

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

RAQUEL LOURENÇO DE CASTRO

**MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E BIOTRANSFORMAÇÃO DE
DITERPENOS CAURÂNICOS COMO ESTRATÉGIA PARA A
OBTENÇÃO DE DERIVADOS COM PROPRIEDADES
FARMACOLÓGICAS**

Belo Horizonte

2013

UFMG-ICEx/DQ 936^a

D. 518^a

RAQUEL LOURENÇO DE CASTRO

**MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E BIOTRANSFORMAÇÃO DE
DITERPENOS CAURÂNICOS COMO ESTRATÉGIA PARA A
OBTENÇÃO DE DERIVADOS COM PROPRIEDADES
FARMACOLÓGICAS**

**Dissertação apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química – Química Orgânica.**

Belo Horizonte

2013

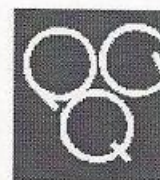
C355m Castro, Raquel Lourenço de
2013 Modificações químicas e biotransformação de
D diterpenos caurânicos como estratégia para obtenção de
derivados com propriedades farmacológicas / Raquel
Lourenço de Castro. 2013.
xv, 139 f. : il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Terpenios - Teses 3.
Biotransformação (Metabolismo) - Teses 4. Atividade
antifúngica - Teses 5. Relação estrutura-atividade
(Bioquímica) - Teses 6. Fungos - Teses I. Takahashi,
Jacqueline Aparecida, Orientadora II. Título.

CDU 043



"Modificações Químicas e Biotransformação de Diterpenos Caurânicos como Estratégia para Obtenção de Derivados com Propriedades Farmacológicas"

Raquel Lourenço de Castro

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora
UFMG

Prof. Sidney Augusto Vieira Filho
UFOP

Profa. Roqueline Rodrigues Silva
UFMG

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2013.

**Este trabalho foi desenvolvido sob
orientação da Professora Dra. Jacqueline
Aparecida Takahashi.**

**Este trabalho foi desenvolvido sob
colaboração da Professora Dra. Henriete
da Silva Vieira (UFMG).**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais José Modesto de Castro e Maria Lucileide Lourenço de Castro que estão sempre presentes na minha vida, iluminando os meus caminhos com afeto e dedicação.

“Direi ao senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza e nele confiarei.”

Salmo 91.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu grande companheiro e esposo André Luiz dos Santos. Agradeço pelo respeito, dedicação, paciência e por ter compartilhado ao longo desse caminho as angústias, expectativas e alegrias por mim vividas. Obrigada pela sua existência na minha vida.

À professora Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi, por ter aberto as portas do seu grupo de pesquisa, depositando em mim a confiança para execução desse trabalho. Agradeço imensamente pela paciência, compreensão, incentivo e por ter dividido comigo todas as dificuldades encontradas, tornando-se grande exemplo de dedicação e profissionalismo.

À professora Dra. Henriete da Silva Vieira, pela valiosa colaboração tanto na parte experimental quanto na fase da redação. Agradeço pelas críticas, ensinamentos, atenção, paciência e apoio.

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas de laboratório: Ana Paula Teles, Adriana Bracarense, Bibiane Lindsay, Fernanda Lyra, Douglas Alencar, Arthur Silva, Dhionne Gomes, Heveline Arruda, Thaís Carrilho, Mirra Angelina, Filipe Augusto e Vínicius Viana, que proporcionaram um ambiente agradável de trabalho, trazendo-me muitas alegrias.

Agradeço em especial à Adriana Bracarense, ao Dhionne Gomes e à Fernanda Lyra pelo auxílio nos testes de atividade biológica.

A minha colega Karina Dornelas e aos demais que sofreram comigo ao fazer as disciplinas avançadas. Obrigada por fazer da união a força.

À Ivana Lula e ao Ricardo Assis pelo auxílio na obtenção dos espectros de RMN.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química pela contribuição na minha formação científica.

Aos funcionários do Departamento de Química que de alguma forma me ajudaram a concretizar esse trabalho.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE TABELAS.....	x
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
 INTRODUÇÃO.....	 01
 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1.1- Diterpenos: biossíntese e classificações.....	06
1.2- <i>Sphagneticola trilobata</i> (ASTERACEAE): fonte de diterpenos caurânicos.....	09
1.3- Modificações estruturais de diterpenos caurânicos.....	11
 2- OBJETIVOS	
2.1- Objetivo geral.....	17
2.2- Objetivos específicos.....	17
2.3- Propostas de modificações estruturais	17
 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1- Obtenção da mistura dos ácidos caurenoico (1) e grandiflorênico (2) a partir das partes aéreas de <i>S. trilobata</i>	18
3.1.1- Identificação da mistura dos ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-oico (1) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-oico (2).....	19
3.2- Preparação da lactona 28 a partir da mistura dos ácidos caurânicos 1 e 2	20
3.2.1- Quebra oxidativa da ligação dupla exocíclica da mistura de ácidos caurenoico (1) e grandiflorênico (2) utilizando tetróxido de ósmio em quantidades catalíticas.....	21
3.2.1.2- Identificação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27).....	24

3.2.2- Reação de lactonização do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27) através da reação de oxidação de Baeyer-Villiger.....	25
3.2.2.1- Identificação do ácido <i>ent</i> -13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28).....	27
3.3- Reação de biotransformação do ácido <i>ent</i> -13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28).....	28
3.3.1- Reação de biotransformação do ácido <i>ent</i> -13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28) com o fungo <i>F. proliferatum</i>	30
3.3.2- Reação de biotransformação do ácido <i>ent</i> -13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28) com o fungo <i>P. mineoluteum</i>	31
3.3.2.1- Identificação do produto de biotransformação através dos seus dados espectroscópicos.....	32
3.4- Formação de oxima e lactama caurânicas a partir da mistura dos ácidos caurânicos.....	38
3.4.1- Reação de esterificação dos ácidos caurânicos.....	40
3.4.1.1- Identificação da mistura dos ésteres etílicos caurânicos.....	41
3.4.2- Clivagem oxidativa da ligação dupla exocíclica da mistura dos ésteres etílicos caurânicos.....	42
3.4.2.1- Identificação do ceto-éster <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (39).....	42
3.4.3- Reação de adição nucleofílica ao grupo carbonila do ceto-éster 39	43
3.4.3.1- Identificação espectroscópica do <i>ent</i> -16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (40).....	45
3.4.4- Rearranjo de Beckmann da <i>ent</i> -16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (40).....	47
3.4.4.1- Identificação do <i>ent</i> -13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (42).....	49
3.5- Testes biológicos.....	51
3.5.1- Testes antimicrobianos.....	51
3.5.1.1- Testes antibacterianos.....	52

3.5.1.2- Testes antifúngicos.....	57
3.5.2- Avaliação da atividade de inibição de acetilcolinesterase em microplaca	60
 4- METODOLOGIA	
4.1.- Equipamentos, reagentes e materiais.....	64
4.1.1- Equipamentos.....	64
4.1.2- Materiais.....	65
4.1.3- Reagentes.....	66
4.2- Separações cromatográficas.....	67
4.2.1- Cromatografia em coluna de sílica gel (CCS).....	67
4.2.2- Cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDS).....	67
4.3- Faixa de fusão.....	68
4.4- Elucidação estrutural das substâncias.....	68
4.4.1- Espectroscopia no infravermelho.....	68
4.4.2- Ressonância magnética nuclear.....	68
4.4.3- Espectrometria de massas.....	68
4.5- Processamentos do material vegetal e preparação do extrato.....	69
4.6- Fracionamento cromatográfico do EAST.....	69
4.7- Modificações químicas para obtenção do ácido <i>ent</i> -13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28).....	70
4.7.1- Preparação dos ácidos <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (26) e <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27) através de quebra oxidativa (PAPPO <i>et al.</i> , 1956).....	70
4.7.2- Reação tipo Baeyer-Villiger para formação do ácido <i>ent</i> -13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28) (ANASTASIA <i>et al.</i> , 1985).....	74
4.8- Reação de biotransformação do ácido <i>ent</i> -13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-óico-16 $\rightarrow$ 13-lactona através dos fungos <i>P. mineoluteum</i> e <i>F. proliferatum</i>	76
4.8.1- Preparo do meio de cultura.....	76

4.8.2- Preparo do inóculo.....	77
4.8.3- Preparo do extrato fúngico.....	78
4.8.4- Fracionamento do extrato de biotransformação de <i>P. mineoluteum</i>	78
4.8.5- Fracionamento do extrato de biotransformação de <i>F. proliferatum</i>	82
4.9- Modificações Químicas para obtenção da lactama <i>ent</i> -13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila.....	82
4.9.1- Reação de esterificação da mistura dos ácidos 1 e 2 (GRUNDY <i>et al.</i> , 1972).....	82
4.9.2- Reação de clivagem oxidativa da ligação dupla exocíclica da mistura de ésteres etílicos caurânicos (PAPPO <i>et al.</i> , 1956).....	83
4.9.3- Reação de adição nucleofílica ao grupo carbonila do ceto-éster 39 (LA MATTINA e SULESKE, 1990).....	85
4.9.4- Reação de formação da <i>ent</i> -13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (42) (SHAFIKOV <i>et al.</i> , 2009).....	87
4.10- Testes biológicos.....	89
4.10.1- Bioensaios antibacterianos e antifúngicos.....	89
4.10.1.1- Preparo do pré-inóculo e do inóculo bacteriano.....	90
4.10.1.2- Preparo da solução de esporos dos fungos filamentosos.....	91
4.10.1.3- Preparo das amostras para os bioensaios antibacterianos e antifúngicos.....	91
4.10.1.4- Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica.....	91
4.10.2- Avaliação da atividade anticolinesterásica pelo método de Ellmann (1961).....	92
5- CONCLUSÕES	93
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
7- ANEXO- Espectros	113
8- ANEXO- Tabelas comparativas de dados de RMN	136

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Procedimentos gerais para obtenção de compostos biologicamente ativos a partir de plantas. Adaptado de CECHINEL e YUNES (1998).....	05
Esquema 2. Origem biossintética dos terpenos. Adaptado de TOTTÉ <i>et al.</i> , 2000.....	07
Esquema 3. Biotransformação do <i>ent</i> -7 α -acetoxi-caur-16-eno (16) em <i>ent</i> -7 α -acetoxi-19-hidroxi-caur-16-eno (17) por <i>G. fujikuroi</i> (FRAGA <i>et al.</i> , 2012).....	15
Esquema 4: Produtos de biotransformação do candidiol (18) por <i>M. plumbeus</i> (FRAGA <i>et al.</i> , 2010).....	15
Esquema 5: Produtos de biotransformação do ácido <i>ent</i> -caur-16-en-19-oico (23) por <i>A. niger</i> (MARQUINA <i>et al.</i> , 2009).....	16
Esquema 6: Proposta de modificações estruturais para o ácido caurenoico.....	18
Esquema 7: Proposta em duas etapas para a preparação de lactona 28 a partir da mistura dos ácidos caurânicos 1 e 2	21
Esquema 8. Mecanismo da reação de oxidação de <i>Lemieux-Johnson</i> . Adaptado de PAPPO <i>et al.</i> (1956).....	22
Esquema 9. Regeneração do tetróxido de ósmio através do periodato de potássio (PAPPO <i>et al.</i> , 1956).....	23
Esquema 10. Obtenção da lactona 28 a partir da reação de oxidação de Baeyer-Villiger.....	26
Esquema 11: Biotransformação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27) com o fungo <i>F. proliferatum</i> , produzindo-se o ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (30) (ROCHA <i>et al.</i> , 2010).....	29
Esquema 12: Biotransformação do 2 β -metoxiclovan-9 α -ol (31) utilizando o fungo <i>P. mineoludem</i> , produzindo-se o clovan-2 β -9 α -diol (32) e clovan-2 β -9 β -diol (33) (SOUZA <i>et al.</i> , 2012).....	29
Esquema 13: Biotransformação da lactona clovânica 34 , utilizando o fungo <i>P. mineoludem</i> , produzindo-se a lactona clovânica 35 (SOUZA, 2012).....	30

Esquema 14. Síntese da lactona caurânica 36 a partir do ácido grandiflorênico (2) (VIEIRA <i>et al.</i> , 2006).....	39
Esquema 15. Proposta de rota sintética para a obtenção da oxima e lactama caurânica.....	40
Esquema 16. Mecanismo de formação da oxima a partir do céto-éster 39	44
Esquema 17. Proposta de mecanismo para a formação de lactama, adaptado de SHAFIKOV <i>et al.</i> (2009).....	48
Esquema 18. Hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (MIAO <i>et al.</i> , 2010).....	60
Esquema 19. Processos cromatográficos utilizados no isolamento do produto de biotransformação Biot-1	81
Esquema 20. Representação da microplaca utilizada nos testes de avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos diterpenos caurânicos.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas da morfina e quinina, princípios ativos isolados de plantas (PINTO <i>et al.</i> , 2002).....	03
Figura 2. Exemplos de quimioterápicos de origem vegetal com estruturas moleculares complexas e de interesse da indústria farmacêutica (PINTO <i>et al.</i> , 2002).....	04
Figura 3. Estrutura química do isopreno.....	07
Figura 4. Exemplos de algumas substâncias representantes de algumas das diferentes classes de diterpenos. Adaptado de ROCHA (2010).....	08
Figura 5. Estruturas químicas dos ácidos caurenoico (1) e grandiflorênico (2).....	09
Figura 6. Foto da planta <i>S. trilobata</i> . A: partes aéreas (folhas, flores e caule); B: folhas (faces axial e abaxial); (BACCARIN, 2009).....	10
Figura 7. Foto da parte floral da <i>S. trilobata</i> (SARTORI, 2005).....	10

Figura 8: Estruturas das lactonas 28 e 29 , possíveis produtos formados pela migração do C-13 ou pela migração do C-15, respectivamente, na lactonização de 27	26
Figura 9. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Biot-1	32
Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de Biot-1	33
Figura 11. Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de Biot-1	33
Figura 12. Mapa de contornos HSQC (100 MHz, CDCl_3) de Biot-1	36
Figura 13. Mapa de contornos COSY (100 MHz, CDCl_3) de Biot -1	36
Figura 14. Mapa de contornos HMBC (100 MHz, CDCl_3) de Biot-1	37
Figura 15. Ampliação do mapa de contornos HMBC (100 MHz, CDCl_3) de Biot-1 , na região entre δ_{H} 0,60 a δ_{H} 2,60.....	37
Figura 16. Possibilidades de formação de oximas: isômeros geométricos E (40) e Z (41).....	46
Figura 17: Estruturas químicas das lactamas 13a-aza (42) e 15a-aza (43).....	50
Figura 18. Percentual de inibição antibacteriana e inibição da levedura <i>C. albicans</i> das amostras especificadas na legenda.....	56
Figura 19. Avaliação da porcentagem de inibição antifúngica das amostras especificadas na legenda.....	59
Figura 20. Avaliação da atividade da enzima AchE em função do tempo de incubação com as amostras testadas.....	61
Figura 21. Avaliação da atividade da enzima AchE em função do tempo de incubação com as amostras testadas.....	62
Figura 22. Atividade da enzima AchE (%) e função do tempo de incubação com a eserina (controle positivo).....	64
Figura 23. Espectro na região do IV (KBr) da mistura dos ácidos caurenoico (1) e grandiflorênico (2).....	113
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura dos ácidos 1 e 2 . Em destaque alguns sinais de hidrogênio que caracterizam os ácidos caurenoico (C) e grandiflorênico (G).....	113
Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da mistura dos ácidos caurenoico (1) e grandiflorênico (2).....	114

Figura 26. Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl ₃) da mistura dos ácidos 1 e 2 . Em destaque alguns sinais de hidrogênio que caracterizam os ácidos caurenóico (C) e grandiflorênico (G).....	114
Figura 27. Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> da mistura dos ácidos caurânicos 1 e 2	115
Figura 28. Espectro na região do IV (KBr) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (26).....	115
Figura 29. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (26).....	116
Figura 30. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (26).....	116
Figura 31. Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl ₃) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (26).....	117
Figura 32. Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (26).....	117
Figura 33. Espectro na região do IV (KBr) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27).....	118
Figura 34. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27).....	118
Figura 35. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27).....	119
Figura 36. Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl ₃) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27).....	119
Figura 37. Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27).....	120
Figura 38. Espectro na região do IV (KBr) do ácido <i>ent</i> -13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28).....	120
Figura 39. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) <i>ent</i> -13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28).....	121
Figura 40. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) do ácido <i>ent</i> -13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28).....	121
Figura 41. Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl ₃) do <i>ent</i> -13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28).....	122

Figura 42. Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> do ácido <i>ent</i> -13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28).....	122
Figura 43. Espectro na região do IV (KBr) da mistura dos ésteres caurânicos 37 e 38.....	123
Figura 44. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da misturas dos ésteres etílicos 37 (derivado do ácido caurenoico C) e 38 (derivado do ácido grandiflorênico G).....	123
Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da misturas dos ésteres etílicos 37 (derivado do ácido caurenoico C) e 38 (derivado do ácido grandiflorênico G).....	124
Figura 46. Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3) da misturas dos ésteres etílicos 37 (derivado do ácido caurenoico C) e 38 (derivado do ácido grandiflorênico G).....	124
Figura 47. Espectro na região do IV (KBr) do <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (39).....	125
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (39).....	125
Figura 49. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (39).....	126
Figura 50. Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3) do <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (39).....	126
Figura 51. Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> do <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (39).....	127
Figura 52. Espectro na região do IV (KBr) do <i>ent</i> -16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (39).....	127
Figura 53. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do <i>ent</i> -16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (40).....	128
Figura 54. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do <i>ent</i> -16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (40).....	128
Figura 55. Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3) do <i>ent</i> -16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (40).....	129

Figura 56. Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> do <i>ent</i> -16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (40).....	129
Figura 57. Espectro na região do IV do <i>ent</i> -13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (42).....	130
Figura 58. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do <i>ent</i> -13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (42).....	130
Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do <i>ent</i> -13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (42).....	131
Figura 60. Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do <i>ent</i> -13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (42).....	131
Figura 61. Espectro de massas com ionização por <i>electrospray</i> do <i>ent</i> -13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (42).....	132
Figura 62. Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl_3) do <i>ent</i> -13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (42).....	132
Figura 63. Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl_3) do <i>ent</i> -13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (42).....	133
Figura 64. Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3) do <i>ent</i> -13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (18).....	134
Figura 65. Ampliação do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3) <i>ent</i> -13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (42).....	135

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Comparação dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H da Biot-1 (δ , CDCl_3 , 100 MHz) e da lactona 36 (δ , CDCl_3 , 50 MHz).....	35
Tabela 2. Comparação dos dados espectroscópicos da oxima 40 em relação aos dados fornecidos através da literatura.....	47
Tabela 3. Micro-organismos utilizados nos testes antimicrobianos.....	53
Tabela 4. Porcentagem de inibição antibacteriana e de inibição da levedura <i>C. albicans</i>	54
Tabela 5. Micro-organismos utilizados nos testes antifúngicos.....	57
Tabela 6. Percentual de inibição antifúngica das amostras testadas.....	58
Tabela 7. Percentual inibitório da enzima AchE após 10 min. de ensaio...	63

Tabela 8. Fracionamento cromatográfico do EAS t.....	69
Tabela 9. Fracionamento cromatográfico do EAS t.....	70
Tabela 10. Propriedades físico-químicas da norcetona 26	72
Tabela 11. Propriedades físico-químicas da norcetona 27	73
Tabela 12. Propriedades físico-químicas da lactona 28	75
Tabela 13. Sistema de eluição do EBP m por cromatografia em coluna de sílica.....	79
Tabela 14. Combinações das frações do EBP m e suas respectivas massas.....	79
Tabela 15. Dados físico-químicos do ceto-éster 39	84
Tabela 16. Dados físico-químicos da oxima 40	86
Tabela 17. Dados físico-químicos da lactama 42	88
Tabela 18. Micro-organismos utilizados para avaliação da atividade antibacteriana das substâncias isoladas e sintetizadas.....	90
Tabela 19. Micro-organismos utilizados para avaliação da atividade antifúngica das substâncias isoladas e sintetizadas.....	90
Tabela 20. Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δC) da mistura dos ácidos e da mistura dos ésteres etílicos com os dados obtidos da literatura (VIEIRA, 2000).....	136
Tabela 21. Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δC) das norcetonas 26 e 27 com os dados obtidos da literatura (VIEIRA, 2000).....	137
Tabela 22. Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δC) da lactona 28 com os dados obtidos da literatura (VIEIRA, 2000).....	138
Tabela 23. Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δC) da mistura dos ésteres 37 e 38 com os dados obtidos para o ceto-éster 39 , oxima 40 e lactama 42	139

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AchE	Acetilcolinesterase
%	Porcentagem
δ	Deslocamento químico
ν	Frequência de onda
°C	Graus Celsius
CCS	Cromatografia em coluna sobre suporte de sílica gel
CCDS	Cromatografia em camada delgada de sílica
cm^{-1}	Centímetros recíprocos
COSY	Homonuclear Correlated Spectroscopy
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
dq	Duplo quarteto
DMSO	Dimetilsulfóxido
EBFp	Extrato de biotransformação do <i>Fusarium proliferatum</i>
EBPm	Extrato de biotransformação do <i>Penicillium mineoluteum</i>
g	Grama
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de Acoplamento
L	Litro
m	Multiplete
$[\text{M}-\text{H}]^{-}$	Íon molecular desprotonado
$[\text{M}+\text{H}]^{+}$	Íon molecular protonado
$[\text{M}+\text{Na}]^{+}$	Aduto de sódio do íon molecular
m/z	Relação massa/carga
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mmol	Milimol
MsCl	Cloreto de mesila

ND	Não detectado
nm	Nanômetro
Pág.	Página
Pf	Ponto de fusão
PDA	Ágar de batata dextrosado
Q	quarteto
Rf	Fator de retenção
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H
S	Simpleto
sl	Sinal largo
T	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
U	Unidade de atividade enzimática (quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol de produto por minuto)

RESUMO

Diterpenos caurânicos, como os ácidos caurenoico e o grandiflorênico, são uma classe de produtos naturais conhecidos por possuírem uma gama de propriedades biológicas tais como reguladora do crescimento de plantas, atividade antimicrobiana, antiparasitária, citotoxicidade, atividade antiinflamatória, antifertilizante, dentre outras. A *Sphagneticola trilobata* é uma planta facilmente encontrada em muitas regiões do Brasil e conhecida por conter em quantidade majoritária os ácidos caurenoico e grandiflorênico. Este trabalho teve como objetivo isolar esses ácidos a partir das partes aéreas da *S. trilobata* e fazer modificações estruturais através de reações químicas e de biotransformações para obtenção de derivados a fim de se observar alterações nas atividades biológicas em relação aos diterpenos precursores. A partir dos ácidos caurenoico e grandiflorênico isolados do material vegetal, foram obtidos, via reações químicas, seis derivados: ácido *ent*-16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico, ácido *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico, ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona, *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila, *ent*-16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila e *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila, sendo que os dois últimos compostos são inéditos. O ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona foi submetido às reações de biotransformação utilizando os fungos *Fusarium proliferatum* e *Penicillium mineoluteum*. Produtos de biotransformação formados pelo *F. proliferatum* não foram identificados. Através do *P. mineoluteum* foi isolado o *ent*-caur-5 α -15 α -epoxi-9-10-friedo-10 β -11 β -dihidroxi-16,11 α :19,10 β -diseco-17-nor-16 $\rightarrow$ 11:19 $\rightarrow$ 10-dilactona, considerado como produto de biotransformação, com 1,31 % de rendimento. Os ácidos caurenoico e grandiflorênico e os seus derivados foram submetidos a testes de atividade antifúngica, antibacteriana e anticolinesterásica. A lactama inédita *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila destacou-se como potencial inibidora da levedura *Candida albicans*, da bactéria *Bacillus cereus* e da enzima acetilcolinesterase, induzindo atividades superiores em relação ao ácido caurenoico, seu precursor.

ABSTRACT

Kaurane diterpenes, as kaurenoic and grandiflorenic acids, are a class of natural products known to possess a wide spectrum of biological activities such as plant growth regulators, antimicrobial, antiparasite, cytotoxicity, anti-inflammatory activity, fertility inhibitor, among others. *Sphagneticola trilobata* is a plant commonly found in many regions of Brazil and known to contain high quantities of kaurenoic and grandiflorenic acids. This work aims to isolate these acids from aerial parts of *S. trilobata* and to make structural modifications through chemical reactions and biotransformations to obtain derivatives, in order to evaluate the effects of such changes in the biological activities in relation to the precursors. Through kaurenoic and grandiflorenic acids, isolated from plant material, were obtained seven derivatives via chemical reactions: *ent*-kaur-16-oxo-17-nor-9(11)-en-19-oic acid, *ent*-kauran-16-oxo-17-nor-19-oic acid, *ent*-13 α -hydroxy-17-nor-13,16-seco-kauran-19-oic-16 $\rightarrow$ 13-lactone acid, ethyl *ent*-kaur-16-en-19-oate, ethyl *ent*-kauran-16-oxo-17-nor-19-oate and novel compounds ethyl *ent*-kauran-16-E-oxime-17-nor-19-oate and ethyl *ent*-kauran-13-lactam-13a-aza-19-oate. The *ent*-13 α -hydroxy-17-nor-13,16-seco-kauran-19-oic-16 $\rightarrow$ 13-lactone acid was subjected to biotransformation reactions using the fungus *Penicillium mineoluteum* and *Fusarium proliferatum*. Biotransformation products of *F. proliferatum* were not isolated, however, from *P. mineoluteum*, it was isolated the *ent*-5 α ,15 α -epoxy-9,10-friedo-10 β ,11 β -dihydroxy-16,11 α :19,10 β -diseco-17-norkauran-16,19-dioic acid 16 $\rightarrow$ 11:19 $\rightarrow$ 10-di-lactone, a possible biotransformation product, with 1.31 % yield. Kaurenoic and grandiflorenic acids and their derivatives were tested in relation to antimicrobial and inhibition of acetylcholinesterase enzyme activities. The novel diterpene lactam *ent*-kauran-13-lactam-13a-aza-19-oate ethyl stood out as inhibitory substance of the yeast *Candida albicans*, the bacterium *Bacillus cereus* and of acetylcholinesterase, inducing superior activities relative to kaurenoic acid, its precursor.

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais constituem uma variedade muito extensa de compostos orgânicos que faz a natureza parecer, na perspectiva humana, uma fonte inesgotável de novos produtos. Dentre tamanha riqueza, é possível encontrar produtos úteis para diversos fins. Nos dias atuais, mesmo com todo o desenvolvimento da indústria química e farmacêutica, os produtos naturais ainda constituem uma matéria prima fundamental na indústria de medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímica. Isso se tornou possível devido ao desenvolvimento de técnicas que permitiram a detecção, o isolamento e a elucidação estrutural com maior precisão e rapidez e ao desenvolvimento de bioensaios rápidos e eficientes para o monitoramento da atividade biológica das substâncias. Assim, a química de produtos naturais ganhou um enfoque multidisciplinar envolvendo principalmente a área biológica.

Embora tenham importância em muitas áreas, é na medicina que os produtos naturais têm maior destaque, dando origem a numerosos agentes terapêuticos que são utilizados diretamente como princípios ativos ou, ainda, utilizados como modelo para o desenvolvimento, por síntese, semi-síntese ou biotransformação, de novas substâncias com potencial biológico (BUTLER, 2004 e 2005; KOEHN E CARTER, 2005; NEWMAN *et al.*, 2000 e 2003).

A maioria dos fármacos em uso clínico é de origem natural ou foi desenvolvida por síntese química planejada a partir de produtos naturais. Plantas, fungos, bactérias, insetos e organismos marinhos, por exemplo, são geralmente utilizados como fonte de substâncias biologicamente ativas (BARREIRO, 2009). Em termos econômicos, a biodiversidade transcende os limites dados às indústrias convencionais, visto que se trata de uma valiosa fonte de dados biológicos e químicos para a descoberta de novos fármacos (LÓPEZ *et al.*, 2006).

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, é o reino vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos. Desde os primórdios, os seres

humanos dependem da natureza, especialmente de plantas, para tratar uma diversidade de enfermidades.

A maioria das antigas civilizações desenvolveu uma tradicional e sofisticada medicina através do uso de plantas (GROTHAUS *et al.*, 2010). A história mostra o quanto as plantas contribuem para manter e restabelecer a saúde humana. A proteção da biodiversidade da flora, atualmente faz parte de projetos de saúde pública estratégicos do mundo inteiro. Muitas plantas facilmente cultiváveis previnem doenças graves e contribuem para economizar gastos anuais em tratamentos hospitalares caros (PINHEIRO, 2004). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os vegetais são as maiores e melhores fontes de fármacos para a humanidade (BEZERRA *et al.*, 2006).

Muitas das propriedades terapêuticas das plantas, relatadas pela população, posteriormente são confirmadas em sua maioria, através de estudos científicos, comprovando a importância da pesquisa nessa área. Tais propriedades propiciaram o desenvolvimento de vários medicamentos, sejam estes obtidos por síntese a partir de molécula protótipo ou através de isolamento (NOLDIN *et al.*, 2006).

Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos com base científica sobre plantas. Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes que, até hoje, ainda são muito empregadas no tratamento de certas doenças, a exemplo da morfina e quinina (**Figura 1**) (DHOLWANI *et al.*, 2008; GORDALIZA, 2007; MONTANARI e BOLZANI, 2001; VIEGAS JUNIOR *et al.*, 2009).

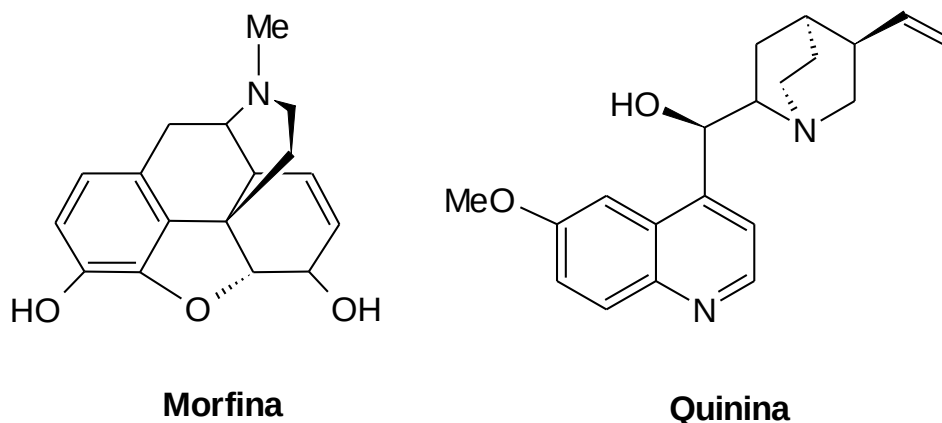


Figura 1: Estruturas químicas da morfina e quinina, princípios ativos isolados de plantas (PINTO *et al.*, 2002).

