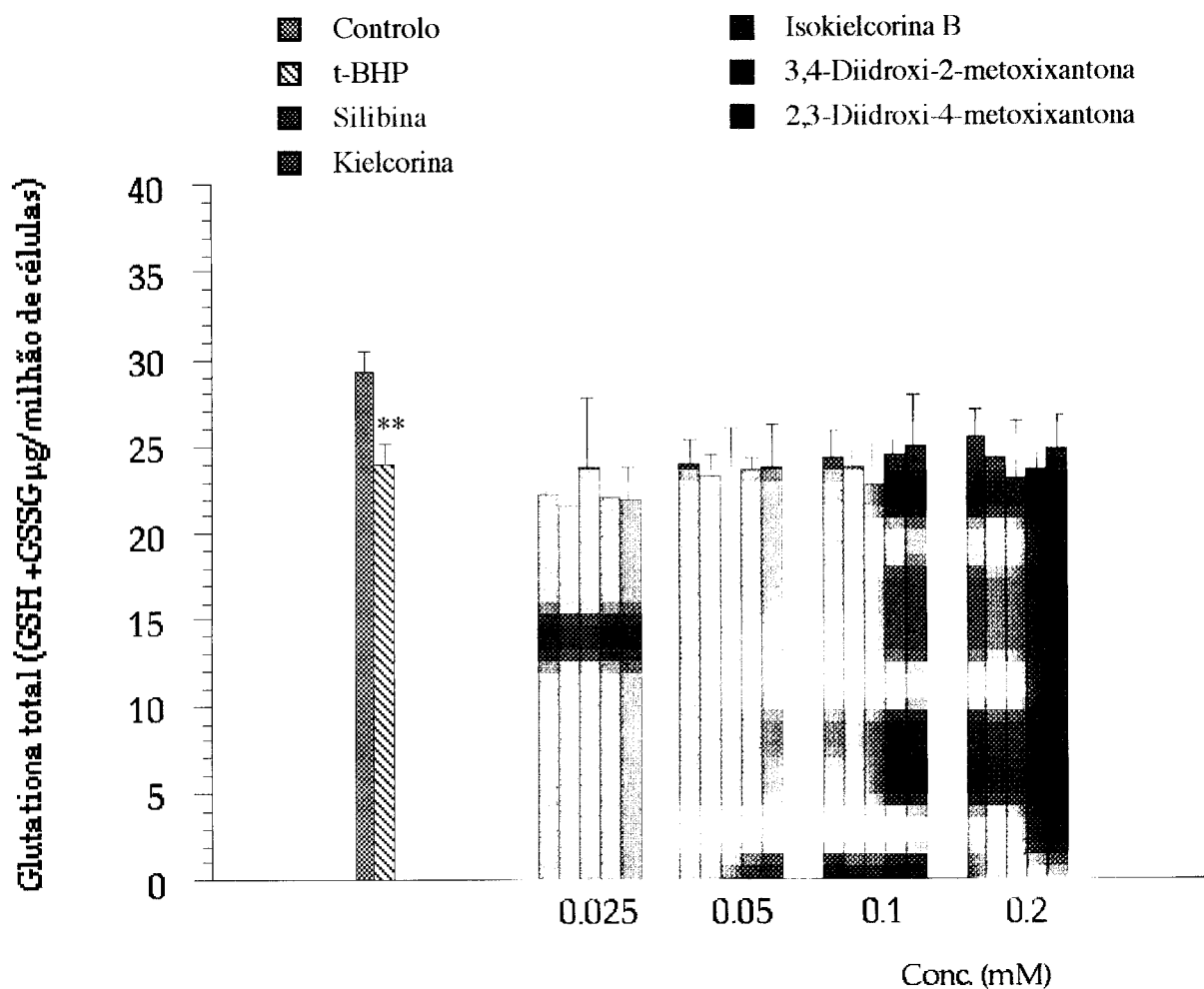


Fig. 12. Efeito da silibina (5), *trans*-kielcorina (1), *trans*-isokielcorina B (2), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) na glutathiona total (GSH + GSSG) em hepatócitos isolados de rato após 30 minutos de exposição ao *t*-BHP (médias ± erros padrão). n=4 ou 8; **p<0,0001 (entre o controlo e as células expostas ao *t*-BHP). Não foram encontradas diferenças significativas entre as células expostas apenas ao *t*-BHP e as células expostas ao *t*-BHP + composto testado.

Tabela 1. Dados (média± erros padrão, n=4) obtidos nas experiências de anti-hepatotoxicidade.

