UFMG/ICEx/DQ 857ª
T. 365ª

JOCIANI ASCARI

Estudo do Epicarpo e Mesocarpo Externo do Fruto de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi); Síntese e Biotransformação de Isocariolanos e Derivados para Avaliação da Atividade Biológica.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Belo Horizonte

2011

Ascari, Jociani
A811e
2011
T
Estudo do epicarpo e do mesocarpo externo do fruto de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi); síntese e biotransformação de isocariolanos e derivados para avaliação da atividade biológica/ Jociani Ascari. 2011

389 f. : il.
Orientadora: Maria Amélia Diamantino Boaventura
Co-Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.
Bibliografia: p.81-86; p.252-256
1.Química orgânica - Teses 2.*Caryocar brasiliense* – Teses 3.Isocariolanos e derivados – Teses
I.Boaventura, Maria Amélia Diamantino, Orientadora II. Takahashi, Jacqueline Aparecida, Co-Orientadora
III.Título

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br

"Estudo do Epicarpo e do Mesocarpo Externo do Fruto de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi); Síntese e Biotransformação de Isocariolanos e Derivados para Avaliação da Atividade Biológica"

Jociani Ascari

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Maria Amélia Diamantino Boaventura - Orientadora
UFMG

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi - Co-Orientadora
UFMG

Prof. Laurent Frédéric Gil
UFOP

Prof. João Máximo de Siqueira
UFSJ

Profa. Lucienir Pains Duarte
UFMG

Profa. Dorila Piló Veloso
UFMG

Belo Horizonte, 29 de março de 2011.

Este trabalho foi elaborado sob a orientação da Professora Dra. Maria Amélia Diamantino Boaventura e co-orientação da Professora Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi, ambas do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Dedico...

À minha família, em especial, aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram.

Agradecimentos

Agradeço a Deus sempre presente, iluminando e guiando meus passos.

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio e amor incondicional, por sempre me ajudarem e não me deixarem fraquejar nas horas mais difíceis. Agradeço a vocês por tudo que fizeram por mim. Amo vocês.

À Professora Doutora Maria Amélia Diamantino Boaventura, pela amizade, ensinamentos, orientação e por acreditar na minha capacidade.

À Professora Doutora Jacqueline Aparecida Takahashi, pelo carinho, conselhos e por ser uma pessoa ímpar.

Ao Professor Doutor Antonio José Macias Sanchez, pela amizade, paciência e confiança depositada em mim, pelo acolhimento e orientação no estágio de Doutorado Sanduíche realizado na Universidad de Cádiz.

Ao grande amigo e ídolo, Thiago Freitas Borgati, pela valiosa amizade, prestabilidade, conselhos, companheirismo e grande ajuda durante todo este período de doutorado. Muito obrigada por tudo, você é um anjo!

À amiga Alessandra, pela amizade, carinho, apoio e bom humor. Agradeço pelas horas agradáveis dentro e fora do laboratório.

À Aline, por ser sempre muito prestativa, carinhosa e levantar meu astral com seu jeitinho cativante e toda sua família em especial seus pais, pessoas maravilhosas.

À amiga Marcinha, pela amizade, compreensão, pelas palavras positivas e horas de relax (cervejinha, jazz, cinema, caminhadas...).

Ao Braulio, pela dedicação incansável, paciência, apoio e amor incondicional e a sua família, em especial seus pais, pelo carinho e amizade.

Ao Edilson, pela amizade e apoio constante em toda a caminhada.

À Simone, pelo carinho e toda dedicação nas aulas de espanhol pelo Skype.

Aos amigos do laboratório, pela força e carinho: Luiza, Eva e Leandro.

Aos alunos de iniciação científica: Mirele, Felipe, Ludmila e Laís. Muito obrigada pela ajuda.

Aos professores: Henriete da Silva Vieira, Jarbas Magalhães Resende e Rosemeire Brondi Alves pela amizade, disponibilidade e ajuda.

Aos colegas e amigos da Universidad de Cádiz, que me ajudaram a superar a ausência da minha família e amigos durante toda estância, em especial:

À Gabriela Mancila, pela ajuda no laboratório e com a língua espanhola quando cheguei. Pela amizade e companhia nos finais de semana no laboratório.

Ao Reduan, sempre muito prestativo e atencioso. Saudade do café nas tardes de domingo depois do laboratório.

À Michele, pela grande amizade, carinho, confiança e convívio dentro e fora do laboratório. Saudade enorme!!

Ao Javier Moraga, Cristina, Beth, Antonio Ruano pela agradável convivência dentro e fora do laboratório, sempre muito prestativos.

Ao Jacinto, Ana, Mayra, Mariana, Raquel, Villi, Helena, pessoas maravilhosas que conheci nesta estância e que marcaram meu coração para sempre.

Ao Giovani e a Thais, pela agradável convivência durante a estância na UCA. Por dividir comigo não apenas o apartamento em que morávamos mas também todos os momentos tristes e felizes.

Aos amigos da graduação e mestrado que mesmo de longe sempre me apoiaram: Fran, Juliane, Rúbia, Liliam e Rejane

Aos funcionários da Universidade de Minas Gerais e da Universidad de Cádiz.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

PARTE 1..... vi
ÍNDICE DE ESQUEMAS..... vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS..... vi
INDICE DE TABELAS..... vi
INDICE DE FIGURAS..... ix
PARTE 2..... xii
ÍNDICE DE ESQUEMAS..... xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS..... xiii
ÍNDICE DE TABELAS..... xiv
ÍNDICE DE FIGURAS..... xvi
PARTE 1 E 2 – ABREVIATURAS..... xxvi
RESUMO xxvii
ABSTRACT..... xxviii
PARTE 1..... 1
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO 2
1.1 Introdução..... 3
1.2 Objetivos deste trabalho..... 14
CAPÍTULO 2 – PARTE EXPERIMENTAL..... 15
2.1 Técnicas instrumentais e cromatográficas..... 16
2.1.1 Cromatografia em camada delgada de sílica (CCDS)..... 16
2.1.2 Cromatografia em coluna..... 16
2.1.2.1 Sílica gel 70-230 mesh da Merck..... 16
2.1.2.2 Poliamida (< 0,07 mm) da Macherey Nagel..... 16
2.1.3 Reagentes para revelações cromatográficas..... 16
2.1.3.1 Irradiação de luz ultravioleta..... 16
2.1.3.2 Vapores de iodo (revelador geral)..... 16
2.1.3.3 Solução ácida de sulfato cérico (revelador geral)..... 17
2.1.3.4 Anisaldeído /H_2SO_4 (revelador geral)..... 17
2.1.3.5 Reagente de Lieberman Bourchard (específico para triterpenos pentacíclicos e esteróides)..... 17
2.1.4 Critérios de pureza..... 17
2.1.5 Métodos espectrométricos..... 17
2.1.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho..... 17
2.1.5.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)..... 17
2.2 Obtenção do extrato etanólico do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb..... 18
2.2.1 Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) de *Caryocar brasiliense* Camb. 18
2.2.1.1 Partição do grupo G-1 proveniente da cromatografia em poliamida do extrato etanólico bruto (EEB)..... 19
2.2.1.1.1 Fracionamento da fração etérea (G-1E) de *Caryocar brasiliense* Camb..... 20
2.2.1.2 Fracionamento de G-2, proveniente da cromatografia em poliamida do extrato etanólico bruto (EEB)..... 29
2.2.1.3 Fracionamento de G-3, proveniente da cromatografia em poliamida do extrato etanólico bruto (EEB)..... 34
2.2.2 Fracionamento do extrato metanólico bruto (EMB) de *Caryocar brasiliense* Camb..... 37
2.3 Dados físico-químicos..... 42
CAPITULO 3 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL..... 49

3.1 Identificação estrutural dos constituintes químicos isolados de *Caryocar brasiliense* Camb..... 50
3.1.1 Identificação de galato de etila (43)..... 50
3.1.2 Identificação de 5-hidroximetilfurfural (44)..... 52
3.1.3 Identificação de ácido gálico (45)..... 54
3.1.4 Identificação de chiquimato de metila (46)..... 55
3.1.5 Identificação *β-D*-frutofuranose (47) e *β-D*-frutopiranose (48), em mistura..... 57
3.1.6 Identificação da *α*- e *β-D*-glicose (49) e (50), em mistura..... 59
3.1.7 Identificação do de lupeol (51) e ácido oléico (52), em mistura..... 60
3.1.8 Identificação da mistura de *β*-sitosterol (53), estigmasterol (54), contaminada com o ácido oléico (52)..... 63
3.1.9 Identificação de galato de metila (55)..... 65
CAPITULO 4 – TESTES BIOLÓGICOS..... 66
4.1. Testes de avaliação da atividade larvicida, frente à Artemia salina, do extrato etanólico bruto (EEB), de duas frações e de duas substâncias puras obtidas a partir do epicarpo e mesocarpo externo de *C. brasiliense* Camb..... 67
4.1.1 Introdução..... 67
4.1.2 Metodologia utilizada, de acordo com Pimenta e colaboradores[63].. 67
4.1.3 Resultados..... 68
4.2 Testes de avaliação da atividade antioxidante, pela utilização do DPPH, do extrato bruto e de algumas frações obtidas a partir do epicarpo e mesocarpo externo de *C. brasiliense* Camb..... 69
4.2.1 Introdução..... 69
4.2.2 Metodologia utilizada, de acordo com Burda & Oleszek [66]..... 70
4.2.3 Resultados..... 70
4.3 Testes de avaliação da atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB), de frações e substâncias puras obtidas a partir do epicarpo e mesocarpo externo de *C. brasiliense* Camb..... 72
4.3.1 Introdução..... 72
4.3.2 Metodologia, de acordo com Vieira e colaboradores[68]..... 73
4.3.3 Resultados..... 73
4.4 Testes de avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto (EEB) e de frações obtidas a partir do epicarpo e mesocarpo externo de *C. brasiliense* Camb..... 76
4.4.1 Introdução..... 76
4.4.2 Metodologia, de acordo com Lana e colaboradoes[71]..... 77
4.4.3 Resultados..... 78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 80
PARTE 2..... 87
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO 88
1 Introdução..... 89
1.1 Biotransformações..... 89
1.2 Sesquiterpenos..... 91
1.3 Características gerais de *Botrytis cinerea*..... 95
1.4 Biotransformações de sesquiterpenos por *Botrytis cinerea*..... 96
1.5 Objetivos deste trabalho..... 105
CAPITULO 2 – DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL..... 107

2.1 Preparação e identificação das substâncias obtidas..... 108

2.1.1 Preparação e identificação do 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (77)..... 108
2.1.2 Preparação e identificação de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78), isocariolan-9-ona (79) e (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.02,5]undecano-8-carbaldeído (81)[34]..... 113
2.1.2.1 Identificação de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)..... 114
2.1.2.2 Identificação de isocariolan-9-ona (79)..... 119
2.1.2.3 Identificação de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}] undecano-8-carbaldeído (81) 121
2.1.3 Preparação e identificação de (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (80)..... 123
2.1.3.1 Identificação do (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (80)..... 124
2.1.4 Preparação e identificação dos éteres (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78), (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84), (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85), (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86) e (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87) a partir de 77..... 129
2.1.5 Preparação e identificação de isocariolan-9*α*-ol (82)..... 134
2.1.5.1 Identificação do isocariolan-9*α*-ol (82) 134
2.1.6 Preparação e identificação de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano (83) 138
2.1.6.1 Identificação do (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano (83) 138
2.2 Transformações fúngicas de isocariolanos..... 142
2.2.1 Biotransformação de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)..... 142
2.2.1.1 Identificação de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80)..... 143
2.2.1.2 Identificação de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (88)... 143
2.2.1.3 Identificação de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89)..... 146
2.2.1.4 Identificação de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90)..... 149
2.2.1.5 Identificação de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (91)..... 152
2.2.2 Biotransformação de (8*R*, 9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80)..... 155
2.2.2.1 Identificação de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89)..... 155
2.2.2.2 Identificação de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90) 156
2.2.2.3 Identificação de (6*R*, 8*S*, 9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (91) 156
2.2.2.4 Identificação de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (92) 156
2.2.2.5 Identificação de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (93) 160
2.2.3 Biotransformação de isocariolan-9*α*-ol (82) 162
2.2.3.1 Identificação de (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (80)..... 162
2.2.3.2 Identificação de (2*S*,4*R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo [6.3.1.02,5] dodecan-9-ona (94)..... 163
2.2.3.3 Identificação de (15*R*,9*R*)-isocariolano-9,15-diol (95)..... 166
2.2.3.4 Identificação de (3*S*,9*R*)- isocariolano-9,3-diol (96)..... 168
2.2.4 Biotransformação do (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano (83)..... 171
2.2.4.1 Identificação de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.0^{2,5}]undeca-6β,12-diol (97)..... 171
2.2.4.2 Identificação do (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undeca-6β,9β,12-triol (98) 175
2.2.4.3 Identificação do (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undeca-6β,15,12-triol (99) 179

2.2.4.4 Identificação do (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.0^{2,5}]undeca-12,14,15-triol (100) 182

CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL..... 185
3.1. Técnicas instrumentais e cromatográficas..... 186
3.1.1 Cromatografia em camada delgada de sílica (CCDS) 186
3.1.2 Cromatografia em coluna..... 186
3.1.3 Cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE) 186
3.1.4 Reagente para revelação cromatográfica..... 186
3.1.5 Critério de pureza..... 186
3.1.6 Faixa de fusão..... 187
3.1.7 Métodos espectrométricos..... 187
3.1.7.1 Atividade óptica..... 187
3.1.7.2 Espectroscopia na região do infravermelho..... 187
3.1.7.3 Espectrometria de massas..... 187
3.1.7.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)..... 187
3.2 Transformações químicas realizadas com o óxido de cariofileno, com cariofilanos, isocariolanos e derivados procedentes de rearranjo de isocariolanos..... 188
3.2.1 Preparação do 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (77)[33]..... 188
3.2.2 Preparação do (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78), da isocariolan-9-ona (79) e do (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}] undecano-8-carbaldeído (81)[34]..... 188
3.2.3 Preparação do (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (80)[34], da isocariolan-9-ona (79) e do (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano-8-carbaldeído (81) 189
3.2.4 Redução da isocariolan-9-ona (4), com $NaBH_4$ [34]..... 189
3.2.5 Redução do (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}] undecano-8-carbaldeído (5) com $NaBH_4$[34]..... 190
3.2.6 Procedimento geral da reação de 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (77) com alcoóis catalisada por $Sn(OTf)_2$[38]..... 190
3.3 Transformações microbianas de isocariolanos..... 191
3.3.1 Procedimentos gerais empregados nos experimentos de biotransformações..... 191
3.3.1.1 Preparo do inóculo..... 191
3.3.1.2 Preparo do meio de cultura, inoculação do meio de cultura e adição do substrato ao meio de cultura..... 192
3.3.1.2.1 Modo agitação..... 192
3.3.1.2.2 Modo estático..... 193
3.3.2 Biotransformação do (8R,9R)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78) por *B. cinerea*..... 193
3.3.2.1 Purificação do resíduo obtido com 5 dias de fermentação de 78.. 193
3.3.2.2 Purificação do resíduo obtido com 9 dias de fermentação de 78.. 195
3.3.3 Biotransformação do (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (6) por *Botrytis cinerea* 197
3.3.3.1 Purificação do resíduo obtido com 5 dias de fermentação de 80.. 197
3.3.3.2 Purificação do resíduo obtido com 9 dias de fermentação de 80.. 201
3.3.4 Biotransformação do isocariolan-9*α*-ol (82) por *Botrytis cinerea*..... 203
3.3.4.1 Purificação do resíduo obtido com 5 dias de fermentação de 82.. 204
3.3.4.2 Purificação do resíduo obtido com 9 dias de fermentação de 82.. 206

3.3.5 Biotransformação de 1*R*,2*S*,5*R*,8*S*-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil-triciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano (83) por *Botrytis cinerea*..... 209
3.3.5.1 Purificação do resíduo obtido com 5 dias de fermentação de 83.. 210

3.3.5.2 Purificação do resíduo obtido com 9 dias de fermentação de 83.. 212
3.4 Dados físico-químicos..... 215
CAPITULO 4 TESTES BIOLÓGICOS..... 237
4.1 Avaliação da atividade fungistática de isocariolanos..... 238
4.1.1 Introdução..... 238
4.1.2 – Metodologia..... 239
4.1.3 – Resultados..... 240
4.2 - Teste de avaliação da atividade alelopática de isocariolanos e derivados de rearranjo de isocariolanos..... 244
4.2.1 Resultados..... 245
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 251
CONCLUSÃO GERAL..... 257
ANEXO 1 – Parte1..... 260
ANEXO 2 – Parte 2..... 286

PARTE 1

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Extração do grupo G-1 com éter etílico..... 20
Esquema 2 – Substâncias isoladas a partir do fracionamento da fração etérea (G-1E) de *Caryocar brasiliense* Camb..... 29
Esquema 3 – Substâncias isoladas a partir do fracionamento da fração G-2 de *Caryocar brasilienses* Camb..... 34
Esquema 4 – Substâncias isoladas a partir do fracionamento da fração G-3 de *Caryocar brasilienses* Camb..... 37

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Percentual de inibição do DPPH pelo extrato bruto e frações, obtidas a partir do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), em três concentrações diferentes..... 71
Gráfico 2 – Efeito do extrato etanólico bruto (EEB), obtido a partir do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), e da fração G-1, derivada deste, sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes..... 75
Gráfico 3 – Efeito da fração etérea (G-1E), da torta obtida a partir desta extração (T1) e da fração G-3, obtida a partir de EEB, proveniente do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes... 75
Gráfico 4 – Efeito das substâncias puras 43 (galato de etila), 44 (hidroximetilfurfural) e 45 (ácido gálico), obtidas a partir do extrato etanólico bruto (EEB), proveniente do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes..... 76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto (EEB) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb..... 18
Tabela 2 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato etanólico bruto (**EEB**) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb., de acordo com comportamento em CCDS..... 19
Tabela 3 – Fracionamento cromatográfico da fração etérea (G-1E) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb... 20
Tabela 4 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento da fração etérea **G-1E** do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb., de acordo com comportamento em CCDS..... 21

Tabela 5 – Fracionamento cromatográfico de G-1E2, proveniente do fracionamento da fração etérea G-1E..... 22
Tabela 6 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de G-1E2, proveniente da fração etérea G-1E, de acordo com comportamento em CCDS..... 22
Tabela 7 – Fracionamento cromatográfico do Subgrupo 2, proveniente do fracionamento de G-1E2..... 23
Tabela 8 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento do Subgrupo 2, proveniente do fracionamento de G-1E2, de acordo com comportamento em CCDS..... 23
Tabela 9 – Fracionamento cromatográfico de G-1E6, proveniente do fracionamento da fração etérea G-1E..... 25
Tabela 10 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de G-1E6, proveniente do fracionamento da fração etérea G-1E, de acordo com comportamento em CCDS..... 25
Tabela 11 – Fracionamento cromatográfico de G-1E8, proveniente do fracionamento da fração etérea G-1E..... 27
Tabela 12 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de G-1E8, proveniente do fracionamento da fração etérea G-1E, de acordo com comportamento em CCDS..... 27
Tabela 13 – Fracionamento cromatográfico de G-2, proveniente do extrato etanólico bruto (EEB) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb..... 30
Tabela 14 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de G-2, proveniente do extrato etanólico bruto (EEB) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb., de acordo com comportamento em CCDS..... 30
Tabela 15 – Fracionamento cromatográfico de G-2-4, proveniente do fracionamento inicial de G-2..... 31
Tabela 16 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de G-2-4, proveniente do fracionamento inicial de G-2, de acordo com comportamento em CCDS 32
Tabela 17 – Fracionamento cromatográfico de G-2-5, proveniente do fracionamento inicial de G-2..... 33
Tabela 18 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de G-2-5, proveniente do fracionamento inicial de G-2, de acordo com comportamento em CCDS..... 33
Tabela 19 – Fracionamento cromatográfico de G-3, proveniente do extrato etanólico bruto (EEB) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb..... 34
Tabela 20 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de G-3, proveniente do extrato etanólico bruto (EEB) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb., de acordo com comportamento em CCDS..... 35
Tabela 21 – Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico bruto (EMB) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb..... 38
Tabela 22 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato metanólico bruto (EMB) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb., de acordo com comportamento em CCDS..... 38

Tabela 23 – Fracionamento cromatográfico do G-11, proveniente do extrato metanólico bruto (EMB) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb..... 39
Tabela 24 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de G-11, proveniente do extrato metanólico bruto (EMB) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb., de acordo com comportamento em CCDS..... 40
Tabela 25 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, piridina-d5) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, piridina) de 43 com aqueles relatados na literatura para o galato de etila (solvente: DMSO-d6[50])..... 51
Tabela 26 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 200 MHz, $CDCl_3$) e ^{13}C (δ, 50 MHz, $CDCl_3$) de 44 com aqueles relatados na literatura para o 5-hidroximetilfurfural (solvente:$CDCl_3$[51])..... 53
Tabela 27 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (δ, 100 MHz, CD_3OD) de 45 com aqueles relatados na literatura para o ácido gálico (solvente:CD_3OD[52])..... 55
Tabela 28 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, CD_3OD) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, CD_3OD) com aqueles relatados na literatura para o chiquimato de metila (46) (solvente: D_2O[54])..... 57
Tabela 29 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (δ, 100 MHz, CD_3OD) de 47 com aqueles relatados para a *β-D*-frutofuranose (solvente: D_2O[55, 56])..... 58
Tabela 30 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (δ, 100 MHz, CD_3OD) de 48 com aqueles relatados para a *β*-D-frutopiranose (solvente: D_2O[55, 56])..... 58
Tabela 31 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, D_2O) e ^{13}C (δ, 100 MHz, D_2O) de 49 com aqueles relatados para a *α*-D-glicose (solvente: D_2O[57])..... 60
Tabela 32 Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, D_2O) e ^{13}C (δ, 100 MHz, D_2O) de 50 com aqueles relatados para a *β*-D-glicose (solvente: D_2O[57])..... 60
Tabela 33 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 51 com aqueles do lupeol (solvente: $CDCl_3$[58])..... 62
Tabela 34 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 52 com aqueles do ácido oléico (solvente: $CDCl_3$[59])..... 62
Tabela 35 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 53 e 55 com aqueles do *β*-sitosterol e estigmasterol (solvente: $CDCl_3$[60])..... 64
Tabela 36 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 200 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 50 MHz, $CDCl_3$) de 55 com aqueles relatados na literatura para o galato de metila (solvente: DMSO-d6[50])..... 65
Tabela 37 – Atividade larvicida, frente à *Artemia salina*, apresentada pelo extrato etanólico bruto, frações e substâncias isoladas do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)..... 69

Tabela 38 – Valores relativos às médias do percentual de redução de DPPH apresentados pelo extrato etanólico bruto e frações obtidas a partir do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), em três concentrações diferentes e valores de da concentração efetiva necessária para descolorir 50% da solução de DPPH (CE_{50})..... 71
Tabela 39 – Atividade antimicrobiana, *in vitro*, da fração G-1E obtida a partir do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) frente a várias bactérias e o fungo *C. albicans*..... 79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Alguns constituintes das folhas de *C. microcarpum*..... 4
Figura 2 – Alguns constituintes dos frutos de *C. villosum* e polpa de *C. coriaceum*..... 5
Figura 3 – Ilustração do fruto de *Caryocar brasiliense* Camb. (A), com o corte transversal (B): mesocarpo externo (ME), mesocarpo interno (MI),endocarpo lenhoso ou espinhoso (EE) e amêndoa (A). Fonte: Damiani, 2006[15]..... 7
Figura 4 – Alguns constituintes das folhas de *C. brasiliense*..... 7
Figura 5 – Ácidos graxos presentes na amêndoa e triglicerídeos majoritários presentes na polpa de *C. brasiliense*..... 8
Figura 6 – Alguns constituintes dos frutos de *C. brasiliense*..... 9
Figura 7 – Alguns carotenóides presentes na polpa de *C. brasiliense*..... 10
Figura 8 – Componentes voláteis presentes na polpa do fruto e na amêndoa de *C. brasiliense*..... 11
Figura 9 – Espectro no IV de galato de etila (43)..... 261
Figura 10 – Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, piridina-d5) de galato de etila (43)..... 261
Figura 11 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, piridina-d5) de galato de etila (43)..... 262
Figura 12 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, piridina-d5) de galato de etila (43)..... 262
Figura 13 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, piridina-d5) de galato de etila (43). Expansão da região entre δ_H 1,00 – 5,00..... 263
Figura 14 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, piridina-d5) de galato de etila (43)..... 263
Figura 15 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, piridina-d5) de galato de etila (43). Expansão da região entre δ_H 0,00 – 5,00..... 264
Figura 16 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, piridina-d5) galato de etila (43). Expansão da região entre δ_H 7,30 – 8,20..... 264
Figura 17 – Espectro no IV de 5-hidroximetilfurfural (44)..... 265
Figura 18 – Espectro de RMN de ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (44)..... 265
Figura 19 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (44)..... 266
Figura 20 – Subespectro DEPT-135 (50 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (44)..... 266
Figura 21 – Mapa de contornos COSY (200 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (44)..... 267

Figura 22 – Mapa de contornos HSQC (200 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (44)..... 267
Figura 23 – Mapa de contornos HMBC (200 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (44)..... 268
Figura 24 – Mapa de contornos ROESY (200 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (44)..... 268
Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de ácido gálico (45).. 269
Figura 26 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de ácido gálico (45). 269
Figura 27 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD) de ácido gálico (45).. 270
Figura 28 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD) de ácido gálico (45). Expansão da região entre δ_H 4,0 – 10,0..... 270
Figura 29 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3OD) de ácido gálico (45). Expansão da região entre δ_H 5,0 – 7,5..... 271
Figura 30 – Espectro no IV de chiquimato de metila (46)..... 271
Figura 31 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (46)..... 272
Figura 32 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (46)..... 272
Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (46)..... 273
Figura 34 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (46)..... 273
Figura 35 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (46)..... 274
Figura 36 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (46)..... 274
Figura 37 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (46)..... 275
Figura 38 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (46)..... 275
Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da mistura de *β*-D-Frutofuranose (47) e *β*-D-Frutopiranose (48)..... 276
Figura 40 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da mistura de *β*-D-Frutofuranose (47) e *β*-D-Frutopiranose (48). Expansão da região entre δ_H 3,0-4,2..... 276
Figura 41 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da mistura de *β*-D-Frutofuranose (47) e *β*-D-Frutopiranose (48)..... 277
Figura 42 – Subspectro DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD) da mistura de *β*-D-Frutofuranose (47) e *β*-D-Frutopiranose (48)..... 277
Figura 43 – Espectro no IV da mistura de *α*-D-glicose (49) e *β*-D-glicose (50).. 278
Figura 44 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) da mistura de *α*-D-glicose (49) e *β*-D-glicose (50)..... 278
Figura 45 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O) da mistura de *α*-D-glicose (49) e *β*-D-glicose (50)..... 279
Figura 46 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, D_2O) da mistura de *α*-D-glicose (49) e *β*-D-glicose (50)..... 279
Figura 47 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) da mistura de lupeol (51) e ácido oléico (52)..... 280
Figura 48 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de lupeol (51) e ácido oléico (52)..... 280

Figura 49 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de lupeol (51) e ácido oléico (52). Expansão da região entre δ_C 33,00 – 14,40..... 281
Figura 50 – Subspectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de lupeol (51) e ácido oléico (52)..... 281
Figura 51 – Subspectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de lupeol (51) e ácido oléico (52). Expansão da região entre δ_C 32,00 – 13,80..... 282
Figura 52 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) da mistura de *β*-sitosterol (53), estigmasterol (54), contaminada com o ácido oléico (52)..... 282
Figura 53 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de β-sitosterol (53), estigmasterol (54), contaminada com o ácido oléico (52)..... 283
Figura 54 – Subspectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de da mistura de β-sitosterol (53), estigmasterol (54), contaminada com o ácido oléico (52)..... 283
Figura 55 – Subspectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de β-sitosterol (53), estigmasterol (54), contaminada com o ácido oléico (52). Expansão da região entre δ_C 77,00 – 19,00..... 284
Figura 56 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $CDCl_3$) de galato de metila (55)..... 284
Figura 57 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl3) de galato de metila (55)..... 285

PARTE 2

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Biossíntese dos sesquiterpenos 8 e 10, isolados de fungos do gênero *Botrytis*..... 94

Esquema 2 – Biotransformação do óxido de cariofileno (11) por *B. cinerea*.... 97

Esquema 3 – Biotransformação do (4*E*,8*R*)-cariofil-4(5)-en-8-ol (27) por *B. cinerea*..... 98

Esquema 4 – Biotransformação do patchoulol (41) por *B. cinerea*..... 99

Esquema 5 – Biotransformação do ginsenol (53) por fungo *B. cinerea*..... 99

Esquema 6 – Biotransformação do 2β-metoxiclovan-9α-ol (61) por *B. cinerea*..... 100

Esquema 7 – Biotransformação do 2β-metoxiclovan-9-ona (62) por *B. cinerea*..... 101

Esquema 8 – Biotransformação do2β-metoxiclovan-9β-ol (63) por *B. cinerea*... 101

Esquema 9 – Biotransformação do 2β-(prop-2-eniloxi)clovan-9α-ol (68) por *B. cinerea*..... 102

Esquema 10 – Biotransformação do 2β-(nitroetoxi) clovan-9α-ol (69) por *B. cinerea*..... 102

Esquema 11 – Biotransformação do 10-hidroxi-2β-metoxiclovan-10-en-9-ona (70) por *B. cinerea*..... 103

Esquema 12 – Biotransformação do 2β-metoxiclovan-9β,10β-diol (71) por *B. cinerea*..... 103

Esquema 13 – Biotransformação do isoprobotrian-9α-ol (73) por *B. cinerea*..... 103

Esquema 14 – Compostos com esqueleto isocariolânico..... 104

Esquema 15 – Transformações químicas realizadas com o óxido de cariofileno (11)..... 106

Esquema 16 – Preparação do 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (77)..... 108

Esquema 17 – Mecanismo proposto para a reação de 11 com TCNE, em acetona..... 108

Esquema 18 – Preparação de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78), isocariolan-9-ona (79) e (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)- 1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído (81) a partir de (77)..... 113

Esquema 19 – Mecanismo proposto para a reação de 77 com com TCNE, em metanol..... 114

Esquema 20 – Preparação de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80), isocariolan-9-ona (79) e (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído (81) a partir de 77..... 123

Esquema 21 – Mecanismo da obtenção de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80), isocariolan-9-ona (79) e (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído (81), a partir do cariofila-4(12),8(13)-dien-5*α*-ol (77)..... 124

Esquema 22 – Preparação dos éteres 78, 84, 85, 86 e 87 com triflato de estanho, a partir de 77..... 129

Esquema 23 – Preparação de isocariolan-9-α-ol (82) a partir de 79..... 134

Esquema 24 – Preparação de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (83) a partir de 81..... 138

Esquema 25 – Produtos de biotransformação do (8*R*,9*R*)-8-metoxiisocariolan-9-ol (3) pelo fungo *B. cinerea*..... 142

Esquema 26 – Produtos de biotransformação do (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol

(80) pelo fungo *B. cinerea*..... 155
Esquema 27 – Produtos de biotransformação do isocariolan-9*α*-ol (82) pelo fungo *B. cinerea*..... 162
Esquema 28 – Biotransformação do (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (83) pelo fungo *B. cinerea*..... 171

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação da porcentagem de inibição frente a *B. cinerea* pelos compostos 78, 80 e 88..... 241
Gráfico 2 – Comparação da porcentagem de inibição frente a *B. cinerea* pelos éteres 78, 84, 85, 86 e 87, durante 72 horas..... 242
Gráfico 3 – Comparação da porcentagem de inibição frente a *B. cinerea* pelos éteres 78, 84, 85, 86 e 87, durante 120 horas..... 243
Gráfico 4 – Efeito das substâncias (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78), (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80), isocariolan-9*α*-ol (82), (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (83) sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes..... 246
Gráfico 5 – Efeito das substâncias (8*R*,9*R*)-8-metoxiisocariolan-9-ol (78), (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80), isocariolan-9*α*-ol (82), (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (83) sobre a germinação da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes..... 247
Gráfico 6 – Efeito dos éteres (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78), (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84), (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85), (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86) e (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87) sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes..... 248
Gráfico 7 – Efeito dos éteres (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78), (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84), (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85), (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86) e (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87) sobre a germinação da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes..... 248
Gráfico 8 – Efeito dos produtos de biotransformação (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxiisocariolano-9,15-diol (88), (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89), (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90), (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (91), (2*S*,4*R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo [6.3.1.02,5]dodecan-9-ona (94), (15*R*,9*R*)-isocariolano - 9, 15-diol (95) e (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.02,5] undeca-6β,12-diol (97) sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes..... 249
Gráfico 9 – Efeito dos produtos de biotransformação (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxiisocariolano-9,15-diol (88), (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89), (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90), (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (91), (2*S*,4*R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo [6.3.1.02,5]dodecan-9-ona (94), (15*R*,9*R*)-isocariolano - 9, 15-diol (95) e (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.02,5] undeca-6β,12-diol (97) sobre a germinação da alface (*L. sativa*), em três concentrações

diferentes..... 250

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 11 com aqueles relatados na literatura para o 4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno[39]..... 110

Tabela 2 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 77 com aqueles relatados na literatura para o 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno[33]..... 112

Tabela 3 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 78 com aqueles relatados na literatura para o (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol[34]..... 118

Tabela 4 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 79 com aqueles relatados na literatura para a isocariolan-9-ona[41]..... 120

Tabela 5 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 81 com aqueles relatados na literatura para o (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído [34]..... 122

Tabela 6 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 80 com aqueles relatados na literatura para o (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol [34]..... 128

Tabela 7 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) de 78, 84, 85, 86 e 87..... 132

Tabela 8 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 78, 84, 85, 86 e 87..... 133

Tabela 9 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 82 com aqueles relatados na literatura para o isocariolan-9α-ol[41]..... 137

Tabela 10 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 83 com aqueles relatados na literatura para o (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undecano[34]..... 141

Tabela 11 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de 88 com aqueles do material de partida (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)..... 145

Tabela 12 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 89 com aqueles do material de partida (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol 78..... 148

Tabela 13 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de 90 com aqueles do material de partida (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)..... 151

Tabela 14 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, CD_3OD) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, CD_3OD) de 91 com aqueles do material de partida (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)..... 154

Tabela 15 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de 92 com aqueles do material de partida 80..... 159

Tabela 16 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, CD_3OD) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, CD_3OD) de 93 com aqueles de 91..... 161
Tabela 17 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 94 com aqueles do material de partida isocariolan-9α-ol (82)..... 165
Tabela 18 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 95 com aqueles do material de partida isocariolan-9α-ol (82)..... 167
Tabela 19 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de 96 com aqueles do material de partida isocariolan-9α-ol (82)..... 170
Tabela 20 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de 97 com aqueles do material de partida (1*R*,2*S*,5*R*,8S)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (83)..... 174
Tabela 21 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de 98 com aqueles do material de partida (1*R*,2*S*,5*R*,8S)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (83)..... 178
Tabela 22 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de 99 com aqueles do material de partida (1*R*,2*S*,5*R*,8S)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (83)..... 181
Tabela 23 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de 100 com aqueles do material de partida (1*R*,2*S*,5*R*,8S)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (83)..... 184
Tabela 24 – Produtos obtidos da reação de 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (77) com álcoois catalisada por $Sn(OTf)_2$[38]..... 191
Tabela 25 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato 78 por *B. cinerea*..... 194
Tabela 26 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato 78..... 195
Tabela 27 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato 80 por *B. cinerea*..... 197
Tabela 28 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato 80 por *B. cinerea*, de acordo com comportamento por CCDS..... 198
Tabela 29 – Fracionamento cromatográfico do grupo 10, proveniente do fracionamento do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato 80 por *B. cinerea*..... 199
Tabela 30 – Reunião em grupos das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do grupo 10 procedente do fracionamento do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato 80 por *B. cinerea*, de acordo com comportamento em CCDS..... 200
Tabela 31 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato 80 por *B. cinerea*..... 201

Tabela 32 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato 80 por *B. cinerea*, de acordo com comportamento por CCDS..... 202
Tabela 33 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato 82..... 204
Tabela 34 – Reunião em grupos das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato 82, de acordo com comportamento em CCDS..... 205
Tabela 35 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato 82..... 207
Tabela 36 – Reunião em grupos das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato 82, de acordo com comportamento em CCDS..... 208
Tabela 37 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato 83..... 210
Tabela 38 – Reunião em grupos das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato 83, de acordo com comportamento em CCDS..... 211
Tabela 39 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato 83..... 213
Tabela 40 – Reunião em grupos das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato 83, de acordo com comportamento em CCDS..... 213

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Biossíntese dos terpenos..... 92
Figura 2 – Compostos com esqueleto sesquiterpênico..... 93
Figura 3 – Metabólitos fúngicos com esqueleto sesquiterpênico..... 94
Figura 4 – “Podridão cinza” causada por *B. cinerea*..... 95
Figura 5 – Efeito produzido por *B. cinerea* em diferentes cultivos..... 95
Figura 6 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$), de 4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno (11)..... 287
Figura 7 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de 4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno (11). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 287
Figura 8 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de 4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno (11)..... 288
Figura 9 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (77)..... 288
Figura 10 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (77). Expansão da região entre δ_H 1,0 – 3,0..... 289
Figura 11 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (77)..... 289

Figura 12 – Espectro na região de IV de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)..... 290
Figura 13 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)..... 290
Figura 14 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de(8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 291
Figura 15 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxiisocariolan-9-ol (78)..... 291
Figura 16 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)..... 292
Figura 17 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)..... 292
Figura 18 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 293
Figura 19 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)..... 293
Figura 20 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)..... 294
Figura 21 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 294
Figura 22 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de(8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)..... 295
Figura 23 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5. 295
Figura 24 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9-ona (79)..... 296
Figura 25 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9-ona (79). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 296
Figura 26 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9-ona (79)..... 297
Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9-ona (79). Expansão da região entre δ_C 20 – 48..... 297
Figura 28 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído (81)..... 298
Figura 29 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído (81). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 298
Figura 30 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído (81)..... 299
Figura 31 – Espectro na região de IV de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80) 299
Figura 32 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80) 300
Figura 33 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80). Expansão da região entre δ_H 1,0 – 2,2 300
Figura 34 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80) 301
Figura 35 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80) 301

Figura 36 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80) 302
Figura 37 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5 302
Figura 38 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80) 303
Figura 39 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80) 303
Figura 40 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80).Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5. 304
Figura 41 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (80) 304
Figura 42 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de 80. Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 305
Figura 43 – Espectro no IV de (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84)..... 305
Figura 44 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84) 306
Figura 45 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 306
Figura 46 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84)..... 307
Figura 47 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84) 307
Figura 48 – Espectro de Massas de (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84)..... 308
Figura 49 – Espectro no IV de (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85)..... 308
Figura 50 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85) 309
Figura 51 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 309
Figura 52 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85) 310
Figura 53 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85) 310
Figura 54 – Espectro de Massas de (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85).. 311
Figura 55 – Espectro no IV de (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86)..... 311
Figura 56 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86) 312
Figura 57 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 312
Figura 58 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86) 313
Figura 59 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86) 313
Figura 60 – Espectro de Massas de alta resolução de (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86) 314
Figura 61 – Espectro no IV de (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87)..... 314
Figura 62 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87)..... 315

Figura 63 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 315

Figura 64 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87)..... 316

Figura 65 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87)..... 316

Figura 66 – Espectro de Massas de alta resolução de (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87)..... 317

Figura 67 – Espectro na região de IV de isocariolan-9*α*-ol (82)..... 317

Figura 68 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (82)..... 318

Figura 69 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-*9α*-ol (82). Expansão da região entre δ_H 1,0 – 2,2..... 318

Figura 70 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (82)..... 319

Figura 71 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (82). 319

Figura 72 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (82). 320

Figura 73 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (82). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 320

Figura 74 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (82)..... 321

Figura 75 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (82). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 321

Figura 76 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (82)..... 322

Figura 77 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (82). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 322

Figura 78 – Espectro na região de IV de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (83)..... 323

Figura 79 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (83)..... 323

Figura 80 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (83). Expansão da região entre δ_H 0,8 – 1,80..... 324

Figura 81 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (83)..... 324

Figura 82 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (83)..... 325

Figura 83 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (83)..... 325

Figura 84 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (83). Expansão da região entre δ_C 20 – 50..... 326

Figura 85 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (83)..... 326

Figura 86 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (83). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 327

Figura 87 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (83). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 1,80..... 327
Figura 88 – Espectro na região de IV de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (88)..... 328
Figura 89 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (88)..... 328
Figura 90 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (88). Expansão da região entre δ_H 0,5 –2,5..... 329
Figura 91 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (88)..... 329
Figura 92 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (88)..... 330
Figura 93 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (88)..... 330
Figura 94 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (88). Expansão da região entre δ_H 3,0 – 3,5..... 331
Figura 95 – Espectro de Massas de alta resolução de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (88)..... 331
Figura 96 – Espectro na região de IV de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89)..... 332
Figura 97 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89)..... 332
Figura 98 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89). Expansão da região entre δ_H 1,5 – 2,5..... 333
Figura 99 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89)..... 333
Figura 100 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de 89..... 334
Figura 101 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de 89..... 334
Figura 102 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89)..... 335
Figura 103 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89)..... 335
Figura 104 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89)..... 336
Figura 105 – Espectro de Massas de alta resolução de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89)..... 336
Figura 106 – Espectro na região de IV de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90)..... 337
Figura 107 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90) 337
Figura 108 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, $CDCl_3$) de 90. Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 338
Figura 109 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90) 338
Figura 110 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90). Expansão da região entre δ_C15–50. 339

Figura 111 – Subespectro DEPT-135 (150 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90) 339
Figura 112 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90). Expansão da região entre δ_H2,5 – 4,0..... 340
Figura 113 – Mapa contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90). Expansão da região entre δ_H0,5 – 2,5. 340
Figura 114 – Espectro de NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90) 341
Figura 115 – Espectro de Massas de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (90) 341
Figura 116 – Espectro de IV de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (91)..... 342
Figura 117 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (91)..... 342
Figura 118 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (91). Expansão da região entre δ_H 1,2 – 2,0..... 343
Figura 119 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (91)..... 343
Figura 120 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (91)..... 344
Figura 121 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (91)..... 344
Figura 122 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (91)..... 345
Figura 123 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (91)..... 345
Figura 124 – Mapa de contornos NOESY(400 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (91)..... 346
Figura 125 – Espectro de Massas de alta resolução de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (91)..... 346
Figura 126 – Espectro no IV de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5, 8, 9-triol (92)... 347
Figura 127 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (92)..... 347
Figura 128 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5, 8, 9-triol (92). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,0..... 348
Figura 129 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5, 8, 9-triol (92)..... 348
Figura 130 – Subespectro DEPT- 135 (150 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (92). 349
Figura 131 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (92) 349
Figura 132 – Mapa de contornos COSY (600 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (92). 350
Figura 133 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (92). 350
Figura 134 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5, 8, 9-triol (92). 351
Figura 135 – Espectro de Massas de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (92). 351
Figura 136 – Espectro no IV de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (93)..... 352

Figura 137 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de(6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (93)..... 352
Figura 138 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (93). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 353
Figura 139 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (93). 353
Figura 140 – Mapa de contornos HSQC-DEPT – fase positiva (CH_3 e CH) (600 MHz, $CDCl_3$) de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (93)..... 354
Figura 141 – Mapa de contornos HSQC-DEPT – fase negativa (CH_2) (600 MHz, $CDCl_3$) de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (93)..... 354
Figura 142 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (93). 355
Figura 143 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (93). 355
Figura 144 – Espectro de Massas de alta resolução de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (93) 356
Figura 145 – Espectro no IV de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo [6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (94). 356
Figura 146 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (94)..... 357
Figura 147 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (94). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 357
Figura 148 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (94)..... 358
Figura 149 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (94)..... 358
Figura 150 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (94)..... 359
Figura 151 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (94)..... 359
Figura 152 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (94)..... 360
Figura 153 – Espectro de Massas de alta resolução de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (94)..... 360
Figura 154 – Espectro no IV de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (95)..... 361
Figura 155 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (95) 361
Figura 156 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (95). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 362
Figura 157 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (95) 362
Figura 158 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (95) 363
Figura 159 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (95) 363
Figura 160 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (95) 364
Figura 161 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (95). 364

Figura 162 – Espectro de Massas de alta resolução de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (95). 365
Figura 163 – Espectro no IV de (3*S*,9*R*)- isocariolano-9,3-diol (96)..... 365
Figura 164 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9,3-diol (96)..... 366
Figura 165 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9,3-diol (96). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 366
Figura 166 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9,3-diol (96). 367
Figura 167 – Subespectro DEPT-135 (150 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9, 3-diol (96) 367
Figura 168 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9, 3-diol (96)..... 368
Figura 169 – Mapa de contornos COSY (600 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9, 3-diol (96) 368
Figura 170 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9,3-diol (96)..... 369
Figura 171 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9,3-diol (96)..... 369
Figura 172 – Espectro de Massas de alta resolução de (3*S*,9*R*)- isocariolano-9,3-diol (96). 370
Figura 173 – Espectro no IV de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetil entriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97)..... 370
Figura 174 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97), ... 371
Figura 175 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97). Expansão da região entre δ_H 1,0 – 2,5..... 371
Figura 176 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97). 372
Figura 177 – Subespectro DEPT-135 (150 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97). 372
Figura 178 – Mapa de contornos COSY (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97). 373
Figura 179 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97). 373
Figura 180 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97). 374
Figura 181 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97). 374
Figura 182 – Espectro de Massas de alta resolução de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97)..... 375

Figura 183 – Espectro no IV de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (98)..... 375
Figura 184 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (98)..... 376
Figura 185 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (98). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 376
Figura 186 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,9β,12-triol (98)..... 377
Figura 187 – Mapa de contornos HSQC-DEPT – fase positiva (CH_3 e CH) (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,9β,12-triol (98)..... 377
Figura 188 – Mapa de contornos HSQC-DEPT – fase negativa (CH_2) (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (98)..... 378
Figura 189 – Mapa de contornos COSY (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,9β,12-triol (98)..... 378
Figura 190 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*, 6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (98) 379
Figura 191 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*, 6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (98). 379
Figura 192 – Espectro de Massas de alta resolução de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (98). 380
Figura 193 – Espectro no IV de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (99)..... 380
Figura 194 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (99)..... 381
Figura 195 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (99). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 381
Figura 196 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (99)..... 382
Figura 197 – Subespectro DEPT-135 (150 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (99).,..... 382
Figura 198 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) de *R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,15,12-triol (99)..... 383
Figura 199 – Mapa de contornos COSY (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*, 5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (99). 383

Figura 200 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*, 5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (99). 384
Figura 201 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*, 6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,15,12-triol (99). 384
Figura 202 – Espectro de Massas de alta resolução de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (99). 385
Figura 203 – Espectro no IV de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-12,14,15-triol (100)..... 385
Figura 204 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (100) 386
Figura 205 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (100). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5..... 386
Figura 206 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (100) 387
Figura 207 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (100) 387
Figura 208 – Mapa de contornos HSQC (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-12,14,15-triol (100) 388
Figura 209 – Mapa de contornos HMBC (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-12,14,15-triol (100) 388
Figura 210 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-12,14,15-triol (100) 389
Figura 211 – Espectro de Massas de alta resolução de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (100) 389
Figura 212 – Compostos testados no ensaio fungistático sobre *B. cinerea*..... 239
Figura 213 – Ilustração do ensaio fungistático para 0 e 72 horas..... 240
Figura 214 – Isocariolanos avaliados quanto à sua ação sobre a germinação e o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*)..... 245

PARTE 1 E 2 - ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATR	*Attenuated total reflectance*
BHI	*Brian Heart Infusion*
λ	Comprimento de onda
CE_{50}	Concentração efetiva para descolorir 50% da solução de DPPH
J	Constante de acoplamento escalar
COSY	*Correlation Spectroscopy*
CCDS	Cromatografia em camada delgada de sílica gel
CCS	Cromatografia em coluna de sílica gel
CLAE	Cromatográfica líquida de alta eficiência
δ	Deslocamento químico
Φ	Diâmetro interno
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DMSO	Dimetilsulfóxido
DEPT	*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
DL_{50}	Dose mínima letal para 50% dos indivíduos
dd	Dupleto duplo
EEB	Extrato etanólico bruto
TAS	Ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*: expresso em µg/mL
Rf (s)	Fator(es) de retenção
g	Grama (s)
g/L	Gramas/Litro
ºC	Graus celsius
ºGL	Graus Gay-Lussac
HMBC	*Heteronuclear Multiple bond Coherence*
IV	Infravermelho
MHz	Mega-Hertz
m	Multipleto
nm	Nanômetro
p/v	Peso/volume
q.s.p.	Quantidade suficiente para
q	Quarteto
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
TCNE	Tetracianoetileno
$Sn(OTf)_2$	Triflato de estanho
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

RESUMO

O presente trabalho consta de duas partes.

Na Parte 1 é descrito o estudo fitoquímico do mesocarpo e epicarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), sendo a primeira vez que esta parte da planta é estudada. Foram isoladas seis substâncias puras, sendo elas, galato de etila, 5-hidroximetilfurfural, ácido gálico, chiquimato de metila, galato de metila e quatro misturas, *β-D*-frutopiranose e *β-D*-frutofuranose, *α*- e *β-D*-glicose, lupeol e ácido oléico, *β*-sitosterol e estigmasterol, contaminados com o ácido oléico.

Foram avaliadas as atividades citotóxica, antioxidante, alelopática e antimicrobiana sobre o extrato bruto, frações e substâncias puras.

Na Parte 2 desta tese foram feitas transformações químicas e biotransformações (pela utilização do fungo *B. cinerea*) de isocariolanos. Foram isolados 11 produtos de transformação química, sendo eles, 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno, (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol, isocariolan-9-ona,(1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano-8-carbaldeído,(8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol, isocariolan-9*α*-ol, (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano, (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol, (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol, (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol, (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol e 13 novos produtos de biotransformação, sendo eles, (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9,15-diol, (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol, (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol, (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol, (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-5,8,9-triol, (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol, (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo [6.3.1.$0^{2,5}$]dodecan-9-ona, (15*R*,9*R*)-isocariolan-9,15-diol, (3*S*,9*R*)-isocariolan-9,3-diol, (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,12-diol, (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol,(1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol, (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol.

Foram realizados testes de avaliação das atividades fungistática e alelopática sobre alguns dos derivados isocariolânicos isolados.

ABSTRACT

This Thesis consists of two parts.

In Part 1, the phytochemical study of mesocarpe and external epicarpe of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) and their biological activity are described.

This study led to the isolation of six pure compounds, ethyl gallate, 5-hydroxymethylfurfural, gallic acid, methyl shikimate, methyl gallate and four mixtures, *β*-D-fructopiranose and *β*-D-fructofuranose, *α*- and *β*-D-glucose, lupeol and oleic acid, *β*-sitosterol and stigmasterol, contaminated with oleic acid.

Biological assays for citotoxic, antioxidant, antimicrobial and allelopathic activities were carried out for the crude extract, fractions and pure substances.

In Part 2 of this thesis we describe chemical transformations and biotransformations (by using the fungus *B. cinerea*) of isocariolane compounds, resulting in 11 new products of chemical transformations, 5α-hidroxycaryophylla-4(12),8(13)-diene, (8*R*,9*R*)-8-methoxyisocariolan-9-ol, isocaryolan-9-one, (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetyltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecane-8-carbaldehyde, (8*R*,9*R*)-isocaryolan-8,9-diol, isocaryolan-9*α*-ol, (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hydroxymethyl-1,4,4-trimethyltricicle[6.2.1.$0^{2,5}$]undecan, (8*R*,9*R*)-8-etoxyisocariolan -9-ol, (8*R*,9*R*)-8-propoxyisocariolan-9-ol, (8*R*,9*R*)-8-butoxyisocariolan-9-ol, (8*R*,9*R*)-8-pentoxyisocariolan-9-ol and 13 new biotransformation products, (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxyisocariolan-9,15-diol, (3*S*,8*R*,9*R*)-isocaryolan-3,8,9-triol, (4*R*,8*R*,9*R*)-isocaryolan-8,9,15-triol, (6*R*,8*S*,9*R*)-isocaryolan-6,8,9-triol, (2*R*,5*S*, 8*R*,9*R*)-isocaryolan-5,8,9-triol, (6*S*,8*S*,9*R*)-isocaryolan-6,8,9-triol, (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hydroxymethyl-1,4-dimethyltricycle[6.3.1.$0^{2,5}$]dodecan-9-one, (15*R*,9*R*)-isocaryolan-9,15-diol, (3*S*,9*R*)- isocaryolan-9,3-diol, (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-methyl-4,4,8-trimethylentricycle[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,12-diol, (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-methyl-4,4,8-trimethylentricycle[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol, (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*, 8*S*)-1-methyl-4,4,8-trimethylentricycle[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol, (1*S*,2*S*,5*R*, 8*S*)-1-methyl-4,4,8-trimethylentricycle[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol .

Bioassays to evaluate fungistatic and allelophatic activities of some isoariolanes isolated were carried out.

PARTE 1

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1 Introdução

Cerrado é o nome regional dado às savanas brasileiras, que distribuí-se sobre cerca de 85% do grande platô que ocupa o Brasil Central, representando cerca de 1,5 a 2 milhões de km^2, ou aproximadamente 20% da superfície do Brasil. Trata-se de um das principais áreas de ecossistemas tropicais da Terra, sendo um dos centros prioritários ("hot spots") para a preservação da biodiversidade do planeta[1].

Estudos recentes estimam em cerca de cinco mil o número de plantas vasculares do cerrado; dentre elas, algumas espécies características frutíferas tais como mangaba, araticum ou marolo, guabiroba, pequi e espécies medicinais barbatimão, carobinha e catuaba podem ser citadas. Entretanto, tem havido uma redução dramática da biodiversidade deste ecossistema, principalmente devido à expansão das atividades agropecuárias. Embora tais atividades sejam importantes, inclusive sob o ponto de vista econômico, a perda desta biodiversidade tão peculiar precisa ser evitada[2].

A pequena família Caryocaraceae, distribuída em toda a América Central e do Sul, pertence a este bioma e é composta por 25 espécies, distribuídas em dois gêneros, *Caryocar* e *Anthodiscus*. Este último apresenta nove espécies, que têm sido utilizadas, principalmente, como fonte de madeira. Nenhum estudo fitoquímico foi relatado para as espécies deste gênero. Já as espécies do gênero *Caryocar* apresentam potencial para se tornarem importantes economicamente: os frutos são frequentemente utilizados como fonte de óleo; além disso, estes frutos são altamente nutritivos e são utilizados na preparação de sucos e licores; as sementes também são utilizadas na manufatura de sabonetes, e a madeira, resistente e durável, é empregada na construção de barcos[3, 4].

Kawanish e Raffauf (1986)[5] relatam a atividade repelente, se não tóxica, das folhas de *C. microcarpum* contra formigas cortadoras de folhas, relatam também o uso dessas folhas pelos índios do noroeste do Amazonas e o uso da polpa do fruto de *C. glabrum*, *C. gracile* e *C. microcarpum* como veneno para peixes, estes usos podem ser atribuidos à presença de saponinas nestas partes da planta[5].

As folhas de *C. microcarpum* apresentam altos teores de galataninos, juntamente com os ácidos elágico (**1**) e gálico (**2**) e galato de metila (**3**); além disso, glicosídeos do ácido oleanóico e seus derivados hidroxilados, como o ácido 2*β*-hidroxioleanólico (**4**), a hederagenina (**5**) e a baiogenina (**6**) (Figura 1, p. 4) também

são encontrados nas folhas de *C. microcarpum*[5] (Figura 1). O extrato etanólico das folhas e galhos desta espécie revelou, por CCDS e reveladores específicos, a presença de triterpenos, flavonóides e 3',4'-di-hidroxiflavonóis[6].

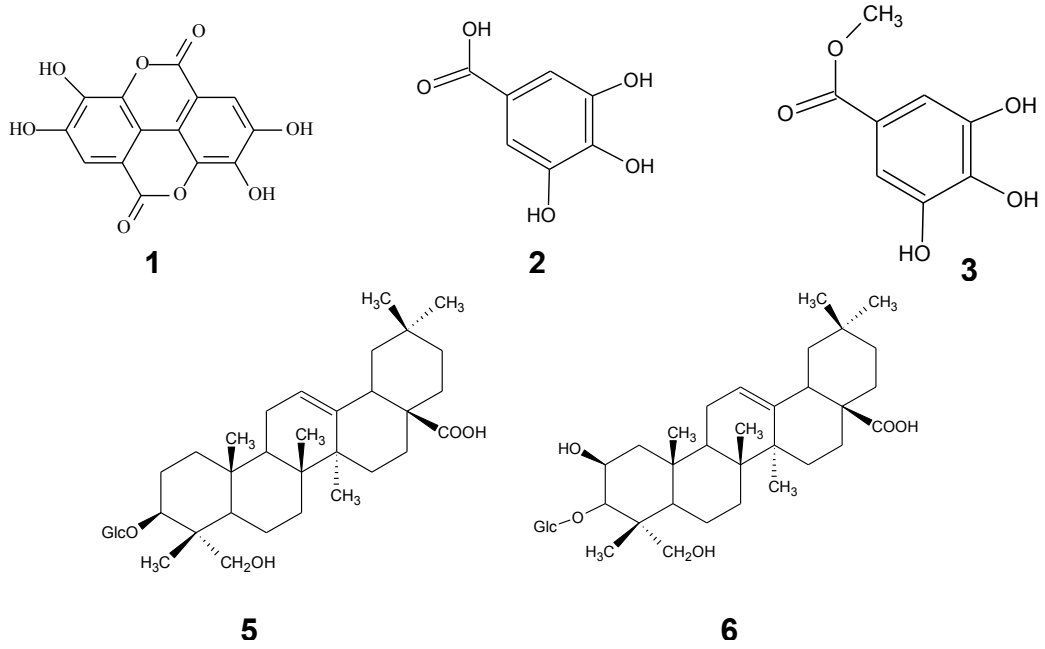


Figura 1 – Alguns constituintes das folhas de *C. microcarpum.*

Em estudo feito com os frutos da espécie *C. villosum* (Aubl.) Pers., foi detectado que estes apresentam em torno de 64,5% de conteúdo lipídico, 33,5% de ácido palmítico (**7**), 29,5% de ácido oléico (**8**), 3,1% de carboidratos, 0,1% de *β*-sitosterol (**9**), 0,1% de estigmasterol (**10**) (Figura 2, p. 5), 0,6% de esteróides totais e 0,1% de cálcio referente ao peso seco. Através do método por arraste de vapor, foram obtidos componentes voláteis tais como, 2-heptanona (19,3 %), o furfural (**11**) (14,6%), o α-bisaboleno (**12**) (18,1%) e o (E)-nerolidol (**13**) (19,8%), em relação ao total de componentes voláteis extraídos[7] (Figura 2, p. 5).

O óleo da polpa de *C. coriaceum* contém 56,3% de ácido oléico (**8**), 27,6% de ácido palmítico (**7**), além dos ácidos linoléico (**14**) (5,2%) e linolênico (**15**) (4,4%), em menor quantidade[8] (Figura 2, p. 5). Outro estudo avaliando a composição de ácidos graxos na polpa do *C. coriaceum*, apresentou maior concentração de **8** (55,8 %) e **7** (34,2%), valores estes, similares aos encontrados na manteiga de cacau[9].

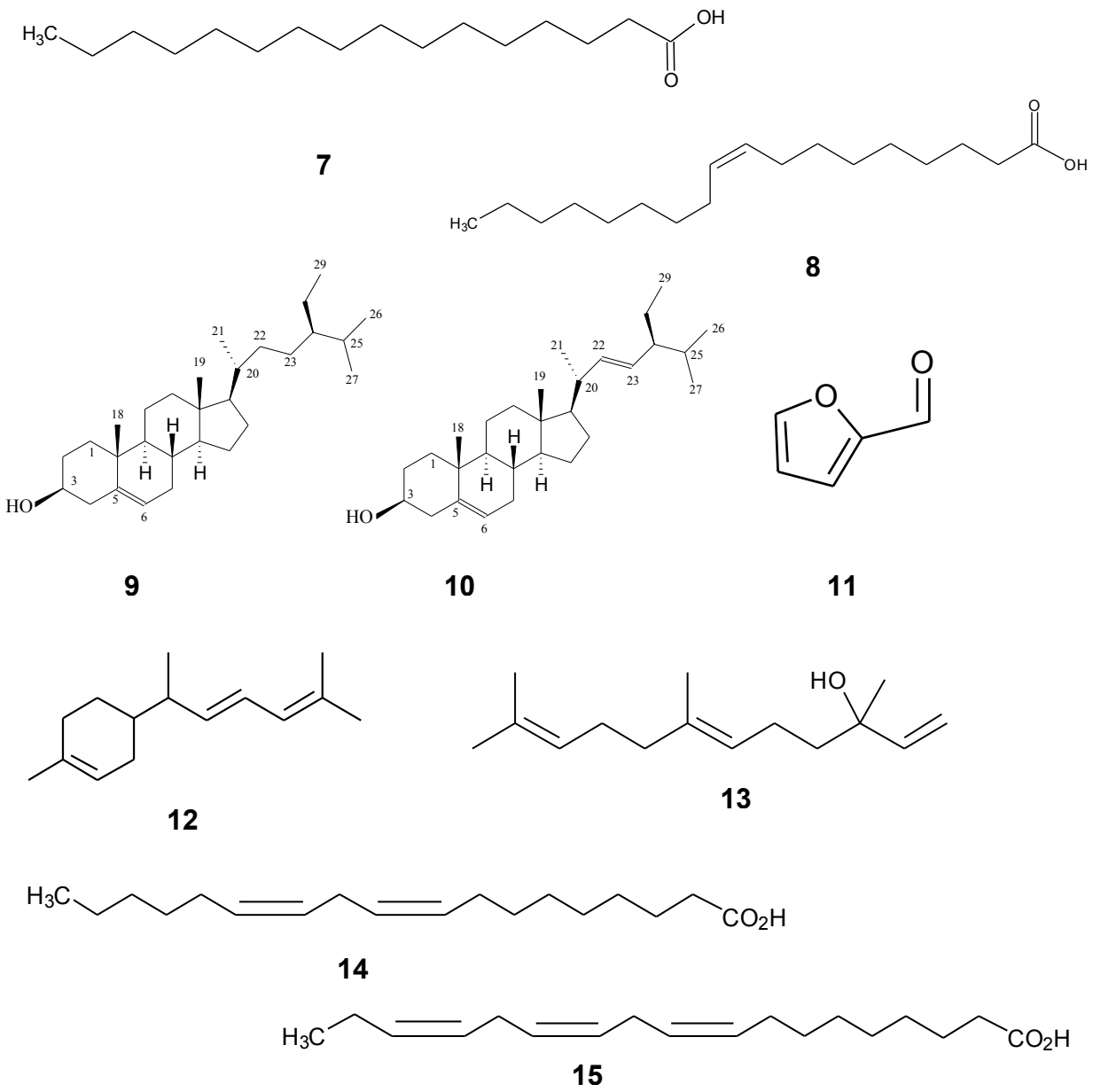


Figura 2 – Alguns constituintes dos frutos de *C. villosum* e polpa de *C. coriaceum.*

Nos frutos e nas cascas do caule de *C. villosum,* e nos frutos de *C. glabrum* foram encontradas saponinas triterpênicas[10,11,12]. Em outro estudo, foi relatado o isolamento de sete novos glicosídeos fenólicos, a partir de cascas do caule, dois deles de *C. villosum* e cinco de *C. glabrum*[13], além de duas di-hidroisocumarinas glicosiladas a partir das cascas do caule de *C. glabrum* [14].

A espécie *Caryocar brasiliense* Camb., conhecida popularmente como pequizeiro, merece destaque pela importância comercial, nutricional, gastronômica e

medicinal de seu fruto, o pequi. As pesquisas sobre o pequi têm aumentado nos últimos anos, principalmente quanto aos aspectos fitoquímicos e biológicos[15].

Seu fruto é muito utilizado na culinária da região central do Brasil, sendo um importante elemento na complementação alimentar de diversas dietas na nutrição de toda uma população. A polpa do fruto do pequi é comestível depois do cozimento, e é rico em vitaminas, lipídeos e proteínas. Esta parte do fruto, é geralmente utilizada no cozimento de arroz e de frango, fornecendo um aroma intenso. Também é utilizado, na fabricação de doces caseiros e licores conhecidos como “licor de pequi”[16].

Além disso, o fruto e as folhas são utilizados, na medicina popular, no tratamento de várias enfermidades: as folhas e o óleo da polpa, no tratamento de resfriados, gripes e edemas; o óleo do fruto é também utilizado no tratamento de bronquites, tosses e queimaduras; a semente é usada como afrodisíaca, e no tratamento de resfriados[17], além de ser utilizada como cicatrizante em ferimentos, contusões e inchaços[18]. O chá das folhas é utilizado como regulador menstrual[16].

Na indústria cosmética, a amêndoa do pequi, devido à alta porcentagem de óleo que contém e por suas características químicas, é utilizada na produção de sabonetes e cremes[19]. A casca e as folhas possuem altos teores de taninos, sendo matéria-prima para a fabricação de tinturas[20]. A madeira da árvore, por ser resistente e durável, é empregada na fabricação de móveis, na construção civil e também na produção de carvão vegetal, que tem sido largamente explorado[21].

O fruto é globoso, do tipo drupóide (com 3,2 x 6,5 a 7,8 cm), verde, possuindo de 1 a 4 pirênios (Figura 3, p. 7). Este fruto é uma estrutura composta pelo epicarpo fino, pelo mesocarpo externo (coriáceo carnoso), mesocarpo interno (amarelo-claro, carnoso, rico em óleo, vitaminas e proteínas), que envolve uma camada de espinhos endocárpicos, finos e rígidos, com 2 a 5 mm de comprimento, e amêndoa branca ou semente (Figura 3, p. 7). O conjunto mesocarpo interno, endocarpo espinhoso e semente constituem o pirênio. Tanto os frutos jovens como os maduros possuem o epicarpo com coloração verde, mas os maduros exalam forte aroma, o qual constitui a sua característica mais significativa[15].

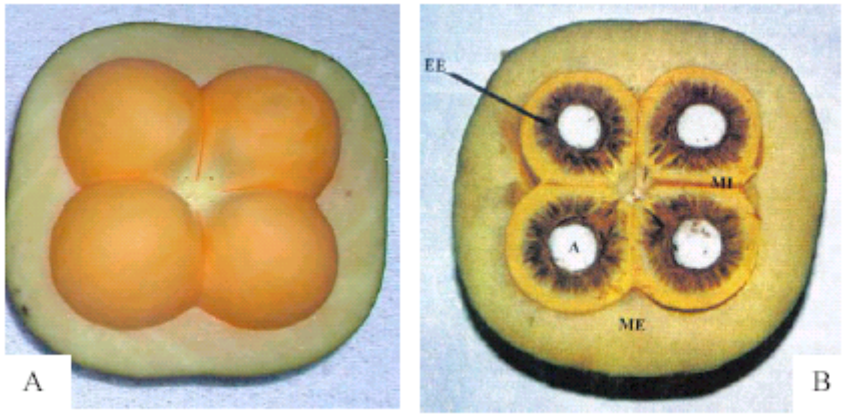


Figura 3 – Ilustração do fruto de *Caryocar brasiliense* Camb. (A), com o corte transversal (B): mesocarpo externo (ME), mesocarpo interno (MI),endocarpo lenhoso ou espinhoso (EE) e amêndoa (A). Fonte: Damiani, 2006[15].

Em estudos fitoquímicos já realizados sobre partes de *C. brasiliense,* a presença de ácido elágico (**1**), β-amirina (**16**), ácido oleanólico (**17**), friedelina (**18**) (Figura 4) e mistura de β-sitosterol (**9**) e estigmasterol (**10**), é relatada nas folhas[22]. A análise dos extratos etéreo, etanólico e aquoso das folhas de *C. brasiliense*, obtidos pela utilização de marcha química, revelou a presença de heterosídeos antociânicos, saponinas, taninos, antraquinonas, flavonóides, esteróides, alcalóides e osídeos redutores[18].

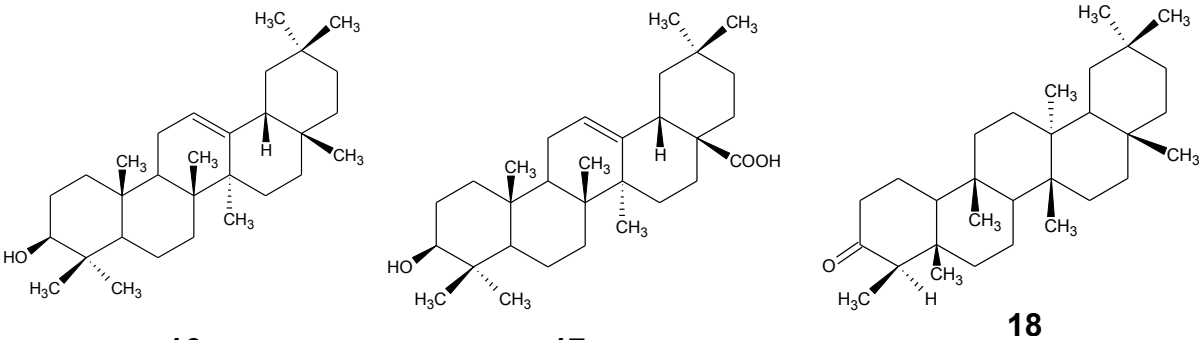
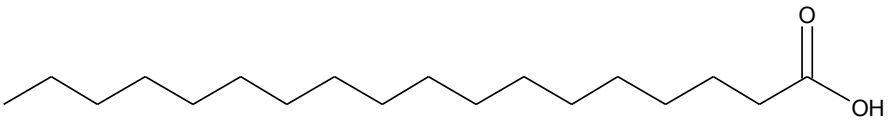


Figura 4 – Alguns constituintes das folhas de *C. brasiliense.*

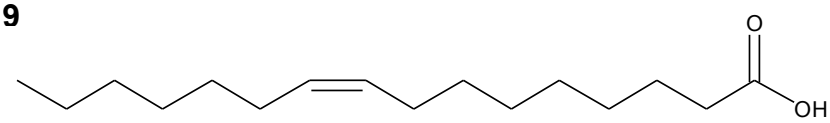
Os quatro componentes majoritários encontrados na amêndoa de *C. brasiliense* foram lipídios (51,5%), proteínas (25,3%), carboidratos (8,3%) e fibra alimentar (2,2%). Tanto na polpa, quanto na amêndoa, pode ser observado o predomínio dos ácidos graxos insaturados, com 61,4% e 52,2%, respectivamente.

O ácido oléico (**8**) está presente em maior concentração na polpa, com 55,8%, seguido pelo ácido palmítico (**7**) (35,2%). Na amêndoa, predominam os ácidos **8** e **7** em quantidade similares, 43,6% e 43,8%, respectivamente. Também estão presentes, o ácido linoléico (**14**) 5,5%, esteárico (**19**) 2,0%, palmitoléico (**20**) 1,2% (Figura 5), sendo detectados em menores quantidades outros ácidos graxos[23]. Assim, tanto a polpa como a amêndoa do pequi, possuem ácidos graxos importantes para compor uma dieta saudável.

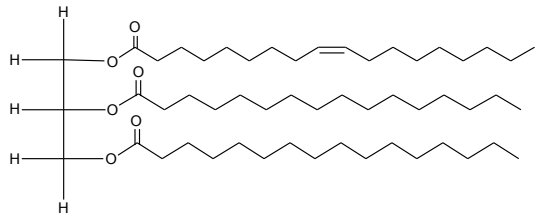
Os valores de triglicerídeos, também foram determinados na polpa do pequi, e como compostos majoritários, observaram-se o dipalmitato oleato de glicerila (**21**) (46,4%) e o palmitato dioleato de glicerila (**22**) (47,8%) (Figura 5)[24, 25].



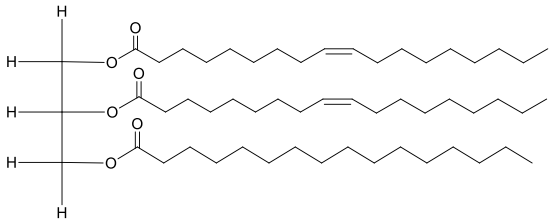
19



20



21



22

Figura 5 – Ácidos graxos presentes na amêndoa e triglicerídeos majoritários presentes na polpa de *C. brasiliense.*

Os pirênios provenientes do sul e do norte de Minas Gerais apresentam composições centesimais diferentes: 49,2% e 59,1% de umidade, 4,2% e 2,2% de proteína, 20,5% e 25,1% de gordura, 0,4% e 0,5% de cinzas, 6,8% e 4,9% de fibras e 18,9% e 8,2% de glicídios, fornecendo um total energético de 267,9 kcal e 267,5 kcal, respectivamente; no que diz respeito aos teores de fibra, apresentaram 13,4% e 19,6 % de carboidratos[15].

A amêndoa do pequi é rica em vitamina A (**23**) (47,2%), sendo, portanto, um importante elemento na complementação alimentar e na nutrição de toda uma popu-

lação. O mesocarpo interno também apresenta alto teor de carotenos (120,1 mg.100 g^{-1}), e vitaminas, tais como, riboflavina (**24**) e tiamina (**25**). Contém, ainda, 78,3 mg.100 g^{-1} de vitamina C (**26**) (Figura 6), valor acima daqueles de quatro frutas tradicionalmente cultivadas e consumidas pela população brasileira: a laranja 'pêra' (40,9 mg.100 g^{-1}), o limão (26,4 mg.100 g^{-1}), a banana 'd'água' (6,4 mg.100 g^{-1}) e a maçã 'argentina' (59,2 mg.100 g^{-1})[15].

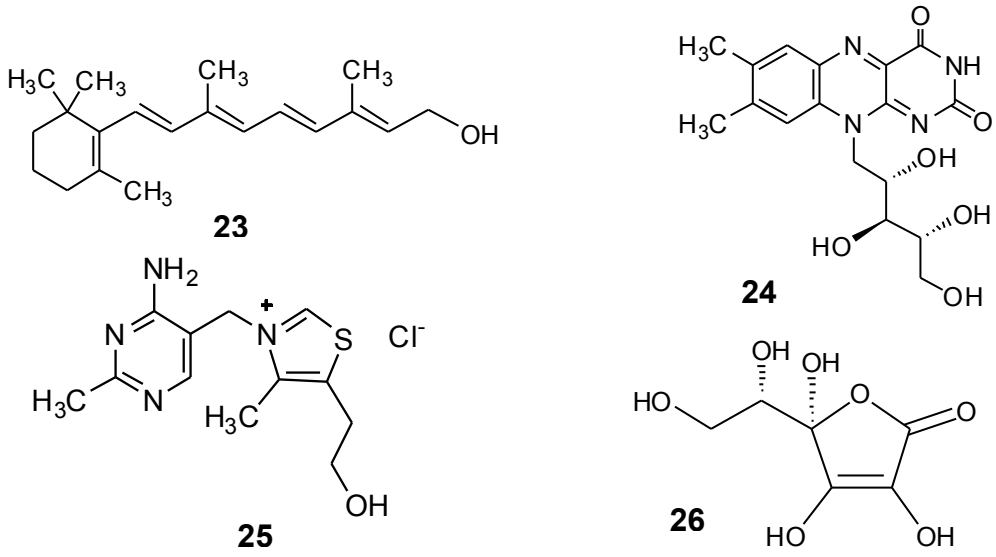


Figura 6 – Alguns constituintes dos frutos de *C. brasiliense.*

O valor médio de carotenóides no mesocarpo interno cru é de 231,1 mg.100 g^{-1}. Entre os pigmentos, a anteraxantina (**27**) foi encontrada em maior porcentagem (40,5%), seguida pela zeaxantina (**28**) (34,2%), criptoflavina (**29**) (7,7%), β-criptoxantina (**30**) (5,3%), γ-caroteno (**31**) (4,1%) e mutatoxantina (**32**) (1,9%) (Figura 7, p. 10)[15,26].

Outros carotenóides, tais como α (**33**) e β (**34**) carotenos (Figura 7, p. 10), também foram encontrados no fruto do pequi[27,28]. Estes metabólitos impedem a lipoperoxidação, evitando desta maneira a formação de radicais livres, conferindo proteção à pele e, conseqüentemente, retardando o envelhecimento cutâneo. Além do mais, dietas ricas em carotenóides, estão associadas à redução do risco de incidência de tumores, doenças cardiovasculares e problemas oftalmológicos[29].

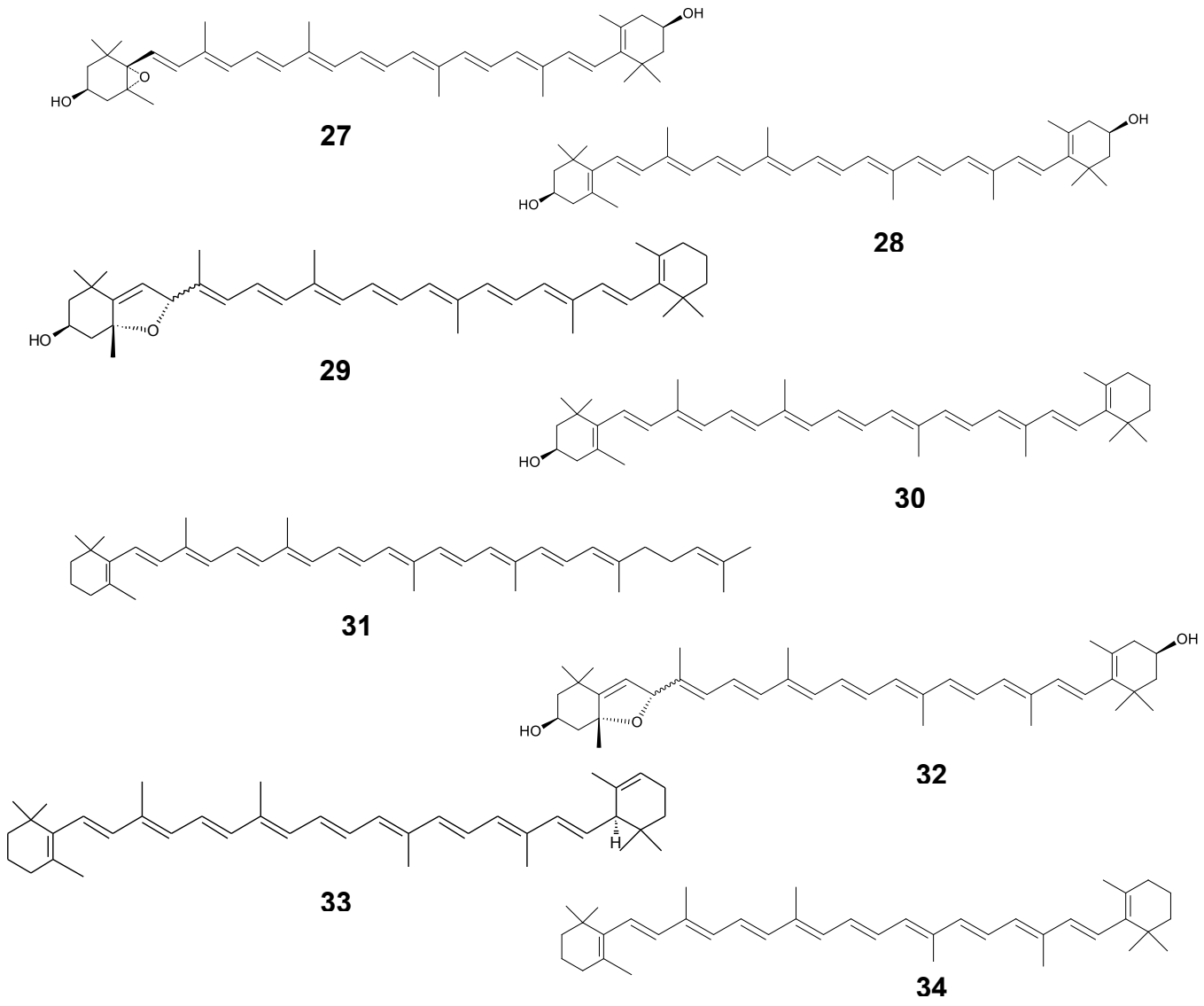


Figura 7 – Alguns carotenóides presentes na polpa de *C. brasiliense.*

Quanto aos minerais, o mesocarpo interno do pequi, coletado em Goiás, apresentou Na (20,9 μg.g^{-1}), Fe (15,6 μg. g^{-1}), Mn (5,7 μg. g^{-1}), Zn (5,3 μg. g^{-1}), Cu (4,2 μg. g^{-1}), Mg (0,1 μg. g^{-1}), P (0,1 μg. g^{-1}) e K (0,2 μg. g^{-1}), sendo que a amêndoa apresentou Na (3,0 μg. g^{-1}), Fe (26,8 μg. g^{-1}), Mn (14,4 μg. g^{-1}), Zn (53,6 μg. g^{-1}), Cu (15,9 μg. g^{-1})[15,30, 31].

A composição dos compostos voláteis na polpa do fruto, assim como aquela das amêndoas e das folhas de *C. brasiliense* foram analisadas. A polpa do fruto apresentou, como componente majoritário o hexanoato de etila (**35**) (52.9 %) e como componentes minoritários o 2-hexenoato de etila (**36**) (6,1%), o octanoato de etila (**37**) (4,6%) e 2-octenoato de etila (**38**) (5,4%) (Figura 8, p. 11). Estes ésteres são os responsáveis pelo intenso aroma apresentado pelo fruto do pequi[32].

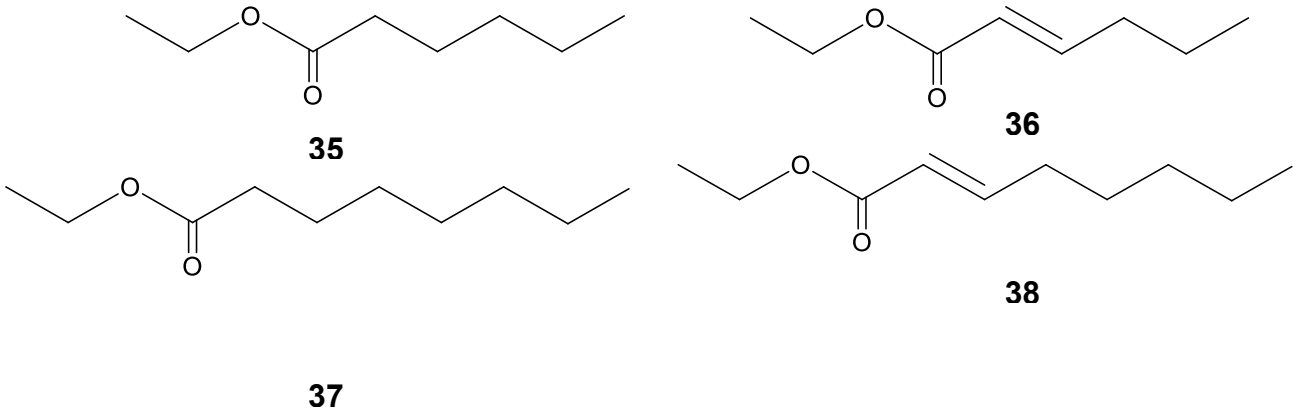


Figura 8 – Componentes voláteis presentes na polpa do fruto e na amêndoa de *C. brasiliense.*

De maneira análoga, as amêndoas apresentaram como composto majoritário, o éster **35**, porém em maior concentração (70,9 %) em comparação com a polpa do fruto e, como composto minoritário, o octanoato de etila (**37**) (4,6%). Nas folhas de *C. brasiliense* foram detectados o heptadecano (14,9 %), o hexadecanol (15,5%) e o octacosano (9,3%), como componentes voláteis majoritários[33].

A polpa do pequi apresenta 209mg/100g de fenólicos totais, valores superiores aos encontrados na maioria das polpas de frutas consumidas no Brasil, como: açaí com 136,8 mg/100g; goiaba com 83,1 mg/100g; graviola com 84,3 mg/100g, sendo inferior apenas à acerola com 580,1 mg/100g e a manga com 544,1 mg/100g[23]. Esses resultados indicam que a polpa do pequi é um alimento com elevada capacidade antioxidante, tendo em vista a correlação existente entre a quantidade de fenólicos totais e a atividade capturadora de radicais livres do composto[34].

Diversas atividades biológicas são relatadas para o óleo extraído a partir do mesocarpo interno do pequi: antifúngica[35], contra gripes e doenças pulmonares[36,37]. O ácido oleanólico (**17**), presente no óleo, apresentou habilidade de inibir o crescimento de sarcoma 180 de rato[38].

O extrato etanólico das cascas do pequizeiro apresentou atividade contra o *Trypanosoma cruzi.* Assim, este extrato pode vir a ser usado como uma nova alternativa no controle da doença de Chagas[39].

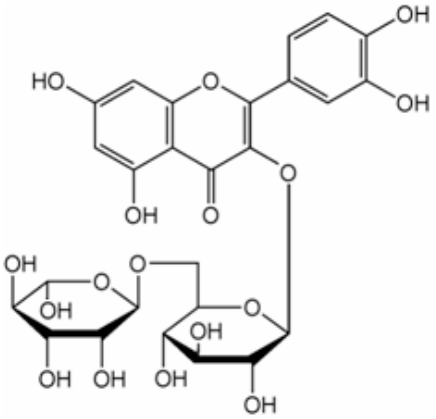
Bezerra e colaboradores[40], ao investigarem a atividade moluscicida de plantas medicinais do cerrado, demonstraram que os extratos brutos etanólicos preparados

das cascas e das folhas de *C. brasiliense*, possuem atividade tóxica contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, agente causador da esquistossomose. O extrato etanólico da cera da superfície epicuticular das folhas *C. brasiliense* apresentaram elevada atividade antifúngica sobre *C. neoformans*[35].

O efeito tóxico dos extratos metanólico e etanólico, obtidos a partir das folhas e dos botões florais, do mesocarpo externo e interno do fruto de *C. brasiliense* sobre fungos fitopatogênicos das espécies *Botrytis cinerea, Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum* foi avaliado, sendo observado um estímulo no crescimento destes fungos[41].

O potencial alelopático dos extratos metanólicos de folhas e raízes do pequizeiro, foi avaliado por Moreira e colaboradores[42], em ensaios de germinação, desenvolvimento da raiz e da parte áerea de *Panicum maximum* e *Amaranthus sp*. Foi demonstrado que ambos extratos influenciaram significativamente tanto no desenvolvimento fisiológico de *Panicum maximum*, alterando o crescimento da raiz e da parte aérea em relação aos controles, como no processo germinativo de *Amaranthus sp.*

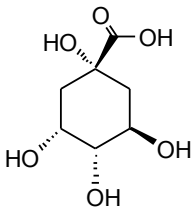
Paula-Junior e colaboradores[43] avaliaram as atividades bactericida, leishmanicida e antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de *C. brasiliense*. Observou-se que este extrato foi ativo contra todas bactérias patogênicas testadas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*), apresentando maior atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Este extrato também apresentou elevada atividade leishmanicida, inibindo a proliferação da forma promastigota *L. amazonensis*, sendo este efeito superior àquele do controle, glucantime, o qual é utilizado no tratameto da leishmaniose. A atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas do pequi, foi avaliada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), e apresentou elevada atividade quando comparada com a vitamina C e a rutina (**39**) conhecida como vitamina P[43].



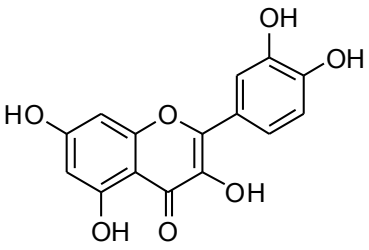
39

Roesler e colaboradores[44] avaliaram a atividade capturadora de radicais livres, pelo método DPPH, dos extratos aquoso e etanólico da polpa, das sementes e das cascas, de diferentes frutas do cerrado, o ariticum, a lobeira, a cagaita, o pequi, conhecidas e consumidas principalmente pela população nativa desta região. Os extratos aquoso e etanólico da casca do pequi apresentaram IC_{50} igual a 9,4 e 17,9 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente; o extrato etanólico das sementes da cagaita apresentou IC_{50} igual a 14,2 $\mu g.mL^{-1}$; o extrato etanólico das sementes e da casca do araticum um IC_{50} igual a 30,9 e 49,2 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente, sendo utilizado como referência, o ácido gálico (**2**), que apresentou IC_{50} igual a 1,4 $\mu g.mL^{-1}$ [44].

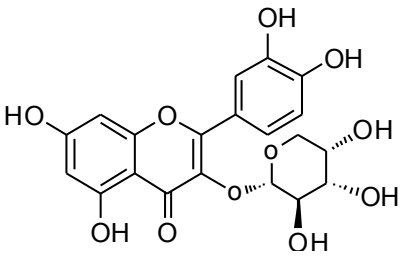
A elevada atividade antioxidante observada nas cascas do pequi foi novamente confirmada no ano seguinte por Roesler e colaboradores[45], que identificaram no extrato etanólico do pequi, por ESI(-)MS/MS, os compostos fenólicos, ácido gálico (**2**), ácido quínico (**40**), quercetina (**41**) e quercetina-3-O-arabinose (**42**).



40



41



42

Na avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso e das frações contendo derivados fenólicos provenientes da polpa do pequi, pela utilização dos métodos de co-oxidação do β-caroteno e do teste Rancimat, Lima e Mancini-Filho[46] evidenciaram elevada atividade antioxidante deste extrato e das frações, quando comparados ao padrão comercial butil-hidroxitolueno (BHT).

Miranda-Vilela e colaboradores[47,48] investigaram o efeito antioxidante do óleo de pequi contra danos oxidativos no DNA e em células musculares e hepáticas de voluntários corredores do Distrito Federal. Este estudo mostrou que o óleo de pequi forneceu proteção contra os danos no DNA, sendo também eficiente na proteção da musculatura contra traumatismos decorrentes da corrida. Além do mais, a queda dos valores da pressão arterial, de colesterol total e LDL, sugeriu que o óleo do pequi possui efeitos cardiovasculares protetores.

A casca verde (epicarpo) e o mesocarpo externo do fruto do pequi, que envolvem o pirênio constituem um volumoso resíduo ao qual poder-se-ia agregar valor, o que poderia refletir de forma extremamente positiva sobre a economia e o desenvolvimento locais.

1.2. Objetivos deste trabalho

O objetivo deste trabalho foi a avaliação do epicarpo e mesocarpo externo do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) ainda não estudados, sob o seguinte ponto de vista:

- isolamento e identificação dos constituintes do epicarpo e mesocarpo externo do pequi, biomonitorados por testes de atividades antibacteriana, antifúngica, alelopática, antilarvicida (TAS) e antioxidante.

CAPÍTULO 2

Parte Experimental

2.1 Técnicas instrumentais e cromatográficas

2.1.1 Cromatografia em camada delgada de sílica (CCDS)

Na preparação das cromatoplacas utilizou-se suspensão de sílica gel Merck 60G em água [8,0 g para 15,0 mL (p/v)], formando uma camada de 0,25 mm de espessura, sobre suporte de vidro. Após secagem parcial à temperatura ambiente, as placas foram ativadas em estufa a 100 °C/ 60 minutos.

2.1.2 Cromatografia em coluna

2.1.2 .1 Sílica gel 70-230 mesh da Merck

Para separações cromatográficas em coluna a proporção entre amostra e fase estacionária foi, em geral, 1:30. Foram utilizadas colunas de vidro, de diversos diâmetros e eluídas à pressão normal.

2.1.2.2 Poliamida (< 0,07 mm) da Macherey Nagel

Uma quantidade suficiente de poliamida foi mantida em contato com água por 24 horas. Após este período, a suspensão foi empacotada em coluna de vidro e eluída com o solvente (água) até total decantação da fase estacionária. A amostra foi solubilizada em água e aplicada no topo da coluna, e então eluída inicialmente com água (obedecendo-se uma escala gradativa decrescente de polaridade) até acetato de etila.

2.1.3 Reagentes para revelações cromatográficas

2.1.3.1 Iradiação de luz ultravioleta

Utilizou-se lâmpada UV no comprimento de onda 254 nm.

2.1.3.2 Vapores de iodo (revelador geral)

A cromatoplaca foi colocada em uma câmara fechada em contato com vapores de iodo (revelador geral).

2.1.3.3 Solução ácida de sulfato cérico (revelador geral)

Sulfato cérico (4,2 g) foi dissolvido em 500 mL de água destilada, seguido da adição de 2,8 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi aquecida até a dissolução do sólido e, após resfriamento, o volume foi completado para 1000 mL, com água destilada. A cromatoplaca é borrifada com esta mistura e aquecida a 100 °C.

2.1.3.4 Anisaldeído /H_2SO_4 (revelador geral)

O reagente é constituído por duas soluções:

Solução A: Solução de 2 % de anisaldeído em ácido acético.

Solução B: Solução etanólica de H_2SO_4 a 20 %.

Procedimento: Pulveriza-se a placa cromatográfica com a solução A e, em seguida, com a solução B. Após, aquece-se a placa a 100 °C.

2.1.3.5 Reagente de Liebermann Bourchard (específico para triterpenos pentacíclicos e esteróides)

Foram misturadas, sob refrigeração, 5 mL de anidrido acético, 5mL de ácido sulfúrico concentrado e 50 mL de etanol.

A cromatoplaca foi pulverizada com a solução acima e, em seguida, aquecida a 100 ºC.

2.1.4 Critérios de pureza

As substâncias foram consideradas puras por observação de mancha única em CCDS, pontos de fusão e por análise dos espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C.

2.1.5 Métodos espectrométricos

2.1.5.1 Espectrometria na região do Infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos em aparelho Spectrum One, Perkin-Elmer (Laboratório de Química Farmacêutica, FAFAR, UFMG), com sistema ATR.

2.1.5.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^{1}H, RMN de ^{13}C e subespectros DEPT 135 foram obtidos em espectrômetros da Bruker DPX-200 e DRX-400, linha AVANCE do De-

partamento de Química-ICEx-UFMG. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade δ e as constantes de acoplamento escalar *J* fornecidas em *Hz*. O tetrametilsilano, TMS, foi usado como padrão de referência interno. Como solventes, foram utilizados clorofórmio, piridina, metanol e água deuterados.

2.2 Obtenção do extrato etanólico do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb.

O epicarpo e mesocarpo externo do pequi foram separados do fruto, lavados e imediatamente triturado em etanol, utilizando-se um liquidificador, tendo em vista a rápida oxidação do material. Este material (1,5 Kg) foi, então, deixado em contato com o etanol, a frio, durante cinco dias. A parte insolúvel foi filtrada e o solvente evaporado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, fornecendo 256,0 g de extrato etanólico bruto (**EEB**), que foi armazenado em frasco de vidro e conservado em geladeira.

2.2.1 Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) de *Caryocar brasiliense Camb.*

Parte do extrato etanólico bruto **EEB** (130,0 g) foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna de poliamida (106,0 g, Φ= 5,0 cm). Foram recolhidas 28 frações de aproximadamente 100 mL, utilizando-se um gradiente decrescente de polaridade de solventes (Tabela 1).

Tabela 1 – Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto (**EEB**) do epicarpo e mesocarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb.

Eluentes	Frações
Água	1 – 4
Água/ metanol (1:1)	5 – 11
Metanol	12 – 19
Metanol/ acetato de etila (1:1)	20 – 25
Acetato de etila	26 – 28

Estas frações foram reunidas em grupos (Tabela 2), mediante análise comparativa das frações, por CCDS, utilizando-se diversos sistemas de eluentes e pela utilização de iodo, sulfato cérico e anisaldeído/H_2SO_4 como reveladores.

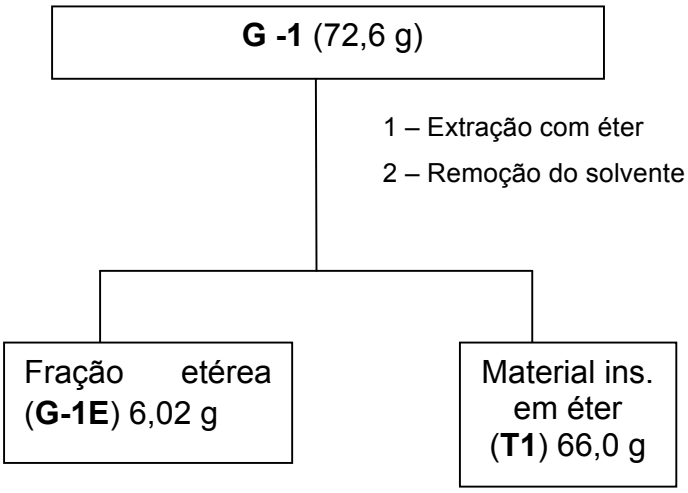
Tabela 2 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato etanólico bruto (**EEB**) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb., de acordo com comportamento em CCDS

Grupos	Frações	Massa (g)
G – 1	1 – 10	92,6
G – 2	11	10,0
G – 3	12	8,0
G – 4	13 - 18	3,2
G – 5	19 - 28	0,6

Os grupos, **G-1** (92,6 g), **G-2** (10,0 g) e **G-3** (8,0 g), apresentaram-se como materiais resinosos e foram analisados por CCDS, mostrando-se como misturas complexas. O grupo **G-1** foi submetido a extração com éter etílico e os grupos **G-2** e **G-3** foram submetidos à recromatografia em coluna de sílica gel. Os demais grupos não foram trabalhados.

2.2.1.1 Partição do grupo G-1 proveniente da cromatografia em poliamida do extrato etanólico bruto (EEB)

Parte do material (72,62 g) de **G-1** foi extraído com éter etílico. Este solvente foi adicionado ao material, sendo a parte insolúvel em éter obtida por filtração. Após a remoção do solvente, obteve-se 6,0 g da fração etérea (**G-1E**) e 66,0 g de material insolúvel em éter (**T1**) (Esquema 1, p. 20).



Esquema 1: Extração do grupo **G-1** com éter etílico.

2.2.1.1.1 Fracionamento da fração etérea (G-1E) de *Caryocar brasiliense* Camb.

Toda fração **G-1E** (6,02 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (180,0 g, Φ= 3,0 cm), sendo usados, como eluentes, misturas de diclorometano, metanol e água, em várias proporções, com gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 48 frações de aproximadamente 50 mL cada (Tabela 3). As frações foram reunidas mediante análise por CCDS utilizando-se diversos sistemas de eluentes e pela utilização de iodo, sulfato cérico e anisaldeído/H_2SO_4 como reveladores (Tabela 4, p. 21).

Tabela 3 – Fracionamento cromatográfico da fração etérea **G-1E** do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb.

Eluentes	Frações
Diclorometano / metanol (95:5)	1 – 7
Diclorometano / metanol (90:10)	8 – 12
Diclorometano / metanol (85:15)	13 – 17
Diclorometano / metanol (80:20)	18 – 21
Diclorometano / metanol (75:25)	22 – 25
Diclorometano / etanol (70:30)	26 – 28
Diclorometano / metanol / água (70:30:1)	29 – 31
Diclorometano / metanol / água (70:30:3)	32 – 36
Diclorometano / metanol / água (70:30:5)	37 – 40
Metanol / água (1:1)	41 – 48

Tabela 4 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento da fração etérea **G-1E** do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb., de acordo com comportamento em CCDS

Grupo (GE)	Frações	Massa (mg)
G-1E-1	1 – 3	20,7
G-1E-2	4	635,8
G-1E-3	5	836,3
G-1E-4	6	236,7
G-1E-5	7 – 9	308,4
G-1E-6	10	618,1
G-1E-7	11 – 12	450,5
G-1E-8	13 – 14	594,6
G-1E-9	15 – 17	487,9
G-1E-10	18 – 28	1.159,5
G-1E-11	29 – 48	106,3

Grupo G-1E1

O material deste grupo, proveniente do fracionamento inicial de **G-1E**, apresentou-se como um óleo viscoso e de cor amarelada. Análise por CCDS (hexano/ acetato de etila 7:3 e revelação com sulfato cérico) mostrou que o grupo 1 tratava-se de uma mistura complexa. Devido à pouca quantidade de material optou-se por não trabalhar com este grupo.

Grupo G-1E2

Este material, proveniente do fracionamento inicial de **G-1E**, apresentou-se como um óleo viscoso e de coloração escura. A análise por CCDS (eluentes: acetato de etila/ metanol 8:2 e revelação com solução ácida de sulfato cérico) mostrou a presença de duas manchas de RF´s próximos. O material deste grupo (635,8 mg) foi recromatografado em coluna de sílica gel (23,0 g, Φ= 1,5 cm), de onde foram obtidas 19 frações de aproximadamente 20 mL cada (Tabela 5, p. 22). As frações foram reunidas mediante análise por CCDS, utilizando-se como sistema eluente acetato de etila/ metanol 8:2 e pela utilização de iodo, sulfato cérico e anisaldeído/H_2SO_4 como reveladores (Tabela 6, p. 22).

Tabela 5 – Fracionamento cromatográfico de **G-1E2**, proveniente do fracionamento da fração etérea **G-1E**

Eluentes	Frações
Hexano	1 – 2
Hexano / diclorometano (1:1)	3 – 5
Diclorometano	6 – 8
Diclorometano / acetato de etila (1:1)	9 – 17
Acetato de etila	18 – 19

Tabela 6 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de **G-1E2**, proveniente da fração etérea **G-1E**, de acordo com comportamento em CCDS

Subgrupo	Frações	Massa (mg)
1	1 – 11	94,3
2	12	150,6
3	13 – 17	130,1
4	18 – 19	168,4

Subgrupos 1, 3 e 4

Devido à complexidade observada por CCDS, estes grupos não foram estudados.

Subgrupo 2

O subgrupo 2 (150,6 mg) apresentou-se como um sólido amorfo, em meio a um óleo viscoso escuro. Este material foi então lavado com diclorometano, originando um sólido branco (40 mg), identificado por IV, RMN de ^{1}H e de ^{13}C como sendo galato de etila (**43**). O óleo viscoso (102 mg) restante foi submetido à recromatografia em coluna de sílica gel (5 g, Φ= 0,8 cm) utilizando-se como eluente hexano, diclorometano e acetato de etila, puros ou em misturas binárias, com gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 54 frações de aproximadamente 5 mL cada (Tabela 7, p. 23). As frações foram reunidas mediante análise por CCDS utilizando-se diversos sistemas de eluentes e pela utilização de iodo e sulfato cérico como reveladores (Tabela 8, p. 23). O grupo 2´ referente às frações 31-36 (41 mg) apresentou-se como um óleo viscoso de coloração amarelada, que mostrou a presença de apenas uma mancha por CCDS (hexano/acetato de etila 1:1 e revela-

ção com solução ácida de sulfato cérico). Este material foi codificado como **44** e identificado como sendo o 5-hidroximetilfurfural (**44**).

Os demais subgrupos 1´, 3´ e 4´, não foram trabalhados.

Tabela 7 – Fracionamento cromatográfico do Subgrupo 2, proveniente do fracionamento de **G-1E2**

Eluentes	Frações
Hexano	1 – 10
Hexano / diclorometano (1:1)	11 – 16
Diclorometano	17 – 19
Diclorometano / acetato de etila (9,5: 0,5)	20 – 22
Diclorometano / acetato de etila (9:1)	23 – 25
Diclorometano / acetato de etila (8,5: 1,5)	26 – 31
Diclorometano / acetato de etila (8:2)	32 – 49
Diclorometano / acetato de etila (1:1)	50 – 52
Acetato de etila	53 – 54

Tabela 8 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento do Subgrupo 2, proveniente do fracionamento de **G-1E2**, de acordo com comportamento em CCDS

Subgrupos	Frações	Massa (mg)
1’	1 – 30	18,1
2’	31 – 36	41
3’	37 – 39	6,05
4’	40 – 54	38,2

Grupo G-1E3

G-1E3 (836,3 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-1E**, apresentou-se como um sólido branco, cuja análise por CCDS (eluentes: acetato de etila/ metanol 8:2 e revelação com solução ácida de sulfato cérico) mostrou a presença de uma única mancha de coloração marrom clara. Este sólido foi identificado como quantidade adicional de galato de etila (**43**).

Grupo G-1E4

O material deste grupo (236,7 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-1E**, foi também identificado também como o galato de etila (**43**), ligeiramente impuro, por comparação, por CCDS.

Grupo G-1E5

O material deste grupo, proveniente do fracionamento inicial de **G-1E**, apresentou-se como uma mistura complexa, por CCDS (acetato de etila/ metanol 8:2 e revelação com iodo e sulfato cérico), com várias substâncias com Rf´s muito próximos. Sendo assim, este grupo não foi trabalhado.

Grupo G-1E6

Este grupo (618,1 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-1E**, apresentou-se como um sólido amorfo, em meio a um material resinoso de coloração marrom. Por análise por CCDS (eluentes: acetato de etila/ metanol 8:2 e revelação com solução ácida de sulfato cérico) observou-se uma mancha na parte superior da placa e uma cauda na parte inferior da placa. Parte do material deste grupo (600 mg) foi recromatografado em coluna de sílica gel (25,0 g, Φ= 1,5 cm), de onde foram eluídas 47 frações de aproximadamente 20 mL cada (Tabela 9, p. 25), combinadas mediante análise por CCDS, pela utilização de diversos sistemas de eluentes e de iodo, sulfato cérico e anisaldeído/H_2SO_4 como reveladores, em 7 grupos (Tabela 10, p. 25).

Tabela 9 – Fracionamento cromatográfico de **G-1E6**, proveniente do fracionamento da fração etérea **G-1E**

Eluentes	Frações
Diclorometano	1 – 6
Diclorometano / acetato de etila (9,5: 0,5)	7 – 9
Diclorometano / acetato de etila (9:1)	10 – 12
Diclorometano / acetato de etila (8:2)	13 – 14
Diclorometano / acetato de etila (7:3)	15 – 16
Diclorometano / acetato de etila (1:1)	17 – 29
Acetato de etila	30 – 36
Acetato de etila / metanol (9:1)	37 – 40
Acetato de etila / metanol (8:2)	41 – 43
Acetato de etila / metanol (1:1)	44 – 45
Metanol	46 – 47

Tabela 10 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de **G-1E6**, proveniente do fracionamento da fração etérea **G-1E**, de acordo com comportamento em CCDS

Subgrupos	Frações	Massa (mg)
1	1 – 19	30,1
2	20 – 24	201,0
3	25 - 29	36,4
4	30 – 33	27,6
5	34 – 35	38,8
6	36 – 44	56,3
7	45 - 47	67,1

Subgrupo 2

Este material (201,0 mg) apresentou-se como um sólido branco que apresentou uma única mancha de coloração marrom clara, por análise por CCDS (eluentes: acetato de etila/ metanol 8:2 e revelação com solução ácida de sulfato cérico). Este sólido foi identificado como sendo o ácido gálico (**45**).

Os outros subgrupos da Tabela 10 não foram trabalhados, pois apresentaram-se como misturas complexas através da análise por CCDS e também por conterem pouco material.

Grupo G-1E7

O material deste grupo (450,5 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-1E**, apresentou-se como uma mistura complexa por CCDS e foi recromatografado em coluna de sílica gel (15,0 g, Φ: 1 cm) usando-se, como fase móvel, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias destes solventes com gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 52 frações de aproximadamente 40 mL cada. Nenhuma fração resultou em substância pura, e todas estas frações apresentaram grande complexidade quando analisada por CCDS em diversos sistemas eluentes e pela utilização de vários reveladores, sendo inviável a purificação das mesmas.

Grupo G-1E8

O material deste grupo (594,6 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-1E**, apresentou-se como um material resinoso. A análise por CCDS, utilizando-se como fase móvel acetato de etila/ metanol 1:1 e revelação com vapores de I_2 e com solução ácida de sulfato cérico, mostrou a presença manchas com Rf´s próximos. Desse modo, o material (594,6 mg) foi recromatografado em coluna de sílica gel (23,0 g, Φ= 1,3 cm), de onde foram eluídas 62 frações de aproximadamente 40 mL cada (Tabela 11, p. 27). Estas frações foram reunidas em 9 grupos, por análise das mesmas por CCDS, utilizando diversos sistemas de eluentes e iodo, sulfato cérico e anisaldeído/H_2SO_4 como reveladores (Tabela 12, p. 27).

Tabela 11 – Fracionamento cromatográfico de **G-1E8**, proveniente do fracionamento da fração etérea **G-1E**

Eluentes	Frações
Diclorometano	1 – 8
Diclorometano / acetato de etila (9,5:0,5)	9 – 10
Diclorometano / acetato de etila (9:1)	11 – 14
Diclorometano / acetato de etila (8:2)	15 – 19
Diclorometano / acetato de etila (1:1)	20 – 23
Acetato de etila	24 – 35
Acetato de etila / metanol (9:1)	36 – 40
Acetato de etila / metanol (8:2)	41 – 43
Acetato de etila / metanol (7:3)	44 – 48
Acetato de etila / metanol (1:1)	49 – 54
Metanol	55 – 58
Metanol / água (1:1)	59 – 60
Água	61 – 62

Tabela 12 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de **G-1E8**, proveniente do fracionamento da fração etérea **G-1E**, de acordo com comportamento em CCDS

Subgrupo	Frações	Massa (mg)
1	1 – 25	30,4
2	26	8,2
3	27 – 29	34,6
4	30 – 31	36,8
5	32 – 35	34,1
6	36 – 37	26,3
7	38 - 41	155,7
8	42 – 55	69,1
9	56 - 62	78,5

Subgrupo 2

O material do subgrupo 2 (8,2 mg) apresentou-se como um sólido branco, puro por análise por CCDS (eluentes: acetato de etila/ metanol 7:3 e revelação com solução ácida de sulfato cérico), sendo identificado por IV e RMN como o chiquimato de metila (**46**).

Os demais subgrupos não foram trabalhados, pois apresentaram-se como pequenas quantidades de misturas complexas, através da análise por CCDS em diversos sistemas eluentes e pela utilização de vários reveladores.

Grupo G-1E9

O material deste grupo (487,9 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-1E**, mostrou-se ser uma mistura complexa por CCDS e foi recromatografado em coluna de sílica gel (12,0 g, Φ= 1,3 cm) usando-se, como fase móvel, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias com polaridade crescente. Foram coletadas 61 frações de aproximadamente 20 mL cada. Nenhuma fração resultou em substância pura, e todas as frações apresentaram grande complexidade quando analisadas por CCDS em diversos sistemas eluentes e pela utilização de vários reveladores, sendo inviável a purificação das mesmas.

Grupo G-1E10

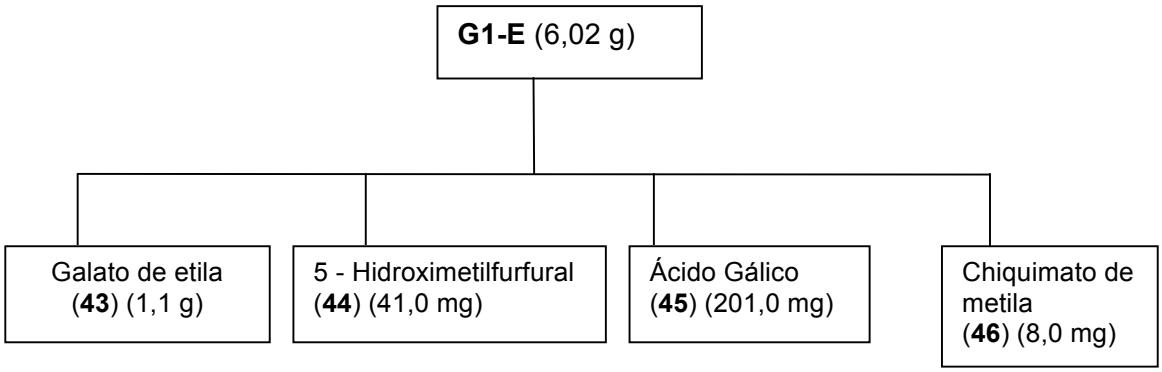
O material deste grupo (1159,0 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-1E**, mostrou-se ser uma mistura complexa por CCDS e foi recromatografado em coluna de sílica gel (38,0 g Φ= 2,0 cm) usando-se, como fase móvel, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias com polaridade crescente. Foram coletadas 46 frações de aproximadamente 20 mL cada. Nenhuma fração resultou em substância pura, e todas as frações apresentaram grande complexidade, quando analisadas por CCDS em diversos sistemas eluentes, e pela utilização de vários reveladores, sendo inviável a purificação das mesmas.

Grupo G-1E11

O material deste grupo (106,3 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-1E**, foi recromatografado em coluna de sílica gel (8,0 g, Φ= 1,0 cm) usando-se, como fase móvel, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias com gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 61 frações de aproximada-

mente 20 mL cada. Nenhuma fração resultou em substância pura, e todas estas frações apresentaram grande complexidade quando analisadas por CCDS.

Da fração etérea **G-1E** de *Caryocar brasiliense* Camb. foram identificadas quatro substâncias puras, apresentadas no Esquema 2. O material insolúvel em éter (**T1**) não foi trabalhado.



Esquema 2: Substâncias isoladas a partir do fracionamento da fração etérea **G-1E** de *Caryocar brasiliense* Camb.

2.2.1.2 Fracionamento de G-2, proveniente da cromatografia em poliamida do extrato etanólico bruto (EEB)

Parte do material (9,5 g) de **G-2**, foi cromatografada em coluna de sílica gel (200 g, Φ= 4,5 cm). Foram eluídas 55 frações de aproximada-mente 125 mL cada, utilizando-se diclorometano, acetato de etila e metanol em um gradiente de eluição em ordem crescente de polaridade (Tabela 13, p. 30). As frações foram reunidas em 8 grupos de acordo com seu comportamento por CCDS, utilizando-se vários sitemas eluentes e revelação com I_2, solução ácida de sulfato cérico e anisaldeído/H_2SO_4) (Tabela 14, p. 30).

Tabela 13 – Fracionamento cromatográfico de **G-2**, proveniente do extrato etanólico bruto (**EEB**) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb.

Eluentes	Frações
Diclorometano	1 – 5
Diclorometano / acetato de etila (9:1)	6 – 9
Diclorometano / acetato de etila (8:2)	10 – 14
Diclorometano / acetato de etila (1:1)	15 – 19
Acetato de etila	20 – 23
Acetato de etila / metanol (1:1)	24 – 36
Metanol	37 – 49
Metanol / água (1:1)	50 – 55

Tabela 14 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de **G-2,** proveniente do extrato etanólico bruto (**EEB**) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb., de acordo com comportamento em CCDS

Grupo	Frações	Massa (g)
G-2-1	1 – 15	60,0
G-2-2	16 – 19	150,0
G-2-3	20 – 24	130,0
G-2-4	25 – 28	2.100,0
G-2-5	29	2.300,0
G-2-6	30 – 35	1.400,0
G-2-7	36 – 42	800,0
G-2-8	42 – 55	1.600,0

Grupo G-2-1

O material deste grupo, proveniente do fracionamento inicial de **G-2**, um óleo viscoso e de cor amarelada, devido à pequena massa obtida (60 mg) e à complexidade observada por CCDS, não foi trabalhado.

Grupo G-2-2

Este material (150,0 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-2**, mostrou-se constituído de um sólido de coloração marrom claro que foi identificado como galato

de etila (**43**), por comparação por CCDS (eluentes: acetato/ metanol 8:2, e revelação com solução ácida de sulfato cérico), ligeiramente impuro.

Grupo G-2-3

O material deste grupo (130,0 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-2**, apresentou-se como um óleo viscoso e como uma mistura complexa, por CCDS (eluentes: acetato de etila/ metanol 8:2 e revelação com solução ácida de sulfato cérico) e não foi trabalhado.

Grupo G-2-4

O material deste grupo (2.100,0 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-2**, apresentou-se como um material resinoso. A análise por CCDS, utilizando-se como fase móvel acetato de etila / metanol 1:1 e revelada com vapores de I_2 e com solução ácida de sulfato cérico, mostrou manchas com Rf´s próximos. Desse modo, o material foi recromatografado em coluna de sílica gel (36,0 g, Φ= 1,5 cm), de onde foram obtidas 47 frações de aproximadamente 50 mL cada (Tabela 15), combinadas, através de CCDS, em 5 grupos (Tabela 16, p. 32).

Tabela 15 – Fracionamento cromatográfico de **G-2-4**, proveniente do fracionamento inicial de **G-2**

Eluentes	Frações
Diclorometano / acetato de etila (1:1)	1 – 11
Acetato de etila	12 – 28
Acetato de etila / metanol (9:1)	29 – 33
Acetato de etila / metanol (8:2)	34 – 38
Acetato de etila / metanol (1:1)	39 – 42
Metanol	43 – 47

Tabela 16 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de **G-2-4**, proveniente do fracionamento inicial de **G-2**, de acordo com comportamento em CCDS

Subgrupo	Frações	Massa (mg)
1	1 – 13	186,0
2	14 – 23	308,0
3	24 – 31	253,0
4	32 – 34	146,0
5	35 – 47	369,0

Subgrupo 4

Este material (146,0 mg) proveniente do fracionamento de **G-2-4**, apresentou-se como um óleo viscoso de coloração escura. Através de CCDS utilizando-se como fase móvel acetato de etila/ metanol (7:3) e revelada com anisaldeído /H_2SO_4, foi observada uma única mancha. Este material foi identificado como sendo uma mistura de *β*-D-frutofuranose (**47**) e *β*-D-frutopiranose (**48**).

Os demais grupos não foram trabalhados.

Grupo G-2-5

Este material (2.300,0 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-2**, apresentou-se como um material resinoso. A análise por CCDS, utilizando-se como fase móvel acetato de etila/ metanol 1:1 e revelada com vapores de I_2 e com solução ácida de sulfato cérico, foi observada a presença manchas com Rf´s próximos. Desse modo, o material (2.300,0 mg) foi recromatografado em coluna de sílica gel (35,0 g, Φ= 1,5 cm, CC-13), de onde foram eluídas 42 frações de aproximadamente 50 mL cada (Tabela 17, p. 33), que foram combinadas em 4 grupos, de acordo com seu perfil cromatográfico por CCDS, utilizando-se diversos sistemas eluentes e I_2, sulfato cérico e anisaldeído/H_2SO_4, como reveladores (Tabela 18, p. 33)

Tabela 17 – Fracionamento cromatográfico de **G-2-5**, proveniente do fracionamento inicial de **G-2**

Eluentes	Frações
Diclorometano / acetato de etila (1:1)	1 – 7
Acetato de etila	8 – 11
Acetato de etila / metanol (8:2)	12 – 29
Acetato de etila / metanol (1:1)	30 – 36
Metanol	37 – 42

Tabela 18 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de **G-2-5**, proveniente do fracionamento inicial de **G-2**, de acordo com comportamento em CCDS

Subgrupo	Frações	Massa (mg)
1	1 – 15	25,0
2	16 – 22	1.500,0
3	23 – 26	120,0
4	27 – 42	100,0

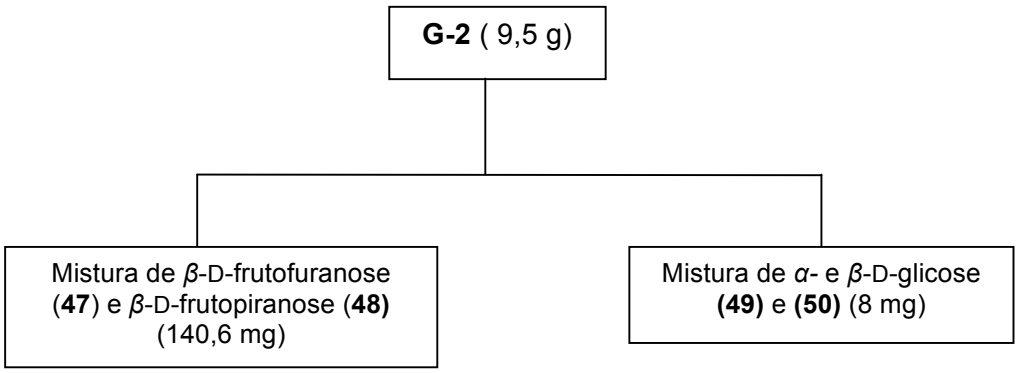
Subgrupo 2

O material do subgrupo 2 (1.500,0 mg) proveniente do fracionamento do Grupo - 5, fracionamento inicial de **G-2** (Tabela 14), apresentou-se como um sólido branco imerso em um óleo viscoso de coloração escura. Este material foi então lavado com diclorometano, e o sólido branco (8 mg) foi identificado como sendo uma mistura de *α*- e *β*-*D*-glicose (**49**) e (**50**), respectivamente.

Os demais subgrupos não foram trabalhados.

Os outros grupos provenientes da fração **G-2** não foram trabalhados.

Da fração **G-2**, proveniente da cromatografia em poliamida do extrato etanólico bruto (**EEB**) foram identificadas três substâncias, apresentadas no Esquema 3, p. 34.



Esquema 3: Substâncias isoladas a partir do fracionamento da fração **G-2** de *Caryocar brasilienses* Camb.

2.2.1.3 Fracionamento de G-3, proveniente da cromatografia em poliamida do extrato etanólico bruto (EEB)

O material do grupo G-3 (8,0 g) foi cromatografado em coluna de sílica gel (160,0 g, Φ= 4,5 cm). Foram eluídas 39 frações de 100 mL cada, sendo utilizados diclorometano, acetato de etila, metanol e água, em um gradiente crescente de polaridade (Tabela 19). Estas frações foram reunidas em 9 grupos, com base em análise por CCDS (diversos sistemas de eluentes e I_2, sulfato cérico e anisaldeído/H_2SO_4, como reveladores) (Tabela 20, p. 35).

Tabela 19 – Fracionamento cromatográfico de **G-3**, proveniente do extrato etanólico bruto (**EEB**) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb.

Eluentes	Frações
Diclorometano	1 – 6
Diclorometano / acetato de etila (1:1)	7 – 12
Acetato de etila	13 – 18
Acetato de etila/ metanol (1:1)	19 – 26
Metanol	27 – 33
Metanol/ água (1:1)	34 – 39

Tabela 20 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de **G-3**, proveniente do extrato etanólico bruto (**EEB**) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb., de acordo com comportamento em CCDS

Grupo	Frações	Massa (mg)
G-3-1	1 – 7	270,0
G-3-2	8	970,0
G-3-3	9 – 12	120,0
G-3-4	13	100,0
G-3-5	14 – 18	190,0
G-3-6	19 – 20	2.140,0
G-3-7	21 – 26	2.130,0
G-3-8	27 – 33	530,0
G-3-9	34 – 39	610,0

Grupo G-3-1

O material deste grupo (270 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-3**, apresentou-se como um óleo viscoso e de cor amarelada. A análise por CCDS (hexano/ acetato de etila 8:2 e revelação com solução ácida de anisaldeído e reagente de Liebermann-Bouchard) mostrou a presença de mistura de substâncias com valores de Rf´s muito próximos. Esta fração foi recromatografada por CCS (12 g, Φ= 1 cm) utilizando como sistema eluente, hexano/acetona com gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 23 frações de aproximadamente 3 mL cada. Das frações 8-10 foi possível isolar 8,0 mg de um material oleoso, identificado como sendo o lupeol (**51**), contaminado com ácido oléico (**52**) e das frações 15-17 foi possível isolar 20,0 mg de outro óleo identificado como uma mistura do *β*-sitosterol (**53**) e estigmasterol (**54**), também contaminado com ácido oléico.

Grupo G-3-2

O grupo 2 (970 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-3**, apresentou-se como um sólido branco. Por análise por CCDS (acetato de etila /metanol 8:2 e revelação com solução ácida de sulfato cérico), observou-se uma única mancha de coloração marrom clara, que foi identificado como uma quantidade adicional de galato de etila (**43**).

Grupo G-3-3

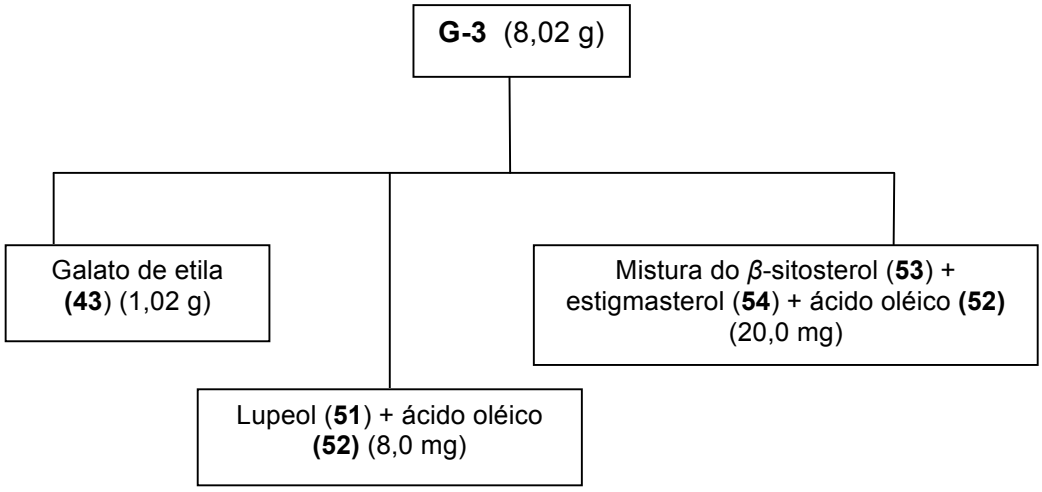
O material deste grupo (120 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-3**, apresentou-se como um sólido marrom claro. Através da análise por CCDS, utilizando-se como fase móvel acetato de etila/ metanol 8:2 e vapores de I_2 e solução ácida de sulfato cérico, como reveladores, foi observada a presença de manchas de Rf´s próximos. Parte deste sólido (100 mg) foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel (9,0 g, Φ= 1 cm), utilizando-se como fase móvel, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, com gradiente crescente de polaridade. Foram eluídas 23 frações de aproximadamente 50 mL cada. Apenas as frações reunidas 5-8 (45,0 mg) puderam ser identificadas como uma quantidade adicional de galato de etila (**43**).

Grupo G-3-6

O material deste grupo (2.140,0 mg), proveniente do fracionamento inicial de **G-3**, mostrou-se ser uma mistura complexa por CCDS e foi recromatografado em coluna de sílica gel (35,0 g, Φ= 1,5 cm) usando-se, como fase móvel, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias destes solventes com gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 41 frações de aproximadamente 50 mL cada. Nenhuma fração resultou em substância pura, e todas estas frações apresentaram grande complexidade quando analisada por CCDS em diversos sistemas eluentes e pela utilização de vários reveladores, sendo inviável a purificação das mesmas.

Os demais grupos do fracionamento de **G-3** não foram trabalhados.

Da fração **G-3**, proveniente da cromatografia em poliamida do extrato etanólico bruto (**EEB**) foram identificadas quatro misturas, e uma substância pura, conforme apresentado no Esquema 4, p. 37.



Esquema 4: Substâncias isoladas a partir do fracionamento da fração **G-3** de *Caryocar brasiliense* Camb.

2.2.2 Fracionamento do extrato metanólico bruto (EMB) de *Caryocar brasiliense Camb.*

A fim de se verificar se o galato de etila (**43**) é um artefato obtido por esterificação durante a preparação de **EEB**, o mesocarpo e epicarpo externo do pequi foram extraídos com metanol, de acordo com metodologia descrita na página 16. Foram obtidos 163,0 g de extrato metanólico bruto (**EMB**).

Parte de **EMB** (30,0 g) foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel (250,0 g, Φ= 10,0 cm). Foram recolhidas 62 frações de aproximadamente 125 mL, utilizando-se gradiente decrescente de polaridade de solventes (Tabela 21, p. 38). Estas frações foram reunidas em grupos (Tabela 22, p. 38 mediante análise comparativa das frações, por CCDS, utilizando-se diversos sistemas de eluentes e pela utilização de iodo, sulfato cérico e anisaldeído/H_2SO_4 como reveladores.

Tabela 21 – Fracionamento cromatográfico do extrato metanólico bruto (**EMB**) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb.

Eluente	Frações
Diclorometano	1 – 8
Diclorometano / acetato de etila 1:1	9 – 21
Acetato de etila	22 - 37
Acetato de etila / metanol 1:1	38 – 53
Metanol	54 - 62

Tabela 22 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato metanólico bruto (**EMB**) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb., de acordo com comportamento em CCDS

Grupo	Frações	Massa (mg)
G-1	1 – 6	-
G-2	7 – 11	9,2
G-3	12 – 14	18,3
G-4	15 – 16	16,5
G-5	17 – 22	19,5
G-6	23	17,3
G-7	24 – 27	2,4
G-8	28 – 29	7,6
G-9	30 – 39	46,1
G-10	40 – 41	999,6
G-11	42	469,5
G-12	43 – 48	7.990,0
G-13	49 – 50	585,0
G-14	51 – 56	3.465,9
G-15	57 – 62	4.115,6

Dos grupos acima, apenas G-9, G-10 e G-11 apresentaram, por CDDS (acetato de etila/ metanol 8:2 e revelação com iodo e sulfato cérico), mancha similar àquela do galato de etila (**43**), isolado anteriormente do extrato etanólico bruto (**EEB**).

Assim, G-11 foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (20,0 g, Φ= 1,0 cm), de onde foram eluídas 125 frações de aproximadamente 50 mL cada (Tabela 23), que foram combinadas em 28 grupos, de acordo com seu perfil cromatográfico por CCDS, utilizando-se diversos sistemas eluentes e I_2, sulfato cérico e anisaldeído/H_2SO_4, como reveladores (Tabela 24, p. 40).

Tabela 23 – Fracionamento cromatográfico de **G-11**, proveniente do extrato metanólico bruto (**EMB**) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb.

Eluente	Frações
Hexano	1 – 4
Hexano / diclorometano1:1	5 – 9
Diclorometano	10 – 17
Diclorometano / acetato de etila 9:1	18 – 30
Diclorometano / acetato de etila 8:2	31 – 59
Diclorometano / acetato de etila7:3	60 – 74
Diclorometano / acetato de etila1:1	75 – 81
Acetato de etila	82 – 101
Acetato de etila / metanol1:1	102 – 117
Metanol	118 – 125

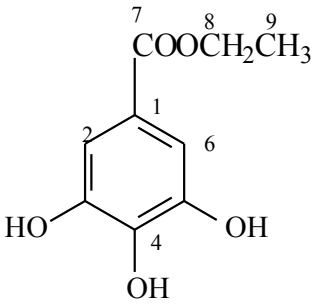
Tabela 24 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento de G-11, proveniente do extrato metanólico bruto (**EMB**) do mesocarpo e epicarpo externo de *Caryocar brasiliense* Camb., de acordo com comportamento em CCDS

Grupo	Frações	Massa (mg)
G-11-1	1 – 12	15,8
G-11-2	13 – 18	6,8
G-11-3	19 – 22	6,2
G-11-4	23	0,8
G-11-5	24 – 25	7,5
G-11-6	26 – 30	8,7
G-11-7	31 – 34	10,5
G-11-8	35 – 37	38,3
G-11-9	38 – 41	39,3
G-11-10	42 – 45	15,3
G-11-11	46 – 52	24,3
G-11-12	53 – 58	19,8
G-11-13	59 – 60	13,8
G-11-14	61 – 64	14,5
G-11-15	65 – 80	57,4
G-11-16	81	13,6
G-11-17	82 – 83	284,1
G-11-18	84 – 88	86,5
G-11-19	89 – 90	10,3
G-11-20	91 – 94	41,7
G-11-21	95 – 96	1,5
G-11-22	97	9,7
G-11-23	98 – 99	11,2
G-11-24	100 – 102	19,9
G-11-25	103	245,5
G-11-26	104 – 105	241,9
G-11-27	106 – 109	171,8
G-11-28	110 – 125	734,6

Análise por CDDS mostrou que os grupos G-11-8 e G-11-9 contêm o 5-hidroximetilfurfural impuro. G-11-12, G-11-13, e G-11-14 apresentaram por CCDS (acetato de etila /metanol 8:2 e revelação com solução ácida de sulfato cérico) uma única mancha de coloração marrom com Rf igual ao do galato de etila, no entanto, análise espectroscópica permitiu identificar o sólido como sendo o galato de metila (**55**). Conclui-se assim que originalmente apenas o ácido gálico está presente no mesocarpo e epicarpo externo do pequi.

2.3 Dados físico-químicos

Galato de etila (43)



FM/MM: $C_9H_{10}O_5$ / 198 g/mol

Aspecto físico: sólido.

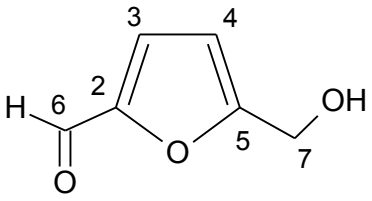
Faixa de fusão: 170 – 172°C (Lit.: 159 – 163°C)[50]

IV (KBr, $\nu_{máx.}$, cm^{-1}): 3446, 3290, 2973, 2933, 1704, 1615, 1533, 1469, 1309, 1250.

RMN de ^1H (Piridina-d5, 400 MHz, δ_H): 7,86 (s, 1H, H-2); 7,86 (s, 1H, H-6); 4,27 (q, *J*=7,2 Hz, 2H, H-8); 1,19 (t, *J*=7,2 Hz, 3H, H-9).

RMN de ^{13}C (Piridina-d5, 100 MHz, δ_C): 121,83 (C-1); 110,56 (C-2); 147,99 (C-3); 141,29 (C-4); 147,99 (C-5); 110,56 (C-6); 167,46 (C-7); 60,78 (C-8); 14,78 (C-9).

5-Hidroximetilfurfural (44)



FM/MM: $C_7H_6O_3$/ 138 g/mol

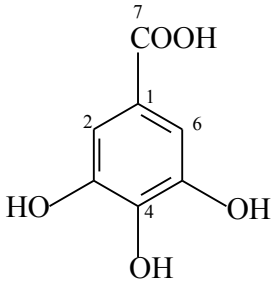
Aspecto físico: oleoso

IV (KBr, $\nu_{máx.}$, cm^{-1}): 3369, 1658, 1582, 1519, 1018.

RMN de ^1H ($CDCl_3$, 200 MHz, δ_H): 7,24 (d, *J*=3,4 Hz, 1H, H-3); 6,52 (d, *J*=3,4 Hz, 1H, H-4); 9,58 (s, 1H, H-6); 4,72 (s, 2H, H-7); 2,74 (s, 1H, OH).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz, δ_C): 152,31 (C-2); 123,03 (C-3); 110,00 (C-4); 160,84 (C-5); 177,75 (C-6); 57,55 (C-7).

Ácido gálico (45)



FM/MM: $C_7H_6O_5$ / 170 g/mol

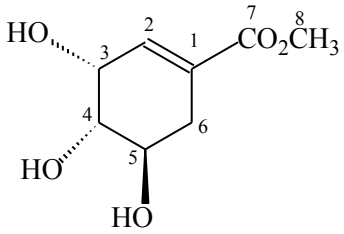
Aspecto físico:sólido.

Faixa de fusão: 241 – 245 °C (Lit.: 249 – 251°C)[52]

RMN de ^{1}H (CD_3OD, 400 MHz, δ_H): 7,07 (s, 1H, H-2); 7,07 (s, 1H, H-6).

RMN de ^{13}C (CD_3OD, 100 MHz, δ_C): 122,08 (C-1); 110,48 (C-2); 146,48 (C-3); 139,70 (C-4); 146,48 (C-5); 110,48 (C-6); 170,55 (C-7).

Chiquimato de metila (46)



FM/MM: $C_{96}H_{12}O_5$ / 188 g/mol

Aspecto físico: sólido.

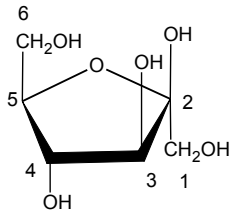
Faixa de fusão: 108 - 109 °C (Lit.: 106 – 107°C)[53]

IV (KBr, $\nu_{máx.}$, cm^{-1}): 3303, 1715, 1657, 1233.

RMN de ^{1}H (CD_3OD, 400 MHz, δ_H): 6,78-6,80 (m, 1H, H-2); 4,37 (sl, 1H, H-3); 3,68 (dd, *J*=6,8, 3,6 Hz, 1H, H-4); 3,97-4,02 (m, 1H, H-5); 2,20 (m, 1H, H-6_{ax}); 2,72 (m, 1H, H-6_{eq}); 3,74 (s, 3H, H-8); 4,55 (OH).

RMN de ^{13}C (CD_3OD, 100 MHz, δ_C): 130,36 (C-1); 139,26 (C-2); 67,41 (C-3); 72,74 (C-4); 68,55 (C-5); 31,64 (C-6); 168,89 (C-7); 52,53 (C-8).

***β*-D-Frutofuranose (47)**



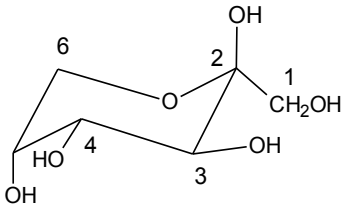
FM/MM: $C_6H_{12}O_6$ / 180 g/mol

Aspecto físico: oleoso.

RMN de ^{1}H (CD_3OD, 400 MHz, δ_H): 3,64 e 3,73 (m, 2H, H-1); 4,03-4,08 (m, 1H, H-3); 4,03-4,08 (m, 1H, H-4); 4,03-4,08 (m, 1H, H-5); 3,52 e 3,81 (m, 2H, H-6).

RMN de ^{13}C (CD_3OD, 100 MHz, δ_C): 64,35 (C-1); 103,57 (C-2); 77,70 (C-3); 76,79 (C-4); 83,76 (C-5); 64,35 (C-6).

***β*-D-Frutopiranose (48)**



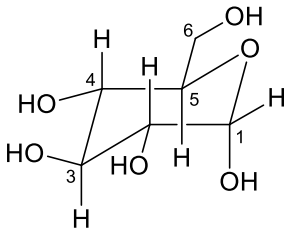
FM/MM: $C_6H_{12}O_6$ / 180 g/mol

Aspecto físico: oleoso.

RMN de ^{1}H (CD_3OD, 400 MHz, δ_H): 3,52 e 3,67 (m, 2H, H-1); 3,77 (sl, 1H, H-3); 3,86 (sl, 1H, H-4); 4,03 (m, 1H, H-5); 3,73 e 4,03 (m, 2H, H-6).

RMN de ^{13}C (CD_3OD, 100 MHz, δ_C): 64,70 (C-1); 99,87 (C-2); 69,59 (C-3); 72,00 (C-4); 71,50 (C-5); 64,70 (C-6).

***α*-D-glicose (49)**



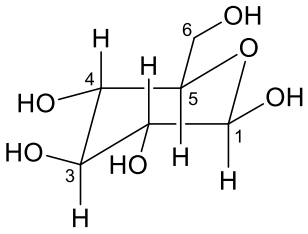
FM/MM: $C_6H_{12}O_6$ /180 g/mol

Aspecto físico: oleoso

RMN de ^{1}H (D_2O, 400 MHz, δ_H): 5,17 (d, *J*=3,6 Hz, 1H, H-1); 3,40-3,43(m, 1H, H-2); 3,65 (t, *J*=9,6 Hz, 1H, H-3); 3,35 (t, *J*=9,6 Hz, 1H, H-4); 3,71 – 3,80 (m, 1H, H-5); 3,69 (dd, *J*=5,6, 12,4 Hz, 2H, H-6).

RMN de ^{13}C (D_2O, 100 MHz, δ_C): 92,08 (C-1); 71,47 (C-2); 72,75 (C-3); 69,64 (C-4); 71,43 (C-5); 60,53 (C-6).

***β*-D-glicose (50)**



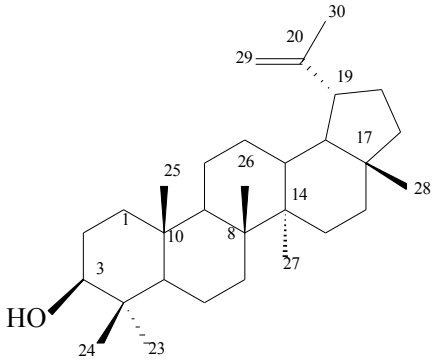
FM/MM: $C_6H_{12}O_6$ /180 g/mol

Aspecto físico: oleoso

RMN de ^{1}H (D_2O, 400 MHz, δ_H): 4,59 (d,*J*=8,16 Hz, 1H, H-1); 3,18 (t, *J*=8,8 Hz, 1H, H-2); 3,45-3,37 (m, 1H, H-3); 3,45-3,37 (m, 1H, H-4); 3,45-3,37 (m, 1H, H-5); 3,72 – 3,80 (m, 2H, H-6).

RMN de ^{13}C (D_2O, 100 MHz, δ_C): 95,89 (C-1); 74,13 (C-2); 75,74 (C-3); 69,59 (C-4); 75,93 (C-5); 60,74 (C-6).

Lupeol (51)

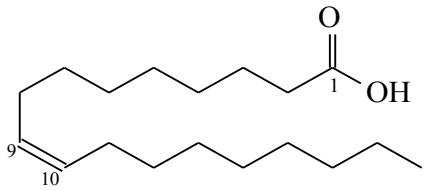


FM/MM: $C_{30}H_{50}O$ / 426 g/mol

Aspecto físico: oleoso

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 38,40 (C-1); 27,47 (C-2); 79,38 (C-3); 39,04 (C-4); 55,64 (C-5); 18,65 (C-6); 34,62 (C-7); 41,17 (C-8); 50,78 (C-9); 37,51 (C-10); 21,26 (C-11); 25,01 C-12); 38,40 (C-13); 43,17 (C-14); 27,53 (C-15), 35,92 (C-16); 43,32 (C-17); 48,33 (C-18); 48,31(C-19); 151,29 (C-20); 29,35 (C-21); 40,33 (C-22); 28,30 (C-23); 15,68 (C-24); 16,43 (C-25); 16,30 (C-26); 14,87 (C-27); 18,32 (C-28); 109,63 (C-29); 19,63 (C-30).

Ácido oléico (52)

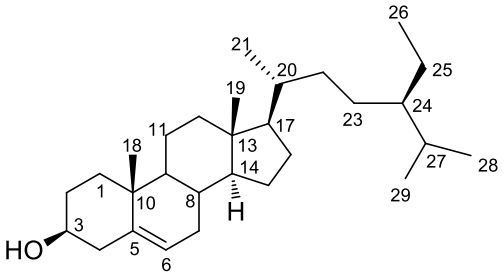


FM/MM: $C_{18}H_{34}O_2$ / 282 g/mol

Aspecto físico: oleoso

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 178,69 (C-1); 34,09 (C-2); 25,01 (C-3); 29,55 (C-4); 29,38 (C-5); 29,45 (C-6); 29,63 (C-7); 27,78 (C-8); 130,34 (C-9); 130,05 (C-10); 27,72 (C-11); 29,67 C-12); 29,90 (C-13); 29,83 (C-14); 29,75 (C-15), 32,22 (C-16); 22,99 (C-17); 14,41 (C-18).

***β*-sitosterol (53)**

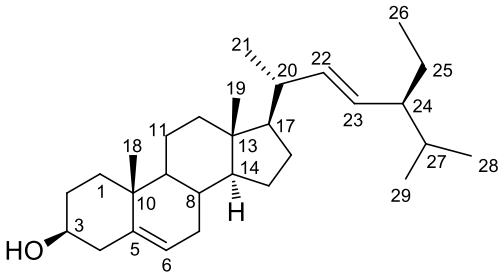


FM/MM: $C_{29}H_{50}O$ / 414 g/mol

Aspecto físico: oleoso

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 37,29 (C-1); 31,67 (C-2); 71,87 (C-3); 42,30 (C-4); 140,76 (C-5); 121,75 (C-6); 31,95 (C-7); 31,93 (C-8); 50,20 (C-9); 36,17 (C-10); 21,11 (C-11); 39,72 (C-12); 42,30 (C-13); 56,90 (C-14); 24,39 (C-15), 28,93 (C-16); 56,00 (C-17); 12,07 (C-18); 19,41 (C-19); 36,17 (C-20); 19,00 (C-21); 33,99 (C-22); 26,13 (C-23); 45,88 (C-24); 29,15 (C-25); 19,00 (C-26); 19,83 (C-27); 22,70 (C-28); 12,00 (C-29).

Estigmasterol (54)

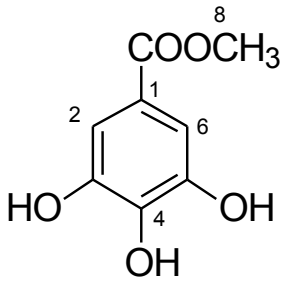


FM/MM: $C_{29}H_{48}O$ / 413 g/mol

Aspecto físico: oleoso

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 37,29 (C-1); 31,67 (C-2); 71,87 (C-3); 42,30 (C-4); 140,76 (C-5); 121,75 (C-6); 31,95 (C-7); 31,93 (C-8); 50,20 (C-9); 36,17 (C-10); 21,11 (C-11); 39,72 (C-12); 42,30 (C-13); 56,90 (C-14); 24,39 (C-15), 28,93 (C-16); 56,00 (C-17); 12,07 (C-18); 19,41(C-19); 40,50 (C-20); 21,23 (C-21); 138,33 (C-22); 129,75 (C-23); 51,27 (C-24); 31,92 (C-25); 19,00 (C-26); 19,00 (C-27); 25,42 (C-28); 12,26 (C-29).

Galato de metila (55)



FM/MM: $C_8H_8O_5$ / 184 g/mol

Aspecto físico: sólido

Faixa de fusão: 188 – 191°C (Lit.: 201 – 204°C)[50]

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 200 MHz, δ_H): 7,24 (s, 1H, H-2); 7,24 (s, 1H, H-6); 3,79 (s, 3H, H-8).

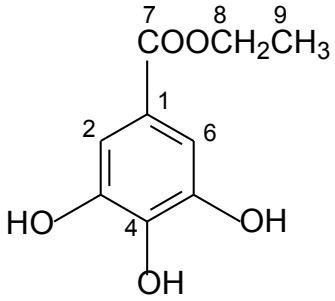
RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 50 MHz, δ_C): 120,79 (C-1); 109,38 (C-2); 145,57 (C-3); 138,82 (C-4); 145,57 (C-5); 109,38 (C-6); 167,47 (C-7); 51,72 (C-8).

CAPÍTULO 3

Determinação Estrutural

3.1 Identificação estrutural dos constituintes químicos isolados de *Caryocar brasiliense* Camb.

3.1.1 Identificação do galato de etila (43)



O composto **43** foi isolado da fração etérea (**G-1E**), proveniente da fração **G-1**, obtida a partir do fracionamento do extrato etanólico bruto (**EEB**) em poliamida. Além disso, quantidades adicionais de **43** foram também detectadas em **G-2** e **G-3**. Apresentou-se como um sólido branco com temperatura de fusão na faixa entre 170 – 172 ^{o}C e, quando submetido à CCDS, utilizando-se como fase móvel acetato de etila /metanol (8:2) e revelação com solução ácida de sulfato cérico sob aquecimento apresentou uma única mancha de coloração marrom clara.

O espectro de absorção na região do IV (Figura 9, p. 261) de **43** apresentou bandas de absorção em 3446, 3287 cm^{-1} (estiramento de ligação O-H), 2973, 2933 cm^{-1} (estiramento de ligação C-H), 1704, (estiramento de ligação C=O de éster conjugado), 1615, 1533 e 1469 cm^{-1} (estiramento C=C aromático) e em 1309, 1250 cm^{-1} (estiramentos de ligação C-O)[49].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 10, p. 261) de **43** apresentou um simpleto relativo a dois hidrogênios aromáticos em δ_H 7,86 (2H), além de um quarteto em δ_H 4,27 (2H) e um tripleto em δ_H 1,19 (3H), sendo que estes dois últimos podem ser claramente associados a um grupo etoxila. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 11, p. 262) apresentou 7 sinais e, com o auxílio do subespectro DEPT-135 (Figura 12, p. 262), quatro sinais relativos a carbonos quaternários puderam ser detectados em δ_C 167,46, 147,99, 141,29 e 121,83. Além de um sinal relativo a carbono metínico aromático em δ_C 110,56, também observou-se a presença de sinais do grupo etoxila em 60,78 e 14,78.

O mapa de contornos COSY (Figura 13, p. 263) mostrou o acoplamento entre os sinais em δ_H 4,27 (2H, q) e δ_H 1,19 (3H, t) confirmando o grupo etoxila.

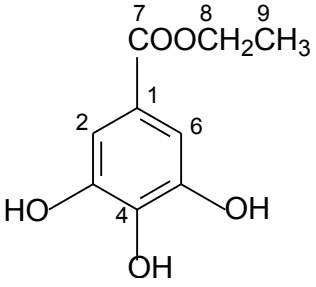
A análise do mapa de contornos HSQC (Figura 14, p. 263) possibilitou associar os sinais de carbonos com os sinais dos hidrogênios correspondentes em δ_C 14,27 (C-9) / δ_H 1,19 (t, H-9), δ_C 60,78 (C-8) / δ_H 4,27 (q, H-8), δ_C 110,56 (C-2 e C-6) / δ_H 7,86 (s, H-2 e H-6).

O sinal de carbono carbonílico em δ_C 167,46 (C-7), mostrou uma correlação no mapa de contornos HMBC (Figuras 15 e 16, p. 264), com o sinal de hidrogênio em δ_H 4,27 (q, H-8, ^3J). O sinal de hidrogênio δ_H 7,86 (s, H-2 e H-6), pelo mapa de contornos HMBC, mostrou manchas de correlações com os sinais de carbono em δ_C 110,56 (C-2 e C-6, ^3J), δ_C 121,83 (C-1, ^2J), δ_C 147,99 (C-3 e C-5, ^2J), δ_C 141,29 (C-4, ^3J), e em δ_C 167,46 (C-7, ^3J).

A comparação destes dados com aqueles registrados na literatura para o galato de etila[50] confirmou esta estrutura para **43** (Tabela 25).

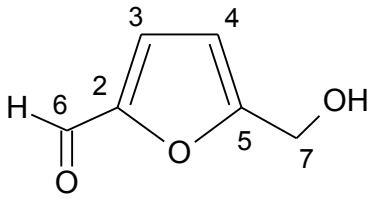
Tabela 25 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, piridina$_{-d5}$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, piridina-d5) de **43** com aqueles relatados na literatura para o galato de etila (solvente: DMSO$_{-d6}$[50])

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**43**	**Galato de etila[50]**	**C**	**43**	**Galato de etila[50]**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	121,83	119,6
2	7,86 (s)	6,92 (s)	**2**	110,56	108,5
3	-	-	**3**	147,99	145,6
4	-	-	**4**	141,29	138,6
5	-	-	**5**	147,99	145,6
6	7,86 (s)	6,92 (s)	**6**	110,56	108,5
7	-	-	**7**	167,46	165,9
8	4,27 (q, *J*=7,2 Hz)	4,18 (q, *J*=7,2 Hz)	**8**	60,78	60,0
9	1,19 (t, *J*=7,2 Hz)	1,25 (t, *J*=7,2 Hz)	**9**	14,78	14,3



43

3.1.2 Identificação do 5-hidroximetilfurfural (44)



O composto **44** foi isolado a partir da fração etérea (**G-1E**) e apresentou-se como um óleo viscoso, de coloração amarelada. Quando submetido à CCDS, utilizando-se como fase móvel hexano/ acetato de etila (1:1) e após revelação com solução ácida de sulfato cérico sob aquecimento apresentou uma única mancha escura.

O espectro no infravermelho (Figura 17, p. 265) de **44** apresentou bandas de absorção para grupo hidroxila em 3369 cm^{-1} (estiramento O-H), 1658 cm^{-1} (estiramento C=O de aldeído conjugado), 1582 e 1519 cm^{-1} (estiramento C=C de aromáticos) e 1018 cm^{-1} (estiramento C-O)[49].

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 18, p. 265) o sinal δ_H 9,58 (s) foi atribuído ao H-6 do aldeído e os sinais em δ_H 7,24 e 6,52, relativos cada um a um hidrogênio, foram atribuídos aos dois hidrogênios aromáticos. O sinal em δ_H 4,72 (2H, s) foi atribuído aos dois hidrogênios metilênicos em carbono oxigenado, e o sinal de hidrogênio ligado a grupo OH se apresentou como um simpleto largo em δ_H 2,74. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19, p. 266) e o subespectro DEPT-135 (Figura 20, p. 266) mostraram sinais em δ_C 177,75 (CH do aldeído *α*, *β* insaturado), em δ_C 152,31 e δ_C 160,84 (carbonos quaternários C-2 e C-5), em δ_C 123,03 e δ_C 110,00 (CH, C-3 e C-4), e em δ_C 57,55 (CH_2-7, ligado à hidroxila).

O mapa de contornos COSY (Figura 21, p. 267), apresentou correlação entre os hidrogênios metínicos H-3 em δ_H 7,24 e H-4 em δ_H 6,52 e, através dos mapas de contornos HSQC e HMBC, foi possível atribuir as correlações de todos os sinais de hidrogênios e carbonos presentes na molécula.

A análise do mapa de contornos HSQC (Figura 22, p. 267) possibilitou associar os sinais de carbonos com os sinais dos hidrogênios correspondentes, δ_C 57,55 (C-7)/ δ_H 4,72 (H-7), δ_C 110,0 (C-4)/δ_H 6,52 (H-4), δ_C 123,03 (C-3)/δ_H 7,24 (H-3) e δ_C 57,55 (C-6)/δ_H 9,57 (H-6).

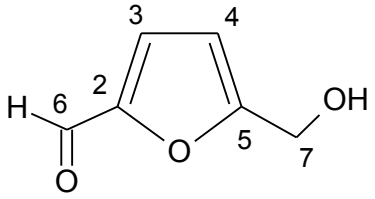
Pelo mapa de contornos HMBC (Figura 23, p. 268), o sinal do hidrogênio em δ_H 7,24 (H-3) apresentou correlações com os sinais de carbono em δ_C 110,0 (C-4, ^2J), em δ_C 152,31(C-2, ^2J) e em δ_C 160,84 (C-5, ^3J). O sinal de hidrogênio em δ_H 6,52 (H-4) mostrou correlações com os sinais de carbono em δ_C 123,03 (C-3, ^2J), em δ_C 152,31(C-2, ^3J) e em δ_C 160,84 (C-5, ^2J). O sinal dos hidrogênios oximetilênicos, em δ_H 4,72 (H-7) apresenta correlações com os sinais de carbono em δ_C 110,0 (C-4, ^3J) e em δ_C 160,84 (C-5, ^2J). Por fim, o sinal em δ_C 152,31 (C-2), mostrou uma mancha de correlação com o sinal de hidrogênio em δ_H 9,62 (H-6, ^2J).

A análise do mapa de contornos ROESY (Figura 24, p. 268), evidenciou a correlação do hidrogênio H-7 (δ_H 5,14) com hidrogênio H-4 (δ_H 6,54), e a correlação do hidrogênio H-6 (δ_H 9,64) com o hidrogênio H-3 (δ_H 7,21), confirmando a estrutura proposta para **44**.

A comparação destes dados com aqueles registrados na literatura[51] confirmou a estrutura do 5-hidroximetilfurfural para **44** (Tabela 26).

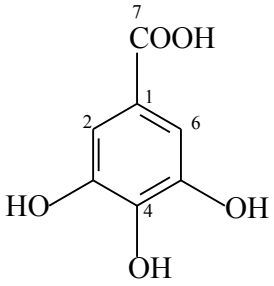
Tabela 26 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 200 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 50 MHz, $CDCl_3$) de **44** com aqueles relatados na literatura para o 5-hidroximetilfurfural (solvente: $CDCl_3$[51])

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**44**	**5-Hidroximetil-furfural[51]**	**C**	**44**	**5-Hidroximetil-furfural[51]**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
2	-	-	**2**	152,31	152,2
3	7,24 (d, *J*=3,4 Hz)	7,18 (d, *J*=3,7 Hz)	**3**	123,03	123,1
4	6,52 (d, *J*=3,4 Hz)	6,48 (d, *J*=3,7 Hz)	**4**	110,00	109,9
5	-	-	**5**	160,84	160,7
6	9,58 (s)	9,46 (s)	**6**	177,75	177,7
7	4,72 (s)	4,65 (s)	**7**	57,55	57,4
OH	2,74 (s)	3,08 (s)			



44

3.1.3 Identificação do ácido gálico (45)



O composto **45**, um sólido branco com temperatura de fusão na faixa entre 241 – 245 ºC, foi isolado a partir de G-1, proveniente da fração etérea (**G-1E**) e, quando submetido à CCDS, utilizando-se como fase móvel acetato de etila/ metanol 8:2 e por revelação com solução ácida de sulfato cérico sob aquecimento, forneceu uma única mancha de coloração marrom clara.

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 25, p. 269) de **45** mostrou um único simpleto em δ_H 7,07, sinal relativo a hidrogênios aromáticos.

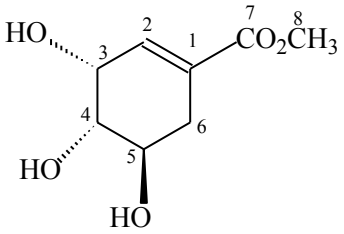
A análise dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 26, p. 269) indicou a presença de cinco sinais; o subespectro DEPT-135 (Figura 27, p. 270) apresentou um único sinal relativo a dois carbonos aromáticos em δ_{CH} 110,48; os outros quatro sinais de carbonos quaternários foram observados, no espectro de RMN de ^{13}C, em δ_C 122,08, 139,70, 146,48 e 170,55. A análise destes dados e comparação com aqueles de **43** e com dados da literatura[52], levaram à conclusão de que **45** se tratava-se do ácido gálico (Tabela 27, p. 55).

A análise do mapa de contornos HSQC (Figura 28, p. 270) possibilitou associar os sinais de carbonos com os sinais dos hidrogênios correspondentes em δ_C 110,67 (C-2 e C-6) / δ_H 7,07 (s, H-2 e H-6). O sinal de hidrogênio em δ_H 7,07 (s, H-2 e H-6), pelo mapa de contornos HMBC (Figura 29, p. 271) mostrou correlações com os sinais de carbono em δ_C 110,48 (C-2 e C-6, ^{3}J), δ_C 122,08 (C-1, ^{2}J), δ_C 139,70 (C-4, ^{3}J), δ_C 146,48 (C-3 e C-5, ^{2}J) e em δ_C 170,55 (C-7, ^{3}J).

