

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Thiago Freitas Borgati

Síntese e Atividade Alelopática de Carboxamidas Indólicas

Belo Horizonte

2010

UFMG / ICEx – DQ – 806

D 471

Thiago Freitas Borgati

Síntese e Atividade Alelopática de Carboxamidas Indólicas

Dissertação apresentada ao
Departamento de Química do
Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre em
Química – QO.

Belo Horizonte

2010

B732s Borgati, Thiago Freitas.
2010 Síntese e atividade alelopática de carboxamidas
indólicas / Thiago Freitas Borgati. 2010.
D ix, 91 f. : il.
Orientadora: Maria Amélia Diamantino Boaventura.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Carboxamidas
indólicas - Teses 3. Alelopatia - Teses I.
Boaventura, Maria Amélia Diamantino, Orientadora
II.Título.

CDU 043




PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br




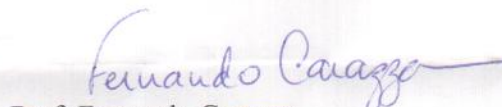
"Síntese e Atividade Aleopática de Carboxamidas Indólicas"

Thiago Freitas Borgati

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profa. Maria Amélia Diamantino Boaventura - Orientadora
UFMG


Profa. Lucienir Pains Duarte
UFMG


Prof. Fernando Carazza
UFMG

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2010.

**Este trabalho foi realizado sob a orientação da
profa. Dra. Maria Amélia Diamantino
Boaventura e contou com a colaboração da profa.
Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi.**

Agradecimentos

Agradeço a DEUS e a Nossa Senhora pela ajuda nos momentos difíceis e pela perseverança.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio incondicional, pela convivência e pela lição de vida, meus exemplos máximos.

À professora Doutora Maria Amélia Diamantino Boaventura pela paciência, orientação, disponibilidade, atenção e pelos valiosos conselhos.

Aos professores Lucienir Pains Duarte e Fernando Carazza por terem aceitado o convite de participarem da minha banca.

Aos professores: Henriete da Silva Vieira, Jacqueline Aparecida Takahashi, Jarbas Magalhães Resende, Lúcia Pinheiro Santos Pimenta, Luiza de Marilac Pereira Dolabella, Rosemeire Brondi Alves, Rossimíriam Pereira de Freitas e Valmir Fascio Juliano pela amizade, disponibilidade e conselhos.

Aos amigos de laboratório: Alessandra, Jociani, Leandro, Luiza, Rondinelli e Thais, pela convivência, discussões, pelo incentivo e pela ajuda para desenvolver este trabalho.

Aos amigos de graduação e mestrado: Bruno, Diego, Felipe e Maria Elisa pelos empréstimos, sábios conselhos e incentivo.

À Ana Paula pela ajuda, pelos empréstimos de equipamentos e reagentes, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos meus amigos do Departamento de Química: Dayse, Guilherme, Leandro, Lucas.

Ao meu grande amigo, conselheiro e exemplo máximo de pessoa centrada Giovanni.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE ESQUEMAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1. Alcalóides	1
1.1.1. Alcalóides indólicos	1
1.2. Alelopatia	8
1.2.1. Histórico, definições e considerações	8
1.2.2. Modos de liberação dos aleloquímicos	11
1.2.3. Principais classes de aleloquímicos	13
1.2.3.1 Compostos fenólicos	14
1.2.3.2 Quinonas	16
1.2.3.3 Terpenos	17
1.2.3.4 Ácidos hidroxâmicos	20
1.2.3.5 Citocininas	21
1.2.3.6 Alcalóides	22
1.2.3.7 Auxinas	23
1.2.3.8 Poliaminas	26

CAPÍTULO 2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Introdução	28
2.2. Proposta de trabalho	29
2.3. Resultados e discussão	29
2.3.1. Preparação das amidas 2-6 a partir da morfolina e das diaminas, e do ácido indol-3-carboxílico (1)	29
2.3.2. Identificação da N-morfolina-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (2), da N-piperazino-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (3), da N-(etil-2-amino)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (4), da Preparação da N-(propil-3-amino)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (5) e da N-(butil-4-amino)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (6)	31
2.4. Espectros	41

CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais utilizados e métodos.....	60
3.1.1. Cromatografia em camada delgada de sílica (CCDS)	60
3.1.2. Cromatografia em coluna	60
3.1.3. Evaporação de frações	60
3.1.4. Faixa de fusão	60
3.1.5. Espectroscopia na região do infravermelho	61

3.1.6.	Espectrometria de Massas	61
3.1.7.	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	61
3.1.8.	Espectroscopia UV-VIS	61
3.1.9.	Critério de pureza	61
3.1.10.	Tratamento de solventes e reagentes	62
3.2.	Preparação de amidas 2-6 – Metodologia geral	62
3.2.1.	Preparação da N-morfolina-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (2).....	63
3.2.1.1.	N-morfolina-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (2)	63
3.2.2.	Preparação da N-piperazino-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (3)	64
3.2.2.1.	N-piperazino-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (3)	65
3.2.3.	Preparação da N-(etil-2-amino)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (4) ...	65
3.2.3.1.	N-(etil-2-amino)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (4)	66
3.2.4.	Preparação da N-(propil-3-amino)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (5)	67
3.2.4.1	N-(propil-3-amino)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (5)	67
3.2.5	Preparação da N-(butil-4-amino)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (6) .	68
3.2.5.1	N-(butil-4-amino)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (6)	68

CAPÍTULO 4 – TESTES BIOLÓGICOS

4.1.	Avaliação das atividades antimicrobianas das amidas 2-6	70
4.1.1.	Introdução	70
4.1.2.	Metodologia	70
4.1.2.1.	Preparo dos meios de cultura	70
4.1.2.2.	Metodologia de ensaio	71
4.1.3.	Discussão dos resultados	72
4.2.	Avaliação da atividade das amidas 2-6 sobre a germinação das sementes e o crescimento das raízes e do caule de plantículas de <i>Lactuca sativa</i> (alface) e <i>Allium cepa</i> (cebola)	72
4.2.1.	Introdução	72
4.2.2.	Metodologia	73
4.2.3.	Tratamento estatístico	74
4.2.4.	Discussão dos resultados	75
4.2.4.1.	Efeito das amidas 2-6 sobre <i>Lactuca sativa</i>	75
4.2.4.2.	Efeito das amidas 2-6 sobre <i>Allium cepa</i>	77
4.3.	Cálculo do logaritmo do coeficiente de partição n-octanol-água para o ácido indol-3-carboxílico e para as amidas 2-6	80
4.3.1.	Introdução	80
4.3.2.	Metodologia	81
4.3.3.	Resultados e discussão	81

5 - CONCLUSÕES	83
-----------------------------	-----------

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
---	-----------

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.1 - Biossíntese do <i>L</i> -triptofano	2
Esquema 1.2 - Conversão do corinanteal à cinconinona	6
Esquema 2.1 - Obtenção das amidas 2-6	29
Esquema 2.2 - Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos picos observados no espectro de Massas da monoamida 2	36
Esquema 2.3 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos picos observados no espectro de Massas da monoamida 3	37
Esquema 2.4 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos picos observados no espectro de Massas da monoamida 4	38
Esquema 2.5 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos picos observados no espectro de Massas da monoamida 5	39
Esquema 2.6 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos picos observados no espectro de Massas da monoamida 6	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Substâncias sintetizadas por Heda <i>et al.</i> (2009) que apresentaram os melhores resultados de atividade antimicrobiana	6
Figura 1.2 - Derivados do ácido benzóico que apresentam atividade alelopática	14
Figura 1.3 - Derivados do ácido cinâmico que apresentam atividade alelopática	15
Figura 1.4 - Ácidos hidroxâmicos naturais apresentando atividade alelopática ..	20
Figura 2.1 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) de 1	41
Figura 2.2 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) de 1	41
Figura 2.3 - Espectro no infravermelho de 2	42
Figura 2.4 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) de 2	42
Figura 2.5 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) de 2	43
Figura 2.6 - Subespectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (50 MHz, CD_3OD) de 2	43
Figura 2.7 - Mapa de contornos COSY (200MHz, CD_3OD) de 2	44
Figura 2.8 - Mapa de contornos HMQC (200MHz, CD_3OD) de 2	44
Figura 2.9 - Espectro de Massas de 2	45
Figura 2.10 - Espectro no infravermelho 3	45
Figura 2.11 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) de 3	46
Figura 2.12 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) de 3	46
Figura 2.13 - Subespectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (50 MHz, CD_3OD) de 3 ..	47
Figura 2.14 - Mapa de contornos COSY (200MHz, CD_3OD) de 3	47
Figura 2.15 - Mapa de contornos HMQC (200MHz, CD_3OD) de 3	48
Figura 2.16 - Espectro de Massas de 3	48
Figura 2.17 - Espectro no infravermelho 4	49
Figura 2.18 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) de 4	49
Figura 2.19 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) de 4	50
Figura 2.20 - Subespectro de RMN de ^{13}C DEPT 135(50 MHz, CD_3OD) de 4 ...	50
Figura 2.21 - Mapa de contornos COSY (200MHz, CD_3OD) de 4	51
Figura 2.22 - Mapa de contornos HMQC (200MHz, CD_3OD) de 4	51
Figura 2.23 - Espectro de Massas de 4	52
Figura 2.24 - Espectro no infravermelho 5	52

Figura 2.25 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) de 5	53
Figura 2.26 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) de 5	53
Figura 2.27 - Subespectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (50 MHz, CD_3OD) de 5 ..	54
Figura 2.28 - Mapa de contornos COSY (200MHz, CD_3OD) de 5	54
Figura 2.29 - Espectro de Massas de 5	55
Figura 2.30 - Mapa de contornos HMQC (200MHz, CD_3OD) de 5	55
Figura 2.31 - Espectro no infravermelho 6	56
Figura 2.32 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) de 6	56
Figura 2.33 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) de 6	57
Figura 2.34 - Subespectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (50 MHz, CD_3OD) de 6 ..	57
Figura 2.35 - Mapa de contornos COSY (200MHz, CD_3OD) de 6	58
Figura 2.36 - Mapa de contornos HMQC (200MHz, CD_3OD) de 6	58
Figura 2.37 - Espectro de Massas de 6	59
Figura 4.1 - Efeito do ácido indol-3-carboxílico (1) e das amidas 2-6 sobre a germinação de <i>L. sativa</i> (alface)	76
Figura 4.2 - Efeito do ácido indol-3-carboxílico (1) e das amidas 2-6 sobre o crescimento da raiz e do caule de plantículas de <i>L. sativa</i> (alface)	77
Figura 4.3 - Efeito do ácido indol-3-carboxílico (1) e das amidas 2-6 sobre a germinação de <i>A. cepa</i> (cebola)	78
Figura 4.4 - Efeito do ácido indol-3-carboxílico (1) e das amidas 2-6 sobre o crescimento da raiz e do caule de plantículas de <i>A. cepa</i> (cebola)	79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Valores de deslocamentos químicos (δ) nos espectros de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD , δ), do ácido indol-3-carboxílico (1) e das monoamidas 2 , 3 , 4 , 5 e 6	34
Tabela 2.2 – Comparação dos principais sinais nos espectros de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD , δ), das monoamidas 2 , 3 , 4 , 5 e 6 derivadas do ácido 3-indolcarboxílico (1)	35
Tabela 4.1 – Valores de log P calculados utilizando-se o programa ACDLabs 6.0 para o ácido 1 e para as amidas 2-6	82

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
CCDS	Cromatografia em camada delgada sílica
COSY	Espectroscopia de correlação (Correlation Spectroscopy)
δ	Deslocamento Químico (RMN)
d	duplete
DEPT	Aumento sem distorção por transferência de polarização com pulso de 135° (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
dd	duplete duplo
ddd	duplo duplete duplo
HMQC	Transferência de coerência heteronuclear via múltiplo <i>quantum</i> (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)
IV	Espectroscopia na região do Infra-vermelho
J	Constante de acoplamento escalar
$\bar{\nu}_{\max}$	Número de onda
q	quinteto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	simpleto
t	triplete

RESUMO

O presente trabalho descreve a preparação de cinco amidas a partir da reação entre o ácido indol-3-carboxílico (**1**) com uma monoamina e 4 diaminas simétricas, a fim de serem testadas quanto à sua atividade alelopática e antimicrobiana, além de terem seus coeficiente de partição *n*-butanol-água (P) calculados.

Inicialmente, numa Introdução Geral, Capítulo 1, é feita uma revisão bibliográfica sobre alcalóides indólicos e alelopatia.

No Capítulo 2 (Resultados e Discussão) é descrita a análise espectrométrica (por IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e EM) das amidas sintetizadas. A amida obtida a partir da monoamina foi: N-morfolina-1*H*-indol-3-carboxamida (**2**). As moamidas obtidas a partir das diaminas simétricas foram: N-piperazino-1*H*-indol-3-carboxamida (**3**), N-(etil-2-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (**4**), N-(propil-3-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (**5**) e N-(butil-4-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (**6**).

Todas essas monoamidas obtidas são inéditas, com exceção da carboxamida derivada da morfolina (**2**).

O Capítulo 3 (Parte Experimental) descreve a metodologia de preparação dessas amidas descritas acima.

No Capítulo 4 são apresentados os resultados dos Testes Biológicos realizados: teste de atividade antimicrobiana, teste de atividade alelopática sobre o crescimento e germinação da *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola) e cálculo do log P.

ABSTRACT

This work describes the preparation of five amides from indole-3-carboxylic acid (**1**) with one monoamide and 4 symmetric diamines, to evaluate their activities as allelopathic and antimicrobial agents and to calculate their *n*-butanol-water partition coefficient (P).

Initially, in a General Introduction, Chapter 1, a bibliographic review on indole alkaloids and allelopathy is done.

Chapter 2 (Results and Discussion) describes the spectrometric analysis of synthesized amides by IR, ¹H and ¹³C NMR and MS. The obtained amide from monoamine was: N-(morpholin)-1*H*-indole-3-carboxamide (**2**). The obtained amides from symmetric diamines were: N-(piperazin)-1*H*-indole-3-carboxamide (**3**), N-(2-aminoethyl)-1*H*-indole-3-carboxamide (**4**), N-(3-aminopropyl)-1*H*-indole-3-carboxamide (**5**) and N-(4-aminobutyl)-1*H*-indole-3-carboxamide (**6**).

All monoamides are described here for the first time, except the one derived from morpholin (**2**).

Chapter 3 (Experimental Part) describes the methodology to obtain the above amides.

In Chapter 4, the results obtained from biological evaluation, antimicrobial and allelopathic tests, and the calculated log P are presented.

Capítulo 1

Introdução:

Alcalóides indólicos

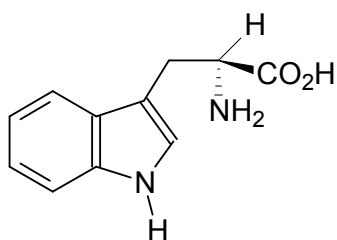
Alelopatia

1.1 – Alcalóides

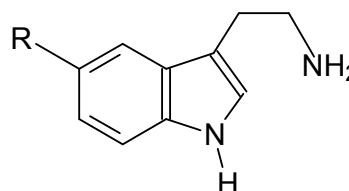
Alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas amplamente encontradas na natureza. Um ou mais átomos de nitrogênio podem estar presentes em sua estrutura, geralmente na forma de aminas primárias, secundárias ou terciárias. Estes átomos são originários de aminoácidos, que têm grande parte de seu esqueleto de carbono retido no alcalóide. Assim, os alcalóides são classificados de acordo com o aminoácido precursor, sendo eles: ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, histidina, ácido antranílico, e triptofano.

1.1.1 – Alcalóides indólicos

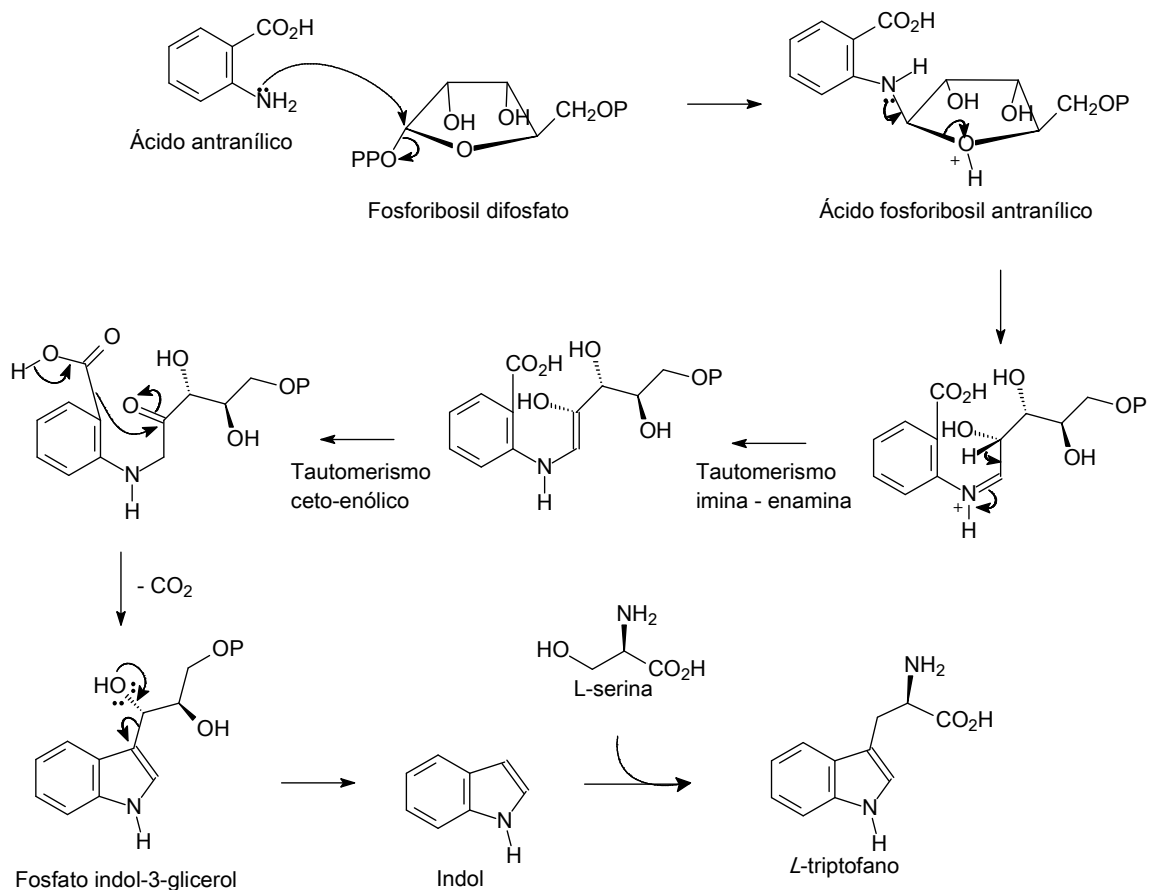
São os alcalóides derivados do *L*-triptofano (I), que é originado a partir da rota do chiquimato via ácido antranílico (**Esquema 1.1**, página 2). Os derivados mais simples são amplamente distribuídos tanto no reino vegetal quanto no animal. A triptamina (II) e a serotonina (5-hidroxi-triptamina, III), com atividade cerebral, são exemplos de alcalóides indólicos simples, com ampla distribuição na natureza.



L-triptofano (I)



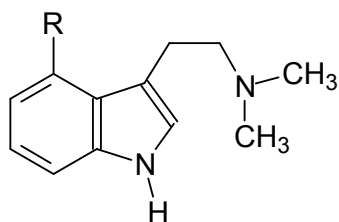
R
H Triptamina (II)
HO Serotonina (III)



Esquema 1.1 - Biossíntese do *L*-triptofano (Dewick, 2002).

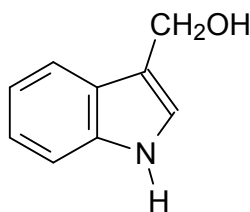
Os alcalóides indólicos apresentam um amplo espectro de atividades farmacológicas, tais como analgésica, antiinflamatória, bactericida, estrogênica, estimulante e depressora do sistema nervoso central, dentre outras (Fumagali *et al.*, 2008).

A psilocina (**IV**) e a psilocibina (**V**), compostos alucinógenos utilizados por nativos mexicanos como intoxicantes e presentes principalmente em cogumelos do gênero *Psilocybe*, são outros exemplos de alcalóides indólicos (Agurell e Nilsson, 1968).



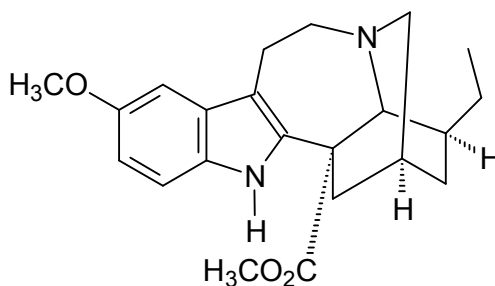
R
OH Psilocina (IV)
OPO₃H₂ Psilocibina (V)

Alguns destes compostos isolados da folha da árvore *Voacanga africana* demonstraram terem, além das atividades citadas, alta toxicidade contra células carcinogênicas (Macabeo *et al.*, 2009) como o indol-3-carbinol (VI), utilizado no tratamento contra o câncer de mama, e encontrado no repolho e no brócolis e (Riby *et al.*, 2000).



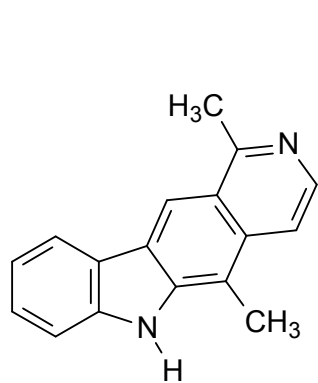
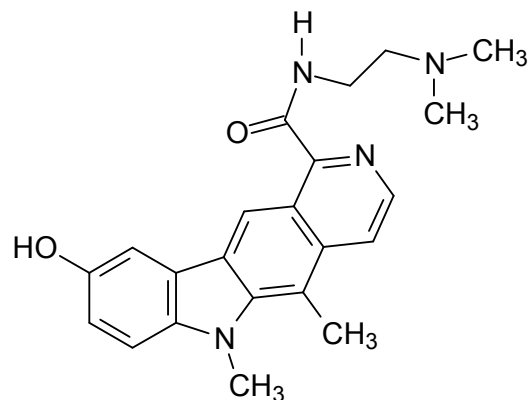
Indol-3-carbinol (VI)

A coronaridina (VII) é um dos exemplos desta classe de compostos que apresenta grande diversidade de ação biológica: atividade anticolinesterásica, hipotensora, contraceptiva, citotóxica, contra o câncer de ovário, leishmanicida, antiinflamatória, analgésica e hipotérmica (Assis *et al.*, 2009).

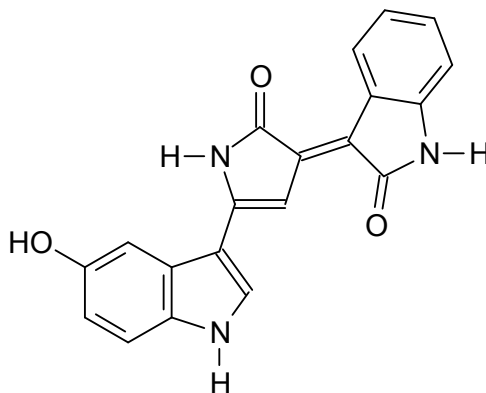


Coronaridina(VII)

A olivacina (**VIII**) é um alcalóide natural extraído de espécies da família *Apocynaceae*. Devido à sua atividade antineoplásica, várias modificações foram feitas em sua estrutura visando um aumento da sua atividade (Hyrac *et al.*, 2002). O derivado denominado S16020-2 (**IX**), por exemplo, demonstrou maior citotoxicidade *in vivo* contra células cancerosas que os padrões utilizados como referência (Mée *et al.*, 1998).

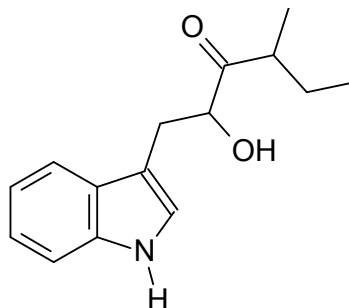
Olivacina (**VIII**)S16020-2 (**IX**)

Outro representante desta classe que apresenta várias atividades biológicas e é utilizado como potencial droga anticarcinogênica é a violaceína (**X**). Além das atividades tripanossomicida e antibiótica, testes *in vitro* demonstraram baixos valores de IC₅₀ : $0,62 \times 10^{-8}$ mol/L; $0,58 \times 10^{-8}$ mol/L e $0,27 \times 10^{-9}$ mol/L para células de câncer de ovário, de pulmão e de cólon, respectivamente (Azevedo *et al.*, 2000).

Violaceína (**X**)

Derivados indólicos naturais produzidos por *Xenorhabdus nematophilus*, um nematóide, tais como o derivado (**XI**) demonstraram atividade antibiótica sobre

bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, pela inibição da síntese de RNA (Sundar e Chang, 1993).



(XI)

Heda *et al.* (2009) sintetizaram derivados indólicos halogenados (**XII-XIX**) e avaliaram sua atividade antimicrobiana sobre o crescimento de bactérias, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e fungos, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*, pelo método de difusão em disco. Os melhores resultados de concentração inibitória mínima calculados foram: 50 µg/mL para os derivados **XII-XV** para as culturas bacterianas e o mesmo valor para os derivados **XVI-XVII** para as culturas de fungos (**Figura 1.1**).

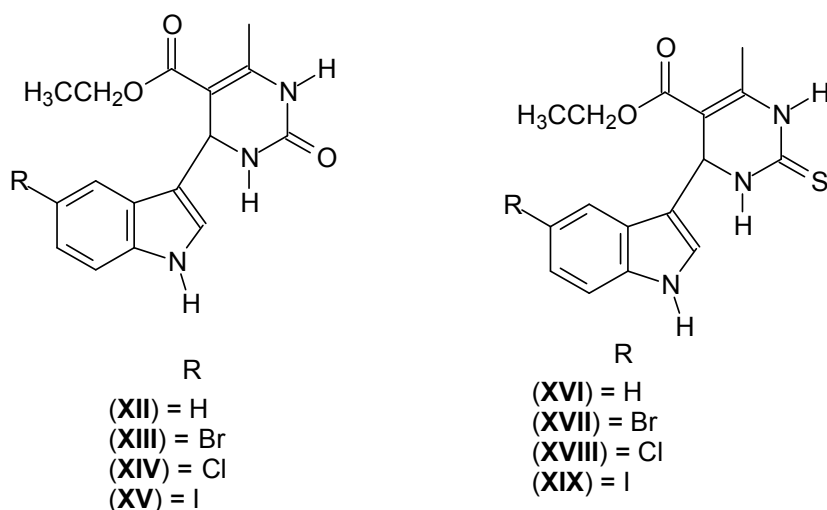
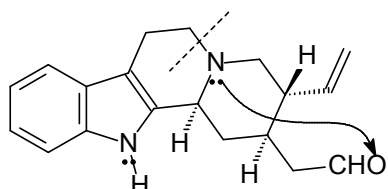


Figura 1.1 - Substâncias sintetizadas por Heda *et al.* (2009) que apresentaram os melhores resultados de atividade antimicrobiana.

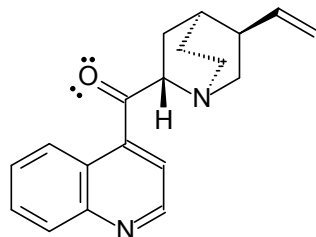
O triptofano também pode ter seu núcleo indólico convertido a um núcleo quinolínico, via rearranjos, aumentando ainda mais o número de alcalóides a que dá

origem. Um exemplo desse rearranjo é observado na conversão do corinanteal (**XX**) à cinconinona (**XXI**) (**Esquema 1.2**).

Clivagem da ligação C-N via imínio e formação de uma nova ligação C-N também via imínio

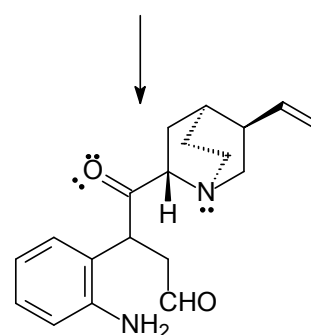
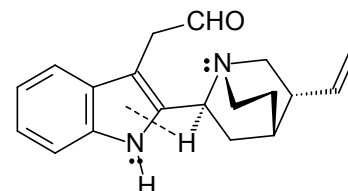


Corinanteal (**XX**)



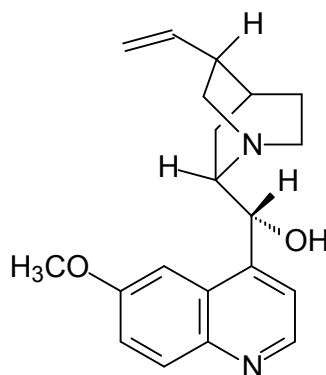
Cinconinona (**XXI**)

Clivagem da ligação C-N indólica



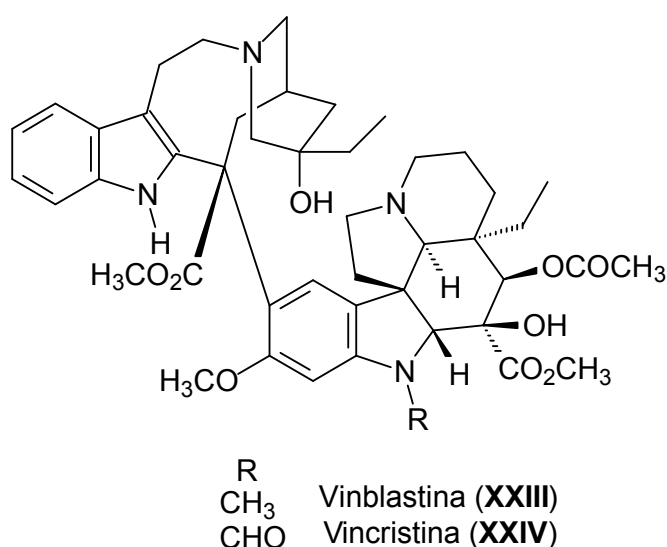
Esquema 1.2 – Conversão do corinanteal à cinconinona (Dewick, 2002).

Um alcalóide quinolínic muito comum é a quinina (**XXII**) que foi utilizada na medicina como antimalárico natural, mas devido aos efeitos colaterais e ao aumento da resistência do parasita teve seu uso drasticamente reduzido. Contudo, com o aumento do problema de resistência do parasita às drogas sintéticas tem-se tentado obter derivados da quinina com maior atividade antimalárica (Kumura *et al.*, 2005).

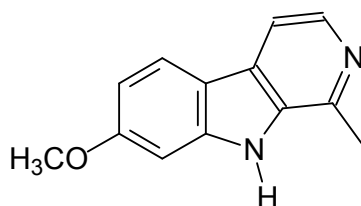


Quinina (**XXII**)

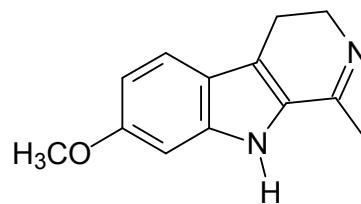
O núcleo indólico pode aparecer associado a terpenos, sendo que já foi descrito o isolamento de mais de 3000 representantes deste tipo de alcalóides a partir de plantas, fazendo deste um dos maiores grupos dentro da classe dos alcalóides. Dois exemplos são a vinblastina (**XXIII**) e a vincristina (**XXIV**), duas das substâncias a que se atribui o sucesso da quimioterapia desde sua introdução clínica como drogas antitumorais (Gigant *et al.*, 2005). Elas agem inibindo o fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares e, conseqüentemente, interrompendo a divisão celular na metáfase (Donnici *et al.*, 2005).



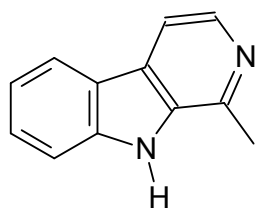
Os derivados β -carbolínicos são obtidos pela reação de um derivado da triptamina (**II**) com o acetaldeído. Este núcleo está presente na harmina (**XXV**), harmalina (**XXVI**) e harmano (**XXVII**). Estes alcalóides, devido aos seus efeitos neurofarmacológicos, são substâncias de grande interesse; dentre outras atividades descritas, eles demonstraram inibir a monoamino oxidase, alterar o reaproveitamento de aminas biogênicas e interferir no receptor benzodiazepínico. Parecem também ter participação na patogênese do alcoolismo e em distúrbios psíquicos. As fontes exógenas mais comuns desse tipo de substância são plantas comestíveis, queijos, molho de soja, produtos defumados e bebidas alcoólicas (Gutsche e Herderich, 1997). Em adição a esses efeitos neurofarmacológicos, outras duas potentes atividades recentemente relatadas para as tetrahydro- β -carbolidinas (por exemplo o tetrahydroharmano, **XXVIII**) são a inibição da agregação plaquetária e a ação anti-oxidante, pela captação de radicais livres (Stanley, 1999).



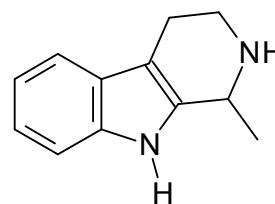
Harmina (XXV)



Harmalina (XXVI)



Harmano (XXVII)



Tetrahydroharmano (XXVIII)

1.2 - Alelopatia

1.2.1- Histórico, definições e considerações

Theophrastus, biólogo grego, discípulo de Aristóteles, foi quem primeiro observou e relatou a influência de plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), em 300 A.C., na exaustão do solo e destruição de ervas daninhas. Plínio o Velho, naturalista romano, observou em 1 D.C. que árvores de noqueira (*Juglans regia* L.) eram tóxicas para outras plantas e que a cevada (*Hordeum vulgare* L.) e o grão-de-bico destruíam o solo preparado para o cultivo de milho (Weir *et al.*, 2004).