	Concentração (mM)	TBARS (Abs)	LDH (%)	Exclusão do azul de tripano (%)	GSH (nmol/milhão de células)	GSSG (nmol/milhão de células)	GSSG/GSHx100	GSH total (µg/milhão de células)
Controle		0,030±0,002	19,5±1,4	99,2±0,8	78,4±1,9	8,5±1,5	10,8±1,9	29,3±1,2
t-BHP		0,224±0,012	65,3±4,0	24,2±4,9	33,6±2,1	22,3±1,2	68,0±4,9	24,0±1,1
t-BHP + Siliibina (5)	0,025	0,192±0,012	57,4±3,0	26,1±6,6	40,4±3,2	16,1±1,6	42,7±6,0	22,3±0,8
	0,050	0,175±0,013	49,7±4,5	34,3±5,4	52,9±3,9	14,1±1,1	26,6±3,0	23,9±1,3
	0,100	0,147±0,013	42,5±4,2	43,1±7,1	53,1±3,2	13,4±1,5	25,5±3,1	24,4±1,5
	0,200	0,133±0,009	36,2±4,0	55,7±6,6	54,6±3,9	13,8±1,2	26,5±3,1	25,5±1,5
t-BHP + 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3)	0,025	0,167±0,012	32,9±7,0	67,2±12	3,65±3,2	17,7±0,6	50,2±5,8	22,1±0,7
	0,050	0,103±0,007	22,8±0,41	90,4±0,9	45,3±4,7	16,1±1,3	38,5±6,8	23,6±0,8
	0,100	0,028±0,002	20,1±1,0	96,7±1,6	53,5±5,6	13,2±2,3	26,5±6,6	24,5±0,8
	0,200	0,020±0,002	24,2±1,4	88,3±5,9	49,2±6,0	14,0±1,8	30,8±6,5	23,7±0,8
t-BHP + 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4)	0,025	0,144±0,022	39,7±4,0	62,5±6,2	50,4±9,5	14,6±2,7	30,4±5,4	21,9±1,8
	0,050	0,090±0,016	26,6±4,4	85,0±4,1	60,0±9,5	11,9±3,2	20,1±4,7	23,8±2,5
	0,100	0,046±0,005	21,6±3,1	89,0±3,8	61,5±8,9	10,0±1,3	17,3±3,3	25,0±2,9
	0,200	0,028±0,007	22,3±4,4	91,5±2,9	61,6±6,0	9,60±1,8	16,2±3,5	24,8±1,9
t-BHP + trans-licetorina (1)	0,025	0,193±0,015	51,9±8,6	38,4±12	41,8±4,1	13,3±2,4	36,7±10	21,6±0,5
	0,050	0,155±0,013	42,2±5,3	58,8±8,1	49,1±4,7	13,0±0,8	27,8±3,6	23,2±1,2
	0,100	0,142±0,010	39,5±5,2	66,1±5,5	48,5±4,5	15,1±1,3	33,3±5,4	23,8±1,2
	0,200	0,130±0,011	38,5±4,4	67,1±5,9	48,6±4,6	15,2±1,1	33,1±4,6	24,3±1,3
t-BHP + trans-isokictorina B (2)	0,025	0,155±0,021	47,2±1,8	37,5±6,3	52,7±7,7	12,5±2,8	23,5±3,4	23,8±3,8
	0,050	0,144±0,022	39,4±5,1	55,5±7,5	53,4±7,9	10,4±1,9	19,9±3,1	22,8±3,2
	0,100	0,121±0,020	33,4±4,5	66,7±7,0	56,3±5,4	9,0±1,4	15,9±1,9	22,7±2,4
	0,200	0,080±0,008	22,1±5,6	82,2±1,7	57,5±6,6	8,9±2,2	15,0±2,8	23,1±3,2

Discussão

IV - Discussão

Neste estudo, a silibina (5), *trans*-kielcorina (1), *trans*-isokielcorina B (2), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) protegeram os hepatócitos isolados de rato contra a toxicidade induzida pelo *t*-BHP. Ambas as xantonas mostraram ser mais eficazes do que a *trans*-kielcorina (1) e a *trans*-isokielcorina B (2) na protecção da viabilidade celular e diminuição da peroxidação lipídica, embora a *trans*-isokielcorina B (2) e a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) tenham sido as mais eficazes na manutenção da homeostase da glutathiona intracelular.

De uma forma geral, estes quatro compostos mostraram ser mais eficazes do que a silibina (5) na protecção dos hepatócitos contra a toxicidade induzida pelo *t*-BHP.

A depleção da glutathiona total (GSH + GSSG) não foi evitada por qualquer dos compostos estudados.

A manutenção da homeostase da glutathiona é sem dúvida muito importante para a actividade anti-hepatotóxica de compostos naturais, como acontece no caso da silibina (5) [5, 6]. No entanto, o facto de a protecção da homeostase da glutathiona não ter sido proporcional à protecção da viabilidade celular pelos compostos estudados significa, neste caso, que o efeito sobre a homeostase referida não será o factor que mais contribui para o efeito observado sobre a viabilidade das células. Observou-se que a *trans*-isokielcorina B (2) e a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) foram mais eficazes do que a *trans*-kielcorina (1) e a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) respectivamente, na diminuição da formação de GSSG. Isto pode ajudar a explicar a maior eficácia da *trans*-isokielcorina B (2) na protecção da viabilidade celular a 0,200 mM quando comparada com a *trans*-kielcorina (1). No entanto, para as xantonas, no caso da protecção da viabilidade celular a diferença não é significativa.

A diminuição quase total da peroxidação lipídica pelas xantonas, nas duas concentrações mais elevadas, terá possivelmente um papel mais importante na protecção da viabilidade celular. De facto, é evidente uma boa correlação entre a diminuição da peroxidação lipídica e a protecção da viabilidade celular para todos os compostos estudados. Os melhores resultados foram os obtidos com a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4), as quais evitaram qualquer aumento da peroxidação lipídica a 0,100 e 0,200 mM e evitaram praticamente qualquer perda de viabilidade a 0,050, 0,100 e 0,200 mM.

Apesar de todos os compostos terem sido capazes de evitar em determinada extensão a depleção de GSH e a formação de GSSG, foram todos incapazes de evitar a depleção de glutathiona total (GSH + GSSG). Isto poderá dever-se à ligação covalente da GSH a espécies electrofílicas que podem aparecer durante o metabolismo do *t*-BHP, ou então à reacção da GSH com os grupos sulfidrilo proteicos induzida pelo estado oxidativo celular [16, 30].

A diferente eficácia de anti-hepatotoxicidade encontrada entre os compostos estudados, expressas pelos seus efeitos na peroxidação lipídica e homeostase da glutathiona, poderá significar que nos encontramos em presença de vias complementares de protecção contra a toxicidade provocada pelo *t*-BHP. Uma destas vias poderá, por exemplo, dever-se a uma possível capacidade diferente dos compostos estudados reagirem com radicais livres.

Uma possível diferença de solubilidade dentro das biomembranas também poderá ajudar a explicar as diferenças quanto ao efeito sobre a peroxidação lipídica.

A protecção contra a toxicidade induzida pelo *t*-BHP pode ser obtida por complexação dos catiões ferroso e férrico livres, com quelantes específicos destas espécies iónicas, como é o caso da

desferrioxamina [29]. Muito embora ainda não se tenha testado esta possibilidade para os derivados xantónicos, seria interessante saber qual a sua capacidade quelante relativamente aos catiões citados.

