# UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA "Prof. DELBY FERNANDEZ DE MEDEIROS" PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

SÍNTESE DO BOWDENOL UM DIHIDROBENZOFURANOIDE ISOLADO DE *Bowdichia virgilioides* E PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DA RIPARINA ISOLADA DE *Aniba riparia* COM POTENCIAL ATIVIDADE BIOLÓGICA

# STANLEY JUAN CHÁVEZ GUTIERREZ

JOAO PESSOA DEZEMBRO 2006

# **Livros Grátis**

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

# STANLEY JUAN CHÁVEZ GUTIERREZ

# SÍNTESE DO BOWDENOL UM DIHIDROBENZOFURANOIDE ISOLADO DE *Bowdichia virgilioides* E PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DA RIPARINA ISOLADA DE *Aniba riparia* COM POTENCIAL ATIVIDADE BIOLÓGICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, da Universidade Federal da Paraíba, para a obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Area de concentração: FARMACOQUÍMICA.

**ORIENTADOR:** 

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

**CO-ORIENTADOR:** 

Prof. Dr. Celso de Amorin Camara

João Pessoa 2006

# C512s Chávez Gutierrez, Stanley Juan

Síntese do Bowdenol, um dihidrobenzofuranoide isolado de *Bowdichia virgilioides* e preparação de derivados da Riparina isolada de *Aniba riparia* com potencial atividade biológica/ Stanley Juan Chávez Gutierrez.- João Pessoa, 2007.

134p.

Orientador: José Maria Barbosa Filho.

Tese (doutorado) UFPB/CCS

1. Produtos naturais- Bowdenol 2. Riparina

3. Síntese orgânica

UFPB/BC C.D.U:547.9(043)

# STANLEY JUAN CHÁVEZ GUTIERREZ

SÍNTESE DO BOWDENOL UM DIHIDROBENZOFURANOIDE ISOLADO DE Bowdichia virgilioides E PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DA RIPARINA ISOLADA DE Aniba riparia COM POTENCIAL ATIVIDADE BIOLÓGICA

TESE APRO 28 / 12 /			
Prof. Dr. Jo	osé Maria Barbosa Filho	(Orientador LTF-UFPB)	
Prof. Dr.	Davi Antas e Silva (Examir	nador externo UFRPE)	
Profa. Dra.	Ivana Maria Fechine Sette (	(Examinador externo - UEPB)	
Prof. Dr.	Petrônio Athayde Filho (Ex	aminador interno-UFPB)	
Prof. Dr.	Bruno Freitas Lira (Examir	nador interno- UFPB)	

# **DEDICATORIA**

Para Elsa, Mateo, China, Mensa e Nano, conseguimos...

### **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pai, amigo,companheiro, irmão, fonte de vida e de segurança nas nossas vidas, obrigado por sempre permanecer ao meu lado, Você é tudo.

A minha mãe que sempre esteve, está e estará comigo me protegendo e a toda minha família; "viejita" saudades só se tem de quem não mais conosco está, você nunca foi embora, permaneça assim conosco.

Ao meu pai exemplo de vida, sensatez e coragem de poder mudar, que com palavras simples soube me encorajar para poder nunca decepcionar à família.

A minha irmã Evelyn por sua coragem e força de vontade de saber lutar contra tudo que a vida se propôs colocar no seu caminho, você é uma guerreira, continue assim pelo "yayo" e por todos nós.

A minha esposa que sempre soube me incentivar para conseguir ir em frente em nossa vida juntos, você é a base de nossa família, sem você não teria conseguido superar muitas coisas, espero poder te fazer feliz.

Ao meu filho pela compreensão da falta de tempo para te dedicar espero poder te recompensar, a vida ensina muito porem com companhia ao teu lado as coisas são menos difíceis, pra frente é que se vê.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, pela confiança depositada, paciência e pelo exemplo de seriedade, organização e dedicação ao trabalho, não mude jamais, nós agradecemos.

Ao Prof. Dr. Celso de Amorin Câmara, pelo seu apoio incessante no desenvolvimento de nossa pesquisa e claro por me permitir ser seu amigo, espero ter podido corresponder pelo menos um pouco à sua confiança.

A Profa. Dra. Maria Célia de Oliveira Chaves, pelo amor para com o ensino e a sua dedicação por tentar fazer dos seus alunos profissionais diferentes, que gostem do que fazem o maior ensinamento é o seu exemplo.

A Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva pela sua garra e interesse para com a comunidade LTF, obrigado pelo seu apoio quando mais precisei.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, especialmente Roberto, Kristerson, Antonio, Cibelle, com os quais evoluímos juntos em vários aspectos e a todos os que de alguma maneira interagiram durante esta longa caminhada, obrigado.

A todos os funcionários do LTF, técnicos, setor administrativo e pessoal da limpeza, sem os quais o andamento das pesquisas realizadas por todos se veriam dificultadas.

A Vicente Carlos, Wellington, Vanderlei, Raimundo Nonato, Severino, Crispim e Gilmario, não só pelo ótimo desempenho de suas atribuições dentro do LTF senão também pela amena convivência diária com a qual se consolidou uma relação de companheirismo.

A Tania, a nossa salvadora secretária, sem ela o LTF não vai pra frente.

A todas as pessoas que mesmo sem estar aqui citadas acreditaram no sucesso deste trabalho, e claro a aquelas pessoas que não colocaram confiança no meu desempenho obrigado por servir como incentivo.

	LISTA DE FIGURAS	Pág.
Figura 1.	Bowdichia virgilioides (Fabaceae)	5
Figura 2.	Riparinas isoladas de <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez	7
Figura 3.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil-3- (4-hidroxifenil)acrilato	
	(BOW-01) (MeOD , 200 MHz)	49
Figura 4.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil-3 – (4-	
	hidroxifenil)acrilato (BOW-01) (MeOD, 200 MHz)	50
Figura 5.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT de ( <i>E</i> )-metil-3- (4-	
	hidroxifenil)acrilato (BOW-01) (MeOD , 50 MHz)	51
Figura 6.	Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT de ( <i>E</i> )-metil-3- (4-	
	hidroxifenil)acrilato (BOW-01) (MeOD, 50 MHz)	52
Figura 7.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil-3-[4 -(3-metilbut-2-	
	eniloxi)fenil]acrilato (BOW-02) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz)	53
Figura 8.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil-3-[4 -(3-	
	metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW-02) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz)	54
Figura 9.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT de ( <i>E</i> )-metil-3-[4 -(3-metilbut-2-	
	eniloxi)fenil]acrilato (BOW-02) (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz)	55
Figura 10.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil-3-[4 –hidroxi-3-(3-metilbut-	
	2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW-03 (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz)	56
Figura 11.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil-3-[4 –hidroxi-	
	3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW-03 (CDCl <sub>3</sub> , 200	
	MHz)	57
Figura 12.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil-3-[4 –hidroxi-	
	3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW-03 (CDCl <sub>3</sub> , 200	
	MHz)	58
Figura 13.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT de ( <i>E</i> )-metil-3-[4 –hidroxi-3-(3-	
	metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW-03) (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz)	59
Figura 14.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil-3-[2-(2-hidroxipropan-2-il)-	
	2,3-dihidrobenzoufuran-5-il] (BOW 04) (CDCl $_{\rm 3}$ , 50 MHz)	
	(CDCI <sub>3</sub> , 200 MHz)	60

Figura 15.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil-3-[2-(2-	
	hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il] (BOW 04)	
	(CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz)	61
Figura 16.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil-3-[2-(2-	
	hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il] (BOW 04)	
	(CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz)	62
Figura 17.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT de ( <i>E</i> )-metil-3-[2-(2-	
	hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il] (BOW 04)	
	(CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz) (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz)	63
Figura 18.	Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT de ( <i>E</i> )-metil-3-[2-(2-	
	hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il] (BOW 04)	
	(CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz) (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz)	64
Figura 19.	Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT de ( <i>E</i> )-metil-3-[2-(2-	
	hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il] (BOW 04)	
	(CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz)	65
Figura 20.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil 3-[2-(prop-1-en-2-il)-2,3-	
	dihidrobenzofuran-5-il] (BOW 05) (CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz)	66
Figura 21.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil 3-[2-(prop-1-	
	en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il] (BOW 05) (CDCl <sub>3</sub> , 200	
	MHz)	67
Figura 22.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil 3-[2-(prop-1-	
	en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il] (BOW 05) (CDCl <sub>3</sub> , 200	
	MHz)	68
Figura 23.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de de ( <i>E</i> )-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-2-en-	
	2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato. Bowdenol (BOW 06)	
	(CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)	69
Figura 24.	Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT de de ( <i>E</i> )-metil 3-[2-(1-	
	hidroxiprop-2-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato.	
	Bowdenol (BOW 06) (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz)	70
Figura 25.	Espectro de <sup>1</sup> Hx <sup>13</sup> C- HMQC de ( <i>E</i> )-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-	
	2-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato. Bowdenol (BOW	
	06) (CDCl <sub>3</sub> , 500MHz)	71

Figura 26	Espectro de 'Hx <sup>13</sup> C- HMBC de ( <i>E</i> )-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-	
	2-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato. Bowdenol	
	(BOW 06) (CDCl <sub>3</sub> , 500MHz)	72
Figura 27.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de Riparina III (CDCl <sub>3</sub> , 200MHz)	73
Figura 28.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de Riparina III (CDCI <sub>3</sub> ,	
	200MHz)	74
Figura 29.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de Riparina III (CDCI <sub>3</sub> ,	
	200MHz)	75
Figura 30.	Espectro de RMN $^{13}$ C de Riparina III (CDCI $_3$ , 50MHz)	76
Figura 31.	Expansão do espectro de RMN $^{13}$ C de Riparina III (CDCI $_3$ ,	
	50MHz)	77
Figura 32.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-benzoiltiramina (Rip-a) (DMSO-	
	<i>d</i> 6, 200 MHz)	78
Figura 33.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-benzoiltiramina (Rip-	
	a) (DMSO- <i>d</i> 6, 200 MHz)	79
Figura 34.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-benzoiltiramina (Rip-	
	a) (DMSO- <i>d</i> 6, 200 MHz)	80
Figura 35.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-	
	benzamida (Rip-b) (DMSO- <i>d</i> 6, 200 MHz)	81
Figura 36.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-[2-(3,4-dimetoxi-	
	fenil)-etil]-benzamida (Rip-b) (DMSO- <i>d</i> 6, 200 MHz)	82
Figura 37.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-[2-(3,4-dimetoxi-	
	fenil)-etil]-benzamida (Rip-b) (DMSO- <i>d</i> 6, 200 MHz)	83
Figura 38.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 2-hidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-	
	c) (DMSO- <i>d</i> 6, 200 MHz)	84
Figura 39.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de 2-hidroxi-N-fenetil-	
	benzamida (Rip-c) (DMSO- <i>d</i> 6, 200 MHz)	85
Figura 40.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de 2-hidroxi-N-fenetil-	
	benzamida (Rip-c) (DMSO- <i>d</i> 6, 200 MHz)	86
Figura 41.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 2-hidroxi-N-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-	
	benzamida (Rip-d) (DMSO-d6, 200 MHz)	87
Figura 42.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de 2-hidroxi-N-[2-(4-	
	metoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-d) (DMSO-d6, 200 MHz)	88

Figura 43.	Expansão do espectro de RMN 'H de 2-hidroxi-N-[2-(4-	
	metoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-d) (DMSO- <i>d</i> 6, 200 MHz)	89
Figura 44.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 2,6-diidroxi-N-fenetil-benzamida	
	(Rip-e) (DMSO- <i>d</i> 6, 200 MHz)	90
Figura 45.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de 2,6-diidroxi-N-fenetil-	
	benzamida (Rip-e) (DMSO-d6, 200MHz)	91
Figura 46.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de 2,6-diidroxi-N-fenetil-	
	benzamida (Rip-e) (DMSO-d6, 200 MHz)	92
Figura 47.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-2,6-	
	diidroxi-benzamida (Rip-f) (DMSO- <i>d</i> 6, 200 MHz)	93
Figura 48.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-[2-(3,4-dimetoxi-	
	fenil)-etil]-2,6-diidroxi-benzamida (Rip-f) (DMSO-d6, 200	
	MHz)	94
Figura 49.	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de N-[2-(3,4-dimetoxi-	
	fenil)-etil]-2,6-diidroxi-benzamida (Rip-f) (DMSO-d6, 200	
	MHz)	95

LISTA DE TABELAS		Pág
TABELA 1	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de ( <i>E</i> )-metil-3- (4-hidroxifenil)acrilato (BOW 01) (MeOD, 200 ppm; 50ppm).	25
TABELA 2	Dados de RMN $^{1}$ H e $^{13}$ C de ( <i>E</i> )-metil-3-[4 -(3-metilbut-2-eniloxi)fenil)acrilato (BOW 02) (CDCl <sub>3</sub> , 200 ppm ; 50ppm)	27
TABELA 3	Dados de RMN $^{1}$ H e $^{13}$ C de ( <i>E</i> )-metil-3-[4 -hidroxi-3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil)-acrilato (BOW 03) (CDCl <sub>3</sub> , 200 ppm ;	
TABELA 4	50ppm)  Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de ( <i>E</i> )-metil-3-[2-(2 –hidroxipropan-	30
TABELA 4	2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il]-acrilato (BOW 04) (CDCl <sub>3</sub> , 200 ppm; 50ppm)	33
TABELA 5	Dados de RMN <sup>1</sup> H de ( <i>E</i> )-metil 3-[2-(prop-1-em-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato (BOW 05) (CDCl <sub>3</sub> , 200 ppm)	36
TABELA 6	Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de ( <i>E</i> )-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-2-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato. Bowdenol (BOW 06) (CDCl <sub>3</sub> , 500 ppm; 125ppm)	39
TABELA 7	Dados comparativos de RMN <sup>1</sup> H da riparina III	41
TABELA 8	Dados comparativos de RMN <sup>13</sup> C da riparina III  Dados de RMN <sup>1</sup> H dos derivados das riparinas (Rip a-f) em	41
	DMSO-d6 (200 ppm)	46

# LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

APT Attached proton test

**BINAP** 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl

**CC** Cromatografia em coluna

CCDA Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP Cromatografia em camada delgada preparativa

**DCM** Diclorometano

**DMSO-d**<sub>6</sub> Dimetilsulfóxido deuterado

**d** Dupleto

dd Duplo dupleto

5 Desclocamento químico

**HMQC** Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

**HMBC** Heteronuclear Multiple Bond Coherence

J Constante de acoplamento

**L-DOPA** Levodopa

MCPBA Ácido metacloroperbenzóico

m Multipletonm nanômetro

PEPFosfoenolpiruvatoppmPartes por milhão

Rf's Fator de retenção

**RMN** <sup>1</sup>H Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

**RMN**<sup>13</sup>**C** Ressonância magnética nuclear de carbono treze

SAM s-adenosil metionina

**SEM** Metano sulfonato de etila

s Simpleto

sl Simpleto largo

**t.a.** Temperatura ambiente

u Micron

THF TetraidrofuranoTMS Tetrametilsilano

v. Volume

# **LISTA DE ESQUEMAS**

ESQUEMA 1	Proposta biogenética para o Bowdenol	6
ESQUEMA 2	Rota sintética proposta para a obtenção de Bowdenol	12
ESQUEMA 3	Reação geral para a obtenção dos novos derivados das	
	riparinas	23

#### **RESUMO**

Da árvore conhecida como "sucupira preta", *Bowdichia virgilioides* Kunt (Fabaceae), foram isoladas várias substâncias pertencentes às classes dos triterpenos, alcalóides, flavonóides, óleos essenciais e um dihidrobenzofuranoide denominado Bowdenol.

A Plicatina B é um precursor biogenético do Bowdenol que foi isolado do tronco e das flores de *Psoralea juncea* (Leguminoseae), esta substância mostrou atividade antimutagênica contra mutações induzidas por metano sulfonato de etila (SEM) em *Salmonella typhimurium* TA 100.

No presente trabalho, presentamos a síntese do Bowdenol, através de uma rota inédita em seis etapas: Metilação do ác. *p*-hidroxicinâmico (Preparação de BOW-01), Prenilação do éster do ác. *p*-hidroxicinâmico (BOW-02), deslocamento da porção prenílica à posição –orto- da hidroxila (BOW-03), ciclização do radical prenila (BOW-04), obtenção de BOW-05 utilização do reagente de Burgess e finalmente a obtenção do BOW-06 (Bowdenol) com dióxido de selênio. Os rendimentos obtidos foram considerados bons, passando pela obtenção da Plicatina B, seu intermediário chave.

Paralelamente é mostrada a preparação através da reação de Schotten Bauman, de seis (06) novos derivados da Riparina, substância isolada pela primeira vez de *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) com potencias atividades biológicas.

#### **ABSTRACT**

From the Stern bark of *Bowdichia virgilioides* Kunt (Fabaceae), atree popularly known as "sucupira preta" was isolated triterpenes, alkaloids, flavonoids, essential oil and a dihidrobenzofuran (Bowdenol).

The Plicatin B an antimutagenic constituent, isolated of *Psoralea juncea* (Leguminoseae) is a biogenetic precursor for Bowdenol, this substance, and shown antimutagenic activity against mutations induced by ethyl methanesufonate (SEM) in *Salmonella typhimurium* TA 100.

In this work, show the Bowdenol synthesis by an unpublished route in six steps: Esterification of *p*-hidroxicinamic acid (obtaining of BOW-01), prenylation of BOW-01 (obtaining of BOW-02), displacement of prenyil radical to place to hydroxyl radical (BOW-03), Ciclization of prenyl radical (BOW-04), obtaining of BOW-05 using Burgess reagent and finally obtaining of BOW-06 (Bowdenol) with selenium dioxide. The yields were good, including the obtaining of Plicatin B their intermediary key.

We also show the synthesis using Schotten Baumen reaction of six (06) new derivates of Riparin, substance isolated of first time from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), with potentials pharmacological activities.

XVI

# **SUMARIO**

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	8
PARTE EXPERIMENTAL	9
Especificação dos materiais, métodos e equipamentos utilizados.	9
Reagentes	10
Solventes	11
Preparação de ( <i>E</i> )-metil-3- (4-hidroxifenil)acrilato (BOW 01)	13
Preparação de (E)-metil-3-[4 -(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW 02)	14
Preparação de (E)-metil-3-[4 – hidroxi-3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato	
(BOW 03) Plicatina B	15
Preparação de (E)-metil-3-[2-(2 –hidroxipropan-2-il)-2,3dihidrobenzofuran	
-5-il]acrilato (BOW 04)	16
Preparação de (E)-metil 3-[2-(prop-1-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-	
il]acrilato:(BOW 05)	17
Preparação de (E)-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-2-en-2-il)-2,3-	
Dihidrobenzofuran-5-il]-acrilato : Bowdenol (BOW 06)	18
Obtenção da Riparina III	19
Preparação das novas riparinas	20
Obtenção de N-fenetilbenzamida (Rip-a)	20
Obtenção de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-b)	20
Obtenção de 2-hidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-c)	21
Obtenção de 2-hidroxi-N-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-d)	21
Obtenção de 2,6-diidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-e)	21
Obtenção de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-2,6-diidroxi-benzamida (Rip-f)	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
Identificação de ( <i>E</i> )-metil-3- (4-hidroxifenil)acrilato (BOW 01)	24
Identificação de ( <i>E</i> )-metil-3-[4 -(3-metilbut-2- eniloxi)	
fenil]acrilato (BOW 02)	26
Identificação de (E)-metil-3-[4 –hidroxi-3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato	
(BOW 03)	28

XVII

Elucidação estrutural de ( <i>E</i> )-metil-3-[2-(2 –hidroxipropan-2-il)-2,3-	
dihidrobenzofuran-5-il]acrilato (BOW 04)	31
Elucidação estrutural de ( <i>E</i> )-metil 3-[2-(prop-1-en-2-il)-2,3-	
dihidrobenzofuran-5-il]acrilato (BOW 05)	34
Elucidação estrutural de ( <i>E</i> )-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-2-en-2-il)-2,3-	
dihidrobenzofuran-5-il]acrilato . Bowdenol (BOW 06)	37
Identificação da Riparina III	40
Elucidação estrutural de N-fenetilbenzamida (Rip-a)	42
Elucidação estrutural de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-b)	42
Elucidação estrutural de 2-hidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-c)	43
Elucidação estrutural de 2-hidroxi-N-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida	
(Rip-d)	44
Elucidação estrutural de 2,6-diidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-e)	44
Elucidação estrutural de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-2,6-diidroxi-	
benzamida (Rip-f)	45
CONCLUSÕES	47
ESPECTROS	48
REFERENCIAS	96
ANEXO	102
Novo derivado benzoiltriptaminico e processo de sua obtenção (Depósito	
de pedido Nacional de patente	103
$\mathit{N}^{\mathit{b}}$ - benzoiltriptamines derivatives with relaxant activitiy in guinea-pig-	
ileum.	104
Synthesis and structural characterization of N-benzoyl-tryptamine and its	
new analogue N-salicyloyltryptamine apotential anticonvulsant agent	107
Antianxiety effects of riparin I from Aniba riparia (Nees) mez (Lauraceae)	
in mice	111
Antianxiety and antidepressant effects of Riparin III from Aniba riparia	
(Nees) Mez (Lauraceae) in mice	115
Electronic and structural effects in muscular relaxants: Riparin I and	
Riparin III	122
Anticonvulsivant properties of Riparin I (RIP I) and Riparin III (RIP III) from	
Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice	131

132

Avaliação da atividade antimicrobiana de Riparinas sobre cepas de Staphylococcus Aureus e Escherichia coli multirresistente

# **INTRODUÇÃO**

O emprego de plantas com objetivo de recuperar a saúde é um dos costumes que acompanham a história da humanidade. Ainda hoje um grande número de cascas, raízes e folhas são usadas em preparações simples para uso caseiro, mesmo com o desenvolvimento da síntese de fármacos ou bioisosterismo (BARREIRO, 1991).

Exemplos históricos do emprego de plantas medicinais encontram-se na digitoxina (*Digitalis purpurea*) e a digoxina (*Digitalis lanata* e *Digitalis orientalis*) empregadas como cardiotônicos (MOURA, 1989). A morfina, isolada da *Papaver somniferum*, planta conhecida na Europa desde o século XVI por suas propriedades analgésicas, teve sua estrutura determinada apenas em 1923 (GULLAND et al., 1923), sendo sintetizada somente em 1952 (GATES *ECT al.*, 1952).

Outro exemplo relevante de produto natural útil na terapêutica é a quinina (*Cinchona officinalis*) e seus derivados, como a primaquina (ELDERFIELD et al., 1955), empregada no tratamento da malária. Cabe mencionar também a atropina (*Atropa belladona*), utilizada como bloqueador colinérgico (BROWN, 1991).

A partir das substâncias provenientes da matéria prima natural, e com o avanço dos processos de síntese orgânica, é que se torna possível a obtenção de substâncias farmacologicamente ativas, com maior rendimento, menor custo e de elevado grau de pureza; além disto, as substâncias sintéticas atingem 75% do total de fármacos consumidos no mundo (BARREIRO, 1991)

Historicamente, a síntese orgânica tem se desenvolvido de acordo com as necessidades e a curiosidade humana (TROST, 1985). Dentre os descobrimentos que marcaram época e que, podem ser considerados como fundamentais no desenvolvimento da Química Orgânica, destacam-se a síntese da uréia por Frederich Wöhler em 1828, a partir do cianato de amônio e a síntese do corante mauveína por Willian H. Perkin em 1856 (MARK, 2000). O feito de Wöhler marca não somente o fim da teoria da força vital, fervorosamente defendido por vários químicos influentes da época, como também o nascimento da síntese orgânica como ramo da Química Orgânica. Já o feito de Perkin, uma tentativa frustrada de preparar quinina a partir da anilina, abriu caminho para o desenvolvimento racional e científico da Química Medicinal e estabeleceu uma forte associação entre Química Orgânica e

Química Medicinal, que permanece até os dias de hoje; de fato, entre os principais alvos escolhidos pelos químicos orgânicos sintéticos ao longo dos anos encontramse produtos cuja complexidade estrutural, potência e com diversificadas atividades biológico-farmacológicas despertaram enorme interesse científico e medicinal, como por exemplo, os esteróides, prostaglandinas, antibióticos b-lactâmicos, substâncias macrocíclicas com ação antibiótica e anticâncer, entre outros exemplos (FURLAN et al., 1996).

A síntese orgânica se desenvolveu mais rapidamente na segunda metade do século XX, devido à descoberta de muitas reações novas, principalmente reações de formação da ligação C-C e ao avanço dos reagentes organometálicos preparados a partir de metais de transição. Considerando isto podemos dividir este período nas seguintes décadas ou eras:

- Década de 50: Primeira síntese total de um produto natural
- Década de 60: Planejamento sintético- moléculas alvo-complexas
- Década de 70: Metodologias baseadas em processos biosintéticos
- Década de 80: Desenvolvimento de reações enantioseletivas- uso de catalisadores guirais
- Década de 90: Química orgânica química medicinal síntese planejada utilizando conhecimentos de sitio ativo de enzimas – moléculas alvo (FURLAN et al., 1996).

Assim o desenvolvimento contínuo de novas metodologias sintéticas e o aperfeiçoamento constante das técnicas de análise orgânica, conjugados com uma grande variedade de reações e metodologias, associadas aos avanços das técnicas instrumentais, permitiu a preparação de moléculas com alto controle da enantiosseletividade (ROQUE, 2002).

Dentro desses avanços nas metodologias de síntese, tem se observado o interesse no uso de sólidos inorgânicos como meio para transformações orgânicas (SETTON, 1986; LAZSLO, 1993; CLARK, 1994; NIKALZE, 2000; IZUMI, 1992). Dentre destes sólidos inorgânicos se encontram as argilas, que ocorrem abundantemente na natureza, e pelas suas propriedades (troca de íons e grande área de contato) tem sido explorados para aplicações catalíticas durante muito tempo. Argilas catalíticas têm uma grande variedade de funções incluindo (a) uso como agentes catalíticos; (b) como suporte inertes e (c) para fornecer propriedades físicas específicas (resistência, densidade, etc.) (PINNAVIA, 1983) (LAZSLO, 1987).

As argilas são formadas por camadas de silicatos. São materiais cristalinos com partículas muito pequenas (150 a 1  $\mu$ ), basicamente formadas por camadas tetraédricas e octaédricas. (www.rhodium.ws/chemistry/mw.clays.txt acessado em 31/7/2000).

A montmorillonita apresenta estrutura de alumino silicato semelhante a um sanduíche aonde as partes externas correspondem à sílica tetraédrica e a interna ao alumínio octaedrico (BALLATINE, 1993). A parte interna possui camadas interlamelares de água contendo íons dissolvidos (Na<sup>+</sup> e Ca<sup>++</sup>), estas camadas de água podem interferir nas propriedades ácidas desta argila, por isto é recomendado colocar a argila na mufla a aproximadamente 400 °C antes de utilizá-la na reação usada como agente catalítico. Estas argilas na sua forma natural, quase não têm atividade catalítica, porém podem ser transformadas através de tratamento ácido em fortes condições (refluxo) ou por troca de cátions com íons polivalentes assim como Al<sup>+3</sup> ou Cr<sup>+3</sup>. (www.rhodium.ws/chemistry/mw.clays.txt acessado em 31/7/2000).

Como características especiais estas argilas têm:

- capacidade de troca de íons
- capacidade de expansão (Absorção de água entre as camadas)
- acidez (pelos cátions presentes entre as camadas)

(www.rhodium.ws/chemistry/mw.clays.txt acessado em 31/7/2000).

Na atualidade, é grande o interesse pela descoberta ou modificação de substâncias naturais ou sintéticas para descobrir ou melhorar o tratamento de inúmeras doenças que ainda acometem a humanidade; como por exemplo, o câncer, que é uma das doenças que mais causa mortes hoje em dia. Anualmente morrem aproximadamente 6 milhões de pessoas no mundo vítimas deste mal, segundo algumas pesquisas epidemiológicas (ANONYMOUS, 1997) (RENNIE and RUSTIG, R.., 1996). Nos Estados Unidos 60% dos casos de mortalidade por câncer poderiam ter sido prevenidos desde que fossem atribuídas as causas externas que provocaram a doença (WILLETT et al,. 1996). Uma descoberta logo no início e o tratamento adequado da doença, são essenciais. Há uma grande busca por uma dieta com alimentos (frutas, verduras, etc.) e chás que possam ser associados como possíveis agentes naturais de prevenção do desenvolvimento de câncer (GREENWALD, 1996) (HAYATSU et al., 1988) (JANG et al., 1997) (MITSCHER et al., 1997) (REN et al., 1997).

Alguns agentes antimutagênicos podem exercer sua ação quimiopreventiva através de sua possível habilidade de atuar como antimutagênicos na prevenção ou reversão dos danos genéticos causados por alguns agentes mutagênicos. Dependendo do modo de ação os agentes antimutagênicos podem ser classificados em: desmutagênicos, os quais operam por inativação dos agentes mutagênicos antes que eles provoquem algum dano nos constituintes celulares tal como DNA, e os agentes desmutagênicos os quais modulam a mutagêneses a nível celular (dentro da célula) para iniciar um mecanismo de reparo celular em resposta aos danos provocados. Também pode se esperar que alguns outros agentes antimutagênicos possam atuar através de uma combinação destes dois mecanismos (DE FLORA et al., 1988).

Um destes agentes antimutagênicos é a Plicatina B, composto isolado do tronco e das flores de *Psoralea juncea* (Leguminosae), que apresentou atividade contra mutações induzidas por metano sulfonato de etila (SEM), em *Salmonella typhimurium* TA 100 (MITSCHER et al., 1997) (MENON et al., 1999). Além disso, o grupo fenil orto-prenilato exibe uma larga gama de atividades farmacológicas incluindo antiinflamatória, antifúngica, antibacteriana e seus farmacóforos estão envolvidos em tratamentos de HIV e doença de Alzheimer (DINTZNER et al., 2004).

Plicatina B

Bowdichia virgilioides Kunth (Fabaceae), (figura 1, pág. 5) é uma árvore vulgarmente conhecida como "sucupira preta". As cascas do tronco deste vegetal são utilizadas na medicina popular em casos de diarréia crônica e purificação do sangue (BRAGA, 1960) entre outros usos. Estudos prévios na área da fitoquímica reportaram a ocorrência de diversas substâncias pertencentes às classes dos triterpenos (CALLE et al., 1983; TORRENEGRA et al. 1985; MARINHO et al., 1994),

alcalóides (MARINHO et al., 1994; TORRENEGRA et al., 1989), flavonóides (VELOSO et al., 1999; ARRIAGA et al. 1999) e óleos essenciais (ARRIAGA et al. 1998).



Figura 1. Bowdichia virgilioides Kunth (Fabaceae)

Outro estudo fitoquímico da *Bowdichia virgilioides* mostrou a presença de um composto contendo o núcleo 2,3-dihidrobenzofurano, que foi denominado BOWDENOL (MELO, et al., 2001). Sendo o Bowdenol um composto isolado da *Bowdichia virgilioides* no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica sobre o qual não foram efetuados estudos sobre suas potencialidades biológicas e considerando que, a Plicatina B, seu provável precursor biogenético, (esquema 1, pág. 6) apresenta atividades antimutagênicas (MENON et al., 1999), almejamos então propor e realizar uma rota de síntese para este composto.

Esquema 1. Proposta biogenética para o Bowdenol

O gênero *Aniba* pertence à família Laurácea, popularmente conhecida como "louro", encontrada na Amazônia central e Guiana, compreende 40 espécies entre arbustos e árvores. Da espécie *Aniba riparia* (Nees) Mez foram isolados os éteres metílicos de N-benzoiltiramina (Riparina I); N-(-2-hidroxibenzoil) tiramina (Riparina II) e N-(2,6-dihidroxibenzoil) tiramina (Riparina III) (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Riparina I e Riparina III têm atividade antimicrobiana (CATAO, et al., 2005).

A riparina III é um potente relaxante muscular (CASTELO BRANCO et al,. 2000) (THOMAS et al., 1994). O músculo esquelético é controlado pelo cérebro e medula espinhal e atua através de impulsos elétricos. O mecanismo de contração do músculo esquelético é menos sensível à ação de drogas que o músculo liso. O músculo liso é encontrado em órgãos internos do corpo humano e uma de suas funções é controlar o diâmetro das veias. As drogas que provocam relaxamento no músculo liso diminuem a pressão sanguínea e podem ser úteis para o tratamento da

hipertensão a arteriosclerose e diminuem também o risco de complicações cardiovasculares (NELSON 2000) (BERG et al., 2002). A riparina III apresentou também atividades ansiolítica e antidepressiva (SOUSA et al., 2004).

Tendo em vista a importância das Riparinas I, II e III, resolveu-se preparar as mesmas, em maior quantidade e também obter análogos estruturais, que serão submetidos à avaliação farmacológica.

Riparina III

Figura 2. Riparinas isoladas de Aniba riparia (Nees) Mez

# **OBJETIVOS**

#### **GERAL**

Contribuir para a síntese de produtos naturais, com o intuito de melhorar o rendimento e a pureza dos mesmos para fins de melhor avaliar os efeitos farmacológicos destes componentes sintetizados.

# **ESPECÍFICOS**

- Propor uma rota de síntese inédita para o Bowdenol, com poucas etapas
- Sintetizar o Bowdenol a partir da rota de síntese proposta
- Identificar os intermediários e produto final através de métodos físicos usuais (IV, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C)
- Obter novos derivados das riparinas, substâncias naturais que já apresentaram ótimos resultados em estudos farmacológicos prévios.

# PARTE EXPERIMENTAL

#### Especificação dos materiais, métodos e equipamentos utilizados.

- a) Cromatografias de adsorção em colunas (CC) foram feitas em colunas de vidro de comprimentos e diâmetros variados, utilizando como adsorvente sílica gel da marca Merck, Art. 7733, com partículas 0,02-0,05 mm de diâmetro.
- b) Cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) e em camada delgada preparativa foram feitas com sílica gel PF<sub>254</sub> suspensa em água destilada e distribuída sobre placas de vidro (de diferentes medidas) por meio de um cursor "Quickfit", secas ao ar livre e ativadas em estufa a 110°C por duas horas.
- c) As revelações cromatográficas foram feitas por irradiação à luz ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 366 nm e/ou vapores de iodo, sendo este último apenas para cromatografia em camada delgada analítica.
- d) A evaporação das soluções das reações e frações de colunas foi feita sob pressão reduzida, usando-se rota evaporador da marca Fisatom 802.
- e) Os solventes P.A. utilizados, foram da marca Merck, Vetec e Sigma utilizados como recebidos, quanto aos solventes comerciais, estes foram destilados quando necessário.
- f) O grau de pureza das substâncias foi evidenciado por CCDA, determinandose a pureza quando observada uma única mancha, após eluição em pelo menos três tipos de solventes, e por determinação do ponto de fusão num

aparelho digital modelo MQAPF-302 marca Micro Química, com variação máxima de 2°C entre o inicio e o fim da fusão.

- g) Os espectros no Infravermelho (IV) foram registrados em pastilhas de KBr, em espectrofotômetro modelo BOMN MICHELSON, na faixa entre 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>.
- h) Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) 200 ppm e 500 ppm e ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C) operando a 50ppm e 125 ppm, foram obtidos em aparelho tipo VARIAN-MERCURY, utilizando técnicas uni e bidimensionais, sendo usado como solventes clorofórmio e dimetilsulfóxido deuterados.
- i) Para recristalização das substâncias foram utilizados metanol, clorofórmio e acetona PA, Merck.

#### Reagentes

- Ácido 4-hidroxicinâmico Sigma –Aldrich
- Brometo de prenila (1-Bromo-3-metil-2-buteno) Sigma Aldrich / Acros
- Montmorillonita K-10 Aldrich
- Montmorillonita KSF Aldrich
- Acido metacloroperbenzóico Sigma-Aldrich
- Reagente de Burgess (hidróxido de metoxicarbonil sulfamoil trietilamônio) Aldrich
- Hidroperóxido de tert-butila Avocado Research chemicals Ltd.
- Óxido de Selênio (IV) Aldrich

# **Solventes**

- Clorofórmio (comercial)
- Clorofórmio PA Vetec
- Hexano (comecial)
- Hexano PA Vetec
- Metanol (comercial)
- Metanol PA Vetec
- Diclorometano Tedia
- Piridina (comercial)
- Acetato de etila (comercial)

A metodologia proposta para a obtenção do bowdenol está contida no esquema a seguir:

**Esquema 2**. Rota sintética proposta para a obtenção de Bowdenol

# Preparação de (E)-metil-3- (4-hidroxifenil)acrilato (BOW 01)

Uma solução do ácido. *p*-hidroxicinâmico (4 g; 24,36 mmoles) em metanol (20 mL) e ácido sulfúrico concentrado (1,2 mL) foi mantida sob refluxo e agitação magnética por 8 horas. Após o término da reação, a solução foi neutralizada com uma solução de bicarbonato de sódio e extraída com três porções de acetato de etila, estas fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotatório, obtendo-se assim 3,8 g, na forma de cristais brancos, codificado como BOW 01 com rendimento de 87%.

Ponto de fusão: 132-133 °C (MENON et al. 1999; 138-139 °C)

**NMR** <sup>1</sup>**H (CDCI<sub>3</sub>, 200 ppm)** 7,40 (d J=8,6); 6,79 (d J= 8,6); 7,57 (d J=15,8); 6,27 (d J= 15,8); 3,72 (s) (Figura 3, pág. 49)

**NMR** <sup>13</sup>**C (CDCI<sub>3</sub>, 50 ppm)** 172,26; 163,68; 145,03; 133,63; 129,54; 119,30; 117,32; 54,53. (Figura 5, pág. 51)

# Preparação de (E)-metil-3-[4 -(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW 02)

A uma suspensão de carbonato de potássio (1,98 g; 14,04 mmoles) em acetona (60 mL), foram adicionados 2 g (11, 23 mmoles) do éster metílico do ácido *p*-hidrocinâmico (BOW 01). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por meia hora a temperatura ambiente, em seguida foi adicionado 1,8 mL de brometo de prenila (11,7 mmoles) vagarosamente (durante 15 min.). A agitação magnética continuou por 3 horas. Após o término da reação a mistura foi neutralizada com uma solução de HCl 10% e extraída com clorofórmio (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotatório, obtendo-se 2,47g de um sólido esbranquiçado, codificado de BOW 02 com rendimento de 89,5%.

Ponto de fusão: 64-65 °C

**NMR** <sup>1</sup>**H (CDCI<sub>3</sub>, 200 ppm)** 7,63 (d, 15,8); 7,43 (d 8,8); 6,88 (d 8,8); 6,28 (d, 15,8); 5,46 (m); 4,51 (d 7,0); 3,77 (s); 1,78 (s); 1,73 (s). (Figura 7, pág. 53)

**NMR** <sup>13</sup>**C (CDCI<sub>3</sub>, 50 ppm)** 167,70; 160,62; 144,50; 138,58; 129,61; 126,85; 119,10; 114,99; 114,88; 64,77; 51,47; 25,73; 18,13. (Figura 9, pág. 55)

# Preparação de (*E*)-metil-3-[4 – hidroxi-3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW 03) Plicatina B

A uma suspensão de 2 g de montmorillonita K-10 em diclorometano (30 mL) foram adicionados 0,200 g de BOW 02 e deixada sob agitação magnética à temperatura ambiente por duas horas. Em seguida a mistura reacional foi filtrada e a motmorillonita K-10 lavada com metanol, as fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotatório, em seguida foram identificadas três substâncias por CCDA. Através de cromatografia em coluna de sílica gel 60 com eluentes em gradiente crescente de polaridade: hexano, hexano-CHCl<sub>3</sub> (1:1), CHCl<sub>3</sub> e CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1%) foram obtidos 25 frações das quais, as sub-frações 2-7 foram identificadas como sendo BOW -02 que não reagiu (0,08 g), as sub-frações 12-16 foram identificadas sendo BOW -03 (plicatina B) 0,07 g como um sólido amarelado, com rendimento de 35% e as sub-frações 18-23 identificadas como sendo BOW 01 (0.04 g), além de subprodutos da reação.

