



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Preparação e Avaliação Farmacológica de Derivados dos Lipídios Fenólicos do Líquido da Casca da Castanha de Caju

Wellington Alves Gonzaga

Dissertação submetida à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na Área de Química de Produtos Naturais

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Lucilia dos Santos

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Dâmaris Silveira

Brasília
2008

**Preparação e avaliação farmacológica de derivados dos lipídios
fenólicos do líquido da casca da castanha de caju**

Brasília, Fevereiro de 2008

*Dedico este trabalho a Deus por ter
me provido de saúde, força e coragem
para terminar mais uma batalha de minha
vida.*

Agradecimentos

À professora e amiga Dr.^a Maria Lucilia dos Santos pelos ensinamentos e acolhimento no laboratório.

Aos meus pais pelo exemplo e dedicação em minha formação intelectual e profissional.

À minha esposa que caminha ao meu lado para que tenhamos um futuro melhor e que sempre me apoiou nos momentos difíceis.

Às minhas irmãs, por terem ajudado direta e indiretamente.

Aos meus cunhados pela ajuda direta ou indireta nessa caminhada árdua.

Aos meus sobrinhos e sobrinha que me iluminam e trazem felicidade para que eu possa ter futuro melhor. Ao fim dessa batalha ficará o exemplo a ser seguido e uma trilha marcada que poderá ser o início de uma caminhada paralela ou tangencial.

Aos técnicos de laboratório Rogério Fagundes Marzola e ao Modoaldo Teles do Espírito Santo pela presteza e empréstimo de materiais.

À Professora Dr.^a Inês Sabioni Resck, pela presteza na aquisição de espectros de RMN e pela colaboração na elucidação dos espectros.

Ao Sr. Wilson R. de Oliveira pela aquisição de espectros de Infra Vermelho.

Ao professor Dr. Luiz Antônio Soares Romeiro, Universidade Católica de Brasília, e à Prof.^a Dr.^a Maria Márcia Murta, Universidade de Brasília pela contribuição no esclarecimento de algumas questões.

À Professora. Dr.^a Dâmaris Silveira, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, pela ajuda e trilha marcada no caminho a seguir.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni pelo auxílio no Laboratório de Farmacologia Molecular e a Prof.^a Dr.^a Andrea Barretto Motoyama pelos testes realizados em células cancerosas de boca e mama.

Aos professores Dr.^a Maria Lucilia dos Santos, Dr.^a Dâmaris Silveira, Dr. Luiz Alberto Simeoni da Universidade de Brasília e ao professor Dr. Luiz Antônio Soares Romeiro da Universidade Católica de Brasília, por aceitarem participar da Banca Examinadora.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) Processo CT-INFRA 970/2001, 1040091/2004, pelo apoio a projetos que contribuíram para a finalização desse trabalho.

Ao Instituto de Química e a Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília pela utilização das facilidades dos laboratórios.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Acrônimos	ixi
Lista de Figuras	xi
Lista de Esquemas	xiii
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Anexos	xv
Resumo	xvii
Abstract	xix
1. Introdução	1
1.1. Compostos fenólicos com uso consagrado na Medicina	2
1.2. Lipídios Fenólicos não-Isoprenóides	4
1.3. Cajueiro – Fonte potencial de lipídios fenólicos não-isoprenóides	11
2. Objetivos	16
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3. Materiais e Métodos	19
3.1. Parte Química	20
3.1.1. Procedimentos Gerais	20
3.1.2. Obtenção dos lipídeos fenólicos do líquido da casca da castanha do caju (LCC).	21
3.1.2.1. Extração do LCC da castanha de caju	21
3.1.2.2. Separação dos ácidos anacárdicos do LCC <i>in natura</i>	21
3.1.2.3. Separação do cardanol do LCC técnico	23
3.1.3. Modificações químicas	24
3.1.3.1. Reações de hidrogenação catalítica	24
3.1.3.1.1. Preparação do ácido 2-hidróxi-6-pentadecilbenzóico	24
3.1.3.1.2. Preparação do 3-Pentadecil fenol	25
3.1.3.2. Reações de proteção de grupos funcionais	25
3.1.3.2.1. Preparação do 2-metóxi-6-pentadecil benzoato de metila	25
3.1.3.2.2. Preparação do 2-hidróxi-6-pentadecil-benzoato de metila	26
3.1.3.2.3. Preparação do ácido 2-acetiloxi-6-pentadecil-benzóico	26
3.1.3.2.4. Preparação do 2-acetiloxi-6-pentadecilbenzoato de metila	27

3.1.3.2.5. Preparação do acetato de 3-pentadecilfenol	27
3.1.3.3. Reações químicas envolvidas na proposta de síntese de derivados 4-hidróxi cumarínicos	28
3.1.3.3.1. Preparação do magnésio etoximalônico	28
3.1.3.3.2. Preparação do dietil [2-(acetiloxi)-6-pentadecilfenil]carbonil propanedioato	29
3.1.3.3.3. Preparação do 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona	30
3.2. Avaliação da atividade biológica	30
3.2.1. Testes biológicos	30
3.2.1.1. Toxicidade a larvas de <i>Artemia salina</i>	30
3.2.1.2. Avaliação do potencial antioxidante utilizado como modelo a redução do complexo de fosfomolibdênio	31
3.2.1.3. Atividade fotoprotetora	37
3.2.1.4. Inibição de crescimento celular <i>ex-vivo</i>	38
4. Resultados e Discussão	39
4.1. Extração e separação dos constituintes do LCC	40
4.2. Modificações Químicas	42
4.2.1. Modificações químicas moderadas	42
4.2.2. Estudos visando à síntese de derivados 4-hidroxycumarínicos	50
4.3. Testes Biológicos	59
4.3.1. Verificação de atividade citotóxica utilizando como modelo a toxicidade às larvas de <i>Artemia salina</i>	59
4.3.2. Ensaio da redução do complexo de fosfomolibdênio	60
4.3.3. Avaliação da capacidade protetora contra raios ultravioleta	64
4.3.4. Avaliação da atividade inibidora de crescimento celular <i>ex vivo</i> em linhagens de células tumorais	71
5. Conclusões e Perspectivas	74
6. Dados Físico-Químicos	77
6.1. Ácido 2-hidróxi-6-pentadecilbenzóico	78
6.2. 2-Metóxi-6-pentadecil benzoato de metila	79
6.3. 2-hidróxi-6-pentadecil-benzoato de metila	80
6.4. Ácido 2-acetiloxi-6-pentadecil-benzóico	81
6.5. 2-acetiloxi-6-pentadecilbenzoato de metila	82
6.6. Dietil [2-(acetiloxi)-6-pentadecilfenil]carbonil propanedioato	83
6.7. 3-Pentadecil fenol	83

6.8. Acetato de 3-pentadecilfenol	84
6.9. 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona	85
7. Referências Bibliográficas	86
Anexo I	95
Anexo II	131
Anexo III	133

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

ABS	Absorbância
Ac	Acetil
AcOEt	Acetato de Etila
BHT	Butilidroxitolueno
BSA	Albumina de soro bovino
CBD	Canabidiol
CCD	Cromatografia de camada delgada
CTF	Catálise de transferência de fase
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
DL₅₀	Dose mínima letal para 50% dos indivíduos
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Et	Etila
Hex	Hexano
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento escalar
LCC	Líquido da casca da castanha de caju.
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
m	Multiplete
Me	Metila
MHz	Mega Hertz
MIC	Concentração inibitória mínima
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	Nanômetro
OSCC	Oral squamous cell carcinoma
p.f.	Ponto de fusão
Ph	Fenil
ppm	Partes por milhão
PSI	PoundPer Square inch

Py	Piridina
RMN¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
Rf	Fator de retenção
s	Simpleto
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
UV	Radiação ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta na região de 320 a 400 nm
UVB	Radiação ultravioleta na região de 280 a 320 nm
UVC	Radiação ultravioleta na região de 200 a 280 nm
δ	Deslocamento químico

Lista de Figuras

FIGURA 1. Fenóis simples: fenol e 3-propilfenol.	2
FIGURA 2. Ácido salicílico e derivados.	4
FIGURA 3. Exemplos de lipídios fenólicos não-isoprenóides.	5
FIGURA 4. Análogos do sildenafil preparados a partir dos ácidos anacárdicos	8
FIGURA 5. Derivados benzotiazola, benzimidazola e benzoxazola preparados a partir dos ácidos anacárdicos	8
FIGURA 6. Canabidiol e seu derivado cardanol C-5.	9
FIGURA 7. Derivados do cardanol com atividade antitumoral.	9
FIGURA 8. Derivados do LCC capazes de absorver na região do UVA e UVB.	10
FIGURA 9. Derivados β -alcoxilfenilacético do cardanol.	10
FIGURA 10. Rivastigmina e análogos derivados do cardanol.	11
FIGURA 11. Cajueiro.	12
FIGURA 12. Caju.	13
FIGURA 13. Corte transversal da castanha de caju	13
FIGURA 14. Lipídios fenólicos não-isoprenóides constituintes do LCC.	14
FIGURA 15. Modelo esquemático do teste de <i>A. salina</i>	31
FIGURA 16: Atividade redutora do ácido ascórbico no método do fosfomolibdênio.	34
FIGURA 17. Atividade redutora do BHT no método do fosfomolibdênio.	35
FIGURA 18. Atividade redutora da quercetina no método do fosfomolibdênio.	36
FIGURA 19. Espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos ácidos anacárdicos	41
FIGURA 20. Espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos cardanóis	42
FIGURA 21. Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do ácido anacárdico saturado	43
FIGURA 22. Expansão do espectro de RMN ^1H do ácido anacárdico dimetilado	44
FIGURA 23. Expansão de espectro de RMN ^{13}C do ácido anacárdico dimetilado	45
FIGURA 24. RMN ^1H referente ao singlete éster do ácido anacárdico	46
FIGURA 25: Expansão de espectro do de RMN ^{13}C referente ao singlete éster do ácido anacárdico	46
FIGURA 26. Espectro de RMN ^1H do ácido 2-acetilóxi 6-pentadecil-benzóico	47
FIGURA 27. Expansão de espectro de RMN ^1H do 2-acetiloxi-6-	48

pentadecilbenzoato de metila

FIGURA 28. Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do cardanol saturado	49
FIGURA 29. Espectro do acetato de cardolila (50
FIGURA 30. 4-Hidroxicumarina e derivados representativos.	51
FIGURA 31. Espectro de RMN ^1H da 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona	57
FIGURA 32. Espectro de RMN ^{13}C da 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona	58
FIGURA 33. Ácido ascórbico.	62
FIGURA 34. Quercetina	62
FIGURA 35. BHT.	63
FIGURA 36. Regiões do espectro eletromagnético	65
FIGURA 37. Oxibenzona.	66
FIGURA 38. Espectro de varredura do EUSOLEX 4360 [®] , na região do ultravioleta (400 nm a 200 nm).	67
FIGURA 39. Absorbância do Eusolex 4360 [®] .a 325 e 288 nm.	67
FIGURA 40. Absorbância do Eusolex 4360 [®] .a 325.	68
FIGURA 41. Absorbância do Eusolex 4360 [®] a 288.	68
FIGURA 42. Teste de citotoxicidade por cristal violeta em células OSCC	72
FIGURA 43. Teste de citotoxicidade por cristal violeta em células MCF-7	73

Lista de Esquemas

ESQUEMA 1. Rota biossintética dos lipídios não-isoprenóides.	5
ESQUEMA 2. Separação dos componentes do LCC.	22
ESQUEMA 3. Separação dos cardanóis do LCC técnico.	23
ESQUEMA 4. Preparação do ácido 2-hidróxi-6-pentadecilbenzóico	42
ESQUEMA 5. Preparação de 2-metóxi-6-pentadecilbenzoato de metila	44
ESQUEMA 6. Preparação do 2-hidróxi-6-pentadecilbenzoato de metila	45
ESQUEMA 7. Preparação do ácido 2-acetiloxi-6-pentadecil-benzóico	46
ESQUEMA 8. Preparação do 2-acetilóxi-6-pentadecilbenzoato de metila	47
ESQUEMA 9. Hidrogenação do cardanol.	48
ESQUEMA 10. Preparação do acetilcardanol	49
ESQUEMA 11. Sínteses da 4-hidroxicumarina descritas na literatura.	52
ESQUEMA 12. Proposta sintética para preparação de derivados 4- hidroxicumarínicos via etóximalonato.	53
ESQUEMA 13. Proposta sintética para preparação de derivados 4- hidroxicumarínicos via reação de ciclização com sódio metálico.	53
ESQUEMA 14. Preparação do 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona.	54
ESQUEMA 15. Tentativa de síntese de derivados 4-HC via magnésio etoximalônico	54
ESQUEMA 16. Preparação de derivados 4-hidroxicumarínicos.	55
ESQUEMA 17. Preparação de 4-HC via ácido malônico.	56
ESQUEMA 18. Preparação de 4-HC via dietilcarbonato e ácido malônico.	56
ESQUEMA 19. Preparação da 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona	57
ESQUEMA 20. Tentativa de preparação da 4-HC.	59
ESQUEMA 21. Oxidação do ácido ascórbico ao ácido desidroascórbico.	62

Lista de Tabelas

TABELA 1. Valores das concentrações do ácido ascórbico, das absorvâncias em triplicata, média das absorvâncias e desvio padrão do ácido ascórbico.	34
TABELA 2. Valores das concentrações do BHT, das absorvâncias em triplicata, média das absorvâncias e desvio padrão do BHT.	35
TABELA 3. Valores das concentrações da quercetina, das absorvâncias em triplicata, média das absorvâncias e desvio padrão do BHT.	36
TABELA 4. Citotoxicidade do ácido salicílico, ácido anacárdico e do ácido acetilsalicílico contra <i>A. salina</i> .	60
TABELA 5. Formação biológica das principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	61
TABELA 6. Equivalência das substâncias sintetizadas com relação ao ácido ascórbico, BHT e quercetina.	64
TABELA 7. Valores das concentrações do Eusolex 4360 [®] , das absorvâncias na região de 325, em triplicata, média das absorvâncias e desvio padrão.	68
TABELA 8. Valores das concentrações do Eusolex 4360 [®] , das absorvâncias na região de 288, em triplicata, média das absorvâncias e desvio padrão.	69
TABELA 9. Valores de absorção de UV dos derivados do LCC.	70
TABELA 10. Atividade fotoprotetora UVB dos derivados do LCC em equivalentes de EUSOLEX4360 [®] .	70

Lista de Anexos

Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 15 i-m	96
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 15 i-m	97
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 15 i-m	98
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 15 i	99
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 15 i	100
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 15 i	101
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 47	102
Espectro no RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 47	103
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 47	104
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 48	105
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 48	106
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 48	107
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 49	108
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 49	109
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 49	110
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 50	111
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 50	112
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 53	113
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 53	114
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 53	115
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 16 i-m	116
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 16 i-m	117
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 16 i-m	118
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 16 i	119
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 16 i	120
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 16 i	121
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 32	122
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 32	123
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 32	124
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1} ; KBr) de 54	125
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 54	126

Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 54	127
Espectro no Infravermelho (ν cm^{-1}; KBr) de 56	128
Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 56	129
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 56	130

RESUMO

O presente trabalho descreve a utilização do Líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC), fonte abundante de lipídios fenólicos não-isoprenóides encontrada no País, como matéria-prima para a obtenção de substâncias com aplicações sintéticas e biológicas em potencial.

Os processos de extração, separação e caracterização dos lipídios fenólicos do LCC foram conseguidos por meio de procedimentos de domínio no nosso grupo de pesquisa. Foram realizadas modificações químicas moderadas (e.g. hidrogenação, acetilação, metilação) nos grupos funcionais dos ácidos anacárdicos e cardanóis. Adicionalmente, foram realizadas algumas modificações de maior complexidade visando à preparação de derivados 4-hidroxycumarínicos. As matérias-primas, os intermediários e derivados envolvidos neste estudo foram purificados por cromatografia em coluna ou recristalização e, caracterizados por métodos espectroscópicos de IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C .

Paralelamente, as substâncias foram submetidas a testes biológicos. No ensaio utilizando *Artemia salina* apenas o ácido tetrahydroanacárdico (DL_{50} 0,252 ppm) apresentou atividade. As demais substâncias derivadas do LCC não foram avaliadas no teste de *Artemia salina* devido à insolubilidade nas condições do ensaio. O ensaio da redução do complexo de fosfomolibdênio foi realizado de acordo com uma modificação do método de Prieto. Para validação e construção da curva-padrão, ácido salicílico, butilidroxitolueno (BHT) e quercetina foram usados como padrões. Dentre as substâncias testadas, 1-(2-hidróxi-4-pentadecil acetofenona (**46**), 2-hidróxi-6-pentadecil-benzoato de metila (**48**), ácido 2-acetiloxi-6-pentadecil-benzóico (**49**) e o acetato de 3-pentadecilfenol (**32**) apresentaram um perfil antioxidante semelhante ao do BHT. No teste para verificar a atividade fotoprotetora a substância **48** apresentou melhor resultado na região do UVB. No ensaio de inibição de crescimento celular *ex-vivo* usando células OSCC, a substância **46**, a **49** e a **32** apresentaram atividade. Já no ensaio com células MCF-7 o cardanol saturado, 2-metóxi-6-pentadecil benzoato de metila e LCC técnico apresentaram maior atividade.

Palavras-chave: lipídeos fenólicos, LCC, modificações químicas, derivados 4-hidroxycumarínicos, testes biológicos/farmacológicos.

ABSTRACT

The present work describes the utilization of Cashew Nut-Shell Liquid (CNSL), abundant source of phenolic non-isoprenoids lipids from our country, as raw material for preparation of compounds with synthetic applications as well as biological useful.

The extraction, separation and characterization of CNSL phenolic non-isoprenoids lipids were done by procedures well-known in our research group. Moderates modifications (e.g. hydrogenation, acetylation, metylation) were accomplished on functional groups of anacardic acids and cardanols. Additionally, were done more complex modifications aiming the preparation of 4-hydroxycoumarin derivatives. The natural lipids, all intermediates and derivatives involved at this study were purified by chromatographic column or recrystallization, and characterization by spectrometric methods (IR, ^1H and ^{13}C NMR).

Simultaneously, all substances were submitted to biological assays. By *Artemia salina* assay only saturated anacardic acid shown activity (DL_{50} 0,252 ppm). The other CNSL derivatives were not evaluated *Artemia salina* test because they were not soluble on the assay conditions. The reduction phosphomolybdenum complex assay was done by a modification on Prieto's method. For validation and construction of standard curve, salicylic acid, BHT and quercetin were used as standard. Among all assayed compounds, 1-(2-hydroxi-4-pentadecyl) acetophenone (**46**), methyl 2-hydroxi-6-pentadecylbenzoate (**48**), 2-(acetyloxy)-6-pentadecylbenzoic acid (**49**) and anacardyl acetate (**32**) exhibited antioxidant property similar to BHT. In relation to the fotoprotetion activity the methyl ester of anacardic acid exhibited best result on UVB region. By *ex vivo* cellular inhibition assay using OSCC, the compounds **46**, **49** and **32** showed activity. On the other hand, the assay with MCF-7 cells the 3-pentadecylphenol, methyl 2-hydroxi-6-pentadecylbenzoate and CNSL exhibited better activity.

Keywords: phenolic lipids, CNSL, chemical modifications, 4-hydroxi-coumarin, and biological/pharmacological assays.

Introdução

1. Introdução

1.1. Compostos fenólicos com uso consagrado na Medicina.

Os fenóis e seus derivados são amplamente encontrados em organismos marinhos e em plantas, em adição a sua origem petroquímica (MARIANO, 2001; PRADO, 2005; SILVA, V. M. D., 2007). O fenol (**1**) (FIGURA 1), o membro representativo mais simples da classe dos compostos fenólicos, foi introduzido por Lister, em 1867, como um anestésico cirúrgico, primeiramente, concentrado, que se mostrou tóxica para a pele. Subseqüentemente, o fenol foi empregado na forma diluída como antisséptico (ABRAHAM, 2003).

Outra utilidade do fenol (**1**) está relacionada ao rejuvenescimento da pele por *peeling* químico, preparado por meio da fórmula de Baker-Gordon. Em altas concentrações na corrente sanguínea pode ter efeito tóxico no miocárdio, desencadeando a taquicardia, contrações ventriculares prematuras, dissociação eletromecânica, fibrilação atrial e ventricular (VELASCO, 2004).

Registros científicos apontam que o potencial antimicrobiano do fenol (**1**) aumenta com o incremento de grupos alquila no sistema aromático, sugerindo que a lipofilia é uma propriedade física importante para a ação dessas substâncias. O aumento da atividade bactericida é potencializado por halogenação. Substituintes na posição *para* são mais efetivos do que na posição *orto* (ABRAHAM, 2003).

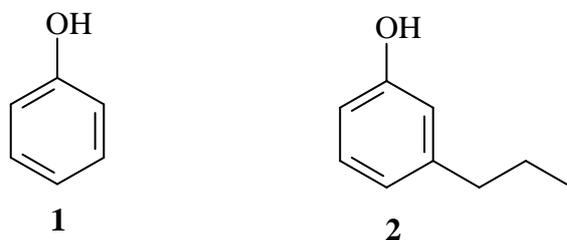


FIGURA 1. Fenóis simples: fenol (**1**) e 3-propilfenol (**2**).

Na natureza podemos encontrar diversos fenóis com cadeia lateral, a exemplo do 3-propilfenol (**2**) (FIGURA 1), identificado como um dos componentes da urina de búfalos e bovino. Essa substância tem sido utilizada como um atrativo

para a mosca Tsé-tsé (*Glossina palpalis.*) em função do seu odor (UJVÁRY, 2003).

Os fenóis podem ser utilizados para a obtenção de diversos compostos de interesse para a indústria química e farmacêutica. Os derivados fenólicos com substituintes na posição *orto*, a exemplo de *o*-hidroxiácidos, são intermediários sintéticos importantes na preparação de muitos heterociclos e compostos de origem natural.

Diversos agentes terapêuticos e biológicos são *o*-hidroxiácidos, derivados imediatos desses, ou ainda, tiveram *o*-hidroácidos como precursores em alguns dos processos de síntese. Um dos primeiros aliviadores da dor foi o ácido salicílico (**3**) (FIGURA 2), isolado pela primeira vez da casca do salgueiro (*Salix alba*) e industrialmente, preparado pela carboxilação direta do fenol pelo método de Kolbe-Schmitt. O ácido salicílico (**3**), além de suas propriedades analgésicas e antipiréticas, provoca irritação nas mucosas, por isso, foram efetuadas modificações em sua estrutura com o objetivo de minimizar o efeito indesejável, mantendo, as suas propriedades favoráveis a saúde. A primeira modificação aconteceu com a simples neutralização do grupo ácido levando a preparação do salicilato de sódio (**4**). Depois vieram o salicilato de fenila (**5**) (salol), a salicilamida (**6**), o ácido acetil salicílico (**7**) (AAS) e o ácido *p*-aminosalicílico (**8**) (PAS) (FIGURA 2).

O ácido acetilsalicílico (**7**) (FIGURA 2), conhecido como aspirina, foi introduzido na indústria terapêutica em 1899 e ainda hoje é o protótipo dos analgésicos antipiréticos e o fármaco de uso mais difundido no controle da dor e da febre, isoladamente, ou associado a outros fármacos. O PAS é um agente com atividade antibacteriana usado em associação com a estreptomicina e isoniazida no tratamento da tuberculose (MADSEN, 1911; CRAVEN, 1950; FELDMAN, 1950; CERVINI, 1951; LITTER, 1951).

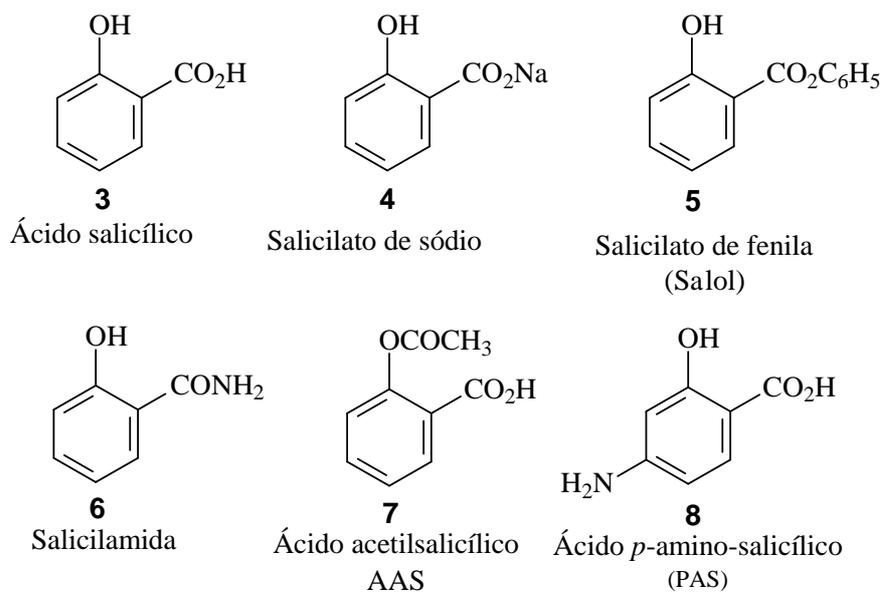
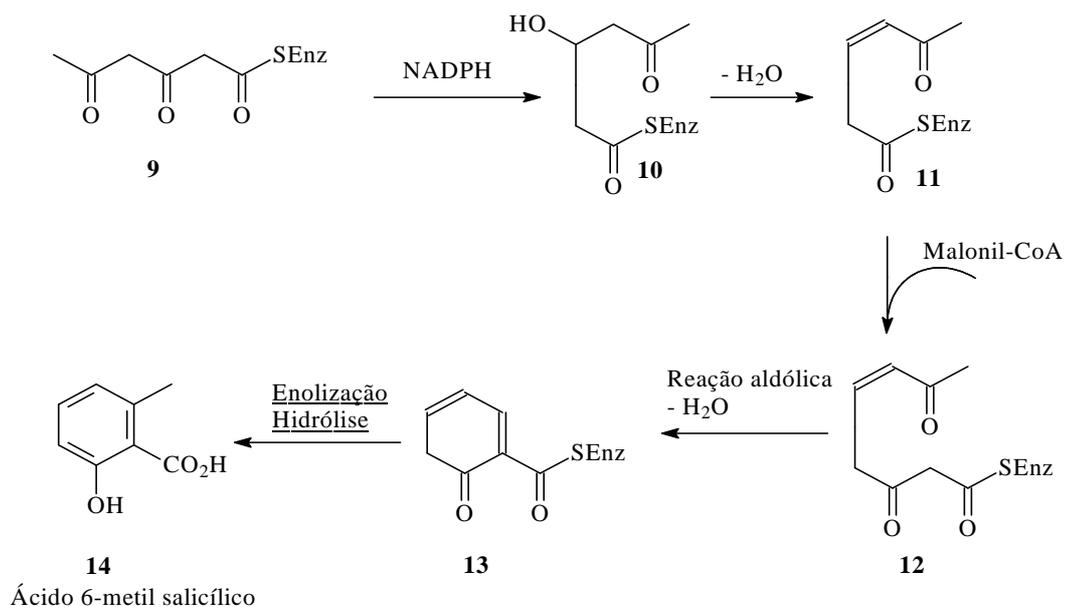


FIGURA 2. Ácido salicílico (**3**) e derivados.

1.2. Lipídios Fenólicos não-Isoprenóides.

Lipídios fenólicos não-isoprenóides constituem uma classe especial de fenóis, contendo uma cadeia alquílica lateral que tem sua origem biossintética na rota dos policetídeos aromáticos. A subunidade aromática dos lipídios fenólicos é formada a partir de uma molécula de Acetil-CoA e três moléculas de malonil-CoA. O NADPH atua na redução do grupo carbonila para álcool que posteriormente, sofre desidratação. Uma nova molécula de malonil-CoA é incorporada e uma reação aldólica intramolecular ocorre com subsequente perda de água. A rota biossintética é finalizada por enolização, seguida de hidrólise (ESQUEMA 1) (DEWICK, 2002). A rota biossintética do ácido 6-metilsalicílico (**14**) (ESQUEMA 1), encontrado na bactéria *Mycobacterium phlei* em 1966 (HUDSON, 1970), envolve a enzima ácido 6-metilsalicílico sintase. Para aumentar a cadeia lateral, responsável pela natureza lipídica dessa classe de compostos, é necessário um maior número de unidades malonil-CoA no início da biossíntese.



ESQUEMA 1. Rota biossintética dos lipídios não-isoprenóides.

Lipídios fenólicos não-isoprenóides são encontrados em várias espécies de plantas. A primeira espécie na qual foram encontrados esses lipídios foi a *Ginkgo biloba*, que possui em suas folhas considerável quantidade de ácido ginkgólico (análogo ao ácido anacárdico **15 g, i, j, n e o**), cardanol (**16 i**) e cardol (**17 i**) (FIGURA 3) (BEEK, 2001). Ácido anacárdico (**15 e, f, g, h e i**), cardanol (**16 e e g**) e cardol, (**17 e e g**) (FIGURA 3) também foram encontrados em algas marrons *Caulocystis cephalornithos* (NARKOWICZ, 2006).

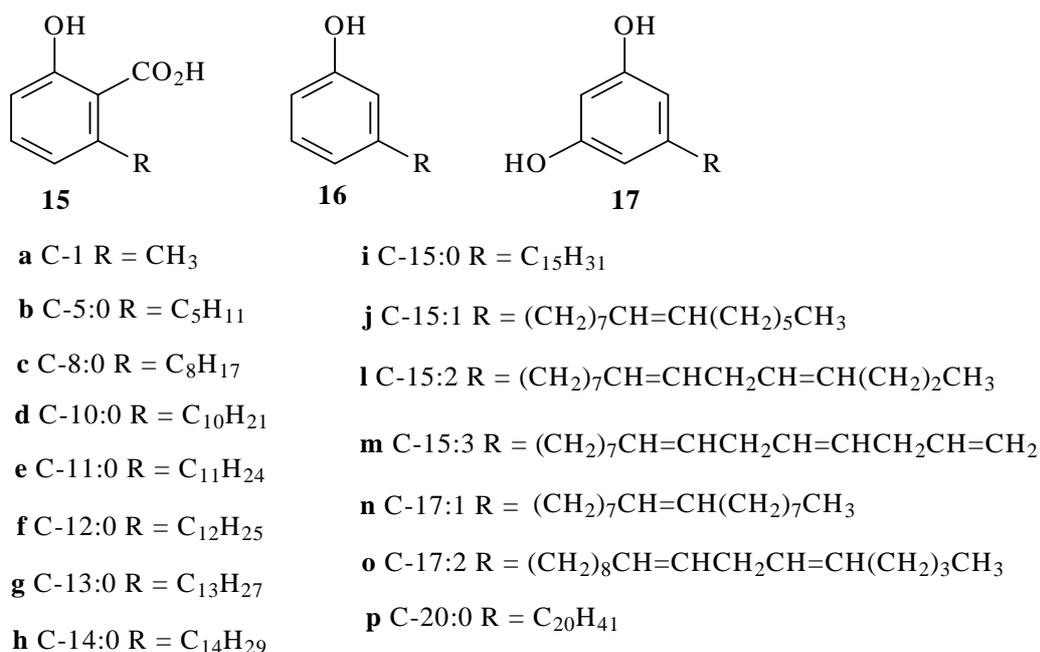


FIGURA 3. Exemplos de lipídios fenólicos não-isoprenóides.

A existência de lipídios resorcinólicos foi registrada em diversas fontes naturais, tais como: plantas, algas, fungos, bactérias e animais (KOZUBEK, 1999). Em geral esses lipídios resorcinólicos não-isoprenóides apresentam cadeia lateral variando entre C-5 e C-27 podendo ser saturada ou insaturada, e.g. mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexaeno. O anel aromático pode conter um grupo metila (metilcardol) e as hidroxilas podem se apresentar mono ou dimetilada e diacetilada. Alguns exibem um grupo carboxila, esterificado ou livre, entre as hidroxilas (KOZUBEK, 1999).

O ácido anacárdico (**15 i**) (FIGURA 3) se apresenta como um dos lipídios fenólicos mais relatados na literatura com relação à atividade biológica. Os ácidos anacárdicos (**15 a, b, c, d, f, n e p**) (sintéticos) e (**15 i-m**) (naturais) (FIGURA 3) exibiram atividade inibitória seletiva contra bactéria Gram-positiva quando comparados com o ácido salicílico. Esse último exibiu amplo espectro de atividade antimicrobiana, porém com alta concentração inibitória mínima. A atividade em *Staphylococcus mutans* e *S. aureus* do ácido anacárdico (**15 m**) (FIGURA 3) foi 2048 vezes mais efetiva que a do ácido salicílico (64 µg/mL). Nesse sentido, o ácido anacárdico deve ser considerado para uso prático, especialmente, para problemas de pele e dente causados por essas bactérias (KUBO, I., 1993).

Quando saturado, o ácido anacárdico (**15 i**) (FIGURA 3) pode ser usado vantajosamente, não somente como suplemento alimentar, mas também, para a diminuição da gordura corporal em terapia antiobesidade (TOYOMIZU, 2003b). Além de diminuir o conteúdo da gordura corporal, o ácido tetraidroanacárdico (**15 i**) tem o potencial de atuar como agente antiinflamatório em infecção causada pelo protozoário do gênero *Eimeria* (TOYOMIZU, 2003a).

A úlcera péptica é uma das doenças humanas mais comuns, afetando 50% da população em países industrializados. Por muitos anos, acreditava-se que essa patologia fosse causada por hipersecreção ácida do estômago, até surgirem evidências mostrando sua relação com a bactéria *Helicobacter pylori*, isolada a partir da mucosa gástrica de pacientes com doença de úlcera duodenal. A virulência do *H. pylori* parece estar associada à alta atividade da urease, que protege esse microorganismo do efeito deletério do ácido gástrico. No micro ambiente bacteriano, a geração de amônia torna-se importante no processo de

colonização e fator de sobrevivência do *H. pylori*. Um estudo da atividade contra *H. pylori* (de uma série homóloga de ácidos anacárdicos (**15 f, i-m**) (FIGURA 3) mostrou que esta cresceu gradualmente, com o comprimento da cadeia lateral C-12 exibiu o máximo e C-15 mostrou-se inativo. O cardanol (**16 m**) (FIGURA 3) não exibiu qualquer atividade antimicrobiana (KUBO, J., 1999).

Na procura por uma fonte natural contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM), o ácido anacárdico (**15 m**) (FIGURA 3) foi classificado como um excelente agente anti-SARM. Além disso, um efeito sinérgico foi observado na combinação do ácido anacárdico com meticilina, pelo qual a concentração inibitória mínima (MIC) de meticilina foi diminuída de 800 µg/mL para 1,56 µg/mL para SARM por combinação com 3,13 µg/mL do ácido anacárdico. A atividade do ácido anacárdico contra SARM aumentou com a homologia da cadeia alquila para o máximo ao redor 10-12 átomos de carbono. O ácido anacárdico com cadeia lateral alquílica entre C-10 e C-12 parece apresentar equilíbrio ótimo entre hidrofília e lipofília, importante para que o mesmo atinja concentração ótima na membrana celular de SARM. Além disso, o comprimento e o volume da subunidade lipofílica, que são alterados pela posição, número e estereoquímica das ligações duplas, também afetam a atividade (MUROI, 2004).

Os ácidos anacárdicos (**15 g, j, o e n**) (FIGURA 3) foram avaliados *in vitro* quanto à inibição da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH) proveniente do músculo de coelho, apresentaram concentração inibitória 50% (IC₅₀) de 9,4, 4,0, 4,6 e 2,4 µmol/L, respectivamente. No mesmo estudo foi demonstrado que o ácido anacárdico inibiu o crescimento de *Bacillus subtilis* (MURATA, 1997).

Outras aplicações biológicas dos ácidos anacárdicos foram mencionadas na literatura: contra zoósporos de *Aphanomyces cochlioides* (BEGUM, 2002), como agente antiinflamatório (TOYOMIZU, 2003a), inibição enzimática (HILDEBRAND, 1988) e antioxidante (ROSS, 1991).

Recentemente, o ácido anacárdico saturado (**15 i**) (FIGURA 3) foi utilizado como matéria-prima na preparação de análogos do sildenafil (**18, 19, 20 e 21**) (FIGURA 4) (PARAMASHIVAPPA, 2002), um importante fármaco utilizado no tratamento da disfunção erétil, conhecido comercialmente como Viagra[®]

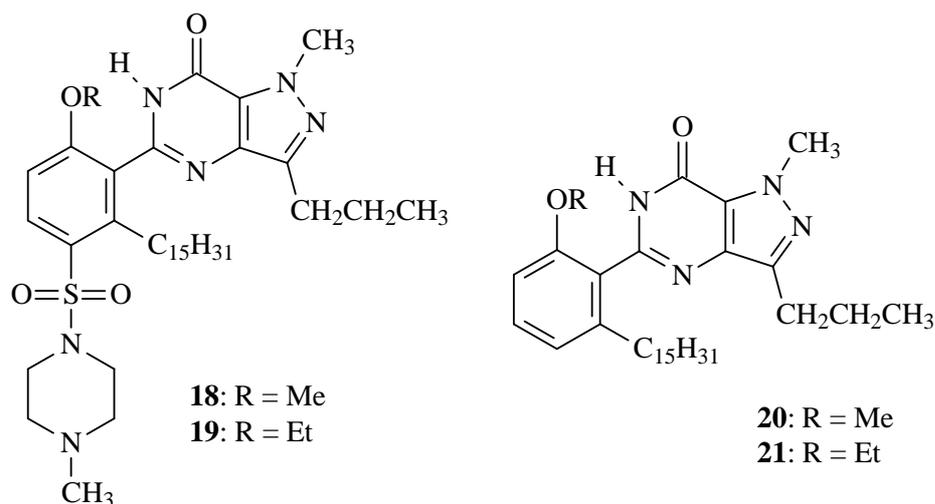


FIGURA 4. Análogos do sildenafil preparados a partir dos ácidos anacárdicos (PARAMASHIVAPPA, 2002).

Derivados benzotiazola (**22 e 23**), benzoxazola (**24 e 25**) e benzimidazola (**26, 27 e 28**) (FIGURA 5) candidatos a inibidores da ciclooxigenase (COX), enzima responsável pela catálise da conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas e tromboxanas, foram também preparados a partir do ácido anacárdico saturado (**15 i**) (FIGURA 3) (PARAMASHIVAPPA, 2003).

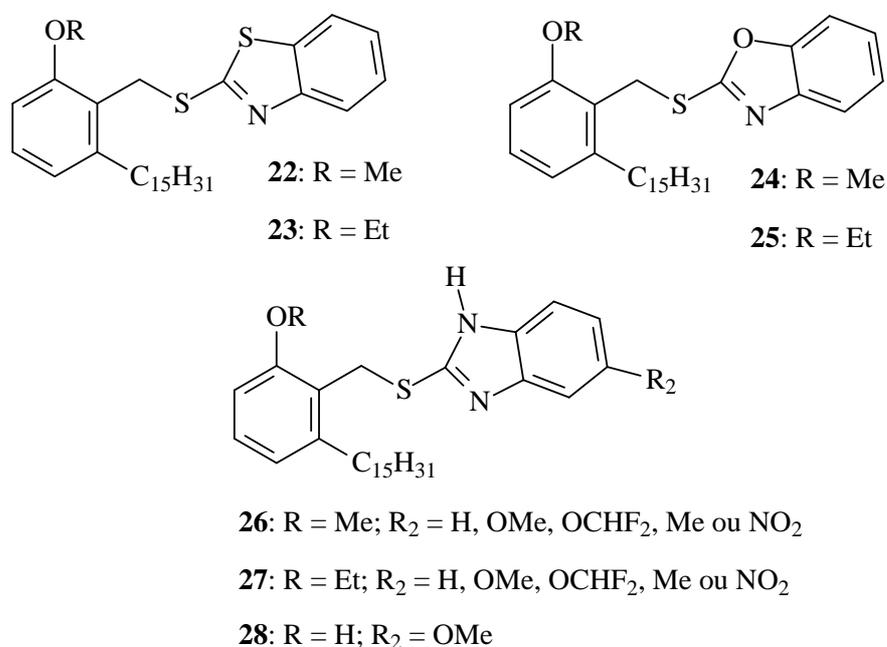


FIGURA 5. Derivados benzotiazola, benzimidazola e benzoxazola preparados a partir dos ácidos anacárdicos (PARAMASHIVAPPA, 2003).

O cardanol (**16 i-m**) (FIGURA 3) é amplamente utilizado na síntese de polímeros, vernizes, surfactantes, borrachas e antioxidantes automotivos (DANTAS, 2003; MAFFEZZOLI, 2004; PATEL, 2006).

O cardanol (**16 l e m**) (FIGURA 3) mostrou atividade moluscicida (KUBO, I., 1986). Enquanto que cardanóis sintéticos (**16 d e e**) (FIGURA 3) exibiram atividade antinematóide (TAKAISHI, 2004).

Um derivado do cardanol (**30**), análogo do canabidiol (**29**) (CBD) (FIGURA 6), um antipsicótico constituinte da *Cannabis sativa L.* (FIGURA 6), apresentou propriedades farmacológicas potencialmente importantes, tais como: antiepiléptica e ansiolítica (IC_{50} de 30,9 nM). Esse resultado sugere que o CBD é capaz de ativar o receptor canabinoide (CB1), embora com reduzida eficácia (REGGIO, 1995).

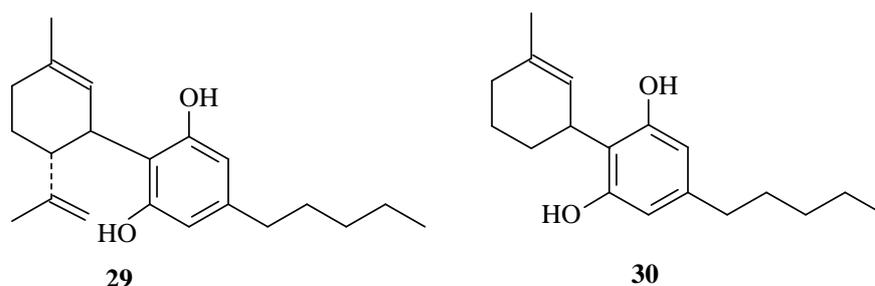


FIGURA 6. Canabidiol e seu derivado cardanol C-5.

Derivados sintéticos do cardanol (**16 i**) (FIGURA 3) foram avaliados quanto ao potencial antitumoral em linhagens de células de rato de fibroblastos. As substâncias que demonstraram maior atividade foram cardanol metilado (**31**), cardanol acetilado (**32**) e 2-*tert*-butilcardanol (**33**) (FIGURA 7) (SALADINO, 2000).

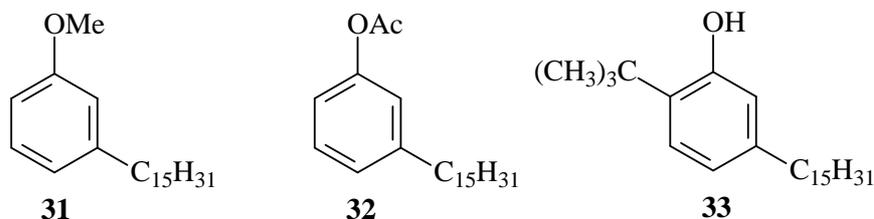


FIGURA 7. Derivados do cardanol com atividade antitumoral.

Derivados do cardanol (**16 i**) (FIGURA 3) foram sintetizados com o intuito de obter substâncias capazes de absorver radiação nas faixas de UVA e UVB. Apenas a mistura de isômeros do derivado benzofenona (**34**) e o benzoato (**35**) (FIGURA 8) se destacaram em relação à radiação UV de interesse, porém com fator de proteção considerado baixo (SILVA, V. C., 2003).

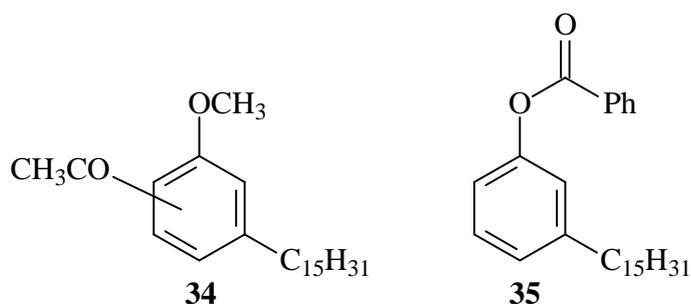


FIGURA 8. Derivados do LCC capazes de absorver na região do UVA e UVB.

Derivados β -alcoxilfenilacético do cardanol (**36-42**) (FIGURA 9) foram preparados com o objetivo de estudar o grupo hidrofílico quanto ao perfil antibacteriano *in vivo* (NASCENTE, 2006).

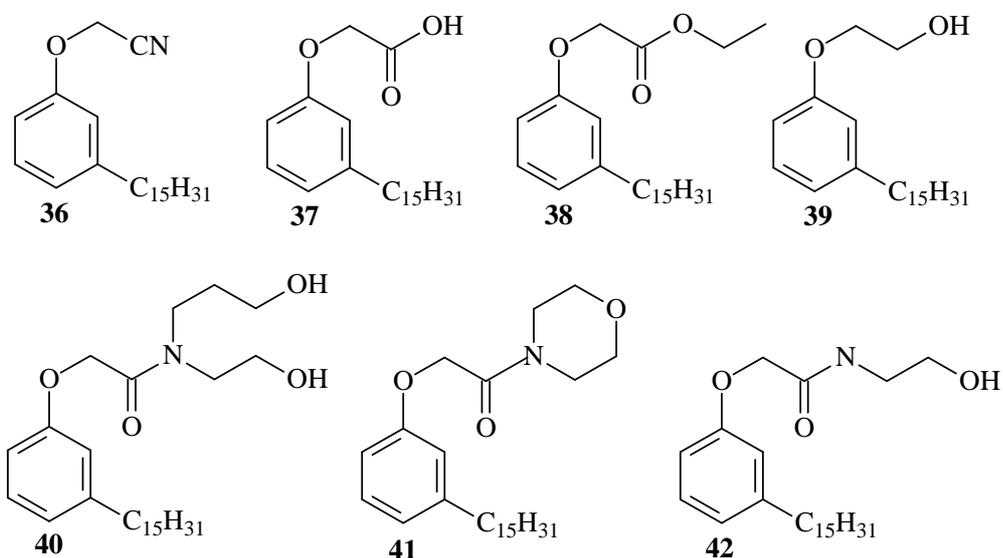


FIGURA 9. Derivados β -alcoxilfenilacético do cardanol.

