

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HERBICIDA DE LACTONAS

Anderson Barros Archanjo, André Kulitz Marins, Patrícia Fontes Pinheiro, Vagner Tebaldi de Queiroz, Adilson Vidal Costa

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Alto Universitário, s/n, caixa postal 16, Guararema, Cep. 29.500-000 - Alegre - ES, E-mail: avcosta@hotmail.com

Resumo - A lactona sesquiterpênica glaucolide B [1], isolada a partir de *Vernonia fruticulosa* (Asteraceae), foi transformada em seis lactonas [2-7]. As estruturas dos produtos foram elucidadas por análise espectroscópica. Uma série de soluções dos compostos 1-7, em 50 µM, 100 µM e 200 µM, foram testados na germinação e na raiz e crescimento da parte aérea das dicotiledôneas *Physalis ixocarpa* e *Alexandrinum Trifolium* e das monocotiledôneas *Lolium multiflorum* e *hypochondriacus Amaranthus*. A lactona 5 exibiu seletividade clara para espécies dicotiledôneas em concentração de 200 µM, com uma inibição média de 90% na germinação de *Physalis ixocarpa*. As lactonas 1, 3 e 4 tiveram um efeito maior no comprimento da raiz de espécies de monocotiledôneas, inibindo cerca de 70% a 200 µM *L. multiflorum*. Parece que a função diol é exigida nas lactonas 4-6 para aumentar a atividade.

Palavras-chave: Síntese, Lactonas Sesquiterpênicas, Herbicida.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra

Introdução

Nos últimos anos, a indústria de agroquímicos vem constantemente disponibilizando no mercado novos compostos cada vez mais seletivos, eficientes e seguros sob o ponto de vista ambiental. Produtos naturais têm sido muito utilizados no desenvolvimento de herbicidas com novos mecanismos de ação, uma vez que fitotoxinas naturais apresentam freqüentemente sítios de ação diferentes dos que são alvos comuns de herbicidas sintéticos. As fitotoxinas naturais apresentam ampla diversidade estrutural incluindo, entre outros, sesquiterpenos, compostos fenólicos e substâncias heterocíclicas (BARBOSA *et al.*, 2004).

As lactonas sesquiterpênicas são compostos de grande ocorrência na natureza e representam um importante grupo de metabólitos secundários da família Asteraceae. Devido ao seu amplo espectro de atividade biológica, as lactonas sesquiterpênicas constituem uma classe de substâncias com potencial para utilização na medicina destacando-se as atividades citotóxica, antitumoral, antibacteriana, antiinflamatória, esquistossomocida, antimalárica e antifúngica (ARANTES, 2007). Numerosos estudos sugerem que esses metabólitos secundários apresentem importante papel na proteção de plantas contra organismos patógenos, insetos herbívoros e mamíferos e que também apresentem função alelopática (PICMAN, 1986). Apesar do alto número de lactonas sesquiterpênicas descritas e

das suas atividades biológicas, poucos estudos têm sido feitos sobre a correlação estrutura-atividade biológica das mesmas e também sobre os modos de ação nas plantas. (MACÍAS *et al.*, 2006).

Tendo em vista que as lactonas sesquiterpênicas têm sido responsáveis por efeitos alelopáticos sobre algumas plantas, afetando a germinação e o crescimento de outras espécies, esse trabalho teve como objetivo a síntese de novos compostos, derivados do Glaucolídeo B, uma lactona sesquiterpênica, com potencial atividade herbicida ou reguladora do crescimento de plantas.

Metodologia

A planta *Vernonia fruticulosa* Mart. foi coletada próximo a Termópolis, Minas Gerais, em janeiro de 1997. A planta foi identificada pelo professor Hermógenes de Freitas Leitão Filho, Departamento de Morfologia e Sistemática de Vegetais, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, S.P.. A exsiccata (N^o 101) encontra-se depositada no herbário do mesmo instituto.