Ponto de fusão: 78-80 °C (MENON et al. 1999, 78-82 °C)

**NMR** <sup>1</sup>**H (CDCI<sub>3</sub>, 200 ppm)** 7,59 (d 16); 7,21 (m); 6,79 (d 8,6); 6,24 (d 16); 5,27(m); 3,76 (s); 3,31 (d 7,2); 1,72 (s); 1,71 (s). (Figura 10, pág. 56)

**NMR** <sup>13</sup>**C (CDCI<sub>3</sub>, 50 ppm)** 168,36; 156,70; 145,38; 134,68; 130,00; 127,86; 127,68; 126,71; 121,23; 115,91; 114,39; 51,68; 29,03; 25,75; 17,81. (Figura 13, pág. 59)

# Preparação de (*E*)-metil-3-[2-(2 –hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato (BOW 04)

Uma solução de 0,338 g (1,38 mmoles) de BOW 03 em diclorometano (5 mL), foi adicionada a uma solução de ácido metacloroperbenzoico (MCPBA) (0,370 g) em 20 mL de diclorometano. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética a 0 °C por 20 minutos. Em seguida, foi adicionada uma solução saturada de bicarbonato de sódio e deixada em agitação magnética por 3 horas. Por meio de funil de separação separaram-se duas fases. A fase aquosa foi extraída com três porções (20 mL) de diclorometano. As fases orgânicas foram reunidas, secas em sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotatório, obtendo-se um óleo amarelado 0,32g com rendimento de 89 %.

**NMR** <sup>1</sup>**H (CDCI<sub>3</sub>, 200 ppm)** 7,57 (d 16); 7,32 (m); 6,74 (d 8,0); 6,32 (d 16); 4,89 (sl); 3,74 (s); 3,01 (dd 5,2; 16); 2,72 (dd 7,2; 16); 1,32 (s); 1,26 (s). (Figura 14, pág 60)

NMR <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, **50 ppm)** 169,56; 156,79; 146,36; 131,60; 128,59; 127,85; 121,77; 118,57; 115,38; 78,85; 70,02; 52,01; 31,89; 25,89; 21,34. (Figura 17, pág. 63)

## Preparação de (*E*)-metil 3-[2-(prop-1-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato: (BOW 05)

A um balão contendo tolueno recentemente destilado (2 mL), foram adicionados 0.50 g de BOW 04 e reagente de Burgess (hidróxido de metoxicarbonil sulfamoil trietilamônio) (0,050 g) foi mantido sob refluxo por 12 horas. Após este tempo foi adicionada água destilada. A mistura reacional foi extraída com três porções (20 mL) de acetato de etila. Em seguida, as fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotatório. Obtiveram-se três compostos, sendo um deles material de partida que não reagiu (identificado por comparação com padrão em CCDA). Após coluna em sílica gel 60 e utilizando eluentes em gradiente crescente de polaridade, obteve-se 0,20 g de BOW -05 (óleo viscoso amarelo).

**NMR** <sup>1</sup>**H (CDCI<sub>3</sub>, 200 ppm)** 7,62 (d 15.8); 7,31 (m); 7,31 (m); 6,78 (d 8,2); 6,25 (d 15.8); 5,21 (m); 4,99 (m); 3,77 (s); 3,35 (dd 9,6; 16); 3,03 (dd 8,4; 16); 1,75 (s). (Figura 20, pág. 66)

Preparação de (*E*)-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-2-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]-acrilato : Bowdenol (BOW 06)

Seguindo a metodologia encontrada na literatura para a preparação de um composto semelhante (FURSTNER et al., 2000), é que a uma suspensão de SeO<sub>2</sub> (9 mg; 0,069 mmol) e diclorometano 10 mL, foram adicionados hidroperóxido de tertbutila (t-BuOOH) (70% p/p em água; 21 µL, 0,165 mmol). A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética à temperatura ambiente por 2 horas. Após este tempo uma solução de BOW-05 (0,010 g; 0,041 mmol) em 2 mL de diclorometano foi adicionada vagarosamente e a suspensão foi mantida sob agitação magnética por 6 horas a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados água e diclorometano, sendo a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório. Após purificação em cromatografia em coluna de sílica gel utilizando como eluentes hexano-clorofórmio (1/1), clorofórmio, clorofórmio-metanol (1%) obteve-se 1,5 mg de bowdenol na forma de um óleo amarelo viscoso, além de subprodutos.

**NMR** <sup>1</sup>**H (CDCI<sub>3</sub>, 200 ppm)** 7,63 (d 15,9); 7,33 (s); 7,28 (d 8,3); 6,76 (d 8,3); 6,24 (d 15,9); 5,35 (m); 5,27(m); 5,23 (m); 4,23 (d 13,7)4,22 (d 13,7); 3,37 (dd, J= 9,5;15.7);3,75 (s); 3,13(dd, J= 8,3; 15,7) (Figura 23, pág. 69)

NMR <sup>13</sup>C (CDCI<sub>3</sub>, **50 ppm**) 168,04; 161,64; 147,32; 145,06; 129,83; 127,85; 127,78; 124,61; 114,98; 112,68; 109,88; 84,50; 62,11; 51,72; 34,95. (Figura 24, pág. 70)

#### Obtenção da Riparina III

Ácido 2,6-dihidroxibenzoico

Éster metilico do ácido 2,6-dihidroxibenzoico

Uma solução de ácido 2,6-dihidroxibenzóico (10 g) e metanol (80 mL) e 3,2 mL de ácido sulfúrico concentrado, foi mantida sob refluxo por 36 h. Em seguida, a mistura reacional foi neutralizada com bicarbonato de sódio e extraída com três porções (20 mL) de acetato de etila. As fases orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em rotaevaporador. Obtevese 2,93 g de cristais da cor branca com rendimento de 27 %.

Para a obtenção da riparina III, colocou-se 0,10 g do éster do ácido 2,6-dihidroxibenzoico em 10 mL de diclorometano, em seguida foram adicionados 0,18 mL de 4-metoxifenetilamina. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética por 4 h. Após purificação em coluna de sílica gel, utilizando como solventes hexano, clorofórmio e metanol em gradiente crescente de polaridade, obtiveram-se 0,078 g de um sólido amarelado (riparina III) com rendimento de 45%.

### PREPARAÇÃO DAS NOVAS RIPARINAS

Para a síntese dos derivados com estrutura geral Rip a-f (Esquema 3, pág 23) os reagentes de partida numa proporção 1:2 (excesso da amina), foram submetidos à agitação magnética sem solvente a temperatura ambiente por um tempo que foi de 30 min a 8 h.

#### Obtenção de Rip-a

Utilizando-se a reação de Schotten-Bauman, foram misturados em um balão de 50 mL 0,41 mL de cloreto de ácido e 0,89 mL de 2-feniletilamina com trietilamina. A mistura reacional sem solvente foi deixada em agitação magnética por 30 min. a temperatura ambiente. Após purificação em cromatografia em coluna obteve-se 0,68 g. de N-fenetilbenzamida (Rip-a) com um rendimento de 84%.(pf. 115°C)

### Obtenção de Rip-b

Utilizando-se a mesma metodologia foi preparado o N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-b) a partir de 0,41 mL de cloreto de benzoila e 1,2 mL de 3,4-dimetoxifenetilamina. A reação terminou em 30 min. Resultando assim em 0,82 g. do composto denominado Rip-b. Rendimento de 80,44%.(pf. 88,5-90°C).

### Obtenção de Rip-c

A partir de 0,43 mL de salicilato de metila e 0,83 mL de feniletilamina, sob agitação magnética por 8 h. e a temperatura ambiente, foram obtidos 0,52 g. de 2-hidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-c) com rendimento de 65%. (pf. 93,6-95°C).

#### Obtenção de Rip-d

Em seguida foi preparada a 2-hidroxi-N-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-d), a partir de 0,43 mL de salicilato de metila com 1, 12 mL de 3,4-dimetoxifenetilamina, sob agitação magnética e a temperatura ambiente por 6 h. com rendimento de 33,68%.(pf. 96°C)

#### Obtenção de Rip-e

Para a preparação de 2,6-diidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-e), foram adicionados 0,75 mL de feniletilamina a uma solução de 0,5 g do éster do ácido 2,6-dihidroxibenzóico em 30 mL de diclorometano e 1 mL de trietilamina. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética por 5 h. Em seguida foi a mistura foi neutralizada com HCl 2%. Em seguida extraiu-se com três porções (20 mL) de acetato de etila. As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas a vácuo. Obteve-se assim 0,58 g do composto denominado Rip-e com rendimento de 75%. (pf. 154-155°C)

### Obtenção de Rip-f

A N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-2,6-diidroxi-benzamida (Rip-f) foi preparada a partir da adição de 1 mL de 3,4-dimetoxifenetilamina, a uma solução de 0,5 g de 2,6-dihidroxibenzoato de metila em 30 mL de diclorometano e 1 mL de trietilamina. A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética por 5 h. Em seguida foi neutralizada com HCl 2% e extraída com três porções de acetato de etila. As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em rotaevaporador. Obteve-se 0,66 g do composto denominado Rip-f com rendimento de 69 %(pf. 166-167°C)

No esquema a seguir esta sumarizada a preparação dos derivados das riparinas

Rip-a; Rip-b; Rip-c; Rip-d

**Esquema 3**. Reação geral para a obtenção dos novos derivados das riparinas.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### Identificação de (E)-metil-3- (4-hidroxifenil)-acrilato (BOW 01)

O espectro de RMN  $^1$ H (Fig. 3, pág. 49) mostrou um simpleto em 3,72 ppm com integral para três hidrogênios, referente a hidrogênios de metoxila. Ainda pôdese observar a presença de dois dupletos em 7,57 ppm e em 6,27 ppm ambos com uma constante de acoplamento de 15,8 Hz, referentes aos hidrogênios olefínicos nas posições 7 e 8 respectivamente. Também, observou-se na região dos hidrogênios aromáticos, dois dupletos referentes aos hidrogênios 2,6 e 3,5 do anel aromático em 7,40 ppm e 6,79 ppm respectivamente, com um J = 8,6 Hz, caracterizando um sistema AA'BB'. Finalmente, observou-se uma absorção em 4,88 ppm atribuída à presença de uma hidroxila.

A análise do espectro de RMN <sup>13</sup>C, utilizando a técnica APT (Fig. 5 pág. 51) revelou 8 sinais dentre os quais podemos observar um sinal referente ao carbono de metoxila em 54.53 ppm. Ao carbono da carbonila foi atribuída a absorção em 172,26 ppm. O carbono na posição 4 ligado diretamente a hidroxila, foi identificado pela absorção em 163,68 ppm e os carbonos olefínicos foram identificados pelas absorções em 145,03 ppm para o carbono na posição 7 e 117,32 ppm para o carbono na posição 8. As absorções em 133,63 e 119,30 ppm foram atribuídas aos carbonos 2-6 e 3-5 respectivamente, confirmando assim a existência de um sistema AA'BB'; e finalmente um sinal em 129,54 ppm referente ao carbono na posição 1.

Com base nestes resultados pudemos identificar o composto em estudo BOW 01 como (*E*)-metil-3- (4-hidroxifenil)acrilato.

**TABELA 1.** Dados de RMN  $^{1}$ H e  $^{13}$ C de (*E*)-metil-3- (4-hidroxifenil)acrilato (BOW 01) (MeOD, 200 ppm; 50ppm).

С	δΗ (ррт)	δС (ррт)
1		129,54
4		163,68
9		172,26
3'		
СН		
2/6	7,40 (d J=8,6)	133,63
3/5	6,79 (d, J=8,6)	119,30
7	7,57 (d J=15,8)	145,03
8	6,27 (d J= 15,8)	117,32
MeO	3,72 (s)	54,53

### Identificação de (E)-metil-3-[4 -(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]-acrilato (BOW 02)

O espectro de RMN  $^1$ H (Fig. 7 pág. 53) mostrou uma absorção em 3,77 ppm com integral para três hidrogênios, atribuída a hidrogênios de metoxila. Ainda podemos observar a presença de dois dupletos em 7,63 ppm e em 6,28 ppm referentes aos hidrogênios olefínicos nas posições 7 e 8 respectivamente, com J = 15,8 Hz. Observa-se ainda na região dos hidrogênios aromáticos, dois dupletos referentes aos hidrogênios 2 e 6 do anel aromático em 7,43 ppm com J = 8,8 Hz e dos hidrogênios nas posições 3 e 5 em 6,88 ppm com J = 8,8 Hz, caracterizando um sistema do tipo AA'BB'. Observou-se também um multipleto em 5,46 ppm atribuído ao hidrogênio na posição H2', já o hidrogênio na posição H-1' foi identificado pelo dupleto observado em 4,51 ppm com J = 7,0 Hz. Finalmente, observou-se dois simpletos em 1,78 e 1,73 ppm referentes as duas metilas nas posições 4' e 5'.

No espectro de RMN <sup>13</sup>C (Fig. 9, pág. 55) foram observadas 13 absorções. Aquelas que absorveram em 25,73 e 18,13 ppm foram atribuídas aos carbonos das duas metilas nas posições 4' e 5'. A absorção em 51,47 ppm foi atribuída ao carbono da metoxila. O carbono mais desprotegido nesta molécula, referente a uma carbonila encontra-se em 167,70 ppm. O carbono na posição 4 (ligado ao oxigênio com a porção prenilica) foi identificado pela absorção em 160,62 ppm. Os carbonos do anel aromático foram identificados pelas absorções em 129,61 ppm referentes aos carbonos das posições 2 e 6 e a absorção em 114,88 ppm referente aos carbonos 3 e 5. Os carbonos nas posições 7 e 8 foram identificados pelas absorções em 144,50 ppm e 114,99 ppm respectivamente, da mesma maneira os carbonos quaternários 1 e 3' foram identificados pelas absorções em 126,85 e 138,58 ppm respectivamente. O carbono na posição 1' mostrou uma absorção em

64,77 ppm e finalmente o carbono na posição 2' foi determinado pela absorção encontrada em 119,1 ppm. Tomando em conta estes indícios podemos afirmar que a estrutura do composto denominado como BOW 02 é (*E*)-metil-3-[4 -(3-metilbut-2-eniloxi)fenil)acrilato.

**TABELA 2.** Dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de (*E*)-metil-3-[4 -(3-metilbut-2-eniloxi)fenil)acrilato (BOW 02) (CDCl<sub>3</sub>, 200 ppm; 50ppm)

С	δH (ppm)	δC (ppm)	
1		126,85	
4		160,62	
9		167,70	
3'		138,58	
СН			
2/6	7,43 (d 8,8)	129,61	
3/5	6,88 (d 8,8)	114,88	
7	7,63 (d, 15,8)	144,50	
8	6,28 (d, 15,8)	114,99	
2'	5,46 (m)	119,10	
CH <sub>2</sub>			
1'	4,51 (d 7,0)	64,77	
CH <sub>3</sub>			
4'	1,78 (s)	25,73	
5'	1,73 (s)	18,13	
MeO	3,77 (s)	51,47	

# Identificação de (*E*)-metil-3-[4 –hidroxi-3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil] acrilato (BOW 03)

De inicio a reação era processada com benzeno e montmorillonita KSF durante três dias de refluxo, (DAUBEN et al., 1999). Já nos estudos feitos por DITZNER et al. (2004) testando diferentes solventes e os dois tipos de montmorillonita (KSF e K-10) observou-se melhores rendimentos com o uso de diclorometano e a argila K-10, . Especificamente no nosso caso isto também foi observado, não na mesma proporção.

Foi feita uma modificação na metodologia, após testar-se diferentes tipos de solventes e os dois tipos de argila; também foi feita uma avaliação sobre a quantidade de argila que se adaptaria melhor à nossa reação, testando-se as proporções de 1:1; 1:2; 1:5; 1:10 e 1:15 (BOW 02 : montmorillonita K-10). Os resultados nos mostraram que a melhor opção é de 10 (dez) vezes o peso de argila em relação ao peso da substância a sofrer o deslocamento da porção prenilica. Em todas as tentativas realizadas para chegar ao procedimento adotado, o rendimento foi de aproximadamente 10-15%.

Ainda foi realizada mais uma série de tentativas para obter a plicatina B, desta vez utilizando sílica flash e florisil no lugar da montmorillonita, (TALAMAS et al., 1997), com diferentes solventes e temperaturas, seguindo a mesma metodologia. O resultado foi que em nenhuma destas tentativas o rendimento foi considerado bom (aprox. 5%).

A uma suspensão BOW 01 (éster do ac. p-hidroxicinâmico) em tolueno seco, foi adicionado hidreto de sódio (NaH). Inicialmente a mistura reacional foi deixada a temp. ambiente e em seguida aquecida a 65 °C por 4 h. Após este tempo a mistura foi resfriada a temp. ambiente e adicionou o brometo de prenila vagarosamente e a reação continuou por 72 h. Após isto foi adicionada água gelada (MENON et al., 1999). Após verificação com CCDA, foi observado que houve a formação de muitos subprodutos. No final o rendimento desta reação foi de 14 % de Plicatina B.

Os compostos BOW 02 (material de partida que não reagiu) e BOW -01 (produto da deprenilação) foram reaproveitados.

O espectro de RMN  $^1$ H (Fig. 10, pág. 56) mostrou uma absorção em 3,76 ppm referente a hidrogênios de metoxila. Ainda podemos observar a presença de dois dupletos em 7,59 ppm e em 6,24 ppm referentes aos hidrogênios olefínicos nas posições 7 e 8 respectivamente acoplando entre si com J =16Hz. Também observou-se na região dos hidrogênios aromáticos um dupleto em 6,79 ppm referente ao hidrogênio na posição 5 com J = 8,6 Hz; já em 7,21 ppm encontram-se um dupleto referente ao hidrogênio na posição 6 e um simpleto do hidrogênio na posição 2, isto foi evidenciado pela integração destas absorções, para dois hidrogênios. O dupleto em 3,31ppm com J = 7,2 Hz, foi atribuída ao hidrogênio na posição 1'. Finalmente observaram-se dois simpletos em 1,72 e 1,71 ppm atribuído as duas metilas nas posições 4' e 5' respectivamente.

No espectro de RMN <sup>13</sup>C (Fig. 13, p. 59) foram observadas 15 absorções, sendo as que apareceram em 25,75 e 17,81 ppm atribuídas aos carbonos das duas metilas nas posições 4' e 5', em 51,68 ppm atribuída ao carbono de metoxila e em 29,03 ppm observamos uma absorção atribuída a C-1'. O carbono mais desprotegido nesta molécula, referente a uma carbonila encontra-se em 168,36 ppm. Ao carbono na posição 4 (ligado à hidroxila) foi atribuída a absorção em 156,70 ppm; os carbonos do anel aromático foram identificados pelas absorções em 127,68 ppm referente ao carbono na posição 3, em 130,00 ppm atribuída ao carbono 2, em 127,86 ppm referente ao carbono 6, em 115,91 ppm ao carbono na posição 5. Os carbonos nas posições 7 e 8 foram identificados pelas absorções em 145,38 e 114,39 ppm respectivamente, e os carbonos quaternários 1, e 3' foram identificados

pelas absorções em 126,71 e 134,68 ppm respectivamente e finalmente o carbono na posição 2' foi determinado pela absorção encontrada em 121,23 ppm. Considerando tais valores pudemos afirmar que a estrutura do composto denominado como BOW 03 tratava-se de (*E*)-metil-3-[4 –hidroxi-3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil)-acrilato.

**TABELA 3.** Dados de RMN  $^{1}$ H e  $^{13}$ C de (*E*)-metil-3-[4 -hidroxi-3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil)-acrilato (BOW 03) (CDCl<sub>3</sub>, 200 ppm; 50ppm)

С	δH (ppm)	δC (ppm)	
1		126,71	
3		127,68	
4		156,70	
9		168,36	
3'		134,68	
СН			
2	7,21 (m)	130,00	
5	6,79 (d 8,6)	115,91	
6	7,21 (m)	127,86	
7	7,59 (d 16)	145,38	
8	6,24 (d 16)	114,39	
2'	5,27(m)	121,23	
CH <sub>2</sub>			
1'	3,31 (d 7,2)	29,03	
CH <sub>3</sub>			
4'	1,72 (s)	25,75	
5'	1,71 (s) 17,81		
OMe	3,76 (s)	51,68	

# Elucidação estrutural de (*E*)-metil-3-[2-(2 –hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidro benzofuran-5-il]-acrilato (BOW 04)

Para chegar à metodologia descrita anteriormente, foi necessário modificar a que foi encontrada na literatura, para poder obter o álcool terciário desejado em maior rendimento. Basicamente, o que foi feito foi dividir a reação em duas, formação do epóxido com o MCPBA, e depois basificar a mistura reacional e continuar a reação sem isolar o epóxido para poder direcionar a formação predominante do álcool terciário. O importante que se deve atentar nesta fase é a basificação do meio logo após a formação do epóxido, caso contrario há formação de subprodutos.

Outra tentativa de se obter o BOW-04 foi através da reação de BOW 3 (plicatina B) e MCPBA a temperatura ambiente em diclorometano e/ou metanol, com hidróxido de lítio, deixando a mistura reacional sob agitação magnética por 2 dias, (LINDSEY et al.,2002). Após este tempo, observou-se que o rendimento da reação foi de aproximadamente 12%.

O espectro de RMN  $^{1}$ H (Fig. 14 pág. 60) mostrou um simpleto em 3,74 ppm referente à hidrogênios de metoxila. Também observou-se a presença de dois dupletos em 7,57 ppm e em 6,32 ppm com J =16 Hz, referentes aos hidrogênios olefínicos nas posições 7 e 8 respectivamente. Ainda pudemos observar na região dos hidrogênios aromáticos um dupleto em 6,74 ppm com J = 8,0 ppm referente ao hidrogênio na posição 5. Em 7,32 ppm observamos um multipleto referente aos hidrogênios nas posições 6 e 2, determinados pela integração destas absorções para dois hidrogênios. Finalmente observaram-se dois simpletos em 1,32 e 1,26

ppm atribuídos as duas metilas nas posições 4' e 5', e para caracterizar esta molécula observa-se um simpleto largo em 4,89 ppm atribuído ao hidrogênio na posição 2' e dois duplos dupletos em 3,01 com J = 5,2; 16 Hz e em 2,72 ppm com J = 7,2; 16 Hz referentes aos hidrogênios na posição 1'.

No espectro de RMN <sup>13</sup>C (Fig.17 pág.63) foram observadas 15 absorções, onde as que surgiram em campo alto em 25,89 e 21,34 ppm foram atribuídas aos carbonos das duas metilas nas posições 4' e 5', em 52,01 ppm foi atribuída ao carbono da metoxila. Em 31,89 ppm observamos uma absorção atribuída a C-1'. O carbono da carbonila foi observado em 169,56 ppm, o carbono na posição 4 foi atribuído à absorção em 156,79 ppm. Os carbonos do anel aromático foram identificados pelas absorções em 127,85 ppm referente ao carbono na posição 3, em 131,60 ppm atribuída ao carbono na posição 2, em 128,59 ppm referente ao carbono na posição 6 e em 115,38 ppm do carbono na posição 5. Os carbonos nas posições 7 e 8 foram identificados pelas absorções em 146,36 e 118,57 ppm respectivamente. Os carbonos quaternários 1 e 3' foram identificados pelas absorções em 121,77 e 78,85 ppm respectivamente. Finalmente, o carbono metínico na posição 2' foi determinado pela absorção encontrada em 70,02 ppm. Levando em consideração estes indícios podemos afirmar que a estrutura do composto denominado como BOW 04 é (E)-metil-3-[2-(2 -hidroxipropan-2-il)-2,3dihidrobenzoufuran-5-il]acrilato.

**TABELA 4.** Dados de RMN  $^1$ H e  $^{13}$ C de (*E*)-metil-3-[2-(2 -hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il]-acrilato (BOW 04) (CDCl<sub>3</sub>, 200 ppm ; 50ppm)

С	δH (ppm)	δC (ppm)
1		121,77
3		127,85
4		156,79
9		169,56
3'		78,85
СН		
2	7,32 (m)	131,60
5	6,74 (d 8,0)	115,38
6	7,32 (m)	128,59
7	7,57 (d 16)	146,36
8	6,32 (d 16)	118,57
2'	4,89 (sl)	70,02
CH <sub>2</sub>		
1'	3,01 (dd 5,2; 16)	24.00
ı	2,72 (dd 7,2; 16)	31,89
CH₃		
4'	1,32 (s)	25,89
5'	1,26 (s) 21,34	
OMe	3,74 (s)	52,01

# Elucidação estrutural de (*E*)-metil 3-[2-(prop-1-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato (BOW 05)

Na primeira tentativa da metodologia citada anteriormente, a solução do BOW 04 foi tratada com piridina e POCl<sub>3</sub>, em banho de gelo após o termino da reação. A mistura reacional foi vertida em gelo e extraída com diclorometano, lavada com solução de HCl 10%, solução 5% de bicarbonato de sódio e solução saturada de NaCl, seca em sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório, dando rendimento baixo (5%) por conta da formação de vários subprodutos. Isto foi solucionado pela destilação do POCl<sub>3</sub> para eliminar as impurezas, o que melhorou o rendimento porém continuou abaixo (8 %) do obtido com o reagente de Burgess.

Em seguida foi modificada a temperatura da reação tentando melhorar o rendimento, seguindo a mesma metodologia foi realizada a reação a 80°C em banho de óleo por 10 minutos. Em seguida a mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente por 30 minutos, dessa maneira não foi observada uma melhora significativa no rendimento (APPENDINO et al, 1999)

O composto BOW-03 (plicatina B) foi tratado com (CAN) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ce(NO<sub>2</sub>)<sub>6</sub> e acetonitrila a temperatura ambiente por 3 horas, (PEREZ-SACAN et al., 2005). Após remoção do solvente, verificou-se que a reação, não ocorreu.

O espectro de RMN  $^{1}$ H (Fig. 20, pág. 66) mostrou um simpleto em 3,77 ppm referente à hidrogênios de metoxila. Também pudemos observar a presença de dois dupletos em 7,62 e 6,25 ppm ambos com J = 15,8 Hz, referentes aos hidrogênios olefínicos nas posições 7 e 8 respectivamente. Ainda observou-se na região dos

hidrogênios aromáticos um dupleto em 6,78 ppm com J =8,2 Hz, referente ao hidrogênio na posição 5. Já em 7,31 ppm observou-se um multipleto, referente aos hidrogênios na posição 6 e na posição 2. Finalmente observou-se um simpleto em 1,75 ppm atribuído a metila na posição 4', um tripleto em 5,21 ppm atribuído ao hidrogênio na posição 2', assim como também dois duplo dupletos em 3,35 ppm (J =9,6; 16 Hz) e 3,03 ppm (J = 8,4; 16 Hz) referentes aos hidrogênios na posição 1'. Um multipleto em 4,99 ppm referente aos hidrogênios metilénicos na posição 5'. O BOW 05 foi caracterizado então como (E)-metil 3-[2-(prop-1-em-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]-acrilato.

**TABELA 5.** Dados de RMN  $^1$ H de (*E*)-metil 3-[2-(prop-1-em-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato (BOW 05) (CDCl<sub>3</sub>, 200 ppm)

С	δH(ppm)	
1		
3		
4		
9		
3'		
СН		
2	7,31 (m)	
5	6,78 (d 8,2)	
6	7,31 (m)	
7	7,62 (d 15.8)	
8	6,25 (d 15.8)	
2'	5,21 (m)	
CH <sub>2</sub>		
1'	3,35 (dd 9,6; 16)	
I	3,03 (dd 8,4; 16)	
5'	4,99 (m)	
CH <sub>3</sub>		
4'	1,75 (s)	
ОМе	3,77 (s)	

Elucidação estrutural de (*E*)-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-2-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato . Bowdenol (BOW 06)

O espectro de RMN  $^1$ H (Fig. 23 pág. 69) mostrou um simpleto em 3,75 ppm referente à hidrogênios de metoxila. Ainda, podemos observar a presença de dois dupletos em 7,63 ppm e em 6,24 ppm com J =19,9 Hz, referentes aos hidrogênios olefínicos nas posições 7 e 8 respectivamente. Na região dos aromáticos observouse um dupleto em 6,76 ppm com J =8,3 Hz referente ao hidrogênio na posição 5, e em 7,28 ppm observou-se um dupleto referente ao hidrogênio na posição 6. Um simpleto em 7,33 ppm foi atribuído ao hidrogênio da posição 2. Também observou-se um multipleto em 5,35 ppm atribuído ao hidrogênio na posição 2', assim como também dois duplo dupletos em 3,37 ppm (J =8,9; 15,7Hz) e 3,13 ppm (J =8,9; 15,9 Hz) referentes aos hidrogênios na posição 1'. Hidrogênios olefínicos foram evidenciados através de dois dupletos em 4,23 e 4,22 ppm referentes aos hidrogênios na posição 4'. Finalmente um multipleto em 5,25 ppm referente aos hidrogênios na posição 5'. .

No espectro de RMN<sup>13</sup>C (Fig.24 pág. 70) foram observadas 15 absorções, em 51,72 ppm, foi atribuída ao carbono de metoxila, em 34,95 ppm observamos uma absorção atribuída a C-1', o carbono da carbonila, encontra-se em 168,04 ppm, o carbono na posição 4 foi atribuído à absorção em 161,64 ppm. Os carbonos do anel aromático foram identificados pelas absorções em 127,78 ppm do carbono na posição 3, em 124,61 ppm atribuída ao carbono na posição 2, em 129,83 ppm referente ao carbono na posição 6 e em 109,88 ppm do carbono na posição 5. Os carbonos nas posições 7 e 8 foram identificados pelas absorções em 145,06 e 114,98 ppm respectivamente. Os carbonos quaternários 1 e 3' foram identificados

pelas absorções em 127,85 e 147,32 ppm respectivamente. O carbono na posição 2' foi determinado pela absorção encontrada em 84,50 ppm e a absorção em 62,11 ppm atribuída ao carbono na posição 4'. Finalmente a absorção em 112,68 ppm foi atribuída ao carbono na posição 5'.

A análise dos espectros bidimensionais (HMQC $^{-1}J_{CH}$ ) (fig. 25, pág. 71) permitiu correlacionar os núcleos de  $^{13}$ C com os  $^{1}$ H a eles diretamente ligados (acoplados) em:  $\delta$  7.33 (H-2) com 124.61 (C-2);  $\delta$  6.76 (H-5) com 109.88 (C-5);  $\delta$  7,28 (H-6) com 129.83 (C-6);  $\delta$  7.63 (H-7) com 145.06 (C-7);  $\delta$  6.24 (H-8) com 114.98 (C-8);  $\delta$  7.28 (H-2') com 84.50 (C-2');  $\delta$  3.37 e 3.13 (H-1') com 34.95 (C-1');  $\delta$  4.23 e 4.22 (H-4') com 62.11 (C-4');  $\delta$  5.27 e 5.23 (H-5') com 112.68 (C-5') e  $\delta$  3.75 (CH<sub>3</sub>O-10) com 51.72 (CH<sub>3</sub>O -10)

Utilizando as correlações a longa distancia (HMBC –  $^2$ J e  $^3$ J<sub>CH</sub>) (fig. 26, pág. 72) foi possível atribuir inequivocamente os acoplamentos entre  $^{13}$ C e  $^1$ H distante 3 ligações ( $^3$ J<sub>CH</sub>) em:  $\delta$  6.24 (H-8) com 127.85 (C-1);  $\delta$  7.33 (H-2) com 161.64 (C-4);  $\delta$  7.28 (H-6) com 161.64 (C-4);  $\delta$  7.63 (H-7) com 168.04 (C-9);  $\delta$  3.75 (H-10) com 168.04 (C-9);  $\delta$  7.33 (H-2) com 129.83 (C-6);  $\delta$  7.33 (H-2) com 145.06 (C-7);  $\delta$  7.28 (H-6) com 145.06 (C-7);  $\delta$  7.33 (H-2) com 62.11(C-4) e  $\delta$  7.33 (H-2) com 112.68(C-5') ppm.

Tomando em conta estes indícios podemos afirmar que a estrutura do composto denominado como BOW 06 é (E)-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-2-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato

**TABELA 6.** Dados de RMN  $^1$ H e  $^{13}$ C de (*E*)-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-2-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato. Bowdenol (BOW 06) (CDCl<sub>3</sub>, 500 ppm ; 125ppm)

Carbono	APT/HMQC		НМВС	
(ppm)	δ ( <sup>13</sup> C) <sup>a</sup>	δ (¹H) <sup>b, d</sup>	$\delta (^2 J e^3 J_{CH})^c$	
С				
1	127.85	-	6.24 (H-8)	
3	127.78	-	-	
4	161.64	-	7.33 (H-2); 7.28 (H-6)	
9	168.04	-	7.63 (H-7); 3.75 (H-10)	
3'	147.32	-		
СН				
2	124.61	7,33 s (1H)	-	
5	109.88	6.76 d (1H)(8.3Hz)	-	
6	129,83	7.28 d (1H)(8.3Hz)	7.33 (H-2)	
7	145.06	7.63 d (1H)(15.9Hz)	7.33 (H-2); 7.28 (H-6)	
8	114.98	6.24 d (1H)(15.9Hz)	-	
2'	04.50	7.28 dd (1H)(9.5 e 8,3Hz)	-	
CH <sub>2</sub>	84.50			
1'	34.95	3.37 dd (1H) (15.7 e 9.5Hz) 3.13 dd (1H) (15.7 e 8,3Hz) 4.23 d (1H) (13.7Hz)	-	
4'	62.11	4.22 d (1H) (13.7Hz)	7.33 (H-2′)	
5'	112.68	5.27 5.23	7.33 (H-2´)	
CH₃				
OMe	51.72	3.75 s(3H)	-	

### Identificação da Riparina III

A metodologia aqui utilizada para a preparação da riparina III foi em duas etapas: 1.-preparação do éster metilico do ácido 2,6 dihidroxibenzoico. Esta reação é simples apesar do baixo rendimento e do material que não reagiu pode ser reaproveitado. 2- A segunda etapa foi a utilização da reação de Schotten-Bauman a partir do éster metílico do ácido 2,6-dihidroxibenzoico com 4-metoxifenetilamina. O rendimento desta reação foi maior (45%) em relação metodologia encontrada na literatura (30%) (SEIXAS, 1996).

A identificação da riparina III obtida pela nova metodologia, foi feita através da comparação dos dados espectroscópicos obtidos com os da literatura (BARBOSA FILHO et al, 1987; SEIXAS, 1996), dados que estão contidos nas seguintes tabelas:

**Tabela 7.** Dados comparativos de RMN <sup>1</sup>H da riparina III (Fig. 27, pág. 73)

С	Riparina III Isolada (60 ppm, CDCl₃) δ	Riparina III síntese anterior (400 ppm, C₅D₅N) δ	Riparina III síntese atual (200 ppmCDCl₃) δ
1			
2			
3	6,50 d $J$ = 8 Hz	6,70 d J = 8 Hz	6,46  d  J = 8  Hz
4	7,20 t $J = 8 \text{ Hz}$	7,26  t  J = 8  Hz	7,14 m
5	6,50  d  J = 8  Hz	6,70  d  J = 8  Hz	6,46  d  J = 8  Hz
6			
1'			
2'	7,18 d $J$ = 8 Hz	7,26  d  J = 8,6  Hz	7,14 m
3'	6,85  d  J = 8  Hz	6,91  d  J = 8,6  Hz	6,81 d <i>J</i> = 8,6 Hz
4'			
5'	6,85  d  J = 8  Hz	6,91 d <i>J</i> = 8,6 Hz	6,81 d <i>J</i> = 8,6 Hz
6'	7,18 d $J$ = 8 Hz	7,26  d  J = 8,6  Hz	7,14 m
7'	2,85  t  J = 7  Hz	2,91  t  J = 7  Hz	2,84  t  J = 7  Hz
8'	3,63  t  J = 7  Hz	3,82  t  J = 7  Hz	3,65 m
OH-2	14,5 s	14,15 sl	10,6 sl
OH-6	14,5 s	14,15 sl	10,6 sl
NH	8,92 s	9,55 sl	8.95 s
OMe	3,69 s	3,62 s	3,72 s

**Tabela 8.** Dados comparativos de RMN <sup>13</sup>C da riparina III (Fig. 30, pág. 76)

С	Riparina III Isolada (20 ppm, CDCI <sub>3</sub> ) ppm	Riparina III síntese anterior (100 ppm, C₅D₅N) ppm	Riparina III síntese atual (50 ppm, CDCI <sub>3</sub> ) ppm
1	103,3	104,78	102,86
2	160,0	162,58	159,71
3	108,2	108,48	108,14
4	133,4	134,22	133,67
5	108,2	108,48	108,14
6	160,0	162,58	159,71
1'	131,0	132,15	130,49
2'	129,8	130,72	129,62
3'	114,2	114,95	113,96
4'	158,4	159,25	158,12
5'	114,2	114,95	113,96
6'	129,8	130,72	129,62
7'	34,7	35,42	34,32
8'	41,0	41,68	41,07
OMe	55,3	55,56	55,12
C=O	170,6	171,99	170,55

### Elucidação estrutural dos derivados das riparinas

### Elucidação estrutural de N-fenetilbenzamida (Rip-a)

No espectro de RMN  $^{1}$ H (fig. 32, pág. 78) observamos em 7,81 ppm um duplo dupleto (J = 2,0; 8,0) referente aos hidrogênios nas posições 2 e 6. Em 7,45 ppm observa-se um multipleto atribuído aos hidrogênios nas posições 3,4 e 5. Já em 7,24 ppm observa-se um multipleto que foi atribuído aos hidrogênios nas posições 2', 3', 4', 5' e 6'. Em 3,47 ppm encontra-se um multipleto com J = 6,8 referente ao hidrogênio na posição 8, também observa-se um tripleto em 2,83 ppm com J = 7,8 referente ao hidrogênio na posição 7. Finalmente observa-se um simpleto largo em 8,57 ppm atribuído ao NH.

### Elucidação estrutural de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-b)

No espectro de RMN  $^{1}$ H (fig. 35, pág. 81) observamos em 7,82 ppm um duplo dupleto (J = 1,8; 7,8) referente aos hidrogênios nas posições 2 e 6, em 7,45 ppm observa-se um multipleto atribuído aos hidrogênios nas posições 3,4 e 5. Já em 6,81 ppm observa-se um simpleto que foi atribuído ao hidrogênio na posição 2'. Em 6,84 ppm observa-se um dupleto com J = 8,4 referente ao hidrogênio na posição 5'. Também observa-se um duplo dupleto em 6,73 ppm (J = 2,0; 8,0) atribuído ao hidrogênio na posição 6'. Em 3,46 ppm encontra-se um multipleto com J = 7,6 referente ao hidrogênio na posição 8. Também observa-se um tripleto em 2,77 ppm com J = 7,6 referente ao hidrogênio na posição 7. Ainda observa-se um tripleto em

8,55 ppm com J = 5,4 atribuído ao NH. Finalmente observa-se um simpleto em 3,69 ppm referente aos hidrogênios de duas metilas nas posições 3' e 4'.

### Elucidação estrutural de 2-hidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-c)

No espectro de RMN  $^{1}$ H (fig. 38, pág. 84) observamos em 7,28 ppm um multipleto referente aos hidrogênios nas posições 3, 4 e 5. Em 7,66 ppm observa-se um duplo dupleto (J = 1,4; 8,1) atribuído ao hidrogênio na posição 6. Em 6,84 ppm observa-se um tripleto com J = 7,8 referente ao hidrogênio na posição 4'. Também observa-se um multipleto em 7,28 ppm atribuído aos hidrogênios nas posições 2', 3', 5' e 6'. Já em 3,52 ppm encontra-se um quarteto com J = 6,8 referente ao hidrogênio na posição 8, também observa-se um tripleto em 2,86 ppm com J = 7,8 referente ao hidrogênio na posição 7. Também observa-se um tripleto em 8,93 ppm com J = 5,4 atribuído ao NH. Finalmente observa-se um simpleto largo em 12,62 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila fenólica.