Foi só em 1937, entretanto, que o termo alelopatia foi proposto pelo fisiologista Hans Molisch. Ele sugeriu o termo enquanto observava o efeito do gás etileno no amadurecimento de frutos. A palavra alelopatia, derivada do latim *allelon* = de um para o outro, *pathos* = prejuízo, foi utilizada para se referir às interações bioquímicas entre todos os tipos de plantas e inclusive entre microorganismos. Anos depois, o mesmo autor redefiniu o termo alelopatia como sendo “qualquer efeito direto ou

indireto danoso ou benéfico que uma planta exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente” (Rizvi e Rizvi, 1992).

A Sociedade Internacional de Alelopatia (IAS) definiu, em 1996, o termo de uma maneira mais abrangente como: “a ciência que estuda qualquer processo envolvendo, essencialmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos, incluindo efeitos positivos e negativos” (Macías *et al.*, 2006a).

Resumindo, a alelopatia é um ramo da ciência que se dedica ao estudo de vários processos primários envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que têm influência sobre o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e agrônômicos incluindo tanto a inibição quanto a estimulação. Contudo, apesar do conceito proposto por Molisch envolver tanto os efeitos benéficos como os deletérios, estes têm sido mais comumente documentados do que aqueles (Souza, 2002a).

Um dos aspectos mais estudados em alelopatia atualmente é a resposta de um organismo em relação aos aleloquímicos, isto é, estimulação (vegetal) ou atração (animal) a baixas concentrações dos aleloquímicos e inibição (vegetal) ou repelência (animal) aos aumentos de concentração (Marize *et al.*, 1998). Herbicidas e agroquímicos baseados em produtos naturais biologicamente ativos são interessantes por vários motivos sendo os mais importantes o fato de serem considerados mais benignos ao meio ambiente, pois suas meias-vidas são mais curtas, e o fato de serem substâncias naturais, pois fornece certo conforto às agências governamentais reguladoras das atividades agrícolas (Duke *et al.*, 2000). Também, os mecanismos de ação dessas substâncias é diferenciado daqueles dos herbicidas comerciais. Tudo isso faz com que os produtos naturais sejam mais recomendáveis na elaboração de novos defensivos agrícolas ou sejam materiais de partida ideais para a obtenção de derivados visando a mesma utilização. No entanto, a complexidade estrutural da maioria dos metabólicos secundários, normalmente contendo vários estereocentros, dificulta seu isolamento, caracterização e síntese, tornado questionável sua produção em escala industrial. Simplificações estruturais

são utilizadas para contornar esse obstáculo, podendo, contudo levar a produtos com menor atividade biológica (Vyvyan, 2002).

Foi observado que o aparecimento e o desaparecimento de algumas espécies de plantas, assim como a flutuação da densidade populacional de uma determinada espécie em alguns ecossistemas, principalmente os monocultivos, como as pastagens, têm sido atribuídos a diferentes fatores como a competição por componentes ambientais essenciais à sobrevivência das espécies (Souza, 2002a). É neste contexto que a utilização de substâncias biologicamente ativas, naturais ou análogas destas, no controle de ervas daninhas (algumas resistentes à grande maioria dos herbicidas usualmente empregados) de insetos e de microorganismos patogênicos, pode vir a reduzir ou eliminar a contaminação do meio ambiente, oferecendo alternativas à produção de cultivares isentos de agentes contaminantes e preservando os recursos naturais (Souza, 2002b; Andrade *et al.*, 2003).

Os agroquímicos são largamente empregados em agricultura industrial visando o aumento do rendimento das lavouras e diminuição dos custos de produção. No entanto, o uso contínuo de herbicidas em áreas de monocultivo tem levado ao crescente aparecimento, a nível mundial, de biotipos de plantas daninhas tolerantes e resistentes a esses herbicidas o que tem ocasionado um aumento significativo dos custos de produção e problemas graves de contaminação do ambiente (Macías *et al.*, 2000).

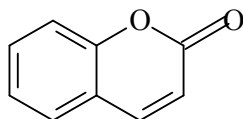
A preparação de derivados como potenciais aleloquímicos tem seguido uma tendência atualmente. Na maioria dos casos a síntese destes compostos é realizada utilizando-se duas estratégias diferentes: a) alguns reagentes não são as moléculas bioativas propriamente ditas, mas sim fragmentos moleculares responsáveis pela atividade biológica observada nos produtos naturais ou b) realiza-se a funcionalização de um esqueleto molecular. A preparação destes derivados em uma escala maior, necessária para os testes em casas de vegetação e em campo, contudo, é difícil e cara (Macías *et al.*, 2006b).

1.2.2 – Modos de liberação dos aleloquímicos

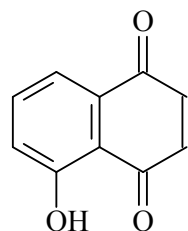
Os aleloquímicos são sintetizados nas plantas como metabólicos secundários e localizados em certos órgãos especializados. A quantidade armazenada, no entanto, varia de acordo com o órgão, assim como com a variedade da planta, o estágio de crescimento em que ela se encontra e a época do ano. A espécie *Anthoxanthum odoratum*, por exemplo, apresenta cumarina (**XXIX**) em todas as suas partes sendo a concentração maior nas folhas, porém esta concentração varia com a estação do ano (Kobayashi *et al.*, 2004). A cumarina inibe a divisão celular do *Allium cepa* (cebola), através do bloqueio da mitose.

A quantidade de aleloquímicos liberada pela planta doadora e a sensibilidade da planta receptora são dependentes do estágio de crescimento de ambas. O solo e as plantas são influenciados pelas condições ambientais, portanto a atividade fitotóxica dos aleloquímicos no solo é função de uma complexa interação entre o comportamento dos aleloquímicos e as propriedades fisiológicas e ecológicas de ambas as espécies, doadora e receptora (Kobayashi *et al.*, 2004) (Lovett *et al.*, 1989). As formas de liberação mais comum dos aleloquímicos se dão por lixiviação, volatilização, exsudação pelas raízes e pela queda de partes da planta seja por um fator biótico, seja por um fator abiótico (Xuan *et al.*, 2005).

- a) Lixiviação: este processo ocorre via água da chuva, como é o caso da liberação de juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) (**XXX**) pelas folhas da nogueira. Esta substância tem efeito seletivo uma vez que inibe o crescimento de arbustos e estimula o desenvolvimento de outras espécies formando uma cobertura vegetal sob a copa das árvores. Gotas de orvalho também podem transportar aleloquímicos para o solo, como é o caso da lixiviação de substâncias tóxicas das folhas de *Eucalyptus globulus*.

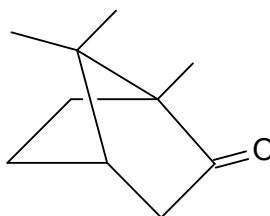


Cumarina (XXIX)



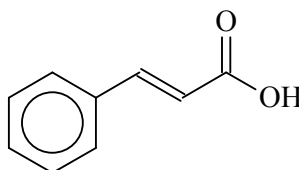
Juglona (XXX)

- b) Volatilização: dentre os principais aleloquímicos voláteis encontram-se os terpenos. As espécies *Salvia leucophylla* e *Artemisia californical*, arbustos que ocorrem no sul da Califórnia no bioma Chaparral, um tipo de cerrado, liberam alguns terpenos voláteis, como a cânfora (XXXI), além de deixarem o ar perfumado, são absorvidos pelo solo e inibem a germinação de ervas daninhas.



Cânfora (XXXI)

- c) Excreção ou exsudação pelas raízes: a raiz da espécie *Parthenium argentatum* libera o ácido cinâmico (XXXII), que é autotóxico. Esta substância atua na orientação do crescimento das raízes evitando que outro indivíduo ocupe aquele lugar no solo.



Ácido cinâmico (XXXII)

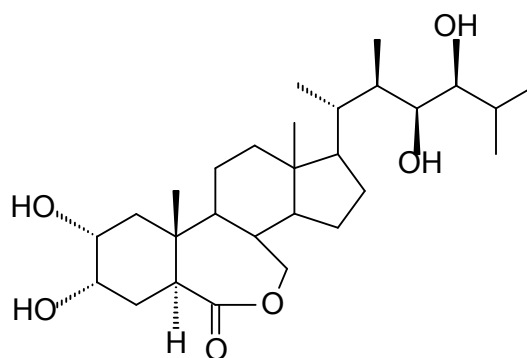
- d) Decomposição das partes aéreas ou subterrâneas: as plantas podem liberar aleloquímicos por alguma parte específica, fato observado para a espécie

Agropyron repens que libera ácidos fenólicos pelas suas raízes apodrecidas, assim como por todo o espécime, como é o caso da *Erica cinerea* a qual compete com certas gramíneas pela liberação de substâncias de caráter fenólico e cumárico (Silva, 1978).

Outra forma de liberação de aleloquímicos pouco relatada, até pouco tempo, se dá diretamente nos meios aquosos. Atualmente, um crescente número de artigos evidencia os efeitos tóxicos de uma variedade de substâncias liberadas pelo fitoplâncton para inibir seus competidores naturais. O fenômeno da alelopatia tem sido, nestes casos, uma justificativa para a dominância de algumas espécies de algas no fitoplâncton (Rengefors e Legrand, 2007). A produção de substâncias alelopáticas que inibem o crescimento de outras espécies do fitoplâncton tem sido observada para dinoflagelados, diatomáceas, algas verdes e cianobactérias (Oberhaus *et al.*, 2008). Uma atenção especial é dada à atividade alelopática das cianobactérias por duas razões principais: a primeira delas é pela possibilidade da descoberta de herbicidas e agentes que promovam o biocontrole de algumas populações nos meios aquosos, de maneira análoga ao desenvolvimento de agroquímicos, sendo a possibilidade de obtenção de novas substâncias que não são prejudiciais para o meio ambiente a principal motivação para estas pesquisas. O segundo fator é que a compreensão do mecanismo pelo qual os aleloquímicos agem pode fornecer informações importantes sobre o processo de seleção natural em algumas comunidades de algas (Gantar *et al.*, 2008). As substâncias produzidas por microorganismos são aquelas que fornecem o maior número de aleloquímicos com novos sítios de ação, apesar da maior dificuldade para isolá-los (Duke *et al.*, 1999).

1.2.3 – Principais classes de aleloquímicos

Os aleloquímicos apresentam uma grande diversidade química, podendo ser encontrados na maior parte das classes de substâncias e sua estrutura pode ser muito simples como, por exemplo, o eteno, utilizado no amadurecimento de frutos, até muito complexa como, por exemplo o brassinolídeo (XXXIII), isolado do nabo (Mallik, 2005).



Brasinolídeo (XXXIII)

1.2.3.1 – Compostos fenólicos

Este grupo de aleloquímicos é muito amplo compreendendo estruturas com diferentes graus de complexidade, de derivados simples dos ácido benzóico e cinâmico a complexos fenóis e polifenóis.

Os derivados dos ácidos benzóico (XXXIV-XXXVII, **Figura 1.2**) e cinâmico (XXXVIII-XLI, **Figura 1.3**, página 15) são os agentes aleloquímicos mais comuns. A eles têm sido atribuída a atividade alelopática observada em ecossistemas de florestas, sendo responsáveis pela dificuldade de reflorestamento (Macías *et al.*, 2007).

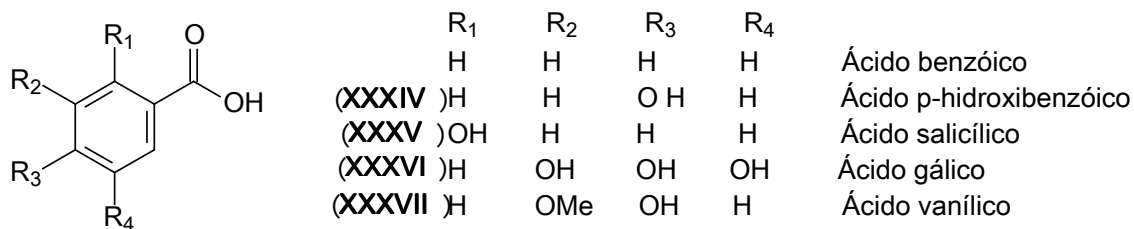


Figura 1.2 – Derivados do ácido benzóico que apresentam atividade alelopática.

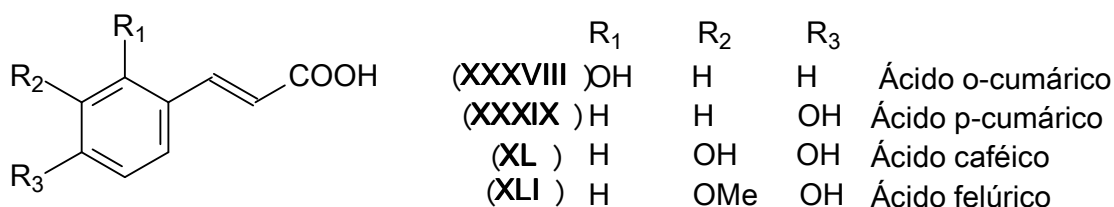
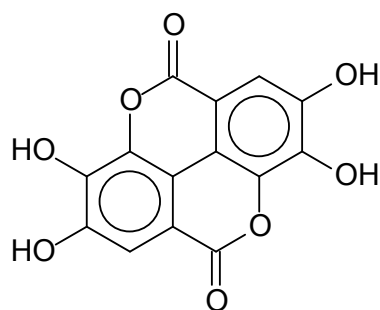
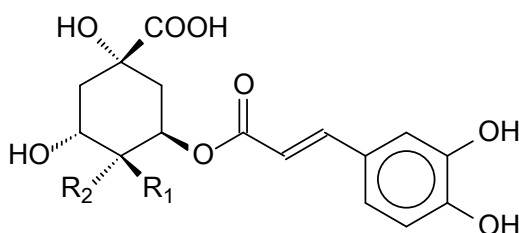


Figura 1.3 – Derivados do ácido cinâmico que apresentam atividade alelopática.

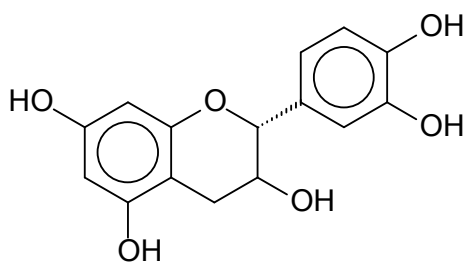
A alguns fenóis como o ácido elágico (XLII), clorogênico (XLIII) e isoclorogênico (XLIV) juntamente com o flavonóide (+)-catequina (XLV), isolados de *Myriophyllum spicatum* L., tem sido atribuída a atividade de inibição de crescimento da alga azul *Microcystis aeruginosa* (Macías *et al.*, 2007).



Ácido elágico (XLII)

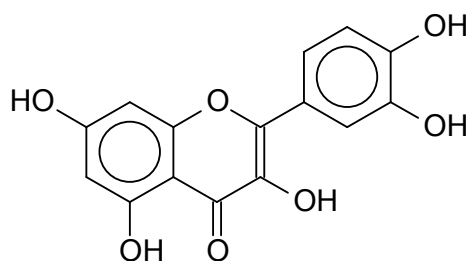
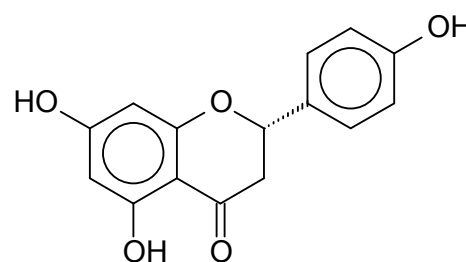
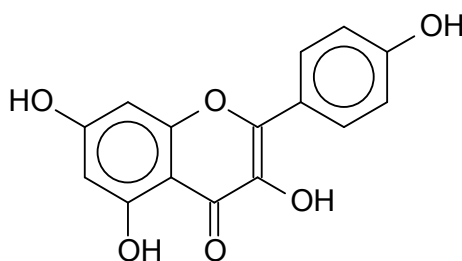


	R ₁	R ₂	
(XLIII)	H	OH	Ácido clorogênico
(XLIV)	OH	H	Ácido isoclorogênico



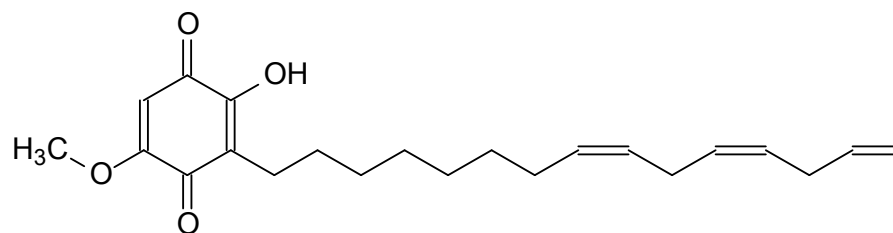
(+) -Catequina (XLV)

Os flavonóides são responsáveis pela coloração apresentada pelas flores, pela polinização e por resistência a doenças. Como aleloquímicos, os mais citados são a quercetina (**XLVI**), a narigenina (**XLVII**) e o kampferol (**XLVIII**), este último isolado de *Quercus mongólica* (Macías *et al.*, 2007).

Quercetina (**XLVI**)Narigenina (**XLVII**)Kampferol (**XLVIII**)

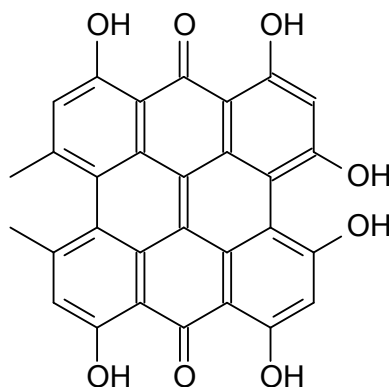
1.2.3.2 – Quinonas

Algumas quinonas apresentam atividade aleloquímica, sendo a juglona (**XXX**), citada anteriormente, uma das primeiras substâncias com atividade alelopática a ser relatada. A sorgoleona (**XLIX**) e compostos relacionados são os aleloquímicos responsáveis pela atividade alelopática do sorgo. Ela seria, em teoria, considerada um herbicida eficiente devido à sua efetiva inibição no transporte de elétrons no ciclo fotossintético, contudo sua curta meia-vida no solo, de 10 dias a 7 semanas dependendo das condições do ambiente, fazem dela um fraco herbicida (Macías *et al.*, 2007; Vyvyan, 2002).



Sorgoleona (XLIX)

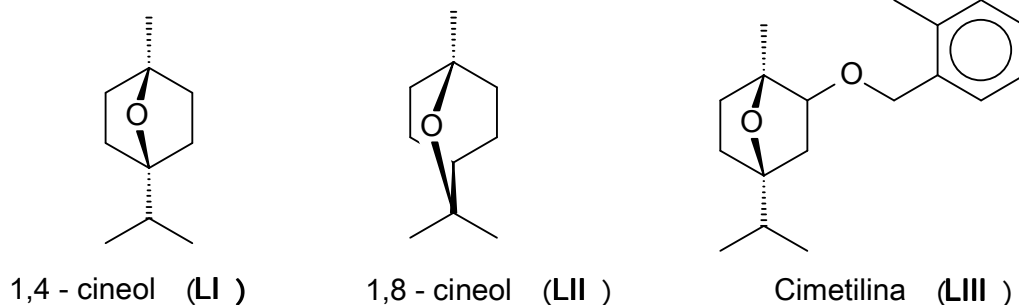
Algumas espécies de *Hypericum* sp. produzem hipericina (L) que é um pigmento fotodinâmico com várias aplicações farmacêuticas, incluindo atividade antiviral, anticarcinogênica, sendo também utilizada em tratamentos para prevenir a degeneração macular. Hipericina é ainda um efetivo inseticida fotoativo e fitotoxina, e estudos indicam que ela é utilizada como um composto de defesa pela planta (Bidlack *et al.*, 2000).



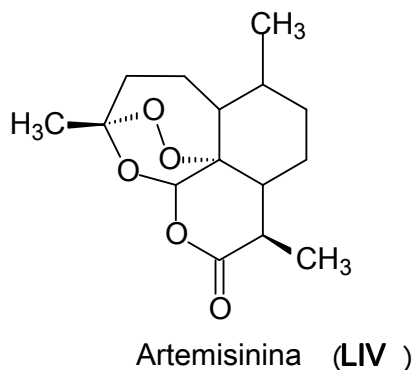
Hipericina (L)

1.2.3.3 – Terpenos

Os terpenos apresentam grande variedade estrutural assim como diversidade e atividade biológicas. Vários monoterpenos apresentam atividade alelopática como, por exemplo, o 1,4-cineol (LI) e o 1,8-cineol (LII), e a cimética (LIII), sendo esta última substância um proherbicida que, ao sofrer uma quebra metabólica fornece o 2-hidroxi-1,4-cineol, o verdadeiro herbicida (Macías *et al.*, 2007).

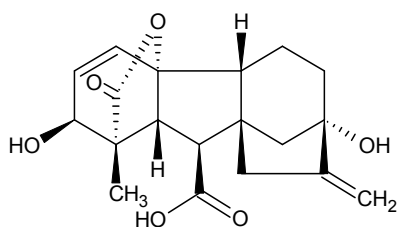


A artemisinina (**LIV**), uma lactona sesquiterpênica, é um outro exemplo de aleloquímico terpenóide altamente fitotóxico. Os pesquisadores confirmaram que devido à necessidade de se evitar a autotoxicidade os organismos vegetais possuem estruturas especializadas, glândulas, para seqüestrar a artemisinina (Bidlack *et al.*, 2000).



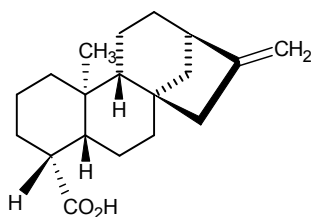
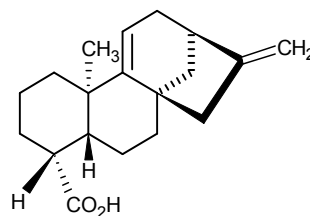
O brassinolídeo (**XXXIII**), página 14, um diterpeno tetracíclico, quando aplicado na concentração de 1ng/planta, provoca um aumento de 15% no crescimento de rabanetes, de 30% em alfaces, e de 25% em tomates (Mallik, 2005). Brassinolídeos sintéticos são disponíveis comercialmente.

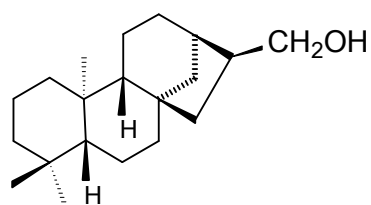
Outros diterpenos tetracíclicos, as giberelinas, são hormônios de crescimento de plantas, também com aplicação comercial. A giberelina GA₃, também chamada de ácido giberélico (**LV**) é a mais importante da classe. A correta estrutura do ácido giberélico, exceto por um erro de estereoquímica, foi proposta em 1959 (Mander, 1992).

Ácido giberélico (GA₃, **LV**)

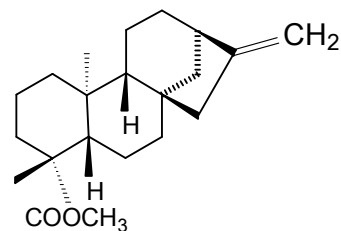
Cascas de laranja têm tendência a amolecer quando o fruto amadurece, sendo expostas, assim, a efeitos danosos desencadeados por ataque de fungos e fatores ambientais, os quais tornam o fruto indesejável comercialmente. Aplicações de giberelinas mantêm as cascas em melhores condições. Em maçãs, a aplicação de uma mistura de giberelinas também minimiza os estragos nas cascas provocados por vários fatores, o que diminui a qualidade do produto. O processo de produção de malte durante a fabricação de cervejas é uma fase cara e demorada, requerendo de 8 a 10 dias. Dois ou três dias podem ser diminuídos no processo se forem adicionados 25-500 µg de GA₃ para cada quilo de cevada.

A classe dos diterpenos tetracíclicos de esqueleto caurânico apresenta substâncias com reconhecida atividade alelopática, alguns já tendo sido estudados pelo nosso grupo de pesquisa. Os ácidos caurenóico (**LVI**) e grandiflorênico (**LVII**) apresentaram atividades sobre o crescimento de raízes e caule da alface, *L. sativa*, enquanto o *ent*-caur-16-en-19-ol (**LVIII**) inibiu este crescimento. O éster **LIX** apresentou alto estímulo sobre a germinação das sementes de *L. sativa* (Vieira *et al.*, 2005).

Ácido caurenóico (**LVI**)Ácido grandiflorênico (**LVII**)



Ent-caur-16-en-19-ol (LVIII)



(LIX)

1.2.3.4 – Ácidos hidroxâmicos

Os ácidos hidroxâmicos **LX-LXIII** (Figura 1.4) são um dos mais recentes exemplos de aleloquímicos isolados de plantas com potencial utilização na agricultura, no controle de ervas daninhas. São encontrados nas famílias das gramíneas (Gramineae) em grandes quantidades e agem como antifúngicos, antimicrobios, inseticida e fitotóxicos. São estocados nas plantas como glicosídeos inofensivos para evitar a autotoxicidade. Quando excretados pelas raízes ou por lesões causadas nos tecidos por insetos esses glicosídeos são degradados por microorganismos presentes no solo liberando a aglicona. Estes compostos são instáveis e passam por hidrólise seguida por contração de anel formando produtos ainda mais tóxicos (Macías *et al.*, 2007).

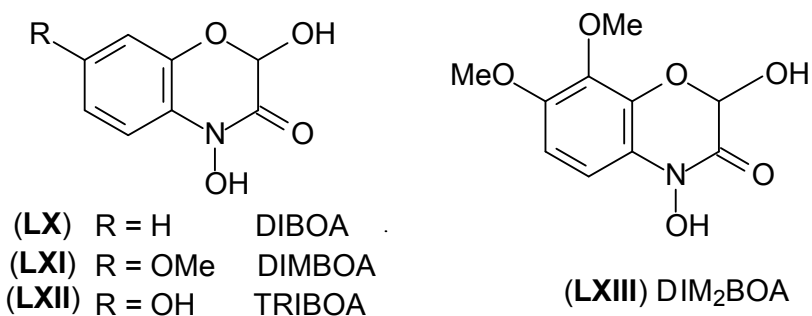
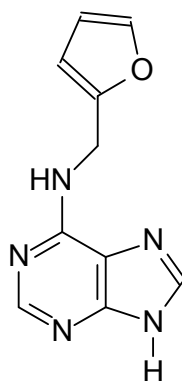


Figura 1.4 – Ácidos hidroxâmicos naturais apresentando atividade alelopática.

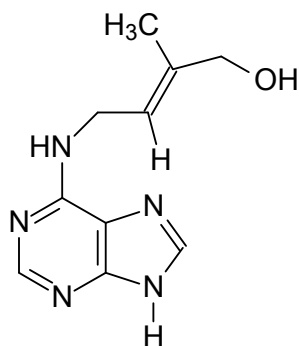
1.2.3.5 – Citocininas

Citocininas são uma classe de fitohormônios que desempenham um importante papel em todas as fases de desenvolvimento da planta, da germinação da semente à senescência. Elas agem a nível celular promovendo mitoses e o desenvolvimento do cloroplasto, assim como liberando brotos apicais e inibindo o crescimento da raiz. O exemplo mais conhecido desta classe é a cinetina (**LXIV**), que já foi identificada tanto em DNA celular animal quanto em extratos de tecidos de plantas (Bajguz e Piotrowska, 2009).

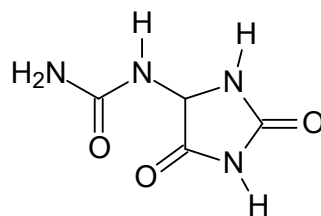


Cinetina (**LXIV**)

Outros exemplos de citocininas isoladas de plantas são a 6-(4-hidroxi-3-metilbut-*trans*-2-enil)aminopurina (zeatina, **LXV**) obtida a partir do endosperma do milho (*Zea mays*) e a alantoína (**LXVI**), principal aleloquímico encontrado em *Agrostemma githago*, flor silvestre da Europa (Mallik, 2005).



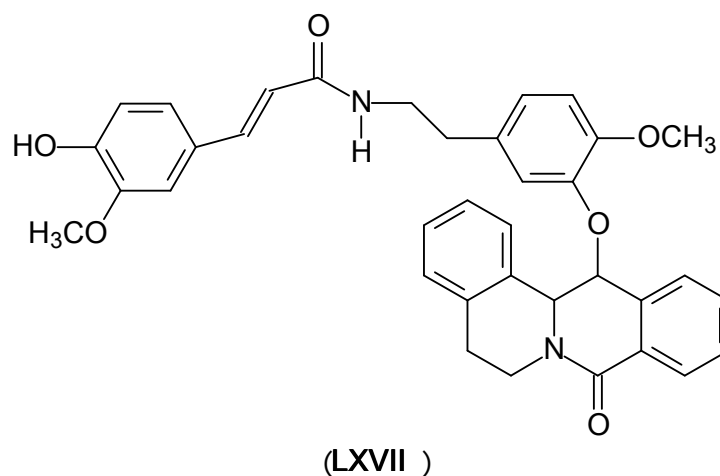
Zeatina (**LXV**)



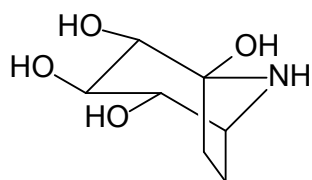
Alantoína (**LXVI**)

1.2.3.6 – Alcalóides

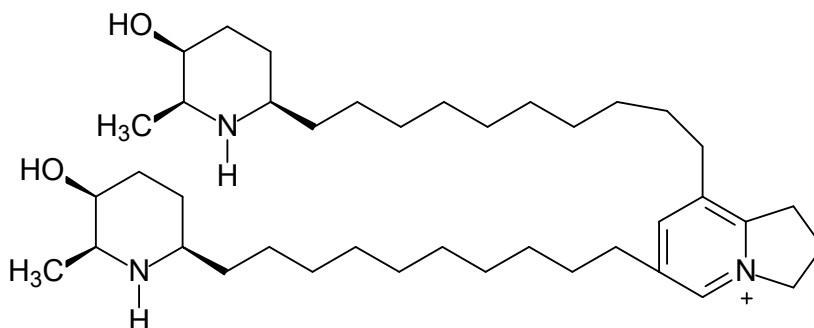
O extrato metanólico da erva daninha *Chenopodium album* demonstrou atividade inibitória sobre o crescimento e germinação das seguintes espécies de plantas: *Beta vulgaris*, *Brassica oleraceae*, *Triticum aestivum* e *Zea mays*. Do extrato da raiz desta erva daninha foi isolada uma amida do ácido cinâmico ligada a um alcalóide (**LXVII**) que apresentou atividades inibitórias sobre o crescimento da raiz da alface (*Lactuca sativa*) a 10^{-4} e 10^{-5} mol/L e sobre o crescimento da raiz e do caule, nas concentrações 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L (Cutillo *et al.*, 2004).



As calisteginas são uma nova classe de aleloquímicos caracterizadas pela ausência de N-metilação no anel nortropânico, alto grau de hidroxilação e uma funcionalização aminocetal pouco usual na posição da cabeça de ponte, como a calistegina B₂ (**LXVIII**), por exemplo. São encontradas principalmente nas famílias Convolvulaceae, Moraceae e Solanaceae e apresentaram uma potente atividade inibitória das glicosidases, sendo que essa atividade sugere que elas poderiam ser também utilizadas como aleloquímicos. Goldmann e colaboradores (1996) provaram tal atividade sobre a espécie teste *Medicago sativa* ao observarem a inibição da germinação e do crescimento da raiz pela calistegina B₂.

Castaligenina B₂ (LXVIII)

Alguns alcalóides isolados da espécie *Prosopis juliflora*, leguminosa muito comum nos Estados Unidos, Arábia Saudita e Índia, demonstraram acentuada atividade inibitória sobre o crescimento de algumas plantas. Nakano e colaboradores (2004) realizaram um estudo de estrutura-atividade de cinco alcalóides isolados dessa espécie avaliando suas atividades sobre a germinação e o crescimento de alguns modelos de monocotiledôneas e dicotiledôneas. O alcalóide juliprosina (LXIX) apresentou os melhores resultados com IC₅₀ de 27 µmol/L e 17 µmol/L, para a alface e o arroz, respectivamente.

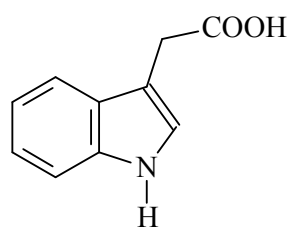
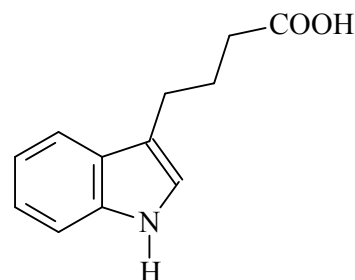
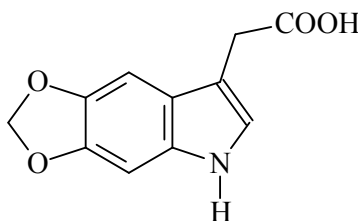


Juliprosina (LXIX)

1.2.3.7 – Auxinas

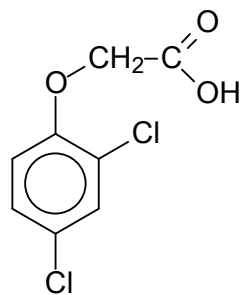
As auxinas constituem uma classe de hormônios de crescimento de plantas, tendo como principal representante de ocorrência natural, o ácido indol-3-acético (AIA) (LXX), isolado e identificado em 1934 (Sarr *et al.*, 2003), pertencendo à classe dos alcalóides indólicos sendo, portanto, o triptofano seu precursor metabólico (Shu-Ming Li, 2010). Elas são os reguladores vegetais com maior efetividade no alongamento e divisão celulares, atuando na promoção do enraizamento, cujo principal efeito está relacionado à ação sobre a iniciação dos primórdios radicais (Lima *et al.*, 2008), além de proporcionar uma maior uniformidade e qualidade das raízes (Ono *et al.*, 1992). Esses fito-hormônios também apresentam envolvimento

em outras etapas no processo de crescimento das plantas, além da indução do crescimento de raízes, tais como desenvolvimento da flor, do fruto e maturação deste último. O ácido indol-3-butírico (AIB) (**LXXI**), com ação análoga àquela do AIA, é muito utilizado comercialmente como uma auxina sintética para a indução de formação de raízes e apenas na última década foi identificado como um constituinte natural de plantas (Müller *et al.*, 1995). Recentemente foi preparado um novo regulador de crescimento vegetal, o ácido-5,6-metilenodioxindol-3-acético (**LXXII**) que demonstrou atividade auxínica (Marchi *et al.*, 2007).