A parte aérea seca e pulverizada da planta (5 Kg) foi extraída com 7 L de hexano/acetato de etila (4:1, v/v) obtendo-se 200 g de um resíduo, após a remoção do solvente. Esse resíduo foi dissolvido em 1L de metanol/água (9:1), extraído com clorofórmio (1,2 L) e concentrado no evaporador

rotatório, obtendo-se 30 g de um resíduo contendo o Glaucolídeo B. Esse material foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como solvente hexano/acetato de etila (1:1) (7L) como eluente, obtendo-se 12 g do composto puro (ALARCON, LOPES e HERZ,1990).

Para obtenção dos compostos **2** e **3** foi utilizado um balão de fundo redondo bitubulado (50 mL), sob atmosfera de hidrogênio e agitação magnética, onde foram adicionados acetato de etila destilado (10 mL), Glaucolídeo B [**1**] (1,1 g, 2,5 mmol) e Pd/C 10% (14 mg, 0,13 mmol). O meio reacional foi deixado à temperatura ambiente por seis horas, quando todo material de partida foi consumido, conforme indicado pela análise por cromatografia em camada delgada. A mistura reagente foi filtrada, o filtrado foi secado com MgSO₄ anidro e concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se um óleo amarelo claro. O produto resultante (980 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel (Clorofórmio/Éter dietílico 5:1), levando à obtenção do composto **2**, (cristais claros, 700 mg, 1,84 mmol, 74%), e do composto **3** (cristais claros, 240 mg, 0,63 mmol, 25%). O composto **2** foi recristalizado em éter dietílico e o composto **3** recristalizado em éter dietílico e hexano (2:1).

Para a obtenção do composto **6** foi utilizado um balão de fundo redondo onde foram colocados 300 mg de **3** (0,78 mmol), 6 mL de ácido trifluoroacético e 0,5 mL de H₂O. A mistura reagente foi deixada sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por uma hora. Após decorrido esse tempo, a mistura foi concentrada em evaporador rotatório, observando-se a formação de um sólido escuro. Ao sólido foi adicionado éter dietílico (20 mL) e solução aquosa saturada de NaHCO₃ (20 mL). Após a separação das fases, a fase aquosa foi extraída com éter dietílico (5x20 mL). A fase orgânica reunida foi extraída com solução saturada de NaCl (20 mL), secada com MgSO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto formado foi submetido a cromatografia em coluna de sílica-gel (Éter etílico/ diclorometano 10:1), levando à obtenção do composto **6**, (cristais amarelos, 211 mg, 0,53 mmol, 68%).

Para o preparo do composto **5** foi utilizado um balão de fundo redondo onde foram colocados 300 mg de **2** (0,78 mmol), 5 mL de ácido trifluoroacético e 0,5 mL de H₂O. A mistura reagente foi deixada sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 15 minutos. Após decorrido esse tempo, a mistura foi concentrada em evaporador rotatório, observando-se a formação de um óleo amarelo. Ao óleo foram adicionados éter dietílico (20 mL) e solução aquosa saturada de NaHCO₃ (20 mL). Após a separação das fases, a fase aquosa foi extraída

com éter dietílico (5x20 mL). A fase orgânica reunida foi extraída com solução saturada de NaCl (20 mL), secada com MgSO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida, o que resultou em um óleo marrom. Esse óleo foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel (Éter etílico/Diclorometano 10:1), levando à obtenção do composto **5**, (cristais claros, 230 mg, 0,59 mmol, 76%).

O composto **4** foi obtido utilizando um balão de fundo redondo onde foram colocados 300 mg de **1** (0,68 mmol), 5 mL de ácido trifluoroacético e 0,5 mL de H₂O. A mistura reagente foi deixada sob agitação, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Após decorrido esse tempo, a mistura foi concentrada em evaporador rotatório, observando-se um resíduo branco. A esse resíduo foram adicionados éter dietílico (20 mL) e solução saturada de NaHCO₃. As duas fases foram separadas e a fase aquosa extraída com éter dietílico (5x20 mL). A fase orgânica reunida foi lavada com solução saturada de NaCl (20 mL), secada com MgSO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida, levando à obtenção de um óleo amarelo. Esse óleo foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel (Éter etílico/Diclorometano 10:1), o que resultou na obtenção do composto **4** como um sólido branco (200 mg, 0,44 mmol, 65%).

