

**UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU – FURB
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS - CCEN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGP**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REGULADORA DE CRESCIMENTO
VEGETAL DE COMPOSTOS 5,6-METILENODIOXINDÓLICOS ANÁLOGOS AO
ÁCIDO INDOL-3-IL-ACÉTICO**

MARIA SUZETE RAMPAZZO SMANIOTO

**BLUMENAU - SC
2005**

MARIA SUZETE RAMPAZZO SMANIOTO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REGULADORA DE CRESCIMENTO
VEGETAL DE COMPOSTOS 5,6-METILENODIOXINDÓLICOS ANÁLOGOS AO
ÁCIDO INDOL-3-IL-ACÉTICO**

Dissertação submetida à Universidade Regional de
Blumenau, como requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. FLÁVIA APARECIDA
FERNANDES DA ROSA

Co-Orientador Prof. Dr. RICARDO ANDRADE
REBELO

**BLUMENAU - SC
2005**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REGULADORA DE CRESCIMENTO
VEGETAL DE COMPOSTOS 5,6-METILENODIOXINDÓLICOS ANÁLOGOS AO
ÁCIDO INDOL-3-IL-ACÉTICO**

MARIA SUZETE RAMPAZZO SMANIOTO

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Química pela
banca examinadora formada por:

.....
Presidente - Prof^a. Dr^a. Flávia Aparecida Fernandes da Rosa – Orientadora - FURB

.....
Membro – Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Nascimento - UFSC

.....
Membro – Prof^a. Dr^a. Iêda Maria Begnini – FURB

.....
Suplente - Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo - FURB

Blumenau, 16 de dezembro de 2005

**Ao meu esposo Sidnei e aos meus filhos
Thiago e Thalita pelo apoio, incentivo, e
por me fazerem acreditar que nunca é
tarde para a realização de um sonho.**

AGRADECIMENTOS

⇒ Agradeço a Deus, fonte de toda sabedoria, por ter me conferido a graça da existência, saúde, inteligência, paixão pelo saber, e por me acompanhar e me guiar na busca de novos conhecimentos.

⇒ Aos meus familiares, especialmente aos meus pais, Zemiro e Odilma, pelo amor e exemplo de vida, alicerce de toda minha trajetória.

⇒ À Prof^a. Dr^a. Flávia Aparecida Fernandes da Rosa e ao Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo pelos preciosos ensinamentos, permanente apoio, incentivo, paciência e, acima de tudo, pela amizade ao longo de nossa convivência.

⇒ Aos Professores da FURB: Iêda, Ivonete, Paulo, Ricardo, Marcos e Jürgen que compartilharam comigo seu saber, ajudando-me a crescer como profissional e como ser humano.

⇒ Às minhas amigas do laboratório de pesquisa da FURB, Tatiane, Lanuza e Riceli, pela amizade, companheirismo, apoio e colaboração.

⇒ Aos queridos colegas de mestrado, especialmente a Silvana e Melissa, pelo carinho em todas as horas de nossa jornada científica.

⇒ Aos profs. Dr^a. Iêda Maria Begnini e Dr^a. Rosete Pescador (FURB), Dr^a. Maria da Graça Nascimento e Dr. Antonio Carlos Yossef (UFSC), pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

⇒ Ao Departamento de Química da FURB pelo espaço físico disponibilizado.

⇒ Aos funcionários do Departamento de Química da FURB e do Departamento de Química da UFSC (Central de Análises), pelos serviços prestados.

⇒ A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, seja por uma palavra de incentivo, seja por uma palavra de desafio.

“... e aprendi que se depende sempre de tanta, muita, diferente gente. Toda pessoa sempre é as marcas de outras tantas pessoas. E é tão bonito quando a gente entende que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá. É tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho, por mais que pense estar...”

(Gonzaguinha)

RESUMO

No presente trabalho explorou-se a reatividade do piperonal (**32**), um derivado do safrol (**31**), como material de partida para a síntese de novos compostos indólicos 5,6-metilenodioxisubstituídos, estruturalmente relacionados ao ácido indol-3-il-acético (**AIA**, **1**), principal representante natural das auxinas, e ao recém sintetizado ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-acético (**3-AMIA**, **29**), com comprovada atividade auxínica. Na preparação do núcleo metilenodioxindólico (**35**), empregou-se uma seqüência de reações baseadas em procedimentos descritos na literatura, alternando-se a última etapa: hidrogenação catalítica e ciclização reductiva do *o*- β -dinitroestireno, em busca de um melhor rendimento. Ambas as metodologias empregadas levaram ao produto desejado (**35**), entretanto, a ciclização reductiva foi mais eficiente na construção do núcleo metilenodioxindólico. A formilação desse núcleo na posição 3 também seguiu procedimento da literatura, mas a tentativa de oxidação do composto obtido, para produzir o ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico (**30**), nas condições realizadas, fracassou. O ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-propiónico (**38**) foi obtido com sucesso utilizando-se ácido acrílico como reagente via reação de substituição aromática eletrofílica. Até o presente momento somente o **3-MIF** (**37**) foi testado quanto à propriedade reguladora de crescimento vegetal em testes de promoção de crescimento de radículas e bioteste de pecíolos. O primeiro teste, foi realizado com sementes de *Lactuca sativa* (alface crespa), de *Cucumis sativus* (pepino) e de *Raphanus sativus* (rabanete), através de ensaios biológicos “*in vitro*”, em câmara de germinação. Em alface e pepino o **3-MIF** (**37**) não apresentou diferença estatística significativa, entretanto, em rabanete houve estimulação do crescimento radicular. No bioteste de pecíolos com plantas de *Phaseolus vulgaris*

(feijão de vagem), observou-se atividade mais expressiva com o **3-MIF (37)** do que com o **2,4-D (20)** empregado como padrão.

ABSTRACT

The present work describes the use of piperonal (**32**), a safrol (**31**) derivative, as starting material for the synthesis of new 5,6-methylenedioxy-substituted indole compounds structurally related to indol-3-yl-acetic acid (**IAA**, **1**), the main natural auxin, and to the recently prepared 5,6-methylenedioxyindol-3-yl-acetic acid (**3-MIAA**, **29**). In the preparation of the methylenedioxyindole nucleus it was employed a sequence of reactions based on classical literature procedures, where Pd-catalyzed hydrogenation and reductive cyclizations of *o*- β -dinitrostyrene, were successfully used in the construction of the indole ring. The latter method was shown to be the most efficient. To introduce a formyl group in the C-3 it was also employed literature methods, but the oxidation of this group to produce 5,6-methylenedioxyindol-3-yl-methanoic acid (**30**) failed in the working conditions. The acrylic acid was successfully used in the synthesis of the 5,6-methylenedioxyindol-3-yl-propionic acid (**38**) employing electrophilic aromatic substitution reaction. Until now, only the **3-MIF** (**37**) was tested towards the plant growth regulator properties in tests to promote root growing and petioles bioassays. The first test was realized with *Lactuca Sativa* (lettuce), *Cucumis sativus* (cucumber) and *Raphanus sativus* (radish) seeds, towards “*in vitro*” biological assays in germination chamber under controlled conditions. With lettuce and cucumber the **3-MIF** (**37**) showed no auxine activity, therefore radish showed root growth stimulation. In the petioles bioassays using *Phaseolus vulgaris* (string beans) the **3-MIF** (**37**) was more efficient than the **2,4-D** (**20**) used as control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Envolvimento dos hormônios no ciclo de vida de uma planta	21
Figura 2 -	Experiência de Went	30
Figura 3 -	Mecanismos reguladores dos níveis de AIA livre nas células vegetais	31
Figura 4 -	Rotas de respostas hormonais	35
Figura 5 -	A auxina estimula o alongamento de segmentos de coleótilo de aveia	36
Figura 6 -	Influência da dominância apical	38
Figura 7 -	Formação de raízes adventícias em pecíolos de violeta africana.	39
Figura 8 -	Camada de abscisão	41
Figura 9 -	Influência de auxinas no crescimento de morangos	42
Figura 10 -	Efeito do composto 3-MIF no crescimento radicular de <i>Lactuca sativa</i>	66
Figura 11 -	Efeito do composto AIA no crescimento radicular de <i>Lactuca sativa</i>	66
Figura 12 -	Efeito do composto 3-MIF no crescimento radicular de <i>Cucumis sativus</i>	67
Figura 13 -	Efeito do do composto AIA no crescimento radicular de <i>Cucumis sativus</i>	67
Figura 14 -	Efeito do composto 3-MIF no crescimento radicular de <i>Raphanus sativus</i>	68
Figura 15 -	Efeito do do composto AIA no crescimento radicular de <i>Raphanus sativus</i>	69

Figura 16 - Bioteste de pecíolo	69
Figura 17 - Efeito do composto 3-MIF em porcentagem no fechamento dos ângulos internos de peças em “Y” com plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	70
Figura 18 - Efeito do composto 2,4-D em porcentagem no fechamento dos ângulos internos de peças em “Y” com plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	71
Figura 19 - Esquema do procedimento para avaliação da atividade reguladora de crescimento vegetal.....	81
Figura 20 - Esquema do procedimento do bioteste de pecíolos.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

p.f.	Ponto de fusão
p.e.	Ponto de ebulição
c.c.d.	Cromatografia em camada delgada
IV	Infravermelho
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênios
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbonos
v_s	Deformação axial simétrica
v_{as}	Deformação axial simétrica
δ	Deslocamento químico
s	Singleto
t	Tripleto
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
TMS	Tetrametilsilano
C₀	Carbono quaternário

LISTA DE SÍMBOLOS

AcOH	Ácido acético
NH₄OAc	Acetato de amônio
HNO₃	Ácido nítrico
Pd	Paládio
Fe	Ferro
H₂	Hidrogênio
N₂	Nitrogênio
C	Carbono
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
POCl₃	Tricloreto de fosforila
DMF	Dimetilformamida
NaOH	Hidróxido de sódio
Ac₂O	Anidrido acético
HCl	Ácido clorídrico
Ph	Fenila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Síntese Orgânica	16
1.2 Hormônios Vegetais	17
1.2.1 Hormônios Vegetais Clássicos	20
1.2.1.1 Auxinas	22
1.2.1.2 Giberelinas	23
1.2.1.3 Citocininas	24
1.2.1.4 Ácido abscísico	24
1.2.1.5 Etileno	25
1.2.2 Hormônios Vegetais não Clássicos	26
1.2.3 Reguladores de Crescimento Vegetal	27
1.3 Auxinas	28
1.3.1 Histórico das Auxinas	28
1.3.2 Biossíntese e Metabolismo do AIA	31
1.3.3 Mecanismo de Ação das Auxinas	33
1.3.4 Efeitos Fisiológicos das Auxinas.....	36
1.3.4.1 Alongamento Celular.....	36
1.3.4.2 Dominância Apical.....	37
1.3.4.3 Indução de Formação de Raízes em Estacas e Folhas.....	38
1.3.4.4 Inibição da Abscisão de Folhas e Frutos.....	39
1.3.4.5 Promoção do Crescimento de Frutos.....	41
1.3.4.6 Atuação como Herbicidas no Controle de Plantas Invasoras.....	42
1.4 Relação entre a Estrutura Química e a Atividade Biológica das Auxinas..	43

1.5 Metodologias de Preparação do Indol.....	45
1.5.1 Rearranjo Sigmatrópico: Síntese de Fischer.....	45
1.5.2 Ciclização Nucleofílica: Síntese de Madelung.....	46
1.5.3 Ciclização Eletrofílica: Ciclização via nitreno.....	47
1.5.4 Ciclização Redutiva.....	48
2 OBJETIVOS	50
2.1 Objetivos Gerais.....	50
2.2 Objetivos Específicos.....	50
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 Síntese do Núcleo Metilenodioxindólico a partir do Piperonal.....	52
3.2 Síntese do Núcleo Metilenodioxindólico Substituído na Posição 3 do Anel Heterocíclico.....	58
3.2.1 Proposta de Síntese do Ácido 5,6-Metilenodioxindol-3-il-metanóico.....	59
3.2.2 Síntese do Ácido 5,6-Metilenodioxindol-3-il-propiónico.....	62
3.3 Avaliação de Atividade Reguladora de Crescimento Vegetal.....	65
3.3.1 Promoção de Crescimento de Radículas	65
3.3.2 Bioteste de Pecíolos.....	69
4 PARTE EXPERIMENTAL	72
4.1 Técnicas de Caracterização	72
4.2 Reagentes Químicos	73
4.3 Procedimentos	73
4.3.1 Síntese do Núcleo Metilenodioxindólico	73
4.3.2 Síntese do Núcleo Metilenodioxindólico Substituído na Posição 3 do Anel Heterocíclico	77

4.3.2.1 Proposta de Síntese do Ácido 5,6-metilenodioxindol-3-metanóico	77
4.3.2.2 Ácido 5,6-metilenodioxindol-3-propiónico	79
4.4 Avaliação da Atividade Reguladora de Crescimento Vegetal	80
4.4.1 Promoção de Crescimento de Radículas	80
4.4.2 Bioteste de Pecíolos em <i>Phaseolus vulgaris</i>	82
5 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
APÊNDICES	91
1 Comunicações em Congressos	91
2 Perspectivas	92
ANEXOS	93
Anexo 1 - Espectro no IV do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il propiónico.....	93
Anexo 2 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênios do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il propiónico.....	94
Anexo 3 - Espectro de ressonância magnética nuclear de carbonos do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il propiónico.....	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síntese Orgânica

Uma propriedade especial do átomo de carbono é poder se ligar a outros átomos de carbono formando um grande número de compostos orgânicos. Moléculas orgânicas complexas podem ser conseguidas a partir de seus componentes mais simples, por meio de procedimentos reacionais. À medida que o tempo foi passando, o número de reações orgânicas foi crescendo e, com elas, a possibilidade de se produzir novas, e mais complexas, substâncias químicas. A síntese orgânica é um processo que envolve uma série de reações orgânicas, que conduzem ou a formação de novas ligações C—C que darão a estrutura carbônica desejada ou a produção de uma nova molécula através da substituição, remoção, introdução ou modificação de grupos funcionais. Aspectos importantes da síntese são a introdução de grupos funcionais numa molécula e a interconversão de grupos funcionais. Em certos casos é fácil funcionalizar certas posições, enquanto que em outros isso se torna impossível e o produto desejado só pode ser obtido através de uma série de interconversões de grupos funcionais (IRELAND, 1971; MACKIE et al., 1982).

Antes de propor um plano de síntese, considerar: a viabilidade do processo, a disponibilidade de matéria-prima, o número de etapas para se chegar ao produto desejado, os tipos de reações em cada esquema proposto, a complexidade do esqueleto carbônico e, principalmente, a relevância dessa síntese.

Com o alto índice de crescimento populacional mundial, aumenta a demanda por alimentos, o que requer melhorias na produtividade agrícola moderna. Aliado ao

problema demográfico, tem-se as perdas de produção agrícola devido a pestes tais como roedores, insetos, microrganismos e ervas daninhas. Quase metade do alimento destinado ao homem é consumido ou estragado (30% das perdas, durante as safras e 20%, durante o transporte e estocagem das colheitas). Métodos biológicos de proteção vegetal são de grande importância, mas é mais comum o controle químico, utilizando-se pesticidas, inseticidas, fungicidas e herbicidas. Entretanto, o uso de estimulantes e reguladores de crescimento e desenvolvimento vegetal também é de grande importância (POZHARSKII et al., 1996).

Compostos com atividade auxínica têm grande aplicação na agricultura e biotecnologia vegetal, na busca de safras agrícolas com melhor qualidade e maior rendimento, pois eles são essenciais no controle de crescimento e desenvolvimento vegetal. Geralmente são empregados em baixas concentrações, pois, em quantidades maiores, atuam como herbicidas.

Associadas a outros compostos, as auxinas são usadas em culturas de células e tecidos vegetais, fazendo com que ocorra não apenas divisão celular, como também diferenciação. Este processo, denominado micropropagação, permite que se faça, a partir de algumas células, a clonagem de espécies (KRIKORIAN, 1995).

1.2 Hormônios Vegetais

Os seres vivos precisam regular suas atividades de acordo com o mundo ao seu redor. Os animais, tendo poder de locomoção, podem alterar suas circunstâncias de acordo com suas necessidades. Os vegetais, ao contrário, ficam imobilizados a partir do momento em que emitem para o solo sua primeira raiz.

Mesmo assim, as plantas têm a capacidade de captar alterações no meio em que se encontram, responder e fazer ajustes para se adaptar a elas. Essa capacidade é manifestada principalmente nas mudanças dos padrões de desenvolvimento.

O desenvolvimento compreende não só o crescimento da planta, mas também a diferenciação em células, tecidos e órgãos. O crescimento decorre da capacidade das células se dividirem e se alongarem ou aumentarem de volume. A diferenciação resulta da capacidade que as células têm de alterar suas funções, inibindo ou estimulando novas atividades. A diferenciação e o crescimento vegetal dependem tanto de fatores externos, como luz, temperatura, gravidade, comprimento do dia, etc, como de fatores internos, pequenas moléculas orgânicas que funcionam como mensageiros químicos altamente específicos em tecidos vegetais: os hormônios (GOWDAK e MATTOS, 1993; RAVEN et al., 2001).

Os fatores que controlam o desenvolvimento das plantas despertaram a curiosidade de cientistas há muito tempo. A presença de substâncias atuando como mensageiros químicos em tecidos vegetais foi sugerida em consequência de uma série de observações do crescimento vegetal muito antes que experimentos, no início do século, eventualmente, provassem sua existência. Só em 1934, o primeiro hormônio vegetal chegou a ser isolado em estado puro, da urina e, um ano mais tarde, mostrou-se que ocorre naturalmente nas plantas. Desde então, desenvolveram-se muitas técnicas sofisticadas e especializadas para extrair e purificar hormônios vegetais. Essas técnicas permitem agora relacionar mudanças quantitativas e qualitativas no teor hormonal das plantas com mudanças no padrão de crescimento (BLEASDALE, 1977).

As investigações puramente acadêmicas de Darwin e outros cientistas até o isolamento do primeiro hormônio vegetal serviram de fundamento para o

desenvolvimento de técnicas defensivas que revolucionaram a agricultura. Outras áreas de pesquisa ativa incluem a procura por agentes hibridizantes químicos, que podem induzir esterilidade masculina em plantas cultivadas, facilitando polinização cruzada e o desenvolvimento de sementes híbridas. Antídotos herbicidas, capazes de reduzir a toxicidade do herbicida às plantas cultivadas, mas não à erva daninha, também foram descobertos (FERRI, 1985; GIANFAGNA, 1995).

Os avanços na pesquisa hormonal permitem aos especialistas a alteração nos processos fisiológicos de crescimento, diferenciação e resistência das plantas a doenças.

O termo hormônio originou-se do grego *horman* que significa *estímulo*. O hormônio vegetal é um composto orgânico de ocorrência natural que é sintetizado em alguma parte da planta e se desloca para outra parte onde, em concentrações muito baixas, causa uma resposta fisiológica. Nem toda resposta fisiológica promotora pode ser atribuída a um hormônio. Isso porque íons inorgânicos, como K^+ e Ca^{2+} , também causam respostas importantes, mas não são considerados hormônios, pois não são sintetizados pela planta. Nem sempre a resposta fisiológica é promotora, alguns hormônios apresentam efeito inibitório. Por isso é mais adequado considerar como regulador químico e não como estimulante (RAVEN et al., 2001; MILLER, 1967; SALISBURY e ROSS, 1994).

De acordo com Bleasdale (1997) e Davies (1995), os hormônios vegetais têm um importante papel no controle do crescimento, diferenciação e desenvolvimento das plantas. São eles que regulam a velocidade de crescimento das partes individuais e integram essas partes para produzir a forma que é reconhecida como uma planta. Eles desempenham um papel em determinar se a planta é anã ou gigante, se suas folhas envelhecem e caem, se gemas laterais se desenvolvem, etc.

Eles afetam todas as fases do crescimento vegetal, além de poder afetar a germinação, em particular, superando a dormência da semente. Estão presentes nos tecidos vegetais em concentrações muito baixas, mas seu efeito é, freqüentemente, imenso e drástico.

O hormônio não precisa causar uma resposta no próprio local onde foi sintetizado. Pode ser transportado e atuar a certa distância de seu local de síntese. A resposta nem sempre é a mesma, depende da espécie, da parte do vegetal, do estágio de desenvolvimento, da concentração, das interações entre os hormônios presentes e de diversos fatores ambientais. Convém salientar que os hormônios não agem sozinhos, cada um age em conjugação ou oposição com outro hormônio presente na planta, de modo que a condição final de desenvolvimento é resultado de um balanço hormonal. (DAVIES, 1995; SALISBURY e ROSS, 1994; RAVEN et al., 2001).

1.2.1 Hormônios Vegetais Clássicos

Os hormônios vegetais considerados clássicos são agrupados, de acordo com o efeito que produzem nas plantas. São eles: as auxinas, as giberelinas, as citocininas, o ácido abscísico e o etileno.

Segundo Raven et al. (2001), resultados de estudos recentes evidenciam o fato de que esses hormônios raramente agem sozinhos. O desenvolvimento normal de uma planta depende de um equilíbrio entre esses hormônios que, ora atuam em sinergismo, ora atuam antagonisticamente e, em muitos casos, seus efeitos se superpõem. Até o momento, pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares da interação entre os hormônios. Acredita-se que essa interação possa ser devida

ao próprio metabolismo desses hormônios, ou seja, um influenciando a atividade da enzima envolvida na biossíntese ou inativação do outro (GOWDAK e MATTOS,1993; PERES e KERBAUY, 2004).