A partir do cardanol (**16 i-m**) (FIGURA 3), recentemente, foram preparados análogos da rivastigmina (**44** e **45**) (FIGURA 10), importante fármaco utilizado no tratamento da doença de Alzheimer (IMBROISI, 2006).

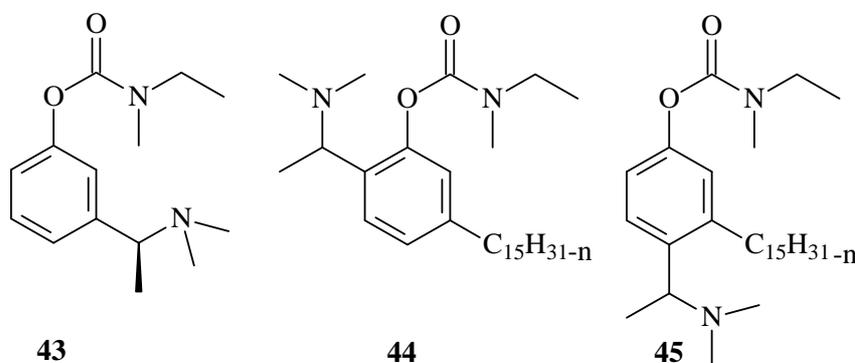


FIGURA 10. Rivastigmina e análogos derivados do cardanol.

Lipídios fenólicos não-isoprenóides são encontrados em grande percentagem na família Anacardiaceae, mais especificamente, em *Anacardium occidentale*, espécie amplamente distribuída no Brasil e conhecida como cajueiro (CORREIA, 2006). Dada a importância dessa fonte natural de lipídios, especial atenção será reservada ao cajueiro, na próxima seção.

1.3. Cajueiro – Fonte potencial de lipídios fenólicos não-isoprenóides.

O cajueiro, *Anacardium occidentale* Linn, pertence ao gênero *Anacardium*, da família Anacardiaceae. É uma planta nativa do Brasil e tem como habitat a região litorânea que se estende da Amazônia ao Nordeste, atualmente, é encontrada em diversas regiões tropicais, as quais se destacam Índia, Brasil, Moçambique, Tanzânia, Quênia e, recentemente, Guiné Bissau, Indonésia, Tailândia e Vietnã (MITCHELL, 1987; LUBI, 2000; PARAMASHIVAPPA, 2001), sendo a Índia o maior produtor de caju do mundo (DAS, 2003). A crescente exploração do cajueiro nessas nações acontece devido a sua grande utilização como uma fonte de alimentação nutritiva para as famílias; fonte de rendimento monetário para os pequenos e grandes produtores; carvão de ótima qualidade; além de ser uma fonte renovável (TREVISAN, 2006).

No Brasil, a agroindústria do caju está concentrada na região Nordeste (Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte participam com 95% da produção). O agronegócio da castanha do caju representa uma parcela significativa da economia, garantindo emprego a mais de 36.100 pessoas no meio rural (PESSOA, 2006).

O cajueiro (FIGURA 11) é uma árvore cuja copa chega a alcançar uma altura entre 10 a 15 metros, mas dependendo do solo, o seu desenvolvimento fica prejudicado reduzindo seu porte e apresentando ramos tortuosos e emaranhados (LUBI, 2000). Nenhum vegetal brasileiro supera o cajueiro quanto ao aproveitamento, pois além do caju e da castanha, a madeira, a casca, a entrecasca e a folha também têm uso consagrado.



FIGURA 11. Cajueiro (Fonte: LITMO).

O fruto do cajueiro é uma noz (castanha do caju) que se prende a extremidade do pseudofruto (caju) (FIGURA 12). O caju sofre fácil deterioração, não sendo totalmente aproveitado para a venda. No processo de extração industrial do suco do caju, a massa orgânica residual é aproveitada para a fabricação de hambúrguer que é distribuído nas escolas públicas (fonte: http://bs.sede.embrapa.br/seguranca_alimentar.html. Acesso em 16/02/08).



FIGURA 12. Caju (Fonte: LITMO).

A castanha do caju apresenta a forma de um rim, com tamanho variável e subdivida em casca (pericarpo), película e amêndoa. A casca da castanha é composta pelo epicarpo, fina camada externa da casca, mesocarpo, camada alveolada, que contém um óleo escuro, cáustico, irritante, viscoso e inflamável, conhecido como líquido da castanha do caju (LCC). O endocarpo, uma película dura que protege a amêndoa é fonte rica em proteínas e componentes graxos (FIGURA 13) (MITCHELL, 1987; SMITH, 2003).

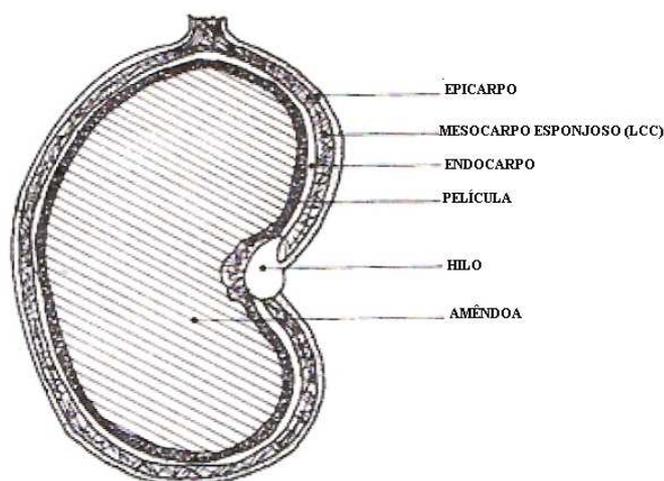


FIGURA 13. Corte transversal da castanha de caju

(Fonte: <http://www.cnpat.embrapa.br/users/vitor/cajucultura/index.html>).

A castanha é a parte economicamente mais importante, pois após a retirada do pericarpo, é obtida a amêndoa, que é comercializada crua, torrada e salgada. As amêndoas inteiras servem como sobremesa e aperitivo em coquetéis. Os pedaços da castanha quebrada são aproveitados na manufatura de chocolate, confeito e pastéis. O índice de amêndoas danificadas oscila entre 40 e 50% (FERRAZ, 2005).

No processo de industrialização da castanha para obtenção da amêndoa, isola-se o LCC técnico, um material de grande interesse como matéria-prima na fabricação de inseticidas, germicidas, antioxidantes, isolantes térmicos, material de atrito, plastificantes, tensoativos, tintas e vernizes (MITCHELL, 1987; LUBI, 2000).

O LCC natural compreende 25% do peso do fruto, sendo uma das fontes mais ricas de lipídios fenólicos não-isoprenóides formada por uma mistura de quatro constituintes (e.g. ácidos anacárdicos, cardóis, cardanolis e metilcardóis) (MITCHELL, 1987; LUBI, 2000). Os cardanolis (**16 i-m**) (FIGURA 14) apresentam apenas uma hidroxila no anel aromático, enquanto que, os cardóis (**17 i-m**) (FIGURA 14) apresentam estrutura resorcílica. Os metil cardóis (**46 i-m**) (FIGURA 14) apresentam um grupo metila entre as hidroxilas. Os ácidos anacárdicos (**15 i-m**) (FIGURA 14) têm um grupo carboxila na posição *orto*, fato que os diferencia dos demais lipídios fenólicos. Todos os lipídios fenólicos não-isoprenóides constituintes do LCC contêm uma cadeia lateral com quinze átomos de carbono, saturada ou insaturada, e.g. mono-, di-, e trieno (FIGURA 14) (PATEL, 2006).

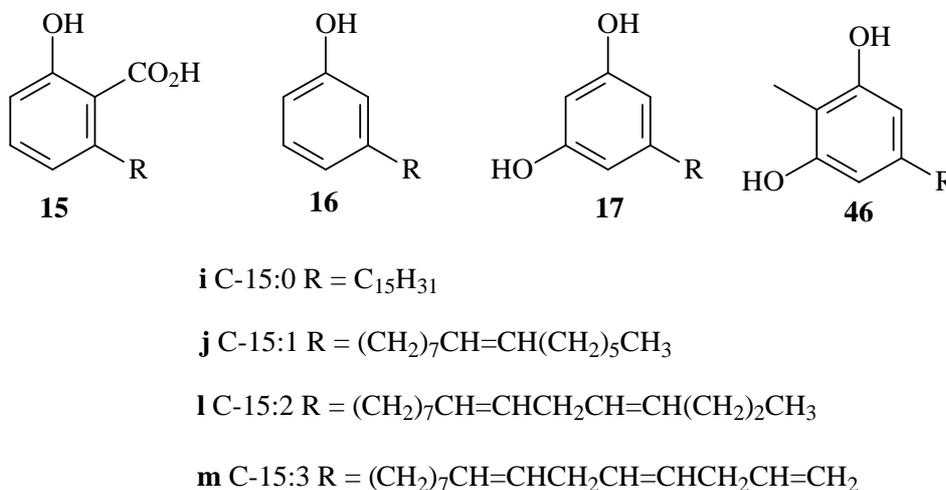


FIGURA 14. Lipídios fenólicos não-isoprenóides constituintes do LCC.

O LCC técnico, um subproduto da torrefação da castanha de caju, é menos corrosivo que o natural, apresentando como principais constituintes o cardol (**17 i-m**) e o cardanol (**16 i-m**) (FIGURA 14). O ácido anacárdico (**15 i-m**) (FIGURA 14) encontra-se em pequena proporção, em função da descarboxilação que ocorre durante o processo de aquecimento no refino (TYMAN, 1979; MAHANWAR, 1996;

SMITH, 2003). Devido a excelência de mercado para a amêndoa, o LCC técnico é um importante produto da pauta de exportação do Brasil, entretanto, em função dos preços irrisórios praticados pelo mercado de exportação, por vezes torna-se rejeito da cajucultura.

Convencionalmente, a quantidade e a qualidade do LCC no extrato bruto dependem do método de extração e das condições do acondicionamento das castanhas. Vários autores têm informado a variação da composição na extração de LCC. Registros da literatura demonstram que a extração do LCC por método frio forneceu 90% de ácido anacárdico e aproximadamente 10% de cardol (DAS, 2004). Segundo Lubi, (2003), o LCC natural contém aproximadamente 65% de ácido anacárdico (**15 i-m**), 11% de cardol (**17i-m**), 2-3% de 2-metil cardol (**46 i-m**), traços de cardanol (**16 i-m**) (FIGURA 14), sendo o restante formado por material polimérico. Para o LCC técnico, são relatadas as seguintes composições aproximadas 63% de cardanol (**16 i-m**), 11% de cardol (**17 i-m**) e 24% de material polimérico (LUBI, 2003; LUBIC, 2003); 64,8% de cardanol (**16 i-m**), 20,5% de cardol (**17 i-m**), 2,8% de 2-metilcardol (**46 i-m**) (FIGURA 14) e o restante como um material polimérico não volátil (TYMAN, 1975).

O LCC configura-se como uma matéria-prima valiosa em função da abundância e das características estruturais dos seus lipídios fenólicos constituintes de caráter aromático e acíclico, aliado à existência de diversos grupos funcionais no anel aromático e múltiplas insaturações na cadeia alifática em C-8. A abundância, a versatilidade e os vários registros de atividades biológicas de constituintes fenólicos do LCC e seus derivados, em conjunto, têm motivado ao longo de alguns anos o interesse do nosso grupo de pesquisa em estudos envolvendo a sua utilização para o desenvolvimento de candidatos a fármacos (SANTOS, 1993; SANTOS, 1999; LOGRADO, 2005; RESCK, 2005).

O presente trabalho representa mais uma contribuição para essa linha de pesquisa que visa à exploração sustentável de matérias-primas abundantes no País na produção de compostos com maior valor agregado.

Objetivos

2.1. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Devido à abundância, o grande número de registros que evidenciam o potencial químico, biológico e/ou farmacológico dos lipídios fenólicos do LCC e de seus derivados nosso grupo de pesquisa vem ao longo de vários anos realizando estudos em uma linha de pesquisa que visa à exploração do LCC como uma matéria-prima promissora e renovável na preparação de compostos com maior valor agregado, em especial, substâncias com potencial atividade biológica e/ou farmacológica.

Por ser o ácido anacárdico o maior componente do LCC *in natura* e o cardanol o constituinte mais abundante no LCC técnico, o presente estudo tem como objetivo geral a preparação de derivados do ácido anacárdico e do cardanol, visando à avaliação comparativa do perfil farmacológico das substâncias naturais e modificadas.

2.2. Objetivos específicos

Na consecução do objetivo geral desse estudo, os seguintes objetivos específicos foram esboçados:

- I. Separação dos lipídeos fenólicos do LCC por meio de metodologias de domínio do nosso grupo de pesquisa.
- II. Modificação química dos lipídeos fenólicos do LCC - As transformações a serem realizadas encontram-se divididas em duas categorias: modificações moderadas (proteção dos grupos funcionais e hidrogenação da cadeia lateral) e modificações com maior grau de complexidade visando a preparação de derivados 4-hidroxicumarínicos.
- III. Caracterização dos lipídeos e seus derivados por meio de técnicas cromatográficas e espectrométricas;

- IV. Avaliação da atividade biológica e/ou farmacológica por meio de testes *in vitro* e *ex-vivo*, tendo como objetivo à descoberta de novos insumos para a indústria nacional. O estudo da estrutura-atividade objetivará à identificação de grupos funcionais indispensáveis à atividade biológica e/ou que intensifiquem os efeitos biológicos minimizando os possíveis efeitos indesejáveis.

Espera-se que as modificações químicas no ácido anacárdico (**15 i**) e no cardanol (**16 i**) (FIGURA 14) produzam derivados com propriedades farmacológicas interessantes, tais como atividade antioxidante, fotoprotetora e antitumoral, com baixa toxicidade para células eucariotas, principalmente de mamíferos. Além disso, a determinação de atividades inéditas, tais como a antifúngica e antiparasitária podem ser avaliadas, visando à descoberta de novas entidades químicas que possam ser empregadas na terapêutica.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Parte Química

3.1.1. Procedimentos Gerais

- As reações e procedimentos químicos foram realizados no Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas – LITMO.
- Os reagentes e solventes foram adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Merck, Vetec) e utilizados sem purificação adicional, exceto nas reações que requereram um maior grau de pureza na qual foi necessário realizar a secagem.
- As análises em cromatografia de camada delgada foram efetuadas em placas de silicagel suportada em alumínio 60F₂₅₄/0,2 mm (Merck), utilizando como reveladores: luz ultravioleta, iodo, solução de vanilina sulfúrica, solução de permanganato de potássio e/ou uma solução 5% de ácido molibdofosfórico em etanol.
- Os produtos foram purificados por recristalização, cromatografia rápida sob pressão (Flash Column Chromatography) ou por cromatografia rápida em coluna seca (Dry-Flash Column Chromatography), usando como suporte silicagel 60 (0,04-0,06 mm) e como eluente hexano-acetato de etila em concentrações apropriadas.
- Os pontos de fusão foram determinados no bloco de Köfler e foram apresentados sem correção.
- Os espectros no IV foram registrados nos espectrômetros Bomem Hartmann & Braun (MB – 100), com valores expressos em cm⁻¹.
- Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram registrados em espectrômetros Varian Mercury plus (300 MHz, 7.05 T), utilizando como solvente, CDCl₃. Os

deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm) com referência ao TMS, e os padrões de acoplamento definidos por: s (singleto), d (dubleto), t (tripleto), m (multiplete), dd (duplo dubleto), td (triplo dubleto), dt (duplo tripleto) e bl (banda larga).

3.1.2. Obtenção dos lipídeos fenólicos do LCC.

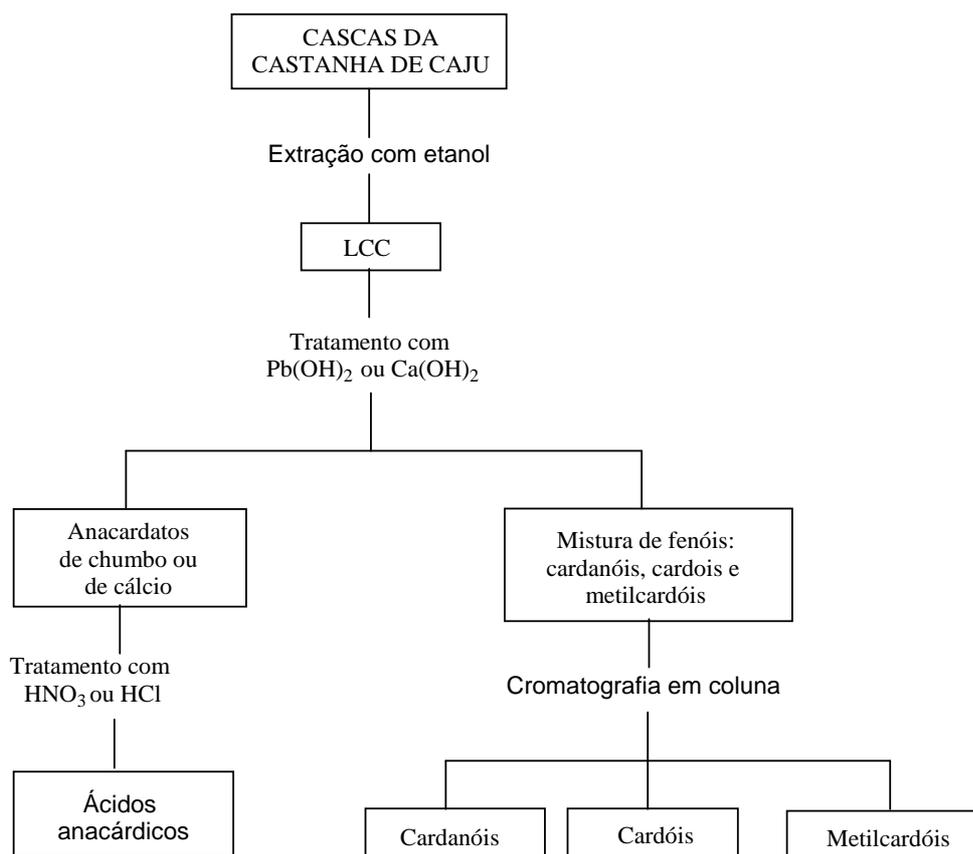
3.1.2.1. Extração do LCC da castanha de caju.

Os lipídios fenólicos constituintes do LCC *in natura* foram extraídos das castanhas de caju (*Anacardium occidentale*), gentilmente cedidas pela Iracema Indústrias de Caju Ltda, Fortaleza – Ceará.

Procedimento: As castanhas foram cortadas em duas partes para remoção da amêndoa. 500 g de cascas de castanha de caju fragmentadas em pedaços menores foram exaustivamente extraídas com etanol durante 6 h em um sistema Söhxlet. Após evaporação do solvente foi obtido um líquido escuro e cáustico (157 g; 31%) (comparado por ccd com LCC técnico, hexano:acetato de etila 4:1).

3.1.2.2. Separação dos ácidos anacárdicos do LCC *in natura* (TYMAN, 1991).

De acordo com a literatura (PARAMASHIVAPPA, 2001) os lipídios fenólicos do LCC podem ser fracionados por diferentes metodologias (ESQUEMA 2). Neste estudo, optamos pela utilização de uma adaptação do método que emprega hidróxido de chumbo para extração química dos ácidos anacárdicos (TYMAN, 1991).



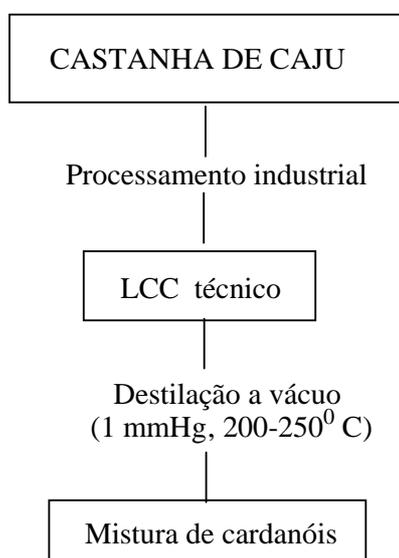
ESQUEMA 2. Separação dos componentes do LCC.

Procedimento: Em um Erlenmeyer de 500 mL foram dissolvidos 44 g de nitrato de chumbo em 175 mL de água. A esta solução, mantida sob agitação, foram adicionados 12 g de hidróxido de sódio dissolvido em 60 mL de água. Após 1 h de agitação à temperatura ambiente, o líquido sobrenadante foi filtrado em um funil de Büchner, o precipitado foi lavado com água até que o pH do filtrado apresentou-se neutro ao papel de pH e, finalmente, lavado com 100 mL de etanol. O precipitado de hidróxido de chumbo foi transferido para um Erlenmeyer de 500 mL, a este foi adicionado o LCC natural (25 g) dissolvido em 150 mL de etanol e a mistura foi deixada sob forte agitação durante 2 h. O precipitado formado foi recolhido por filtração a vácuo e lavado com etanol. A mistura de anacardatos de chumbo foi transferida para um Erlenmeyer de 500 mL e suspenso em 200 mL de éter etílico. À suspensão, foram adicionados cerca de 100 mL de uma solução de ácido nítrico 20% e a mistura foi mantida sob vigorosa agitação durante 1 h. A mistura foi filtrada em funil de Büchner e o filtrado foi transferido para um funil de separação. Após a separação da fase aquosa, a fase orgânica foi lavada por várias vezes com água e,

finalmente, com uma solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, tratada com carvão ativado e concentrada no evaporador rotatório para fornecer um óleo escuro, caracterizado como uma mistura de ácidos anacárdicos (**15 i-m**) (FIGURA 14) (15,25 g; 61% a partir do LCC).

3.1.2.3. Separação do cardanol do LCC técnico (IZZO, 1950).

O cardanol foi obtido do LCC técnico (dado pela CASCAJU AGROINDUSTRIAL S.A., Cascavel – Ceará) por meio da técnica de destilação a vácuo (ESQUEMA 3), conforme descrito na literatura (IZZO, 1950).



ESQUEMA 3. Separação dos cardanóis do LCC técnico.

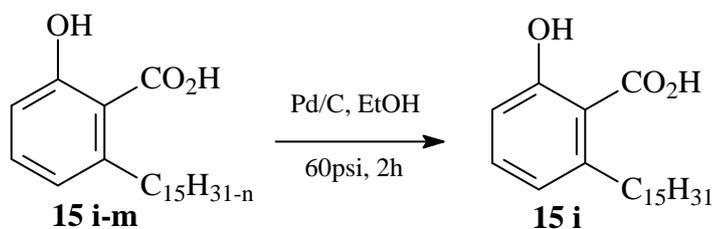
Procedimento: 120 g de LCC técnico foram transferidos para um balão de destilação de 200 mL, que na seqüência foi adaptado a um sistema de destilação a vácuo. O sistema foi aquecido até que o ponto de ebulição do cardanol foi alcançado (218-224⁰C). Ao final da destilação foi obtido um óleo amarelo claro caracterizado como uma mistura de cardanóis (**16 i-m**) (FIGURA 14) (77,17 g; 64,30%).

3.1.3. Modificações químicas

3.1.3.1. Reações de hidrogenação catalítica

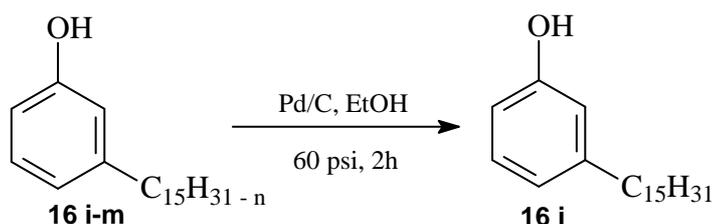
Em um primeiro momento, os ácidos anacárdicos (**15 i-m**) e os cardanóis naturais (**16 i-m**) (FIGURA 14) obtidos conforme procedimentos descritos acima foram submetidos a processo de hidrogenação catalítica para obtenção dos correspondentes lipídios fenólicos saturados. As reações de hidrogenação catalítica foram efetuadas em um aparelho da série 3910 - Parr Instrument Company.

3.1.3.1.1. Preparação do ácido 2-hidróxi-6-pentadecilbenzóico (ácido tetraidroanacárdico)



Procedimento: A mistura de ácidos anacárdicos (**15 i-m**) (10 g; 28 mmol) dissolvida em etanol seco (40 mL) foi adicionada de Pd-C 10% (0,2 g) e a mistura reacional foi mantida sob agitação a um pressão de 60 psi de H₂ num hidrogenador, por 2 horas. Após esse tempo, a mistura reacional foi filtrada num funil sinterizado contendo sílica e Celite® (95:5). Após evaporação do solvente foi obtido um sólido marrom o qual recristalizado em hexano forneceu um sólido branco (**15 i**) (9.5 g; 27,2 mmol; 94%; p.f. 88-90^oC).

3.1.3.1.2. Preparação do 3-Pentadecil fenol (cardanol saturado)

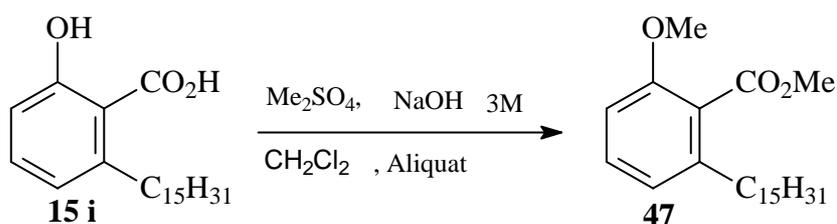


Procedimento: Uma mistura de cardanóis (8,62 g; 28 mmol) dissolvidos em etanol seco (40 mL), foi adicionada de Pd-C (10%; 0,2 g) e a mistura de reação foi mantida sob agitação a uma pressão de 60 psi de H₂ num hidrogenador por 2 horas. Após esse tempo, a mistura da reação foi filtrada num funil sinterizado contendo sílica e Celite® (95:5). Após evaporação do solvente foi obtido um sólido que foi recristalizado em hexano para fornecer 8,14 g de um sólido branco (**16 i**) (26 mmol; 92%, p.f. 53.5⁰C).

3.1.3.2. Reações de proteção de grupos funcionais

O ácido anacárdico (**15 i**) e o cardanol (**16 i**) saturados foram modificados por meio de procedimentos clássicos (metilação e acetilação) de forma a gerar éteres e ésteres correspondentes, conforme descrito abaixo.

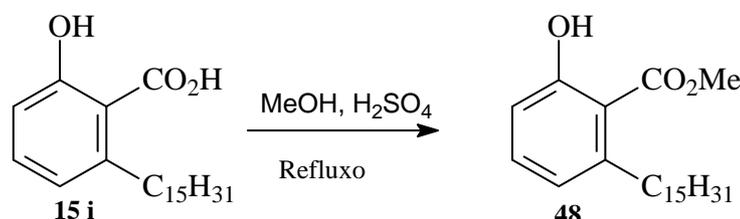
3.1.3.2.1. Preparação do 2-metóxi-6-pentadecil benzoato de metila



Procedimento: O ácido anacárdico saturado (**15 i**) (7,2 g; 20,65 mmol) foi dissolvido em diclorometano (100 mL), hidróxido de sódio (3 M), Aliquat (0,8 g) e sulfato de metila (10 mL). A mistura ficou sob agitação por 2 horas. Ao final de 2 horas a fase orgânica foi lavada com solução de NH₄OH 5%, e em seguida, extraída com acetato de etila. Os extratos foram lavados três vezes com solução saturada de cloreto de sódio. A solução foi seca, tratada com carvão ativado e

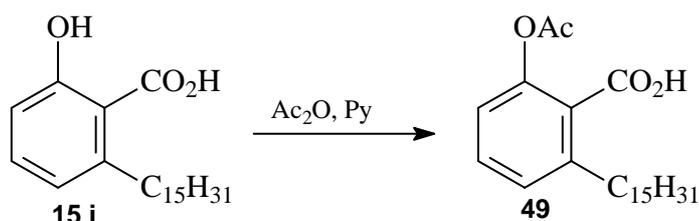
celite. O produto foi recristalizado em hexano para fornecer um sólido amarelo claro (**47**) (6,95 g; 96,66 %; p.f. 85-86°C).

3.1.3.2.2. Preparação do 2-hidróxi-6-pentadecil-benzoato de metila



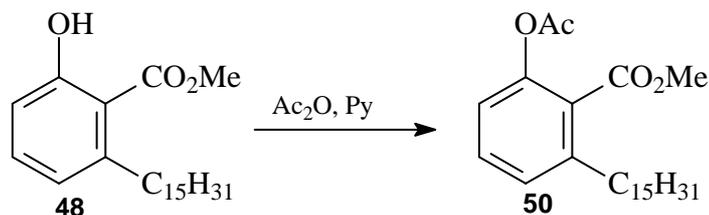
Procedimento: Num balão de 100 mL adaptado com condensador de refluxo foram adicionados 3 g do ácido anacárdico saturado (**15 i**) dissolvidos em 50 mL de metanol e à solução foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. O sistema foi mantido sob refluxo e agitação por 48 h. O solvente foi evaporado e uma solução diluída de K₂CO₃ foi adicionada, até ser neutralizada. A fase orgânica foi separada e seca com sulfato de sódio. O produto foi recristalizado em hexano para fornecer um sólido amarelado (**48**) com rendimento de 77% (2,4 g, 6,6 mmol).

3.1.3.2.3. Preparação do ácido 2-acetiloxi-6-pentadecil-benzóico



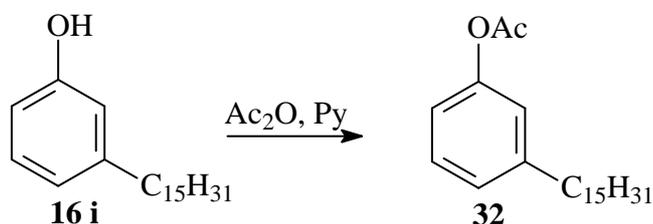
Procedimento: O ácido anacárdico saturado (**15 i**) (5 g; 14,36 mmol) foi dissolvido em 20 mL de anidrido acético e 40 mL de piridina. A mistura foi aquecida em banho-maria por 4h, sob agitação constante. Ao final de 4h a mistura reacional foi despejada sobre gelo picado e extraída com acetato de etila. Os extratos foram lavados três vezes com HCl (10%, gelado) e com solução saturada de NaCl. O produto foi seco e recristalizado em hexano com rendimento de 85% (4,93 g; pf 70-72°C).

3.1.3.2.4. Preparação do 2-acetiloxi-6-pentadecilbenzoato de metila



Procedimento: 2-Hidróxi-6-pentadecil-benzoato de metila (**48**) (0,9 g; 2,7 mmol) foi dissolvido em 3,4 mL de anidrido acético e 6,8 mL de piridina. A mistura foi aquecida em banho-maria por 4h, sob agitação constante. Ao final de 4h a mistura reacional foi despejada sobre gelo picado e extraída com acetato de etila. Os extratos foram lavados três vezes com HCl (10%, gelado) e com solução saturada de NaCl. O produto (**50**) foi seco e recristalizado em hexano com rendimento de 63,8% (1 g; 2,4 mmol).

3.1.3.2.5. Preparação do acetato de 3-pentadecilfenol

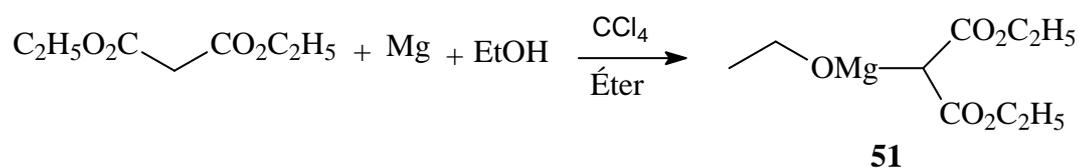


Procedimento: Cardanol saturado (**16 i**) (4,35 g; 14,28 mmol; massa molar $304,51 \text{ g mol}^{-1}$) foi dissolvido em 19,5 mL de anidrido acético e 39 mL de piridina. A mistura foi aquecida em banho-maria por 4 horas, sob agitação constante. Ao final de 4 horas a mistura reacional foi vertida sobre gelo picado e extraída com acetato de etila. Os extratos foram lavados três vezes com HCl (10%, gelado) e com solução saturada de NaCl. O produto (**32**) foi seco e recristalizado em hexano para fornecer um sólido branco com rendimento de 83,83% (4,15 g; 11,97 mmol; p.f. $53,5^{\circ}\text{C}$).

3.1.3.3. Reações químicas envolvidas na proposta de síntese de derivados 4-hidróxi cumarínicos.

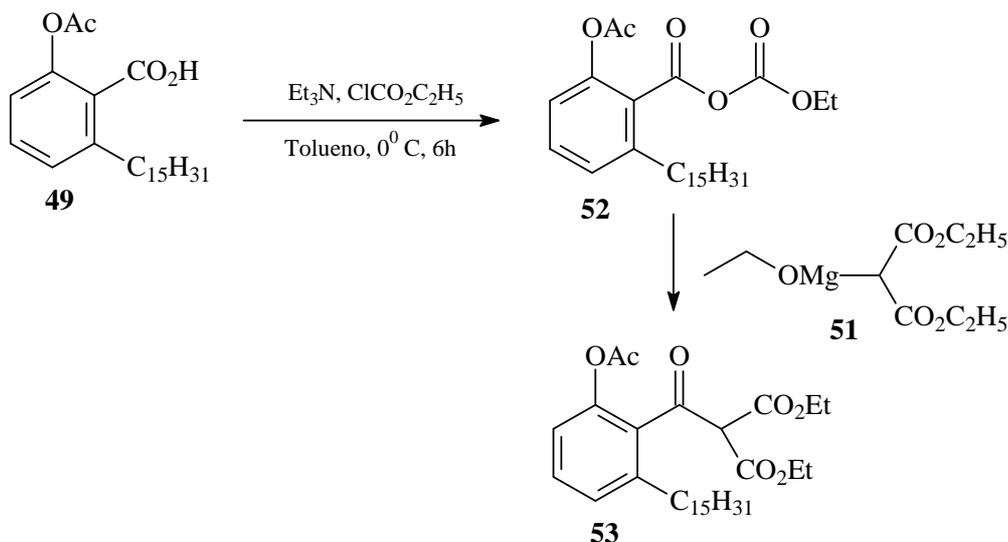
Visando à preparação de derivados 4-hidroxicumarínicos planejados a partir dos lipídios do LCC foram realizadas modificações com maior grau de complexidade com os ácidos anacárdicos e os cardanóis, que serão descritas abaixo.

3.1.3.3.1. Preparação do magnésio etoximalônico



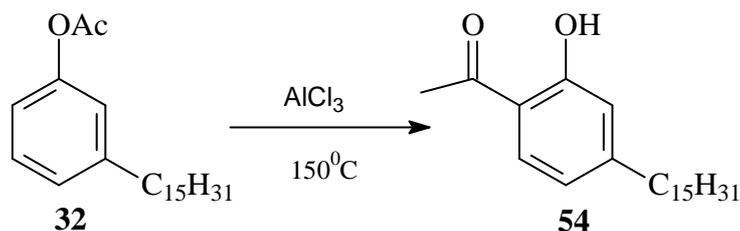
Procedimento: Foi adicionado $\text{Mg}_{(s)}$ (1,25 g), etanol seco (1,25 mL) e tetracloreto de carbono (0,05 mL) num balão com duas bocas de 100 mL. Logo após, adicionou-se 1,5 mL de uma mistura de dietilmalonato (8,41 mL) e etanol seco (4 mL), aguardou-se 30 min e foi adicionado o restante da mistura. Ao sistema foi adicionado éter seco (15 mL) e o mesmo ficou sob agitação por 6h em banho-maria (brando). O produto (**51**) foi colocado num balão de 100 mL e foi levado ao rotaevaporador. Benzeno seco (15 mL) foi adicionado e a mistura foi colocada no rotaevaporador. Foi adicionado éter seco (5 mL) ao produto (**51**) e esse foi misturado com o anidrido da preparação seguinte.

3.1.3.3.2. Preparação do dietil [2-(acetiloxi)-6-pentadecilfenil]carbonil propanedioato



Procedimento: Em um balão com três bocas foi adicionado acetato de anacardolila (**49**) (3,9 g), trietilamina (1,26 mL) e tolueno (11,3 mL). O sistema foi mantido sob em agitação por 30 minutos a 0°C , posteriormente, foi adicionado cuidadosamente cloroformiato de etila (0,85 mL). A reação foi mantida em agitação a 0°C por 6 h. Logo depois foi adicionado magnésio etoximalônico (**51**) e o sistema mantido sob agitação por 24 h. O produto foi tratado com ácido sulfúrico (18 mL) a 5%, a fase orgânica foi separada e a fase aquosa foi lavada com três porções de éter (5 mL), o extrato com éter foi adicionado na fase orgânica. A fase orgânica foi lavada com ácido sulfúrico diluído, com água (15 mL) e três vezes com solução saturada de bicarbonato de sódio. A solução foi seca com sulfato de sódio e o solvente foi extraído no rotoevaporador. O produto foi colocado no vácuo e obtivemos um sólido marrom (**53**) (6,01 g; 43%).

3.1.3.3.3. Preparação do 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona



Procedimento: Acetato de cardanolila (**32**) (1,8 g; 6 mmol) e tricloreto de alumínio previamente sublimado (0,97 g; 7 mmol; massa molar 136) foram aquecidos num balão com constante agitação, mantendo a temperatura reacional abaixo de 130⁰C por 25 minutos. Ao final foram adicionados 1,5 mL de água e 1,5 mL de HCl - concentrado. A fase orgânica foi extraída com acetato de etila e o solvente foi evaporado. Da fase orgânica foi obtido um líquido vermelho vinho, que foi separado por uma coluna flash utilizando acetato de etila/hexano (5, 10, 15, 20, 100%) fornecendo um líquido amarelo, que quando recristalizado em hexano gerou um sólido marrom claro (**54**) (1,63 g; 79%. p.f. 41-42⁰C).

3.2. Avaliação da atividade biológica

3.2.1. Testes biológicos

Os testes biológicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Molecular - FARMOL.

3.2.1.1. Toxicidade a larvas de *Artemia salina* (MEYER et al., 1982).

Os ensaios de letalidade serão realizados com larva *Artemia salina* para analisar o efeito citotóxico contra células eucariotas.

Preparação da solução salina: Uma solução salina foi preparada a partir de 36,5 g de sal marinho sintético em 1 L de água destilada. Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e preparo das diluições.

Eclosão dos ovos: Os ovos de *Artemia salina* de alta eclosão foram adquiridos no comércio local. Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/350 mL) foram colocados para eclodir em solução salina por 48 horas com aeração e luz artificial contínua (lâmpada de 40 W).

Controle positivo: O controle positivo foi realizado com dicromato de potássio 2 mg,

Controle negativo: em tubos contendo 0,2 mL de DMSO e 10 larvas de *Artemia*, sendo esse submetido a condições da amostra a ser analisada.

Bioensaio: As amostras foram dissolvidas em 200 μ L de DMSO e 20 mL de solução salina. Parte dessa solução (10 mL) foi transferida para um béquer e diluída com 10 mL de salina, sendo o procedimento realizado novamente noutro béquer. Depois de 48 horas a temperatura ambiente, as soluções a serem testadas, em triplicata, foram introduzidas em tubos de ensaios nos quais foram adicionadas 10 unidades de *Artemia* no segundo estágio larvar (nauplii) e a cultura foi incubada por 24 horas (FIGURA 15). Após o termino das 24 horas as larvas sobreviventes foram contadas. O cálculo da DL_{50} foi realizado pelo método Probit.

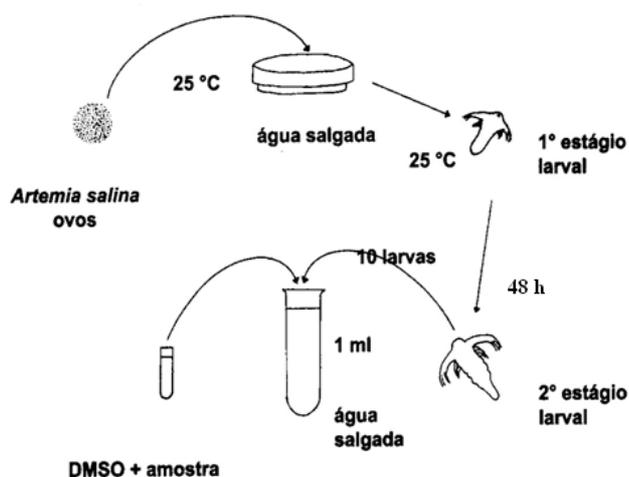


FIGURA 15. Modelo esquemático do teste de *A. salina* (HOSTETTMAN, 2003).

3.2.1.2. Avaliação do potencial antioxidante utilizado como modelo a redução do complexo de fosfomolibdênio (PRIETO, 1999)

Os dados de absorvância foram registrados em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601).

O método de avaliação da capacidade antioxidante utilizado neste estudo foi baseado na redução do complexo de fosfomolibdênio em comparação com 3 compostos de atividade antioxidante conhecida.

O ensaio foi testado quanto à sua significância estatística utilizando a metodologia de Prieto, 1999, com ligeira modificação na qual consiste em construir uma curva-padrão utilizando material antioxidante como referência.

Reagentes: O reagente foi preparado pela mistura de 0,025 L de solução aquosa de fosfato de sódio (Na_3PO_4 , 28 mM, 0,114 g), 0,025 L de solução aquosa de molibdato de amônio tetraidratado [$(\text{N}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4 mM, 0,117 g] e 0,025 L de solução aquosa de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 0,6 M, 0,079 L).

Substâncias de referência: quercetina (amostra gentilmente cedida pelo professor Dr. Lauro E. S. Barata do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Unicamp), 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (Synth), ácido ascórbico (Dinâmica).

Foram preparadas soluções-estoque das três substâncias de referência utilizando etanol como solvente.

Quercetina: para a construção da curva-padrão, alíquotas da solução-estoque foram adicionadas de etanol, para fornecer soluções diluídas nas concentrações: 0,302 mg/mL, 0,453 mg/mL, 0,604 mg/mL, 0,755 mg/mL e 0,906 mg/mL,

BHT: para a construção da curva-padrão, alíquotas da solução-estoque foram adicionadas de etanol, para fornecer soluções diluídas nas concentrações: 0,2192 mg/mL, 0,4384 mg/mL, 0,6576 mg/mL, 0,8768 mg/mL, 1,096 mg/mL e 1,3152 mg/mL).

Ácido ascórbico: para a construção da curva-padrão, alíquotas da solução-estoque foram adicionadas de etanol, para fornecer soluções diluídas nas concentrações: 0,264 mg/mL, 0,352 mg/mL, 0,44 mg/mL, 0,528 mg/mL, 0,616 mg/mL, 0,704 mg/mL.

Obtenção das curvas de calibração: Em tubos do tipo eppendorf, 0,1 mL de cada solução diluída foi adicionada de 1 mL de reagente, em triplicata. Os tubos foram tampados e mantidos em banho-maria a 95°C por 90 min. Após o período determinado, as amostras foram deixadas a arrefecer até a temperatura ambiente.

O conteúdo de cada um dos tubos foi transferido para cubetas de plástico (caminho óptico 1 cm) e analisado sob o comprimento de onda 695 nm em espectrofotômetro Shimadzu, previamente zerado com uma mistura de 1 mL do reagente e 0.1 mL do solvente utilizado no preparo as soluções das substâncias em análise.

Os dados foram analisados utilizando o programa Prisma e curvas-padrão foram construídas.

Teste de atividade antioxidante: Em tubos do tipo eppendorf, a solução em análise (0,1 mL) foi adicionada de 1 mL de reagente, em triplicata. Os tubos foram tampados e mantidos em banho-maria a 95^oC por 90 min. Após o período determinado, as amostras foram deixadas a arrefecer até a temperatura ambiente.

O conteúdo de cada um dos tubos foi transferido para cubetas de plástico (caminho óptico 1 cm) e analisado sob o comprimento de onda 695 nm em espectrofotômetro Shimadzu, previamente zerado com uma mistura de 1 mL do reagente e 0.1 mL do solvente utilizado no preparo as soluções das substâncias em análise.

Construção da curva-padrão do ácido ascórbico

A TABELA 1 apresenta a concentração das soluções de ácido ascórbico utilizadas para a construção da curva-padrão (FIGURA 16), que apresentou boa linearidade (< 1 mg/mL), com coeficiente de correlação (r) igual a 0,992.

Para verificar a repetitividade do método, os experimentos foram realizados em dia diferente e por outro analista.

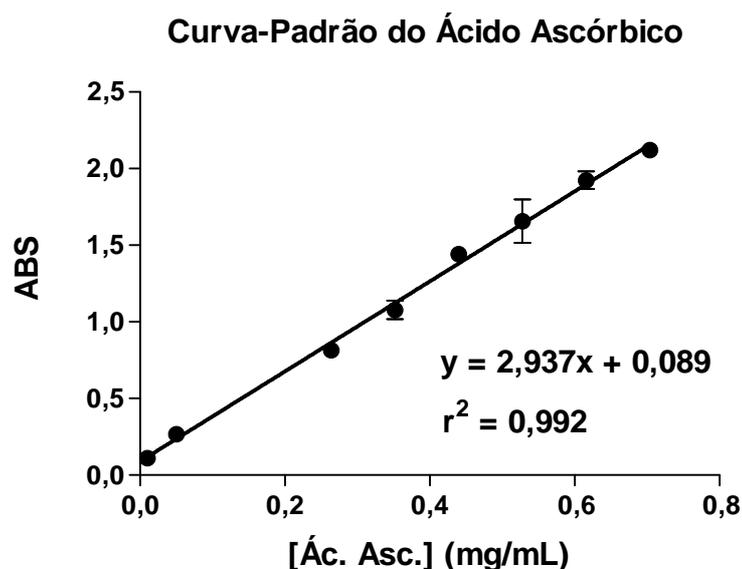


FIGURA 16. Atividade redutora do ácido ascórbico no método do fosfomolibdênio. Curva-padrão construída com a média de três experimentos de concentrações crescentes de ácido ascórbico.

Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão de três experimentos em triplicata.

TABELA 1. Valores das concentrações do ácido ascórbico, das absorvâncias em triplicata, média das absorvâncias e desvio padrão do ácido ascórbico.