Tabela 27 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, CD_3OD) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, CD_3OD) de **45** com aqueles relatados na literatura para o ácido gálico (solvente:CD_3OD[52])

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**45**	**Ácido gálico[52]**	**C**	**45**	**Ácido gálico[52]**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	122,08	121,9
2	7,07 (s)	7,05 (s)	**2**	110,48	110,3
3	-	-	**3**	146,48	146,4
4	-	-	**4**	139,70	139,6
5	-	-	**5**	146,48	146,4
6	7,07 (s)	7,05 (s)	**6**	110,48	110,3
7	-	-	**7**	170,55	170,4

3.1.4 Identificação do chiquimato de metila (46)



O composto **46** apresentou-se como um sólido branco com temperatura de fusão na faixa entre 108-109 ^{o}C, tendo sido isolado a partir do fracionamento de **G-1E**. Quando submetido à CCDS, utilizando-se como fase móvel acetato de etila/ metanol 7:3 e após revelação com solução ácida de sulfato cérico sob aquecimento, observou-se uma única mancha de coloração escura.

Seu espectro no Infravermelho (Figura 30, p. 271) apresentou bandas de absorção em 3307 cm^{-1} (estiramento de ligação O-H), 1715 cm^{-1} (estiramento de carbonila de éster conjugado), 1658 cm^{-1} (estiramento C=C de alqueno) e em 1233 cm^{-1} (estiramento de ligação C-O)[49].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 31 e 32, p. 272) de **46** apresentou em δ_H 3,74 um simpleto que pode ser atribuído a grupo metoxila (éster, com base no IV). O espectro RMN de ^{13}C (Figura 33, p. 273) confirmou esta função, apresentando sinais em δ_C 168,89 (carboxila) e 52,53 (metoxila). O espectro de RMN de ^{1}H apresentou também dois multipletos centrados em δ_H 2,20 e 2,72, relativos a dois hidrogênios metilênicos diastereoisoméricos; um duplo dupleto (*J*=6,8 e 3,6 Hz) em δ_H 3,68, um

multipleto entre δ_H 3,97-4,02, um simpleto em δ_H 4,55, um simpleto largo em δ_H 4,37, e um multipleto entre δ_H 6,78-6,80, cada um com integração relativa a um hidrogênio, também foram observados. No espectro de RMN de ^{13}C puderam ser vistos oito sinais e, com o auxílio do subespectro DEPT-135, (Figura 34, p. 273) puderam ser identificados, a metoxila, um carbono metilênico, quatro carbonos metínicos, sendo um deles sp^2. Os dois carbonos quaternários foram associados à carbonila do éster em δ_C 168,89 e a um carbono sp^2 de dupla em δ_C 130,36.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **46** se mostraram similares àqueles do chiquimato de metila e do ácido chiquímico (Tabela 28, p. 57)[53, 54].

O mapa de contornos COSY (Figura 35, p. 274), apresentou correlação entre os hidrogênios metilênicos em δ_H 2,17 (H-6_{ax}) e δ_H 2,60-2,67 (H-6_{eq}) com o hidrogênio metínico H-5 em δ_H 3,97 – 4,02. O sinal do hidrogênio H-4 em δ_H 3,68 apresentou correlação com os hidrogênios H-3 em δ_H 4,37 e H-5 em δ_H 3,97 – 4,02, e a correlação do sinal de hidrogênio metínico H-2, em δ_H 6,78 – 6,80, com o hidrogênio H-3 em δ_H 4,37.

Através do mapa de contornos HSQC (Figura 36, p. 274) foi possível associar os sinais dos carbonos com aqueles dos hidrogênios correspondentes: δ_C 139,36 (C-2)/ δ_H 6,78-6,80 (m, H-2); δ_C 72,74 (C-4)/ δ_H 3,68 (dd, H-4); δ_C 68,55 (C-5)/ δ_H 3,97-4,02 (m, H-5); δ_C 67,41 (C-3)/ δ_H 4,37 (sl, H-3); δ_C 52,53 (C-8)/ δ_H 3,74 (s, H-8); δ_C 31,64 (C-6)/ δ_H 2,20 (m, H6ax) e δ_H 2,72 (m, H6eq).

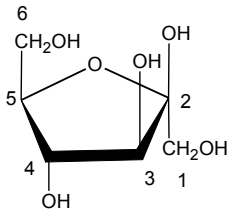
Pelo mapa de contornos HMBC (Figura 37, p. 275), pode-se observar a correlação do sinal relativo ao hidrogênio metilênico H_{6eq}, em δ_H 2,72, com o sinal de carbono em δ_C 130,36 (^2J, C-1); o sinal do outro hidrogênio metilênico H_{6ax}, em δ_H 2,20, apresentou correlação com os sinais de carbonos em δ_C 68,55 (^2J, C-5), em δ_C130,36 (^2J, C-1) e em δ_C 139,26 (^3J, C-2). O sinal do carbono carbonílico em δ_C 168,89 (C-7) mostrou correlação com os sinais de hidrogênios em δ_H 6,78-6,80 (^3J, H-2) e em δ_H 3,74 (^2J, H-8). Por fim, o multipleto em δ_H 6,78 (H-2) apresentou correlação com o sinal de carbono em δ_C 31,64 (^3J, C-6).

Pelo mapa de contornos NOESY (Figura 38, p. 275), observa-se a correlação de H-6_{ax} com o hidrogênio H-4, confirmando a estereoquímica de H-6_{ax}.

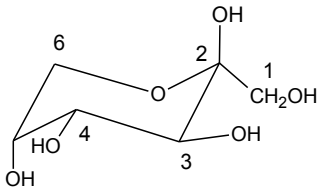
Tabela 28 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, CD_3OD) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, CD_3OD) de **46** com aqueles relatados na literatura para o chiquimato de metila (solvente: CD_3OD[53]) e o ácido chiquímico (solvente: D_2O[54])

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**46**	**Chiquimato de metila[53]**	**C**	**46**	**Ácido chiquímico[54]**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	130,36	129,6
2	6,78-6,80 (m)	6,71-9,73 (m)	**2**	139,26	137,2
3	4,37 (sl)	4,31 (sl)	**3**	67,41	65,7
4	3,68 (dd, *J*=6,8, 3,6)	3,61-3,65 (m)	**4**	72,74	70,9
5	3,97-4,02 (m)	3,93 (dd, *J*=12,3 e 5,1)	**5**	68,55	66,5
6_{ax}	2,20 (m)	2,17 (dd, *J*=18,0, 5,1)	**6**	31,64	30,2
6_{eq}	2,72 (m)	2,60-2,67 (m)			
7	-	-	**7**	168,89	170,0
8	3,74 (s)	4,83 (s)	**8**	52,53	-
OH	4,55(s)	3,25 (s)			

3.1.5 Identificação da mistura de *β-D*-frutofuranose (47) e *β-D*-frutopiranose (48)



β-D-Frutofuranose (**47**)



β-D-Frutopiranose (**48**)

A mistura foi isolada como um óleo viscoso a partir do grupo **G-2**, proveniente da cromatografia em poliamida do extrato etanólico bruto (**EEB**).

O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 39 e 40, p. 276) revelou a presença de sinais múltiplos na região entre δ_H 3,50–4,08, característicos de hidrogênios carbinólicos de açúcares.

Os espectros de RMN de ^{13}C (Figura 41, p. 277) e DEPT 135 (Figura 42, p. 277) da mistura mostraram a presença de três sinais de carbonos anoméricos em δ_C 99,34, 103,32 e 105,99, indicando a presença de três unidades de açúcar. Com base em dados da literatura[55, 56] foi possível a atribuição dos sinais de RMN de ^{1}H e de ^{13}C das duas unidades mais abundantes, sendo estes a *β-D*-frutofuranose (**47**) e

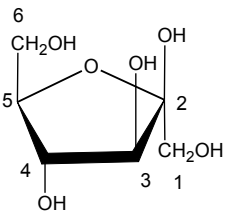
a *β-D*-frutopiranose (**48**), respectivamente (Tabelas 29 e 30). O outro sinal do carbono anomérico em δ_C105,99, sugeriu a presença de α-*D*-frutofuranose[56].

Tabela 29 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (δ, 100 MHz, CD_3OD) de **47** com aqueles relatados para a *β-D*-frutofuranose (solvente: D_2O[55, 56])

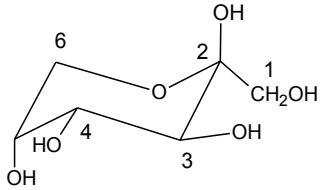
RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**47**	***β-D*-frutofuranose**[55]	**C**	**47**	***β-D*-frutofuranose**[56]
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	3,64 e 3,73 (m)	3,54 e 3,71 (dd)	**1**	64,35	63,6
2	-	-	**2**	103,57	102,6
3	4,03-4,08 (m)	4,11 m	**3**	77,70	76,4
4	4,03-4,08 (m)	4,11 m	**4**	76,97	75,4
5	4,03-4,08 (m)	4,05	**5**	83,76	81,6
6	3,52 e 3,81 (m)	3,67 (dd) e 3,79 (dd)	**6**	64,35	63,2

Tabela 30 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, CD_3OD) e ^{13}C *(δ,* 100 MHz, CD_3OD) de **48** com aqueles relatados para a *β*-D-frutopiranose (solvente: D_2O[55, 56])

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**48**	***β*-D-frutopiranose**[55]	**C**	**48**	***β*-D-frutopiranose**[56]
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	3,52 e 3,67 (m)	3,55 (d) e 3,71 (d)	**1**	64,70	64,7
2	-	-	**2**	99,87	99,1
3	3,77 (sl)	3,79 (dd)	**3**	69,59	68,4
4	3,86 (sl)	3,89 (dd)	**4**	72,00	70,5
5	4,03 (m)	3,99 (ddd)	**5**	71,50	70,0
6	3,73 e 4,03 (m)	3,70 (dd) e 4,02 (dd)	**6**	64,70	64,1

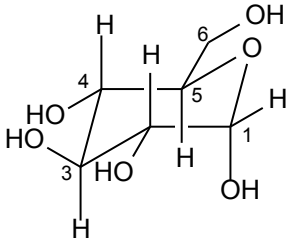


β-D-Frutofuranose (**47**)

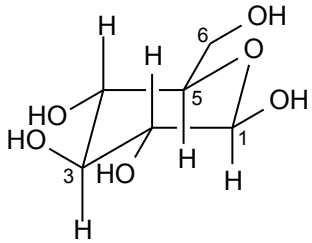


β-D-Frutopiranose (**48**)

3.1.6 Identificação da mistura da *α*- e *β*-*D*-glicose (49) e (50)



α-*D*-glicose (**49**)



β-*D*-glicose (**50**)

A mistura contendo **49** e **50** foi isolada como um sólido branco a partir do grupo **G-2**, proveniente da cromatografia em poliamida do extrato etanólico bruto (**EEB**). Quando submetido à CCDS, utilizando-se como fase móvel acetato de etila/ metanol 1:1 e após revelação com anisaldeído/H_2SO_4 sob aquecimento, observou-se uma única mancha de coloração escura.

O espectro no IV (Figura 43, p. 278) apresentou feição característica de açúcar, com uma banda larga em 3249 cm^{-1} (estiramento de OH), em 2937 (estiramento de ligação CH), 1423 e 1373 cm^{-1} (deformação de ligação CH) e em 1020 cm^{-1}, banda característica de estiramento de ligação C-O[49].

O espectro de RMN de ^1H (Figura 44, p. 278) de **49** e **50** apresentou dois dupletos relativo a hidrogênios anoméricos em δ_H 5,17 e δ_H 4,58 (J=4,08 e 8,16 Hz). Os sinais de carbonos correspondentes a estes hidrogênios foram encontrados no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 45, p. 279) e subespectro DEPT-135 (Figura 46, p. 279) em δ_C 95,89 e 92,08 respectivamente.

A comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C com aqueles relatados na literatura[57] para a glicose, assim como com a comparação direta com uma amostra autêntica por CCDS, permitiram identificar **49** e **50** como uma mistura de isômeros *α* e *β* da D-glicose (Tabelas 31 e 32, p. 60).

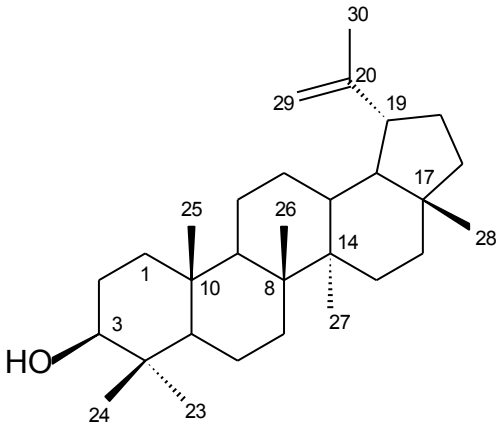
Tabela 31 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, D_2O) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, D_2O) de **49** com aqueles relatados para a *α-D*-glicose (solvente: D_2O[57])

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**49**	***α-D*-glicose**[57]	**C**	**49**	***α-D*-glicose**[57]
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	5,17 (d, *J*=3,6)	5,1 (d, *J*=3,1)	**1**	92,08	92,9
2	3,40-3,43 (m)	3,4 (t, *J*=9,5)	**2**	71,47	72,5
3	3,65 (t, *J*=9,6)	3,6 (t, *J*=9,5)	**3**	72,75	73,8
4	3,35 (t, *J*=9,6)	3,3 (t, *J*=9,5)	**4**	69,64	70,6
5	3,71 – 3,80 (m)	3,7 (m)	**5**	71,43	72,3
6	3,69 (dd, *J*=5,6, 12,4)	3,6 (dd, *J*=5,7, 12,8)	**6**	60,58	61,6

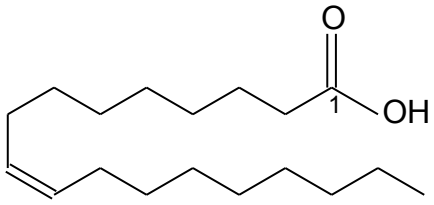
Tabela 32 – Comparação dos dados de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, D_2O) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, D_2O) de **50** com aqueles relatados para a *β-D*-glicose (solvente: D_2O[57])

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**50**	***β-D*-glicose**[57]	**C**	**50**	***β-D*-glicose**[57]
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	4,59 (d,*J*=8,16)	4,5 (d, *J*=7,8)	**1**	95,89	96,7
2	3,18 (t, *J*=8,8)	3,1 (t, *J*=9,5)	**2**	74,13	75,1
3	3,45-3,37 (m)	3,4 (t, *J*=9,5)	**3**	75,74	76,7
4	3,45-3,37 (m)	3,3 (t, *J*=9,5)	**4**	69,59	70,6
5	3,45-3,37 (m)	3,5 (m)	**5**	75,93	76,8
6	3,72 – 3,80 (m)	3,7 (dd,*J*=5,7, 12,8)	**6**	60,74	61,7

3.1.7 Identificação da mistura de lupeol (51) e ácido oléico (52)



Lupeol (**51**)



Ácido Oléico (**52**)

A mistura contendo **51** e **52** foi isolada como um óleo, a partir do grupo **G-3**, proveniente do fracionamento de **EEB** por cromatografia em coluna de poliamida. Apresentou uma mancha de coloração rósea, com outra mancha em cauda sobreposta, observada através da análise por CCDS (hexano/ acetato de etila 8:2 e revelação com reagente de Liebermann Bouchard). Por comparação com amostra autêntica, a mancha rósea mostrou ser o lupeol.

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 47, p. 280) da mistura apresentou dois simpletos em δ_H 4,68 e em δ_H 4,57, atribuídos aos hidrogênios da dupla ligação terminal do lupeol, H-29. Este espectro também mostrou um duplo dupleto em δ_H 3,17 e 3,20 ($J_{3ax\text{-}2ax}$ = 11,2 e $J_{3ax\text{-}2eq}$ = 4,8 Hz), relativo ao hidrogênio H-3, do carbono carbinólico. Os simpletos relativos aos hidrogênios metílicos H-28, H-27, H-26, H-25, H-24 e H-23 podem ser vistos entre δ_H 0,78 e 1,03. Um sinal intenso entre δ_H 1,26-1,31, típico de hidrocarboneto de cadeia longa pode ser associado à contaminação observada por CCDS. O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 48 e 49, p. 280 e 281) apresentou um sinal em δ_C 178,69, que pode ser atribuído a carbonila de ácido. Um tripleto em δ_H 2,34 (J=7,6 Hz), relativo a 2 hidrogênios pode ser associado a grupo metileno vizinho a uma carbonila. O multipleto entre 5,33-5,36 foi atribuído a sinal de hidrogênios olefínicos da cadeia do ácido carboxílico.

Os sinais característicos do esqueleto lupânico puderam ser detectados no espectro de RMN de ^{13}C em δ_C 79,38 (C-3), 151,29 (C-20) e 109,63 (C-29). Os sinais relativos aos carbonos olefínicos do ácido insaturado foram encontrados em δ_C 130,34 e 130,05. Com a ajuda do subespectro DEPT-135 (Figuras 50 e 51, p. 281 e 282), a outra substância foi identificada como o ácido oléico, que apresenta insaturação entre C9 (δ_C 130,05) e C10 (δ_C 130,34). O sinal do C2 deste ácido foi encontrado δ_C 34,09. Entretanto, devido ao número de sinais, a mistura ainda contém outra contaminação, que não pôde ser identificada. Os dados de RMN de ^{13}C e aqueles da literatura, relativos a estas duas substâncias, estão apresentados nas Tabelas 33 e 34, p. 62.

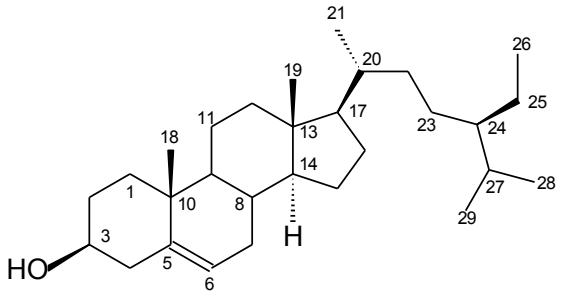
Tabela 33 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **51** com aqueles do lupeol (solvente: $CDCl_3$[58])

RMN de ^{13}C			RMN de ^{13}C		
C	**51**	**Lupeol** [58]	**C**	**51**	**Lupeol**[58]
	δ_C			δ_C	
1	38,40	38,7	**16**	35,92	35,5
2	27,47	27,4	**17**	43,32	43,0
3	79,38	78,9	**18**	48,33	48,2
4	39,04	38,8	**19**	48,31	47,9
5	55,64	55,3	**20**	151,29	150,9
6	18,65	18,3	**21**	29,35	29,8
7	34,62	34,2	**22**	40,33	40,0
8	41,17	40,8	**23**	28,30	28,0
9	50,78	50,4	**24**	15,68	15,4
10	37,51	37,1	**25**	16,43	16,1
11	21,26	20,9	**26**	16,30	15,9
12	25,01	25,1	**27**	14,87	14,5
13	38,40	38,0	**28**	18,32	18,0
14	43,17	42,8	**29**	109,63	109,3
15	27,53	27,4	**30**	19,63	19,3

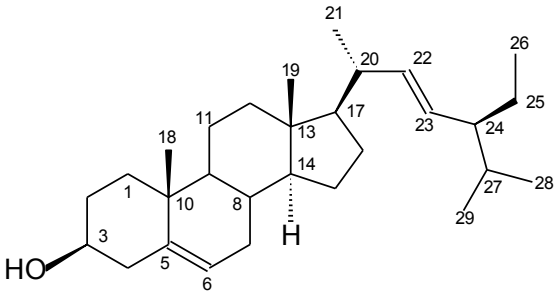
Tabela 34 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **52** com aqueles do ácido oléico (solvente: $CDCl_3$[59])

RMN de ^{13}C		
C	**52**	**Ácido oléico**[59]
	δ_C	
1	178,69	179,03
2	34,09	33,97
3	25,01	24,70
4	29,55	29,25
5	29,38	29,08
6	29,45	29,15
7	29,63	29,78
8	27,78	27,23
9	130,34	130,03
10	130,05	129,74
11	27,72	27,16
12	29,67	29,70
13	29,90	29,45
14	29,83	29,53
15	29,75	29,33
16	32,22	31,93
17	22,99	22,70
18	14,41	14,12

3.1.8 Identificação da mistura de *β*-sitosterol (53), estigmasterol (54), contaminada com o ácido oléico (52)



β-Sitosterol (**53**)



Estigmasterol (**54**)

Esta mistura foi isolada como um óleo, a partir de **G-3**, proveniente do fracionamento de **EEB** em coluna de poliamida. Por CCDS (hexano/ acetato de etila 8:2 e revelação com solução ácida de sulfato cérico, sob aquecimento), mostrou ser constituído de uma mistura de *β*-sitosterol e estigmasterol, por comparação com uma amostra autêntica desta mistura. Uma cauda em toda a extensão da placa mostrou haver ainda alguma contaminação na mistura.

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 52, p. 282) apresentou multipletos relativos aos hidrogênios olefínicos H-22 e H-23 do estigmasterol, em δ_H 4,99-5,13 e 5,15-5,17, O multipleto entre 5,30-5,39 foi atribuído a sinal de hidrogênio olefínico H-6 do *β*-sitosterol e estigmasterol e também, pela integração, aos hidrogênios olefínicos H-9 e H-10 do ácido oléico. O sinal de H-3 para os dois esteróides apareceu como um multipleto entre δ_H 3,49-3,56. Os demais sinais puderam ser vistos entre em δ_H 0,68 e 2,29. O sinal intenso entre δ_H 1,26-1,31, típico de hidrocarboneto de cadeia longa, deve ser associado ao ácido oléico, por comparação dos sinais de hidrogênio com a mistura anterior.

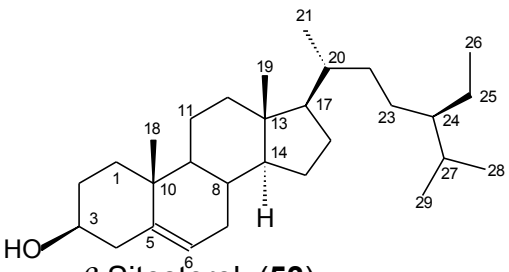
A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 53, p. 283), auxiliada pelo subespectro DEPT-135 (Figuras 54 e 55, p. 283 e 284) indicou tratar-se esta mistura de estigmasterol e *β*-sitosterol, pelos deslocamentos químicos característicos de carbonos olefínicos em δ_C 140,76 (C-5), 138,33 (C-22 do estigmasterol), 129,32 (C-23 do estigmasterol), e δ_C 121,75 (C-6). Também pelo espectro de RMN de ^{13}C, puderam ser observados os sinais em δ_C 178,95, 130,05 e 129,75, relativos aos carbono carbonílico e olefínicos C-9 e C-10 do ácido oléico. Entretanto, devido ao

número de sinais, a mistura ainda contém outra contaminação, que não pôde ser identificada.

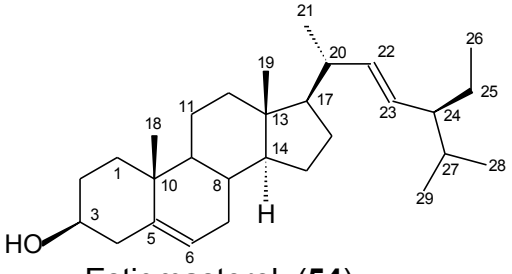
A comparação dos dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C desta mistura com aqueles da literatura para o *β*-sitosterol e o estigmasterol se encontra na Tabela 35.

Tabela 35 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (*δ*, 100 MHz, $CDCl_3$) de **53** e **54** com aqueles do *β*-sitosterol e estigmasterol[60] (solvente: $CDCl_3$[60])

RMN de ^{13}C				
C	**53**	***β*-sitosterol[60]**	**54**	**estigmasterol[60]**
	δ_C		δ_C	
1	37,29	37,25	37,29	37,25
2	31,67	31,64	31,67	31,64
3	71,87	71,81	71,87	71,81
4	42,30	42,29	42,30	42,29
5	140,76	140,73	140,76	140,73
6	121,75	121,72	121,75	121,72
7	31,95	31,89	31,95	31,89
8	31,93	31,89	31,93	31,89
9	50,20	50,12	50,20	50,12
10	36,17	36,40	36,17	36,40
11	21,11	21,08	21,11	21,08
12	39,72	39,78	39,72	39,68
13	42,30	42,29	42,30	42,29
14	56,90	56,75	56,90	56,81
15	24,39	24,30	24,39	24,38
16	28,93	28,24	28,93	28,24
17	56,00	56,05	56,00	55,93
18	12,07	11,87	12,07	11,87
19	19,41	19,38	19,41	19,38
20	36,17	36,16	40,50	40,50
21	19,00	19,03	21,23	21,20
22	33,99	33,94	138,33	138,40
23	26,13	26,12	129,75	129,27
24	45,88	45,83	51,27	51,23
25	29,15	29,20	31,92	31,89
26	19,00	18,76	19,00	19,00
27	19,83	19,81	19,00	19,00
28	22,70	23,06	25,42	25,42
29	12,00	11,99	12,26	12,27

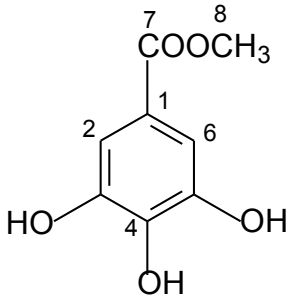


β-Sitosterol (**53**)



Estigmasterol (**54**)

3.1.9 Identificação do galato de metila (55)



O composto **55** foi isolado do extrato metanólico bruto (**EMB**). Apresentou-se como um sólido branco e quando submetido à CCDS, utilizando-se como fase móvel acetato de etila /metanol (8:2) e revelação com solução ácida de sulfato cérico sob aquecimento, apresentou uma única mancha de coloração marrom.

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 56, p. 284) de **55** apresentou um simpleto relativo a dois hidrogênios aromáticos em δ_H 7,24 (2H) e outro simpleto em δ_H 3,79 (3H), associados a um grupo metoxila.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 57, p. 285) mostrou a presença de seis sinais, sendo quatro deles relativos a carbonos quaternários, em δ_C 167,47, 145,57, 138,82 e 120,79. Outro sinal relativo a carbono metínico aromático foi observado em δ_C 109,38.

A comparação destes dados com aqueles registrados na literatura para o galato de metila[50] confirmou esta estrutura para **55** (Tabela 36).

Tabela 36 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 200 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 50 MHz, $CDCl_3$) de **55** com aqueles relatados na literatura para o galato de metila (solvente: $DMSO_{-d6}$[50])

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**55**	**Galato de metila[50]**	**C**	**55**	**Galato de metila[50]**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	120,79	119,4
2	7,24 (s)	6,92 (s)	**2**	109,38	108,6
3	-	-	**3**	145,57	145,6
4	-	-	**4**	138,82	138,4
5	-	-	**5**	145,57	145,6
6	7,24 (s)	6,92 (s)	**6**	109,38	108,6
7	-	-	**7**	167,47	166,4
8	3,79 (s)	3,73 (s)	**8**	51,72	51,7

CAPÍTULO 4

Testes Biológicos

4.1. Testes de avaliação da atividade larvicida, frente à *Artemia salina*, do extrato etanólico bruto (EEB), de duas frações e de duas substâncias puras obtidas a partir do epicarpo e mesocarpo externo de *C. brasiliense* Camb.

4.1.1 Introdução

Um ensaio simples, barato e eficiente (feito no próprio laboratório de fitoquímica) de determinação da toxidade aguda de substâncias é o teste sobre o estágio larval da *Artemia salina* (TAS).

A consolidação da técnica e sua utilização sistemática, como meio de se obterem substâncias ativas de extratos vegetais foi inicialmente descrita por McLaughlin e colaboradores[61] e Meyer e colaboradores[62]. De acordo com o último, extratos vegetais com valores de DL_{50} menores que 1000 *μ*g/mL em *A. salina* são considerados tóxicos.

O teste de toxicidade frente à *Artemia salina* foi realizado sob a coordenação da Professora Lúcia Pinheiro Santos Pimenta.

4.1.2 Metodologia utilizada, de acordo com Pimenta e colaboradores[63].

Procedimento:

a) Preparou-se 1L de solução salina, usando-se sal marinho sintético e água deionizada (38,0 g/L).
b) Em 100 mL de solução salina, adicionaram-se cerca de 10 mg de ovos de *A. salina*, sendo deixado sob iluminação artificial a 28 °C. A eclosão ocorreu após aproximadamente 24 horas. O restante da solução descrita no item anterior foi utilizado para a diluição das amostras.
c) As larvas eclodidas foram transferidas para um segundo recipiente e mantidas sob aquecimento por mais 24 horas.
d) Foram preparadas as soluções de lapachol e das amostras-teste (extrato, frações e substâncias isoladas dissolvidos em DMSO) em cinco concentrações diferentes. O galato de etila (**43**) e o ácido gálico (**45**) foram testados com concentrações de: 2, 4, 10, 20 e 40 *μ*g/mL e o extrato etanólico bruto (**EEB**), fração etérea (**G-1E**) e extrato vegetal (**T1**) foram testados com concentrações de: 60, 120, 240, 600 e 960 *μ*g/mL. Os testes foram feitos em triplicata e as soluções distribuídas em frascos.

e) Preparou-se um grupo controle, pela utilização de solução marinha contendo 1% de DMSO (v/v).
f) As larvas eclodidas foram adicionadas às soluções a serem testadas, utilizando-se uma pipeta de Pasteur, sendo colocadas aproximadamente dez larvas para cada frasco.
g) Toda a bateria de ensaio foi mantida em local fresco durante 24 horas.
h) Após este período, fez-se a leitura, pela contagem de larvas sobreviventes e mortas; esta foi realizada a olho nu, sendo usado um fundo branco para melhor contraste.
i) A determinação da DL_{50} (com intervalo de confiança de 95%) foi feita utilizando-se o método probitos de análise.
j) Foram realizados testes de padronização com o lapachol, cuja DL_{50} sobre o microcrustáceo *A. salina* é conhecida: 70,0 μg /mL (61< DL_{50} < 81). A média dos resultados obtidos para esta substância, durante os ensaios de padronização da técnica, em nosso laboratório, foi DL_{50} = 68 μg /mL (57< DL_{50} < 79), valor próximo daquele descrito na literatura.

4.1.3 Resultados

A Tabela 37, p. 69 apresenta os resultados dos testes de toxicidade, realizados com o extrato etanólico bruto (**EEB**), frações etérea (**G-1E**) e extrato vegetal (**T1**), provenientes da partição de **G-1** e duas substâncias puras: galato de etila (**43**) e ácido gálico (**45**), frente às larvas de *A. salina.*

O resultado mais promissor, entre o extrato e as frações testadas, foi obtido com a fração etérea (**G-1E**), que apresentou DL_{50}= 160,80 μg/ mL. De acordo com Meyer e colaboradores[62], **EEB** e **T1**, que apresentaram DL_{50} > 1000 μg/mL, não podem ser considerados tóxicos.

A ótima atividade apresentada pelo ácido gálico e pelo galato de etila pode explicar o resultado observado para a fração etérea **G-1E**, pois ambas as substâncias foram isoladas desta fração.

Tabela 37 – Atividade larvicida, frente à *Artemia salina*, apresentada pelo extrato etanólico bruto, frações e substâncias isoladas do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)

Extrato, frações e substâncias isoladas testadas	DL_{50} (*μ*g/ mL)	Intervalo de confiança 95% (*μ*g/ mL)
EEB	55629,86	1345,02< DL_{50} >2300,19
G-1E	160,80	131,32< DL_{50} >196,89
T1	2875,69	1265,79< DL_{50} >6533,17
Galato de etila (**43**)	149,27	27,97< DL_{50} >96,53
Ácido gálico (**45**)	62,08	38,42< DL_{50} >100,30

4.2 Testes de avaliação da atividade capturadora de radicais, pela utilização do DPPH, do extrato bruto e de algumas frações obtidas a partir do epicarpo e mesocarpo externo de *C. brasiliense* Camb.

4.2.1 Introdução

Uma definição biológica de antioxidante é "substância natural ou sintética que é adicionada a produtos para prevenir ou retardar a sua deterioração pela ação do oxigênio do ar. Em bioquímica e medicina, antioxidantes são enzimas ou outras moléculas orgânicas como as vitaminas E e C e o *β*-caroteno, que são capazes de contra-atacar os efeitos danosos da oxidação em tecidos animais"[64].

Pesquisas fitoquímicas com extratos de plantas, de maneira geral, têm focalizado seu trabalho na detecção, no isolamento e na determinação estrutural de antioxidantes naturais. Assim, é de grande importância a utilização de um método conveniente para a rápida quantificação da ação antioxidante de extratos vegetais e/ ou substâncias puras. Diversas metodologias foram criadas e, dentre elas, o teste com o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), é "um método fácil e exato para se medir a capacidade capturadora de radicais livres de frutos, sucos, substâncias e extratos vegetais"[65].

O DPPH é um dos poucos radicais orgânicos estáveis e comercialmente disponíveis, tendo máximo de absorção, no UV-VIS, em torno de *λ*=515 nm. Sob redução, sua coloração violeta desaparece gradualmente. O progresso da reação é monitorado por um espectrofotômetro.

O teste de atividade antioxidante foi realizado sob a coordenação da Professora Maria Amélia Diamantino Boaventura.

4.2.2 Metodologia utilizada, de acordo com Burda & Oleszek [66]

O teste foi realizado com o extrato etanólico bruto (**EEB**) e três frações (**G-1**, **G1-E** e **T-1**), obtidas a partir do primeiro.

As amostras do extrato etanólico bruto e frações (1 mg) foram solubilizadas em 10 mL de metanol e a partir dessa solução foram feitas diluições, obtendo-se, no final, concentrações de 1, 10 e 100 μg/ mL.

Alíquotas de 750 μL de cada diluição foram colocadas em cubetas de plástico (1 cm de caminho ótico) contendo 1500 µL de solução de DPPH (0,002% p/v) em metanol. Os experimentos foram realizados em triplicata e após 30 minutos as absorbâncias foram medidas em λ= 517 nm. A absorbância desta solução de DPPH foi também medida no mesmo tempo (30 min), tendo sido preparada no tempo zero de experimento, ficando, durante os 30 minutos protegida da incidência direta da luz.

O metanol puro foi utilizado para a correção da linha de base no espectrofotômetro. O cálculo da CE_{50} (concentração efetiva para descolorir 50% da solução de DPPH) foi feito utilizando-se o método probitos de análise.

4.2.3 Resultados

Na Tabela 38, p. 71, encontram-se as médias dos valores do percentual de redução de DPPH e do CE_{50} para cada amostra (**EEB**, **G-1**, **G-1E** e **T1**), nas três concentrações testadas. Esses dados podem ser também visualizados no gráfico de barras (Gráfico 1), onde o eixo y representa a média da % de inibição do DPPH e o eixo x, as amostras nas três concentrações testadas.

Tabela 38 – Valores relativos às médias do percentual de redução de DPPH apresentados pelo extrato etanólico bruto e frações obtidas a partir do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), em três concentrações diferentes e valores da concentração efetiva necessária para descolorir 50% da solução de DPPH (CE_{50})

Extratos/ frações	Porcentagem de inibição			
	1 μg / mL	10 μg / mL	100 μg / mL	CE_{50}(μg / mL)
EEB	0	63,67	94,36	28,33
G – 1	5,4	51,28	96,69	9,30
G – 1E	16,59	95,49	96,92	2,42
T1	3,60	16,93	91,74	22.21
BHT	40,4	45,6	84,2	16,4

Pela análise da Tabela 38, pode-se observar uma diminuição da CE_{50} partindo de **EEB** para **G-1E**. Já **T1** apresentou CE_{50} na mesma faixa que aquela apresentada por **EEB**, indicando que as substâncias ativas presentes no extrato bruto e em **G-1** passaram para **G-1E** e não **T1**. Estas substâncias ativas devem ser principalmente compostos fenólicos, como por exemplo o ácido gálico (**45**), isolado desta fração.

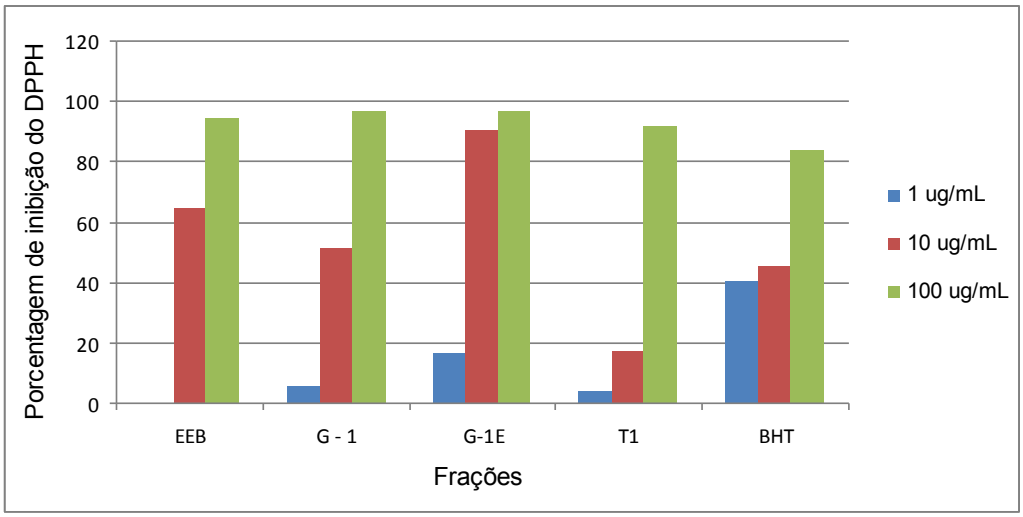


Gráfico 1 – Percentual de inibição do DPPH pelo extrato bruto e frações, obtidas a partir do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), em três concentrações diferentes.

Através do Gráfico 1, pode-se observar que na concentração de 100*μ*g/mL todas as amostras tiveram um percentual de inibição maior do que o BHT e a 10 *μ*g/mL as amostras EEB, G-1 e G-1E foram mais ativas do que o padrão BHT.

4.3 Testes de avaliação da atividade alelopática do extrato etanólico bruto (EEB), de frações e substâncias puras obtidas a partir do epicarpo e mesocarpo externo de *C. brasiliense* Camb.

4.3.1 Introdução

A definição mais recente para alelopatia, aceita pela Sociedade Internacional de Alelopatia, é a seguinte: "É a ciência que estuda qualquer processo envolvendo, principalmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento de sistemas biológicos com efeitos positivos e negativos".

A importância do efeito estimulador e sua utilização, por exemplo, em agricultura, é bastante óbvio. No entanto, atualmente, o principal objetivo da pesquisa de substâncias possuindo atividade alelopática é a busca de herbicidas alternativos, já que o uso indiscriminado, nas últimas décadas, de herbicidas sintéticos provocou um aumento na incidência de resistência das espécies daninhas a serem eliminadas, além da poluição ambiental, com os conseqüentes danos para a saúde animal e humana[67].

As estratégias para a descoberta de aleloquímicos são análogas àquelas utilizadas para a descoberta de substâncias bioativas na indústria farmacêutica e envolvem a avaliação da atividade de extratos brutos e substâncias puras sobre um determinado sistema biológico (bioensaio) e desde os trabalhos pioneiros da década de 40, numerosos bioensaios têm sido desenvolvidos e utilizados.

Os bioensaios preliminares em laboratório precisam ser rápidos, econômicos e relevantes para o sistema em questão, sendo úteis para se estabelecer o potencial alelopático de uma substância pura ou um extrato. O ensaio para aleloquímicos mais amplamente utilizado é aquele que monitora a germinação e crescimento de

plantículas (raiz e caule) de uma dada espécie. As sementes da espécie vegetal selecionada são geralmente colocadas sobre papel de filtro ou ágar em uma placa de petri e tratadas com a solução do aleloquímico a ser testado em concentrações

variadas (entre 10^{-3} e 10^{-9} mol/L). A germinação e o crescimento da raiz e do caule da plantícula são monitorados em relação a um branco (solução sem o aleloquímico) [67].

A consideração mais importante, no entanto, no desenvolvimento de um bioensaio para o estudo alelopático, é a seleção da espécie vegetal a ser testada. Espécies vegetais, denominadas "plantas indicadoras", são o fator crucial para a determinação acurada do impacto alelopático, nessa avaliação preliminar da atividade. *Lactuca sativa* L. (alface), *Raphanus sativus* L. (rabanate) e *Lepidium sativum* (agrião) têm sido as mais utilizadas nessa etapa da avaliação, principalmente devido à sua grande sensibilidade e sua alta taxa de germinação.

O teste de atividade alelopática foi realizado sob a coordenação da Professora Maria Amélia Diamantino Boaventura.

4.3.2 Metodologia utilizada, de acordo com Vieira e colaboradores[68]

Foram empregadas sementes de *Lactuta sativa* L. var. Grands Rapids da marca Islã Pak. Todas as sementes menores ou danificadas foram desprezadas. Adicionaram-se 25 sementes de alface sobre cada placa de Petri de 100 mm, contendo papel Whatman n^{o}. 1, de 90 mm, e 10 mL das soluções teste (o extrato **EEB** e as frações **G-1**, **G-1E**, **T1** e **G-3** nas concentrações entre 1 mg/mL até 1,6 x10^{-3} mg/mL e as substâncias puras nas concentrações 10^{-3}, 10^{-5} e 10^{-7} mol/L) e da solução controle (branco). As soluções teste foram preparadas por dissolução do extrato **EEB** e das frações e substâncias puras em água destilada (tamponada com 10 mmol/L do ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico e seu pH ajustado para 6,0 – 6,5 com solução de NaOH). As concentrações inferiores a 1 mg/mL, nas soluções teste, foram obtidas por diluição desta. O teste foi realizado em triplicata para cada concentração e para o controle. As placas de petri foram fechadas e incubadas, no escuro, a 25^{o}C por 5 dias. Depois deste tempo, as placas foram abertas e comprimento de cada raiz e caule medidos.

4.3.3 Resultados

Pela análise do Gráfico 2, p. 75, relativo à atividade de **EEB** e **G-1**, pode-se imediatamente observar uma atividade inibidora predominando sobre o crescimento da raiz, enquanto uma total atividade estimulatória é observada para o caule de *L.*

sativa. **G-1** foi um pouco mais inibidor do crescimento da raiz que **EEB**, a 1 mg/mL, e foi também mais estimulador sobre o crescimento do caule, a 0,2 mg/mL.

As frações **G-1E**, **T1** e **G-3** (Gráfico 3, p. 75) foram testadas a concentrações inferiores a 0,04 mg/mL (até onde se chegou para **EEB** e **G-1**), visando observar se uma diminuição da concentração aumentaria o estímulo sobre o crescimento de *L. sativa,* já que de acordo com Macías e colaboradores[67] concentrações mais elevadas de substâncias ativas apresentam maior tendência à inibição, enquanto que, em maiores diluições podem mesmo provocar estímulo. No entanto, para a raiz, até na concentração de 0,008 mg/mL, **G-1E** apresentou inibição. O melhor estímulo ocorreu sobre o crescimento do caule, por **G-3** também a 0,008 mg/mL.

O Gráfico 4, p. 76, é relativo ao efeito sobre as substâncias puras galato de etila (**43**), 5-hidroximetilfurfural (**44**) e ácido gálico (**45**) sobre o crescimento de raiz e caule de *L. sativa*. O efeito, neste caso, foi predominantemente inibidor tanto para o caule quanto para a raiz. O composto **44** inibiu o crescimento da raiz e do caule em todas as concentrações testadas. Foi interessante observar um efeito oposto do ácido gálico (**45**) e de seu éster etílico (**43**) sobre o crescimento da raiz: enquanto o último estimulou este crescimento, o ácido gálico o inibiu, ambos na concentração de 10^{-3}mol/L . O ácido gálico apresentou o maior estímulo sobre o crescimento da raiz, a 10^{-7} mol/L.

Esta é a primeira descrição da atividade alelopática do ácido gálico e galato de etila sobre *L. sativa*.

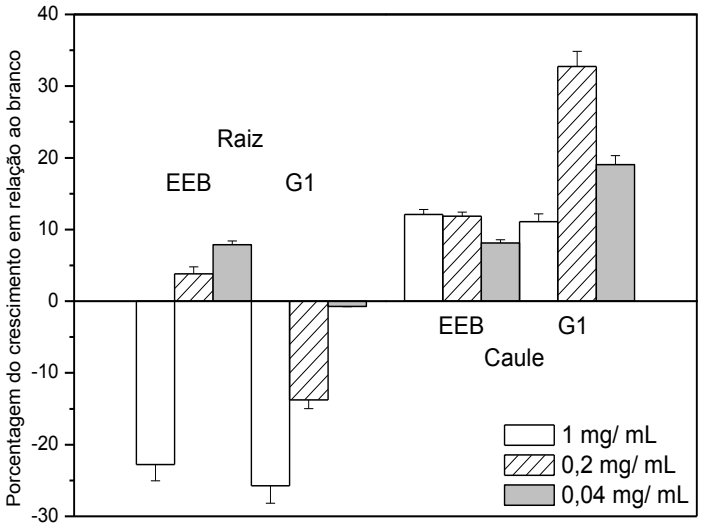


Gráfico 2 – Efeito do extrato etanólico bruto (**EEB**), obtido a partir do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), e da fração **G-1**, derivada deste, sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes.

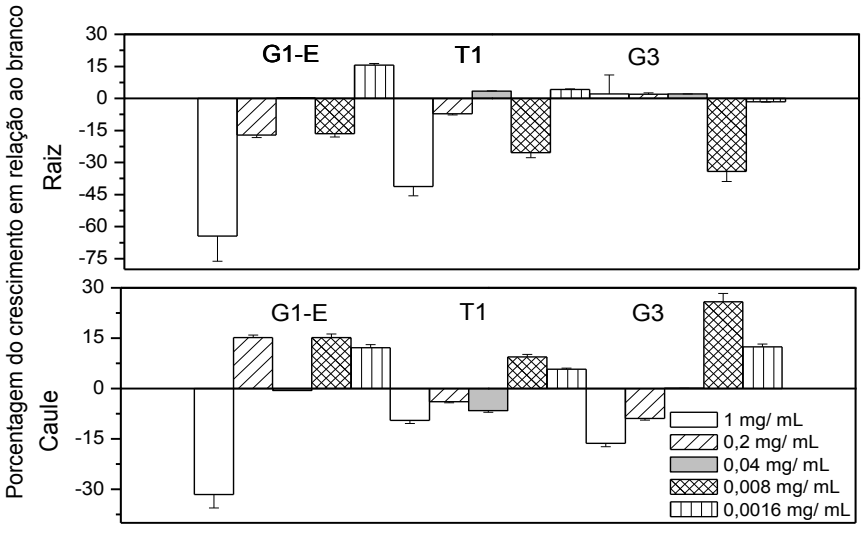


Gráfico 3 – Efeito da fração etérea (**G-1E**), da fração (**T1**) e da fração **G-3**, obtida a partir de **EEB**, proveniente do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes.

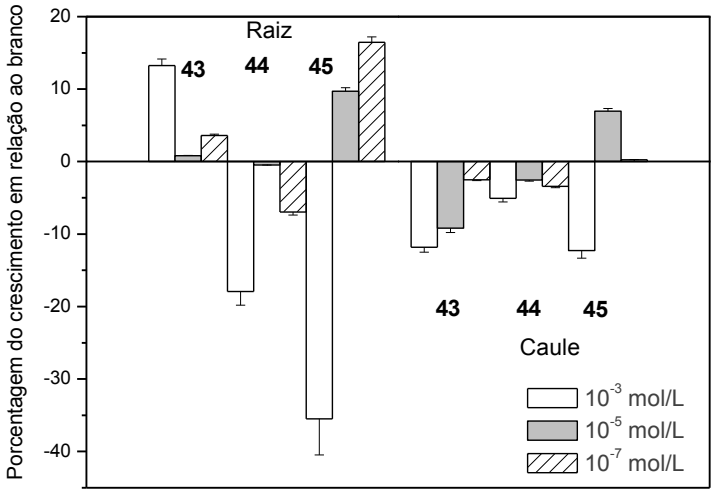


Gráfico 4 – Efeito das substâncias puras **43** (galato de etila), **44** (hidroxi-metilfurfural) e **45** (ácido gálico), obtidas a partir do extrato etanólico bruto (**EEB**), proveniente do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes.

4.4 Testes de avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto (EEB) e de frações obtidas a partir do epicarpo e mesocarpo externo de *C. brasiliense* Camb.

4.4.1 Introdução

Os antibióticos são considerados, em um sentido restrito, como substâncias produzidas por microrganismos (fungos ou bactérias) que suprimem o crescimento de outros. A utilização intensa e incorreta destes fármacos leva continuamente ao surgimento de resistências dos patógenos a estes e, conseqüentemente, à necessidade da introdução de novos antibióticos no mercado. O ritmo de desenvolvimento de novos agentes microbianos deve ser então intenso, mas, infelizmente, caiu drasticamente na última década[69]. Daí a importância de se testar tanto produtos naturais, como aqueles obtidos de síntese como possíveis fontes de agentes anti-infecciosos.

Pesquisas relacionadas à avaliação da atividade antimicrobiana de plantas medicinais têm encontrado problemas devido à diversidade de critérios, técnicas empregadas e propriedades lipofílicas de algumas amostras a serem testadas. Rios e colaboradores[70] publicaram uma revisão sobre as diferentes técnicas e métodos aplicados à avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais e substâncias

isoladas. Os métodos de difusão (disco, cavidade e cilindro) são mais frequentemente empregados na pesquisa, e a vantagem que apresentam está associada ao pequeno volume das alíquotas utilizadas e na possibilidade de se testar várias substâncias simultaneamente, contra os mesmos microrganismos.

O teste de atividade antimicrobiana foi realizado sob a coordenação da Professora Jacqueline Aparecida Takahashi.

4.4.2 Metodologia utilizada, de acordo com Lana e colaboradores[71]

Método por difusão em disco

a) Preparo dos meios de cultura

Todos os meios foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, sendo autoclavados a 121 ºC, por 15 minutos.

Meio de cultura sólido antibiótico n º 1:

- Meio antibiótico n º.1: 27,0 g/L; Água destilada: qsp; 8 mL/tubo.

Meio de cultura BHI:

- BHI: 37,0 g/L; Água destilada: qsq; 2 mL/tubo

Solução salina:

- NaCl: 9,0 g/L; $MgSO_4.7H_2O$: 0,5 g/L; Água destilada: qsq; 4,5 mL/ tubo

b) Metodologia do ensaio:

As amostras foram testadas em duplicata, empregando-se o método convencional de difusão em ágar. Discos de papel estéreis, de 6 mm de diâmetro, foram impregnados com 50 µL de solução de 4 mg da amostra dissolvidos em 1000 *µ*L de solvente apropriado (metanol). Foram utilizados como controle positivo para bactérias, discos impregnados com cloranfenicol (30 *µ*g/disco) e, como controle positivo para fungos, miconazol (30 mg/disco).

Para este teste foram preparados o inóculo microbiano, a suspensão em solução salina, o meio antibiótico inoculado e os discos impregnados.

Para o preparo do inóculo, repicaram-se os microrganismos, conservados em tubos de ensaio contendo ágar inclinado, para novos tubos contendo o meio BHI. Incubou-se, durante 24 horas, em estufa microbiológica, a 37 ºC. Deste inóculo, pipetou-se uma quantidade suficiente para alcançar a turbidez da Escala de *McFarland* na solução salina. Uma alíquota de 0,3 mL foi retirada desta suspensão e inoculada nos tubos contendo meio antibiótico. Após homogeneização verteu-se esta suspensão junto com o meio antibiótico dos tubos em placas de Petri. Os

discos contendo a amostra foram colocados sobre o meio solidificado, dispostos de distâncias iguais entre os discos. As placas foram incubadas à temperatura de 37 ºC, por 24 horas. O grau de resistência/sensibilidade dos microrganismos foi observado pela ausência/presença de halos de inibição ao redor dos discos após 24 horas de incubação. A leitura dos halos foi feita medindo-se o diâmetro interno dos mesmos e os resultados expressos em milímetros. Foram consideradas ativas as amostras que causaram halos de inibição superiores a 7 mm.

Concentração inibitória mínima (CIM)

O método da CIM visa testar várias concentrações diferentes da amostra em tubos contendo a mesma quantidade de microrganismo. A menor concentração da amostra capaz de inibir a turvação do meio é considerada a CIM. Foram utilizados tubos em duplicata contendo a amostra solubilizada em DMSO nas seguintes concentrações 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 0,5 *µ*g/mL, para cada microrganismo avaliado.

Após a amostra ser inoculada no primeiro tubo, são feitas diluições seriadas até o ultimo tubo, cada um com o mesmo volume de BHI. Como citado no método de difusão em disco, é preparada a suspensão microbiológica em solução salina e destas são adicionados 100 *µ*L em cada um dos 10 tubos.

Os tubos foram incubados durante 18 horas, a 35 ºC e posteriormente procedeu-se a leitura. As culturas de microrganismos utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 29212, *Salmonella typhymurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Citobacter freundi* ATCC 8090, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 18804.

4.4.3 Resultados

O extrato etanólico bruto (**EEB**) e as frações **G-1** e **G-1E** foram analisados quanto à sua atividade antimicrobiana, apresentando halos de inibição inferiores a 7 mm. Apenas a fração **G-1E** apresentou atividade expressiva frente aos microrganismos testados, conforme apresentado na Tabela 39, p. 79. *C. albicans* foi resistente a esta fração, na concentração testada. O valor da concentração inibitória mínima (CIM) encontrado foi de 512 *µ*g/ mL para todos microrganismos testados, exceto *S. typhymurium* e *C. albicans* os quais não apresentaram valores significativos.

Tabela 39 – Atividade antimicrobiana, *in vitro*, da fração **G-1E** obtida a partir do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) frente a várias bactérias e o fungo *C. albicans*

Halos de inibição de crescimento (mm)			
	Material testado	Controles	
Microrganismos utilizados	**G – 1E**	Cloranfenicol	Miconazol
S. aureus	13	20	nt
S. typhymurium	11	20	nt
E. coli	12	23	nt
C. freundi	11	22	nt
B. cereus	11	24	nt
L. monocytogenes	18	30	nt
P. aeruginosa	10	14	nt
C. albicans	nd	nt	25

nd= não detectado
nt= não testado

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

1 - Sano, S. M.; Almeida, S. P. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina, EMBRAPA-CPAC, **1998**, p. 89-152.

2 - Melo-Júnior, A. F.; Carvalho, D.; Povoa, J. S. R.; Bearzoti, E. Estrutura genética de populações naturais do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) *Scientia Forest Alis*, **2004**, 66, 56-65.

3 - Prance, G. T. The genus *Caryocar* L. (*Caryocaraceae*): an underexploited tropical resource. *Advances in Economic Botany* **1990**, 8, 177-188.

4 - Perez, E. Diagnose fitoquímica dos frutos de *Caryocar brasiliense* Camb., Caryocaraceae. Dissertação de mestrado. Curitiba, **2004**.

5 - Kawanishi, K.; Raffauf, R. F. *Caryocar microcarpum:* an ant repelent and fish poison of the nothwest amazon. *Journal of Natural Products* **1986,** 49, 1167-1168.

6 - Jiménez, G.; Hasegawa, M.; Rodriguez, M.; Estrada, O.; Méndez, J.; Castillo, A.; Gonzalez-Mujica, F.; Motta, N.; Vásquez, J.; Romerovecchione, E. Biological screening of plants of the Venezuelam amazons. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, 7, 77-83.

7 - Marx, F.; Andrade, E. H. A.; Maia, J.G. Chemical composition of the fruit pulp of *Caryocar villosum*. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A.* **1997**, 20, 442-444.

8 – Lima, M. T.; Maia, G. A.; Guedes, Z. B. L.; Oriá, H. F. Composição de ácidos graxos da fração lipídica do pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm), *Ciência Agronômica* **1981**, 12, 93-96.

9 - Sena, D. M.; Rodrigues, F. F. G.; Freire, P. T. C.; Lima, S. G.; Coutinho, H. D.M.; Carvajal, J. C. L.; Costa, J. G. M. Physicochemical and spectroscopical investigation of Pequi (*Caryocar coriaceum Wittm*.) pulp oil. *Grasas y Aceites*, **2010**, 15, 191-196.

10 - Magid, A. A.; Voutquenne, N. L.; Moretti, C.; Long, C.; Lavaud, C., Triterpenoid saponins from the fruits of *Caryocar glabrum*. *Journal of Natural Products* **2006**, 69, 196-205.

11 - Magid, A. A.; Voutquenne, N. L.; Harakat, D.; Pouny, I.; Caron, C.; Moretti, C.; Lavaud, C., Triterpenoid saponins from the fruits of *Caryocar villosum*. *Journal of Natural Products* **2006**, 69, 919–926.

12 - Magid, A. A.; Voutquenne, N. L.; Renimel, I.; Harakat, D.; Moretti, C.; Lavaud, C. Triterpenoid saponins from the stem bark of *Caryocar villosum*. *Phytochemistry* **2006,** 67, 2096–2102.

13 – Magid, A. A.; Voutquenne, N. L.; Harakat, D.; Moretti, C.; Lavaud, C., Phenolic Glycosides from the Stem Bark of *Caryocar villosum* and *Caryocar glabrum*. *Journal of Natural Products* **2008**, 71, 914–917.

14 - Magid, A. A.; Voutquenne, N. L.; Moroy, G.; Moretti, C.; Lavaud, C., Dihydroisocoumarin glucosides from stem bark of *Caryocar glabrum*. *Phytochemistry* **2007,** 68, 2439-2443.

15 - Damiani, C. Qualidade e perfil volátil de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) minimamente processado, armazenado sob diferentes temperaturas. Dissertação de Mestrado, Lavras, **2006**.

16 - Araújo, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (*Caryocaracea*) – an economically valuable species of the central Brasilian cerrados. *Economy Botany*, **1995**, 49, 40-48.

17 - Vieira, R. F.; Martins, M. V. M., Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2000**, 3,13–36.

18 - Magalhães, H. G.; Monteiro Neto, H.; Lagrota, M. H.; Wigg, M. D.; Guimarães, L. A. S.; Loja, M. A. S. O.; Araújo, R. R. Estudo estrutural do pequizeiro *Caryocar brasiliense* Camb. *Caryocaraceae*, sob o aspecto farmacoquímico e botânico. *Revista Brasileira de Farmácia* **1988**, 69, 31-41.

19 - Almeida, S. P.; Silva, J. A. Pequi e buriti: Importância alimentar para a população dos Cerrados; Planaltina: EMBRAPA-CPAC, **1994.**

20 - Barradas, M. M.; *Revista de Biologia*; São Paulo; **1993**, 9, 69-75.

21 - Almeida, S. P.; Proença, C. E. B.; Sano, S. M.; Ribeiro, J. F.; Cerrado: espécies vegetais úteis.EMBRAPA-CPAC; **1998**, p. 106-112.

22 - Oliveira, M. M.; Gilbert, B.; Mors, W. B. Triterpenes in *Caryocar brasiliense*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* **1968**, 40, 451- 452.

23 - Lima, A.; Silva, A. M.; Trindade, R. A.; Torres, R. P.; Mancini-Filho, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura* **2007**, 29, 695-698.

24 - Facioli, N. L.; Gonçalvez, L. A. G. Modificação por via enzimática da composição triglicerídica do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). *Química Nova*, **1998**, 21, 16-19.

25 - Segall, S. D.; Artz, W. E.; Raslan, D. S.; Ferraz, V. P.; Takahashi, J. A. Triacylglycerol analysis of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil by electrospray and tandem mas spectrometry. *J. Sci. Food. Agric*. **2006**, 86, 445-452.

26 - Azevedo-Meleiro, C. H.; Rodriguez-Amaya, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis* **2004**, 17, 385–396.

27 - Rodriguez-Amaya, D. B.; Godoy, H. T.; Mercadante, A. Z.; Ramos, D. M.R. Carotenoid composition of underexploited Brazilian fruits. In: Proceedings of the

Nineth World Congress of Food Science and Tecnology. International Union of Food Science and Tecnology, Budapest, **1995.**

28 - Alves, C. C. O.; Resende, J. V.; Prado, M. E. T.; Cruvinel, R. S. R. The effects of added sugars and alcohols on the induction of crystallization and the stability of the freeze-dried pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruits pulp. *Food Science and Technology*, **2010**, 43, 934-941.

29 - Bender, D. A. As vitaminas. In: Gibney, M. J.; Vorster, H. H.; Kok, F. J. Introdução à nutrição humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **2005**. 114 – 161.

30 - Angeloni, L. Caracterização mineral do fruto do pequizeiro (*Caryocar brasiliense*) oriundo de dois municípios do Estado de Goiás. In: Congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos, **2004**, Recife. CBCTA.

31 - Silva, S. M.; Brait, J. D. A.; Faria, F. P.; Silva, S. M.; Oliveira, S. L.; Braga, P. F.; Silva, F. M. S. Chemical characteristics of pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) native of three municipalities in the State of Goiás – Brazi. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **2009,** 29, 771 – 777.

32 - Maia, J. G. S.; Andrade, E. H. A.; Silva, M. H. L. Aroma volatiles of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) *Journal of Food Composition and Analysis*. **2008**, 21, 574-576.

33 - Passos, X. S.; Castro, A. C. M.; Pires, J. S.; Garcia, A. C.; Campos, F. C.; Fernandes, O. F. L.; Paula, J. R.; Ferreira, H. D.; Santos, S. C.; Ferri, P. H.; Silva, M. R. Composition and antifungal activity of essential oils of *Caryocar brasiliensis*. *Pharmaceutical Biology*. **2003**, 41, 319-324.

34 - Kuskoski, E.E.; Asuero, G.A.; Troncoso, A.M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en la pulpa de los frutos. *Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **2005**, 25, 726-732.

35 - Passos, X. S.; Santos, S. C.; Ferri, P. H.; Fernandes, O. F.; Paula, T. F.; Garcia, A. C.; Silva, M. R., Antifungal activity of *Caryocar brasiliense* (*Caryocaraceae*) against *Cryptococcus neoformans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **2002**, 35, 623-627.

36 - Septimio, L.R., **1994**. A fitoterapia baseada em ervas medicinais do cerrado. SIPE-Ministério da Cultura, Brasil.

37 - Siqueira, J.C., Plantas do cerrado na medicina popular. *Spectrum*: *Jornal* Brasileiro de Ciência. **1982,** 2, 41-44.

38 - Oliveira, M. M.; Sampaio, R. P.; Giorgi, W.; Gilbert, B.; Mors, W. B., *Caryocar brasiliense* - isolamento e identificação de algumas substâncias: atividade biológica sobre o sarcoma 180. *Arquivos do Instituto Biológico,* **1970**, 37, 25-27.

39 - Herzog-Soares, J.D.; Alves, R. K.; Isac, E.; Bezerra, J. C. B.; Gomes, M. H.; Santos, S. C.; Ferri, P. H., Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron*

adstringens (barbatimão vedadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2002**, 12, 11-15.

40 - Bezerra, J. C. B.; Silva, I.A.; Ferreira, H.D.; Ferri, P.H.; Santos, S.C. Molluscidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian cerrado medicinal plantas. *Fitoterapia,* **2002**, 73, 428-430.

41 - Marques, M. C. S.; Cardoso, M. G.; Souza, P. E.; Gavilanes, M. L.; Souza, J. A.; Pereira, N. E.; Negrão, I. O. Efeito fungitóxicos dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botritys cinera, Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. *Ciênci. Agrotec*. **2002**, Ed. especial, 1410-1419.

42 - Moreira M.R.; Pistori G.R.; Domingues F.G. e Hernandes-Terrones M.G. Potencial alelopático de extratos da raiz de *Caryocar brasiliense* no crescimento de Panicum maximum. **2002** XXIII CBCPD. Uberlândia.

43 – Paula-Junior, W.; Rocha, F. H.; Donatti, L.; Fadel-Picheth, C. M. T.; Weffort-Santos, A. M. Leismanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense Camb*. Leaves hydroethanolic extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* **2006**, 16, 625-630.

44 - Roesler, R.; Malta, L. G.; Carrasco, L. C.; Holanda, R. B.; Sousa, C. A. S.; Pastore, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* **2007**, 27, 53-60.

45 - Roesler, R.; Catarino, R. R.; Malta, L. G.; Eberlin, M. N.; Pastore, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry,* **2008**, 110, 711-717.

46 - Lima, A.; Mancini-Filho, J. Compostos com atividade antioxidante no fruto do pequi (*Caryocar brasiliense*). *Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, **2005**, 30, 310-315.

47 – Miranda-Vilela, A. L.; Akimoto, A. K.; Alves, P. C. Z.; Pereira, L. C. S.; Gonçalves, C. A.; Klautau-Guimarães, M.N.; Grisolia, C. K. Dietary carotenoid-rich pequi oil reduces plasma lipid peroxidation and DNA damage in runners and evidence for an association with MnSOD genetic variant -Val9Ala. *Genetis and Molecular. Research.* **2009**, 8 , 1481-1495.

48 - Miranda-Vilela, A. L.; Akimoto, A. K.; Alves, P. C. Z.; Pereira, L. C. S.; Klautau-Guimarães, M.N.; Grisolia, C. K. Dietary carotenoid-rich oil supplementation improves exercise-induced anisocytosis in runners: influences of haptoglobin, MnSOD (Val9Ala), CAT (21A/T) and GPX1 (Pro198Leu) gene polymorphisms in dilutional pseudoanemia (“sports anemia”). *Genetics and Molecular Biology*, **2010**, 33, 359-367.

49 - Silverstein, R. M., Webster, F. X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara-Koogan, **2000**.

50 - Ceruks, M.; Romoff, P.; Fávero, O. A.; Lago, J. H. G. Constituíntes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddl (*Anacardiaceae*). *Química Nova*, **2007**, 30, 597-599.

51 - Daniel, J. F. S. ; Carvalho, M. G. de ; Ferreira, D. T.; Schmitz, W.; Saridakis, H. O. . Phenolic Compounds and hydroximethylfurfural from the Flowers of *Caesalpinia peltophoroides* and their Antibacterial Activity. *Revista Latinoamericana de Química*, v. 32, n. 1, p. 25-29, 2004.

52 - Souza Filho, A. P. S.; Santos, R. A.; Santos, L. S.; Guilhon, G. M. P.; Santos, A. S.; Arruda, M. S. P.; Muller, A. H.; Arruda, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. *Planta Daninha,* **2006**, 24, 649-656.

53 - Liu, A.; Liu, Z. Z.; Zou, Z. M.; Chen, S. Z.; Xu, L. Z.; Yang, S. L. Synthesis of (+) zeylenone from shikimic acid. *Tetrahedron,* **2004**, 60, 3689-3694.

54 - Adrio, J.; Carretero, J. C.; Ruano, J. L. G.; Cabrejas, L. M. M. Enantioseletive synthesis of (+)-shikimic acid and (+)-5-epi-shikimic acid by assymetric Diels-Alder reaction of (+)-α-sulfinylacrylates. *Tetrahedron Assymetric*. **1997**, 8, 1623-1631.

55 - Sobolev, A. P.; Segre, A.; Lamanna, R. Próton High-Field NMR study of tomato juice. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2003**, 41, 237-245.

56 - Breitmaier, E.; Voelter, W.; Carbon 13 NMR spectroscopy high- resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry. 3 ed. New York: Ed. Weinheim, **1987.**

57 - Collins, P.; Ferrier, R.; "Monosaccharides", Their chemistry and their roles in Natural Products; 1ª. Ed, Chichester: Ed. John Wiley & Sons LTDA, **1995**.

58 - Mahato, S. B.; Jundi, A .P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry* **1994**, *37,* 1517-1575.

59 - Oliveira, D. M. Estudo fitoquímico de raízes de *Maytenus acanthophylla Reissek* (*Celastraceae*) e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato clorofórmico. Dissertação de Mestrado, Belo Horizonte, **2004**.

60 - Goulart, M. O. I; Sant´ana, A. E. G.; Lima, R. A.; Cavalcante, S. H.; Fitoconstituintes químicos isolados de Jatropha elliptica. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos triterpenos de jatrofolonas A e B. *Química Nova* **1993**,16, 95-100.

61 - McLaughlin, J.L..Crown gall tumours on potato disc and brine shrimp lethalily: two simple bioassay for higher plants screening and fraction methods in plant biochemistry; London: Hodtettmann Ed., v. 6, p. 1-32, **1991.**

62 - Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; MacLaughlin, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant contituents. *Planta Medica* **1982**, *45*, 31.

63 - Pimenta, L. P. S.; Pinto, G. B.; Takahashi, J. A.; Silva, L. G. F.; Boaventura, M. A. D., Biological Screening of *Annonaceus* Brazilian Medicinal using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test), *Phytomedicine*, **2003**, *10*, 209-212.

64 - Huang, D.; Ou, B.; Pnor, R. L.; The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Agricultural Food Chemistry,* **2005**, *53*, 1841-1856.

65 - Sanchez-Moreno, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science Technology International.* **2002**, 8, 121-137.

66 - Burda, S.; Oleszek, P. M. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal Agricultural Food Chemistry,* **2001**, *49*, 2774-2779.

67 - Macías, F. A.; Castellano, D.; Molinillo, J. M. G.; Search for Standard Phytotoxic Bioassay for Allelo Chemicals. Selection of Standard Target Species. *Journal Agricultural Food Chemistry,* **2000**, *48*, 2512-2521.

68 - Vieira, H. S.; Takahashi, J. A.; Pimenta, L. P. S.; Boaventura, M. A. D. Effects of kaurane Diterpene Derivatives on Germination and Growth of *Lactuca sativa* Seedlings. *Zeitschrift Für Naturforschung C.,* **2005**, *60*, 72-78.

69 - Gilman, A. G. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 10ª Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., **2003**.

70 - Rios, J. L.; Recio, M. C.; Villar, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, **1988**, *23*, 127-149.

71 - Lana, E. J. L.; Carazza, F. ; Takahashi, J. A. Antibacterial Evaluation of Some New 2-Aryl-3,5-Dimethoxy-1,4-Benzoquinone Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **2003**, *54*, 2053-2056.

PARTE 2

CAPÍTULO 1

Introdução

1. Introdução

1.1 Biotransformações

As estratégias para o estudo de produtos naturais vêm se modernizando, sendo a biotecnologia uma das alternativas interessantes na obtenção de metabólitos secundários inacessíveis por métodos clássicos de síntese, no desenvolvimento de técnicas de melhoramento vegetal e regeneração *in vitro*, na estimulação da germinação e crescimento de plantas[1] e na obtenção de moléculas ativas a partir de transformações microbianas.

O uso de células íntegras de microrganismos vivos (fungos, bactérias, algas ou células vegetais), cultivados em meios apropriados, é uma das técnicas mais usadas, pois dispõe integralmente do complexo enzimático, mas pode gerar misturas de produtos biotransformados[2]. No entanto, seu uso persiste pois esta metodologia é usualmente mais barata do que o emprego de enzimas isoladas. Dentre todos os sistemas de células íntegras existentes, os fungos têm sido tradicionalmente os mais empregados em reações de biotransformação[3].

As biotransformações consistem na utilização de microrganismos ou partes destes para se efetuar modificações estruturais no esqueleto de moléculas orgânicas, por meio de reações, tais como oxidações, reduções, hidrólises, condensações, isomerizações, formação de ligação carbono–carbono e introdução de heteroátomos[2,3,4]. Este tipo de reação tem se mostrado de significativa importância para a síntese de novos compostos de interesse biológico e/ou comercial, sendo uma técnica complementar que pode ter grande êxito em casos nos quais a química clássica não pode ser empregada[2,5].

As biotransformações têm vantagens quando comparadas aos métodos químicos correspondentes. As condições para tais processos são mais amenas e, na maioria das vezes, não requer proteção de outros grupos funcionais. As posições do esqueleto onde estas transformações ocorrem são, muitas vezes, inacessíveis a reagentes orgânicos clássicos. Em muitos casos, as

biotransformações são também enantioespecíficas, permitindo a produção de substâncias quirais puras a partir de misturas racêmicas[2].

Outras vantagens das biotransformações estão relacionadas à velocidade das reações, às condições de realização dos ensaios e à versatilidade que estas apresentam como reagentes[6]. As condições de reação usualmente são brandas, isto é, o pH do meio é ajustado entre 5 e 8, os experimentos são desenvolvidos à temperaturas entre 20 e 40 ºC e solventes aquosos são mais freqüentemente utilizados. Assim, há minimização de reações indesejáveis como decomposição, isomerização, racemização ou rearranjos inoportunos que interferem freqüentemente nas metodologias químicas[7].

A principal desvantagem do uso de reações microbianas é o rendimento, usualmente baixo. No entanto, os reagentes biológicos mostram-se muito versáteis e alterações na forma de cultivo (aeração, composição do meio, tempo e temperatura) ou no próprio reagente biológico (uso de outras espécies do gênero e de mutantes) podem levar a um aumento significativo do rendimento dos produtos[2].

Em termos econômicos, algumas biostransformações podem ser mais baratas e diretas do que os métodos químicos análogos e a conversão normalmente ocorre em condições que são consideradas ecologicamente mais aceitáveis[6].

Atualmente, várias são as transformações microbianas que fazem parte de processos industriais como uma etapa da síntese das penicilinas semi-sintéticas, potentes antibióticos de ampla utilização mundial[8,9,10].

1.2 Sesquiterpenos

Os terpenos são compostos formados a partir de unidades chamadas de isoprenos. Esta classe de metabólitos secundários apresenta grande complexidade estrutural, é amplamente distribuída na natureza[11], sendo classificada de acordo com o número de unidades isoprênicas que a constituem, sendo divididos em monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40})[11,12].

A biossíntese destes compostos consiste na condensação do precursor pirofosfato de isopentenila (IPP). São conhecidas duas rotas biossintéticas diferentes para a formação destes metabólitos [11,12].

A primeira rota, conhecida desde o fim da década de 1950[13], parte do mevalonato (MVA) e requer três moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA) para produzir o composto 3-hidroxi-3-metilglutaril-SCoA. A condensação de Claisen entre as duas unidades de acetil-CoA pode ocorrer de forma linear, porém o segundo ataque ocorre na carbonila cetônica[12]. As próximas etapas são de redução, que são de grande importância nos animais, pois agem como limitadores da biossíntese do colesterol[14]. O MVA resultante é fosforilado, formando o pirofosfomevalonato. A formação do IPP é catalisada pela pirofosfomevalonato decarboxilase (descarboxilação) e seguida de desidratação[12] (Figura 1, p. 92).

Outra rota ocorre por meio do intermediário 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP), formado a partir da reação entre o piruvato e o gliceraldeído-3-fosfato, sendo intermediada por enzima sintase[12]. A partir da catálise enzimática, ocorre um rearranjo na molécula de DXP e o aldeído formado é reduzido na dependência de NADPH para formar o 2-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), o primeiro intermediário desta rota metabólica[12] (Figura 1, p. 92).

Em ambas as rotas, após a formação do IPP, este é convertido por uma isomerase em pirofosfato de dimetil alila (DMAPP). A condensação de uma molécula de IPP em uma molécula de DMAPP, por meio do clássico modelo "cabeça-cauda", mediada por enzimas denominadas preniltransferases, gera o pirofosfato de geranila (GPP), unidade precursora dos monoterpenos. Por sua vez,

a reação do GPP com uma unidade de IPP gera o pirofosfato de farnesila (FPP), precursor imediato dos sesquiterpenos (Figura 1). A reação continua, formando as diferentes classes dos terpenos[11, 12].

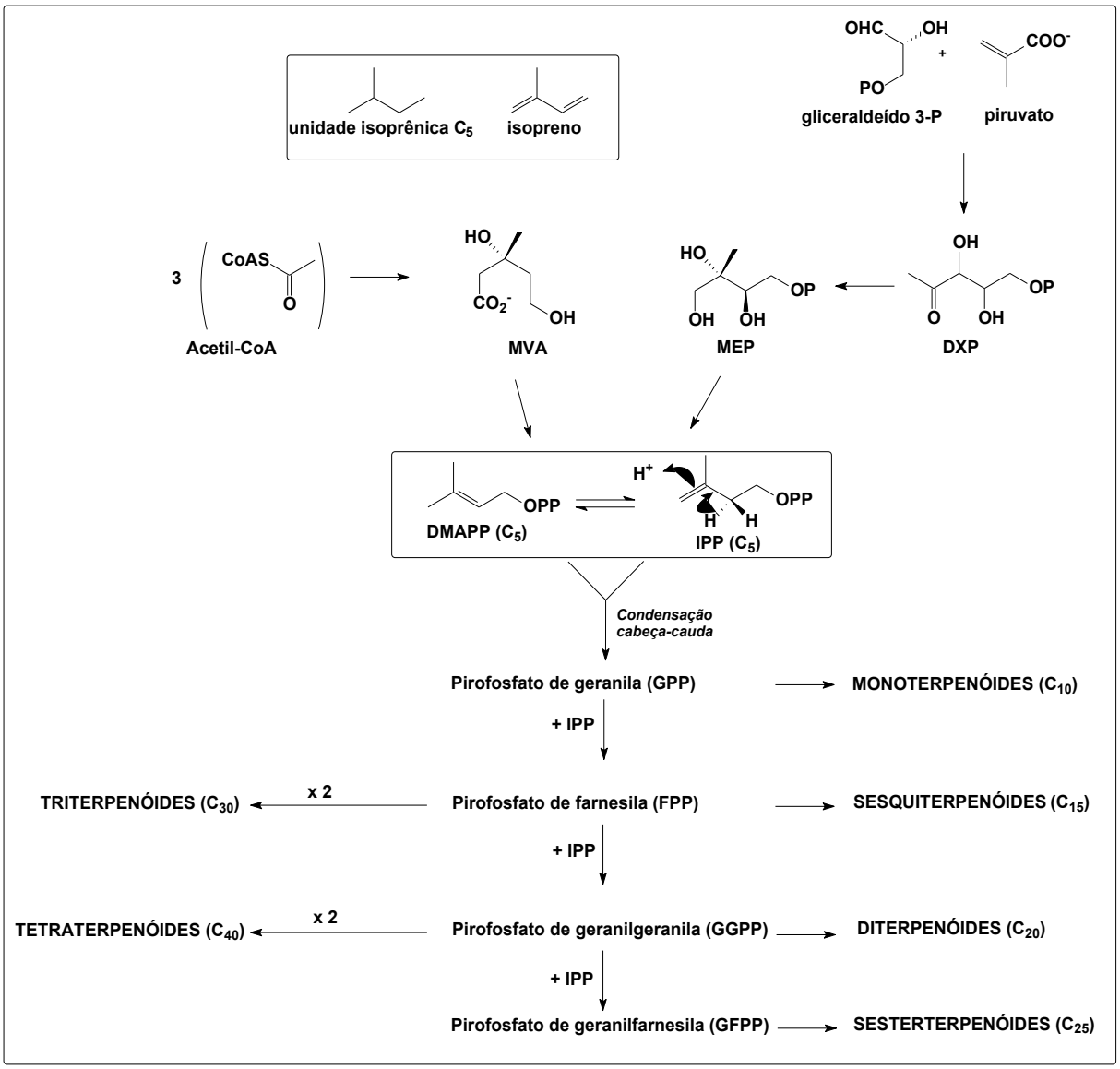


Figura 1 – Biossíntese dos terpenos[12].

Os sesquiterpenos são a subclasse mais diversificada entre os terpenos, sendo constituídos de quinze átomos de carbono. Esta diversificação estrutural, aliada à atividade biológica apresentada por eles, resulta em um grande interesse nesta subclasse[12].

Diversos sesquiterpenos são encontrados em óleos essenciais. Estes incluem o cariofileno (**1**), presente no óleo do cravo, o humuleno (**2**), presente no óleo do lúpulo, o cedreno (**3**), presente no óleo da madeira do cedro, o longifoleno (**4**), presente na resina terebinto (*Pinus ponderosa*), entre outros[11]. O sesquiterpeno santonino (**5**), presente na *Artemisia maritima*, tem sido usado na eliminação de vermes do intestino[11,12]. Artemisinina (**6**), um sesquiterpeno isolado de *Artemisia annua*, tem sido recentemente recomendado pelo *World Health Organization* no tratamento de cepas resistentes de vetores da malária. O hormônio de plantas ácido abscisico (**7**) é um sesquiterpeno que estimula a caída das folhas e a dormência das plantas. As estruturas destes sesquiterpenos (Figura 2) exemplificam a diversidade dos esqueletos carbônicos dos sesquiterpenos.

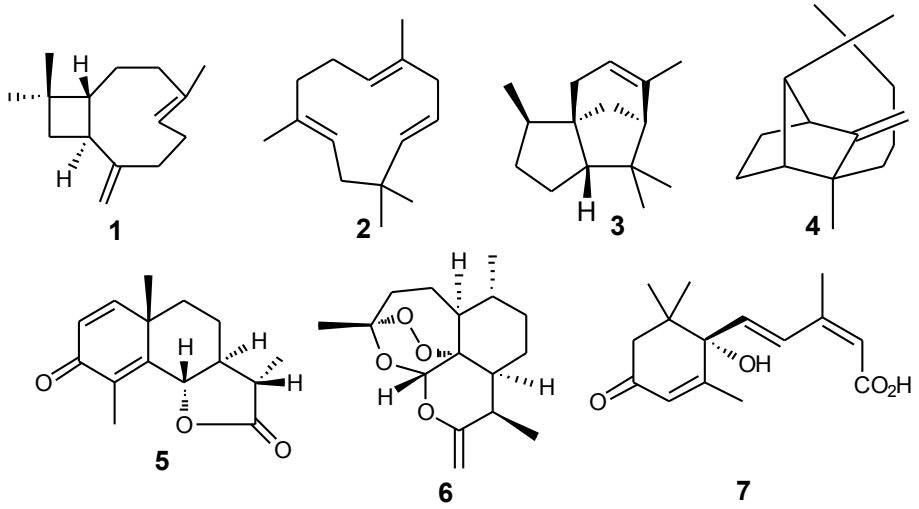
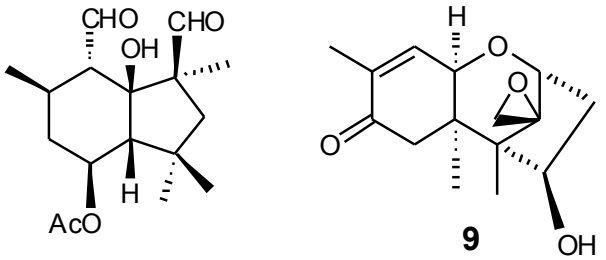


Figura 2 – Compostos com esqueleto sesquiterpênico.

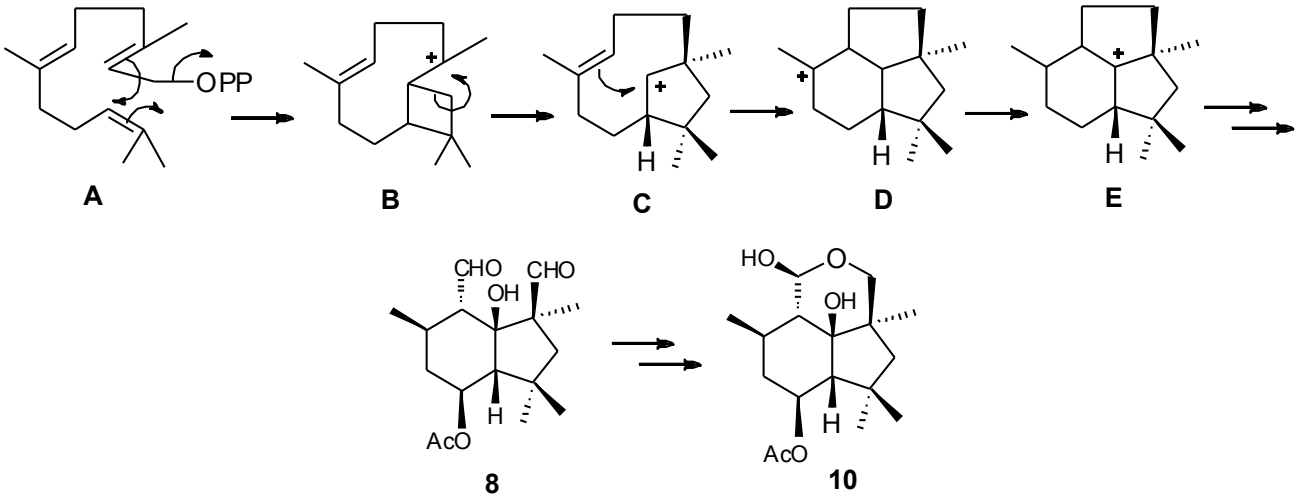
Alguns metabólitos fúngicos (Figura 3, p. 94) também apresentam este esqueleto, como os botrilanos (ex. botridial, **8**), produzidos pelo fungo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, são considerados fitotoxinas e outros, como os tricotecenos (ex. **9**), são metabólitos característicos do gênero *Fusarium*[11].



8 **9**

Figura 4 – Metabólitos fúngicos com esqueleto sesquiterpênico.

A biossíntese do botridial (**8**), um sesquiterpeno bicíclico, foi proposta, em 1981, por Hanson *et al*.[15], como indicado no Esquema 1. Os primeiros passos passam pela formação do carbocátion (**B**), gerando, após a ciclização, um carbocátion tricíclico intermediário (**D**). Após a transferência 1,3 de hidreto, o carbocátion terciário é atacado por uma molécula de água do meio. Uma posterior ruptura oxidativa do álcool tricíclico conduz ao botridial (**8**), a partir do qual se derivam todas as toxinas isoladas do gênero *Botrytis,* tais como o di-hidrobotridial (**10**)[15, 16].



A **B** **C** **D** **E**

8 **10**

Esquema 1 – Biossíntese dos sesquiterpenos **8** e **10,** isolados de fungos do gênero *Botrytis.*

1.3 Características gerais de *Botrytis cinerea*

O fungo *Botrytis cinerea* é um fitopatógeno causador da doença “podridão cinza”, um mofo cinza pulverulento que cobre culturas de hortaliças e frutas (Figura 4), causando grandes perdas e prejuízos. Este fungo pertence a um grupo de fungos imperfeitos do gênero *Botrytis* e família *Moniliaceae*[16].



Figura 4 – “Podridão cinza” causada por *B. cinerea*

B. cinerea é um parasita polífago e tem a possibilidade de alternar períodos de vida saprófita com outros de comportamento parasitário ou semiparasitário[6]. Reproduz-se de forma sexuada ou assexuada, apresentando diversos estados e formas de latência, podendo permanecer no solo ou sobre restos de plantas durante extensos períodos de tempo. Este fungo tem sido identificado como um patógeno de mais de 235 espécies de plantas, incluindo, uvas, alface, tomates, tabaco e morangos[16] (Figura 5).

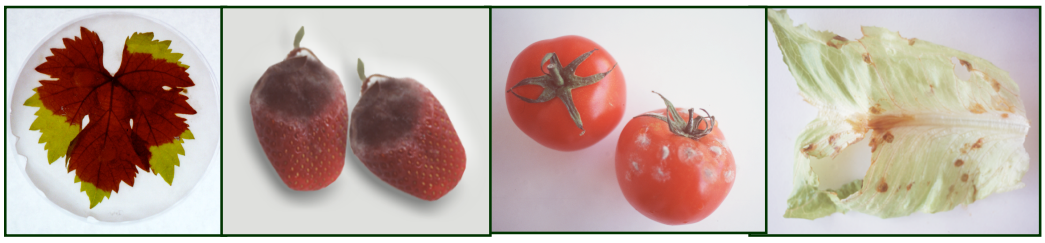


Figura 5 – Efeito produzido por *B. cinerea* em diferentes cultivos.

Espécies do gênero *Botrytis* apresentam ampla distribuição geográfica e têm sido encontradas desde em regiões frias como Alasca ou Canadá, até em regiões tropicais como Egito[16]. Dentre as espécies deste gênero, destacam-se as espécies *B. cine*rea, que infectam principalmente uvas, *B. allii, B. byssoides* e *B. squamosa,* patógenos de cebolas, *B. fabae*, patógeno do feijão *B. gladioli*, o qual afeta lírios e *B. tulipae*, que afeta tulipas e açafrão[6,16].

Apesar do fungo *Botrytis cinerea*, ao infectar as uvas, causar danos que afetam a produção de vinhos, em certas circunstâncias, esta contaminação também podem levar a vinhos de excelente qualidade, tais como o Sauternes (França), Tokays (Hungria) e Trockenbeerenauslesen (Alemanha e Austria). A vantagem é que o fungo consome, proporcionalmente, muito mais compostos ácidos do que o açúcar da uva, obtendo-se, assim, vinhos suaves, doces, com corpo e sabor agradáveis[17, 18].

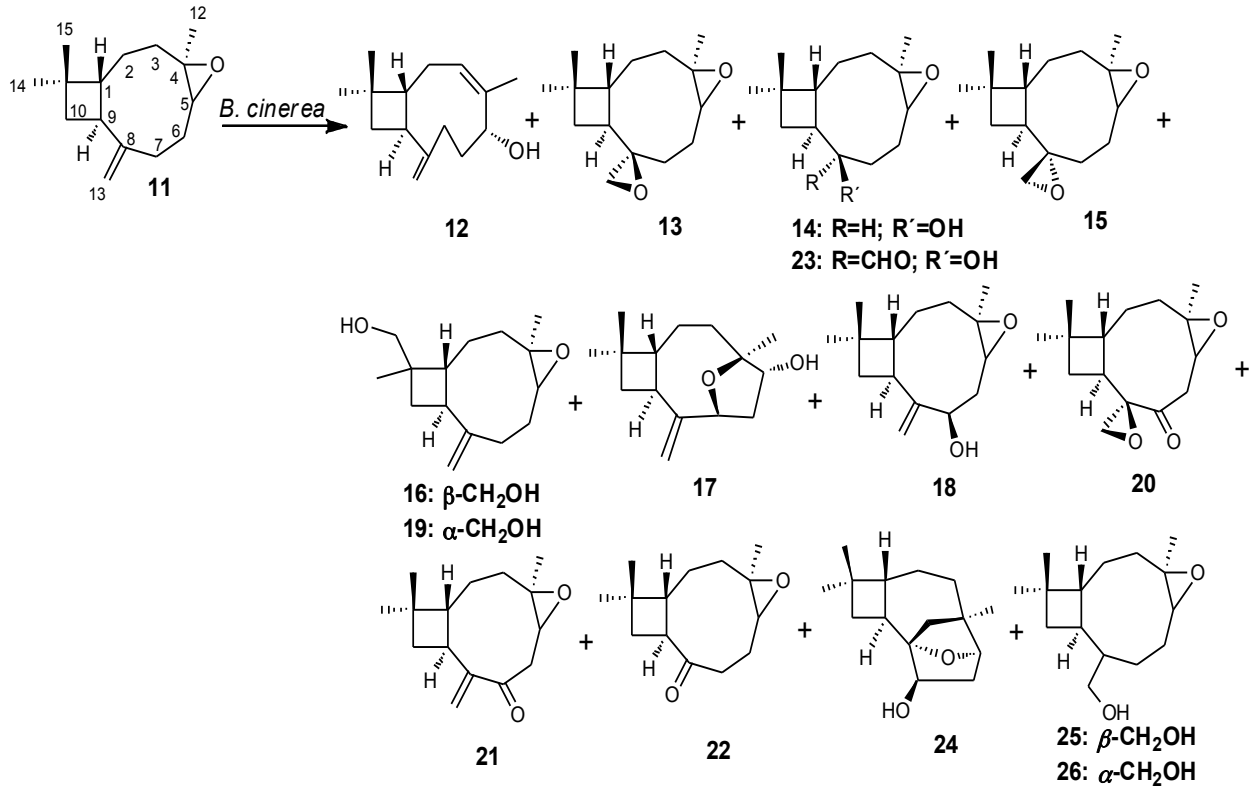
Durante a infecção da planta, este fungo produz duas séries de metabólitos fitotóxicos: a) lactonas policetídicas, conhecidas como botcnilidas e botrilactonas, além de botcininas, compostos com estrutura policétida, cujo principal representante é o ácido botcínico e b) botrianos, sesquiterpenos tais como botridial (**8**) e di-hidrobotridial (**10**), sendo estes os primeiros metabólitos isolados de *B. cinerea*[2,19].

Foi relatado que *B. cinerea* biossintetiza uma série de metabólitos com esqueleto botriano, principalmente o botridial, o di-hidrobotridial e derivados destes. Estes metabólitos reproduzem alguns dos sintomas da doença causada pelo fitopatógeno[19,20]. A detecção de botridial, *in vivo*, sobre plantículas de *Capsicum annum* (pimentão verde), demonstrou que estes metabólitos são toxinas associadas com a patogênese e o mecanismo de infecção[21].

1.4 Biotransformações de sesquiterpenos por *Botrytis cinerea*

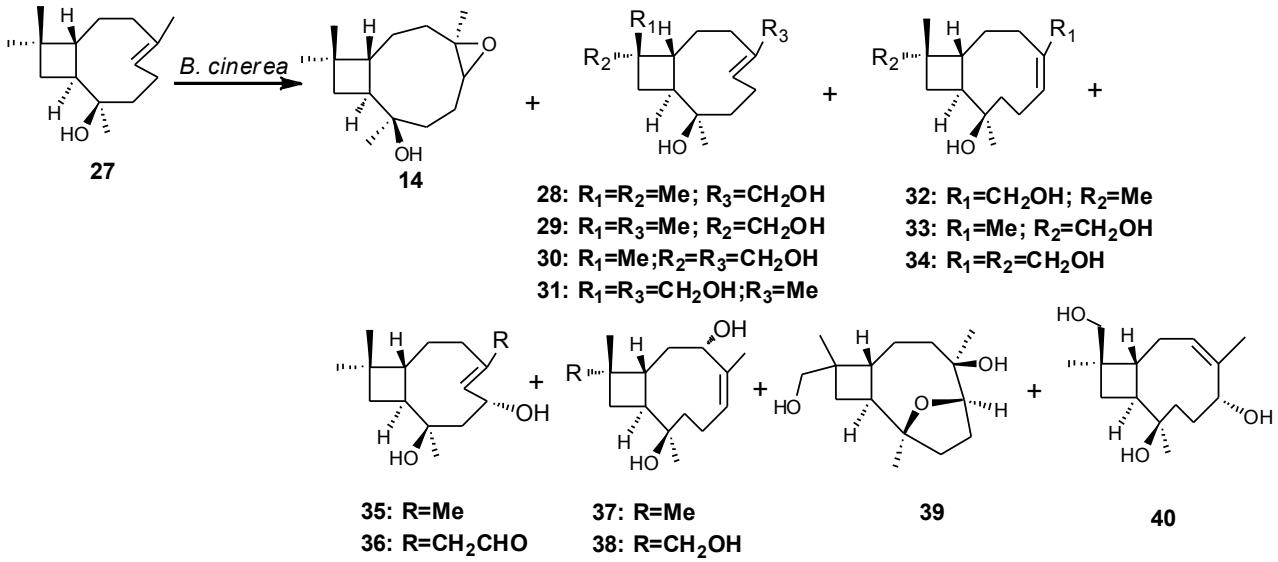
A biotransformação por *B. cinerea* de sesquiterpenos como cariofilanos[22,23], clovanos [24,25,26], ginsano [27,28], patchoulano[28,29], isoprobotriano[27,30], entre outros, tem sido estudada. Estes estudos incluem a análise de hidroxilação e

destoxificação de compostos por *B. cinerea.* A conversão do óxido de cariofileno (**11**) por este fungo resultou em quinze produtos de biotransformação[23], sendo eles (1*R*,5*R*,9*S*)-*Z*-4,11,11-trimetil-8-metilenobiciclo[7.2.0]undec-3-en-5-ol (**12**), (4*R*,5*R*,8*R*)-4,5,8,13-diepoxicariofilano (**13**), (4*R*,5*R*,8*R*)-4,5-epoxicariofilan-8-ol (**14**), (4*R*,5*R*,8*S*)-4,5,8,13-diepoxicariofilano (**15**), (4*R*,5*R*,11*R*)-4,5-epoxicariofilan-8(13)-en-14-ol (**16**), (4*R*,5*R*,7S)-4,7-epoxicariofil-8(13)-en-5-ol (**17**), (4*R*,5*R*)-4,5-epoxicariofil-8(13)-en-7-ol (**18**), (4*R*,5*R*,11*S*)-4,5-epoxicariofilan-8(13)-en-14-ol (**19**), (4*R*,5*R*,8*R*)-4,5,8,13-diepoxicariofilan-7-ona (**20**), (4*R*,5*R*)-4,5-epoxicariofil-8(13)-en-7-ona (**21**), (1*S*,9*R*,11*R*)-1,9-epoxicariofilan-11-ol (**24**), (4*R*,5*R*,8*R*)-4,5-epoxicariofilan-13-ol (**25**) e (4*R*,5*R*,8*S*)-4,5-epoxicariofilan-13-ol (**26**) (Esquema 2). O principal caminho da reação envolveu a epoxidação estereosseletiva dos carbonos C8/C13 e hidroxilação no carbono C7.



Esquema 2 – Biotransformação do óxido de cariofileno (**11**) por *B. cinerea.*

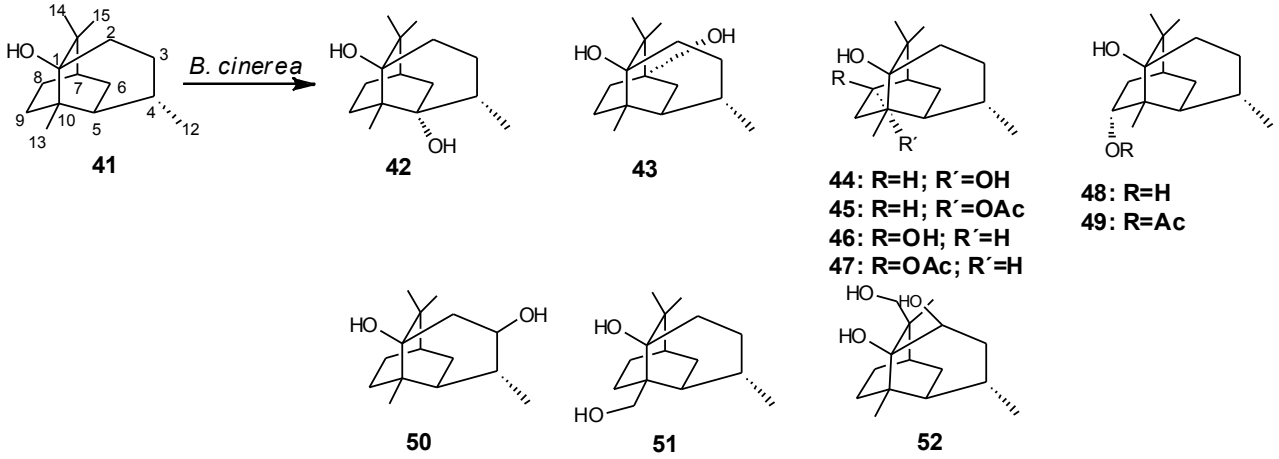
Similarmente, a transformação do (8*R*)-4*E*-cariofil-4(5)-en-8-ol (**27**) por *B. cinerea*[19] levou a quatorze produtos, sendo eles (4*R*,5*R*,8*R*)-4,5-epoxicariofilan-8-ol (**14**), (4*Z*,8*R*)-cariofil-4(5)-en-8,12-diol (**28**), (4*E*,8*R*,11*S*)-cariofil-4(5)-en-8,14-diol (**29**), (4*Z*,8*R*,11*S*)-cariofil-4(5)-en-8,12,14-triol (**30**), (4*Z*,8*R*,11*R*)-cariofil-4(5)-en-8,12,15-triol (**31**), (4*E*,8*R*)-cariofil-4(5)-en-8,12-diol (**32**), (4*Z*,8*R*,11*S*)-cariofil-4(5)-en-8,14-diol (**33**), (4*E*,8*R*,11*S*)-cariofil-4(5)-en-8,12,14-triol (**34**), (4*E*,6*R*,8*R*)-cariofil-4(5)-en-6,8-diol (**35**), (4*Z*,6*R*,8*R*)-cariofil-4(5)-en-6,8,12-triol (**36**), (4*Z*,3*S*,8*R*)-cariofil-4(5)-en-3,8-triol (**37**), (4*Z*,3*S*,8*R*,11*S*)-cariofil-4(5)-en-3,8,14-triol (**38**), (4*R*,5*S*,8*R*)-5,8-epoxicariofilan-4,14-diol (**39**) e (3*Z*,5*R*,8*R*,11*R*)-cariofil-3-en-5,8,15-triol (**40**) (Esquema 3). O principal caminho da reação envolveu a isomerização da dupla ligação em C4/C5 e hidroxilação de grupos metílicos e metilênicos.



Esquema 3 – Biotransformação do (4*E*,8*R*)-cariofil-4(5)-en-8-ol (**27**) por *B. cinerea*.

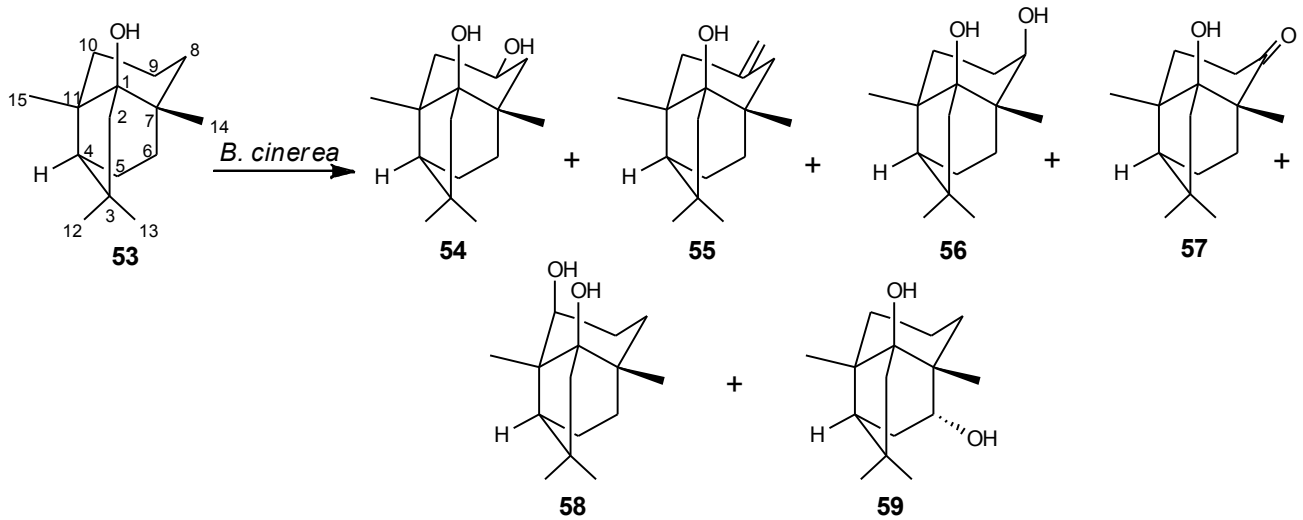
A bioconversão do patchoulol (**41**) pelo fungo *Botrytis cinerea*[29] gerou oito novos produtos, sendo eles (5*R*)-5-hidroxipatchoulol (**42**), (7*S*)-7-hidroxipatchoulol (**43**), (8*S*)-8-hidroxipatchoulol (**44**), (8*S*)-8-acetoxipatchoulol (**45**), (8*R*)-8-hidroxipatchoulol (**46**), (8*R*)-8-acetoxipatchoulol (**47**), (9*R*)-9-hidroxipatchoulol (**48**), (9*R*)-9-acetoxipatchoulol (**49**), (3*R*)-3-acetoxipatchoulol (**50**), 15-hidroxipatchoulol

(**51**) e (2*S*)-2,14-dihidroxipatchoulol (**52**), decorrentes da hidroxilação de C2, C3, C5, C9, C13 e C14 (Esquema 4).



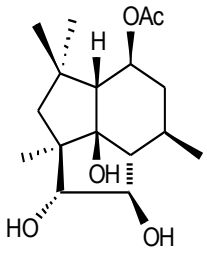
Esquema 4 – Biotransformação do patchoulol (**41**) por *B. cinerea.*

Em 2001, Aleu e colaboradores[28] descreveram a biotransformação do sesquiterpeno ginsenol (**53**) por *B. cinerea*, que levou a seis novos produtos, 9β-hidroxiginsenol (**54**), 9-oxoginsenol (**55**), 8β-hidroxiginsenol (**56**), 8-oxoginsenol (**57**), 10β-hidroxiginsenol (**58**) e 6α-hidroxiginsenol (**59**), sendo eles resultantes de oxidações (Esquema 5). A partir da observação que *B. cinerea* é capaz de degradar os produtos patchoulol e ginsenol, foi sugerido que esta degradação seja parte de um mecanismo de destoxificação presente no fungo.

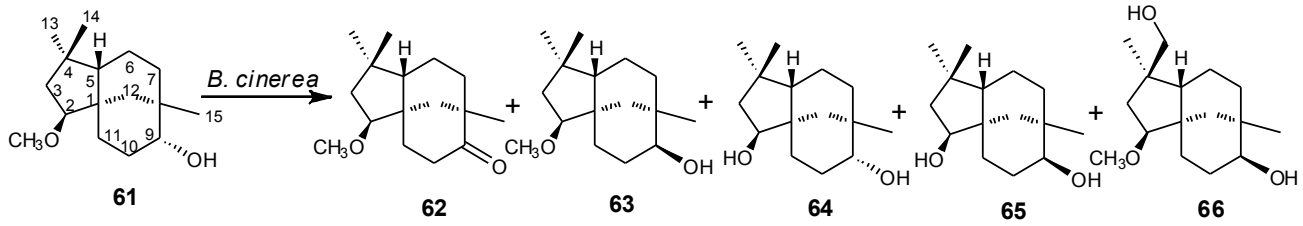


Esquema 5 – Biotransformação do ginsenol (**53**) por fungo *B. cinerea*.

Derivados de 2-alcoxiclovanóis, tais como o 2β-metoxiclovan-9α-ol (**61**) apresentam similaridade estrutural com o composto 4β-acetoxi-9β,10β,15α-trihidroxiprobotridial (**60**)[31], um intermediário da biossíntese do metabólito botriano produzido por *B. cinerea*[15], que apresentou inibição do crescimento deste fungo [24,26].

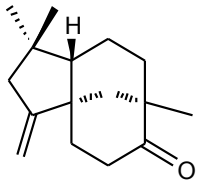


Em 1998, Collado e colaboradores[26] investigaram o metabolismo do 2β-metoxiclovan-9α-ol (**61**) por *B. cinerea* e isolaram os derivados hidroxilados 2β-metoxiclovan-9-ona (**62**), 2β-metoxiclovan-9β-ol (**63**), clovan-2β,9α-diol (**64**), clovan-2β,9β-diol (**65**) e 2β-metoxiclovan-9β,13-diol (**66**) (Esquema 6) .



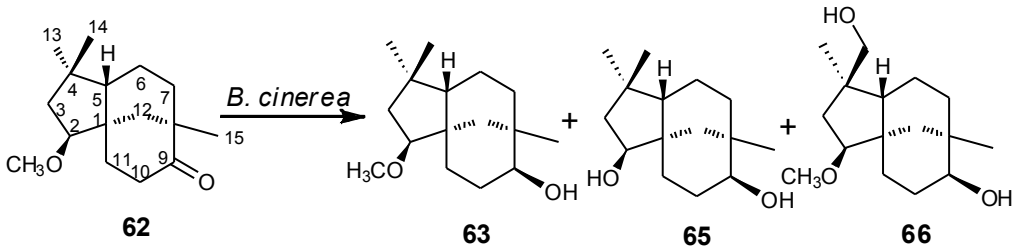
Esquema 6 – Biotransformação do 2β-metoxiclovan-9α-ol (**61**) por *B. cinerea*.

A ação deste fungo sobre 2β-metoxiclovan-9-ona (**62**), 2β-metoxiclovan-9β-ol (**63**) e clovan-2, 9-diona (**67**), também foi estudada[26].

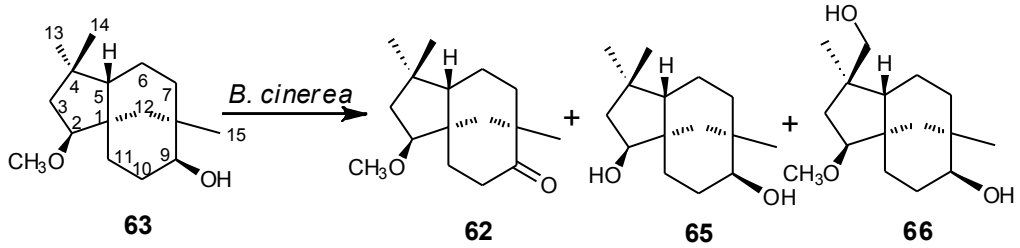


67

A incubação do 2β-metoxiclovan-9-ona (**62**) com *B. cinerea* levou ao isolamento de três produtos com esqueleto clovano, 2β-metoxiclovan-9β-ol (**63**), clovan-2β,9β-diol (**65**) e 2β-metoxiclovan-9β,13-diol (**66**) (Esquema 7) e a incubação do 2β-metoxiclovan-9β-ol (**63**) levou ao 2β-metoxiclovan-9-ona (**62**), clovan-2β,9β-diol (**65**) e 2β-metoxiclovan-9β,13-diol (**66**) (Esquema 8). Quando o composto clovan-2,9-diona (**67**) foi incubado com este fungo, nenhum produto de biotransformação foi isolado da fermentação[26].



Esquema 7 – Biotransformação do 2β-metoxiclovan-9-ona (**62**) por *B. cinerea.*

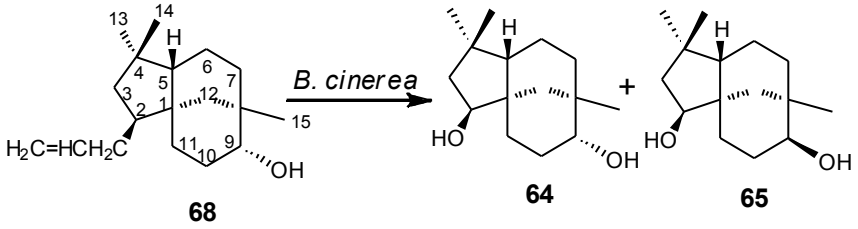


Esquema 8 – Biotransformação do2β-metoxiclovan-9β-ol (**63**) por *B. cinerea.*

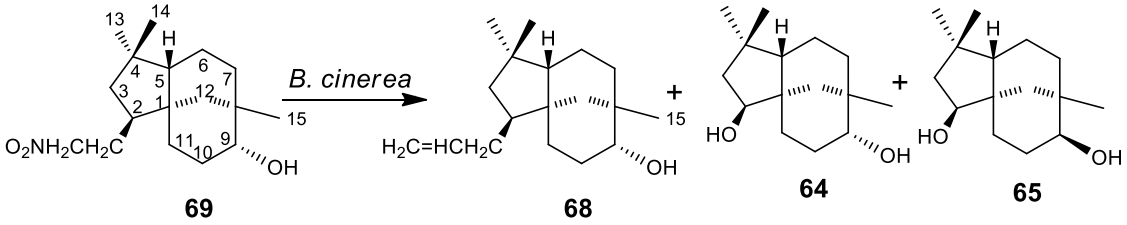
Os principais produtos da biotransformação de 2β-metoxiclovan-9α-ol (**61**) apresentaram redução da atividade biológica, quando comparados com aquela do material de partida[26,27]. Assim, a destoxificação microbiana deste composto está associada às hidroxilações[25], sugerindo que produtos ativos podem não persistir no ambiente por um longo tempo após sua aplicação[6, 25].

O metabolismo de destoxificação de derivados do 2β-metoxiclovan-9α-ol (**61**) também tem sido estudado[24,25]. Em 2009, Saiz-Urra e colaboradores[25] avaliaram o metabolismo do 2β-(prop-2-eniloxi)clovan-9α-ol (**68**) e do 2β-(nitroetoxi)-clovan-9α-ol (**69**) por *B. cinerea.* O composto **68** apresentou dois

produtos de biotransformação, clovan-2β,9α-diol (**64**) e clovan-2β,9β-diol (**65**) (Esquema 9), enquanto **69** apresentou, além de **64** e **65,** também o clovano **68** como produtos de biotransformação (Esquema 10). Ambos os produtos, **64** e **65**, apresentaram baixa atividade biológica, quando comparados com os substratos[25].



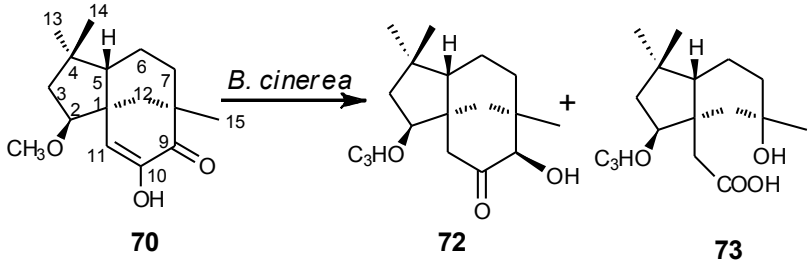
Esquema 9 – Biotransformação do 2β-(prop-2-eniloxi)clovan-9α-ol (**68**) por *B. cinerea*



Esquema 10 – Biotransformação do 2β-(nitroetoxi) clovan-9α-ol (**69**) por *B. cinerea*

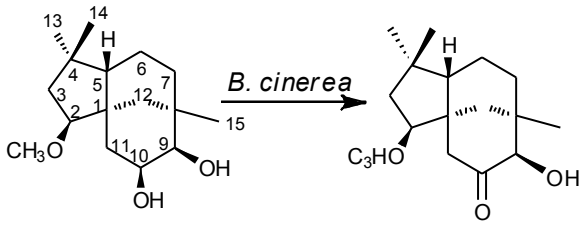
O metabolismo dos clovanos 10-hidroxi-2β-metoxiclovan-10-en-9-ona (**70**) e 2β-metoxiclovan-9β,10β-diol (**71**) por *B. cinerea* foram investigados[4]. A incubação do 10-hidroxi,2β-metoxiclovan-10-en-9-ona (**70**) com este fungo, forneceu dois produtos de biotransformação, o 9β-hidroxi-2β-metoxiclovan-10-en-9-ona (**72**) e o ácido 2β-metoxi-9,10-secoclovan-9,10-dióico (**73**) (Esquema 11, p. 103), enquanto o 2β-metoxiclovan-9β,10β-diol (**71**) também incubado com *B. cinerea*, levou apenas ao produto **72** (Esquema 12, p. 103). Nestes estudos foi também observada à diminuição da atividade biológica de alguns dos produtos de

biotransformação, em comparação com seus substratos, inferindo que estes substratos sofrem destoxificação por *B. cinerea*[24].



70 **72** **73**

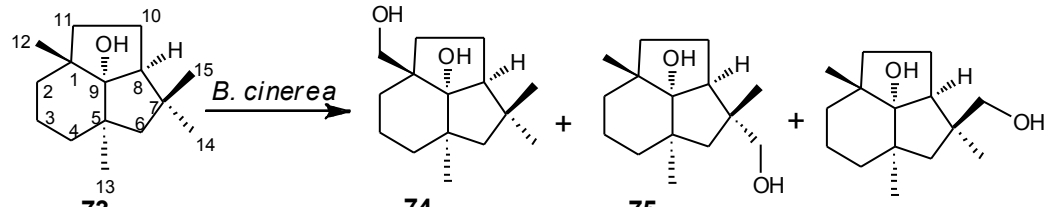
Esquema 11 – Biotransformação do 10-hidroxi-2β-metoxiclovan-10-en-9-ona (**70**) por *B. cinerea.*



71 **72**

Esquema 12 – Biotransformação do 2β-metoxiclovan-9β,10β-diol (**71**) por *B. cinerea.*

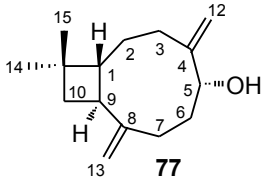
O efeito do fungo *B. cinerea* no metabolismo do isoprobotrian-9α-ol (**73**) foi também avaliado[31]. Desta biotransformação foram isolados três novos produtos, isoprobotrian-12,9α-diol (**74**), isoprobotrian-14,9α-diol (**75**) e do isoprobotrian-15,9α-diol (**76**), resultantes de hidroxilações do material de partida (Esquema 13).



73 **74** **75** **76**

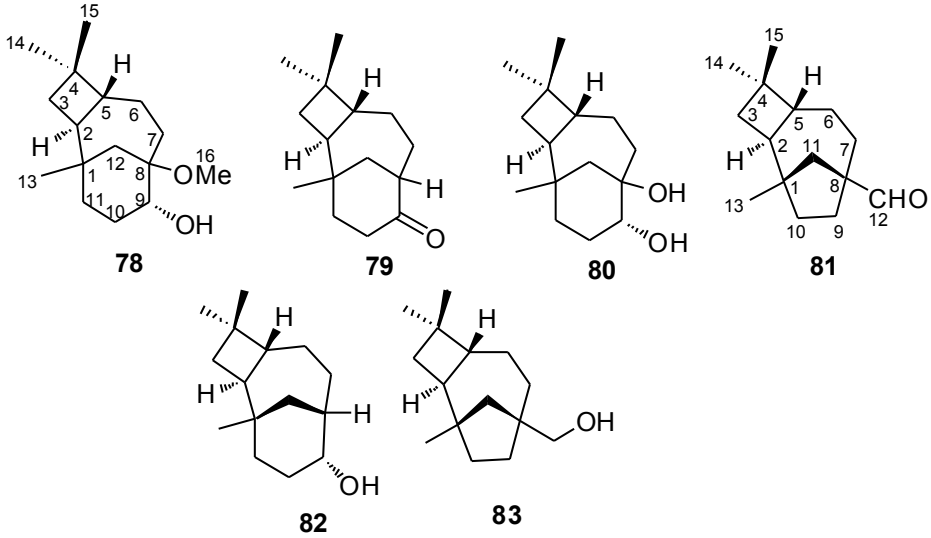
Esquema 13 – Biotransformação do isoprobotrian-9α-ol (**73**) por *B. cinerea.*

Uma classe de sesquiterpenos conhecida como isocariolanos pode ser obtida pela ciclização do 5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (**77**)[33,35], proveniente do óxido de cariofileno (**11**)[33], sendo de interesse devido à sua similaridade estrutural com os metabólitos botrilanos, produzidos por *B. cinerea*[35].



77

Em 2000, Racero e colaboradores[34] sintetizaram compostos com esqueleto isocariolânico tais como (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**), isocariolan-9-ona (**79**), (8R, 9R)-isocariolano- 8,9-diol (**80**) e um derivado procedente do rearranjo de isocariolanos, o (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído (**81**). Os compostos isocariolan-9α-ol (**82**) e 1R,2S,5R,8S-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.02,5] undecano (**83**) foram sintetizados a partir da redução de **79** e **81** (Esquema 14).



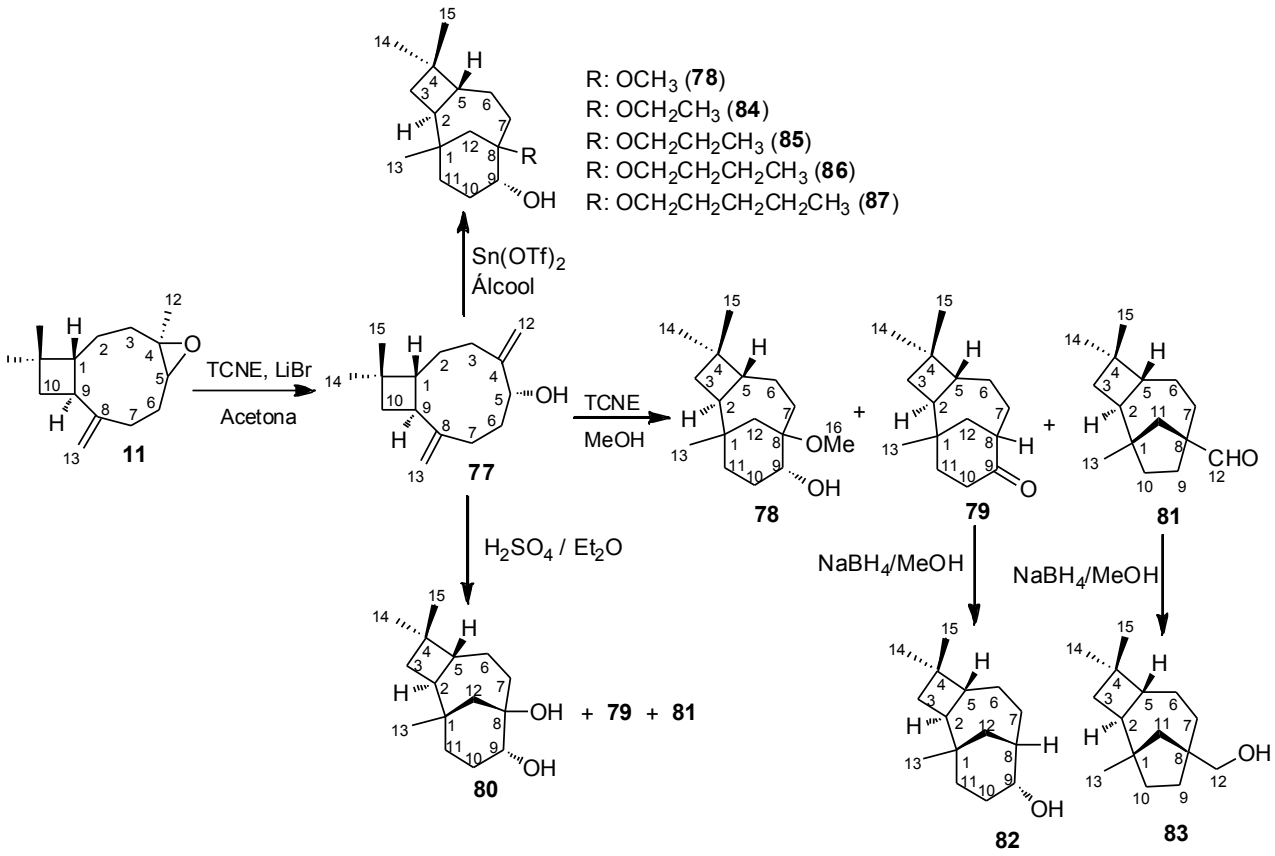
Esquema 14 – Compostos com esqueleto isocariolânico.

Os sesquiterpenos com esqueleto do tipo isocariolano apresentam características estruturais importantes e atrativas[35], sendo, no entanto, escassos os dados existentes na literatura sobre estes compostos. Tendo em vista a reatividade já descrita de clovanos e cariolanos frente ao fungo *Botrytis cinerea* em reações de biotransformação e a ocorrência de destoxificação destes por *B. cinerea*, este trabalho visa a obtenção, por transformação química, de derivados isocariolanos, para serem, em seguida, submetidos a transformações microbianas utilizando este fungo.

1.2 Objetivos deste trabalho

Obtenção, por meio de transformação química, de isocariolanos e derivados de isocariolanos, para serem submetidos posteriormente a transformações microbianas utilizando o fungo *Botrytis cinerea*.

Assim, a primeira etapa das transformações químicas será a abertura do anel oxirânico do óxido de cariofileno (**11**), em meio ácido, utilizando-se o tetracianoetileno (TCNE)[36,37], levando a alcoóis alílicos com o mesmo tipo de esqueleto. O álcool alílico (**77**) que se propõe obter será, em seguida, submetido a um rearranjo, sendo utilizadas três metodologias diferentes: com TCNE/CH_3OH[34], com ácido sulfúrico concentrado[34] e com triflato de estanho/ROH[38]. Com base em resultados previamente obtidos, o primeiro reagente levará ao éter **78**, mas acompanhado da cetona **79** e do aldeído **81**; com H_2SO_4, o diol **80** será também possivelmente acompanhado de **79** e de **81**; e com $Sn(OTf)_2$ e uma seqüencia de álcoois, espera-se isolar, além dos dois últimos, os éteres rearranjados **78**, **84**, **85**, **86** e **87**. Os produtos **79** e **81** serão, em seguida, submetidos a reações de redução, para a obtenção dos alcoóis **82** e **83** (Esquema 15, p. 106).



Esquema 15 – Transformações químicas a serem realizadas com o óxido de cariofileno (**11**).

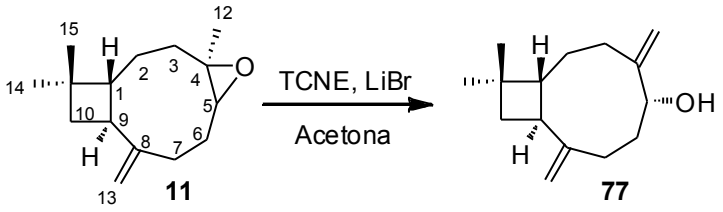
Os isocariolanos rearranjados **78**, **80**, **82** e **83** serão submetidos a biotransformações com *B. cinerea*. Também será feita a avaliação das atividades fungistática e alelopática de alguns dos derivados e produtos de biotransformação obtidos.

CAPÍTULO 2

Determinação Estrutural

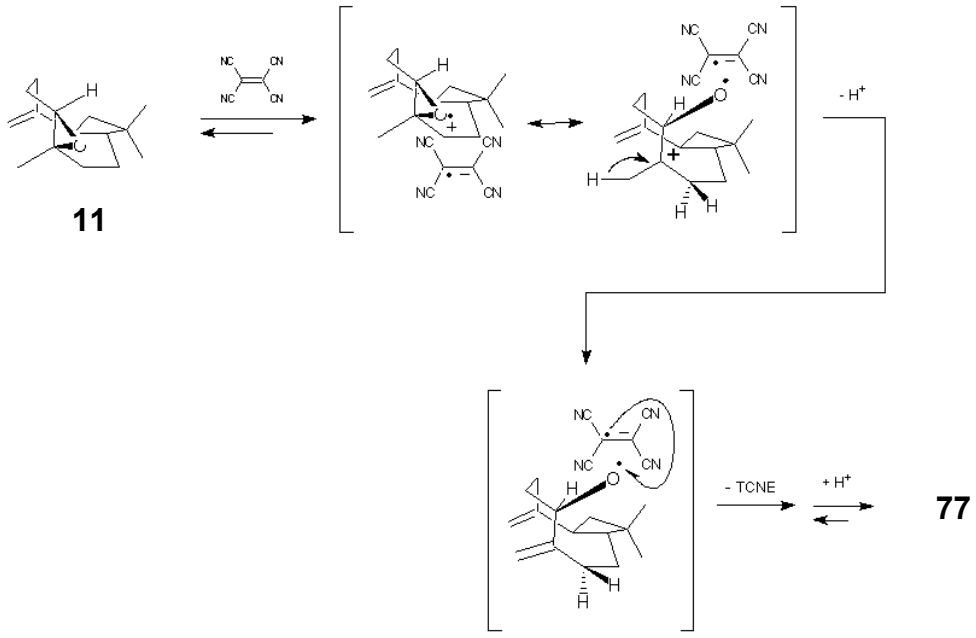
2.1. Preparação e identificação das substâncias obtidas

2.1.1 Preparação e identificação do 5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (77)



Esquema 16 – Preparação do 5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (**77**).

A reação do 4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno (**11**) em acetona, com TCNE em presença de LiBr, apresentou rendimento de 83% do 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (**77**). A formação da diolefina exocíclica **77** pode ser justificada considerando-se uma eliminação concertada do tipo E_2, a partir do complexo de transferência de carga, onde o íon Br^- atuaria como uma base para dar lugar ao produto de eliminação (Esquemas 16 e 17).



Esquema 17 – Mecanismo proposto[36] para a reação de **11** com TCNE, em acetona.

O espectro de RMN de ^{1}H do composto **11** (Figuras 6 e 7, p. 287), obtido comercialmente, apresentou dois simpletos em δ_H 4,97 e 4,86, relativos aos sinais dos hidrogênios olefínicos ligados ao C-13 (H-13 e H-13´).

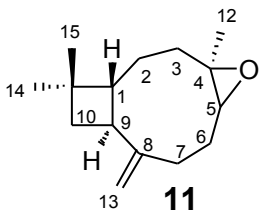
Observou-se um sinal de dupleto duplo em δ_H 2,88 (J=4,4 e 10,6 Hz), atribuído ao hidrogênio H-5 e um dupleto duplo em δ_H 2,62 (J=9,6 e 18,4 Hz), atribuído ao hidrogênio H-9. Foram também observados sinais de hidrogênios metílicos em δ_H 0,98 e δ_H 1,00 referentes aos hidrogênios H-14 e H-15 e, em δ_H 1,20, referente ao hidrogênio H-12.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 8, p. 288) apresentou sinal característico de carbono olefínico metilênico em δ_C 112,73e de carbono não hidrogenado ligado à dupla ligação em δ_C 151,79. Estes e os demais deslocamentos químicos dos carbonos apresentaram-se análogos àqueles registrados na literatura[39].

A partir da comparação dos dados de RMN obtidos para **11** com dados de RMN disponíveis na literatura para o 4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno (Tabela 1, p.110) pôde-se confirmar a pureza desta molécula.

Tabela 1 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **11** com aqueles relatados na literatura para o 4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno[39]

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**11**	**4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno[39]**	**C**	**11**	**4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno[39]**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1β	1,75 (t, *J*=10,0)	1,76 (t, *J*=10,0)	**1**	50,72	50,8
2	1,39 – 1,47 (m)	1,43 (tdd, *J*=4,0, 10,5, 13,5	**2**	27,18	27,2
2´	1,58 – 1,69 (m)	1,65 (dddd, *J*=1,0, 3,5, 5,0, 13,5)			
3	0,92 -1,00 (m)	0,97 (td, *J*=5,0, 13,0)	**3**	39,12	39,2
3´	2,05 – 2,13 (m)	2,09 (dt, *J*=3,5, 13,0)			
4	-	-	**4**	59,82	59,8
5	2,88 (dd, *J*=4.4, 10.6)	2,87 (dd, *J*=4,0, 11,0)	**5**	63,73	63,7
6	1,27 – 1,37 (m)	1,32 (dddd, *J*=4,5, 8,0, 11,0, 12,5)	**6**	30,16	30,3
6´	2,24 (ddd, *J*=4,2, 8,1, 16,8)	2,25 (ddt, *J*=4,0, 8,0, 12,0)			
7	2,05 – 2,13 (m)	2,11 (ddd, *J*=4.,5, 8,0, 12,5)	**7**	29,76	29,8
7´	2,32 (ddd, *J*=4,4, 8,2, 12,6)	2,34 (ddd, *J*=4,5, 8,0, 12,5)			
8	-	-	**8**	151,79	151,8
9α	2,62 (dt, *J*=9,6, 18,4)	2,62 (dt, *J*=9,5, 18,0)	**9**	48,70	48,7
10	1,63 (t, *J*=10,8)	1,62 (t, *J*=10,0)	**10**	39,73	39,8
10´	1,67 (dd, *J*=8,4, 10,6)	1,62 (dd, *J*=8,0, 10,0)			
11	-	-	**11**	33,98	34,1
12	1,20 (s)	1,20 (s)	**12**	16,97	17,0
13	4,86 (s)	4,86 (s)	**13**	112,73	112,8
13´	4,96 (s)	4,97 (s)			
14	1,00 (s)	1,01 (s)	**14**	21,60	21,7
15	0,98 (s)	0,98 (s)	**15**	29,86	29,9



11

A identificação de **77** foi realizada com base na análise dos espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C, e por comparação com dados obtidos na literatura[33].

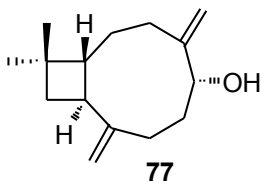
O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 9 e 10, p. 288 e 289) apresentou dois simpletos em δ_H 4,95 e 5,04, referentes aos sinais dos hidrogênios olefínicos H-13 e H-13´. O espectro apresentou também dois simpletos em δ_H 4,78 e 4,76, referentes aos sinais dos hidrogênios olefínicos H-12 e H-12´, originários da abertura do epóxido. Observou-se um sinal de dupleto duplo em δ_H 4,09 (J=3,2 e 9 Hz), atribuído ao hidrogênio H-5 e um simpleto em δ_H 0,97, com integração para seis hidrogênios, confirmando a presença de dois grupos metila, respectivamente H-14 e H-15.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 11, p. 289) apresentou sinais característicos de carbonos olefínicos metilênicos em δ_C 113,74 (C-12) e 110,11 (C-13) e de carbonos quaternários sp^2 em δ_C 150,83 (C-4) e 152,89 (C-8). Estes e os demais deslocamentos químicos dos carbonos apresentaram-se semelhantes àqueles registrados na literatura[33].

A comparação dos dados de RMN obtidos para **77** com dados de RMN disponíveis na literatura para o 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (Tabela 2, p. 112) levou à constatação de que a substância em análise tratava-se deste cariofilano.

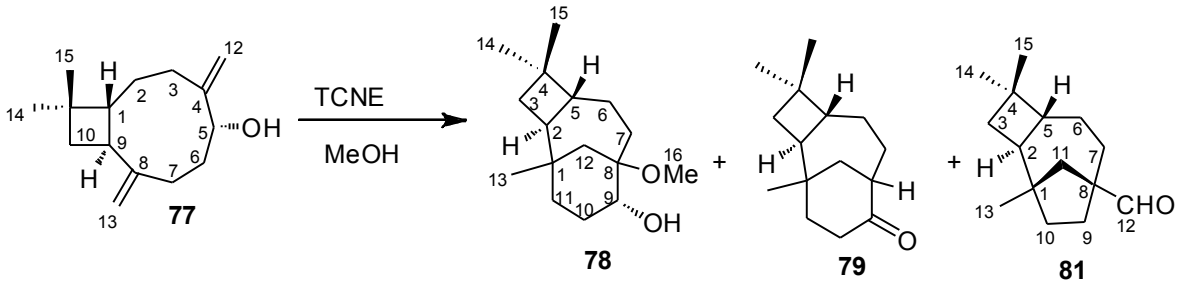
Tabela 2 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **77** com aqueles relatados na literatura para o 5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno[33]

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**77**	**5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno[33]**	**C**	**77**	**5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno[33]**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1β	1,51 – 2,05 (m)	1,50 – 2,10 (m)	**1**	55,23	54,23
2	1,51 – 2,05 (m)	1,50 – 2,10 (m)	**2**	38,07	37,06
2´	1,51 – 2,05 (m)	1,50 – 2,10 (m)			
3	1,51 – 2,05 (m)	1,50 – 2,10 (m)	**3**	32,79	32,58
3´	2,48 – 2,54 (m)	2,51 (brddd, *J*=3,8, 3,9, 13,5)			
4	-	-	**4**	150,83	151,34
5	4,09(dd, *J*=3,2, 9,0)	4,08 (dd, *J*=3,6, 8,9)	**5**	74,21	75,22
6	1,51 – 2,05 (m)	1,50 – 2,10 (m)	**6**	32,44	32,51
6´	1,51 – 2,05 (m)	1,50 – 2,10 (m)			
7	1,51 – 2,05 (m)	1,50 – 2,10 (m)	**7**	32,88	32,83
7´	2,26 -2,39 (m)	2,28 (m)			
8	-	-	**8**	152,89	152,46
9α	2,26 – 2,34 (m)	2,32 (m)	**9**	43,95	43,83
10	1,51 – 2,05 (m)	1,50 – 2,10 (m)	**10**	30,78	30,67
10´	1,51 – 2,05 (m)	1,50 – 2,10 (m)			
11	-	-	**11**	32,94	33,83
12	4,76 (s)	4,77 (s)	**12**	113,74	113,39
12´	4,78 (s)	4,78 (s)			
13	4,95 (s)	4,95 (s)	**13**	110,11	109,14
13´	5,04 (s)	5,04 (s)			
14	0,97 (s)	0,97	**14**	30,02	30,00
15	0,97(s)	0,97	**15**	21,97	21,97



77

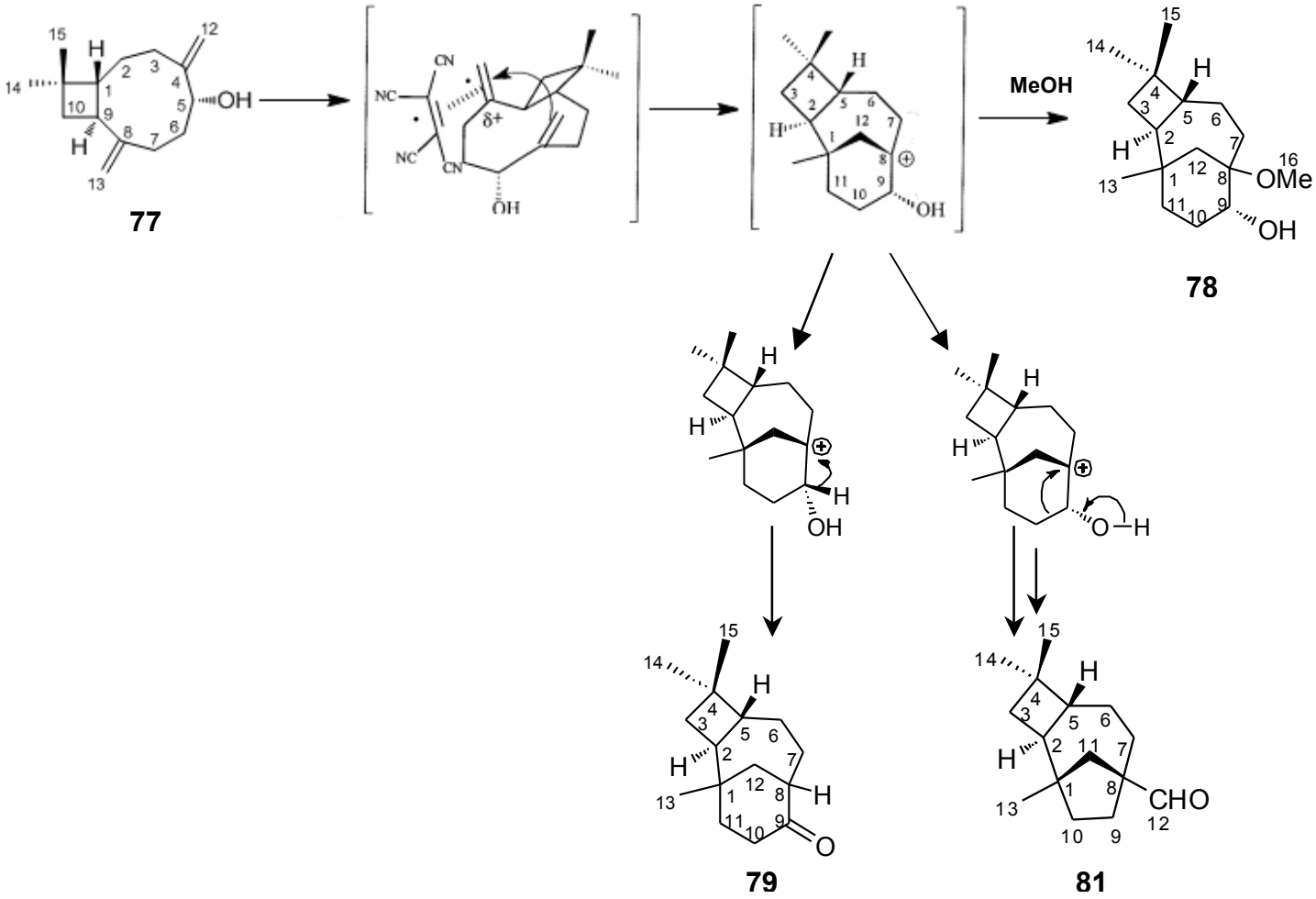
2.1.2 Preparação e identificação de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78), isocariolan-9-ona (79) e (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}] undecano-8-carbaldeído (81)[34]



Esquema 18 – Preparação de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**), isocariolan-9-ona (**79**) e (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano-8-carbaldeído (**81**) a partir de **77**.

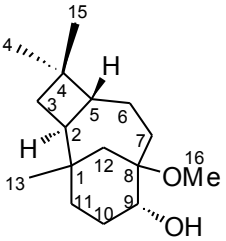
O composto **77,** dissolvido em metanol, foi tratado com TCNE sob agitação à temperatura ambiente por 48 horas. Posteriormente, a mistura reacional foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel, obtendo-se um rendimento de 60,5% de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**), 10% de isocariolan-9-ona (**79**) e 19,5% de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano-8-carbaldeído (**81**) (Esquema 18).

O tratamento de **77** com TCNE, em metanol, levou à formação de um carbocátion rearranjado que, por competitivas reações de substituição e novos rearranjos, levou aos produtos **78**, **79** e **81** (Esquema 19, p. 114). A obtenção de **78** pode ser explicada pelo ataque nucleofílico do solvente. Também, nestas condições, ocorreu uma interessante transferência 1,2 de hidreto, levando ao isocariolan-9-ona **79.** A obtenção de **81** pode ser explicada pela possível migração da ligação σ C_9-C_{10}, mediante um rearranjo de Wagner-Meerwein.



Esquema 19 – Mecanismo proposto[35] para a reação de **77** com TCNE, em metanol.

2.1.2.1 Identificação de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)



A identificação de **78** foi realizada com base na análise dos espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C mono e bidimensionais, e por comparação com dados obtidos na literatura [34].

O espectro no IV (Figura 12, p. 290) apresentou banda de absorção em 3425 cm^{-1}, características de estiramento da ligação O-H e banda em 2910 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H. A banda em 1018 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular de ligação C-O. Bandas na região entre 1326 e 542 cm^{-1} do espectro foram atribuídas à deformação angular de ligações C-H[40].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 13 e 14, p. 290 e 291) mostrou um simpleto em δ_H 3,23, com integração para três hidrogênios, confirmando a presença do grupo metoxila; em δ_H 3,57 (dd, *J*=11,6 e 5,6 Hz) foi observado um sinal de dupleto duplo correspondente ao hidrogênico metínico H-9*β*. Foram observados três simpletos em δ_H 0,80, δ_H 0,96 e δ_H 0,97, atribuídos a hidrogênios de grupos metila e dois tripletos, um em δ_H 1,45 (*J*=8,9 Hz) e outro em δ_H 1,27 (*J*=10,8 Hz), referentes aos hidrogênios metilênicos H-3*α* e H-3*β*. Observou-se um sinal de dupleto característico de esqueleto de isocariolano, com deslocamento químico em δ_H 0,89 (d, *J*=13,2 Hz) e foi atribuído ao hidrogênio H-12b.

A análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 15, p. 291) e subespectro DEPT 135 (Figura 16, p. 292) mostrou que **78** apresentou dezesseis sinais, sendo três referentes a carbonos não hidrogenados, três a carbonos metínicos, seis a carbonos metilênicos e quatro sinais de carbonos metílicos, sendo um deles de grupo metoxila (δ_C 49,21).

O mapa de contornos homonuclear COSY (Figura 17 e 18, p. 292 e 293) possibilitou estabelecer, através das manchas de correlação, as conectividades entre os hidrogênios H-2α/H-3α,H-3β,H-5β; H-9β/H-10α,H-10β; H-10α, H-10β/H11α. Assim, a partir do sinal de H-2α em δ_H 2,06 (dt, 1H, *J*=11,2, 11,2 e 8,4 Hz), confirmou-se a atribuição de H-3α em δ_H 1,45 (t, *J*=8,9 Hz) e H-3β em δ_H 1,27 (t, *J*=10,8 Hz) e de H-5β em δ_H 1,74 – 1,67 (m). A atribuição dos hidrogênios H-10α e H-10β em δ_H 1,82 – 1,75 (m) foram confirmadas com a correlação com H-9β em δ_H 3,57 (dd, 1H, *J*=11,6, 5,6 Hz) e com H-11α em δ_H 1,20 (dt, 1H, *J*=13,2, 13,2, 5,6 Hz).

Através dos valores de carbono encontrados na literatura[2] e a análise do mapa de contornos HSQC (Figura 19, p. 293) pôde-se associar os sinais dos hidrogênios metínicos com aqueles dos carbonos correspondentes δ_H 2,06 (H-2*α*/

δ_C 36,61 (C-2); δ_H 1,74 – 1,67 (H-5β); δ_H 3,57 (H-9β/ δ_C 76,38 (C-9) e os sinais dos carbonos metilênicos com os hidrogênios diastereotópicos correspondentes δ_C 35,58 (C-3)/ δ_H 1,45 (H-3α), δ_H 1,27 (H-3β); δ_C 21,71 (C-6)/ δ_H1,49- 1,58 (H-6α), δ_H 1,60-1,68 (H-6β); δ_C28,94 (C-7)/ δ_H 1, 49-1, 58 (H-7α), δ_H 1,84 -1, 92 (H-7β); δ_C 27,45 (C-10) / δ_H 1,75 – 1,82 (H-10α e H-10β); δ_C 36,71 (C-11)/ δ_H1,20 (H-11α), δ_H 1,35 – 1,40 (H-11β) e δ_C 42,05 (C-12)/ δ_H 1, 84 – 1,92 (H-12a), δ_H 0,89 (H-12b).

Através da análise do espectro bidimensional HMBC (Figuras 20 e 21, p. 294) verificou-se a correlação entre o sinal de carbono em δ_C 36,61 (C-2) e os sinais de hidrogênios em δ_H 0,80 (H-13, ^3J), δ_H 1,92-1,84 (H-12a ^3J) / δ_H 0,89 (H-12b ^3J) e δ_H 1,20 (H-11α, ^3J); também observou-se a correlação entre o sinal de carbono δ_C 44,03 (C-5) e os sinais de hidrogênios δ_H 0,96 (H-14, ^3J), δ_H 0,97 (H-15 ^3J) e δ_H 1,45 (H-3α, ^3J). Estas correlações e as conectividades observadas no mapa de contornos COSY confirmam a posição dos hidrogênios metínicos H-2 e H-5. Os hidrogênios metilênicos em δ_H 1,45 (H-3α) e δ_H 1,27 (H-3β) apresentaram conectividade com o hidrogênio metínico H-2, visualisada no mapa de contornos COSY, e estas posições foram confirmadas pelas correlações entre os sinais de hidrogênios δ_H 1,45 (H-3α) e δ_H 1,27 (H-3β) com os sinais de carbono δ_C 34,99 (C-4, ^2J), δ_C 20,89 (C-14α, ^3J) e δ_C 30,73 (C-15β, ^3J).

O sinal do carbono não hidrogenado δ_C 34,99 (C-4) apresentou correlações com os sinais de hidrogênios δ_H 0,96 (H-14, ^2J) e δ_H 0,97 (H-15 ^2J).

No mapa de contornos HMBC (Figuras 20 e 21, p. 294), o sinal de carbono em δ_C 21,71 (C-6) apresentou correlação com os hidrogênios em δ_H 1,49 – 1,58 (H-7α, ^2J) e δ_H 1,84 - 1,92 (H-7β, ^2J) e o sinal de carbono em δ_C 28,94 (C-7) apresentou correlação com os hidrogênios em δ_H 3,57 (H-9β, ^3J), δ_H 0,87 (H-12b, ^3J) e δ_H 1,49 – 1,58 (H-6α). O sinal de carbono não hidrogenado em δ_C 32,90 (C-1) apresentou correlação com os hidrogênios em δ_H 1,45 (H-3α, ^3J) e δ_H 0,80 (H-13, ^2J). E o sinal de carbono não hidrogenado em δ_C 80,43 (C-8), apresentou correlação com os hidrogênios em δ_H 3,57 (H-9β, ^2J), δ_H 3,22 (H-16, ^3J).

As posições dos hidrogênios metilênicos H-10α/H-10β e H-11α/H-11β foram confirmadas pela análise dos mapas de contornos COSY e HSQC, aliados ao mapa de contornos HMBC. No mapa de contornos HMBC, o sinal de carbono

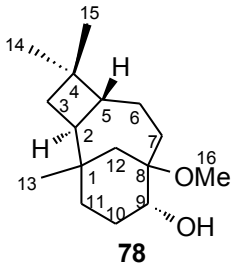
δ_C 27,45 (C-10) apresentou correlação com os sinais em δ_H 3,57 (H-9β, ^2J) e δ_H 1,20 (H-11α, ^2J). O sinal de carbono em δ_C 36,71 (C-11) apresentou correlação com os hidrogênios em δ_H 0,80 (H-13, ^3J), δ_H 1,92-1,84 (H-12a, ^3J), δ_H 0,89 (H-12b, ^3J) e δ_H 2,06 (H-2α, ^3J). O sinal de carbono em δ_C 42,05 (C-12) correlacionou-se com os sinais de hidrogênios em δ_H 0,80 (H-13, ^3J) e δ_H 1,49 – 1,58 (H-7α, ^3J).

O mapa de contornos NOESY (Figuras 22 e 23, p. 295) apresentou correlações do sinal de hidrogênio em δ_H 2,06 (H-2α) com os hidrogênios H-14α (δ_H 0,96; δ_C 20.89) e H-3α (δ_H 1,42; δ_C 35,58), confirmando a configuração α para H-2. O sinal de hidrogênio em δ_H 1,70 (H-5β) apresentou correlações com o hidrogênio H-15β (δ_H 0,97; δ_C 30,73), confirmando a configuração β para o H-5. A configuração β do hidrogênio H-9 em δ_H 3,54 foi confirmada pela correlação com H-12b (δ_H 0,87, δ_C 76,38) e com H-12a (δ_H 1,92-1,84, δ_C 76,38).

A Tabela 3, p. 118, apresenta as atribuições feitas utilizando RMN, bem como a comparação com os dados da literatura[34], alguns valores encontrados para **78** foram corrigidos em relação à literatura.

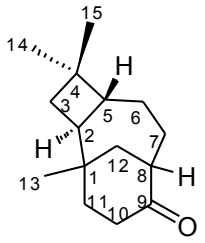
Tabela 3 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **78** com aqueles relatados na literatura para o (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol[34]

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**78**	**(8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol[34]**	**C**	**78**	**(8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol[34]**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	32,91	32,7
2α	2,06 (dt, *J*=11,2, 11,2, 8,4)	2,05 (q, *J*=9,5)	**2**	36,61	36,5
3α	1,45 (t, *J*=8,9)	1,42 (t, *J*=9,5)	**3**	35,58	35,4
3β	1,27 (t, *J*=10,8)	1,26 (t, *J*=9,5)			
4	-	-	**4**	34,99	34,8
5β	1,67 –1,74 (m)	1,70 (m)	**5**	44,04	43,9
6α	1,49 –1,58 (m)	1,48 – 1,58 (m)	**6**	21,72	21,6
6β	1,60 – 1,68 (m)	1,60 – 1,75 (m)			
7α	1,49 – 1,58 (m)	1,48 – 1,58 (m)	**7**	28,95	28,8
7β	1,84 – 1,92 (m)	-			
8	-	-	**8**	80,43	80,3
9β	3,57 (dd, *J*=11,6, 5,6)	3,54 (dd, *J*=11,2, 5,8)	**9**	76,38	76,2
10α	1, 75 – 1,82 (m)	1,35 (m)	**10**	27,46	27,3
10β	1, 75 – 1,82 (m)	1,79 (m)			
11α	1,20 (dt, *J*=13,2, 13,2, 5,6)	1,21 (dt, *J*=5,2, 12,0)	**11**	36,71	36,6
11β	1,35 – 1,40 (m)	1,60 – 1,75 (m)			
12a	1,84 – 1,92 (m)	1,85 – 1,90 (m)	**12**	42,06	41,9
12b	0,89 (d, *J*=13,2)	0,87 (d, *J*=13,0)			
13	0,80 (s)	0,95 (s)	**13**	26,27	26,1
14	0,96 (s)	0,94 (s)	**14**	20,90	20,7
15	0,97 (s)	0,78 (s)	**15**	30,73	30,6
16	3,23 (s)	3,21 (s)	**16**	49,21	49,0



78

2.1.2.2 Identificação de isocariolan-9-ona (79)



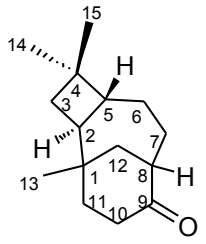
Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 26 e 27, p. 297) observou-se um sinal em δ_C 215,74, característico de carbonila de cetona. Após uma busca na literatura sugeriu-se que este composto trata-se de **79**.

O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 24 e 25, p. 296) apresentou, em δ_H 2,01 um sinal de dupleto duplo (J=8,8, 14,0 Hz), e, em δ_H 1,70, um sinal de dupleto duplo (J=3,2 e 14,0 Hz), similares aos observados na literatura. Foram observados três simpletos em δ_H 0,95, δ_H 0,91 e δ_H 0,87, correspondentes aos hidrogênios metílicos característicos do esqueleto de isocariolanos.

A Tabela 4, p. 120, apresenta as atribuições feitas utilizando RMN de ^{1}H e de ^{13}C, bem como a comparação com os dados da literatura[41].

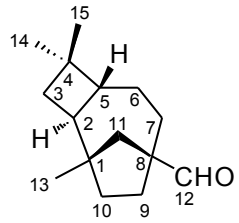
Tabela 4 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **79** com aqueles relatados na literatura para a isocariolan-9-ona[41]

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**79**	**Isocariolan-9-ona[41]**	**C**	**79**	**Isocariolan-9-ona[41]**
	δ_H **(multip., *J* em Hz)**			δ_C	
1	-	-	**1**	31,64	31,9
2α	2,22 – 2,28 (m)	2,27 (m)	**2**	41,96	42,7
3α/3β	1,51 – 1,56 (m)	1,55 (dd, *J*=7,7,10,2)	**3**	36,62	36,8
4	-	-	**4**	32,90	33,1
5β	2,22 – 2,28 (m)	2,27 (m)	**5**	46,22	46,4
6α	1,30 (dq, *J*=5,2, 12,8)	1,33 (ddt, *J*=5,2, 12,9, 13,1)	**6**	25,52	25,8
6β	1,41 – 1,48 (m)	1,43 – 1,48 (m)			
7α/7β	1,00 – 1,18 (m)	1,16 (dddd, *J*=1,3, 1,3, 3,8, 5,6)	**7**	29,79	30,0
8	2,36 – 2,51 (m)	2,39 – 2,52 (m)	**8**	44,80	45,0
9	-	-	**9**	215,74	215,7
10α	2,36 – 2,51 (m)	2,39 – 2,52 (m)	**10**	35,82	36,0
10β	2,36 – 2,51 (m)	2,39 – 2,52 (m)			
11α / 11β	1,41 – 1,48 (m)	1,43 – 1,48 (m)	**11**	41,16	42,0
12a	1,70 (dd, *J*=3,2, 14,0)	1,72 (dd, *J*=2,5, 14,0)	**12**	36,61	36,8
12b	2,01 (dd, *J*=8,8, 14,0)	2,03 (dd, *J*=9,6, 14,0)			
13	0,87 (s)	0,88 (s)	**13**	25,97	26,2
14	0,91 (s)	0,88 (s)	**14**	21,75	22,0
15	0,95 (s)	0,96 (s)	**15**	30,50	30,7



79

2.1.2.3 Identificação de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído (81)



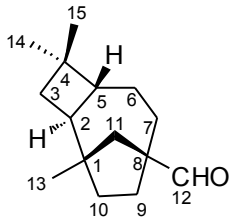
A identificação de **81** foi realizada com base na análise dos espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C, e por comparação com dados obtidos na literatura [34].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 28 e 29, p. 298) apresentou sinal característico de hidrogênio aldeídico em δ_H 9,40. Observou-se um dupleto duplo correspondente ao hidrogênio metilênico H-7β em δ_H 1,79 (dd, *J*=8,8 e 14,4 Hz). O espectro apresentou dois simpletos em δ_H 0,98 (6H) e δ_H 0,94 (3H), correspondentes aos hidrogênios metílicos característicos do esqueleto de isocariolanos.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 30, p. 299) apresentou um sinal em δ_C 204,53, característico de carbonila de aldeído. Os demais deslocamentos químicos dos carbonos foram análogos àqueles registrados na literatura para o (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano-8-carbaldeído[34]. A Tabela 5, p. 122, apresenta as atribuições feitas utilizando RMN de ^{1}H e de ^{13}C, bem como a comparação com os dados da literatura[34].

