

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

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE REGULADORA DE
CRESCIMENTO VEGETAL DE COMPOSTOS INDÓLICOS
DERIVADOS DO SAFROL

IRINEU MARCHI

BLUMENAU - SC
NOVEMBRO - 2004

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

IRINEU MARCHI

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE REGULADORA DE
CRESCIMENTO VEGETAL DE COMPOSTOS INDÓLICOS
DERIVADOS DO SAFROL**

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

Orientador: Prof. Dr. RICARDO ANDRADE REBELO

Co-Orientadora: Profa. Dra. FLAVIA APARECIDA
FERNANDES DA ROSA

**BLUMENAU - SC
NOVEMBRO - 2004**

IRINEU MARCHI

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE REGULADORA DE
CRESCIMENTO VEGETAL DE COMPOSTOS INDÓLICOS
DERIVADOS DO SAFROL**

Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e demais membros da banca examinadora.

Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo
Orientador

Profa. Dra. Flávia Aparecida Fernandes da Rosa
Co-orientadora

Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo
Coordenador PPGQ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo
Departamento de Química da FURB

Profa. Dra. Flávia Aparecida Fernandes da Rosa
Departamento de Química da FURB

Profa. Dra. Iêda Maria Begnini
Departamento de Química da FURB

Prof. Dr. Luciano da Silva
Centro de Ensino Superior São José – Engenharias – UNIVALI

Blumenau, 19 de janeiro de 2005.

**“EXISTINDO VIDA,
NENHUM OBSTÁCULO É
SUFICIENTEMENTE GRANDE E
CAPAZ DE INIBIR A REALIZAÇÃO DE
UM SONHO DO SER HUMANO,
QUANDO ESTE É DETERMINADO COM
CLAREZA E PERSEVERANÇA”**

(IRINEU MARCHI)

AGRADECIMENTOS

- Agradecemos a Deus pelo dom da vida, pela saúde e pela inteligência;
- Aos nossos familiares, especialmente aos nossos pais Hermenegildo e Helena Marchi pelo exemplo de vida que sempre demonstraram;
 - À minha esposa, Iraci Neves, pelo carinho, amor e compreensão, mas também pelo exemplo de grandeza que sempre demonstrou, especialmente quando da notícia do desafio de termos um filho com dificuldades;
 - Aos nossos filhos Jéferson Irineu, Cleberon Irineu, Guilherme Neves e Vinícius Neves Marchi;
 - Aos nossos amigos de laboratório: Alberto Joel, Sandra, Melissa, José Adilson, Maria Suzete e Leandro, pelo companheirismo, apoio e colaboração;
 - Ao Departamento de Química da FURB pela infraestrutura de trabalho disponibilizada;
 - Aos nossos Professores da FURB: Iêda, Ivonete, Paulo, Ricardo, Marcos, Jürgen que colaboram com a nossa formação;
 - Aos funcionários do Departamento de Química da FURB;
 - À Escola Agrotécnica Federal de Rio do Sul, pela licença concedida para a realização deste sonho;
 - À acadêmica Riceli Antunes Maiochi e à Profa. Rosete Pescador do Departamento de Ciências Naturais da FURB pela importante contribuição na realização dos experimentos referentes à atividade reguladora de crescimento vegetal e discussão dos resultados;
 - Ao Prof. Ricardo Andrade Rebelo e a Profa. Flávia Aparecida Fernandes da Rosa pela orientação nas atividades laboratoriais em geral.
 - A Universidade Federal de Santa Catarina UFSC, pelas Análises Espectroscópicas.

DEDICATÓRIA

DEDICAMOS:

Aos nossos pais: Hermenegildo e Helena;

A minha esposa Iraci Neves;

Aos nossos filhos: Jeferson, Cleberson, Guilherme e Vinícius;

A todos os nossos familiares e amigos;

A todos os nossos professores e orientadores;

Aos colegas de curso.

Por acreditarem, apoiarem, compreenderem e me incentivarem nesta nova etapa.

OFERECEMOS

A DEUS

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Hormônios Vegetais e Reguladores de Crescimento.....	1
1.2	Auxinas.....	2
1.2.1	Biossíntese do Ácido Indol-3-il-acético	4
1.2.2	Metabolismo das Auxinas.....	6
1.2.3	Mecanismo de Ação das Auxinas.....	7
1.2.4	Propriedades Auxínicas.....	8
1.2.4.1	Estímulo do Enraizamento em Estacas, Caule e Desenvolvimento Lateral de Raízes	8
1.2.4.2	Promoção de Crescimento de Frutos	9
1.2.4.3	Abscisão de Folhas e Frutos	11
1.2.4.4	Dominância Apical	12
1.2.4.5	Atuação como herbicidas no Controle de Plantas Invasoras de Solos Agricultáveis	13
1.3	Reguladores de Crescimento Vegetal	14
1.4	Relação Estrutura Química – Atividade Biológica das Auxinas.....	17
1.5	Metodologias para Preparação de Indóis.....	18
1.5.1	Síntese de Fischer.....	19
1.5.2	Síntese de Madelung.....	21
1.5.3	Ciclização Via Nitreno.....	22
1.5.4	Ciclização Redutiva.....	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivos Gerais	24
2.2	Objetivos Específicos	24
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
3.1	Ciclização Redutiva	26
3.2	Carboxilação Seletiva.....	27
3.3	Tentativa de Conversão do 3-Ciano-5,6-metilenodioxindol em 5,6-metileno-dioxi-3-il-tetrazol (3-MIT)	29
3.4	Avaliação de Atividade Reguladora de Crescimento Vegetal	30

3.4.1	Promoção de Crescimento de Radículas	31
3.4.2	Ensaio do Bioteste de Pecíolos.....	33
4	PARTE EXPERIMENTAL	35
4.1	Técnicas de Caracterização.....	35
4.2	Solventes e Reagentes.....	35
4.3	Síntese do Núcleo Metilenodioxindólico Não-substituído na Sub- unidade Heterocíclica	36
4.3.1	Síntese do 3,4-Metilenodioxib-nitroestireno (33)	36
4.3.2	Síntese do δ -Nitro-3,4-metilenodioxib-Nitroestireno (34)	37
4.3.3	Síntese do 5,6-Metilenodioxindol (35) Via Ciclização Redutiva.....	37
4.3.4	Síntese do 5,6-Metilenodioxindol-3-il-formaldeído (3-MIF) (36).....	39
4.3.5	Síntese do 3-Ciano-5,6-Metilenodioxindol (3-MIC) (37)	40
4.3.6	Síntese do Ácido 5,6-Metilenodioxindol-3-il-metanóico (3-AMIM) (38).....	40
4.3.7	Tentativa de Preparação do 5,6-metilenodioxindol-3-il-tetrazol (3-MIT)	41
4.4	Avaliação da Atividade Reguladora de Crescimento Vegetal	42
4.4.1	Promoção de Crescimento de Radículas	42
4.4.2	Bioteste de Pecíolos em <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão de vagem)	43
5	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	ANEXOS.....	50

ANEXOS

ANEXO 01 – MORFOLOGIA VEGETAL – COLEÓPTILO.....	50
ANEXO 02 – ESPECTRO IV DO 3-CIANO-5,6-METILENODIOXINDOL.....	51
ANEXO 03 – ESPECTRO RMN ¹ H DO 3-CIANO-5,6-METILENODIOXINDOL...52	
ANEXO 04 – ESPECTRO RMN ¹³ C DO 3-CIANO-5,6-METILENODIOXINDOL..53	
ANEXO 05 – ESPECTRO IV DO ÁCIDO 5,6-METILENODIOXINDOL-3-IL-META- NÓICO.....	54
ANEXO 06 – ESPECTRO RMN ¹ H DO ÁCIDO 5,6-METILENODIOXINDOL-3-IL- METANÓICO.....	55
ANEXO 07 – ESPECTRO RMN ¹³ C DO ÁCIDO 5,6-METILENODIOXINDOL-3-IL- METANÓICO.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** – Formação de raízes nos pecíolos de violeta africana. (I) O pecíolo da folha foi colocado em uma solução contendo **ANA** por 10 dias. (II) O pecíolo da folha foi colocado em água pura também por 10 dias.....9
- Figura 2** – Influência de auxinas no crescimento de morango. (I) Desenvolvimento normal na presença de auxina. (II) Retirada completa das sementes, não há desenvolvimento do fruto. (III) Retirada de um estreito anel de sementes, o fruto forma uma cinta na área das sementes retiradas..11
- Figura 3** – Influência de auxinas na dominância Apical. (a) Ápice caulinar – gemas axilares inibidas por auxina. (b) Ápice caulinar removido – gemas axilares em desenvolvimento.....12
- Figura 4** – Efeito do composto **3-AMIM (38)** no comprimento médio de radícula de sementes germinadas de *Lactuca sativa* (alface crespa).....31
- Figura 5** – Efeito do composto **3-AMIM (38)** no comprimento médio de radícula de sementes germinadas de *Cucumis sativus* (pepino). As letras minúsculas representam o teste de médias - Tukey, 5%.....33
- Figura 6** – Efeito do composto **3-AMIM (38)** no comprimento médio de radículas de sementes germinadas de *Raphanus sativus* (rabanete).....33
- Figura 7** – Efeito do composto **3-AMIM (38)** em porcentagem no fechamento do ângulo interno de peças em “Y” com plantas *Phaseolus vulgaris* (feijão de vagem).....34
- Figura 8** – Efeito do composto **2,4-D** em porcentagem no fechamento do ângulo interno de peças em “Y” com plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão de vagem)....34

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EtOAc	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
BuLi	Butil lítio
C₀	Carbono quaternário
<i>J</i>	Constante de acoplamento
CDCl₃	Clorofôrmio deuterado
λ	Comprimento de onda
CCD	Cromatografia em camada delgada
δ	Deslocamento químico
(EtO₂C)₂	Dietiloxalato
DMSO_{d6}	Dimetilsulfóxido deuterado
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
Et₂O	Éter dietílico
EtONa	Etóxido de sódio
Et	Etila
EtOK	Etóxido de potássio
Ph	Fenila
M⁺	Íon molecular
IV	Infravermelho
Me	Metila
pe	Ponto de ebulição
pf	Ponto de fusão
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
s	Singleto
ta	Temperatura ambiente
TMS	Tetrametilsilano
THF	Tetraidrofurano

RESUMO

Neste trabalho descreve-se a reatividade do piperonal (**31**), derivado do metabólito secundário safrol (**32**), para a síntese de novos compostos indólicos 5,6-metilenodioxissubstituídos estruturalmente relacionados ao ácido indol-3-il-acético (**AIA**, **1**). O heterociclo 5,6-metilenodioxindol (**35**) foi preparado via ciclização redutiva, sendo obtido analiticamente puro em 3 etapas. Posteriormente, procedeu-se à carboxilação seletiva na posição 3 de **35** mediante a formilação com DMF/ POCl_3 , conversão do composto formilado **36** à oxima com hidroxilamina, seguida de desidratação *in situ* para formar a nitrila **37** precursora do grupo carboxílico. Hidrólise alcalina de **37** e acidificação conduziu à molécula alvo, o ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico (**38**). Este foi obtido a partir de **31** em 6 etapas, com rendimento global de aproximadamente 19%.

O composto **38** foi testado quanto às suas propriedades reguladoras de crescimento vegetal, utilizando-se ensaios específicos para determinação de atividade auxínica. Os testes empregados na avaliação da atividade reguladora de crescimento vegetal envolveram ensaios biológicos *in vitro* em câmara de germinação. Foram empregadas sementes de *Lactuca sativa* (alface crespa), *Cucumis sativus* (pepino) e *Raphanus sativus* (rabanete) nos ensaios de promoção de crescimento de radículas e plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão de vagem) no bioteste de pecíolos.

Os resultados observados nos ensaios de crescimento de radículas de sementes germinadas foram satisfatórios para a espécie *Cucumis sativus* na concentração de 10^{-5} M. O bioteste de pecíolos para **38** demonstrou que sua atividade a concentração de 50 ppm assemelha-se ao regulador de crescimento comercial **2,4-D** utilizado como controle.

Ensaio complementares *in vitro*, embriogênese somática, e *in vivo*, enraizamento caulinar, se fazem necessários para o estabelecimento adequado das propriedades reguladoras de crescimento vegetal de **38** e de seus precursores **36** e **37**.

ABSTRACT

The present work describes the use of piperonal (**31**), a derivative of the secondary metabolite safrole (**32**), for the synthesis of new 5,6-methylenedioxy-substituted indole carboxylic acids structurally related to the indol-3-yl-acetic acid (**AIA**, **1**). The heterocycle 5,6-methylenedioxyindole (**35**) was prepared as a pure compound *via* reductive cyclisation reaction in 3 steps. In the sequence, selective carboxylation of **35** at the 3-position was carried out by formylation with DMF/POCl₃, followed by the conversion of the formylated compound **36** in the oxime with hydroxylamine and “*in situ*” dehydration to give the corresponding nitrile **37**, precursor of the carboxylic group. Alkaline hydrolysis of **37** and acidification gave the target molecule **38**. The route comprised six steps from piperonal with an overall yield of about 19%.

Compound **38** was tested towards its plant growth regulator properties in bioassays specific for auxine activity. The *in vitro* assays were performed in germination chamber and were of two types: rooting growth in germinated seeds of *Lactuca sativa*, *Cucumis sativus* and *Raphanus sativus* and petiole biotest using *Phaseolus vulgaris*.

The observed results in the rooting growth bioassays were satisfactory only for *Cucumis sativus* at the concentration of 10⁻⁵ M. The petiole biotest for **38** showed activity at the concentration of 50 ppm similar to the commercial plant growth regulator **2,4-D** used as control.

Complementary bioassays *in vitro*, somatic embryogenesis, and *in vivo*, caulinar rooting, are required to properly establish the plant growth regulator properties of compound **38** and its precursors **36** and **37**.

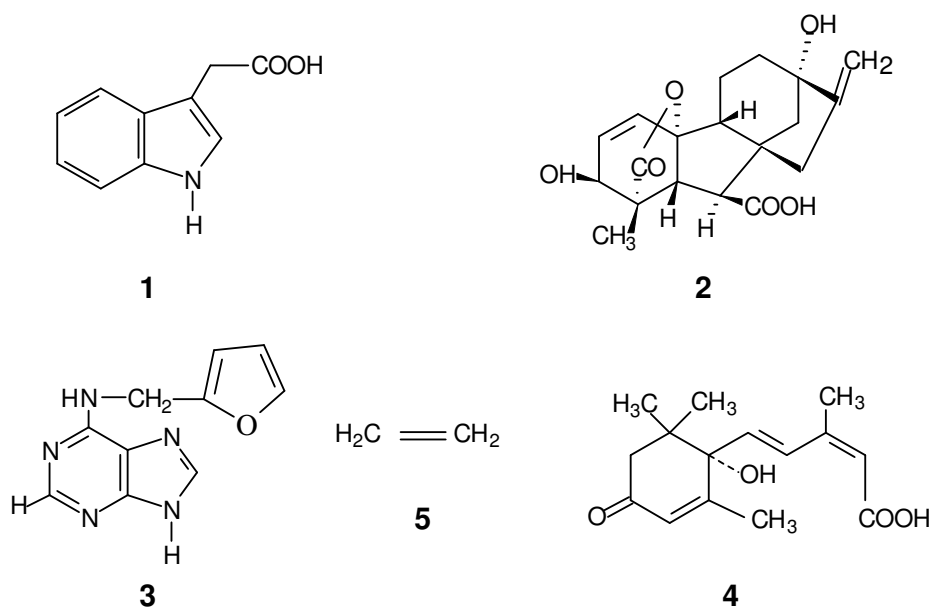
1. INTRODUÇÃO

1.1 Hormônios Vegetais e Reguladores de Crescimento

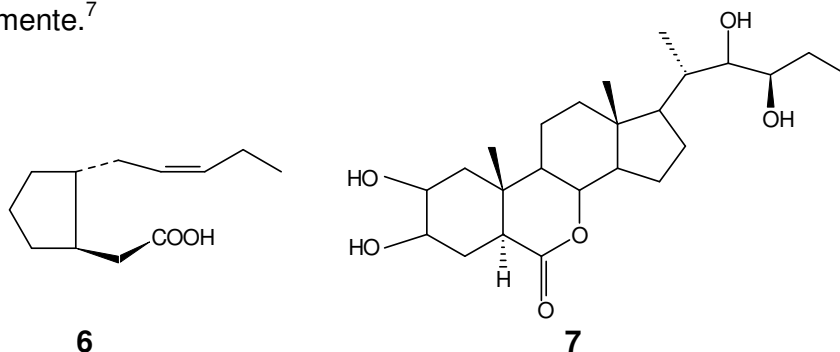
Em plantas, assim como nos animais, muitos processos bioquímicos e fisiológicos são controlados por hormônios. Os hormônios são produzidos em um sítio da planta e translocados para outros sítios para alterar o crescimento e o desenvolvimento. O hormônio natural e outros materiais são essencialmente "**mensageiros químicos**", influenciando em muitas partes no desenvolvimento da planta.¹

Uma distinção pode ser feita entre os termos hormônio vegetal e reguladores de crescimento. O hormônio vegetal é uma substância natural produzida pela própria planta, enquanto que os reguladores de crescimento ou reguladores vegetais são compostos sintetizados quimicamente, podendo incluir a forma natural, e que quando aplicados em plantas influenciam no seu crescimento e desenvolvimento.