Concentrações em mg/mL	Absorbância do complexo de molibdênio com ácido ascórbico			Média das absorvâncias	Desvio padrão
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3		
0,010	0,115	0,103	0,117	0,111	0,007
0,050	0,228	0,280	0,295	0,267	0,035
0,264	0,822	0,802	0,821	0,815	0,011
0,352	1,131	1,011	1,092	1,078	0,061
0,440	1,421	1,464	1,442	1,442	0,021
0,528	1,519	1,803	1,649	1,657	0,142
0,616	1,864	1,931	1,979	1,924	0,058
0,704	2,114	2,142	2,107	2,121	0,018

Construção da curva-padrão do BHT

Da mesma forma, foi realizado procedimento experimental descrito acima para a construção da curva-padrão do BHT, para o qual foram utilizadas soluções em etanol em diferentes concentrações.

No segundo experimento, da mesma forma que ocorreu com o ácido ascórbico, a construção da curva demonstrou que em concentração acima de 1,315 mg/mL, não há diferença estatística nos valores de absorvância obtidos e a curva apresenta-se com um patamar (FIGURA 17).

Portanto um novo experimento foi realizado com concentrações inferiores que pudessem ser utilizados na construção da curva-padrão do BHT.

A TABELA 2 apresenta a concentração das soluções de BHT utilizadas para a construção da curva-padrão (FIGURA 17), que apresentou boa linearidade ($r = 0,967$).

Para verificar a repetitividade do método, os experimentos foram realizados em dia diferente e outro analista.

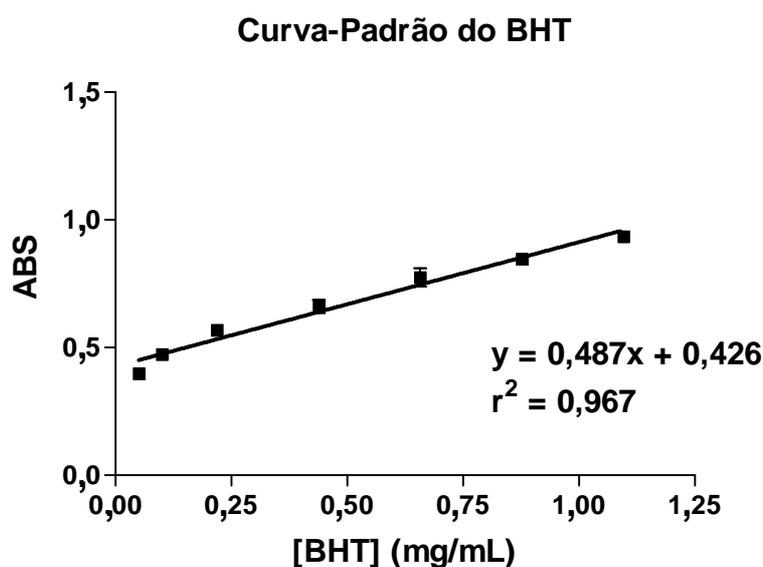


FIGURA 17. Atividade redutora do BHT no método do fosfomolibdênio. Curva-padrão construída com a média de três experimentos de concentrações crescentes de BHT. Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão de três experimentos em triplicata.

TABELA 2. Valores das concentrações do BHT, das absorvâncias em triplicata, média das absorvâncias e desvio padrão do BHT.

Concentrações em mg/mL	Absorbância do complexo de molibdênio com BHT			Média das absorvâncias	Desvio padrão
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3		
0,050	0,408	0,392	0,393	0,397	0,009
0,100	0,468	0,480	0,473	0,473	0,006
0,219	0,564	0,578	0,564	0,568	0,008
0,438	0,664	0,635	0,686	0,661	0,026
0,657	0,748	0,815	0,761	0,774	0,035
0,876	0,846	0,832	0,862	0,846	0,015
1,096	0,928	0,953	0,922	0,934	0,016

Construção da curva-padrão da quercetina

No procedimento para a aquisição da curva-padrão da quercetina foi observado que patamar foi atingido na concentração de 0,906 mg/mL, sendo que uma nova curva foi elaborada com valores menores que o patamar encontrado (FIGURA 18).

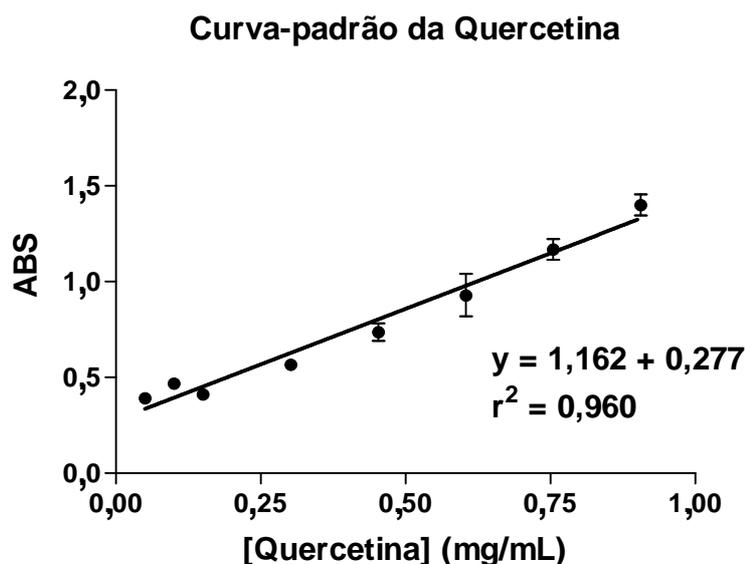


FIGURA 18. Atividade redutora da quercetina no método do fosfomolibdênio. Curva-padrão construída com a média de três experimentos de concentrações crescentes de quercetina. Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão de três experimentos em triplicata.

TABELA 3. Valores das concentrações da quercetina, das absorbâncias em triplicata, média das absorbâncias e desvio padrão do BHT.

Concentrações em mg/mL	Absorbância do complexo de molibdênio com quercetina			Média das absorbâncias	Desvio padrão
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3		
0,050	0,408	0,392	0,393	0,398	0,009
0,100	0,468	0,480	0,473	0,474	0,006
0,219	0,564	0,578	0,564	0,569	0,008
0,438	0,664	0,635	0,686	0,661	0,026
0,657	0,748	0,815	0,761	0,775	0,035
0,877	0,846	0,832	0,862	0,847	0,015
1,096	0,928	0,953	0,922	0,934	0,016

Os resultados obtidos demonstraram que todas as substâncias antioxidantes utilizadas como padrão forneceram curvas com boa linearidade e repetitividade.

Para calcular a percentagem de equivalência dos compostos analisados com relação às substâncias antioxidantes – ácido ascórbico, BHT e quercetina - foram utilizadas as equações das retas obtidas das curvas-padrão construídas para cada substância antioxidante. A absorbância lida no comprimento de onda de 695 nm foi aplicada à equação da reta e, desta forma, foi obtida a concentração relativa aos controles. A equivalência foi calculada dividindo-se a concentração obtida de cada padrão pela concentração usada de cada composto analisado.

3.2.1.3. Atividade fotoprotetora

Os dados de absorbância foram registrados em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601).

O EUSOLEX 4360 (pó branco a levemente amarelado com p.f.= 62-65⁰C) foi adquirido do fabricante Hubei Maxipahrm da China.

Preparo da amostra: O EUSOLEX 4360 foi preparado na concentração de 0,684 mg/mL, em meio etanólico. Foram preparadas soluções nas seguintes concentrações: 0,114 mg/mL, 0,228 mg/mL, 0,342 mg/mL, 0,456 mg/mL, 0,570 mg/mL.

Varredura de espectro: Para o EUSOLEX 4360 na concentração de 0.684 mg/mL, em meio etanólico, foi realizada uma varredura num espectrofotômetro utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1cm. A leitura foi realizada entre 288 nm e 325 nm no qual o valor da absorbância foi de 3.612.

Construção da curva-padrão: Foi realizada uma leitura no espectrofotômetro com as seguintes concentrações de EUSOLEX: 0,114 mg/mL, 0,228 mg/mL, 0,342 mg/mL, 0,456 mg/mL, 0,570 mg/mL para a construção da curva padrão.

Para calcular a percentagem de equivalência dos compostos analisados com relação ao EUSOLEX foi utilizada a equação da reta obtida da curva-padrão construída para o EUSOLEX na região de 288 nm. A absorbância lida no comprimento de onda de 288 nm foi aplicada à equação da reta e, desta forma,

foi obtida a concentração relativa aos controles. A equivalência foi calculada dividindo-se a concentração obtida de cada padrão pela concentração usada de cada composto analisado.

3.2.1.4. Inibição de crescimento celular *ex-vivo*

O teste de citotoxicidade por cristal foi realizada no Laboratório de Farmacologia Molecular -FARMOL - da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília pela equipe da Prof.^a Dr.^a Andrea Barretto Motoyama.

Linhagem celular: Células de carcinoma mamário (MCF-7) e oral (OSCC - oral squamous cell carcinoma), gentilmente cedidas pelos professores doutores Andrea Maranhao e Ricardo Bentes de Oliveira, respectivamente, ambos do Instituto de Ciências Biológicas da UnB.

Reagentes: Cristal violeta, etanol.

Estocagem: As linhagens foram cultivadas em DMEM, acrescido de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina e estreptomicina), em atmosfera umidificada a 37°C e 5 % de CO₂.

Controle positivo: Paclitaxel.

Controle negativo: Etanol.

Bioensaio: Para os ensaios de citotoxicidade por cristal violeta, foram plaqueadas 3×10^4 células por poço, em placas de 12 poços. No dia seguinte, meio completo contendo composto a ser testado, ou etanol ou 500 nM de paclitaxel, foram adicionados as células, e o tratamento foi realizado por 24 e 48 h. Após esse período de incubação, as células foram lavadas com PBS, fixadas em metanol, e coradas com 0,2% de cristal violeta em metanol. Após lavagens extensivas com PBS, as células remanescentes foram coletadas em 1 mL de tampão de recuperação (etanol + 0,2 M citrato de sódio, 1:1), sendo a absorbância dessa solução medida a 570 nm. Todos os testes foram feitos em triplicatas.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Extração e separação dos constituintes do LCC.

O LCC *in natura* foi extraído da castanha de caju por extração contínua em aparelho Söhxlet, usando etanol comercial como solvente. Em geral os rendimentos obtidos variam em torno de 30% em relação ao peso da castanha, dependendo do tempo e condições de estocagem. Para a extração da mistura de ácidos anacárdicos (**15 i-m**) foi utilizada a metodologia que emprega a extração química com hidróxido de chumbo (TYMAN, 1991). A mistura de ácidos anacárdicos (**15 i-m**) foi obtida com 61% de rendimento e caracterizada por meio de técnicas espectrométricas (ANEXO I, IV pág.96; RMN ^1H pág. 97; RMN ^{13}C pág.98).

Analisando o espectro no infravermelho da mistura de ácidos anacárdicos (**15 i-m**) foi observado a estiramento das ligações OH na região de 3459 cm^{-1} , estiramento C-H sp^2 em 3007 , deformação axial de C-H de carbonos sp^3 nas regiões de 2925 e 2854 cm^{-1} . Observa-se ainda, a estiramento da dupla ligação C=O em 1644 cm^{-1} e estiramento C=C (anel aromático e cadeia lateral) em 1607 e 1452 cm^{-1} . O espectro de RMN ^1H confirma a presença de duplas ligações, pois na região entre δ 5,90 e 4,92 são encontrados multipletos (=CH, =CH₂) e a presença de sinal característico de hidrogênio ligado a oxigênio O-H em δ 11. Na região entre δ 2,99-2,73 e 2,05-1,96 ocorre a presença de outros multipletos característicos dos grupos metilenos e grupo metila. O espectro de carbono apresenta sinais correspondentes a carbono carbonílico em δ 176,8 e carbono aromático ligado a oxigênio em δ 163,7 (FIGURA 19).

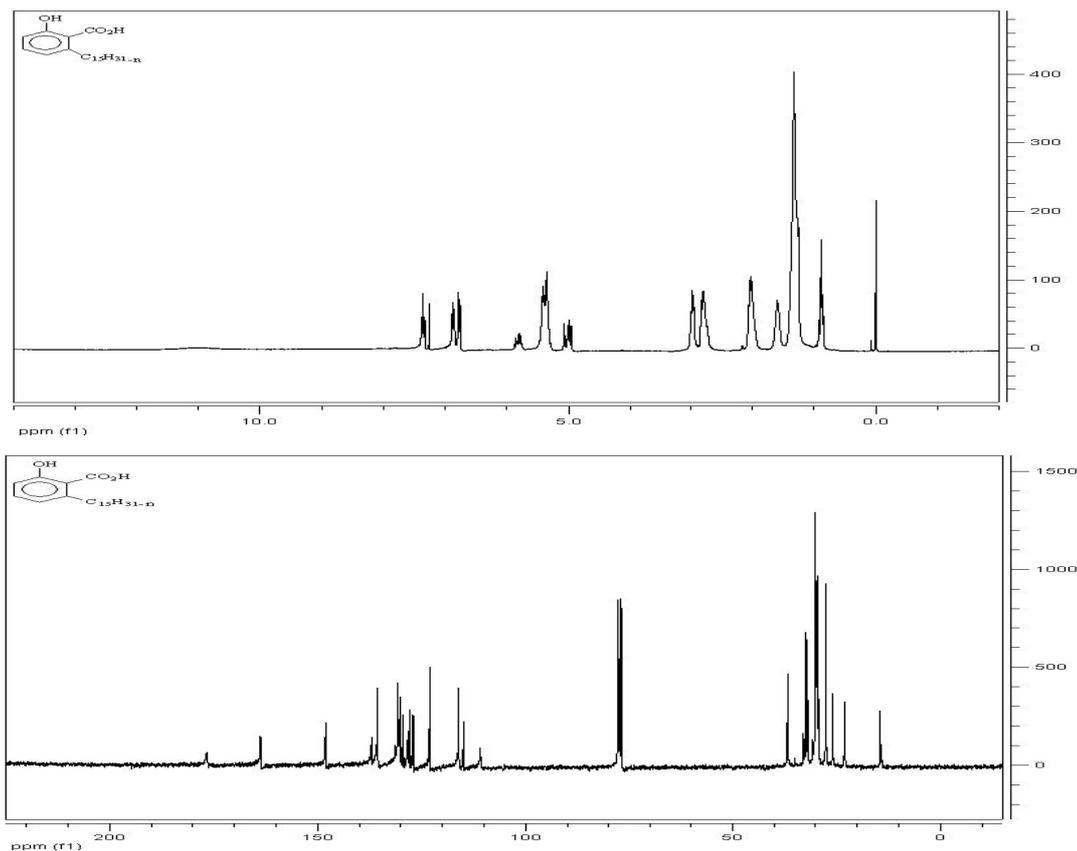


FIGURA 19. Espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos ácidos anacárdicos (**15 i-m**).

Os cardanóis (**16 i-m**) foram obtidos do LCC técnico por meio da técnica de destilação a vácuo (1 mmHg, 218-224 $^{\circ}\text{C}$). É recomendável que o processo de destilação não seja demorado, para evitar reações de polimerização (IZZU, 1950). Por esse procedimento, a mistura de cardanóis (**16 i-m**) foi obtida como um óleo amarelo claro em rendimento de 64,3% e caracterizada por espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C (ANEXO I, RMN ^1H pág. 117; RMN ^{13}C pág.118).

Analisando o espectro na região do infravermelho da mistura de cardanóis (**16 i-m**), foi observado a presença de uma banda larga do grupo OH na região de 3354 cm^{-1} no sinal da deformação fora do plano do anel aromático. Em 1455 cm^{-1} encontramos o CH_3 e na região de 2928 temos um sinal um pouco mais largo característico das ligações duplas. O espectro de RMN ^1H ratifica a presença de duplas ligações na cadeia lateral, pois na região compreendida entre δ 4,91 e 5,42 é encontrado multipletos e na região entre δ 2,08 e 1,42 apresenta outro multipletos característico dos grupos metilenos e grupo metila. O espectro de carbono demonstra o ArOH em δ 155,21 (Figura 20).

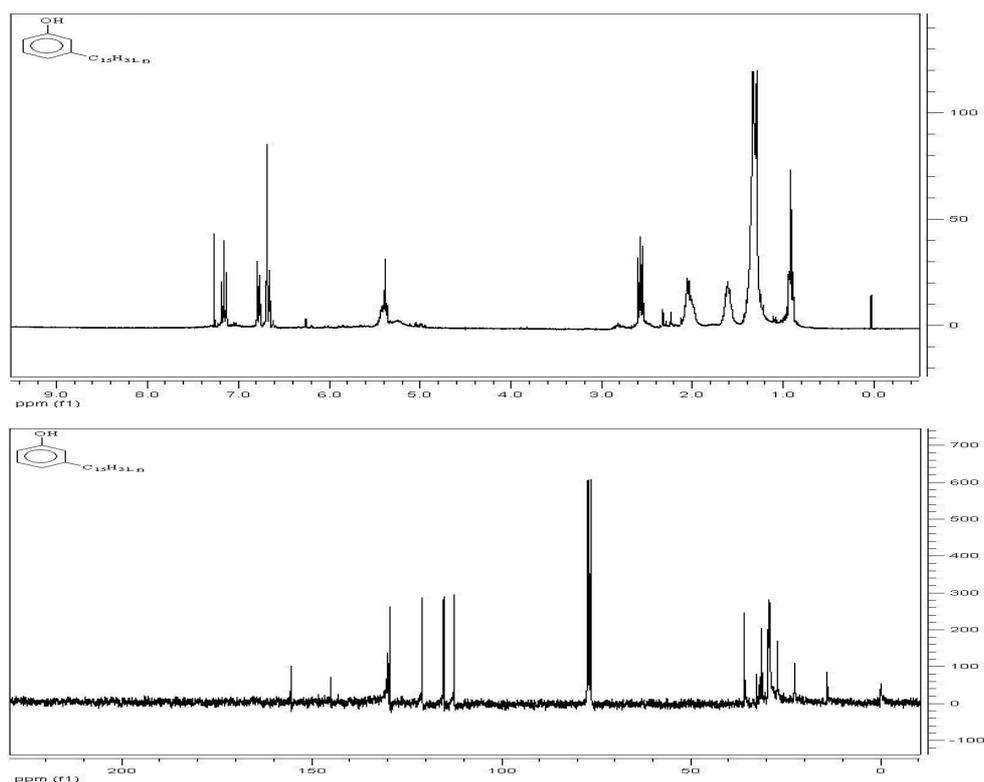
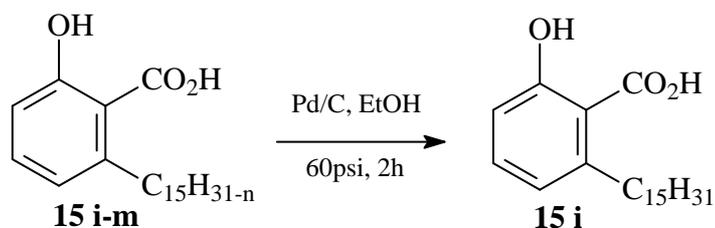


FIGURA 20. Espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos cardanóis (**16 i-m**).

4.2. Modificações Químicas

4.2.1. Modificações químicas moderadas

Inicialmente foi optado pela preparação de derivados do ácido anacárdico (**15 i-m**). A seqüência metodológica foi iniciada com a reação de hidrogenação do ácido anacárdico que foi realizada em rendimento de 94%. O produto (**15 i**) foi caracterizado por meio de técnicas espectrométricas (ESQUEMA 4) (ANEXO I, RMN ^1H pág. 100; RMN ^{13}C pág.101).



ESQUEMA 4. Preparação do ácido 2-hidróxi-6-pentadecilbenzóico (**15 i**).

O espectro no IV do produto (**15 i**) não foi conclusivo em relação à modificação realizada. No espectro RMN de hidrogênio foi confirmado a ocorrência da hidrogenação, porque os sinais na região entre δ 4,98 e 5,84 dos espectros da matéria prima (**15 i-m**) referentes as duplas ligações da cadeia lateral e referentes aos carbonos vicinais a estas, respectivamente, desaparecem totalmente. No espectro de carbono não é mais observado sinais adicionais na região aromática correspondente as ligações duplas da cadeia lateral (FIGURA 21).

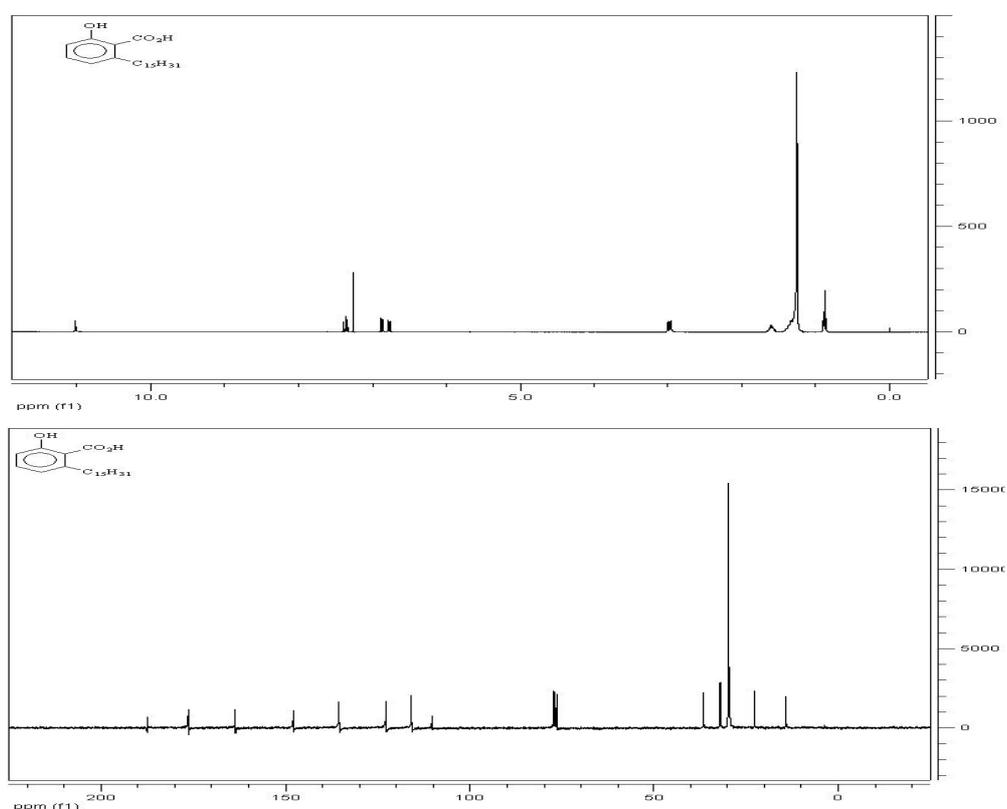
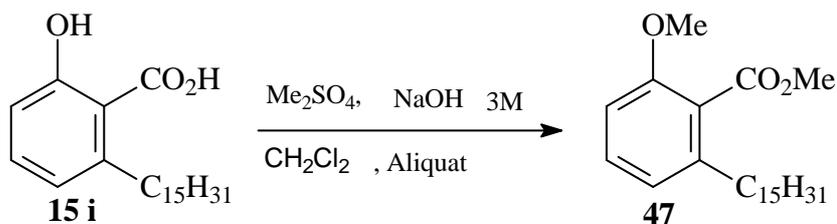


FIGURA 21. Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do ácido anacárdico saturado (**15 i**).

Para a dimetilação do ácido anacárdico (**15 i**) foi utilizado sulfato de dimetila e hidróxido de sódio, em presença de catalisador de transferência de fase (Aliquat[®]) (ESQUEMA 5). Essa reação ocorreu de forma bastante eficiente, sendo o produto purificado por filtração rápida em silicagel seguida de recristalização com rendimento de 96,66%.



ESQUEMA 5. Preparação de 2-metóxi-6-pentadecilbenzoato de metila (**47**).

Comparando os espectros de RMN do ácido anacárdico dimetilado (**47**) com os espectros da matéria-prima (**15 i**) observa-se em ambos os casos (hidrogênio e carbono), a presença de dois sinais adicionais. Adicionalmente, em ambas as técnicas de RMN pequenas variações nos deslocamentos dos carbonos e dos hidrogênios do sistema aromático também observadas. O RMN ^1H mostra o desaparecimento do sinal em δ 11,00 referente ao hidrogênio do grupo O-H e apresenta dois singletos, em δ 3,89 referente a metoxila e um outro em δ 3,80 referente ao CH_3 do éster (FIGURA 22). Quanto ao espectro de RMN ^{13}C , o sinal com deslocamento em δ 52,0 referente ao carbono do éster formado e o outro com deslocamento em δ 55,7 representa o carbono da metoxila (FIGURA 23).

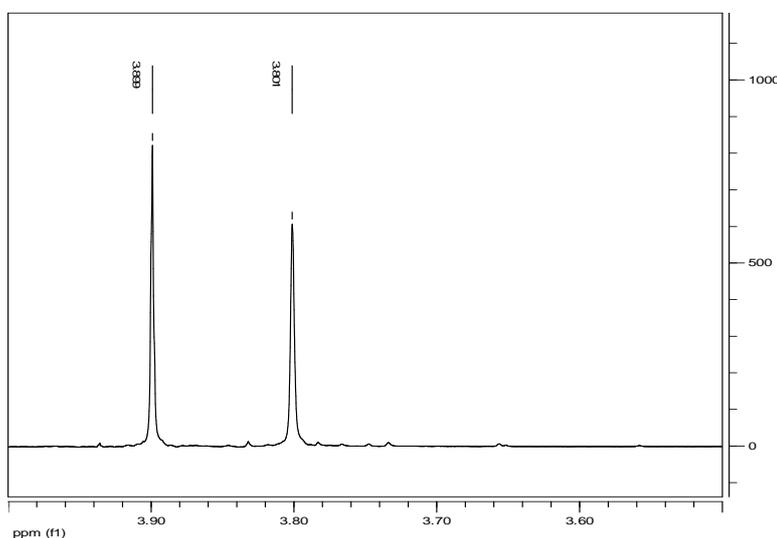


FIGURA 22. Expansão do espectro de RMN ^1H do ácido anacárdico dimetilado (**47**).

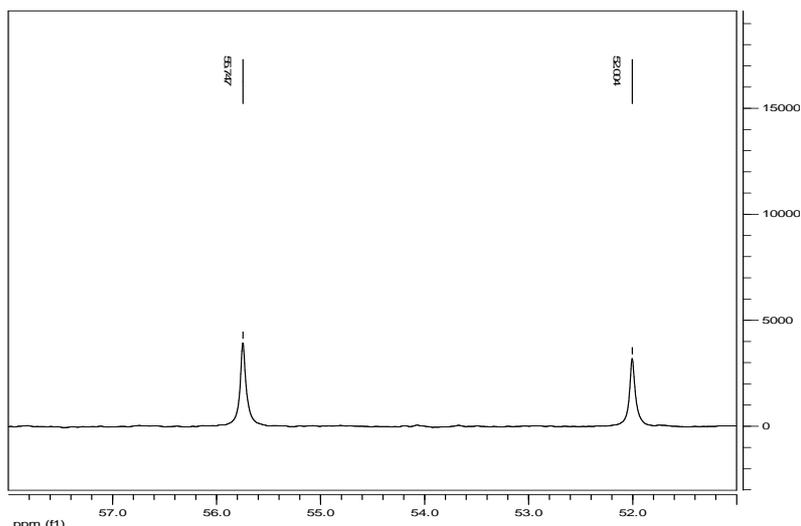
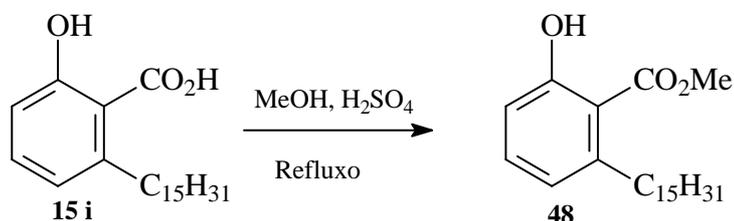


FIGURA 23. Expansão de espectro de RMN ^{13}C do ácido anacárdico dimetilado (**47**).

O anacardato de metila (**48**) foi obtido via esterificação de Fischer, por refluxo do ácido anacárdico (**15 i**) com metanol em presença de quantidade catalítica de ácido sulfúrico (ESQUEMA 6). Nestas condições, o éster almejado foi obtido como um sólido branco com rendimento de 77%, após recristalização com hexano.



ESQUEMA 6. Preparação do 2-hidróxi-6-pentadecilbenzoato de metila (**48**).

O espectro no IV na região de 1665 cm^{-1} demonstra a obtenção do éster (**48**) (ANEXO I, IV pág.105).

No espectro de RMN ^1H (FIGURA 24) foi possível verificar o deslocamento químico do singlete referente aos hidrogênios CH_3 do éster em δ 3,95. Na análise de RMN ^{13}C é observado um deslocamento químico em δ 52,0, sinal esse característico do carbono do grupo metila (FIGURA 25).

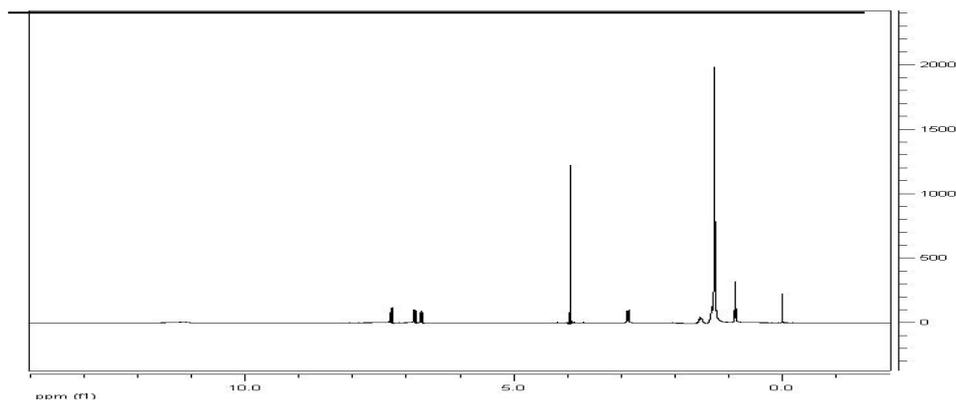


FIGURA 24. RMN ^1H referente ao singlete éster do ácido anacárdico (**48**).

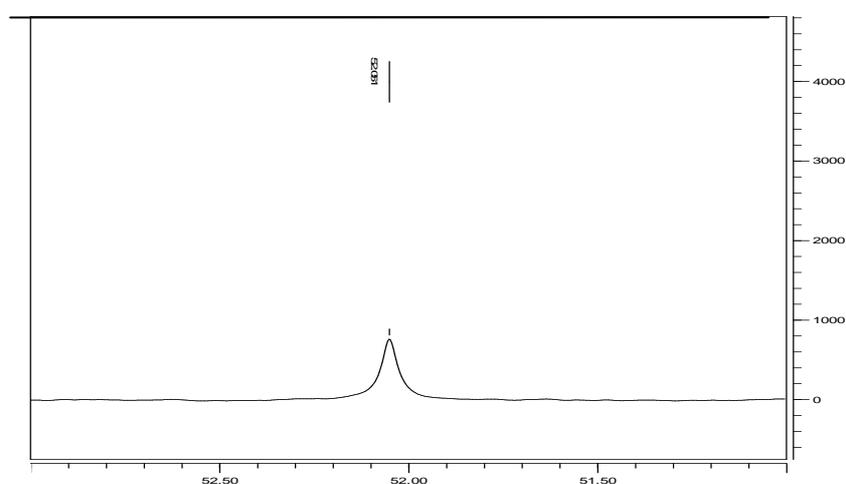
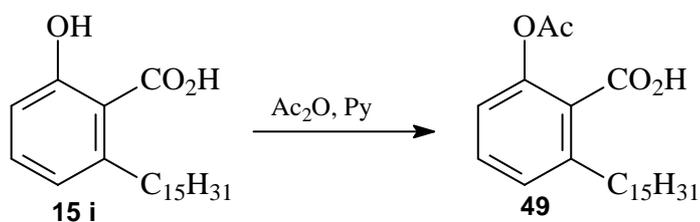


FIGURA 25. Expansão de espectro do de RMN ^{13}C referente ao singlete éster do ácido anacárdico (**48**).

A acetilação do ácido tetraidroanacárdico (**15 i**) foi conseguida por meio do tratamento deste com anidrido acético e piridina (ESQUEMA 7). Sob estas condições, o ácido acetilanacárdico (**49**) foi obtido como um sólido branco com rendimento de 85%.



ESQUEMA 7. Preparação do ácido 2-acetiloxi-6-pentadecil-benzóico (**49**).

Nas análises de espectros de RMN ^1H é possível observar o CH_3CO do grupo acetil em δ 2,29 (FIGURA 26). Contudo, o RMN ^{13}C do acetato, demonstra a presença de dois carbonos adicionais um em δ 169,6 referente a $\text{C}=\text{O}$ e outro em δ 20,8 ao $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$.

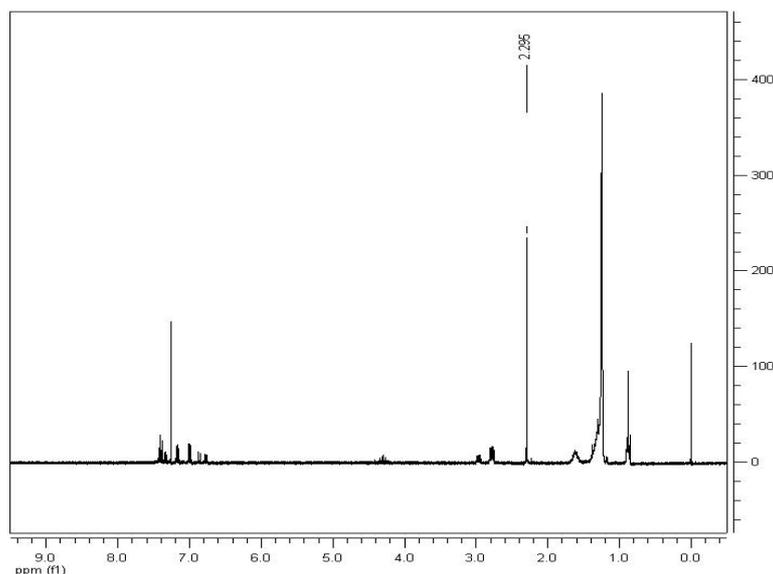
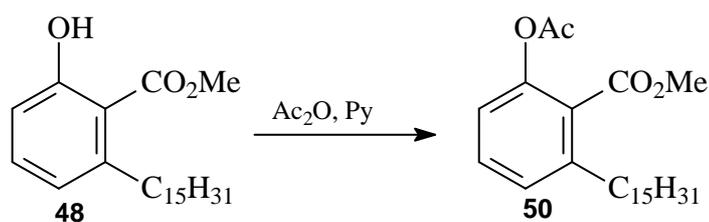


FIGURA 26. Espectro de RMN ^1H do ácido 2-acetilóxi 6-pentadecil-benzóico (**49**).

Para a produção do acetato de **48** utilizamos anidrido acético e piridina. Nessas condições, o 2-acetilóxi-6-pentadecilbenzoato de metila (**50**) foi obtido como um sólido bege claro com rendimento de 63,8 % (ESQUEMA 8).



ESQUEMA 8. Preparação do 2-acetilóxi-6-pentadecilbenzoato de metila (**50**).

Quando comparamos o espectro de espectro no IV de **48** (3439 cm^{-1}) com o de **50** podemos observar o desaparecimento do sinal do grupo OH e o aparecimento do sinal correspondente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ do grupo éster em 1766 cm^{-1} . O RMN ^1H apresenta o sinal do CH_3 ligado ao $\text{C}=\text{O}$ como singlete na região de δ 2,25 (FIGURA 27).

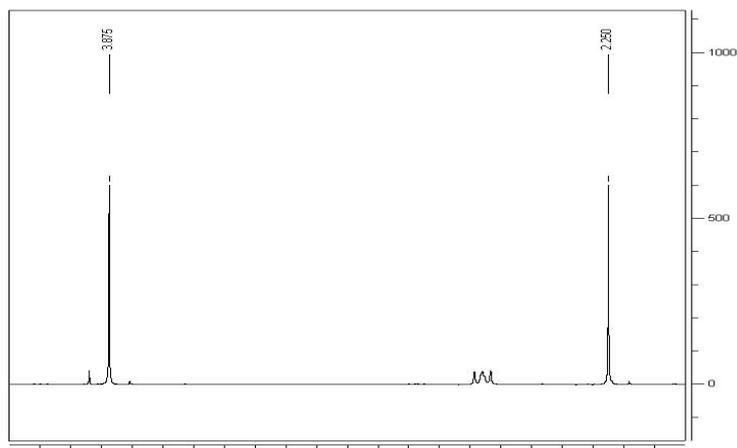
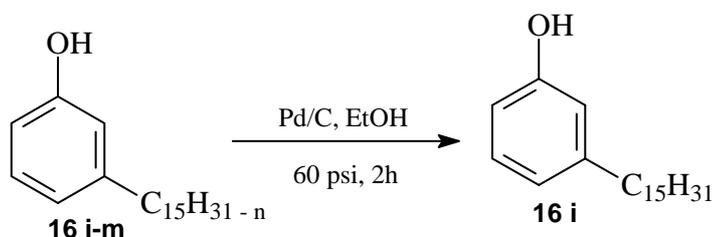


FIGURA 27. Expansão de espectro de RMN ^1H do 2-acetiloxi-6-pentadecilbenzoato de metila (**50**).

Os cardanóis (**16 i-m**) foram obtidos conforme procedimento descrito no item 3.1.2.3. A seqüência se iniciou com a mistura de cardanóis (**16 i**) sendo submetida à adição catalítica de hidrogênio às duplas ligações. Diversos catalisadores metálicos (platina, paládio, ródio, rutênio e níquel) têm sido empregados em reações de hidrogenação. Neste estudo, a hidrogenação total da mistura de cardanóis foi conseguida com rendimento 92% via catálise com paládio sob carvão (Pd/C) (ESQUEMA 9).



ESQUEMA 9. Hidrogenação do cardanol.

Na comparação dos espectros no IV do produto (**16 i**) da reação (cardanol com cadeia lateral saturada) com a matéria-prima (**16 i-m**), foi observado a diminuição da intensidade dos sinais referentes C=C região entre 2800 e 2900 cm^{-1} (ANEXO I, IV pág.119), comprovando que ocorreu a hidrogenação. No espectro de RMN de ^1H do produto não é mais constatado o multipletto característico das ligações duplas da cadeia lateral na região entre δ 5,43 e 5,36 e também entre 2,07 e 1,97 pm. No espectro de carbono podemos observar que dois sinais na da ligação C=C desaparecem e que vários sinais também

referentes aos grupos metílenos e grupo metila desaparecem na região entre 35,8-27,2 (FIGURA 28).

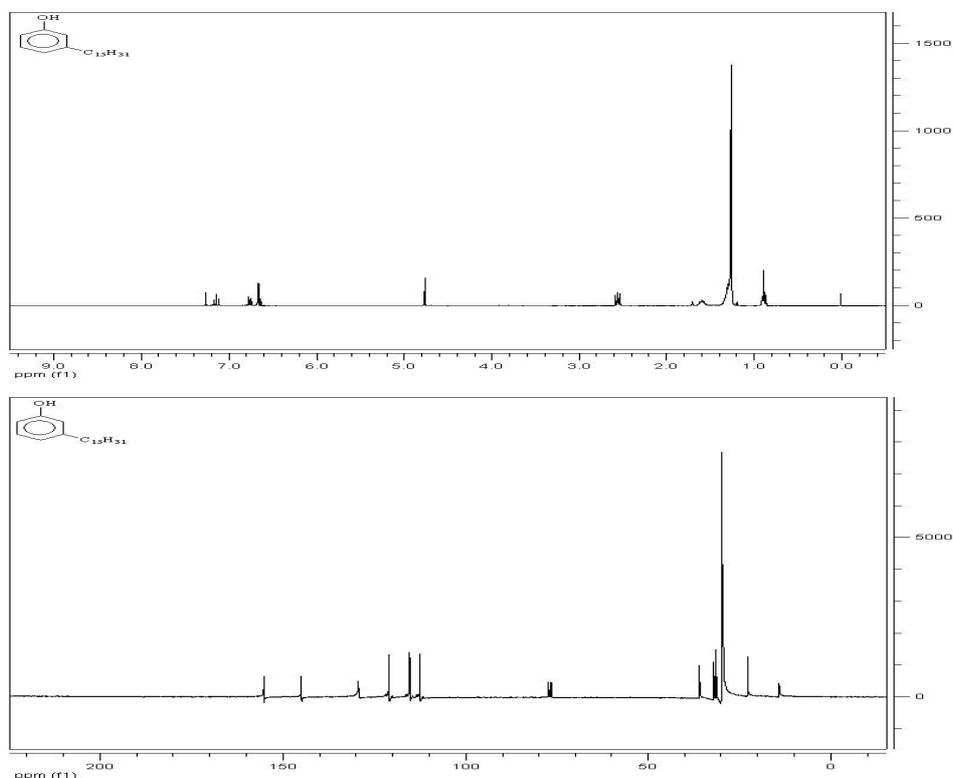
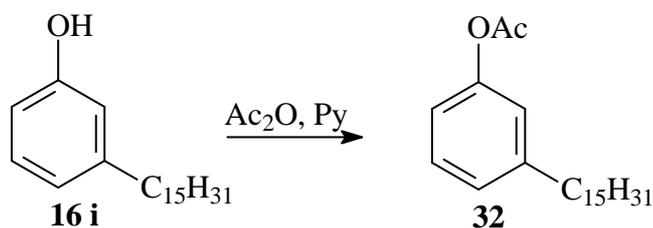


FIGURA 28: Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do cardanol saturado (**16 i**).

O produto da reação de hidrogenação do cardanol (**16 i**) foi submetido à reação clássica de acetilação (anidrido actético em piridina) para fornecer um sólido branco (83,83%), caracterizado como acetilcardanol (**32**) (ESQUEMA 10).



ESQUEMA 10. Preparação do acetilcardanol (**32**).

Em comparação com o espectro da matéria-prima (**16 i**), o espectro no IV do acetilcardanol (**32**) aponta o desaparecimento da banda na região 3364 cm^{-1} , correspondente à absorção característica de ligação O-H de **16 i** e o aparecimento de absorções em 1760 cm^{-1} e em 1206 cm^{-1} , características,

respectivamente, do estiramento da ligação C=O e do estiramento assimétrico do éster da ligação C-O. Isso permite confirmar que a reação se processou de forma efetiva. Por análise espectroscópica de RMN ^1H foi evidenciada a formação do acetilcardanol (**32**), pois foi verificada a presença de acetila como um singleto na região de δ 2,28. Já a análise do espectro de carbono comprova a presença do grupo acetila na região 169,42 (C=O) e δ 21,02 para o carbono CH_3 (FIGURA 29).

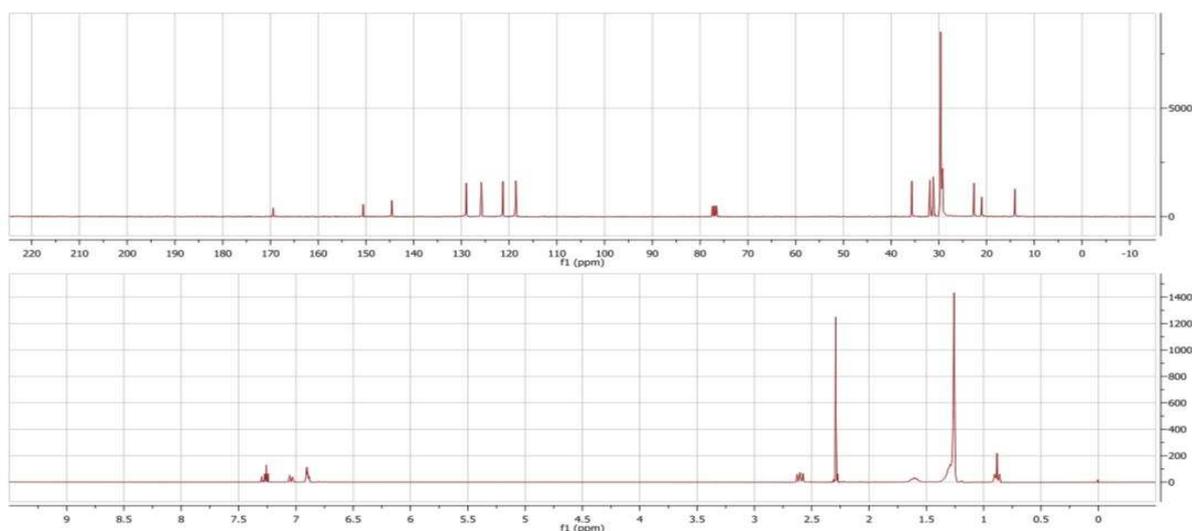


FIGURA 29. Espectro do acetato de cardolila (**32**) (RMN ^1H e 300 MHz; RMN ^{13}C 75 MHz, CDCl_3).

4.2.2. Modificações químicas com maior grau de complexidade - Estudos visando à síntese de derivados 4-hidroxicumarínicos

As modificações com maior grau de complexidade visam à preparação de derivados 4-hidroxicumarínicos a partir dos ácidos anacárdicos (**15 i**) e dos cardanóis (**16 i**).

O interesse pelo grupo das 4-hidroxicumarinas (**56**) originou-se a partir do isolamento, determinação estrutural e síntese do dicumarol (**55**), identificado como o agente causador da doença hemorrágica do trevo doce (STAHMANN, 1941), no qual estudos da relação estrutura-atividade estabeleceram que a presença da subunidade 4-hidroxicumarina (**56**) (4-HC) consiste no requisito mínimo para a ação farmacológica destas substâncias (JANSEN, 1942). Compostos derivados de 4-HC, utilizados terapeuticamente como agentes anticoagulantes (antitrombose) e.g. warfarina (**57**) e acenocumarol (**58**) (FIGURA

30), são bem conhecidos na literatura e têm sido sintetizados (HARUKI, 1979; IVANOV, 1990; DEMIR, 1996) e vastamente empregados como raticidas (HAUSTEIN, 1971; SILVEIRA, 1987).