### Elucidação estrutural de 2-hidroxi-N-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-d)

No espectro de RMN  $^1$ H (fig. 41, pág. 87) observamos em 7,83 ppm com J = 7,6 um dupleto referente ao hidrogênio na posição 6. Em 7,38 ppm observa-se um tripleto com J = 7,0 atribuído ao hidrogênio na posição 5. Já em 6,86 ppm com J = 7,6 observa-se um tripleto que foi atribuído aos hidrogênios nas posições 3 e 4. Em 6,73 ppm observa-se um duplo dupleto (J = 1,2; 8,2) referente ao hidrogênio na posição 6'. Também observa-se um dupleto em 6,8 ppm atribuído ao hidrogênio na posição 5'. Em 6,8 ppm observa-se um simpleto referente ao hidrogênio na posição 2'. Em 3,50 ppm encontra-se um quarteto com J = 6,8 referente ao hidrogênio na posição 8, também observa-se um tripleto em 2,78 ppm com J = 7,4 referente ao hidrogênio na posição 7. Também observa-se um tripleto em 8,87 ppm com J = 5,6 atribuído ao NH. Finalmente observa-se um simpleto largo em 12,59 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila, assim como também observa-se um simpleto em 3,69 ppm referente aos hidrogênios das metilas nas posições 3' e 4'.

### Elucidação estrutural de 2,6-diidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-e)

No espectro de RMN  $^1$ H (fig. 44, pág. 90) observamos em 7,24 ppm um multipleto referente aos hidrogênios nas posições 3, 4 e 5. Também observou-se um multipleto em 7,24 ppm atribuído aos hidrogênios nas posições 3', 4' e 5'. Foi observado ainda um dupleto em 6,35 ppm com J = 8,0 referente aos hidrogênios nas posições 2' e 6'. Já em 3,58 ppm encontra-se um quarteto com J = 6,8 referente ao hidrogênio na posição 7. Também observa-se um tripleto em 2,84 ppm com J = 7,4 referente ao hidrogênio na posição 8. Um tripleto em 8,94 ppm com J = 4,8 Hz

foi atribuído ao NH. Finalmente observa-se um simpleto largo em 12,6 ppm referente aos hidrogênios das hidroxilas nas posições 2 e 6.

# Elucidação estrutural de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-2,6-diidroxi-benzamida (Rip-f)

No espectro de RMN  $^{1}$ H (fig. 47, pág. 93) observamos em 7,13 ppm com J = 8,2 um tripleto referente ao hidrogênio na posição 4. Em 6,33 ppm observa-se um tripleto com J = 8,4 Hz atribuído aos hidrogênios nas posições 3 e 5. Em 6,86 ppm com J = 8,0 Hz observa-se um dupleto que foi atribuído ao hidrogênio na posição 6'. Em 6,8 ppm observou-se um simpleto referente ao hidrogênio na posição 2'. Um dupleto em 6,75 ppm com J = 8,0 atribuído ao hidrogênio na posição 5'. Já em 3,56 ppm encontra-se um quarteto com J = 7,4 Hz referente ao hidrogênio na posição 7. Um tripleto em 2,77 ppm com J = 7,2 Hz referente ao hidrogênio na posição 8. Também observou-se um simpleto largo em 8,9 ppm com atribuído ao NH. Finalmente observou-se um simpleto largo em 12,58 ppm referente aos hidrogênios de duas hidroxilas nas posições 2 e 6, assim como também observou-se um simpleto em 3,7 ppm referente aos hidrogênios das metilas nas posições 3' e 4'.

**Tabela 9**. Dados de RMN <sup>1</sup>H dos derivados das riparinas (Rip a-f) em DMSO-d6 (200 ppm).

Н	Rip-a	Rip-b	Rip-c	Rip-d	Rip-e	Rip-f
1						
2	7,81 (dd 2,0; 8,0)	7,82 (dd 1,8; 7,8)				
3	7,45 (m)	7,45 (m)	7,28 (m)	6,86 (t 7,6)	7,24 (m)	6,33 (d 8,4)
4	7,45 (m)	7,45 (m)	7,28 (m)	6,86 (t 7,6)	7,24 (m)	7,13 (t 8,2)
5	7,45 (m)	7,45 (m)	7,28 (m)	7,38 (t 7,0)	7,24 (m)	6,33 (d 8,4)
6	7,81 (dd 2,0; 8,0)	7,82 (dd 1,8; 7,8)	7,66 (dd 1,4; 8,1)	7,83 (d 7,6)		
1′						
2′	7,24 (m)	6,81 (s)	7,28 (m)	6,8 (s)	6,35 (d 8,0)	6,8 (s)
3΄	7,24 (m)		7,28 (m)		7,24 (m)	
4΄	7,24 (m)		6,872 (t 7,8)		7,24 (m)	
5΄	7,24 (m)	6,84 (d 8,4)	7,28 (m)	6,8 (d)	7,24 (m)	6,75 (d 8,0)
6′	7,24 (m)	6,73 (dd 2; 8,0)	7,28 (m)	6.73 (dd 1,8; 8,2)	6,35 (d 8,0)	6,86 (d 8,0)
7'	2,83 (t 7,8)	2,77 (t 7,6)	2,86 (t 7,8)	2,78 (t 7,4)	2,84 (t 7,4)	2,77 (t 7,2)
8'	3,47 (q 6,8)	3,46 (q 7,6)	3,52 (q 6,8)	3,50 (q 6,8)	3,58 (q 6,8)	3,56 (q 7,4)
N-H	8,57 (sl)	8,552 (t 5,4)	8,93 (t 5,4)	8,87 (t 5,6)	8,94 (t 4,8)	8,9 (sl)
2-OH			12,628 (s)	12,59 (s)	12,6 (sl)	12,58 (s)
6-OH					12,6 (sl)	12,58 (s)
3'-OMe		3,69 (s)		3,69 (s)		3,7 (s)
4'-OMe		3,69 (s)		3,69 (s)		3,7 (s)

### **CONCLUSÕES**

Através da rota sintética inédita proposta, foi obtido o bowdenol e também outros compostos intermediários desta rota, sendo o intermediário chave a plicatina B seu precursor biogenético que apresentou atividade antimutagênica (MENON et al., 1999).

Na maior parte da obtenção dos intermediários os rendimentos foram bons e os produtos foram caracterizados com um bom grau de pureza

A riparina III foi obtida através de uma nova rota simples, os análogos das Riparinas 4a-4f foram obtidos em rendimentos que variaram de modestos a bons,utilizando-se metodologia simples e de resultados seguros.

Os análogos encontram-se, a exemplo das riparinas naturais, sendo submetidos a screenings farmacológicos para a determinação de suas potenciais atividades farmacológicas, suportando futuros estudos de relação estrutura/atividade nesta classe de compostos.

Os derivados sintetizados foram identificados por RMN <sup>1</sup>H, e os dados de RMN <sup>13</sup>C estão sendo obtidos.



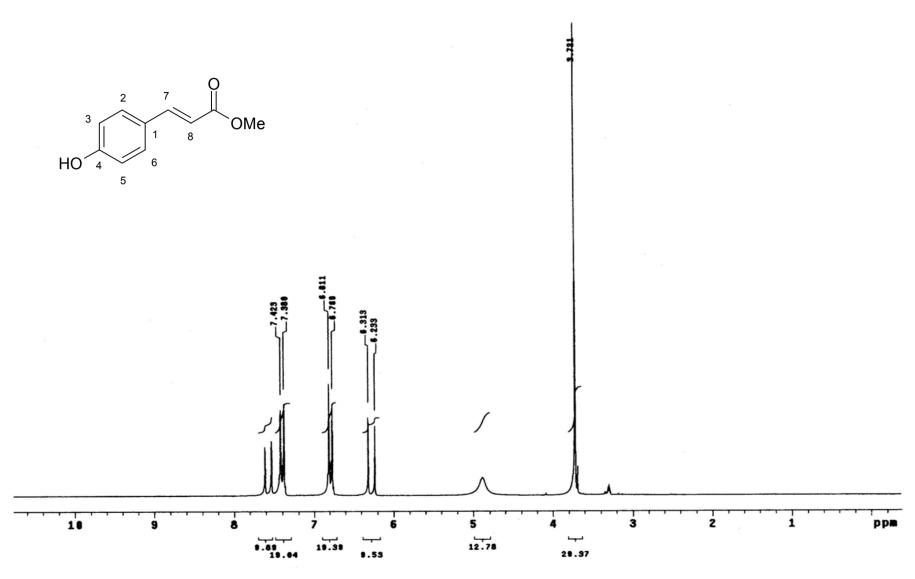


Figura 3. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de (*E*)-metil-3- (4-hidroxifenil) acrilato (BOW-01) (MeOD , 200MHz)

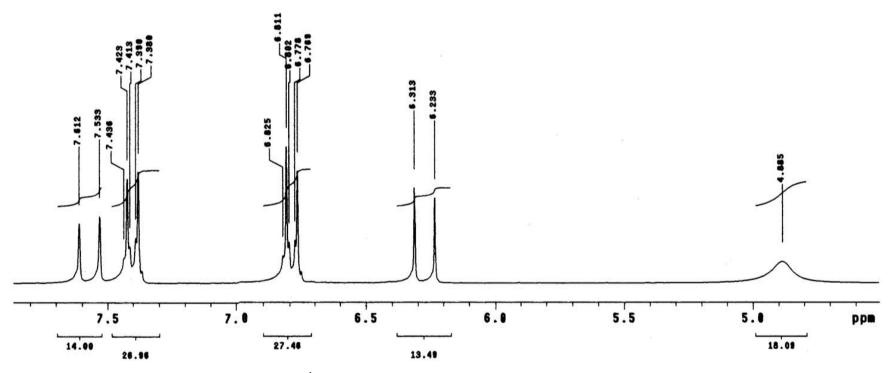


Figura 4. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de (*E*)-metil-3- (4-hidroxifenil)acrilato (BOW-01) (MeOD , 200MHz)

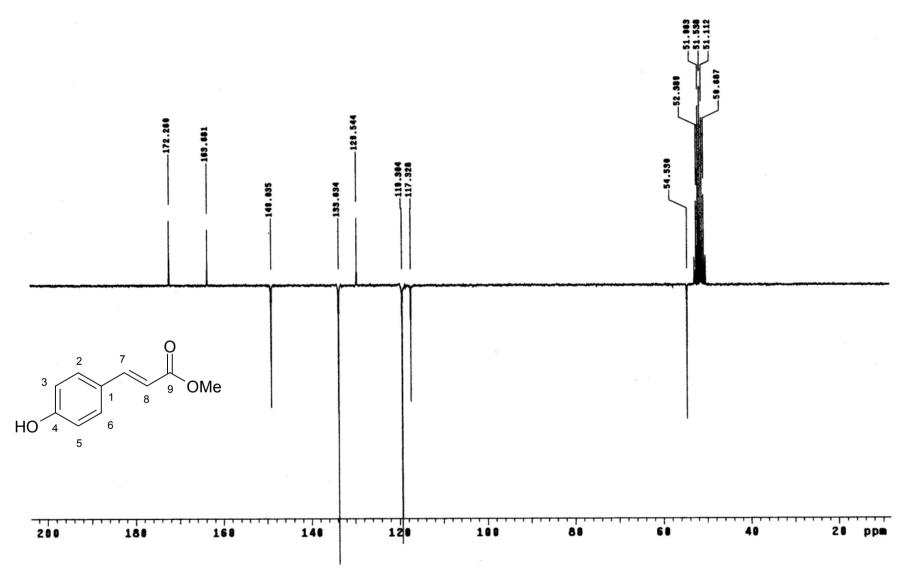


Figura 5. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de (*E*)-metil-3- (4-hidroxifenil)acrilato (BOW-01) (MeOD , 50MHz)

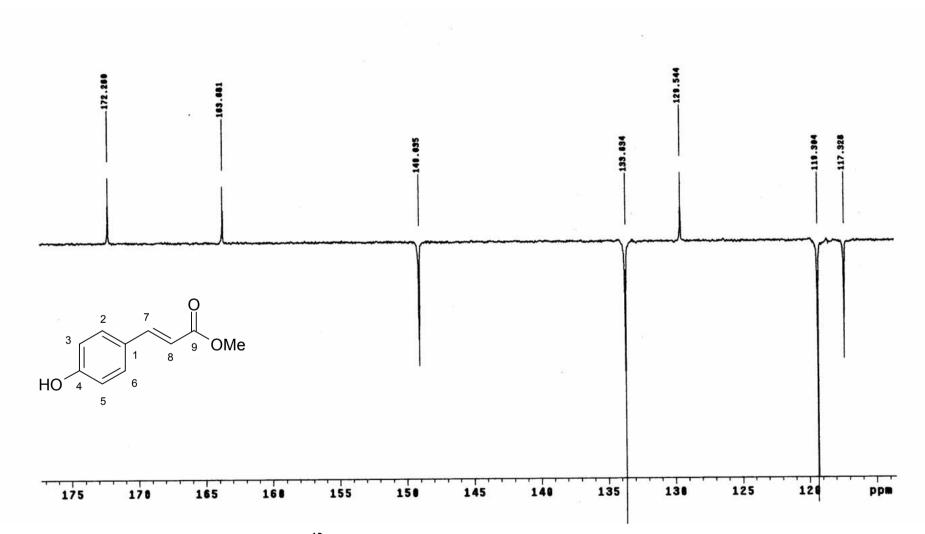


Figura 6. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C de (*E*)-metil-3- (4-hidroxifenil)acrilato (BOW-01) (MeOD , 50MHz)

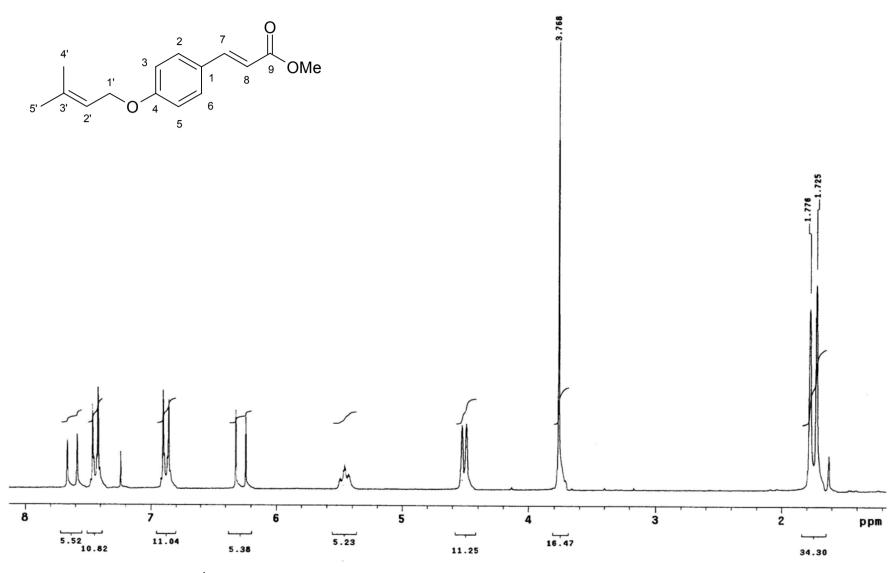


Figura 7. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de (*E*)-metil-3-[4 -(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW-02) (CDCl<sub>3</sub> , 200MHz)

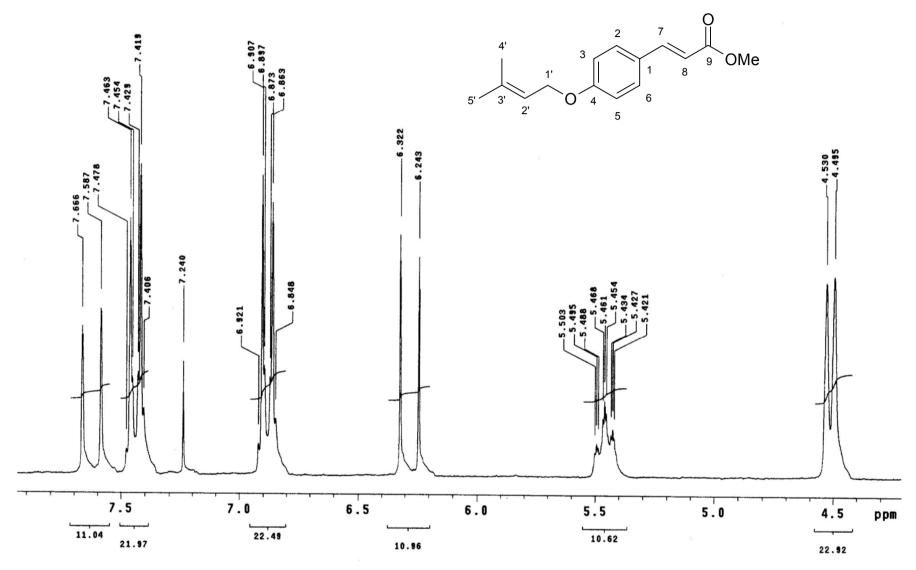


Figura 8. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de(*E*)-metil-3-[4 -(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW-02) (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz).

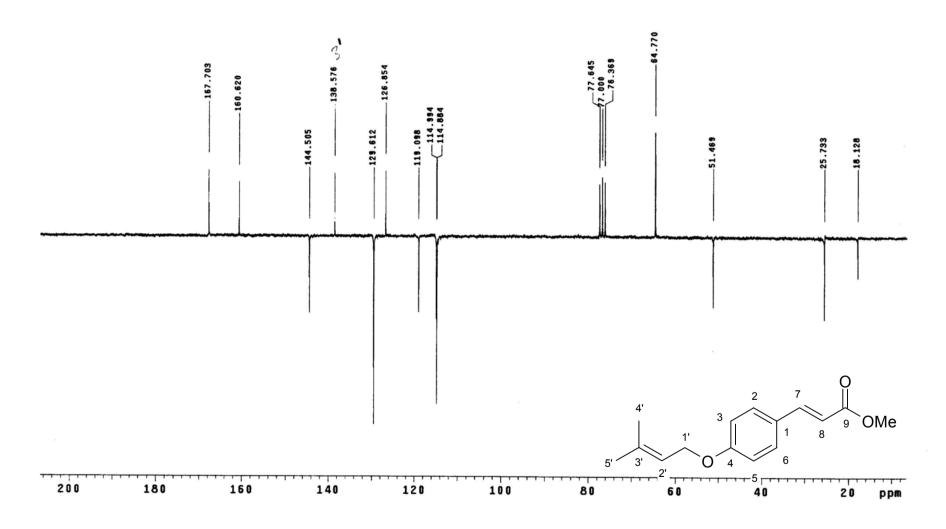


Figura 9. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de (*E*)-metil-3-[4 -(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW-02) (CDCl<sub>3</sub> , 50MHz)

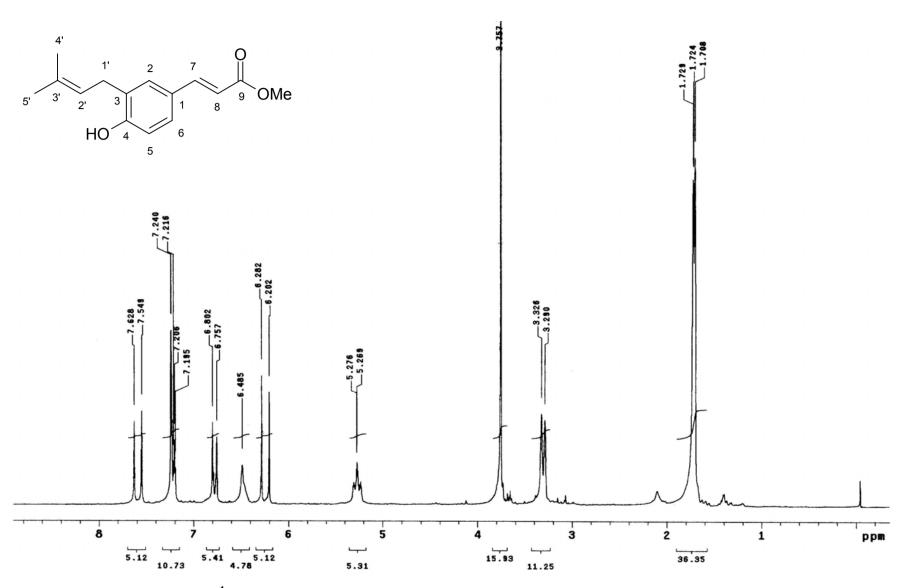


Figura 10. Espectro de RMN  $^1$ H de ( $\it E$ )-metil-3-[4 –hidroxi-3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW-03) (CDCl $_3$ , 200MHz)

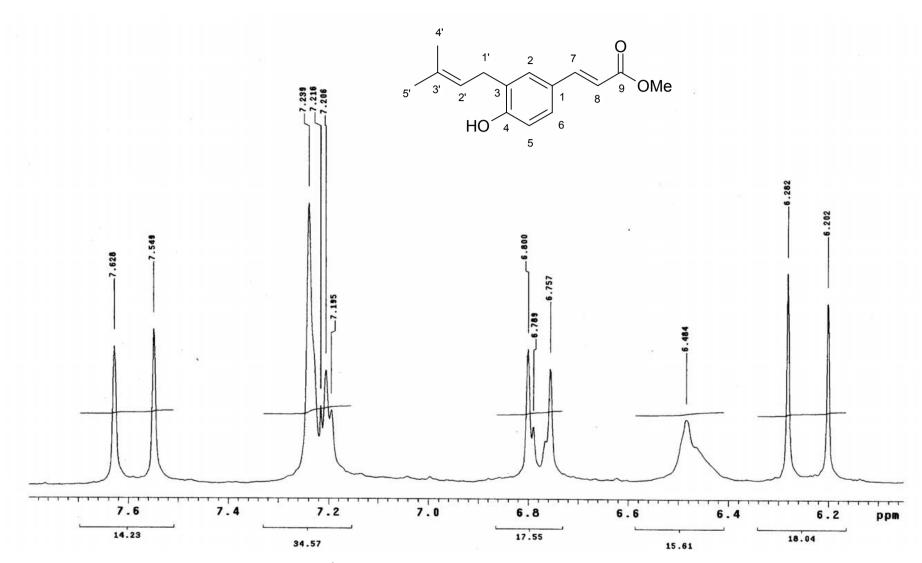


Figura 11. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de (*E*)-metil-3-[4 –hidroxi-3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW-03) (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz)

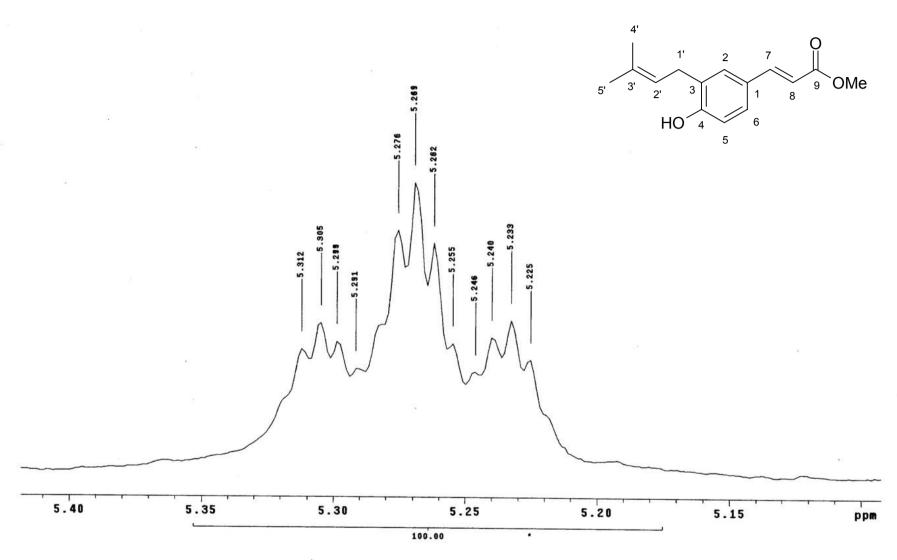


Figura 12. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de (*E*)-metil-3-[4 –hidroxi-3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato BOW-03 (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz)

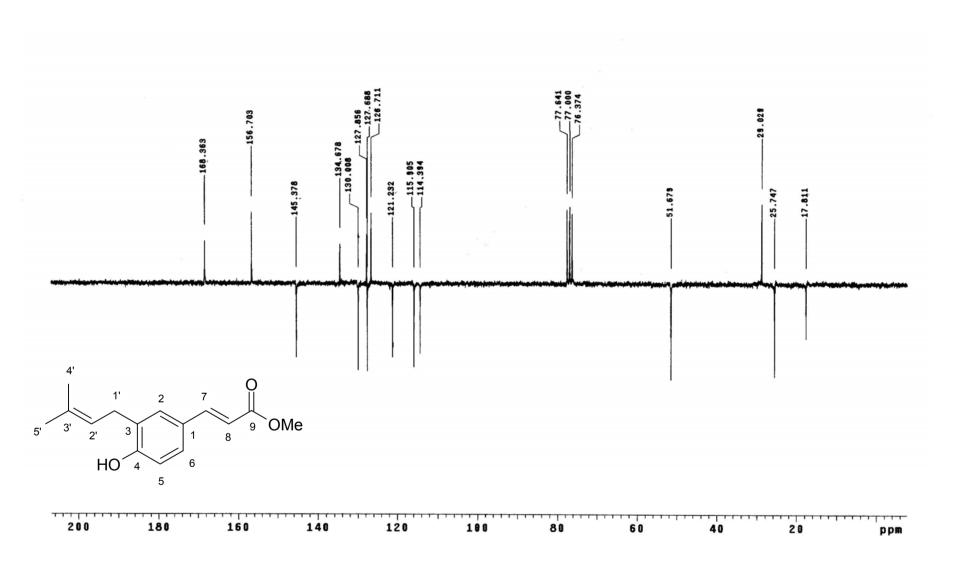


Figura 13. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de (*E*)-metil-3-[4 –hidroxi-3-(3-metilbut-2-eniloxi)fenil]acrilato (BOW-03) (CDCl<sub>3</sub>, 50MHz)

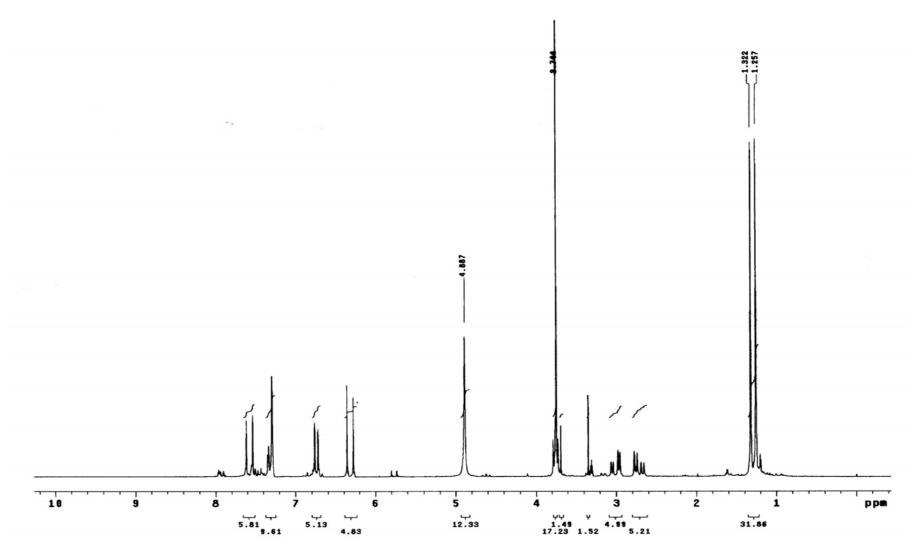


Figura 14. Espectro de RMN  $^{1}$ H de (*E*)-metil-3-[2-(2 -hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il] (BOW-04) (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz)

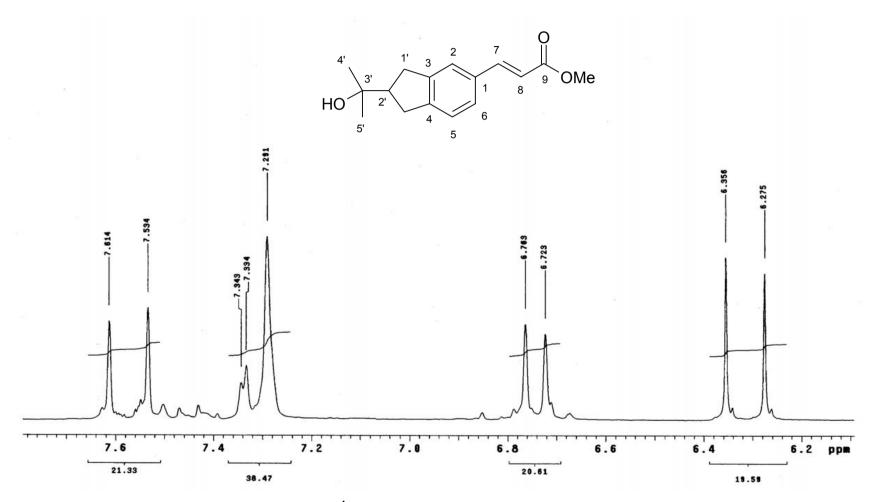


Figura 15. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de (*E*)-metil-3-[2-(2 –hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il] (BOW-04) (CDCl<sub>3</sub> , 200MHz)

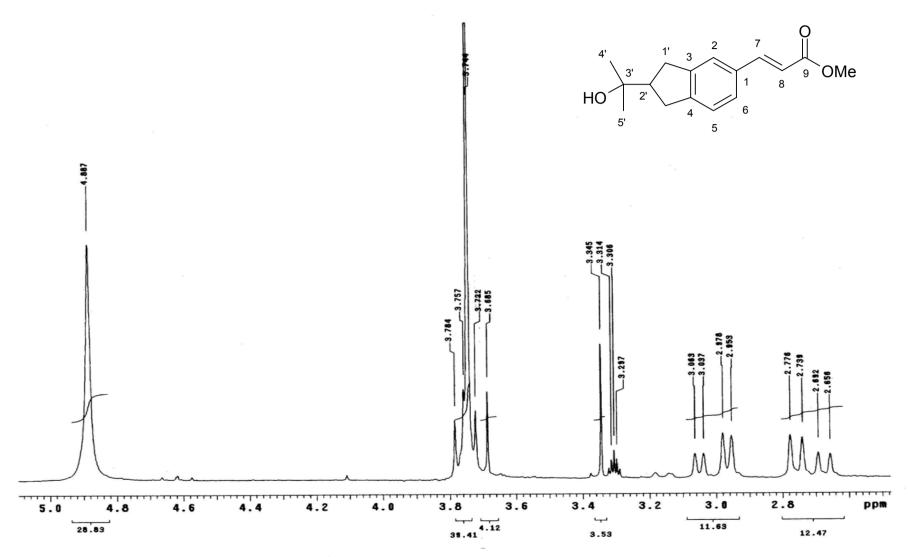


Figura 16. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de (*E*)-metil-3-[2-(2 –hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il] (BOW-04) (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz)

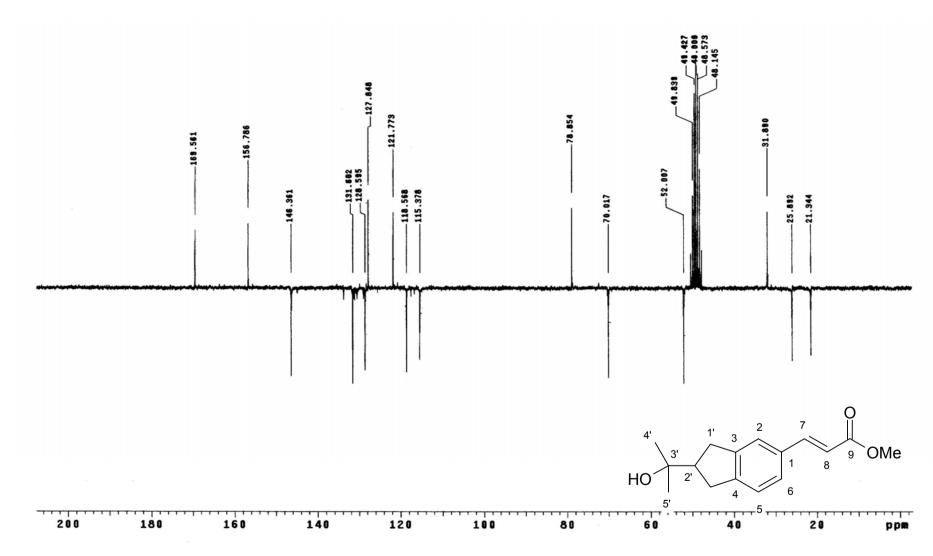


Figura 17. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de (*E*)-metil-3-[2-(2 –hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il] (BOW-04) (CDCl<sub>3</sub>, 50MHz)

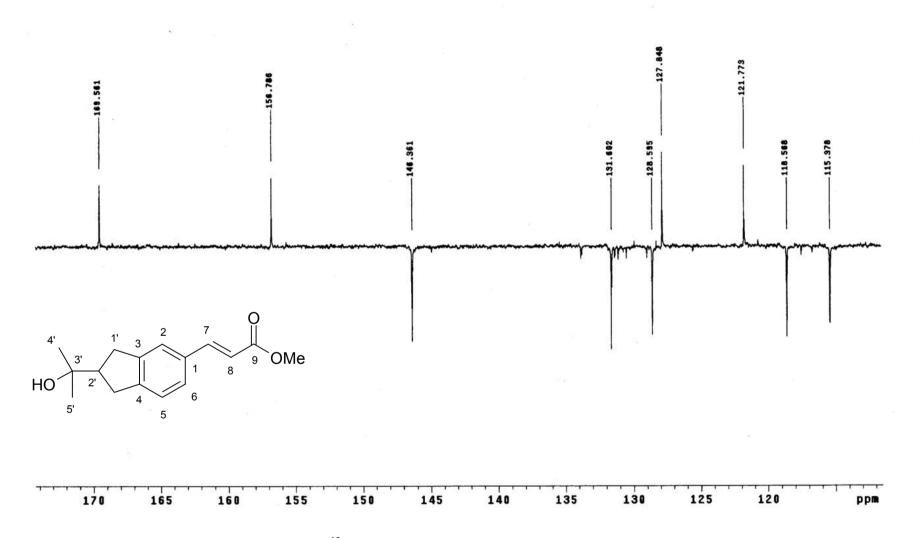


Figura 18. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C de (*E*)-metil-3-[2-(2 –hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il] (BOW-04) (CDCl<sub>3</sub> , 50MHz)

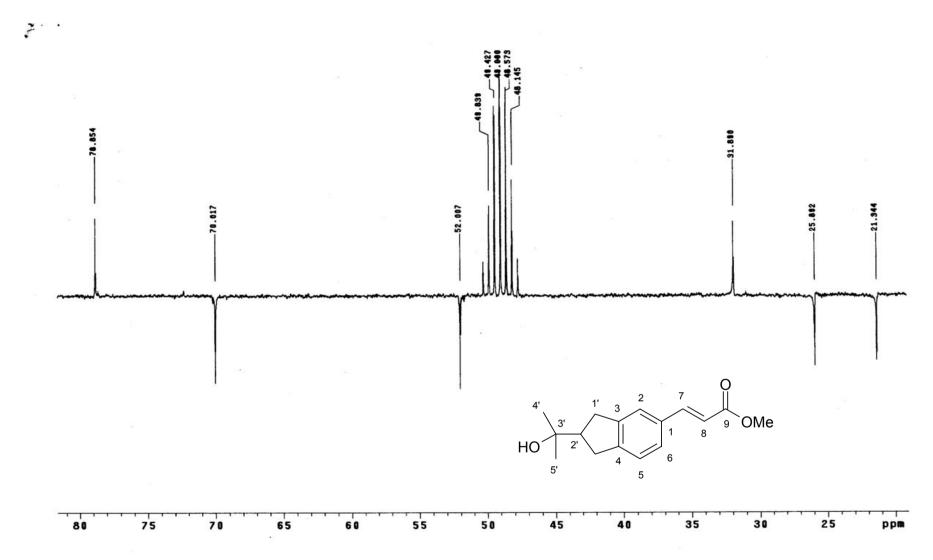


Figura 19. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C de (*E*)-metil-3-[2-(2 –hidroxipropan-2-il)-2,3-dihidrobenzoufuran-5-il] (BOW-04) (CDCl<sub>3</sub> , 50MHz)

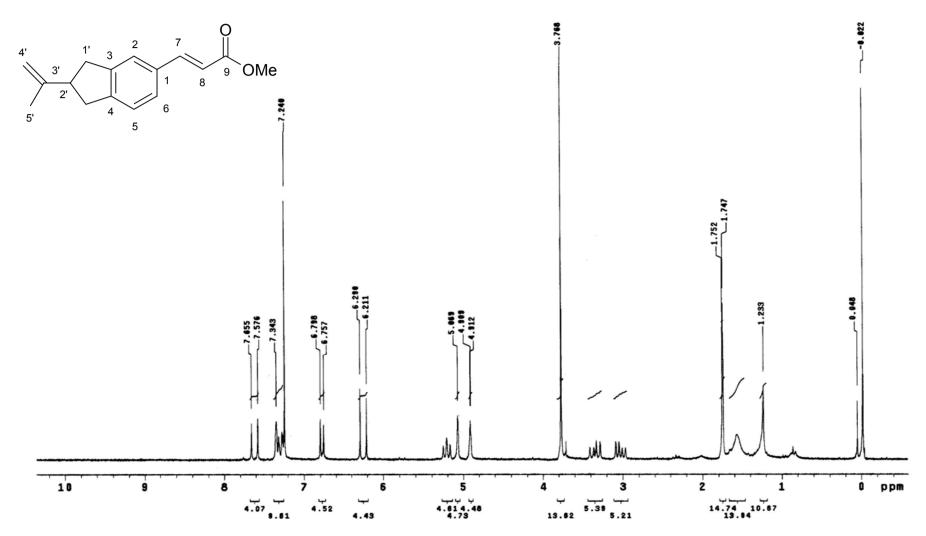


Figura 20. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de (*E*)-metil 3-[2-(prop-1-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato (BOW-05) (CDCl<sub>3</sub> , 200MHz)

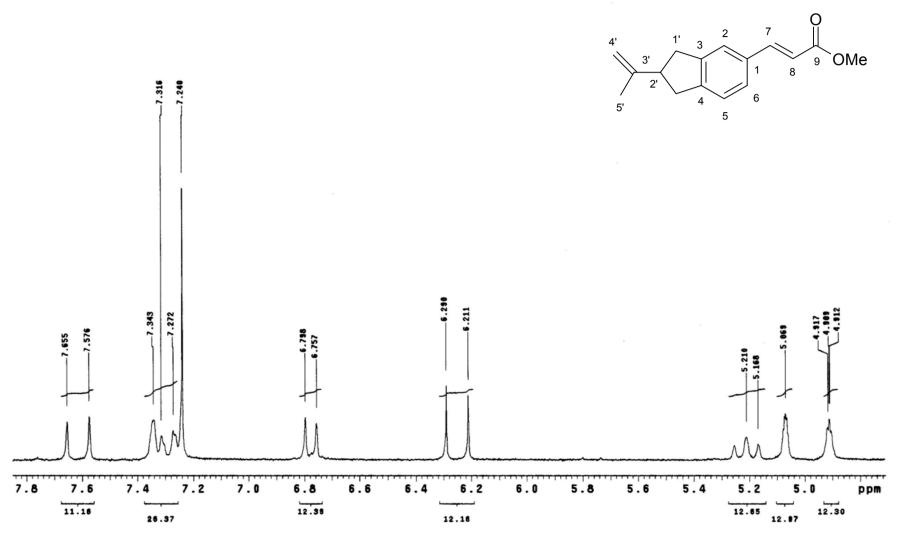


Figura 21. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de (*E*)-metil 3-[2-(prop-1-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato (BOW-05) (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz)

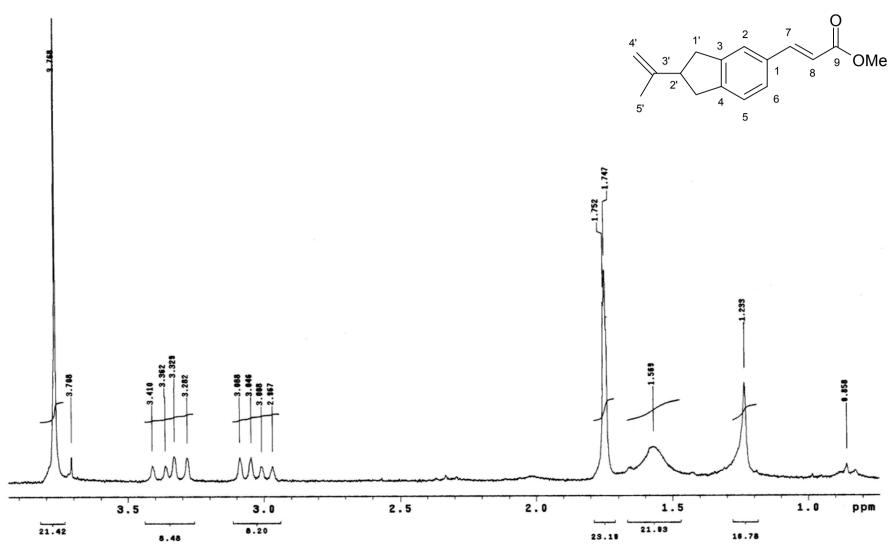


Figura 22. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de (*E*)-metil 3-[2-(prop-1-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato (BOW-05) (CDCl<sub>3</sub>, 200MHz