O preparo do composto **7** foi realizado utilizando um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL), onde foram adicionados THF seco (8 mL), iodeto de sódio (232 mg, 1,56 mmol), o composto **2** (300 mg, 0,78 mmol) dissolvido em THF seco (2 mL) e em seguida o cloreto de trimetilsilila (1,56 mmol, 0,2 mL), mantidos sob agitação magnética e atmosfera de nitrogênio. A reação foi mantida sob agitação por três horas. Decorrido este período adicionou-se Na₂S₂O₃ 5 mol/L (7 mL), e a mistura foi parcialmente concentrada em evaporador rotatório. Em seguida procedeu-se a extração com éter etílico (5 x 20 mL). A fase orgânica reunida foi extraída com solução saturada de NaCl (30 mL), secada com MgSO₄ anidro e concentrada, obtendo-se um óleo amarelo. O produto resultante foi cromatografado em coluna de sílica (éter etílico/hexano 2:1), levando a obtenção do composto **7** com 26% de rendimento (0,20 mmol).

Os ensaios biológicos foram realizados no laboratório da Faculdade de Química da Universidade Nacional Autônoma do México de acordo com a metodologia descrita por Anaya e colaboradores (1990), utilizando como plantas-teste, as espécies de plantas daninhas *Physalis ixocarpa* (tomate mexicano), *Lolium multiflorum* (azevém), *Trifolium alexandrium* (trevo de Alexandria) e *Amaranthus hypochondriacus* (caruru). Foram preparadas soluções dos compostos (**1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6** e **7**) (Figura 1) diluídos

em DMSO, nas concentrações de 50, 100 e 200 μM . Os experimentos foram conduzidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, nas quais foram colocados duas folhas de papel de filtro Whatman nº1. Em cada placa foram adicionados 10 mL de cada solução e 40 sementes da planta teste, previamente esterilizadas por imersão, durante 10 minutos em solução aquosa a 20% de hipoclorito de sódio. As placas foram colocadas no germinador, no escuro, a uma temperatura de 25°C, por um período de cinco dias. Após três dias de incubação, foi determinada a porcentagem de germinação das sementes e, após outros dois dias, medi-se o comprimento das raízes e da parte aérea das plantas. As porcentagens de inibição foram calculadas com base nos dados obtidos nos tratamentos controle, que foram preparados com os mesmos componentes e quantidades usadas para o preparo das soluções exceto os compostos a serem testados (solução 0 μM). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições.

Resultados

As transformações químicas, apresentadas na Figura 1, efetuadas no Glaucolídeo B [1], no composto 2 e no composto 3, mostraram-se eficientes para obtenção dos derivados sintetizados, tendo em vista os bons rendimentos e a facilidade de separação dos produtos obtidos. Estes fatos mostram a alta seletividade dos reagentes utilizados na síntese dos compostos, haja vista que existe um elevado grau de funcionalização dos substratos.

Nestes procedimentos foram preparados seis derivados que junto ao Glaucolídeo B tiveram sua atividade herbicida testada sobre: a germinação, desenvolvimento radicular e a parte aérea de plantas de *Physalis ixocarpa*, *Lolium multiflorum*, *Trifolium alexandrium* e *Amaranthus hypochondriacus*. Os resultados mais importantes foram observados para os compostos inéditos 4 e 5 que causaram maior efeito sobre todas as plantas testadas. A atividade dos compostos 1 a 7 sobre *Physalis ixocarpa*, na concentração de 200 μM pode ser observada na Figura 2. Nessa figura destaca-se a atividade do composto 5.