A **Figura 1** apresenta as principais etapas da vida de uma planta e a ação dos hormônios vegetais envolvidos.

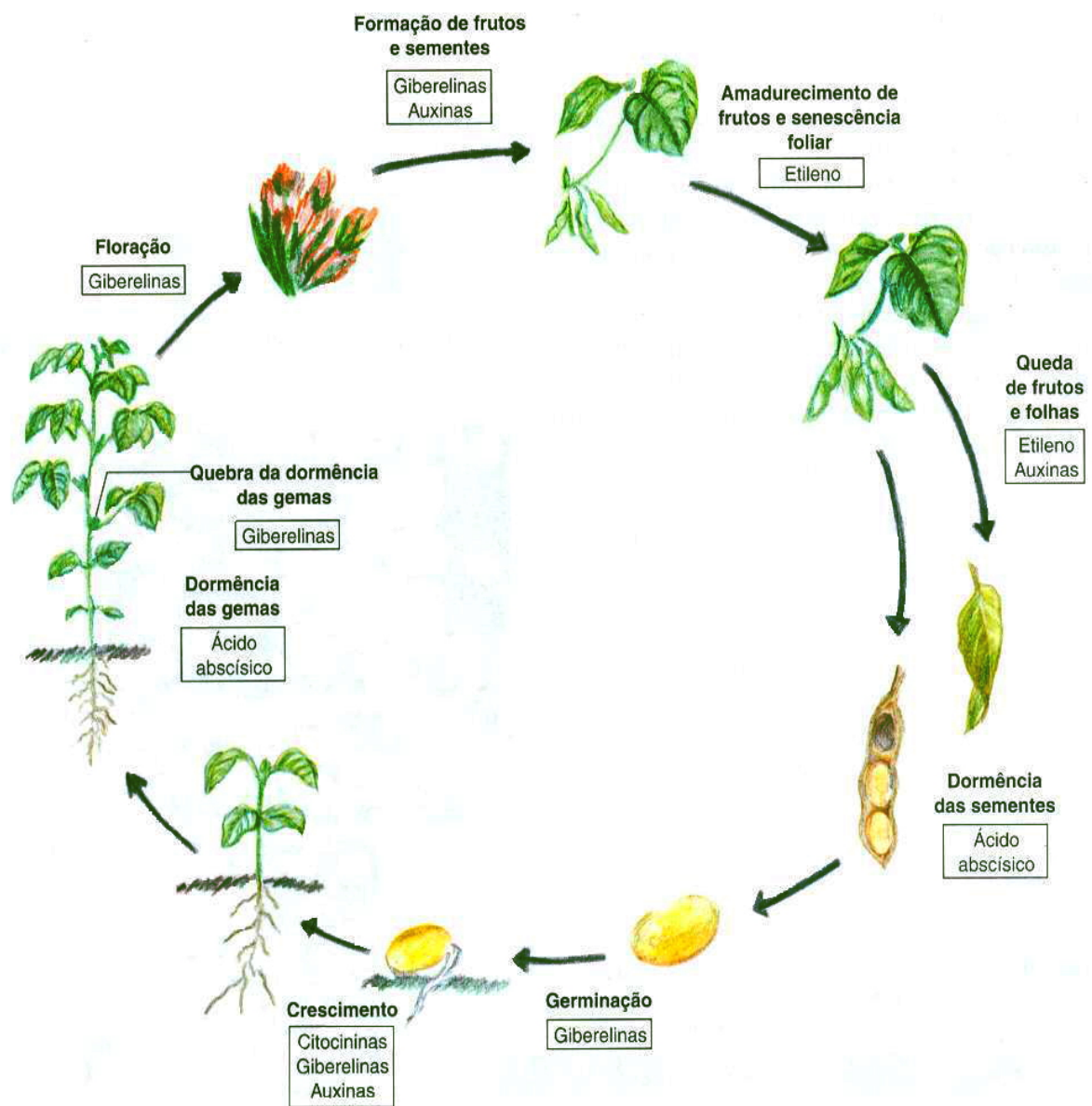
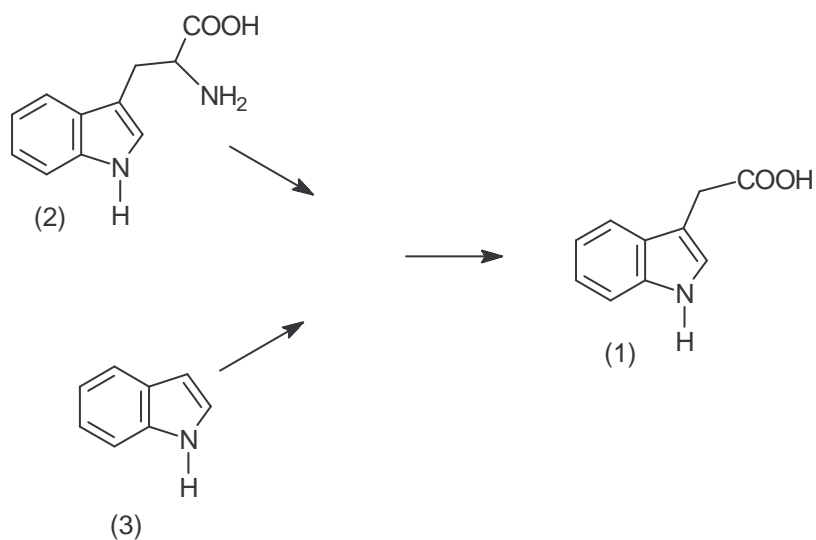


Figura 1 - Envolvimento dos hormônios no ciclo de vida de uma planta (FAVARETTO e MERCADANTE, 1999, p.345).

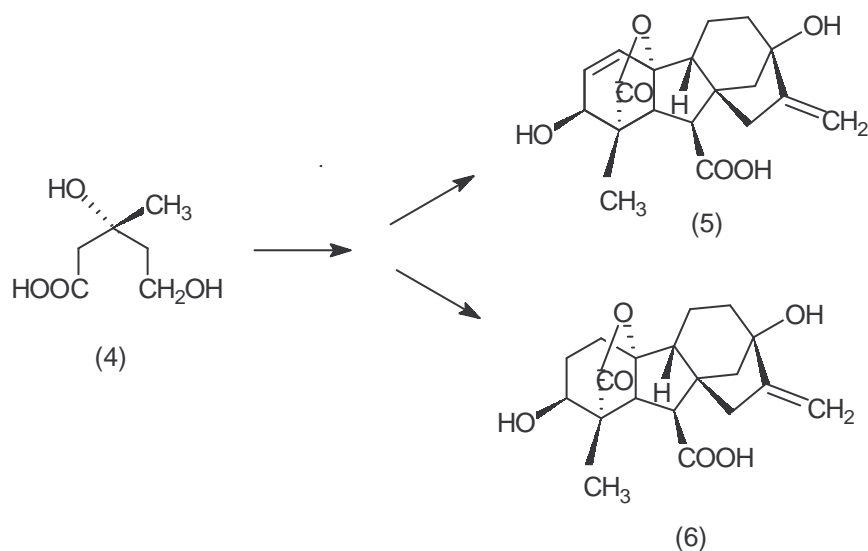
1.2.1.1 Auxinas

O termo auxina vem do grego *auxein* que significa *crescer*. É um termo genérico que designa os compostos caracterizados principalmente por sua capacidade de induzir o alongamento celular. Em geral são ácidos com um núcleo cíclico insaturado, ou derivados desses ácidos. A principal auxina de ocorrência natural é o ácido indol-3-il-acético (**AIA, 1**), sintetizado principalmente a partir do triptofano (**Trp, 2**) ou do indol (**3**), primariamente em primórdios foliares e folhas jovens e em sementes em desenvolvimento. Seu transporte é unidirecional, de uma célula para outra. Seus principais efeitos em plantas são: alongamento celular, dominância apical, indução de formação de raízes em estacas e folhas, diferenciação de tecidos vasculares, inibição da abscisão de folhas e frutos (DEVLIN,1970; RAVEN et al., 2001; BLEASDALE, 1977, DAVIES, 1995).



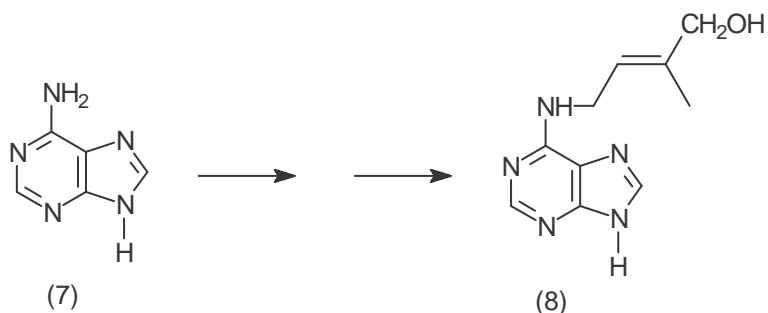
1.2.1.2 Giberelinas

As giberelinas são sintetizadas a partir do ácido mevalônico (4), em tecidos jovens dos ramos e em sementes em desenvolvimento. Seus efeitos em plantas são: hiperalongamento de ramos por estímulo tanto da divisão celular, quanto do alongamento celular, produzindo plantas altas e revertendo o nanismo de alguns mutantes, indução da germinação de sementes, estimulação de florescimento de plantas bianuais e de dia longo, estímulo da produção de enzimas durante a germinação. Todas as giberelinas de ocorrência natural e que foram quimicamente caracterizadas foram numeradas como GA_x onde X representa a ordem em que foram descobertas. Uma das primeiras a ser isolada e caracterizada foi o ácido giberélico ou GA_3 (5). Apesar de ser a mais encontrada e facilmente extraída de fungos, a mais importante e mais ativa em plantas superiores é a GA_1 (6) (HOPKINS, 1995; GUERRA, 2004; BLEASDALE, 1977; FERRI, 1985).



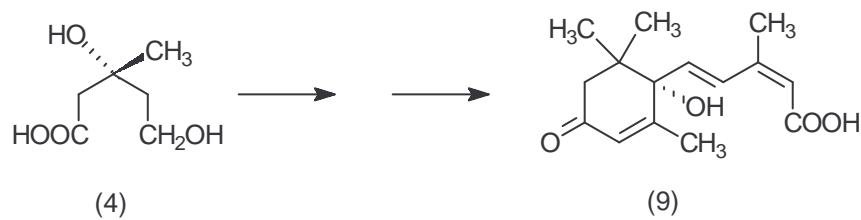
1.2.1.3 Citocininas

São derivados da adenina (7) ou compostos de fenil uréia e ocorrem nos ápices radiculares e sementes em desenvolvimento. Caracterizam-se por uma habilidade de induzir a divisão celular. Retardam a senescência foliar e promovem a formação de gemas laterais. A mais ativa das citocininas de ocorrência natural é a zeatina (8), encontrada em sementes de milho (RAVEN et al., 2001; DAVIES, 1995).



1.2.1.4 Ácido abscísico

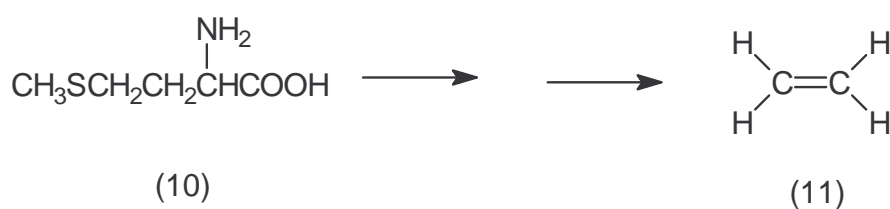
O ácido abscísico (**ABA**, 9) é um hormônio de ação inibidora, sintetizado a partir do ácido mevalônico (4), em folhas maduras. Gemas dormentes e sementes também são ricas em **ABA**. Esse ácido induz o fechamento estomático na maioria das espécies vegetais, estimula a produção de proteínas e lipídios de reserva das sementes, previne a germinação prematura e pode afetar a indução e manutenção de dormência nas sementes e gemas de algumas espécies (RAVEN et al., 2001; BLEASDALE, 1977; DAVIES, 1995).



1.2.1.5 Etileno

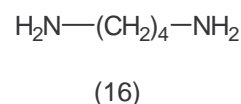
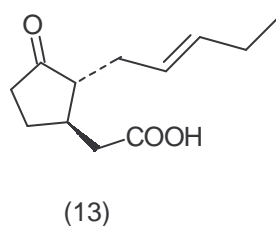
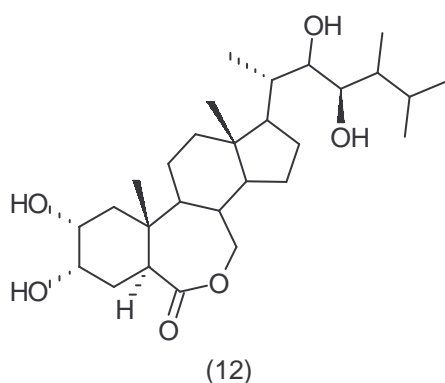
O etileno (**11**) é o único hidrocarboneto com efeito pronunciado em plantas. É produzido por todas as partes das plantas superiores, e a taxa de produção depende do tipo de tecido e do estágio de desenvolvimento. É sintetizado a partir da metionina (**10**), em resposta a estresses físicos ou biológicos, como ferimentos, alagamento, doenças, temperaturas inadequadas ou períodos de seca.

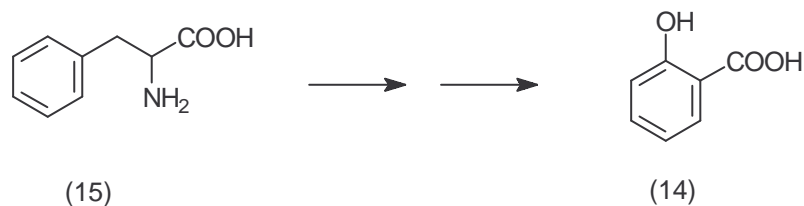
Sendo um gás, o etileno move-se por difusão a partir de seu sítio de síntese. Acelera o amadurecimento de frutos, principalmente os climáticos, induz a senescência de folhas e flores, induz a floração de certas plantas e a abscisão de folhas e frutos (COLLI, 2004; BLEASDALE, 1977; FERRI, 1985; RAVEN et al., 2001).



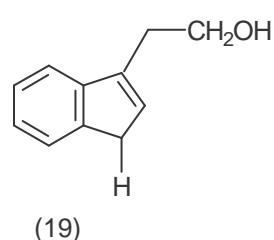
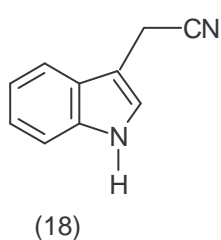
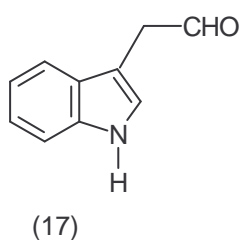
1.2.2 Hormônios Vegetais não Clássicos

Estudos mais recentes, mostram que outros compostos como os brassinoesteróides, os jasmonatos, o ácido salicílico e as poliaminas estão sendo adicionados às listas de hormônios vegetais, embora não se tenha definido se eles apresentam efeitos em todas as plantas ou se a ação é somente em poucos casos especiais (DAVIES, 1995). Os brassinoesteróides, como por exemplo a brassinolida (12), são esteróides que estimulam o alongamento e a divisão celular, inibem o crescimento e desenvolvimento de ápices produzindo plantas anãs. Os jasmonatos, derivados do ácido jasmônico (13), regulam o crescimento radicular, germinação de sementes, promovem senescência e abscisão, induzem a síntese de proteínas de defesa, mas não se sabe ao certo sua localização nos tecidos. O ácido salicílico (14), amplamente distribuído nas plantas tanto nas folhas como nas estruturas reprodutivas, é biossintetizado a partir do aminoácido fenilalanina (15) e ativa a produção de gens de defesa a patógenos. Poliaminas, como a putrescina (16), têm uma série de efeitos em plantas e parecem ser essenciais para o crescimento, principalmente na divisão celular (RAVEN et al.,2001; BLEASDALE; 1977; COLLI, 2004; FERRI, 1985; DEVLIN, 1970).





Outros três compostos encontrados nas plantas, com considerável atividade auxínica são: indol-3-il-acetaldeído (**IAld**, **17**), indol-3-il-acetonitrila (**IAN**, **18**) e indol-3-il-etanol (**19**). Convertem-se facilmente “*in vivo*” produzindo o **AIA** e é provável que sejam ativos só depois dessa conversão. Assim sendo, não são considerados auxinas e sim precursores auxínicos (BLEASDALE, 1977; GIANFAGNA, 1995; SALISBURY e ROSS, 1994).

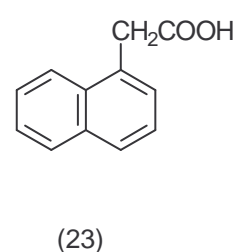
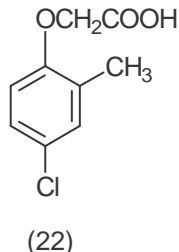
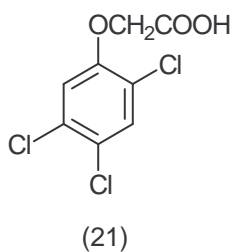
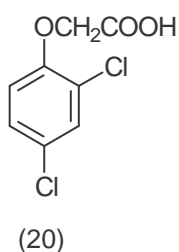


1.2.3 Reguladores de Crescimento Vegetal

Os reguladores de crescimento vegetal formam um grupo bastante numeroso de compostos de uso comercial, divididos em categorias devido as variadas estruturas e efeitos. Não são encontrados naturalmente, mas exercem sobre as plantas uma ação semelhante a dos hormônios, causando respostas fisiológicas e influenciando o desenvolvimento das plantas. Vêm sendo utilizados há muito tempo, não só para combater ervas daninhas, mas também para criar condições favoráveis

a melhoria no rendimento ou na qualidade de colheitas. Atuam modificando o desenvolvimento da planta através do sistema hormonal, bloqueando a síntese ou a ação de um hormônio, ou suplementando o fornecimento de hormônio num dado momento, alterando os processos fisiológicos chaves tais como fotossíntese, fixação de nitrogênio, etc (POZHARSKII et al., 1996; GIANFAGNA, 1995; BASTIN, 1970).

Entre os reguladores de crescimento vegetal estão alguns herbicidas seletivos como os ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (**2,4-D**, **20**), 2,4,5-triclorofenoxiacético (**2,4,5-T**, **21**), 2-metil-4-clorofenoxiacético (**MCPA**, **22**) e α -naftalenacético (**ANA**, **23**) que, em concentrações relativamente altas, matam as dicotiledôneas, sem causar danos às monocotiledôneas (GALSTON; 1974; BLEASDALE, 1977; SALISBURY e ROSS, 1994; BASTIN, 1970).



1.3 Auxinas

1.3.1 Histórico das Auxinas

Segundo Pennazio (2002), o conceito de substância atuando como um mensageiro químico em tecidos vegetais surgiu no último quarto do século XIX, em

conseqüência de uma série de observações e experimentos de Darwin buscando entender a interação mais conhecida entre plantas e o mundo externo e que é conhecida como tropismo.

O termo hormônio foi introduzido por Hans Fitting (1909), para indicar uma substância promotora de correlações químicas entre vários órgãos animais e, em fisiologia vegetal, para indicar uma substância estimuladora do desenvolvimento da planta.

As auxinas foram os primeiros hormônios vegetais a serem descobertos. Os precursores dessa descoberta foram Charles e Francis Darwin, em 1880, enquanto estudavam a influência da luz no desenvolvimento das plantas.

A existência desses hormônios vegetais foi demonstrada pela primeira vez pelo fisiologista Frits W. Went, no início do século XX, quando realizou uma série de experiências com coleóptilos de aveia, que se tornaram clássicas. Secionou ápices de coleóptilos de aveia e colocou-os sobre blocos de agar. Depois de algumas horas, apoiou os blocos de agar sobre a extremidade livre dos coleóptilos decapitados, mas deslocados para um dos lados. Com o tempo, observou que os coleóptilos se curvavam no sentido oposto àquele sobre o qual repousava o bloco de agar (**Figura 2**). Analisando esses resultados, Went concluiu que alguma substância produzida pelo ápice passava para o agar e deste para o coleóptilo decapitado, promovendo a curvatura. Went chamou esta substância de auxina (GOWDAK e MATTOS, 1993; FAVARETTO e MERCADANTE, 1999; GALSTON, 1974).