Os cinco grupos de hormônios naturais de plantas são: auxinas, representada pelo ácido indol acético (**AIA 1**), giberelinas (**2**), citocinina (**3**), ácido abscísico (**ABA, 4**) e o etileno (**5**).^{2,3}



No entanto, mais recentemente foram isoladas novas substâncias de diversificada estrutura molecular que também apresentam atividade reguladora de crescimento vegetal e vêm sendo estudadas intensivamente nos últimos anos. Entre elas encontram-se os jasmonatos, derivados do ácido jasmônico (**6**), que são compostos voláteis amplamente conhecidos como componentes das fragrâncias florais; os brassinosteróides (**7**), moléculas orgânicas complexas relacionadas aos esteróides animais; o ácido salicílico que tem sido relacionado como um sinal de defesa contra patógenos vegetais, oligossacarídeos e poliaminas, estes considerados hormônios vegetais não clássicos.⁴⁻⁶ Dentre os hormônios, as giberilinas e o ácido indol acético estão disponíveis comercialmente.⁷



1.2 Auxinas

O termo é originário da palavra grega “auxein” que significa crescer. Dentre os reguladores de crescimento vegetal, as auxinas constituem um grupo de reguladores de crescimento mais estudado e de ação fisiológica mais variada na planta.

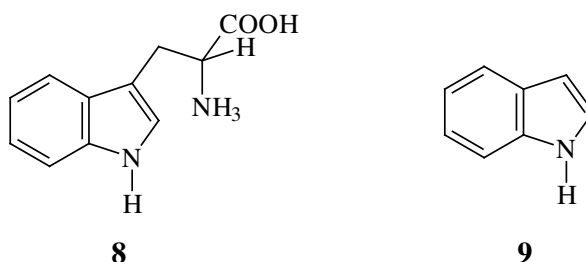
As auxinas são hormônios vegetais produzidos principalmente nas regiões apicais que, transportados para outros locais da planta, participam do seu crescimento e diferenciação.

Charles Darwin e seu filho Francis, em 1880, foram os precursores da descoberta das auxinas, quando estudaram o fototropismo em coleótilos de alpiste, *Phalaris canariensis* (**ANEXO 01**). Somente em 1926 a auxina responsável pelo fototropismo foi isolada por Frits W. Went dos ápices de coleótilos de aveia colocados sobre pequenos cubos de ágar. Após algumas horas esses cubos adquiriram a propriedade de estimular a curvatura de coleótilos decapitados quando colocados unilateralmente no escuro. Went

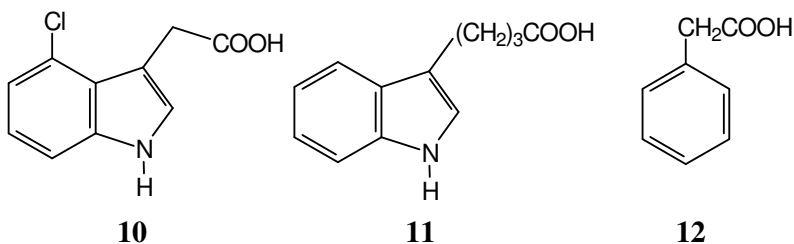
também observou que a curvatura desses coleótilos era proporcional à quantidade de auxina presente nos cubos de ágar, estabelecendo um teste biológico de ampla utilização.¹

A primeira auxina isolada foi o ácido indolilacético **AIA**, sendo também a mais importante e estudada das auxinas, responsável por numerosos processos biológicos em vegetais.

Como pode ser observado, o **AIA** é estruturalmente relacionado ao aminoácido Triptofano (**8**), e tanto **1** quanto **8** possuem nas suas estruturas o heterociclo indol **9**. Acredita-se que os vegetais são capazes de produzir esse regulador essencial de crescimento por diversas vias. A auxina é produzida nos ápices de cotilédones, em ápices caulinares, em folhas jovens e também é encontrada em flores, frutos e sementes.⁸



Estudos posteriores mostraram que o **AIA** não é o único composto com atividade auxínica presente nas plantas. Além deste também foram descobertos outros compostos com esta atividade, como por exemplo, o ácido 4-cloro-indolacético (**4-CI-AIA**, **10**) encontrado em plantas leguminosas e que em alguns testes apresentou atividade 10 vezes maior que o **AIA**. Outro composto endógeno é o ácido indolbutírico (**AIB**, **11**) muito usado no enraizamento de estacas, e o ácido fenilacético (**12**).⁸⁻¹¹



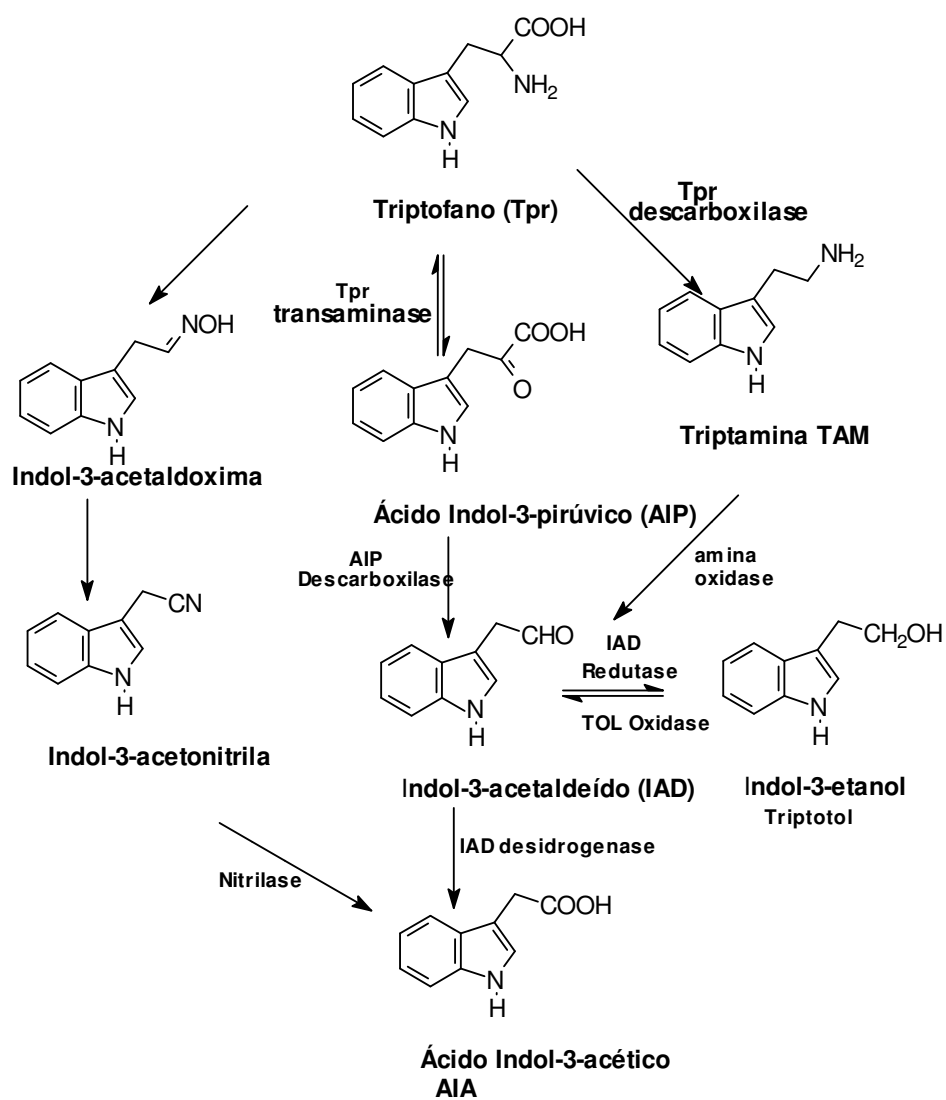
1.2.1 Biossíntese do Ácido Indol-3-il-acético

As vias de biossíntese do **AIA** têm sido estudadas há muito tempo, porém, ainda existem algumas dúvidas quanto a contribuição de cada uma delas. O **AIA** é quimicamente semelhante ao triptofano (**8**), sendo este muito provavelmente o seu precursor² (**Esquema 1**).

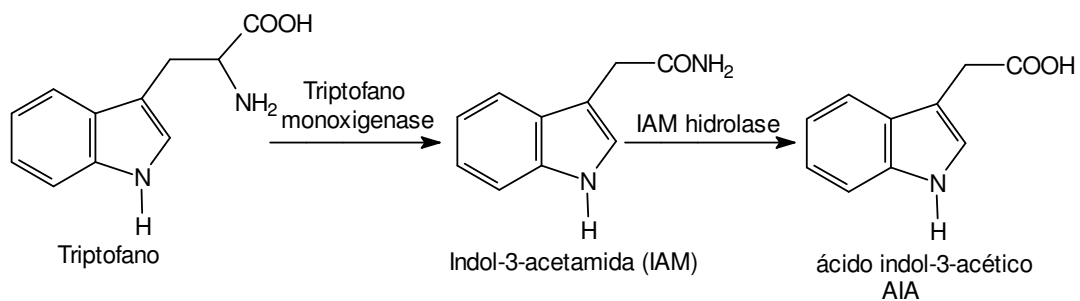
A biossíntese do **AIA** a partir do triptofano têm sido objeto de intensa pesquisa nas últimas décadas. Embora vários caminhos tenham sido propostos, o que envolve o ácido indol-3-pirúvico **AIP** é o mais provável. A conversão subsequente do ácido indol-3-pirúvico em indol-3-acetaldeído ocorre por meio de uma reação de descarboxilação. O aldeído é então oxidado a ácido indol-3-acético pela enzima indolacetaldeído desidrogenase ou pela indolacetaldeído oxidase, dependendo da espécie da planta envolvida. O caminho pelo qual a triptamina é o primeiro intermediário, é similar ao caminho do **AIP**, no entanto, a ordem das reações de desaminação e dascarboxilação são inversas, e diferentes enzimas estão envolvidas.

Em um terceiro caminho, o triptofano é primeiramente convertido em indol-3-acetaldoxima, e posteriormente em indol-3-acetonitrila, seguido pela perda do nitrogênio amino do triptofano através da hidrólise da nitrila para ácido, que acontece pela ação de uma nitrilase.

Finalmente, o triptofano pode ser convertido em **AIA** pela ação de bactérias patogênicas como, por exemplo, as fitopatógenas *Pseudomonas savastanoi* e *Agrobacterium tumefaciens*. Inicialmente a triptofano monoxigenase converte o triptofano em indol-3-acetamida **IAM** e posteriormente este composto é hidrolisado pela enzima hidrolase, formando o **AIA** (**Esquema 2**).¹¹



Esquema 1



Esquema 2

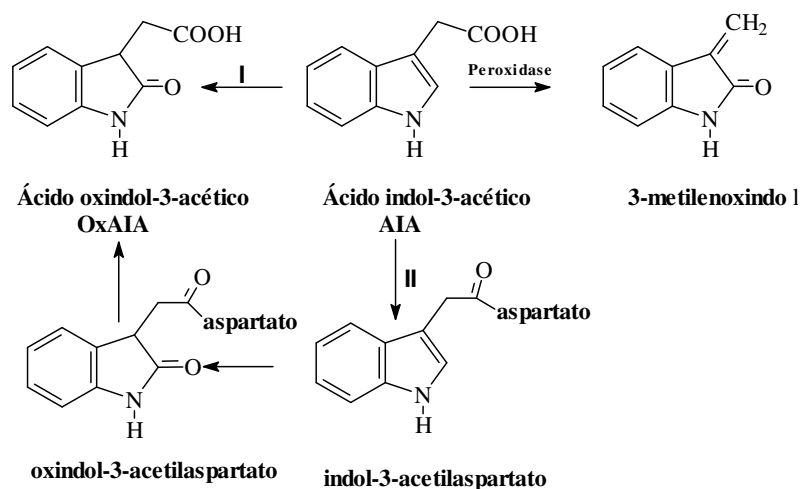
1.2.2 Metabolismo das Auxinas

A concentração de **AIA** em um determinado tecido ou célula vegetal pode ser afetada tanto pela taxa de inativação, quanto pela biossíntese. A inativação é reversível quando ocorre uma reação de conjugação da auxina com compostos de baixo ou alto pesos moleculares. Os compostos de baixo peso molecular incluem os açúcares, aminoácidos e o inositol. Os de alto peso molecular são o glucanos (7 a 50 unidades de glicose por **AIA**) e as glicoproteínas-**AIA**, encontradas em sementes de cereais.

Os produtos da conjugação do **AIA** com outras moléculas formam um “pool” ou reserva de auxina, onde somente o **AIA** livre é ativo nos processos fisiológicos. A grande maioria das auxinas nas plantas são encontradas no estado conjugado, mas podem ser rapidamente disponibilizadas pela ação de enzimas que desdobram esta forma. Altas concentrações de auxinas livres em plantas vivas são encontradas em meristema apical de raízes, ápices caulinares e folhas jovens, sendo estes os sítios primários da síntese de auxinas. Entretanto, as auxinas são amplamente distribuídas nas plantas. O metabolismo das auxinas conjugadas pode ser o fator de maior contribuição na regulação dos níveis de auxina livre. Por exemplo, durante a germinação de sementes de *Zea mays* (milho), o mio-inositol-**AIA** é transportado do endosperma para o coleóptilo. Acredita-se que pelo menos uma parte do **AIA** livre produzido na ápice do coleóptilo de *Zea mays* deve ter sido formado a partir da hidrólise do mio-inositol-**AIA**. A formação dos conjugados de auxina pode ser vista como uma maneira de proteção e armazenagem de auxina livre, já que sua forma conjugada não sofre degradação oxidativa.¹²

Como na biossíntese do **AIA** a quebra enzimática pode envolver mais de uma rota, acreditou-se que as enzimas peroxidativas eram as principais responsáveis pela oxidação do **AIA**, principalmente porque elas estão presentes nas plantas e são capazes de degradar o **AIA**. A rota via peroxidase conduz ao produto oxidado, o 3-metilenoxindol no qual a cadeia lateral (ácido acético) é reduzida em um carbono.

Com base na marcação isotópica e identificação de metabólitos, duas outras rotas oxidativas têm sido propostas. Estas, provavelmente, estão envolvidas no controle da degradação do **AIA**, com o ácido oxindol-3-acético **OxAIA**, como produto final (**Esquema 3**).¹²



Esquema 3

Na rota “I” o **AIA** é oxidado sem descarboxilação conduzindo ao **OxAIA**. Na rota “II” o **AIA**-aspartato conjugado é inicialmente oxidado ao intermediário oxindol-3-acetilaspártato, e posteriormente forma o **OxAIA**. Estas rotas diferem da peroxidase, devido ao fato de que a oxidação ocorre sem descarboxilação mantendo a cadeia lateral intacta.

Os mecanismos de biossíntese e degradação das moléculas de auxina são importantes para o futuro da agricultura. Informações sobre o metabolismo possibilitarão manipulações genéticas e químicas dos níveis de hormônios endógenos, resultando em crescimento e diferenciação desejáveis de importantes colheitas. Atualmente, existe a possibilidade de regular o crescimento de plantas sem o uso de fertilizantes e herbicidas tóxicos.¹³

1.2.3 Mecanismo de Ação das Auxinas

O alongamento da parede celular é a resposta inicial dos tecidos vegetais às auxinas. Esta primeira fase da resposta é extremamente rápida e exclui a

síntese de novas proteínas. A segunda fase do alongamento da parede celular exige a síntese de proteínas (enzimas). A parede celular é constituída por microfibrilas de celulose unidas por polissacarídeos complexos. Apesar de todos os processos responsáveis pela alongação celular por ação auxínica não terem sido ainda esclarecidos, alguns deles podem ser apontados a partir de evidências experimentais.²

A rápida resposta em alongamento da parede celular parece estar relacionada com a acidificação. A auxina poderia estimular uma bomba de prótons que promoveria a secreção de íons hidrogênio em um compartimento da parede celular causando acidificação. A produção de prótons poderia ser compensada por um movimento de cátions para o protoplasma. A acidificação promoveria a ativação de enzimas preexistentes causadoras do afrouxamento da parede celular. Isso possibilitaria uma expansão celular por efeito do potencial de pressão do interior da célula. A síntese de ácidos nucleicos e de proteínas, sob efeito de auxinas, mostra-se importante para o mecanismo de expansão da parede celular. Uma reserva de glicose e xilose, além de outros carboidratos, deve estar presente no sistema que dará origem ao material necessário para o processo de alongamento.^{1,2}

1.2.4 Propriedades Auxínicas

1.2.4.1 Estímulo do Enraizamento em Estacas, Caule e Desenvolvimento Lateral de Raízes

A primeira aplicação prática da auxina envolveu seu efeito indutor de raízes em estacas, que é altamente estimulada por estes compostos (**Fig 1**).²

Nas espécies cujos teores endógenos de auxina são suficientes e estando presentes os demais fatores imprescindíveis ao processo, o enraizamento ocorre sem aplicação de auxina exógena. Entretanto, em algumas espécies o enraizamento só ocorre com a aplicação de uma auxina como o **AIB**, misturado

com talco ou dissolvido em solução aquosa ou alcoólica. A prática de tratar estacas em auxinas tem importância comercial, especialmente para a propagação vegetativa de plantas lenhosas.² Na **Figura 1** está demonstrada a formação de raízes em violeta africana na presença da auxina sintética ácido naftaleno acético (**ANA 13**).²

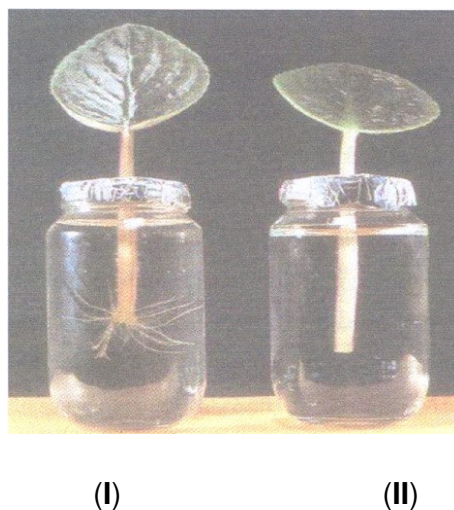


Figura 1 – Formação de raízes nos pecíolos de violeta africana. (I) O pecíolo da folha foi colocado em uma solução contendo **ANA** por 10 dias. (II) O pecíolo da folha foi colocado em água pura também por 10 dias.