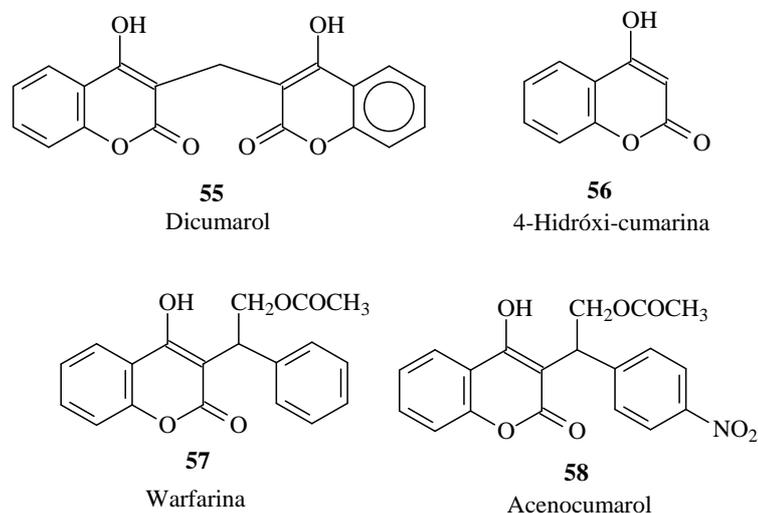
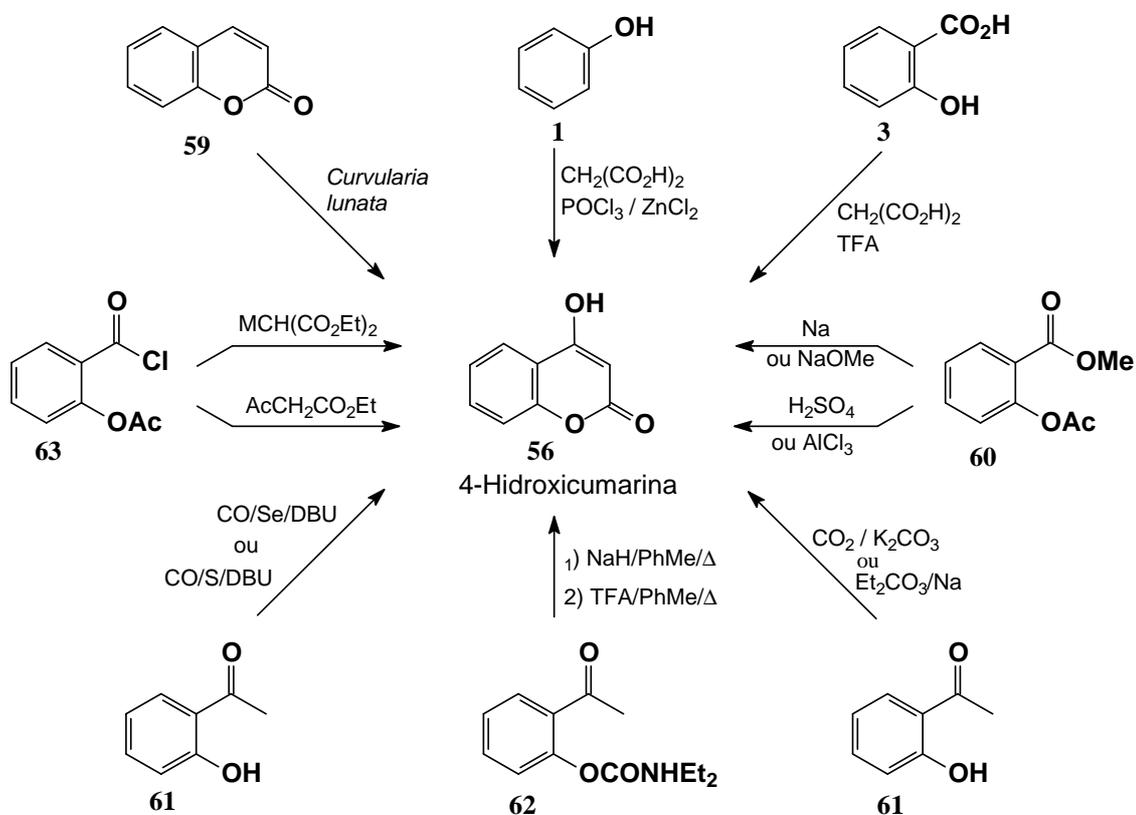


FIGURA 30. 4-Hidroxicumarina e derivados representativos.

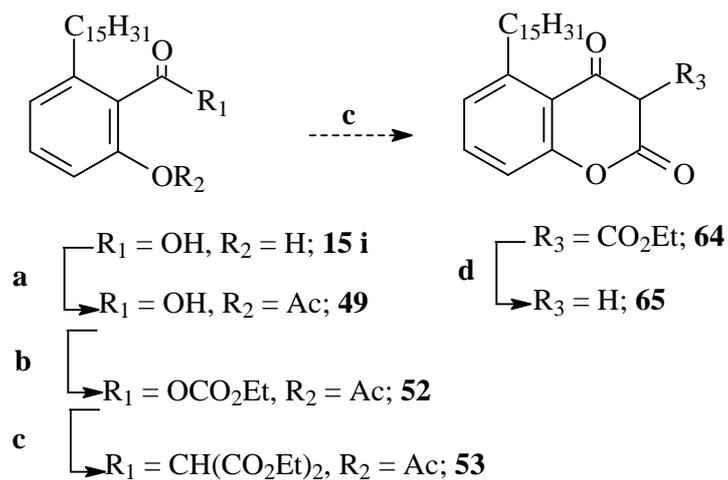
Dentre as metodologias sintéticas descritas na literatura para a obtenção da 4-HC (**56**) encontram-se reações de condensação utilizando o cloreto de acetilsaliciloíla (**63**) com sais de malonato de etila (ANSCHÜTZ, 1909; TARBELL, 1957; KAKIMOTO, 1993) e com acetoacetato de etila (TOMEK, 1974; YAMAMOTO, 1990), na qual a formação e reatividade do cloreto de ácido apresentam-se como limitações para estes métodos. Condensações intramoleculares de acetilsalicilato de metila com sódio fundido (PAULY, 1915; STAHMANN, 1941), metóxido de sódio (SHELTON, 1944), em ácido sulfúrico (IONESCU, 1954) e na presença de cloreto de alumínio (MATSUI, 1957), constituem outros métodos para a síntese de 4-hidroxicumarinas (**56**) (ESQUEMA 11). Entretanto, o emprego de condições muito vigorosas leva à formação da cumarina almejada apresenta baixos rendimentos. A literatura ainda descreve a utilização de ácido malônico com ácido salicílico na presença de ácido trifluoroacético (WOODS, 1965) e com fenol (**1**), juntamente, na presença de cloreto de zinco e oxiclreto de fósforo (SHAH, A. K., 1984) na síntese de 4-hidróxi-2H-1-benzopiran-2-onas. Oxidações biológicas de cumarinas (**59**) utilizando *Curvularia lunata* (MANDAL, 1990), *Aspergillus fumigatus* (BYE, 1970) e

outros microorganismos (EL-SHARKAWY, 1994) têm sido descritas como rotas para produção de 4-HC (**56**) (ESQUEMA 11).



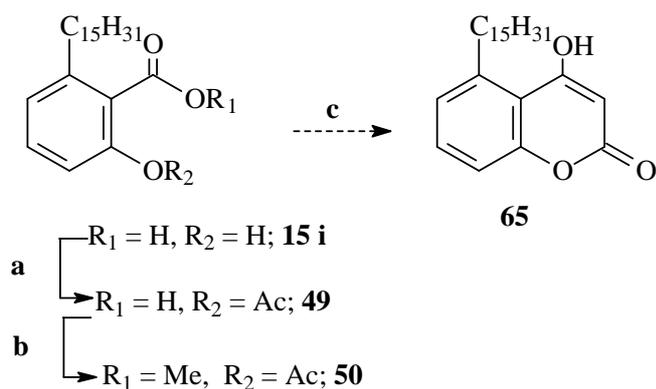
ESQUEMA 11. Sínteses da 4-hidroxycumarina descritas na literatura.

Com base na revisão da literatura acima descrita, o planejamento sintético escolhido para os derivados 4-HC do ácido anacárdico (**15 i**) envolveu a utilização de metodologia via a adição do magnésio etoximalônico (**51**) a um anidrido misto do ácido anacárdico (**52**) (ESQUEMA 12) e via ciclização do acetil-tetraidroanacardato de metila (**50**), com sódio metálico (ESQUEMA 13).



(a) Ac_2O , Py; (b) Et_3N , $\text{ClCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$; (c) $\text{EtOMgCH}(\text{CO}_2\text{Et})_2$; (d) KOH, MeOH; H_2O

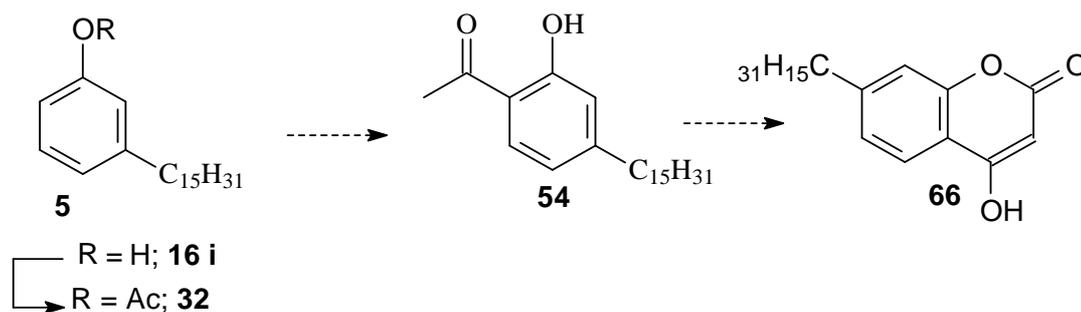
ESQUEMA 12. Proposta sintética para preparação de derivados 4-hidroxycumarínicos via etóximalonato.



(a) Ac_2O , Py; (b) MeOH, H_2SO_4 , refluxo; (c) Na, OPh_2 ; (c) H_2O

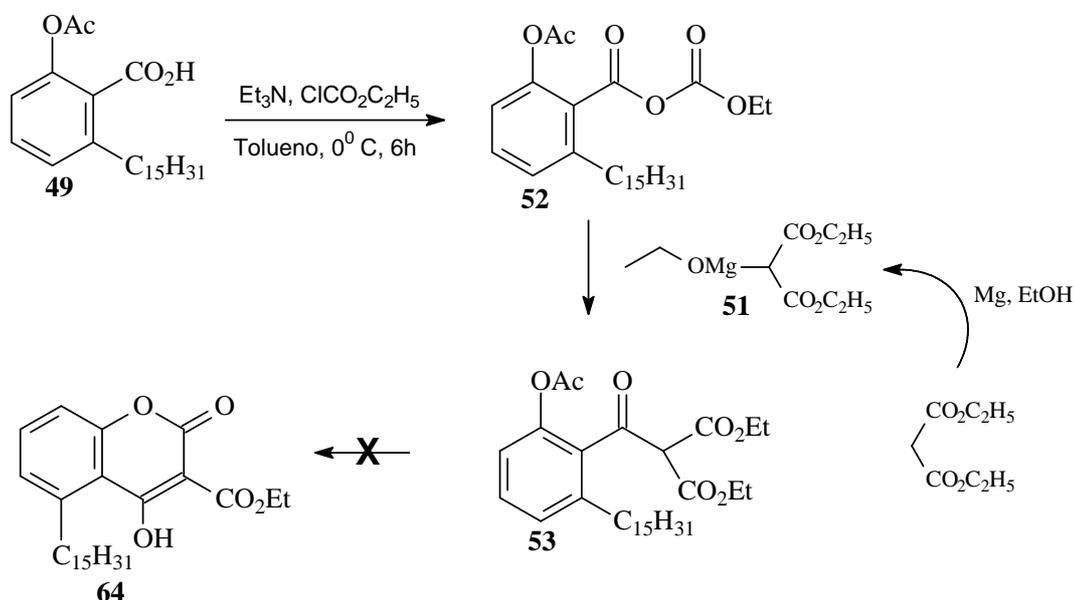
ESQUEMA 13. Proposta sintética para preparação de derivados 4-hidroxycumarínicos via reação de ciclização com sódio metálico.

Alternativamente, os derivados 4-hidróxi-cumarínicos (**66**) podem ser obtidos via a 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona (**54**), via ciclização com Dietilcarbonato e sódio metálico (ESQUEMA 14).



ESQUEMA 14. Preparação do 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona.

Para o estudo de derivados 4-hidroxicumarínicos a partir do ácido anacárdico (**15 i**) inicialmente foi utilizada a metodologia que emprega magnésio etoximalônico (**51**) (TARBELL, 1957) (ESQUEMA 15). Neste sentido, o acetato do ácido tetraidroanacárdico (**49**) foi transformado no anidrido misto correspondente (**52**). Este último foi tratado com magnésio etoximalônico (**51**), preparado antes do uso, em tolueno anidro para fornecer o derivado dietilmalônico (**53**) com rendimento de 43%. Este último foi submetido a diversos tratamentos com diferentes bases (e.g. NaOH, KOH, NaOEt) para promover a ciclização, entretanto, não foi possível obter o derivado 4-hidroxicumarínico (**64**) (ESQUEMA 15).

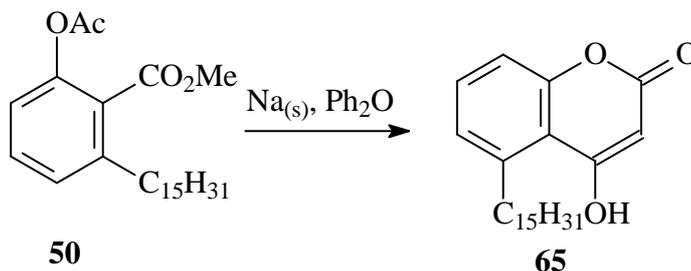


ESQUEMA 15. Tentativa de síntese de derivados 4-HC via magnésio etoximalônico (**51**).

A formação do intermediário **53** foi confirmada por técnicas espectrométricas. No espectro de IV observamos um sinal em 3448 cm^{-1} da

ligação Ar-OH e na região de 1743 cm^{-1} pode ser verificada a absorção referente a ligação C=O (éster). O RMN ^1H apresenta sinal δ 4,19 referente ao hidrogênio HC(CO₂)₂, δ 4,22 dos grupos metilenos que aparecem como um quarteto e δ 2,52 representado como um singleto referente COCH₃. No RMN de carbono podemos confirmar a formação do produto, pois temos um sinal em δ 168,84 referente ao ArC=O, em δ 166,46 é observado C=O do grupo acil, em δ 160,77 podemos observar também a presença das C=O dos dois ésteres formados (ANEXO I, IV pág. 113; RMN ^1H pág. 114; RMN ^{13}C pág.115).

De acordo com o planejamento inicial, a substância (**50**) foi utilizada com o intuito de obter um derivado 4-hidroxicumarínico (**65**). Para isso foi utilizado sódio metálico e difenil éter com agitação e temperatura elevada ($220\text{-}230^\circ\text{C}$) (DEZELIC, 1963) (ESQUEMA 16). Para esse procedimento houve uma adaptação no solvente utilizado na literatura, parafina líquida, porque não dispúnhamos deste solvente. A opção pelo difenil éter se deu em função do seu elevado ponto de ebulição.

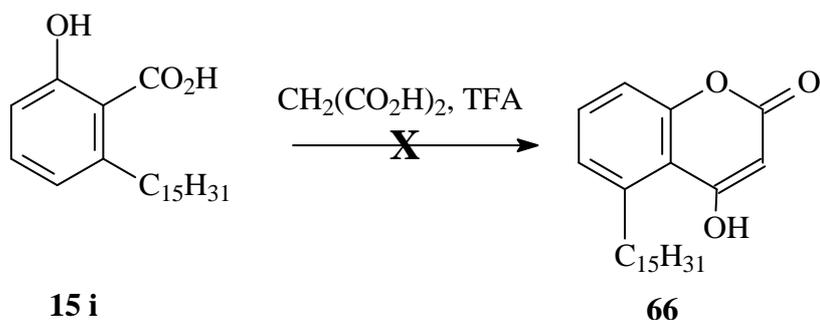


ESQUEMA 16. Preparação de derivados 4-hidroxicumarínicos.

Verificado os espectros foi observada que a reação não ocorreu conforme o desejado, havendo apenas a recuperação da matéria-prima (**50**). O emprego dessa metodologia com o análogo sem a cadeia lateral levou a formação da 4-HC, confirmando que a presença da cadeia lateral nos derivados do LCC modifica a reatividade química do sistema salicílico.

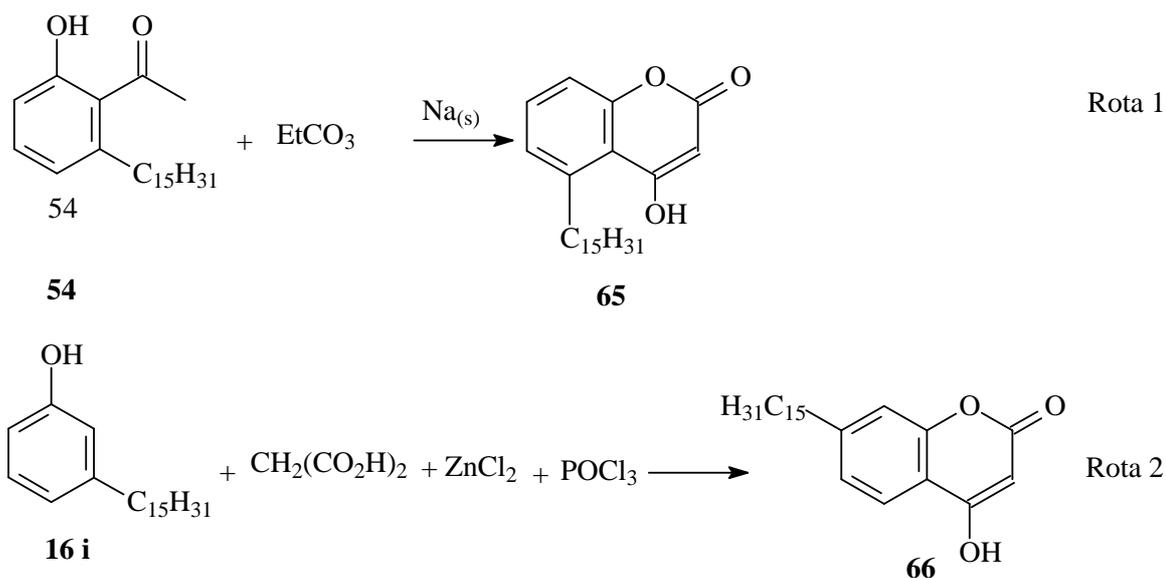
Como as várias tentativas de obter os derivados 4-HC segundo o planejamento inicial não lograram êxito, foi proposto um redirecionamento da proposta sintética. Neste sentido, foi proposta uma nova rota sintética utilizando ácido anacárdico (**15 i**) que foi tratado ácido malônico em presença de ácido trifluoroacético visando condensação e ciclização direta de acordo com o descrito

na literatura para o ácido salicílico (**3**) (WOODS, 1965) (ESQUEMA 17). Entretanto, mesmo com garantia do padrão de pureza da matéria-prima (**15 i**) e de todos os reagentes (ácido trifluoroacético, ácido malônico), controle rigoroso da temperatura e utilização de longos tempos de reação não se verificou qualquer vestígio de formação da 4-HC almejada (**65**).



ESQUEMA 17. Preparação de 4-HC via ácido malônico.

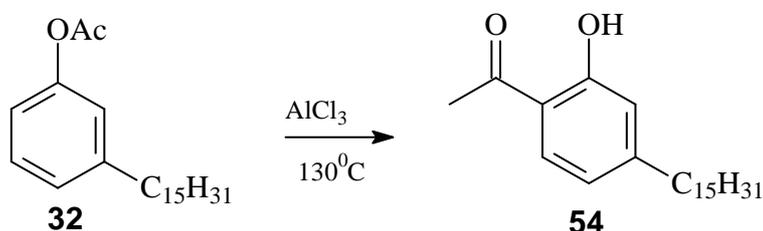
Alternativamente, partimos para utilização do cardanol (**16 i**) como matéria-prima para produção de derivados 4-HC. Os registros da literatura para síntese de 4-HC utilizando fenóis (**1**) apontam para o emprego da metodologia via condensação da 2-hidroxiacetofenona (**61**) com dietilcarbonato e ciclização direta na presença de sódio metálico (DESAI, 1957) e a rota envolvendo o uso do fenol (**1**) com ácido malônico e cloreto de zinco fundido em presença de POCl_3 (SHAH, V. R., 1966) (ESQUEMA 18, rota 1 e 2).



ESQUEMA 18. Preparação de 4-HC via dietilcarbonato e ácido malônico.

Com o intuito de padronizar e otimizar as condições das metodologias eleitas, inicialmente, as reações foram testadas usando como modelo matérias-primas sem a cadeia lateral (fenol e acetofenona), obtendo-se a 4-HC (**56**) em rendimento satisfatório por duas vias sintéticas distintas (ANEXO I, IV pág. 128; RMN ^1H pág. 129; RMN ^{13}C pág.130).

A partir desses resultados, ambas as metodologias foram empregadas visando à síntese de derivados 4-HC a partir do cardanol (**16 i**). Com o cardanol acetilado (**32**) em mãos, a 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona (**54**) foi obtida com rendimento de 79%, utilizando cloreto de alumínio e aquecimento (ESQUEMA 19).



ESQUEMA 19. Preparação da 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona (**54**).

No espectro de RMN ^1H foi verificado um deslocamento para δ 2,60 do sinal correspondente aos hidrogênios COCH₃. No espectro de RMN ^{13}C foi identificado mudança substancial dos carbonos do sistema aromático e da ligação C=O, quando comparado com o material de partida, o que é compatível com a formação da cetona aromática (FIGURA 31, 32).

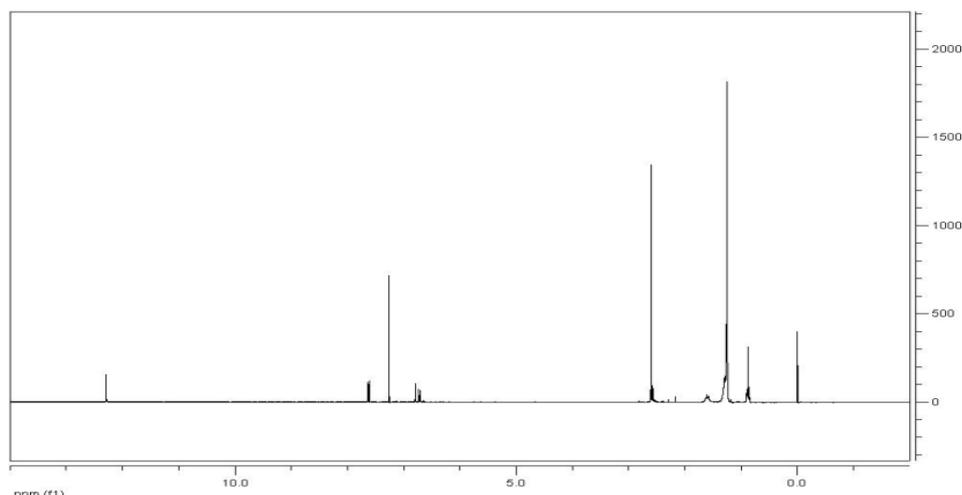


FIGURA 31. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl₃) da 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona (**54**).

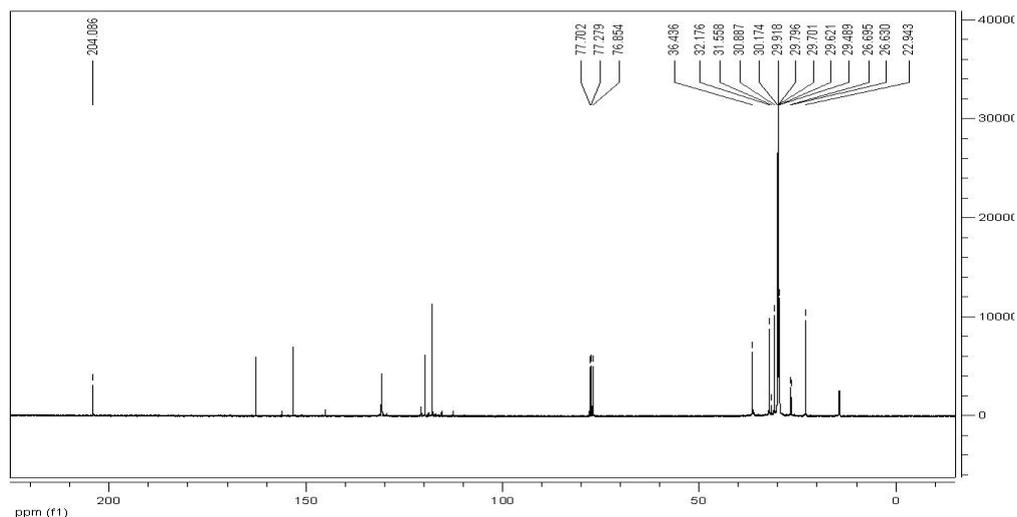
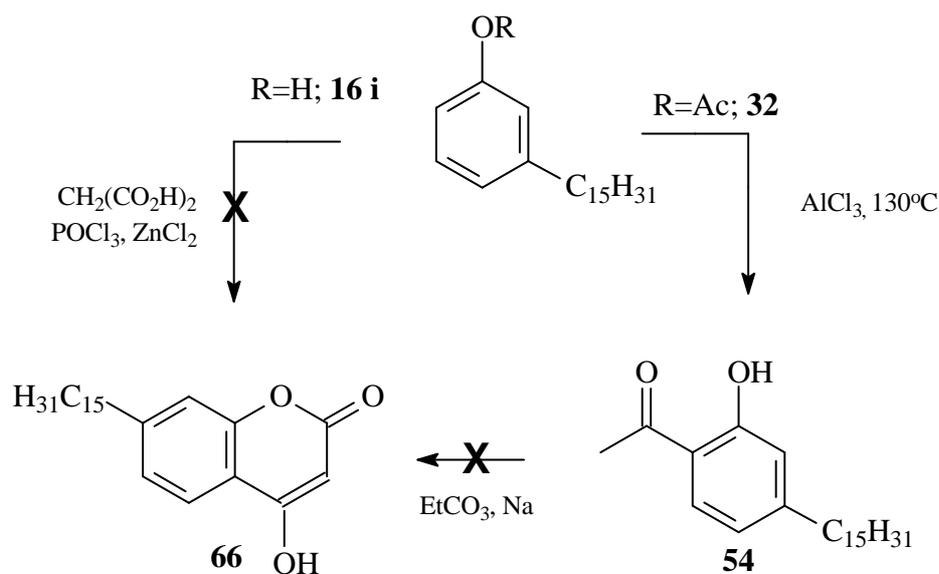


FIGURA 32. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona (**54**).

Usando como matéria-prima o derivado 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona (**54**) tentamos produzir os derivados 4-hidroxycumarínicos via reação com dietilcarbonato na presença de sódio metálico. Infelizmente, após diversas tentativas não obtivemos os derivados almejados. Partimos então para a rota via ciclização direta com cardanol (**16 i**) na presença de ácido malônico recristalizado, cloreto de zinco fundido e POCl_3 destilado. Entretanto, essa metodologia também se apresentou ineficaz quando da utilização do cardanol (**16 i**) para obter a 4-HC almejada, mesmo variando-se as condições de reação (tempo, temperatura e ácido de Lewis) previamente estabelecidas para os fenóis sem a cadeia lateral (ESQUEMA 20).



ESQUEMA 20. Tentativa de preparação da 4-HC.

As matérias-primas, derivados e intermediários envolvidos no desenvolvimento dessas seqüências sintéticas foram submetidos a testes biológicos cuja discussão será objeto da próxima seção.

4.3. Testes Biológicos

4.3.1. Verificação de atividade citotóxica utilizando como modelo a toxicidade às larvas de *Artemia salina*

O bioensaio de letalidade a larvas do micro-crustáceo *Artemia salina* Leach é rápido, de baixo custo e requer pequena quantidade de amostra. Este ensaio tem sido utilizado na avaliação preliminar de toxicidade, de extratos de plantas, metais pesados e material dentário (CARBALLO, 2002; MOLINA-SALINAS, 2006).

Neste trabalho foi utilizado o método de Meyer que possui correlação com os ensaios de citotoxicidade frente a células cancerígenas P338 (MEYER, 1982).

Os resultados apresentados na TABELA 4 revelaram que o ácido salicílico é inativo e seu análogo, ácido anacárdico saturado exibiu uma significativa

toxicidade contra *Artemia salina*, quando comparando com o controle positivo (dicromato de potássio). De forma geral, as substâncias que não apresentam cadeia lateral variam a dose eficaz com os diferentes grupos funcionais. Infelizmente, a grande maioria dos lipídios fenólicos do LCC e seus derivados não foram testados contra *A. salina* devido à insolubilidade nas condições do teste.

TABELA 4. Citotoxicidade do ácido salicílico (**3**), ácido anacárdico (**15 i**) e do ácido acetilsalicílico (**7**) contra *A. salina*.

Composto	DL ₅₀ ppm	Intervalo de confiança ppm
3	INATIVO	INATIVO
15 i	0,252	0,299444 < DL ₅₀ < 0,2046014
7	INATIVO	INATIVO
K ₂ Cr ₂ O ₇	0,149	0,197568 < DL ₅₀ < 0,1006989

INATIVO = nenhuma atividade detectada na concentração ≥ 200 ppm.

4.3.2. Ensaio da redução do complexo de fosfomolibdênio

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas altamente reativas ou fragmentos moleculares que são continuamente produzidos em todos os organismos celulares, como consequência da respiração aeróbica. O termo abrange vários tipos de metabólitos de oxigênio reativo que são definidos como moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, como exemplo, ânion radical peroxila ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila ($\cdot OH$). O termo ROS também pode ser utilizado para não radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KARIHTALA, 2007). Na TABELA (5) estão representadas reações que produzem radicais livres.

TABELA 5. Formação biológica das principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (KARIHTALA, 2007).

Reação	Produção de ROS
$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -}$	Formação de superóxido
$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$	Formação de peróxido de hidrogênio
$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$	Reação de Fenton
$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \longrightarrow \cdot OH + OH^- + O_2$	Reação de Haber- Weiss
L - arginina $\longrightarrow NO \cdot +$ L - Citrulina	Formação de $NO \cdot$
$NO \cdot + O_2^{\bullet -} \longrightarrow ONOO^-$	Formação de peróxinitrito

Um dos fatores que contribuem para a oxidação biológica é a presença de metais de transição no interior da célula (íons de Fe, Cu, Co ou Ni) (MACHLIN, 1987), sendo assim, a ingestão de antioxidantes naturais, por exemplo, polifenóis consiste em um importante mecanismo antioxidação celular.

Os metais de transição participam da formação de espécies reativas de oxigênio as quais estão envolvidas no desenvolvimento de diversas patologias, tais como, o enfisema pulmonar, a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, câncer, a hipertensão arterial sistêmica, a aterosclerose, a degeneração macular relacionada à idade e a catarata (GUS, 2006).

Os lipídios são compostos presentes em alimentos que se oxidam facilmente, principalmente, os ácidos graxos insaturados e poliinsaturados, e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Os fosfolipídios, colesterol e triglicerídeos conhecidos como LDL, quando oxidados não são metabolizados normalmente, podendo causar o acúmulo no organismo (BORGES, 2007).

Antioxidantes naturais ou sintéticos podem formar complexos com metais de transição, impedindo assim, a formação de radicais livres. O ácido ascórbico (67) (FIGURA 33), um antioxidante natural, é essencial para a formação do tecido conjuntivo, por exemplo, o colágeno. Um adulto deve ingerir 60 mg/dia para manter uma reserva de 1500 mg. O baixo consumo do ácido ascórbico na alimentação humana pode causar o escorbuto (FIORUCCI, 2003).

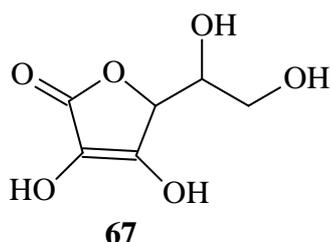
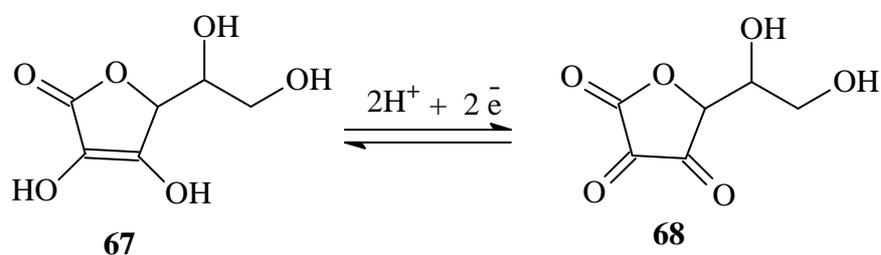


FIGURA 33. Ácido ascórbico.

Esse composto, também conhecido como vitamina C é um ótimo agente redutor em solução aquosa, pois é facilmente oxidado (**68**) como mostra o ESQUEMA 23.



ESQUEMA 21. Oxidação do ácido ascórbico ao ácido desidroascórbico.

Dentre os flavonóides, uma classe de compostos fenólicos de origem natural, pode ser citada a quercetina (**69**) (FIGURA 34) que apresenta a propriedade de remover os radicais superóxido, oxigênio singlete e peróxidos lipídicos e inibir a oxidação das LDL (BATLOUNI, 1997).

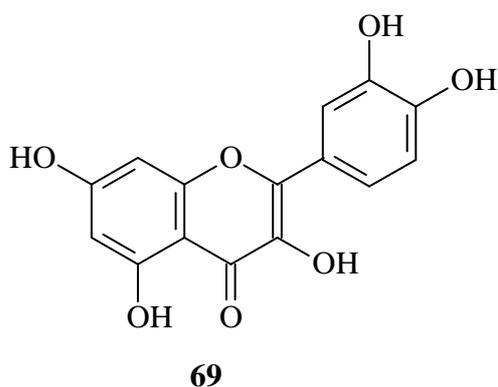
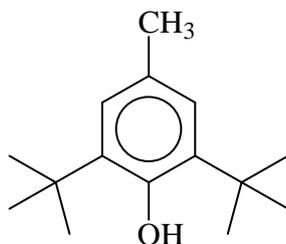


FIGURA 34. Quercetina

Antioxidantes sintéticos como o butilidróxitolueno (**70**) (BHT) (FIGURA 35), o butilidróxianisol (BHA), triidroxibutilfenona (THBP) e o propil galato (PG) são

amplamente utilizados pela indústria de alimentos. Porém, estudos *in vivo* demonstraram que tanto a exposição aguda quanto a prolongada a esses compostos pode causar tumores de fígado, pâncreas, glândulas, aumento da formação de H_2O_2 e carcinogênese no estômago de ratos (JARDINI, 2007).



70

FIGURA 35. BHT.

Recentemente, foi desenvolvido um método para determinar, quantitativamente a capacidade antioxidante de uma substância a partir de método espectrométrico (PRIETO, 1999). Neste ensaio, o molibdênio VI é reduzido a molibdênio V participando da reação como agente oxidante. São avaliados o tempo e a temperatura necessários para a redução do molibdênio. Esse método foi utilizado com ligeira modificação. Após ser avaliado, demonstrou que pode ser utilizado como ferramenta preliminar para avaliar o potencial antioxidante de extratos de plantas e substâncias naturais ou sintéticas.

Avaliação da atividade antioxidante

A capacidade redutora é obtida a partir da comparação dos valores de absorvância encontrados para determinada substância, em comparação com o padrão.

Nos experimentos realizados com os lipídios do LCC e seus derivados, foi convencionado que seria preparada uma solução da amostra a ser analisada, na concentração conhecida de cerca de 1 mg/mL utilizando como solvente etanol. Os resultados são apresentados em equivalentes de quercetina, BHT e ácido ascórbico (TABELA 6).

TABELA 6. Equivalência das substâncias sintetizadas com relação ao ácido ascórbico, BHT e quercetina.

Composto	Equivalentes em mg/mL				
	Concentração mg/mL	ABS	AA	BHT	Quercetina
16 i-m	1,1	0,530	0,150	0,213	0,217
16 i	1,08	0,432	0,117	0,012	0,133
32	1,25	0,610	0,177	0,378	0,286
15 i-m	1,1	0,518	0,146	0,189	0,207
15 i	1,1	0,565	0,162	0,285	0,248
47	1,09	0,520	0,147	0,193	0,209
48	1,08	0,682	0,202	0,526	0,348
49	1,23	0,610	0,177	0,378	0,286
54	1,58	0,675	0,199	0,511	0,342

A partir dos resultados (TABELA 6), pode ser observado que todas as amostras analisadas apresentam menor atividade antioxidante que a quercetina (69) e ácido ascórbico (67). Entretanto a 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona (54) teve atividade correspondente a 75,70 % de BHT (70), 2-hidróxi-6-pentadecil-benzoato de metila (48) teve atividade equivalente 77,12% de BHT, o ácido anacárdico (15 i) e o acetato de 3-pentadecilfenol (32) foram as substâncias que exibiram caráter antioxidante de 61,96% de BHT.

4.3.3. Avaliação da capacidade protetora contra raios ultravioleta

O espectro eletromagnético é o intervalo que compreende desde as ondas elétricas, ondas de rádio, infravermelho, a luz visível, os raios ultravioleta, os raios X, a radiação γ e os raios cósmicos (FIGURA 36).

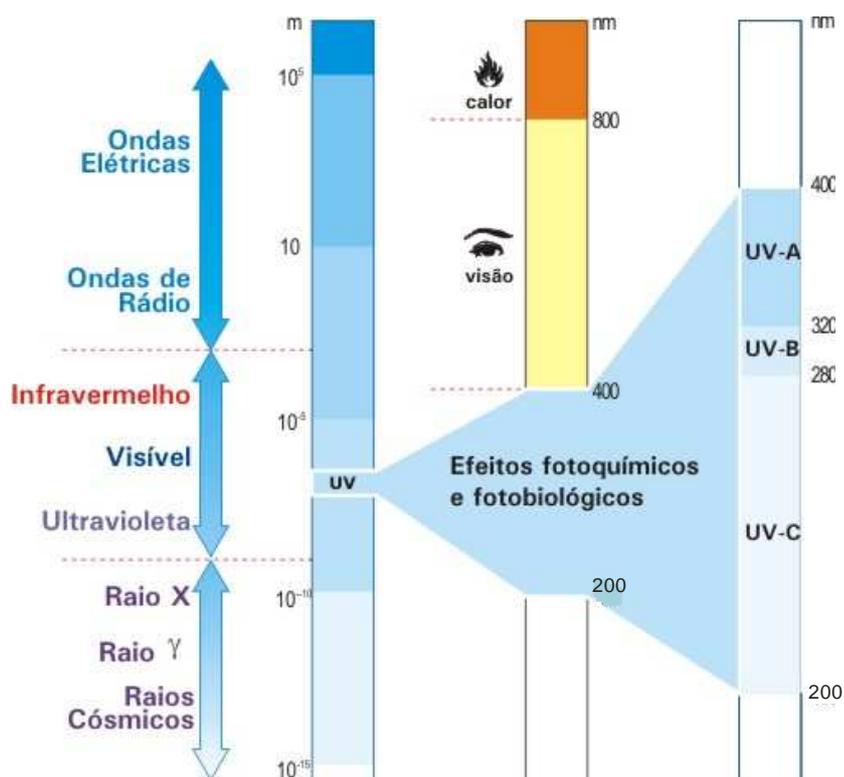


FIGURA 36. Regiões do espectro eletromagnético (Fonte: INPE)

A radiação ultravioleta (UV), comprimento de onda de 200 a 400 nm, é formada por raios invisíveis que penetram na pele. Existem três tipos de radiação UV: UVA, UVB e UVC. A radiação UVA, que é equivalente à faixa de comprimento de onda de 320 a 400 nm, está relacionada com o bronzeamento, enquanto a UVB, equivalente à faixa de comprimento de onda de 280 a 320 nm, está relacionada ao câncer de pele. Os raios UVC estão na faixa de 100-280 nm e são nocivos aos tecidos vivos, entretanto, o mesmo é absorvido pela camada de ozônio, que é produzida pela radiação UVC (COSTA, 1995; KEMENY, 2007).

O sol em excesso é um fator que contribui para o desenvolvimento do câncer de pele, assim indivíduos que estão na faixa de risco, ou seja, as pessoas que têm sardas ou que ficam expostas muito tempo ao sol têm grande probabilidade de desenvolver os seguintes tipos de câncer: carcinoma basocelular, espinocelular e melanoma (Fonte: <http://www.sbd.org.br>, acesso em 8/08/2007). A maioria da população não utiliza protetores solares e a maior incidência de câncer de pele está na população branca (<http://www.sbd.org.br/publico/cancer/estatisticas.aspx>, acesso em 08/08/2007.).

Os filtros solares estão no mercado há mais de 60 anos e no início esses protegiam apenas contra a radiação UVB, mas com novas pesquisas na área foi constatado que é essencial a proteção contra a radiação UVA para minimizar a incidência de câncer de pele (FLOR, 2007).

Diversas moléculas orgânicas são utilizadas como bloqueador solar. Na Europa e nos Estados Unidos se utilizam: ácido para aminobenzóico (PABA), avobenzona, salicilato de octila e oxibenzona (YAAR, 2007), no entanto, essas moléculas orgânicas têm um valor financeiro elevado, assim, a busca por novos compostos orgânicos que apresentem tal atividade, tenha baixa toxicidade e custo reduzido, tem se tornado constante pelas indústrias químicas e pelos pesquisadores visando favorecer a sociedade.

Para avaliar se os compostos preparados apresentam atividade fotoprotetora, foi feita a comparação da absorção de radiação ultravioleta da solução de cada uma com uma solução de Eusolex 4360[®] (**71**) (FIGURA 37) na região de 288 nm. O poder fotoprotetor foi estimado em equivalentes de Eusolex 4360[®]. Por procedimento semelhante àquele utilizado na avaliação da atividade antioxidante, foram construídas duas curvas-padrão a partir de soluções etanólicas de Eusolex 4360[®]. A primeira a partir dos dados obtidos através da análise, no espectrômetro de UV, no comprimento de onda 325 nm.; para a segunda, as soluções foram analisadas no comprimento de onda 288 nm.

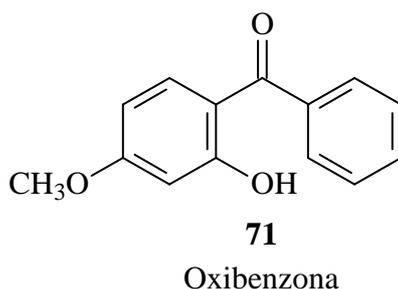


FIGURA 37. Oxibenzona.

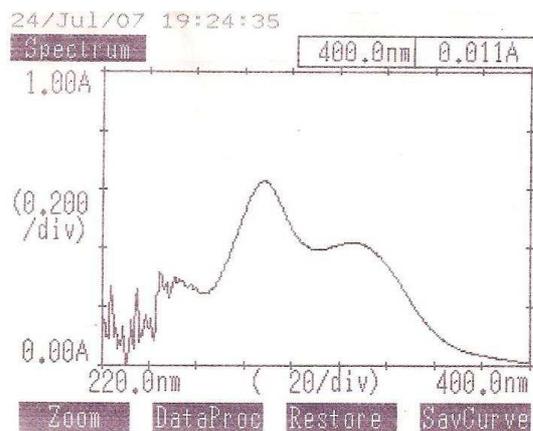


FIGURA 38. Espectro de varredura do EUSOLEX 4360[®], na região do ultravioleta (400 nm a 200 nm).

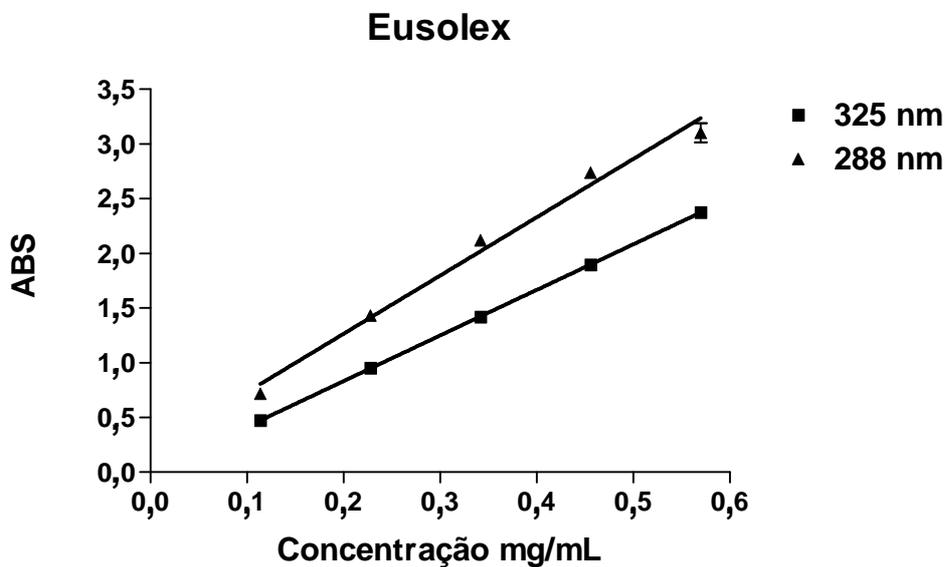


FIGURA 39. Absorbância do Eusolex 4360[®].a 325 e 288 nm.

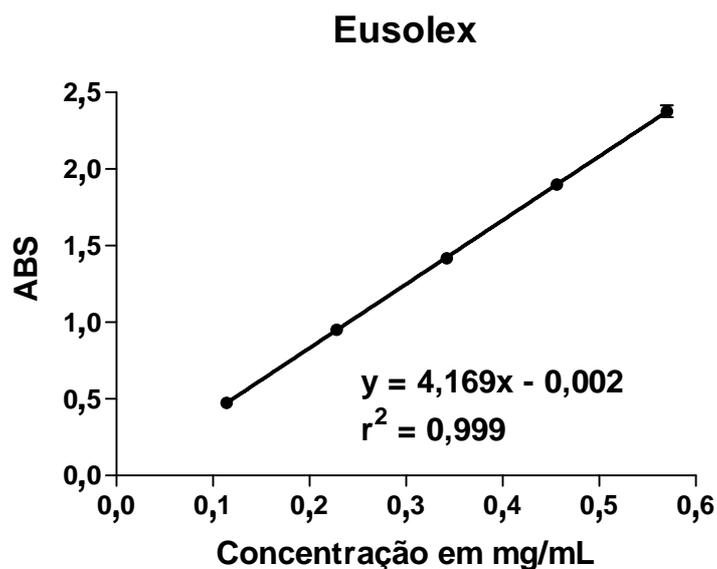


FIGURA 40. Absorvância do Eusolex 4360[®].a 325.