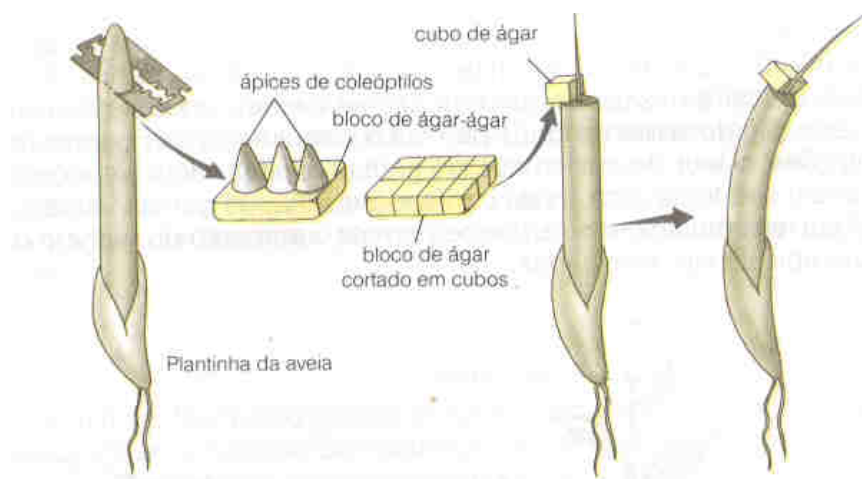


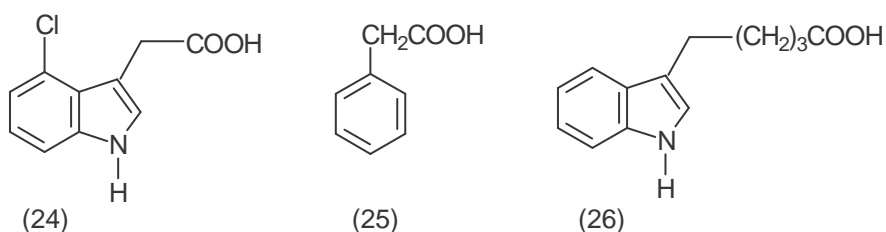
Figura 2 - Experiência de Went (1928): ápices de coleótilos são colocados sobre blocos de ágar; descartados os ápices, os blocos são cortados e colocados sobre um lado dos coleótilos decapitados e estes crescem fazendo uma curvatura para o lado oposto (GOWDAK e MATTOS, 1993, p. 217)

Depois de quase meio século de pesquisas, com o sucesso dos trabalhos de Went, abriram-se as portas para a química das auxinas. Um passo importante seguinte foi a purificação de quantidades suficientes da substância para propostas analíticas. Cinco anos de tentativas realizadas por vários pesquisadores até que tiveram sucesso e a substância, denominada auxina, finalmente foi identificada como o ácido indol-3-il-acético (**AIA**, 1). Este resultado livrou definitivamente o conceito de crescimento vegetal de um misticismo secular e estabeleceu o marco inicial na fisiologia vegetal moderna.

O termo auxina vem do grego *auxein* que significa *crescer*. É um termo genérico que designa os compostos caracterizados principalmente por sua capacidade de induzir o alongamento celular. Em geral são ácidos com um núcleo cíclico insaturado, ou derivados desses ácidos. (PENNAZIO, 2002; DEVLIN, 1970).

O principal representante natural do grupo das auxinas é o **AIA** (1). Nas plantas há ainda três outros compostos semelhantes ao **AIA**, que provocam muitas das mesmas respostas que ele, por isso são considerados hormônios auxínicos:

ácido 4-cloroindol-3-il-acético (**4-CI-AIA**, **24**), o ácido fenilacético (**APA**, **25**) e o ácido indol-3-il-butírico (**AIB**, **26**). (SALISBURY e ROSS, 1994; ROSA, 2002).



1.3.2 Biossíntese e Metabolismo do AIA

De acordo com Valio (1986, p. 47) “os estudos sobre metabolismo das auxinas têm-se concentrado quase que exclusivamente no **AIA**, devido as provas convincentes de que é a principal auxina das plantas.” São as variações nas velocidades de síntese, degradação e inativação que controlam os níveis de **AIA** nos vegetais (**Figura 3**).

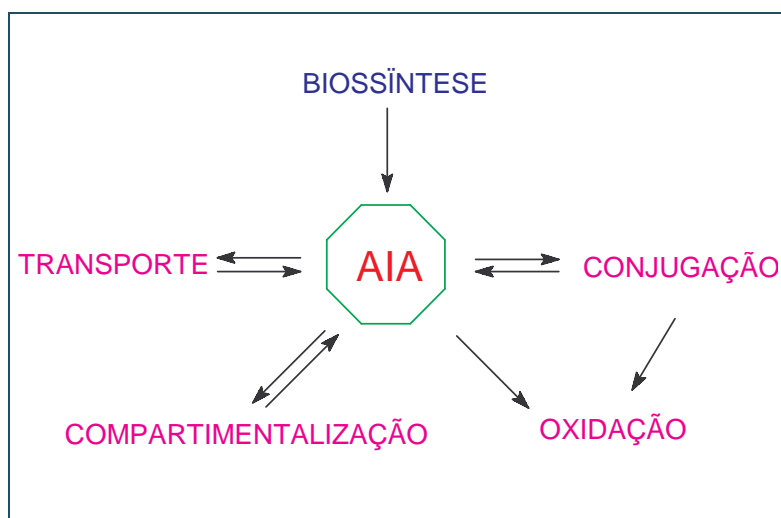


Figura 3 - Mecanismos reguladores dos níveis de **AIA** livre nas células vegetais (MERCIER, 2004).

Além dos fatores ambientais, a velocidade de síntese depende da idade fisiológica da planta ou do órgão. Segundo Taiz e Zeiger (2004), ainda não se sabe ao certo o mecanismo exato de biossíntese do **AIA** mas, há vários indícios de que seu precursor é o triptofano (**Trp, 2**), substância química com estrutura semelhante ao **AIA** e que ocorre em todas as células vegetais vivas. Estudos genéticos recentes têm fornecido evidências de que o **AIA** pode ser sintetizado pelos vegetais por rotas independentes desse aminoácido.

A inativação do **AIA** inclui o consumo durante os processos de crescimento e diferenciação vegetal, o transporte de um sítio para outro da planta, a compartimentalização em cloroplastos, o catabolismo oxidativo e a síntese conjugada.

O consumo de **AIA** devido ao crescimento vegetal inclui um mecanismo especial de destruição do **AIA** que é semelhante à ação de promoção do crescimento.

O transporte do **AIA** de um sítio para outro é de fundamental importância para o crescimento e desenvolvimento dos vegetais por acarretar mudanças nos níveis de auxina em tecidos e órgãos. É um fator determinante nos processos de expansão, alongamento e divisão celular, na diferenciação vascular, na dominância apical, na senescência e na abscisão (VALIO, 1986; MERCIER, 2004; TAIZ e ZEIGER, 1991 e 2004).

De acordo com Mercier (2004), a distribuição do **AIA** na célula parece ser regulada basicamente pelo pH. Como o **AIA** não se difunde rapidamente pelas membranas, a auxina tende a se acumular em compartimentos da célula que sejam mais alcalinos. Existem dois *pools* subcelulares de **AIA**: o citosol (fase coloidal-aquosa do citoplasma) e os cloroplastos.

O catabolismo oxidativo é uma modificação química no núcleo indólico ou na cadeia lateral acarretando diminuição na atividade auxínica. É o único processo irreversível que regula níveis de **AIA**. Esse processo inclui a descarboxilação oxidativa da cadeia lateral e oxidação nas posições 2, 3 e 7 do núcleo indólico, sem descarboxilação (DAVIES; 1995; BASTIN, 1970).

Conhecer os mecanismos de biossíntese e metabolismo de hormônios endógenos é muito importante para o futuro da agricultura. Essas informações tornarão possível a manipulação química e genética de níveis de hormônios endógenos, com controle do nível de crescimento e diferenciação vegetal, resultando em melhores safras agrícolas. Tornará possível também controlar o crescimento das plantas sem a aplicação de reguladores de crescimento químicos tóxicos.

Algumas técnicas em desenvolvimento envolvem a utilização de hormônios vegetais geneticamente modificados, que podem atuar, por exemplo, na germinação de sementes, na floração e no amadurecimento de frutos (TAIZ e ZEIGER, 1991; KRIKORIAN, 1995; SALISBURY e ROSS, 1994; DEVLIN, 1970; LIBNENGA e MENNES, 1995; VALIO1986).

1.3.3 Mecanismos de Ação das Auxinas

Durante o processo de desenvolvimento vegetal, as células individuais precisam se comunicar umas com as outras. Essa comunicação é atribuída aos hormônios vegetais que, atuando como mensageiros químicos entre as células, ajudam na coordenação do crescimento e do desenvolvimento. Há evidências de que tanto os hormônios vegetais tradicionais quanto os recentemente descobertos

podem atuar na estimulação ou na repressão de gens específicos dentro do núcleo, influenciando na taxa de divisão celular e na frequência e direção da expansão vegetal. Para que os hormônios vegetais operem como sinais químicos entre as células, as células alvo devem possuir mecanismos para: identificar o hormônio específico, medir a quantidade que está presente, transferir essa informação via rotas metabólicas e converter a informação em um conjunto complexo de mudanças no desenvolvimento. As células reconhecem os hormônios vegetais utilizando proteínas denominadas receptores que contém um sítio de ligação específico para cada hormônio. A ligação de um hormônio ao seu receptor resulta numa mudança conformacional da proteína receptora, que é alterada, levando-a a interagir com outros componentes da célula (**Figura 4**) (RAVEN, et al., 2001; TAIZ e ZEIGER, 1991 e 2004).

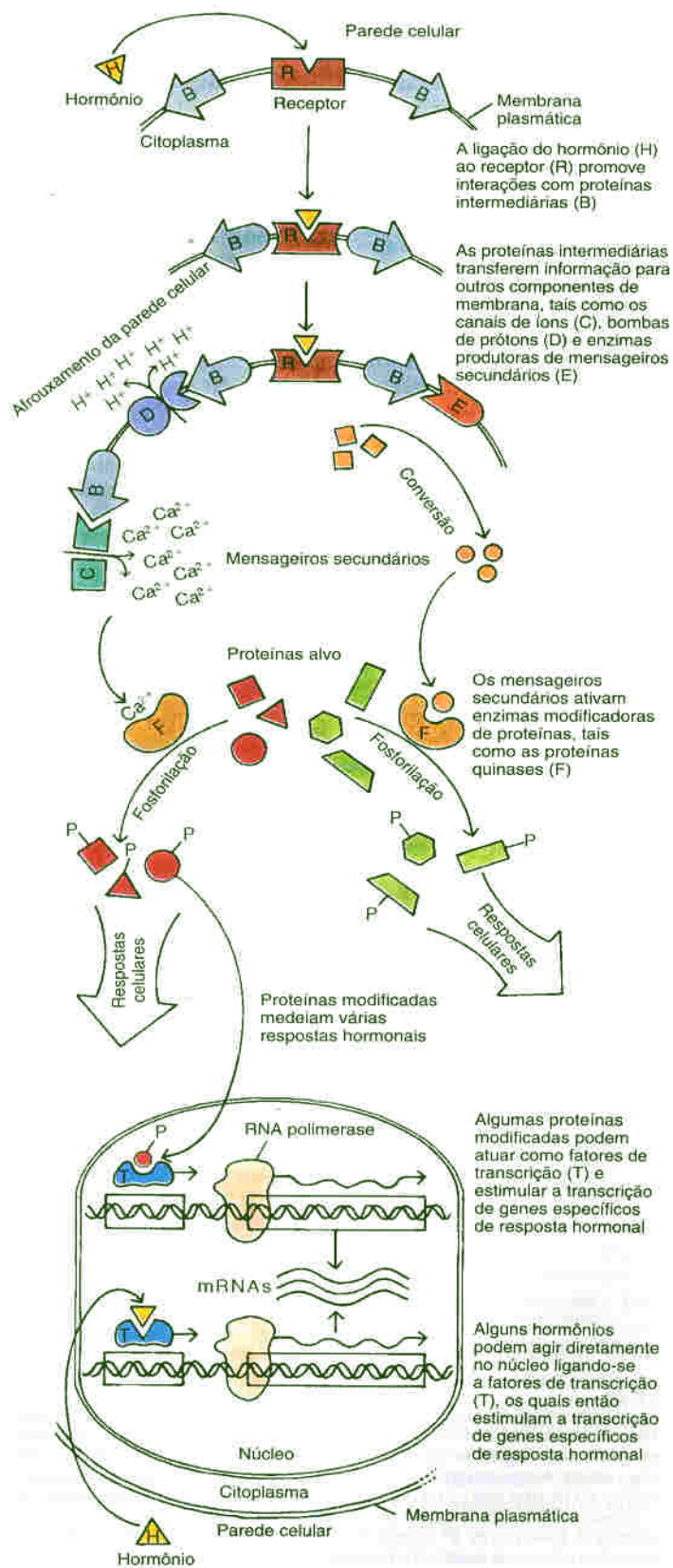


Figura 4 - Rotas de respostas hormonais: os hormônios agem ligando-se a proteínas denominadas receptores. (RAVEN et al., 2001, p. 665).

1.3.4 Efeitos Fisiológicos das Auxinas

1.3.4.1 Alongamento Celular

Uma das principais propriedades das auxinas é o crescimento de caule e raízes. Isso devido à ação que elas exercem sobre as paredes celulares, tornando-as menos rígidas e permitindo a expansão e/ou alongamento das células. Por exemplo, pedaços de coleótilos de aveia mergulhados em solução contendo auxina têm seu crescimento estimulado, o que não é observado quando o mesmo procedimento é realizado somente em água (**Figura 5**) (TAIZ e ZEIGER, 2004).

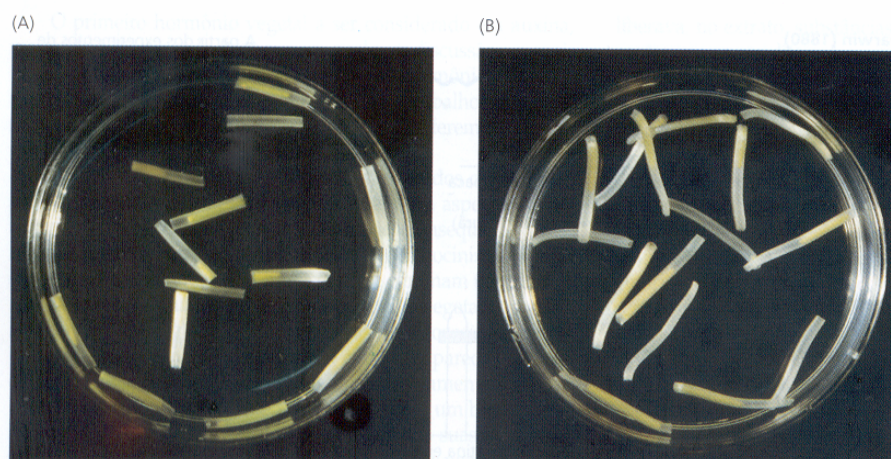


Figura 5 - A auxina estimula o alongamento de segmentos de coleótilo de aveia: segmentos incubados por 18 horas (a) em água (b) com auxina. (O tecido amarelo dentro do coleótilo translúcido corresponde às folhas primárias) (TAIZ e ZEIGER, 2004, p.452).

Prova, também, que as auxinas participam do controle de crescimento está no fato de que altos níveis de auxinas são encontrados justamente nas regiões do caule que estão crescendo mais ativamente. O mecanismo interno que controla o crescimento das raízes é muito pouco conhecido, mas sabe-se que as raízes são extremamente sensíveis a auxinas. Assim, a mesma quantidade de auxina que induz o crescimento do caule pode inibir o crescimento das raízes. Portanto deve-se

empregar concentrações suficientemente mais baixas em se tratando de raízes (GOWDAK e MATTOS, 1993; FERRI, 1985).

1.3.4.2 Dominância Apical

Admitia-se outrora que a gema apical dominava as gemas laterais impedindo seu crescimento. Isso porque a gema apical desenvolvia-se primeiro, atraindo os suprimentos de nutrientes da planta.

Uma série de estudos a partir da década de 20 forneceu evidências da existência de uma substância especial, mais tarde denominada auxina, que se difunde do ápice e flui de modo descendente no caule, inibindo o crescimento das gemas laterais mais próximas, que dariam origem a novos ramos do caule. Elas se desenvolvem pouco, formando um ângulo pequeno com o caule principal da planta. A partir de certa distância da gema apical, a concentração de auxina diminui, reduzindo ou anulando a inibição e permitindo o desenvolvimento dos ramos. Pequenas concentrações de auxina estimulam e grandes concentrações inibem o crescimento dos ramos.

A remoção do ápice do caule permite o crescimento de gemas laterais pois, nessas condições, o teor de auxina nessas gemas diminui. Removendo-se o ápice e colocando em seu lugar uma pasta contendo auxina, as gemas laterais continuam inibidas (**Figura 6**) (RAVEN et al., 2001; TAIZ e ZEIGER, 1991; BLEASDALE, 1977; GALSTON, 1974).

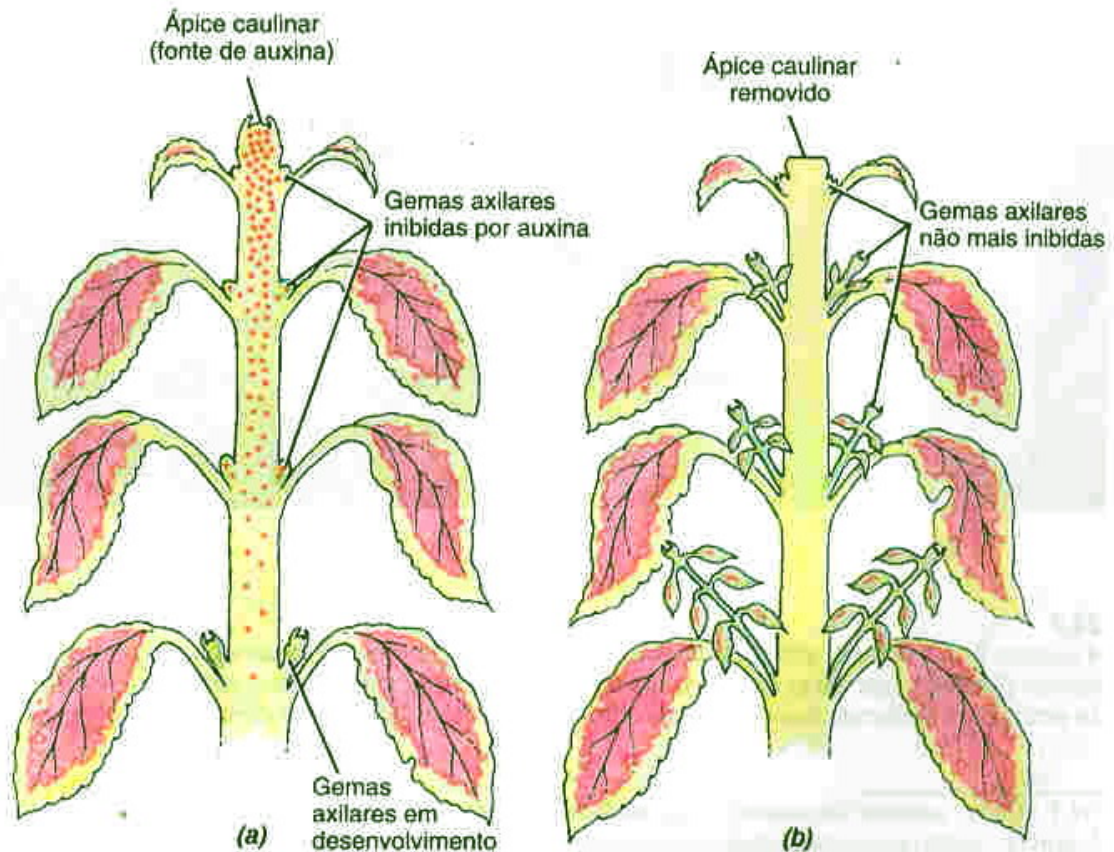


Figura 6 - Influência da dominância apical: (a) a gema apical produz auxinas, que migram em direção à base, inibindo as gemas laterais mais próximas; (b) com a retirada da gema apical, as gemas laterais deixam de ser inibidas (RAVEN et al, 2001, p. 653).

1.3.4.3 Indução da Formação de Raízes em Estacas e Folhas

As auxinas auxiliam na obtenção de mudas a partir de ramos ou folhas. Quando as estacas não têm folhas ou gemas, não enraízam prontamente e, muitas vezes, nem chegam a formar raízes. Folhas jovens e gemas existentes acima da região do corte fornecem a auxina que estimula o desenvolvimento das raízes. Em doses relativamente pequenas, elas provocam o enraizamento de estacas e folhas sendo, por isso, muito utilizadas na reprodução assexuada dos vegetais. A técnica de reprodução assexuada tem importância comercial e é muito usada na agricultura, pois muitos indivíduos se formam em pouco tempo e preservam certas

características desejáveis para os seres humanos como determinada cor da flor, sabor do fruto, quantidade de sacarose em certas variedades de cana-de-açúcar. Um exemplo dessa técnica é a estaquia empregada no plantio de mandioca, cana-de-açúcar, hibisco, roseira, violeta, etc.

Quando a auxina é aplicada num caule cortado, o transporte polar causa um acúmulo da substância na porção basal. A auxina acumulada nessa região causa ativação das células do enraizamento espontâneo, desenvolvendo raízes adventícias (**Figura 7**). Dependendo da planta, o enraizamento ocorre dentro de dias ou de semanas (RAVEN et al., 1993; FAVARETTO e MERCADANTE, 1999; DEVLIN, 1970).

