

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
TESE DE DOUTORAMENTO EM QUÍMICA**

**" OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FARMACOLOGICAMENTE ATIVOS
A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS. CORRELAÇÃO ESTRUTURA
QUÍMICA - ATIVIDADE BIOLÓGICA "**

Valdir Cechinel Filho

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Rosendo A. Yunes
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. João B. Calixto**

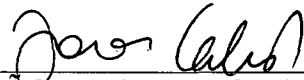
Florianópolis, março de 1995

OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FARMACOLOGICAMENTE ATIVOS A PARTIR DE
PRODUTOS NATURAIS. CORRELAÇÃO ESTRUTURA QUÍMICA-ATIVIDADE
BIOLÓGICA

VALDIR CECHINEL FILHO

ESTA TESE FOI JULGADA E APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO
ORIENTADOR E MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:



Prof. ROSENDO A. YUNES, Ph.D.
ORIENTADOR

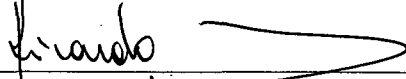

Prof. JOÃO B. CALIXTO, Ph.D.
CO-ORIENTADOR

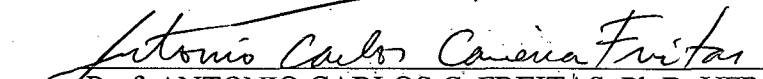

Prof. FARUK A. NOME, Ph.D.
COORDENADOR

BANCA EXAMINADORA


Prof. ROSENDO A. YUNES, Ph.D.


Prof. JOÃO B. CALIXTO, Ph.D.

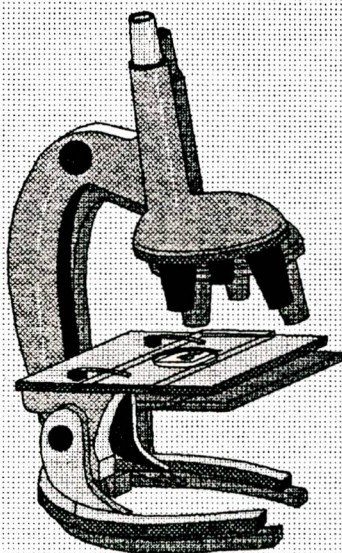

Prof. RICARDO I. NUNES, Ph.D.


Prof. ANTONIO CARLOS C. FREITAS, Ph.D., UFRJ


Prof. ADEMIR MOREL, Ph.D., UFSM

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
.....
TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**"OBTENÇÃO DE COMPOSTOS
FARMACOLOGICAMENTE
ATIVOS A PARTIR DE
PRODUTOS NATURAIS:
CORRELAÇÃO
ESTRUTURA-ATIVIDADE"**



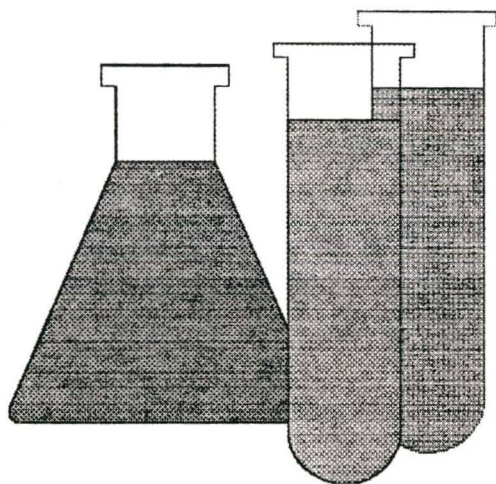
Aluno: Valdir Cechinel Filho
Orientador: Profº Rosendo A. Yunes
Co-Orientador: Profº João B. Calixto

**"UMA PLANTA PODE CONTER CENTENAS
DE SUBSTÂNCIAS DIFERENTES.
A DESCOBERTA DE UMA SÓ DELAS PODE
SER MAIS IMPORTANTE PARA A
HUMANIDADE QUE A DE UMA NOVA
GALÁXIA"**

SIR ROBERT ROBINSON



**"QUANDO VOCÊ PROCURAR
DESCOBRIR NOVAS DROGAS,
NÃO DEVE
TENTAR FAZER MOLÉCULAS
COMPLICADAS, MAS FAZER
MOLÉCULAS
QUE SEJAM EFETIVAS"**



Barry Price
Gerente Geral de Pesquisas
Glaxo, 1989

**Este trabalho é dedicado especialmente
à minha esposa Lenita e à minha filha
Camile, com quem compartilho o êxito
obtido**

**Aos meus pais Valdir Cechinel e
Amélia Copetti Cechinel**

**Aos meus sogros Emílio Cecconi e
Bilmar Canarin Cecconi**

À memória de meus nonos

José e Ida

Pedro e Inês

seu Quino

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- Ao Prof. Dr. Rosendo A. Yunes, pela orientação deste trabalho e por toda a amizade e estímulo, fatores essenciais para a realização de um trabalho de pesquisa.
- Ao Prof. Dr. João B. Calixto, pela co-orientação deste trabalho e pelo incentivo e companherismo constante
- À Mestre Zulma Vaz, pela importante contribuição na realização dos testes farmacológicos e pela amizade demonstrada

AGRADECIMENTOS

- À minha esposa Lenita e à minha filha Camile, pelo apoio, estímulo e paciência, e pela "força" para superar os obstáculos encontrados
- Aos meus pais, Valdir e Amélia, e minhas irmãs, Cristiane e Paula, pelo apoio e incentivo
- Aos meus sogros Emilio e Bilmar, pela valorização e amizade
- Ao Homero, Rita e Andrey, pelo incentivo constante
- Ao amigo Alexandre B. Cruz e sua equipe, pelo apoio, estímulo e realização dos testes microbiológicos
- Ao Pareennnt Rivaldo Niero, pelo apoio e companherismo constante
- Ao amigo Rogério Correa pelas sugestões nas sínteses de imidas
- Aos amigos do Departamento de Química : Clóvis, Bird, Obdúlio, Tânia, Jacir, Edésio, Sônia Hess et al. , pela amizade e companherismo constante.
- Ao Professor Ricardo J. Nunes, pelas importantes sugestões na parte experimental
- Aos Professores A.C. Freitas, A. Morel e M.G. Nascimento, pelas importantes sugestões que enriqueceram o trabalho
- Aos colegas do Departamento de Farmacologia: Adair, Luciano, Adenir, Rosana, F. Osório e Yara, pela realização de testes farmacológicos usados neste trabalho e pela amizade demonstrada
- À nona Otilia, pela honra de sua amizade
- Aos amigos Rivaldo Macari e Alduir Damiani, pela contribuição e incentivo
- Aos amigos Silvana, Douglas, Victor e Bibí, que mesmo à distância, proporcionaram um grande incentivo e apoio
- À Mariza Calixto, pelo incentivo e paciência
- Aos Professores de Roma/Itália, F.Delle Monache, I. Messana e F. Ferrari, pela realização de alguns espectros e pela amizade
- À Professora E. O. Lima (UFPB) e sua equipe, pelos testes antifúngicos e pelo estímulo.
- À todos os Professores e Funcionários do Departamento de Química que auxiliaram na realização deste trabalho
- À CAPES, pelo suporte financeiro
- À Deus, por mais esta etapa vencida

RESUMO

O presente trabalho teve como finalidade obter compostos farmacologicamente ou biologicamente ativos a partir de substâncias isoladas de plantas medicinais. Assim, três compostos naturais (xantoxilina, astilbina e filantimida) foram usados como protótipos para a síntese de derivados ou análogos que foram posteriormente analisados em diversos modelos farmacológicos "in vitro" e "in vivo".

Entre as várias modificações estruturais realizadas na xantoxilina, observou-se alguns resultados interessantes. A série de compostos benzilados, por exemplo, apresentou importantes ações antiespasmódicas no íleo isolado de cobaia contraído pela acetilcolina. O uso do Método de Topliss para correlacionar a estrutura com a atividade possibilitou a síntese de compostos antiespasmódicos mais potentes, sendo que alguns destes derivados foram cerca de 5 vezes mais efetivos do que a papaverina. Além disso, foi possível determinar que os efeitos eletrônicos assim como os efeitos hidrofóbicos dos grupos substituintes são fatores estruturais importantes relacionados com o efeito antiespasmódico. Por outro lado, outros derivados da xantoxilina, como o derivado monobromado, algumas chalconas e o derivado benzofurânico foram efetivos não só como analgésicos, mas também como antiinflamatórios em vários modelos de dor e de inflamação. O derivado benzofurânico, obtido a partir da reação entre a xantoxilina e brometo de p-bromo fenacila, foi o que apresentou resultados bastante promissores. No modelo de dor induzido pelo ácido acético, este composto foi cerca de 130 vezes mais potente do que a aspirina e acetaminofeno, drogas tradicionalmente usadas na clínica. No modelo de dor causado pela formalina, o referido composto foi cerca de 18 vezes mais potente em inibir a dor de origem inflamatória do que estas drogas. Inibiu

também a primeira fase da dor causada pela formalina, fato que apenas alguns analgésicos disponíveis no mercado são capazes.

Além disso, apresentou efeito prolongado e parece atuar por mecanismos diferentes da aspirina e da morfina, o qual é de extrema importância na procura de novos analgésicos. Quando testado no edema de pata causado pela carragenina, este e outros compostos derivados da xantoxilina foram equipotentes aos conhecidos ibuprofene e indometacina.

Os derivados do flavonóide astilbina, como o taxifolin e taxifolin tetrametilado apresentaram não só pronunciado efeito analgésico e antiinflamatório, mas também potente efeito antialérgico. Interessante, estes compostos mostraram atividade analgésica quando administrados oralmente, ao contrário dos derivados da xantoxilina, que foram ativos somente quando administrados intraperitonealmente.

Os análogos do alcalóide filantimida, que foi usado como modelo, apresentaram importantes ações antiespasmódicas e antimicrobianas. Foi observado que em todos os modelos testados, as maleimidias foram mais efetivas do que as succinimidias, sugerindo que a dupla ligação imídica constitui-se num importante grupo farmacofórico.

ABSTRACT

The present study was aimed at obtaining active compounds from isolated products of medicinal plants. Thus, three natural substances, xanthoxyline, astilbin and phyllanthimide, were used as models for the synthesis of several derivatives or analogues. The compounds were analysed in several experimental pharmacological models. Some interesting results were found for the xanthoxyline derivatives, such as a series of benzylated compounds, which showed antispasmodic activity against acetylcholine-induced contraction of the guinea pig ileum. The use of the Topliss method furnished the synthetic route for obtaining more active compounds, and some of them were several times more active than xanthoxyline itself. Furthermore, it was determined that electronic and hydrophobic effects of substituent groups were important structural factors related to the antispasmodic activity. On the other hand, other xanthoxyline derivatives, such as monobrominated xanthoxyline, some chalcones and a benzofuran analogue, were effective as analgesics and also as antiinflammatories in different models of pain in mice and of inflammation in rats, respectively. Benzofuran analogue, obtained as an unexpected compound from the reaction between xanthoxyline and 4-bromo phenacyl bromide, gave very good results. In the writhing test, it was about 130-fold more active than aspirin and acetoaminophen. In the formalin test, it was about 18-fold more active than these drugs in the second phase of pain. Benzofuran analogue also inhibited the first phase of pain caused by formalin, which very few clinically-used analgesics are capable of doing. Thus, this compound exhibited a long-lasting analgesic effect and seemed to exert its effect through different mechanisms of action than those found for morphine and aspirin, which is extremely important in the effort to produce new analgesic drugs. Several xanthoxyline derivatives presented antiinflammatory activity, inhibiting the paw edema caused by carrageenan, dextran or bradykinin,

some of them being equipotent to ibuprofen and indomethacin, two well known nonsteroidal drugs. On the other hand, stilbin derivatives, such as taxifolin and tetramethyl taxifolin, exhibited analgesic, antiinflammatory and antiallergic effects. It is important to mention that these compounds also present analgesic action when administered orally, in contrast with the xanthoxylone derivatives described before, which were only active intraperitoneally. Another investigated aspect concerns the alkaloid phyllanthimide, that was used as a model for the synthesis of several analogues, which were effective as antispasmodics and antimicrobials. Our results demonstrated that maleimide derivatives were more active than succinimide derivatives, suggesting that the double-bond imidic constitutes an important pharmacophoric group.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO 1

1-INTRODUÇÃO

	Pág.
1.1- Antecedentes.....	1
1.2- Processo geral para a obtenção de fármacos.....	7
1.2.1- Modificação estrutural na obtenção de compostos ativos.....	10
1.2.2- Correlação estrutura-atividade.....	10
1.2.3- Métodos de Topliss.....	13
1.2.3.1- Método Manual de Topliss.....	14

CAPÍTULO 2

2- Objetivos da Tese.....	18
---------------------------	----

CAPÍTULO 3

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Isolamento da xantoxilina.....	19
3.2- Isolamento da astilbina.....	19
3.3- Análise química.....	20
3.4- Síntese dos compostos.....	20
3.4.1- Síntese dos derivados da xantoxilina.....	21

3.4.2- Síntese dos derivados da astilbina.....	31
3.4.3- Síntese dos análogos da filantimida.....	33

CAPÍTULO 4

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Derivados da xantoxilina.....	44
4.1.1- Síntese.....	44
4.1.2- Atividade antiespasmódica.....	56
4.1.3- Efeito analgésico.....	59
4.1.4- Atividade antiinflamatória.....	62
4.1.4.1- Efeito antiedematogênico na pata de rato.....	62
4.1.4.2- Efeito na pleurisia em ratos.....	65
4.1.5- Atividade antialérgica.....	66
4.2- Derivados da astilbina.....	67
4.2.1- Síntese.....	67
4.2.2- Atividade analgésica.....	68
4.2.3- Atividade antiinflamatória.....	70
4.2.3.1- Efeito antiedematogênico na pata de rato.....	70
4.2.3.2- Efeito na pleurisia em ratos.....	71
4.2.4- Atividade antialérgica.....	71
4.3- Análogos da filantimida.....	73
4.3.1- Síntese.....	73
4.3.3- Atividade analgésica.....	79
4.3.4- Atividade antibacteriana.....	81

4.3.4.1- Mecanismo de ação.....	84
4.3.5- Atividade antifúngica.....	85

CAPÍTULO 5

5- CONCLUSÕES

5.1- Síntese.....	87
5.2- Análise farmacológica.....	89
5.2.1- Atividade antiespasmódica.....	89
5.2.1.1- Derivados da xantoxilina.....	89
5.2.1.2- Análogos da filantimida.....	89
5.2.2- Atividade analgésica.....	90
5.2.2.1- Derivados da xantoxilina.....	90
5.2.2.2- Derivados da astilbina.....	91
5.2.3- Atividade antiinflamatória.....	92
5.2.3.1- Derivados da xantoxilina.....	92
5.2.3.2- Derivados da astilbina.....	93
5.2.4- Atividade antialérgica.....	93
5.2.4.1- Derivados da xantoxilina.....	93
5.2.4.2- Derivados da astilbina.....	94
5.2.5- Atividade antibacteriana.....	94
5.2.6- Atividade antifúngica.....	95
Referências bibliográficas.....	97
Anexos.....	112

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- Procedimento para obtenção de princípios ativos de plantas.....	8
Figura 2- Esquema geral para obtenção de fármacos.....	9
Figura 3-Espectro de Infra-Vermelho de 2- (p-bromobenzilóxi) - 4,6 dimetóxiacetofenona (3).....	48
Figura 4- Espectro de ¹ H-RMN de (3).....	49
Figura 5- Espectro de ¹ H-RMN do derivado benzofurânico(14).....	52
Figura 6- Espectro de ¹³ C-RMN(DEPT) de (14).....	53
Figura 7- Efeito da astilbina e derivados sobre a contração induzida pela ovalbumina em traquéias isoladas de cobaia.....	132
Figura 8- Espectro de IV do ácido N-benzilmaleâmico e N-benzilmalei- mida.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1- Ordem de potência para vários parâmetros físico-químicos.....	15
Tabela 2- Tabela proposta por Topliss para seleção de novos substituintes..	16
Tabela 3- Valores dos parâmetros físico-químicos σ e π e ambos relacionados.....	17
Tabela 5- Atividade antiespasmódica de derivados benzilados da xantoxi- lina no íleo isolado de cobaia contraído pela acetilcolina.....	114
Tabela 4- Ordem de potência de derivados da xantoxilina usando os subs- tituintes propostos por Topliss.....	58
Tabela 6- Atividade analgésica de derivados da xantoxilina no modelo de contorções abdominais induzidas pelo AcOH, i.p., em camund.....	120
Tabela 7- Efeito analgésico de derivados da xantoxilina no modelo de dor causado pela formalina,i.p., em camundongos.....	121
Tabela 8- Atividade analgésica da xantoxilina, xantoxilina monobromada e chalconas no modelo de contorções abdominais causadas pelo AcOH (i.p., 30 mg/kg) em camundongos.....	122
Tabela 9- Atividade antiedematogênica para a xantoxilina e seus derivados na pata de rato.....	128
Tabela 10- Efeito analgésico de derivados da astilbina no modelo de dor induzida pelo AcOH, i.p., em camundongos.....	123
Tabela 11- Efeito anlgésico de derivados da astilbina no modelo de dor causado pela formalina,i.p., em camundongos.....	123
Tabela12- Efeito antiedematogênico para a astilbina e seus derivados na pata de rato.....	129

Tabela 13- Efeito de derivados da astilbina na pleurisia induzida pela carra- genina em ratos.....	129
Tabela 14- Efeito antiespasmódico de succinimidas no íleo isolado de cobaia contraído pela acetilcolina.....	115
Tabela 15- Efeito antiespasmódico de maleimidas no íleo isolado de cobaia contraído pela acetilcolina.....	116
Tabela 16- Efeito analgésico de N-alkuilfenilmaleimidas no modelo de dor causado pelo AcOH,i.p., em camundongos.....	124
Tabela 17- Efeito de substituintes no anel aromático de N-fenilmaleimidas na atividade antibacteriana pelo método de difusão em agar.....	135
Tabela 18- Efeito de substituintes no anel aromático de N-benzilmaleimidas na atividade antibacteriana pelo método de difusão em agar.....	136
Tabela 19- Efeito da distância entre o anel imídico e o grupo fenila na ativi- dade antibacteriana pelo método de difusão em agar.....	137
Tabela 20- Efeito da modificação do anel imídico na atividade antibacteriana pelo método de difusão em agar.....	138
Tabela 21- Concentração Inibitória Mínima (CIM) em ug/ml para N-fenilma- leimidas.....	139
Tabela 22- Concentração Inibitória Mínima (CIM) em ug/ml para N-benzil- maleimidas.....	139
Tabela 23- Concentração Inibitória Mínima (CIM) em ug/ml para N-alkuil- fenilmaleimidas.....	140
Tabela 24- Concentração Inibitória Mínima (CIM) em ug/ml para N-alkuil- fenilsuccinimidas.....	140
Tabela 25- Efeito de N-alkuilfenilmaleimidas contra fungos leveduriformes e filamentosos.....	143

Tabela 26- Efeito de N-alkilfenilmaleimidas substituidas contra fungos

leveduriformes e filamentosos..... 144

CAPÍTULO 1

1-INTRODUÇÃO

1.1-Antecedentes

As plantas medicinais constituem-se numa fonte alternativa de medicamentos e seus usos com finalidades terapêuticas vem crescendo gradativamente nos últimos anos entre a população em geral. Um dos principais fatores que contribui para este fato constitui nos avanços oriundos de estudos científicos , que comprovam cada vez mais a eficácia de vários princípios de plantas medicinais.

Baseados na medicina popular, estes estudos vem sendo realizados no intuito de verificar as ações farmacológicas descritas em algumas plantas para posterior isolamento e identificação dos princípios ativos para a obtenção de fármacos ou protótipos para sua fabricação. Dados da literatura mostram que, entre as fontes de medicamentos, 25 % são obtidos de origem vegetal e cerca de 50 % de origem sintética, grande parte, porém, relacionada com as plantas medicinais [Ugaz, 1994].

No Brasil, embora a flora disponha de cerca de 100-200 mil espécies de plantas e que aproximadamente 40-50 % contenham propriedades terapêuticas, o país emprega recursos na ordem de 2-3 bilhões de dolares/ano importando a matéria prima da maioria dos fármacos disponíveis no mercado. Entretanto, alguns laboratórios e universidades brasileiras estão buscando conhecer os princípios responsáveis pelos efeitos farmacológicos destas plantas, visando o aproveitamento deste potencial terapêutico e tentando encontrar subsídios científicos suficientes para que futuramente se possa obter no país, não só novos fitoterápicos mas também produtos sintéticos que possam ser transformados em fármacos.

Atualmente, é grande o interesse dos pesquisadores do mundo inteiro em buscar na natureza drogas eficazes contra várias doenças, principalmente algumas

ainda incuráveis , como o câncer, a AIDS e a hepatite B, e outras como processos inflamatórios, dor e alergia. Desta forma, recentes estudos demonstram que uma grande quantidade de plantas possuem princípios ativos contra estas e outras doenças, observados em diversos experimentos " in vitro " e " in vivo " .

Embora seja cada vez mais difícil o isolamento de moléculas com estruturas inéditas em produtos naturais, principalmente devido aos avanços tecnológicos da Química Orgânica, que possibilita elucidar as mais complexas estruturas, constantemente são isolados compostos de estrutura conhecida, porém com efeitos farmacológicos nunca antes observados. Neste contexto, dificilmente o estudo de uma planta estará esgotado, onde em cada efeito farmacológico encontrado para o extrato, o estudo fitoquímico deverá ser retomado para o isolamento do(s) princípio(s) ativo(s). São vários os compostos isolados de plantas que possuem estruturas conhecidas, e que demonstrar importantes efeitos farmacológicos. Neste aspecto, pode-se destacar o alcalóide pilocarpina, isolado de Pilocarpus microphyllus e P. jaborandi, que hoje é usado mundialmente contra o glaucoma [Andrade Neto, 1989; Matos, 1990]. Outros exemplos são o timol, agente antisséptico isolado de Lippia sidoides [Gilman et al., 1987; Matos, 1990] e o bisabolol, um eficaz agente antiinflamatório isolado de Vanillosmopsis arborea [Jakolev et al., 1983; Jellinek et al., 1984; Craveiro et al., 1989].

Um grande número de moléculas isoladas de plantas, incluindo principalmente alguns terpenos, flavonóides, fenóis, alcalóides, lignanas, etc. foi descrito como tendo potentes ações antialérgicas e/ou antiinflamatória [Calixto et al.,1990; Garbor et al.,1990; Wagner,1990; Souza et al., 1992; Freire et al., 1994].

Algumas espécies de plantas do gênero Phyllanthus (Euphorbiaceae), conhecidas como quebra-pedra, vem demonstrando importantes efeitos contra o vírus da hepatite B [Unander et al.,1991;Yeh et al.,1993] e o vírus HIV [Ogata et al., 1993], além de pronunciado efeito analgésico [Gorski et al.,1993; Santos et

al.,1993, 1994a,b]. Estudos realizados com cultura de callus de algumas espécies selecionadas de *Phyllanthus* também confirmaram os efeitos analgésicos demonstrados pelos extratos das plantas [Santos et al., 1994c], sugerindo que os princípios ativos destas espécies podem ser produzidos " in vitro ". Recentemente foi confirmado que alguns esteróides comuns nestas plantas, como β -sitosterol, stigmasterol e campesterol, são responsáveis, pelo menos em parte, pelos efeitos analgésicos dos referidos extratos [Niero, 1993; Santos et al., 1994d].

Anteriormente foi relatado que alguns compostos obtidos a partir dos rizomas de Mandevilla velutina foram ativos como antagonistas seletivos da ação da bradicinina. Estes compostos, além de apresentarem um efeito antiinflamatório significativo por via tópica ou sistêmica, foram capazes de inibir também a anafilaxia causada por injeção de ovalbumina em cobaias sensibilizados a esse antígeno, associado com potente efeito analgésico [Calixto et al.,1990a; Yunes et al., 1993].

Recentemente foi também demonstrado em nossos laboratórios que o extrato hidroalcoólico de Drimys winteri (Winteraceae) apresentou interessante perfil antialérgico, antiinflamatório e analgésico em diversos modelos experimentais [Matta et al., 1994; Tratsk et al., 1994], podendo estes efeitos estarem relacionados com a presença de sesquiterpenos e flavonóides anteriormente isolados [Appel et al., 1959; Cruz et al., 1973].

Assim, conforme já mencionado, inúmeros compostos naturais tem encontrado emprego no mercado farmacêutico. Entretanto, talvez um dos principais exemplos da importância do estudo químico e farmacológico de plantas medicinais constitui-se na descoberta do diterpenoide Taxol, isolado das cascas de Taxus brevifolia Nutt (Taxaceae), que demonstrou ser um efetivo agente anticancerígeno [Kingston,1991] e recentemente, após aprovado pela US Food and Drug Administration, se transformou em uma droga comercializada pelo National Cancer

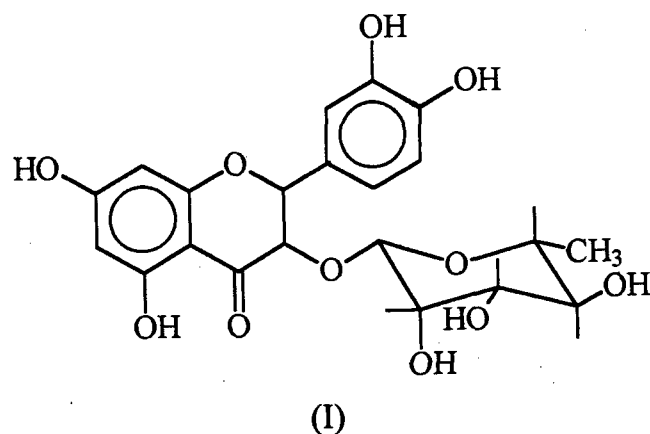
Institute e Bristol-Myer Squibb Co., tornando-se assim uma grande esperança para os pacientes portadores de câncer, principalmente no ovário [Horwitz,1993].

Nos últimos anos, outros estudos desenvolvidos nos laboratórios de Química e Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, permitiram isolar e caracterizar vários compostos farmacologicamente ativos.

Em estudos anteriores foi demonstrado que o extrato hidroalcoólico obtido das cascas da Hymeneae martiana (Leguminosae), planta conhecida como Jatobá e empregada popularmente como antiinflamatória e antialérgica, foi efetivo em antagonizar as respostas a vários neurotransmissores, incluindo a bradicinina, serotonina, angiotensina II e prostaglandinas em preparações isoladas de músculos lisos [Calixto et al.,1988]. Além disso, este extrato apresentou também atividade antiinflamatória quando analisado em diversos modelos experimentais, além de efeito analgésico pronunciado [Calixto et al.,1989; Neves et al.,1993].

O fracionamento deste extrato permitiu isolar e identificar três glicosídeos, caracterizados como sendo a eucrifina, engeletina e astilbina (I), sendo os mesmos responsáveis por parte dos efeitos farmacológicos descritos para o extrato total [Carneiro, 1988]. É interessante salientar que a astilbina pode ser obtida em altas concentrações (cerca de 6 % de rendimento a partir das cascas) e que este produto hexaacetilado foi mais potente em antagonizar as ações da bradicinina " in vitro " do que a própria astilbina [Carneiro et al. 1993].

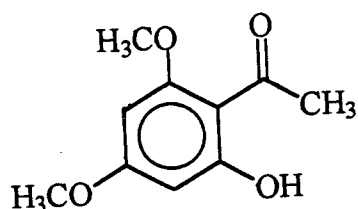
A astilbina foi também isolada de outras plantas, incluindo Quintinia serrata A. Cunn [Cambie, 1959], Erythroxylon argentinum (Erythroxylaceae) [Inigo & Pomilio, 1985], Astilbe odontophylla [Hayashi & Ouchi, 1950] e Drimys winteri [Cruz et al., 1973]. Este composto também ocorre naturalmente em uvas e vinhos [Trousdale & Singleton, 1983].



Recentemente, estudos realizados em nossos laboratórios com os extratos de Sebastiania schottiana (Euphorbiaceae), planta conhecida como quebra-pedra, abundante na região sul do país e usada popularmente em forma de chás para afecções renais, demonstraram que o extrato desta planta apresentou atividade antiespasmódica em diversos modelos experimentais "in vitro" [Calixto et al., 1986], sendo que o principal constituinte ativo presente no extrato hexânico foi identificado como sendo a 2-hidróxi-4,6 dimetóxiacetofenona, também conhecida como xantoxilina (II) e obtida com rendimento de 0,25 % a partir das folhas e ramos jovens [Miguel, 1987; Calixto et al., 1990 b]. Este composto também mostrou efeito antibacteriano contra bactérias frequentemente encontradas no trato urinário [Godoy et al., 1991], além de ação fungicida contra vários fungos leveduriformes e filamentosos patogênicos aos seres humanos [Lima et al., 1994].

A xantoxilina foi também isolada de outras plantas, como Hipponame mancinella [Shaeffer et al., 1954], Eucalyptus michaeliana (Myrtaceae) [Courtney et al., 1983], Pulicaria undulata (Compositae) [Ayoub & Ellassam, 1981], Sapium sebiferum (Euphorbiaceae) [Kouno et al., 1983]. Vários derivados da xantoxilina foram sintetizados em nossos laboratórios e testados no íleo isolado de cobaia contraído pela acetilcolina, cujos resultados indicaram que a carbonila e os dois grupos metoxilas são importantes para a atividade antiespasmódica. A introdução de

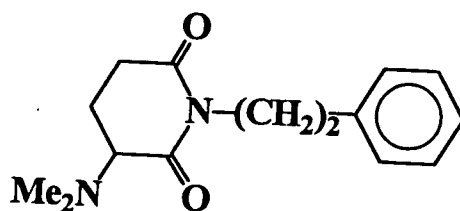
grupos benzilas substituídos e a formação de chalconas resultaram em compostos com maior potência antiespasmódica [Cechinel Filho et al.1991, 1993; 1995a].



(II)

Em outro estudo realizado com o Phyllanthus sellowianus (Euphorbiaceae), planta morfológicamente semelhante à Sebastiania schottiana, foi demonstrado que a fração de alcalóides obtida desta planta apresentou potente efeito antiespasmódico em íleo isolado de cobaia e útero de rata, comparável à papaverina [Calixto et al.,1984]. Um destes compostos foi isolado e identificado como um novo alcalóide de estrutura inédita, derivado da glutarimida e denominado filantimida (III) [Tempesta et al.,1988].

Entretanto, este composto antagonizou apenas discretamente as respostas contráteis induzidas pela acetilcolina no íleo isolado de cobaia, embora alguns de seus análogos tenham sido bastante efetivos como antiespasmódicos [Cechinel Filho et al., 1995b]. Além disso, a filantimida também apresentou efeito bactericida [Cruz,1993]. A xantoxilina foi isolada nesta planta, porém com rendimento muito baixo [Miguel et al., 1995].



(III)

1.2- Processo geral para obtenção de compostos farmacologicamente ativos

As plantas podem conter centenas ou milhares de metabólitos, e, entre as espécies estimadas (250000-500000), somente uma pequena porcentagem tem sido investigada fitoquimicamente e um número ainda menor foram submetidas aos testes farmacológicos ou biológicos [Hamburger et al.,1991].

O processo para se chegar à obtenção de constituintes farmacologicamente ativos é longo e tedioso, e requer uma colaboração multidisciplinar de botânicos, farmacognosistas, químicos e farmacólogos, envolvendo uma série de etapas preliminares, como:

- identificação botânica, coleta e secagem do material vegetal
- preparação dos extratos apropriados e análise cromatográfica preliminar
- testes farmacológicos ou biológicos do extrato bruto e extratos semi-purificados,
- várias etapas consecutivas de separação cromatográfica, onde cada fração obtida deve ser testada, no sentido de " guiar " o isolamento do(s) constituinte(s) ativo(s).
- verificação da pureza dos constituintes isolados,
- elucidação estrutural,
- síntese parcial ou total,
- preparação dos análogos ou derivados para investigar a relação estrutura-atividade,
- isolamento em grande escala para posterior teste farmacológico e toxicológico.

A Figura 1 ilustra os procedimentos citados acima:

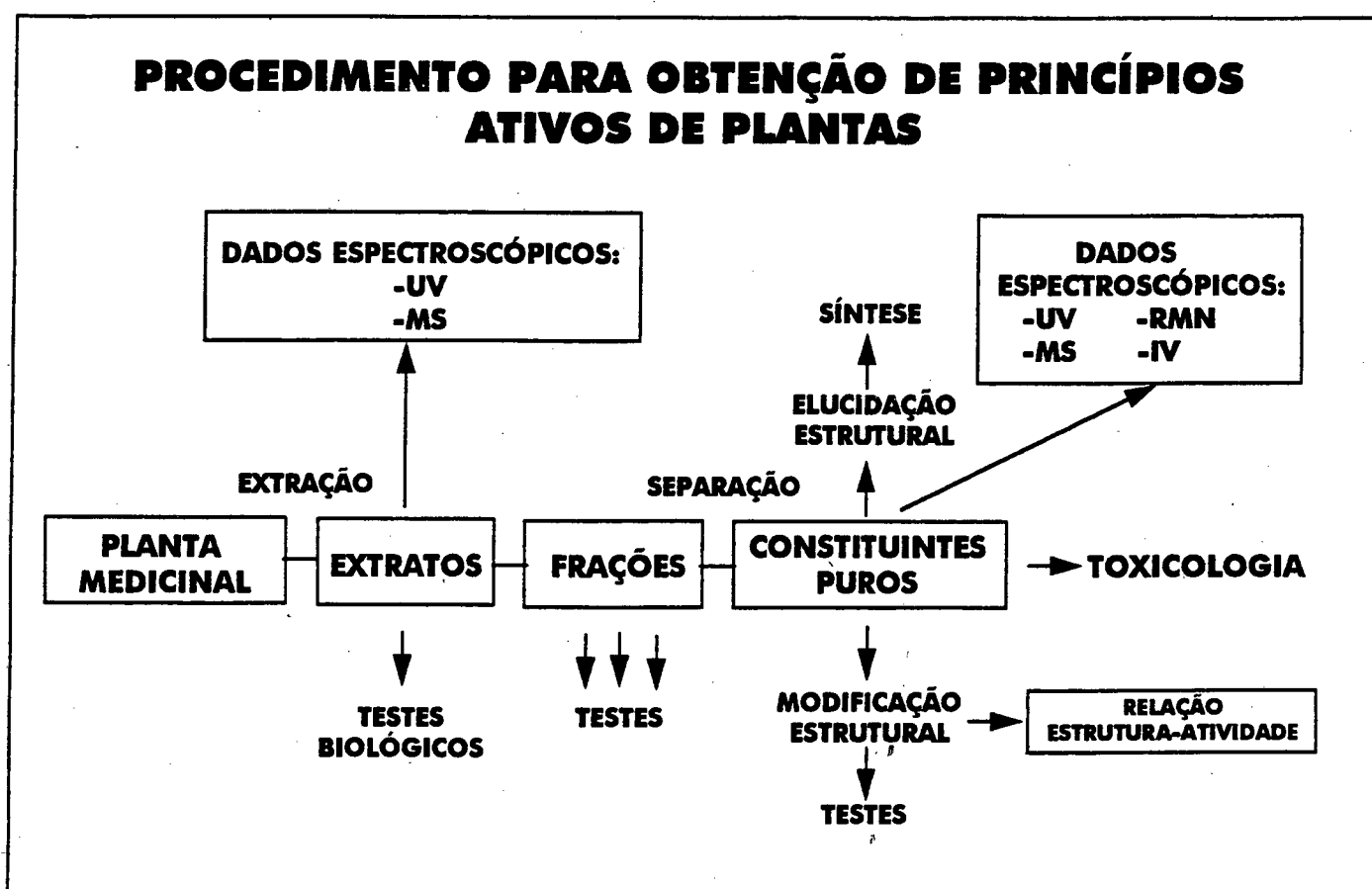


Figura 1: Procedimento para obtenção de princípios ativos de plantas

Geralmente, o material botânico a ser estudado baseia-se em seu uso pela medicina popular. A obtenção de princípios ativos a partir de produtos naturais possibilita economia de tempo e diminui os custos, considerando que a síntese de compostos ativos ao acaso, além de desgastante e onerosa, pode levar anos. Além disso, existe a possibilidade de compostos inativos serem transformados em compostos com pronunciada atividade farmacológica, conforme poderá ser observado no decorrer deste trabalho.

A introdução de novos fármacos no mercado, no entanto, é muito difícil e, em média, de cada 10.000 produtos químicos testados, apenas um chega a ser introduzido na terapêutica [Franke, 1984]. A Figura 2 mostra o esquema geral para obtenção de fármacos:



Figura 2: Esquema geral para obtenção de fármacos

1.2.1- Modificação estrutural na obtenção de compostos ativos

A modificação molecular, também chamada de variação molecular ou manipulação molecular, constitui-se no método mais usado e econômico para obtenção de compostos farmacologicamente ativos ou para otimizar a atividade de princípios ativos naturais. Muitas mudanças podem ser introduzidas numa molécula, dependendo de seus centros reativos.

Em geral, este processo pode ser dividido em duas classes:

- 1- Alterações que aumentam ou diminuem as dimensões da molécula, como fechamento ou abertura do anel e obtenção de homólogos de pesos moleculares mais baixo ou mais alto;
- 2- Alterações através da introdução de novos grupos, ou substituição de determinados grupos da molécula.

O uso da modificação estrutural possibilita analisar a correlação existente entre a estrutura química e atividade biológica, sendo que estes estudos vem se expandindo nos últimos anos.

1.2.2- Correlação estrutura-atividade

A análise e aplicação da correlação entre estrutura química e atividade biológica tem como principal objetivo realizar um planejamento racional de novas moléculas ativas. Desta forma, foram desenvolvidos vários métodos de correlação que auxiliam na predição de quais novos grupos ou átomos podem ser introduzidos em uma molécula para torná-la mais ativa, proporcionando assim muitas vantagens aos químicos e farmacólogos.

No Brasil, no entanto, estes estudos estão ainda iniciando, principalmente, devido ao pouco desenvolvimento da indústria farmacêutica e da dificuldade inerente à aquisição de reagentes específicos e também devido aos altos custos e complexidade dos testes farmacológicos ou biológicos.

Para o desenvolvimento de novas drogas são utilizados diferentes métodos, mas o principal e mais usado foi desenvolvido por Hansch e colaboradores [Hansch et al., 1971]. O método de Hansch pode ser considerado o mais popular porque procura relacionar a atividade biológica com as propriedades físico-químicas, como coeficiente de partição (P), constante de hidrofobicidade (π), grau de ionização, tamanho molecular e efeitos eletrônicos (constante σ de Hammett), propriedades estas que podem ser medidas mas que geralmente são obtidas por extrapolação ou cálculos.

Como modelo geral para a ação da droga no organismo, pode-se considerar principalmente duas etapas necessárias para se obter uma resposta biológica [MacFarland, 1970]:

- 1- A droga alcança a vizinhança de algum receptor específico pelo transporte passivo, isto é, ela é aplicada em alguma região externa e através de um caminho aleatório, ao acaso, um número efetivo de moléculas ultrapassam várias membranas para chegar ao sítio de ação.
- 2- A droga interage com o receptor, formando um complexo molécula-receptor, levando a uma resposta biológica.

Utilizando trabalhos anteriores desenvolvidos por Hammett [Hammett, 1970], Hansch propôs que a atividade biológica depende fundamentalmente de uma combinação de dois fatores: do $\log P$, que representa o transporte pela membrana e a constante σ de Hammett, que representa a interação eletrônica com o receptor. O valor de $\log P$ pode ser obtido experimentalmente a partir de um sistema octanol/água.

Posteriormente, a partir do $\log P$, foi calculado a constante de hidrofobicidade do substituinte π , conforme a equação 1:

$$\pi = \log P_X - \log P_H \quad \text{Eq. 1}$$

onde P_X e P_H são coeficientes de partição da molécula com substituinte X e com H, respectivamente. Um valor positivo de π significa que o grupo substituinte aumentará a solubilidade do composto na fase orgânica (apolar) e um valor negativo de π indica que o composto será mais solúvel na fase aquosa (polar).

A constante de Hammett σ pode ser obtida a partir da equação 2:

$$\log K_x/K_o = \sigma \rho \quad \text{Eq. 2}$$

onde K_o é a constante de equilíbrio do ácido benzóico, K_x é a constante de equilíbrio do ácido benzóico para ou meta substituídos e $\rho = 1$ a 25 °C e 1 atm de pressão.

Considerando as equações 1 e 2, Hansch propôs a equação 3, que permite prever estruturas mais ativas ou com menor produção de efeitos secundários:

$$\log 1/C = a \log P + b \log \sigma + c \quad \text{Eq. 3}$$

onde C = concentração da droga necessária para produzir um efeito específico, geralmente expresso pela DI_{50} , dose que causa inibição de 50 % na resposta biológica, $\log P$ e σ já foram definidas e a, b e c são constantes obtidas por métodos estatísticos, e podem ser melhores calculadas para uma série de compostos. Posteriormente foi adicionado o valor do efeito estérico E_s tornando a equação de Hansch mais completa como:

$$\log 1/C = a \log P + b \log \sigma + c E_s + d \quad \text{Eq. 4}$$

Além destes métodos quantitativos de correlação, existem outros de aspectos teóricos, tais como o uso de mecânica quântica [Gupta, et al.,1983], o uso de índices topológicos bem como o índice de conectividade χ [Testa & Kier, 1991] e uma série de outros parâmetros computacionais [Kubinyi, 1993, 1994; Bruns, 1994]. No entanto, um dos métodos mais simples de correlação estrutura-atividade foi proposto por Topliss [Topliss, 1977].

1.2.3- Métodos de Topliss

Utilizando os princípios básicos de Hansch, Topliss desenvolveu dois métodos para correlacionar quantitativamente a estrutura química com a atividade biológica: o primeiro, denominado " Método da Árvore de Decisão " [Topliss, 1972], que consiste em um modelo realizado em etapas, resultando em mudanças nas propriedades físico-químicas dos compostos, como hidrofobicidade, efeitos eletrônicos e efeitos estéricos; e o segundo, denominado " Método Manual " [Topliss, 1977], que será estudado com maiores detalhes neste trabalho. O método da árvore não será usado devido ao longo tempo para obtenção dos derivados, já que é um modelo por etapas e requer grande disponibilidade de reagentes para síntese, além de exigir uma maior interrelação entre química e farmacologia.

1.2.3.1- Método Manual de Topliss

O método manual de Topliss consiste em um modelo não estatístico e não computadorizado, que pode ser usado para prever quais grupos substituintes podem ser introduzidos em determinada molécula para aumentar significativamente sua atividade biológica. Uma condição para a aplicação deste método é que haja a presença de um anel aromático na estrutura, fato que 40 % das moléculas orgânicas e 50 % dos fármacos possuem [Granito,1971].

O método manual é fundamentado na síntese de 5 derivados contendo os seguintes substituintes: H, 4-Cl, 3,4-Cl₂, 4-CH₃ e 4-OCH₃, escolhidos devido a acessível obtenção sintética destes compostos como ponto de partida. A atividade biológica é avaliada em relação aos parâmetros π (constante de hidrofobicidade), σ (constante de Hammett), efeitos estéricos Es e π e σ relacionados ($\pi - \sigma$, $\pi - 2\sigma$, $\pi - 3\sigma$, $\pi + \sigma$, etc.).

A ordem de potência projetada destes 5 derivados para vários parâmetros relacionados são mostrados na tabela 1. A seguir, os compostos experimentalmente testados são colocados em ordem de atividade e comparado com a ordem destes parâmetros. A tabela 2 indica uma seleção de novos substituintes que podem melhorar a atividade farmacológica dos compostos em estudo. Aos parâmetros relacionados π e σ , baseados nos estudos de correlação de Hansch, Topliss incluiu também os efeitos estéricos Es, que muitas vezes exercem influência dominante. Estes parâmetros foram agrupados (tabela 2) de modo a obter-se uma maior diferença entre os valores.

Este método foi aplicado com sucesso em vários estudos descritos na literatura [Kakeya et al.,1969; Bucker et al.,1970; Fuller et al.,1971; Hansch et al.,1973] e demonstra que também com apenas 4 substituintes podem ser obtidos bons resultados [Cammarata et al.,1970].