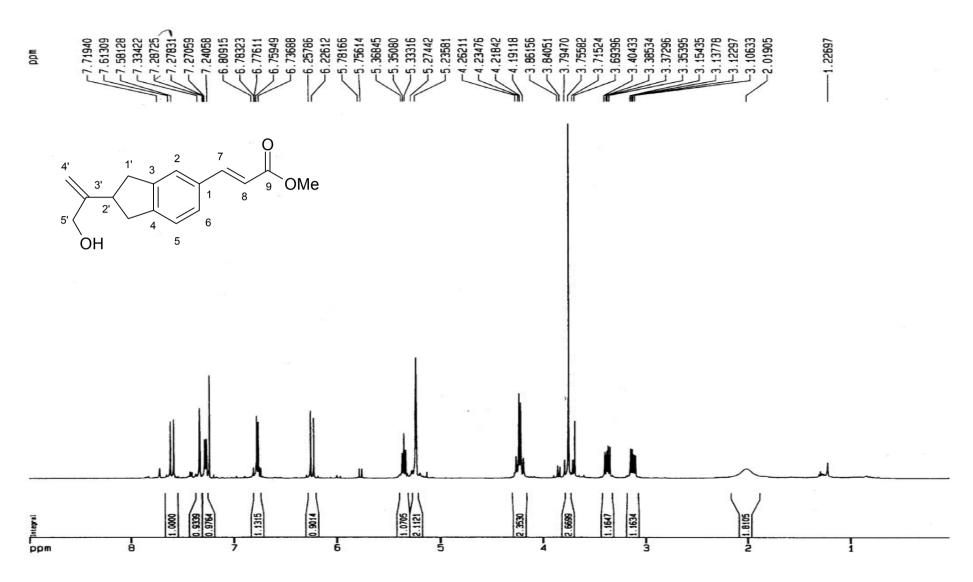


Figura 23. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de (*E*)-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-2-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato . Bowdenol (BOW-06) (CDCl<sub>3</sub> , 500MHz)

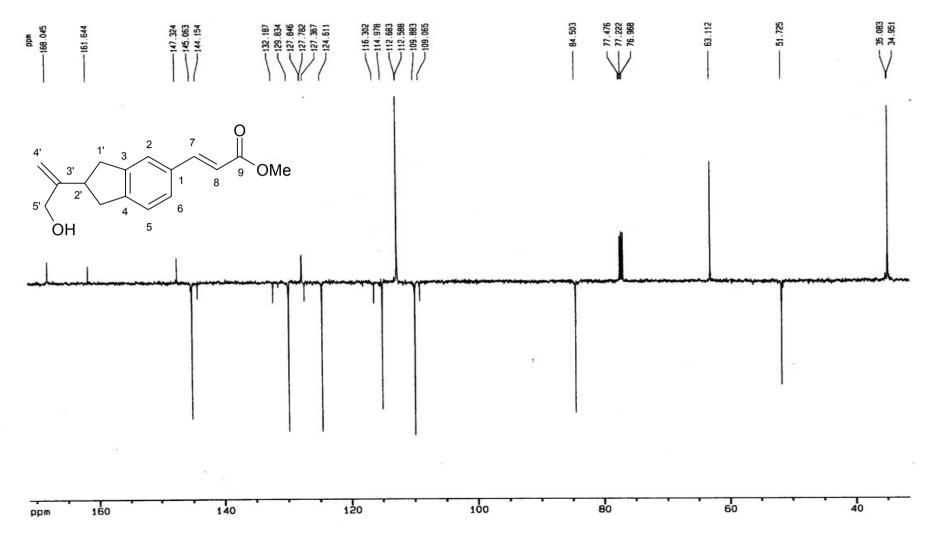


Figura 24. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de (*E*)-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-2-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato . Bowdenol (BOW-06) (CDCl<sub>3</sub> , 500MHz)

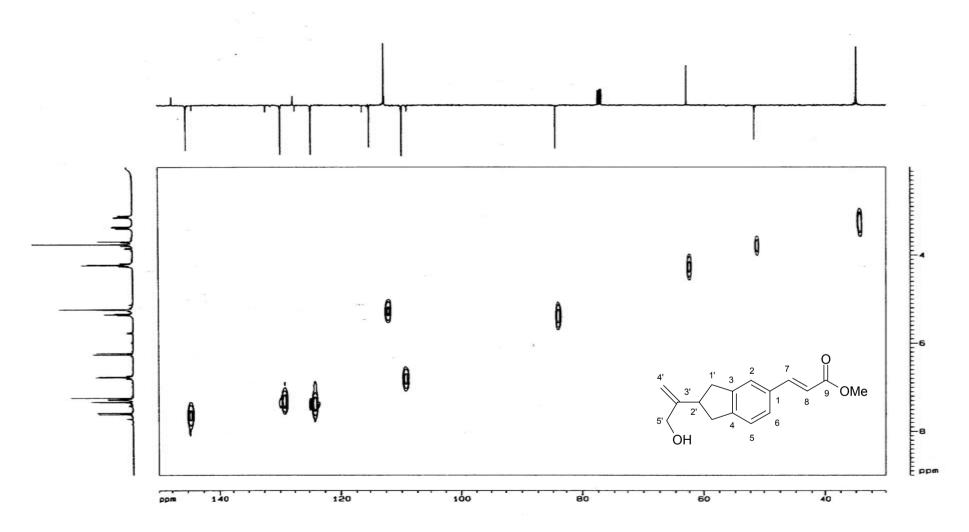


Figura 25. Espectro de <sup>1</sup>Hx<sup>13</sup>C- HMQC de (*E*)-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-2-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato Bowdenol (BOW-06) (CDCl<sub>3</sub> , 500MHz)

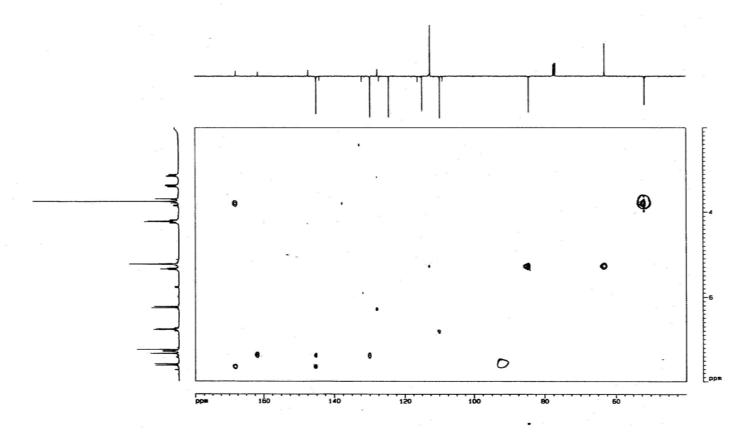


Figura 26. Espectro de <sup>1</sup>Hx<sup>13</sup>C- HMBC de (*E*)-metil 3-[2-(1-hidroxiprop-2-en-2-il)-2,3-dihidrobenzofuran-5-il]acrilato Bowdenol (BOW-06) (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz)

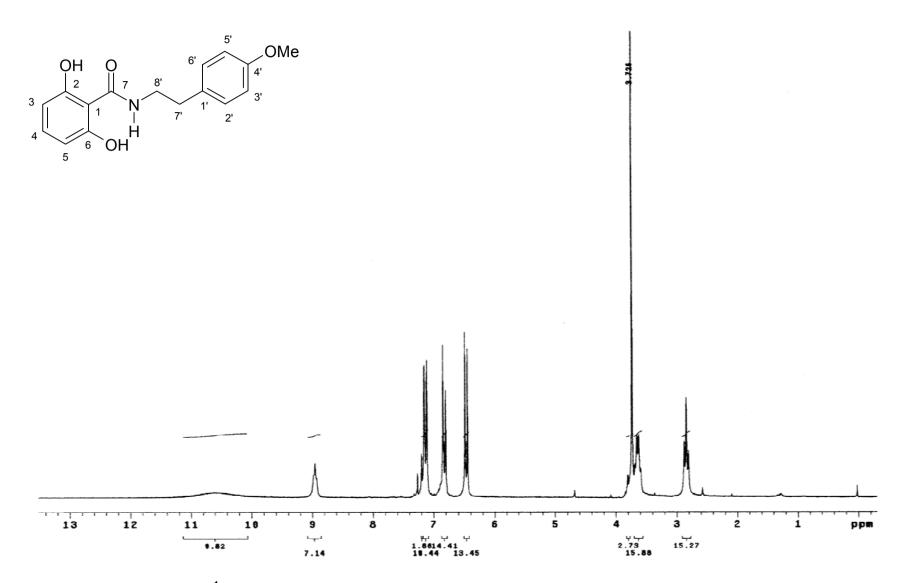


Figura 27. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de Riparina III (CDCI<sub>3</sub> , 200MHz)

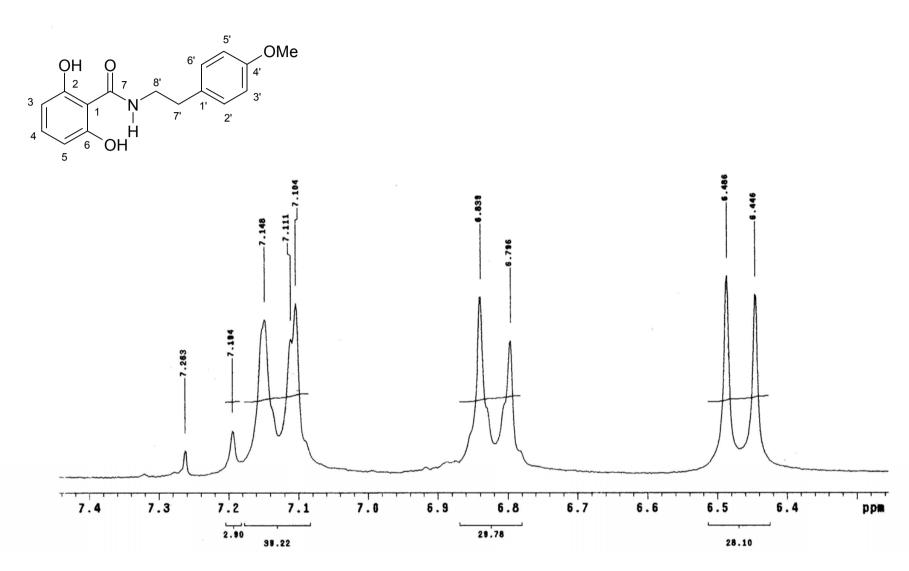


Figura 28. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de Riparina III (CDCI<sub>3</sub>, 200MHz)

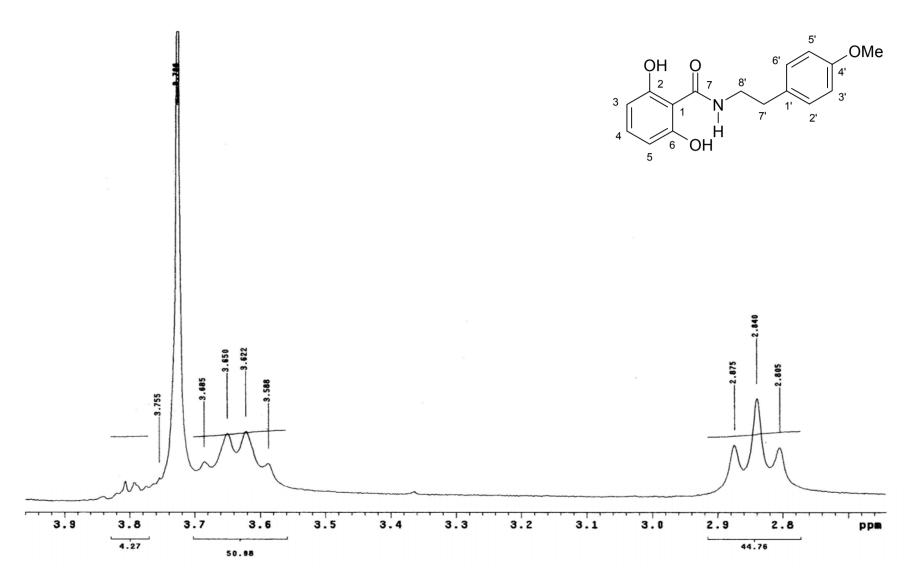


Figura 29. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de Riparina III (CDCI<sub>3</sub>, 200MHz)

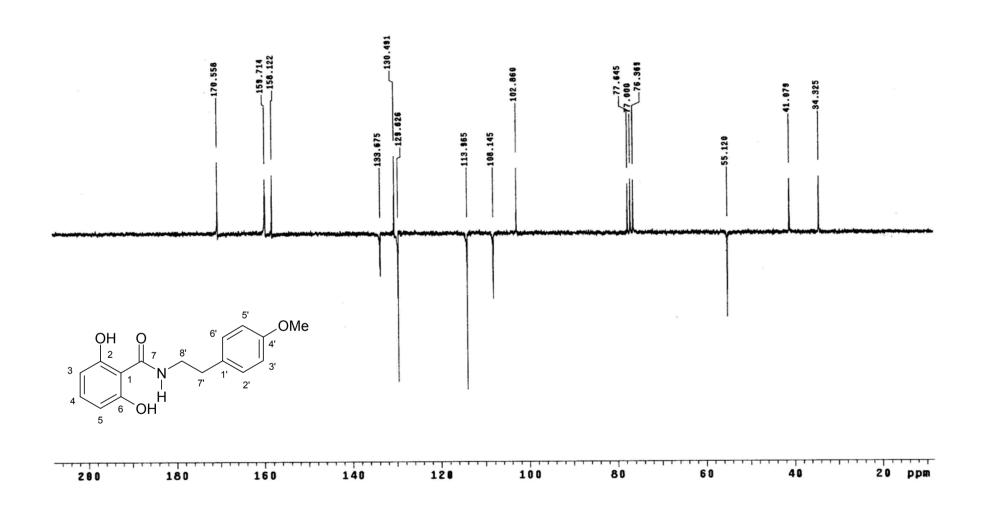


Figura 30. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de Riparina III (CDCI<sub>3</sub> , 50MHz)

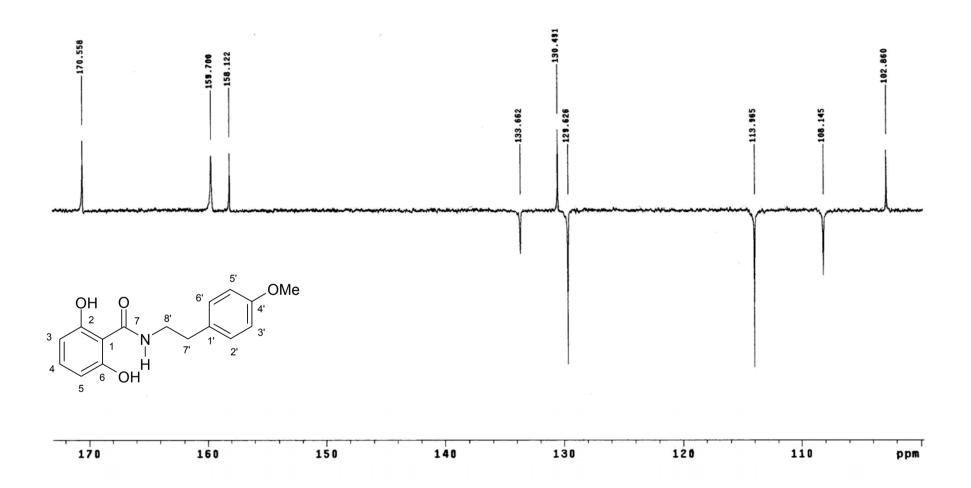


Figura 31. Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C de Riparina III (CDCI<sub>3</sub> , 50MHz)

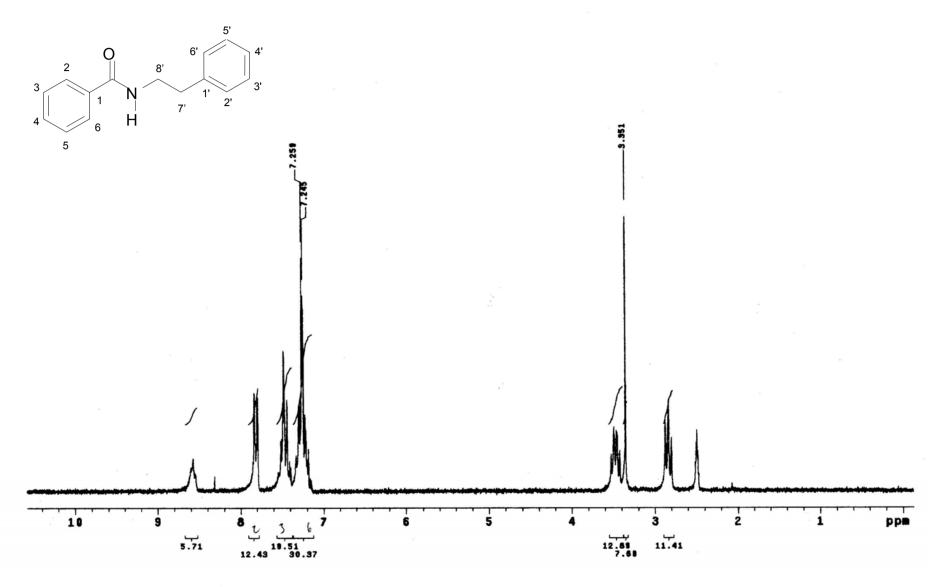


Figura 32. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-fenetilbenzamida (Rip-a) (DMSO-*d*6 , 200MHz)

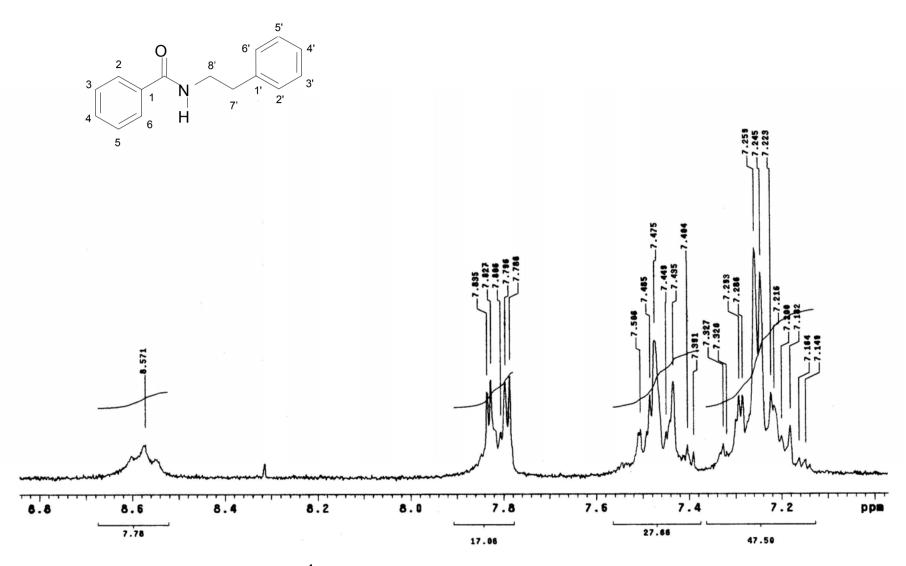


Figura 33. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-fenetilbenzamida (Rip-a) (DMSO-*d*6 , 200MHz)

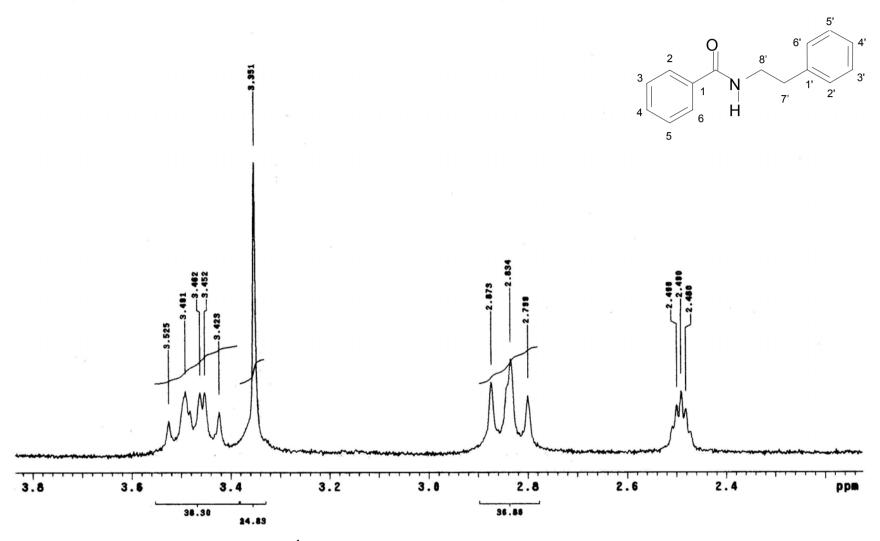


Figura 34. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-fenetilbenzamida (Rip-a) (DMSO-*d*6 , 200MHz)

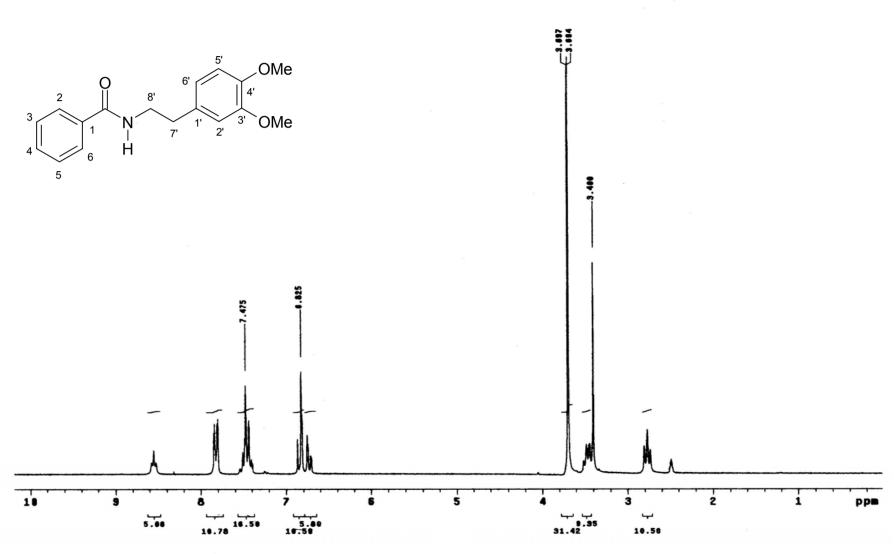
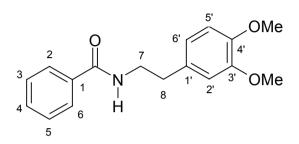


Figura 35. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-b) (DMSO-*d*6 , 200MHz)



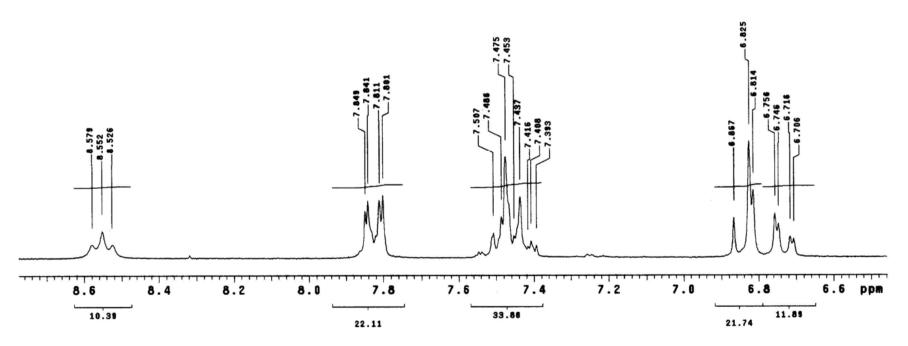


Figura 36. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-b) (DMSO-*d*6 , 200MHz)

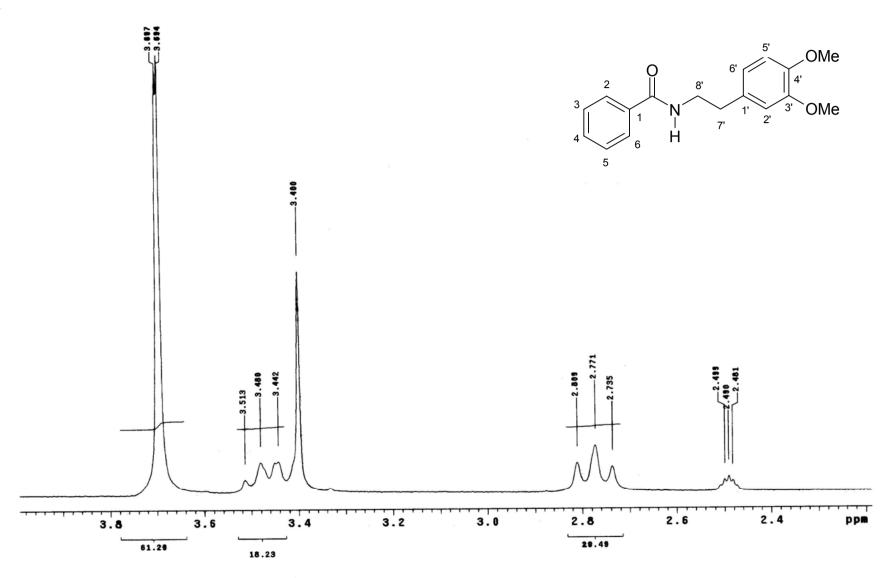


Figura 37. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-b) (DMSO-*d*6 , 200MHz)

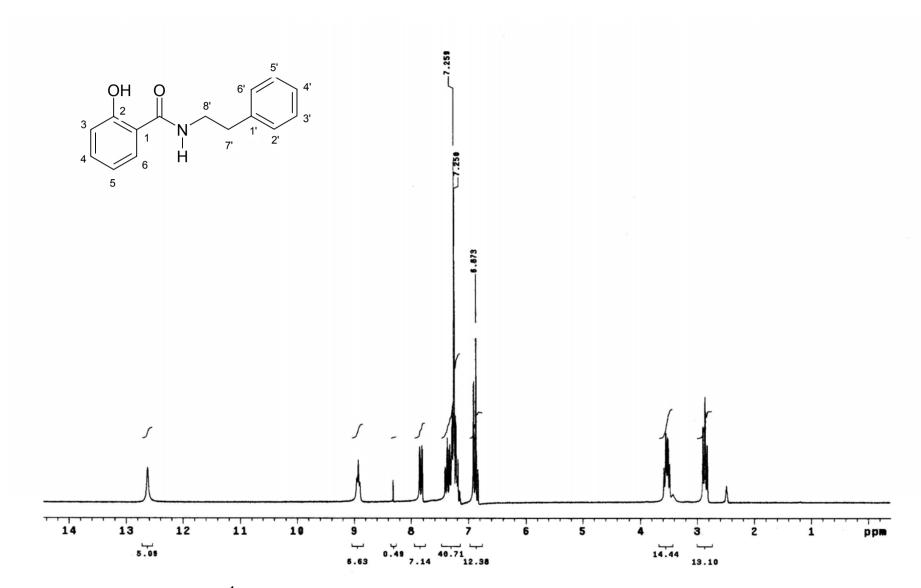


Figura 38. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2-hidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-c) (DMSO-*d*6 , 200MHz)

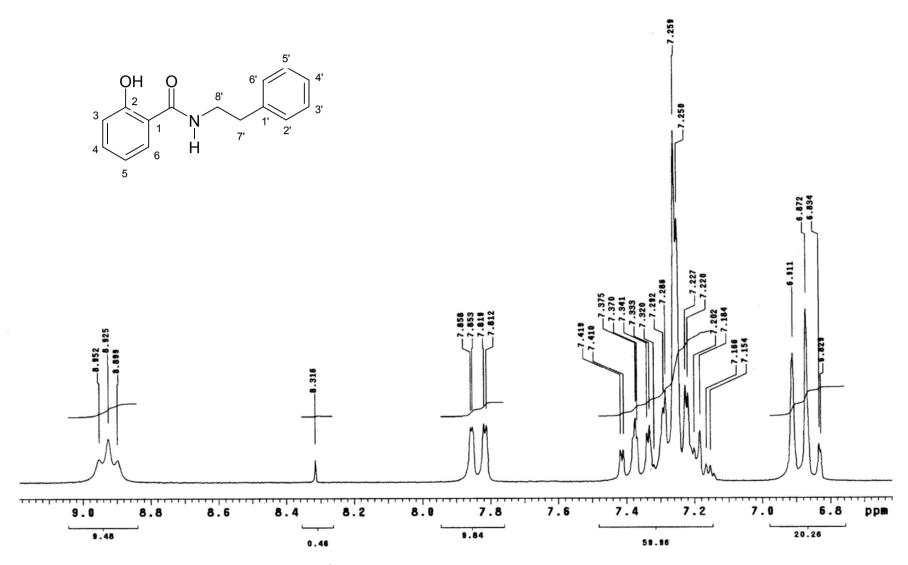
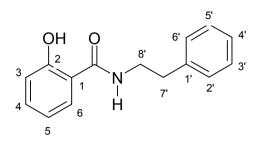


Figura 39. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2-hidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-c) (DMSO-*d*6 , 200MHz)



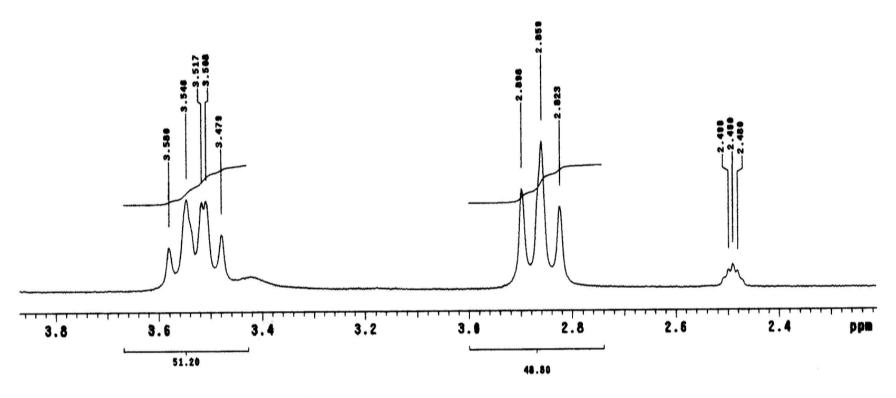


Figura 40. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2-hidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-c) (DMSO-*d*6 , 200MHz)

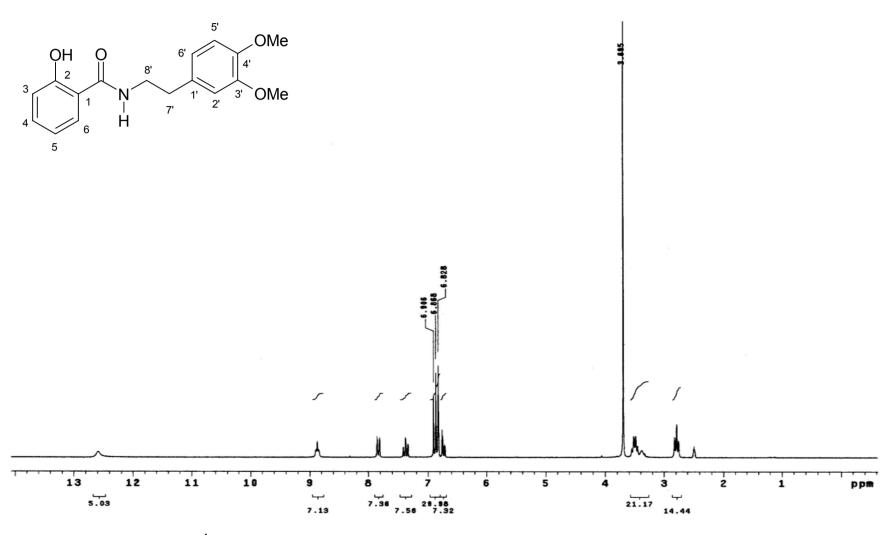


Figura 41. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2-hidroxi-N-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-d) (DMSO-*d*6 , 200MHz)

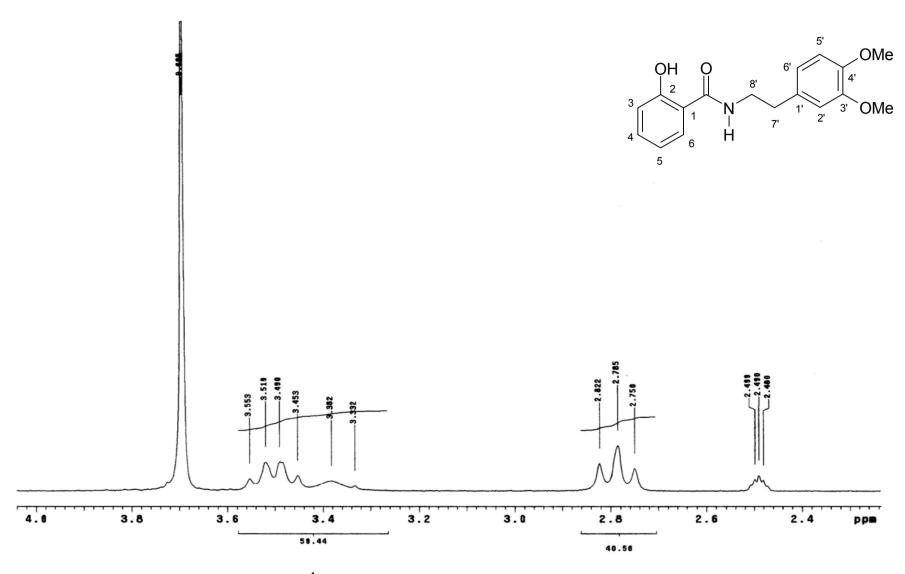
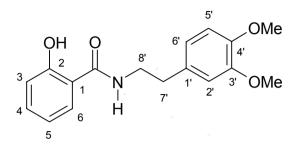


Figura 42. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2-hidroxi-N-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-d) (DMSO-*d*6 , 200MHz)



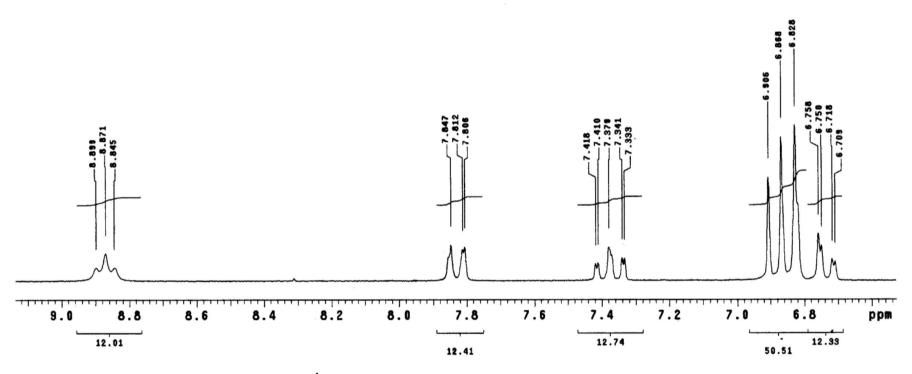


Figura 43. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2-hidroxi-N-[2-(4-metoxi-fenil)-etil]-benzamida (Rip-d) (DMSO-*d*6 , 200MHz)

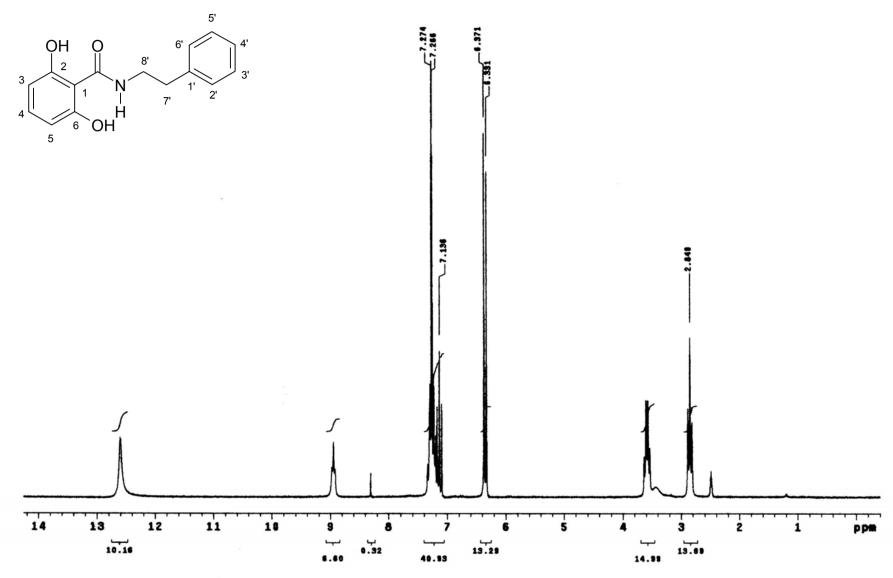


Figura 44. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2,6-diidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-e) (DMSO-*d*6 , 200MHz)

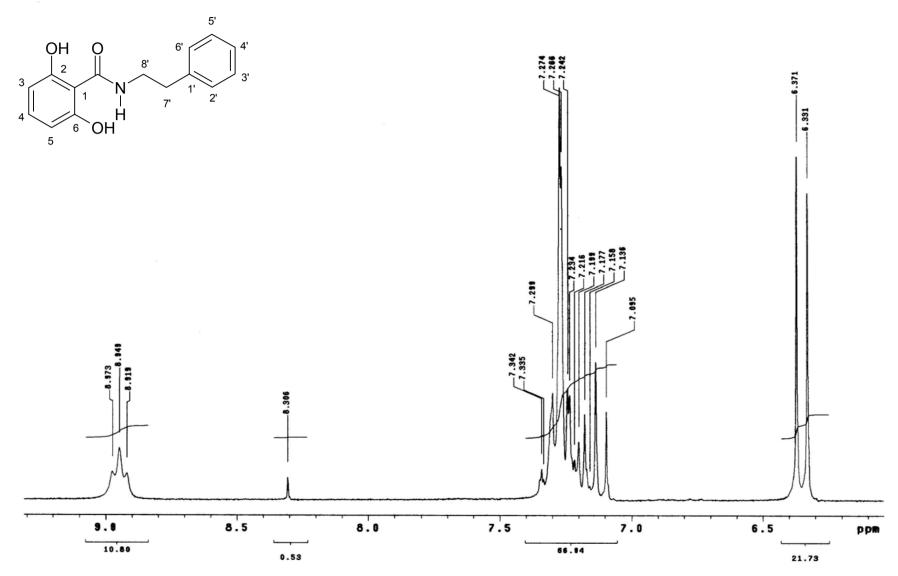


Figura 45. Expansão do espectro de RMN  $^1$ H de 2,6-diidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-e) (DMSO-d6 , 200MHz)

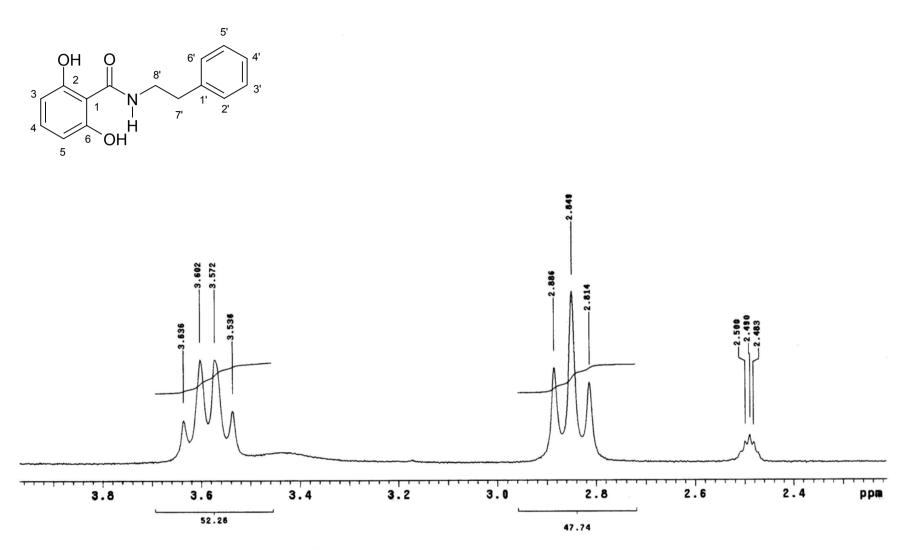


Figura 46. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2,6-diidroxi-N-fenetil-benzamida (Rip-e) (DMSO-*d*6 , 200MHz)