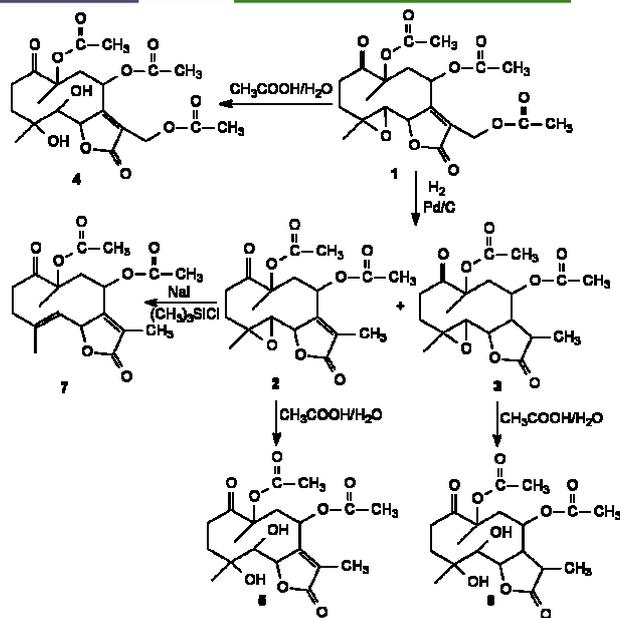


Figura 1. Glaucolídeo B [1] e os derivados sintetizados 2 a 7.

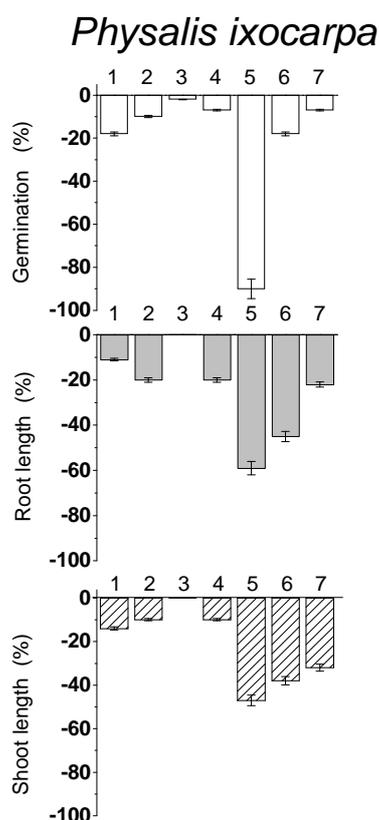


Figura 2. Efeitos do composto 1-7 sobre *Physalis ixocarpa*, nas concentrações de 200 μM .

Discussão

A primeira etapa desse trabalho envolveu a determinação estrutural inequívoca do Glaucolídeo B **[1]** uma lactona sesquiterpênica, isolada da parte aérea da planta *Vernonia fruticulosa*.

Os estudos para identificação inequívoca do Glaucolídeo B **[1]** envolveram análise espectroscópicas no infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN).

O espectro no infravermelho de **1** (Figura 3) apresentou, como absorções mais características, áquelas devidas a grupos carbonílicos entre 1718 e 1774 cm^{-1} . A banda em 1774 cm^{-1} é característica de estiramento de carbonila conjugada de γ -lactona. A absorção em 1741 cm^{-1} é devida aos estiramentos das carbonilas de éster. Em 1718 cm^{-1} foi observada a banda referente a estiramento de carbonila cetônica.

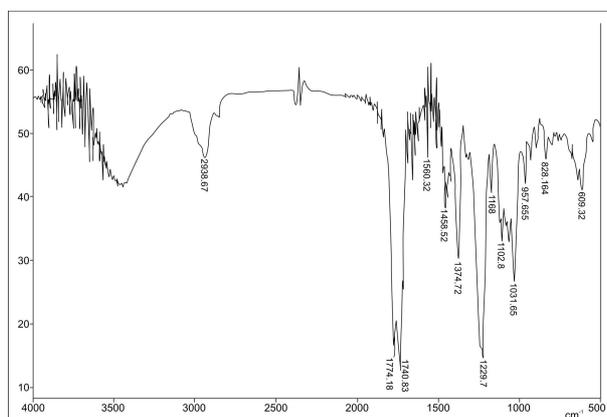


Figura 3. Espectro no infravermelho (KBr) do Glaucolídeo B.