TABELA 7. Valores das concentrações do Eusolex 4360[®], das absorvâncias na região de 325, em triplicata, média das absorvâncias e desvio padrão.

Concentrações em mg/mL	Absorvância do Eusolex 4360 [®]			Média das absorvâncias	Desvio Padrão
	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3		
0,114	0,480	0,463	0,479	0,474	0,009
0,228	0,954	0,942	0,958	0,951	0,008
0,342	1,435	1,406	1,413	1,414	0,015
0,456	1,896	1,883	1,915	1,898	0,016
0,570	2,378	2,338	2,415	2,377	0,038

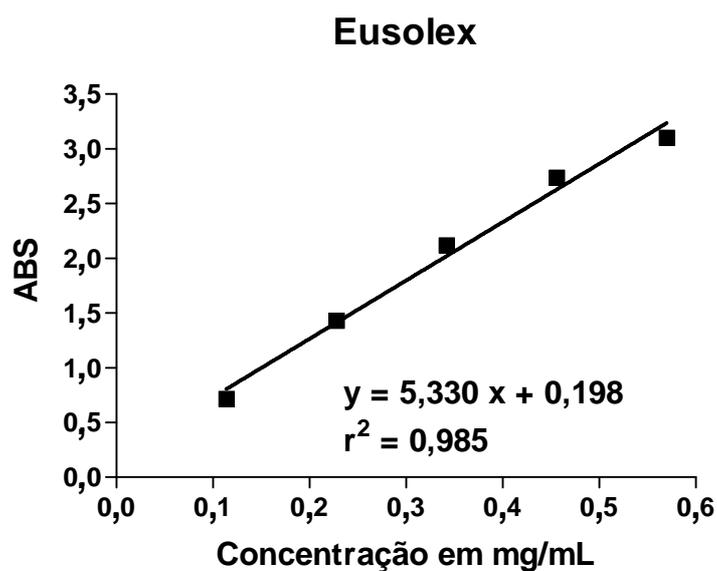


FIGURA 41. Absorvância do Eusolex 4360[®] a 288.

TABELA 8. Valores das concentrações do Eusolex 4360[®], das absorbâncias na região de 288, em triplicata, média das absorbâncias e desvio padrão.

Concentrações em mg/mL	Absorbância do Eusolex 4360 [®]			Média das curvas	Desvio padrão
	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3		
0,114	0,725	0,698	0,724	0,715	0,015
0,228	1,435	1,417	1,442	1,431	0,013
0,342	2,148	2,094	2,112	2,118	0,027
0,456	2,783	2,693	2,734	2,736	0,045
0,570	3,177	3,005	3,121	3,101	0,088

Em seguida, para os lipídios do LCC e seus derivados do LCC foram preparadas soluções etanólicas que foram analisadas espectrofotometricamente, numa varredura ente 200 a 400 nm, para definir o máximo de absorção e, conseqüentemente, estimar a região de absorção (TABELA 9).

Como mostrado na TABELA 9, os resultados mostraram que o ácido anacárdico insaturado (**15 i-m**), ácido anacárdico saturado (**15 i**), 2-hidróxi-6-pentadecil-benzoato de metila (**48**), o ácido 2-acetiloxi-6-pentadecil-benzóico (**49**), 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona (**54**) e LCC natural absorvem na região UVB. Dessa forma, a solução foi analisada em 288 nm e o valor encontrado foi extrapolado para a curva-padrão do Eusolex, obtida no comprimento de onda 288 nm. O cardanol insaturado (**16 i-m**), cardanol saturado (**16 i**), acetato de 3-pentadecil fenol (**32**), 2-metóxi-6-pentadecil benzoato de metila (**47**) e o LCC técnico apresentaram máximos de absorção na região do UVC e, portanto, não foram analisados.

TABELA 9. Valores de absorção de UV dos derivados do LCC.

Substância	Absorção	
	UV	máximo (nm)
16 i-m	UVC	282,5
16 i	UVC	279.5
32	UVC	263.0
15 i-m	UVB	310
15 i	UVB	306.5
47	UVC	283.0
48	UVB	311.0
		286.0
49	UVB	308.0
	UVC	276.5
54	UVB	315.5
	UVC	265.0
LCC natural	UVB	310.5
	UVC	283.5
LCC técnico	UVC	283.0

TABELA 10. Atividade fotoprotetora UVB dos derivados do LCC em equivalentes de EUSOLEX4360®.

Substância	mg/mL	ABS	Equivalente ao Eusolex em mg/mL (288 nm)
15 i-m	0,147	1,136	0,176
15 i	0,147	0,94	0,139
48	0,218	1,321	0,210
54	0,136	1,852	0,310
LCC natural	0,286	1,623	0,267

As soluções do ácido anacárdico insaturado (**15 i-m**) e 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona (**54**) mostraram atividade de absorção na região do UVB superior àquela apresentada pelo EUSOLEX (TABELA 10). Testes adicionais poderão ser realizados para verificar a potencialidade dessa substância como fotoprotetora. O ácido anacárdico insaturado (**15 i-m**), saturado (**15 i**) e esterificado (**48**) também possui absorção na região UVB, assim essas substâncias têm potencial para serem usadas como fotoprotetoras, entretanto, necessitarão ser avaliadas quanto à toxicidade.

4.3.4. Avaliação da atividade inibidora de crescimento celular *ex vivo* em linhagens de células tumorais

O câncer é uma doença que a cada ano mata 7 milhões de pessoas mundialmente e no Brasil a estimativa para 2008 é de 466.730 casos novos de câncer (AZEVEDO, 2006).

As células cancerosas têm um estágio de crescimento, desenvolvimento, reprodução e morte. Quando ocorre uma alteração externa ou interna na célula, essa consegue contornar o obstáculo formado. Entretanto, quando a célula não se adapta as modificações ocorridas começa a formação do câncer (BÉLIVEAU, 2007).

Alguns mecanismos foram propostos para entender o desenvolvimento do câncer: Uma hipótese é que o câncer surja a partir de uma simples célula diferenciada por mutações. A deterioração da comunicação de célula por célula também tem sido postulado como uma causa do câncer. Também podemos citar a metilação do DNA e remodelamento da cromatina (DUCASSE, 2006). Mutações e anormalidades genéticas observadas em células cancerosas podem ser causadas por fatores ambientais, e.g., substâncias químicas carcinogênicas, fatores de estilo de vida tais como: consumo de álcool ou de cigarro, abuso de drogas (GRANDICS, 2006). Contudo, o câncer também pode ser desenvolvido por alimentação deficiente, exposição aos raios UV sem proteção para a pele, infecções, fatores hereditários, obesidade, falta de exercícios físicos, prática sexual sem proteção e exposição ocupacional (AZEVEDO, 2006; BÉLIVEAU, 2007).

A célula tumoral possui as seguintes características: crescimento anárquico, não obedecem as ordens de parada de crescimento, resistência a auto-destruição por apoptose, imortalidade e invasão, e colonização dos tecidos do organismo (BÉLIVEAU, 2007).

Para o tratamento do câncer podemos citar: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia (BÉLIVEAU, 2007). A melhor maneira de prevenção ao câncer é pela alimentação saudável e fazendo exercícios físicos regularmente. Pela alimentação podemos citar algumas substâncias fitoquímicas anti-tumorais, tais como: Cúrcuma (Curcumina), morango (Ácido Elágico), Chá Verde (Epigallocatequina-3-Galato), Soja (Genisteína), Tomate (Licopeno), Uvas

(Resveratrol), Cítricos (Limoneno), Alho (Dialil Sulfeto), Repolho (Indol-3-Carbinol) e Brócolis (Sulforafano) (BÉLIVEAU, 2007).

Nesse trabalho, os lipídios do LCC e seus derivados foram submetidos a avaliação antitumoral com células cancerosas de boca e de mama. Os testes foram realizados no FARMOL pela Prof.^a Dr.^a Andrea Barretto Motoyama. Os GRÁFICOS 1 e 2 apresentam os resultados dos testes de citotoxicidade por cristal violeta realizados com células OSCC (FIGURA 42) e MCF-7 (FIGURA 43), respectivamente.

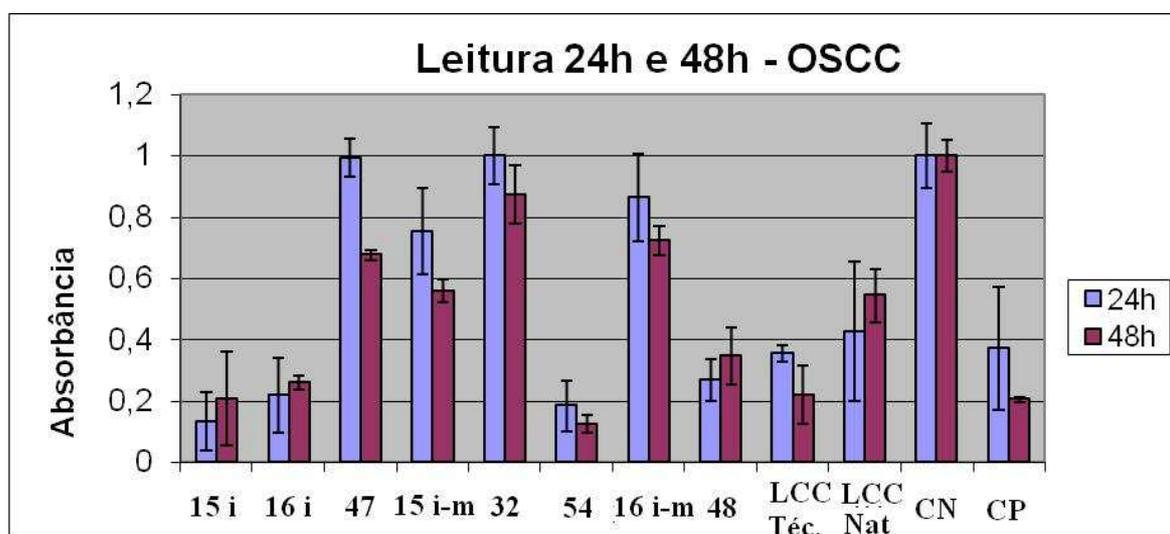


FIGURA 42: Teste de citotoxicidade por cristal violeta em células OSCC (CN= controle negativo e CP = controle positivo).

O teste de citotoxicidade por cristal violeta com OSCC em 24h demonstra que os compostos com maior atividade quando comparados com o controle positivo foram: ácido anacárdico saturado, cardanol saturado, 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona e 2-hidróxi-6-pentadecilbenzoato de metila. Com o teste realizado em 48 h a substância que apresentou maior atividade quando comparada com o controle positivo foi a 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona.

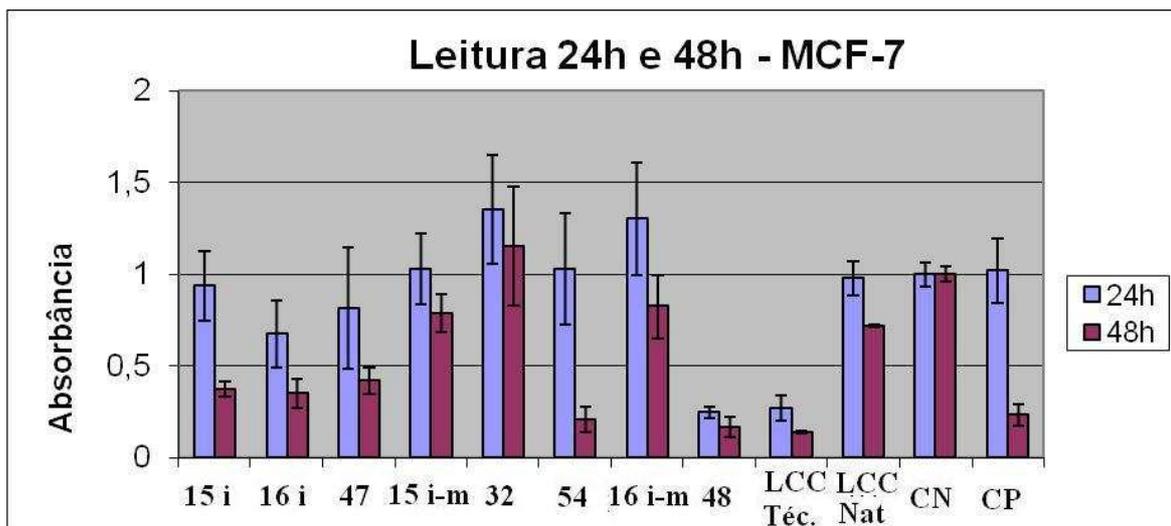


FIGURA 43: Teste de citotoxicidade por cristal violeta em células MCF-7 (CN= controle negativo e CP = controle positivo).

O teste de citotoxicidade por cristal violeta com leitura realizada após 24 h com células mamárias MCF-7 demonstra os compostos que apresentaram maior atividade quando comparados com o controle positivo foram: cardanol saturado e 2-metóxi-6-pentadecil benzoato de metila. Com leitura realizada a 48h os compostos 2-hidróxi-6- pentadecilbenzoato de metila e LCC técnico foram as que apresentaram atividade antitumoral.

Conclusões e Perspectivas

5. Conclusões e perspectivas

As modificações parciais dos lipídios do LCC foram realizadas com êxito e os derivados planejados foram obtidas com rendimento satisfatório. Já o estudo de preparação de derivados 4-hidroxicumarínicos não conduziu ao resultado desejado.

Somente foi possível realizar o ensaio de *Artemia salina* com o ácido anacárdico, pois a cadeia lipossolúvel impediu a solubilidade necessária para a realização do experimento. Contudo, podemos notar que o ácido tetraidroanacárdico possui alta atividade frente ao ensaio com *A. salina*.

Paralelamente, foi desenvolvido um novo procedimento com base na propriedade redutora do complexo de fosfomolibdênio. Na validação esse procedimento se mostrou eficaz podendo ser aplicado para teste de atividade antioxidante. Dentre as substâncias estudadas, a cetona do cardanol, o éster do ácido anacárdico saturado, o ácido anacárdico e o cardanol acetilados foram as substâncias que exibiram um caráter antioxidante próximo ao do BHT.

O teste de citotoxicidade por cristal violeta com OSCC demonstrou que as substâncias com maior atividade foram: Ácido 2-hidróxi-6-pentadecilbenzóico (**15 i**), 3-Pentadecil fenol (**16 i**), 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona (**54**) e 2-hidróxi-6-pentadecilbenzoato de metila (**48**). Já o teste de citotoxicidade com células mamárias MCF-7 demonstrou de modo geral os compostos que apresentaram atividade foram: 3-Pentadecil fenol (**16 i**), 2-metóxi-6-pentadecil benzoato de metila (**47**) e LCC técnico.

Na varredura de espectrofotometria o 2-hidróxi-6-pentadecilbenzoato de metila (**48**) apresentou dois sinais na região do UVB e uma banda larga de absorção. Dentre as substâncias verificadas essa é a que apresentou a maior proteção no UVB.

Para melhorar os resultados sintéticos pode ser feito uma ozonólise da cadeia lateral dos lipídios do LCC para verificar a influência desta na reatividade química e, posteriormente, tentar contornar os problemas encontrados na síntese dos derivados 4-hidroxicumarínicos. Essa clivagem na cadeia lateral provavelmente possibilitará também a preparação de novos derivados dos lipídios

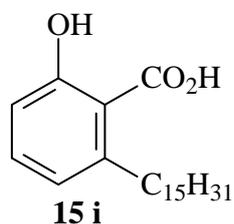
do LCC com solubilidade adequada para a realização do ensaio com *Artemia salina*.

Os resultados preliminares dos ensaios biológicos se mostraram promissores, sugerindo que possíveis modificações químicas nessas substâncias podem proporcionar melhoraria na atividade destes tipos de compostos, inclusive frente a testes com células cancerosas.

Dados Físico-Químicos

6.Dados Físico-Químicos

6.1. Ácido 2-hidróxi-6-pentadecilbenzóico (ácido tetraidroanacárdico)



Característica: sólido branco, solúvel em hexano.

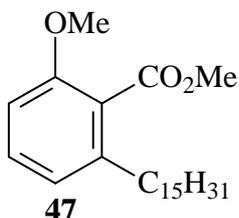
Faixa de Fusão: 88-90⁰C.

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}) 3422, 3056, 2917, 2850, 1655,1604, 1466, 1446, 1308, 1248, 1220.

RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (multiplicidade, J)]: 11(s;OH); 7,36 (t; 7,83; ArH); 6,87 (d; 8,38; ArH); 6,77 (d; 7,49; ArH); 3,00-2,97(m, CH₂);1,62-1,58 (m,CH₂), 1,35-1,28 (bl, CH₂, cadeia alifática); 0,87(t,CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 176,3; 163,6; 147,9, 135,5; 122,8; 115,9; 110,4; 77,4; 77,0; 76,6; 36,4-22,6; 14,1.

6.2. 2-Metóxi-6-pentadecil benzoato de metila



Característica: sólido amarelo claro, solúvel em hexano.

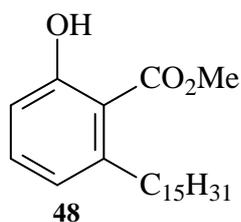
Faixa de fusão: 85-86⁰C.

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3435, 2918, 2850, 1763, 1655, 1605, 1466, 1447, 1308, 1248, 1220, 1206, 1047, 880.

RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (multiplicidade, J)]: 7,24 (t; 7,63; ArH); 6,81 (d; 7,72; ArH); 6,74 (d; 8,33; ArH); 3,89 (s, OCH₃); 3,80 (s, OCH₃); 2,56-2,51 (m, ArCH₂); 1,60-1,52 (m, CH₂); 1,33-1,26 (bl, CH₂); 0,88 (t; CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 168,8; 156,2; 141,3; 130,1; 123,4; 121,4; 108,2 (Região olefínica); 55,7; 52,0; 33,4-22,6; (Região alifática); 14,0.

6.3. 2-hidróxi-6-pentadecil-benzoato de metila



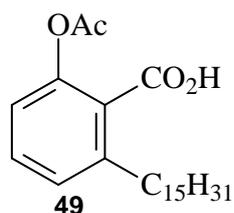
Característica: sólido amarelado, solúvel em hexano.

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3439; 2916; 2851; 1665; 1606; 1578; 1472; 1449; 1337;

RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3 , δ (multiplicidade, J)]: 7,28 (t; 7,53; ArH); 6,83 (d; 7,09; ArH); 6,77 (d; 7,09; ArH); 3,95 (s; OCH_3); 2,56-2,51 (m, ArCH_2); 1,60-1,52 (m, CH_2); 1,33-1,26 (bl, CH_2); 0,88 (t; CH_3).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 171,9; 162,5; 146,1; 134,1; 122,38; 115,5; 111,8; (Região olefínica); 52,0; 36,6-22,7 (Região alifática); 14,1.

6.4. Ácido 2-acetiloxi-6-pentadecil-benzóico



Característica: sólido bege, solúvel em hexano.

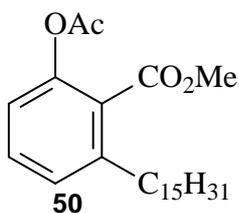
Faixa de ponto: 70-72⁰C.

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3435; 2918; 2850; 1763; 1655; 1605; 1466; 1447; 1308; 1248; 1220; 1206; 1047; 880.

RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (multiplicidade, J)]: 6,7 (d; 6,81; ArH); 6,86 (d; 7,52; ArH); 7,39 (t; 7,85; ArH); 2,29 (s, COCH₃); 1,30-1,24 (bl, CH₂, cadeia alifática); 0,88 (t;CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 171,6; 169,6; 148,4; 143,4; 131,1; 127,5; 120,4 (Região olefínica); 33,8 -20,9 (Região alifática); 14,1.

6.5. 2-acetiloxi-6-pentadecilbenzoato de metila

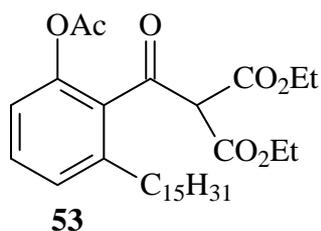


Característica: sólido marrom, solúvel em hexano.

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3552; 3479; 3413; 2954; 2919; 2850; 1766; 1726

RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (multiplicidade, J)]: 7,33 (t; 7,75; ArH); 7,10 (d; 7,75; ArH); 3,87 (s; OCH₃); 2,25 (s; COCH₃); 1,30-1,24 (bl, CH₂, cadeia alifática); 0,88 (t; CH₃).

6.6. Dietil [2-(acetiloxi)-6-pentadecilfenil]carbonil propanedioato

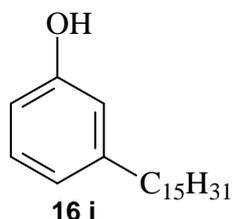


Característica: sólido marrom.

RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (multiplicidade, J)]: 7,41 (t; 7,95; ArH); 7,15 (d; 7,34; ArH); 7,01 (d; 7,13; ArH); 4,21 (q; 7,13; CH₂); 2,30 (s; CH₃CO); 2,68 (t; 2,27; CH₂Ar); 1,37-1,25 (bl.; CH₂; cadeia alifática); 0,88 (t; CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 168,8; 166,5; 160,8; 148,6; 148,4; 143,7; 131,7; 127,3; 123,4; 120,58 (região olefínica); 77,4; 76,9; 76,6; 41,5; 29,5; 41,5-13,9 (Região alifática); 13,9.

6.7. 3-Pentadecil fenol (cardanol saturado)



Característica: sólido branco, solúvel em hexano.

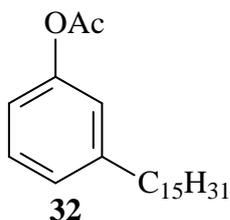
Faixa de fusão: 53-53,5°C.

IV (KBr, ν_{máx}, cm⁻¹): 3364, 2951, 2915, 2848, 1618, 1586, 1499, 1463, 1365.

RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (multiplicidade, J)]: 7,26 (s; ArOH); 7,14 (t; 7,51; ArH); 6,76 (d; 7,53; ArH); 6,64 (d; 7,56; ArH); 2,55 (t; ArCH₂-); 1,70-1,62 (m, -CH₂); 1,29-1,25 (bl; CH₂; cadeia alifática); 0,88 (t; CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 155,2; 144,9; 129,4; 120,9; 115,4; 112,5; 35,8-22,7; 14,1.

6.8. Acetato de 3-pentadecilfenol



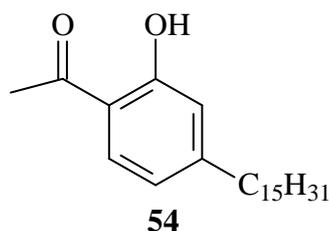
Característica: sólido branco, solúvel em hexano.

Faixa de fusão: 53-53,5⁰C).

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3443, 2916, 2849, 1760, 1615, 1587, 1541, 1488, 1471, 1370, 1206.

RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (multiplicidade, J)]: 7,25 (t; xxx, ArH); 7,04(d; 8,06, ArH); 6,89 (m, 7,41; ArH); 2,60 (t; ArCH₂-); 1,63-1,60 (t, -CH₂-); 1,30-1,28 (bl; CH₂; cadeia alifática); 0,88 (t; CH₃)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 169,4; 150,6; 144,6; 128,9; 125,8; 121,3; 118,6; 35,6-21,0; 14,0.

6.9. 1-(2-hidróxi-4-pentadecil) acetofenona

Característica: sólido marrom claro, solúvel em hexano.

Faixa de fusão: 41-42^oC).

IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3439, 2917, 2849, 1638, 1619, 1573, 1471, 1366, 1326, 1249, 1227, 1147.

RMN ¹H [300 MHz, CDCl₃, δ (multiplicidade, J)]: 12,28 (s. OH); 7,62 (d, 8,15, ArH); 6,79 (s, ArH); 6,71 (d, 7,12, ArH); 2,60 (s. COCH₃); 1,63-1,25 (bl, CH₂, cadeia alifática); 0,87(t; CH₃).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): 204,1; 162,7; 153,2; 130,8; 119,8; 119,87; 117,9; 36,5-22,9; 14,4.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- ABRAHAM, D. J. Medicinal Chemistry Drug Discovery. v.5, p.548-550. 2003.
- ANSCHÜTZ, R. The benzotetronic acid group I. **Ann.**, v.367, p.169-218. 1909.
- AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S.; NORONHA, C. P.; ALMEIDA, L. M. D. A situação do câncer no Brasil. **INCA**, p.1-119. 2006.
- BATLOUNI, M. Hipótese Oxidativa da Aterosclerose e Emprego dos Antioxidantes Na Doença Arterial Coronária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** v.68. 1997.
- BEEK, T. A. V.; WINTERMANS, M. S. Preparative isolation and dual column high-performance liquid chromatography of ginkgolic acids from Ginkgo biloba. **Journal of Chromatography A**, v.930, p.109-117. 2001.
- BEGUM, P.; HASHIDOKO, Y.; ISLAM, M. T.; OGAWA, Y.; TAHARA, S. Zoosporicidal Activities of Anacardic Acids against *Aphanomyces cochlioides*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.57, p.874-882. 2002.
- BÉLIVEAU, R.; GINGRAS, D. Os alimentos contra o câncer: a prevenção e o tratamento do câncer pela alimentação. **Editora Vozes**, p.1-208. 2007.
- BORGES, F. M. D. O.; SALGARELLO, R. M.; GURIAN, T. M. Recentes avanços na nutrição de cães e gatos. p.1-32. 2007.
- BYE, A.; KING, H. K. The biosynthesis of 4-hydroxycoumarin and dicoumarol by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Biochem J**, v.117, n.2, p.237-245. 1970.
- CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, p.1-5. 2002.
- CERVINI, C.; TERZANI, G. Salicylamide in antirheumatic therapy. **Minerva medica** v.42, p.186-188. 1951.
- CORREIA, S. D. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de anacardiaceae. **Quim. Nova**, v.29, n.6, p.1287-1300. 2006.
- COSTA, M. L.; SILVA, R. R. D. Ataque a pele. **Química nova na escola**, v.1, p.3-7. 1995.
- CRAVEN, L. L. Acetylsalicylic acid, possible preventive of coronary thrombosis. **Annals of western medicine and surgery** v.4, p.95. 1950.

DANTAS, T. N. C.; DANTAS, M. S. G.; NETO, A. A. D.; D'ORNELLAS, C. V.; QUEIROZ, L. R. Novel antioxidants from cashew nut shell liquid applied to gasoline stabilization. **Fuel**, v.82, p.1465-1469. 2003.

DAS, P.; GANESH, A. Bio-oil from pyrolysis of cashew nut shell-a near fuel **Biomass and Bioenergy** v.25, p.113-117. 2003.

DAS, P.; SREELATHA, T.; GANESH, A. Bio oil from pyrolysis of cashew nut shell-characterisation and related properties. **Biomass and Bioenergy**, v.27, p.265-275. 2004.

DEMIR, A. S.; TANYELI, C.; GULBEYAZ, U.; AKGUN, H. Enantioselective synthesis of 4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)2H-1-benzopyran-2-one (warfarin). **Turk. J. Chem.**, v.20, n.2, p.139-145. 1996.

DESAI, N. J.; SETHNA, S. Synthesis of Some 4-Hydroxycoumarin Derivatives. **American Chemical Society**, v.22, n.4, p.388-390. 1957.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. p.1-507. 2002.

DEZELIC, M.; TRKOVNIK, M. Synthesis of some 4-hydroxycoumarins and their condensation products with aldehydes and carboxylic acids. The anticoagulant activity of some 4-hydroxycoumarin derivatives. v.7, p.284-288. 1963.

DUCASSE, M.; BROWN, M. A. Epigenetic aberrations and cancer. **Molecular Cancer**, v.5, p.1-10. 2006.

EL-SHARKAWY; SALEH, H. Microbial conversion of coumarin. **Indian J. Pharm. Sci.**, v.56, n.3, 1994, p.100-104. 1994.

FELDMAN, H. T. Methyl salicylate poisoning. **PubMed**, v.6, p.362-365. 1950.

FERRAZ, A. C. O.; BISCEGLI, C. I.; INAMASU, R. Y. Circular Técnica. **Embrapa**, v.26, p.1-9. 2005.

FIORUCCI, A. R. F.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, É. T. G. A importância da Vitamina C na Sociedade Através dos Tempos. **Quim. Nova na Escola**, v.17, p.3-7. 2003.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R. Protetores solares. **Quim. Nova**, v.30, n.1, p.153-158. 2007.

GRANDICS, P. The cancer stem cell: Evidence for its origin as an injured autoreactive T Cell. **Molecular Cancer**, v.5, p.1-17. 2006.

GUS, P. I.; BELLÓ-KLEIN, A.; LLESUY, S.; QUINTO, G. G.; MATOS, G. H.; BECHARA, S. J. Potencial antioxidativo da lágrima de adultos jovens. **Arq Bras Oftalmol.**, v.69, n.4, p.565-570. 2006.

HARUKI, E. 4-Hydroxycoumarin derivatives. . **Jpn, Kokai Tokkio Koho 79**, v.141, p.774. 1979.

HAUSTEIN, K. O.; MARKWARDT, F. 4-Hydroxycoumarins, bishydroxycoumarins and 1,3-indandiones. **Handb. Exp. Pharmacol**, v.27, p.192-301. 1971.

HILDEBRAND, D. F.; HAMILTON-KEMP, T. R.; LEGG, C. S.; BOOKJANS, G. Plant lipoxygenase: occurrence, properties and possible functions. *Curr. Top. . Plants Biochem. Physiol.*, v.7, p.201-219. 1988.

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. **Editora Universidade Federal de São Carlos**, p.55. 2003.

HUDSON, A. T.; CAMPBELL, I. M.; BENTLEY, R. Biosynthesis of 6-Methylsalicylic Acid by *Mycobacterium phlei*. **Biochemistry**, v.9, p.3988-3992. 1970.

IMBROISI, D. D. O.; ARAÚJO, C. R. M. Progressos na síntese de análogos da rivastigmina a partir do líquido da castanha de caju (LCC). **Sociedade Brasileira de Química**. 2006.

IONESCU, C. N.; SELMICIU, I.; NICULESCU, V.; GOSTEA, T.; LEOVEANU. *Studii Cercetari Chim.* v.2, p.191-194. 1954.

IVANOV, I.; MALONOV, I.; ALEXANDROVA, L. New efficient catalyst in the synthesis of warfarin and acenocoumarol. **Arch. Pharm**, v.323, n.8, p.521-522. 1990.

IZZO, P. T.; DAWSON, C. R. Cashew nut shellliquid. VII. The higher olefinic components of cardanol. **Journal of Organic Chemistry**, v.15, p.707-714. 1950.

JANSEN, K. F.; A., J. K. Constitution and hemorrhagic of 3,3'-methylenebis(4-hydroxycoumarin). . **Z. Physiol. Chem.**, v.277, p.66-73. 1942.

JARDINI, F. A.; FILHO, J. M. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.1. 2007.

KAKIMOTO, T.; HIRAI, T. Preparation of 4-hydroxycoumarin. **Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 05**, v.262, p.756. 1993.

KARIHTALA, P.; SOINI, Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. **APMIS**, v.115, p.81-103. 2007.

KEMENY, L.; KORECK, A. Ultraviolet light phototherapy for allergic rhinitis. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.87, p.58-65. 2007.

KOZUBEK, A.; TYMAN, J. H. P. Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity. **American Chemical Society**, v.99, n.1, p.1-25. 1999.

KUBO, I.; KOMATSU, S.; OCHI, M. Molluscicides from the Cashew *Anacardium occidentale* and Their Large-Scale Isolation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 34, p. 970-973. 1986.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Structure-Antibacterial Activity Relationships of Anacardic Acids. **J. Agric. Food Chem.** , v.41, p.1016-1019. 1993.

KUBO, J.; LEE, J. R.; KUBO, I. Anti-*Helicobacter pylori* Agents from the Cashew Apple. **J. Agric. Food Chem**, v.47, p.533-537. 1999.

LITTER, M.; MORENO, A. R.; DONIN, L. Salicylamide; pharmacology, fate and clinical use. **PubMed** v.101, p.119-124. 1951.

LOGRADO, L. P. L.; SILVEIRA, D.; ROMEIRO, L. A. S.; MORAES, M. O. D.; CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. D. Ó.; SANTOS, M. L. D. Synthesis and Biological Evaluation of New Salicylate Macrolactones from Anacardic Acids. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.16, p.1217-1225. 2005.

LUBI, M. C.; THACHIL, E. T. Cashew nut shell liquid (CNSL) - a versatile monomer for polymer synthesis. **Monomers and polymers**, v.3, n.2, p.123-153. 2000.

_____. Copolymerization of cashew shell liquid (CNSL) and phenol by condensation with hexamine **Journal of Polymeric Materials**, v.52, p.793-807. 2003.

LUBIC, M.; THACHIL, E. T. COPOLYMERIZATION OF CASHEW NUT SHELL LIQUID (CNSL) AND PHENOL BY CONDENSATION WITH HEXAMINE. **International Journal of Polymeric Materials**, v.52, p.793-807. 2003.

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. . **FASEB Journal Bethesda**, v.1, n.6, p.441-445. 1987.

MADSEN, E. H. Acetylsalicylic Acid. Aspirin. **Pharmazeutische Zeitung** v.54, n.209. 1911.

MAFFEZZOLI, A.; CALO, E.; ZURLO, S.; MELE, G.; TARZIA, A.; STIFANI, C. Cardanol based matrix biocomposites reinforced with natural fibres. **Composites Science and Technology** v.64, p.839-845. 2004.

MAHANWAR, P. A.; KALE, D., ; . **Indian j. Technol.**, v.3, p.191-193. 1996.

MANDAL, N. C.; CHAKRABARTTY, P. K.; JASH, S. S.; BASU, K.; BHATTACHARYYA, P. Metabolism of coumarin by *Curvularia lunata*. **Indian J. Exp. Biol.**, v.28, n.2, p.189. 1990.

MARIANO, J. B. Impactos ambientais do refino de petróleo. **Tese**, p.1-279. 2001.

MATSUI, K. O., M. . The reactions of esters with acyl chloride in the presence of aluminum chloride. I. Synthesis of 4-hydroxycoumarin. **Nippon Kagaku Zasshi**, v.78, p.517-520. 1957.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTMAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. . **Planta Médica**, v.45, p.31-34. 1982.

MITCHELL, J. D.; MORI, S. A. The Cashew and Its Relatives (*Anacardium*: Anacardiaceae). **The New York Botanical Garden**, v.42, p.1-76. 1987.

MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A MODIFIED MICROPLATE CYTOTOXICITY ASSAY WITH BRINE SHRIMP LARVAE (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline** 3, v.3, p.633-638. 2006.

MURATA, M.; IRIE, J.; HOMMA, S. Inhibition of Lipid Synthesis of Bacteria, Yeast and Animal Cells by Anacardic Acids, Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase Inhibitors from Ginkgo. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v.30, p.458-463. 1997.

MUROI, H.; NIHEI, K.; TSUJIMOTO, K.; KUBO, I. Synergistic effects of anacardic acids and methicillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.12, p.583-587. 2004.

NARKOWICZ, C. K.; BLACKMAN, A. J. Further acetogenins from Tasmanian collections of *Caulocystis cephalornithos* demonstrating chemical variability. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, p.635-641. 2006.

NASCENTE, L. D. C.; SAMPAIO, E. D. S.; SILVA, R. O.; LOGRADO, L. P. L.; SANTOS, M. L. D.; ROMEIRO, L. A. S. Síntese de Novos Derivados Anfifílicos Planejados a partir do Cardanol. **Sociedade Brasileira de Química**. 2006.

PARAMASHIVAPPA, R.; KUMAR, P. P.; RAO, P. V. S. Synthesis of sildenafil analogues from anacardic acid and their phosphodiesterase-5 Inhibition. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.7709-7713. 2002.

_____. Design, synthesis and biological evaluation of benzimidazole/benzothiazole and benzoxazole derivatives as cyclooxygenase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, v.13, p.657. 2003.

PARAMASHIVAPPA, R.; P. P. KUMAR; P. J. VITHAYATHIL; A. SRINIVASA RAO, J. Novel Method for Isolation of Major Phenolic Constituents Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Shell Liquid. **Agric. Food Chem.**, v.49, p.2548-2551. 2001.

PATEL, R. N.; BANDYOPADHYAY, G., S.A.; . Economic appraisal of supercritical fluid extraction of refined cashew nut shell liquid. **Bioresource Technology**, v.97, p.847-853. 2006.

PAULY, H.; LOCKEMANN, K. Methods of formation of monophenolketones and new synthesis of benzotetronic acid. **Ber**, v.48, p.28-32. 1915.

PESSOA, P. F. A. D. P.; LEITE, L. A. D. S. Cadeia Produtiva do Caju: subsídios para pesquisa e desenvolvimento. http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_582.pdf, p.1-36. 2006.

PRADO, C. C.; ALENCAR, R. G.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Avaliação do teor de polifenóis da *Camellia sinensis* (Chá verde). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, p.164-167. 2005.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341. 1999.

REGGIO, P. H.; BRAMBLETT, R. D.; YUKNAVICH, H.; SELTZMAN, H. H.; FLEMING, D. N.; FEMANDO, S. R.; STEVENSON, L. A.; PERTWEE, R. G. The design, synthesis and testing of desoxy-CBD: Further evidence for a region of steric interference at the cannabinoid receptor. **Life Sciences**, v.56, p.2025-2032. 1995.

RESCK, I. S.; SANTOS, M. L.; ROMEIRO, L. A. S. New application of triphosgene in a convenient synthesis of 3-aryl-1,3-benzoxazine-2,4-diones from anacardic acids. **Heterocycles**, v.65, p.311-318. 2005.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. **CRC Press**, p.151-170. 1991.

SALADINO, R.; NERI, V.; MINCIONE, E.; MARINI, S.; COLETTA, M.; FIORUCCI, C.; FILIPPONE, P. A new and efficient synthesis of ortho- and para-benzoquinones of cardanol derivatives by the catalytic system $\text{MeReO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$. **J. Chem. Soc.**, v.1, p.581-586. 2000.

SANTOS, M. L. D.; MAGALHÃES, G. C. Síntese de lactona macrocíclica a partir do ácido anacárdico: Uma reinvestigação. **Química Nova**, v.16, p.634-536. 1993.

SANTOS, M. L. D.; MAGALHÃES, G. C. D. Utilisation of Cashew Nut Shell Liquid from *Anacardium occidentale* as Starting Material for Organic Synthesis: A Novel Route to Lasiodiplodin from Cardols. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.10, p.13-20. 1999.

SHAH, A. K.; BHATT, N. S.; RAVAL, R. V.; THAKOR, V. M. Synthesis of 4-hydroxycoumarins. **Curr. Sci.**, v.53, n.23, p.1241-1242. 1984.

SHAH, V. R.; SHAH, R. C. New Synthesis of 4-hydroxycoumarins. **Journal of Organic Chemistry**, v.25, p.677-679. 1966.

SHELTON, R. S.; VAN CAMPEN JR, M. G. benzoic acid. **US Patent 2**, p.349-765. 1944.

SILVA, V. C. Estudos iniciais para a utilização dos constituintes do líquido da castanha de caju (LCC) como filtros solares. **Dissertação**. 2003.

SILVA, V. M. D.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. D. Bromofenóis simples relacionados ao "flavor" de organismos marinhos. **Quim. Nova, Vol. 30, No. 3, 629-635, 2007**, v.30, p.629-635. 2007.

SILVEIRA, W. D. C. A.; ALVES, S. N. B. Process for obtaining the anticoagulant and rodenticide (warfarin) and alkali metal salts. **Pedido PI BR 87 00**, v.724. 1987.

SMITH, R. L.; MALALUAN, R. M.; SETIANTO, W. B.; INOMATA, H.; ARAI, K. **Bioresource Technology**, v.88, p.1-7. 2003.

STAHMANN, M. A.; HUEBNER, C. F.; LINK, K. P. The hemorrhagic sweet clover disease. V. Identification and synthesis of hemorrhagic agent. **Journal of Biological Chemistry**, v.138, n.2, p.513-527. 1941.

TAKAISHI, K.; ALEN, Y.; KAWAZU, K.; BABA, N.; NAKAJIMA, S. Synthesis and Antinematodal Activity of 3-n-Alquil fenóis. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.68, p.2398-2400. 2004.

TARBELL, D. S. P., J. R. . The use of mixed carboxylic-carbonic anhydrides to acylate carbanions, . **J. Org. Chem**, v.22, p.245-250. 1957.

TOMEK, B.; INDRUCH, M. 4-Hydroxycoumarin. **Czech Patent 153**. 1974.

TOYOMIZU, M.; NAKAI, Y.; NAKATSU, T.; AKIBA, A. Y. Inhibitory effect of dietary anacardic acid supplementation on cecal lesion formation following chicken coccidial infection. **Animal Science Journal**, v.74, p.105–109. 2003a.

TOYOMIZU, M.; OKAMOTO, K.; ISHIBASHI, T.; NAKATSU, T.; AKIBA, Y. Reducing effect of dietary anacardic acid on body fat pads in rats. **Animal Science Journal**, v.74, p.499-504. 2003b.

TREVISAN, M. T. S.; PFUNDSTEIN, B.; HAUBNER, R.; WURTELE, G.; SPIEGELHALDE, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R. W. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.188-197. 2006.

TYMAN, J. H. P. Long-chain phenols IV quantitative determination of the olefinic composition of the component phenols in cashew nut shell liquid. **Journal of Chromatography** v.111, p.277-284. 1975.

_____. Non-isoprenoid Long Chain Phenols. **Chem. Soc. Rev.**, v.8, p.499-537. 1979.

_____. The Chemistry of Non-Isoprenoid Phenolic Lipids, Studies in Natural Products Chemistry. **Elsevier Science Publisher**, v.9, p.313. 1991.

UJVÁRY, I.; MIKITE, G. A Practical Synthesis of 3-n-Propylphenol, a Component of Tsetse Fly Attractant Blends. **Organic Process Research & Development** v.7, p.585-587. 2003.

VELASCO, M. V. R.; RIBEIRO, M. E.; BEDIN, V.; OKUBO, F. R.; STEINER, D. Rejuvenescimento da pele por peeling químico: enfoque no peeling de fenol. **An bras Dermatol**, v.79, n.1, p.91-99. 2004.

WOODS, L. L.; JOHNSON, D. Coumarins from 2-hydroxyaryl acids and malonic acid. **J. Org. Chem**, v.30, n.12, p.4343-4344. 1965.

YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. **British Journal of Dermatology**, v.157, p.874-887. 2007.

YAMAMOTO, T.; YAMASHITA, A.; HATANO, T.; KURAHARA, T. preparation of 4-hydroxycoumarin. . **Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 02 06481**. 1990.