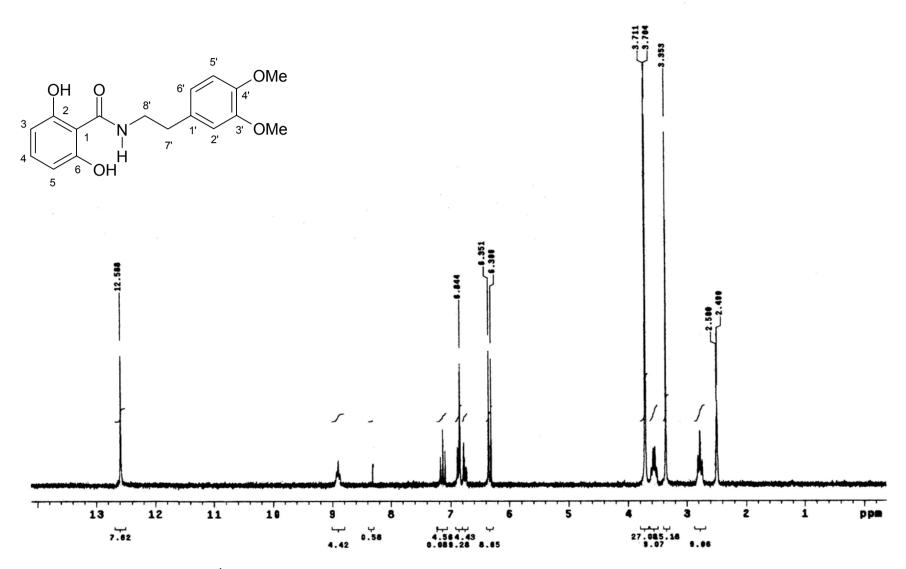


Figura 47. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-2,6-diidroxi-benzamida (Rip-f) (DMSO-*d*6 , 200MHz)

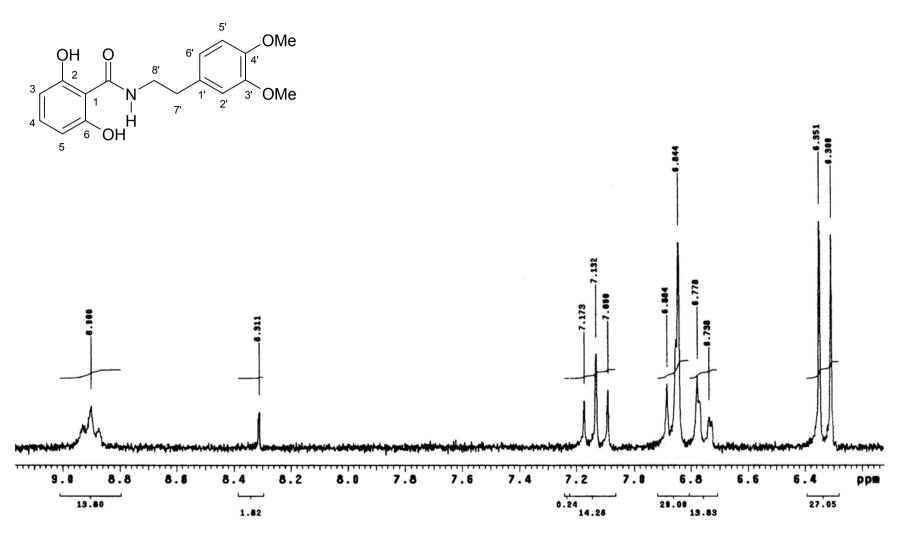


Figura 48. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-2,6-diidroxi-benzamida (Rip-f) (DMSO-*d*6, 200MHz)

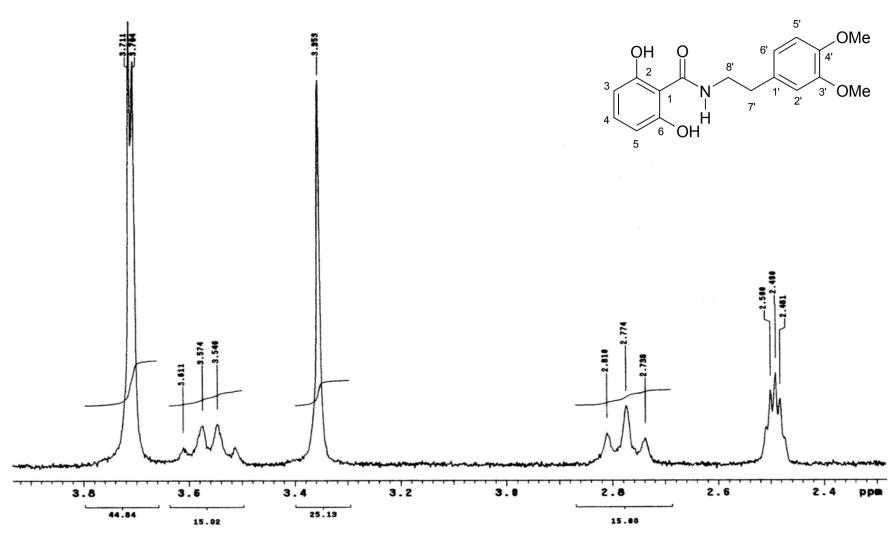


Figura 49. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H de N-[2-(3,4-dimetoxi-fenil)-etil]-2,6-diidroxi-benzamida (Rip-f) (DMSO-*d*6, 200MHz)

### REFERENCIAS

ANONYMOUS. Health, United States, 1996-97 and Injury chartbook; National Center for Health Statistics: Hyattsville, MD, 1997.

APPENDINO, G., CRAVOTTO, G., GIOVENZANA, G. B. and PALMISANO, G. A Straightforward Entry into Polyketide Monoprenylated Furanocoumarins and Pyranocoumarins. Journal of Natural Products, v.62, p. 1627-1631; 1999.

ARRIAGA, A. M. C.; GOMES, G. A.; BRAZ-FILHO, R.. Constituents of *Bowdichia virgilioides*. Fitoterapia, v. 71; p. 211-212; 2000.

ARRIAGA, A. M. C.; GOMES, G. A.; BRAZ-FILHO, R. Fitoterapia in press; 1999.

ARRIAGA, A. M. C.; MACHADO, G. A.; GOMES, G. A. and CRAVEIRO, A. A. Journal of essential oil research; v. 10; p. 205; 1998.

BALLATINE, J. In "Bologh, Lazlo, Organic chemistry Using Clays" in Chp 4 Springer-Verlag, p. 100-103; 1993.

BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YOUNG, M. C. M. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of Aniba riparia. Phytochemistry, Reino Unido, v. 26; n. 9; p. 2615-2617; 1987.

BARBOSA-FILHO J.M., YOSHIDA M, GOTTLIEB OR. The tyramines of *Aniba riparia*: transformation into models of natural products. *Rev. Latinoamer. Quim.* v. 21; p. 5-7; 1990.

BARREIRO, E. J., Bioisoterismo: Importante Estratégia de Modificação Molecular para o Planejamento Racional de Medicamentos. Parte I. Ver. Brás. Farm.; v. 72; p. 2-6; 1991

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L., Biochemistry, 5a Ed., W. H. Freeman, New York, 2002.

BRAGA, R. In.: Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. p. 449. Imprensa Oficial, Fortaleza, 1960.

BROWN, J. H. Atropina, escopolamina e drogas antimuscarínicas relacionadas. Em: As bases farmacológicas da terapêutica. 8ª ed. (GILMAN, A. G., RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. eds) Guabanara Koogan; p. 98-108; 1991.

CALLE, A. J.; UMANA, A. R. and MORENO, E. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmaceuticas; v. 4; p. 93; 1983.

CASTELO BRANCO, U.V.; CASTELO BRANCO, U.J.V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C.C.; BARBOSA-FILHO, J.M., *Acta Farm. Bonaerense*,v. 19, p. 197–202, 2000.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O. L.; PEREIRA, M.S. V.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. RBAC, v. 37(4); p. 247-249; 2005.

CLARK, J.H., Ed.; VCH: Catalsys of organic reactions by supported inorganic reagents, New York, 1994.

DAUBEN, W. G. COGEN, J. M. and BEHAR, V.. Clay catalized rearrangement of substituted allyl phenyl ethers: synthesis of orto-allyl phenols, chromans and coumarans. Tetrahedron Letters, v. 31; n. 23; p. 3241-3244; 1999

DE FLORA, S.; RAMEL, C.; Mutation Res.; v. 202; p. 285-306; 1988.

DINTZNER, M.; MORSE, K.; MCCLELLAND, K.; COLIADO, D. Investigation of the Montmorillonite clay-catalyzed [1,3] shift reaction of 3-methyl-2-butenyl phenyl ether. Tetrahedron Letters, v. 45; p. 79-81; 2004.

ELDERFIELD, R. C.; MERTEL, H. E.; MITCH, R. T.; WENPEN, I. M.; WERBLE, E. Synthesis of Primarquine and Certain of its Analogs. J. Amer. Chem. Soc. v. 77; p. 4816-4819; 1955.

F.C.F. SOUSA, C.T.V. MELO, A.P. MONTEIRO, V.T.M. LIMA, S.J.C. GUTIERREZ, B.A. PEREIRA, J.M. BARBOSA-FILHO, S.M.M. VASCONCELOS, M.F. FONTELES, G.S.B. VIANA, Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 78; p. 27–33; 2004.

FURLÁN, R. L. E.; LABADIE, G. R.; PELLEGRINET, S. C.; PONZO, V. L.; *Quim. Nova*, v. 19, n. 4, 1996.

FURSTNER, A. GASTNER, T.; Total synthesis of cristatic acid. Organic Letters; v. 2; n. 16; p. 2467-2470; 2000.

THOMAS G., CASTELO BRANCO J.V., BARBOSA FILHO J.M., BACHELET M., VARGAFTIG B.B., *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 46; p.103–107; 1994.

GATES, M.; TSCHUDI, G. The Synthesis of Morphine. J. Amer. Soc.; v. 74; p. 1109-1110; 1952.

GREENWALD, P.; Sci. Am.; v. 275; p. 96-99; 1996.

GULLAND, J.; ROBINSON, R., The Morphine Group. Part. I. A Discussion of the Constitutional Problem. *J. Chem. Soc.*, v. 123; p. 980-998; 1923.

GUTIERREZ, S.J.C., CLAUDINO, F de S., da SILVA, B.A. CÂMARA, C.A., et al II Farmaco, v. 60; p. 475-477; 2005.

HAYATSU, H.; ARIMOTO, S.; NEGISHI, T.; Mutation Res.; v. 202; p. 429-449; 1988.

IZUMI, Y., URABE, K., ONAKA, M., Zeolite, clay and heteroply acids in organic reactions; VCH, New York, 1992.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SOLWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W.W.; FONG, H. H. S.; FARNAWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M.; Science; v. 275; p. 218-220; 1997.

(a) LASZLO, P., Ed.; Academic: Using supported reagents, San Diego, CA, 1987.

(b) BALOGH, M.; LAZLO, P., Organic cehemistry using clays; Springer, Berlin, 1993.

LAZSLO, P., Science, v. 235; p. 1473; 1987.

LINDSEY, C. C.; GOMEZ-DIAZ, C.; VILLALBA, J. M. and PETTUS, T. R. R.. Synthesis of the F11334's from *o*-prenilated phenol: μM inhibitors of neutral sphingomyelinase (N-SMase). Tetrahedron; v. 58; p. 4559-4565; 2002.

MARINHO, L. C.; CARNEIRO DA CUNHA, M. T. M.; THOMAS, G. BARBOSA FILHO, J. M. Constituents of *Bowdichia virgilioides*. Fitoterapia, v. 65; p. 5; 1994.

MARK, S. L.; *Modern Drug Discovery*, november, 17, 2000.

MITSCHER, L. A.; TELIKEPALLI H.; MCGHEE, E.; SHANKEL, D. M.; Mutation Res.; v. 350; p. 143-152; 1996.

MELO, N. F,; NAVARRO, R. V.; DA SILVA, S. M.; DA CUNHA, E. V. L.; BARBOSA FILHO, J.M.; BRAZ FILHO, R. "Bowdenol, a new 2,3-dihydrobenzofuran constituent from *Bowdichia virgilioides*", *Natural Product Letters*; v. 15(4); p. 261-266; 2001.

MENON, S. R.; PATEL, V. K.; MITSCHER, L. A.; SHIH, P.; PILLAI, S. P. and SHANKEL, D. M.. J. Nat. Prod.; v. 62; p. 102; 1999.

MITSCHER, L. A.; JUNG, M.; SHANKEL, D.; DOU, J. H.; STEELE, L.; PILLAI,S.P.; Med. Res. Rev.; v. 17; p. 327-365; 1997.

MOURA, R. S. Cardiotonicos. Em: Farmacologia Aplicada 4ª ed. (ZANINI, A.C.; OGA, S. eds.) Editora Atheneu, São Paulo, p. 183-200; 1989.

NELSON, D. J.; COX, M. M.; Lenhninger Principles of Biochemistry, 3<sup>a</sup> Ed., Worth Publisher, 2000.

NIKALZE, M. D., PHUKAN, P., SUDALAI, A., Org. Prep. Proced. Int., 32, 1, 2000.

PEREZ-SACAN, E.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; YAPU, D. G.; TURBA, A. G.; Antiplasmodial Activity of Naphtoquinones related to Lapachol and β-Lapachone. CHEMISTRY & BIODIVERSITY- v. 2; p. 264-274; 2005

PINNAVIA, T. J.; Sciencew; v. 220; p. 4595; 1983.

REN, S.; LIEN, E.J.; Prog. Drug Res.; v. 48; p. 147-171; 1997.

RENNIE, J.; RUSTIG, R.; Sci. Am.; v. 275; p. 55-59; 1996.

ROQUE, D. C. C.; COSTA, P. R. R.; FERREIRA, V. F.; Vinte e cinco anos de reações. Estragégias e metodologias em química orgânica; Química Nova, v. 25 ; 1; p. 74-81; 2002.

S.R. MENON, V. K. PATEL, L. A. MITSCHER, P. SHIH, S. P. PILLAI and D.M, SHANKEL *Journal of Natural Products*, v. 62; p. 102; 1999.

SETTON, R., Ed.; Reidel: Dordrecht, Chemical reaction in organic constrained systems, 1986.

SEIXAS, S. R. S. "Preparação de derivados benzoiltiraminicos e sua atividade cardiodepressora". Dissertação de mestrado; 1996.

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; MONTEIRO, A.P.; LIMA, V.T.M.; GUTIERREZ S.J.C.; PEREIRA B.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.F.; VIANA G.S.B., Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 78, p. 27–33, 2004.

TALAMÁS, F. X.; SMITH, D. B.; CERVANTES, A.; FRANCO, F.; CUTLER, S. T.; LOUGHHEAD, D. G.; MORGANS, D. J. Jr.; and WEIKERT, R. J.. The Florisil

Catalized [1,3]-sigmatropic shift of allyl phenyl ethers- An entryway into novel mycophenolic acid analogues. Tetrahedron Letters v. 38; n. 27; p. 4725-4728; 1997.

THOMAS G., CASTELO BRANCO J.V., BARBOSA FILHO J.M., BACHELET M., VARGAFTIG B.B., *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 46, p.103–107, 1994.

TORRENEGRA, R.; BAUEREI, P. and ACHENBACH, H.; Phytochemistry; v. 28; p. 276; 1989.

TORRENEGRA, R.; ESCARRIA, S.; BAUEREI, P. and ACHENBACH, H. Planta Médica, p. 276; 1985.

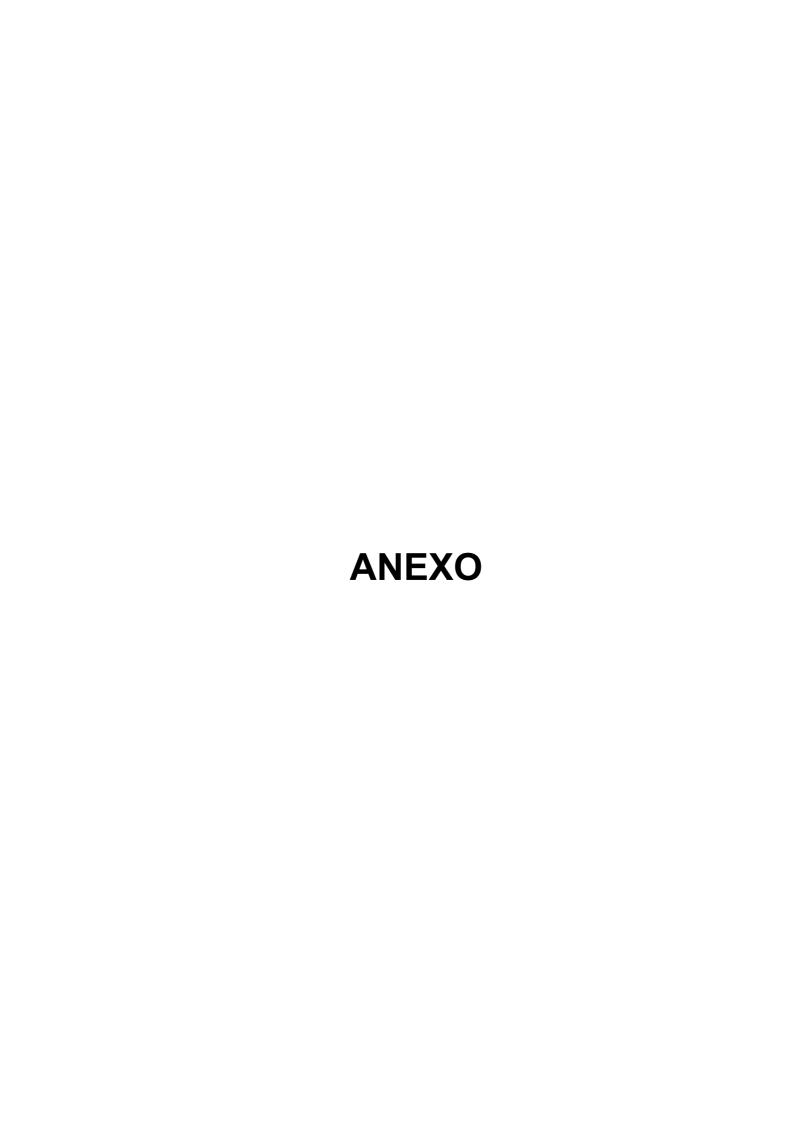
TROST, B. M.; Science; v. 227, p. 908; 1985.

U.V. CASTELO BRANCO, U.J.V. CASTELO BRANCO, G. THOMAS, C.C. ARAÚJO, J.M. BARBOSA-FILHO, *Acta Farm. Bonaerense*, v. 19; p. 197–202; 2000.

VELOSO, L. S. M.; da SILVA, B. P.; da SILVA, E. M. B. and PARENTE, J. P.; Fitoterapia; v. 70; p. 532; 1999.

WILLETT, W.C.; COLDITZ, G.A.; MUELLER, N. E.; Sci. Am.; v. 275; p. 88-95; 1996.

www.rhodium.ws/chemistry/mw.clays.txt acessado em 31/7/2000.





### Consulta à Base de Patentes - Detalhes da Patente

[ Pesquisa Base Marcas | Pesquisa Base Desenhos | Ajuda? ]

» Consultar por: Base Patentes | Finalizar Sessão

### Depósito de pedido nacional de Patente

(21) Nº do Pedido: PI0304393 2

(22) Data do Depósito: 25/02/2003

(51) Classificação: 25/00 CO7D 209/20; CO7D 209/44; A61P 25/16; A61P 25/22; A61P 25/28; A61P

(54) Título: NOVO DERIVADO BENZOILTRIPTAMINICO E PROCESSO PARA SUA OBTENÇAO

"NOVO DERIVADO BENZOILTRIPTAMÍNICO E PROCESSO DE SUA OBTENÇÃO". Um novo derivado benzoiltriptamínico, com semelhanças funcionais à N-benzoiltriptamina foi obtido a partir da reação da triptamina com cloreto de anisoila na presença de trietilamina, produzindo-se, por sintese

(57) Resumo: orgânica, o N-o-anisolltriptamina, aqui denominado de (SJ-2). Apresentou identificadas características de droga depressora do Sistema Nervoso Central (SNC) e ação anticonvulsivante. Sua estrutura foi confirmada por meio de dados usuais e técnicas espectrométricas, assim como por comparação com os espectros dos reagentes de partida.

(71) Nome do Depositante: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (BR/DF) Reinaldo Nóbrega de Almeida / José Maria Barbosa Filho / Maria de Fátima

(72) Nome do Inventor: Vanderlei de Souza / Stanfey Juan Chavéz Gutierrez / Davi Antas e Silva / Lucindo

José Quintans Júnior (74) Nome do Procurador: Eury Pereira Luna Filho/Aírton Rocha Nóbrega

### **PUBLICAÇÕES**

Nº RPI Data RPI Complemento do Despacho Despacho 1796 07/06/2005 3.1 1726 03/02/2004 2.1

Dados atualizados até 19/12/2006 - Nº da Revista: 1876



Available online at www.sciencedirect.com



IL FARMACO

Il Farmaco 60 (2005) 475-477

http://france.elsevier.com/direct/FARMAC/

# N<sup>b</sup>-benzoyltryptamine derivatives with relaxant activity in guinea-pig ileum

Stanley Juan C. Gutierrez <sup>a</sup>, Fladmir de S. Claudino <sup>a</sup>, Bagnólia A. Da Silva <sup>a</sup>, Celso A. Câmara <sup>a</sup>, Reinaldo N. de Almeida <sup>a</sup>, Maria de Fátima V. de Souza <sup>a</sup>, Marcelo S. Da Silva <sup>a</sup>, Emídio V.L. Da-Cunha <sup>a,b</sup>, José Maria Barbosa-Filho <sup>a,\*</sup>

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paralba, Cx. Postal 5009, 58051-970 João Pessoa, Paralba, Brazil
 Departamento de Farmácia e Biologia, Universidade Estadual da Paralba, CCBS, 58100-000 Campina Grande, Paralba, Brazil

Received 10 October 2004; received in revised form 6 April 2005; accepted 8 April 2005

Available online 23 May 2005

### Abstrac

A series of derivatives analogous to N\*-benzoyltryptamine were synthesized by the Schotten-Bauman procedure. The products obtained were: N\*-4-methoxy-benzoyltryptamine, N\*-2,4-dimethoxy-benzoyltryptamine, N\*-3,4-dimethoxy-benzoyltryptamine, N\*-3,4-methylenedioxy-benzoyltryptamine and N\*-3,4,5-trimethoxy-benzoyltryptamine. They were characterized through the usual spectrometric methods (UV, IR, ¹H and ¹³C NMR) and showed non-selective relaxant activity in guinea-pig ileum pre-contracted with acetylcholine, histamine and KCl. © 2005 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Indole alkaloids; Tryptamine; Spasmolytic activity

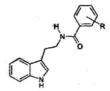
### 1. Introduction

Because of their biological importance, and potentiality as key intermediates in the synthesis of more complicated indole alkaloids, the synthesis of indoles bearing an aminoalkyl or carboxyaryl group has attracted our interest, with the indole nucleus of tryptamine consisting of an important pharmacophore itself. Recently we have been engaged in the synthesis and anticonvulsant activity of a structurally related Nb-2-hydroxy-benzoyltryptamine (1) derivative [1]. The pharmacological activity found with this compound prompted us to perform the synthesis of some amide analogs (2) focusing on the benzoyl portion of the molecule by the suitable Schotten-Bauman procedure with available acid chlorides and tryptamine was performed (Fig. 1). These substances are structurally related to the parent compound of the series, Nb-benzoyltryptamine (N-[2-(1H-Indol-3-yl)ethyl]benzamide), that was previously isolated as a natural product from Myrtopsis myrtoidea, a plant of the Rutaceae family [2]. A preliminary study concerning the structure-activity relationships in these compounds was also performed.

0014-827X/\$ - see front matter © 2005 Elsevier SAS. All rights reserved. doi:10.1016/j.farmac.2005.04.001

### 2. Chemistry

For the synthesis of the substances with general structure  $(2\mathbf{a}-\mathbf{e})$ , Schotten-Baumann's technique was used, for the condensation of the respective benzoyl chlorides with tryptamine in a single reaction, using triethylamine as base. Following this simple methodology, it was possible to synthesize the five amide derivatives  $(2\mathbf{a}-\mathbf{e})$  with reasonable yields. The compounds are, namely,  $N^b$ -4-methoxy-benzoyltryptamine  $(2\mathbf{a})$ ,  $N^b$ -2,4-dimethoxy-benzoyltryptamine  $(2\mathbf{c})$ ,  $N^b$ -3,4-dimethoxy-benzoyltryptamine  $(2\mathbf{c})$ ,  $N^b$ -3,4-methylenedioxy-benzoyltryptamine  $(2\mathbf{c})$ , and were obtained in good to reasonable yields of 53-80% in a straightforward methodology (Fig. 1).



R	Yield (%)
2-OH	Ref 1
4-OMe	75
2,4-OMe	65
3.4-OMe	63
3,4-OCH,0	53
3,4,5-OMe	
	2-OH 4-OMe 2,4-OMe 3,4-OMe 3,4-OCH <sub>2</sub> O

Fig. 1.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +55 83 216 7364; fax: +55 83 216 7365. E-mail address: jbarbosa@ltf.ufpb.br (J.M. Barbosa-Filho).

The  $N^b$ -3,4-methylenedioxy-benzoyltryptamine is a new compound.

### 3. Experimental procedures

### 3.1. Chemistry

Melting points are uncorrected and were determined on an electrically heated metal block apparatus. UV spectra were recorded on a Vankel 50 UV-Vis spectrophotometer in MeOH as solvent. IR spectra were obtained on a Bomen Michelson spectrophotometer using KBr. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N on a Varian-Mercury 200 spectrometer at 200 MHz for <sup>1</sup>H NMR and 50 MHz for <sup>13</sup>C NMR and 2D techniques. For the analytical TLC, precoated Merck silica gel PF<sub>254</sub> plates were used with a 0.25 mm layer. For column chromatography, silica gel-60 Merck was used. The tryptamine and benzoyl chlorides were purchased from Sigma-Aldrich and used as received.

### 3.1.1. Nb-4-methoxy-benzoyltryptamine (2a)

To a solution of triethylamine (1 ml) and chloroform (20 ml), tryptamine was added until total solubilization. To this solution a solution of p-anisoyl chloride (1 g) dissolved in chloroform (10 ml) was added dropwise over 15 min with magnetic stirring. The reaction mixture was left at room temperature for 2 h. The solution was then washed with first 2% HCl and then H2O, dried over anhydrous Na2SO4, filtered and concentrated under vacuum, yielding a white powder. This product was chromatographed on a silica gel column, eluted with CHCl<sub>3</sub>/hexane (1:1 and 8:2), CHCl<sub>3</sub> and CHCl<sub>3</sub>/MeOH (98:02). After TLC analysis, fractions 10-21 were reunited and crystallized from CHCl3/MeOH (1:1). The resulting material (2a, 75% yield) was obtained as white crystals with melting point of 134 °C (Lit. 132.5-133.5 °C) [3]; IR v<sub>max</sub> (KBr) cm-1: 1179, 1257, 1437, 1455, 1507, 1607, 1615, 2847, 2937, 2977, 3011; UV  $\lambda_{\text{max}}$  MeOH nm: 235, 247, 256; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz,  $C_3D_5N$ )  $\delta$ : 3.36 (1H, s), 3.64 (3H, s), 4.07 (2H, q, J = 8.0), 7.01 (1H, d, J = 8.8), 7.25 (1H, dt, J = 1.2; 7.0), 7.29 (1H, dt, J = 1.4; 7.0), 7.35 (1H, d, J = 2.4), 7.60 (1H, d, J = 7.2), 7.89 (1H, d, J = 8.0), 8.31 (1H, d, J = 8.8), 9.09 (1H, t, J = 6.0), 11.8 (1H, s); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta$ : 26.4, 41.4, 55.2, 112.0, 113.3, 113.9, 119.1, 119.2, 123.3, 128.5, 128.5, 129.7, 162.3, 167.3.

### 3.1.2. Nb-2,4-dimethoxy-benzoyltryptamine (2b)

Yield of the product was 65%, orange solid from CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1), with m.p. 116 °C (Lit. reported as oil) [4]; IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1206, 1437, 1466, 1497, 1604, 1634, 2850, 2975, 3016, 3111, 3228, 3369; UV  $\lambda_{\text{max}}$  MeOH nm: 225, 255, 287; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz,  $C_5D_5$ N)  $\delta$ : 3.25 (2H, t, J=6.8), 3.53 (3H, s), 3.67 (3H, s), 4.08 (2H, q, J=6.4), 6.57 (1H, d, J=2.2), 6.68 (1H, d, J=7.8), 7.25 (1H, dt, J=1.2; 7.0), 7.29 (1H, dt, J=1.4; 7.0), 7.40 (1H, d, J=1.6), 7.62 (1H, d, J=8.2), 8.37 (1H, t, J=5.2), 8.61 (1H, d, J=8.6),

11.85 (1H, sl);  $^{13}$ C NMR (50 MHz,  $C_5D_6N$ )  $\delta$ : 26.0, 40.9, 55.4, 55.5, 98.9, 105.9, 112.0, 113.1, 115.7, 119.2, 119.3, 121.9, 123.5, 128.4, 133.9, 137.7, 159.4, 163.6, 165.2.

### 3.1.3. Nb-3,4-dimethoxy-benzoyltryptamine (2c)

Yield of the product was 63% as a white powder from CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1), with m.p. 182 °C (Lit. 182 °C) [5]; IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1230, 1416, 1441, 1461, 1504, 1605, 2839, 2873, 2930, 3011, 3080, 3219, 3390; UV  $\lambda_{\text{max}}$  MeOH nm: 220, 260, 290; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz,  $C_5D_5N$ ) & 3.36 (2H, t J=7.4), 3.65 (3H, s), 3.72 (3H, s), 4.06 (2H, q, J=8.8), 6.96 (1H, d, J=8.2), 7.24 (1H, dt, J=1.2; 7.0), 7.32 (1H, dt, J=1.4; 7.0), 7.60 (1H, d, J=7.2), 7.60 (1H, d, J=2.2), 7.87 (1H, si), 7.93 (1H, m), 7.99 (1H, d J=2.0), 9.13 (1H, t J=5.8); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz,  $C_5D_5N$ ) & 26.0, 41.5, 55.8, 56.9, 111.4, 111.8, 113.4, 119.1, 119.2, 121.0, 121.7, 123.4, 128.5, 128.7, 137.6, 149.5, 152.2, 167.4.

### 3.1.4. Nb-3,4-methylenedioxy-benzoyltryptamine (2d)

Yield of the product was 53% as a white powder from CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1) with m.p. 150 °C; IR  $\nu_{\rm max}$  (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1443, 1457, 1485, 1501, 1618, 1640, 2787, 2918, 2976, 3118, 3342, 3401, 3416; UV  $\lambda_{\rm max}$  MeOH nm: 220, 260, 290; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta$ : 3.35 (2H, t J=8.0), 4.04 (2H, q J=6.0), 5.95 (2H, s), 6.91 (1H, dJ=8.6), 7.24 (1H, td J=1.2; 7.0), 7.29 (1H, td J=1.4; 7.0), 7.35 (1H, d J=2.4), 7.59 (1H, d J=1.2), 7.86 (1H, m), 9.06 (1H, t J=6.0); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta$ : 26.3, 41.5, 102.5, 108.1, 108.4, 112.0, 113.2, 119.1, 119.2, 121.7, 122.6, 128.5, 137.6, 148.2, 149.7, 167.0.

### 3.1.5. Nb-3,4,5-trimethoxy-benzoyltryptamine (5e)

Yield of the product was 80%, white powder from CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1), with a m.p. 214 °C (Lit. 165 °C [6]; 200–202 °C [7]);  $\text{IR } \nu_{\text{max}}$  (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1127, 1233, 1413, 1458, 1503, 1586, 1635, 2855, 2938, 2959, 3013, 3297, 3363; UV  $\lambda_{\text{max}}$  MeOH nm: 230, 260, 270; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz,  $C_5D_5N$ ) &: 3.35 (2H, t J = 8.0), 3.64 (3H, s), 3.89 (3H, s), 4.05 (2H, q J = 6.0), 7.24 (1H, td J = 1.2; 7.0), 7.29 (1H, td J = 1.4; 7.0), 7.36 (1H, d J = 2.0), 7.61 (1H, m), 7.62 (1H, s), 7.88 (1H, d J = 2.0), 9.25 (1H, tJ = 6.0); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz,  $C_5D_5N$ ) &: 26.2, 41.6, 55.9, 60.5, 105.7, 112.0, 113.3, 119.1, 119.2, 121.7, 123.4, 128.6, 131.5, 137.6, 141.2, 153.6, 167.3.

### 3.2. Pharmacology

The tissues were suspended in 6 ml organ baths under a resting load of 1.0 g at 37 °C. Force generation was monitored using an isometric transducer (7003-UGO BASILE) coupled to a polygraph (7070-UGO BASILE). The modified Krebs solution: NaCl (117.0), KCl (4.7), MgSO<sub>4</sub>·TH<sub>2</sub>O (1.3), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (1.2), CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (2.5), glucose (11.0), NaHCO<sub>3</sub> (25.0) was bubbled with a 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> gas mixture before use. Drugs—NaHCO<sub>3</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>·TH<sub>2</sub>O (Reagen); acetylcholine, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, NaCl, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, glucose (Merck) and histamine (Sigma-

Table 1
Percentages values for relaxation of derivates (2a-e) in guinea-pig ileum

Substance (10 <sup>-4</sup> M) <sup>a</sup>	Acetylcholine (1 μM) <sup>a</sup>	Histamine (1 µM) <sup>a</sup>	KCl (40 mM) <sup>a</sup>
2a	77.6 ± 11.7	92.9 ± 4.1	$88.7 \pm 6.4$
2b	$100 \pm 0$	$86.7 \pm 1.0$	100 ± 0
2c	$73.0 \pm 15.1$	$100 \pm 0$	$64.0 \pm 2.6$
2d	$75.3 \pm 2.6$	$78.1 \pm 1.4$	$54.6 \pm 6.7$
2e	100 ± 0	$84.3 \pm 2.0$	$78.3 \pm 5.6$

 $^{a}$  n = 4 for all the tests; values are given in percentage of relaxation of the tonic contractions induced by 1  $\mu$ M of acetylcholine or histamine, and KCl 40 mM

Aldrich). Data analysis—unless otherwise stated, all values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical analysis were performed by Student's "T"-test, and was considered significant when probability (P) was < 0.05. All data were analyzed with the software package GraphPad Prism version 3.02 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, CA 92121, USA).

### 4. Results and discussion

The pharmacological effects on smooth muscle of isolated guinea-pig ileum for the derivatives synthesized in present study are listed in Table 1, with the percentages relaxation tested at  $10^{-4}$  M. The most important finding is that all the substances tested presented spasmolytic action. The tests were performed measuring the percentage of relaxation of the contractions induced by acetylcholine (1  $\mu$ M), histamine (1  $\mu$ M) or KCl (40 mM).

These preliminary results showed a correlation between the substitution patterns in the tested compounds. The 4- and 3,4-substitution drops the activity (2a, 2c and also 2d, respectively), against acetylcholine-, histamine- and KCl induced contractions. An extra alkoxy-substitution at C-5 is also tolerated without significant increase of activity (2e), but an *ortho* group shows an increase in the tested activity. These findings suggest that the observed effect is probably from stereo-electronic nature.

The fact that all the substances were active reflects probably the presence of the indole core nucleus. The substances tested relaxed the guinea-pig ileum pre-contracted by acetylcholine, histamine and KCl in a non-selective manner. Independently of the contraction being evoked by either pharmacomechanical (acetylcoline and histamine) or electromechanical (KCl) coupling, the maintenance of tonic contraction involves activation of the voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels (VOCC's) [8,9]. Since the substances tested relaxed the guinea-pig ileum pre-contracted with used contractile agents, it is suggestive that this effect is probably due to blockade of Ca<sup>2+</sup> influx through VOCC'S, however further studies will be necessary to reinforce this hypothesis.

### Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES and CNPq for financial support.

### References

- [1] F.A. Oliveira, R.N. Almeida, M.F.V. Souza, J.M. Barbosa-Filho, S.A. Diniz, Anticonvulsivant properties of N-salicyloyltryptamine in mice, Pharmacol. Biochem. Be. 68 (2001) 199-202 (This compound was obtained in low to moderate yield (20-45%) by transamidation with neat methyl salycilate and tryptamine at reflux).
- [2] M.S. Hifnaway, A. Cavé, Produits neutres et alcalóides de Myrtopsis macrocarpa, M. myrtoidea, M. novae caledoniae et M. sellingii, Phytochemistry 16 (1957) 1035–1039.
- [3] T. Yoshioka, K. Mohri, Y. Oikawa, O. Yonemitsu, Synthesis of oxazolyndole alkaloids from tryptamine and tryptophan by oxidation with 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone, J. Chem. Res. Synth. (1981) 194-195.
- [4] M. Logers, L.E. Overman, G.S. Welmalker, Mannich biscyclizations—total synthesis of (-)-ajmalicine, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 9139–9150.
- [5] M. Protiva, M. Rajsner, Z.J. Vejdelek, Synthetische versuche in der gruppe hypotensiv wirksamer alkaloide.25. Einige 3-(2benzylaminoathyl)indole und 3-[2-(-phenoxyathylamino) athyl]indole, Coll. Czech. Chem. Commun. 28 (1963) 629-635.
- [6] B.T. Ho, W.M. McIsaac, L.W. Tansey, Hydroxyindole-O-methyl-transferase.3. Influence of phenyl moiety on inhibitory activities of some N-acyltryptamines, J. Pharm. Sci. 58 (1969) 563-572 (The previous reported melting points for this compound are very different, in our hands, the value was confirmed by double-checked and corrected procedures).
- [7] M.K. Karin, W.H. Linnell, L.K. Sharp, Potential reserpine analogues. 1. Derivatives of tryptamine, J. Pharm. Pharmacol. 12 (1960)
- [8] C.M. Rembold, Electromechanical and pharmacomechanical coupling, in: M. Bárány (Ed.), Biochemistry of Smooth Muscle Contraction, Academic Press, San Diego, 1996, pp. 227–239.
- [9] A.V. Somlyo, A.P. Somlyo, Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle, J. Pharmacol. Exp. Ther. 159 (1968) 129–145.

### SYNTHESIS AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF N-BENZOYL-TRYPTAMINE AND ITS NEW ANALOGUE N-SALICYLOYLTRYPTAMINE, A POTENTIAL ANTICONVULSANT AGENT

FRANCISCO DE ASSIS OLIVEIRA, DAVI ANTAS E SILVA, LUCINDO JOSÉ QUINTANS-JÚNIOR, STANLEY JUAN CHAVEZ GUTIERREZ, REINALDO NÓBREGA DE ALMEIDA, JOSÉ MARIA BARBOSA-FILHO AND MARIA DE FÁTIMA VANDERLEI DE SOUZA\*

> Laboratório de Tecnologia Farmacêutica "Delby Fernandes de Medeiros", Universidade Federal da Paraíba, Brazil

### ABSTRACT

N-Benzoyltryptamine (3), previously isolated from Myrtopsis myrtoidea and a new analogue, N-salicyloyltryptamine (5), were prepared by ycoupling tryptamine (b), perform stated that myrings and a new animage, resamply striptamine (s), were prepared by coupling tryptamine with benzoylchloride and methyl salicylate, respectively. Their structural elucidation was made by the usual spectroscopic methods and two-dimentional NMR techniques COSY, COBY and HMBC. A salicylcyltryptamine (5) was submitted to pharmacological screening behavior, showing depressant effects

Keywords: N-benzoyltryptamine, N-saficyloyltryptamine, two-dimentional NMR spectroscopy, anti-convulsant activity

### INTRODUCTION

The isolation of reserpine in 1952 and its synthesis [1] in 1956 motivated the study of indole derivatives and their therapeutic uses. The indole nucleus is found in many bioactive substances with psychobiological and medicinal activity [2]. They include N-N-dimethyltryptamine and 5-methoxy-N-N-dimethyltryptamine, which possess psychomimetic

N-Benzoyltryptamine (3) is a natural product, isolated for the first time from Myrtopsis myrtoidea, a plant of the Rutaceae family [4]. N-Salicyloyltryptamine (5) is a new analogue. In this work both compounds were prepared by coupling tryptamine with benzoylchloride and methyl salicylate, respectively.