Uma outra hipótese para a actividade anti-hepatotóxica poderia ser através da inibição do citocromo P-450, resultando numa diminuição do metabolismo do *t*-BHP mediada por este sistema enzimático. No entanto, nas concentrações utilizadas neste estudo, este mecanismo não pode ser considerado para a silibina (5), pois esta não inibe o sistema enzimático citocromo P-450 [20].

A actividade hepatoprotectora *in vivo* encontrada por Shankaranarayan *et al.* [15] para as xantonas mangiferina, mangostina e mangostina-3,6-di-O-glucosido contra a necrose hepática em ratinhos é também um estudo interessante que pode contribuir para um melhor esclarecimento desta actividade. No entanto como este estudo foi apenas histológico, sem qualquer determinação bioquímica, não permite concluir que as xantonas testadas exerceram o seu efeito protector de uma forma directa nos hepatócitos, ou de uma forma indirecta através de acção colerética, já conhecida para esta família de compostos [52, 53]

A discussão desenvolvida terá de ser complementada com estudos posteriores, na medida em que este trabalho corresponde, tanto quanto se encontrou descrito, ao primeiro estudo de actividade anti-hepatotóxica *in vitro* da *trans*-kielcorina (1), da *trans*-isokielcorina B (2), da 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e da 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4).

Conclusões

V - Conclusões

Os xantonolignóides *trans*-kielcorina (1) e *trans*-isokielcorina B (2), bem como os seus precursores xantónicos 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4), da mesma forma que a silibina (5), exibem actividade protectora *in vitro* contra a toxicidade induzida pelo *t*-BHP sobre hepatócitos isolados de rato.

Nas concentrações estudadas, estes compostos previnem a perda da homeostase da glutathiona, a peroxidação lipídica e a mortalidade celular induzidos pelo *t*-BHP em hepatócitos isolados de rato. A 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) e a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) são mais eficazes que a *trans*-kielcorina (1) e a *trans*-isokielcorina B (2), respectivamente, sendo a silibina (5) a menos eficaz na protecção celular contra a peroxidação lipídica e perda de viabilidade celular. A *trans*-isokielcorina B (2) e a 2,3-diidroxi-4-metoxixantona (4) parecem ser as mais eficazes na prevenção da perda de homeostase da glutathiona. A depleção da glutathiona total (GSH+GSSG) não foi evitada por qualquer dos compostos estudados.

A menor eficácia anti-hepatotóxica da *trans*-kielcorina (1) e da *trans*-isokielcorina B (2), quando comparadas com a das respectivas xantonas precursoras, poderá não ser problemática para uma aplicação destes compostos uma vez que mesmo assim ainda são mais eficazes do que a silibina (5). Além disso, no que concerne às suas actividades biológicas, os xantonolignóides poderão ter especificidade diferente das xantonas, mas esta hipótese necessita ser confirmada.

A presença de *trans*-kielcorina (1) e de 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (3) em plantas utilizadas em medicina popular para o

tratamento de doenças hepáticas poderá ter um papel importante. No sentido de aprofundar este estudo, a disponibilidade de xantonas e xantonolignóides sintéticos poderá ajudar a desenvolver estudos de relação estrutura-actividade necessários para estabelecer e aumentar o conhecimento acerca do(s) respectivo(s) mecanismo(s) de acção.

Parte B₂

**AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE INIBIDORA SOBRE A
MONOAMINA OXIDASE POR XANTONAS MONO- E DI-
SUBSTITUÍDAS**

Introdução

I - Introdução

1. Preâmbulo.....	225
1.1. A monoamina oxidase.....	226

I - Introdução

1. Preâmbulo

Com o objectivo de descobrir novos fármacos, todos os anos são sintetizados e testados *in vivo* e *in vitro* uma grande quantidade de novos compostos [54].

O aproveitamento de intermediários de síntese é hoje em dia uma fonte comum de obtenção de novos fármacos [54]. De facto, em certos casos, os intermediários de síntese de compostos com actividade biológica poderão ser, por si só, também activos, de uma forma semelhante ou distinta da do composto final.

Durante a síntese da *trans*-kielcorina B foram obtidos vários intermediários xantónicos (Parte A).

Desde há muito tempo que os derivados xantónicos despertaram o interesse de químicos, biólogos e farmacologistas devido principalmente à sua potencial actividade biológica (Parte A, p. 14). Entre as actividades descritas para estes núcleos heterocíclicos encontra-se a actividade inibidora da monoamina oxidase [55-61].

Uma vez que o grupo de trabalho do Centro de Estudo de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia da Universidade do Porto tem já alguma experiência na determinação da actividade inibidora da MAO por xantonas [59], pareceu ser de grande interesse testar esta actividade em alguns intermediários xantónicos obtidos durante a síntese da *trans*-kielcorina B (Parte A).

Para a determinação da actividade inibidora da MAO foram seleccionadas as xantonas di-substituídas no mesmo anel aromático (Fig. 13, p. 227).

Os resultados obtidos foram um estímulo para a obtenção de

derivados xantónicos mono-substituídos em posições sequenciais no mesmo anel aromático por grupos com oxidabilidade diferente (Parte A), (Fig. 13). Muito embora a síntese destes derivados não tenha a ver com o objectivo de sintetizar a *trans*-kielcorina B, a vontade de esclarecer a relação estrutura-actividade inibidora da MAO levou-nos a investir algum do nosso tempo neste empolgante campo de investigação.

O estudo referido poderá contribuir para a definição do farmacóforo, com consequente optimização do inibidor.

A obtenção de derivados xantónicos necessários para a continuação do estudo da relação estrutura-actividade (SAR) está a ser efectuada e faz parte do projecto de investigação desenvolvido pelo grupo de trabalho do Centro de Estudos de Química Orgânica, Fitoquímica e Farmacologia da Universidade do Porto em colaboração com o grupo do Professor Bernard Testa, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lausanne, Suíça.