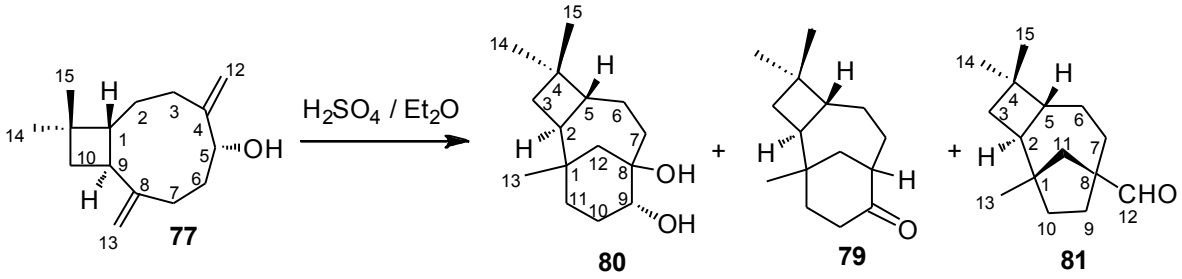
Tabela 5 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **81** com aqueles relatados na literatura para o (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído [34]

RMN ^{1}H			RMN ^{13}C		
H	**81**	**(1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído[34]**	**C**	**81**	**(1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído[34]**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	34,22	33,4
2α	1,58 -1,62 (m)	1,60 (m)	**2**	46,67	46,5
3α	1,34 – 1,37 (m)	1,36 (m)	**3**	37,33	37,11
3β	1,52 -1,54 (m)	1,54 (m)			
4	-	-	**4**	42,23	41,9
5β	1,47 – 1,52 (m)	1,50 (m)	**5**	50,13	49,2
6α	1,37 – 1,41 (m)	1,38 (m)	**6**	31,23	30,4
6β	1,60 – 1,64 (m)	1,63 (m)			
7α	1,58 – 1,62 (m)	1,59 (m)	**7**	28,15	27,0
7β	1,79 (dd, *J*=8,8, 14,4)	1,80 (dd, *J*= 8,8, 12,0)			
8	-	-	**8**	56,98	56,8
9α	1,28 – 1,32 (m)	1,31 (dd, *J*=4,4, 12,0)	**9**	25,93	25,2
9β	1,68 – 1,70 (m)	1,69 (m)			
10α/10β	1,38 – 1,41(m)	1,39 – 1,40 (m)	**10**	45,52	45,2
11α	1,65 - 1,69 (m)	1,69 (d, *J*=11,6)	**11**	47,78	45,4
11β	1,40 – 1,43 (m)	1,40 (d, *J*=11,6)			
12	9,4 (s)	9,4 (s)	**12**	204,53	204,1
13	0,94 (s)	0,94 (s)	**13**	31,90	30,5
14	0,98 (s)	0,98 (s)	**14**	22,32	21,9
15	0,98 (s)	0,98 (s)	**15**	20,67	20,3



81

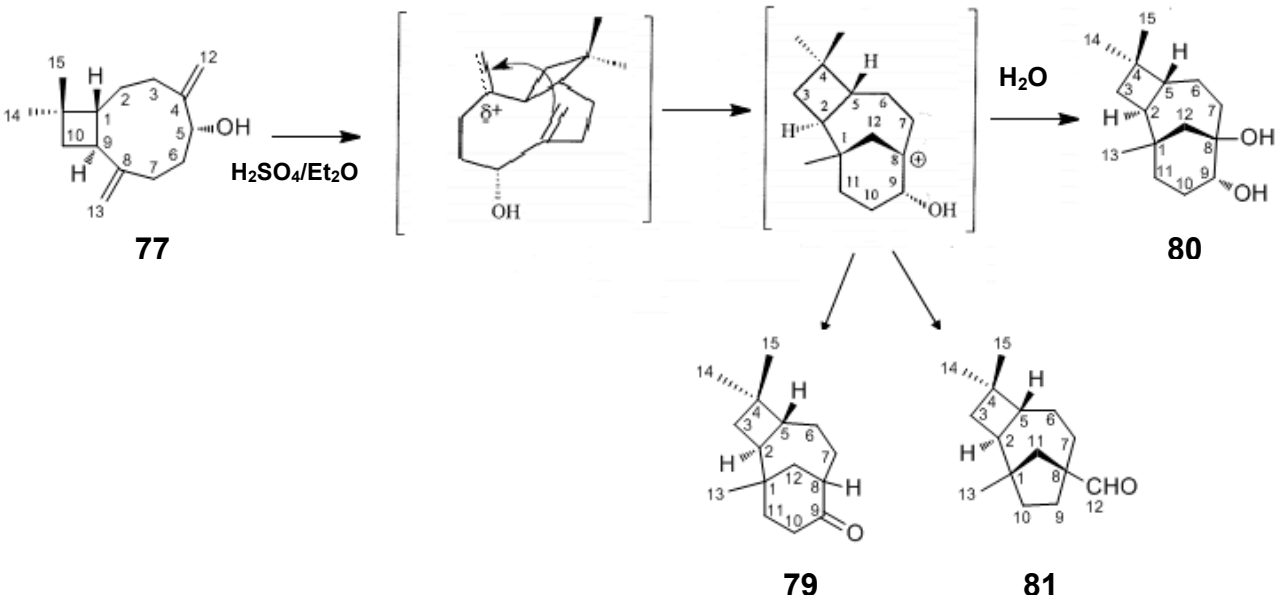
2.1.3 Preparação e identificação de (8*R*,9*R*)-isocariolan- 8,9-diol (80)



Esquema 20 – Preparação de (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (**80**), isocariolan-9-ona (**79**) e (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído (**81**) a partir de **77**.

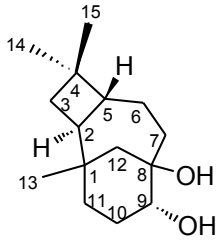
O (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (**80**) foi preparado a partir da reação do cariofil-4(12),8(13)-dien-5α-ol (**77**), dissolvido em éter dietílico, adicionando-se uma solução de ácido sulfúrico a 96% em éter dietílico (Esquema 20). Após purificação do produto obtido da reação por cromatografia em coluna de sílica gel, obteve-se os compostos (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (**80**), com rendimento de 11%, isocariolan-9-ona (**79**, 27% de rendimento) e (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano-8-carbaldeído (**81**, 41% de rendimento), os dois últimos já obtidos anteriormente.

A obtenção destes produtos pode ser novamente explicada pela formação de um carbocátion intermediário, com esqueleto de isocariolano, o qual novamente pode reagir posteriormente levando a três produtos distintos, conforme mostrado no Esquema 21, p. 124.



Esquema 21 – Mecanismo[35] da obtenção de (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (**80**), isocariolan-9-ona (**79**) e (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano-8-carbaldeído (**81**), a partir do cariofil-4(12),8(13)-dien-5α-ol (**77**).

2.1.3.1 Identificação do (8*R*,9*R*)-isocariolan- 8,9-diol (80)



A identificação de **80** foi realizada com base na análise dos espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C mono e bidimensionais e por comparação com dados obtidos na literatura [34].

O espectro no IV (Figura 31, p. 299) apresentou banda de absorção em 3391 cm^{-1}, características de estiramento da ligação O-H e bandas em 2946, 2864 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H alifáticas. A banda em 1060 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular de ligação C-O. Bandas na região entre 1458 e 756 cm^{-1} do espectro foram atribuídas à deformação angular de ligações C-H[40].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 32 e 33, p. 300) apresentou, em δ_H 3,48 (dd, *J*=11,6, 5,6 Hz), um sinal de dupleto duplo correspondente ao hidrogênico metínico H-9β. Foram observados três simpletos em δ_H 0,79, δ_H 0,96 e δ_H 0,97, atribuídos a hidrogênios dos grupos metila, e um dupleto duplo em δ_H 1,46 (*J*=9,6, 8,0 Hz). Este espectro também apresentou um dupleto em δ_H 1,00 (d, *J*=12,8 Hz), que foi atribuído ao hidrogênio H-12b. Apresentou também um dupleto duplo em δ_H 1,73 (*J*=12,8, 2,8 Hz), atribuído ao hidrogênio H12a e um dupleto triplo em δ_H 1,23 (*J*=13,2, 13,2, 4,8 Hz), referente ao hidrogênio metilênico H-11α.

A análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 34, p. 301) e subespectro DEPT 135 (Figura 35, p. 301) levou à conclusão de que **80** apresenta quinze sinais, sendo três referentes a carbonos não hidrogenados, três carbonos metínicos, seis carbonos metilênicos e três carbonos metílicos.

O mapa de contornos homonuclear COSY (Figuras 36 e 37, p. 302) possibilitou estabelecer, através das correlações, as conectividades entre os hidrogênios H-2α/H-3α,H-3β,H-5β; H-9β/H-10α,H-10β; H-10α, H-10β/H11α. Assim, a partir do sinal de H-2α em δ_H 2,06 -1,94 (m), confirmou-se a atribuição de H-3α em δ_H 1,46 (dd, *J*=9,6, 8,0 Hz) e H-3β em δ_H 1,25 – 1,28 (m) e de H-5β em δ_H 1,62 – 1,70 (m).

A atribuição dos hidrogênios H-10α e H-10β em δ_H 1,76-1,84 (m) foi confirmada com a correlação com H-9β em δ_H 3,48 (dd, 1H, *J*=11,6 e 5,6 Hz) e com H-11α em δ_H 1,23 (dt, 1H, *J*=13,2, 13,2 e 4,8 Hz).

Com base nos dados de RMN de ^{13}C encontrados na literatura[2] e na análise do mapa de contornos HSQC (Figura 38, p. 303), foi possível associar os sinais dos hidrogênios metínicos com aqueles dos carbonos correspondentes em δ_H 1,94 – 2,06 (H-2α) / δ_C 37,76 (C-2); δ_H 1,62 – 1,70 (H-5β) / δ_C 45,03 (C-5); δ_H 3,48 (H-9β) / δ_C 79,11(C-9).

Observaram-se os sinais dos hidrogênios metílicos com aqueles dos carbonos correspondentes em δ_H 0,79 (H-13) / δ_C 25,97(C-13); em δ_H 0,96 (H-14) / δ_C 20,67 (C-14α) e em δ_H 0,97 (H-15β) / δ_C 30,60 (C-15) e os sinais dos hidrogênios diastereotópicos com os sinais dos carbonos correspondentes em δ_C

35,78 (C-3)/ δ_H 1,46 (H-3α), δ_H 1,25-1,28 (H-3β); em δ_C 20,66 (C-6)/ δ_H1,56-1,61 (H-6α), δ_H 1,31-1,42 (H-6β); em δ_C 32,56 (C-7)/ δ_H 1,94-2,06 (H-7α), δ_H 1,31-1,42 (H-7β); em δ_C 28,43 (C-10)/ δ_H 1,76 – 1,84 (H-10α e H-10β); em δ_C 37,47 (C-11)/ δ_H1,23 (H-11α), em δ_H 1,31-1,42 (H-11β) e em δ_C 48,08 (C-12)/ δ_H 1,73 (H-12a), δ_H 1,00 (H-12b).

Através da análise do mapa de contornos HMBC (Figura 39 e 40, p. 303 e 304) verificou-se a correlação entre o sinal de carbono em δ_C 37,76 (C-2) com os sinais de hidrogênios em δ_H 0,79 (H-13, ^3J), δ_H 1,73 (H-12a ^3J), δ_H 1,46 (H-3α, ^2J) e δ_H 1,25-1,28 (H-3β, ^2J). Observou-se, também, a correlação entre o sinal de carbono δ_C 45,03 (C-5) e os sinais de hidrogênios δ_H 0,96 (H-14, ^3J), δ_H 0,97 (H-15 ^3J) e δ_H 1,46 (H-3α, ^3J) e δ_H 1,25-1,28 (H-3β, ^3J). Estas correlações e a conectividade observada através do mapa de contornos COSY, confirmam a posição dos hidrogênios metínicos H-2 e H-5.

Os carbonos não hidrogenados foram diferenciados analisando-se as correlações do mapa de contornos HMBC: o sinal do carbono não hidrogenado em δ_C 34,84 (C-4) apresentou correlações com os sinais de hidrogênios δ_H 0,96 (H-14, ^2J) e δ_H 0,97 (H-15 ^2J); o sinal do carbono em δ_C 33,21 (C-1) apresentou correlação com os hidrogênios em δ_H 1,23 (H-11α, ^2J) e δ_H 0,78 (H-13, ^2J); e o sinal de carbono não hidrogenado em δ_C 76,70 (C-8) apresentou correlações com os hidrogênios em δ_H 3,48 (H-9β, ^2J) e δ_H 1,94 – 2.06 (H-7α, ^2J). Também neste espectro podem ser visualizadas as correlações do sinal em δ_C 20,66 (C-6) com os hidrogênios δ_H 2,06 – 1,94 (H-7α, ^2J) e do sinal em δ_C 32,56 (C-7) com os hidrogênios δ_H 3,48 (H-9β, ^3J) e δ_H 1,73 (H-12a, ^3J) e δ_H 1,00 (H-12b, ^3J). O sinal de carbono em δ_C 48,08 (C-12) correlacionou com os sinais de hidrogênios em δ_H 0,78 (H-13, ^3J), δ_H 1,94 - 2,06 (H-7α, ^3J) e δ_H 1,31 – 1,42 (H-7β, ^3J).

As posições dos hidrogênios metilênicos H-10α/H-10β e H-11α/H-11β foram confirmadas pela análise dos mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC. No mapa de contornos HMBC, o sinal de carbono δ_C 28,43 (C-10) apresentou correlação com os hidrogênios δ_H 3,48 (H-9β, ^2J) e δ_H 1,23 (H-11α, ^2J). O sinal de

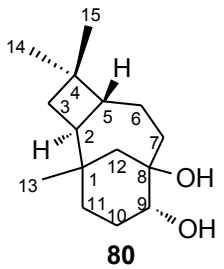
carbono δ_C 37,47 (C-11) apresentou correlação com os hidrogênios δ_H 0,79 (H-13, ^3J), δ_H 1,72 (H-12a, ^3J) e δ_H 1,00 (H-12b, ^3J).

No mapa de contornos NOESY (Figuras 41 e 42, p. 304 e 305) foram observadas correlações do sinal de hidrogênio em δ_H 1,94 - 2,06 (H-2α) com o hidrogênio H-14α (δ_H 0,96; δ_C 20,87), confirmando a configuração α para H-2. O sinal de hidrogênio em δ_H 1,62-1,79 (H-5β) apresentou correlações com os hidrogênios H-15 (δ_H 0,97; δ_C 30,80) confirmando a configuração β para o H-5, e para C-15. A configuração β do hidrogênio H-9, em δ_H 3,48, foi confirmada pela correlação com o H-12b (δ_H 1,00, δ_C 48,28) e com H-12a (δ_H 1,73, δ_C 48,28).

A Tabela 6, p. 128, apresenta as atribuições feitas utilizando RMN de ^{1}H e de ^{13}C, bem como a comparação com os dados da literatura[34], alguns valores encontrados para **80** foram corrigidos em relação à literatura.

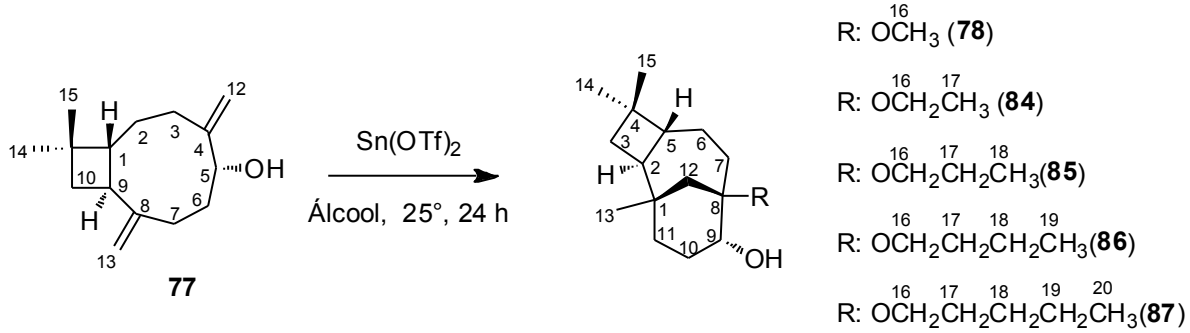
Tabela 6 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **80** com aqueles relatados na literatura para o (8*R*,9*R*)-isocariolan- 8,9-diol [34]

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**80**	**(8*R*,9*R*)-isocariolan- 8,9-diol[34]**	**C**	**80**	**(8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol[34]**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	33,21	33,2
2α	1,94 – 2,06 (m)	1,94 - 2,05 (m)	**2**	37,76	37,7
3α	1,46 (dd, *J*=9,6, 8,0)	1,46 (dd, *J*=9,6, 8,0)	**3**	35,78	35,7
3β	1,25 – 1,28 (m)	1,23 – 1,41 (m)			
4	-	-	**4**	34,84	34,8
5β	1,62 –1,70 (m)	1,94 – 2,05 (m)	**5**	45,03	44,9
6α	1,56 –1,61 (m)	1,48 – 1,57 (m)	**6**	20,66	20,6
6β	1,31 – 1,42 (m)	1,58 – 1,72 (m)			
7α	1,94 – 2,06 (m)	1,48 – 1,57 (m)	**7**	32,56	28,4
7β	1,31 – 1,42 (m)	-			
8	-	-	**8**	76,70	76,7
9β	3,48 (dd, *J*=11,6, 5,6)	3,48 (dd, *J*=11,5, 5,6)	**9**	79,11	79,1
10α	1, 76 – 1,84 (m)	1,58 – 1,72 (m)	**10**	28,43	32,5
10β	1, 76 – 1,84 (m)	1,79 (m)			
11α	1,23 (dt, *J*=13,2, 13,2, 4,8)	1,23 – 1,41 (m)	**11**	37,47	37,4
11β	1,31 – 1,42 (m)	1,58 – 1,75 (m)			
12a	1,73 (dd, *J*=12,8, 2,8)	1,75 (m)	**12**	48,08	48,0
12b	1,00 (d, *J*=13,8)	0,98 (d, *J*=12,9)			
13	0,78 (s)	0,79 (s)	**13**	25,97	25,9
14	0,96 (s)	0,96 (s)	**14**	20,67	20,6
15	0,97 (s)	0,97 (s)	**15**	30,60	30,6



80

2.1.4 Preparação e identificação dos éteres (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78), (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84), (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85), (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86) e (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87) a partir de 77



Esquema 22 – Preparação dos éteres **78**, **84**, **85**, **86** e **87** com triflato de estanho, a partir de **77.**

Os compostos **78** (também preparado anteriormente pela reação de **77** com TCNE), **84**, **85**, **86** e **87** foram preparados a partir da reação do $Sn(OTf)_2$ com o 5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (**77**) e os alcoóis metanol, etanol, propanol, butanol e pentanol, sob atmosfera inerte, à temperatura ambiente por 24 horas (Esquema 22).

A identificação dos compostos **84**, **85**, **86** e **87** foi feita a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos, obtidos nos espectros no IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C mono e bidimensionais e por comparação com os dados espectroscópicos do composto **78** (Item 2.1.2.1, p. 114), já identificado.

O espectro no IV do composto **84** (Figura 43, p. 305) apresentou-se simliar ao de **78** e o espectro de RMN de ^1H (Figuras 44 e 45, p. 306) só diferiu daquele de **78** pelos sinais relativos ao grupo etila. O tripleto associado aos hidrogênios do grupo metila pode ser observado em δ_H 1,10. Os sinais dos dois hidrogênios metilênicos, apresentaram-se como um multipleto (δ_H 3,36-3,49). O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 46, p. 307) apresentou o sinal do carbono metílico em δ_C 16,59 e aquele do carbono metilênico em δ_C 56,51. A presença da cadeia alquílica do composto **84** foi confirmada através do mapa de contornos COSY (Figura 47, p.

307), o qual apresentou correlações entre os hidrogênios H16/H16´ em δ_H 3,36-3,49 (m) com o hidrogênio H-17 (δ_H 1,10).

O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **84** forneceu o pico [M^+] com *m/z* 266,2249, compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{30}O_2$ do (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**), um composto inédito. A Figura 48, p. 308, mostra o espectro de Massas de **84**.

Os dados acima, associados à comparação com aqueles de **78,** permitiram confirmar a estrutura do composto **84** como sendo o (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol. Nas Tabelas 7 e 8 (p. 132 e 133) estão compilados os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **84**, respectivamente, bem como a comparação com os dados do (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**).

O espectro no IV do composto **85** (Figura 49, p. 308) apresentou-se simliar ao de **78** e o espectro de RMN de ^1H (Figuras 50 e 51, p. 309) apresentou os sinais dos dois hidrogênios diastereotópicos como um multipleto em δ_H 3,27 -3,39 (m). Outro multipleto pode ser observado em δ_H 1,46-1,53, que foi associado a H-17. O tripleto observado em δ_H 0,88 foi atribuído ao hidrogênio H-18. A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 52, p. 310) apresentou os sinais da cadeia alquílica em δ_C 62,67, em δ_C 23,92 e em δ_C 10,77, atribuídos aos carbonos C-16, C-17 e C-18, respectivamente. A adição desta cadeia alquílica no carbono C-8 do esqueleto isocariolano em **85** foi confirmada pelo mapa de contornos COSY (Figura 53, p. 310), o qual apresentou correlações entre os hidrogênios H16/H16´(δ_H 3,27-3,39, m), com o hidrogênio H-17 (δ_H 1,46 -1,53, m) e entre este último e o hidrogênio H-18 (δ_H 0,88).

O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **85** (Figura 54, p. 311) forneceu o pico do íon molecular [M^+] com *m/z* 280,2386, compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{32}O_2$ do (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**), um composto inédito.

A comparação dos dados de RMN obtidos para **85** com aqueles de **78** permitiu a determinação da estrutura de **85** como sendo o (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**). Nas Tabelas 7 e 8 (p. 132 e 133) estão compilados os dados

de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **85**, respectivamente, bem como a comparação com os dados do (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**).

O espectro no IV dos compostos **86** (Figura 55, p. 311) e **87** (Figura 61, p. 314) são simliares ao de **78** e o espectro de RMN de ^{1}H dos compostos **86** (Figuras 56 e 57, p. 312) e **87** (Figuras 62 e 63, p. 315) apresentaram os sinais dos hidrogênios diastereotópicos em δ_H 3,31-3,43 (m) e δ_H 3,36-3,49 (m), respectivamente. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 58, p. 313) de **86** apresentou os sinais dos carbonos da cadeia alquílica em δ_C 60,68, δ_C 32,85, δ_C 19,46 e δ_C 13,95, atribuídos aos carbonos C-16, C-17, C-18 e C-19, respectivamente. O espectro de RMN de ^{13}C de **87** (Figura 64, p. 316) apresentou os sinais dos carbonos da cadeia alquílica em δ_C 61,03 (C-16), δ_C 30,44 (C-17), δ_C 28,50 (C-18), δ_C 22,56 (C-19) e δ_C 14,01 (C-20). O mapa de contornos COSY de **86** (Figura 59, p. 313) apresentou correlaçôes entre os hidrogênios H16/H16´, em δ_H 3,31 -3,43 (m), com o hidrogênio H-17, em δ_H 1,41 -1,51 (m), entre o hidrogênio H-17 e o hidrogênio H-18, em δ_H 1,30 -1,37 (m). Observou-se também correlação entre o hidrogênio H-18 e o hidrogênio H-19, em δ_H 0,89. Correlações análogas foram observadas no mapa de contornos COSY de **87** (Figura 65, p. 316).

O espectro de Massas por impacto eletrônico de **86** forneceu o pico do íon molecular $[M^+]$ em *m/z* 294,2592, compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{34}O_2$ do (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**). Na Figura 60, p. 314 apresenta-se o espectro de Massas de **86**. Já o espectro de Massas por impacto eletrônico de **87** forneceu um $[M^+]$ = 308,2733 u.m.a., compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{36}O_2$ do (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**) e na Figura 66, p. 317 apresenta-se o espectro de Massas de **87**.

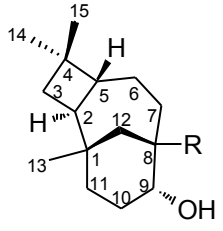
Assim, o composto **86** foi identificado como sendo o (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**) e composto **87** como o (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**), inéditos. Nas Tabelas 7 e 8, p. 132 e 133, estão compilados os dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C, de **86** e **87**, respectivamente, bem como a comparação com os dados do (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**).

Tabela 7 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) de **78**, **84**, **85**, **86** e **87**

H	(8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)	(8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84)	(8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85)	(8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86)	(8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87)
1	-	-	-	-	-
2α	2,06 (dt, *J*=11,2, 11,2, 8,4)	2,01 - 2,09 (m)	2,03 -2,11 (m)	2,02 -2,11 (m)	2,02 -2,10 (m)
3α	1,45 (t, *J*=8,9)	1,42 (t, *J*=9,6)	1,42 -1,47 (m)	1,41 -1,51 (m)	1,42 -1,51(m)
3β	1,27 (t, *J*=10,8)	1,25 (t, *J*=10)	1,27 (t, *J*=10,4)	1,26 (t, *J*=10,0)	1,23 -1,29 (m)
4	-	-	-	-	-
5β	1,67 –1,74 (m)	1,62 –1,71 (m)	1,66 -1,74 (m)	1,53 -1,67 (m)	1,66 -1,74 (m)
6α	1,49 –1,58 (m)	1,47- 1,55 (m)	1,46 -1,53 (m)	1,41 -1,51 (m)	1,42 -1,51 (m)
6β	1,60 – 1,68 (m)	1,57 - 1,61 (m)	1,55 -1,64 (m)	1,53 -1,67 (m)	1,52 – 1,63 (m)
7α	1,49 – 1,58 (m)	1,47 -1,55 (m)	1,46 -1,53 (m)	1,41 -1,51 (m)	1,42 -1,51 (m)
7β	1,84 – 1,92 (m)	1,83 - 1,91(m)	1,83 -1,92 (m)	1,81-1,91 (m)	1,83 -1,91 (m)
8	-	-	-	-	-
9β	3,57 (dd, *J*=11,6, 5,6)	3,53 (dd, *J*=11,6, 6,0)	3,54 (dd, *J*=11,0, 5,6)	3,54 (dd, *J*=11,2, 6,0)	3,55 (dd, *J*=11,2, 6,0)
10α /10 β	1, 75 – 1,82 (m)	1,73 -1,81(m)	1,75 -1,82 (m)	1,68 -1,80 (m)	1,76 -1,81 (m)
11α	1,20 (dt, *J*=13,2, 13,2, 5,6)	1,19 (dt, *J*=12,8, 12,8, 4,4)	1,21 (dt, *J*=13,0, 13,0, 5,2)	1,19 (dt, *J*=12,8, 12,8, 5,2)	1,20 (dt, *J*=13,0, 13,0, 5,2)
11´	1,35 – 1,40 (m)	1,33 -1,37 (m)	1,34 -1,40 (m)	1,30 -1,37 (m)	1,32 -1,39 (m)
12a	1,84 – 1,92 (m)	1,83 -1,91 (m)	1,83 -1,92 (m)	1,81-1,91 (m)	1,83 -1,91 (m)
12b´	0,89 (d, *J*=13,2)	0,89 (d, *J*=13,2)	0,86 -0,91 (m)	0,87 -0,91 (m)	0,85 -0,89 (m)
13	0,80 (s)	0,77 (s)	0,79 (s)	0,78 (s)	0,78 (s)
14	0,96 (s)	0,94 (s)	0,95 (s)	0,95 (s)	0,95 (s)
15	0,97 (s)	0,94 (s)	0,96 (s)	0,96 (s)	0,96 (s)
16, 16'´	3,22 (s)	3,36-3,49 (m)	3,27 -3,39 (m)	3,31 -3,43 (m)	3,29 -3,42 (m)
17	-	1,10 (t, *J*=7,2)	1,46 -1,53 (m)	1,41 -1,51 (m)	1,42 -1,51(m)
18	-	-	0,88 (t, *J*=7,6)	1,30 -1,37 (m)	1,23 -1,29 (m)
19	-	-	-	0,89 (t, *J*=7,2)	1,27 – 1,32 (m)
20	-	-	-	-	0,85 -0,89 (m)

Tabela 8 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **78**, **84**, **85**, **86** e **87**

C	(8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)	(8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84)	(8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85)	(8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86)	(8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87)
1	32,90	32,98	32.82	32,85	32,81
2	36,91	36,73	36,56	36,55	36,55
3	35,58	35,70	35,51	35,51	35,51
4	34,99	35,05	34,87	34,88	34,87
5	44,03	44,14	43,95	43,94	43,94
6	21,71	21,90	21,69	21,70	21,71
7	28,94	29,47	29,28	29,28	29,28
8	80,43	80,47	79,95	79,95	79,97
9	76,38	76,98	76,85	76,68	76,83
10	27,45	27,37	27,08	27,08	27,09
11	36,71	36,82	36,64	36,63	36,63
12	42,05	42,93	42,69	42,66	42,67
13	26,27	26,41	26,23	26,23	26,23
14	20,89	21,02	20,83	20,83	20,83
15	30,73	30,85	30,66	30,66	30,65
16	49,20	56,51	62,67	60,68	61,03
17	-	16,59	23,92	32,85	30,44
18	-	-	10,77	19,46	28,50
19	-	-	-	13,95	22,56
20		-	-	-	14,06



R: $O\overset{16}{C}H_3$ (**78**)

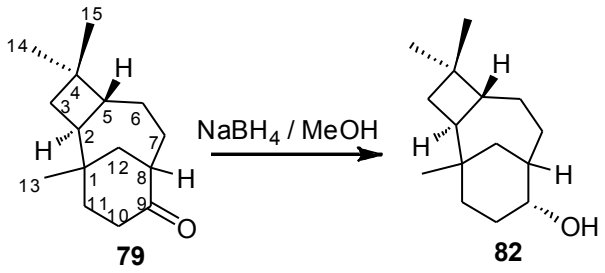
R: $O\overset{16}{C}H_2\overset{17}{C}H_3$ (**84**)

R: $O\overset{16}{C}H_2\overset{17}{C}H_2\overset{18}{C}H_3$(**85**)

R: $O\overset{16}{C}H_2\overset{17}{C}H_2\overset{18}{C}H_2\overset{19}{C}H_3$(**86**)

R: $O\overset{16}{C}H_2\overset{17}{C}H_2\overset{18}{C}H_2\overset{19}{C}H_2\overset{20}{C}H_3$(**87**)

2.1.5 Preparação e identificação de isocariolan-9*α*-ol (82)

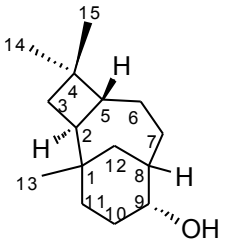


79 **82**

Esquema 23 – Preparação de isocariolan-9-α-ol (**82**) a partir de **79**.

O composto isocariolan-9-α-ol (**82**) foi preparado a partir da redução da isocariolan-9-ona (**79**) (Esquema 23). A isocariolan-9-ona (**79**) foi dissolvida em metanol e tratada com $NaBH_4$. Posteriormente, o produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, obtendo-se um rendimento de 80%.

2.1.5.1 Identificação do isocariolan-9*α*-ol (82)



A identificação de **82** foi realizada com base na análise dos espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C mono e bidimensionais e por comparação com dados obtidos na literatura [41].

O espectro no IV (Figura 67, p. 317) apresentou banda de absorção em 3291 cm^{-1}, características de estiramento da ligação O-H e banda em 2911 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H. A banda em 1053 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular de ligação C-O. Bandas na região entre 1458 e 720 cm^{-1} do espectro foram atribuídas à deformação angular de ligações C-H[40].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 68 e 69, p. 318) mostrou, em δ_H 3,71 (td, *J*=11,6, 5,6, 5,6 Hz), um tripleto duplo, correspondente ao hidrogênico metínico H-

9β. Foram observados três simpletos em δ_H 0,74, δ_H 0,97 e δ_H 0,96, atribuídos a hidrogênios de grupos metila sendo eles H-13, H-14α e H-15β. Observou-se, também, um dupleto duplo em δ_H 1,46 (J=9,6 e 7,6 Hz), referente ao hidrogênio metilênico H-3α e um sinal em δ_H 1,27, referente ao hidrogênio metilênico H-3β. O espectro apresentou, ainda, um dupleto duplo em δ_H 1,04 (d, J=14,4 e 4,0 Hz), atribuído ao hidrogênio H-12b, sinal característico de esqueleto de isocariolanos, e um dupleto triplo em δ_H 1,18 (J=13,2, 13,2 e 4,4 Hz), referente ao hidrogênio metilênico H-11α.

A análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 70, p. 319) e subespectro DEPT 135 (Figura 71, p. 319) permitiu detectar a presença de quinze sinais, sendo dois referentes a carbonos não hidrogenados, quatro carbonos metínicos, seis carbonos metilênicos e três carbonos metílicos.

O mapa de contornos homonuclear COSY (Figuras 72 e 73, p. 320) possibilitou estabelecer, através das manchas de correlação, as conectividades entre os hidrogênios H-2α/H-3α,H-3β,H-5β; H-8/ H-12a, H-12b; H-9β/H-10α,H-10β e H-10α, H-10β/ H11α. Assim, a partir do sinal de H-2α em δ_H 2,04 – 2,11 (m), confirmou-se a atribuição de H-3α em δ_H 1,46 (dd, J=9,6, 7,6 Hz) e H-3β em δ_H 1,27 (t, J=10,6Hz) e de H-5β em δ_H 1,61 – 1,71 (m). As atribuições dos hidrogênios H-10α em δ_H 1,61 – 1,70 (m) e H-10β em δ_H 1,75 – 1,85 (m) foram confirmadas com a correlação de ambos com H-9β em δ_H 3,71 (td, 1H, J=11,6, 5,6 e 5,6 Hz) e com H-11α em δ_H 1,18 (dt, 1H, J=13,2, 13,2 e 4,4 Hz). A atribuição do sinal em δ_H 2,04-2,11 ao hidrogênio metínico H-8 foi confirmada por sua correlação com os hidrogênios H-12a (δ_H 1,61 – 1,70, m) e H-12b (δ_H 1,04, dd, J=14,4 e 4,0 Hz).

A análise do mapa de contornos HSQC (Figura 74, p. 321), juntamente com os dados de RMN encontrados na literatura[2], possibilitou associar os sinais dos hidrogênios metínicos com aqueles dos carbonos correspondentes em δ_H 2,04 – 2,11 (H-2α) / δ_C 39,51 (C-2); δ_H 1,61 – 1,79 (H-5β) / δ_C 46,16 (C-5); δ_H 3,71 (H-9β) / δ_C 73,16 (C-9) e δ_H 2,04 – 2,11 (H-8) / δ_C 38,32 (C-8).

Observaram-se os sinais dos carbonos metilênicos com os hidrogênios diastereotópicos correspondentes em δ_C 36,06 (C-3)/ δ_H 1,46 (H-3α), δ_H 1,27 (H-3β); em δ_C 24,23 (C-6)/ δ_H1,34 – 1,42 (H-6α), δ_H 1,50 -1,57 (H-6β); em δ_C 24,35 (C-7)/ δ_H 1,71 – 1,75 (H-7α, H-7β); em δ_C 27,88 (C-10)/ δ_H 1,61 – 1,70 (H-10α), δ_H 1,75 – 1,85 (H-10β); em δ_C 38,41 (C-11)/ δ_H1,18 (H-11α), δ_H 1,34 – 1,42 (H-11β) e em δ_C 40,26 (C-12)/ δ_H 1,61 – 1,70 (H-12a), δ_H 1,04 (H-12b).

Através da análise do mapa de contornos HMBC (Figura 75, p. 321), verificou-se a correlação entre o sinal de carbono em δ_C 39,51 (C-2) com os sinais de hidrogênios em δ_H 0,73 (H-13, ^3J) e δ_H 1,27 (H-3β, ^2J). Observou-se, também, a correlação entre o sinal de carbono em δ_C 46,16 (C-5) com os sinais de hidrogênios em δ_H 0,97 (H-14, ^3J), δ_H 0,96 (H-15 ^3J) e δ_H 1,46 (H-3α, ^3J). Estas correlações e a conectividade observada no mapa de contornos COSY confirmam a posição dos hidrogênios metínicos H-2 e H-5.

As posições dos hidrogênios metilênicos H-10α/H-10β e H-11α/H-11β foram confirmadas pela análise dos mapas de contornos COSY e HSQC, aliados ao mapa de contornos HMBC. No mapa de contornos HMBC, o sinal de carbono em δ_C 27,88 (C-10) apresentou correlação com o hidrogênio em δ_H 1,18 (H-11α, ^2J). O sinal de carbono em δ_C 38,41 (C-11) apresentou correlação com os hidrogênios δ_H 1,04 (H-12b, ^3J) e δ_H 2,04-2,11 (H-2α, ^3J).

O carbono não hidrogenado em δ_C 34,34, apresentou correlações com os sinais de hidrogênios δ_H 0,97 (H-14, ^2J), δ_H 0,96 (H-15 ^2J) e δ_H 1,27 (H-3β, ^2J) e foi atribuído ao carbono C-4, assim como o carbono não hidrogenado em δ_C 31,36 que apresentou correlações com os sinais de hidrogênios δ_H 0,74 (H-13,^2J) e δ_H 1,04 (H-12b,^2J) e foi atribuído ao carbono C-1.

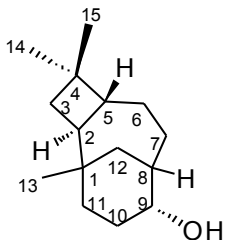
O mapa de contornos NOESY (Figuras 76 e 77, p. 322) apresentou correlações entre o sinal de hidrogênio em δ_H 2,04 – 2,11 (H-2α) com o sinal de H-14α (δ_H 0,97; δ_C 20,61), confirmando a configuração α para H-2. O sinal de hidrogênio em δ_H 1,61 – 1,70 (H-5β) apresentou correlações com o hidrogênio H-15β (δ_H 0,96; δ_C 30,61), confirmando a configuração β para H-5 e H-15. A

configuração β do hidrogênio H-9 em δ_H 3,71 foi confirmada pela correlação com H-12b (δ_H 1,04, δ_C 40,26) e com H-12a (δ_H 1,61-1,70, δ_C 40,26).

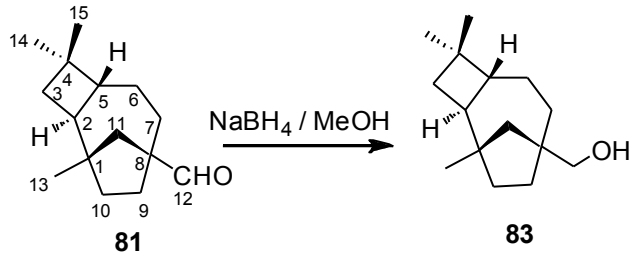
A Tabela 9 apresenta as atribuições feitas utilizando RMN de ^{1}H e de ^{13}C, bem como a comparação com os dados da literatura[41].

Tabela 9 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **82** com aqueles relatados na literatura para o isocariolan-9α-ol[41]

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**82**	**Isocariolan-9α-ol[41]**	**C**	**82**	**Isocariolan-9α-ol[41]**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	31,37	31,4
2α	2,04 – 2,11 (m)	2,04 – 2,12 (m)	**2**	39,51	38,3
3α	1,46 (dd, *J*=9,6, 7.6)	1,46 (dd, *J*=10,6, 7,9)	**3**	36,06	36,0
3β	1,27 (m)	1,24 (dd, *J*=10,6, 10,6)			
4	-	-	**4**	34,34	34,3
5β	1,61 – 1,70 (m)	1,63 – 1,86 (m)	**5**	46,16	46,1
6α	1,34 – 1,42 (m)	1,34 – 1,43 (m)	**6**	24,23	24,2
6β	1,50 –1,57 (m)	1,55 (m)			
7α	1,23 – 1,30 (m)	1,34 – 1,43 (m)	**7**	24,35	24,3
7β	1,71 – 1,75 (m)	1,63 – 1,86 (m)			
8	2,04 – 2,11 (m)	2,04 – 2,12 (m)	**8**	38,32	39,5
9β	3,71 (td, *J*=11,6, 5,6, 5,6)	3,71 (ddd, *J*=11,2, 5,6, 5,6)	**9**	73,16	73,1
10α	1, 61 – 1,70 (m)	1,63 – 1,86 (m)	**10**	27,88	27,9
10β	1, 75 – 1,85 (m)	1,63 – 1,86 (m)			
11α	1,18 (dt, *J*=13,2, 13,2, 4,4)	1,20 (ddd, *J*=13,2, 9,0, 4,3)	**11**	38,41	38,4
11β	1,34 – 1,42 (m)	1,34 – 1,43 (m)			
12a	1,61 – 1,70 (m)	1,63 – 1,86 (m)	**12**	40,26	40,2
12b	1,04 (dd, *J*=14,4, 4,4)	1,05 (dd, *J*=13,9, 4,6)			
13	0,73 (s)	0,74 (s)	**13**	26,39	26,4
14	0,97 (s)	0,98 (s)	**14**	20,62	20,6
15	0,96 (s)	0,97 (s)	**15**	30,61	30,6



2.1.6 Preparação e identificação de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano (83)

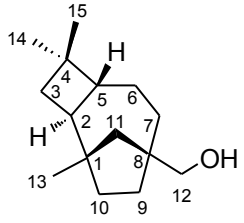


81 **83**

Esquema 24 – Preparação de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano (**83**) a partir de **81**.

O composto (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}] undecano (**83**) foi preparado a partir da redução do (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano-8-carbaldeído (**81**) (Esquema 24). O reagente **81** foi dissolvido em metanol e tratado com $NaBH_4$. Posteriormente, o produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, obtendo-se um rendimento de 82%.

2.1.6.1 Identificação do (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano (83)



A identificação de **83** foi realizada com base na análise dos espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C mono e bidimensionais e por comparação com dados obtidos na literatura[34].

O espectro no IV (Figura 78, p. 323) apresentou banda de absorção em 3350 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação O-H e bandas em 2923, 2859 cm^{-1}, referentes ao estiramento de ligações C-H. A banda em 1034 cm^{-1} foi atribuída à

deformação angular de ligação C-O. Bandas na região entre 1458 e 557 cm^{-1} do espectro foram atribuídas à deformação angular de ligações C-H[41].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 79 e 80, p. 323 e 324) mostrou um simpleto em δ_H 3,32, com integração para dois hidrogênios, característicos de hidrogênios metilênicos ligados a hidroxila. O espectro apresentou um sinal em δ_H 1,03 (d, *J*=12,2 Hz), atribuído ao hidrogênio H-11b, apresentou também um dupleto em δ_H 1,63 (*J*=12,2 Hz), atribuído ao hidrogênio H-11a.

A análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 81, p. 324) e subespectro DEPT 135 (Figura 82, p. 325) permitiu visualizar 15 sinais, sendo três referentes a carbonos não hidrogenados, dois carbonos metínicos, sete carbonos metilênicos e três carbonos metílicos.

Pela análise do mapa de contornos HSQC (Figura 83 e 84, p. 325 e 326) e por comparação com dados de RMN encontrados na literatura foi possível associar os sinais dos hidrogênios metínicos com os sinais dos carbonos correspondentes em δ_H 1,53 – 1,57(H-2α) / δ_C 46,11 (C-2); δ_H 1,47 – 1,50 (H-5β) / δ_C 49,10 (C-5).

Observaram-se os sinais dos hidrogênios metílicos com os sinais dos carbonos correspondentes em δ_H 0,88 (H-13) / δ_C 22,35 (C-13); em δ_H 0,96 (H-14α) / δ_C 20,41 (C-14) e em δ_H 0,96 (H-15β) / δ_C 30,49 (C-15) e os sinais dos hidrogênios diastereotópicos com os carbonos correspondentes em δ_C 37,19 (C-3)/ δ_H 1,50 – 1,53 (H-3α), δ_H 1,26 – 1,29 (H-3β); em δ_C 25,67 (C-6)/ δ_H1,26 – 1,29 (H-6α), δ_H 1,57 – 1,60 (H-6β); em δ_C 34,03 (C-7)/ δ_H 1,20 – 1,27(H-7α), δ_H 1,41 – 1,45 (H-7β); em δ_C 45,18 (C-10)/ δ_H 1,35 – 1,38 (H-10α e H-10β); em δ_C 47,78 (C-11)/ δ_H 1,03 (H-11b), 1,63 (H-11a); em δ_C 28,46 (C-9)/ δ_H 1,31 – 1,33 (H-9α), δ_H 1,47 – 1,50 (H-9β).

O espectro bidimensional HMBC (Figuras 85 e 86, p. 326 e 327) mostrou correlação entre o sinal em δ_C 46,11(C-2) com os sinais em δ_H 0,88 (H-13, ^{3}J) e correlação entre o sinal de carbono δ_C 49,10 (C-5) com os sinais de hidrogênios metínicos H-2 e metílicos em δ_H 0,96 (H-14, ^{3}J), δ_H 0,96 (H-15 ^{3}J).

O carbono não hidrogenado em δ_C 33,38 apresentou correlações com os sinais de hidrogênios em δ_H 0,96 (H-14, ^{2}J) e δ_H 0,96 (H-15, ^{2}J) e foi atribuído ao

carbono C-4, assim como o carbono não hidrogenado em δ_C 41,13, que apresentou correlações com os sinais de hidrogênios δ_H 0,88 (H-13,^2J) e foi atribuído ao carbono C-1.

A correlação do sinal de carbono em δ_C 25,67 com os sinais de hidrogênio em δ_H 1,20–1,27 (H-7α, ^2J), δ_H 1,41–1,45 (H-7β, ^2J) e em δ_H 1,47–1,50 (H-5β, ^2J) permitiu associar este sinal ao carbono C-6.

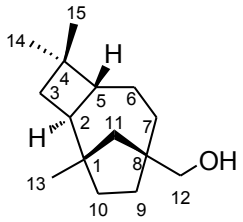
O sinal de carbono em δ_C 28,46 (C-9) apresentou correlação com os sinais de hidrogênios em δ_H 1,35 – 1,38 (H10α, H10β, ^2J), δ_H 3,32 (H-12, ^3J), δ_H 1,20–1,27 (H-7α, ^3J) e em δ_H 1,63 (H-11a, ^3J). O sinal em δ_C 34,07 mostrou correlação com os sinais de hidrogênios em δ_H 3,32 (H-12, ^3J), δ_H 1,63 (H-11a, ^3J), δ_H 1,03 (H-11b, ^3J) e em δ_H 1,26 – 1,29 (H-6α, ^3J), atribuído ao carbono C-7.

O mapa de contornos NOESY (Figura 87, p. 327) apresentou correlações do sinal de hidrogênio em δ_H 1,53–1,57 (H-2α) com o hidrogênio H-14α (δ_H 0,96; δ_C 20,40) confirmando a configuração α para H-2 e para o H-14. O sinal de hidrogênio em δ_H 1,47–1,50 (H-5β) apresentou correlações com o hidrogênio H-15β (δ_H 0,96; δ_C 30,48) confirmando a configuração β para o H-5, e para H-15.

A Tabela 10, p. 141, apresenta as atribuições feitas utilizando RMN de ^{1}H e de ^{13}C para **83**, bem como a comparação com os dados da literatura[34], alguns valores encontrados para **83** foram corrigidos em relação à literatura.

Tabela 10 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (*δ,* 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (*δ*, 100 MHz, $CDCl_3$) de **83,** com aqueles relatados na literatura para o (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undecano[34]

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**83**	**(1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undecano[34]**	**C**	**83**	**(1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undecano[34]**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	41,13	33,3
2α	1,53 – 1,57 (m)	1,52 – 1,57 (m)	**2**	46,11	46,1
3α	1,50 – 1,53 (m)	1,24 – 1,30(m)	**3**	37,19	37,2
3β	1,26 – 1,29 (m)	1,32 – 1,38 (m)			
4	-	-	**4**	33,38	41,1
5β	1,47 – 1,50 (m)	1,40 – 1,47 (m)	**5**	49,10	49,1
6α	1,26 – 1,29 (m	1,24 – 1,30 (m)	**6**	25,67	34,0
6β	1,57 –1,60 (m)	1,58 – 1,64 (m)			
7α	1,20 – 1,27 (m)	1,32 – 1,38 (m)	**7**	34,03	28,5
7β	1,41 – 1,45 (m)	1,52 – 1,57 (m)			
8	-	-	**8**	47,54	47,5
9α	1,31 – 1,33 (m)	1,40 – 1,47 (m)	**9**	28,46	25,7
9β	1,47 – 1,50 (m)	1,40 – 1,47 (m)			
10α	1, 35 – 1,38 (m)	1,58 – 1,64 (m)	**10**	45,18	45,2
10β	1, 35 – 1,38 (m)	1,52 – 1,57 (m)			
11α	1,63 (d, *J*=12,2)	1,66 (d, *J*=12,8)	**11**	47,78	47,8
11β	1,03 (d, *J*=12,2)	1,05 (d, *J*=12,8)			
12	3,32 (s)	3,31 (s)	**12**	73,77	73,7
13	0,88 (s)	0,88 (s)	**13**	22,35	30,5
14	0,960 (s)	0,96 (s)	**14**	20,41	22,3
15	0,964(s)	0,96 (s)	**15**	30,49	20,4

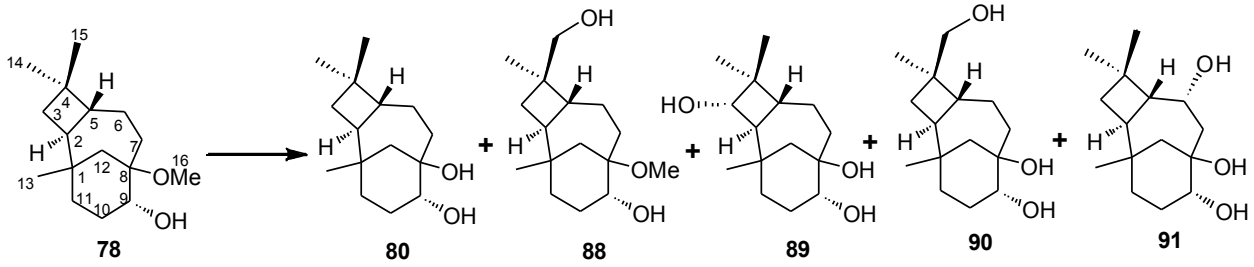


83

2.2 Transformações fúngicas de isocariolanos

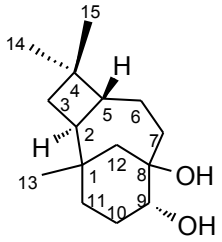
2.2.1 Biotransformação de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)

O substrato (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**) foi incubado com o fungo *Botrytis cinerea*, sendo realizados dois experimentos com duração de cinco e nove dias, utilizando o modo estático e temperatura ambiente. Os extratos obtidos foram submetidos à purificação por coluna de sílica gel e CLAE preparativa, levando ao isolamento de cinco produtos, resultantes de hidroxilações, hidrólise do material de partida em diferentes posições do esqueleto isocariolano, sendo quatro deles inéditos: (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (**80**), (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9,15-diol (**88**), (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (**89**), (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (**90**), (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (**91**) (Esquema 25).



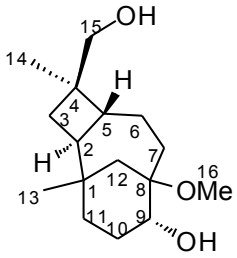
Esquema 25 – Produtos de biotransformação do (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**) pelo fungo *B. cinerea.*

2.2.1.1 Identificação de (8*R*,9*R*)-isocariolan- 8,9-diol (80)



O produto de transformação microbiana **80** (15,6 mg, 17,3% de bioconversão em cinco dias e 32,6 mg, 18,2% de bioconversão em nove dias) foi isolado como um sólido amorfo branco, de faixa de fusão 115 - 117 °C. A determinação estrutural substância foi descrita no item 2.1.3.1, p. 124.

2.2.1.2 Identificação de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9,15-diol (88)



O produto de transformação microbiana **88** (15,5 mg, 17,2% de bioconversão em cinco dias e 34,4 mg, 19,1% de bioconversão em nove dias), foi isolado como um material resinoso amarelado.

A estrutura desta substância foi elucidada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos nos espectros no IV e de RMN de ^{1}H e de ^{13}C mono e bidimensionais, por espectrometria de massas e por comparação com os dados espectroscópicos do material de partida (**78**).

O espectro no IV (Figura 88, p. 328) apresentou banda de absorção em 3421 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação O-H e banda em 2945 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H. A banda em 1064 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular de ligação C-O. Bandas na região entre 1462 e 631 cm^{-1} do espectro foram atribuídas à deformação angular de ligações C-H[40].

No espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 89 e 90, p. 328 e 329) observou-se um simpleto em δ_H 3,22, com integração para três hidrogênios, confirmando a presença do grupo metoxila e um dupleto duplo em δ_H 3,57 (J=13,2 e 5,4 Hz), associado ao hidrogênico metínico H-9β, estando estes sinais também presentes no material de partida (**78**). Um novo simpleto, em δ_H 3,33, relativo a hidrogênio em carbono oxigenado, foi observado neste espectro, assim como foi também observado o desaparecimento de um dos três simpletos relativos aos três grupos metila presentes em **78**, inferindo a ocorrência de hidroxilação em um dos carbonos metílicos. O simpleto em δ_H 0,82, associado aos hidrogênios metílicos H-13, foi conservado em relação ao espectro do material de partida.

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 91, p. 329), foi possível observar o desaparecimento do sinal de carbono metílico em δ_C 30,73, atribuído ao C-15, e o aparecimento de um sinal de carbono em δ_C 72,05, característico de carbono oxigenado, em relação ao material de partida.

Pelo mapa de contornos HSQC (Figura 92, p. 330), foi observada a correlação do carbono C-15 (δ_C 72,05) com o hidrogênio metilênico H-15β em δ_H 3,33. Este sinal de C-15 apresentou correlações no mapa de contornos HMBC (Figura 93, p. 330) com os hidrogênios em δ_H 1,01 (H-14, ^{3}J), δ_H 1,35 (H-3β, ^{3}J) e δ_H 1,93 – 1,96 (H-5β, ^{3}J), confirmando a hidroxilação na posição 15.

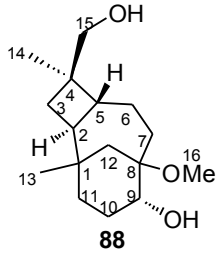
A estereoquímica β no novo grupo CH_2OH foi estabelecida pela análise do mapa de contornos NOESY expandido (Figura 94, p. 331), que mostrou a correlação entre o H-15 (C-15 encontra-se em β neste esqueleto) (δ_H 3,33) com H-5β (δ_H 1,93 – 1,96).

O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **88** forneceu um pico [M^+] = 268.2029 u.m.a., confirmando a fórmula molecular $C_{16}H_{28}O_3$ de **88**, um produto inédito. Na Figura 95, p. 331 apresenta-se o espectro de Massas de **88.**

Na Tabela 11, p. 145, estão compilados os dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C do (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9,15-diol (**88**), e aqueles do material de partida **78**.

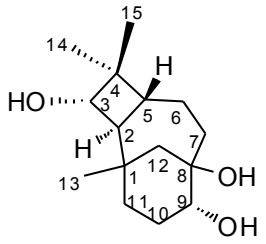
Tabela 11 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de **88** com aqueles do material de partida (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**)

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**(4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9,15-diol (88)**	**78**	**C**	**(4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9,15-diol (88)**	**78**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	32,92	32,90
2α	2,15 - 2,20 (m)	2,06 (dt, *J*=11,2, 11,2, 8,4)	**2**	36,27	36,91
3α	1,46 (t, *J*=10,2)	1,45 (t, *J*=8,9)	**3**	30,21	35,58
3β	1,35 (dd, *J*=9,6, 7,8)	1,27 (t, *J*=10,8)			
4	-	-	**4**	39,79	34,99
5β	1,91 -1,97 (m)	1,67 –1,74 (m)	**5**	38,56	44,03
6α	1,52 –1,58 (m)	1,49 –1,58 (m)	**6**	21,92	21,71
6β	1,62 – 1,69 (m)	1,60 – 1,68 (m)			
7α	1,52 – 1,58 (m)	1,49 – 1,58 (m)	**7**	28,90	28,94
7β	1,86 – 1,91 (m)	1,84 – 1,92 (m)			
8	-	-	**8**	80,24	80,43
9β	3,55 (dd, *J*=11,4, 5,4)	3,57 (dd, *J*=11,6, 5,6)	**9**	76,27	76,38
10α	1,75 (ddd, *J*=25,8, 13,8, 4,8)	1, 75 – 1,82 (m)	**10**	27,32	27,45
10β	1,80 – 1,85 (m)	1, 75 – 1,82 (m)			
11α	1,22 (dt, *J*=13,2, 13,2, 4,8)	1,20 (dt, *J*=13,2, 13,2, 5,6)	**11**	36,45	36,71
11β	1,38 – 1,46 (m)	1,35 – 1,40 (m)			
12 a	0,90 (d, *J*=12,6)	1,84 – 1,92 (m)	**12**	41,85	42,05
12 b	1,86 – 1,91 (m)	0,89 (d, *J*=13,2)			
13	0,81 (s)	0,80 (s)	**13**	26,09	26,27
14	1,01 (s)	0,96 (s)	**14**	16,22	20,89
15	3,33 (s)	0,97 (s)	**15**	72,05	30,73
16	3,22 (s)	3,26 (s)	**16**	49,16	49,20



88

2.2.1.3 Identificação de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (89)



O produto **89,** proveniente da biotransformação de **78**, foi isolado como um material resinoso amarelado, com rendimento de 3,2 mg (3,5% de bioconversão), em cinco dias, e 3,1 mg (1,7% de bioconversão), em nove dias.

A estrutura desta substância foi elucidada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos nos espectros no IV e de RMN mono e bidimensionais, por espectrometria de massas e por comparação com os dados espectroscópicos do material de partida (**78**).

O espectro no IV (Figura 96, p. 332) apresentou banda de absorção em 3378 cm^{-1}, características de estiramento da ligação O-H e banda em 2947, 2865 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H alifáticas. A banda em 1058 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular de ligação C-O. Bandas na região entre 1461 e 754 cm^{-1} do espectro foram atribuídas à deformação angular de ligações C-H[40].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 97 e 98, p. 332 e 333) mostrou um dupleto duplo em δ_H 3,50, correspondente ao hidrogênico metínico H-9β, três simpletos em δ_H 0,90, δ_H 0,95, δ_H 1,02 atribuídos a hidrogênios dos 3 grupos metila e um dupleto em δ_H 1,03 atribuído ao hidrogênio H-12b, estando estes sinais também presentes no espectro do material de partida. Observou-se também, neste espectro, um novo sinal, um dupleto, em δ_H 3,42, relativo a hidrogênio em carbono oxigenado, assim como o desaparecimento do simpleto em δ_H 3,26, referente ao grupo metoxila.

A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 99, p. 333) e subespectro DEPT-135 (Figura 100, p. 334) de **89** foram identificados sinais referentes a 15 carbonos, sendo três carbonos metílicos, cinco metilênicos, quatro metínicos e três quaternários. A comparação com os correspondentes espectros

de **78** mostra a presença, em **89**, de um carbono metínico oxigenado a mais, em δ_C 75,56, e um carbono metilênico a menos.

O desaparecimento do sinal do grupo metoxila em C-8, que aparecia em δ_H 3,26 no material de partida e apresentava correlação com o carbono não hidrogenado C-8, no mapa de contornos HMBC (Figura 21, p. 294), inferiu-se ter ocorrido à hidrólise enzimática do éter em C-8 pelo fungo, pois este carbono apresentou, em **89**, um deslocamento químico em δ_C 76,48, característico de carbono oxigenado.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e do mapa de contornos HSQC (Figura 101, p. 334) possibilitou alocar a outra hidroxila em C-3 (δ_C 75,56), tendo os sinais relativos a C-2 e C-4 sido deslocados para um maior valor (δ_C 50,38 e δ_C 40,86, respectivamente), em relação àqueles observados no espectro de **78**. O sinal do carbono metínico C-2 (δ_C 50,89) apresentou correlação, no mapa de contornos HSQC, com o sinal em δ_H 1,78 – 1,87 (m), referente ao hidrogênio H-2α.

Através do mapa de contornos COSY (Figura 102, p. 335), foi possível observar a correlação do hidrogênio H-2α em δ_H 1,78 – 1,87 (m) com o hidrogênio H-3 em δ_H 3,40 e com o H-5β, em δ_H 1,16 – 1,23.

No mapa de contornos HMBC (Figura 103, p. 335), observaram-se correlações entre o C-3, em δ_C 75,56, e o hidrogênio metiníco em δ_H 1,78 – 1,87 (H-2α, ^2J); este carbono também se correlaciona com os hidrogênios metílicos em δ_H 0,90 (H-14, ^3J) e em δ_H 1,02 (H-15, ^3J). Foram ainda observadas correlações entre o C-5, em δ_C 37,35, e os hidrogênios metilícos H-14 (^3J), H-15 (^3J) e o hidrogênio metilênico em δ_H 2,03 (H-7α, ^3J).

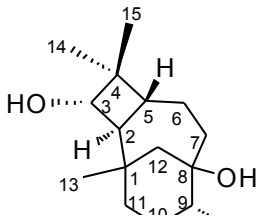
A configuração da hidroxila em C-3 foi estabelecida a partir da análise do mapa de contornos NOESY (Figura 104, p. 336), tendo sido observada a correlação do H-3, em δ_H 3,42, com o H-5β em δ_H 1,16 – 1,23, confirmando a configuração α para a hidroxila.

O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **89** forneceu um pico [M^+] = 254,1860 u.m.a., compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{26}O_3$ do (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (**89**), um composto inédito. Na Figura 105, p. 336, apresenta-se o espectro de Massas de **89**.

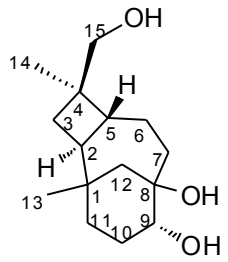
Na Tabela 12 estão compilados os dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **89**, bem como aqueles do material de partida **78**.

Tabela 12 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **89,** com aqueles do material de partida (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol **78**

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**(3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89)**	**78**	**C**	**(3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (89)**	**78**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	32,89	32,90
2α	1,78 – 1,87 (m)	2,06 (dt, *J*=11,2, 11,2, 8,4)	**2**	50,38	36,91
3α	-	1,45 (t, *J*=8,9)	**3**	75,56	35,58
3β	3,42 (d, *J*=8,8)	1,27 (t, *J*=10,8)			
4	-	-	**4**	40,87	34,99
5β	1,16 -1,23 (m)	1,67 –1,74 (m)	**5**	37,35	44,03
6α	1,43 (m)	1,49 –1,58 (m)	**6**	20,15	21,71
6β	1,76 – 1,62 (m)	1,60 – 1,68 (m)			
7α	2,03 (ddd, *J*=14,8, 9,2, 4,0)	1,49 – 1,58 (m)	**7**	33,04	28,94
7β	1,30 – 1,38 (m)	1,84 – 1,92 (m)			
8	-	-	**8**	76,48	80,43
9β	3,50 (dd, *J*=11,6, 5,6)	3,57 (dd, *J*=11,6, 5,6)	**9**	78,90	76,38
10α/ 10β	1,72 - 1,88 (m)	1, 75 – 1,82 (m)	**10**	28,40	27,45
11α	1,47 - 1,53 (m)	1,20 (dt, *J*=13,2, 13,2, 5,6)	**11**	38,77	36,71
11β	1,30 -1,38 (m)	1,35 – 1,40 (m)			
12a	1,62 - 1,72 (m)	1,84 – 1,92 (m)	**12**	48,29	42,05
12b	1,03 (d, *J*=13,2)	0,89 (d, *J*=13,2)			
13	0,95 (s)	0,80 (s)	**13**	25,42	26,27
14	0,90 (s)	0,96 (s)	**14**	14,78	20,89
15	1,02 (s)	0,97 (s)	**15**	28,16	30,73



2.2.1.4 Identificação de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (90)



O (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (**90**) foi obtido com rendimento de 6,5 mg em cinco dias (7,2% de bioconversão) e 7,6 mg em nove dias (4,2 % de bioconversão), sendo isolado como um material resinoso amarelado.

A estrutura desta substância foi elucidada pela análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos nos espectros no IV, RMN de ^{1}H e de ^{13}C mono e bidimensionais, EM e também por comparação com os dados espectroscópicos do material de partida (**78**).

O espectro no IV (Figura 106, p. 337) apresentou banda de absorção em 3379 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação O-H[40].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 107 e 108, p. 337 e 338) mostrou um simpleto adicional, em δ_H 3,35 relativo a hidrogênio em carbono oxigenado, assim como o desaparecimento do simpleto em δ_H 3,26, referente ao grupo metoxila, presente no material de partida **78**.

Através da análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (Figuras 109 e 110, p. 338 e 339) e do subespectro DEPT-135 (Figura 111, p. 339), foi possível observar, como em **88**, o desaparecimento do sinal de carbono metílico em δ_C 30,73 atribuído ao C-15, e o aparecimento de um sinal de carbono em δ_C 72,10, característico de carbono oxigenado, em relação ao material de partida.

A hidrólise enzimática do éter em C-8 foi também observada neste produto, pois, apesar do desaparecimento do sinal do grupo metoxila em δ_H 3,26, que apresentava correlação com C-8, no mapa de contornos HMBC (Figura 113, p. 340), o último apresentou um deslocamento químico em δ_C 76,47, característico de carbono oxigenado.

Através do mapa de contornos HSQC (Figura 112, p. 340), foi possível observar a correlação do carbono em δ_C 72,10 com o hidrogênio metilênico em δ_H 3,35. Este sinal de carbono em δ_C 72,10 apresentou correlações no mapa de contornos HMBC com os hidrogênios em δ_H 1,03 (H-14, ^3J), em δ_H 1,42 - 1,48 (H-3β, ^3J) e em δ_H 1,92 (H-5β, ^3J), confirmando a hidroxilação no carbono C-15.

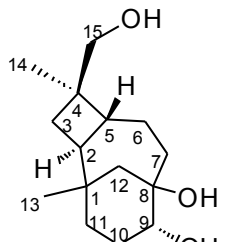
A análise do mapa de contornos NOESY expandido (Figura 114, p. 341) evidenciou a correlação entre o H-15 (δ_H 3,35) e H-5β (δ_H 1,92), confirmando a posição β do grupo CH_2OH em C-15.

O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **90** forneceu um pico [M^+] = 254,1904 u.m.a., compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{26}O_3$ do (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (**90**), um composto inédito. Na Figura 115, p. 341, apresenta-se o espectro de Massas de **90**.

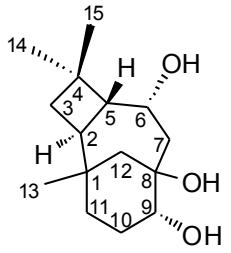
Na Tabela 13, p. 151, estão compilados os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **90**, bem como aqueles do material de partida **78**.

Tabela 13 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de **90** com aqueles do material de partida (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**)

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**(4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (90)**	**78**	**C**	**(4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (90)**	**78**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	33,34	32,90
2α	2,15 (ddd, *J*=12,0, 10,8, 8,4)	2,06 (dt, *J*=11,2, 11,2, 8,4)	**2**	37,36	36,91
3α	1,36 – 1,42 (m)	1,45 (t, *J*= 8,9)	**3**	30,46	35,58
3β	1,42 – 1,48 (m)	1,27 (t, *J*=10,8)			
4	-	-	**4**	39,76	34,99
5β	1,92 (ddd, *J*=12,0, 7,8,0, 6,0)	1,67 –1,74 (m)	**5**	39,57	44,03
6α	1,64 (m)	1,49 –1,58 (m)	**6**	20,79	21,71
6β	1,43 – 1,47 (m)	1,60 – 1,68 (m)			
7α	1,98 (ddd, *J*=4,0, 11,4, 15,6)	1,49 – 1,58 (m)	**7**	32,43	28,94
7β	1,36 – 1,40 (m)	1,84 – 1,92 (m)			
8	-	-	**8**	76,47	80,43
9β	3,50 (dd, *J*=12,0, 4,8)	3,57 (dd, *J*=11,6, 5,6)	**9**	79,14	76,38
10α	1,84 (m)	1, 75 – 1,82 (m)	**10**	28,36	27,45
10β	1,70 - 1,77 (m)	1, 75 – 1,82 (m)			
11α	1,26 (dt, *J*=13,2, 13,2, 4,8)	1,20 (dt, *J*=13,2, 13,2, 5,6)	**11**	37,22	36,71
11β	1,47 – 1,36 (m)	1,35 – 1,40 (m)			
12a	1,70 - 1,77 (m)	1,84 – 1,92 (m)	**12**	47,97	42,05
12b	1,01 (d, *J*=13,2)	0,89 (d, *J*=13,2)			
13	0,81 (s)	0,80 (s)	**13**	25,86	26,27
14	1,03 (s)	0,96 (s)	**14**	16,07	20,89
15	3,35 (s)	0,97 (s)	**15**	72,10	30,73



2.2.1.5 Identificação de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (91)



O produto de transformação microbiana **91** foi isolado como um material resinoso amarelado, com rendimento de 2,5 mg em cinco dias (2,7% de bioconversão) e 3,4 mg em nove dias (1,8% de bioconversão).

A estrutura desta substância foi elucidada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos nos espectros no IV, de RMN, EM e por comparação com os dados espectroscópicos do material de partida (**78**).

O espectro no IV (Figura 116, p. 342) apresentou banda de absorção em 3419 cm^{-1}, característica de estiramento da ligação O-H e banda em 2952 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H alifáticas[40].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 117 e 118, p. 342 e 343) mostrou um dupleto triplo adicional em δ_H 3,79, ausente em **78**, relativo a hidrogênio em carbono oxigenado, sugerindo ter ocorrido uma hidroxilação do substrato original **78**, além de um dupleto duplo em δ_H 2,26. Também foi observado o desaparecimento do simpleto em δ_H 3,26, referente ao grupo metoxila.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 119, p. 343) de **91** foram identificados sinais referentes a 15 carbonos, sendo sua multiplicidade estabelecida a partir do subespectro DEPT-135 (Figura 120, p. 344), como sendo três carbonos metílicos, cinco metilênicos, quatro metínicos e três carbonos não hidrogenados indicando a presença em **91** de um carbono metínico oxigenado a mais e um carbono metilênico a menos em relação ao substrato da biotransformação **78**. Foi observado também o desaparecimento do sinal de carbono metilênico em δ_C 21,71 atribuído ao C-6, em **78**, e o aparecimento de um sinal de carbono em δ_C 70,71, característico de carbono oxigenado, em **91**.

A presença da hidroxila proveniente da hidrólise enzimática do grupamento éter em C-8 foi confirmada pelo deslocamento químico deste carbono em δ_C 76,64, característico de carbono oxigenado.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e o mapa de contornos HSQC (Figura 121, p. 344) possibilitou alocar a hidroxilação do composto **91** em C-6 (δ_C 76,64), tendo os sinais de C-5 e de C-7 sido deslocados para um maior valor (δ_C 54,37 e δ_C 43,92, respectivamente) em relação àqueles observados para os mesmos carbonos em **78**. O sinal do carbono metínico C-5, em δ_C 54,37, apresentou correlação, no espectro HSQC, com o sinal em δ_H 1,65 – 1,75 (m), referente ao hidrogênio H-5β, e o sinal do carbono metilênico C-7 em δ_C 43,92, apresentou correlação com o sinal em δ_H 2,26 (dd, *J*=14,4, 4,0 Hz) e em δ_H 1,31 - 1,38, referente aos hidrogênios H-7α e H-7β.

Através do mapa de contornos COSY (Figura 122, p. 345), foi possível observar a correlação entre o hidrogênio metínico H-6 (δ_H 3,79), e os hidrogênios em δ_H 2,26 e em δ_H 1,31 - 1,38 (H-7α e H-7β) e o hidrogênio metínico H-5β (δ_H 1,65 – 1,75).

No mapa de contornos HMBC expandido (Figura 123, p. 345), observou-se correlações entre C-6 (δ_C 70,71) e o hidrogênio metínico em δ_H 1,65 – 1,75 (H-5β, ^2J) e os hidrogênios metilênicos em δ_H 2,26 (H-7α, ^2J) e δ_H 1,31 - 1,38 (H-7β, ^2J).

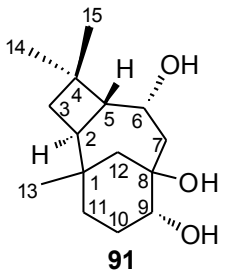
A configuração da hidroxila em C-6 foi estabelecida a partir da análise do mapa de contornos NOESY (Figura 124, p. 346), onde a correlação do hidrogênio H-6 (δ_H 3,79) com o H-5β (δ_H 1,65 – 1,75) foi observada, confirmando a configuração α para a hidroxila em C-6.

O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **91** forneceu um pico [M^+] = 254,1882 u.m.a., compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{26}O_3$ do (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (**91**), um composto inédito. Na Figura 125, p. 346 apresenta-se o espectro de Massas de **91**.

Na Tabela 14, p. 154, estão compilados os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **91** e aqueles do material de partida **78**.

Tabela 14 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, CD_3OD) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, CD_3OD) de **91** com aqueles do material de partida (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**)

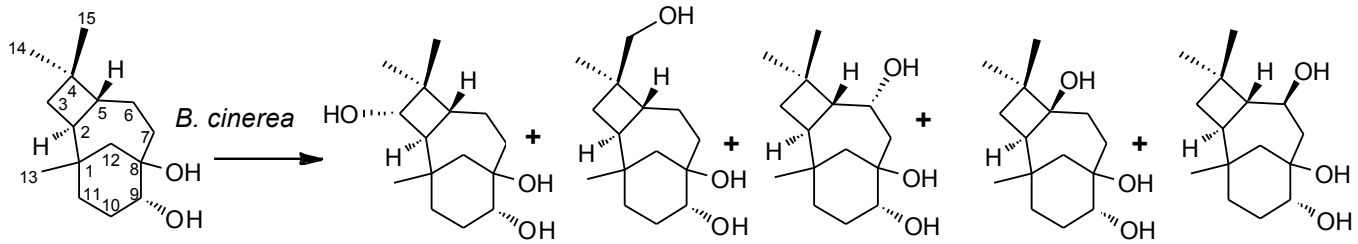
RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**(6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6, 8, 9-triol (91)**	**78**	**C**	**(6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6, 8, 9-triol (91)**	**78**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	33,64	32,90
2α	1,88 - 1,99 (m)	2,06 (dt, *J*=11,2, 11,2, 8,4)	**2**	40,14	36,91
3α	1,44 (t, *J*=8,8)	1,45 (t, *J*=8,9)	**3**	37,19	35,58
3β	1,31 – 1,38 (m)	1,27 (t, *J*=10,8)			
4	-	-	**4**	35,50	34,99
5β	1,65 - 1,75 (m)	1,67 –1,74 (m)	**5**	54,37	44,03
6α	-	1,49 –1,58 (m)	**6**	70,71	21,71
6β	3,79 (dt, *J*=8,4, 8,4, 4,4)	1,60 – 1,68 (m)			
7α	2,26 (dd, *J*=14,4, 4,0)	1,49 – 1,58 (m)	**7**	43,92	28,94
7β	1,31 - 1,38 (m)	1,84 – 1,92 (m)			
8	-	-	**8**	76,64	80,43
9β	3,38 (dd, *J*=11,6, 5,2)	3,57 (dd, *J*=11,6, 5,6)	**9**	78,82	76,38
10α /10β	1,75 – 1,55 (m)	1, 75 – 1,82 (m)	**10**	29,55	27,45
11α	1,21 (dt, *J*=13,2, 13,2, 5,2)	1,20 (dt, *J*=13,2, 13,2, 5,6)	**11**	39,88	36,71
11β	1,30 - 1,40 (m)	1,35 – 1,40 (m)			
12a	1,98 (dd, *J*=13,6, 2,8)	1,84 – 1,92 (m)	**12**	49,21	42,05
12b	1,05 (d, *J*=13,6)	0,89 (d, *J*=13,2)			
13	0,81 (s)	0,80 (s)	**13**	27,19	26,27
14	1,12 (s)	0,96 (s)	**14**	21,27	20,89
15	1,08 (s)	0,97 (s)	**15**	31,78	30,73



91

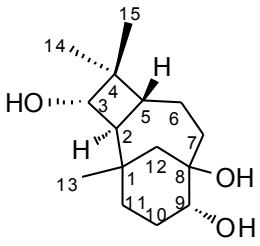
2.2.2 Biotransformação de (8*R*,9*R*)-isocariolan- 8,9-diol (80)

O substrato (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (**80**) foi incubado com o fungo *Botrytis cinerea*, em dois experimentos (com duração de cinco e nove dias), utilizando-se o modo estático e temperatura ambiente. Os extratos obtidos foram submetidos a purificação por coluna de sílica gel e CLAE preparativa, levando ao isolamento de cinco produtos inéditos, resultantes da hidroxilação do material de partida em diferentes posições do esqueleto isocariolano: (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (**89**), (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (**90**), (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (**91**), (2*R*,5*S*,8*R*, 9R)-isocariolan-5,8,9-triol (**92**) e (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (**93**) (Esquema 26).



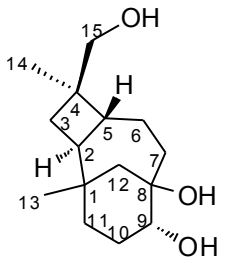
Esquema 26 – Produtos de biotransformação do (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**) pelo fungo *B. cinerea*.

2.2.2.1 Identificação de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (89)



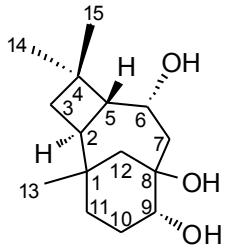
O produto de transformação microbiana **89** (5,6 mg, 3,7% de bioconversão em cinco dias e 5,2 mg, 2,8% de bioconversão em nove dias) foi isolado como um material resinoso amarelado. A estrutura desta substância foi determinada no item 2.2.1.3 , p. 146.

2.2.2.2 Identificação de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (90)



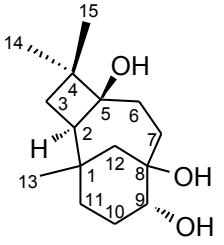
O (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol **90** (6,4 mg, 4,3 % de bioconversão em cinco dias e 3,2 mg, 1,7% de bioconversão em nove dias) foi isolado como um material resinoso amarelado. A estrutura desta substância foi determinada no item 2.2.1.4, p. 149.

2.2.2.3 Identificação de (6R, 8S, 9R)-isocariolan-6,8,9-triol (91)



O produto (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol **91** (12,9 mg, 8,6 % de bioconversão em cinco dias e 21,4 mg, 11,8 % de bioconversão em nove dias) foi isolado como um material resinoso amarelado. A estrutura desta substância foi determinada no item 2.2.1.5, p. 152.

2.2.2.4 Identificação de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-5,8,9-triol (92)



O composto **92** (3,1 mg, 2,1% de bioconversão em cinco dias e 4,3 mg, 2,4% de bioconversão em nove dias) foi isolado como um material resinoso amarelado.

A estrutura desta substância foi elucidada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos nos espectros no IV, RMN, e EM e por comparação com os dados espectroscópicos do material de partida **80**.

O espectro no IV (Figura 126, p. 347) apresentou banda de absorção em 3462 cm^{-1}, características de estiramento da ligação O-H e banda em 2938, 2826 cm^{-1}, referente à deformação axial de ligações C-H alifáticas[40].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 127 e 128, p. 347 e 348) de **92** mostrou o dupleto duplo em δ_H 3,52, correspondente ao hidrogênio metínico H-9β, três simpletos em δ_H 0,95, δ_H 1,09 e δ_H 0,98, atribuídos a hidrogênios dos três grupos metila, o sinal em δ_H 2,39, referente ao hidrogênio metínico H-2α e os sinais em δ_H 2,62 e δ_H 0,97, referentes aos hidrogênios metilênicos H-12a e H-12b, presentes no material de partida **80**. Nenhum novo sinal de hidrogênio ligado a carbono oxigenado foi observado neste espectro.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 129, p. 348) de **92** foram identificados sinais referentes a 15 carbonos e sua multiplicidade foi estabelecida, a partir do subespectro DEPT-135 (Figura 130, p. 349), como sendo três carbonos metílicos, seis metilênicos, dois metínicos (havia três no espectro de **80**) e quatro não hidrogenados (haviam três no espectro de **80**). Assim, pode-se concluir que hidroxilação em **92** ocorreu sobre um carbono metínico, sendo observado, no espectro de RMN de ^{13}C o desaparecimento do sinal de carbono metínico em δ_C 45,23 atribuído ao C-5, e o aparecimento de um sinal de carbono quaternário no subespectro DEPT-135 em δ_C 82,73, característico de carbono oxigenado.

Pela análise do mapa de contornos HSQC (Figura 131, p. 349) foi possível observar correlação entre o carbono C-6 em δ_C 30,40 e os hidrogênios metilênicos H-6α em δ_H 1,86 – 1,93 e H-6β em δ_H 1,53 – 1,59, e entre carbono C-2 em δ_C 39,13 e o hidrogênio metínico H-2α em δ_H 2,39. Estes carbonos, assim como o carbono não hidrogenado C-4, em δ_C 41,90, apresentaram deslocamentos químicos maiores do que aqueles observados para o material de partida **80**, confirmando a hidroxilação em C-5.

O mapa de contornos COSY (Figura 132, p. 350) apresentou correlações do hidrogênio metínico H-2, em δ_H 2,39, com os hidrogênios metilênicos H-3α em δ_H

1,49 e H-3β em δ_H 1,82 e do hidrogênio metínico H-9β em δ_H 3,52 com os hidrogênios metilênicos H-10α, em δ_H 1,86-1,93 e H-10β, em δ_H 1,72-1,74.

No mapa de contornos HMBC (Figura 133, p. 350) observaram-se correlações do C-5 (δ_C 82,73) com os hidrogênios metílicos em δ_H 1,09 (H-14, ^3J) e em δ_H 0,98 (H-15, ^3J), com o hidrogênio metínico em δ_H 2,39 (H-2α, ^2J) e com o hidrogênio metilênico em δ_H 1,49 (H-3α, ^3J). O sinal em δ_C 31,97 referente a C-7 apresentou correlações com o hidrogênio metínico em δ_H 3,52 (H-9β, ^3J).

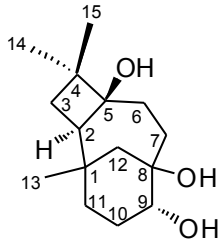
Inferiu-se a configuração β para a hidroxila em C-5, a mesma configuração apresentada pelo hidrogênio metínico em C-5 no material de partida **80.** No mapa de contornos NOESY (Figura 134, p. 351) observou-se a correlação do hidrogênio H-2α (δ_H 2,39) com o H-14α (δ_H 1,09).

O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **92** forneceu um pico com [M^+] = 254,1719 u.m.a., compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{24}O_3$ do (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-5,8,9-triol (**92**), um composto inédito. Na Figura 135, p. 351 apresenta-se o espectro de Massas de **92**.

A Tabela 15, p. 159, apresenta os dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **92**, bem como aqueles do material de partida **80**.

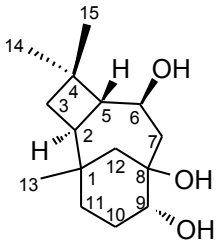
Tabela 15 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de **92** com aqueles do material de partida **80**

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**(2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5, 8, 9-triol (92)**	**80**	**C**	**(2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5, 8, 9-triol (92)**	**80**
	δ_H **(multip., *J* em Hz)**			δ_C	
1	-	-	**1**	33,45	33,40
2α	2,39 (dd, *J*=12,0, 8,4)	1,94 – 2,06 (m)	**2**	39,13	37,96
3α	1,49 (dd, *J*=9,0, 7,8)	1,46 (dd, *J*=9,6, 8,0)	**3**	34,26	35,98
3β	1,82 (dd, *J*=12,0, 9,0)	1,25 – 1,28 (m)			
4	-	-	**4**	41,90	34,04
5	-	1,62 –1,70 (m)	**5**	82,73	45,23
6α	1,86 -1,93 (m)	1,56 –1,61 (m)	**6**	30,40	20,85
6β	1,53 - 1,59 (m)	1,31 – 1,42 (m)			
7α	1,86 -1,93 (m)	1,94 – 2,06 (m)	**7**	31,97	32,76
7β	1,53 - 1,59 (m)	1,31 – 1,42 (m)			
8	-	-	**8**	76,43	76,89
9β	3,52 (dd, *J*=11,4, 5,4)	3,48 (dd, *J*=11,6, 5,6)	**9**	79,59	79,31
10 α	1,81- 1,84 (m)	1, 76 – 1,84 (m)	**10**	28,52	28,62
10β	1,72 -1,74 (m)	1, 76 – 1,84 (m)			
11 α	1,15 (dt, *J*=13,2, 13,2, 4,8)	1,23 (dt, *J*=13,2, 13,2, 4,8)	**11**	37,87	37,67
11β	1,38 -1,41 (m)	1,31 – 1,42 (m)			
12a	2,62 (dd, *J*=12,6, 3,0)	1,73 (dd, *J*=12,8, 2,8)	**12**	46,25	48,28
12b	0,97 (d, *J*=12,6)	1,00 (d, *J*=12,8)			
13	0,94 (s)	0,78 (s)	**13**	26,59	26,16
14	1,09 (s)	0,96 (s)	**14**	23,71	20,87
15	0,98 (s)	0,97 (s)	**15**	21,92	30,80



92

2.2.2.5 Identificação de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (93)



O produto de transformação microbiana **93** (0,9 mg, 0,6% de bioconversão em cinco dias e 2,1 mg, 1,2% de bioconversão em nove dias) foi isolado como um material sólido de coloração branca de ponto de fusão de 113-115°.

A estrutura desta substância foi elucidada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos nos espectros no IV (Figura 136, p. 352), RMN e EM e também por comparação destes dados com aqueles do material de partida **80** e do produto de biotransformação **91**.

Os espectros de RMN de ^{1}H (Figuras 137 e 138, p. 352 e 353) e de ^{13}C (Figura 139, p. 353) mostraram-se semelhantes àqueles de **91**, que apresentou uma nova hidroxilação na posição 6α. A análise do mapa de contornos HSQC-DEPT (Figuras 140 e 141, p. 354) de **93** apresentou a correlação do carbono C6 em δ_C 69,48 com o hidrogênio metínico H-6 em δ_H 4,10. Observou-se, também, correlação do carbono C12 em 47,80 com os hidrogênios metilênicos H-12a (δ_H 2,04) e H-12b (δ_H 1,10).

No mapa de contornos HMBC expandido de **93** (Figura 142, p. 355), observaram-se correlações entre o C-6 (δ_C 69,49), o hidrogênio metínico em δ_H 1,74 – 1,79 (H-5β, ^{2}J) e o hidrogênio metilênico em δ_H 2,10 (H-7α, ^{2}J).

Pelo mapa de contornos NOESY (Figura 143, p. 355) de **93**, a posição espacial da hidroxila foi estabelecida: foi observada a correlação do sinal em δ_H 4,10 (H-6) com o sinal dos três hidrogênios metílicos, em δ_H 1,02, relativos ao grupo metila 14, na posição α, inferindo assim, a estereoquímica β para a hidroxila **91.**

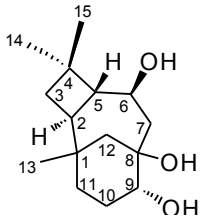
O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **93**, forneceu um pico [M^+] = 254,1417 u.m.a., compatível com a fórmula molecular

$C_{15}H_{26}O_3$ do (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (**93**), um composto inédito. Na Figura 144, p. 356, apresenta-se o espectro de Massas de **93**.

A Tabela 16 apresenta, para comparação, os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C dos produtos de biotransformação **93** e **91**.

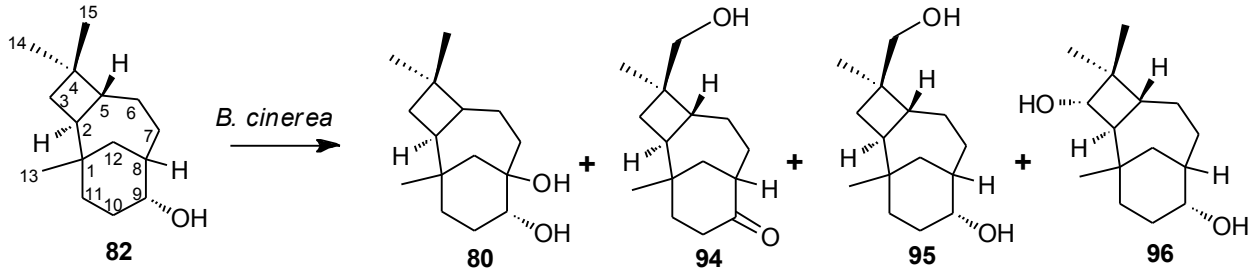
Tabela 16 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^1H (δ, 400 MHz, CD_3OD) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, CD_3OD) de **93** com aqueles de **91**

RMN de ^1H			RMN de ^{13}C		
H	**(6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (93)**	**91**	**C**	**(6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (93)**	**91**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	33,69	33,63
2α	1,91 -1,99 (m)	1,88 - 1,99 (m)	**2**	38,36	40,13
3α	1,46 (t, *J*=9,2)	1,44 (t, *J*=8,8)	**3**	35,56	37,18
3β	1,35 (t, *J*=10,4)	1,31 - 1,38 (m)			
4	-	-	**4**	35,09	35,49
5β	1,74 -1,79(m)	1,65 - 1,75 (m)	**5**	53,67	54,37
6α	4,10 (m)		**6**	69,48	70,76
6β		3,79 (dt, *J*=8,4, 8,4, 4,4)			
7α	2,10 (dd, *J*=15,4, 3,2)	2,26 (dd, *J*=14,4, 4,0)	**7**	40,20	43,91
7β	1,64 – 1,79 (m)	1,31 – 1,38 (m)			
8	-	-	**8**	76,99	76,64
9β	3,47 (dd, *J*=12,0, 5,6)	3,38 (dd, *J*=11,6, 5,2)	**9**	78,36	78,82
10α	1,61 – 1,69 (m)	1,55 – 1,75 (m)	**10**	27,87	29,55
10β	1,80 -1,87 (m)	1,55 – 1,75 (m)			
11α	1,27 (dt, *J*=13,2, 13,2, 4,8)	1,21 (dt, *J*=13,2, 13,2, 5,2)	**11**	37,02	39,88
11β	1,38 – 1,43 (m)	1,30 - 1,40 (m)			
12a	2,04 (dd, *J*=13,2, 3,2)	1,98 (dd, *J*=13,6, 2,8)	**12**	47,80	49,22
12b	1,10 (d, *J*=13,2)	1,05 (d, *J*=13,6)			
13	0,83 (s)	0,81 (s)	**13**	26,01	27,18
14	1,02 (s)	1,12 (s)	**14**	21,31	21,27
15	1,09 (s)	1,08 (s)	**15**	31,08	31,77



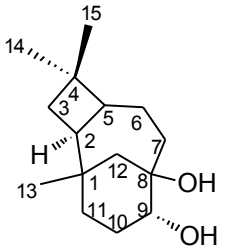
2.2.3 Biotransformação de isocariolan-9*α*-ol (82)

O substrato isocariolan-9α-ol **82** foi incubado com o fungo *Botrytis cinerea* em dois experimentos com duração de cinco e nove dias, sob agitação orbital, à temperatura ambiente. Após purificação dos extratos obtidos, quatro produtos foram isolados, sendo três inéditos, resultantes da hidroxilação e ou oxidação do material de partida **82** em diferentes posições do esqueleto isocariolano: (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (**80**), (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (**94**), (15*R*,9*R*)-isocariolan-9,15-diol, (**95**), (3*S*,9*R*)-isocariolan-9,3-diol (**96**) (Esquema 27).



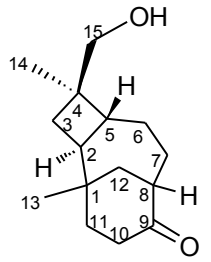
Esquema 27 – Produtos de biotransformação do isocariolan-9α-ol (**82**) pelo fungo *B. cinerea.*

2.2.3.1 Identificação de (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (80)



O produto (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (**80**) (9,4 mg, 9,4 % de bioconversão em cinco dias e 10,2 mg 5,1 % de bioconversão em nove dias) foi isolado como um material resinoso amarelado. A estrutura desta substância foi determinada no item 2.1.3.1, p. 124.

2.2.3.2 Identificação de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo [6.3.1.$0^{2,5}$]dodecan-9-ona (94)



O produto de transformação microbiana **94** (1,6 mg, 1,6% de bioconversão em cinco dias e 3,2 mg, 1,6 % de bioconversão em nove dias) foi isolado como um material resinoso incolor, e foi identificado com base na análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos nos espectros no IV, RMN, EM e por comparação com os dados espectroscópicos do material de partida (**82**).

O espectro no IV (Figura 145, p. 356) apresentou bandas de absorção em 3454 cm^{-1}, características de estiramento da ligação O-H, em 2933 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H alifáticas e em 1695 cm^{-1}, característica de estiramento de ligação C=O de cetona[40].

No espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 146 e 147, p. 357) observou-se novo sinal, diferente daqueles presentes no material de partida, um simpleto em δ_H 3,33, relativo a hidrogênio em carbono oxigenado, assim como o desaparecimento do sinal relativo a um dos três grupos metila, presentes no material de partida **82**.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 148, p. 358) e do subespectro DEPT-135 (Figura 149, p. 358) de **94** indicou o desaparecimento do sinal do CH_3-15 do material de partida, em δ_C 30,61, e o aparecimento de um sinal de carbono metilênico em δ_C 71,90, característico de carbono oxigenado. Também foi possível observar o desaparecimento do sinal em δ_C 73,16, atribuído ao carbono metínico C-9 e o aparecimento de um sinal em 215,59, referente a carbono de carbonila, inferindo-se assim, ter ocorrido uma oxidação em C-9.

O mapa de contornos HSQC (Figura 150, p. 359) mostrou a correlação de C-15, em δ_C 71,90, com o hidrogênio metilênico H-15 em δ_H 3,32. Este sinal em δ_C 71,90, apresentou correlações, no mapa de contornos HMBC (Figura 151, p. 359), com os hidrogênios em δ_H 0,97 (H-14, ^{3}J) e em δ_H 1,61-1,75 (H-3α, ^{3}J),

confirmando a hidroxilação no carbono C-15. Através do mapa de contornos HMBC, foi também possível observar as correlações do sinal do carbono C-9, em δ_C 215,59, com o sinal do hidrogênio metínico em δ_H 2,48-2,53 (H-8, ^2J) e aquele do hidrogênio metilênico em δ_H 1,61-1,75 (H-12b, ^3J)

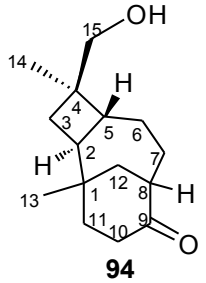
A análise do mapa de contornos NOESY expandido (Figura 152, p. 360) evidenciou a correlação entre os hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-15 (δ_H 3,32) com H-5β (δ_H 1,81 – 1,88), confirmando a posição β do grupo CH_2OH.

O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **94** forneceu um pico [M^+] = 236,1779 u.m.a., compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{23}O_2$ do (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$]dodecan-9-ona (**94**), um composto inédito. Na Figura 153, p. 360, apresenta-se o espectro de Massas de **94.**

A Tabela 17, p. 165, apresenta os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **94**, bem como aqueles do material de partida **82**.

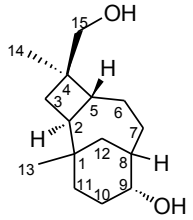
Tabela 17 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **94** com aqueles do material de partida isocariolan-9α-ol (**82**)

RMN ^{1}H			RMN ^{13}C		
H	**(*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo [6.3.1.0^{2,5}]dodecan-9-ona (94)**	**82**	**C**	**(*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo [6.3.1.0^{2,5}]dodecan-9-ona (94)**	**82**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	31,84	31,36
2α	1,61 -1,75 (m)	2,04 – 2,11 (m)	**2**	42,06	39,51
3α	1,61 - 1,75 (m)	1,46 (dd, *J*=9,6, 7,6)	**3**	30,26	36,06
3β	1,37 -1,48 (m)	1,27 (t, *J*=10,6)			
4	-	-	**4**	37,76	34,34
5β	1,81 -1,88 (m)	1,61 – 1,70 (m)	**5**	40,97	46,15
6α	1,37 - 1,48 (m)	1,34 – 1,42 (m	**6**	25,50	24,24
6β	1,51 – 1,55 (m)	1,50 –1,57 (m)			
7α	2,25 - 2,29 (m)	1,71 – 1,75 (m)	**7**	29,50	24,34
7β	1,17 - 1,21 (m)	1,71 – 1,75 (m)			
8	2,48 - 2,53 (m)	2,04 – 2,11 (m)	**8**	44,68	38,32
9β	-	3,71 (td, *J*=11,6, 5,6, 5,6)	**9**	215,59	73,16
10α	2,41 - 2,47(m)	1, 61 – 1,70 (m)	**10**	36,47	27,88
10β	1,61 - 1,75 (m)	1, 75 – 1,85 (m)			
11α	2,41 - 2,47 (m)	1,18 (dt, *J*=13,2, 13,2, 4,4)	**11**	36,57	38,41
11β	1,61 -1,75 (m)	1,34 – 1,42 (m)			
12a	2, 01 - 2,05(m)	1,61 – 1,70 (m)	**12**	41,86	40,26
12b	1,61 -1,75 (m)	1,04 (dd, *J*=14,4, 4,4)			
13	0,90 (s)	0,73 (s)	**13**	25,83	26,38
14	0,97 (s)	0,97 (s)	**14**	17,04	20,61
15	3,33 (s)	0,96 (s)	**15**	71,90	30,61



94

2.2.3.3 Identificação de (15*R*,9*R*)-isocariolan- 9,15-diol (95)



O composto **95** (1,5 mg, 1,5% de bioconversão em cinco dias e 5,6 mg, 2,8% de bioconversão em nove dias) foi isolado como um material resinoso incolor.

O espectro no IV (Figura 154, p. 361) apresentou banda de absorção em 3262 cm^{-1}, características de estiramento da ligação O-H e banda em 2917 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H alifáticas. A banda em 1094 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular de ligação C-O. Bandas na região entre 1474 e 674 cm^{-1} do espectro foram atribuídas à deformação angular de ligações C-H[40].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 155 e 156, p. 361 e 362) de **95** mostrou-se bastante semelhante àquele de **94,** indicando uma possível hidroxilação em C-15, sendo a única diferença um tripleto duplo observado no espectro do primeiro, em δ_H 3,72, sinal análogo àquele observado para H-9β no material de partida **82**.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 157, p. 362) e subespectro DEPT-135 (Figura 158, p. 363) de **82** confirmou a hidroxilação em C-15 (δ_C 72,40). O sinal associado a H-9β, no espectro de RMN de ^{1}H, também foi confirmado, por comparação com o espectro de **82** (Tabela 18, p. 167).

Através do mapa de contornos HSQC (Figura 159, p. 363), foi possível observar a correlação do carbono C-15, em δ_C 72,40 com os hidrogênios metilênicos H-15 em δ_H 3,34. Este último apresentou correlações no mapa de contornos HMBC (Figura 160, p. 364) com os carbonos em δ_C 16,02 (C-14, ^{3}J), em δ_C 30,78 (C-3, ^{3}J) e em δ_C 40,78 (C-5, ^{3}J), confirmando a hidroxilação no carbono C-15.

A análise do mapa de contornos NOESY expandido (Figura 161, p. 364) evidenciou a correlação entre o H-15 (δ_H 3,34) e H-5β (δ_H 1,85 – 1,92), confirmando a posição β do grupo CH_2OH em C-15.

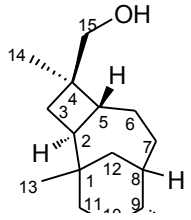
O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **95** forneceu um pico $[M^+]$ = 238,1225 u.m.a., compatível com a fórmula molecular

$C_{15}H_{26}O_2$ do (15*R*,9*R*)-isocariolan- 9,15-diol (**95**), um composto inédito. Na Figura 162, p. 365, apresenta-se o espectro de Massas de **95**.

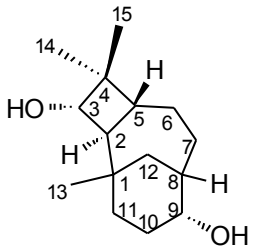
A Tabela 18 apresenta os dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **95**, bem como aqueles do material de partida **82**.

Tabela 18 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **95,** com aqueles do material de partida isocariolan-9α-ol (**82**)

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**(15*R*,9*R*)-isocariolano - 9,15-diol (95)**	**82**	**C**	**(15*R*,9*R*)-isocariolano - 9,15-diol (95)**	**82**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	31,55	31,36
2α	2,16 – 2,24 (m)	2,04 – 2,11 (m)	**2**	39,32	39,51
3α	1,37 - 1,46 (m)	1,46 (dd, *J*=9,6, 7,6)	**3**	30,78	36,06
3β	1,37 - 1,46 (m)	1,27 (t, *J*=10,6)			
4	-	-	**4**	39,13	34,34
5β	1,85 - 1,92 (m)	1,61 – 1,70 (m)	**5**	40,78	46,15
6α	1,54 -1,58 (m)	1,34 – 1,42 (m	**6**	24,40	24,24
6β	1,54 -1,58 (m)	1,50 –1,57 (m)			
7α	1,65 -1,70 (m)	1,71 – 1,75 (m)	**7**	24,23	24,34
7β	1,37 - 1,40(m)	1,71 – 1,75 (m)			
8	2,11 (m)	2,04 – 2,11 (m)	**8**	38,21	38,32
9β	3,72 (td, *J*=11,2, 5,6, 5,6)	3,71 (td, *J*=11,6, 5,6, 5,6)	**9**	73,10	73,16
10α	1,76 -1,83 (m)	1, 61 – 1,70 (m)	**10**	27,73	27,88
10β	1,65 -1,70 (m)	1, 75 – 1,85 (m)			
11α	1,37 -1,46 (m)	1,18 (dt, *J*=13,2, 13,2, 4,4)	**11**	38,16	38,41
11β	1,17 -1,25 (m)	1,34 – 1,42 (m)			
12a	1,65 - 1,70 (m)	1,61 – 1,70 (m)	**12**	40,16	40,26
12b	1,04 (dd, *J*=4,8, 14,4)	1,04 (dd, *J*=14,4, 4,4)			
13	0,75 (s)	0,73 (s)	**13**	26,27	26,38
14	1,04 (s)	0,97 (s)	**14**	16,02	20,61
15	3,34 (s)	0,96 (s)	**15**	72,40	30,61



2.2.3.4 Identificação de (3*S*,9*R*)- isocariolan-9,3-diol (96)



O produto **96** proveniente da biotransformação de **82** (1,1 mg, 1,1% de bioconversão em cinco dias e 3,6 mg, 1,8 % de bioconversão em nove dias) foi isolado como um material resinoso amarelado, sendo sua estrutura determinada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos (IV, RMN mono e bidimensionais, EM) e comparação com aqueles do material de partida **82**.

O espectro no IV (Figura 163, p. 365) apresentou banda de absorção em 3362 cm^{-1}, características de estiramento da ligação O-H e banda em 2937 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H. A banda em 1054 cm^{-1} foi atribuída a deformação angular de ligação C-O. Bandas na região próximas a 1458 e 756 cm^{-1} do espectro foram atribuídas à deformação angular de ligações C-H[40].

A análise do espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 164 e 165, p. 366) mostrou o tripleto duplo em δ_H 3,72, relativo ao hidrogênio metínico H-9β, três simpletos em δ_H 0,91, δ_H 0,91, δ_H 1,01, atribuídos aos três grupos metila (C-13, C-14 e C-15, respectivamente), presentes no material de partida. Além destes, foi observado um novo sinal, um dupleto, em δ_H 3,41, que foi atribuído a hidrogênio em carbono oxigenado.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 166, p. 367) e o subespectro DEPT-135 (Figura 167, p. 367) de **96** mostraram a presença de um novo carbono metínico oxigenado em δ_C 75,79, que não existia no material de partida **82.**

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e o mapa de contornos HSQC (Figuras 168, p. 368) possibilitou relacionar a hidroxilação do composto **96** ao carbono metínico oxigenado C-3 (δ_C 75,79), tendo o sinal do carbono metínico C-2 e do carbono não hidrogenado C-4 sido deslocados para um maior valor (δ_C 52,28 e δ_C 40,22, respectivamente) em relação aos sinais observados para C-2 e C-4 no espectro de RMN de ^{13}C do material de partida **82**.

No mapa de contornos HSQC, o sinal do carbono metínico C-3 em δ_C 75,79, apresentou correlação com o sinal em δ_H 3,41, referente ao hidrogênio H-3, e o sinal do carbono metínico C-2, em δ_C 52,28, apresentou correlação com o sinal em δ_H 1,85, referente ao hidrogênio H-2α. A análise do mapa de contornos COSY (Figura 169, p. 368) permitiu observar a correlação do hidrogênio H-2α em δ_H 1,85 com os hidrogênios H-3 em δ_H 3,41 e H-5β em δ_H 1,21 – 1,71.

No mapa de contornos HMBC (Figuras 170, p. 369) observaram-se correlações do C-3, em δ_C 75,79 com o hidrogênio metínico em δ_H 1,85 (H-2α ^2J), com os hidrogênios metílicos em δ_H 0,91 (H-14, ^3J) e em δ_H 1,01 (H-15, ^3J). Foram identificadas, ainda, correlações do C-2, em δ_C 52,28, com os hidrogênios metilênicos em δ_H 1,59 – 1,63 (H-12a, ^3J) e em δ_H 1,09 (H-12b, ^3J), com o hidrogênio metínico em δ_H 1,21 – 1,71(H-5, ^3J) e com o hidrogênio metílico em δ_H 0,91 (H-13, ^3J).

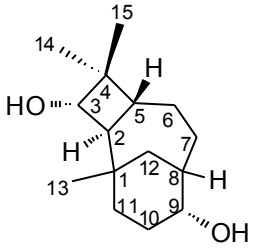
A configuração da hidroxila em C-3 foi estabelecida a partir de análise do mapa de contornos NOESY (Figura 171, p. 369), onde a correlação do H-3, em δ_H 3,41, com o H-5β em δ_H 1,21 – 1,71 foi observada, confirmando a configuração α para a hidroxila.

O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **96** apresentou um pico [M^+] = 238,1027 u.m.a., compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{26}O_2$ do (3*S*,9*R*)-isocariolan-9,3-diol (**96**), um composto inédito. Na Figura 172, p. 370, apresenta-se o espectro de Massas de **96**.

A Tabela 19, p. 170, apresenta os dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **96** e do material de partida **82**.

Tabela 19 –: Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de **96** com aqueles do material de partida isocariolan-9α-ol (**82**)

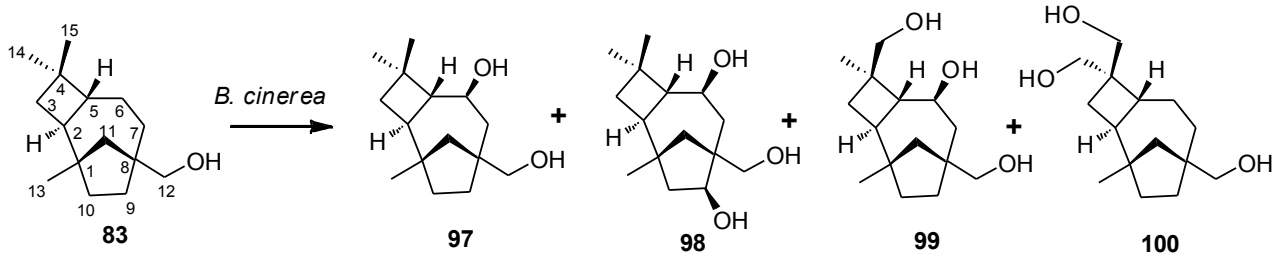
RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**(3*S*,9*R*)-isocariolan-9, 3-diol (96)**	**82**	**C**	**(3*S*,9*R*)-isocariolan-9, 3-diol (96)**	**82**
	δ_H **(multip., *J* em Hz)**			δ_C	
1	-	-	**1**	30,92	31,36
2α	1,85 (dd, *J*=12,6, 8,4)	2,04 – 2,11 (m)	**2**	52,28	39,51
3α	-	1,46 (dd, *J*=9,6, 7,6)	**3**	75,79	36,06
3β	3,41 (d, *J*=9,0)	1,27 (t, *J*=10,6)			
4	-	-	**4**	40,22	34,34
5β	1,17 -1,21(m)	1,61 – 1,70 (m)	**5**	38,54	46,15
6α	1,66 -1,69 (m)	1,34 – 1,42 (m	**6**	23,91	24,24
6β	1,39 -1,44 (m)	1,50 –1,57 (m)			
7α	1,75 - 1,82 (m)	1,71 – 1,75 (m)	**7**	24,89	24,34
7β	1,33 -1,38 (m)	1,71 – 1,75 (m)			
8	2,13 (m)	2,04 – 2,11 (m)	**8**	38,30	38,32
9β	3,72 (td, *J*=12,0, 6,0, 5,4)	3,71 (td, *J*=11,6, 5,6, 5,6)	**9**	72,82	73,16
10α	1,75 -1,82 (m)	1, 61 – 1,70 (m)	**10**	28,19	27,88
10β	1,66 -1,69 (m)	1, 75 – 1,85 (m)			
11α	1,27 (dt, *J*=13,2, 13,2, 4,2)	1,18 (dt, *J*=13,2, 13,2, 4,4)	**11**	39,69	38,41
11β	1,46 -1,50 (m)	1,34 – 1,42 (m)			
12a	1,59-1,63 (m)	1,61 – 1,70 (m)	**12**	40,48	40,26
12b	1,09 (dd, *J*=14,4, 4,8)	1,04 (dd, *J*=14,4, 4,4)			
13	0,90 (s)	0,73 (s)	**13**	25,73	26,38
14	0,90 (s)	0,97 (s)	**14**	14,74	20,61
15	1,00 (s)	0,96 (s)	**15**	28,15	30,61



96

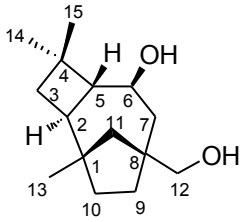
2.2.4 Biotransformação do (1*R*,2*S*,5*R*,8S)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (83)

O substrato (1*R*,2*S*,5*R*,8S)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (**83**) foi incubado com o fungo *B. cinerea* em dois experimentos que duraram cinco e nove dias, sendo utilizados o modo estático e temperatura ambiente. Os extratos obtidos foram purificados, levando ao isolamento de quatro produtos, todos inéditos, resultante da hidroxilação do material de partida **83** em diferentes posições do esqueleto isocariolano: (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,12-diol (**97**), (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (**98**), (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*, 6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (**99**), (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (**100**) (Esquema 28).



Esquema 28 – Biotransformação do (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**) pelo fungo *B. cinerea.*

2.2.4.1 Identificação de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97)



O produto de transformação microbiana **97** foi isolado como um material resinoso amarelado (6,6 mg, 4,4% de bioconversão em cinco dias e 22 mg, 12,2%

de bioconversão em nove dias), tendo sua estrutura determinada partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos (IV, RMN mono e bidimensionais, EM) e por comparação com os dados espectroscópicos do material de partida (**83**).

O espectro no IV (Figura 173, p. 370) apresentou banda de absorção em 3361 cm^{-1}, características de estiramento da ligação O-H e banda em 2948, 2864 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H[1].

O espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 174 e 175, p. 371) de **97** mostrou-se semelhante àquele de **83**, sendo que também um dupleto triplo, em δ_H 3,78, relativo a hidrogênio metínico em carbono oxigenado, C-6 foi observado. Além disso, este espectro mostrou dois dupletos duplos, em δ_H 1,91 e em δ_H 1,18, que poderiam ser atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-7α e H-7 β, respectivamente. O sinal de C-12, como em **83**, foi visto como um simpleto, em δ_H 3,33.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 176, p. 372) e no subespectro DEPT-135 (Figura 177, p. 372) de **97** foram identificados sinais referentes a 15 carbonos, sendo três metílicos, seis metilênicos, três não hidrogenados e três metínicos, confirmando uma hidroxilação em grupo CH_2. Observou-se o desaparecimento do sinal de carbono metilênico em δ_C 25,66, atribuído ao C-6, e o aparecimento de um sinal de carbono em δ_C 72,48, característico de carbono oxigenado, em relação ao material de partida **83**.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e o mapa de contornos HSQC (Figura 179, p. 373) possibilitou relacionar a hidroxilação do composto **97** ao C-6, em δ_C 72,48, tendo o sinal do carbono metínico C-5 e do carbono metilênico C-7 sido deslocados para um maior valor (δ_C 53,90 e δ_C 44,78, respectivamente) em relação aos sinais observados para C-5 e C-7, no espectro de RMN de ^{13}C do material de partida **83**. O sinal do carbono metínico C-6 em δ_C 72,48 apresentou correlação, no mapa de contornos HSQC, com o sinal em δ_H 3,78, referente ao hidrogênio H-6. O carbono metínico C-5, em δ_C 53,90, apresentou correlação, com o sinal em δ_H 1,63 – 1,66 (m), referente ao hidrogênio H-5β, e o sinal do carbono metilênico C-7 em δ_C 44,78, apresentou correlação com o sinal em δ_H 1,91 (dd,

J=12.6, 6.0 Hz) e em δ_H 1,18 (dd, *J*=12.6, 9.9 Hz), referente aos hidrogênios H-7α e H-7β.

Através do mapa de contornos COSY (Figura 178, p. 373), foi possível observar a correlação do hidrogênio metínico H-6, em δ_H 3,78 com os hidrogênios metilênicos H-7α em δ_H 1,91 e H-7β em δ_H 1,18 e com o hidrogênio metínico H-5β em δ_H 1,63 – 1,66.

No mapa de contornos HMBC expandido (Figura 180, p. 374), observou-se correlações do C-6, em δ_C 72,48, com o hidrogênio metínico em δ_H 1,63 – 1,66 (H-5β, ^2J) e com os hidrogênios metilênicos em δ_H 1,91 (H-7α, ^2J) e em δ_H 1,18 (H-7β, ^2J).

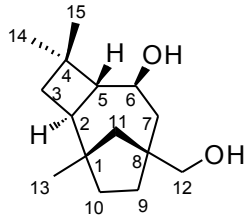
A configuração da hidroxila em C-6 foi estabelecida a partir da análise do mapa de contornos NOESY (Figura 181, p. 374), onde a correlação do hidrogênio H-6, em δ_H 3,78, com o H-14 em δ_H 1,14 e com o H-2α em δ_H 1,79 em foi observada, confirmando a configuração β para a hidroxila em C-6.

A estrutura do (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (**97**), um composto inédito, foi também confirmada pelo pico [M^+] = 238,1484 ($C_{15}H_{26}O_2$), no seu espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico e na Figura 182, p. 375 apresenta-se o espectro de Massas de **97**.

A Tabela 20, p. 174, apresenta os dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **97** e do material de partida **83**.

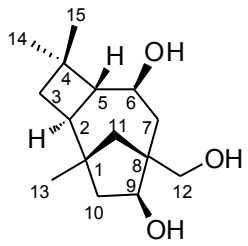
Tabela 20 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de **97,** com aqueles do material de partida (1*R*,2*S*,5*R*,8S)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**)

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97)**	**83**	**C**	**(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (97)**	**83**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	41,04	41,13
2α	1,79 (dt, *J*=10,8, 10,8, 8,1)	1,53 – 1,57 (m)	**2**	41,61	46,11
3α	1,53 (dd, *J*=9,6, 8,1)	1,50 – 1,53 (m)	**3**	36,50	37,18
3β	1,37 – 1,31 (m, 1H)	1,26 – 1,29 (m)			
4	-	-	**4**	33,33	33,37
5β	1,63 – 1,66 (m)	1,47 – 1,50 (m)	**5**	53,90	49,09
6α	3,78 (dt, *J*=10,2, 9,9, 6,0)	1,26 – 1,29 (m	**6**	72,48	25,66
6β	-	1,57 –1,60 (m)			
7α	1,91 (dd, *J*=12,6, 6,0)	1,20 – 1,27 (m)	**7**	44,78	34,02
7β	1,18 (dd, *J*=12,6, 9,9)	1,41 – 1,45 (m)			
8	-	-	**8**	45,91	47,53
9α	1,43 – 1,47 (m)	1,31 – 1,33 (m)	**9**	29,90	28,45
9β	1,43 – 1,47 (m)	1,47 – 1,50 (m)			
10α/ 10β	1,31 – 1,37 (m)	1, 35 – 1,38 (m)	**10**	44,80	45,17
11a	1,05 (d, *J*=12,6)	1,63 (d, *J*=12,2)	**11**	47,33	47,77
11b	1,63 – 1,66 (m)	1,03 (d, *J*=12,2)			
12	3,33 (s)	3,32 (s)	**12**	73,43	73,76
13	0,93 (s)	0,88 (s)	**13**	22,35	22,35
14	1,14 (s)	0,960 (s)	**14**	20,60	20,41
15	1,10 (s)	0,964(s)	**15**	31,94	30,48



97

2.2.4.2 Identificação do (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilen-triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (98)



O produto de transformação microbiana **98** foi isolado como um material resinoso incolor (0,6 mg, 0,4% de bioconversão em cinco dias e 1,2 mg, 0,6% de bioconversão em nove dias) e teve sua estrutura elucidada a partir de análise dos dados nos espectro no IV, RMN e EM, além de comparação com os dados de RMN do material de partida **83**.

O espectro no IV (Figura 183, p. 375) apresentou banda de absorção em 3421 cm^{-1}, características de estiramento da ligação O-H e banda em 2948 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H[40].

No espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 184 e 185, p. 376) foram observados dois dupletos, em δ_H 3,55 e em δ_H 3,46 (J=11,4 Hz), que foram associados aos H_{12a} e H_{12b}, respectivamente. Dois novos sinais, em δ_H 3,76 e em δ_H 4,16, ambos relativos a hidrogênios em carbono oxigenado, sugerem a ocorrência de duas hidroxilações no substrato original **83**. Através do espectro, observaram-se dois dupletos duplos, em δ_H 2,20 e em δ_H 0,86 atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-7α e H-7β, por analogia com **97**.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 186, p. 377) e no mapa de contornos HSQC-DEPT (Figuras 187 e 188, p. 377 e 378) de **98** foram identificados sinais referentes a 15 carbonos, sendo três metílicos, cinco metilênicos, três não hidrogenados e quatro metínicos, confirmando a dupla hidroxilação de **83**. Observou-se o desaparecimento dos sinais dos carbonos metilênicos em δ_C 25,66, atribuído ao C-6, e em δ_C 28,45, atribuído ao C-9, e o aparecimento de dois sinais de carbonos em δ_C 72,08 e em δ_C 77,11 característicos de carbonos oxigenados.

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C e o mapa de contornos HSQC-DEPT (Figuras 187 e 188, p. 377 e 378) foi possível relacionar uma das

hidroxilações do composto **98**, ao carbono metínico oxigenado C-6, em δ_C 72,00, tendo os sinais de C-5 e C-7 sido deslocados para um maior valor (δ_C 54,61 e δ_C 44,21, respectivamente), em relação aos sinais observados para C-5 e C-7 no espectro de RMN de ^{13}C do material de partida **83** (Tabela 21, p. 178). O sinal de C-6, em δ_C 72,08, apresentou correlação, no mapa de contornos HSQC, com o sinal em δ_H 3,76, referente ao hidrogênio H-6; C-5, em δ_C 54,61, apresentou correlação, no mapa de contornos HSQC, com o sinal em δ_H 1,64 (t, *J*=1.8 Hz), referente ao hidrogênio H-5β, e o sinal referente a C-7, em δ_C 44,21, apresentou correlação com os sinais em δ_H 2,20 (dd, *J*= 12.6, 5.7 Hz) e em δ_H 0,86 (dd, *J*= 12.6, 10.2 Hz), referentes aos hidrogênios H-7α e H-7β.

A outra hidroxilação do composto **98**, em C-9 (δ_C 77,11) foi confirmada pelo deslocamento do sinal de C-10 para um maior valor (δ_C 55,62), em relação àquele observado para C-10 no espectro de RMN de ^{13}C do material de partida **83**. O sinal de C-9 apresentou correlação no mapa de contornos HSQC, com o sinal em δ_H 4,16 (H-9); C-10, em δ_C 55,62, apresentou correlação com os sinais em δ_H 1,93 (ddd, *J*=11,4, 6,6, 3,0 Hz) e em δ_H 1,35 (m), atribuídos aos hidrogênios H-10α e H-10β. O sinal de C-12 apresentou correlação no mapa de contornos HSQC, com os sinais em δ_H 3,55 (H-12a) e em δ_H 3,46 (H-12b).

Através do mapa de contornos COSY (Figura 189, p. 378), foi possível confirmar a posição dos hidrogênios H-6 e H-9. O sinal do hidrogênio H-6 em δ_H 3,76 apresentou correlação com o sinal do hidrogênio metínico H-5 em δ_H 1,69 e os hidrogênios metilênicos H-7α em δ_H 2,20 e H-7β em δ_H 0,86. O sinal do hidrogênio H-9 em δ_H 4,16 apresentou correlações com os sinais dos hidrogênios metilênicos H-10α em δ_H 1,93 e H-10β em δ_H 1,34.

No mapa de contornos HMBC (Figura 190, p. 379) pode-se observar as correlações do C-6, em δ_C 72,08, com o hidrogênio metínico em δ_H 1,69 (H-5β, ^2J) e com os hidrogênios metilênicos em δ_H 2,20 (H-7α, ^2J) e em δ_H 0,86 (H-7β, ^2J). E as correlações do C-9 em δ_C 77,11, com o hidrogênio em δ_H 0,86 (H-7β, ^3J) e em δ_H 1,35 (H-10β, ^2J) .

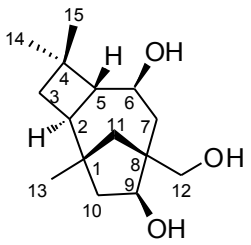
As configurações das hidroxilas em C-6 e em C-9 foram estabelecidas a partir da análise do mapa de contornos NOESY (Figura 191, p. 379). Observaram as correlações do sinal de H-6, com aquele de H-14 em δ_H 1,12 e com o de H-2α, em δ_H 1,63 e a correlação de H-9 com o H-2α, em δ_H 1,63, e com o H-7α, em δ_H 2,20, confirmando a configuração β para as hidroxilas em C-6 e em C-9.

A estrutura do (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,9β,12-triol (**98**), um composto inédito, foi também confirmada pelo pico [M^+] = 254,1237 ($C_{15}H_{26}O_3$), no seu espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico e na Figura 192, p. 380 apresenta-se o espectro de Massas de **98**.

A Tabela 21, p. 178, apresenta os dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **98** e do material de partida **83**.

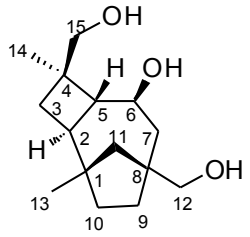
Tabela 21 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de **98,** com aqueles do material de partida (1*R*,2*S*,5*R*,8S)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (**83**)

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**(1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (98)**	**83**	**C**	**(1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (98)**	**83**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	37,64	41,13
2α	1,63 (dt, *J*=11,4, 11,4, 7,8)	1,53 – 1,57 (m)	**2**	42,01	46,11
3α	1,50 -1,57 (m)	1,50 – 1,53 (m)	**3**	36,52	37,18
3β	1,35 (m)	1,26 – 1,29 (m)			
4	-	-	**4**	33,37	33,37
5β	1,69 (t, *J*=10,8)	1,47 – 1,50 (m)	**5**	54,21	49,09
6α	3,76 (dt, *J*=10,2, 10,2, 6,0)	1,26 – 1,29 (m	**6**	72,08	25,66
6β	-	1,57 –1,60 (m)			
7α	2,20 (dd, *J*=12,6, 5,4)	1,20 – 1,27 (m)	**7**	44,21	34,02
7β	0,86 (dd, *J*=12,6, 10,2)	1,41 – 1,45 (m)			
8	-	-	**8**	48,00	47,53
9α	4,16 (dd, *J*=9,2, 7,2)	1,31 – 1,33 (m)	**9**	77,11	28,45
9β	-	1,47 – 1,50 (m)			
10α	1,93 (ddd, *J*=11,4, 6,6, 3,0)	1, 35 – 1,38 (m)	**10**	55,62	45,17
10β	1,35 (m)	1, 35 – 1,38 (m)			
11a	1,50 -1,57 (m)	1,63 (d, *J*=12,2)	**11**	44,94	47,77
11b	1,50 -1,57 (m)	1,03 (d, *J*=12,2)			
12a	3,55 (d, *J*=11,4)	3,32 (s)	**12**	68,75	73,76
12b	3,46 (d, *J*=11,4)	-			
13	0,92 (s)	0,88 (s)	**13**	22,44	22,35
14	1,12 (s)	0,960 (s)	**14**	20,47	20,41
15	1,09 (s)	0,964(s)	**15**	31,87	30,48



98

2.2.4.3 Identificação do (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (99)



O produto de transformação microbiana **99** (0,9 mg, 0,6% de bioconversão em cinco dias e 0,5 mg, 0,3% de bioconversão em nove dias) foi isolado como um material resinoso incolor e teve sua estrutura elucidada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos nos espectros no IV, RMN e EM, além da comparação com aqueles do material de partida (**83**).

O espectro no IV (Figura 193, p. 380) apresentou banda de absorção em 3377 cm^{-1}, características de estiramento da ligação O-H e banda em 2944 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H alifáticas[40].

No espectro de RMN de ^{1}H (Figura 194 e 195, p. 381) foram observados sinais relativos a novos carbonos oxigenados em δ_H 3,43 (d, *J*=9,6 Hz) e em δ_H 3,32 (d, *J*=9,6 Hz) e em δ_H 3,69 (ddd, *J*=10,8, 9,6 e 6,0 Hz). Os sinais relativos aos hidrogênios diastereotópicos 7α e 7β puderam ser observados em δ_H 1,97 e em δ_H 1,23-1,26, respectivamente, indicando hidroxilação em C-6.

Através da análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 196, p. 382), e do subespectro DEPT-135 (Figura 197, p. 382), foi possível observar o desaparecimento do sinal de carbono metílico em δ_C 30,48 atribuído ao C-15 e do sinal de carbono metilênico em δ_C 25,66 atribuído ao C-6, assim como o aparecimento de dois sinais de carbono, em δ_C 70,04 e em δ_C 73,37, característicos de carbonos oxigenados, em relação ao material de partida **83**.

Através do mapa de contornos HSQC (Figura 198, p. 383) foi possível observar que o sinal em δ_C 73,36 apresentou correlações com os dupletos em δ_H 3,43 e em δ_H 3,32, que foram atribuídos aos hidrogênios H-15a e H-15b, e correlação com o simpleto em δ_H 3,38 atribuído a H-12. Observou-se, também, a

correlação do carbono C-6, em δ_C 70,04 com o hidrogênio metínico H-6 em δ_H 3,69.

O mapa de contornos COSY (Figura 199, p. 383) apresentou a correlação do hidrogênio H-6 (δ_H 3,69) com os hidrogênios em δ_H 1,97 atribuído ao H-7α e com o hidrogênio em δ_H 1,78, atribuído ao hidrogênio H-5β, confirmando a posição do H-6.

No mapa de contornos HMBC (Figura 200, p. 384) pode-se observar as correlações do sinal de C-6, em δ_C 70,04, com aquele do hidrogênio metínico em δ_H 1,78 (H-5β, ^2J) e com os sinais dos hidrogênios metilênicos em δ_H 1,97 (H-7α, ^2J) e em δ_H 1,23 – 1,26 (H-7β, ^2J).

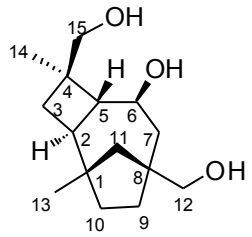
As configurações das hidroxilas em C-6 e em C-15 foram estabelecidas a partir da análise do mapa de contornos NOESY (Figura 201, p. 384). Observou-se a correlação do sinal do hidrogênio H-6, com aquele de H-14, em δ_H 1,21, e com o de H-7α, em δ_H 1,97 bem como a correlação do sinal dos hidrogênios H-15, com o sinal de H-5β, em δ_H 1,78, e com o sinal de H-7β, em δ_H 1,23 -1,26, confirmando a configuração β para as hidroxilas em C-6 e em C-15.

O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **99** apresentou um pico [M^+] = 254,1886 u.m.a., compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{26}O_3$ do (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,15,12-triol (**99**), um composto inédito. Na Figura 202, p. 385 apresenta-se o espectro de Massas de **99**.

A Tabela 22 na p. 181, apresenta os dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **99** e do material de partida **83**.

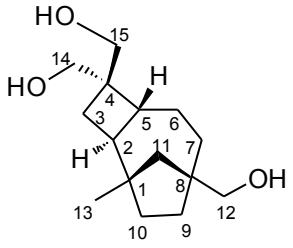
Tabela 22 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 600 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 150 MHz, $CDCl_3$) de **99** com aqueles do material de partida (1*R*,2*S*,5*R*,8S)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (**83**)

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**(1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*, 8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2 .1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (99)**	**83**	**C**	**(1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1. $0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (99)**	**83**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	41,12	41,13
2α	1,86 (dt, *J*=11,4, 11,4, 7,8)	1,53 – 1,57 (m)	**2**	42,14	46,11
3α	1,45 – 1,51(m)	1,50 – 1,53 (m)	**3**	32,21	37,18
3β	1,35 - 1,40 (m)	1,26 – 1,29 (m)			
4	-	-	**4**	38,71	33,37
5β	1,78 (t, *J*=11,4)	1,47 – 1,50 (m)	**5**	52,57	49,09
6α	3,69 (ddd, *J*=10,8, 9,6, 6,0)	1,26 – 1,29 (m	**6**	70,04	25,66
6β	-	1,57 –1,60 (m)			
7α	1,97 (dd, *J*=13,2, 6,0)	1,20 – 1,27 (m)	**7**	43,92	34,02
7β	1,23 -1,26 (m)	1,41 – 1,45 (m)			
8	-	-	**8**	46,03	47,53
9α	1,23 -1,26 (m)	1,31 – 1,33 (m)	**9**	29,78	28,45
9β	1,45 -1,51 (m)	1,47 – 1,50 (m)			
10α/ 10β	1,35 -1,40 (m)	1, 35 – 1,38 (m)	**10**	44,75	45,17
11a	1,67 (dd, *J*=12,6, 1,2)	1,63 (d, *J*=12,2)	**11**	47,46	47,77
11b	1,08 (dd, *J*=12,6)	1,03 (d, *J*=12,2)			
12	3,38 (s)	3,32 (s)	**12**	73,37	73,76
13	0,91 (s)	0,88 (s)			
14α	1,21 (s)	0,960 (s)	**13**	22,18	22,35
15a	3,43 (d, *J*=9,6)	0,964(s)	**14**	15,84	20,41
15b	3,32 (d, *J*=9,6)	-	**15**	73,36	30,48



99

2.2.4.4 Identificação do (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (100)



O produto de transformação microbiana **100** foi isolado como um material resinoso incolor (1,2 mg, 0,8% de bioconversão em cinco dias e 1,6 mg, 0,8% de bioconversão em nove dias).

A estrutura desta substância foi elucidada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos nos espectros no IV, RMN e EM e por comparação com os dados espectroscópicos do material de partida (**83**).

O espectro no IV (Figura 203, p. 385) apresentou banda de absorção em 3344 cm^{-1}, características de estiramentoda ligação O-H e banda em 2929 cm^{-1}, referente ao estiramento de ligações C-H[40].

No espectro de RMN de ^{1}H (Figuras 204 e 205, p. 386) foram observados dois novos dupletos em relação a **83**, um deles em δ_H 3,71 e δ_H 3,66 (J=10,4 Hz) e o outro em δ_H 4,02 e δ_H 3,90 (J=11,2 Hz), relativos a hidrogênios em carbonos oxigenados.

Através da análise conjunta dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 206, p. 387), e do subespectro DEPT-135 (Figura 207, p. 387), foi possível observar o desaparecimento dos sinais de carbonos metílicos em δ_C 30,48 atribuído ao C-15 e, em δ_C 20,40, atribuído ao C-14, assim como o aparecimento de dois sinais de carbono, em δ_C 73,15 e em δ_C 65,81, inferindo-se a ocorrência de hidroxilações nos carbonos C-14 e C-15.

No mapa de contornos HSQC (Figura 208, p. 388), o sinal de carbono em δ_C 65,81 apresentou correlação com os sinais em δ_H 4,02 e em δ_H 3,90, referente aos hidrogênios H-14a e 14b. O sinal referente ao carbono em δ_C 73,15 apresentou correlação com os sinais em δ_H 3,71 e em δ_H 3,66, referentes aos hidrogênios H-15a e H-15b. Pelo mapa de contornos HMBC (Figura 209, p. 388) foi possível

observar as correlações dos sinais de carbonos: C-14 em δ_C 65,81 com os sinais dos hidrogênios metilênicos em δ_H 3,71 (H-15a, ^3J) e em δ_H 3,66 (H-15b, ^3J), e o sinal do carbono C-15 com aqueles hidrogênios metilênicos em δ_H 4,02 (H-14a, ^3J) e em δ_H 3,90 (H-14b, ^3J).

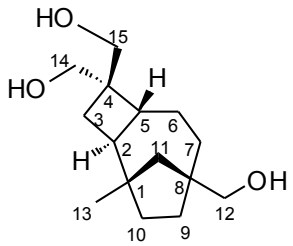
As configurações das hidroxilas em C-14 e em C-15 foram estabelecidas a partir da análise do mapa de contornos NOESY (Figura 210, p. 389). Observaram-se correlações dos sinais dos hidrogênios H-14a e H-14b, com o sinal de H-2α, em δ_H 1,74, e aquelas dos hidrogênios H-15a e H-15b com o sinal de H-5β, em δ_H 1,78, confirmando a configuração α para a hidroxila em C-14 e a configuração β para a hidroxila em C-15.

O espectro de Massas de alta resolução por impacto eletrônico de **100** apresentou um pico [M^+] = 254,1880 u.m.a., compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{26}O_3$ do (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-12,14,15-triol (**100**), um composto inédito. Na Figura 211, p. 389, apresenta-se o espectro de Massas de **100**.

A Tabela 23, p. 184**,** apresenta os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de **100**, e do material de partida **83**.

Tabela 23 – Comparação dos dados dos espectros de RMN de ^{1}H (δ, 400 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (δ, 100 MHz, $CDCl_3$) de **100** com aqueles do material de partida (1*R*,2*S*,5*R*,8S)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (**83**)

RMN de ^{1}H			RMN de ^{13}C		
H	**(1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (100)**	**83**	**C**	**(1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (100)**	**83**
	δ_H (multip., *J* em Hz)			**δ_C**	
1	-	-	**1**	41,13	41,13
2α	1,74 (m)	1,53 – 1,57 (m)	**2**	46,73	46,11
3α	1,70 (m)	1,50 – 1,53 (m)	**3**	28,67	37,18
3β	1,33 (m)	1,26 – 1,29 (m)			
4	-	-	**4**	42,54	33,37
5β	1,78 (m)	1,47 – 1,50 (m)	**5**	45,08	49,09
6α	1,83 (m)	1,26 – 1,29 (m	**6**	26,95	25,66
6β	1,46 (m)	1,57 –1,60 (m)			
7α	1,44 (m)	1,20 – 1,27 (m)	**7**	34,05	34,02
7β	1,28 (m)	1,41 – 1,45 (m)			
8	-	-	**8**	47,38	47,53
9α	1,47 (m)	1,31 – 1,33 (m)	**9**	28,41	28,45
9β	1,38 (m)	1,47 – 1,50 (m)			
10α/ 10β	1,35 – 1,42 (m)	1, 35 – 1,38 (m)	**10**	45,02	45,17
11a	1,62 (d, *J*=12,4)	1,63 (d, *J*=12,2)	**11**	47,52	47,77
11b	1,08 (d, *J*=12,4)	1,03 (d, *J*=12,2)			
12	3,32 (s)	3,32 (s)	**12**	73,48	73,76
13	0,92 (s)	0,88 (s)			
14a	4,02 (d, *J*=11,2)	0,960 (s)	**13**	22,06	22,35
14b	3,90 (d, *J*=11,2)	-			
15a	3,71 (d, *J*=10,4)	0,964(s)	**14**	65,81	20,41
15b	3,66 (d, *J*=10,4)	-	**15**	73,15	30,48



100

CAPÍTULO 3

Parte Experimental

3.1 Técnicas instrumentais e cromatográficas

3.1.1 Cromatografia em camada delgada de sílica (CCDS)

A cromatografia em camada delgada foi feita utilizando sílica gel Kiesegel 60 HF_{254} (Merck) com espessura de 0,25 mm e indicador fluorescente.

3.1.2 Cromatografia em coluna

Para as separações cromatográficas em coluna foram utilizados sílica gel Merck (70- 230 Mesh *ASTM*), sendo a proporção da fase estacionária para a quantidade de amostra de 30:1. A fase móvel empregada para as colunas filtrantes seguiu uma ordem eluotrópica usual, na ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol.

3.1.3 Cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE), foi utilizado um cromatógrafo Merck-Hitachi equipado com detector de índice de refração IR-71, bomba L-6200 A e integrador D-2500 e um processador Pentium 90 utilizando o programa Borwin, versão1.21. A coluna utilizada foi coluna de sílica gel analítica LiChrospher Si-60, 5 μm, 0,4 × 25 cm. A amostra foi filtrada utilizando filtros Teknokroma de 0,45 μm de poro.

3.1.4 Reagentes para revelações cromatográficas

As revelações cromatográficas foram feitas utilizando-se uma solução de ácido sulfúrico, água e ácido acético na proporção 4:16:80 (denominada "óleo"). A placa foi aquecida a 100 °C durante alguns minutos.

3.1.5 Critérios de pureza

Os critérios de pureza adotados foram mancha única em CCDS, variando-se a fase móvel e análises dos espectros de RMN de ^{1}H e de ^{13}C.

3.1.6 Faixa de fusão

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho *Reichert-Jung* (Dept. de Química – UCA) e não foram corrigidos.

3.1.7 Métodos espectrométricos

3.1.7.1 Atividade óptica

As atividades ópticas das substâncias foram determinadas em um polarímetro Perkin-Elmer 241(Dept. de Química – UCA), provido de uma lâmpada de sódio (λ=589 nm), com uma célula padrão de 1 dm de longitude e 1 mL de volume, empregando $CHCl_3$ ou MeOH como dissolvente.

3.1.7.2 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros no infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro com transformada de Fourier, Génesis Series FTIR de Mattsob (Dept. de Química – Universidad de Cádiz), obtendo-se os valores em cm^{-1}. As amostras foram dissolvidas em $CHCl_3$ ou MeOH Panreac UV-IR e foram preparadas em pastilha de KBr. Inicialmente foi feito o branco (apenas o solvente na pastilha) e após foi aplicada a amostra.

3.1.7.3 Espectrometria de massas

Os espectros de Massas foram obtidos em aparelho Finnigan Voyager 70 eV. E os espectro de Massas de alta resolução foram obtidos em aparelho Micromass Autospec 70 eV.

3.1.7.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^{1}H, ^{13}C e bidimensionais foram registrados em espectrômetros Varian Inova-400 e Varian Inova-600 (SCCYT – Universidad de Cádiz). Os solventes deuterados utilizados são indicados em cada caso. Como referências internas, foram utilizados os picos relativos ao tetrametilsilano (TMS), clorofórmio e metanol. Os dados espectrais de RMN de ^{1}H são expressos da

seguinte forma: deslocamentos químicos (δ) em ppm e constante de acoplamento escalar (J) em Hertz. Os multipletos foram definidos com o valor de δ de seu ponto médio.

3.2 Transformações químicas realizadas com o óxido de cariofileno, com cariofilanos, isocariolanos e derivados procedentes de rearranjo de isocariolanos

3.2.1 Preparação do 5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (77)[33]

Foram dissolvidos 300 mg (1,36 mmol) de 4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno (**11**) em 7,5 mL de acetona, sendo posteriormente adicionados 600 mg (6,97 mmol) de LiBr e 25 mg (0,19 mmol) de TCNE à solução. A agitação foi mantida durante 1 hora à temperatura ambiente e o progresso da reação foi monitorado por CCDS. Após o consumo completo do epóxido o solvente foi evaporado em evaporador rotativo e a mistura dissolvida em acetato de etila e secada com Na_2SO_4 anidro. Após filtração e evaporação do solvente, o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com hexano/acetato de etila, com polaridades crescentes, obtendo-se 249 mg de 5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (83%) (**77**).

3.2.2 Preparação do (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78), da isocariolan-9-ona (79) e do (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano-8-carbaldeído (81)[34]

Ao composto **77** (200 mg; 0,79 mmol), dissolvido em metanol (4 mL), foi adicionado TCNE (27 mg; 0,21 mmol) e a solução foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente por 48 horas. O progresso da reação foi monitorado por CCDS e, após o consumo completo do material de partida, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. A mistura foi dissolvida em acetato de etila e secada com Na_2SO_4 anidro. Após a evaporação do solvente, o resíduo foi submetido à cromatográfica em coluna de sílica gel, eluída com hexano/acetato de etila, em polaridades crescentes, obtendo-se 121 mg de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**, 60,5% de rendimento), 20 mg de isocariolan-9-ona (**79**, 10%)

e 39 mg de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undecano-8-carbaldeído (**81**, 19,5%).

3.2.3 Preparação do (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (80)[34], da isocariolan-9-ona (79) e do (1*S*,2*S*,5*R*, 8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano-8-carbaldeído (81)

A uma solução contendo 500 mg (2,27 mmol) do composto **77** dissolvido em 4 mL de éter dietílico, adicionou-se uma solução de ácido sulfúrico 96% (0,5 mL) em éter dietílico (2 mL), sendo a mistura mantida sob agitação, a 0° C, durante 4 horas. O progresso da reação foi monitorado por CCDS e, após o consumo completo do material de partida, foram adicionados 20 mL de água e a solução neutralizada com Na_2CO_3. A fase aquosa foi extraída três vezes com acetato de etila e secada com Na_2SO_4 anidro. Após a evaporação do solvente, o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (hexano/acetato de etila em polaridades crescentes), obtendo-se 53 mg de (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (**80,** 10,6% de rendimento), 135 mg de isocariolan-9-ona (**79,** 27%) e 205 mg de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano-8-carbaldeído (**81,** 41%).

3.2.4 Redução da isocariolan-9-ona (79), com $NaBH_4$ [34]

O composto **79** (300 mg, 1,36 mmol) foi dissolvido em metanol (10 mL), sendo, em seguida, adicionados 100 mg (2,64 mmol) de $NaBH_4$. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A reação foi monitorada por CCDS e, após o consumo completo do material de partida, água foi adicionada lentamente à mistura reacional, que foi, em seguida, extraída com acetato de etila e secada com Na_2SO_4 anidro. Após filtração e evaporação do solvente, o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com hexano/acetato de etila, em polaridades crescentes, obtendo-se 240 mg de isocariolan-9α-ol (**82**, 80% de rendimento).

3.2.5 Redução do (1S, 2S, 5R, 8S)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano-8-carbaldeído (81) com $NaBH_4$ [34]

O composto **81** (300 mg, 1,36 mmol), dissolvido em metanol (10 mL), foi tratado com $NaBH_4$ (100 mg, 2,64 mmol) e a mistura mantida sob agitação, à temperatura ambiente, durante 24 horas. A reação foi monitorada por CCDS, e água foi adicionada à mistura quando não se detectou mais a presença do material de partida. Após extração com acetato de etila, secagem com Na_2SO_4 anidro, filtração e evaporação do solvente, o resíduo foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com hexano/acetato de etila, em polaridades crescentes, obtendo-se 246 mg de 1R, 2S, 5R, 8S-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**, 82% de rendimento).

3.2.6 Procedimento geral da reação de 5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (77) com alcoóis, catalisada por $Sn(OTf)_2$ [38].

Foram adicionados 118 mg (0,28 mmol) de $Sn(OTf)_2$ a uma mistura de 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (**77**) (250 mg, 1,14 mmol) e álcool 10 mL de cada um (vide Tabela 2.4) sob agitação magnética e mantida em atmosfera inerte à temperatura ambiente por 24 horas (Esquema 15, p.106). A reação foi monitorada por CCDS e, após o consumo completo do composto **77**, a mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna sílica gel, utilizando sistema eluente de hexano/acetato de etila (95:5 - 50:50, v/v). Os produtos obtidos assim como seus rendimentos estão especificados na tabela 24, p.191.

Tabela 24 – Produtos obtidos da reação de 5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (**77**) com alcoóis, catalisada por $Sn(OTf)_2$[38]

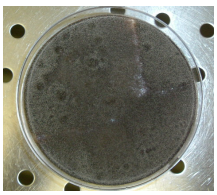
Álcool	Produtos (%)
CH_3OH	(8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**) (41,7 %), **79** (12,6 %),**81** (26,7 %)
CH_3CH_2OH	(8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**) (39,2%), **79** (14,1%), **81** (28,6%)
$CH_3CH_2CH_2OH$	(8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**) (35,4%), **79** (15,7%), **81** (31,4%)
$CH_3CH_2CH_2CH_2OH$	(8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**) (34,1%), **79** (19,4%), **81** (42,4%)
$CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2OH$	(8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**) (35,1%), **79** (19,6%), **81** (37,5%)

3.3 Transformações microbianas de isocariolanos

3.3.1 Procedimentos gerais empregados nos experimentos de biotransformações

3.3.1.1 Preparo do inóculo

As cepas de *Botrytis cinerea* UCA992, empregadas neste trabalho, foram isoladas de uvas das Bodegas Domecq, no ano de 1992, em Jerez de la Fronteira na Província de Cádiz, Espanha.



Para a obtenção dos esporos, o fungo foi cultivado em placas de Petri sobre meio ágar-tomate (500 mL de tomates crus sem pele, 500 mL de H_2O destilada e 20 g de ágar) até a total esporulação, quando a placa adquire coloração marrom característica (em torno de 5 a 8 dias). Os esporos foram recolhidas com glicerol 80% com auxílio de uma alça de Drigalski e conservadas em Eppendorfs a – 40 °C.

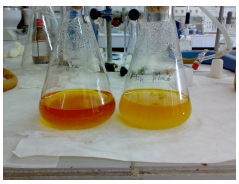
A contagem dos esporos foi feita microscopicamente utilizando uma superfície de vidro especial denominada câmara Neubauer. Esta câmara com quadros de 0,0025 mm^2 de área suporta uma fina camada de líquido de 0,100 mm de profundidade, o que permite conhecer o volume correspondente a cada

quadrado da câmara. Através da observação direta com aumentos adequados, pode-se contar os esporos existentes no volume de análise. Para a contagem, foi utilizado um microscópio óptico Nikon modelo 115, equipado com oculares de 10 aumentos e objetivas de 4, 10, 20 e 40, assim como objetiva de imersão de 100.

3.3.1.2 Preparo do meio de cultura, inoculação do meio de cultura e adição do substrato ao meio de cultura

As biotransformações foram realizadas de dois modos distintos: com agitação orbital a 180 rpm e de modo estático.

3.3.1.2.1 Modo agitação



Para as biotransformações feitas no modo agitação, foram utilizados *erlenmeyers* de 500 mL, contendo 200 mL de meio de cultura *Czapeck-Dox* (40 mg de glicose, 1 g de extrato de levedura, 5 g de KH_2PO_4, 2 g de $NaNO_3$, 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,005 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, em 1L de água destilada). Este meio foi esterilizado e deixado resfriar e, em seguida, em cada erlenmeyer foi inoculado *B. cinerea* em uma concentração de $1{,}87 \times 10^6$ esporos/mL. A fermentação foi feita em agitador orbital, a 180 rpm, em presença de luz artificial (tubos fluorescentes), a uma temperatura de 25 °C. Após quatro dias foi adicionado o substrato a ser biotransformado, dissolvido em etanol em uma concentração de 100 ppm por erlenmeyer. Para finalizar o experimento, o micélio foi separado do meio de cultivo por filtração a vácuo, usando um filtro “nytal” de 200 μm de poro. O meio foi saturado com NaCl, acidificado a pH 2 e posteriormente extraído com acetato de etila, secado com Na_2SO_4 anidro. Após filtração o solvente foi evaporado e o resíduo cromatografado em sílica gel. Foram preparados dois controles, um apenas com o meio de cultivo e os esporos, sem adição do substrato (controle do fungo) e outro, com o meio de cultura e o substrato, sem adição do inóculo (controle do substrato). Estes dois controles foram também extraídos como descrito acima e o resíduo analisado por CCDS.

3.3.1.2.2 Modo estático



A biotransformação foi feita utilizando garrafas *Roux* de 1L contendo 150 mL de meio de cultura *Czapeck-Dox* (ver acima). A quantidade de *B. cinerea* utilizada foi à mesma utilizada no modo de agitação. As garrafas foram colocadas em uma superfície plana, em presença de luz artificial (tubos fluorescentes) a uma temperatura de 25 °C. No quarto dia foi adicionado o substrato a ser biotransformado, dissolvido em etanol, na concentração de 100 ppm por garrafa. A finalização do experimento e etapas posteriores foram realizadas conforme descrito no item anterior. Foram também preparados os controles do fungo e do substrato.

3.3.2 Biotransformação do (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78) por *B. cinerea*

Foram realizadas duas biotransformações, utilizando o modo estático, com o substrato **78**, sendo a primeira com duração de cinco dias (90 mg, 6 garrafas) e nove dias (180 mg, 12 garrafas) após a adição do substrato no meio de cultura.

3.3.2.1 Purificação do resíduo obtido com cinco dias de fermentação de 78

O resíduo obtido no primeiro experimento (105,8 mg) foi submetido à cromatografia em sílica gel (25,8 mg, Φ = 1,8 cm). Foram obtidas sete frações de aproximadamente 150 mL cada, sendo utilizados hexano, acetato de etila e metanol, como eluentes, com gradiente crescente de polaridade. As frações foram analisadas por CCDS, utilizando-se como sistema eluente hexano/acetato de etila (7:3) e “óleo” como revelador, sendo possível verificar que as frações 3, 4 e 6 continham produtos de biotransformação. (Tabela 25).

Tabela 25 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato **78** por *B. cinerea*

Eluente	Frações	Massa (mg)
Hexano / acetato de etila (8,5:1,5)	1	5,4
Hexano / acetato de etila (7:3)	2	17,9
Hexano / acetato de etila (1:1)	3	15,6
Hexano / acetato de etila (2:8)	4	15,5
Acetato de etila (100%)	5	3,7
Acetato de etila / metanol (1:1)	6	15,6
Metanol	7	3,9

As frações trabalhadas foram aquelas que mostraram, por CCDS, a presença de produtos diferentes daqueles presentes no resíduo do controle do fungo.

Fração 2

O material deste grupo (17,9 mg) apresentou-se como um sólido branco, que por comparação com um padrão do material de partida, por CCDS (hexano/acetato de etila 7:3, revelação com "óleo") e RMN de ^{1}H foi possível identificar como sendo material de partida **78**.

Fração 3

O material deste grupo (15,6 mg) apresentou-se como um sólido branco de faixa de fusão 115 - 117 °C, identificado como o (8*R*,9*R*)-isocariolan- 8,9-diol (**80**, 17,3% de bioconversão), por comparação com padrão, através de CCDS (hexano/acetato de etila 7:3, revelação com "óleo") e análise do espectro de RMN de ^{1}H.

Fração 4

O material deste grupo (15,5 mg) apresentou-se como um material viscoso, que mostrou-se puro por análises por CCDS (hexano/acetato de etila 1:1,

revelação com “óleo”) e RMN, sendo identificado como o (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9,15-diol (**88**), obtido com 17,2 % de bioconversão.

Grupo 6

Através da análise por CCDS (acetato de etila: metanol 95,5:0,5) observaram-se manchas relativas a um possível produto de biotransformação, porém a fração apresentava-se impura. Este material foi purificado por CLAE em coluna analítica (1mg/1mL), utilizando-se hexano/acetato de etila 6:4. Foram obtidos o (3*S*,8*R*, 9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (**89**, 3,2 mg, 3,5% de bioconversão), o (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (**90**, 6,5 mg, 7,2% de bioconversão) e o (6*R*,8*S*, 9*R*)-isocariolan-6, 8, 9-triol (**91**, 2,5 mg, 2,7% de bioconversão), puros.

As demais frações apresentaram-se como misturas complexas por CCDS e espectro de RMN de ^{1}H e não foram trabalhadas.

3.3.2.2 Purificação do resíduo obtido com nove dias de fermentação de 78

O resíduo (203,4 mg) obtido com nove dias de biotransformação do substrato **78** foi submetido a fracionamento cromatográfico com sílica gel, sendo utilizado o mesmo sistema de eluentes descrito anteriormente (para cinco dias). Foram obtidas frações que foram agrupadas de acordo com a CCDS (Tabela 26).

Tabela 26 –Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato **78**

Eluente	Frações	Massa (mg)
Hexano / acetato de etila (8,5:1,5)	1	14,6
Hexano / acetato de etila (7:3)	2	15,9
Hexano / acetato de etila (1:1)	3	32,1
Hexano / acetato de etila (2:8)	4	34,4
Acetato de etila (100%)	5	8,8
Acetato de etila / metanol (1:1)	6	40,9
Metanol	7	40,6

As frações trabalhadas foram aquelas que mostraram, por CCDS, a presença de produtos diferentes daqueles presentes no resíduo do controle do fungo.

Fração 2

O material deste grupo (15,9 mg) apresentou-se como um sólido branco, que por comparação com um padrão do material de partida, por CCDS (hexano/acetato de etila 7:3, revelação com "óleo") e RMN de ^{1}H foi possível identificar como sendo material de partida **78**.

Fração 3

O material deste grupo (32,1 mg) apresentou-se como um sólido branco de faixa de fusão 115 - 117 °C, identificado como o (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (**80**, 17,8 % de bioconversão), por comparação com padrão, através de CCDS (hexano/acetato de etila 7:3, revelação com "óleo") e análise do espectro de RMN de ^{1}H.

Fração 4

O material deste grupo (34,4 mg) apresentou-se como um material viscoso, que mostrou-se puro por análises por CCDS (hexano/acetato de etila 1:1, revelação com "óleo") e RMN, sendo identificado como o (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9,15-diol (**88**), obtido com 19,1 % de bioconversão.

Fração 6

Através da análise por CCDS (acetato de etila: metanol 95,5: 0,5) observaram-se manchas relativas a um possível produto de biotransformação, porém a fração apresentava-se impura. Este material foi purificado por CLAE em coluna analítica (1mg/1mL), utilizando-se hexano/acetato de etila 6:4. Foram obtidos o (3*S*,8*R*, 9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (**89**, 3,1 mg, 1,7% de bioconversão), o (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (**90**, 7,6 mg, 4,2% de bioconversão) e o (6*R*,8*S*, 9*R*)-isocariolan-6, 8, 9-triol (**91**, 3,4 mg, 1,8% de bioconversão), puros.

As demais frações apresentaram-se como misturas complexas, conforme visualizado por CCDS e espectro de RMN de ^{1}H e não foram trabalhadas.

3.3.3 Biotransformação do (8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9-diol (80) por *Botrytis cinerea*

Foram realizadas duas biotransformações utilizando o modo estático com o substrato **80**, sendo a primeira com duração de cinco dias (150 mg, 10 garrafas) e nove dias (180 mg, 12 garrafas) após a adição do substrato no meio de cultura.

3.3.3.1 Purificação do resíduo obtido com cinco dias de fermentação de 80

O resíduo obtido no primeiro experimento (280,8 mg) foi submetido à cromatografia em sílica gel (34,3 g, Φ= 2 cm). Foram eluídas 210 frações de aproximadamente 8 mL cada, sendo utilizados hexano, acetato de etila e metanol, como eluentes, com gradiente crescente de polaridade (Tabela 27). As frações foram analisadas por CCDS, utilizando-se como sistema eluente hexano/acetato de etila e "óleo" como revelador, tendo sido as frações reunidas em 11 grupos (Tabela 28, p.198).

Tabela 27 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato **80** por *B. cinerea*

Eluentes	Frações
Hexano / acetato de etila (7:3)	1 – 55
Hexano / acetato de Etila (1:1)	56 – 98
Hexano / acetato de Etila (2:8)	99 – 182
Acetato de etila / metanol (8:2)	183 – 195
Acetato de etila / metanol (1:1)	196 - 210

Tabela 28 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato **80** por *B. cinerea*, de acordo com comportamento por CCDS

Grupo	Frações	Massa (mg)
1	1 – 18	3,8
2	19 – 34	6,5
3	35 – 53	53,3
4	54 – 77	14,7
5	78 – 98	14
6	99 – 129	37,4
7	130 – 162	14,1
8	162 – 171	16,4
9	172 – 182	3,8
10	183 – 197	82,6
11	198 – 210	24,6

As frações trabalhadas foram aquelas que mostraram, por CCDS, a presença de produtos diferentes daqueles presentes no resíduo do controle do fungo.

Grupo 6

O material deste grupo (37,4 mg) apresentou-se como um sólido branco que, por comparação com um padrão do material de partida por CCDS (hexano/acetato de etila 8:2, revelação com “óleo”) e análise do espectro de RMN de ^{1}H foi identificado como sendo material de partida **80**.

Grupos 8 e 9

Estes grupos foram reunidos (20,2 mg) por apresentarem espectros de RMN de ^{1}H similares. Este material foi purificado por CLAE (coluna analítica (1mg/1mL), utilizando-se hexano/acetato de etila 45:55. Foram isolados os produtos de biotransformação: (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (**89**, 1,5 mg, 1 %

de bioconversão) e (2*R*,5*S*,8*R*, 9R)-isocariolan-5, 8, 9-triol (**92**, 3,1 mg, 2,1% de bioconversão).

Grupo 10

A análise por CCDS (acetato de etila: metanol 95,5:0,5) mostrou a presença de possíveis produtos de biotransformação, impuros. Este material (80,2 mg) foi recromatografado em coluna de sílica gel (19,5 g, Φ: 1,5 cm) utilizando-se, como eluentes, hexano, acetato de etila e metanol, com gradientes crescentes de polaridade, tendo sido obtidas 224 frações de aproximadamente 5 mL cada (Tabela 29). Estas foram reunidas mediante análise por CCDS utilizando-se, como sistema eluente, hexano/acetato de etila 3:7 até 100% e acetato de etila/metanol 9,5:0,5 e "óleo" como revelador, levando a 8 subgrupos (Tabela 30, p.200).

Tabela 29 – Fracionamento cromatográfico do grupo 10, proveniente do fracionamento do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato **80** por *B. cinerea*

Eluentes	Frações
Hexano / acetato de etila (2:8)	1 – 85
Hexano / acetato de etila (1:9)	86 – 160
Acetato de etila (100%)	161 – 224

Tabela 30 – Reunião em grupos das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do grupo 10, procedente do fracionamento do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato **80** por *B. cinerea*, de acordo com comportamento em CCDS

subgrupo	Frações	Massa (mg)
1	1 -109	4,2
2	110 – 137	4,4
3	138 – 151	3,9
4	152 – 158	1,3
5	159 – 170	4,3
6	171 – 179	4,5
7	180 – 183	3,9
8	184 – 224	21,9

Subgrupos 2 e 3

Os grupos 2 e 3 foram reunidos (8,4 mg), com base nos seus espectros de RMN de ^{1}H e purificados por CLAE (coluna analítica (1mg/1mL) usando hexano/acetato de etila 45:55. Esta purificação levou ao isolamento do produto de biotransformação (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (**89**, 4,1 mg, 2,73% de bioconversão), puro .

Subgrupos 4 e 5

Os grupos 4 e 5 (5,6 mg) também foram reunidos com base em seus espectros similares de RMN de ^{1}H e purificados por CLAE em coluna analítica (1mg/1mL), usando hexano/acetato de etila 55:45. O produto de biotransformação (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (**90**, 3,3 mg, 2,2% de bioconversão) foi isolado puro.