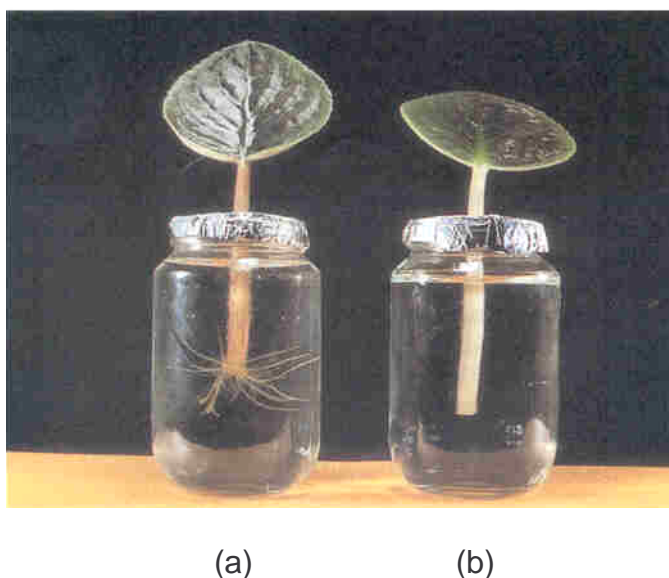


Figura 7 - Formação de raízes adventícias em pecíolos de violeta africana. Os pecíolos permaneceram nos frascos durante dez dias. (a) Pecíolo em solução contendo auxina (**ANA**); (b) Pecíolo em água pura (RAVEN et al.2001, p. 654).

1.3.4.4 Inibição da Abscisão de Folhas e Frutos

A queda das folhas, flores e frutos depende da relação entre os teores de auxinas desses órgãos e do caule. Enquanto esses órgãos apresentarem um teor de

auxina maior do que o caule, não ocorre a queda. As plantas são dotadas de mecanismos através dos quais as folhas velhas são eliminadas. À medida que a planta cresce, as folhas mais velhas entram em senescência: suas pontas amarelecem, depois suas margens e, assim, gradualmente, a folha inteira, que se torna flácida e cai, num momento em que as próximas folhas mais velhas entram em senescência. Em algumas plantas, ocorre a senescência foliar simultânea e as folhas morrem todas ao mesmo tempo. Em plantas perenes, a senescência é caulinar, a parte aérea morre, mas as partes subterrâneas mantêm-se vivas, servindo como reservas para o crescimento no ano seguinte. Há casos em que as plantas morrem completamente, logo que a reprodução se completou, e a senescência é total (BLEASDALE, 1977; GALSTON, 1974; MARCONDES e LAMMOGLIA, 1991).

À medida que as folhas e os frutos amadurecem, a auxina deixa de ser produzida, a camada de abscisão se forma, acontece o afrouxamento da união das células, causado por atividade enzimática, que enfraquece a ligação do fruto e da folha com o caule. A queda se dá por simples ruptura mecânica da camada de abscisão (**Figura 8**). Uma camada suberosa se forma na superfície do toco do pecíolo, protegendo os tecidos da planta contra invasão microbiana e perda de água. A aplicação de auxina na região do corte do pecíolo no estágio inicial da senescência inibe a queda. Entretanto, durante o estágio final, a aplicação de auxina (**AIA**) acelera o processo, provavelmente pela indução da síntese de etileno, que promove a abscisão (FAVARETTO e MERCADANTE, 1999; GALSTON e DAVIES, 1972).

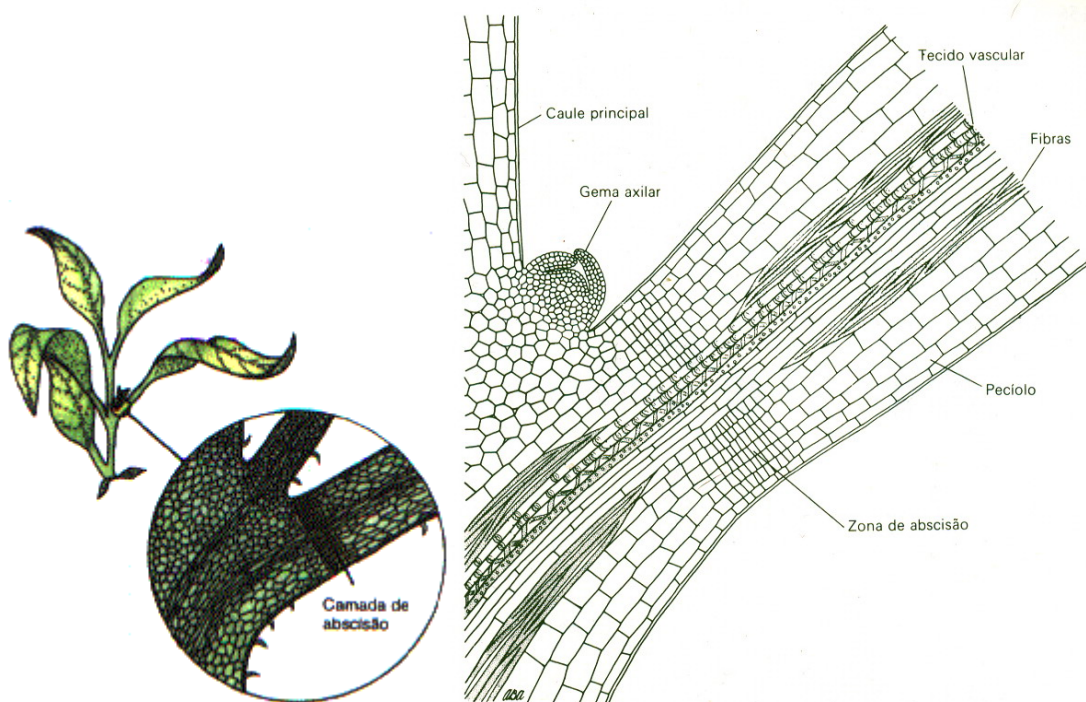


Figura 8 - Camada de abscisão situada transversalmente , na base do pecíolo adjacente ao caule. (FAVARETTO e MERCADANTE, 1999; GALSTON e DAVIES, 1972, p. 154).

1.3.4.5 Promoção do Crescimento de Frutos

As auxinas desempenham um importante papel no desenvolvimento dos frutos. Depois da polinização e da fertilização do óvulo de uma flor, começa o complicado conjunto de fenômenos que conduz à formação do fruto. Assim que se inicia o processo de frutescência, o pólen, que só contém traços de auxina, induz sua produção e o crescimento do tubo polínico pode estimular os tecidos do gineceu a produzir mais auxina. Uma polinização bem sucedida inicia o crescimento do óvulo. Após a fecundação, as sementes em desenvolvimento produzem auxina que determina o crescimento do ovário. A auxina é necessária nas diversas etapas do processo, sendo produzida após a polinização, após a fertilização e pela semente em desenvolvimento. As concentrações de auxinas endógenas são maiores após

polinização durante os primeiros estágios do desenvolvimento do fruto e menores durante a maturação (FAVARETTO E MERCADANTE, 1999; LUDFORD, 1995; GALSTON E DAVIES, 1972; DEVLIN, 1970).

A **Figura 9** mostra a influência das auxinas no crescimento de morangos. O pseudofruto do morangueiro (receptáculo intumescido) tem seu crescimento regulado pela auxina produzida pelos aquênios (pequenos frutos na superfície do receptáculo). Se a formação dos frutos for impedida por remoção das estruturas reprodutoras das flores, o pseudofruto (morango) não se desenvolverá. Porém, se o pseudofruto for pulverizado com uma solução de auxina (**AIA**), readquire seu crescimento, mas não forma frutos (aquênios) (VALIO, 1986; TAIZ e ZEIGER, 2004; MERCIER, 2004).

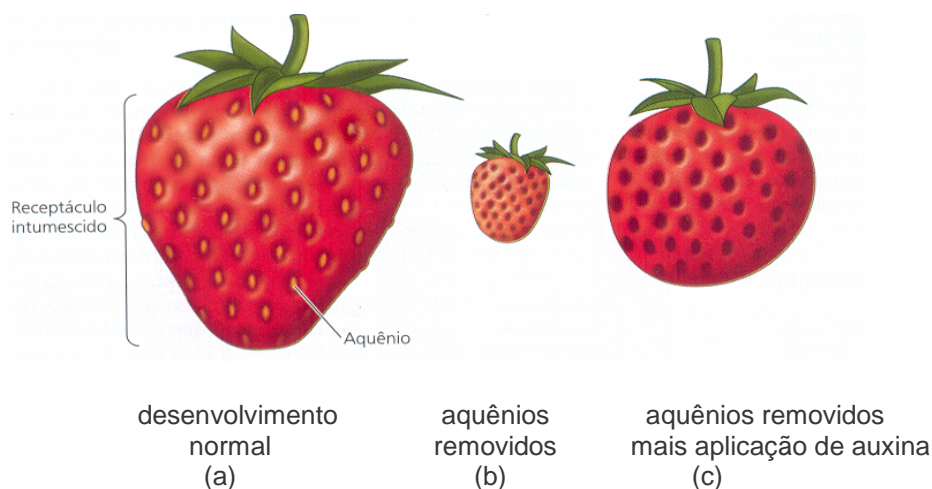
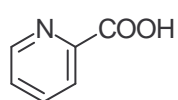


Figura 9 - Influência de auxinas no crescimento de morangos: (a) crescimento natural do pseudofruto, com frutos; (b) crescimento do pseudofruto sem frutos, sem auxina; (c) crescimento do pseudofruto sem frutos, com aplicação de auxina (TAIZ e ZEIGER, 2004, p. 478).

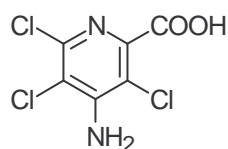
1.3.4.6 Atuação como Herbicidas no Controle de Plantas Invasoras

Os herbicidas auxínicos que mais têm sido usados na agricultura são os ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (**2,4-D**, **20**), 2,4,5-triclorofenoxiacético (**2,4,5-T**, **21**),

2-metil-4-clorofenoxiacético (**MCPA, 22**) e derivados do ácido picolínico (**27**), como o picloramo (**28**), conhecido comercialmente como Tordon. A popularidade desses herbicidas deve-se a sua alta fitotoxicidade, custo relativamente baixo e sua propriedade de afetar as dicotiledôneas, sem causar danos às monocotiledôneas. Apesar de muita pesquisa realizada para determinar porque os herbicidas matam apenas ervas daninhas, o mecanismo de ação é pouco conhecido. A seletividade desses compostos contra ervas de folhas largas deve-se, em parte, a maiores taxas de absorção e transporte dessas folhas quando comparadas a gramíneas, mas outros fatores importantes devem estar envolvidos. Certas partes de alguns órgãos crescem mais rapidamente que as outras, provocando torções e deformações em hastes, pecíolos e caules, devido ao crescimento irregular. Dependendo da quantidade de herbicida absorvido e transportado, o crescimento de todas as partes da planta pode ser retardado ou inibido (POZHARSKII et al., 1996; SALISBURY e ROSS, 1994; DAVIES, 1995; GALSTON, 1974).



(27)



(28)

1.4 Relação entre a Estrutura Química e a Atividade Biológica das Auxinas

De acordo com Devlin (1970) “a estrutura química dos compostos fisiologicamente ativos nunca deixou de ter interesse, devido a sua relação com a atividade fisiológica de cada um deles”. Estudos sobre isso levaram a estabelecer

certas características mínimas para que um composto tenha atividade auxínica: 1) uma parte cíclica insaturada ou cadeia facilmente transformada em anel; 2) uma cadeia lateral ácida, 3) uma carboxila ou grupo carboxílico, a certa distância da ligação dupla do ciclo, 4) uma disposição espacial adequada (VALIO, 1986).

Alguns pesquisadores tentaram fazer generalizações simples para explicar a diversidade de efeitos das auxinas. As moléculas de auxinas se ajustariam em nichos particulares nas membranas e deveriam, assim, possuir uma terminação hidrofílica e outra hidrofóbica com dimensões espaciais próprias. Outros envolvem considerações puramente geométricas, tais como a distância padrão de $5,5 \text{ \AA}$ entre as porções eletrofílica e nucleofílica da molécula. Embora tais generalizações concordem com um grande número de observações associadas à função auxínica, nenhuma afirmação explica ainda, satisfatoriamente, as exigências estruturais das moléculas ativas das auxinas.

Apesar de boa parte do metabolismo auxínico e efeitos fisiológicos produzidos pela aplicação do hormônio serem conhecidos, nada se sabe de essencial a respeito da reação principal que governa tais efeitos na célula. A atividade hormonal é um mecanismo complexo, influenciado por vários fatores, tais como afinidade do receptor em relação às auxinas, estabilidade metabólica, lipofilicidade, distribuição do hormônio nos tecidos, distribuição eletrônica e da carga no sistema do anel aromático e estereoquímica (ROSA, 2002; GALSTON e DAVIES, 1972; LUDFORD, 1995).

1.5 Metodologias para Obtenção de Indóis

Dos compostos heterocíclicos, os indóis são, provavelmente, os mais abundantes na natureza e fazem parte de um grande número de produtos naturais e compostos medicinais. A importância bioquímica e farmacológica de inúmeros derivados do indol serviu para manter um contínuo interesse dos químicos orgânicos que trabalham com sínteses no desenvolvimento de novos e melhores métodos para a síntese do núcleo indólico. Assim, um grande número de novas rotas baseadas nos métodos clássicos vêm sendo desenvolvidas para novos problemas na química do indol.

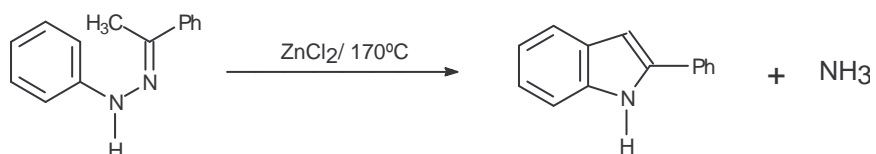
Geralmente os indóis são preparados por reações de ciclização com benzenos substituídos, a partir de precursores não heterocíclicos. Alguns dos métodos mais importantes de preparação de indol envolvem métodos clássicos como o rearranjo sigmatrópico, a ciclização nucleofílica, a ciclização eletrofílica, e a ciclização redutiva, entre outros (JOULE et al., 1995; SMITH, 1994; GRIBBLE, 2000).

Alguns exemplos de metodologias para obtenção de indóis estão descritas a seguir.

1.5.1 Rearranjo Sigmatrópico: Síntese de Fischer

Estabelecida em 1883, a síntese de Fischer ainda é a rota mais utilizada na preparação de indóis e derivados. Segundo Paquete (1968), a síntese de Fischer envolve um rearranjo da *o*-benzidina e um tautômero da fenilhidrazona.

A reação consiste no aquecimento de uma fenilhidrazona com ácido, algumas vezes, em solvente inerte, com formação de um indol e liberação de amônia. Um exemplo é a reação de preparação do 2-fenilindol representada no **Esquema 1** (JOULE et al., 1995).

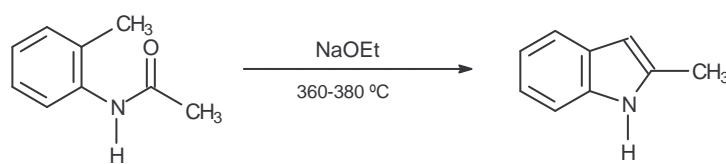


Esquema 1

Numerosos derivados da triptamina (**TAM**) têm sido preparados via síntese de indol de Fischer, assim como alcalóides e alcalóides marinhos e um grande número de intermediários farmacêuticos. Em vista disso, novas metodologias têm sido desenvolvidas, visando melhores rendimentos e redução no tempo de reação.

1.5.2 Ciclização Nucleofílica: Síntese de Madelung

A síntese de Madelung é a ciclização intramolecular de *o*-alquilanilinas-*N*-acetiladas. Um exemplo é a reação de *o*-acetotoluidina com base forte a temperaturas elevadas e na ausência de ar, produzindo o 2-metilindol (**Esquema 2**). Condições severas são exigidas para realizar catálise básica intramolecular na condensação entre o grupo metila aromático não ativado e o substituinte *o*-aciloamino (JOULE et al., 1995; PAQUETTE, 1968).



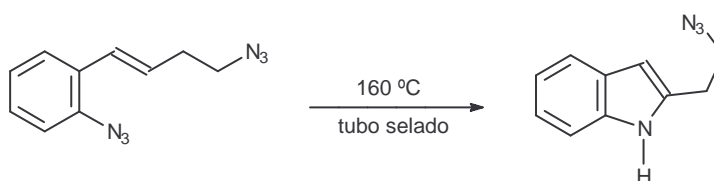
Esquema 2

Embora esta síntese clássica raramente seja empregada atualmente, excelentes modificações têm sido realizadas. Segundo Newkome e Paudler (1982), “na modificação de Verley, o uso de sodamida substituindo as bases alcóidas, freqüentemente, aumenta os rendimentos”. A variação de Madelung-Houlihan, divulgada primeiramente por Clark e colaboradores, tem sido utilizada na síntese de novos agentes dopaminérgicos (GILCHRIST, 1985; GRIBBLE, 2000).

1.5.3 Ciclização Eletrofílica: Ciclização via nitreno

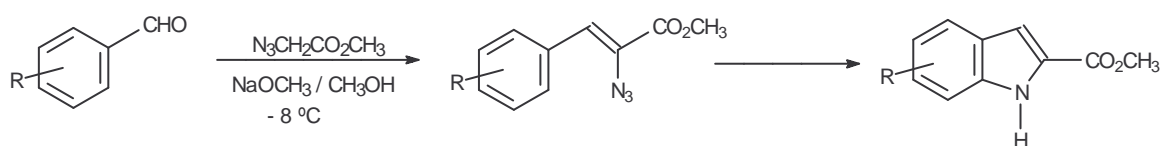
Algumas rotas sintéticas clássicas para obtenção do indol via ciclização eletrofílica são as sínteses de Sundberg e de Hemetsberger envolvendo o nitreno como intermediário.

A síntese de Sundberg envolve a termólise de *o*-azidoestirenos e ciclização do nitreno resultante (SUNDBERG, 1968). Esse método foi utilizado por Molina e colaboradores para preparar o 2-(2-azidoetil)-indol, conforme representado no **Esquema 3** (ROSA, 2002; GRIBBLE, 2000).



Esquema 3

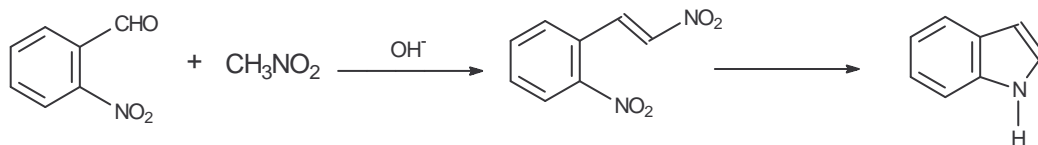
A síntese de Hemetsberger tem sido utilizada na preparação de núcleos indólicos 2-substituídos. O método envolve a condensação do azido acetato de etila com aldeído aromático, em presença de base forte, seguida da ciclização em xileno, produzindo o indol correspondente. De acordo com Gribble (2000) “esse método tem sido usado em síntese de alcalóides antitumorais”. Um exemplo desse método está representado no **Esquema 4** (ROSA, 2002 e 2003) e tem sido bastante utilizado na síntese de compostos indólicos que apresentam atividade anticancerígena significativa (MOODY e WHITHAM, 1992).



Esquema 4

1.5.4 Ciclização redutiva

A ciclização redutiva de nitro aromáticos é um método muito utilizado na obtenção de indol e as metodologias também vêm sendo aprimoradas. Por exemplo, a metodologia envolvendo a redução parcial do *o*,*β*-dinitroestirenos, que podem ser preparados pela condensação de *o*-nitrobenzaldeídos com nitrometano em meio básico, conforme representado no **Esquema 5** (ROSA, 2002; KATRITZKY e REES, 1984).



Esquema 5

Essa metodologia também foi utilizada por Fukuyama e Chen para preparar o precursor indólico para a síntese de hapalindol G (FUKUYAMA et al., 1998; GRIBBLE, 2000).

Huebner e colaboradores utilizaram esse método para preparar o 5,6-dimetoxindol a partir do 3,4-dimetoxi-6- β -dinitroestireno (HUEBNER et al., 1953).

O método mais utilizado e mais conveniente para a síntese de alcoxindóis não substituídos no nitrogênio é a ciclização redutiva de α,β -dinitroestirenos usando ferro em ácido acético. Apesar de muito utilizado, é um método que dá baixos rendimentos. Uma modificação desse método, utilizada por Sinhababu e Borchardt, foi empregar um sistema de solventes apolares (benzeno-cicloexano ou tolueno) em presença de sílica gel (SINHABABU e BORCHARDT, 1983). Esse método assim modificado (Fe-HOAc-sílica gel-tolueno-refluxo), foi utilizado também por Corey e colaboradores, para preparar 6,7-dimetoxindol para a síntese total da aspidofitina (HE et al., 1999).

Uma nova modificação da ciclização redutiva envolvendo α,β -dinitroestirenos foi realizada por Prota e colaboradores, utilizando zinco, para obter 5,6-dihidroindol, devido a sua importância em formulações dermocosméticas (NOVELLINO et al., 1999).

Outra modificação desse importante método que tem sido desenvolvida é a hidrogenação catalítica usando Pd/C, na presença de um ácido apropriado (SINHABABU e BORCHARDT, 1983; YANG et al., 1995).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

⇒ Sintetizar novos compostos indólicos análogos ao ácido indol-3-il-acético e ao ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-acético utilizando-se como material de partida o piperonal, um derivado do safrol.