1.1. A monoamina oxidase

A monoamina oxidase (MAO, EC 1.4.3.4) é uma enzima que contém flavina adenina dinucleotido (FAD). Está largamente distribuída nos vários tecidos dos mamíferos e outros animais, encontrando-se associada principalmente à membrana externa das mitocôndrias das células neuronais, gliais e outras [62]. As suas funções incluem a regulação dos níveis das aminas biogénicas no cérebro e em tecidos periféricos através da desaminação oxidativa destas aminas [63, 64].

A MAO existe sob a forma de duas isoenzimas, MAO-A e MAO-B.

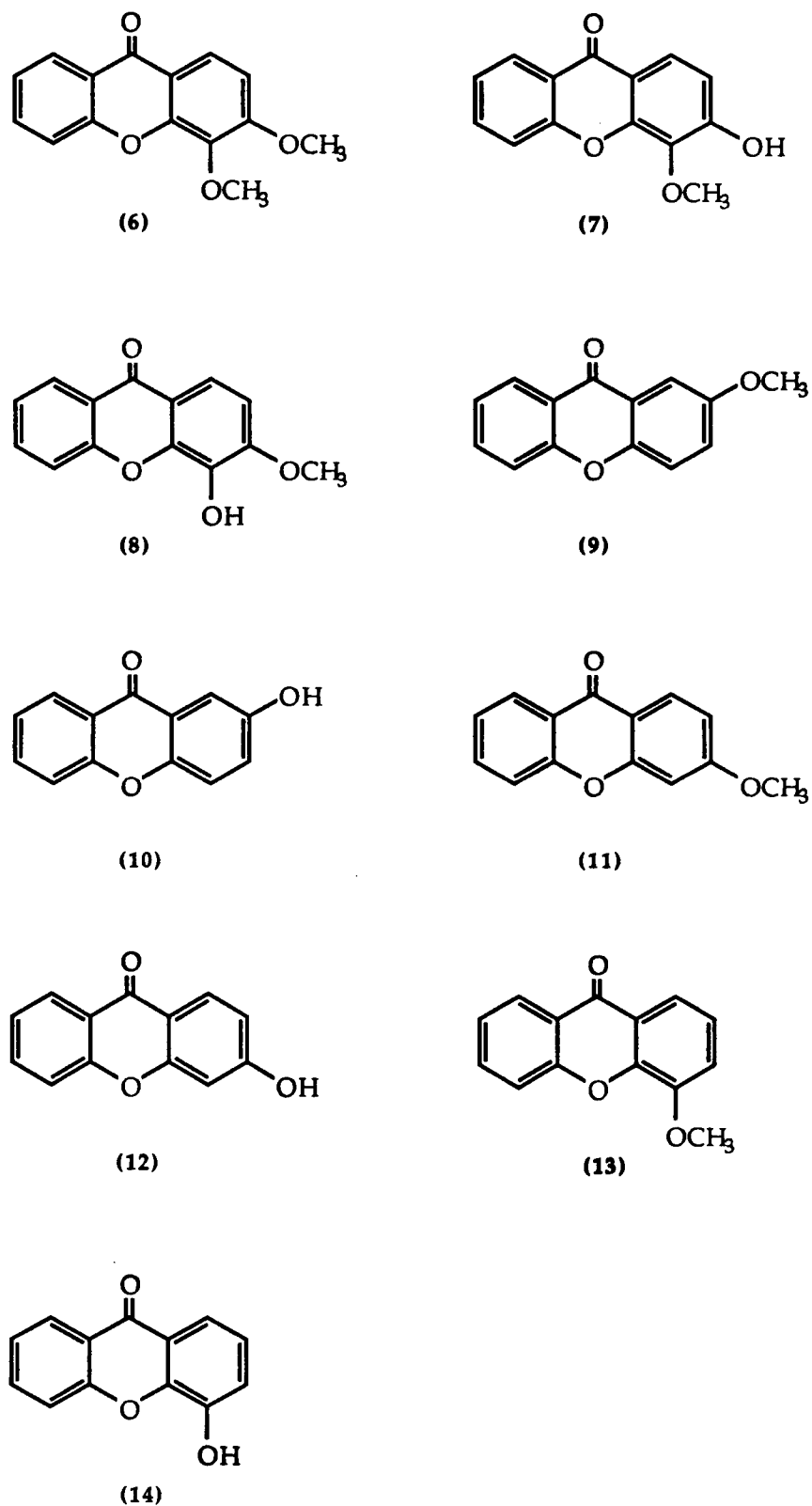


Fig. 13. Estruturas das xantonas: 3,4-dimetoxixantona (6), 3-hidroxi-4-metoxixantona (7), 4-hidroxi-3-metoxixantona (8), 2-metoxixantona (9), 2-hidroixantona (10), 3-metoxixantona (11), 3-hidroixantona (12), 4-metoxixantona (13) e 4-hidroixantona (14).

Estas duas isoenzimas foram inicialmente definidas pelas respectivas afinidades para diferentes substratos e pela diferente sensibilidade a inibidores específicos. Deste modo, a MAO-A caracterizou-se pela afinidade para a serotonina e para a noradrenalina e por ser selectiva e irreversivelmente inibida pela clorgilina; a MAO-B, por apresentar maior afinidade para a benzilamina e β -feniletilamina e por ser inibida selectiva e irreversivelmente pelo (-)-deprenil [65, 66].

Os inibidores de ambas as formas da MAO têm mostrado ter grande utilidade como agentes terapêuticos. Os inibidores selectivos da MAO-B mostraram ter interesse para o tratamento da doença de Parkinson, quando usados em associação com a L-dopa. A administração de inibidores selectivos da MAO-B, nomeadamente o (-)-deprenil, numa fase inicial da doença de Parkinson, parece retardar a sua evolução [66]. Por outro lado, os inibidores da MAO-A são úteis em psiquiatria clínica no tratamento de depressões endógenas e de fobias [63]. No entanto, o uso destes últimos compostos tem sido questionado devido ao "efeito de queijo", que é uma resposta hipertensiva marcada à tiramina e a outras aminas pressoras existentes em alguns alimentos como é o caso do queijo e do chocolate [62, 63].