Existe uma variedade de grandes exemplos de êxito na pesquisa de produtos naturais. O taxol (Taxol[®]) foi descoberto na década de 70 e trata-se de um diterpenoide isolado das cascas do vegetal *Taxus brevifolia*, uma planta nativa dos EUA, que tem grande eficácia contra tumores. Depois de anos de pesquisa, os pesquisadores conseguiram obtê-lo sinteticamente em 23 etapas de síntese, sendo posteriormente aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), órgão federal de registros de produtos farmacêuticos nos EUA. Atualmente se encontra no mercado, sendo comercializado pela empresa *Bristol-Meyer Squibb* (KINGSTON, 1991; PINHEIRO, 2004). A Vimblastina (Velban[®]) é um alcalóide isolado das folhas de *Catharanthus roseus*. Possui a propriedade biológica de inibir a polimerização das proteínas do fuso mitótico, parando a divisão celular na metáfase. Ainda hoje é considerada uma das substâncias mais bem sucedidas na terapia antitumoral (VA *et al.*, 2010).

A indústria farmacêutica motivada por grandes exemplos de êxitos na pesquisa de produtos naturais, ainda possui um grande interesse pelos princípios ativos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, difíceis de serem obtidas por processos sintéticos clássicos (MONTANARI e BOLZANI, 2001). As estruturas de algumas dessas substâncias podem ser observadas na **Figura 2**.

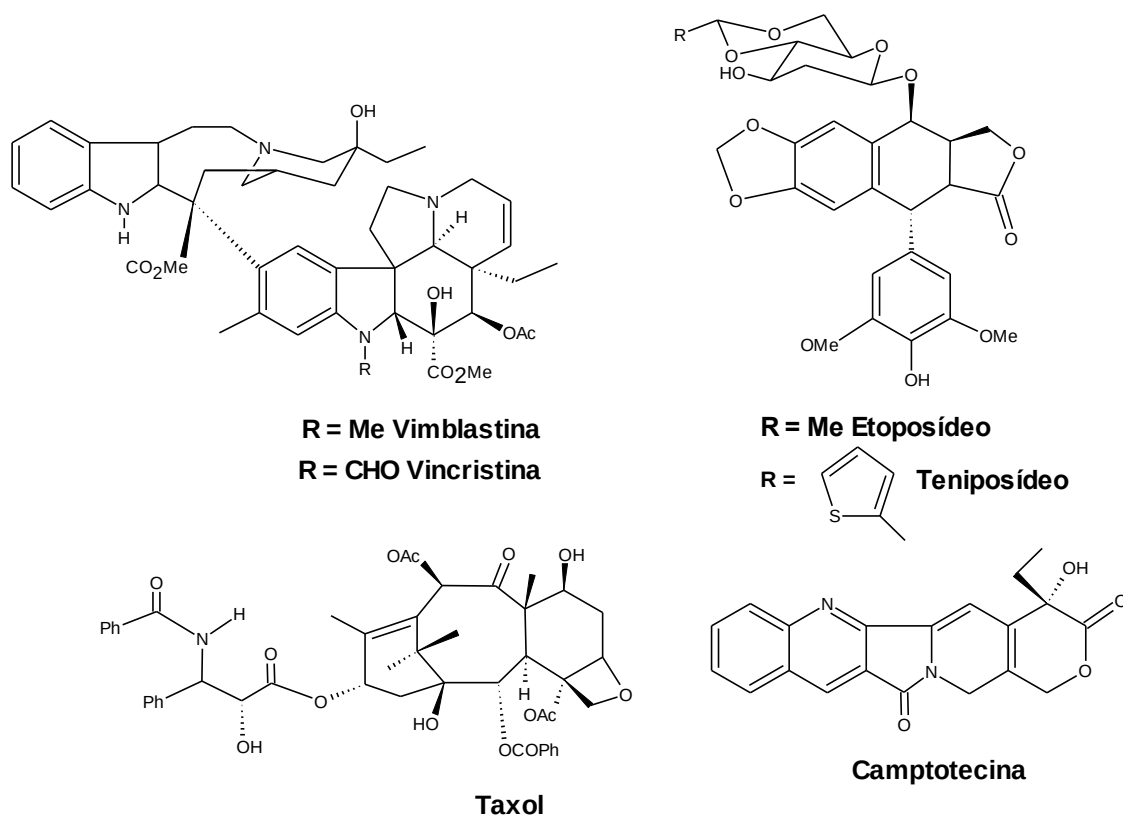


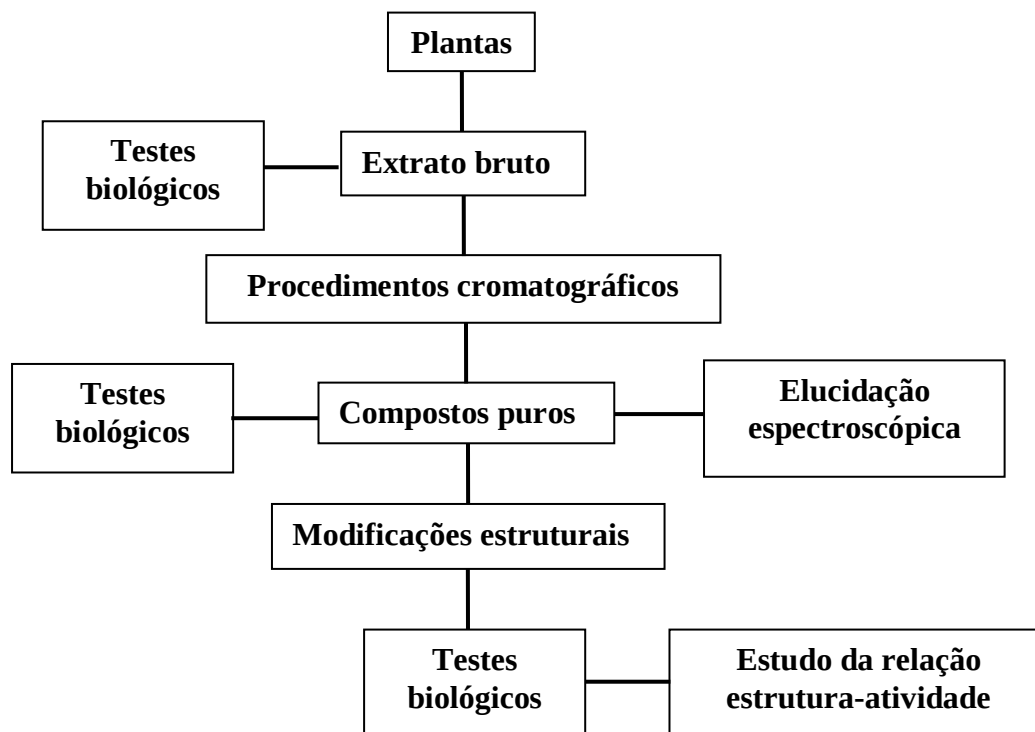
Figura 2: Exemplos de quimioterápicos de origem vegetal com estruturas moleculares complexas e de interesse da indústria farmacêutica (PINTO *et al.*, 2002).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais, de alguns de seus constituintes e de seus derivados, tais como flavonoides, alcaloides, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos. Em muitos casos, já foram comprovadas ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais (CECHINEL e YUNES, 1998).

Quando um produto natural apresenta atividade biológica, costuma-se modificar sua estrutura com intuito de melhorar ou especificar suas propriedades. A modificação estrutural é um método utilizado para melhorar o potencial e/ou a seletividade da atividade dos princípios ativos naturais. Muitas mudanças podem ser introduzidas em uma molécula, dependendo dos seus grupos funcionais. Assim, existe grande importância de estudos da correlação estrutura-atividade, que consiste de uma ferramenta para a obtenção de compostos mais ativos e para melhor compreensão tanto do mecanismo de

ação desses compostos bem como da síntese racional de novas moléculas bioativas (PINHEIRO, 2004; MONTANARI e BOLZANI, 2001).

A modificação estrutural de produtos naturais, utilizada como estratégia para obtenção de compostos farmacologicamente ativos, demanda procedimentos cromatográficos, elucidação estrutural e testes biológicos. O **Esquema 1** ilustra algumas etapas básicas quando se procura obter substâncias biologicamente ativas a partir de plantas.



Esquema 1: Procedimentos gerais para obtenção de compostos biologicamente ativos a partir de plantas. Adaptado de CECHINEL e YUNES (1998).

O Brasil, com a grandeza de sua flora, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não deve abdicar de sua vocação para os produtos naturais (PINTO *et al.*, 2002). A natureza, portanto, é uma fonte inigualável de diversidade química, capaz de construir moléculas de alta complexidade estrutural, com quimio, régio e esterosseletividade, desafiando a capacidade criativa do homem. Ela desempenha um papel fundamental na química medicinal, seja como fonte de matéria-prima ou como fonte de inspiração para o planejamento racional de novos fármacos (VIEGAS, 2009).

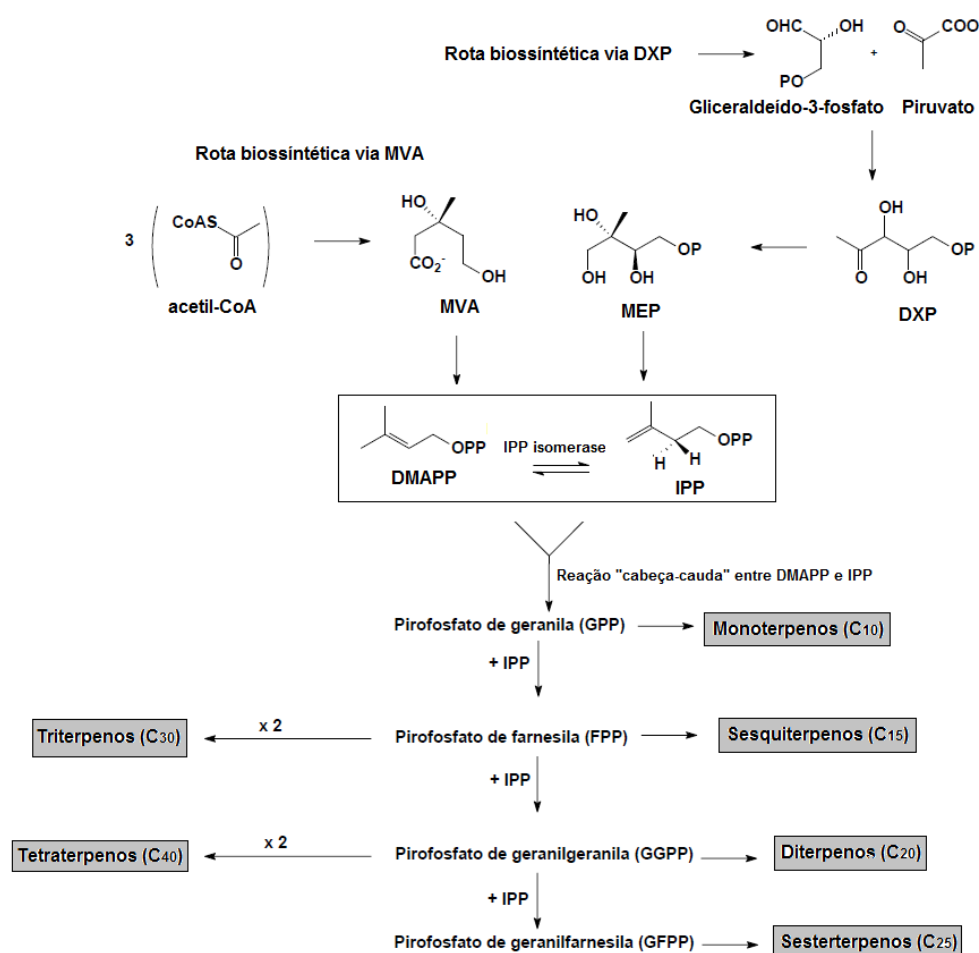
1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1- Diterpenos: biossíntese e classificações

Os terpenos, amplamente distribuídos na natureza, são constituídos por uma classe de metabólitos secundários complexos em termos de estrutura. Esses metabólitos são formados a partir de duas rotas biossintéticas: uma proveniente do mevalonato (MVA) e a outra proveniente do 2-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (KIRBY e KEASLING, 2009).

A primeira rota ocorre no citoplasma e gera o MVA a partir de unidades de acetil coenzima A (acetil-CoA). O MVA é submetido à fosforilação seguida de descaboxilação dando origem ao pirofosfato de isopentenila (IPP). O IPP é isomerizado pela enzima IPP isomerase formando o γ , γ – dimetilalila (DMAPP) (GARCÍA e CARRIL, 2009). O IPP e o DMAPP reagem através do modelo clássico “cabeça-cauda” iniciando a formação dos diferentes tipos de esqueletos terpênicos que são classificados, de acordo com o número de unidades isopentânicas, em: monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (**Esquema 2**) (SIMÕES *et al.*, 2004).

A segunda rota proveniente do MEP ocorre nos plastídeos. A reação entre o piruvato e o gliceraldeído-3-fosfato, intermediada por enzimas sintase e descarboxilase, forma o intermediário 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP), que sofre um rearranjo seguido de redução a partir do NADPH para formar MEP. O MEP, por sua vez, origina o IPP e, a partir dessa etapa, essa rota torna-se semelhante à rota proveniente do MVA (**Esquema 2**) (DEWICK, 2002; TOTTE *et al.*, 2000).



Esquema 2: Origem biossintética dos terpenos. Adaptado de TOTTÉ *et al.*, 2000.

Os diterpenos são, portanto, metabólitos secundários da classe dos terpenos, contendo 20 átomos de carbonos e correspondendo a 4 unidades de isopreno (**Figura 3**). Essa classe de terpenos é sintetizada exclusivamente através da rota via MEP (TOTTÉ *et al.*, 2000).

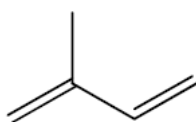


Figura 3: Estrutura química do isopreno.

Os diterpenos podem ser acíclicos ou poli-cíclicos. Os poli-cíclicos são classificados de acordo com o esqueleto carbônico que possuem, sendo que os mais comuns são: bicíclicos (labdano e clerodano), tricíclicos (pimarano,

abietano e vouacapano) e tetracíclicos (graianotoxinas, giberelinas, afidicolanos, estemodanos, cauranos, isocauranos, beierenos, traquilobanos, atisirenos e isoatisereno) (VIEIRA, 2000). A **Figura 4** apresenta estruturas básicas de algumas das diferentes classes de diterpenos.

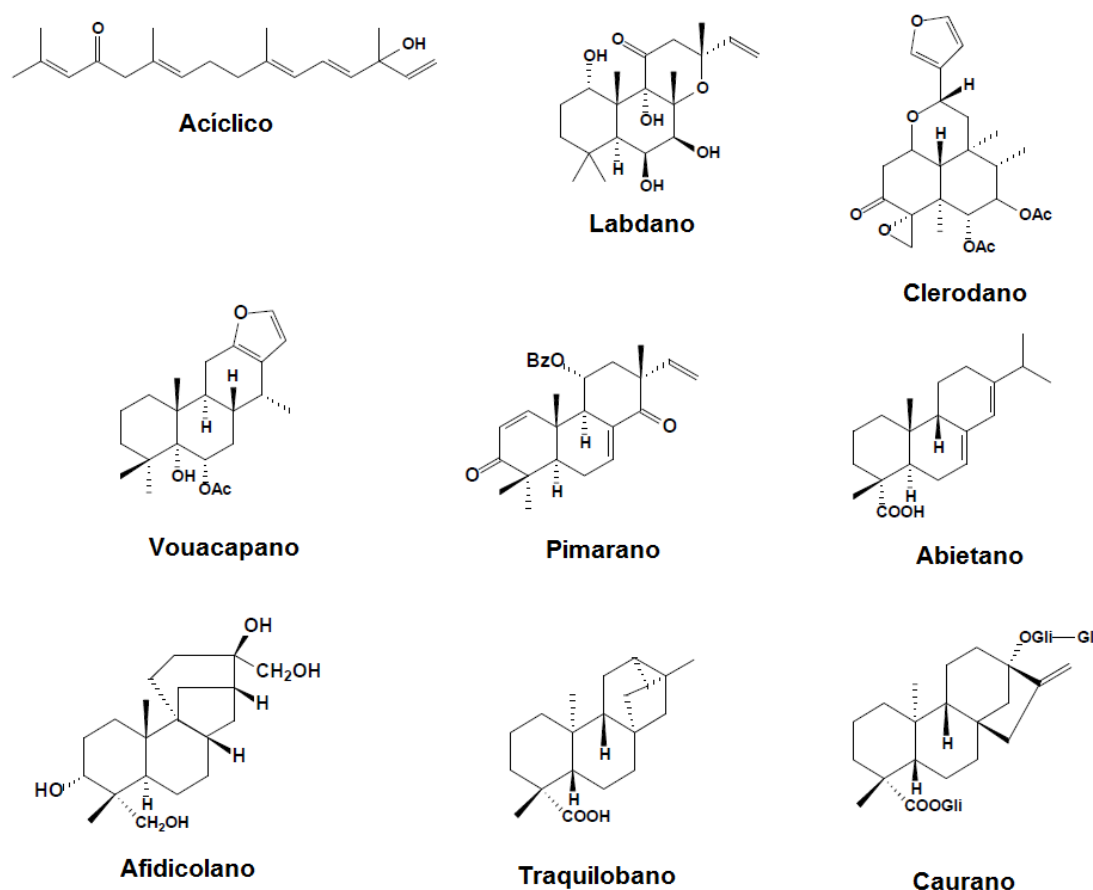


Figura 4: Exemplos de algumas substâncias representantes de algumas das diferentes classes de diterpenos. Adaptado de ROCHA (2010).

Dentre os diterpenos, um interesse especial tem sido observado em relação aos do tipo caurano, como os ácidos *ent*-caur-16-en-19-oico (ácido caurenico) e o *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oico (ácido grandiflorênico) (**Figura 5**), visto que apresentam uma variedade de atividade biológica tais como: antiparasitária (TAKAHASHI *et al.*, 2002), antimicrobiana (STEFANELLO *et al.*, 2006), antiviral (WU *et al.*, 1996) e antioxidante (KO *et al.*, 2008).

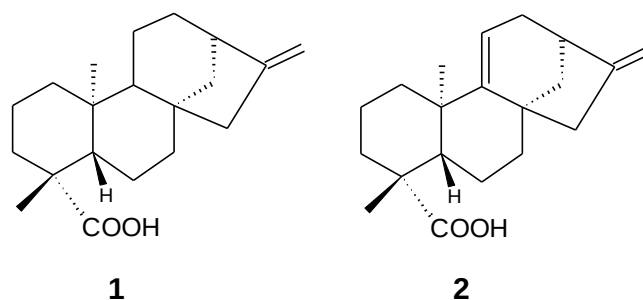


Figura 5: Estruturas químicas dos ácidos caurenico (1) e grandiflorênico (2).

1.2- *Sphagneticola trilobata* (ASTERACEAE): fonte de diterpenos caurânicos

A família Asteraceae compreende cerca de 25.000 espécies distribuídas em aproximadamente 1.600 gêneros, sendo representada no Brasil por cerca de 180 gêneros. Esta família aparece com um número relativamente grande de citações bibliográficas, nas áreas de farmacognosia, fitoquímica e plantas medicinais (CARVALHO G. e CARVALHO M., 2001; HATTORI e NAKAJIMA, 2008).

Sphagneticola trilobata, anteriormente classificada como *Wedelia paludosa*, é pertencente à família Asteraceae (SILVA *et al.*, 2012). Trata-se de uma espécie ornamental, facilmente encontrada em muitas regiões do Brasil especialmente nos estados de Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina, onde é conhecida mais popularmente como pingo-de-ouro, margaridão, pseudo-arnica ou mal-me-quer-do-brejo (BATISTA *et al.*, 2009; MEOTTI *et al.*, 2006; SARTORI, 2005). É muito freqüente em regiões húmidas (BACCARIN *et al.*, 2009).

A *S. trilobata* é uma planta herbácea com caule castanho avermelhado, folhas opostas, curto-pecioladas e membranáceas, apresentando pelo nas duas faces, mais pronunciadamente na dorsal (BACCARIN *et al.*, 2009).

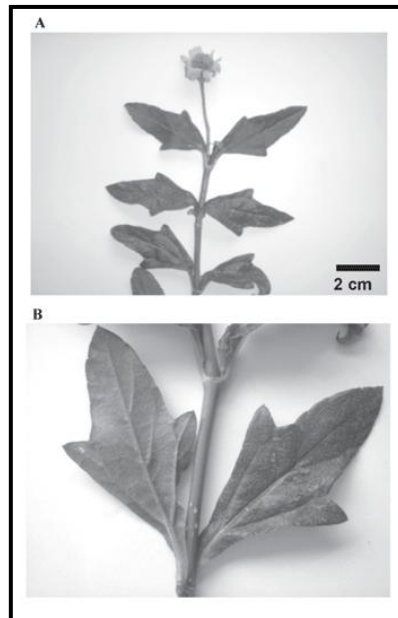


Figura 6: Foto da planta *S. trilobata*. **A:** partes aéreas (folhas, flores e caule); **B:** folhas (faces axial e abaxial); (BACCARIN, 2009).

As flores, com coloração amarela, ocorrem em capítulos isolados a partir da axila foliar, com receptáculo cônico e carnoso (**Figura 7**) (BACCARIN *et al.*, 2009).



Figura 7: Foto da parte floral da *S. trilobata* (SARTORI, 2005).

Os estudos sobre esse gênero e a espécie são voltados principalmente às propriedades químicas e medicinais (AGRA *et al.*, 2008).

Essa espécie é amplamente conhecida pelo poder medicinal de suas partes aéreas. É utilizada na medicina popular para o tratamento de várias patologias, incluindo infecções do trato respiratório e inflamações (CARLI *et al.*,

2009). Também possui ações hipoglicemiante, analgésica, antiespasmódica, antifúngica e antibacteriana (SARTORI *et al.*, 2005).

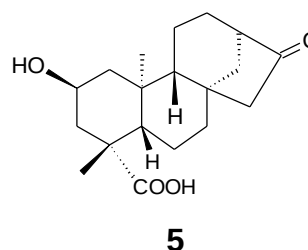
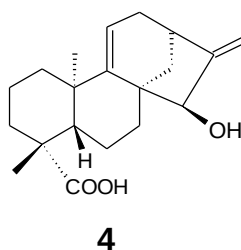
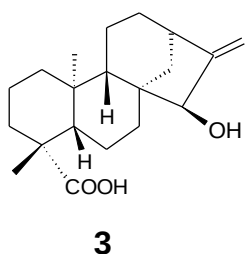
Estudos fitoquímicos realizados com essa planta demonstraram maior concentração de compostos de natureza diterpênica, esteroidal e flavonoidal e ausência de alcaloides (BACCARIN *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos confirmam que a partir dessa espécie é possível obter quantidades significativas do ácido caurenico e do ácido grandiflorênico, sendo estes os compostos majoritários dessa planta (BATISTA *et al.*, 2005 e 2009; CARVALHO *et al.*, 1994; CRAVEIRO *et al.*, 1993; VIEIRA, 2000).

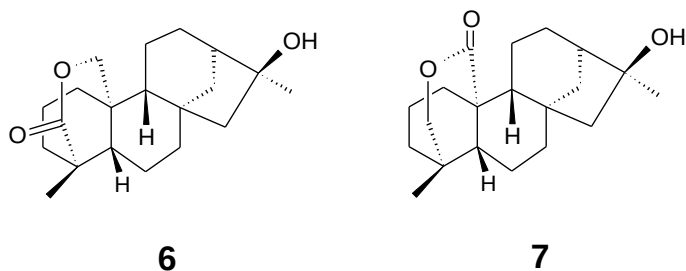
1.3- Modificações estruturais de diterpenos caurânicos

Diterpenos caurânicos é uma classe de produtos naturais que têm apresentado diversos tipos de atividade biológica. Na literatura constam vários exemplos de cauranos, sejam eles isolados ou derivados das substâncias isoladas, detentores de atividade.

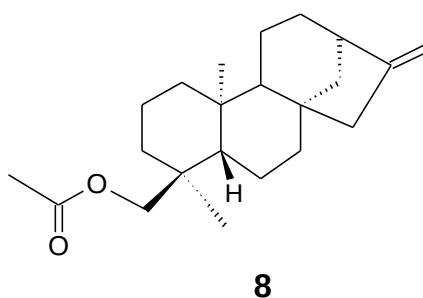
Os ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-oico (**3**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-en-19-oico (**4**) apresentaram atividade alelopática sobre o crescimento da raiz da *Lactuca sativa* (alface) nas concentrações de 10⁻² e 10⁻⁴ mg/mL com porcentagens estimulatórias de 60 e 40 %, respectivamente. Já o ácido diterpênico *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (**5**) apresentou atividade anticolinesterásica na concentração de 100 μ g/mL (ROCHA, 2010).



A tripterifordina (**6**), isolada das raízes de *Tripterygium wilfordii* (Celestraceae) mostrou além de atividade citotóxica, atividade anti-HIV. A neotripterifordina (**7**) mostrou ser ainda mais potente (CHEN *et al.*, 1995).



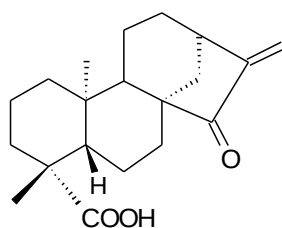
O ácido *ent*-18 α -acetoxi-caur-16-eno (**8**), isolado da partes áreas da *Annona squamosa*, revelou-se como uma substância analgésica e antiinflamatória (CHAVAN *et al.*, 2011).



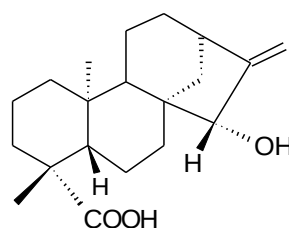
Diterpenos caurânicos com estrutura diversificada são geralmente encontrados em pequenas quantidades a partir de material vegetal, o que limita as suas utilizações. Entretanto, diterpenos menos funcionalizados, como os ácidos caurenoico e grandiflorênico, são obtidos em quantidades significativas, o que torna de extrema importância a modificação química desses compostos com a finalidade de se obter derivados mais funcionalizados e biologicamente ativos.

Vários autores têm descrito diversos tipos de atividade biológica de diterpenos caurânicos obtidos através da modificação estrutural de diterpenos menos funcionalizados e isolados a partir de material vegetal.

RUIZ *et al.* (2008) obteve o ácido *ent*-15-oxo-caur-16-en-19-oico (**9**) a partir da oxidação do ácido *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-oico (**10**) que, por sua vez, foi isolado das partes áreas da *Espeletia schultzii*. Segundo os autores, o composto derivado apresentou efeito proapoptótico contra carcinoma humano de próstata com IC₅₀ = 3,7 μ g/mL.

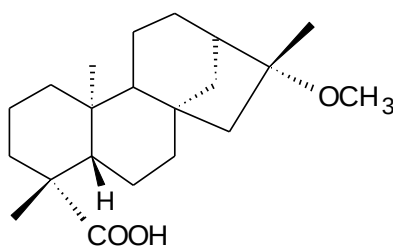


9



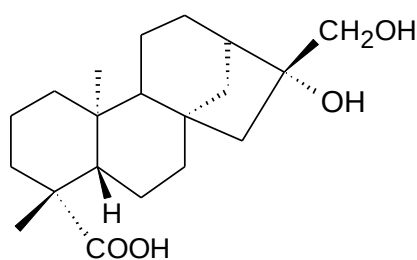
10

O ácido *ent*-16 α -metoxi-caur-19-oico (**11**), derivado do ácido caurenico, apresentou efeito vasodilatador em ratos hipertensos (HIPÓLITO *et al.*, 2011).



11

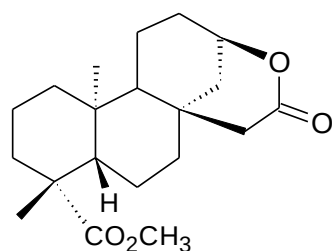
O ácido *ent*-16 α ,17-dihidroxi-cauran-19-oico (**12**), derivado do ácido caurenico, mostrou-se mais eficaz no ensaio de inibição da tirosinase, quando comparado ao seu precursor, uma vez que o seu IC₅₀ foi 88% inferior (IC₅₀= 0,56 e 4,64 μ M, respectivamente) (JUNG *et al.*, 2012).



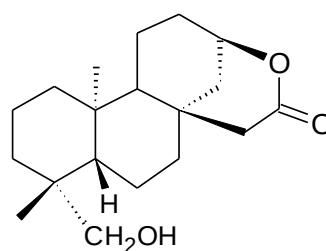
12

As lactonas caurânicas **13** e **14**, sintetizadas partir do ácido caurenico, apresentaram atividade contra carcinoma da mama na concentração de 10⁻⁴

M/L, promovendo 79,0 e 58,0 % de morte celular, respectivamente (VIEIRA, 2000).

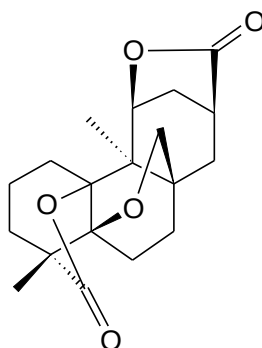


13



14

A lactona **15**, produto rearranjado de um derivado oxidado em C-16 do ácido grandiflorênico, apresentou atividade *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (VIEIRA, 2006).