⇒ Avaliar a atividade desses compostos quanto as suas propriedades reguladoras de crescimento vegetal.

2.2 Objetivos Específicos

⇒ Sintetizar compostos indólicos 5,6-metilenodioxissubstituídos, empregando-se na construção do anel heterocíclico, reações via ciclização redutiva e hidrogenação catalítica.

⇒ Utilizar reações clássicas de substituição aromática eletrofílica para a funcionalização na posição 3 do anel heterocíclico dos compostos indólicos 5,6-metilenodioxissubstituídos.

⇒ Caracterizar os compostos sintetizados através de métodos espectroscópicos no infravermelho (IV), espectrométricos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono -13 (RMN ^{13}C), de massas e análise elementar.

⇒ Avaliar a atividade reguladora de crescimento vegetal dos compostos 5,6-metilenodioxi-indólicos.

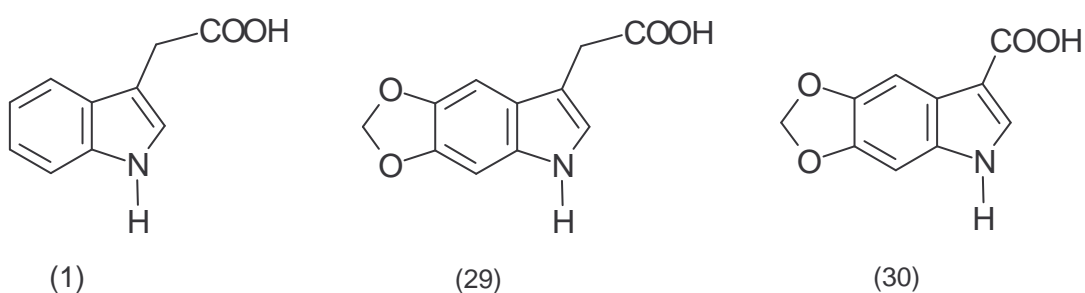
⇒ Empregar ensaios *in vitro* de promoção de crescimento radicular em sementes de *Lactuca sativa* (alface), *Cucumis sativus* (pepino) e *Raphanus sativus* (rabanete) e biotestes de pecíolos utilizando-se plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão de vagem).

.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando a síntese de compostos análogos ao ácido indol-3-il-acético (**AIA**, **1**), principal representante natural dos reguladores de crescimento vegetal, e a continuidade dos trabalhos de síntese de novos reguladores de crescimento vegetal desenvolvidos pelo grupo Síntese e Tecnologia (SINETEC) do Departamento de Química da Universidade Regional de Blumenau (FURB), buscou-se empregar metodologias clássicas e alternativas de síntese, partindo-se de compostos naturais e de baixo custo.

Assim sendo, foi utilizado o mesmo material de partida, o piperonal (derivado do safrol), empregado com sucesso nas sínteses dos ácidos 5,6-metilenodioxindol-3-il-acético (**3-AMIA**, **29**) (ROSA et al., 2003) e 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico (**3-AMIM**, **30**), (MARCHI, 2005), sintetizados recentemente e com atividade auxínica comprovada.

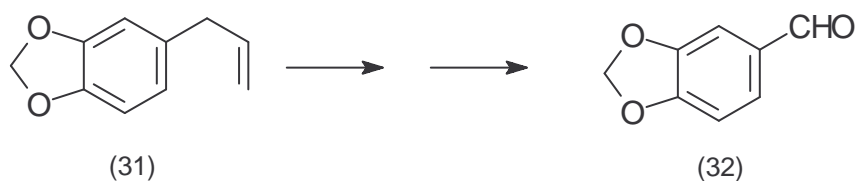


3.1 Síntese do Núcleo Metilenodioxindólico a partir do Piperonal

Dentre os principais componentes dos óleos essenciais brasileiros, o safrol (**31**), um alilbenzeno natural, pode ser considerado como um dos mais abundantes.

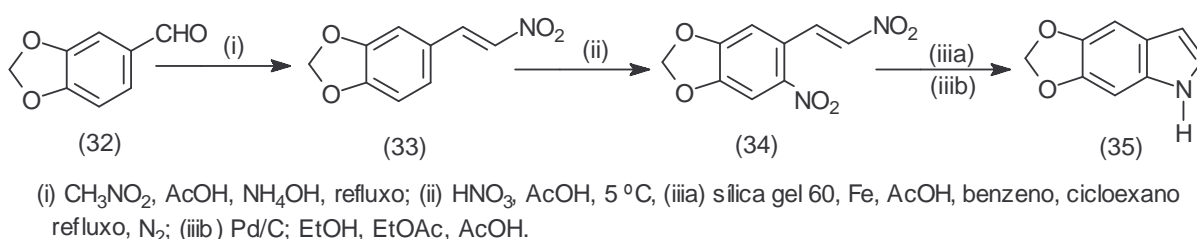
Está presente no óleo de Sassafras (*Ocotea sp*), obtido de diferentes espécies de canelas encontradas no sul do Brasil (BARREIRO e FRAGA, 1999).

O 3,4-metilenodioxibenzaldeído (**32**), derivado do safrol (**31**) conhecido como piperonal, é um composto de distribuição mais restrita e menos abundante no reino vegetal. Entretanto, pode ser obtido facilmente por isomerização da ligação dupla do safrol, seguida de oxidação e, assim sendo, torna-se um produto relativamente barato, de fácil acesso e disponível comercialmente (COSTA, 2000).



Tanto o piperonal como o safrol são intermediários importantes em síntese orgânica. Segundo Barreiro e Fraga (1999, p. 745) “a presença da unidade metilenodioxila introduz neste alilbenzeno natural e em derivados estruturalmente relacionados a ele, uma reatividade química particular”. De acordo com Costa (2000, p. 357), “quando as moléculas alvos possuem em suas estruturas anéis aromáticos contendo a porção metilenodioxibenzeno, o uso dessas substâncias como matérias primas é estrategicamente vantajoso”. A unidade metilenodioxila pode ser identificada em diversos grupos de produtos naturais biologicamente ativos como lignanas e neo-lignanas, diversos tipos de alcalóides, diversas substâncias de interesse terapêutico, como antiinflamatórios e analgésicos, e substâncias sintéticas originárias de projetos de desenvolvimento de fármacos, como os antitrombóticos (ROSA, 2002; BARREIRO e FRAGA, 1999).

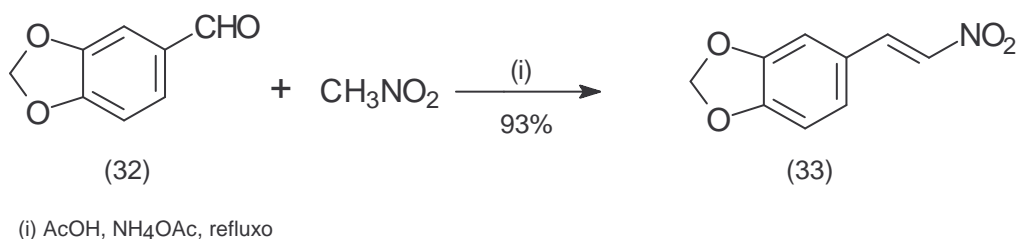
Para a preparação do núcleo 5,6-metilenodioxindólico (**35**), tendo como material de partida o piperonal (**32**), foi usada a rota sintética representada no **Esquema 6**. Essa rota, via ciclização redutiva, envolve a redução parcial do *o*, β -dinitroestireno, preparado pela condensação do piperonal com nitrometano, seguida da nitração do composto obtido (ROSA et al., 2003).



Esquema 6

Inicialmente, o 3,4-metilenodioxibenzal (**33**) foi preparado por meio de uma reação de condensação, refluxando-se o piperonal com nitrometano, em presença de ácido acético e acetato de amônio durante quatro horas (**Esquema 7**) (ROSA, 2003; CHEN-FU-YANG, 1995). O produto desejado (**33**) foi obtido em 93% de rendimento e foi utilizado na próxima etapa de síntese sem purificação prévia. Seu ponto de fusão é $159,3\text{-}160,9^\circ\text{C}$ e está de acordo com dados descritos na literatura, $159\text{-}161^\circ\text{C}$ (DALLACKER e BERNABEI, 1967; ROSA, 2002).

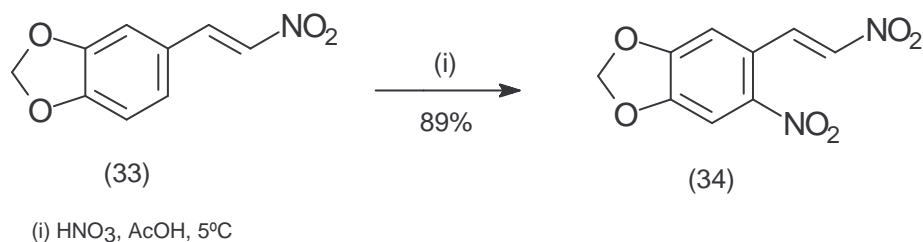
A obtenção do β -nitroestireno é de grande importância, pois análogos a ele, segundo a literatura, são precursores na construção de núcleos indólicos não substituídos na porção heterocíclica (ROSA, 2002; CADOGAN, 1986). Novellino e colaboradores (NOVELLINO et al., 1999) utilizaram esse método para a preparação do 3,4-dihidroxibenzal (**33**) a partir do 3,4-dihidroxibenzal com excelente rendimento.



Esquema 7

O espectro de IV (KBr) do **(33)** apresentou as bandas características em 1627 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{NO}$); 1367 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{NO}$); 831 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{CN}$); 1263 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{COC}$).

A preparação do *o*-nitro-3,4-metilenodioxib- β -nitroestireno (**34**) a partir do **(33)**, foi conduzida por meio de uma reação de nitração, conforme demonstrado no **Esquema 8**. Uma mistura de ácido nítrico concentrado e ácido acético glacial, resfriada a 5 °C, foi adicionada gota a gota ao composto **(33)** e agitada por três horas (ROSA, 2002). O produto foi obtido com 89% de rendimento e apresentou p.f. 120,6-121,9 °C, estando de acordo com dados descritos na literatura, 121-122 °C (DALLACKER e BERNABEI, 1967).



Esquema 8

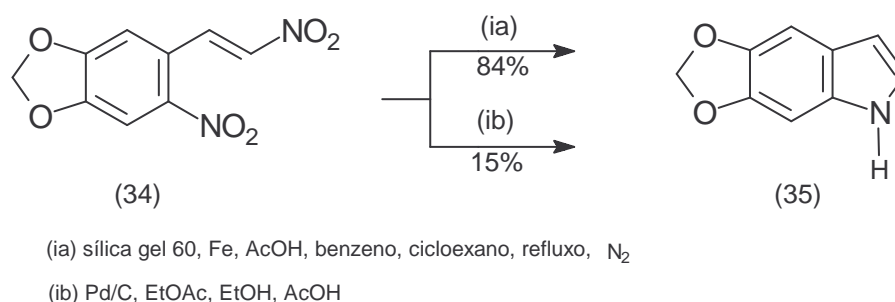
O espectro de IV (KBr) do **(34)** apresentou as bandas características em 1637 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{NO}$); 1346 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{NO}$); 840 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{CN}$); 1249 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{COC}$).

Duas estratégias sintéticas diferentes foram empregadas no intuito de preparar o núcleo 5,6-metilenodioxindólico (**35**) a partir do *o*-nitro-3,4-metilenodioxib- β -nitroestireno (**34**) (**Esquema 9**). Na primeira, o composto (**35**) foi preparado, via ciclização redutiva, de acordo com o procedimento descrito por Sinhababu e Borchardt (1983) e utilizado também por Fukuyama e colaboradores (1998), por Dallacker e Barnabei (1967) e Rosa (2002) a partir de uma mistura de (**34**), ferro em pó, sílica gel 60 para cromatografia em coluna, ácido acético glacial, cicloexano e benzeno (**Esquema 9 ia**). A mistura foi refluxada durante quatro horas, sob atmosfera de nitrogênio, com a temperatura mantida entre 65-70 °C.

Esta etapa foi repetida várias vezes em função dos baixos rendimentos obtidos. Uma das maiores dificuldades encontradas durante a realização desta etapa foi manter a agitação da mistura reacional, contendo ferro, com agitador magnético. Menos complicada, mas também problemática, foi a separação das fases orgânica e aquosa com bicarbonato e cloreto de sódio, devido a formação de emulsão. Mas, para contornar esses problemas, várias reações foram realizadas, alterando-se as condições experimentais como: diminuição das quantidades de material, purificação dos reagentes, variação da quantidade de solvente ou reagente, tempo de reação, uso de agitador mecânico e diminuição da agitação durante a separação das fases. Parte do produto foi obtido na forma de cristais e parte como um resíduo escuro viscoso, que solidificou quando resfriado. Para purificação desse sólido escuro foi usado hexano a quente, mas não se obteve sucesso, nas condições realizadas. Tentou-se a sublimação do sólido escuro com aparelho tipo “dedo frio”, mas o material fundiu, sem sublimar. Tentativas de purificação por cromatografia em coluna, utilizando-se diclorometano como eluente, também apresentaram baixos rendimentos (38%). A recristalização com benzina foi

mais eficiente e o produto, de cor cinza, foi então obtido em 84 % de rendimento, apresentando p.f 107,6-108,9 °C, estando de acordo com dados descritos na literatura, 108-110 °C (DALLACKER e BERNABEI, 1967).

Em vista das dificuldades encontradas com a ciclização reductiva, na tentativa de obter o núcleo indólico (**35**) com melhor rendimento, foi explorada, como uma metodologia alternativa, a hidrogenação catalítica. Nessa redução, o composto (**34**) foi tratado com paládio sobre carbono em uma mistura de acetato de etila e etanol na presença de ácido acético (**Esquema 9 ib**) (YANG et al., 1995; HUEBNER et al., 1953). O sólido escuro, depois de isolado, foi recristalizado com benzina, obtendo-se um sólido cinza, com rendimento de 15% e p.f. 107,6-109,7 °C, estando de acordo com dados descritos na literatura, 108-110 °C (DALLACKER e BERNABEI, 1967).



Esquema 9

O espectro de IV (KBr) do (**35**) apresentou as bandas características em 3439 cm⁻¹ (ν_{ax} NH); 1469 cm⁻¹ (ν_{an} NH); 1211 cm⁻¹ (ν_{ax} CO); 1286 cm⁻¹ (ν_{ax} COC);.

Comparando-se os resultados obtidos, apesar das dificuldades encontradas, a ciclização reductiva, descrita por Sinhababu e colaboradores, demonstrou ser mais eficiente, pois o rendimento foi maior (84%). “Segundo a literatura, nessa rota sintética a ciclização depende de uma redução parcial do nitroestireno e a aromatização ocorre pela eliminação de amônia ou hidroxilamina” (ROSA, 2002).

O 5,6-metilenodioxindol (**35**) foi obtido a partir do piperonal em três etapas com rendimento total de aproximadamente 70% (VOLLHARDT e SCHORE, 2004).

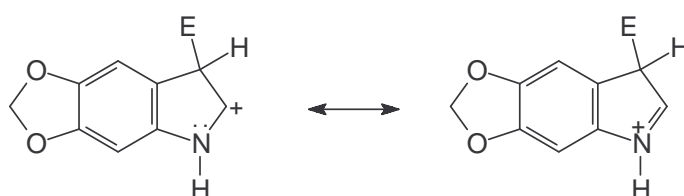
Como a sílica gel se liga fortemente a materiais polares, numa ciclização redutiva induzida por Fe/ácido acético na presença de sílica gel num sistema de solvente apolar, seria possível manter o material de partida reativo, mas relativamente apolar, na fase solvente e os intermediários polares na superfície da sílica gel, minimizando as interações entre espécies polares e apolares e também dos intermediários polares entre si (SINHABABU e BORCHARDT, 1983).

Convém ressaltar que os compostos (**33**), (**34**) e (**35**) não têm os dados das análises espectrométricas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono -13 (RMN ^{13}C), de massas e análise elementar descritos neste trabalho por já terem sido caracterizados anteriormente (ROSA, 2002).

3.2 Síntese do Núcleo Metilenodioxindólico Substituído na Posição 3 do Anel Heterocíclico:

Para Joule et al. (1995), “a química do indol é dominada pela fácil substituição eletrofílica.” Comparado com o anel benzênico, o anel heterocíclico é muito rico em elétrons e, assim sendo, o ataque por eletrófilos sempre acontece no anel de cinco membros, exceto em circunstâncias especiais. Das três posições do anel heterocíclico onde poderia ocorrer substituição, o ataque ao nitrogênio poderia destruir a aromaticidade desse anel e produzir um cátion localizado; as outras duas posições podem ser atacadas por eletrófilos, levando a produtos C-substituídos, mas há uma preferência considerável pelo ataque ao C-3 (posição β), mesmo quando há substituintes nessa posição, devido a interação do par de elétrons não

compartilhado do nitrogênio com a dupla ligação do pirrol. O intermediário mais estável do ataque ao C-3 tem a carga localizada no C adjacente ao nitrogênio e é capaz de produzir uma estabilização bem considerável pela interação com seu par de elétrons livres, conforme representado no **Esquema 10** (IRELAND, 1982; JOULE et al., 1995; KATRITZKY, e LAGOWSKY, 1968).

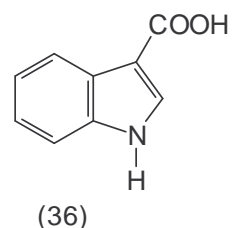
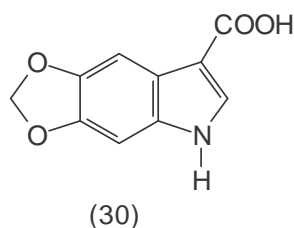


Esquema 10

Os ácidos 5,6-metilenodioxindolcarboxílicos, substituídos na posição 3 do anel heterocíclico, são compostos inéditos e podem ser considerados candidatos em potencial quanto à atuação como reguladores de crescimento vegetal, uma vez que se tem conhecimento de que seus análogos, ácidos indolcarboxílicos-3-il-substituídos, apresentam essa propriedade. Uma comprovação da atuação desses ácidos como reguladores de crescimento vegetal foi citada por Rosa (2002) através de ensaios de indução de promoção de crescimento de radículas e de enraizamento caulinar utilizando o ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-acético (**3-AMIA, 29**), sintetizado recentemente.

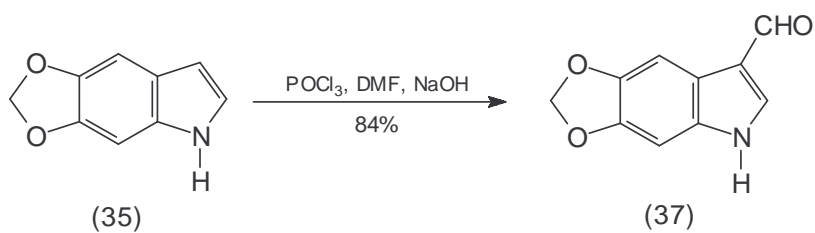
3.2.1 Proposta de Síntese do Ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico

A síntese do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico (**30**) é importante, uma vez que seu análogo, o ácido indol-3-il-metanóico (**36**), foi identificado em pinheiro e apresenta atividade reguladora de crescimento vegetal (DAVIES, 1995).



A reação de formação do 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído (**3-MIF, 37**) pelo procedimento de Vilsmeier-Haack é um exemplo de uma eficiente substituição eletrofílica na química dos indóis. Esse método baseia-se no emprego de tricloreto de fosforila e *N,N*-dimetilformamida como agente de formilação, (NEWKOME, 1982; FLAUGH et al., 1979; ALLEN et al., 1992) e foi explorado com sucesso na preparação do 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído (**37**). Este aldeído é um precursor importante na obtenção do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico (**30**) através de sua oxidação (COSTA et al., 2003).

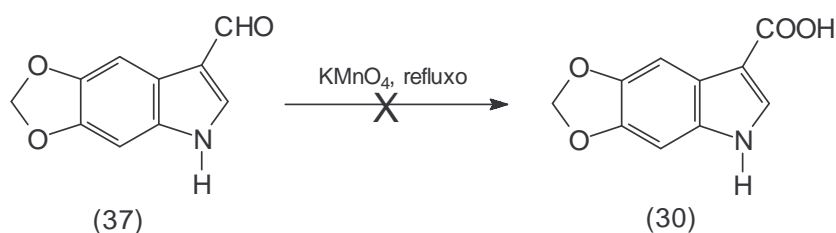
Para preparar o aldeído (**37**), uma solução do núcleo metilenodioxindólico (**35**) em *N,N*-dimetilformamida foi adicionada lentamente a uma mistura de *N,N*-dimetilformamida e tricloreto de fosforila resfriada a 10-20 °C. A mistura reacional, após agitação por duas horas e meia, foi vertida em gelo picado, filtrada e tratada com hidróxido de sódio. O sólido formado foi filtrado, lavado com água gelada e purificado por cromatografia em coluna, empregando-se como eluente uma mistura de acetato de etila e diclorometano (1:1), obtendo-se o 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído (**3-MIF, 37**) em 84% de rendimento apresentando p.f. 221,9 °C com decomposição (**Esquema 11**).



Esquema 11

O espectro de IV (KBr) do **(37)** apresentou as bandas características em 3290 cm^{-1} (ν_{ax} NH); 2875 cm^{-1} (ν_{ax} CH); 1635 cm^{-1} (ν_{ax} CO); 1264 cm^{-1} (ν_{ax} COC).