É interessante observar que baseados nos resultados de apenas 4 ou 5 análogos, pode-se prever, em muitos casos, a rota sintética provável para obtenção de compostos farmacologicamente mais potentes. A maior vantagem da aplicação deste método de correlação entre estrutura e atividade consiste na sua simplicidade, possibilitando bons resultados rapidamente, e não requerer o uso de procedimentos estatísticos e computadorizados, embora uma deficiência do método consiste em não se estender a outros parâmetros que não sejam π , σ e E_s .

Tabela 1: Ordem de potência para vários parâmetros físico-químicos :




TABELA 1

ORDEM DE POTÊNCIA PARA VÁRIOS PARÂMETROS

PARÂMETROS

SUBSTITUINTE	π	$2\pi-\pi^2$	σ	$\pi+\sigma$	$2\pi-\sigma$	$\pi-\sigma$	$\pi-2\sigma$	$\pi-3\sigma$	E
3,4-Cl ₂	1	1-2	1	1	1	1-2	3-4	5	2-5
4-Cl	2	1-2	2	2	2-3	3	3-4	3-4	2-5
4-CH ₃	3	3	4	3	2-3	1-2	1	1	2-5
4-OCH ₃	4-5	4-5	5	5	4	4	2	2	2-5
H	4-5	4-5	3	4	5	5	5	3-4	1

Tabela 2: Tabela proposta por Topliss para seleção de novos substituintes:

TABELA 2	
.....	
TABELA PROPOSTA POR TOPLISS PARA SELEÇÃO DE NOVOS SUBSTITUINTES	
PROVÁVEIS PARÂMETROS ATIVOS	SELEÇÃO DE NOVOS SUBSTITUINTES
π , $\pi+\sigma$, σ	3-CF ₃ , 4-Cl; 3-CF ₃ ; 4-NO ₂ ; 4-CF ₃ ; 2,4Cl ₂ ; 4-C-C ₆ H ₅ ; 4C ₆ H ₅
π , 2 $\pi-\sigma$, $\pi-\sigma$	4-CH(CH ₃) ₂ ; 4-C(CH ₃) ₃ ; 3,4(CH ₃) ₂ ; 4-O(CH ₂) ₃ CH ₃ ; 4-OCH ₂ Ph; 4-NEt ₂
$\pi-2\sigma$, $\pi-3\sigma$, σ	4-N(C ₂ H ₅) ₂ ; 4-N(CH ₃) ₂ ; 4-NH ₂ ; 4NHC ₄ H ₉ ; 4-OH(CH ₃) ₂ ; 3-CH ₃ ; 4-OCH ₃
$2\pi-\pi^2$	4-Br, 3-CF ₃ ; 3,4(CH ₃) ₂ ; 4-C ₂ H ₅ ; 3-Cl; 3-CH ₃ ; 3-N(CH ₃) ₂ ; 3-CF ₃ ; 3,5-Cl ₂ .

Tabela 3: Valores dos parâmetros físico-químicos σ e π e ambos relacionados:

Substituents	π	σ	$\pi - \sigma$	$2\pi - \sigma$	$\pi - 2\sigma$	$\pi - 3\sigma$	$-\sigma$	$\pi + \sigma$	$2\pi - \pi^2$
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-Cl	0.71	0.23	0.48	1.19	0.25	0.02	-0.23	0.94	0.92
3,4-Cl ₂	1.25	0.52	0.73	1.98	0.21	-0.31	-0.52	1.77	0.94
4-CH ₃	0.56	-0.17	0.73	1.29	0.90	1.07	0.17	0.39	0.81
4-OCH ₃	-0.02	-0.27	0.25	0.23	0.52	0.79	0.27	-0.29	-0.04
3-CF ₃ ,4-Cl	1.59	0.66	0.93	2.52	2.91	-0.39	-0.66	2.25	0.65
3-CF ₃ ,4-NO ₂	0.60	1.21	-0.61	-0.01	-1.82	-2.97	-1.21	1.81	0.84
4-CF ₃	0.88	0.54	0.34	1.22	-0.20	-0.74	-0.54	1.42	0.99
2,4-Cl ₂	1.42	0.46	0.96	2.38	0.50	0.04	-0.46	1.88	0.82
c-C ₆ H ₉	2.14	-0.02	2.16	4.30	2.18	2.20	0.02	2.12	-0.30
c-C ₆ H ₁₁	2.51	-0.22	2.73	5.24	2.95	3.17	0.22	2.29	-1.28
4-CH(CH ₃) ₂	1.53	-0.05	1.58	3.11	1.63	1.68	0.05	1.48	0.72
4-C(CH ₃) ₃	1.98	-0.20	2.18	4.16	2.38	2.58	0.20	1.78	0.04
3,4-(CH ₃) ₂	0.99	-0.30	1.29	2.28	1.59	1.89	0.30	0.69	1.00
4-O(CH ₂) ₃ CH ₃	1.55	-0.32	1.87	3.42	2.19	2.51	0.32	1.23	0.70
4-N(C ₂ H ₅) ₂	1.18	-0.83	2.01	3.19	3.84	4.67	0.83	0.35	0.97
4-N(CH ₃) ₂	0.18	-0.83	1.01	1.19	1.84	2.67	0.83	-0.65	0.33
4-NH ₂	-1.23	-0.66	-0.57	-1.80	0.09	0.75	0.66	-1.89	-3.97
4-NHC ₄ H ₉	1.45	-0.51	1.96	2.39	2.47	2.98	0.51	0.94	-0.80
4-OCH(CH ₃) ₂	1.03	-0.45	1.48	2.51	1.93	2.38	0.45	0.58	1.00
3-CH ₃ ,4-OCH ₃	0.54	-0.26	0.80	1.34	1.06	1.32	0.26	0.28	0.79
4-Br	0.86	0.23	0.57	1.49	0.40	1.55	-0.23	1.09	0.98
3-CF ₃	0.88	0.43	0.45	1.43	0.02	2.17	-0.43	1.31	0.99
4-C ₂ H ₅	1.02	-0.15	1.17	2.19	1.32	1.47	0.15	0.87	1.00
4-O(CH ₂) ₂ CH ₃	1.05	-0.25	1.30	2.35	1.55	1.80	0.25	0.80	1.00
3-CH ₃ ,4-Cl	1.29	0.17	1.12	2.41	0.95	0.78	-0.17	1.46	0.92
3-Cl	0.71	0.37	0.34	1.05	-0.03	-0.30	-0.37	1.08	0.92
3-CH ₃	0.56	-0.07	0.63	1.19	0.70	0.77	0.07	0.49	0.81
3-OCH ₃	-0.02	0.12	-0.14	-0.16	-0.26	-0.38	-0.12	0.10	-0.04
3-N(CH ₃) ₂	0.18	-0.15	0.33	0.51	0.48	0.63	0.15	0.03	0.33
3,5-Cl ₂	1.25	0.75	0.50	1.75	-0.25	-1.00	-0.75	2.20	0.94
2-Cl	0.71	0.23	0.48	1.19	0.25	0.02	-0.23	0.94	0.92
2-CH ₃	0.56	-0.17	0.73	1.29	0.90	1.07	0.17	0.39	0.81
2-OCH ₃	-0.02	-0.27	0.25	0.23	0.52	0.79	0.27	-0.29	-0.04
2-F	0.14	0.06	0.08	0.22	0.02	-0.04	-0.06	0.20	0.28
4-F	0.14	0.06	0.08	0.22	0.02	-0.04	-0.06	0.20	0.28
4-NHCOCH ₃	-0.97	0.00	-0.97	-1.94	-0.97	-0.97	0.00	-0.97	-2.88
4-NHSO ₂ CH ₃	-1.18	0.03	-1.21	-2.39	-1.24	-1.27	-0.03	-1.15	-3.75
4-NO ₂	-0.28	0.78	-1.06	-1.34	-1.84	-2.62	-0.78	0.50	-0.64
4-COCH ₃	-0.55	0.50	-1.05	-1.60	-1.55	-2.05	-0.50	-0.05	-1.40
4-SO ₂ CH ₃	-1.63	0.72	-2.35	-3.98	-3.07	-3.79	-0.72	-0.72	-5.92
4-CONH ₂	-1.49	0.36	-1.85	-3.34	-2.21	-2.57	-0.36	-1.13	-5.20
4-SO ₂ NH ₂	-1.82	0.57	-2.39	-4.21	-3.01	-3.53	-0.57	-1.25	-6.95

CAPÍTULO 2

2- OBJETIVOS DA TESE

1- Realizar modificações na estrutura molecular de alguns produtos naturais ativos farmacologicamente, como a xantoxilina, isolada da Sebastiania schottiana, e que apresentou atividade antiespasmódica, e da astilbina, isolada da Hymenaea martiana, que apresentou efeito antiinflamatório, no intuito de obter derivados análogos à moléculas de atividade farmacológica comprovada, e testar os compostos obtidos em diversos experimentos " in vitro " e " in vivo " procurando obter compostos antiespasmódicos, analgésicos, antiinflamatórios e antialérgicos mais potentes.

2- Sintetizar compostos análogos ao alcalóide natural filantimida, que demonstrou possuir atividade antiespasmódica e antimicrobiana, no intuito de obter compostos mais potentes nestes efeitos biológicos.

3- Investigar a relação estrutura-atividade sob o aspecto qualitativo, avaliando qual é o grupo farmacofórico essencial, ou seja, a característica da molécula que confere ação farmacológica aos produtos isolados e sintéticos, para poder predizer quais novas modificações devem ser realizadas nas estruturas em estudo.

4- Otimizar os efeitos farmacológicos ou biológicos propondo um racionamento de moléculas mais ativas através da utilização de modificação molecular simples e aplicação do Método de Topliss para correlacionar quantitativamente a estrutura química com a atividade biológica.

5- Obter dados comparativos sobre a atividade farmacológica dos compostos em estudo com a atividade de compostos conhecidos ou disponíveis no mercado, como a papaverina, aspirina, acetaminofeno, indometacina e ibuprofeno.

CAPÍTULO 3

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Isolamento da Xantoxilina

A Sebastiania schottiana foi coletada no município de Apiúna-SC, e as partes aéreas foram moídas e submetidas à dessecação (40 °C) em estufa. O material foi pesado e macerado com MeOH comercial à temperatura ambiente durante 15 dias e, após evaporação do solvente, foi obtido o "extrato metanólico bruto", que foi particionado sucessivamente com hexano para obtenção do "extrato de hexano". Este extrato foi cromatografado em uma coluna de sílica gel eluída com hexano. As primeiras frações foram desprezadas até o aparecimento da xantoxilina [Miguel, 1987], que foi recristalizada com hexano, dando um rendimento de cerca de 0,25 %. $P_f = 81$ °C; $IV(KBr)_{cm^{-1}}$: 3460 (OH) ; 2925 (CH); 1615 (CO); 1385 (CH₃). 1H -RMN(100 MHz, CDCl₃)ppm: 2,60 (s,3H,CH₃); 3,82 (s,3H,OCH₃); 3,85 (s,3H,OCH₃); 5,92 (d,J=2,5 Hz, 1H-Ar); 6,06 (d, J=2,5 Hz,1H-Ar); 14,03 (s,1H,OH).

3.2- Isolamento da Astilbina

As cascas secas de Hymeneae martiana foram moídas, submetidas à dessecação em estufa (40 °C) e colocadas em maceração com acetato de etila à temperatura ambiente durante 10 dias. Após evaporação do solvente, foi obtido o "extrato de acetato de etila ", que foi particionado sucessivamente com solventes de polaridade crescente, conforme anteriormente descrito [Carneiro, 1989]. A fração de acetato de etila foi cromatografada em coluna de sílica gel e eluída com

CHCl₃:MeOH (9:1, 8:2 e 5:5), obtendo-se a astilbina com elevado grau de pureza e rendimento de 6 %.

Pf= 180-2 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 3420 (OH), 1640 (C=O), 1600 (C=C); ¹H-RMN (C₅D₅N, 300 MHz) ppm: 7,64 (d,2H,Ar), 7,21 (d,2H,Ar), 6,46 (d,J=1,5 Hz,1H,Ar), 6,34 (d,J=1,5 Hz,1H,Ar), 5,45 (d,J=10,8 Hz,1H,C₂), 5,15 (d,J=10,8 Hz,1H,C₃), 5,10 (m,1H-5,ramnose), 5,00 (s,1H-1,ram.), 4,63 (dd, 1H-3,ram.), 4,46 (s,1H-2,ram.), 4,30 (t,1H-4,ram.), 1,70 (s,3H,CH₃,ram.)

3.3- Análise Química:

Os pontos de fusão foram determinados com um aparelho Microquímica AP-300 e não foram corrigidos. A análise elementar (CHN) foi realizada com um Perkin Elmer 2400. Os espectros de IV foram realizados em um Perkin Elmer 720 ou FT-16 PC em discos de KBr ou filme de NaCl. Os espectros de ¹H-RMN foram feitos em um Varian 60 ou 100 MHz e em um Brucker 200, 270 ou 300 MHz, usando solventes deuterados adquiridos comercialmente. Alguns solventes e reagentes foram purificados de maneira usual antes de usados.

3.4- Síntese dos compostos

Os derivados da xantoxilina e da astilbina foram obtidos utilizando alguns métodos já descritos na literatura, que serão citados a seguir, e outros modificados.

Os análogos da filantimida foram sintetizados usando-se conjuntamente os métodos de Cava [Cava et al.,1973] e Mustafa [Mustafa et al.,1961] ou estes métodos modificados [Nunes, 1986; Cechinel Filho et al., 1992].

Todos os compostos foram caracterizados por IV e ^1H -RMN e por ^{13}C quando necessário. Para as imidas foram também analisadas as porcentagens de C, H, e N e os valores encontrados foram compatíveis com os valores calculados.

A pureza dos compostos foi verificada através de cromatografia em camada delgada de alta resolução (Merck e Sigma), utilizando-se vários sistemas diferentes de eluentes e distintos reveladores. O rendimento dos compostos foi calculado a partir dos mesmos após purificação.

3.4.1- Síntese dos Derivados da Xantoxilina :

3.4.1.1- Síntese de 2-benzilóxi-4,6 dimetóxiacetofenona (1):

Xantoxilina (0,2 g/1,02 mmols) foi adicionada a uma solução contendo 2,0 ml de MeOH e NaOH (0,041 g/ 1,05 mmols). 10 ml de DMF foi juntado à mistura e após 5 min. foi adicionado brometo de benzila (1,05 mmols). A solução foi aquecida a 90-100 °C durante cerca de 2 horas e colocada sobre H_2O gelada. O produto foi extraído com CHCl_3 e purificado por cromatografia em camada preparativa usando AcOEt/hexano 1:2 como eluente. R= 80 %; Pf= 64 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3000-2800 (CH), 1690(CO), 1600 (C=C,Ar). ^1H -RMN (CDCl_3 , 60 MHz) ppm: 7,20 (s,5H-Ar), 6,05 (d, 1H-Ar), 5,93 (d,1H-Ar), 4,80 (s,2H, CH_2), 3,72 (s, 3H, OCH_3), 3,70 (s,3H, OCH_3), 2,30 (s,3H, COCH_3).

3.4.1.2- Síntese de 2-(4-clorobenzilóxi)-4,6 dimetóxiacetofenona (2):

Metodologia similar ao item 3.4.1.1. R=52 %; Pf= 89 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3000-2800 (CH), 1700 (C=O), 1600 (C=C). ^1H -RMN (CDCl_3 ,60 MHz) ppm: 7,55 (m,4H-

Ar),6,30 (d, 1H-Ar), 6,15 (d,1H-Ar), 5,30 (s,2H,CH₂), 3,82 (s,3H,OCH₃), 3,80 (s,3H,OCH₃), 2,30 (s, 3H,COCH₃).

3.4.1.3- Síntese de 2-(4-bromobenzilóxi)-4,6 dimetóxiacetofenona (3):

Metodologia similar a item 3.4.1.1. A purificação do composto foi por precipitação em H₂O e posterior recristalização em EtOH. R= 78 %; Pf= 109 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 2900 (CH), 1690 (C=O), 1600 (C=C,Ar). ¹H-RMN (CDCl₃,60 MHz) ppm:7,75-7,35 (m,4H-Ar), 6,31(d,1H-Ar), 6,29(d,1H-Ar), 5,15 (s,2H,CH₂), 3,90 (s,3H,OCH₃); 3,88 (s,3H,OCH₃), 2,50(s,3H,COCH₃).

3.4.1.4- Síntese de 2-(4-nitrobenzilóxi)- 4,6 dimetóxiacetofenona (4):

Metodologia similar ao item 3.4.1.3. R= 65 %; Pf= 159 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 3100-2700 (CH), 1695 (C=O); 1600(C=C,Ar); ¹H-RMN (CDCl₃,60 MHz) ppm: 8,10-7,40 (m,4H-Ar), 6,02(d,1H-Ar), 5,98 (d,1H-Ar), 5,10 (s,2H,CH₂), 3,75(s,3H,OCH₃), 3,72(s,3H,OCH₃), 2,30 (s,3H,COCH₃).

3.4.1.5- Síntese de 2-(4-fluorbenzilóxi)-4,6 dimetóxiacetofenona (5):

Metodologia similar ao item 3.4.1.1. R= 47 %; Pf= 58 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 3000-2800 (CH), 1700 (C=O), 1600 (C=C,Ar); ¹H-RMN (CDCl₃,60 MHz); 7,30-6,80 (m,4H-Ar), 5,98 (d,1H-Ar); 5,90 (d,1H-Ar); 4,80 (s,2H,CH₂), 3,80 (s,3H,OCH₃), 3,78 (s,3H,OCH₃), 2,40 (s,3H,COCH₃).

3.4.1.6- Síntese de 2-(4-metilbenzilóxi)-4,6 dimetóxiacetofenona (6):

Metodologia similar ao item 3.4.1.1. R= 40 %; Pf= 84 °C; IV (KBr)cm⁻¹: 3000 (CH), 1680 (C=O), 1600 (C=C,Ar); ¹H-RMN (CCl₄,60 MHz): 7,40 (s,4H,Ar), 6,20 (d,1H,Ar), 6,05 (d,1H,Ar), 5,0 (s,2H,CH₂), 3,81(s,3H,OCH₃), 3,79(s,3H,OCH₃), 2,50(s,3H,COCH₃), 1,20 (s,3H,CH₃).

3.4.1.7- Síntese de 2-(4-metóxi benzilóxi)-4,6 dimetóxiacetofenona (7):

Metodologia similar ao item 3.4.1.1.R= 55 %; Pf= 75 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 3000 (CH), 1690 (C=O), 1600 (C=C,Ar); ¹H-RMN (CDCl₃,60 MHz)ppm: 7,35(s,4H,Ar-H), 6,15 (d,1H,Ar), 6,00 (d,1H,Ar), 5,20 (s,2H,CH₂); 3,83 (s,3H,OCH₃), 3,80 (s,3H, OCH₃), 3,75 (s,3H,OCH₃), 2,35 (s,3H,COCH₃).

3.4.1.8- Síntese de 2-(4-tercbutilbenzilóxi)-4,6 dimetóxiacetofenona (8):

Metodologia similar ao item 3.4.1.1. R= 35 %; Pf= 100 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 2950-3050 (CH), 1702 (C=O), 1605 (C=C,Ar). ¹H-RMN (CDCl₃, 60MHz) ppm: 7,45(s,4H,Ar), 6,20 (d,1H,Ar), 6,15(d,1H,Ar), 5,05(s,2H,CH₂), 3,82(s,3H,OCH₃), 3,79(s,3H,OCH₃), 2,35(s,3H,COCH₃), 1,15(s,9H,3xCH₃).

3.4.1.9- Síntese de 2-(4-benzilóxi benzilóxi)-4,6 dimetóxiacetofenona (9):

Metodologia similar ao item 3.4.1.3. R= 40 %; Pf= 88 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 3000-2700(CH), 1698(C=O), 1597(C=C,Ar); ¹H-RMN(CDCl₃,60MHz)ppm: 7,75-7,15(2m.9H,2Ar), 6,50 (d,1H,Ar), 6,40(d,1H,Ar), 5,32(s,2H,CH₂), 5,25(s,2H,CH₂), 3,95(s,3H,OCH₃), 3,90 (s,3H,OCH₃), 2,60(s,3H,COCH₃).

3.4.1.10- Síntese de 2-(3,4-dimetilbenzilóxi)-4,6 dimetóxiacetofenona (10):

Metodologia similar ao item 3.4.1.1. R= 51 %; Pf= 57-9 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 3000 (CH), 1685(C=O), 1600(C=C,Ar); ¹H-RMN(CDCl₃,60 MHz)ppm: 7,35-7,10(m,3H,Ar), 6,30(d,1H,Ar), 6,20(d,1H,Ar), 5,00 (s,2H,CH₂), 3,82(s,3H,OCH₃), 3,80 (s,3H,OCH₃), 2,35(s,3H,COCH₃), 2,20(s,3H,CH₃), 2,10 (s,3H,CH₃).

3.4.1.11- Síntese de 2-hidróxi-3-bromo-4,6 dimetóxiacetofenona (11):

Xantoxilina(0,2g) foi solubilizada em 10 ml de AcOH glacial e a mistura foi colocada em banho de gelo e, por agitação, foi adicionada, gota a gota, uma solução de Br₂/AcOH, até permanecer a cor vermelha, indicando o excesso de bromo. Após cerca de 30 min., o precipitado formado foi filtrado e recristalizado com EtOH, obtendo-se 0,265 g do produto puro. R= 94,5 %; Pf= 185 °C (lit.[Beirne et al., 1970] Pf= 186-7 °C); IV(KBr) cm⁻¹: 3000-2700(CH), 1613(C=O), 1595 (C=C,Ar); ¹H-RMN (CDCl₃, 60MHz) ppm: 12,15 (s,1H,OH), 6,30(s,1H,Ar), 4,15 (s,3H, OCH₃), 4,10(s,3H,OCH₃), 2,75 (s,3H,COCH₃). ¹³C-RMN (CDCl₃,50MHz) ppm: 203,3 (C=O), 162,6(Cq), 162,4(Cq), 161,8(Cq), 106,3(Cq), 91,3(CH), 86,6(Cq), 56,3 (OCH₃), 55,7(OCH₃), 33,0(CH₃).

3.4.1.12- Síntese de 2-hidróxi-3,5 dibromo-4,6 dimetóxiacetofenona (12):

O composto (11) obtido anteriormente (0,2g) foi solubilizado em CHCl₃ e se adicionou, gota a gota, uma solução de Br₂/CHCl₃ até coloração vermelha. Após algumas horas, o solvente foi evaporado e o sólido recristalizado com n-hexano, obtendo-se 0,167 g do produto puro. R= 46 %; Pf= 109 °C (lit [Donnelly & Policky, 1965] Pf= 111 °C); IV(KBr)cm⁻¹: 3450 (OH), 3010-2970 (CH), 1614 (C=O), 1572

(C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 ,60MHz) ppm: 13,50 (s,1H,OH), 3,90 (s,3H,OCH₃), 3,87 (s,3H, OCH₃), 2,75 (s,3H,COCH₃).

3.4.1.13- Síntese de 2-benzoil-3-metil-4,6 dimetóxiacetofenona (13) :

Metodologia similar ao item 3.4.1.14. R= 31 %; Pf= 116 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3000-2850 (CH), 1625(C=O), 1600(C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 ,200MHz) ppm: 8,00-7,50 (m,5H,Ar), 6,55 (d,1H,Ar), 6,25 (d,1H,Ar), 3,80 (s,3H,OCH₃), 3,77 (s,3H, OCH₃), 2,75(s,3H,CH₃).

3.4.1.14- Síntese de 2-(4-bromobenzoil)-3-metil-4,6 dimetóxi benzofurano (14):

Foram solubilizados 0,2 g de xantoxilina em uma solução contendo 5 ml de MeOH, 0,05 g de NaOH e 15 ml de DMF. Após adição de 0,28 g de brometo de p-bromo fenacila, a mistura foi aquecida cerca de 1,5 horas à 90-100 °C e vertida sobre gelo picado e deixada 24 horas na geladeira. Após filtração, o precipitado foi recristalizado com EtOH, obtendo-se 0,19 g do produto puro. R= 47,5 %, Pf= 185 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3000-2900(CH), 1630 (C=O), 1600(C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 60 MHz) ppm: 8,00-7,50 (m,4H,Ar), 6,60 (d,1H,Ar), 6,30 (d,1H,Ar), 4,00 (s,3H, OCH₃), 3,97(s,3H,OCH₃), 2,90(s,3H,CH₃). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 ,50MHz) ppm: 183,6(C=O), 162,5(Cq), 157,0(Cq), 156,8(Cq), 137,1(Cq),131,4(CH), 131,1(CH), 129,7(Cq), 127,0(Cq), 94,9(CH), 87,5(CH), 55,8(2xOCH₃), 12,0(CH₃).

3.4.1.15- Síntese de 2-(4-metóxi benzoil)-3-metil-4,6 dimetóxi benzofurano (15):

Metodologia similar ao item 3.4.1.14. R= 30 %; Pf= 111 °C; IV (KBr) cm^{-1} :

3000-2850 (CH), 1620(C=O), 1590 (C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 200 MHz) ppm: 8,10 (d,2H,Ar), 7,00 (d,2H,Ar), 6,60 (d,1H,Ar), 6,25 (d,1H,Ar), 3,9-3,8 (3 s, 9H, 3OCH₃), 2,68 (s,3H,CH₃).

3.4.1.16-Síntese de 2-(4-bromobenzoil)-3-metil-4,6 dimetóxi-7-bromobenzo-furano (16):

50 mg do composto (14) foram dissolvidos em AcOH, onde foi adicionado a esta mistura Br₂/AcOH até a permanência da cor vermelha. Após 30 min. de repouso, a solução foi derramada sobre H₂O gelada. O precipitado foi recristalizado com EtOH, obtendo-se 30 mg do produto puro. R= 50 %; Pf= 178-181 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 2950 (CH), 1630 (C=O), 1595 (C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl₃,300MHz) ppm: 8,10 (d, 2H, Ar), 7,70 (d,2H,Ar), 6,35 (s,1H,Ar), 4,00 (s,3H,OCH₃), 3,95 (s,3H,OCH₃), 2,75 (s,3H,CH₃).

3.4.1.17- Síntese de 2-hidróxi-4,6 dimetóxi-chalcona (17):

A metodologia empregada foi anteriormente descrita por Guider [Guider et al., 1955] para a síntese de chalconas. Assim, uma mistura contendo xantoxilina (0,18 g), 15 ml de EtOH, 0,1 g de NaOH (com o mínimo de H₂O) e 0,1 g de benzaldeído foi deixada à temperatura ambiente por várias horas. Esta mistura foi então vertida sobre AcOH diluído gelado, cujo precipitado formado foi recristalizado com n-hexano, obtendo-se 0,135 g do produto puro. R= 52 %; Pf= 84-5 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 3400(OH), 3000-2900(CH),1630(C=O),1590(C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl₃,60MHz) ppm:16,30 (s,1H,OH), 8,10 (s,2H,H α -H β) 7,80 (m,5H,Ar), 6,28 (d,1H,Ar), 6,20 (d,1H,Ar), 4,00 (s,3H,OCH₃), 3,98 (s,3H,OCH₃).

3.4.1.18- Síntese de 2-hidróxi-4,6 dimetóxi-4'-cloro chalcona (18):

Metodologia similar ao item 3.4.1.17. O produto foi recristalizado com CCl_4 . R= 70,5 %; Pf= 167 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3450 (OH), 3000-2900(CH), 1630(C=O), 1590 (C=C); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 ,60MHz) ppm:16,60 (s,1H,OH), 7,90 (s,2H,H α -H β), 7,75 (d,2H,Ar), 7,65 (d,2H,Ar), 6,28 (d,1H,Ar), 6,25 (d,1H,Ar), 3,95 (s, 3H, OCH $_3$), 3,85 (s,3H,OCH $_3$).

3.4.1.19- Síntese de 2-hidróxi-4,6 dimetóxi-3',4' metilenodioxichalcona (19):

Metodologia similar ao item 3.4.1.17. O produto foi recristalizado com Hexano/AcOEt 3:1. R= 88,5 %; Pf= 160 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3400 (OH), 2990-2850 (CH), 1625 (C=O), 1590 (C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 ,200MHz) ppm: 14,30 (s,1H,OH), 7,75 (s,2H,H α -H β), 7,60-6,80 (m,3H,Ar), 6,15 (s,1H,Ar), 3,90 (s,3H, OCH $_3$), 3,82(s,3H,OCH $_3$), 2,15 (s,2H,CH $_2$).

3.4.1.20- Síntese de 2-p-toluenossulfono-4,6 dimetóxiacetofenona (20):

Uma mistura de 0,2 g de xantoxilina, 0,05 g de NaOH, 10 ml de isoprOH, 10 ml de DMF e 0,25 g de cloreto de p-toluenossulfonila foi refluxada durante 2 horas. Após esfriada, a mistura foi adicionada em 100 ml de H_2O e o produto bruto foi extraído com CHCl_3 . Após secagem com MgSO_4 anidro, a solução orgânica foi deixada à temperatura ambiente por alguns dias, precipitando 0,16 g do produto puro. R= 45 %; Pf= 150 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3000-2900(CH), 1680(C=O), 1600(C=C,Ar);

$^1\text{H-RMN}(\text{MeOD}, 270 \text{ MHz})\text{ppm}$: 7,80(dd,2H,Ar), 7,50(dd,2H,Ar), 6,60(d,1H,Ar), 6,20 (d,1H,Ar), 3,95 (s,3H,OCH₃), 3,85 (s,3H,OCH₃), 2,50 (s,3H,COCH₃), 2,25 (s,3H,CH₃).

3.4.1.21- Síntese de 2-hidróxi-3-bromo-4,6 dimetóxi chalcona (21):

Metodologia similar ao ítem 3.4.1.17, usando (11) ao invés da xantoxilina. Purificação por recristalização com Hexano/AcOEt 3:1. R= 72,5 %; Pf= 183 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3450(OH), 3000-2950(CH), 1650 (C=O), 1580(C=C,Ar) ; $^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3, 200 \text{ MHz})\text{ppm}$: 14,78 (s,1H,OH), 7,83 (s,2H,H α -H β), 7,60-7,25 (m, 5H, Ar), 6,06(s,1H,Ar), 3,99(s,3H,OCH₃), 3,97 (s,3H,OCH₃).

3.4.1.22- Síntese de 2-hidróxi-3-bromo-4,6 dimetóxi-4'-cloro chalcona (22):

Metodologia similar ao ítem 3.4.1.21. Purificação por recristalização com EtOH/AcOEt/Me₂CO 2:2:1 ; R= 56 %; $^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3)\text{ppm}$: 13,95 (s,1H,OH), 8,05 (s,2H,H α -H β), 7,65 (d,2H,Ar), 7,45 (d,2H,Ar), 6,10 (s,1H,Ar), 4,10 (s,3H, OCH₃), 4,05(s,3H,OCH₃).

3.4.1.23- Síntese de 2-hidróxi-3-bromo-4,6-dimetóxi-4'-bromo chalcona (23):

Metodologia similar ao ítem 3.4.1.21. Purificado por recristalização com EtOH/Me₂CO/CHCl₃ 2:2:1; R= 60 %; Pf= 246 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3450 (OH), 1632 (C=O), 1555 (C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6, 200\text{MHz}) \text{ppm}$: 14,60 (s, 1H, OH), 8,05 (s,2H,H α -H β), 7,90-7,55 (m,4H,Ar), 6,30 (s,1H,Ar), 3,50 (s,3H,OCH₃), 3,45(s,3H,OCH₃).

3.4.1.24- Síntese de 2-hidróxi-3-bromo-4,6-dimetóxi-4'-metil chalcona (24):

Metodologia similar ao item 1.4.1.21. Purificação por recristalização com $\text{CCl}_4/\text{Me}_2\text{CO}$ 4:1. R= 50 %; Pf= 184-186 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3450 (OH), 1630 (C=O), 1555 (C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 ,60 MHz) ppm: 13,90 (s,1H,OH), 8,10 (s, 2H, H α -H β), 7,70 (d,2H,Ar), 7,50 (d,2H,Ar), 6,20 (s,1H,Ar), 4,10 (s,3H,OCH $_3$), 4,05 (s,3H,OCH $_3$), 1,80 (s,3H,CH $_3$).

3.4.1.25- Síntese de 2-hidróxi-3-bromo-4,6 dimetóxi-4'-metóxi chalcona (25):

Metodologia similar ao item 1.4.1.21. Produto purificado por recristalização com EtOH. R= 62 %; Pf= 145 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3500(OH), 3025-2850(CH), 1625(C=O), 1585 (C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 ,60 MHz)ppm:13,85(s,1H,OH), 8,15 (s,2H,H α -H β), 7,85(d,2H,Ar), 7,75(d,2H,Ar), 6,35(s,1H,Ar), 4,20(s,3H,OCH $_3$), 4,15(s,3H,OCH $_3$), 4,10 (s,3H,OCH $_3$).

3.4.1.26- Síntese de 2-hidróxi-3-bromo-4,6-dimetóxi-4'-dimetilamino chalcona (26):

Metodologia similar ao item 1.4.1.21. Produto purificado por recristalização com EtOH/ Me_2CO 2:1. R= 43 %; Pf= 210 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3450(OH), 3000-2900(CH), 1608(C=O), 1550(C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 60 MHz) ppm: 15,25 (s,1H,OH), 7,83 (s,2H,H α -H β), 7,73-6,66 (m,4H,Ar), 6,04 (s,1H,Ar), 4,00 (s,3H, OCH $_3$), 3,97 (s,3H,OCH $_3$), 3,04 (s,6H,N(CH $_3$) $_2$)

3.4.1.27- Síntese de 2-acetóxi-3-bromo-4,6 dimetóxiacetofenona (27):

0,2 de xantoxilina monobromada (11) foram dissolvidos em uma solução contendo 2 ml de Ac₂O e 2 ml de piridina. Após aquecimento em banho-maria durante 1 hora a 90 °C, foi adicionado gelo picado à mistura e o precipitado formado foi recristalizado com MeOH, obtendo-se 0,18 g do produto puro. R= 78 %; Pf= 148 °C; IV (KBr) cm⁻¹: 3000-2760 (CH), 1755 (C=O,éster), 1670 (C=O,cetona), 1585 (C=C,Ar); ¹H-RMN (CDCl₃, 60 MHz)ppm: 6,55 (s,1H,Ar), 4,00 (s,3H,OCH₃), 3,95 (s,3H,OCH₃), 2,50 (s,3H,OCOCH₃), 2,32 (s,3H,COCH₃).

1.4.1.28- Síntese de 2,4,6-trimetóxi-3-bromo- acetofenona (28):

0,2 g de xantoxilina monobromada (11) foram dissolvidos em 20 ml de Me₂CO. Após adição de 0,05 g de NaOH em 1 ml de H₂O e 0,1 ml de Me₂SO₄, a solução foi deixada durante 24 horas a temperatura ambiente. A seguir, o solvente foi evaporado e o sólido recristalizado com hexano, obtendo-se 0,17 g do produto puro. R= 81 %; Pf= 71°C; IV(KBr)cm⁻¹: 2990-2850(CH), 1685(C=O, 1585(C=C,Ar); ¹H-RMN (CDCl₃,60 MHz)ppm: 6,15 (s,1H,Ar), 3,90 (s,3H,OCH₃), 3,8 5(s,3H,OCH₃), 3,80 (s,3H,OCH₃), 2,35(s,3H,COCH₃).

3.4.1.29- Síntese de 2-etil-3,5 dimetóxi-6-bromo-fenol (29):

0,3 g de xantoxilina monobromada (11) foram dissolvidos em cerca de 3 ml de MeOH e juntados a uma mistura contendo zinco amalgamado (1,5 g de zinco granulado, 60 mg de HgCl₂ e 4,5 ml de H₂O). A esta solução foram adicionados 3 ml de H₂O, 3 ml de HCl e 5 ml de EtOH. A mistura total foi refluxada durante 2

horas e deixada 3 dias no freezer, precipitando o produto bruto que foi recristalizado com EtOH 50 %, obtendo-se 130 mg do produto puro.

R= 46 %; Pf=71°C; IV(KBr)cm⁻¹: 3500 (OH), 3000-2800 (CH), 1595 (C=C,Ar); ¹H-RMN (CDCl₃,60MHz)ppm: 6,25(s,1H,Ar), 5,80 (s,1H,OH), 3,90(s,3H,OCH₃), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 2,65(q,2H,CH₂), 1,00(t,3H,CH₃).

3.4.2- Síntese de derivados da astilbina

3.4.2.1- Síntese da dihidroquercetina ou taxifolin (31):

Este composto foi obtido através de hidrólise ácida da astilbina, como anteriormente descrito [Cambie,1959]. Astilbina(1,5 g) foi refluxada durante 2 horas com cerca de 35 ml de H₂SO₄ 7 % e após 3 extrações com 50 ml de éter etílico, obteve-se 1 g de taxifolin, e após recristalizado com H₂O várias vezes foi obtido 0,45 g do produto puro. R= 70 %; Pf= 238 °C (lit [Cambie,1959] Pf= 239-240 °C); IV(KBr)cm⁻¹: 3500-3100(OH), 1635 (C=O), 1605 (C=C); ¹H-RMN (CD₃COCD₃, 200 MHz) ppm:11,70 (s,1H,OH-Ar), 9,85 (s,1H,OH-Ar), 8,10(s,1H,OH-Ar), 8,05(s,1H,OH-Ar), 7,05(d, 1H-5', ArB), 6,90 (q,1H-6'-Ar), 6,85 (d,1H-2',ArB), 5,95 (d,1H-6,ArA), 5,88 (d,1H-8,ArA), 4,95 (d,1H,C₂), 4,60 (d,1H,C₃); ¹³C-RMN (DMSO-d₆,50MHz) ppm: 197,7 (C=O), 166,7(Cq), 163,3(Cq), 162,5(Cq), 145,7(Cq), 144,9(CH), 128,0(Cq), 119,4(CH), 115,3(CH), 115,1(CH), 100,5(Cq), 95,9(CH), 94,9(CH), 83,0(Cq), 71,5(CH). Este espectro foi idêntico ao descrito na literatura para este composto [Markham, 1982].

3.4.2.2- Síntese do taxifolin pentaacetilado (32):

A mistura contendo 0,1 g de taxifolin, 2 ml de anidrido acético e 0,1 g de acetato de sódio foi aquecida em banho-maria a uma temperatura de 80-90 °C durante 3 horas. Posteriormente, esta mistura foi adicionada sobre H₂O gelada com vigorosa agitação. A solução foi deixada cerca de 2 horas no freezer, ocorrendo a formação de precipitado, que foi recristalizado 3 vezes com Me₂CO-MeOH / H₂O 1:1, obtendo-se cerca de 0,15 g do composto puro. R= 47 %; Pf= 128 °C (lit [Awastri & Mitra, 1962] : Pf= 130 °C); IV(KBr)cm⁻¹: 3050-2900 (CH), 1770-1740 (4 x C=O), 1730 (C=O), 1695 (C=O), 1605 (C=C,Ar); ¹³C-RMN (CDCl₃, 50MHz)ppm: 187,5(C=O), 184,9(C=O), 180,6(C=O), 177,3(C=O), 172,9(C=O), 169,1(C=O), 167,9(Cq), 162,2(Cq), 156,4(Cq), 151,4(Cq), 142,8(CH), 133,5(Cq), 125,3(CH), 123,8(CH), 122,8(CH), 111,4(Cq), 110,6(CH), 109,0(CH), 80,3(Cq), 73,1(CH), 30,9(COCH₃), 21,1(COCH₃), 20,9(COCH₃), 20,6(COCH₃), 20,3(COCH₃).

3.4.2.3- Síntese do taxifolin tetrametilado (33):

Taxifolin (0,2 g) foi adicionado a uma mistura contendo 1,66 g de K₂CO₃ anidro e 10 ml de Me₂CO. A seguir, 1 ml de Me₂SO₄ foi adicionado lentamente à solução em porções de 0,1 ml durante 1 hora. Após 14 horas de refluxo, a solução foi filtrada e o sólido resultante após evaporação de Me₂CO foi recristalizado com EtOH 90 %, obtendo-se 0,13 g do produto puro. R= 60 %; Pf= 166 °C (lit [Hergert et al., 1956]: Pf= 169-170 °C); IV(KBr)cm⁻¹: 3495 (OH), 3010-2825(CH), 1675 (C=O), 1625 (C=C,Ar); ¹H-RMN(CDCl₃, 200 MHz)ppm: 7,15 (d,1H-5',ArB), 7,10 (q,1H-6',ArB), 6,95 (d,1H-2',ArB), 6,12(d,1H-6,ArA), 6,10 (d,1H-8,ArA), 5,00 (d,1H,C₂), 4,50 (d,1H,C₃), 3,95-3,80 (4s,12H,4OCH₃). ¹³C-RMN (CDCl₃, 50

MHz) ppm: 190,9(C=O), 167,1(Cq), 165,0 (Cq), 162,2(Cq), 149,9(Cq), 149,2(CH), 128,9(Cq), 120,5(CH), 111,2(CH), 110,3(CH), 93,7(Cq), 93,4(CH), 83,4(Cq), 72,7(CH), 56,3(OCH₃), 56,0(OCH₃), 56,0(OCH₃), 55,8 (OCH₃).

3.4.3- Síntese de análogos da filantimida

3.4.3.1- Síntese de N-fenilmaleimida (34):

1 mol de anilina foi adicionada a uma solução de 1 mol de anidrido maleico em éter etílico com agitação magnética, formando o ácido N-fenilmaleâmico. Este ácido (1 mol) foi adicionado a 4 mols de anidrido acético e 0,5 mol de acetato de sódio anidro. A mistura foi deixada em banho-maria a 60-80 °C, com agitação ocasional, durante 45 minutos. Em seguida, a mistura foi vertida sobre H₂O com gelo picado. O precipitado foi lavado com H₂O e recristalizado com ciclohexano, dando um rendimento de 85 %. Pf= 87°C (lit [Cava et al., 1970] Pf= 89 °C). ¹H-RMN(CCl₄,60MHz)ppm: 7,40(s,5H,Ar), 6,60(s,2H,CH=CH).

3.4.3.2- Síntese de 4-cloro-N-fenilmaleimida (35):

Metodologia similar ao item 3.4.3.1. Produto recristalizado com EtOH; R= 40 %; Pf= 111 °C (lit.[Kretov & Kulchitskaya, 1956]: Pf= 109-110 °C); IV(KBr)cm⁻¹: 3115-1800 (CH), 1710 (C=O), 1584 (C=C,Ar), ¹H-RMN (CDCl₃,200 MHz)ppm: 7,44 (d,2H,Ar), 7,32 (d,2H,Ar), 6,86 (s,2H,CH=CH).

3.4.3.3- Síntese de 4-metil-N-fenilmaleimida (36):

Metodologia similar ao item 3.4.3.1. Produto recristalizado com acetona/hexano 1:1
R= 45 %; Pf= 148 °C (lit [Machida et al., 1977]:Pf= 148,5-150 °C); IV(KBr)
cm⁻¹:3000(CH), 1700(C=O), 1600(C=C,Ar).

3.4.3.4- Síntese de 4-metóxi-N-fenilmaleimida (37):

Metodologia similar ao item 3.4.3.4. Produto recristalizado com EtOH; R= 40
%; Pf= 146 °C (lit [Kretov & Kulchitskaya, 1956]: Pf= 148 °C) ; IV(KBr)cm⁻¹:
3050-2800(CH), 1700(C=O), 1590 (C=C,Ar); ¹H-RMN (CCl₄,60MHz) ppm: 7,70-
7,00 (m,4H,Ar), 6,85 (s,2H, CH=CH), 3,80 (s,3H,OCH₃).

3.4.3.5- Síntese de 3,4-dicloro-N-fenilmaleimida (38):

Metodologia similar ao item 3.4.3.4. Produto recristalizado com EtOH;
R= 38 %; Pf= 104 °C ; ¹H-RMN(CCl₄,60MHz)ppm: 7,85-7,40 (m,3H,Ar), 7,10
(s,2H,CH=CH).