1.2.4.2 Promoção de Crescimento de Frutos

As auxinas também estão envolvidas na formação dos frutos. O desenvolvimento do ovário para formar o fruto é um processo intimamente relacionado com as auxinas. Na natureza, o início do desenvolvimento do fruto está relacionado com a fertilização. Neste processo, não só o ovário receberá uma pequena quantidade de auxina fornecida pelo grão de pólen como também a fertilização irá liberar auxinas existentes como precursores nas partes femininas da flor. Nessa liberação, parece que o grão de pólen age ativando a síntese do ácido indol-3-acético a partir do triptofano existente no gineceu. Esta auxina libertada pela fertilização é responsável pelo início do desenvolvimento do ovário, sendo a seguir suplementada com grandes quantidades produzidas pela

semente. Normalmente, se a flor não for polinizada e a fertilização não ocorre, o fruto não irá desenvolver-se. Em algumas plantas a fertilização de uma osfera é suficiente para o desenvolvimento normal do fruto, mas em outras como as maçãs ou melões, as quais possuem muitas sementes, várias devem ser fertilizadas para as paredes do ovário amadurecerem e tornarem-se carnosas. Tratando as estruturas femininas (carpelos) de certas espécies, é possível produzir frutos partenocárpicos, que são produzidos sem fertilização, por exemplo: tomates, pepinos e berinjela, sem sementes.²

Contudo, em muitos ou na maioria desses frutos sem sementes, existem óvulos imaturos. O tratamento da parte feminina da flor não polinizada de algumas espécies com auxinas, possibilita a produção de frutos como o tomate. Existe uma íntima correlação entre o número de sementes e o tamanho do fruto. Sementes em desenvolvimento são fontes de auxina. No caso do morango, a retirada de todas as sementes (aquênios) provoca a paralização do crescimento. Se um estreito anel de sementes for retirado, o fruto forma uma cinta na área das sementes. Se auxina for aplicada ao receptáculo sem sementes, o crescimento prossegue normalmente. Cada “semente” de morango é um fruto não carnoso do tipo aquênio. A auxina produzida pelos embriões contidos em cada aquênio promove o desenvolvimento do receptáculo da inflorescência do morangueiro, formando o pseudofruto carnoso que é denominado de morango. No caso de frutos sem sementes, o crescimento provavelmente é controlado pelas auxinas, que estão invariavelmente em altas concentrações nos botões florais (**Fig. 2**).²

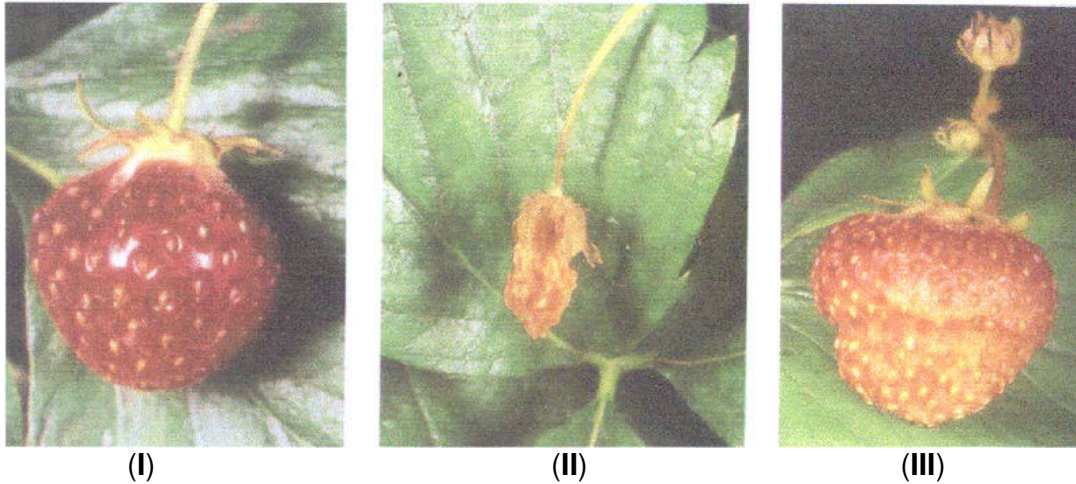


Figura 2 – Influência de auxinas no crescimento de morango. (I) Desenvolvimento normal na presença de auxina. (II) Retirada completa das sementes, não há desenvolvimento do fruto. (III) Retirada de um estreito anel de sementes, o fruto forma uma cinta na área das sementes retiradas.

1.2.4.3 Abscisão de Folhas e Frutos

A concentração de auxina diminui durante o amadurecimento dos frutos, formando camadas de abscisão no caule que permitem a queda do fruto. Os fruticultores freqüentemente pulverizam suas plantações com auxina sintética, a fim de mantê-los nas árvores até que possam ser colhidos.²

A queda de folhas de uma planta é um processo periódico e comum em muitas árvores e arbustos. Esta é chamada de abscisão e pode ser induzida por diferentes fatores do meio, tais como, falta de água, baixas temperaturas, intensidade solar reduzida e variações do comprimento do fotoperíodo, mas é em última análise controlada pelo gradiente de auxinas. A folha jovem tem a capacidade de sintetizar níveis de auxinas relativamente altos: durante a senescência, a síntese de auxinas no limbo foliar diminui consideravelmente, o que promove o rompimento do pecíolo na camada de abscisão. A auxina produzida na folha inibe a abscisão da mesma, bem como a produzida no fruto inibe a sua abscisão. Quando o teor de auxina no órgão diminui, forma-se a

conhecida camada de abscisão na base do pecíolo da folha, ou na base do pedúnculo do fruto, e com o balançar do vento ocorre a abscisão do órgão.²

1.2.4.4 Dominância Apical

Antes da descoberta da participação dos hormônios no crescimento das plantas, a dominância apical, isto é, a habilidade que a gema apical tem de inibir o desenvolvimento das gemas laterais (gemas auxiliares), já era bem conhecida pelos fisiologistas. Entre os vegetais, há desde gemas apicais com dominância muito acentuada, com a conseqüente formação de plantas eretas e não ramificadas como as palmeiras, até plantas como os arbustos em que a dominância apical é mínima ou nula. O papel da auxina na dominância apical pode ser demonstrada experimentalmente. Por exemplo, quando a gema apical de uma planta de feijão é removida, as gemas laterais começam a crescer. Contudo, quando a auxina é aplicada no lugar da gema apical removida, a inibição do crescimento das gemas laterais permanece inalterada (**Figura 3**).²

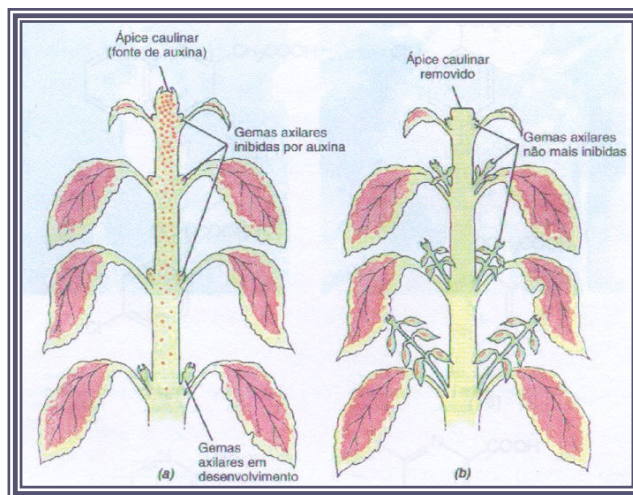
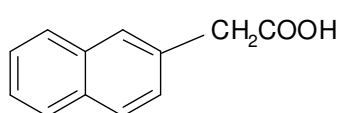
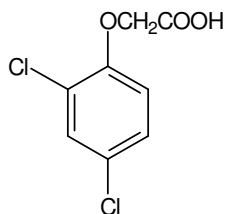
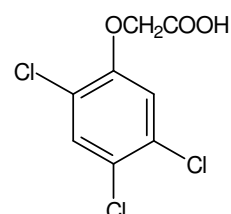
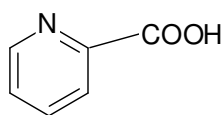
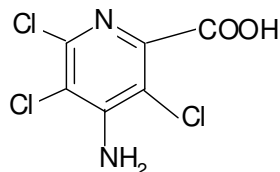
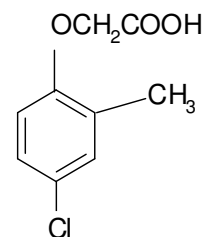


Figura 3 – Influência de auxinas na dominância Apical. (a) Ápice caulinar – gemas axilares inibidas por auxina. (b) Ápice caulinar removido – gemas axilares em desenvolvimento.

A **Figura 3** mostra que em (a) a auxina produzida no ápice caulinar move-se de modo descendente no caule, inibindo o crescimento dos ramos laterais. À medida que a distância entre o ápice caulinar e as gemas axilares aumenta – e a concentração da auxina diminui – as gemas são gradualmente liberadas da inibição. Em (b), quando o ápice caulinar é removido, eliminando a produção posterior de auxina, as gemas axilares não são mais inibidas e começam a crescer vigorosamente.

1.2.4.5 Atuação como herbicidas no Controle de Plantas Invasoras de Solos Agrícolas

As auxinas sintéticas como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (**2,4-D**, **14**), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (**2,4,5-T**, **15**), e derivados do ácido picolínico (**16**) como o picloramo (**17**) - que é vendido com o nome comercial de Tordon, têm sido usados extensivamente como herbicidas na agricultura. Como esses herbicidas matam as ervas daninhas ainda não é completamente elucidado. O **2,4-D** é degradado nas plantas como as auxinas naturais.

**13****14****15****16****17****18**

Os mecanismos pelos quais os herbicidas matam apenas certas ervas daninhas são também pouco conhecidos. A seletividade desses compostos contra ervas de folhas largas é devido em parte as maiores taxas de absorção dessas folhas quando comparadas as estreitas das gramíneas.²

Uma observação importante, é que as auxinas causam respostas fisiológicas somente quando presentes em baixas concentrações. No entanto, se a auxina estiver em altas concentrações agirá como herbicida inibindo o crescimento.¹

1.3 Reguladores de Crescimento Vegetal

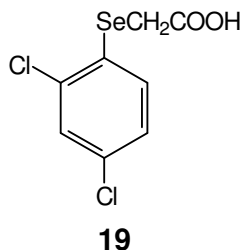
Após ter-se demonstrado que o ácido indolilacético era a auxina de mais comum ocorrência nas plantas superiores, iniciou-se uma procura por compostos sintéticos de constituição química semelhante e capazes de promover o crescimento vegetal.¹ Em 1936, Zimmerman e colaboradores investigaram numerosos novos compostos, incluindo o ácido indolbutírico **AIB** e o ácido naftalenacético **ANA**, dentre outros.

O ácido indolbutírico, devido à sua capacidade de promover a formação de primórdios radiculares, tem sido utilizado para provocar e acelerar o enraizamento de estacas na propagação vegetativa de numerosas espécies vegetais. O ácido naftalenacético tem sido bastante utilizado para o desbaste de frutos. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético é usado principalmente como herbicida seletivo, sendo capaz de matar as ervas daninhas do grupo das dicotiledôneas sem afetar as monocotiledôneas.

Os reguladores de crescimento vegetais formam um grupo com mais de quarenta compostos de uso comercial, cujas estruturas variam amplamente resultando numa série de classes químicas. Dada a importância desta classe de compostos com ampla aplicação na agricultura e na biotecnologia vegetal, inúmeros reguladores de crescimento vegetal foram desenvolvidos.

Estes compostos imitam os efeitos do **AIA** em diferentes testes fisiológicos, e dentre eles destacam-se os ácidos naftalenoacético (**ANA**, **13**), 2,4-diclorofenoxiacético (**2,4-D**, **14**), 2,4,5-triclorofenoxiacético (**2,4,5-T**, **15**), 2-metil-4-

clorofenoxiacético (**AMCP**, **18**), **AIB** (**11**), mencionados anteriormente, e dentre aqueles contendo selênio o ácido 2,4-diclorofenilselenoacético (**2,4-D-Se**, **19**),¹⁴ análogo do **2,4-D**.

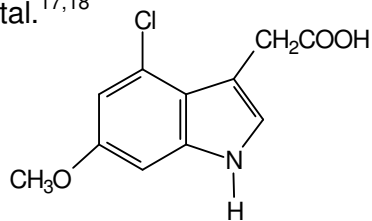
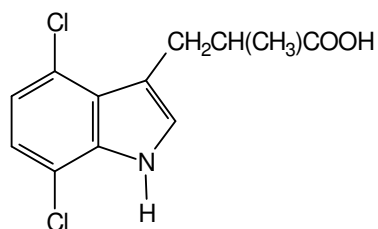


A maioria deles é utilizada amplamente na agricultura como herbicida e pesticida. Em termos econômicos, esse pode ser o principal uso prático para os reguladores de crescimento vegetal.¹⁵

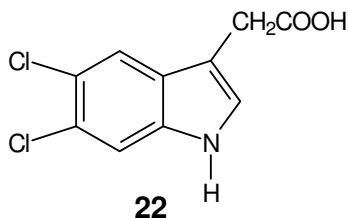
O agente laranja, recebeu atenção considerável, pois foi o herbicida comumente utilizado como desfolhante durante a Guerra do Vietnã. Este composto é uma mistura de ésteres n-butílicos de (**2,4-D**, **14**) e (**2,4,5-T**, **15**) ou outra auxina sintética. Ele também contém a dioxina **2,3,7,8-TCDD**, um contaminante do **2,4,5-T**, que é tóxico para animais e seres humanos.¹⁶

Uma série de reguladores de crescimento vegetal disponíveis comercialmente permitem avaliar a influência no desenvolvimento e crescimento da planta em todos os estágios, desde o enraizamento até o amadurecimento. Um modo de ação importante é o alongamento celular, formando plantas mais compactas e vistosas. Os trabalhos sobre estes compostos concentram-se basicamente na descoberta, eficácia e atividade biológica. O destino de aplicação, bem como a toxicidade, geralmente não são divulgados.⁷

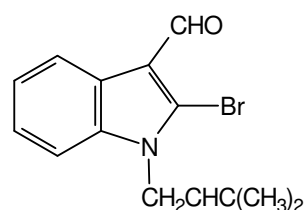
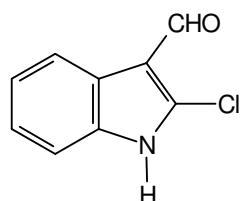
Marumo e Katayama sintetizaram os ácidos 4-cloro-6-metoxi-indol-3-acético e o 4,7-dicloro-indol-3-isobutírico (**20** e **21**) e realizaram ensaios biológicos, verificando que estes compostos são potentes reguladores de crescimento vegetal.^{17,18}

**20****21**

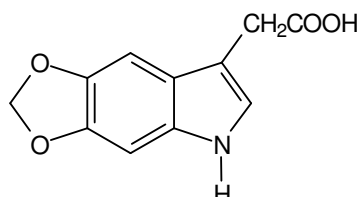
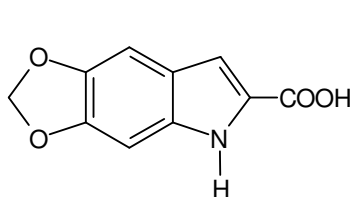
Torii e colaboradores sintetizaram o ácido 5,6-dicloroindol-3-acético (**22**) e derivados com alto rendimento e pureza, e estes compostos também apresentaram atividade reguladora de crescimento vegetal.¹⁹



Visando obter um regulador de crescimento vegetal efetivo na promoção de brotos e germinação de sementes pelo uso de um ou mais tipos de derivados indólicos como componente ativo, Somei e colaboradores sintetizaram novos derivados indólicos. Dentre eles o 2-cloroindol-3-carboxialdeído e o 2-bromo-1-(3-metil-2-butenil)indol-3-carboxialdeído (**23** e **24**), foram eficazes quando aplicados em arroz, trigo, pepino e tomate.²⁰



Aliando a utilização de metabólitos secundários abundantes à síntese de reguladores de crescimento vegetal indólicos, Ricardo A. Rebelo & Flávia A. F. Rosa prepararam os ácidos 5,6-metilenodioxindol-2-il-metanóico (**25**) e 5,6-metilenodioxindol-3-il-acético (**26**) que demonstraram ter atividade auxínica,²¹ notadamente.



1.4 Relação Estrutura Química – Atividade Biológica das Auxinas

Os estudos da relação estrutura-atividade são de grande importância para a síntese de novos reguladores de crescimento vegetal com atividade auxínica e herbicida, pois o objetivo é compreender o mecanismo dos efeitos fisiológicos a nível molecular, bem como conhecer a forma e as propriedades do receptor das auxinas.

A atividade hormonal é um mecanismo complexo influenciado por vários fatores, como a afinidade do receptor em relação as auxinas, estabilidade metabólica, lipofilicidade, distribuição do hormônio nos tecidos, densidade eletrônica no núcleo indólico, distribuição eletrônica e da carga no sistema do anel aromático, estereoquímica e outros parâmetros físico-químicos.

Nenhuma correlação simples de ambas propriedades físico-químicas ou parâmetros estruturais para derivados do ácido indol-3-acético com bioatividade tem sido estabelecida. A fim de compreender as propriedades moleculares essenciais de um substrato ou inibidor para a interação com o receptor proteico das auxinas - **ABP** (**A**uxin **B**inding **P**rotein), o receptor e a estrutura tridimensional dessas proteínas devem ser conhecidos. Estas pesquisas estão progredindo, e quando a topologia do sítio de interação hormônio-ABP for conhecida, dados estruturais completos para uma variedade de substratos ou inibidores serão conhecidos.