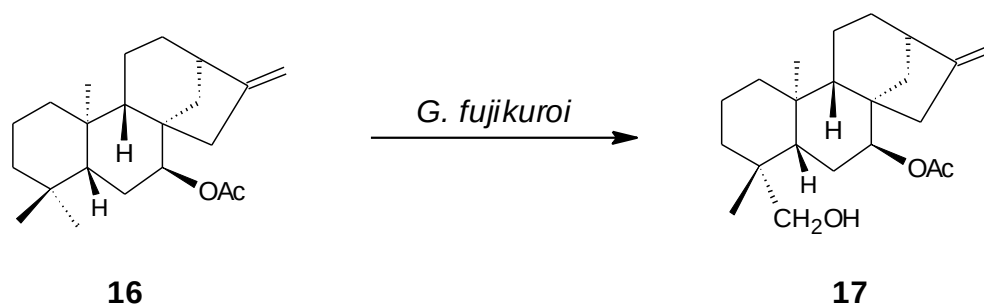
15

Além de reações químicas, as biotransformações têm sido utilizadas como alternativa de modificação estrutural de cauranos. Biotransformação é definida como o uso de sistemas biológicos, micro-organismos vivos ou enzimas isoladas destes, para a realização de modificações químicas em compostos que não são seus substratos naturais (HANSON, 1995).

A utilização de cauranos em conversões microbiológicas tem sido de extrema importância para obtenção de novas substâncias com atividade biológica. A seguir constam alguns exemplos de modificações estruturais em cauranos realizadas por micro-organismos.

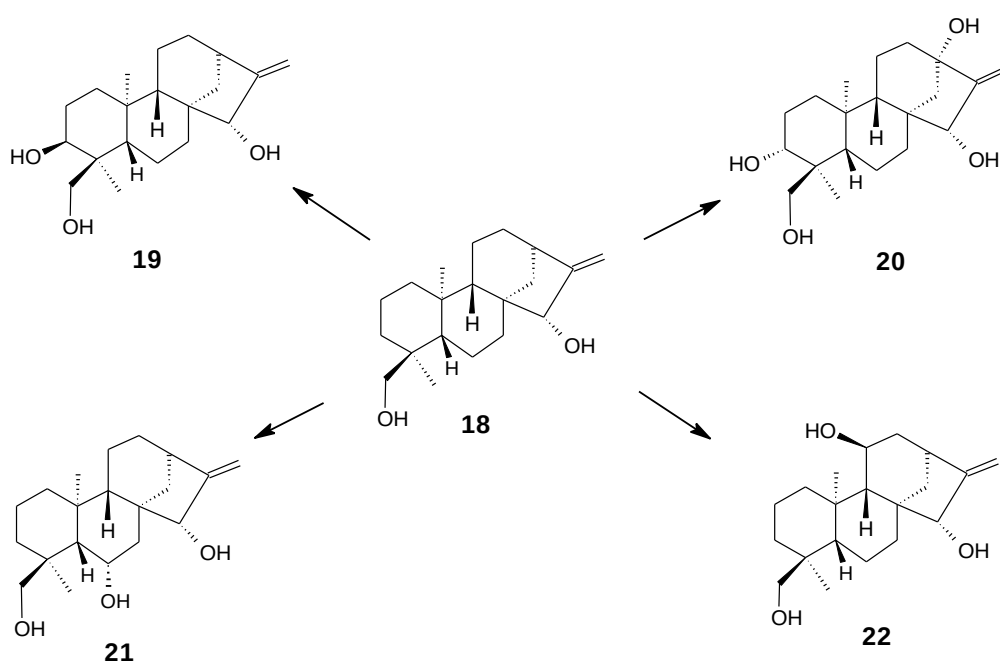
FRAGA *et al.* (2012) relataram recentemente a transformação microbiana do *ent-7 α* -acetoxi-caur-16-eno (**16**) por *Gibberella fujikuroi*

(Esquema 3) levando a obtenção do *ent*-7 α -acetoxi-19-hidroxi-caur-16-eno (17).



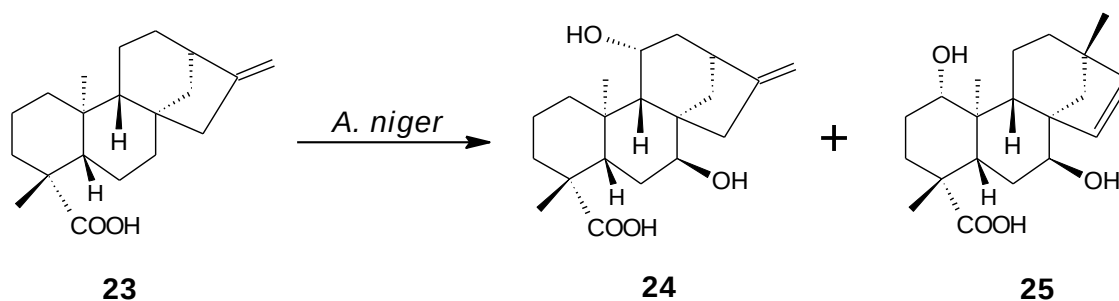
Esquema 3: Biotransformação do *ent*-7 α -acetoxi-caur-16-eno (16) em *ent*-7 α -acetoxi-19-hidroxi-16-eno (17) por *G. fujikuroi* (FRAGA *et al.*, 2012).

O fungo *Mucor plumbeus* mostrou-se bastante eficiente para hidroxilar diversas posições do caurano *ent*-15 β -18-dihidroxi-caur-16-eno (18), mais conhecido por candidiol (FRAGA *et al.*, 2010). O **Esquema 4** apresenta os derivados hidroxilados obtidos: *ent*-3 α ,15 β ,18-trihidroxi-caur-16-eno (19), *ent*-13 β ,15 β ,18-trihidroxi-caur-16-eno (20), *ent*-6 β ,15 β ,18-trihidroxi-caur-16-eno (21) e *ent*-11 α ,15 β ,18-trihidroxi-caur-16-eno (22).



Esquema 4: Produtos de biotransformação do candidiol (18) por *M. plumbeus* (FRAGA *et al.*, 2010a).

Hidroxilações e rearranjo em cauranos também foram relatados por MARQUINA *et al.* (2009). Segundo os autores, o ácido *ent*-caur-16-en-19-oico (**23**) foi biotransformado nos ácidos *ent*-7 α ,11 β -dihidroxi-caur-16-en-19-oico (**24**) e *ent*-1 β ,7 α -dihidroxi-caur-16-en-19-oico (**25**) através do fungo *Aspergillus niger* (Esquema 5).



Esquema 5: Produtos de biotransformação do ácido *ent*-caur-16-en-19-oico (**23**) por *A. niger* (MARQUINA *et al.*, 2009).

Neste contexto, fica claro que diterpenos caurânicos podem ser detentores de uma grande variedade de atividade biológica. Entretanto, a utilização e exploração destas substâncias são limitadas pelo pequeno número de derivados diferentes obtidos a partir do material vegetal em quantidades suficientes para avaliação biológica. Portanto, torna-se muito importante o estudo das modificações químicas de precursores mais simples obtidos em quantidades mais significativas em determinadas plantas. Essas modificações podem ser realizadas eficientemente por reações químicas ou através de biotransformações.

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

O projeto proposto teve como objetivo efetuar modificações estruturais nos diterpenos caurânicos ácido caurenico e ácido grandiflorênico, através de síntese e de biotransformação, com a finalidade de se obter derivados com propriedades biológicas.

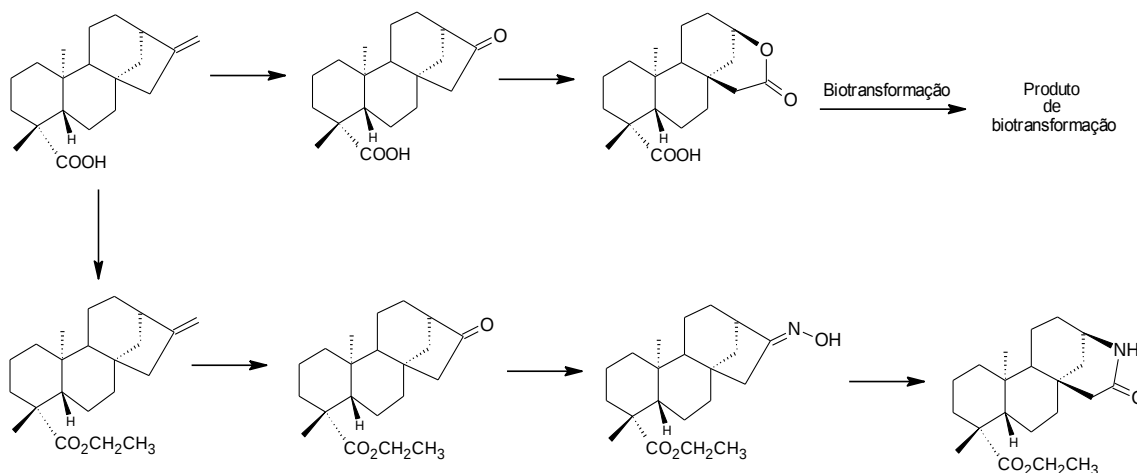
2.2- Objetivos específicos

- Preparo de extrato a partir das partes áreas da *S. trilobata* e o isolamento dos diterpenos ácido caurenico e ácido grandiflorênico;
- Modificações estruturais por reações químicas dos diterpenos obtidos a partir do material vegetal para a obtenção de derivados mais funcionalizados;
- Modificações estruturais por reações de biotransformação dos derivados obtidos para a obtenção de derivados funcionalizados em posições que geralmente não são acessíveis por reações químicas;
- Elucidação estrutural das substâncias obtidas utilizando técnicas de RMN de ^1H e de ^{13}C mono e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e NOESY), espectrometria de massas e infravermelho;
- Avaliação da atividade antibacteriana, antifúngica e de inibição da enzima acetilcolinesterase a fim de se observar alterações nas propriedades biológicas em relação à atividade dos precursores para estabelecer correlações entre estrutura química e efeito biológico.

2.3- Propostas de modificações estruturais

O ácido caurenico será submetido a modificações estruturais, através de reações químicas e de bionsformações, com o objetivo de se obter

derivados com grupos lactona, hidroxila, oxima e lactama. O esquema da rota de modificação estrutural proposta está representado através do **Esquema 6**.



Esquema 6: Proposta de modificações estruturais para o ácido caurenóico.

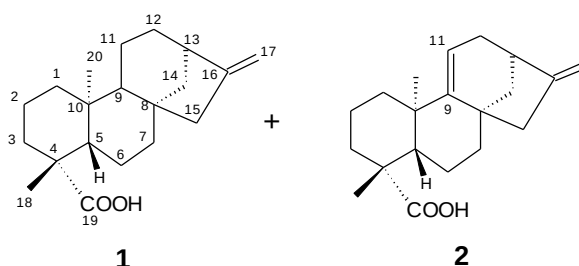
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Obtenção da mistura dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2) a partir das partes aéreas de *Sphagneticola trilobata*

As partes aéreas de *S. trilobata* são frequentemente utilizadas para obtenção de diterpenos com esqueleto caurânico (BATISTA *et al.*, 2009, 2010; BRESCIANI *et al.*, 2004; CARLI *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2007; VIEIRA, 2000). Sua utilização é justificada principalmente por dois motivos: 1) a sustentabilidade do processo, já que utiliza-se material vegetal proveniente de poda e 2) as quantidades significativas dos diterpenos obtidos. Assim, a partir de 3 kg da planta seca e utilizando-se acetato de etila como solvente, foram obtidos 127 g de extrato vegetal. O extrato foi trabalhado de forma usual utilizando-se cromatografia em coluna de sílica gel. Somente as frações que pareciam conter quantidades significativas dos diterpenos de interesse foram trabalhadas. Este fato foi evidenciado pela presença de material cristalizado em frações contendo material oleoso de coloração alaranjada. Estas frações foram

submetidas a processos de solubilização, decantação e filtração utilizando-se éter de petróleo como solvente para remoção do material oleoso e obtenção do sólido branco. Após este tratamento, foi possível obter uma mistura de ácidos diterpênicos (5,5 g) contendo os ácidos caurenoico (**1**) e grandiflorênico (**2**) na proporção estimada de 2:1 determinada através dos sinais nos espectros de RMN de ^1H .

3.1.1- Identificação da mistura dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-oico (**1**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oico (**2**)



A mistura de ácidos foi obtida como um sólido branco com faixa de fusão de 156,0 a 179,1 °C. O espectro no IV (**Figura 23**, pág.113) evidenciou uma banda de absorção larga centrada em 3448 cm^{-1} , referente ao estiramento do grupo hidroxila, e uma banda atribuída ao estiramento de grupo carbonila em 1694 cm^{-1} , ambas relacionadas à função ácida. Também foi observada uma banda em 1654 cm^{-1} que foi atribuída ao estiramento da ligação dupla exocíclica.

O espectro de RMN de ^1H dessa mistura (**Figura 24**, pág. 113) apresentou três simpletos, atribuídos aos grupos metílicos que encontram-se ligados a carbonos não hidrogenados: em δ 0,95 e δ 1,02 (relacionados aos hidrogênios H-20 de **1** e de **2**, respectivamente) e em δ 1,24 (H-18 de **1** e de **2**).

Na região de hidrogênios olefínicos, observaram-se sinais largos que correspondem aos hidrogênios H-17 de **1** (δ 4,73 e δ 4,79, este último sobreposto) e de **2** (δ 4,79 sobreposto e δ 4,91). Um sinal largo centrado em δ 5,25 corresponde ao H-11 de **2**.

O espectro de RMN de ^{13}C da mistura dos ácidos (**Figura 25**, pág. 114) evidenciou a presença de dois sinais de carbonos carboxílicos (δ 184,6 e δ 184,4). Com o auxílio do subespectro DEPT-135 (**Figura 26**, pág. 114), foram

atribuídos todos os sinais de carbonos. Os sinais δ 103,09 e δ 105,59 foram atribuídos aos carbonos metilênicos (C-17) de **1** e de **2**, respectivamente, e o sinal em δ 156,02 ao carbono não hidrogenado C-16. A presença da insaturação entre os carbonos 9 e 11 no composto **2** foi indicada através dos sinais em δ 114,9 (C-11, carbono metínico) e δ 158,6 (C-9, carbono não hidrogenado).

O espectro de massas de alta resolução dessa mistura (**Figura 27**, pág. 115) apresentou dois picos $[M-H]^-$ com m/z equivalentes a 301,2165 e 299,2015, que correspondem às massas de **1** (302,2246 g mol⁻¹) e de **2** (300,2089 g mol⁻¹).

A comparação dos dados espectrais obtidos com dados da literatura (**Tabela 20**, pág. 136) (BATISTA *et al.*, 2007; GUILLOPÉ *et al.*, 2011; HUESO-FALCÓN *et al.*, 2010; ROCHA, 2010; TAKAHASHI *et al.*, 2001; VIEIRA, 2000; VIEIRA *et al.*, 2002a) permitiu a identificação desta mistura de ácidos diterpênicos como sendo constituída pelos ácidos caurenoico (**1**) e grandiflorênico (**2**).

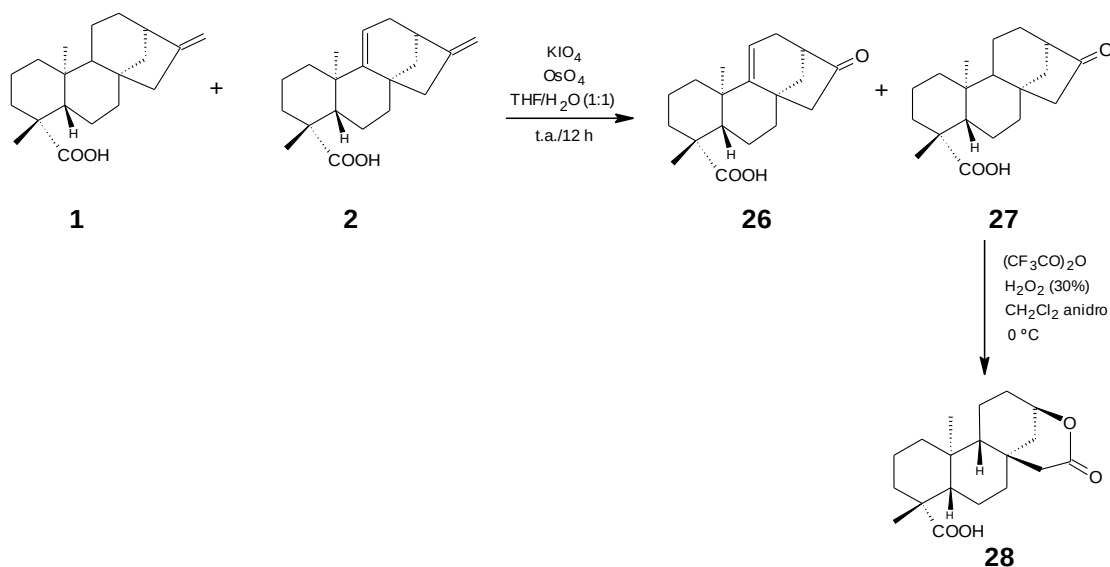
3.2- Preparação da lactona **28** a partir da mistura dos ácidos caurânicos **1** e **2**

Na literatura consta uma diversidade de produtos naturais com função lactona. Esses compostos geralmente apresentam propriedades biológicas, tais como anti-tumoral (BRAGUINI *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2012), anti-bacteriana (TANG *et al.*, 2011), anti-fúngica (COENH *et al.*, 2011), anti-protozoária (COTA *et al.*, 2011; LOZANO *et al.*, 2012; SÜLSEN *et al.*, 2008) e anti-larvas (MARCOS *et al.*, 2000). Os estudos mostram que existe uma relação entre a presença da função lactona com a atividade biológica desses produtos.

Outra característica que está relacionada à potencialização da atividade biológica é a presença de muitos grupos funcionais, principalmente hidroxilas. Cauranos poli-hidroxilados, geralmente obtidos em pequenas quantidades a partir do material vegetal, têm apresentado atividade anti-tumoral e anti-HIV (WU *et al.*, 1996; GHISALBERTI, 1997).

Diante desses dados, a lactona foi preparada com intuito de avaliar sua atividade biológica. Posteriormente, foi submetida a reações de biotransformação com a intenção de se obter uma lactona caurânica ativa biologicamente e funcionalizada em posição não convencional.

A lactona **28** foi obtida em duas etapas: inicialmente realizou-se a quebra oxidativa da ligação dupla exocíclica dos ácidos, com quantidades catalíticas de tetróxido de ósmio, na presença de periodato de potássio para se obter as norcetonas **26** e **27**. Posteriormente a norcetona **27**, proveniente do ácido caurenoico (**1**), foi submetida à reação de Baeyer-Villiger com ácido trifluoroperacético gerado *in situ* pela adição de anidrido trifluoroacético e peróxido de hidrogênio a 30% (**Esquema 7**).



Esquema 7: Proposta em duas etapas para a preparação de lactona **28** a partir da mistura dos ácidos caurânicos **1** e **2**.

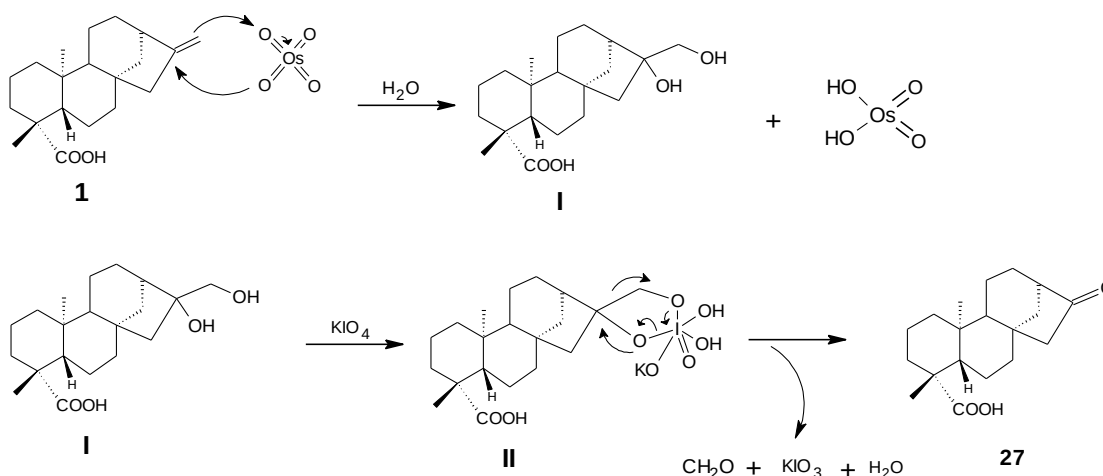
3.2.1- Quebra oxidativa da ligação dupla exocíclica da mistura de ácidos caurenoico (**1**) e grandiflorênico (**2**) utilizando tetróxido de ósmio em quantidades catalíticas

A separação da mistura dos ácidos caurânicos **1** e **2** por cromatografia convencional é difícil uma vez que ambos possuem praticamente a mesma

polaridade. Esse fato é verificado pela presença de uma única mancha por CCDS mesmo utilizando-se diversas misturas de eluentes.

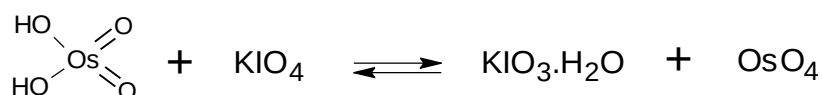
Segundo estudos prévios (ROCHA, 2010; VIEIRA, 2000), a separação é possível utilizando-se sílica gel impregnada com nitrato de prata. Entretanto, a preparação desse adsorvente não é fácil uma vez que ele se degrada facilmente com aquecimento ou exposição à luz, perdendo sua função. Assim sendo, nesse trabalho, optou-se por utilizar a mistura dos ácidos na reação de quebra oxidativa da dupla ligação exocíclica, para se obter as respectivas norcetonas. Esses derivados possuem, por CCDS, Rfs diferentes e são facilmente separados por cromatografia *flash*.

A oxidação da mistura foi realizada utilizando-se periodato de potássio em presença catalítica de tetróxido de ósmio, conforme descrito em PAPPO *et al.* (1956). Esse método de oxidação é conhecido como Oxidação de *Lemieux-Johnson* e ocorre em duas etapas: primeiro a ligação dupla carbono-carbono é clivada através do tetróxido de ósmio formando-se um diol; posteriormente, a ligação simples entre carbono-carbono do intermediário **II** é clivada pelo periodato de potássio, formando-se a carbonila (**Esquema 8**).



Esquema 8: Mecanismo da reação de oxidação de *Lemieux-Johnson*. Adaptado de PAPPO *et al.* (1956).

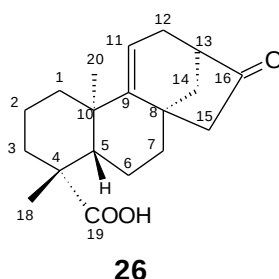
O tetróxido de ósmio é regenerado a partir do periodato de sódio (**Esquema 9**), e por isso basta estar presente em quantidades catalíticas para que a reação ocorra.



Esquema 9: Regeneração do tetróxido de ósmio através do periodato de potássio (PAPPO *et al.*, 1965).

Após purificação por cromatografia *flash*, foram obtidos os ácidos *ent*-16-oxo-17-nor-caur-9(11)-*en*-19-oico (**26**) e *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (**27**) com rendimento estimado de 45 % e 65 %, respectivamente.

3.2.1.1- Identificação do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-caur-9(11)-*en*-19-oico (**26**)



O composto **26** foi isolado na forma de um sólido branco com faixa de fusão de 228,0-232,0 °C.

O espectro no IV da norcetona **26** (**Figura 28**, pág. 115) apresentou uma banda larga centrada em 3190 cm⁻¹, referente ao estiramento do grupo hidroxila da função ácida, e duas bandas (1726 e 1712 cm⁻¹) correspondentes ao estiramento dos dois grupos carbonílicos presentes no composto.

No espectro de RMN de ¹H de **26** (**Figura 29**, pág. 116), observou-se um sinal na região de hidrogênios olefínicos em δ 5,30 referente ao H-11 e o desaparecimento dos sinais dos hidrogênios da ligação dupla exocíclica (δ 4,73 e δ 4,79).

No espectro de RMN de ¹³C (**Figura 30**, pág. 116) há a presença de 19 sinais de carbono, ausência do sinal do carbono metilênico olefínico (δ 105,2) e a presença de um sinal em δ 221,7 na região de carbono carbonílico de cetonas (atribuído ao C-16) comprovam a quebra oxidativa da ligação dupla

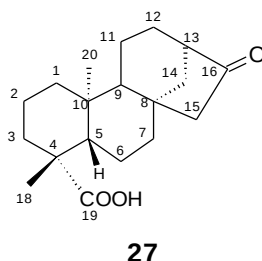
exocíclica. Através da análise do subespectro DEPT-135 (**Figura 31**, pág. 117) confirmou-se os sinais atribuídos através do espectro de RMN de ^{13}C .

Os sinais de carbonos olefínicos em δ 114,9 e δ 156,0 foram atribuídos aos carbonos C-11 e C-9, respectivamente. O sinal do carbono carboxílico foi observado em δ 183,9.

O espectro de massas de alta resolução de **26** (**Figura 32**, pág. 117), apresentou um pico $[\text{M-H}]^-$ equivalente a 301,1810 m/z (massa molecular = 302,1882 g mol^{-1}).

Todos esses dados espectroscópicos foram comparados e encontram-se de acordo com os dados apresentados na literatura (**Tabela 21**, pág. 137) (BATISTA *et al.*, 2007; ROCHA, 2010; VIEIRA, 2000; VIEIRA *et al.*, 2006). O composto **26**, portanto, corresponde ao ácido *ent*-16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico.

3.2.1.2- Identificação do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (**27**)



O composto **27** foi isolado como sólido branco, com faixa de fusão de 225,0 a 235,7 $^{\circ}\text{C}$.

No espectro de IV do composto **27** (**Figura 33**, pág. 118), foi evidenciada a modificação do grupo funcional. A banda relativa ao estiramento de ligação dupla exocíclica existente no material de partida (em 1654 cm^{-1}) não foi visualizada. Além disso, observou-se um deslocamento (de 1694 para 1732 cm^{-1}) e um alargamento da banda relativa ao estiramento de grupo carbonila. Esse alargamento foi associado a uma sobreposição de bandas, sugerindo um novo grupo carbonila na molécula. O deslocamento é compatível com a presença de um grupo carbonila proveniente de uma cetona.

Os dados do espectro no IV foram confirmados pela análise dos espectros de RMN de ^1H (**Figura 34**, pág. 118) e de ^{13}C (**Figura 35**, pág. 119) onde também não se observaram os sinais de hidrogênios (em δ 4,73 e em δ 4,79) nem de carbonos (em δ 103,0 e em δ 156,0) olefínicos. No espectro de RMN de ^{13}C , com o auxílio do subespectro DEPT-135 (**Figura 36**, pág. 119), confirma-se a quebra oxidativa pelo surgimento do sinal em δ 222,6 referente ao grupo carbonila de cetona. Todos os outros sinais observados estão condizentes com o esqueleto caurânico.

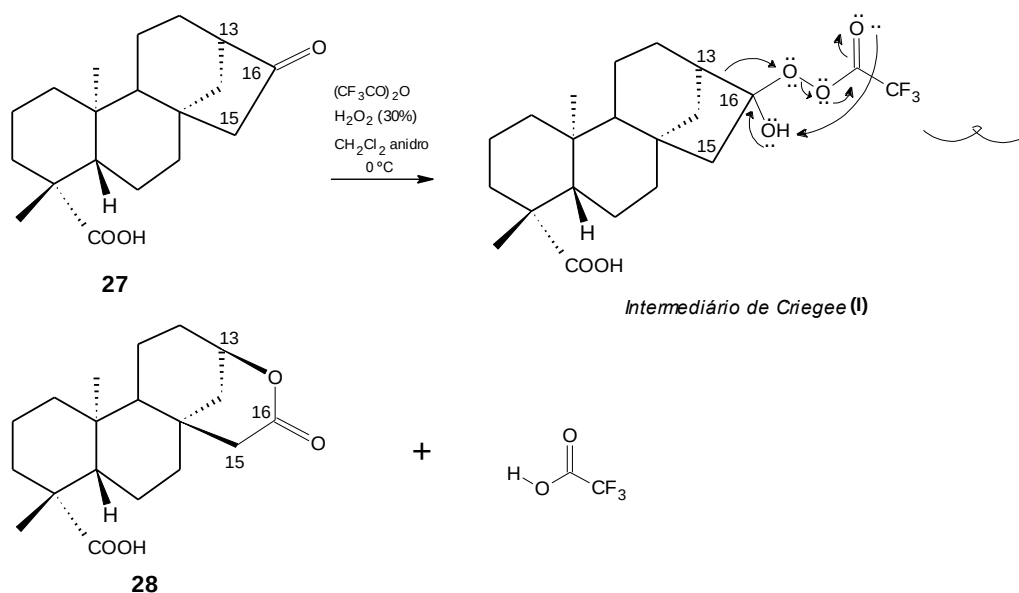
O espectro de massas de alta resolução (**Figura 37**, pág. 120) apresentou um pico $[\text{M}-\text{H}]^-$ equivalente a 303,1976 m/z , o que corresponde à massa da molécula proposta (massa molecular de 304,2038 g mol^{-1}).

A comparação dos dados espectrais obtidos com dados da literatura (**Tabela 21**, pág. 137) (BOECK *et al.*, 2005; ROCHA, 2010; VIEIRA, 2000; VIEIRA *et al.*, 2002a) permitiu a identificação do composto **27** como sendo o ácido *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico.

3.2.2- Reação de lactonização do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (**27**) através da reação de oxidação de Baeyer-Villiger

A norcetona caurânica **27** foi submetida à reação de oxidação de Baeyer-Villiger com o ácido trifluoroperacético gerado *in situ* pela utilização de anidrido trifluoroacético com peróxido de hidrogênio a 30 %. Após purificação por cromatografia *flash* em coluna com sílica gel utilizando-se como único eluente a mistura hexano/acetato de etila (1:1), obteve-se a lactona **28** com um rendimento de 70 %.

A oxidação de Baeyer-Villiger de cetonas para preparar lactonas, relatada pela primeira vez em 1899 (XU *et al.*, 2012; PARYZEK e KOENIG., 2012), é uma das reações mais frequentemente utilizadas em síntese orgânica. A reação em duas etapas envolve a formação de um intermediário denominado *Intermediário de Criegee*, o qual é formado a partir de um ataque nucleofílico do peroxiácido no grupo carbonila de cetona. No passo seguinte, ocorre a migração do grupo que melhor possa estabilizar a carga positiva parcial do oxigênio (**Esquema 10**).



Esquema 10: Obtenção da lactona **28** a partir da reação de oxidação de Baeyer-Villiger.