Com o objetivo de sintetizar o ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico **(30)**, várias tentativas de oxidação do **3-MIF (37)** foram realizadas utilizando-se solução aquosa de permanganato de potássio, sob agitação (**Esquema 12**) (COSTA et al., 2003; MENDER e LEE, 1981; SHRINER e KLEIDERER, 1943). Como não se obteve sucesso neste procedimento, adicionou-se gotas de ácido sulfúrico ao meio reacional. Esta modificação também foi realizada sem sucesso.



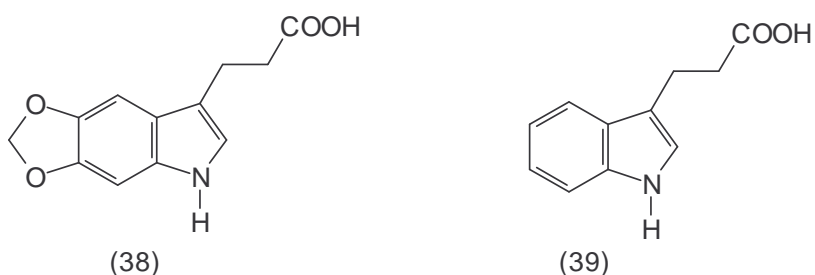
Esquema 12

Como outras tentativas semelhantes a essa já haviam sido realizadas sem sucesso (ROSA, 2002), cogitou-se em proteger o grupo amino do 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído, antes de submeter o composto a reação de oxidação. Devido a falta de reagentes necessários para as rotas sintéticas descritas na literatura (ALLEN et al., 1992) para proteção do Nitrogênio do núcleo indólico, nenhuma reação nesse sentido foi realizada até o presente momento. Os estudos deverão ser retomados, priorizando a otimização dos métodos empregados e/ou buscando novas alternativas para a obtenção do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico **(30)**.

O composto foi obtido, recentemente, com sucesso por Marchi (2005), empregando-se uma rota sintética via oxima.

3.2.2 Síntese do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-propiónico (38)

A síntese do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-propiónico (**38**) é de grande importância, uma vez que seu análogo, o ácido indol-3-il-propiónico (**39**) apresenta atividade reguladora de crescimento vegetal (DAVIES, 1999; VALIO, 1986).

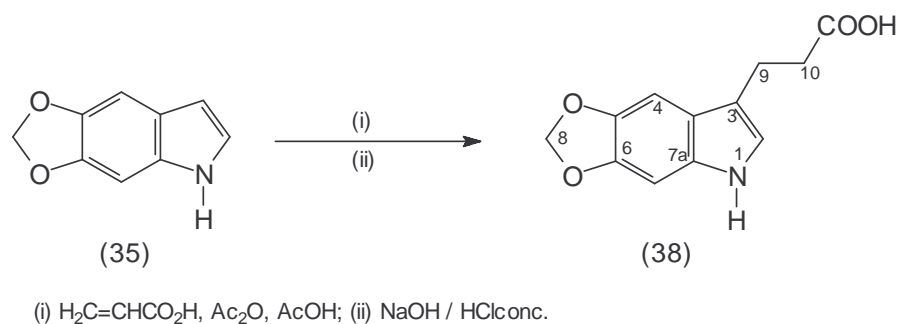


A preparação do ácido (**38**) baseia-se na reação entre o núcleo 5,6-metilenodioxindólico (**35**), em ácido acético e ácido acrílico na presença de anidrido acético (ROSA, 2002; JOHNSON e CROSBY, 1960). A mistura foi aquecida a 95°C durante cinco horas, formando um líquido escuro viscoso. A esse líquido foi adicionada uma solução aquosa de hidróxido de sódio, até pH básico, formando um sólido que foi removido por filtração a vácuo. O filtrado foi então acidificado até pH 3 com ácido clorídrico concentrado, produzindo um sólido escuro com rendimento bruto de 94% (**Esquema 13**).

Convém salientar que o ácido (**38**) foi obtido após a otimização das condições reacionais. Depois de um longo período de trabalho, em que foram enfrentadas dificuldades na purificação do produto devido a produção de um resíduo viscoso e grudento, conseguiu-se isolar o produto com bom rendimento. Para contornar o problema, a reação foi repetida muitas vezes, alterando-se as condições experimentais, como: purificação dos reagentes, variação na proporção entre os

reagentes, tempo de reação, temperatura, ordem de adição dos reagentes, temperatura durante a adição dos reagentes e pH do meio reacional.

A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada e os resultados demonstraram que o 5,6-metilenodioxindol foi totalmente consumido durante o processo reacional. Tentativas de recristalização utilizando como solventes o benzeno, clorofórmio, água destilada, acetona, diclorometano, acetato de etila, metanol e acetonitrila, foram realizadas sem sucesso. Os testes de solubilidade foram repetidos, variando-se as quantidades de solvente e temperatura. Numa outra tentativa de purificação, o composto foi submetido a refluxo brando com água destilada, obtendo-se o ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-propiónico (**38**) puro, por recristalização, com 21% de rendimento e apresentando p.f. 213,6 °C com decomposição. Numa outra tentativa de purificação, o composto foi submetido a uma coluna cromatográfica “*flash*”, utilizando-se, inicialmente, acetato de etila como eluente e, em seguida, uma mistura de acetato de etila-metanol (19:1), obtendo-se o composto puro com 25% de rendimento e p.f. 213,6 °C, com decomposição.



Esquema 13

O composto (**38**) foi caracterizado por análises espectroscópicas no IV e espectrométricas de RMN de ^1H e de ^{13}C .

A análise no IV (KBr) (Espectro 1 - anexos) resultou em um espectro com bandas características em 3261 cm^{-1} (ν_s NH); 2930 cm^{-1} (ν_{ax} OH); 1739 cm^{-1} (ν_{ax} C=O); 1463 cm^{-1} (ν_{ax} C-OH); 1296 (ν_{as} COC); 1031 cm^{-1} (ν_s COC).

O espectro de RMN de ^1H em DMSO d_6 (Espectro 2 - anexos) apresentou sinais em 2,55 ppm um tripleto de integração dois prótons atribuído aos hidrogênios do grupo metileno (-CH₂-) ligado à carboxila na cadeia lateral, em 2,78 ppm um tripleto de integração dois prótons atribuído aos hidrogênios do grupo metileno (-CH₂-) benzílico, em 3,40 ppm um singleto de integração um próton atribuído ao hidrogênio do grupo amino (-NH) do anel heterocíclico, em 6,03 ppm um singleto de integração dois prótons atribuído aos hidrogênios do grupo metilenodioxí (-O-CH₂-O-), 7,08 ppm um singleto de integração um próton atribuído ao H-4 do anel benzênico e um singleto de integração dois prótons atribuído ao H-7 do anel benzênico; em 7,36 ppm um singleto de integração um próton atribuído ao H-2 do anel heterocíclico, e em aproximadamente 12,2 ppm um singleto de integração um próton atribuído ao hidrogênio da hidroxila do grupo carboxílico (COOH).

O espectro de RMN de ^{13}C em DMSO d_6 (Espectro 3 - anexos) apresentou doze sinais na região de 33,84 a 174, 75 ppm. Em 33,84 ppm um sinal relativo ao grupo metileno (-CH₂-, C-10) da cadeia lateral, em 34,92 ppm um sinal relativo ao grupo metileno (-CH₂-, C-9) da cadeia lateral, em 94,85 ppm um sinal relativo ao C-7 do anel benzênico, em 99,41 ppm um sinal relativo ao C-4 do anel benzênico, em 101,74 ppm um sinal relativo ao carbono do grupo metilenodioxí (-OCH₂O-, C-8), 111,98 ppm um sinal relativo ao carbono quaternário C-3 do heterociclo, em 124,37 ppm um sinal relativo ao carbono quaternário C-4a do anel benzênico, em 129,83 ppm um sinal relativo ao C-2 do anel heterocíclico, em 139,97 ppm um sinal relativo ao carbono quaternário C-7a do anel benzênico, em 145,08 ppm um sinal relativo ao

carbono quaternário C-6 do anel benzênico, em 145,43 ppm um sinal relativo ao carbono quaternário C-5 do anel benzênico, em 174,75 ppm um sinal relativo ao carbono da carboxila do grupo funcional (-CO₂H).

3.3 Avaliação de Atividade Reguladora de Crescimento Vegetal

A importância dos reguladores de crescimento vegetal na produção agrícola já era sentida mesmo antes da identificação dos hormônios vegetais. De acordo com Gianfagna (1995, p. 753), “enquanto o mecanismo bioquímico de ação dos reguladores de crescimento vegetal não for bem conhecido, é possível classificar compostos com base na semelhança da ação com hormônios vegetais de ocorrência natural”.

3.3.1 Promoção do Crescimento de Radículas

A avaliação do crescimento de radículas, baseia-se na medida do comprimento das radículas e foi realizada, através de ensaios biológicos “*in vitro*”, com sementes de *Lactuca sativa* (alface crespa), de *Cucumis sativus* (pepino) e de *Raphanus sativus* (rabanete).

Os testes foram realizados utilizando-se o **3-MIF (37)** e foram repetidos duas vezes com cada tipo de semente e os dados referentes ao seu efeito estão apresentados nas figuras a seguir.

Conforme apresentado na **Figura 10**, o **3-MIF** não apresentou diferença estatística significativa nas diferentes concentrações no teste realizado em sementes de *Lactuca sativa* (alface). Praticamente todos os tratamentos apresentaram

algumas raízes necrosadas, provavelmente devido a falta de umidade nos discos de papel filtro utilizados como suporte para as sementes. A concentração 10^{-6} M apresentou a maior média entre os tratamentos, 16,90 mm de comprimento, já a concentração de 10^{-3} M, a menor média, 7,25 mm de comprimento radicular.

Comparando esses resultados com o **AIA**, utilizado como padrão nas mesmas concentrações, (**Figura 11**), pode-se considerar que o **3-MIF** apresentou atividade similar.

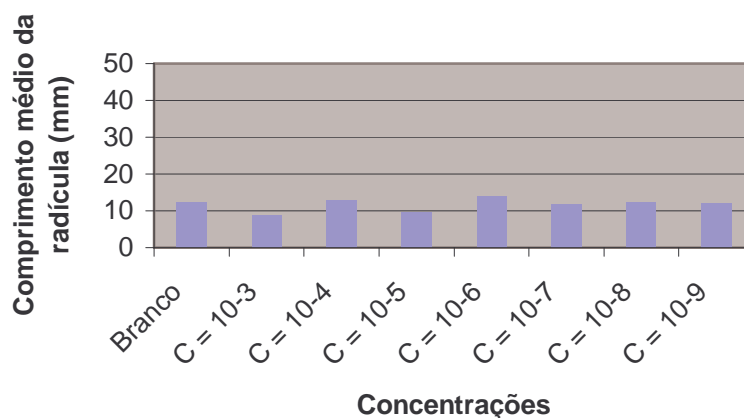


Figura 10 – Efeito do composto **3-MIF** no crescimento radicular de *Lactuca sativa*.

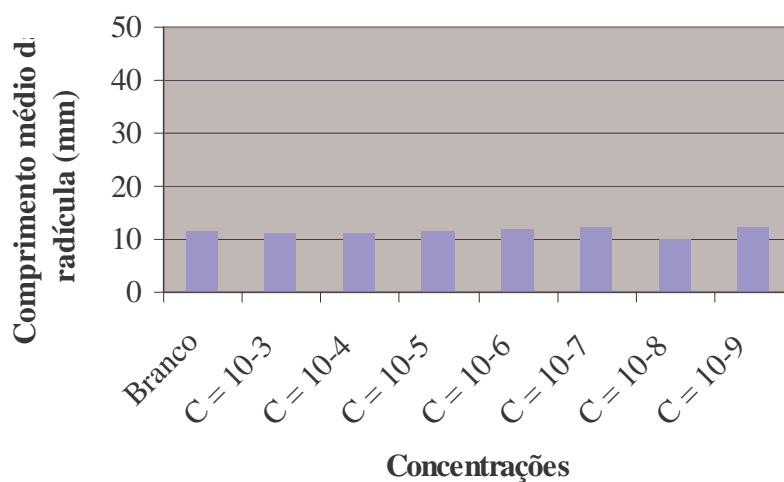


Figura 11 – Efeito do composto **AIA** no crescimento radicular de *Lactuca sativa*.

As **Figuras 12 e 13** apresentam os resultados do efeito do **3-MIF (37)** e **AIA (1)**, respectivamente, no crescimento radicular de *Cucumis sativus* (pepino).

Em sementes de *Cucumis sativus*, o composto **3-MIF (37)** também não apresentou diferença estatística significativa, nas concentrações testadas, quando comparado ao hormônio de crescimento **AIA (1)**, apesar de que em todas as concentrações (10^{-3} a 10^{-9} M) foi verificada estimulação no crescimento radicular, quando comparado ao ensaio controle (branco). Já a atividade do AIA foi condizente com a literatura, sendo que na concentração de 10^{-3} M inibiu o crescimento radicular e nas concentrações mais baixas estimulou.

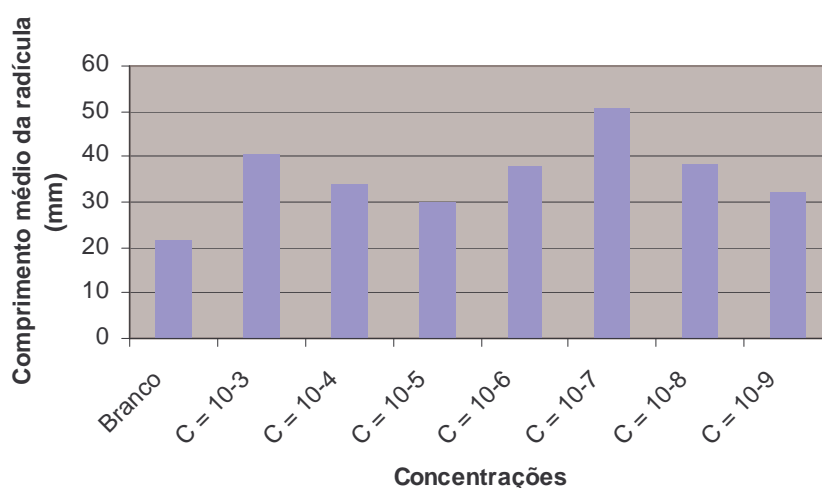


Figura 12 – Efeito do composto **3-MIF** no crescimento radicular de *Cucumis sativus* .

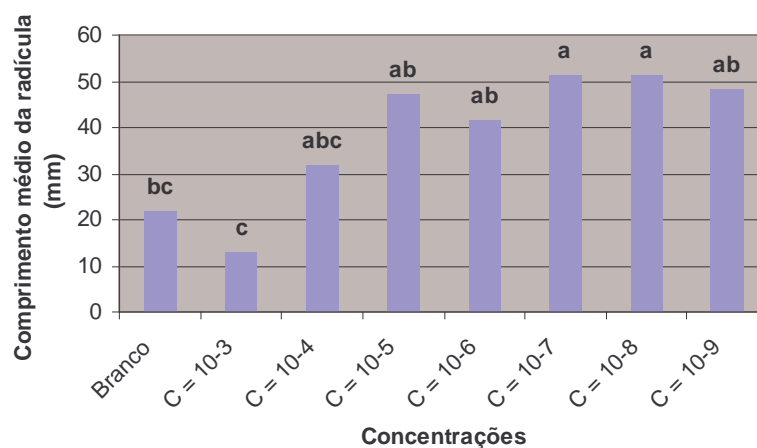


Figura 13 – Efeito do composto **AIA** no crescimento radicular de *Cucumis sativus*.

Os resultados do teste em sementes de *Raphanus sativus* (rabanete) estão representados nas **Figuras 14 e 15**.

O composto **3-MIF (37)** apresentou diferença estatística significativa nas concentrações empregadas no teste com sementes de *Raphanus sativus*. Observou-se que as concentrações 10^{-3} M (18,35 mm) e 10^{-4} M (18,50 mm) inibiram o crescimento radicular enquanto as demais concentrações foram mais efetivas no crescimento radicular do que o ensaio controle (branco), com exceção da concentração de 10^{-6} M.

Estes dados estão condizentes com os encontrados na literatura (DAVIES, 1995; DEVLIN, 1970) sendo que em altas concentrações os reguladores inibem o crescimento agindo como herbicidas e em concentrações mais baixas estimulam o crescimento de raízes agindo, assim, como composto auxínico.

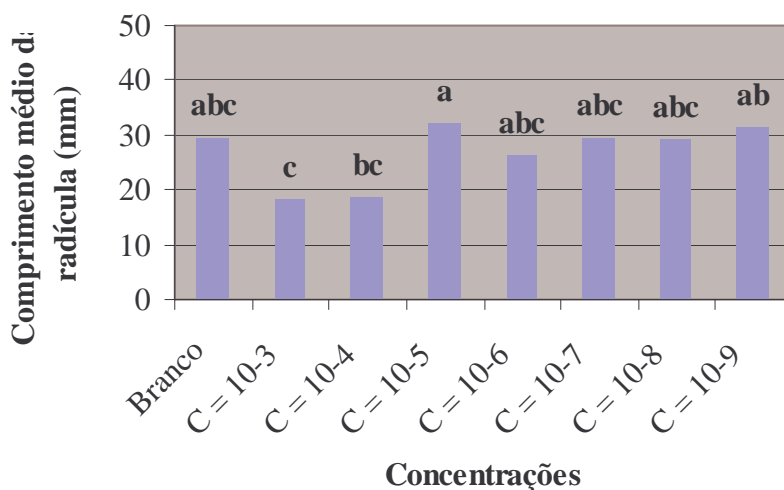


Figura 14 – Efeito do composto **3-MIF** no crescimento radicular de *Raphanus sativus*.

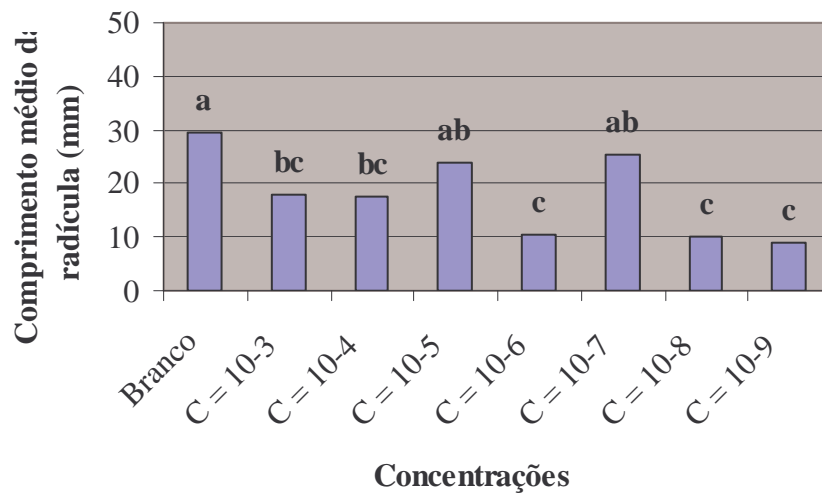


Figura 15 – Efeito do composto **AIA** no crescimento radicular de *Raphanus sativus*.

3.3.2 Bioteste de Pecíolos

O bioteste de pecíolos, descrito por Ferri e Camargo, em 1950, baseia-se na determinação da porcentagem de variação do ângulo compreendido entre os lados internos dos pecíolos. Trata-se de um teste de execução simples, empregando-se material de fácil obtenção, específico para auxinas. (VALIO, 1986)

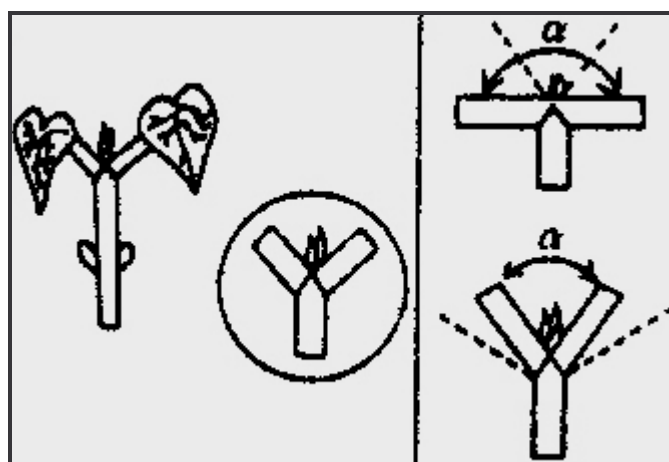


Figura 16 – Bioteste do pecíolo: na ausência de auxinas, o ângulo final é maior que o inicial; na presença de auxinas, o ângulo final é menor. (VALIO, 1986, p. 44)

O teste foi realizado “*in vitro*”, utilizando-se plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão de vagem). O composto **3-MIF (37)** foi avaliado nas concentrações 25, 50 e 100 ppm. O composto **2,4-D**, utilizado como padrão, foi empregado nas mesmas concentrações, sendo as soluções preparadas de acordo com o procedimento descrito na parte experimental. Na **Figura 17** é possível observar que o **3-MIF** foi mais efetivo no fechamento dos ângulos entre os pecíolos na concentração de 50 ppm. Os resultados observados para o **3-MIF** demonstram que este composto foi tão ativo quanto o **2,4-D (Figura 18)**, utilizado como padrão; embora o **2,4-D** na concentração de 100 ppm foi mais efetivo no fechamento dos ângulos internos entre os pecíolos.