Anexo I

File # 3 : ATHAI

Mode = 2 (Mid-IR)

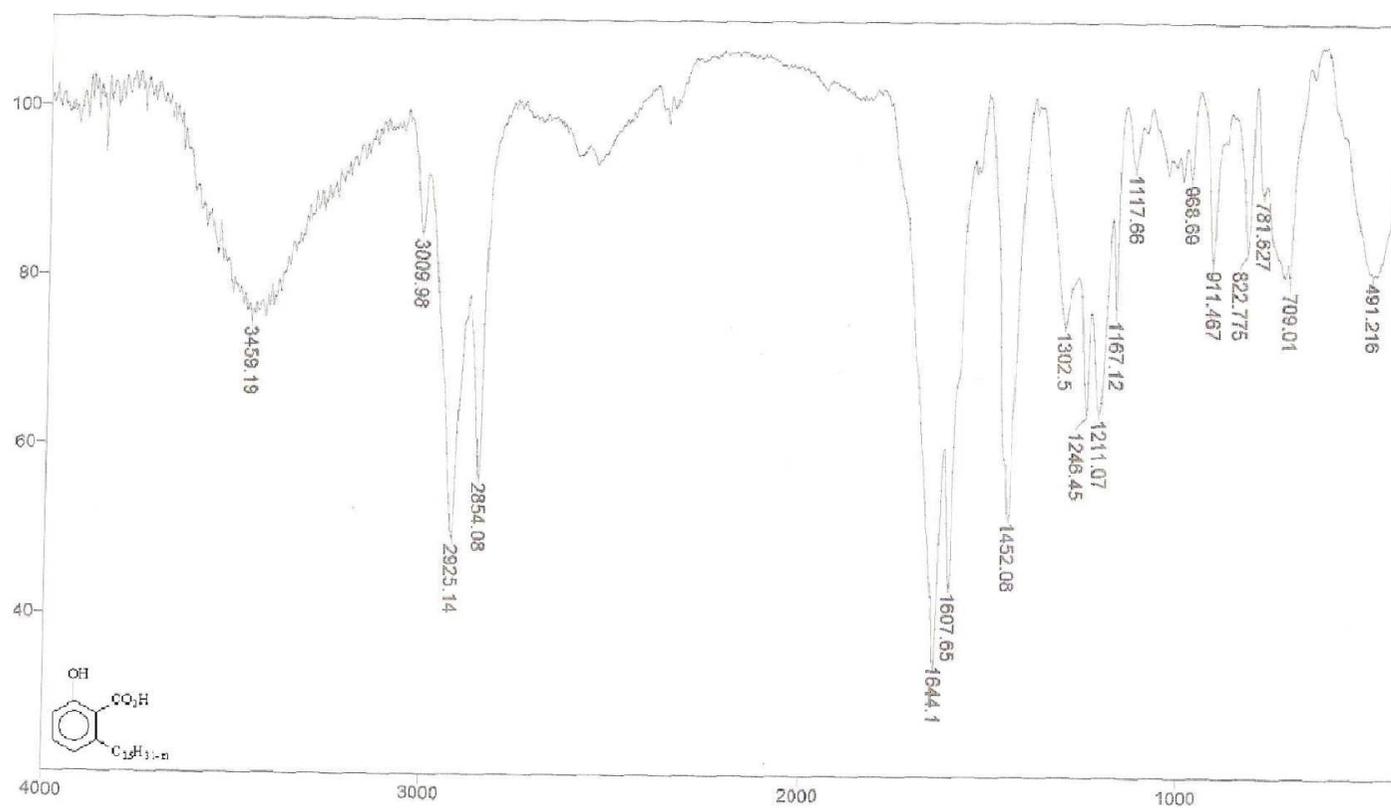
23/11/07 15:06

Sample Description: KBr-Wellington

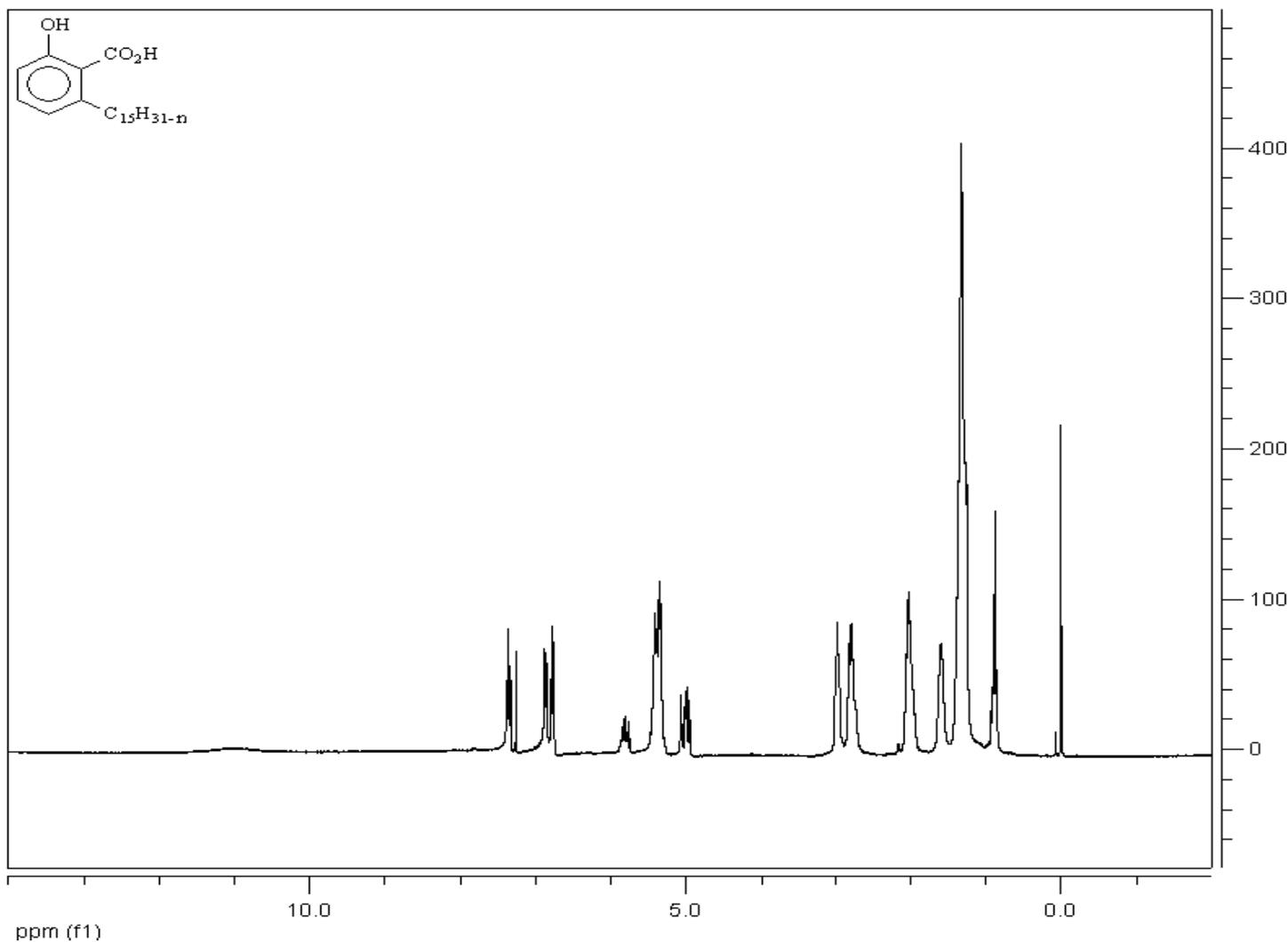
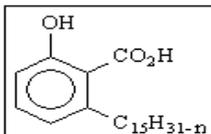
Scans = 10

Res = 4 cm⁻¹ 21 scans/min

Apod = Cosine



Espectro de Infravermelho (v cm⁻¹; KBr) de 15 i-m



Date:
24 Nov 2007
Document's Title:
24h-ATHI.fid

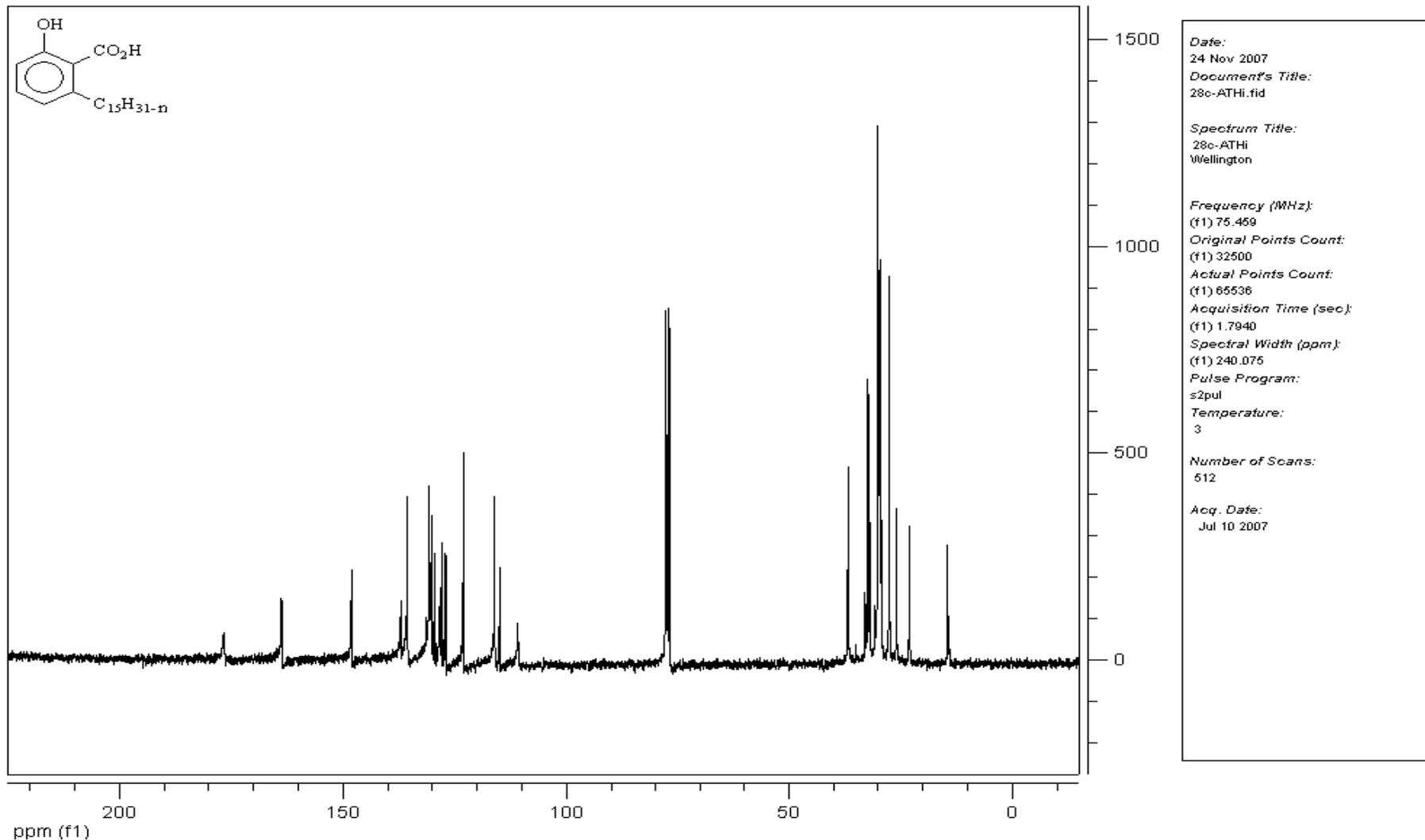
Spectrum Title:
24h-ATHI

Frequency (MHz):
(f1) 300.067
Original Points Count:
(f1) 32500
Actual Points Count:
(f1) 65536
Acquisition Time (sec):
(f1) 6.7698
Spectral Width (ppm):
(f1) 15.999
Pulse Program:
s2pul
Temperature:
27

Number of Scans:
32

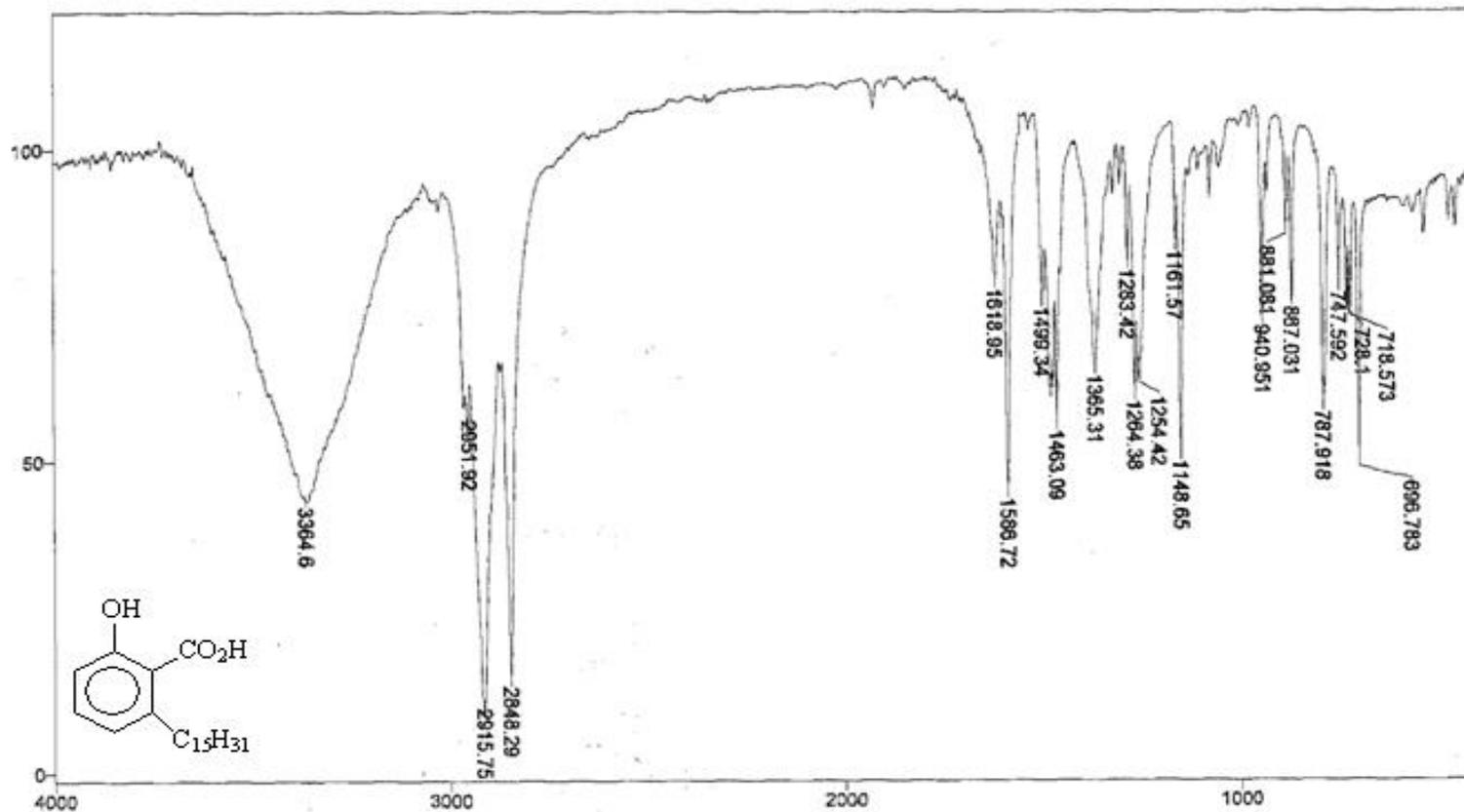
Acq. Date:
Jun 11 2007

Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de 15 i-m



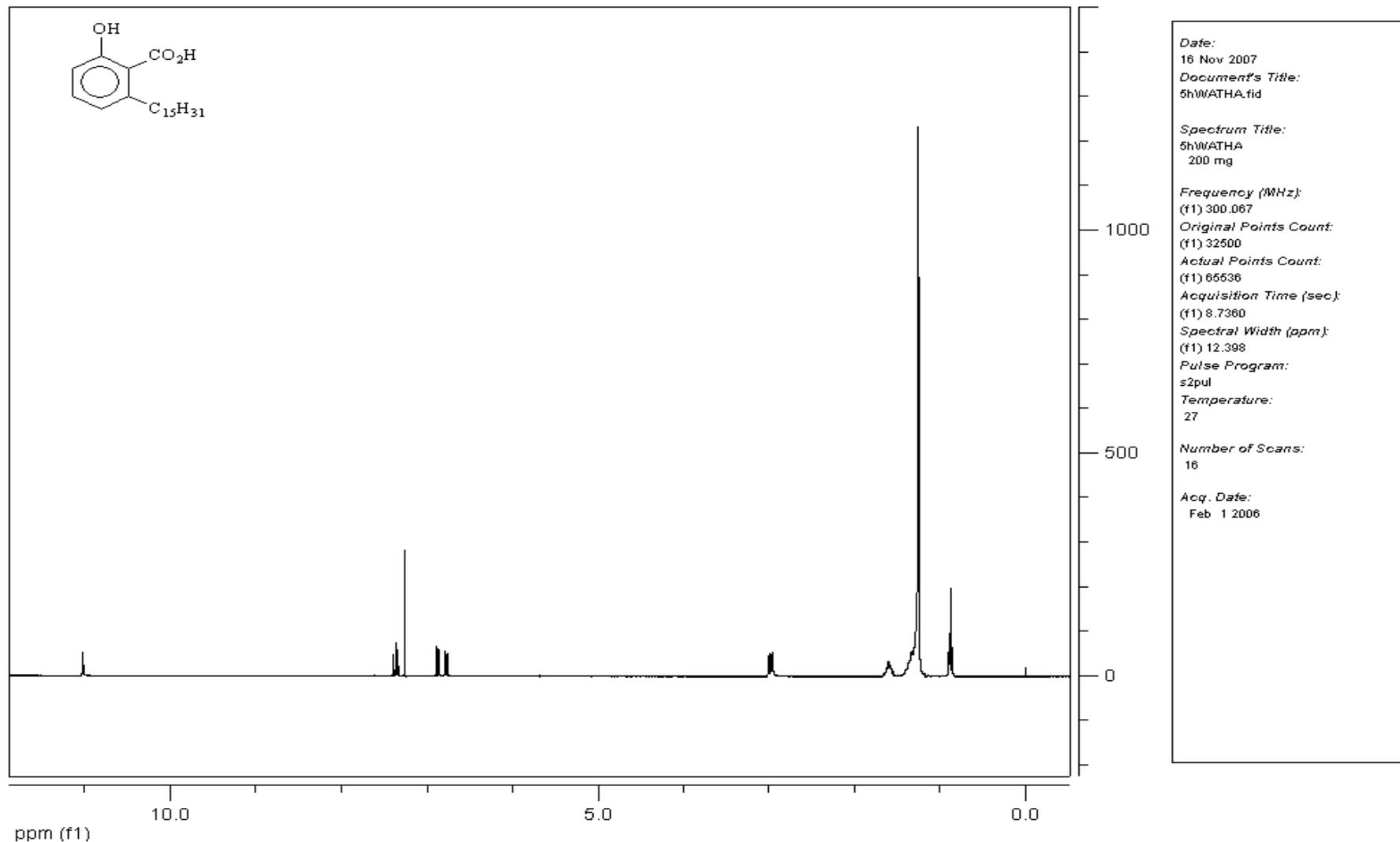
Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) da substância 15 i-m

File # 2 : B Mode= 2 (MIR-IR) 23/04/07 14:02
 Sample Description: KBr LuciliaWilson
 Scans= 10 Slow Res=4 cm-1 Apod= Cosine Zero Filling= 1 x

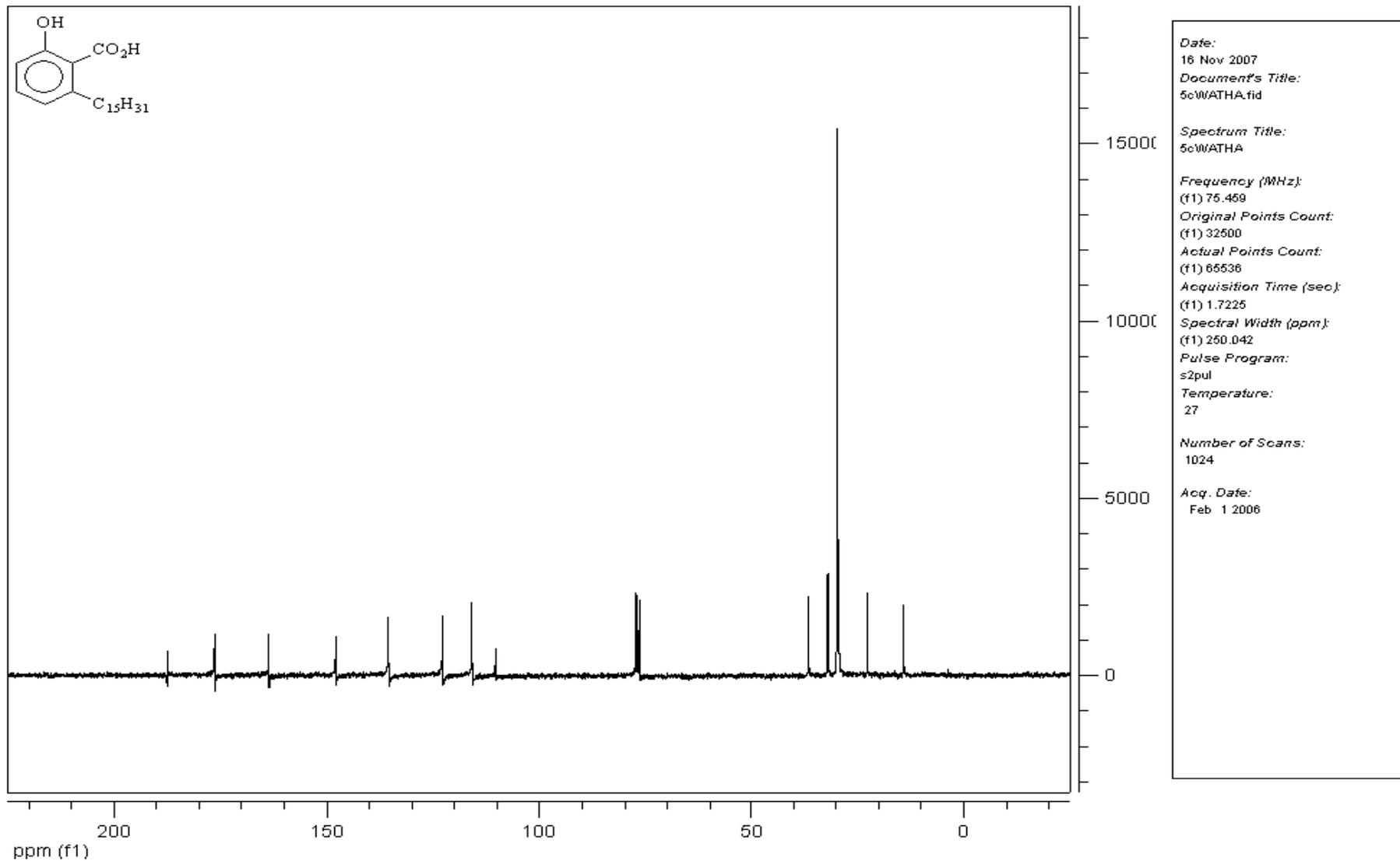


Transmittance / Wavenumber (cm

Espectro de Infravermelho (v cm⁻¹; KBr) da substância 15 i



Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) da substância 15 i



Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) da substância 15 i

File # 1 : C

Mode = 2 (Mid-IR)

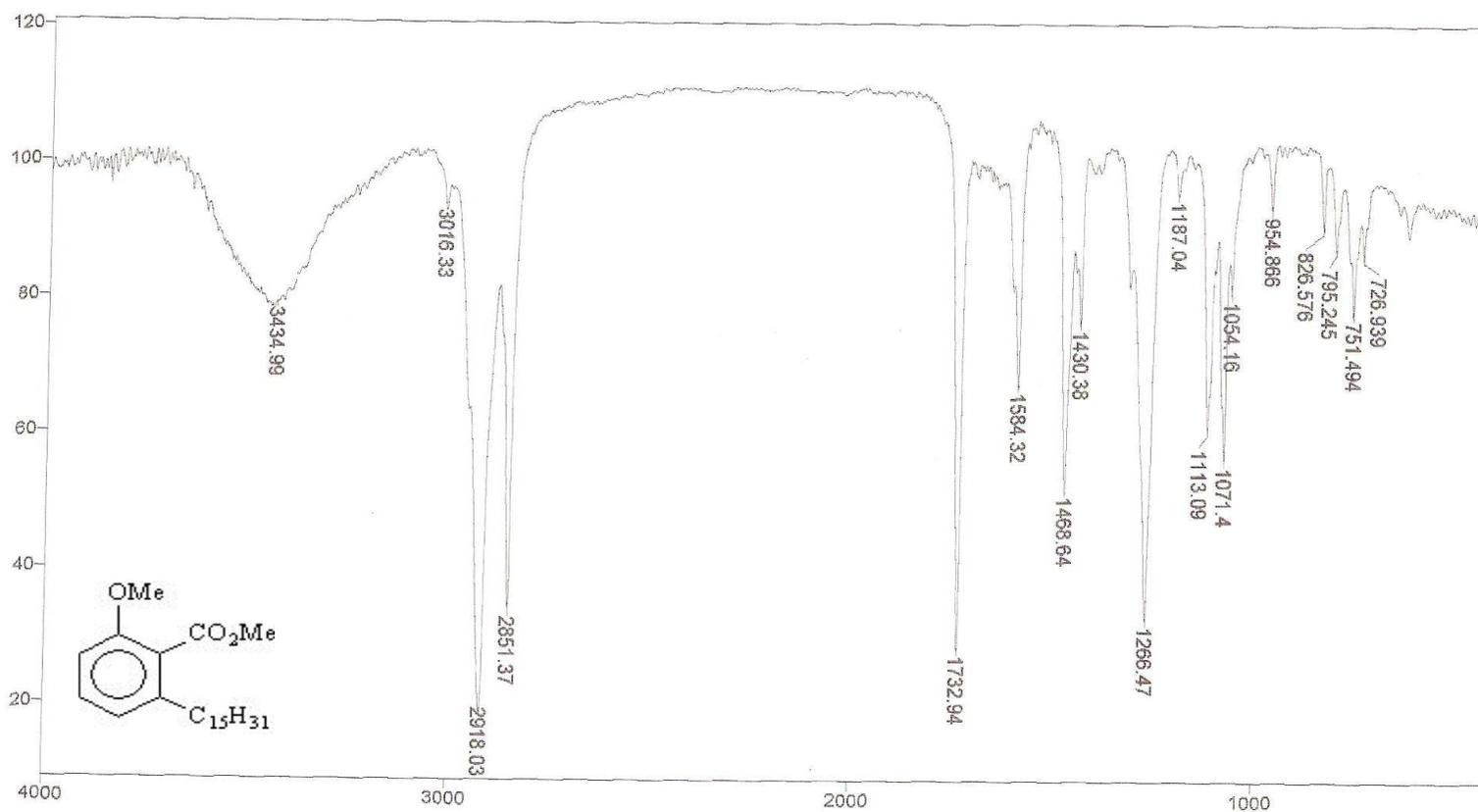
15/10/07 07:35

Sample Description: KBr-

Res = 4 cm⁻¹ 20 scans/min

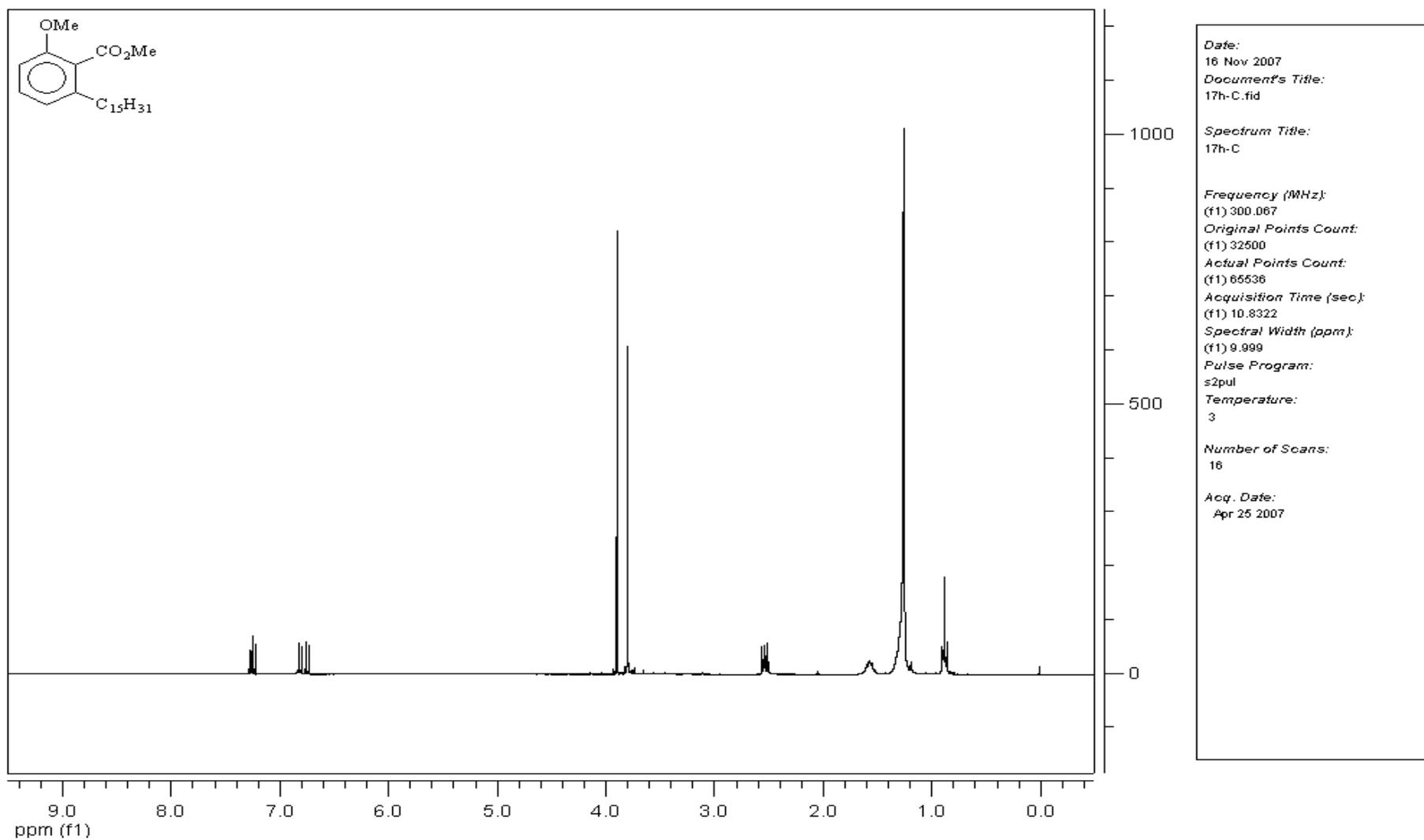
Apod = Cosine

Scans = 10

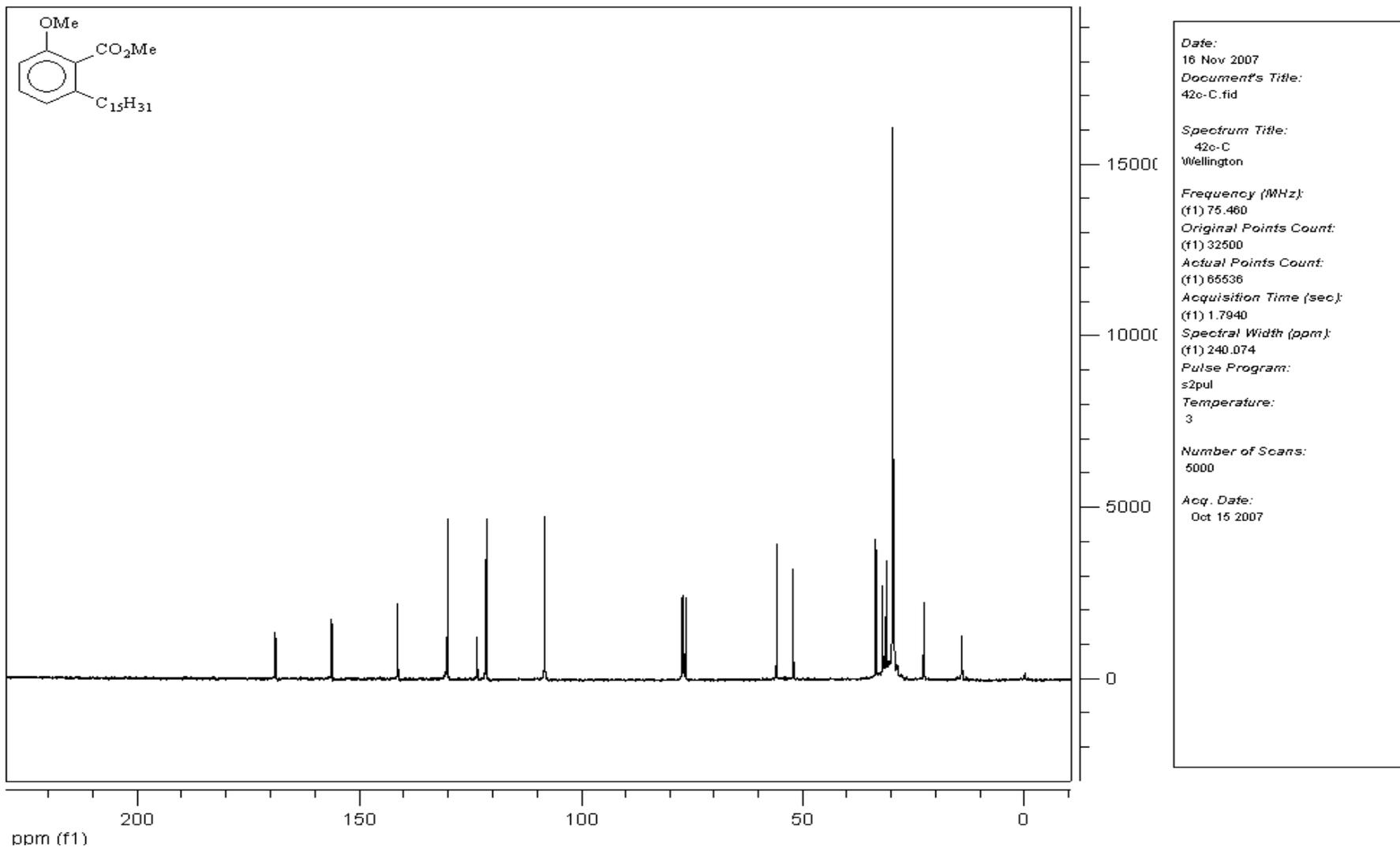


Transmittance / Wavenumber (cm⁻¹)

Espectro de Infravermelho (v cm⁻¹; KBr) da substância 47



Espectro de RMN ¹H(300 MHz, CDCl₃) da substância 47



Espectro de RMN ¹³C(75 MHz, CDCl₃) da substância 47

File # 1 : M136

Mode = 2 (Mid-IR)

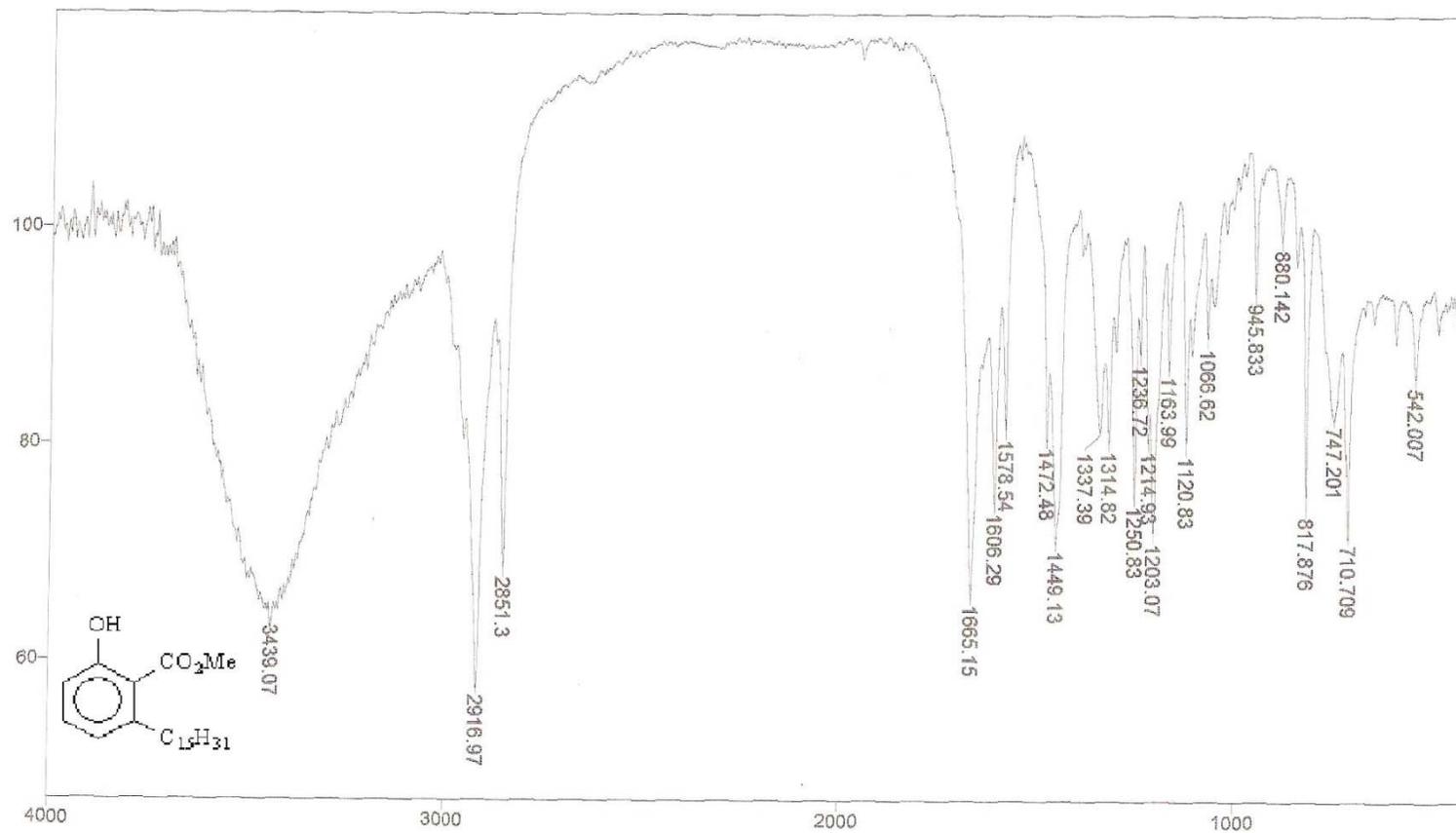
04/12/07 16:16

Sample Description: KBr

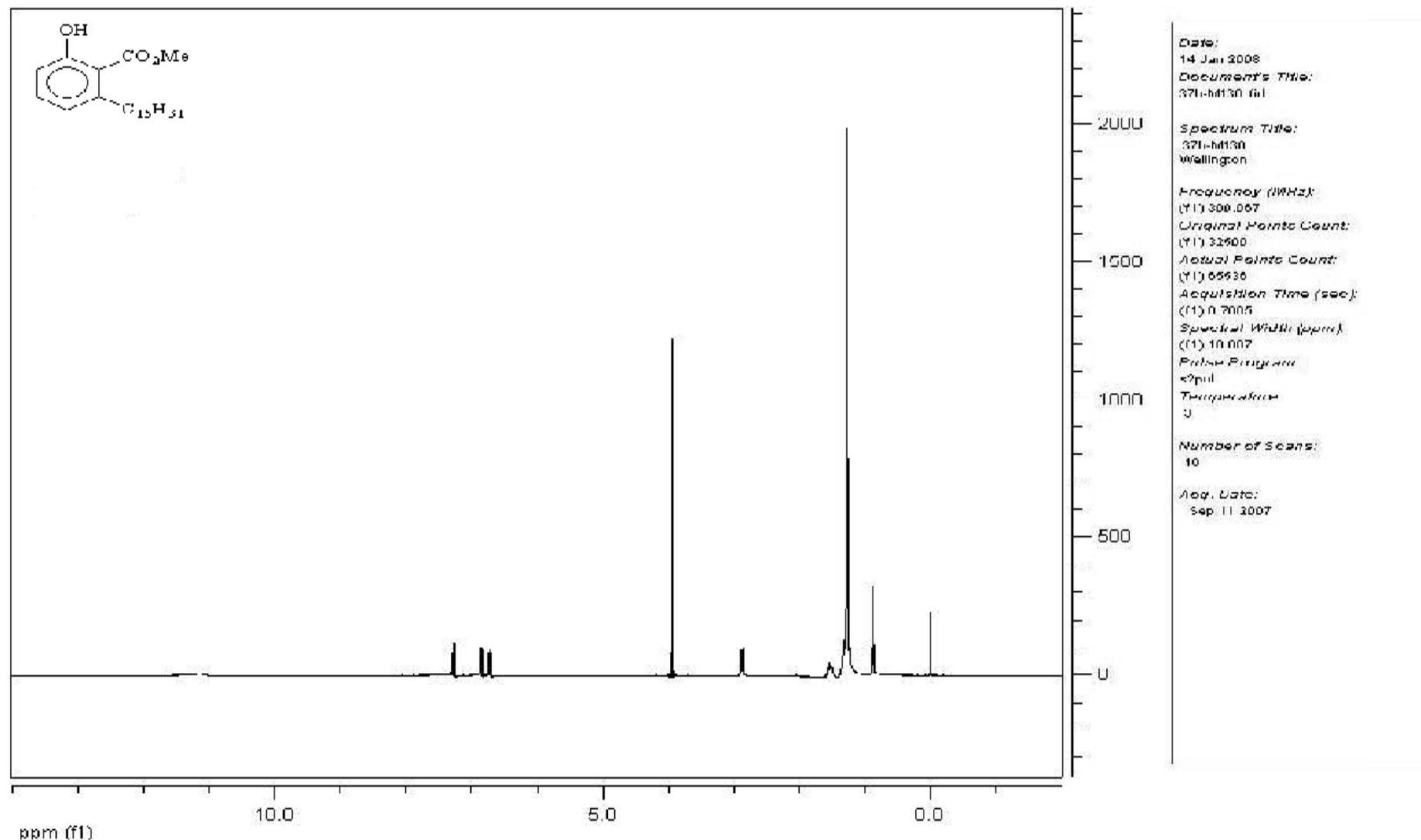
Scans = 10

Res = 4 cm⁻¹ 21 scans/min

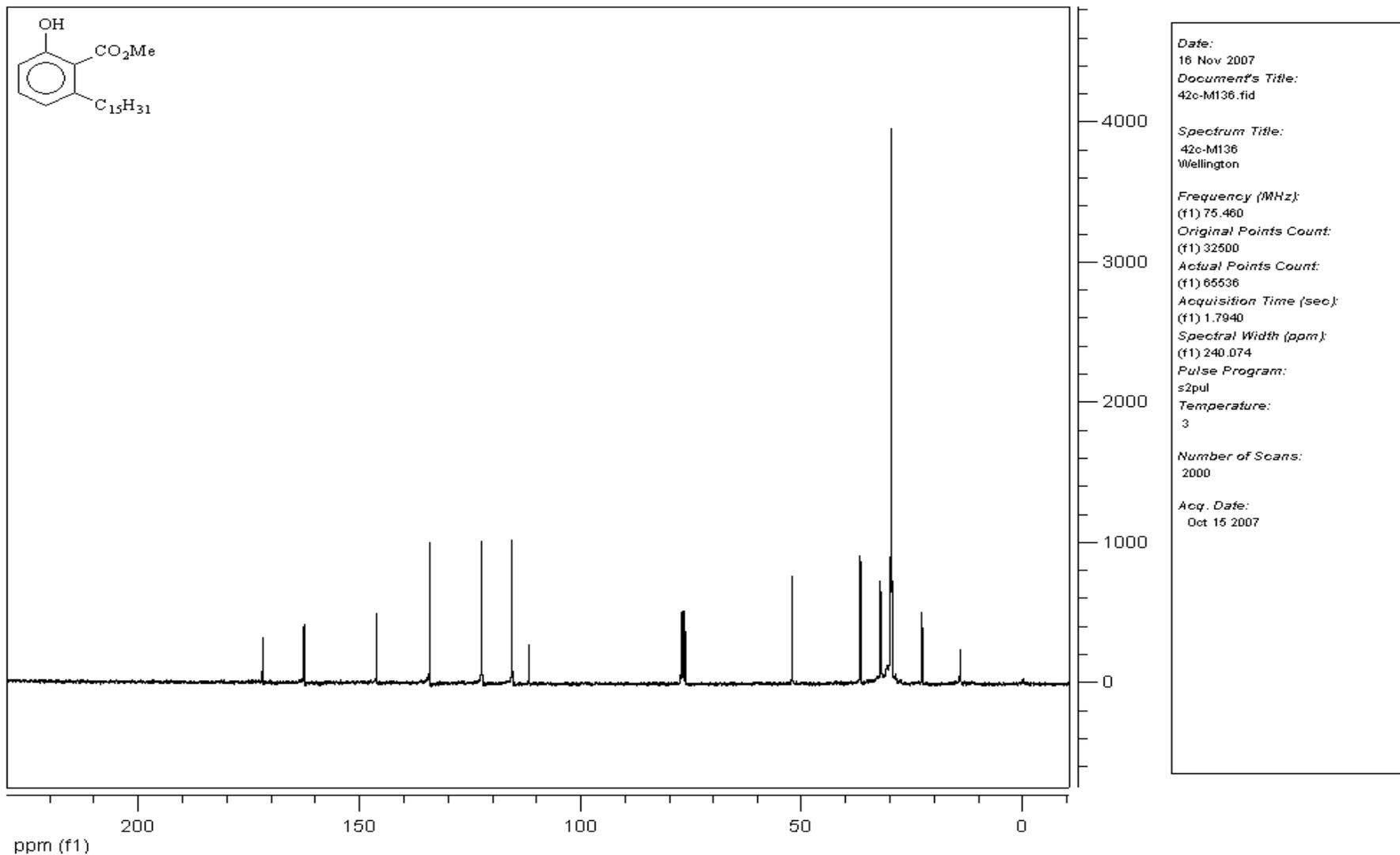
Apod = Cosine



Espectro de Infravermelho (v cm⁻¹; KBr) da substância 48



Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) da substância 48



Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) da substância 48

File # 1 : E

Mode = 2 (Mid-IR)