In a preliminary behavioral screening in our laboratory, only

(5) showed depressant effects on the Central Nervous System (CNS) in mice [5]. Therefore, we attempted to investigate the effect of (5) on seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ).

### EXPERIMENTAL.

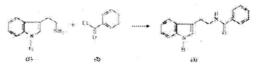
General Methods

UV spectra were recorded on a VANKEL 50 UV-Vis
spectrophotometer in MeOH as solvent. IR spectra were obtained on a

BOMEN MICHELSON spectrophotometer using KBr. 'H and 'I'C NMR
spectra were recorded in C,D,N on a BRUKER AMX 400 spectrometer at
400 MILE for 'H and 100 MHz for 'I'C, using 1D and 2D techniques. EIMS
were collected on a HP 5988A at 70 eV. For the analytical TLC, silica gel
PF MERC:K was used with a 0.25 mm fayer. For Cofunn Chromatography, silica gel MERCK 7733 was used. Tryptamine, benzoyl chloride, meth-salicylate and triethylamine were purchased from SIGMA-ALDRICH.

### Preparation of N-benzoyltryptamine (3)

Tryptamine (1) (3 g) was dissolved in a solution containing 3 ml of triethylamine in 60 ml of chloroform. Then 3 ml of benzoyl chloride (2) tricthylamine in 60 ml of chloroform. Then 3 ml of benzoyl chloride (2) dissolved in 30 ml of CHCl, were added dropwise. The solution was stirred for 30 min and then the reaction mixture was washed with 2% aqueous HCl, then with water, dehydrated with anhydrous sodium sulphate, yielding an oily residue (2,5 g). This residue was chromatographed on a sifica gel column, and eluted with hexane, CHCl, and Meo'll with increasing polarity and the product was crystallized from hexane-CHCl, (9,5:0,5), affording 80% of 4/benzoyltryptamine (3), white crystals, mp=131 °C (Hexane-CHCl). CHCL).



### Preparation of N-salicylevltryptamine (5)

Tryptamine (1) (3 g) and 3 ml of methyl salicylate (4) were kept under reflux with magnetic stirring in 60 ml of methanol during 6 hours. Stirring was continued for further 24 hours at room temperature. The excess reagent was removed at reduced pressure and the city residue (6.3) g) was chromatographed on silica gel using hexane. CHCl<sub>2</sub> and MeoH with increasing polarity. Fractions 13-20, containing the desired product was recrystallized from CHCl<sub>3</sub>:MeOH (8:2), giving 55% of N-saficyloglytyptamine (5), which formed a white powder with mp=153 °C (CHCl<sub>3</sub>-MeOH).

Figure 2. Preparation of A-salicyloyltryptamine

### Animals

Male Swiss mice (25-30 g) were used throughout this study. The animals were randomly housed in appropriate cages at  $25 \pm 2$  °C on a 12 h light/dark cycle (fights on 06:00-18:00) with free access to food (Purina) and water. They were used in groups of ten animals cach. Experimental protocols and procedures were approved by the Laboratório de Tecnología Farmaceutica Animal Care and Use Committee.

Pentylenetetrazole (PTZ), polyoxyethylenesorbitan m (Tween 80) and cremophor were purchased from Sigma (USA) and Diazepam (DZP) from CEME (Brazil). Agents were injected intraperitoneally (i.p.) with a dose volume of Imk(100g.

e-mail: mfuanderlei@ltf.ufpb.br

919

### J. Chil. Chem. Soc., 51, Nº 2 (2006)

### Anticonvulsant activity

FTZ-induced convulsions. PTZ (60 mg/kg ip) was used to induce clonic convulsions [6,7]. Mice were divided into 4 groups (n = 10). The first group was used as control and received Tween 80 (0.2%) (vehicle), while to the second group diazepam (DZP, 4 mg/kg ip) was given. The remaining groups received an injection of (5) at doses of 100 and 200 mg/kg. After 60 min of drug administration, the mice were treated with intraperitoneal PTZ at a dose of 60 mg/kg and observed for at least 30 min to detect the occurrence of the first episode of forclimb clomus. The incidence of mortality was noted until 24 h after the injection of PTZ.

### Statistical analysis.

The data obtained were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's t test. The incidence (%) of clonic or tonic convulsions as well as the mortality were evaluated by Fisher's Exact Test. Differences were considered to be statistically significant when p < 6:05.

### RESULTS AND DISCUSSION

N-Benzoyltryptamine (3). The mass spectrum of N-Benzoyltryptamine (3) showed the molecular ion peak at m/z 264, consistent with the molecular formula C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O. The IR spectrum v<sub>min</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup> exhibited the characteristic band of N-H and amide at 3407 and 3308 cm<sup>-1</sup>, respectively. The presence of the amide group was further confirmed by the band at 1649 cm<sup>-1</sup> (C=O) and 1484 cm<sup>-1</sup> (N-H). The UV spectrum: k<sub>min</sub> McOH showed absorptions at 220, 277 and 288 nm, characteristic of the indole nucleus. The mass spectrum showed a fragment 143 m/z consistent with indol-3-ethylene group and others at m/z 121 and 105 suggesting a benzamide group in the molecule.

The two-dimensional NMR spectrum ('H x 'H-COSY), confirmed the indole nucleus in the molecule exhibiting coupling between H-2 (7.39 &) and N-H (11.08 &), as well as the correlations & 7.92/7.24, consistent with aromatic hydrogens.

By heteronuclear correlated two-dimensional spectroscopy NMR <sup>1</sup>J - <sup>1</sup>H x <sup>12</sup>C-COBY it was possible to assign the coupling H-4\*/C-4\*, H-2/C-2 and H-3/C-3, besides H-8 and H-7 by its coupling with C-8 (26.91 δ) and C-7 (42.08 δ), respectively.

The heteronuclear multiple bond correlation spectrum (\*\*J, \*\*J - \*\*H x \*\*PC-HMBC supported absorption for H-7 (4.10 \delta) through interaction with C-3 and H-8 (3.35 \delta) which showed interactions with C-3 (\*\*J) and C-3a (\*\*J) (Table 1). The structure elucidation was also confirmed by comparison with literature data [4, 5, 8]. When this compound was first isolated, only one dimensional methods were performed. In the present work, all the hydrogen and carbon assignments were made unambiguously-based on two-dimensional techniques.

Table 1. NMR spectral data of N-benzoyltryptamine (3) (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 400 MHz,

		'H x 'C-COB		'H x '3C-HMBC
C	δ,,	Ą.	2 <i>J</i>	',/
1.	11.80 (brs)			
2	7.39 (d. £2.16 Hz)	124:13	113.65	138.26;129.08;
3	-	143.65		*-
3a	9 B	129.08		
4	7.92 (d, J= 10 Hz)	119.80	129.08;	138.26;113.65; 122.39
5 .	7.24 (dt. J = 10 and 1.5 Hz)	119.76	122.39:129.08	
6	7.34 (dt, $J = 10$ and 1.5 Hz)		119.76;	138.26;119.80
7	7.63 (F= 10 Hz)	112.64		129:08:119.76
Ta		138.26		-
1:	, re	136.74	*	
2'	8.03 (m)	128:50	136:74;129.26	131.90
3"	7.45 (m)	129.26	131.90;128.50	136.74
4-	7.45 (m)	131.90	129.26	128.50
5'	7.45 (m)	129.26	128.50	136.74
6.	8.32 (m)	128.50	131.90	128.50
7'	4.10 (q. J= 6 Hz)	42.08		(13.75
8-	3.35 (t, J= 6 Hz)	26.91	113.75	127.08;124.13
NH.	9.20 (t, F= 2.10 Hz)	•	•	
C=0		168.50		-

The IR spectrum of A salicyloyltryptamine (5) showed peaks at 3125 and 1661 em. for the stretching of the hydragen bond O-H and C=O, respectively. This was also supported by the mass spectrum which showed a fragment at m/e 137 related to the existence of an orthohydroxybenzamide moiety (C,H,NO<sub>2</sub>). A peak at m/z 280 refers to the molecular ion, consistent with the formula C<sub>1</sub>,H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. More details of structural fragmentation can be seen in Figure 3.

Figure 3. Mass fragmentation of N-salicyloyltryptamine (5)

J. Chil. Chem. Soc., 51, № 2 (2006)

The 'H NMR spectrum supported the attribution of orthohydroxy benzamide substituted at C-2' due to the absence of a multiplet at 8.03 (H-2') which could be seen in 3. Indeed, it shows a large singlet at 13.75 & related to a hydroxyl group, deshielded due to the formation of an intramofecular hydrogen bond with carboxyl from the amide group localized in the ortho position in the orthohydroxybenzamide moiety.

Through the two-dimensional homonuclear correlated NMR spectrum ( $^{1}$ H x  $^{1}$ H-COSY 45 $^{\circ}$ ) it was possible to assign magnetic interaction between the indole hydrogen N-H at 11.79  $\delta$  with H-2 at 7.23  $\delta$ . The two-dimensional heteronuclear correlation NMR  $^{1}$ J- $^{1}$ H x  $^{13}$ C - COBY technique showed the correlations between the indole hydrogen and its respective carbons. Interaction between H and C through 2 and 3 shown in the HMBC spectrum, allowed the unambiguously assignments of hydrogens and carbons (Table 2).

Table 2. NMR spectral data of A salicyloyltryptamine (5) (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 400 MHz, &, f = Hz)

	1884 January - 1884 - 1884 - 1884 - 1884 - 1884 - 1884 - 1884 - 1884 - 1884 - 1884 - 1884 - 1884 - 1884 -	'H x '3C-COBI	'H x '	C-HMBC
C	δμ	1/	2∕	ν.
1	11.79 (brs)	•		
2	7.37 (d, $J = 1.68$ Hz)	124.01	113.52	138.25; 128.97
3	-	113.52	-	-
3a	- 4	128.97	- C21	-
4	7.88 (d, $J = 7.80 \text{ Hz}$ )	119.72	-	113.52; 138.25; 122.42
5	7.23 (t, $J = 9.32 \text{ Hz}$ )	119.79	119.79	128.97; 112.64
6	7.31 (t, $J = 7.46$ Hz)	122.42	119.79	138.25
7	7.61  (d,  J = 7.52  Hz)	112.64		128.97; 119.79
7a		138.25		3 <b>=</b> 3
1.	•	117.35	100	-
2'	5000 6 <b>€</b> 0	162.22	2	
3,	7.23 (d, $J = 9.32 \text{ Hz}$ )	118.83	134.46	119.52; 117.35
4'	7.42 (d, $J = 7.20$ and 1.04 Hz)	134.46	118.83	128.86
5'	6.89 (t, $J = 7.56 \text{ Hz}$ )	119.52	134.46; 128.86	118.83; 117.35
	8.23  (d,  J = 7.96  Hz)	128.86	119.52	134.46
6°	4.02 (q, J = 7.40 Hz)	41.64	-	113.52
8'	3.33 (t, $J = 7.40 \text{ Hz}$ )	26.65	113:52	128.97, 124.01
NH	9.60 (brs)	<u> </u>	14	-
C=Θ	(1.00 × 1	170.95	12	-
OH	13.75 (brs)	51	-	72

Table 3 shows in the control group that PTZ consistently induced clonic seizures in 100% of 10 mice. However, administration of 200 mg/kg (ip) of 5 increased the latency of clonic convulsions significantly different from control (p < 0.05; Dunnett's test). Similarly, the group which received DZP, the latencies

increased the latency of clonic convulsions significantly different from control (p < 0.05; Dunnett's test). Similarly, the group which received DZP, the fatencies significantly were prolonged and was observed a reduction of percentage for clonic seizures induced by PTZ.

The results showed that acute administration of 5 (200 mg/kg ip) on PTZ-induced convulsive seizures in mice significantly reduced (P < 0.05) the incidence of clonic seizures and mortality (as shown in Table 3). The PTZ-induced seizures, is considered as an experimental model for "generalized absence seizure" [6]. PTZ may cause convulsions by inhibiting chloride ion channels associated with GABA, receptors. However, the PTZ test is particularly sensitive to GABA mimetic drugs [7].

Table 3. Effect of N-salicyloyltryptamine (5), on PTZ-induced convulsive seizures in mice

Treatment	n	Dose (mg/kg)	Latency of clonic seizures (s)"	Percent clonic	seizures	Percent mortality
Vehicle	10		187,5 ± 26,3	100	70	
DZP	10	4	$632.9 \pm 58.9^{\circ}$	10°	0°	
(5)	10	100	$237,4 \pm 13,4$	60b	30 <sup>6</sup>	
(5)	10	200	$258,9 \pm 37,3^{d}$	60 <sup>b</sup>	70	

- n: number of mice per group.
  \* Values represent mean ± S.D.
- b P < 0,05 (Fisher's test), significantly different from control. c P < 0,01 (Fisher's test), significantly different from control.
- <sup>d</sup> P < 0,05 (one-way ANOVA and Dunnetts's test), significantly different from control.
- P < 0.01 (one-way ANOVA and Dunnetts's test), significantly different from control.

J. Chil. Chem. Soc., 51, Nº 2 (2006)

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to CNPq for financial support and Alexander I. Gray of Glasgow University for the acquisition of NMR spectra.

### REFERENCES

- Woodward, R. E.; Barder, H.; Bickelf, A. J. F.; Kiertead, R. W. J. Amer. Chem. Soc., 1956, 78 (9): 2023-2025.
   Lednicer, D.; Mitscher, L. A. The Organic Chemistry of Drug. Synthesis. 1977. Academic Press.
   B. R. Sintaram, W. R. McLeod, Biol. Psychiatry. 1990, 28 (10): 841-249.
- 848.

- Hifnawy, M. S. J. V.; Sevenet, T.; Pousset, J. L.; Cavé, André. Phytochemistry, 1977, 16 (7): 1035-1039.
   F. A. Oliveira, Estudo químico e efeitos psicofarmacológicos desubstâncias indólicas, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasif, (2003).
   Swinyard, E. A.; Woodhead, J. H.; White, H. S.; Franklin, M. R. Experimental sefection, quantification and evaluation of anticonvulsants. In: Levy, R.H. Dreyfuss, F.E. Mattson, R.M. Meldrum, B.S. Penry, J.K. editors. Antiepileptic drugs. New York: Raven Press, (1989).
   Almenida, R. N.; Navarro, D. S.; Assis, E. S.; Medeiros, L.A.; Thomas, G. J. Ethnopharmacol., 1998, 63 (3): 247-252.
   Barbosa-Filho, J. M.; Silva, E. C.; Bhattacharyya, J. Química Nova, 1990, 13 (4): 332-334.

PHYTOTHERAPY RESEARCH Phytother. Res. 19, 1005-1008 (2005) Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ptr.1771

## Antianxiety Effects of Riparin I from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in Mice

Francisca Cléa Florenço de Sousa<sup>1\*</sup>, Andreisa Paiva Monteiro<sup>1</sup>, Carla Thiciane Vasconcelos de Melo<sup>1</sup>, Glício Rebouças de Oliveira<sup>1</sup>, Silvânia Maria Mendes Vasconcelos<sup>1,2</sup>, Marta Maria de França Fonteles<sup>1</sup>, Stanley Juan Chavez Gutierrez³, José Maria Barbosa-Filho³ and Glauce Socorro Barros Viana1

This work presents the behavioral effects of riparin I (methyl ether of N-benzoyl tyramine) from unripe fruit of Aniba riparia (Lauraceae) on the elevated plus maze, open field, rota rod and hole board tests in mice. Riparin I was administered acutely by intraperitoneal (i.p.) and oral routes to male mice at doses of 25 and 50 mg/kg. The results showed that riparin I (25 and 50 mg/kg, i.p. and per os) increased the number of entries and the time of permanence in the open arms in the plus maze test. Similarly, in the hole board test, riparin I in both routes increased the number of head dips. Riparin I with both doses and routes had no effects on spontaneous motor activity in mice or in the rota rod test, but decreased the number of groomings. These results showed that riparin I by both administration routes has effects on the central nervous system with antianxiety effects on the plus maze and hole board tests. The substance is devoid of myorelaxant effects. Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: central nervous system; antianxiety; plus maze; hole board; riparin.

### INTRODUCTION

The species Aniba riparia (Nees) Mez, from the Lauraceae family, is popularly known as 'louro' and belongs to a genus mainly found in Central Amazonia and Guiana comprising approximately 40 species of lowland shrubs and trees (Barbosa-Filho et al., 1987; Castelo-Branco et al., 2000)

Three substances with broad spectrum antimicrobial activity: methyl ether of N-benzoyl tyramine (riparin I), N-(2-hydroxybenzoil) tiramine (riparin II) and N-(2,6-dihydroxybenzoil) tyramine (riparin III) were previously isolated from the unripe fruit of Aniba riparia (Barbosa-Filho et al., 1987). Previous data showed that riparin III obtained synthetically (Barbosa Filho et al., 1990) has potent smooth muscle relaxant activity (Castelo Branco et al., 1991; Castelo Branco, 1992) and this spasmolytic effect was possibly related to a reduction of intracellular Ca<sup>+2</sup> concentration (Thomas et al.,

Recently, it was reported (Sousa et al., 2004) that riparin III also presented antianxiety and antidepressant effects in mice treated with doses of 25 and 50 mg/ kg ip. These results led to investigation of the behavioral effects of riparin I on animals models of locomotion, anxiolytic and myorelaxant activities.

Correspondence to: Dr Cléa Florenço de Sousa, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará.

### MATERIALS AND METHODS

Animals. Male Swiss mice (30 g) were used in each experiment and the animals were maintained at a controlled temperature (23 ± 1 °C) with a 12 h dark/light cycle and free access to water and food. Animals were treated in accordance with the current law and the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Drugs. Riparin I was emulsified with 3% Tween 80 (Sigma-USA) and dissolved in distilled water. Animals were treated with the compound in doses of 25 and 50 mg/kg, once a day, 30 or 60 min when administered intraperitoneally or orally respectively, before the experiments. Controls received vehicle in the same volume (10 mL/kg) and by the same route as the treated groups. Diazepam, União Química Brazil, (1 mg/kg) was used as a standard.

Experimental protocol. After the treatment, each animal was submitted to a series of tests as described below. The experiments were done in an isolated room, at constant temperature (23  $\pm$  1 °C) and poorly illuminated with a 15 V red light. Initially, each animal was placed inside a plus maze and observed blind for 5 min. Immediately after the plus maze test, it was placed in the open field area for 5 min. Finally, the animal was removed to the rota rod where it was evaluated for

Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Brazil
Department of Pharmacology, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil, Rua Cel. Nunes de Melo 1127, 60430-270

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Laboratory of Pharmaceutics Technology, Federal University of Parasba, Brazil

Elevated plus maze test. The elevated plus maze for mice (Lister, 1987) consisted of two perpendicular open arms  $(30 \times 5 \text{ cm})$  and two closed arms  $(30 \times 5 \times 25 \text{ cm})$ also in the perpendicular position. The open and closed arms were connected by a central platform  $(5 \times 5 \text{ cm})$ . The platform and the lateral walls of the closed arms were made of transparent acrylic. The floor was made of black acrylic. The maze was 45 cm above the floor. Thirty minutes or 1 h after intraperitoneal and oral treatments, respectively, the mouse was placed at the center of the plus maze with its nose in the direction of one of the closed arms, and observed for 5 min. The parameters observed were: number of entries in the open and closed arms, and time of permanence in the open and closed arms. Anxiolytic compounds reduce the animal's natural aversion to the open arms and promote the exploration thereof.

Open field test. The open field area was made of acrylic (transparent walls and black floor,  $30 \times 30 \times 15$  cm) divided into nine squares of equal area. The open field was used to evaluate the exploratory activity of the animal (Archer, 1973). The observed parameters were: the number of squares crossed with the four paws (locomotor activity) and the numbers of grooming (number of times the animal stood with its forepaws) and rearing (number of times the animal stood completely erect on its hind legs).

Rota rod. For the rota rod test, the animal was placed with the four paws on a 2.5 cm diameter bar, 25 cm above the floor, which was rotating at 12 rpm. For each animal, the number of falls (up to three falls) and the time of permanence on the bar for 1 min were registered (Dunham and Miya, 1957).

Hole board test. The hole-board test for exploratory behavior of mice was used as described previously by Clark et al. (1971). The apparatus used was an Ugo Basile of 60 cm × 30 cm with 16 evenly spaced holes with inbuilt infra red sensors. For each animal, the number of head dips into the holes was counted for each animal for 5 min.

Statistical analysis. All results are presented as mean  $\pm$  SEM. ANOVA followed by Tukey as the *post hoc* test were used. Results were considered significant at p < 0.05.

### RESULTS

The results showed that in the plus maze test (Table 1) the intraperitoneal treatment with both doses of riparin I presented a statistical increase in all parameters observed compared with the controls. The groups treated orally with riparin I, at both doses, increased the number of entries and the time of permanence in the open arms compared with the controls. Similarly, diazepam (1 mg/kg, i.p.) used as a positive control group increased all parameters observed.

Table 2 shows the effects of riparin I on the open field parameters. In this test, the groups treated intraperitoneally with 25 and 50 mg/kg and orally with 25 mg/kg riparin I decreased the number of groomings compared with the controls. Diazepam, at the dose used in this test did not interfere in the locomotor activity, rearing or grooming compared with the controls.

In the rota rod test (Table 3), there were no differences after the treatment with riparin I, at the doses

Table 1. Effects of riparin I in the elevated plus maze in mice

Group		NEOA*	PEOA*		TPOA*	PTOA*
Control per os	· .	5.7 ± 0.51(10)	 46.45 ± 2.37(10)		106.5 ± 6.16(10)	45.91 ± 2.51(10)
Riparin 25 mg/kg per os		8.8 ± 0.61(10)b	52.31 ± 1.97(10)		134.4 ± 5.78(10)b	52.42 ± 1.94(10)
Riparin 50 mg/kg per os		$7.8 \pm 0.46(10)^{b}$	51.58 ± 2.14(10)		139.9 ± 8.4(10)b	52.02 ± 2.91(10)
Control i.p.		$5.2 \pm 0.32(10)$	41.90 ± 2.24(10)		$94.0 \pm 7.16(10)$	42.15 ± 3.22(10)
Riparin 25 mg/kg i.p.		$7.6 \pm 0.6(10)^{6}$	52.98 ± 1.90(10)b	·	135.7 ± 11.21(10) <sup>6</sup>	59.61 ± 3.89(9)b
Riparin 50 mg/kg i.p.		7.3 ± 0.66(10)b	52.53 ± 1.66(10)b		129.5 ± 7.81(10)b	54.93 ± 2.66(9)b
Diazepam i.p.		11.1 ± 0.9(10)b	69.45 ± 2.93(10)b		197.6 ± 7.21(10) <sup>b</sup>	76.91 ± 2.76(10)

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Each values represents mean ± SEM for the number of animals shown in parenthesis. NEOA, number of entries in the open arms; PEOA, percentage of entries in the open arms; TPOA, time of permanence in the open arms; PTOA, percentage of time in the open arms.

Table 2. Effects of riparin I in open field test in mice

Group	Number of crossing*	Rearing*	Grooming*
Control per os	53.33 ± 6.97(9)	6.10 ± 0.88(10)	3.0 ± 0.44(10)
Riparin 25 mg/kg per os	$40.8 \pm 2.55(10)$	6.30 ± 1.06(10)	1.0 ± 0.25(10)
Riparin 50 mg/kg per os	$51.6 \pm 2.85(10)$	$8.90 \pm 0.73(10)$	1.5 ± 0.26(10)
Control i.p.	$48.4 \pm 2.35(10)$	$3.9 \pm 0.86(10)$	$4.22 \pm 0.52(9)$
Riparin 25 mg/kg i.p.	55.4 ± 4.37(10)	$4.87 \pm 1.55(9)$	2.33 ± 0.44(9)6
Riparin 50 mg/kg i.p.	$46.3 \pm 4.58(10)$	$5.44 \pm 0.78(9)$	$3.44 \pm 0.58(9)$
Diazepam i.p.	55.52 ± 3.69(21)	$3.56 \pm 0.8(16)$	2.47 ± 0.28(23)

 $<sup>^{\</sup>rm b}$  p < 0.05 compared with control (ANOVA and Tukey as a post hoc test were used).

Table 3. Effects of riparin I in the rota rod test in mice

Group	Number of falls*	Time of permanence (s)
Control per os	1.1 ± 0.37(10)	55.0 ± 2.27(10)
Riparin 25 mg/kg per os	$0.8 \pm 0.24(10)$	57.5 ± 0.77(10)
Riparin 50 mg/kg per os	1.5 ± 0.26(10)	53.4 ± 2.57(10)
Control i.p.	1.33 ± 0.3(12)	52.91 ± 3.05(12)
Riparin 25 mg/kg i.p.	$1.3 \pm 0.3(13)$	53.76 ± 2.22(13)
Riparin 50 mg/kg i.p.	$0.91 \pm 0.35(12)$	54.08 ± 3.13(12)
Diazepam i.p.	$1.6 \pm 0.26(10)$	55.7 ± 0.86(10)

Data are reported as mean ± SEM for the number of animals shown in parenthesis.

Table 4. Effects of riparin I in the hole board test in mice

Group	Number of head dips	
Control per os		30.11 ± 0.97 (27)
Riparin 25 mg/kg per os		40.81 ± 4.64 (11)b
Riparin 50 mg/kg per os		41.18 ± 4.35 (11) <sup>b</sup>
Control i.p.		26.7 ± 1.80(10)
Riparin 25 mg/kg i.p.		$30.4 \pm 3.4$ (9)
Riparin 50 mg/kg i.p.		$37.1 \pm 2.5 (9)^{b}$
Diazepam i.p.		$45.4 \pm 1.27 (9)^{6}$

Data are reported as mean ± SEM for the number of animals shown in parenthesis.

and routes used, and diazepam, suggesting that none of the drugs used in this test presented myorelaxant activity.

In the hole board test (Table 4) the oral treatment with both doses of riparin I increased the number of head dips compared with the controls. The groups treated intraperitoneally with riparin I, only at the highest dose (50 mg/kg), increased the number of head dips compared with the controls. Similarly, diazepam (1 mg/kg, i.p.) used as a positive control group increased this parameter.

### DISCUSSION

In this work, the effects of riparin I from *Aniba riparia* were studied in several behavioral animal models as elevated plus maze, open field, rota rod and hole board tests to evaluate its possible central activities. The tests cited above are classical animal models for screening of activities on the central nervous system and provide information about anxiety, psychomotor performance and myorelaxant activity.

The elevated plus maze test is the most popular test to search for new anxiolytic agents (Pellow et al., 1985; Rodgers et al., 1997). Similar to diazepam, the animals treated with riparin I (25 and 50 mg/kg, i.p. and per os) increased the number of entries and the time of permanence in the open arms, reducing the natural animal's aversion to the open arms and pro-

moting the exploration thereof, indicating anxiolytic effect. This effect was confirmed in the hole board test which measures exploratory behavior (Crawley, 1985). An agent that decreases this parameter reveals a sedative behavior (File and Pellow, 1985). Anxiolytics have been shown to increase the number of head dips (Takeda et al., 1998). Our results showed that riparin I by both routes increased the number of head dips, indicating an anxiolytic effect.

Data in the literature demonstrated that drugs that alter general motor activity may give false-positive/negative results in the plus maze. Therefore the study aimed to investigate the effects of riparin I in the open-field test, a classical animal model used to evaluate the autonomic effects of drugs and the general activity of animals. The findings showed that riparin I (25 and 50 mg/kg) and diazepam (1 mg/kg) did not change the locomotor activity. Thus, the present study demonstrated that riparin I at the doses and routes that produced an anxiolytic-like effect did not significantly change the motor activity in naïve mice.

Riparin I in both doses and through both administration routes as well as diazepam did not modify motor coordination in the rota rod test in the protocol studied, suggesting that this substance is devoid of myorelaxant effect.

As far as is known, there are no studies in the literature on the central actions of riparin I. However, riparin I is a methyl ether of N-benzoyl tyramine, and previous data showed that the action of tyramine increased the release of norepinephrine (Meck et al., 2003). Some reports cited that individuals in treatment with anti-depressive drugs, such as monoaminoxidase inhibitors, presented a prolonged increase in blood pressure when ingesting tyramine-rich foods (Potter and Hollister, 1998). Recently (Sousa et al., 2004), data from our laboratory using a N-(2,6-diihydroxybenzoil) tyramine (riparin III) showed that this substance presented anti-depressant-like and anxiolytic-like effects.

In conclusion, it was shown that acute treatment with riparin I (25 and 50 mg/kg, i.p. and per os) presents possible antianxiety effects on the central nervous system demonstrated on the plus maze and hole board tests. The results also suggest that the substance is probably devoid of myorelaxant activity, as indicated in the rota rod model. Further work is on going in our laboratory to clarify the central activity of riparin I.

 $<sup>^{\</sup>rm b}$  p < 0.05 compared with control (ANOVA and Tukey as a post hoc test were used).

### REFERENCES

- Archer J. 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 21: 205–235.

  Barbosa-Filho JM, Yoshida M, Gottlieb OR. 1990. The tyramines of: transformation into models of natural products. *Rev Letinoamer Quim* 21: 5–7.

  Barbosa-Filho JM, Yoshida M, Gottlieb OR, Barbosa RCSBC, Giesbrecht AM, Young CM. 1987. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry* 26: 2615–2617.
- styrylpyrones and neolignans from the fruits of Aniba riparia. 
  Phytochemistry 26: 2615–2617.

  Castelo-Branco UJV. 1992. Estudos Farmacológicos do Éter 
  Metilico de N-(2,6-dihydroxibenzoil)-tiramine. MSc Thesis. 
  Universidade Federal de Paraíba, Brazil.

  Castelo-Branco UJV, Thomas G, Araújo CC, Barbosa-Filho JM. 
  1991. Atividade espasmolítica de benzamidas isoladas de 
  Aniba Riparia (parte 1). Resumo VI Annual Meeting of the 
  Federation of the Societies of Experimental Biology, FESBE, 
  Brazil Abetr. 6, 69, 302.
- Brazil. Abstr. 6 69, 302. Castelo-Branco UV, Castelo-Branco UJV, Thomas G, Araújo CC, Barbosa-Filho JM. 2000. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Ness)
- Mez (Lauraceae). Acta Farm Bonaerense 19: 197-202. Clark G, Koster AG, Person DW. 1971. Exploratory behavior in chronic disulfoton poisoning in mice. *Psychopharmacology* 20: 169–171.
- 20: 169-171.
  Crawley JN. 1985. Exploratory behaviour models of anxiety in mice. Neurosci Biobehav Rev 9: 37-44.
  Dunham NW, Miya TS. 1957. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. J Am Pharm Assoc 46: 208-212.
  File S, Pellow S. 1985. The effect of triazolobenzodiazepines

- in two animal tests of anxiety and on the hole-board.
- Br J Pharmacol 86: 729-735.
  Lister RG. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology 92: 180-185.
  Meck JV, Martin DS, D'Aunno DS, Waters WW. 2003. Pressor
- response to intravenous tyramine is a marker of cardiac, but not vascular, adrenergic function. J Cardiovasc Phar-
- macol 41: 126-131.
  Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open:
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods 14: 149–167.
   Potter WZ, Hollister LE. 1998. Antidepressant agents. In Basic and Clinical Pharmacology, 7th edn, Katzung BG (ed.). Appleton & Lange: Connecticut-EUA, 483–495.
   Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. 1997. Animal models of anxiety on ethological perspective. Braz J Med Biol Res 30: 289–304.
- Sousa FCF, Melo CTV, Monteiro AP et al., 2004. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from Aniba riparia (Nees)
  Mez (Lauraceae) in mice. Pharmacol Biochem Behav 78:
- Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. 1998. Changes in head-dipping behaviour in the hole-board test reflect the anxiolytic state in mice. Eur J Pharmacol 350: 21–29.
- Thomas G, Castelo-Branco UJV, Barbosa-Filho JM, Bachelet M, Vargaftig BB, 1994. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae), in rat uterus, rabit aorta and guinea pig alveolar leucocyttes. *J Pharm Pharmacol* 46: 103–107.



## Available online at www.sciencedirect.com

PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 78 (2004) 27-33

www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh

# Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice

F.C.F. Sousa<sup>a,\*</sup>, C.T.V. Melo<sup>a</sup>, A.P. Monteiro<sup>a</sup>, V.T.M. Lima<sup>a</sup>, S.J.C. Gutierrez<sup>b</sup>, B.A. Pereira<sup>a</sup>, J.M. Barbosa-Filho<sup>b</sup>, S.M.M. Vasconcelos<sup>a</sup>, M.F. Fonteles<sup>a</sup>, G.S.B. Viana<sup>a</sup>

\*Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo 1127, 60431-270, Fortaleza, Brazil

\*Laboratory of Pharmaceutics Technology, Federal University of Paraiba, João Pessoa, Brazil

Received 25 April 2003; received in revised form 27 August 2003; accepted 23 January 2004

Available online 16 April 2004

### Abstract

This work presents behavioral effects of methyl ethers of N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine (riparin III) isolated from the unripe fruit of Aniba riparia on the open field, elevated plus maze (EPM), rotarod, hole board, barbiturate-induced sleeping time, tail suspension and forced swimming tests in mice. Riparin III was administered intraperitoneally to male mice at single doses of 25 and 50 mg/kg. The results showed that riparin III with both doses had no effects on spontaneous motor activity in mice or in the rotarod test, but decreased the number of grooming and rearing. At the dose of 50 mg/kg, riparin III increased the number of entries in the open arms of the EPM test as compared with control. Similarly, in the hole-board test, both doses increased the number of head dips. There was a reduction on the sleeping latency with both doses and a prolongation of the pentobarbital-induced sleeping time with the dose of 25 mg/kg. In the tail suspension test, similar to mipramine (30 mg/kg), riparin III at the dose of 50 mg/kg presented a reduction in the immobility time. In the forced swimming test, both doses of riparin III decreased the immobility time. These results showed that riparin III potentiated the barbiturate-induced sleeping time and presented antidepressant- and anxiolytic-like effects.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Aniba riparia; Riparin III; Anxiolytic and antidepressant effects

1. Introduction

Aniba riparia (Nees) Mez, from the Lauraceae family, is popularly known in Brazil as "louro." The plant belongs to a genus mainly found in Central Amazonia and Guiana which comprises approximately 40 species of lowland shrubs and trees (Barbosa-Filho et al., 1987: Castelo-Branco et al., 2000). From the unripe fruit of A. riparia, were isolated three substances with broad spectrum antimicrobial activity: methyl ethers of N-benzoyl tyramine (riparin 1), N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin 11) and N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine (riparin 111; Fig. 1). Recently, it was reported that one of the above compounds (O-methyl-)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine (riparin 111) obtained synthetically (Barbosa-Filho et al., 1990) has potent smooth

0091-3057/\$ - see front matter © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.pbb.2004.01.019

muscle relaxant activity (Castelo Branco et al., 1991; Castelo Branco, 1992). Thus, in concentrations from 8 to 30 μM, riparin III antagonized acetylcholine- and histamine-induced contractions of guinea-pig ifeum, and oxytocin- and brady-kinin-induced contractions of the rat uterus. Furthermore, in the guinea-pig trachea, riparin III inhibited the spontaneous tone (IC<sub>50</sub> 7.7 μM) and carbachol-induced contractions (IC<sub>50</sub> 10 μM). The spasmolytic effect of riparin III was investigated by Thomas et al. (1994) concerning the involvement of the compound in relation to Ca<sup>2+</sup> metabolism. It was demonstrated that riparin III produces an inhibition of Ca<sup>2+</sup> influx and release of intracellular Ca<sup>2+</sup>. These results lead to the reduction of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and possibly contribute to the drug spasmolytic effect.

The interest of our group to study biologically active compounds obtained from Brazilian plants led us to perform a broad spectrum pharmacological screening of riparin III on the central nervous system, considering that as far as we know, there are no studies in the literature on the central

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +55-85-288-8337; fax: +55-85-288-8333.

E-mail address: clea@ufc.br (F.C.F. Sousa)

28

Riparin I (R1=R2=H) Riparin II (R1=OH, R2=H) Riparin III (R1=R2=OH)

Fig. 1. Structure of riparin (I, II and III).

actions of riparin III. In this way, the objectives of the present work were to study effects of riparin III on animal models of locomotor, anxiolytic, myorelaxant and depressant activities.

### 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Swiss mice (30 g) were used in each experiment and animals were maintained at a controlled temperature (23  $\pm$  1 °C) with a 12-h dark/light cycle and free access to water and food. Animals were treated in accordance to the current law and the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

### 2.2. Drugs

Riparin III was emulsified with 2% Tween 80 (Sigma, USA). Animals were treated with the substance at doses of 25 and 50 mg/kg ip, 30 min before the experiments. Controls received 2% Tween 80 (Sigma) dissolved in distilled water at the same volume as the treated groups (10 ml/kg). Diazepam (DZP) 1 and 2 mg/kg (União Química Brazil) and imipramine (IMP) 10 and 30 mg/kg (Geigy) were used as standards.

### 2.3. Experimental protocol

The animals were tested during the light period and were observed in a closed room at constant temperature ( $23 \pm 1$  °C) and poorly illuminated with a 15-V red light, except in the forced swimming test which was illuminated with normal light. Thirty minutes after the treatment, the openfield and rotarod tests were performed with the same animals in the manner described below: Firstly, the animal was placed in the open-field area for 5 min. Immediately

after the open-field test, the animal was removed to the rotarod where it was evaluated for 1 min. All the other tests were performed in different days with other groups of animals.

### 2.4. Open-field test

The open-field area was made of acrylic (transparent walls and black floor,  $30 \times 30 \times 15$  cm) divided into nine squares of equal area. The open field was used to evaluate the exploratory activity of the animal (Archer, 1973). The observed parameters were as follows: number of squares crossed (with the four paws) and number of grooming and rearing. The animals were divided into four groups with 7–12 animals per group.

### 2.5. Rotarod

In the rotarod test, the method of Dunham and Miya (1957) was used. The animals divided into four groups with 7-16 mice per group were placed with the four paws on a 2.5-cm-diameter bar, 25 cm above the floor, which was turning at 12 rpm. For each animal, the time of permanence on the bar for 1 min was registered.

### 2.6. Elevated plus maze test

The elevated plus maze (EPM) for mice (Lister, 1987) consisted of two perpendicular open arms (30 × 5 cm) and two closed arms (30 × 5 × 25 cm) also in perpendicular position. The open and closed arms were connected by a central platform (5 × 5 cm). The platform and the lateral walls of the closed arms were made of transparent acrylic. The floor was made of black acrylic. The maze was 45 cm above the floor. After treatment, the animal was placed at the center of the plus maze with its nose in the direction of one of the closed arms, and observed for 5 min, according to the following parameters: number of entries in the open and closed arms, and time of permanence in each of them. The time of permanence measures the time spent by the animal in the open and closed arms. Anxiolytic compounds reduce the animal's aversion to the open arms and promotes the exploration thereof. On the other hand, the forced or voluntary passages of the animal into the open arms of the EPM are associated with hormonal and behavioral changes indicative of increased anxiety. The animals were divided into four groups with 8-12 per group.