Diante da possibilidade de migração de dois grupos, em cetonas assimétricas, regioseletividade é frequentemente observada em oxidações de Baeyer-Villiger. Efeitos eletrônicos são utilizados para explicar a regioseletividade (PARYZEK e KOENIG *et al.*, 2012). A **Figura 8** mostra os produtos possíveis de serem formados através dessa reação.

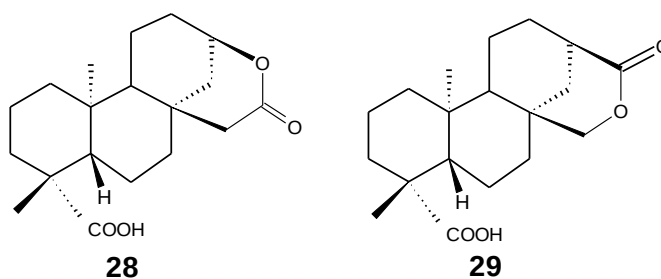
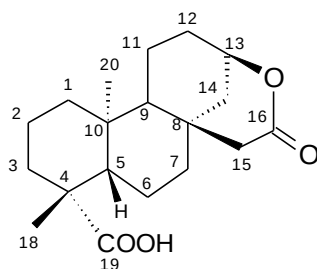


Figura 8: Estruturas das lactonas **28** e **29**, possíveis produtos formados pela migração do C-13 ou pela migração do C-15, respectivamente, na lactonização de **27**.

3.2.2.1 Identificação do ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (**28**)

**28**

O composto **28** foi isolado como um sólido branco, com faixa de fusão de 217,0–219,2 °C (literatura – 218-219 °C) (VIEIRA, 2000).

Uma banda larga centrada em 3296 cm⁻¹, referente ao estiramento OH do grupo ácido, foi visualizada no espectro no IV, bem como duas bandas em 1726 e 1686 cm⁻¹, associadas às carbonilas das funções éster e ácido carboxílico, respectivamente (**Figura 38**, pág. 120).

No espectro de RMN de ¹H de **28**, (**Figura 39**, pág. 121) observaram-se os simpletos referentes aos hidrogênios metílicos H-18 e H-20 do esqueleto caurânico em δ 1,27 e δ 0,97, respectivamente. Observou-se também um sinal largo em δ 4,80, integrado para um hidrogênio. Devido ao valor de sua integral e ao fato de esse hidrogênio ser o mais desblindado do composto, este sinal foi atribuído ao H-13, o que sugere a formação da lactona **28**. Esse fato foi confirmado pelo espectro de RMN de ¹³C.

No espectro de RMN de ¹³C do composto **28** (**Figura 40**, pág. 121), observaram-se dois sinais na região de carbonos carbonílicos, um em δ 183,8 (C-16) e o outro em δ 172,5 (C-19). O deslocamento do sinal do grupo carbonila de δ 222,6 para δ 172,5 (em relação à norcetona **27**) demonstrou a alteração do grupo funcional ocasionada pela oxidação de Baeyer-Villiger. A blindagem desse sinal indica a formação de um grupo carboxila de éster, sendo assim atribuído ao C-16. Com auxílio do subespectro DEPT-135 (**Figura 41**, pág. 121), pode-se constatar a desblindagem do sinal do carbono metínico atribuído ao C-13, de δ 47,7 para δ 75,5 (em relação à norcetona **27**). Essa desblindagem se deve à presença do oxigênio do grupo lactona, o que confirma a migração do C-13, e não do C-15, durante o processo de

lactonização. O sinal do carbono C-15 foi blindado, passando de δ 54,9 para δ 47,9.

O espectro de massas de alta resolução (**Figura 42**, pág. 122) apresentou um pico $[M-H]^+$ intenso em 319,1926 m/z , o que está compatível com a molécula proposta, que possui massa molecular de 320,1988 g mol⁻¹.

A comparação desses dados espectroscópicos com os encontrados na literatura (**Tabela 22**, pág. 138) (VIEIRA, 2000) mostrou que o produto da reação de Baeyer-Villiger trata-se do ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (**28**).

3.3- Reação de biotransformação do ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (**28**)

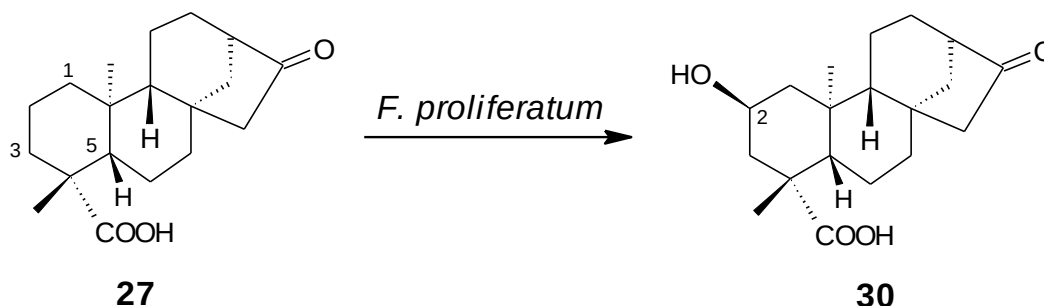
A síntese de diterpenos poli-oxigenados é de interesse por parte de muitos pesquisadores, porque são dificilmente disponíveis a partir de recursos naturais, o que torna a sua exploração limitada. Além disso, tem sido relatada com frequência a considerável bioatividade desses compostos (CHAVAN *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2010; RODILLA *et al.*, 2004, VIEIRA *et al.*, 2002a; ZHI *et al.*, 2002).

Determinadas modificações químicas de produtos naturais são dificilmente acessíveis por métodos clássicos de síntese. Nesse contexto, a biotransformação constitui uma alternativa interessante, uma vez que torna possível efetuar modificações através de diversos tipos de reações, tais como oxidação e redução, em carbonos não funcionalizados. Segundo SINGH *et al.* (2012), a biotransformação é um potencial método de funcionalização, principalmente no caso de oxidação de carbonos inativados.

Vários autores têm relatado oxidação de compostos diterpênicos utilizando fungos (BUCHANAN e REESE, 2001; GHOUMARI *et al.*, 2006; MARQUINA *et al.*, 2009; FRAGA *et al.*, 2001, 2003, 2005, 2007, 2009, 2010a, b, 2012; VIEIRA *et al.*, 2002b).

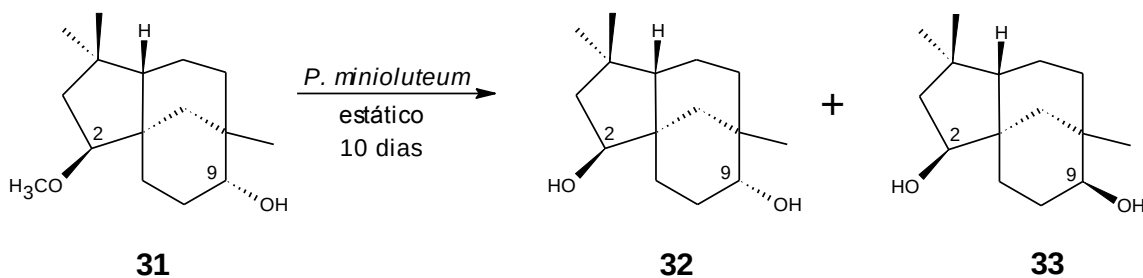
ROCHA *et al.* (2010) relataram resultado promissor na biotransformação do diterpeno caurânico **27**, utilizando o fungo *Fusarium proliferatum*. Segundo

os autores, esse micro-organismo foi capaz de hidroxilar ineditamente a posição C-2 com uma bioconversão de 17,6 % (**Esquema 11**).



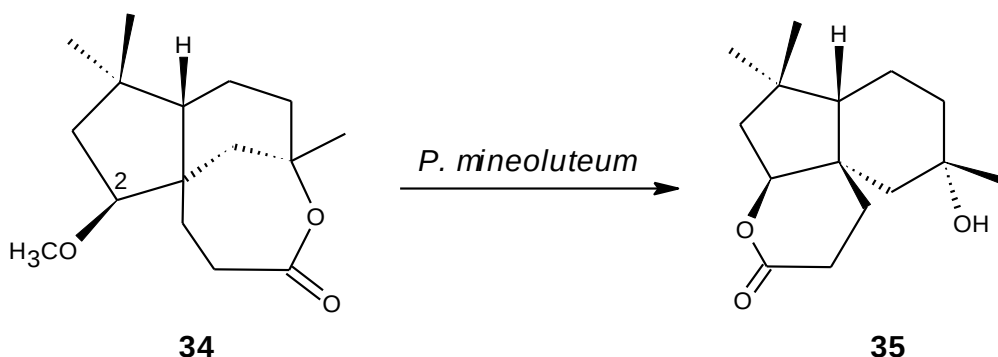
Esquema 11: Biotransformação do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (**27**) com o fungo *F. proliferatum*, produzindo-se o ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (**30**) (ROCHA *et al.*, 2010).

Por outro lado, SOUZA *et al.* (2012) obtiveram resultados promissores com a biotransformação de clovanos utilizando o fungo *Penicillium mineoluteum*. Segundo esses autores, *P. mineoluteum* foi capaz de desmetilar e epimerizar, em condição estática, o 2 β -metoxiclovan-9 α -ol (**31**) (**Esquema 12**) obtendo-se bioconversões de 32 e 14 %, respectivamente.



Esquema 12: Biotransformação do 2 β -metoxiclovan-9 α -ol (**31**) utilizando o fungo *P. mineoluteum*, produzindo-se o clovan-2 β -9 α -diol (**32**) e clovan-2 β -9 β -diol (**33**) (SOUZA *et al.*, 2012).

Segundo SOUZA (2012), ao utilizar como substrato a lactona clovânica **34**, esse micro-organismo, além de desmetilar a metoxila na posição 2, promoveu o rearranjo do anel lactônico originando a lactona **35** (**Esquema 13**). O rendimento desta conversão, equivalente a 16 %, foi consideravelmente alto, em se tratando de biotransformação.



Esquema 13: Biotransformação da lactona clovânica **34**, utilizando o fungo *P. mineoluteum*, produzindo-se a lactona clovânica **35** (SOUZA, 2012).

Levando em consideração esses resultados e o fato de que ainda é pouco explorado o uso desses micro-organismos em biotransformações, os mesmos foram escolhidos para a biotransformação da lactona **28**. Este processo foi utilizado para se obter produtos rearranjados e produtos hidroxilados em posições pouco acessíveis pelos métodos clássicos de síntese.

3.3.1- Reação de biotransformação do ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-caur-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (**28**) com o fungo *F. proliferatum*

Esta reação de biotransformação foi processada sob agitação à temperatura ambiente. A reação e o controle (branco do substrato) foram acompanhados periodicamente por CCDS e, após 25 dias, verificou-se a produção de várias substâncias com polaridade muito próxima à do material de partida. Foi encontrado um alto grau de dificuldade para separação desses compostos *via* CCS e, devido a isso, não se conseguiu o isolamento desses possíveis produtos de biotransformação. Sugere-se, portanto, que esse micro-

organismo seja capaz de biotransformar esse substrato em mais de um derivado, porém, o processo de purificação precisa ser melhor estudado.

3.3.2- Reação de biotransformação do ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16→13-lactona (28) com o fungo *P. mineoluteum*

Da mesma forma utilizada para a biotransformação com o *Fusarium proliferatum*, a reação de biotransformação e o respectivo controle (branco do substrato) foram acompanhados periodicamente por CCDS. A reação foi realizada à temperatura ambiente por um período de 25 dias, porém sem agitação.

Os estudos de reações de biotransformação em SOUZA (2012) com *P. mineoluteum* mostraram que esse micro-organismo promove bioconversões com bons rendimentos em meio estático. Devido a esses resultados, optou-se por utilizar essa condição no experimento envolvendo *P. mineoluteum*.

O material de partida **28** apresentou, por CCDS, uma mancha com o formato de uma calda, típico de compostos ácidos. O extrato obtido após a elaboração dessa biotransformação, mostrou, por CCDS, a presença de uma substância com mancha arredondada sobreposta à mancha do material de partida recuperado. O formato dessa mancha é um indicativo de que não se trata de um ácido carboxílico, havendo, portanto, uma mudança de grupo funcional na região do grupo ácido.

Fez-se necessária mais de uma etapa de purificação para obtenção dessa substância e a última etapa foi realizada através de uma filtração em alumina neutra. Optou-se por esse processo de purificação pelo fato de a alumina ter caráter básico e, por consequência, interagir mais fortemente com o material de partida, retendo-o e facilitando, assim, a eluição e consequente o isolamento do produto. Foram obtidos 2,85 mg de produto e recuperado 102,73 mg (49 %) do material de partida.

3.3.2.1- Identificação do produto de biotransformação através dos seus dados espectroscópicos

O produto de biotransformação obtido a partir do fungo *P. mineoluteum* (**Biot-1**) foi isolado como um composto oleoso com coloração amarela clara.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 9**, pág. 32), os sinais referentes aos hidrogênios metílicos H-18 e H-20, típicos de cauranos, foram encontrados em δ 0,91 (s, 1H) e δ 1,14 (s, 1H), respectivamente. Os sinais em δ 4,86 (d, 1H), δ 4,43 (dd, $J = 9,6$ Hz, 1H), δ 3,40 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H) são ausentes no espectro de RMN de ^1H do material de partida (lactona **28**) e encontram-se na região de hidrogênios próximos a grupos oxigenados.

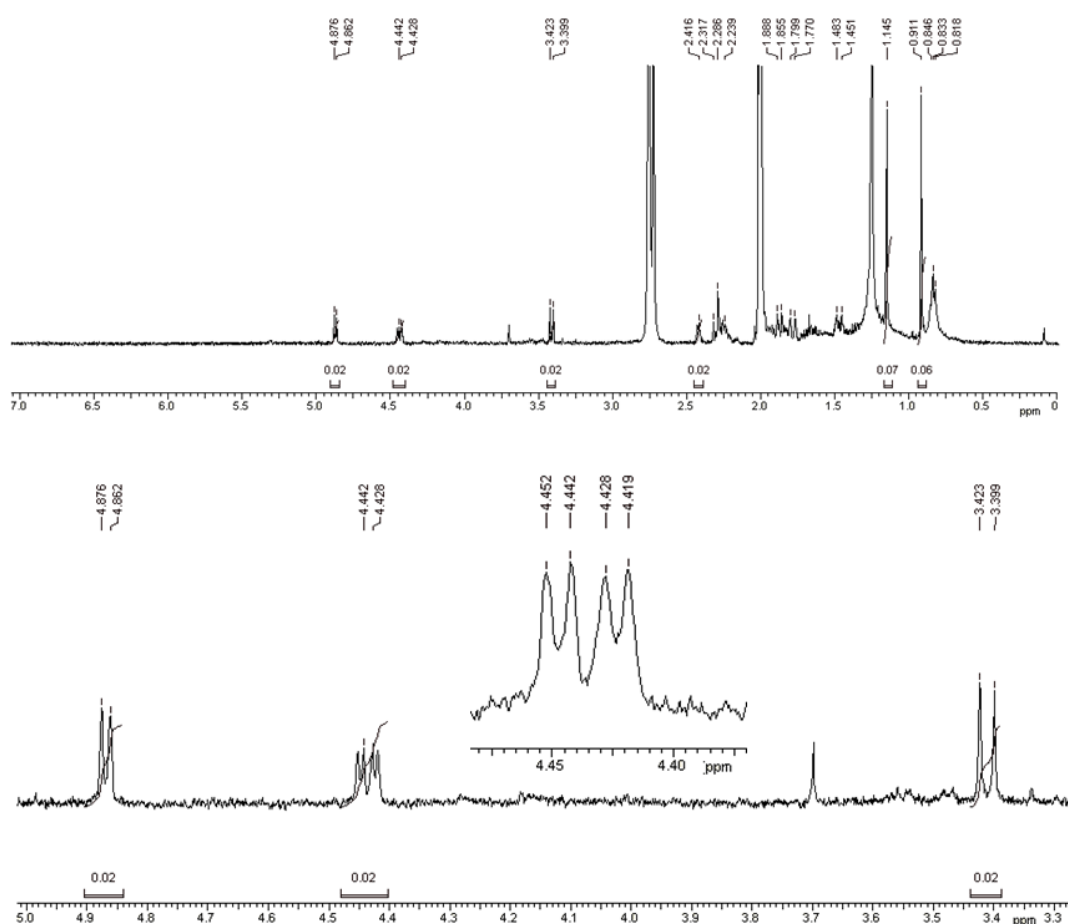


Figura 9: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **Biot-1**.

Através do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 10**, pág 33) e com o auxílio do subespectro DEPT-135 (**Figura 11**, pág. 33), foram encontrados dois sinais de carbonos metílicos, dois sinais de carbonos metínicos, oito sinais de carbonos metilênicos e sete sinais de carbonos não hydrogenados. O espectro de RMN de ^{13}C da **Biot-1** apresenta, em relação ao material de partida **28**, um sinal a menos de CH_2 e de CH e dois sinais a mais de carbonos não hydrogenados. Também foi observada a ausência do sinal do carbono carboxílico, que, no caso do material de partida, localiza-se em δ 183,5 e a conservação do sinal referente ao carbono carbonílico da função lactona (δ 178,6).

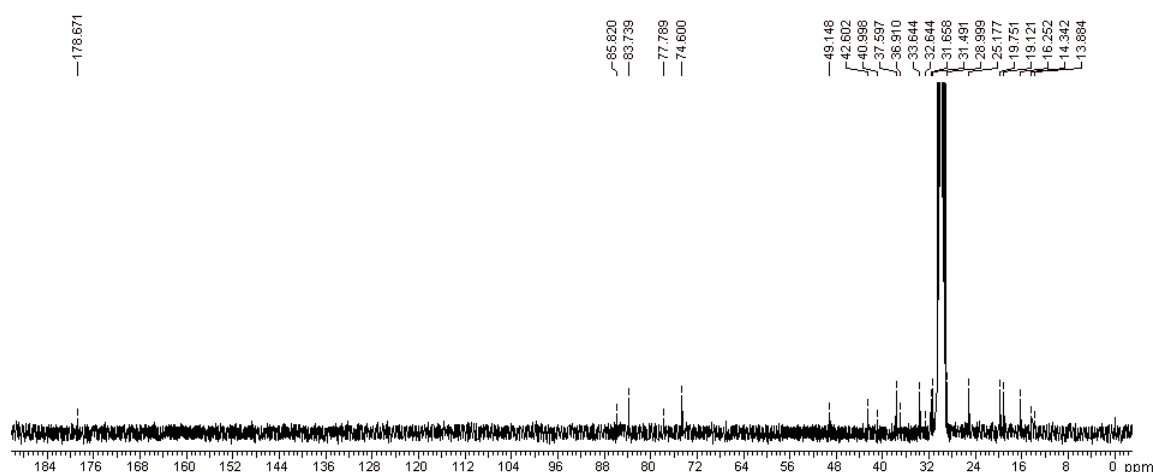


Figura 10: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **Biot-1**.

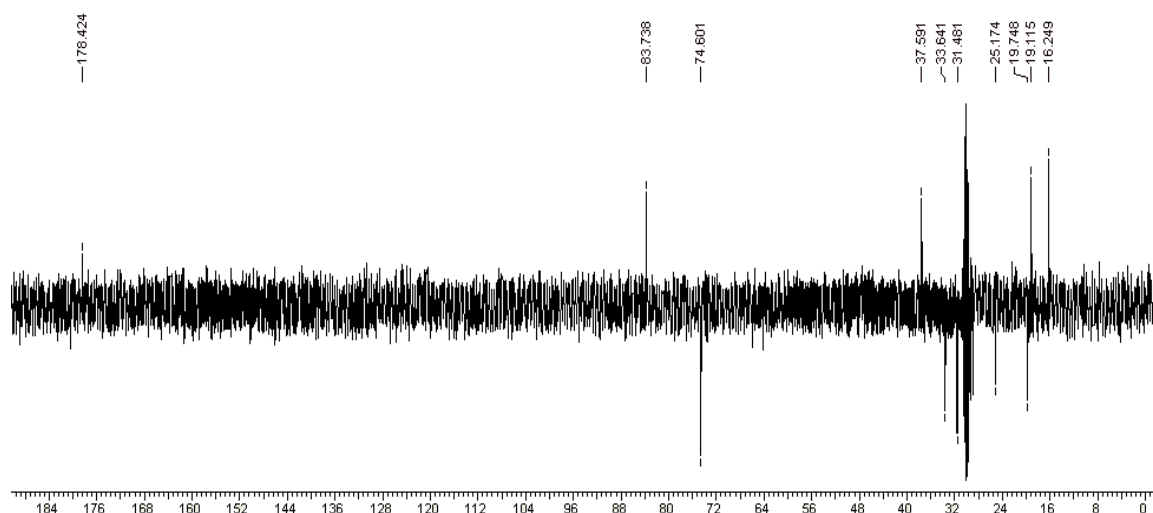
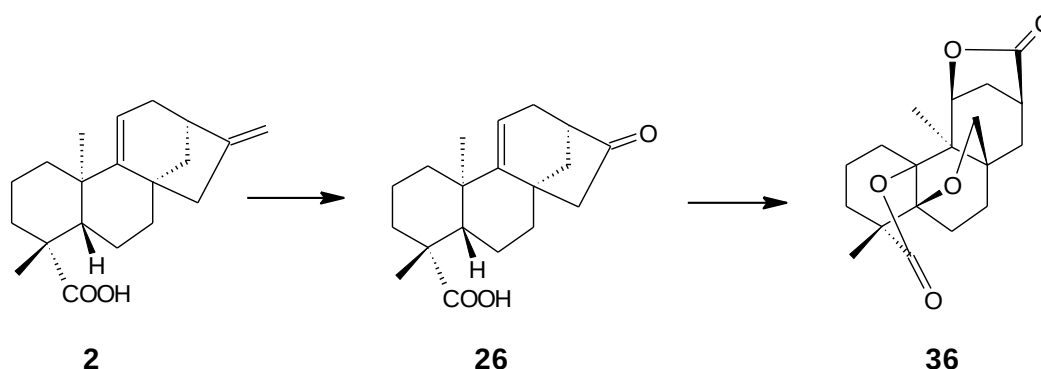


Figura 11: Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de **Biot-1**.

A partir da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , observou-se que **Biot-1** possui sinais característicos do esqueleto caurânico. Entretanto os valores de deslocamentos químicos são muito diferentes do material de partida **28**, indicando que ocorreu uma considerável modificação estrutural. Como foi relatado que *P. mineoluteum* é capaz de promover rearranjos em anéis lactônicos conservando a função lactona (SOUZA, 2012) e tendo em vista que foi observado o sinal em δ_{C} 178,6 (C-16), fez-se um levantamento, na literatura, de estruturas caurânicas com função lactona no intuito de auxiliar no processo de elucidação da estrutura de **Biot-1**.

VIEIRA *et al.* (2006) sintetizaram o *ent*-caur-5 α -15 α -epoxi-9-10-friedo-10 β -11 β -dihidroxi-16,11 α :19,10 β -diseco-17-nor-16 $\rightarrow$ 11:19 $\rightarrow$ 10-dilactona (**36**) a partir do ácido grandiflorênico (**Esquema 14**).



Esquema 14: Síntese da lactona caurânica **36** a partir do ácido grandiflorênico (**2**) (VIEIRA *et al.*, 2006).

Os deslocamentos químicos da lactona **36** mostraram-se muito semelhantes aos encontrados para **Biot-1** (Tabela 1).

Tabela 1: Comparação dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H da **Biot-1** (δ , CDCl_3 , 100 MHz) e da Lactona **36*** (δ , CDCl_3 , 50 MHz)

	Biot-1	Lactona 36*	Biot-1	Lactona 36*
Posição	δ_{C}		δ_{H}	
1	31,5	30,9		
2	19,8	18,8		
3	29,2	28,4		
4	49,1	48,6		
5	77,8	77,0		
6	25,2	24,4		
7	28,9	28,1		
8	36,9	36,1		
9	42,6	41,7		
10	85,8	85,2		
11	83,7	83,0	4,86 (d, J = 5,6 Hz)	4,81 (d, J = 6,0 Hz)
12	33,6	33,1		
13	37,6	36,7	2,52 (sl)	2,53 (sl)
14	31,6	31,2		
15	74,6	73,9	α : 3,40 (d, J = 9,6 Hz)	α : 3,46 (d, J = 10 Hz)
15	-	-	β : 4,43 (dd, J = 9,6 Hz)	β : 4,55 (dd, J = 10 Hz)
16	178,6	178,2		
17	-	-		
18	16,2	15,7	0,91(s)	1,05 (s)
19	178,6	178,9		
20	19,1	19,0	1,14	1,18 (s)

*VIEIRA *et al.*, 2006

A estrutura de **Biot-1** como sendo a lactona **36** foi confirmada a partir da análise dos mapas de contornos HSQC (**Figura 12**, pág.36), COSY (**Figura 13**, pág. 36) e HMBC (**Figura 14**, pág. 37).

No mapa de contornos HSQC (**Figura 12**, pág. 36), foi verificado que os sinais em δ_{H} 3,40 (H-15 α) e δ_{H} 4,42 (H-15 β) correlacionam com o sinal em δ_{C} 74,6, atribuído ao C-15.

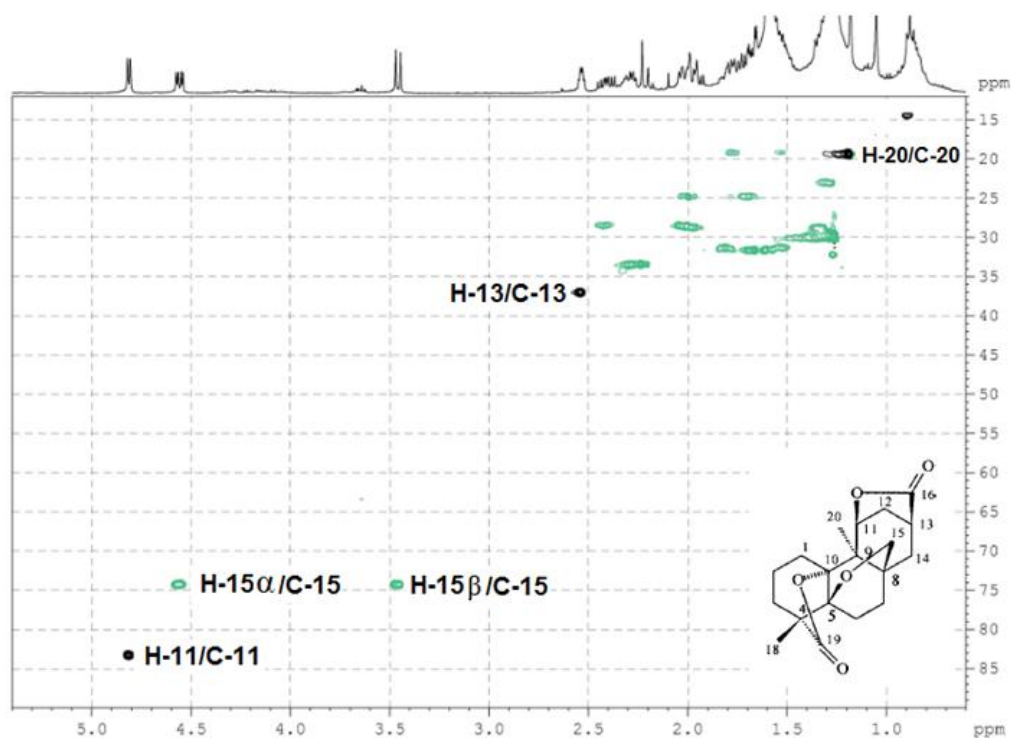


Figura 12: Mapa de contornos HSQC (100 MHz, CDCl_3) de **Biot-1**.

No mapa de contornos COSY (Figura 13, pág. 36) os sinais em δ_{H} 3,40 (H-15 α) e em δ_{H} 4,42 (H-15 β) correlacionam entre si.

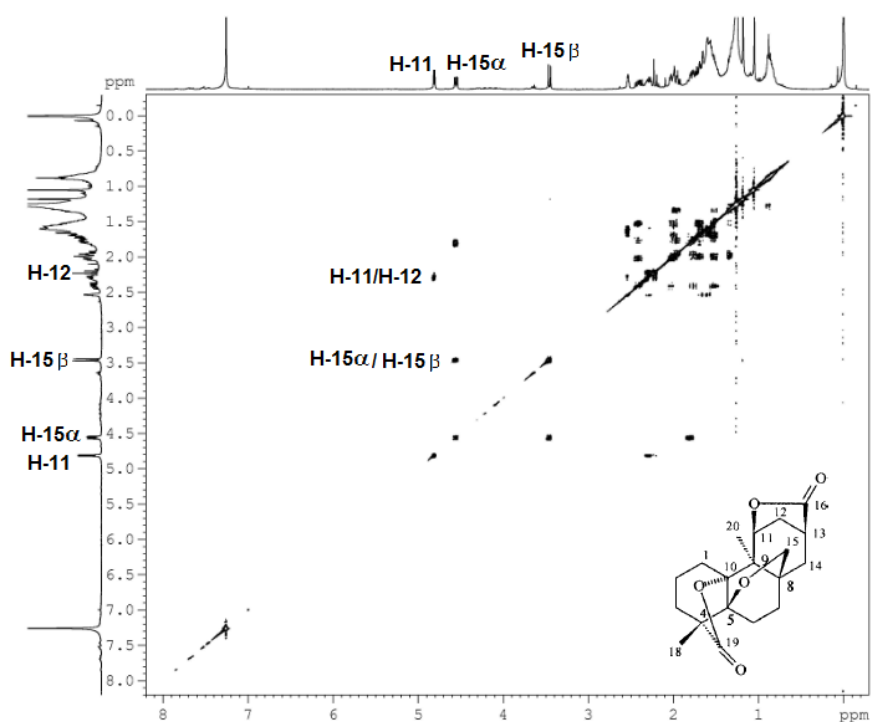


Figura 13: Mapa de contornos COSY (100 MHz, CDCl_3) de **Biot-1**.

Através do mapa de contornos HMBC (**Figura 14**, pág. 37), observou-se que o sinal em δ_H 1,14 (H-20) está correlacionado com os sinais em δ_C 83,7 e δ_C 85,8, atribuídos aos carbonos C-11 e C-10, respectivamente. Também foram observadas as correlações entre os sinais em δ_H 0,91 (H-18) e δ_C 77,9 (atribuído ao carbono C-5) e entre os sinais em δ_H 4,86 (H-11) e δ_C 37,6 (atribuído ao carbono C-13).