A técnica de cristalografia de raios-x e os métodos espectroscópicos de RMN são extremamente importantes nos estudos da relação estrutura-atividade. Esta abordagem baseada nas propriedades moleculares, pode ser utilizada para prever a atividade de novos reguladores de crescimento vegetal e dos herbicidas.^{22,23}

Thomas e colaboradores²⁴ prepararam e analisaram a atividade biológica de três derivados 5-substituídos da auxina sintética **ANA** (**13**). Os derivados foram os ácidos 5-nitro, 5-azido e 5-amino naftalenoacéticos. Os derivados foram testados em bioensaios de alongamento de caule, utilizando ervilha e milho. Enquanto o 5-amino-**ANA** foi completamente inativo em uma faixa de concentração de 1-300 μ M, o 5-azido-**ANA** foi ativo em ambas espécies, demonstrando estímulo favorável a 30 μ M para ervilha e 100 μ M para milho. O derivado 5-nitro-**ANA**

também foi ativo na promoção do alongamento do caule de ervilha, mas foi inativo ou inibidor em altas concentrações sobre o milho.

A falta de atividade para o milho pode estar relacionada à bases metabólicas, porém esse fato não foi explorado. No entanto, a impossibilidade do 5-nitro-**ANA** em promover o alongamento do caule do milho não parece resultar da incapacidade de ligação da auxina ao receptor.

Magnus e colaboradores estudaram o efeito de derivados halogenados do ácido indol acético. O **AIA** e o ácido 4-cloro-3-indolacético (**4-CI-AIA**) ocorrem naturalmente em frutos de ervilha. Entretanto, suas atividades biológicas são diferentes, e somente a aplicação de **4-CI-AIA** estimula o crescimento do pericarpo de ervilha. A falta de atividade do **AIA** sobre o tecido do pericarpo de ervilha reflete sua instabilidade química ou bioquímica.²⁶

Na análise dos derivados halogenados do **AIA** sobre pericarpo de ervilha, observou-se que o **4-CI-AIA**, e em uma menor amplitude o **5-CI-AIA**, promoveram o crescimento. O **4-**, **5-**, **6-** e **7-CI-AIA** e **5-F-AIA** foram todos ativos, e mudança de flúor para cloro na posição 4, resultou em uma diminuição acentuada no crescimento.^{25,26}

Uma série de derivados do ácido indol-3-acético fluorados foram examinados por Biserka e colaboradores. A substituição no anel benzênico nas posições 4, 5, 6 e 7 resultou em 4 compostos, os quais foram analisados em biotestes baseados no alongamento do caule de aveia e ervilha. A atividade dos compostos fluorados foi equivalente ou mais efetiva do que as auxinas não substituídas originais. Os resultados para a aveia mostraram que o **5-F-AIA** e o **7-F-AIA** apresentaram a mesma atividade. No entanto, o **4-F-AIA** e o **6-F-AIA** foram mais ativos, sendo a atividade do primeiro mais expressiva. Já para a ervilha o **5-F-AIA** demonstrou maior atividade.²⁷

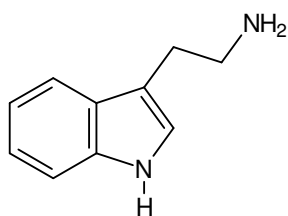
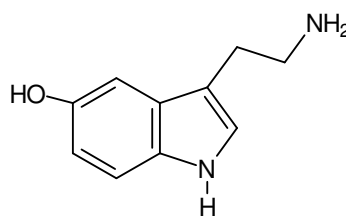
1.5 Metodologias para Preparação de Indóis

A investigação química dos indóis tem sido, e continua sendo, uma das áreas da química dos heterociclos mais estudadas. A palavra indol é derivada da

palavra de origem indígina, um importante corante azul da Índia conhecido como índigo.

Os indóis são provavelmente dos compostos heterocíclicos, mais distribuídos na natureza, sendo conhecidos mais de mil alcalóides indólicos, muitos deles apresentando atividade biológica importante.

Alguns indóis naturais são derivados simples monossubstituídos, como o triptofano (**8**), que é um aminoácido essencial e constituinte de muitas proteínas. E, também é precursor biossintético da triptamina (**27**) serotonina (**28**) e metabólitos secundários contendo o núcleo indólico, como por exemplo o ácido indol-3-acético (**1**), o principal representante dos hormônios vegetais.

**27****28**

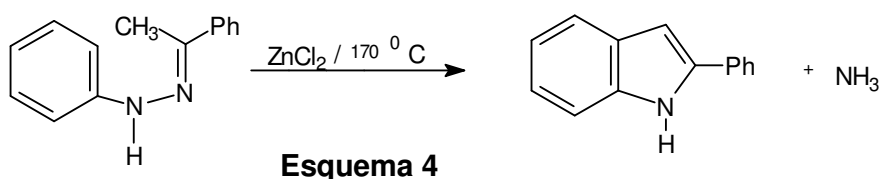
Devido a importância dos indóis nos produtos naturais e na síntese de fármacos, um grande número de novas rotas sintéticas para a sua obtenção e melhoramento de antigas reações, têm sido desenvolvidas.

Os indóis são usualmente preparados a partir de precursores não heterocíclicos, por reações de ciclização com benzenos devidamente substituídos. Outros métodos gerais para a síntese do núcleo indólico são os fundamentados na ciclização de isonitrilas e via nitreno.^{28,29}

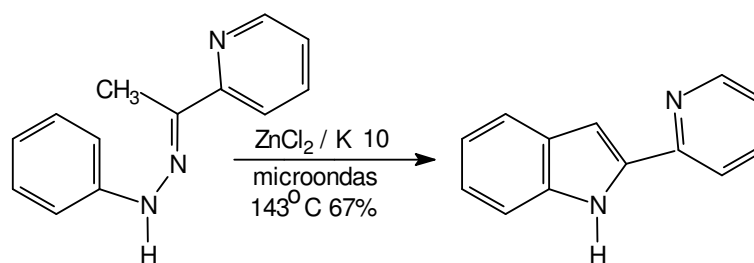
Serão apresentados alguns dos principais métodos para a obtenção de indóis.

1.5.1 Síntese de Fischer

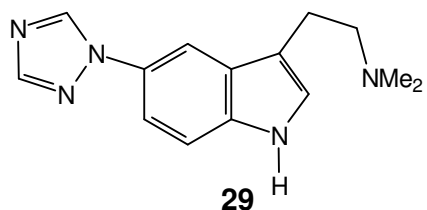
A síntese de Fischer foi estabelecida em 1883, sendo até hoje a rota mais amplamente utilizada na preparação de indóis. A reação consiste no aquecimento de uma fenilidrazona, com ácido clorídrico ou ácido de Lewis em um solvente inerte, com liberação de amônia durante a formação do núcleo indólico. No **Esquema 4** está representada a preparação do 2-fenilindol. Este método é acessível e pode ser utilizado na obtenção de indóis com vários substituintes e com cadeias carbônicas nas posições 2 e 3.^{30,31}



Uma variação desta metodologia consiste em preparar indóis a partir de hidrocloreto de fenilidrazonas e cetonas em ácido acético com irradiação de microondas. Esta metodologia apresenta melhorias em muitos casos, altos rendimentos e reações com tempo menor que um minuto, sob condições convencionais. O uso de montmorilorita (K10) e cloreto de zinco na presença de microondas, a temperaturas mais baixas e com solvente livre de ácido forma o 2-(2-piridil)indol em bom rendimento, um composto cuja unidade básica estrutural está presente em muitos produtos naturais (**Esquema 5**).³²

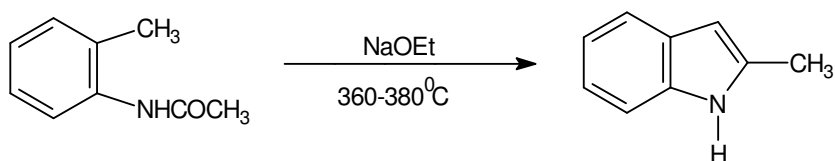


A síntese de Fischer é amplamente utilizada na preparação de indóis e derivados. Exemplos incluem a síntese de alcalóides e alcalóides marinhos, derivados da triptamina (**29**) e novas estruturas indólicas com anéis fusionados. Também tem sido utilizada em escala industrial na obtenção de intermediários farmacêuticos.³³



1.5.2 Síntese de Madelung

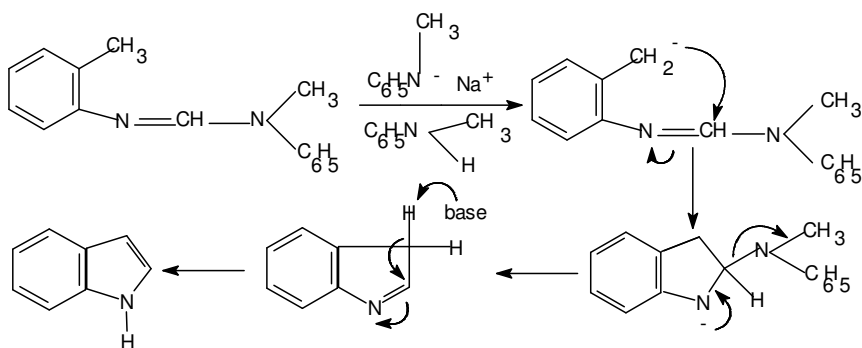
Em 1912, Madelung mostrou que o 2-metilindol podia ser preparado com 60% de rendimento, aquecendo-se a *o*-aceto-toluidina com etóxido de sódio a 360-380°C em atmosfera inerte. O emprego desta metodologia exige condições severas para realizar catálise básica intramolecular na condensação entre um grupo metila aromática não ativado e um substituinte *o*-acilamino (**Esquema 6**).³⁴



Esquema 6

Embora a síntese clássica de Madelung seja atualmente pouco empregada, uma modificação do método introduzida por Houlihan, na qual é utilizado Butil Lítio (**BuLi**) como base sob condições mais brandas do que a síntese original, método de Mandelung-Houlihan, permitiu a síntese de novos agentes dopaminérgicos por Clark e colaboradores.³⁵

No **Esquema 7** temos representada uma inovação na síntese de Madelung, onde formamidinas são ciclizadas na presença de *N*-metilanilina de sódio sob refluxo.

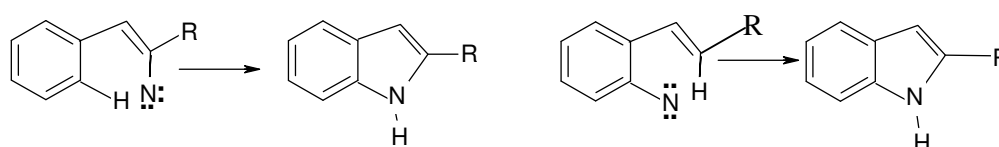


Esquema 7

1.5.3 Ciclização Via Nitreno

Além das rotas sintéticas clássicas, o núcleo indólico pode também ser obtido através de metodologias alternativas baseadas no emprego da espécie nitreno como intermediário.

No **Esquema 8**, está representada uma reação protótipo para a obtenção de indóis na qual a espécie nitreno é empregada na forma de nitrogênio eletrofílico.^{36,37}

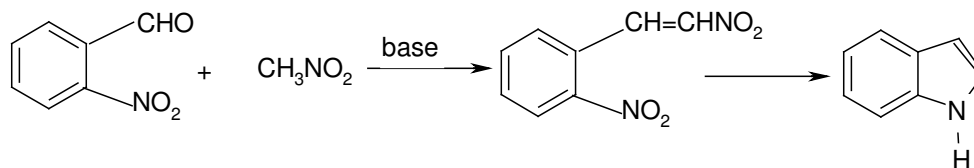


Esquema 8

1.5.4 Ciclização Redutiva

A ciclização redutiva de nitrocompostos aromáticos é um método eficiente para a preparação de indóis, e progressos na metodologia foram descritos recentemente.^{38,39}

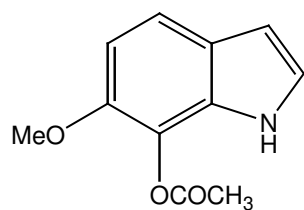
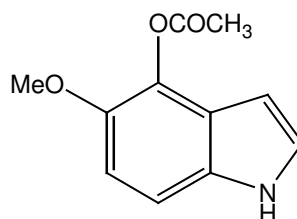
Esta metodologia envolve a redução parcial de α,β -dinitroestirenos que podem ser preparados por meio de condensação em meio básico de o -nitrobenzaldeídos e nitrometano (**Esquema 9**).^{40,41}



Esquema 9

Corey e colaboradores⁴² utilizaram a metodologia de ciclização redutiva de α,β -nitroestirenos, modificada por Borchardt (Fe-AcOH-sílica gel-tolueno-refluxo)⁴³ para preparar 6,7-dimetoxindol para a síntese total da aspidofilina. Esta mesma

metodologia foi empregada na preparação do 7-acetoxi-6-metoxindol (**30a**) e do 4-acetoxi-5-metoxindol (**30b**), os quais foram utilizados na síntese de indolquinonas que apresentam atividade antimicrobiana moderada para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.⁴⁴

**30a****30b**

Fukuyama e Chen utilizaram a ciclização reductiva de α,β -nitroestirenos para preparar um potente precursor indólico para a síntese de hapalindol G.⁴⁵ Esta metodologia foi empregada com sucesso para a síntese do 5,6-metilenodioxindol (**35**).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- Sintetizar novos compostos indólicos 5,6-metilenodioxissubstituídos;
- Avaliar a propriedade reguladora de crescimento vegetal dos compostos sintetizados empregando ensaios *in vitro* e *in vivo*.

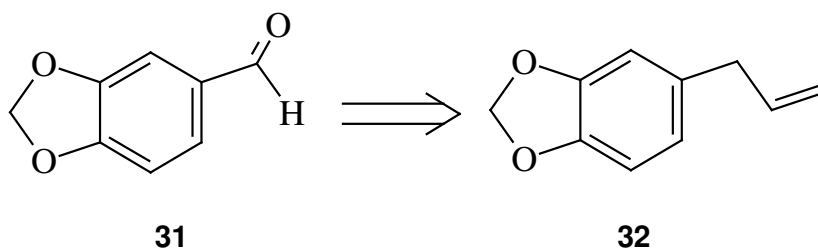
2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar o ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico a partir do piperonal empregando na construção do anel heterocíclico o método de ciclização reductiva;
- Utilizar reações clássicas de substituição aromática eletrofílica para a funcionalização da posição **3** do anel indólico;
- Caracterizar os compostos sintetizados através de métodos espectroscópicos no **IV** e **RMN** de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, espectrometria de massa e análise elementar;
- Empregar ensaios *in vitro* de promoção de crescimento de radículas em sementes de *Lactuca sativa* (alface), *Cucumis sativus* (pepino) e de *Raphanus sativus* (rabanete);
- Avaliar a atividade reguladora de crescimento vegetal empregando bioteste de pecíolos em plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão de vagem).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

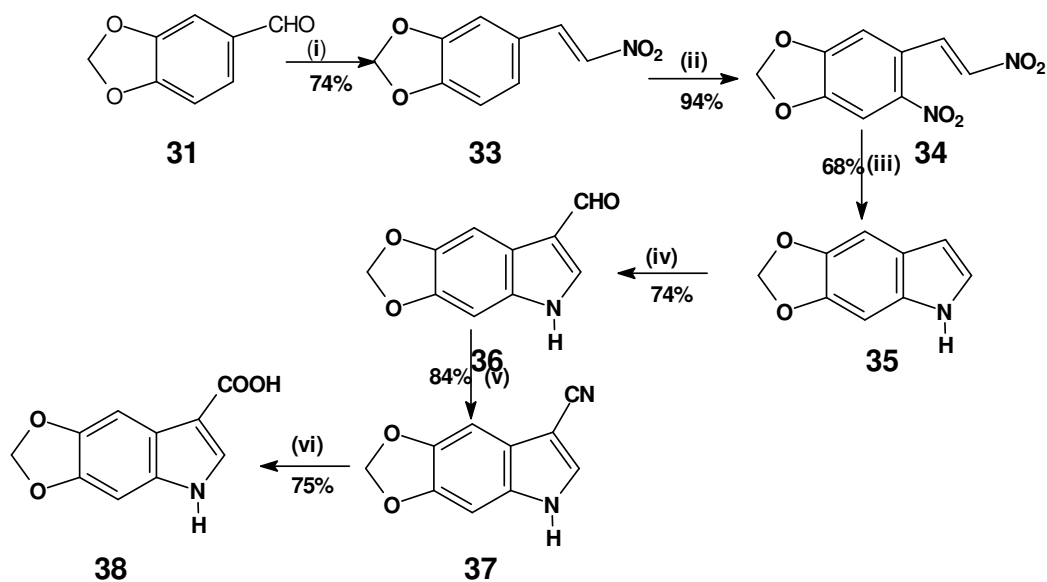
Dando continuidade aos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Pesquisa de investigação de novos reguladores indólicos de crescimento vegetal contendo o substituinte metilenodioxí, foi realizada a síntese total do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico (**38**) empregando como precursor o produto comercial piperonal (**31**).

O aldeído aromático **31**, bem como o seu precursor natural safrol (**32**), têm sido amplamente empregados por pesquisadores brasileiros como matérias-primas na preparação de diversos produtos naturais e compostos biologicamente ativos, devendo-se destacar os trabalhos conduzidos por Barreiro, Costa e colaboradores.⁴⁶⁻⁵¹ Embora disponível comercialmente, o piperonal pode ser preparado em escala laboratorial de forma eficiente a partir do safrol pela isomerização da ligação olefínica, seguida da sua oxidação parcial.



A metodologia geral de síntese adotada para o núcleo 5,6-metilenodioxindol é a mesma que foi empregada com sucesso na preparação do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-acético (**26**).²¹ Dentre as rotas disponíveis no trabalho, ciclização redutiva e inserção por nitreno, optou-se pela primeira por permitir reações em maior escala e exigir uma etapa a menos que a construção do anel indólico através da inserção via nitreno.

O **Esquema 10** apresenta a rota sintética empregada na obtenção da molécula alvo **38**. A metodologia global é constituída de 6 etapas, podendo ser agrupadas em **ciclização redutiva**, para a construção do anel indólico, e **carboxilação seletiva**, para a funcionalização da posição-3.