Subgrupos 6 e 7

Os grupos 6 e 7 (8,4 mg) também foram reunidos, com base em seus espectros similares de RMN de ^{1}H, e purificados por CLAE em coluna analítica (1mg/1mL), usando hexano/acetato de etila 60:40. Os produtos de

biotransformação (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (**90**, 3,1 mg, 2,06% de bioconversão) e (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (**93**, 0,9 mg, 0,6% de bioconversão) foram isolados em suas formas puras.

Subgrupo 8

O material deste grupo apresentou-se como um material viscoso, cuja análise por CCDS (acetato/metanol 9,5:0,5, revelação com "óleo") indicou estar puro. Por RMN de ^{1}H foi possível identificá-lo como sendo o (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6, 8, 9-triol (**91**, 12,9 mg, 8,6% de bioconversão).

Os demais grupos e subgrupos apresentaram-se como mistura complexas, por CCDS e não foram trabalhados.

3.3.3.2 Purificação do resíduo obtido com nove dias de fermentação de 80

O resíduo (305,7 mg) obtido com nove dias de biotransformação do substrato **80**, foi submetido a fracionamento cromatográfico com sílica gel, sendo utilizado o mesmo sistema de eluentes descrito para cinco dias. Foram obtidas 166 frações de aproximadamente 5 mL cada, (Tabela 31), que foram reunidas por CCDS em grupos (Tabela 32, p.202).

Tabela 31 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato **80** por *B. cinerea*

Eluentes	Frações
Hexano / acetato de etila (7:3)	1 – 34
Hexano / acetato de etila (1:1)	35 – 68
Hexano / acetato de etila (2:8)	69 – 121
Acetato de etila / metanol (8:2)	122 – 157
Acetato de etila / metanol (1:1)	158 - 166

Tabela 32 – Reunião das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato **80** por *B. cinerea*, de acordo com comportamento por CCDS

Grupo	Frações	Massa (mg)
1	1 – 6	3,8
2	7 – 20	50,9
3	21 – 30	5,9
4	32 – 45	6,4
5	46 – 59	9,3
6	60 – 71	32,6
7	72 – 86	42,3
8	87 – 114	11,4
9	115 – 128	6,2
10	129 – 133	12,6
11	134 – 139	13,8
12	140 – 142	15,7
13	143 – 157	15
14	158 – 166	39,2

As frações trabalhadas foram aquelas que mostraram, por CCDS, a presença de produtos diferentes daqueles presentes no resíduo do controle do fungo.

Grupo 7

O material deste grupo (42,3 mg) apresentou-se como um sólido branco que, por comparação com um padrão do material de partida por CCDS (hexano/acetato de etila 8:2, revelação com “óleo”) e análise do espectro de RMN de ^{1}H foi identifiado como sendo material de partida **80**.

Grupo 9

O material deste grupo foi purificado por CLAE usando-se uma coluna analítica (1mg/1mL) e hexano/acetato de etila 45:55 como eluente. Esta

purificação levou ao isolamento do produto de biotransformação (2*R*,5*S*,8*R*,9R)-isocariolan-5, 8, 9-triol (**92**, 2,2 mg, 1,22% de bioconversão), puro .

Grupo 10

Este grupo (12,6 mg) foi purificado por CLAE (coluna analítica, 1mg/1mL), utilizando-se hexano/acetato de etila 45:55. Foram isolados os produtos de biotransformação: (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (**89**, 5,4 mg, 3 % de bioconversão) e (2*R*,5*S*,8*R*,9R)-isocariolan-5, 8, 9-triol (**92**, 2,1 mg, 1,17% de bioconversão).

Grupo 11

O material deste grupo foi purificado por CLAE em coluna analítica (1mg/1mL), usando o eluente hexano/acetato de etila 45:55. Esta purificação levou ao isolamento dos produtos de biotransformação (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (**90**, 3,2 mg, 1,7% de bioconversão), (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (**89**, 3,4 mg, 1,8 % de bioconversão), (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (**93**, 2,1 mg, 1,2% de bioconversão), puros .

Grupos 12 e 13

O material destes grupos apresentou-se como um material viscoso, cuja análise por CCDS (acetato/metanol 9,5: 0,5, revelação com “óleo”) indicou estar puro. Por RMN de ^{1}H foi possível identificá-lo como sendo o (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (**91**, 21,4 mg, 11,8% de bioconversão).

3.3.4 Biotransformação do isocariolan-9*α*-ol (82) por *Botrytis cinerea*

O substrato **82** foi submetido a dois experimentos de biotransformação, sob agitação orbital, um com duração de cinco dias (100 mg, 5 erlenmeyers) e outro com duração nove dias (200 mg, 10 erlenmeyers), após a adição do substrato no meio de cultura. A metodologia utilizada para biotransformar este composto esta descrita no item 3.3.1.2.1, p.192.

3.3.4.1 Purificação do resíduo obtido com cinco dias de fermentação de 82

O resíduo (112,5 mg) obtido após cinco dias de fermentação foi submetido à cromatografia em sílica gel (26,5 mg, Φ= 1,8 cm). Foram obtidas 216 frações de aproximadamente 5 mL cada, sendo utilizados, como eluentes, hexano, acetato de etila e metanol, sozinhos ou em misturas binárias, com gradiente crescente de polaridade (Tabela 33). As frações foram reunidas mediante a análise por CCDS utilizando-se como sistema eluente hexano/acetato de etila (9,5:0,5 até 100%, v/v) e "óleo" como revelador (Tabela 34, p.205).

Tabela 33 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato **82**

Eluentes	Frações
Hexano / acetato de etila (9,5:0,5)	1 – 66
Hexano / acetato de etila (8,5:1,5)	64 – 101
Hexano / acetato de etila (7:3)	102 – 155
Hexano / acetato de etila (1:1)	156 – 181
Hexano / acetato de etila (2:8)	182 – 211
Metanol 100%	212 – 216

Tabela 34 – Reunião em grupos das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato **82**, de acordo com comportamento em CCDS

Grupo	Frações	Massa (mg)
1	1 – 26	9,4
2	27 – 40	11,9
3	41 – 97	7,6
4	98 – 119	20,6
5	120 – 136	4,9
6	137 – 157	4,1
7	158 – 166	1,7
8	167 – 171	2,1
9	172 – 176	1,4
10	177-183	1,5
11	184 – 187	2,6
12	188 – 193	2,2
13	194-195	1,2
14	196 – 202	7,1
15	203 – 210	4,9
16	211 - 216	10,7

As frações trabalhadas foram aquelas que mostraram, por CCDS, a presença de produtos diferentes daqueles presentes no resíduo do controle do fungo.

Grupo 4

O material deste grupo (20,6 mg) apresentou-se como um sólido branco que, por comparação com um padrão do material de partida, por CCDS (hexano/acetato de etila 8:2, revelação com “óleo”) e RMN de ^{1}H foi possível identificar como sendo material de partida **82**.

Grupos 7, 8, 9 e 10

O material destes grupos (6,7 mg) foram reunidos por apresentarem espectros similares de RMN de ^{1}H. Este material foi purificado por CLAE em coluna analítica (1mg/1mL) e hexano/acetato de etila 20:80 como eluente. Esta metodologia resultou no isolamento produto de biotransformação **94** (1,6 mg, 1,6% de bioconversão), puro.

Grupo 12 e 13

Estes grupos foram reunidos (3,2 mg) por apresentarem espectros de RMN de ^{1}H similares. Este material também foi purificado por CLAE, nas mesmas condições descritas anteriormente. Esta metodologia resultou na purificação do produto de biotransformação **95** (1,5 mg, 1,5% de bioconversão), puro.

Grupo 14

Esta fração, impura, foi submetida à CLAE preparativa (mesmas condições descritas acima), levando ao isolamento de **96** (1,1 mg, 1,1% de bioconversão) e **80** (4,5 mg), puros.

Grupo 15

O material deste grupo (4,9 mg) apresentou-se como um sólido branco, puro por CCDS (hexano/acetato de etila 2:8, revelação com “óleo”). A análise do espectro de RMN de ^{1}H mostrou ser, este material, uma quantidade adicional de **80** (4,9 mg, 4,9 % de bioconversão total).

3.3.4.2 Purificação do resíduo obtido com nove dias de fermentação de 82

O resíduo (246,5 mg), obtido com nove dias de biotransformação do substrato **82**, foi submetido a fracionamento cromatográfico com sílica gel, utilizando como sistema eluente o mesmo utilizado para o fracionamento do resíduo com cinco dias, resultando na obtenção de **210** frações (Tabela 35, p.

207), que foram reunidas por análise por CCDS (eluentes: hexano:acetato de etila), levando a 17 grupos de frações (Tabela 36, p. 208).

Tabela 35 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato **82**

Eluentes	Frações
Hexano / acetato de etila (9,5:0,5)	1-28
Hexano / acetato de etila (8,5:1,5)	29 -73
Hexano / acetato de etila (7:3)	74 – 98
Hexano/ acetato de etila (1:1)	99 -123
Hexano/ acetato de etila (2:8)	124 -156
Acetato de etila/metanol (8:2)	157 - 189
Metanol 100%	190 – 210

Tabela 36 – Reunião em grupos das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato **82**, de acordo com comportamento em CCDS

Grupo	Frações	Massa (mg)
1	1 – 26	18,8
2	27 – 38	34,3
3	39 – 57	15,2
4	58 – 85	14,3
5	86 - 100	13,5
6	101 - 110	8,4
7	111 - 118	11
8	119 - 125	6,4
9	126 -133	11,6
10	134 - 138	6,7
11	139 - 145	3,4
12	146 - 151	6,8
13	152 - 157	13,5
14	158 – 166	10,5
15	167 - 171	6,6
16	172 - 192	9,9
17	193 - 210	6,6

As frações trabalhadas foram aquelas que mostraram, por CCDS, a presença de produtos diferentes daqueles presentes no resíduo do controle do fungo.

Grupo 2

O material deste grupo (34,3 mg) apresentou-se como um sólido branco, que por comparação com um padrão do material de partida, por CCDS (hexano/acetato de etila 8:2, revelação com “óleo”) e RMN de ^{1}H foi possível identificar como sendo material de partida **82**.

Grupo 6

O material deste grupo (8,4 mg) foi purificado por CLAE em coluna analítica (1mg/1mL) e hexano/acetato de etila 20:80 como eluentes. Esta metodologia resultou no isolamento produto de biotransformação **94** (3,2 mg, 1,6% de bioconversão) puro.

Grupo 9

Este grupo foi purificado por CLAE, nas mesmas condições descritas acima. Esta metodologia resultou na purificação do produto de biotransformação **95** (5,6 mg, 2,8% de bioconversão) puro.

Grupo 10

Esta fração, impura, foi submetida à CLAE (nas condições já descritas acima), levando ao isolamento de **96** (3,6 mg, 1,8% de bioconversão).

Grupos 11 e 12

O material destes grupos (10,2 mg) apresentou-se como um sólido branco, puro por CCDS (hexano/acetato de etila 2:8, revelação com “óleo”). A análise do espectro de RMN de ^{1}H mostrou ser este material uma quantidade adicional de **80** (10,2 mg, 5,1 % de bioconversão total).

3.3.5 Biotransformação de 1R, 2S, 5R, 8S-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (83) por *Botrytis cinerea*

O substrato **83** foi submetido a duas fermentações no modo estático, uma com duração de cinco dias (150mg, 10 garrafas) e nove dias (180 mg, 12 garrafas), após a adição do substrato no meio de cultura. A metodologia utilizada este composto foi descrita no item 3.3.1.2.2, p. 192.

3.3.5.1 Purificação do resíduo obtido com cinco dias de fermentação de 83

O resíduo (240 mg) obtido após cinco dias de fermentação foi submetido à cromatografia em sílica gel (33 g, Φ= 2 cm). Foram obtidas 169 frações de aproximadamente 8 mL cada, sendo utilizados, como eluentes, hexano, acetato de etila e metanol, sozinhos ou em misturas binárias, com gradiente crescente de polaridade (Tabela 37). As frações foram reunidas mediante a análise por CCDS utilizando-se como eluentes hexano/acetato de etila (80:20 – 30:70) e "óleo" como revelador (Tabela 38, p. 211).

Tabela 37 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato **83**

Eluentes	Frações
Hexano / acetato de etila (7:3)	1 – 53
Hexano / acetato de etila (1:1)	54 – 109
Hexano / acetato de etila (2:8)	110 – 144
Acetato de etila	145 – 154
Acetato de etila/metanol (1:1)	155 – 161
Metanol	162 – 169

Tabela 38 – Reunião em grupos das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após cinco dias de fermentação do substrato **83**, de acordo com comportamento em CCDS

Grupo	Frações	Massa (mg)
1	1 – 10	6,6
2	11 – 21	70,9
3	22 – 34	2,5
4	35 – 51	17,2
5	52 – 82	8,7
6	83 – 90	4,4
7	91 – 95	3,5
8	96 – 106	5,7
9	107 – 116	1,6
10	118 – 123	2,4
11	124 – 137	4,2
12	138 – 150	2,8
13	151 – 155	6,8
14	156 – 161	6,3
15	162 – 169	24,5

As frações trabalhadas foram aquelas que mostraram, por CCDS, a presença de produtos diferentes daqueles presentes no resíduo do controle do fungo.

Grupo 2

O material deste grupo apresentou-se como um sólido branco, que foi identificado como sendo material de partida **83**, por comparação com um padrão do material de partida, por CCDS (hexano/acetato de etila 8:2, revelação com "óleo") e análise do espectro de RMN de ^{1}H.

Grupo 10

O material deste grupo apresentou-se como um material viscoso, cujas análises por CCDS (hexano/acetato de etila 3:7, revelação com "óleo") e RMN de ^{1}H mostraram ser um produto novo de biotransformação, **97** (2,4 mg, 1,6% de bioconversão total).

Grupo11

O material deste grupo apresentou-se como um material viscoso, cujas análises por CCDS (hexano/acetato de etila 3:7, revelação com "óleo") e por RMN de ^{1}H mostrou ser o produto **97**, já isolado do grupo 10, puro (4,2 mg, 4,4% de bioconversão total).

Grupo 14

A análise por CCDS (hexano/acetato de etila 0,5:95) mostrou estar, esta fração, muito impura, sendo ela então purificada por CLAE em coluna analítica (1mg/1mL), com hexano/acetato de etila 70:30. Foram isolados, na sua forma pura, os seguintes produtos: **98** (0,6 mg, 0,4% de bioconversão), **99** (0,9 mg, 0,6% de bioconversão) e **100** (1,2 mg, 0,8% de bioconversão).

3.3.5.2 Purificação do resíduo obtido com nove dias de fermentação de 83

O resíduo (267,3 mg) obtido após nove dias de fermentação foi submetido à cromatografia em sílica gel (45 g, Φ= 2,5 cm). Foram obtidas 252 frações de aproximadamente 8 mL cada, sendo utilizados, como eluentes, hexano, acetato de etila e metanol, sozinhos ou em misturas binárias, com gradiente crescente de polaridade (Tabela 39, p. 213). As frações foram reunidas mediante análise por CCDS utilizando-se, como eluentes, hexano/acetato de etila (80:20 e 30:70) e "óleo" como revelador (Tabela 40, p. 213).

Tabela 39 – Fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato **83**

Eluentes	Frações
Hexano / acetato de etila (7:3)	1 – 70
Hexano / acetato de etila (1:1)	71 – 131
Hexano / acetato de etila (2:8)	132 – 170
Acetato de etila	172 – 184
Acetato de etila / metanol (9,5:0,5)	185 – 193
Acetato de etila / metanol (9:1)	194 – 209
Acetato de etila / metanol (8:2)	210 – 232
Acetato de etila / metanol (1:1)	234 -240
Metanol	241 – 252

Tabela 40 – Reunião em grupos das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do resíduo obtido após nove dias de fermentação do substrato **83**, de acordo com comportamento em CCDS

Grupo	Frações	Massa (mg)
1	1 – 6	10,4
2	7 - 14	41,3
3	15 - 33	13
4	34 - 88	41,6
5	89 - 110	12
6	111 - 128	8,1
7	129 - 159	22,9
8	160 - 163	3,5
9	164 - 167	4,8
10	168 – 175	9,2
11	176 – 181	4,5
12	182 – 200	7,1
13	201 – 215	14,4
14	216 - 221	14
15	222 – 230	7,2
16	232 - 252	21,8

As frações trabalhadas foram aquelas que mostraram, por CCDS, a presença de produtos diferentes daqueles presentes no resíduo do controle do fungo.

Grupo 2

O material deste grupo apresentou-se como um sólido branco, que foi identificado como sendo material de partida **83**, por comparação com um padrão do material de partida por CCDS (hexano/acetato de etila 8:2, revelação com "óleo") e análise do espectro de RMN de ^{1}H.

Grupos 8 e 9

Os materiais destes grupos apresentaram-se viscosos, cujas análises por CCDS (hexano/acetato de etila 3:7, revelação com "óleo") e RMN de ^{1}H mostraram ser o produto de biotransformação, **97** (8 mg, 4,4 de bioconversão total).

Grupos 10 e 11

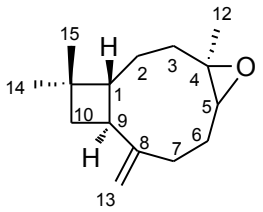
Os materiais destes grupos também apresentaram-se viscosos, sendo que as análises por CCDS (hexano/acetato de etila 3:7, revelação com "óleo") e por RMN de ^{1}H mostraram ser o produto **97**, já isolado acima (14 mg, 12,2% de bioconversão total).

Grupo 15

A análise por CCDS (hexano/acetato de etila 0,5:95) mostrou estar esta fração muito impura, sendo então purificada por CLAE em coluna analítica (1mg/1mL), com hexano/acetato de etila 70:30. Foram isolados, na sua forma pura, os seguintes produtos: **98** (1,2 mg, 0,6% de bioconversão), **99** (0,5 mg, 0,3% de bioconversão) e **100** (1,6 mg, 0,8% de bioconversão).

3.4 Dados físico-químicos

4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno (11)



FM/MM: $C_{15}H_{24}O$ / 220 g/mol

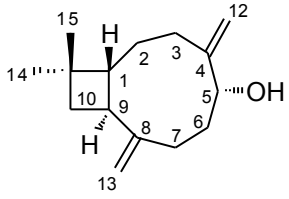
Aspecto físico: sólido.

Faixa de fusão: 108 – 110°C[39]

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 1,75 (t, *J*=10,0 Hz, 1H, H-1β); 1,39 – 1,47 (m, 1H, H-2); 1,58 – 1,69 (m, 1H, H-2´); 0,92 -1,00 (m, 1H, H-3); 2,05 – 2,13 (m, 1H, H-3´); 2,88 (dt, *J*=4,4, 10,6 Hz, 1H, H-5); 1,27 – 1,37 (m, 1H, H-6); 2,24 (ddd, *J*=4,2, 8,1, 16,8 Hz, 1H, H-6´); 2,05 – 2,13 (m, 1H, H-7); 2,32 (ddd, *J*=4,4, 8,2, 12,6 Hz, 1H, H-7´); 2,62 (dt, *J*=9,6, 18,4 Hz, 1H, H-9α); 1,63 (t, *J*=10,8 Hz, 1H, H-10); 1,67 (dd, *J*=8,4, 10,6 Hz, 1H, H-10´); 1,20 (s, 3H, H-12); 4,86 (s, 1H, H-13); 4,96 (s, 1H, H-13´); 1,00 (s, 3H, H-14); 0,98 (s, 3H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 50,72 (C-1); 27,18 (C-2); 39,12 (C-3); 59,82 (C-4); 63,73 (C-5); 30,16 (C-6); 29,76 (C-7); 151,79 (C-8); 48,70 (C-9); 39,73 (C-10); 33,94 (C-11); 16,97 (C-12); 112,73 (C-13); 21,60 (C-14); 29,86 (C-15).

5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (77)



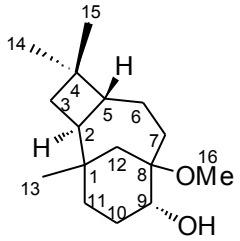
FM/MM: $C_{15}H_{24}O$ / 220 g/mol

Aspecto físico: oleoso.

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 1,51 – 2,05 (m, 7H, H-1β, H-2, H-2´, H-3, H-6, H-6´, H-7); 2,48 – 2,54 (m, 1H, H-3´); 4,09 (dd, *J*=3,2, 9,0 Hz, 1H, H-5); 2,26 -2,39 (m, 1H, H-7´); 2,26 – 2,34 (m, 1H, H-9α); 1,51 – 2,05 (m, 1H, H-10); 1,51 – 2,05 (m, 1H, H-10´); 4,76 (s, 1H, H-12); 4,78 (s, 1H, H-12´); 4,95 (s, 1H, H-13); 5,04 (s, 1H, H-13´); 0,97 (s, 6H, H-14, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 55,23 (C-1); 38,07 (C-2); 32,79 (C-3); 150,83 (C-4); 74,21 (C-5); 32,44 (C-6); 32,88 (C-7); 152,89 (C-8); 43,95 (C-9); 30,78 (C-10); 32,94 (C-11); 113,74 (C-12); 110,11 (C-13); 30,02 (C-14); 21,97 (C-15).

(8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (78)



FM/MM: $C_{16}H_{28}O_2$ / 252 g/mol

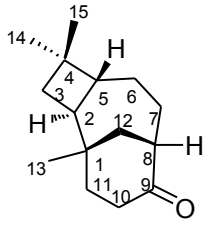
Aspecto físico: oleoso.

IV (KBr, $\nu_{máx.}$, cm^{-1}): 3425, 2910, 1326, 1018, 542.

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 2,06 (dt, *J*=11,2, 11,2, 8,4 Hz, 1H, H-2α); 1,45 (t, *J*=8,9 Hz, 1H, H-3α); 1,27 (t, *J*=10,8 Hz, 1H, H-3β); 1,67 –1,74 (m, 1H, H-5β); 1,49 –1,58 (m, 1H, H-6α); 1,60 – 1,68 (m, 1H, H-6β); 1,49 –1,58 (m, 1H, H-7α); 1,84 – 1,92 (m, 1H, H-7β); 3,57 (dd, *J*=11,6, 5,6 Hz, 1H, H-9β); 1,75 – 1,82 (m, 1H, H-10α); 1,75 – 1,82 (m, 1H, H-10β); 1,20 (dt, *J*=13,2, 5,6 Hz, 1H, H-11α); 1,35 – 1,40 (m, 1H, H-11β); 1,84 – 1,92 (m, 1H, H-12a); 0,89 (d, *J*=13,2 Hz, 1H, H-12b); 0,80 (s, 3H, H-13); 0,96 (s, 3H, H-14); 0,97 (s, 3H, H-15); 3,23 (s, 3H, H-16).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 32,91 (C-1); 36,61 (C-2); 35,58 (C-3); 34,99 (C-4); 44,04 (C-5); 21,72 (C-6); 28,95 (C-7); 80,43 (C-8); 76,38 (C-9); 27,46 (C-10); 36,71 (C-11); 42,06 (C-12); 26,27 (C-13); 20,90 (C-14); 30,73 (C-15); 49,21 (C-16).

Isocariolan-9-ona (79)



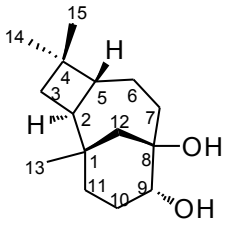
FM/MM: $C_{15}H_{24}O$ / 220 g/mol

Aspecto físico: oleoso.

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 2,22 – 2,28 (m, 2H, H-2α, H-5β); 1,51 – 1,56 (m, 2H, H-3α, H-3β); 1,30 (dq, *J*=5,2, 12,8 Hz, 1H, H-6α); 1,41 – 1,48 (m, 1H, H-6β); 1,00 – 1,18 (m, 2H, H-7α, H-7β); 2,36 – 2,51 (m, 1H, H-8); 2,36 – 2,51 (m, 2H, H-10α, H-10β); 1,41 – 1,48 (m, 2H, H-11α, H-11β), 1,70 (dd, *J*=3,2, 14,0 Hz, 1H, H-12a), 2,01 (dd, *J*=8,8, 14,0 Hz, 1H, H-12b), 0,87 (s, 3H, H-13), 0,91 (s, 3H, H-14), 0,95 (s, 3H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 31,64 (C-1), 41,96 (C-2), 36,62 (C-3), 32,90 (C-4), 46,22 (C-5), 25,52 (C-6), 29,79 (C-7), 44,80 (C-8), 215,74 (C-9), 35,82 (C-10), 41,16 (C-11), 36,61 (C-12), 25,97 (C-13), 21,75 (C-14), 30,50 (C-15).

(8*R*, *9R)*-isocariolan-8,9-diol (80)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O_2$ / 238 g/mol

Aspecto físico: sólido.

Faixa de fusão: 115 – 117°C[34]

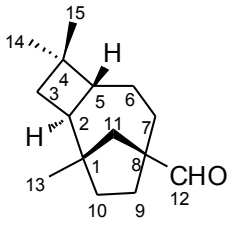
IV (KBr, $\nu_{máx.}$, cm^{-1}): 3391, 2946, 2864, 1458, 1060, 756.

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 1,94 – 2,06 (m, 1H, H-2α); 1,46 (dd, *J*=9,6, 8,0 Hz, 1H, H-3α); 1,25 – 1,28 (m, H-3β); 1,62 –1,70 (m, 1H, H-5β); 1,56 –1,61 (m, 1H, H-6α); 1,31 – 1,42 (m, 1H, H-6β); 1,94 – 2,06 (m, 1H, H-7α); 1,31 – 1,42 (m, 1H,

H-7β); 3,48 (dd, *J*=11,6, 5,6 Hz, 1H, H-9β); 1, 76 – 1,84 (m, 2H, H-10α, H-10β); 1,23 (dt, *J*=13,2, 4,8 Hz, 1H, H-11α); 1,31 – 1,42 (m, 1H, H-11β); 1,73 (dd, *J*=12,8, 2,8 Hz, 1H, H-12a); 1,00 (d, *J*=13,8 Hz, 1H, H-12b); 0,78 (s, 3H, H-13); 0,96 (s, 3H, H-14); 0,97 (s, 3H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 33,21 (C-1), 37,76 (C-2), 35,78 (C-3), 34,84 (C-4), 45,03 (C-5), 20,66 (C-6), 32,56 (C-7), 76,70 (C-8), 79,11 (C-9), 28,43 (C-10), 37,47 (C-11), 48,08 (C-12), 25,97 (C-13), 20,67 (C-14), 30,60 (C-15).

(1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}] undecano-8-carbaldeído (81)



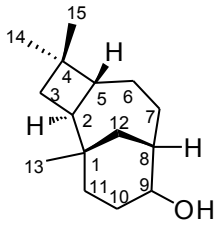
FM/MM: $C_{15}H_{24}O$ / 220 g/mol

Aspecto físico: oleoso

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 1,58 -1,62 (m, 1H, H-2α); 1,34 – 1,37 (m, 1H, H-3α); 1,52 -1,54 (m, 1H H-3β); 1,47 – 1,52 (m, 1H, H-5β); 1,37 – 1,41 (m, 1H, H-6α); 1,60 – 1,64 (m, 1H, H-6β); 1,58 – 1,62 (m, 1H, H-7α); 1,79 (dd, *J*=8,8, 14,4 Hz, 1H, H-7β); 1,28 – 1,32 (m, 1H, H-9α); 1,68 – 1,70 (m, 1H, H-9β); 1, 38 – 1,41 (m, 2H, H-10α, H-10β); 1,65 - 1,69 (m, 1H, H-11α); 1,40 – 1,43 (m, 1H, H-11β); 9,4 (s, 2H, H-12); 0,94 (s, 3H, H-13); 0,98 (s, 6H, H-14, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 34,22 (C-1); 46,67 (C-2); 37,33 (C-3); 42,23 (C-4); 50,13 (C-5); 31,23 (C-6); 28,15 (C-7); 56,98 (C-8); 25,93 (C-9); 45,52 (C-10); 47,78 (C-11); 204,53 (C-12); 31,90 (C-13); 22,32 (C-14); 20,67 (C-15).

Isocariolan-9α-ol (82)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O$ / 222 g/mol

Aspecto físico: sólido.

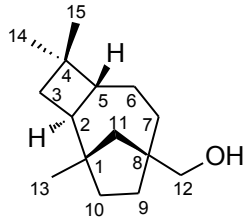
Faixa de fusão: 129 – 132°C[41]

IV (KBr, $\nu_{máx.}$, cm^{-1}): 3291, 2911, 1458, 1053, 720.

RMN de ^1H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 2,04 – 2,11 (m, 1H, H-2α); 1,46 (dd, *J*=9,6, 7.6 Hz, 1H, H-3α);1,27 (t, *J*=10,6 Hz, 1H, H-3β);1,61 – 1,70 (m, 1H, H-5β); 1,34 – 1,42 (m, 1H, H-6α); 1,50 –1,57 (m, 1H, H-6β); 1,71 – 1,75 (m, 2H, H-7α, H-7β); 2,04 – 2,11 (m, 1H, H-8); 3,71 (td, *J*=11,6, 5,6, 5,6 Hz, 1H, H-9β); 1, 61 – 1,70 (m, 1H, H-10α); 1,75 – 1,85 (m, 1H, H-10β); 1,18 (dt, *J*=13,2, 4,4 Hz, 1H, H-11α); 1,34 – 1,42 (m, 1H, H-11β); 1,61 – 1,70 (m, 1H, H-12a); 1,04 (dd, *J*=14,4, 4,4 Hz, 1H, H-12b); 0,73 (s, 3H, H-13); 0,97 (s, 3H, H-14); 0,96 (s, 3H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 31,37 (C-1); 39,51 (C-2); 36,06 (C-3); 34,34 (C-4); 46,16 (C-5); 24,23 (C-6); 24,35 (C-7); 38,32 (C-8); 73,16 (C-9); 27,88 (C-10); 38,41 (C-11); 40,26 (C-12); 26,39 (C-13); 20,62 (C-14); 30,61 (C-15).

(1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undecano (83)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O$ / 222 g/mol

Aspecto físico: sólido

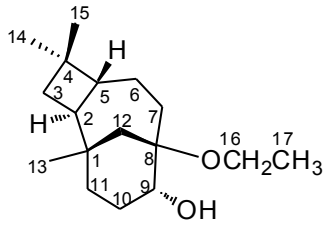
Faixa de fusão: 110 – 128°C[34]

IV (KBr, $\nu_{máx.}$, cm^{-1}): 3350, 2923, 2859, 1458, 1034, 557.

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 1,53 -1,57 (m, 1H, H-2α); 1,50 – 1,53 (m, 1H, H-3α); 1,26 -1,29 (m, 1H H-3β); 1,47 – 1,50 (m, 1H, H-5β); 1,26 – 1,29 (m, 1H, H-6α); 1,57 – 1,60 (m, 1H, H-6β); 1,20 – 1,27 (m, 1H, H-7α); 1,41 – 1,45 (m, 1H, H-7β); 1,31 – 1,33 (m, 1H, H-9α); 1,47 -1,50 (m, 1H, H-9β); 1,35 – 1,38 (m, 2H, H-10α, H-10β); 1,63 (d, *J*=12,2 Hz, 1H, H-11α); 1,03 (d, *J*=12,2 Hz, 1H, H-11β); 3,32 (s, 2H, H-12); 0,88 (s, 3H, H-13); 0,960 (s, 3H, H-14); 0,964 (s, 3H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 41,13 (C-1); 46,11 (C-2); 37,19 (C-3); 33,38 (C-4); 49,10 (C-5); 25,67 (C-6); 34,03 (C-7); 47,54 (C-8); 28,46 (C-9); 45,18 (C-10); 47,78 (C-11); 73,77 (C-12); 22,35 (C-13); 20,41 (C-14); 30,49 (C-15).

(8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (84)



FM/MM: $C_{17}H_{30}O_2$ / 266 g/mol

Aspecto físico: oleoso

[α]$^{25}_{D}$ -2,3 (c 0,38, $CHCl_3$)

IV (KBr, $\nu_{máx.}$, cm^{-1}): 3437, 2943, 1456, 1072, 559.

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 2,01 - 2,09 (m, 1H, H-2α); 1,42 (t, *J*=9,6 Hz, 1H, H-3α); 1,25 (t, *J*=10 Hz, 1H, H-3β); 1,62 –1,71 (m, 1H, H-5β); 1,47- 1,55 (m, 2H, H-6α, H-7α); 1,57 - 1,61 (m, 1H, H-6β); 1,83 - 1,91(m, 1H, H-7β); 3,53 (dd, *J*=11,6, 6,0 Hz, 1H, H-9β); 1,73 -1,81(m, 1H, H-10α,10β); 1,19 (dt, *J*=12,8, 4,4 Hz, 1H, H-11α); 1,33 -1,37 (m, 1H, H-11β); 1,83 -1,91 (m, 1H, H-12a); 0,89 (d, *J*=13,2 Hz, 1H, H-12b); 0,77 (s, 3H, H-13); 0,94 (s, 3H, H-14); 0,94 (s, 3H, H-15); 3,36-3,49 (m, 2H, H-16, H-16´); 1,10 (t, *J*=7,2 Hz, 3H, H-17).

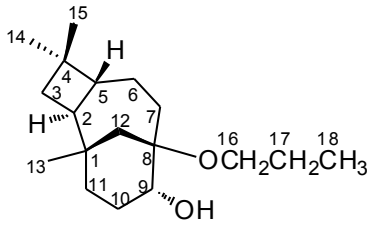
RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 32,98 (C-1); 36,73 (C-2); 35,70 (C-3); 35,05 (C-4); 44,14 (C-5); 21,90 (C-6); 29,47 (C-7); 80,47 (C-8); 76,98 (C-9); 27,37 (C-

10); 36,82 (C-11); 42,93 (C-12); 26,41 (C-13); 21,02 (C-14); 30,85 (C-15), 56,51 (C-16), 16,59 (C-17).

EM: 266 [M^+], 220 [$M-OCH_2CH_3]^+$, 207 [$M-OC_3H_6]^+$.

EMAR: 266,2249 [M^+] calc. 266,2246.

(8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (85)



FM/MM: $C_{18}H_{32}O_2$ / 280 g/mol

Aspecto físico: oleoso

[α] $^{25}_{D}$ – 4,4 (c 0,34, $CHCl_3$).

IV (KBr, $\nu_{máx.}$, cm^{-1}):3435, 2947, 1458, 1078, 559.

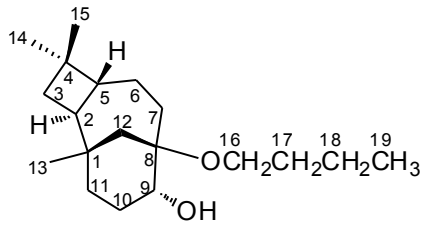
RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 2,03 -2,11 (m, 1H, H-2α); 1,42 -1,47 (m, 1H, H-3α); 1,27 (t, *J*=10,4 Hz, 1H, H-3β); 1,66 -1,74 (m, 1H, H-5β); 1,46 -1,53 (m, 2H, H-6α, H-7α); 11,55 -1,64 (m, 1H, H-6β); 1,83 -1,92 (m, 2H, H-7β, H-12a); 3,54 (dd, *J*=11,0, 5,6 Hz, 1H, H-9β); 1,75 -1,82 (m, 1H, H-10α,10β); 1,21 (dt, *J*=13,0, 5,2 Hz, 1H, H-11α); 1,34 -1,40 (m, 1H, H-11β); 0,86 -0,91 (m, 1H, H-12b); 0,79 (s, 3H, H-13); 0,95 (s, 3H, H-14); 0,96 (s, 3H, H-15); 3,27 -3,39 (m, 2H, H-16, H-16´); 1,46 -1,53 (m, 2H, H-17), 0,88 (t, *J*=7,6 Hz, 1H, H-18).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 32,82 (C-1); 36,56 (C-2); 35,51 (C-3); 34,87 (C-4); 43,95 (C-5); 21,69 (C-6); 29,28 (C-7); 79,85 (C-8); 76,85 (C-9); 27,08 (C-10); 36,64 (C-11); 42,69 (C-12); 26,23 (C-13); 20,83 (C-14); 30,66 (C-15); 62,67 (C-16); 23,92 (C-17); 10,77 (C-18).

EM: 280 [M^+], 221 [$M-OCH_2CH_2CH_3]^+$.

EMAR: 280,2386 [M+] calc. 280,2402.

(8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (86)



FM/MM: $C_{19}H_{34}O_2$ / 294 g/mol

Aspecto físico: oleoso

$[\alpha]^{25}_D$ – 4,8 (c 0,41, $CHCl_3$).

IV (KBr, $v_{máx.}$, cm^{-1}): 3334, 2945, 1458, 1080, 559.

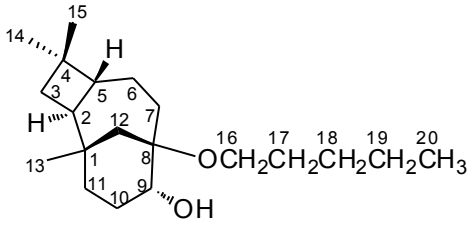
RMN de ^1H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 2,02 -2,11 (m, 1H, H-2α); 1,41 -1,51 (m, 3H, H-3α, 6α, H-7α); 1,26 (t, *J*=10,0 Hz, 1H, H-3β); 1,53 -1,67 (m, 1H, H-5β); 1,53 -1,67 (m, 1H, H-6β); 1,81 -1,91 (m, 1H, H-7β); 3,54 (dd, *J*=11,2, 6,0 Hz, 1H, H-9β); 1,68 -1,80 (m, 1H, H-10α,10β); 1,19 (dt, *J*=12,8, 5,2 Hz, 1H, H-11α); 1,30 -1,37 (m, 1H, H-11β); 1,81 -1,91 (m, 1H, H-12a); 0,87 - 0,91 (m, 1H, H-12b); 0,78 (s, 3H, H-13); 0,95 (s, 3H, H-14); 0,95 (s, 3H, H-15); 3,31 -3,43 (m, 2H, H-16, H-16´); 1,41 -1,51 (m, 2H, H-17); 1,30- 1,37(m, 2H, H-18); 0,89 (t, *J*=7,2 Hz, 3H, H-19).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 32,85 (C-1); 36,55 (C-2); 35,51 (C-3); 34,88 (C-4); 43,94 (C-5); 21,70 (C-6); 29,28 (C-7); 79,95 (C-8); 27,08 (C-9); 27,08 (C-10); 36,63 (C-11); 42,66 (C-12); 26,23 (C-13); 20,83 (C-14); 30,66 (C-15); 60,68 (C-16); 32,85 (C-17); 19,46 (C-18); 13,95 (C-19).

EM: 294 $[M^+]$, 236 $[M-H_2O]^+$.

EMAR: 294,2592 [M+] calc. 294,2559.

(8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (87)



FM/MM: $C_{20}H_{36}O_2$ / 308 g/mol

Aspecto físico: oleoso

[α] $^{25}_{D}$ – 2,2 (c 0,49, $CHCl_3$).

IV (KBr, $\nu_{máx.}$, cm$^{-1)}$:3433, 2940, 1457, 1085, 560.

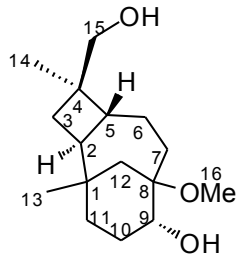
RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 2,02 -2,10 (m, 1H, H-2α); 1,42 -1,51 (m, 2H, H-3α, H-6α); 1,23 -1,29 (m, 1H, H-3β); 1,66 -1,74 (m, 1H, H-5β); 1,52 -1,63 (m, 1H, H-6β); 1,42 -1,51 (m, 1H, H-7α); 1,83 -1,91 (m, 2H, H-7β, H-12a); 3,55 (dd, *J*=11,2, 6,0 Hz, 1H, H-9β); 1,76 -1,81 (m, 1H, H-10α,10β); 1,20 (dt, *J*=13,0, 5,2 Hz, 1H, H-11α); 1,32 -1,39 (m, 1H, H-11β); 0,85 - 0,89 (m, 1H, H-12b); 0,78 (s, 3H, H-13); 0,95 (s, 3H, H-14); 0,96 (s, 3H, H-15); 3,29 -3,42 (m, 2H, H-16, H-16´); 1,42 -1,51 (m, 2H, H-17); 1,23 - 1,29 (m, 2H, H-18); 1,27 – 1,32 (m, 2H, H-19); 0,85 – 0,89 (m, 3H, H-19).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 32,81 (C-1); 36,55 (C-2); 35,51 (C-3); 34,87 (C-4); 43,94 (C-5); 21,71 (C-6); 29,28 (C-7); 79,97 (C-8); 76,83 (C-9); 27,09 (C-10); 36,63 (C-11); 42,67 (C-12); 26,23 (C-13); 20,83 (C-14); 30,65 (C-15); 61,03 (C-16); 30,44 (C-17); 28,50 (C-18); 22,56 (C-19); 14,06 (C-20).

EM: 308 [M^+], 221 [$M - OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_3]^+$.

EMAR: 308,2733 [M+] calc. 308,2715

(4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9,15-diol (88)



FM/MM: $C_{16}H_{28}O_3$ / 268 g/mol

Aspecto físico: oleoso

$[\alpha]^{25}_D$ -5 (c 0,22, $CHCl_3$).

IV (KBr, $v_{máx.}$, cm^{-1}): 3421, 2945, 1462, 1064, 631.

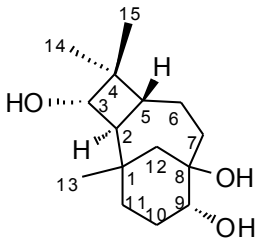
RMN de ^1H ($CDCl_3$, 600 MHz, δ_H): 2,15 - 2,20 (m, 1H, H-2α); 1,46 (t, *J*=10,2 Hz, 1H, H-3α); 1,35 (dd, *J*=9,6, 7,8 Hz, 1H, H-3β); 1,91 –1,97 (m, 1H, H-5β); 1,52 – 1,58 (m, 1H, H-6α); 1,62 – 1,69 (m, 1H, H-6β); 1,52 –1,58 (m, 1H, H-7α); 1,86 – 1,91 (m, 1H, H-7β); 3,55 (dd, *J*=11,4, 5,4 Hz, 1H, H-9β); 1,75 (ddd, *J*=25,8, 13,8, 4,8 Hz, 1H, H-10α); 1,80 – 1,85 (m, 1H, H-10β); 1,22 (dt, *J*=13,2, 4,8 Hz, 1H, H-11α); 1,38 – 1,46 (m, 1H, H-11β); 0,90 (d, *J*=12,6 Hz, 1H, H-12a); 1,86 – 1,91 (m, 1H, H-12b); 0,81 (s, 3H, H-13); 1,01 (s, 3H, H-14); 3,33 (s, 2H, H-15); 3,22 (s, 3H, H-16).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz, δ_C): 32,92 (C-1); 36,27 (C-2); 30,21 (C-3); 39,79 (C-4); 38,56 (C-5); 21,92 (C-6); 28,90 (C-7); 80,24 (C-8); 76,27 (C-9); 27,32 (C-10); 36,45 (C-11); 41,85 (C-12); 26,09 (C-13); 16,22 (C-14); 72,05 (C-15); 49,16 (C-16).

EM: 268 [M^+], 237 [M-OCH_3]$^+$, 211 [M-OC_3H_6]$^+$.

EMAR: 268.2029 [M+] calc. 268,2038.

(3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (89)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O_3$ / 254 g/mol

Aspecto físico: oleoso

$[\alpha]^{25}_D$ -5 (c 0,22, $CHCl_3$).

IV (KBr, $v_{máx.}$, cm^{-1}): 3378, 2947, 2865, 1461, 1058, 754.

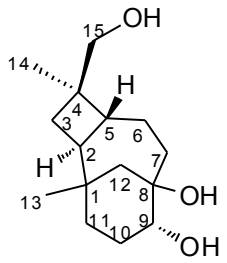
RMN de ^1H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 1,78 – 1,87 (m, 1H, H-2α); 3,42 (d, *J*=8,8 Hz, 1H, H-3β); 1,16 –1,23 (m, 1H, H-5β); 1,43 (m, 1H, H-6α); 1,76 – 1,62 (m, 1H, H-6β); 2,03 (ddd, *J*=14,8, 9,2, 4,0 Hz, 1H, H-7α); 1,30 – 1,38 (m, 1H, H-7β); 3,50 (dd, *J*=11,6, 5,6 Hz, 1H, H-9β); 1,72 – 1,88 (m, 2H, H-10α, H-10β); 1,47 - 1,53 (m, 1H, H-11α); 1,30 -1,38 (m, 1H, H-11β); 1,62 - 1,72 (m, 1H, H-12a); 1,03 (d, *J*=13,2 Hz, 1H, H-12b); 0,95 (s, 3H, H-13); 0,90 (s, 3H, H-14); 1,02 (s, 3H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 32,89 (C-1); 50,38 (C-2); 75,56 (C-3); 40,87 (C-4); 37,35 (C-5); 20,15 (C-6); 33,04 (C-7); 76,48 (C-8); 78,90 (C-9); 28,40 (C-10); 38,77 (C-11); 48,29 (C-12); 25,42 (C-13); 17,78 (C-14); 28,16 (C-15).

EM: 254[M^+], 236 [M-H_2O]$^+$, 218 [M- H_2O - H_2O]$^+$, 195 (196-1)[M-OC_3H_6]$^+$.

EMAR: 254,1860 [M+] calc. 254,1882

(4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (90)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O_3$ / 254 g/mol

Aspecto físico: oleoso

[α] $^{25}_{D}$ -6 (c 0,33, $CHCl_3$)

IV (KBr, $v_{máx.}$, cm^{-1}): 3379, 2937, 1456, 1049, 752.

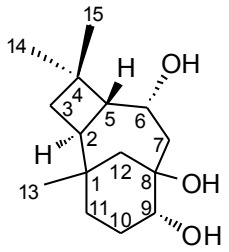
RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz, δ_H): 2,15 (ddd, *J*=12,0, 10,8, 8,4 Hz, 1H, H-2α); 1,36 – 1,42 (m, 1H, H-3α); 1,42 – 1,48 (m, 1H, H-3β); 1,92 (ddd, *J*=12,0, 7,8,0, 6,0 Hz, 1H, H-5β); 1,64 (m, 1H, H-6α); 1,43 – 1,47 (m, 1H, H-6β); 1,98 (ddd, *J*=15,6, 11,4, 4,0 Hz, 1H, H-7α); 1,36 – 1,40 (m, 1H, H-7β); 3,50 (dd, *J*=12,0, 4,8 Hz, 1H, H-9β); 1,84 (m, 1H, H-10α); 1,70 - 1,77 (m, 1H, H-10β); 1,26 (dt, *J*=13,2, 4,8 Hz, 1H, H-11α); 1,47 -1,36 (m, 1H, H-11β); 1,70 - 1,77 (m, 1H, H-12a); 1,01 (d, *J*=13,2 Hz, 1H, H-12b); 0,81 (s, 3H, H-13); 1,03 (s, 3H, H-14); 3,35 (s, 2H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz, δ_C): 33,34 (C-1); 37,36 (C-2); 30,46 (C-3); 39,76 (C-4); 39,57 (C-5); 20,79 (C-6); 32,43 (C-7); 76,47 (C-8); 79,14 (C-9); 28,36 (C-10); 37,22 (C-11); 47,97 (C-12); 25,86 (C-13); 16,07 (C-14); 72,10 (C-15).

EM: 254[M^+], 218 [M- H_2O - H_2O]$^+$, 195 [M-OC_3H_6]$^+$.

EMAR: 254,1904 [M+] calc. 254,1882

(6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (91)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O_3$ / 254 g/mol

Aspecto físico: oleoso

$[\alpha]^{25}_D$ +7 (c 0,41, $CHCl_3$)

IV (KBr, $\nu_{máx.}$, cm^{-1}): 3419, 2952, 1489, 1019, 579.

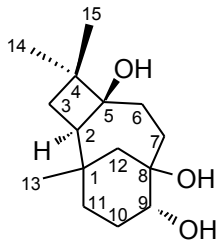
RMN de ^1H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 1,88 - 1,99 (m, 1H, H-2α); 1,44 (t, *J*=8,8 Hz, 1H, H-3α); 1,31 – 1,38 (m, 1H, H-3β); 1,65 – 1,75 (m, 1H, H-5β); 3,79 (dt, *J*=8,4, 4,4 Hz, 1H, H-6β); 2,26 (dd, *J*=14,4, 4,0 Hz, 1H, H-7α); 1,31 - 1,38 (m, 1H, H-7β); 3,38 (dd, *J*=11,6, 5,2 Hz, 1H, H-9β); 1,75 – 1,55 (m, 1H, H-10α, 10β); 1,21 (dt, *J*=13,2, 5,2 Hz, 1H, H-11α); 1,30 – 1,40 (m, 1H, H-11β); 1,98 (dd, *J*=13,6, 2,8 Hz, 1H, H-12a); 1,05 (d, *J*=13,6 Hz, 1H, H-12b); 0,81 (s, 3H, H-13); 1,12 (s, 3H, H-14); 1,08 (s, 3H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 33,64 (C-1); 40,14 (C-2); 37,19 (C-3); 35,50 (C-4); 54,37 (C-5); 70,71 (C-6); 43,92 (C-7); 76,64 (C-8); 78,82 (C-9); 29,55 (C-10); 39,88 (C-11); 49,21 (C-12); 27,19 (C-13); 21,27 (C-14); 31,78 (C-15).

EM: 254[M^+], 236 [M-H_2O]$^+$, 218 [M- H_2O - H_2O]$^+$, 195 [M-OC_3H_6]$^+$.

EMAR: 254,1882 [M+] calc. 254,1882

(2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-5,8,9-triol (92)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O_3$ / 254 g/mol

Aspecto físico: oleoso

$[\alpha]^{25}_D$ +4 (c 0,2, $CHCl_3$).

IV (KBr, $v_{máx.}$, cm^{-1}): 3462, 2938, 2826, 1489, 1062, 642.

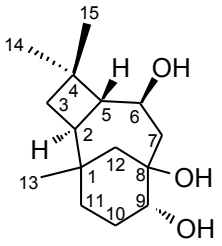
RMN de ^1H ($CDCl_3$, 600 MHz, δ_H): 2,39 (dd, *J*=12,0, 8,4 Hz, 1H, H-2α); 1,49 (dd, *J*= 9,0, 7,8 Hz, 1H, H-3α); 1,82 (dd, *J*=12,0, 9,0 Hz, 1H, H-3β); 1,86 -1,93 (m, 1H, H-6α); 1,53 - 1,59 (m, 1H, H-6β); 1,86 -1,93 (m, 1H, H-7α); 1,53 - 1,59 (m, 1H, H-7β); 3,52 (dd, *J*=11,4, 5,4 Hz, 1H, H-9β); 1,81 – 1,84 (m, 1H, H-10α) , 1,72 -1,74 (m, 1H, 10β); 1,15 (dt, *J*=13,2, 4,8 Hz, 1H, H-11α); 1,38 – 1,41 (m, 1H, H-11β); 2,62 (dd, *J*=12,6, 3,0 Hz, 1H, H-12a); 0,97 (d, *J*=15,0 Hz, 1H, H-12b); 0,94 (s, 3H, H-13); 1,09 (s, 3H, H-14); 0,98 (s, 3H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz, δ_C): 33,45 (C-1); 39,13 (C-2); 34,26 (C-3); 41,90 (C-4); 82,73 (C-5); 30,40 (C-6); 31,97 (C-7); 76,43 (C-8); 79,59 (C-9); 28,52 (C-10); 37,87 (C-11); 46,25 (C-12); 26,59 (C-13); 23,71 (C-14); 21,92 (C-15).

EM: 254[M^+], 236 [M-H_2O]$^+$, 218 [M- H_2O - H_2O]$^+$, 195 [M-OC_3H_6]$^+$.

EMAR: 254,1719 [M+] calc. 254,1882.

(6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (93)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O_3$ / 254 g/mol

Aspecto físico: sólido

Faixa de fusão: 113-115°

$[\alpha]^{25}_D$ +9 (c 0,13, $CHCl_3$)

IV (KBr, $v_{máx.}$, cm^{-1}): 3368, 2905, 1480, 1052, 575

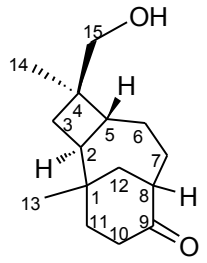
RMN de ^1H ($CDCl_3$, 600 MHz, δ_H): 1,91 -1,99 (m, 1H, H-2α); 1,46 (t, *J*=9,2 Hz, 1H, H-3α); 1,35 (t, *J*=10,4 Hz, 1H, H-3β); 1,74 -1,79 (m, 1H, H-5β); 4,10 (m, 1H, H-6α); 2,10 (dd, *J*=15,4, 3,2 Hz, 1H, H-7α); 1,64 - 1,79 (m, 1H, H-7β); 3,47 (dd, *J*=12,0, 5,6 Hz, 1H, H-9β); 1,61 – 1,69 (m, 1H, H-10α) , 1,80 -1,87 (m, 1H, 10β); 1,27 (dt, *J*=13,2, 4,8 Hz, 1H, H-11α); 1,38 – 1,43 (m, 1H, H-11β); 2,04 (dd, *J*=13,2, 3,2 Hz, 1H, H-12a); 1,10 (d, *J*=13,2 Hz, 1H, H-12b); 0,83 (s, 3H, H-13); 1,02 (s, 3H, H-14); 1,09 (s, 3H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz, δ_C): 33,69 (C-1); 38,36 (C-2); 35,56 (C-3); 35,09 (C-4); 53,67 (C-5); 69,48 (C-6); 40,20 (C-7); 76,99 (C-8); 78,36 (C-9); 27,87 (C-10); 37,02 (C-11); 47,80 (C-12); 26,01 (C-13); 21,31 (C-14); 31,08 (C-15).

EM: 254[M^+], 236 [M-H_2O]$^+$, 218 [M- H_2O - H_2O]$^+$, 195 [M-OC_3H_6]$^+$.

EMAR: 254,1417 [M+] calc. 254,1882.

(*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo [6.3.1.0^{2,5}]dodecan-9-ona (94)



FM/MM: $C_{15}H_{23}O_2$ / 235 g/mol

Aspecto físico: oleoso

[α] $^{25}_{D}$ -10 (c 0,22, $CHCl_3$),

IV (KBr, $v_{máx.}$, cm$^{-1)}$: 3454, 2933, 1695, 1458, 1038, 517

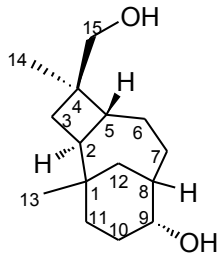
RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 1,61 -1,75 (m, 5H, H-2α, H-3α, H-10β, H-11β, H-12b); 1,37 – 1,48 (m, 1H, H-3β); 1,81 -1,88 (m, 1H, H-5β); 1,37 - 1,48 (m, 1H, H-6α); 1,51 – 1,55 (m, 1H, H-6β); 2,25 - 2,29 (m, 1H, H-7α); 1,17 - 1,21 (m, 1H, H-7β); 2,48 - 2,53 (m, 1H, H-8); 2,41 - 2,47 (m, 1H, H-10α); 2,41 - 2,47 (m, 1H, H-11α); 2, 01 - 2,05 (m, 1H, H-12a); 0,90 (s, 3H, H-13); 0,97 (s, 3H, H-14); 3,33 (s, 2H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 31,84 (C-1); 42,06 (C-2); 30,26 (C-3); 37,76 (C-4); 40,97 (C-5); 25,50 (C-6); 29,50 (C-7); 44,68 (C-8); 215,59 (C-9); 36,47 (C-10); 36,57 (C-11); 41,86 (C-12); 25,83 (C-13); 17,04 (C-14); 71,90 (C-15).

EM: 236[M+1]$^+$, 218 [M- H_2O]$^+$.

EMAR: 236,1779 [M+1]$^+$ calc. 235,1698

(15*R*,9*R*)-isocariolan-9,15-diol (95)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O_2$ / 238 g/mol

Aspecto físico: oleoso

$[\alpha]^{25}_D$ +22 (c 0,15, $CHCl_3$)

IV (KBr, $v_{máx.}$, cm^{-1}): 3262, 2917, 1474,1094, 674

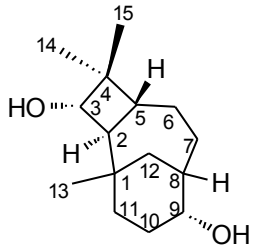
RMN de ^1H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 2,16 – 2,24 (m, 1H, H-2α); 1,37 - 1,46 (m, 4H, H-3α, H-3β, H-7β, H-11α); 1,85 - 1,92 (m, 1H, H-5β); 1,54 - 1,58 (m, 1H, H-6α); 1,54 – 1,58 (m, 1H, H-6β); 1,65 – 1,70 (m, 1H, H-7α); 2,11 (m, 1H, H-8); 3,72 (td, *J*=11,2, 5,6, 5,6Hz, 1H, H-9β); 1,76 – 1,83(m, 1H, H-10α) , 1,65 - 1,70 (m, 1H, 10β); 1,17 -1,25 (m, 1H, H-11β); 1,65 – 1,70 (m, 1H, H-12a); 1,04 (dd, *J*=4,8, 14,4 Hz, 1H, H-12b); 0,75 (s, 3H, H-13); 1,04 (s, 3H, H-14); 3,34 (s, 2H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 31,55 (C-1); 39,32 (C-2); 30,78 (C-3); 39,13 (C-4); 40,75 (C-5); 24,40 (C-6); 24,23 (C-7); 38,21 (C-8); 73,10 (C-9); 27,73 (C-10); 38,16 (C-11); 40,16 (C-12); 26,27 (C-13); 16,02 (C-14); 72,40 (C-15).

EM: 238 $[M^+]$, 220 $[M- H_2O]^+$.

EMAR: 238,1225 $[M+1]^+$ calc. 238,1933.

(3*S*,9*R*)-isocariolan-9,3-diol (96)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O_2$ / 238 g/mol

Aspecto físico: oleoso

[α] $^{25}_{D}$ +6 (c 0,43, $CHCl_3$).

IV (KBr, $v_{máx.}$, cm^{-1}): 3362, 2937, 1458,1054, 756

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 1,85 (dd, *J*=12,6, 8,4 Hz, 1H, H-2α); 3,41 (d, *J*=9,0 Hz, 1H, H-3β); 1,17 - 1,21 (m, 1H, H-5β); 1,66 - 1,69 (m, 1H, H-6α); 1,39 – 1,44 (m, 1H, H-6β); 1,75 – 1,82 (m, 1H, H-7α); 1,33 - 1,38 (m, 1H, H-7β); 2,13 (m, 1H, H-8); 3,72 (td, *J*=12,0, 6,0, 5,4 Hz, 1H, H-9β); 1,75 – 1,82 (m, 1H, H-10α) , 1,66 - 1,69 (m, 1H, 10β); 1,27 (dt, *J*=13,2, 4,2 Hz, 1H, H-11α); 1,46 -1,50 (m, 1H, H-11β); 1,59-1,63 (m, 1H, H-12a); 1,09 (dd, *J*=14,4, 4,8 Hz, 1H, H-12b); 0,90 (s, 3H, H-13); 0,90 (s, 3H, H-14); 1,00 (s, 3H, H-15).

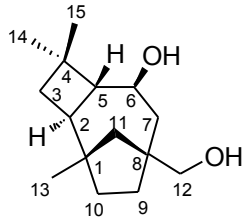
RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 30,92 (C-1); 52,38 (C-2); 75,79 (C-3); 40,22 (C-4); 38,54 (C-5); 23,91 (C-6); 24,89 (C-7); 38,30 (C-8); 72,82 (C-9); 28,19 (C-10); 39,69 (C-11); 40,48 (C-12); 25,73 (C-13); 14,74 (C-14); 28,15 (C-15).

EM: 238 $[M^+]$, 220 $[M- H_2O]^+$.

EMAR: 238,1027 $[M+1]^+$ calc. 238,1933.

(1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,12-diol

(97)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O_2$ / 238 g/mol

Aspecto físico: oleoso

[α] $^{25}_{D}$ +9 (c 0,46, $CHCl_3$)

IV (KBr, $v_{máx.}$, cm$^{-1)}$: 3361, 2948, 2864, 1458,1037, 756

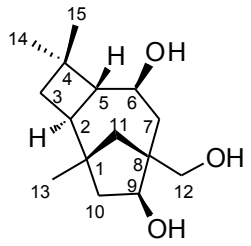
RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz, δ_H): 1,79 (dt, *J*=10,8, 8,1 Hz, 1H, H-2α); 1,53 (dd, *J*=9,6, 8,1 Hz, 1H, H-3α); 1,37 – 1,31 (m, 1H, H-3β); 1,63 - 1,66 (m, 1H, H-5β); 3,78 (dt, *J*= 9,9, 6,0 Hz, 1H, H-6α); 1,91 (dd, *J*=12,6, 6,0 Hz, 1H, H-7α); 1,18 (dd, *J*=12,6, 9,9 Hz, 1H, H-7β); 1,43 – 1,47 (m, 1H, H-9α, H-9β); 1,31 – 1,37 (m, 1H, H-10α, 10β); 1,05 (d, *J*=12,6 Hz, 1H, H-11a); 1,63 - 1,66 (m, 1H, H-11β); 1,59-3,33 (s, 2H, H-12); 0,93 (s, 3H, H-13); 1,14 (s, 3H, H-14); 1,10 (s, 3H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz, δ_C): 41,04 (C-1); 41,61 (C-2); 36,50 (C-3); 33,33 (C-4); 53,90 (C-5); 72,48 (C-6); 44,78 (C-7); 45,91 (C-8); 29,90 (C-9); 44,80 (C-10); 47,33 (C-11); 73,43 (C-12); 22,35 (C-13); 20,60 (C-14); 31,94 (C-15).

EM: 238 [M^+], 220 [M- H_2O]$^+$, 207 [M-CH_2OH]$^+$

EMAR: 238,1484 [M+1]$^+$ calc. 238,1933.

(1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilen triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (98)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O_3$ / 254 g/mol

Aspecto físico: oleoso

[α] $^{25}_{D}$ +23 (c 0,12, $CHCl_3$)

IV (KBr, $\nu_{máx.}$, cm^{-1}): 3421, 2948, 1462,1042, 589

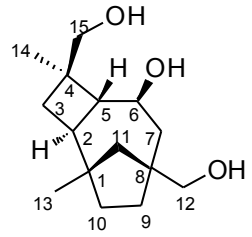
RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz, δ_H): 1,63 (dt, *J*=11,4, 7,8 Hz, 1H, H-2α); 1,50 -1,57 (m, 1H, H-3α); 1,35 (m, 1H, H-3β); 1,69 (t, *J*=10,8 Hz, 1H, H-5β); 3,76 (dt, *J*=10,2, 6,0 Hz, 1H, H-6α); 2,20 (dd, *J*=12,6, 5,4 Hz, 1H, H-7α); 0,86 (dd, *J*=12,6, 10,2 Hz, 1H, H-7β); 4,16 (dd, *J*=9, 7.2 Hz, 1H, H-9α); 1,93 (ddd, *J*=11,4, 6,6, 3,0 Hz, 1H, H-10α); 1,35 (m, 1H, H-10β); 1,50 -1,57 (m, 2H, H-11a, H-11b); 3,55 (d, *J*=11,4 Hz, 1H, H-12a); 3,46 (d, *J*=11,4 Hz, 1H, H-12b) ; 0,92 (s, 3H, H-13); 1,12 (s, 3H, H-14); 1,09 (s, 3H, H-15).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz, δ_C): 37,64 (C-1); 42,01 (C-2); 36,52 (C-3); 33,37 (C-4); 54,21 (C-5); 72,08 (C-6); 44,21 (C-7); 48,00 (C-8); 77,11 (C-9); 55,62 (C-10); 44,94 (C-11); 68,75 (C-12); 22,44 (C-13); 20,47 (C-14); 31,87 (C-15).

EM: 254 [M^+], 236 [M- H_2O]$^+$

EMAR: 254,1237 [M+1]$^+$ calc. 254,1882.

(1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (99)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O_3$ / 254 g/mol

Aspecto físico: oleoso

[α] $^{25}_{D}$ +49 (c 0,14, $CHCl_3$).

IV (KBr, $v_{máx.}$, cm^{-1}):3377, 2944, 1457,1034, 756

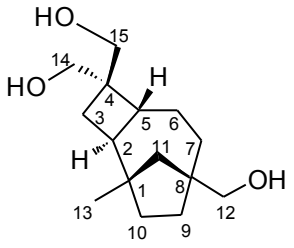
RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz, δ_H): 1,86 (dt, *J*=11,4, 11,4, 7,8 Hz, 1H, H-2α); 1,45 – 1,51(m, 1H, H-3α); 1,35 - 1,40 (m, 1H, H-3β); 1,78 (t, *J*=11,4 Hz, 1H, H-5β); 3,69 (ddd, *J*=10,8, 9,6, 6,0 Hz, 1H, H-6α); 1,97 (dd, *J*=13,2, 6,0 Hz, 1H, H-7α); 1,23 - 1,26 (m, 1H, H-7β); 1,45 -1,51 (m, 1H, H-9α); 1,35 -1,40 (m, 2H, H-10α, H-10β); 1,67 (dd, *J*=12,6, 1,2 Hz, 1H, H-11a); 1,08 (dd, *J*=12,6 Hz, 1H, H-11b); 3,38 (s, 2H, H-12); 0,91 (s, 3H, H-13); 1,21 (s, 3H, H-14); 3,43 (d, 1,09 *J*=9,6 Hz, 1H, H-15a) ; 3,32 (d, *J*=9,6 Hz, 1H, H-15b).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz, δ_C): 41,12 (C-1); 42,14 (C-2); 32,21 (C-3); 38,71 (C-4); 52,57 (C-5); 70,04 (C-6); 43,92 (C-7); 46,03 (C-8); 29,78 (C-9); 44,75 (C-10); 47,46 (C-11); 73,37 (C-12); 22,18 (C-13); 15,84 (C-14); 73,36 (C-15).

EM: 254 [M^+], 223 [M- $CH_2OH]^+$, 205 [M-CH_2OH-$H_2O]^+$,187[M-CH_2OH-H_2O-$H_2O]^+$

EMAR: 254,1886 $[M+1]^+$ calc. 254,1882.

(1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (100)



FM/MM: $C_{15}H_{26}O_3$ / 254 g/mol

Aspecto físico: oleoso

[α] $^{25}_{D}$ +32 (c 0,1, $CHCl_3$).

IV (KBr, $v_{máx.}$, cm^{-1}):3344, 2929, 1452,1028, 752

RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz, δ_H): 1,74 (m, 1H, H-2α); 1,70 (m, 1H, H-3α); 1,33 (m, 1H, H-3β); 1,78 (m, 1H, H-5β); 1,83 (m, 1H, H-6α); 1,46 (m, 1H, H-7α); 1,28 (m, 1H, H-7β); 1,47 (m, 1H, H-9α); 1,38 (m, 1H, H-9β); 1,35 – 1,42 (m, 2H, H-10α, H-10β); 1,62 (d, *J*=12,4 Hz, 1H, H-11a); 1,08 (d, *J*=12,4 Hz, 1H, H-11b); 3,32 (s, 2H, H-12); 0,92 (s, 3H, H-13); 4,02 (d, *J*=11,2 Hz, 1H, H-14a); 3,90 (d, *J*=11,2 Hz, 1H, H-14b); 3,71 (d, *J*=10,4 Hz, 1H, H-15a) ; 3,66 (d, *J*=10,4 Hz, 1H, H-15b).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz, δ_C): 41,13 (C-1); 46,73 (C-2); 28,67 (C-3); 42,54 (C-4); 45,08 (C-5); 26,95 (C-6); 34,05 (C-7); 47,38 (C-8); 28,41 (C-9); 45,02 (C-10); 47,52 (C-11); 73,48 (C-12); 22,06 (C-13); 65,81 (C-14); 73,15 (C-15).

EM: 254 [M^+], 236 [M- H_2O]$^+$, 223 [M-CH_2OH]$^+$, 205 [M-CH_2OH-H_2O]$^+$,187[M-CH_2OH-H_2O-H_2O]$^+$.

EMAR: 254,1880 [M+1]$^+$ calc. 254,1882.

CAPÍTULO 4

Testes Biológicos

4.1 Avaliação da atividade fungistática de isocariolanos

4.1.1 Introdução

O desenvolvimento de novas moléculas que permitam o controle racional de fungos fitopatógenos em cultivos comerciais tem sido uma prioridade de pesquisadores mundialmente[42].

Avanços científicos na identificação de fatores associados à patogenia de fungos fitopatógenos abriu alternativas para a inovação no controle destes agentes. O recente descobrimento do papel desempenhado pelas toxinas excretadas por alguns fungos fitopatógenos no mecanismo de infecção tem permitido abordar alternativas novas e racionais para o desenvolvimento de fungicidas comerciais, baseadas no uso de análogos biossintéticos de tais fitotoxinas, possibilitando uma ação do fungicida seletiva[43, 44].

Apesar destes avanços, a maioria das estratégias de controle de fungos fitopatógenos utilizadas atualmente é baseada no emprego de agentes químicos, os fungicidas. No entanto, os problemas de contaminação ambiental provenientes do seu emprego extensivo e o freqüente desenvolvimento de cepas resistentes tornam necessária a busca de novos fungicidas [45].

B. cinerea é um fungo fitopatógeno causador da "podridão cinza", que ocasiona grandes perdas em culturas de hortaliças e frutas[16], sendo desejável o desenvolvimento de fungicidas com novos modos de ação para o combate de cepas resistentes de *B. cinerea*[16]. Um grande número de derivados sesquiterpênicos são capazes de inibir o crescimento de *B. cinerea*, incluindo cariofilanos, clovanos, ginsanos, isoprobotrianos, entre outros[22 - 30]. Entretanto, *B. cinerea* é capaz de metabolizar muitos destes compostos gerando produtos de destoxificação, portanto, diminuindo a efetividade destes compostos como fungicidas.

No presente trabalho, alguns isocariolanos usados como substratos para as biotransformações, bem como alguns derivados obtidos por biotransformação ou semi-síntese foram testados contra *B. cinerea.* Os compostos testados foram (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**) material de partida de biotransformação, os produtos de biotransformação de (**78**), (8R, 9R)-isocariolano-8,9-diol (**80**) e

(4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (**88**), além de uma série de isocariolanos com cadeias laterais distintas, sendo eles, (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**), (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**), (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**) e (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**) Figura 212, abaixo, com o objetivo de explorar a relação estrutura-atividade.

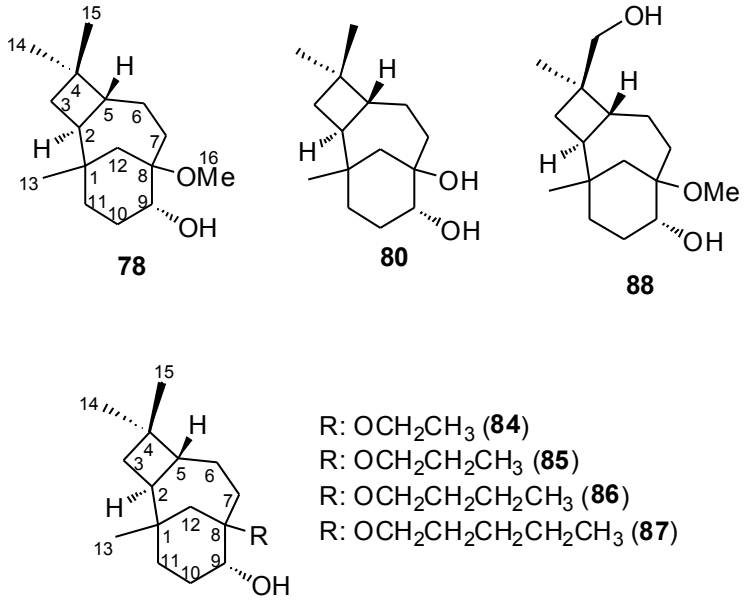


Figura 212 – Compostos testados no ensaio fungistático sobre *B. cinerea*.

4.1.2 – Metodologia

A atividade fungistática dos compostos foi testada pela técnica de envenenamento, descrita por Patil (1986)[46] e foi realizada sob coordenação dos professores Rosa Durán-Patrón e Antonio José Macías-Sanchez no laboratório de ensaios biológicos do Departamento de Química da Universidad de Cádiz.

O meio de cultura empregado como substrato para o crescimento de *B. cinerea* foi o ágar-malte-peptona. Este meio de cultura foi esterilizado e resfriado naturalmente até 45 – 50 °C. Alíquotas dos compostos a serem testados, solubilizadas em 50 *μ*L de etanol foram adicionadas a 20 mL deste meio[47, 48]. Os compostos **80** e **88** foram testados na concentração de 100 ppm; os isocariolanos **84**, **85**, **86** e **87** foram testados nas concentrações de 126, 63, 25,2 e 12,6 ppm e, finalmente, **78** foi testado em todas as doses anteriormente citadas. O ensaio foi

feito em triplicata e com três réplicas de cada concentração. Como controles, foram usados 50 μL de etanol no meio de cultura, sem se adicionar nenhum composto.

A mistura do meio de cultura e do composto foi agitada e vertida, sob condições estéreis, em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Após o tempo necessário para a solidificação, foi feito um orifício de aproximadamente 5mm de diâmetro no centro das placas. Neste orifício foi colocado um disco de mesmo diâmetro contendo *B. cinerea* previamente cultivado em ágar por 24 horas[49, 50].

As placas foram fechadas e cultivadas em condições adequadas para o crescimento do micélio do fungo (aproximadamente 25 °C e iluminação contínua). A cada 24 horas procedeu-se a medida dos diâmetros das colônias, para cada concentração e réplica, obtendo-se o valor do crescimento médio. A Figura 213 mostra um exemplo do aspecto apresentado pelas placas neste ensaio.

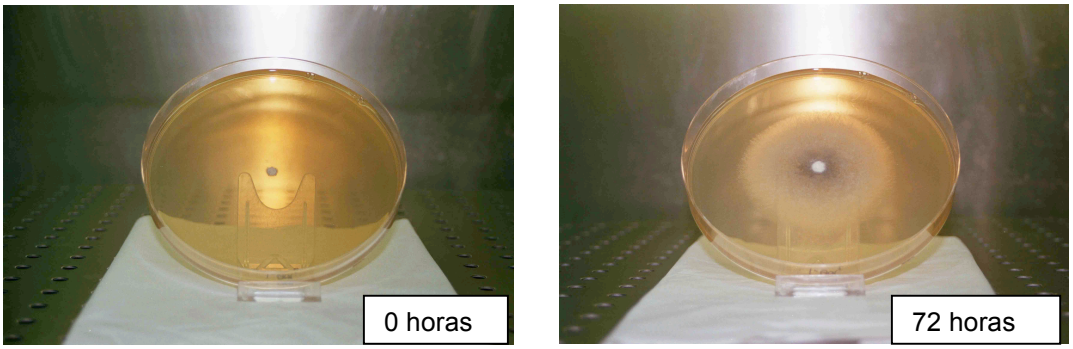


Figura 213 – Ilustração do ensaio fungistático para 0 e 72 horas.

Com os dados dos ensaios compilados, obtiveram-se os valores de porcentagem de inibição do crescimento (I%)[51], os quais serão empregados para avaliar alterações (positivas ou negativas) da eficácia dos compostos avaliados como agentes fungicidas.

4.1.3 – Resultados

O ensaio da atividade fungistática frente a *B. cinerea* do material de partida (**78**) e dos produtos de biotransformação **80** e **88** (Figura 212) mostrou níveis de

inibição diferenciados. O Gráfico 1 apresenta os diâmetros de crescimento radial do fungo entre 0 e 120 horas, em meio de cultura contendo 100 ppm de cada um dos compostos anteriormente mencionados. Observa-se que a inibição máxima ocorreu com o composto **78**, e esta inibição decresce na seqüência **78** > **80** > **88**.

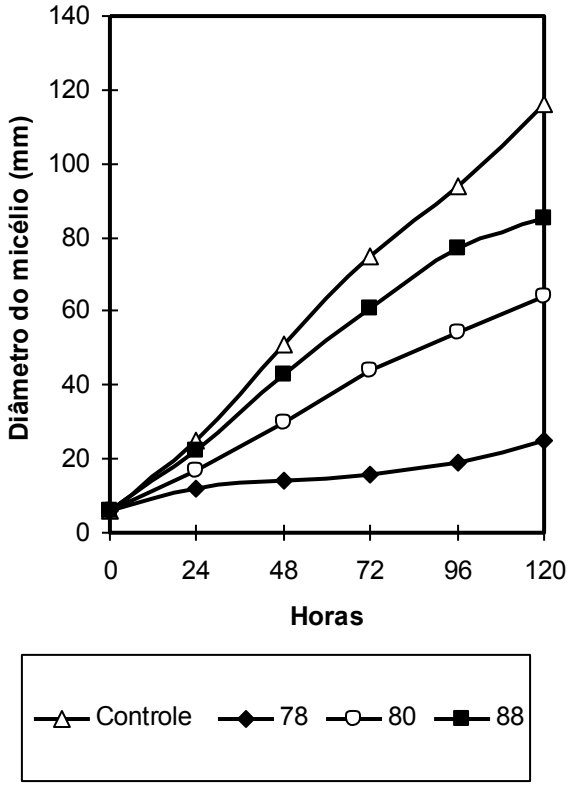


Gráfico 1 – Comparação da porcentagem de inibição frente a *B. cinerea* pelos compostos **78**, **80** e **88**.

O composto **88** (produto de biotransformação) apresentou uma atividade muito menor em comparação com o material de partida **78,** logo, a biotransformação de **78** em **88** consiste em um mecanismo de destoxificação efetivo em *B. cinerea*. A metabolização de **78** em **80** é uma maneira menos efetiva de diminuir a toxicidade de **78**, visto que **80** ainda apresenta um nível moderado de atividade antifúngica (Gráfico 1). Assim, é de se esperar que o composto **80** continue sendo metabolizado pelo fungo em derivados menos tóxicos. De fato, isto

é consistente com a obtenção de outros compostos hidroxilados em diversas posições, na biotransformações de **78** e **80** por *B. cinerea.*

A presença da função éter no esqueleto de isocariolanos parece ser relevante para a atividade dos compostos com este esqueleto, pois *B. cinerea* recorrentemente hidrolisa o grupo metoxila do carbono C-8 de **78** em um álcool. Assim, visando aumentar a atividade deste tipo de composto frente ao fitopatógeno *B. cinerea*, foi feita uma variação sistemática da estrutura e para se estudar a correlação com a atividade. Portanto, foi preparada uma série homóloga de isocariolanos (Esquema 22, p. 129), cuja síntese, catalisada por $Sn(OTf)_2$ foi descrita pela primeira vez neste trabalho (Item 3.2.6, p. 190).

A avaliação da inibição do crescimento de *B. cinerea* pelos éteres **78**, **84**, **85**, **86** e **87** (Figura 212, p.239) permitiu calcular as porcentagens de inibição em 72 e 120 horas, apresentadas nos Gráficos 2 e 3 (p. 243).

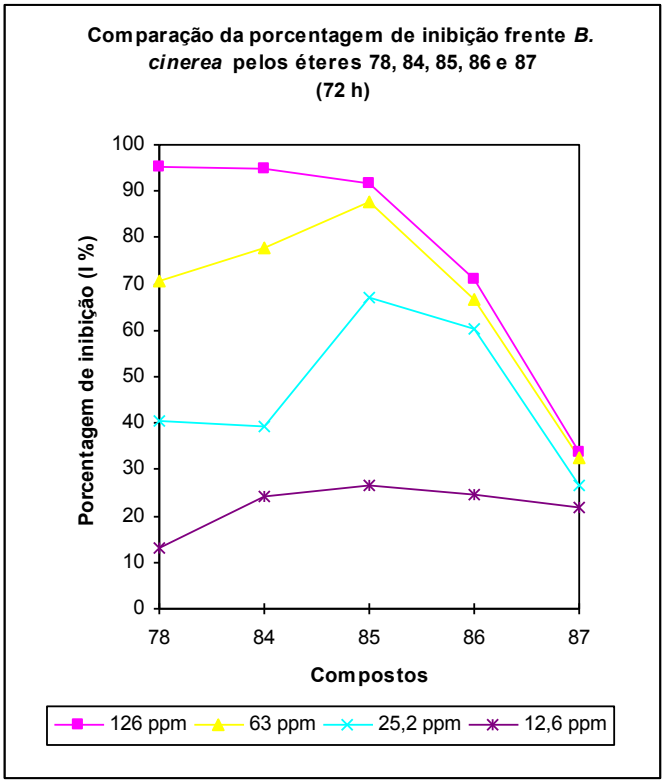


Gráfico 2 – Comparação da porcentagem de inibição frente a *B. cinerea* pelos éteres **78**, **84**, **85**, **86** e **87**, durante 72 horas.

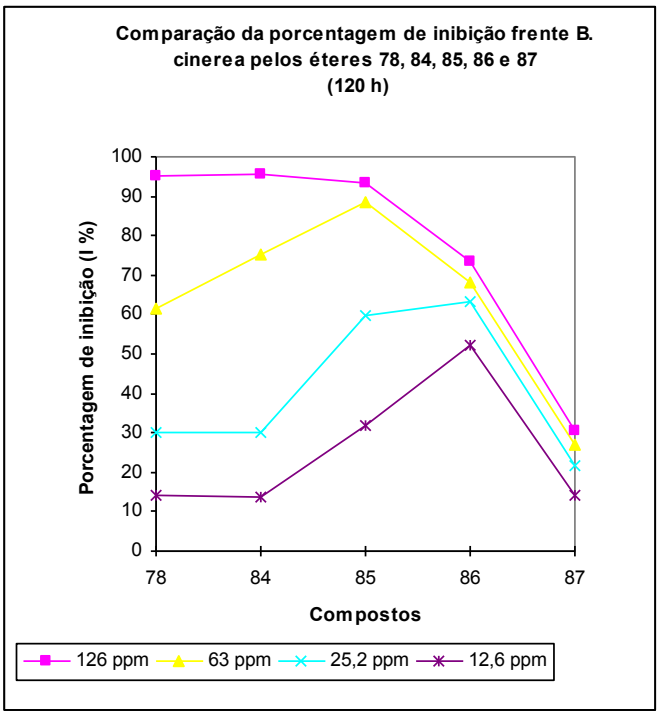


Gráfico 3 – Comparação da porcentagem de inibição frente a *B. cinerea* pelos éteres **78**, **84**, **85**, **86** e **87**, durante 120 horas.

Pela análise dos Gráficos 2 (p. 242) e **3**, observou-se que o composto **78** apresentou melhor atividade de inibição, tanto em 72 quanto em 120 horas, desde as concentrações mais baixas, mas, principalmente, a partir de 63 ppm. Novos ensaios comprobatórios desta atividade deverão ser realizados visto que, em uma perspectiva teórica, a diminuição da solubilidade em água dos compostos devido ao aumento da cadeia carbônica pode ter influenciado os resultados obtidos, já que o ensaio biológico foi feito em meio aquoso. Ainda assim, estes resultados preliminares são encorajadores para o planejamento racional de novos fungicidas contra *B. cinerea.*

4.2 - Teste de avaliação da atividade alelopática de isocariolanos e derivados de rearranjo de isocariolanos.

Foram avaliados quanto à sua atividade sobre a germinação e o crescimento de *L. sativa* alguns dos isocariolanos obtidos por transformação química, sendo eles (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**), (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**), isocariolan-9*α*-ol (**82**), (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**), (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**), (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**), (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**) e (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**) (Figura 214, p. 245).

Além destes, foram também avaliadas sete substâncias derivadas das biotransformações com *B. cinerea*: (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (**88**), (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (**89**), (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**), (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**), (2*S*,4*R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetil triciclo[6.3.1.$0^{2,5}$]dodecan-9-ona (**94**), (15*R*,9*R*)-isocariolano-9,15-diol (**95**) e (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (**97**) (Figura 214, p. 245).

A metodologia utilizada está descrita na Parte I, Item 4.3.2, p. 73 e foi realizada sob a coordenação da professora Maria Amélia D. Boaventura

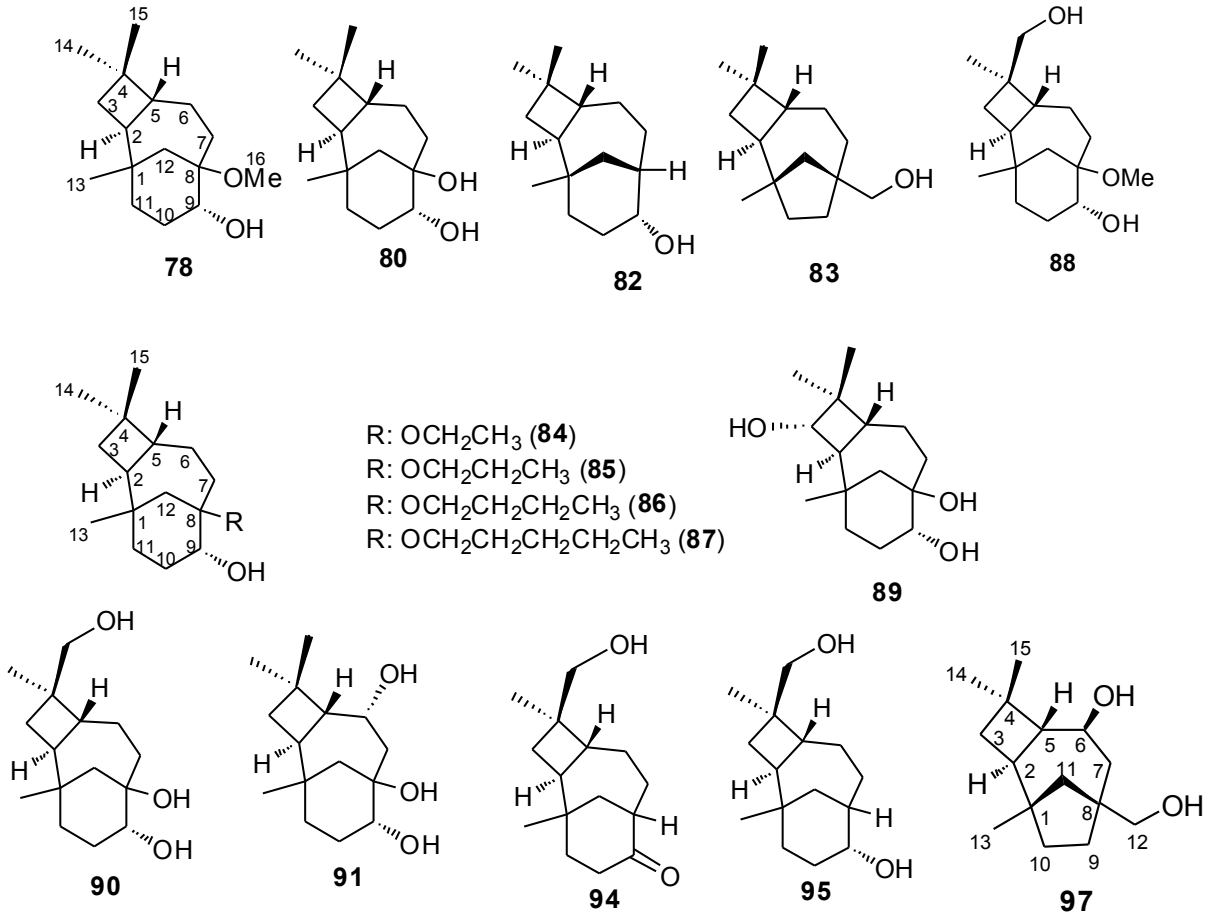


Figura 214 – Isocariolanos avaliados quanto à sua ação sobre a germinação e o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*).

4.2.1 Resultados

Pela análise do Gráfico 4, p. 246, relativo aos efeitos dos produtos obtidos por transformação química **78**, **80**, **82** e **83**, sobre o crescimento da raiz e do caule de *L. sativa***,** pôde-se observar uma atividade estimulatória predominante sobre o crescimento da raiz, sendo **82** aquele que apresentou melhor atividade estimulatória (entre 30-40% em relação ao branco), a 100 *µ*mol/L. Entretanto uma total atividade inibidora sobre o crescimento do caule de *L. sativa* foi observada para os quatro compostos testados, sendo o (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-

trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**) aquele que mostrou maior inibição também a 100 µmol/L. De acordo com Macías e colaboradores[52], substâncias testadas em bioensaios alopáticos padrão tendem a apresentar efeitos inibitórios (sendo, assim, potenciais herbicidas) apenas a concentrações mais altas; a concentrações mais baixas, o efeito inibitório geralmente diminui, podendo às vezes chegar até a um efeito estimulatório.

Um efeito inibitório de todas as substâncias testadas foi também observado para a germinação de *L. sativa*, principalmente a 100 *µ*mol/L (Gráfico 5, p. 247).

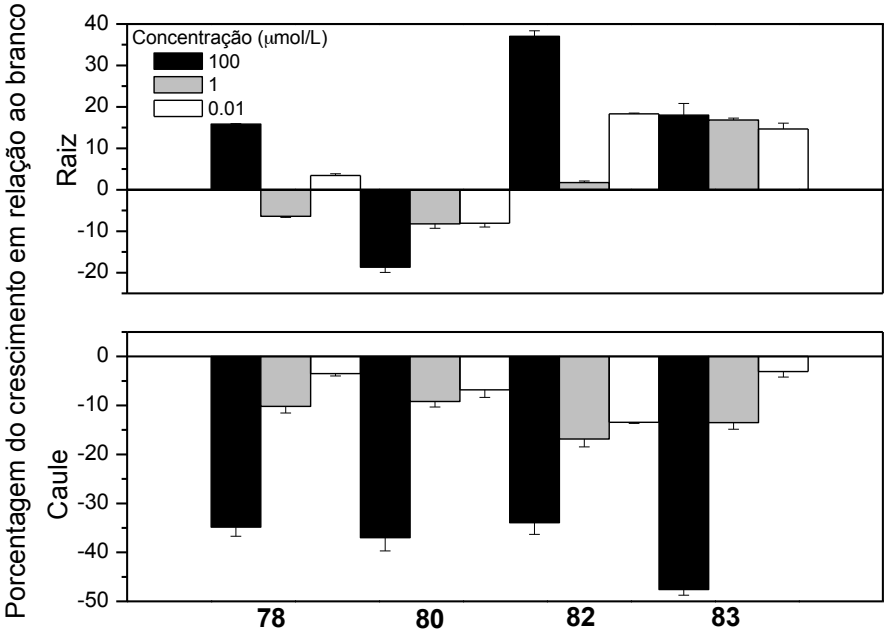


Gráfico 4 – Efeito das substâncias (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**), (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**), isocariolan-9*α*-ol (**82**), (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**) sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes.

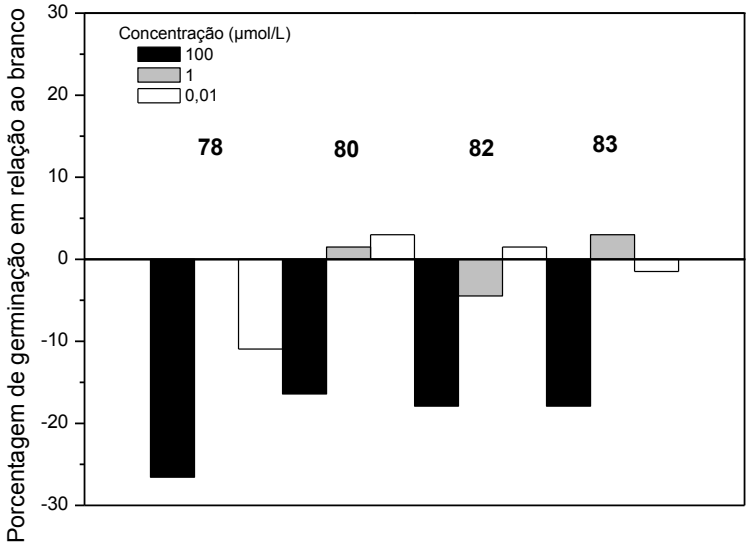


Gráfico 5: Efeito das substâncias (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**), (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**), isocariolan-9*α*-ol (**82**), (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**) sobre a germinação da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes.

Os resultados observados sobre o crescimento da raiz e do caule de *L. sativa* para a seqüencia de éteres **78**, **84**, **85**, **86** e **87**, também obtidos por transformação química, foram análogos aos anteriores: efeito estimulatório predominante sobre o crescimento da raiz e inibitório predominante sobre o crescimento do caule de *L. sativa*. O (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**) apresentou o maior efeito inibitório e (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**), o maior efeito estimulatório, ambos a 100 *µ*mol/L (Gráfico 6, p. 248). Entretanto os resultados obtidos para a germinação de *L. sativa* foram bastante diferentes daqueles anteriores: enquanto no Gráfico 5 observou-se uma predominante inibição, no Gráfico 7, p. 249 é um predominante estímulo da germinação, a 100 µM, que foi observado, sendo que este estímulo aumentou proporcionalmente com o tamanho da cadeia alquílica do éter.

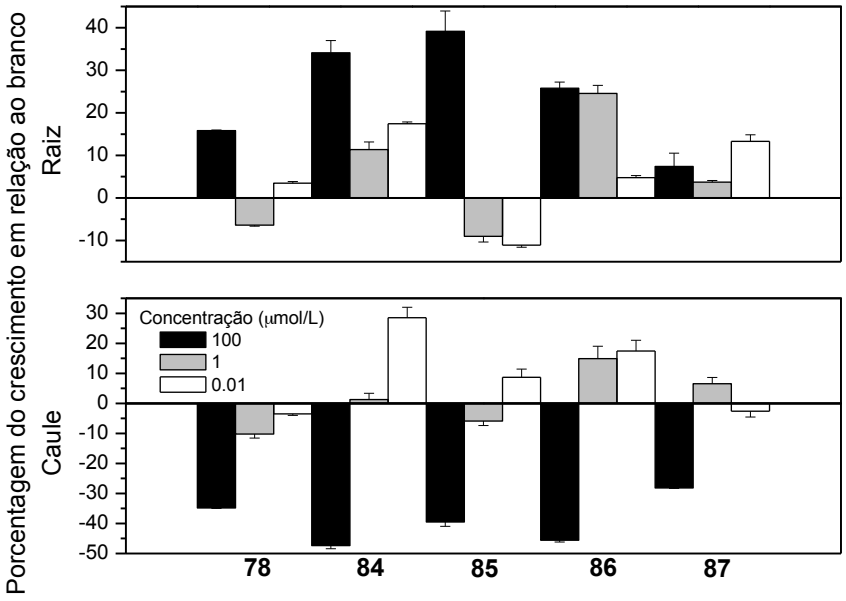


Gráfico 6: Efeito dos éteres (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**), (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**), (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**), (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**) e (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**) sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes.

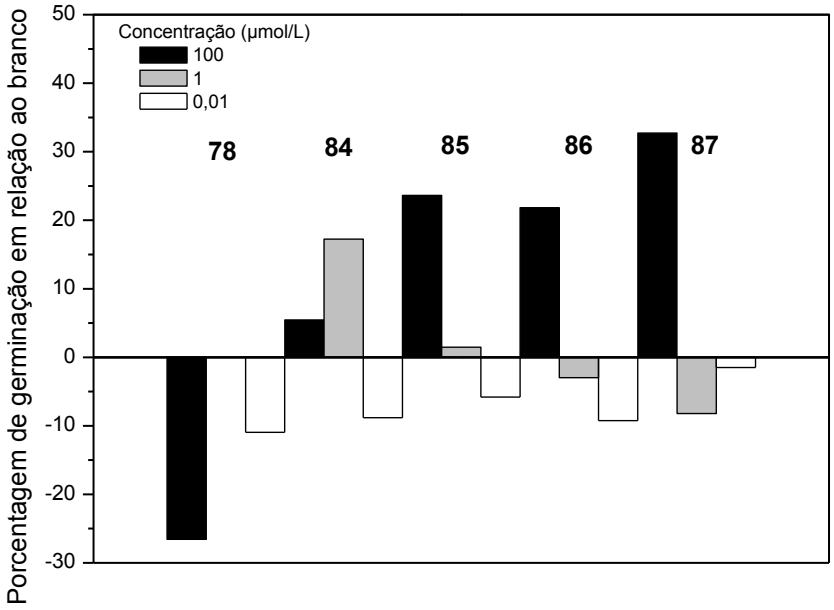


Gráfico 7: Efeito dos éteres (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**), (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**), (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**), (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**) e (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**) sobre a germinação da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes.

O **Gráfico 8** mostra o resultado dos testes de avaliação dos produtos de biotransformação **88**, **89**, **90**, **91**, **94**, **95** e **97** sobre o crescimento da raiz e do caule de *L. sativa*. Pode novamente ser observado o mesmo padrão anterior: o efeito estimulatório foi predominante sobre a raiz, enquanto um efeito inibitório foi predominante sobre o caule. O (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**) foi o maior inibidor e o maior estimulador a 100 *μ*mol/L. Pode-se ainda observar que os produtos de biotransformação apresentaram menor efeito inibitório sobre o crescimento do caule, quando comparados com seus materiais de partida (Gráfico 4, p. 246).

O Gráfico 9, p. 251 mostra o efeito sobre a germinação de *L. sativa* pelos produtos obtidos por biotransformação. Novamente o (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8,9-triol (**91**) foi aquele que inibiu mais fortemente a germinação (~20% em relação ao branco). Um resultado interessante foi observado para o (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.02,5]undeca-6β,12-diol (**97**), que estimulou a germinação da alface na menor concentração (0,01 *μ*mol/L).

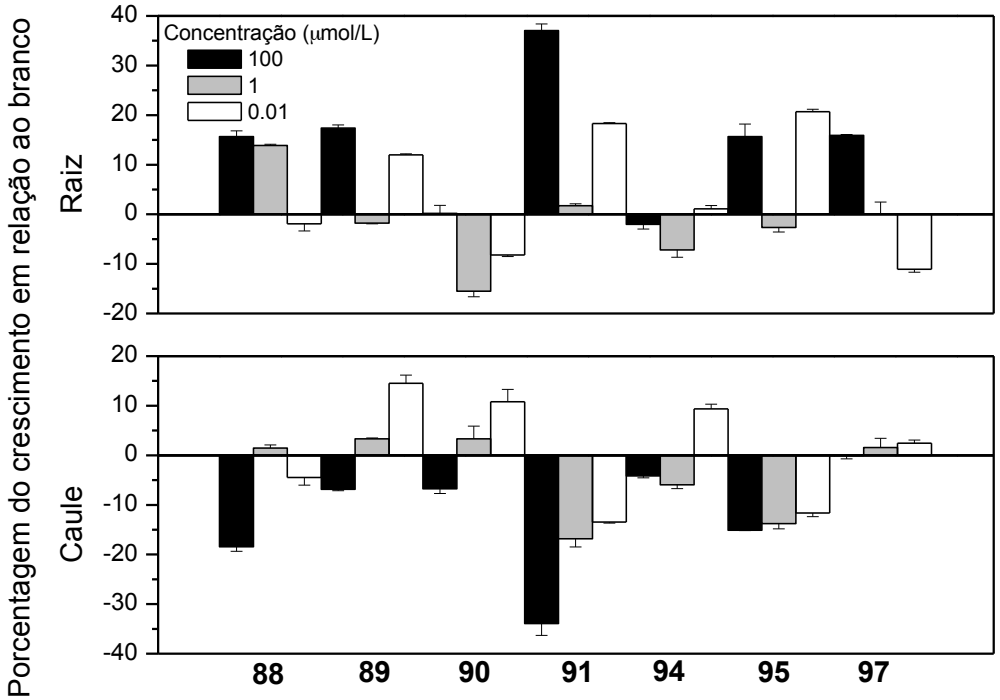


Gráfico 8: Efeito dos produtos de biotransformação (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (**88**), (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (**89**), (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**), (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**), (2*S*,4*R*,5*R*)-

4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.02,5]dodecan-9-ona (**94**), (15*R*,9*R*)-isocariolano-9,15-diol (**95**) e (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.02,5] undeca-6β,12-diol (**97**) sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes.

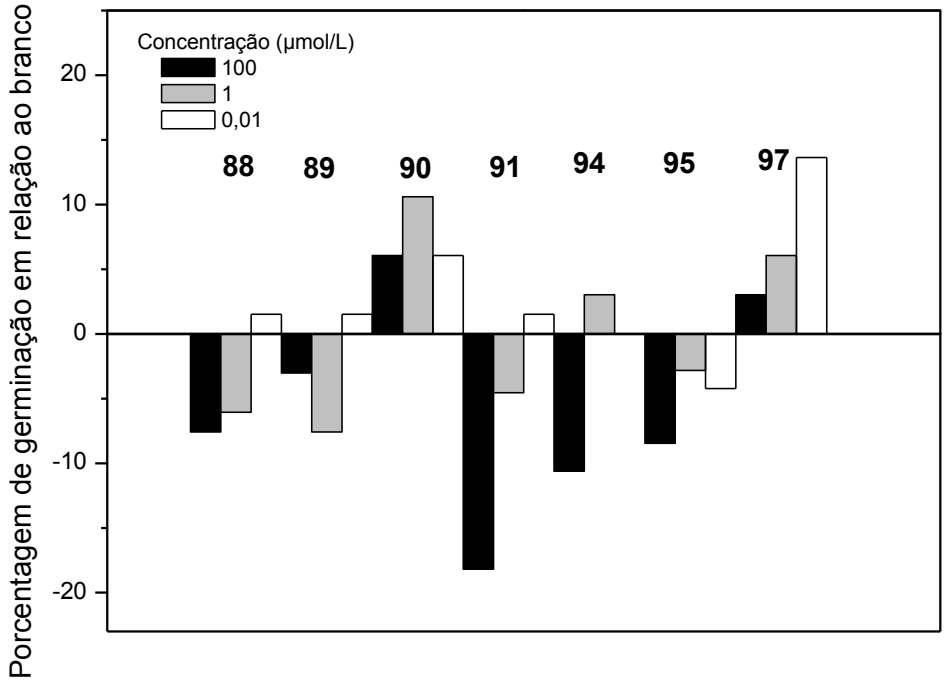


Gráfico 9: Efeito dos produtos de biotransformação (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (**88**), (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (**89**), (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**), (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**), (2*S*,4*R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.02,5]dodecan-9-ona (**94**), (15*R*,9*R*)-isocariolano-9,15-diol (**95**) e (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.02,5]undeca-6β,12-diol (**97**) sobre a germinação da alface (*L. sativa*), em três concentrações diferentes.

Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas

1 – Cabral, G. .B; Pires, M. V.V.; Lacerda, A. L.; Carneiro, V.T.C. Introdução *in vitro*, micropopagação e conservação de plantas de Brachiaria SP., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado técnico 101, 1. Ed. **2003**.

2 – Hanson, J. R. An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry. New York: W. H. Freeman/Spectrum and Co. Ltd., **1995**, 100 p.

3 – Magdalou, J.; Fournel-Gigleux, S.; Testa, B. ; Ouzzine, M. The Practice of Medicinal Chemistry. Prestwick Chemical, France: Elsevier, 3° Ed., **2008**, 736 p.

4 – Holland, H.L. Organic synthesis with oxidative enzimes, VCH Publishers Inc., Cambridge, UK, **1992**, 463 p.

5 - Peterson, D.H. & Murray, H.C. Microbiological Oxygenation of Steroids at Carbon 11. *Journal of the American Chemical Society*, **1952**, 74, 1871–1872.

6 - Aleu, J.; Collado, I. G. Biotransformations by *Botrytis species*. *Journal of Molecular Catalysis B* : Enzymatic, **2001,** 13, 77 – 93.

7 - Azerad, R. Application of biocatalysts in organic synthesis. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, **1995**, 132, 71-51.

8 - Fraga, B.M. & Hoffmann, J.J. Microbial transformation of diterpenes: Hydroxylation of 17-acetoxy-kolavenol acetate by Mucor plumbeus *Phytochemistry*, **1993**, 33, 827 – 830.

9 - Lowe, D.A. & Elander, R.P. Contribution of mycology to the antibiotic industry. *Mycologia*, **1983**, 75, 2, 361 - 373.

10 - Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. Industrial Biotransformations. Germany: Wiley-VCH: **2001**, 425 p.

11 – Hanson, J. R. Natural Products: The Secondary Metabolites. Cambridge: Royal Society of Chemistry. **2003**, 147 p.

12 - Dewick, P. M. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. 2° Ed., Chichester: John Wiley & Sons, **2002**, 550 p.

13 – Lichtenthaler, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,.* **1999**, 50, 47-65.

14 – Goldstein, J. L.; Brown, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, **1990**, 343, 425 – 430.

15 - Hanson, J. R. The biosynthesis of some sesquiterpenoids. *Pure and Applied Chemistry,* **1981**, 53, 1155-1162.

16 - Collado, I.G.; Macías Sánchez, A. J.; Hanson, J. R. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationship and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Natural Products Reports,* **2007**, 24, 674-686.

17 - Bulit, J., Dubos, B. Compendium of grape diseases. Minnesota: APS Press, St. Paul, **1998**, 121 p.

18 - Copping, L. G.; Hewitt, H. G. Chemistry and mode of action of crop protection agents. *The Royal Society of Chemistry,* **1998**, 74-114.

19 - Colmenares, A.; Aleu, J.; Duran- Patrón, R.; Collado, I. G.; Hernández Gálan, R. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology,* **2002**, 28, 997-1005.

20 - Rebordinos, L.; Cantoral, J. M.; Prieto, M. V.; Collado, I. G. The phytotoxic activity of some metabolites of ***Botrytis cinerea***. *Phytochemistry,* **1996**, 42, 383-387.

21 Deighton, N.; Muckenschnabel, I.; Colmenares, A. J.; Collado, I. G.; Williamson, B. *Botrydial* is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea. Phytochemistry*, **2001**, 57, 689-692.

22 - Durán-Patrón, R.; Aleu, J.; Hernandez-Galán, R.; Collado, I. G. Biotransformation of (4E, 8R)-Caryophyll-4(5)-en-8-ol by *Botrytis cinerea*. *Journal Natural Products,* **2000,** 63, 44 – 47.

23 - Durán-Patrón, R.; Corrales, H.; Hernandez-Galán, R.; Collado, I. G. Biotransformation of Caryophyllene Oxide by *Botrytis cinerea*. *Journal Natural Products,* **1999**, 62, 41 – 44.

24- Deligeorgopoulou, A.; Macías Sánchez, A. J.; Mobbs, D. J.; Hitchcock, P. B.; Hanson, J. R.; Collado, I.G. Structure-Activity relationships in the fungistatic activity against *Botrytis cinerea* of clovanes modified on ring C. *Journal Natural Products*, **2004**, 67, 793-798.

25 - Saiz-Urra, L.; Racero, J. C.; Macias-Sanchez, A. J.; Hernandez-Galan, Rosario; Hanson, J. R.; Perez-Gonzalez, M.; Collado, I. G. J. Synthesis and quantitative structure – antifungal activity relationships of clovane derivatives against *Botrytis cinerea*. *Food Chemistry,* **2009**, 57, 2420-2428.

26 - Collado, I.G.; Hanson, J.R.; Macías-Sánchez, A.J., Mobbs, D. The biotransformation of some clovanes by *Botrytis cinerea*. *Journal Natural Products,* **1998,** 61, 1348-1351.

27 - Pinedo-Rivilla, C.; Aleu, J.; Benito, M. G.; Collado, I. G. Biocatalytic preparation and absolute configuration of enantiomerically pure fungistatic anti-2-benzylindane derivatives. Study of the detoxification mechanism by *Botrytis cinerea*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2010**, 8, 3784-3789.

28 - Aleu, J.; Hanson, J. R.; Hernandez-Galan, Rosario; Collado, I. G. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoids patchoulol, ginsenol, cedrol and globulol by *Botrytis cinerea. Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic,* **2001**, 11, 329-334.

29 - Aleu, J.; Hernandez-Galan, Rosario; Hanson, J. R.; Hitchcock, P. B.; Collado, I. G. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoid ginsenol by *Botrytis cinerea. Journal of Chemical Society Perkin Transactions*, **1999**, 727-730.

30 - Aleu, J.; Hanson, J. R.; Hernandez-Galan, R.; Collado, I. G. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoids patchoulol by *Botrytis cinerea. Journal Natural Products*, **1999**, 62, 437-440.

31 - Aleu, J.; Hernandez-Galan, Rosario; Collado, I. G. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoid isoprobotrian-9α-ol by *Botrytis cinerea*. *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic,* **2002**, 16, 249-253.

32 - Collado, I. G.; Hernandez-Galan, R.; Durán-Patrón, R.; Cantoral, J. M. Metabolites from a shake culture of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*. **1995**, 38, 647-650.

33 - Collado, I.G.; Hanson, J. R.; Macías-Sánchez, A. J. The cleavage of caryophyllene oxide catalysed by tetracyanoethylene. *Tetrahedron,* **1996**, *52*, 7961-7972.

34 - Racero, J. C.; Macías-Sánchez, A.J.; Hernández-Galan, R.; Hitchcock, P.B.; Hanson, J.R.; Collado, I.G. Novel rearrangement of an isocaryolane sesquiterpenoid under Mitsunobu conditions. *Journal of Organic Chemistry,* **2000**, 65, 7786-7791.

35 - Racero, J. C.; Collado, I. G.; Macías-Sanchez, A. J. Síntesis de sesquiterpenos isocariolánicos con potencial actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea. Revista de la Sociedad Química de México,* **2004**, 48, 58 – 66.

36 - Masaki, Y.; Miura, T.; Ochiai, M. Alcoholysis of epoxides catalyzed by tetracyanoethylene and dicyanoketene acetals. *Bulletin of the Chemical Society of Japan,* **1996**, 69, 195 – 205.

37 – Handson, J. R.; Macías-Sanchez, A. J. ; Uyanik, C. Applications of tetracyanoethylene as a π-acid catalyst. J*ournal of Chemical Research*. **2001**, 121 – 123.

38 – Mancilla, G.; Femenía-Ríos, M.; Macías-Sanchez, A. J.; Collado, I. G. $Sn(OTf)_2$ catalysed regioselective styrene oxide ring opening with aromatic amines. *Tetrahedron*, **2008**, 64, 11732-11737.

39 - Heymann, H.; Tezuka, Y.; Kikuchi, T.; Supriyatna, S. Constituents of *Sindora sumatrana* MIQ. I. Isolation and NMR spectral analysis of sesquiterpenes from the dried pods. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin,* **1994**, 42, 138 – 146.

40 – Silverstein, R. M., Webster, F. X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara-Koogan, , **2000,** 460p.

41 - Collado, I. G.; Handson, J. R.; Hernández-Galán, R.; Hitchcock, P. B.; Macías-Sanchez, A. J.; Racero, J. C. Stereochemistry of a rearrangement of B and C rings in clovane skeleton. *Tetrahedron,* **1998**, 54, 1615 – 1626.

42 – Koller, W. Antifungal agents with target sites in sterol functions and biosynthesis. In Target Sites of Fungicide Action. London: Ed. W. Koller. CRC Press, Ann Arbor, **1992**, 352 p.

43 - Pinedo, C., Wang, C. M., Pradier, J. M., Dalmais, B., Choquer, M., Le Pecheur, P., Morgant, G., Collado, I. G., Cane, D. E., Viaud, M. Sesquiterpene syntase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea, ACS Chemical Biology,* **2008**, 3, 791-801.

44 - Collado, I. G., Cantoral, J. M., Hernández, R., Rebordinos, L., Durán, R. Inhibition of *botrydial* biosynthesis: an approach to the synthesis of selective fungicides, *ICHEME-Environmental biotechnology*, **1994**, 107-109.

45 - Ward, B. G.; Poole, P. R.; Hill, R. A.; Cutler, H. G. Postharvest application of natural products to control *botrytis* storage rot in kiwifruit. Acta Horticulturae, **1998**, 46, 225 – 230.

46 – Patil, I. S.; Kulkarni, S.; Hedge, R. K. Bioassay of fungicides against *Drechslera sorokiniana* (Sacc). *Pesticides* 1986, 20, 30–31

47 – Leroux, P.; Gredt, M. C. R. Resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosyntesis in laboratory strains of *Botrytis cinerea* and *Ustilago maydis*. *Pesticides Science,* **1984**, 15, 85-89.

48 – Rewal, N.; Coley-Smith, J. R.; Sealy-Lewis, H. M. Studies on resistance to dichlofluanid and other fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology,* **1991**, 40, 554-560.

49 – Smith, T. A.; Barker, J. H. A.; Jung, M. Growth inhibition of *Botrytis cinerea* by compounds interfering with polyamine metabolism. J*ournal of General Microbiology,* **1990**, 136, 985 – 992.

50 – Fallik, E.; Grinberg, S. Hinokitiol: a natural substance that control postharvest diseases in eggplant and pepper fruits. *Postharvest Biology Technology,* **1992**, 2, 137 – 144.

51 – Amer, M. A.; Poppe, J. In vitro evaluation of adjuvants for more racional fungicide treatments. *Medinice Faculty Landbouww,* **1991**, 52, 545 – 558.

52 - Macías, F. A.; Castellano, D.; Molinillo J. M. G. Search for a standard phytotoxic biassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **2000**, 48, 2512-2521.

Conclusão Geral

Conclusão geral

Na Parte 1 desta tese foi realizado o estudo fitoquímico do epicarpo e mesocarpo externo do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). Este estudo possibilitou o isolamento de seis substâncias puras e quatro misturas inéditas nesta parte da planta, sendo elas o galato de etila (**43**), 5-hidroximetilfurfural (**44**), ácido gálico (**45**), chiquimato de metila (**46**), galato de metila (**55**) e as misturas *β-D*-frutofuranose (**47**) e *β-D*-frutopiranose (**48**), *α*- e *β-D*-glicose (**49**) e (**50**), lupeol (**51**) e ácido oléico (**52**) e *β*-sitosterol (**53**), estigmasterol (**54**) e ácido oléico (**52**). Tendo em vista **43** ter sido isolado a partir do extrato etanólico e **55** a partir do extrato metanólico, conclui-se que ambos são produtos da reação de esterificação do ácido gálico, ocorrida durante a extração. Assim, o produto natural presente no mesocarpo e epicarpo externo do pequi é o ácido gálico (**45**).

A avaliação das atividades citotóxica, antioxidante, alelopática e antimicrobiana, foram realizados sobre o extrato bruto, frações e substâncias puras, visando medir o potencial biológico desta parte do fruto. Foi observada ótima atividade citotóxica do ácido gálico e do galato de etila frente à *Artemia salina*. No teste de atividade antioxidante, as frações **G-1** e **G-1E** foram muito ativas, resultado corroborado pela presença de substâncias fenólicas nestas frações. Quanto à atividade alelopática, o ácido gálico mostrou-se o melhor inibidor entre frações e substâncias puras testadas, inibindo o crescimento da raiz em 35% em relação a um branco, em concentrações mais altas e estimulando o crescimento da mesma em concentrações mais baixas. Tendo em vista os resultados obtidos, pode-se também concluir que a esterificação de **45** reduz sua ação inibidora. Observou-se que, das frações testadas quanto à atividade antimicrobiana, a fração **G-1E** apresentou atividade expressiva frente aos microrganismos testados.

Na Parte 2 desta tese foram feitas transformações químicas e biotransformações de isocariolanos e de derivados de rearranjos destes, resultando em quatro novos produtos de transformação química e 14 novos produtos de biotransformação. A avaliação das atividades fungistática e alelopática foi realizada com alguns dos compostos obtidos.

O ensaio da atividade fungistática, frente a *B. cinerea,* do material de partida (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**) e dos produtos de biotransformação (8*R*,9*R)*-isocariolan-8,9-diol (**80**) e (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9,15-diol (**88**) mostrou

que a biotransformação de **78** em **88** consiste em um mecanismo de destoxificação efetivo sobre a citotoxicidade de *B. cinerea,* e a metabolização de **78** em **80** é uma maneira menos efetiva de diminuir a toxicidade de **78**, visto que **80** ainda apresenta um nível moderado de atividade antifúngica. Os éteres **78**, (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**), (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**), (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**) e (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**) também foram avaliados quanto à inibição do crescimento de *B. cinerea*. Observou-se que o éter **87** apresentou melhor atividade de inibição da série testada. Entretanto, novos ensaios comprobatórios desta atividade deverão ser realizados visto que, em uma perspectiva teórica, a diminuição da solubilidade em água dos compostos, devido ao aumento da cadeia carbônica, pode ter influenciado os resultados obtidos, já que o ensaio biológico foi feito em meio aquoso. Ainda assim, estes resultados preliminares são encorajadores para o planejamento racional de novos fungicidas contra *B. cinerea*.

Em relação ao teste de atividade alelopática, foram testados os materiais de partida das biotransformações, **78**, **80**, isocariolan-9α-ol (**82**) e (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**), observando-se que os quatro compostos apresentaram atividade inibitória em relação ao crescimento do caule de *L. sativa* a 100 μmol/L, e o composto **83** foi o que apresentou maior atividade inibitória do caule nesta concentração. Foram testados os seguintes produtos de biotransformação **88**, (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (**89**), (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolan-8,9,15-triol (**90**), (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolan-6,8,9-triol (**91**), (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo [6.3.1.$0^{2,5}$]dodecan-9-ona (**94**), (15*R*,9*R*)-isocariolan-9,15-diol (**95**) e (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (**97**), sendo o produto **91** aquele que mais inibiu tanto o crescimento do caule quanto o da raiz de *L. sativa*, a 100 μmol/L. A série de éteres **78**, (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**), (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**), (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**) e (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**) também foi avaliada quanto à atividade alelopática, e todos apresentaram atividade inibitória do caule 100 μmol/L. Quanto à germinação de *L. sativa*, foi um predominante estímulo que foi observado, sendo que este estímulo aumentou proporcionalmente com o tamanho da cadeia alquílica do éter.

Anexo 1

Parte 1

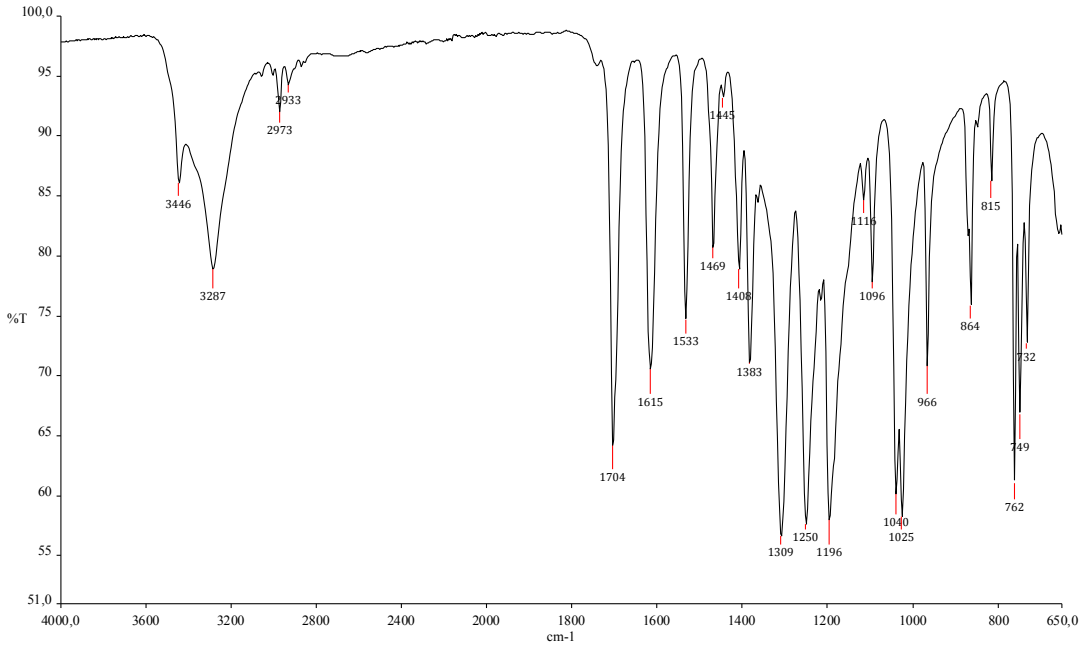


Figura 9 – Espectro no IV de galato de etila (**43**) (ATR).

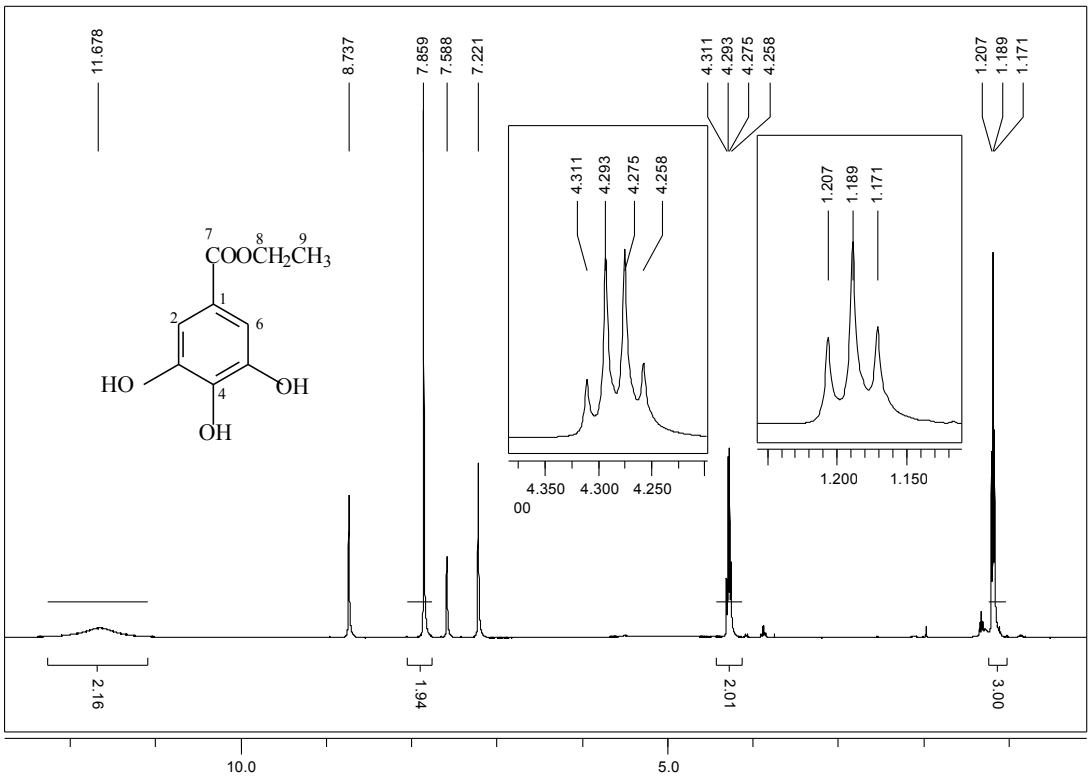


Figura 10 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, piridina-d5) de galato de etila (**43**).

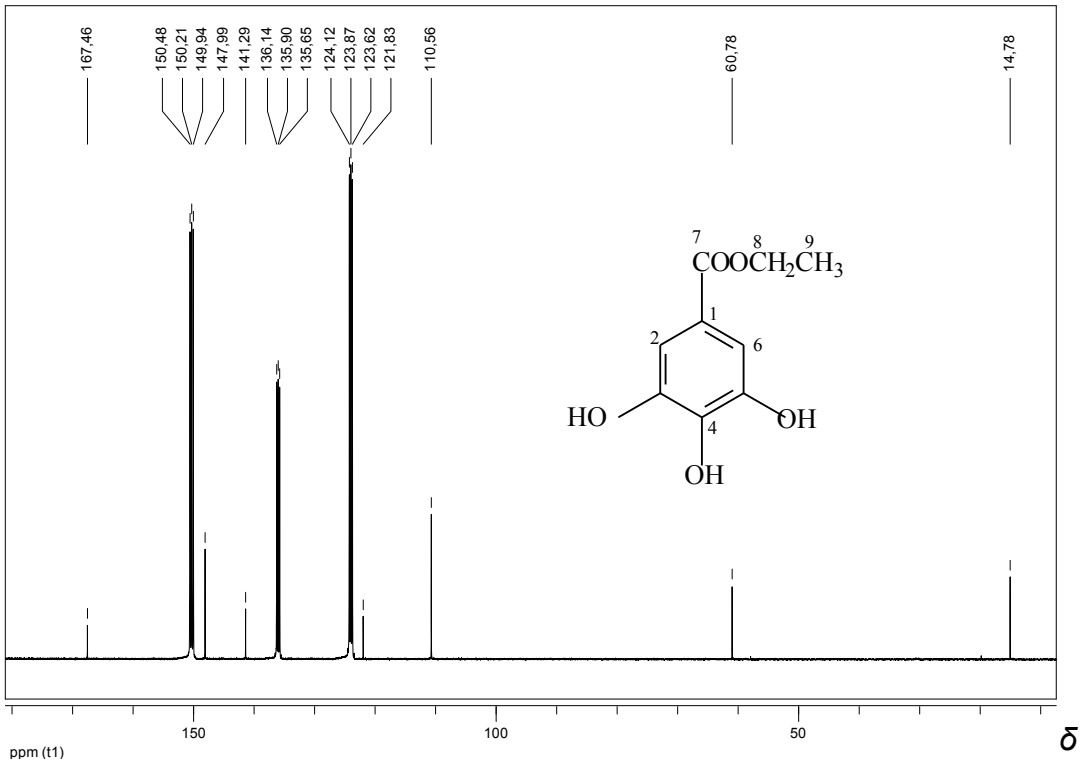


Figura 11 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, piridina-d5) de galato de etila (**43**).

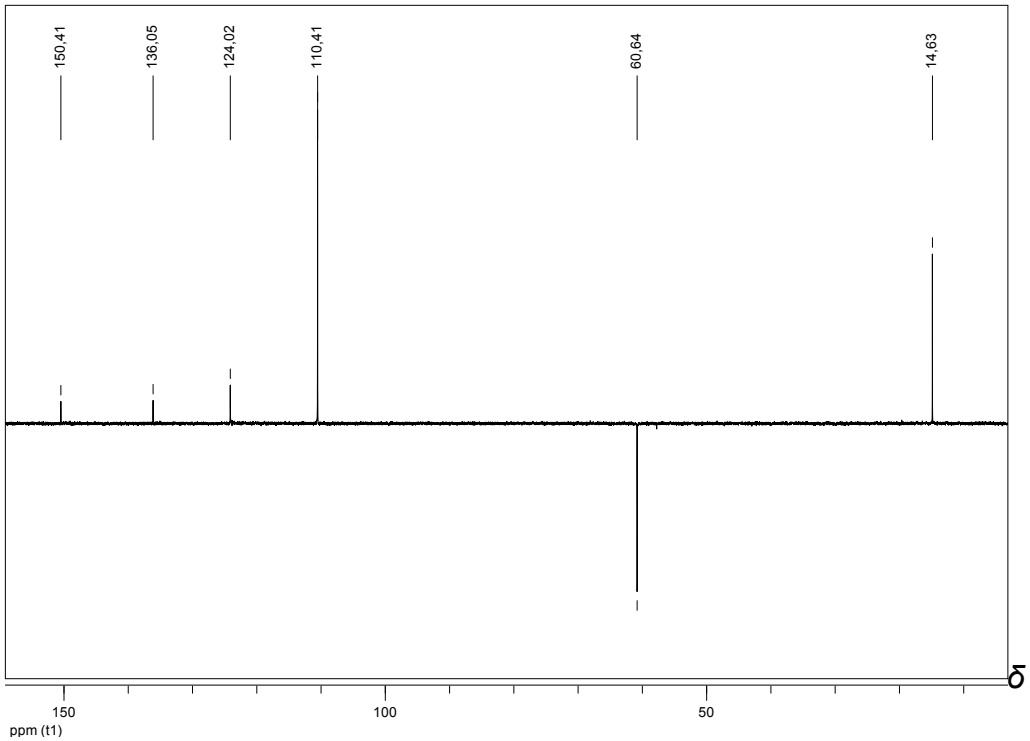


Figura 12 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, piridina-d5) de galato de etila (**43**).

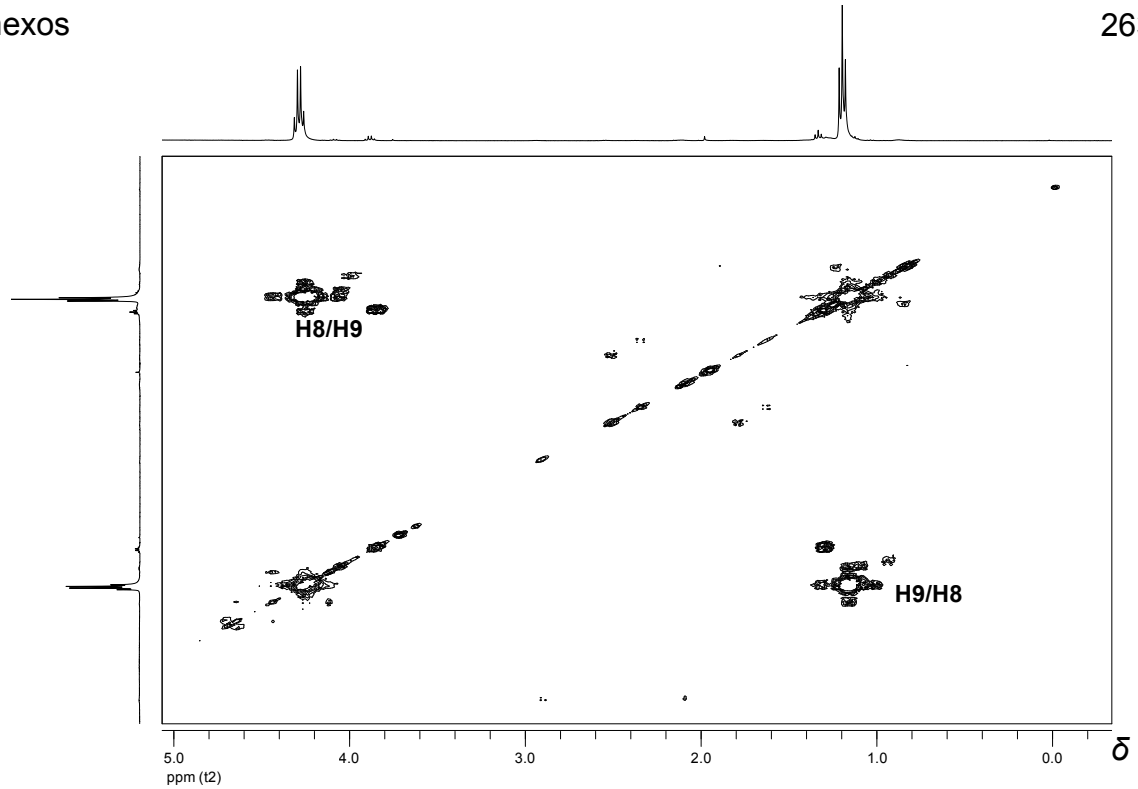


Figura 13 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, piridina-d5) de galato de etila (**43**). Expansão da região entre δ_H 1,00 – 5,00.

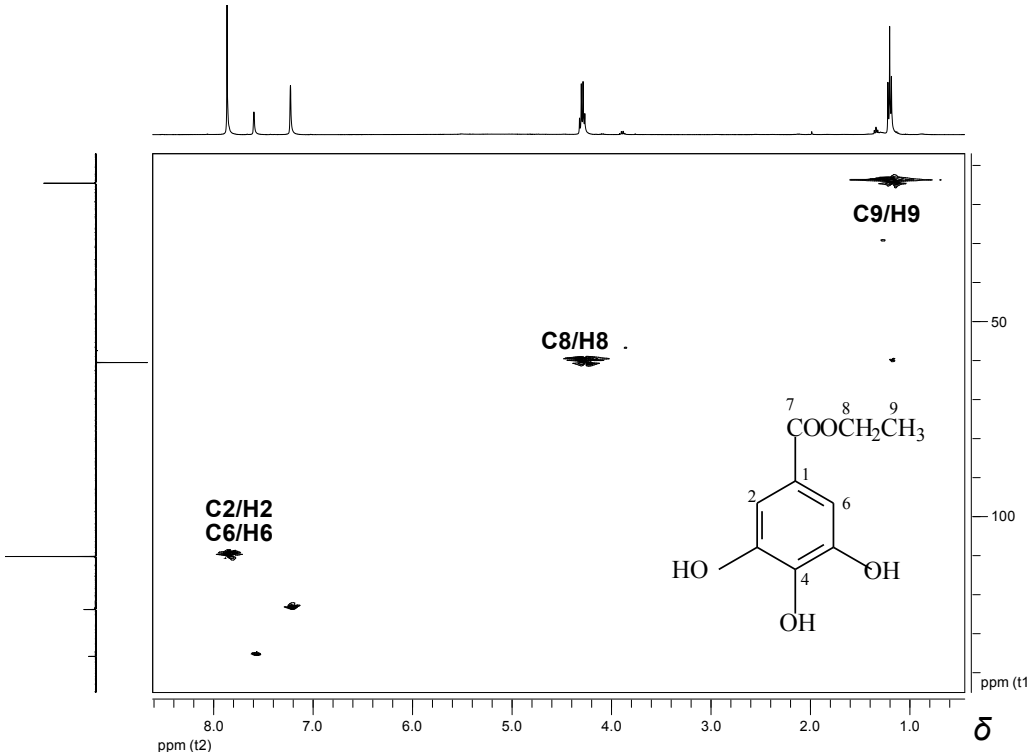


Figura 14 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, piridina-d5) de galato de etila (**43**).

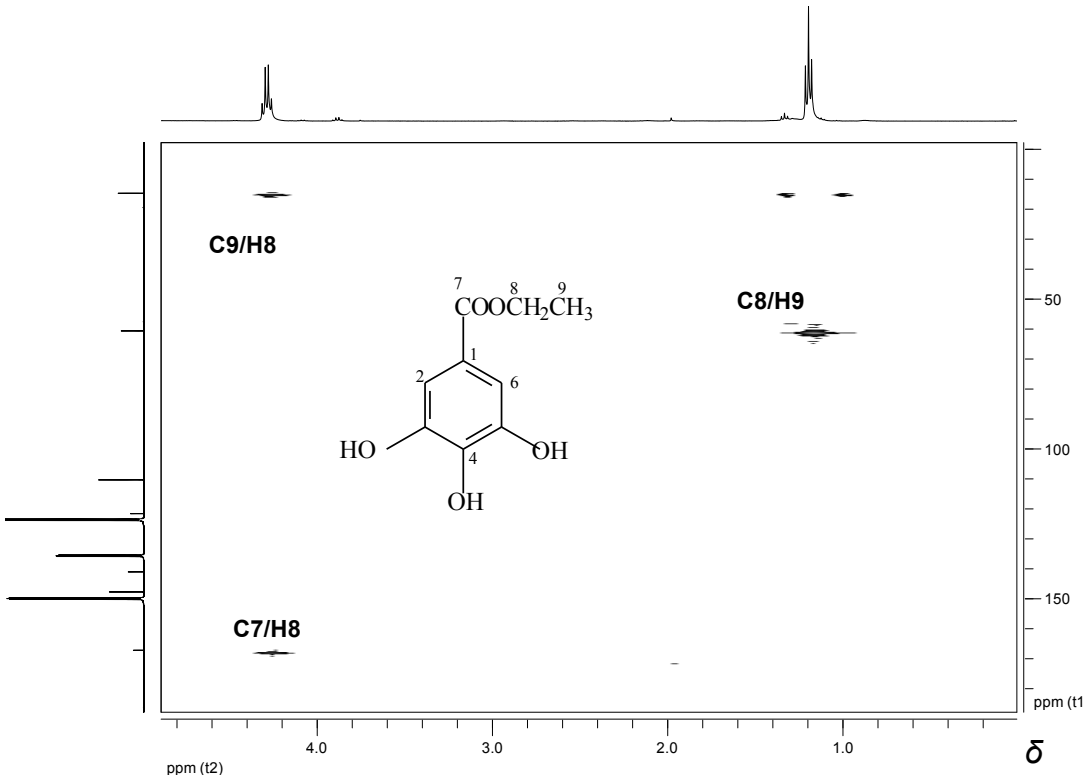


Figura 15 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, piridina-d5) de galato de etila (**43**).Expansão da região entre δ_H 0,00 – 5,00.

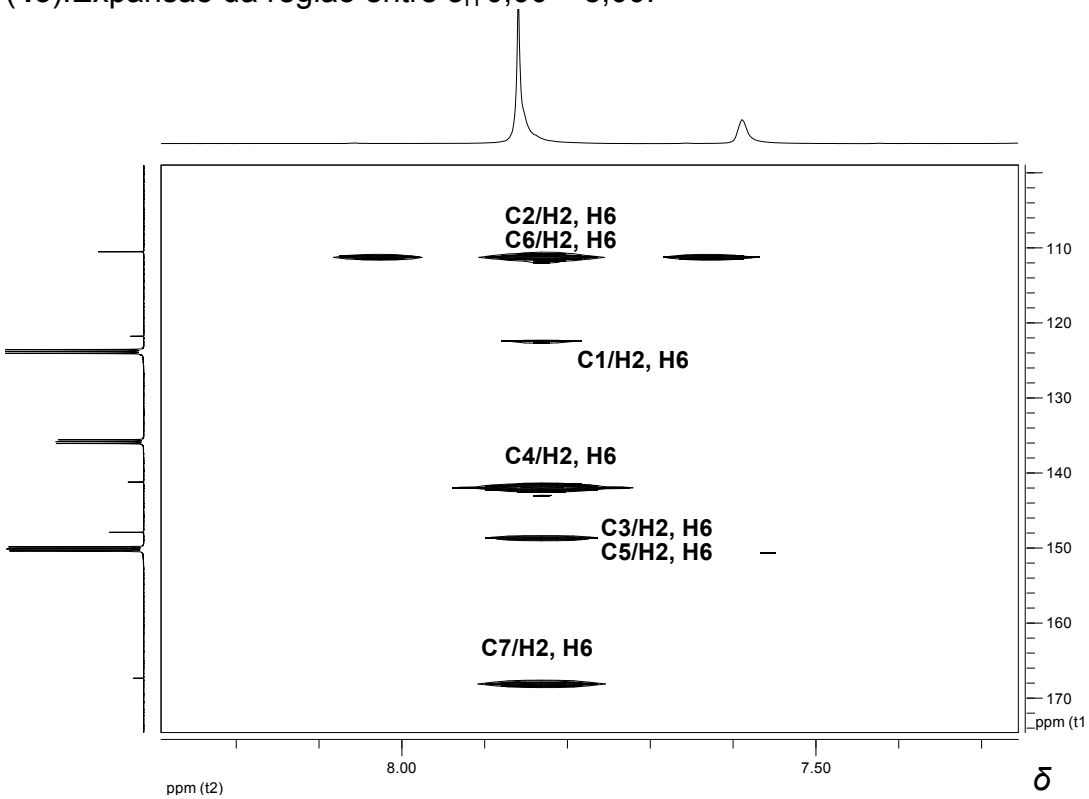


Figura 16 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, piridina-d5) de galato de etila (**43**). Expansão da região entre δ_H 7,30 – 8,20.

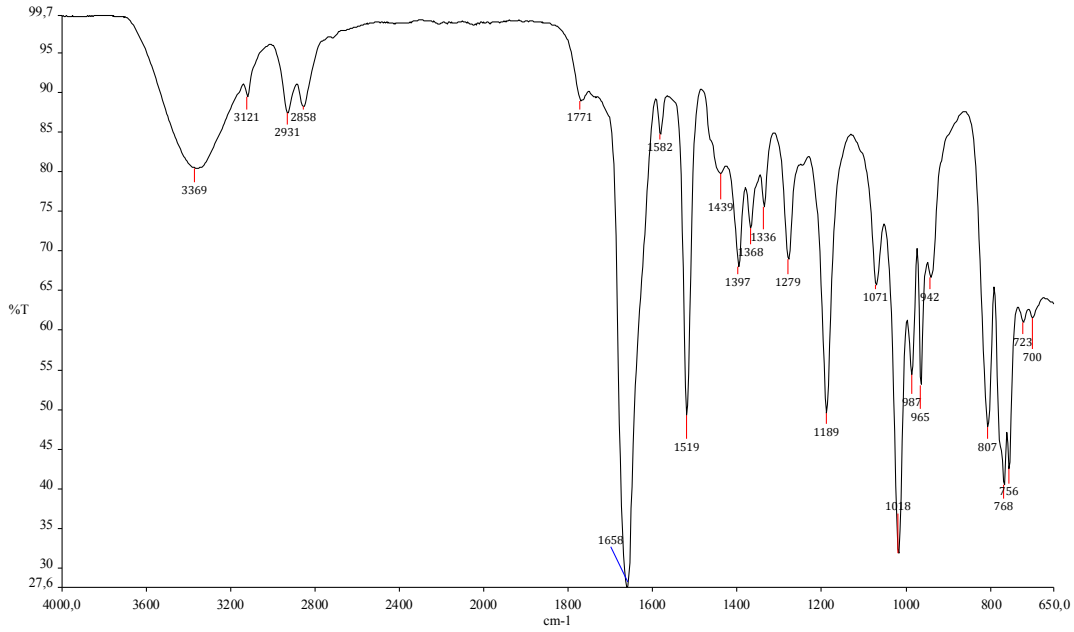


Figura 17 – Espectro no IV de 5-hidroximetilfurfural (**44**) (ATR).

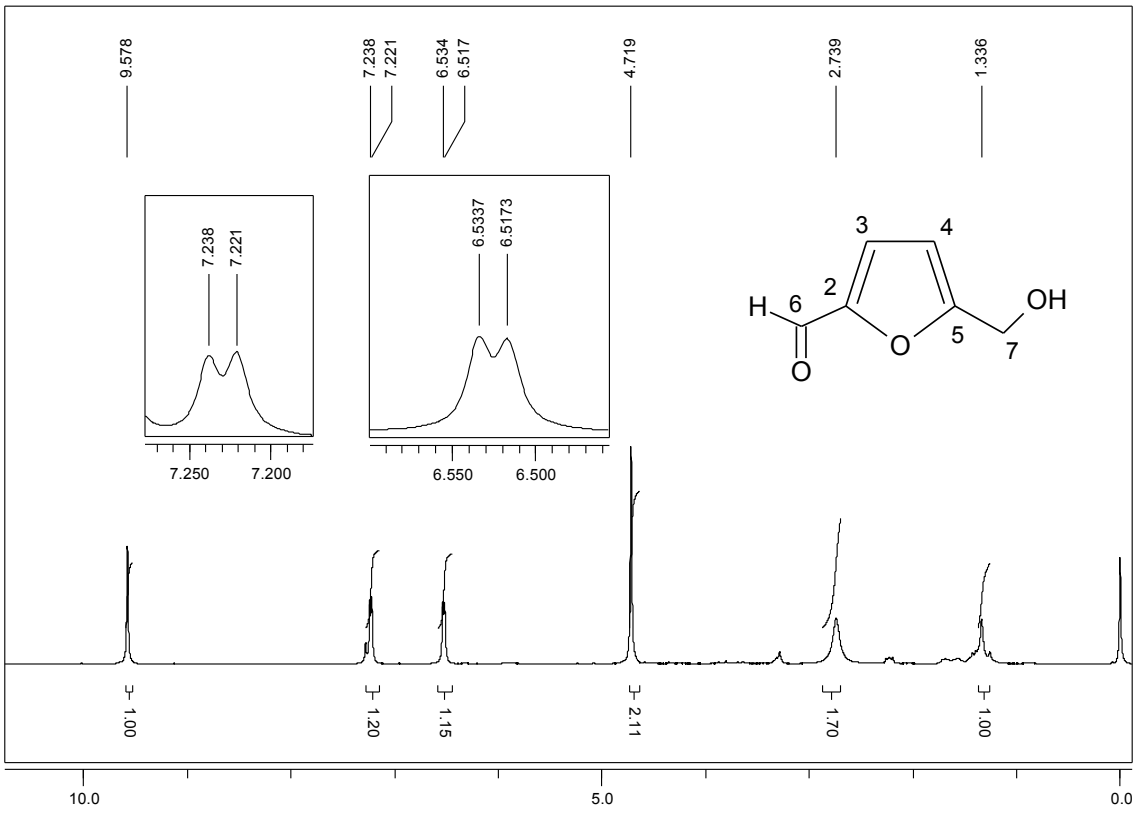


Figura 18 – Espectro de RMN de ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (**44**).

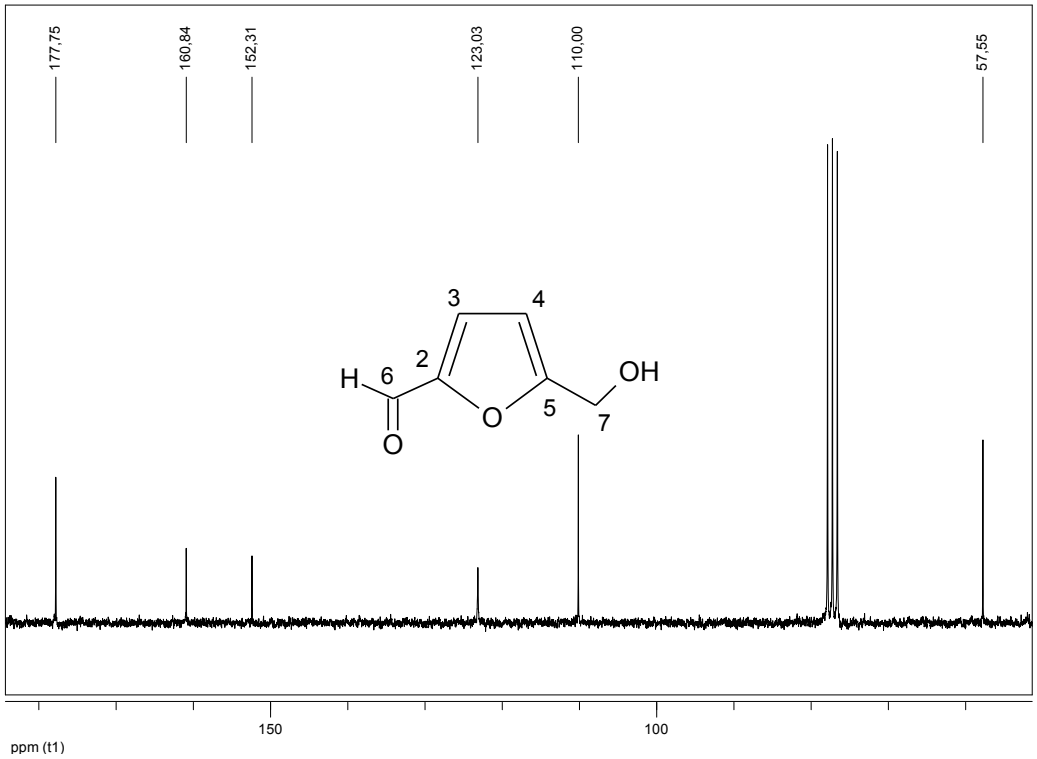


Figura 19 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (**44**).

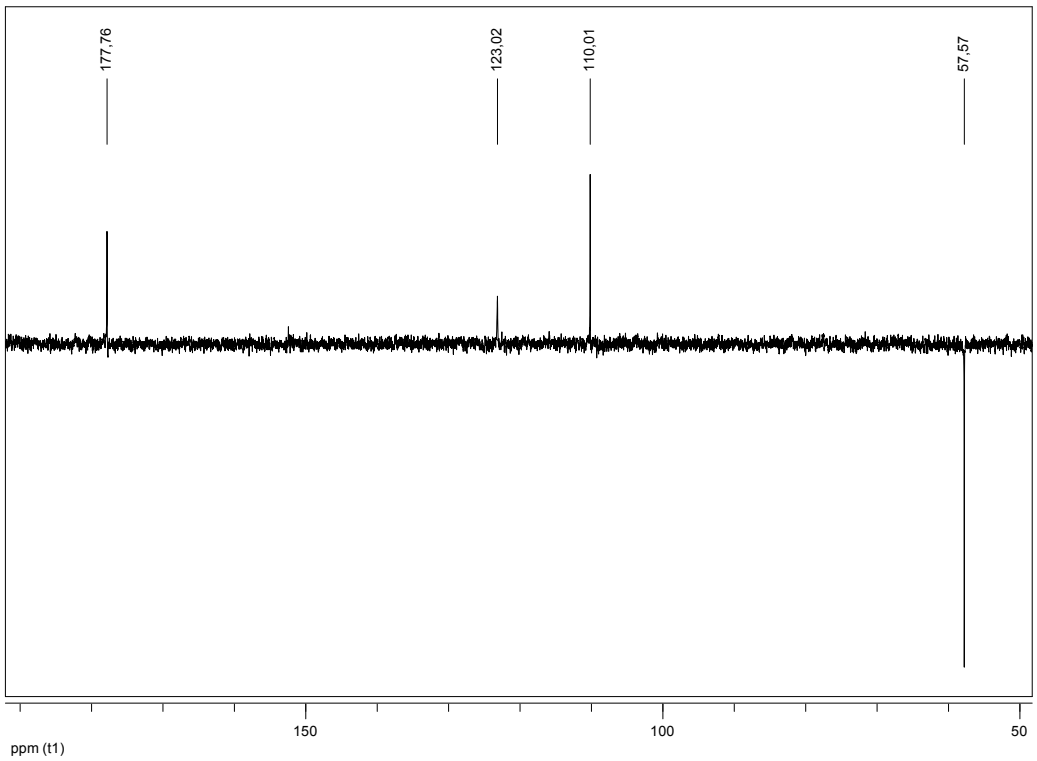


Figura 20 – Subespectro DEPT-135 (50 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (**44**).

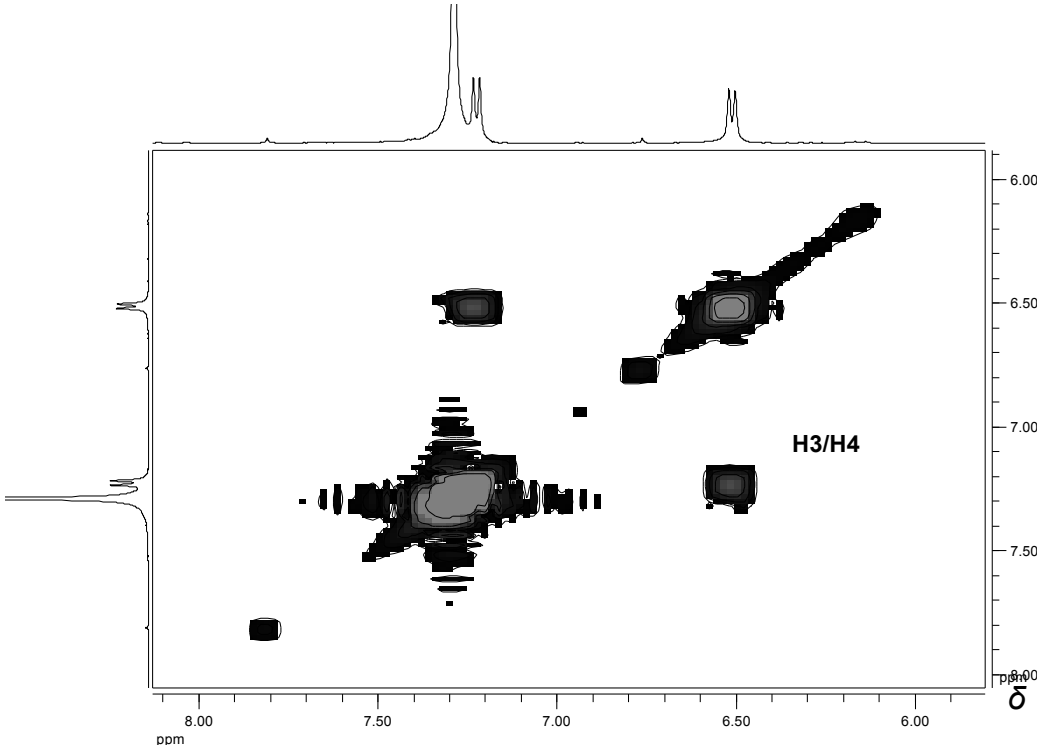


Figura 21 – Mapa de contornos COSY (200 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (**44**).

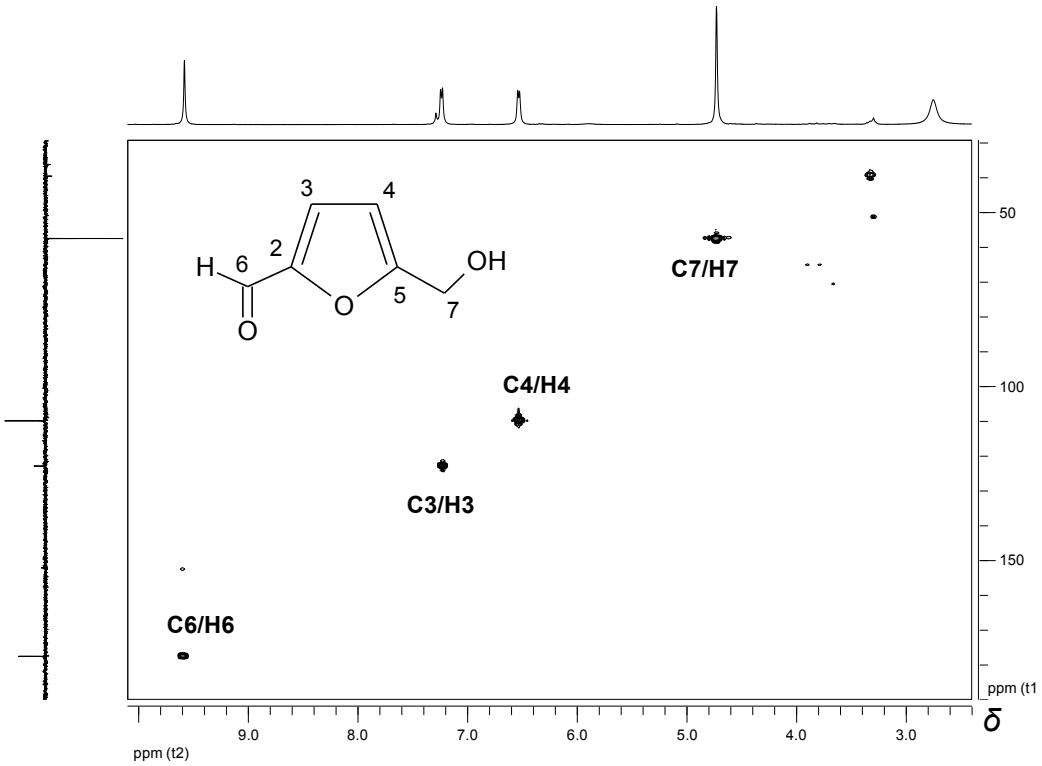


Figura 22 – Mapa de contornos HSQC (200 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (**44**).

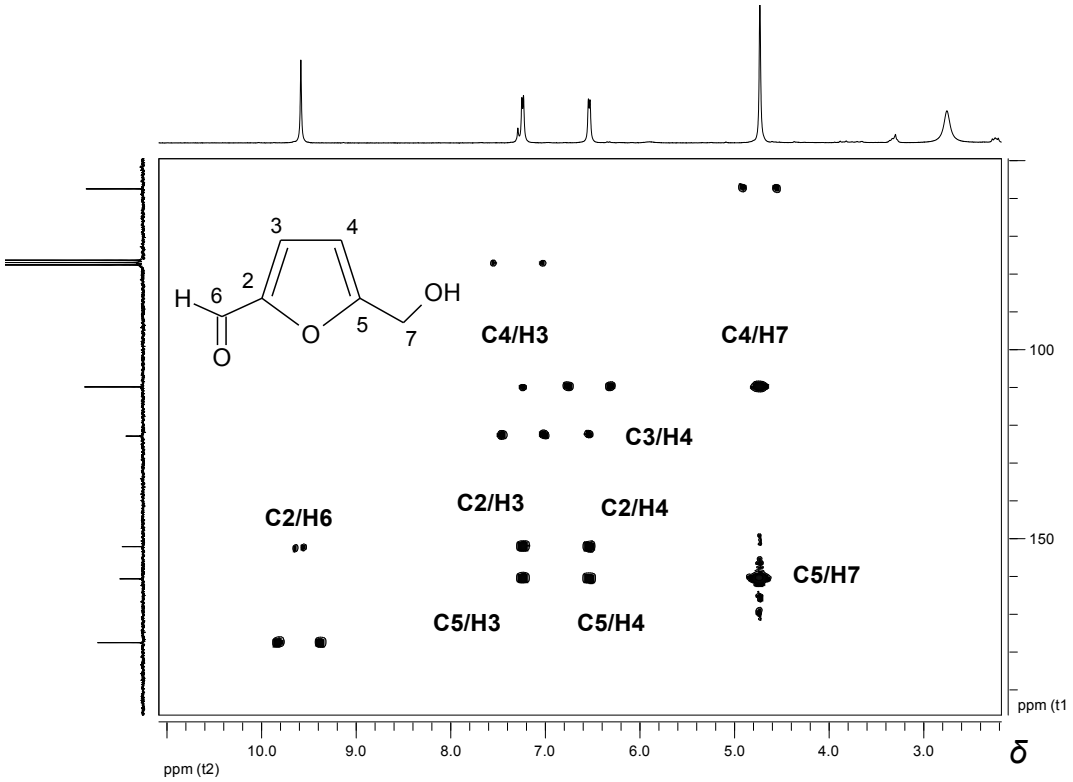


Figura 23 – Mapa de contornos HMBC (200 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (**44**).