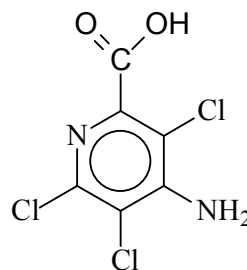
Ácido indol-3-acético (**LXX**)Ácido indol-3-butírico (**LXXI**)Ácido 5,6-metilenodioxindol-3-acético (**LXXII**)

O mecanismo de ação do ácido indol-3-acético ainda não foi totalmente definido, existindo duas propostas que tentam explicar como ele atua no crescimento vegetal. A primeira sugere que o hormônio diminui a resistência da parede celular à pressão de turgor permitindo assim que as células aumentem de tamanho. A outra teoria propõe que o aumento do tamanho das células é o resultado do aumento da intensidade da pressão osmótica. Embora elas sejam consideradas teorias opostas deve-se observar que ambas corroboram que a força diretora que age no alargamento das células é osmótica por natureza, a pressão de turgor é consequência de forças osmóticas (Chu e Ho, 1975).

Dentre as auxinas sintéticas pode-se citar o ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) (LXXIII) e o picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridinocarboxílico) (LXXIV) que apresentam atividade herbicida e são utilizados comercialmente.



2,4 - D (LXXIII)



Picloram (LXXIV)

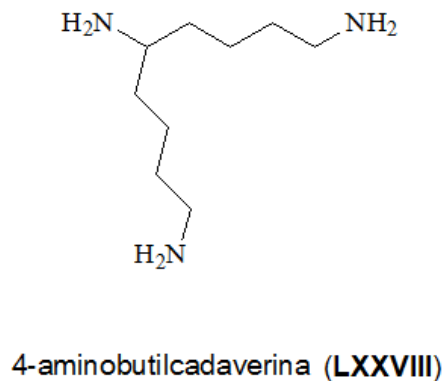
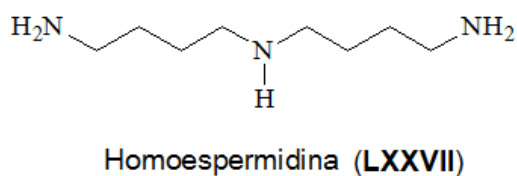
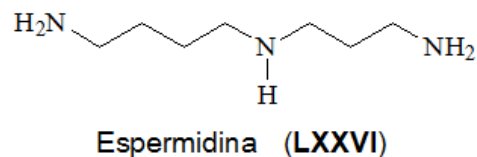
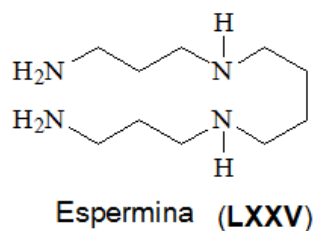
O 2,4-D, assim como outros herbicidas fenólicos, é um herbicida seletivo, induzindo a morte de dicotiledôneas, porém não de gramíneas (USUI, 2001). Este herbicida age de maneira semelhante àquela do ácido indol-3-acético e, quando administrado em doses efetivas promove o crescimento descontrolado e desorganizado da planta e levá-la à morte de três a cinco semanas a partir da aplicação. Apesar de seu mecanismo de ação não estar totalmente elucidado acredita-se que ele acidifica a parede celular promovendo um alongamento descontrolado. Em baixas concentrações, também estimula a síntese de RNA, de DNA e de proteínas que promovem uma divisão celular descontrolada e destruição do tecido vascular. O picloram atua de modo análogo ao 2,4-D, sendo a principal diferença entre os dois sua meia vida: enquanto este último não é considerado persistente e seu tempo de meia-vida em condições naturais ideais é em torno de 10 dias, o picloram pode permanecer no solo de um mês a vários anos (Tu *et al.*, 2001).

Quando as plantas são expostas a altas concentrações de auxina, seja a AIA ou o 2,4-D, a ação destas é fitotóxica. A estratégia utilizada para a desintoxicação é a conjugação com outras moléculas, glicose, por exemplo, sendo que o mesmo mecanismo é utilizado para a estocagem do fito-hormônio na planta. A formação e a hidrólise das auxinas conjugadas são bem reguladas em organismos vegetais e varia de acordo com o tipo de tecido. Contudo, diferentes espécies de plantas apresentam distintos perfis de conjugação. Em geral, monocotiledôneas acumulam

auxina na forma de ésteres conjugados, enquanto que a maioria das dicotiledôneas forma amidas conjugadas. Estas formas modificadas da auxina além de serem hidrolisadas podem posteriormente ser oxidadas inativando permanentemente o fitohormônio (Bajguz e Piotrowska, 2009).

1.2.3.8 – Poliaminas

A diamina putrecina (1,4-diaminobutano) e as poliaminas espermina (**LXXV**) e espermidina (**LXXVI**) são essenciais para o desenvolvimento de todos os organismos, agindo como estimuladores da divisão celular. São encontradas em todas as células vivas na forma protonada, interagindo com macromoléculas aniônicas como o DNA, o RNA, fosfolipídios e algumas proteínas. Elas estão envolvidas em uma grande variedade de processos biológicos, nas plantas, por exemplo, regulam o crescimento, o desenvolvimento e a resposta ao stress. Outras poliaminas menos comuns como 1,3-diaminopropano e a homoespermidina (**LXXVII**) têm sido detectadas em alguns sistemas biológicos como plantas, algas, bactérias e animais (Pandey *et al.*, 2000). Algumas células vegetais podem ainda sintetizar longas cadeias de poliaminas, primeiramente observadas em bactérias, como as células do caule do arroz sob influência de calor intenso. Outra amina incomum encontrada nos nódulos da raiz do feijão é a 4-aminobutildaverina (**LXXVIII**) (Couée *et al.*, 2004).



Baixos níveis de putrecina, espermina e espermidina são observados em células em processo de expansão (Walden *et al.*, 1997), enquanto altas concentrações relativas são observadas em células e tecidos com elevada taxa de divisão, como tumores, por exemplo. Assim, drogas que interferem na biossíntese dessas poliaminas ou na sua função biológica têm potencial como agentes terapêuticos (Kalac e Krausová, 2005). Elas também são encontradas conjugadas ao ácido húmico, que é originado da degradação química e biológica de plantas, animais e de atividade metabólica de microorganismos e que tem efeito estimulatório semelhante às auxinas, giberelinas e citocininas (Young e Chen, 1997).

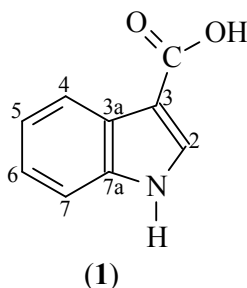
Capítulo 2

Síntese de monoamidas indólicas

Resultado e Discussão

2.1 – Introdução

O ácido indol-3-carboxílico (**1**) já foi detectado em extratos de plantas, tais como de raízes do arroz (Rimando *et al.*, 2001) e paredes celulares de folhas e raízes da *Arabidopsis thaliana* (Tan *et al.*, 2004).



Foi observado que sua concentração nas folhas é aumentada pela infecção destas com *Pseudomonas syringae* (Hagemeyer *et al.*, 2001) e, nas raízes, pela contaminação do fungo *Pythium silvaticum* (Tan *et al.*, 2004). Este ácido também já foi isolado a partir de cultura fermentada de um fungo endofítico, EM-22, derivado da alga vermelha marinha *Polysiphonia urceolata* (Zhao *et al.*, 2009). Dentre as atividades biológicas descritas para o ácido **1**, as mais importantes são a anti-inflamatória e anti-pirética, sendo utilizado no tratamento da artrite e desordens dermatológicas (Shen, 1967). Além disso, este alcalóide é matéria prima para a preparação de inúmeros derivados apresentando atividade biológica, tais como ésteres ativos contra vírus da hepatite e influenza A (Vasil'evich *et al.*, 2009), alcalóides marinhos inibidores da topoisomerase II (Pouilhes *et al.*, 2003) e derivados piridínio-ilamidas, que apresentaram alta afinidade e seletividade para o receptor 5-HT_{2C} (receptores serotoninícos) e D₂-D₄ (receptores dopamínicos) (Park *et al.*, 2008).

O ácido 3-indol-3-carboxílico (**1**) também apresentou atividade aleloquímica similar àquela apresentada pelo ácido indol-3-acético (**LVIII**) sobre o crescimento de coleótilos obtidos a partir de 5 cultivares de trigo (Popov, 1979).

2.2 – Proposta de trabalho

O trabalho de Dissertação de Pereira (2007) constituiu na síntese de monoamidas a partir de diterpenos caurânicos (ácido caurenóico e grandiflorênico) e a morfolina e diaminas simétricas, que foram testadas quanto à sua atividade alelopática sobre o crescimento e germinação de *L. sativa*, tendo sido obtidos muito bons resultados.

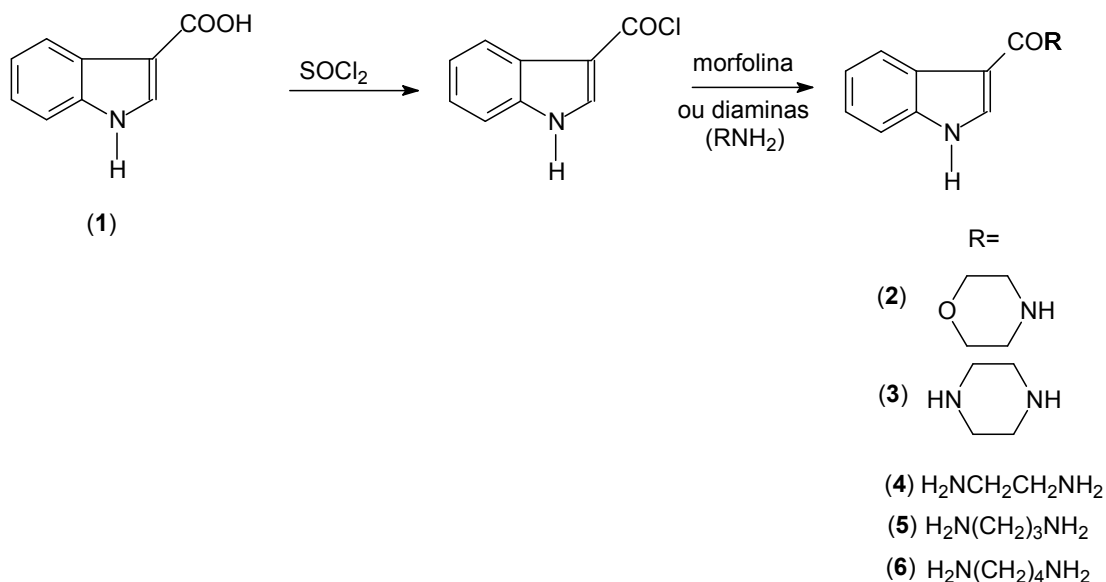
Assim, este trabalho visou à obtenção de novas amidas a partir da reação do ácido indol-3-carboxílico (**1**), com as mesmas aminas citadas acima, para serem avaliadas quanto à sua atividade alelopática sobre a germinação e o crescimento de raiz e caule de *L. sativa* (alface) e *A. cepa* (cebola).

Estes derivados também foram submetidos a teste de atividade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e sobre uma espécie de levedura.

Além destes testes, a lipofilia dos produtos foi estimada pelo cálculo do coeficiente de partição *n*-octanol-água (P) utilizando-se o programa ACDLABS (Macías et al., 2005a).

2.3 – Resultados e discussão

2.3.1 – Preparação das amidas 2-6 a partir da morfolina e das diaminas, e do ácido indol-3-carboxílico (**1**)



Esquema 2.1 - Obtenção das amidas 2-6.

A síntese das amidas **2-6** foi realizada em duas etapas: a primeira foi a preparação do cloreto de ácido seguindo a metodologia descrita por Sears *et al.* (2005). A segunda etapa foi a reação entre a morfolina e as diaminas com o cloreto do ácido indol-3-carboxílico, pela metodologia descrita por Pereira (2007), modificada (**Esquema 2.1**, página 29). Este autor isolou diamidas simétricas a partir de reações independentes envolvendo 2 mol de cada ácido (caurenóico e grandiflorênico) e 1 mol da diamina e, para minimizar a formação deste subproduto, um grande excesso da diamina, um controle rigoroso da temperatura e um tempo mínimo de reação foram utilizados, sendo 0° C a temperatura ideal para que a diamida não fosse obtida. No caso do nosso trabalho, para minimizar a formação das diamidas, utilizou-se o mesmo excesso da diamina, um tempo de reação de apenas 10 minutos e temperatura em torno de -30° C. Nestas condições as diamidas não foram detectadas e parte do material de partida foi recuperado. A piperazina, sendo sólida, teve de ser solubilizada em solvente anidro (THF) antes de ser adicionada ao cloreto de ácido. Devido ao fato de ser pouco solúvel neste solvente, foi necessária a utilização de menor excesso de piperazina em relação às outras diaminas e de um ligeiro aumento da temperatura. Entretanto, nestas condições, a monoamida pode ser obtida com rendimento razoável (46%). A reação de **1** com a morfolina, uma monoamina, pode ser realizada à temperatura ambiente, tendo sido obtida com o maior rendimento (73%).

As monoamidas foram purificadas por cromatografia em coluna de sílica gel e cromatografia por exclusão, utilizando-se Sephadex LH-20.

Não foi encontrada na literatura nenhuma referência sobre os produtos obtidos, podendo, assim, serem eles considerados substâncias inéditas, com exceção da monoamida **2** (derivada da morfolina) que já tinha sido obtida como um produto indesejável na síntese de brassininas, substâncias antimicrobianas (Kutschy *et al.*, 1999).

2.3.2 – Identificação da N-morfolina-1*H*-indol-3-carboxamida (2), da N-piperazino-1*H*-indol-3-carboxamida (3), da N-(etil-2-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (4), da N-(propil-3-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (5) e da N-(butil-4-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (6)

Os espectros no IV das amidas **4-6** (Figura 2.17, página 49; Figura 2.24, página 52; Figura 2.31, página 56) apresentaram alguma semelhança entre eles, sendo as atribuições mais significativas a banda de deformação axial da ligação N-H da amina na região de 3180–3366 cm⁻¹, a banda de deformação axial da ligação C-H alifática na região de 2858–2926 cm⁻¹ e a banda da carbonila (amida I) na região de 1587-1622 cm⁻¹ e de amida II em 1574-1614 cm⁻¹. Os espectros de **2** e **3** (Figura 2.3, página 42; Figura 2.10, página 45) também apresentaram certa semelhança entre eles, a região mais significativa observada foi entre 3033–3142 cm⁻¹ em que aparecem bandas referentes ao estiramento N-H e as bandas 2853-2922 cm⁻¹ referentes ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H alifática, respectivamente. As bandas da carbonila (amida I) e de amida II foram observadas em 1588 cm⁻¹ e em 1567 cm⁻¹, respectivamente.

O espectro de RMN de ¹H e de ¹³C do ácido indol-3-carboxílico (**1**) (Figuras 2.1 e 2.2, página 41) apresentou sinais compatíveis com a estrutura, sendo estes sinais análogos àqueles obtidos da literatura (Hagelmeier et al., 2001). Os sinais dos hidrogênios aromáticos do anel benzênico apareceram entre δ_H 8,05 e 7,18 e aquele relativo ao H-2 apareceu em δ_H 7,98 como um multipletto sobreposto aos sinais de H-4 (**Tabela 2.1**, página 34). O sinal do hidrogênio ligado ao nitrogênio não pode ser visto devido à troca rápida com o solvente utilizado, o metanol deuterado. Os sinais dos carbonos aromáticos do anel benzênico foram observados entre δ_C 107,0 e 138,2; o sinal de C-3, ligado à carbonila foi detectado em δ_H 109,0, aquele da própria carbonila em δ_C 167,6 e aquele de C-2 em δ_C 131,7 (**Tabela 2.2**, página 35).

A atribuição dos sinais dos hidrogênios e carbonos das amidas foi realizada com o auxílio dos dados obtidos nos espectros de RMN de ¹H, de ¹³C, subespectros DEPT 135, e mapas de contornos COSY e HMQC. Os sinais relativos ao esqueleto indólico foram determinados por comparação com aqueles observados para o material de partida **1**. Todos os sinais observados nos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C relativos às amidas **2-6** estão apresentados nas **Tabelas 2.1** e **2.2**.

Normalmente, observa-se que o sinal atribuído aos hidrogênios em carbonos vizinhos ao nitrogênio de amidas é mais desblindado em relação àqueles de aminas (Silverstein e Webster, 2006). Isto fica bem evidenciado no caso das amidas **2** e **3**, obtidas pela reação do ácido indol-3-carboxílico (**1**) com a morfolina e pela monoacilação da piperazina, respectivamente: no espectro de RMN de ^1H da amida **2** (Figura 2.4, página 42) o sinal dos hidrogênios metilênicos vizinhos à amida e ao oxigênio são observados sobrepostos em δ_{H} 3,70; já no espectro da monoamida **3** (Figura 2.11, página 46) além deste sinal (δ_{H} 4,0; sl, 4H) pode ser observado também o sinal dos hidrogênios metilênicos vizinhos ao nitrogênio da amina (δ_{H} 3,3; sl, 4H). Isto também é observado no espectro de RMN de ^1H de **4** (Figura 2.18, página 49), o sinal correspondente aos hidrogênios metilênicos vizinhos ao nitrogênio da amida aparece em δ_{H} 3,60 (t, $J = 5,8$ Hz); já o deslocamento químico dos hidrogênios metilênicos vizinhos ao grupo amina aparece em δ_{H} 3,10 (t, $J = 5,8$ Hz).

Os sinais dos hidrogênios metilênicos da amida **2** (Figura 2.4, página 42) foram observados, no espectro de RMN de ^1H , entre δ_{H} 3,68-3,76, devido à desblindagem provocada pela vizinhança com os átomos de nitrogênio e de oxigênio. Esta atribuição foi confirmada pela análise do mapa de contornos heteronuclear, HMQC (Figura 2.7, página 44) em que o sinal largo a δ_{H} 3,68-3,76 está correlacionado ao sinal a δ_{H} 67,09, no espectro de RMN de ^{13}C ; este sinal foi atribuído ao C-2', vizinho ao oxigênio da morfolina, confirmando sua atribuição aos hidrogênios H-2'. Nesta mesma região, no mapa de contornos heteronuclear, HMQC, observa-se a correlação entre H-1' e o C-1' (δ_{H} 3,68-3,76 e δ_{C} 46,04). Observa-se ainda, que o sinal referente ao carbono ligado ao nitrogênio da amida, C-1', em δ_{C} 46,04, apresenta-se alargado, isso se deve à interferência do momento de quadrupolo do nitrogênio (Silverstein e Webster, 2006).

Os sinais dos hidrogênios metilênicos em carbonos não diretamente ligados aos átomos de nitrogênio foram localizados com o auxílio de mapas de contornos heteronuclear, HMQC, e homonuclear, COSY. O sinal relativo aos hidrogênios H-2' (δ_{H} 1,84) da monoamida **5** (Figura 2.25, página 53) apresenta multiplicidade de quinteto e está correlacionado aos sinais dos hidrogênios H-1' (δ_{H} 3,38) e H-3' (δ_{H} 2,89), no mapa de contornos COSY (Figura 2.28, página 54). No mapa de contornos HMQC (Figura 2.29, página 55) o sinal relativo a H-2', δ_{H} 1,84, correlaciona-se ao

sinal relativo a C-2', δ_C 27,89, este carbono é o que possui menor deslocamento químico dos provenientes da diamina 1,3-diaminopropano pois não está ligado diretamente a nenhum átomo de nitrogênio.

O sinal relativo aos hidrogênios H-2' e H-3' da monoamida **6** (Figura 2.32, página 56) aparece sobreposto na região δ_H 1,32-1,58. Este sinal foi localizado considerando-se o valor da integral, relativo a quatro hidrogênios. Esta atribuição também foi confirmada pelos mapas de contornos COSY e HMQC. No COSY (Figura 2.35, página 58) observa-se a correlação com os sinais de H-1' (δ_H 3,15) e H-4' (δ_H 2,68) e no HMQC (Figura 2.36, página 58) com os sinais de C-2' (δ_C 26,60) e C-3' (δ_C 24,76).

A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C das amidas **2-6** e por comparação com o ácido **1** foi possível identificar sinais referentes aos 8 carbonos do esqueleto indólico e aquele da carbonila. A multiplicidade destes sinais foi atribuída pela análise do subespectro DEPT-135 que confirmou a presença de 4 carbonos quaternários e 5 carbonos metínicos. Os sinais relativos aos carbonos quaternários 3a (δ_C 125,9-126,8) e 7a (δ_C 136,6-136,8) foram aqueles que apresentaram maior deslocamento químico, devido à proximidade com o átomo de nitrogênio.

Dentre os carbonos metínicos, aquele que apresentou o sinal de maior deslocamento químico, foi o C-2, uma vez que está ligado diretamente ao átomo de nitrogênio do núcleo indólico. Esta atribuição foi confirmada, além da comparação com os dados da literatura (Hagelmeier *et al.*, 2001), pela correlação no mapa de contornos HMQC entre C-2 e H-2, sendo o sinal relativo a este hidrogênio o único simpleto observado nos mapas de contornos (exceto nos das amidas **2** e **3** onde o sinal relativo a H-2 apresenta-se sobreposto ao sinal correspondente ao hidrogênio H-4). O carbono 7, por comparação com dados da literatura (Hagelmeier *et al.*, 2001) é aquele que apresenta o menor deslocamento químico entre os carbonos metínicos (o átomo de nitrogênio do anel indol doa densidade eletrônica para ele por ressonância, blindando-o). Os carbonos C-4, C-5 e C-6 apresentaram deslocamentos químicos muito próximos, não sendo possível sua localização inequívoca. Poder-se-ia tentar correlacionar o sinal relativo aos hidrogênios ligados a estes carbonos, utilizando-se o mapa de contornos HMQC; no entanto estas correlações não forneceriam informação adicional, uma vez que dois destes sinais

encontram-se sobrepostos (H-5 e H-6) Dessa forma, os deslocamentos dos carbonos C-4, C-5 e C-6 foram atribuídos unicamente por comparação com os dados obtidos na literatura.

Tabela 2.1 – Valores de deslocamentos químicos (δ) nos espectros de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD , δ), do ácido indol-3-carboxílico (1) e das monoamidas 2, 3, 4, 5 e 6.

H	Ácido indol-3-carboxílico*	1	2	3	4	5	6
H-4	8,1 (dd, $J = 7,7$; 1,3)	8,05 (m, 1H)	7,60 – 7,70 (m*, 1H)	7,62 – 7,72 (sl*, 1H)	8,04 (m, 1H)	7,99 (m, 1H)	7,85 (m, 1H)
H-2	7,9 (s)	8,03 (s, 1H)	7,60 – 7,70 (m*, 1H)	7,62 – 7,72 (sl*, 1H)	7,91 (s, 1H)	7,82 (s, 1H)	7,73 (sl, 1H)
H-7	7,4 (dd, $J = 7,7$; 1,3)	7,38 (m, 1H)	7,43 (m, 1H)	7,42 (m, 1H)	7,38 (m, 1H)	7,30 (m, 1H)	7,19 (m, 1H)
H-6	7,2 (ddd, $J = 7,7$; 7,7; 1,3)	7,07-7,15 (m*, 1H)	7,11 – 7,23 (m*, 1H)	7,08 – 7,22 (m*, 1H)	7,07 – 7,15 (m*, 1H)	7,01 – 7,09 (m*, 1H)	6,89 – 6,92 (m*, 1H)
H-5	7,2 (ddd, $J = 7,7$; 7,7; 1,3)	7,07-7,15 (m*, 1H)	7,11 – 7,23 (m*, 1H)	7,08 – 7,22 (m*, 1H)	7,07 – 7,15 (m*, 1H)	7,01 – 7,09 (m*, 1H)	6,89 – 6,92 (m*, 1H)
H-1'	#	#	3,68 – 3,76 (sl*, 4H)	4,02 (sl, 4H)	3,60 (t, $J = 5,8$, 2H)	3,38 (t, $J = 6,0$, 2H)	3,15 (sl, 2H)
H-2'	#	#	3,68 – 3,76 (sl*, 4H)	3,29 (sl, 4H)	3,10 (t, $J = 5,8$, 2H)	1,84 (q, $J = 6,0$, 2H)	1,32 – 1,58 (sl*, 2H)
H-3'	#	#	#	#	#	2,89 (t, $J = 6,0$, 2H)	1,32 – 1,58 (sl*, 2H)
H-4'	#	#	#	#	#	#	2,68 (sl, 2H)

*(Hagemeier *et al.*, 2001); ** sinal sobreposto; δ (multiplicidade, constante de acoplamento, J , em Hz, integral); # sinal inexistente.

Tabela 2.2 – Comparação dos principais sinais nos espectros de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD , δ), das monoamidas **2**, **3**, **4**, **5** e **6**, derivadas do ácido 3-indolcarboxílico (**1**).

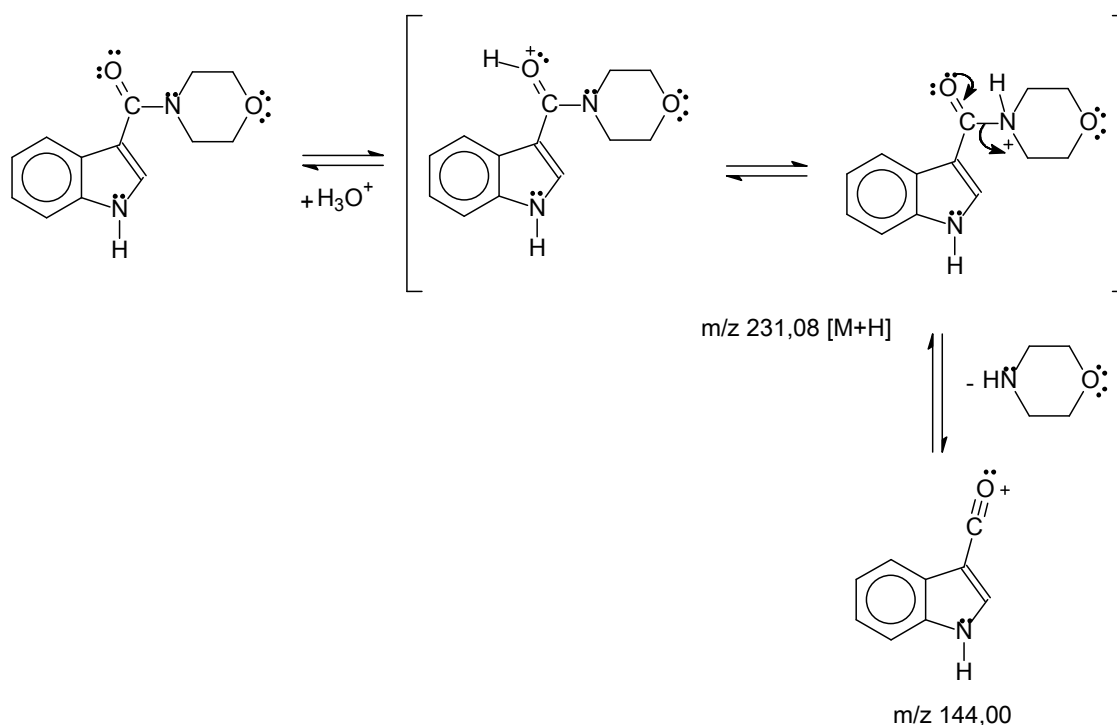
C	Ácido indol-3-carboxílico*	R		R			
		(1) —OH	(2) —N	(3) —N	(4)	(5)	(6)
2	133,4	131,7	128,2	128,8	128,3	128,3	128,0
3	108,7	107,0	109,7	108,9	110,8	110,0	110,5
3a	127,6	125,8	125,9	125,9	126,8	125,9	125,9
4	122,0	120,7	120,9	121,1	120,7	121,0	120,8
5	122,4	121,9	122,6	122,8	122,6	122,4	122,3
6	123,6	120,3	119,9	119,9	121,2	120,5	120,5
7	112,9	111,2	112,0	112,1	111,9	111,8	111,8
7a	138,2	136,5	136,6	136,6	136,6	136,8	136,8
8	**	167,6	168,4	168,4	168,5	167,8	167,8
1'	#	#	46,0	42,3	37,4	35,6	38,3
2'	#	#	67,1	43,6	40,5	27,9	24,8
3'	#	#	#	#	#	37,2	26,6
4'	#	#	#	#	#	#	39,3

* (Hagemeier *et al.*, 2001); ** sinal não detectado; # sinal inexistente .

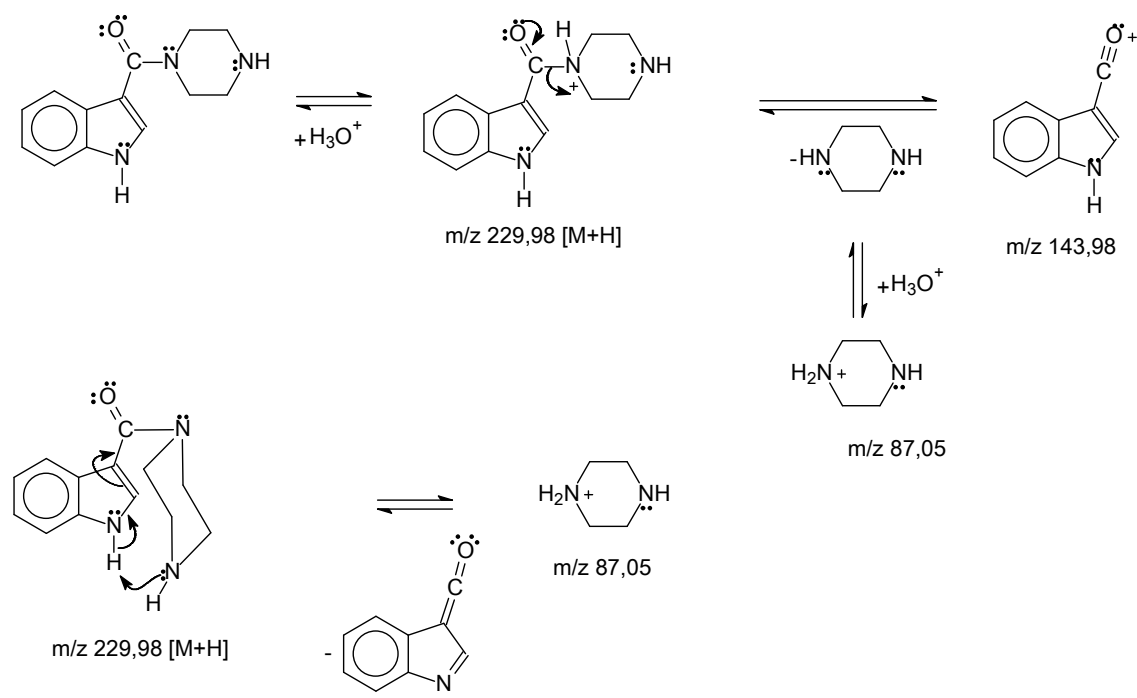
O método empregado para se obter os espectros de Massas foi aquele que utiliza a ionização por *electrospray* (spray eletrostático, ESI/MS), e o pico $[\text{M}+\text{H}]^+$ foi observado para todas as amidas. Uma vez que o aparelho utilizado foi um espectrômetro de Massas seqüencial, todos os fragmentos obtidos foram selecionados e fragmentados no segundo espectrômetro e pelo aumento da intensidade dos sinais tiveram sua origem confirmada inequivocamente.

O pico $[M-NH_3+H]^+$, relativo à perda de 17u, devido à protonação do nitrogênio do grupo amina e saída de uma molécula de amônia foi sinal comum aos espectros das monoamidas **4**, **5** e **6**. Para as amidas **2** e **3** esta fragmentação não foi observada.

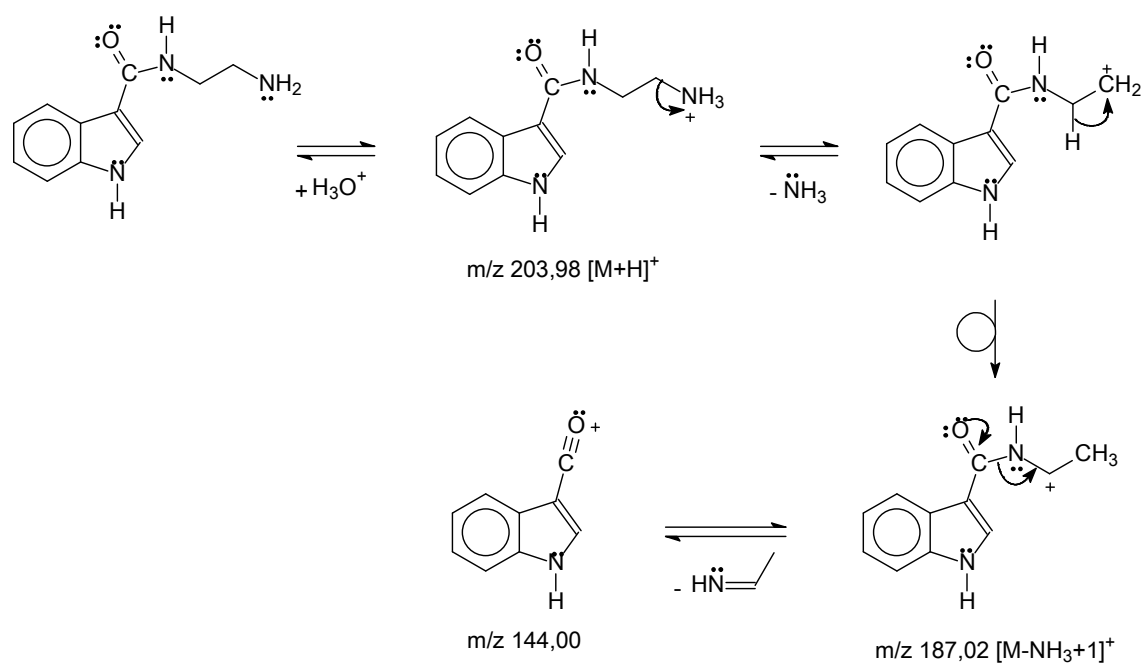
O pico a $m/z = 144,00$ apareceu em todos os espectros e foi atribuído ao cátion arênio na posição 3 do núcleo indólico. Este sinal corresponde à perda de iminas para as amidas **4**, **5** e **6** e à perda de uma molécula de morfolina e piperazina e para as aminas **2** e **3**, respectivamente. Para a amida **3** ainda foi observado um pico a $m/z = 87$, atribuído à molécula de piperazina protonada. As fragmentações que podem originar estes picos estão representadas nos **Esquemas 2.2 a 2.6**.