No presente trabalho, apresenta-se o estudo da actividade inibidora da MAO-A e MAO-B para nove xantonas: 3,4-dimetoxixantona (6), 3-hidroxi-4-metoxixantona (7), 4-hidroxi-3-metoxixantona (8), 2-metoxixantona (9), 2-hidroxixantona (10), 3-metoxixantona (11), 3-hidroxixantona (12), 4-metoxixantona (13) e 4-hidroxixantona (14) (Fig. 13), obtidas por síntese e com substituintes num só anel aromático.

A avaliação da actividade inibidora da MAO foi realizada pelo grupo do Prof. Bernard Testa da Universidade de Lausanne, na Suíça, em mitocôndrias de cérebro de rato [59].

Resultados e Discussão

II - Resultados e Discussão

Após a determinação da actividade inibidora da MAO-A e da MAO-B, os resultados foram representados graficamente, relacionando-se as concentrações das xantonas com os diversos graus de inibição obtidos. Na Fig. 14, p. 231, está representado, como exemplo, o resultado obtidos para três xantonas (6), (7) e (8). A partir dos gráficos calcularam-se as concentrações que inibiram 50% a actividade enzimática (IC₅₀) para cada xantona (Tabela 2, p. 232). Os valores conhecidos de IC₅₀ para a xantona não substituída [61] são referidos nesta tabela para comparação.

Os resultados de IC₅₀ e IC₅₀ (A/B) apresentados na Tabela 2 indicam que as dez xantonas testadas são inibidoras da MAO, com uma preferência marcada para a MAO-A. A 3-metoxixantona (11) é a mais potente relativamente a ambas as enzimas, enquanto que a 4-hidroxixantona (14) é a mais selectiva para a MAO-A.

Embora o número de compostos ensaiados seja reduzido para efectuar estudos de relação de estrutura/actividade, salientam-se algumas tendências que se consideraram relevantes:

A introdução de substituintes nas posições R₂, R₃ e R₄ modifica a actividade inibidora da MAO-A e MAO-B relativamente à xantona não substituída.

A introdução de um grupo OCH₃ ou OH na posição R₂ aumenta a actividade inibidora para a MAO-B e diminui a actividade inibidora para a MAO-A, sendo o efeito obtido para qualquer dos dois substituintes.

A introdução de um grupo OCH₃ na posição R₃ aumenta a actividade inibidora para a MAO-A e MAO-B, enquanto que o grupo OH, na mesma posição, aumenta a actividade inibidora apenas para a MAO-B.

A introdução de um grupo OH na posição R₄ não modifica a

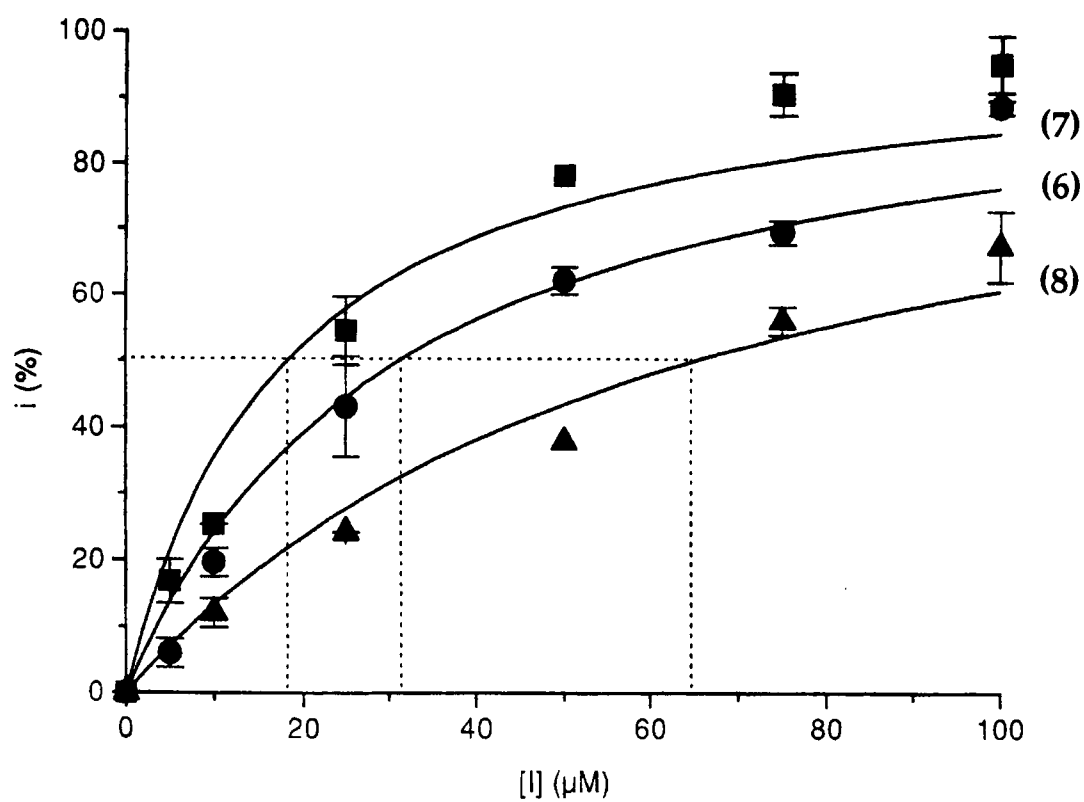
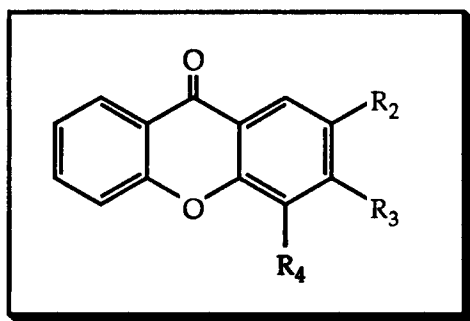


Fig. 14. Curvas de inibição da MAO-A para as xantonas: 3,4-dimetoxixantona (6), 3-hidroxi-4-metoxixantona (7), e 4-hidroxi-3-metoxixantona (8).

actividade relativamente à xantona não substituída, enquanto que a introdução de um grupo OCH₃ nesta posição diminui a actividade para ambos os tipo de MAO.