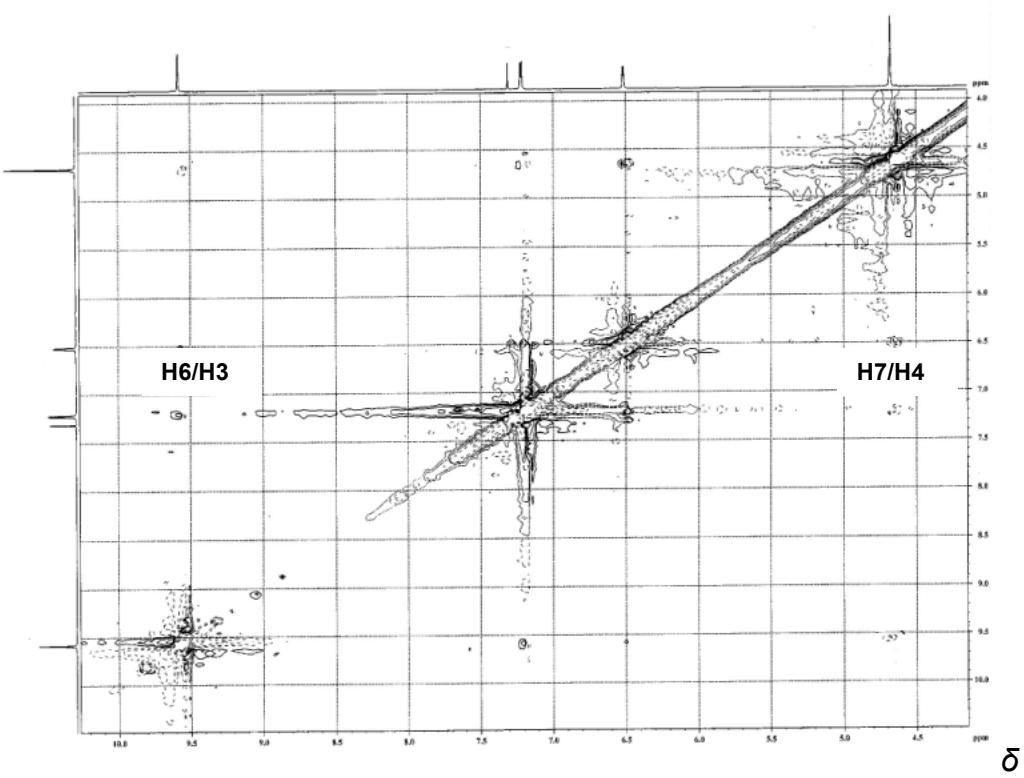


Figura 24 – Mapa de contornos ROESY (200 MHz, $CDCl_3$) de 5-hidroximetilfurfural (**44**).

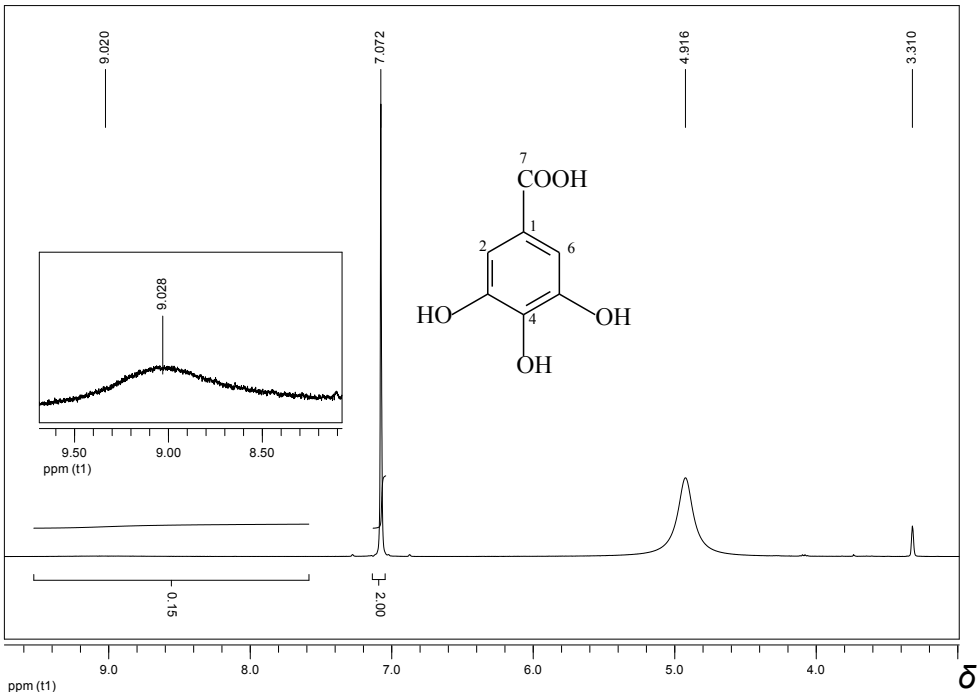


Figura 25 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) de ácido gálico (**45**).

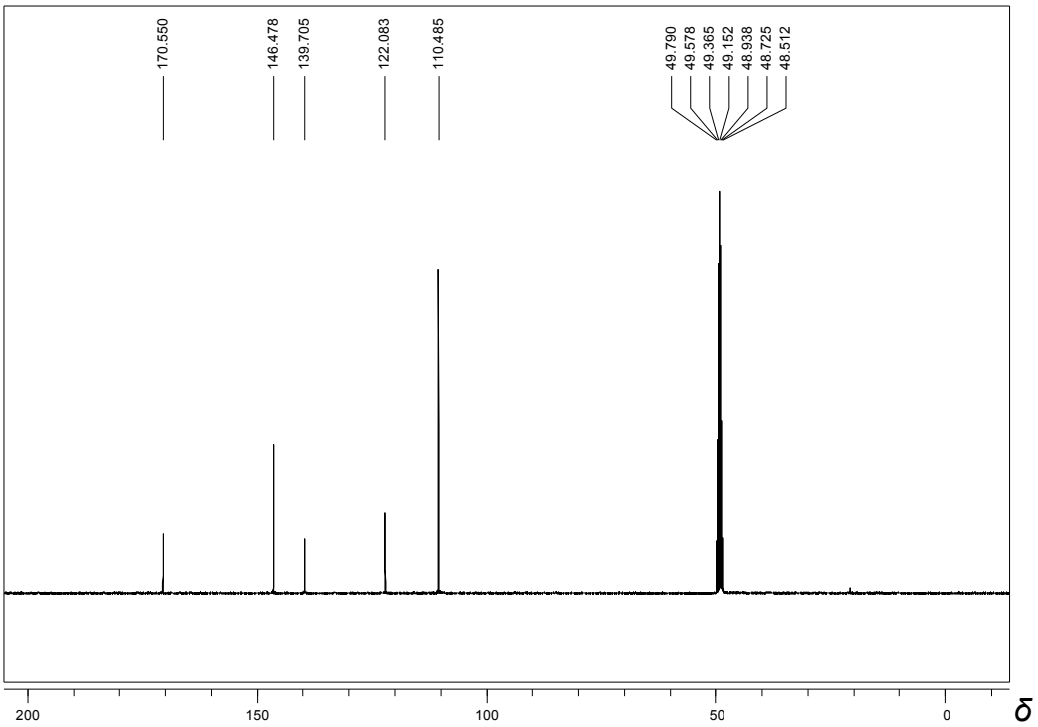


Figura 26 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de ácido gálico (**45**).

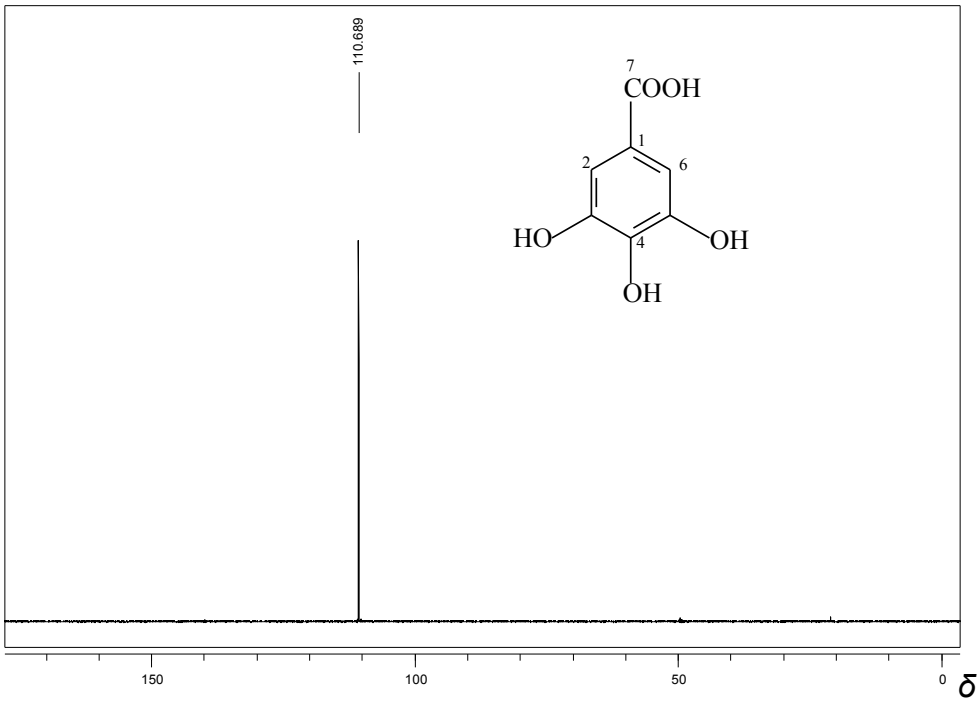


Figura 27 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD) de ácido gálico (**45**).

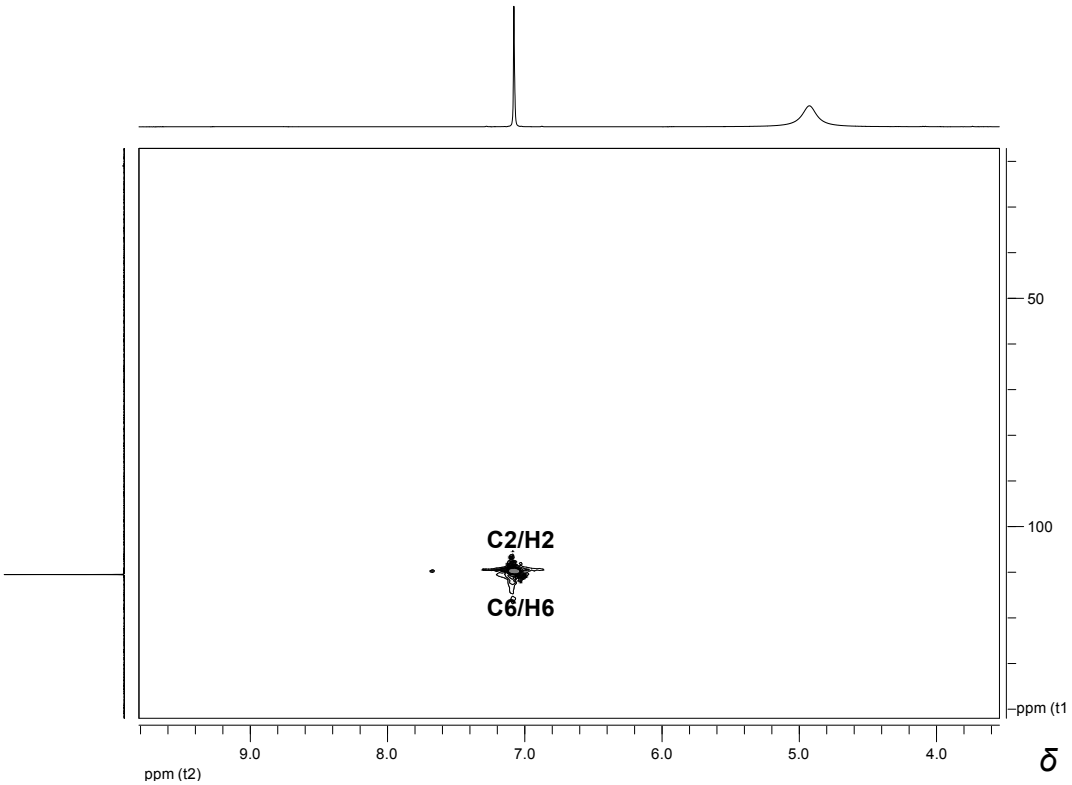


Figura 28 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD) de ácido gálico (**45**).Expansão da região entre δ_H 4,0 – 10,0.

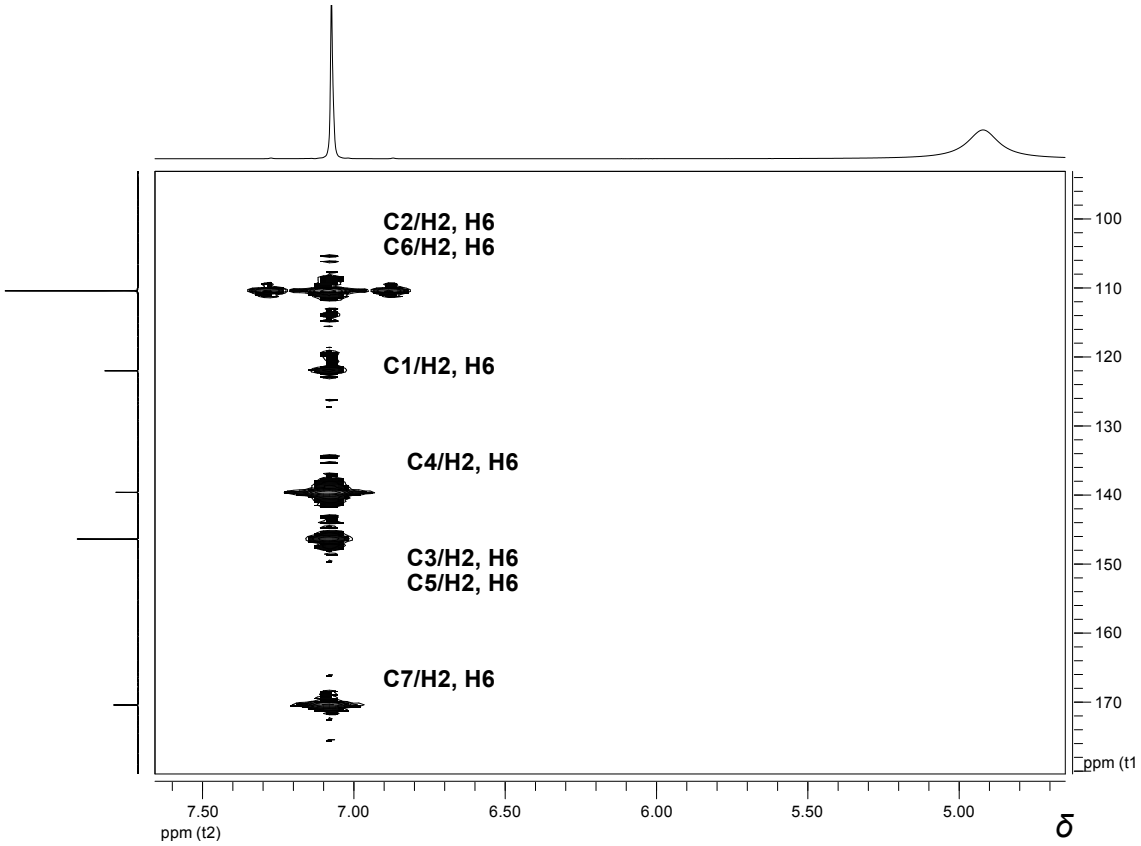


Figura 29 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3OD) de ácido gálico (**45**). Expansão da região entre δ_H 5,0 – 7,5.

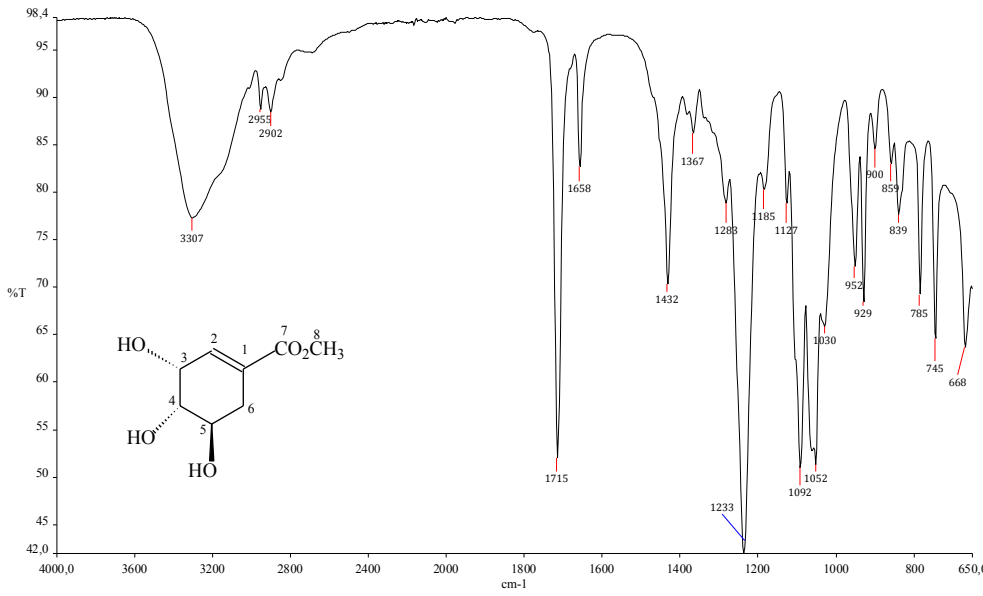


Figura 30 – Espectro no IV de chiquimato de metila (**46**) (ATR) .

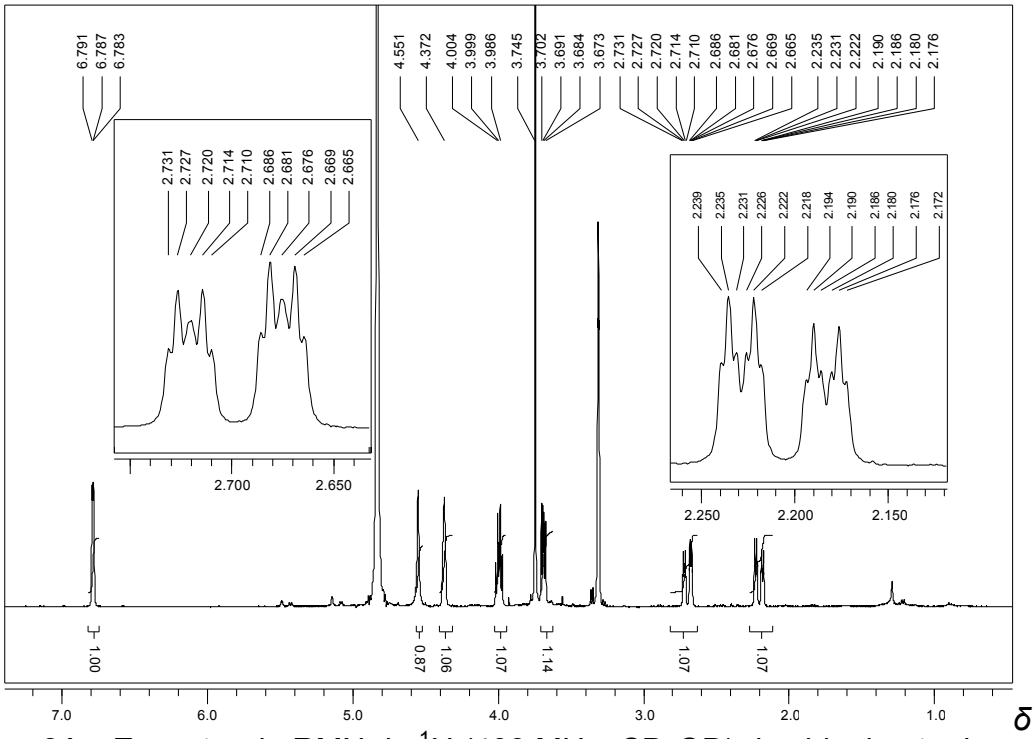


Figura 31 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (**46**).

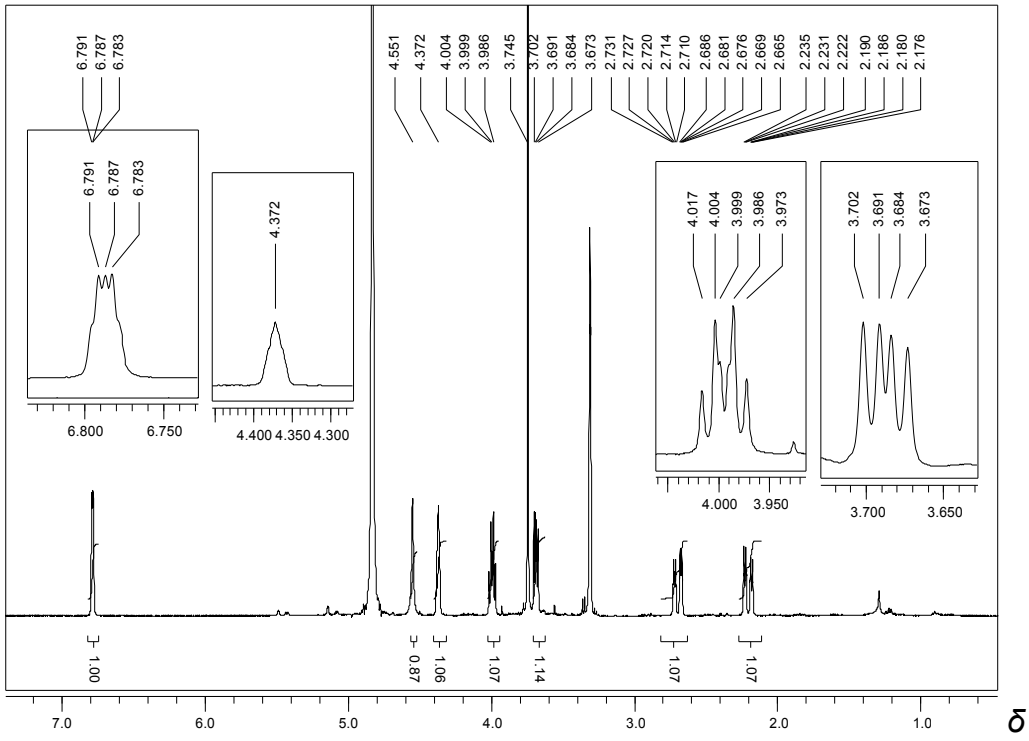


Figura 32 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (**46**).

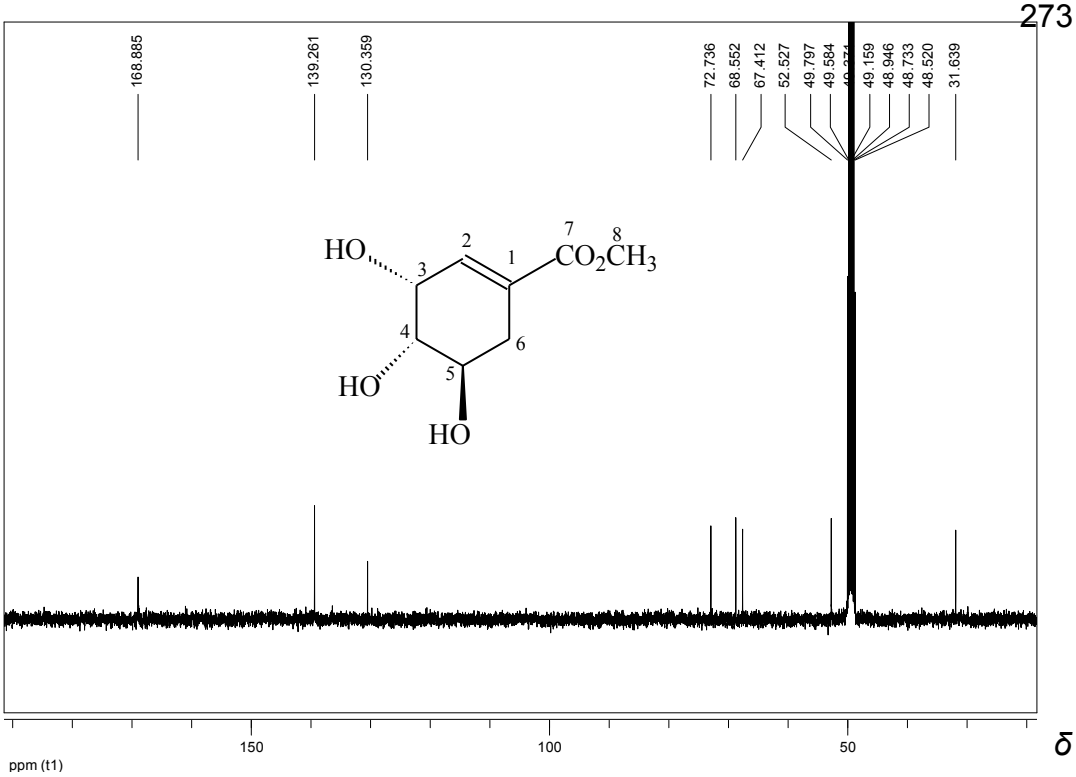


Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (**46**).

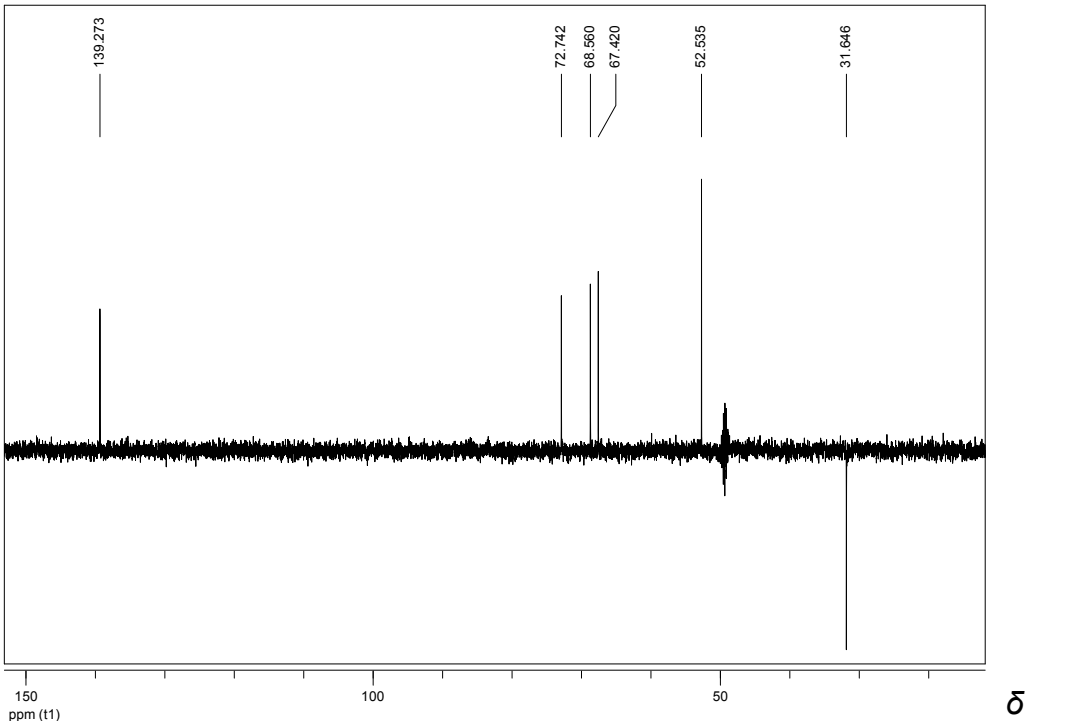


Figura 34 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (**46**).

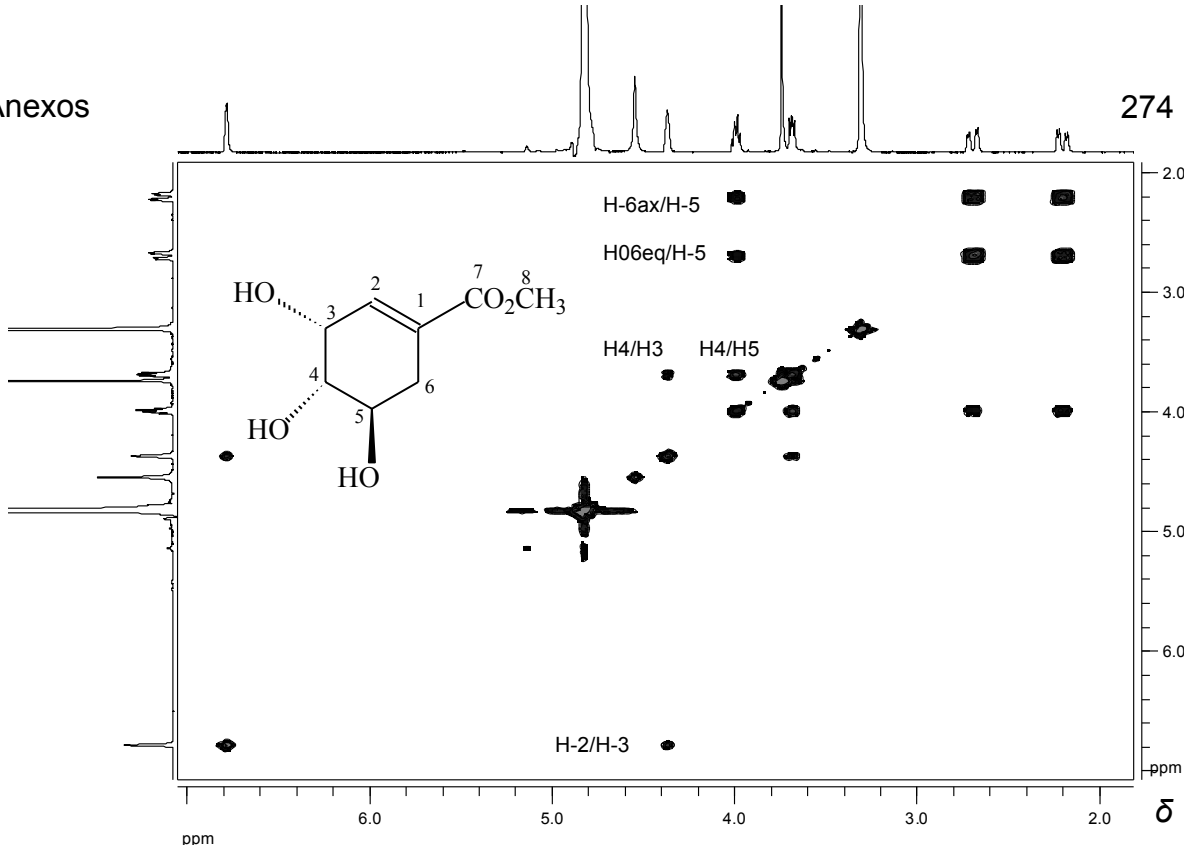


Figura 35 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (**46**).

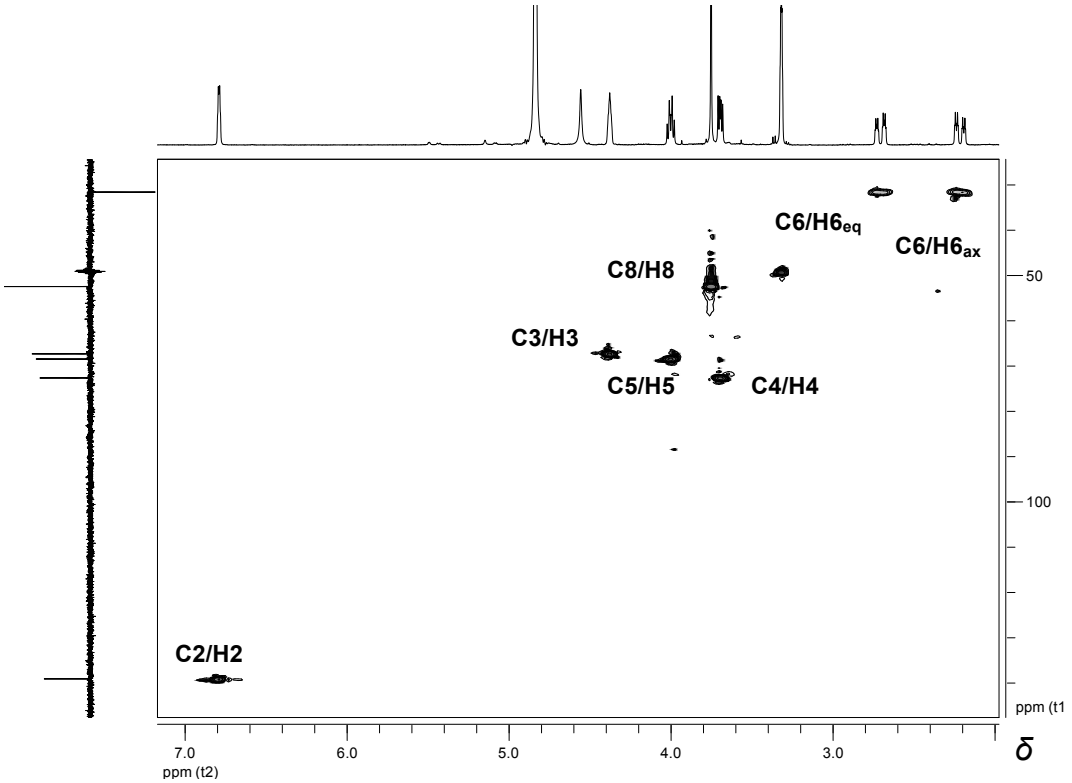


Figura 36 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (**46**).

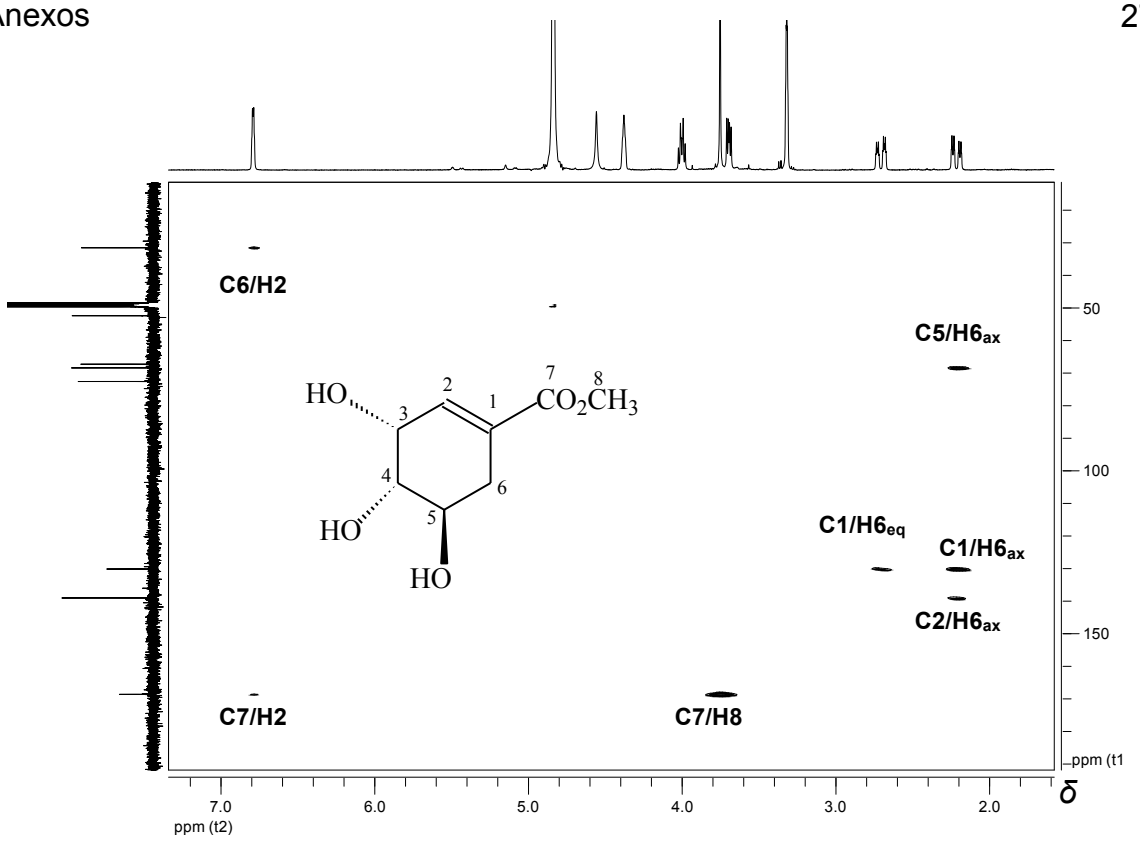


Figura 37 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (**46**).

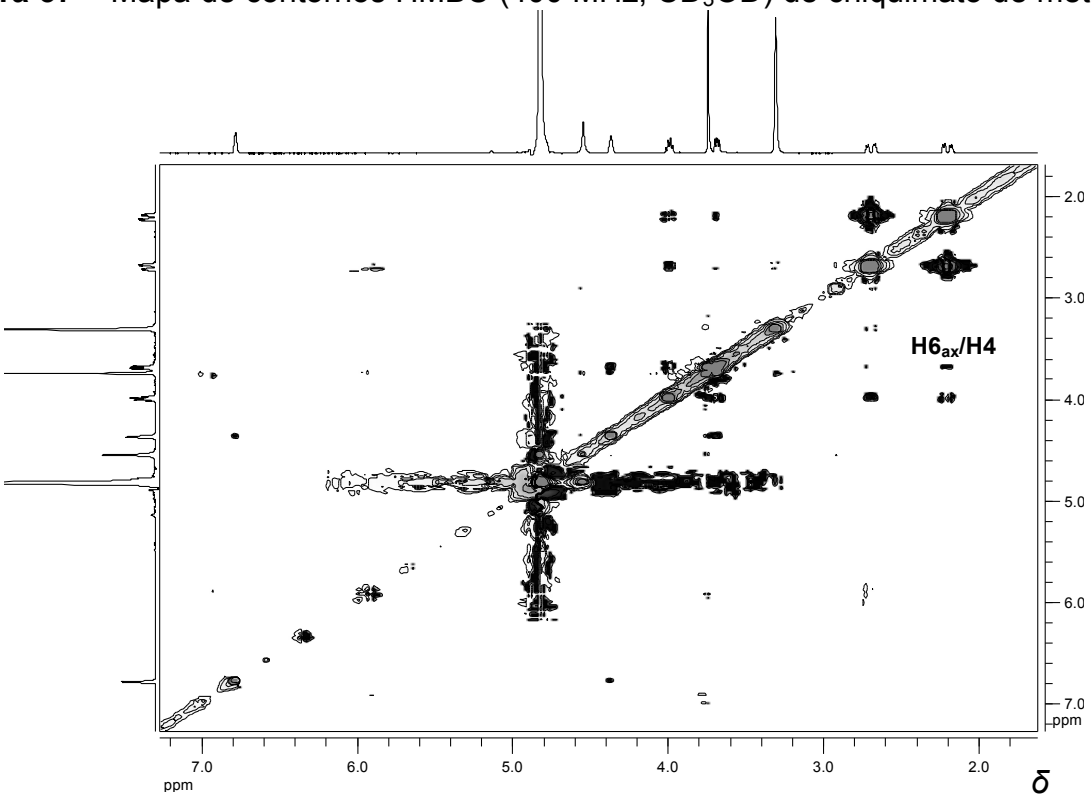


Figura 38 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CD_3OD) de chiquimato de metila (**46**).

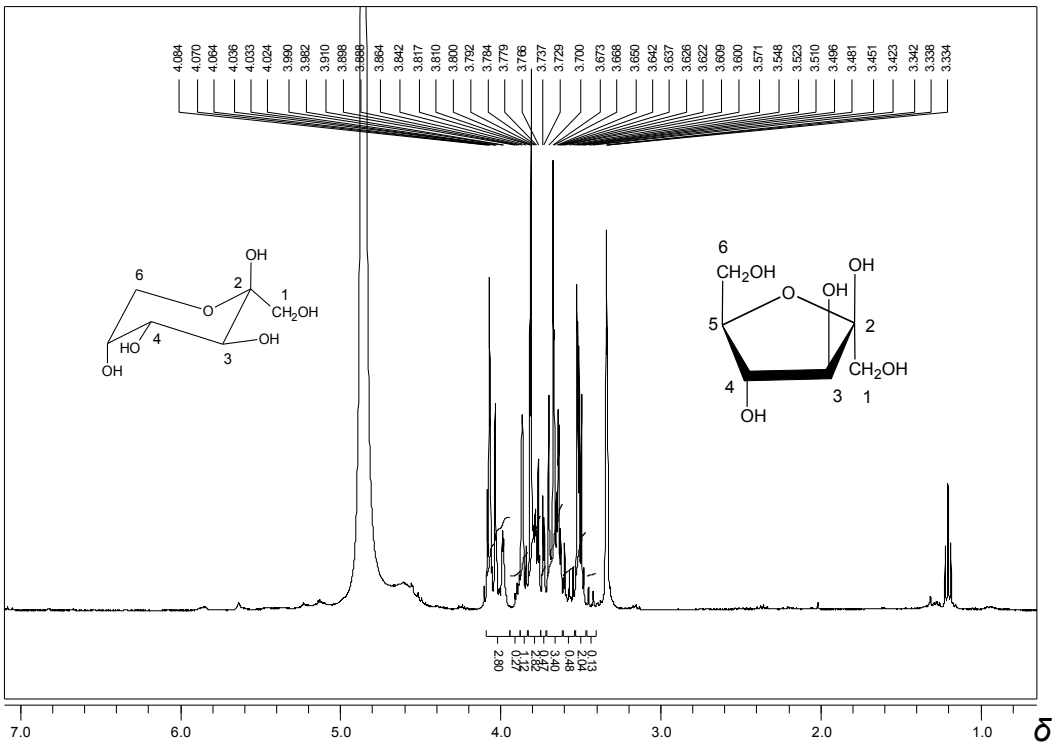


Figura 39 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) da mistura de *β*-D-Frutofuranose (**47**) e *β*-D-Frutopiranose (**48**).

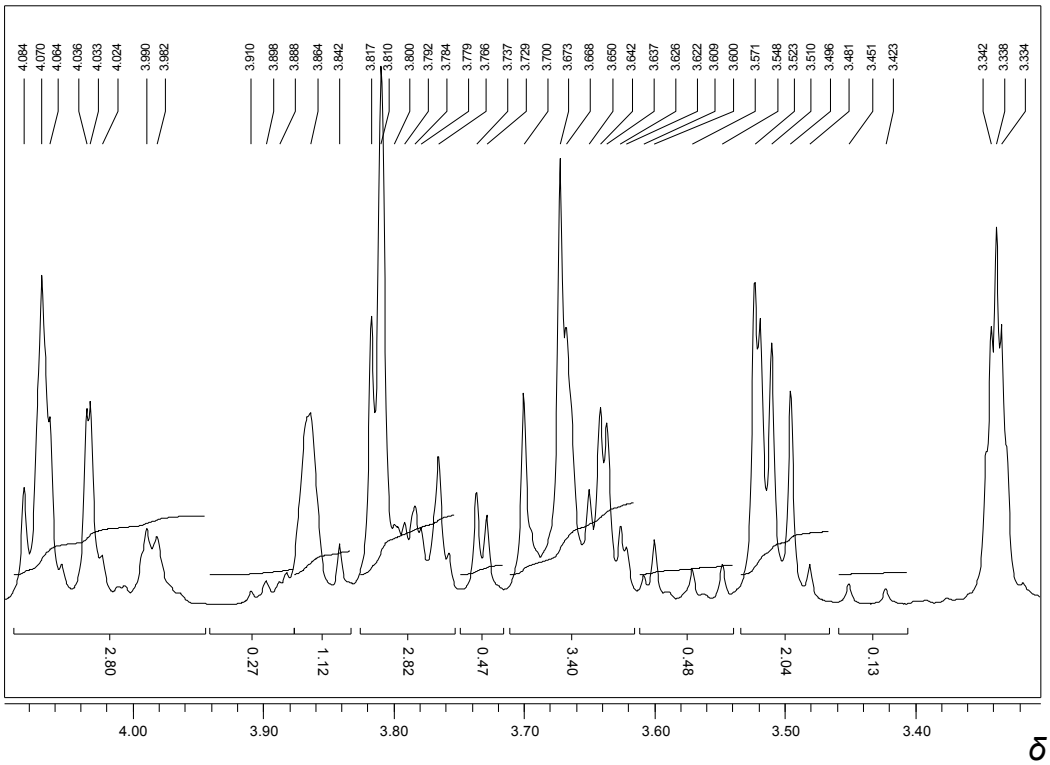


Figura 40 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) da mistura de *β*-D-Frutofuranose (**47**) e *β*-D-Frutopiranose (**48**). Expansão da região entre δ_H 3,0-4,2.

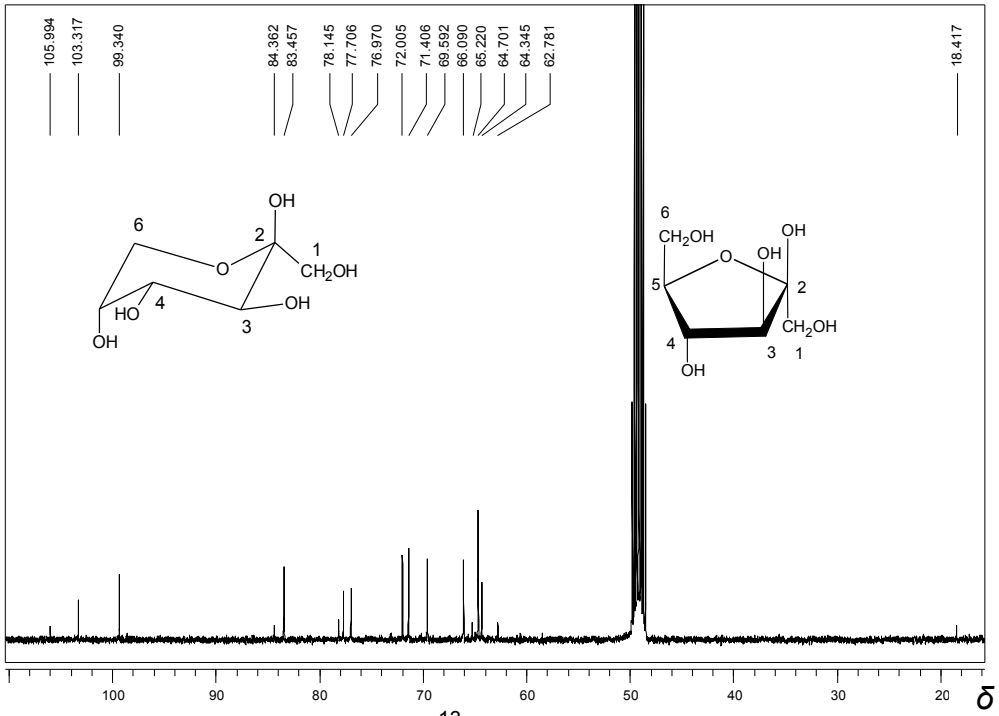


Figura 41 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da mistura de *β*-D-Frutofuranose (**47**) e *β*-D-Frutopiranose (**48**).

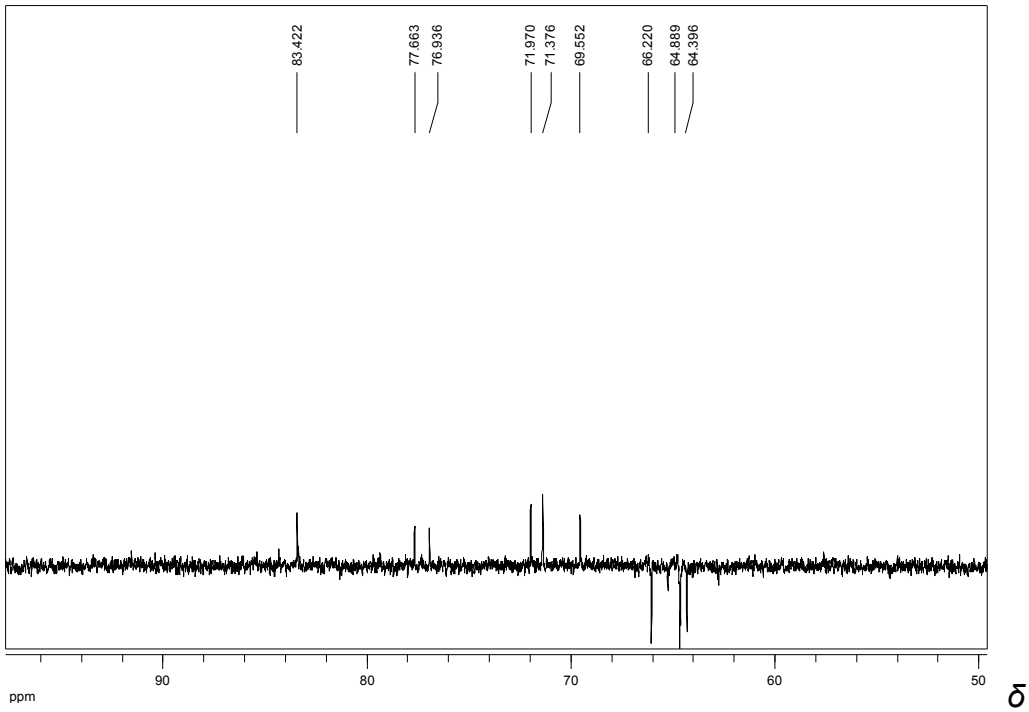


Figura 42 – Subspectro DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD) da mistura de *β*-D-Frutofuranose (**47**) e *β*-D-Frutopiranose (**48**).

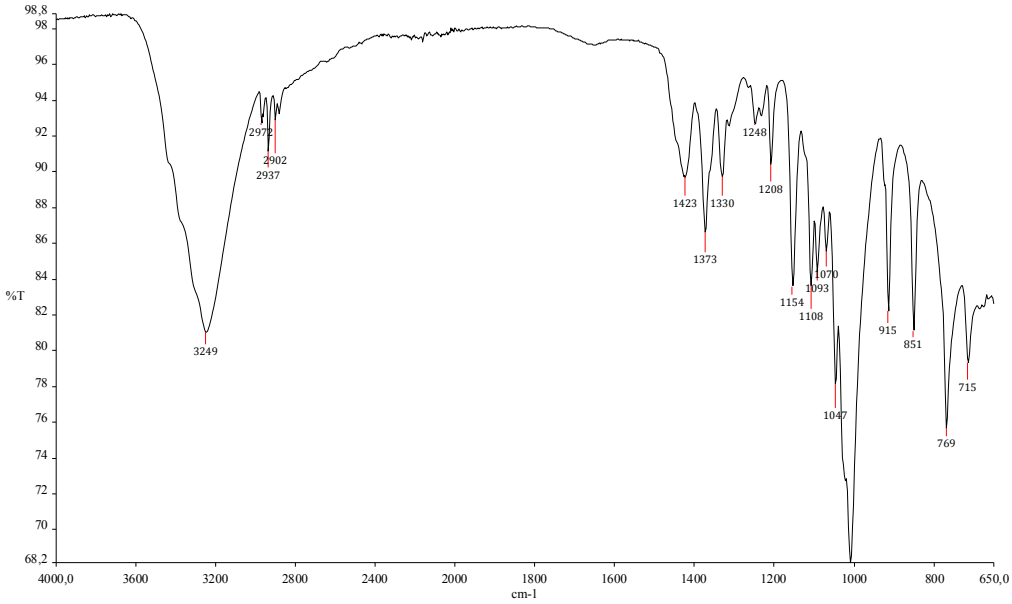


Figura 43 – Espectro no IV da mistura de *α*-D-glicose (**49**) e *β*-D-glicose (**50**)(ATR).

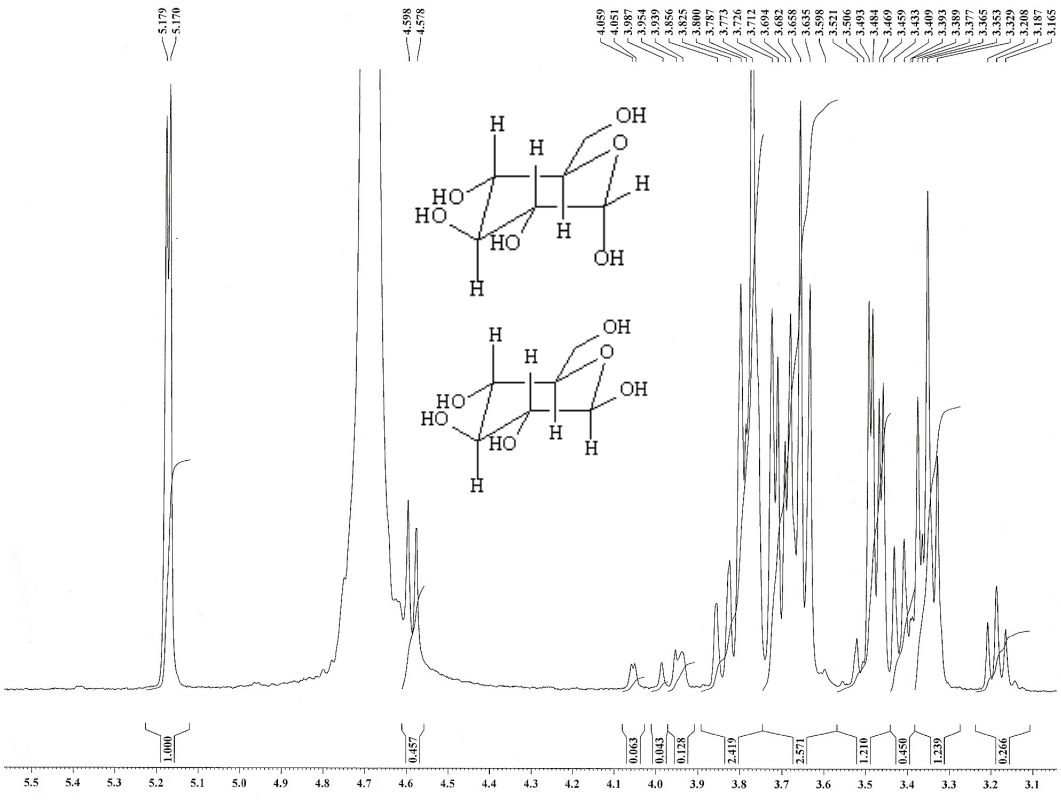


Figura 44 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, D_2O) da mistura de *α*-D-glicose (**49**) e *β*-D-glicose (**50**).

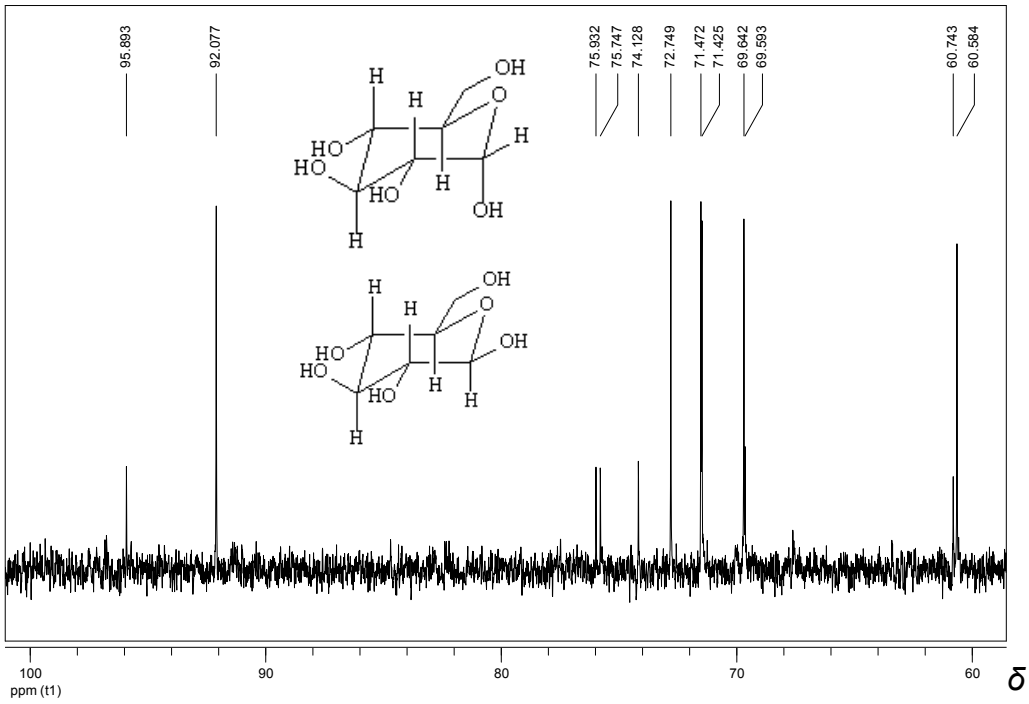


Figura 45 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O) da mistura de *α*-D-glicose (**49**) e *β*-D-glicose (**50**).

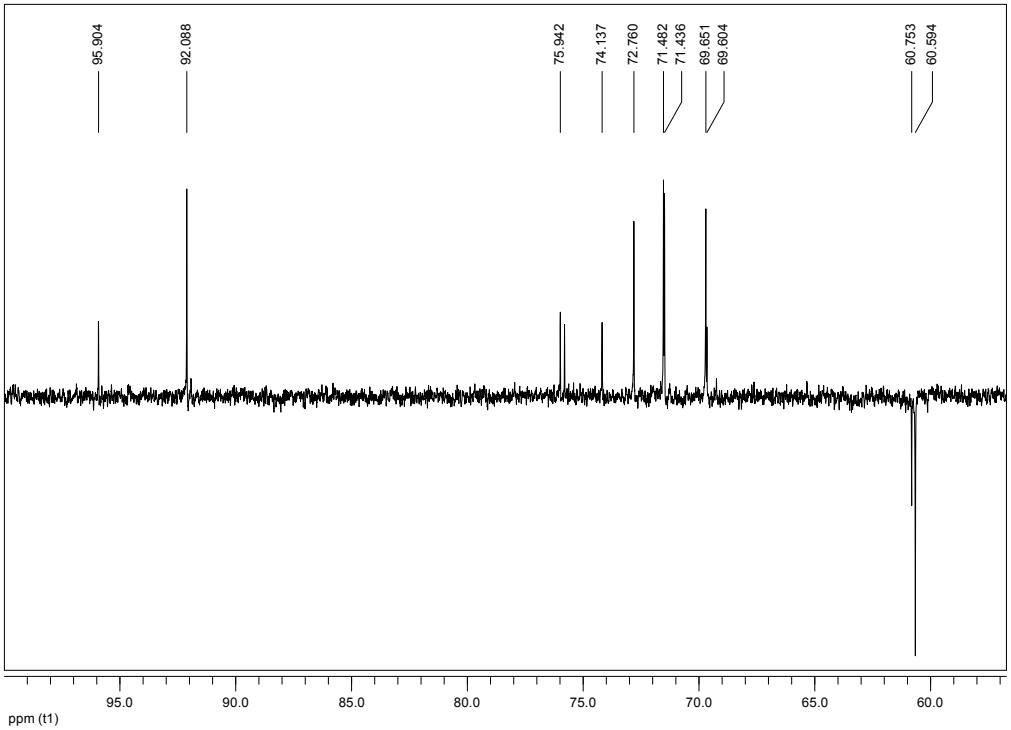


Figura 46 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, D_2O) da mistura de *α*-D-glicose (**49**) e *β*-D-glicose (**50**).

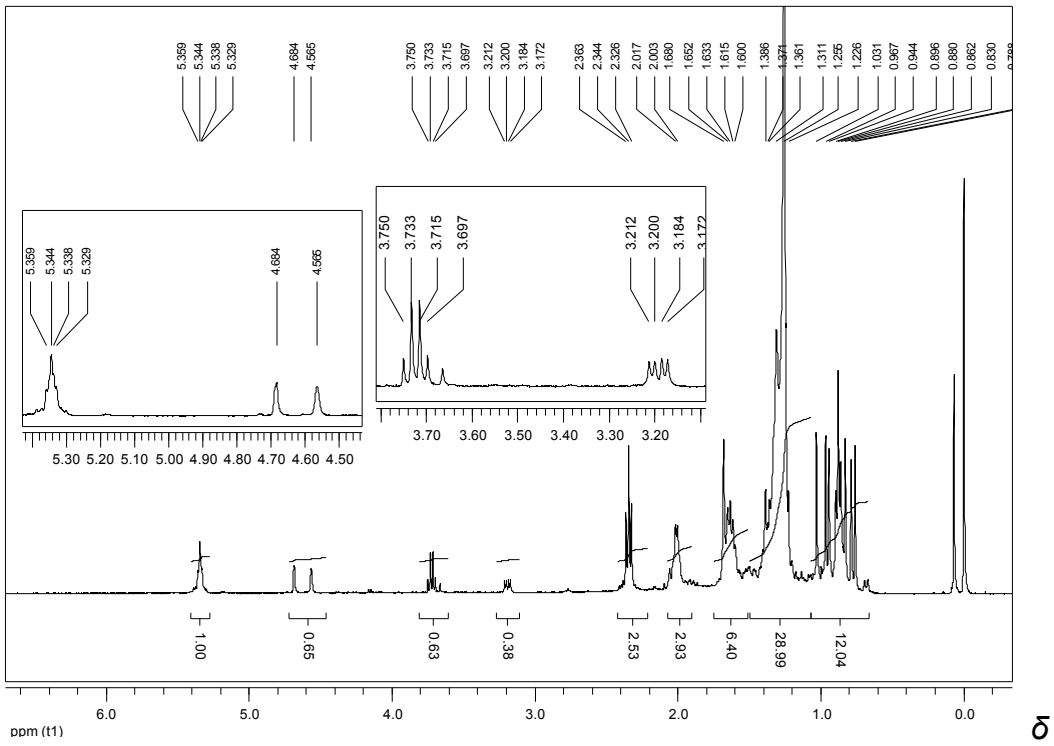


Figura 47 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) da mistura de lupeol (**51**) e ácido oléico (**52**).

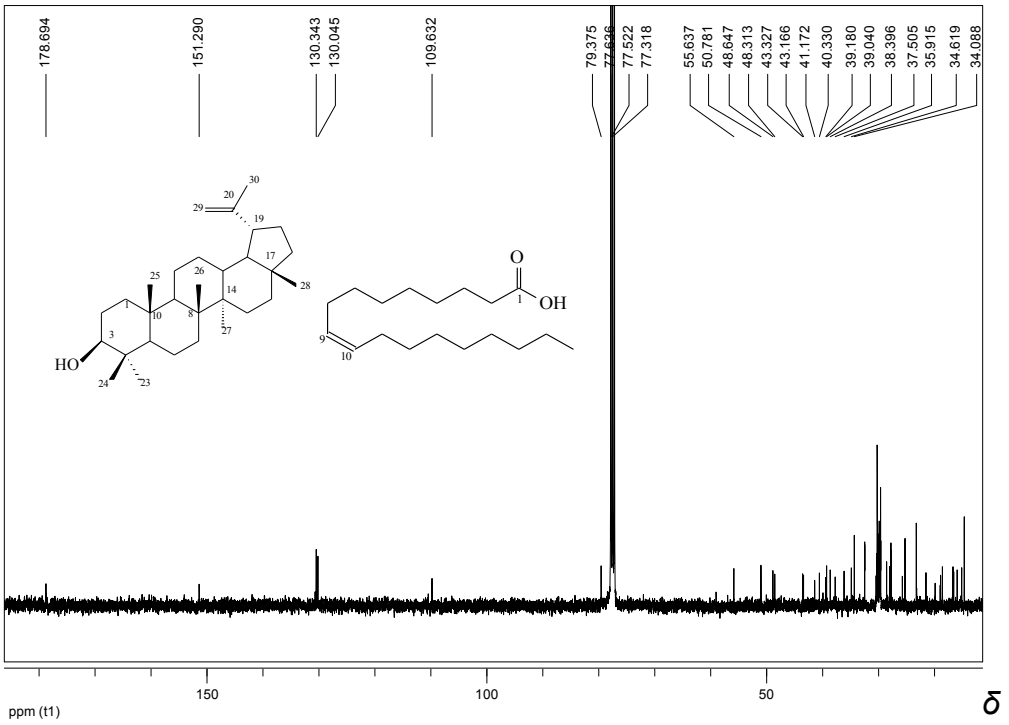


Figura 48 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de lupeol (**51**) e ácido oléico (**52**).

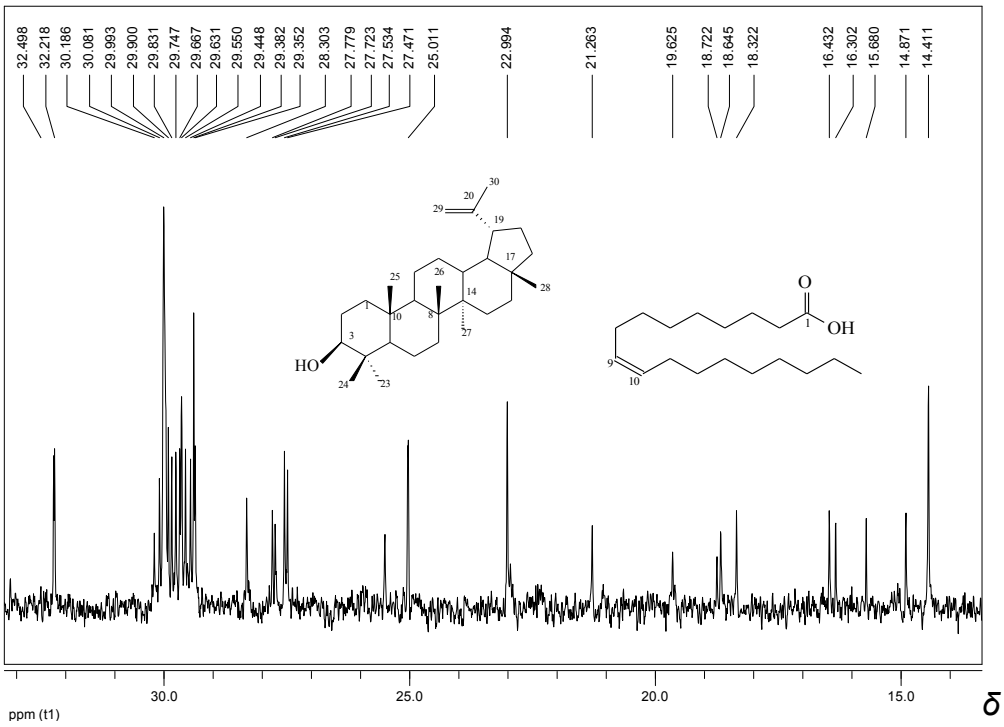


Figura 49 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de lupeol (**51**) e ácido oléico (**52**). Expansão da região entre δ_C 33,00 – 14,40.

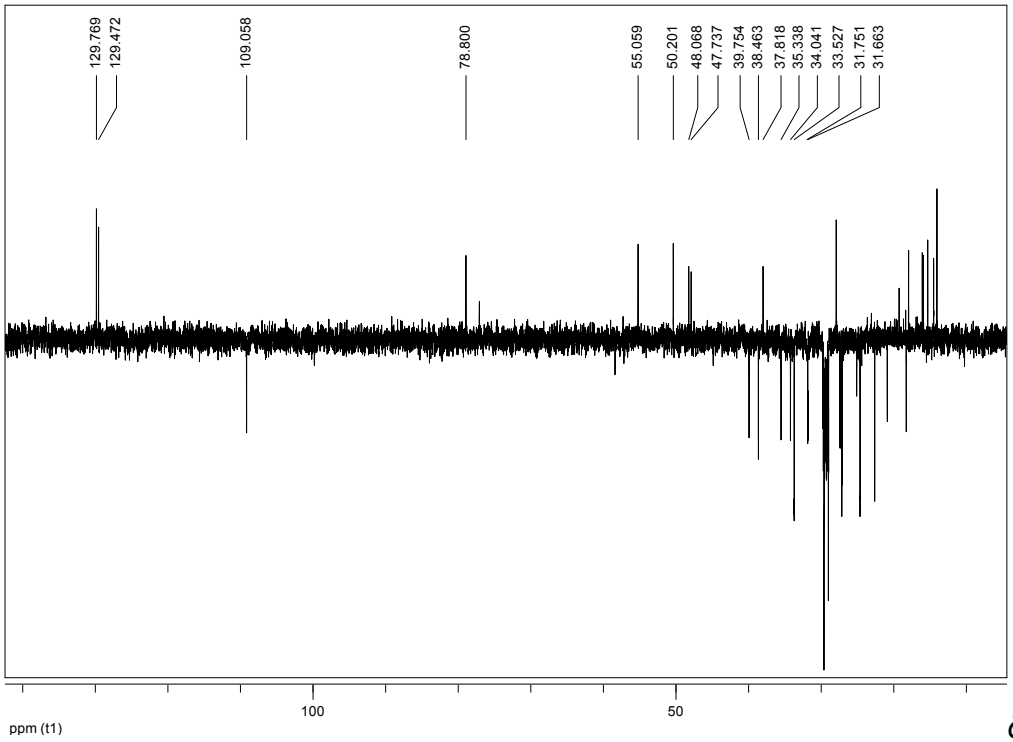


Figura 50 – Subspectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de lupeol (**51**) e ácido oléico (**52**).

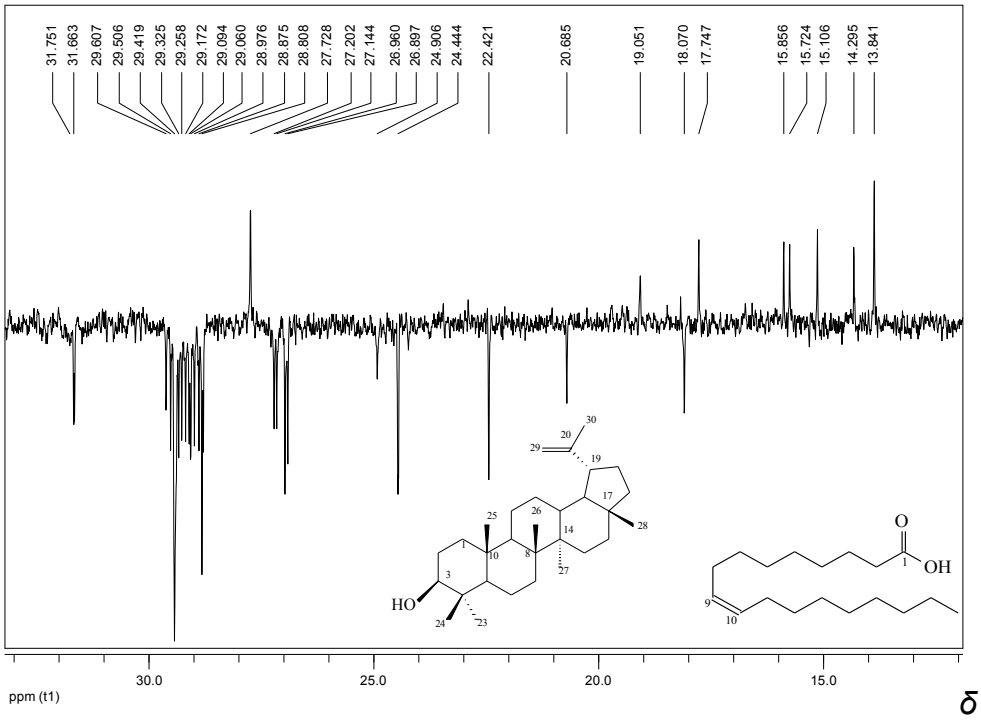


Figura 51 – Subspectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de lupeol (**51**) e ácido oléico (**52**). Expansão da região entre δ_C 32,00 – 13,80.

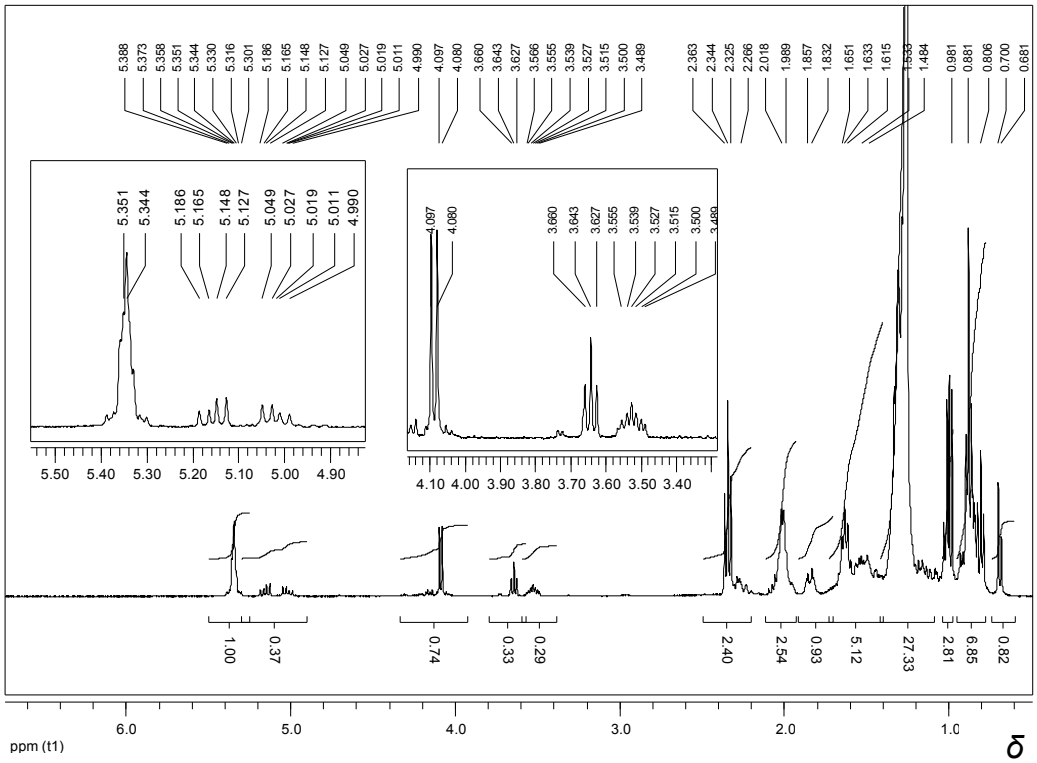


Figura 52 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) da mistura de *β*-sitosterol (**53**), estigmasterol (**54**), contaminada com o ácido oléico (**52**).

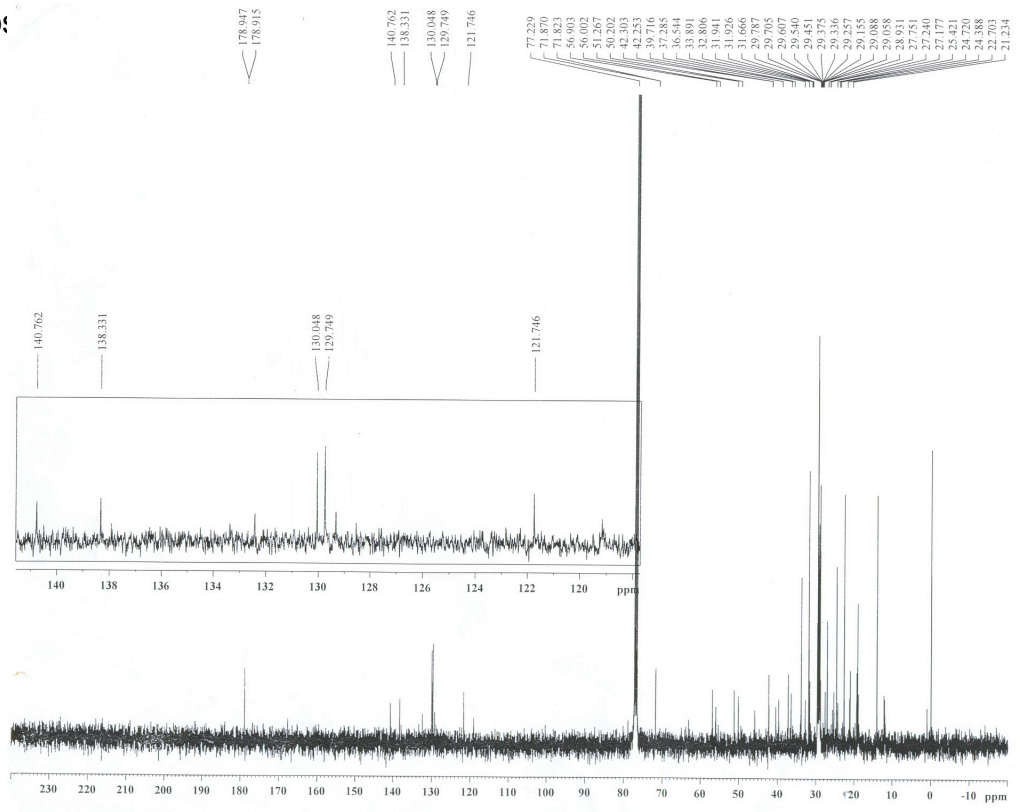


Figura 53 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de *β*-sitosterol (**53**), estigmasterol (**54**), contaminada com o ácido oléico (**52**).

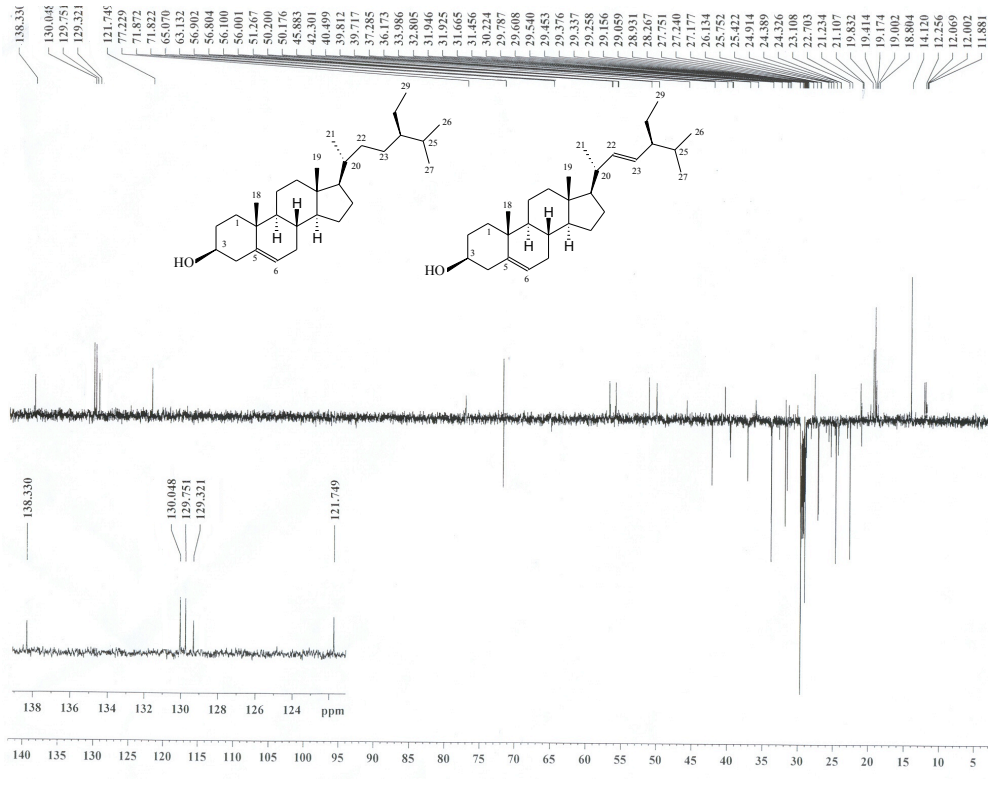


Figura 54 – Subspectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de *β*-sitosterol (**53**), estigmasterol (**54**), contaminada com o ácido oléico (**52**).

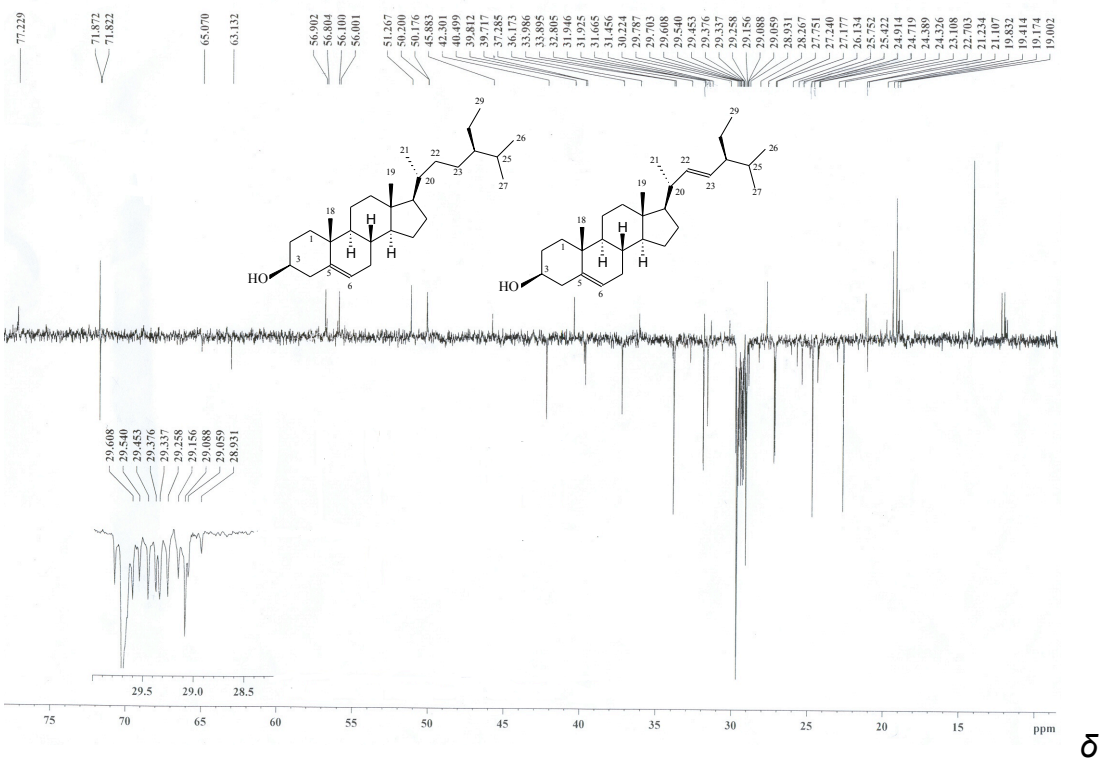


Figura 55 – Subspectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) da mistura de *β*-sitosterol (**53**), estigmasterol (**54**), contaminada com o ácido oléico (**52**).Expansão da região entre δ_C 77,00 – 19,00.

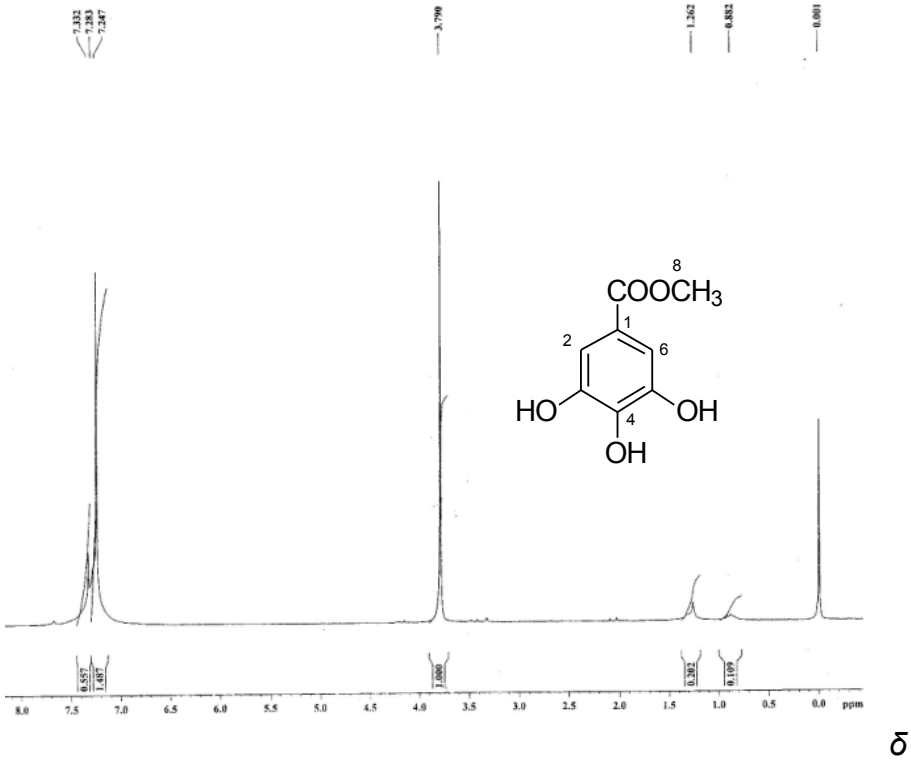


Figura 56 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $CDCl_3$) de galato de metila (**55**).

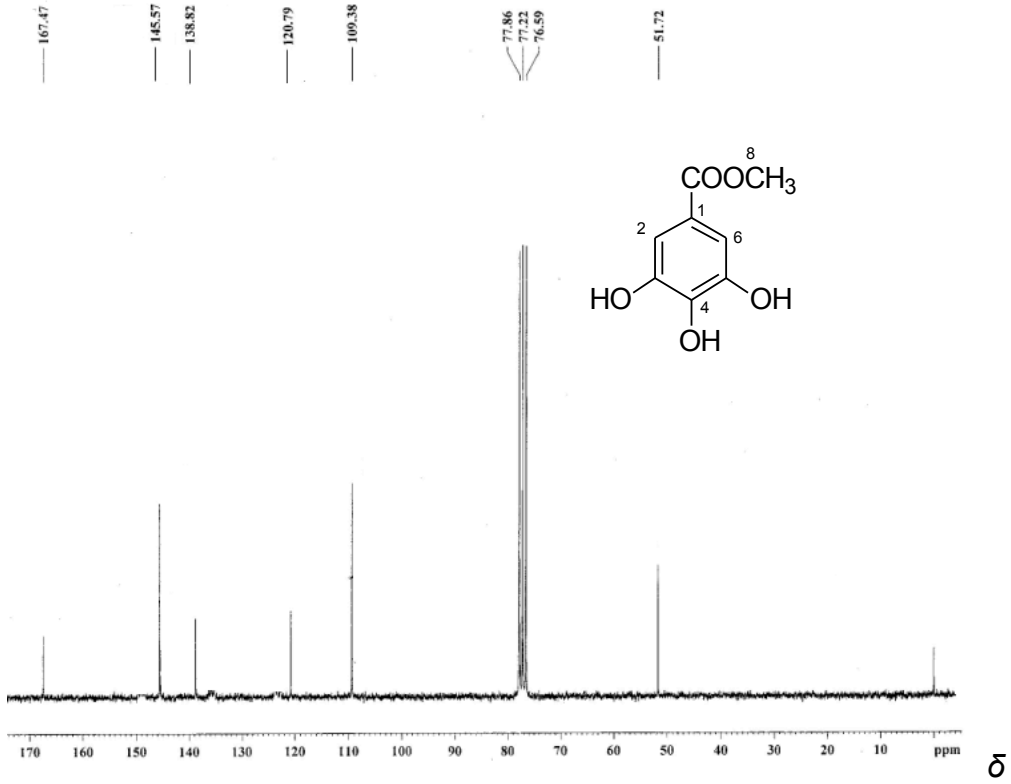


Figura 57 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) de galato de metila (**55**).

Anexo 2

Parte 2

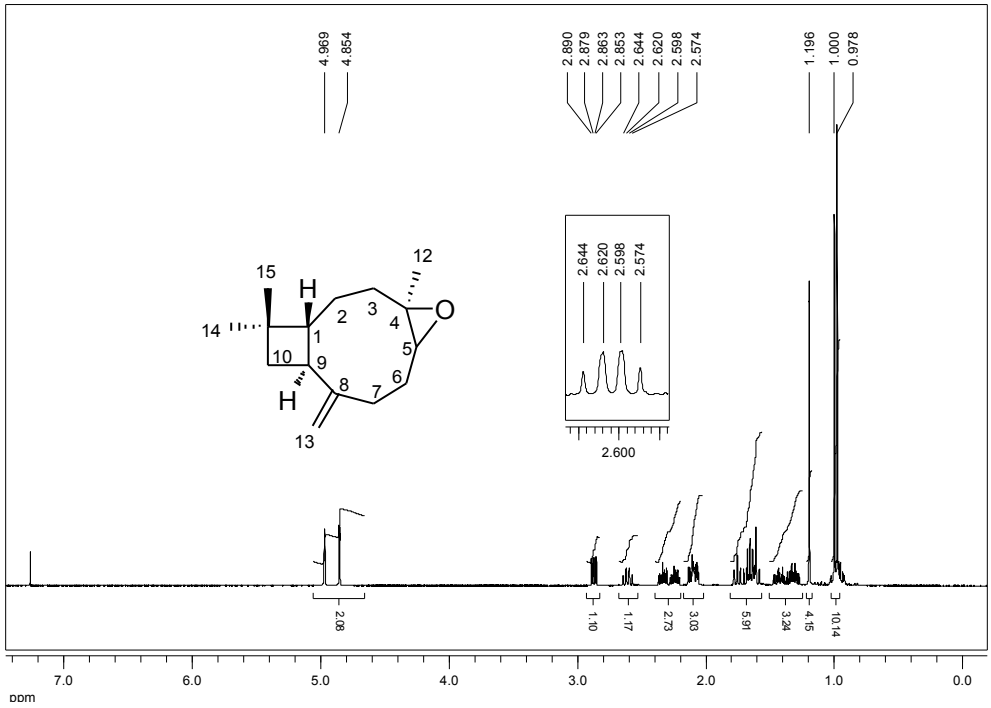


Figura 6 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$), de 4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno (**11**).

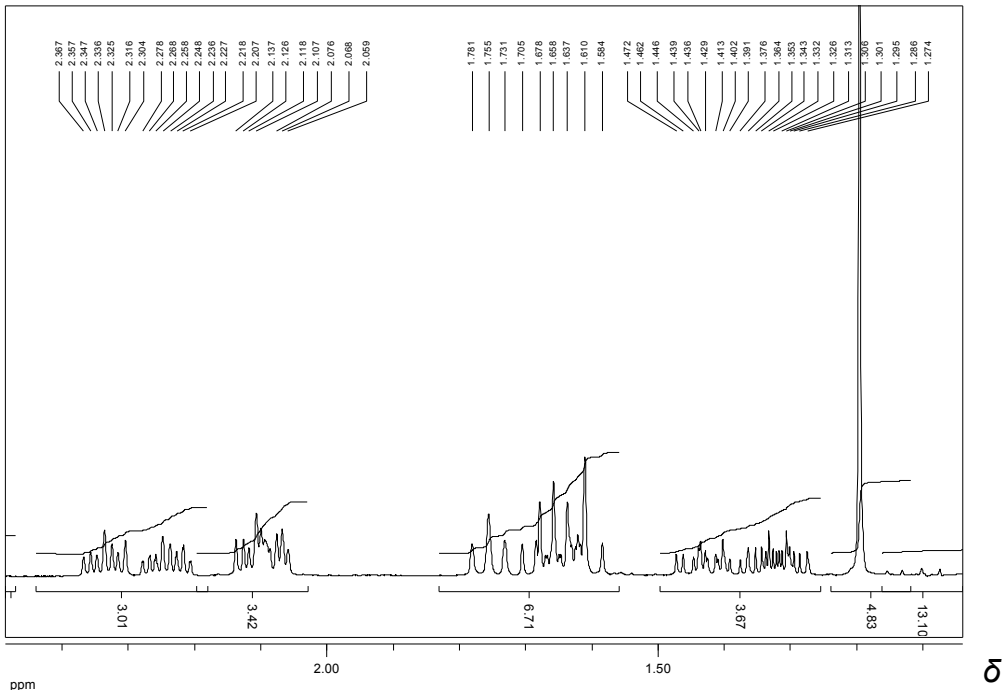


Figura 7 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de 4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno (**11**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

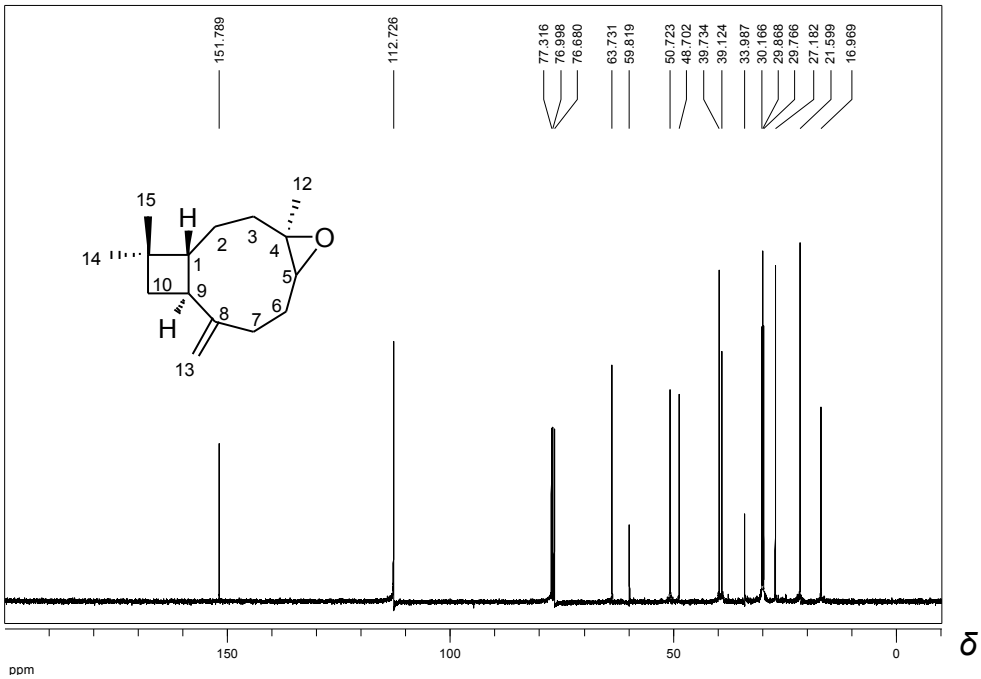


Figura 8 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de 4β,5α-epoxicariofil-8(13)-eno (**11**).

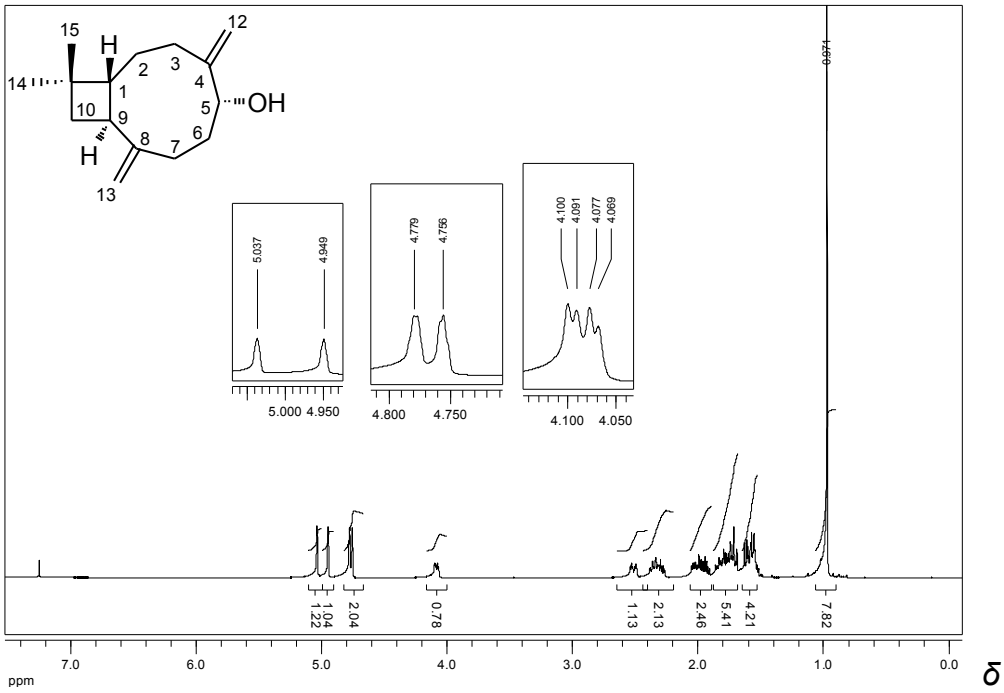


Figura 9 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (**77**).

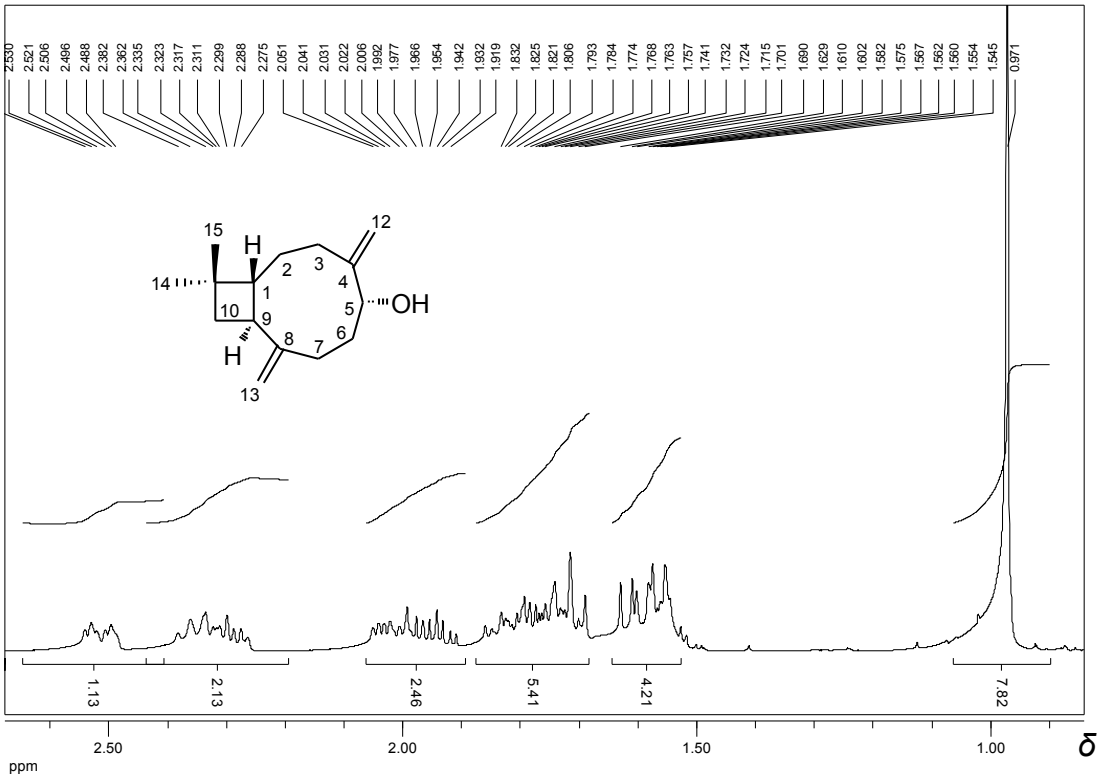


Figura 10 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (**77**). Expansão da região entre δ_H 1,0 – 3,0.

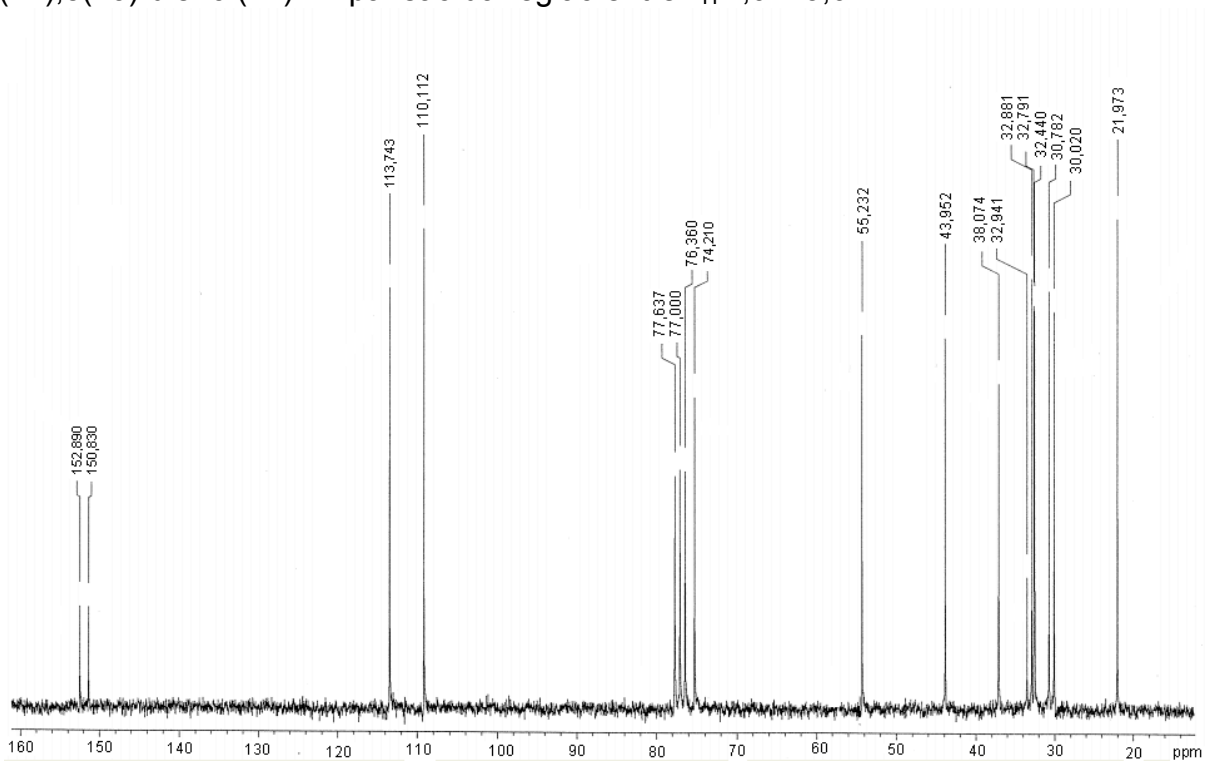


Figura 11 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de 5α-hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (**77**).

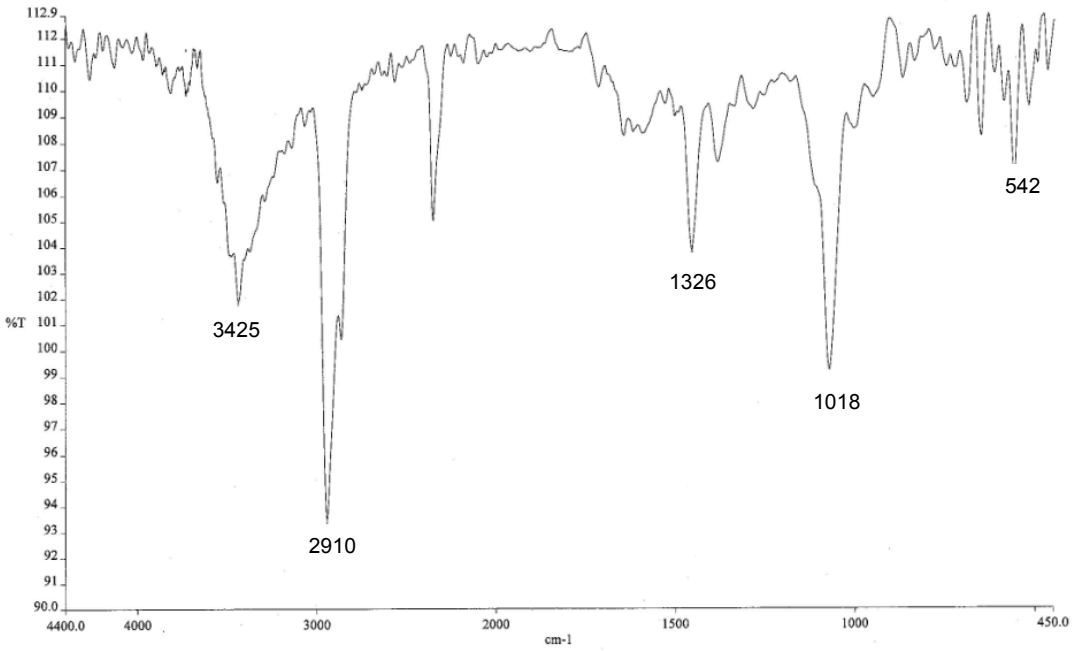


Figura 12 – Espectro na região de IV de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**) (KBr).

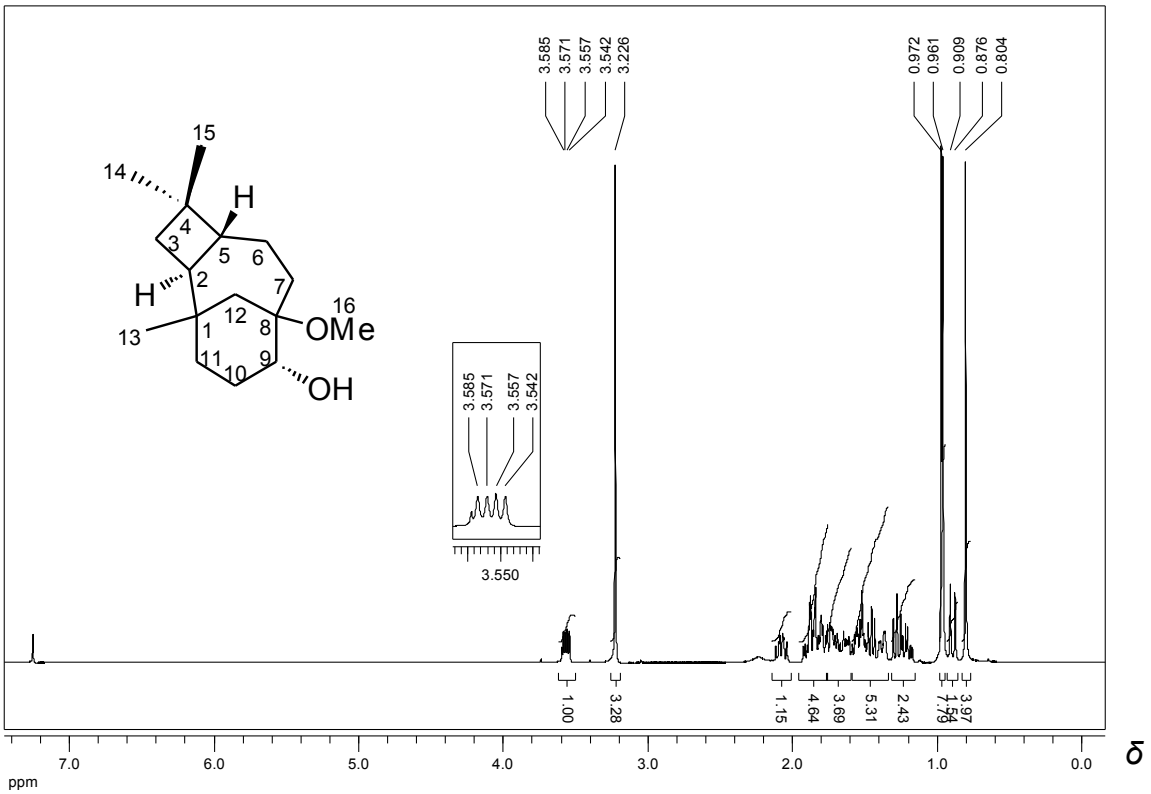


Figura 13 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**).

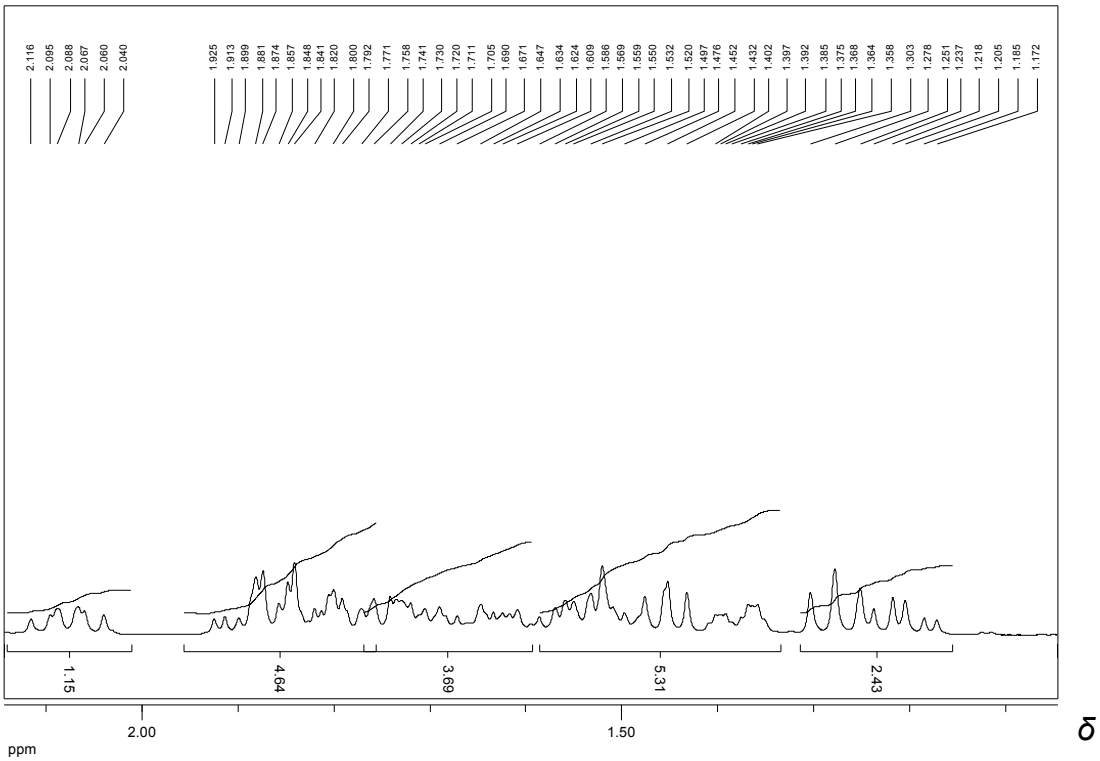


Figura 14 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

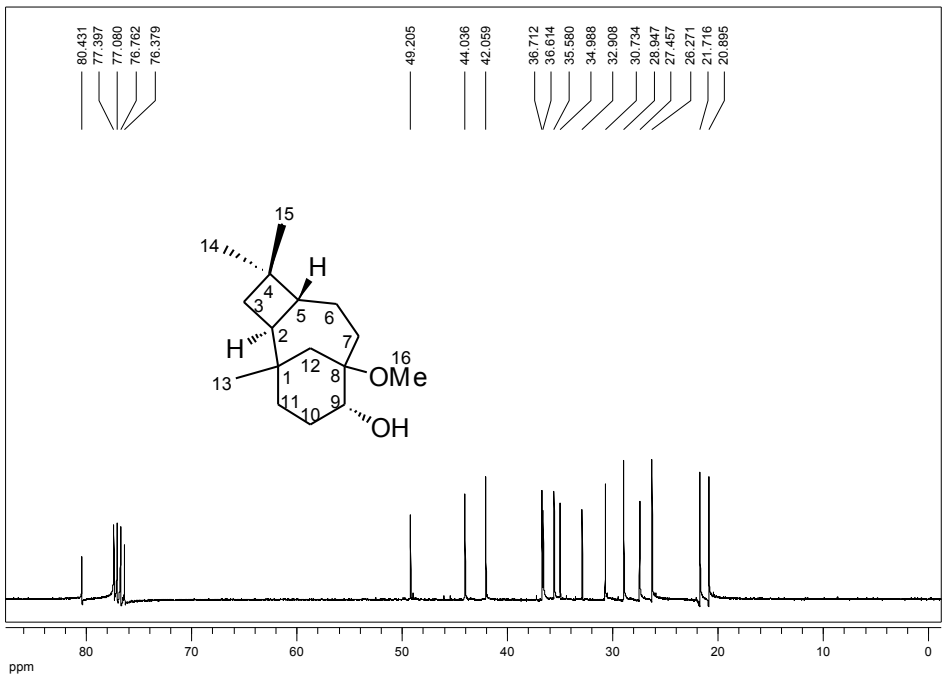


Figura 15 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**).

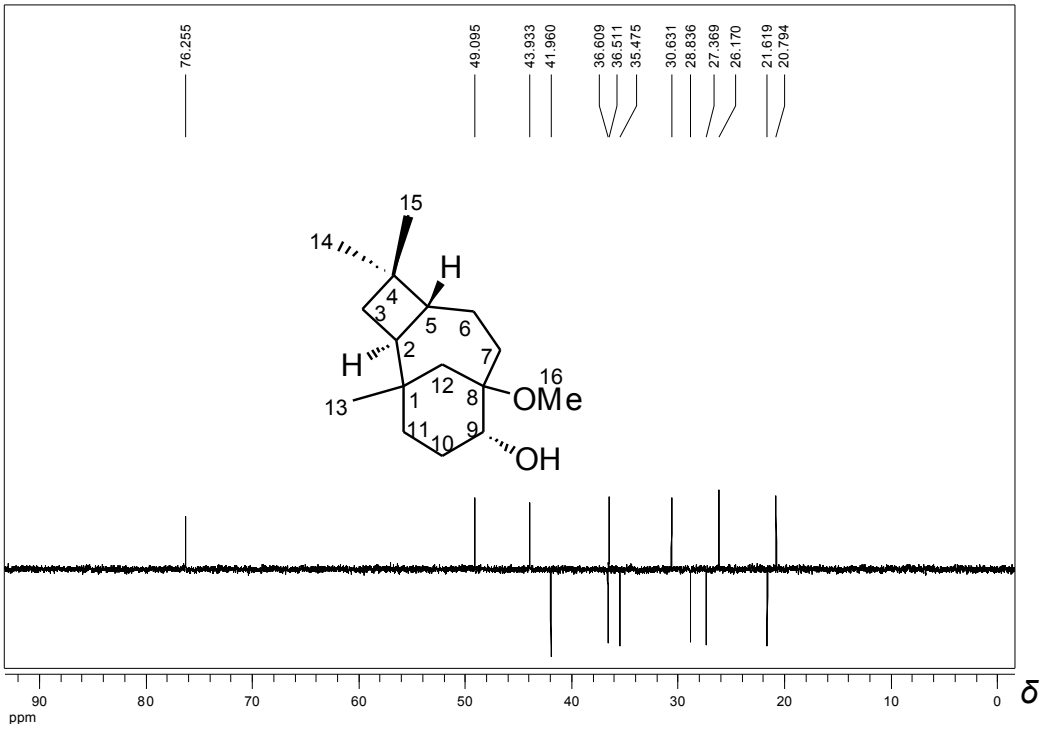


Figura 16 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**).

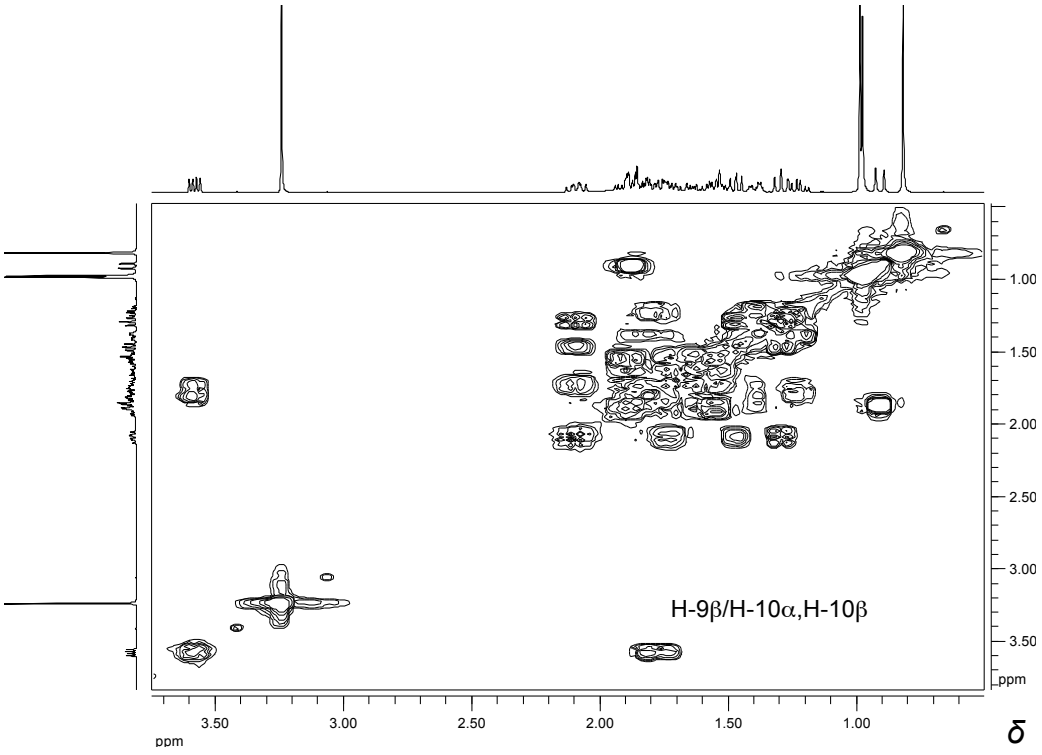


Figura 17 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**).

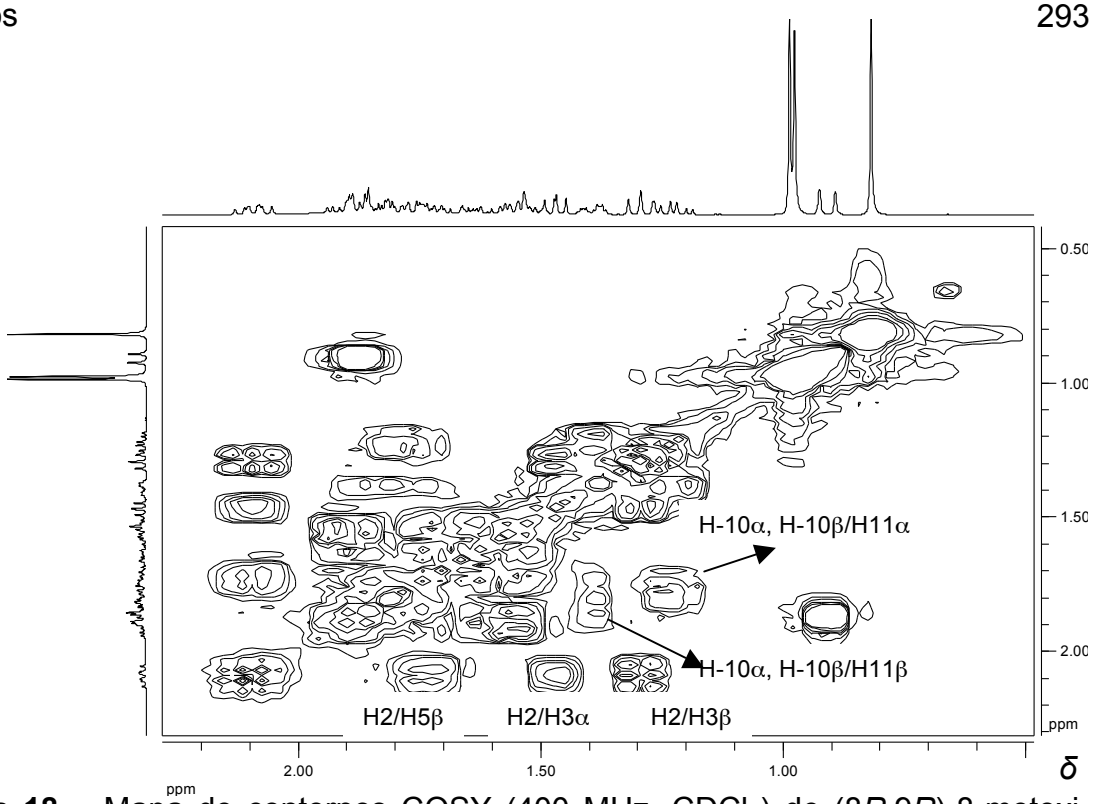


Figura 18 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

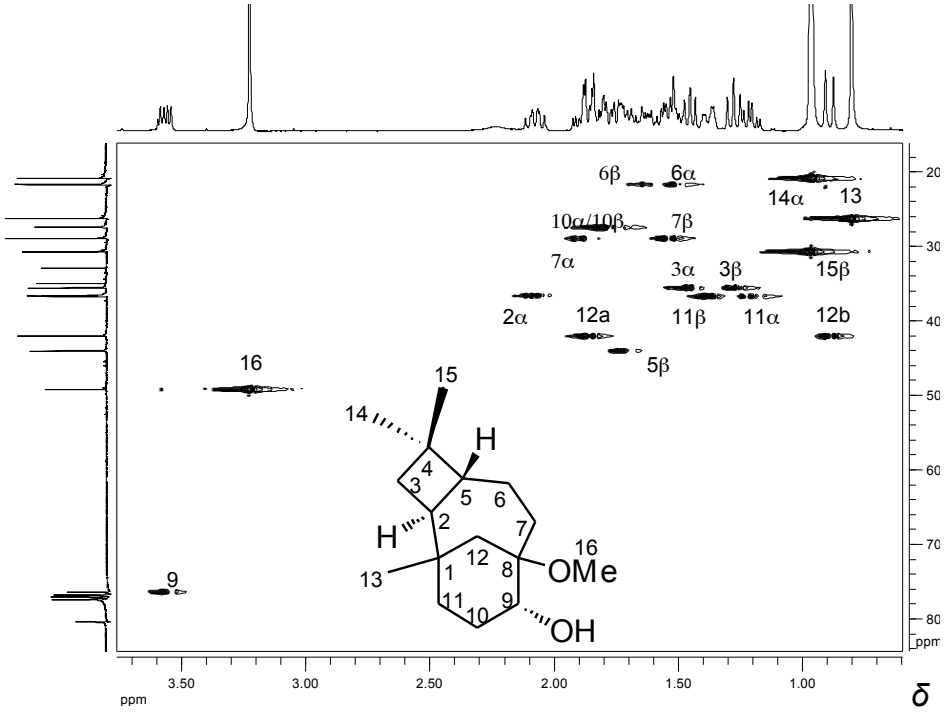


Figura 19 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**).

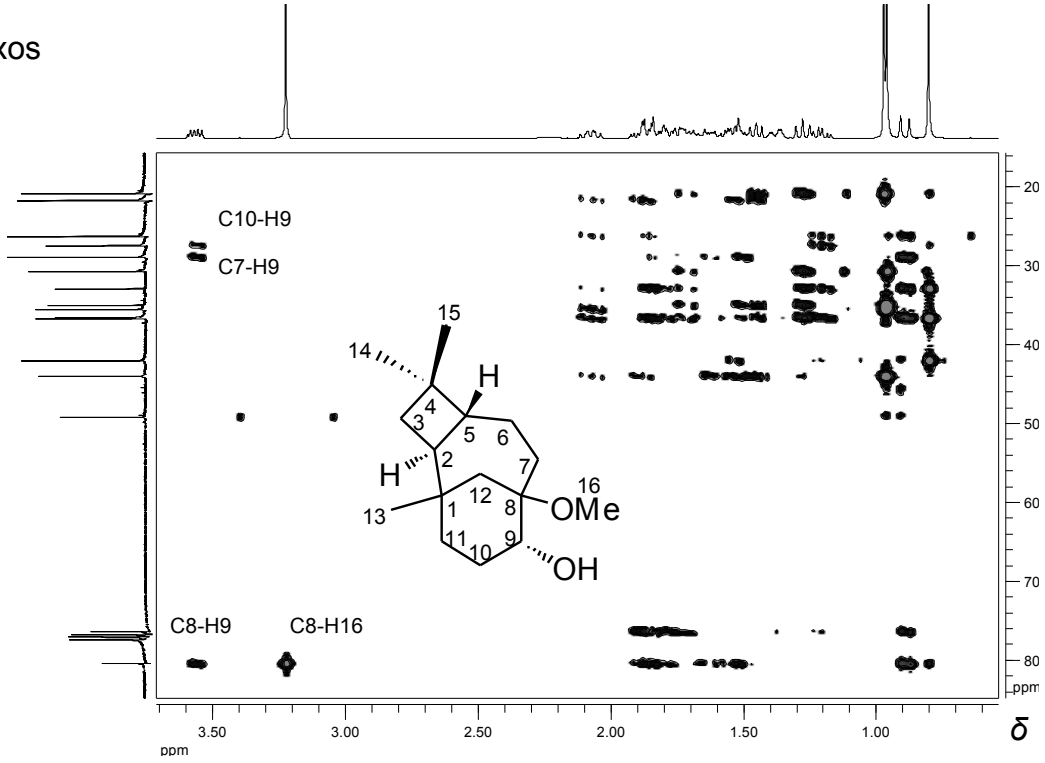


Figura 20 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**).

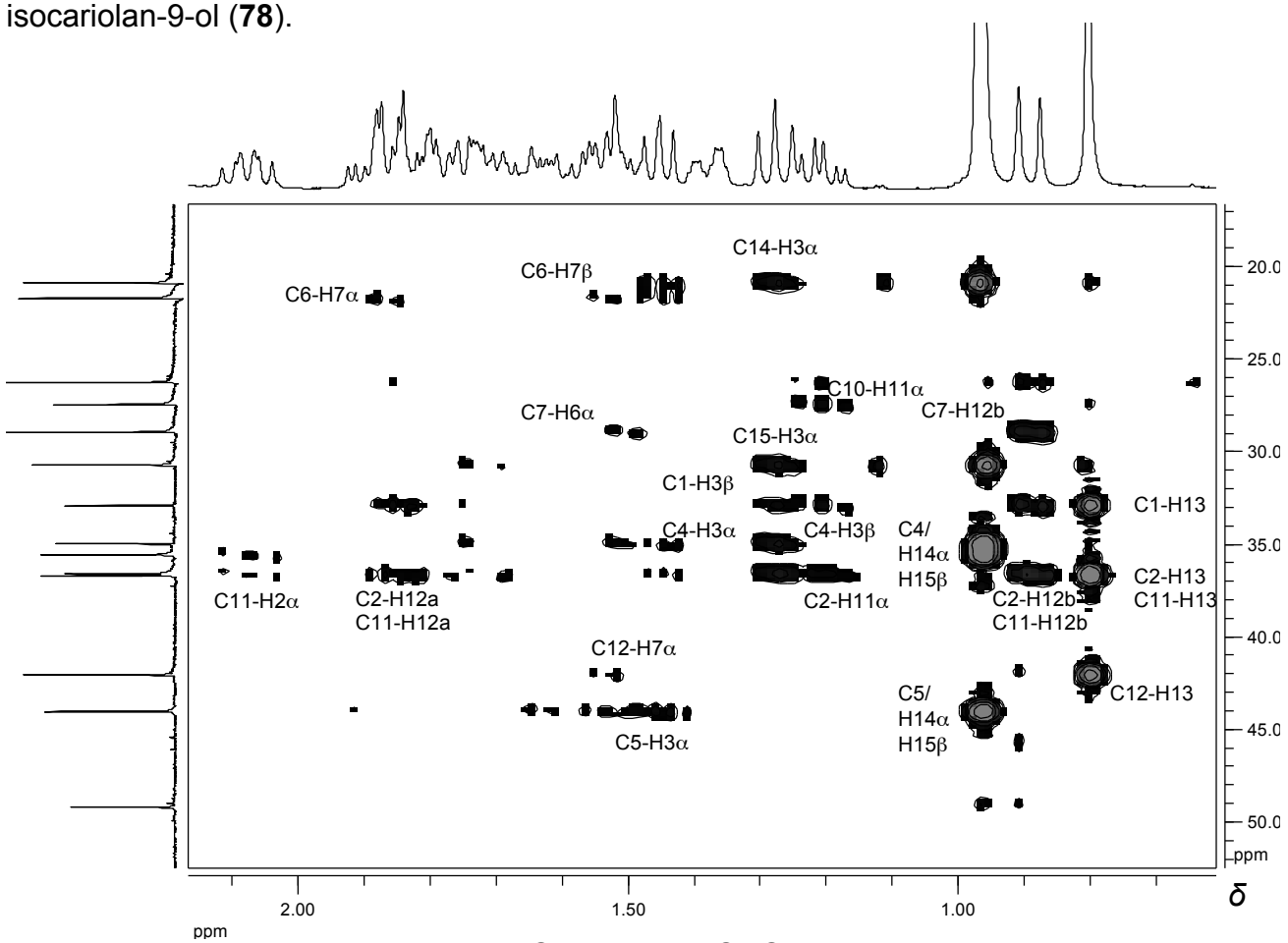


Figura 21 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

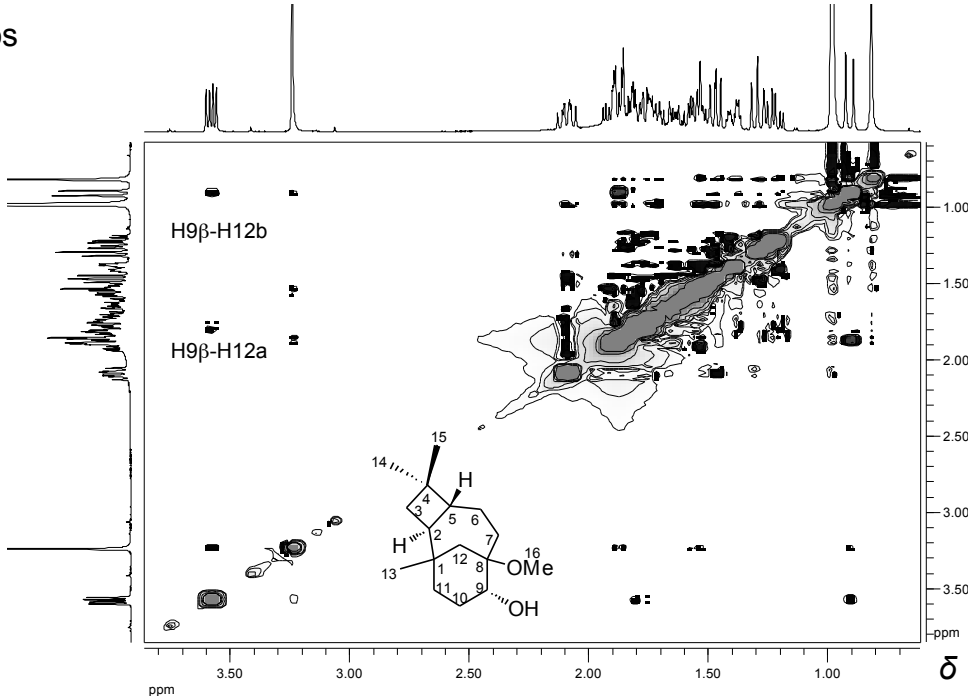


Figura 22 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de(8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**).

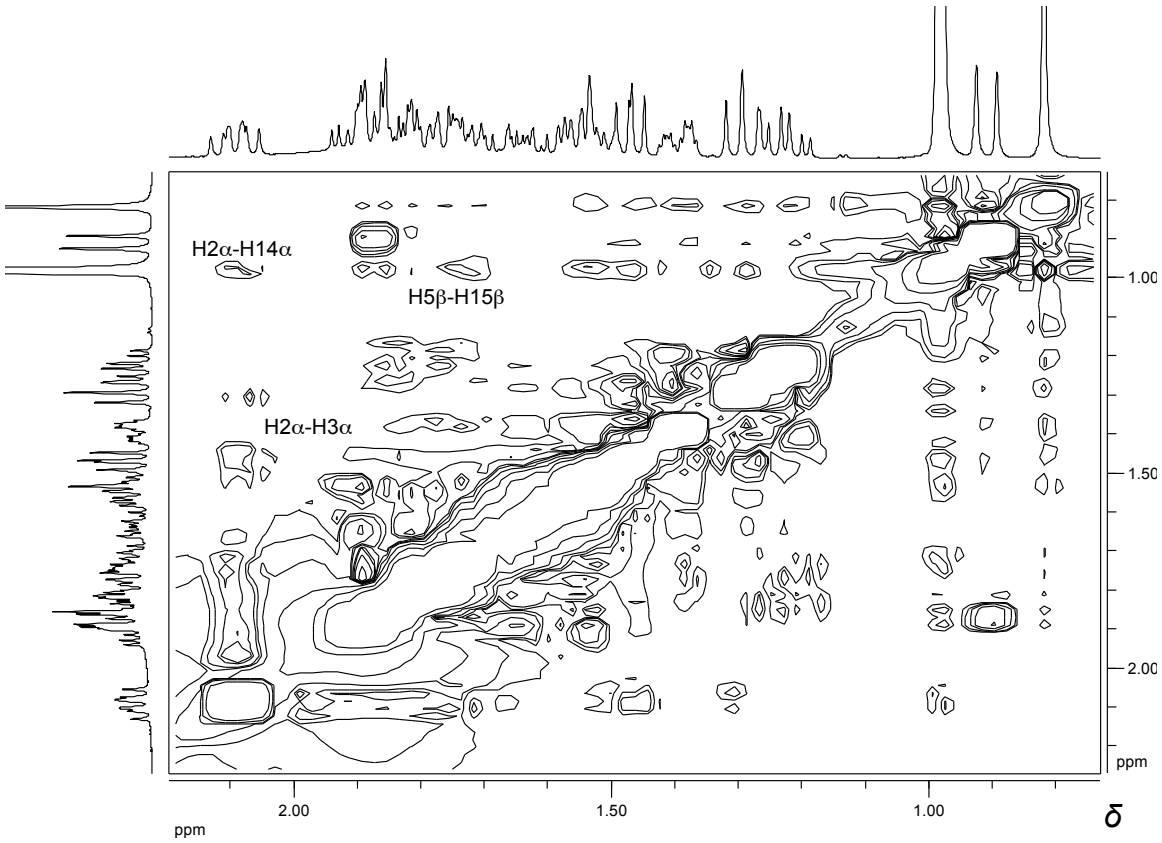


Figura 23 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolan-9-ol (**78**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

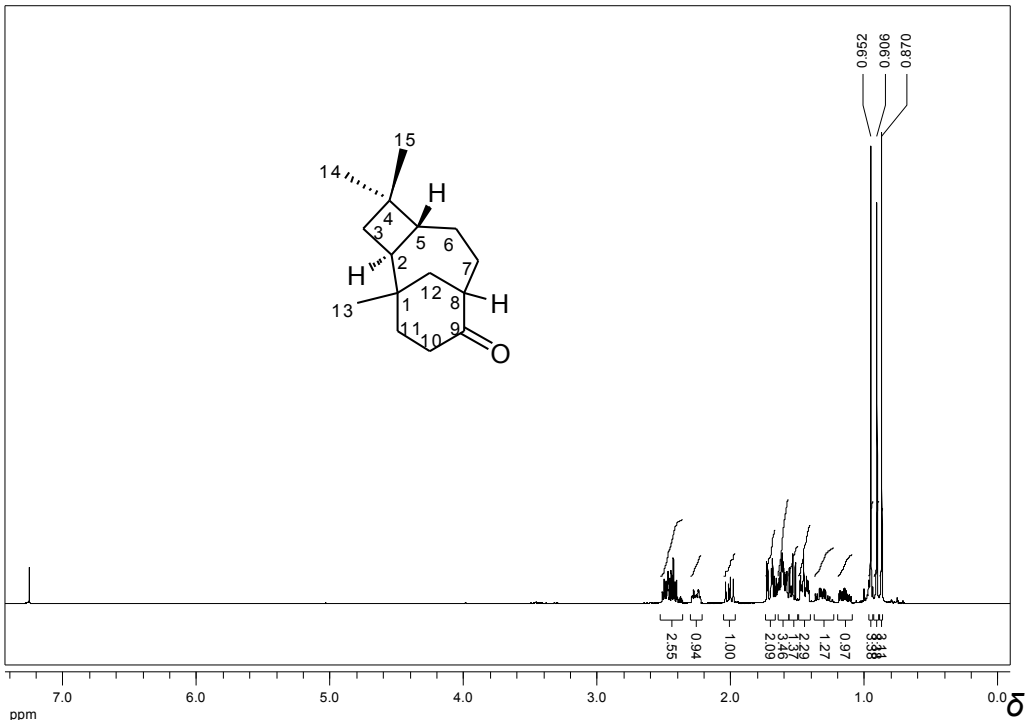


Figura 24 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9-ona (**79**).

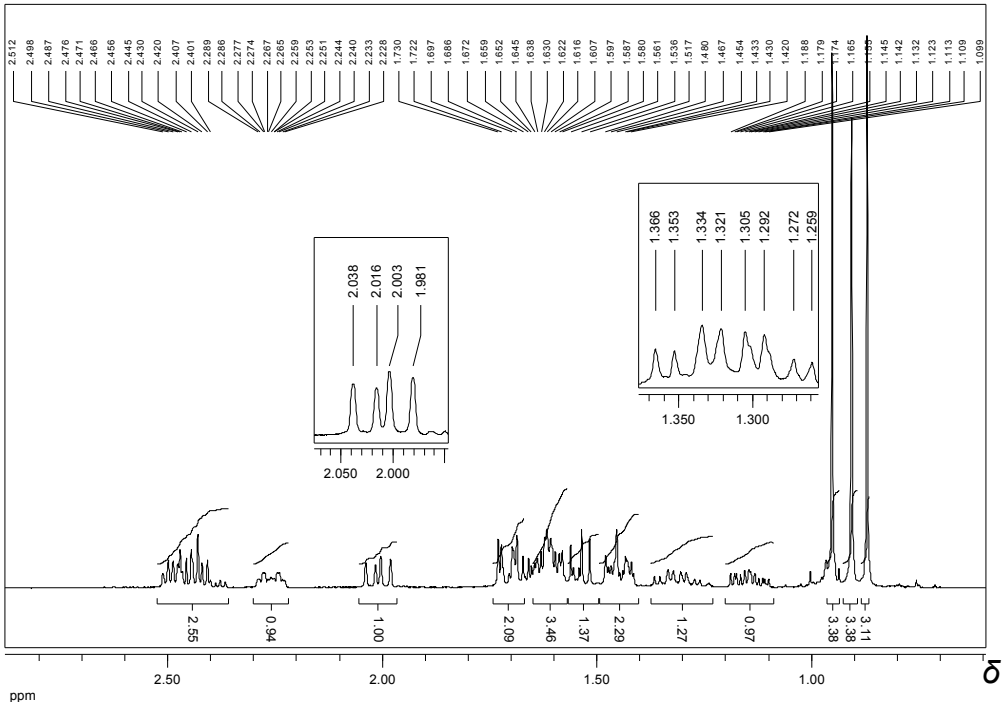


Figura 25 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9-ona (**79**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

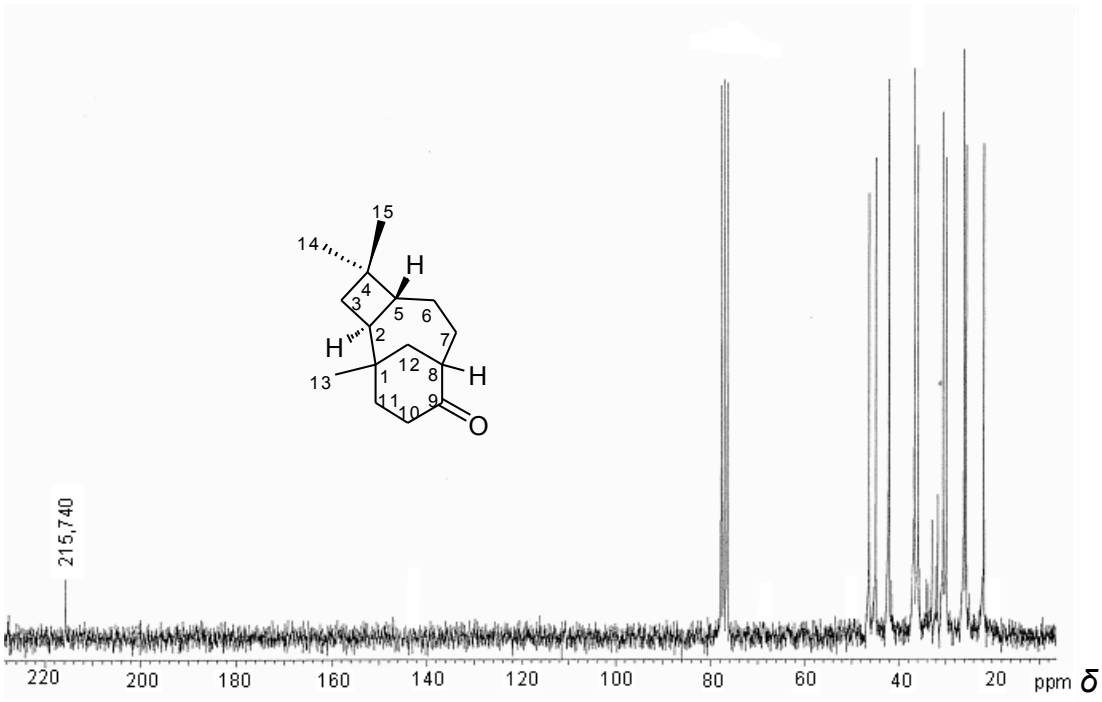


Figura 26 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9-ona (**79**).

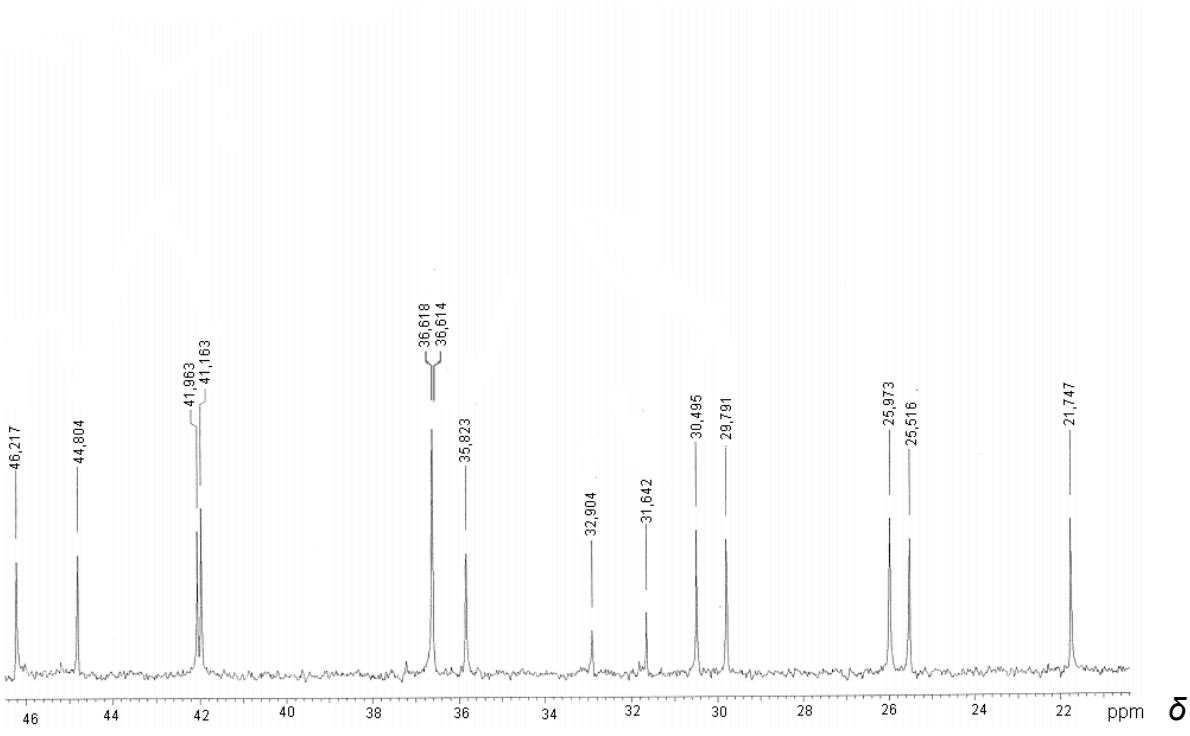


Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9-ona (**79**). Expansão da região entre δ_C 20 – 48.

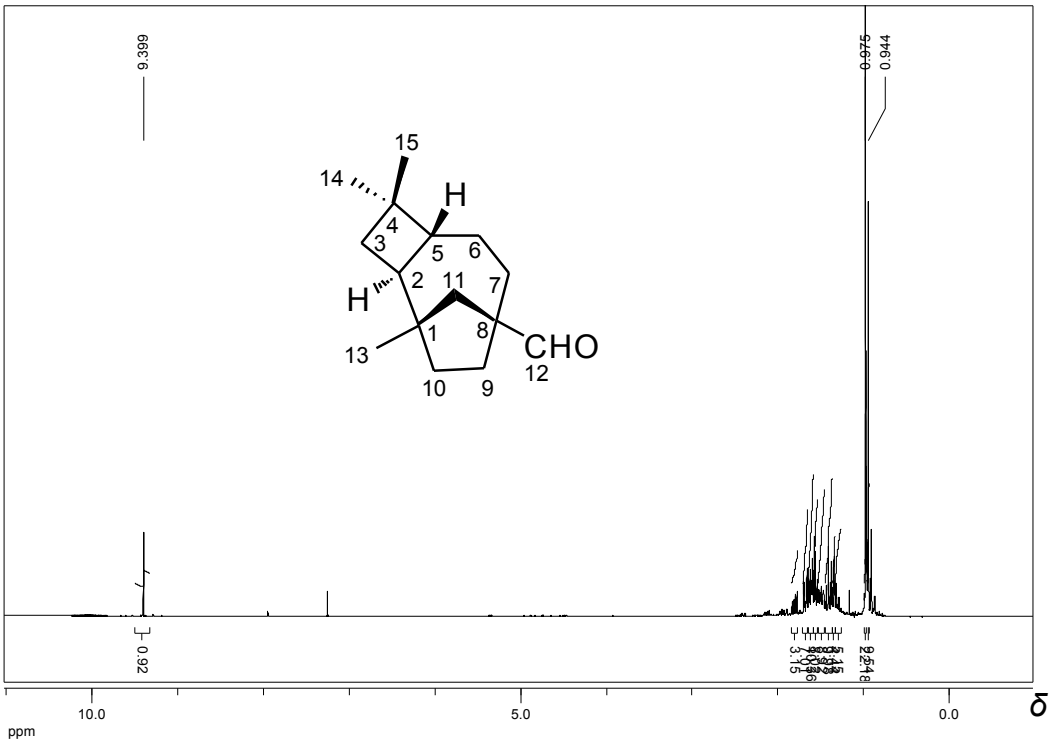


Figura 28 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano-8-carbaldeído (**81**).

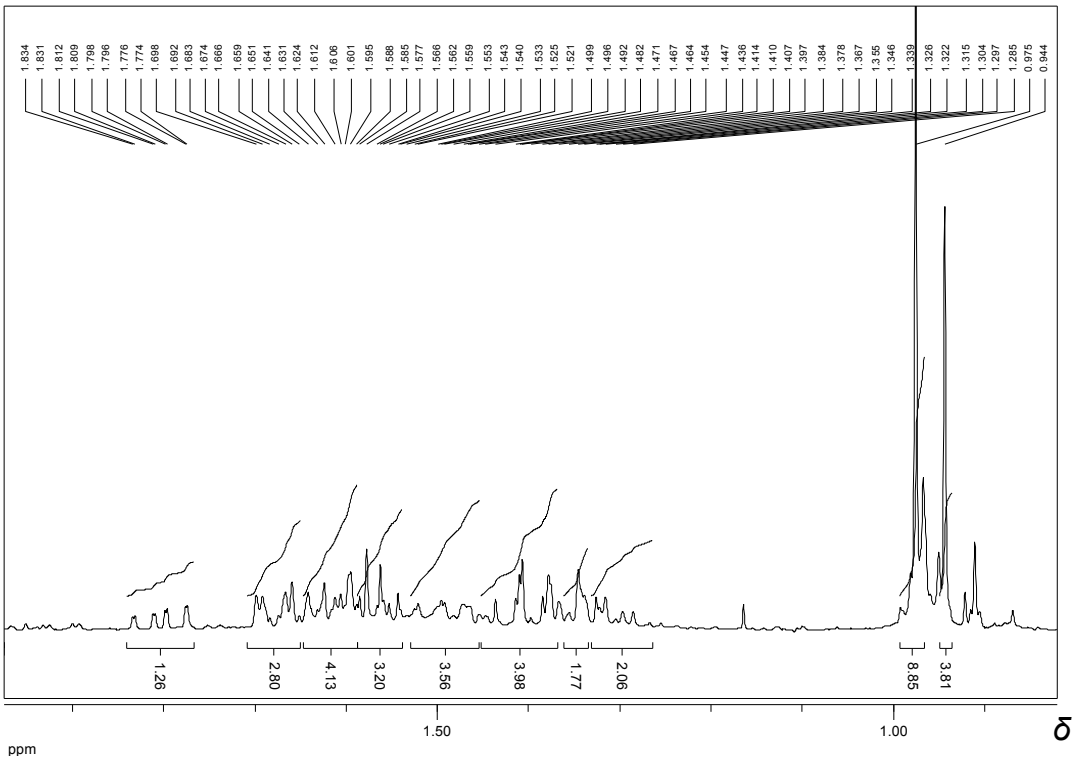


Figura 29 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano-8-carbaldeído (**81**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

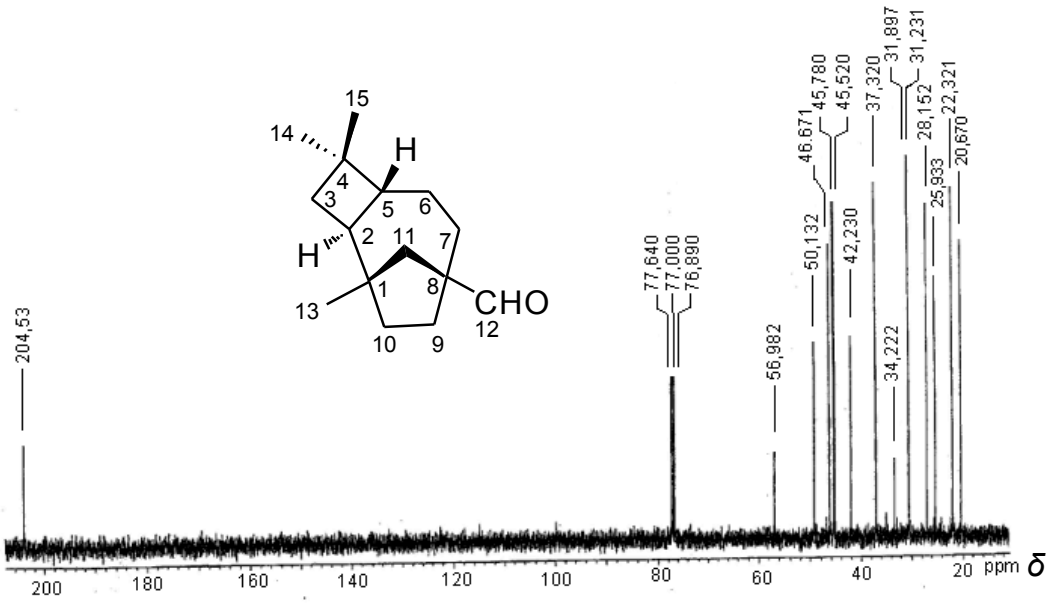


Figura 30 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undecano-8-carbaldeído (**81**).

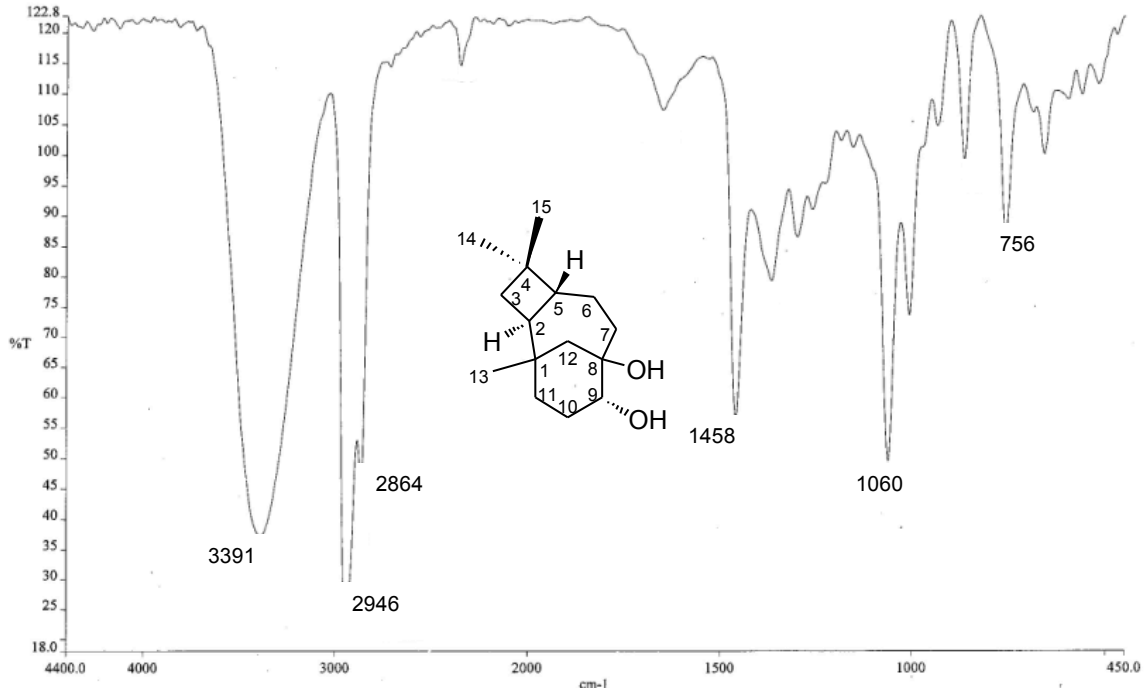


Figura 31 – Espectro na região de IV de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (**80**) (KBr).

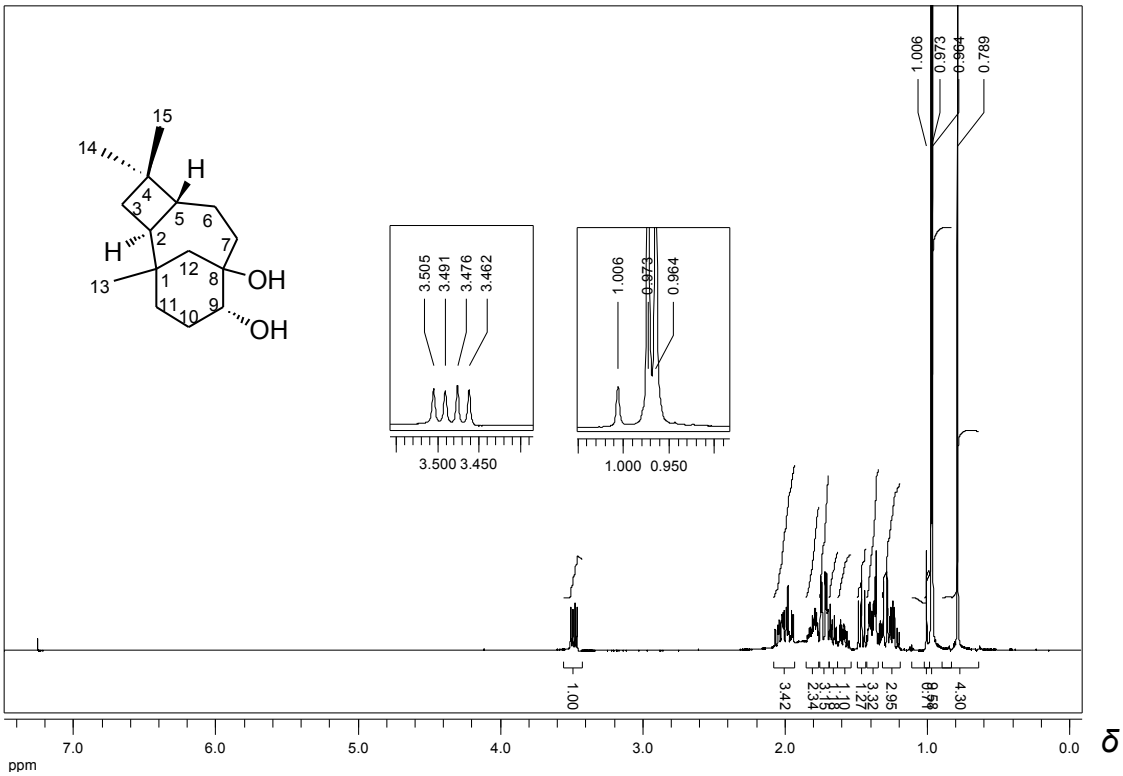


Figura 32 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**).

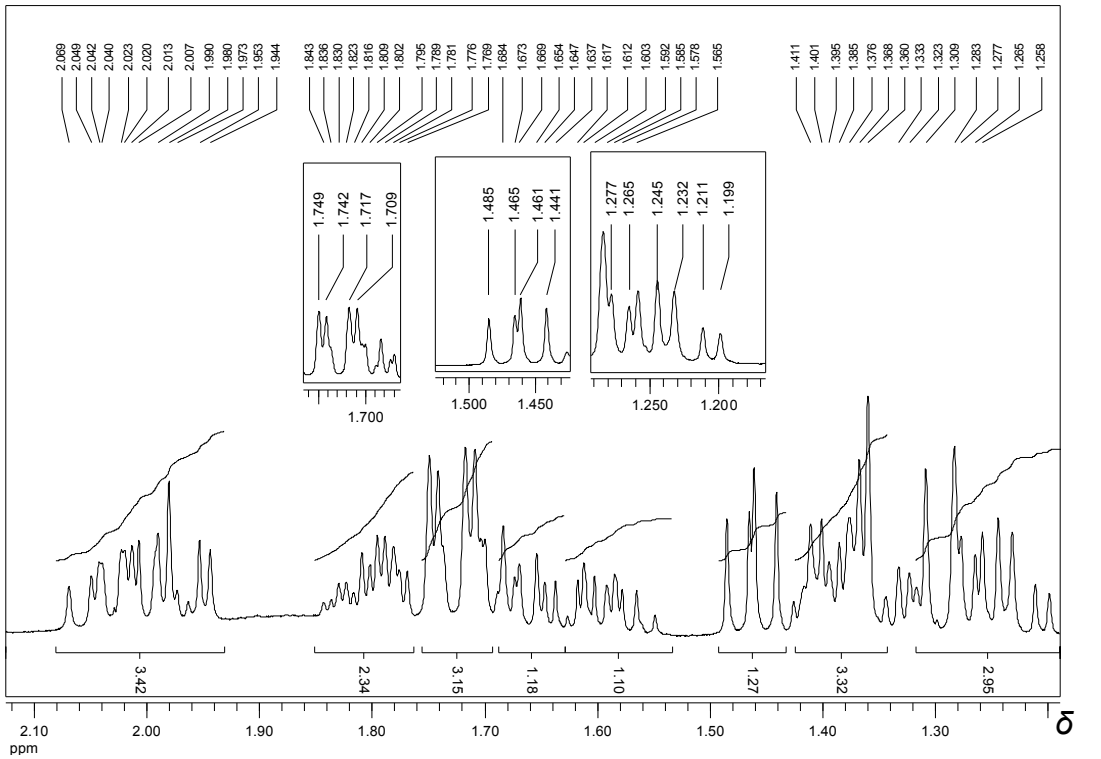


Figura 33 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**). Expansão da região entre δ_H 1,0 – 2,2.