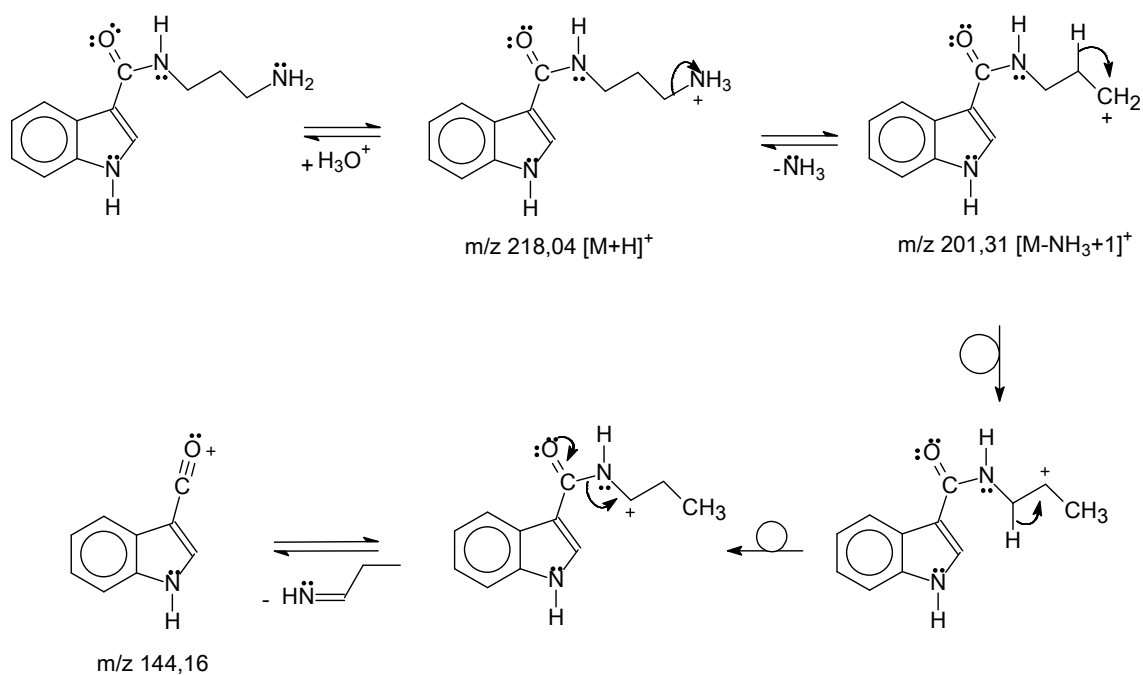
Esquema 2.2 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos picos observados no espectro de Massas da monoamida **2** (Figura 2.9, página 45).



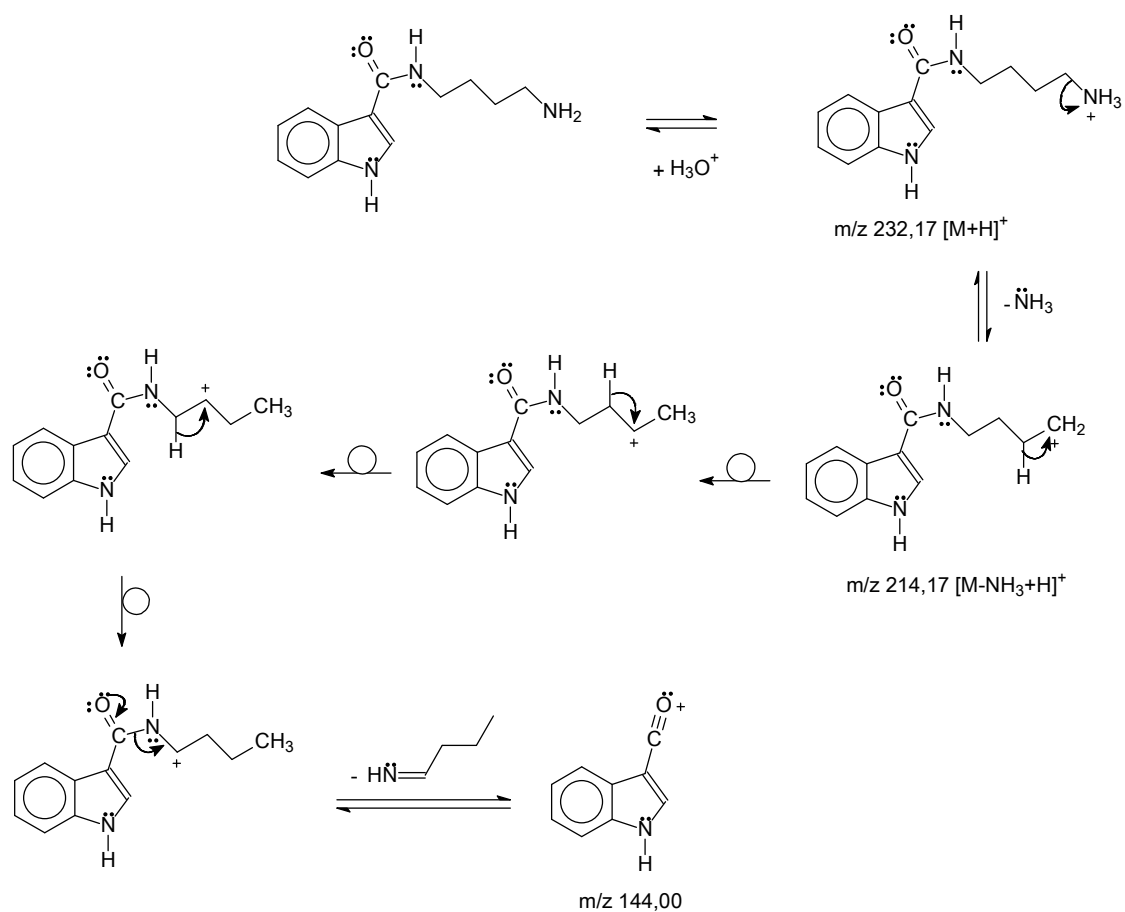
Esquema 2.3 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos picos observados no espectro de Massas da monoamida **3** (Figura 2.16, página 48).



Esquema 2.4 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos picos observados no espectro de Massas da monoamida 4 (Figura 2.23, página 52).



Esquema 2.5 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos picos observados no espectro de Massas da monoamida **5** (Figura 2.30, página 55).



Esquema 2.6 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos picos observados no espectro de Massas da monoamida **6** (Figura 2.37, página 59).

2.4 – Espectros

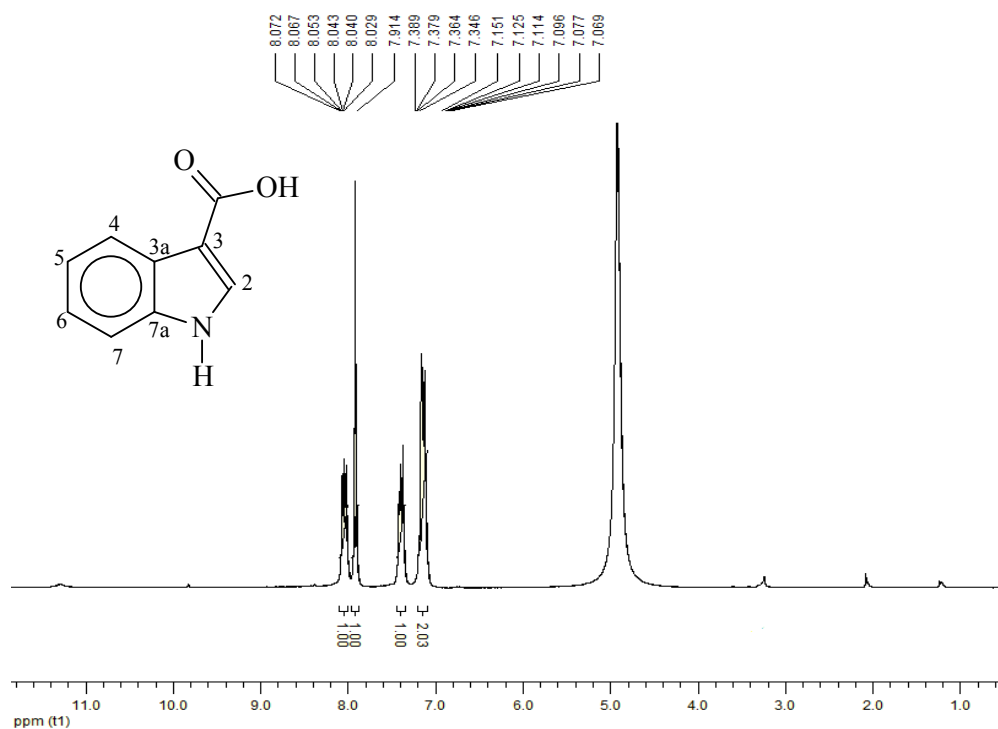


Figura 2.1 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) de 1.

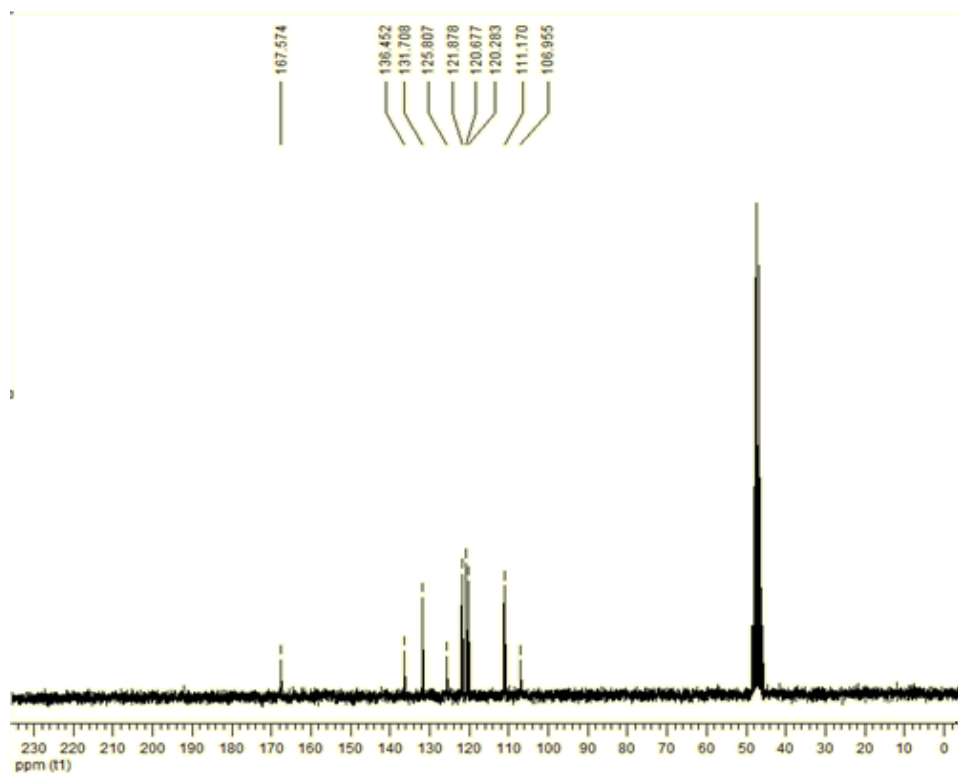


Figura 2.2 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) de 1.

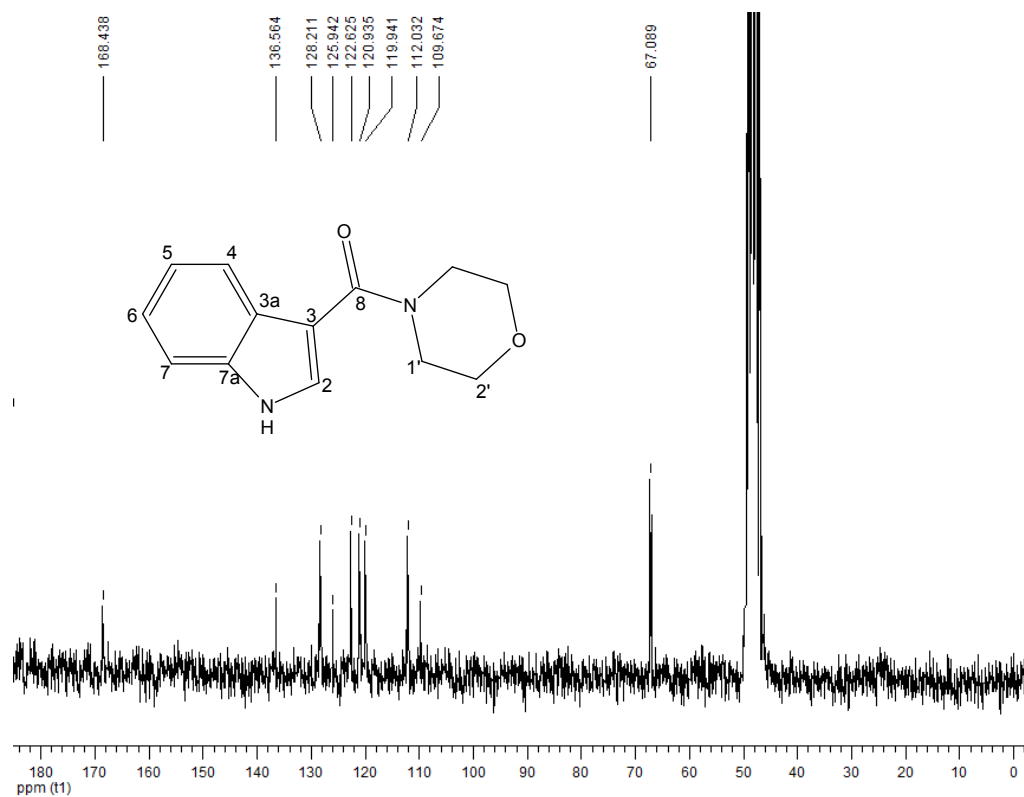


Figura 2.5 - Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CD₃OD) de 2.

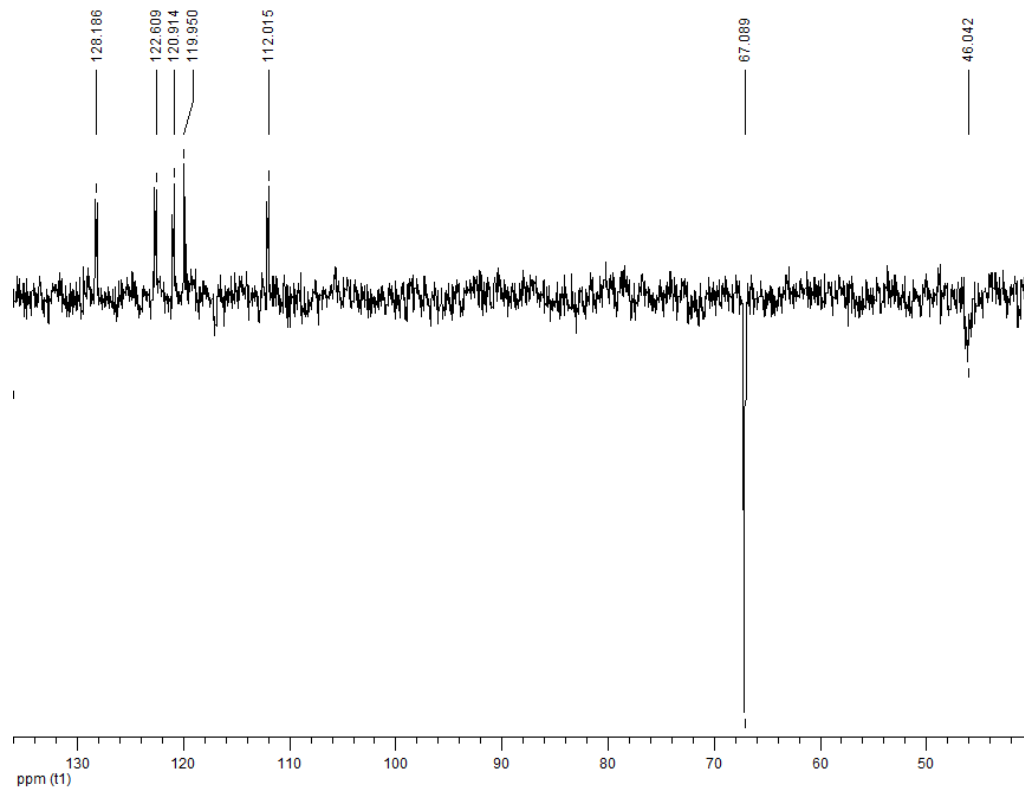


Figura 2.6 - Subespectro de RMN de ¹³C DEPT 135 (50 MHz, CD₃OD) de 2.

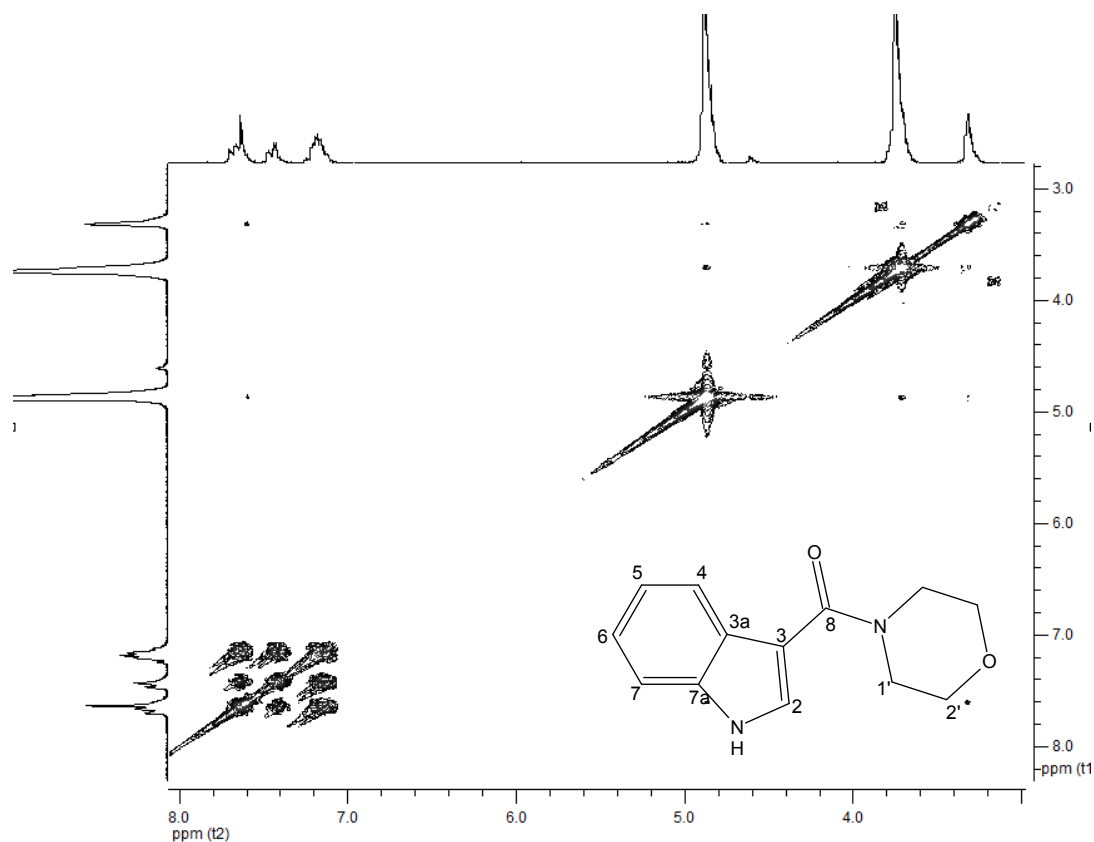


Figura 2.7 - Mapa de contornos COSY (200MHz, CD₃OD) de 2.

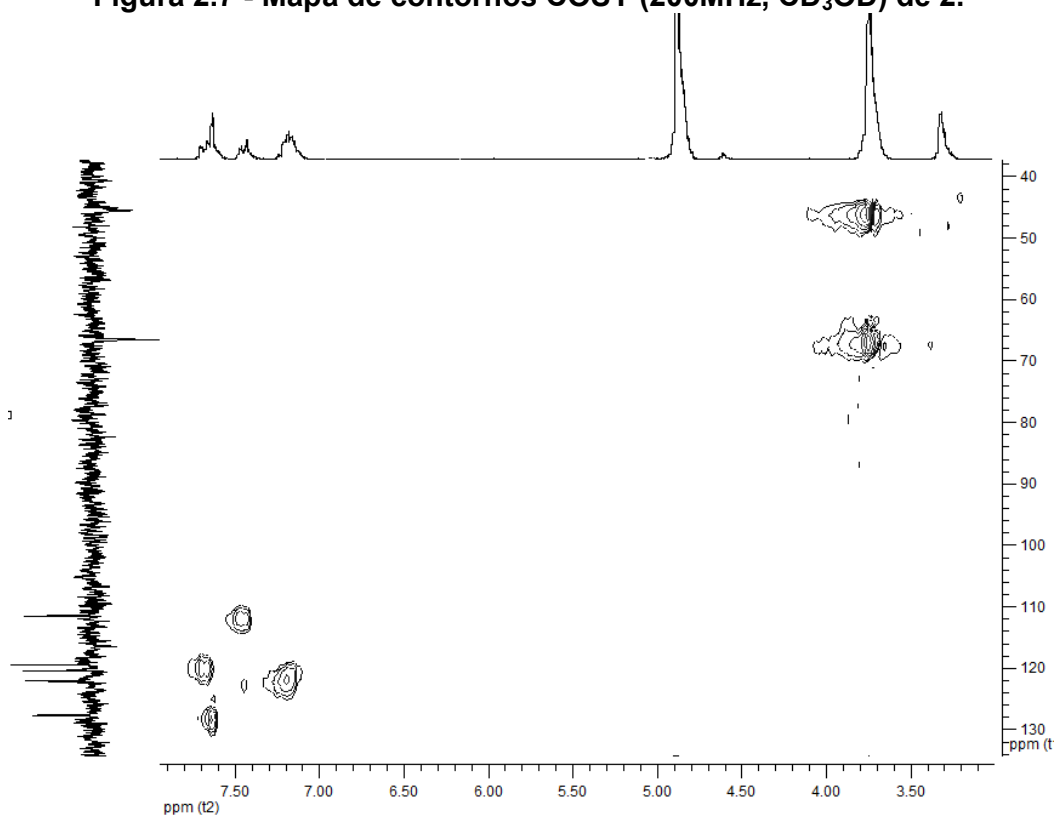


Figura 2.8 - Mapa de contornos HMQC (200MHz, CD₃OD) de 2.

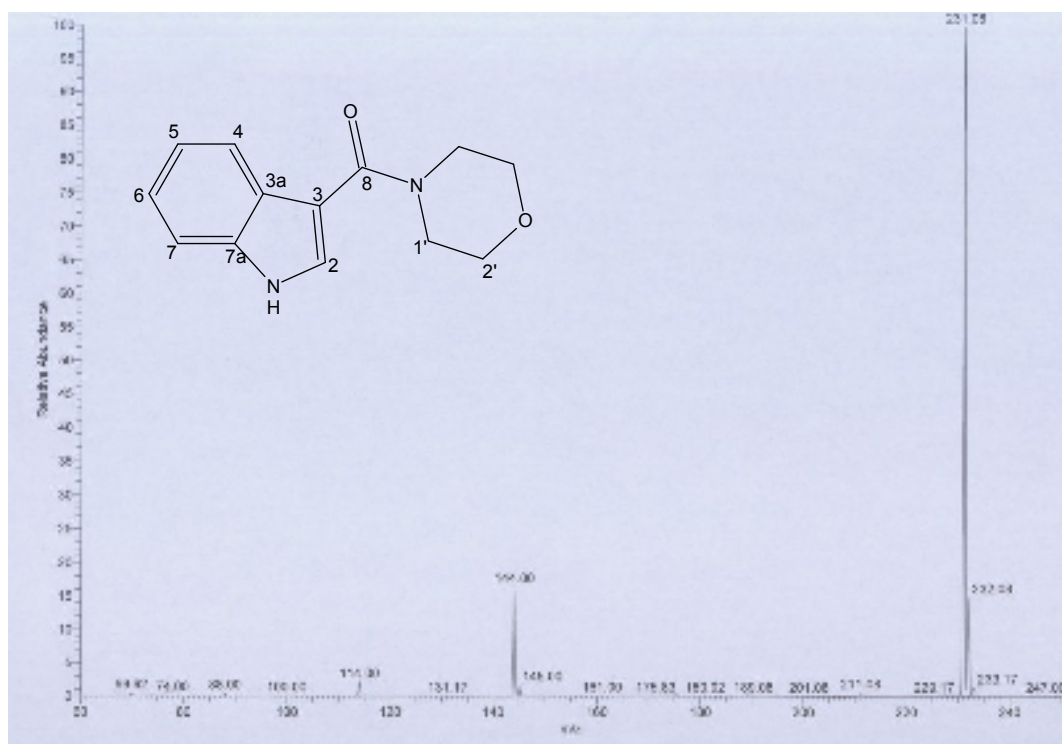


Figura 2.9 - Espectro de Massas de 2.

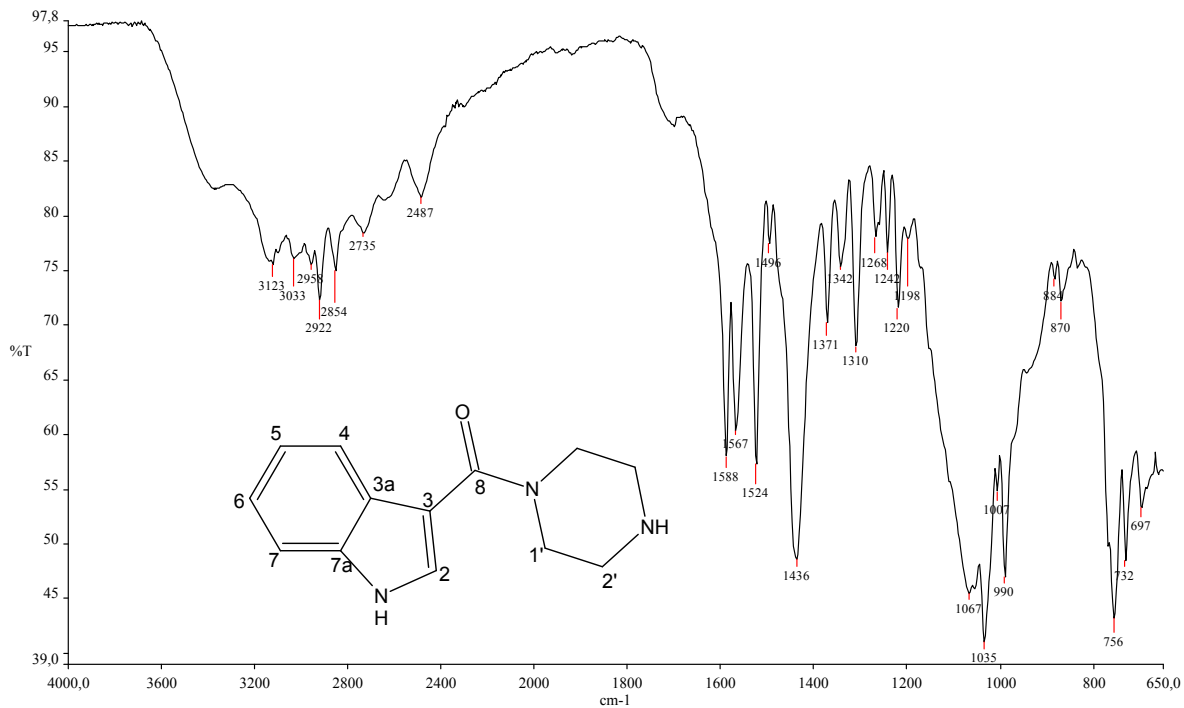


Figura 2.10 - Espectro no infravermelho 3.

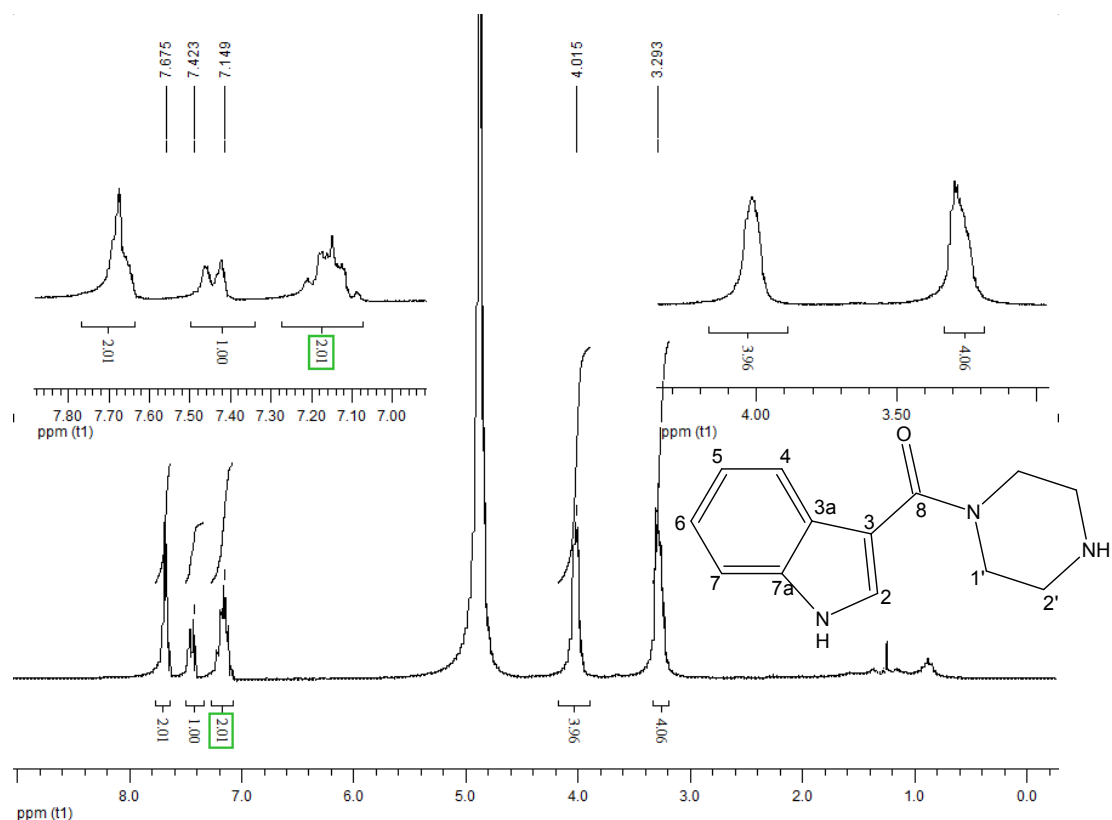


Figura 2.11 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) de 3.

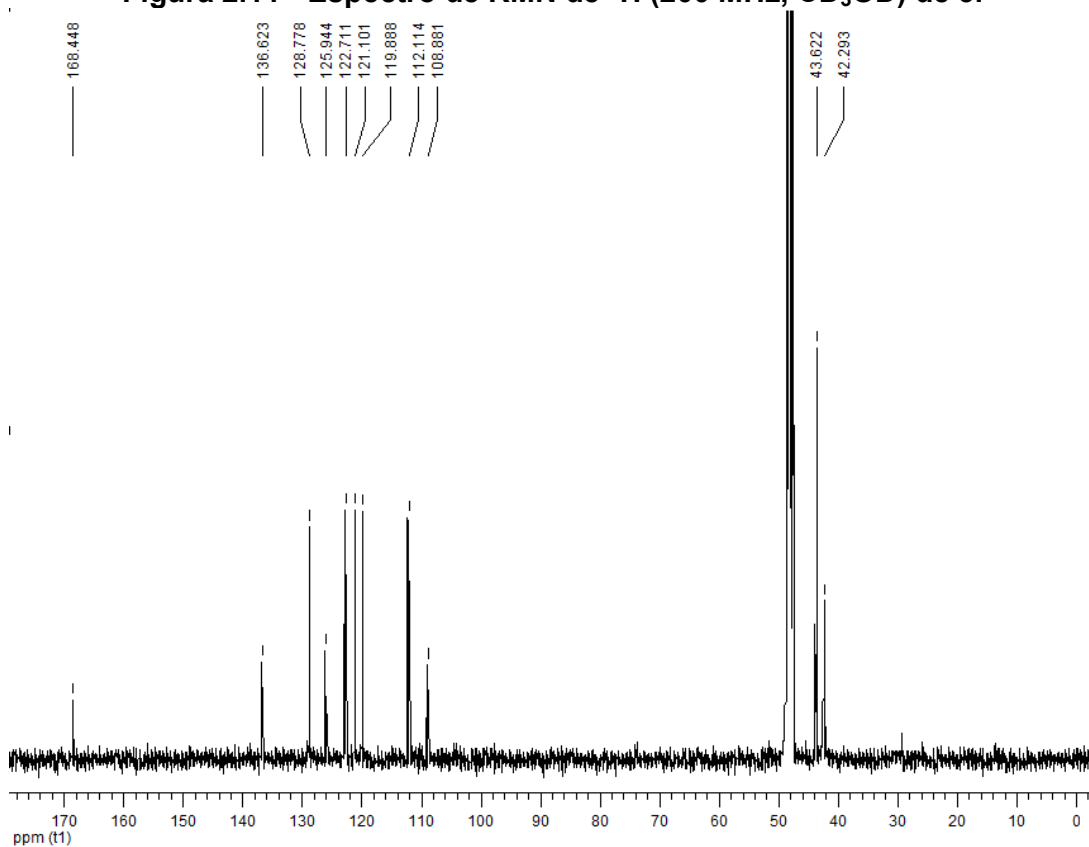


Figura 2.12 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) de 3.