### 2.7. Hole-board test

The hole-board test for exploratory behavior in mice was used as described previously by Clark et al. (1971). The apparatus used was an Ugo Basile of  $60 \times 30$  cm with 16 evenly spaced holes with built-in infrared sensors. In brief, adult male mice were randomly divided into four groups with 7-10 mice per group. Two groups received graded

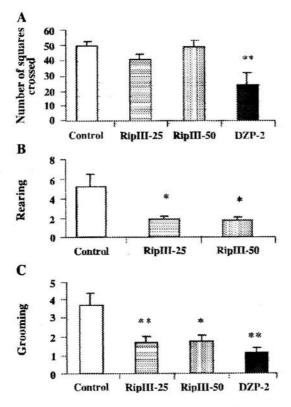


Fig. 2. Open-field test of groups of mice which received vehicle, riparin III (25 and 50 mg/kg) and DZP (2 mg/kg). (A) Number of squares crossed. (B) Rearing. (C) Grooming. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Significant difference compared with control (\*P<.05; \*\*P<0.01). ANOVA and Tukey as the post hoc test.

doses of riparin III (25 and 50 mg/kg ip). One group received DZP (1 mg/kg ip) and the remaining group received vehicle to serve as control. Thirty minutes later, the number of head dips into the holes was counted for each animal for 5 min.

### 2.8. Pentobarbital-induced sleeping time

Thirty minutes after intraperitoneal injection of riparin III (25 and 50 mg/kg), vehicle (control) or DZP (1 mg/kg), all four groups, with 12-17 animals per group, received sodium pentobarbital (40 mg/kg) intraperitoneally. The time since the injection up to the loss of the righting reflex is recorded as sleeping latency and the time elapsed between the loss and voluntary recovery of the righting reflex is recorded as sleeping time (Wambebe, 1985; Rolland et al., 1991).

### 2.9. Forced swimming test

The Porsolt et al. (1978) swimming test includes two exposures to a water tank, spaced 1 day apart. For these experiments, the tank sizes were 22 cm in diameter and 40

cm in height. The tank had a rounded lid and contained 20-cm-high fresh water at 25 °C. During the first exposure, mice not yet treated were placed in the tank and left there for 15 min. During the second exposure (test session), 30 min after the treatment, mice were placed in the tank and left there for 5 min during which their immobility time was observed. A mouse was considered immobile when it remained floating in the water, without struggling, making only very slight movements necessary to keep its head above the water. The animals were divided into four groups with 8–15 per group. Each animal was used only once.

### 2.10. Tail suspension test

The tail suspension test has been described by Steru et al. (1985). Male Swiss mice were housed in plastic cages in a 12-h light cycle with food and water freely available. Animals were transported from the housing room to the testing area in their own cages and allowed to adapt to the new environment for 1 h before testing. For the test, the animals were divided into four groups with 10 animals per group. Thirty minutes after the injection, they were suspended by the tail on the edge of a shelf 58 cm above a table top by adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. The duration of immobility was recorded for a period of 6 min.

### 2.11. Statistical analyses

The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Results were considered significant at P < .05.

### 3. Results

### 3.1. Open-field test

Fig. 2 shows that riparin III 25 mg/kg (ripIII-25), 50 mg/kg (ripIII-50) and DZP 2 mg/kg (DZP-2) decreased the number of grooming [control:  $3.8 \pm 0.7$ ; ripIII-25:  $1.7 \pm 0.3$ ,

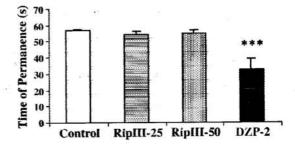


Fig. 3. Rota rod test of groups of mice which received vehicle, riparin III (25 and 50 mg/kg) and DZP (2 mg/kg). The figure shows time of permanence (s). The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Significant difference compared with control (\*\*\*P<.001). ANOVA and Tukey as the post hoc test.

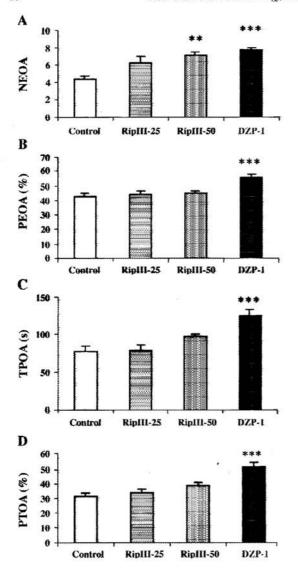


Fig. 4. Plus-maze test of groups of mice which received vehicle, riparin III (25 and 50 mg/kg) and DZP (1 mg/kg). (A) NEOA: number of entries in the open arms; (B) PEOA (%): percentage of entries in the open arms; (C) TPOA (s): time of permanence in the open arms; (D) PTOA (%): percentage of time of permanence in the open arms. The results are presented as mean ± S.E.M. Significant difference compared with control (\*\*P<.01; \*\*\*P<.001). ANOVA and Tukey as the post hoc test.

F(3,35) = 7.224, P < .01; ripIII-50:  $1.8 \pm 0.4$ , F(3,35) = 7.224, P < .05; DZP-2:  $1.1 \pm 0.3$ , F(3,35) = 7.224, P < .001] and riparin 25 and 50 mg/kg decreased the number of rearing [control:  $5.2 \pm 1.4$ ; ripIII-25:  $1.9 \pm 0.4$ , F(2,27) = 4.697, P < .05; ripIII-50:  $1.8 \pm 0.4$ , F(2,27) = 4.697, P < .05]. DZP (2 mg/kg) treatment did not alter the number of rearing but decreased the number of crossings [control:  $50.7 \pm 2.9$ ; DZP-2:  $24.3 \pm 7.6$ , F(3,40) = 6.936, P < .01] as compared to controls.

### 3.2. Rotarod test

No alteration was observed in the time of permanence on bar with both doses of riparin III and, unlikely, DZP (2 mg/kg) which decreased this parameter [control:  $57.1 \pm 0.6$ ; DZP-2:  $32.4 \pm 7.0$ , F(3,47) = 15.308, P < .001] as presented in Fig. 3.

### 3.3. EPM test

In this test (Fig. 4), only riparin III 50 mg/kg significantly increased the number of entries in the open arms (NEOA) [control:  $4.4 \pm 0.4$ ; ripIII-50:  $7.1 \pm 0.4$ , F(3,40) = 8.979, P < .01]. Neither dose of riparin III altered the percentage of entries in the open arms (PEOA), the time of permanence in the open arms (TPOA) nor the percentage of time of permanence in the open arms (PTOA). DZP (1 mg/kg) treatment increased significantly all the observed parameters: NEOA [control:  $4.4 \pm 0.4$ ; DZP-1:  $7.7 \pm 0.3$ , F(3,40) = 8.979, P < .001]; PEOA [control:  $42.9 \pm 2.1$ ; DZP-1:  $55.8 \pm 1.9$ , F(3,39) = 9.950, P < .001]; TPOA [control:  $77 \pm 7.4$ ; DZP-1:  $125.6 \pm 8.6$ , F(3,40) = 10.502, P < .001] and PTOA [control:  $31.9 \pm 2.4$ ; DZP-1:  $51.8 \pm 3.3$ , F(3,39) = 11.439, P < .001].

### 3.4. Hole-board test

Similar to DZP (1 mg/kg), riparin III at both doses (Fig. 5) increased the number of head dips [control:  $34.2 \pm 2.5$ ; ripIII-25:  $45.1 \pm 1.4$ , F(3,32) = 7.811, P < .05; ripIII-50:  $48.8 \pm 3.3$ , F(3,32) = 7.811, P < .001; DZP-1:  $46.1 \pm 1.5$ , F(3,32) = 7.811, P < .01] as compared to controls.

### 3.5. Pentobarbital sleeping time

The absolute values of the sleeping latency and sleeping time are presented in Fig. 6. The intraperitoneal treatment with riparin III (25 and 50 mg/kg) and DZP (1 mg/kg)

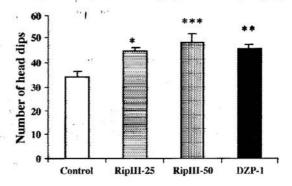


Fig. 5. Hole-board test of groups of mice which received vehicle, riparin III (25 and 50 mg/kg), and DZP (1 mg/kg). The figure shows the number of head dips. The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Significant difference compared with control (\*P<.05; \*\*P<.01; \*\*\*P<.001). ANOVA and Tukey as the post hoc test.

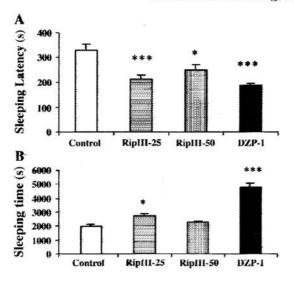


Fig. 6. Effects of mice treatment with riparin III (25 and 50 mg/kg ip) on sleep latency time (A) and sleeping time (B) caused by pentobarbital (40 mg/kg). The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Significant difference compared with control (\*P<.05; \*\*\* P<.001). ANOVA and Tukey as the post hoc test.

resulted in a statistically significant decrease in sleeping latency [control:  $328.7 \pm 24.5$ ; ripIII-25:  $210.5 \pm 16.8$ , F(3, 53) = 9.879, P < .001; ripIII-50:  $248.6 \pm 20.4$ , F(3,53) = 9.879, P < .05; DZP-1:  $187.6 \pm 9.2$ , F(3,53) = 9.879, P < .001] and increase in sleeping time [control:  $2001 \pm 185.3$ ; ripIII-25:  $2756.5 \pm 147.2$ , F(3,48) = 37.453, P < .05; DZP-1:  $4769.2 \pm 340.4$ , F(3,48) = 37.453, P < .001].

### 3.6. Forced swimming test

In this test (Fig. 7), animals treated with both doses of riparin III showed decreases in their immobility times [control:  $96.8 \pm 6.9$ ; ripIII-25:  $66.6 \pm 6.8$ , F(3,40) = 23.912, P < .05; ripIII-50:  $51.3 \pm 7.2$ , F(3,40) = 23.912, P < .001].

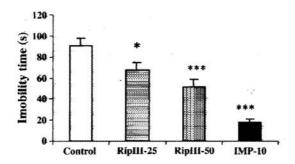


Fig. 7. Forced swimming of groups of mice which received vehicle, riparin III (25 and 50 mg/kg) and imipramine (10 mg/kg). The figure shows immobility time (s). The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Significant difference compared with control (\*P<.05; \*\*\*P<.001). ANOVA and Tukey as the post hoc test.

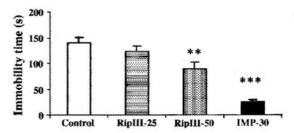


Fig. 8. Tail suspension test of groups of mice which received vehicle, riparin III (25 and 50 mg/kg) and imipramine (30 mg/kg). The figure shows immobility time (s). The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Significant difference compared with control (\*\*P<.01; \*\*\*P<.001). ANOVA and Tukey as the post hoc test.

Similarly, animals treated with imipramine 10 mg/kg, as expected, showed a decrease in the immobility time [IMP-10:  $18.1 \pm 2.7$ , F(3.40) = 23.912, P < .001].

### 3.7. Tail suspension test

Fig. 8 shows that riparin III 50 mg/kg reduced in 64% the immobility time [control:  $140 \pm 10.8$ ; ripIII-50:  $90.2 \pm 11.0$ , F(3,39) = 27.494, P < .01] similar to imipramine 30 mg/kg [IMP-30:  $26.2 \pm 4.6$ , F(3,39) = 27.494, P < .001], as compared to control.

### 4. Discussion

In this work, the effects of riparin Ill from A. riparia were studied in several animal models, such as open-field, rotarod, EPM, hole board, barbiturate-induced sleeping time, tail suspension and forced swimming tests to evaluate its possible central activity. These tests are classical models for screening central nervous system actions providing information about psychomotor performance, anxiety, myorelaxant activity and depression.

The effects of riparin III in the central nervous system were evaluated by the potentiation of sodium pentobarbital sleeping time. Decrease in sleeping latency and increase in sleeping time are classically related to central nervous system depressant drugs (Williamson et al., 1996). However, this test is not specific because compounds that interfere with biotransformation of pentobarbital by cytochrome P450 complex can show the same effects as central nervous system depressant drugs (Goloubkova et al., 1998). Our results showed that riparin III, in both doses, decreased the sleeping latency time and with the dose of 25 mg/kg, increased the sleeping time, suggesting a potentiation of pentobarbital sleeping time. Although riparin III 50 mg/kg presented lower absolute value as compared to the dose of riparin 25 mg/kg, there was no significant difference between them. Thus, we assume that the maximum effect of riparin III on the sleeping time was already produced by the dose of 25 mg/kg.

The EPM test is the most popular test to search for new benzodiazepine-like anxiolytic agents (Pellow et al., 1985; Rodgers et al., 1997). Similar to DZP, animals treated with riparin III (50 mg/kg) increased the number of entries in the open arms, reducing the animal's aversion to the open arms and promoting the exploration thereof, indicating anxiolytic effect. This effect was confirmed in the hole-board test which measures exploratory behavior (Crawley, 1985). An agent that decreases this parameter reveals a sedative behavior (File and Pellow, 1985). Anxiolytics have been shown to increase the number of head dips (Takeda et al., 1998). Our results showed that riparin III with both doses increased the number of head dips, indicating anxiolytic effect.

On the basis of the clinical association of depressive episodes and stressful life events, many of the animal models for the evaluation of antidepressant drug activity assess stress-precipitated behaviors. The two most widely used animal models for antidepressant screening are the forced swimming and tail suspension tests. Although the relationship between immobility (a posture thought to reflect a state of "behavior despair" in which animals have given up the hope to escape) and depression remains controversial (Gardier and Bourin, 2001), it is well demonstrated that drugs with antidepressant activity reduce the time during which the animals remain immobile (Porsolt et al., 1977; Borsini and Meli, 1988). In our results, a significantly reduced immobility time for mice in both tests was observed, although to a smaller extent, in the tail suspension test. These behavior effects are similar to those that we and other investigators have observed after treatment with a classical antidepressant drug, such as imipramine (Porsolt et al., 1977; Borsini and Meli, 1988).

Data in the literature demonstrated that drugs that alter general motor activity may give false-positive/negative results in the forced swimming test. In this way, we decided to study the effects of riparin III in the open-field test, a classical animal model used to evaluate autonomic effects of drugs and general activity of animals (Novas et al., 1988). Our findings show that riparin III (25 and 50 mg/kg) and DZP (1 mg/kg) did not change the locomotor activity, different from DZP at the dose of 2 mg/kg, which decreased the number of crossings. Thus, the present study demonstrated that riparin III, at doses which produced antidepressant- and anxiolytic-like effects, did not significantly change motor activity in naive mice. Therefore, it is unlikely that these effects of riparin III observed in the forced swimming and plus-maze tests are based on the stimulation of general motor activity. Furthermore, this compound did not alter the time of permanence on the bar in the rotarod test, differently from DZP (2 mg/kg), which decreased this parameter. The failure of riparin III in the motor coordination test is suggestive that the activity of the substance might not be exerted through peripheral neuromuscular blockage, but rather, elicited centrally. Thus, together, these experiments support the idea that riparin III plays a major role in depression and anxiety with antidepressant- and anxiolytic-like properties.

As far as we know, there are no studies in the literature on the central actions of riparin III. However, riparin III is an N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, and previous data showed that the spectrum of tyramine actions are similar to those of norepinephrine. In fact, some reports related that tyramine-rich foods when ingested by individuals taking antidepressant drugs, such as monoamino oxidase inhibitors, might result in a prolonged increase in blood pressure (Potter and Hollister, 1998). Another work reported that p-synephrine has an antidepressant-like activity in murine models of forced swimming and tail suspension tests (Kim et al., 2001). Furthermore, these points must be taken into consideration concerning the antidepressant effects of riparin III.

In conclusion, we showed that acute treatment with riparin III (25 and 50 mg/kg) potentiated the barbiturate-induced sleeping time and presents antidepressant-like effect as demonstrated in the forced swimming and tail suspension tests and also presents anxiolytic-like effect in the plus-maze and hole-board tests.

### References

- Archer J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. Anim Behav 1973;21:205-35.
- Barbosa-Filho JM, Yoshida M, Gottlieb OR, Barbosa R.C.S.B.C., Giesbrecht AM, Young CM. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. Phytochemistry 1987; 26:2615-7.
- Barbosa-Filho JM, Yoshida M, Gottlieb OR. The tyramines of Aniba riparia: transformation into models of natural products. Ver Latinoamr Quim 1990;21:5-7.
- Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? Psychopharmacology (Berl.) 1988;94:147–60.
- Castelo Branco UJV. Estudos Farmacológicos do Éter Metilico de N-(2,6-dihydroxibenzoyl)-tyramine. MSc Thesis, Universidade Federal da Paraiba, Brazil; 1992.
- Castelo Branco UJV, Thomas G, Araújo CC, Barbosa-Filho JM. Atividade espasmolítica de benzamidas isoladas de Aniba riparia (Parte 1). Resume VI Reunião Anual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental. FESBE, 1991. p. 302 [Abstr. 6-69].
- Castelo-Branco UV, Castelo-Branco UJV, Thomas G, Araújo CC, Barbosa-Filho JM. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). Acta Farm Bonaer 2000;19(3):197-202.
- Clark G, Koster AG, Person DW. Psychopharmacology 1971;20:169-71.
  Crawley JN. Exploratory behaviour models of anxiety in mice. Neurosci Behav Rev 1985;9:37-44.
- Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. J Am Pharm Assoc 1957;46:208.
- File S, Pellow S. The effect of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and on the hole-board. Br J Pharmacol 1985;86:729-35.
- Gardier AM, Bourin M. Appropriate use of "knockout" mice as models of depression or models of testing the efficacy of antidepressants. Psychopharmacology (Berl.) 2001;153:393-4.
- Goloubkova TD, Heckler E, Rates SMK, Henriques JAP, Henriques AT. Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from Helietta apiculata markedly potentiate the hypnotic action of pentobarbital. J Ethnopharmacol 1998;60:141-8.

- Kim WK, Kim HD, Jung JS, Woo RS, Kim HS, Suh HW, et al. Characterization of antidepressant-like effects of p-synephrine stereoisomers. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2001;364:21-6.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psycopharmacology 1987;92:180-5.
- Novas ML, Wolfman C, Medina JH, De Robertis E. Proconvulsant and anxiogenic effects of *n*-butyl-β-carboline-3-carboxylate, on endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. Pharmacol Biochem Behav 1988;30:331-6.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods 1985;14:149-67.
- Porsell RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. Arch Int Pharmacodyn Ther 1977; 229:327-36.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jafre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. Eur J Pharmacol 1978; 47:339-79.
- Potter WZ, Hollister LE. Antidepressant agents. In: Katzung BG, editor. Basic and clinical pharmacology. 7th ed. Connecticut-EUA: Appleton & Lange; 1998. p. 483-95.

- Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety on ethological perspective. Braz J Med Biol Res 1997;30:289-304.
- Rolland A, Fleurentin J, Lanhers MC, Younos C, Misslin R, Mortier F, et al. Behavioural effects of the American traditional plant Eschscholzia californica: sedative and anxiolytic properties. Planta Med 1991;57:212-6.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. Psychopharmacology 1985;85: 367-70.
- Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behaviour in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. Eur J Pharmacol 1998;350:21-9.
- Thomas G, Castelo-Branco UJV, Barbosa-Filho JM, Bachelet M, Vargaftig BB. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, a constituent of Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae), in rat uterus, rabit aorta and guinea pig alveolar leucocyttes. J Pharm Pharmacol 1994;46:103-7.
- Wambebe C. Influence of some agents that affect 5-hydroxy-tryptamine metabolism and receptors on nitrazepam-induced sleep in mice. Braz J Pharmacol 1985;84:185-91.
- Willianson E, Okpako D, Evans FJ. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. Chichester: Wiley; 1996.



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Molecular Structure 753 (2005) 13-21

Journal of MOLECULAR STRUCTURE

www.elsevier.com/locate/molstruc

### Electronic and structural effects in muscular relaxants: Riparin I and Riparin III

A.D.S. Marques<sup>a,1</sup>, C. Zheng<sup>a</sup>, C.T. Lin<sup>a,\*</sup>, Y. Takahata<sup>b</sup>, M. Barbosa-Filho<sup>c</sup>, S.J.C. Gutierrez<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Northern Illinois University, DeKalb, IL 60115-2862, USA

<sup>b</sup>Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP: 6154, CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, CP: 5009, CEP: 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil

Received 11 January 2005; revised 6 June 2005; accepted 7 June 2005 Available online 19 July 2005

### Abstract

Two muscular relaxants (MR), methyl ethers of N-benzoyl tyramine (Riparin I) and N-(1,6-dihydroxybenzoyl) tyramine (Riparin III) were studied with X-ray diffraction (XRD), optical spectroscopy and semi-empirical calculations. The XRD data show that the C=O group in Riparin I is  $34^{\circ}$  out of plane from the closest benzene ring. The abinitio calculations using RHF/6-31G\* suggest that the dihydroxybenzoyl (DHB) group in Riparin III forms intramolecular hydrogen bond between the H of the O-H group and the O of the C=O group, and gives a relatively planar structure between DHB group and C=O group. The spectral analysis together with the excitation energy calculations using the ZINDO program showed that the absorption band at 309 nm in Riparin III, absence in Riparin I, is assigned to the  $\pi \rightarrow \pi^*$  transition associated mainly from the DHB. A long range charge-transfer (CT) transition, as the low-lying excited electronic state,  $S_1$  has been calculated for both relaxants involving the non-bonding electron on carbonyl and/or amine group and the antibonding orbitals of aromatic ring. The planar structure of Riparin III and its extensive electron delocalization may have an important role on the pharmacological action mode and on the potency this MR as compared to those of Riparin I.

### 1. Introduction

The methyl ethers of N-benzoyl tyramine and of N-(1,6-dihydroxybenzoyl) tyramine are named Riparin I and Riparin III, respectively. The molecular structure of Riparin I is shown in Fig. 1A as determined by X-ray diffraction (XRD) and that of Riparin III is shown in Fig. 1B as simulated by abinitio RHF/6-31G\* method. The molecular difference is a dihydroxybenzoyl (DHB) group in Riparin III and a benzoyl group in Riparin I. These molecules are isolated from the unripe fruit of the Aniba riparia, a Lauraceous popularly known as 'louro' that grows in the Humaitá region of the Amazon state, Brazíl and/or synthesized by Barbosa Filho et al. [1,2].

Riparin I and Riparin III have an antimicrobial activity. but the most important of their pharmacological actions are as a potent relaxant of the smooth muscles and skeletal muscles. Riparin III has been tested to be twice more potent as a muscular relaxant than the Riparin I [1,2]. The skeletal muscle is controlled by the central nervous system and works through electrical impulses from the brain or the spinal cord. The contraction mechanism of the skeletal muscle is less sensitive to drugs action than the smooth muscle. The smooth muscles are found in the internal organs of the human body and one of their functions is to control the blood vein's diameter. The drug which produces the relaxation of the smooth muscle, reduces the blood pressure, that may be useful in the hypertension treatment and atherosclerosis, and in reducing the risk of cardiovascular complications [3].

In spite of the pharmacological importance of these riparins, no study on the structure and activity relationship has been reported in literature. In this paper, we present the results of a comprehensive investigation of electronic structures of Riparin 1 and Riparin 111, including optical

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +1 815 753 6861; fax: +1 815 753 4802. E-mail address: ctlin@niu.edu (C.T. Lin).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Current Address: Departamento de Química, Universidade Federal da Paraiba, Campus I, CP: 5093, CEP: 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil.

<sup>0022-2860/\$ -</sup> see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.molstruc.2005.06.018

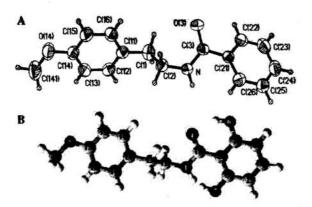


Fig. 1. Molecular structures: (A) Riparin I determined from XRD; the thermo-ellipsoids are drawn at 50% probability level, and (B) Riparin III simulated by abinitio and ZINDO calculations.

spectroscopy, X-ray diffraction, abinitio calculations using the RHF/6-31G\* method contained in the PC SPARTAN program [4] and semi-empirical calculations using the ZINDO program [5]. The electronic and structural properties of Riparin I and Riparin III will be correlated with the potency of the drugs and their possible action modes [6,7].

### 2. Experimental

### 2.1. Crystal growth

The samples of Riparin I and Riparin III were prepared by one of our collaborators in pure form for spectroscopic study, but to obtain a single crystal, they were recrystallized using a solvent mixture of methanol:water in a 2:1 volume ratio. The solutions were put in a small Erlenmeyer flask with a thin bottle-neck and sealed with a parafilm, on which a tiny hole was made for solvent to slowly evaporate. The attempt to obtain a good quality single crystal, for a reliable crystal structure determination by the x-ray diffraction, was successful only for Riparin I.

### 2.2. Spectroscopic and instrumentation techniques

Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 19 UV-vis spectrophotometer. The emission spectra were measured for Riparin I dissolved in ethanol and for Riparin III dissolved in methylcyclohexane (MCH) and ethanol. The samples were sealed in quartz ampoules and placed inside a liquid nitrogen optical Dewar at 77 K. The 313 nm band was selected from a 200 W Hg (Xe) lamp (Oriel Corp., Stratford, CT) and was used to excite the samples. The excitation wavelength was isolated using a 10-cm optical path length filter containing a NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O (200 g/L) solution, attached to a UG11 filter from Schott glass filter (Schott Technology, Inc., Duryear, PA). The emission spectra were detected by an EMI 9789QB

photomultiplier (Thorn EMI Gencom Inc. Fairfield, NJ) attached to a 1/2 m spectrometer (Jarrel-Ash Division/-Fisher Scientific Co., Waltham, MA).

For FTIR analysis, the samples of Riparin I and Riparin III were prepared in the optically transparent KBr pellets, and the spectra were recorded by using an ATI Mattson Genesis FTIR spectrometer.

All solvents used in this study are spectroscopic grade and were purchased from Aldrich Chemical Company (St Louis, MO), except for ethanol-dehydrated 200 proof that was purchased from Pharmeo products, Inc. (DSP-CT18 Brookfield, CT). Deionized and doubly distillated water was used to prepare the aqueous solutions.

### 3. Results and discussions

## 3.1. Crystallographic structure determination of the Riparin I

Several crystals of the Riparin I molecule were indexed on a Bruker SMART CCD diffractometer using 40 frames with an exposure time of 20 s per frame. All of them exhibited the same triclinic cell. One of them was used for data collection. A total of 2744 reflections were collected in the hemisphere of the reciprocal lattice of the triclinic cell, of which 1816 were unique with R(int) = 0.0238. An empirical absorption correction using the program SADABS was applied to all observed reflections. The structure was solved with the direct method using the SHELXS and SIR97 programs [8,9]; both programs yielded the same structure. Full matrix least square refinement on  $F^2$ was carried out using the SHELXTL program [8]. The final agreement factor values are R1 = 0.0737, wR2 = 0.1640 (I > $2\sigma$ ). The unit cell information and refinement details for Riparin I are reported in Table 1a. The atomic positions and equivalent isotropic displacement parameters are listed in Table 1b. Selected bond lengths and angles for Riparin I are listed in Table 1c.

The ORTEP plot of the structure of Riparin I is shown in Fig. 1A. The C=O group in the structure is not in the same plane of the closest benzene ring. It is 34.0° out of the plane. The two benzene rings on the opposite sides of the structure are also 71.74° rotation to each other. Each molecule makes a hydrogen bond with another one in an adjacent cell. The O-H contact is 2.16 Å and the O-H-N angle is 153.3°. The X-ray structure of Riparin I is used for simulating the molecular structure of Riparin III, and also for calculating the electronic structures of both Riparin I and Riparin III as will be described below.

### 3.2. Absorption spectra

Fig. 2 shows absorption spectrum of Riparin 1 in A and that of Riparin III in B, both dissolved in MCH at a concentration of  $1\times10^{-4}$  M. The spectrum 2A has four

Table 1a Crystal data and structure refinement for Riparin I

Empirical formula	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	
Formula weight	255.31	
Temperature	293(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P-1	
Unit cell dimensions	a=5.1508(13) Å	$\alpha = 99.156(4)^{\circ}$
	b = 8.175(2)  Å	$\beta = 95.395(4)^{\circ}$
	c = 16.321(4)  Å	$\gamma = 90.563(5)^{\circ}$
Volume, Z	675.3(3) Å <sup>3</sup> , 2	
Density (calculated)	1.256 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.083 mm - 1	
Index ranges	$-5 \le h \le 5$ , $-7 \le k \le 8$ ,	
	-17≤1≤17	
Reflections collected	2744	
Independent reflec- tions	1816 [R(int)=0.0238]	
Data/restraints/par- ameters	1816/0/190	
Goodness-of-fit on F2	1.272	
Final R indices [I> 2sigma(I)]	R1=0.0736, wR2=0.1640	
R indices (all data)	R1 = 0.0793, wR2 = 0.1678	

bands: the first band, P1, with a maximum at 284.6 nm (absorbance, 0.1613), the second band, P2, at 276.1 nm (0.2680), the third band, P3, at 226.8 nm (2.3278) and the fourth band, P4, at 202.5 nm (1.8350). The spectrum 2B has five bands: the first band, P1, with the maximum at 308.8 nm (absorbance, 0.3473), the second band, P2, at 283.1 nm (0.2228), the third band, P3, at 277.8 nm (0.2272), the fourth band, P4, at 249.1 nm (1.0877), and the fifth band, P5, at 220.2 nm (2.2963). The spectral band at 308.8 nm is new only for Riparin 111, and is absent (or very week) for

Table 1b Atomic coordinates ( $\times 10^4$ ) and equivalent isotropic displacement recompletes ( $\mathring{A}^2 \times 10^3$ ) for Riparin I

	x	y	z	U(eq)
N	8184(5)	2813(3)	4230(2)	46(1)
C(1)	7490(8)	1779(4)	5554(2)	54(1)
C(2)	8327(7)	3188(4)	5132(2)	48(1)
C(3)	5950(6)	2641(4)	3741(2)	41(1)
O(3)	3813(4)	2713(3)	4027(1)	57(1)
C(H)	8019(6)	2189(4)	6485(2)	45(1)
C(12)	10108(7)	1564(4)	6910(2)	51(1)
C(13)	10644(7)	1957(4)	7768(2)	52(1)
C(14)	9039(7)	3023(4)	8211(2)	49(1)
O(14)	9364(6)	3499(4)	9060(1)	71(1)
C(15)	6963(7)	3686(5)	7796(2)	55(1)
C(16)	6463(7)	3273(4)	6955(2)	53(1)
C(21)	6149(6)	2355(4)	2822(2)	40(1)
C(22)	4286(7)	1351(4)	2309(2)	52(1)
C(23)	4384(8)	1076(5)	1460(2)	65(1)
C(24)	6286(8)	1842(5)	1109(2)	62(1)
C(25)	8132(7)	2849(5)	1613(2)	60(1)
C(26)	8059(7)	3101(4)	2463(2)	51(1)
C(141)	11620(10)	2985(7)	9495(3)	83(2)

U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized  $U^{ij}$  tensor.

Table Ic Bond lengths (A) for Riparin I

N-C(3)	1.331(4)	C(14)-C(15)	1.374(5)
N-C(2)	1.450(4)	O(14)-C(141)	1.407(5)
C(D-C(II)	1.502(5)	C(15)-C(16)	1.361(5)
C(1)-C(2)	1.511(5)	C(21)-C(26)	1.377(4)
C(3)-O(3)	1.234(4)	C(21)-C(22)	1.382(5)
C(3)-C(21)	1.493(4)	C(22)-C(23)	1,375(5)
C(11)-C(12)	1.373(5)	C(23)-C(24)	1.373(6)
C(11)-C(16)	1.389(5)	C(24)-C(25)	1.371(5)
C(12)-C(13)	1.386(5)	C(25)-C(26)	
C(12) C(13)		1.374(5)	
C(13)-C(14)	1.375(5)		
C(14)-O(14)	1.372(4)		

Riparin I. All spectral bands observed in Fig. 2A and B were assigned to originate from  $\pi \rightarrow \pi^*$  transitions, and no spectral band was identified to originate from the  $n \rightarrow \pi^*$ transitions, presumably these weak  $n \rightarrow \pi^*$  transitions are hidden under the lowest energy, P1 band. It is noted that the spectral band in Fig. 2B for Riparin III has a slight redshifted in relation to the corresponding band in Fig. 2A for Riparin 1. The spectral red-shifted and the relative intensity changes of the observed bands in Fig. 2 are the characteristics of the  $\pi \rightarrow \pi^*$  transitions from the aromatic ring, and due mainly to the effects of the dihydroxysubstituents in Riparin III. As will be illustrated below the dihydroxybenzoyl (DHB) group in Riparin III forms an intramolecular hydrogen bond between the H of the O-H group and the O of the C=O group, and gives a relatively planar structure between DHB group and C=O group. The extended planar geometry of DHB relative to the C=O group in Riparin III is probably responsible for the observation of low energy band at 308.8 nm in spectrum 2B.

The absorption spectra of Riparin 1 and Riparin III dissolved in ethanol (polar solvent, not shown), at a concentration of  $1\times10^{-4}$  M, are also shown to have similar spectral characteristics of those in Fig. 2A and B (in MCH, non-polar solvent). The observation of no spectral shift on solvent polarity confirms that the spectral assignment of all spectral bands in Fig. 2A and B are the  $\pi\to\pi^*$  transitions in nature.

### 3.3. Molecular orbital calculations

The molecular geometry of Riparin I obtained by X-ray diffraction, as described in Section 3.1 and in Fig. 1A, is used for all molecular orbital calculations. Since the single crystal growth of Riparin III was not successful, thus the abinitio RHF/6-31G\* method was used to calculate the molecular structure of Riparin III. The crystallographic data of Riparin I was used as the starting structure, and was optimized for two hydroxyl groups substituted at 1 and 6 positions of the benzoyl group of Riparin III. The simulated molecular geometry of Riparin III is plotted in Fig. 1B.

Excitation energies of Riparin I and Riparin III were calculated by a singly excited configuration interaction

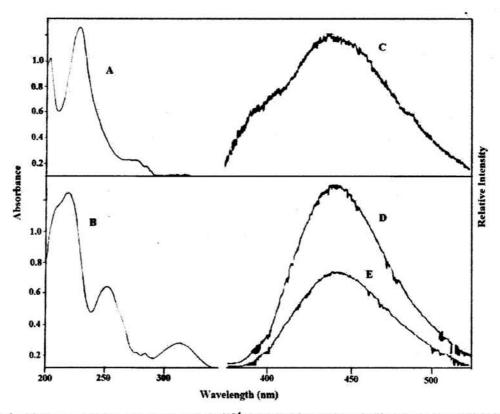


Fig. 2. Left: absorption spectra recorded at room temperature and in  $1 \times 10^{-4}$  M methylcyclohexane solution. (A) Riparin I and (B) Riparin III. Right: emission spectra recorded at 77 K and in  $1 \times 10^{-4}$  M solution. (C) Riparin I in ethanol, (D) Riparin III in ethanol, and (E) Riparin III in methylcyclohexane.

(SCI) using the ZINDO program. Spectra were simulated with SPECTRUM.C (Paul D. Soper, DuPont, Central Research & Development, E328/123, DUCOM 695-1757, ESVAX::SOPERPD, 1997), having a specified Gaussian lineshape, HWHM=5 nm. The calculated values of excitation energies (column 2) and oscillator strengths (f-values, column 3) for some low-lying electronic transitions of Riparin I and Riparian III are listed in Table 2. Only one or two most predominant configurations were listed for the assignments (column 6 of Table 2). Experimental transition energies (column 4 of Table 2) and absorbance (column 5 of Table 2) are also included for comparison.

In Fig. 2A, four absorption bands (P1, P2, P3, and P4) are observed for Riparin I dissolved in MCH. The P1 band is located in the longest wavelength and has an extremely low intensity. Fig. 3A plots the simulated UV-vis spectrum for Riparin I using the calculated spectral data listed in Table 2. The positions of the four observed bands are marked on top of the simulated spectrum. The simulated spectrum (Fig. 3A) seems to reproduce reasonably well for all principal spectral features of the observed bands (Fig. 2A) as far as the peak positions are concerned. However, the relative band intensity is not well reproduced.

Before we discuss the assignments of the observed absorption spectra for Riparins, we need to give a brief review on the electronic transitions of benzene molecule with  $D_{6h}$  symmetry. The highest occupied molecular orbitals (HOMO) of benzene are doubly degenerate  $\pi$ orbitals (e<sub>10</sub>). The lowest unoccupied molecular orbitals (LUMO) are doubly degenerate  $\pi^*$  orbitals (e<sub>2u</sub>). The lowlying electronic transitions in benzene are due to transitions from  $\pi(e_{1g})$  to  $\pi^*(e_{2u})$ . Three lowest electronic transitions in benzene are: 1B<sub>2u</sub> (forbidden) < 1B<sub>1u</sub> (forbidden) < 1E<sub>1u</sub> (allowed). The benzene rings in Riparin I and Riparin III should have a lower symmetry than  $D_{6h}$ . The degeneracy of  $\pi(e_{1g})$  and  $\pi^*(e_{2u})$  orbitals in benzene should be removed for the benzoyl groups in Riparins. The Riparins should have no degenerate  $\pi$  orbitals, however, the splitted  $\pi$ orbitals should retain their main characteristics of the degenerate  $\pi(e_{1g})$  and  $\pi^*(e_{2u})$  orbitals in benzene. The five highest occupied molecular orbitals (HOMOs) in Riparin I are all shown to have the  $\pi$  character, while the five lowest unoccupied molecular orbitals (LUMOs) are all shown to contain the  $\pi^*$  character localized either in the paramethoxybenzene (pMB) or benzoyl (B) ring. The ascending order of orbital energy in Riparin I is following:  $\pi_{N,Ox}$ 

Table 2
Excitation energies (in eV) and oscillator strengths (f-values) of some low-lying electronic transitions of Riparin II and Riparin III, calculated by ZINDO and compared with the observed UV absorption spectra

Transitions (singlet)	Energies (eV)	f-values	Observed	Absorb.	Assignments	
Riparin I		SE 19413311			100	
S <sub>1</sub> (n,π*)	3.656	0.0016	=	_	nonceth nn> TB*	
$S_2(\pi,\pi^*)$	4.457	0.0352	4.356 (PI)	0.1613	$2\pi_{pMB} \rightarrow 1\pi_{pMB}*/1\pi_{pMB} \rightarrow 2\pi_{pMB}*$	
S <sub>3</sub> (π,π*)	4.657	0.0068	4.491 (P2)	0.2680	$1\pi_B \rightarrow 1\pi_B^*/2\pi_B \rightarrow 2\pi_B^*$	
$S_4(\pi,\pi^4)$	5.414	0.5539	5.467 (P3)	2.3278	$2\pi_{pMB} \rightarrow 2\pi_{pMB}^*$	
S <sub>5</sub> (π,π*)	5.538	0.1822	5.467 (P3)	2.3278	$2\pi_B \rightarrow 1\pi_B^*$	
S <sub>6</sub> (π,π*)	5.943	0.0156	6.122 (P4)	1.8350	$2\pi_{\text{pMB}} \rightarrow 1\pi_{\text{B}}^*$	
S <sub>7</sub> (π,π*)	6.162	0.0058	6.122 (P4)	1.8350	2π <sub>pMB</sub> → p <sub>OCH3</sub> *	
S <sub>8</sub> (π,π*)	6.220	0.3436	6.122 (P4)	1.8350	$1\pi_{\text{pMB}} \rightarrow 2\pi_{\text{pMB}}^*$	
S <sub>9</sub> (π,π*)	6.235	0.6819	6.122 (P4)	1.8350	$2\pi_B \rightarrow 2\pi_B */1\pi_B \rightarrow 1\pi_B *$	
$S_{10}(\pi,\pi^*)$	6.306	0.9567	6.122 (P4)	1.8350	$1\pi_B \rightarrow 2\pi_B^*$	
S <sub>11</sub> (π,π*)	6.419	0.3386	6.122 (P4)	1.8350	$1\pi_{\text{pMB}} \rightarrow 1\pi_{\text{pMB}}^*$	
$S_{12}(\pi,\pi^*)$	6.424	0.5994	6.122 (P4)	1.8350	$\pi_{O(C=0)} \rightarrow 1\pi_B*2/\pi_{phiB} \rightarrow 1\pi_B*$	
Riparin 3						
S <sub>1</sub> (n,π*)	3.644	0.0017	1 <del>-</del>	-	noxc=ornn→1πoha*	
$S_2(\pi,\pi^*)$	4.146	0.0750	4.015 (PI)	0.3473	$2\pi_{DHB} \rightarrow 1\pi_{DHB}^{*}$	
S <sub>3</sub> (π,π <sup>2</sup> )	4.461	0.0330	4.379 (P2)	0.2228	$2\pi_{pMB} \rightarrow 1\pi_{pMB}*/1\pi_{pMB} \rightarrow 2\pi_{pMB}*$	
-	-	-	4.474 (P3)	0.2272		
S4 (n,n*)	4.934	0.2087	4.977 (P4)	1.0877	$I\pi_{DHB} \rightarrow I\pi_{DHB}^*$	
S <sub>5</sub> (π,π*)	5.446	0.4588	5.632 (P5)	2.2963	$2\pi_{\text{pMB}} \rightarrow 2\pi_{\text{pMB}}^*$	
S <sub>6</sub> (π,π*)	5.599	0.5103	5.632 (P5)	2.2963	2π <sub>DHB</sub> →2π <sub>DHB</sub> *	
S <sub>7</sub> (π,π*)	5.659	0.2488	5.632 (P5)	2.2963	Iπ <sub>DHB</sub> → 2π <sub>DHB</sub> */2π <sub>DHB</sub> → Iπ <sub>DHB</sub> *	

The compounds were dissolved in methylcyclohexane  $(1 \times 10^{-4} \text{ M})$ .