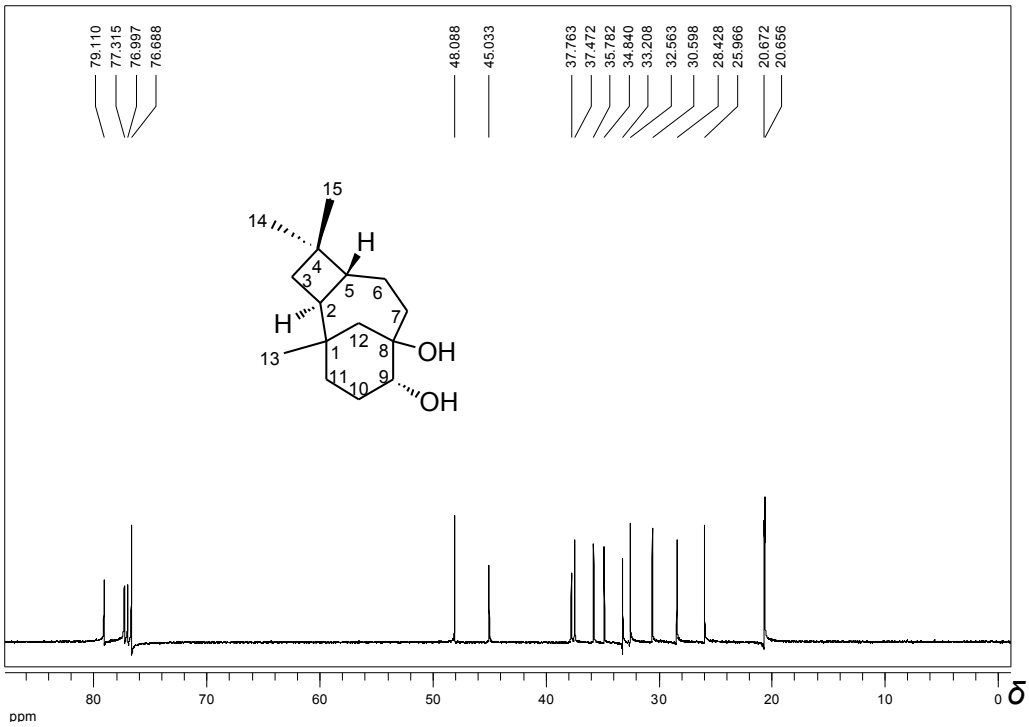


Figura 34 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**).

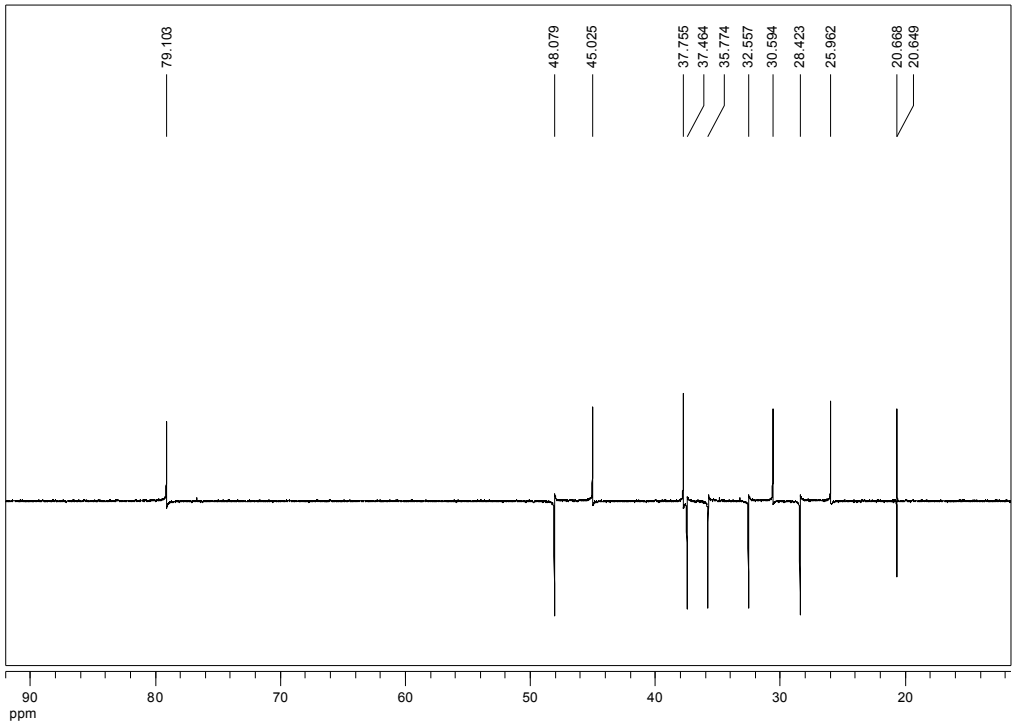


Figura 35 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**).

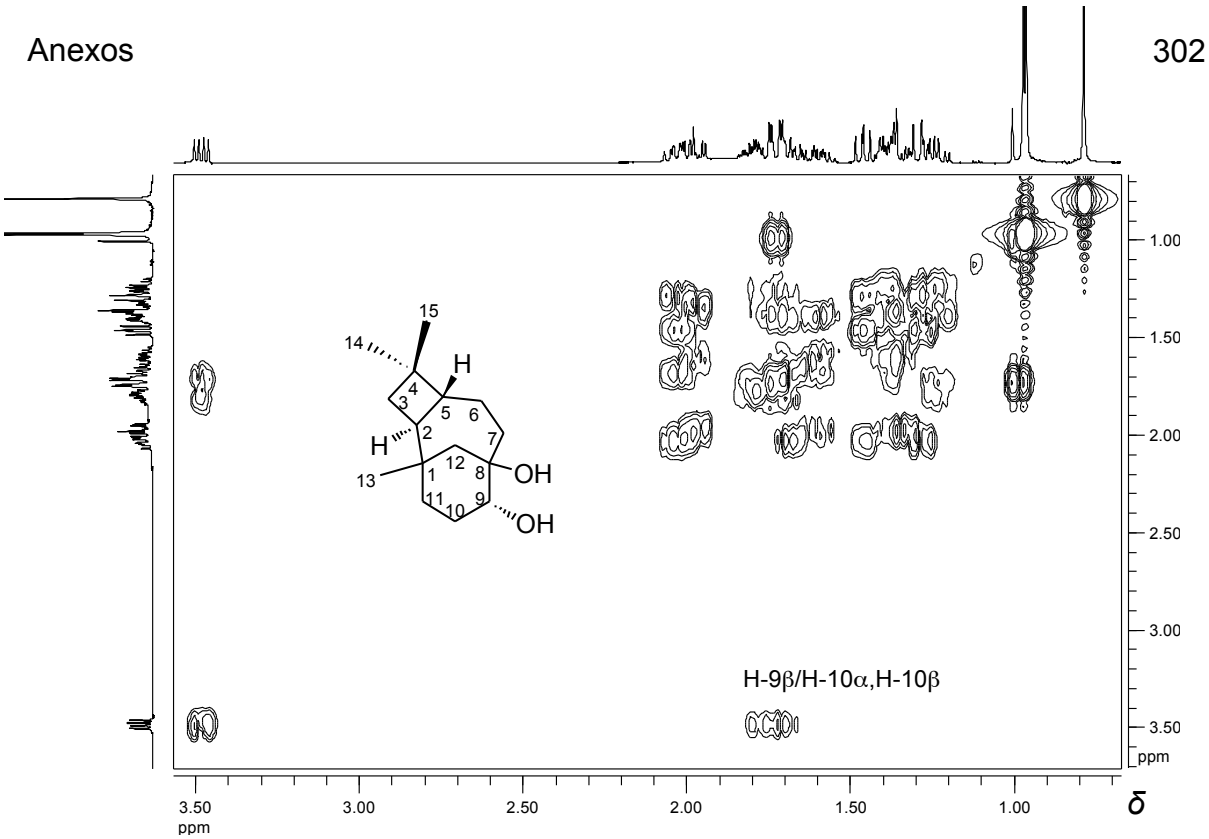


Figura 36 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**).

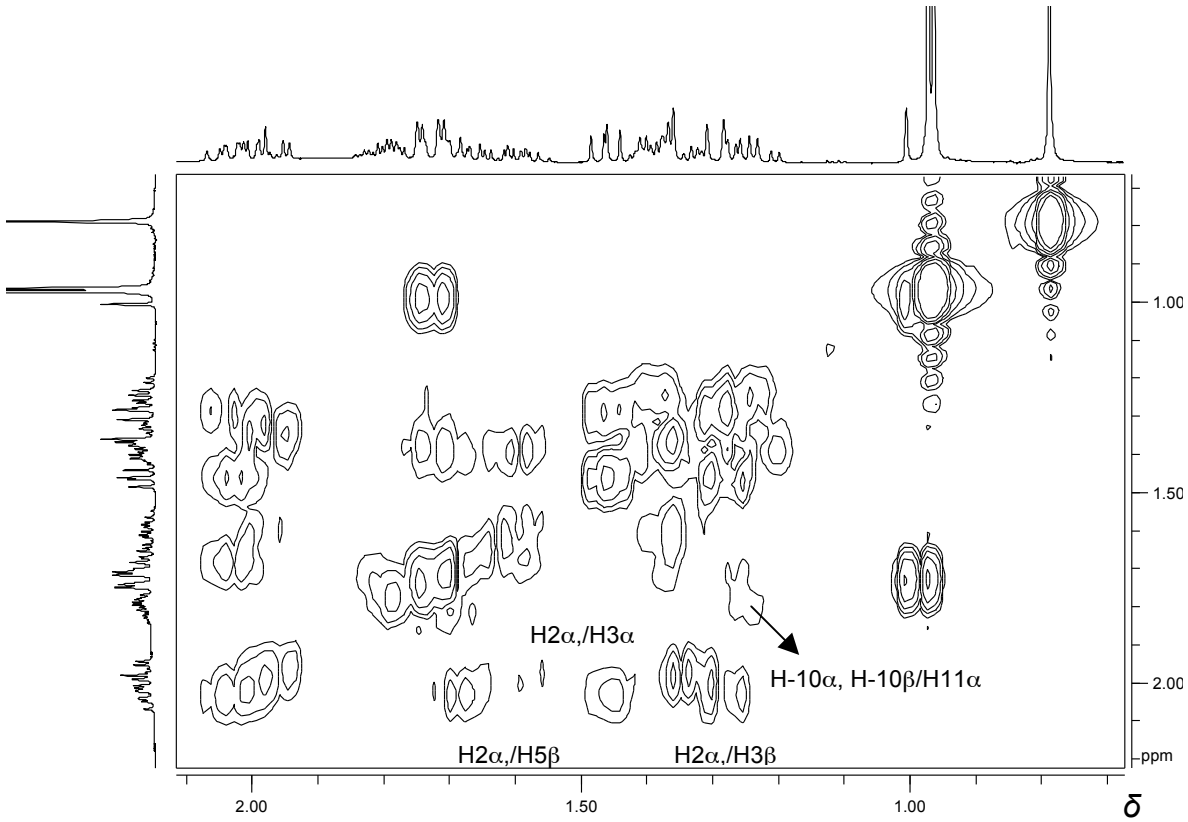


Figura 37 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

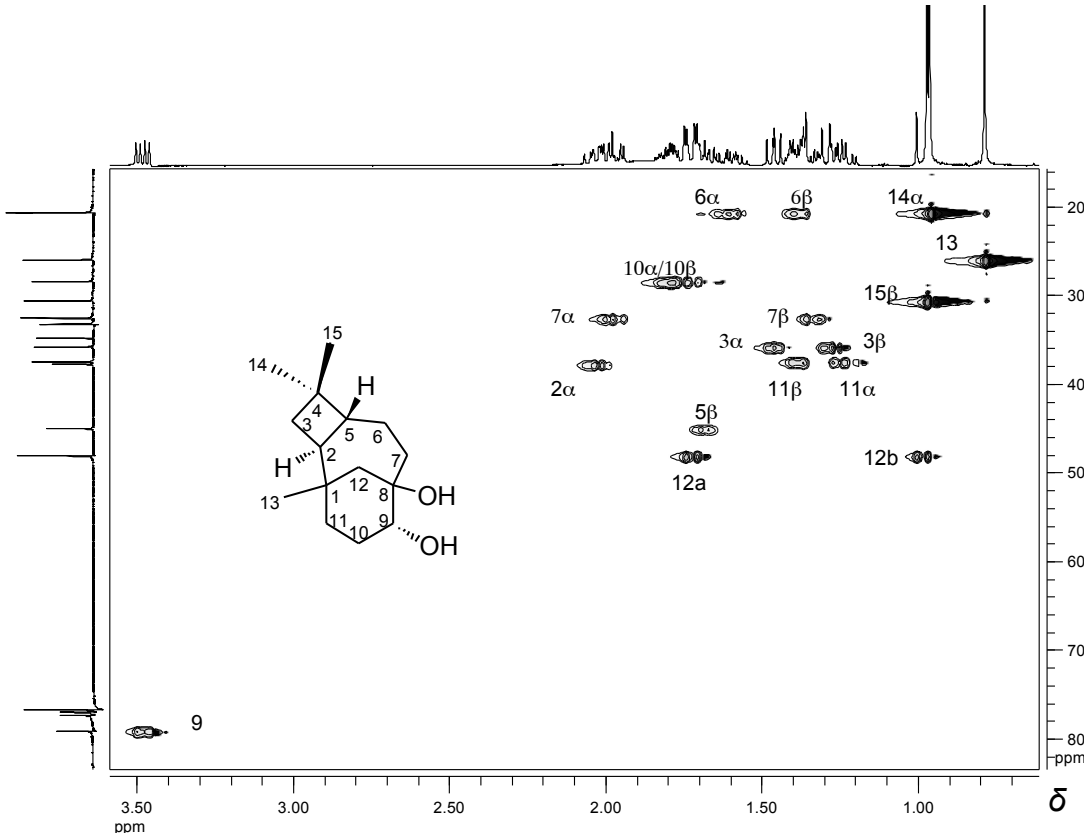


Figura 38 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**).

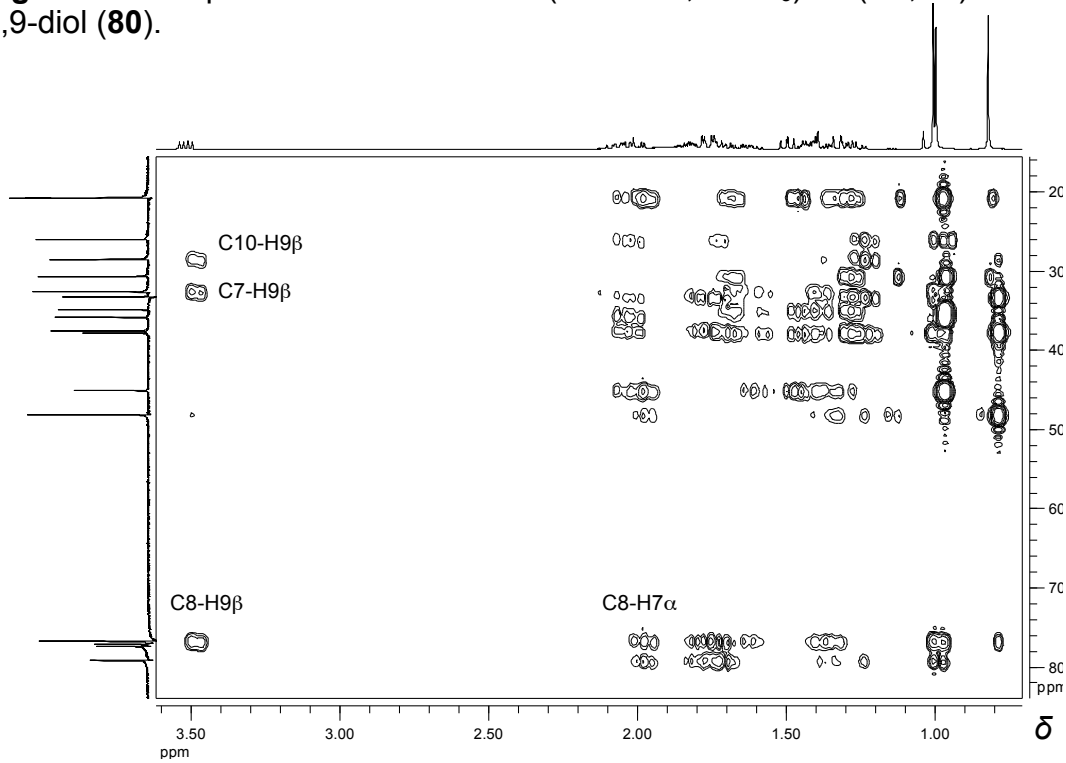


Figura 39 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**).

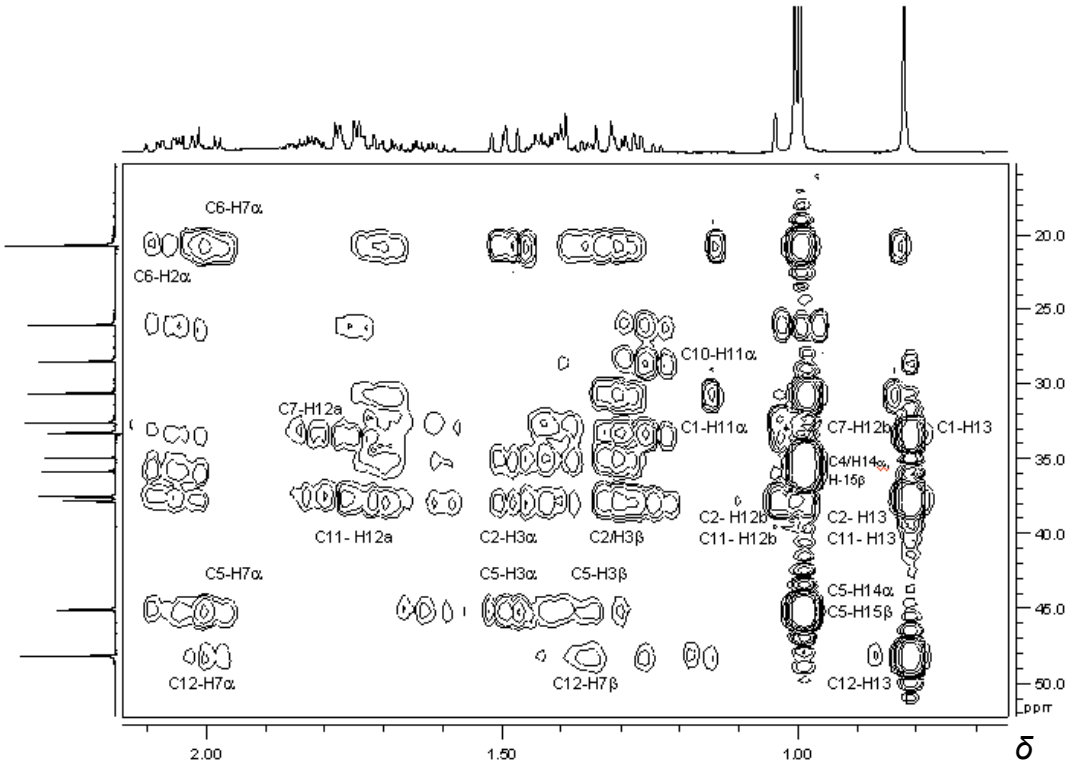


Figura 40 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9-diol (**80**).Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

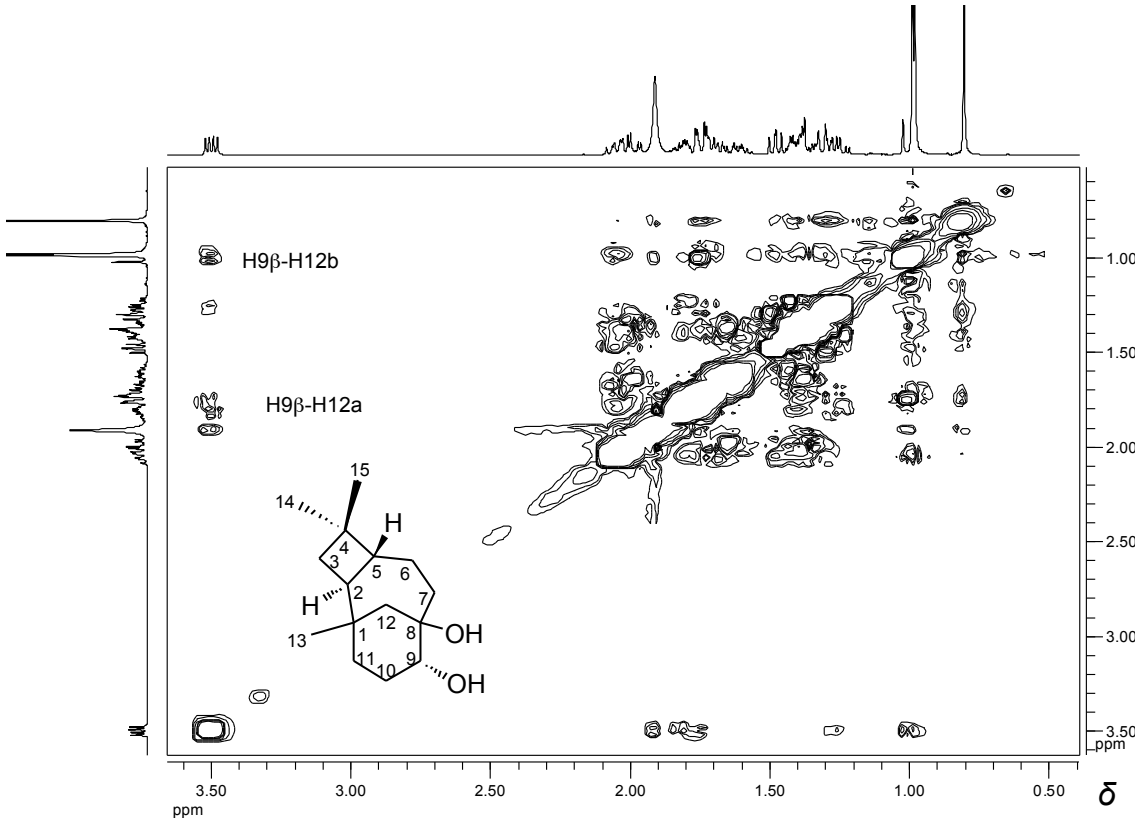


Figura 41 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-isocariolano- 8,9-diol (**80**).

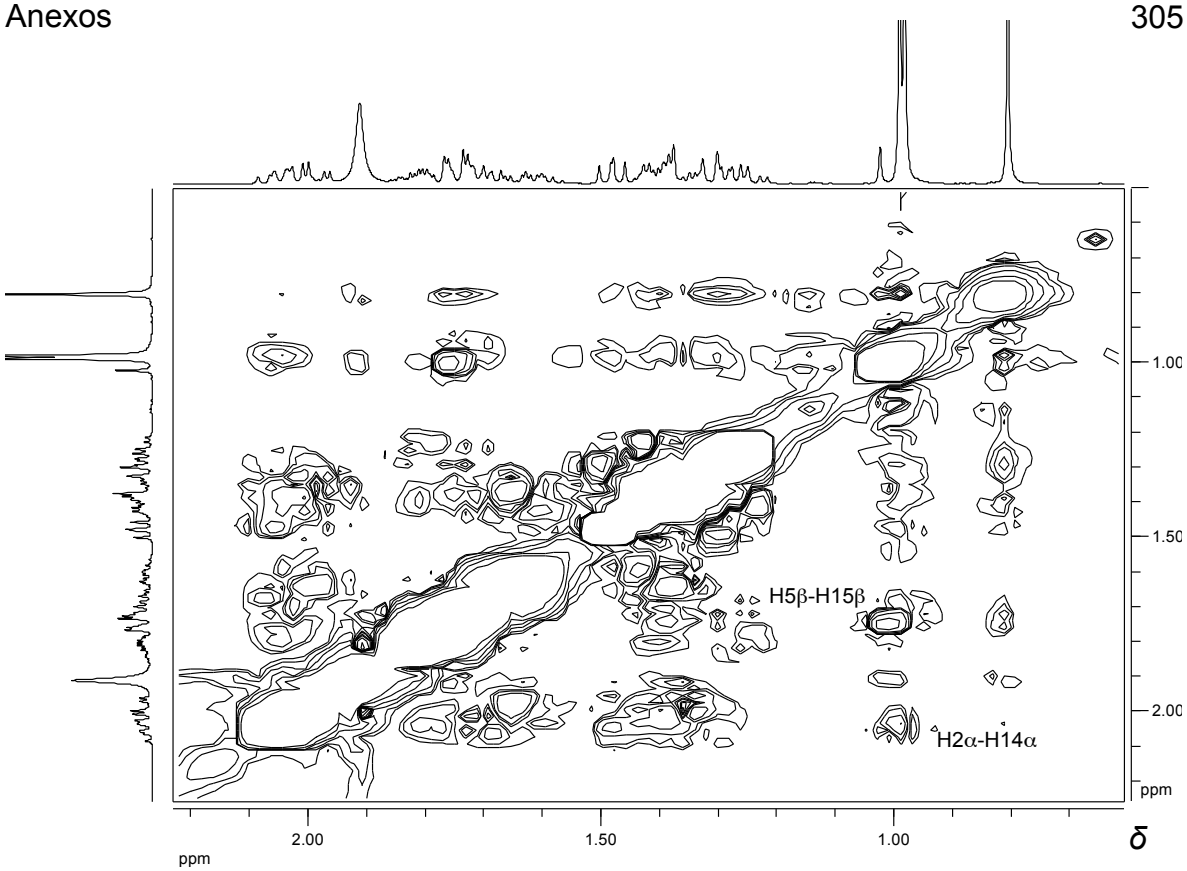


Figura 42 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de **80**. Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

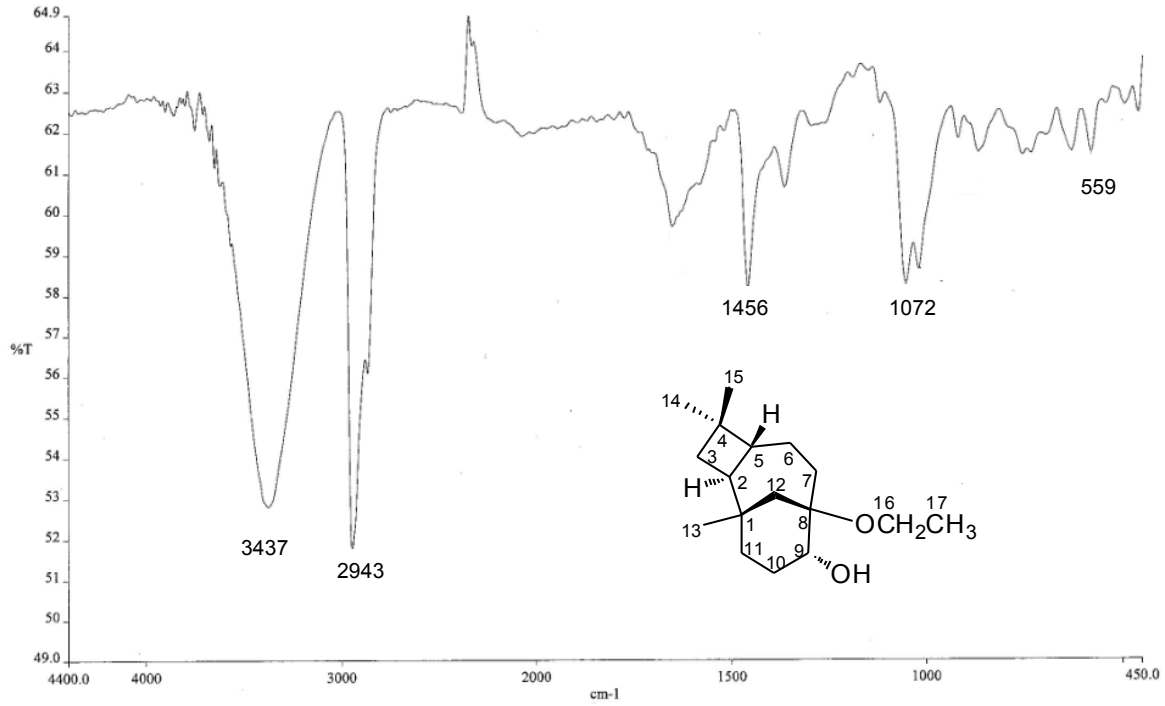


Figura 43 – Espectro no IV de (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**) (KBr).

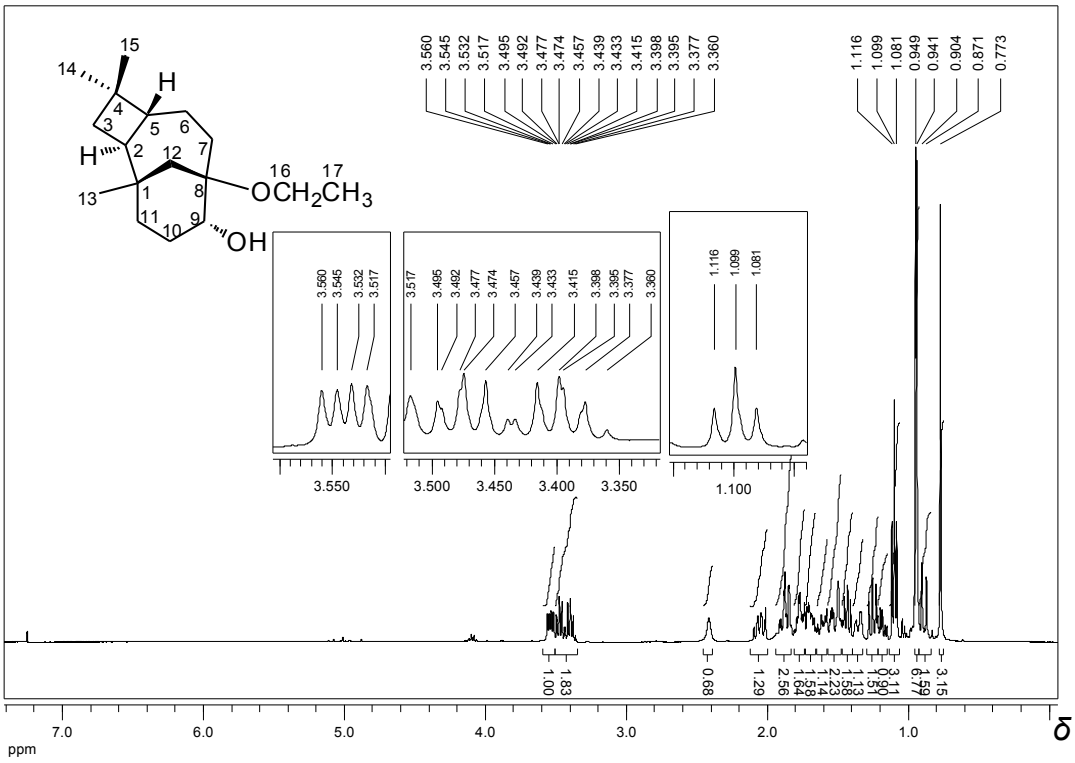


Figura 44 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**).

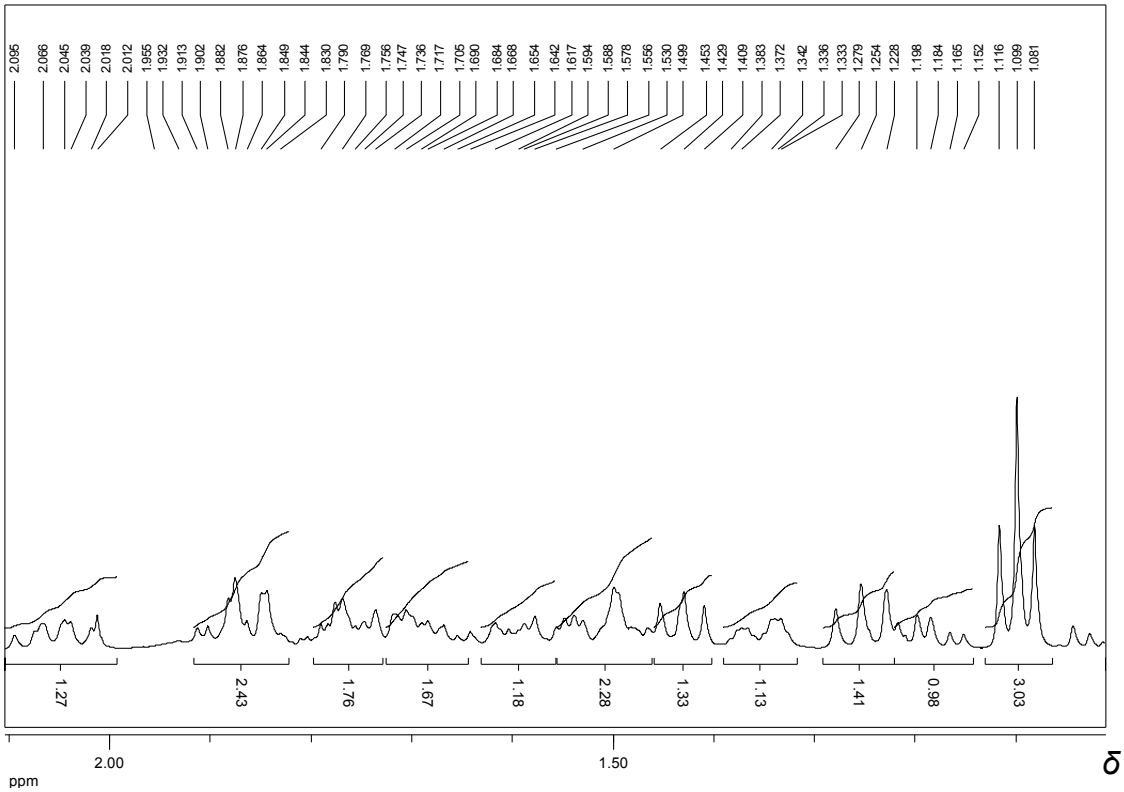


Figura 45 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

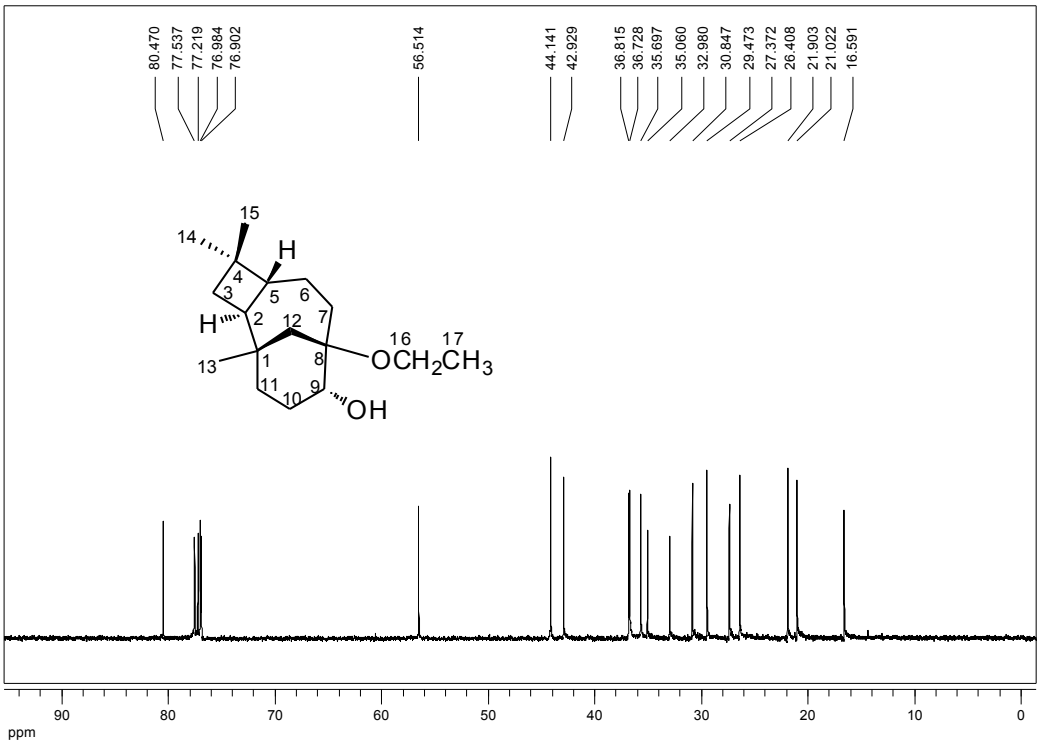


Figura 46 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**).

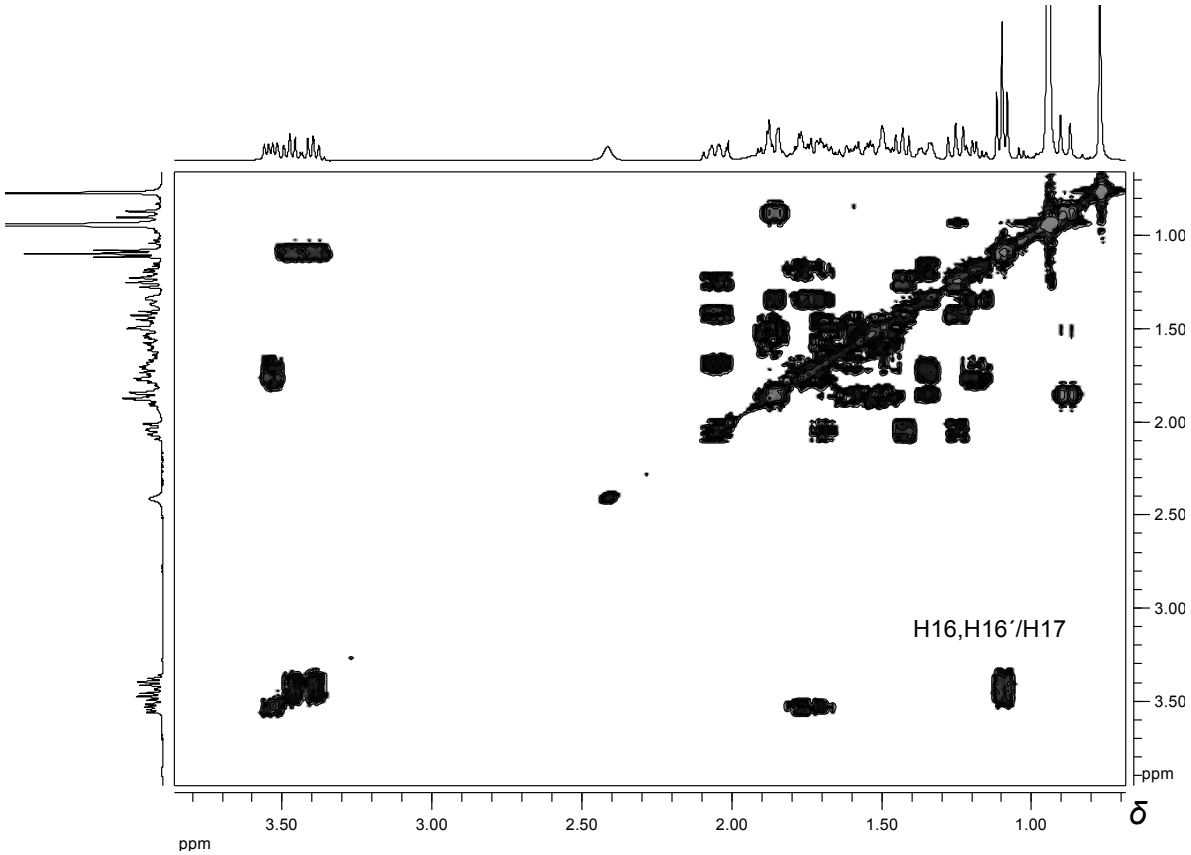


Figura 47 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**).

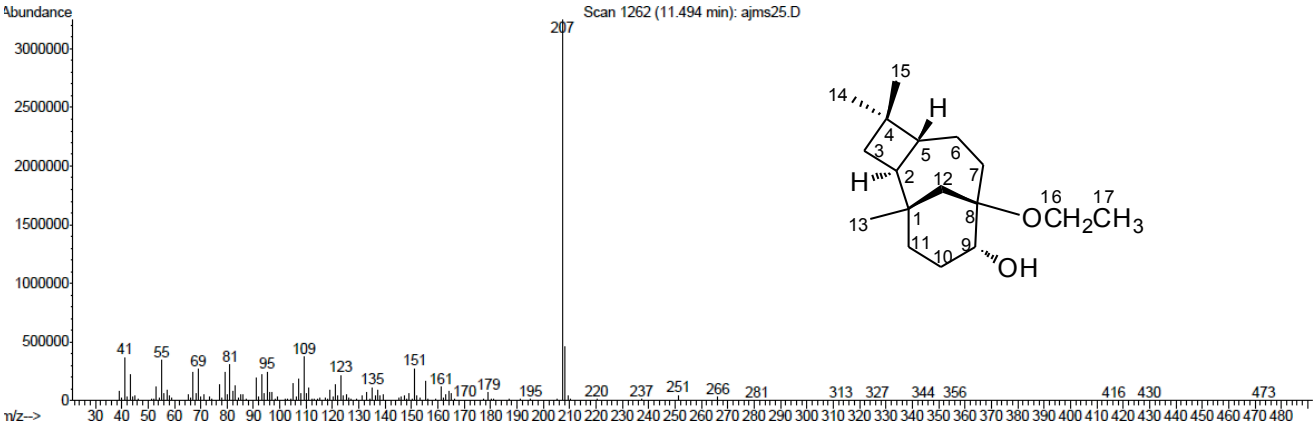


Figura 48 – Espectro de Massas de (8*R*,9*R*)-8-etoxi-isocariolan-9-ol (**84**).

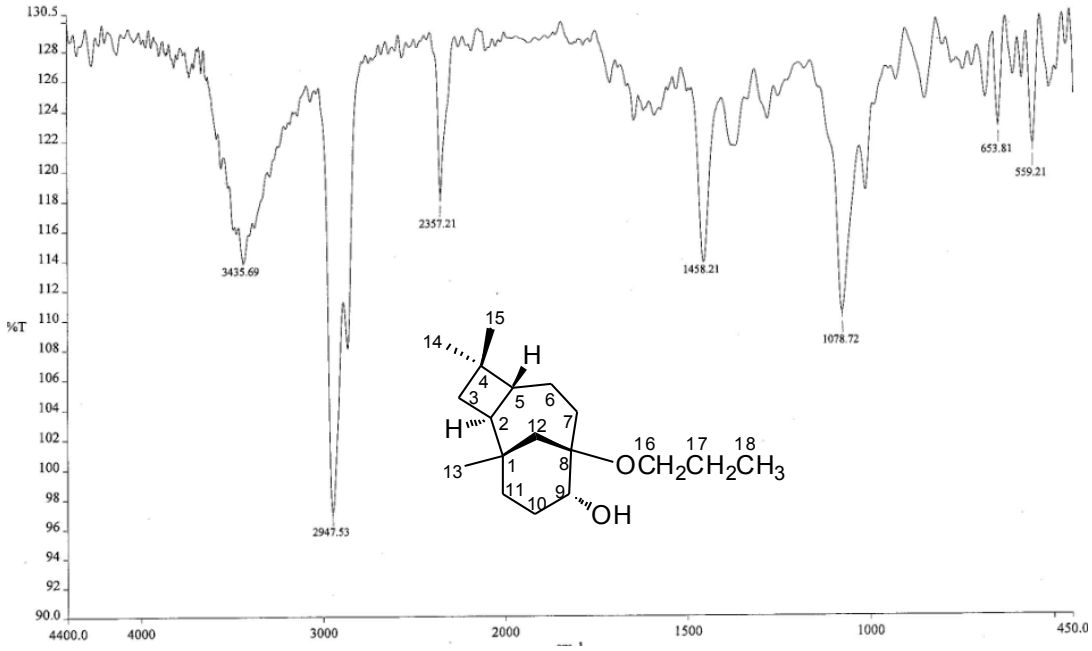


Figura 49 – Espectro no IV de (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**) (KBr).

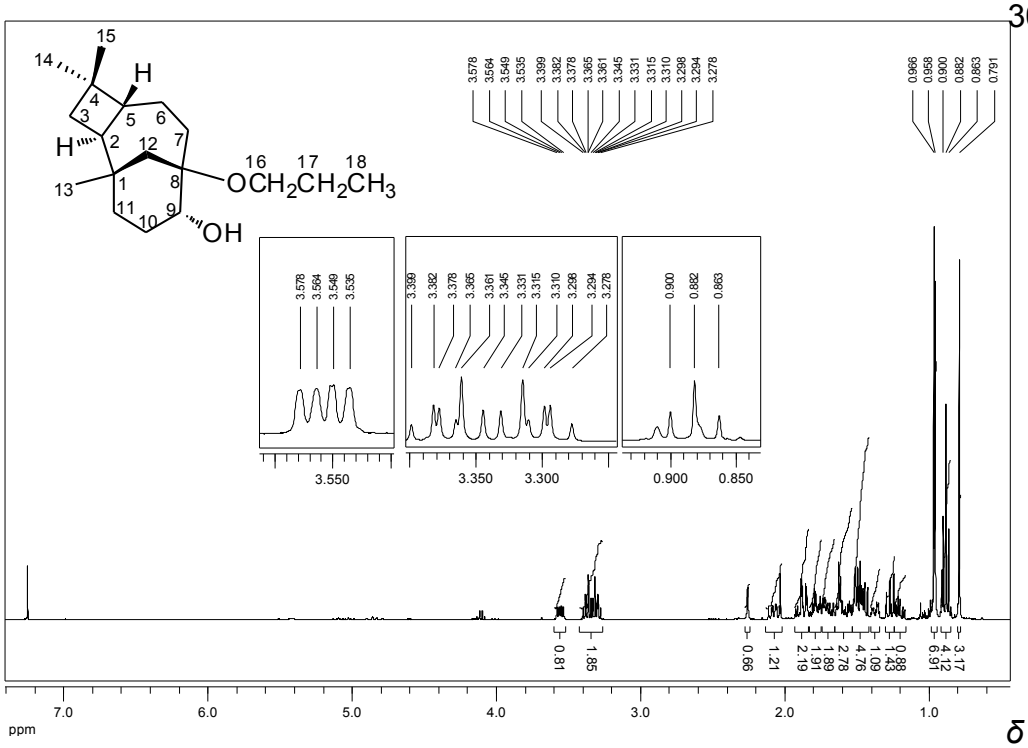


Figura 50 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**).

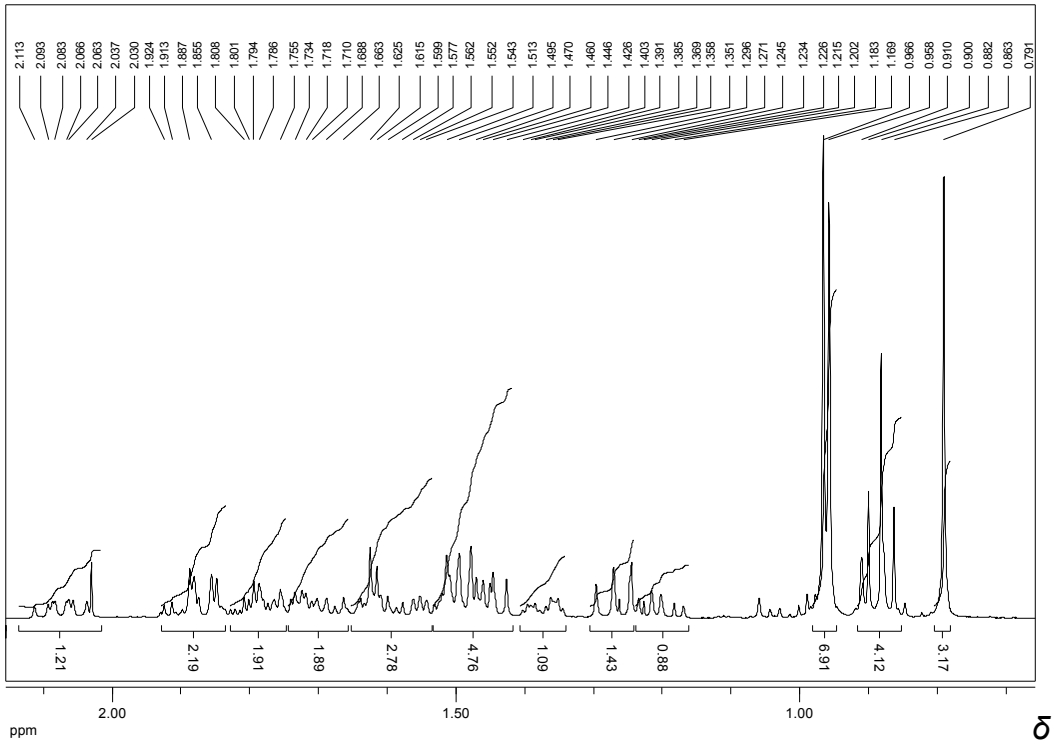


Figura 51 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

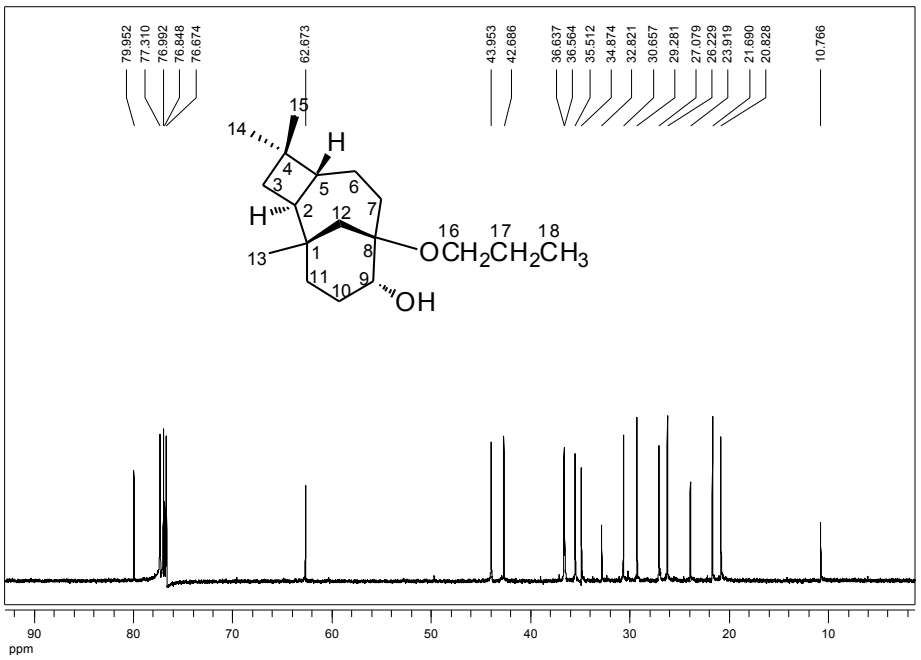


Figura 52 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**).

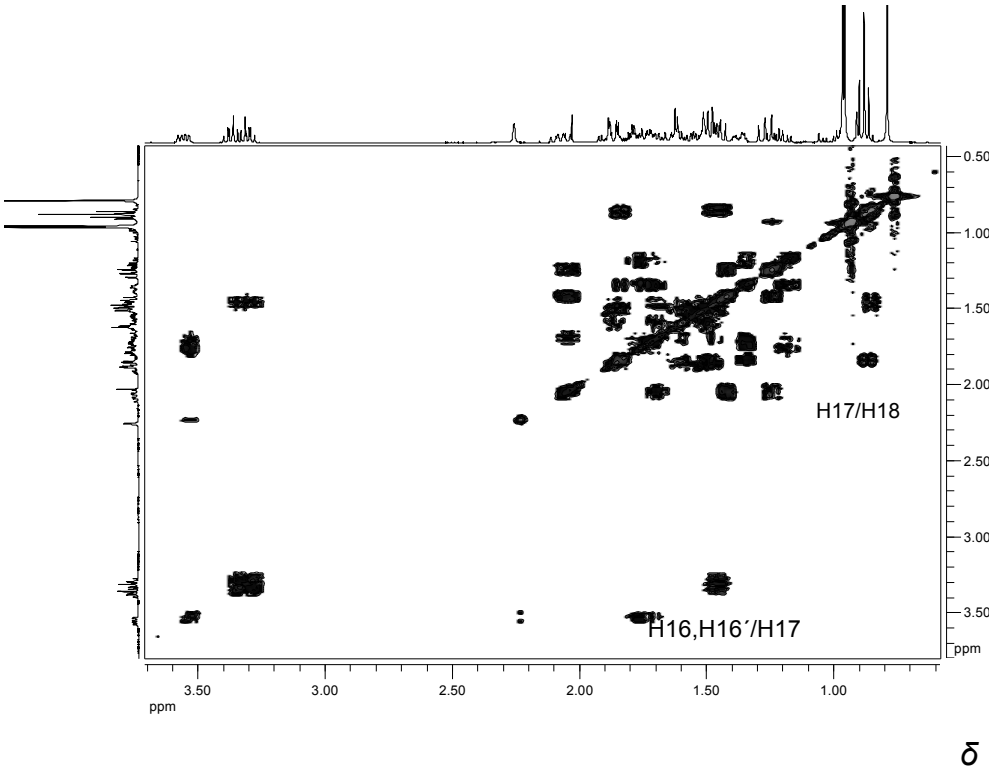


Figura 53 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**).

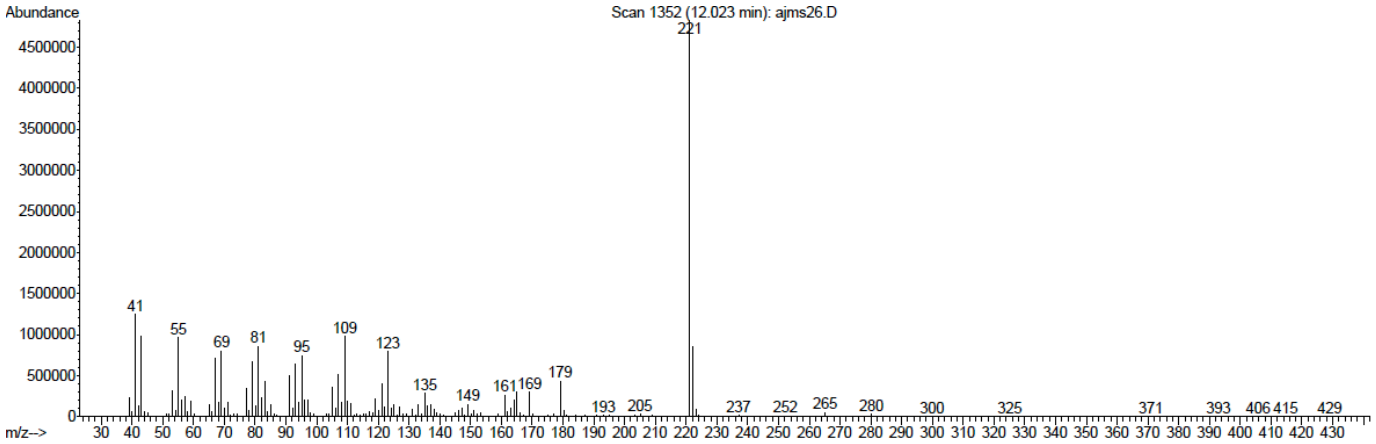


Figura 54 – Espectro de Massas de (8*R*,9*R*)-8-propoxi-isocariolan-9-ol (**85**).

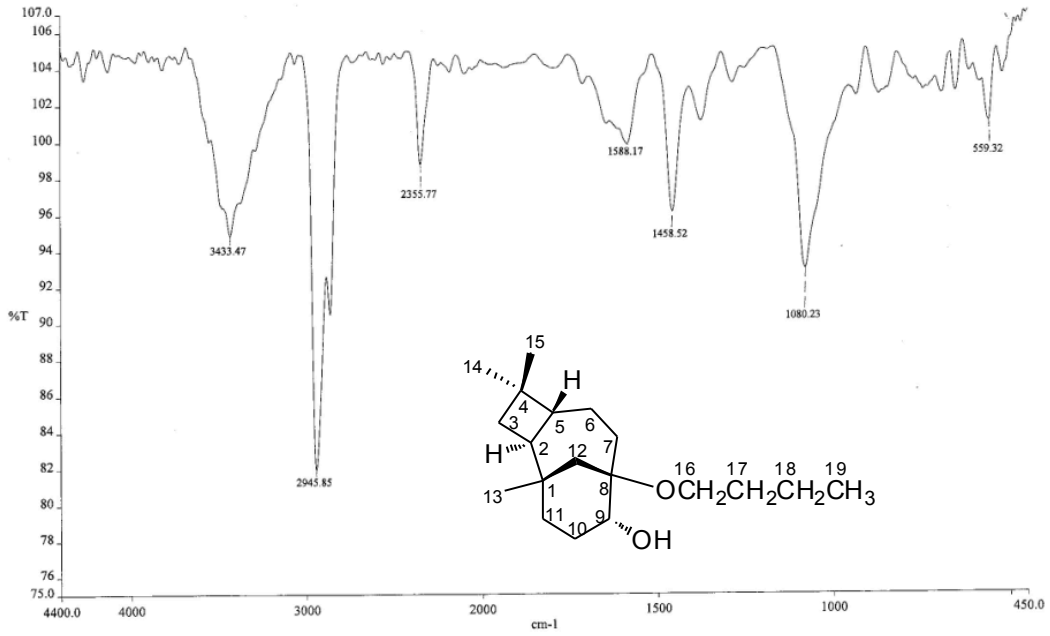


Figura 55 – Espectro no IV de (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**) (KBr).

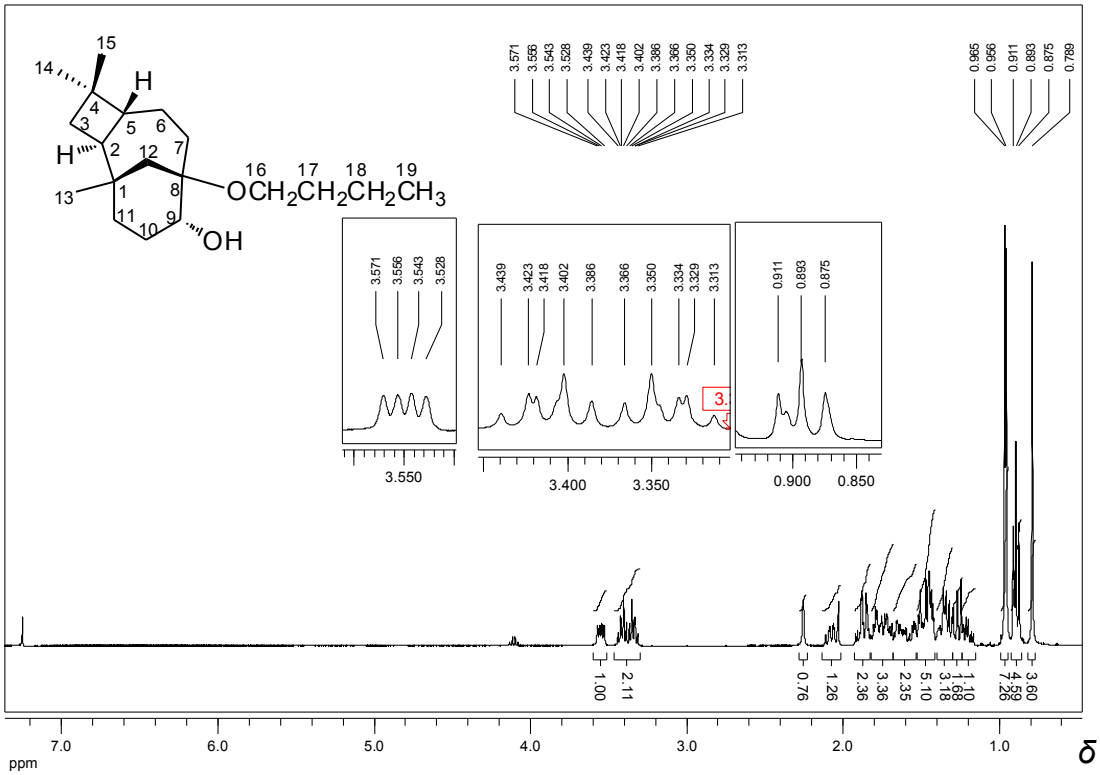


Figura 56 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**).

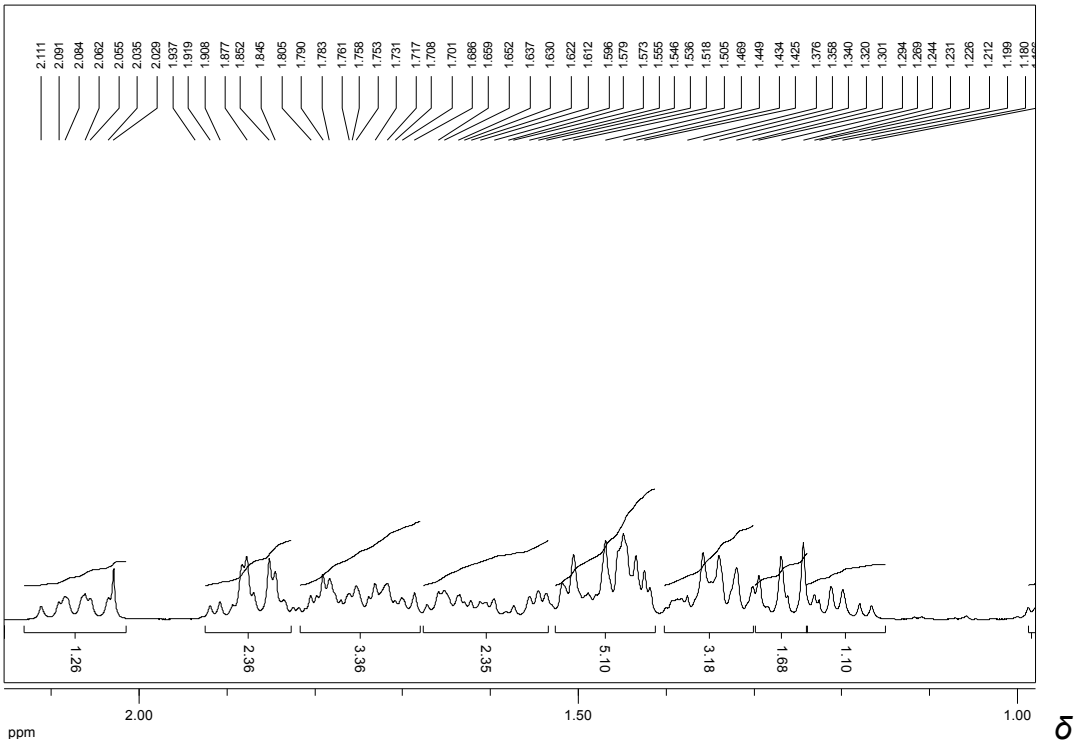


Figura 57 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

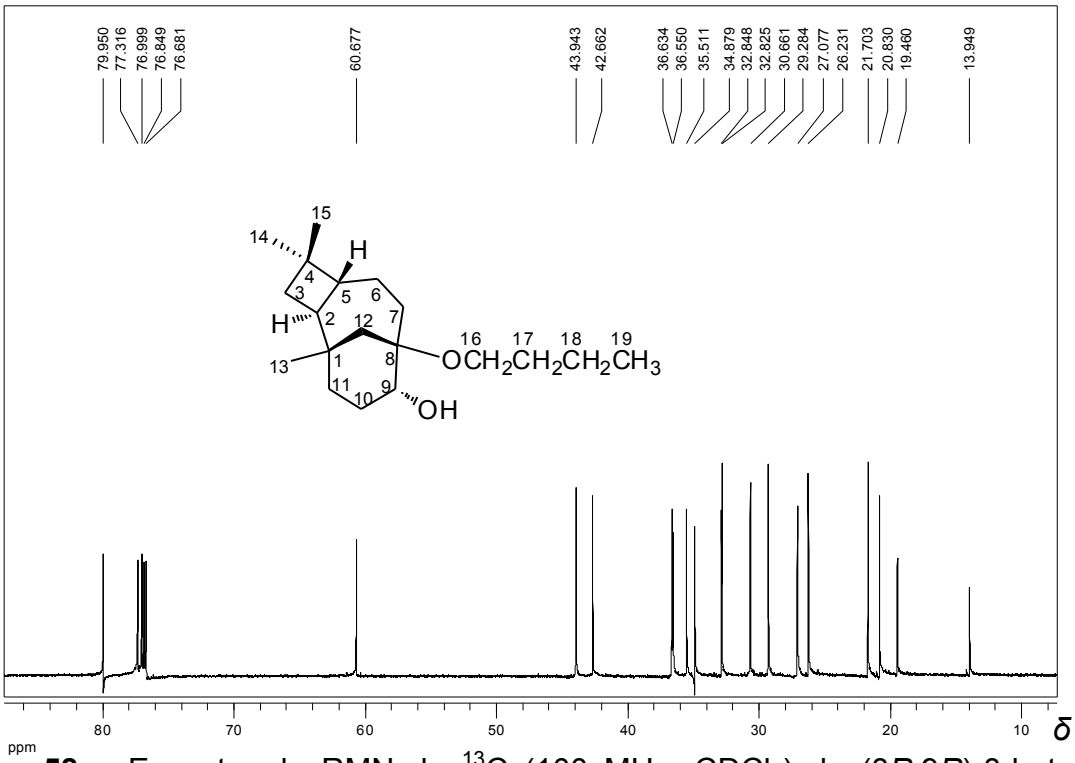


Figura 58 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**).

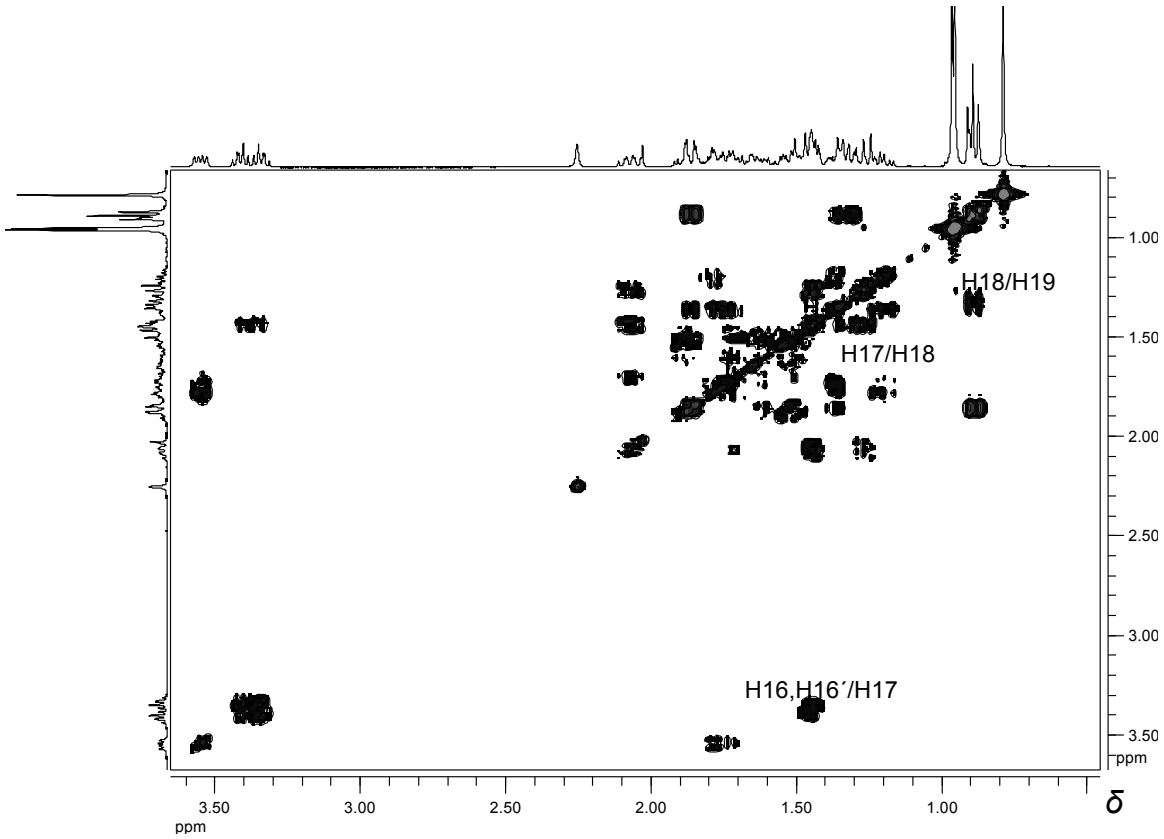


Figura 59 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**).

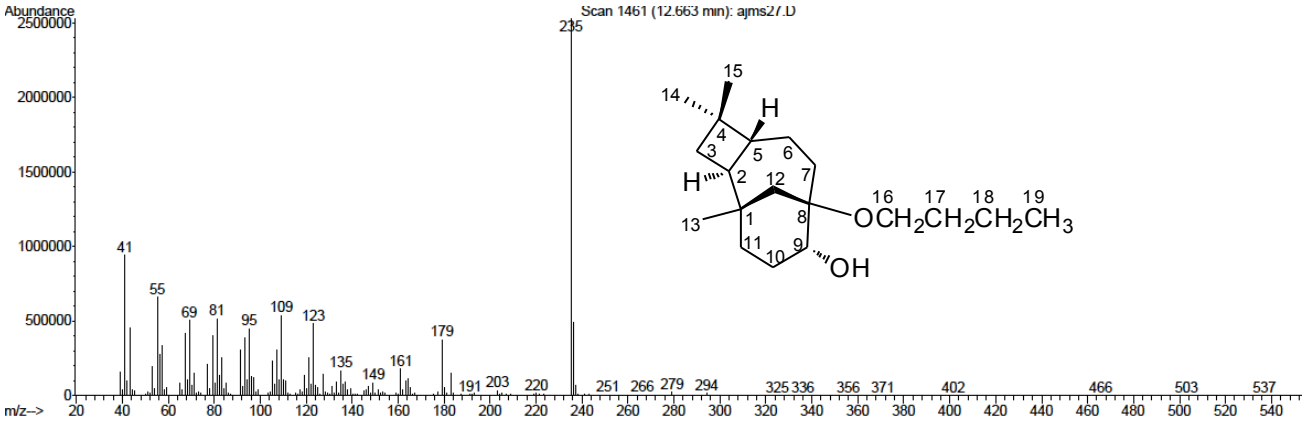


Figura 60 – Espectro de Massas de (8*R*,9*R*)-8-butoxi-isocariolan-9-ol (**86**).

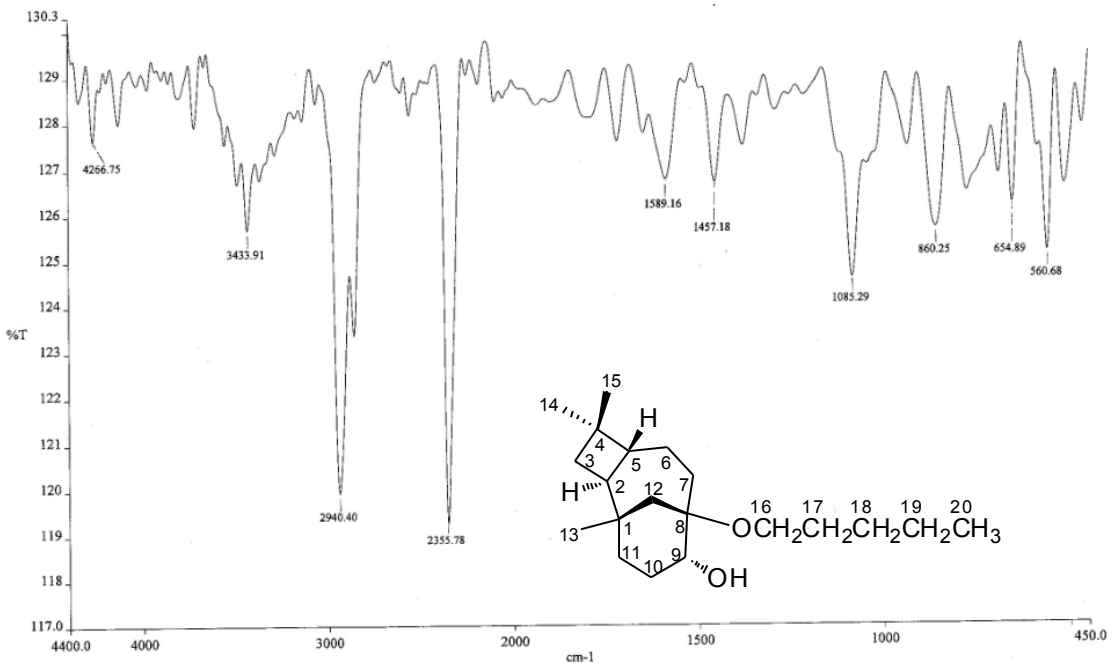


Figura 61 – Espectro de IV no (8*R*,9*R*)-8-pentoxiisocariolan-9-ol (**87**) (KBr).

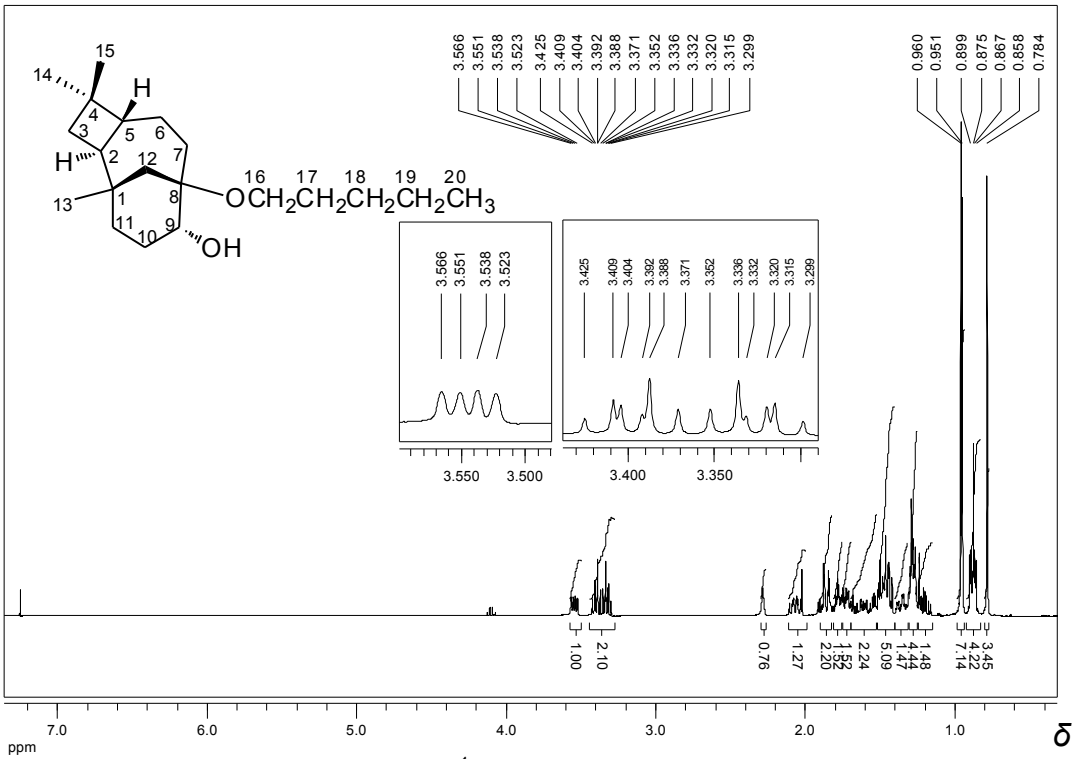


Figura 62 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**).

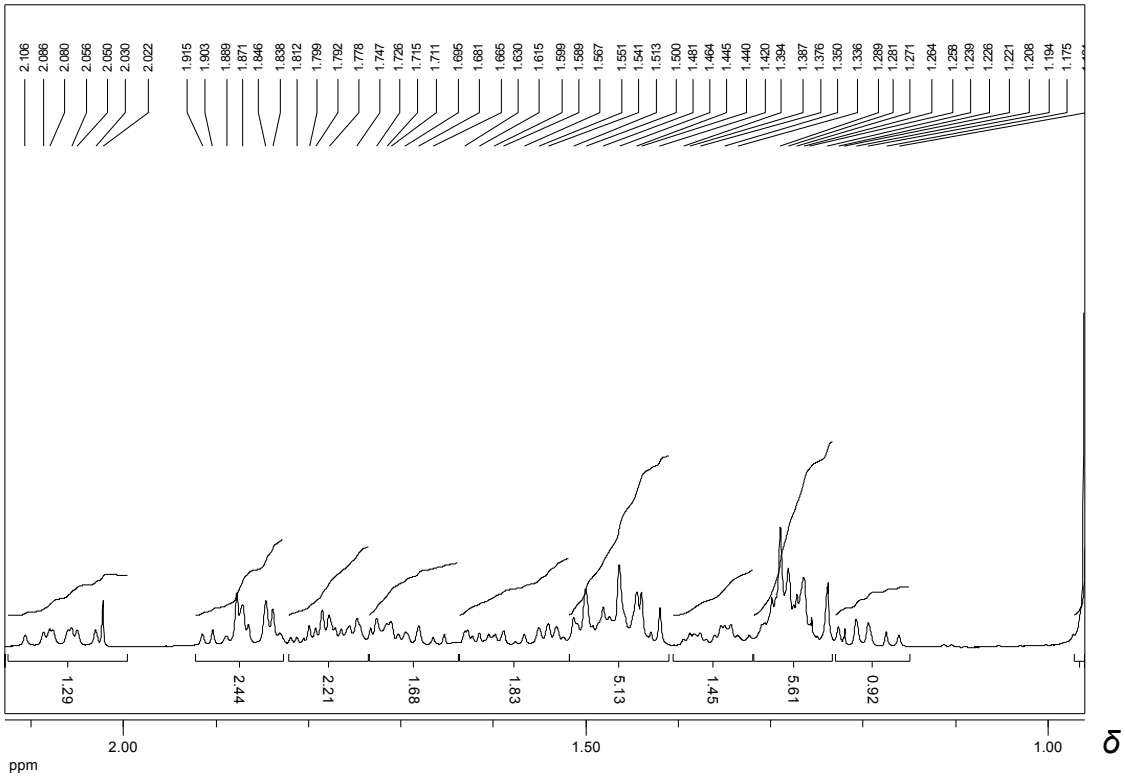


Figura 63 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

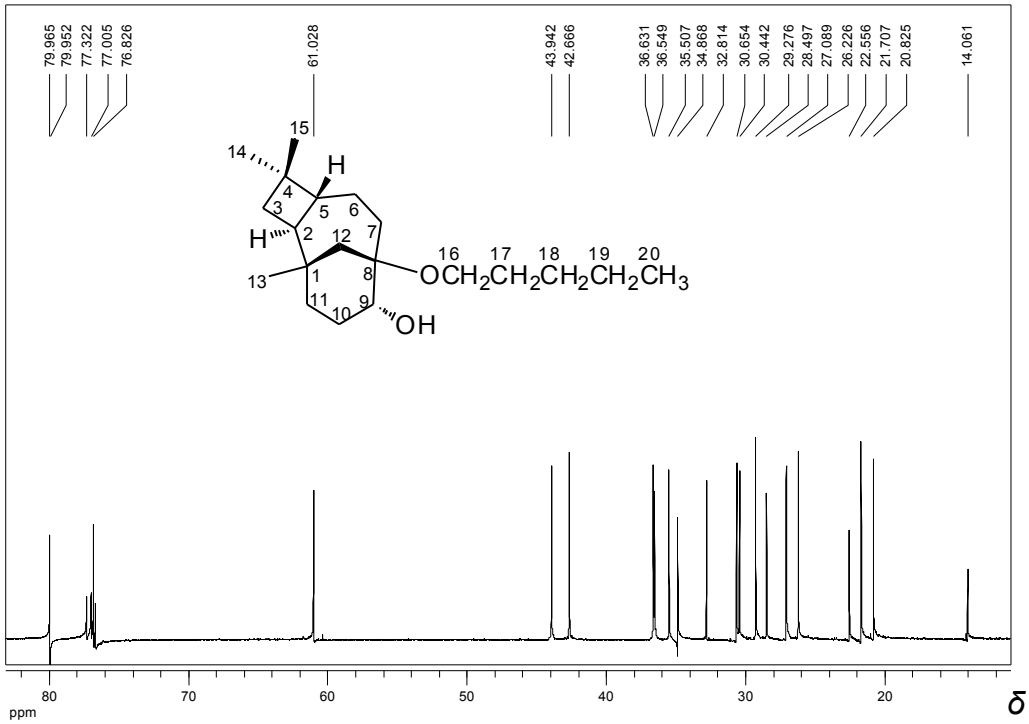


Figura 64 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**).

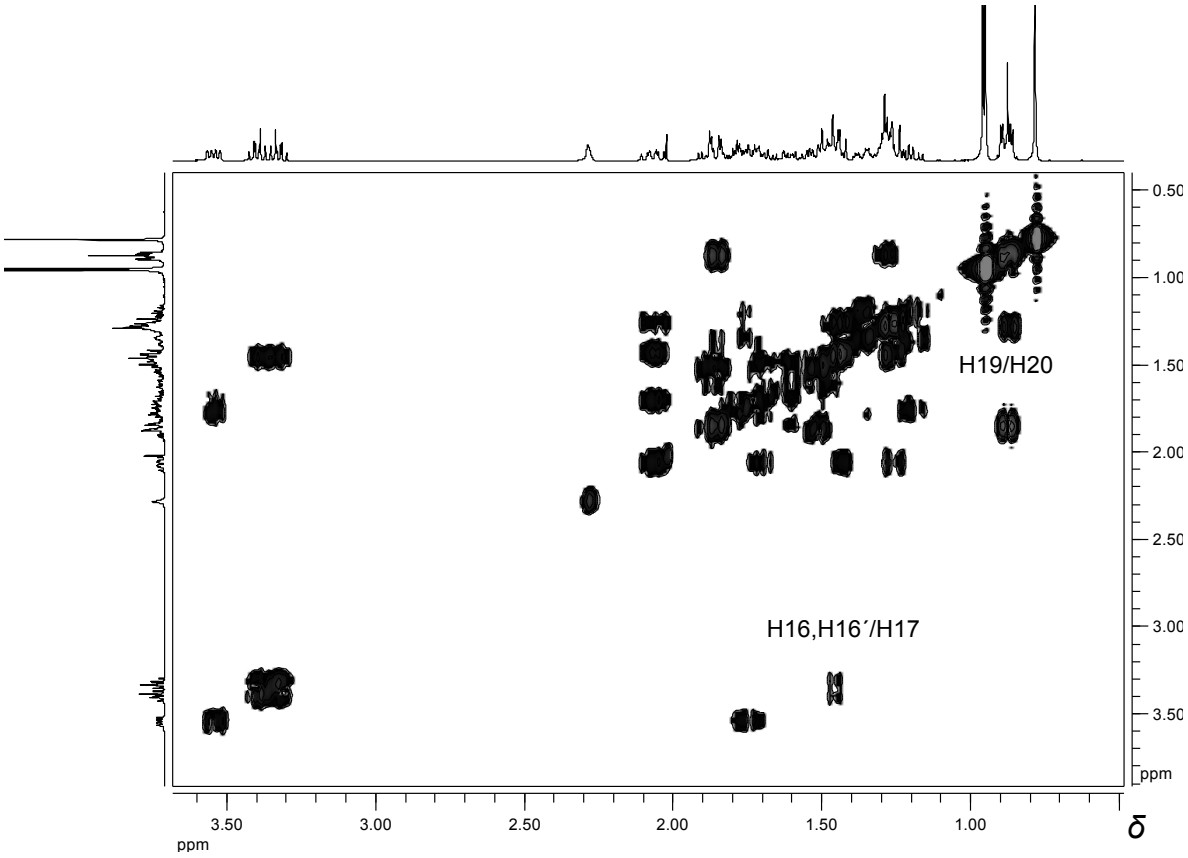


Figura 65 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**)

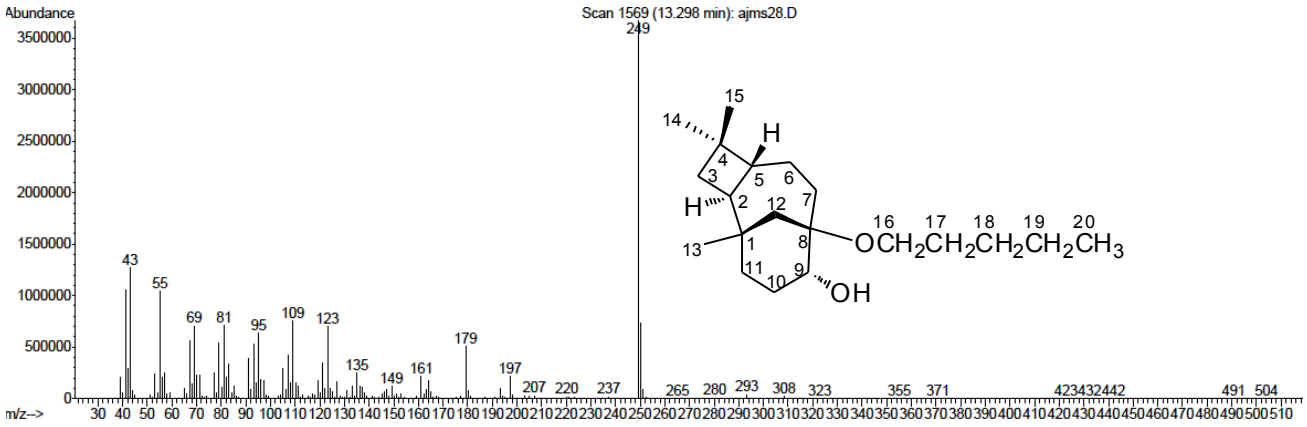


Figura 66 – Espectro de Massas de (8*R*,9*R*)-8-pentoxi-isocariolan-9-ol (**87**).

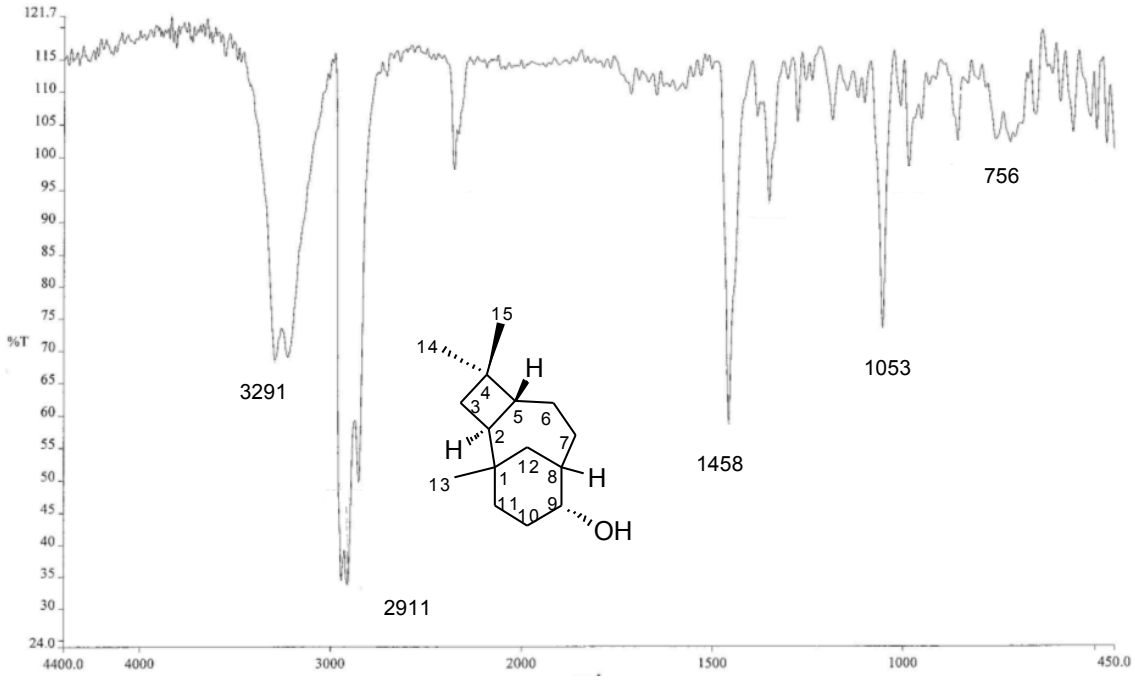


Figura 67 – Espectro na região no IV de isocariolan-9*α*-ol (**82**) (KBr).

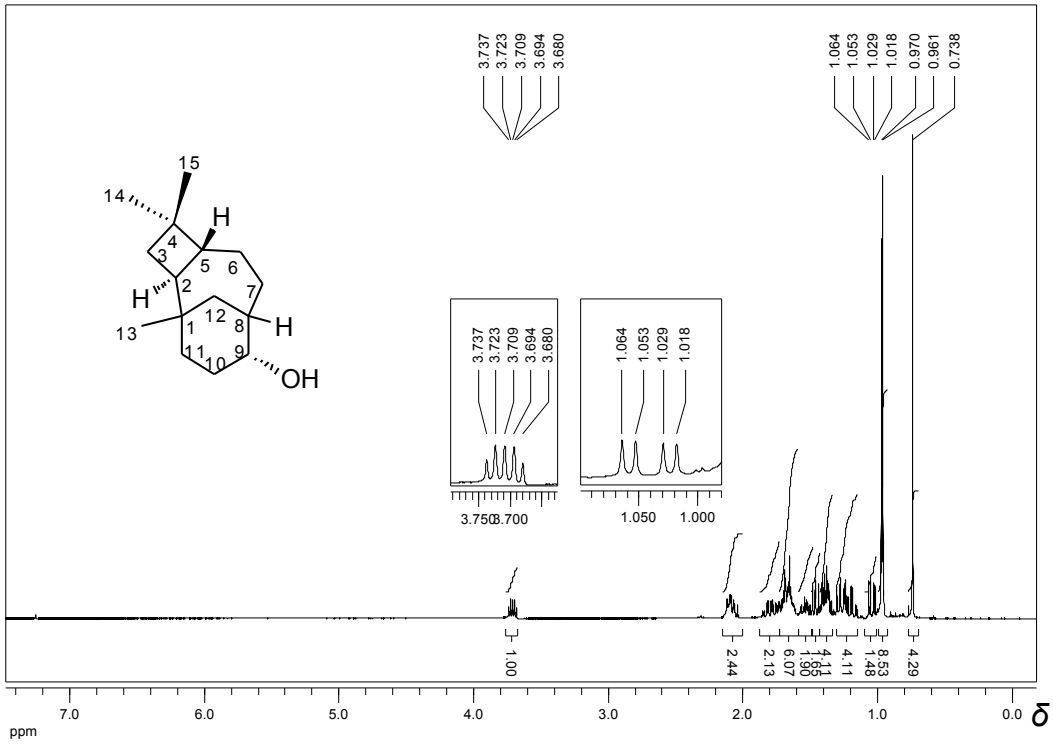


Figura 68 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (**82**).

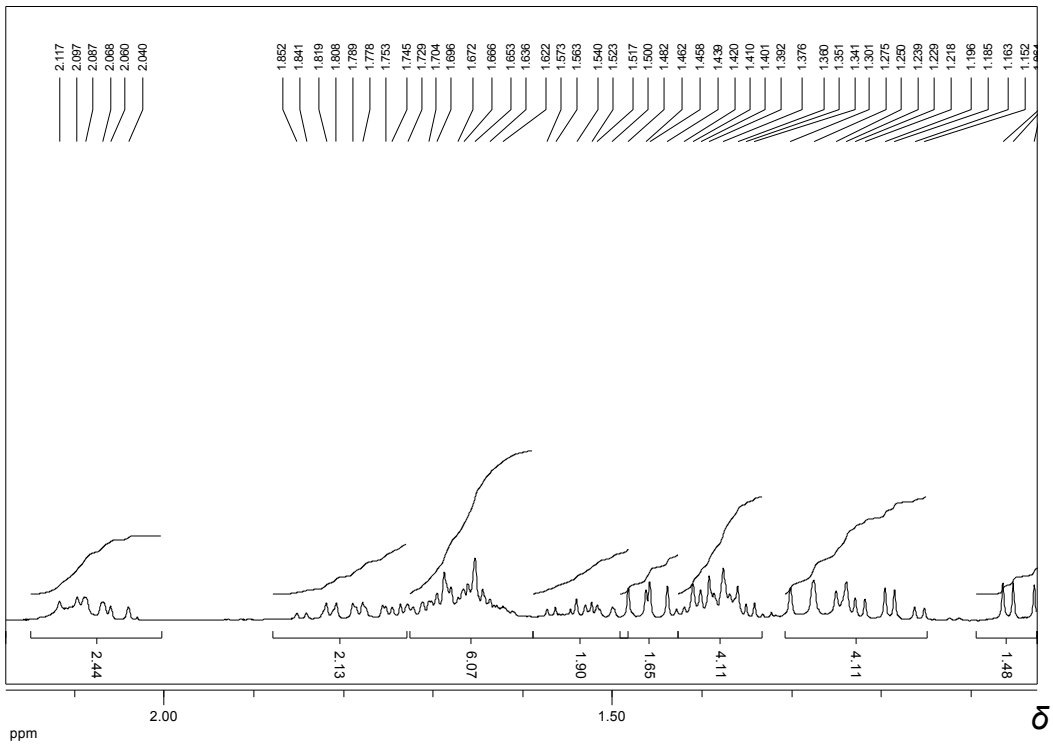


Figura 69 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (**82**). Expansão da região entre δ_H 1,0 – 2,2.

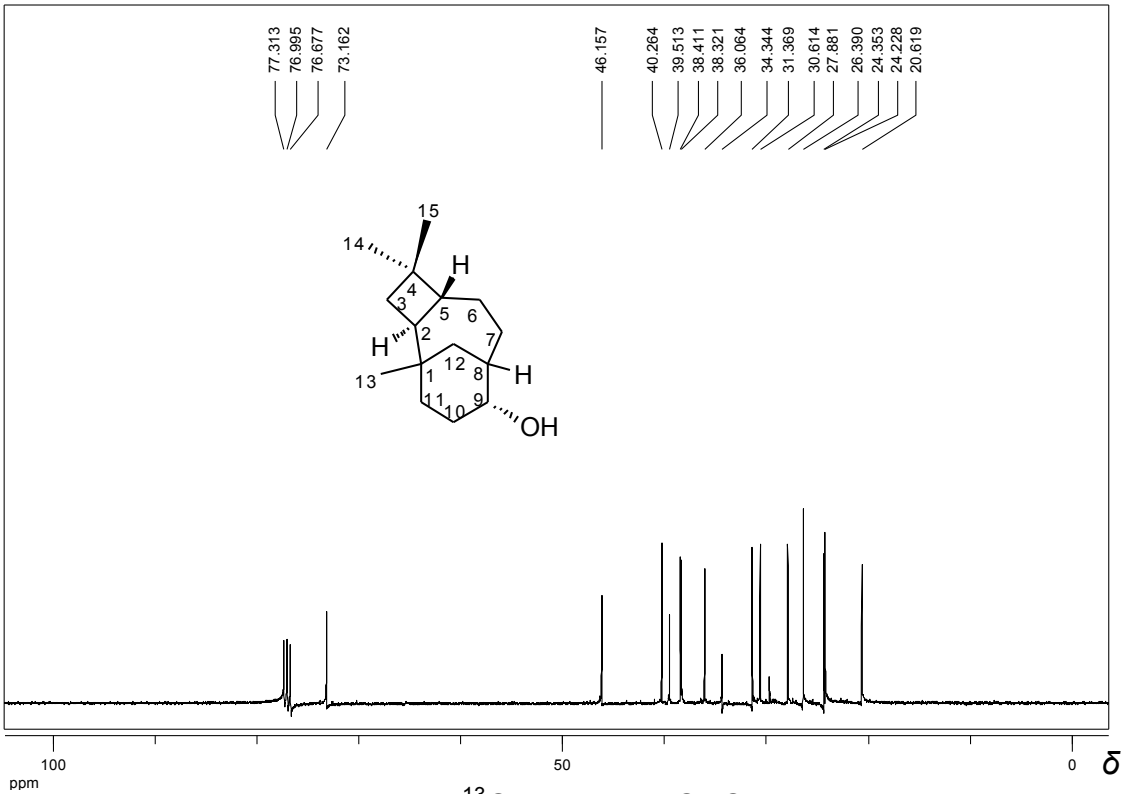


Figura 70 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (**82**).

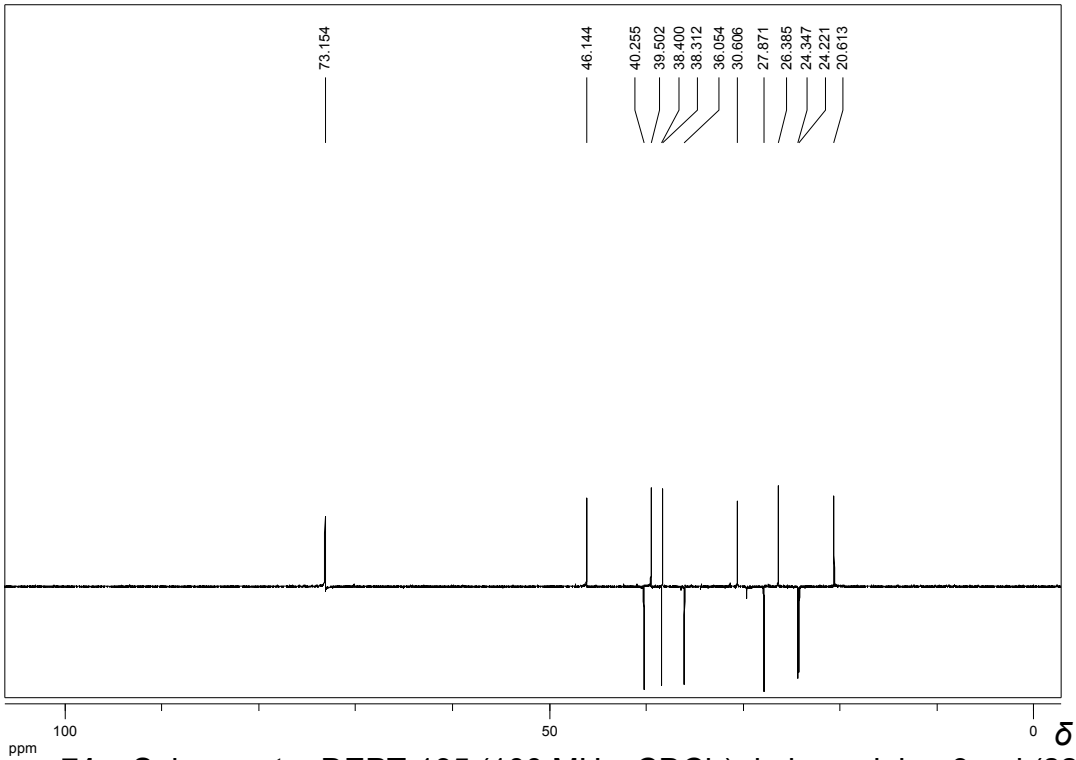


Figura 71 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (**82**).

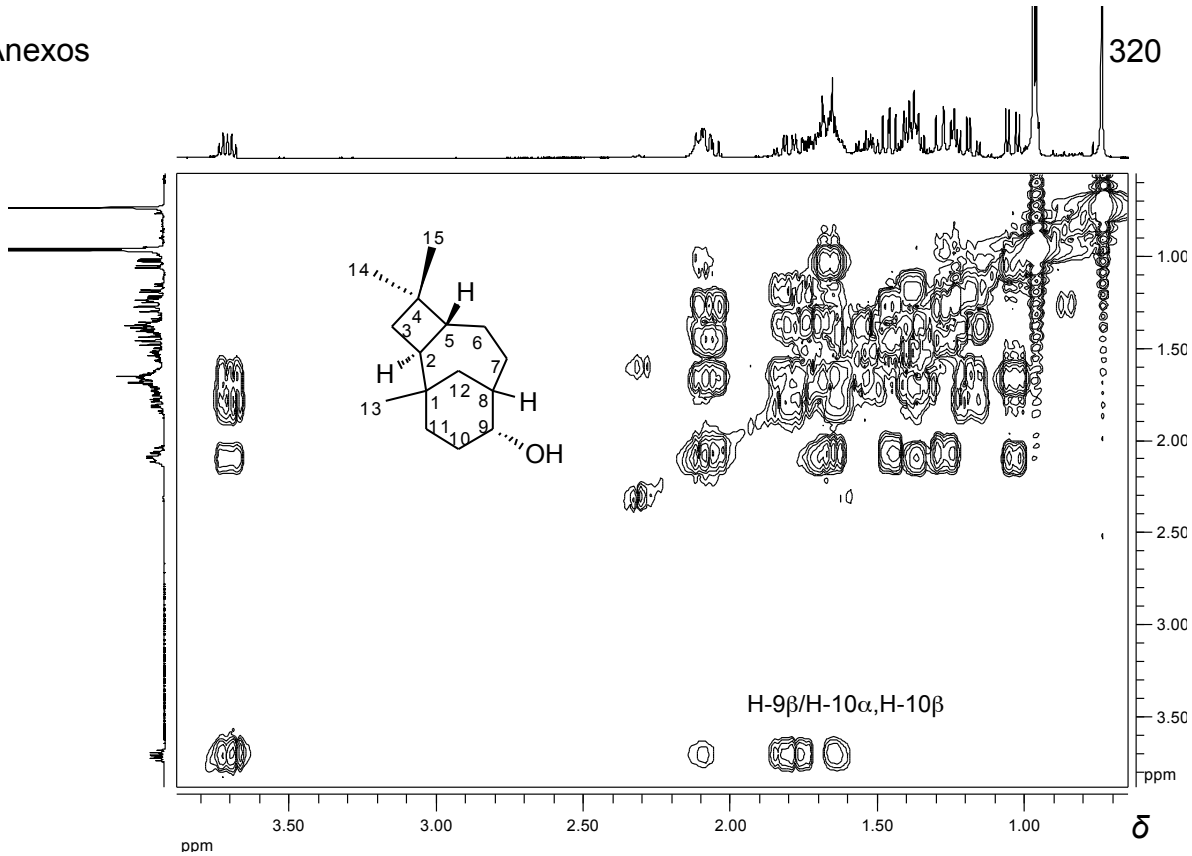


Figura 72 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9α-ol (**82**).

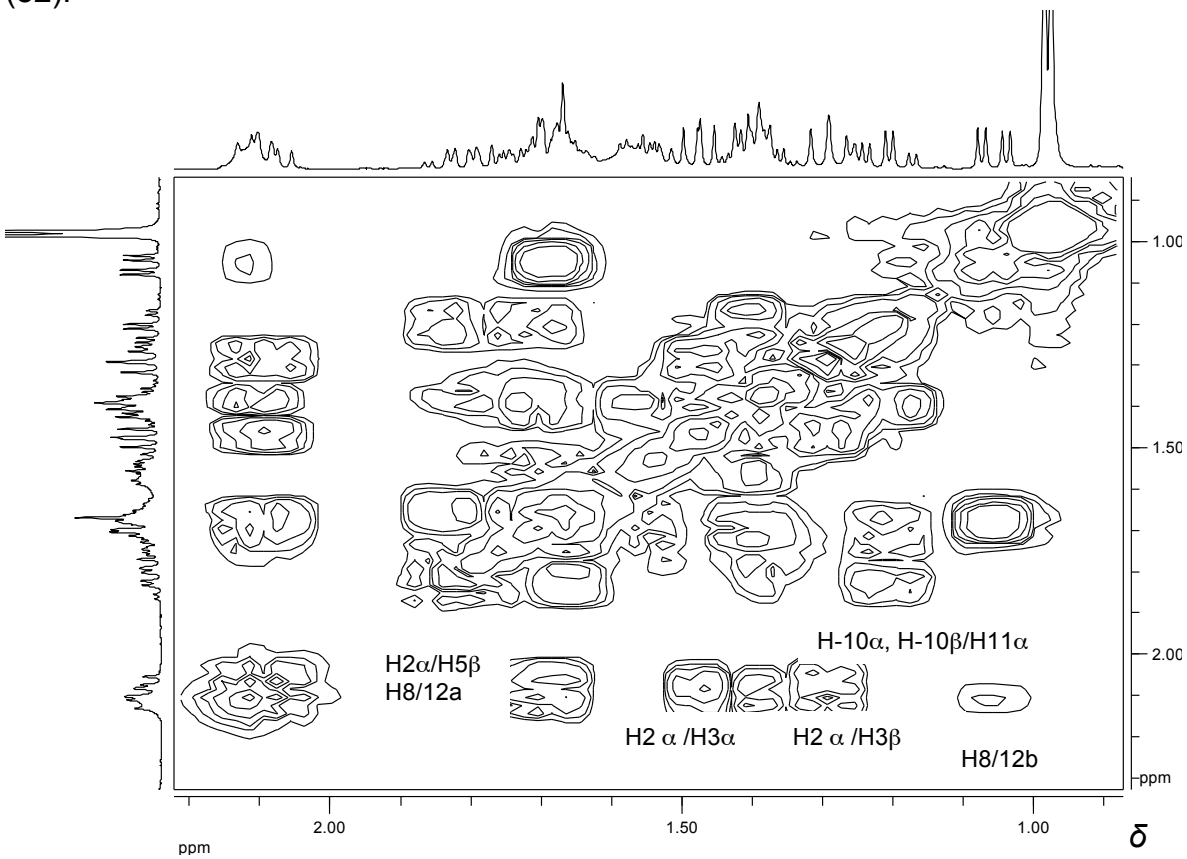


Figura 73 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (**82**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

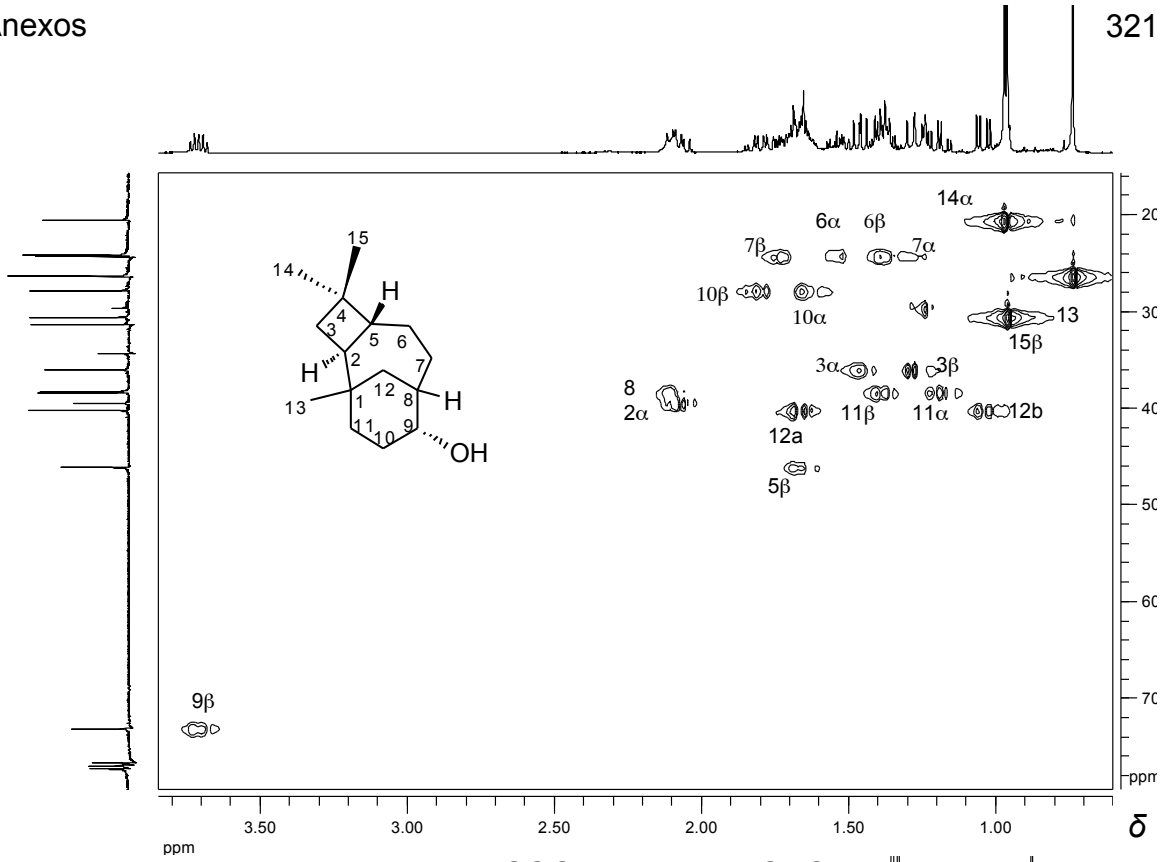


Figura 74 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (**82**).

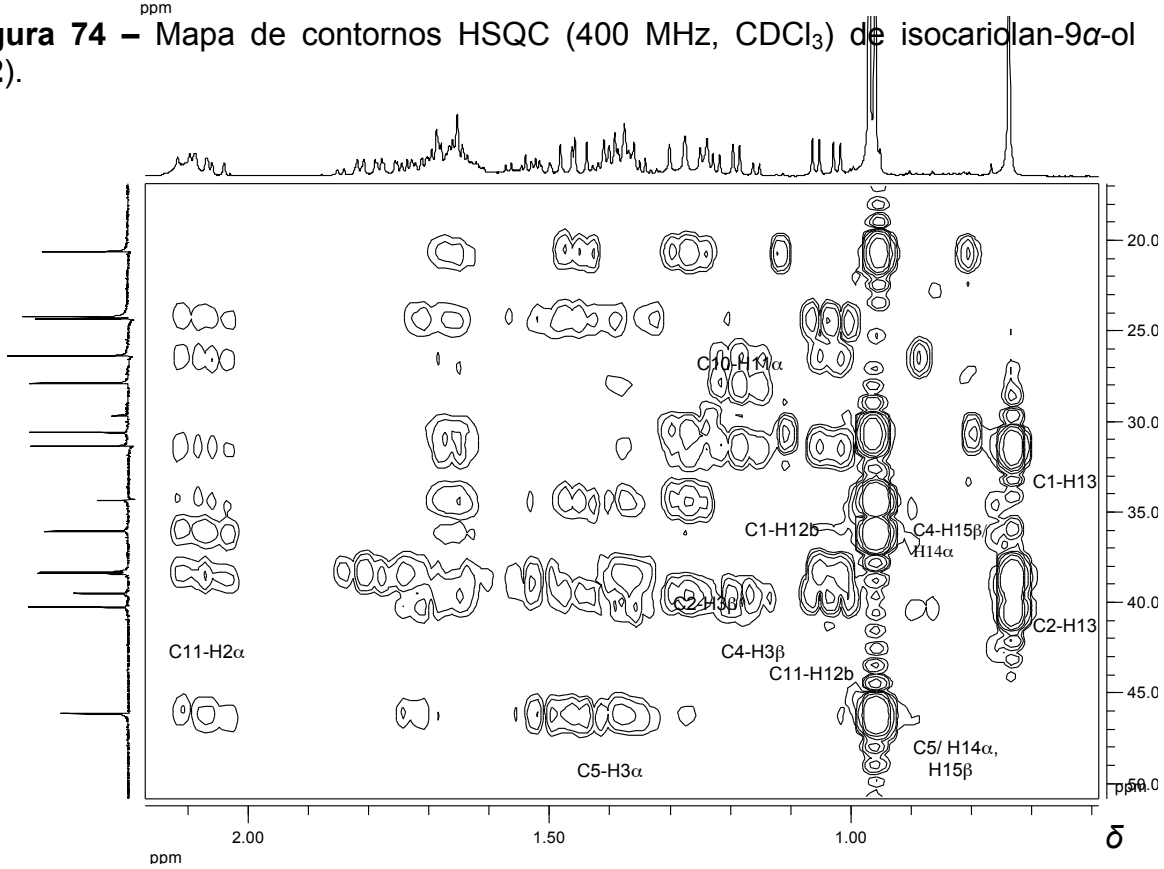


Figura 75 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (**82**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

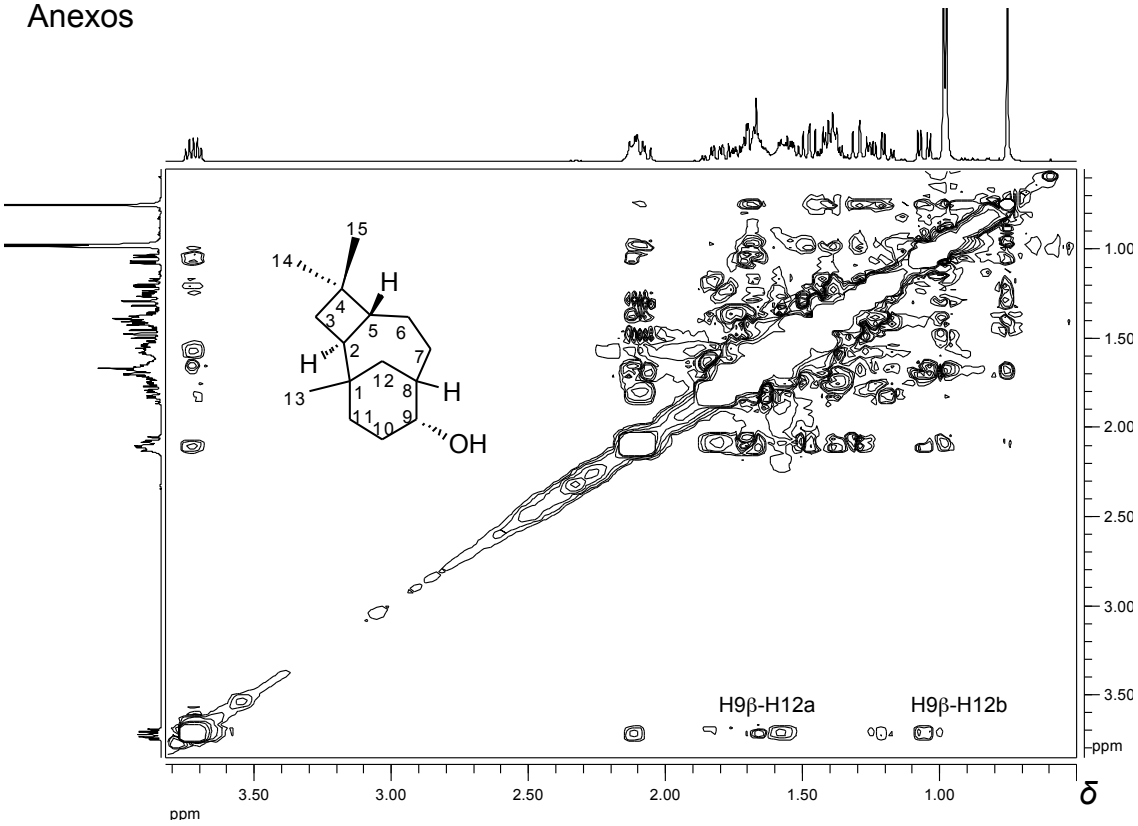


Figura 76 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (**82**).

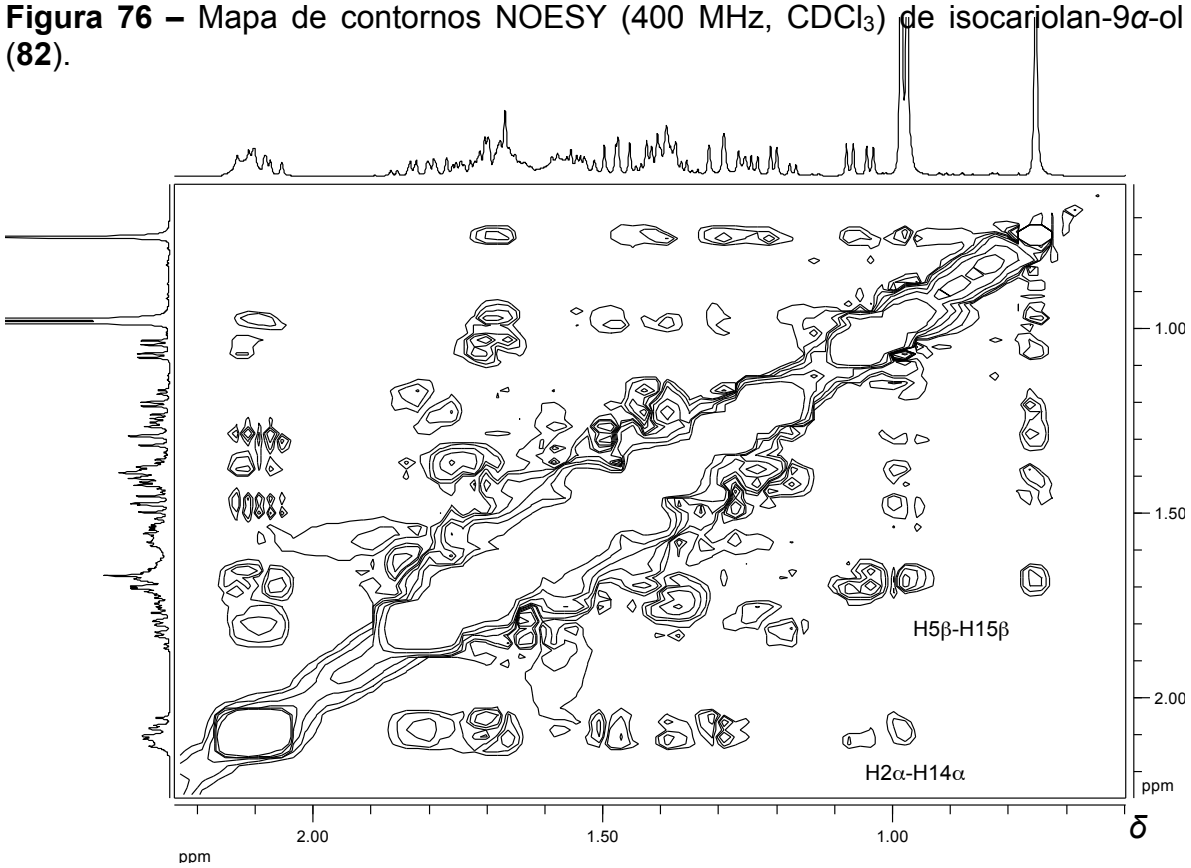


Figura 77 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de isocariolan-9*α*-ol (**82**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

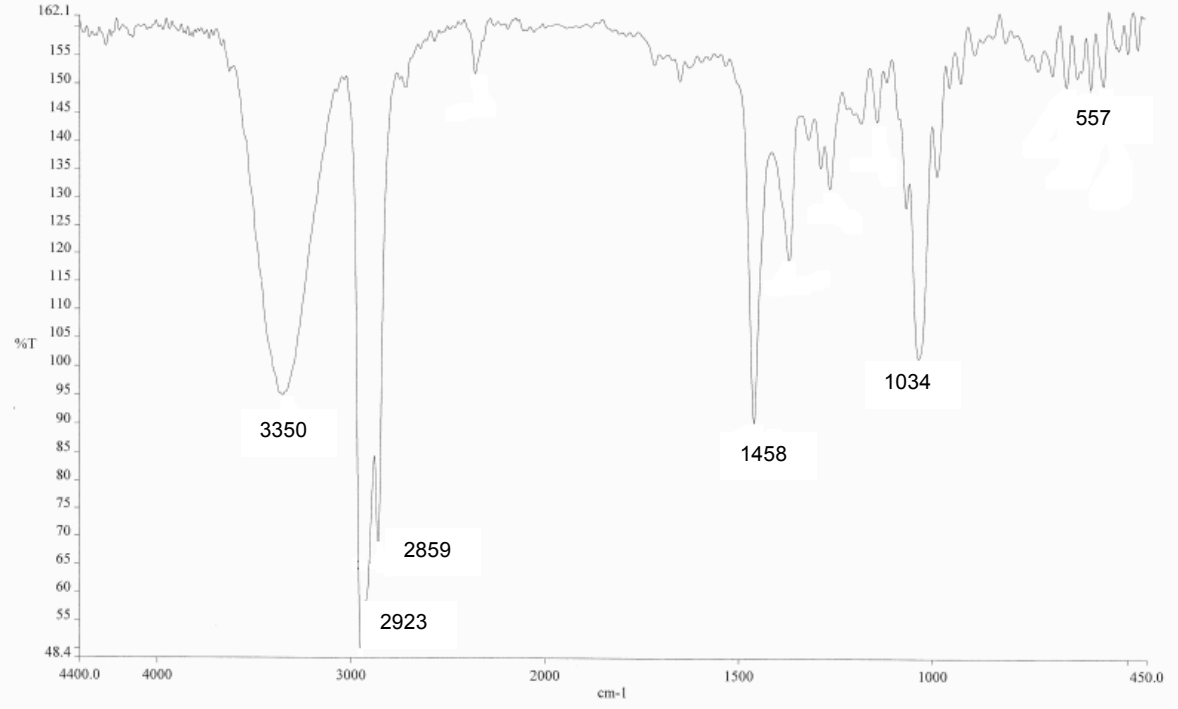


Figura 78 – Espectro no IV de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**) (KBr).

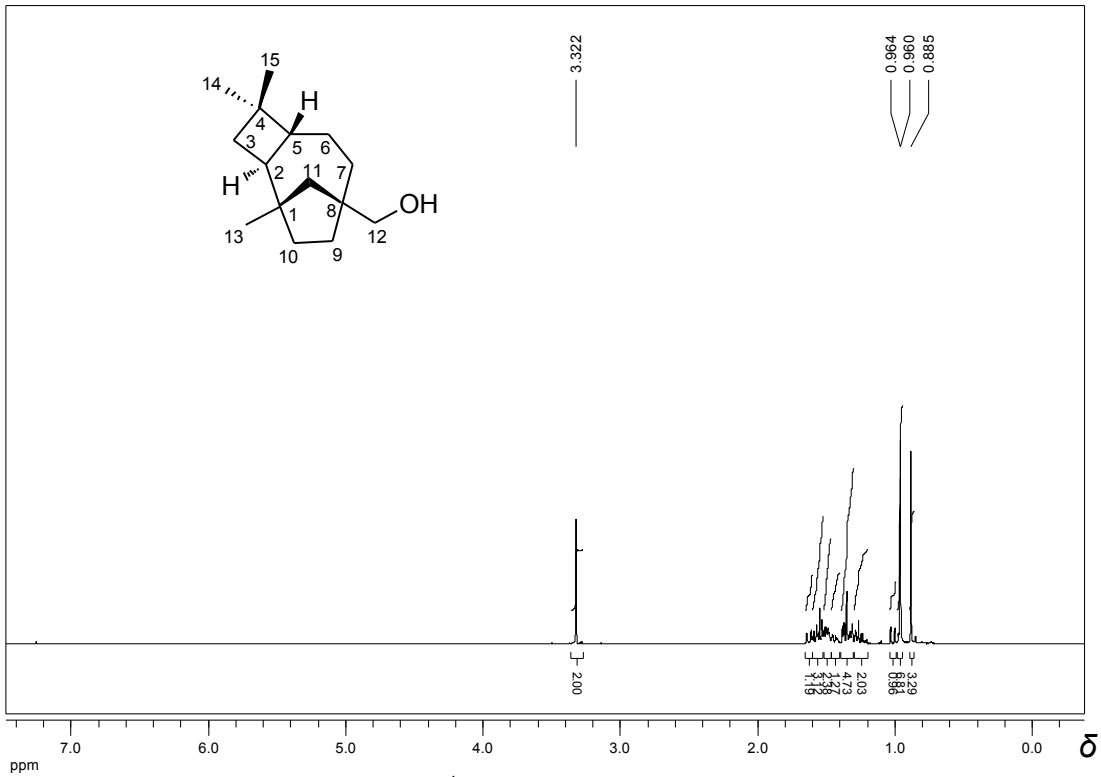


Figura 79 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**).

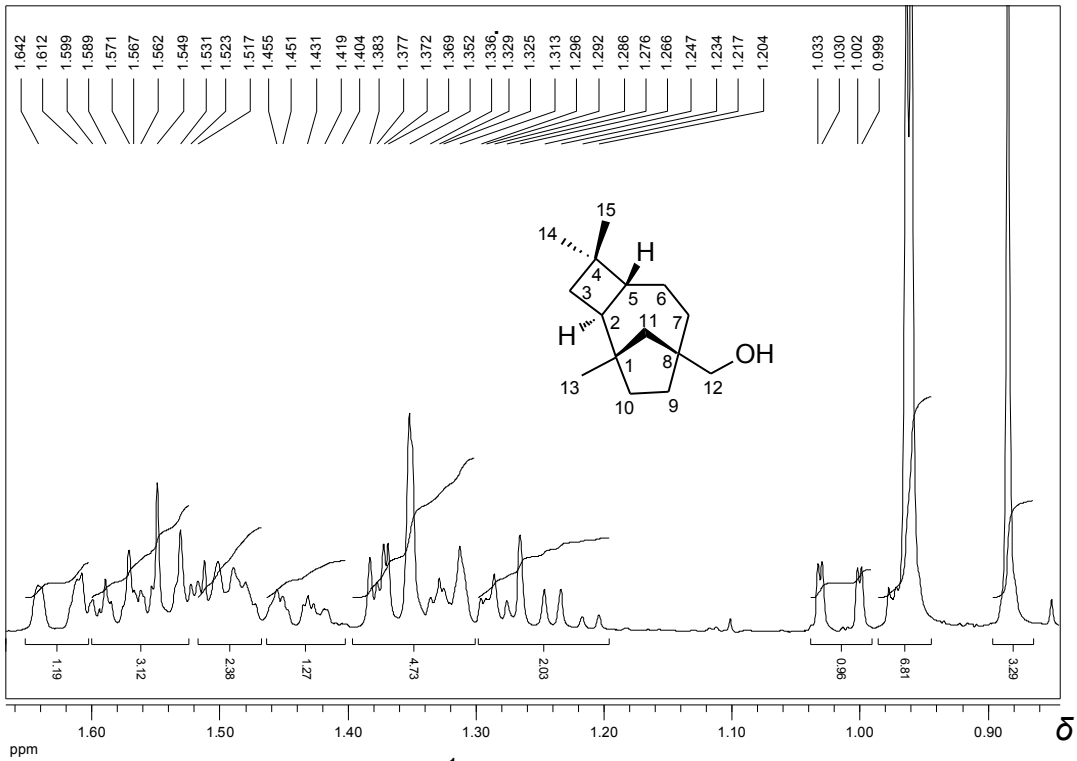


Figura 80 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**). Expansão da região entre δ_H 0,8 – 1,80.

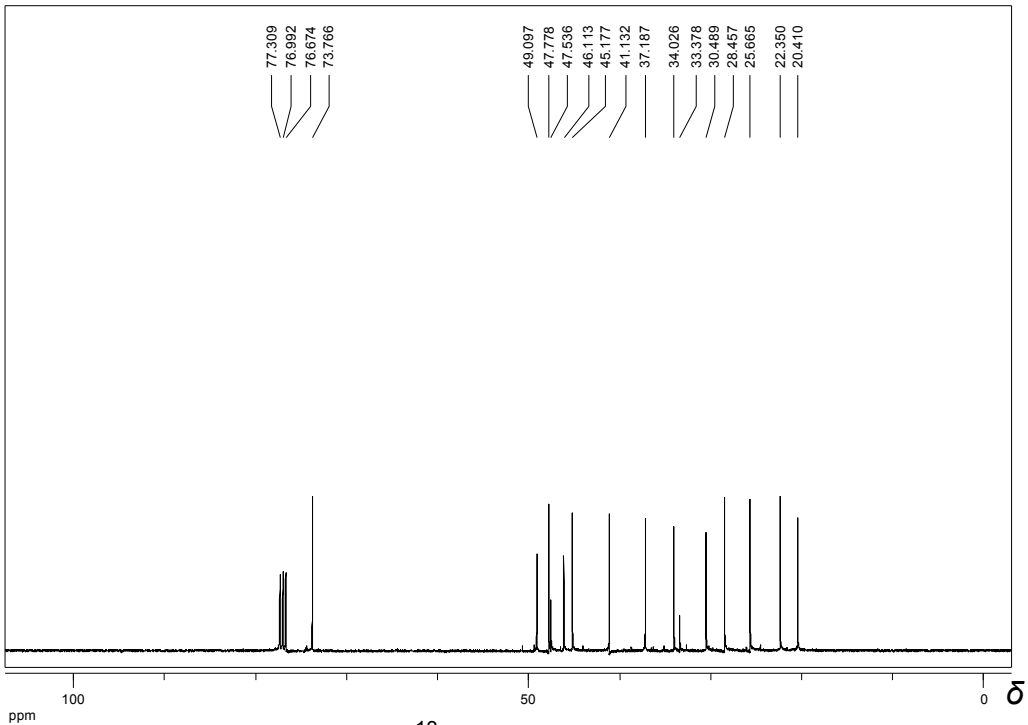


Figura 81 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**).

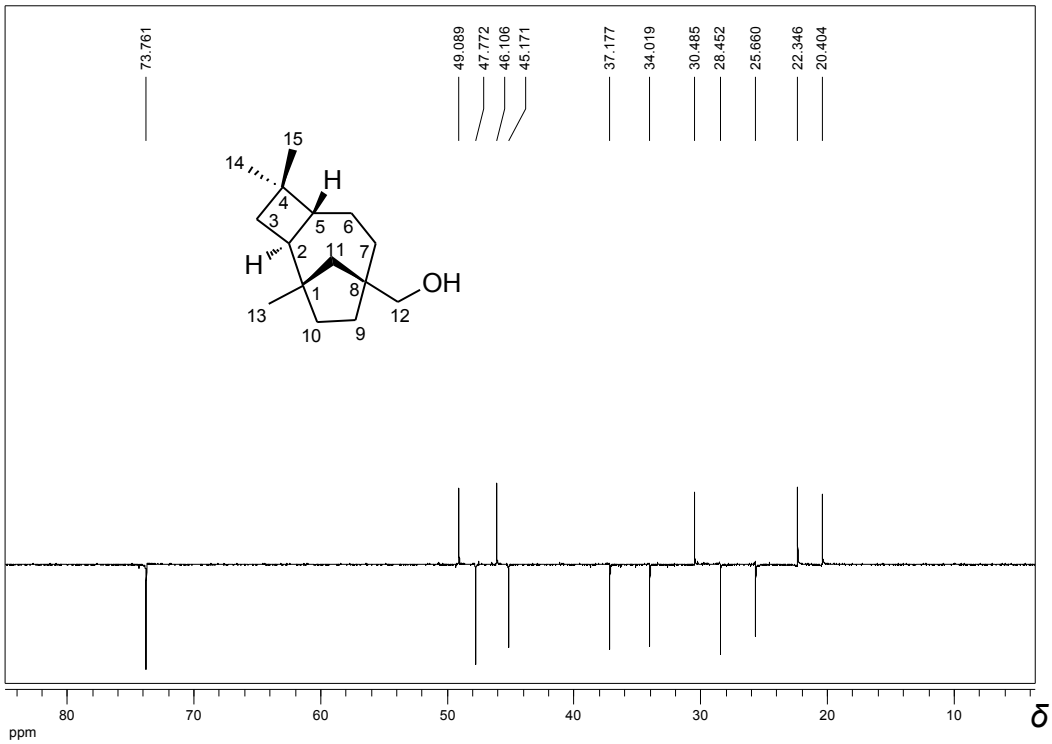


Figura 82 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**).

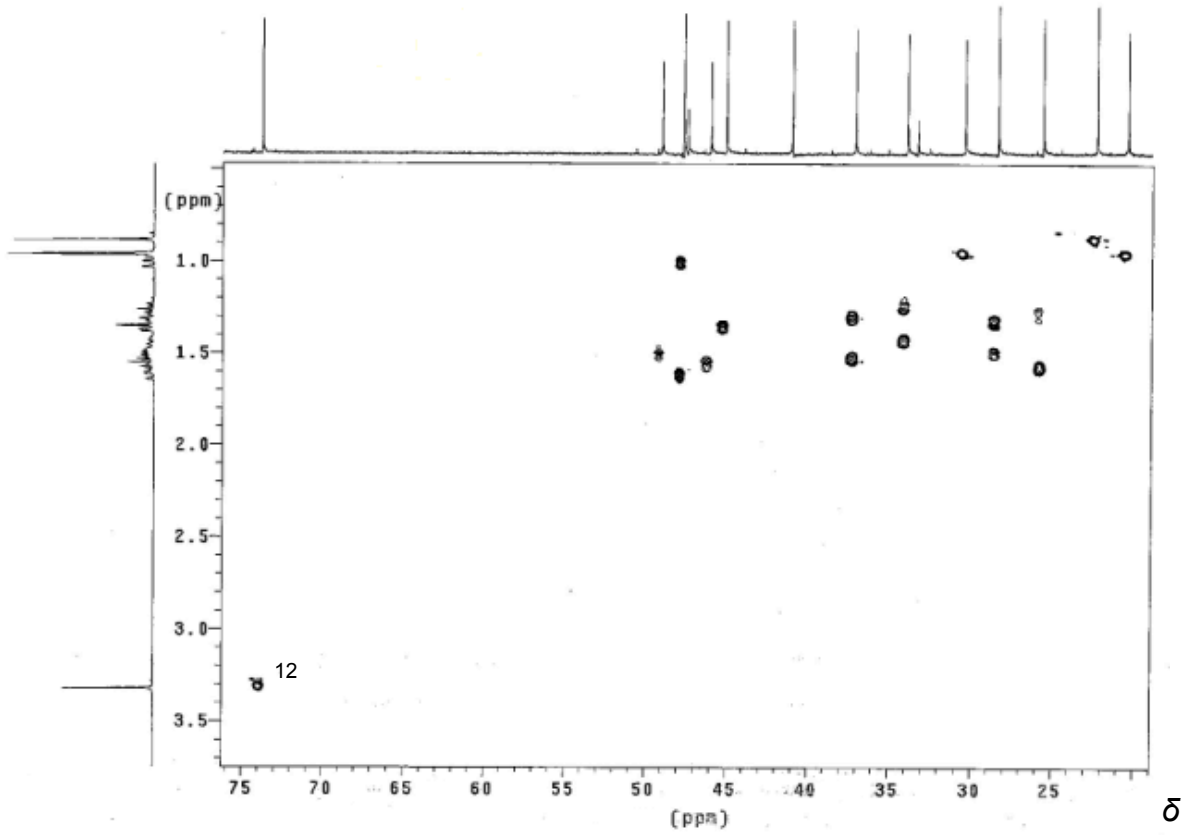


Figura 83 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**).

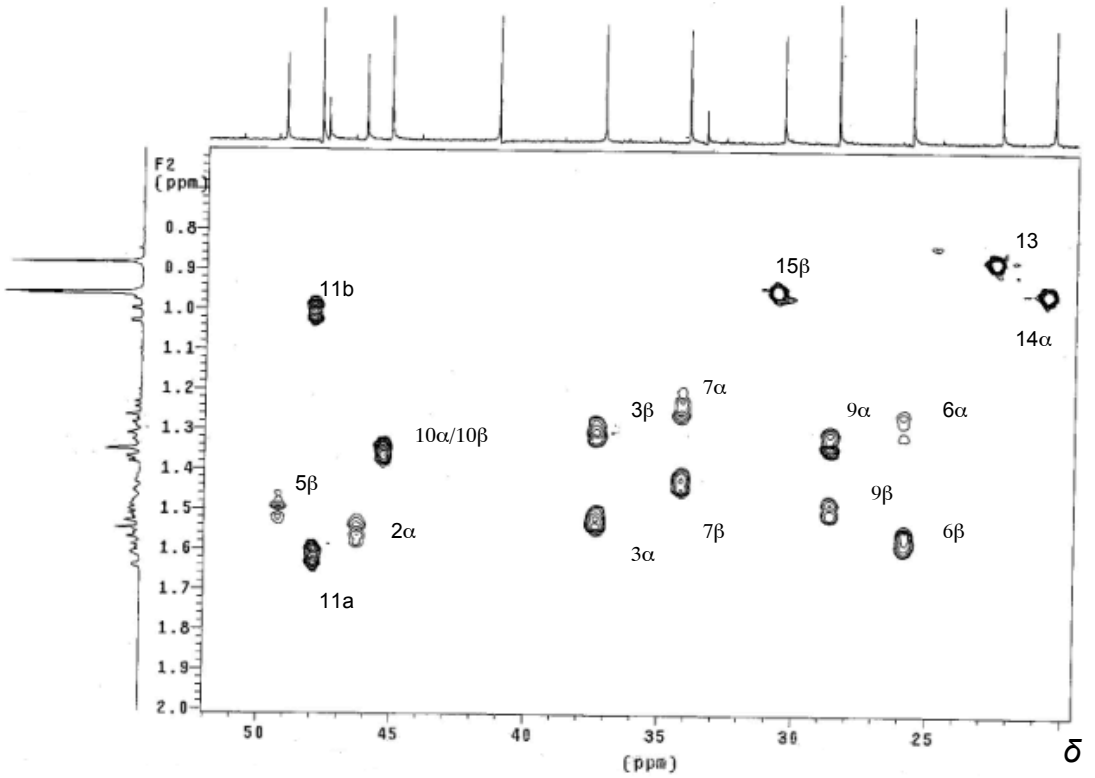


Figura 84 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetil triciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**). Expansão da região entre δ_C 20 – 50.

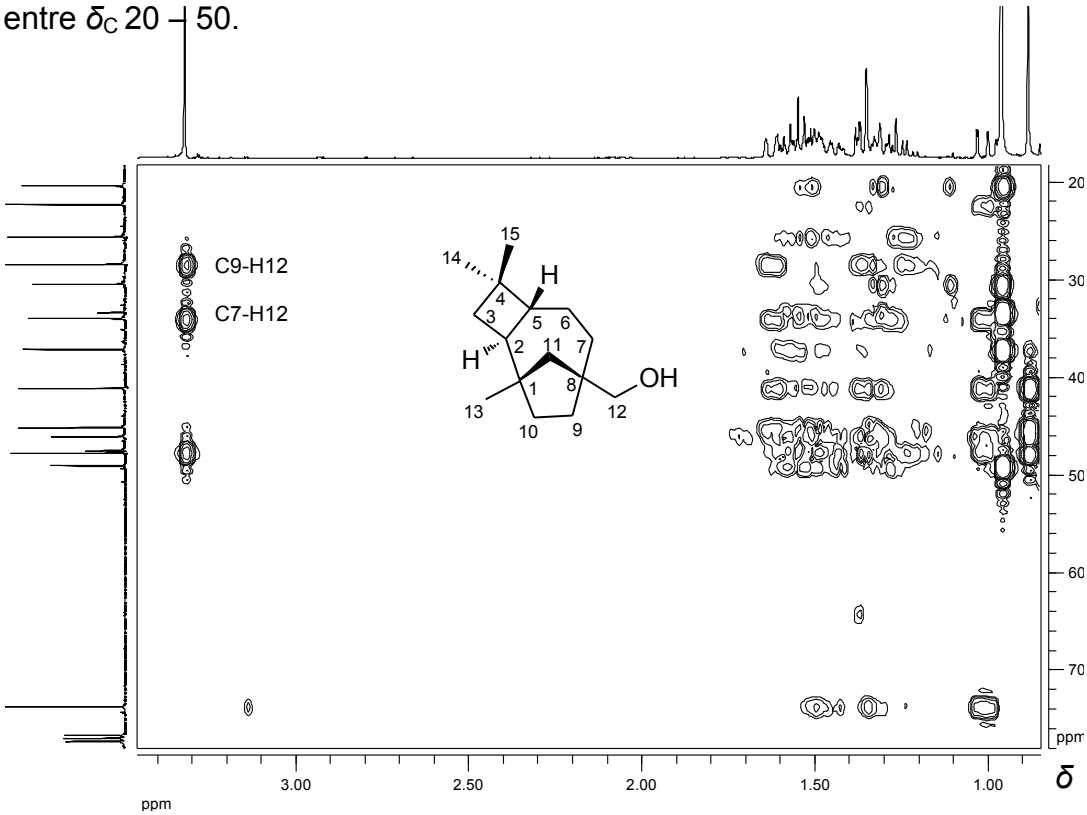


Figura 85 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**).

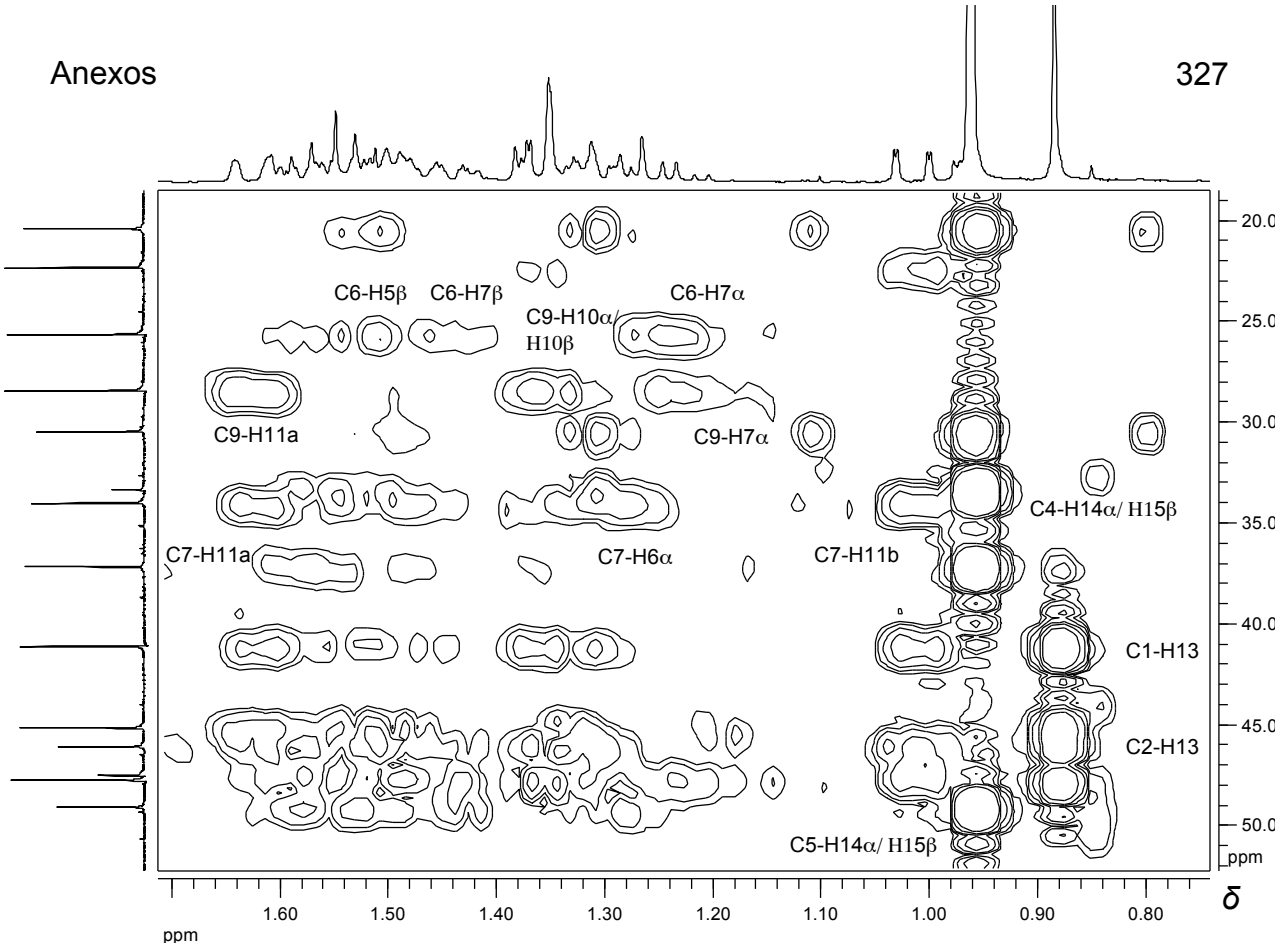


Figura 86 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

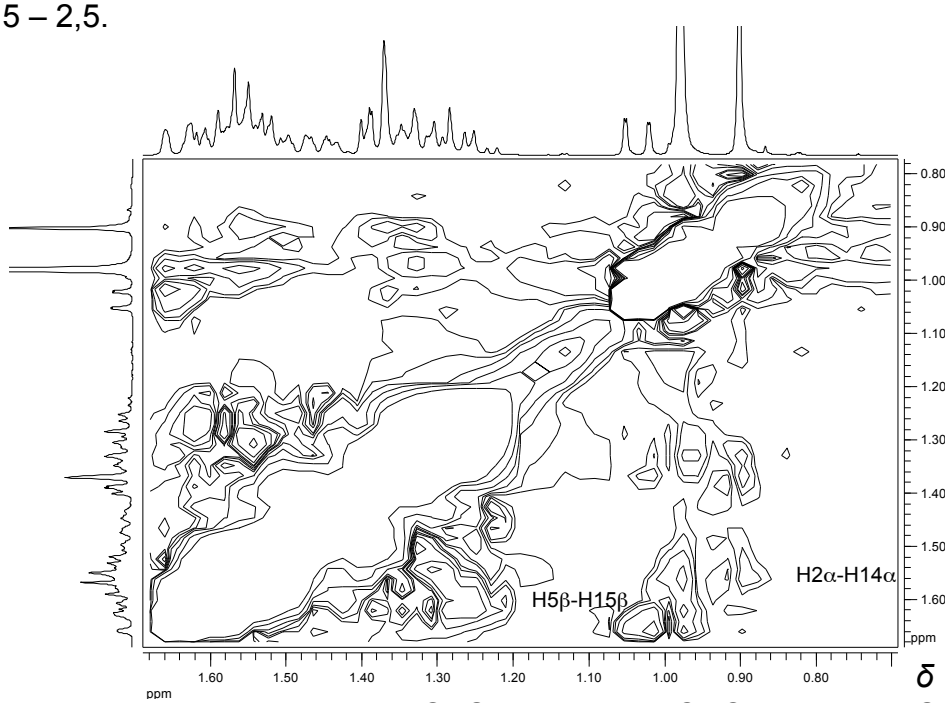


Figura 87 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,8*S*)-8-hidroximetil-1,4,4-trimetiltriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undecano (**83**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 1,80.

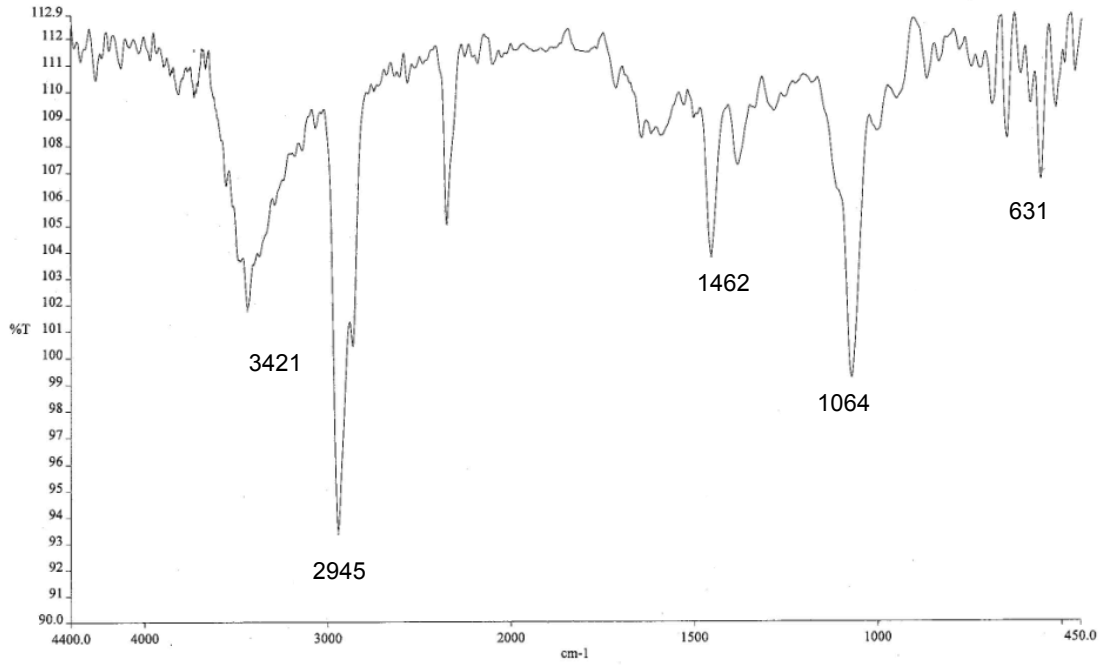


Figura 88 – Espectro no IV de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (**88**) (KBr).

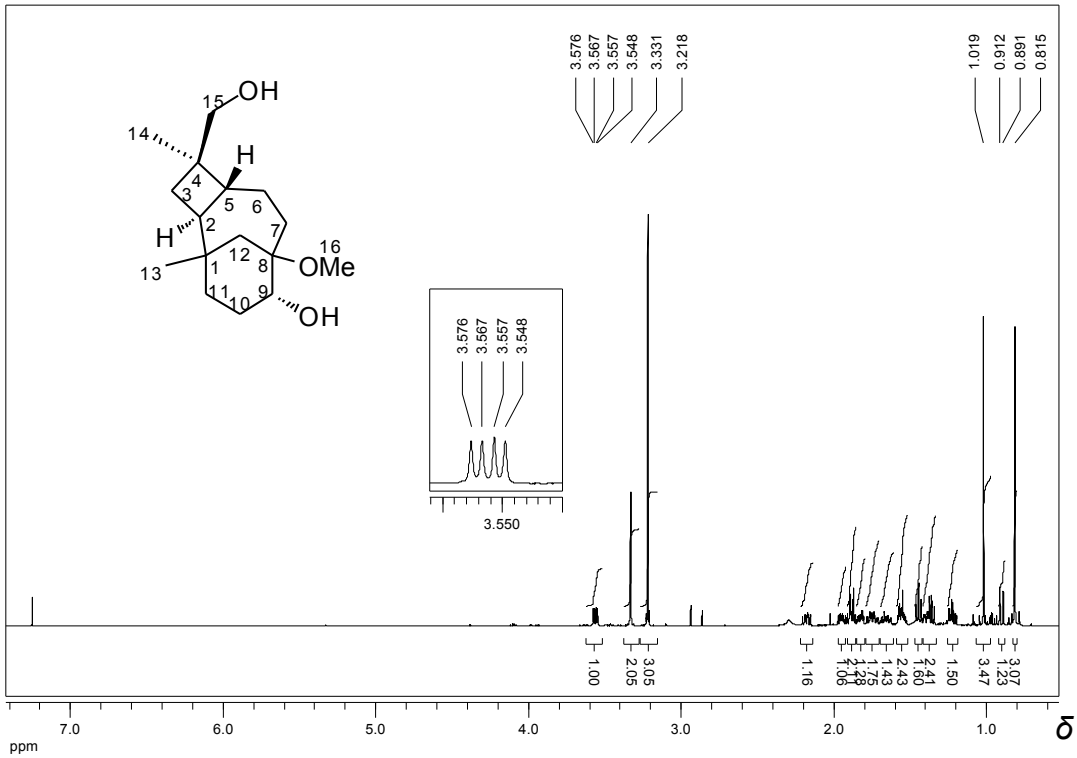


Figura 89 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (**88**).

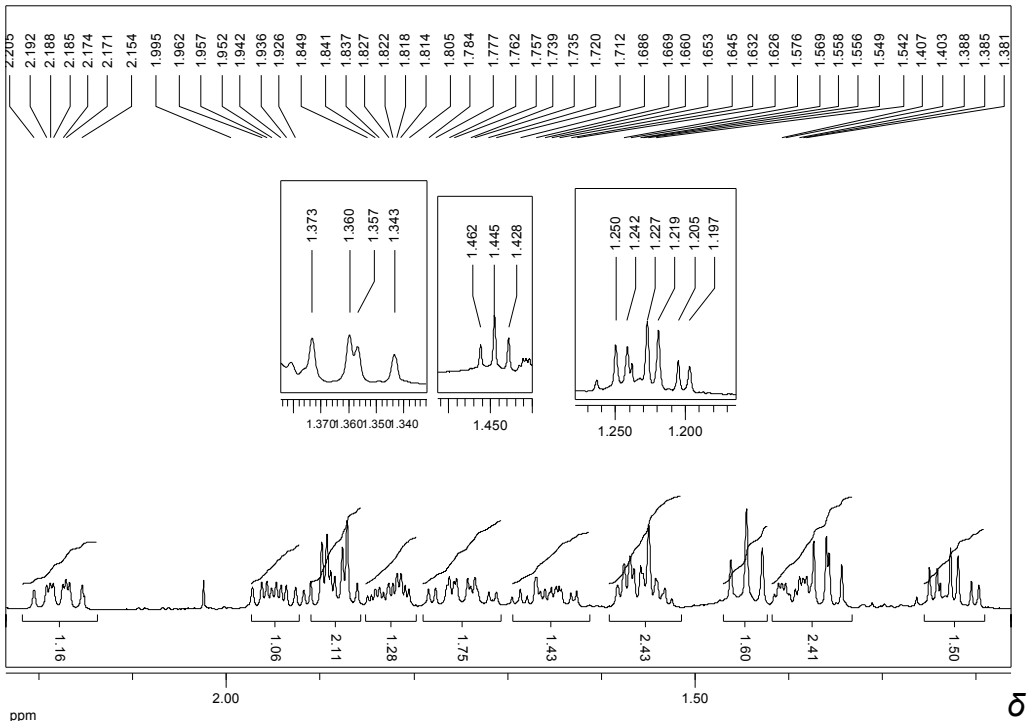


Figura 90 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (**88**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

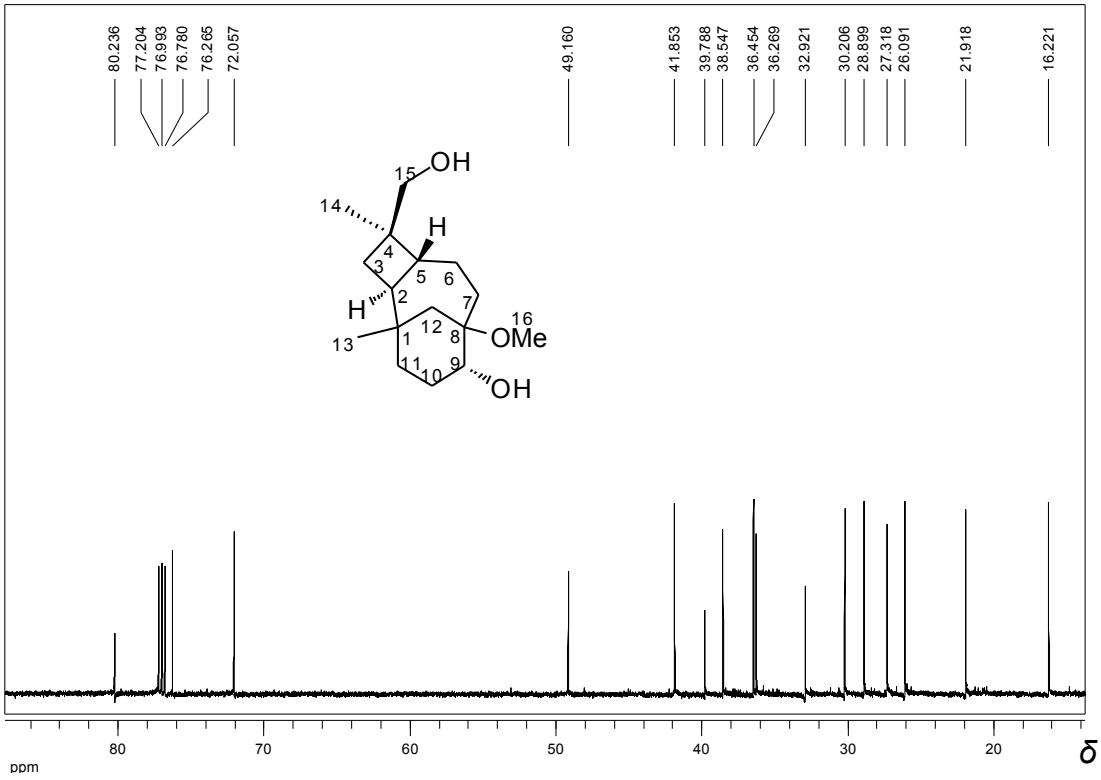


Figura 91 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (**88**).

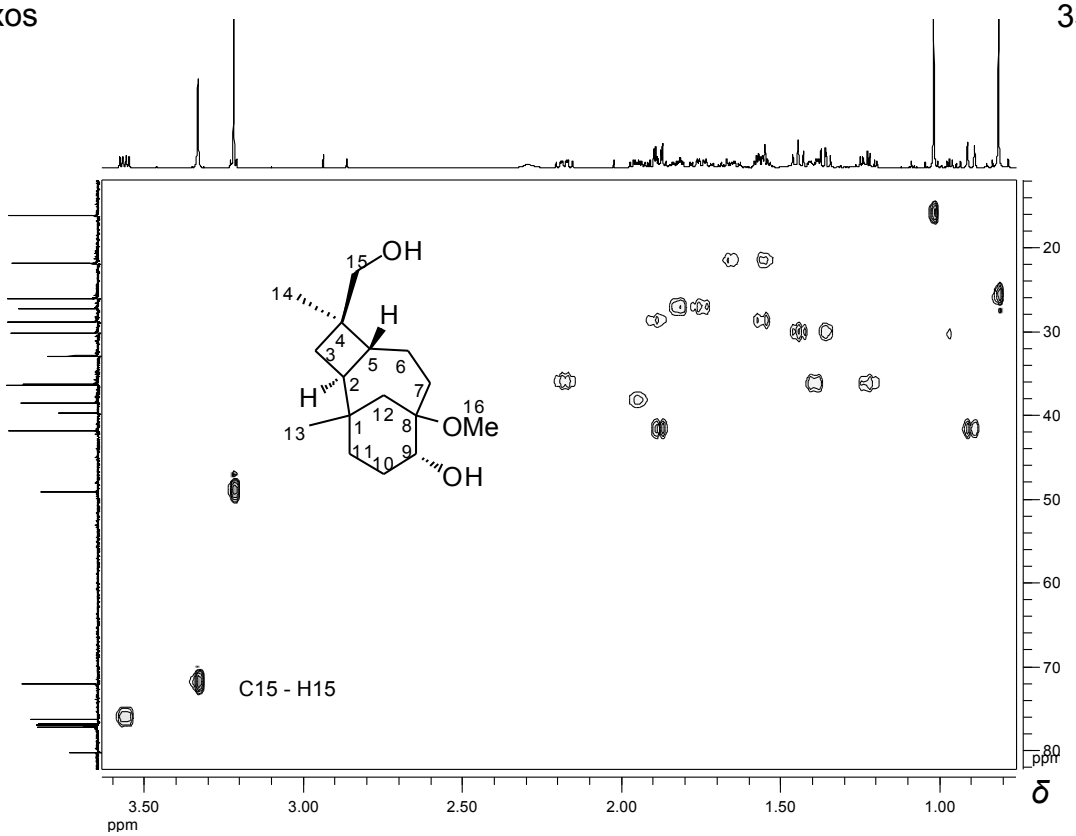


Figura 92 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (**88**).