3.4.3.6- Síntese de 4-butóxi-N-fenilmaleimida (39):

Metodologia similar ao item 3.4.3.1. R= 45 %; Pf= 160 °C; IV(KBr)
cm⁻¹:3280-2870(CH), 1708(C=O),1610(C=C,Ar); ¹H-RMN(CCl₄,60 MHz)ppm:
7,62 (d,2H,Ar), 6,96 (d,2H,Ar), 6,67 (s,2H,CH=CH), 4,00 (t,2H,CH₂), 1,72 (m,2H,
CH₂), 1,50 (m,2H,CH₂), 0,99 (t,2H,CH₃).

3.4.3.7- Síntese de N-benzilmaleimida (41):

Metodologia similar ao item 3.4.3.1, usando ácido acético glacial/refluxo (1-2 horas) como agente desidratante. Produto purificado por rec. com EtOH. R= 42 %, Pf= 69-71 °C (lit [Lukes & Pergal,1962]: Pf= 70 °C); ¹H-RMN (CDCl₃, 60 MHz) ppm: 7,60 (m,5H,Ar), 6,95 (s, 2H,CH=CH), 4,85 (s, 2H, CH₂).

3.4.3.8- Síntese de 4-cloro-N-benzilmaleimida (42):

Metodologia similar ao item 3.4.3.6. Produto rec. com EtOH; R= 55 %; Pf= 64 °C; ¹H-RMN(CCl₄,60MHz) ppm: 7,60 (s,4H,Ar), 6,93 (s,2H,CH=CH), 4,80 (s,2H, CH₂).

3.4.3.9- Síntese de 4-metil-N-benzilmaleimida (43):

Metodologia similar ao item 3.4.3.6. Produto rec. com EtOH; R=30 %, Pf= 93 °C; ¹H-RMN(CCl₄,60 MHz) ppm: 7,50 (m,4H,Ar), 6,83 (s,2H,CH=CH), 4,70 (s,2H, CH₂), 2,60 (s,3H,CH₃).

3.4.3.10- Síntese de 4-metóxi-N-benzilmaleimida (44):

Metodologia similar ao item 3.4.3.6. Produto rec. com EtOH; R= 55 %; Pf = 89°C; IV(KBr)cm⁻¹: 2920-2850 (CH), 1706 (C=O), 1600 (C=C,Ar); ¹H-RMN (CCl₄, 60MHz) ppm: 7,60-7,10 (m,4H,Ar), 6,85 (s,2H,CH=CH), 4,70 (s,2H,CH₂), 3,88 (s,3H,OCH₃).

3.4.3.11- Síntese de 3,4-dicloro-N-benzilmaleimida (45):

Metodologia similar ao item 3.4.3.6. Produto rec. com EtOH; R=65 %; Pf= 98 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 3100 (CH), 1708(C=O), 1600 (C=C,Ar); ¹H-RMN(CCl₄, 60 MHz): 7,50-7,25 (m,3H,Ar), 6,75(s,2H,CH=CH), 4,60(s,2H,CH₂).

3.4.3.12- Síntese de N-fenetilmaleimida (46):

Metodologia similar ao item 3.4.3.6; Produto rec. com EtOH; R= 60 %; Pf= 109 °C (lit [Lukes & Pergal, 1962]: Pf= 111 °C); IV(KBr)cm⁻¹: 3000-2800 (CH), 1700 (C=O), 1400 (C=C,Ar); ¹H-RMN(CDCl₃,60MHz) ppm: 7,30 (s,5H,Ar), 6,35 (s,2H, CH=CH), 3,60(t,2H,CH₂), 2,80(t,2H,CH₂).

3.4.3.13- Síntese de 4-cloro-N-fenetilmaleimida (47):

Metodologia similar ao item 3.4.3.6. Produto rec. com EtOH; R= 49 %; Pf= 70 °C; IV(KBr) cm⁻¹: 2940 (CH), 1706 (C=O), 1600 (C=C,Ar); ¹H-RMN (CDCl₃, 60MHz) ppm: 7,45 (s,4H,Ar), 6,85 (s,2H,CH=CH), 3,80 (t,2H,CH₂), 3,00 (t,2H, CH₂).

3.4.3.14- Síntese de 2-cloro-N-fenetilmaleimida (48):

Metodologia similar ao item 3.4.3.6. Produto rec. com EtOH; R=30 %; Pf=82 °C; IV(KBr) cm⁻¹:2950 (CH), 1702 (C=O), 1605 (C=C,Ar); ¹H-RMN(CDCl₃, 60 MHz) ppm: 7,75-7,40 (m,4H,Ar), 6,90 (s,2H,CH=CH), 4,00 (t,2H,CH₂), 3,25 (t,2H,CH₂).

3.4.3.15- Síntese de 4-metil-N-fenetilmaleimida (49):

Metodologia similar ao item 3.4.3.6. Produto por cromatografia em coluna eluida com hexano/AcOEt 2:1; R= 21 %; Pf=86 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 3170-2880(CH), 1706 (C=O), 1584(C=C,Ar); ¹H-RMN (CDCl₃,60MHz) ppm: 7,15 (s,4H,Ar), 6,65 (s,2H,CH=CH), 3,65 (t,2H, CH₂), 2,80 (t,2H,CH₂), 2,28 (s,3H,CH₃).

3.4.3.16- Síntese de N-fenilpropilmaleimida (50):

Metodologia similar ao item 3.4.3.6. Produto rec. com EtOH; R=40 %; Pf= 80-1 °C; IV(KBr)cm⁻¹:3080-2860(CH),1704(C=O),1600(C=C,Ar);¹H-RMN (CCl₄, 60 MHz)ppm: 7,40(s,5H,Ar), 6,90(s,2H,CH=CH), 3,60(t,2H,CH₂), 2,70 (s, 2H ,CH₂), 2,00 (m ,2H, CH₂).

3.4.3.17- Síntese de N-fenilbutilmaleimida (51):

Metodologia similar ao item 3.4.1.6. Produto purificado por c. coluna eluida com hexano/AcOEt 2:1. R= 32 %; Pf= 62 °C; IV(KBr) cm⁻¹: 3100-2850(CH), 1702(C=O), 1600(c=C,Ar); ¹H-RMN (CCl₄,60MHz) ppm: 7,20 (s,5H,Ar), 6,65 (s,2H,CH=CH), 3,50 (t,2H , CH₂), 2,55 (t, 2H, CH₂), 1,50 (m,4H,2xCH₂).

NOTA: O composto 2^o-metil-N-fenilmaleimida (40) foi adquirido comercialmente da Sigma

3.4.3.18- Síntese de 3-dimetilamino-N-fenilsuccinimida (52):

1 mol de N-fenilmaleimida foi dissolvido em CH₃CN, sendo a dimetilamina (1 mol) adicionada a esta solução, que foi agitada e aquecida ocasionalmente durante 1-2 horas. Após evaporação do solvente, o produto foi recristalizado com Bu-OH. R=60 %; Pf= 93 °C; IV(KBr)cm⁻¹:3000-2750(CH), 1700(C=O), 1600(C=C,Ar); ¹H-RMN(CCl₄,60MHz)ppm: 7,80 (s,5H,Ar), 4,30-3,90 (dd,1H,CH), 3,30-2,70 (m,2H, CH₂).

3.4.3.19- Síntese de 3-dietilamino-N-fenilsuccinimida (53):

Metodologia similar ao item 3.4.3.16 usando dietilamina. Produto rec. com ciclohexano. R=30 %; Pf= 112 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 3000-2800(CH), 1700(C=O), 1595 (C=C,Ar); ¹H-RMN (CDCl₃,200MHz) ppm: 7,50-7,40 (m,5H,Ar), 4,25-4,10 (dd, 1H,CH), 3,00(q,2H,CH₂), 2,80-2,60(m,2H,CH₂), 1,10(t,3H,CH₃).

3.4.3.20- Síntese de 3-benzilamino-N-fenilsuccinimida (54):

Metodologia similar ao item 3.4.3.16 usando benzilamina e benzeno como solvente. O produto foi rec. com CCl₄. R= 58 %; Pf= 101 °C; IV(KBr)cm⁻¹: 3500 (NH), 3100-2750 (CH), 1700 (C=O), 1600 (C=C,Ar); ¹H-RMN(CDCl₃, 60MHz) ppm: 7,60 (s,5H,Ar), 7,50 (s,5H,Ar), 4,00 (dd,2H,CH₂), 3,90-3,70 (m,1H,NH), 2,90-2,65 (dd,1H,CH), 2,10-1,80 (m,2H,CH₂).

3.4.3.21- Síntese de 3-morfolino-N-fenilsuccinimida (55):

Metodologia similar ao item 3.4.3.16 usando morfolina e benzeno. Produto rec. com CCl_4 . R= 58 %; Pf= 156 °C; IV(KBr) cm^{-1} : 3060-2850(CH), 1706(C=O), 1598 (C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 ,60MHz) ppm: 7,60-7,25 (m,5H,Ar), 3,80-3,50 (m, CH_2), 3,00-2,30 (m, CH_2), 1,20 (t,2H, CH_2).

3.4.3.22- Síntese de 3-dimetilamino-N-benzilsuccinimida (56):

Metodologia similar ao item 3.4.3.16 usando N-benzilmaleimida. Produto purificado por c. coluna eluida com hexano/AcOEt 2:1. R=80 %; óleo; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 ,60MHz)ppm: 7,60 (s,5H,Ar), 4,85 (s,2H, CH_2), 2,50 (s,6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 4,10-3,80 (dd,1H,CH), 3,00-2,75 (m,2H, CH_2).

3.4.3.23- Síntese de 3-dimetilamino-N-fenetilsuccinimida (57):

Metodologia similar ao item 3.4.3.16 usando N-fenetilmaleimida. Produto purificado por c. coluna eluida com hexano/AcOEt 2:1.R= 45 %; óleo; IV(filme NaCl) cm^{-1} : 2900 (CH), 1700(C=C), 1600(C=C,Ar); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 ,60MHz) ppm: 7,15(s,5H,Ar), 3,65-3,20(dd,1H,CH), 2,60(t,2H, CH_2), 2,20-2,00(m,2H, CH_2).

3.4.3.24-Síntese de 3-dietilamino-N-fenetilsuccinimida (58):

Metodologia similar ao item 3.4.3.16 usando N-fenetilmaleimida. Produto purificado por c. coluna eluida com hexano/AcOEt 2:1. R= 58 %; óleo; $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 60 MHz)ppm: 7,52-7,45 (m,5H,Ar), 4,30-4,20(dd,1H,CH), 4,05(t,2H, CH_2), 3,42(t,2H, CH_2), 3,05(q,2H, CH_2), 2,75-2,58(m,2H, CH_2), 1,00(t,3H, CH_3).

3.4.3.25- Síntese de 3-benzilamino-N-fenetilsuccinimida (59):

Metodologia similar ao item 3.4.3.16 usando benzilamina, N-fenetilamina e benzeno. Produto purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano/AcOEt 2:1. R= 45 %; óleo; $^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3, 60\text{MHz})$ ppm: 7,65 (s,5H,Ar), 7,55 (s,5H,Ar), 4,02 (t,2H,CH₂), 3,86-3,72 (m,1H,NH), 3,30 (t,2H,CH₂), 2,90-2,72 (dd,1H,CH), 2,00-1,90 (m,2H,CH₂).

3.4.3.26- Síntese de 3-morfolino-N-fenetilsuccinimida (60):

Metodologia similar ao item 3.4.3.16 usando N-fenetilmaleimida, morfolina e benzeno. Produto rec. com EtOH. R= 31 %; Pf= 90,5 °C; $^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3, 60 \text{ MHz})$ ppm: 7,55-7,40 (m,5H,Ar), 4,10 (t,2H,CH₂), 3,95 (dd,1H,CH), 3,80-3,70 (m,CH₂), 3,30 (t,2H, CH₂), 3,00-2,50 (m,CH₂), 1,20(t,2H,CH₂).

3.4.3.27- Síntese de 3-piperidino-N-fenetilsuccinimida (61):

Metodologia similar ao item 3.4.3.16 usando N-fenetilmaleimida, piperidina e benzeno. Produto purificado por c. coluna eluída com hexano/AcOEt 2:1. R= 67 %; óleo; $^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3, 200\text{MHz})$ ppm: 7,60 (s,5H,Ar), 4,00 (t,2H,CH₂), 3,90 (dd,1H, CH), 3,40 (t,2H,CH₂), 3,30-3,00 (m,CH₂), 2,95-2,80 (2m,2H,CH₂), 2,40(t,2H,CH₂).

3.4.3.28- Síntese de 3-dimetilamino-N-fenilpropilsuccinimida (62):

Metodologia similar ao item 3.4.3.16 usando N-fenilpropilmaleimida. Produto purificado por c. coluna eluída com hexano/AcOEt 2:1. R= 50 %; óleo; $^1\text{H-RMN}$

(CCl₄,60MHz)ppm: 7,40 (s,5H,Ar), 3,75-3,45 (dd,1H,CH), 2,70 (t,2H,CH₂), 2,55 (t, 2H,CH₂), 2,00 (m,2H,CH₂).

3.4.3.29- Síntese de 3-dimetilamino-N-fenilbutilsuccinimida (63):

Metodologia similar ao item 3.4.3.16 usando N-fenilbutilmaleimida. Produto purificado por c. coluna eluida com hexano/AcOEt 2:1. R= 60 %; óleo; ¹H-RMN(CCl₄,60MHz): 7,50(s,5H,Ar), 4,00-3,85(dd,1H,CH), 3,65(t,2H,CH₂), 2,90-2,60(m,CH₂), 1,90-1,60(m,4H,2xCH₂).

3.4.3.30- Síntese de 3,3-dimetil-N-fenetilglutarimida (64):

1 mol de anidrido 3,3 dimetil-glutárico foi dissolvido em éter etílico. 1 mol de N-fenetilmaleimida foi adicionado a esta solução, formando o respectivo ácido maleâmico. Este ácido foi refluxado com uma mistura de cloreto de acetila/AcOH 2:1 durante 4 horas de acordo com o método anteriormente descrito para obtenção da N-fenetilglutarimida [Nunes et al., 1987c]. O produto foi extraído com CHCl₃ e purificado por c. coluna eluida com hexano/AcOEt 2:1. R= 50 %; óleo; IV(filme NaCl)cm⁻¹: 3000 (CH), 1700 (C=O), 1600 (C=C,Ar); ¹H-RMN (CDCl₃,60MHz) ppm: 7,60 (s,5H,Ar), 4,10 (t,2H,CH₂), 3,30-2,70 (2t,4H,2xCH₂), 2,50 (s,3H,CH₃), 2,35 (s,3H, CH₃), 1,80 (t,2H,CH₂).

3.4.3.31- Síntese de N-antipirina maleimida (65):

Metodologia similar ao item 3.4.3.1 usando 4-aminoantipirina ao invés da amina anterior. O produto foi purificado por c. coluna eluida com hexano/AcOEt 2:1. R= 65 %; óleo ; IV(filme NaCl)cm⁻¹: 3100-2900 (CH), 1700 (C=O), 1650

(C=O), 1595 (C=C,Ar); ^1H -RMN (CDCl_3 ,60MHz) ppm: 7,60 (s,5H,Ar), 7,00 (s,2H,CH=CH), 3,23 (s,3H,CH₃), 2,20 (s,3H,CH₃).

CAPÍTULO 4

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo , para uma melhor compreensão, foi dividido em 3 partes, a saber:

PARTE 1: Derivados da xantoxilina

PARTE 2: Derivados da astilbina

PARTE 3: Análogos da filantimida

PARTE 1

4.1- Derivados ou análogos da xantoxilina

A xantoxilina, uma acetofenona isolada em nossos laboratórios do extrato hexânico da Sebastiania schottiana, além de seu perfil antiespasmódico [Calixto et al., 1990, Miguel, 1987], mostrou também ação antibacteriana [Godoy et al., 1991] e antifúngica [Lima et al., 1994]. Estes efeitos, aliado ao bom rendimento deste composto (0,25 %), nos levaram a procurar obter outros compostos mais ativos e determinar os fatores estruturais responsáveis pelos efeitos estudados, baseados em trabalhos já descritos na literatura, conforme será observado no decorrer deste estudo.

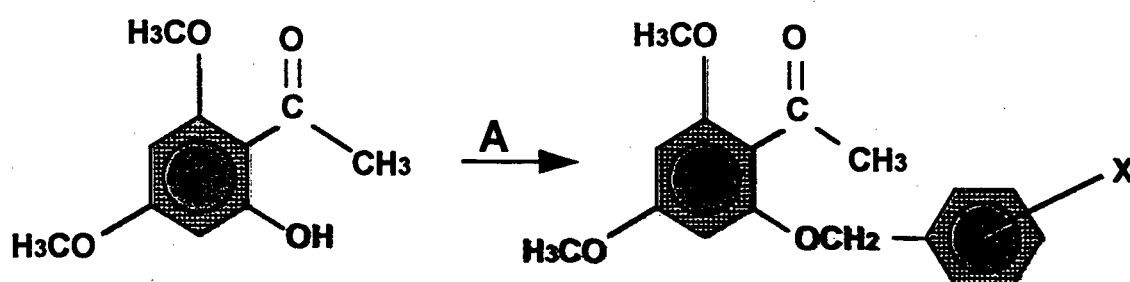
4.1.1- Síntese

Os esquemas a seguir ilustram as etapas realizadas para obtenção de derivados da xantoxilina :



PARTE 1
DERIVADOS DA XANTOXILINA

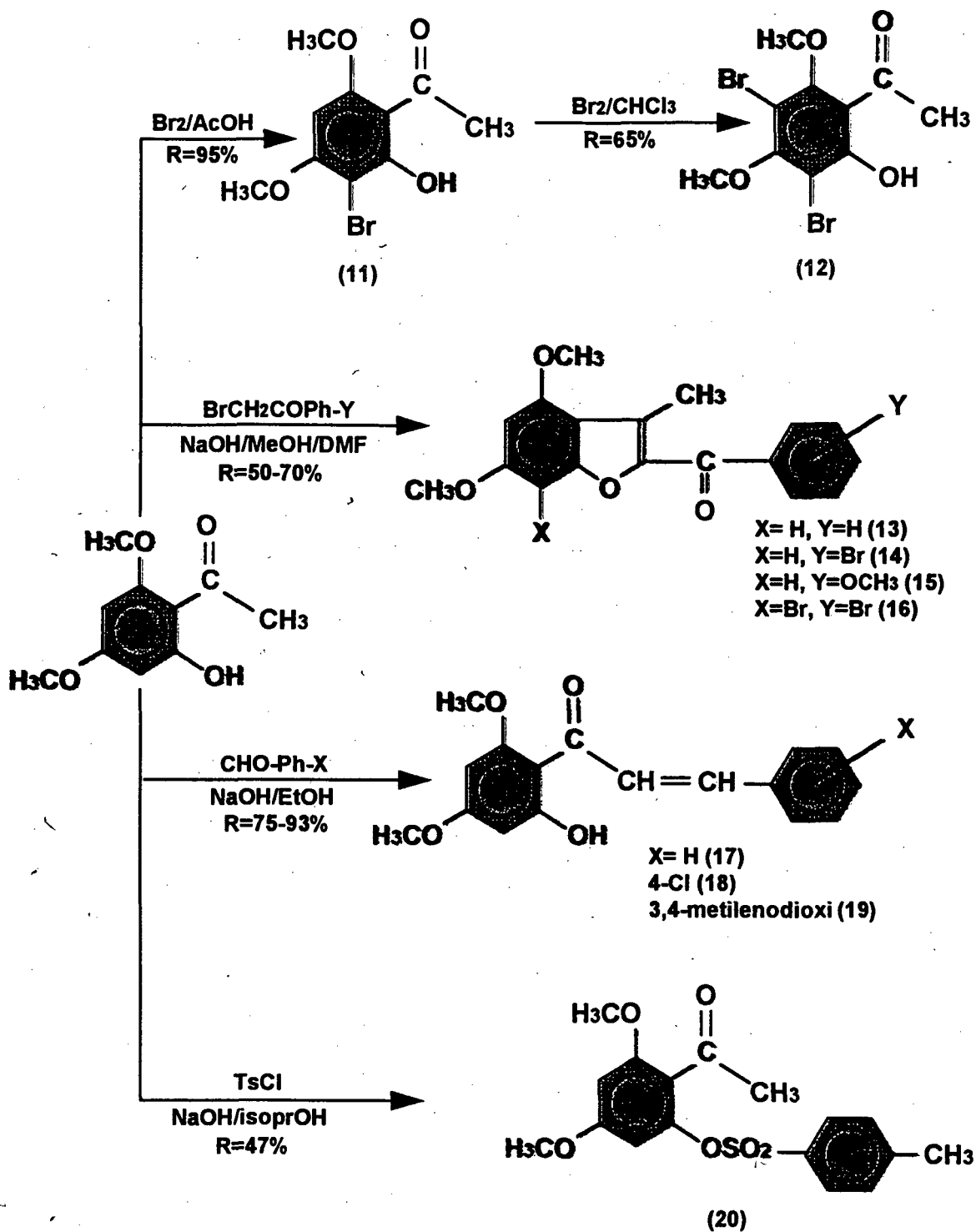
SÍNTESE



A = YCH₂Ph-X
NaOH/MeOH/DMF

Y = Br ou Cl
R = 40-80%

X = H (1)
4-Cl (2)
4-Br (3)
4-NO₂ (4)
4-F (5)
4-CH₃ (6)
4-OCH₃ (7)
4-tbutil (8)
4-OCH₂Ph (9)



As reações de benzilação da xantoxilina (1-10) foram realizadas utilizando a metodologia descrita por Dilts [Dilts & Durand, 1990] com pequenas modificações e ocorreram sem dificuldades, onde todos os produtos puros foram obtidos com rendimentos satisfatórios. Os dados espectroscópicos mostraram que foram obtidos os produtos desejados. Nos espectros de IV, foi observado o desaparecimento da banda fraca de OH presente na xantoxilina e deslocamento da banda CO, indicando claramente que houve ruptura na "quelação" presente na xantoxilina entre OH e o grupo COCH₃. Os espectros de ¹H-RMN confirmaram a presença de um segundo anel aromático, bem como o deslocamento químico de -OCH₂Ph na região de 5 ppm, além dos outros sinais característicos das moléculas em estudo. A figuras 3 e 4 ilustram estas observações, mostrando os espectros de IV e ¹H-RMN para o derivado benzilado (3).

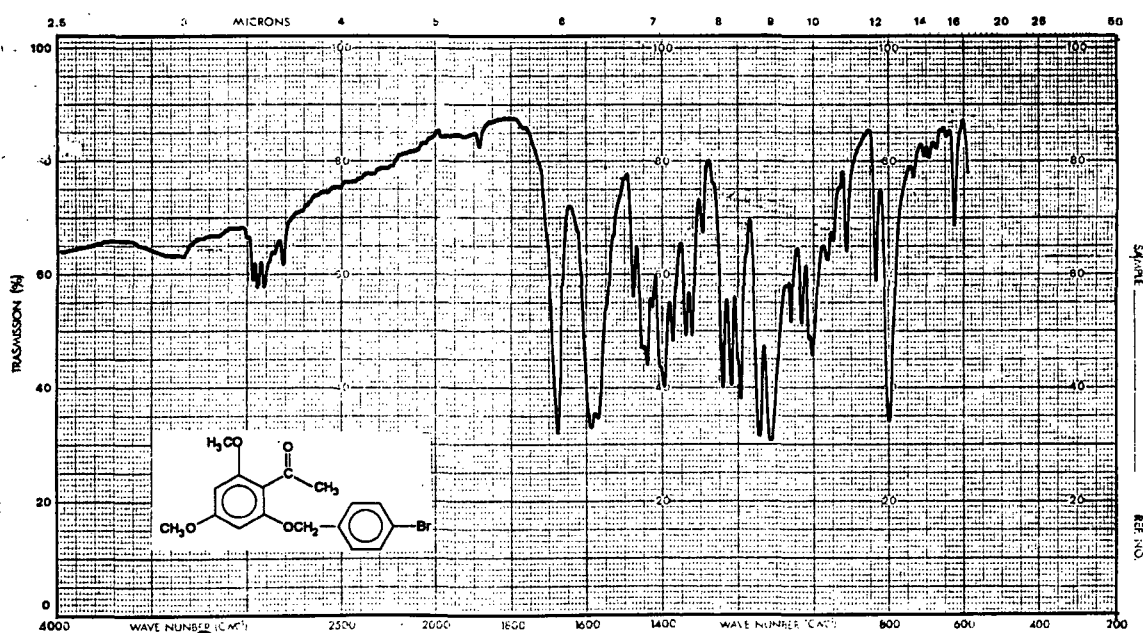


Figura 3: Espectro de IV (KBr,cm⁻¹) do composto 2-(p-bromobenzilóxi)- 4,6 dimetóxi acetofenona (3).

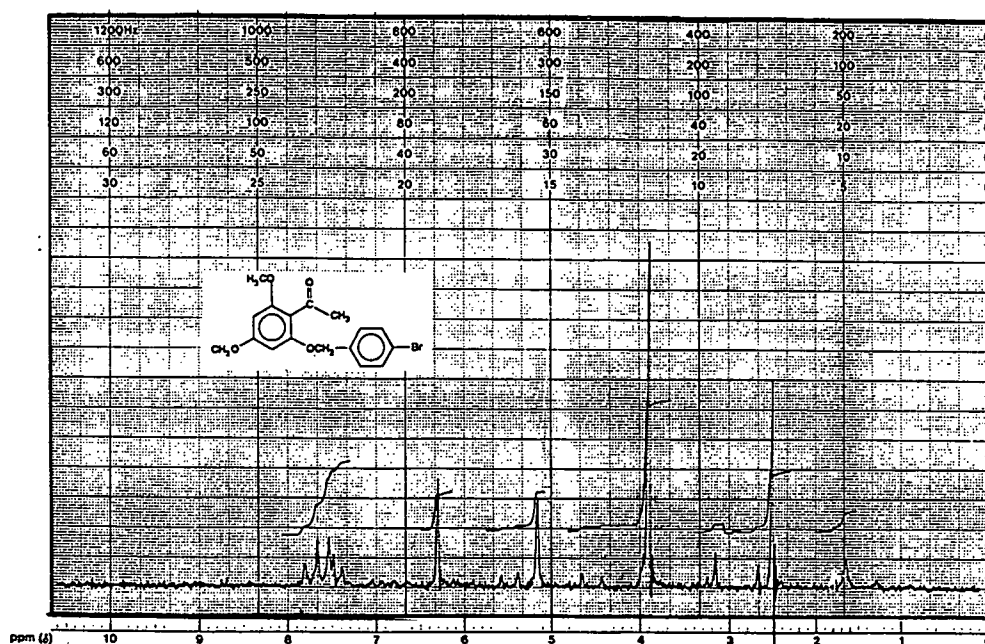


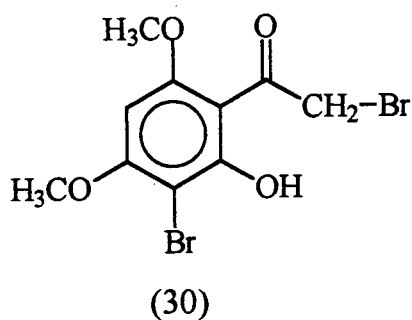
Figura 4- Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 60MHz) do composto 2-(p-bromobenzilóxi)- 4,6 dimetóxiacetofenona (3).

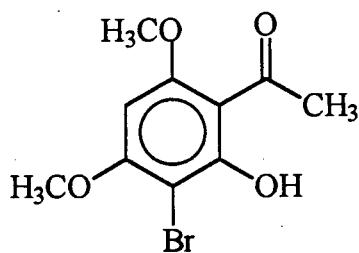
A reação de bromação no grupo metila da xantoxilina foi realizada com o objetivo de obter o composto (30), similar ao brometo de p-bromo fenacila, citado como efetivo antialérgico [Gardiner,1989]. Entretanto, todas as tentativas de obter este composto foram frustradas, e, em todos os casos, foram obtidos a xantoxilina monobromada (11) ou dibromada (12) no anel aromático. Este fato pode ser explicado pela forte ativação do anel devido à presença de vários grupos doadores de elétrons. Vários reagentes foram utilizados para bromar a metila do grupo acetil da xantoxilina, como Br_2/AcOH , $\text{Br}_2/\text{CHCl}_3$, $\text{Br}_2/\text{AcOH}/\text{AcONa}$, NBS e brometo cúprico(CuBr_2), que é um reagente específico para bromação de metilas ligadas ao grupo carbonila [King et al.,1964]. Todos os resultados foram praticamente os mesmos, divergindo apenas nos rendimentos. A xantoxilina monobromada (11) foi obtida com melhor rendimento utilizando Br_2/AcOH (R=95 %).

Apesar da possibilidade do átomo de bromo entrar na posição 5 do anel da xantoxilina, concluímos que na realidade entrou em posição 3, devido aos seguintes fatores: i) menor impedimento estérico em posição 3 do que em 5, ii) possuir o mesmo ponto de fusão do composto citado na literatura [Beirne et al., 1970], iii) Análises de ^{13}C -RMN e ^1H -RMN(NOE).

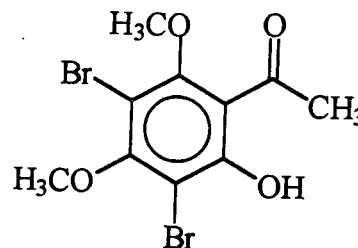
As tentativas de bromar a metila do grupo aceto a partir do (11) levaram, também com os mesmos reagentes descritos anteriormente, à obtenção da xantoxilina dibromada(12). É importante observar que o uso do $\text{Br}_2/\text{MeOH}/\text{NaOH}$ com a xantoxilina levou diretamente ao (12), com rendimento superior ao obtido a partir do (11). Este fato pode ser explicado pela formação do grupo fenóxi ArO- , ativando fortemente as duas posições do anel aromático.

Considerando que o composto monobromado (11) apresentou importante efeito farmacológico, como será discutido mais adiante, e que vários compostos halogenados, como a indometacina [Rodrigues, 1988], possuem um átomo de cloro em posição 4 do anel aromático, tentou-se introduzir este halogênio no anel aromático da xantoxilina usando o método descrito anteriormente [Vogel, 1983]. No entanto, obteve-se uma mistura complexa de compostos, alguns instáveis, provavelmente devido a maior reatividade e menor tamanho do átomo de cloro em relação ao átomo de bromo, favorecendo a formação de vários produtos.



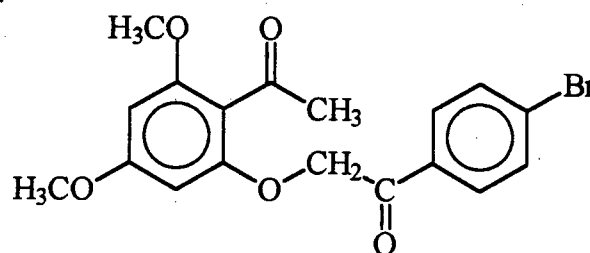


(11)

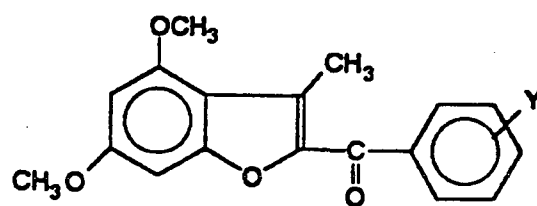


(12)

Como não foi possível conseguir o análogo (30), optou-se por acoplar o brometo de p-bromofenacila à xantoxilina no intuito de obter o derivado 2-(4-bromofenacetilóxi)-4,6 dimetóxiacetofenona (14a). Surpreendentemente, foi obtido o composto ciclizado (14), um análogo do benzofurano, através de uma condensação aldólica intramolecular, sugerindo que o composto (14a) desejado é muito instável, provavelmente devido à nucleofilicidade do grupo metileno, favorecendo o ataque à carbonila do grupo aceto. Os dados espectroscópicos de IV, ^1H -RMN e ^{13}C confirmaram a formação do composto (14). O espectro de IV mostrou apenas uma banda de absorção correspondente ao grupo $\text{C}=\text{O}$. O espectro de ^1H -RMN (figura 5) indicou a ausência do grupo CH_2 na região de 5 ppm, que seria esperado para o composto (14a), enquanto o ^{13}C -RMN (figura 6) confirmou a presença de apenas um grupo $\text{C}=\text{O}$ e apresentou os picos relativos aos C-quaternários, comprovando a estrutura (14) proposta.



(14a)



$\text{Y} = 4\text{-Br}$

(14)

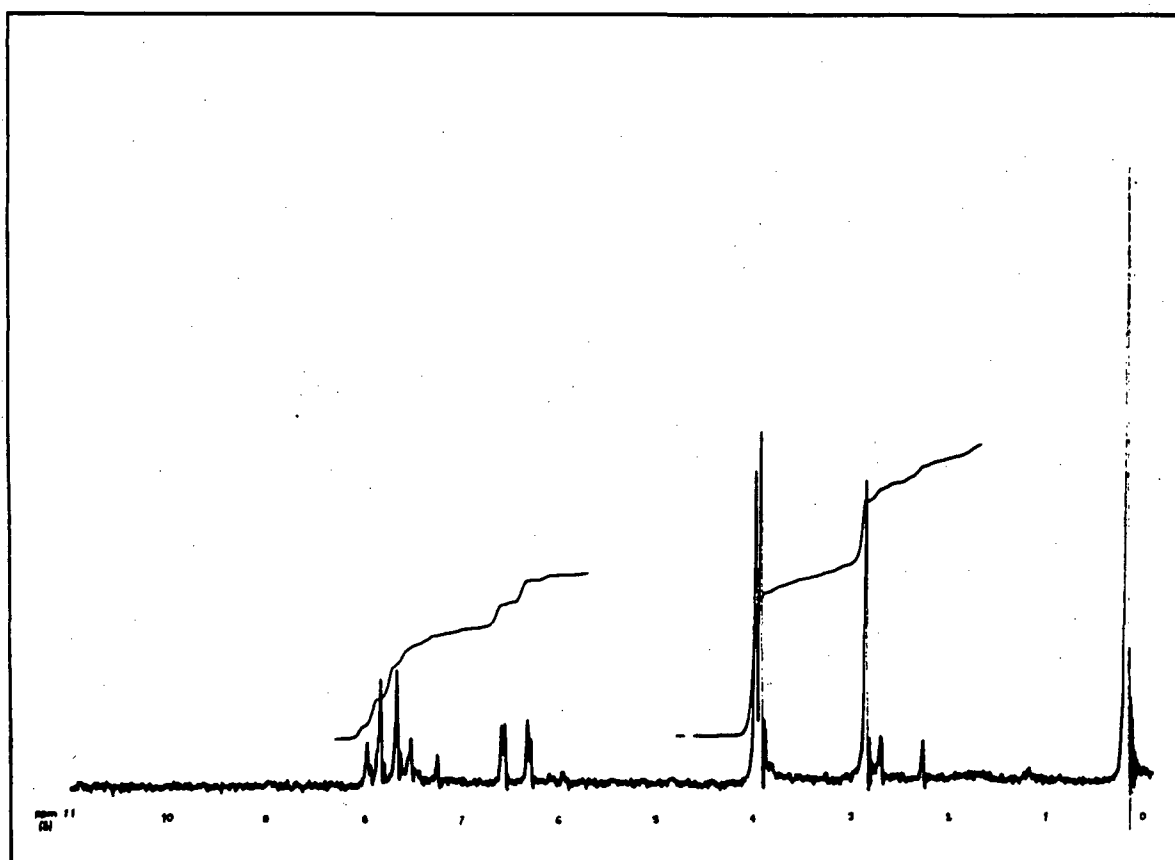


Figura 5: Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 60 MHz) do composto (14).

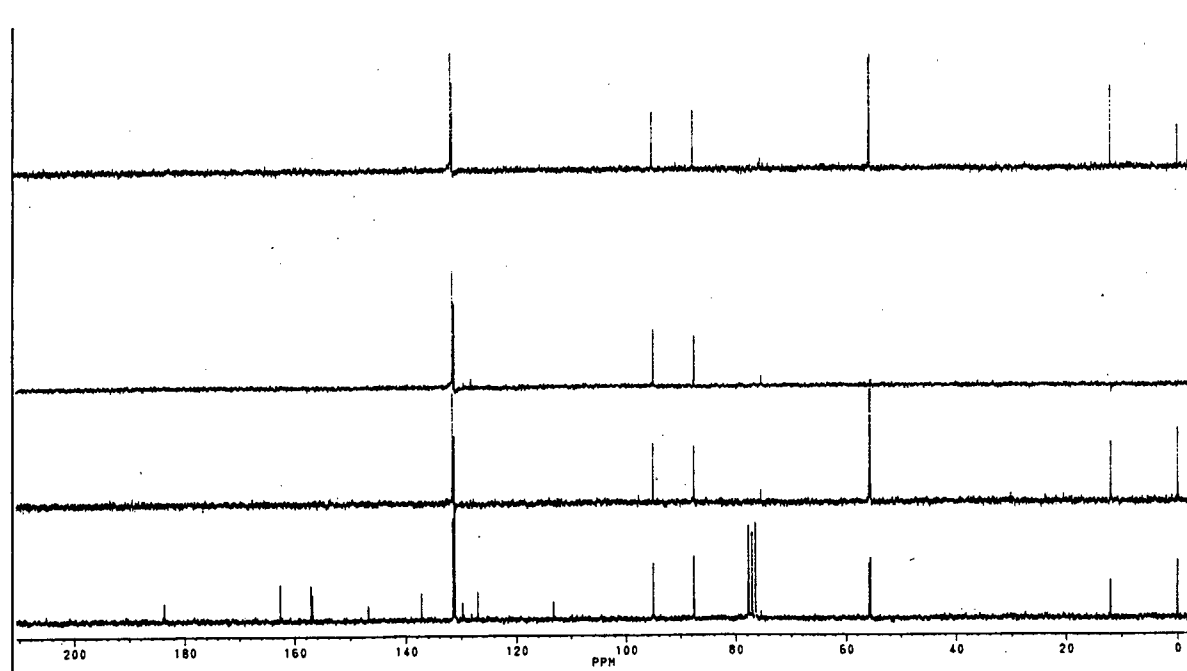


Figura 6: Espectro de ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 50 MHz) do composto (14).

Não foram encontrados dados na literatura referente à obtenção de derivados benzofurânicos a partir de acetofenonas e brometos de fenacila. Em estudos anteriores foi relatado que o composto benzofurano (ou coumarona) pode ser obtido através da reação entre 2-hidróxibenzaldeído e ácido cloroacético em presença de NaOH e posterior ciclização com $\text{Ac}_2\text{O}/\text{AcONa}$ em AcOH [Burgstahler & Worder, 1973]. Compostos de natureza benzofurânica estão também amplamente presentes em plantas. Podemos citar como exemplos a dihidroeuvarina e 2,5-diacetil-6-hidroxi benzofurano isolados de *Werneria ciliolata* A. Gray [Ugaz et al., 1984; Ugaz & Peralta, 1988], eupatone, isolado de *Eupatorium steinbergianum* [González et al., 1982], entre outros [Ugaz, 1994]. Vários aspectos biológicos e farmacológicos para esta classe de compostos foram descritos [Proksch & Rodrigues, 1983].

Exemplos citados na literatura [Graham et al., 1970; Hatayama et al., 1985; Middleton, 1986; Koshihara et al., 1988; Sogaya et al., 1993; Cechinel Filho et al., 1994f], mostram que várias chalconas, conhecida classe de flavonóides, apresentam

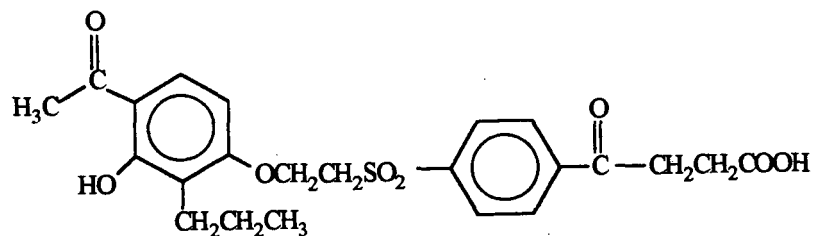
importantes efeitos farmacológicos. Com base nestes dados, as chalconas (17-19) foram obtidas usando-se a conhecida reação de condensação aldólica, anteriormente descrita por Guider [Guider et al., 1955], com pequenas modificações. Estes compostos foram obtidos através da reação da xantoxilina e benzaldeídos substituídos em meio básico. As evidências indicam que as chalconas obtidas possuem a isomeria trans. Esta suposição é baseada nas seguintes observações: i) presença de um único ponto na cromatografia em camada delgada e observação de apenas um composto pelos dados espectroscópicos; ii) a formação da chalcona cis é dificultada devido efeitos estéricos e repulsão de Van der Waals; iii) dados da literatura [Wingrove et al., 1974] relatam que na reação entre a acetofenona e benzaldeído, a chalcona formada é predominantemente a trans-benzalacetofenona.

Outro dado de fundamental importância para elucidar o tipo de isomeria de chalconas consiste na avaliação da constante de acoplamento de $H\alpha$ e $H\beta$ à carbonila no espectro de 1H -RMN. Entretanto, a presença do grupo OH em posição orto à carbonila, que é o caso das chalconas sintetizadas neste trabalho, proporciona uma ponte de hidrogênio intramolecular, dando uma certa rigidez e coplanaridade ao sistema, levando às conformações "cisoid" e "transoid". Assim, ao contrário dos dois dubletes esperados para $H\alpha$ e $H\beta$, o espectro de 1H -RMN mostra um singlete na região de 8 ppm referente a estes dois prótons. Resultados similares foram descritos anteriormente [Dantas et al., 1984], onde foram estudados os dados espectroscópicos de várias chalconas contendo grupos OH e OCH_3 em posição orto à carbonila.

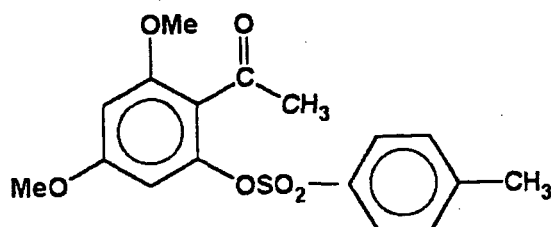
As chalconas (21-26) foram obtidas a partir da reação entre a xantoxilina monobromada (11) e benzaldeídos, cujos resultados foram similares aos descritos anteriormente para as chalconas (17-19).

Estudos anteriores demonstraram que o composto (20a), que possui um átomo de enxofre em sua molécula, apresenta efeito farmacológico importante [Gardner, 1989]. Com o propósito de obter compostos análogos a produtos ativos

descritos na literatura, foi obtido o composto (20), similar ao (20a) em alguns aspectos. O espectro de IV e $^1\text{H-RMN}$ confirmam a estrutura do composto (20).

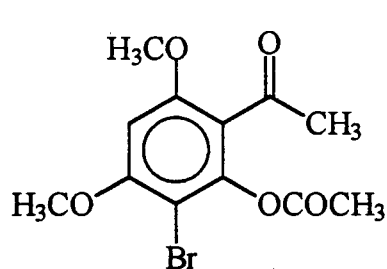


(20a)

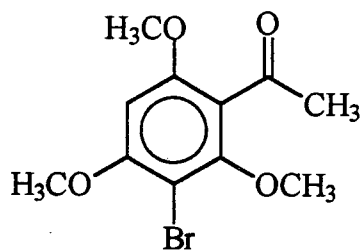


(20)

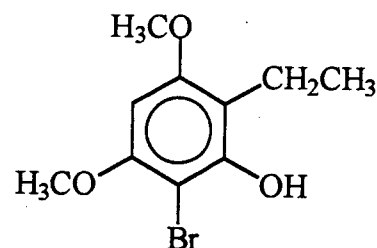
Considerando o efeito farmacológico do composto (11) [Vaz et al; 1992; Zunino et al., 1992], algumas modificações estruturais simples foram realizadas em sua estrutura, como a acetilação (27), metilação (28) e redução do grupo CO para CH_2 (29) através da redução de Clemensen [Read & Wood, 1955], cujas estruturas foram confirmadas pelos dados espectroscópicos de IV e $^1\text{H-RMN}$.