 $\begin{array}{l} 1\pi_{B}\!<\!2\pi_{B}\!<\!1\pi_{pMB}\!<\!2\pi_{pMB}\,(HOMO)\!<\!1\pi^{*}_{B}\,(LUMO)\!<\\ 2\pi^{*}_{B}\!<\!1\ \pi^{*}_{pMB}\!<\!2\pi^{*}_{pMB}\!<\!\pi^{*}_{N,Ox}. \text{ The }\pi_{N,Ox}\text{ orbital is localized on both N and O atoms. The }1\pi_{B}\text{ and }2\pi_{B}\text{ orbitals are the splitted }\pi\text{ orbitals that originate from the }\pi(e_{1g})\text{ in the benzoyl ring. The }1\pi_{pMB}\text{ and }2\pi_{pMB}\text{ orbitals are the splitted }\pi\text{ orbitals that originate from the }\pi(e_{1g})\text{ in the pMB ring. The }1\pi^{*}_{B}\,(LUMO)\text{ and }2\pi^{*}_{B}\text{ orbitals are the splitted }\pi^{*}\text{ orbitals that originate from the }\pi^{*}(e_{2u})\text{ in the benzoyl ring. The }1\pi^{*}_{pMB}\text{ and }2\pi^{*}_{pMB}\text{ orbitals are the splitted }\pi^{*}\text{ orbitals that originate from the }\pi^{*}(e_{2u})\text{ in the pMB ring.} \end{array}$ 

The observed peaks (P1, P2, P3, and P4) in the UV spectrum of Riparin I are all due to the electronic transitions between  $\pi$  and  $\pi^*$  orbitals. The tentative assignments for the observed absorption peaks are listed in the column 6 of Table 5. The lowest singlet transition  $S_1$   $(n,\pi^*)$  was calculated at 339 nm (3.656 eV, with a very low f-value of 0.0016. The  $S_1$   $(n,\pi^*)$  is a forbidden  $(n_{O(C}=_{O)},n_N)\to\pi_B^*$  type transition that has not been identified in both simulated and observed spectra.

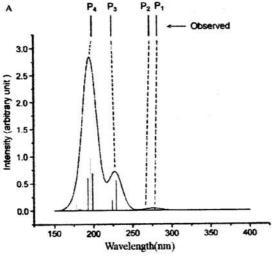
The absorption spectrum of Riparin III dissolved in MCH is recorded in Fig. 2B that composes of five bands, P1, P2, P3, P4 and P5. The P1 peak locates in the longest wavelength at 308.8 nm. The bottom half of Table 2 lists the excitation energies, oscillator strengths (f-values), and possible assignments for some low-lying electronic transitions of Riparin III. The experimental transition energies and absorbance recorded in Fig. 2B are tabulated in column four and column 5 of Table 2, respectively. Fig. 3B shows a simulated spectrum of Riparin III by using the spectral data listed in Table 2. The positions of the five observed peaks

are labeled in the simulated spectrum for comparison. It is noted that both peak position and relative peak intensity of the simulated spectrum have reproduced fairly well for those principal features of the observed spectrum. The five highest occupied molecular orbitals in Riparin III are all have  $\pi$  character, while the five lowest unoccupied molecular orbitals are all have  $\pi^*$  character localized in either the pMB or DHB group. The ascending order of orbital energy in Riparin III is calculated as following:  $\pi_{\text{N,Ox}} < 1\pi_{\text{DHB}} < 1\pi_{\text{pMB}} < 2\pi_{\text{DHB}} < 2\pi_{\text{pMB}}$  (HOMO)  $< 1\pi_{\text{DHB}}^*$  (LUMO)  $< 2\pi_{\text{DHB}}^* < 1\pi_{\text{pMB}}^* < 2\pi_{\text{pMB}}^* < \pi_{\text{N,Ox}}^*$ .

The lowest singlet transition  $S_1$  (n, $\pi^*$ ) in Riparin III was calculated at 340 nm (3.6437 eV), having a very low f-value of 0.0017 that originates from a forbidden  $n_{O(C}=_{O)},n_N\to 2\pi_{DHB}^*$  type transition. It is similar to Riparin I, the  $S_1$  (n, $\pi^*$ ) transition in Riparin III is not shown in the simulated spectrum (Fig. 3B) or visible in the observed spectrum (Fig. 2B). The ordering of the four highest occupied molecular orbitals (HOMO) in Riparin I is  $1\pi_B < 2\pi_B < 1\pi_{pMB} < 2\pi_{pMB}$ , whereas the ordering is  $1\pi_{DHB} < 1\pi_{pMB} < 2\pi_{DHB} < 2\pi_{pMB}$  in Riparin III. There is a clear difference in the ordering of HOMOs in Riparin I and Riparin III that should be the principle cause for the observed difference in the UV spectra 2A and 2B.

The HOMO, LUMO orbital energies and the dipolar moments for the Riparin I and Riparin III are calculated by abinitio RHF/6-31G\* method, and the values are (-8.093, 2.989 eV and 4.678 D) and (-8.257, 2.819 eV and 4.312 D), respectively. The energy of formation (or heat of formation) of Riparin I and Riparin III was also obtained





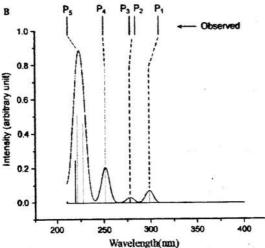


Fig. 3. Simulated absorption spectra using excitation energies and oscillator strength calculated by ZINDO. (A) Riparin I with four peaks observed (PI-P4). (B) Riparin III with five peaks observed (PI-P5). The observed peaks are identified on the top of the figure.

as -820.0 and -969.7 a.u., respectively. The more negative heat of formation for Riparin III suggests that two hydroxy groups substituted at the 1,6-dihydroxybenzoyl ring in Riparin III have stabilized the molecule. The question is what are the driving forces for the molecular stabilization in Riparin III? The answer may be related to the atomic charges and the formation of inter- or intramolecular hydrogen bonds. The calculated atomic charges for (Riparin I, Riparin III) are: O(-0.7268, -0.7588) for the oxygen atom in C=O group; N(-0.8193, -0.7588) and N-H group; and O(-0.6090, -0.6085) for the oxygen atom in methoxy group. Two O-H groups in Riparin III

have the calculated atomic charges as follows: O(-0.7616) and H(0.5401) for the first group which is closer to the C=O group; and O(-0.7637) and H(0.5123) for the second group. The results on the atomic charge distributions indicate that the favorable sites for the formation of intermolecular hydrogen bonds in Riparin 1 are the C=O and N-H groups, whereas those for the formation of intra-molecular hydrogen bonds in Riparin III are the C=O group and the O-H groups of the 2,6-dihydroxybenzoyl ring. The distances of intramolecular hydrogen bond (O-H···O=C) for Riparin III were also calculated as 1.809 Å for the O-H bond and 2.765 Å for the H···O bond that are shown to be very close to the standard experimental values: 1.72 and 2.72 Å [10].

Both Riparin I and Riparin III contain two aromatic rings. One ring (labeled C14-C19 in Table 3) is linked to a para-methoxy group (pMB) that is common for both Riparins. The other ring (labeled C1-C6 in Table 3) gives a principle difference between Riparin I and Riparin III that two hydroxyl groups are substituted at C1 and C6 positions of the ring (referred to as DHB) for Riparin III. The atomic charges for both aromatic rings were calculated and listed in Table 3. For pMB ring, the calculated atomic charges for C14-C19 are quite similar in Riparin 1 as compared to those in Riparin III. For DHB ring, on the other hand, the atomic charges of C1-C6 are calculated to be quite different for Riparin III as compared to those for Riparin I. For Riparin III, the substitution of two hydroxyl groups at the C1 and C6 positions has promoted a change in sign and magnitude of atomic charges at these two carbon positions:  $-0.2050 \rightarrow +0.4942$  for C<sub>1</sub> and  $-0.1712 \rightarrow +0.4516$ for C6. In addition, other carbon atoms display an increase of negative charges in DHB ring as compared to those in benzene ring. The favorable charge distributions provide the driving force for the formation of intramolecular hydrogen bonds between the C=O and two O-H groups in Riparin III. The intramolecular hydrogen bond formation in Riparin III has placed the aromatic ring of the DHB and the C=O group on almost the same plane.

Table 3

Atomic charges calculated by abinitio method using model RHF/6-31G\*

	Atom	Riparin I charge	Riparin III charge
Benzene ring in	CI4	-0.0863	-0.0901
p-methoxy group	CIS	0.3780	0.3805
, , , ,	C16	-0.1897	-0.1894
	C17	-0.1894	-0.1880
	C18	-0.3280	-0.3277
	C19	-0.2736	-0.2736
Benzene ring in 1,	CI	-0.2050	0.4942
6-dihydroxyben-	C2	-0.2320	-0.3638
zoyl group	C3	-0.1653	-0.3736
	C4	-0.2335	-0.3575
	CS	-0.2033	-0.1210
	C6	-0.1712	0.4516

#### 3.4. Emission spectra

The lowest singlet excited state for Riparin 1 was calculated, using abinitio RHF/6-31G\* method, to be a S1  $(n,\pi^*)$  at 339 nm (f-value=0.0016) originated from a  $(n_{O(C}=_{O(n_N)}) \rightarrow \pi_B^*$  type transition. Similarly, the lowest singlet transition  $S_1$  (n, $\pi^*$ ) in Riparin III was calculated at 340 nm (f-value = 0.0017) and originated from a  $n_{O(C}=0)$ ,  $n_N \rightarrow 2\pi_{DHB}^*$  type transition. The S<sub>2</sub>  $(\pi,\pi^*)$  transition for Riparin I was calculated at 278 nm and originated from the  $2\pi_{pMB} \rightarrow 1\pi^*_{pMB}$  and  $1\pi_{pMB} \rightarrow 2\pi^*_{pMB}$  of the pMB. Differently, the  $S_2$   $(\pi,\pi^*)$  transition for Riparin III was calculated at 299 nm and originated from the  $2\pi_{DHB}$   $\rightarrow$ 1πDHB\* transition in the DHB functional group. Based on the calculated electronic states, if the major contribution of the emitting state of Riparins is  $S_1$  (n, $\pi^*$ ), then the observed fluorescence should be located at a similar emission wavelength. Likewise, for a  $S_2$   $(\pi,\pi^*)$  transition as an active emitting state, then the fluorescence band of Riparin I should be observed at ~21 nm in the blue from that of Riparin III. Riparin I does not emit when dissolved in MCH, however, when dissolved in ethanol  $(1 \times 10^{-4} \text{ M})$  it displays a weak emission at 77 K as shown in Fig. 2C. No phosphorescence was observed in Fig. 2C, and the weak fluorescent spectrum of Riparin I is a broad band extending from ~370 to ~540 nm, with a band maximum at ~437 nm. In ethanol solution, Riparin I and ethanol can form intermolecular hydrogen bonds that induce the emission. Fig. 2D and E shows the 77 K emission spectra of Riparin III at a 1×10<sup>-4</sup> M concentration in ethanol and MCH, respectively. The fluorescence spectrum in Fig. 2D is a broad band that goes from ~390 to ~520 nm, with the maximum at ~440 nm. In Fig. 2E, the fluorescence spectrum is extended from ~390 to ~525 nm, with the maximum situated at ~440 nm. No phosphorescence was observed in both spectra 2D and 2E. The only difference between spectra 2D and 2E is that the fluorescence band for Riparin III dissolved in ethanol (Fig. 2D) is narrower and more intense in relation to that dissolved in MCH (Fig. 2E). No fluorescence shift was observed in spectra 2D and 2E, where a band maximum at ~440 nm was displayed for Riparin III dissolved in a non-polar solvent, MCH as well as in a polar solvent, ethanol. This observation suggests that Riparin III prefers to form the intramolecular hydrogen bond instead of the intermolecular hydrogen bond with ethanol solvent. Since Riparin I and Riparin III show a similar emission spectral maximum, ~437 nm in spectrum 2C and ~440 nm in Spectrum 2D, the major contribution of the emitting state of Riparins should be a  $S_1$  (n, $\pi$ \*) state in nature as discussed in previous paragraph. The electronic nature of the  $S_1$  (n, $\pi^*$ ) emitting state in Riparins is a long range charge-transfer (CT) transition from a non-bonding (n) orbital in C=O and N-H groups to a  $\pi^*$  orbital in benzene (for Riparin I) and in DHB (for Riparin III). The solvent effects on the emitting properties of Riparins probably result from the perturbation of the nearby S2  $(\pi,\pi^*)$  state [11]. In Riparin III, the nearby  $S_2(\pi,\pi^*)$  state is at 299 nm and originated from DHB ring, whereas that in Riparin I is at 278 nm and originated from pMB ring. The 1,6-dihydroxy groups in DHB ring of Riparin III facilitate the formation of intramolecular hydrogen bonds between -C=O and H-O- of DHB ring, and result in a near planar structure between DHB group and C=O group. It is evident that the photoactive groups for Riparin III are the DHB, the C=O and the N-H chromophores, where the aromatic ring in DHB is almost coplanar with the C=O group. On the other hand, the photoactive groups for Riparin I are the pMB, the benzoyl (B), the C=O and the N-H chromophores, where the benzoyl ring is aligned in 34.0° from the C=O group.

#### 3.5. Infrared spectra

Fig. 4 shows the transmission FTIR spectra of Riparin I (spectra B and A) and Riparin III (spectra D and C) prepared in KBr pallets. The spectra are relatively complex, thus only the molecular vibrations for the functional groups (-C=O, N-H and O-H) will be examined. These active groups are mainly responsible for the formation of the intra- and inter-molecular hydrogen bonds in Riparins. Spectrum 4B shows a C=O vibration band at ~1638.6 cm<sup>-1</sup> for Riparin I, indicated by an arrow; the same vibration mode at 1637.7 cm<sup>-1</sup> for Riparin III has almost disappeared in the spectrum 4D. A spectral band at ~3325 cm<sup>-1</sup> in Fig. 4A and at ~3346.9 cm<sup>-1</sup> in Fig. 4C were assigned to the stretching vibration of N-H group in Riparin I and Riparin III, respectively. This vibration mode does not show to have a significant effect upon the 1,6-dihydroxy substitution on the benzoyl ring in Riparins. The broad band at ~3463.2 cm<sup>-1</sup> observed in Fig. 4C is assigned to the vibration mode of O-H stretching, resulting from a strong intramolecular hydrogen bonding with the carbonyl group in Ripain III. This spectral band is not observed for Riparin 1 as shown in Fig. 4A. An almost disappearance of the vibration mode v(C=O) at 1637.7 cm<sup>-1</sup> in spectrum 4D and the appearance of a new broad band at 3463.2 cm<sup>-1</sup> in spectrum 4C are due to the formation of intramolecular hydrogen bond between the group O-H in DHB ring and the group C=O. The formation of intramolecular hydrogen bond in Riparin III gives a coplanar structure between the DHB ring and the C=O group, whereas the C=O group in Riparin 1 is 34.0° out of the plane from the closest benzene ring.

#### 4. Conclusions

The photophysical properties of two muscular relaxants Riparin 1 and Riparin III have been investigated experimentally and theoretically. The molecular

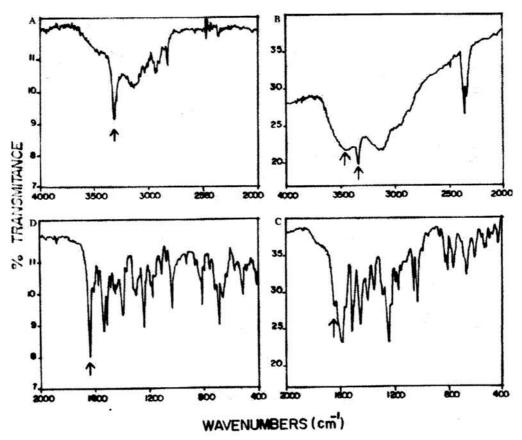


Fig. 4. FTIR spectra recorded in KBr pellet. Riparin 1-(A) and (B); Riparin III-(C) and (D).

structures and electronic properties for both excited and ground states of Riparins are obtained. The molecular structure of Riparin I was determined by XRD, and showed that the C=O group lies in 34.0° out of plane from the benzoyl ring. Based on the experimental structure of Riparin 1, the molecular structure of Riparin Ill was simulated by abinitio RHF/6-31G\* method, and an almost co-planar between the DHB ring and the C=O group was obtained. The formation of intramolecular hydrogen bond between the O-H group of the DHB ring and the group C=O in Riparin III was further illustrated from the FTIR spectral analysis. The active functional groups, C=O, N-H, O-H in DHB ring and in pMB of Riparins are responsible for the observed long range charge-transfer  $n \rightarrow \pi^*$  transition in emission and  $\pi \rightarrow \pi^*$ transition in absorption spectra. These electronic properties may act as the driving forces for pharmacological action and biologic activity of Riparins as muscular relaxants. The fact that Riparin III is a more potent muscular relaxant than Riparin I may be associated to the extended planar structure and more electron negative in DHB ring in Riparin III as compared to those in Riparin

 A planar structure of Riparin III could facilitate the drug's permeability in the biologic membrane and increases its biologic activity.

#### Acknowledgements

A.D.S.M. would like to thank CNPq, (Brazil), for Postdoctoral Fellowship CNPq—#200008/87-0(PR).

#### References

- G. Thomas, J.V. Castelo Branco, J.M. Barbosa Filho, M. Bachelet, B. B. Vargaftig, J. Pharm. Pharmacol. 46 (1994) 103-107.
- [2] U.V. Castelo Branco, U.J.V. Castelo Branco, G. Thomas, C.C. Araújo, J.M. Barbosa-Filho, Acta Farm. Bonaerense 19 (3) (2000) 197-202.
- [3] (a) D.L. Nelson, M.M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, third ed., Worth Publisher, 2000;
  - (b) J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry, fifth ed., W. H. Freeman, New York, 2002.

- [4] P.C. Spartan Pro, version 1.01, Wavefunction, Inc., 18401 Von Karman Ave, Suite 370, Irvine, CA 92612.
- [5] M.C. Zemer, Semi empirical molecular orbital methods in: K.B. Lipkowitz, D.B. Boyd (Eds.), Reviews of Computational Chemistry, VCH Publishing, New York, 1991, p. 313.
- [6] A.D.S. Marques, Y. Takahata, J.R.L. Junior, M.C. Souza, S.S. Simões, W.M. Azevedo, G.F. de Sà, J. Lumin. 97 (2002) 237–249.
- [7] S.F. Chien, F.S. Yen, C.P. Chang, C.T. Lin, J. Phys. Chem. 99 (1995) 17442.
- [8] G.M. Sheldrick, SHELXTL. Version 5.1, Bruker Analytical Instruments, Inc., Madison, WI, 1997.
   [9] A. Altomare, M.C. Burla, M. Camalli, G.L. Cascarano, C.
- [9] A. Altomare, M.C. Burla, M. Camalli, G.L. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A.G.G. Moliterni, G. Polidori, R. Spagna, J. Appl. Crystallogr. 32 (1999) 115–119.
- [10] S.N. Vinogradov, R.H. Linnell, "Hydrogen Bonding", Van Nostrand Reinhold, New York, 1971.
- [11] T.-I. Lai, B.T. Lim, E.C. Lim, J. Am. Chem. Soc. 104 (1982) 7631–7635.

241

## FF029 - ANTICONVULSANT PROPERTIES OF RIPARIN I (RIP I) AND RIPARIN III (RIP III) FROM ANIBA RIPARIA (NEES) MEZ (LAURACEAE) IN MICE

ANDREISA PAIVA MONTEIRO(IC)<sup>1</sup>; CARLA THICIANE V. MELO(PG)<sup>1</sup>; CAROLINE P. LEITE(IC)<sup>1</sup>; FRANCISCO EVANDO RODRIGUES FILHO(IC)<sup>1</sup>; STANLEY GUTIERREZ(PG)<sup>2</sup>; JOSÉ MARIA BARBOSA FILHO(PQ)<sup>2</sup>; FRANCISCA CLÉA F. SOUSA(PQ)<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup>Federal University of Ceara; <sup>(2)</sup>Federal University of Paraiba, Brazil

Introduction: Rip I (methyl ethers of N-benzoyl tyramine) and Rip III (N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine) have been isolated from *Aniba riparia*. Objective: Study the effects of rip I and III on pentilenetetrazole (PTZ)-induced convulsions and rotarod test in mice. Methodology: Male Swiss mice (20-30g) were treated with rip I and III, 25 and 50 mg/kg, i.p. Controls received safine. Results: Values represent mean±SEM number of animals in parenthesis. Rip I (25 and 50 mg/kg, i.p.) increased the latency to 1st convulsion [25=121.6±17.4(s)(8); 50=120.4±14.9(s)(8); c.=73.6±6.8(s)(10)], mortality time [25=567.5±119.3(s)(4); 50=706.0±97.1(s)(7); c.=418.0±45.3(s)(8) and survival [25=55.6%; 50=22.2%; c.=0%] as related to controls. Rip III increased lethal time [25=338.2±27.6(s)(10): 50=304.5±30.0(s)(10)] as related to control [220.5±18.3(s)(23)]. Diazepam, positive control increased all parameters observed. Rotarod test was unaltered. Conclusion: Rip I and III presents a protective effect in seizure and are devoid of myorelaxant effect (rotarod).

Financial support: CNPq

Supervisor: Francisca Cléa F. Sousa

# Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Riparinas sobre Cepas de Staphylococcus aureus e Escherichia coli Multirresistentes \*

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY ABOUT MULTIRESISTENTS SAMPLES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND ESCHERICHIA COLI

CATÃO, RAÍSSA MAYER RAMALHO"; BARBOSA-FILHO, JOSÉ MARIA"; GUTIERREZ, STANLEY JUAN CHAVEZ"; LIMA, EDELTRUDES DE OLIVEIRA LIMA";
PEREIRA, MARIA DO SOCORRO VIERA"; ARRUDA, THÚLIO ANTUNES"; ANTUNES, ROSSANA MIRANDA PESSON"

RESUMO - As alcamidas naturais constituem uma classe especial de alcalóide contendo uma função amida restrita a poucos constituintes na natureza. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da estrutura/atividade antimicrobiana de amidas isoladas de Aniba riparia (Nees) Mez. Lauraceae (riparinas I, III e XIII), sobre cepas multirresistentes de Staphylococcus aureus e Escherichia coli de origem humana. Constatou-se neste estudo que as riparinas, apesar de suas diferenças estruturais, apresentaram atividades antimicrobianas semelhantes. No entanto, a riparina III (O-Metil-N-(2,6-dihidroxibenzoil)-Tiramina) foi a que apresentou maior potencial animicrobiano. Todas as cepas de S. aureus, testadas, mostraram-se mais susceptíveis à ação das riparinas do que as cepas de E. coli. PALAVRAS-CHAVES - Atividade antimicrobiana, Aniba riparia, riparinas, S. aureus, E. coli.

SUMMARY - The natural alcamides compose a special class of alcaloide possessing amide function restricted to few component on nature. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial structural activity action of isolated amides de Aniba riparia (Ness) Mez Lauraceae (riparian I, III and XIII), multiresistents samples of Staphylococcus aureus and Escherichia coli of human origin. In this study was proved that riparian, although of its structure differences, presented similar antimicrobial activity. However, riparian III (O-methyl-N(2,6-dihydroxybenzoyl)-Tyramine) was the one to present the biggest antimicrobial potential. The tested samples of S. aureus, were shown more sensitive to the riparian action than the E.coli samples.

KEYWORDS - Antimicrobial activity, Aniba riparia, riparian, S. aureus, E. coli.

#### INTRODUÇÃO

A s primeiras evidências do uso de plantas com fins terapêuticos datam de 460 a.C. . No entanto, as primeiras informações sobre o uso sistemático de plantas como medicamentos datam da Índia Antiga (15.6).

No Brasil, assim como em vários outros países da América Latina, a fitoterapia constitui uma alternativa econômica quando relacionada aos medicamentos alopáticos. De modo que, nos últimos anos, a fitoterapia atingiu um notável crescimento, assim como, também, o estudo dos metabólitos secundários ou metabólitos especiais produzidos pelas plantas, os quais desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da química sintética. Sobre este prisma, a busca de novos compostos vegetais com ação antimicrobiana se apresenta como um modelo experimental, ecologicamente correto, para se produzir substâncias que sejam eficazes e menos agressivas ao meio ambiente e aos homens, contribuindo, assim, com a melhoria da qualidade de vida.

As alcamidas naturais constituem uma classe especial de alcalóides, contendo uma função amida restrita a poucos representantes na natureza.<sup>211</sup>. Através da descoberta de atividade antimicrobiana de amidas isoladas de Aniba riparia (Nees) Mez. Lauraceae, planta típica da região amazônica, da qual pode-se obter extratos dos frutos e dos cálices.<sup>213</sup>, despertou-se a curiosidade para verificar a potencialidade farmacológica destas amidas, isoladas e sintetizadas pela primeira vez no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - LTF da Universidade Federal da Paraíba.<sup>12, 23</sup>. Estas amidas foram denominadas riparinas em homenagem a planta.<sup>23</sup>. Entre outras ações farmacológicas estudadas, foi demons-

trado que as riparinas (14 alcamidas difrentes obtidas através de síntese orgânica - Ri até Ria), são capazes de induzir um efeito espasmolítico em íleo isolado de cobaia e em útero isolado de rata virgem<sup>(7. 8)</sup>, principalmente, devido à inibição de influxo de íons cálcio para o meio intracelular e da inibição da liberação dos estoques intracelulares de cálcio, não envolvendo a participação da geração de AMPc (30), e que apresentam um efeito hipotensor e bradicárdico transitório, devido a uma ação que parece envolver, principalmente, um componente de origem parassimpática a nível cardíaco (19). A riparina III apresenta efeito antidepressivo, quando administrada intraperitonealmente, em doses de 25 e 50 mg/Kg, em ratos (18). Sugere-se que o efeito da riparina III é dependente da presença exclusivamente do grupo hidroxila, no segundo anel aromático. A riparina I é diferente das demais por não apresentar, no segundo anel aromático, nenhum grupo substituinte, e a riparina XIII contém grupos metilas e hidroxilas dipostos em posições diferentes no segundo anel aromático (19).

O desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano vem sendo acompanhado de resistência bacteriana e a emergência de patógenos resistentes aos antimicrobianos é uma ameaça a esses avanços (34). O aparecimento de resistência resulta em diversos fatores, tais como: uso crescente e inadequado de antimicrobianos, procedimentos invasisos, grande número de hospedeiros susceptíveis e falhas terapêuticas, entre outros, ocasionando aumento da transmissão de organismos multirresistentes. Atualmente, muitas cepas são resistentes a quase todos antimicrobianos e a perspectiva de aparecimento de uma cepa resistente a todos os antimicrobianos constitui uma séria preocupação (17). A necessidade de encontrar novas substâncias com propri-

Recebido em 05/11/2004 Aprovado em 02/06/2005

\*\*CCBS/DF/UEPB-Campina Grande-PB; \*LTF/UFPB-João Pessoa-PB; \*CCS/UFPB-João Pessoa-PB; \*CCN/UFPB-João Pessoa-PB.

RBAC, vol. 37(4): 247-249, 2005

edades antimicrobianas para serem estudadas no combate a esses microrganismos representam um desafio no tratamento de infecções (16).

Vários são os mecanismos pelos quais os microrganismos podem escapar dos efeitos dos antimicrobianos, entre eles incluem-se: alteração da estrutura molecular dos antimicrobianos, produção de enzimas que inativam a droga, alteração das proteínas ligadoras da penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, mutações de permeabilidade e modificações ribossômicas <sup>(2)</sup>.

O objetivo deste experimento foi avaliar a ação da estrutura/atividade antimicrobiana "in vitro" dos seguintes fitoconstituintes ou substratos sintéticos: riparinas I, III e XIII, respectivamente: O-Metil-N-(benzoil)-Tiramina, O-Metil-N-(2,6-dihidroxibenzoil)-Tiramina e O-Metil-N-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-Tiramina), sobre cepas de Staphylococcus aureus e Escherichia coli de origem humana, por serem estes microrganismos, dentre vários outros, freqüentemente isolados em infecções que apresentam elevada resistência aos antimicrobianos.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

As riparinas (I, III e XIII) foram obtidas por sínteses, segundo a metodologia estabelecida no LTF/UFPB (2).

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de difusão em meio sólido, processo cavidadeplaca. As placas de Petri (90mm) contendo 20mL de ágar Mueller-Hinton, foram inoculadas pela técnica de espalhamento em superfície (10), com auxílio de "swabs" estéreis mergulhados na suspensão contendo o inóculo, eliminando-se o excesso de líquido por pressão nas paredes do tubo. O inóculo foi semeado sobre toda a superfície do ágar, de modo a se obter um crescimento confluente e uniforme. Em seguida, as placas foram colocadas para secar durante 3 a 5 minutos, antes de se realizar a perfuração das cavidades (6mm cada), com auxílio de perfuradores descartáveis estéreis.

Foram analisadas 26 cepas, sendo 12 de S. aureus e 14 de E. coli, isoladas de pacientes ambulatoriais, além de uma cepa de S. aureus ATCC 25925 (usada como contrele).

Em cada placa foram realizados 4 orifícios, sendo que, em 3 destes orifícios foram adicionados 50 µl da solução aquosa de riparina a ser testada, na concentração de 200mg/mL e um deles foi destinado ao controle negativo (solução aquosa de dimetil-sulfóxido (DMSO) a 2%). Todas as soluções dos fitoconstituíntes sintéticos (riparinas) foram previamente solubilizados em 2% de DMSO.

As placas foram incubadas a 35-37°C/24 horas e, após este período, observou-se a presença de halos de inibição de crescimento bacteriano, os quais, foram medidos em milimetros. Os ensaios foram realizados em duplicata, para cada cepa selecionada, e os resultados determinados pela média aritmética do tamanho dos halos de inibição.

#### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Considerou-se com a atividade antimicrobiana a presença de halo de inibição de crescimento de qualquer tamanho, por não existir um padrão de comparação dos resultados. Os tamanhos dos halos variaram de 7 a 20 mm tanto para as cepas de *S. aureus* quanto para as de *E. coli.* A solução aquosa de DMSO a 2%, utilizada como controle, não apresentou halo de inibição de crescimento para nenhuma das cepas testadas. O potencial antimicrobiano foi considerado semelhante pa-

ra as riparinas I, III e XIII, que inibiram 12/26 (45,2%), 14/26 (53,8%), e 11/26 (42,3%), respectivamente do total das cepas bacterianas analisadas (Tabela 1).

Tabela I

Demonstração da ação estrutura-atividade
antimicroblana de cepas bacterianas analisadas
frente à solução aquosa de riparinas

Substratos Sintéticos (200mg)	Nomenclators Químics	Estrutura Quimica	N° e % de Cepas Seusiveis
RIPARINA I	O-Metil-N- (benzoil)- Titamina		12/26 (46,2%)
RIPARINA III	O-Metil-N-(2,6 - dihidroxibenzoil) - Tiramina		14/26 (53,8%)
RIPARINA XIII	O-Metil-N- (3,4,5- Trimetoxibenzoil) - Firamina		11/26 (42,3%)

Consideramos que é necessário determinar a concentração inibitória mínima (CIM) destas substâncias frente aos microrganismos testados, para se poder conhecer melhor o percentual de inibição de crescimento bacteriano.

Comparando-se a sensibilidade apresentada pelas cepas analisadas frente as riparinas, observou-se que estas se mostraram mais eficazes frente aos S. aureus. As riparinas I e III apresentaram o mesmo percentual de atividade antimicrobiana, em relação às cepas de S.aureus testadas, no entanto em relação as cepas de E. coli, a riparina I apresentou um discreto aumento no percentual de atividade, quando comparada a riparina XIII. A riparina III foi a que apresentou melhor atividade antimicrobiana, ou seja, com halo de inibição de crescimento para 11 (91,7%) cepas de S. aureus e 3 (21,4%) cepas de E. coli (Figura 1). Esses resultados assemelham-se aos relatados por outros autores que também observaram melhor atividade antimicrobiana dos extratos hexânicos e clorofórmicos dos frutos e cálices de Aniba riparia, contra cepas de S.aureus, Bacillus cereus e Candida albicans, sendo pouco ativos para cepas de E.coli, Proteus sp. e Klebsiella pneumoniae

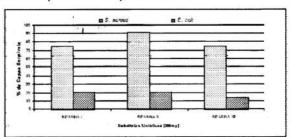


Figura 1. Comportamento diferencial das cepas de S. aureus e E. coli frente à solução aquesa de riparinas pré-solubilizadas em 2% de DMSO

Em relação ao perfil de sensibilidade destas cepas frente aos antimicrobianos usados rotineiramente na clínica médica, observou-se que os menos eficazes para as cepas de S. aureus testadas, foram: Penicilina, Ampicilina e Lincomicina, enquanto que para as cepas de E. coli foram: Tetraciclina, Ampicilina, Sulfametozasol-Trimetropim e Cloran-

fenicol. Observou-se que mesmo tratando-se de cepas multirresistentes a antimicrobianos, a maioria das cepas de S. aureus apresentou sensibilidade frente as riparinas.

#### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados observados neste trabalho mostraram que as riparinas I, III e XIII apresentaram semelhança de comportamento antimicrobiano, apesar de suas diferenças estruturais, frente às cepas analisadas. Entretanto, foram mais eficazes contra cepas multirresistentes de S. aureus do que contra cepas de E. coli e dentre as riparinas testadas, a III foi a que apresentou maior potencial antimicrobiano.

Esses achados preliminares, porém promissores, nos leva a intensificação de estudos complementares que permitam a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), assim como a avaliação da ação sinérgica e/ou antagônica destes fitoconstituintes quando usados em associação com outros produtos de origem vegetal ou não, principalmente sobre bactérias multirresistentes, incluindo a possibilidade de estudar os efeitos biológicos ao nível genético e ação desses compostos sobre plasmídeos de resistência a drogas, e linhagens de S. aureus de origem humana, contribuindo assim na busca de medidas de controle da resistência aos antimicrobianos.

#### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pela CAPES, através das bolsas de mestrado e doutorado e ao Departamento de Farmácia da UEPB, pelo uso do Laboratório de Microbiologia.

#### REFERÊNCIAS

- BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YONG, M. C. M. Benzoyl esters and amides, stryrylpyrones and neolignans from the fruits of Anibe riparia. Phytochemistry, 26 (9): 2615-2617, 1987.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of sewerall new phenylethylamides of substituited benzoic acids. Químice Nova, 13(4):332-334, 1990.
- BARBOSA-FILHO, J. M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da fiora paraibana. Cad.Farm., 13 (2):85-102, 1997.
- BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; BARBOSA-FILHO, J. M; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. Acta Amazônica, 8 (1/2):91-94, 1988. Suplemento.
- BAUER, A. N., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am. J. Clin. Pathol., 45:493-496. 1966.
- CARVALHO, A. A. T.; SAMPAIO, M. C. C.; SAMPAIO, F. C.; MELO, A. F. M.; SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A A; HIGINO, J. H. Atividade Antimicrobiana "in vitro" de extratos hidroalcoólicos de Psidium guajava L. sobre bactérias

- Gram-negativas. Acta Farm.Bonaerense 21 (4):255-8, 2002.
- CASTELO BRANCO, U. V. Preparação e estudos farmacológicos do éter metilico de N-benzoiltiramina e do éter metilico de N-(2-hidroxibenzil)-tiramina. (Dissertação de Mestrado). UFPB). 133p. 1992.
- CASTELO-BRANCO, U. V.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.;THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides constituents of Aniba riparia (Ness) Mez (Lauraceae). Acta Farm. Bonaerense 19 (3):197-202, 2009.
- CONSERVA, A. M. (1985). Constituintes químicos e ensaios farmacológicos de Aristolochia birastris Duchtre. João Pessoa. (Mestrado em Produtos Naturais) Universidade Federal da Paraíba. 192p.
- DEAN, T. Antimicrobial activity of selected spices and herbs. Disponível em:<a href="http://webpages.marshafl.edu/~dean30/ppt22.htm">http://webpages.marshafl.edu/~dean30/ppt22.htm</a>. Acesso em 01/05/2001.
- DÉOUX, S; DÉOUX, P. Ecologia e a Saúde O impacto da deteriorização do ambiente na saúde. Lisboa: Instituto Piaget, 1998.
- FILE Jr., T. M. Visão Geral Sobre Resistência Bacteriana nos Anos 90. In: PLE CHEST The Cardiopulmonary and Critical Care Journal (edição em português). Suplemento 2:1(3-9), 2000.
- MARQUES, C. A. Importância econômica de familia Laurareae Lindi. Floresta e Ambiente, 8 (1): 195-206, 2001.
- MOELLERING, R. C. Jr. Novos desafios no campo das doenças infecciosas.
   In: Patógenos Emergentes nas Doenças Infecciosas: Relatório Especial Hospital Practice. Euromédice. Ed. Médicas: 5-7, 2009.
- OLIVEIRA, R. A. G. Ação farmacológica sobre o sistema nervoso central de alcalóides da Solanum pseudo-quina St. Hil. João Pessoa (Mestrado Produtos Naturais). Universidade Federal da Paraiba. 97p. 1986.
- PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JOGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. Rev.Saúde Púplica, 38 (2): 326-328, 2004.
- SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. Microbiologia. 3"Ed.Guanabara Koogan:120-127. 642p. 2002.
- SOUSA, F. C. E; MELO, C. T.V.; MONTEIRO, A. P.; LIMA, V. T. M.; GUTIER-REZ., S. J. C.; PEREIRA, B. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. E.; VIANA,G. S. B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin (II from Aniba riparia (Ness) Mez (Lauraceae) in mice. Pharmacology Biochemistry and Behavoir, 78 (1): 27-33, 2004.
- SEIXAS, S. R. S. Preparação de derivados benzolitiraminicos e sua atividade cardiopressora. João Pessoa. (Mestrado Produtos Naturais). Universidade Federal da Paraíba. 103p. 1996.
- THOMAS, G.; CASTELO BRANCO, U. J. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BA-CHELET, M.; VARGAFTIG, B. B. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-Methyl-) N-(2,6-dihydroxybenzoyl) Tyramine, a constituent os Aniba riparia (Ness) Mez. (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guineapig aiveolar leukocytes. J.Pharm.Pharmacol., 46, 103-107.1994.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Raissa Mayer R. Catão

Rua Benedito Mota, 702 - Alto Brava - Campine Grande - PB

CEP. 58102.520

# 33º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas 6º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

### 04 a 08 de junho de 2006

Local:

Estação Embratel Convention Center - Curitiba - PR

Promoção e Realização
SOCIEDADE BRASILEIRA DE ÁNÁLISES CLÍNICAS

RBAC, vol. 37(4): 247-249, 2005

249

# **Livros Grátis**

( <a href="http://www.livrosgratis.com.br">http://www.livrosgratis.com.br</a>)

### Milhares de Livros para Download:

<u>Baixar</u>	livros	de A	\dm	<u>inis</u>	<u>tração</u>

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