O espectro em uma dimensão de RMN de ^1H foi obtido inicialmente em CDCl_3 a 27 °C. Nesta temperatura, o espectro apresentou três sinais bem resolvidos entre δ 4,80 - 4,95 e ressonâncias mal resolvidas em δ 4,75 e entre δ 2,22 - 3,00. Essa má resolução no espectro foi devida à existência de vários conformeros em equilíbrio por causa da flexibilidade do anel de dez membros da molécula. Desse modo, decidiu-se obter espectros variando-se a temperatura de 27 °C a -43 °C, com intervalos de 10 °C.

Para o espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , a resolução, como esperado, variou com a temperatura, e o melhor resultado foi obtido a -13 °C, Figura 4. Nesta temperatura, foi observado um par de dupletos largos ($J=12,70$ Hz) em δ 4,84 e δ 4,91, que foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-13.

O duplete em δ 4,89 ($J=9,60$ Hz), que aparece no espectro de RMN de ^1H de **1**, foi atribuído ao

signal de H-6. Este sinal mostrou acoplamento com o hidrogênio H-5, cuja magnitude é consistente com o ângulo diedro de aproximadamente 180°. O H-5 forneceu o duplete em δ 2,83 ($J=9,60$ Hz), atribuído inicialmente pela análise do valor da constante de acoplamento e confirmado pelo mapa de contornos COSY ^1H - ^1H .

A -13 °C o sinal de ressonância de H-8 apareceu em δ 4,69 (duplete, $J=8,60$ Hz). Nesse caso o H-8 está acoplado com H-9 α e não com o H-9 β , pelo fato de o ângulo, com este último, ser de aproximadamente 90°, como mostrado na conformação de mínima energia (Figura 5). Estas correlações foram confirmadas pela análise do mapa de contornos COSY.

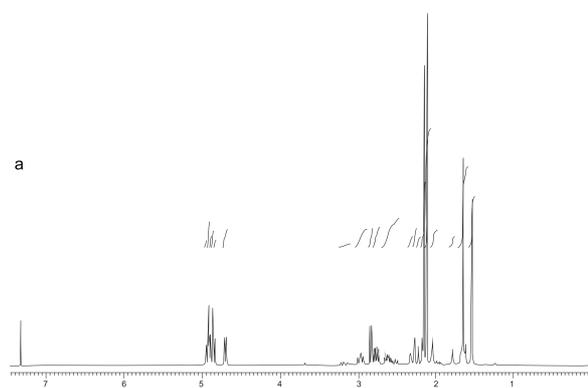
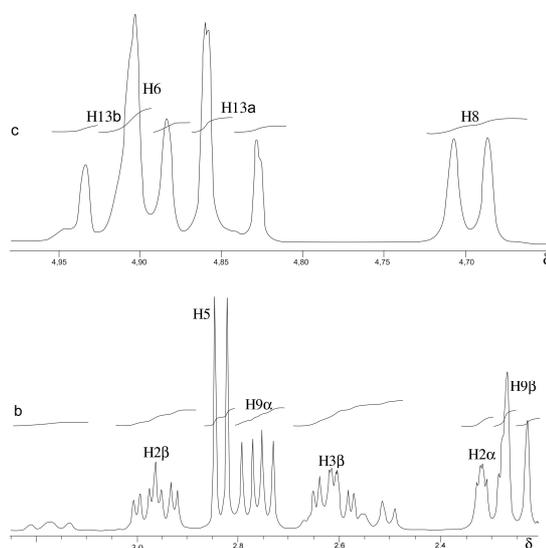


Figura 4. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do Glaucolídeo B, em -13 °C (a) e expansões (b e c).