(27)



(28)



(29)

4.1.2- Atividade antiespasmódica

Visando investigar as propriedades antiespasmódicas de derivados benzilados da xantoxilina, considerando que alguns desses compostos tinham sido efetivos neste efeito [Cechinel Filho, 1991; Cechinel Filho et al., 1993; 1994a], os compostos (1-10) foram testados no íleo isolado de cobaia contraído pela acetilcolina. Os resultados estão descritos na tabela 4 (anexo 1), onde a CI_{50} representa a concentração de cada composto necessária para inibir as respostas à acetilcolina em 50 %.

Pode ser observado que enquanto a xantoxilina apresentou uma $CI_{50} = 47 \mu M$, a papaverina, um antiespasmódico conhecido, apresentou $CI_{50} = 13 \mu M$. Os resultados obtidos mostram que vários compostos são mais potentes do que a papaverina no modelo testado. Os compostos (9) e (10), por exemplo, são cerca de 5 vezes mais ativos, com CI_{50} de 2,6 e 2,8 μM , respectivamente.

Aplicando-se o Método Manual de Topliss, foi obtida uma ordem de atividade que segue a ordem dos parâmetros $\pi - 2\sigma$ e $\pi - 3\sigma$ (Tabela 5), indicando

que grupos substituintes hidrofóbicos e fortemente doadores de elétrons tendem a aumentar o efeito farmacológico. Considerando que muitas vezes os compostos contendo os 5 substituintes indicados por Topliss são difíceis de serem obtidos, e utilizando os mesmos parâmetros π e σ combinados, procurou-se introduzir um método alternativo, onde se realiza uma análise por correlação linear simples, mediante a equação 5:

$$\log 1/C = X_i + Cte \quad \text{Eq. 5}$$

Calculando-se os valores de r (coeficiente de correlação) para os compostos indicados na Tabela 5, obtem-se os melhores resultados também com $\pi - 2\sigma$ ($r = 0,98$) e com $\pi - 3\sigma$ ($r = 0,97$).

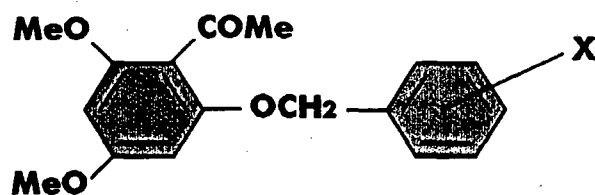
Este método alternativo modificado foi recentemente melhor desenvolvido utilizando-se outros dados disponíveis na literatura [Heizen et al., 1994].

De acordo com o proposto por Topliss, apresentado na Tabela 2, que indica como selecionar novos substituintes, pode-se observar que quando a melhor correlação é obtida com $\pi - 2\sigma$ e $\pi - 3\sigma$, os melhores substituintes seriam: 4-NEt₂, 4-NMe₂, 4-OCHMe₂, etc., fundamentalmente doadores de elétrons, que, em geral, aumentam a hidrofobicidade da molécula (Tabela 3). Porém, os resultados obtidos até o momento indicam que tanto a hidrofobicidade como os efeitos eletrônicos são fatores importantes que podem modificar a atividade farmacológica destes derivados da xantoxilina. Este fato é comprovado pela maior atividade dos compostos contendo os substituintes 3,4-CH₃ (10) e 4-OCH₂Ph (9). A introdução de 4-Br (3) e 4-F (5) dão menores valores de atividade, como esperado, com CI₅₀ de 6,3 e 23 μ M, respectivamente. A introdução de 4-t-butil, que deveria, segundo a correlação, ser mais ativo, mostrou uma CI₅₀ de 4,5 μ M, sendo ligeiramente inferior ao composto 4-CH₃ substituído (6), que apresentou uma CI₅₀ de 3,5 μ M, provavelmente devido

a efeitos estéricos. A continuação destes estudos poderá propiciar o surgimento de compostos não somente mais potentes, mas talvez também com seletividade tecidual.

TABELA 4

ORDEM DE POTÊNCIA DE DERIVADOS DA XANTOXILINA



X	Cl _{50(μM)}	Log _{1/C}	2π-π ²	2π-σ	π+σ	π-σ	π-2σ	π-3σ	-σ	π
4-CH ₃	3,5	5,48	0,81	1,29	0,39	0,73	0,90	1,07	0,17	0,56
4-OCH ₃	5,8	5,23	-0,04	0,23	-0,29	0,25	0,52	0,79	0,27	-0,02
4-Cl	10,2	4,99	0,92	1,19	0,94	0,48	0,25	0,02	-0,23	0,71
H	11,2	4,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
r			0,26	0,22	0,14	0,73	0,98	0,97	0,70	0,20

V. Cechinel Filho, R. J. Runes, J. B. Calixto, R. A. Yunes.
Química Nova, 16(3), 189 - 191 (1993)

4.1.3- Efeito Analgésico

Considerando as importantes ações farmacológicas da xantoxilina e procurando estender os estudos sobre seus derivados, já que a xantoxilina apresentou fraco efeito analgésico [Vaz, et al., 1992], vários análogos foram testados em alguns modelos de dor. A tabela 6 (anexo 2) mostra o efeito analgésico de alguns derivados da xantoxilina no modelo de contorções abdominais causado pelo AcOH 0,6 % em camundongos. A DI_{50} significa a dose necessária para reduzir em 50 % as contorções abdominais, considerados como indicativos de dor.

Como pode ser observado, vários derivados da xantoxilina foram mais efetivos neste modelo do que a aspirina e acetaminofeno, dois analgésicos disponíveis no mercado e muito usados clinicamente. Enquanto a aspirina e o acetaminofeno apresentaram DI_{50} de 133 e 125 $\mu\text{mol/kg}$, respectivamente, o composto mais ativo foi o (14), obtido pela reação da xantoxilina com brometo de p-bromofenacila, que apresentou uma DI_{50} de 1 $\mu\text{mol/kg}$, sendo cerca de 130 vezes mais potente. Outros compostos, como o derivado p-bromobenzilóxi (3), p-benzilóxi-benzilóxi (9), a xantoxilina monobromada (11), o derivado benzofurânico (13), a chalcona (21) e o derivado sulfonado (20) também foram bastante efetivos neste modelo, com DI_{50} de 82, 27, 81, 34, 18 e 49 $\mu\text{mol/kg}$, respectivamente. Comparando a atividade analgésica dos derivados (3) e (9), onde a única diferença consiste no substituinte, pode-se observar que (9) foi cerca de 3 vezes mais potente do que (3) e 5 vezes mais potente do que a aspirina e acetaminofeno, indicando que o grupo benzilóxi, forte doador de elétrons e hidrofóbico, favorece o efeito analgésico neste modelo. Interessante, a xantoxilina monobromada foi efetiva como analgésico, mas a introdução de um segundo átomo de bromo (composto 12) resultou em um composto inativo, sugerindo que o bromo em posição 3 do anel da xantoxilina é importante para a atividade analgésica.

Enquanto a acetilação (27) e a redução da carbonila (29) do composto (11) produziram compostos inativos, a metilação (27), diminuiu significativamente a atividade analgésica.

Como o derivado benzofurânico foi extremamente ativo, procurou-se modificar sua estrutura na tentativa de encontrar um derivado ainda mais potente. Assim, foi observado que as mudanças estruturais realizadas, como a troca do bromo pelo átomo de hidrogênio (13) ou do grupo metoxila (15), levou a uma considerável diminuição da atividade analgésica.

Outra modificação no composto (14) foi a introdução de um segundo átomo de bromo no anel aromático da xantoxilina, levando ao composto (16), onde, surpreendentemente, resultou um composto inativo. Estes dados sugerem que o átomo de bromo em posição 4 do grupo benzoíla no derivado benzofurânico (14) é importante grupo farmacofórico, sugerindo que futuramente, deve-se procurar outras modificações estruturais com preservação deste átomo de bromo.

É interessante salientar, que de todos os compostos testados e descritos na tabela 6 (anexo 2), apenas o composto (11) apresentou atividade analgésica via oral, consistindo um futuro desafio no sentido de sintetizar moléculas mais hidrossolúveis que sejam absorvidas oralmente.

A tabela 7 (anexo 2) mostra o efeito analgésico dos derivados da xantoxilina no modelo de dor causada pela injeção intraplantar de formalina em camundongos, onde a primeira fase corresponde a dor de origem neurogênica e a segunda fase à dor de origem inflamatória [Hunskar & Hole, 1987]. Os compostos mais ativos com ação analgésica neste modelo foram os compostos (9), (11) e (14), com DI_{50} de 33, 74 e 7 μ mol/kg, respectivamente, sendo que o composto (11) apresentou longa duração de ação (até 4 horas).

Como pode ser observado, o estudo comparativo dos derivados da xantoxilina mais potentes com duas drogas tradicionalmente usadas clinicamente, como a

aspirina e o acetaminofeno, no teste da formalina, mostra que enquanto o composto (11) foi ligeiramente mais potente do que estas drogas, o composto (14) foi cerca de 17 vezes mais potente. Quando comparado à xantoxilina, (11) foi muito mais efetivo como analgésico, indicando que o bromo representa um importante grupo farmacofórico. Além disso, os compostos (11) e (14), mas não a aspirina e acetaminofeno, foram efetivos em inibir a dor de origem neurogênica (primeira fase).

Outro resultado interessante foi o observado com o derivado benziloxi (9), que foi inativo na primeira fase, mas foi cerca de 10 vezes mais potente do que a aspirina e acetaminofeno na segunda fase de dor provocada pela formalina.

O fato relevante destes resultados é que alguns compostos foram efetivos em inibir a dor de origem neurogênica (primeira fase) após injeção subplantar de formalina em camundongos, porém, não afetaram significativamente o edema de pata causado pela formalina. Trabalhos recentes descritos na literatura indicam que poucos analgésicos disponíveis no mercado são efetivos em inibir a dor de origem neurogênica, e que os analgésicos não esteroidais apenas inibem a dor de origem inflamatória causada pela formalina (segunda fase) associado com inibição do edema de pata. Ao contrário, drogas do grupo da morfina (opióides) são muito efetivas em inibir ambas as fases da dor causada pela formalina [Corrêa & Calixto, 1993]. No entanto, somente o composto (14) causou discreto, porém significativo, aumento do limiar de dor no modelo da placa quente e no teste do tail flick (resultados não mostrados). Um dado interessante é que estes compostos, mesmo quando injetados em doses superiores àquelas necessárias para produção de suas ações analgésicas, não interferiram com a capacidade de apreensão dos camundongos no teste do rota rod, demonstrando assim que eles não parecem apresentar efeitos tóxicos e/ou depressores (central ou periférico) que pudessem comprometer suas ações analgésicas.

O sítio de ação analgésica destes compostos não está ainda esclarecido, mas estão sendo realizados alguns estudos com os compostos mais relevantes (9) e (14), na tentativa de elucidar seu provável mecanismo de ação, sendo estes estudos tema de Dissertação de Mestrado de Zulma Vaz, do Departamento de Farmacologia-UFSC. Entretanto, estudos preliminares [Vaz et al., 1994] sugerem que estes compostos atuam por um mecanismo de ação diferente do encontrado para aspirina e morfina, constituindo-se desta forma em compostos promissores que possam estar agindo por algum novo mecanismo de ação analgésica.

Procurando-se correlacionar a estrutura molecular com suas ações analgésicas, no sentido de predizer novas sínteses, várias chalconas derivadas da xantoxilina monobromada (11) foram testadas no modelo de contorções abdominais causadas pelo AcOH 0,6 % em camundongos, na dose única de 30 mg/Kg. De acordo com a tabela 8 (anexo 2), pode-se observar, preliminarmente, que átomos de halogênio, como o bromo e o cloro aumentam significativamente o efeito analgésico [Cechinel Filho et al., 1994d], apresentando maior porcentagem de inibição (91 e 93,8 %, respectivamente). Este aumento de atividade pode estar relacionado com a mudança das propriedades físico-químicas da molécula, devido ao fato de que os átomos de halogênio exercem efeitos estéricos, hidrofóbicos e efeitos eletrônicos. Entretanto, estes testes devem ser futuramente estendidos para uma melhor análise da correlação entre a estrutura destas chalconas e suas ações analgésicas.

4.1.4- Atividade antiinflamatória

4.1.4.1- Efeito antiedematogênico na pata de rato

Estudos anteriores demonstraram que várias acetofenonas substituídas, como por exemplo a 3,5-dimetóxi-4-hidróxiacetofenona e a 2,4-dihidróxi-3-metilacetofenona possuem significativa ação antiasmática em cobaias [Dorsch et al.,

1992]. Recentemente foi relatado que algumas chalconas derivadas de acetofenonas possuem efeito antiinflamatório, inibindo a 5-lipoxigenase e cicloxigenase [Sogaya et al., 1993]. Desta forma, os derivados da xantoxilina foram testados em alguns modelos de inflamação em ratos.

De acordo com a tabela 9 (anexo 3), a xantoxilina e os derivados (11), (12),(14), (18), (19), (21) e (27), na dose de 30 mg/kg, via intraperitoneal, foram bastante efetivos em inibir o edema de pata causado pela injeção intraplantar de dextrana.

É conhecido que o edema causado pela dextrana envolve principalmente degranulação de mastócito e liberação de histamina e/ou serotonina, sendo portanto muito sensível aos corticosteróides [Vinegar et al., 1987]. Estes resultados, portanto, indicam que tanto o produto natural xantoxilina, como alguns de seus derivados, parecem interferir com a liberação e/ou ação desses mediadores no modelo de edema de pata. Analisando-se a relação estrutura-atividade, pode-se observar que a introdução de um átomo de bromo em posição 3 do anel aromático da xantoxilina (11) melhorou o efeito antiinflamatório e a introdução de um segundo átomo de bromo (12) em posição 5 tornou o composto ainda mais potente, divergindo dos resultados citados anteriormente para o efeito analgésico. Entretanto, esta variação de atividade não foi muito significativa. A acetilação do composto (11) para a obtenção do composto (27) praticamente não alterou o efeito. No entanto, a metilação do (11) levou ao composto (28) que inibiu apenas discretamente o edema de pata causado pela dextrana. É importante notar que o derivado benzofurânico (14) e as chalconas (19) e (21) foram os compostos mais potentes neste modelo, com IM (Inibição Máxima) de 58, 63 e 61 %, respectivamente, no tempo de 1 hora.

Com relação ao edema provocado pela carragenina, a xantoxilina e os compostos (3), (11), (14), (21) e (27) foram efetivos em interferir com esse edema na dose de 30 mg/kg, i.p. Neste caso, a introdução do bromo também aumentou o efeito

antiedematogênico em relação à xantoxilina, mas ao contrário do observado para o edema da dextrana, o composto dibromado (12) apenas interferiu discretamente com o edema causado pela carragenina. Os compostos (11), (14) e (27) foram os mais potentes neste modelo, apresentando IM de 46, 43 e 27 % respectivamente no tempo de 1 hora, indicando que estes compostos são equipotentes aos conhecidos antiinflamatórios disponíveis no mercado, como a Indometacina (IND) e Ibuprofen (IBU), que neste tempo (1 h) inibiram 48 e 42 %, respectivamente, o edema causado pela carragenina na pata de rato.

Além disso, tanto a xantoxilina como os derivados (14), (21) e (27) foram também efetivos em inibir o edema de pata causado pela bradicinina, apresentando IM de 37, 51, 27 e 25 % respectivamente no tempo de 20 min.. Neste caso, a xantoxilina monobromada (11) apresentou apenas discreta atividade antiedematogênica.

É importante ressaltar que apenas a xantoxilina e os derivados (11), (14) e (21) foram efetivos em inibir tanto o edema causado pela carragenina, como o edema causado pela dextrana e bradicinina. A xantoxilina dibromada (12) e a chalcona (19) apresentaram certa seletividade, inibindo significativamente apenas o edema causado pela dextrana. No entanto, a chalcona (19) potencializou fortemente o edema causado pela carragenina no tempo de 30 min.

Estes resultados sugerem que esta série de derivados da xantoxilina apresentam importantes ações antiedematogênicas em relação a vários mediadores da inflamação e estes dados podem contribuir para explicar parte de suas ações analgésicas.

4.1.4.2- Efeito na pleurisia em ratos

Alguns derivados da xantoxilina foram analisados na pleurisia induzida pela carragenina (CG, 2%, 4h após). Os animais foram pré-tratados (100 µg/cav., 1 h antes) com os compostos em estudo. Os resultados indicaram que a xantoxilina monobromada (11) e dibromada (12) não afetaram significativamente a migração celular e nem inibiram o exsudato, enquanto a chalcona (18) potencializou este efeito. No entanto, os derivados de (11), como os compostos acetilado (27) e metilado (28) foram efetivos em inibir o exsudato ($0,3 \pm 0,05$ e $0,7 \pm 0,08$ ml) em comparação com o controle ($1,3 \pm 0,5$ ml), porém apenas o (27) diminuiu o no. total de células ($27,5 \pm 0,9 \times 10^6$) quando comparado ao controle ($73,8 \pm 9,5 \times 10^6$).

Uma diminuição significativa dos neutrófitos foi induzida tanto pelo (27) como pela chalcona (19) ($55,2 \pm 4,9$), que possui o grupo 3,4-metilenodioxi no lugar do 4-Cl (18), anteriormente citado como inativo neste modelo.

Estes resultados indicam que os compostos (19), (27) e (28) possuem ação antiinflamatória neste modelo. É importante observar que os compostos (19) e (27) também foram efetivos em inibir o edema de pata de rato anteriormente descrito.

Com relação à pleurisia induzida pelo PAF-acéter (1 µg/cav., 6 e 24 h após), onde os compostos (50 µg/cav.) foram administrados 1 h após a indução da pleurisia, foi observado que o derivado benzofurânico (14) foi efetivo em inibir o no. total de leucócitos ($5,2 \pm 0,7$; controle: C= $17,3 \pm 0,5 \times 10^6$) 6 h após a administração do PAF-acéter. Este composto também ocasionou uma diminuição significativa do no. de eosinófilos ($1,9 \pm 0,2$; C= $10,4 \pm 2,2 \times 10^6$) 6 h após a indução da pleurisia e que se manteve até 24 h ($1,2 \pm 0,3$; C= $3,4 \pm 2,0 \times 10^6$). Os compostos (19), (27) e (28) apenas inibiram a migração de eosinófilos 6 h após ($5,5 \pm 0,2$; $2,9 \pm 0,4$; $3,1 \pm 0,7 \times 10^6$, respectivamente), enquanto o composto (14) exerceu um efeito inibitório mais tardio (24 h) ($1,2 \pm 0,1 \times 10^6$). Estes compostos não alteraram significativamente o

volume de exsudado, 6 h após a indução da pleurisia, bem como o no. de mononucleares e neutrófilos. Estes resultados confirmam o efeito antiinflamatório de alguns dos derivados da xantoxilina anteriormente demonstrados.

4.1.5- Atividade antialérgica

Os resultados preliminares indicaram que a xantoxilina, até a concentração de 250 μM , não interferiu com a reação alérgica causada pela exposição do antígeno na traqueia de cobaia, divergindo de dados da literatura que relatam o efeito antialérgico de várias acetofenonas substituídas [Dorsch et al., 1992].

No entanto, a bromação e posterior metilação levou ao composto (28) que causou expressiva inibição na concentração de 346 μM , da contração causada pela ovalbumina. Trabalhos recentes da literatura indicam que este modelo tem sido amplamente usado para o estudo de drogas com potente atividade antialérgica e/ou antiasmática, sendo a resposta contrátil à ovalbumina decorrente da liberação tanto de tromboxana A_2 como de histamina [Mansour & Daniel, 1987].

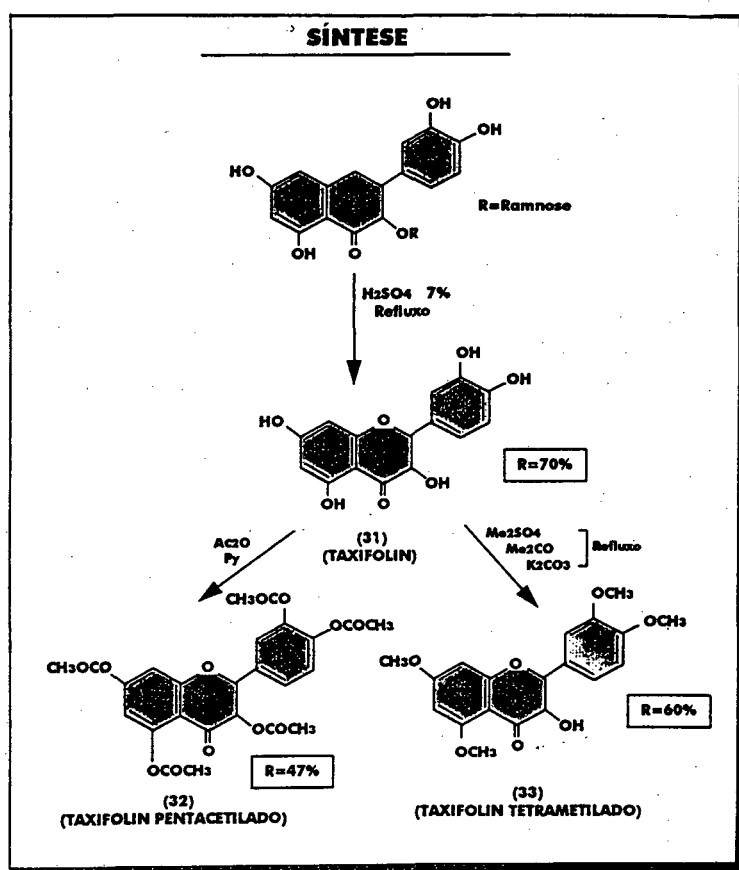
PARTE 2

4.2- Derivados ou análogos da astilbina

A astilbina, flavonóide glicosilado isolado do extrato de acetato de etila das cascas de *Hymenaeae martiana* com alto rendimento (6 %), foi usada como ponto de partida para a obtenção de derivados sintéticos com maior atividade farmacológica, já que este composto apresentou fraca ação antiinflamatória [Carneiro et al., 1993] e analgésica [Vaz et al., 1992].

4.2.1- Síntese

O esquema abaixo ilustra as etapas de síntese realizadas para obtenção de derivados da astilbina:



Inicialmente foi realizada uma hidrólise ácida na astilbina para obtenção da dihidroquercetina, também conhecida como taxifolin ou destylin (31) [Buckingham, 1984]. Este composto também ocorre naturalmente em várias plantas, como Douglas-Fir heartwood [Pew, 1948], Maduca butyraceae nut shell.[Awasthi & Mitra, 1962], Drimys winteri [Cruz et al., 1973], Drimys granadensis [Diaz et al.,1985], entre outras [Buckingham, 1984]. O taxifolin tem demonstrado, além de efeito antiinflamatório equipotente à hidrocortisona [Gupta et al., 1971], efeito antifúngico [Cserjesi, 1969] e efeito antiviral [Bakay et al., 1968]. A metilação do taxifolin com sulfato de dimetila forneceu o composto tetrametilado. Estudos anteriores realizados por Hergert [Hergert et al., 1956] demonstram a dificuldade em metilar o taxifolin em posição 3, provavelmente devido sua característica de álcool secundário, cujo hidrogênio não é ácido o suficiente para ocorrer a metilação. A acetilação, no entanto, realizada de maneira usual com anidrido acético, piridina e aquecimento levou ao composto pentacetilado, cuja ausência de grupos OH foi confirmada pelo espectro de IV, que comprova a ausência de absorções referentes aos grupos OH e mostra a presença dos grupos CO .

4.2.2- Atividade analgésica

Considerando que a astilbina apresentou discreto efeito analgésico [Vaz, et al.,1992] , alguns de seus derivados foram testados em dois modelos de dor em camundongos para avaliar seus possíveis efeitos analgésicos. Os resultados descritos na tabela 10 (anexo 2) mostram que o taxifolin (31) e taxifolin metilado (33) apresentaram potente atividade analgésica no modelo de dor causado pelo AcOH 0,6 % . Eles foram efetivos tanto via intraperitoneal quanto via oral.

Porém, o composto (33) foi cerca de 18 vezes mais potente por via ip e ambos foram equipotentes por via oral.

Comparando a atividade analgésica destes compostos com a astilbina, pode-se observar que as mudanças estruturais, principalmente a eliminação do açúcar ramnose, levaram a obtenção de compostos com maior atividade analgésica. No entanto, o composto acetilado (32) apresentou apenas discreto efeito analgésico no modelo testado. Quando analisados no modelo de dor causado pela formalina, de acordo com a tabela 11 (anexo 2), os compostos (31) e (33) foram efetivos em inibir as duas fases de dor causada neste modelo e ambos não interferiram com o edema de pata associado com a segunda fase. Neste modelo, o composto (33) também foi mais potente do que (31). Quando comparado à aspirina e acetaminofeno o composto (33) foi cerca de 2,5 vezes mais potente em relação à segunda fase de dor causada pela formalina. É interessante ressaltar que a quercetina, flavonóide presente em várias plantas, anteriormente isolado em nossos laboratórios de Phyllanthus sellowianus [Miguel et al., 1994], cuja única diferença em relação ao taxifolin consiste na presença da dupla ligação nos carbonos 2-3 (anel de 3 membros), apresentou, no teste da formalina, uma $DI_{50} > 60$ mg/kg na primeira fase e de 15 mg/kg (50 μ mol/kg) na segunda fase [Santos et al., 1994d], sendo, portanto, ligeiramente mais potente do que o taxifolin, indicando que a dupla ligação não parece influenciar significativamente no efeito analgésico destes compostos. Estes resultados são importantes, pois permitem que futuramente novos derivados da astilbina e taxifolin sejam obtidos e que provavelmente possam apresentar maior atividade analgésica.

4.2.3- Atividade antiinflamatória

4.2.3.1- Efeito antiedematogênico na pata de rato

Estudos anteriores demonstraram que o taxifolin (31) apresentou efeito antiinflamatório [Gupta et al., 1971] e que outros flavonóides também apresentaram este efeito farmacológico [Mabry & Ulubelen, 1980; Hausteen, 1983]. Assim, no intuito de comprovar o efeito do taxifolin (31) em outros modelos de inflamação e buscar novos compostos antiinflamatórios, procurou-se testar alguns análogos de (31) no edema de pata de rato causado pela dextrana e carragenina.

Os resultados mostrados na tabela 12 (anexo 3) indicam que tanto a astilbina como os seus derivados (31) e (33), na dose de 30 mg/kg, ip, 30 min. antes, foram efetivos em inibir o edema de pata causado pela dextrana, apresentando uma IM de 37, 52 e 33 % nos tempos de 1, 2 e 4 h respectivamente. Interessante ressaltar que o taxifolin acetilado (32) potencializou o edema e o taxifolin (31) teve longa duração do efeito, inibindo em 46 % o edema causado pela dextrana no tempo de 4 h. Em relação ao edema causado pela carragenina, na dose de 30 mg/kg, ip, enquanto a astilbina não teve efeito e potencializou o edema em 26 % no tempo de 4 h, o taxifolin (31) e seus derivados, principalmente o pentacetilado (32), ao contrário do anteriormente observado para o edema causado pela dextrana, apresentou potente efeito antiedematogênico, com IM de 40 % no tempo de 1 h. Além disso, este composto também apresentou um efeito duradouro, inibindo em 36 % o edema no tempo de 4 h.

Estes resultados demonstram que enquanto os derivados (31) e (33) exibiram efeito antiedematogênico nos dois modelos testados, o composto pentacetilado (32) foi seletivo, inibindo apenas o edema causado pela carragenina, sugerindo que além do taxifolin (31) anteriormente descrito [Gupta et al., 1971], seus derivados também apresentam efeito antiinflamatório.

Além disso, o taxifolin metilado (33) foi equipotente aos conhecidos antiinflamatórios convencionais indometacina e ibuprofene. Estes dados estão de acordo com os resultados da literatura, que relatam o potencial antiinflamatório de flavonas metiladas, como por exemplo o artemetin [Sertié et al., 1990]; a ternatina [Souza et al., 1992]; a 5,7-dimetóxi-flavona [Pathong et al., 1989], entre outros [Carneiro, 1988].

4.2.3.2- Efeito na pleurisia em ratos

A tabela 13 (anexo 3) mostra o efeito dos derivados da astilbina na pleurisia induzida pela carragenina em ratos, onde os animais foram tratados, 30 min. antes da administração da carragenina (0,1 ml, 2%) com 50 µg intrapleurais de cada um dos compostos em estudo e sacrificados 4 h após a administração do irritante.

Os resultados indicam que apenas o taxifolin (31) diminuiu significativamente a migração celular, embora não tenha modificado o volume do exsudato induzido pela carragenina. O efeito deste composto neste modelo comprova o efeito antiinflamatório anteriormente mencionado e parece não ser semelhante ao dos antiinflamatórios não hormonais conhecidos que inibem acentuadamente a exsudação, sem interferir com a migração celular [Hang & Dale, 1993].

4.2.4- Atividade antialérgica e/ou antiasmática

Buscando obter compostos de atividade antialérgica e/ou antiasmática a partir de produtos naturais, a astilbina e seus derivados obtidos sinteticamente foram analisados na anafilaxia em cobaias ativamente sensibilizados por ovalbumina.

De acordo com a figura 7 (anexo 4), pode ser observado que a astilbina (222 μM) e o taxifolin metilado (33) (278 μM) inibiram fortemente a contração induzida pela ovalbumina (1 $\mu\text{g}/\text{mol}$) na traquéia isolada de cobaia sensibilizada ao antígeno, sendo que (33) apresentou efeito mais expressivo. Ao contrário, o taxifolin (31) (305 μM) e taxifolin acetilado (32) (195 μM) apresentaram apenas discreta inibição desta contração. Estes resultados sugerem que o composto (33), além de suas ações analgésicas e antiinflamatórias, mostrou importante efeito antialérgico e/ou antiasmático, interferindo com a reação anafilática causada pela ovalbumina "in vitro".

PARTE 3

4.3- Análogos da filantimida

A filantimida, um novo alcalóide derivado da glutarimida, isolado da fração ativa de alcalóides de P. sellowianus [Tempesta et al., 1988], devido suas ações antiespasmódicas [Calixto et al., 1984; Cechinel Filho et al., 1994 c,d] e bactericida [Cruz, 1993], foi usada como modelo para a síntese de vários análogos para posterior estudo farmacológico e microbiológico, já que compostos de natureza imídica são amplamente relatados como antimicrobianos [Hargreaves et al., 1970; Nunes, 1986].

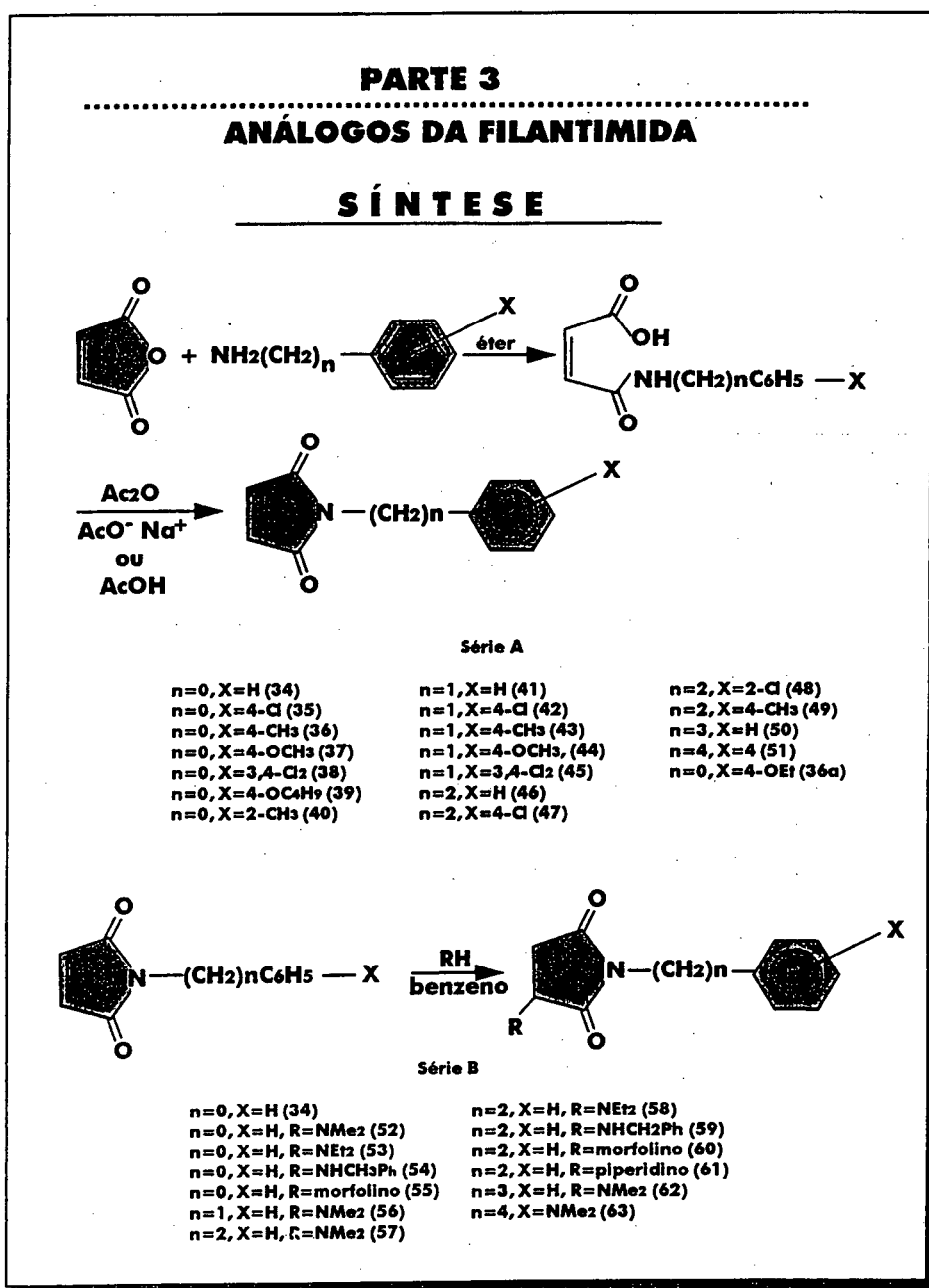
4.3.1- Síntese

As imidas cíclicas em geral são compostos muito importantes sob o ponto de vista químico, farmacológico e industrial [Hargreaves et al., 1970]. Em particular, as maleimidias são de grande interesse na área de química, pois podem ser usadas como dieno nas reações de Diels-Alder [Morrison & Boyd, 1973; Nunes, 1986; Cremlyn et al., 1987a]. Durante os últimos anos, estes compostos também tem sido amplamente estudados em fotoreações [Mazzochi, 1981; Coyle, 1984; Ashraf et al., 1992].

São várias as rotas sintéticas descritas na literatura para a obtenção de imidas cíclicas [Hargreaves et al., 1970]. Para a síntese de N-arilmaleimidias, a reação de anidrido maleico com a amina em estudo em éter etílico, fornecendo o respectivo ácido arilmaleâmico e posterior ciclização com anidrido acético/acetato de sódio, indica ser o método mais adequado para se obter estes compostos [Kretov & Kulchitskaya, 1956; Cava et al., 1973]. A obtenção de succinimidias consiste em

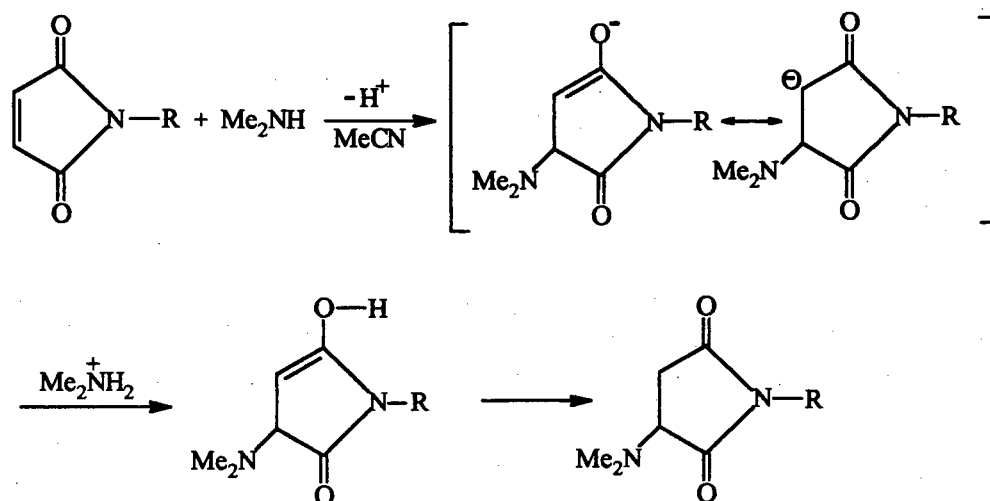
adicionar o radical desejado na dupla ligação imídica usando preferencialmente solventes apróticos [Mustafa et al., 1961; Sharpless & Flavin, 1966].

A síntese dos compostos N-alquilarilmaleimidás e succinimidás, análogos ao alcalóide filantimida, foi baseado nos dois métodos combinados citados acima com pequenas modificações, de acordo com o esquema mostrado a seguir:



A maior parte dos compostos foi obtida com bons rendimentos, mas o uso de solventes próticos, como MeOH, na adição de bases nitrogenadas à dupla ligação imídica levou à formação de produtos secundários, provavelmente devido à ruptura do anel imídico [Nunes, 1986]. É relevante indicar que nas reações de ciclização de compostos contendo dois ou mais grupos metílenos (46-51), os melhores rendimentos foram obtidos quando foi usado ácido acético como agente desidratante, provavelmente por atuar por diferente mecanismo de reação.

A reação de adição nucleofílica de amina na dupla ligação $\alpha\beta$ -insaturada de maleimidas para formação de succinimidas ocorre pelo mecanismo de adição conjugativa 1,4 [Sharpless & Flavin, 1966; Cremlyn & Nunes, 1987b] conforme o esquema abaixo:



A caracterização das maleimidas pode ser feita através de espectroscopia de IV, já que as bandas de absorção das carbonilas do ácido N -arilmaleâmico ($\text{CONHAr} = \sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ e $\text{COOH} = \sim 1880\text{-}1740 \text{ cm}^{-1}$) é completamente distinto das bandas de absorção das carbonilas imídicas (uma banda muito fraca na região de 1770 cm^{-1} e uma banda forte na região de $1700\text{-}1720 \text{ cm}^{-1}$, correspondente às

absorções assimétricas e simétricas, respectivamente) [Nunes, 1986; Pretsch et al., 1989].

Além disso, a análise do espectro de IV permite avaliar o fechamento do anel imídico também pela ausência da absorção característica da hidroxila do ácido, como pode ser observado no exemplo da figura 8. A confirmação da estrutura proposta pode ser feita por $^1\text{H-RMN}$ e análise elementar (CHN).

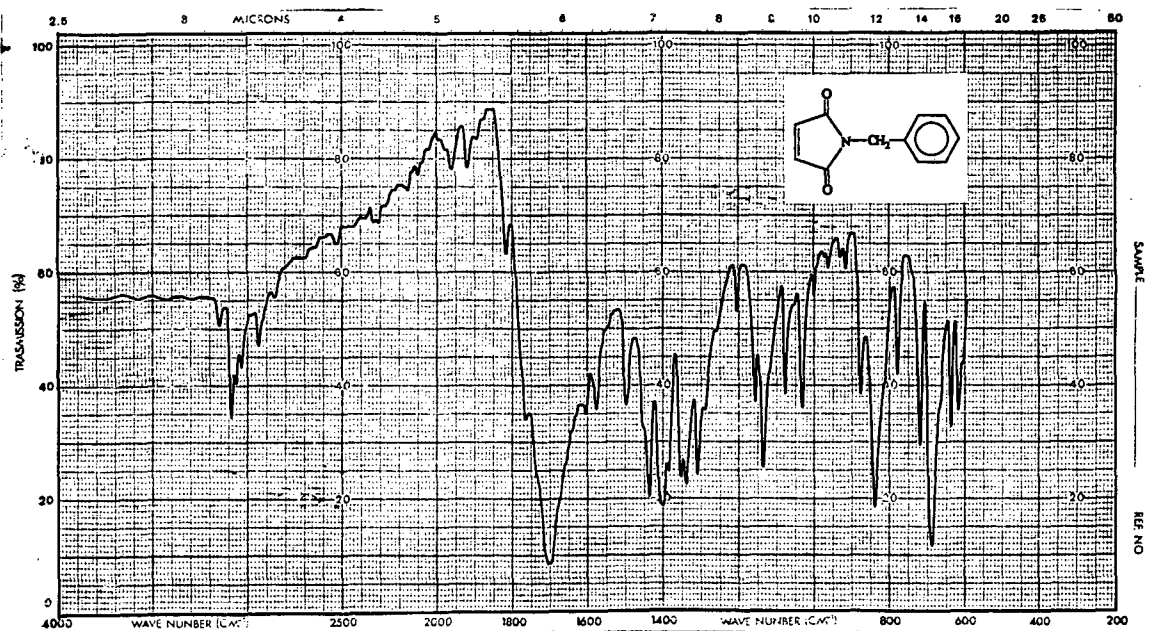
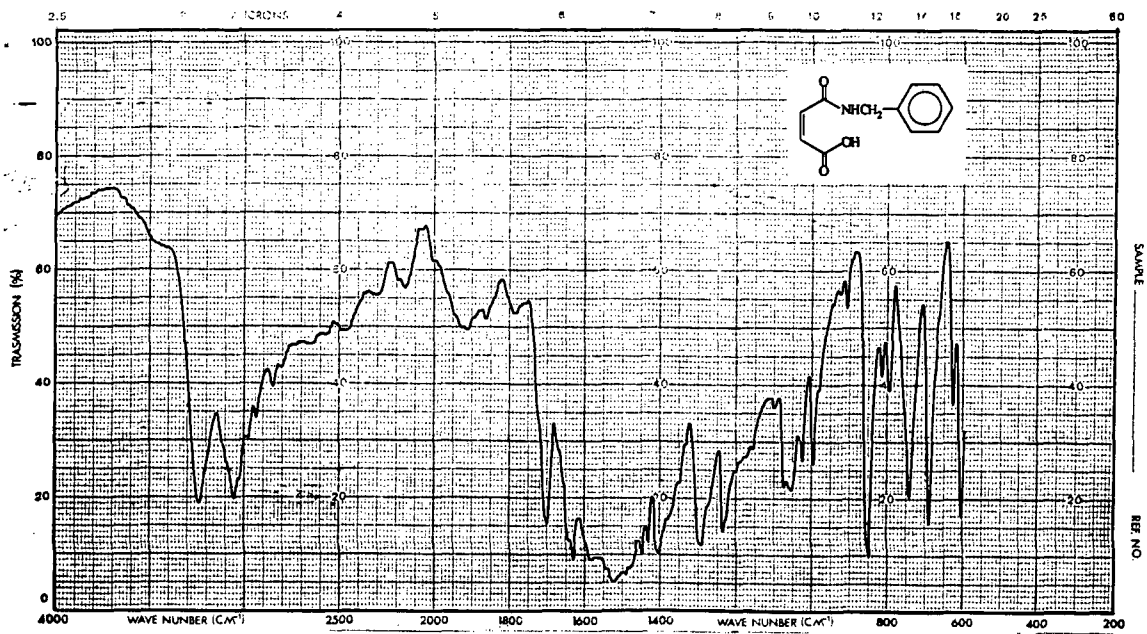


Figura 8: Espectro de IV ($\text{KBr}, \text{cm}^{-1}$) do ácido N-benzilmaleâmico e N-benzilmaleimida

4.3.2- Atividade antiespasmódica

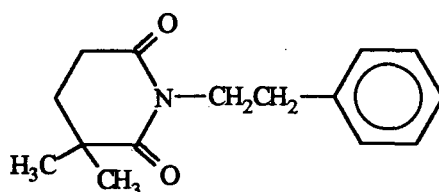
Como a filantimida, alcalóide natural obtido de P. sellowianus, antagonizou apenas discretamente as respostas contráteis induzidas pela acetilcolina no íleo isolado de cobaia, com CI_{50} de 225 μM , vários análogos foram testados neste modelo na tentativa de encontrar compostos mais potentes. Além disso, foi investigada a relação entre a estrutura química e atividade antiespasmódica destes compostos.