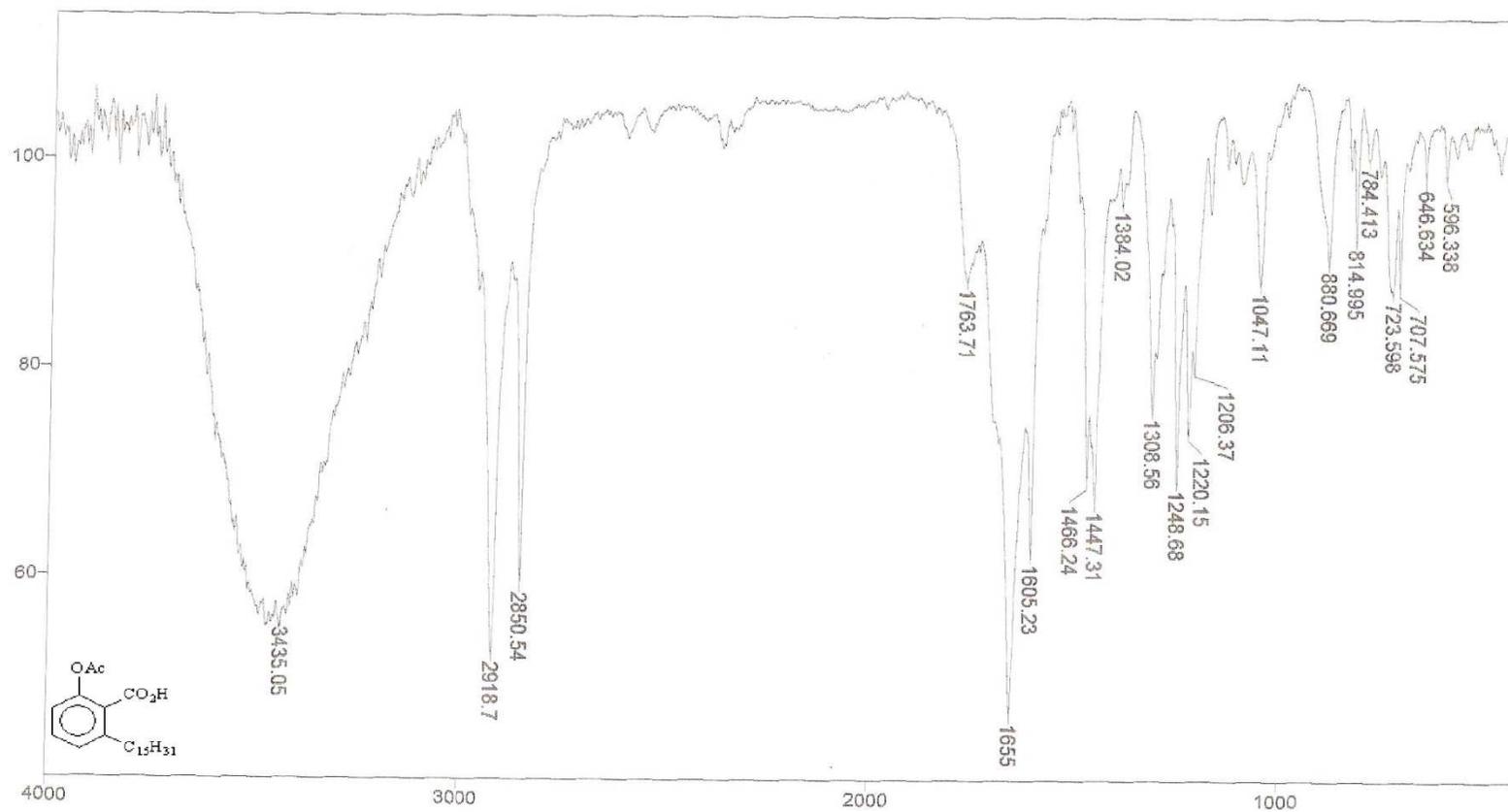
23/11/07 15:00

Sample Description: KBr-Wellington

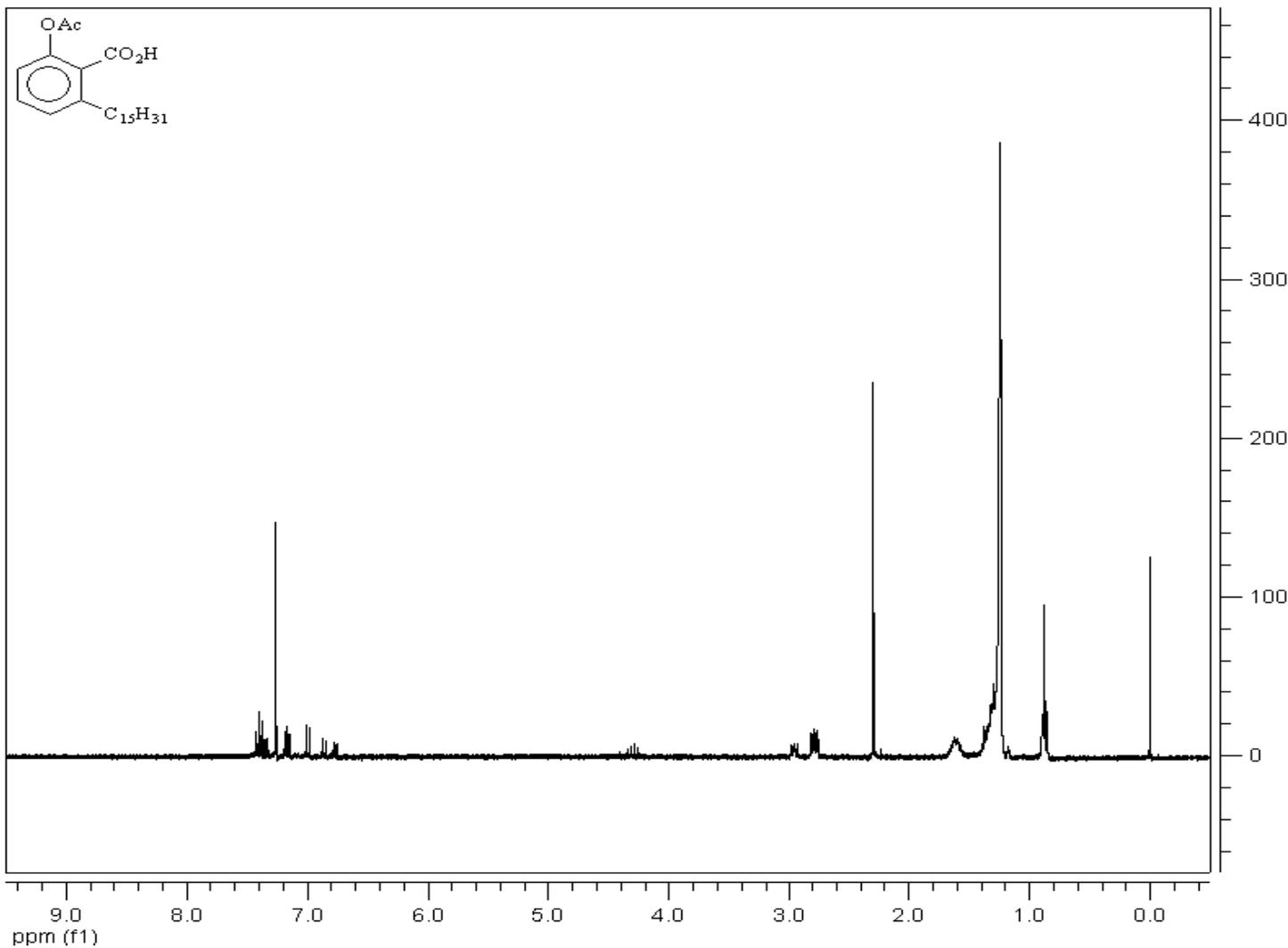
Scans = 10

Res = 4 cm⁻¹ 21 scans/min

Apod = Cosine



Espectro de Infravermelho (v cm⁻¹; KBr) da substância 49



Date:
 24 Nov 2007
 Document's Title:
 17h-E.fid

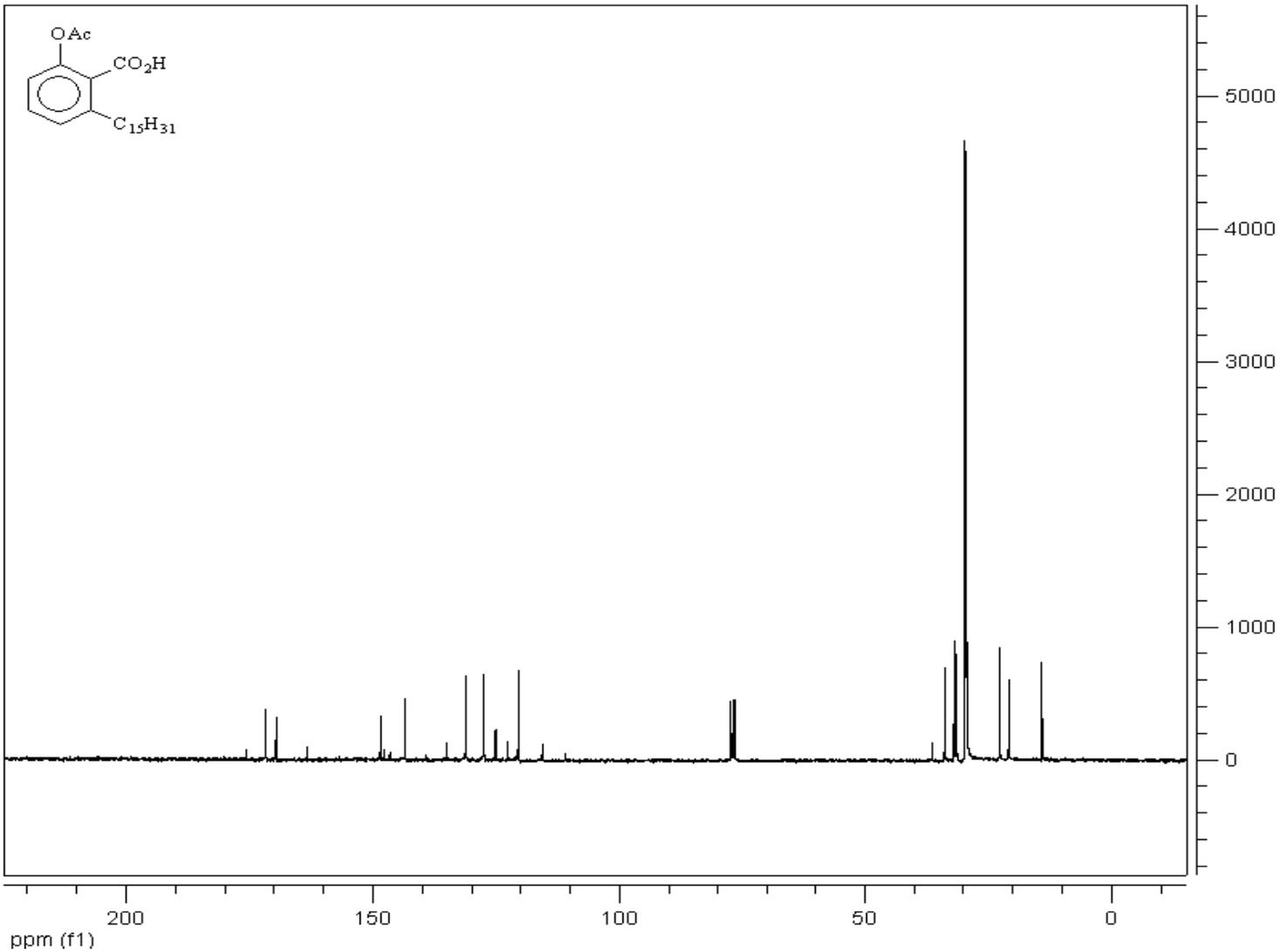
 Spectrum Title:
 17h-E

 Frequency (MHz):
 (f1) 300.067
 Original Points Count:
 (f1) 32500
 Actual Points Count:
 (f1) 65536
 Acquisition Time (sec):
 (f1) 10.8322
 Spectral Width (ppm):
 (f1) 9.999
 Pulse Program:
 s2pul
 Temperature:
 3

 Number of Scans:
 16

 Acq. Date:
 Apr 25 2007

Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) da substância 49



Date:
 12 Jan 2008
 Document's Title:
 2c-WELL-M42.fid

 Spectrum Title:
 2c-WELL-M42

 Frequency (MHz):
 (f1) 75.459
 Original Points Count:
 (f1) 23560
 Actual Points Count:
 (f1) 65536
 Acquisition Time (sec):
 (f1) 1.3005
 Spectral Width (ppm):
 (f1) 240.075
 Pulse Program:
 s2pul
 Temperature:
 3

 Number of Scans:
 512

 Acq. Date:
 Jan 11 2007

Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) da substância 49

File # 2 : F

Mode= 2 (Mid-IR)

25/04/07 09:55

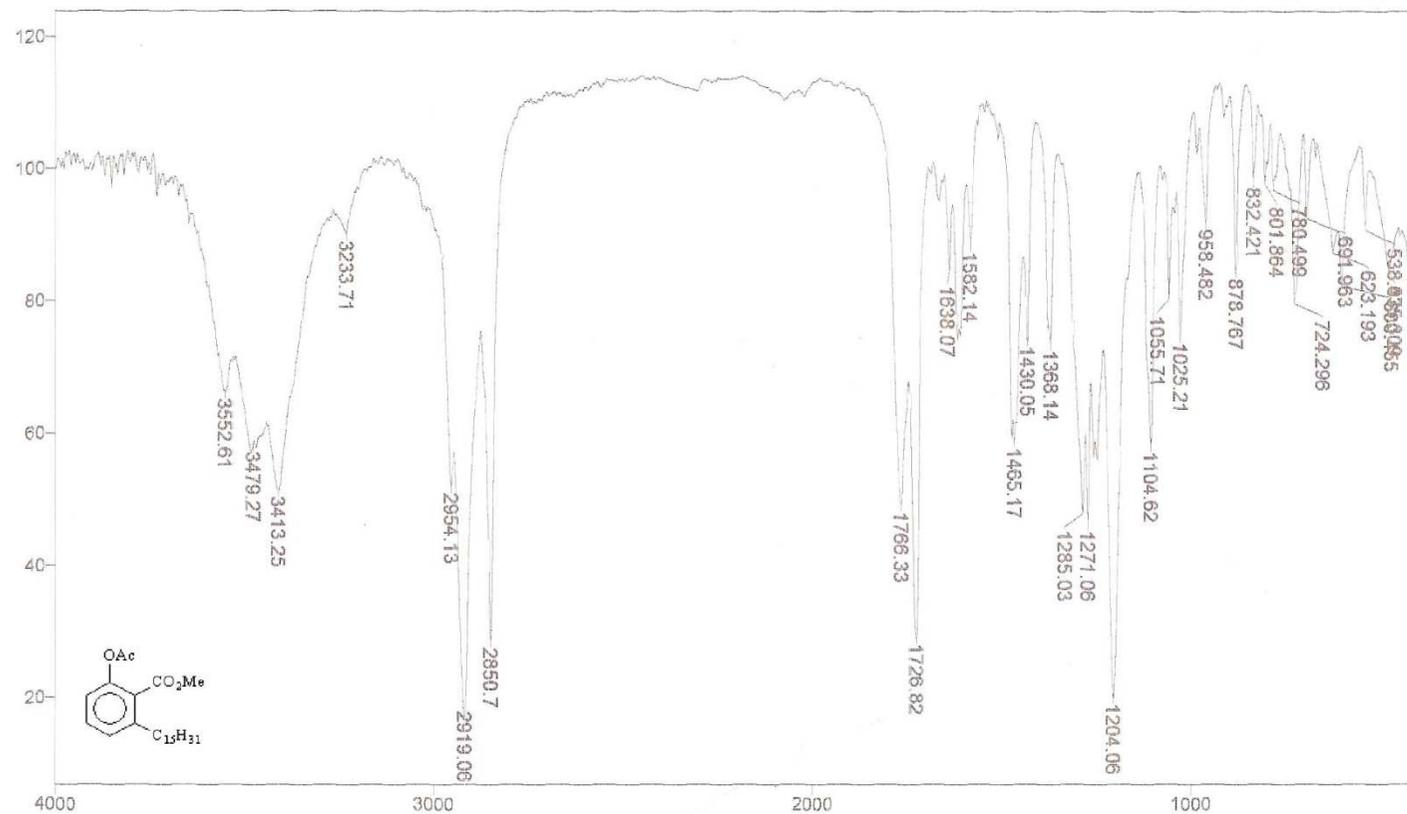
Sample Description: KBr LuciliaWilson

Scans= 10 21 scans/min

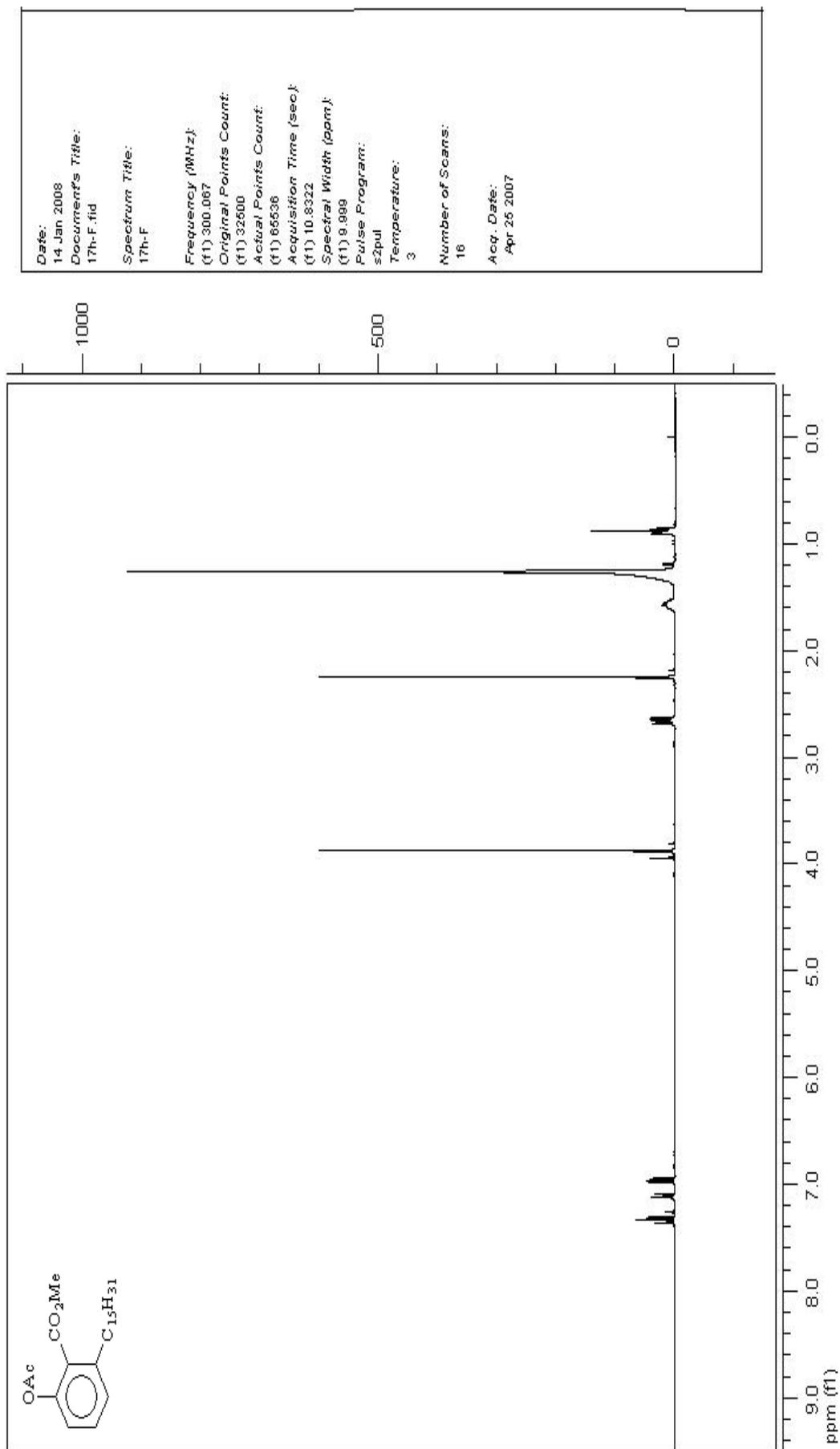
Res=4 cm-1

Apod= Cosine

Zero Filling= 1 x



Espectro de Infravermelho (v cm⁻¹; KBr) da substância 50

Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) da substância 50

File # 1 : LUCILIA

Mode= 2 (Mid-IR)

18/01/06 14:13

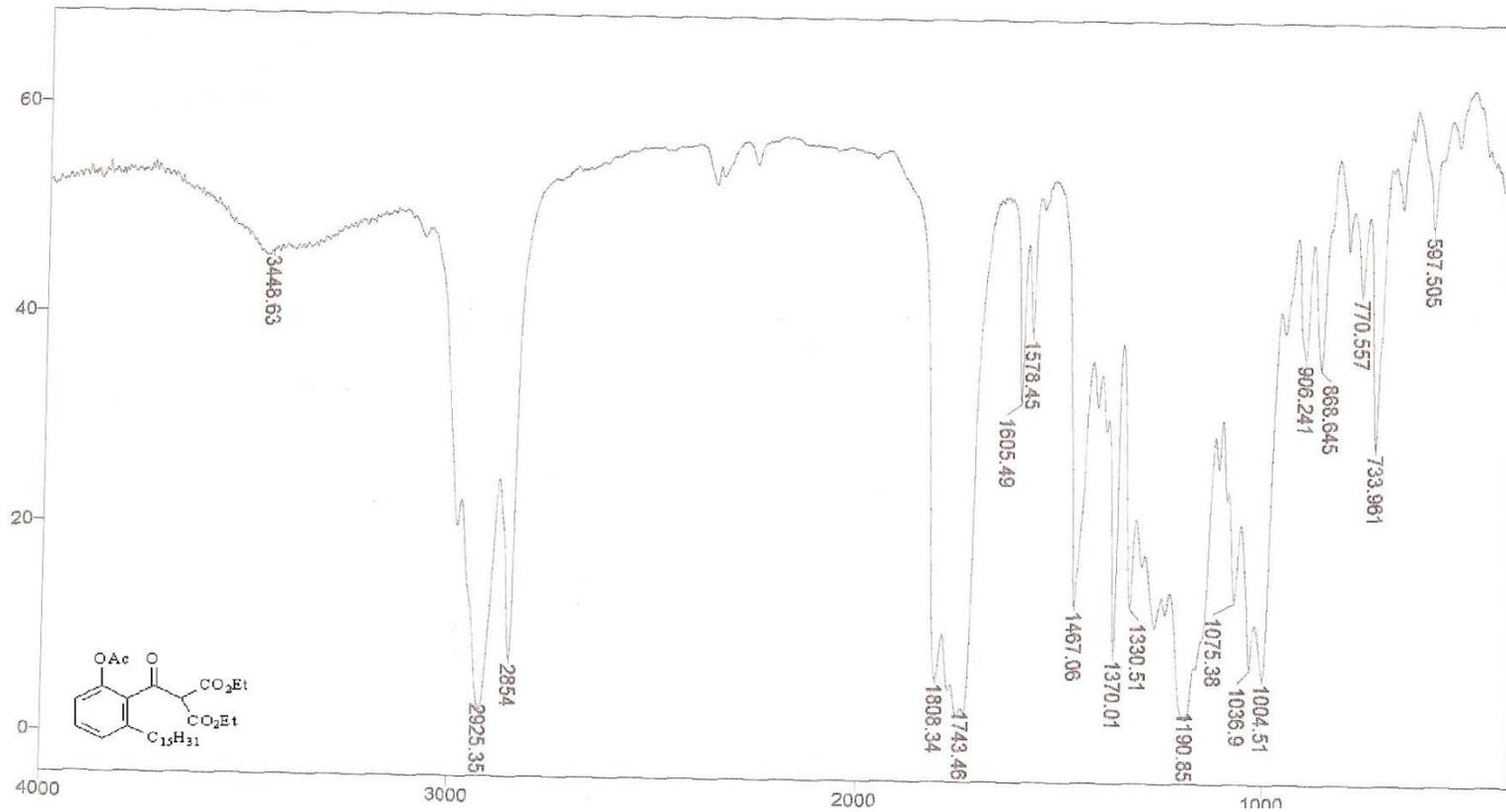
Sample Description: Filme

Scans= 10 Slow

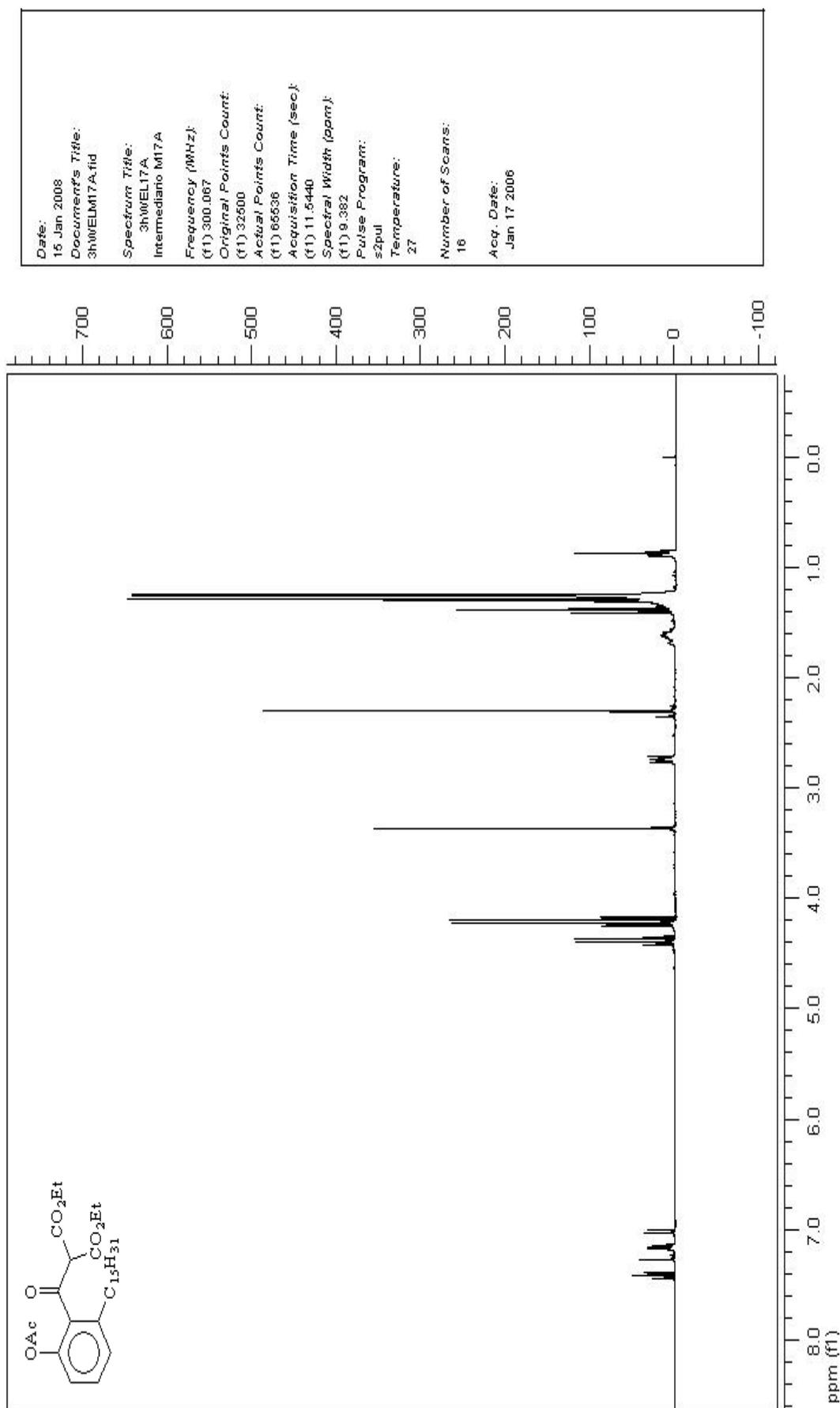
Res=4 cm-1

Apod= Cosine

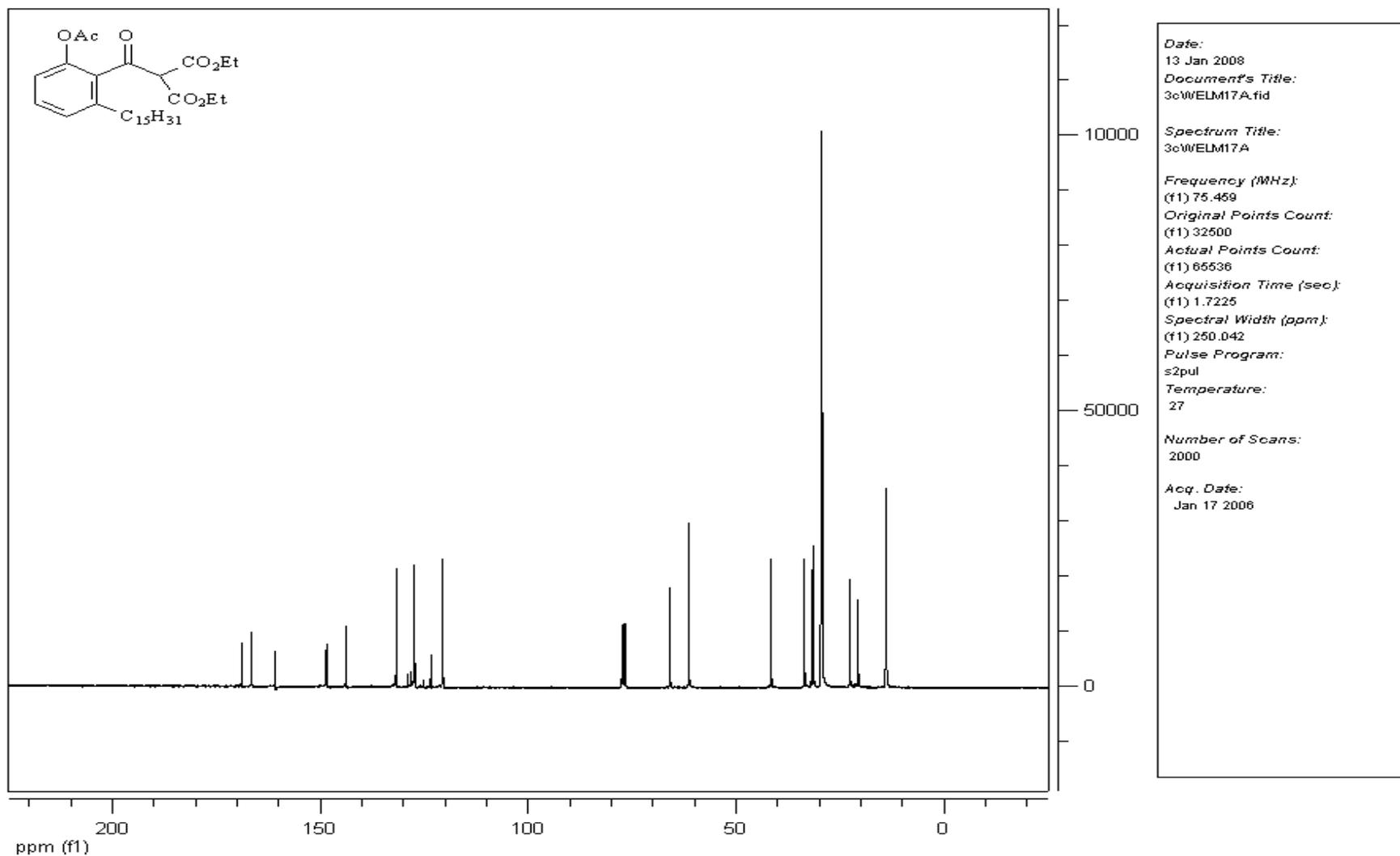
Zero Filling= 1 x



Spectro de Infravermelho (v cm^{-1} ; KBr) da substância 53

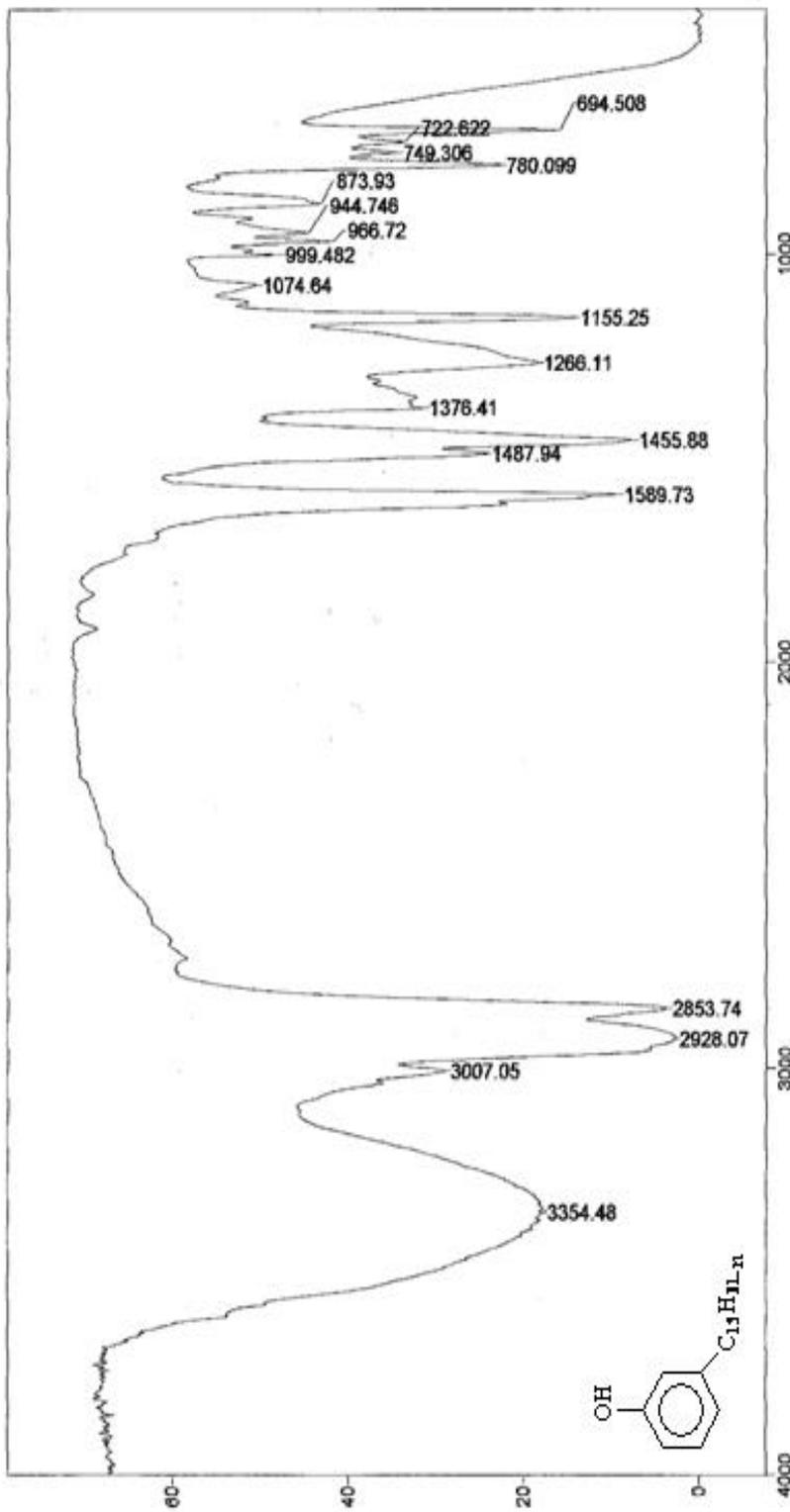


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) da substância 53



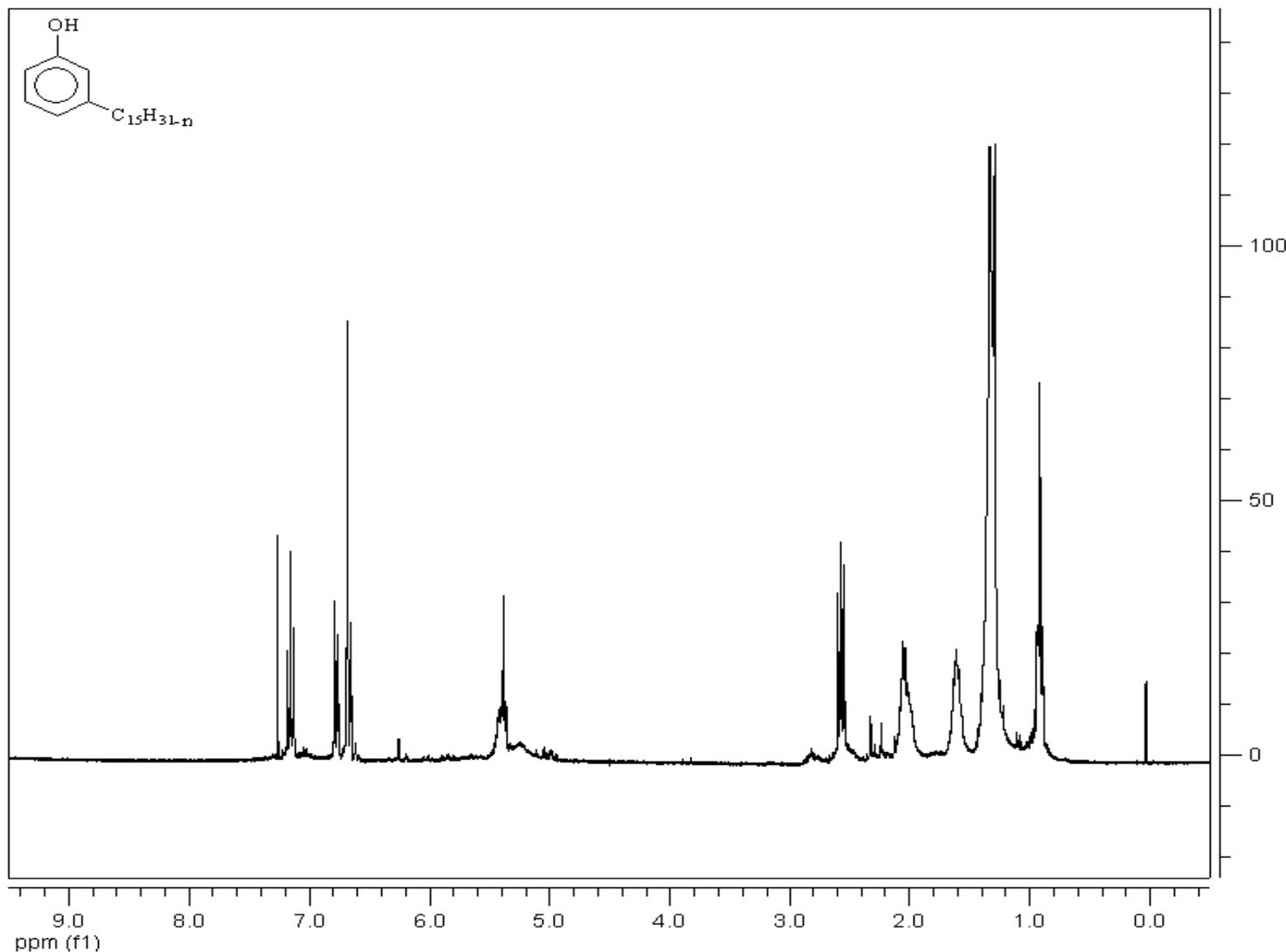
Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) da substância 53

File # 2 : A
Sample Description: Filme LuciliaWilson
Scans= 10 Slow
Mode= 2 (Mid-IR)
Res=4 cm-1
Apod= Cosine
23/04/07 11:38
Zero Filling= 1 X



Espectro de Infravermelho (v cm⁻¹; KBr) de 16 i-m

Transmittance / Wavenumber (cm-1)



Date:
 16 Nov 2007
 Document's Title:
 17h-A.fid

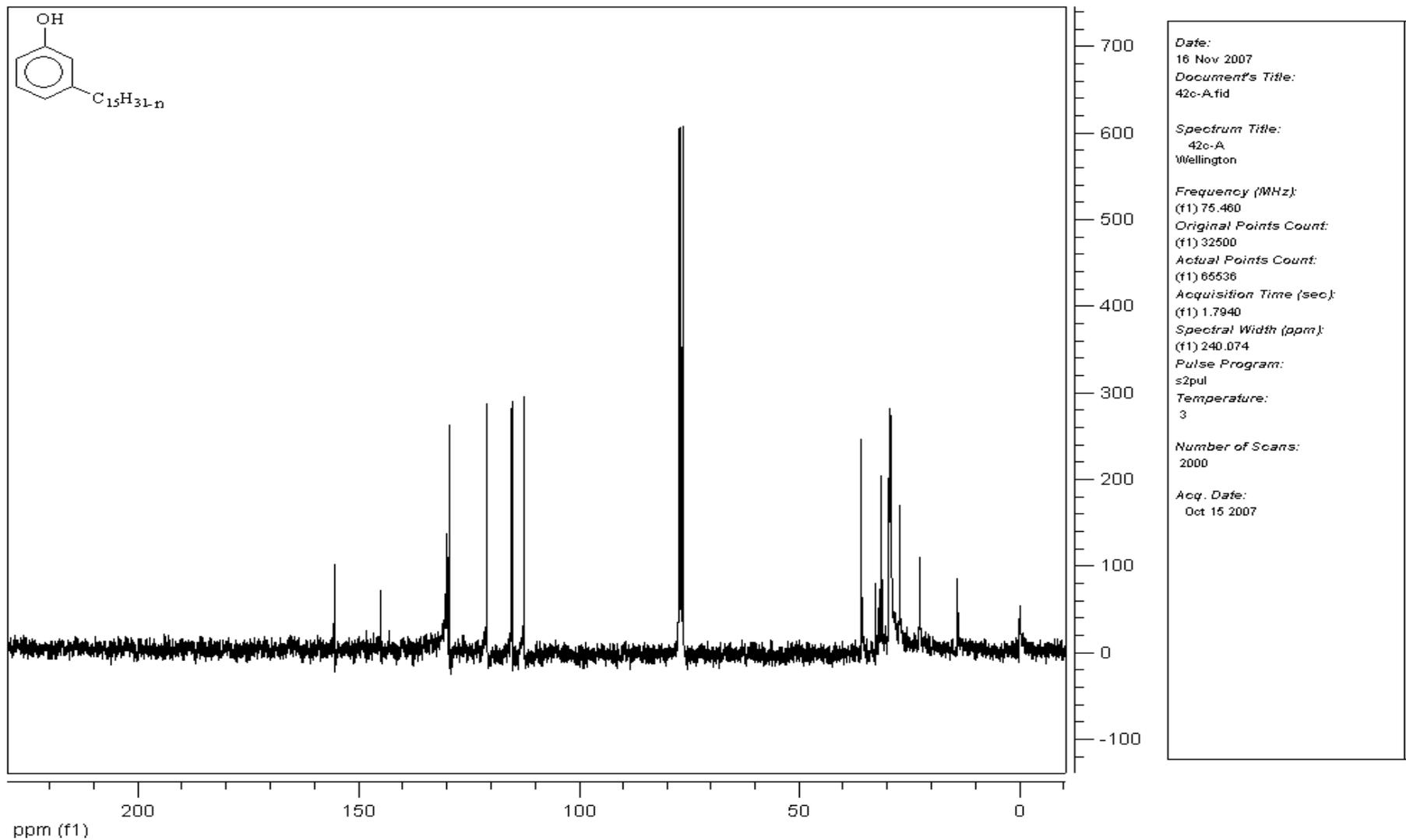
 Spectrum Title:
 17h-A

 Frequency (MHz):
 (f1) 300.067
 Original Points Count:
 (f1) 32500
 Actual Points Count:
 (f1) 65536
 Acquisition Time (sec):
 (f1) 10.8322
 Spectral Width (ppm):
 (f1) 9.999
 Pulse Program:
 s2pul
 Temperature:
 3

 Number of Scans:
 16

 Acq. Date:
 Apr 25 2007

Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de 16 i-m



Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de 16 i-m

File # 2 : B

Mode= 2 (Mid-IR)