A -13 °C, o sinal devido ao H-2 β apareceu em δ 2,96 (ddd, $J_{2\beta,2\alpha}=17,40$ Hz, $J_{2\beta,3\beta}=12,70$ Hz, $J_{2\beta,3\alpha}=4,90$ Hz), e H-2 α apresentou um ddd em δ 2,27 ($J_{2\alpha,2\beta}=17,40$ Hz, $J_{2\alpha,3\beta}=4,60$ Hz, $J_{2\alpha,3\alpha}=2,90$ Hz). Para H-3 β foi observado um ddd em δ 2,60

(ddd, $J_{3\beta,3\alpha}=17,80$; $J_{3\beta,2\beta}=12,70$; $J_{3\beta,2\alpha}=4,60$) e para H-3 α uma banda larga entre δ 1,62-1,67, superposta com o simpleto do CH₃-15. Observando os mapas de contornos COSY e NOESY (não apresentados) verificou-se correlação entre H-3 α /H-3 β , H-2 α /H-2 β e H-9 α /H-9 β confirmando, assim, as atribuições feitas. Pelo mapa de contorno NOESY, foi observado também a correlação entre H-5/H-9 β e entre H-6/H8.

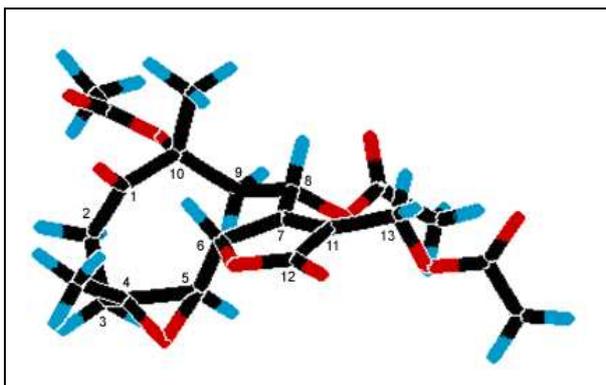


Figura 5. Conformação de menor energia para o Glaucolídeo B.

O espectro de RMN de ¹³C obtido inicialmente a 27 °C não apresentou todos os 21 sinais bem resolvidos. Assim, como para o estudo por RMN de ¹H, foram obtidos espectros de RMN de ¹³C em diferentes temperaturas e o espectro obtido em -13 °C, Figura 6, permitiu a detecção dos sinais de todos os carbonos do Glaucolídeo B [1].

A atribuição inequívoca dos sinais de RMN de ¹³C dos carbonos hidrogenados, foi feita pela análise das correlações entre hidrogênio e carbono-13, registradas via mapa de contornos obtido pela técnica de HMQC, na temperatura de -13 °C, uma vez que os sinais de ressonância dos hidrogênios foram todos assinalados.

Características especiais, observadas na expansão do mapa de contornos HMQC, foram as correlações que permitiram atribuir o sinal de C-6 em δ 80,59, o de C-8 em δ 63,81 e o de C-13 em δ 54,88. Como o sinal em δ 61,44 não estava correlacionado com nenhum hidrogênio foi atribuído ao C-4. O sinal em δ 58,37 correlacionado ao H-5, foi atribuído ao C-5. O sinal de carbono em δ 39,80, correlacionado com as ressonâncias de hidrogênios em δ 2,25 (H-9 β) e δ 2,76 (H-9 α), corresponde a C-9. Os carbonos C-2 e C-3 foram responsáveis pelos sinais em δ 32,53 e δ 31,28 respectivamente, como confirmado pela correlação com os respectivos hidrogênios.

Os sinais das carbonilas e das metilas dos três grupos acetatos apresentaram os respectivos valores de deslocamentos químicos muito

próximos e, portanto, não puderam ser distinguidos pela técnica HMBC.

Todos os derivados sintetizados tiveram suas estruturas determinadas através da utilização de métodos espectrométricos: infravermelho, RMN de ¹H e de ¹³C, incluindo técnicas como: COSY, HMQC, DEPT e NOESY.

A lactona **2** foi obtida por hidrogenólise a partir de **1** em 74% e o composto **3** foi obtido em 25% por hidrogenólise seguido de hidrogenação usando o Glaucolídeo B [1] como material de partida. O tratamento dos compostos **1**, **2** e **3** com água e ácido trifluoroacético levou à obtenção dos compostos **4**, **5** e **6**, com rendimentos de 68%, 76% e 65%, respectivamente. O composto **7** foi obtido pela desoxigenação do composto **2** com rendimento de 26%.