A tabela 14 (anexo 1) mostra o efeito antiespasmódico das succinimidas análogas à filantimida. Pode ser observado que a distância entre o anel aromático e o anel imídico representa um fator importante neste efeito, sendo que os melhores resultados foram obtidos quando esta distância é estabelecida por dois grupos metílenos. Vários compostos foram mais ativos do que o alcalóide natural. O composto (57), mais semelhante à filantimida, cuja única diferença consiste no anel succinimídico, apresentou uma CI_{50} de 85 μM , sendo cerca de 3 vezes mais potente do que a própria filantimida. A mudança de bases nitrogenadas não produziu grandes mudanças na atividade destes compostos.

A tabela 15 (anexo 1) apresenta a atividade das maleimidas, cujos compostos são muito potentes, indicando que a dupla ligação no anel imídico representa um importante grupo farmacofórico. Desta forma, o composto (46), que mostrou uma CI_{50} de 21 μM , foi cerca de 10 vezes mais potente do que a filantimida e equipotente à papaverina. A introdução de diferentes substituintes no anel aromático levou a um aumento da atividade, com os compostos (48) e (49) apresentando uma CI_{50} de 11 e 10 μM , respectivamente. Comparando os dados das tabelas 14 e 15, pode ser observado que os derivados da maleimida foram cerca de 5-8 vezes mais potentes do que os derivados da succinimida. Além do fato da dupla ligação imídica

contribuir para o aumento do efeito, deve-se notar que esta dupla ligação confere uma configuração planar aos compostos.

A importância desta planaridade e de anéis imídicos de 5 membros foi confirmada pela síntese do composto (64), que apresenta um anel imídico de 6 membros e não mostrou efeito antiespasmódico.



(64)

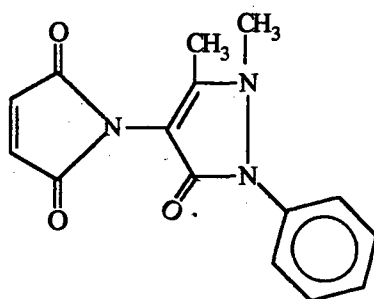
Os resultados obtidos e recentemente reportados [Cechinel Filho et al., 1994a,1995b] possibilitam que futuramente sejam realizados novos estudos nestes tipos de compostos para esclarecer a relação entre estrutura-atividade, possibilitando o surgimento de compostos não somente mais ativos, mas também mais específicos e seletivos.

4.3.3- Atividade analgésica

Estudos recentes indicaram que a filantimida apresentou discreto efeito analgésico quando testada em alguns modelos experimentais em camundongos [resultados não mostrados]. Este fato levou-nos a testar algumas maleimidas preliminarmente no modelo de dor causado pelo AcOH 0,6 % em camundongos, cujos resultados estão indicados na tabela 16 (anexo 2) e demonstram que a

atividade está aparentemente relacionada com a distância entre o anel imídico e o anel aromático.

Quando o grupo nitrogênio do anel imídico está ligado diretamente ao anel aromático (composto 34), a DI_{50} foi de $40,5 \mu\text{mol/kg}$. Quando esta distância é estabelecida por dois grupos metilenos (composto 46), a DI_{50} foi de $32 \mu\text{mol/kg}$. Já o aumento desta distância para quatro grupos metilenos (composto 51) levou a um significativo aumento na atividade analgésica, com DI_{50} de $7,5 \mu\text{mol/kg}$. Assim, a atividade aumenta com o aumento do número grupos metilenos, ou seja, com o aumento da hidrofobicidade da molécula. Tendo em vista a potente atividade apresentada por estes compostos, além de várias publicações indicando que compostos contendo átomos de nitrogênio em sua estrutura possuem efeito analgésico, como N-fenilpirazóis [Barreiro et al., 1991], derivados pirazol - tiazolpirimidínicos [Russo et al., 1993], derivados sulfonamida [Buolamwini & Knaus, 1993], derivados 2-hidrazonopiridina [Todeschini et al., 1994], etc., optou-se por sintetizar o composto (65), que foi bastante efetivo em inibir as contorções abdominais causadas pelo AcOH 0,6 %.



(65)

A potente atividade analgésica do composto (65), obtido a partir da reação entre anidrido maleico e um análogo da antipirina, substância conhecida por seus efeitos antitérmicos, analgésicos e antiinflamatórios [Rodrigues, 1987], foi comprometida, devido ao fato de que todos os animais em estudo morreram após 1 h da administração, em todas as doses, sugerindo que este composto é muito tóxico e possui uma DL₅₀ similar à DI₅₀. No entanto, futuros estudos devem ser desenvolvidos buscando eliminar o efeito tóxico deste composto.

4.3.4- Atividade antibacteriana

Várias imidas cíclicas são conhecidas por suas ações fungicidas, inseticidas e bactericidas [Hargreaves et al., 1970]. A ação da maleimida e compostos relacionados, como a N-etilmaleimida e citraconimida, contra bactérias gram positivas (*S. aureus*) e gram negativas (*E. coli*) foi demonstrada há muitos anos, e também foi comprovado que os ácidos precursores destes compostos não apresentam efeito contra estas bactérias [Marrian et al., 1953]. Outros trabalhos também mostraram o efeito antibacteriano de N-alkilfenilmaleimidias e succinimidias [Cechinel Filho et al., 1994 b,c].

Por outro lado, o alcalóide filantimida apresentou efeito antibacteriano contra algumas bactérias [Cruz, 1993]. Este resultado foi importante, pois além de sugerir o uso de *P. sellowianus* contra infecções, este alcalóide foi usado como modelo para se obter vários análogos, os quais foram inicialmente testados contra bactérias frequentemente encontradas no trato urinário [Andriole, 1987], conforme mostram as tabelas 17-20 (anexo 5). Estes resultados são de caráter qualitativo devido o uso do método de difusão em agar [Bauer et al., 1966].

Entretanto, pode ser observado claramente que as maleimidias apresentaram maior efeito antibacteriano, produzindo halos de inibição mais significativos e que a introdução de diferentes substituintes no anel aromático levou a um decréscimo de atividade.

A atividade destes compostos pelo método de difusão incentivou a aplicação do método de Mitscher [Mitscher et al., 1972] para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) possibilitando uma melhor análise da correlação quantitativa entre a estrutura molecular destas imidas e suas ações bactericidas. Desta forma, escolheu-se algumas destas imidas que foram testadas contra S. aureus e E. coli conforme mostram as tabelas 21-24 (anexo 5).

Pode ser observado que as maleimidias apresentaram uma atividade antibacteriana cerca de 30 vezes mais alta do que as correspondentes succinimidias, sugerindo que a dupla ligação imídica é um importante fator relacionado com a atividade (comparar as maleimidias 34 e 46 com as succinimidias 52 e 57, respectivamente). Similarmente, Cremlyn e Nunes [Cremlyn & Nunes, 1987] demonstraram que as sulfonilmaleimidias são consideravelmente mais potentes do que as sulfonilsuccinimidias contra os microorganismos A. niger, F. culmorum, T. viride e A. glauca. Em outro estudo [Fujiname et al., 1972] foi verificado que a introdução de átomos de cloro no anel aromático das N-fenilmaleimidias aumenta seus efeitos contra S. sclerotiorum. Em nosso caso, porém, a introdução de um ou dois átomos de cloro na N-fenilmaleimida (tabela 21) ou N-benzilmaleimida (tabela 22) não melhora seus efeitos contra E. coli e S. aureus.

Considerando que entre os substituintes introduzidos no anel aromático da N-fenilmaleimida e N-benzilmaleimida estão grupos elétron-doadores, como -OCH₃ e -CH₃, e elétron-aceptores, como -Cl, o decréscimo da atividade contra E. coli observado sugere ser devido, pelo menos em parte, a efeitos estéricos.

Este efeito também pode explicar o decréscimo de atividade produzido pela introdução dos grupos 2-CH₃ e 4-C₄H₉. Surpreendentemente, estes compostos não exibiram este efeito estérico em suas ações contra S. aureus, sugerindo que pode existir algumas diferenças em seus mecanismos de ação contra as duas bactérias.

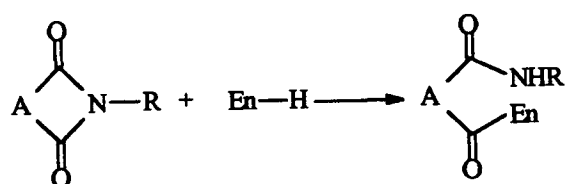
De acordo com a tabela 23, a distância entre o anel aromático e o anel imídico nas N-fenilmaleimidias não é um importante fator relacionado com a atividade antibacteriana destes compostos. Na tabela 24, pode ser notado que a presença do grupo -NMe₂ como substituinte no anel imídico dos compostos 52 e 57, posição similar onde está ligado este grupo no anel glutarimídico da filantimida, aumenta significativamente a atividade destes compostos.

Comparando as duas metodologias usadas para determinar a atividade antibacteriana das imidas cíclicas, é interessante ressaltar que os resultados foram similares, divergindo apenas em alguns aspectos, já que o método de difusão em agar é de caráter mais qualitativo, devido a influência de alguns fatores diferentes da atividade intrínseca do composto, como por exemplo a velocidade de difusão e a solubilidade do composto em estudo no meio nutriente, influências estas ausentes na determinação da CIM, que permite uma melhor análise quantitativa da atividade antibacteriana em geral.

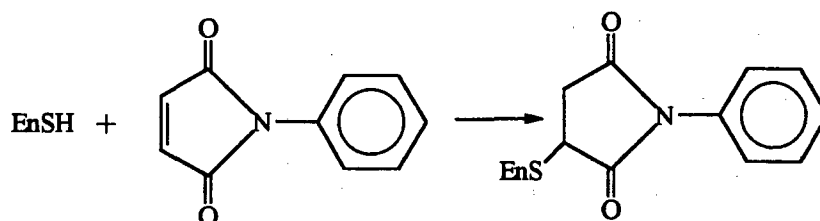
O uso da estrutura da filantimida, composto isolado segundo recomendações da medicina popular, como modelo, foi importante para obter novos compostos com potencial antibacteriano, possibilitando também determinar alguns fatores estruturais relacionados com a atividade biológica.

4.3.4.1- Mecanismo de ação

O mecanismo de ação antimicrobiana das imidas cíclicas é ainda obscuro, mas alguns autores sugerem suas hipóteses. Cremlyn [Cremlyn, 1978] propõe que a atividade de imidas pode estar associada com sua habilidade em acilar o sistema enzimático vital (En-H) como ilustrado pelo esquema abaixo:



Torgeson [Torgeson et al.,1963] propôs que o modo de ação antimicrobiana da N-fenilmaleimida está relacionada com a adição de grupos sulfidril (EnSH) no sistema enzimático vital através da dupla ligação imídica, o qual pode interferir com o processo metabólico normal de alguns microorganismos, conforme mostra o esquema abaixo:



4.3.5-Atividade antifúngica

Diversos trabalhos sobre a ação antifúngica de imidas cíclicas são citados na literatura [Torgeson et al., 1963; Hargreaves et al., 1970; Fujiname et al., 1972, Nunes, 1986 ; Lima et al., 1994]. Compostos como a N-fenilmaleimida e derivados são citados como efetivos contra certos tipos de fungos parasitas em vários alimentos, como Alternaria solani, em tomates, Puccinia triticina, no trigo, e Phytophthora infestans, em batatas, entre outros [Cremllyn, 1971]. A N-fenilmaleimida também foi efetiva contra vários fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Saccharomyces* [Ferenczy et al., 1959] além de atuar contra fungos do solo, como Pythium sp [Torgeson et al., 1963].

No presente trabalho, algumas N-alkuilfenilmaleimidias e succinimidias análogas à filantimida foram testadas pelo método de difusão, processo cavidade-placa [Grove & Randall, 1985] contra diversos fungos filamentosos e leveduriformes patogênicos aos seres humanos [Lima & Oliveira, 1993; Lima et al., 1992], tais como : Candida albicans (CA), Candida tropicalis (CT), Aspergillus flavus (AF), Penicillium sp (PE), Microsporum canis (MC), Epidermophyton floccosum (EF), Trichophyton mentagrophytes (TM) e Trichophyton rubrum (TR), cujos resultados estão descritos nas tabelas 25 e 26 (anexo 6).

Os valores do halo de inibição medidos em mm das maleimidias contra fungos estão sumarizados na tabela 25. A maioria dos compostos foi efetiva contra os microorganismos testados, onde apenas AF mostrou-se resistente aos referidos compostos. A tabela 26 mostra o efeito da introdução de grupos substituintes no anel aromático, produzindo algumas modificações relativas à atividade antifúngica destes compostos.

O derivado metoxilado (44), por exemplo, não apresentou efeito contra CT e o derivado clorado (42) foi mais efetivo contra EF e TM. Mesmo com as modificações estruturais realizadas, AF mostrou-se resistente. Como similarmente mostrado anteriormente para várias bactérias, a succinimida (55) não exibiu nenhum efeito contra os fungos estudados (resultados não mostrados), confirmando também na ação antifúngica a importância da dupla ligação imídica. Estes resultados são preliminares, mas são importantes porque demonstram que os análogos da filantimida exibem atividade contra fungos causadores de doenças nos seres humanos, permitindo que estes estudos sejam futuramente estendidos.

CAPÍTULO 5

5- CONCLUSÕES

5.1- Síntese

Em relação à parte sintética descrita no presente trabalho, foi possível obter algumas conclusões, enumeradas abaixo:

1) As reações envolvendo a bromação da xantoxilina visando obter um composto análogo ao conhecido antialérgico brometo de p-bromofenacila apresentaram alguns resultados não esperados, como: i) dificuldade em bromar a metila do grupo acetil da xantoxilina, mesmo usando os mais variados e específicos reagentes, com o átomo de bromo entrando em posição 3 do anel aromático, conforme demonstraram os dados espectrais e da literatura; ii) resultados similares ocorreram quando se usou a xantoxilina monobromada (11) para o mesmo fim, com o outro átomo de bromo entrando em posição 5 do anel aromático (12); iii) o uso de $\text{Br}_2/\text{MeOH}/\text{NaOH}$ com xantoxilina, como esperado, levou diretamente ao composto dibromado (12), evidenciando a forte ativação do anel aromático com a formação do grupo fenóxi.

2) Na tentativa de acoplar o brometo de p-bromofenacila à xantoxilina, obteve-se um composto não esperado, derivado do benzofurano. Provavelmente, o composto fenacetilóxi desejado é muito instável devido a presença do grupo $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}$, cuja nucleofilicidade do metileno favorece o ataque intramolecular à carbonila da acetofenona, onde através de uma condensação aldólica o produto ciclizado é obtido.

3) A hidrólise ácida da astilbina produziu uma aglicona denominada taxifolin (31). A metilação deste composto com Me_2SO_4 proporcionou a obtenção do composto

tetrametilado (33) e não o pentametilado como esperado. Este fato pode ser explicado pela característica de álcool secundário do grupo hidroxila em posição 3 (anel de 3 membros), cujo hidrogênio não é ácido o suficiente para ocorrer a metilação.

4) Na rota sintética para obtenção dos análogos da filantimida, o uso de ácido acético como agente desidratante para fechamento dos ácidos N-fenilalquilmaleâmicos contendo 2 ou mais grupos metilenos separando o anel imídico do anel aromático, produziu melhores rendimentos. Provavelmente, o ácido acético atua por outro mecanismo diferente do mecanismo obtido quando se usa anidrido acético/acetato de sódio.

5) A adição de bases nitrogenadas à dupla ligação imídica das maleimidias usando solventes apróticos, como CH_3CN e benzeno, levou a melhores rendimentos do que o uso de solventes próticos, como o MeOH , onde obteve-se menores rendimentos e a formação de produtos indesejáveis, provavelmente devido a abertura do anel imídico, com a base adicionando também na dupla ligação do ácido formado.

5.2- Análise Farmacológica

5.2.1- Atividade antiespasmódica

5.2.1.2- Derivados da xantoxilina

Apenas os derivados da xantoxilina (1-10) foram testados neste modelo. Os resultados mostraram alguns destes benzilóxi derivados foram bastante efetivos como antiespasmódicos quando analisados no íleo isolado de cobaia contraído pela acetilcolina. O uso do Método Manual proposto por Topliss para avaliar a relação quantitativa entre a estrutura química e a atividade farmacológica possibilitou a obtenção de compostos extremamente potentes, como os compostos 4-benzilóxi (9) e 3,4-dimetil (10) derivados, que foram cerca de 5 vezes mais potentes do que o conhecido antiespasmódico papaverina e cerca de 17 vezes mais potente do que a própria xantoxilina. Os dados obtidos sugerem que outros grupos substituintes fortemente doadores de elétrons e hidrofóbicos podem acentuar ainda mais a atividade destes derivados.

5.2.1.2- Análogos da filantimida

O alcalóide natural filantimida apresentou apenas discreto efeito antiespasmódico em íleo isolado de cobaia contraído pela acetilcolina com CI_{50} de 225 μ M. Entretanto, vários análogos sintéticos foram consideravelmente mais potentes. As maleimidas apresentaram maior atividade do que as succinimidas. O composto N-fenetilmaleimida, por exemplo, foi cerca de 10 vezes mais potente do que a filantimida, com CI_{50} de 21 μ M e foi equipotente ao conhecido antiespasmódico papaverina.

A introdução de grupos substituintes no anel aromático deste composto, como -Cl e -CH₃ aumentou significativamente o efeito antiespasmódico observado. Os resultados indicaram que além da dupla ligação imídica, a distância entre o anel imídico e o anel aromático é importante fator relacionado com a atividade, cuja distância ideal é a estabelecida por dois grupos metilenos. A mudança de bases nitrogenadas ligadas às succinimidas não produziu grandes mudanças na atividade antiespasmódica destes compostos.

O alcalóide natural filantimida, isolado a partir de indicações da medicina popular, apesar de seu fraco efeito, serviu de modelo para a obtenção de análogos mais potentes. A continuidade deste estudo poderá propiciar futuramente não só compostos mais potentes, mas talvez também com seletividade tecidual.

5.2.2- Atividade analgésica

5.2.2.1- Derivados da xantoxilina

Vários derivados da xantoxilina, ao contrário desta, mostraram potente efeito analgésico quando testados nos modelos de contorção induzido pelo AcOH e no modelo de dor causado pela formalina em camundongos. Alguns compostos, como a xantoxilina monobromada (11), o derivado 4-benzilóxibenzilóxi (9), o derivado sulfonado (20), a chalcona (21) e, principalmente o derivado benzofurânico (14), apresentaram relevante atividade analgésica no modelo do AcOH, com DI₅₀s de 81, 27, 49, 18 e 1 µmol/kg, respectivamente. O composto (14) foi cerca de 130 vezes mais potente do que a aspirina e acetaminofeno neste modelo.

No modelo de dor induzido pela formalina, o derivado benzofurânico (14) foi também o mais ativo, sendo cerca de 17 vezes mais potente em inibir a segunda fase de dor (de origem inflamatória), do que a aspirina e acetaminofeno.

Além disso, este composto, mas não a aspirina e acetoaminofen, foi efetivo em inibir também a primeira fase de dor (origem neurogênica) causada pela formalina, fato que poucos analgésicos disponíveis no mercado farmacêutico são capazes. Outro dado de extrema relevância foi que este composto apresentou um prolongado tempo de efeito.

Entre todos os derivados da xantoxilina, apenas o composto monobromado (11) apresentou efeito analgésico quando administrado oralmente, sugerindo a continuidade destes estudos para obtenção de moléculas que possam ser absorvidas oralmente.

A análise preliminar do mecanismo de ação analgésica do composto (14) sugere que o mesmo atua por mecanismos diferentes da aspirina e da morfina, sendo relevante a continuidade destes estudos mecanísticos.

5.2.2.2- Derivados da astilbina

Os derivados da astilbina, como o taxifolin (31), obtido a partir de hidrólise ácida, e o taxifolin tetrametilado (33) apresentaram relevante efeito antinociceptivo em ambos modelos de dor usado. No modelo de dor induzido pelo AcOH, ambos compostos foram efetivos tanto via ip como via oral. No entanto, (33) foi cerca de 15 vezes mais potente via ip. No modelo da formalina, estes compostos inibiram parcialmente a primeira fase de dor, com o (33) sendo também mais efetivo em inibir a segunda fase de dor. Quando comparado aos analgésicos aspirina e acetaminofeno, este composto foi cerca de 4 vezes mais potente em inibir a segunda fase de dor causada pela formalina em camundongos.

5.2.3- Atividade antiinflamatória

5.2.3.1- Derivados da xantoxilina

A xantoxilina e alguns de seus derivados, como a xantoxilina monobromada (11), dibromada (12), o derivado benzofurânico (14) e as chalconas (19) e (21) inibiram significativamente o edema de pata de rato provocado pela dextrana. Os compostos (14), (19) e (21) foram os mais efetivos com IM de 58, 63 e 61 % (1 h), respectivamente. No edema causado pela carragenina, tanto a xantoxilina como os derivados (11), (14) e (21) foram efetivos, apresentando IM de 46, 43 e 41 % (1 h), respectivamente, sendo estes compostos ligeiramente menos eficazes do que em relação ao edema causado pela dextrana. Estes compostos apresentaram efeitos similares aos conhecidos antiinflamatórios não esteroidais disponíveis no mercado e usados clinicamente, como a indometacina e o ibuprofene.

Em relação ao edema causado pela bradicinina, a xantoxilina e os derivados (14) e (21) demonstraram efeito mais significativo, com IM de 37, 51 e 27 % (20 min.), respectivamente. A xantoxilina monobromada (11) apresentou apenas discreto efeito neste modelo.

Estes resultados indicam que vários derivados da xantoxilina demonstram considerável atividade antiedematogênica em relação a vários mediadores da inflamação. É importante mencionar que alguns destes derivados também foram efetivos quando analisados na pleurisia induzida pela carragenina e pelo PAF-acéter, principalmente o composto benzofurânico (14) em relação ao PAF-acéter, confirmando e estendendo as observações anteriormente citadas sobre a atividade antiinflamatória de derivados da xantoxilina. Estes dados podem explicar, pelo menos em parte, o efeito analgésico demonstrado por estes compostos.

5.2.3.2- Derivados da astilbina

A astilbina e seus derivados taxifolin (31) e taxifolin tetrametilado (33) foram efetivos em inibir o edema de pata de rato induzido pela dextrana, com IM de 37, 52 e 33 % nos tempos de 1,2 e 4h, respectivamente, enquanto o taxifolin pentametilado (32) potencializou o edema. É relevante citar que o taxifolin (31) teve uma longa duração de efeito, com inibição de 46 % no tempo de 4h.

Por outro lado, ao contrário do observado em relação ao edema causado pela dextrana, o composto (32) inibiu consideravelmente o edema induzido pela carragenina, com IM de 40 % (1 h), também com efeito duradouro (36 % de inibição no tempo de 4 h). O taxifolin tetrametilado exibiu IM de 38 % (1h). Ambos compostos foram equipotentes aos convencionais antiinflamatórios indometacina e ibuprofene no modelo de edema de pata causado pela carragenina em ratos. Ao contrário, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em ratos o composto taxifolin (31) foi o mais eficaz, diminuindo significativamente a migração celular.

Estes resultados mostram que tanto a astilbina como seus derivados possuem importantes ações antiinflamatórias que podem explicar, pelo menos em parte, suas ações analgésicas anteriormente descrita.

5.2.4- Atividade antialérgica e/ou antiasmática

5.2.4.1- Derivados da xantoxilina

Poucos derivados da xantoxilina foram testados neste modelo, mas preliminarmente observou-se que enquanto a xantoxilina não interferiu com a reação alérgica causada pela exposição ao antígeno em traqueia de cobaia, a xantoxilina bromada e metilada (28) causou potente efeito antialérgico, inibindo, na dose de 346

μM , a contração causada pela ovalbumina. Estes resultados são importantes, indicando que outros derivados da xantoxilina podem apresentar efeitos antialérgicos e/ou antiasmáticos, e sugerindo a continuação destes estudos para obtenção de compostos mais potentes.

5.2.4.2- Derivados da astilbina

Tanto a astilbina (222 μM) como o taxifolin tetrametilado (33) (278 μM) inibiram fortemente a contração induzida pela ovalbumina na traquéia isolada de cobaia sensibilizada ao antígeno, enquanto que o taxifolin (31) e taxifolin pentacetilado (32) inibiram apenas discretamente esta contração.

5.2.5- Atividade antibacteriana

5.2.5.1- Análogos da filantimida

Os análogos da filantimida foram potencialmente antibacterianos nos dois métodos empregados. No método da determinação da CIM, que é de caráter mais quantitativo, foi possível observar que as maleimidias foram consideravelmente mais potentes do que as succinimidias contra duas bactérias frequentemente encontradas em infecções do trato urinário, como a Escherichia coli e Staphylococcus aureus, sugerindo que a dupla ligação imídica é fator importante para a atividade antibacteriana destes compostos. Também foi observado que a introdução de grupos substituintes, independente de sua natureza, no anel aromático tanto da N-fenilmaleimida como da N-benzilmaleimida, proporcionou um decréscimo da atividade contra estas bactérias, indicando a existência, pelo menos em parte, de efeitos estéricos.

Por outro lado, as succinimidas que apresentaram melhores efeitos antibacterianos contra E. coli e S. aureus foram as contendo o grupo -NMe₂ ligado em posição similar à estrutura glutarimídica da filantimida.

5.2.6- Atividade antifúngica

5.2.6.1- Análogos da filantimida

Vários análogos da filantimida apresentaram interessante efeito antifúngico quando testados pelo método de difusão, processo cavidade-placa. Os derivados da maleimida, como também mostrado anteriormente para o efeito antibacteriano, foram ativos contra uma série de fungos leveduriformes e filamentosos que causam doenças nos seres humanos, como a dermatofitose e a candidíase. Apenas *Aspergillus flavus* mostrou-se resistente aos referidos compostos. De modo geral, a introdução de um átomo de cloro no anel aromático das N-fenilalquilmaleimidas acentuou o efeito antifúngico contra alguns fungos. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o mesmo seja continuado para a obtenção de novos e mais potentes compostos antifúngicos.

CONCLUSÃO FINAL

"A utilização de produtos extraídos de Plantas Medicinais, como a Xantoxilina, Astilbina e Filantimida, usadas como modelo, possibilitou a obtenção de vários compostos importantes farmacologicamente e a determinação de alguns fatores estruturais relacionados com a atividade, abrindo espaço para que novos trabalhos sejam desenvolvidos nesta área"

Referências Bibliográficas

ANDRADE NETO,M. Contribuição ao Conhecimento Químico de Plantas do Nordeste-*Pilocarpus spp.* Dissertação de Mestrado, UFC, Fortaleza-CE(1989).

ANDRIOLE,VT. Infecções do Trato Urinário. Ed. Interlivros, Rio de Janeiro, p.20(1987).

APPEL,HH; BROOKS,CJW; OVERTON,KH. The Connstitution and Stereochemistr of Drimenol, a Novel Bicyclic Sesquiterpenoid. J. Chem. Soc., 3322-3332(1959).

ASHAF,SA; HILL,J; M'HAMEDIA; ZERIZER,H. Photoreactions of 2-(N-alkylaryl-amino)succinimides and Related Compounds. Tetrahedron, 48(32):6747-6756(1992).

AWASTHI,YC & MITRA,CR. Flavanoids of *Madhuca butyraceae*. J. Org. Chem., 27:2636-2637(1962).

AYOUB,SMH & ELASSAM,OE. Phloracetophenone Dimethylether from the Leaves of *Pulicaria undulata*. Fitoterapia, 6:247-249(1981).

BAKAY,M; MUCSI,I; BÉLÁDI,I; GÁBOR,M. Effect of Flavonoids and Related Substances.II- Antiviral Effect of Quercetin, Dihydroquercetin and Dihydrofisetin. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 15:223-227(1968).

BARREIRO,EJ; FREITAS,ACC; PEREIRA,AL; CORREA,CJC. QSAR in N-Phenylpyrazoles. Workshop on Chemical Structure and Biological Activity, São Paulo-SP, (1991).

BAUER, AW; KIRBY, WMM; SERRIS,JC; TURCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Method. The Americ. J. Cin. Pathol., 45:493-496(1966).

BEIRNE,JJ; COYLE,AM; DONNELLY,JA. Halodeacylation of Aryl Ketones. Tetrahedron, 26:3809-3814(1970).

BENTLEY,GA; NEWTON,SH; STARR,J. Evidence for an Action of Morphine and Enkephalin on Sensory Nerve Ending in the Mouse Peritoneum. Br.J.Pharmacol. , 73:325-333 (1981).

BRUNS,RE. Chemometrics and QSAR. IInd Workshop on Chemical Structure and Biological Activity. São Paulo-SP, L 03(1994).

BUCKINGAN,J. Dictionary of Organic Compounds, Fifth ed., Second Supplement, 362 (1984).

BUCKLER, RT; HAYAO,S ; LORENZETTI, OJ; SANCILIO,LF; HARTZLER,HE; STRYCKER,WG. Synthesis and Antiinflammatory Activity of some Aryltetrazolyalkanoic Acids. J. Med. Chem. , 13(4),725-729(1970).

BUOLAMWINI,JK & KNAUS,EE. Synthesis and Antinociceptive Activity of 1-Methylpiperilydene-2-(pyridyl)sulfonamides and Related Dihydropyridy Analogs. Eur. J. Med. Chem., 28:447-453(1993).

BURGSTAHLER,AW & WORDEN,LR. Coumarone. Org. Synthesis Coll., 251-255 (1973).

CALIXTO, JB; YUNES, RA; NETO,ASO; VALLE,RMR; RAE,GA. Antispasmodic Effects of an Alkaloid Extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a Comparative Study with Papaverine. Braz. J. Med. Biol. Res., 17:313-321(1984).

CALIXTO, JB; YUNES,RA; MIGUEL,OG; RAE,GA. Effects of *Sebastiania schottiana* Extracts on Isolated Smooth Muscle Contraction. Planta Medica,52:444-445(1986).

CALIXTO, JB; COELHO,L; CARNEIRO,E; YUNES,RA; MEDEIROS,YS. Análise do Extrato Hidroalcolico da *Hymeneae courbaril* sobre a Ação de Vários Neurotransmissores no Útero e Íleo de Cobaia Isolados. X Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, São Paulo, 1988.

CALIXTO,JB; GOMES,JC; CARNEIRO,E; YUNES,RA; DELLE MONACHE,F; MEDEIROS,YS. Pharmacological Evaluation of Fractions and Two Glicosids from the Bark of *Hymeneae courbaril* " in vitro ". Brazilian-China Symposium on Chemistry and Pharmacology of Natural Products., Rio de Janeiro, p.174(1989).

CALIXTO,JB; YUNES,RA; RAE,GA; MEDEIROS,YS. Nonpeptide bradykinin antagonists. In: Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Res. Ed. By R.M. Burch, Marcel Dekker Inc. New York, p.88-127(1990 a).

CALIXTO,JB; MIGUEL,OG; YUNES,RA; RAE,GA. Action of 2-hydroxy-4,6 dimethoxyacetophenone Isolated from *Sebastiania schottiana*. Planta Medica,56:31-35(1990 b).

CAMMARATA,A; ALLEN,RC; SEYDEL,JK; WEMPE,E. Cautions Regarding the Physical Interpretation of Statistically Based Structure-Activity Relationships. J.Pharm.Sci., 59(10),1496-1499(1970).

CARNEIRO,E; Identificação de Glicosídeos na *Hymeneae martiana*. Estruturas e Atividades Farmacológicas. Dissertação de Mestrado, UFSC,Florianópolis,SC,211 p.(1989).

CARNEIRO,E; CALIXTO,JB; DELLE MONACHE,F; YUNES,RA. Isolation, Chemical Identification and Pharmacological Evaluation of Eucryphin, Astilbin and Engelitin Obtained from the Bark of *Hymeneae martiana*. Int. J. Pharmacog., 31:38-46(1993).

CAVA,MP; DEANA,AA; MUTH,K; MITCHELL,MJ. N-phenylmaleimide. Organic Synthesis Coll., Vol.V,944(1973).

CECHINEL FILHO,V; CALIXTO,JB; NUNES,RJ; YUNES,RA. Synthesis of Phyllanthimide Analogs. 5th Brazilian Meeting on Organic Synthesis. Campinas-SP, PS-075,119(1992).

CECHINEL FILHO,V. Modificação da Estrutura Molecular da Xantoxilina e Estudo da Atividade Farmacológica dos Derivados. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis,SC, 1991.

CECHINEL FILHO,V; NUNES,RJ; YUNES,RA; CALIXTO,JB. Aplicação do Método de Topliss para a Análise da Correlação entre Estrutura Química e Atividade Farmacológica de Derivados da Xantoxilina. Química Nova, 16(3):189-191(1993).

CECHINEL FILHO,V; MIGUEL,OG; NUNES,RJ; CALIXTO,JB; YUNES,RA. Antispasmodic Activity of Xanthoxyline Derivatives. Structure-Activity Relationships. J. Pharmaceutical Sciences, 84(4), 475-477 (1995a).

CECHINEL FILHO,V; NUNES,RJ; CALIXTO,JB; YUNES,RA. Inhibition of Acetylcholine-mediated Contraction of Guinea Pig Ileum " in vitro " Caused by Phyllanthimide Analogs: Structure-Activity Relationships. Pharmaceutical Sciences, in press (1995b).

CECHINEL FILHO,V; NUNES,RJ; CALIXTO,JB; YUNES,RA. Ações Farmacológicas " in vitro " de Análogos da Filantimida. Correlação Estrutura-Atividade. Anais da 17a. Reunião Anual da SBQ, Caxambu-MG, SA-17(1994a).

CECHINEL FILHO,V; CRUZ,AB; NUNES,RJ; CORREIA,R; GONZAGA,L; MORETTO,E; CALIXTO,JB; YUNES,RA. Atividade Antimicrobiana de Análogos da Filantimida. Rev. Latinoamer. Quimica, (1994b)- in press.

CECHINEL FILHO,V; PINHEIRO,T; NUNES,RJ; YUNES,RA; CRUZ,AB; MORETTO,E. Antibacterial Activity of N-phenylmaleimides, N-phenylsuccinimides and Related Compounds. Structure-Activity Relationships. II Farmaco, 49(10):675-677(1994c).

CECHINEL FILHO,V; VAZ,R; CALIXTO,JB; NIERO,R; YUNES,RA. Ações Antinociceptivas de Chalconas Derivadas da Xantoxilina Monobromada. Anais do XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Fortaleza-CE, 121(1994d).

COLLIER,HDJ; DINNIN,LC; JOHNSON,CA; SCHNEIDER,C. The Abdominal Response and its Suppression by Analgesic Drugs in the Mouse. Br. J. Pharmacol. , 32:295-310 (1968).

CORREA,CR & CALIXTO,JB. Evidence for participation of B1 and B2 Kinin Receptors in Formalin-induced Nociceptive Response in the Mouse. Br. J. Pharmacol., 110:193-198(1993).

COURTNEY,JL; LASSAK,EV; SPEIRS,GB. Leaf wax Constituents of Some Myrtaceous Species. Phytochemistry,22(4):947-949(1983).

COYLE,JD. Synthetic Organic Photochemistry. ed. Hospool,W.M., Plenum Press, New York and London, 259-284(1984).

CRAVEIRO,AA; ALENCAR,JW; MATOS,FJA; SOUZA,MP; MACHADO,MIL. Constituents of Leaves, Bark, and Wood from *Vanillosmopsis arborea*. J. Ess. Oil Research, 1:293-294(1989).

CREMLYN,R. The Fungitoxicity of Imides. Int. Pest Control, 13(6):12-16(1971).

CREMLYN,R. Pesticides: Preparation and Mode of Action, John Wiley & Sons, Chichester, (1978).

CREMLYN,R; SWINBOURNE,F; NUNES,RJ. Diels-Alder reactions Using N-(p-Chlorosulfonyl-Phenyl)-Maleimide as Dienophile. Phosphorus and Sulfur, 3 :65-75(1987a).

CREMLYN,R & NUNES,RJ. Reactions of N-(p-Chlorosulphonylphenyl)Maleimide. Phosphorous and Sulfur, 31:245-254(1987b).

CREMLYN,R & NUNES,RJ. Synthesis and Reactions of N-(Chlorosulphonylphenyl) Succinimide, Glutarimide and Camphorimide. Gazz. Chim. Italiana, 117:183-186(1987c).

CRUZ,A; SILVA,M; SAMMERS,PG. Antitumor Compounds from Chilean Plants.III. Terpenoids and Phenolics of *Drimys winteri*. Phytochemistry,12(10):2549-2550(1973).

CRUZ,AB. Resultados não publicados (Depto. Tec. Alimentos-UFSC) 1993.

CSEJESLAJ. Toxicity and Biodegradation of Dihydroquercetin. Can. J. of Microbiology, 15:1137-1140(1969).

DANTAS,TNC; MACHADO,MIL; BRAZ FILHO,R; CRAVEIRO,AA. Contribution to the Study of NMR Spectroscopy of Chalcones. Rev. Latinoamer. Quim., 15(1):25-27(1984).

DIAZ,D; AURA,MP; PEDRO,P; BONILHA,J. Flavonoid Glycosides from *Drimys granadensis*. Rev. Latinoamer. Quim., 16(1):28-30(1985).

DILTS,K & DURAND,M. The Synthesis of Substituted Benzyl Phenyl Ethers. J. Chem. Educ., 67(1):74(1990).

DONNELLY,JA & POLICKY,F. Bromo-deacylation. Chemistry and Industry, July 24:1338(1965).

DORSCH,W; SHAUER,U; BRUDERECK,R; ANTUS,S; WAGNER,H. PAF-Receptor Antagonism of Acetophenone Derivatives. 4th and International Congress on Phytotherapy, Munich-Germany,P2(1992).

FRANKE,R. Theoretical Drug Design Methods .Ed. Elsevier, New York, USA (1984).

FREIRE,SMF; AZEVEDO,SRA; CARTÁGENES,MSS; SOBRINHO,JWBR; TORRES,LMB. Investigação da Atividade Analgésica e Antiinflamatória de uma Flavona Isolada da *Scoparia dulcis*. Anais do XIII S mpo sio de Plantas Medicinais do Brasil, Fortaleza-CE, 092 (1994).

FUJINAME,A; OZAKI,T; NODERA,K; TANAKA,K. Studies on Biological Activity of Cyclic Imide Compounds. Agr. Biol. Chem., 36(2):318-323(1972).

FULLER,RW; MILLS,J; MARSH,MM Inhibition of Phenethanolamine N-methyl Transferase by Ring-Substituted α -Methylphenethylaminos(Anphetamines) J.Med.Chem.,14(4),322-325(1971).

GARBOR,M; Antiinflammatory Substances of Plant Origin.In: Handbook of Experimental Pharmacology, Ed. by J.R. Vane and S.H. Ferreira, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 50, II,p.699-739(1990).

GARDINER,PJ. Inhibitors of the Biosyntheses or Actions of the leukotrienes. Asthma Rev.,3(2):75124(1989).

GILMAN,AG; GOODMAN,LS; HALL,TW; MURAD,F. As Bases Farmacológicas da Terap utica, 7a. ed., Rio de Janeiro-RJ, ed. Guanabara Koogan, (1987).

GODOY,GF; MIGUEL,OG; MOREIRA,EA. Antibacterial Activity of Xanthoxyline, Constituent of *Sebastiania schottiana*. Fitoterapia, LXII(3):269-270(1991).

GORSKI,F; CORRÊA,CR; CECHINEL FILHO,V; YUNES,RA; CALIXTO,JB. Potent Antinociceptive Activity of a Hydroalcoholic Extract of *Phyllanthus corcovadensis*. J.Pharm. Pharmacol. ,45:1046-1049(1993).

GROVE,DC & RANDALL,WS. Assay Methods of Antibiotics, Medical Encyclopedia,New York,1985.

GUIDER,JM; SIMPSON,TH; THOMAS,DB. Anthoxantins. Derivatives of Katuranin and Kaempferol. J. Chem. Soc., 170-173(1955).

GUPTA,MB; BHALLA,TN; GUPTA,GP; MITRA,CR; BHARGATA,K. Antiinflammatory Activity of Taxifolin . Japan J. Pharmacol. ,21:377-382(1971).

GUPTA,SP; SINGH,P; BINDAL,MC. QSAR Studies on Hallucinogens. Chem.Rev. 83:633-649(1983).

HAMBURGER,M & HOSTETTMANN,K. Bioactivity in Plants: the Link Between Phytochemistry and Medicine. Phytochemistry , 30(12),3864-3874(1991).

HAMMETT,LP. Physical Organic Chemistry, Ed. McGraw-Hill,New York, USA, 1970.

HANSCH,C. Drug Design I, Ed. E.J. Arkens, Academic Press, USA,1971.

HANSCH,C; KIM,KH; SARMA,RH. Structure-Activity Relationship in Benzamides Inhibiting Alcohol Dehydrogenase. J.Amer.Chem. Soc. 95(19),6447-6449(1973).

HARGREAVES,MK; PRITCHARD,JG; DAVE,HR. Cyclic Carboxylic Monoimides (Review). Chem. Rev., 70(4):439-469(1970).

HAUSTEEN,B. Flavonoids, A Class of natural Products of High Pharmacological Potency. Biochem. Pharmacol., 32(7),1141-1148(1983).

HAYASHI,K & OUCHI,K. Astilbin, a New Flavanone Glycoside from the Rhizome of *Astilbe odontophylla*. Misc. Repts. Research Inst. Nat. Resources, 17-18:19-24(1950).

HEIZEN,VEF; CECHINEL FILHO,V; YUNES,RA. Revisão do Método Manual Proposto por Topliss. IInd Workshop on Chemical Structure and Biological Activity, São Paulo-SP, PI 05(1994).

HERGERT,HL; COAD,P; LOGAN,AV. The Methylation of Dihydroquercetin. J. Org. Chem., 21:304-310(1956).

HORWITZ,SB. How to Make Taxol from Stratch. Nature, 367:593-594(1994).

INIGO,RPA & POMILIO,AB. Flavonoids from *Erythroxylon argentinum*. Phytochemistry, 24(2):347-349(1985).

JAKOLEV,V; ISAAC,O; FLAKAMP,E. Pharmacologische untersuchugem von *Kamillen inhallstoffen*. Planta Medica, 42(2):67-73(1983).

JELLINEK,I. O-bisabolol, un Agent Antiinflamatoire pour Produits Cosmetiques. Parfums Cosmetiques & Aromes, 55:55-57(1984).

KAKEYA,N; YATA,N; KAMADA,A; AOKI,M. Biological Activities of Drugs.VIII-Structure-Activity Relationship of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors. Chem. Pharm. Bull.,17(12),2558-2564(1969).

KING,LC & OSTRUM,GK. Selective Bromination with Cooper(II)bromide. J. Org.Chem., 29:3459-3461(1964).

KINGSTON,DGI. The Chemistry of Taxol. Pharmac. Ther. , 52:1-34(1991).

KOROLKOVAS,A & BUCKHALTER,JH. Química Farmacêutica, Guanabara Dois, Rio de Janeiro,1982.

KOUNO,I; SAISHOJI,T; SUGIYAMA,M; KAWANO,N. A Xylosylglucoside of Xanthoxylin from *Sapium sebiferum* root Bark. Phytochemistry, 22 (3): 790-791 (1983).

KRETOV,AE & KULCHITSKAYA,NE. The Preparation and Properties of N-arylmaleimides. J. Gen. Chem. USSR, 26:221-225(1956).

KUBINYI,H. QSAR. Hansch Analysis and Related Approaches, VCH Weinheim, (1993).

KUBINYI,H. Variable and Model Selection in QSAR Studies. IInd Workshop on Chemical Structure and Biological Activity. São Paulo-SP, L 06(1994).

LIMA,EO; GOMPERTZ,OF; PAULO,MQ; GIESBRECHT,AM. In Vitro Antifungal Activity of Essential Oils Against Clinical Isolates of Dermatophytes. Rev. Microbiol.
São Paulo,23(4):235-238(1992).