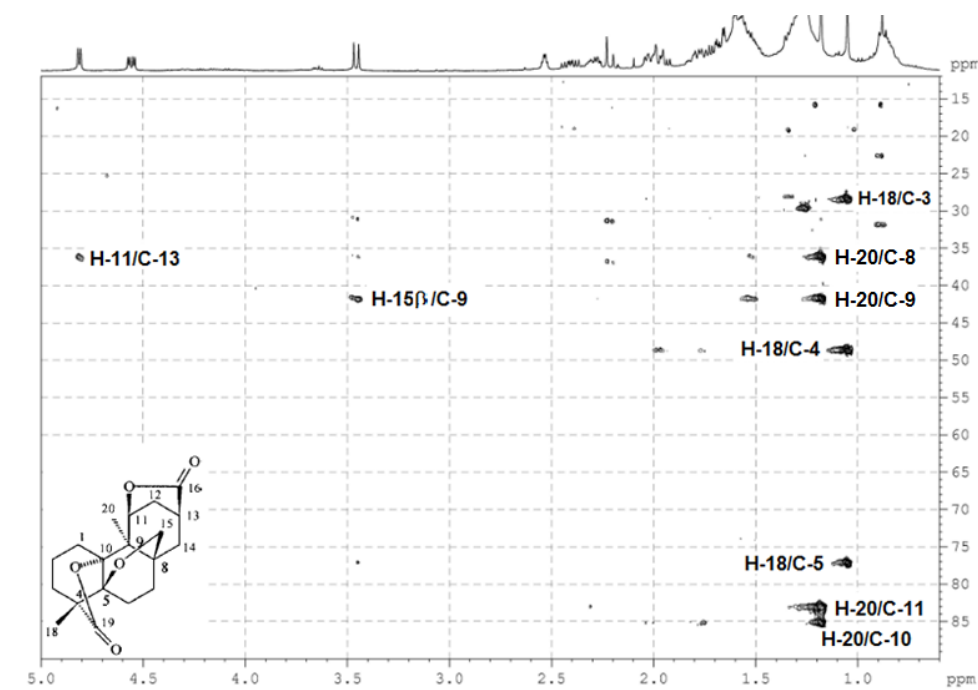


Figura 14: Mapa de contornos HMBC (100 MHz, $CDCl_3$) de **Biot-1**.

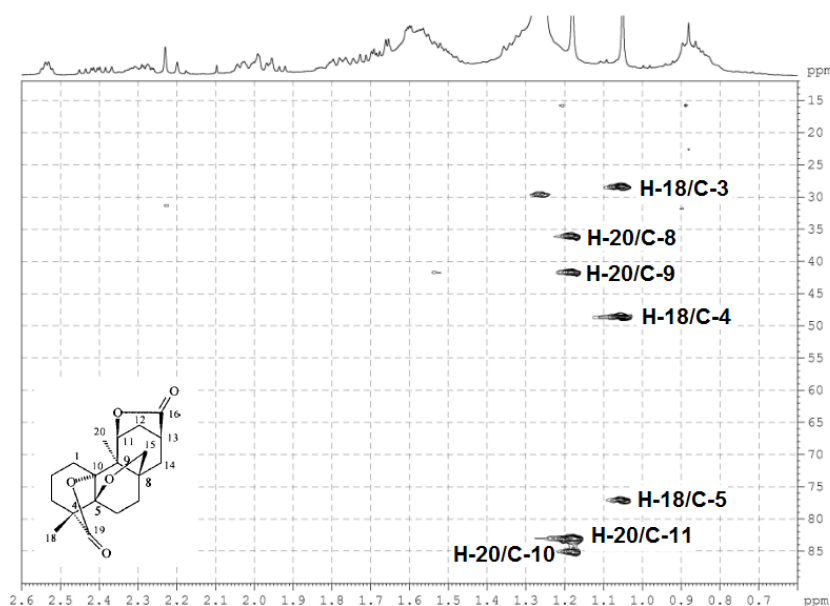


Figura 15: Ampliação do mapa de contornos HMBC (100 MHz, $CDCl_3$) de **Biot-1**, na região entre δ_H 0,60 a δ_H 2,60.

O sinal do carbono C-13 aproximou-se do TMS, em relação ao material de partida **28** (de δ 75,7 para δ 37,6). Na estrutura da lactona **28**, o carbono C-13 estava ligado diretamente ao oxigênio e após a modificação, passou a ligar-se ao carbono carbonílico C-16, o que explica o efeito de blindagem. Já os carbonos C-5, C-10, C-11 e C-15 foram consideravelmente desblindados. A desblindagem está coerente com a estrutura proposta, visto que todos esses carbonos encontram-se ligados diretamente ao oxigênio.

Com base nesses dados, concluiu-se que a substância **Biot-1** corresponde ao ácido *ent*-caur-5 α -15 α -epoxi-9-10-friedo-10 β -11 β -dihidroxi-16,11 α :19,10 β -diseco-17-nor-16 $\rightarrow$ 11:19 $\rightarrow$ 10-dilactona (**36**).

De acordo com VIEIRA *et al.* (2006) o composto **36** é obtido a partir da reação de lactonização da norcetona **26** sob as mesmas condições utilizadas para reação de lactonização da norcetona **28** (método descrito em 4.7.1, pág. 70).

Por CCDS e por RMN de ^1H e ^{13}C , a norcetona **27** encontrava-se pura quando foi submetida à reação de lactonização. Entretanto, a norcetona **27** poderia estar contaminada com pequena quantidade da norcetona **26**, de tal maneira que essa impureza não foi detectada por CCDS e RMN de ^1H e de ^{13}C . Portanto, não é descartada a possibilidade de **Biot-1** ser produto de impureza do material de partida usado na reação da lactonização da norcetona **27**.

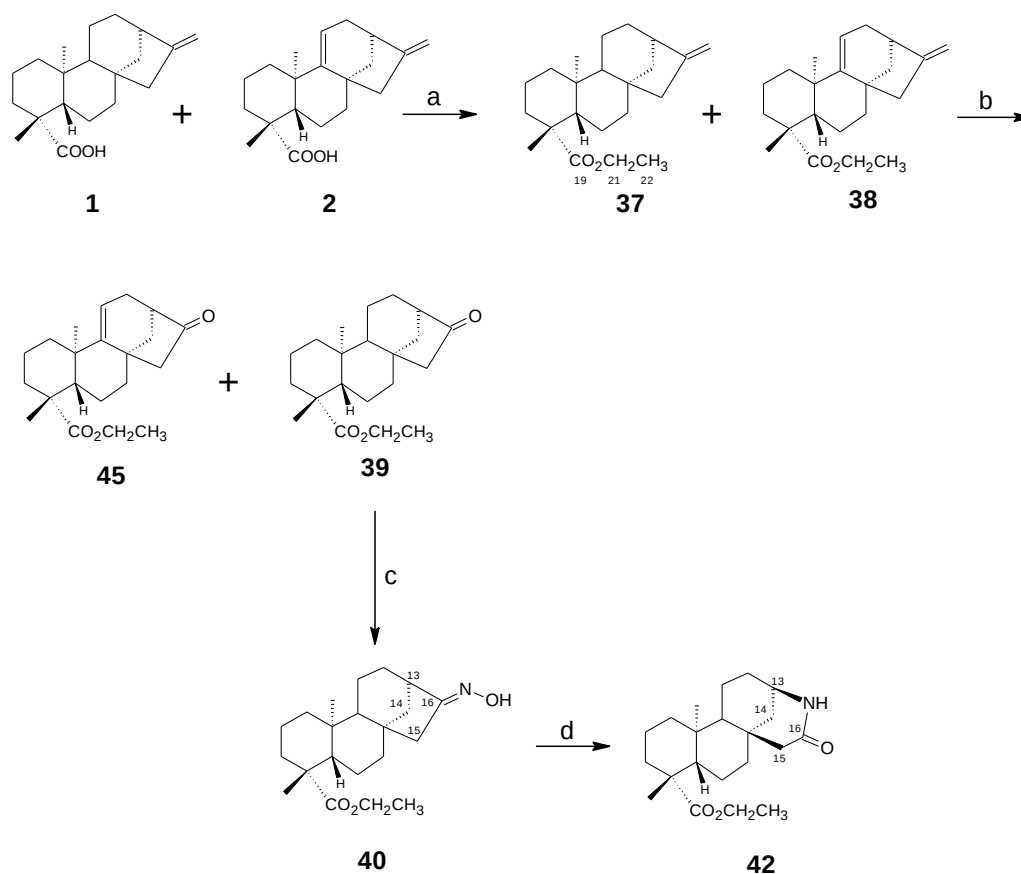
Sabendo-se dessa possibilidade, pretende-se sintetizar a lactona **27** partindo-se do ácido caurenóico puro e submetê-la a uma nova reação de biotransformação para confirmar se **Biot-1** é realmente um produto de biotransformação.

3.4- Formação de oxima e lactama caurânicas a partir da mistura dos ácidos caurânicos

Oximas e lactamas são amplamente utilizadas em síntese orgânica e muitas delas exibem diversas atividades biológicas (CAO *et al.*, 2012; JIANG *et al.* 2011; NARAYANAN *et al.*, 2012; NILSSON *et al.*, 2012; SHAFIKOV *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2010).

Diterpenos caurânicos com função oxima ainda são pouco explorados na literatura. Entretanto, a função lactama em diterpenos caurânicos é inédita. Tendo em vista esse contexto, foi proposta uma rota sintética com objetivo de produzir moléculas inéditas detentoras de atividade biológica.

Como a obtenção de derivados contendo essas funções geralmente forma misturas, optou-se por substituir a função ácida na posição 19 por um grupo éster. Derivados contendo grupo ácido tendem a formar ligação de hidrogênio com a sílica gel, produzindo por CCDS manchas com caudas, o que dificulta a visualização de isômeros e consequentemente a sua separação por CCS. Assim sendo, a rota sintética proposta para obtenção de lactama envolveu as seguintes etapas: 1) Reação de esterificação da mistura de ácidos diterpênicos na presença de sulfato de dietila, carbonato de potássio calcinado e acetona anidra para obtenção da mistura de ésteres etílicos; 2) Reação de quebra oxidativa da ligação dupla exocíclica utilizando-se quantidades catalíticas de tetróxido de ósmio em presença periodato de potássio para obtenção das respectivas norcetonas; 3) Reação de adição nucleofílica ao grupo carbonila utilizando-se cloridrato de hidroxilamina em meio hidroalcoólico para obtenção de oximas; 4) Rearranjo de Beckmann na presença de cloreto de mesila e carbonato de sódio em acetona para obtenção de lactamas (**Esquema 15**).



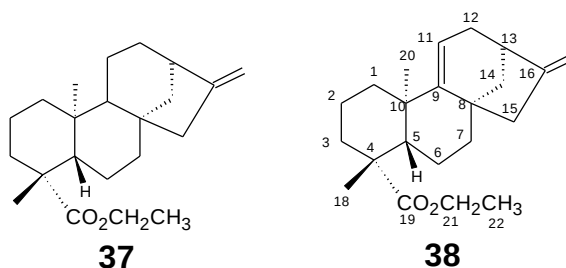
a: $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{SO}_2$, K_2CO_3 , acetona anidra, 3 h de refluxo; **b:** KIO_4 , OsO_4 , $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1), t.a., 12 h; **c:** $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$, NaOH , etanol: H_2O (8:2), t.a., 1 h; **d:** MsCl , Na_2CO_3 , acetona, t.a., 24 h.

Esquema 15: Proposta de rota sintética para a obtenção da oxima e da lactama caurânicas.

3.4.1- Reação de esterificação dos ácidos caurânicos

A mistura dos ácidos **1** e **2** foi submetida a uma reação de esterificação, utilizando-se para essa finalidade sulfato de dietila em meio básico, conforme descrito por GRUNDY *et al.* (1972). Após purificação em CCS, foi obtida com 86 % de rendimento a mistura dos ésteres etílicos com aspecto resinoso e incolor.

3.4.1.1- Identificação da mistura dos ésteres etílicos caurânicos



A comparação do espectro no IV da mistura de ésteres **37** e **38** (Figura 43, pág. 123) com o do material de partida (mistura dos ácidos **1** e **2**, Figura 23, pág. 113) mostrou que a banda de absorção relativa à deformação axial da carbonila, característica de ácido carboxílico, deslocou-se de 1694 cm^{-1} , para 1720 cm^{-1} , dentro da faixa de valores de carbonila de ésteres. Também foi observado o desaparecimento da banda referente ao estiramento do grupo hidroxila de ácido carboxílico ($3400\text{ a }2400\text{ cm}^{-1}$, PAVIA *et al.*, 2012).

No espectro de RMN de ^1H da mistura dos ésteres etílicos (Figura 44, pág. 123), destaca-se a presença de três sinais extras em relação à mistura dos ácidos: um tripleto em $\delta\ 1,30$ e dois quartetos centrados em $\delta\ 4,10$ e $\delta\ 4,11$. O tripleto com constante de acoplamento de $7,2\text{ Hz}$ encontra-se vizinho ao hidrogênio metilênico na posição 21 do grupo éster. O deslocamento químico dos quartetos observados indica a vizinhança com grupo oxigenado. A multiplicidade do sinal, associada a sua constante de acoplamento ($J = 7,2\text{ Hz}$), idêntica à observada para os hidrogênios metílicos H-22, confirma a sua vizinhança. Estes dados, associados à integral para quatro hidrogênios, permitem associar, a estes quartetos, os sinais dos hidrogênios metilênicos H-21 do grupo éster de ambos os compostos.

No espectro de RMN de ^{13}C da mistura dos ésteres etílicos (Figura 45, pág. 124) pode-se observar que o sinal do grupo carboxila C-19 deslocou-se para mais próximo do TMS, passando de $\delta\ 184,6$ para $\delta\ 177,6$.

Com o auxílio do subespectro DEPT-135 (Figura 46, pág. 124) foi possível localizar os sinais dos carbonos do grupo éster: carbono metilênico em $\delta\ 59,9$ (atribuído ao C-21) e carbono metílico em $\delta\ 14,0$ (atribuído ao C-22).

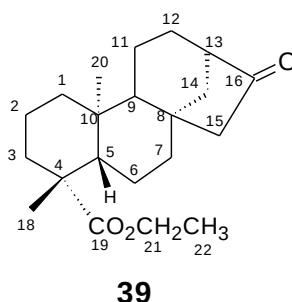
O conjunto de dados espectrais e a análise comparativa dos dados fornecidos pela literatura (ROCHA, 2010) estão compatíveis com a conclusão

de que a amostra analisada trata-se da mistura dos ésteres etílicos *ent*-caur-16-en-19-oato de etila (**37**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (**38**).

3.4.2- Clivagem oxidativa da ligação dupla exocíclica da mistura dos ésteres etílicos caurânicos

Os ésteres etílicos preparados anteriormente foram submetidos à reação de clivagem da ligação dupla exocíclica, utilizando-se periodato de potássio na presença de tetróxido de ósmio em quantidades catalíticas, conforme descrito por PAPPO *et al.* (1956). Após purificação por CCS, conseguiu-se isolar apenas o derivado do ácido caurenoico, o ceto-éster **39**, com aspecto oleoso e coloração amarela clara. A reação forneceu um rendimento equivalente a 63 %.

3.4.2.1- Identificação do ceto-éster *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (**39**)



O derivado *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (**39**) foi isolado na forma de um material gelatinoso com coloração amarela clara.

O espectro no IV de **39** (Figura 47, pág. 125) apresentou bandas de absorção intensas localizadas em 1738 e 1720 cm^{-1} , atribuídas à deformação axial de carbonila de éster e cetona, respectivamente.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 48, pág.125) apresentou um sinal tripleto, atribuído ao H-22 (7,0 Hz) em δ 1,28 e um quarteto em δ 4,12 (7,0 Hz), atribuído ao H-21. Observou-se a ausência dos sinais referentes aos hidrogênios metilênicos olefínicos em δ 4,73 e δ 4,79, associados ao C-17 do material de partida. Esse fato indica a ocorrência de modificação química nesta região.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 49**, pág. 126) revelou a presença de 21 sinais. A ausência dos sinais de carbonos olefínicos e a presença de um sinal de carbono carbonílico da função cetona em δ 222,7 confirmaram a quebra oxidativa da ligação dupla exocíclica. O sinal referente à carbonila de éster, em δ 177,3, foi mantido em relação aos ésteres originais.

Com o auxílio do subespectro DEPT-135 (**Figura 50**, pág. 126), foi possível identificar todos os sinais de carbonos do ceto-éster **39**.

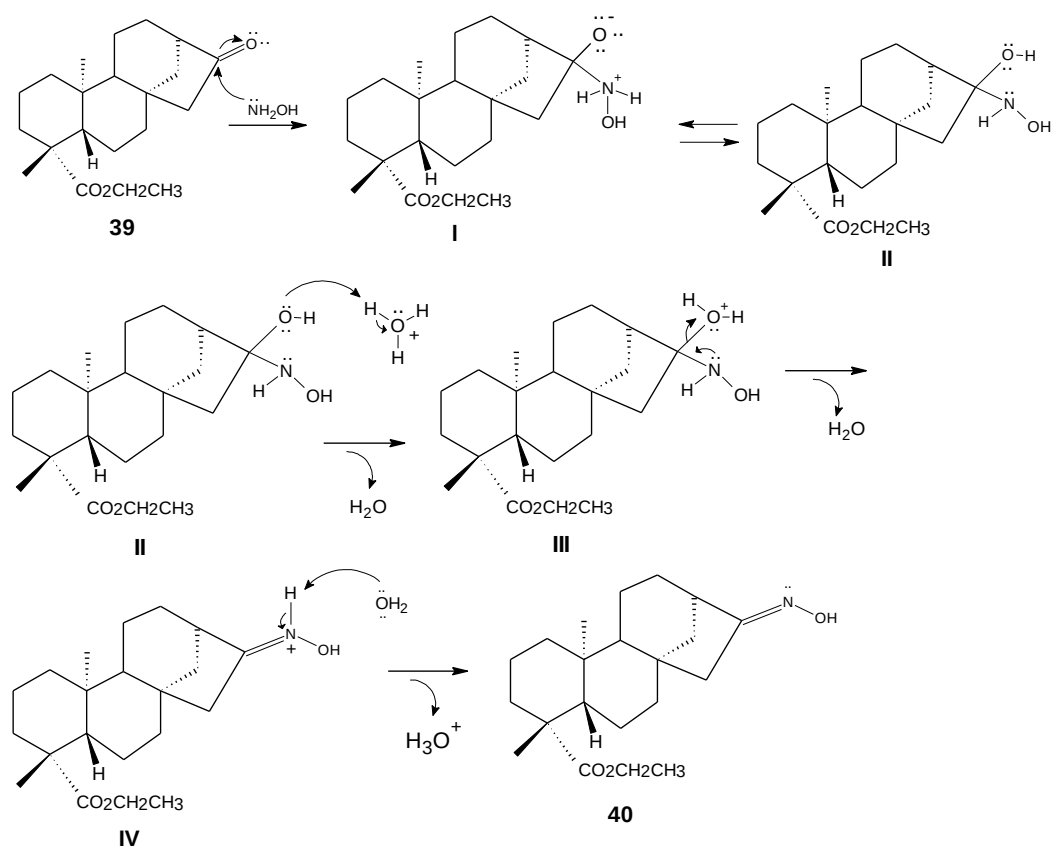
O espectro de massas de alta resolução de **39** (**Figura 51**, pág. 127) apresentou um pico em 355,1388 m/z o que corresponde ao aduto de sódio do íon molecular $[\text{M}+\text{Na}]^+$, sabendo-se que a massa molecular da estrutura sugerida é equivalente a 332,2351 g mol^{-1} .

A análise dos dados espectroscópicos e a comparação destes com a literatura (ROCHA, 2010) estão de acordo com a estrutura proposta, identificando-se o composto analisado como *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (**39**).

3.4.3- Reação de adição nucleofílica ao grupo carbonila do ceto-éster **39**

O ceto-éster **39** foi submetido à reação de adição nucleofílica ao grupo carbonila, utilizando-se cloridrato de hidroxilamina, conforme descrito em LA MATTINA e SULESKE (1990).

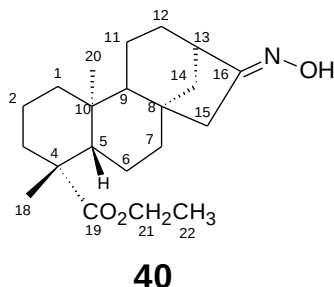
A reação de formação da oxima ocorre através de um mecanismo clássico de adição nucleofílica ao grupo carbonila e está representado no **Esquema 16**.



Esquema 16: Mecanismo de formação da oxima a partir do céto-éster **39**.

No produto obtido, por CCDS (hexano + 30 % de acetato de etila) observou-se a presença de duas manchas com R_f muito próximos, sugerindo-se, portanto, a formação da mistura de isômeros E e Z. A reação ocorre de maneira a se esperar uma mistura com uma porcentagem equivalente dos isômeros geométricos. Após purificação por cromatografia *flash*, utilizando-se como único eluente a mistura de hexano/acetato de etila (7:3), obteve-se pura apenas a substância de menor R_f , como um material oleoso de coloração amarela clara, com 65 % de rendimento.

3.4.3.1- Identificação espectroscópica do *ent*-16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (**40**)



No espectro no IV de **40** (**Figura 52**, pág. 127) observou-se uma banda de absorção larga centrada em 3300 cm^{-1} correspondendo ao estiramento da ligação OH. Segundo PAVIA *et al.* (2012), iminas, oximas ou afins geram uma absorção de intensidade variável na faixa de 1690 a 1640 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N=C. Essa banda de baixa intensidade foi detectada em 1654 cm^{-1} . Uma banda de absorção intensa referente a uma única carbonila foi observada em 1720 cm^{-1} (carbonila de éster), evidenciando o desaparecimento da banda relativa à carbonila de cetona, indicando que a adição nucleofílica ocorreu nessa posição.

A análise comparativa entre os espectros de RMN de ^1H do material de partida, o ceto-éster **39**, e o produto da reação, a oxima **40** (**Figura 53**, pág. 128), evidenciou apenas o deslocamento do sinal atribuído ao H-13, de δ 2,39 no material de partida para δ 2,77 no produto.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 54**, pág. 128) apresentou 21 sinais. O carbono carbonílico da função éster continuou localizado em δ 177,4. Já o carbono C-16 teve seu deslocamento modificado, passando de δ 222,7 para δ 168,7, evidenciando uma ligação C=NOH.

Comparando-se o espectro de RMN de ^{13}C com o subespectro DEPT-135 (**Figura 55**, pág. 129), observou-se a presença de dez carbonos metilênicos, três carbonos metílicos, três carbonos metínicos e cinco carbonos não hidrogenados. Em relação ao material de partida, o ceto-éster **39**, constatou-se, através do subespectro DEPT-135 da oxima **40**, a blindagem dos sinais atribuídos ao carbono C-13 (de δ 44,8 para δ 40,7) e ao carbono C-15 (δ 55,0 para δ 43,7).

A massa molecular dessa oxima corresponde a $347,2460 \text{ g mol}^{-1}$ e o seu espectro de massas de alta resolução (**Figura 56**, pág. 129) apresentou um pico $[M+H]^+$ equivalente a $348,2466 \text{ m/z}$.

Tendo em vista que a reação possibilita à formação de dois isômeros geométricos, **Figura 16**, e que somente um dos dois isômeros foi obtido puro, a identificação foi baseada nos deslocamentos químicos dos sinais atribuídos ao hidrogênio H-13 e aos carbonos C-13 e C-15, vizinhos ao C-16, onde ocorreu a modificação. Segundo VIEIRA (2000) estes dados espectrais são suficientes para se identificar os isômeros geométricos E e Z.

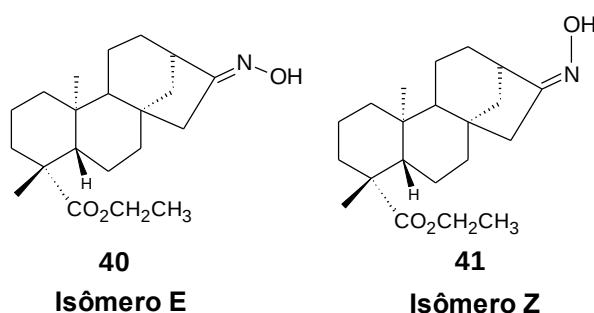


Figura 16: Possibilidades de formação de oximas: isômeros geométricos E (**40**) e Z (**41**).

VIEIRA (2000) sintetizou e isolou os isômeros geométricos E e Z de oximas derivadas do ácido caurenóico (**1**) e observou um padrão de deslocamento químico. A substituição do grupo carbonila por grupo oxima promove uma desblindagem do sinal do hidrogênio H-13 e uma blindagem dos sinais dos carbonos C-13 e C-15 como observado para a oxima inédita **40** obtida. Entretanto, esse efeito é mais intenso sobre o hidrogênio e o carbono em posição *sin* ao grupo hidroxila devido ao impedimento estérico. Assim sendo, o hidrogênio tem sua densidade eletrônica reduzida e o respectivo carbono tem sua densidade eletrônica aumentada (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). Comparando-se o deslocamento químico dos sinais citados da oxima **40**, obtida nesse trabalho, com as outras oximas obtidas por VIEIRA (2000), **Tabela 2**, pode-se identificar **40** como sendo o isômero geométrico E, isto é, *ent-16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila*, uma oxima inédita.

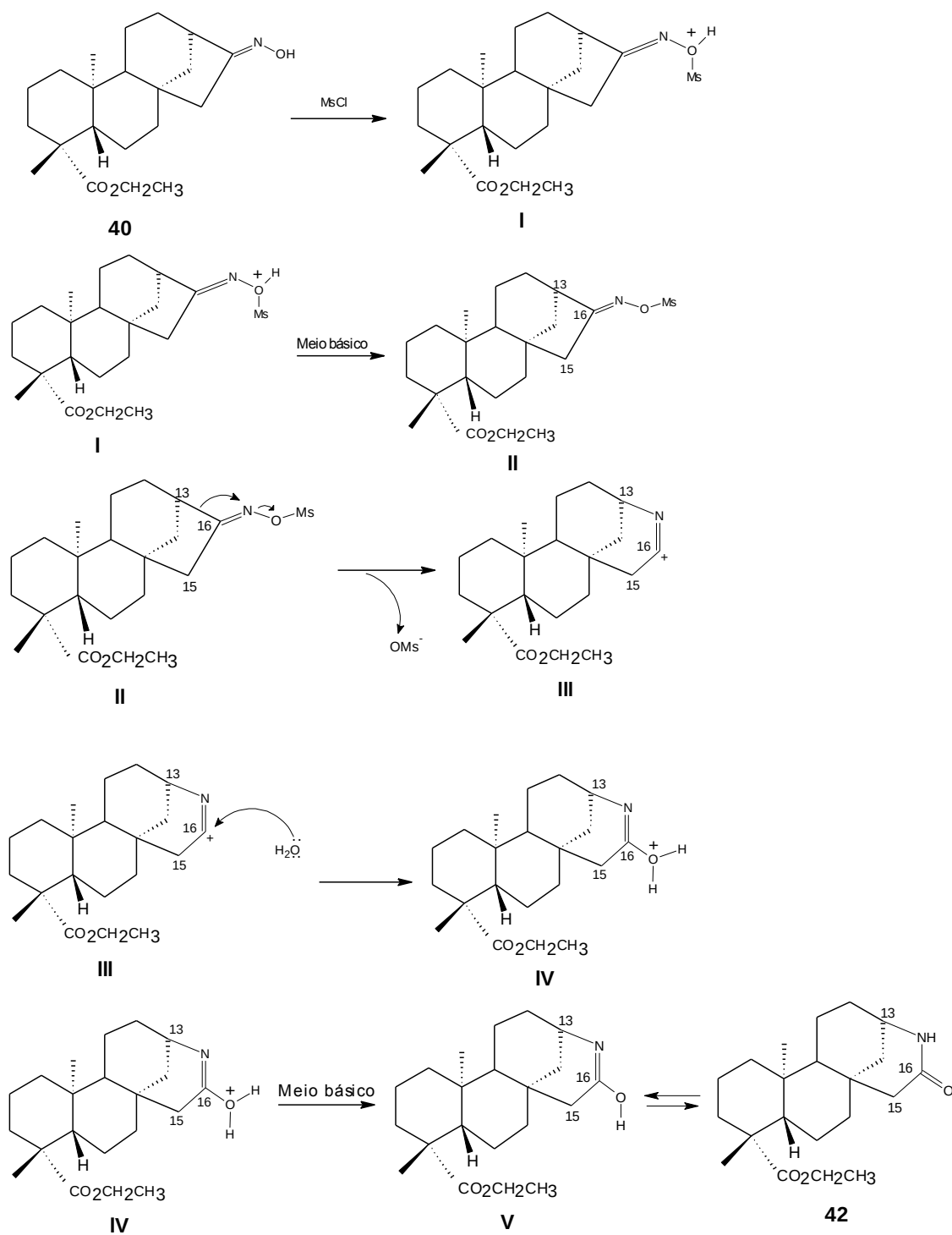
Tabela 2: Comparação dos dados espectroscópicos da oxima **40** em relação aos dados fornecidos por VIEIRA (2000)

Isômero	Z (VIEIRA, 2000) (δ)	E (VIEIRA, 2000) (δ)	Oxima 40 (δ)
C-13	37,8	40,6	40,7
C-15	46,4	43,7	43,8
H-13	3,32	2,76	2,77

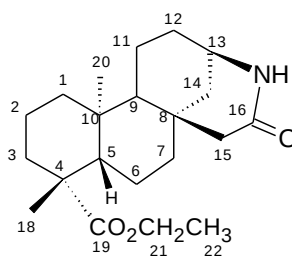
3.4.4- Rearranjo de Beckmann da *ent*-16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (**40**)

A oxima caurânica **40** foi submetida ao rearranjo de Beckmann utilizando-se cloreto de metanossulfonila (cloreto de mesila) em meio básico, de acordo com SHAFIKOV *et al.* (2009). Após purificação por cromatografia *flash* em coluna de sílica, utilizando-se como único eluente a mistura hexano e metanol (95:5), obteve-se um sólido cristalino com 48 % de rendimento, identificado como *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (**42**), uma lactama inédita com esqueleto caurânico.