(i) CH_3NO_2 , AcOH , NH_4OAc , reflux (ii) HNO_3 , AcOH , 0°C (iii) Sílica gel 60, Fe , AcOH , benzeno, cicloexano, refluxo ou Pd/C 10%, EtOH absoluto, cicloexano, refluxo (iv) POCl_3 , DMF , NaOH (v) DMF , $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, (vi) NaOH 35%, HCl 20%.

Esquema 10

3.1 Ciclização Redutiva

Esta inicia-se com a reação de condensação do piperonal (**31**) com nitrometano em meio de ácido acético e acetato de amônio durante quatro horas sob refluxo. A reação é favorecida pela presença de uma base de Lewis que atua desprotonando o nitrometano, tornando-o mais nucleofílico. A reação se processa por um ataque nucleofílico à carbonila, seguido de desidratação. O produto **33** foi obtido com rendimento satisfatório de 74%, sendo o seu ponto de fusão compatível com o da literatura. O produto também apresentou elevado grau de pureza, sendo utilizado sem purificação prévia.

o-Nitro-3,4-metilenodioxib- β -nitroestireno (**34**) foi preparado a partir de **33** através de uma reação clássica de nitração. Esta pôde ser realizada em condições brandas dada a reatividade do composto frente à substituição

eletrofílica aromática. A reação apresentou-se altamente regioseletiva, fornecendo o produto puro desejado em rendimento superior a 90% após cristalização em etanol. Fatores eletrônicos e estéreos podem ser invocados para justificar o resultado obtido. Os éteres são ativadores de elétrons, portanto, orientadores para as posições *o* e *p*, preferencialmente, para a posição *p*, considerando o oxigênio superior do grupamento metilenodioxí justifica a evidência e tendo em vista que para o oxigênio inferior do mesmo grupo encontra a posição *p* impedida.

A etapa crítica, qual seja, a redução parcial dos grupos nitro, ciclização e aromatização foi conduzida de duas formas distintas de acordo com procedimentos da literatura.

A condução da reação de acordo com o procedimento descrito por Sinhababu e colaboradores permitiu a obtenção do composto **35** em rendimento de 68%. Nesta metodologia o *o,β*-dinitroestireno **34** foi refluxado na presença de sílica gel 60 para cromatografia em coluna, ferro em pó, ácido acético glacial, benzeno e ciclohexano como fonte de hidrogênio. Produto analiticamente puro foi purificado pela cristalização em benzina de petróleo.

Alternativamente, investigou-se a reação de ciclização redutiva empregando o método de Fukuyama que substitui ferro por Pd/C e não utiliza ácido acético. O sólido escuro isolado foi purificado por cromatografia em coluna, fornecendo o indol **35** puro em baixo rendimento, apenas 17%.

Mediante análise espectroscópica de RMN de hidrogênio foi possível detectar 2H metilênicos, 4H aromáticos e o grupo N-H (sinal largo). A análise de ¹³C apresentou 9 carbonos na região característica de aromáticos e de carbonos ligados a átomos eletronegativos.

3.2 Carboxilação Seletiva

A carboxilação direta na posição-3 do anel indólico pode ser realizada de forma eficiente e seletiva adotando-se a estratégia sintética que emprega organometálicos e troca metal-halogênio. Entretanto, optou-se por metodologia que explora a substituição aromática eletrofílica de sistemas π -excessivos por permitir a síntese de precursores com atividade potencial no campo dos

reguladores de crescimento vegetal. Conforme apresentado no **Esquema 10**, grupos formil e ciano são considerados nas rotas biossintéticas da auxina **AIA**.

A reação de Vilsmeier-Haack é bastante utilizada na formilação de anéis aromáticos, e baseia-se no emprego de tricloreto de fosforila e N,N-dimetilformamida como agente de formilação.

Nesta reação a espécie altamente eletrofílica, cloro-imínio, é gerada *in situ*. A cloroamina formada na reação de substituição é hidrolizada ao aldeído **36** em meio alcalino. A reação é altamente regioseletiva, por apresentar o anel pirrólico uma densidade eletrônica muito superior ao anel benzênico, e a posição-2 formar um estado de transição mais energético que o correspondente na posição-3. Portanto, o 5,6-metilenodioxindol-3-il-formaldeído (**36**) foi isolado em rendimento satisfatório de 74%.

Este composto foi caracterizado espectroscopicamente, apresentando no infravermelho uma absorção em 1632 cm^{-1} própria de carbonila de aldeído aromático. Este mesmo grupo foi detectado por RMN de ^1H , juntamente com 5 outros sinais, todos singletos. Na análise por ^{13}C o carbono formila ocorre caracteristicamente em 185,24 ppm, sendo acompanhado de mais 9 sinais, compatíveis com a estrutura proposta.

A conversão do grupo formila a ciano foi conduzida via oxima. A adição nucleofílica seguida de eliminação e a desidratação como etapa final requereram temperatura superior a $120\text{ }^\circ\text{C}$. O produto **37** foi conseguido com um rendimento de 84% após otimização das condições reacionais.

O espectro no IV apresentou a banda característica de deformação axial do grupo ciano em 2218 cm^{-1} (**ANEXO 02**). A análise de RMN de ^1H apresentou um sinal largo em aproximadamente 11 ppm referente ao grupo N-H e 3 outros singletos correspondendo a 5H. O espectro de ^{13}C apresentou todos os 10 carbonos, dos quais, 6 quaternários (**ANEXOS 03 e 04**, respectivamente).

Finalmente, a molécula alvo, o ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico (**38**) foi obtido mediante hidrólise alcalina de **37** com rendimento satisfatório.

O grupamento carboxílico foi caracterizado por IV, apresentando as absorções referentes as deformações axiais O-H e C=O (**ANEXO 05**).

A análise de RMN de ^1H apresentou dois sinais largos, 11,67 ppm e 3,65 ppm, referentes aos dois prótons ácidos (um do ácido e outro do grupo amino)

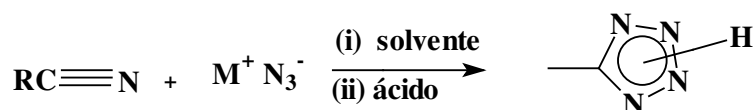
presentes na molécula proposta. Adicionalmente, os prótons metilênicos em 5,98 ppm e 3 prótons aromáticos (singletos) entre 6,98 e 7,79 ppm. O espectro de ^{13}C apresentou de forma previsível todos os 10 carbonos, dos quais, 6 quaternários (**ANEXOS 06 e 07**, respectivamente).

3.3. Tentativa de Conversão do 3-Ciano-5,6-metilenodioxindol (**35**) em 5,6-metileno-dioxi-3-il-tetrazol (**3-MIT**)

O anel tetrazol, mais especificamente o tautômero-*1H*, apresenta semelhanças físico-químicas (pKa), eletrônica e topográfica em relação ao grupo carboxílico, sendo considerado em química medicinal um isótero do referido grupo, podendo mimetizar o seu efeito.⁵²

Estendendo este conceito para a obtenção de novos reguladores de crescimento vegetal tetrazólicos análogos aos ácidos indol carboxílicos, tendo-se em conta a disponibilidade do indol **35** que apresenta em sua estrutura o grupo ciano, clássico precursor do anel tetrazol e devido a ausência na literatura de estudos relacionados à esta subunidade tetrazólica no âmbito dos reguladores de crescimento vegetal, decidiu-se pela investigação da reação de conversão de **35** no 5,6-metilenodioxindol-3-il-tetrazol.

A adição do ânion azida (N_3^-) à nitrilas constitui-se a rota mais extensamente utilizada para a preparação de tetrazóis 5 substituídos. Altamente sensível à natureza do cátion (M^+), a reação desenvolve-se mais satisfatoriamente em solventes polares apróticos (N,N-Dimetilformamida) e com grupos (-R) elétron-retiradores. Esta reação está representada no **Esquema 11**.



Esquema 11

O mecanismo proposto por Finnegan e colaboradores,⁵³ fundamenta-se no ataque nucleófilo do íon azida sobre o carbono do grupamento nitrila, seguido da ciclização da iminoazida para a formação do anel tetrazólico (ciclização 1,3-dipolar). Aparentemente o estabelecimento de uma carga residual δ , sobre o

átomo de carbono faz-se necessária, tendo em vista a observação de que o incremento de tal carga resulta em sensível aumento na velocidade reacional.

A utilização deste procedimento, entretanto, não conduziu ao composto desejado. Tentativas foram feitas em diferentes temperaturas e empregando alternativamente DMSO como solvente. Acredita-se que a baixa eletrofilicidade do grupo ciano possa ser responsável por este resultado.

Outros métodos descritos na literatura deverão ser investigados para a síntese de derivados tetrazólicos, com ênfase na utilização de amidas N-substituídas como precursores em associação com trifenilfosfina e azida de trimetilestano.⁵⁴

3.4 Avaliação de Atividade Reguladora de Crescimento Vegetal

Os eventos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento que ocorrem nos vegetais representam um processo integrado, complexo e pouco conhecido, havendo entretanto, uma estreita relação desses eventos com a ação de substâncias conhecidas como hormônios vegetais.

Conforme citado anteriormente, inúmeros compostos sintéticos reproduzem os efeitos dos hormônios vegetais, dentre eles destacam-se os ácidos indol-3-il-butírico (**AIB**, **11**) e o 2,4-diclorofenoxiacético (**2,4-D**, **14**), pertencentes à classe das auxinas, sendo o ácido indol-3-il-acético (**AIA**, **1**) o seu representante natural mais importante.

Na agricultura a utilização de compostos análogos ao **AIA** constitui uma prática rentável e bastante difundida, encontrando também grande aplicação no âmbito da biotecnologia vegetal. Devido a ampla aplicação dos hormônios vegetais, bem como a reconhecida vocação agrícola brasileira, tornou-se evidente a importância do estudo da atividade biológica dos compostos indólicos sintetizados, visando a avaliação da propriedade reguladora de crescimento vegetal.

Todos os testes realizados na determinação da atividade reguladora de crescimento vegetal foram específicos para auxinas, com o objetivo de avaliar se os compostos testados pertencem ou não à essa classe.

3.4.1 Promoção de Crescimento de Radículas

A avaliação da promoção de crescimento de radícula foi realizada através de ensaios biológicos *in vitro*, e baseia-se na medida do comprimento das radículas.

Objetivando avaliar a atividade reguladora de crescimento vegetal do composto **38**, foram conduzidos ensaios utilizando-se como material vegetal sementes de *Lactuca sativa* variedade Grand Rapids (alface crespa), *Cucumis sativus* (pepino) e de *Raphanus sativus* (rabanete).

Nos experimentos conduzidos com *Lactuca sativa*, sementes submetidas à concentração 10^{-8} M apresentaram a maior média de comprimento de radícula, 16,55 mm, seguida das concentrações 10^{-6} e 10^{-5} M com 15,20 e 13,00 mm, respectivamente. Sementes submetidas a suplementação 10^{-7} M apresentaram a menor média, 7,15 mm, conforme mostra a **Figura 4**. Foram observadas leves variações nos comprimentos médios de radícula, não sendo possível, entretanto, observar diferença estatística significativa entre as médias.

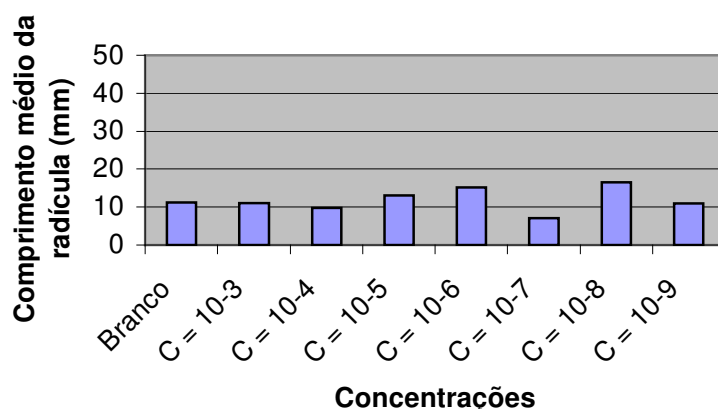


Figura 4 – Efeito do composto **3-AMIM (38)** no comprimento médio de radícula de sementes germinadas de *Lactuca sativa* (alface crespa).

Sementes de pepino submetidas a suplementação de 10^{-5} M apresentaram a maior média de comprimento de radícula, 44,75 mm, seguida das concentrações de 10^{-4} e 10^{-9} M, com médias de 39,25 e 38,40 mm,

respectivamente, com o ensaio controle (branco) apresentando média de 38,40mm (**Figura 5**).

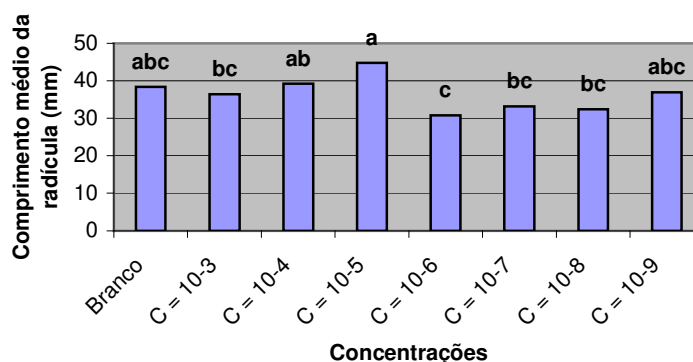


Figura 5 – Efeito do composto **3-AMIM (38)** no comprimento médio de radícula de sementes germinadas de *Cucumis sativus* (pepino). As letras minúsculas representam o teste de médias - Tukey, 5%.

Na **Figura 5** é possível observar variações nos comprimentos médios de radícula, podendo ser notado diferença estatística significativa entre as médias, quando sementes de *Cucumis sativus* (pepino) foram tratadas com diferentes concentrações de **3-AMIM**.

O comprimento médio de radícula de sementes germinadas de *Raphanus sativus* (rabanete) não mostrou-se significativo. Sementes submetidas às concentrações de 10⁻⁶, 10⁻⁸ e 10⁻⁹ M apresentaram as médias mais altas, 32,10, 31,05 e 30,00 mm, respectivamente, sendo a média do controle de 30,00 mm. Sementes suplementadas com **38** na concentração de 10⁻⁴ M apresentaram a menor média de comprimento de radícula, 24,05mm, como mostrado na **Figura 6**.

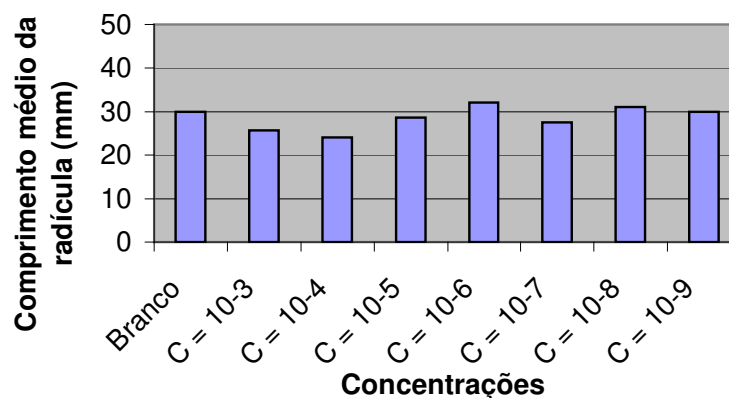


Figura 6 – Efeito do composto **3-AMIM (38)** no comprimento médio de radículas de sementes germinadas de *Raphanus sativus* (rabanete).

3.4.2 Ensaio do Bioteste de Pecíolos

A segunda fase do trabalho corresponde a realização do experimento para avaliação do bioteste dos pecíolos empregando-se plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão de vagem). Os resultados com o composto 3-AMIM foram promissores quando comparados ao composto **2,4-D** (utilizado como padrão), conforme é apresentado nas **Figuras 7 e 8**.

Nos testes conduzidos com o composto **3-AMIM** foi possível observar que os pecíolos tratados nas concentrações de 25 ppm apresentou uma pequena variação para mais, de 100 ppm apresentou média inferior ao **2,4-D (Figura 8)**, no entanto, quando tratados a 50 ppm tiveram 44,1868% de fechamento do ângulo interno das peças em “Y” (**Figura 7**) e o composto 2,4-D na mesma concentração apresentou média mais baixa, 42,70%.

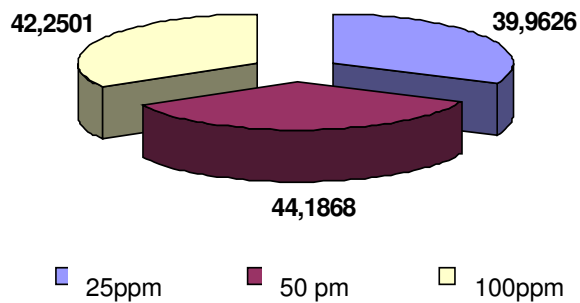


Figura 7 – Efeito do composto **3-AMIM (38)** em porcentagem no fechamento do ângulo interno de peças em “Y” com plantas *Phaseolus vulgaris* (feijão de vagem).

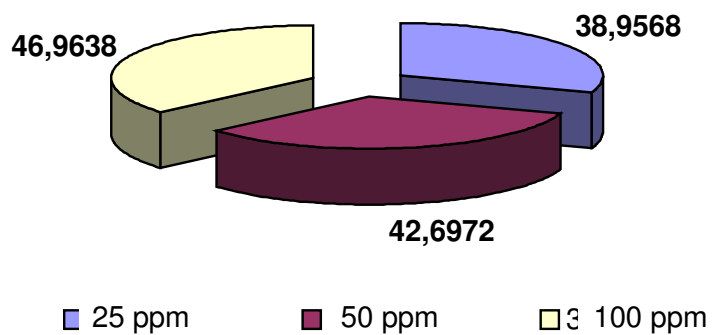


Figura 8 – Efeito do composto **2,4-D** em porcentagem no fechamento do ângulo interno de peças em “Y” com plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão de vagem).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Técnicas de Caracterização

Os espectros de **IV** foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo FT-IR 16PC, empregando-se pastilhas de KBr ou filme em cela de NaCl.

As análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C foram realizadas em aparelho (BRUCKER) de 200 e 50 MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos são dados em partes por milhão (ppm), utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

As análises elementares foram realizadas em um analisador de C, H, N Perkin-Elmer 2400.

As análises de massas foram realizadas em espectrômetro CGMS-QP-2000-A Shimadzu com impacto de elétrons em 70ev.

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

No acompanhamento de reações foi empregada a técnica de CCD utilizando-se como suporte sílica gel 60GF₂₅₄ com os compostos visualizados por irradiação UV (254nm) e vapor de iodo, quando necessário. Esta técnica também foi empregada 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, indicados nos procedimentos.

4.2 Solventes e Reagentes

Os reagentes e solventes empregados foram de pureza e de procedência Aldrich, Merck, Carlo Erba, Sigma, Riedel-de-Haên, Vetec, Reagen, Grupo Químico e Nuclear

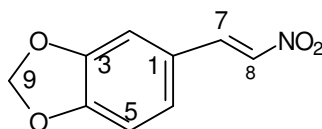
Os solventes orgânicos foram secos e/ou purificados quando necessário de acordo com os métodos tradicionais descritos na literatura.^{55,56}

Cloreto de fosforila foi submetido à destilação simples e à pressão normal previamente ao seu uso.

4.3 Síntese do Núcleo Metilenodioxindólico Não-substituído na Subunidade Heterocíclica

4.3.1 Síntese do 3,4-Metilenodioxi- β -nitroestireno (33)

Uma mistura de 3,4-metilenodioxibenzaldeído (10 g, 66,7 mmol), nitrometano (11 mL), acetato de amônio (13,94 g) e ácido acético glacial (200 mL), foi refluxada durante 4 horas a uma temperatura de 120 °C (inicialmente a mistura era incolor e após 30 min tornou-se alaranjada). A mistura foi resfriada à temperatura ambiente e vertida em água gelada com gelo picado. O sólido amarelo formado foi filtrado em funil de Büchner, lavado com água gelada e secado em estufa a vácuo a 70 °C. O produto foi obtido suficientemente puro com rendimento de 73%.



pf 159,2-160,9°C (Lit²¹ 159-161°C).

IV (KBr, ν/cm^{-1}): 3420 (NH), 1492 (NO), 1334 (NO), 1268 (COC).

RMN ¹H (acetona-d₆, δ): 6,13 (s, 2H, H-9); 6,99 (d, *J* 7,96Hz, 1H, H-3); 7,37 (d, *J* 7,99Hz, 1H, H-2); 7,38 (s, 1H, H-6); 7,9 (d, *J* 13,55 Hz, 1H, H-7); 8,05(d, *J* 13,54 Hz, 1H, H-8).

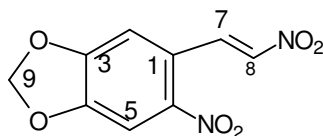
RMN ¹³C (acetona-d₆): δ 102,5 (CH₂, C-9); 106,9 (CH, C-3); 109,0 (CH, C-2); 124,1 (C_O, C-1); 126,6 (C_O, C-6); 135,3 (CH, C-7); 139,0 (CH, C-8); 148,7 (C_O, C-4); 151,3 (C_O, C-5).

EM: *m/z* (intensidade relativa/%) 193 (M⁺, 100%), 146 (100%), 117 (20%), 89 (100%), 65 (26%), 63 (90%).

Anal Calcd para C₉H₇NO₄ (%): C55,96; H3,65; N7,26; encontrado C55,74; H3,67; N7,26.

4.3.2 Síntese do *o*-Nitro-3,4-metilenodioxib- β -nitroestireno (34)

Uma mistura de ácido nítrico concentrado (17,52 mL) e ácido acético glacial (13,25 mL) foi resfriada a 5 °C e adicionada gota à gota a um frasco mantido em banho de gelo contendo 3,4-metilenodioxib- β -nitroestireno (5,0 g) sob agitação magnética. Ao término da adição, o banho de gelo foi removido e a mistura mantida sob agitação por 3 (três) horas adicionais, quando então foi vertida em gelo e água. O sólido formado foi filtrado em funil de Büchner, lavado com água gelada até neutralização e secado em estufa a vácuo. A recristalização com etanol forneceu o produto puro em 94% de rendimento.



pf 121-122⁰C (Lit²¹ 121-122⁰C)

IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} 3450 (NH), 1506 (CNO), 1324 (CNO) 1270 cm^{-1} (COC).

RMN ¹H (200MHz, Acetona-d₆) δ 6,35 (s, 2H, H-9), 7,43 (s, 1H, H-6), 7,69 (s, 1H, H-3), 7,91 (d, *J* 13,42 Hz, 1H, H-7), 8,49(d, *J* 13,42 Hz, 1H, H-8).

RMN ¹³C (50MHz, Acetona-d₆) δ 105,6 (CH₂, C-9), 106,9 (CH, C-3), 108,9 (CH, C-2), 123,2 (C₀, C-1), 136,3 (CH, C-7), 141 (CH, C-8), 153,7 (C₀, C-5).

MS: *m/z* (intensidade relativa) 238 (M⁺, 15%), 206 (2%), 162 (25%), 161 (20%), 136 (55%), 106 (45%), 78 (47%), 76 (70%), 62 (100%).

Anal Calcd, para C₉H₆N₂O₆; C45,39%, H2,53%, N11,76%, encontrado C45,78%, H2,67%, N11,65%.⁶¹

4.3.3 Síntese do 5,6-Metilenodioxindol (35) Via Ciclização Redutiva

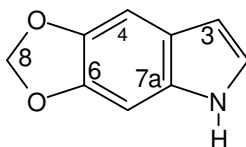
Procedimento 1

Uma mistura de *o*-nitro-3,4-metilenodioxib- β -nitroestireno (1,0 g; 4,2 mmol), sílica gel 60 para coluna cromatográfica (5,6 g, 70-230 mesh), ferro em pó (3,4 g), ácido acético glacial (29,2 mL), benzeno (10,6 mL) e ciclohexano (32,0 mL) foram

refluxados durante quatro horas sob atmosfera de nitrogênio. A mistura foi resfriada a 25 °C, diluída em diclorometano e filtrada. O sólido foi lavado com uma solução 10% de éter etílico em diclorometano, as fases orgânicas combinadas foram lavadas com metabissulfito de sódio (10%), bicarbonato de sódio (20%), cloreto de sódio (20%) e secado com sulfato de magnésio. A fase orgânica seca foi filtrada e o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida. Depois foi adicionado benzina de petróleo, esfriado e devidamente isolado, o sólido escuro formado foi purificado por diversas lavagens com diclorometano e posterior adição de benzina de petróleo fornecendo o indol **35** puro em 68% de rendimento e pf 108,7-109,2 °C, estando de acordo com o citado na literatura (p.f 108-110 °C).⁴⁵

Procedimento 2

Uma mistura de *o*-nitro-3,4-metilenodioxib- β -nitroestireno (0,2 g, 0,84 mmol), catalisador Pd/C 10% (1,08 g), etanol absoluto (24,0 mL) e cicloexano (1,0 mL) foi refluxada durante três horas. A mistura foi esfriada e filtrada e o sólido lavado com uma solução 10% de éter etílico em diclorometano, as fases orgânicas combinadas foram lavadas com metabissulfito de sódio (10%), bicarbonato de sódio (20%), cloreto de sódio (20%) e secadas com sulfato de magnésio. A fase orgânica seca foi filtrada e o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida. Depois foi adicionado benzina de petróleo, esfriado e devidamente isolado, o sólido escuro formado foi purificado por diversas lavagens com dicloro metano e posterior adição de benzina de petróleo fornecendo o indol **35** puro em 17% de rendimento.



pf 109,4-110,0°C (Lit. ²¹ 108-110°C).

IV (KBr) $\nu_{\text{max.}}/\text{cm}^{-1}$, 3410 (NH), 3072 (CH), 1206 (COC).

RMN ¹H (200MHz, CDCl₃) δ 5,92 (s, 2H, H-8), 6,42 (s, 1H, H-2), 6,84(s, 1H, H-7), 7,00(s, 1H, H-4), 7,06 (s, 1H, H-3), 8,0 (s, 1H, NH).

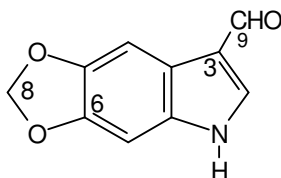
RMN ^{13}C (50MHz), CDCl_3) δ 91,8 (CH, C-7), 99,1 (CH, C-4), 100,5 (CH_2 , C-8), 102,8 (CH, C-3), 121,6 (C_o , C-4a), 122,7(CH, C-2), 130,6 (C_o C-7a), 143 (C_o C-6), 144,9 (C_o , C-5).

MS: m/z (intensidade relativa) 161 (M^+ , 100%), 103 (38%), 76 (33%), 50 (23%).

Anal Calcd, para $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_2$, C67,48%, H4,34%, N8,69%, encontrado C65,10%, H4,23%, N8,56%.

4.3.4 Síntese do 5,6-Metilenodioxindol-3-il-formaldeído (3-MIF) (36)

N,N-Dimetilformamida (2,0 mL) foi resfriada à temperatura de 10-20 $^{\circ}\text{C}$ e tratada gota à gota com tricloreto de fosforila (0,6 mL). Após 15 minutos, uma solução de 5,6-Metilenodioxindol (0,97 g; 6 mmol) em N,N-dimetilformamida (0,3 mL) foi adicionada lentamente à mistura previamente preparada, mantendo-se a temperatura entre 20-30 $^{\circ}\text{C}$. A mistura reacional foi agitada durante 2 horas e vertida em gelo picado. À solução resultante foi adicionada lentamente uma solução de hidróxido de sódio (1,12 g; 28 mmol) em água (5,4 mL). O sólido formado foi filtrado em funil de Büchner, lavado com água gelada e secado em estufa a vácuo. O sólido foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como eluente diclorometano, fornecendo o produto puro em 74% de rendimento.



p.f = 222,2 $^{\circ}\text{C}$ com decomposição

IV (KBr) $\nu_{\text{max.}}/\text{cm}^{-1}$, 3194 (NH), 2886 (CH), 1632 (CO), 1294 (COC).

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) δ 5,99 (s, 2H, H-8), 7,01 (s, 1H, H-7), 7,60(s, 1H, H-4), 8,01(s, 1H, H-2), 9,93 (s, 1H, CHO), 11,0 (s,1H, NH).

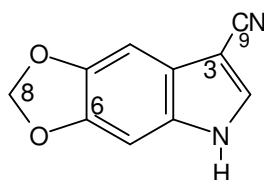
RMN ^{13}C (50MHz), CDCl_3) δ 93,6 (CH, C-7), 100,6 (CH, C-4), 101,8 (CH_2 , C-8), 119,5 (C_o C-4a), 120,3 (C_o , C-3), 133,1 (C_o , C-7a), 136,1 (CH, C-2), 145,7 (C_o , C-6), 146,8 (C_o , C-5), 185,2 (CH, CHO).

MS: m/z (intensidade relativa) 289 (M^+ , 100%), 160 (13%), 76 (33%), 50 (30%).

Anal Calcd, para $C_{10}H_7NO_3$; C63,48%, H3,72%, N7,40%, encontrado C,65,10%; H, 3,82%; N, 7,54%.

4.3.5 Síntese do 3-Ciano-5,6-Metilenodioxindol (3-MIC) (37)

5,6-Metilenodioxindol-3-il-formaldeído (200 mg; 67 mmol) em DMF (1,0 mL) foi aquecido a refluxo quando então foi adicionado gota à gota uma solução de hidrocloreto de hidroxilamina (120 mg, 1mmol) em DMF (1,0 mL). A solução resultante foi refluxada por 7 horas, sendo posteriormente resfriada em banho de gelo. Foi adicionado água lentamente que promoveu a precipitação do sólido. Este foi isolado por filtração em funil de Büchner, lavado com água e secado em estufa a vácuo. O produto nitrila foi obtido em rendimento de 74%.



pf = 219,4-224,1⁰C.

IV (KBr) ν_{max}/cm^{-1} , 3269 (NH), 2218 (CN) e 1223 (COC).

RMN ¹H (200MHz, Acetona-d₆) δ 2,87 (s, 2H, H-8), 5,96 (s, H, H-2), 6,99(s, 1H, H-7), 7,84(s, 1H, H-4), 11,00 (s,1H, NH).

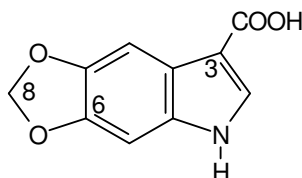
RMN ¹³C (50MHz), Acetona-d₆) δ 87,3 (C₀, C-9), 94,3 (CH₂, C-8), 98,2 (CH, C-7), 102,1 (CH, C-4), 116,3 (C₀, C-7a), 122,5 (C₀, C-4a), 131,5 (C₀, C-3), 132,5 (CH, C-2), 146,1 (C₀, C-6), 147,5 (C₀, C-5).

Anal Calcd para $C_{10}H_6N_2O_2$; C64,51%, H3,24%, N15,05%, encontrado C62,87%, H3,21%, N14,46%.

4.3.6 Síntese do Ácido 5,6-Metilenodioxindol-3-il-metanóico (3-AMIM) (38)

5,6-Metilenodioxindol-3-il-ciano (1,0g; 5,3mmol) em solução aquosa de hidróxido de sódio (30-40%, 5 mL) foi refluxado durante 3 horas. Após resfriamento, a mistura foi diluída com água destilada (5 mL) e acidificada a pH

5,0 com ácido clorídrico (15%). O produto foi isolado por filtração a vácuo e lavado com água e secado em estufa a vácuo, fornecendo o produto desejado em 75% de rendimento. Produto analiticamente puro foi obtido mediante cristalização em solução alcalina e posterior acidificação.



pf = 237,1-239,0⁰C

IV (KBr) $\nu_{\text{max.}}/\text{cm}^{-1}$, 3437 (NH), 2908 (OH), 1678 (CO) da carbonila e 1307 (COC),

RMN ¹H (200MHz, Acetona-d₆) δ 3,65 (s, 1H, OH) 5,98 (s, 2H, H-8), 6,98(s, 1H, H-7), 7,37(s, 1H, H-4), 7,99 (s, 1H, H-2), 11,67 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (50MHz), Acetona-d₆) δ 98,0 (CH₂, C-8), 104,2 (CH, C-7), 105,7 (CH, C-4), 113,0 (C₀, C-7a), 125,4 (C₀, C-4a), 135,1 (CH, C-2), 136,3 (C₀ C-6), 148,7 (C₀ C-5), 149,6 (CH, C-3), 171,2 (CO₂, CO₂H).

Anal Calcd para C₁₀H₇NO₃; C63,48%, H3,72%, N7,40%, encontrado C65,10%, H3,39%, N6,41%

4.3.7 Tentativa de Preparação do 5,6-metilenodioxindol-3-il-tetrazol (3-MIT)

Em um frasco adaptado com condensador de refluxo foram colocados 3-ciano-5,6-metilenodioxindol (0,1 g; 0,53 mmol) dissolvido em 3,0 mL de DMSO, cloreto de amônio (0,14 g; 2,7 mmol) e azida sódica (0,17 g; 2,6 mmol). A mistura reacional foi refluxada em banho de óleo por 9 horas. Após este período, a mistura reacional foi vertida em água e gelo. O precipitado formado foi filtrado em funil de Büchner, secado e caracterizado como sendo o material de partida.

A reação também foi conduzida à temperatura de 140 °C substituindo-se o DMSO por DMF mudando a temperatura, porém, sem sucesso.

4.4 Avaliação da Atividade Reguladora de Crescimento Vegetal

Todos os testes realizados são específicos para determinação da atividade reguladora de crescimento vegetal de auxinas.

Os testes empregados na avaliação da atividade reguladora de crescimento vegetal do composto **38** foram realizados através de ensaios biológicos *in vitro* utilizando-se câmara de germinação.

4.4.1 Promoção de Crescimento de Radículas

Procedimento Geral

Os ensaios para a avaliação do desenvolvimento de radícula foram conduzidos com sementes de *Lactuca sativa* variedade Grand Rapids (alface crespa), *Cucumis sativus* (pepino) e *Raphanus sativus* (rabanete). Soluções de **38** foram preparadas nas concentrações de 10^{-3} a 10^{-9} M utilizando acetona como solvente. Os ensaios foram realizados em placas de Petri esterilizadas, sendo que para cada concentração utilizou-se 1 placa contendo 4 discos de papel filtro. Em cada disco de papel foi adicionado 1mL de solução nas diferentes concentrações, sendo o solvente (acetona) evaporado antes da adição de 1,5 mL de Tween 80 (0,01%). Em seguida procedeu-se à inoculação das sementes: 50 de alface ou 20 de rabanete ou de pepino em cada disco, num total de 200 ou 80 sementes em cada placa, respectivamente. As sementes antes de serem inoculadas foram submetidas ao processo de assepsia em hipoclorito de sódio 40%, etanol 70% e água destilada. As placas foram incubadas em câmara de germinação, com temperatura controlada a 25 ± 2 °C e foto período de 16 h.luz, durante 5 dias. Diariamente foram observados o número de sementes que germinaram e no quinto dia após a inoculação das sementes foi realizada a coleta de dados, onde foram determinados os comprimentos em milímetros das radículas. Como controle foi utilizado ensaio similar, colocando-se as mesmas sementes em discos de papel umedecidos com acetona. Os dados foram tabulados estatisticamente utilizando-se o teste de Tuckey (statgraf).

4.4.2 Bioteste de Pecíolos em *Phaseolus vulgaris* (feijão de vagem)

O ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico (**38**) foi submetido ao bioteste de pecíolos. Foram empregados também água/acetona e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (**2,4-D**) como controle. O composto **38** e o **2,4-D** foram testados nas concentrações de 25, 50 e 100 ppm. No preparo de cada solução foi empregado acetona como co-solvente.