23/04/07 14:02

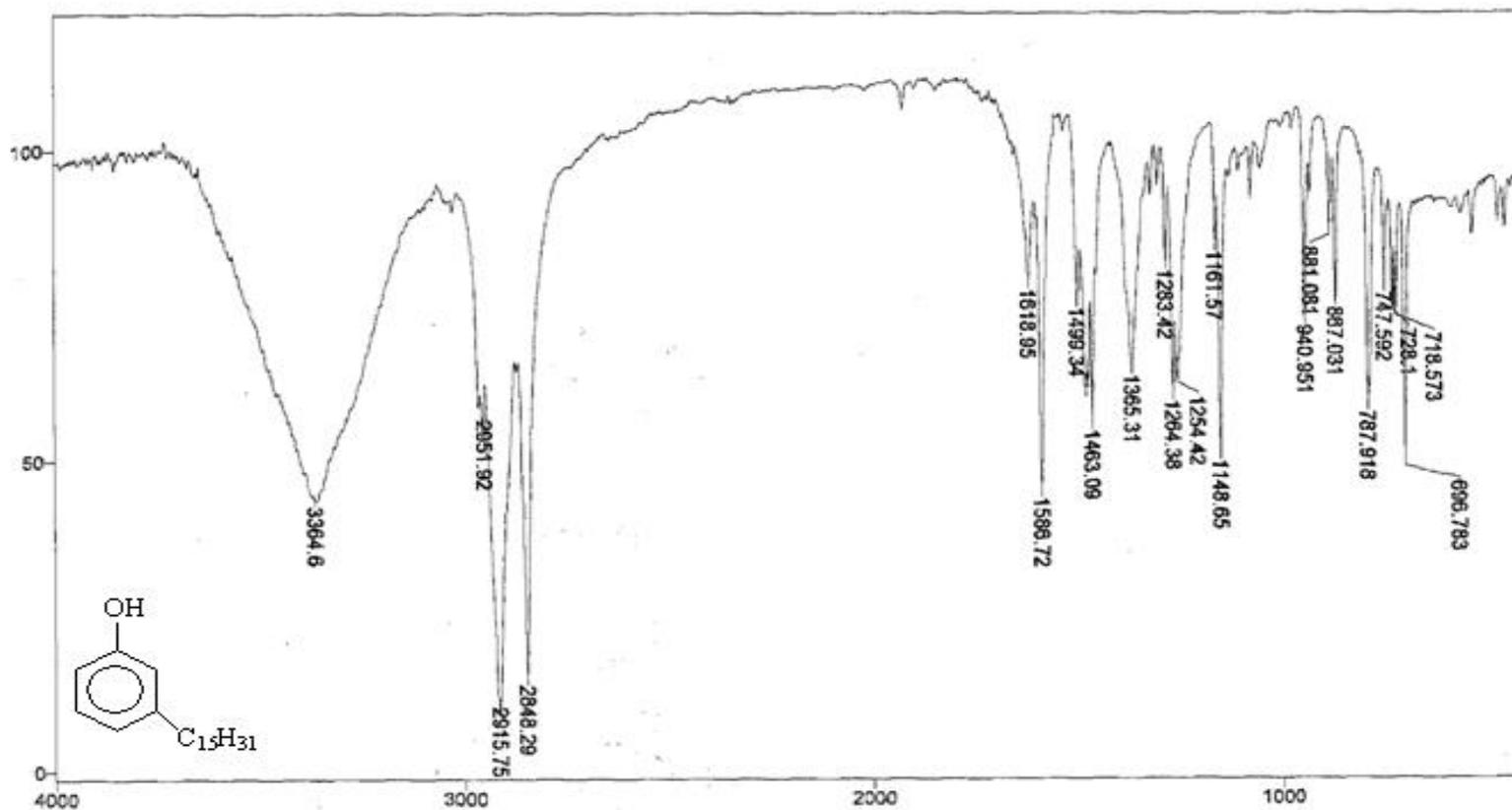
Sample Description: KBr LuciliaWilson

Scans= 10 Slow

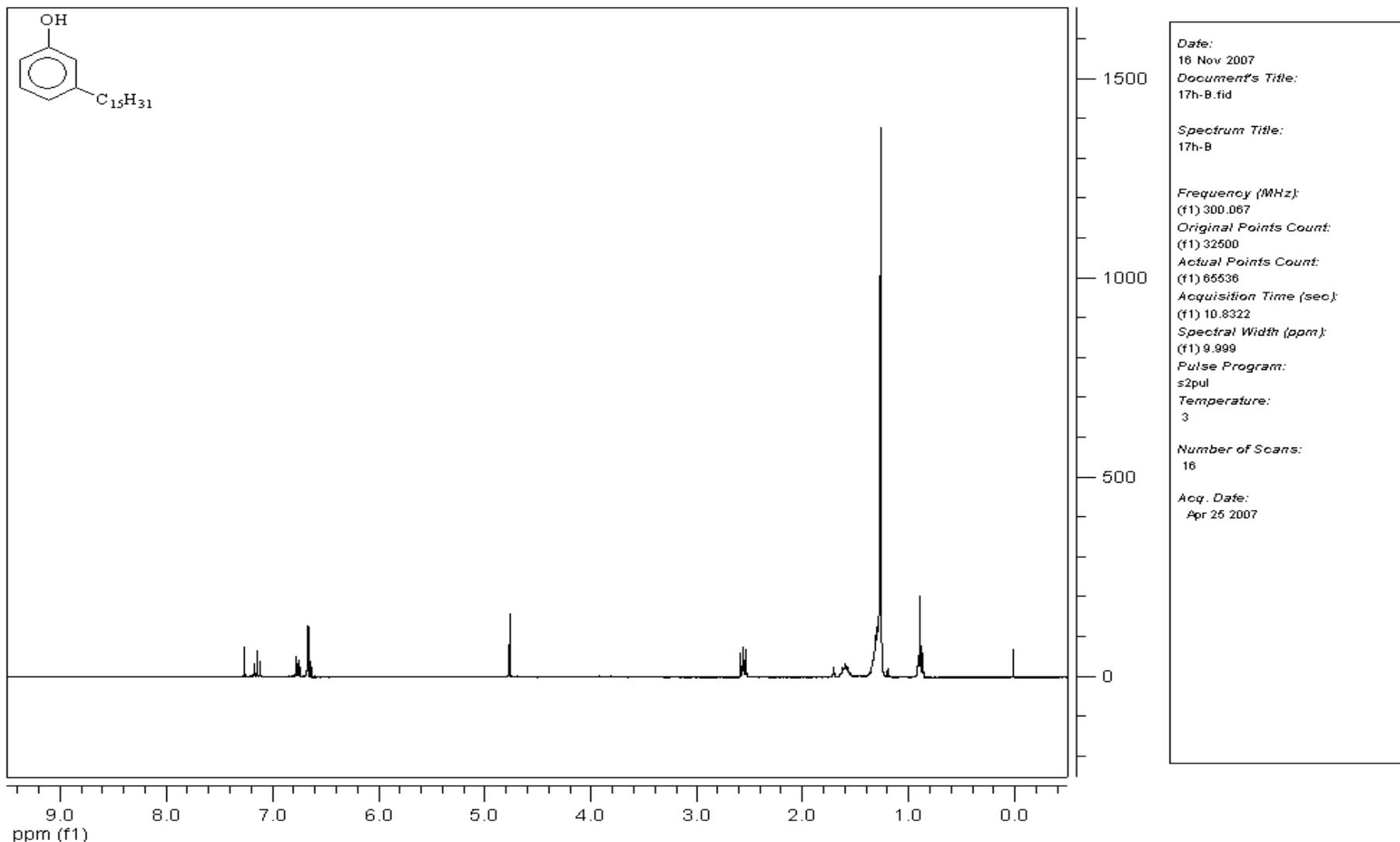
Res=4 cm⁻¹

Apod= Cosine

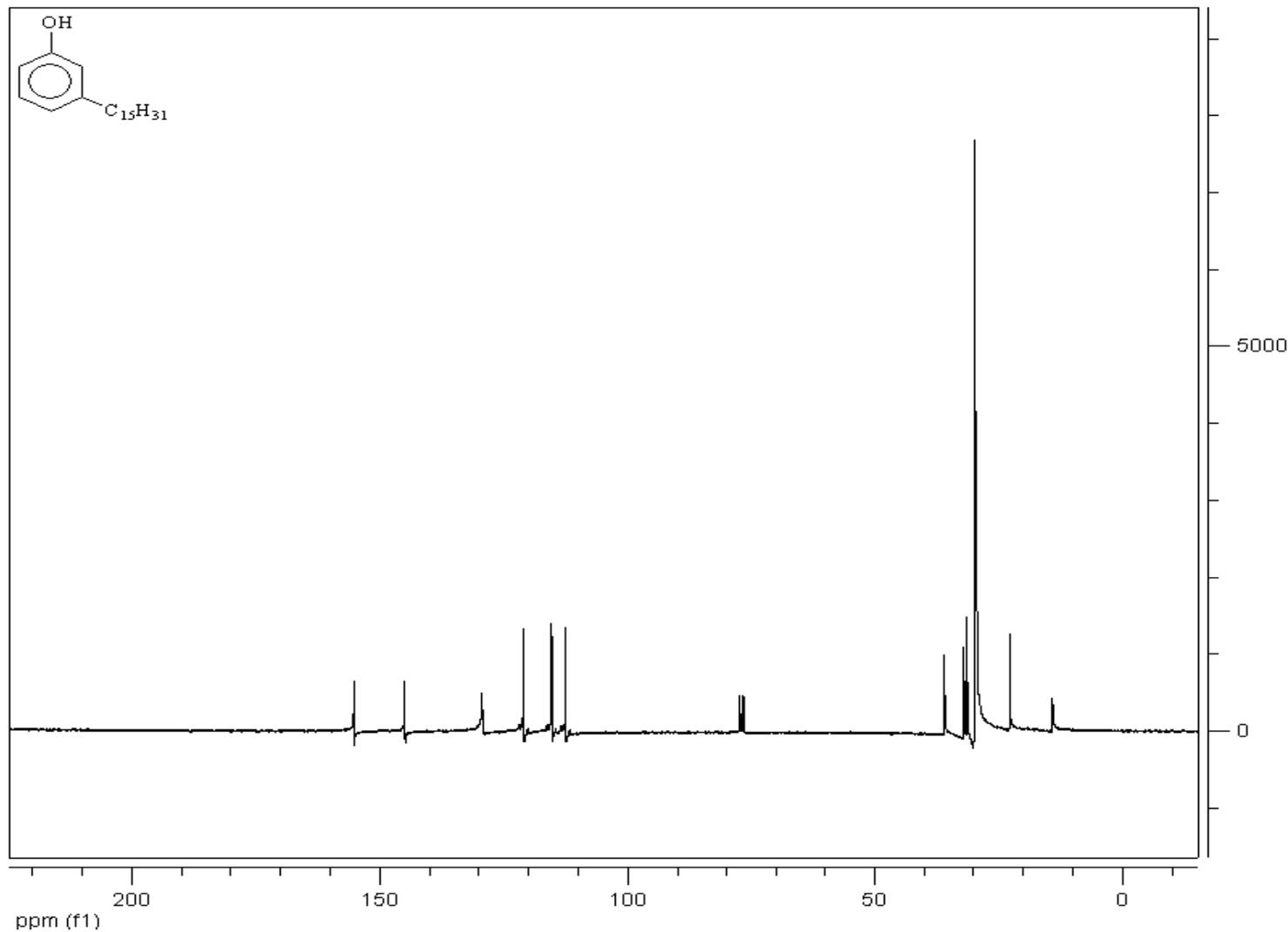
Zero Filling= 1 x



Transmittance / Wavenum Espectro de Infravermelho (v cm⁻¹: KBr) da substância 16 i



Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 16 i



Date:
16 Nov 2007
Document's Title:
23c-B.fid

Spectrum Title:
23c-B

Frequency (MHz):
(f1) 75.469
Original Points Count:
(f1) 23560
Actual Points Count:
(f1) 65536
Acquisition Time (sec):
(f1) 1.3005
Spectral Width (ppm):
(f1) 240.075
Pulse Program:
s2pul
Temperature:
3

Number of Scans:
1000

Acq. Date:
Jun 4 2007

Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) da substância 16 i

File # 1 : M89

Mode = 2 (Mid-IR)

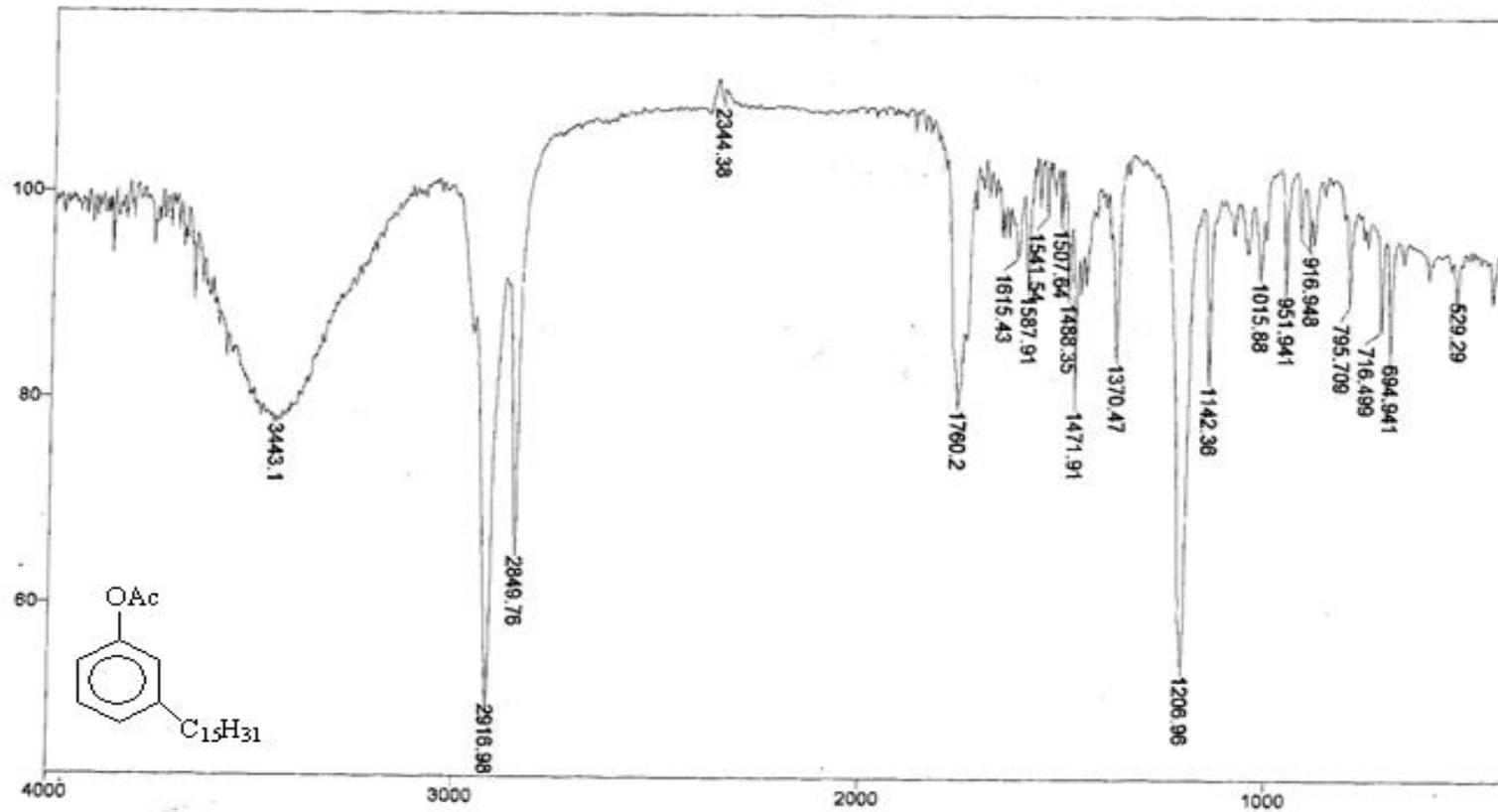
23/05/07 16:23

Sample Description: KBr-Professora Inês

Scans = 10

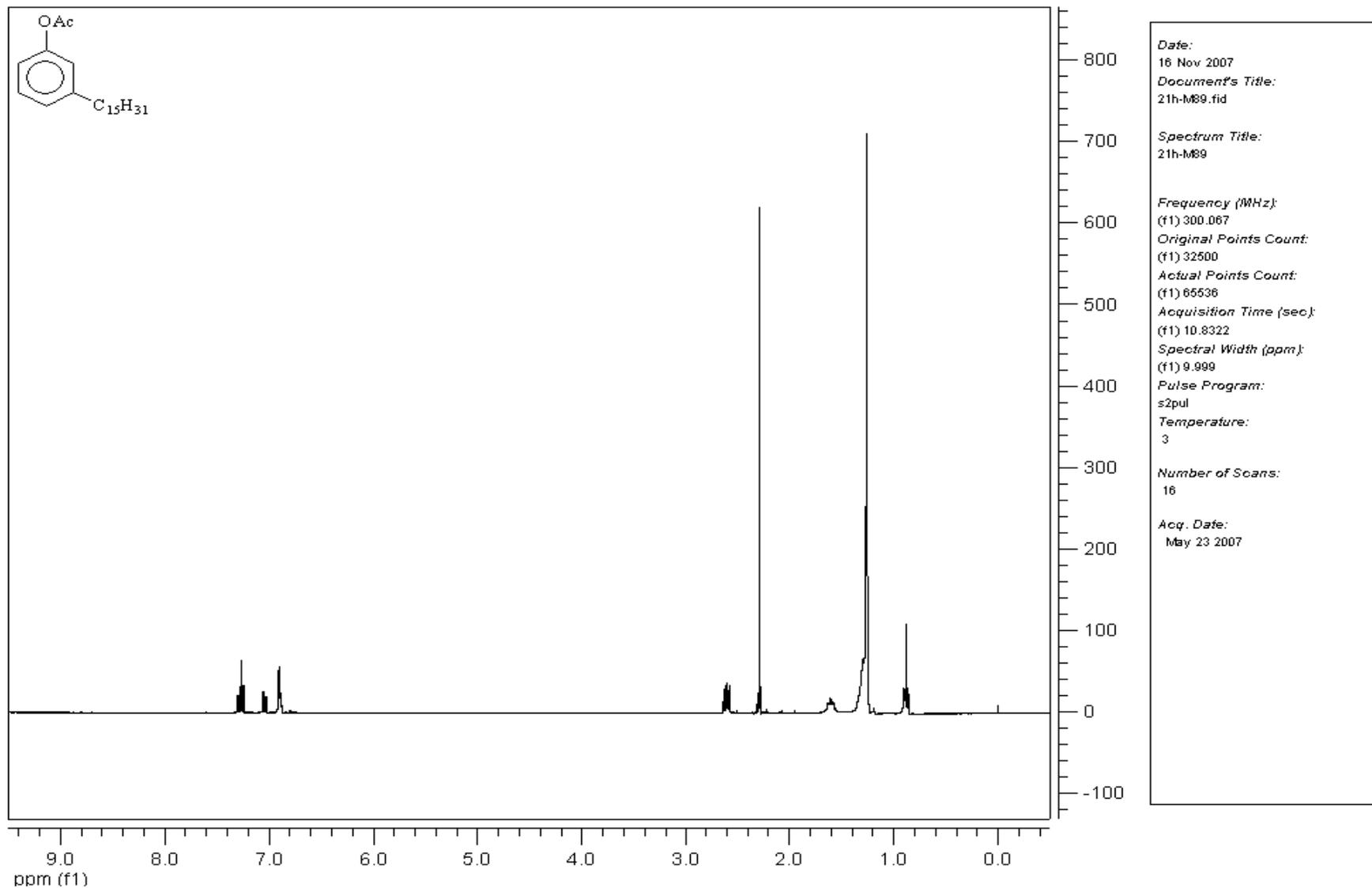
Res = 4 cm⁻¹ 21 scans/min

Apod = Cosine

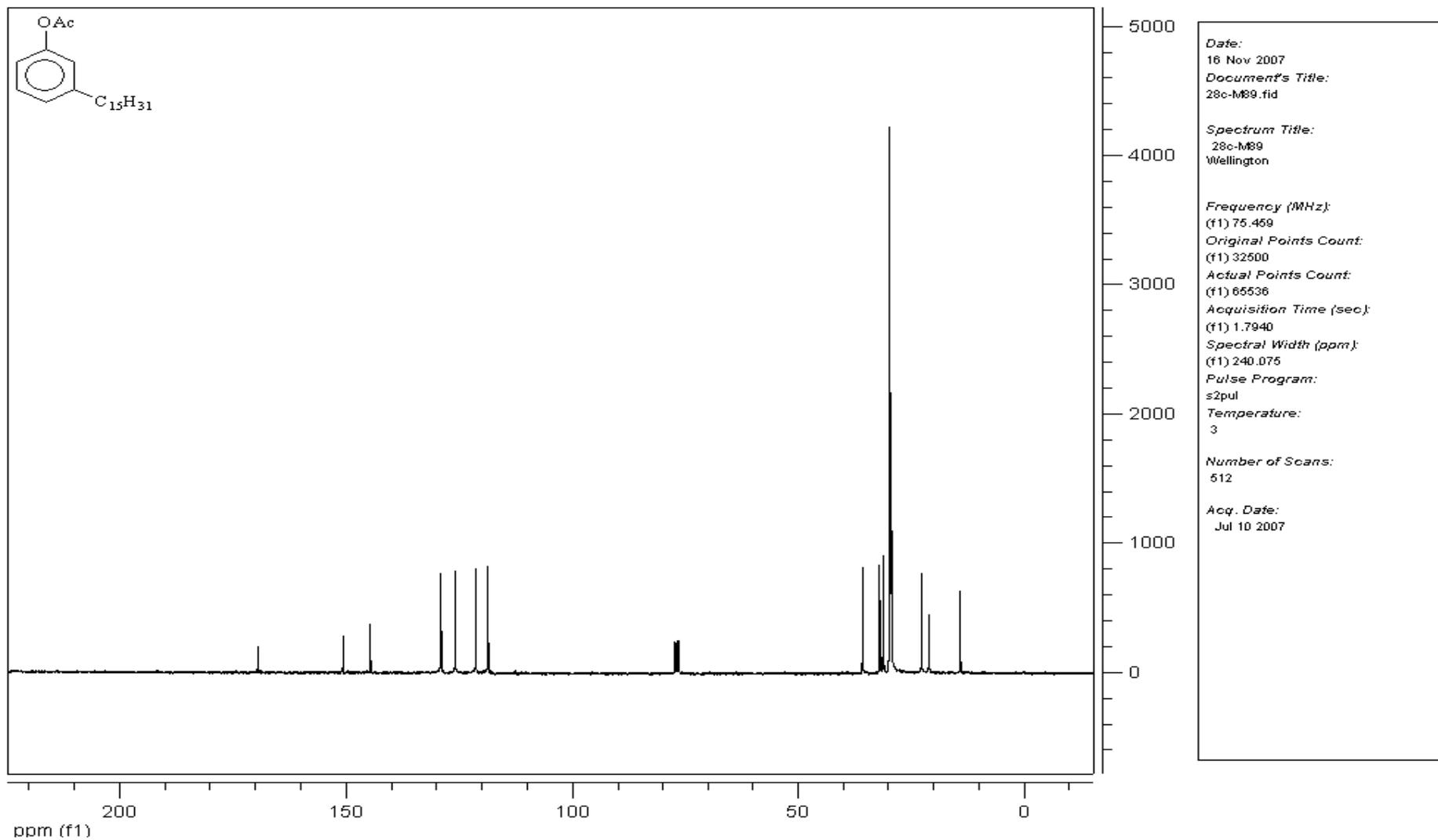


Transmittance / Wavenumber (cm⁻¹)

Espectro de Infravermelho (ν cm⁻¹; KBr) da substância 32



Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 32



Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 32

File # 1 : C15H31

Mode = 2 (Mid-IR)

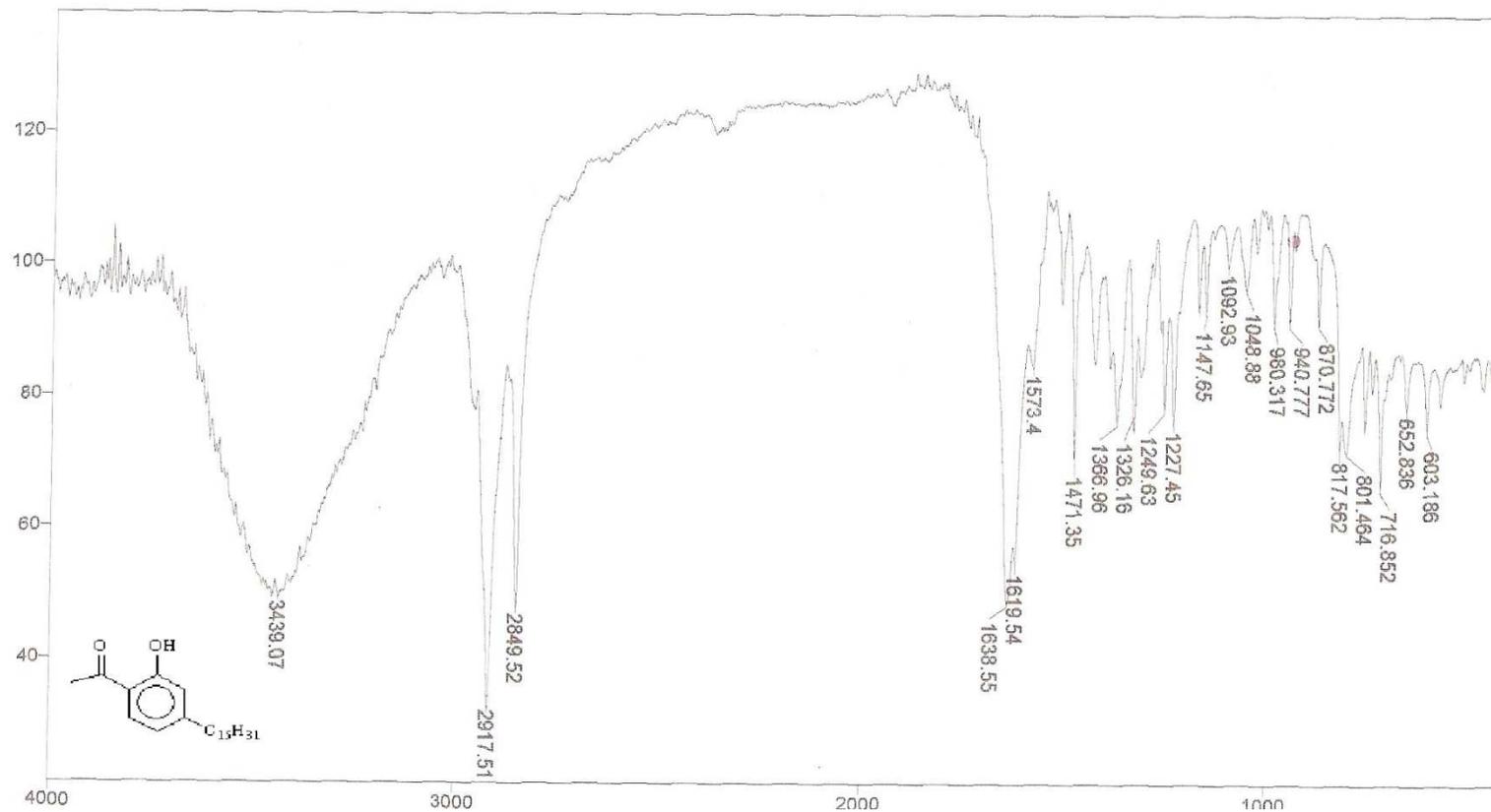
04/12/07 17:30

Sample Description: KBr-27mg

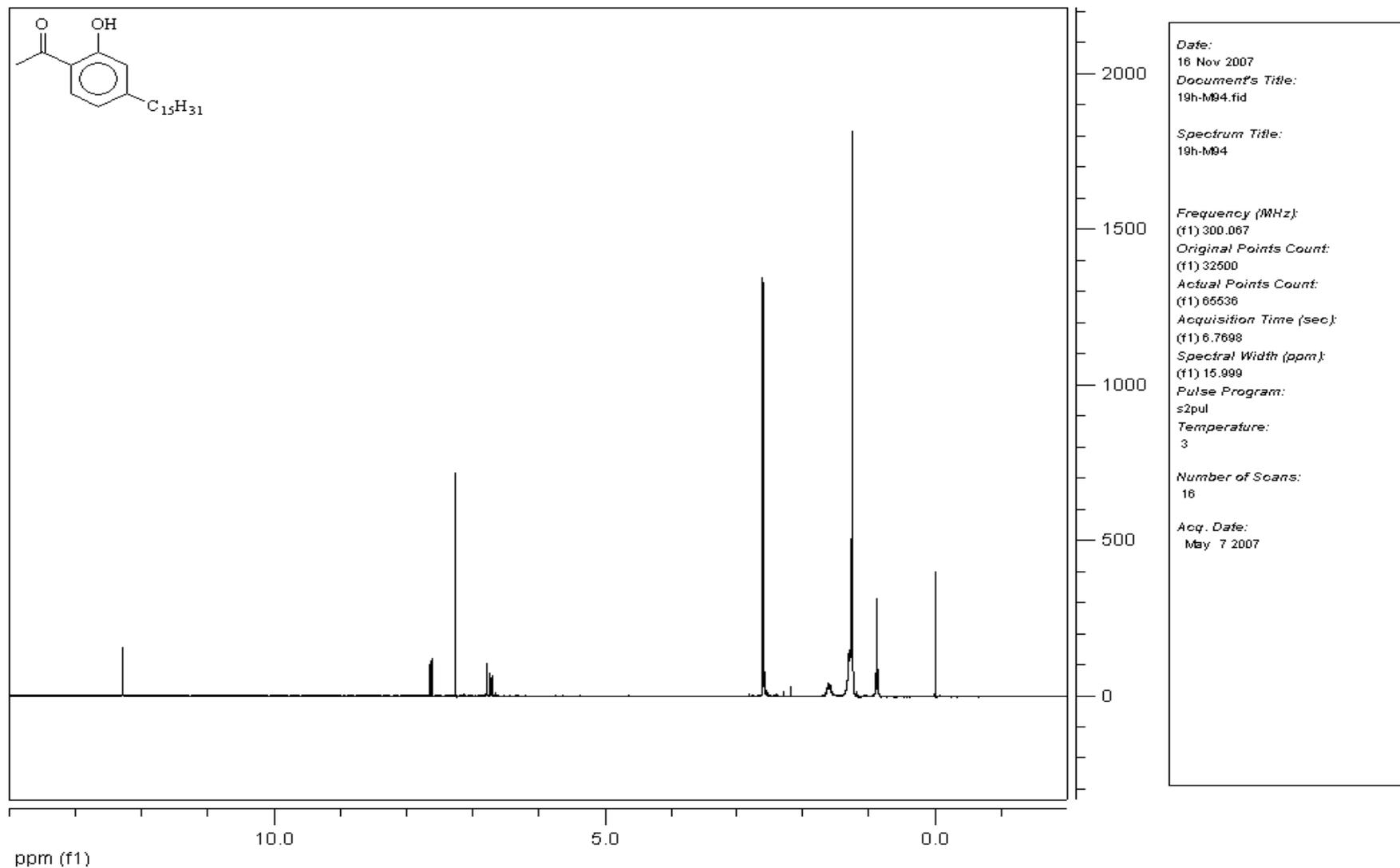
Scans = 10

Res = 4 cm⁻¹ 21 scans/min

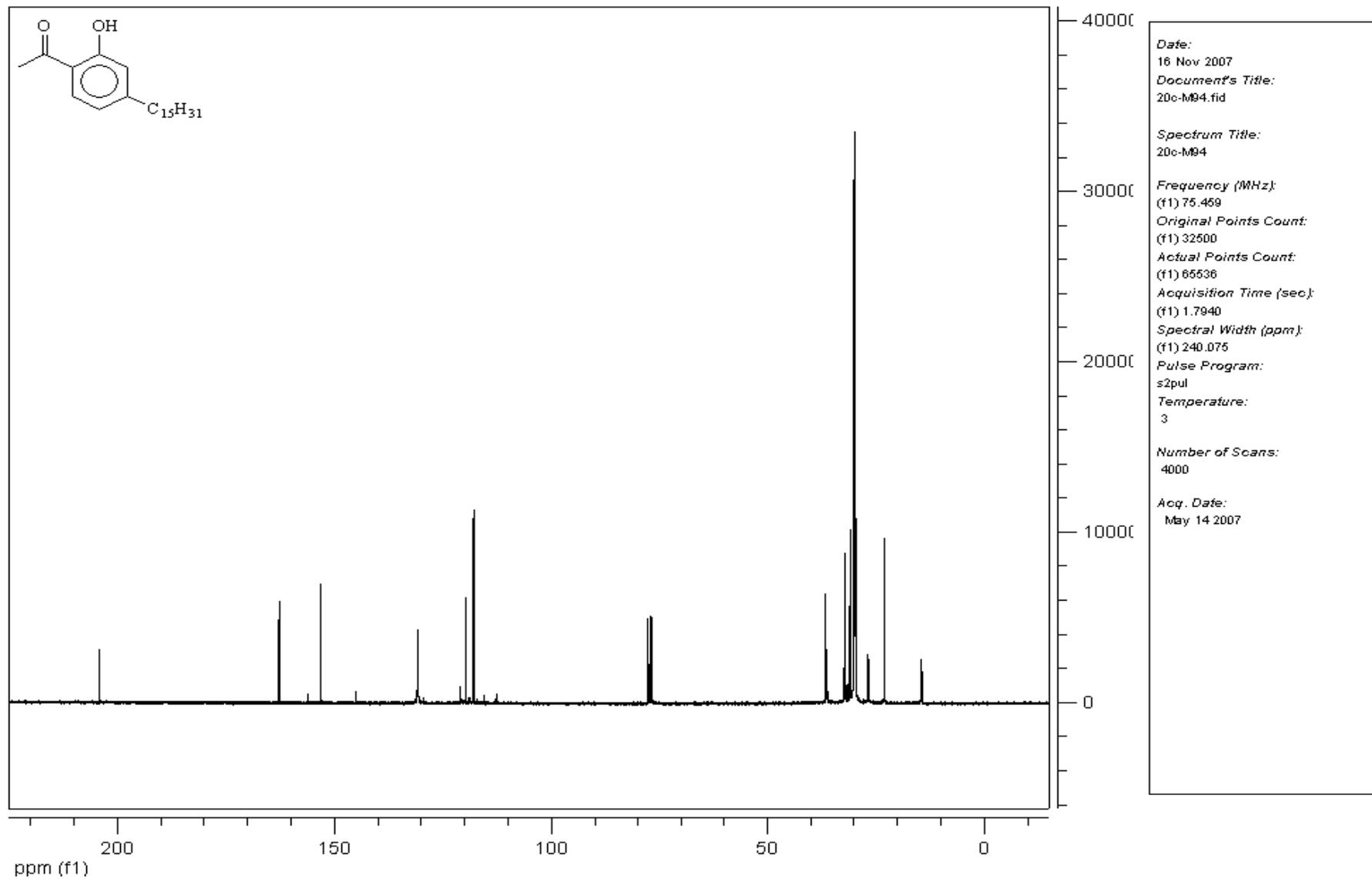
Apod = Cosine



Espectro de Infravermelho (v cm⁻¹; KBr) da substância 54



Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) da substância 54



Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância 54

File # 1 : M73

Mode= 2 (Mid-IR)

07/02/07 08:15

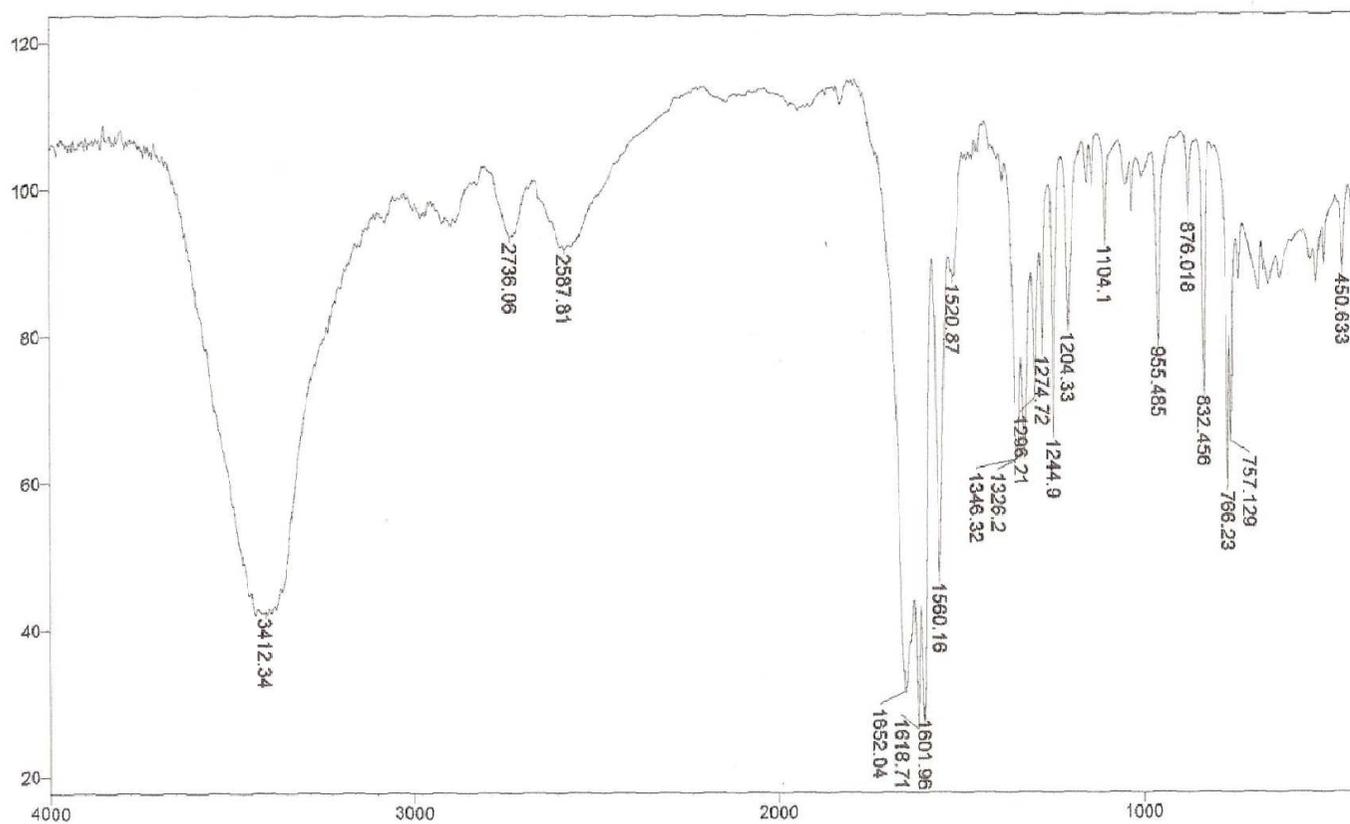
Sample Description: KBr Well

Scans= 10 Slow

Res=4 cm⁻¹

Apod= Cosine

Zero Filling= 1 x

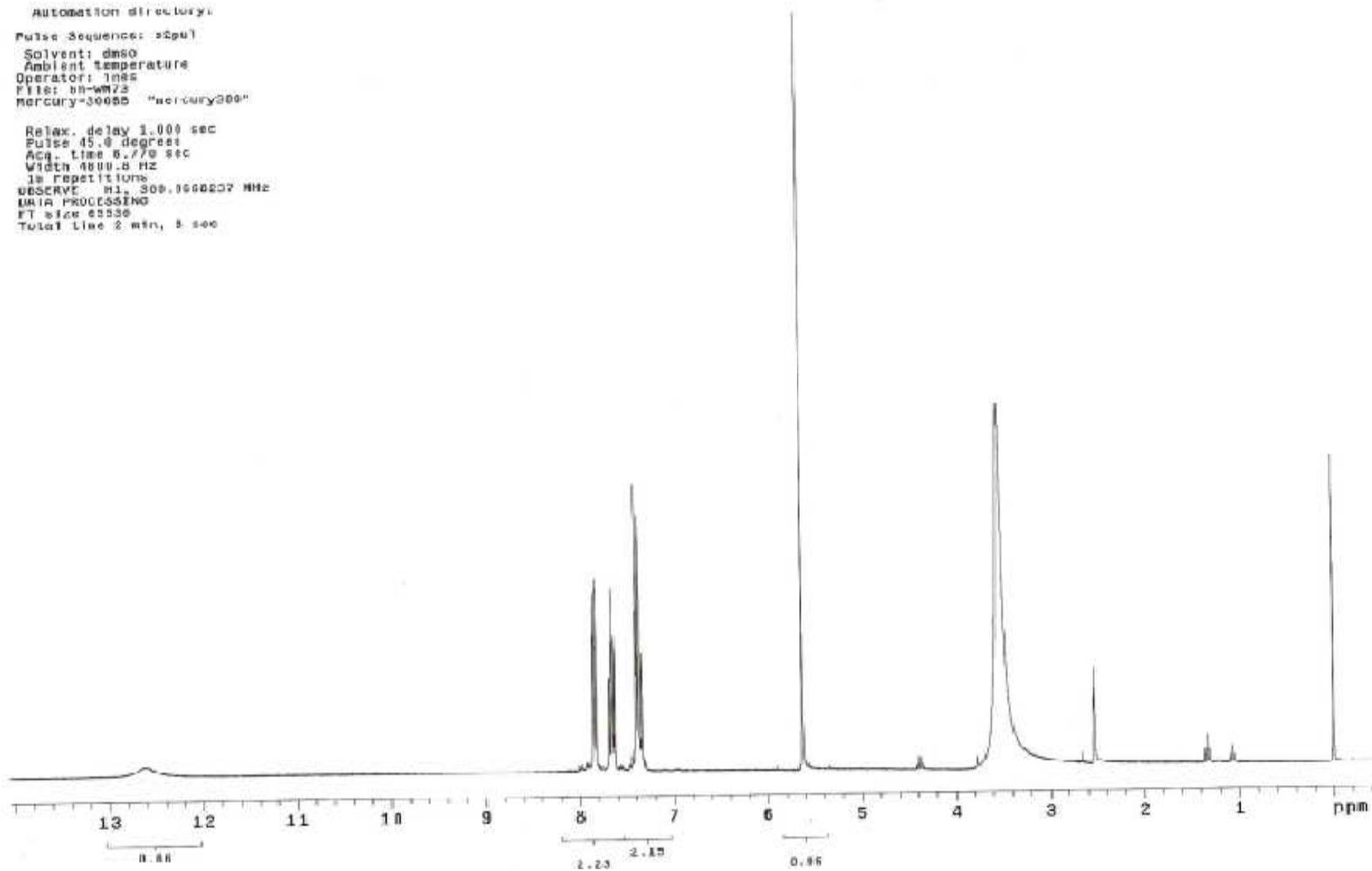


Espectro de Infravermelho (v cm⁻¹: KBr) da substância 56

8h-WK73

Automation directory:
Pulse Sequence: zgpg3
Solvent: dms0
Ambient temperature
Operator: ines
File: 8h-WK73
Mercury-30000 "mercury200"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degree
Acq. Time 6.770 sec
Width 4000.0 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 300.1360207 MHz
P1 12.0000000
FT size 65536
Total Time 2 min, 8 sec



Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância 56

20c-N101

Automation directory:
Pulse Sequence: s2p01
Solvent: dmsd
Ambient Temperature:
Operator: alanox
Mercury-00300 "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degree
Acq. time 1.784 sec
Width 10115.4 Hz
526 Repetitions
DESCRIBE U13, 75.0010738 MHz
DECOUPLE F1, 399.002950 MHz
LOW power 10 dB atten.
CONTINUOUS by on
MULTI-10 modulated
DATA PROCESSING
Line Broadening 3.0 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 0 min, 57 sec



Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) da substância 56

Anexo II

SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF 4-HYDROXYCOUMARIN DERIVATIVE DESIGNED FROM CARDANOL

WELLINGTON ALVES GONZAGA (PG)¹; DÂMARIS SILVEIRA (PQ)²; LUIZ ANTONIO SOARES ROMEIRO(PQ)³; AND MARIA LUCILIA DOS SANTOS(PQ)¹

¹Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília-DF, CEP: 70904-974.

²Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília-DF, CEP: 70904-974.

³Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas, Universidade Católica de Brasília, QS 07 lote 1, EPCT, Águas Claras, Taguatinga – DF, 72966-700.

Cardanol, a natural non-isoprenoid lipid of cashew (*Anacardium occidentale*) nut-shell liquid (CNSL), is found in high amount in the technical CNLS, a byproduct of the cashew nut toasting. Due to demand for new chemical entities (NCEs), the current study focuses on the synthesis of new 4-hydroxycoumarin (4-HC) derivative from cardanol. Since compounds containing the subunit 4-HC have shown to exhibit anti-inflammatory, antiviral and antitumoral activity, the synthesized compound will be bioassayed in order to establish its pharmacological profile. The synthetic methodology for 4-HC include classical organic reactions e.g., catalytic hydrogenation, acetylation, and Fries' rearrangement. All compounds involved in this study will be evaluated by means of Brine Shrimp Lethality Test (BST). The *Brine shrimp* (Leach) lethality assay has been used as model for measure cytotoxic, anti-oxidant, antitumoral, and insecticide activity. To establish if the 4-HC moiety is essential for the activity as well as if the long side-chain play any role on the biological activity, BST screening was performed with 3-pentadecylphenol, 1-(2-hydroxy-4-pentaphenyl)ethanone, 4-HC derivative, the mixture of cardanol (monoene, diene, and triene), and its commercial available analogues (without long side-chain). The compounds were characterized by IR, ¹H and ¹³C-NMR spectra data. Preliminary biological results showed that compounds with C15 side-chain group are significantly higher potent than commercially analogues. The synthesis of 4-HC derivative from of the cardanol may provide lead compounds for development of novel bioactive compounds.

Financial Support: IQ/UnB and FINEP (Process CT-INFRA 970/2001). The authors are indebted with Professor Dr. Inês Sabioni Resck, IQ-UnB.

Anexo III

Estudos visando a síntese e avaliação farmacológica de derivados 4-hidróxi-cumarínicos planejados a partir dos lipídeos fenólicos do LCC.

Wellington Alves Gonzaga^{*1} (PG), Maria Lucilia Santos¹ (PQ), Dâmaris Silveira (PQ) e Luiz A. S. Romeiro² (PQ)

E-mail: quimica2001br@yahoo.com.br

¹Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília-DF, CEP: 70904-974

²Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas, Universidade Católica de Brasília, QS 07 lote 1, EPCT, Águas Claras, Taguatinga – DF, 72966-700

Palavras Chave: 4-hidroxycumarina, LCC, ácido anarcádico

Introdução

O interesse pelo grupo das 4-hidróxi-cumarinas originou-se a partir do isolamento, determinação estrutural e síntese do dicumarol, identificado como o agente causador da doença hemorrágica do trevo doce, onde estudos da relação estrutura-atividade estabeleceram que a presença da subunidade 4-hidroxycumarina consiste no requisito mínimo para a ação farmacológica destas substâncias.

Derivados 4-hidróxi-cumarínicos, utilizados terapeuticamente como agentes anticoagulantes, e.g. warfarina e acenocumarol, são bem conhecidos na literatura e têm sido sintetizados e vastamente empregados como raticidas.

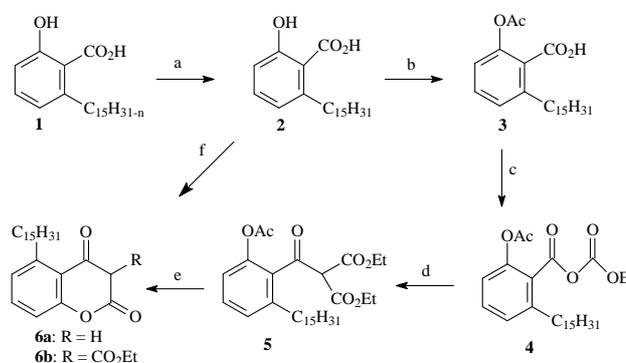
Outros perfis de ação farmacológica de derivados 4-hidróxi-cumarínicos foram avaliados como anti-inflamatórios, antimitóticos, imunológicos e antitumorais e recentemente há um grande interesse em derivados caracterizados como inibidores da enzima HIV integrase, agentes antivirais e inibidores de NA(P)H.

O presente estudo tem por objetivo a preparação e avaliação farmacológica de derivados 4-hidróxi-cumarínicos planejados a partir dos lipídeos fenólicos não-isoprenóides do LCC.

Resultados e Discussão

A seqüência sintética se inicia com a hidrogenação catalítica do ácido anarcádico (**1**) extraído quimicamente do LCC *in natura*³. Na primeira rota sintética, o ácido tetrahydroanarcádico (**2**) foi acetilado e tratado com cloroformiato de etila para a formação do anidrido misto (**4**). O cetoéster **5** foi, inicialmente, submetido a condições básicas, porém não foi observado qualquer traço de produto contendo a subunidade 4-hidróxi-cumarínica, conforme descrito por Tarbell¹. Por outro lado, quando tratado sob condições ácidas (CF₃CO₂H) observou-se a formação de um produto cuja análises espectroscópicas preliminares sugerem o composto cíclico **6a**. Na segunda rota sintética, o ácido anarcádico hidrogenado foi submetido a ciclização com ácido malônico em presença de

ácido trifluoroacético, para obtenção direta **6b** em 59 % de rendimento. Os produtos foram caracterizados por meio de espectroscopia no IV e RMN ¹H e ¹³C.



Esquema 1. Reagentes e condições: a) H₂, Pd/C, EtOH, 60 psi, 98%; b) Ac₂O, piridina; c) Et₃N, ClCO₂Et, tolueno, 0°C; d) EtOMgCH(CO₂Et)₂; e) CF₃CO₂H f) CH₂(CO₂H)₂, CF₃CO₂H.

Conclusões

A partir do ácido anarcádico hidrogenado foi realizado uma ciclização em única etapa, usando reagentes comercialmente disponíveis e de baixo custo.

Tendo o domínio dessa transformação, novos derivados 4-hidróxi-cumarínicos serão preparados dos lipídeos fenólicos do LCC visando a avaliação do perfil farmacológico.

Agradecimentos

Ao IQ/UnB pelo uso de facilidades dos laboratórios e à FINEP (Processo CT-INFRA 970/2001).

¹ Tarbell, D. S.; Price, J. A. *J. Org. Chem.* **1957**, 22, 245-250.

² Appendino, G.; Cravotto, G.; Giovenzana, G. e Palmisano, G. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1627-1631.

³ dos Santos, M. L. *Contribuição ao aproveitamento de matérias-primas abundantes no país em síntese orgânica - Síntese da Lasiodiplodina a partir do LCC.* Tese de Doutorado, UnB, **1997**.

⁴ Woods, L. L.; Johnson, D. *J. Org. Chem.* **1965**, 30, 4343-4344.