No **Esquema 17**, encontra-se a proposta de mecanismo, adaptada de SHAFIKOV *et al.* (2009), para essa reação. Inicialmente a hidroxila é convertida em um melhor grupo abandonador com a utilização do cloreto de mesila. Esse intermediário sofre um rearranjo com migração do grupo em posição oposta ao grupo mesila. Posteriormente a água atua como um nucleófilo.



Esquema 17: Proposta de mecanismo para a formação de lactama, adaptado de SHAFIKOV *et al.* (2009).

3.4.4.1- Identificação do *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (**42**)**42**

O espectro no IV do composto **42** (**Figura 57**, pág.130) apresentou uma banda de absorção larga de alta intensidade centrada em 3378 cm^{-1} atribuída ao estiramento N-H. Geralmente, a banda de C=O de lactama sobrepõe parcialmente à de estiramento N-H ($1680\text{ a }1630\text{ cm}^{-1}$) fazendo com que essa banda apareça na forma de duplete (PAVIA *et al.*, 2012). Entretanto no caso do composto **42**, observou-se apenas uma banda larga em 1650 cm^{-1} . A banda de absorção relativa ao estiramento axial da ligação C=O de éster foi observada em 1722 cm^{-1} e, em 1468 cm^{-1} , localiza-se uma banda de absorção de intensidade média correspondente ao estiramento da ligação C-N.

No espectro de RMN de ^1H de **42** (**Figura 58**, pág. 130) os sinais em δ 4,14 (q, $J = 7,2\text{ Hz}$, 2H) e δ 1,25 (t, $J = 7,2\text{ Hz}$, 3H) foram preservados em relação ao material de partida e, portanto atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-21 e aos hidrogênios metílicos H-22. Já o sinal de H-13 (sl, 1H) afastou-se do TMS, em relação ao material de partida, passando de δ 2,77 para δ 3,69. O sinal largo em δ 6,25, integrado para um hidrogênio, foi atribuído ao hidrogênio ligado diretamente ao nitrogênio.

No espectro de RMN de ^{13}C de **42** (**Figura 59**, pág. 131), observou-se a presença de apenas um sinal na região de carbonos carbonílicos em δ 177,4. Com o auxílio do subespectro DEPT-135 (**Figura 60**, pág. 131) foi possível localizar os sinais do carbono metínico C-13 e do carbono metilênico C-15. O sinal de C-13 afastou-se do TMS, em relação ao material de partida **40**, passando de δ 40,7 para δ 48,0. Esse efeito de desblindagem está coerente com a estrutura proposta, visto que C-13 passou a ligar-se diretamente ao nitrogênio. Também foi observado esse efeito para o sinal de C-15, que, de δ 43,8, passou a localizar-se em δ 49,4. Neste caso, a desblindagem está

relacionada ao maior efeito retirador de elétrons do grupo carbonila em relação ao grupo C=N.

A atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e dos átomos de carbono foi realizada com a análise dos mapas de correlação bidimensional HSQC, COSY e HMBC.

Através do mapa de contornos COSY (**Figura 63**, pág. 133) foram verificados que os sinais em δ_H 4,14 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H) e δ_H 1,28 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H) correlacionavam entre si. No mapa de contornos HSQC (**Figura 62**, pág. 132) estes sinais se correlacionaram respectivamente com os sinais de carbonos em δ_C 60,03 e δ_C 14,14, confirmando as atribuições anteriormente realizadas.

O espectro de massas de alta resolução de **42** (**Figura 61**, pág. 132) apresentou um pico $[M+H]^+$ em 348,2466 m/z, correspondendo a molécula proposta, visto que sua massa molecular equivale a 347,2460 g mol⁻¹.

A determinação da isomeria do composto **42** (**Figura 17**) foi realizada através da análise dos mapas de contornos HSQC (**Figura 62**, pág. 132), COSY (**Figura 63**, pág. 133) e HMBC (**Figura 64**, pág. 134).

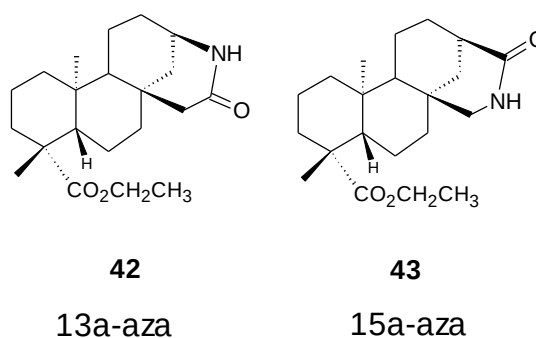


Figura 17: Estruturas químicas das lactamas 13a-aza (**42**) e 15a-aza (**43**).

No mapa de contornos HSQC (**Figura 62**, pág. 132) foi verificado que o sinal em δ_H 3,69 (sl, 1H) está correlacionado com o sinal em δ_C 48,04, confirmando tratar-se do carbono metínico C-13. Já o sinal em δ 6,25 (sl, 1H) não se mostrou correlacionado a nenhum carbono, confirmando a atribuição deste sinal ao hidrogênio ligado diretamente ao nitrogênio. Por sua vez, no mapa de contornos COSY (**Figura 63**, pág. 133), o hidrogênio da ligação N-H

está correlacionado apenas ao H-13, o que permitiu concluir que o rearranjo formou majoritariamente a lactama em que o C-13 está vizinho ao grupo N-H, ou seja, a lactama 13-a-aza.

Essa conclusão está de acordo com o fato de que no rearranjo de Beckmann, o grupo que migra é o que se encontra em posição oposta à hidroxila (COSTA *et al.*, 2003). Como o rearranjo foi realizado com a oxima E, (hidroxila em posição *anti* ao C-13), o carbono C-13 migrou, passando a ligar-se diretamente ao grupo N-H. No mapa de contornos HSQC (**Figura 62**, pág. 132) foi verificado uma correlação entre os hidrogênios localizados em δ_H 2,2 com o carbono localizado em δ_C 49,9 (C-15) indicando que os hidrogênios H-15 estão localizados nessa região. Por sua vez, no mapa de contornos HMBC (**Figura 64**, pág. 134) foi observada uma correlação entre os hidrogênios metilênicos H-15 (δ_H 2,2) com um sinal em δ_C 174,0, associado à carbonila do grupo lactama, que não foi visualizado no espectro de RMN de ^{13}C . Esse fato, associado a não observação de correlação entre o hidrogênio H-13 (δ_H 3,69) com nenhum sinal de carbono carbonílico (δ_C 177,4 e δ_C 174,0), reforçou a conclusão de que o C-15 encontra-se vizinho ao carbono carbonílico C-16.

Os dados espectroscópicos encontram-se de acordo com a estrutura proposta e, portanto, pode-se afirmar que o composto **42** trata-se da lactama inédita *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila.

A análise comparativa dos deslocamentos químicos de ^{13}C dos compostos **37**, **38**, **39**, **40** e **42** consta na **Tabela 23**, pág. 139.

3.5- Testes biológicos

3.5.1- Testes antimicrobianos

As doenças infecciosas representam uma das principais causas de mortes da população humana (DAFFRE *et al.*, 2001). O uso constante, aleatório e indiscriminado de antibióticos, aliado ao surgimento de micro-organismos oportunistas, associados à AIDS, quimioterapia anti-neoplásica e transplantes, contribuem significativamente para o aumento de mortes por doenças infecciosas (PENA *et al.*, 2001). Nesse contexto, o campo de

pesquisa nessa área tem se alargado cada vez mais, tornando-se de grande importância a busca por novos agentes antimicrobianos.

Os testes antibacterianos e antifúngicos foram realizados através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando-se a concentração de 250 µg/mL para todas as amostras testadas.

3.5.1.1- Testes antibacterianos

A avaliação do potencial antibacteriano das amostras foi realizada utilizando as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e das bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Citrobacter freundii*. O potencial de resistência ou sensibilidade da levedura *Candida albicans*, frente às amostras testadas, foi avaliado utilizando-se a mesma metodologia empregada para os testes antibacterianos e, portanto, os resultados estão apresentados conjuntamente. Na **Tabela 3** constam algumas informações a respeito dos micro-organismos utilizados nesse bioensaio.

Tabela 3: Micro-organismos utilizados nos testes antimicrobianos

Micro-organismos utilizados nos testes antimicrobianos	
<i>S. aureus</i>	Bactéria Gram positiva, medindo de 0,5 a 1,0 µm de comprimento. Provoca intoxicação alimentar no homem, devido à contaminação de alimentos, causada pela liberação de exotoxinas (BRESOLIN <i>et al.</i> , 2005).
<i>L. monocytogenes</i>	Agente infeccioso, responsável pela doença de origem alimentar denominada listeriose. É considerado um patógeno humano oportunista, uma vez que a ocorrência da infecção depende principalmente das condições imunológicas dos indivíduos afetados (CRUZ, <i>et al.</i> , 2008).
<i>B. cereus</i>	Bactéria anaeróbia facultativa, responsável por determinadas intoxicações alimentares (RODRIGUES <i>et al.</i> , 2003).
<i>E. coli</i>	Agente infeccioso, responsável por determinados tipos de infecções no trato urinário, causando desde quadros clínicos não complicados, até os mais complicados como pielonefrite crônica (ISHII e SADOWSKY, 2008).
<i>S. typhimurium</i>	Bactéria Gram negativa em forma de bacilo. Causa gastroenterite caracterizada por dores abdominais, diarreia, cefalite e náuseas. Também causa febre entérica, mais conhecida por febre tifóide (MERMIN <i>et al.</i> , 1997).
<i>C. freundii</i>	Bactéria anaeróbia facultativa. Possui forma de haste com 1-5 µm de comprimento. É responsável por um número significativo de infecções oportunistas, que atingem trato respiratório e urinário. (WHALEN <i>et al.</i> , 2007).
<i>C. albicans</i>	Trata-se de uma espécie de fungo que causa, oportunamente nos seres humanos, alguns tipos de infecção oral e vaginal e infecção no aparelho digestivo (ALVES <i>et al.</i> , 2010).

Através dos dados apresentados na **Figura 18** e na **Tabela 4**, observou-se que o ácido grandiflorênico (**2**) induziu porcentagens de inibição superiores em relação às do ácido caurenóico (**1**). No caso da bactéria *Bacillus cereus*, a porcentagem de inibição do ácido **2** foi 54 % maior em relação à provocada pelo ácido **1**. A diferença na estrutura molecular desses ácidos é a presença da insaturação entre os carbonos 9 e 11 em **2**. Possivelmente o mecanismo de ação do composto nos micro-organismos foi intensificado em função dessa insaturação. A mistura dos ácidos **1** e **2**, na proporção estimada de 1:1, potencializou a ação inibitória dos ácidos isolados (**Tabela 4**).

Tabela 4: Porcentagem de inibição bacteriana e de inibição da levedura *C. albicans*

Amostra	% de Inibição (média $\pm$ desvio padrão)			
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. freundii</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>
Mistura dos ácidos 1 e 2	64,65 $\pm$ 3,23	81,20 $\pm$ 4,06	99,79 $\pm$ 4,99	95,93 $\pm$ 0,03
Ácido caurenóico (1)	36,45 $\pm$ 1,82	43,95 $\pm$ 2,20	37,60 $\pm$ 1,88	78,88 $\pm$ 3,94
Ácido grandiflorênico (2)	42,89 $\pm$ 2,14	71,30 $\pm$ 3,56	81,78 $\pm$ 4,09	99,9 $\pm$ 0,05
Norcetona 27	*ND	9,20 $\pm$ 0,46	22,70 $\pm$ 1,14	45,86 $\pm$ 2,29
Norcetona 26	ND	11,12 $\pm$ 0,56	62,10 $\pm$ 3,10	48,84 $\pm$ 2,44
Lactona 28	ND	18,50 $\pm$ 0,92	28,48 $\pm$ 1,42	56,11 $\pm$ 2,80
EBPm	56,76 $\pm$ 2,83	63,77 $\pm$ 3,19	41,13 $\pm$ 2,06	55,04 $\pm$ 2,75
Mistura dos ésteres etílicos 37 e 38	ND	1,12 $\pm$ 0,06	27,03 $\pm$ 1,35	45,93 $\pm$ 2,29
Ceto-éster 39	ND	13,18 $\pm$ 0,66	43,29 $\pm$ 2,16	50,60 $\pm$ 2,53
Oxima 40	0,56 $\pm$ 0,03	24,00 $\pm$ 1,20	56,49 $\pm$ 2,82	52,16 $\pm$ 2,61
Lactama 42	ND	ND	88,81 $\pm$ 4,44	93,52 $\pm$ 0,04

*ND= não detectado

As norcetonas **26** e **27** tiveram suas porcentagens de inibição diminuídas em relação às dos ácidos **1** e **2**. Isso indica que a transformação da dupla exocíclica em carbonila de cetona não foi adequada para ativar esses compostos contra a levedura e as bactérias testadas.

No caso das bactérias *Bacillus cereus* e *Candida albicans*, a lactama **42** provocou uma ação inibitória similar à da mistura dos ácidos **1** e **2** e destacou-se em relação aos outros derivados e principalmente em relação à oxima **40**, seu isômero de constituição. Isso indica que o grupo NHC=O sensibiliza melhor a bactéria *Bacillus cereus* e a levedura *Candida albicans* em relação ao grupo C=NOH.

Das 11 amostras testadas, apenas as norcetonas **26** e **27** e a misturas dos ésteres etílicos **37** e **38** apresentaram porcentagem de inibição da proliferação do crescimento da *C. albicans* inferior a 50 % ($45,86 \pm 2,29$, $48,84 \pm 2,44$ e $45,93 \pm 2,29$) (**Figura 18**). Esses resultados são satisfatórios, visto que a levedura *C. albicans* é uma espécie de fungo oportunista associada a alguns tipos de infecção oral, vaginal e infecção do aparelho digestivo. Estima-se que aproximadamente 75 % das mulheres apresentem pelo menos um episódio de candidíase vaginal e que 40 a 50 % destas vivenciam novos surtos e 5 % tornam-se recorrentes (ALVES *et al.*, 2010).

Detaca-se também as porcentagens de inibição consideravelmente altas da mistura dos ácidos **1** e **2**, do ácido **2** e da lactama **42** contra a bactéria *B. cereus*: $99,79 \pm 4,99$; $81,78 \pm 4,09$ e $88,81 \pm 4,44$, respectivamente.

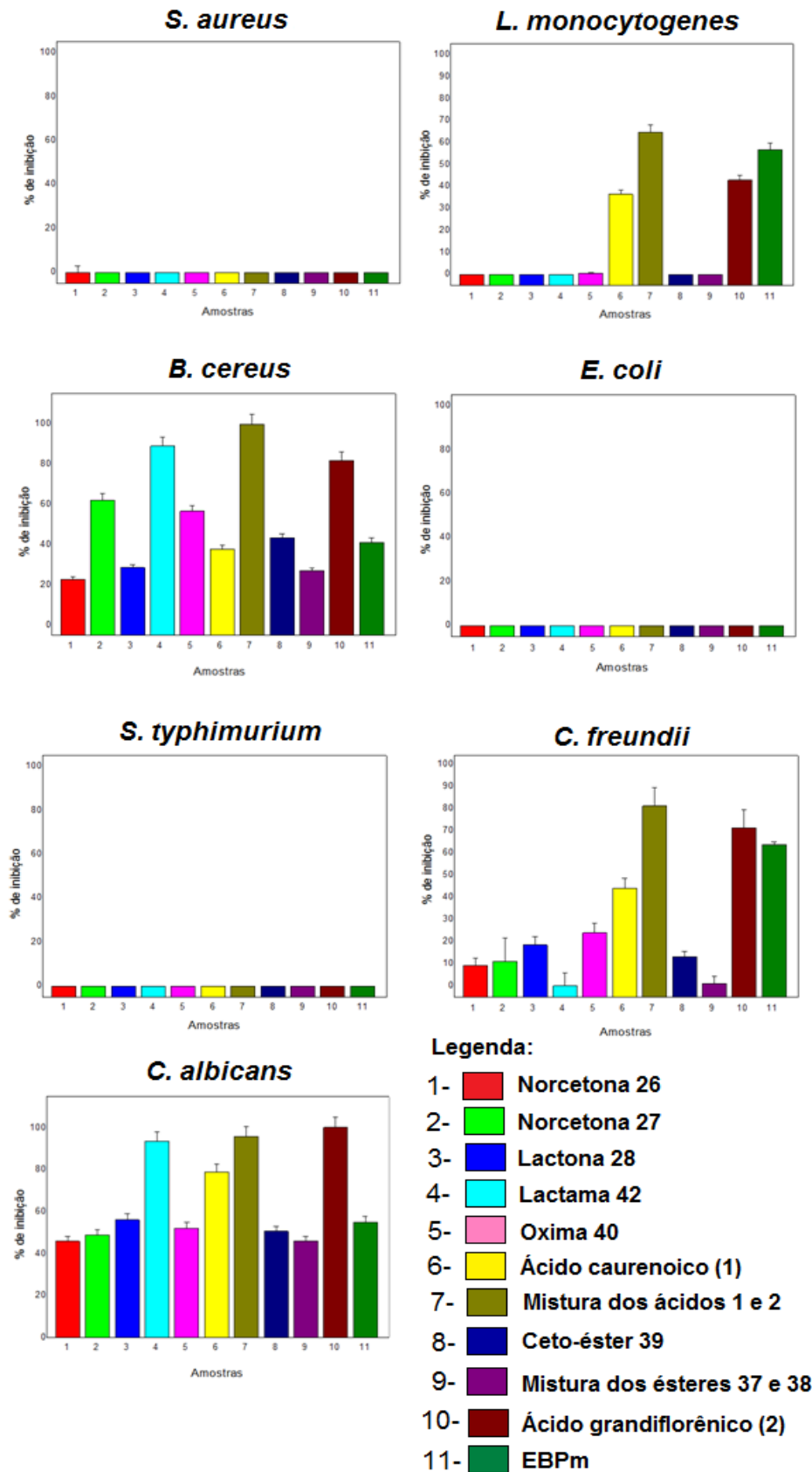


Figura 18: Percentual de inibição antibacteriana e inibição da levedura *C. albicans* das amostras especificadas na legenda.

3.5.1.2- Testes antifúngicos

A avaliação do potencial antifúngico das amostras foi realizada utilizando-se os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger*, *Microsporum gypseum* e *Penicillium citrinum*. Na **Tabela 5** constam algumas informações sobre os fungos utilizados.

Tabela 5: Micro-organismos utilizados nos testes antifungicos

Micro-organismos utilizados nos testes antifúngicos	
<i>C. cladosporioides</i>	Fitopatógeno, produtor de toxinas que frequentemente atuam em cereais e gramíneas (JACYNO <i>et al.</i> , 1993).
<i>A. niger</i>	Fitopatógeno que provoca uma doença popularmente conhecida por “mofo-preto” em determinadas frutas e legumes. (ABARCA <i>et al.</i> , 1994).
<i>M. gypseum</i>	Patógeno humano causador de dermafitoses (infecções fúngicas da pele) (POZIOMCZYK <i>et al.</i> , 2010).
<i>P. citrinum</i>	Fungo produtor de micotoxinas, responsáveis por intoxicações em humanos e animais que se utilizam de alimentos contaminados (NORBERG e SERRA-FREIRE, 1993).

O fungo *A. niger* mostrou-se sensível a todas as amostras testadas, exceto à lactama **42** (**Tabela 6 e Figura 19**). Isso sugere que o grupo NHC=O dificulta a interação do composto com esse fungo.

Tabela 6: Percentual de inibição antifúngica das amostras testadas

Amostra	% de inibição (média $\pm$ desvio padrão)			
	<i>C. cladosporioides</i>	<i>A. niger</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>P. citrinum</i>
Norcetona 27	79,44 $\pm$ 4,94	96,71 $\pm$ 4,83	41,17 $\pm$ 2,06	87,75 $\pm$ 4,39
Norcetona 26	98,87 $\pm$ 3,97	95,22 $\pm$ 4,76	34,34 $\pm$ 1,72	80,13 $\pm$ 4,01
Lactona 28	40,19 $\pm$ 2,01	76,39 $\pm$ 3,82	69,63 $\pm$ 3,48	51,02 $\pm$ 2,55
Lactama 42	*ND	ND	46,8 $\pm$ 2,34	ND
Oxima 40	ND	87,84 $\pm$ 4,39	ND	ND
Ácido caurenoico (1)	10,28 $\pm$ 0,51	94,27 $\pm$ 4,71	ND	ND
Mistura dos ácidos 1 e 2	ND	93,49 $\pm$ 4,67	ND	ND
Ceto-éster 39	ND	97,38 $\pm$ 4,87	ND	ND
Mistura dos ésteres etílicos 37 e 38	ND	99,48 $\pm$ 4,97	ND	ND
Ácido grandiflorênico (1)	ND	99,84 $\pm$ 4,99	ND	78,23 $\pm$ 3,91
EBPm	ND	80,41 $\pm$ 4,02	ND	ND
EASt	ND	77,39 $\pm$ 3,87	ND	ND
EBFp	85,04 $\pm$ 4,25	85,75 $\pm$ 4,29	ND	72,79 $\pm$ 3,64

*ND= não detectado

A inserção de carbonila cetônica, através da reação de oxidação da ligação dupla exocíclica da mistura dos ácidos **1** e **2**, intensificou a atividade inibitória do crescimento dos fungos *C. cladosporioides* e *P. citrinum*. As norcetonas **26** e **27** apresentaram, respectivamente, 98,87 $\pm$ 3,97 e 79,44 $\pm$ 4,94 % de inibição do fungo *C. cladosporioides* e 80,13 $\pm$ 4,01 e 87,75 $\pm$ 4,39 % de inibição, respectivamente, do fungo *P. citrinum*. A presença do grupo ácido no C-19 das norcetonas **26** e **27** também é responsável pelas altas atividades inibitórias desses fungos, visto que o ceto-éster **39** não apresentou atividade inibitória. As norcetonas **27** e o ceto-éster **39** possuem estruturas muito semelhantes, sendo que a única diferença estrutural entre eles é a presença de um agrupamento éster no lugar do grupo ácido na posição C-19.

Como demonstrado na **Tabela 6** e **Figura 19**, os grupos nitrogenados da oxima **40** e da lactama **42** não foram eficazes para inibir os fungos *C. cladosporioides*, *M. gypseum* e *P. citrinum*.

A inserção do grupo lactona, através da reação de Baeyer-Villiger no ácido **1**, intensificou as atividades inibitórias da proliferação do crescimento dos fungos *C. cladosporioides*, *M. gypseum* e *P. citrinum*, mas em uma intensidade menor em relação à inserção da carbonila cetônica.

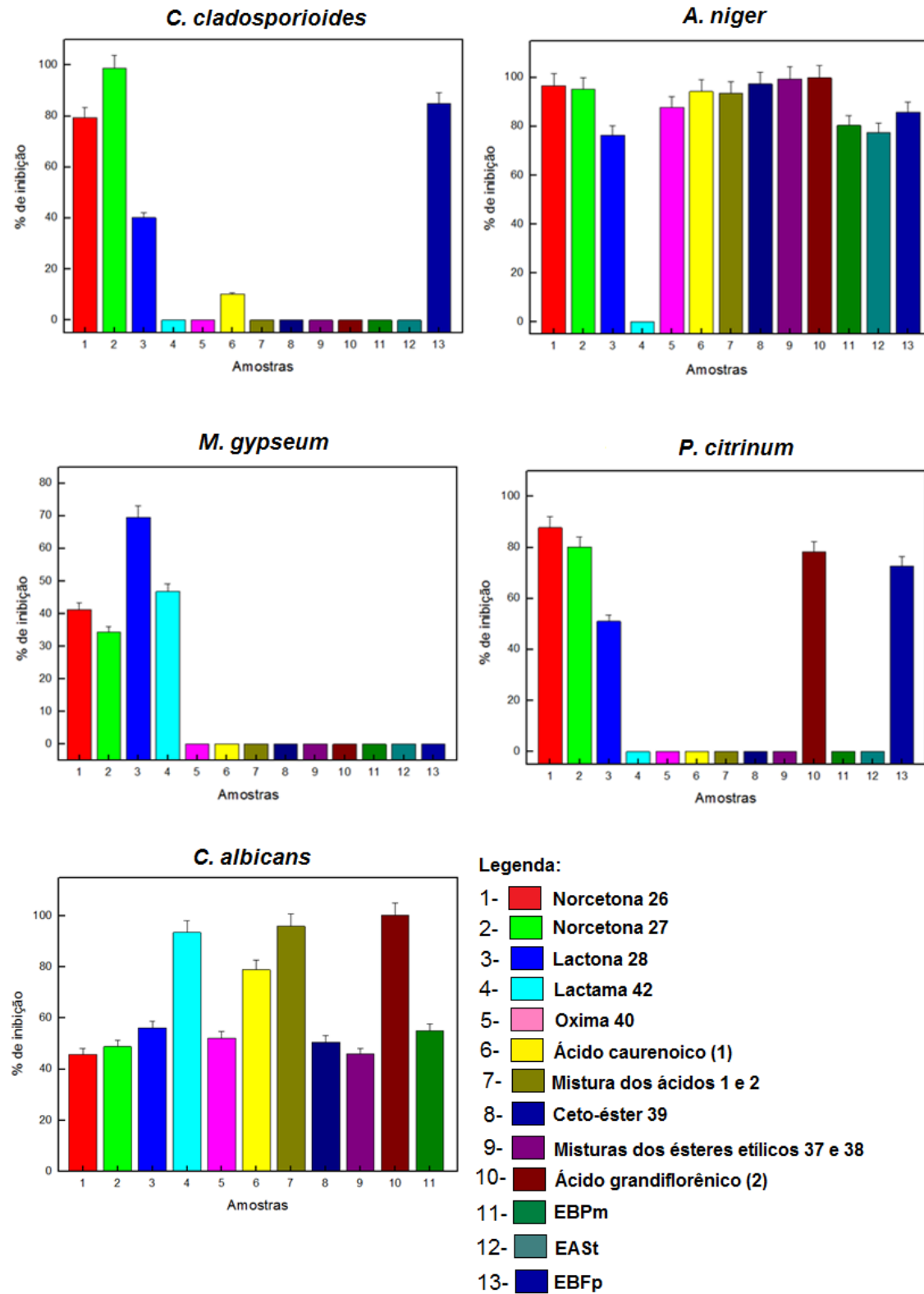


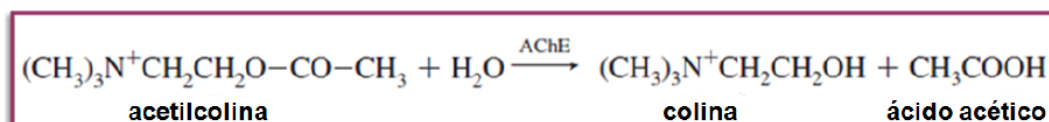
Figura 19: Avaliação da porcentagem de inibição fúngica das amostras especificadas na legenda.

3.5.2- Avaliação da atividade de inibição de acetilcolinesterase em microplaca

A doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa, progressiva, que atinge principalmente a população idosa e seus sintomas envolvem perda de memória, déficit na linguagem, depressão, problemas de comportamento, incluindo agitação, alteração do humor e psicose (VIEGAS JÚNIOR *et al.*, 2004; BARBOSA FILHO *et al.*, 2005 e 2006).

As mudanças mais importantes observadas no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer é a diminuição da concentração de diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, que tem papel muito importante na sinapse colinérgica (DI GIOVANNI *et al.*, 2008).

Atualmente, um dos caminhos utilizados no tratamento dessa doença consiste no aumento do nível de acetilcolina no cérebro usando inibidores de acetilcolinesterase, que catalisa a hidrólise da acetilcolina, (ENZ *et al.*, 1993; SCHNEIDER, 2001) (**Esquema 18**).



Esquema 18: Hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (MIAO *et al.*, 2010).

Tendo em vista esse contexto, a mistura dos ácidos **1** e **2** e seus derivados, juntamente com alguns extratos, foram testados quanto à atividade anticolinesterásica. O teste foi realizado utilizando o método de ELLMAN (1961) em microplacas.

Nas **Figuras 20** e **21** estão inseridas o comportamento da enzima AChE em função do tempo de incubação com a amostra testada.

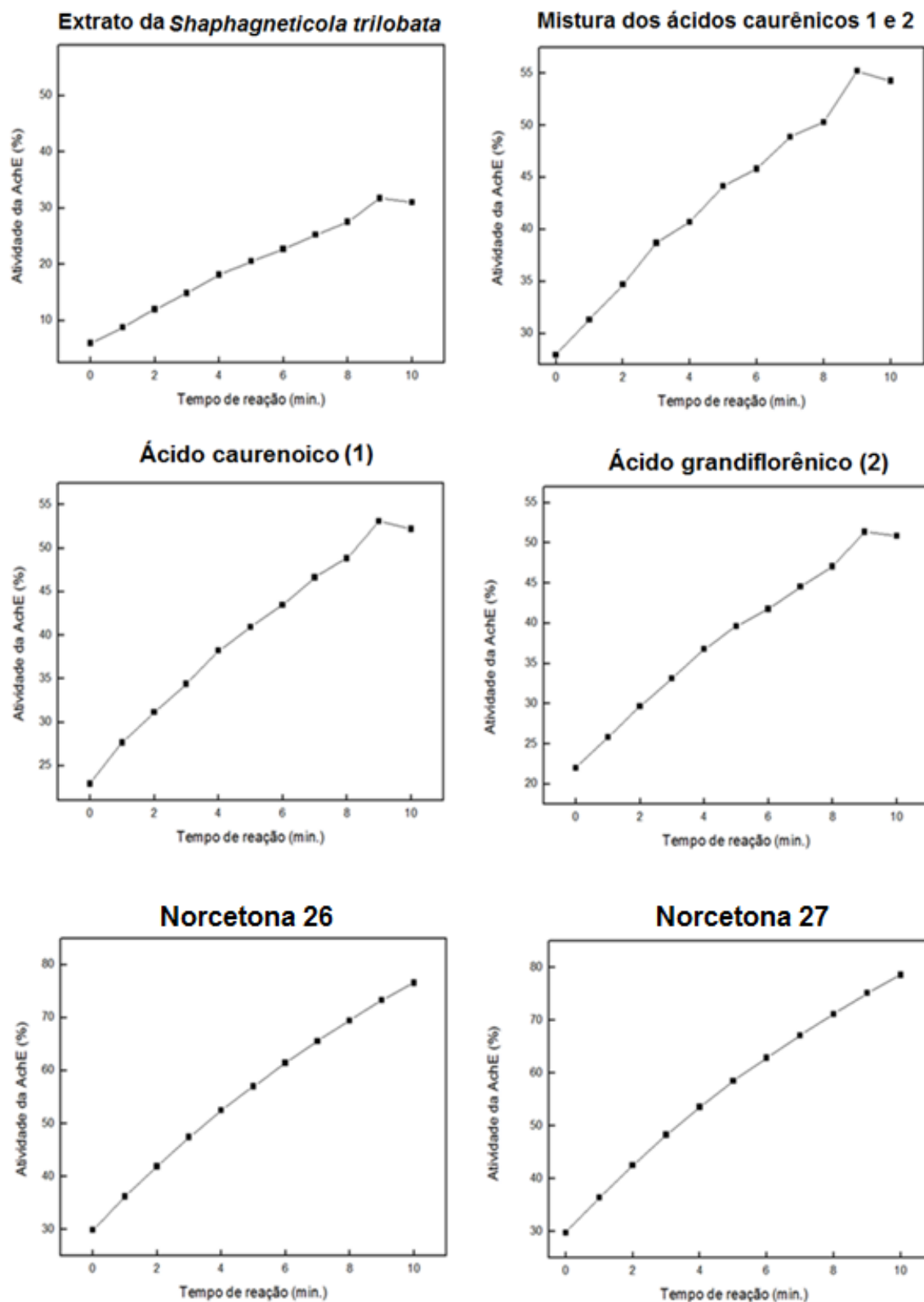


Figura 20: Avaliação da atividade da enzima AchE em função do tempo de incubação com as amostras testadas.