As sementes de *Phaseolus vulgaris* foram inoculadas em placas de Petri sobre discos de papel filtro molhados com água destilada. As placas de Petri foram incubadas em câmara de germinação com temperatura controlada de 25 ± 2 °C e foto período de 16 h.luz durante 4 dias, sendo distribuídas ao acaso. As sementes germinadas foram transplantadas para vasos de polietileno utilizando como substrato terra orgânica misturada com cascas de arroz. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com umidade e ventilação controlada durante 10 a 15 dias.

As peças em “Y” foram colocadas em placas de Petri (1 peça cada placa), com 5 mL de solução conforme os tratamentos: água/acetona, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, e os compostos a serem avaliados. As plantas foram separadas por tratamento, sendo que cada um é constituído de 15 a 20 exemplares. As placas foram mantidas em câmara de germinação com temperatura controlada a 25 ± 2 °C e foto período de 16 h/luz durante 24 horas, sendo distribuídas ao acaso. Após este período foi desenhado o contorno de cada peça, medidos os ângulos entre os pecíolos e calculada a porcentagem de variação em relação à média dos ângulos iniciais para cada tratamento. Os dados do ensaio foram tratados estatisticamente pelo Excel de acordo com o intervalo de confiança obtido da média das variações angulares.

5 CONCLUSÕES

√. A obtenção do núcleo 5,6-metilenodioxindol (**35**) via ciclização redutiva do α,β -dinitroestireno **34** foi conduzida conforme procedimento da literatura. Este empregou piperonal como material de partida, fornecendo o produto desejado em 3 etapas com rendimento global de 46%.

√. A síntese do ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico (**38**) foi conduzida a partir de **35** em 3 etapas, nominalmente: formilação, formação de nitrila via oxima e hidrólise alcalina. O rendimento global do procedimento de carboxilação seletiva foi de 40%.

√. Os compostos ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico e precursores são compostos inéditos.

√. As substâncias sintetizadas foram caracterizadas por análises no IV, RMN ^1H e ^{13}C , espectrometria de massas, análise elementar e ponto de fusão, apresentando dados compatíveis com as estruturas propostas.

√. Os ensaios conduzidos com o ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico (**38**) para avaliação da promoção de crescimento de radículas em sementes germinadas de 3 espécies vegetais apresentaram os seguintes resultados: com a espécie *Lactuca sativa* variedade (alface crespa) não houve diferença estatística significativa, com as concentrações de 10^{-6} e 10^{-8} M apresentando as médias de comprimento de radícula mais elevadas; sementes de *Cucumis sativus* (pepino) submetidas a suplementação de 10^{-5} M apresentaram a maior média de comprimento de radícula, 44,75 mm, sendo o comprimento médio do ensaio controle de 38,40 mm, notando-se diferença estatística neste experimento; e finalmente, o *Raphanus sativus* (rabanete), semelhantemente à espécie *Lactuca sativa*, não apresentou diferença estatística significativa.

√. No bioteste de pecíolos empregando *Phaseolus vulgaris* o ácido 5,6-metilenodioxindol-3-il-metanóico (**38**) apresentou atividade superior ao controle **2,4-D** (**14**) na concentração de 50 ppm, na concentração de 25 ppm apresentou uma pequena variação para mais e na concentração de 100 ppm apresentou média inferior.

√. Ensaios complementares de enraizamento caulinar e de embriogênese somática se fazem necessários para melhor avaliar o potencial das substâncias sintetizadas como reguladores de crescimento vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AWAD, M.; CASTRO, R. C. P.; AUDUS, L. J. Plant growth hormones. Londres: Leonard Hill, 1993.
2. RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. Os hormônios vegetais: regulando o crescimento e o desenvolvimento. In: **BIOLOGIA vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001. p. 648-675.
3. KENDE, H.; ZEEVAART, J. A. D. The five classical plant hormones. **Plant Cell**, v. 9, p. 1197-1210, 1997.
4. CREELMAN, A. R.; MULLET, E. J. Oligosaccharins, brassinolides and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development and gene expression. **Plant Cell**, v. 9, p. 1211-1223, 1997.
5. CREELMAN, A. R.; MULLET, E. J. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 48, p. 355-381, 1997.
6. GALSTON, W. A.; SAWHNEY, K. R. Polyamines in plant physiology. **Plant Physiol**, v. 94, p. 406-410, 1990.
7. TERRY, R. **Metabolic pathways of agrochemicals** – Part 1: herbicides and plant growth regulators. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998.
8. COHEN, J. D.; BANDURSKI, R. S. Chemistry and physiology of the bound auxins. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 33, p. 403-430, 1982.
9. MacMILLAN, J. **Hormonal regulation of development** I. Molecular aspects of plant hormones. Encyclopedia of Plant Physiology. Berlin: Springer, 1980, 9, p. 681.
10. ROBERTS, J. A.; HOOLEY, R. **Plant growth regulators**. Glasgow: Blachie, 1988.
11. TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer, Sunderland, 1998.
12. HOOYKAAS, P. J. J.; HALL, M. A.; LIBBENGA, K, R. **Biochemistry and molecular biology of plant hormones**. Elsevier Science B. V., 1999.
13. <http://www.bio.metu.edu.tr/~e068741/project/auxin.html> (27/01/2000).

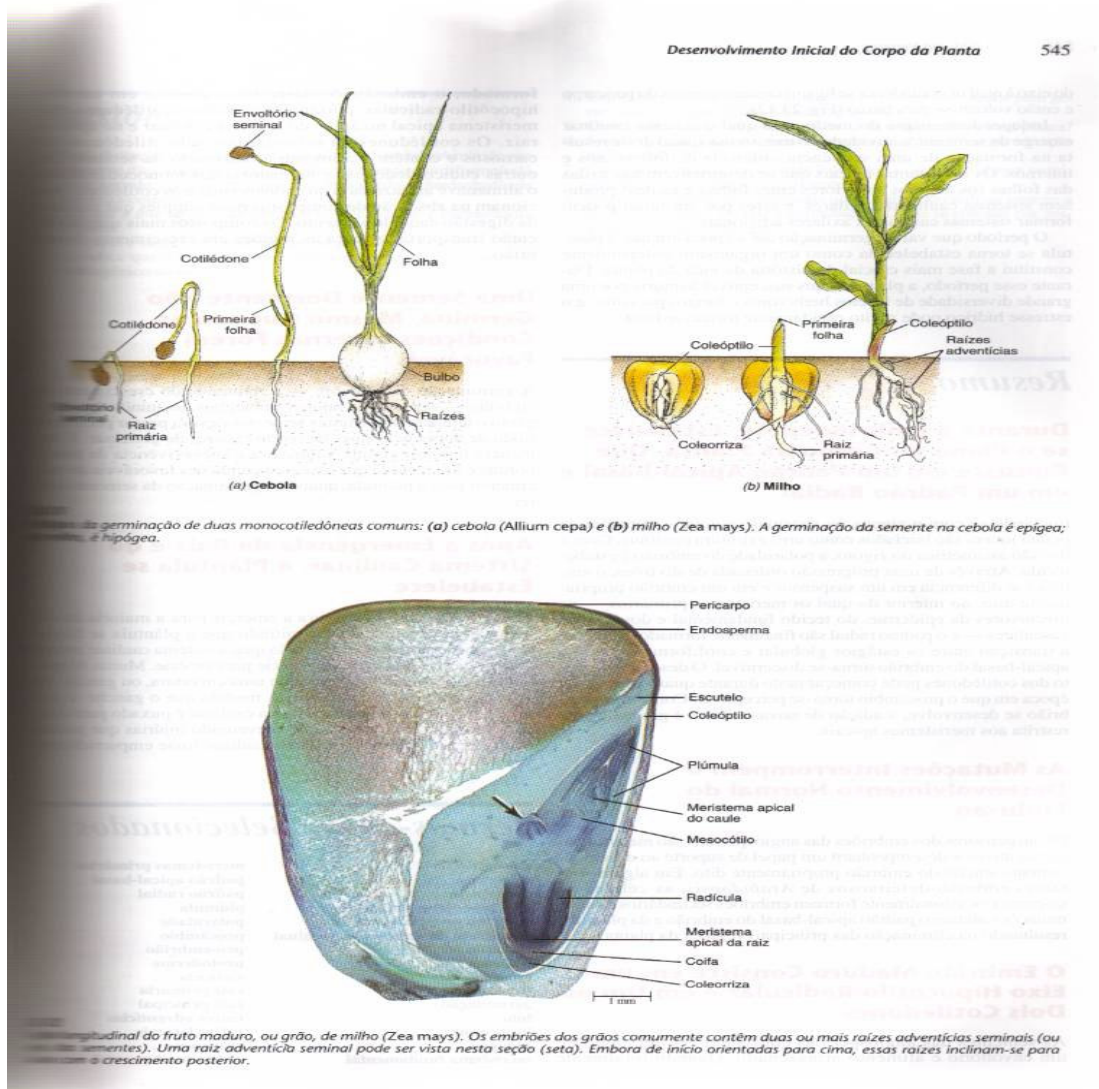
14. TADINO, L. A. V.; FAES, M. J.; CHRISTIAENS, E. L.; KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J. **Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 197-200, 2003.
15. NORMAN, A. G. New growth-regulating compounds 1. Summary of growth inhibitory activities of some organic compounds as determined by three tests. **Botanical Gazette**, v. 107, p. 476-507, 1946.
16. ROSA, F. 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**. 2002. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
17. SHINGO, MARUMO; MASATO, KATAYAMA. **Indoleacetic acid derivative and production thereof**. Patent Abstracts of Japan, 62077366 A, 1987.
18. SHINGO, MARUMO; MASATO, KATAYAMA. **Novel indole acetic acid derivative**. Patent Abstracts of Japan, 01228962 A, 1989.
19. SHIGERU, TORII; HIDEO, TANAKA; YASUO, MURAKAMI; et al. **Production of dichoroindoleacetic acid derivative**. Patent Abstracts of Japan, 01047763 A, 1989.
20. MASANORI, SOMEI; YASUICHI, HIRAI; SENCHI, FUJI; et al. **Plant growth regulator**. Patent Abstracts of Japan, 02085251 A, 1990.
21. ROSA, F. A. F. da; REBELO, R. A.; NASCIMENTO, M. da G. Synthesis of new Indolecarboxylic acids related to the plant hormone indoleacetic acid IAA. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, p. 11-15, 2003.
22. KOJIC-PRODIC, B.; MAGNUS, V.; ANTOLIC, S.; TOMIC, S.; SALOEK-SONDI, B. Structure-activity correlations for auxins. **Acta Bot. Croat.** v. 58, p. 27-37, 1999.
23. NIGOVIC, B.; ANTOLIC, S.; KOJIC-PRODIC, B.; KIRAL, J. R.; MAGNUS, V.; SALOPEK-SONDI, B. Correlations of structural and physico-chemical parameters with the bioactivity of alkylated derivatives of indole-3-acetic acid, a phytohormone (auxin). **Acta Crystallographica Section B**, v. 56, p. 94-111, 2000.
24. VENS, M. A.; THOMAS, E. W. Synthesis and auxin activity of 5-substituted 1-naphthaleneacetic acid. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 381-383, 1990.

25. KATEGAR, G. F.; GEISSLER, A. E. Auxins II: the effect of chlorinated indolyacetic acid on pea stems. **Phytochemistry**, v. 21, p. 257-260, 1982.
26. RENEKE, D. M.; OZGA, J. A.; MAGNUS, V. Effect of halogens substitution of indole-3-acetic acid on biological activity in pea fruit. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1361-1366, 1995.
27. ANTOLIC, S.; KOJIC-PRODIC, B.; TOMIC, S.; NIGOVIC, B.; MAGNUS, V.; COHEN, J. D. Structural studies on monofluorinated derivatives of the phytohormone Indole-3-acetic acid. **Acta Cryst. B**, v. 52, p. 651-661, 1996.
28. GILCHRIST, T. I.; **Heterocyclic Chemistry**. New York: Longman Scientific & Technical, 1985. p.161-165.
29. JOULE, J. A.; SMITH, G. F.; **Heterocyclic Chemistry**. Cap. 21, 2. ed. London: Van Nostrand Reinhold, 1978. 257p.
30. JOULE, J. A.; SMITH, G. F.; **Heterocyclic Chemistry**. Cap. 17, 3. ed. Londres: Chapman & Hall, 1995. 305 p.
31. KATRITZKY, A. R.; REES, C. W. **Comprehensive heterocyclic chemistry**. 1. ed. Londres, 1984.
32. LIPINSKA, T.; GUIBÉ-AMPEL, E.; PETIT, A.; LOUPY, A. 2-(2-Pyridyl)indole derivatives preparation via Fischer reaction on montmorillonite K10 zinc chloride under microwave irradiation. **Synth. Commun.**, v. 29, n. 8, p. 1349-1354, 1999.
33. GRIBBLE, G. W. Recent developments in indoles ring synthesis-methodology and applications. **J. Chem. Soc, Perkin Trans. I**, p. 1045-1075, 2000.
34. ELDERFIELD, R. C. **Heterocyclic compounds**. New York: Editor John Wiley & Sons, Inc., 1952. v. 3.
35. PAQUETTE, L. A. **Modern heterocyclic chemistry**. Nova York: W. A. Benjamin, Inc., 1968.
36. MOODY, C. J.; SWANN, E. N-H insertion reactions of rhodium carbenoids: a modified Bischler indole synthesis. **Synlett**, p. 135-136, 1998.
37. REBELO, R. A. **Synthetic approaches to cytotoxic pyridoacridine alkaloids**. 1992. Thesis (Doctoral in Chemistry) – University of East Anglia, Norwich, England, 1992.
38. SUNDBERG, R. J. Deoxygenation of nitro groups by trivalent phosphorus indoles from *o*-nitrostyrenes. **J. Org. Chem.**, v. 30, p. 3604, 1965.

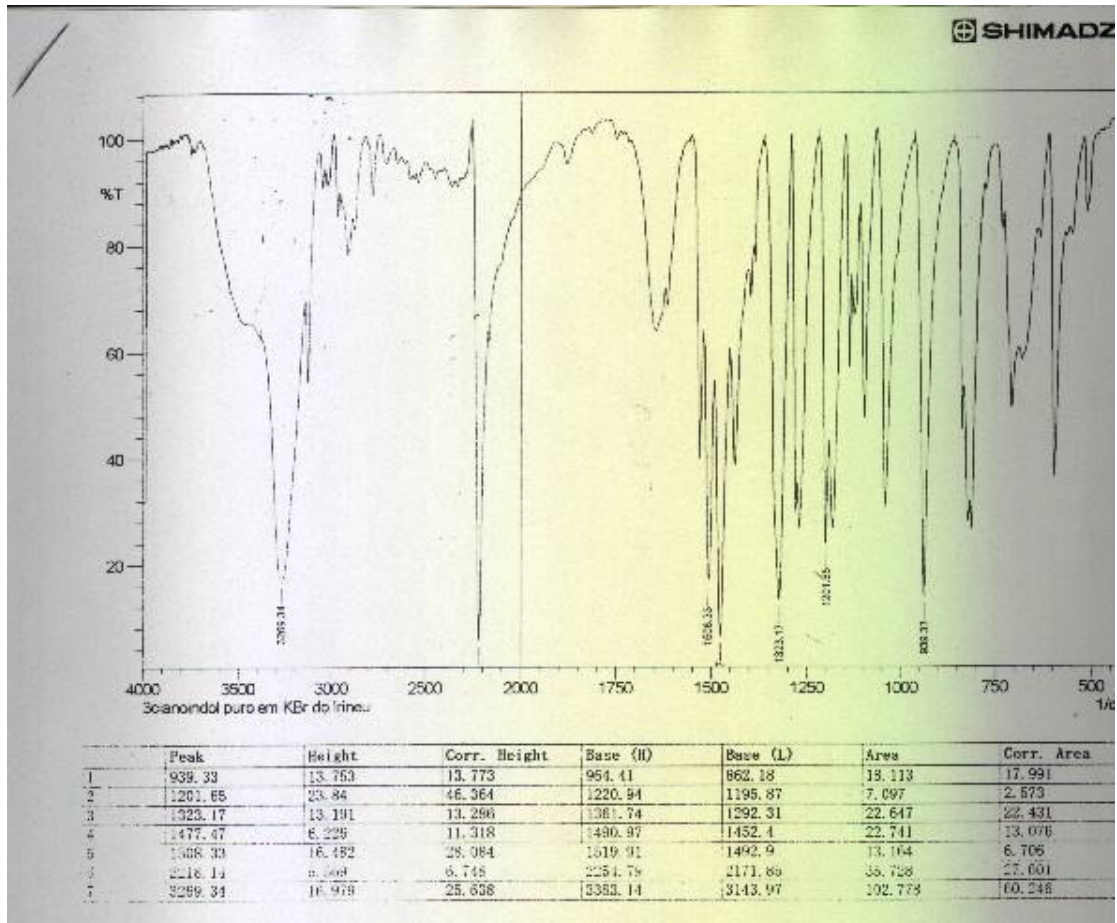
39. SUNDBERG, R. J. Indoles from o-nitrostyrenes. Synthesis and reactions of 2-indolyl-4-piperidylmethylketone. **J. Org. Chem.**, v. 33, n. 2, p. 487, 1968.
40. CATOGAN, J. I. G.; CAMERON-WOOD, M.; MACKIE, R. K.; SEARLE, R. J. G. The reactivity of organophosphorus compounds. Part XIX. Reduction of nitro-compounds by triethylphosphite: a convenient new route to carbazoles, indoles, indazoles, triazoles, and related compounds. **J. Chem. Soc.**, p. 4831, 1965.
41. KRAUS, G. A.; SELVAKUMAR, N. Preparation of a key tricyclic intermediate for the synthesis of pyrrolaminoquinone natural products. **Synlett**, p. 845-846, 1998.
42. HE, F.; BO, Y.; ALTOM, J. D.; COREY, E. J. Enantioselective total synthesis of aspidophytine. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 121, p. 6771, 1999.
43. HUEBNER, C. F.; TROXELL, H. A.; SCHROEDER, D. C. Dimethoxy substituted Harman and other compounds derived from 5,6-dimethoxyindole. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 75, p. 5887-5890, 1953.
44. FUKUYAMA, A. K.; IWATSUKI, C.; KODAMA, M.; OCHI, M.; KATAOKA, K.; Antimicrobial indolequinones from the mid-intestinal gland of the Muricid Gastropod *Drupella Fragum*. **Tetrahedron**, v. 54, p. 10007, 1998.
45. FUKUYAMA, T.; CHEN, X. Stereocontrolled synthesis of (-)-hapalindole G. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 115, p. 3125, 1994.
46. COSTA, P. R. R. Safrol e eugenol estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 357-369, 2000.
47. COSTA, P. R. R.; BARREIRO, E. J.; BARROS, P. R. V. R.; QUEIROZ, W. M. An improved synthesis from natural safrole of indole derivatives related to indomethacin. **J. Chem. Res. (M)**, p. 1142, 1982.
48. COSTA, P. R. R.; BARREIRO, E. J.; FARIAS, F. M. C.; COELHO, F. A. S.; Prostaglandin analogues, the synthesis of new prostanoids from natural safrole. **Química Nova**, v. 5, p. 112, 1984.
49. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A utilização do safrol. Principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico. Anti-inflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 744-759, 1999.