LIMA,EO & OLIVEIRA,NMC. Micologia-Estudo Laboratorial das Micoses. Monografia , João Pessoa,PB,39 p.(1993).

LIMA,EO; MORAIS,VMF; GOMES,STA; CECHINEL FILHO,V; MIGUEL,OG; YUNES,RA. Efeito Antifúngico da Xantoxilina. Anais do XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Fortaleza-CE, 122(1994).

LUKES,R & PERGAL,M. Synthesis of N-Substituted Imides of (\pm)-Malic Acid and Maleic Acid and their Reduction with Lithium Aluminum Hydride. Collection Czech. Chem. Commun.,27:1387-1392(1962).

MABRY,TJ & ULUBELEN,A. Chemistry and Utilization of Phenylpropanoids Including Flavonoids, Coumarins and Lignans. J. Agric. Food Chem. , 28(2),188-195 (1980).

MANSOUR,S & DANIEL,EE. Responsiveness of Isolated Tracheal Smooth Muscle from Normal and Sensitized Guinea Pigs. J. Physiol. Pharmacol., 65:1942-1950(1987).

MARKHAM,KR. Techniques of Flavonoid Identification. New York, Academic Press, 1-14(1982).

MARRIAN,DH; FRIEDMAN,E; WARD,JL. The Antibacterial Effects of Substances Structurally Resembling Maleimide. Biochemical Journal, 54:65-68(1953).

MATA,L; SANTOS,ARS; SCHELEMPER,V; CECHINEL FILHO,V; YUNES,RA; CALIXTO,JB. Efeito Analgésico do Extrato Hidroalcoólico Obtido das cascas de *Drimys winteri*. Anais do XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Fortaleza-CE, 338 (1994).

MATOS,FJA. Plantas Medicinais Brasileiras- um Desafio para Nossos Químicos Orgânicos. Rev. de Extensão-Desafio, UFC, 3(1): 5-13(1990).

MAZZOCHI,PH. Organic Photochemistry, ed. Padwa,A., Marcel Dekker Inc., New York and Basel, Vol.1, 421-471(1981).

MIDDLETON JR,E. Some Effects of Flavonoids on Mammalian Cell Systems. In: Hungarian Bioflavonoid Symposium,7. Szeged, Hungary, 1985. Amsterdam, Elsevier, 382-387(1986).

MIGUEL,OG. Identificação de Compostos Químicos de *Sebastiania schottiana*. Estruturas e Atividade Farmacológica. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis,SC,1987.

MIGUEL,OG; CECHINEL FILHO,V; NIERO,R; PIZZOLATTI,MG; YUNES,RA; SANTOS,ARS; CALIXTO,JB. Constituents of *Phyllanthus sellowianus*. Fitoterapia, Vol. LXVI, 3: 275 (1995).

MITSCHER,LA; LEU,LP; BATHOLA,MS; WU,WN; BEAL,JL. Antimicrobial Agents from Higher Plants.I:Introduction, Rationale and Methodology. Lloydia, 35:157-166(1972).

MUSTAFA,A; ASKER,W; KHATTAB,S; ZAYED,SMAD. On the Reactivity of the Unsaturated System in N-Arylmaleimides. J.Org.Chem., 26:787-789 (1961).

NEVES,CA; NEVES,PCA; ZANINI,JC; MEDEIROS,YS; CALIXTO,JB. Analgesic and Antiinflammatory activities of the Crude Hydroalcoholic Extract Obtained from the Bark of *Hymenaeae martiana*, Phytotherapy Res., 7:356-362(1993).

NIERO,R. Isolamento e Identificação de Compostos de *Phyllanthus corcovadensis* com Efeito Analgésico: Correlação Estrutura-Atividade. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis,SC (1993).

NUNES,RJ. The Chemistry and Biological Activity of Cyclic Imidobenzenesulphonyl Derivatives. PhD Tesis. The Hatfield Polytechnic, 212 p (1986).

OGATA,T; HIGUCHI,H; MOCHIDA,S; MATSUMOTO,H; KATO,A; ENDO,T; KAJI,A; KAJI,H. HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor from *Phyllanthus niruri*. AIDS Research and Human Retroviruses, 8:1937-1944 (1992).

PEW,JC. A Flavanone from Douglas-Fir Heartwood. J. Am. Chem. Soc., 3031-3034 (1948).

PRETSCH,E; SEIBL,J; SIMON,W; CLERC,T. Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds, Second ed., Springer-Verlag, 1989.

PROKSCH,P & RODRIGUEZ,E. Chromenes and Benzofurans of the Asteraceae, their Chemistry and Biological Significance (Review). Phytochemistry, 22(11):2335-2348(1983).

READ,RR & WOOD,JJ. O-n-Heptylphenol. Org. Synthesis Coll., 3:444(1955).

RODRIGUES,LEA. Antiinflamatórios não Esteróides. Centro Editorial e Didático da UFBA, Salvador-BA, (1988).

RUSSO,F; GUCCIONE,S; ROMEO,G; BARRETTA,GU; PUCCIS; CARUSO,A; ROXAS,MA; CUTULI,V. Pyrazolothiazolopyrimide Derivatives as a Novel Class of Antiinflammatory or Antinociceptive Agents: Synthesis, Structural Characterization and Pharmacological Evaluation. Eur. J. Med. Chem., 28:363-376(1993).

SANTOS,ARS; NIERO,R; CECHINEL FILHO,V; YUNES,RA; CALIXTO,JB. Ações Antinociceptivas de Extratos de Espécies de *Phyllanthus*. VIII Reunião Anual da FESBE, Caxambú-MG,P 6.76 (1993).

SANTOS,ARS; CECHINEL FILHO,V; YUNES,RA; CALIXTO,JB. Further Studies on the Antinociceptive Action of the Hydroalcoholic Extracts from Plants of the Genus *Phyllanthus*. J. Pharm. Pharmacol., (1994a)-in press.

SANTOS,ARS; CECHINEL FILHO,V; NIERO,V; MIGUEL,OG; PIZZOLATTI, MG; YUNES,RA; CALIXTO,JB. Estudo Químico e Farmacológico de *Phyllanthus*

carolinienses. Anais do XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Fortaleza-CE, 337(1994b).

SANTOS,ARS; CECHINEL FILHO,V; NIERO,R; VIANA,AM; MORENO,FN; CAMPOS,MM; YUNES,RA; CALIXTO,JB. Analgesic Effects of Callus Culture Extracts from Selected Species of *Phyllanthus* in Mice. J. Pharm. Pharmacol., 46:755-759(1994c).

SANTOS,ARS; NIERO,R; CECHINEL FILHO,V; YUNES,RA; DELLE MONACHE,F; CALIXTO,JB. Antinociceptive Properties of Steroids Isolated from *Phyllanthus corcovadensis*. Planta Medica, (1994d)-in press

SCHAEFFER,HJ; LAUTER,WM; FOOTE,PA. A Preliminary Phytochemical Study of *Hipponame mancinella*. J. Am. Pharm. Assoc., 43:43-45 (1954).

SEPULVEDA,S; DELHVI,S; KOCH,B; ZILLIKEN,F; CASSELS,BK. Constituents of *Centaurea chilensis*. Fitoterapia, LXV(1) (1994).

SERTIÉ,JAA; BASILE,AC; PANIZZA,S; MATIDA,AK; ZELNIK,R. Antiinflammatory Activity and Sub-Acute Toxicity of Artemetin. Planta Medica, 56:36-40(1990).

SHARPLESS,NE & FLAVIN,M. The Reactions of Amines and Amino Acids with Maleimides. Biochemistry, 5(9):2963-2971(1966).

SOGAWA,S; NIHRO,Y; UEDA,H; IZUMI,A; MIKI,T; MATSUMOTO,H; SATOH,T. 3,4-dihydroxy chalcones as Potent 5-Lipoxygenase and Cyclooxygenase Inhibitors. J.Med.Chem., 36(24) : 3904-3909 (1993).

SOUZA,MF; SILVA,JC; RAO,VSN; SILVEIRA,ER. Atividade Antiinflamatória da Ternatina, um Flavonóide Isolado da *Egletes viscosa*. Anais do XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Curitiba-PR, 017(1992).

TEMPESTA,MS; CORLEY,DG; BEUTLER,JA; METRAL,CJ; YUNES,RA; GIACOMOZZI,CA; CALIXTO,JB. Phyllanthimide, a New Alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*. J.Nat.Prod. , 3:617-618 (1988).

TESTA,B & KIER,LB. The Concept of Molecular Structure in Structure-Activity Relationship Studies and Drug Design. Medicinal Research Reviews , 11(1),035-048 (1991).

TODESCHINI,AR; MARTINS,RCA; MIRANDA,ALP; BACHA,CM; BARREIRO, EJ. Relação Estrutura Química Atividade Analgésica de 2-Hidrazonopiridina. II Workshop on Chemical Structure and Biological Activity, São Paulo-SP, PI 10(1994).

TOPLISS,JG. Utilization of Operacional Schemes for Analog Synthesis in Drug Design. J.Med.Chem. , 15(10),1006-1011 (1972).

TOPLISS,JG. A Manual Method for Applying the Hansch Approach to Drug Design. J.Med.Chem. , 20(4), 463-469 (1977).

TORGENSON,DC; HENSLEY,WH; LAMBRECH,JA. N-phenylmaleimides and Related Compounds as Soil Fungicides. Contrib. Boyce Thompson Inst., 22:67-70(1963).

TRATSK,KS; CAMPOS,MM; SCHELEMPER,V; VAZ,ZR; CECHINEL FILHO,V; YUNES,RA; CALIXTO,JB. Efeito do Antiedematogênico e Antialérgico do Extrato Hidroalcolico Obtido das Cascas de *Drimys winteri*. Anais do XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Fortaleza-CE, 341(1994).

TROUSDALE,EK & SINGLETON,VL. Astilbin and Engeletin in Grapes and Wine. Phytochemistry,22(2):619-620(1983).

UGAZ,OL; HIJARA,A; CASTILHO,JB; SELINGMANN,O; WAGNER,H. Dihydro-euparin from *Werneria ciliolata*. Fitoterapia,55:248-249(1984).

UGAZ,OL & PERALTA,A. Benzofurano de la *Werneria ciliolata*. Rev. Latinoamer. Quim., 19:71-72(1988).

UGAZ,OL Investigación Fitoquímica. Pontificia Universidad Catolica del Peru Fondo Editorial, 2a. ed.,Lima-Peru, (1994).

UNANDER,DW; WEBSTER,GL; BLUMBERG,BS. Uses and Bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): a Compilation II. The Subgenus *Phyllanthus*. J.Ethnopharmacology, 34:97-133 (1991).

VAZ,ZR; CECHINEL FILHO,V; MEDEIROS,YS; YUNES,RA; CALIXTO,JB. Atividade Analgésica de Derivados da Astilbina e da Xantoxilina. Anais do XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Curitiba-PR, 011(1992).

VAZ,ZR; CECHINEL FILHO,V; YUNES,RA; MEDEIROS,YS; CALIXTO,JB. Ação Analgésica de Derivados da Xantoxilina. Possível Mecanismo de Ação. Anais da IX Reunião Anual da FESBE, Caxambu-MG, 6.18(1994).

VENKATESWARAN,PS; MILLMAN,I; BLUMBERG,BS. Effects of an Extracts from *Phyllanthus niruri* on Hepatitis B and Woodchuck Hepatitis Viruses: In vivo and in vitro Studies. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:274-278 (1987).

VINEGAR,R. Pathway to Carrageenan-Induced Inflammation in the Hind Limb of the Cat. Federation Proc., 46:118-126(1987).

VOGEL,AI. Química Orgânica, Vol. 3, Ao Livro Técnico S.A., Rio de Janeiro-RJ, 1983.

ZUNINO,L; CORREA,C; CECHINEL FILHO,V; MEDEIROS,YS; YUNES,RA; CALIXTO,JB. Efeito dos Derivados da Astilbina e da Xantoxilina sobre o Edema de Pata e a Agregação Plaquetária. Anais do XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Curitiba-PR, 044(1992).

YEH,SF; HONG,CY; HUANG,YL; LIU,TY; CHOO,KB; CHON,CK. Effect of Extract from *Phyllanthus amarus* on Hepatitis B Surface Antigen Gene Expression in Human Hepatoma Cells. Antiviral Res., 20:185-192 (1993).

YUNES,RA; PIZZOLATTI,MG; SANT'ANA,AEG; HAWKES,GE; CALIXTO,JB. The Structure of Velutinol A, an Anti-inflammatory Compound with a Novel Pregnane Skeleton. Phytochemical Analysis, 4:76-81(1993).

WAGNER,H; DORSH,W; BAYER,T; WILLER,F. Antiasthmatic Effects of Onions: Inhibition of 5-Lipoxygenase and Cyclooxygenase " in vitro " by

Thiosulfinates and "cepaenes" . Prostaglandins Leu. Ess. Fatty Acids , 39:59-62
(1990).

ANEXO 1: ATIVIDADE ANTIESPASMÓDICA

1- Local:

Os testes farmacológicos para avaliar o efeito antiespasmódico dos compostos em estudo foram realizados no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pela técnica de laboratório Adenir Pereira, orientada e supervisionada pelo Prof. Dr. João B. Calixto.

2- Material e Métodos

Íleo de cobaia:

Cobaias de ambos os sexos (350-500 g) foram sacrificadas e fragmentos de íleo foram isolados. Preparações com cerca de 15 a 20 mm de comprimento foram montadas em solução de Tyrodes a 37 °C e oxigenadas com ar sob tensão de 1 g. Após o equilíbrio das preparações durante 30 minutos, foram constituídas curvas concentração resposta cumulativas à acetilcolina na ausência ou na presença de diversas concentrações dos compostos em estudo, incubados 20 minutos antes. Apenas um composto foi testado em cada tecido. Experimentos controle foram realizados usando os solventes próprios para diluir os compostos (etanol ou DMSO).

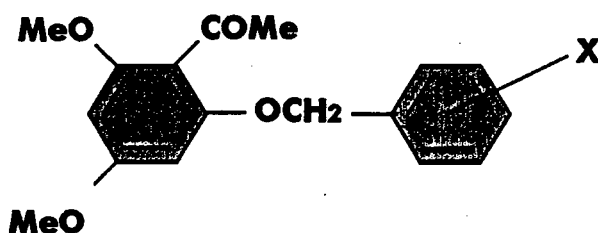
Quando possível, foi calculada a CI_{50} (concentração de cada composto necessária para inibir as respostas à acetilcolina).

3- Resultados :

ATIVIDADE ANTIESPASMÓDICA

TABELA 5

Atividade antiespasmódica de derivados benzilados da xantoxilina no íleo isolado de cobaia contraído pela acetilcolina



X	Cl ₅₀	Log 1/C
4-OCH ₂ Ph	2,6(1,3 - 4,3)	5,58
3,4-(CH ₃) ₂	2,8 (1,6 - 3,8)	5,55
4-CH ₃	3,5 (1,5 - 4,9)	5,48
4-tButil	4,5 (4,1 - 5,0)	5,34
4-OCH ₃	5,8 (3,0 - 11,3)	5,23
4-Br	6,3 (4,1 - 7,1)	5,20
4-Cl	10,2 (9,5 - 11,3)	4,99
H	11,2 (9,1 - 12,8)	4,94
4-F	23,0 (17,2 - 32)	4,63
4-NO ₂	700,0 (640 - 850)	3,15
Xantoxilina	47 (35-64)	-
Papaverina	13 (9-19)	-

^a Limite de confiança (95%) N= 4-6 experimentos por grupo.

V. Cechinel Filho, O. G. Miguel, R. J. Runes, J. B. Calixto,
R. A. Yunes.

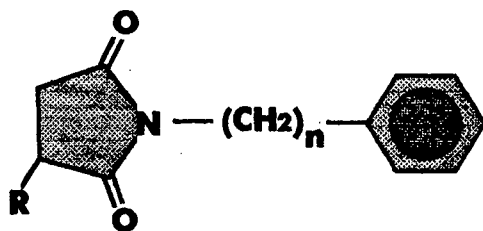
Journal of Pharmaceutical Sciences / 475
Vol. 84, No. 4, April 1995



ATIVIDADE ANTIESPASMÓDICA

TABELA 14

Efeito antiespasmódico de succinimidaz com diferentes grupos R e diferentes comprimentos $(CH_2)_n$ em íleo isolado de cobaias contraído pela acetilcolina.



COMPOSTO			Cl ₅₀ (μM)
N°	n	R	
52	0	NMe ₂	inativo
53	0	NEt ₂	inativo
54	0	NHCH ₂ Ph	inativo
55	0	Morfolino	inativo
56	1	NMe ₂	inativo
57	2	NMe ₂	85 (37-197) ^a
58	2	NEt ₂	79 (59-106)
59	2	NHCH ₂ Ph	81 (62-104)
60	2	Morfolino	76 (73-86)
61	2	Piperidino	50 (21-122)
62	3	NMe ₂	106 (79-145)
63	4	NMe ₂	98 (76-125)
64	-	-	> 200
Filantimida			225 (212-228)
Papaverina			13 (8-19)

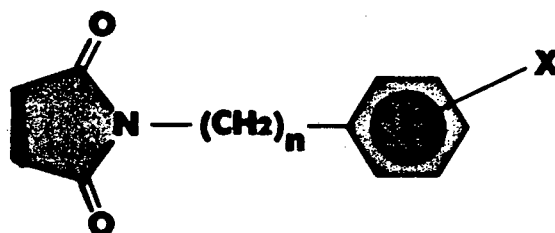
^a - 95% de intervalo de confiança. Cada grupo representa a média de 4-6 experimentos



ATIVIDADE ANTIESPASMÓDICA

TABELA 15

Efeito antiespasmódico de maleimidaz com diferentes grupos substituintes no anel aromático e diferentes comprimentos da cadeia $(CH_2)_n$ no filo isolado de cobraia contraído pela acetilcolina.



COMPOSTO			Cl ₅₀ (μ M)
N°	n	X	
34	0	H	> 100
46	2	H	21 (16-23)
48	2	4-Cl	11 (8-11)
49	2	4-Me	10 (8-11)
51	4	H	27 (20-31)
Filantimida	-		225 (212-228)
Papaverina	-		13 (8-19)

a - 95% de intervalo de confiança. Cada grupo representa a média de 4-6 experimentos

ANEXO 2: ATIVIDADE ANALGÉSICA

1- Local:

Os testes farmacológicos para investigação das ações analgésicas dos compostos em estudo foram efetuados no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pela Mestranda Zulma Vaz, orientada pelo Prof.Dr. João B. Calixto.

2- Material e Métodos :

Teste de contorções induzidas pelo ácido acético :

Camundongos " Swiss" machos (25-30 g) foram mantidos sob temperatura controlada (23 +2 °C) e iluminação em ciclo de 12 horas com ração e água " ad libitum ". A resposta nociceptiva foi induzida utilizando-se " Writhing test " com ácido acético (0,6 %,i.p. ou v.o.). Basicamente as contorções consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores de acordo com o método descrito previamente [Collier et al.,1968; Bentley et al.,1981].

Os animais foram pré-tratados com os compostos em estudo por via intraperitonal ou oral antes da injeção de ácido acético. O grupo controle recebeu volume semelhante aos compostos de uma solução de NaCl (0,9 %,10 ml/Kg). Os animais foram então colocados individualmente em caixas de observação e as contorções abdominais indicativas de dor foram quantificadas cumulativamente durante 20 minutos. O efeito analgésico foi avaliado em função da inibição das contorções e comparado ao grupo controle

Dor induzida pela formalina :

Foram utilizados camundongos machos (25-30 g). 20 μ l de formalina (2,5 %s.c.) e salina foram injetados na região dorsal da pata posterior direita e esquerda do animal, respectivamente. Logo após iniciou-se a observação da reação à dor, cronometrando-se o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata durante 30 minutos, considerando esse período como indicativo de dor. Duas fases de sensibilidade são observadas neste modelo: a primeira fase, aparece nos primeiros 5 min após a injeção de formalina(dor neurogênica) e a segunda fase, ocorre entre 15 e 30 min após a formalina, representando a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores químicos [Hunskaar & Hole, 1987]. Os animais foram pré-tratados por via i.p. ou v.o. com os compostos em estudo, 30 min antes da injeção de formalina. O grupo controle recebeu uma solução de NaCl (0,9 %, 10 ml/Kg), utilizados para diluir os compostos. Ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores foram cortadas e pesadas em balança analítica para quantificação do edema. A diferença do peso da pata direita (injetada com formalina) e da pata esquerda (injetada com salina) corresponde ao volume do edema formado.

3- Resultados:



ATIVIDADE ANALGÉSICA

TABELA 6

Atividade analgésica de derivados da xantoxilina no modelo de contrações abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% (via i.p.) em camundongos.

COMPOSTO	DI ₅₀ (mg/kg)	DI ₅₀ (μ Mol/kg)
Xantoxilina	> 60	> 306
3	30 (11- 82) ^a	82 (30-226)
9	11 (9-13)	27 (22-34)
11	22 (16-31)	81 (58-114)
12	> 60	> 170
13	6 (4-8)	20 (14-27)
14	0,5 (0,3)-0,8)	1 (1-2)
15	> 30	> 92
18	> 60	> 188
19	45 (42-48)	137 (128-146)
20	17 (14-21)	49 (40-60)
21	7 (4-11)	18 (11-32)
27	> 60	> 189
28	72 (69-74)	249 (239-256)
29	> 30	> 111
Aspirina	24 (13-44)	133 (73-243)
Acetaminofeno	19 (16-23)	125 (104-150)

a - Intervalo de confiança (96%). Cada grupo representa a média de 4-6 animais.



ATIVIDADE ANALGÉSICA

TABELA 7

Efeito analgésico de derivados da xantoxilina no modelo de dor causado pela formalina em camundongos (via i.p.).

DI₅₀

COMPOSTO	1a. fase(mg/kg)	2a. fase(mg/kg)	1a. fase(μmol/kg)	2a. fase(μmol/kg)
Xantoxilina	inativo	inativo	inativo	inativo
3	176(107-290) ^a	74(56-100)	482(293-795)	204(152-274)
9	inativo	13(9-18)	inativo	33(24-45)
11	inativo	20(11-38)	inativo	74(39-140)
12	> 30	> 30	>85	>85
14	21(12-38)	3(2-4)	54(29-98)	7(4-11)
18	> 30	>30	>94	>94
19	181(120-272)	89(77-104)	549(366-827)	273(235-316)
21	inativo	inativo	inativo	inativo
27	> 30	>30	>95	>95
28	> 30	>30	>104	>104
29	>30	>30	>115	>115
Aspirina	inativo	22(14-38)	inativo	123(77-209)
Acetaminofeno	inativo	18(14-240)	inativo	120(90-161)

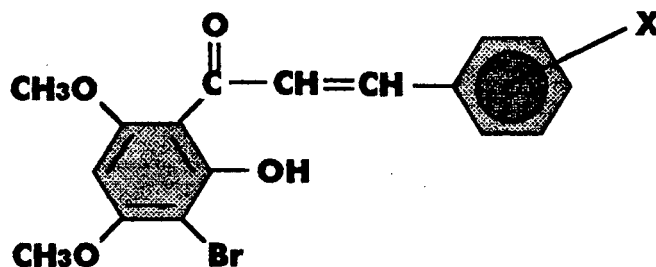
a - Intervalo de confiança (95%) - Cada grupo representa a média de 4-6 animais.



ATIVIDADE ANALGÉSICA

TABELA 8

Atividade analgésica da xantoxilina, xantoxilina monobromada (11) e chalconas derivadas de (11) no modelo de contrações abdominais causadas pelo AcOH 0,6% em camundongos na dose de 30 mg/kg, via intraperitoneal



COMPOSTO	DOSE ($\mu\text{Mol/Kg}$)	X	% INIBIÇÃO
Xantoxilina	153	-	23,2
11	109	-	47,0
21	83	H	62,0
22	75	4-Cl	93,8
23	68	4-Br	91,0
24	80	4-Me	73,6
25	76	4-OMe	91,6
26	74	4-NMe ₂	61,0



ATIVIDADE ANALGÉSICA

TABELA 10

Efeito analgésico de derivados da Astilbina no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% (via i.p. e via oral) em camundongos

COMPOSTO	DI ₅₀ / (µMol/Kg)	
	VIA i.p.	VIA ORAL
Astilbina	> 133	NT
31	~ 99	201 (173-234) ^a
32	>117	NT
33	12 (9-16)	162 (118-223)
Aspirina	133 (73-243)	686 (515-914)
Acetaminofeno	125 (104-150)	988 (643-1518)

NT - Não Testado

a- Intervalo de confiança (95%)

TABELA 11

Efeito analgésico de derivados da Astilbina no modelo de dor causado pela formalina em camundongos (via i.p.)

COMPOSTO	DI ₅₀ / (µMol/kg)			
	1a.fase	IM ^a (%)	2a.fase	IM(%)
31	> 99	36 ^b	>99	58
33	>84	45 ^c	56	63 ^d
Quercetina	>200	-	50	-
Aspirina	inativo	-	123	-
Acetaminofeno	inativo	-	120	-

a- Inibição máxima,

c- Dose de 16 mg/kg (42 µmol/kg),

b- Dose de 10 mg/kg (33 µmol/kg),

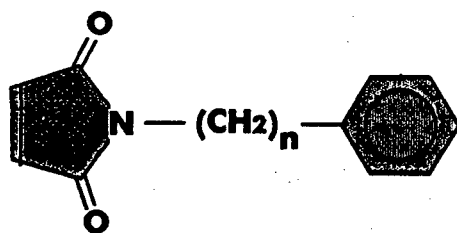
d- Dose de 30 mg/kg (84 µmol/kg)



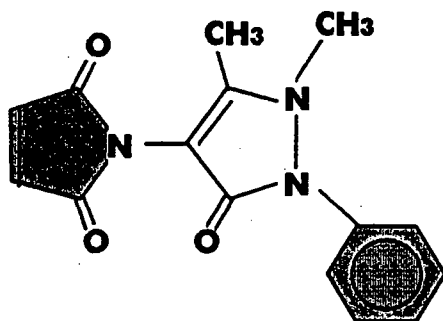
ATIVIDADE ANALGÉSICA

TABELA 16

Efeito analgésico de N-alquifenilmaloimidias administradas via i.p. sobre as contorções abdominais causadas pelo ácido acético em camundongos.



COMPOSTO	n	DI ₅₀	DI ₅₀
		(mg/kg)	(μ Mol/kg)
34	0	7,0	40,5
46	2	6,4	32,0
51	4	1,7	7,5
65	2	< 1,0	< 3,5



(65)

ANEXO 3: ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

1- Local:

Os estudos experimentais para determinar o efeito antiinflamatório dos compostos em estudo foram realizados no Departamento de Farmacologia de Universidade Federal de Santa Catarina. Os testes para determinar os efeitos antiedematogênicos foram efetuados pelo aluno bolsista de Iniciação Científica Luciano Zunino, orientado pelo Prof. Dr. João B. Calixto, enquanto os testes para avaliar os efeitos na pleurisia foram realizados pela aluna bolsista de Iniciação Científica Flávia Osório, orientada pela Profª. Yara Medeiros.

2- Material e Métodos :

Edema de pata de rato :

Ratos machos (130-180 g) foram tratados 30 min antes com solução salina (1 ml/Kg,i.p.) ou com os diversos compostos objetos de estudo (30 mg/Kg,i.p.,30 min antes).Após esse período, sob anestesia com éter, cada animal recebeu 100 ug/pata de dextrana e 300ug/pata de carragenina (0,1 ml dissolvida em salina tamponada,PBS) na pata esquerda e igual volume de salina na pata direita. O edema foi avaliado com o auxílio de pletismógrafo (0.5,1,2 e 4 hs) após a injeção dos irritantes. A diferença de edema da pata esquerda em relação à pata direita foi quantificada em porcentagem.

Efeito sobre a pleurisia em ratos

Ratos machos (130-180 g) previamente tratados com os compostos em estudo (via ip) foram anestesiados com éter para administração de 0,1 ml de solução salina estéril (controle) ou dos agentes flogísticos (diluídos em salina diretamente) na cavidade pleural. Os animais foram sacrificados em diferentes intervalos, após a administração dos agentes flogísticos para avaliação do volume do exsudato bem como da migração celular por microscopia óptica.

3- Resultados :



ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

TABELA 9

Atividade antiedematogênica para a xantoxilina e seus derivados na pata de rato. Os resultados são dados em % de inibição do edema nos respectivos tempos, na dose de 30mg/kg, i.p.

DROGA INJETADA INTRAPLANTARMENTE NA PATA DE RATO

Composto	DEXTRANA				CARRAGENINA				BRADICININA			
	0,5h	1h	2h	4h	0,5h	1h	2h	4h	20'	0,5h	2h	4h
Xantoxilina	27	37	43	22	22	30	23	0,3	37	36	37	23
3	22	9	11	-5	41	32	12	15	NT	NT	NT	NT
11	31	35	26	24	42	46	40	30	16	22	14	19
12	36	40	38	29	9	27	18	11	-6	-10	-6	12
14	36	58	57	48	37	43	37	-3	51	49	47	35
18	30	31	20	25	11	9	10	4	NT	NT	NT	NT
19	40	63	33	30	-54	-26	1	17	7	2	12	20
21	48	61	57	50	37	41	13	23	27	26	20	20
27	36	31	23	6	36	38	34	33	25	27	12	20
28	11	22	21	4	-16	9	17	-1	NT	NT	NT	NT
Indometacina	NT	NT	NT	NT	45	48	53	50	NT	NT	NT	NT
Ibuprofene	NT	NT	NT	NT	38	42	48	10	NT	NT	NT	NT

NT - Não Testado



ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

TABELA 12

Efeito antiedematogênico para a Astilbina e seus derivados na pata de rato. Os resultados são dados em % de inibição de edema, nos respectivos tempos, na dose de 30 mg/kg, i.p.

COMPOSTO	DEXTRANA				CARRAGENINA			
	0,5h	1,0h	2,0h	4,0h	0,5h	1,0h	2,0h	4,0h
Astilbina	19	37	26	4	7	10	-14	-26
31	29	50	52	46	20	-0,4	10	12
32	-17	-19	-18	-13	30	40	37	36
33	25	25	23	33	27	38	12	9
Indometacina	NT	NT	NT	NT	45	48	53	50
Ibuprofene	NT	NT	NT	NT	38	42	48	10

NT - Não Testado

TABELA 13

Efeito de derivados da Astilbina na pleurisia induzida pela carragenina em ratos (N= 4 a 6 animais)

COMPOSTO	LEUCÓCITOS (x10 ⁶)			
	Total	Neutrófilos	Mononucleares	Exsudato
Controle	73,8 ±9,5	58,0 ±7,8	13,7 ±2,2	1,4 ±0,2
31	42,1 ±12,9	21,1 ±12,9	14,7 ±1,5	1,3 ±0,05
32	77,6 ±4,6	59,8 ±4,2	14,9 ±1,1	2,1 ±0,04
33	78,6 ±4,5	56,7 ±6,4	16,2 ±14,2	1,9 ±0,08

ANEXO 4: ATIVIDADE ANTIALÉRGICA

1- Local :

Os testes farmacológicos para avaliar o efeito antialérgico dos compostos em estudo foram realizados no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pela técnica de laboratório Rosana, com orientação e supervisão do Prof. Dr. João B. Calixto.

2- Material e Métodos :

Sensibilização de cobaias por ovoalbumina :

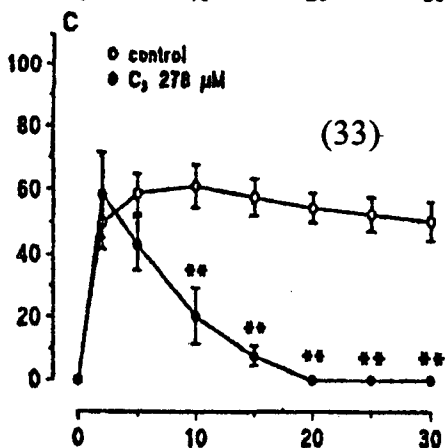
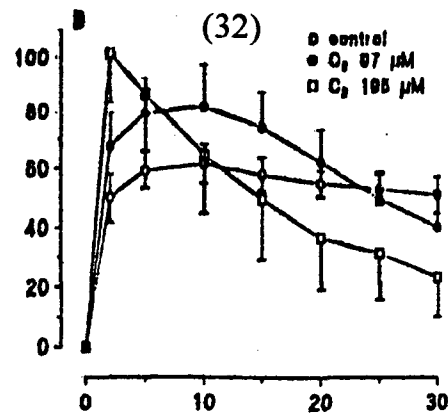
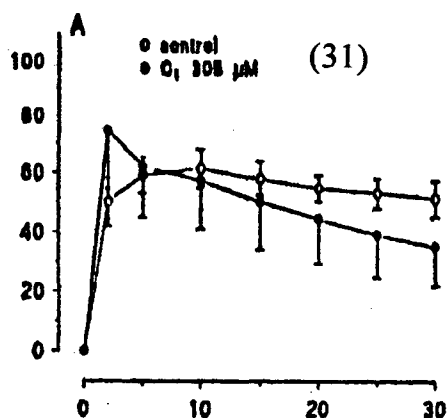
Cobaias de ambos os sexos (200-300 g) foram sensibilizadas pela injeção via i.p. de 0,5 ml de solução salina (0,9 %) contendo 10 µg de ovoalbumina dispersa em hidróxido de alumínio (Al(OH)₃). A injeção foi repetida 14 dias após e os animais foram sacrificados 7 a 10 dias depois da segunda injeção de ovoalbumina.

Seguimentos de traquéias (10 a 13 mm de comprimento), montados em cubas de vidro contendo 5 ml de solução fisiológica de Krebs-Henseleit a 37 °C, pH de 7,2-7,4, borbulhadas (5 % de CO₂ em 95 % de O₂). As preparações foram expostas à tensão de 1 g e os registros isométricos foram obtidos em polígrafo NARCO. Após 1 h de equilíbrio, as preparações foram expostas à ovoalbumina (1 µ/ml) na ausência ou na presença dos compostos em estudo, que foram adicionados 30 min. antes da administração do antígeno. A resposta contrátil ao antígeno foi analisada pelo polígrafo aos 2, 5, 10, 20, 25 e 30 min.

3- Resultados :



ATIVIDADE ANTIALÉRGICA



Efeito da Astilbina e dos derivados (31), (32), e (33) sobre a contração induzida pela ovalbumina em traquéias isoladas de cobaia ativamente sensibilizadas pela ovalbumina. Cada grupo representa a média de 6 animais por experimento e as barras verticais indicam os EPM. (** p<0,01)

ANEXO 5: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

1- Local :

Os testes biológicos para verificar a atividade antibacteriana das imidas em estudo foram realizados no Departamento de Tecnologia de Alimentos pelo MsC. Alexandre Bella Cruz, orientado pela Profa. Dra. Eliane Moretto.

2- Material e Métodos :

Método de difusão em agar

O método utilizado foi o de difusão radial em agar nutriente [Bauer et al., 1966], inoculado com as bactérias anteriormente ativadas em caldo infusão de cérebro e coração. Posteriormente a turbidez foi corrigida através de comparação com a escala de Macfarland. Após a inoculação das bactérias, depositou-se discos de papel esterelizado e adicionou-se aos mesmos os compostos na concentração desejada, dissolvidos em DMSO ou etanol. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas quando então foram efetuadas as leituras dos halos de inibição. Paralelamente, foram feitos controles apenas com o solvente utilizado para dissolver os compostos em estudo.

Método da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM dos compostos em estudo foi investigada contra *Staphylococcus aureus* ITAL SFCO 001 e *Escherichia coli* ITAL ESCH 001. Ambos microorganismos foram obtidos do ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos) em Campinas-SP.

Os valores da CIM foram determinados pela técnica anteriormente descrita [Mitscher et al., 1972].

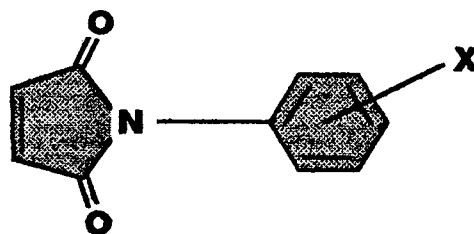
3- Resultados:



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

TABELA 17

Efeito de substituintes no anel aromático de N-fenilmaleimidás na atividade antibacteriana pelo método de difusão em agar.



COMPOSTO		MICROORGANISMO			
n°	X	E.coli	K.pneumoniae	P.mirabilis	S.aureus
34	H	21	16	41	28
35	4-Cl	13	13	11.5	24.5
36	4-Me	10	10	10	21
37	4-OMe	11	12	14	25
38	3,4-Cl ₂	11	12	12	26
40	2-Me	14	1	-	-
39	4-OC ₄ H ₉	1	9	-	12

Os valores referem-se ao diâmetro de inibição medido em mm a partir do halo de crescimento ao halo da zona de inibição na concentração de 250 µg/10 ul em DMSO.

1 - inativo, - não testado.

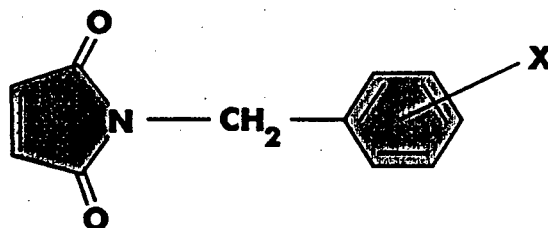
V. Cechinel Filho, A. B. Cruz, R. Correia, E. Moretto, J. B. Calixto, R. J. Nunes, R. A. Yunes.
 Rev. Latinoamericana Química, 1994 - in press.



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

TABELA 18

Efeito de substituintes no anel aromático de N-benzilmaleímidas na atividade antibacteriana pelo método de difusão em agar.



COMPOSTO		MICROORGANISMOS			
n°	X	E.coli	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>S.aureus</i>
41	H	15°	12°	23	38
42	4-Cl	13	12	36	29
43	4-Me	14	13	46	30
45	3,4-Cl ₂	15	17	44	29
44	4-OMe	11	12	12	26

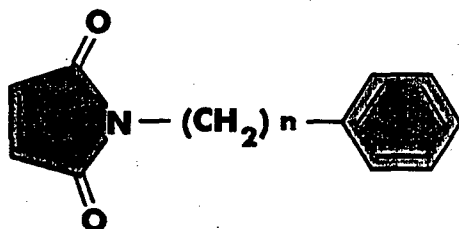
Os valores referem-se ao diâmetro de inibição medido em mm a partir do halo de crescimento ao halo da zona de inibição na concentração de 250 ug/10 ul em DMSO exceto quando indicado:
 ° = 3,9 µg, ° = 15,6 µg, + = 62,5.



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

TABELA 19

Efeito da distância entre o anel imídico e o grupo fenila na atividade antibacteriana pelo método de difusão em agar.



COMPOSTO		MICROORGANISMOS			
N°	n	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>S.aureus</i>
34	0	21	16	52	28
41	1	15°	12°	23	38 +
46	2	12#	11#	46	23#
50	3	15	17	44	30
51	4	14	12	38	23

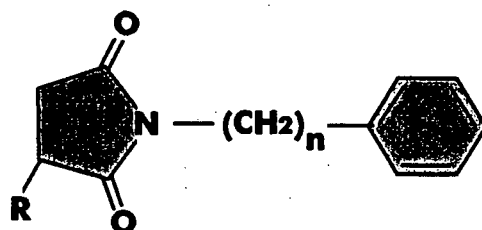
Os valores referem-se ao diâmetro de inibição medido em mm a partir do halo de crescimento ao halo da zona de inibição na concentração de 250 ug/10 ul em DMSO exceto quando indicado:
 ° = 3,9 µg, ° = 15,6 µg, # = 31,2, + = 62,5.



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

TABELA 20

Efeito da modificação do anel imídico na atividade antibacteriana pelo método de difusão em agar.



COMPOSTO		MICROORGANISMOS			
N	n	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>S.aureus</i>
64 ^a	0	I	I	I	I
52 ^b	0	I	I	24+	10
56 ^b	1	I	11	30	18

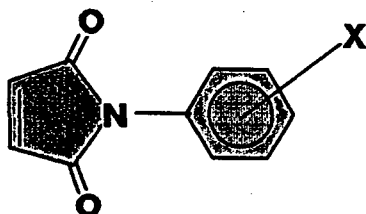
Os valores referem-se ao diâmetro de inibição medido em mm a partir do halo de crescimento ao halo da zona de inibição na concentração de 250 µg/10 ul em DMSO exceto quando indicado:
 + = 62,5 µg a) R=H e b) R=NMe₂, I = inativo.



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

TABELA 21

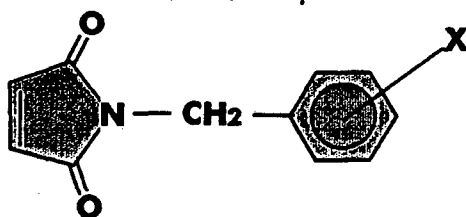
Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/ml}$ para N-fenilmaleímidas.



COMPOSTO	X	CIM($\mu\text{g/ml}$)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
34	H	15	20
35	4-Cl	20	25
36a	4-Et	25	25
37	4-OMe	35	25
38	3,4-Cl ₂	45	20
40	2-Me	180	25
39	4-OC ₄ H ₉	160	40

TABELA 22

Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/ml}$ para N-benzilmaleímidas.



COMPOSTO	X	CIM($\mu\text{g/ml}$)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
41	H	20	15
43	4-Me	60	20
45	3,4-Cl ₂	40	20
44	4-OMe	30	20

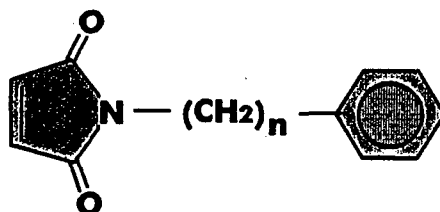
V. Cechinel Filho, T. Pinheiro, R. J. Nunes, R. A. Yunes,
A. B. Cruz, E. Moretto. *II Farmaco*, 49 (10), 675 - 677 (1994).



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

TABELA 23

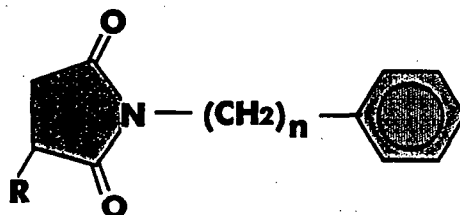
Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/ml}$ para N-alkilfenilmaleimidias.



COMPOSTO	n	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
34	0	15	20
41	1	20	15
46	2	25	20
50	3	20	20
51	4	25	25

TABELA 24

Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/ml}$ para N-alkilfenilmaleimidias.



COMPOSTO	n	R	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
a	0	H	>500	>500
52	0	NMe ₂	35	120
54	0	NHCH ₂ CH ₂ Ph	>250	>50
55	0	morfolino	>500	>500
a	2	H	>500	>500
57	2	NMe ₂	90	40

a - Compostos cedidos pelo Prof. Dr. Ricardo J. Nunes.

V. Cechinel Filho, T. Pinheiro, R. J. Nunes, R. A. Yunes,
A. B. Cruz, E. Moretto. *II Farmaco*, 49 (10), 675 - 677 (1994).

ANEXO 6: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

1- Local :

Os testes biológicos para avaliar o efeito antifúngico das imidas em estudo foram realizados no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba, pela equipe da Profa. Edeltrudes O. Lima.

2- Material e Métodos :

Técnica de difusão, processo cavidade-placa :

Os ensaios foram realizados em meio sólido, pela técnica de difusão, processo cavidade-placa [Grove & Randall, 1985]. Em placas de Petri, esterelizadas, foi colocado 1 ml da suspensão de cada microrganismo, padronizada para 10 UFC, conforme o tubo 0,5 da Escala de MacFarland e leitura espectroscópica para 90 % T (530 nm). Em seguida, foi adicionado 21 ml do meio sólido fundido a 45 °C. Após solidificação, foram feitas cavidades com 8 mm de diâmetro. Em cada cavidade foi colocado 50 ul do composto em suas diferentes concentrações. Em paralelo, foram feitos controles para os microrganismos no meio de cultura isento de antimicrobiano, com antimicrobianos padrões (cloranfenicol, tetraciclina e ketoconazol).