Estes resultados indicam que o **3-MIF** apresenta expressiva atividade reguladora de crescimento vegetal como auxina, uma vez que o bioteste de pecíolos é um ensaio específico para avaliar atividade auxínica.

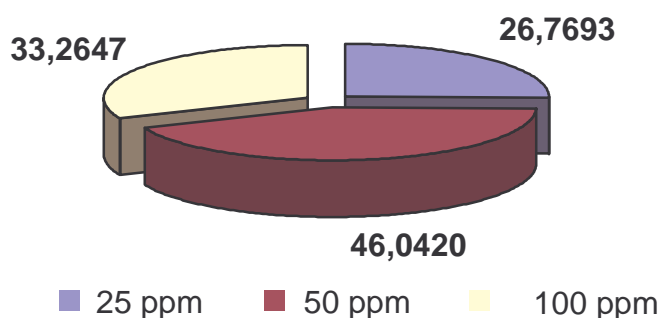


Figura 17 – Efeito do composto **3-MIF** em porcentagem no fechamento dos ângulos internos de peças em “Y” com plantas de *Phaseolus vulgaris*.

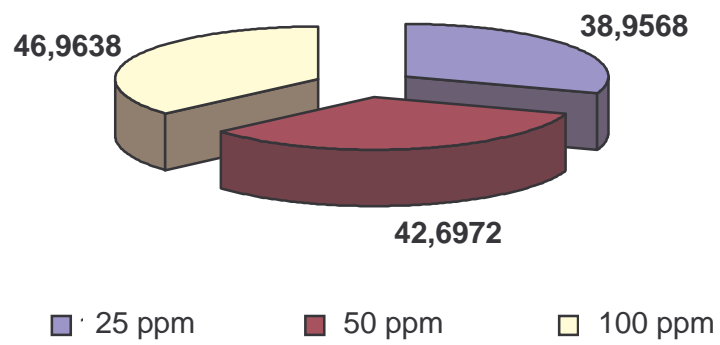


Figura 18 – Efeito do composto **2,4-D** em porcentagem no fechamento dos ângulos internos de peças em “Y” com plantas de *Phaseolus vulgaris*.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Técnicas de Caracterização

As reações foram acompanhadas empregando-se a técnica de cromatografia em camada delgada, utilizando-se como suporte sílica gel 60GF₂₅₄ com os compostos visualizados por irradiação UV (254 nm). Esta técnica foi utilizada também para avaliar o grau de pureza dos reagentes e produtos.

Alguns compostos foram purificados pela técnica de cromatografia em coluna, utilizando-se como suporte sílica gel 70-230 mesh e diferentes eluentes (diclorometano, acetato de etila, ou mistura dos dois), conforme indicado nos procedimentos.

As medidas de ponto de fusão foram efetuadas em aparelho de chapa quente tipo Koffler (MicroQuímica APF-301) e não foram corrigidas.

Além da cromatografia em camada delgada e do ponto de fusão, os compostos foram analisados no Infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono (RMN ¹³C), análise elementar e massas.

As análises por espectrometria no infravermelho foram realizadas em aparelho Shimadzu modelo IR Prestige – 21/FT-IR, empregando-se pastilhas de KBr.

As análises espectroscópicas de RMN ¹H e RMN ¹³C foram realizadas em espectrômetros Brucker de 400 e 200 MHz. Os deslocamentos químicos são dados em partes por milhão (ppm), utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

4.2 Reagentes Químicos

As substâncias químicas utilizadas foram de pureza analítica e de procedência Aldrich, Merck, Sigma, Vetec e Carlo Erba.

Os reagentes de partida utilizados foram: 3,4-metilenodioxibenzaldeído (piperonal), nitrometano, bromoacetato de etila, *N,N*-dimetilformamida, ácido acrílico, anidrido acético, anidrido maleico.

Os solventes orgânicos utilizados foram: diclorometano, benzeno, cicloexano, etanol, acetato de etila, éter etílico, metanol, xileno, benzina de petróleo, clorofórmio.

Os reagentes inorgânicos utilizados: bicarbonato de sódio, pirossulfito de sódio, cloreto de sódio, hidróxido de sódio, tricloreto de fosforila, acetato de amônio, permanganato de potássio, ferro em pó, ácidos: acético, clorídrico, nítrico e sulfúrico e o agente dessecante sulfato de magnésio.

4.3 Procedimentos

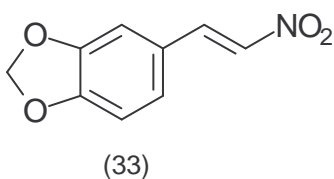
4.3.1 Síntese do Núcleo Metilenodioxindólico

Para a ciclização, na síntese do 5,6-metilenodioxindol (**35**), foram utilizadas duas rotas sintéticas: ciclização reductiva e hidrogenação catalítica.

3,4-metilenodioxi- β -nitroestireno (33)

Uma mistura de piperonal (10 g, 0,066 mol) , acetato de amônio (13,93 g, 0,18 mol), nitrometano (11 mL), e ácido acético (200 mL) foi submetida a refluxo

por 4 horas, em banho de óleo à temperatura de aproximadamente 110°C. Posteriormente foi resfriada à temperatura ambiente, vertida em água gelada e, em seguida, filtrada sob vácuo. O sólido amarelo claro obtido foi lavado com água gelada e secado em estufa a vácuo, sem aquecimento e o composto foi obtido com 93% de rendimento.

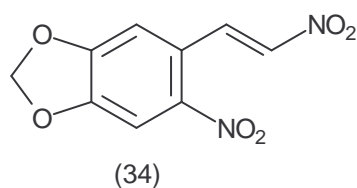


p.f: 159,3 – 160,9 °C (Lit.: 159 – 161 °C).

IV (KBr) (ν_{\max} / cm^{-1}): 1627 cm^{-1} (ν_{as} NO); 1367 cm^{-1} (ν_{s} NO); 831 cm^{-1} (ν_{s} CN); 1263 cm^{-1} (ν_{s} COC).

***o*-nitro-3,4-metilenodioxib-nitroestireno (34)**

Uma mistura de ácido nítrico concentrado (35,3 mL) e ácido acético glacial (26,5 mL) foi resfriada a 5 °C e, em seguida, adicionada gota a gota, sob agitação, em um erlenmeyer, em banho de gelo, contendo 3,4-metilenodioxib-nitroestireno (10g, 0,051 mol). Terminada a adição da solução nitrante, a mistura permaneceu em banho de gelo e agitação por mais 25 min. Retirado o banho de gelo, a mistura continuou sob agitação até completar 3 horas totais. Foi então vertida em água gelada e o sólido formado submetido a filtração sob vácuo. O sólido amarelo foi lavado com água gelada até neutralização e secado em estufa a vácuo, sem aquecimento. O composto foi obtido em 89 % de rendimento.



p.f : 120,6–121,9 °C (Lit. : 121–122 °C).

IV (KBr) ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 1637 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{NO}$); 1346 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{NO}$); 840 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{CN}$); 1249 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{COC}$).

5,6-metilenodioxindol (35)

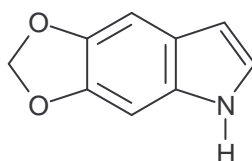
5,6-metilenodioxindol (via Ciclização Redutiva)

Uma mistura de *o*-nitro-3,4-metilenodioxi- β -nitroestireno (5 g, 0,021 mol), ferro em pó (18,085 g, 0,32 mol), sílica-gel (21,276 g), ácido acético (127,7 mL), cicloexano (159,6 mL) e benzeno (53,2 mL), foi refluxada por 4 horas em banho de óleo como fonte de aquecimento, sob atmosfera de nitrogênio. A temperatura foi mantida entre 65–70 °C. O processo de reação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada para verificar a formação do produto. A mistura escura foi resfriada à temperatura ambiente, diluída em diclorometano e filtrada sob vácuo. O sólido foi lavado com uma solução de éter etílico 10% em diclorometano. O sólido foi reservado e o filtrado, contendo a fase orgânica, foi lavado primeiramente com uma solução aquosa 10% de pirossulfito de sódio (2 vezes de 50 mL cada) e, em seguida com solução aquosa de bicarbonato de sódio (20%) e de cloreto de sódio (20%) (também 2 vezes de 50 mL cada). A fase orgânica obtida nessas extrações foi tratada com sulfato de magnésio anidro e filtrada. O solvente foi então removido em

evaporador rotatório, a 40 °C. Para recristalização foram usados, primeiramente, hexano, e depois benzina de petróleo. Parte do produto foi obtido na forma de cristais e parte como um resíduo sólido oleoso. O resíduo foi purificado através de cromatografia em coluna, usando-se diclorometano como eluente. O composto foi obtido em 84% de rendimento e **p.f.** 107,6 – 108,9 °C (Literatura: 107 – 108 °C).

5,6-metilenodioxindol (via Hidrogenação Catalítica)

Esta reação foi realizada utilizando-se *o*-nitro-3,4-metilenodioxi- β -nitroestireno (3,20 g, 0,013 mol), uma mistura de solventes: acetato de etila (36 mL), etanol (4mL), ácido acético (4,5 mL) e, como catalisador, Pd/C (320 mg) que foi adicionado aos poucos e cuidadosamente. A reação foi realizada a uma pressão de 49 p.s.i., por 45 min. A mistura, de cor verde bem escura, foi submetida a filtração sob vácuo para remover o catalisador. O filtrado foi lavado com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio (3,2 g em 12 mL de água). A fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro e o solvente removido em evaporador rotatório, obtendo-se um resíduo escuro e oleoso. Adicionou-se mais acetato de etila e novamente solução aquosa de bicarbonato de sódio (3,2 g em 12 mL de água). Para separar as fases aquosa e orgânica foi usado funil de separação. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório e o sólido foi recristalizado em benzina de petróleo. Obteve-se um sólido cinza, com rendimento de 15 %.



(35)

p.f : 107,6–109,7 °C (Lit.:108-110 °C).

IV (KBr) (ν_{\max} / cm^{-1}): 3439 cm^{-1} (ν_{ax} NH); 1469 cm^{-1} (ν_{an} NH); 1211 cm^{-1} (ν_{ax} CO); 1286 cm^{-1} (ν_{ax} COC).

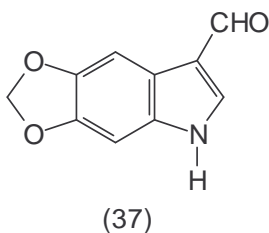
4.3.2 Síntese do Núcleo Metilenodioxindólico Substituído na Posição 3 do Anel Heterocíclico:

4.3.2.1 Proposta de Síntese do Ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico

5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído (37)

A *N,N*-dimetilformamida (2 mL) foi resfriada à temperatura entre 10 e 20 °C e tratada, gota a gota, com tricloreto de fosforila (0,6 mL). Após 15 min, foi adicionada lentamente uma mistura de 5,6-metilenodioxindol (0,9 g, 0,0055 mol) dissolvido em *N,N*-dimetilformamida (0,5 mL), mantendo-se a temperatura entre 20 e 30 °C. A mistura reacional foi então agitada por 2 h 30 min e vertida em gelo picado. A solução resultante foi tratada lentamente com metade do volume (2,7mL) de uma solução de hidróxido de sódio (1,124 g , 28 mmol) em água destilada (5,4 mL). O restante dessa solução alcalina foi adicionado de uma só vez. O sólido formado foi isolado por filtração sob vácuo, lavado com água gelada e secado em estufa sob vácuo, sem aquecimento.

O produto foi purificado por cromatografia em coluna, tendo como eluente uma mistura de acetato de etila e diclorometano (1:1), e obtido com 84% de rendimento.

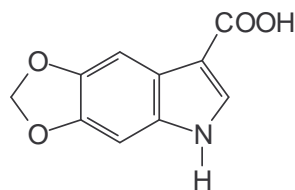


p.f. 221,9 °C com decomposição (p.f._(literatura): 222,2 °C com decomposição).

IV (KBr) (ν_{\max} / cm^{-1}): 3290 cm^{-1} (ν_{ax} NH); 2875 cm^{-1} (ν_{ax} CH); 1635 cm^{-1} (ν_{ax} CO); 1264 cm^{-1} (ν_{ax} COC).

Tentativas de oxidação do 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído

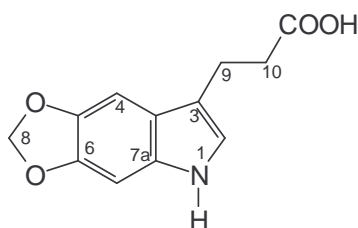
Em um balão de duas bocas, de 25 mL, foram colocados 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído (0,10 g, 0,0052 mol) e água destilada (2,0 mL). O frasco foi adaptado a um condensador reto e aquecido em banho de óleo, sob agitação. Quando a temperatura atingiu 75 °C, foi gotejada lentamente uma solução aquosa de permanganato de potássio (0,13 g, 0,008 mol em 2,6 mL de água). A mistura resultante continuou sob agitação por mais uma hora, com a temperatura mantida entre 70-80 °C. Análise por cromatografia em camada delgada, utilizando-se acetato de etila como eluente, demonstrou que o aldeído não tinha reagido. Foi então acrescentado ácido sulfúrico (2 gotas) mas, uma nova análise de ccd, mostrou que a tentativa fracassou, não conduzindo ao produto desejado, recuperando-se então 28 % do aldeído de partida. Outras tentativas de oxidação foram realizadas sem sucesso.



(30)

4.3.2.2 Ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-propiónico

Uma mistura de 5,6-metilenodioxindol (0,10 g, 0,006 mol) em ácido acético glacial (0,3 mL), contendo anidrido acético (0,13 mL) e ácido acrílico (0,10 ml) foi agitada a 95 °C, durante 5 horas. A mistura foi deixada em repouso durante a noite, à temperatura ambiente e, posteriormente, foi adicionada uma solução aquosa de hidróxido de sódio 3M (0,6 mL), até pH básico, e agitado. A mistura foi resfriada e o material insolúvel foi removido por filtração e lavado com água destilada gelada. Ao filtrado foi adicionado ácido clorídrico concentrado (0,5 mL) até pH 3. O sólido escuro formado foi isolado por filtração sob vácuo e lavado com água, obtendo-se 94 % de rendimento bruto. O produto purificado por cromatografia em coluna flash, foi obtido com 21% de rendimento.



(38)

p.f : 213,6 °C com decomposição.

IV (KBr) (v_{\max}/cm^{-1}): 3261 cm^{-1} (v_s NH); 2930 cm^{-1} (v_{ax} OH); 1739 cm^{-1} (v_{ax} C=O); 1463 cm^{-1} (v_{ax} C-OH); 1296 cm^{-1} (v_{as} COC); 1031 cm^{-1} (v_s COC).

RMN ¹H (400MHz, DMSO *d*₆) δ 2,55 (t, 2H, H-10); 2,78 (t, 2H, H-9); ~3,4 (s, 1H, NH); 6,03 (s, 2H, H-8); 7,08 (s, 1H, H-4); 7,08 (s, 1H, H-7); 7,36 (s, 1H, H-2) e ~12,2 (s, 1H, OH).

RMN de ¹³C (400 MHz, DMSO *d*₆) δ 33,84 (-CH₂-, C-10); 34,92 (-CH₂-, C-9); 94,85 (CH, C-7); 99,41 (CH, C-4); 101,98 (CH₂, C-8); 124,37 (C₀, C-3); 129,83 (C₀, C-4a); 129,83 (CH, C-2); 139,97 (C₀, C-7a); 145,08 (C₀, C-6); 145,43 (C₀, C-5); 174, 75 (CO₂, CO₂H).

4. 4 Avaliação da Atividade Reguladora de Crescimento Vegetal

Os testes realizados são específicos para determinação de atividade reguladora de crescimento vegetal de auxinas.

Os testes empregados na avaliação da atividade reguladora de crescimento vegetal do 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído (**3-MIF**, **37**) foram realizados através de ensaios biológicos “*in vitro*” utilizando-se câmara de germinação.

4.4.1 Promoção de Crescimento de Radículas

Para avaliar o desenvolvimento de radículas foram preparadas soluções do 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído (**3-MIF**, **37**) em acetona nas concentrações de 10⁻³ a 10⁻⁹ M e utilizadas sementes de *Lactuca sativa* variedade Grand Rapids (alface crespa), de *Cucumis sativus* (pepino) e de *Raphanus sativus* (rabanete). Os ensaios foram realizados em placas de Petri esterilizadas. Foram preparadas placas para cada uma das concentrações e, em todas, foram colocados quatro discos de papel de filtro contendo 1mL de solução, sendo o solvente evaporado antes da adição de 1,5 mL de Tween 80 (0,01%). Em cada disco foram colocadas 50

sementes, num total de 200 sementes por placa para os ensaios com alface e 20 sementes, num total de 80 sementes nos testes com pepino e rabanete. As sementes, antes de serem inoculadas, foram submetidas a um processo de assepsia em hipoclorito de sódio 40%, etanol 70% e água destilada. As placas, distribuídas ao acaso, foram incubadas em câmara de germinação durante cinco dias, com a temperatura controlada a 25 ± 2 °C e foto período de 16 h/luz. O número de sementes germinadas foi controlado diariamente e a coleta de dados determinando os comprimentos das radículas em milímetros foi realizada no quinto dia após a inoculação das sementes. Como controle foi utilizado ensaio similar, empregando-se apenas acetona. Como padrão, foi utilizado o **AIA**, nas mesmas concentrações. Os dados foram tratados estatisticamente utilizando-se o teste de Tuckey (VarPC).

A **figura 19** apresenta um esquema do procedimento para a avaliação da atividade reguladora de crescimento de radículas.

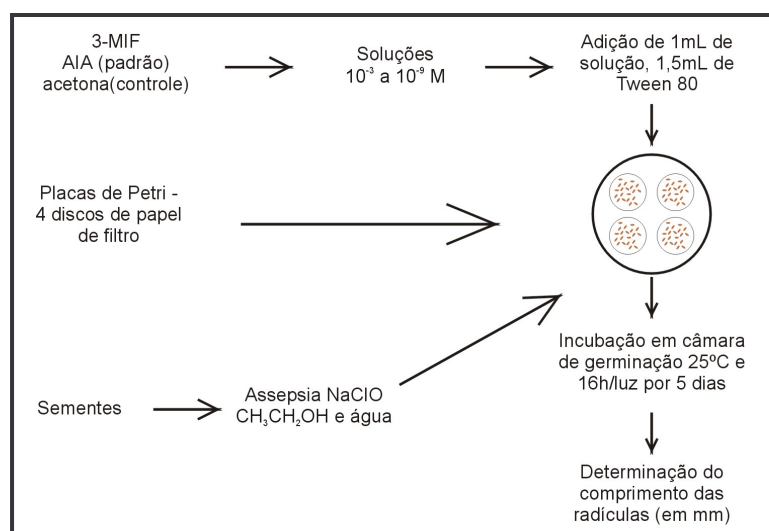


Figura 19 - Esquema do procedimento para avaliação da atividade reguladora de crescimento vegetal

4.4.2 Bioteste de Pecíolos em *Phaseolus vulgaris*

O bioteste de pecíolos foi realizado com plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão de vagem) em soluções de 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído (**3-MIF**, **37**) em acetona/água nas concentrações de 25, 50 e 100 ppm, tendo como controle o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (**2,4-D**, **20**) nas mesmas concentrações. No preparo de cada solução foram utilizados 5 mL de acetona, devido a baixa solubilidade do **3-MIF** em água. O mesmo procedimento foi realizado com as soluções do padrão **2,4-D**, mesmo ele sendo solúvel em água. As sementes de *Phaseolus vulgaris* foram inoculadas em placas de Petri sobre discos de papel de filtro umedecidos com água destilada. As placas foram levadas para uma câmara de germinação com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h/luz por 4 dias. As sementes germinadas foram então transplantadas para vasos de polietileno, utilizando terra orgânica misturada com cascas de arroz como substrato. As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante 10 a 15 dias, com umidade e ventilação controladas.

Após esse período, as plantas tiveram os caules cortados próximos ao ponto de inserção dos pecíolos das folhas primárias e as lâminas foliares retiradas. Assim, foram obtidas peças em forma de Y, com aproximadamente 1 cm de cada lado. Cada peça teve seu contorno traçado, e então foram medidos os ângulos internos entre os pecíolos. As peças foram colocadas individualmente em placas de Petri numeradas, contendo 5 mL de solução conforme os tratamentos: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (**2,4-D**) e 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído (**3-MIF**). As placas foram mantidas em câmara de germinação com temperatura controlada a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h/luz por 24 horas, sendo distribuídas ao acaso.

Após esse período, foi desenhado o contorno de cada peça, medidos os ângulos entre os pecíolos e determinada a porcentagem de variação em relação à média dos ângulos iniciais para cada tratamento.

A **figura 20** apresenta um esquema do procedimento para o bioteste de pecíolos.