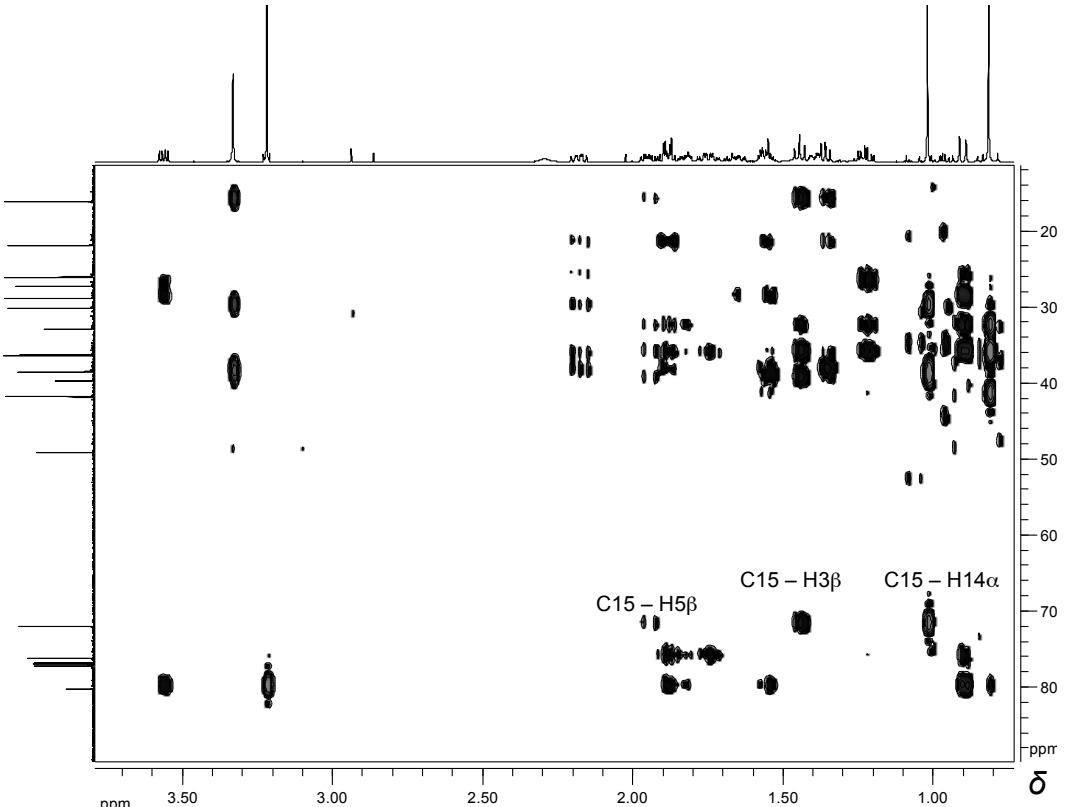


Figura 93 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (**88**).

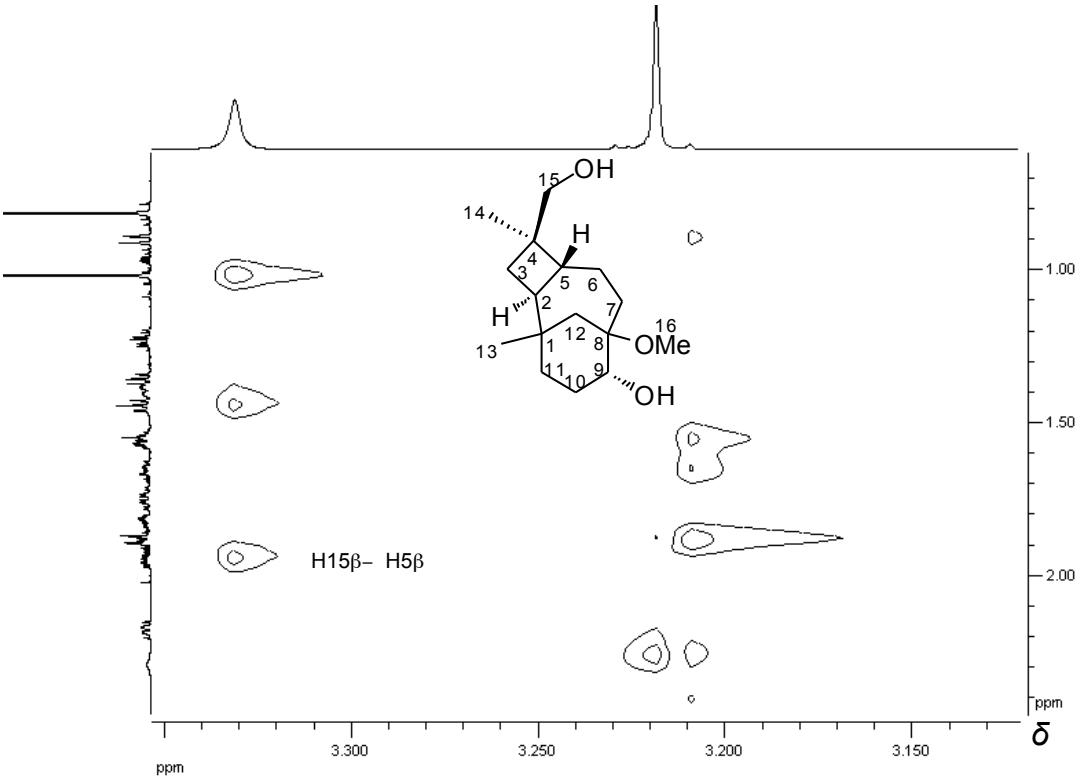


Figura 94 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (**88**). Expansão da região entre δ_H 3,0 – 3,5.

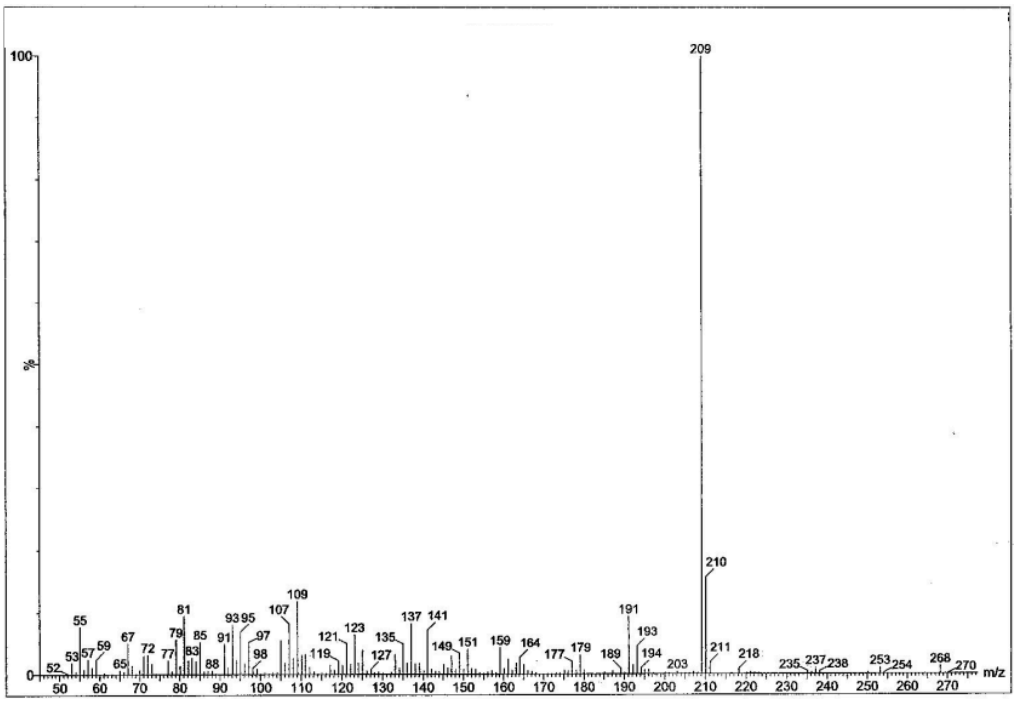


Figura 95 – Espectro de Massas de (4*R*,8*R*,9*R*)-8-metoxi-isocariolano-9,15-diol (**88**).

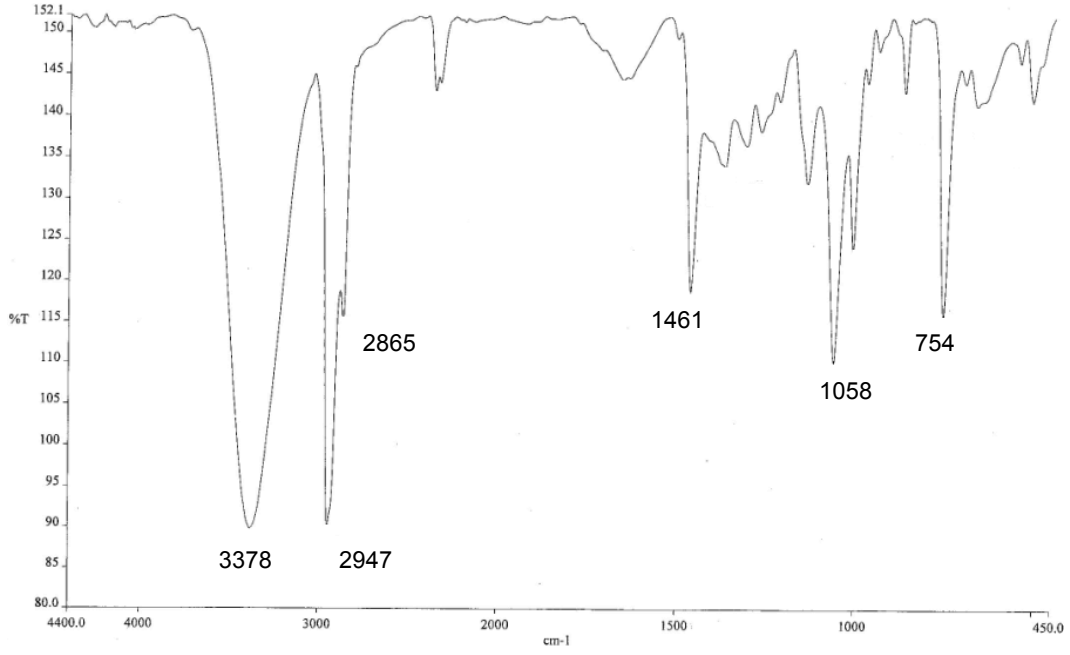


Figura 96 – Espectro na região de IV de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (**89**) (KBr).

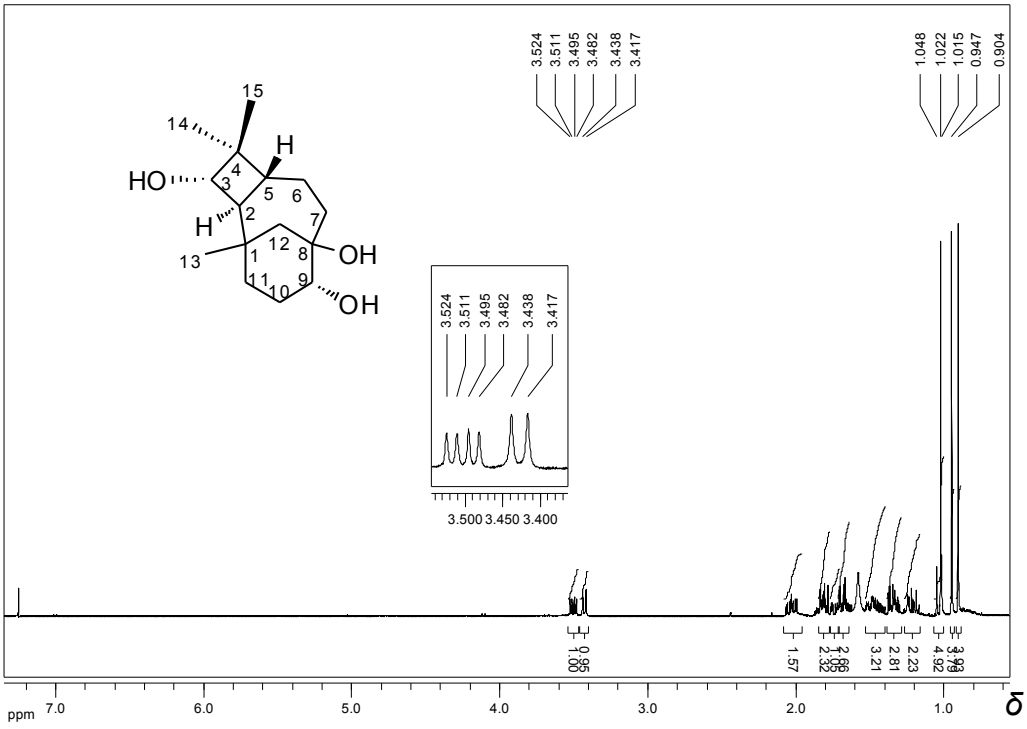


Figura 97 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (**89**).

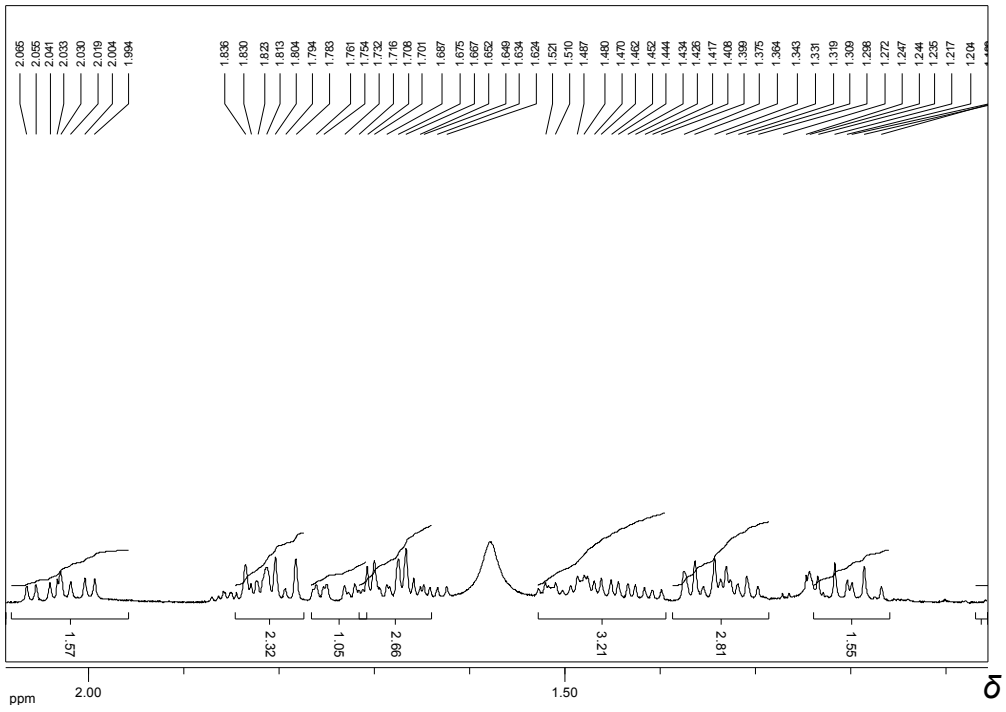


Figura 98 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (**89**). Expansão da região entre δ_H 1,5 – 2,5.

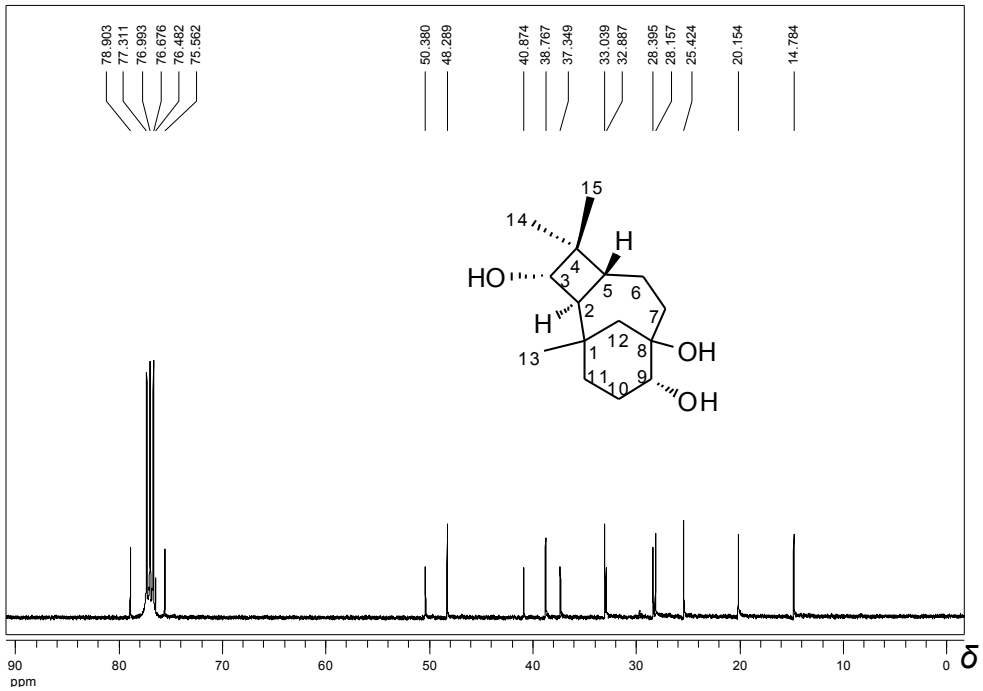


Figura 99 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (**89**).

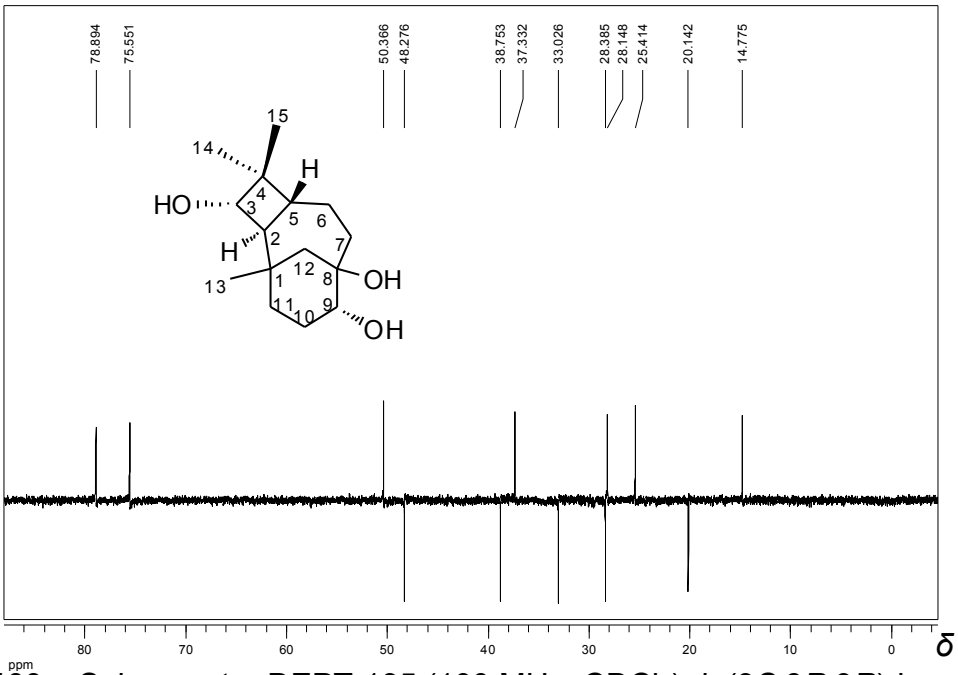


Figura 100 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de(3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (**89**).

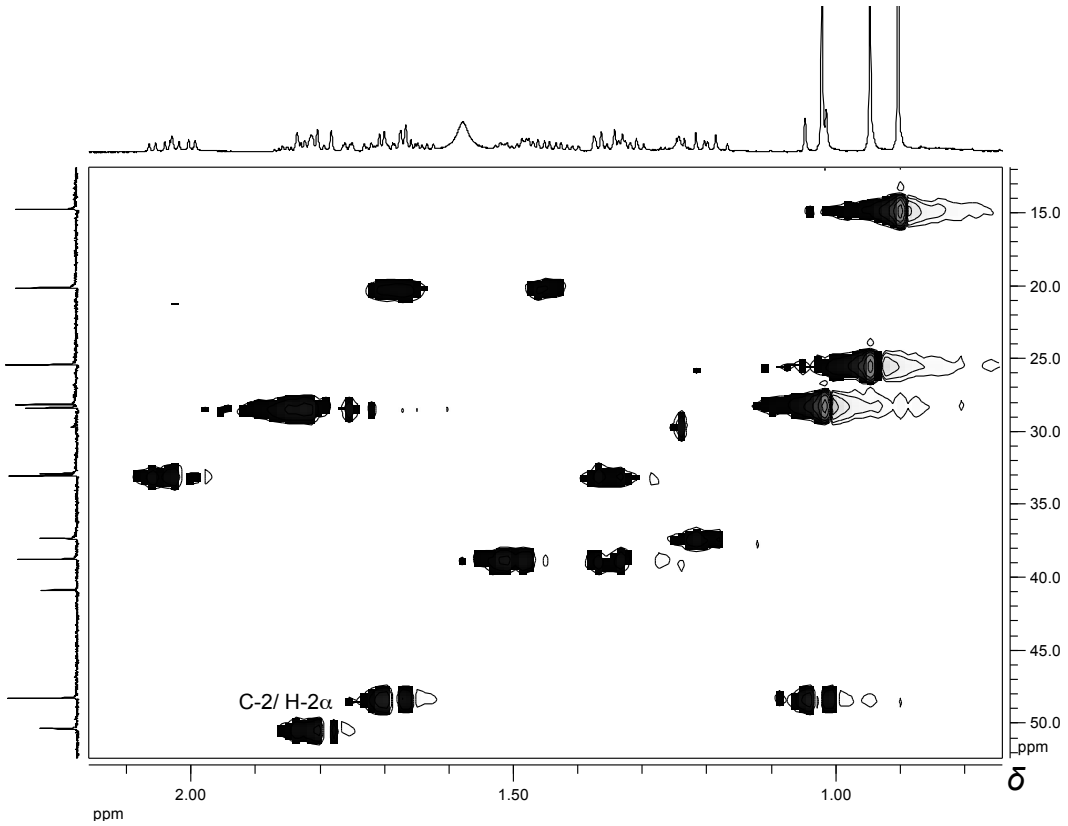


Figura 101 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolan-3,8,9-triol (**89**).

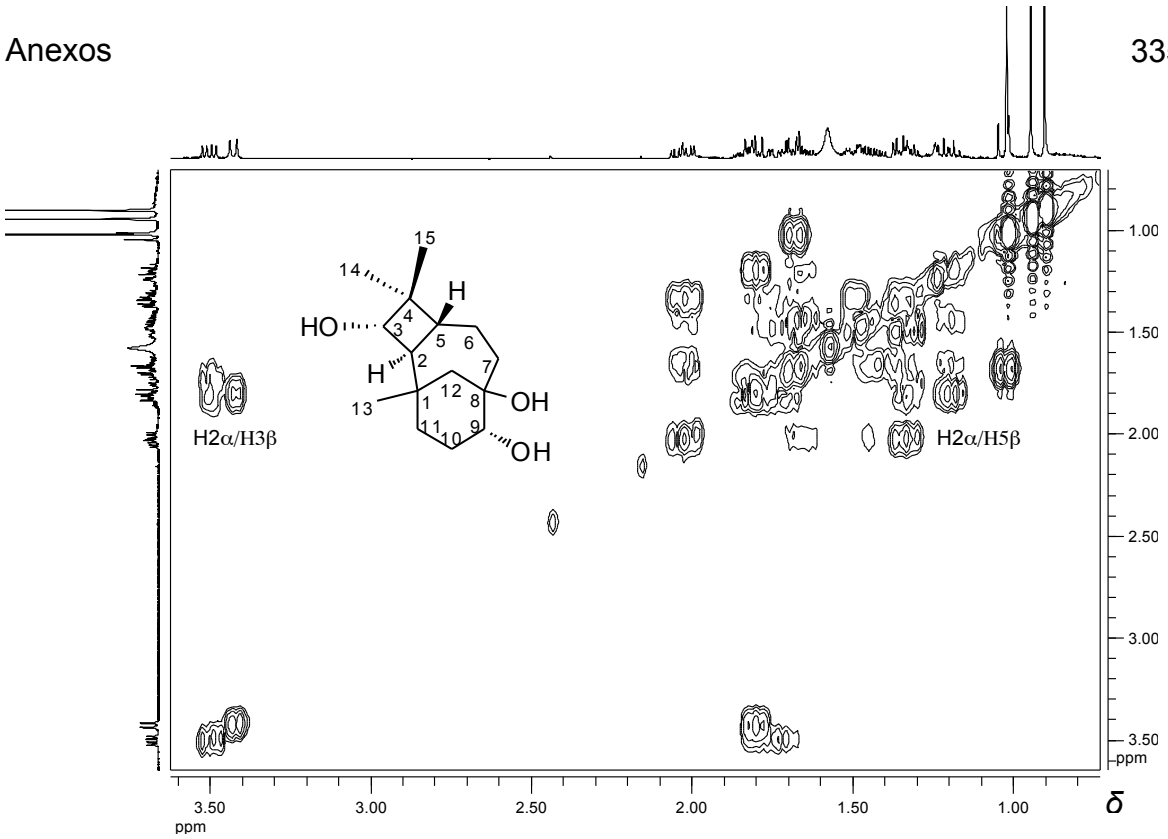


Figura 102 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (**89**).

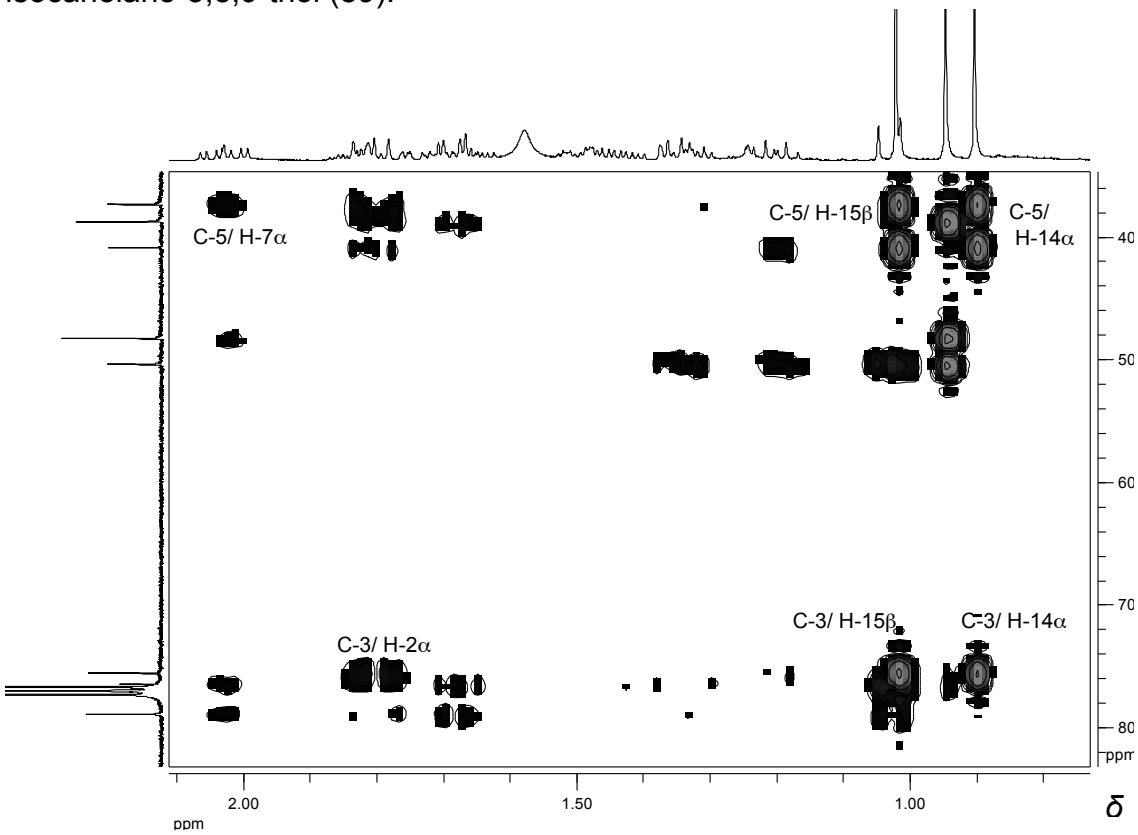


Figura 103 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (**89**).

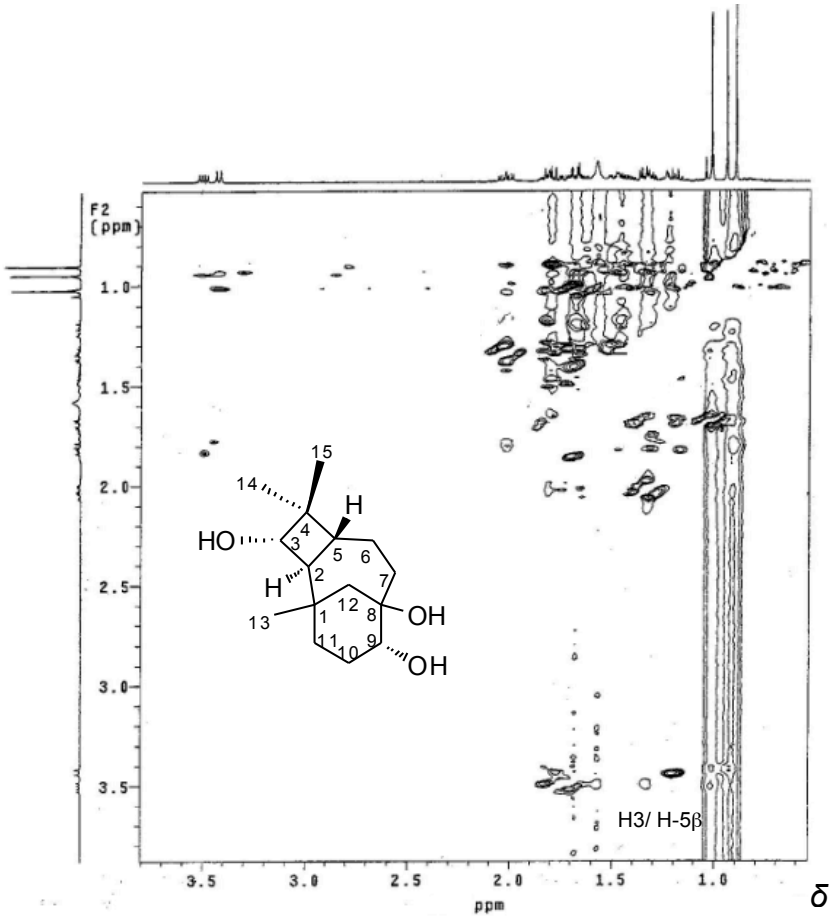


Figura 104 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (**89**).

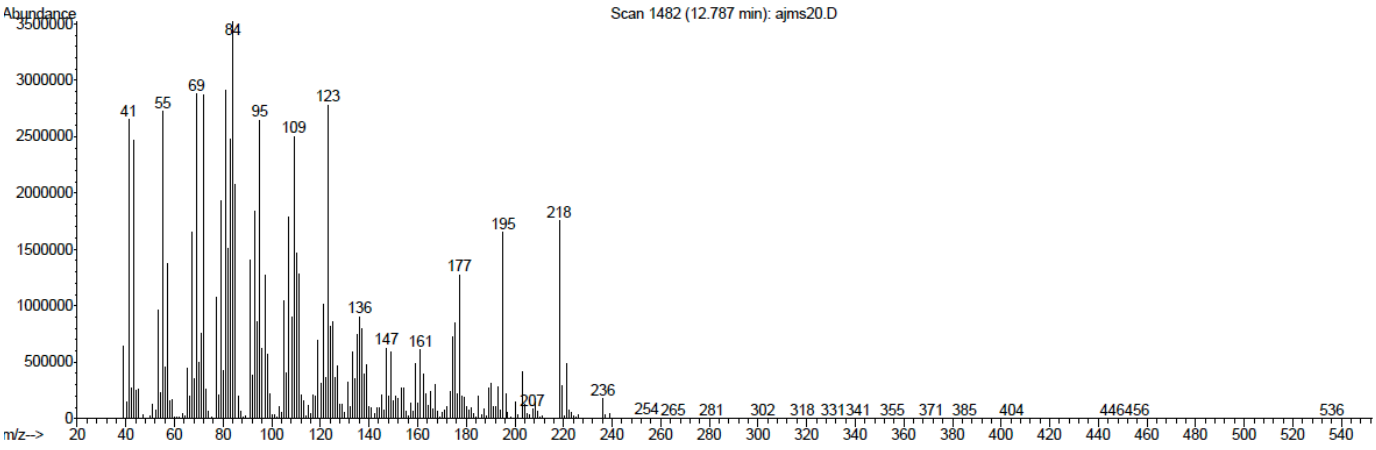


Figura 105 – Espectro de Massas de (3*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-3,8,9-triol (**89**).

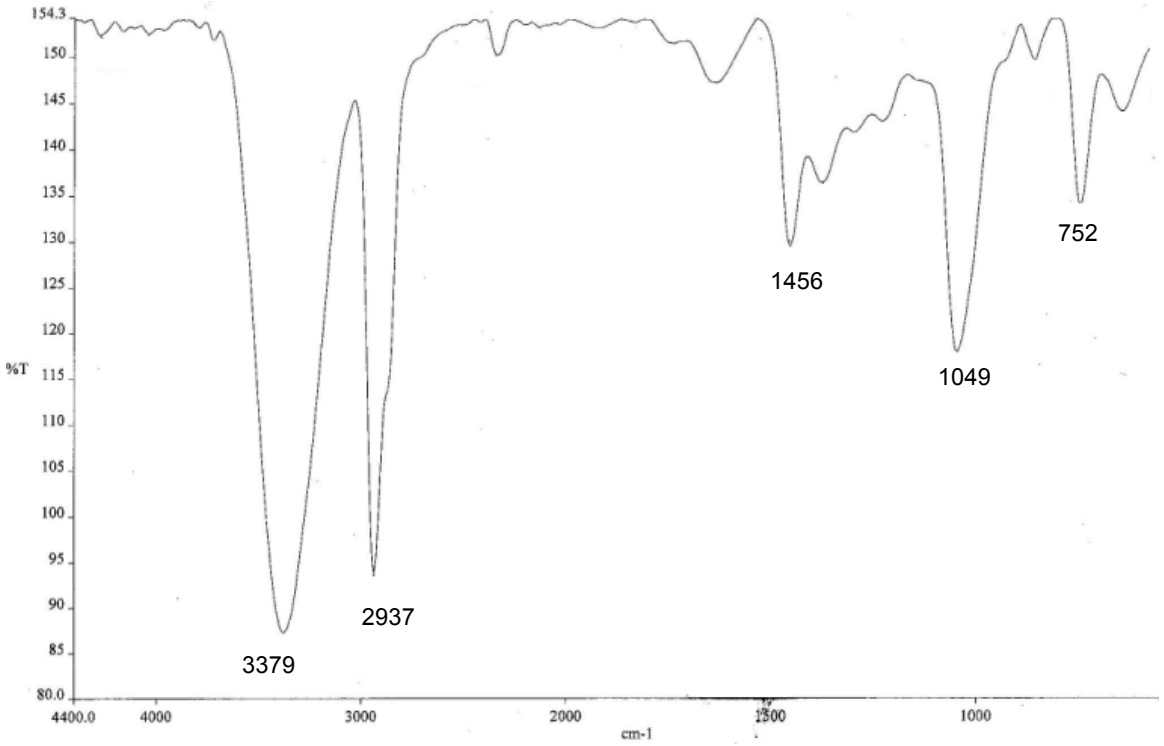


Figura 106 – Espectro na região de IV de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**) (KBr)

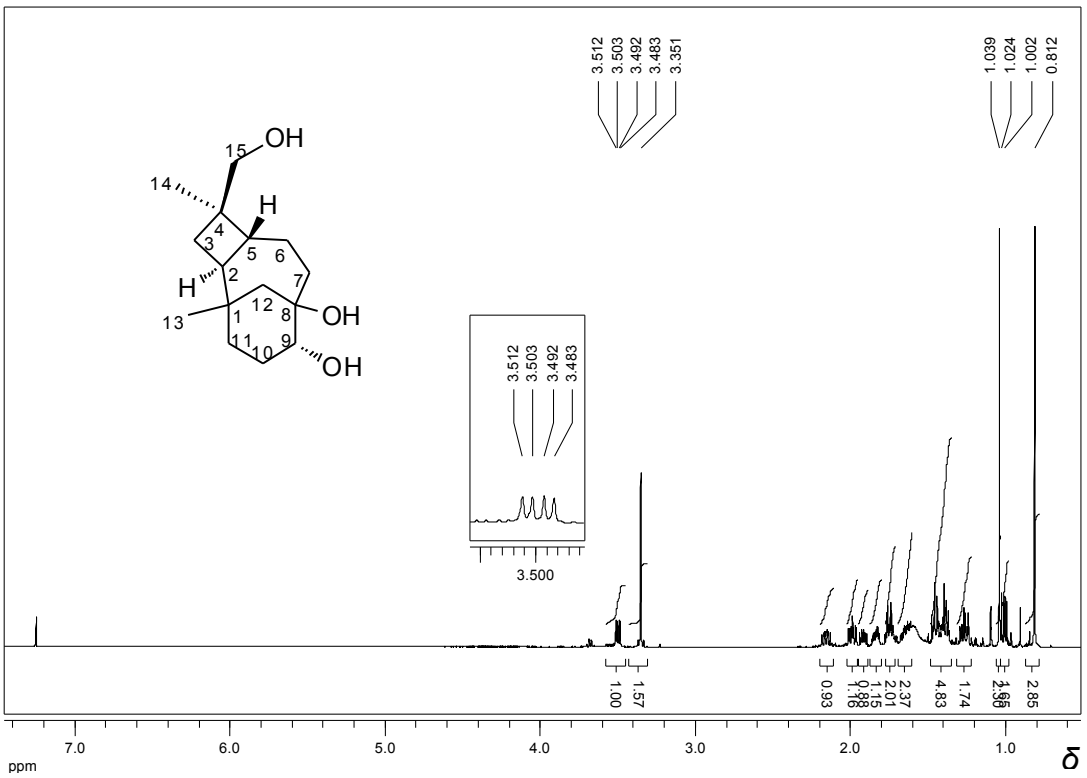


Figura 107 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**).

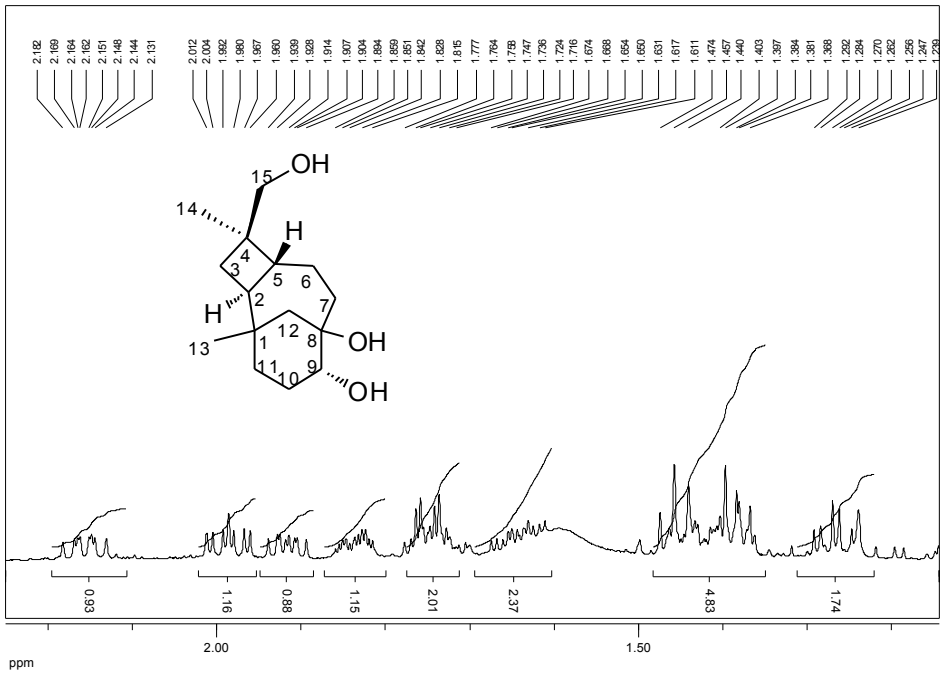


Figura 108 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

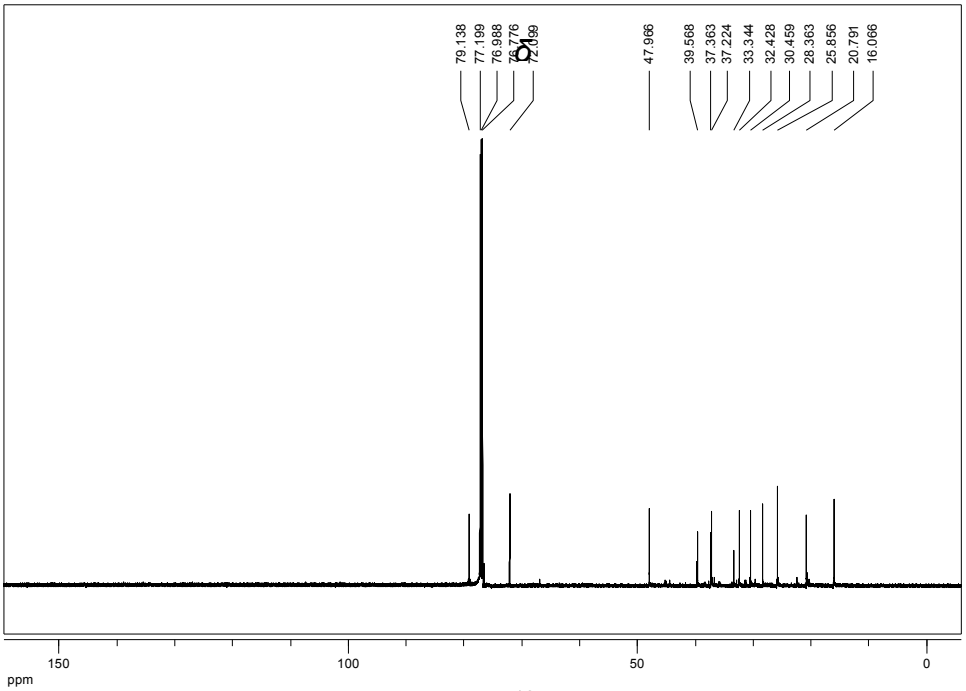


Figura 109 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**).

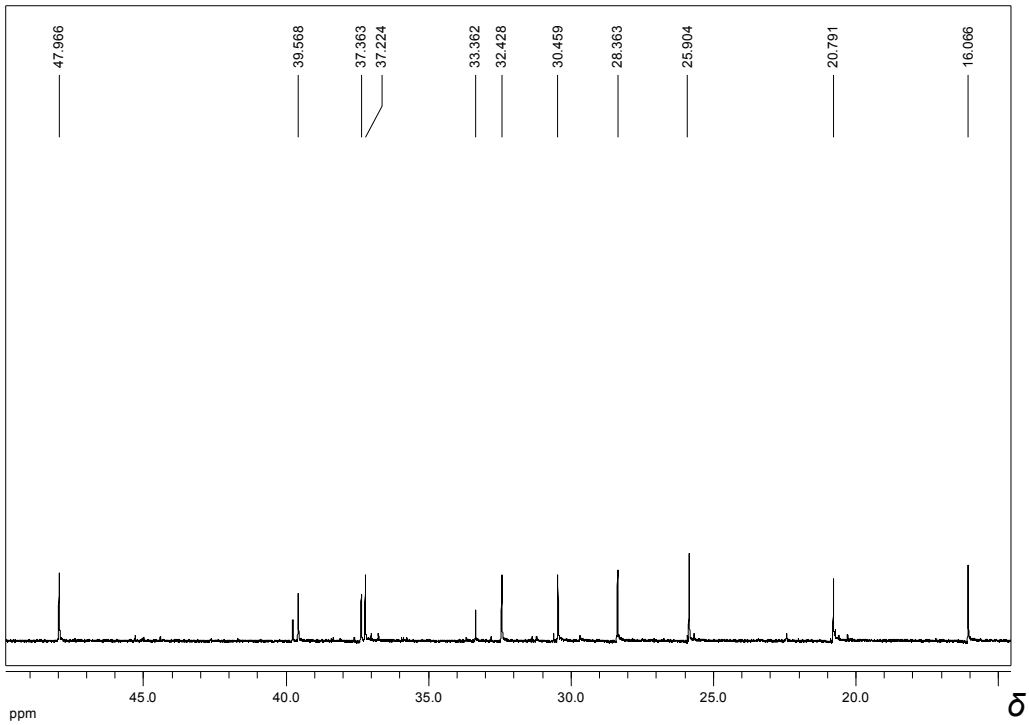


Figura 110 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**). Expansão da região entre δ_C15– 50.

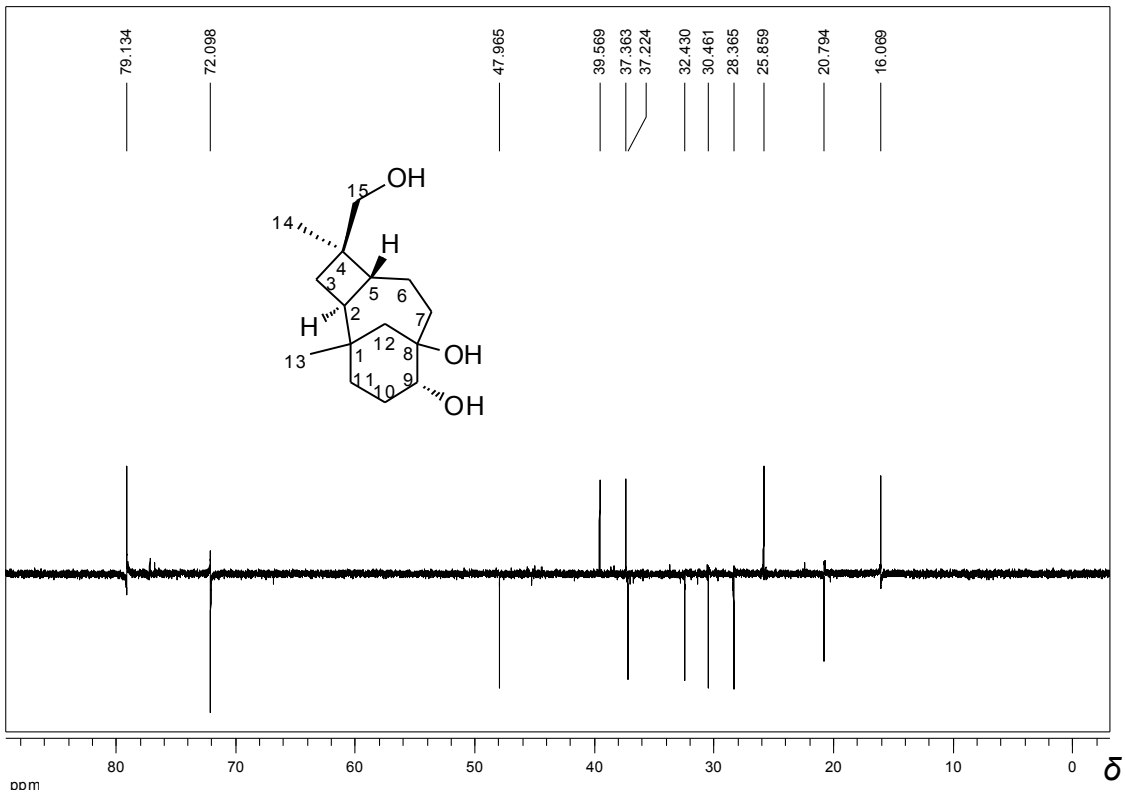


Figura 111 – Subespectro DEPT-135 (150 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**).

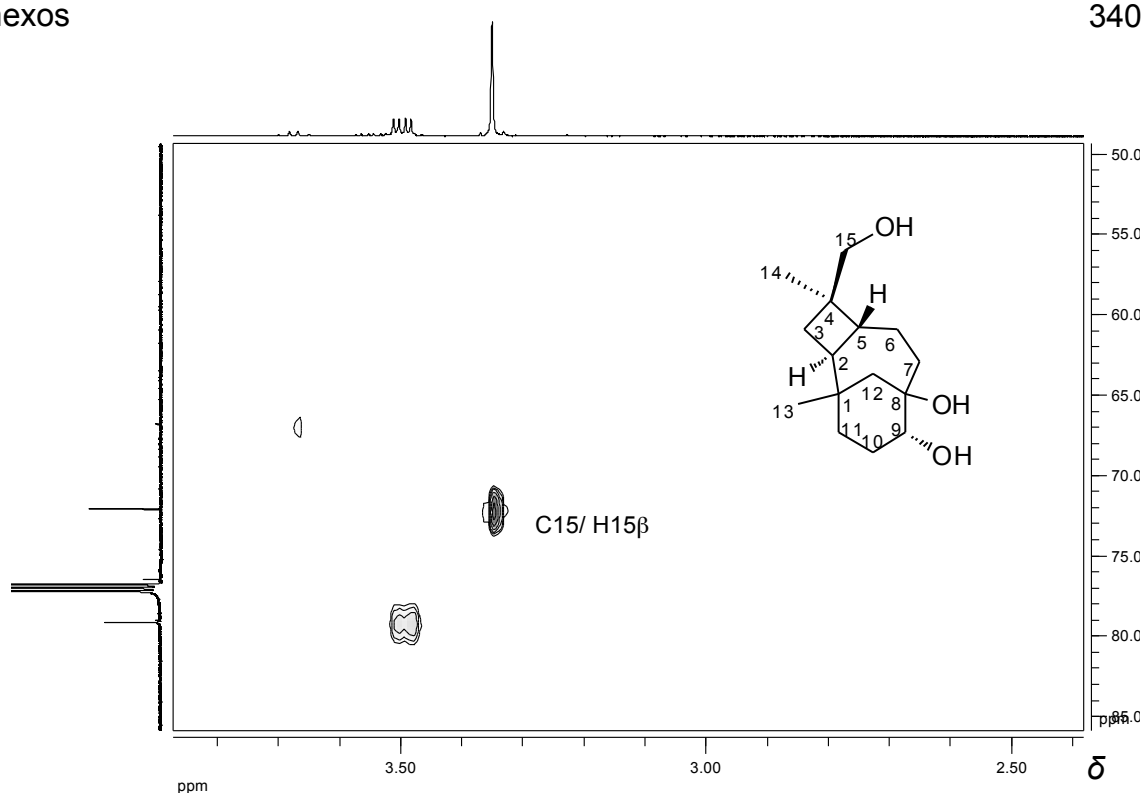


Figura 112 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**). Expansão da região entre δ_H2,5 – 4,0.

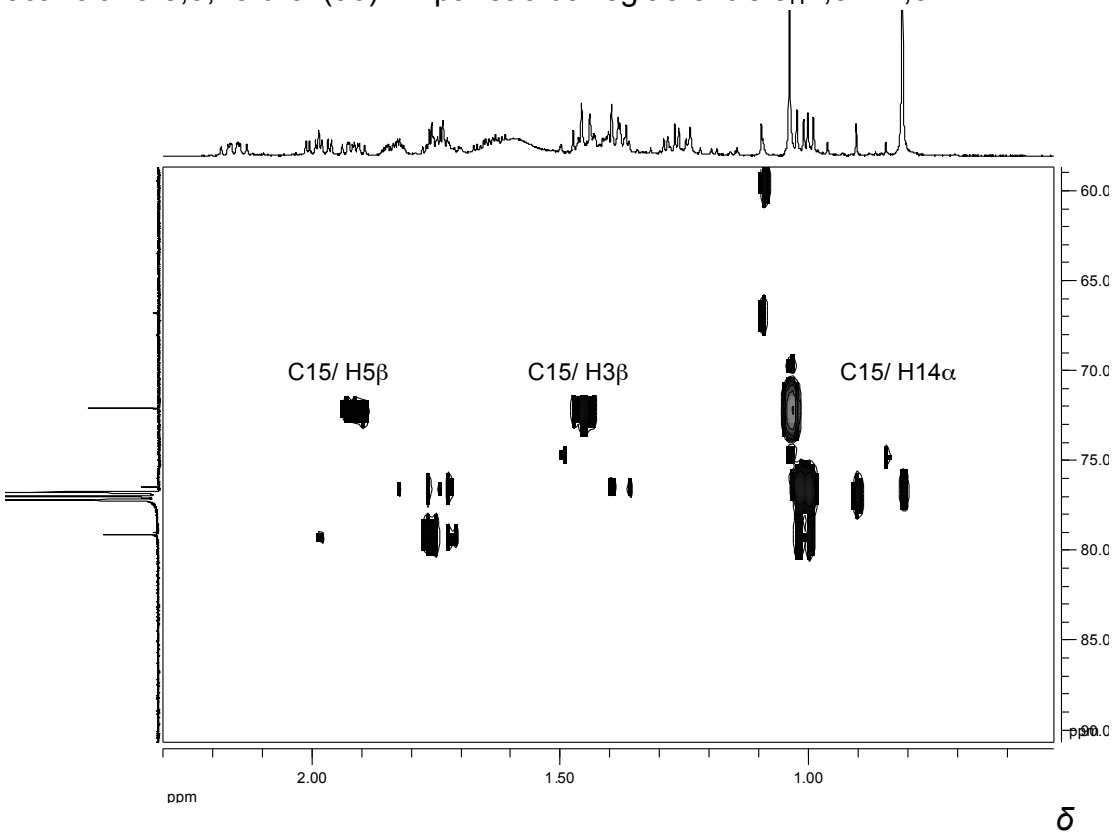


Figura 113 – Mapa contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**). Expansão da região entre δ_H0,5 – 2,5.

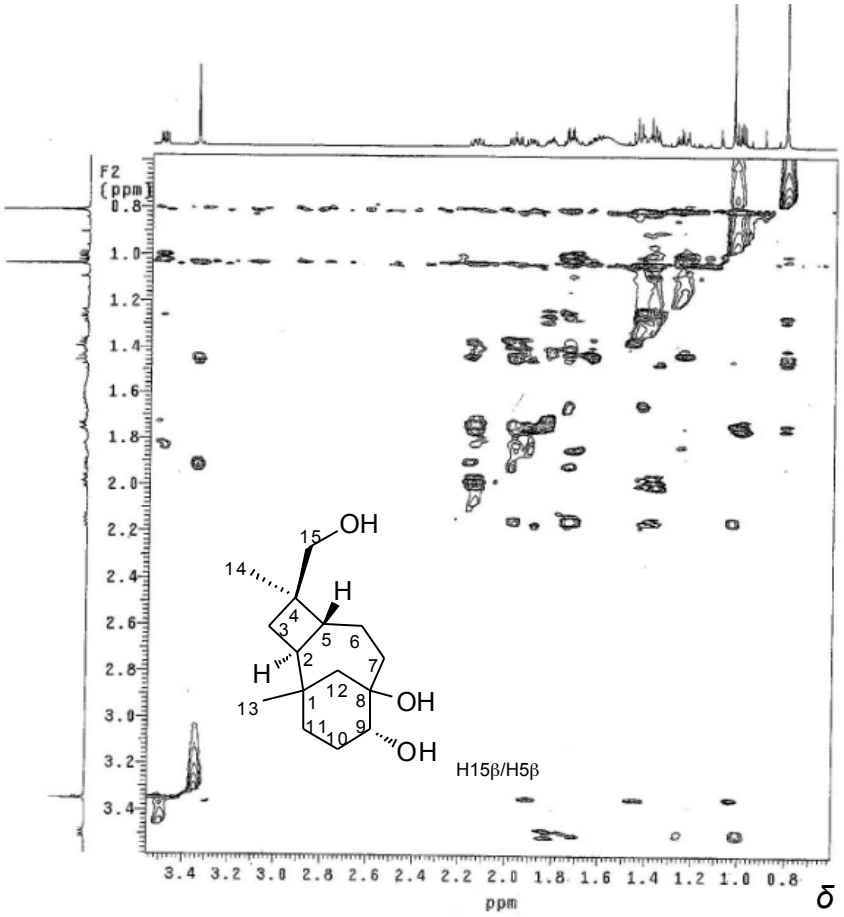


Figura 114 – Mapa de contornos de NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**)

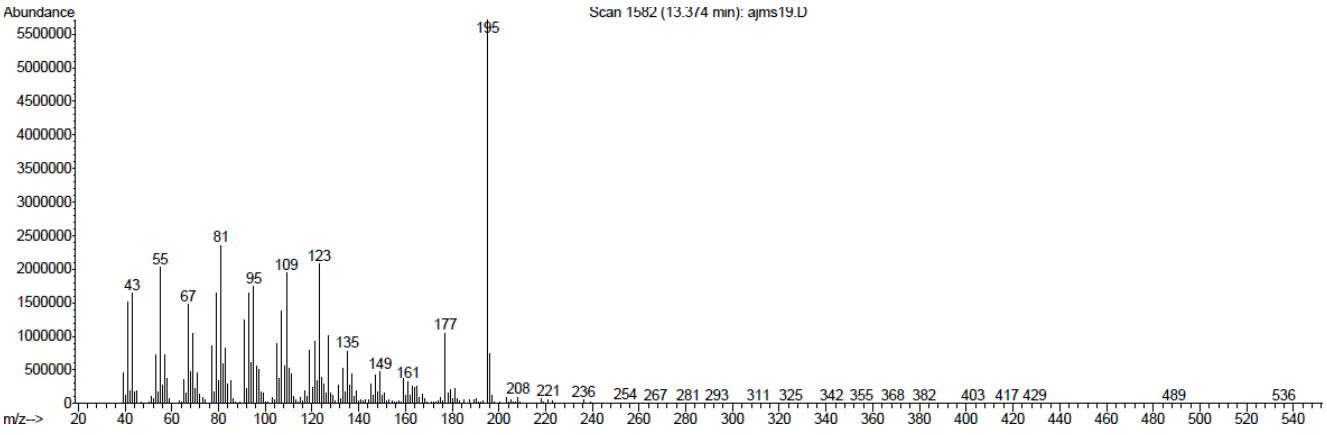


Figura 115 – Espectro de Massas de (4*R*,8*R*,9*R*)-isocariolano-8,9,15-triol (**90**)

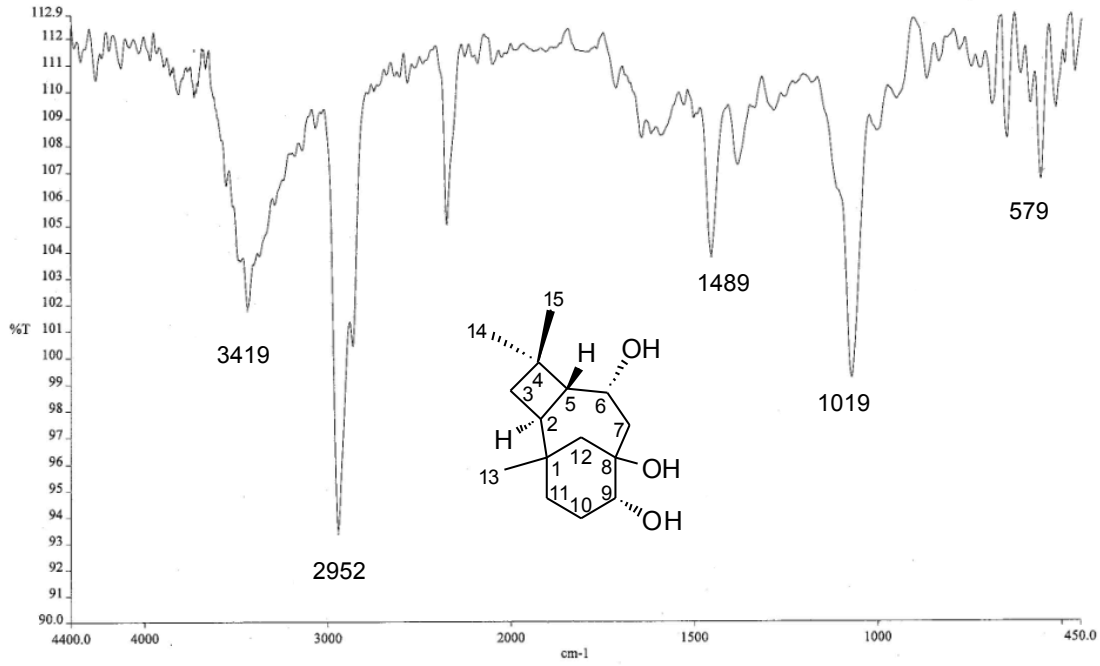


Figura 116 – Espectro no IV de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**) (KBr).

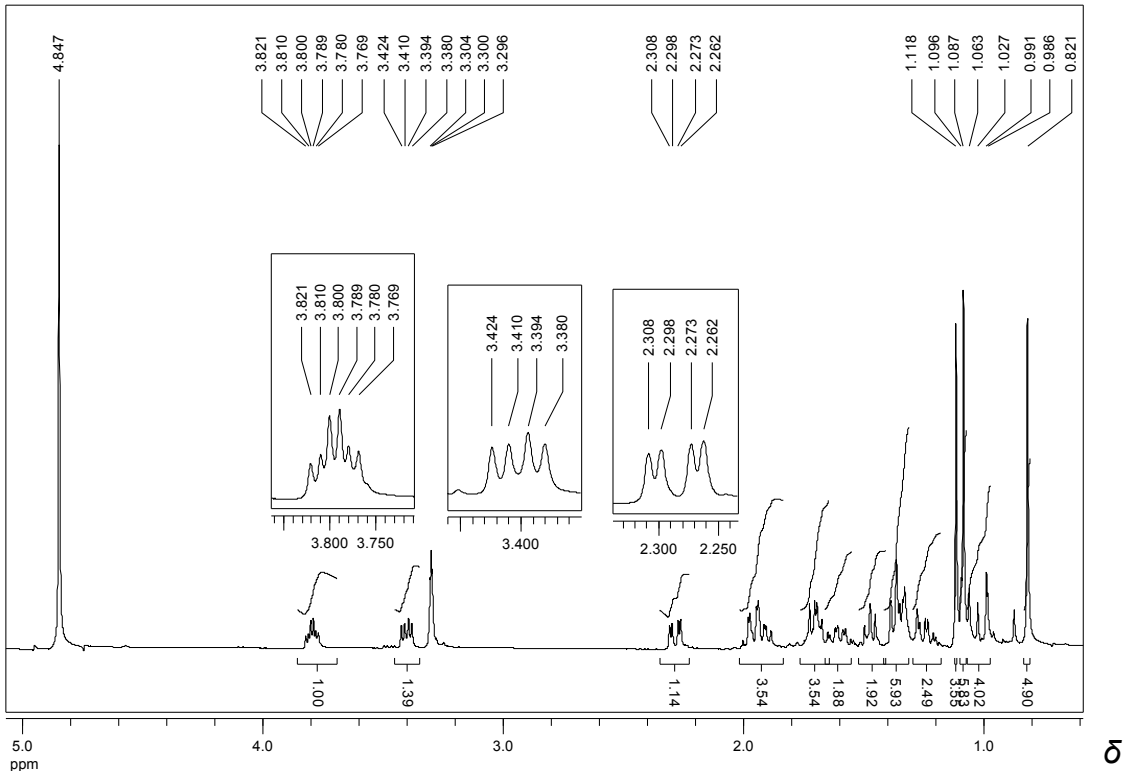


Figura 117 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**).

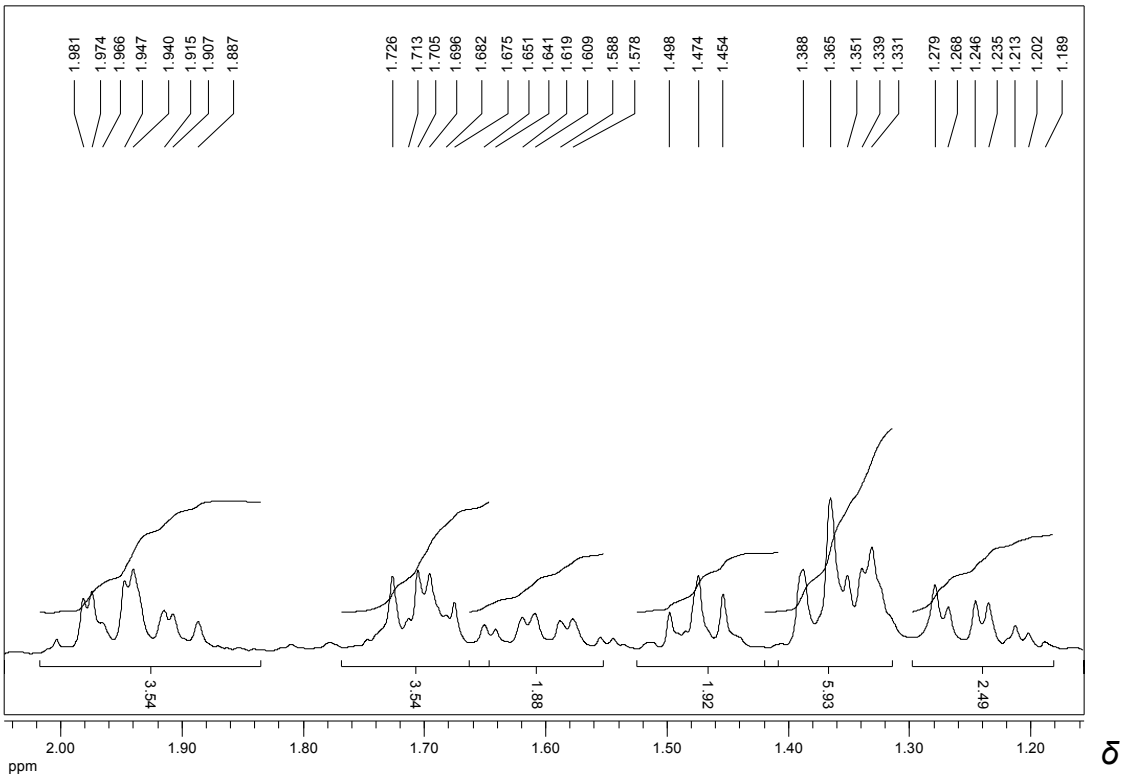


Figura 118 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**). Expansão da região entre δ_H 1,2 – 2,0.

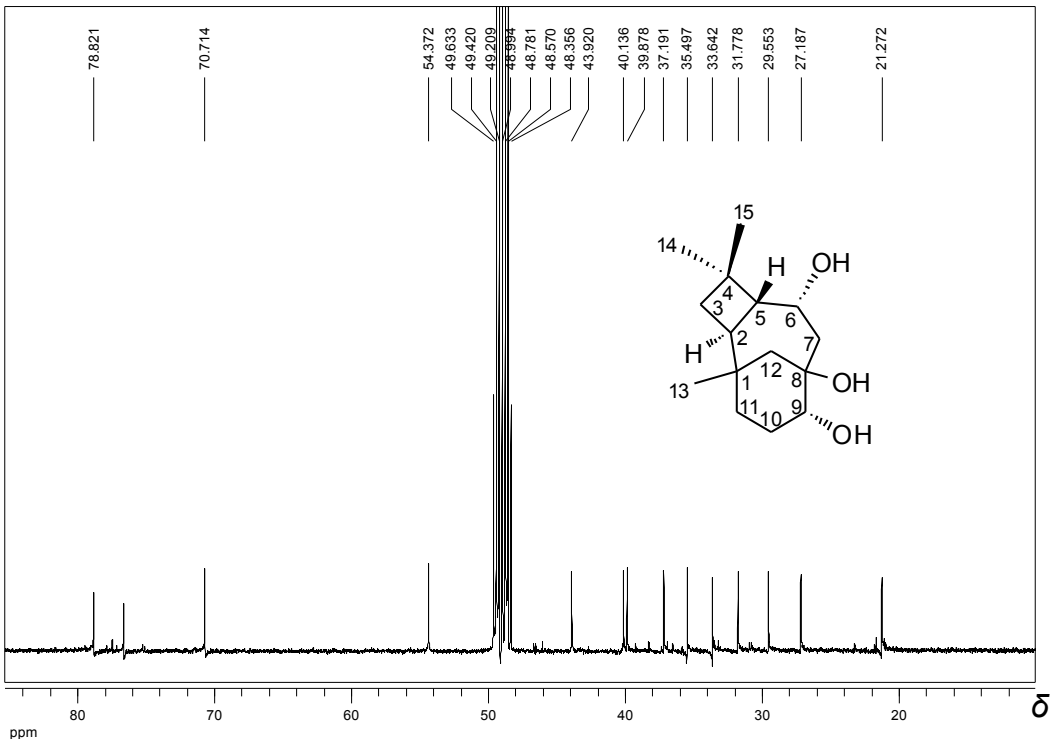


Figura 119 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**).

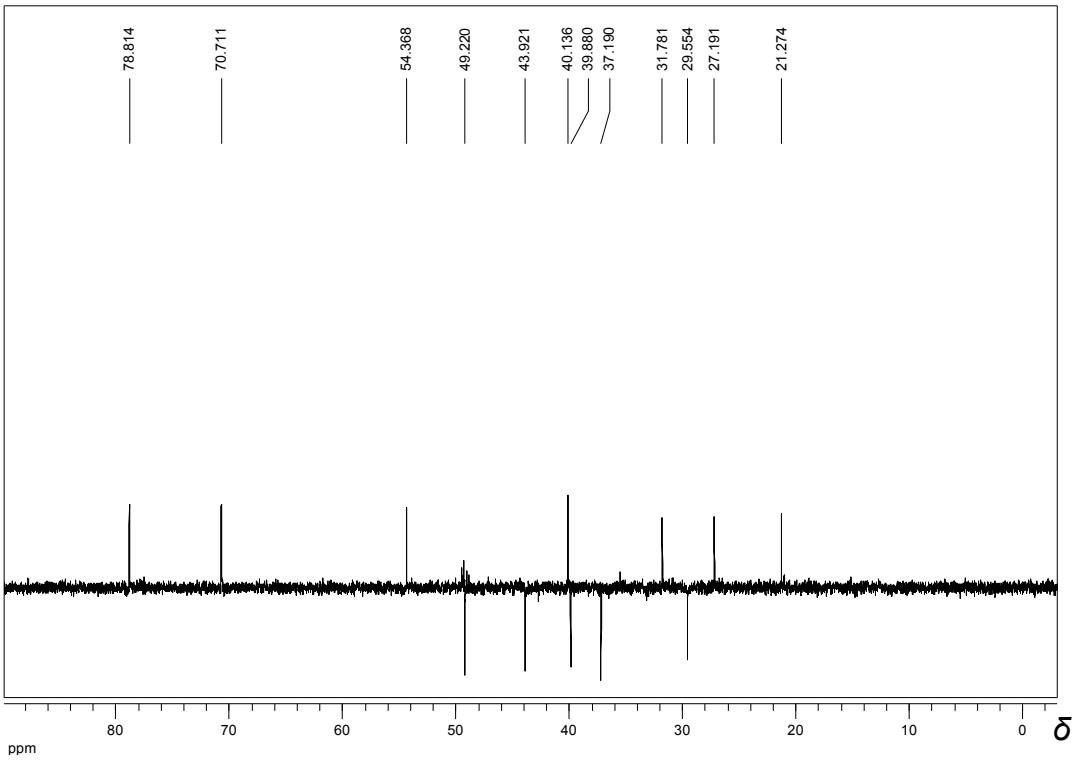


Figura 120 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**).

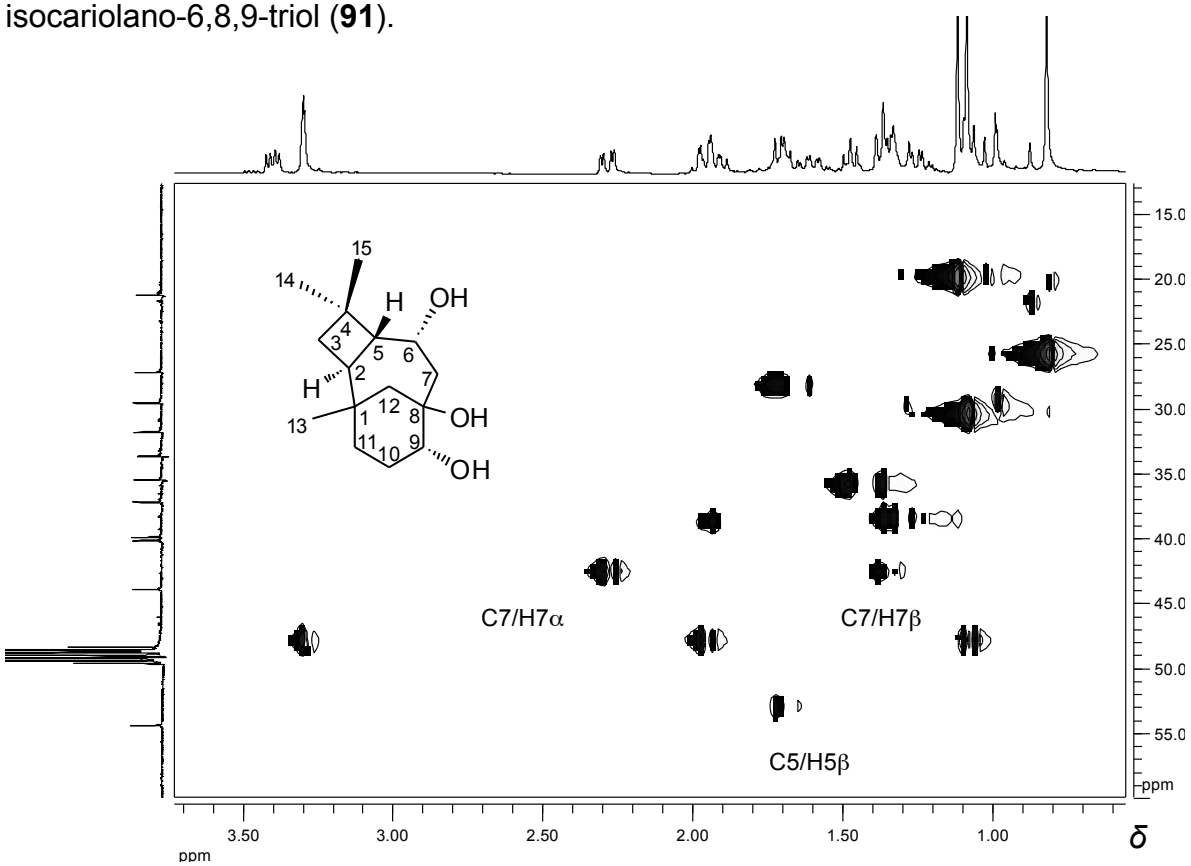


Figura 121 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**).

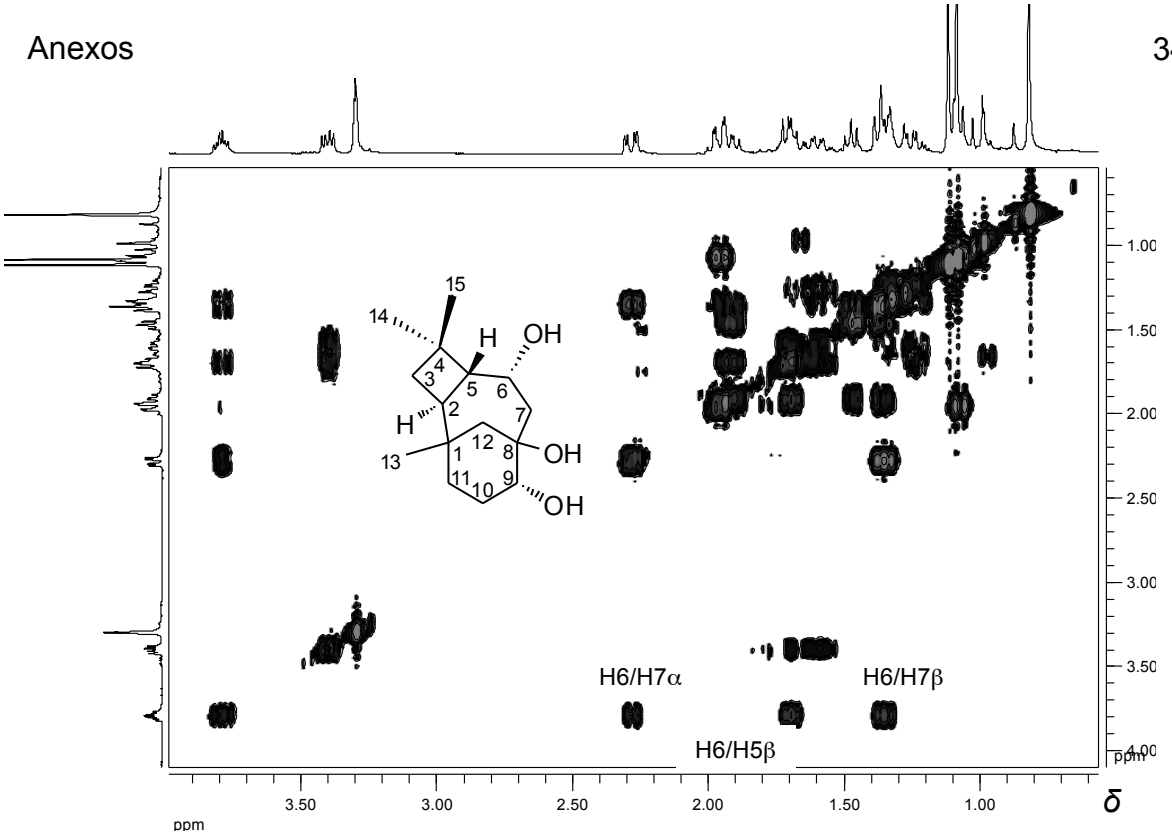


Figura 122 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**).

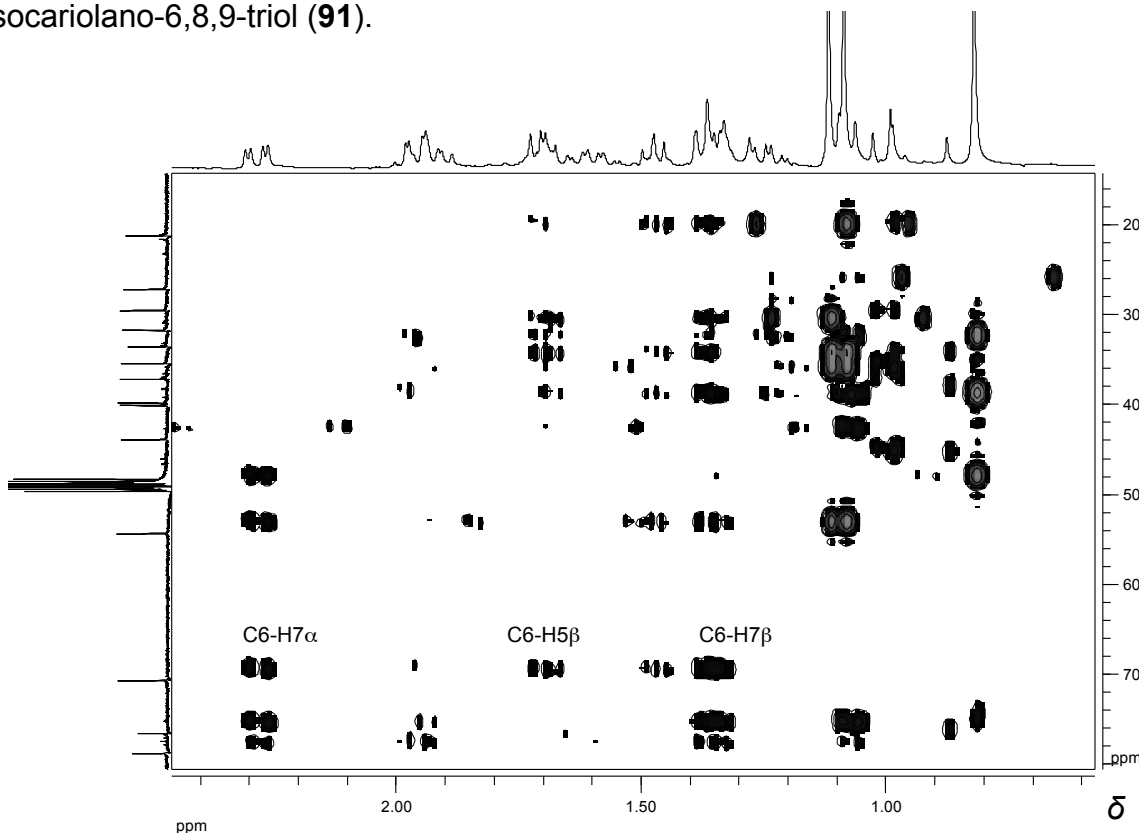


Figura 123 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**).

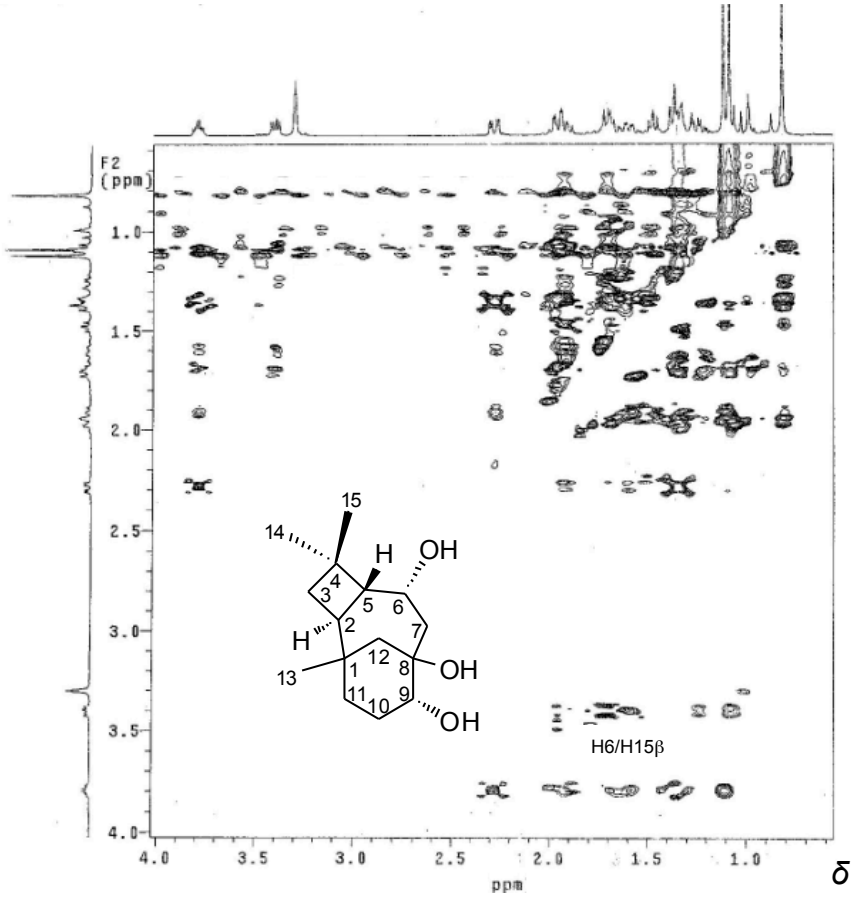


Figura 124 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CD_3OD) de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6, 8, 9-triol (**91**).

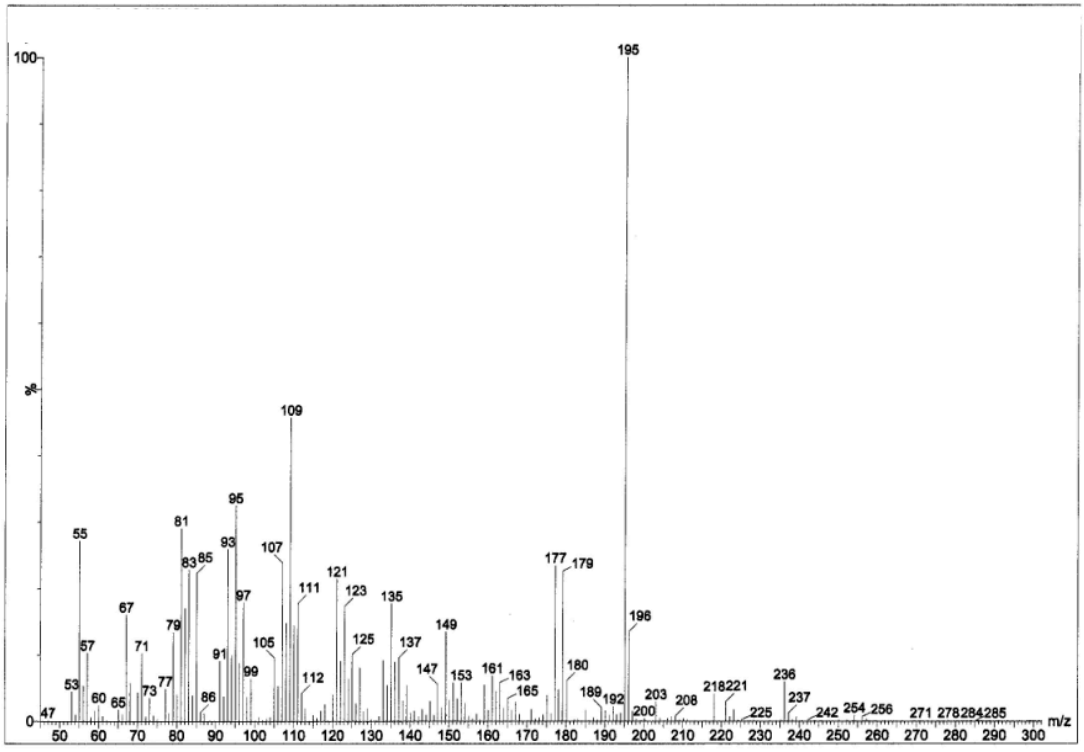


Figura 125 – Espectro de Massas de (6*R*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**91**).

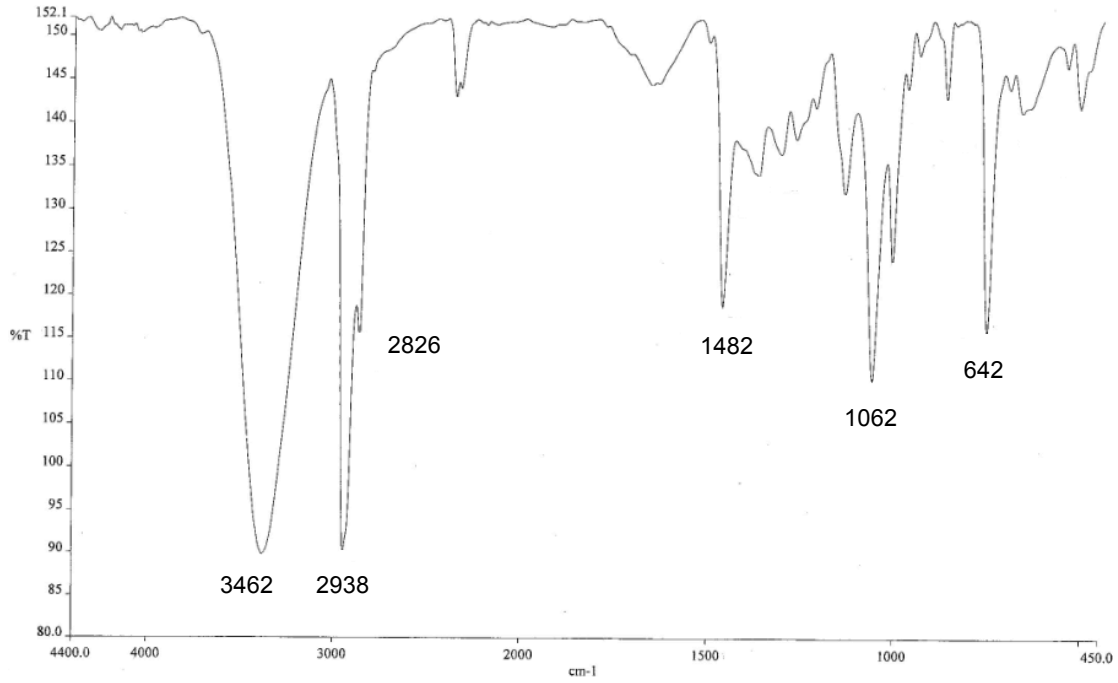


Figura 126 – Espectro no IV de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (**92**) (KBr).

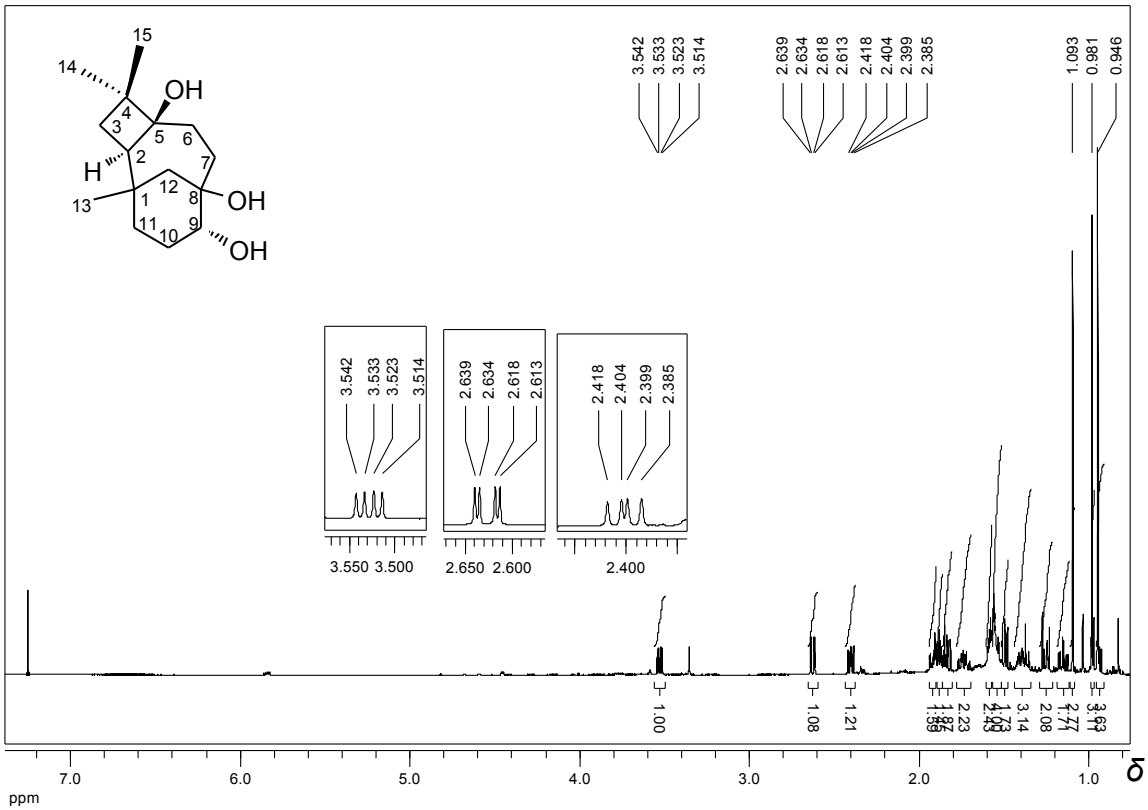


Figura 127 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (**92**).

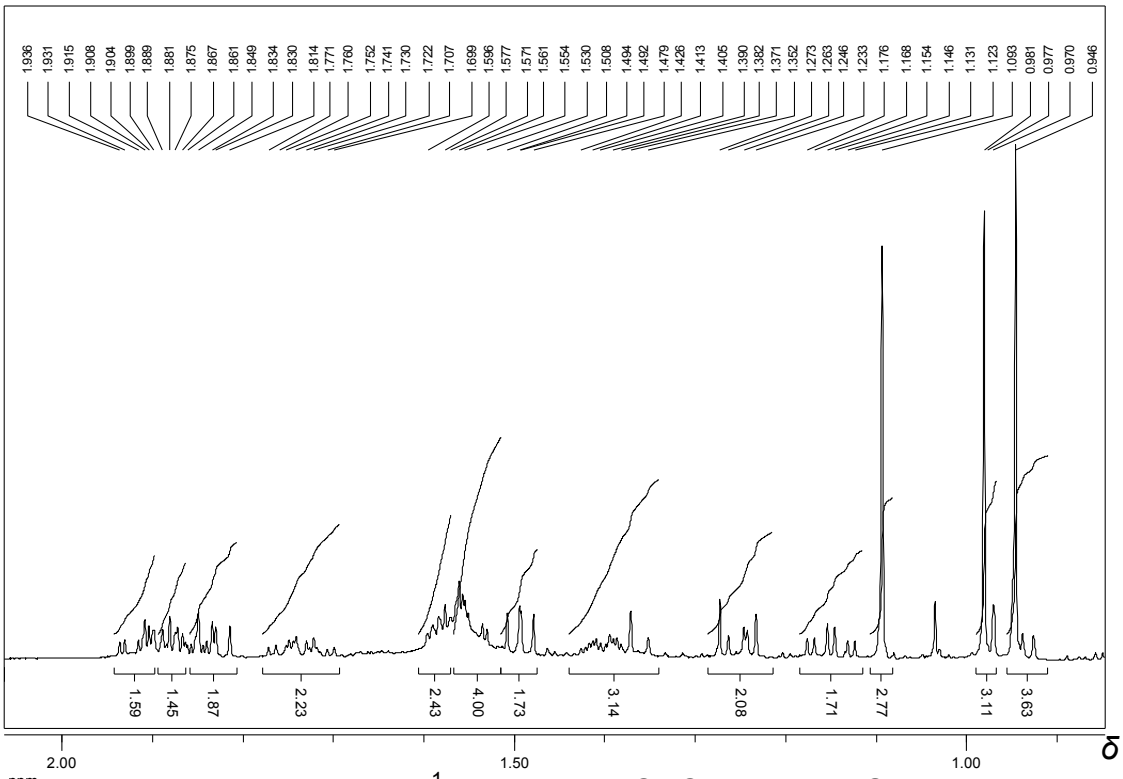


Figura 128 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (**92**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,0.

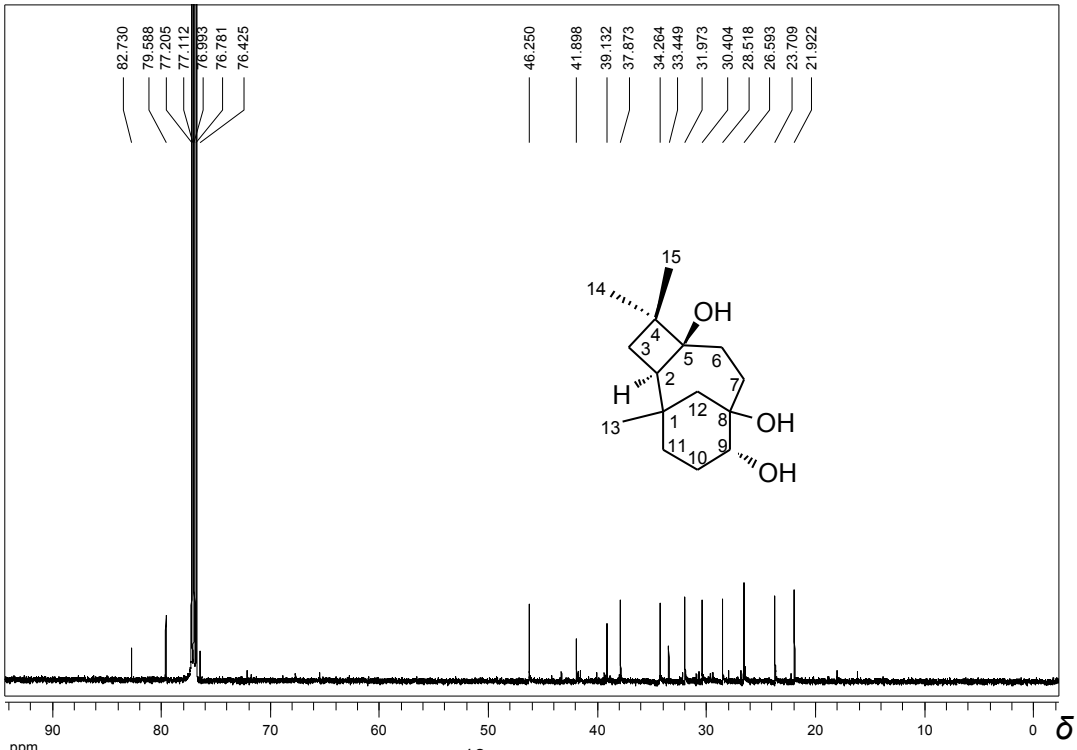


Figura 129 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (**92**).

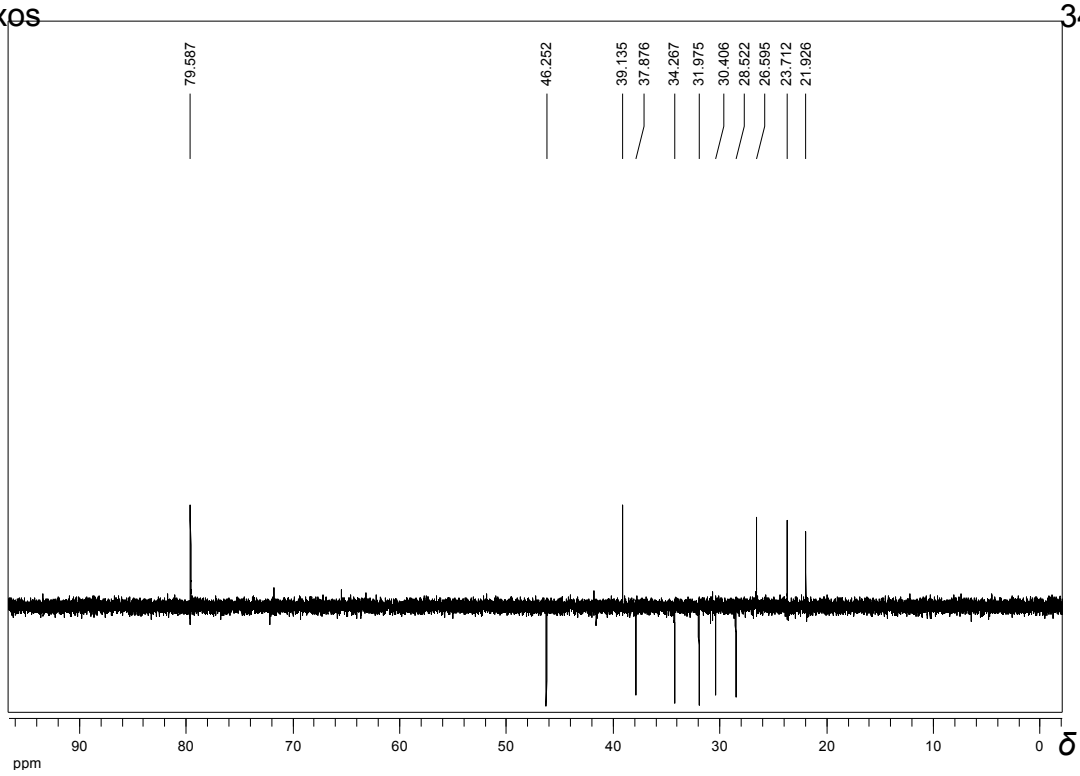


Figura 130 – Subespectro DEPT- 135 (150 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (**92**).

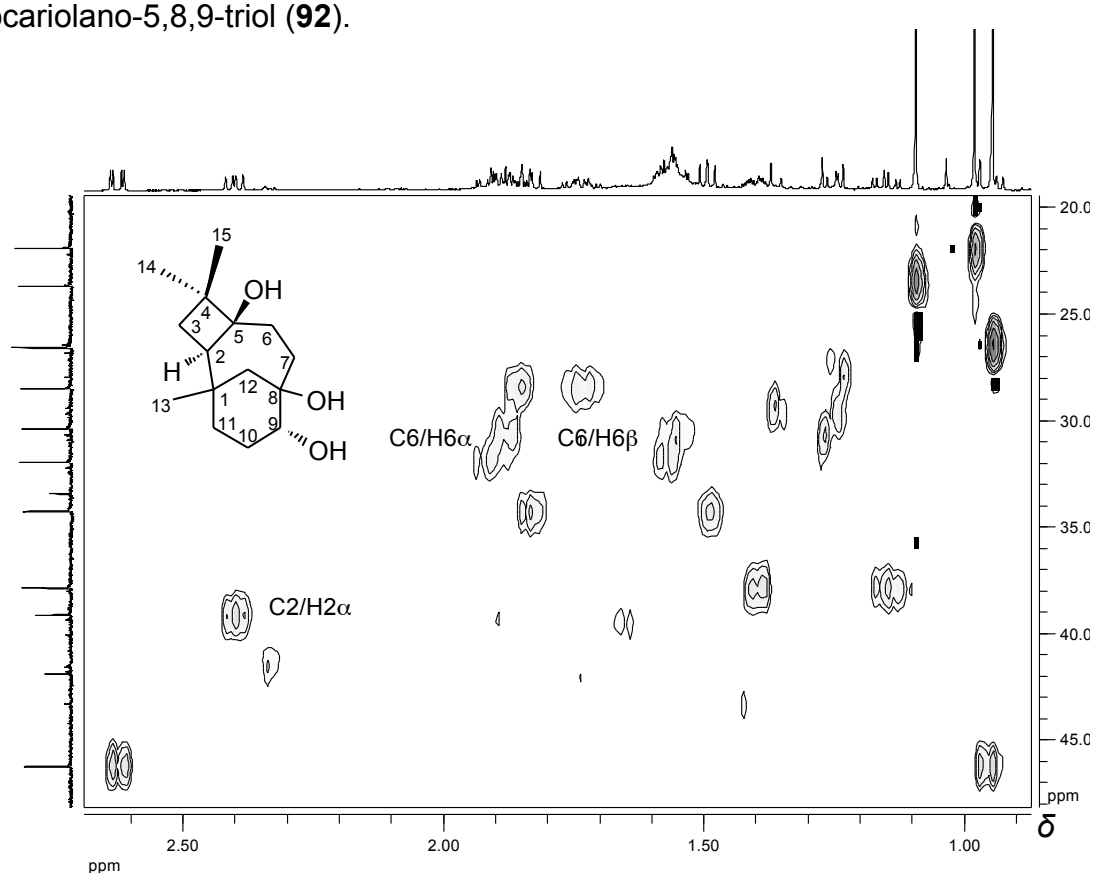


Figura 131 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (**92**).

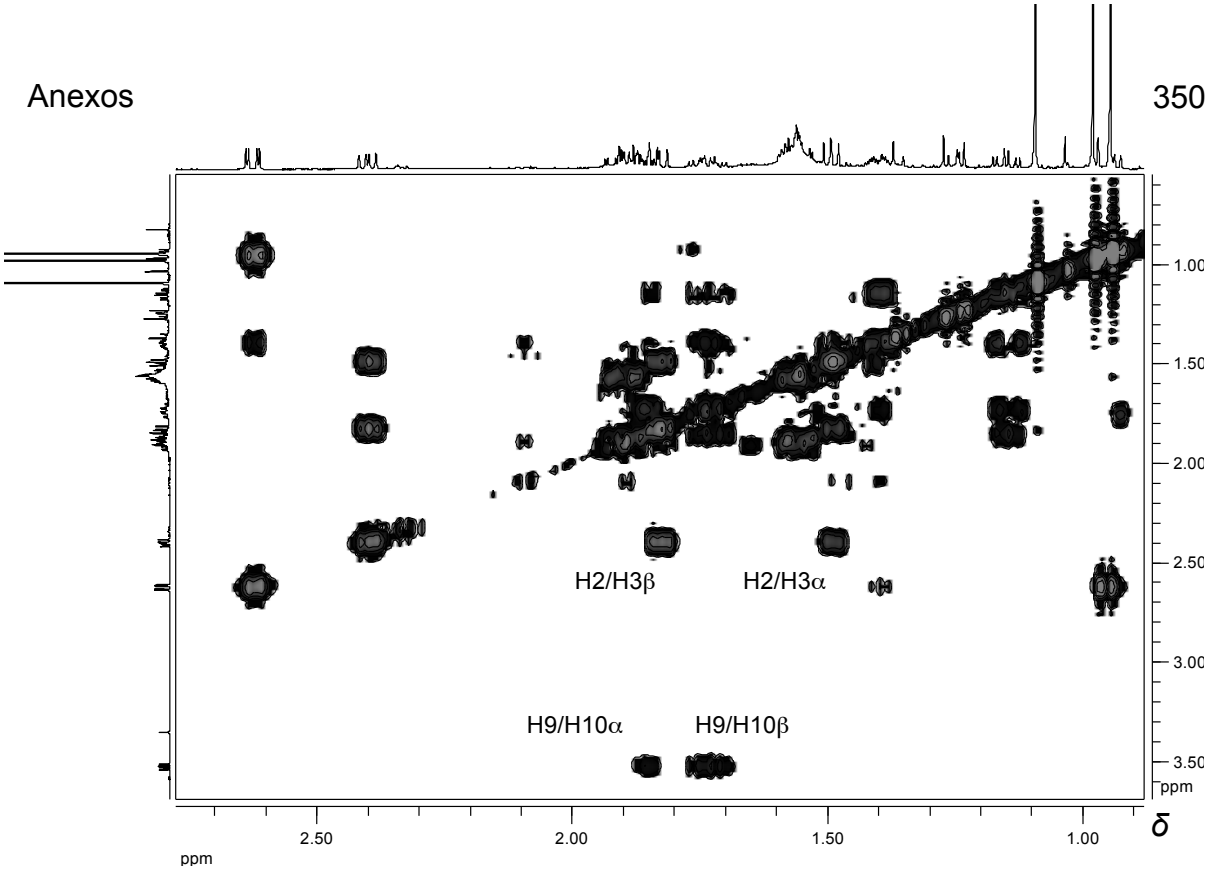


Figura 132 – Mapa de contornos COSY (600 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (**92**).

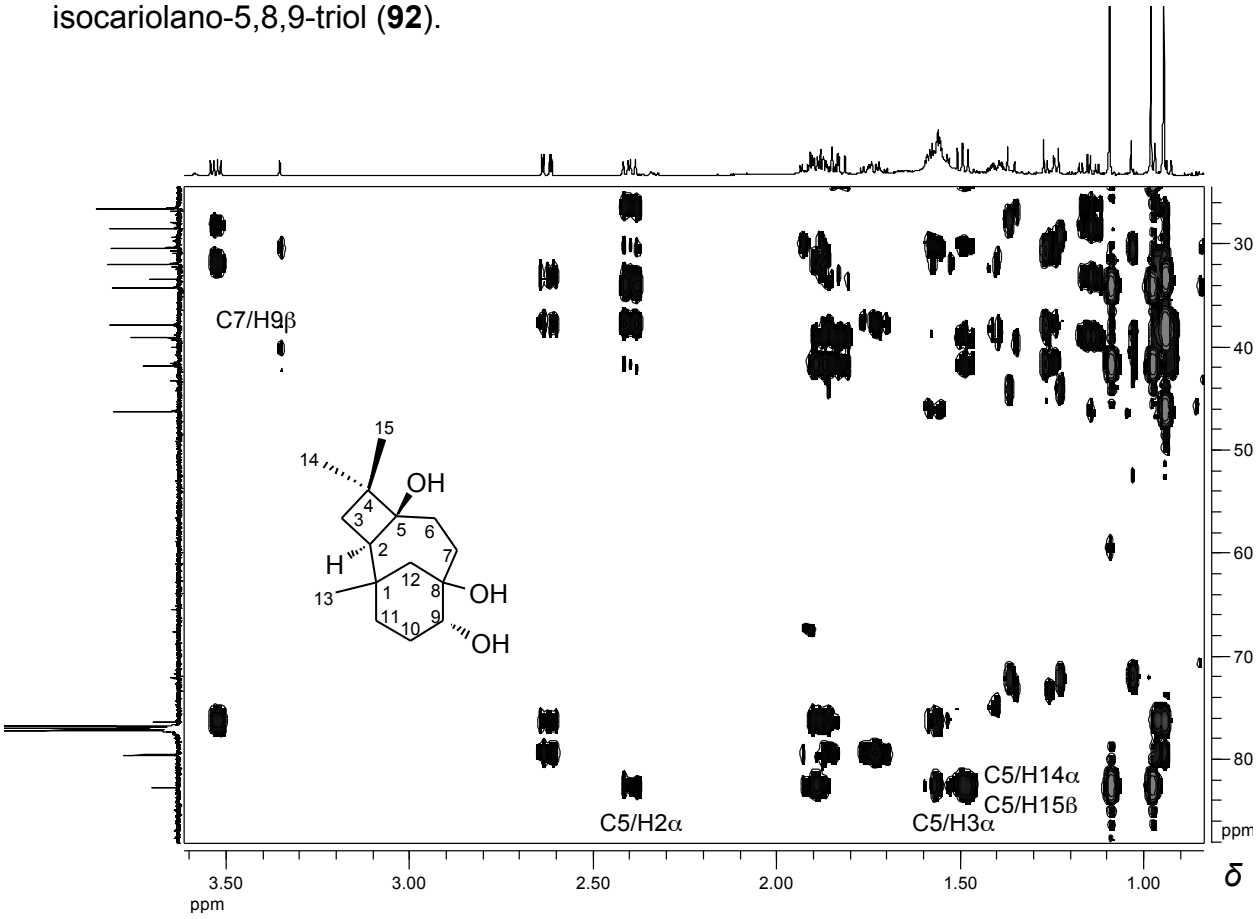


Figura 133 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (**92**).

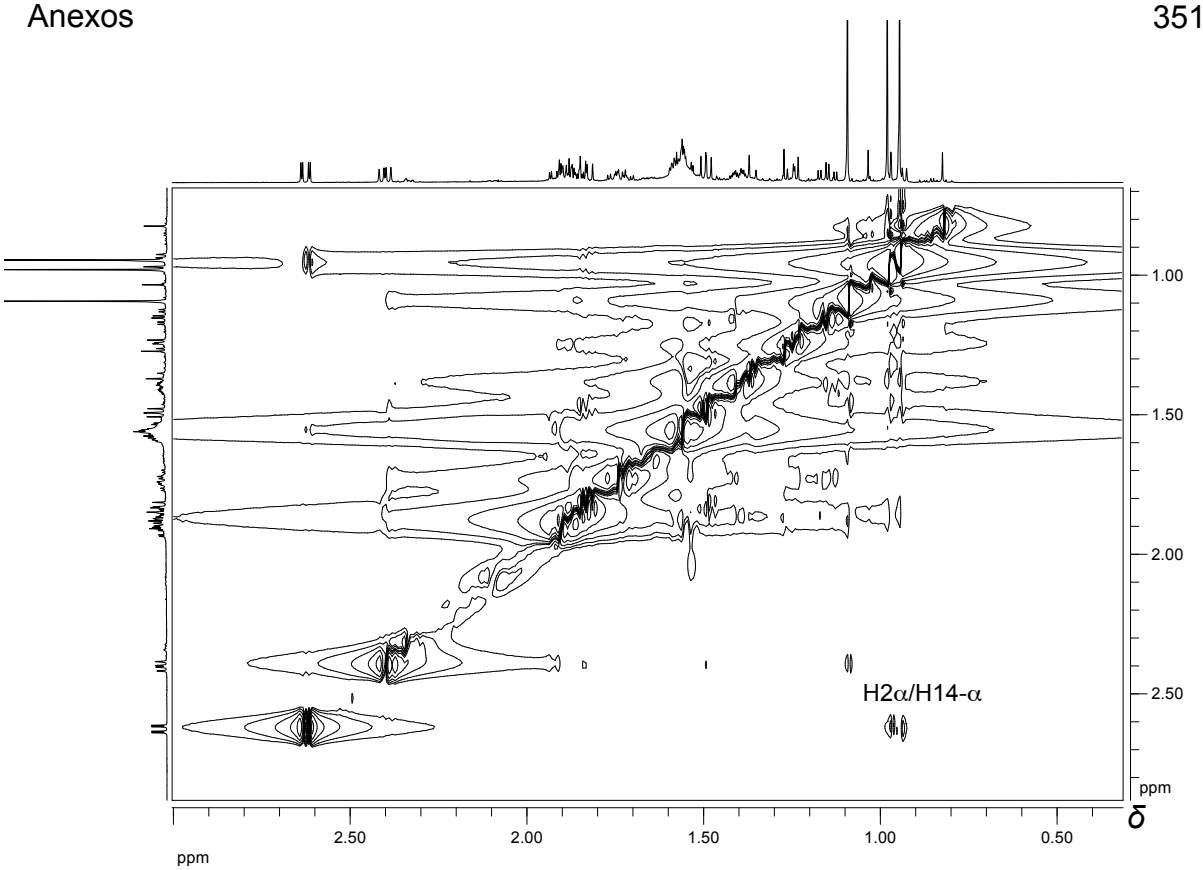


Figura 134 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (**92**).

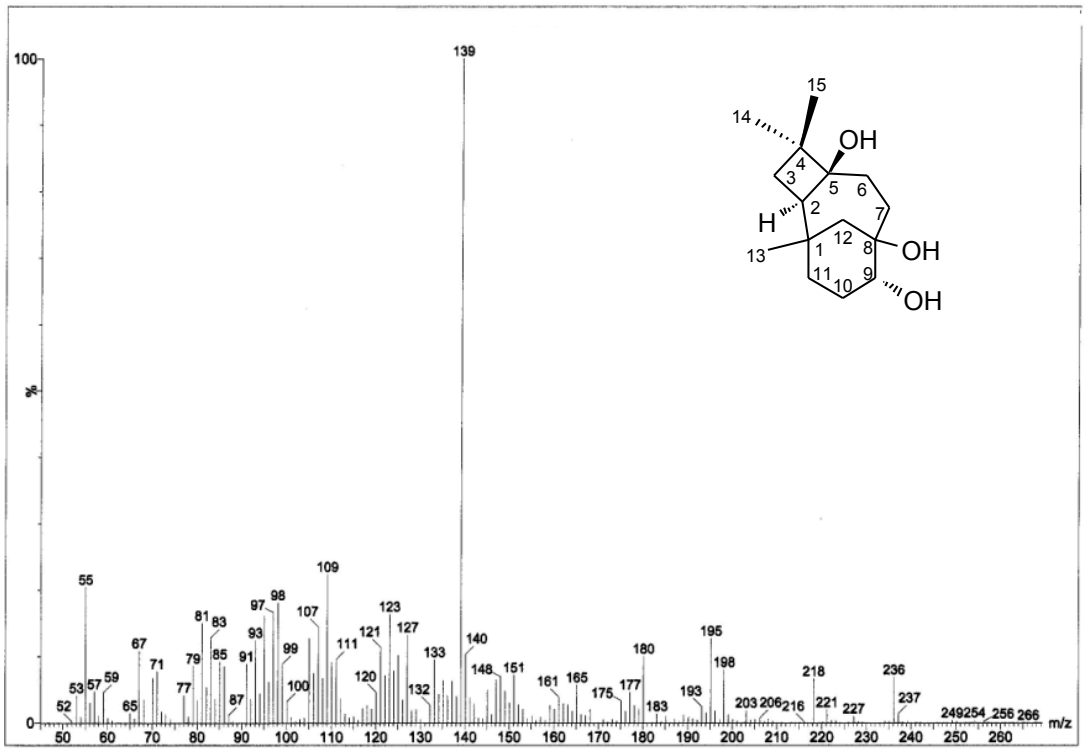


Figura 135 – Espectro de Massas de (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*)-isocariolano-5,8,9-triol (**92**).

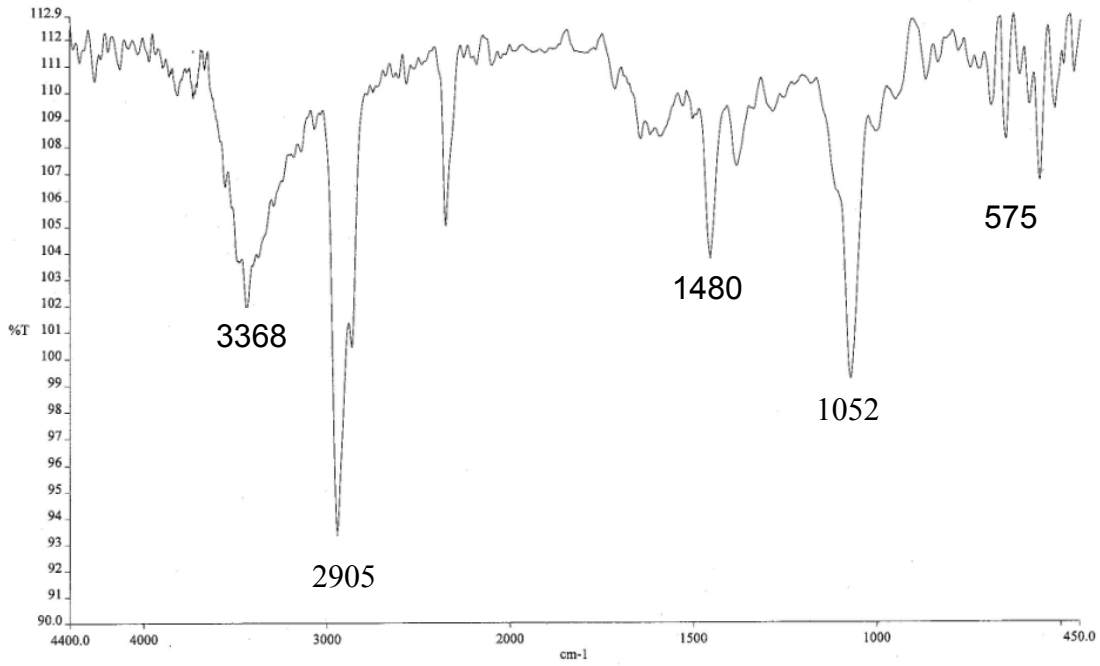


Figura 136 – Espectro no IV de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**93**) (KBr).

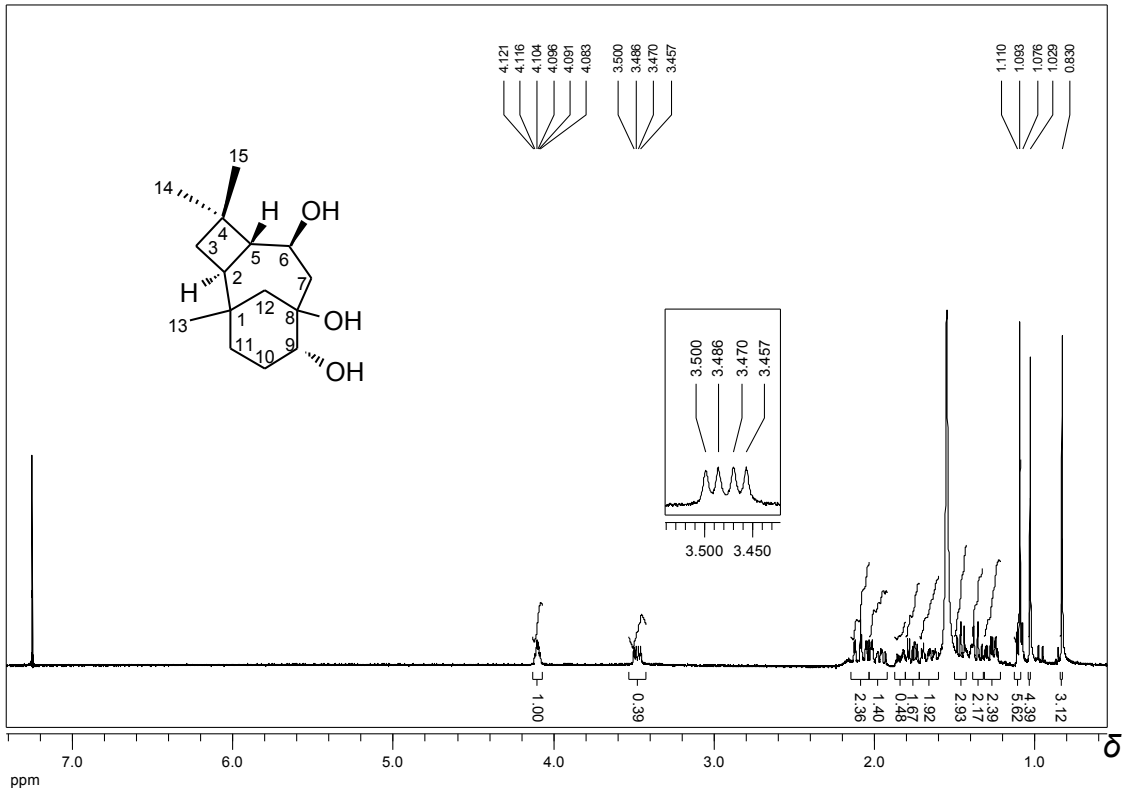


Figura 137 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de(6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**93**).

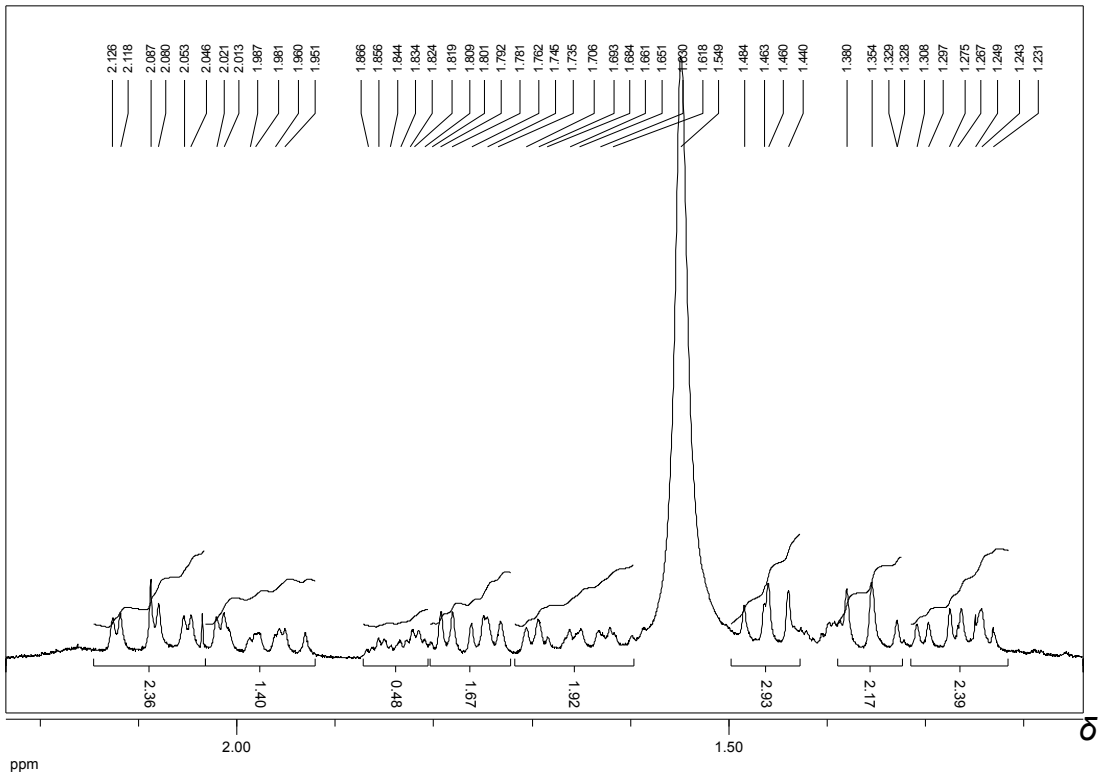


Figura 138 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**93**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

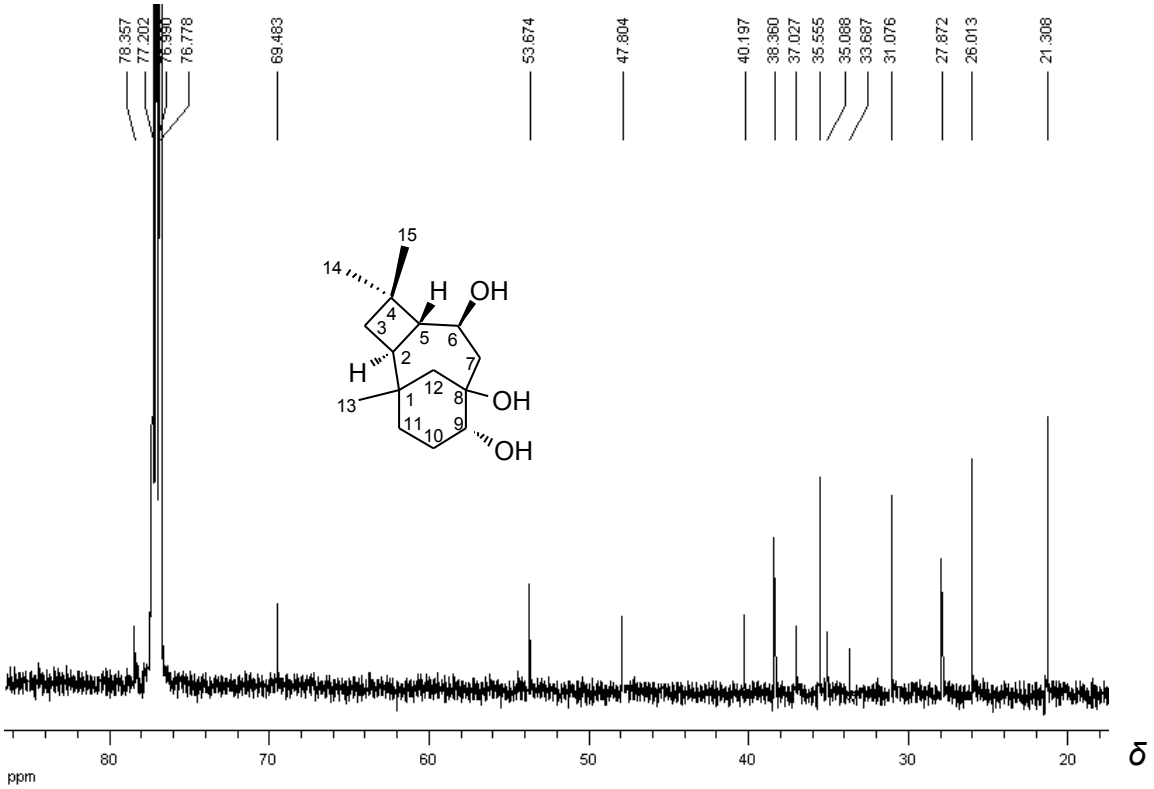


Figura 139 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**93**).

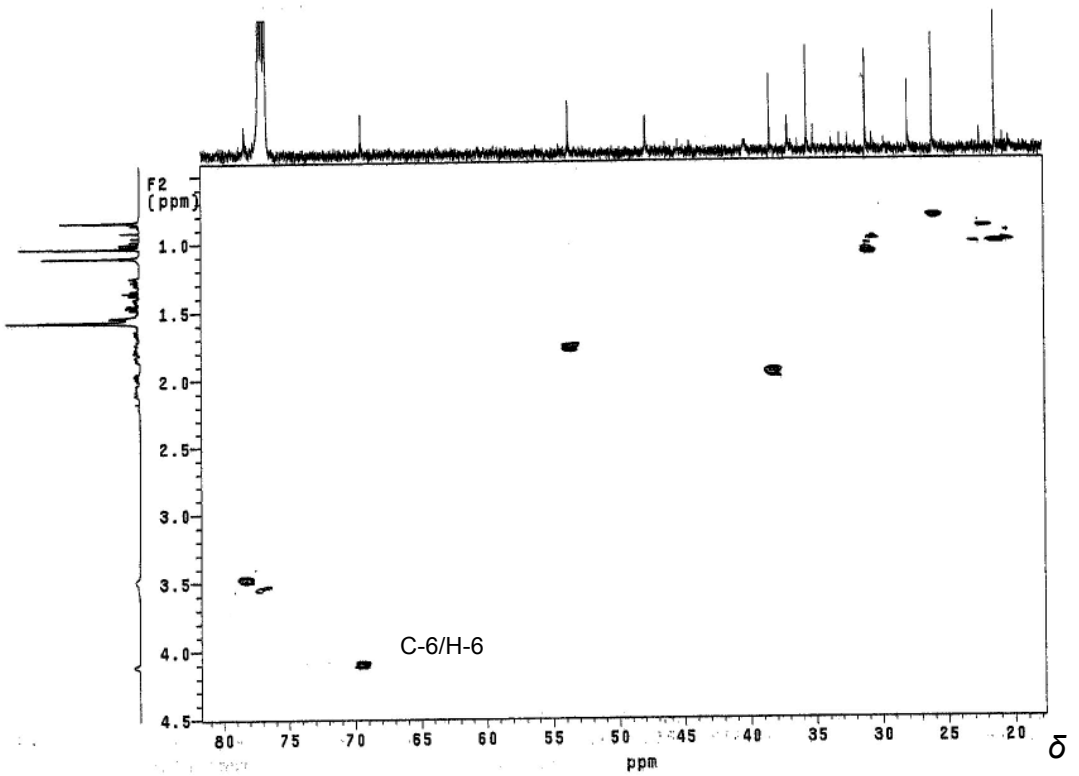


Figura 140 – Mapa de contornos HSQC-DEPT – fase positiva (CH_3 e CH) (600 MHz, $CDCl_3$) de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**93**).

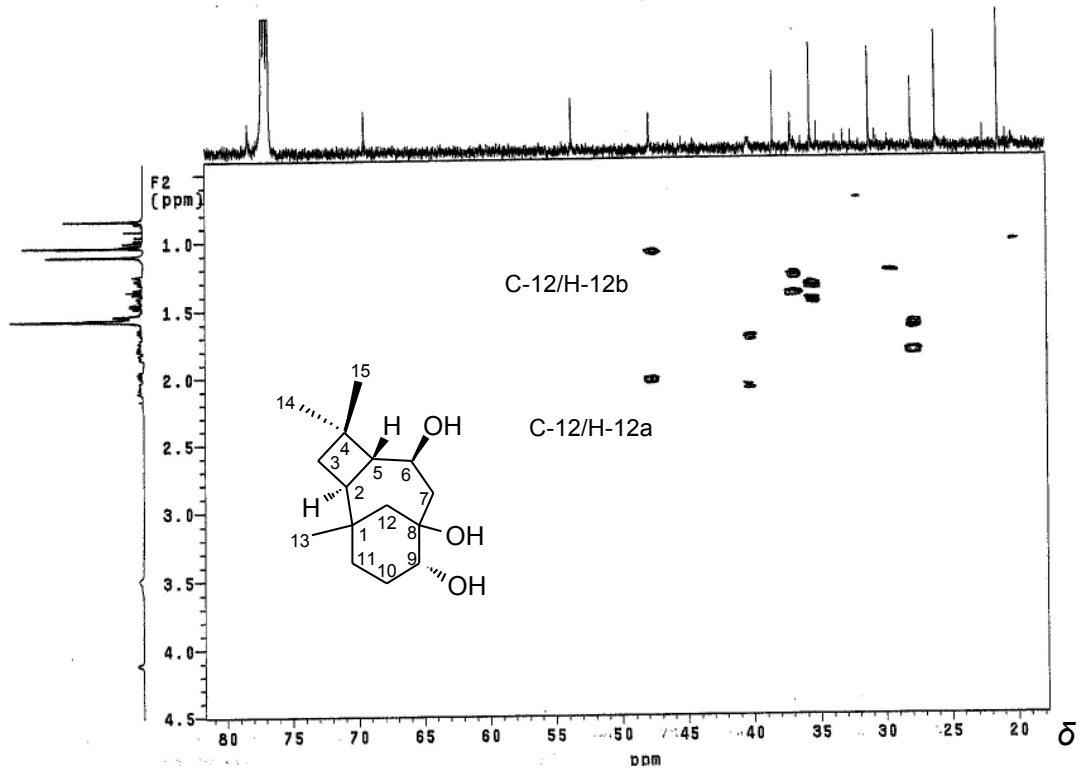


Figura 141 – Mapa de contornos HSQC-DEPT – fase negativa (CH_2) (600 MHz, $CDCl_3$) de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**93**).

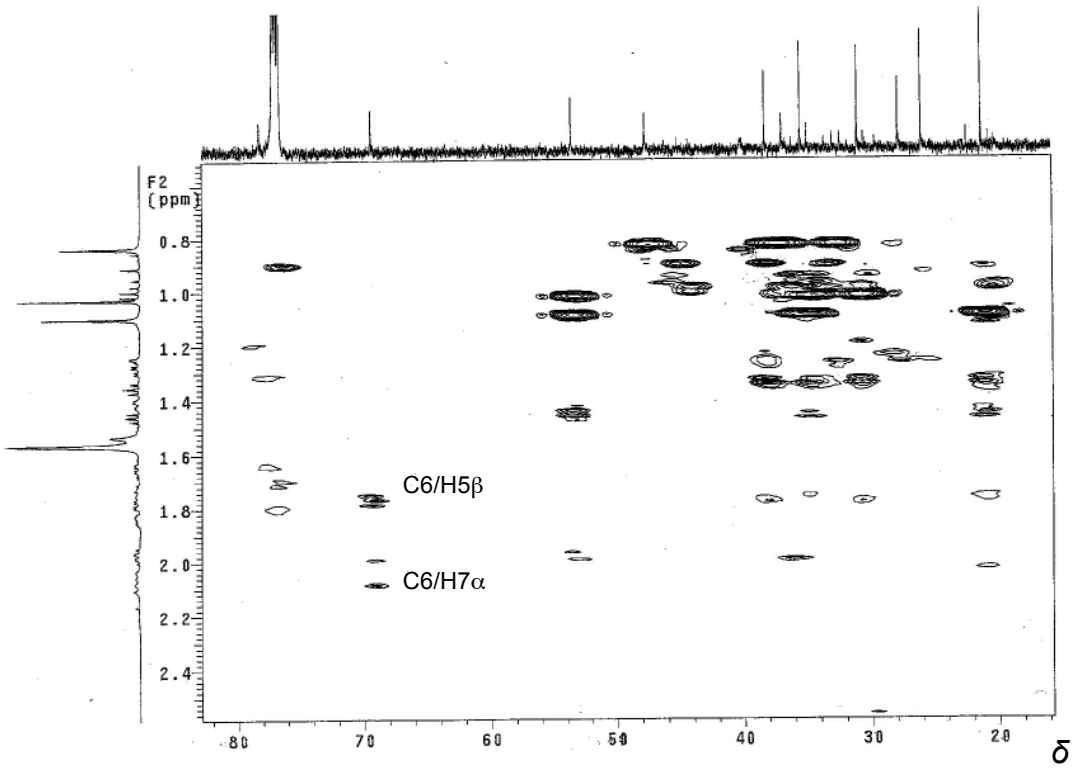


Figura 142 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**93**).

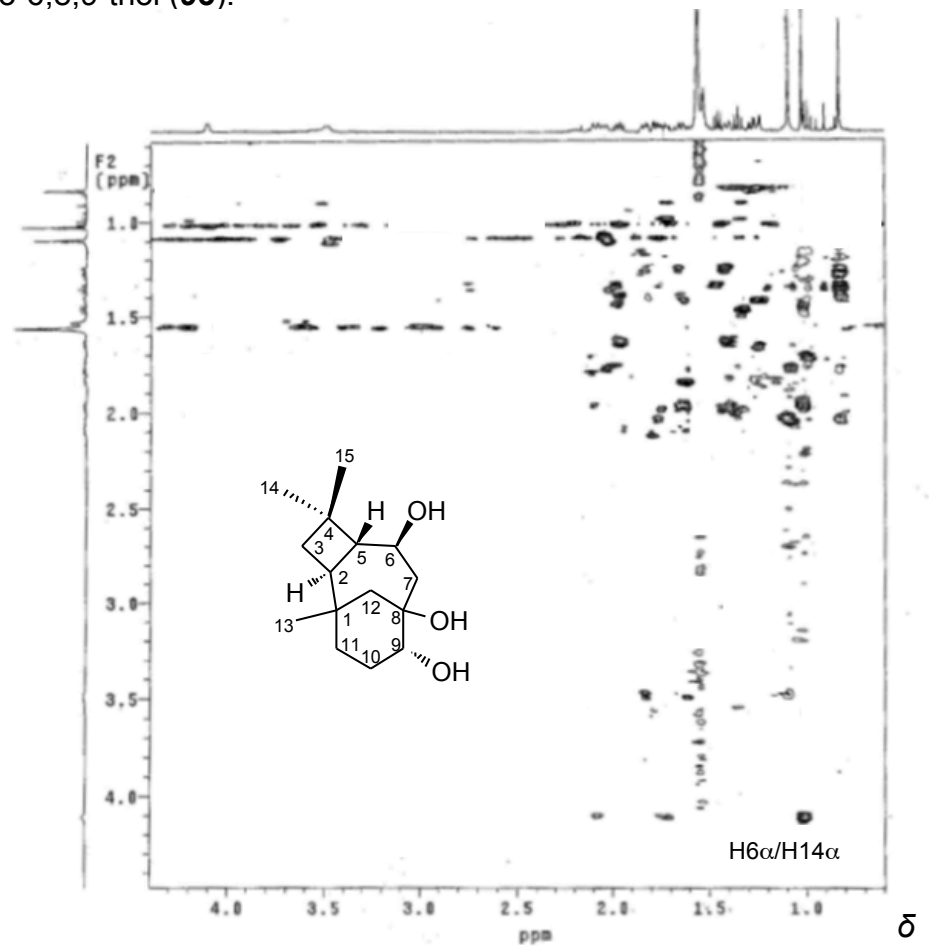


Figura 143 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**93**).

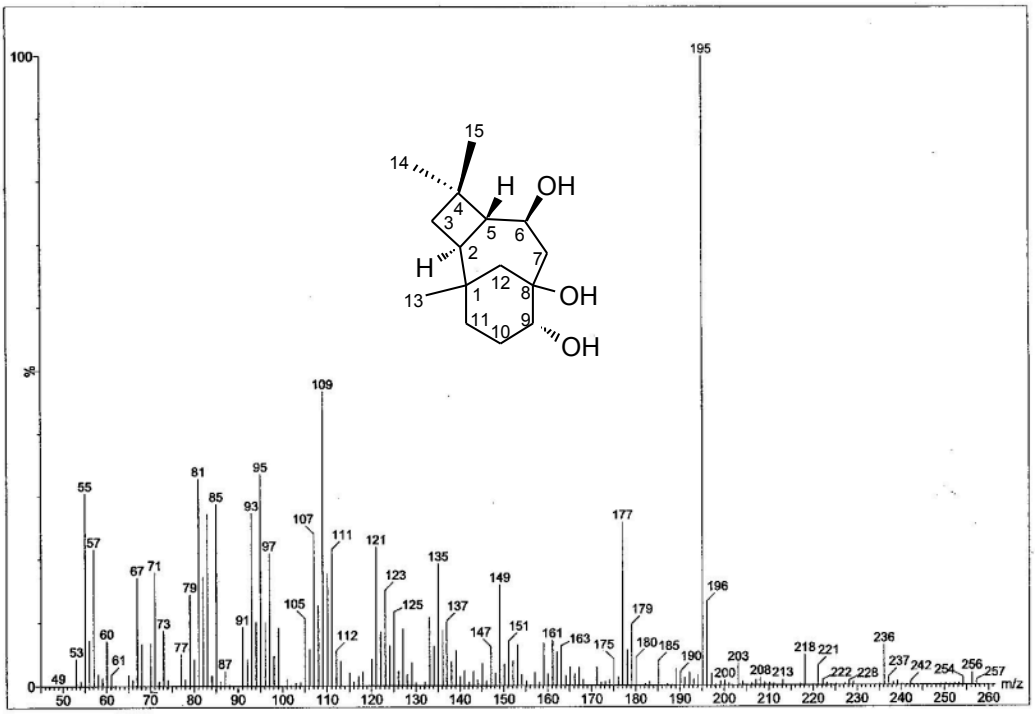


Figura 144 – Espectro de Massas de (6*S*,8*S*,9*R*)-isocariolano-6,8,9-triol (**93**).

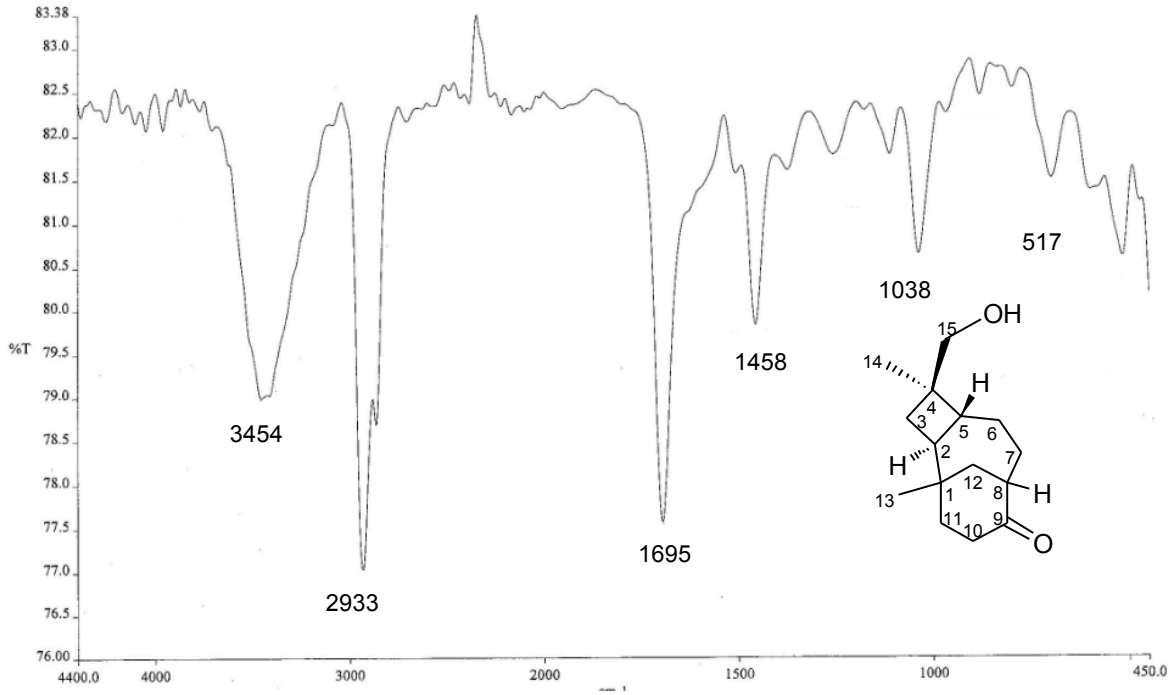


Figura 145 – Espectro no IV de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo [6.3.1.$0^{2,5}$]dodecan-9-ona (**94**) (KBr).

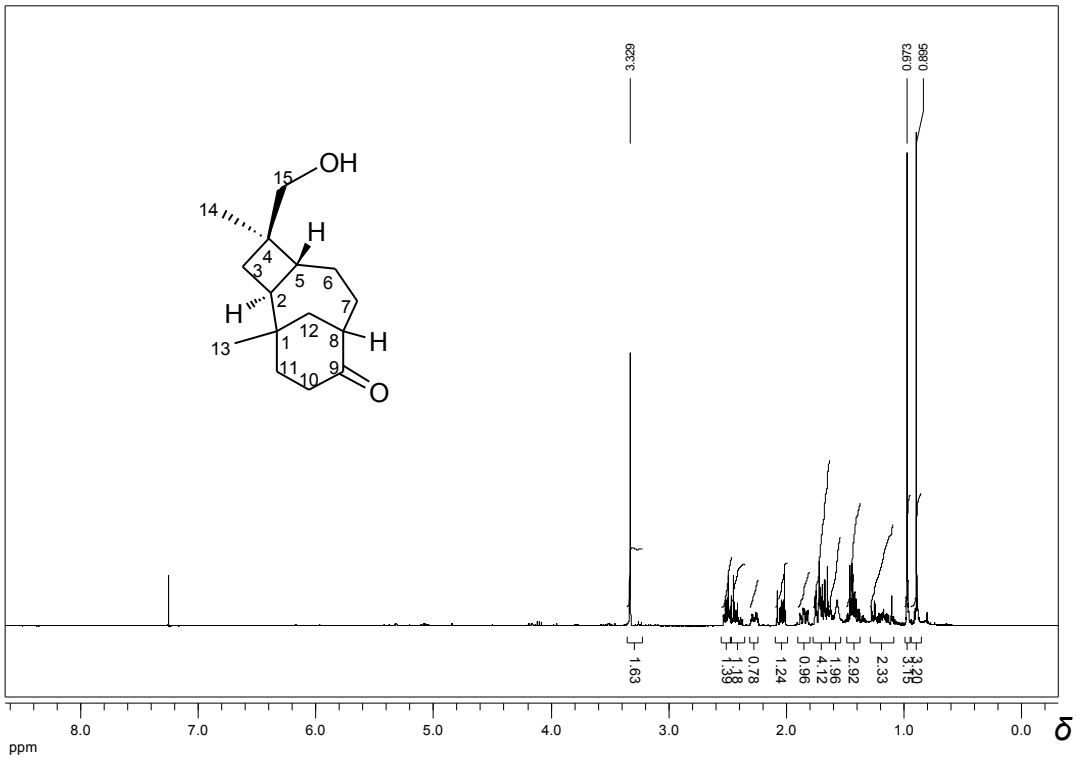


Figura 146 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (**94**).

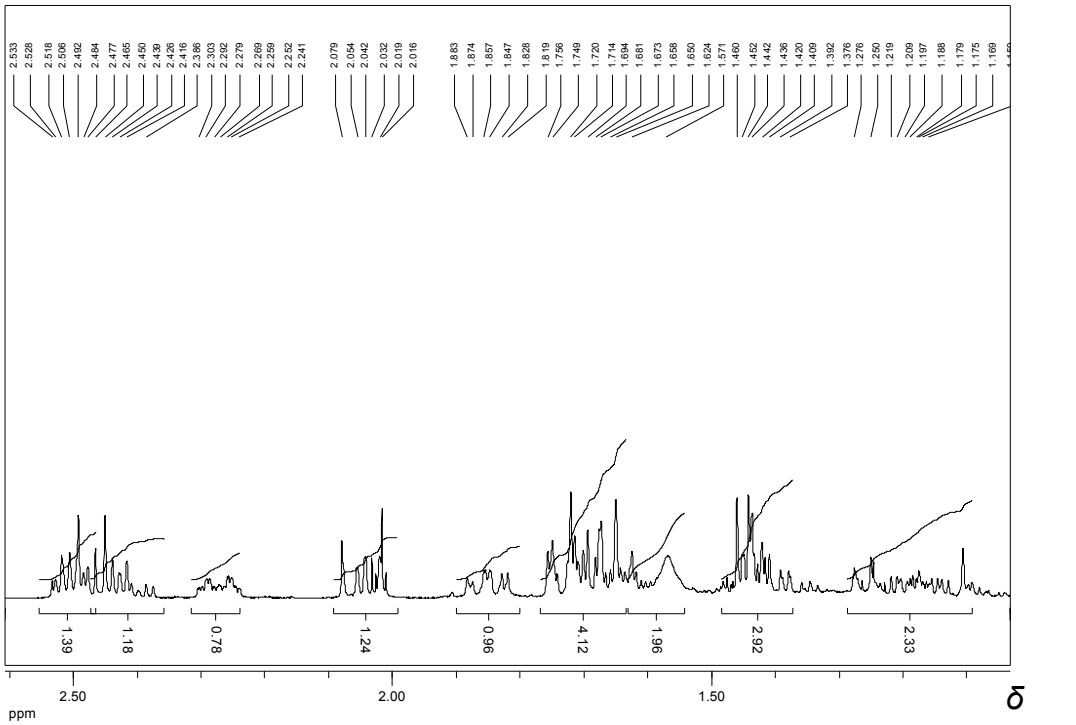


Figura 147 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (**94**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

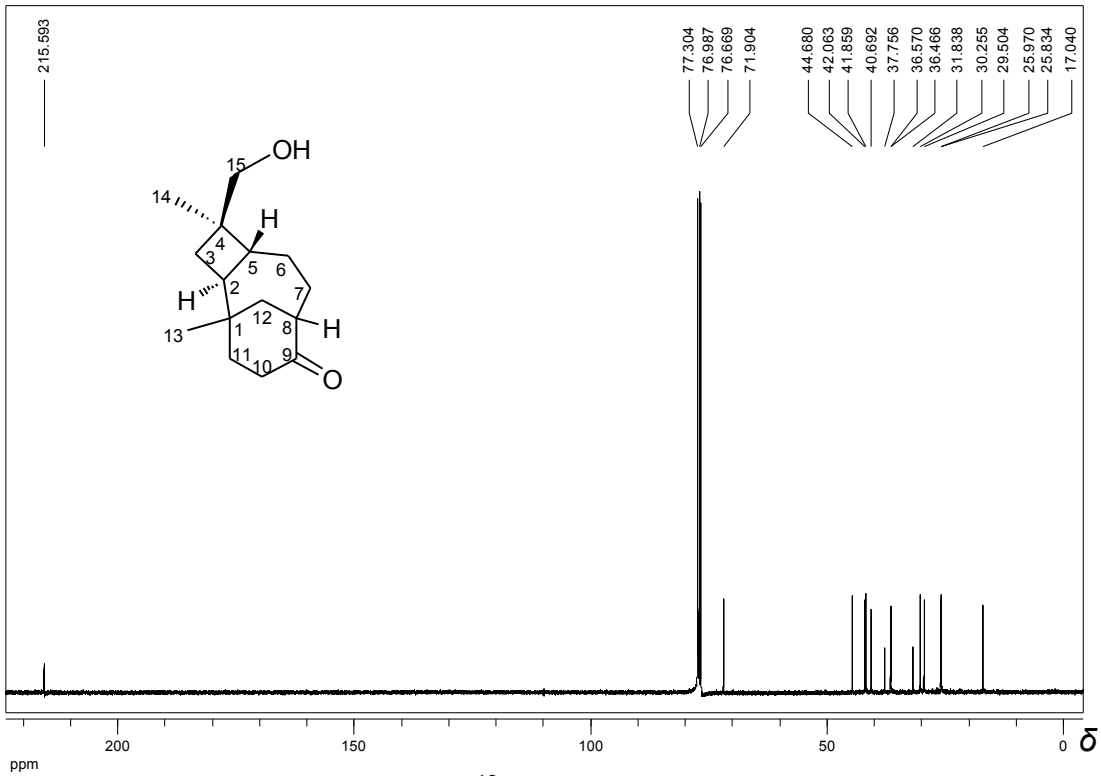


Figura 148 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (**94**).

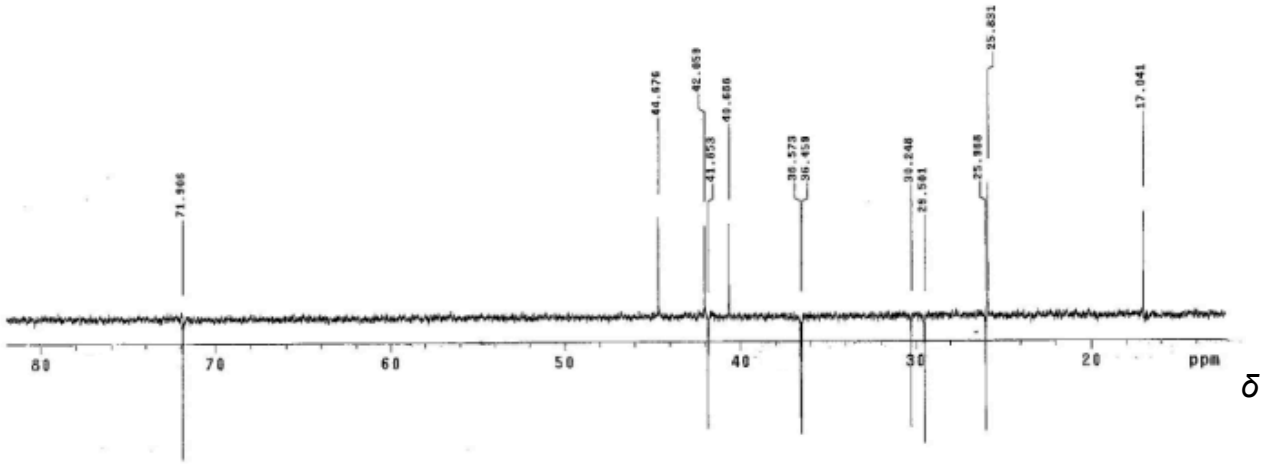


Figura 149 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (**94**).

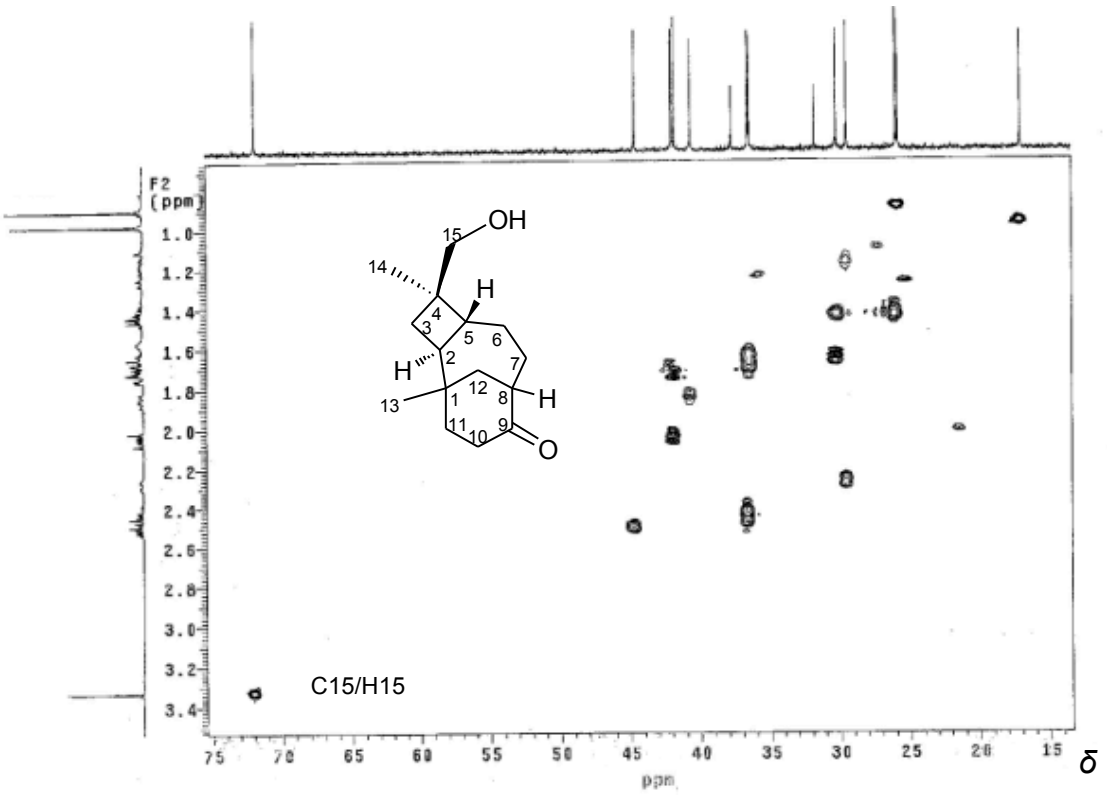


Figura 150 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (**94**).

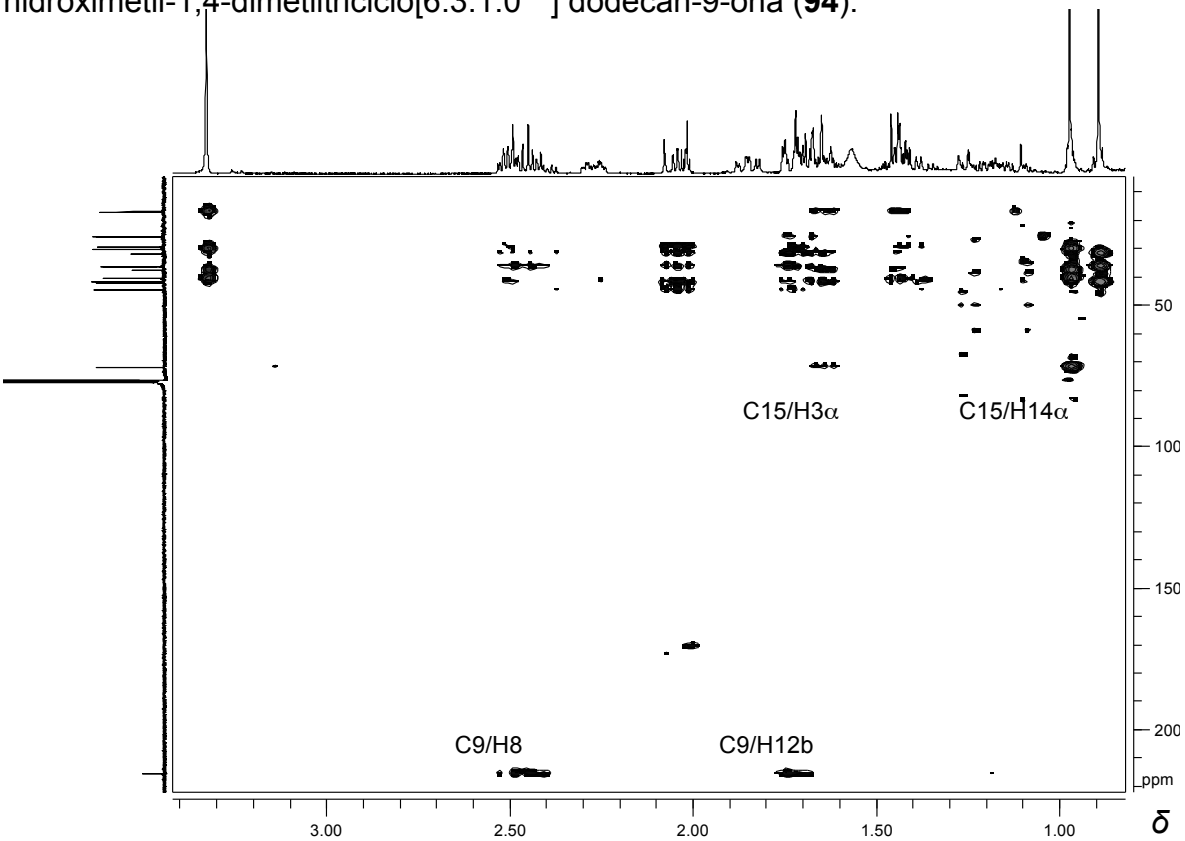


Figura 151 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,5*R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (**94**).