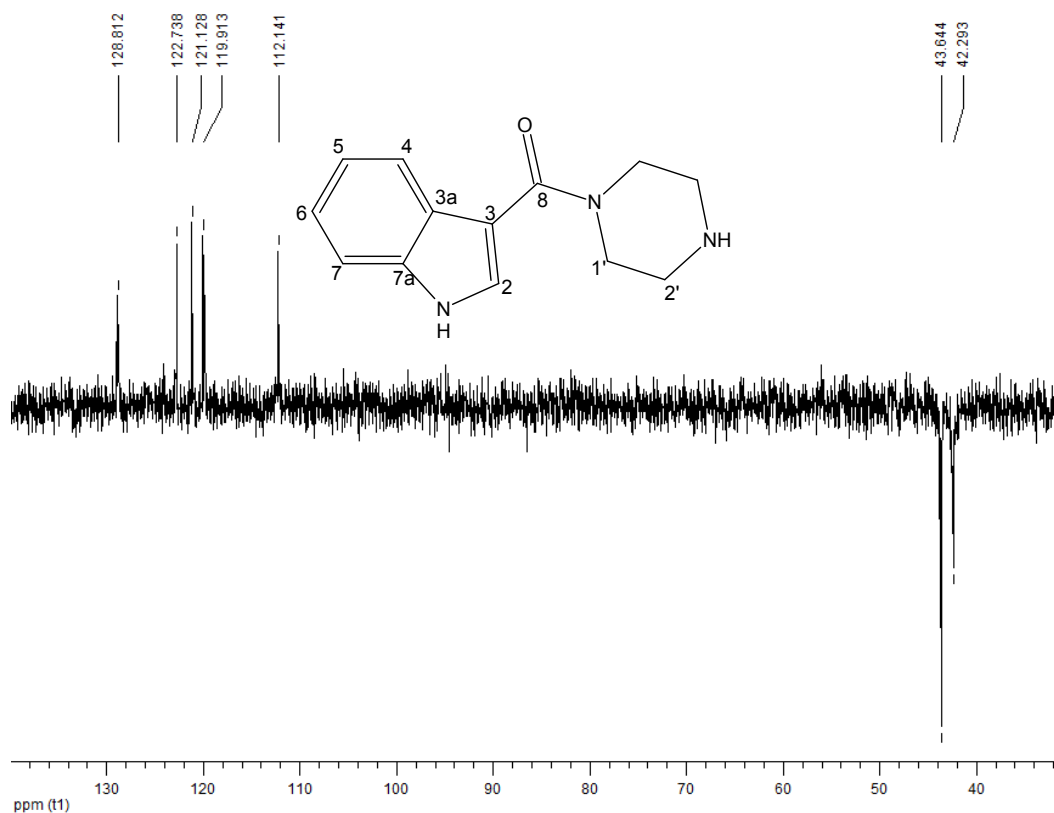


Figura 2.13 - Subespectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (50 MHz, CD_3OD) de 3.

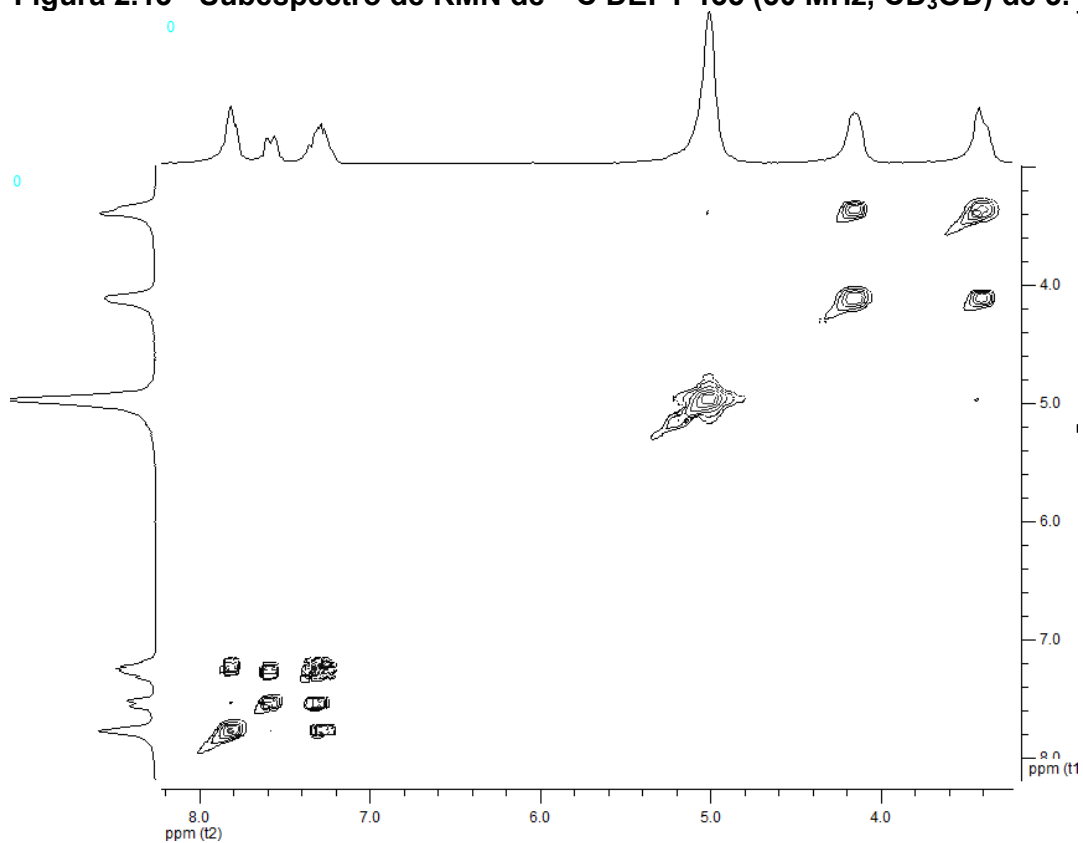


Figura 2.14 - Mapa de contornos COSY (200MHz, CD_3OD) de 3.

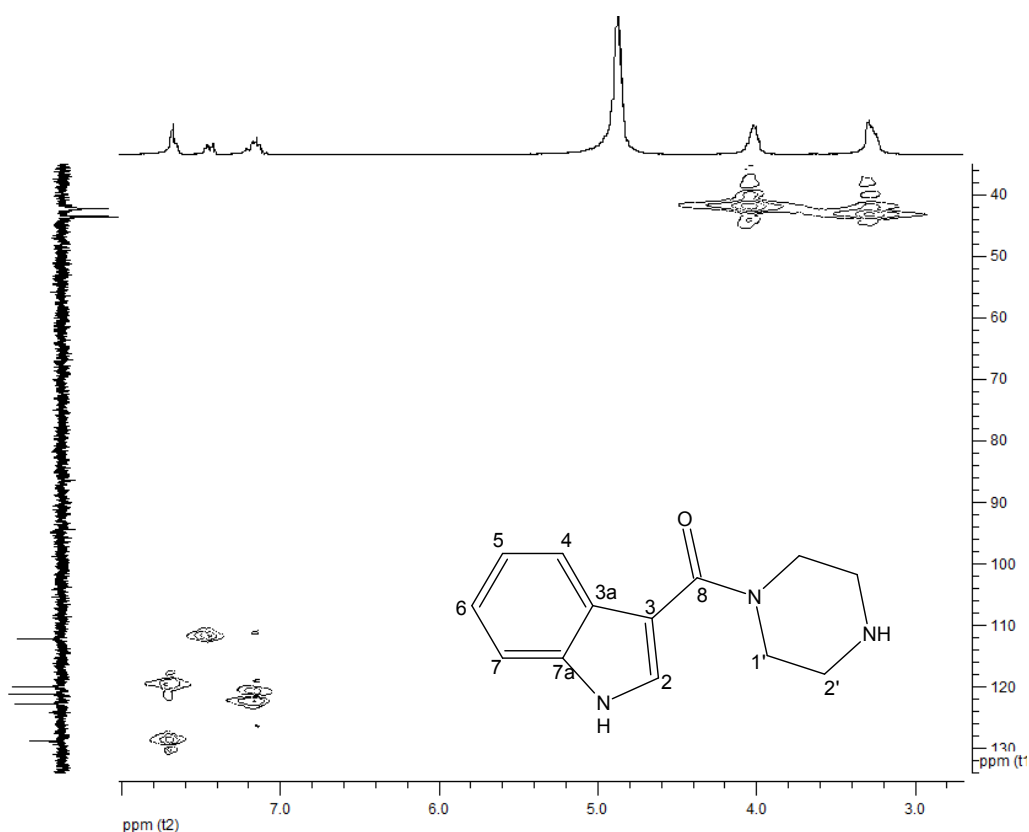


Figura 2.15 - Mapa de contornos HMQC (200MHz, CD₃OD) de 3.

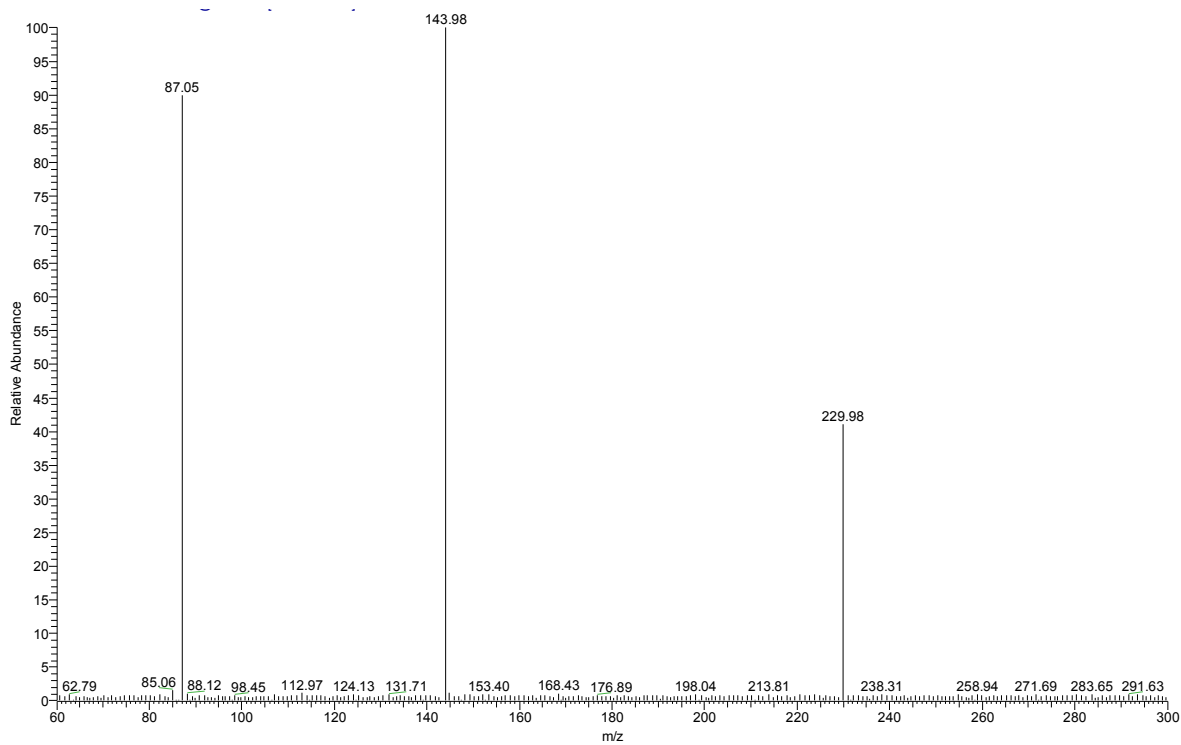


Figura 2.16 - Espectro de Massas de 3.

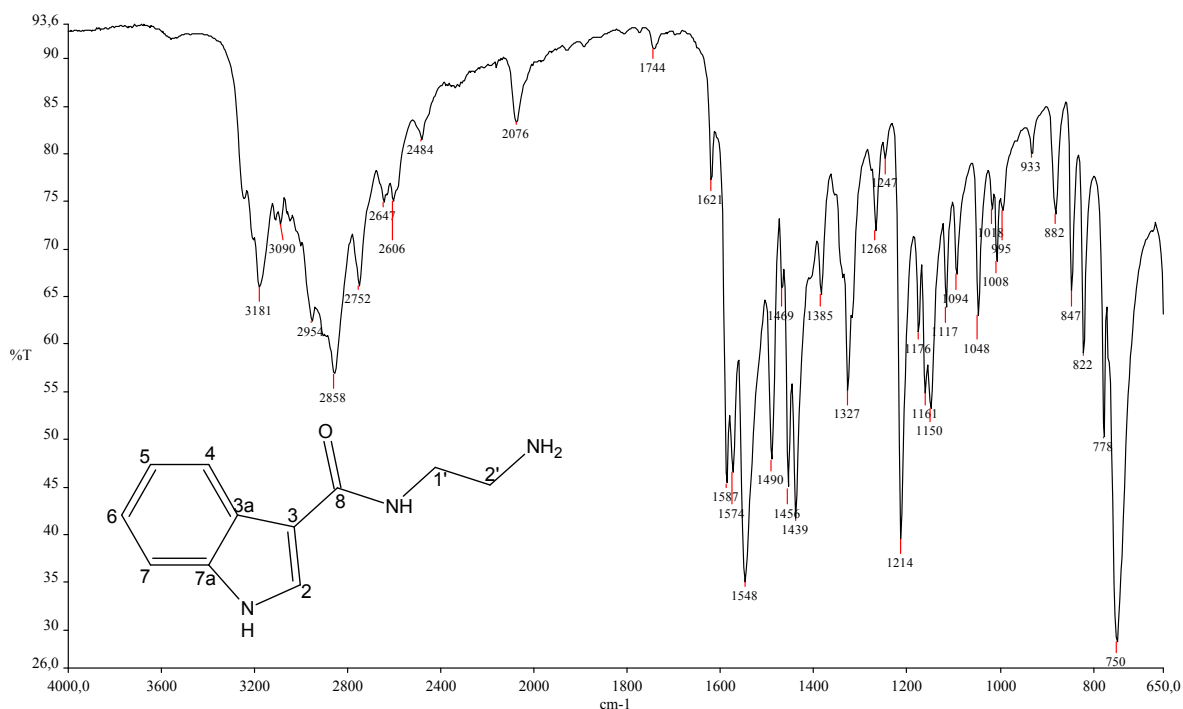


Figura 2.17 - Espectro no infravermelho 4.

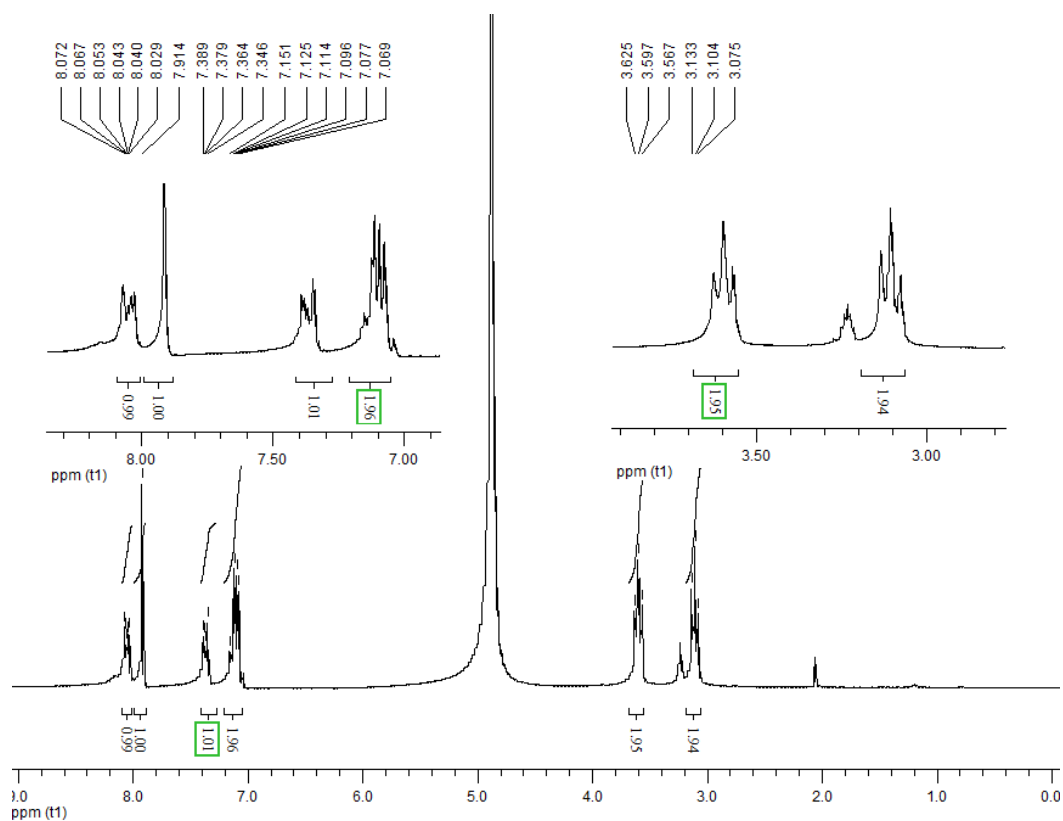


Figura 2.18 - Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CD₃OD) de 4.

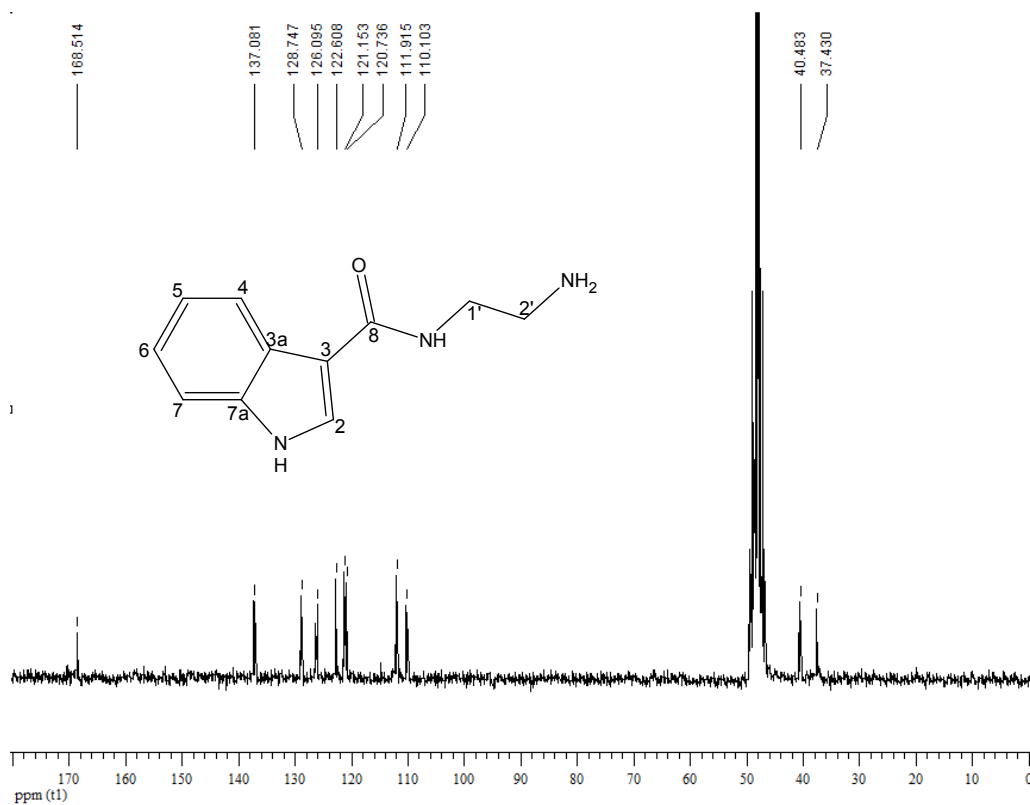


Figura 2.19 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) de 4.

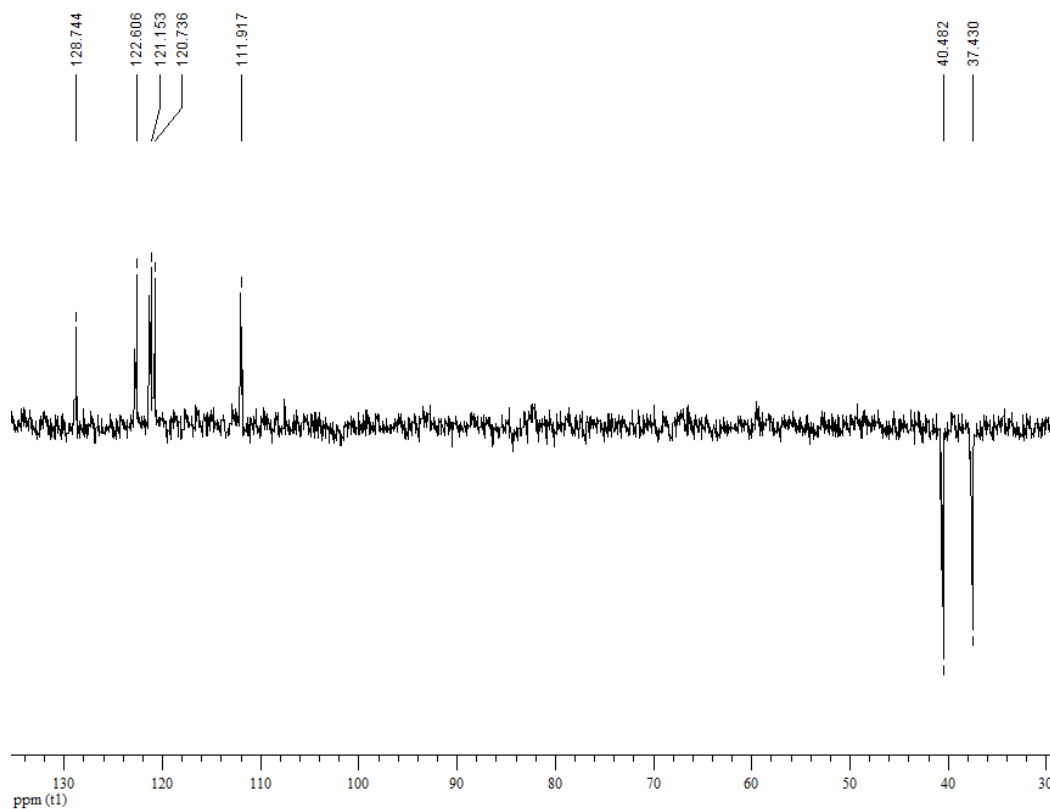


Figura 2.20 - Subespectro de RMN de ^{13}C DEPT 135(50 MHz, CD_3OD) de 4.

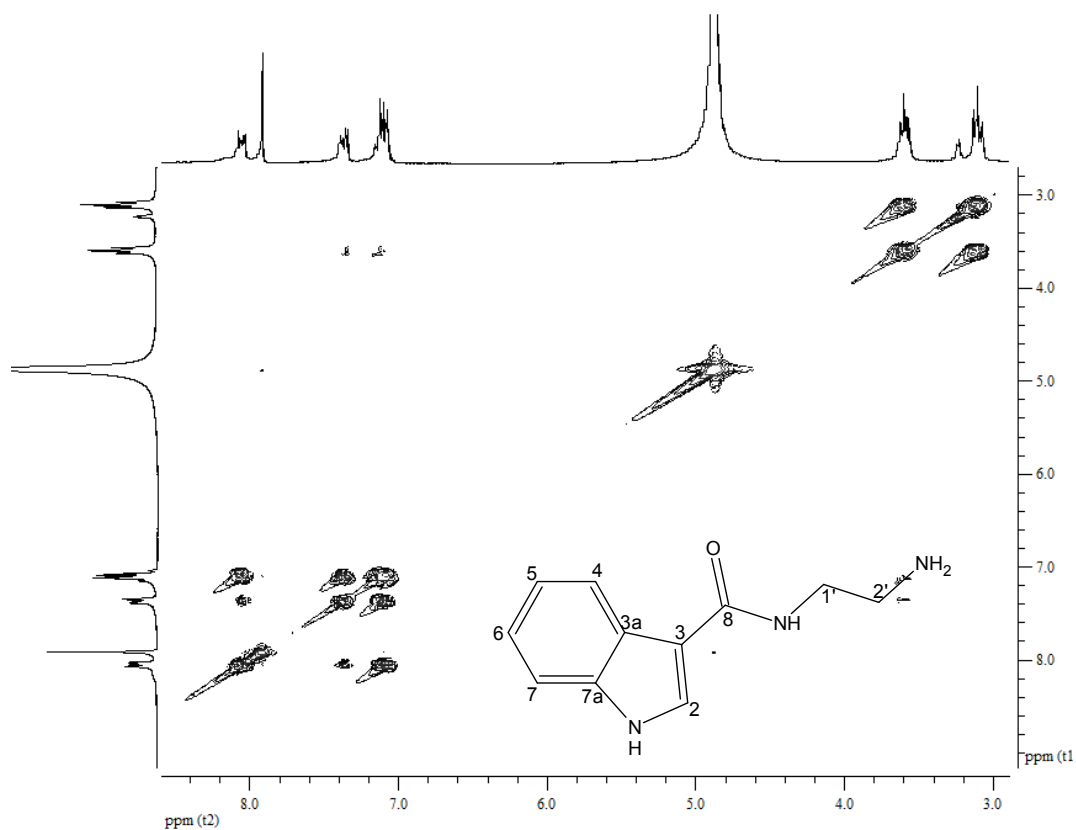


Figura 2.21 - Mapa de contornos COSY (200MHz, CD₃OD) de 4.

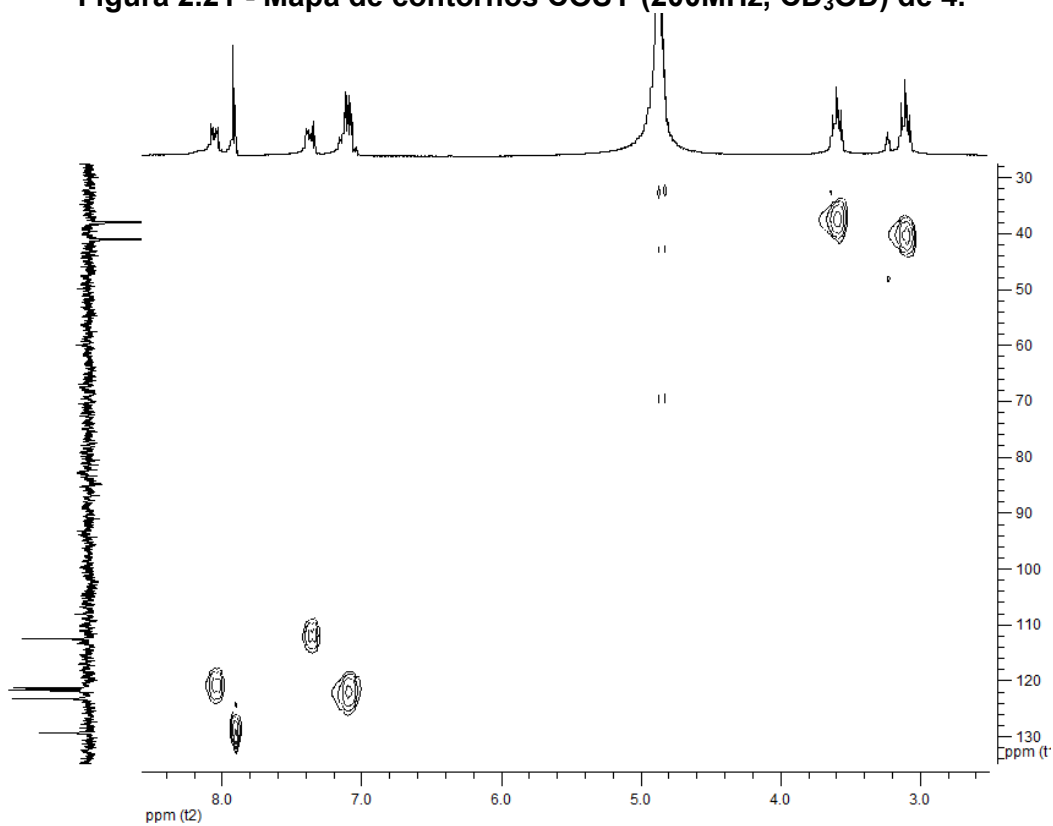


Figura 2.22 - Mapa de contornos HMQC (200MHz, CD₃OD) de 4.

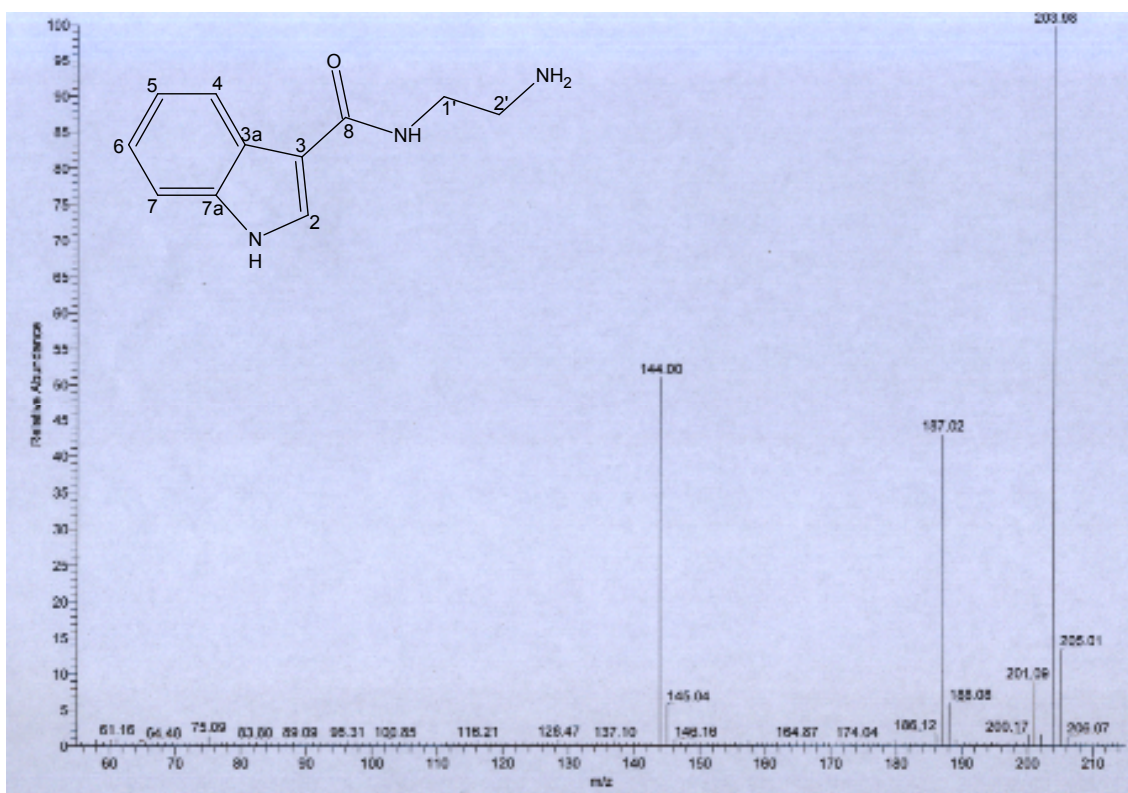


Figura 2.23 - Espectro de Massas de 4.

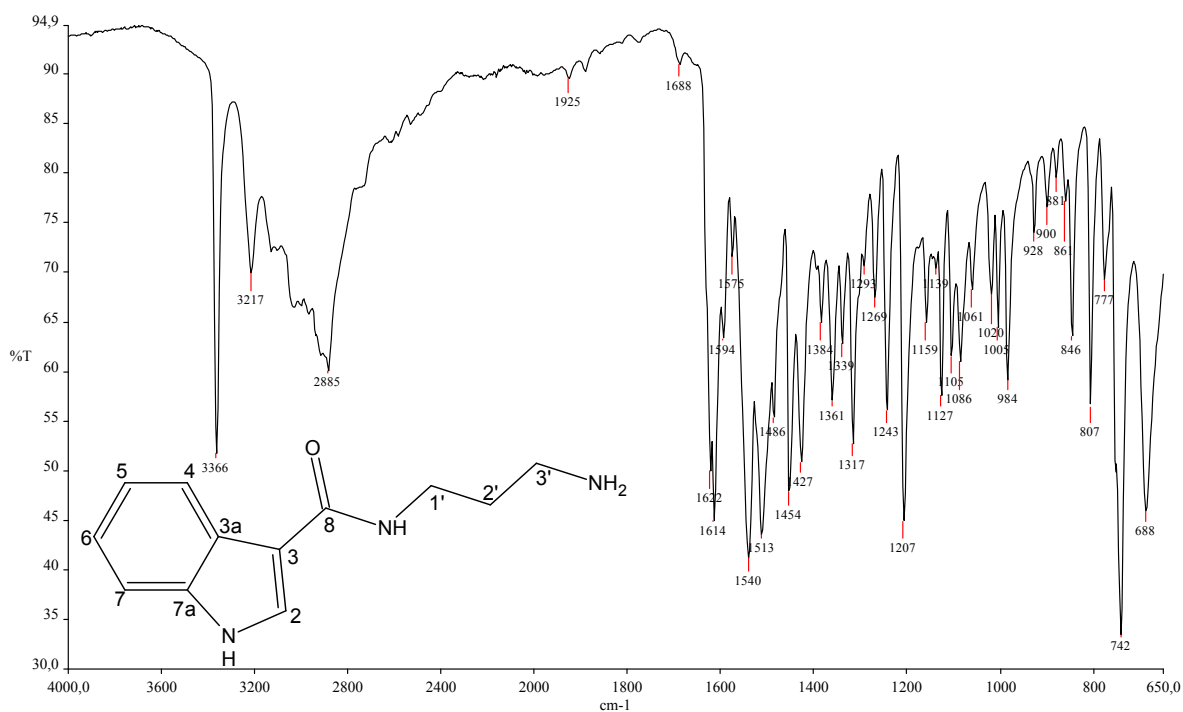


Figura 2.24 - Espectro no infravermelho 5.