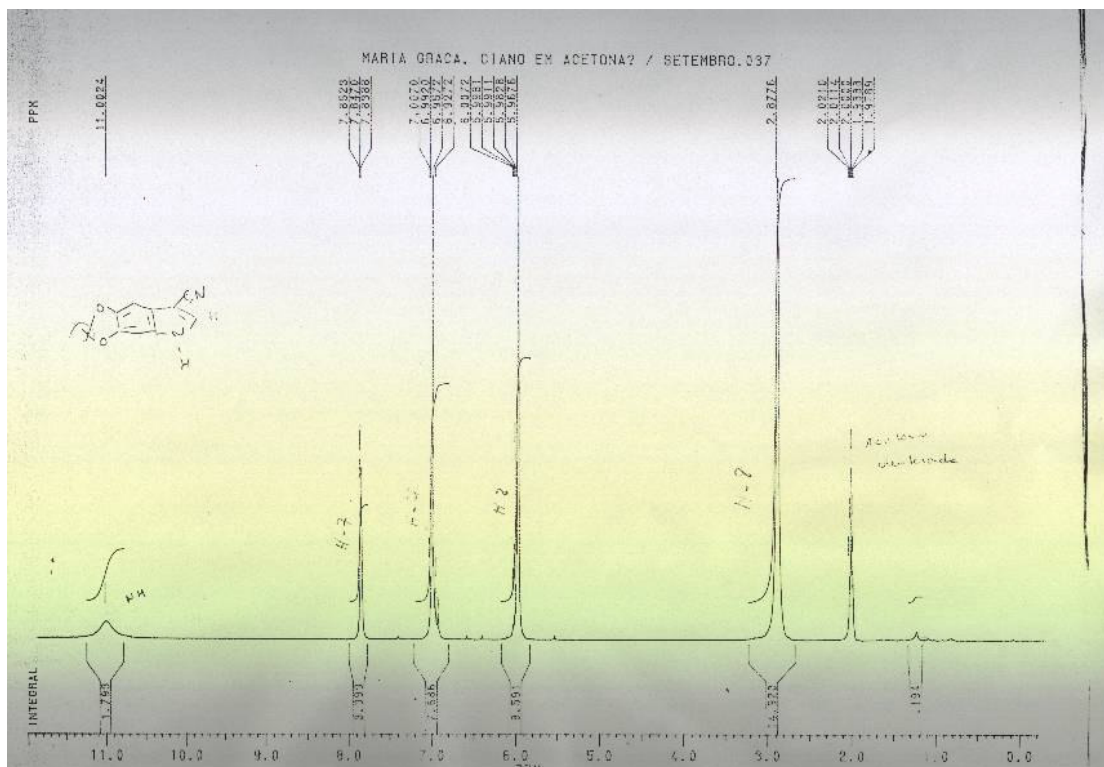
50. PEREIRA, E. F. R.; PEREIRA, N. A.; LIMA, M. E. F.; COELHO, F. A. S.; BARREIRO, E. J. Anti-inflammatory properties of new bioisosteres of indomethacin synthesized from safrole which are sulindac analogues. **Braz. J. Med. Res.**, v. 22, N. 11, p. 1415-1419, 1989.
51. BARREIRO, E. J.; COSTA, P. R. R.; MELLO, R. T.; BARROS, P. R. R. V. Utilização de sintons naturais na preparação de compostos biologicamente ativos II: anti-inflamatórios. **Acad. Bras. Ciênc.**, v. 53, n. 1, p. 65-67, 1981.
52. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal – as bases moleculares da ação dos fármacos**. São Paulo: Artmed Editora S. A., 2001.
53. FINNEGAN, W. G.; HENRY, R. A.; LOFQUISTE, R. An improved synthesis of 5-substituted tetrazoles. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 80, p. 3908-3911, 1958.
ZWEIFEL, G.; HAHN, G. R.; SHOUP, T. M. 3-BOROLENES - THEIR REGIOSELECTIVE AND DIASTEREOSELECTIVE CONVERSION INTO SUBSTITUTED homoallylic alcohols **J. Org. Chem.**, v. 52, p. 5484-5486, 1987.
54. DUNCIA, V. J.; PIERCE, E. M.; SANTELLA, B. J. Three synthetic routes to a sterically hindered tetrazole. A new one-step mild conversion of an amide into a tetrazole. **J. Org. Chem.**, v. 56, p. 2395-2400, 1991.
55. BECKER, H. C.; BERGER, W.; DOMSCHIKE, G.; FAMGHAMEL, E.; et al. **Organikum, química orgânica experimental**. 5. ed. Lisboa: Fundação Caloeste Gulbenkian, 1978.
56. VOGEL, A. **Vogel's textbook of practical chemistry**. New York: Longmen, 1978.

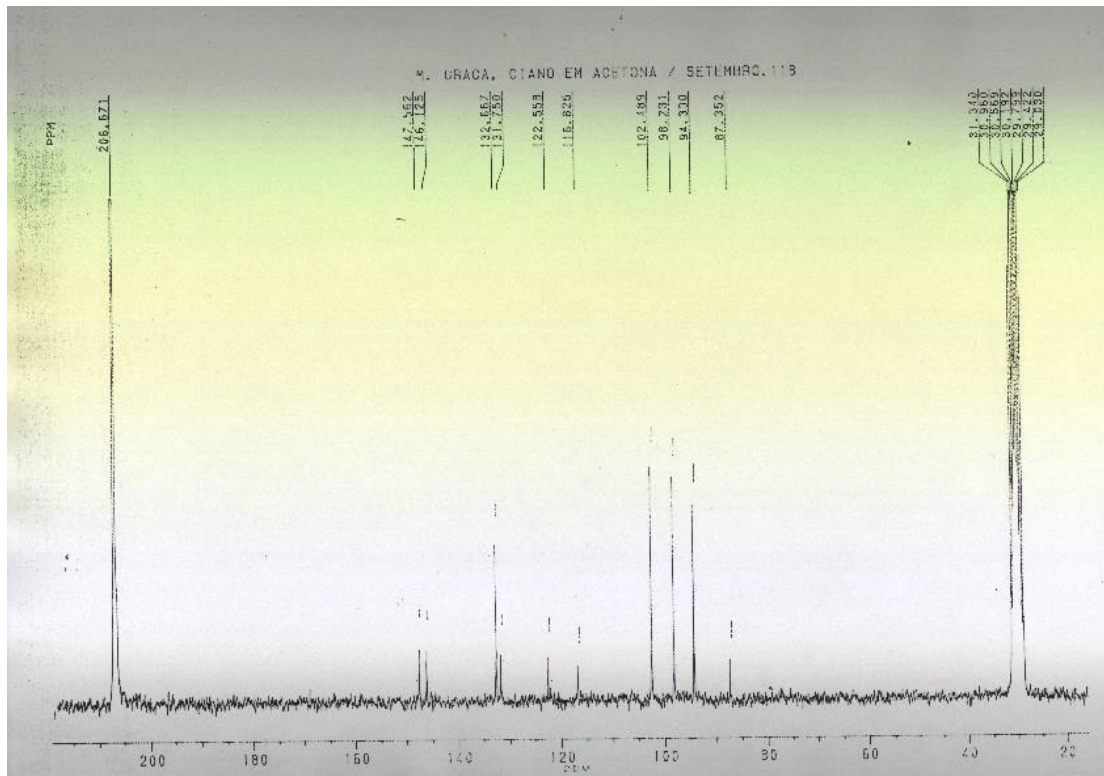
ANEXO 01 – MORFOLOGIA VEGETAL – COLEÓPTILO



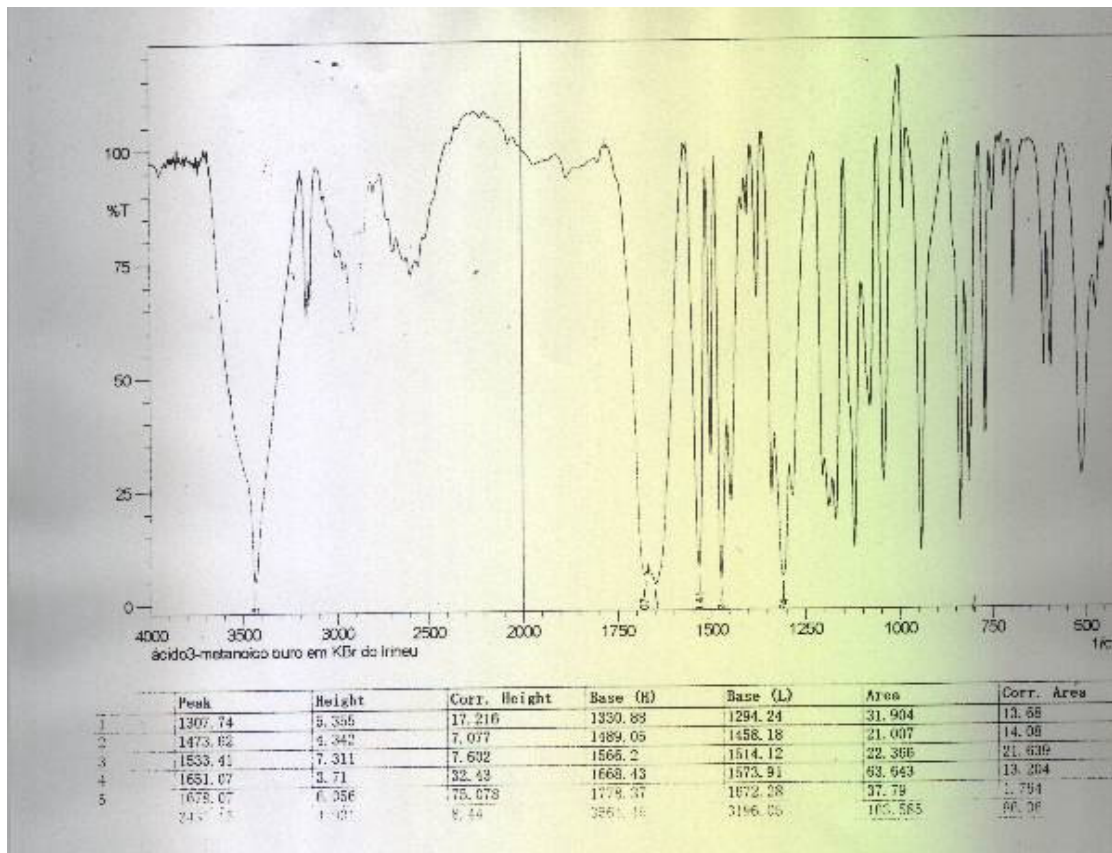
ANEXO 02 – ESPECTRO IV DO 3-CIANO-5,6-METILENODIOXINDOL



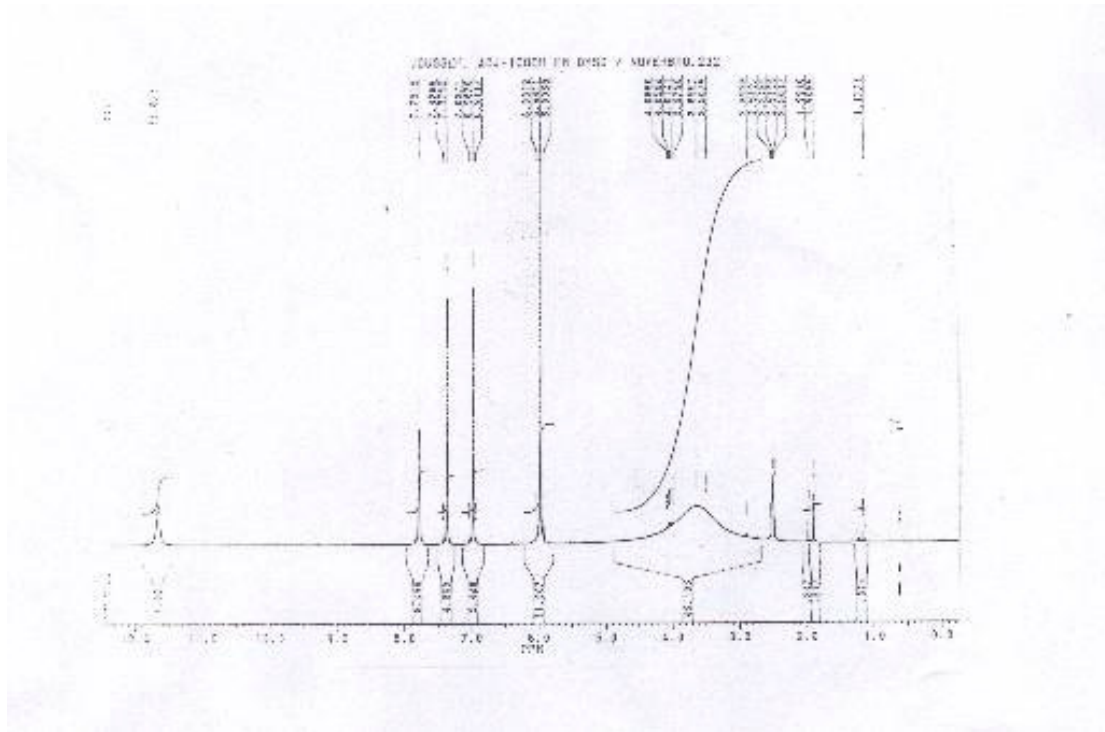
ANEXO 03 – ESPECTRO RMN ¹H DO 3-CIANO-5,6-METILENODIOXINDOL

ANEXO 04 – ESPECTRO RMN ^{13}C DO 3-CIANO-5,6-METILENODIOXINDOL

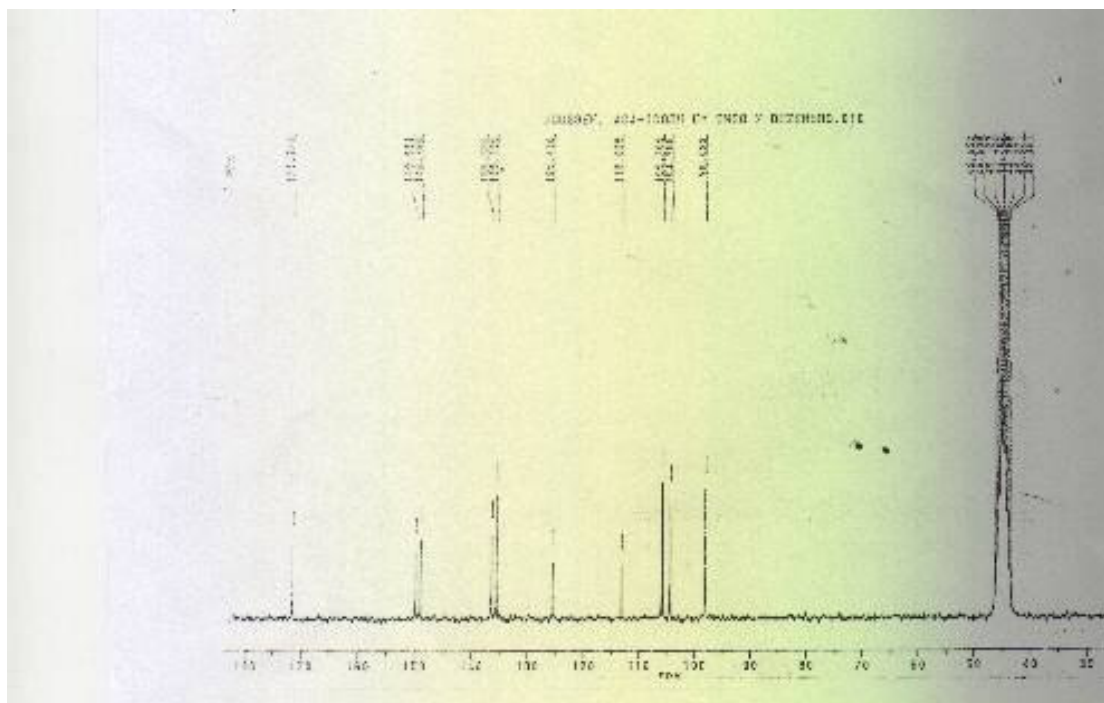
ANEXO 05 – ESPECTRO IV DO ÁCIDO 5,6-METILENODIOXINDOL-3-IL-METANÓICO



ANEXO 06 – ESPECTRO RMN ^1H DO ÁCIDO 5,6-METILENODIOXINDOL-3-IL-METANÓICO



ANEXO 07 – ESPECTRO RMN ^{13}C DO ÁCIDO 5,6-METILENODIOXINDOL-3-IL-METANÓICO



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)