As xantonas mono-substituídas parecem ser mais potentes que as di-substituídas.

Tabela 2. Actividade inibidora da MAO-A e MAO-B (IC₅₀ e selectividade) para as xantonas: 3,4-dimetoxixantona (6), 3-hidroxi-4-metoxixantona (7), 4-hidroxi-3-metoxixantona (8), 2-metoxixantona (9), 2-hidroxixantona (10), 3-metoxixantona (11), 3-hidroxixantona (12), 4-metoxixantona (13), 4-hidroxixantona (14) e xantona (15).



Composto	R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ em μM		Selectividade IC ₅₀ (A/B)
				MAO-A	MAO-B	
(6)	H	OCH ₃	OCH ₃	31,1±4,0	40,5±7,7	0,8
(7)	H	OH	OCH ₃	64,9±6,0	90,4±12,3	0,7
(8)	H	OCH ₃	OH	18,2±3,1	37,5±5,6	0,5
(9)	OCH ₃	H	H	5,27±0,41	25,2±4,7	0,2
(10)	OH	H	H	3,84±0,32	22,7±2,0	0,2
(11)	H	OCH ₃	H	0,18±0,03	7,59±0,59	0,02
(12)	H	OH	H	1,14±0,25	40,8±9,2	0,03
(13)	H	H	OCH ₃	30,4±3,2	n.i.(50μM)	-----
(14)	H	H	OH	1,26±0,13	155±7	0,008
(15)	H	H	H	0,84±0,08	122±14	0,007

Conclusões

III - Conclusões

Todas as xantonas testadas revelaram ser inibidoras reversíveis da MAO, preferencialmente da MAO-A.

Das xantonas testadas, a 3-metoxixantona (11) foi o composto mais activo (IC_{50} para a MAO-A = $0,18 \pm 0,003$ e para a MAO-B = $7,59 \pm 0,59$).

A 4-hidroxixantona (14) foi a mais selectiva para a MAO-A, enquanto que a 3,4-dimetoxixantona (6) foi a menos selectiva.

A selectividade para a MAO-A, relativamente à MAO-B, é marcada para a xantona não substituída e para as xantonas mono-substituídas, especialmente com substituição em R₄ e R₃.

Bibliografia

Bibliografia

- [1] S. S. Handa, A. Sharma, K. K. Chakraborti, *Fitoterapia*, 1986, 57, 307.
- [2] G. Vogel, "New Natural Products and Plant Drugs With Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity", Ed. H. Wagner and P. Wolff, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1977, p. 249.
- [3] H. Hikino, Y. Kiso, H. Wagner, M. Fiebig, *Planta Med.*, 1984, 248.
- [4] A. Valenzuela, R. Guerra, L. A. Videla, *Planta Med.*, 1986, 438.
- [5] A. Valenzuela, M. Aspillaga, S. Vial, R. Guerra, *Planta Med.*, 1989, 55, 420.
- [6] R. Campos, A. Garrido, R. Guerra, A. Valenzuela, *Planta Med.*, 1989, 55, 417.
- [7] "Martindale, The Extra Pharmacopoeia", Ed. J. E. F. Reynolds, twenty-eighth edition, The Pharmaceutical Press, London, 1982.
- [8] T. Cecchini, "Enciclopedia de las hierbas y de las plantas medicinales", Ed. De Vecchi S.A., Barcelona, 1980, p. 239.
- [9] R. Oliveira Feijão, "Medicina pelas plantas", 9ª Edição. Livraria Progresso Editora, Lisboa, 1986, p. 178.
- [10] O. R. Gottlieb, A. A. L. Mesquita, T. J. Nagem, *Phytochemistry*, 1971, 10, 2253.
- [11] J. F. Castelão Jr., O. R. Gottlieb, R. A. Lima, A. A. L. Mesquita, *Phytochemistry*, 1977, 16, 735.
- [12] M. L. Cardona, E. Seoan, *Phytochemistry*, 1982, 21, 2759.
- [13] H. Nielsen, P. Arends, *Phytochemistry*, 1978, 17, 2040.
- [14] M. M. M. Pinto, A. A. L. Mesquita, O. R. Gottlieb, *Phytochemistry*, 1987, 26, 2045.
- [15] D. Shankaranarayan, C. Gopalakrishnan, L. Kameswaran, S.

- Arumugam, *Mediscope*, 1979, 22, 65.
- [16] S. A. Jewell, D. D. Monte, P. Richelmi, G. Bellomo, S. Orrenius, *J. Biochem. Toxicol.*, 1986, 1, 13.
- [17] M. Joyeux, A. Rolland, J. Fleurentin, F. Mortier, P. Dorfman, *Planta Med.*, 1990, 56, 171.
- [18] J. P. Kehrer, L. G. Lund, *Free Radical Biol. Med.*, 1994, 17, 65.
- [19] T. Nakayama, *Cancer Res.*, 1994, 54, 1991s.
- [20] M. -P. Miguez, I. Anundi, L. A. Sainz-Pardo, K. O. Lindros, *Chem. - Biol. Interact.*, 1994, 91, 51.
- [21] L. Eklöw, P. Moldéus, S. Orrenius, *Eur. J. Biochem.*, 1984, 138, 459.
- [22] D. J. Reed, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1990, 30, 603.
- [23] L. D. DeLeve, N. Kaplowitz, *Pharmac. Ther.*, 1991, 52, 287.
- [24] H. Sies, *Eur. J. Biochem.*, 1993, 215, 213.
- [25] G. Bellomo, F. Mirabelli, P. Richelmi, S. Orrenius, *FEBS Lett.*, 1983, 163, 136.
- [26] G. B. Corcoran, S. D. Ray, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1992, 113, 167.
- [27] H. G. Shertser, G. L. Bannenberg, H. Zhu, R. -M. Liu, P. Moldéus, *Chem. Res. Toxicol.*, 1994, 7, 358.
- [28] E. Cadenas, H. Sies, *Eur. J. Biochem.*, 1982, 124, 349.
- [29] M. Ozaki, S. Aoki, Y. Masuda, *Jpn. J. Pharmacol.*, 1994, 65, 183.
- [30] X. Shan, T. Y. Aw, D. P. Jones, *Pharmac. Ther.*, 1990, 47, 61.
- [31] P. D. Mascio, M. E. Murphy, H. Sies, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, 53, 194S.
- [32] W. A. Pryor, J. A. Cornicelli, L. J. Devall, B. Tait, B. K. Trivedi, D. T. Witiak, M. Wu, *J. Org. Chem.*, 1993, 58, 3521.
- [33] T. A. Dix, J. Aikens, *Chem. Res. Toxicol.*, 1993, 6, 2.