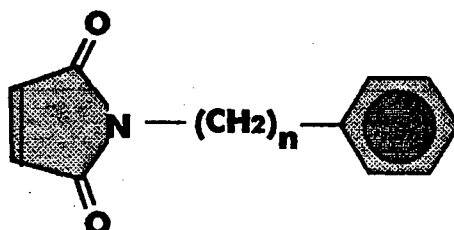
Os ensaios foram incubados à temperatura de 37 °C durante 24-48 horas, para os ensaios com fungos leveduriformes e à temperatura de 28-30 °C durante 10-14 dias para os fungos filamentosos.

3- Resultados :

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

TABELA 25

Efeito de N-alkilfenilmaleimidus contra fungos leveduriformes e filamentosos.



Composto		Dose	Fungos							
Nº	n	µg/ml	CT	CA	AF	PE	MC	TR	EF	TM
34	0	250	12	15	0	11	18	12	6	8
		125	11	13	0	10	12	10	0	0
41	1	250	10	12	0	9	18	10	8	8
		125	10	10	0	8	15	8	8	6
46	2	250	10	12	0	10	18	10	12	12
		125	10	11	0	9	15	8	8	10
50	3	250	8	16	0	15	25	18	10	15
		125	0	12	0	22	16	12	12	12
51	4	250	0	12	0	10	20	12	8	10
		125	0	11	0	8	12	10	0	8

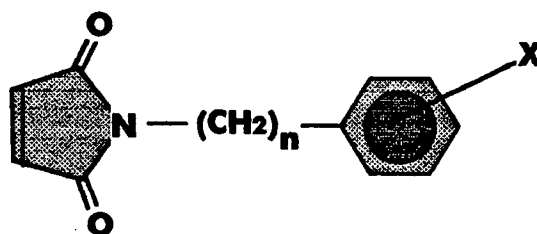
Os valores referem-se ao diâmetro de inibição medido em mm a partir do halo de crescimento ao halo da zona de inibição na concentração indicada.



ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

TABELA 26

Efeito de N-alquilfenilmaloimidias substituídas contra fungos leveduriformes e filamentosos.



Nº	n	X	Dose µg/ml	Fungos							
				CT	CA	AF	PE	MC	TR	EF	TM
44	1	4-OMe	250	0	11	0	10	14	12	8	8
			125	0	0	0	9	12	10	0	0
45	1	3,4-Cl ₂	250	10	13	0	10	14	11	0	8
			125	9	11	0	9	12	9	0	0
42	1	4-Cl	250	10	12	0	10	15	10	18	14
			125	8	11	0	7	12	9	14	10
49	2	4-Me	250	10	13	0	10	18	15	8	10
			125	9	12	0	8	15	10	10	8
47	2	4-Cl	250	11	15	0	14	28	28	8	8
			125	10	12	0	10	20	20	10	0

Os valores referem-se ao diâmetro de inibição medido em mm a partir do halo de crescimento ao halo da zona de inibição.

ANEXO 7: ALGUNS ARTIGOS PUBLICADOS PELO AUTOR

APLICAÇÃO DO MÉTODO DE TOPLISS PARA A ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS DA XANTOXILINA

Valdir Cechinel Filho, Ricardo J. Nunes, Rosendo A. Yunes
Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina - SC
João B. Calixto
Departamento de Farmacologia - Universidade Federal de Santa Catarina - SC

Recebido em 9/9/92; cópia revisada em 14/12/92

2-(X-Benzoyloxy)-4,6-dimethoxyacetophenones (X = 4-H, 4-F, 4-NO₂, 4-CH₃, 4-Cl, 3,4-Me₂) were obtained by reaction between the antispasmodic compound 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone with p-substituted benzyl bromides in the presence of sodium hydroxide. The experimentally determined order of potency of the antispasmodic activities of these compounds were compared with the projected order for various parameters suggested by Topliss and gave the same rank order with π -2 σ and π -3 σ showing that electron donor and hydrophobic substituents are the best to increase the activity.

Keywords: xanthoxylines; SAR; Topliss method.

Rev. Latinoamer. Quím. 23/3(1994) 116

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ANÁLOGOS DA FILANTIMIDA

Cechinel Filho¹, V.; Cruz², A.B.; Correia¹,
R.; Gonzaga², L.V.; Moretto², E.; Calixto³,
J.B.; Nunes¹, R.J. e Yunes¹, R.A.

Departamentos de Química¹, Tecnologia
de Alimentos² e Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina-
Florianópolis - SC - Brasil.

ABSTRACT

Synthetic analogs of Phyllanthimide, an alkaloid isolated from *Phyllanthus sellowianus*, were tested against the following bacteria: *Citrobacter* sp., *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*.

Potent Antinociceptive Activity of a Hydroalcoholic Extract of *Phyllanthus corcovadensis*

FRANCO GORSKI, CLOVIS R. CORRÊA, VALDIR C. FILHO*, ROSENDO A. YUNES* AND JOÃO B. CALIXTO

Department of Pharmacology and *Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049 Florianópolis, SC, Brazil

Abstract—This study analyses the analgesic effect of a hydroalcoholic extract (HE) from *Phyllanthus corcovadensis* in several models of pain in mice. HE (3–60 mg kg⁻¹, i.p.) or (100–500 mg kg⁻¹, p.o.) caused a graded and potent analgesic effect against the abdominal constriction response caused by acetic acid and acetylcholine with an ID₅₀ of about 3 and 100 mg kg⁻¹, respectively. In the tail-flick model HE (up to 500 mg kg⁻¹, p.o.) was without effect, while morphine (1–10 mg kg⁻¹, s.c.) caused a graded increase in pain latency (ID₅₀, 3 mg kg⁻¹). HE (1–300 mg kg⁻¹) given both intraperitoneally and orally caused a potent and graded inhibition of the second phase of formalin-induced persistent pain in mice with an ID₅₀ of 1 and 80 mg kg⁻¹, respectively. In contrast, morphine (1–5 mg kg⁻¹, s.c.) inhibited both phases of formalin-induced pain with an ID₅₀ of 2.5 mg kg⁻¹. Indomethacin (1–10 mg kg⁻¹, i.p.) only inhibited the second phase of formalin-induced pain with an ID₅₀ of about 3 mg kg⁻¹. The analgesic effect of indomethacin, but not that caused by morphine and HE was accompanied by a graded inhibition of formalin-induced mouse paw oedema. In addition, HE up to 1 g kg⁻¹ failed to prevent carrageenan- and dextran-induced rat hindpaw oedema. It is concluded that HE exhibits a potent antinociceptive profile, either when given intraperitoneally or orally. The mechanisms that underly its analgesic effect are unclear at present, but appear to be unrelated to inhibition of synthesis of arachidonic acid via cyclo-oxygenase or to activation of opioid receptors.

Analgesic Effects of Callus Culture Extracts from Selected Species of *Phyllanthus* in Mice

ADAIR R. S. SANTOS, VALDIR C. FILHO*, RIVALDO NIERO*, ANA M. VIANA**, FABIO N. MORENO**, MARIA M. CAMPOS, ROSENDO A. YUNES* AND JOÃO B. CALIXTO

Departments of Pharmacology, *Chemistry and **Botany, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88049-900, Brazil

Abstract—The aim of this study was to evaluate the analgesic effect of the methanolic extract from callus culture of *Phyllanthus tenellus*, *P. corcovadensis* and *P. niruri* in several models of pain in mice. The extracts (medium containing 2,4-dichlorophenoxyacetic acid) of *P. corcovadensis*, *P. niruri* and *P. tenellus* (3–90 mg kg⁻¹, i.p.) caused graded inhibition of abdominal constrictions induced by acetic acid (0.6%), with ID₅₀ (i.e. dose that reduced response of control by 50%) values of about 30, 19 and >30 mg kg⁻¹, respectively. The extract of callus of *Phyllanthus* obtained in indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid media (3–90 mg kg⁻¹, i.p.) caused a similar analgesic effect. In the formalin test, the extract of *P. tenellus* obtained in indole butyric acid medium (3–100 mg kg⁻¹, i.p.) inhibited only the second phase of formalin-induced pain with an ID₅₀ value of about 100 mg kg⁻¹. Both the indole acetic acid and indole butyric acid methanolic extracts of *P. tenellus* and *P. corcovadensis* (10–100 mg kg⁻¹, i.p.) dose-dependently inhibited both phases of formalin-induced pain (ID₅₀ values for the second phase were approx. 100 and 52 mg kg⁻¹, respectively). However, the extract of callus from *Phyllanthus* failed to affect formalin-induced paw oedema, as well as the response to radiant heat in the tail-flick test. In addition, the analgesic effect of morphine, but not the analgesic effects caused by *Phyllanthus* callus extract, was fully antagonized by naloxone. Preliminary phytochemical analysis revealed the presence of several compounds having no apparent relationship with alkaloids or flavonoids but showing the presence of phenols. These results indicate that, similar to previous reported data from the extract of *P. corcovadensis*, the methanolic extracts of callus culture of *P. niruri*, *P. corcovadensis* and *P. tenellus* exhibit potent analgesic properties against neurogenic and inflammatory pain that seem to be unrelated to the activation of opioid mechanisms.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *PHYLLANTHUS URINARIA*

A.B. CRUZ, E. MORETTO

Departamento de Tecnologia de Alimentos, CCA, Universidade Federal de Santa Catarina 88040-970, Florianópolis, SC, Brasil.

V. CECHINEL FILHO, R. NIERO, J.L. MONTANARI, R.A. YUNES*

Departamento de Química, CFM, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-970, Florianópolis, SC, Brasil.

Received May 17, 1993 - Accepted September 7, 1993.

Key words: *Phyllanthus urinaria*; antibacterial activity.

Plant. *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae), leaves, stems and roots collected in March 1992, in Florianópolis, SC, Brazil. The plant was identified by Leila da Graça Amaral and Mirian Ulyseia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina.

Uses in traditional medicine. Several species of this genus have been popularly employed for the treatment of kidney and bladder calculi, diabetes, hepatitis, dysentery and against affections of the intestine.¹⁻⁷

Previously isolated classes of constituents. Flavonoids.⁸

Tested material. EtOH/H₂O 1:1 extract (17.5 g from 0.65 kg). Partitioning of the latter yielded n-hexane (HE, 0.8 g), dichloromethane (DC, 0.77 g), ethyl acetate (EA, 6.5 g) and water (AQ, 9.6 g) fractions.

Used micro-organisms. See Table 1.

IL FARMACO, 49 (10), 675-677 (1994)

SHORT COMMUNICATION

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF N-PHENYLMALEIMIDES,
N-PHENYLSUCCINIMIDES AND RELATED COMPOUNDS.
STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS**

VALDIR CECHINEL FILHO, TÂNIA PINHEIRO, RICARDO J. NUNES, ROSENDO A. YUNES (*)

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

ALEXANDRE BELLA CRUZ, ELIANE MORETTO

Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 88010-970 Florianópolis, SC, Brazil

Summary — The antibacterial activity of several phyllanthimide analogs were investigated by the Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) against *E. coli* and *S. aureus*. It was found that maleimides were approximately 30 times more active than succinimides indicating that the cyclic imido double bond is an important factor related to the activity. Electron-donor and electron-withdrawing substituents in the aromatic ring of N-phenylmaleimides decrease the activity of these compounds indicating the possibility of steric effects. The distance between the aromatic and the imido rings when separated by methylene groups does not affect the antibacterial activity.

Antispasmodic Activity of Xanthoxyline Derivatives: Structure–Activity Relationships

VALDIR CECHINEL FILHO*, OBDÚLIO GOMES MIGUEL*, RICARDO JOSÉ NUNES*, JOÃO BATISTA CALIXTO‡, AND ROSENDO AUGUSTO YUNES*^x

Received October 26, 1993, from the *Departamento de Química and ‡Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil. Accepted for publication October 24, 1994^o.

Abstract □ The antispasmodic activity of several xanthoxyline derivatives against acetylcholine-induced contraction of the guinea pig ileum was evaluated *in vitro*. The acetophenones with two methoxyl groups, mainly in the 3,4 positions, exhibited potent antispasmodic activity. Modification of the hydroxyl group in xanthoxyline by the introduction of benzoyl, acetyl, or tosyl groups produced inactive compounds, whereas the introduction of benzyl or *p*-methoxybenzyl groups furnished compounds that were four- to eight-fold more potent than xanthoxyline. In marked contrast, the introduction of a methyl group gave a compound that caused contractant activity. Modification of the carbonyl group of xanthoxyline lead to inactive compounds, whereas the condensation of xanthoxyline with benzaldehydes gave chalcones that were about fivefold more potent than xanthoxyline. The introduction of benzyl and styrene groups, on the basis of the similarity with papaverine, improves the antispasmodic action of the xanthoxyline derivatives. Our results suggest that the methoxyl and carbonyl groups are critical structural points for the antispasmodic activity of xanthoxyline derivatives. The hydroxyl group improves antispasmodic activity, but is not fundamental to its manifestation.

Pharmaceutical Sciences 1995, 1: 399–401
Received May 11, 1995
Accepted July 30, 1995

© 1995 Pharmaceutical Sciences

Inhibition of Guinea-pig Ileum Contraction by Phyllanthimide Analogues: Structure-activity Relationships

V. CECHINEL FILHO, R. J. NUNES, J. B. CALIXTO* AND R. A. YUNES

*Departamento de Química e de *Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil*

Abstract

The inhibition of acetylcholine-mediated contraction of guinea-pig ileum by several phyllanthimide analogues was evaluated.

It was observed that maleimide derivatives exhibited high antispasmodic activity, being about 5–8-fold more potent than the succinimide derivatives, indicating that the double-bond in the imido ring seems to be important for activity. The distance between the aromatic and the imido ring is also a factor related to the activity; compounds separated into two methylene groups are the most potent. Moreover, the difference in nitrogenated bases in the succinimide derivatives does not significantly affect their antispasmodic activities.

A Triterpene and Phenolic Compounds from Leaves and Stems of *Phyllanthus sellowianus*

Obdulio G. Miguel¹, Valdir Cechinel Filho¹,
Moacir G. Pizzolatti¹, Adair R. Santos², João B. Calixto²,
Franco Ferrari³, Irene Messana³, and Rosendo A. Yunes^{1,4}

¹ Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

² Department of Pharmacology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

³ Centro Chimica dei Recettori, CNR, Università Cattolica S. Cuore, Largo F. Vito 1, I-00168, Rome, Italy

⁴ Address for correspondence

Received: September 26, 1994; Revision accepted: February 21, 1995

The plants of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) have been popularly employed for the treatment of kidney and bladder calculi, diabetes, hepatitis, and dysentery, and have also been used against affections of the intestines (1, 2).

Previous studies carried out by our laboratory have demonstrated that some alkaloids isolated from *P. sellowianus* exhibited an antispasmodic activity similar to papaverine in several pharmacological models (3). One of the compounds was identified as a new alkaloid denoted as phyllanthimide (4). Recently, we have also shown that the hydroalcoholic extracts of several species of the genus *Phyllanthus*, including *P. sellowianus*, given either orally or intraperitoneally, exhibited potent antinociceptive activity in different models of nociception in mice (5). Recent papers on the chemistry of this species have shown the presence of a sterol, phyllanthol (6), a biflavonoid, 4'-di-*O*-methylcupressuflavone (7), a mixture of sterols containing stigmaterol, β -sitosterol, and campesterol, as well as an acetophenone, 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone (xanthoxyline) (8). In this study, we describe the isolation and identification of other compounds, not reported, as far as we know, for *P. sellowianus*.

The leaves and stems of *P. sellowianus* were collected in the Itajai valley between Blumenau and Rio do Sul (State of Santa Catarina-Brazil) in March 1993 and classified by Dr. A. Reis (Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina). The vouchers were deposited in FLOR (# 2757, 3392, 3884). The fresh plants (9 kg) were powdered and extracted exhaustively with 90% ethanol at room temperature by percolation. After solvent removal, the extract was cooled over two days and filtered, providing a solid material (87 g) that was chromatographed on a silica gel column eluted with a hexane-AcOEt gradient. Elution with 9.4:0.6 yielded a white crystalline solid (740 mg), identified as a triterpene, lupa-1,20(29)-dien-3-one (glochidone). The spectroscopic data (UV, IR, ¹H- and ¹³C-NMR) are identical to those re-

ported in the literature (9). This compound was also isolated from other species of *Phyllanthus*, such as *P. watsonii* (10) and *P. flexuosos* (11).

The filtered extract described above was successively partitioned with hexane, CH₂Cl₂, and AcOEt. The AcOEt extract (66 g) was chromatographed on a silica gel column eluted with a CHCl₃:MeOH gradient. After monitoring by TLC, the similar fractions were combined furnishing residue I (green oil, 870 mg) and residue II (brown solid, 5 g). Residue I was rechromatographed as in the previous case, giving, by elution with CHCl₃:MeOH, 9:1, white crystalline needles, identified as gallic acid ethyl ester (60 mg), directly compared with authentic sample, synthesis, and spectroscopic data (IR, ¹H- and ¹³C-NMR). It is important to observe that this compound was reported only for *P. emblica* (12) in the genus *Phyllanthus*. However, in our case, the experimental evidence suggests that this compound is an artefact produced during the obtaining of the hydroalcoholic extract. Residue II was applied directly on a Sephadex LH 20 column prepared in H₂O and eluted with 50% MeOH to afford quercetin-3-*O*-rutinoside (rutin) (1.1 g) and a yellow solid (750 mg), yet not identified. Rutin was identified by direct comparison with authentic sample. Rutin was also isolated from several species of *Phyllanthus*. Copies of the original spectra can be obtained from the author of correspondence.

Preliminary pharmacological studies using the formalin test (5) have demonstrated that gallic acid ethyl ester exhibited potent analgesic activity, showing that this compound contributes, at least in part, for the analgesic effect previously described for the crude hydroalcoholic extract of *P. sellowianus* (5).

Acknowledgements

This study was supported by grants from CAPES, CNPq, and FINEP, Brazil.

References

- Morton, J. F. (1981) Atlas of Medicinal Plants in Middle America (1st ed.), pp. 458–462, Charles C. Thomas, Springfield.
- Oliver-Bever, B. (1983) J. Ethnopharmacol. 9, 1–83.
- Calixto, J. B., Yunes, R. A., Neto, A. S. O., Valle, R. M. R., Rae, G. A. (1984) Brazilian J. Med. Biol. Res. 17, 313–321.
- Tempesta, M. S., Corley, D. G., Beuthler, J. A., Metral, C. J., Yunes, R. A., Giacomozzi, C., Calixto, J. B. (1988) J. Nat. Prod. 51, 617–618.
- Santos, A. R. S., Cechinel Filho, V., Yunes, R. A., Calixto, J. B. (1995) J. Pharm. Pharmacol. 47, 66–71.
- Hnatyszyn, O., Ferraro, G. (1985) Planta Med. 467.
- Hnatyszyn, O., Ferraro, G., Coussio, J. D. (1987) J. Nat. Prod. 50, 1156–1157.
- Miguel, O. G., Cechinel Filho, V., Niero, R., Silva, G. O., Pizzolatti, M. G., Santos, A. R., Calixto, J. B., Yunes, R. A. (1995) Fitoterapia, in press.
- Gauguly, A. K., Govindachari, T. R., Mohamed, P. A., Rahimtula, A. D., Viswanathan, N. (1966) Tetrahedron 22, 1513.
- Matsunaga, S., Tanaka, R., Takaoka, Y., In, Y., Ishida, T., Rahmani, M., Ismail, H. B. M. (1993) Phytochemistry 32, 165–170.
- Tanaka, R., Matsunaga, S. (1988) Phytochemistry 27, 2273–2278.
- Nag, T. N., Khanna, P. (1973) Indian J. Pharmacy 35, 154–155.

Further Studies on the Antinociceptive Action of the Hydroalcoholic Extracts from Plants of the Genus *Phyllanthus*

ADAIR R. S. SANTOS, VALDIR C. FILHO*, ROSENDO A. YUNES* AND JOÃO B. CALIXTO

Department of Pharmacology and *Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88049-900, Brazil

Abstract

The analgesic effects of the hydroalcoholic extracts (HEs) of *Phyllanthus urinaria*, *P. tenellus*, *P. niruri* and *P. sellowianus* have been investigated in several models of nociception in mice.

The HE of four species of *Phyllanthus* (1–90 mg kg⁻¹, i.p.) caused a dose-related inhibition of acetic acid-induced abdominal constriction in mice with ID₅₀ values of 5.4, 8.5, 18.2 and 53.0 mg kg⁻¹ and maximal inhibition (%) of 80 ± 2, 67 ± 8, 63 ± 8 and 50 ± 4 for *P. urinaria*, *P. niruri*, *P. tenellus* and *P. sellowianus*, respectively. In the formalin test, the HE of all *Phyllanthus* species (0.3–60 mg kg⁻¹, i.p.) caused graded inhibition of both phases of formalin-induced pain, but they were, however, more potent in relation to the second phase of the pain. The ID₅₀ values (mg kg⁻¹) for the first phase were 20.0, 23.0, > 60, and > 60 for the *P. urinaria*, *P. tenellus*, *P. niruri* and *P. sellowianus*, respectively, and percentages of maximal inhibition were 63 ± 2, 70 ± 2, 41 ± 3 and 46 ± 4, respectively. The ID₅₀ values (mg kg⁻¹) for the second phase were 0.71, 4.87, 7.7, 33.0, with maximal inhibition (%) of 91 ± 6, 97 ± 3, 97 ± 3 and 92 ± 6, respectively. Given orally, the HEs of species of *Phyllanthus* caused a significant antinociceptive profile, but they were about one-tenth to one-twentieth as potent when given intraperitoneally. However, the HEs of *Phyllanthus* failed to affect formalin-induced paw oedema and did not interfere with the performance of animals in the rota-rod test. Naloxone (5 mg kg⁻¹) completely reversed the analgesic effect caused by morphine (5 mg kg⁻¹), but had no effect against the analgesic effect of the HE of *Phyllanthus*. Furthermore, the HEs of *Phyllanthus* in contrast to morphine had no analgesic effect in either tail-flick or hot-plate tests.

Taken together, these findings confirm and extend our previous results and indicate that all studied HE of species of plant belonging to the genus *Phyllanthus* exhibit potent and long-lasting antinociceptive activity in several models of pain, including the neurogenic algic component of the formalin test. The mechanism underlying their analgesic profile is presently unknown.

Gen. Pharmac. Vol. 26, No. 7, pp. 1499–1506, 1995

Analysis of the Mechanisms Underlying the Antinociceptive Effect of the Extracts of Plants From the Genus *Phyllanthus*

ADAIR R. S. SANTOS,¹ VALDIR C. FILHO,² ROSENDO A. YUNES²
 and JOÃO B. CALIXTO^{1*}

Departments of ¹Pharmacology and ²Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88049-900, Brazil

(Received 12 December 1994)

Abstract—1. We examine some of the mechanisms underlying the analgesic effects of the hydroalcoholic extracts (HE) of *Phyllanthus urinaria* and *P. niruri* against formalin-induced nociception in mice. In addition, we also investigate the action of both HEs against capsaicin-mediated pain.

2. Both prazosin and yohimbine (0.15 mg/kg, i.p.) induced a marked inhibition of the analgesic effect caused by phenylephrine (10 mg/kg, i.p.) and clonidine (0.1 mg/kg, i.p.), respectively, but had no effect on the antinociceptive action caused by HE of *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.) or *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.).

3. N^G-nitro-L-arginine (L-NOARG, 75 mg/kg, i.p.) caused marked analgesic effect against the second phase of formalin-induced pain. Treatment of animals with L-arginine (600 mg/kg) completely antagonized the antinociceptive effect of L-NOARG but had no significant effect against the HE of *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.) or *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.) analgesic properties.

4. The antinociceptive effects caused by the HEs of *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.) and *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.) were unaffected by methysergide (5 mg/kg, i.p.), *p*-chloro-phenylalanine-methyl-ester (100 mg/kg, i.p., once a day for 4 consecutive days) or after previous adrenalectomy of animals.

5. The HE of *P. urinaria* and *P. niruri* given either intraperitoneally (1–30 mg/kg) or orally (25–200 mg/kg) caused marked and dose-related inhibition of capsaicin-induced pain with ID₅₀ of 2.1 and 6.1 mg/kg given intraperitoneally and 39 and 35 mg/kg given orally, respectively.

Antinociceptive Properties of Steroids Isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in Mice

Adair R. S. Santos¹, Rivaldo Niero², Valdir C. Filho², Rosendo A. Yunes², Moacir G. Pizzolatti², Franco Delle Monache³, and João B. Calixto^{1,4}

¹ Department of Pharmacology, Universidade Federal de Santa Catarina, Rua Ferreira Lima, 82, 88015-420, Florianópolis, SC, Brazil

² Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 88049-900, Brazil

³ Istituto di Chimica Recettori e Molecole Biologicamente Attive del C.N.R. Università Cattolica S. Cuore, Largo F. Vito L, I-00168 Rome, Italy

⁴ Address for correspondence

Received: July 6, 1994; Revision accepted: January 30, 1995

Abstract

The antinociceptive actions of the steroid compounds isolated from the leaves, stems, and roots of *P. corcovadensis* have been investigated in mice. Stigmasterol, stigmasterol acetate, β -sitosterol, and aspirin (3–100 mg/kg, *i.p.*) inhibited, in a dose-related manner, acetic acid-induced abdominal constriction in mice with ID_{50} s of 16, 11, 9, and 24 mg/kg, respectively. In the formalin test, stigmasterol and stigmasterol acetate (10–100 mg/kg, *i.p.*) caused graded inhibition of both the neurogenic (first phase) and inflammatory phases (second phase) of formalin-induced pain. However, both compounds were more effective in relation of the second phase of the formalin test with ID_{50} values of 26 and 41 mg/kg, respectively. Furthermore, both steroids failed to affect the edematogenic response of the formalin test. Given orally, stigmasterol and stigmasterol acetate (50–200 mg/kg) also exhibited significant though less potent analgesic action against both acetic acid- and formalin-induced nociception in mice. In addition, stigmasterol (up to 100 mg/kg, *i.p.*), in contrast to morphine (10 mg/kg, *s.c.*), had no analgesic effect in either tail-flick or hot-plate models. These findings suggest that stigmasterol and β -sitosterol may account, at least in part, for the antinociceptive actions reported previously for the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus corcovadensis*.



Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae)

Sônia C. Hess^a, Rosenei L. Brum^b, Neli K. Honda^b, Alexandre B. Cruz^c,
Eliane Moretto^c, Rosana B. Cruz^c, Irene Messana^d, Franco Ferrari^d,
Valdir Cechinel Filho^c, Rosendo A. Yunes*^e

^aDepartamento de Ciências do Ambiente, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Corumbá, MS, Brazil

^bDepartamento de Química, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Corumbá, MS, Brazil

^cDepartamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^dCentro Chimica Dei Recettori, CNR, Università Cattolica Del Sacro Cuore, Roma, Italy

^eDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

Abstract

Vochysia divergens Pohl (Vochysiaceae) is a tree commonly found in wet soils of 'Pantanal' of Mato Grosso, Brazil, and used in folk medicine against infections and asthma. We have studied different extracts and some isolated compounds from this plant for antibacterial activity. From the extracts of the stem bark β -sitosterol, betulinic acid and sericic acid were isolated. The minimal inhibitory concentration (MIC) for *Staphylococcus aureus* were: ethanolic extract (MIC = 1.5 mg/ml); ethyl acetate extract (MIC = 2.0 mg/ml); and sericic acid (MIC = 1.0 mg/ml). *Escherichia coli* was resistant until 5 mg/ml.

Keywords: *Vochysia divergens*; Vochysiaceae; Antibacterial activity; Sericic acid; Betulinic acid; β -Sitosterol

APLICAÇÃO DO MÉTODO DE TOPLISS PARA A ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS DA XANTOXILINA

Valdir Cechinel Filho, Ricardo J. Nunes, Rosendo A. Yunes
Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina - SC
João B. Calixto
Departamento de Farmacologia - Universidade Federal de Santa Catarina - SC

Recebido em 9/9/92; cópia revisada em 14/12/92

2-(X-Benzoyloxy)-4,6-dimethoxyacetophenones (X = 4-H, 4-F, 4-NO₂, 4-CH₃, 4-Cl, 3,4-Me₂) were obtained by reaction between the antispasmodic compound 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone with p-substituted benzyl bromides in the presence of sodium hydroxide. The experimentally determined order of potency of the antispasmodic activities of these compounds were compared with the projected order for various parameters suggested by Topliss and gave the same rank order with $\pi\text{-}\sigma$ and $\pi\text{-}\sigma$ showing that electron donor and hydrophobic substituents are the best to increase the activity.

Keywords: xanthoxylines; SAR; Topliss method.

INTRODUÇÃO

2-Hidróxi-4,6-dimetoxiacetofenona, conhecida como xantoxilina pode ser obtida com alto rendimento (0,25%) a partir das folhas e ramos jovens da *Sebastiania schottiana* (euphorbiaceae)¹, planta abundante na região sul do país, conhecida como "quebra-pedra" e usada popularmente para o tratamento de afecções renais.

Os extratos brutos da *Sebastiania schottiana* apresentaram atividade antiespasmódica em preparações de útero de rato e fleo de cobaia². Recentemente foi relatado³ que a xantoxilina mostrou-se efetiva em inibir as respostas contráteis induzidas por vários agonistas ou por estimulação elétrica em preparações de músculos liso e cardíaco isolados. A xantoxilina inibiu as contrações da bexiga em forma não competitiva e não seletiva e foi potente inibidor das contrações espontâneas do músculo liso circular do ureter de cão. Esses resultados analisados em conjunto reforçam a indicação popular desta planta para o tratamento de afecções renais.

Como o efeito da xantoxilina é, de forma geral, de potência relativamente baixa, além de não apresentar seletividade por agonista e/ou tecidos, vários derivados foram preparados por modificação de algumas funções da molécula (grupo carbonila, grupo hidroxila, etc) e suas atividades antiespasmódicas analisadas inicialmente no fleo isolado de cobaia contraído pela acetilcolina⁴.

No presente estudo, realiza-se uma análise preliminar da correlação entre a estrutura molecular de compostos derivados pela substituição do hidrogênio da hidroxila da xantoxilina pelo grupo benzila e benzilas substituídos, com as respectivas atividades antiespasmódicas *in vitro*.

PARTE EXPERIMENTAL

1) Isolamento da xantoxilina

A *Sebastiania schottiana* Muell. Arg. foi coletada no município de Apiúna, SC e as folhas, flores e ramos jovens foram fragmentados e submetidos à dessecação a 40° C em estufa. O material foi pesado e colocado em maceração com metanol comercial à temperatura ambiente durante 15 dias e

após concentração em evaporador rotatório, foi obtido o extrato metanólico bruto, que foi extraído em éter de petróleo e concentrado, obtendo-se o extrato de éter de petróleo. Este extrato foi submetido a um fracionamento através de uma coluna contendo Sílica-gel 60 (70-230 mesh) eluída com éter de petróleo. As primeiras frações foram desprezadas até o aparecimento da xantoxilina, que cristalizou em solução, dando um rendimento de 0,25%.

2) Síntese dos compostos

a) Procedimento experimental

A 2-hidróxi-4,6-dimetoxiacetofenona (0,2 g/1,02 mmols) foi adicionada a uma solução contendo 2,0 ml de metanol e hidróxido de sódio (0,041 g/1,05 mmols). 10,0 ml de N,N-dimetilformamida foi adicionado à mistura com agitação durante 5 minutos e posteriormente o brometo de X-benzila (1,05 mmols) (X=4-H, F, NO₂, CH₃, Cl, 3,4-Me₂) foi lentamente adicionado, sendo a mistura aquecida a 90°C durante 2 horas. Após adição de 50 ml e extração com clorofórmio, o produto pôde ser purificado por recristalização (etanol) no caso X=4-NO₂, ou por cromatografia em camada preparativa (X=4-H, F, CH₃, Cl e 3,4-Me₂), dando rendimentos que variam de 40 a 80%.

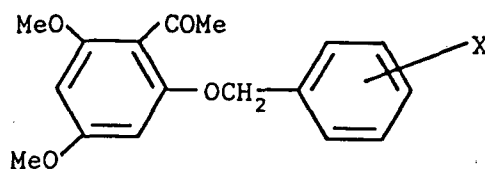
Os aspectos de ¹H-RMN foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Varian XL 100, tendo como padrão interno TMS. Os espectros no infravermelho foram medidos com um espectrofotômetro Perkin Elmer 720 (KBr).

b) Caracterização dos compostos

2-hidróxi-4,6-dimetoxiacetofenona: Pf= 81°C; IV: 3460 (O-H); 3000-2900 (C-H); 1615 (C=O); 1600-1400 (C=C, Ar) cm⁻¹. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 14,03 (s, 1H, OH), 6,06 (d, J= 2,5 Hz, 1H, 2H Ar-H), 5,92 (d, J=2,5 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H, CH₃O), 3,05 (s, 3H, CH₃O), 2,60 (s, 3H, CH₃CO).

2-p-benzilóxi-4,6-dimetoxiacetofenona: Pf= 64°C; R= 80%; IV: 3000-2800 (C-H); 1690 (C=O); 1600-1400 (C=C, Ar) cm⁻¹. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7,20 (s, 5H, Ar-H), 6,05 (d, J=2,5 Hz,

Tabela 1. Ordem de Potência de Derivados da Xantoxilina.



X	log ₁ /C	2π-π ²	2π-σ	π+σ	π-σ	π-2σ	π-3σ	-σ	π
4-Me	5,74	0,81	1,29	0,39	0,73	0,90	1,07	0,17	0,56
3,4-Me ₂	5,61	1,00	2,28	0,69	1,29	1,59	1,89	0,30	0,99
4-OMe	5,23	-0,04	0,23	-0,29	0,25	0,52	0,79	0,27	-0,02
4-Cl	4,99	0,92	1,19	0,94	0,48	0,25	0,02	0,23	0,71
4-H	4,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4-F	4,63	0,16	0,22	0,20	0,08	0,02	-0,04	-0,06	0,14
4-NO ₂	3,15	-0,48	-1,34	0,50	-1,06	-1,84	-2,62	-0,78	-0,28

C = CI₅₀(μM)Obs.: A xantoxilina (composto referência) apresentou CI₅₀ = 47 μM.

1H, 2H Ar-H), 5,93 (d, J=2,5 Hz, 1H), 4,8 (s, 2H, CH₂); 3,72 (s, 3H, OCH₃), 3,70 (s, 3H, OCH₃), 2,3 (s, 3H, CH₃CO).

2-p-flúor-benzilóxi-4,6-dimetoxiacetofenona: Pf= 58°C; R= 47%; IV: 3000-2800 (C-H), 1700 (C=O), 1600-1400 (C=C, Ar) cm⁻¹. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7,30-6,80 (m, 4H, Ar-H); 5,98 (d, J=2,5 Hz, 1H, 2H Ar-H), 5,90 (d, J=2,5 Hz, 1H, Ar-H), 4,8 (s, 2H, CH₂), 3,80 (s, 3H, OCH₃), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 2,4 (s, 3H, CH₃CO).

2-p-nitro-benzilóxi-4,6-dimetoxiacetofenona: Pf= 158-160°C; R= 65%; IV: 3100-2700 (C-H), 1695 (C=O), 1600-1400 (C=C, Ar) cm⁻¹. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 8,10-7,40 (m, 4H, Ar-H), 6,02 (d, J=2,5 Hz, 1H, 2H, arom.), 5,98 (d, J=2,5 Hz, 1H), 5,1 (s, 2H, CH₂), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 3,72 (s, 3H, OCH₃), 2,3 (s, 3H, CH₃CO).

2-p-metil-benzilóxi-4,6-dimetoxiacetofenona: R= 40%; IV: 3000 (C-H), 1680 (C=O), 1600 (C=C, Ar) cm⁻¹. ¹H-RMN (CDCl₄) δ: 7,40 (s, 4H, Ar-H), 6,2 (d, J= 2,5 Hz, 1H, 2H, Ar-H), 6,05 (d, J=2,5 Hz, 1H), 5,0 (s, 2H, CH₂), 3,81 (s, 3H, OCH₃), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 2,5 (s, 3H, CH₃CO), 1,2 (s, 3H, CH₃).

2-p-Cloro-benzilóxi-4,6-dimetoxiacetofenona: Pf= 89°C, R= 52%. IV: 3000-2800 (C-H); 1700 (C=O), 1600 (C=C, Ar). ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7,55 (s, 4H, Ar-H), 6,30 (d, J=2,5 Hz, 2H, Ar-H), 6,15 (d, J=2,5 Hz, 1H, Ar-H), 5,3 (s, 2H, CH₂), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 3,80 (s, 3H, OCH₃), 2,30 (s, 3H, CH₃CO).

2-(3,4-Dimetil)-benzilóxi-4,6-dimetoxiacetofenona: R= 51%; IV: 3000 (C-H), 1685 (C=O), 1600 (C=C, Ar) cm⁻¹. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7,35-7,10 (m, 3H, Ar-H), 6,30 (d, J=2,5 Hz, 1H, 2H, Ar-H), 6,20 (d, J=2,5 Hz, 1H, Ar-H), 5,00 (s, 2H, CH₂), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 3,80 (s, 3H, OCH₃), 2,35 (s, 3H, CH₃CO), 2,20 (s, 3H, CH₃), 2,10 (s, 3H, CH₃).

2-(p-metóxi)-benzilóxi-4,6-dimetoxiacetofenona: R= 55%; IV: 3000(C-H), 1690 (C=O), 1600 (C=C, Ar) cm⁻¹. ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 7,35 (s, 4H, Ar-H), 6,15 (d, J=2,5 Hz, 1H, Ar-H), 6,00 (d, J=2,5 Hz, 1H, Ar-H), 5,20 (s, 2H, CH₂), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 3,80 (s, 3H, OCH₃), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 2,35 (s, 3H, COCH₃).

3) Análise Farmacológica

Cobaias de ambos os sexos (350-500g) foram sacrificadas e fragmentos de fêo foram isolados. Preparações com cerca de 15 a 20 mm de comprimento foram montadas em solução de Tyrodes a 37°C e oxigenadas com ar sob tensão de 1 g. Após o equilíbrio das preparações durante 30 minutos, foram constituídas curvas concentração resposta cumulativas à acetilcolina na ausência ou na presença de diversas concentrações dos derivados, incubados 20 minutos antes. Apenas um composto foi testado em cada tecido. Experimentos controles foram realizados usando os solventes próprios para diluir os compostos (etanol ou DMSO). Quando possível, foi calculada a CI₅₀ (concentração de cada composto necessária para inibir as respostas à acetilcolina em 50%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação de um fármaco ou molécula com um sistema biológico envolve a consideração de efeitos de substituintes que podem dar uma importante contribuição independente e aditiva. Topliss^{5,6} tem indicado que o método de correlação entre estrutura e atividade desenvolvido por Hansch⁷ conseguiu uma aproximação mais racional para a otimização da síntese de fármacos. Quando esta otimização é procurada pela incorporação de diferentes substituintes no anel benzênico, Topliss sugere um método não estatístico, denominado manual, para aplicar o método de Hansch. O método manual consiste na análise dos resultados de cinco compostos, que devem ser sintetizados com os substituintes no anel aromático: H, 4-Cl, 3,4-Cl₂, 4-CH₃ e 4-OCH₃.

Neste trabalho, considerando 4 substituintes: H, 4-Cl, 4-CH₃ e 4-OCH₃, a ordem de potência dos compostos correspondentes (Tabela 1) coincide com os correspondentes para π-3σ e π-2σ. O composto 3,4-(CH₃)₂ substituído que segundo a ordem de Topliss deveria dar um valor de atividade maior do que o 4-CH₃ apresenta um valor ligeiramente menor que pode ser atribuído às incertezas próprias dos métodos biológicos. No entanto, os compostos 4-NO₂ e 4-F substituídos, dão como esperado, valores muito menores.

Os parâmetros π-2σ e π-3σ de Topliss demonstram que tanto os efeitos eletrônicos como os hidrofóbicos dos substituintes causam mudanças na atividade dos compostos sendo

os efeitos eletrônicos mais importantes e determinantes da atividade. De acordo com o método de Topliss os substituintes a serem testados quando há uma boa correlação da ordem de atividade com π -2 σ e π -3 σ : 4-NEt₂, 4-NMe₂, 4-NH₂, 4-OH, 4-Oi-Pr, 3-Me e 4-OMe, ou seja, substituintes fundamentalmente doadores de elétrons e que, em geral, aumentam a hidrofobicidade da molécula.

Pode-se observar também que os três substituintes do outro anel aromático (xantoxilina) apresentam estas mesmas propriedades. É interessante salientar que quando foi introduzido um átomo de bromo na posição 3 deste anel a atividade em relação à xantoxilina aumentou muito pouco e que a acetofenona mostrou-se inativa⁸. Portanto, é evidente que os substituintes neste anel participam de forma importante no efeito farmacológico e que fundamentalmente os doadores de elétrons aumentam este efeito.

Em conclusão, os resultados indicam que: i) a atividade farmacológica dos compostos em estudo, com exceção do 4-nitro derivado, é várias vezes maior do que a atividade da xantoxilina (26 vezes no caso do 4-metil derivado); ii) a atividade conseguida está na ordem micromolar e é possível aumentar a mesma para uma ordem nanomolar o que seria uma potência excelente; iii) a continuidade destes estudos poderá propiciar o surgimento de análogos não somente com maior atividade farmacológica, mas talvez, também, com seletividade tecidual.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao PADCT, CAPES, CNPq e FINEP pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Miguel, O. G., Componentes químicos da *Sebastiania schottiana* Muell. Arg., Tese de Mestrado, UFSC, Florianópolis, 1987.
2. Calixto, J. B., Miguel, O. G., Yunes, R. A. e Rae, G. A., *Planta Medica* (1986) 52, 444.
3. Calixto, J. B., Miguel, O. G., Yunes, R. A. e Rae, G. A., *Planta Medica* (1990) 56, 31.
4. Cechinel Filho, V., Yunes, R. A., Nunes, R. J. e Calixto, J. B., XIX Congresso Latino Americano de Química, Buenos Aires, Argentina, p. 572 (1990).
5. Topliss, J. G., *J. Med. Chem.* (1972) 15, 1006.
6. Topliss, J. G., *J. Med. Chem.* (1977) 20, 463.
7. Hansch, C., *Drug Design I*, Ed. E. J. Arkens, Academic Press, EUA, 1971.
8. Cechinel Filho, V., Modificação da estrutura molecular da xantoxilina e estudo da atividade farmacológica dos derivados. Tese de Mestrado, UFSC, Florianópolis, 1991.

SHORT COMMUNICATION

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF N-PHENYLMALEIMIDES,
N-PHENYLSUCCINIMIDES AND RELATED COMPOUNDS.
STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS

VALDIR CECHINEL FILHO, TÂNIA PINHEIRO, RICARDO J. NUNES, ROSENDO A. YUNES (*)

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

ALEXANDRE BELLA CRUZ, ELIANE MORETTO

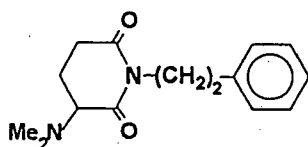
Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina,
88010-970 Florianópolis, SC, Brazil

Summary — The antibacterial activity of several phyllanthimide analogs were investigated by the Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) against *E. coli* and *S. aureus*. It was found that maleimides were approximately 30 times more active than succinimides indicating that the cyclic imido double bond is an important factor related to the activity. Electron-donor and electron-withdrawing substituents in the aromatic ring of N-phenylmaleimides decrease the activity of these compounds indicating the possibility of steric effects. The distance between the aromatic and the imido rings when separated by methylene groups does not affect the antibacterial activity.

INTRODUCTION

Some cyclic imides are biologically active compounds. They are known as fungicides, bactericides, insecticides, physiological regulators, etc.¹.