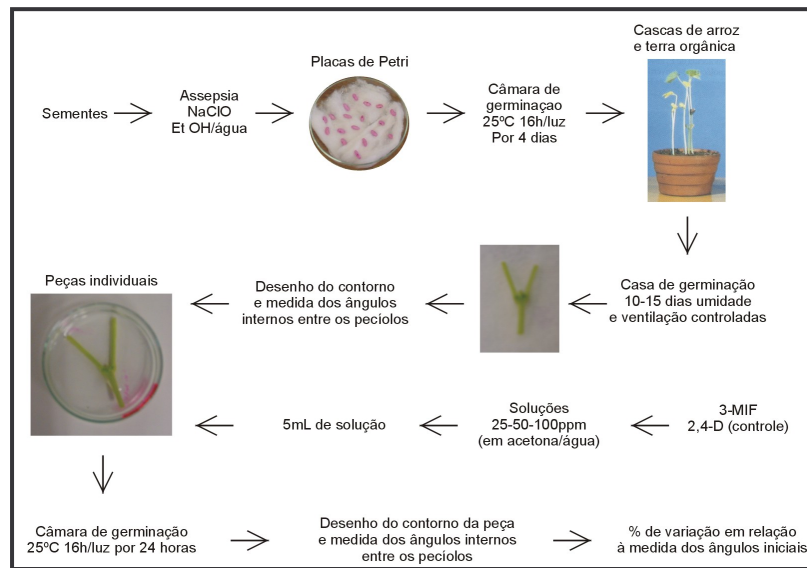


Figura 20 - Esquema do procedimento do bioteste de pecíolos.

5. CONCLUSÕES

O núcleo metilenodioxindólico foi obtido com sucesso, em bons rendimentos, empregando-se a metodologia via ciclização reductiva, que demonstrou ser mais eficiente que a hidrogenação catalítica.

As tentativas de oxidação realizadas para a obtenção do ácido 5,6-metilenodioxi-indol-3-il-metanóico, mesmo sendo procedimentos clássicos, não tiveram sucesso.

A estratégia sintética utilizada para obtenção do ácido 5,6-metilenodioxi-indol-3-il-propiónico foi empregada com sucesso.

O ácido 5,6-metilenodioxi-indol-3-il-propiónico é um composto inédito e pode ser considerado candidato em potencial quanto a atuação como regulador de crescimento vegetal, uma vez que se tem conhecimento de que seu análogo, o ácido indol-3-il-propiónico, é considerado um hormônio vegetal.

Quanto à atividade biológica, os ensaios para verificar a promoção de crescimento de radículas foram realizados apenas com o precursor 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído (**3-MIF**). Comparados com o ensaio controle, os resultados obtidos com sementes de alface não apresentaram diferença estatística significativa em todas as concentrações empregadas. O mesmo aconteceu quando testado em sementes de pepino, embora foi verificada estimulação no crescimento radicular, quando comparado com o ensaio controle (branco). Em sementes de rabanete o composto **3-MIF** apresentou diferença estatística significativa nas concentrações empregadas, podendo-se constatar que em baixas concentrações

houve estímulo no crescimento radicular enquanto que altas concentrações inibiram o crescimento, atuando, portanto, como composto auxínico.

No bioteste dos pecíolos na presença do **3-MIF** observou-se resultados promissores quanto ao seu uso como regulador de crescimento vegetal, haja vista com resultados melhores do que com o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (**2,4-D**), usado como padrão.

Até o momento não foi possível concluir os estudos de avaliação da atividade reguladora de crescimento vegetal do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-propiónico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, Michael S.; HAMAKER, Linda K.; LA LOGGIA, Anthony J.; COOK, James M. Entry into 6-methoxy-D(+)tryptophans. Stereospecific synthesis of 1-benzenesulfonyl-6-methoxy-D(+)-tryptophan ethyl ester. **Synthetic Communications**. 22 (14), 2077-2102, 1992.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.. A Utilização do Safrol, Principal Componente do Óleo de Sassafráz, na Síntese de Substâncias na Cascata do Ácido Araquidônico: Anti-inflamatórios, Analgésicos e Antitrombóticos. **Química Nova**. 22 (5), 744-759, 1999.

BASTIN, R. **Tratado de Fisiologia Vegetal**. Barcelona: Companhia Editorial Continental S.A., 1970.

BLEASDALE, J.K.A. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: EPU, Editora da Universidade de São Paulo, 1977.

CADOGAN, J I G; Reduction of Nitro and Nitroso Compounds by Tetravalent Phosphorus reagents . **Quart. Reviews**, 22, p. 222-232, 1986.

CHEN, Chi-Ming; FU, Yu-Fei; YANG, Tsang-Hsiung. Synthesis of (±)-Annonelliptine and (±)-Anomoline. **Journal of Natural Products**, 58 (11), p. 1767-1771, 1995.

COLLI, Sandra. **Etileno**. in KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12, 2004.

COSTA, Paulo R. R. Safrol e Eugenol: Estudo da Reatividade Química e Uso em Síntese de Produtos Naturais Biologicamente Ativos e seus Derivados. **Química Nova**., 23 (3), 357-369, 2000.

COSTA, P. R. R.; PILL, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. **Substâncias Carboniladas e Derivados**. Porto Alegre: Bookman, 195, 2003.

DALLACKER, F.; BERNABEI, D.; Derivative des Methylendioxybenzols, 22. Mitt.1: Über die Synthese von Indolderivaten der Methylendioxybenzolreihe. **D. Monatsh. Chem.**, 98, p. 785, 1967.

DAVIES, Peter J. **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. 2ª ed.; Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1-65, 1995.

DEVLIN, Robert M. **Fisiologia Vegetal**. Barcelona: Ediciones Omega S. A., 439-502, 1970.

FAVARETTO, José Arnaldo; MERCADANTE, Clarinda. **Biologia**. São Paulo: Moderna, p. 342-349, 1999.

FERRI, Mário Guimarães. **Fisiologia Vegetal 2**. 2ª ed. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda., 1985.

FLAUGH, M. E. et al. Synthesis and Evaluation of the Antiovolatory Activity of Melatonin Analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**. 22 (1), 63-69, 1979.

FUKUYAMA, A.K.; IWATSUKI, C.; KODAMA, M.; OCHI, M.; KATAOKA, K.; SHIBATA, K. Antimicrobial Indolequinones from the mid-Intestinal Gland of Muricid Gastropod *Drupella Fragum*. **Tetrahedron**, 54, p. 10007, 1998.

GALSTON, A. W. **A Planta Verde**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p.61- 75, 1974.

GALSTON, Arthur W; DAVIES, Peter J. **Mecanismos de Controle no Desenvolvimento Vegetal**. São Paulo: Edgar Blücher, 1972.

GILCHRIST, T. L. **Heterocyclic Chemistry**. New York: Longman Scientific & Technical, 161-165, 1985.

GIANFAGNA, Thomas. *Natural and Synthetic Growth Regulators and their Use in Horticultural and Agronomic Crops*. in DAVIES, Peter J. **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. 2ª ed.; Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 751-773, 1995.

GOWDAK, Demétrio; MATTOS, Neide S. **Biologia**. São Paulo: FTD, p. 216-224, 1993.

GRIBBLE, Gordon W. Recent Developments in Indole Ring Synthesis Methodology and Applications. **Journal of Chemical Society**, Perkin Trans I, 1045-1075, 2000.

GUERRA, Miguel Pedro. **Giberelinas**. in KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 10, 2004.

HE, F.; BO, Y.; ALTOM, J. D.; COREY, E. J. Enantioselective Total Synthesis of Aspidophytine. **Journal of American Chemistry**. 121, 6771, 1999.

HOPKINS, William G. **Introduction to Plant Physiology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

HUEBNER, Charles F.; TROXELL, Hyla Ames; SCHROEDER, Dorothy C. A Dimethoxy Substituted Harman and Other Compounds Derived from 5,6-Dimethoxyindole. **Journal of American Chemical Society**, 75, p. 5887-5890, 1953.

IRELAND, Robert E. **Síntese Orgânica**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 1971.

JOHNSON, Herbert E.; CROSBY, Donald G. 3-Indolepropionic Acid. **Journal of Organic Chemistry**, 25, p. 569-570; 1960.

JOULE, J. A.; MILLS, K.; SMITH, G. F. **Heterocyclic Chemistry**. London: Chapman & Hall, 1995.

KATRITZKY, A. R.; LAGOWSKY, J. M. **Química Fundamental de Heterociclos**. Madrid: Alhambra, 1968.

KATRITZKY, Allan R.; REES, Charles W. **Comprehensive Heterocyclic Chemistry**. Londres, 1984.

KRIKORIAN, Abraham D. Hormones in Tissue Culture and Micropropagation. in RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan, E. **Biologia Vegetal**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 28, p. 648-675, 2001.

LIBNENGA, Kees R.; MENNES, Albert M. *Hormone Binding and Signal Transduction*. in DAVIES, Peter J. **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. 2^a ed.; Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 272-289, 1995.

LUDFORD, Pamela. in DAVIES, Peter J. **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. 2^a ed.; Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995.

MACKIE, R. K.; SMITH, D. M.; AITKEN, R. A. **Guidebook to Organic Synthesis**. 2^a ed., New York: Longman Scientific & Technical, 1982.

MARCHI, Irineu. Síntese e Avaliação da Propriedade reguladora de Crescimento Vegetal de Compostos Indólicos Derivados do Safrol. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Regional de Blumenau, 2005.

MARCONDES, A. C.; LAMMOGLIA, D. A. **Aulas de Biologia**. São Paulo: Atual, 1991.

MENGER, Fredric M.; LEE, Chuan. Synthetically Useful Oxidations at Solid Permanganate Surfaces. **Tetrahedron Letters**, v. 22, nº 18, p. 1655-1656, 1981.

MERCIER, Helenice. **Auxinas**. in KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 8, 2004.

MILLER, Erston V. **Fisiologia Vegetal**. México: Union Tipografica Editorial Hispano Americana, cap.14, p. 206-223, 1967.

NEWKOME, George R.; PAUDLER, William W. **Contemporary Heterocyclic Chemistry**. New York: John Wiley & Sons. 1982.

NOVELLINO, L; D'ISCHIA, M.; PROTA, G..Expedient Synthesis of 5,6-Dihydroxyindole and Derivatives via an Improved Zn(II)-Assisted 2, β -Dinitrostyrene Approach. **Synthesis**, 5, p. 793-796, 1999.

PAQUETE, Leo A . **Principles of Modern Heterocyclic Chemistry**. New York: W. A Benjamin, Inc. 1968.

PENNAZIO, S. The Discovery of the Chemical Nature of the Plant Hormone Auxin. **Rivista di Biologia-Biology Forum.**, 95 (2), 289-307, 2002.

PERES, Lázaro E. P., KERBAUY, Gilberto B. **Citocininas**. in KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia Vegetal**.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 9, 2004.

POZHARSKII, Alexander F., SOLDATENKOV, Anatoly T., KATRITZKY, Alan R. **Heterocycles in Life and Society**. Chichester: John Wiley & Sons, cap.8, p. 165-182, 1996.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E..**Biologia Vegetal**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.28, p.648-675, 2001.

ROSA, Flávia A. F. Síntese e Avaliação da Atividade Reguladora de Crescimento Vegetal de Novos Compostos Indólicos Derivados do Safrol e Relacionados ao Ácido Indol-3-Acético. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

ROSA, F. A. F.; NASCIMENTO, M. G; REBELO, R A.; Synthesis of New Indolecarboxylic Acids related to the Plant Hormone Indoleacetic Acid AIA. **Journal of Brazilian Chemical Society**. 14 (1) 11-15, 2003.

SALISBURY, Frank B.; ROSS, Cleon W. **Fisiologia Vegetal**. México: Grupo Editorial Iberoamerica, cap. 17-18, 395-452, 1994.

SHRINER, R. L.; KLEIDERER, E. C. Piperonylic Acid. **Organic Synthesis Coll.** 2, p. 358, 1943.

SINHABABU, Achintya K.; BORCHARDT, Ronald T. Silica Gel Assisted Reductive Cyclization of Alkoxy-2, β -dinitrostyrenes to Alkoxyindoles. **Journal of Organic Chemistry**, 48, p. 3347-3349, 1983.

SMITH, Michael B. **Organic Synthesis**. New York: McGraw-Hill, Inc., p. 1343-1346, 1994.

SUNDBERG, R.J. Indoles from *o*-Nitrostyrenes. Synthesis and Reactions of 2-Indolyl-4-Piperidylmethylketone. **Journal of Organic Chemistry** , 33,2,487, 1968.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Plant Physiology**. Redwood City, California: The Benjamin/cummings Publishing Company, Inc, cap. 16, p. 398-425, 1991.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

VALIO, I. F.M. Auxinas. in FERRI, Mario Guimarães, **Fisiologia Vegetal 2**, 2^a ed., São Paulo: EPU: Editora da Universidade de São Paulo, cap 2, p. 39-72, 1986.

VOLLHARDT, K. Peter C., SCHORE, Neil E.. **Química Orgânica: Estrutura e Função**. 4^a ed.; Porto Alegre: Bookman, 2004.

YANG, Li-Ming; CHEN, Chieh-Fu; LEE, Kuo-Hsiung. Synthesis of Rutaecarpine and Cytotoxic Analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 5 (5), 465-468, 1995.

APÊNDICES

1 Comunicações em Congressos

ROSA, F. A. F.; SMANIOTO, M. S. R.; REIS, T. B.; MAIOCHI, R. A.; REBELO, R.A.; MARCHI, I. Síntese e Avaliação da Atividade Reguladora de Crescimento Vegetal de Compostos Indólicos Derivados do Safrol. 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latinoamericano de Química. Salvador, BA. 30/5 a 02/6, QO-002, 2004.

ROSA, F. A. F.; SMANIOTO, M. S. R.; REIS, T. B.; MAIOCHI, R.A.; REBELO, R.A.; MARCHI, I. Avaliação do Crescimento Radicular em *Lactuca sativa* por Compostos Indólicos Relacionados ao Ácido Indol-3-il-Acético (AIA). 55^o Congresso Nacional de Botânica e 26^o Encontro Regional de Botânicos de MG, BA e ES. Viçosa, MG, 18 a 23/7, 2004.

ROSA, F. A. F.; SMANIOTO, M. S. R.; REIS, T. B.; MAIOCHI, R.A.; REBELO, R.A.; MARCHI, I. Avaliação do Bioteste dos Pecíolos em *Phaseolus vulgaris* por Compostos Indólicos Relacionados ao Ácido Indol-3-il-Acético (AIA). 55^o Congresso Nacional de Botânica e 26^o Encontro Regional de Botânicos de MG, BA e ES. Viçosa, MG, 18 a 23/7, 2004.

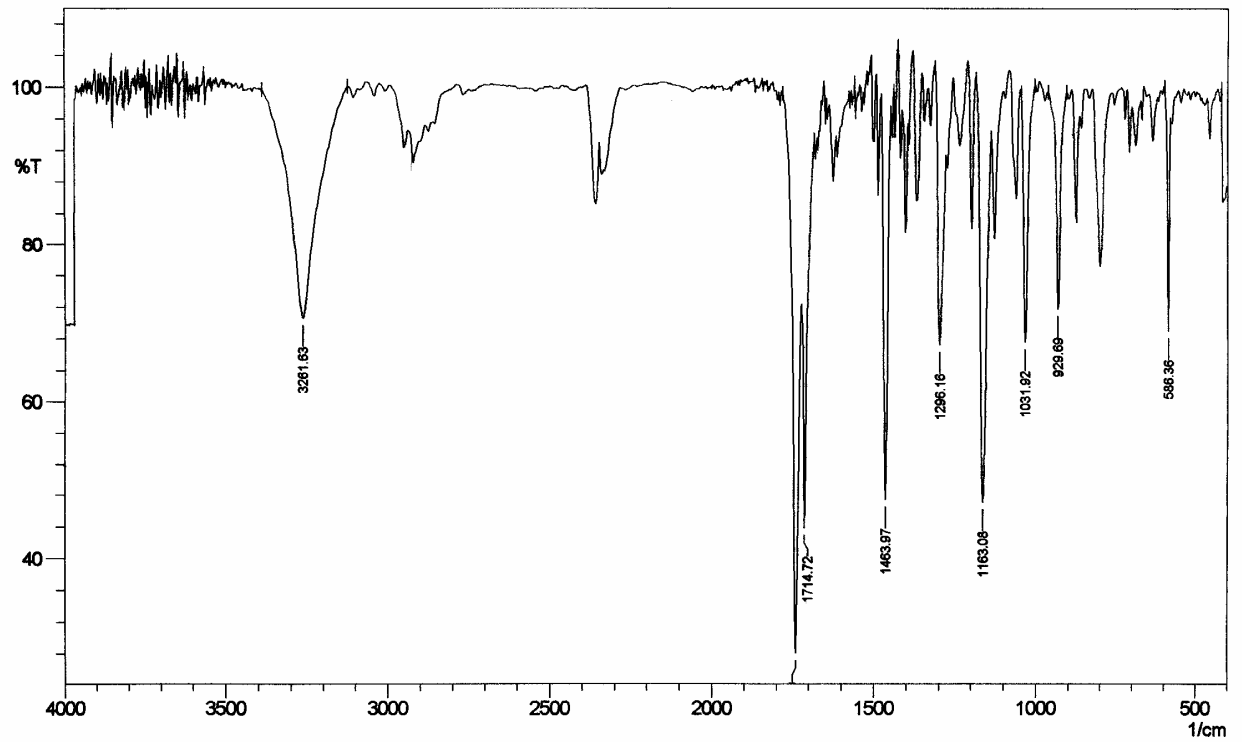
ROSA, F. A. F.; SMANIOTO, M. S. R.; REIS, T. B.; MAIOCHI, R.A.; REBELO, R.A.; MARCHI, I. Síntese e Avaliação da Atividade Reguladora de Crescimento Vegetal de Compostos Indólicos Derivados do Safrol. 13-SBQSul, XIII Encontro de Química da Região Sul. Florianópolis, SC. 02 a 04/11, QO-027, 2005.

2 Perspectivas

- ⇒ Avaliar o ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-propanóico quanto a suas propriedades reguladoras de crescimento vegetal.
- ⇒ Otimizar as condições experimentais e/ou identificar reações alternativas de oxidação do 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído.
- ⇒ Publicação em periódico, indexado e arbitrado, nas áreas relacionadas ao trabalho.

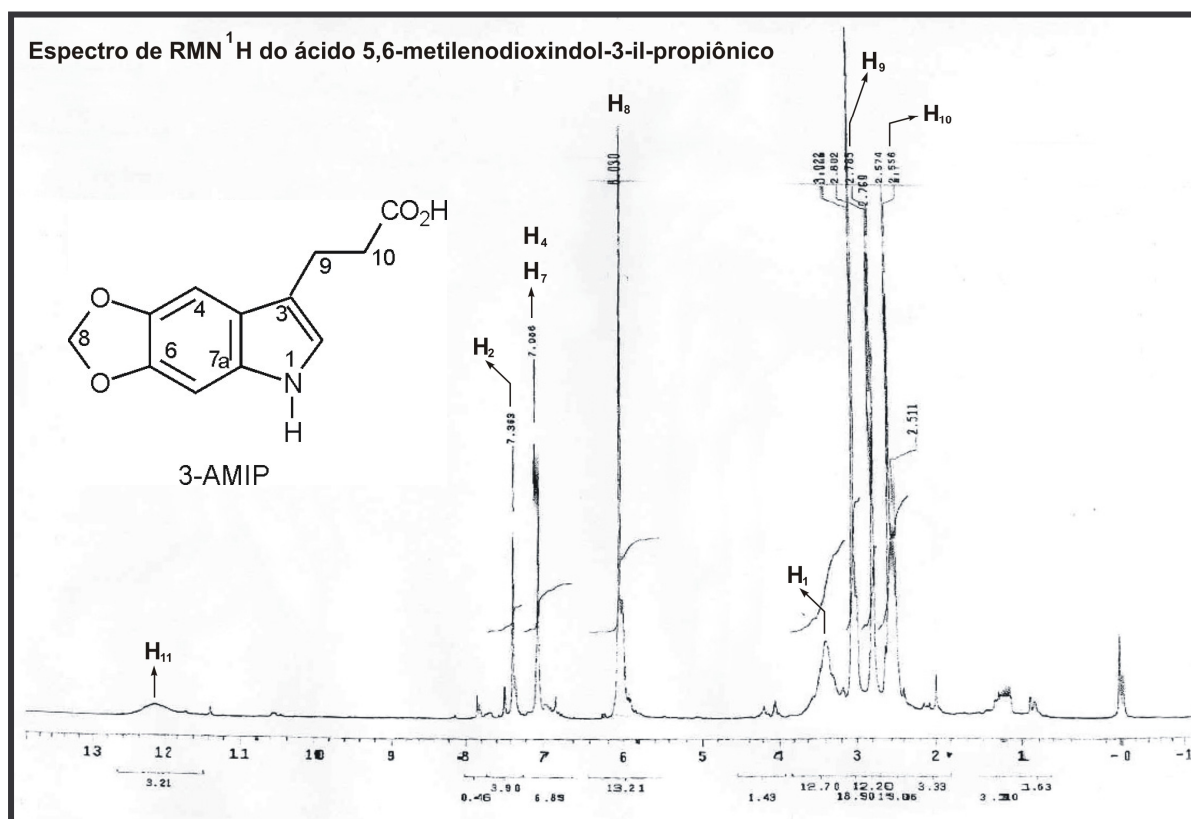
ANEXOS

Anexo 1 - Espectro no infravermelho do ácido 5,6-etilenodioxindol-3-il-propiónico



Anexo 2 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênios do ácido 5,6-etilenodioxindol-3-il-propiónico

Resultados e Discussão



Anexo 3 - Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13 do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-propiónico

Resultados e Discussão