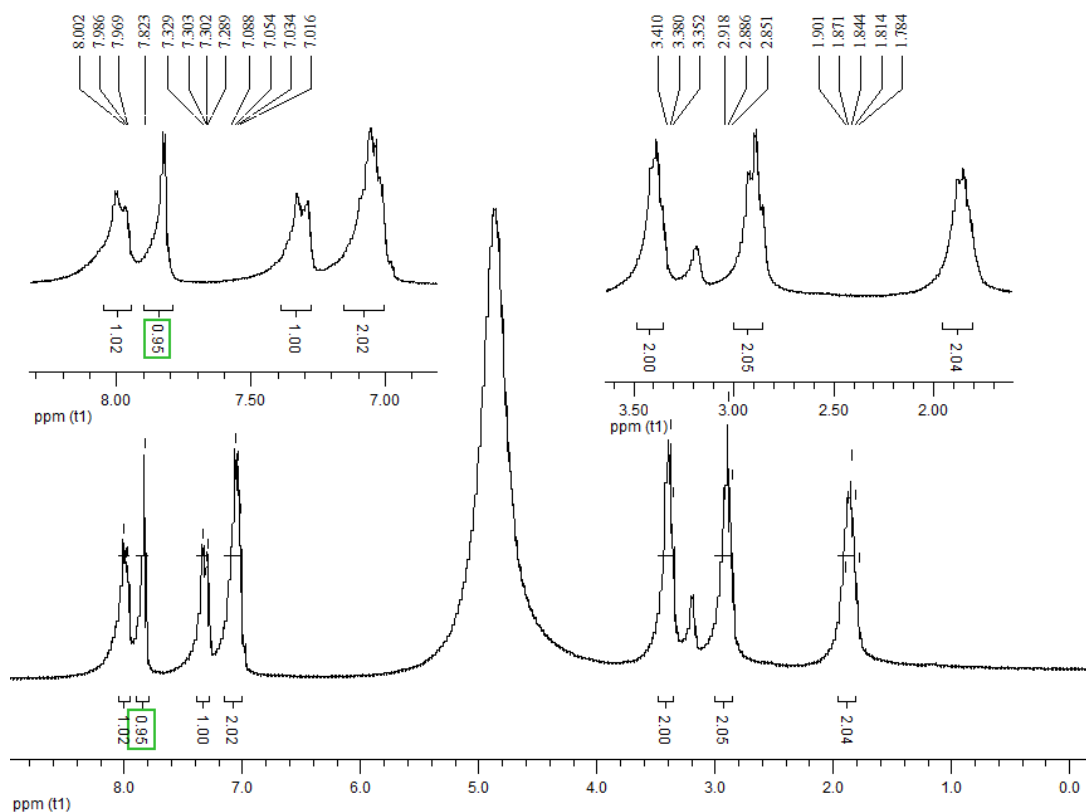


Figura 2.25 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) de 5.

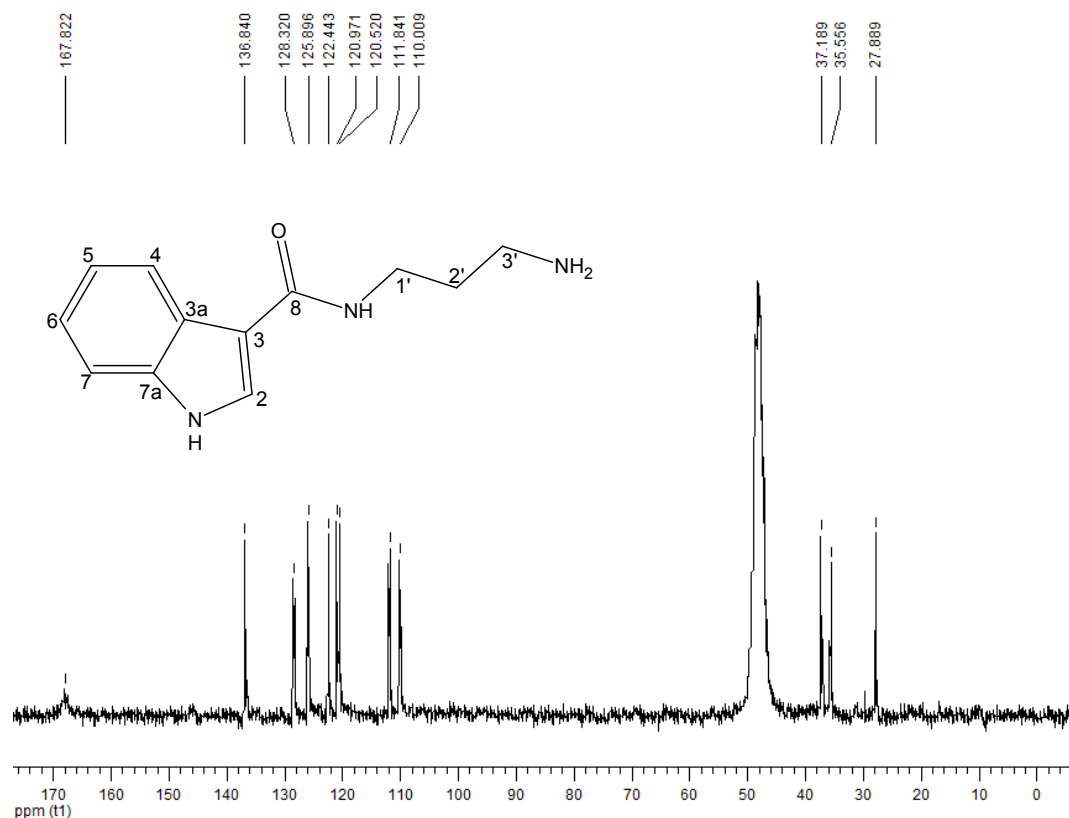


Figura 2.26 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) de 5.

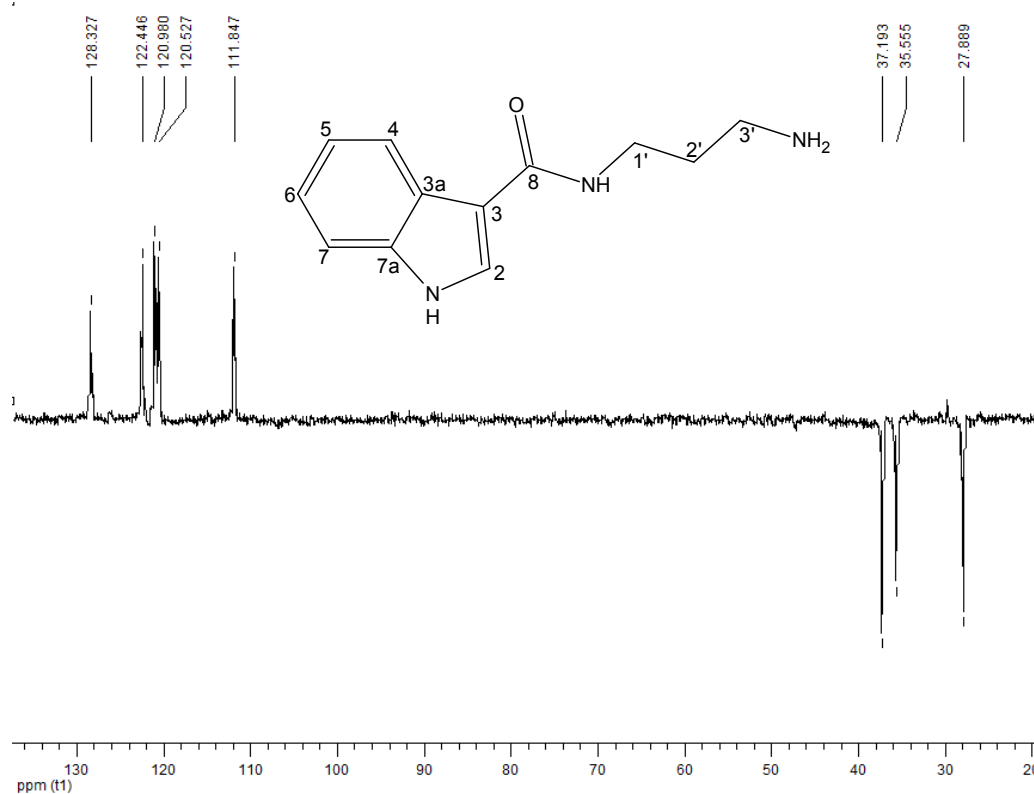


Figura 2.27 - Subespectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (50 MHz, CD_3OD) de 5.

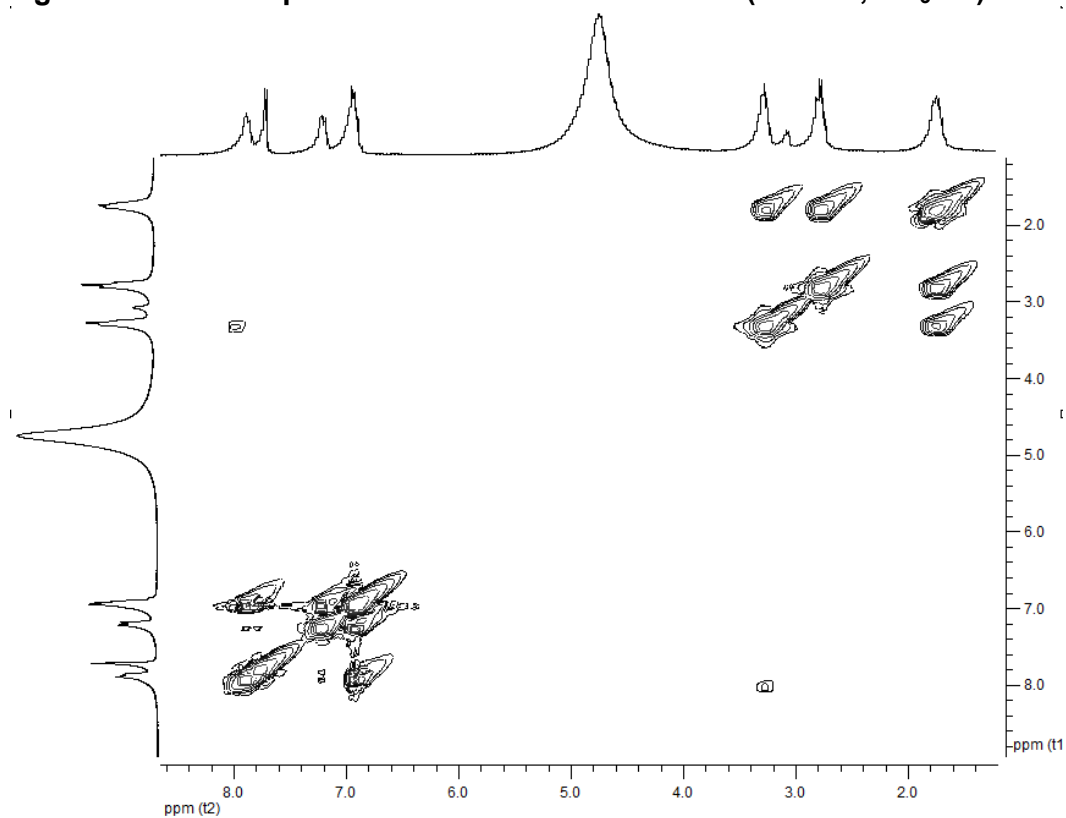


Figura 2.28 - Mapa de contornos COSY (200MHz, CD_3OD) de 5.

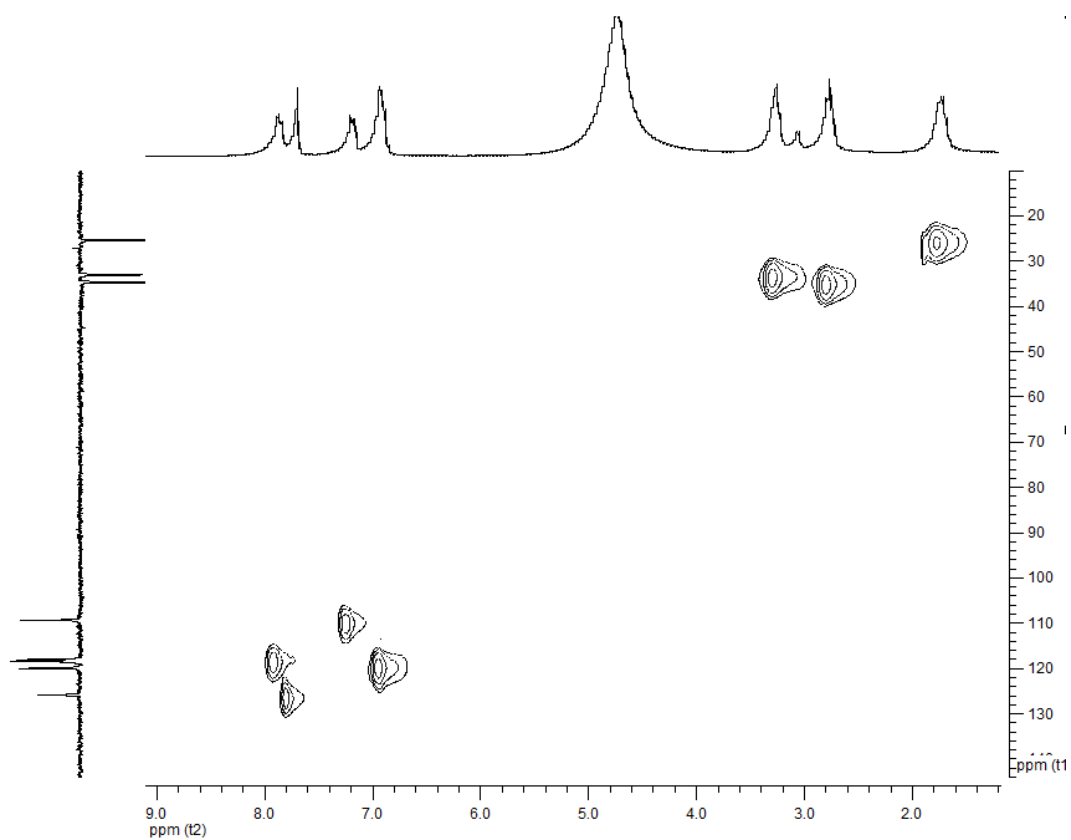


Figura 2.29 - Mapa de contornos HMQC (200MHz, CD₃OD) de 5.

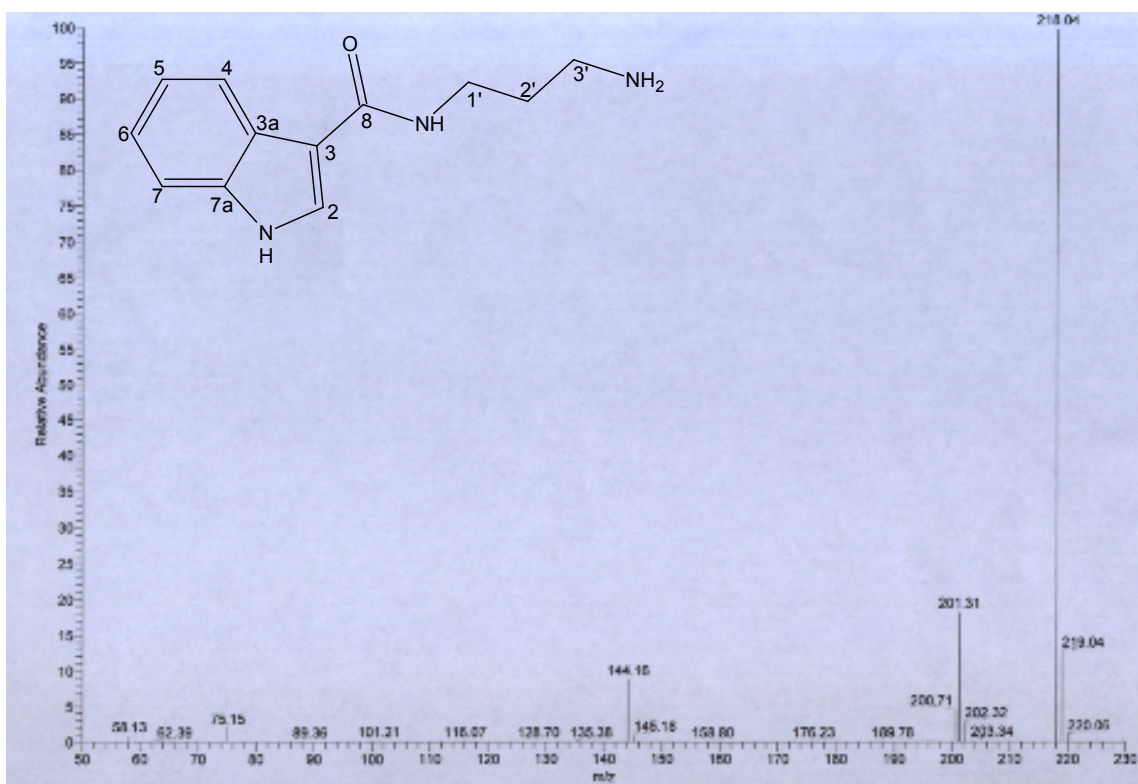


Figura 2.30 - Espectro de Massas de 5.

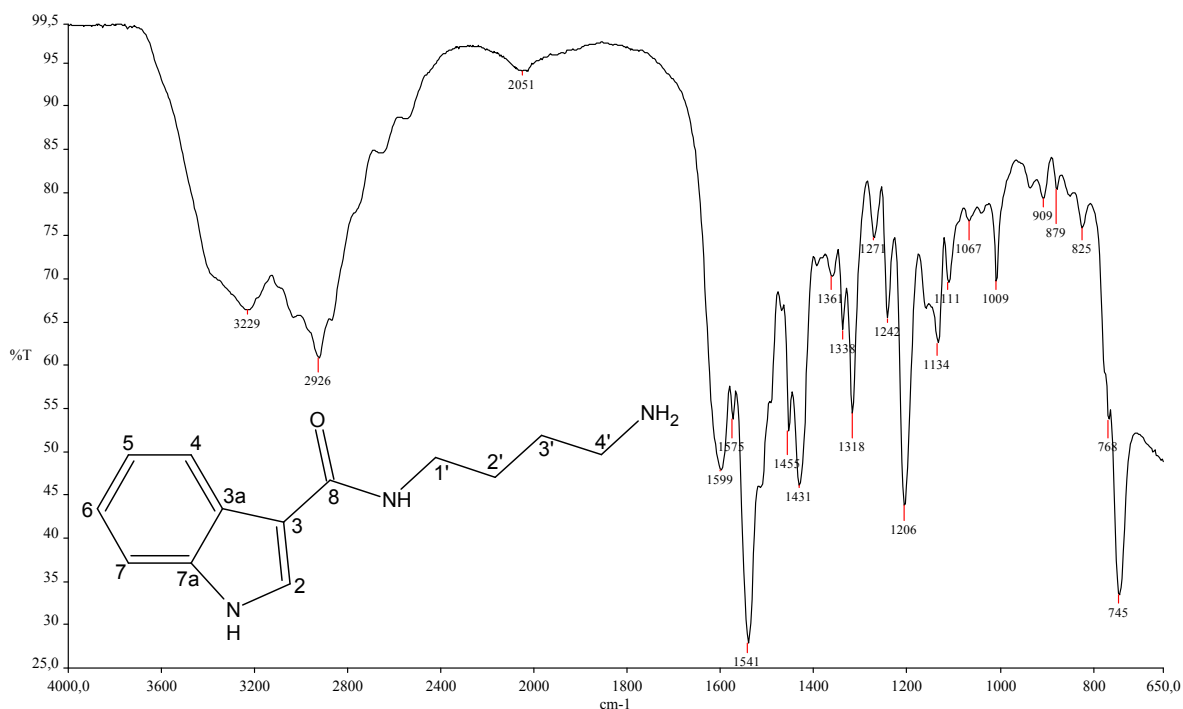


Figura 2.31 - Espectro no infravermelho 6.

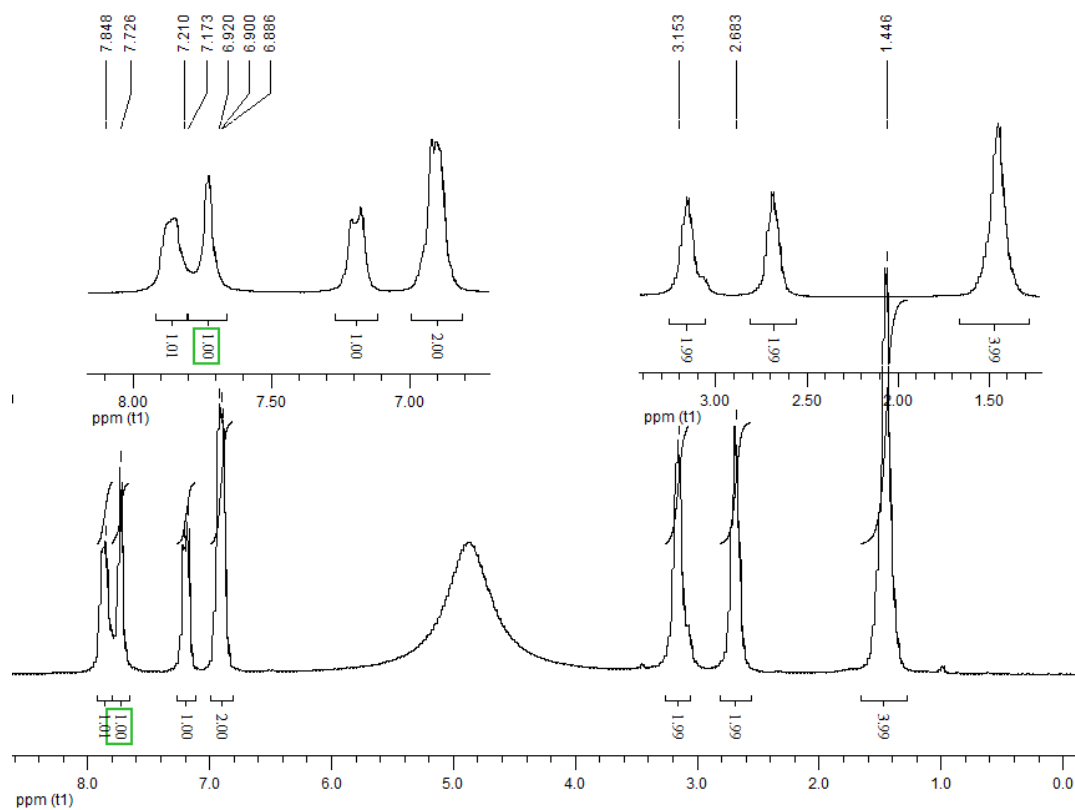


Figura 2.32 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) de 6.

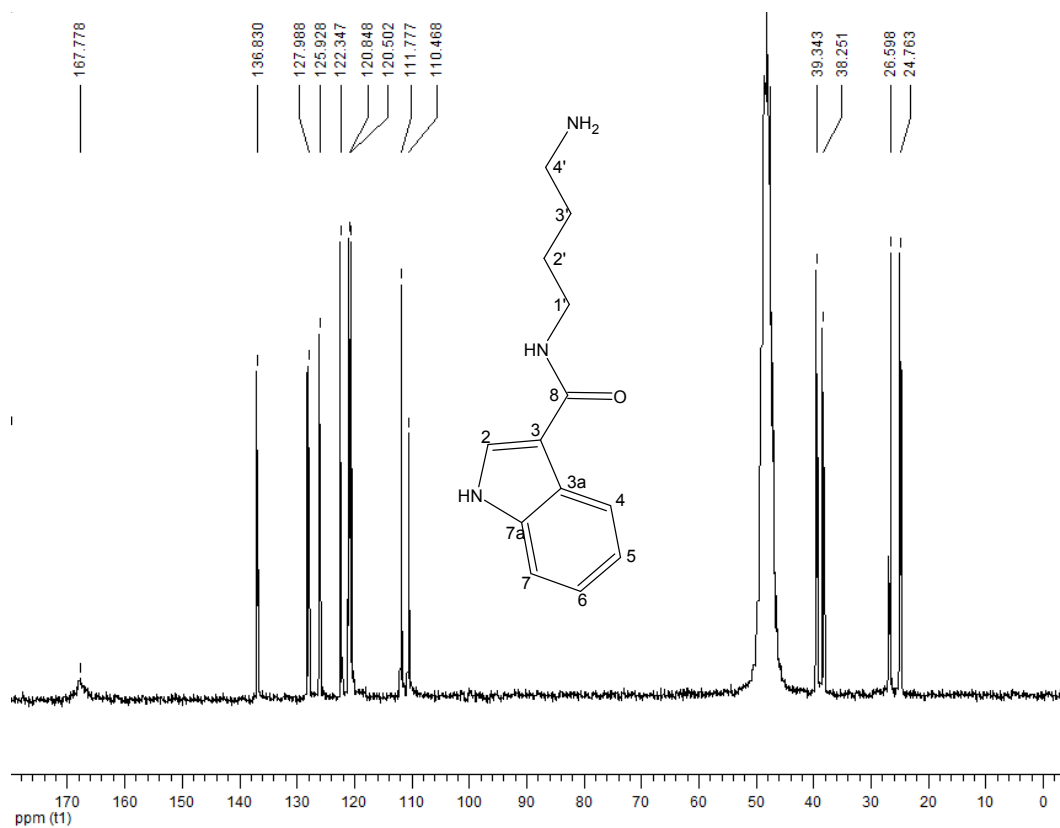


Figura 2.33 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) de 6.

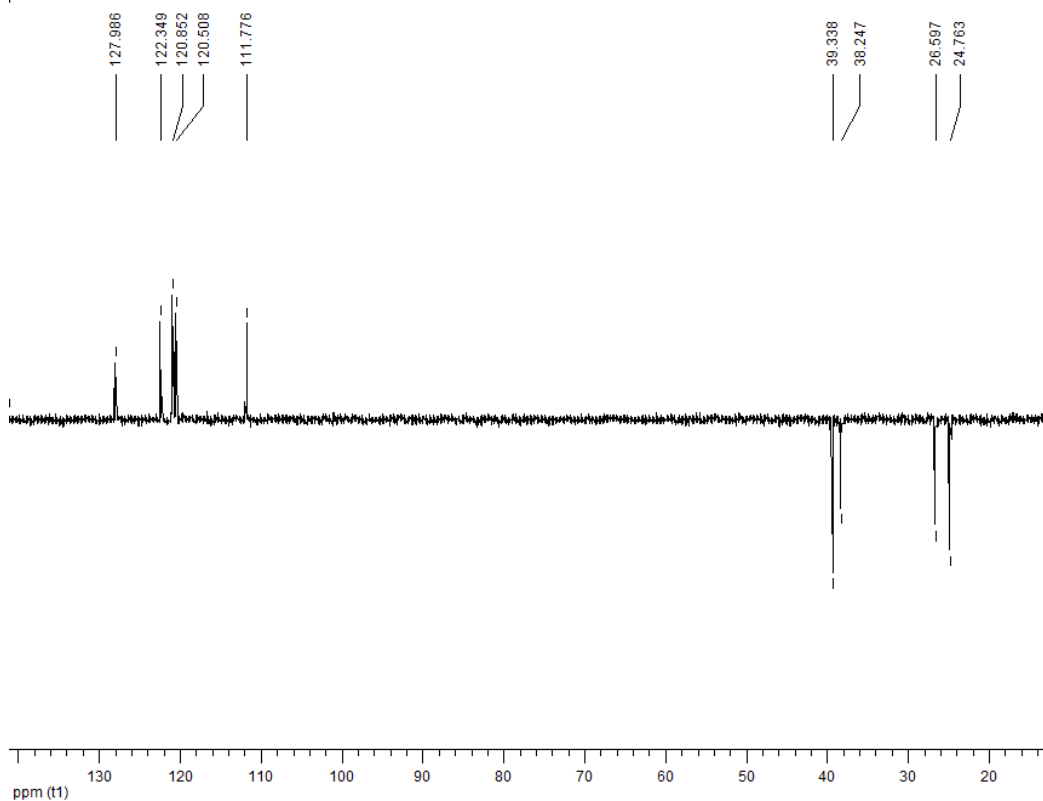


Figura 2.34 - Subspectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (50 MHz, CD_3OD) de 6.

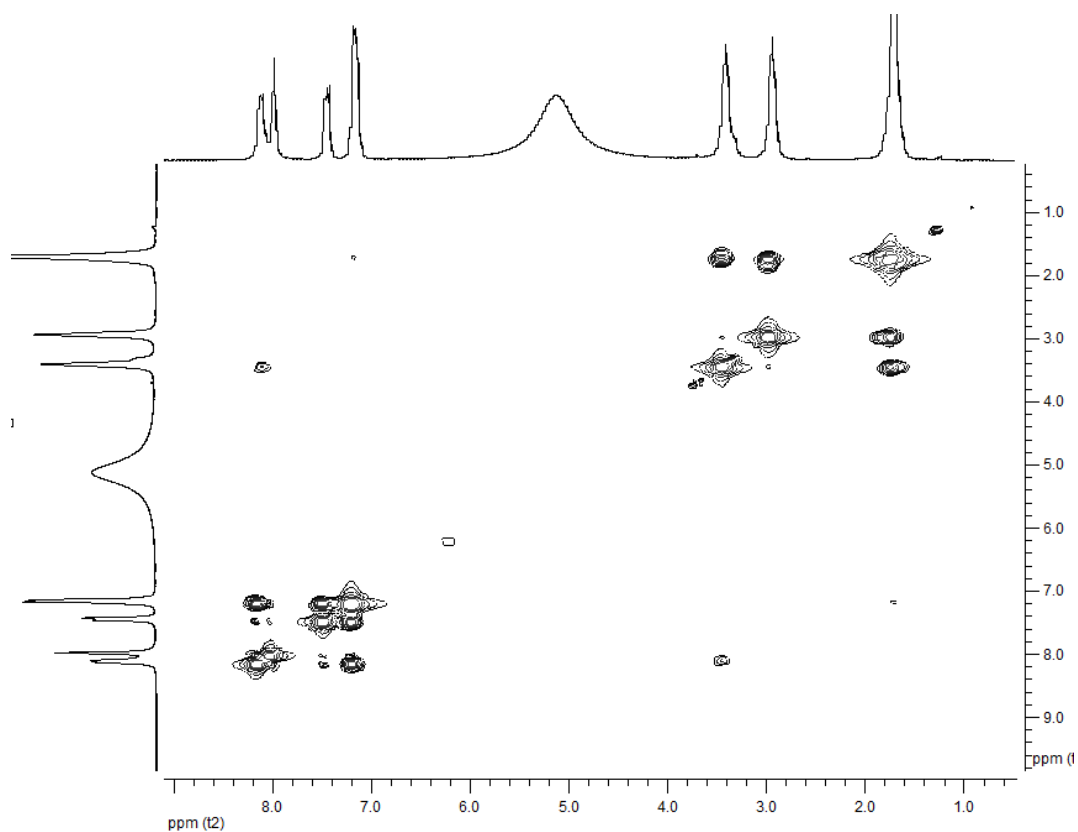


Figura 2.35 - Mapa de contornos COSY (200MHz, CD₃OD) de 6.

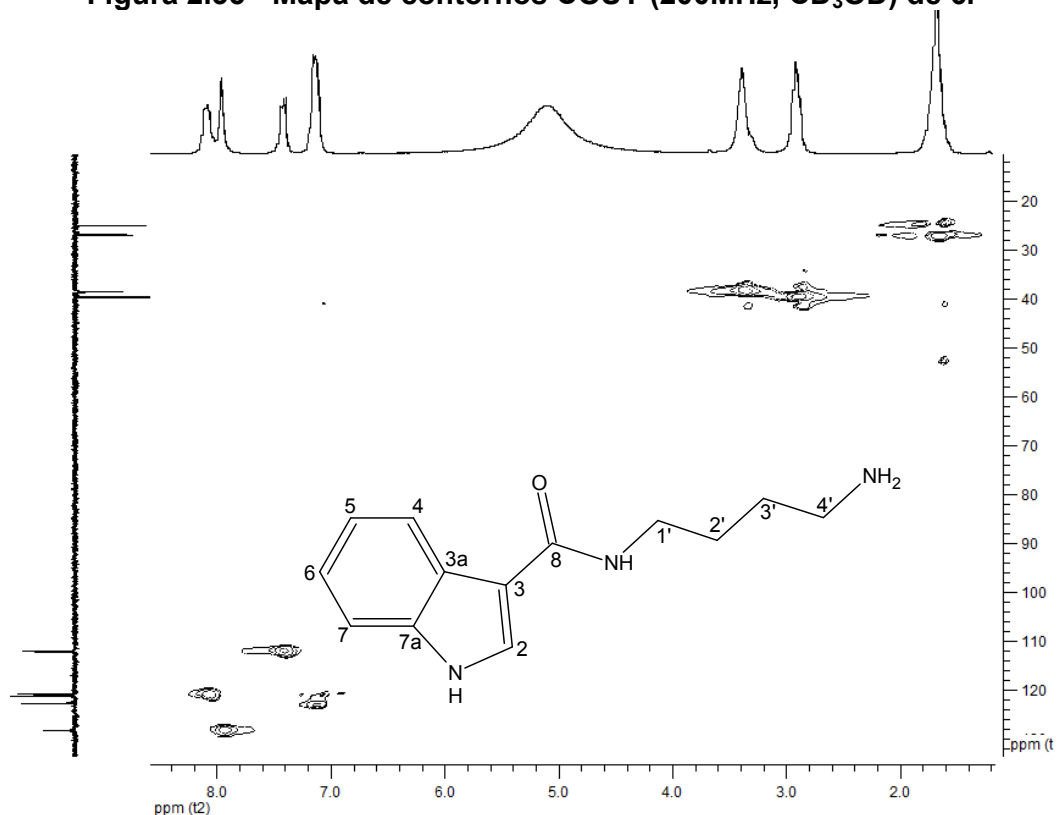


Figura 2.36 - Mapa de contornos HMQC (200MHz, CD₃OD) de 6.