Previous workers²⁻⁵ have demonstrated that several N-arylmaleimides are active as fungicides and bactericides. On the other hand, the alkaloid phyllanthimide⁶ (I), a glutarimide derivative, that was obtained from the *Phyllanthus sellowianus* (Euphorbiaceae), plant used for urinary infections by the folk medicine, exhibits some antibacterial activity; therefore, it was taken as a model to synthesize different N-alkylarylmaleimides, N-arylmaleimides, N-arylsuccinimides and N-alkylarylsuccinimides in order to test them against bacteria frequently found in the urinary tract⁷, like *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, by the Minimum Inhibitory Concentration method (MIC), as described by Mitscher *et al*⁸.



(I)

MATERIAL AND METHODS

A - CHEMICAL PREPARATIONS

N-Arylmaleimides 1-5, 7 were obtained by the reaction of maleic

anhydride with aniline or substituted anilines and dehydration of the corresponding maleamic acid by treatment with hot acetic anhydride/sodium acetate, as previously described^{9,10}. Compound 6 was purchased from commercial sources.

In the synthesis of N-alkylarylmaleimides (8-14) the glacial acetic acid was used as dehydrating agent. The addition in the maleimido double bond (compounds 15-20) was carried out in benzene, according to literature¹¹. All the compounds were obtained in good yields (45-90%).

All the compounds were characterized by ¹H-NMR, IR and microanalysis. Their purity was checked by t.l.c.

B - BACTERIOLOGICAL ASSAYS

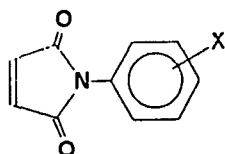
All compounds were investigated by determining their MIC against *Staphylococcus aureus* ITAL SFCO 001 and *Escherichia coli* ITAL E. ESCH 001. Both strains were obtained from ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos) in Campinas, SP, Brazil.

The MIC values were determined by a technique previously described⁸. The inoculum was a 6 hour broth culture of *S. aureus* and *E. coli* in BHI (Brain Heart Infusion-Merck 10493). The optimal density of them were equal to 3.10⁸ bacterial cells per ml of the medium according to McFarland's scale. The solid medium (Grove and Randall no. 1 - Merck 5272) on a Petri dish was inoculated with 0.05 ml of the diluted broth. After incubation at 37°C for 14h, the MIC values were determined.

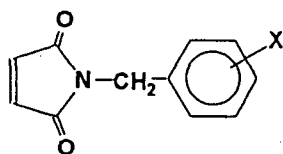
RESULTS AND DISCUSSION

The MIC values obtained with the examined compounds against *E. coli* and *S. aureus* are reported in Tables I-IV. In general, maleimide derivatives showed an activity approximately 30 times higher than the corresponding succinimide derivatives, indicating that the double bond in the imido ring is an important factor related to the activity (compare the maleimides 1 and 12 of Table III with the succinimides 15 and 19 of Table IV respectively). It should be noted that with the double bond the imido ring take a planar configuration. Similarly, Cremlyn and Nunes¹²

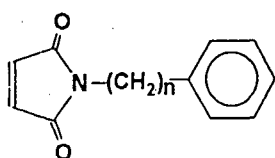
(*) To whom correspondence should be addressed.

TABLE 1 - MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) IN $\mu\text{g/ml}$ OF N-PHENYLMALEIMIDES

Compound	X	E. coli	S. aureus
1	H	15	20
2	4-Cl	20	25
3	4-Et	25	25
4	4-OMe	35	25
5	3,4-Cl ₂	45	20
6	2-Me	180	25
7	4-OC ₂ H ₅	160	40

TABLE 2 - MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) IN $\mu\text{g/ml}$ OF N-BENZYLMALEIMIDES

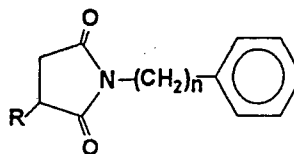
Compound	X	E. coli	S. aureus
8	H	20	15
9	4-Me	60	20
10	3,4-Cl ₂	40	20
11	4-OMe	30	20

TABLE 3 - MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) IN $\mu\text{g/ml}$ OF N-ALKYLPHENYLMALEIMIDES

Compound	n	E. coli	S. aureus
1	0	15	20
8	1	20	15
12	2	25	20
13	3	20	20
14	4	25	25

demonstrated that sulphonylmaleimides were appreciably more active than sulphonylsuccinimides against the fungi *A. niger*, *F. culmorum*, *T. viride* and *A. glauca*.

A. Fujinami¹³ demonstrated that the introduction of chloride atoms in the benzene ring of the N-phenylmaleimides increase their activity against the fungi *S. sclerotiorum*. In our case, however, the introduction of one or two chlorine atoms in the

TABLE 4 - MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) IN $\mu\text{g/ml}$ OF N-ALKYLPHENYLSUCCINIMIDES

Compound	n	R	E. coli	S. aureus
15	0	H	> 500	> 500
16	0	NMe ₂	35	120
17	0	NHCH ₂ CH ₂ Ph	> 250	> 50
18	0	Morpholino	> 500	> 50
19	2	H	> 500	> 500
20	2	NMe ₂	90	40

The phyllanthimide has an activity similar to that of the compound 20.

aromatic ring of N-phenylmaleimides (Table I) or N-benzylmaleimides (Table II) do not improve their activities against *E. coli* and *S. aureus*.

Considering that among the substituents introduced in the aromatic ring of the N-phenylmaleimides and N-benzylmaleimides there are electron-donor groups, such as -OCH₃ and -CH₃, and electron withdrawing atoms as -Cl, the decrease of activity against *E. coli* observed with all of them, suggests that this effect may be due, at least in part, to steric effect. This effect also can explain the high decrease of activity produced by the introduction of 2-CH₃ and 4-OC₂H₅ groups. Surprisingly, these compounds do not exhibit this steric effect in their activity against *S. aureus*, suggesting that some difference may exist in their mechanism of action against the two bacteria.

According to Table III the distance between the aromatic ring and the imido ring in N-phenylalkylmaleimides is not an important factor in relation with the activity of these compounds.

It should be noted that the presence of some nitrogenated moieties, especially the -NMe₂ as substituent in the imido ring of N-phenylsuccinimide and N-phenylethylsuccinimide (Table IV), in the same position where it is present in the glutarimide ring of phyllanthimide, increase notably the activity of these compounds.

It is interesting to note that the structure of phyllanthimide, an active naturally occurring alkaloid isolated following the recommendations of the folk medicine, considered as a model, led to the synthesis of more potent compounds and to the determination of some important structural factors related to their antibacterial activity.

This study was supported by grants from CAPES and CNPq, Brazil.

Received July 21, 1993; accepted May 14, 1994.

- (1) M.K. HARGREAVES, J.G. PRITCHARD and H.R. DAVE, *Chemical Reviews*, 70 (4), 439 (1970).
- (2) D.C. TORGENSON, W.H. HENSLEY and J.A. LAMBRECH, *Contrib. Boyce Thompson Inst*, 22, 67 (1983).
- (3) D. LEE, J.A.W. TURNER and J.N. TURNER, *Brit. P.*, 852, 634 (1960).
- (4) G.T. BOTTGER and S.I. GERTNER, *Plant Quiniflantine, E-777* (1949).
- (5) V. CECHINEL FILHO, A.B. CRUZ, R.J. NUNES, J.B. CALIXTO, E. MORETTO, L. GONZAGA, R. CORRELA and R.A. YUNES, *Revista Latino Americana de Química*, in press (1993).
- (6) M.S. TEMPESTA, D.G. CORLEY, J.A. BEUTHLER, C.J. METRAL, R.A. YUNES, C.A. GIACOMOZZI and J.B. CALIXTO, *J. Nat. Prod.*, 51 (3), 617 (1988).
- (7) V.T. ANDRIOLE. *Infecções do Trato Urinário*, Ed. Interlivros, Rio de Janeiro, p. 20 (1987).
- (8) L.A. MITSCHER, R.P. LEU, M.S. BATHOLA, W.N. WU and J.L. BEAL, *Lloydia*, 25, 157 (1972).
- (9) M.P. CAVA, A.A. DEANA, K. MUTH and M.J. MITCHELL, *Organic Synthesis Coll.*, Vol. V, p. 944 (1973).
- (10) N.F. SEARLE, *U.S. Patent*, 2, 444, 536 (1948). C. Abstracts 42, 7340 (1948).
- (11) A. MUSTAFA, W. ASKER, S. KHATTAB and S.M.A.D. ZAYED, *J. Org. Chem.*, 26, 787 (1961).
- (12) R. CREMLYN and R.J. NUNES, *Phosphorus and Sulfur*, 31, 245 (1987).
- (13) A. FUJINAME, T. OZAKI, K. NODERA and K. TANAKA, *Agr. Biol. Chem.*, 36, 318 (1972).

Antispasmodic Activity of Xanthoxyline Derivatives: Structure–Activity Relationships

VALDIR CECHINEL FILHO*, OBÚLIO GOMES MIGUEL*, RICARDO JOSÉ NUNES*, JOÃO BATISTA CALIXTO‡, AND ROSENDO AUGUSTO YUNES*^x

Received October 26, 1993, from the *Departamento de Química and †Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil. Accepted for publication October 24, 1994[®].

Abstract □ The antispasmodic activity of several xanthoxyline derivatives against acetylcholine-induced contraction of the guinea pig ileum was evaluated in vitro. The acetophenones with two methoxyl groups, mainly in the 3,4 positions, exhibited potent antispasmodic activity. Modification of the hydroxyl group in xanthoxyline by the introduction of benzoyl, acetyl, or tosyl groups produced inactive compounds, whereas the introduction of benzyl or *p*-methoxybenzyl groups furnished compounds that were four- to eight-fold more potent than xanthoxyline. In marked contrast, the introduction of a methyl group gave a compound that caused contractant activity. Modification of the carbonyl group of xanthoxyline lead to inactive compounds, whereas the condensation of xanthoxyline with benzaldehydes gave chalkones that were about fivefold more potent than xanthoxyline. The introduction of benzyl and styrene groups, on the basis of the similarity with papaverine, improves the antispasmodic action of the xanthoxyline derivatives. Our results suggest that the methoxyl and carbonyl groups are critical structural points for the antispasmodic activity of xanthoxyline derivatives. The hydroxyl group improves antispasmodic activity, but is not fundamental to its manifestation.

2-Hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone (xanthoxyline; **1**) is the major constituent isolated from the hexane extracts of *Sebastiania schottiana* (Euphorbiaceae), a native Brazilian medicinal plant used in folk medicine for the treatment of kidney disease. Xanthoxyline has also been isolated from other plants, such as *Fagara okinawaensis* (Rutaceae),¹ *Pulicaria undulata* (Compositae),² *Eucalyptus michaeliana* (Myrtaceae),³ *Sapium sebiferum* (Euphorbiaceae),⁴ and *Phyllanthus sellowianus* (Euphorbiaceae).⁵ We have previously demonstrated that the extract of *Sebastiania schottiana* and xanthoxyline caused a potent and concentration-dependent non-competitive antagonistic effect against several agonist-mediated contractions of the ileum and urinary bladder from guinea pig and rat uterine smooth muscles in vitro, with 50% inhibitory concentration with IC₅₀ values ranging from 47 to 190 μM. In addition, xanthoxyline also inhibited, in a graded manner, twitch responses evoked by electrical stimulation of strips of guinea pig longitudinal ileum, urinary bladder, dog ureter, and rat left atrium, with IC₅₀ values of 50 to 480 μM.^{6–8} We have also recently reported that xanthoxyline exhibited antibacterial activity against some bacteria frequently found in the urinary tract.⁹

The present study was therefore designed to produce several xanthoxyline derivatives by structural modification and to analyze their structure–activity relationships, determining the structural groups responsible for their in vitro antispasmodic activity against acetylcholine-induced contraction of the guinea pig ileum to achieve more active compounds.

Experimental Section

Chemical Procedures—Melting points were determined with a Microquímica AP-300 apparatus and were uncorrected. Elementary analyses were obtained on a Perkin Elmer 2400. Percentages of C,

H, N were in agreement with the product formula. IR spectra were recorded with a Perkin-Elmer 720 spectrometer on KBr disks or in a liquid film on NaCl disks. The ¹H-NMR spectra were recorded on a Varian XL 60 or 100 MHz and on a Bruker 270 or 200 MHz. Compounds were dissolved in deuterated solvents from commercial sources with tetramethylsilane (TMS) as the internal standard. The purity of the synthesized substances was monitored by thin-layer chromatography (TLC) with 200-μm thick silica pre-coated plastic plates (Sigma), with several solvent systems of different polarity. Some compounds were purified by preparative TLC (PTLC) performed with Kiesegel 60 PF254 Merck plates (1.0–2.0 mm in thickness) that were activated at 105 °C for 1–2 h prior to use. Spots were visualized by shortwave UV light and iodine vapor. The solvents and reagents were purified in the usual manner. Compounds **2–4** were purchased from commercial sources. 3,4-Dimethoxyacetophenone (**5**) was donated by Prof. Franco Delle Monache, Università Cattolica S. Cuore, Rome, Italy.

Procedure for Isolation of Xanthoxyline—Dried stems and leaves of *Sebastiania schottiana* were extracted with 90% MeOH at room temperature. The extract was concentrated, diluted with water, and treated with hexane. The hexane extract was chromatographed on a Si-gel (toluene) column to give xanthoxyline (**1**; yield, 0.25%); mp 81 °C; IR (KBr): 3460, 2925, 1615, 1460, and 1385 cm⁻¹; ¹H NMR (100 MHz, CDCl₃): 2.60 (s, 3H, CH₃); 2.82 (s, 3H, CH₃O); 3.85 (s, 3H, CH₃O); 5.92 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H); 6.06 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 2 arom H); and 14.03 ppm (s, 1H, OH).

Synthesis of Xanthoxyline Derivatives—2,4,6-Trimethoxyacetophenone (**6**)—Xanthoxyline (0.14 g) was dissolved in acetone (3 mL), (CH₃)₂SO₄ (0.106 g), and 10% NaOH (1 mL). The mixture was allowed to stand for several hours, the solvent was evaporated, and the crude product was purified by PTLC (hexane:ethyl acetate, 2:1) to give **6** (yield, 0.083 g or 55%); mp, 103 °C (lit.¹ 104 °C); IR (KBr): 2900, 1680, 1600, and 1370 cm⁻¹; ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃): 2.20 (s, 3H, CH₃); 3.70 (s, 3H, CH₃O); 3.82 (s, 3H, CH₃O); 3.86 (s, 3H, CH₃O); and 6.10 ppm (2d, 2 arom. H).

Oxime Derivative (8)—Xanthoxyline (0.2 g) was dissolved in a mixture containing hydroxylamine hydrochloride (0.5 g) and 10% NaOH (3 mL). The solution was refluxed for 3 h and poured into cool water, and the solid was recrystallized from benzene to give **8** (yield, 0.145 g or 73%); mp, 106 °C (lit.⁴ 108–109 °C); IR (KBr): 3250, 1640, 1600, and 1375 cm⁻¹; ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃): 2.25 (s, 3H, CH₃); 3.70 (ds, 6H, 2-CH₃O); 6.05 (2d, 2 arom. H); 6.40 (s, 1H, NOH); and 14.15 ppm (s, 1H, OH).

2,4-Dinitrophenylhydrazone Derivative (9)—2,4-Dinitrophenylhydrazine (0.25 g), MeOH (5 mL), and H₂SO₄ (0.4 mL) were added to a solution of xanthoxyline (0.1 g) in MeOH (1 mL). The solid formed was recrystallized from chloroform to give **9** (yield, 0.063 g or 33%); mp; 229 °C (lit.¹¹ 230–231 °C); IR (KBr): 3250, 1600, 1385; and 900 cm⁻¹; ¹H-NMR (270 MHz, DMSO-*d*₆): 2.25 (s, 3H, CH₃); 3.73 (ds, 6H, 2-CH₃O); 7.86 (d, 1 arom. H); 8.40 (2d, 1 arom. H); 8.90 (d, 1 arom. H); 9.70 (s, 1H, NH); 11.00 (s, 1H, OH).

2-Ethyl-3,5-dimethoxyphenyl (10)—Xanthoxyline (0.4 g) was dissolved in ethanol (5 mL), and a mixture of amalgamated mossy zinc (1.7 g), water (1.5 mL), and HCl (1.4 g) was added to it. The solution was stirred, refluxed for 40 min, and treated with chloroform. The organic phase was chromatographed on PTLC (hexane: ethyl acetate, 2:1) to give as an oil **10**. (Yield, 0.28 g or 75%); IR (NaCl film): 3400, 3000, 1600, 1370, and 1220 cm⁻¹; ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃): 1.00 (t, 3H, CH₃); 2.50 (q, 2H, CH₂); 3.60 (ds, 6H, 2-CH₃O); 6.00 (2d, 2 arom. H); and 12.00 ppm (s, 1H, OH).

2-Propoxy-4,6-dimethoxyacetophenone (11)—Xanthoxyline (0.2 g), NaOH (0.045 g), MeOH (2 mL), dimethylformamide (DMF, 10 mL),

[®] Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, December 15, 1994.

and propyl bromide (0.14 g) were refluxed for 1 h and poured into cool water. The crude product was extracted with chloroform and purified by PTLC (hexane:ethyl acetate, 2:1) to give 11 as an oil (yield, 0.1 g or 40%); IR (NaCl film): 3000, 1690, 1600, 1380 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (60 MHz, CDCl_3): 1.00 (t, 3H, CH_3); 1.70 (m, 2H, CH_2); 3.70 (s, 3H, CH_3); 3.73 (s, 3H, CH_3O); 3.78 (t, 2H, OCH_2); and 6.00 ppm (2d, 2 arom. H).

2-Acetoxy-4,6-dimethoxyacetophenone (12)—Xanthoxyline (0.1 g) was acetylated in the usual manner with pyridine (1 mL) and acetic anhydrid (0.5 mL). The mixture was refluxed for 5 min and poured into cool water. The resulting precipitate was washed with water to give the pure product 12 (yield, 0.17 g or 70%); mp, 105–107 °C (lit.¹² 106–108 °C); IR (KBr): 3000, 1750, 1660, 1600, and 1380 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (60 MHz, CDCl_3): 2.25 (s, 3H, COCH_3); 2.50 (s, 3H, OCH_3); 3.80 (ds, 6H, 2- CH_3O); 6.15 (d, 1 arom. H); and 6.30 ppm (d 1 arom. H).

2-Benzoyloxy-4,6-dimethoxyacetophenone (13)—Xanthoxyline (0.2 g), NaOH (0.045 g), and MeOH (3 mL) were stirred for 15 min, and benzoylchloride (0.2 g) was added. The solution was stirred for another 30 min and poured into 3% HCl (6 mL) containing ~5 g of crushed ice. The product was filtered and purified by PTLC (hexane: ethyl acetate, 2:1) to give 13 (yield, 0.11 g or 38%); mp, 60 °C; IR (KBr): 3000, 1730, 1690, 1400, and 1100 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (60 MHz, CDCl_3): 2.40 (s, 3H, CH_3); 3.75 (ds, 6H, 2- CH_3O); 6.30 (2d, 2 arom. H); and 7.50 ppm (m, 5 arom. H).

2-(*p*-Toluenesulphonyl)-4,6-dimethoxyacetophenone (14)—Xanthoxyline (0.1 g), NaOH (0.03 g), isopropyl alcohol (5 mL), and *p*-toluenesulphonyl chloride (0.12 g) were refluxed for 2 h. The mixture was cooled at room temperature and poured into water. The pure product 14 was extracted with chloroform (yield, 0.08 g or 45%); mp, 150 °C; IR (KBr): 3000, 1680, 1600, and 1355 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, MeOD): 2.25 (s, 3H, CH_3); 2.50 (s, 3H, COCH_3); 3.85 (s, 3H, CH_3O); 3.95 (s, 3H, CH_3O); 6.20 (d, 1 arom. H); 6.60 (d, 1 arom. H); 7.50 (2d, 2 arom. H); and 7.80 ppm (2d, 2 arom. H).

2-Benzoyloxy-4,6-dimethoxyacetophenone (15)—Xanthoxyline (0.2 g), NaOH (0.045 g), MeOH (2 mL), DMF (10 mL), and benzyl bromide (0.192 g) were refluxed for 1 h. The mixture was cooled at room temperature and poured into water (50 mL). The crude product was extracted with chloroform and purified by PTLC (hexane:ethyl acetate, 2:1) to give 15 (yield, 0.19 g or 64%); mp, 64 °C; IR (KBr): 2990, 1690, 1600, and 1380 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (60 MHz, CDCl_3): 2.30 (s, 3H, CH_3); 3.70 (ds, 6H, 2- CH_3O); 4.80 (s, 2H, CH_2); 6.00 (2d, 2 arom. H); and 7.20 ppm (s, 5 arom. H).

2-(4-Methoxybenzyloxy)-4,6-dimethoxyacetophenone (16)—Compound 16 was prepared in manner similar to that described above to yield 0.18 g (56%); mp, 60 °C; IR (KBr): 3000, 1690, 1600, and 1375 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (60 MHz, CDCl_3): 2.35 (s, 3H, CH_3); 3.75 (s, 3H, CH_3O); 3.80 (s, 3H, CH_3O); 3.83 (s, 3H, CH_3O); 5.2 (s, 2H, CH_2); 6.00 (d, 1 arom. H); 6.15 (d, 1 arom. H); and 7.35 ppm (s, 4 arom. H).

2-Hydroxy-4,6-dimethoxychalkone (17)—A mixture of xanthoxyline (0.18 g), EtOH (15 mL), NaOH (0.1 g in the minimum of boiled water), and benzaldehyde (0.1 g) was allowed to stand for several hours. The crude product, isolated by acidification of the cooled diluted solution, was recrystallized from hexane to give 17 (yield, 0.135 g or 52%); mp, 84–85 °C; IR (KBr): 3400, 2900, 1625, and 1370 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (60 MHz, CDCl_3): 3.98 (s, 3H, CH_3O); 4.00 (s, 3H, CH_3O); 6.20 (d, 1 arom. H); 6.28 (d, 1 arom. H); and 7.80 ppm (m, 5 arom. H); 8.10 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$).

4',2-dihydroxy-4,6 dimethoxychalkone (18)—Compound 18 was prepared as described above to yield 0.13 g (47%); mp, 193–195 °C (Lit.¹³ 194–196 °C); IR (KBr): 3250, 1620, 1600, and 1375 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 3.80 (s, 3H, CH_3O); 3.90 (s, 3H, CH_3O); 6.13 (2d, 2 arom. H); 6.85–7.60 (m, 4H, arom.); 7.70 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$); 10.15 (s, 1H, OH); and 13.70 ppm (s, 1H, OH).

Evaluation of Pharmacological Activity Guinea pigs of both sexes (300–500 g) were killed by cervical dislocation and were exanguinated. Preparations of guinea pig ileum (15–20 mm long) were set up in a 5-mL jacketed organ bath containing Tyrode's solution at 37 °C that was bubbled with air under 1 g of load. The Tyrode solution had the following composition (mM): NaCl (136.8), KCl (2.7), CaCl_2 (1.3), MgCl_2 (0.5), NaHCO_3 (12.0), NaH_2PO_4 (0.14), and glucose (5.5). The isotonic contractions were recorded under 1 g of load with a light lever (sixfold amplification) writing on a kymograph.¹⁴ A stabilization period of at least 60 min was allowed before drug addition, during which the bath solution was renewed every 20 min. All xanthoxyline derivatives were incubated with the preparations

Table 1—Potency (IC_{50}) for Xanthoxyline and Several Derivatives against Acetylcholine-Induced Contraction of the Guinea Pig Ileum in Vitro

Compound	$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})^a$	Compound	$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})^a$
1	47 (35–64) ^b	10	>500
2	>700	11	77 (60–86)
3	>700	12	>250
4	407 (223–744)	13	>100
5	39 (31–51)	14	>300
6	Contractant	15	7 (4–12)
7	13 (8–19)	16	6 (3–11)
8	>700	17	10 (6–18)
9	>700	18	8 (5–14)

^a Each value represents the mean of four to six individual experiments. ^b 95% confidence limits.

for at least 20 min, which in previous experiments proved to be the best contact period. Usually, three to four concentrations of each compound were tested in each preparation. Only one compound was tested in each preparation. After an equilibration period of 40–50 min, successive cumulative concentration-response curves were constructed for acetylcholine (0.01–100 μM) at 30-min intervals in the absence or in the presence of increasing concentrations of each compound. The mean of two control contractile responses for acetylcholine was taken to be 100%, and all other responses were calculated as a function of this value. Control experiments for acetylcholine were carried out in parallel in the presence of the vehicle (dimethylsulfoxide or absolute ethanol) used to dilute the test compounds. The final bath concentrations of these solvents did not exceed 0.2% and did not interfere with the tonus of the preparations or with acetylcholine-mediated contraction.

The potency of these compounds in atagonizing acetylcholine-mediated contraction was evaluated by estimation of IC_{50} (i.e., the concentrations of compounds required to inhibit the agonist response to 50% relative to control responses). The IC_{50} values were determined for individual experiments, at a minimum of three different concentrations of each compound, with a computer program produced in our laboratory (Armando Dettemer) for least-square regression analysis. Data relative to IC_{50} values are presented as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits ($p < 0.05$).

Results and Discussion

The IC_{50} values for the xanthoxyline derivatives, tested in the guinea pig isolated ileum, against acetylcholine-induced contraction are reported in Table 1. The acetophenone 2 and 4-methoxyacetophenone 3 did not display antispasmodic activity, but dimethoxyacetophenones 4 and especially 5 exhibited potent antispasmodic activity. This fact indicates that two methoxy groups are necessary for this activity. However, 5 was ~10-fold more potent than 4, indicating that the methoxyl groups in positions 3 and 4 are more effective than those in positions 2 and 4 in producing this activity. It is interesting to note that the substitution pattern of 5 is similar to that found in the aromatic ring of the isoquinolinic moiety of papaverine 7, where the $\text{C}=\text{N}$ is compared with the $\text{C}=\text{O}$ group of 5.

The transformation of the $\text{C}=\text{O}$ group into the $\text{C}=\text{N}$ group of xanthoxyline by synthesis of oxime derivative 8 and the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative 9, suprisingly, leads to practically inactive compounds. Further studies are needed to determine the reason for this lack of effect considering the similarity of these compounds to papaverine. The importance of the carbonyl group to the xanthoxyline activity is confirmed by the absence of activity of 10, in which the carbonyl was reduced to CH_2 group. The effects of the substitution of the hydrogen atom of the hydroxyl group in xanthoxyline may be summarized as follows: (i) The introduction of a methyl group gave 6, which suprisingly displayed marked contractile activity that was not concentration-dependent. In marked contrast, 11, into which the *n*-propyl group was introduced,

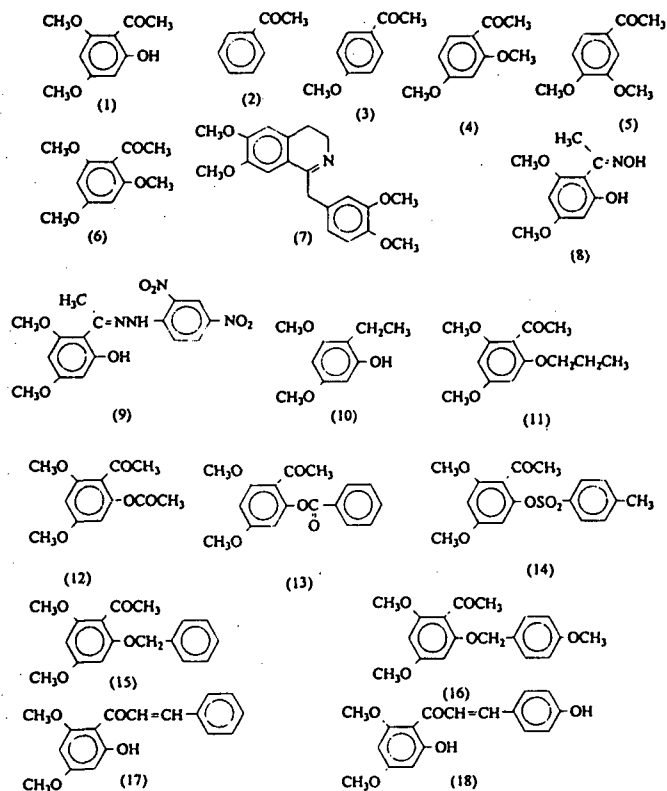


Figure 1—Molecular structures of the studied compounds.

was about two-fold less active than xanthoxyline. (ii) The substitution by acetyl and benzoyl groups gave 12 and 13, respectively, and both exhibited very low antispasmodic activities. A very similar pattern of response was also observed with the tosyl substituent group in 14. However, the introduction of benzyl and *p*-methoxybenzyl moieties (15 and 16, respectively) improved the pharmacological activity; 15 and 16 were about four- to eightfold more potent than xanthoxyline. It should be noted that 13 and 14 have two aromatic groups separated by a polar moiety ($-\text{OC}=\text{O}-$ and $-\text{OSO}_2-$, respectively), whereas 15 and 16 have two aromatic moieties separated by an electronegative atom and an apolar methylene group ($-\text{CH}_2-$) similar to papaverine ($-\text{CH}_2\text{C}=\text{N}-$).

Modification of the methyl group bonded to the carbonyl group by condensation with benzaldehyde and *p*-hydroxybenzaldehyde gave 17 and 18, respectively, which showed higher

antispasmodic activity (about fivefold more potent than 1). These compounds present, like papaverine 7, two aromatic moieties that are separated by $-\text{C}(=\text{O})-\text{C}=\text{C}-$ instead of $-\text{C}(=\text{N})-\text{CH}_2-$, which results in the two aromatic groups in the same plane.

In summary, our results suggest that both the methoxyl and the carbonyl groups are important factors related to the antispasmodic activity of xanthoxyline and related compounds. In addition, the hydroxyl group enhances, but is not fundamental to the manifestation of the antispasmodic activity. Finally, the introduction of a second aromatic group, like that found in papaverine, explains the great increase in the antispasmodic activity.

These results showed that new active molecules can be designed with active natural products as models. The new molecules should be more specific and active.

References and Notes

- Morita, N.; Arisawa, M.; Takezaki, T. *Yukugaku Zasshi* 1967, 87(8), 1017-1019.
- Ayoub, S. M. H.; Ellassam, O. E. *Fitoterapia* 1981, 6, 247-249.
- Courtney, J. L.; Lassak, E. V.; Speirs, G. B.; *Phytochemistry* 1983, 22(4), 947-949.
- Kouno, I.; Saishoji, T.; Sugiyama, M.; Kawano, N. *Phytochemistry* 1983, 22(3), 790-791.
- Miguel, O. G.; Cechinel Filho, V.; Niero, R.; Pizzollatti, M.; Santos, A. R. S.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A. *Fitoterapia*, in press.
- Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; Miguel, O. G.; Rae, G. A. *Planta Med.* 1986, 52, 444-445.
- Miguel, O. G. MSc. Thesis, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil, 1987.
- Calixto, J. B.; Miguel, O. G.; Yunes, R. A.; Rae, G. A. *Planta Med.* 1990, 56, 31-35.
- Godoy, G. F.; Miguel, O. G.; Moreira, E. A.; *Fitoterapia* 1991, LXII, 3, 269-270.
- Dave, K. G.; Telang, S. A.; Venkataraman, K. *J. Sci. Ind. Research* 1960, 19B, 470-476.
- Schaffer, H. J.; Lauter, W. M.; Foote, P. A. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1954, 43, 43-45.
- Liu, C. T.; Loh, J. Y. *Hua Hueh Hueh Pao* 1957, 23, 259-261.
- Guider, J. M.; Simpson, T. H.; Thomas, D. B. *J. Chem. Soc.* 1955, 170-173.
- Calixto, J. B.; Yunes, R. A.; Neto, A. S. O.; Valle, R. M. R.; Rae, G. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 1984, 17, 313-321.

Acknowledgments

We are grateful to Miss Adenir Pereira for technical assistance and to Dr. Marina Uieara for some NMR spectra. V.C.F. was an Msc. student receiving a grant from CNPq (Brazil). This work was supported by grants from PADCT and CNPq (Brazil).

JS930300X

Inhibition of Guinea-pig Ileum Contraction by Phyllanthimide Analogues: Structure-activity Relationships

V. CECHINEL FILHO, R. J. NUNES, J. B. CALIXTO* AND R. A. YUNES

*Departamento de Química e de *Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil*

Abstract

The inhibition of acetylcholine-mediated contraction of guinea-pig ileum by several phyllanthimide analogues was evaluated.

It was observed that maleimide derivatives exhibited high antispasmodic activity, being about 5-8-fold more potent than the succinimide derivatives, indicating that the double-bond in the imido ring seems to be important for activity. The distance between the aromatic and the imido ring is also a factor related to the activity; compounds separated into two methylene groups are the most potent. Moreover, the difference in nitrogenated bases in the succinimide derivatives does not significantly affect their antispasmodic activities.

In a previous work, we demonstrated that a semipurified fraction containing two alkaloids obtained from *Phyllanthus sellowianus* (Euphorbiaceae), an abundant plant of the southern region of Brazil and employed in folk medicine as a remedy for the treatment of kidney or bladder calculi, exhibited antispasmodic activity in several pharmacological models in-vitro (Calixto et al 1984). One of the active constituents of this fraction was further purified and identified as a new alkaloid derivative of glutarimide, and was named phyllanthimide (Tempesta et al 1988).

In the present study, several analogues of phyllanthimide from maleimide and succinimide, were synthesized and their antispasmodic activity against acetylcholine-induced contraction of the guinea-pig isolated ileum was evaluated. In addition, we also examined the structural factors related to the activity to achieve more active compounds based on the structure-activity relationships.

Materials and Methods

Chemical procedures

Melting points were determined with a Microquímica AP-300 apparatus and were uncorrected. Elementary analyses were obtained on a Perkin Elmer 2400. Percentages of C, H, N were in agreement with the product formula. IR spectra were recorded with a Perkin-Elmer 720 spectrometer on KBr disks or in a liquid film on sodium chloride disks. The ¹H NMR spectra were recorded on a Varian XL 60 or on a Bruker 200 MHz instrument. Compounds were dissolved in deuterated solvents from commercial sources with tetramethylsilane (TMS) as the internal standard. The purity of the synthesized substances was monitored by thin-layer chromatography (TLC) using Sigma silica pre-coated

plastic plates 200 µm in thickness with several solvent systems of different polarity. Some compounds were purified by column chromatography on Sigel (Merck) eluted with a hexane:ethyl acetate gradient. Spots were visualized by short-wave UV light and iodine vapour. The solvents and reagents were purified in the usual manner.

Synthesis of phyllanthimide analogues

N-Phenylmaleimides (1-5) were obtained by the reaction of maleic anhydride with aniline or substituted anilines and dehydration of the corresponding maleamic acid by treatment with hot acetic acid or acetic anhydride/sodium acetate, as previously described (Kretov & Kulchitskaya 1956; Cava et al 1973).

The addition of amines to the maleimido double bond was carried out in benzene (8,9,13-15) or acetonitrile (6,7, 10-12,16,17) as described by Mustafa et al (1961) and Cremlyn & Nunes (1987).

Evaluation of pharmacological activity

Guinea-pigs of either sex, 300-500 g, were killed by cervical dislocation and were exsanguinated. Preparations of guinea-pig ileum (15-20-mm long) were prepared in a 5-mL jacketed organ bath containing Tyrode solution at 37°C, bubbled with air under 1 g of load. The Tyrode solution had the following composition (mM): NaCl 136.8, KCl 2.7, CaCl₂ 1.3, MgCl₂ 0.5, NaHCO₃ 12.0, NaH₂PO₄ 0.14 and glucose 5.5. The isotonic contractions were recorded under 1 g of load by means of a light lever (sixfold amplification) writing on a kymograph (Calixto et al 1984). A stabilization period of at least 60 min was allowed before drug addition, during which the bath solution was renewed every 20 min. All phyllanthimide analogues were incubated with the preparations for at least 20 min, which in previous experiments proved to be the best contact period. Usually 3-4 concentrations of each compound were tested in each preparation. Only one compound was tested in each

Correspondence: R. A. Yunes, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitario- Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

preparation. After an equilibration period of 40–50 min, successive cumulative concentration–response curves were constructed for acetylcholine (0.01–100 μM) at 30-min intervals in the absence or in the presence of increasing concentrations of each compound. The mean of two control contractile responses for acetylcholine was taken to be 100% and all other responses were calculated as a function of this value. Control experiments for acetylcholine were carried out in parallel in the presence of the vehicle used to dilute these compounds (dimethyl sulphoxide or absolute ethanol). The final bath concentrations of these solvents did not exceed 0.2% and did not interfere with the tonus of the preparations or with acetylcholine-mediated contraction.

The potency of these compounds in antagonizing acetylcholine-mediated contraction was evaluated by estimation of IC_{50} values, i.e. the concentrations of compounds required to inhibit the agonist response to 50% of the control responses. The IC_{50} values were determined for individual experiments by the use of at least three different concentrations of each compound, using least-square regression analysis. Data relative to the mean IC_{50} s are presented as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits ($P < 0.05$).

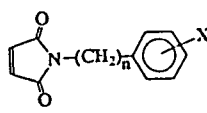
Results and Discussion

Cyclic imides are well-studied compounds and some of them exhibit antifungal, antibacterial and insecticidal activities (Hargreaves et al 1970; Fujiname et al 1972; Torgenson et al 1983; Cechinel Filho et al 1994, 1995). However, to date as far as we know there exists no data to suggest that these compounds present antispasmodic activity. We have previously demonstrated (Calixto et al 1984) that phyllanthimide, a cyclic imide alkaloid isolated from *P. sellowianus*, exhibits an antispasmodic activity, antagonizing in a concentration-dependent manner acetylcholine-induced contractions of the guinea-pig isolated ileum. Thus, the structure of phyllanthimide was considered an appropriate model for the synthesis of several analogues.

The synthetic route by which the analogues of phyllanthimide were obtained is shown in Fig. 1.

The mean IC_{50} values for the analogues of phyllanthimide tested in the guinea-pig isolated ileum against acetylcholine-

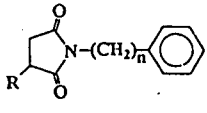
Table 1. Mean IC_{50} values for phyllanthimide and several maleimide analogues against acetylcholine-induced contraction of the guinea-pig ileum in-vitro.



Compound	n	X	IC_{50} (μM)
1	0	H	> 100
2	2	H	21(16–23)*
3	2	4-Cl	11(8–13)
4	2	4-CH ₃	10(8–11)
5	4	H	27(20–31)
Phyllanthimide			225(212–228)

*95% confidence limits. Each group represents the mean of four to six individual experiments.

Table 2. Mean IC_{50} values for phyllanthimide and several succinimide analogues against acetylcholine-induced contraction of the guinea-pig ileum in-vitro.



Compound	n	R	IC_{50} (μM)
6	0	N(CH ₃) ₂	Inactive
7	0	N(C ₂ H ₅) ₂	Inactive
8	0	NHCH ₂ C ₆ H ₅	Inactive
9	0	Morpholino	Inactive
10	1	N(CH ₃) ₂	Inactive
11	2	N(CH ₃) ₂	85 (37–197)*
12	2	N(C ₂ H ₅) ₂	79 (59–106)
13	2	NHCH ₂ C ₆ H ₅	81 (62–104)
14	2	Morpholino	76 (73–86)
15	2	Piperidino	50 (21–122)
16	3	N(CH ₃) ₂	106 (79–143.3)
17	4	N(CH ₃) ₂	98 (76–125)
Phyllanthimide			225 (212–228)

*95% confidence limits. Each group represents the mean of four to six individual experiments.

induced contraction are reported in Tables 1 and 2. It should be noted that, in general, maleimide derivatives (Table 1) exhibited a 5–8-fold increase in antispasmodic activity compared with the succinimide derivatives (Table 2). This result indicates that the double bond in the imido ring is an important factor related to the activity. It is interesting to observe that with the double bond, the imido ring takes on a planar configuration.

The introduction of substituent groups in the aromatic ring of maleimides (compounds 3 and 4) improves their antispasmodic activities, these compounds being about 20-fold more potent than phyllanthimide. The data of Tables 1 and 2 show that the distance between the aromatic and the imido ring is also an important feature in this effect. Thus, while the compounds that have the imido ring attached directly to the aromatic group (1, 6–9) or separated by one methylene group (10) were inactive, those separated by two methylene groups (2–4, 12–16) showed antispasmodic activity. The increase of the distance separating the rings by three or four methylene moieties in compounds 5, 16 and 17 did not improve their effects, indicating that the distance of two methylene groups seems to be the best for their activities. The activity of the

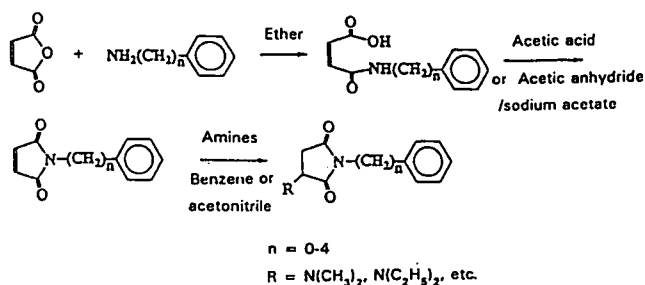


FIG. 1. Synthesis of phyllanthimide analogues.

succinimide derivatives (Table 2) was not affected by the presence of different nitrogenated bases attached to the imido ring, with the exception of compound 15 which was the most active succinimide derivative tested, exhibiting approximately twice the potency of the compound with the $N(\text{CH}_3)_2$ group. This suggests that probably the presence of more hydrophobic moieties attached to the succinimido ring would enhance the antispasmodic activity.

It is interesting to note that the structure of phyllanthimide, a naturally-occurring active alkaloid isolated in accordance with the recommendations of folk medicine and used as a model, led to the synthesis of more potent antispasmodic compounds and to the determination of some important structural factors related to this activity.

Acknowledgements

We are grateful to Miss Adenir Pereira for technical assistance. V. Cechinel Filho is a PhD student receiving a grant from CAPES (Brazil). This work was supported by grants from PADCT/FINEP and CNPq (Brazil).

References

- Calixto, J. B., Yunes, R. A., Neto, A. S. O., Valle, R. M. R., Rae, G. A. (1984) Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*. Braz. J. Med. Biol. Res. 17: 313-321
- Cava, M. P., Deana, A. A., Muth, K., Mitchell, M. J. (1973) *N*-Phenylmaleimide. Organic Synthesis Coll., vol. V, p. 944
- Cechinel Filho, V., Cruz, A. B., Moretto, E., Pinheiro, T., Nunes, R. J., Yunes, R. A. (1994) Antibacterial activity of *N*-phenylmaleimides, *N*-phenylsuccinimides and related compounds. Structure-activity relationships. II Farmaco 49: 675-677
- Cechinel Filho, V., Cruz, A. B., Nunes, R. J., Calixto, J. B., Moretto, E., Gonzaga, L., Correia, R., Yunes, R. A. (1995) Atividade antimicrobiana de analogos da Filantimida. Rev. Latinoam. Quim. In press
- Cremlyn, R., Nunes, R. J. (1987) Reactions of *N*-(*p*-chloro-sulfonylphenyl)maleimide. Phosphorus Sulfur 31: 245-254
- Fujiname, A., Ozaki, Nodera, K., Tanaka, K. (1972) Studies on biological activity of cyclic imide compounds. Agr. Biol. Chem. 36: 318-323
- Hargreaves, M. K., Pritchard, J. G., Dave, H. R. (1970) Cyclic carboxylic monoimides. Chem. Rev. 70: 439-469
- Kretov, A. E., Kulchitskaya, N. E. (1956) The preparation and properties of *N*-arylmaleimides. J. Gen. Chem. (USSR) 26: 221-225
- Mustafa, A., Asker, W., Khattab, S., Zayed, S. M. A. D. (1961) On the reactivity of the unsaturated system in *N*-arylmaleimide. J. Org. Chem. 26: 787-789
- Tempesta, M. S., Corley, D. G., Beuthler, J. A., Metral, C. J., Yunes, R. A., Giacomozzi, C. A., Calixto, J. B. (1988) Phyllanthimide, a new alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*. J. Nat. Prod. 51: 617-618
- Torgenson, D. C., Hensley, W. H., Lombrech, J. A. (1983) *N*-Phenylmaleimides and related compounds as soil fungicides. Contrib. Boyce Thompson Inst. 22: 67-70