- [34] N. I. Krinsky, *P. S. E. B. M.*, 1992, 200, 248.
- [35] S. Uhlig, A. Wendel, *Life Sci.*, 1992, 51, 1083.
- [36] N. Kaplowitz, T. Y. Aw, M. Ookhtens, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1985, 25, 715.
- [37] M. Kretzschmar, W. Klinger, *Exp. Pathol.*, 1990, 38, 145.
- [38] J. C. Roberts, D. J. Francetic, *Ana. Biochem.*, 1993, 211, 183.
- [39] B. Ketterer, *Drug Metabolism Reviews*, 1982, 13, 161.
- [40] J. A. Timbrell, "Principles of Biochemical Toxicology" Ed. J. A. Timbrell, second edition, Taylor & Francis, London, 1993.
- [41] P. Moldéus, J. Högberg, and S. Orrenius, *Methods in Enzymology*, 1978, 52, C, 60.
- [42] F. D. Carvalho, "Estudo da Toxicidade do Paracetamol em Hepatócitos Isolados de Rato", Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica, 1994, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- [43] M. N. Berry, A. M. Edwards, G. J. Barritt, "Isolated Hepatocytes Preparation, Properties and Applications", Ed. R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg, Elsevier, Oxford, 1991, p.93.
- [44] "The Index Merck" 11ª Ed., Merck & CO. Inc., EUA, 1988.
- [45] M. N. Berry, R. B. Gregory, A. R. Grivell, D. C. Henly, C. D. Nobes, J. W. Philips, P. G. Wallace, *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 936, 294.
- [46] M. Claret, J. L. Mazet, *J. Physiol.*, 1972, 223, 279.
- [47] *idem, ibid* [43], p. 85.
- [48] *idem, ibid* [43], p. 91.
- [49] H. O. Jauregui, N. T. Hayner, J. L. Driscoll, R. Williams-Holland, M. H. Lipsky, P. M. Galletti, *In Vitro*, 1981, 17, 1100.
- [50] F. D. Carvalho, F. Remião, P. Vale, J. A. Timbrell, M. L. Bastos, M. A. Ferreira, *Biomed. Chrom.*, 1994, 8, 134.

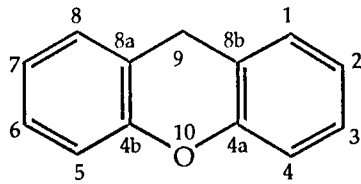
- [51] J. A. Buege, S. D. Aust, *Methods Enzymol.* 1978, 52, 302.
- [52] S. K. Bhattacharya, S. Ghosal, R. K. Chaudhuri, A. K. Sanyal, *J. Pharm. Sci.*, 1972, 61, 1838.
- [53] S. Mandal, P. C. Das, P. C. Joshi, *J. Indian Chem Soc.*, 1992, 69, 611.
- [54] A. Korolkovas, J. H. Burckhalter, "Química Farmacêutica", Guanabara Dois S. A., Rio de Janeiro, 1982.
- [55] O. Suzuki, Y. Katsumata, M. Oya, V. M. Chari, R. Klapfenberger, H. Wagner, K. Hostettmann, *Planta Med.*, 1980, 39, 19.
- [56] O. Suzuki, Y. Katsumata, M. Oya, V. M. Chari, B. Vermes, H. Wagner, K. Hostettmann, *Planta Med.*, 1981, 42, 17.
- [57] D. Schaufelberger, K. Hostettmann, *Planta Med.*, 1988, 219.
- [58] S. Mandal, P. C. Das, P. C. Joshi, *J. Indian Chem Soc.*, 1992, 69, 611.
- [59] U. Thull, S. Kneubuhler, B. Testa, M. F. M. Borges, M. M. M. Pinto, *Pharm. Res.*, 1993, 10, 1187.
- [60] L. Rocha, A. Marston, M. A. C. Kaplan, H. Stoeckli-Evans, U. Thull, B. Testa, K. Hostettmann, *Phytochemistry*, 1994, 36, 1381.
- [61] U. Thull, B. Testa, *Biochem. Pharm.*, 1994, 47, 2307.
- [62] B. Testa, "The Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics. Biochemistry of Redox Reactions" Ed. B. Testa, Academic Press, London, 1995.
- [63] C. Cativiela, J. I. Garcia, E. F. Alvarez, C. Elorriaga, *Acta Chimica Hungarica*, 1992, 130, 129.
- [64] W. Osswald, M. B. Matos, "Antidepressores" in "Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas", Ed. J. Garrett, W. Osswald, 2ª edição, Vol. 1, Porto Editora, Porto, 1986.
- [65] B. Testa, "Advances in Drug Research", Ed. B. Testa, vol. 23, Academic Press, London, 1992.
- [66] J. A. M. Prates, J. H. R. D. Correia, *Rev. Port. Farm.*, 1993, 43, 5.