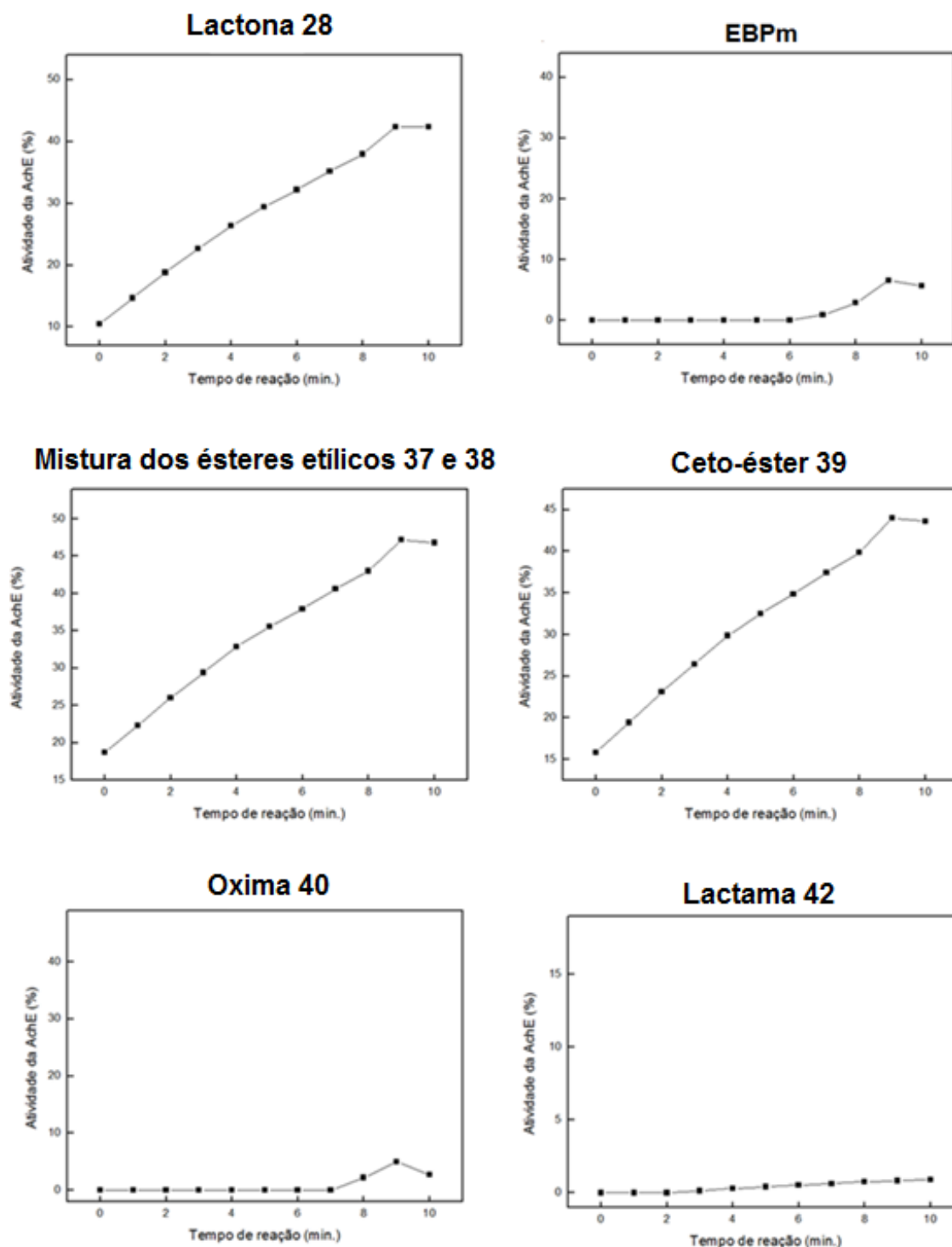


Figura 21: Avaliação da atividade da enzima AchE em função do tempo de incubação com as amostras testadas.

O extrato em acetato de etila da *Shaphagneticola trilobata* (**EAS**_t) inibiu a atividade da enzima AchE em 57,7 %, após 10 min. de ensaio (**Tabela 7**).

Tabela 7: Percentual inibitório da enzima AchE após 10 min. de ensaio

Amostra	% de Inibição (média $\pm$ desvio padrão)
Extrato da <i>Sphagneticola trilobata</i>	57,67 $\pm$ 2,88
Mistura dos ácidos 1 e 2	45,72 $\pm$ 2,28
Ácido caurenico (1)	47,78 $\pm$ 2,39
Ácido grandiflorênico (2)	49,15 $\pm$ 2,46
Norcetona 26	23,39 $\pm$ 1,17
Norcetona 27	21,45 $\pm$ 1,07
Lactona 28	57,67 $\pm$ 2,88
EBPm	94,36 $\pm$ 4,71
Mistura dos ésteres 37 e 38	53,20 $\pm$ 2,66
Ceto-éster 39	56,39 $\pm$ 2,82
Oxima 40	97,35 $\pm$ 4,86
Lactama 42	99,09 $\pm$ 4,95
Controle positivo (eserina)	99,88 $\pm$ 4,99
Controle negativo	0,00 $\pm$ 0,00

Por outro lado, o extrato de biotransformação do *P. mineoluteum* (**EBP**_m), a oxima **40** e a lactama **42** tiveram comportamentos semelhantes ao do controle positivo (eserina) (**Figura 22**). Os gráficos referentes a essas substâncias (**Figura 21**) mostram que a enzima AchE, ao ser incubada com essas amostras, permaneceu com a atividade estabilizada e próxima de zero ao longo do tempo. Dentre as substâncias puras testadas, a oxima **40** e a lactama **42** destacaram-se como substâncias com alto potencial inibitório da enzima AchE.

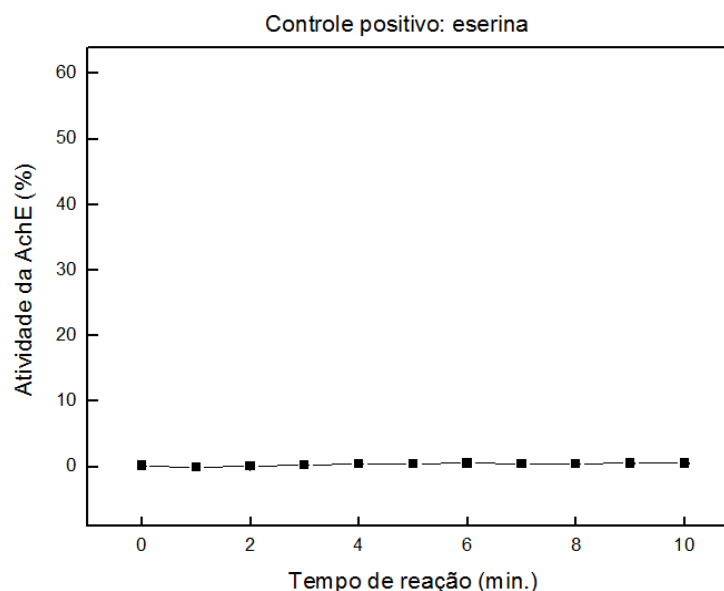


Figura 22: Atividade da enzima AchE (%) em função do tempo de incubação com a eserina (controle positivo).

As demais amostras apresentaram de moderada a alta atividade anticolinesterásica, visto que substâncias ou extratos que apresentam porcentagens de inibição maiores do que 50 % têm potencial anticolinesterásico considerado como alto e porcentagens de inibição entre 15 a 50 % como de atividade moderada a baixa (SEIDL, 2010).

4- METODOLOGIA

4.1- Equipamentos, reagentes e materiais

4.1.1- Equipamentos

- Agitador de tubos Phoenix modelo AP 56, série 10359;
- Aparelho Mattson Instruments Galaxy 3000 – para registrar os espectros na região do infravermelho;
- Autoclave vertical Fanen, modelo 415/3, série J036110;
- Balança analítica Quimis, modelo Q-ILA2104, 210/0,1mg;
- Balança eletrônica Digimed KN1000C, classe de exatidão II, série 04G6;
- Banho Büchi Waterbath B-480;

- Bomba de pressão Quimis Modelo Q-355B1, série 806377;
- Bomba de vácuo Tecnal TE-0581;
- Capela VECO, modelo JLF 912, série FL 5799;
- Espectrômetro BRUKER AVANCE DPX 200 e DPR 400 – para registrar espectros de RMN;
- Espectrômetro SHIMADZU LCMS-IT-TOF equipado com fonte de ionização por electrospray;
- Espectrofotômetro Bioespectro SP-22, série 08080407;
- Estufa de secagem Fanen Ltda Modelo 002 CB;
- Estufa para placa cromatográfica Quimis Q-316.12, série 807.131;
- Leitora de Elisa BioTek ELx800, série 268183;
- Microondas Master Cooking CCE M-500;
- Microscópio Olympus CX 40 Model CX40 RF100;
- Aparelho digital de ponto de fusão Microquímica Equipamentos Ltda MQAPF - 302;
- Refrigerador Electrolux Double D440;
- Rotavaporador Büchi Waterbath, modelo B – 480 e Fisaton modelo 802, série 531782;
- UV Modelo UVG-II Mineralight Lamb short wave UV-254 nm;

4.1.2- Materiais

- Colunas de vidro com diâmetro interno entre 0,7 a 5,0 cm e comprimento entre 15,0 a 100,0 cm;
- Cubetas de poliestireno com capacidade volumétrica de 5,0 mL;
- Micropipeta automática Digipet 1,0 - 5,0 mL;
- Micropipeta automática Digipet 20,0 - 200,0 µL;
- Placas de vidro com espessura de 0,25 mm;
- Termômetro Incoterm, série 313675.
- Câmera de Neubauer

4.1.3- Reagentes

- Ácido clorídrico P.A. (Quimex);
- Ácido sulfúrico P.A. (Proanalysis).
- Ágar de batata dextrosado - PDA (Acumedia);
- Alumina neutra (Merck);
- Anidrido trifluoroacético (Aldrich);
- Bicarbonato de sódio (Vetec);
- Bissulfito de sódio (Vetec);
- Caldo de infusão de cérebro e coração – BHI, (Acumedia);
- Cloreto de mesila (Aldrich);
- Cloreto de sódio (Vetec);
- Cloridrato de hidroxilamina (Vetec);
- Clorofórmio deuterado (Aldrich);
- D-glicose (Synth);
- Eserina;
- Fosfato de potássio dibásico P.A. (Synth);
- Iodo sublimado;
- Hidróxido de sódio (Synth);
- Kit Sigma para teste de inibição da enzima acetilcolinesterase: Albumina bovina sérica B4287-25G, Ácido 5,5-ditiobis- [2-nitrobenzóico] (DTNB) D8130-5G, Tris/HCl 0,1 M pH 8, Iodeto de acetilcolina (ACTI) A5751-5G, Acetilcolinesterase liofilizada tipo V-S C2888.
- Peptona bacteriológica (Acumedia);
- Periodato de potássio (Vetec);
- Peróxido de hidrogênio a 30 % (CRQ);
- Sacarose P.A. (ACS);
- Sílica gel (Sigma, 70-230 Mesh);
- Sílica gel (Vetec, 70-230 Mesh);
- Sílica gel (Sigma, 230-400 Mesh);
- Sílica gel 60 G (Vetec) para cromatografia em camada delgada (CCD);

- Solventes P.A.: acetato de etila, dimetilsulfóxido, hexano, álcool metílico, diclorometano, acetona, éter etílico, éter de petróleo, clorofórmio e álcool etílico das marcas Synth, CRQ, Quimex, Nuclear, Dinâmica e Merck;
- Sulfato cérico (Aldrich);
- Sulfato de magnésio heptaidratado (Vetec);
- Sulfato de sódio anidro (Vetec);
- Tetróxido de ósmio (Aldrich);
- Tiosulfato de sódio (Vetec);
- Vanilina (Synth);

4.2. Separações cromatográficas

4.2.1- Cromatografia em coluna de sílica gel (CCS)

As separações cromatográficas em coluna foram realizadas através de sílica gel 60 (70-230 Mesh) das marcas Sigma ou Vetec.

Para separações cromatográficas *flash* empregou-se sílica gel 60 Sigma (230-400 Mesh).

4.2.2- Cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDS)

Para cromatografia em camada delgada foi utilizada sílica gel 60 G, Vetec, na espessura de 0,25 mm.

As revelações cromatográficas foram realizadas por um dos três métodos:

- Exposição a vapores de iodo sublimado;
- Aplicação de solução aquosa de sulfato cérico acidificado (2 % de sulfato cérico e 6 % de ácido sulfúrico concentrado) seguida por aquecimento em estufa a 100 °C;
- Aplicação de solução metanólica de vanilina acidificada (1 % de vanilina e 10 % de ácido sulfúrico concentrado) seguida por aquecimento em estufa a 100 °C.

O grau de pureza das amostras foi determinado pela presença de uma única mancha em diversos tipos de eluentes.

4.3- Faixa de fusão

As faixas de fusão foram determinadas no aparelho digital de ponto de fusão Microquímica Equipamentos Ltda MQAPF – 302.

4.4- Elucidação estrutural das substâncias

Para as determinações estruturais das substâncias foram empregadas espectroscopia na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas.

4.4.1- Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no IV foram obtidos na região de 4000 a 600 cm^{-1} . As substâncias foram incorporadas em KBr, previamente dessecado e pulverizado. A mistura foi prensada em forma de disco transparente, sob pressão de 700 a 1050 kg m^{-2} e utilizada para obtenção dos espectros.

4.4.2- Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN (^1H , ^{13}C , DEPT-135, HSQC, HMBC e COSY) foram obtidos no equipamento AVANCE DPX 200 ou DPR 400 utilizando-se como solvente o CDCl_3 e como padrão interno o tetrametilsilano (TMS).

4.4.3- Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos através do equipamento Shimadzu LCMS-IT-TOF equipado com fonte de ionização por *electrospray*.

As condições de análise empregadas foram vaporização da amostra a 198,0 °C, voltagem do detector a 1,63 kV e fluxo do gás nebulizador (argônio) a 1,5 L/min. As amostras foram solubilizadas em metanol ou acetonitrila e foram analisadas no modo positivo ou negativo.

Os dados foram analisados usando o software Masslynx 4.0 da Micromass.

4.5- Processamentos do material vegetal e preparação do extrato

As partes áreas de *S. trilobata* foram coletadas durante a poda do vegetal no canteiro interno da USIMINAS, Av. Presidente Carlos Luz, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais. Uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Botânica do ICB da UFMG sob o número BHCB 19033.

O material vegetal, após coletado, ficou em repouso à temperatura ambiente até ficar totalmente seco. Obtiveram-se 3 kg da planta seca. Posteriormente esse material foi pulverizado e extraído em um percolador com acetato de etila. Após o processo de remoção do solvente sob pressão reduzida, obtiveram-se 127 g de extrato. A extração foi iniciada em maio e o extrato em acetato de etila de *S. trilobata* (**EAS_t**) foi utilizado em julho, ambos em 2011.

4.6- Fracionamento cromatográfico do EAS_t

O extrato em acetato de etila de *S. trilobata* **EAS_t** (127 g) foi submetido à cromatografia filtrante em coluna de sílica gel (516 g). Foram coletadas 65 frações de 1L utilizando-se os eluentes especificados na **Tabela 8**.

Tabela 8: Fracionamento cromatográfico do **EAS_t**

Eluente	Frações coletadas
Hexano	1-9
Hexano e Diclorometano (9:1)	10-21
Hexano e Diclorometano (8:2)	22-25
Hexano e Diclorometano (6:4)	26-48
Diclorometano	49-60
Metanol	61-65

As frações foram reunidas em oito grupos de acordo com seu aspecto visual e perfil cromatográfico por CCDS (**Tabela 9**).

Tabela 9: Fracionamento cromatográfico do **EAS**t

Frações reunidas	Massa (g)	Frações reunidas	Massa (g)
1-6	3,63	19-23	8,81
7-10	4,35	31-42	7,58
11-13	5,14	43-50	5,26
14-18	8,38	51-65	40,38

Das frações reunidas, três delas (F11-13, F14-18 e F19-23) apresentavam-se com aspecto oleoso de coloração alaranjada e com resíduo solidificado. Estas frações foram, separadamente, submetidas a processos de solubilização, decantação e filtração utilizando éter de petróleo como solvente. Este processamento foi repetido sucessivamente nos filtrados que, após remoção de solvente, mostraram novo material solidificado. Os sólidos obtidos [F11-13sol (1,16 g), F14-18sol (2,01 g) e F19-23sol (2,33 g)] apresentaram mesmo R_f por CCDS e, após análise utilizando os respectivos espectros de RMN de ^1H , foram identificados como uma mistura constituída pelos ácidos caurenóico (ácido *ent*-caur-16-en-19-oico) e grandiflorênico (ácido *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oico) (VIEIRA, 2000). Os sólidos reunidos, contendo a mistura de ácidos com esqueleto caurênico (5,5 g), foram reunidos e utilizados, sem posterior purificação, para a realização das reações de modificação química.

4.7- Modificações químicas para obtenção do ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28)

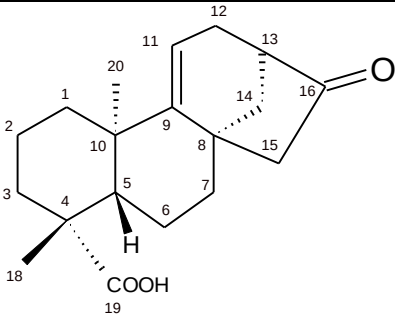
4.7.1- Preparação dos ácidos *ent*-16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (26) e *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27) através de quebra oxidativa (PAPPO *et al.*, 1956)

Um pequeno cristal de tetróxido de ósmio (OsO_4) foi adicionado a uma mistura contendo 1,0 g da mistura dos ácidos caurênicos, 3,2 g (14,7 mmol) de periodato de potássio em 100,0 mL de THF/ H_2O (1:1). Essa mistura foi mantida sob agitação por um período de 12 h à temperatura ambiente. Após esse período, por CCDS, utilizando como eluente 20 % de acetato de etila em

hexano, foi observado o consumo completo do material de partida e a presença de duas substâncias de R_f muito próximos. Em seguida, essa mistura foi tratada com 0,5 g de bissulfito de sódio e lavada (3 vezes) com 25,0 mL de solução aquosa de tiosulfato de sódio (10 %). O produto foi extraído (três vezes) com 50,0 mL de éter etílico. As fases orgânicas foram reunidas e secadas com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido sob pressão reduzida obtendo-se, no final desse processo, um sólido de coloração amarela clara (0,957 g).

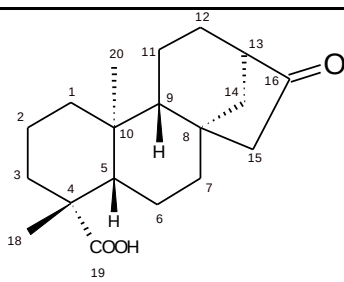
Esse resíduo da reação foi submetido à cromatografia *flash* em coluna de sílica utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila (8:2). Foram recolhidas 80 frações de 20 mL cada. As frações foram analisadas por CCDS e reunidas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico. Foi obtido, nas frações 48 a 54, um sólido branco com massa equivalente a 151 mg, o qual foi identificado como *ent*-16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (**26**). Na **Tabela 10** constam os dados físico-químicos da norcetona **26**.

Tabela 10: Propriedades físico-químicas da norcetona **26**

Propriedades	26
Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₁₉ H ₂₆ O ₃
Massa molecular	302,1882 g mol ⁻¹
Aparência	Sólido branco
Faixa de fusão	228,0-232,0 °C
IV (KBr) (ν, cm ⁻¹)	3190 (O-H); 1732 e 1712 (C=O).
RMN de ¹ H, 200 MHz, CDCl ₃ (δ, multiplicidade)	H-11 (5,30, sl, 1H); H-18 (1,27, s, 3H) e H-20 (1,02, s, 3H).
RMN de ¹³ C, 50 MHz, CDCl ₃ (δ)	C-1 (40,6); C-2 (20,0); C-3 (38,1); C-4 (44,7); C-5 (46,2); C-6 (18,1); C-7 (30,1); C-8 (40,3); C-9 (156,1); C-10 (38,9); C-11 (115,0); C-12 (31,9); C-13 (46,3); C-14 (42,4); C-15 (56,2); C-16 (221,7); C-17 (-); C-18 (28,2); C-19 (184,0); C-20 (23,6).
[M-H] ⁻	301,1810 m/z

Das frações 56 a 68 foram obtidos 440,2 mg de outro sólido branco identificado como ácido *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (**27**). Os dados físico-químicos de **27** constam na **Tabela 11**.

Tabela 11: Propriedades físico-químicas da norcetona **27**

Propriedades	27
Estrutura química	
Fórmula molecular	$C_{19}H_{28}O_3$
Massa molecular	304,2038 g mol ⁻¹
Aparência	Sólido branco
Faixa de fusão	225,0-235,7 °C
IV (KBr) (ν, cm ⁻¹)	3162 (O-H); 1732 (C=O).
RMN de ¹ H, 200 MHz, CDCl ₃ (δ, multiplicidade)	H-18 (1,27, s, 3H) e H-20 (1,02, s, 3H).
RMN de ¹³ C, 50 MHz, CDCl ₃ (δ)	C-1 (40,6); C-2 (19,0); C-3 (37,7); C-4 (47,7); C-5 (56,8); C-6 (20,7); C-7 (41,0); C-8 (42,5); C-9 (54,0); C-10 (39,8); C-11 (18,8); C-12 (29,5) C-13 (47,8); C-14 (37,3); C-15 (54,9); C-16 (222,7); C-17 (-); C-18 (29,0); C-19 (184,0); C-20 (16,1).
[M-H] ⁻	303,1976 m/z

Essas substâncias foram identificadas de acordo com seus dados espectrais e estão de acordo com dados fornecidos na literatura (BOECK *et al.*, 2005; ROCHA, 2010; VIEIRA *et al.*, 2002a; VIEIRA, 2000).

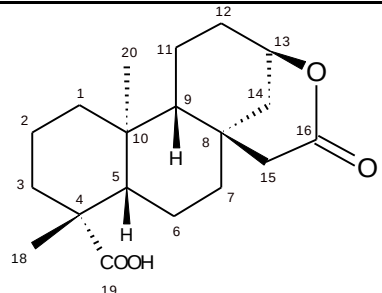
4.7.2- Reação tipo Baeyer-Villiger para formação do ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (**28**) (ANASTASIA *et al.*, 1985)

O reagente da reação, ácido trifluoroperacético, foi gerado *in situ* pela adição de 20,0 mL (244 mmol) de anidrido trifluoroacético a uma solução contendo 6,0 mL (60 mmol) de peróxido de hidrogênio a 30 % em 40 mL diclorometano anidro a 0 °C. Posteriormente foram adicionados 637,4 mg (2,1 mmol) da norcetona caurânica **27** dissolvida em 4 mL de diclorometano anidro. Essa mistura ficou sob agitação por um período de 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, 15,0 mL de uma solução aquosa a 2 % de carbonato de potássio foram adicionados. O produto foi extraído por três vezes com 50 mL de diclorometano em cada etapa. As fases orgânicas foram reunidas e secadas sobre sulfato de sódio anidro. O resíduo da reação foi concentrado sob pressão reduzida.

Após a elaboração da reação, o resíduo (598,7 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica *flash* (31 g de sílica em uma coluna de 2,0 de diâmetro) utilizando-se como único eluente a mistura hexano/acetato de etila (1:1). Foram retiradas 40 frações de 10 mL cada.

Um sólido branco obtido do grupo de frações 8-21 (470,0 mg, 70 % de rendimento) foi identificado como ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (**28**) através da comparação de seus dados espectrais com os dados fornecidos pela literatura (VIEIRA, 2000). Os dados físico-químicos da lactona **28** constam na **Tabela 12**.

Tabela 12: Propriedades físico-químicas da lactona **28**

Propriedades	28
Estrutura química	
Fórmula molecular	$C_{19}H_{28}O_4$
Massa molecular	$320,1988 \text{ g mol}^{-1}$
Aparência	Sólido branco
Faixa de fusão	$217,0\text{-}219,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$
IV (KBr) (ν , cm^{-1})	3296 (O-H); 1726 e 1686 (C=O).
RMN de ^1H , 200 MHz, CDCl_3 (δ ; multiplicidade)	H-13 (4,80; sl, 1H); H-18 (1,27; s, 3H) e H-20 (1,97; s, 3H).
RMN de ^{13}C , 50 MHz, CDCl_3 (δ)	C-1 (40,6); C-2 (18,9); C-3 (37,3); C-4 (43,4); C-5 (56,5); C-6 (19,8); C-7 (42,9); C-8 (33,8); C-9 (53,0); C-10 (39,4); C-11 (16,2); C-12 (28,7); C-13 (75,7); C-14 (33,0); C-15 (47,9); C-16 (172,2); C-17 (-); C-18 (28,8); C-19 (183,5); C-20 (16,2).
$[\text{M-H}]^-$	$319,1926 \text{ } m/z$

4.8- Reação de biotransformação do ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28) pelos fungos *Penicillium mineoluteum* e *Fusarium proliferatum*

4.8.1- Preparo do meio de cultura

Para o preparo do meio de manutenção dos fungos foi utilizado o meio de cultura sólido ágar de batata dextrosado – 39,0 g L⁻¹.

A incubação dos fungos foi realizada utilizando-se os meios de cultura líquidos especificados abaixo.

P. mineoluteum (Lucas *et al.*, 2007):

- D-Glicose – 20,0 g L⁻¹;
- Peptona bacteriológica – 5,0 g L⁻¹;
- K₂HPO₄ – 1,0 g L⁻¹;
- MgSO₄.7H₂O – 0,5 g L⁻¹;
- NaCl – 5,0 g L⁻¹.

F. proliferatum (Lucas *et al.*, 2007):

- Sacarose – 30 g L⁻¹;
- Nitrato de sódio – 3,0 g L⁻¹;
- Fosfato de potássio dibásico – 1,0 g L⁻¹;
- Cloreto de potássio – 0,5 g L⁻¹;
- Sulfato de magnésio hexahidratado – 0,5 g L⁻¹;
- Sulfato ferroso heptahidratado – 0,01 g L⁻¹.

Os procedimentos de preparo de manutenção do fungo, do inóculo e preparo do extrato fúngico foram equivalentes para as duas espécies e realizados concomitantemente.

Para o preparo do meio de manutenção dos fungos, o ágar de batata dextrosado foi dissolvido em água destilada (39 g L⁻¹), sob agitação, e a solução resultante foi aquecida até a formação de um líquido translúcido, o qual foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 min. Os fungos foram armazenados nesse meio a 11 °C em tubo de ensaio.

Os constituintes do meio de incubação do fungo também foram dissolvidos em água destilada, a solução resultante foi transferida para erlenmeyers de 500 mL e estes foram tampados. Foram transferidos 200 mL de meio para cada um dos 16 erlenmeyers, os quais foram esterilizados sob as mesmas condições do meio de manutenção.

4.8.2- Preparo do inóculo

Em todas as etapas, o pré-inóculo e o inóculo dos fungos foram preparados em cabine de segurança biológica nas proximidades da chama do bico de Bunsen. A cabine foi previamente esterilizada com solução aquosa de álcool etílico 70 % e posteriormente por radiação UV por 15 min.

De um tubo de ensaio contendo o fungo, após fase de crescimento, foi retirada uma pequena quantidade de micélio com o auxílio de alça de platina e transferida para outros tubos de ensaio contendo ágar de batata inclinado (meio de manutenção). Aguardou-se um período de três dias para o desenvolvimento do fungo à temperatura ambiente. Após esse período, adicionaram-se 10 mL de água destilada previamente esterilizada, produzindo-se uma suspensão de esporos, a qual foi transferida para um erlenmeyer contendo 200 mL de meio de incubação previamente esterilizado em autoclave (pré-inóculo). O fungo cresceu nesse meio líquido por um período de cinco dias em condição estática. Em seguida, 10,0 mL desse meio contendo o fungo crescido foram adicionados em cada um dos 15 erlenmeyers restantes. O fungo foi mantido nesses erlenmeyers em condição estática à temperatura ambiente por um período de três dias. Após esse período, foram adicionados 15,0 mg de substrato (**28**) dissolvidos em 25 µL de clorofórmio em cada um dos 14 erlenmeyers (14 foram utilizados para a reação de biotransformação e um para o controle do crescimento do fungo na ausência do substrato). Após a adição do substrato, o mesmo foi mantido em contato com o fungo por 25 dias para a biotransformação, em condição estática e à temperatura ambiente. No caso do *F. proliferatum* utilizaram-se os mesmos procedimentos, porém em todas as etapas de crescimento, o meio de cultivo contendo o fungo foi submetido à agitação (80 rpm).