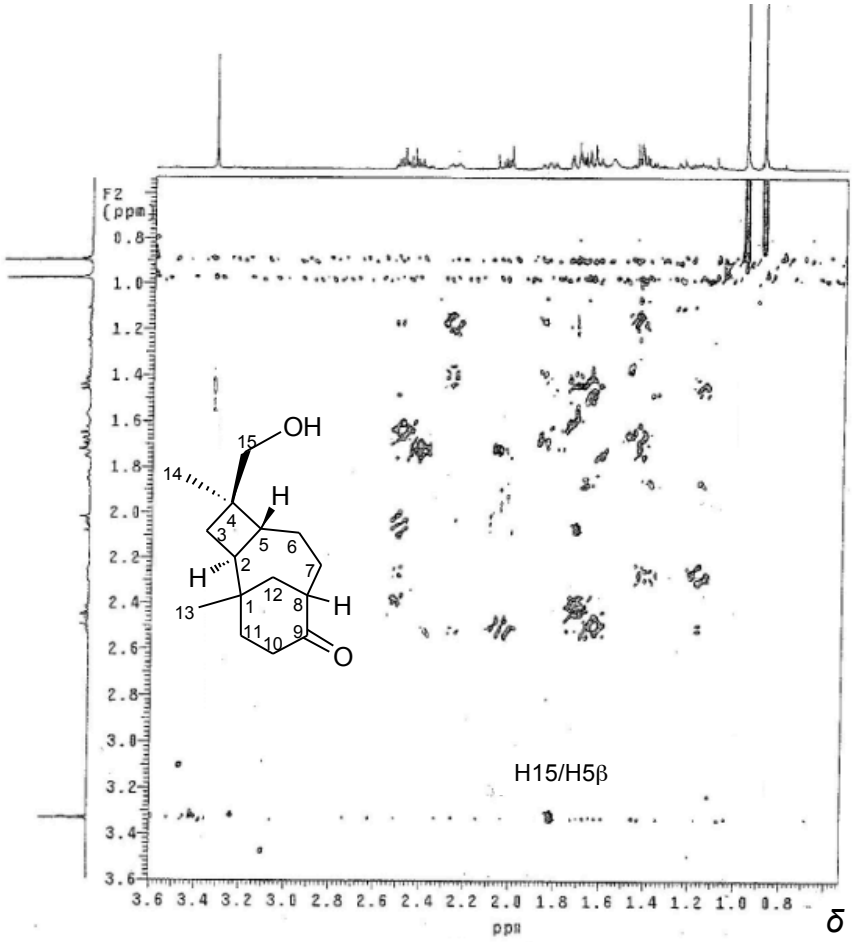


Figura 152 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (*2S*,*4R*,*5R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (**94**).

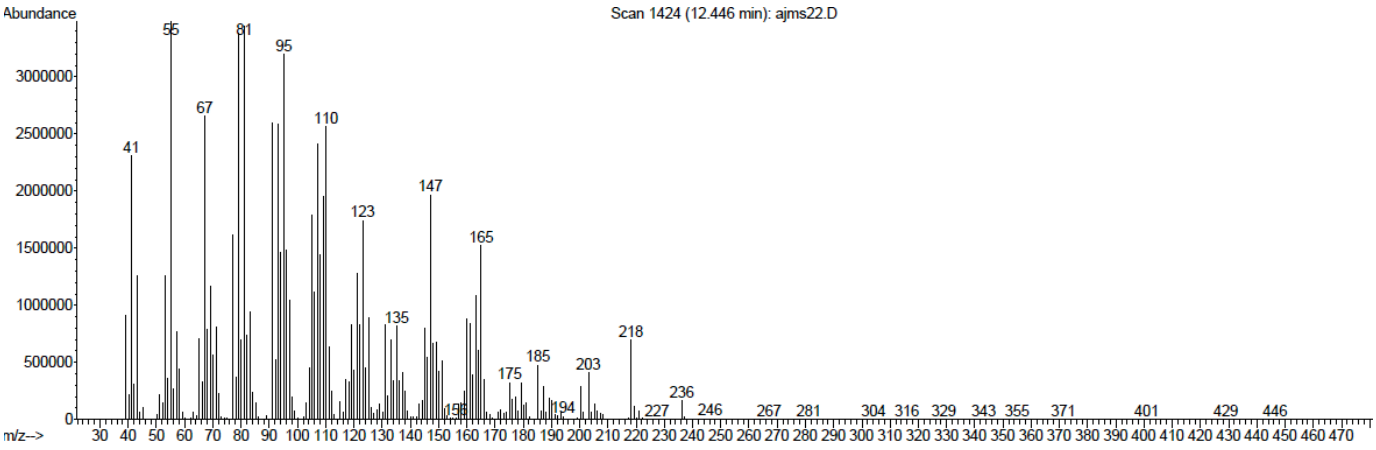


Figura 153 – Espectro de Massas de (*2S*,*4R*,*5R*)-4-hidroximetil-1,4-dimetiltriciclo[6.3.1.$0^{2,5}$] dodecan-9-ona (**94**).

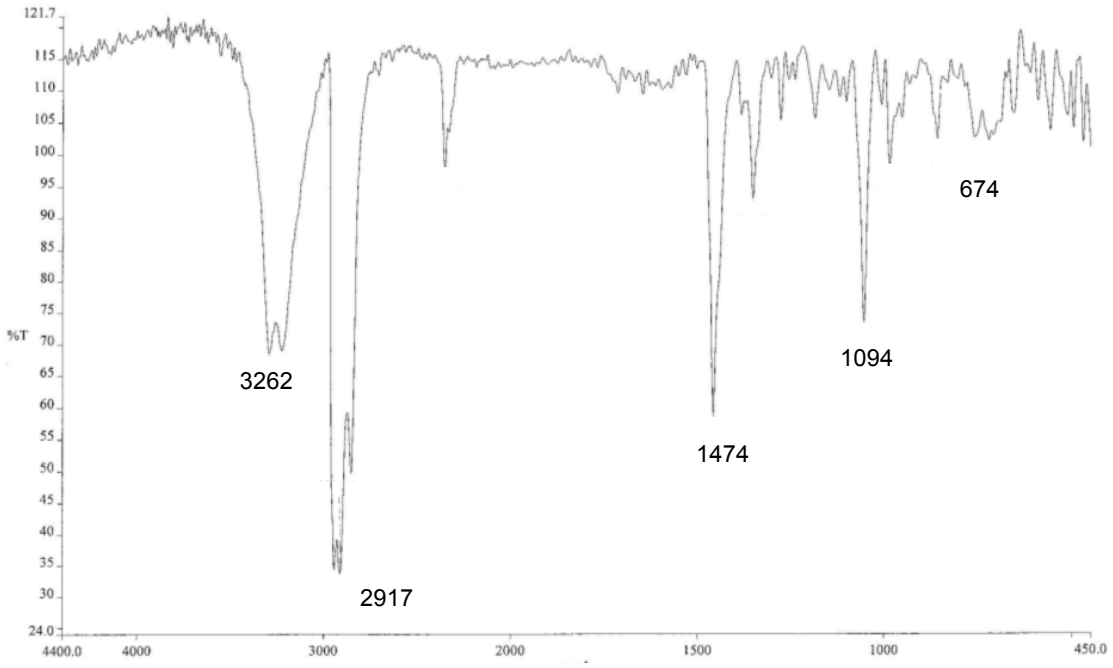


Figura 154 – Espectro de IV no15*R*,9*R*)-isocariolano-9,15-diol (**95**) (KBr)

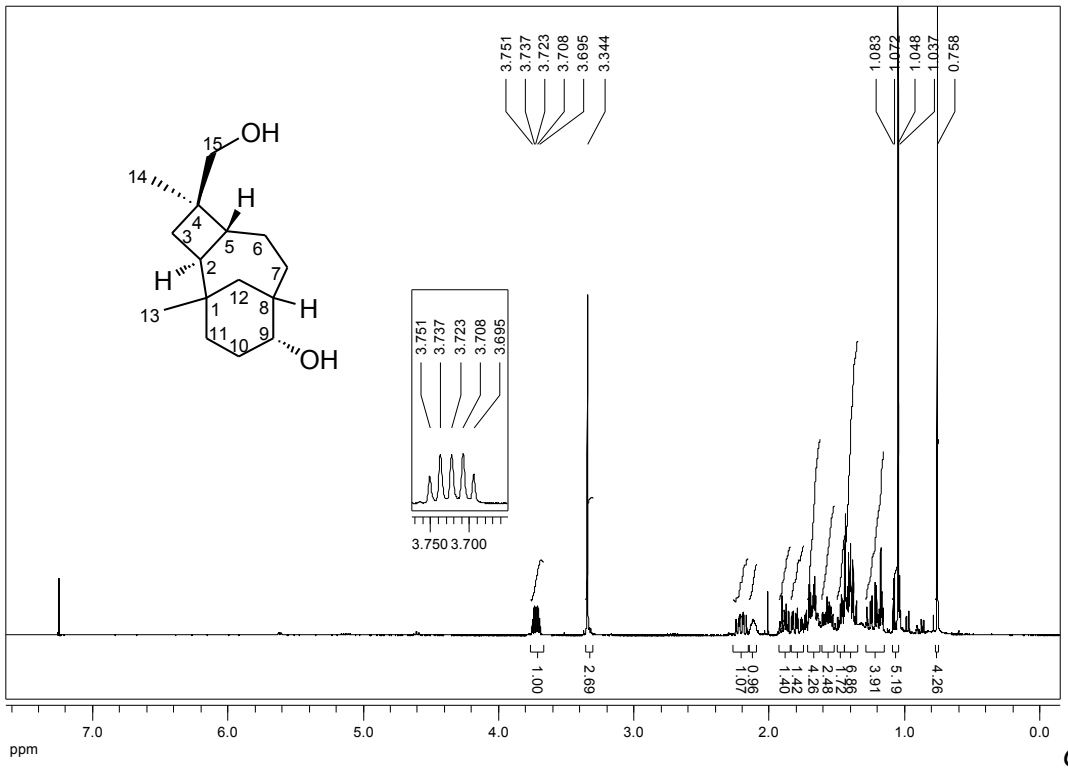


Figura 155 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano-9,15-diol (**95**).

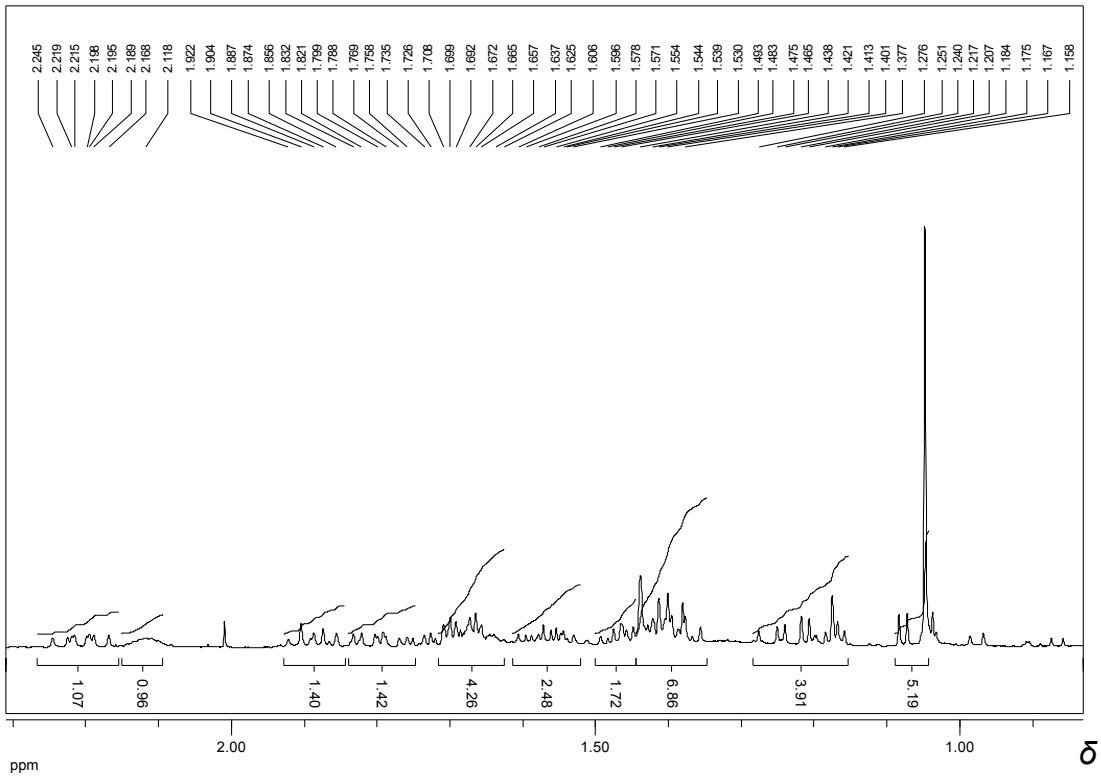


Figura 156 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano-9,15-diol (**95**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

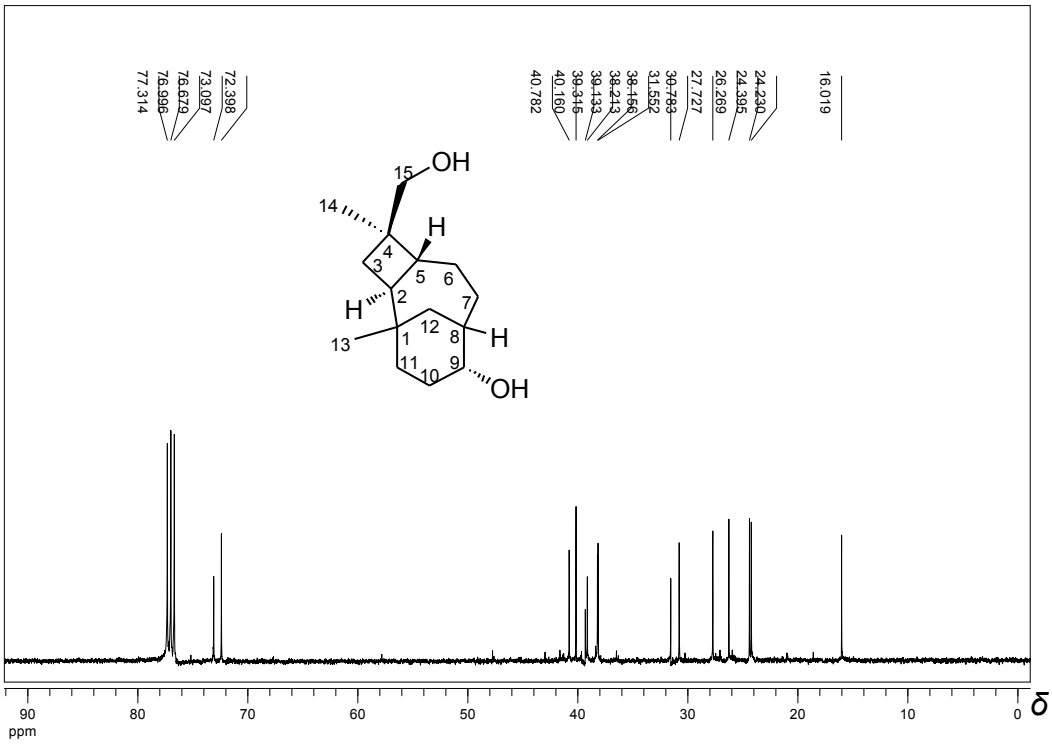


Figura 157 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (**95**).

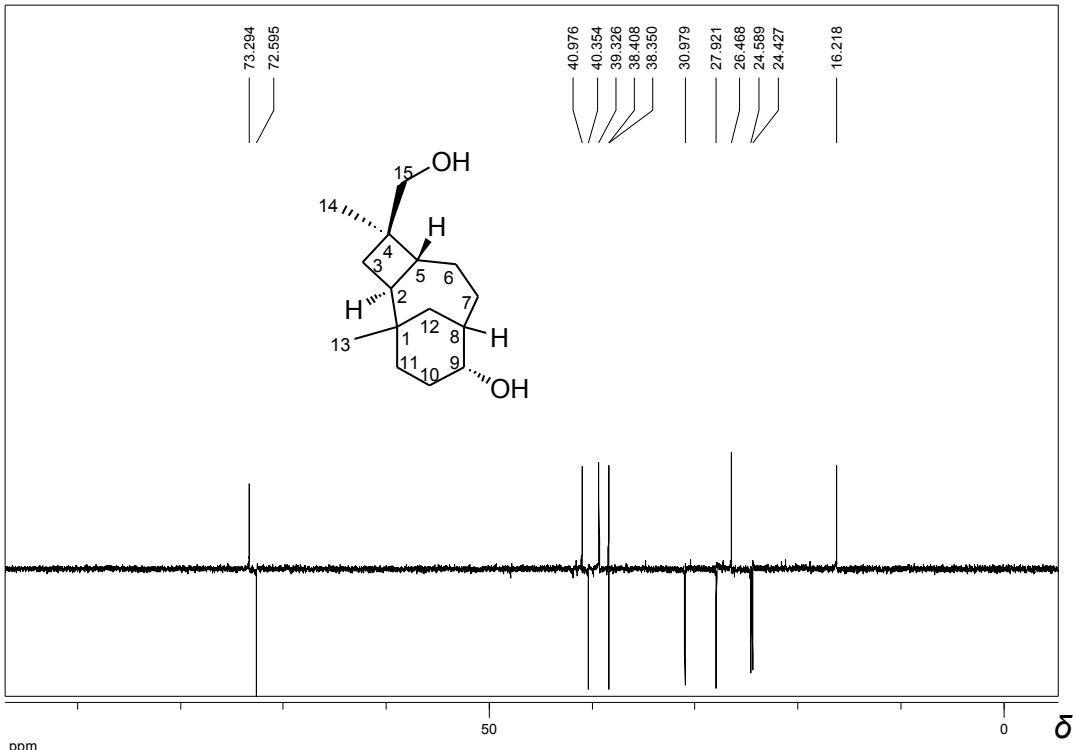


Figura 158 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano-9,15-diol (**95**).

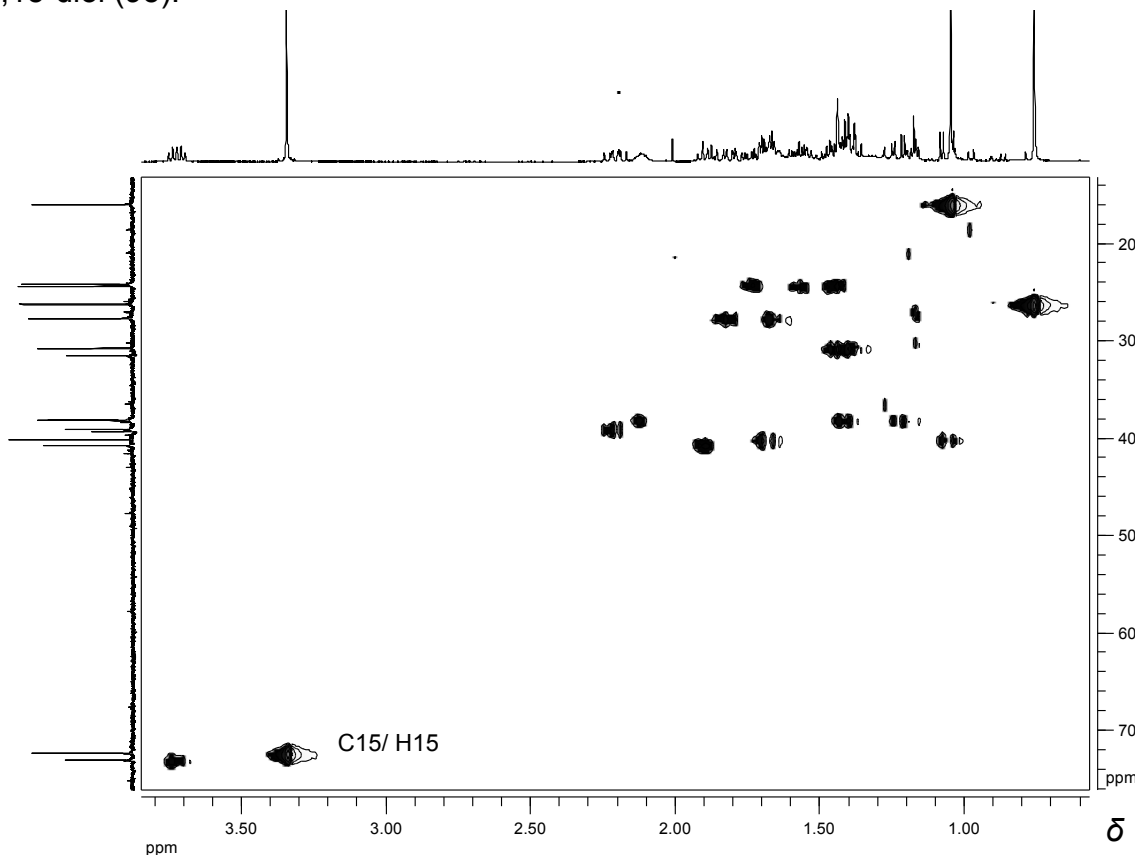


Figura 159 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (**95**).

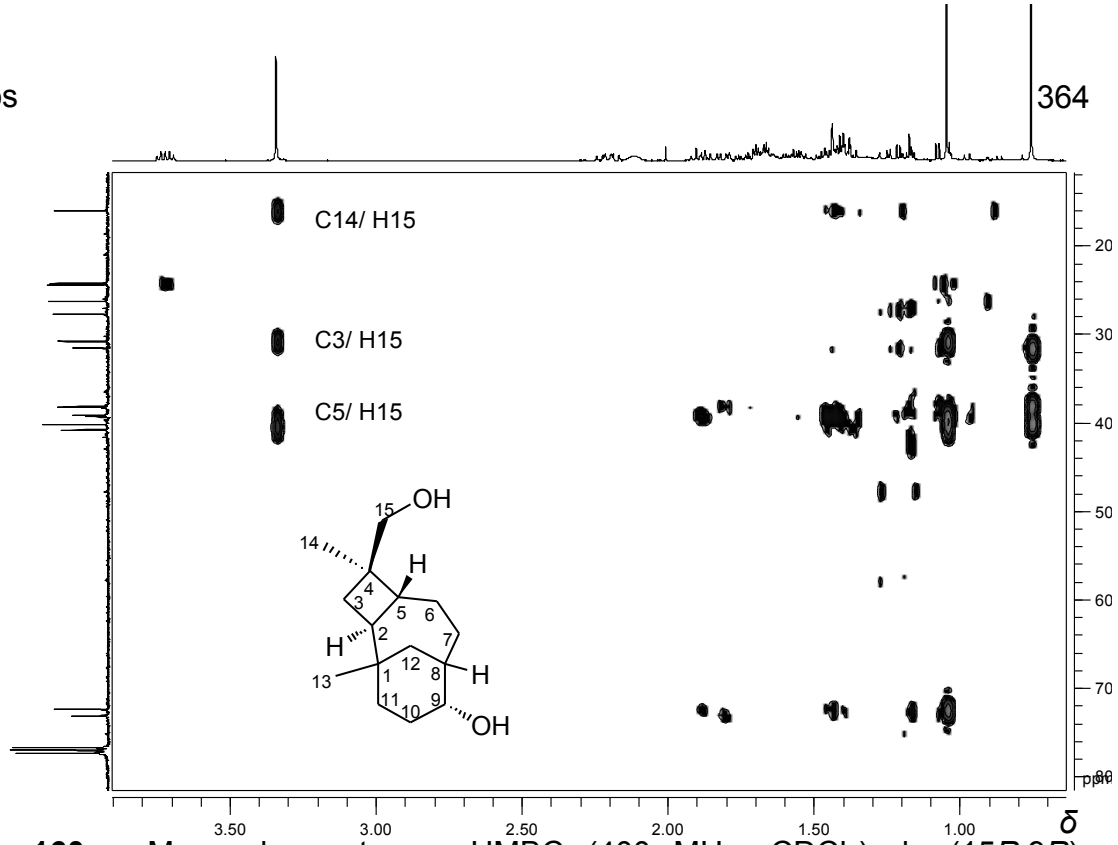


Figura 160 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (**95**).

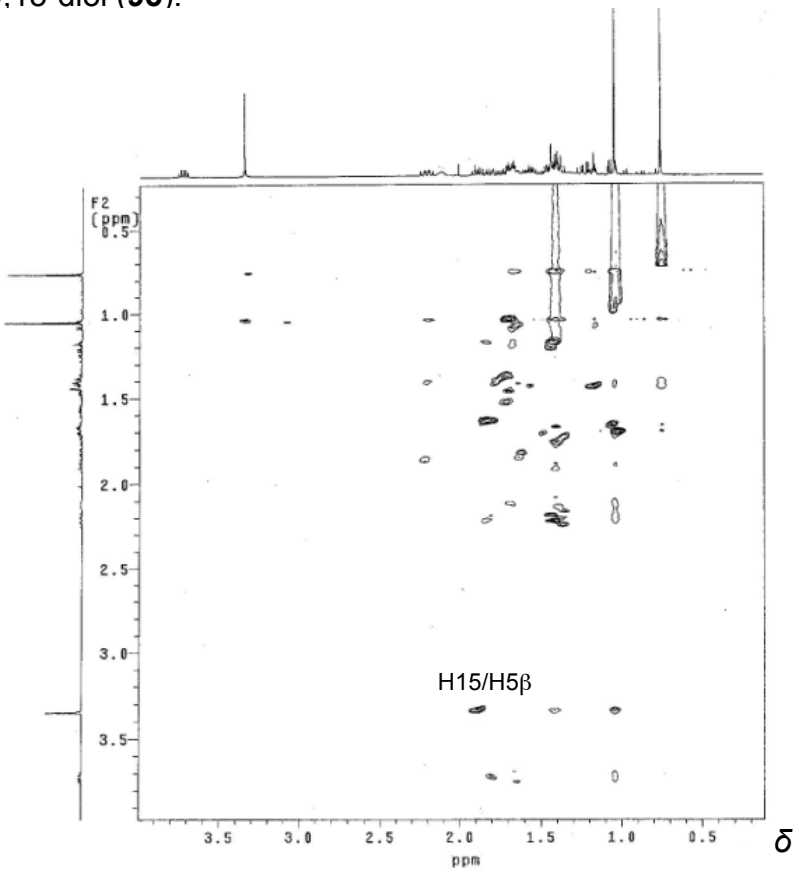


Figura 161 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (**95**).

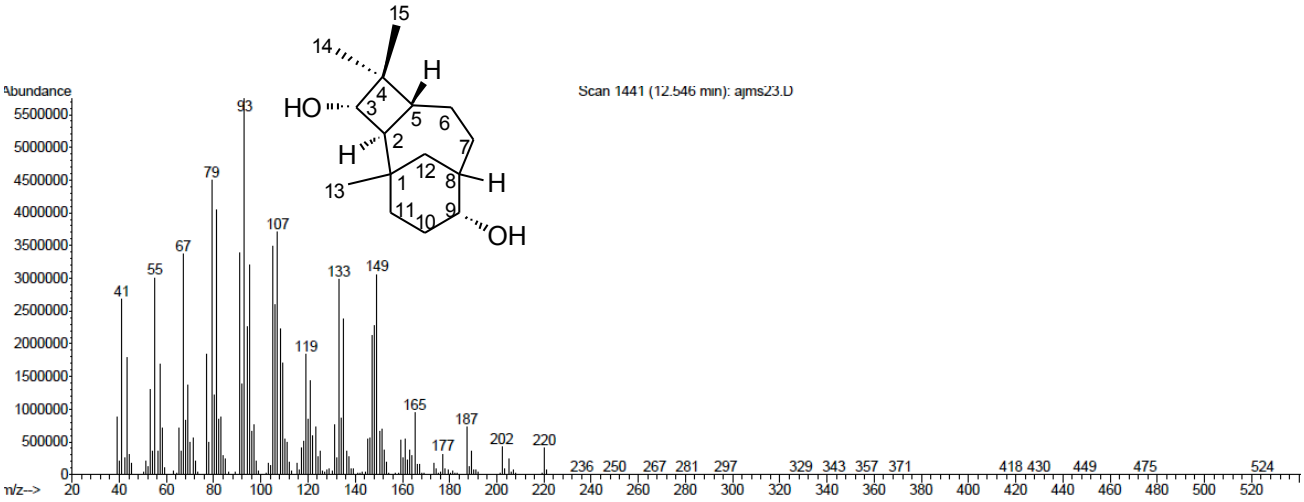


Figura 162 – Espectro de Massas de (15*R*,9*R*)-isocariolano- 9,15-diol (**95**).

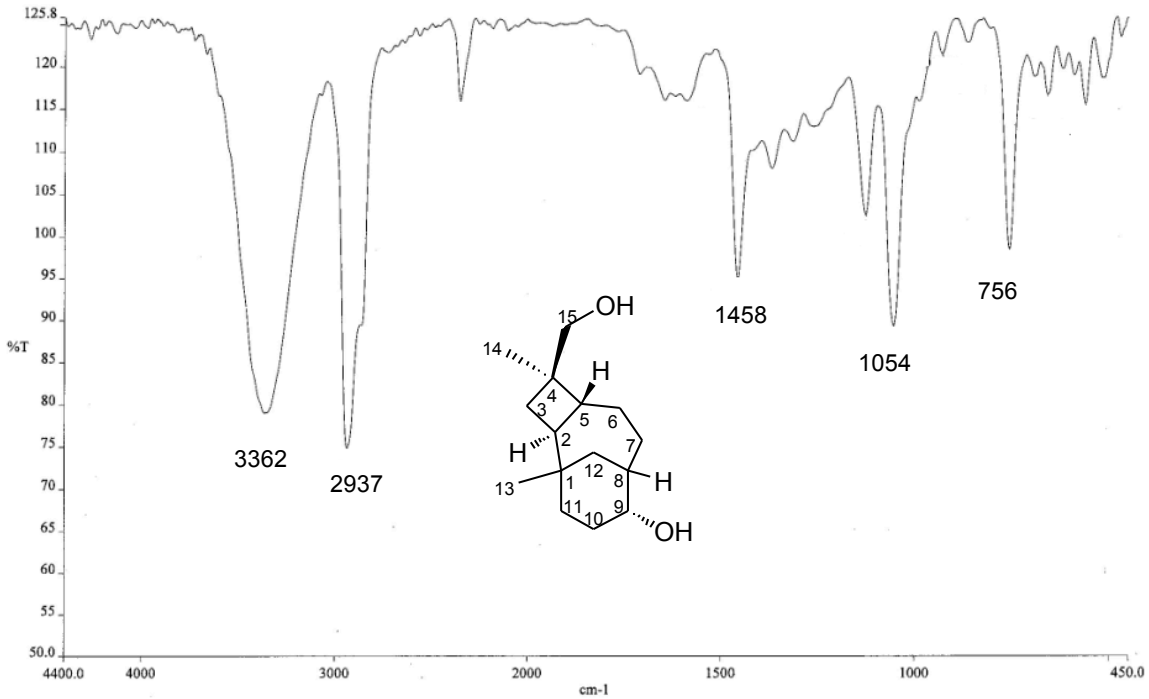


Figura 163 – Espectro de no (3*S*,9*R*)- isocariolano-9, 3-diol (**96**) (KBr).

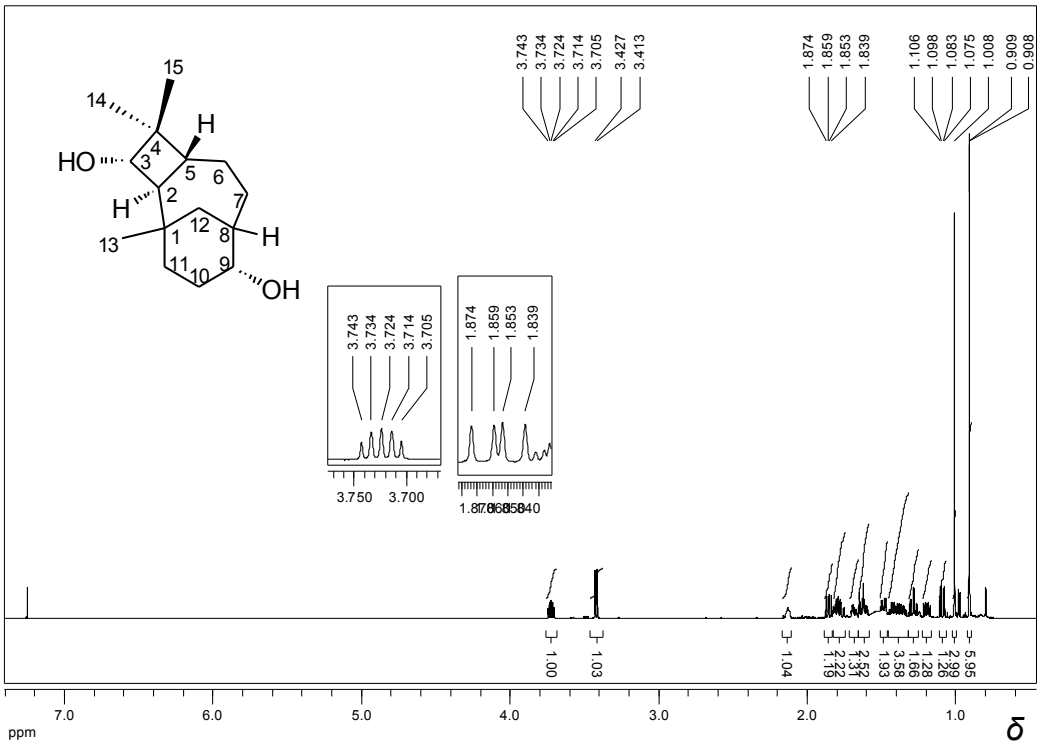


Figura 164 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9,3-diol (**96**).

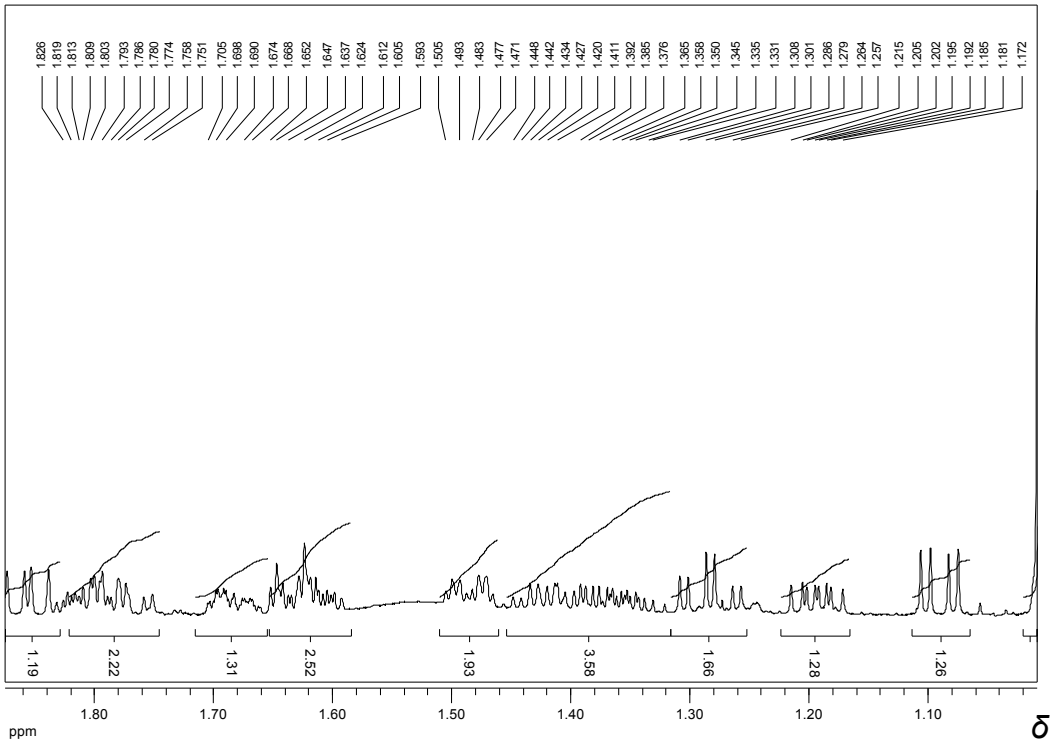


Figura 165 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)- isocariolano-9,3-diol (**96**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

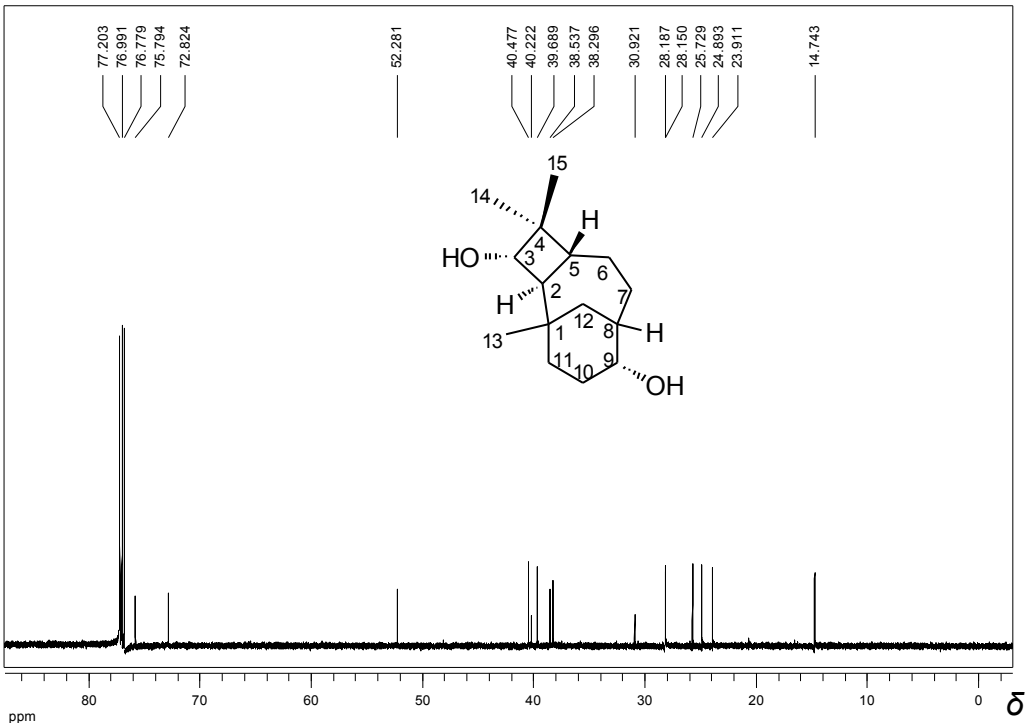


Figura 166 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)- isocariolano-9, 3-diol (**96**).

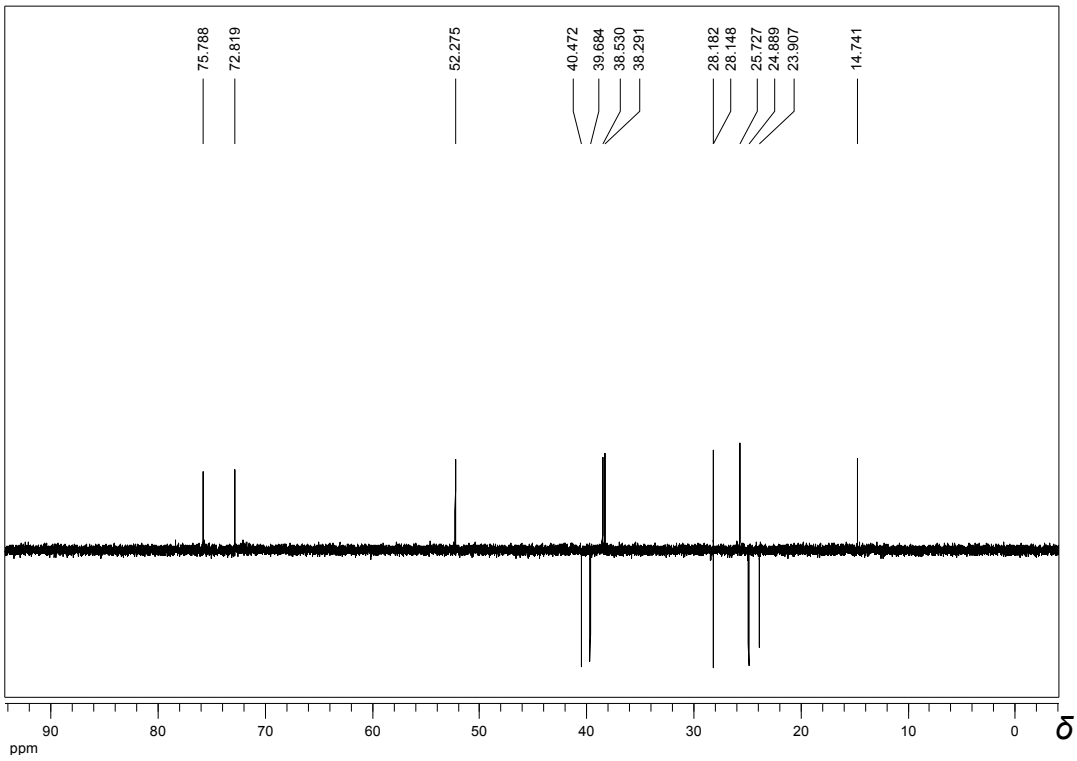


Figura 167 – Subespectro DEPT-135 (150 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)- isocariolano-9, 3-diol (**96**).

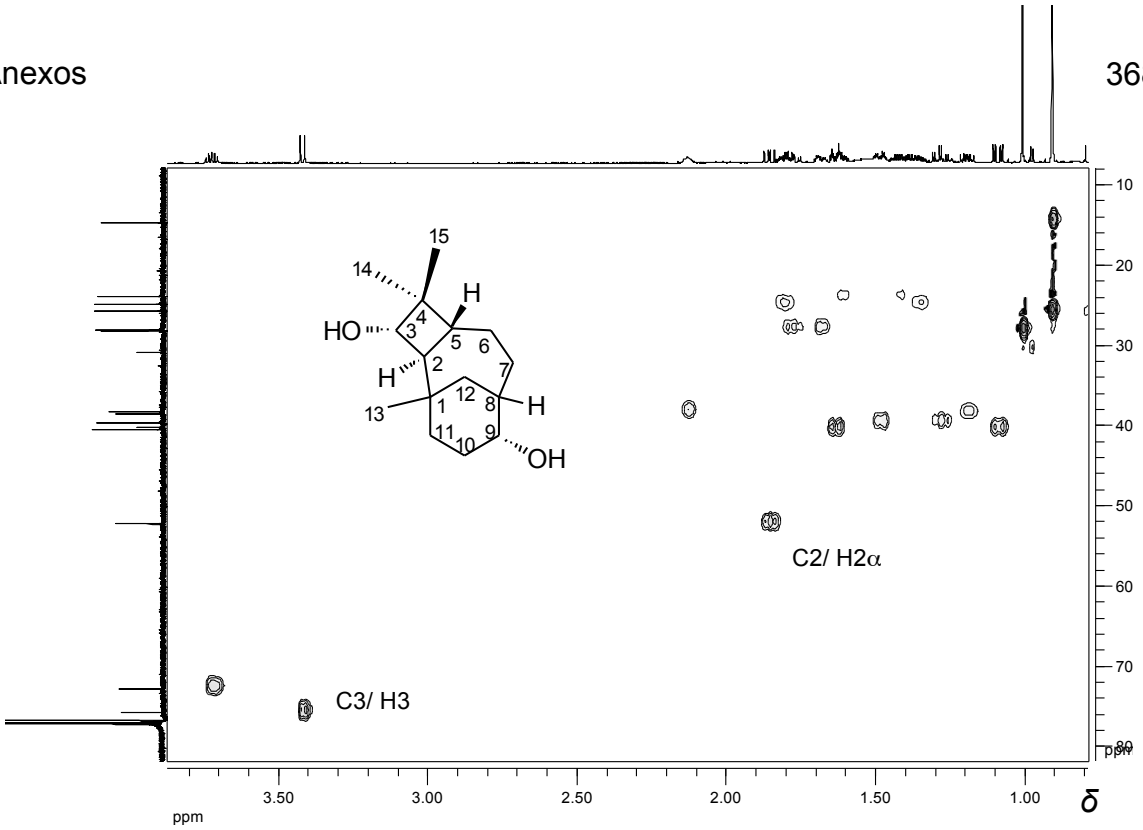


Figura 168 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9,3-diol (**96**).

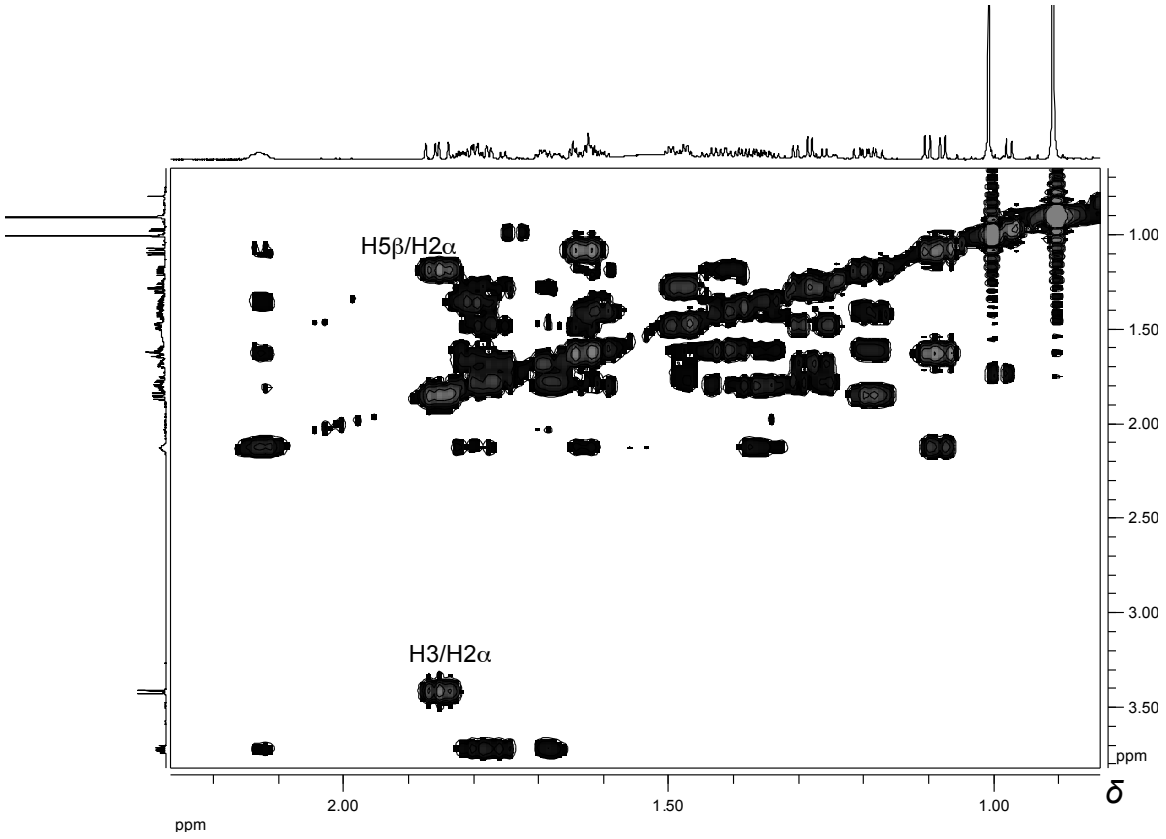


Figura 169 – Mapa de contornos COSY (600 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9,3-diol (**96**).

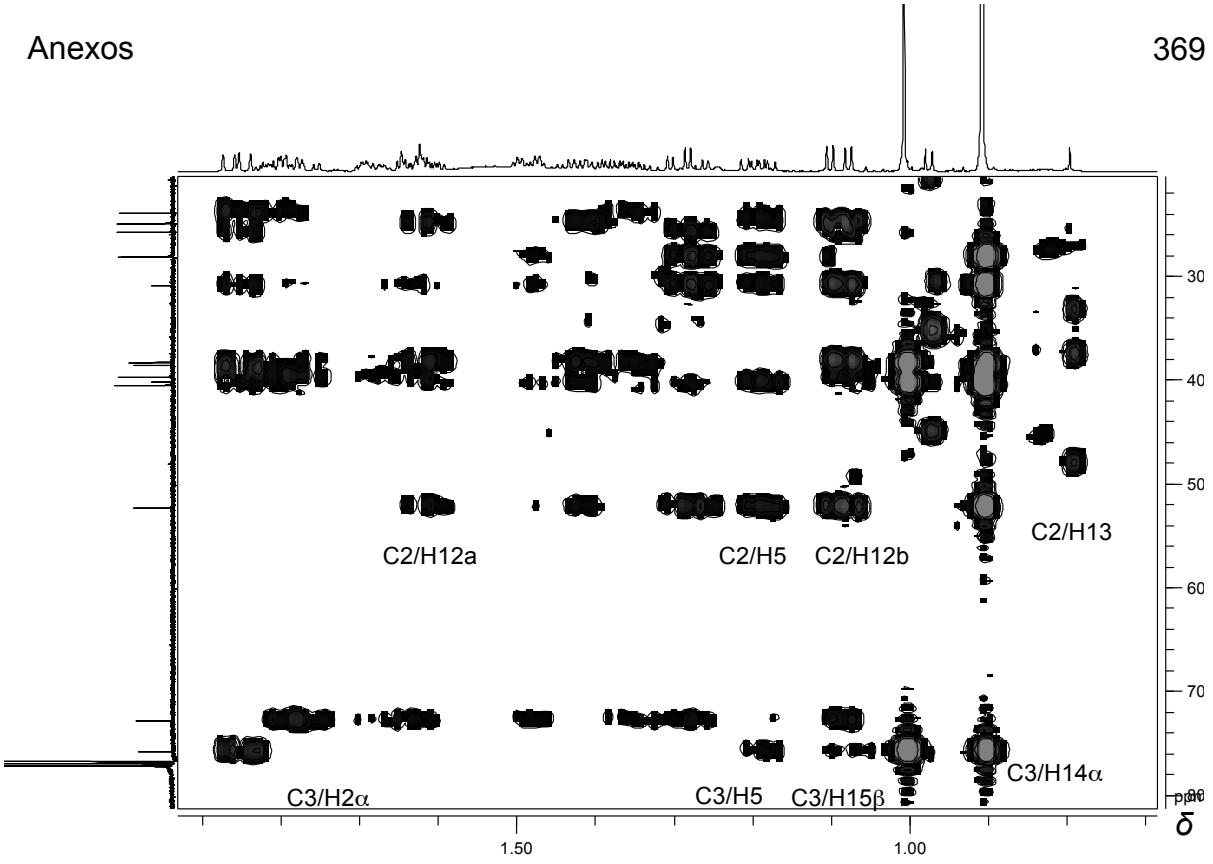


Figura 170 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9,3-diol (**96**).

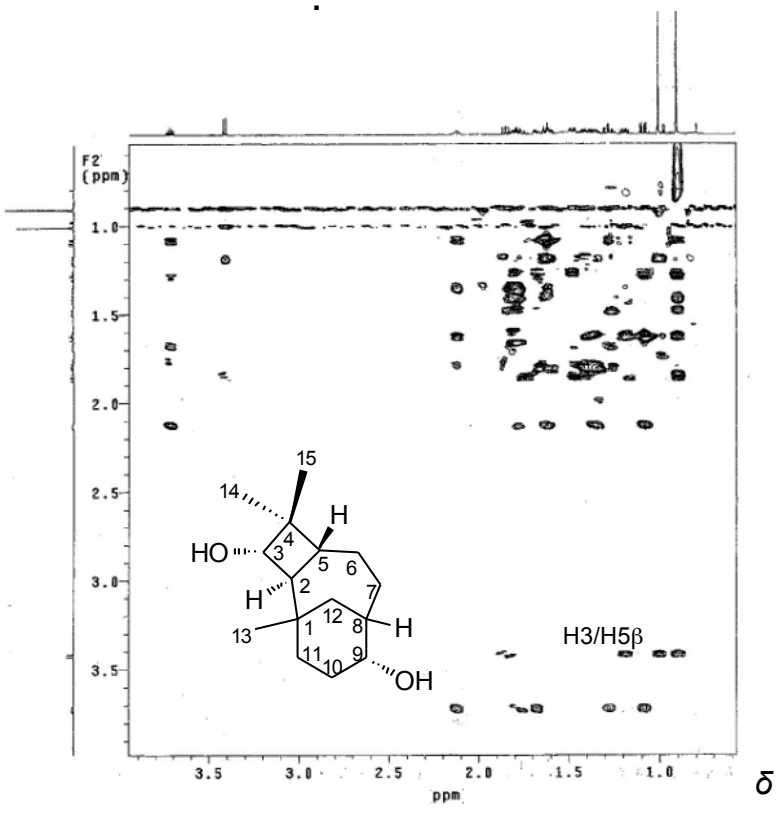


Figura 171 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (3*S*,9*R*)-isocariolano-9,3-diol (**96**).

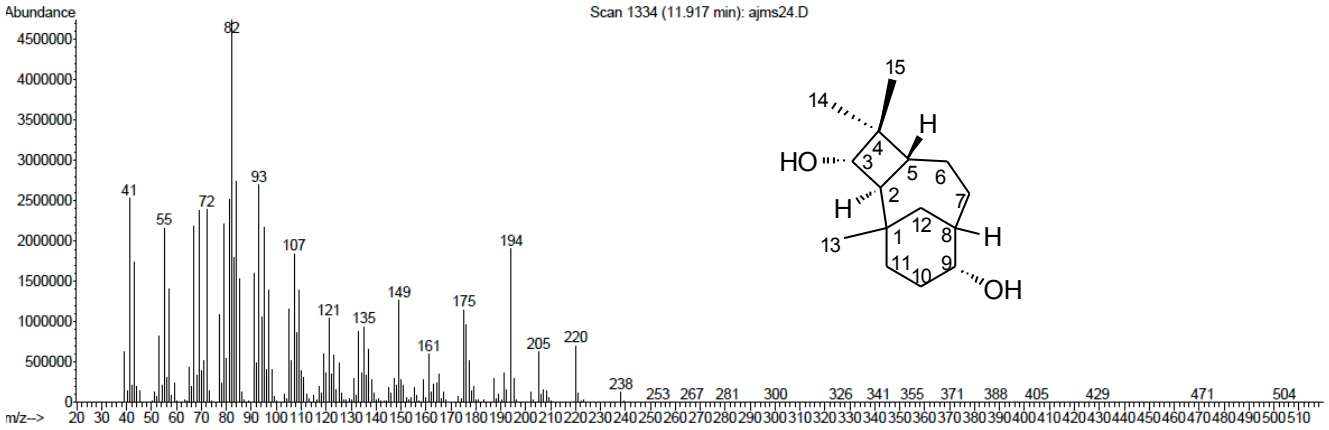


Figura 172 – Espectro de Massas de (3*S*,9*R*)- isocariolano-9, 3-diol (**96**).

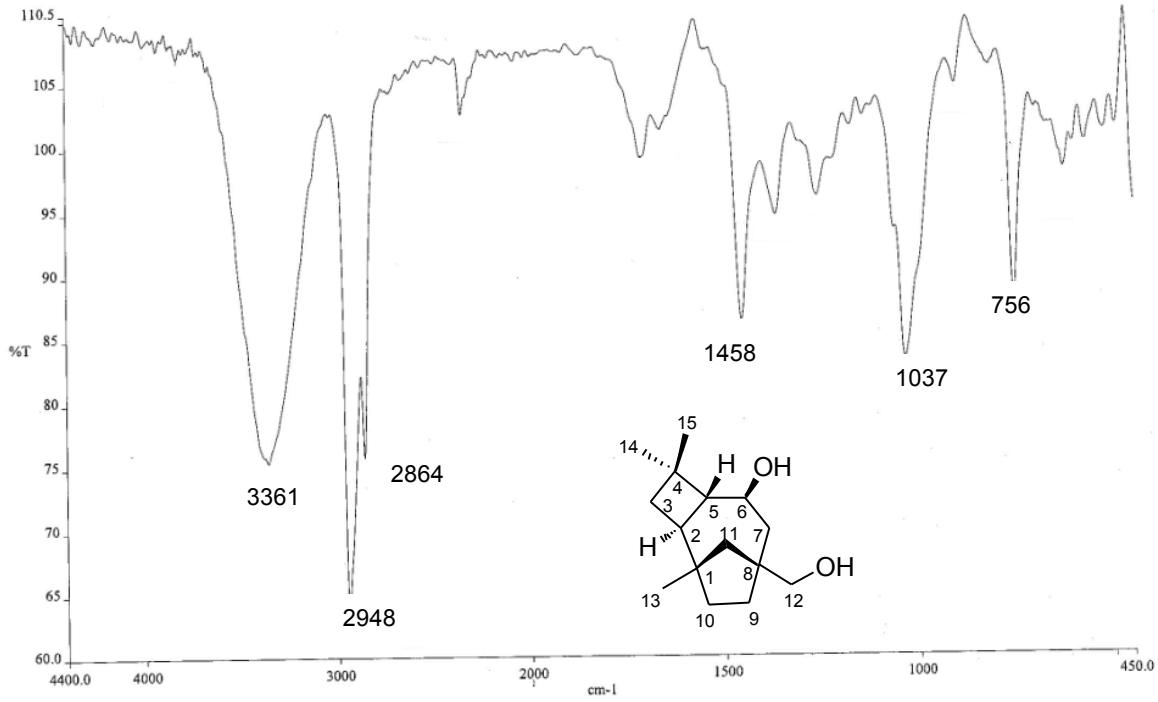


Figura 173 – Espectro no IV de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.0^{2,5}] undeca-6β,12-diol (**97**) (KBr).

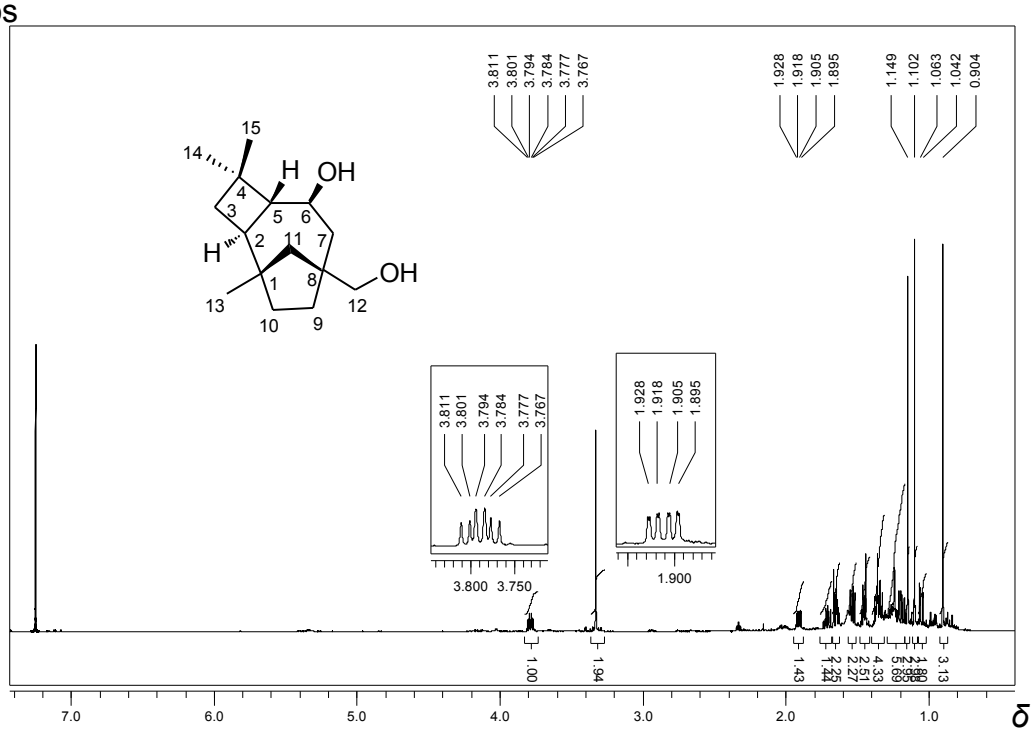


Figura 174 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (**97**).

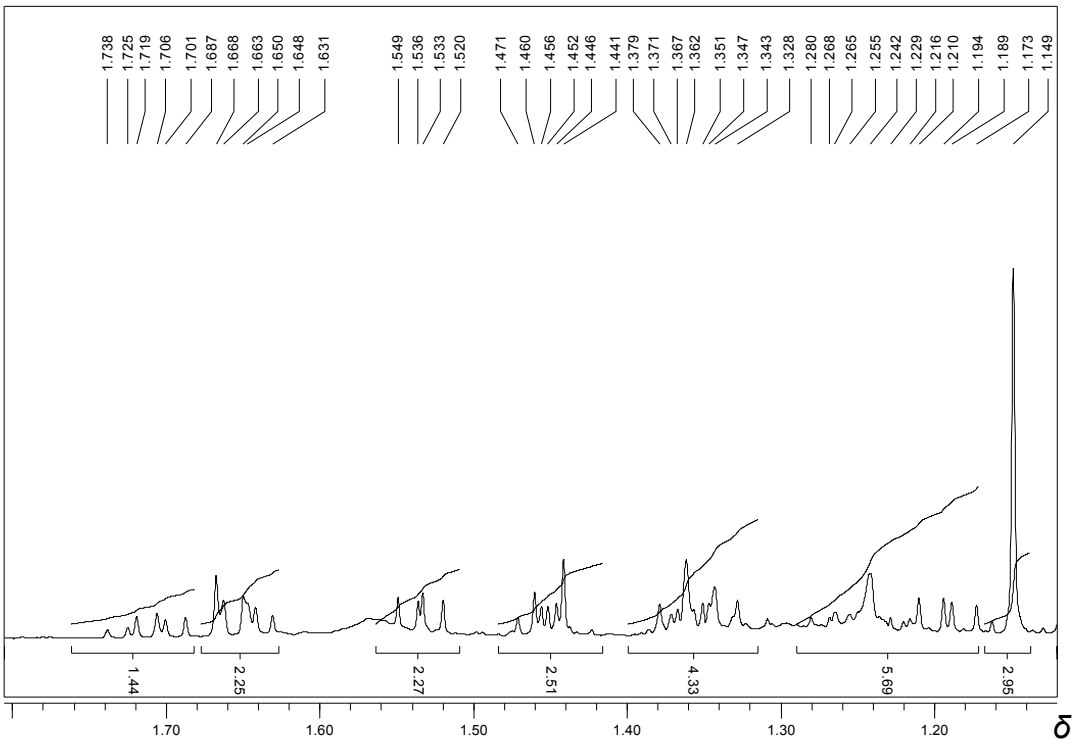


Figura 175 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (**97**). Expansão da região entre $\delta_{H\ 1,0}$ – 2,5.

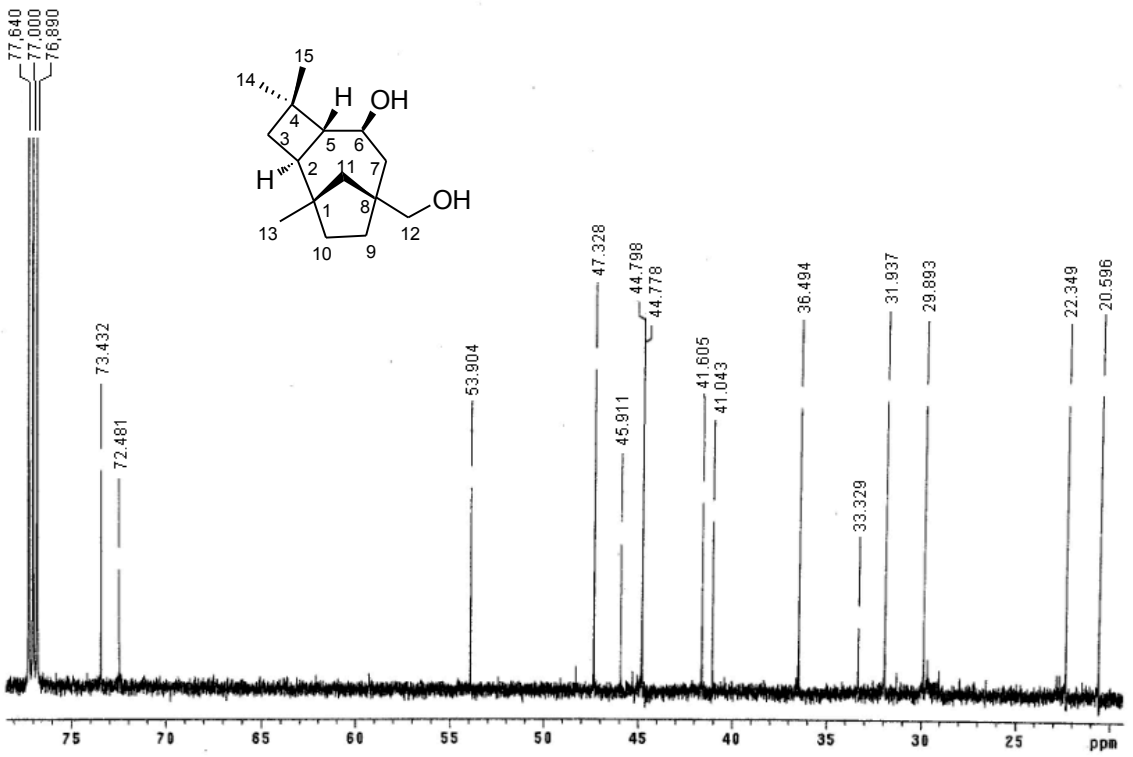


Figura 176 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (**97**).

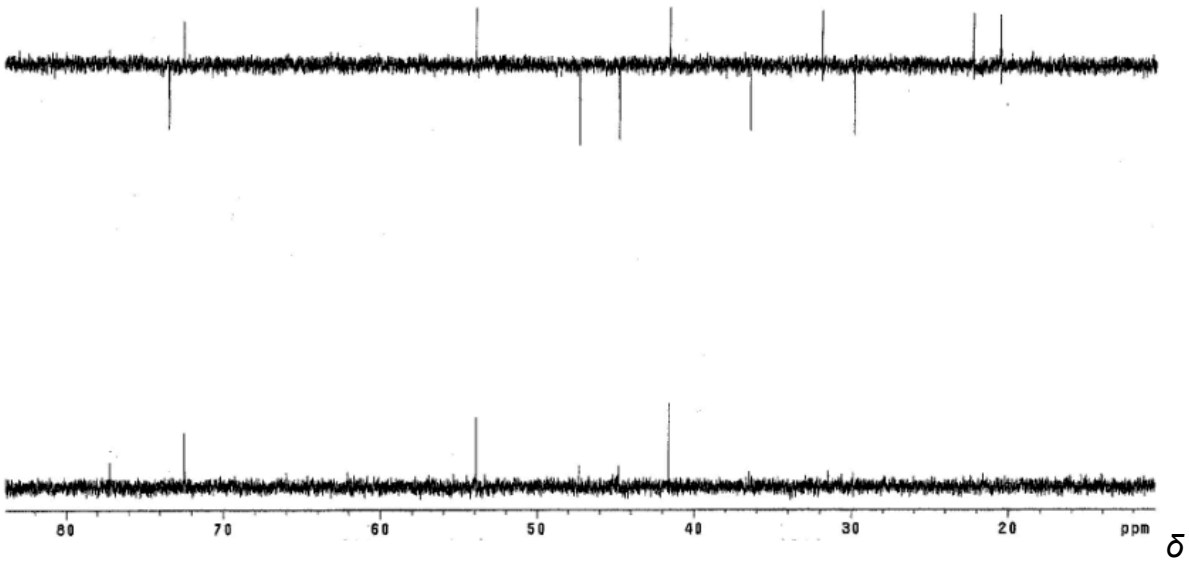


Figura 177 – Subespectro DEPT-135 (150 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (**97**).

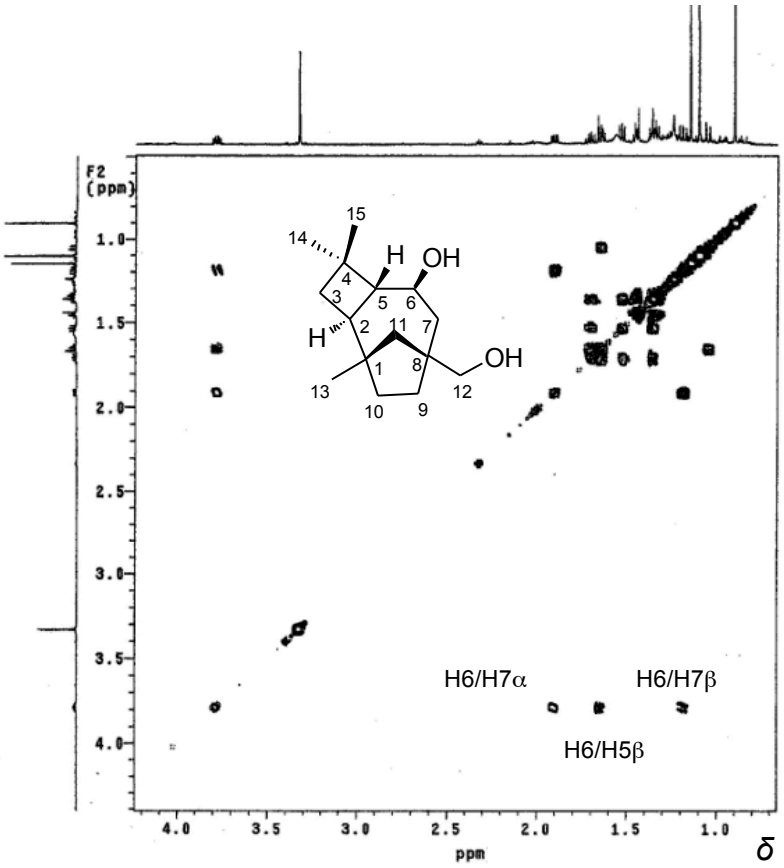


Figura 178 – Mapa de contornos COSY (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (**97**).

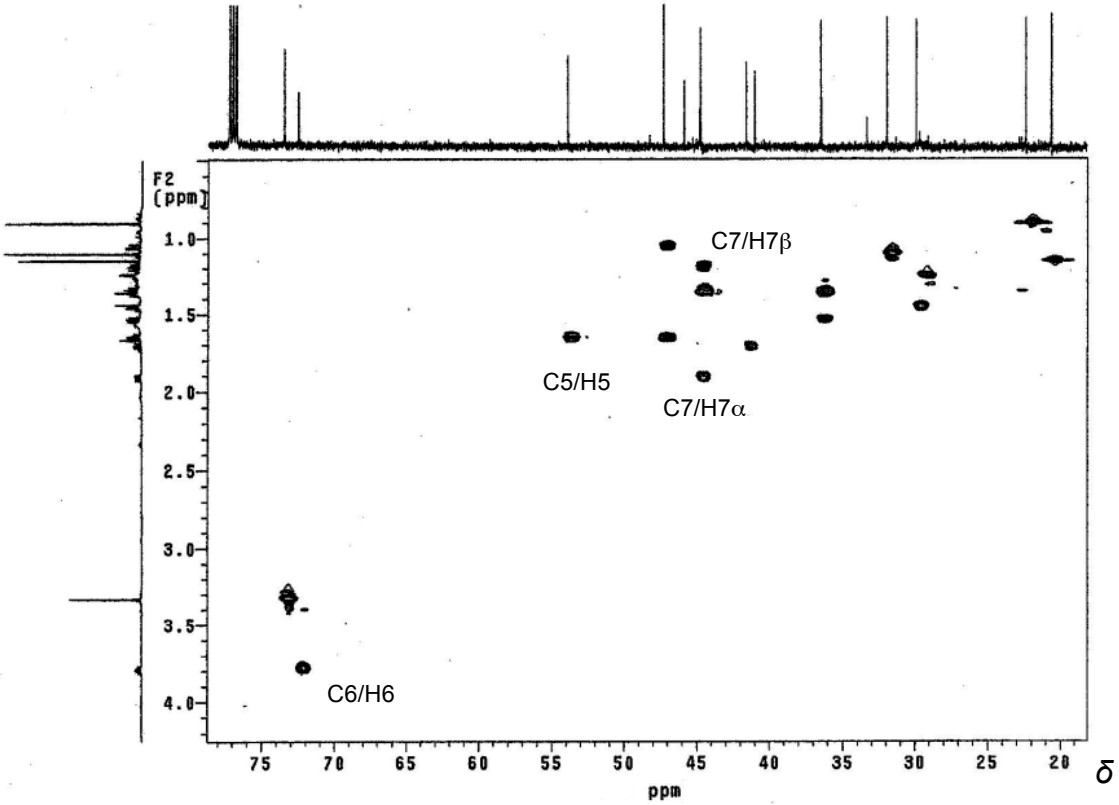


Figura 179 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (**97**).

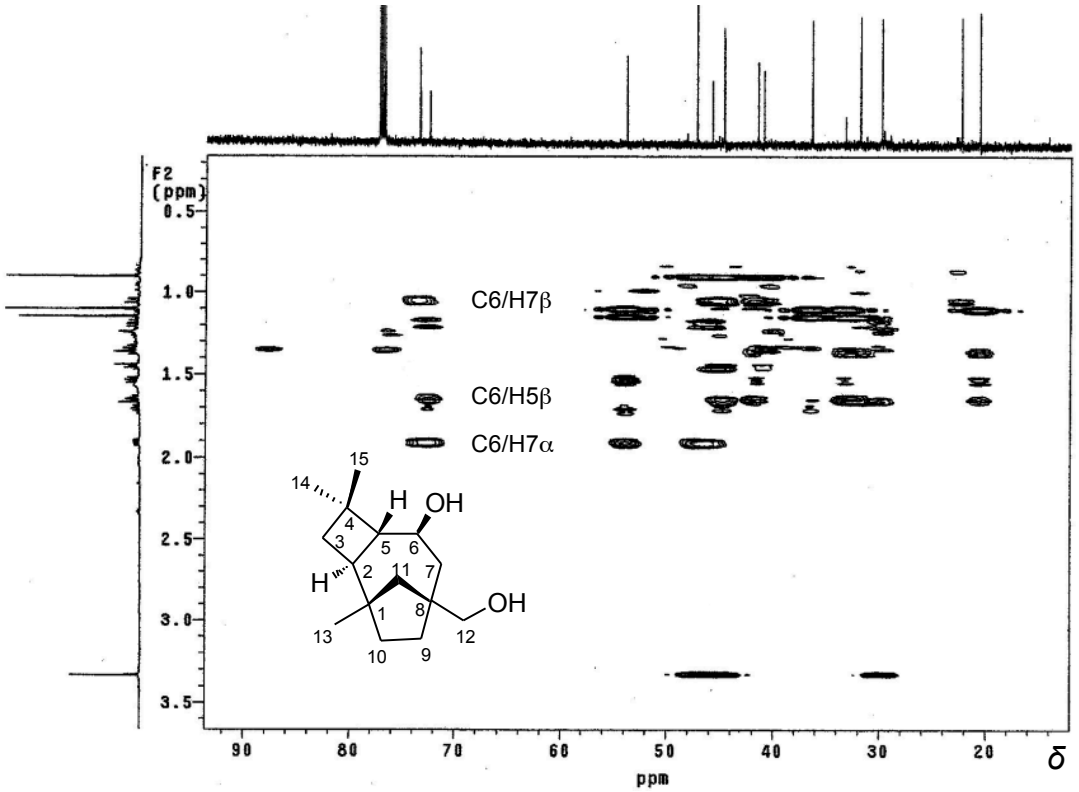


Figura 180 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (**97**).

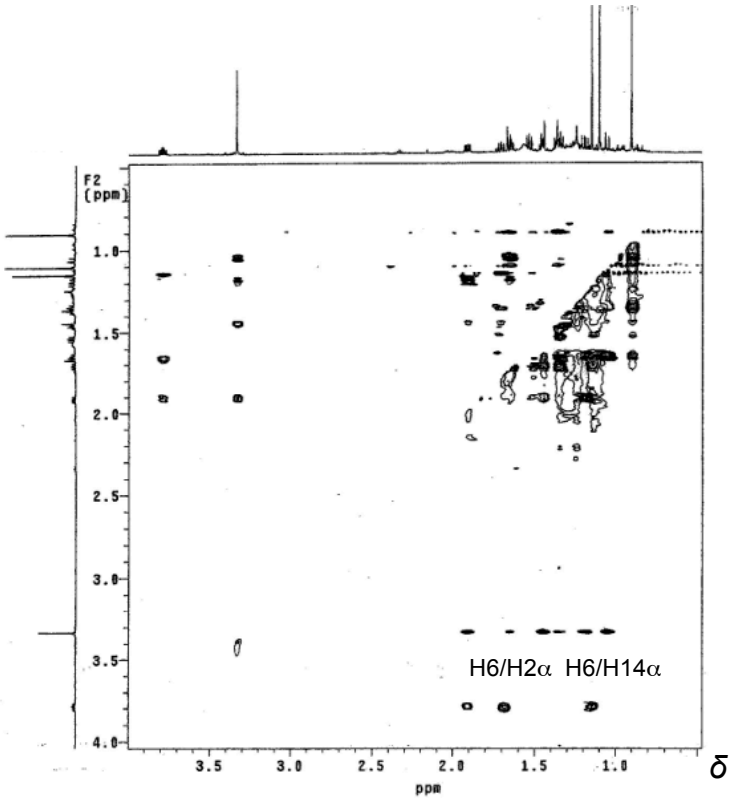


Figura 181 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$] undeca-6β,12-diol (**97**).

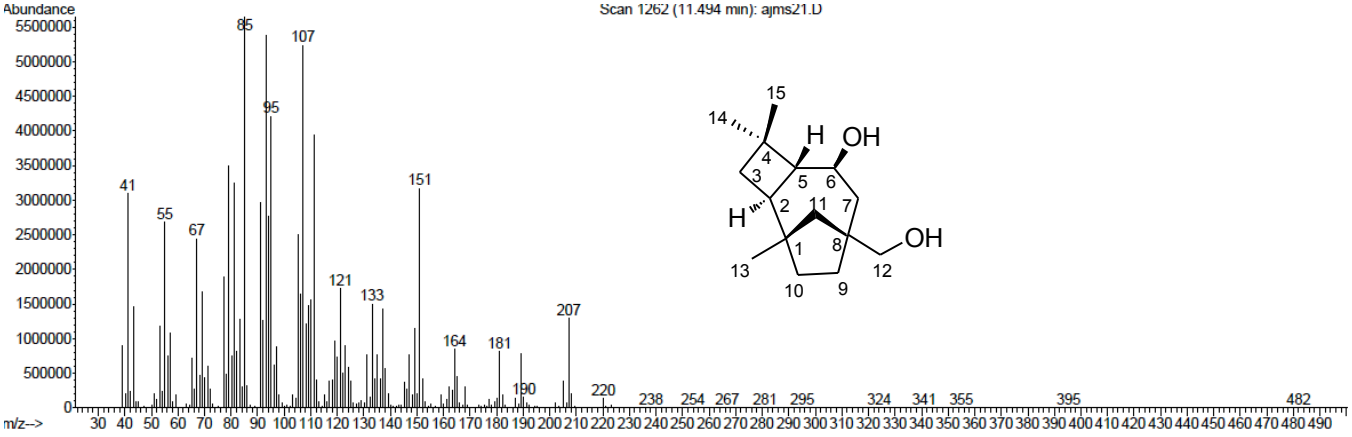


Figura 182 – Espectro de Massas de (1*S*,2*S*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.0^{2,5}] undeca-6β,12-diol (**97**).

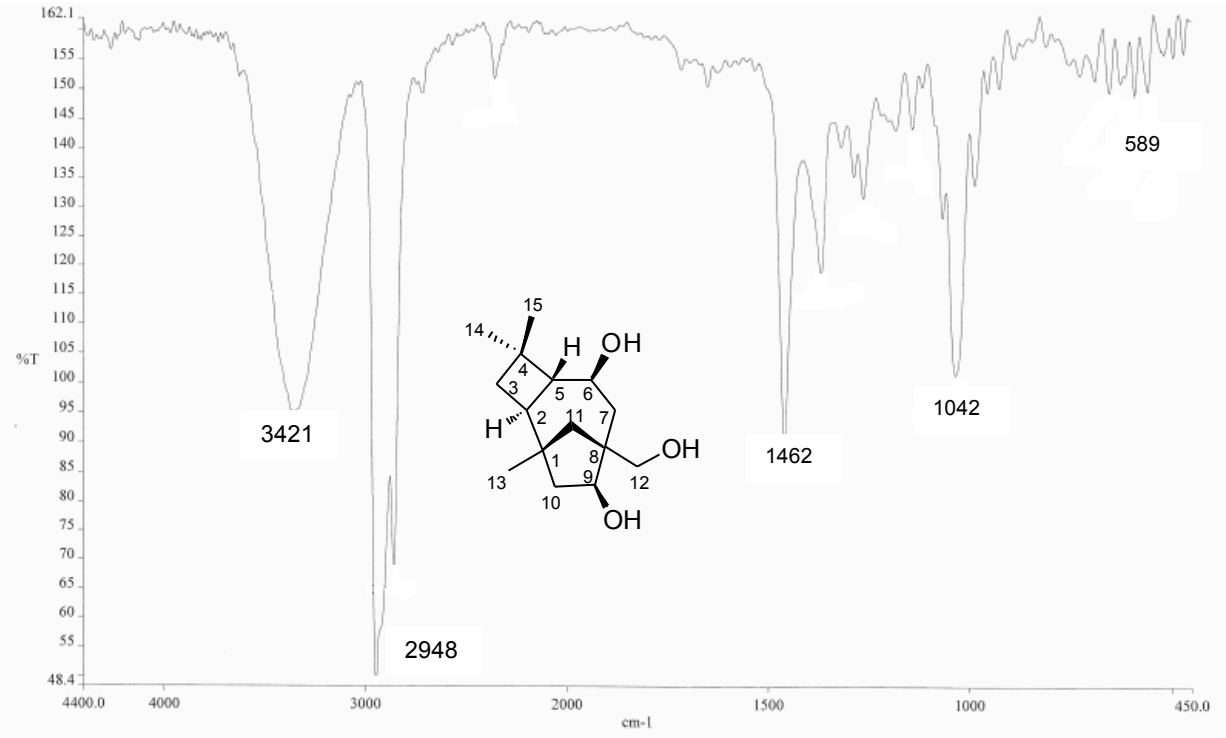


Figura 183 – Espectro no IV de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.0^{2,5}]undeca-6β,9β,12-triol (**98**) (KBr).

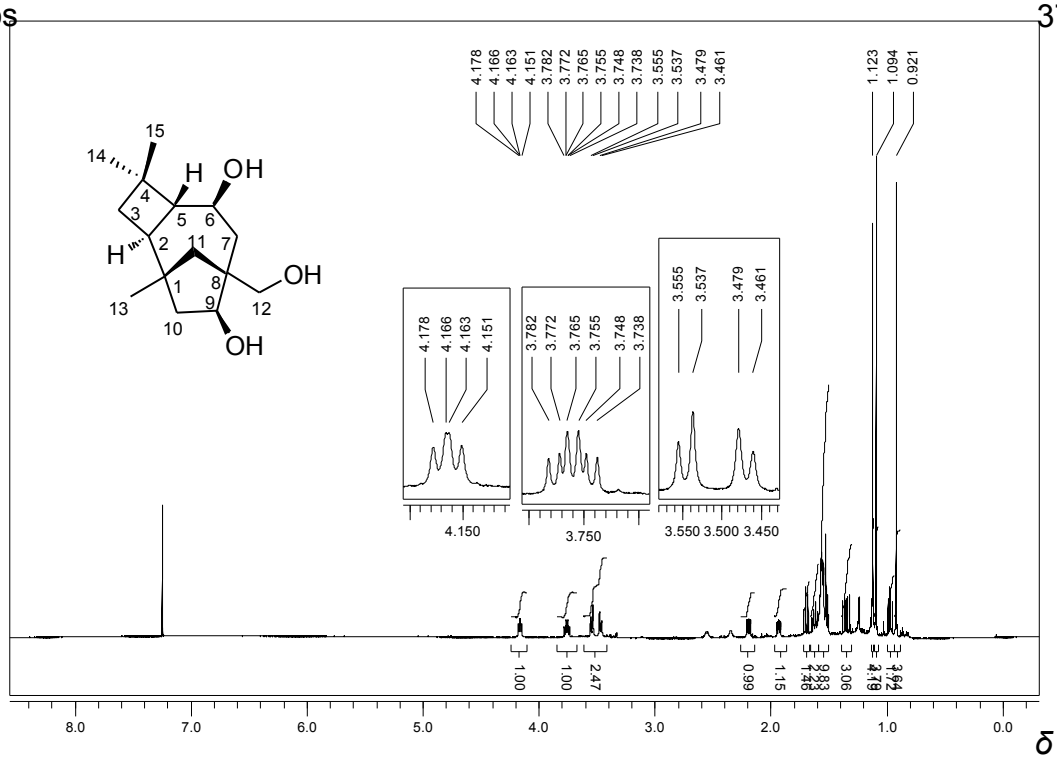


Figura 184 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (**98**).

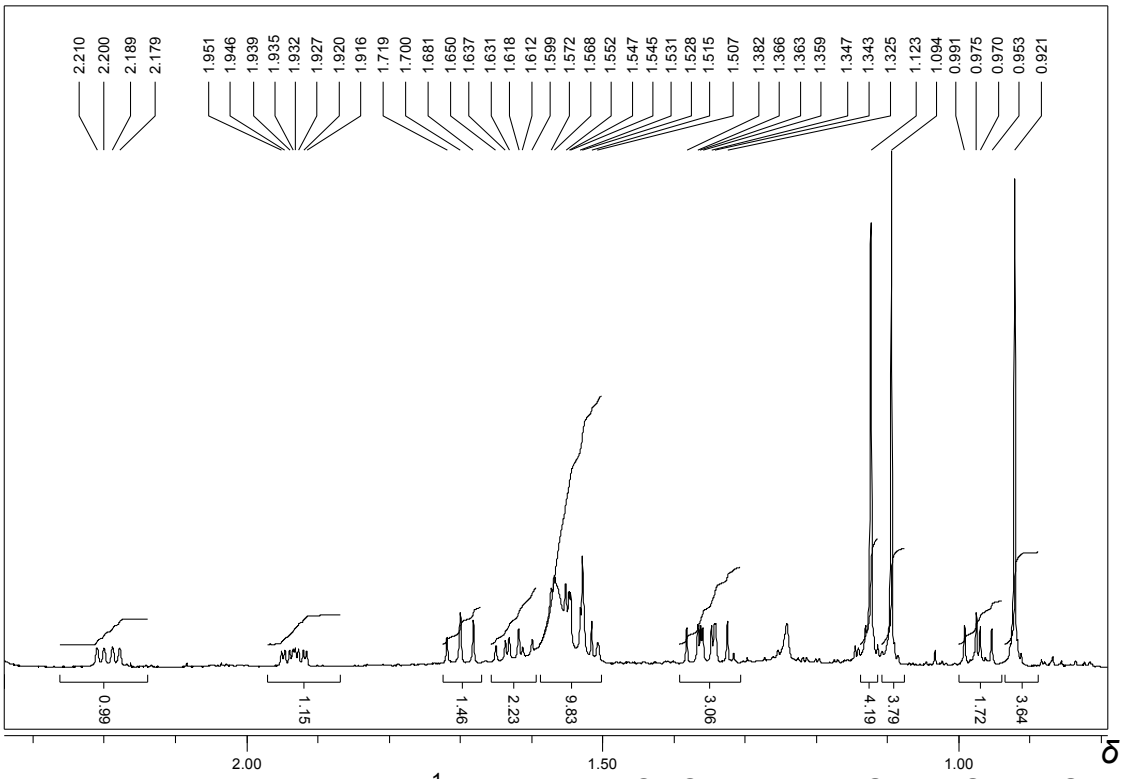


Figura 185 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (**98**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

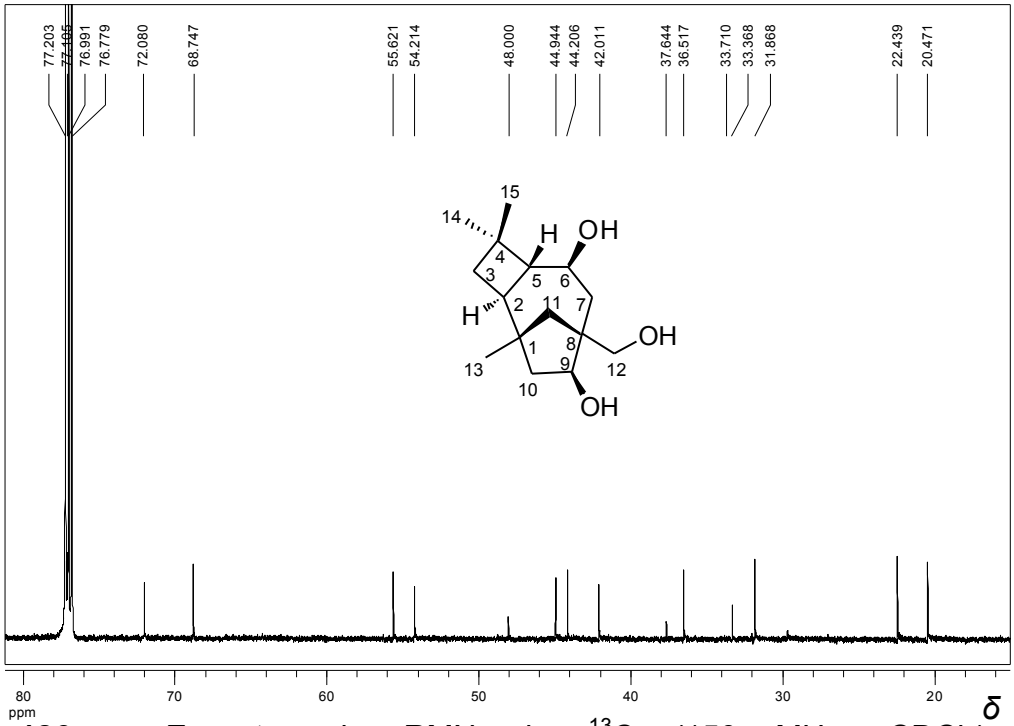


Figura 186 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.0^{2,5}]undeca-6β,9β,12-triol (**98**).

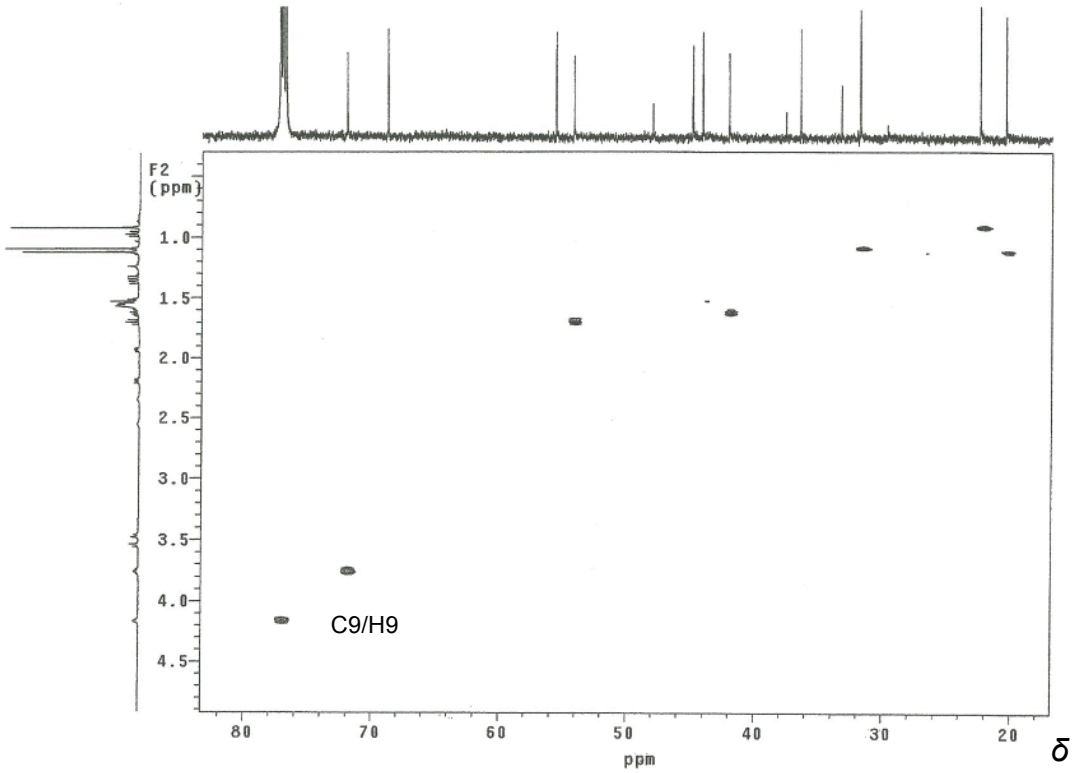


Figura 187 – Mapa de contornos HSQC-DEPT – fase positiva (CH_3 e CH) (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.0^{2,5}] undeca-6β,9β,12-triol (**98**).

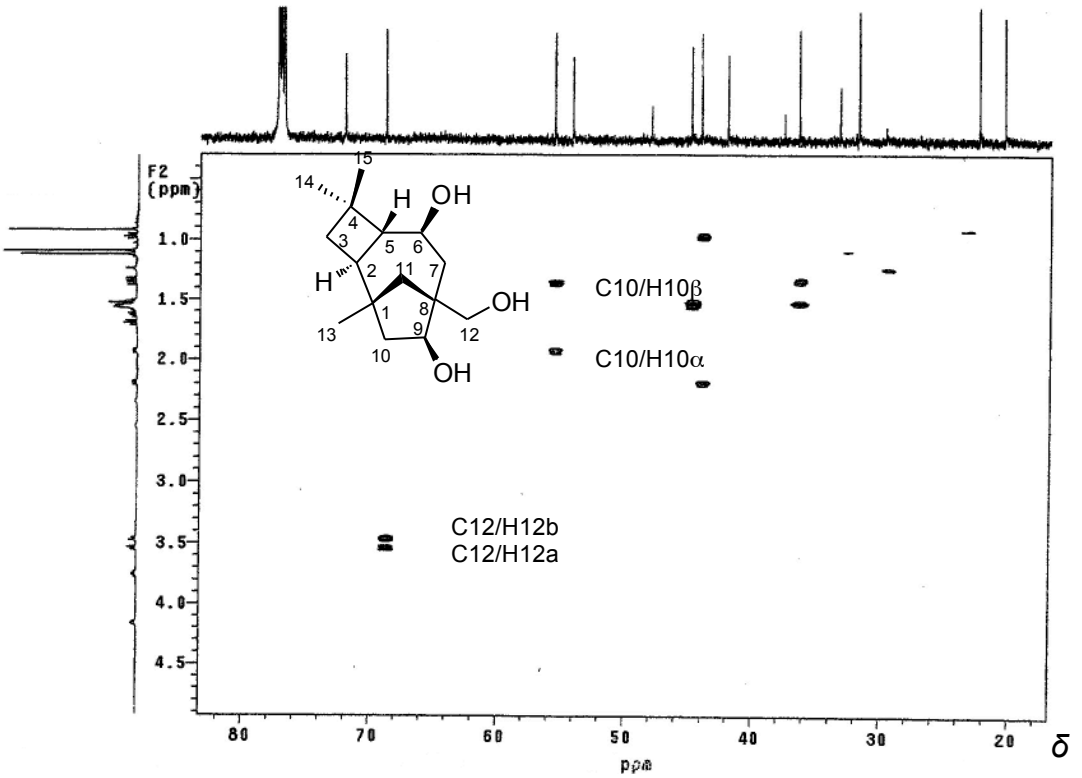


Figura 188 – Mapa de contornos HSQC-DEPT – fase negativa (CH_2) (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (**98**).

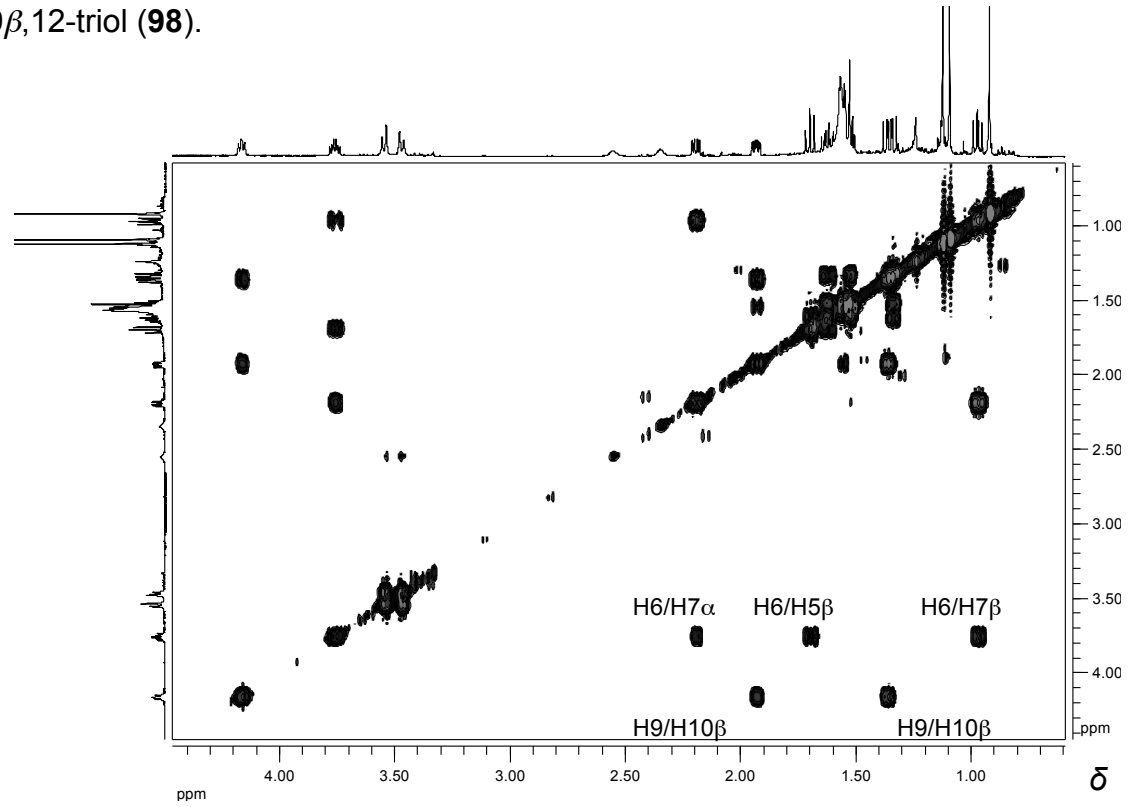


Figura 189 – Mapa de contornos COSY (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (**98**).

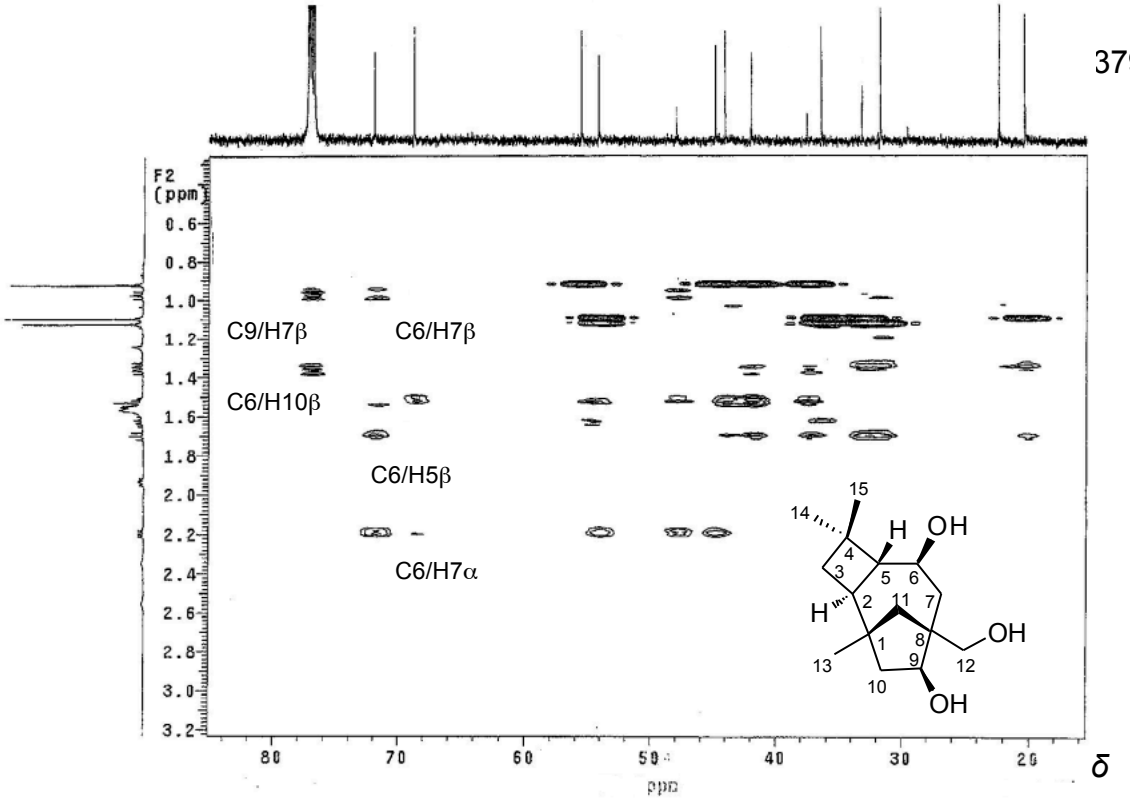


Figura 190 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*, 6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4.4.8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β.9β.12-triol (**98**).

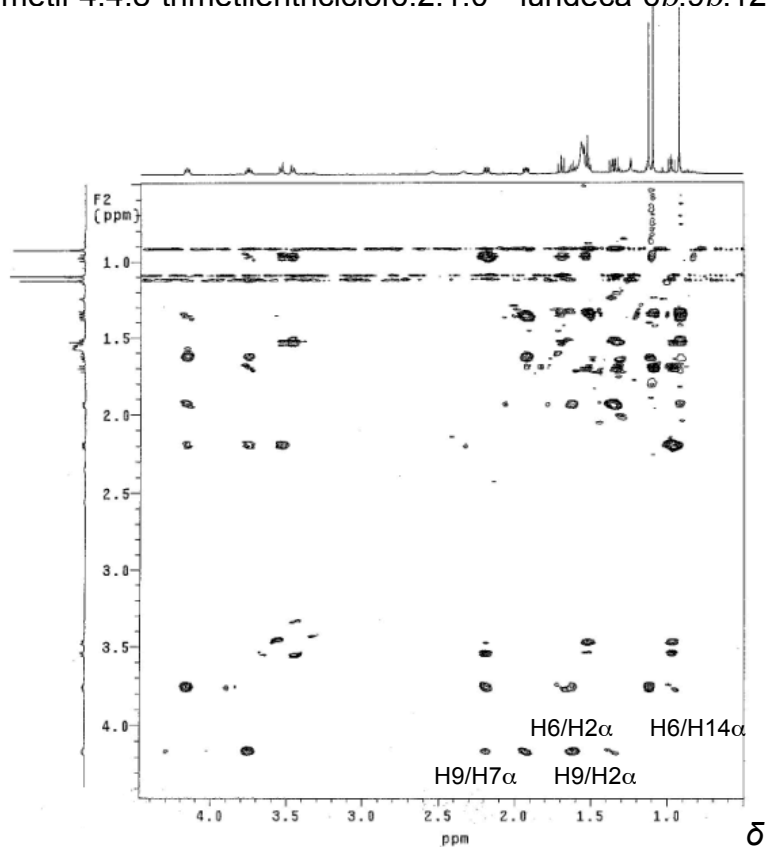


Figura 191 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,5*R*, 6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,9β,12-triol (**98**).

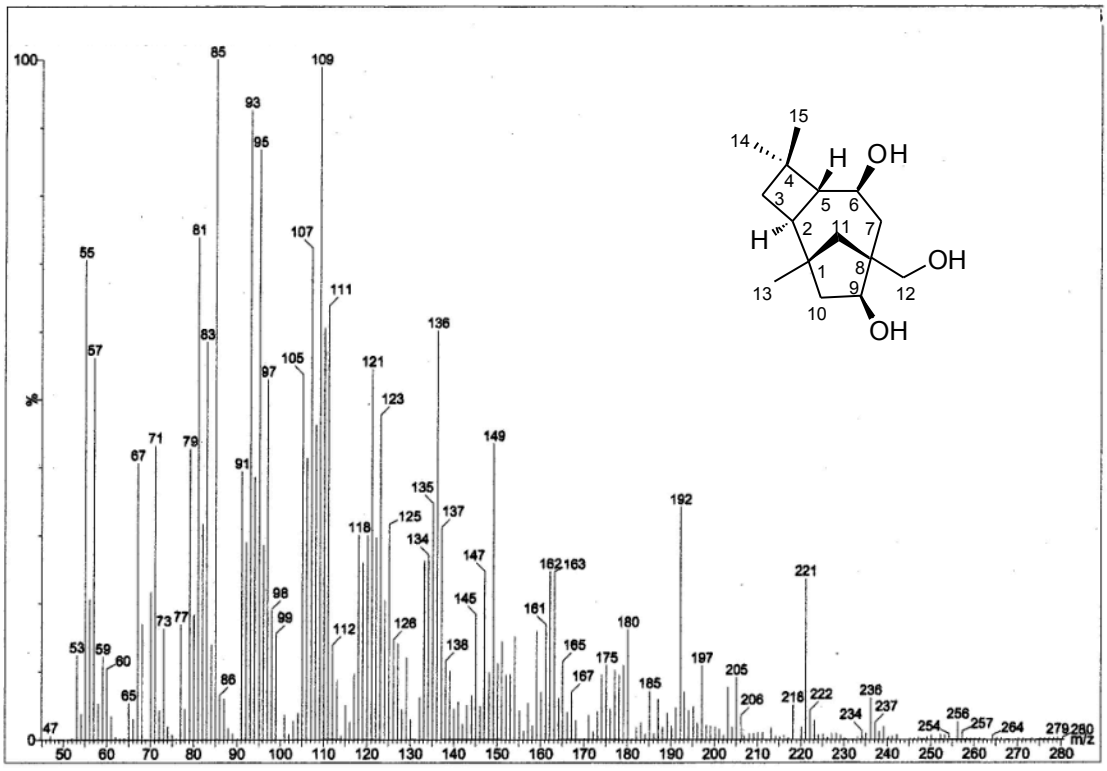


Figura 192 – Espectro de Massas de (1*R*,2*S*,5*R*,6*S*,8*R*,9*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undeca-6β,9β,12-triol (**98**).

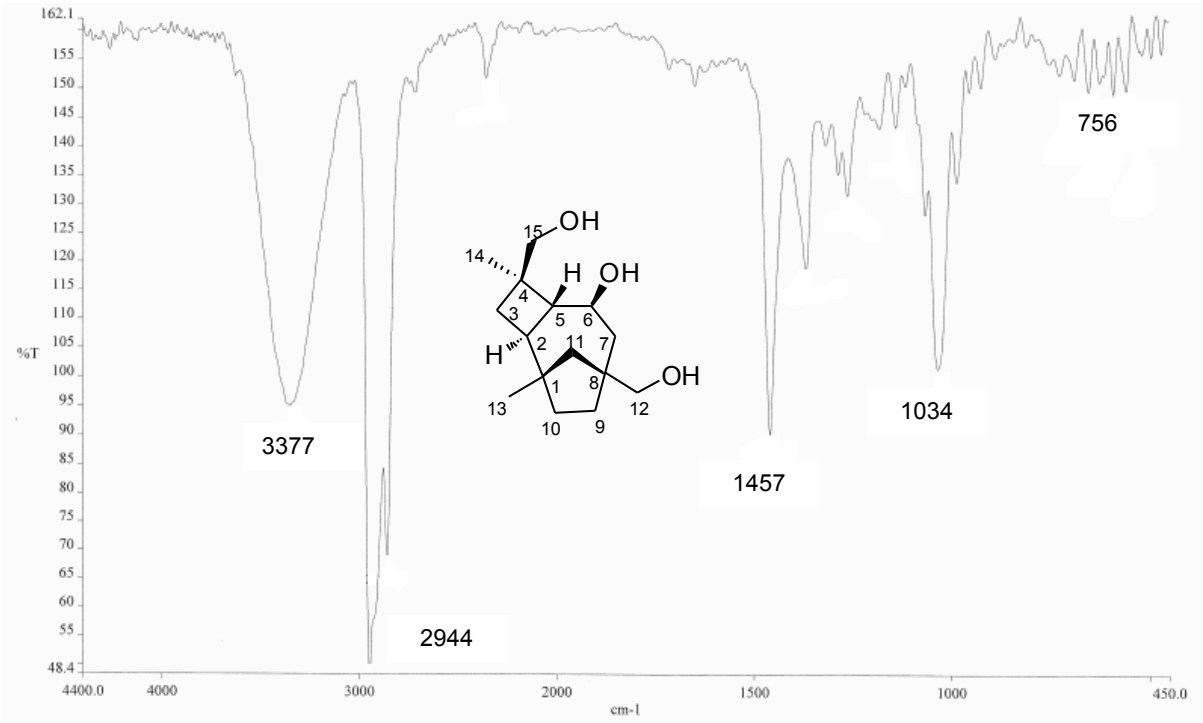


Figura 193 – Espectro no IV de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undeca-6β,15,12-triol (**99**) (KBr).

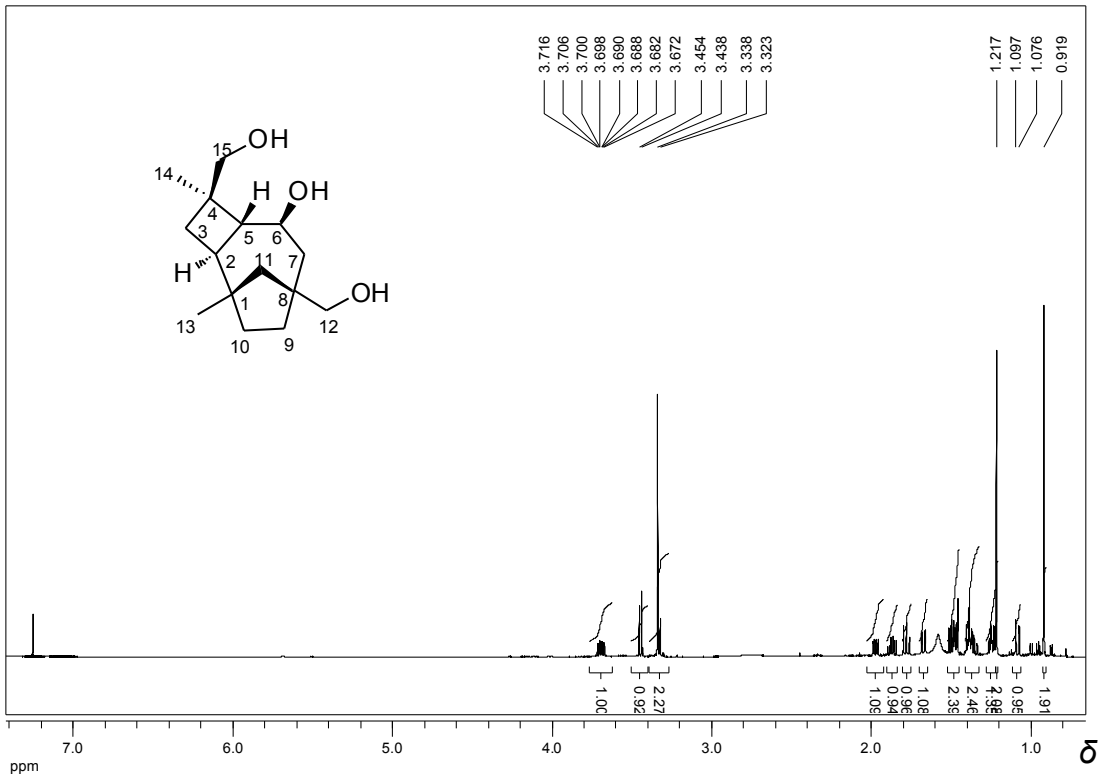


Figura 194 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (**99**).

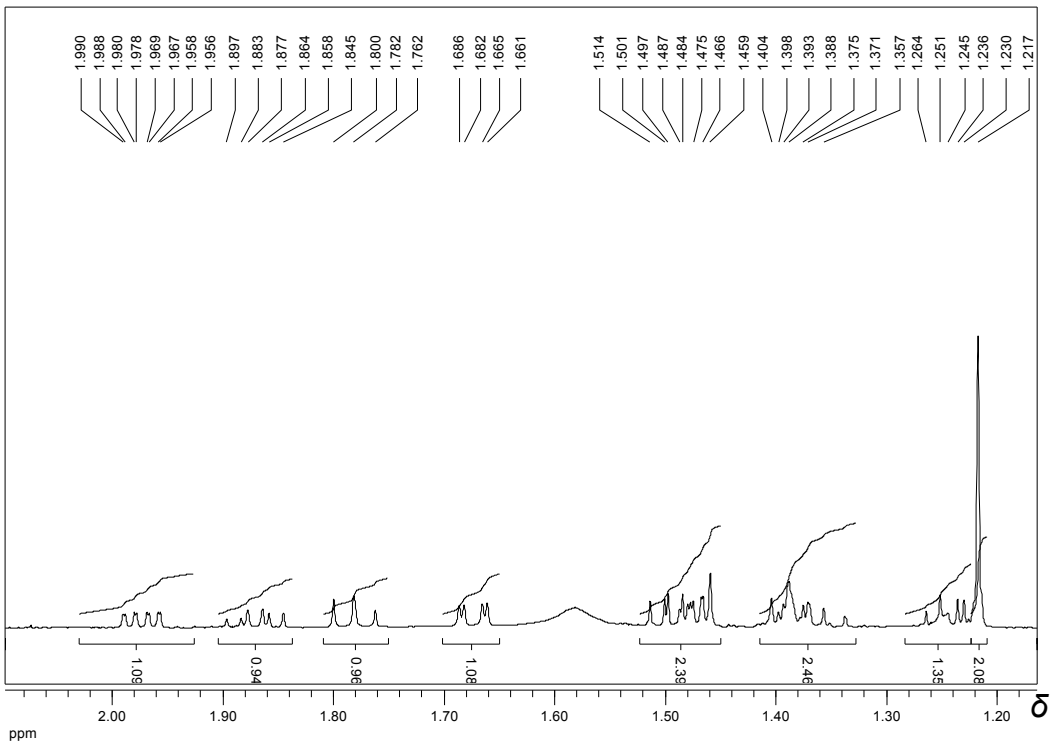


Figura 195 – Espectro de RMN de ^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (**99**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

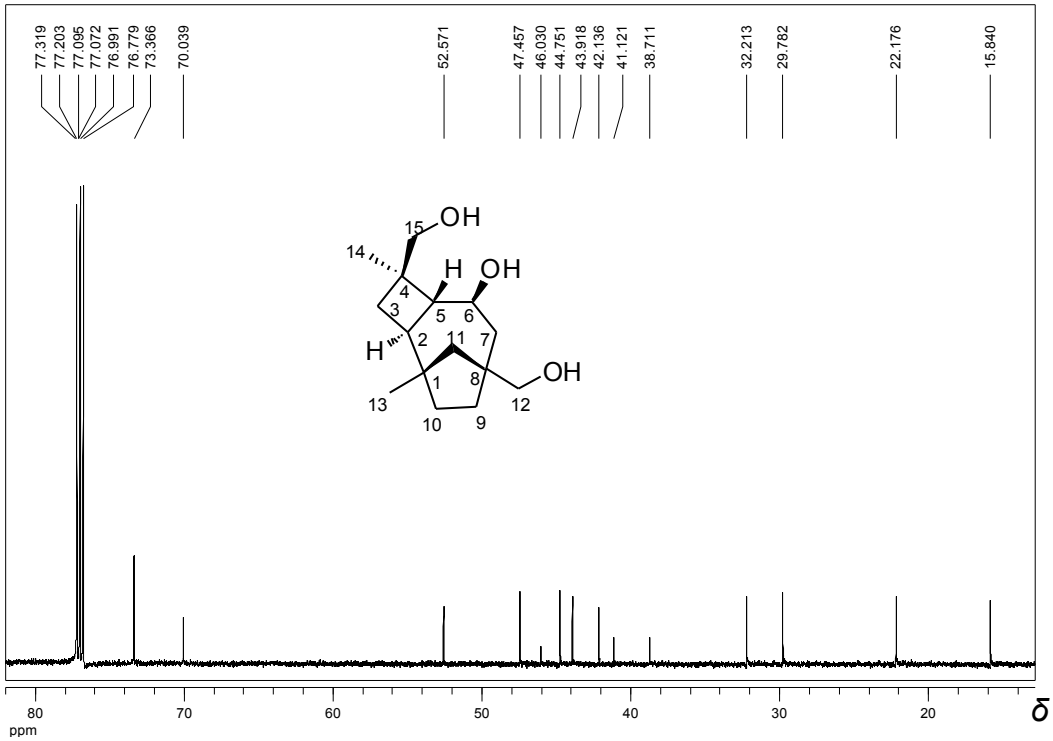


Figura 196 – Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (**99**).

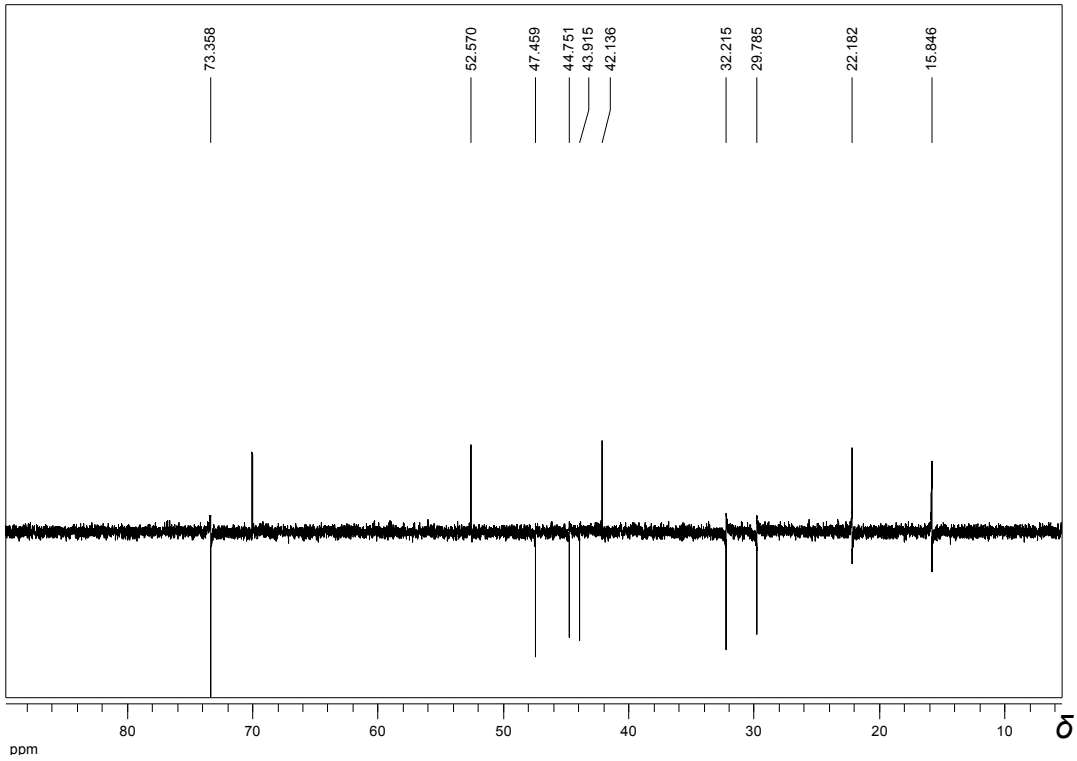


Figura 197 – Subespectro DEPT-135 (150 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (**99**).

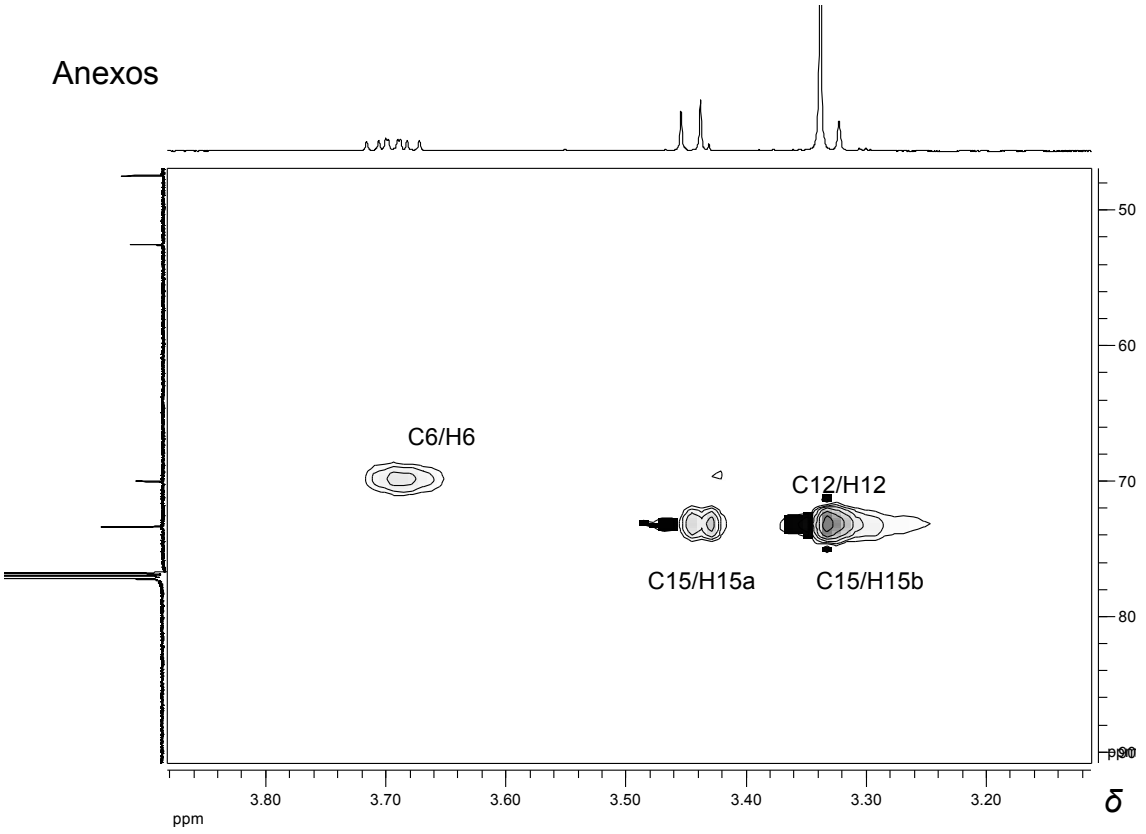


Figura 198 – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) de *R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (**99**).

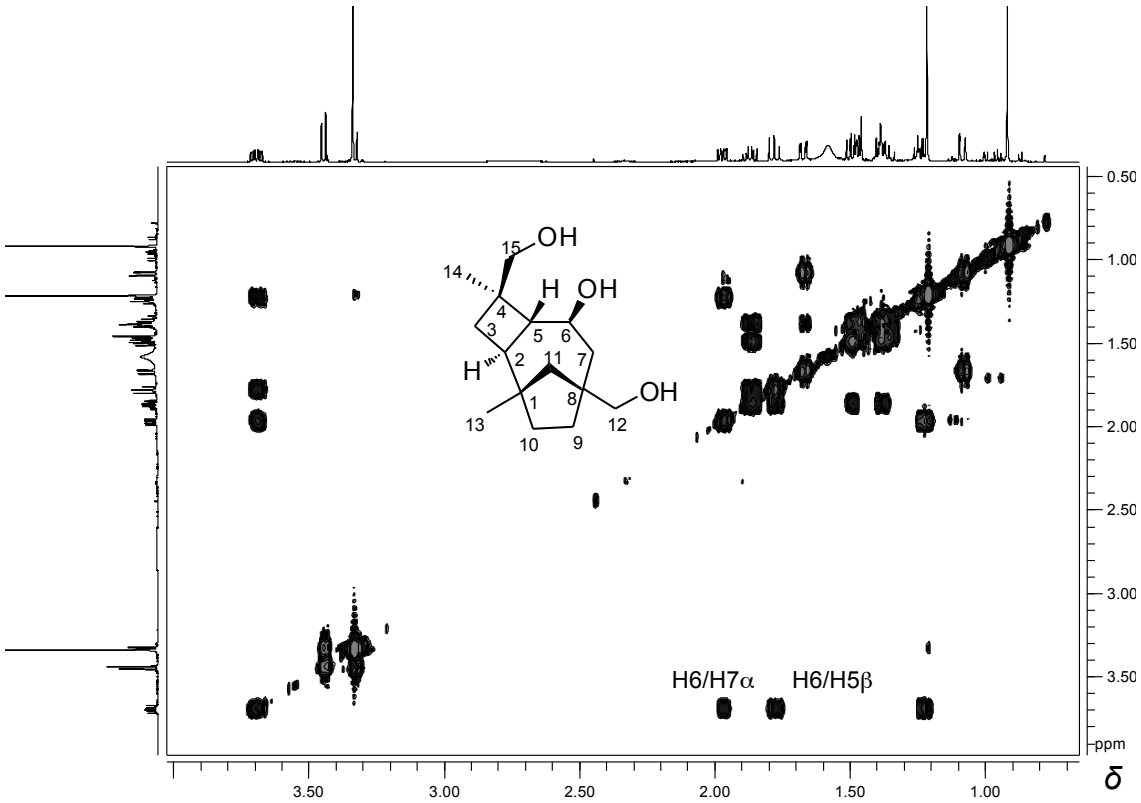


Figura 199 ppm Mapa de contornos COSY (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*, 5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (**99**).

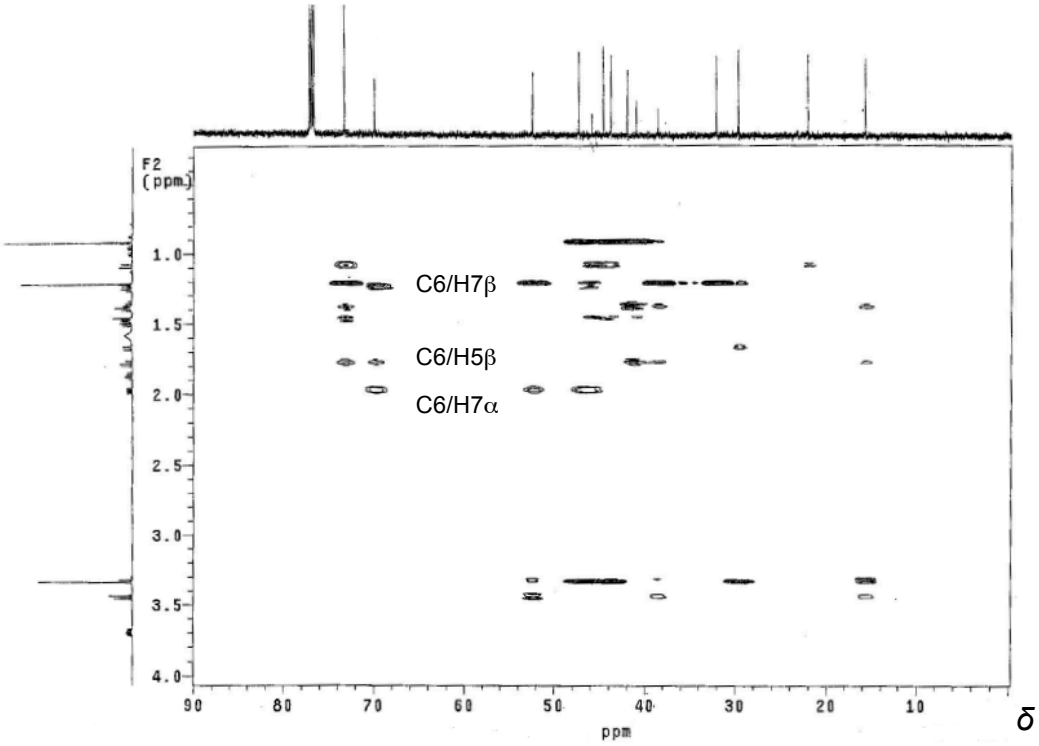


Figura 200 – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*, 5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4.4.8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (**99**).

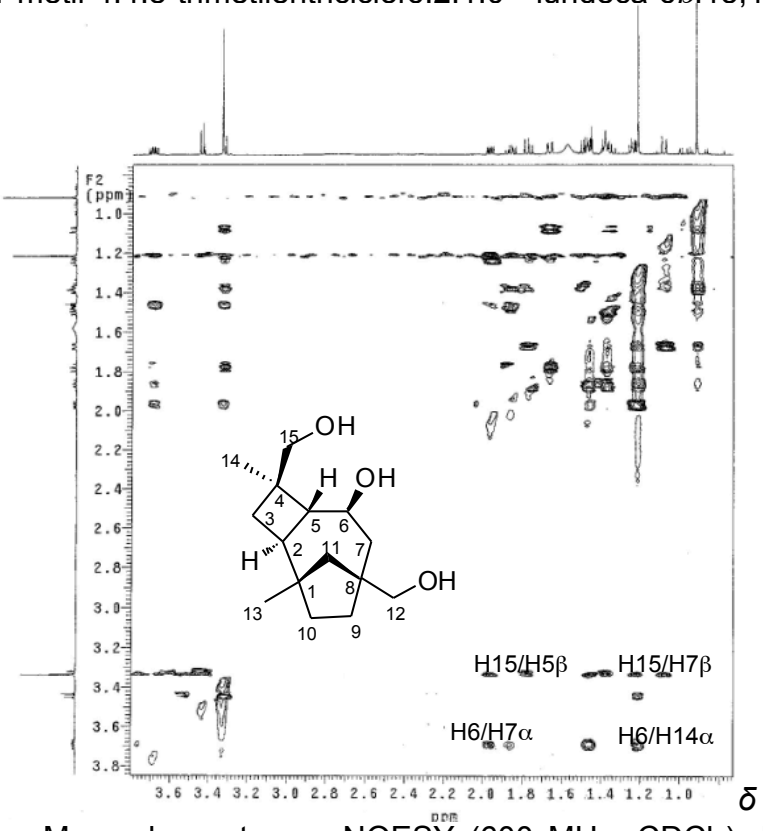


Figura 201 – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, $CDCl_3$) de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*, 6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-6β,15,12-triol (**99**).

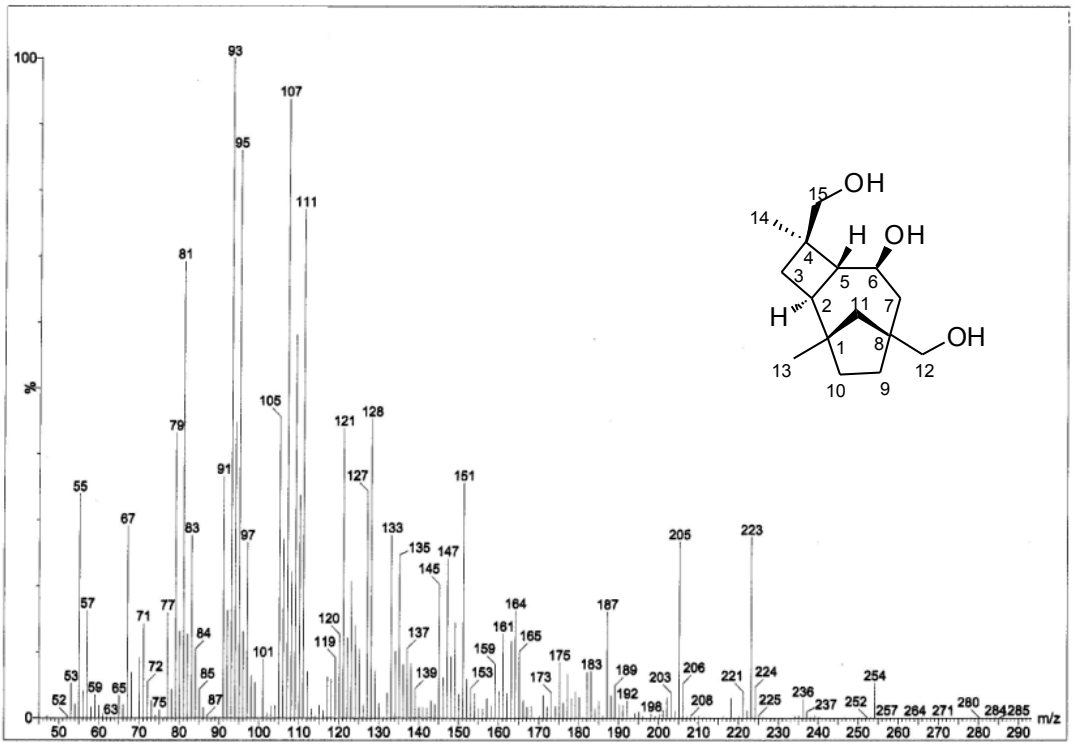


Figura 202 – Espectro de Massas de (1*R*,2*S*,4*R*,5*R*,6*S*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.0^{2,5}]undeca-6β,15,12-triol (**99**).

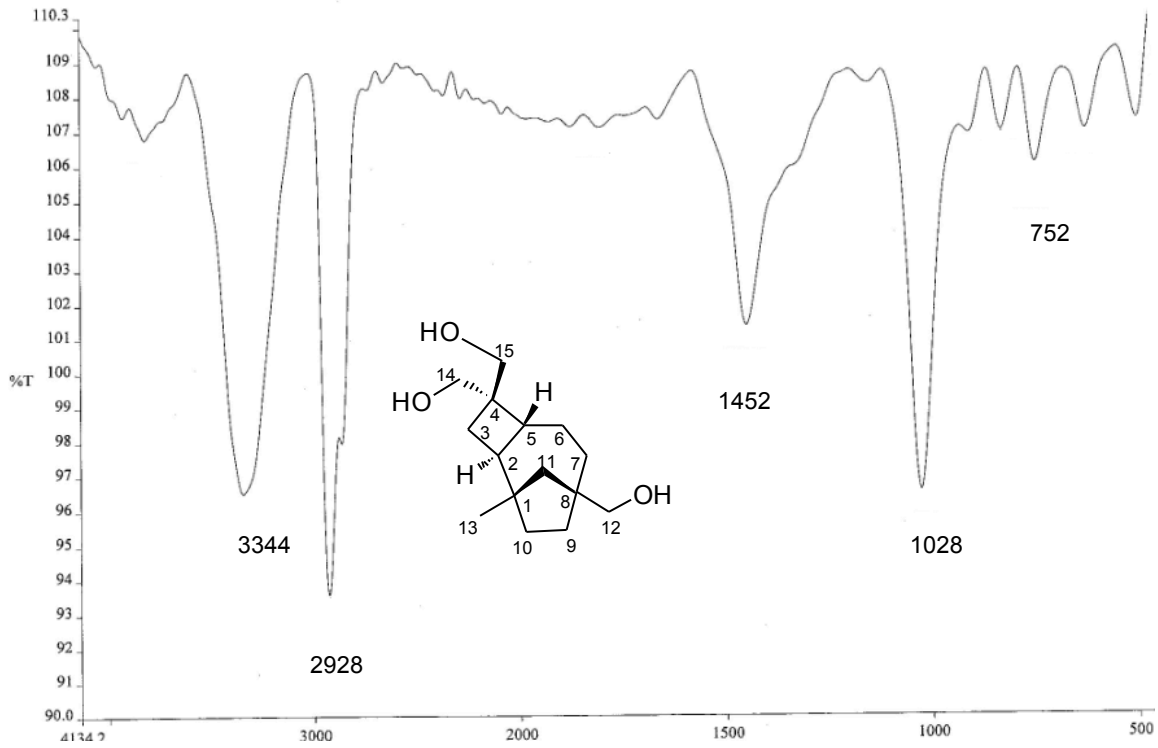


Figura 203 – Espectro no IV de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.0^{2,5}]undeca-12,14,15-triol (**100**) (KBr).

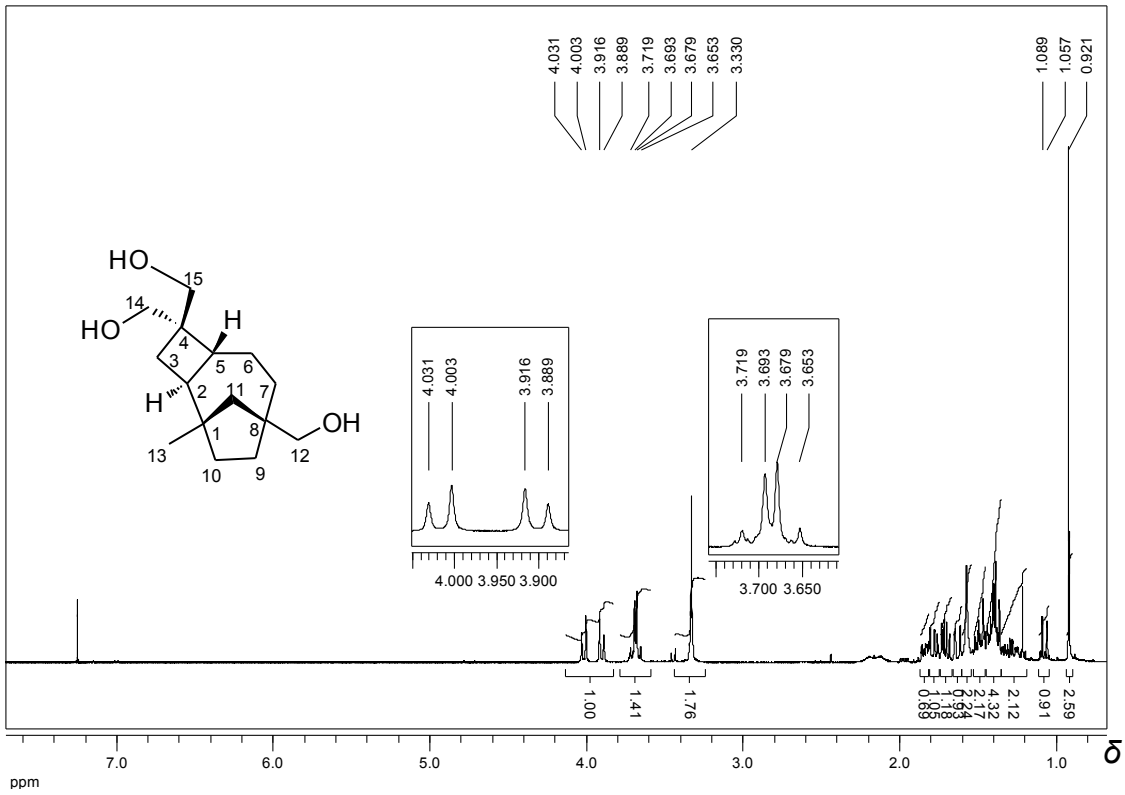


Figura 204 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (**100**).

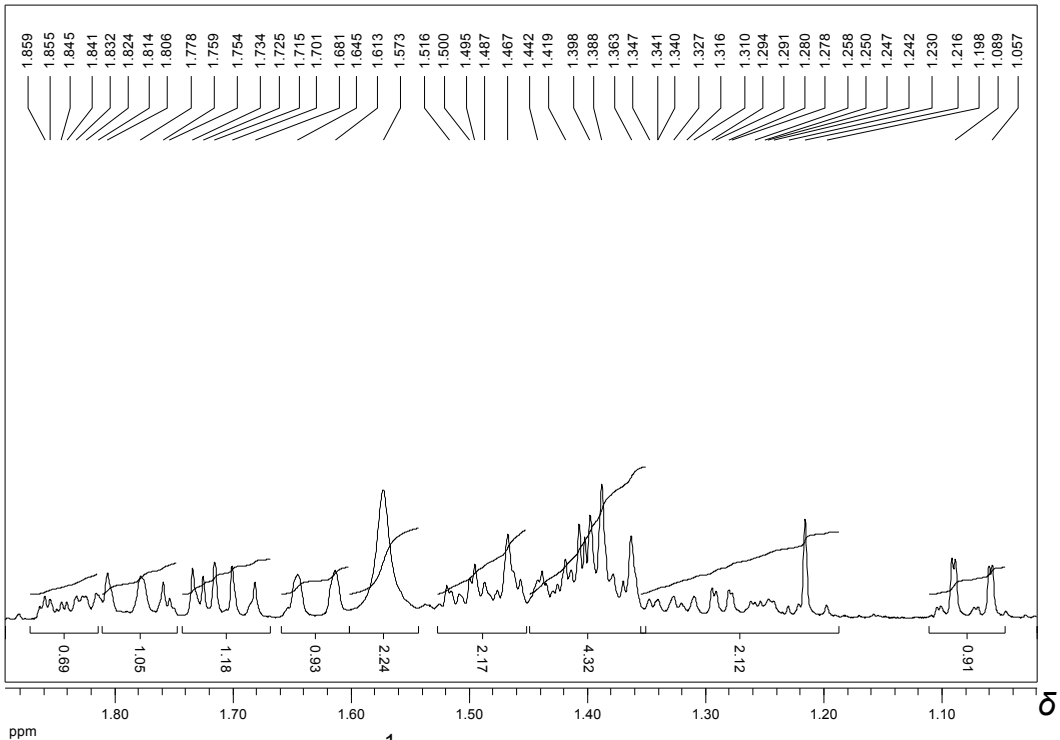


Figura 205 – Espectro de RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (**100**). Expansão da região entre δ_H 0,5 – 2,5.

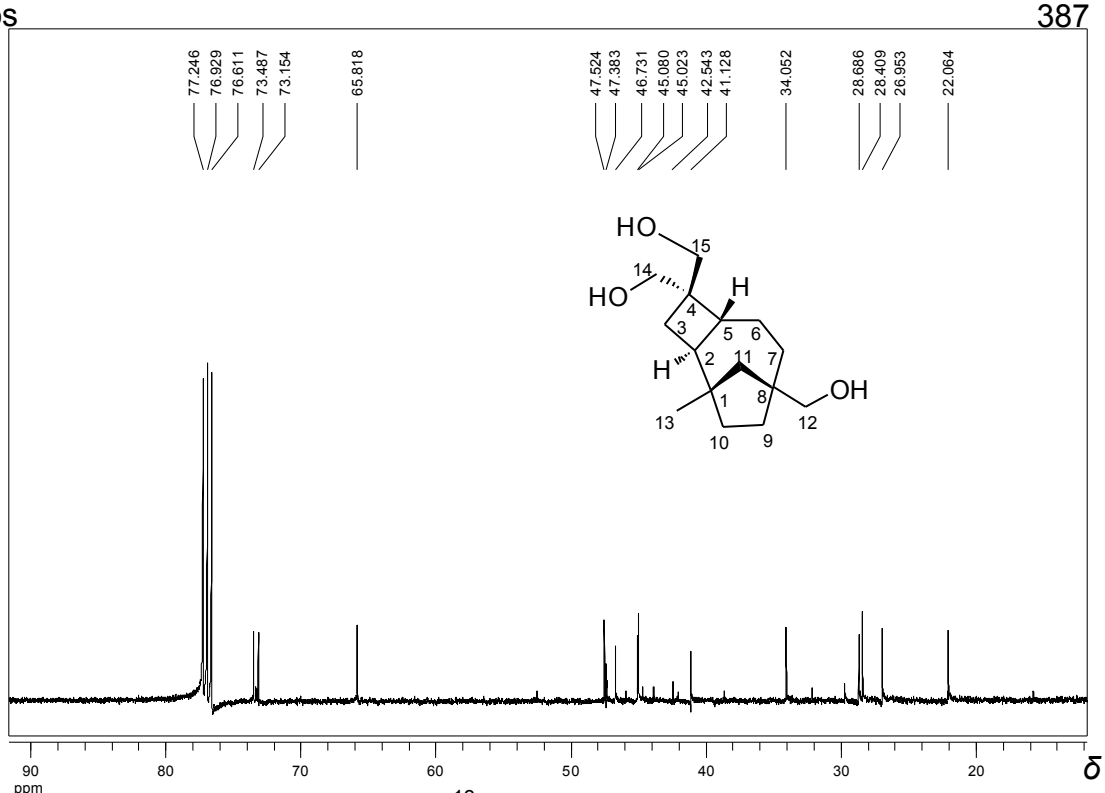


Figura 206 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (**100**).

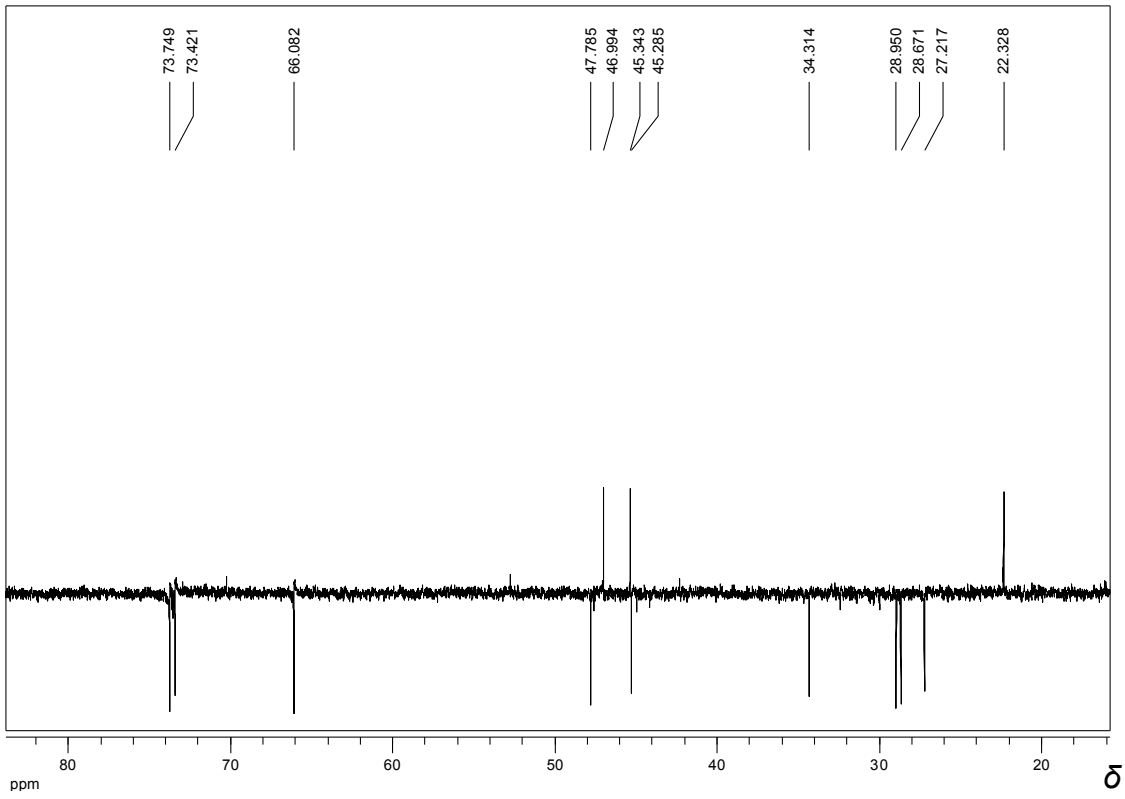


Figura 207 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (**100**).

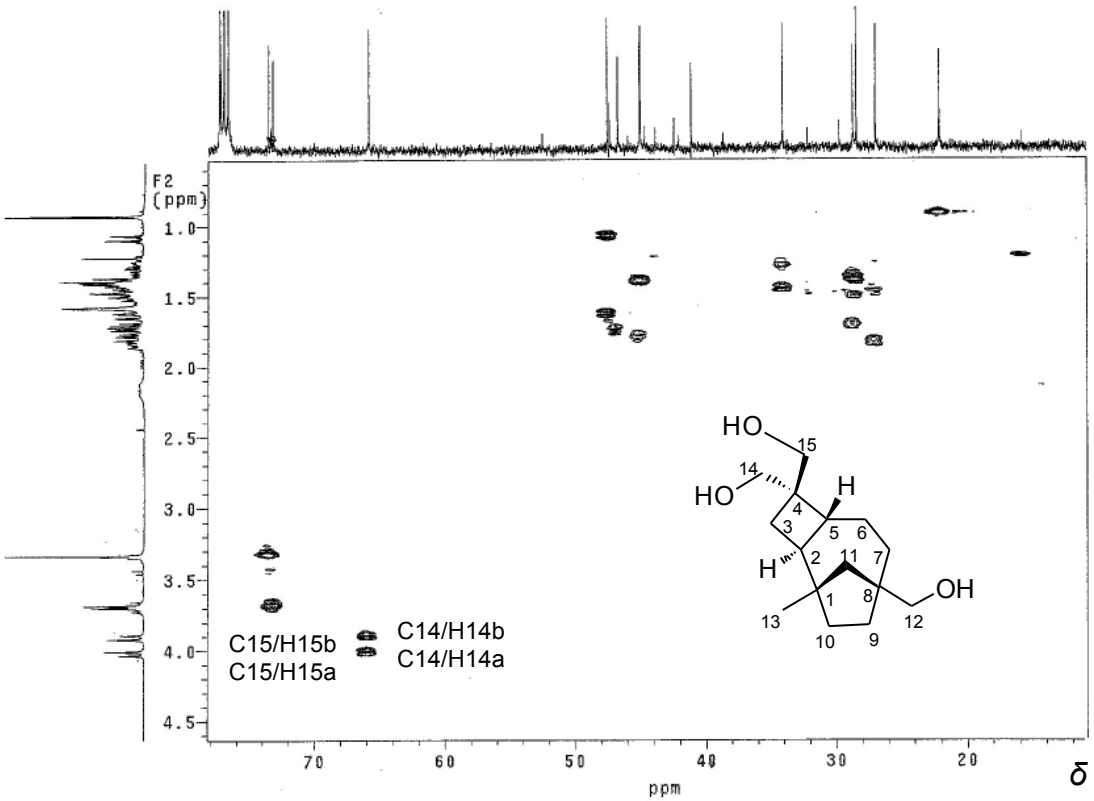


Figura 208 – Mapa de contornos HSQC (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (**100**).

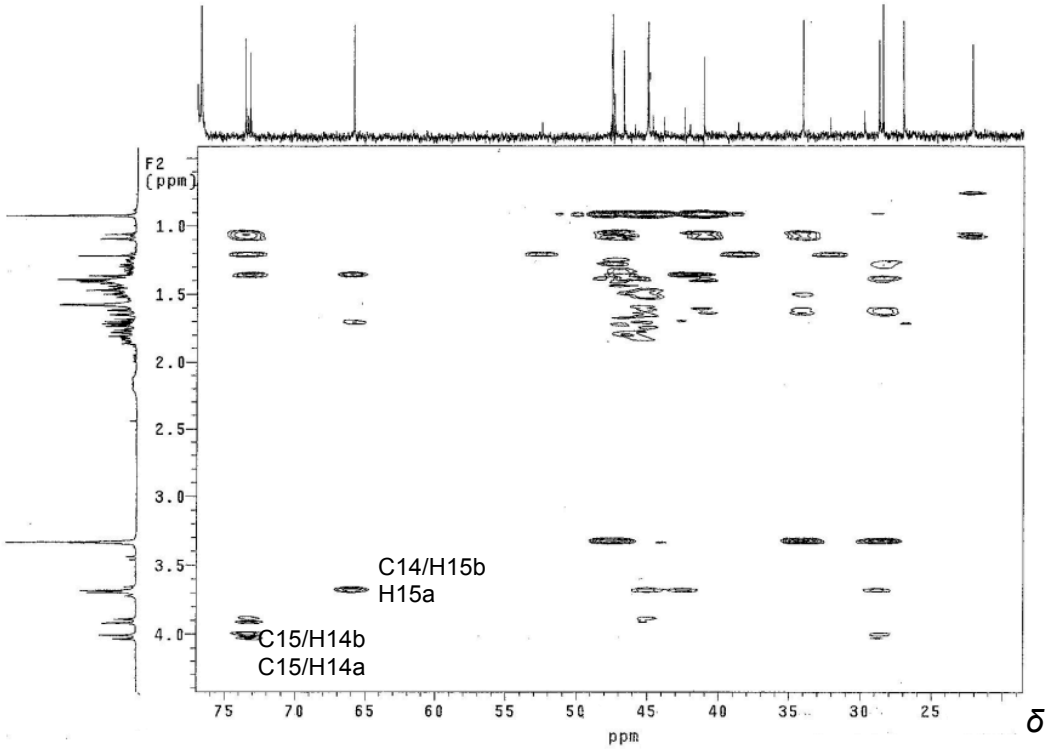


Figura 209 – Mapa de contornos HMBC (100 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (**100**).

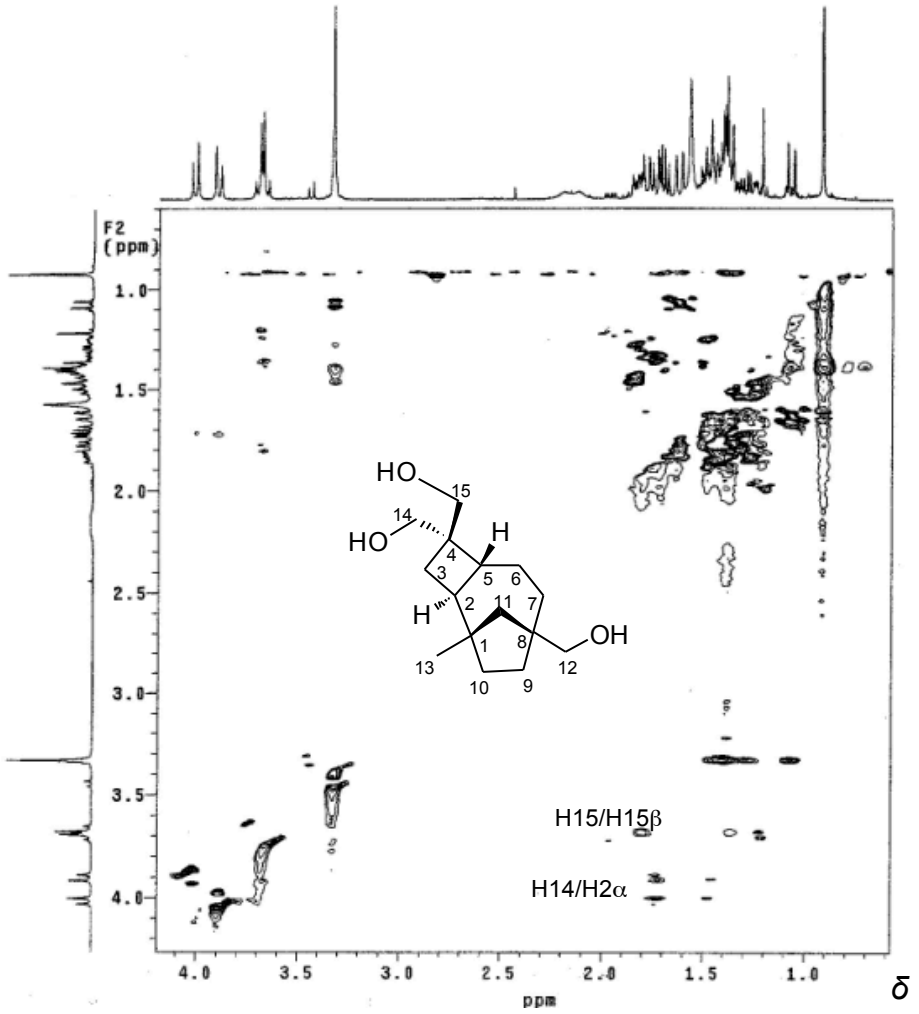


Figura 210 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $CDCl_3$) de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo[6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (**100**).

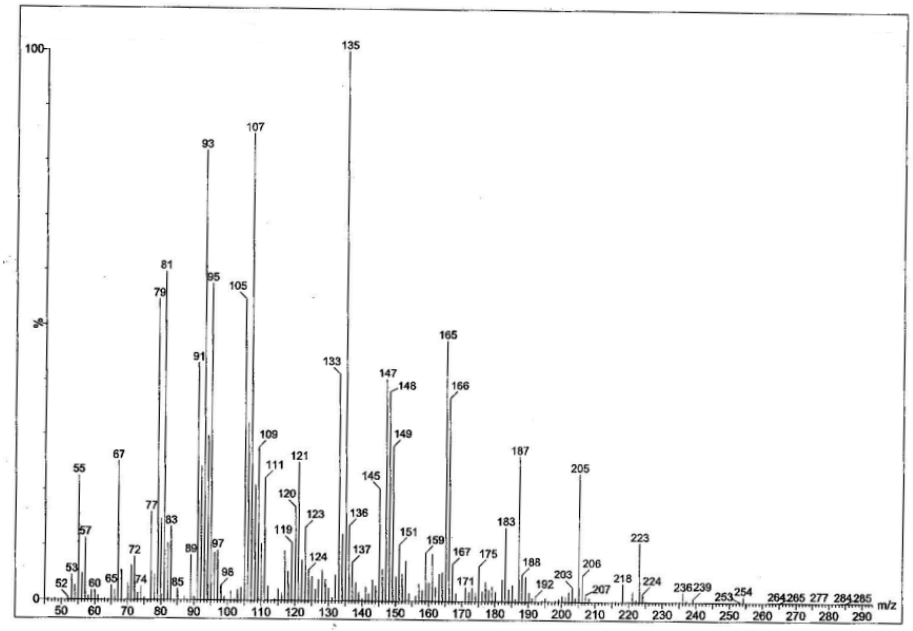


Figura 211 – Espectro de Massas de (1*S*,2*S*,5*R*,8*S*)-1-metil-4,4,8-trimetilentriciclo [6.2.1.$0^{2,5}$]undeca-12,14,15-triol (**100**).