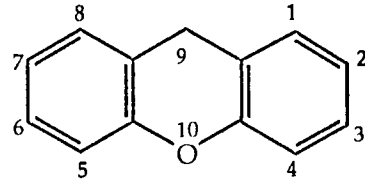
ERRATA

Página	Linha	Onde se lê...	Deve ler-se...
vi	11	PROTEC	PROTECT
xxiv	18	Monoamino	Monoamina
5	19	Kielmeyra e Hypericum	<i>Kielmeyra e Hypericum</i>
5	22	estruturais e	estruturais e/ou

12



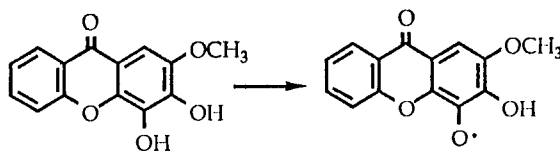
(I₂)



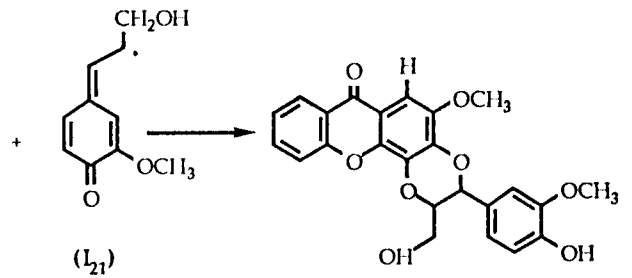
(I₃)

10	9	Estrutura	Estrutura
14	9	Gutiferae	Guttiferae
17		6-Hidroxicadensina F	6-Hidroxi-isocadensina F
19	4	do grupo em C(4) metoxilo	do grupo metoxilo em C(4)
21	14	6-hidroxicadensina F	6-hidroxi-isocadensina F

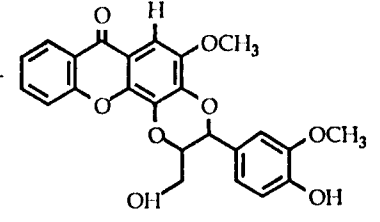
22 Fig. 6



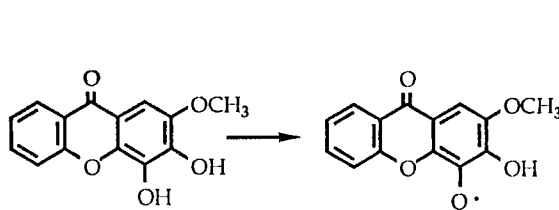
(I₂₀)



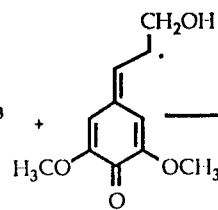
(I₂₁)



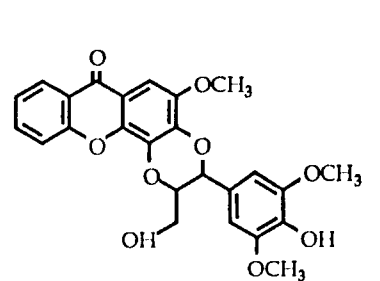
(I₄)



(I₂₀)



(I₂₂)

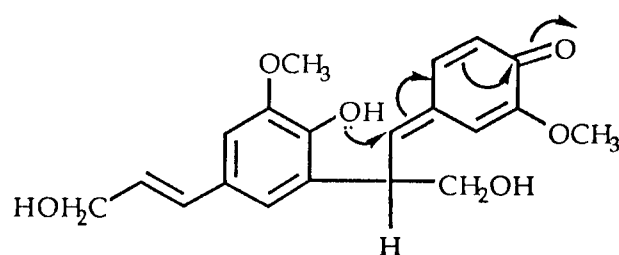
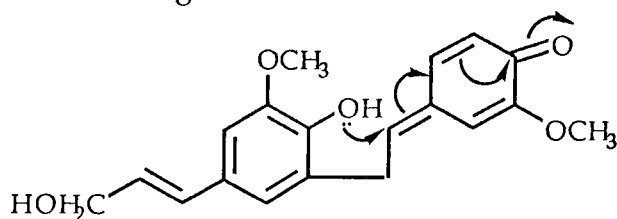


(I₁₀)

29 7 [12]
 32 28 terminanda
 34 7 TLC
 36 5 e) C₆H₆
 38 1 AgCO₃
 43 2 Universida
 43 3 MOPHC
 44 9 quinonóide

[18]
 terminada
 CCF
 e) C₆H₆ anidro
 Ag₂CO₃
 Universidade
 MOPAC
 semiquinonóide

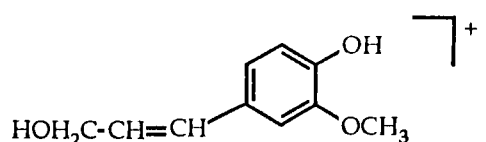
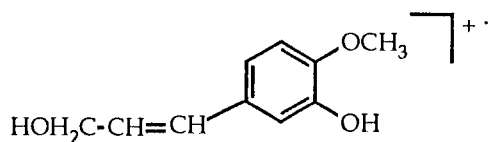
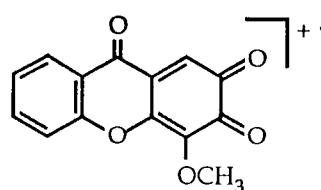
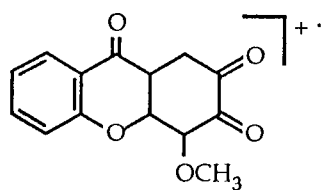
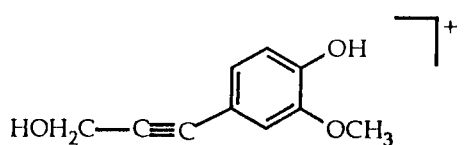
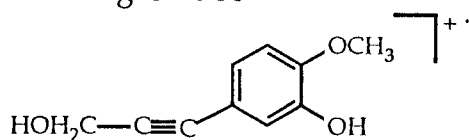
45 Fig. 16



58 1 anisotrópicos
 79 numeração com "

anisotrópico
 numeração com '

100 e 101 Fig. 34 e 35



115 13 sinai
 177 3 estruturais e

sinai
 estruturais e/ou