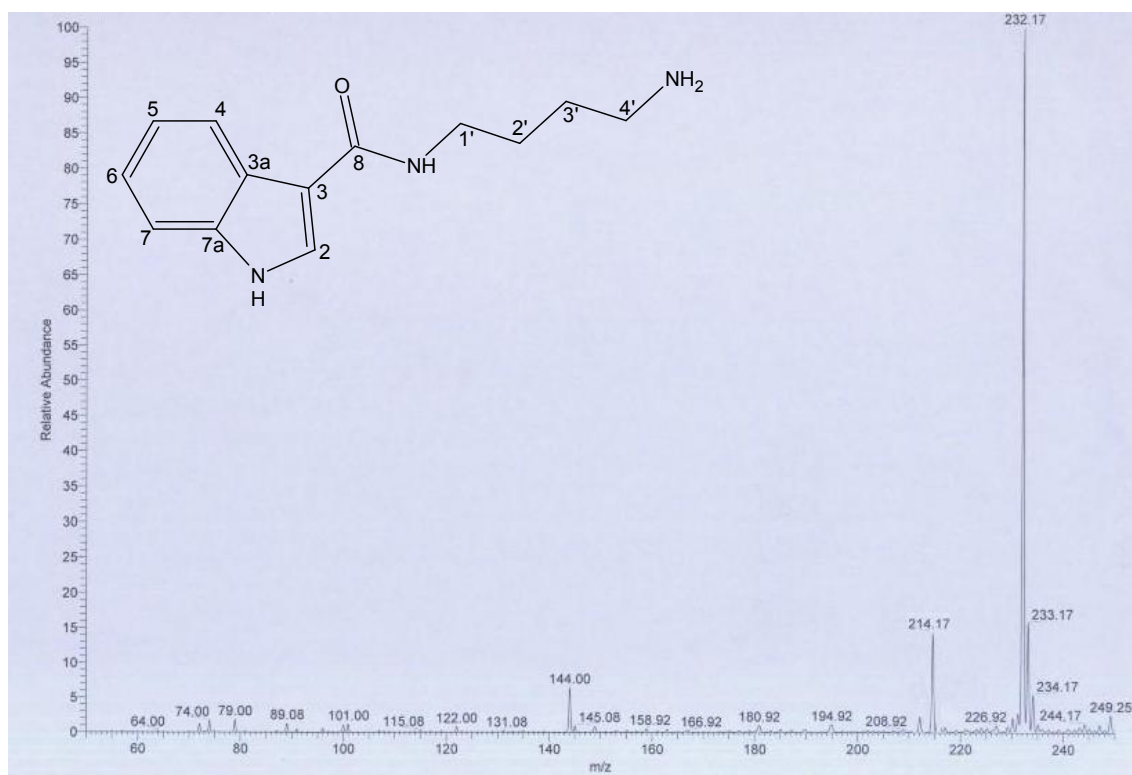


Figura 2.37 - Espectro de Massas de 6.

Capítulo 3

Parte Experimental

3.1 – Materiais utilizados e métodos

3.1.1 - Cromatografia em camada delgada de sílica (CCDS)

Para cromatografia em camada delgada foi utilizada sílica gel 60 G, Merck, na espessura de 0,25 mm, para as analíticas, e 0,50 mm, para as preparativas. As placas foram ativadas por 40 minutos a 100 °C. Como revelador foi utilizado vapor de iodo.

3.1.2 - Cromatografia em coluna

Para cromatografia em coluna foi utilizada Sílica gel Merck 70-230 MESH, sendo a proporção da fase estacionária para a quantidade de amostra de 30:1. A fase móvel empregada para as colunas filtrantes seguiu a ordem eluotrópica usual, na ordem crescente de polaridade: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Já para as colunas isocráticas a fase móvel utilizada foi uma mistura de acetato de etila e metanol na proporção de 9:1.

Na cromatografia por exclusão foi utilizada como fase estacionária Sephadex LH-20, da Sigma Aldrich, em colunas de 1 cm de diâmetro interno e 40 cm de altura. A fase móvel utilizada foi uma mistura de clorofórmio e metanol na proporção de 1:1.

3.1.3 - Evaporação de frações

Foi realizada sob pressão reduzida utilizando-se evaporadores rotatórios Büchi.

3.1.4 – Faixa de fusão

As faixas de fusão foram determinadas no aparelho Mettler FT80, com razão de aquecimento de 4 °C/min.

3.1.5 - Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros foram obtidos em espectrômetro FT-IR, Spectrum One, Perkin-Elmer com sistema ATR no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

3.1.6 - Espectrometria de Massas

Os espectros foram obtidos em equipamento Thermo Finnigan LCQ, equipado com fonte de ionização por electrospray, do Centro de Pesquisas René Rachou. Soluções metanólicas dos compostos foram preparadas e analisadas no modo positivo na faixa de m/z entre 50 e 1000 daltons.

3.1.7 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT 135 e os mapas de contornos COSY e HSQC foram obtidos no equipamento Bruker Advance DPX 200 com transformada de Fourier do Laboratório de Análises em Ressonância Magnética Nuclear de Alta Eficiência do Departamento de Química da UFMG. O solvente deuterado empregado na solubilização das amostras foi CD_3OD . Como referência interna foram utilizados os picos relativos à metoxila (δ 3,31 ppm) e a água residual (δ 4,87 ppm) (Gottlieb *et al.*, 1997).

3.1.8 – Espectroscopia UV-VIS

A marca e modelo do espectrofotômetro utilizado é Biospectro SP-22, do laboratório de microbiologia do Departamento de Química, ICEX, UFMG.

3.1.9 - Critério de pureza

Os critérios de pureza adotados foram mancha única em CCD, variando-se a fase móvel, e análises dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .

3.1.10 - Tratamento de solventes e reagentes

Alguns dos solventes e reagentes utilizados foram tratados a fim de se eliminar água e outros eventuais resíduos:

1. Cloreto de tionila: foi destilado, utilizando-se uma micro montagem para destilação simples, volume máximo de 50 mL.
2. Tetrahidrofurano: foi refluxado em fios de sódio sendo o indicador utilizado a benzofenona, que conferia à solução coloração azul quando esta se encontrava isenta de água.
3. Piperazina: foi recristalizada utilizando-se o tetrahidrofurano como solvente.

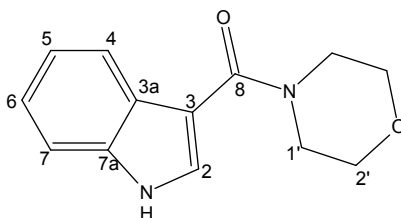
3.2 - Preparação de amidas 2 - 6 – Metodologia geral

Em um balão de fundo redondo de 25 mL equipado com uma rolha de saia, contendo 200,0 mg (1,2 mmol) do ácido indol-3-carboxílico foi adicionado 2,2 ml (30,2 mmol) de SOCl_2 . A mistura foi resfriada a 0°C e, após 1,5 hora, o excesso deste reagente foi retirado sob pressão reduzida. Em seguida, o balão foi mergulhado em um banho de acetato de etila resfriado, com gelo seco, a -30°C , sendo então adicionados, sob agitação, 33,2 mmol da diamina dissolvida em aproximadamente 4,0 mL de THF. A agitação e a temperatura foram mantidas durante 10 minutos, sendo então adicionados 15,0 mL de água para interromper a reação. Os solventes foram, então, removidos sob pressão reduzida à temperatura ambiente, utilizando-se uma bomba de ultravácuo.

O resíduo obtido após a remoção dos solventes foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (~20 g, ~ 18 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro), utilizando-se *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, com gradiente crescente de polaridade. Para as amidas **3**, **5** e **6** uma purificação adicional foi realizada utilizando-se Sephadex LH-20 (clorofórmio:metanol 6:4).

Os produtos puros apresentaram tempo de retenção intermediário entre os dois reagentes, observado por análise por CCDS (solvente: metanol) e revelação com vapores de iodo, as aminas apresentaram menor fator de retenção enquanto que o ácido indol-3-carboxílico apresentou o maior.

3.2.1 - Preparação da N-morfolina-1*H*-indol-3-carboxamida (**2**)

**2**

Utilizaram-se, neste caso, 3,7 mmol (322,0 mg) de morfolina. Durante a adição da amina a temperatura ficou em torno de 0° C. A agitação se prolongou por 2 horas. O resíduo obtido (600,0 mg) foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, sendo recolhidas 15 frações. O produto foi detectado no grupo de frações 10-14, juntamente com a amina de partida, a partir da eluição com mistura de acetato de etila e metanol. As frações foram reunidas e o material (~400,0 mg) foi recromatografado em coluna de sílica gel (1,5cm de diâmetro e 20cm de comprimento), eluída com acetato de etila e metanol, com aumento gradativo de polaridade (de acetato de etila puro a metanol puro). Das 17 frações recolhidas, obteve-se um sólido cristalino branco no grupo de frações de 6-8 (214,0 mg) identificado como N-morfolina-1*H*-indol-3-carboxamida (**2**), com rendimento de 73,0 % (faixa de fusão = 220-223 °C).

3.2.1.1 - N-morfolina-1*H*-indol-3-carboxamida (**2**)

FM/MM: C₁₃H₁₄N₂O₂ / 230 g/mol.

Faixa de fusão: 220–223 °C.

IV (ν_{máx.}, cm⁻¹):

1434 (estiramento C-N); 1567 (deformação N-H, amida II); 1588 (estiramento C=O, amida I); 2853 (estiramento simétrico C-H alifático); 2922 (estiramento assimétrico C-H); 3142 (estiramento simétrico N-H).

RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz, δ):

3,68–3,76 (sl*, 4H, H-1'); 3,68–3,76 (sl*, 4H, H-2'); 7,11–7,23 (m*, 1H, H-6); 7,11–7,23 (m*, 1H, H-5); 7,60–7,70 (m*, 1H, H-4); 7,43 (m, 1H, H-7); 7,60–7,70 (m*, 1H, H-2).

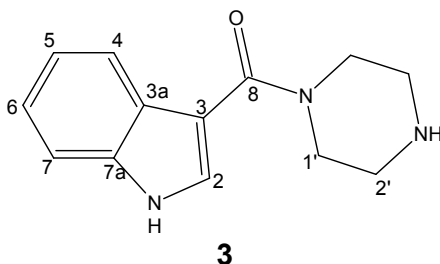
RMN de ^{13}C (CD_3OD , 50 MHz, δ):

128,2 (C-2); 109,6 (C-3); 125,9 (C-3a); 120,9 (C-4); 122,6 (C-5); 119,9 (C-6); 112,0 (C-7); 136,6 (C-7a); 168,4 (C-8); 46,0 (C-1'); 67,1 (C-2').

IES – m/z (%):

231,08 (100%) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 144,00 (17%) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}]^+$

* sinal sobreposto

3.2.2 - Preparação da N-piperazino-1*H*-indol-3-carboxamida (3**)**

Utilizaram-se 8,85 mmol (761,0 mg) de piperazina. Na tentativa de solubilizar um pouco mais a diamina, foram utilizados 6,6 mL de THF. Na temperatura descrita na metodologia geral (-30°C), nenhum produto foi isolado, apenas sendo recuperados os materiais de partida. A 0°C , apesar de pouca piperazina solubilizar, a monoamida (tempo de retenção entre os 2 reagentes) foi detectada, por CCDS do material reacional. Depois de 10 min. nesta temperatura foi adicionada a água, sendo obtidos 1,1924 g de resíduo após a remoção dos solventes. Este resíduo foi cromatografado em coluna de sílica gel, sendo obtidas 14 frações. O grupo de frações 5-7 (250,2 mg) foi purificado em coluna de Sephadex LH-20 (clorofórmio/metanol, 6:4), sendo obtidas 18 frações. A N-piperazino-1*H*-indol-3-carboxamida (**3**) foi obtida a partir do grupo de frações 4-7 (105,4 mg, 46 % de

rendimento), apresentando-se como um sólido cristalino amarelo (faixa de fusão = 223-229 °C).

3.2.2.1 - N-piperazino-1*H*-indol-3-carboxamida (3)

FM/MM: C₁₃H₁₅N₃O / 229 g/mol.

Faixa de fusão: 223-229 °C.

IV (ν_{máx.}, cm⁻¹):

1436 (estiramento C-N); 1566 (deformação N-H, amida II); 1588 (estiramento C=O, amida I); 2854 (estiramento simétrico C-H alifático); 2922 (estiramento assimétrico C-H); 3033 (estiramento simétrico N-H); 3123 (estiramento assimétrico N-H).

RMN de ¹H (CD₃OD, 200 MHz, δ):

3,29 (sl, 4H, H-1'); 4,02 (sl, 4H, H-2'); 7,08–7,22 (m*, 1H, H-5); 7,08–7,22 (m*, 1H, H-6); 7,42 (m, 1H, H-7); 7,62–7,72 (sl*, 1H, H-2); 7,62–7,72 (sl*, 1H, H-4);

RMN de ¹³C (CD₃OD, 50 MHz, δ):

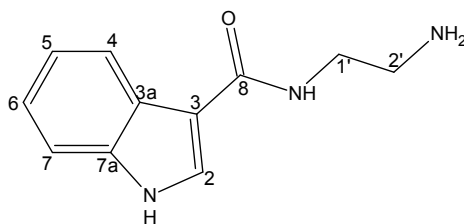
128,8 (C-2); 108,9 (C-3); 125,9 (C-3a); 121,1 (C-4); 122,8 (C-5); 119,9 (C-6); 112,1 (C-7); 136,6 (C-7a); 168,4 (C-8); 43,6 (C-1'); 42,3 (C-2').

IES – m/z (%):

229,98 (42%) [M+H]⁺, 143,98 (100%) [M-C₄H₁₀N₂]⁺, 87,05 (92%) [M-C₉H₅ON]

* sinal sobreposto

3.2.3 - Preparação da N-(etil-2-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (4)



4

Foram utilizados 2,3 mL (33,3 mmol) de etilenodiamina. O resíduo obtido, após a remoção dos solventes (1,7523 g) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, sendo obtidas 15 frações. O grupo de frações 9-10 (450,0 mg) foi recromatografado em coluna de sílica gel (16,0 cm de comprimento e 2,0 cm de diâmetro), eluída com uma mistura de acetato de etila e metanol (9:1). Das 15 frações recolhidas, somente as frações 9 e 10 continham o produto puro. A N-(etil-2-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (**4**) (103,5 mg, 41 % de rendimento) foi obtida como um sólido cristalino amarelo (faixa de fusão = 235-238 °C).

3.2.3.1 - N-(etil-2-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (**4**)

FM/MM: C₁₁H₁₃N₃O / 203 g/mol.

Faixa de fusão: 235-238 °C.

IV (ν_{máx.}, cm⁻¹):

1439 (estiramento C-N); 1548 (deformação N-H, amina); 1574 (deformação N-H, amida II); 1587 (estiramento C=O, amida I); 1621 (estiramento C=O); 2858 (estiramento simétrico C-H alifático); 3181 (estiramento assimétrico C-H).

RMN de ¹H (CD₃OD, 200 MHz, δ):

3,10 (t, *J* = 5,8Hz, 2H, H-2'); 3,60 (t, *J* = 5,8Hz, 2H, H-1'); 7,07–7,15 (m*, 1H, H-6); 7,07–7,15 (m*, 1H, H-5); 7,38 (m, 1H, H-7); 7,91 (s, 1H, H-2); 8,04 (m, 1H, H-4).

RMN de ¹³C (CD₃OD, 50 MHz, δ):

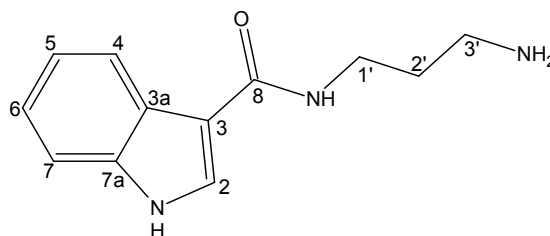
128,3 (C-2); 110,8 (C-3); 126,8 (C-3a); 120,7 (C-4); 122,6 (C-5); 121,2 (C-6); 111,9 (C-7); 136,6 (C-7a); 168,5 (C-8); 40,5 (C-1'); 37,4 (C-2').

IES – m/z (%):

203,98 (100%) [M+H]⁺, 187,02 (45%) [M-NH₃+1]⁺, 144,00 (52%) [M-C₂H₈N₂]⁺

* sinal sobreposto

3.2.4 - Preparação da N-(propil-3-amino)-1H-indol-3-carboxamida (5)



5

Para a preparação da N-(propil-3-amino)-1H-indol-3-carboxamida foram utilizados 2,8 mL (33,3 mmol) de 1,3-diaminopropano. O resíduo obtido após a remoção dos solventes (1,6789 g) foi submetido à primeira purificação por coluna de sílica gel, obtendo-se 13 frações. O grupo de frações 4–5 (150,0 mg) foi purificado utilizando-se uma coluna de Sephadex LH-20, eluída com uma mistura de clorofórmio e metanol (6:4), sendo obtidas 17 frações. A N-(propil-3-amino)-1H-indol-3-carboxamida (5) foi obtida a partir do grupo de frações 12-16 (111,7 mg, 42,0 % de rendimento), apresentando-se como um sólido amarelo gelatinoso (faixa de fusão = 240-244 °C).

3.2.4.1 - N-(propil-3-amino)-1H-indol-3-carboxamida (5)

FM/MM: C₁₂H₁₅N₃O / 217 g/mol.

Faixa de fusão: 240-244 °C.

IV (v_{máx.}, cm⁻¹):

1540 (deformação N-H, amina); 1614 (deformação N-H, amida II); 1622 (estiramento C=O, amida I); 2885 (estiramento simétrico C-H alifático); 3181 (estiramento simétrico N-H); 3336 (estiramento assimétrico N-H).

RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz, δ):

1,84 (q, $J=6\text{Hz}$, 2H, H-2'); 2,89 (t, $J=6\text{Hz}$, 2H, H-3'); 3,38 (t, $J=6\text{Hz}$, 2H, H-1'); 7,01–7,09 (m*, 1H, H-5); 7,01–7,09 (m*, 1H, H-6); 7,30 (m, 1H, H-7); 7,82 (s, 1H, H-2); 7,99 (m, 1H, H-4).

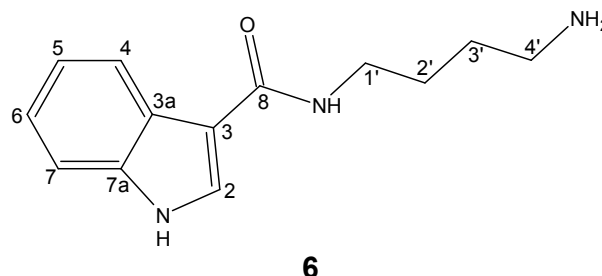
RMN de ^{13}C (CD_3OD , 50 MHz, δ):

128,3 (C-2); 110,0 (C-3); 125,9 (C-3a); 121,0 (C-4); 122,4 (C-5); 120,5 (C-6); 111,8 (C-7); 136,8 (C-7a); 167,8 (C-8); 37,2 (C-1'); 27,9 (C-2'); 35,6 (C-3').

IES – m/z (%):

218,04 (100%) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 201,31 (45%) $[\text{M}-\text{NH}_3+1]^+$, 144,16 (52%) $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_{10}\text{N}_2]^+$

* sinal sobreposto

3.2.5 Preparação da N-(butil-4-amino)-1H-indol-3-carboxamida (6)

A amida foi preparada utilizando-se 3,3 mL (33,3 mmol) de 1,4-diaminobutano, obtendo-se, após a remoção dos solventes, 1,5489 g de resíduo que foi cromatografado em coluna de sílica gel, sendo obtidas 9 frações. O grupo de frações 4-5 (360,1 mg) foi purificado em coluna de Sephadex LH-20 (clorofórmio/metanol, 6:4), sendo obtidas 36 frações. O produto foi isolado puro a partir do grupo de frações 30-32 (112,5 mg, 39 % de rendimento), apresentando-se como um sólido amarelo gelatinoso (faixa de fusão = 242-246 °C).

3.2.5.1 - N-(butil-4-amino)-1H-indol-3-carboxamida (6)

FM/MM: $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$ / 231 g/mol.

Faixa de fusão: 242-246 °C.

IV ($\nu_{\text{máx.}}$, cm^{-1}):

1541 (deformação N-H, amina); 1599 (sobreposição das bandas de estiramento C=O, amida I, e deformação N-H, amida II); 2926 (estiramento simétrico C-H alifático); 3229 (estiramento simétrico N-H).

RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz, δ):

1,32–1,58 (sl*, 2H, H-2'); 1,32–1,58 (sl*, 2H, H-3'); 2,68 (sl, 2H, H-4'); 3,15 (sl, 2H, H-1'); 6,89–6,92 (m*, 1H, H-5); 6,89–6,92 (m*, 1H, H-6); 7,19 (m, 1H, H-7); 7,73 (sl, 1H, H-2); 7,85 (m, 1H, H-4).

RMN de ^{13}C (CD_3OD , 50 MHz, δ):

128,0 (C-2); 110,5 (C-3); 125,9 (C-3a); 120,8 (C-4); 122,3 (C-5); 120,5 (C-6); 111,8 (C-7); 136,8 (C-7a); 167,8 (C-8); 39,3 (C-1'); 26,6 (C-2'); 24,8 (C-3'); 38,25 (C-4').

IES – m/z (%):

232,17 (100%) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 214,17 (15%) $[\text{M}-\text{NH}_3+1]^+$, 144,00 (8%) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2]^+$

* sinal sobreposto

Capítulo 4

Testes Biológicos

Cálculo do log P

4.1 – Avaliação das atividades antimicrobianas das amidas 2–6

Os testes foram realizados sob coordenação da Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi, do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, UFMG.

4.1.1 – Introdução

Os antibióticos são considerados como substâncias produzidas por microorganismos (fungos ou bactérias) que suprimem o crescimento de outros. A utilização intensa e incorreta destes fármacos leva continuamente ao surgimento de novos antibióticos no mercado. O ritmo de desenvolvimento de compostos bioativos deveria ser então intenso, mas, infelizmente, caiu drasticamente nas últimas décadas (Gilman, 2003). Daí a importância de se testar tanto produtos naturais, como aqueles obtidos de síntese como possíveis fontes de agentes anti-infecciosos.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana das amidas **2 – 6** foi utilizado o método de difusão em disco (método de Kirby-Bauer), utilizando os seguintes microorganismos: *Staphylococcus aureus* (Gram +) (ATCC 29212), *Bacillus cereus* (Gram +) (ATCC 11778), *Escherichia coli* (Gram -) (ATCC 25922), *Salmonella thymimurium* (Gram -) ATCC 14028 e *Candida albicans* (levedura) (9ATCC 18804).

4.1.2 – Metodologia

A avaliação da atividade antimicrobiana das amidas **2 – 6** foi feita de acordo com a metodologia descrita por Lana *et al.* (2006) e realizada no laboratório de microbiologia do DQ, UFMG.

4.1.2.1 – Preparo dos meios de cultura

Todos os meios foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, sendo autoclavados a 121 °C, por 15 minutos.

Ágar semi-sólido

- Ágar antibiótico
- Água destilada: qsp
- 7,5 mL/tubo.

Meio BHI

- BHI: 37,0 g/L
- Água destilada: qsp
- 2,0 mL/tubo.

Solução Salina

- NaCl: 9,0 g/L
- MgSO₄.7H₂O: 0,5 g/L
- Água destilada: qsp
- 4,5 mL/tubo.

4.1.2.2 – Metodologia de ensaio

A discos de papel estéreis, com diâmetro de 6,0 mm, foram adicionadas soluções de 2,0 g/L das amidas a serem testadas, de tal maneira que 100,0 µg de cada uma das amidas foram adicionados aos discos. Foram utilizados, como controle positivo, discos impregnados com clorafenicol (30,0 mg/disco), ativo para as espécies de bactéria utilizadas e nistatina (30 mg/disco), ativo para a espécie de levedura. Como controle negativo, foram empregados discos impregnados com o solvente utilizado na solubilização das amostras. Cada disco, depois de seco o solvente em estufa a 37 °C, foi colocado sobre placas de petri contendo 7,5 mL do meio solidificado, inoculado com as bactérias (0,3 mL da suspensão salina do microorganismo. Esta solução foi preparada da seguinte forma: inicialmente inocularam-se as culturas de microorganismos em tubos contendo 2,0 mL do meio BHI. Estes tubos, contendo os microorganismos no meio de manutenção, foram então incubados em estufa a 37° C, durante 18 horas. Foram retiradas alíquotas

destes meios e transferidas para uma cubeta contendo solução salina na quantidade necessária para que a transmitância da solução ficasse entre 74-75 % (600 nm) para os inóculos bacterianos e 75-76% (530 nm) para o inóculo do fungo). As placas contendo as amostras e os controles foram incubadas a 37 ° C por 48 horas. A sensibilidade dos microorganismos frente aos produtos foi avaliada pela medida do diâmetro do halo de inibição (em mm), quando formado, após o período de incubação. Foram consideradas ativas as amostras que causaram halos de inibição iguais ou superiores a 7 mm, já que os discos de papel apresentam diâmetro de 6 mm.

4.1.3 – Discussão dos resultados

Todas as amidas testadas não apresentaram atividade antimicrobiana sobre as espécies de microorganismos utilizadas uma vez que o halo de inibição observado não foi superior a 6 mm de diâmetro.

4.2 - Avaliação da atividade das amidas 2-6 sobre a germinação das sementes e o crescimento das raízes e do caule de plantículas de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola)

4.2.1 - Introdução

As estratégias para a descoberta de aleloquímicos (metabólitos responsáveis pelo fenômeno alelopático) são análogas àquelas utilizadas para a descoberta de substâncias bioativas na indústria farmacêutica e envolvem a avaliação da atividade de extratos brutos e substâncias puras sobre um determinado sistema biológico (bioensaio) e desde os trabalhos pioneiros da década de 40, numerosos ensaios têm sido desenvolvidos e utilizados.

Os bioensaios preliminares em laboratório precisam ser rápidos, econômicos e relevantes para o sistema em questão, sendo úteis para se estabelecer o potencial alelopático de uma substância pura ou um extrato, mas devendo ser seguidos de

estudos em estufas e em campo a fim de se constatar se as observações iniciais são reprodutíveis no meio natural (Duke *et al.* 2000; Vyvyan, 2002).

O ensaio para aleloquímicos mais amplamente utilizado é aquele que monitora a germinação e crescimento de plantículas (raiz e caule) de uma dada espécie. As sementes da espécie vegetal selecionada são geralmente colocadas sobre papel de filtro ou Agar em placa de Petri e tratadas com a solução do aleloquímico a ser testado em concentrações variadas (entre 10^{-3} e 10^{-9} mol/L). A germinação e o crescimento da raiz e do caule da plantícula são monitorados em relação a um controle (solução sem o aleloquímico).

A consideração mais importante no desenvolvimento de um bioensaio para o estudo alelopático é a seleção da espécie vegetal a ser testada. Espécies vegetais, denominadas "plantas indicadoras", são o fator crucial para a determinação acurada do impacto alelopático, nessa avaliação preliminar da atividade. *Lactuca sativa* L. (alface), *Raphanus sativus* L. (rabanete), *Lepidium sativum* (agrião) e *Allium cepa* (cebola), dentre outras espécies, têm sido as mais utilizadas nessa etapa da avaliação, principalmente devido à sua grande sensibilidade e sua alta taxa de germinação. As ervas daninhas, que seriam as candidatas de escolha nessa avaliação inicial, visando a detecção de potenciais herbicidas, só são testadas após a atividade ser constatada sobre essas espécies citadas acima, devido ao fato de apresentarem geralmente uma baixa taxa de germinação (Macías *et al.*, 2000).

4.2.2 - Metodologia

A avaliação da atividade alelopática das amidas **2-6** foi feita de acordo com a metodologia descrita por Macías *et al.* (2000) para um modelo de monocotiledônea, cebola, e um de dicotiledônea, alface.

Sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) variedade Grand Rapids foram obtidas da marca Isla. Todas as sementes menores ou danificadas foram desprezadas. Foram adicionadas 25 sementes de alface sobre cada placa de petri de 100 mm, contendo papel Whatman nº 1, de 90 mm, e 10 mL das soluções teste (10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} mol/L das substâncias a serem testadas) e da solução controle (branco). As

soluções teste foram preparadas por dissolução das substâncias em água destilada tamponada com 10 mmol/L do ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico e seu pH ajustado para 6,0-6,5 com solução de NaOH. As substâncias **2-6**, solúveis em água, foram dissolvidas na própria solução tampão. Os brancos foram a água destilada tamponada. As concentrações mais baixas que 10^{-4} mol/L, nas soluções teste, foram obtidas por diluição desta. O teste foi realizado em triplicata para cada concentração e para o controle. As placas de Petri foram fechadas e incubadas, no escuro, a 25 °C por 5 dias. Depois deste tempo, as placas foram abertas e o comprimento de cada raiz e caule medidos.

Para a espécie *Allium cepa* (cebola) sementes da variedade Crioula foram adquiridas da marca TOPSEED Garden. O procedimento do bioensaio foi idêntico ao descrito anteriormente para a alface exceto pelo tempo de incubação, que para a cebola foi de 7 dias (Macías *et al.*, 2000).

4.2.3 – Tratamento Estatístico

O cálculo da porcentagem de crescimento em relação ao branco foi feito utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ crescimento} = \frac{Am - B}{B} \times 100\% \quad (1)$$

onde **Am** é o valor médio da germinação ou do crescimento da amostra e **B** o valor médio do crescimento do branco. Considerando-se esta equação fica claro que valores relacionados a efeitos estimulatórios estão representados acima da linha de base e que os relacionados a efeitos inibitórios abaixo dela.

O erro foi estimado para a porcentagem de crescimento, em relação ao branco, para a alface e cebola utilizando-se o método das derivadas. A equação do erro é, portanto:

$$\Delta (\% \text{ crescimento}) = \left| \left(\frac{1}{B} \Delta Am - \frac{Am}{B^2} \Delta B \right) \times 100\% \right| \quad (2)$$

onde os parâmetros **Am** e **B** são os mesmos da equação anterior e ΔAm e ΔB são os erros estatísticos calculados para a amostra e para o branco, respectivamente, considerando-se um intervalo de confiança de 95%.

4.2.4 - Discussão dos Resultados

4.2.4.1 – Efeito das amidas 2-6 sobre *Lactuca sativa*

Os efeitos das amidas **2-6** sobre a germinação e o crescimento da raiz e do caule de *L. sativa* (alface) estão apresentados nas Figuras **4.1** e **4.2**.

As amidas **3-6**, bem como o ácido indol-3-carboxílico, apresentaram uma atividade estimulatória sobre a germinação da alface em torno de 10-15%, em todas as concentrações. A amida **2**, derivada da morfolina, inibiu fortemente a germinação da alface: 73% de inibição, para a concentração 10^{-4} mol/L e também estimulou de maneira considerável (27% e 42%, para as concentrações 10^{-6} mol/L e 10^{-8} mol/L, respectivamente). De acordo com Macías *et al.* (2000), substâncias testadas em bioensaios alelopáticos padrão tendem a apresentar efeitos inibitórios (sendo, assim, potenciais herbicidas) apenas a concentrações mais altas; a concentrações mais baixas, o efeito inibitório geralmente diminui, podendo às vezes chegar até a um efeito estimulatório. Pode-se observar que foi este o efeito apresentado pela amida **2**, cuja atividade inibitória sobre a germinação diminuiu proporcionalmente à concentração.

As amidas **2-6** apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento do caule de *L. sativa*, preponderantemente, sendo que apenas a amida **5** (derivada da 1,3-diaminopropano) apresentou um ligeiro estímulo. Os maiores valores de inibição foram observados com a N-(etil-2-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (**4**) que apresentou 17%, 28% e 38% de inibição para as concentrações de 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} mol/L, respectivamente. Curiosamente, o efeito desta amida foi oposto àquele comumente observado por Macías *et al.* (2000), citado no parágrafo anterior: aqui a inibição cresceu de maneira inversamente proporcional à concentração, um resultado bastante interessante, pois no caso de uma potencial utilização desta molécula como herbicida, ela poderia ser utilizada em muito baixas concentrações. Outros resultados expressivos foram 24% de atividade inibitória do derivado da 1,4-diaminobutano (**6**) para a concentração de 10^{-8} mol/L e também da amida **2** para a concentração de 10^{-4} mol/L.

É interessante observar que, diferentemente dos produtos, o material de partida (**1**) apresentou atividade estimulatória sobre o crescimento do caule da alface

para todas as concentrações utilizadas, sendo o valor máximo igual a 12% de estimulação para a concentração de 10^{-8} mol/L.

O ácido indol-3-carboxílico (**1**) também estimulou o crescimento das raízes das plantículas da alface, mas apenas nas menores concentrações. A 10^{-4} mol/L o efeito foi inibitório. As diluições contendo as amidas **2-6** apresentaram maior número de resultados estimulatórios sobre o crescimento da raiz da alface que sobre o caule, apesar destes terem sido menos intensos que os resultados de inibição. O derivado da morfolina (**2**) foi novamente o mais fortemente inibidor, também 73%, para a concentração de 10^{-4} mol/L, não tendo apresentado nenhum efeito nas outras duas concentrações. O derivado da putrecina (**6**) também inibiu consideravelmente o crescimento da raiz da alface, 46%, a 10^{-4} mol/L. A monoamida derivada da 1,3-diaminopropano (**5**) apresentou ligeira atividade estimulatória sobre o crescimento da raiz, em todas as três concentrações, e de maneira diretamente proporcional à concentração.