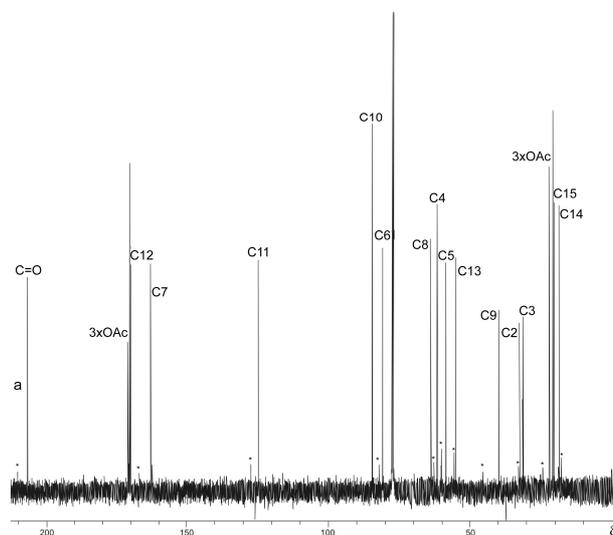


Figura 6. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do Glaucolídeo B, em -13 °C (a) e expansão (b). Picos marcados, devidos ao conformero menos abundante.

Os compostos exibiram clara seletividade sobre a germinação da espécie dicotiledônea *P. ixocarpa* (90% na concentração de 200 μ M) pelo composto **5**, e que as outras espécies foram menos afetadas (<50 %). Os compostos **1**, **3** e **4** também exibiram clara seletividade sobre o crescimento das raízes nas plantas daninhas *L. multiflorum*, causando efeito inibitório de 70%, 72% e 73% na concentração de 200 μ M, respectivamente. O composto **5** apresentou seletividade na inibição no crescimento da parte aérea da espécie *T. Alexandrinum* com 70% na concentração de 200 μ M, e em outras espécies testadas o efeito observado foi menor. Os outros compostos testados apresentaram efeitos pequenos ou moderados. Portanto, as lactonas estudadas nesse trabalho produzem efeito inibidor

sobre a germinação e crescimento das espécies de plantas testadas. Os resultados discutidos anteriormente, sugerem que o composto **5** apresenta um grande espectro de ação contra a germinação e crescimento de espécies de plantas mono e dicotiledôneas, destacando ser mais ativo sobre a dicotiledônea *P. ixocarpa*.

Conclusão

A atividade apresentada pelos compostos sintetizados foi significativa, principalmente devido ao fato da concentração na qual foram testados ser relativamente baixa, pois, atualmente apenas compostos eficazes, ou seja, que provoquem inibição quando aplicados em baixas dosagens são aproveitados no processo de desenvolvimento de agroquímicos.

Referências

- ALARCON, M.C.B.V.; LOPES, J.L.C.; HERZ, W. Glaucolide B, a molluscicidal sesquiterpene lactone, and other constituents of *Vernonia eremophila*. **Planta Med.** v. 56, p. 271-273, 1990.
- ANAYA, A. I.; CALERA, M. R.; MATA, R.; PEREDA, R. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* cav. **J. Chem. Ecology**, New York, v.16, nº 7, p. 2145-2152, 1990.
- ARANTES, F. F. P. **Síntese e avaliação da fitotoxicidade de novas lactonas sesquiterpênicas**. Viçosa, MG: Dissertação UFV (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 2007. 136p.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; DEMUNER, A. J.; FILOMENO, C. A. Síntese de novos herbicidas derivados do 1,2 α ,4 α ,5-tetrametil-8-oxabicyclo[3.2.1]-oct-6-em-3-ona. **Química Nova**, v.27, p. 241-246, 2004.
- MACÍAS, A. F.; FERNANDES A.; VARELA, R. M.; MOLINILLO, J. M. G.; TORRES, A.; ALVES, P. L. C. A. Sesquiterpene lactones as allelochemicals **J. Nat. Prod.**, v.69, p. 795-800, 2006.
- PICMAN, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Bioch. Syst. Ecol.**, 14, p.255-281, 1986.