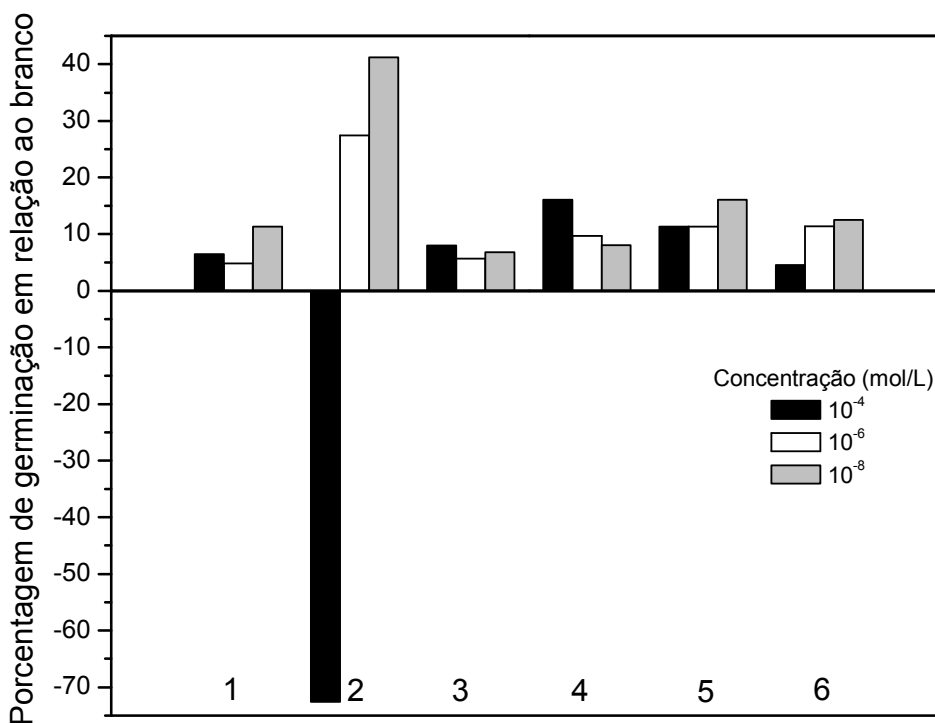


Figura 4.1 - Efeito do ácido indol-3-carboxílico (**1**) e das amidas **2-6** sobre a germinação de *L. sativa* (alface).

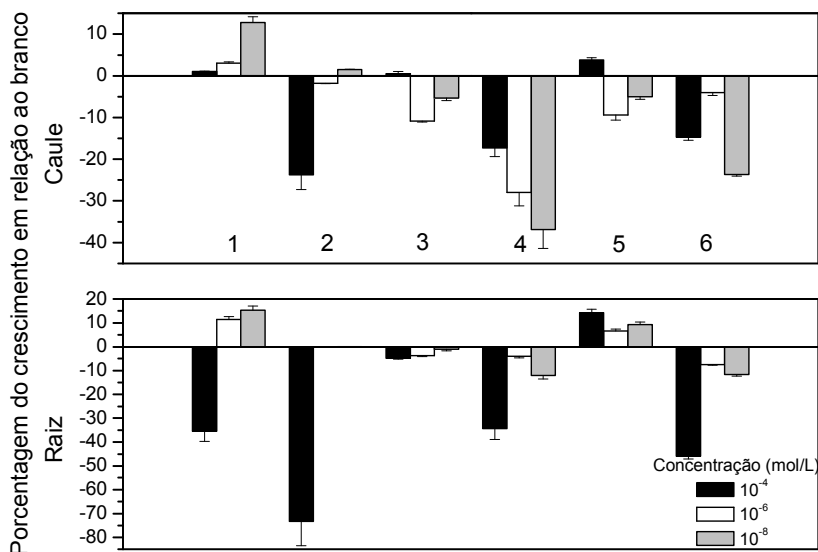


Figura 4.2 - Efeito do ácido indol-3-carboxílico (1) e das amidas 2-6 sobre o crescimento da raiz e do caule de plantículas de *L. sativa* (alface).

4.2.4.2 – Efeito das amidas 2-6 sobre *Allium cepa*

Os efeitos das amidas 2-6 sobre a germinação e o crescimento da raiz e do caule de *Allium cepa* (cebola) estão apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4.

O efeito das amidas 2-6 sobre a germinação da cebola foi totalmente estimulatório para todas as concentrações testadas, mesmo a amida 2. Os valores de estimulação variaram entre 25-30% para as amidas 2, 4 e 5 e entre ~5-20% para as amidas 3 e 6. Já o ácido indol-3-carboxílico (1) apresentou 10% de atividade inibitória para as concentrações 10⁻⁴ mol/L e 10⁻⁶ mol/L e 16% de atividade estimulatória para a concentração de 10⁻⁸ mol/L.

Em relação ao crescimento das plantículas de *Allium cepa* observou-se um padrão de atividade análogo tanto sobre o caule quanto sobre a raiz para quase todas as amidas. A amida 2, por exemplo, mostrou uma inibição de 68% para o caule e de 48% para a raiz na concentração de 10⁻⁴ mol/L, sendo que para as outras duas concentrações os valores foram bastante semelhantes, em torno de 20%. As amidas 4 e 5 mostraram menor atividade inibitória para ambos, caule e raiz, em relação a 2, mas o padrão pra ambos foi absolutamente semelhante. No caso destas

duas últimas amidas também foram observadas atividades atípicas para a concentração intermediária, 10^{-6} mol/L, menos inibitória que a concentração 10^{-8} mol/L no caso da amida **4** e mesmo ligeiramente estimulatória, no caso da amida **5**.

Outra correlação interessante para a atividade das monoamidas **4**, **5** e **6** sobre *A. cepa* é que a atividade inibitória diminuiu à medida que a massa molecular aumentou. Para a alface esta tendência não foi observada.

Contudo, o resultado mais interessante observado foi a grande diferença de atividade entre as amidas **2** e **3** sobre as espécies vegetais testadas. A substituição do oxigênio do anel morfolínico em **2** por um nitrogênio em **3** diminuiu drasticamente a atividade inibitória do composto.

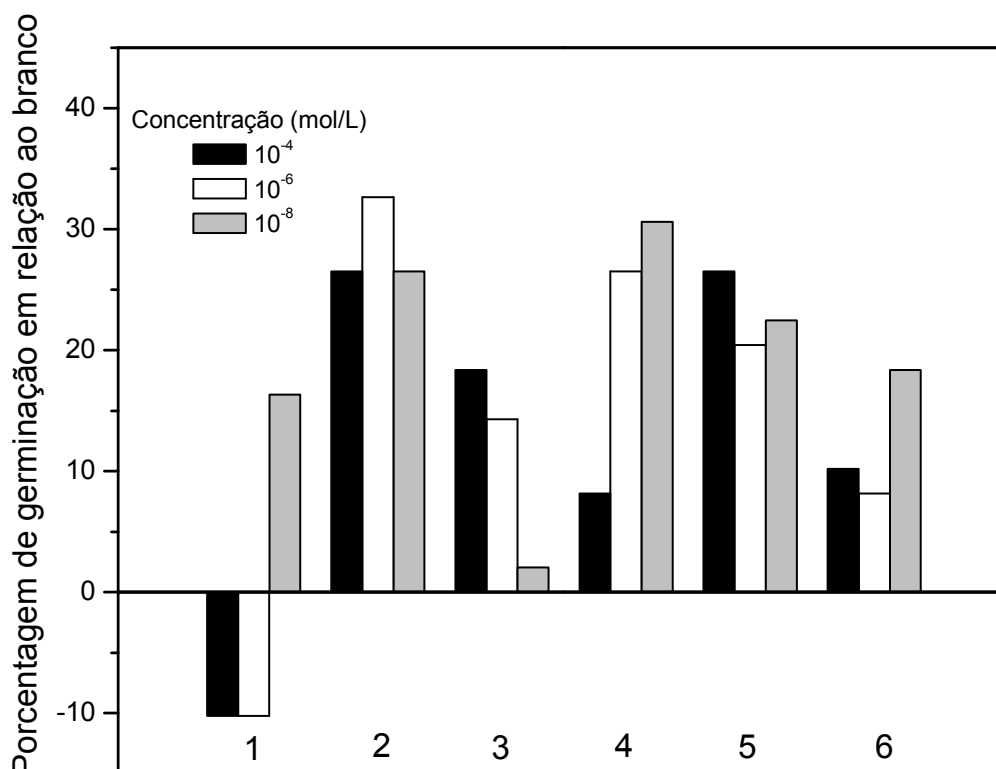


Figura 4.3 - Efeito do ácido indol-3-carboxílico (**1**) e das amidas **2-6** sobre a germinação de *A. cepa* (cebola).

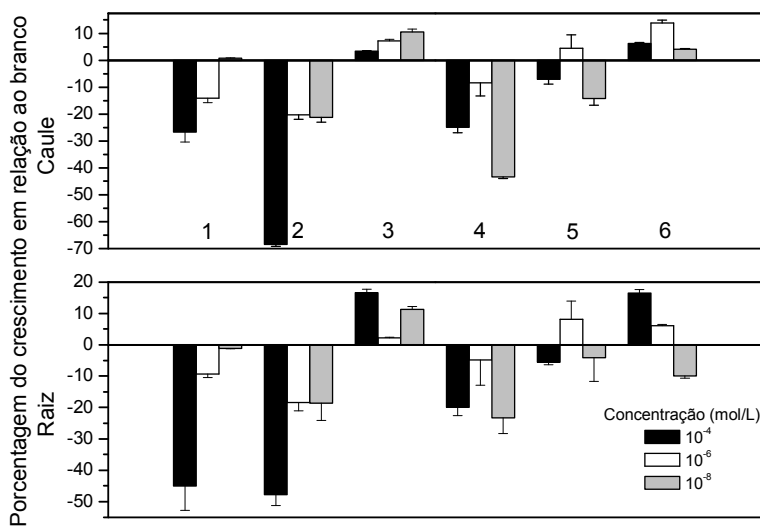


Figura 4.4 - Efeito do ácido indol-3-carboxílico (1) e das amidas 2-6 sobre o crescimento da raiz e do caule de plantúculas de *A. cepa* (cebola).

Concluindo, pode-se observar que:

- a atividade da amida **2**, derivada da morfolina, foi fortemente inibitória sobre o crescimento da raiz e do caule das duas espécies testadas, chegando a 73% de inibição em relação ao branco, na concentração de 10⁻⁴ mol/L;
- quando se compara as atividades das monoamidas **2-6** com aquelas do ácido indol-3-carboxílico(1) observa-se que a presença da função amida intensificou a atividade inibitória sobre caule e raiz para as duas espécies estudadas, em todas as concentrações, principalmente para *L. sativa*;
- o efeito dessas amidas sobre a germinação foi predominantemente estimulatória, exceto a amida **2** que inibiu fortemente a germinação de *L. sativa* a 10⁻⁴ mol/L;
- todas as amidas apresentaram uma maior atividade estimulatória sobre o crescimento das plantúculas da cebola em comparação com o ácido **1**;
- o comportamento observado para a maioria das amidas está de acordo com a conclusão descrita por Macías *et al.* (2000): a atividade inibitória tende a diminuir com a diluição;

- mas uma maior atividade inibitória em diluições maiores (Macías *et al.*, 2000) foi observada para algumas amidas: este efeito foi mais pronunciado na amida **4** sobre o caule de *A. sativa*;
- a substituição do átomo de nitrogênio da amina no anel piperazínico do produto **3** por um átomo de oxigênio no anel morfolínico do produto **2** potencializou a atividade alelopática.

4.3 – Cálculo do logaritmo do coeficiente de partição *n*-octanol-água para o ácido indol-3-carboxílico e para as amidas 2–6.

4.3.1 – Introdução

A lipofilia, parâmetro relacionado com a capacidade da molécula de transpor as membranas biológicas é um parâmetro de extrema importância que determina a biodisponibilidade de um composto no organismo. Em seu caminho até o sítio de ação, a molécula tem que se distribuir entre as membranas de natureza lipídica e os fluidos biológicos, de caráter aquoso. Um parâmetro utilizado para se avaliar a lipofilia é a constante de partição *n*-octanol-água (*P*). Estudos de relação estrutura-atividade de agroquímicos e fármacos utilizam este valor como fator crucial para o desenvolvimento de novas moléculas, além disso, este parâmetro é muito importante do ponto de vista ambiental, pois indica a extensão que um composto químico pode se acumular em organismos aquáticos (Danielsson e Zhang, 1996).

Com respeito ao desenvolvimento dos pesticidas em geral, e dos herbicidas em particular, a importância do log *P* se manifesta no comportamento dos mesmos na planta. Um exemplo disso é a absorção dos agroquímicos pelas folhas: devido à natureza lipídica da cera epicuticular que cobre esta parte da planta o aumento da absorção do agroquímico se dá com o aumento do log *P*; no entanto este valor não aumenta indefinidamente, tendendo a um máximo, uma vez que a penetração na folha não depende unicamente do log *P* (Liu e Wang, 2007). Geralmente os agentes xenobióticos são absorvidos pela planta à medida que o log *P* se aproxima de 2 e acima de 4 praticamente nenhum agente xenobiótico entra pelo xilema (Edgington, 1981). Por outro lado, para um transporte eficiente de agentes xenobióticos pelo

floema a solubilidade em água da substância bioativa deve ser elevada, valores de log P próximos a zero. Assim, substâncias altamente lipofílicas ($\log P > 4$) praticamente não são transportadas sistemicamente enquanto que as pouco lipofílicas ($\log P < 0$) não conseguem cruzar a membrana citoplasmática (Macías *et al.*, 2005a). A maioria dos herbicidas possui log P entre 1 e 3 e os inseticidas, mais lipofílicos, possuem log P entre 4 e 6 (Edgington, 1981).

Com respeito aos requisitos físico-químicos que regulam o comportamento de um herbicida, ou de uma molécula bioativa, eles não dependem exclusivamente da estrutura química deste último. Estas propriedades são amplamente estudadas no campo da química farmacêutica com a intenção de correlacioná-las com a atividade biológica que apresentam e podem ser resumidas na chamada Regra de Lipinski, em que uma molécula é mal absorvida ou permeada se: a) apresentar cinco átomos doadores de ligação de hidrogênio; b) 10 átomos aceptores de ligação de hidrogênio; c) massa molecular maior que 500 Da e d) log P calculado maior que 5. (Macías *et al.*, 2005a). Tice (2001) mostrou que a regra dos cinco de Lipinski também pode ser utilizada no desenvolvimento de novos herbicidas e inseticidas.

4.3.2 – Metodologia

Os valores de log P para as amidas **2-6** e para o ácido indol-3-carboxílico (**1**) foram calculados utilizando-se o programa ACDLabs 6.0 (versão de 2002).

4.3.3 – Resultados e Discussão

Os valores calculados para o ácido **1** e para as amidas **2-6** estão apresentados na tabela 4.1, página 82.

Tabela 4.1 – Valores de log P calculados utilizando-se o programa ACDLabs 6.0 para o ácido **1** e para as amidas **2-6**

	log P
1	1,99 ± 0,30
2	-0,18 ± 0,79 *
3	-0,22 ± 0,85 *
4	0,37 ± 0,56
5	0,81 ± 0,36
6	0,89 ± 0,56

* os altos valores de incerteza são devido à interações aromáticas que o programa não foi capaz de calcular.

Uma vez que o programa utilizado não foi capaz de calcular o log P das amidas **2** e **3** de maneira confiável, nada se pode dizer sobre os valores obtidos, o programa não possuía na sua base de dados parâmetros suficientes para o cálculo das interações do sistema aromático com os anéis da morfolina, em **2**, e da piperazina, em **3**. Para as amidas **4-6** é interessante observar que a função amida nos produtos aumentou a hidrofobicidade em mais de 12 vezes em relação ao ácido **1**. Assim, segundo Macías e colaboradores (2005a), as amidas **4-6** possuem um valor de constante de partição n-octanol-água aceitável para um herbicida.

Conclusões

Conclusões

Neste trabalho foram obtidas 5 monoamidas, sendo 4 inéditas (**3-6**):

1. N-morfolina-1*H*-indol-3-carboxamida (**2**)
2. N-piperazino-1*H*-indol-3-carboxamida (**3**)
3. N-(etil-2-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (**4**)
4. N-(propil-3-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (**5**)
5. N-(butil-4-amino)-1*H*-indol-3-carboxamida (**6**)

via reação de monoacilação do cloreto do ácido indol-3-carboxílico com aminas. As aminas empregadas foram a morfolina e as diaminas simétricas: 1,2-diaminoetano, 1,3-diaminopropano e 1,4-diaminobutano (putrecina). As condições utilizadas nesta reação levou à obtenção apenas das monoamidas, não tendo sido isolado nenhum produto de di-acilação, produtos comumente obtidos nas reações de acilações de diaminas.

Estas monoamidas foram submetidas a teste de atividade antimicrobiana, pelo método de disco. Foram utilizadas as bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram +) (ATCC 29212), *Bacillus cereus* (Gram +) (ATCC 11778), *Escherichia coli* (Gram -) (ATCC 25922), *Salmonella thyphimurium* (Gram -) (ATCC 14028) e a levedura *Candida albicans* (9ATCC 18804). Como controle positivo foi utilizado o cloranfenicol e nistadina. Nenhuma das amidas apresentou halo de inibição superior a 6 mm de diâmetro, não apresentando, portanto nenhuma atividade.

Os cinco produtos de monoacilação também foram submetidos a testes de atividade fitotóxica (alelopática) sobre duas espécies indicadoras: *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola). Observou-se, quando as atividades das monoamidas **2-6** e aquela do ácido indol-3-carboxílico (**1**) foram comparadas, que a presença da função amida intensificou a atividade inibitória sobre o crescimento do caule e da raiz, principalmente para *L. sativa*. Os estímulos sobre o crescimento da raiz e do caule em comparação com o ácido **1** foram predominantes para *A. cepa*. Quanto à germinação, houve estímulo em relação a **1**, com exceção da amida **2**.

A amida **2**, derivada da morfolina, apresentou grandes percentagens de inibição, tanto sobre *L. sativa* quanto sobre a *A. cepa*, a 10^{-4} mol/L: 73% sobre a

germinação das sementes e sobre o crescimento do caule de *L. sativa*; ~70% e ~50% sobre o crescimento do caule e da raiz de *A. cepa*, respectivamente.

O valor de log P calculado para as amidas **4-6** utilizando-se o programa ACDLabs 6.0 está dentro da faixa aceitável para um herbicida, para as amidas **2 e 3** este parâmetro não foi calculado de maneira confiável.

***Referências
Bibliográficas***

Referências bibliográficas

Andrade, C. A.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G.; Ferronato, M. L.; Peitz, C.; Cunico, M.; Dias, J. F. G.; Balestrin, L.; Kerber, V. A. Efeitos alelopáticos das flores da *Acacia podalyriaefolia* A. CUNN. *Visão Acadêmica*, 4, 93-98, 2003.

Agurell, S.; Nilsson, J. L. G. Biosynthesis of psilocybin part II: incorporation of labeled triptamine derivatives. *Acta Chemica Scandinavica*, 22, 1210-1218, 1968.

Assis, C. M.; Moreno, P. R. H.; Young, M. C. M.; Campos, I. P. A.; Suffredini, I. B. Isolamento e avaliação da atividade biológica dos alcalóides majoritários de *Tabernaemontana angulata* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 626-631, 2009.

Azevedo, M. B. M.; Alderete, J.; Rodriguez, J. A.; Souza, A. O.; Rettori, D.; Torsoni, M. A.; Faljoni-Alario, A.; Haun, M.; Durán, N. Biological Activities of Violacein, a New Antitumoral Indole Derivative, in an Inclusion Complex with β -Cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 37, 93-101, 2000.

Bajguz, A.; Piotrowska, A. Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70, 957-969, 2009.

Bauer, N.; Blaschke, U.; Beutler, E.; Gross, E. M.; Siems, K. J.; Siems, K.; Hilt, S. Seasonal and interannual dynamics of polyphenols in *Myriophyllum verticillatum* and their allelopathic activity on *Anabaena variabilis*. *Aquatic Botany*, 91, 110-116, 2009.

Bidlack, W. R.; Omaye, S. T.; Meskin, M. S.; Topham, D. K. W. *Phytochemicals as bioactive agents*. 1st Edition, Technomic Publication, 271p, 2000.

Chu, Chun; Ho, Chin-Li. Action mechanism of auxin. *Kexue Nongye*, 23, 283-90, 1975.

Corrêa, M. F. P.; Melo, G. O.; Costa, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 785-797, 2008.

Couée, I.; Hummel, I.; Sulmon, C.; Gouesbet, G.; El Amrani, A. Involvement of polyamines in root development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76, 1-10, 2004.

Cutilo, F.; D'Abrosca, B.; Greca, M. D.; Zarrelli, A. Chenoalbicin, a Novel Cinnamic Acid Amide Alkaloid from *Chenopodium album*. *Chemistry Biodiversity*, 1, 1579-1583, 2004.

Dalton, D. R. *The Alkaloids: the fundamental chemistry, a biogenetic chemistry*. Marcel Dekker, 789p, 1979.

Danielsson, L.; Zhang, Y. Methods for determining n-octanol-water partition constant. *Trends in Analytical Chemistry*, 15, 188-196, 1996.

Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 2nd Edition. John Wiley, 507p., 2002.

Donnici, C. L.; Almeida, V. L. ; Leitão, A.; Reina, L. C. B.; Montanari, C. A. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. Química Nova, 28, 118-129, 2005.

Duke, S. O.; Dayan, F. E.; Rimando, A. M. Natural products as tools for new weed management. Natural Products Utilization Research Unit, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture (USDA), 1-11, 1999.

Duke, S. O.; Dayan, F. E.; Romagni, J. G.; Rimando, A. M. Natural Products as sources of herbicides: current status and future trends. Weed Research, 40, 99-111, 2000.

Edgington, L. V. Structural requirements of system fungicides. Annual Reviews Phytopathol, 19, 107-124, 1981.

Fumagali, E.; Gonçalves, R. A. C.; Machado, M. F. P. S.; Vidoti, G. J.; Oliveira, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma Elisângela*. Revista Brasileira de Farmacognosia.18, 627-641, 2008.

Gantar, M.; Berry, J. P.; Thomas, S.; Wang, M.; Perez, R.; Rein, K. S. Allelopathic activity among cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. Federation of European Microbiological Societies, 64, 55–64, 2008.

Gigant, B.; Wang, C.; Ravelli, R. B. G.; Roussi, F. ; Steinmetz, M. O. ; Curmi, P. A. ; Sobel, A.; Knossow, M. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. Nature, 435, 519-522, 2005.

Gilman, A. G. Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 10^a Edição. Rio Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., 1647p., 2003.

Goldmann, A.; Message, B.; Tepfer, D.; Molyneux, R. J.; Duclos, O.; Boyer, F. D.; Pan, Y. T.; Elbein, A. D. Biological Activities of the Nortropane Alkaloid, Calystegine B2, and Analogs: Structure-Function Relationships. Journal of Natural Products, 59, 1137-1142, 1996.

Gottlieb, H.G.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of common laboratory solvents as trace impurities, Journal of Organic Chemistry, 62, 7512-7515, 1997.

Gutsche, B.; Herderich, M. High-performance liquid chromatography – electrospray ionisation - tandem mass spectrometry for the analysis of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline derivatives. Journal of Chromatography, 767, 101-106, 1997.

Hagemeyer, J. ; Schneider, B. ; Oldham, N. J.; Hahlbrock, K. Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. Proc. Natl. Academy Sa. U.S.A., 98, 753-58, 2001.

Heda, L. C.; Sharma, R.; Pareek, C.; Chaudhari, P. B. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Derivatives of 5-Substituted Indole Dihydropyrimidines. E-Journal of Chemistry, 6, 770-774, 2009.

Hyaric, M.; Almeida, M. V.; Souza, M. V. N. Síntese e reatividade de azaindóis: aplicações na preparação de moléculas de interesse biológico. Química Nova, 25, 1165-1171, 2002.

Inderjit, D. S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy. Planta, 214, 529-539, 2003.

Kalac, P.; Krausová, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. Food Chemistry, 90, 219-230, 2005.

Kim, K. U.; Park, S. K.; Koh, J. C.; Lee, J.; Shin, D. H.; Ma, H. J. Allelopathic potential of K21, selected as a promising allelopathic rice. Weed Biology and Management ,6, 189–196, 2006.

Kobayashi, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. Weed Biology and Management, 4, 1-7, 2004.

Kumura, N.; Izumi, M.; Nakajima, S.; Shimizu, S.; Kim, H.; Wataya, Y.; Baba, N. Synthesis and biological activity of fat acid derivatives of quinine. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 69, 2250-2253, 2005.

Kutschy, P.; Dzurilla, M.; Takasugi, M.; Sabová, A. Synthesis of some analogs of indole phytoalexins brassinin ana methoxybrassenin B and their positional isomers. Collection Czech Chemical Communication, 64, 348-362, 1999.

Lana, E. J. L.; Carazza, F.; Takahashi, J. A. Antibacterial Evaluation of Some New 2-Aryl-3,5-Dimethoxy-1,4-Benzoquinone Derivatives. Journal of Agricultural Food Chemistry, 54, 2053-2056, 2006.

Lovett, J. V.; Ryuntyu, M. Y., Liu, D. L. Allelopathy, chemical communication and plant defense. Journal of Chemical Ecology, 15, 1989.

Lima, D. M.; Silva, C. L.; Ritter, M.; Biasi L. A.; Zanette, F.; Zuffellato-Ribas, K. C. Substratos e auxinas no enraizamento de estacas caulinares de espinheira-santa. Scientia Agraria, 9, 85-89, 2008.

Liu, Z. Q.; Wang, C. J. Foliar uptake of pesticides – Present status and future challenge. Pesticide Biochemistry and Physiology, 87, 1-8, 2007.

Macabeo, A. P.; Allejandro, G. J. D.; Hallare, A. V.; Vidar, W. S.; Villaflores, O. B. Phytochemical Survey and Pharmacological Activities of the Indole Alkaloids in the

-
- Genus *Voacanga Thouars* (Apocynaceae) – An Update. *Phcognosis Review*, 3, Issue 5, 132-142, 2009.
- Macías, F. A.; Castellano, D.; Molinillo J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 48, 2512-2521, 2000.
- Macías, F.A.; Chinchilla, N.; Varela, R.M.; Molinillo, J.M.G. Bioactive steroids from *Oryza sativa* L. *Steroids*, 71, 603-608, 2006a.
- Macías, F. A.; Molinillo, J. M. G.; Varela, R. M.; Galindo, J. C. G. Review Allelopathy: a natural alternative for weed control. *Pest Management Science*, 63, 327-348, 2007.
- Macías, F. A.; Velasco, R. F.; Castellano, D.; Galindo, J. C. G. Application of Hansch's Model to Guaianolide Ester Derivatives: A Quantitative Structure-Activity Relationship Study. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 3530-3539, 2005a.
- Macías, F. A.; Siqueira, J. M.; Chinchilla, N.; Marin, D.; Varela, R. M.; Molinillo, J. M. G. New Herbicides Models from Benzoxazinones: Aromatic Ring Functionalization Effects. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 54, 2006b.
- Mallik, M. A. B.; Williams, R. D. Allelopathic growth stimulation of plants and microorganisms. *Allelopathy Journal*, 16, 175-198, 2005.
- Mander, L. N. The chemistry of gibberellins: an overview. *Chemical Reviews*, 92, 573-612, 1992.
- Marize, T. L. P. P.; Moacir, G. P.; Maíke, H. Q.; Rosendo, A. Y. Potencial de atividade alelopática de *Gleichenia pectinata* Willd. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 33, 2, 1998.
- Marchi, I.; Rebelo, R. A.; Rosa, F. A. F.; Maiochi, R. A. Síntese e avaliação da propriedade de crescimento vegetal de compostos indólicos derivados do safrol. *Química Nova*, 30, 763-767, 2007.
- Mée, S. ; Pierré, A. ; Markovits, J. ; Atassi, G. ; Jacquemim-Sablon, A.; Saucier, J. S16020-2, a New Highly Cytotoxic Antitumor Olivacine Derivative: DNA Interaction and DNA Topoisomerase II Inhibition. *Molecular Pharmacology*, 53, 213 – 220, 1998.
- Müller, J. L.; Hilgenberg, W.; Epstein, E. The in vitro biosynthesis of indole-3-butyric acid in maize. *Phytochemistry*, 40, 61-68, 1995.
- Nakano, H.; Nakajima, E.; Fujii, Y.; Shigemori, H.; Hasegawa, K. Structure-activity relationships of alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.). *Plant Growth Regulation*, 44, 207-210, 2004.
- Oberhaus, L.; Briand, J. F.; Humbert, J.F. Allelopathic growth inhibition by toxic, bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Federation of European Microbiological Societies*, 66, 243-249, 2008.

Ono, E. O.; Rodrigues, J. D.; Rodrigues, S. D. Interações entre auxinas e boro no enraizamento de estacas de camélia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 4, 107-112, 1992.

Pandey, S.; Ranade, S. A.; Nagar, P. K.; Kumar, N. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *Journal of Bioscience*, 25, 291–299, 2000.

Park, C. M.; Kim, S. Y.; Park, W. K.; Park, N. S.; Seong, C. M. Synthesis and structure-activity relationship of 1H-indole-3-carboxylic acid pyridine-3-ylamides: a novel series of 5-HT_{2C} receptor antagonists. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 18, 3844-3847, 2008.

Pereira, R. G. P. Obtenção de amidas derivadas de diterpenos caurânicos, para serem testados quanto à sua atividade alelopática, citotóxica e anti-microbiana. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX, UFMG. Tese de mestrado, 151p., 2007.

Popov, N. V. Study an optimal conditions and suitability of some wheat cultivars in Bulgaria for determining the activity of indole auxins inhibitors. *Higher Institute of Agriculture*, 5, 39-44, 1979.

Pouilhes, A.; Langlois, Y.; Chiaroni, A. First synthesis of marine alkaloid (±)-bengacarboline. 50, 1522-67, 2003.

Rademacher, W. Growth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annual Review in Plant Physiology. Plant Molecular Biology*, 51, 501-531, 2000.

Rengefors, K.; Legrand, C. Broad allelopathic activity in *Peridinium aciculiferum* (Dinophyceae). *European Journal of Phycology*, 42, 341-349, 2007.

Riby, J. E.; Feng, C.; Chang, Y. C.; Schaldach, C. M.; Firestone, G. L.; Bjeldanes, L. F. The major cyclic trimeric product of indole-3-carbinol is a strong agonist of the estrogen receptor signaling pathway. *Biochemistry*, 5, 910–918, 2000.

Rimando, A. M.; Olofsdotter, M.; Dayan, F. E.; Duke, S. O. Searching for Rice Allelochemicals: An Example of Bioassay-Guided Isolation. *Agronomy*, 93, 16–20, 2001.

Rizvi, S. J. H.; Rizvi, V. Allelopathy. Basic and applied aspects. Chapman and Hall, 1992.

Sarr, D., Coly, A; Douabalé, S. E.; Tine, A.; Traoré, S.; Diallo, N. Photodegradation kinetics of some indolecarboxylic acids and their regulation effects on plant growth (groundnut and haricot bean). *Talanta*, 60, 571-79, 2003.

Sears, R. B.; Carpenter, R. A.; Whitlock, C. R. A general synthesis of tris-indole derivatives as potencial iron chelators. *Molecules*, 10, 488-491, 2005.

Shu-Ming Li. Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological

activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis. *Natural Products*, 27, 57–78, 2010.

Shen, Tsung-Ying. Indolecarboxylic acids. Número da patente: US 3316267. 1967.

Silva, Z. L. Alelopatia e defesa em plantas. *Boletim Geográfico*, 36, 90-96, 1978.

Siverstein, R. M., Webster, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC Editora S. A., 2006, 490p.

Simões, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2003.

Souza Filho, A. P. S. Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólicos de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). *Planta Daninha*, 20, 357-364, 2002a.

Souza Filho, A. P. S.; Alelopatia: principios básicos e aspectos gerais. 1ª edição, Embrapa, 131-154, 2002b.

Stanley, M.R. Preparative biotransformations. *Journal Chemical Society, Perkin Trans.1*, 1-21,1999.

Sundar, L.; Chang, F. N. Antimicrobial activity and biosynthesis of indole antibiotics produced by *Xenorhabdus nematophilus*. *Journal of General Microbiology*, 139, 3139-3148, 1993.

Tan, J.; Pawel, B.; Jikai, L.; Bernd, S.; Ales, S.; Klaus, H. Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry*, 65, 691-699, 2004.

Tan, R. X.; Zou, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites, *R. X. Natural Products*, 18, 448–459, 2001.

Tice, C. M. Selecting the right compounds for screening: does Lipinski's Rule of 5 for pharmaceuticals apply to agrochemicals. *Pest Management Science*, 57, 3–16, 2001.

Tu, M., Hurd, C.A. & Randall, J.M. 2001. *Weed Control Methods Handbook: The Nature Conservancy*. [http:// tncweeds.ucdavis.cdu](http://tncweeds.ucdavis.cdu), version april 2001.

Usui, K. Metabolism and selectivity of rice herbicides in plants. *Weed Biology and Management*, 1, 137-146, 2001.

Vasil'evich, I. A.; Ivashchenko, A. A.; Kisil, V. M.; Matusovich, O.; Savchuk, N. F. Esters of substituted 5-hydroxy-1H-indol-3-carboxylic acid, pharmaceutical compositions thereof useful as antiviral agents. *Drug Data*, 31, 368, 2009.

Vieira, H. S., Takahashi, J. A., Pimenta, L. P. S., Boaventura, M. A. D. Effects of kaurane diterpene derivatives on germination and Growth of *Lactuca sativa* Seedlings. Zeitschrift für Naturforschung C, 60, 72-78, 2005.

Vyvyan, J.R. Allelochemicals for new herbicides and agrochemicals. Tetrahedron, 58, 1631-1646, 2002.

Walden, R.; Cordeiro, A.; Tiburcio, A. F. Polyamines: Small Molecules Triggering Pathways in Plant Growth and development. Plant Physiology, 113, 1009-1013, 1997.

Weir, T. L.; Park, S.W.; Vivanco, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. Current Opinion in Plant Biology, 7, 472-479, 2004.

Xuan, T. D.; Shinkichi, T.; Khanh, T. D; Min, C. I. Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. Crop Protection, 24, 197-206, 2005.

Young, C. C.; Chen, L. F. Polyamines in humic acid and their effects on radical growth of lettuce seedlings. Plant and Soil, 195, 143-149, 1997.

Zhao, N.; Miyako, K.; Makoto, K.; Takayuki, T.; Keiko, Y.; Noriyuki, K.; Mami, Y.; Mariko, K.; Kazuki, S.; Hiromitsu, T. Metabolomics-oriented isolation and structure elucidation of 37 compounds including two anthocyanins from *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry, 70, 1017-29, 2009.