As reações de biotransformação, juntamente com seus respectivos controles (branco do substrato), foram acompanhadas por CCDS periodicamente.

4.8.3- Preparo do extrato fúngico

Após 25 dias, o meio de cultivo foi filtrado no intuito de separar o micélio do filtrado. O filtrado foi extraído com acetato de etila em um funil de separação. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida.

O micélio foi tratado com acetato de etila por 24 h e em seguida submetido à filtração. Da mesma forma, a fase orgânica foi secada e concentrada. Os extratos do filtrado e do micélio foram combinados e obtiveram-se, no final desse procedimento, 1,78 g de extrato de biotransformação do *P. mineoluteum* (**EBPm**) e 1,97 g de extrato de biotransformação do *F. proliferatum* (**EBFp**).

O procedimento de obtenção do extrato do filtrado e do extrato do micélio, ambos provenientes do controle, foi realizado de forma equivalente ao já descrito. Esses extratos foram combinados e o extrato resultante foi denominado branco do substrato. As substâncias presentes no extrato que continha o substrato e ausentes no branco do substrato, reveladas através de CCDS, foram consideradas como produtos de biotransformação.

4.8.4- Fracionamento do extrato de biotransformação de *P. mineoluteum*

O **EBPm** foi submetido à cromatografia em coluna de sílica (105,0 g de sílica em uma coluna de 3,0 cm de diâmetro). O sistema de eluição utilizado é apresentado na **Tabela 13**.

Tabela 13: Sistema de eluição do **EBPm** por cromatografia em coluna de sílica

Eluente	Volume de cada fração (mL)	Frações
Hexano	200,0	1-3
Hexano/Acetato de etila (7:3)	200,0	4-6
Hexano/Acetato de etila (1:1)	150,0	7-18
Hexano/Acetato de etila (13:7)	150,0	19-28
Hexano/Acetato de etila (8:2)	150,0	29-38
Acetato de etila	250,0	39-40
Acetato de etila/Metanol (8:2)	250,0	41-43
Acetato de etila/Metanol (1:1)	250,0	44-45
Metanol	400,0	46

As frações coletadas foram reunidas em grupos de acordo com os respectivos perfis cromatográficos, os quais se encontram especificados na **Tabela 14**.

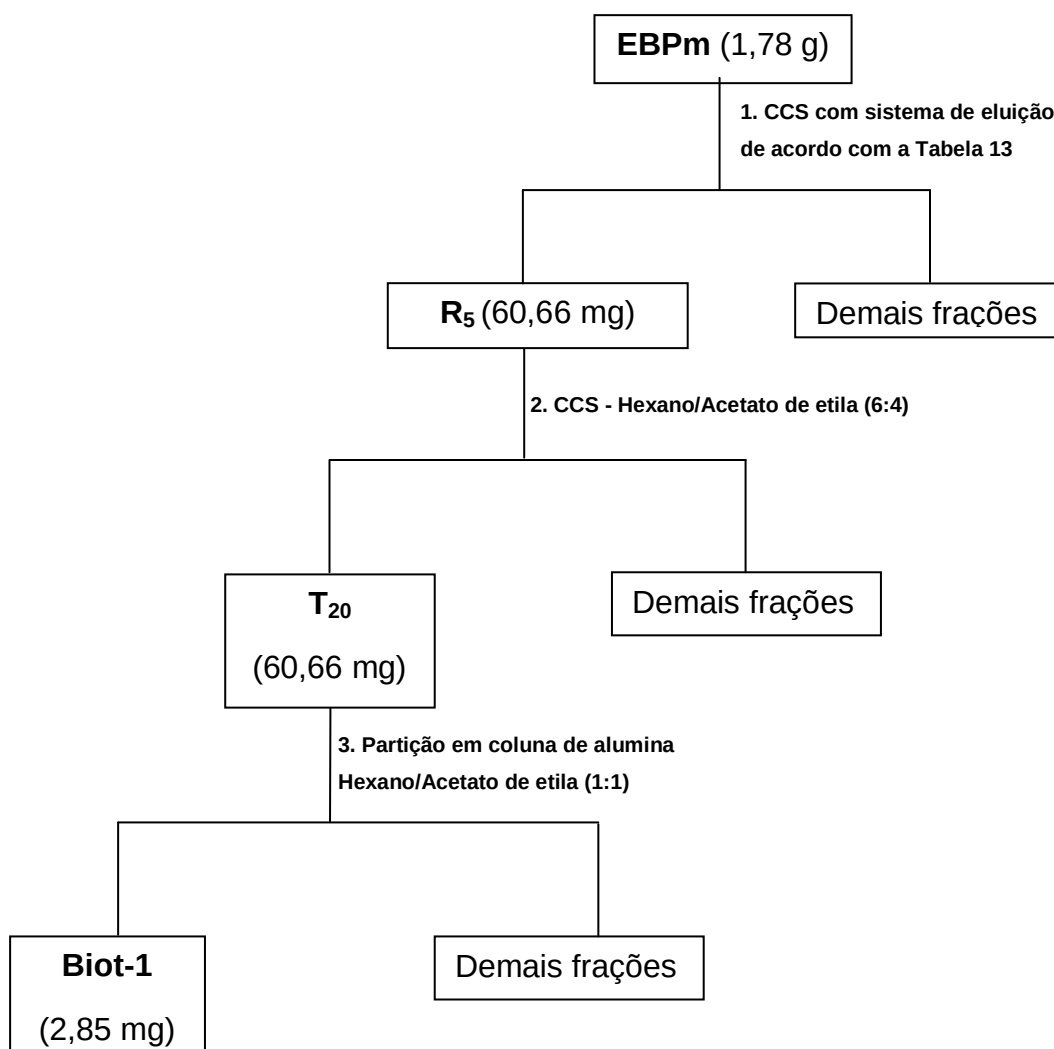
Tabela 14: Combinações das frações do **EBPm** e suas respectivas massas

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
1-6	37,03	20-30	37,13
7-9	18,75	31-33	32,34
10-11	13,72	34-35	18,58
12-13	102,73	36-38	53,99
14-19	60,66	39-46	950,00

Através de CCDS, o grupo de frações 12-13 (denominado **R₁**) foi considerado puro. Seus dados espectrais levaram à sua identificação como sendo material de partida recuperado. Portanto, dos 210,00 mg de material de partida utilizados na reação de biotransformação, conseguiu-se recuperar 102,73 mg (49 %) desse material.

O grupo 14-19 (denominado **R₅**) apresentou alguns cristais, mas por CCDS mostrou-se ainda impuro. Este grupo foi então submetido a uma nova

cromatografia *flash* em coluna de sílica (29,08 g de sílica em uma coluna de 1,0 cm de diâmetro). Foram retiradas 164 frações de 5 mL cada, utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila (6:4). As frações foram reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico. O grupo de frações 20-84 denominado **T₂₀** (40,33 mg) mostrou em CCDS substâncias com R_f muito próximo em relação ao do material de partida, revelando-se possíveis derivados de biotransformação com pequena alteração de polaridade. Essa amostra foi submetida a uma coluna cromatográfica de alumina neutra (coluna com 0,7 cm de diâmetro e 10,0 cm de altura). A mistura acetato de etila/hexano (1:1) foi utilizada como eluente e foram retiradas 20 frações de 10 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico. Foram obtidos 2,85 mg da substância denominada **Biot-1** (frações 2-3), considerada como um produto de biotransformação. O **Esquema 19** representa resumidamente todos os processos cromatográficos que foram realizados para a obtenção desse biotransformado.



Esquema 19: Processos cromatográficos utilizados no isolamento do produto de biotransformação **Biot-1**.

A estrutura da substância presente no extrato de biotransformação foi elucidada de acordo com seus respectivos dados espectrais. O rendimento da reação de biotransformação foi equivalente a 1,31 %. Tendo em vista que uma considerável quantidade do material de partida (**28**) foi recuperada, obteve-se 2,56 % de rendimento relativo.

4.8.5- Fracionamento do extrato de biotransformação de *F. proliferatum*

O **EBFp** foi submetido a CCS (321,9 g de sílica em uma coluna de 4,0 cm de diâmetro). Foram retiradas 60 frações, as quais foram reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico (CCDS). O material de partida e possíveis produtos de biotransformação foram identificados, através de CCDS, no grupo de frações 18-30. Após várias tentativas de purificação por CCS, as frações mostravam ainda impuras. Portanto, não foi possível isolar os possíveis biotransformados desse extrato.

4.9- Modificações químicas para obtenção da lactama *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila

4.9.1- Reação de esterificação da mistura dos ácidos 1 e 2 (GRUNDY *et al.*, 1972)

A mistura de ácidos caurânicos (1,5 g, 5,0 mmol), dissolvida em acetona anidra (10 mL), foi adicionada a uma mistura contendo carbonato de potássio calcinado (0,75 g, 6,0 mmol), sulfato de dietila (0,5 mL, 6,0 mmol) e acetona anidra (70 mL). O material resultante foi aquecido sob refluxo por três horas. Após este período observou-se, por CCDS (n-hexano/diclorometano 1:1), o completo desaparecimento do material de partida e o aparecimento de uma mancha de R_f maior. A reação foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada. A acetona foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi extraído com éter etílico. A fase orgânica foi lavada com solução de bicarbonato de sódio (5 %), água destilada e, em seguida, secada com sulfato de sódio anidro.

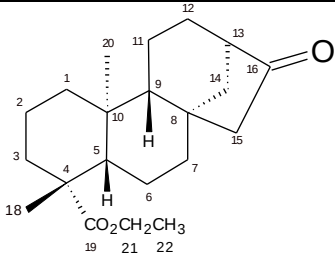
Após concentração sob pressão reduzida, obteve-se um resíduo escuro (2,1 g) que foi fracionado utilizando coluna filtrante de sílica gel (12,0 g), eluída com hexano. A mistura de ésteres com esqueleto caurânico (1,36 g) foi obtida como uma resina incolor com 86 % de rendimento.

4.9.2- Reação de clivagem oxidativa da ligação dupla exocíclica da mistura de ésteres etílicos caurânicos (PAPPO *et al.*, 1956)

A metodologia empregada para a execução e elaboração da reação foi equivalente à descrita em 3.2.1, pág. 21.

Utilizou-se 1,3 g (4,0 mmol) da mistura de ésteres caurânicos, 4,0 g (19,0 mmol) de periodato de sódio e um cristal de tetróxido de ósmio. Após elaboração, conforme descrito no item 3.2.1, pág. 21, obteve-se um resíduo oleoso amarronzado. Por CCDS, observou-se o desaparecimento do material de partida e a presença de outras manchas de R_fs menores. Este material (1,85 g) foi submetido à cromatografia filtrante em coluna de sílica gel, utilizando-se como eluentes n-hexano (300 mL), mistura de n-hexano e diclorometano 1:1 (300 mL), diclorometano (300 mL) e posteriormente mistura de diclorometano e acetato de etila 1:1 (300 mL). Foram recolhidas nove frações de 100 mL cada. Apenas um dos produtos esperados foi obtido, o composto *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (**39**), na fração 3, como um resíduo oleoso claro (858,0 mg, 63 % de rendimento) e foi caracterizado pelos métodos espectroscópicos usuais. Na **Tabela 15** constam os dados físico-químicos do ceto-éster **39**.

Tabela 15: Dados físico-químicos do ceto-éster **39**

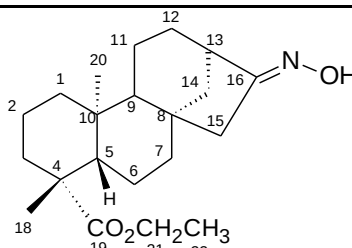
Propriedades	39
Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₃₂ O ₃
Massa molecular	332,2351 g mol ⁻¹
Aparência	Substância oleosa amarela clara
IV (KBr) (ν, cm ⁻¹)	1720 e 1738 (C=O).
RMN de ¹ H, 200 MHz, CDCl ₃ (δ, multiplicidade)	H-18 (1,19; s, 3H); H-20 (0,92; s, 3H); H-13 (2,39; sl, 1H); H-21 (4,12; q, J = 7,2 Hz, 2H) e H-22 (1,28; t, J = 7,2 Hz, 3H).
RMN de ¹³ C, 50 MHz, CDCl ₃ (δ)	C-1 (40,7); C-2 (19,1); C-3 (37,9); C-4 (43,7); C-5 (56,8); C-6 (20,8); C-7 (41,1); C-8 (42,5); C-9 (54,0); C-10 (39,6); C-11 (18,7); C-12 (29,5); C-13 (47,8); C-14 (37,2); C-15 (55,0); C-16 (222,7); C-17 (-); C-18 (28,8); C-19 (177,4); C-20 (16,16); C-21 (60,0); C-22 (14,1).
[M+Na] ⁺	355,1388 m/z

4.9.3- Reação de adição nucleofílica ao grupo carbonila do ceto-éster **39 (LA MATTINA e SULESKE, 1990)**

Em 24,0 mL de uma solução de etanol/água (8:2) contendo 400,0 mg (1,20 mmol) de **39**, foram adicionados, sob agitação e à temperatura ambiente, 2,42 mmol de cloridrato de hidroxilamina e 1,0 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 1,5 mol L⁻¹. Essa mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 1 h. Após esse período, observou-se por CCDS (eluente: 30 % de acetato em hexano) que todo o material de partida havia sido consumido. O solvente foi removido sob pressão reduzida. Adicionaram-se 10 mL de água destilada, e em seguida, mediu-se o pH, o qual estava levemente ácido. O produto orgânico foi extraído com éter etílico. A fase etérea foi secada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida.

A fração orgânica obtida (459,40 mg) foi submetida à cromatografia *flash* em coluna de sílica gel (79,13 g de sílica em uma coluna de 2,0 cm de diâmetro) utilizando-se como único eluente uma mistura de hexano/acetato de etila (7:3). Foram coletadas 80 frações de 10 mL cada. Do grupo de frações 17-34 obtiveram-se 274,34 mg de um material com coloração amarelo claro e com aspecto oleoso que foi identificado, de acordo com seus espectros, como *ent*-16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (**40**). A reação descrita forneceu um rendimento de 65 %. Na **Tabela 16** constam os dados físico-químicos da oxima **40**.

Tabela 16: Dados físico-químicos da oxima **40**

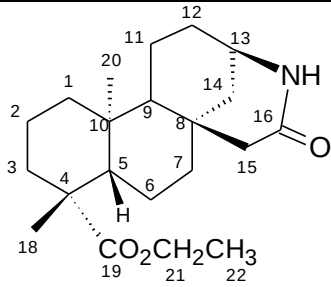
Propriedades	40
Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₃₃ NO ₃
Massa molecular	347,2460 g mol ⁻¹
Aparência	Substância oleosa amarela clara
IV (KBr) (ν, cm ⁻¹)	1654 (N=C); 1720 (C=O) e 3300 (O-H)
RMN de ¹ H, 200 MHz, CDCl ₃ (δ, multiplicidade)	H-13 (2,77; sl, 1H); H-18 (1,18; s, 3H); H-20 (0,87; s, 3H); H-21(4,12; q, J = 7,0 Hz, 2H); H-22 (1,27; t, J = 7,0 Hz, 3H).
RMN de ¹³ C, 50 MHz, CDCl ₃ (δ)	C-1 (40,7); C-2 (19,1); C-3 (37,9); C-4 (42,7); C-5 (56,8); C-6 (21,5); C-7 (40,9); C-8 (43,7); C-9 (54,4); C-10 (39,5); C-11 (18,4); C-12 (31,2); C-13 (40,7); C-14 (38,6); C-15 (43,7); C-16 (168,7); C-17 (-); C-18 (28,8); C-19 (177,4); C-20 (15,8); C-21 (60,0); C-22 (14,1).
[M+H] ⁺	348,2462 m/z

4.9.4- Reação de formação da *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (42) (SHAFIKOV *et al.*, 2009)

Foram dissolvidos, sob agitação e à temperatura ambiente, 76,12 mg (0,22 mmol) da oxima **40**, 0,22 mmol de carbonato de sódio e 0,44 mmol de cloreto de metanossulfonila (cloreto de mesila) em 10 mL de acetona previamente destilada. Essa mistura permaneceu sob agitação por um período de 24 h à temperatura ambiente. Após esse intervalo de tempo, a mistura foi resfriada a 0 °C e, em seguida, adicionaram-se, sob agitação, 6,0 mL de água destilada. O produto foi extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida.

Obtiveram-se 82,74 mg de produto com um aspecto viscoso e com coloração alaranjada. Essa amostra foi submetida à cromatografia em coluna de sílica (45,0 g de sílica em uma coluna de 1,0 cm de diâmetro) utilizando-se 5 % de metanol em hexano como eluente. Retiraram-se 40 frações com o volume de 10 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico. O grupo de frações 8-17 (36,69 mg) apresentou-se como um sólido cristalino, cuja estrutura foi elucidada de acordo com seus dados espectrais e identificada como *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (**42**), com rendimento de 48 %. Os dados físico-químicos da lactama **42** constam na **Tabela 17**.

Tabela 17: Dados físico-químicos da lactama **42**

Propriedades	42
Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₃₃ NO ₃
Massa molecular	347,2460 g mol ⁻¹
Aparência	Sólido cristalino
Faixa de fusão	194,0-196,1 °C
IV (KBr) (ν, cm ⁻¹)	1722 (C=O) e 1468 (N-H)
RMN de ¹ H, 400 MHz, CDCl ₃ (δ, multiplicidade)	H-13 (3,69; sl, 1H); H-18 (1,18; s, 3H); H-20 (0,98; s, 3H); H-21 (4,12; q, J = 7,2 Hz, 2H); H-22 (1,25; t, J = 7,2 Hz, 3H).
RMN de ¹³ C, 100 MHz, CDCl ₃ (δ)	C-1 (41,4); C-2 (19,2); C-3 (37,8); C-4 (43,7); C-5 (56,9); C-6 (20,2); C-7 (43,7); C-8 (34,1); C-9 (53,8); C-10 (39,6); C-11 (16,6); C-12 (29,7); C-13 (48,7); C-14 (33,5); C-15 (49,4); C-16 (174,0); C-17 (-); C-18 (28,8); C-19 (177,4); C-20 (16,5); C-21 (60,0); C-22 (14,1).
[M+H] ⁺	348, 2466 m/z

4.10- Testes biológicos

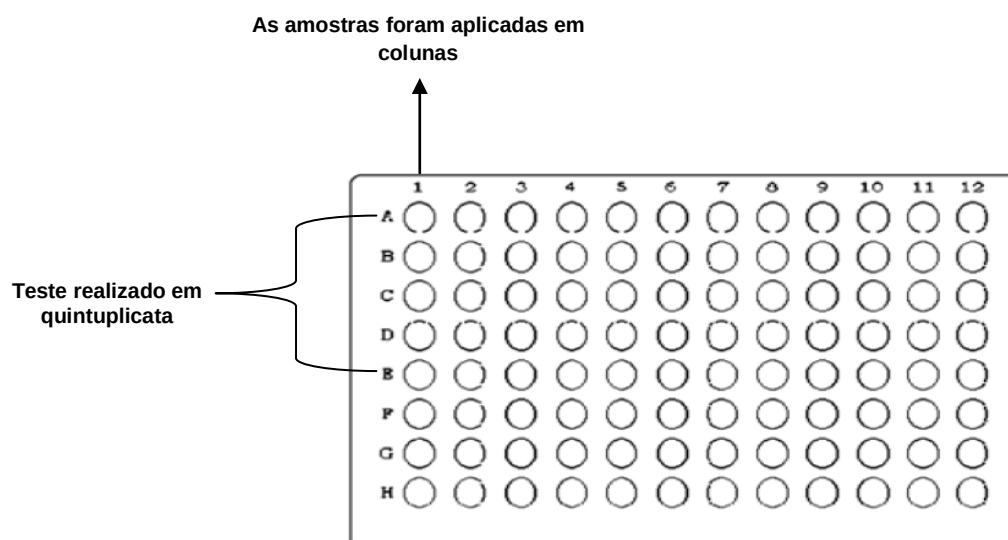
4.10.1- Bioensaios antibacterianos e antifúngicos

Para testar a atividade antibacteriana e antifúngica das substâncias isoladas e sintetizadas, foi utilizada a técnica da microdiluição em meio de cultivo líquido.

Os procedimentos de obtenção do pré-inóculo e do inóculo das bactérias e da suspensão de esporos dos fungos filamentosos foram realizados próximo à chama do bico de Bunsen em cabine de segurança biológica devidamente esterilizada. Os materiais e os reagentes utilizados para esses procedimentos foram previamente autoclavados a 120 °C por 20 min.

Para todos os testes, foram utilizadas placas com 96 poços (12 colunas e 8 linhas), como demonstrado no **Esquema 20**.

Nos testes, cada amostra foi aplicada em coluna utilizando-se cinco poços, realizando-se os bioensaios, dessa forma, em quintuplicata.



Esquema 20: Representação da microplaca utilizada nos testes de avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos diterpenos caurânicos.

Os testes antibacterianos foram realizados utilizando-se as bactérias especificadas na **Tabela 18**.

Tabela 18: Micro-organismos utilizados para avaliação da propriedade antibacteriana das substâncias isoladas ou sintetizadas

Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29212)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 15313)	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	<i>Citrobacter freundii</i> (ATCC 8090)

Os testes antifúngicos foram realizados utilizando-se os fungos especificados na **Tabela 18**.

Tabela 19: Fungos utilizados para avaliação da propriedade antifúngica das substâncias isoladas ou sintetizadas

Fungos filamentosos	Levedura
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 18804)
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (ATCC 16022)	
<i>Penicillium citrinum</i> (ATCC 10499)	
<i>Microsporum gypseum</i> (ATCC 14683)	

Todos esses micro-organismos são mantidos no LABB (Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG).

4.10.1.1- Preparo do pré-inóculo e do inóculo bacteriano

O procedimento do preparo do pré-inóculo e inóculo das bactérias foi igualmente realizado para a levedura *Candida albicans*.

No preparo de pré-inóculo, as bactérias estocadas em tubo de ensaio foram retiradas com o auxílio de uma alça de platina e transferidas para tubos de ensaio contendo 4,5 mL de meio de cultura BHI (37,0 g L⁻¹). Posteriormente, as bactérias foram armazenadas em estufa a 37 °C por um período de 12 h.

Para o preparo do inóculo bacteriano, 500 µL do pré-inóculo e 4,0 mL de água destilada e estéril foram adicionados em uma cubeta de 1,0 cm de caminho óptico. A quantidade de pré-inóculo ou de água foi ajustada de

maneira que a transmitância em 625 nm ficasse compreendida entre 74 a 75 %.

4.10.1.2- Preparo da solução de esporos dos fungos filamentosos

Para a preparação da suspensão de esporos dos fungos filamentosos, os mesmos foram incubados por sete dias a 28 °C em ágar batata dextrosado. Posteriormente retiraram-se, com auxílio de uma alça estéril, os esporos e estes foram transferidos para um erlenmeyer de 125 mL contendo água esterilizada. Os esporos foram contados em câmara de Neubauer e realizou-se a diluição adequada para que a concentração final fosse de 5×10^3 esporos/mL.

4.10.1.3- Preparo das amostras para os bioensaios antibacterianos e antifúngicos

As amostras foram solubilizadas em DMSO de maneira a se obter uma concentração de 12 mg/mL para as amostras puras e 50,0 mg/mL para os extratos.

Foram preparados 5,0 mL de solução trabalho para cada amostra, adicionando-se 200 µL da amostra solubilizada em DMSO em 4,8 mL de meio de cultura BHI.

4.10.1.4- Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica

Nas placas testes, foram adicionados, em cada poço, 100 µL da solução trabalho e 100 µL do inóculo ou da suspensão de esporos do micro-organismo testado. Foram realizados, também em quintuplicata, três tipos de controle:

- Controle da amostra: foram adicionados em cada poço 100 µL da solução trabalho e 100 µL de água destilada estéril;
- Controle do meio: para testar a esterilidade do meio, foram adicionados 100 µL do meio de cultura BHI e 100 µL de água destilada estéril;

- Controle do crescimento do micro-organismo: adicionou-se em cada poço 100 µL do inóculo ou da suspensão de esporos do micro-organismo testado e 100 µL de água destilada estéril.

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por um período de 24 h para os testes antibacterianos e para a levedura *C. albicans* e 48 h para os fungos filamentosos. Após o intervalo de tempo especificado, fez-se a leitura em uma leitora de Elisa no comprimento de onda fixo em 492 nm.

Todos os resultados foram tratados através dos softwares *Microsoft Excel 2010* e *Origin 6.1*.

4.10.2- Avaliação da atividade anticolinesterásica pelo método de ELLMAN (1961)

A avaliação quantitativa da atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi realizada de acordo com a metodologia de ELLMAN (1961).

Esse teste foi realizado em microplacas (**Esquema 18**) e a disposição das amostras foi igual à dos testes antimicrobianos (bioensaio realizado em quintuplicata). Utilizou-se como controle positivo uma solução de eserina (10 mg/mL) em tampão Tris/HCl (0,1 M) pH 8,0 e, como controle negativo, o solvente utilizado para solubilizar as amostras (clorofórmio).

A solução trabalho foi preparada solubilizando-se 10,0 mg da amostra teste em 1,0 mL de clorofórmio. A solução de DTNB (3,0 mM) foi preparada em tampão Tris/HCl (0,1 M) pH 8,0 contendo NaCl (0,1 M) e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20,0 mM).

Em cada poço foram aplicados:

- 25 µL da solução trabalho;
- 25 µL da solução aquosa de ACTI (15,0 mM);
- 125 µL da solução de DTNB (3,0 mM);
- 50 µL de Tris/HCl (50,0 mM) pH 8,0 com albumina sérica bovina 0,1% (p/v);

Posteriormente, efetuaram-se as leituras em leitora de Elisa no comprimento de onda fixo em 406 nm a cada 1 min. por 10 vezes (controle das amostras).

Após as leituras, foram aplicados em cada poço 25,0 µL da solução de AchE (0,222 U/mL) em tampão Tris/HCl (50,0 mM) pH 8,0 contendo albumina sérica bovina 0,1 % (p/v). Mediram-se novamente as absorbâncias a 406 nm a cada 1 min. por 10 vezes.

Os dados foram tratados utilizando-se os softwares *Microsoft Excel 2010* e *Origin 6.1*.

5- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram realizadas modificações estruturais dos ácidos caurenoico e grandiflorênico, através de reações químicas e reações de biotransformação, a fim de se testar a atividade antimicrobiana e anticolinesterásica dos derivados obtidos.

A partir de 3,0 kg de partes aéreas da *Sphagneticola trilobata* foram isolados 5,5 g da mistura dos ácidos caurenoico e grandiflorênico, na proporção de 2:1, respectivamente.

A lactona **28** foi obtida a partir da mistura dos ácidos caurânicos em duas etapas reacionais: primeiro através da reação de oxidação de *Lemieux-Johnson* da mistura dos ácidos caurênicos seguida da reação de oxidação de Baeyer-Villiger. A oxidação de Baeyer-Villiger foi regioseletiva, produzindo majoritariamente a lactona formada pela migração do carbono C-13, lactona **28**.

As biotransformações realizadas pelos fungos *Fusarium proliferatum* e *Penicillium mineoluteum*, utilizando como substrato a lactona **28**, necessitam ser melhor estudadas. Os possíveis biotransformados provenientes do **EBFp** não foram isolados devido a um alto grau de dificuldade encontrado no processo de purificação via CCS. A partir do **EBPm**, foi isolado o *ent*-caur-5α-15α-epoxi-9-10-friedo-10β-11β-dihidroxi-16,11α:19,10β-diseco-17-nor-16→11:19→10-dilactona (**Biot-1**). **Biot-1** pode ser obtido através da reação de lactonização da norcetona **26**. Essa norcetona poderia estar presente com a

norcetona **27**, na forma de impureza, antes da última ser submetida à reação de lactonização. A lactona **28**, portanto, poderia estar contaminada com pequenas quantidades de **Biot-1** antes de ser submetida às reações de biotransformação, de maneira que essa contaminação não foi detectada por CCDS e RMN de ^1H e ^{13}C . Existe, portanto, a possibilidade de **Biot-1** ser impureza da lactona **28** e não um produto de reação de biotransformação. No caso de **Biot-1** ser um produto de biotransformação, a reação forneceu um rendimento de 1,31 %.

Os compostos inéditos oxima **40** e a lactama **42** foram obtidos através da seguinte rota sintética: 1) Reação de esterificação da mistura de ácidos caurênicos para obtenção da mistura de ésteres etílicos caurênicos; 2) Reação de quebra oxidativa da ligação dupla exocíclica da mistura dos ésteres etílicos para obtenção dos respectivos ceto-ésteres; 3) Reação de adição nucleofílica ao grupo carbonila do ceto-éster **39** para obtenção da oxima **40** e 4) Rearranjo de Beckmann da oxima **40** para obtenção de lactama **42**.

A oxima **40** e a lactama **42** foram obtidas com 65 e 48 % de rendimento, respectivamente. Esses compostos, juntamente com os outros derivados dos ácidos caurênicos, foram testados quanto à atividade antibacteriana, antifúngica e anticolinesterásica.

A lactama **42** induziu alta porcentagem de inibição contra a levedura *Candida albicans* (93,5 %) e contra a bactéria *Bacillus cereus* (88,8 %). Essas porcentagens de inibição foram superiores em relação ao seu precursor ácido caurenoico (78,9 e 37,6 %, respectivamente). A lactama **42** e a oxima **40** destacaram-se também como substâncias com alta atividade anticolinesterásica, com porcentagens inibitórias equivalentes a 99,1 e 97,3 %, respectivamente. Essas substâncias tiveram comportamentos semelhantes ao controle positivo eserina, tendo em vista que na presença desses compostos, a atividade da enzima AchE permaneceu estabilizada e próximo de zero ao longo do intervalo de tempo testado.

A oxidação na posição C-17 do ácido caurenoico, através da reação de oxidação de *Lemieux-Johnson*, aumentou a porcentagem de inibição dos fungos filamentosos *C. cladosporioides* e *P. citrinum*. O ácido caurenoico promoveu porcentagens de inibição para esses fungos equivalentes a 10,3 e 0,0 %, respectivamente. As porcentagens de inibição da norcetona

27, proveniente da oxidação do ácido caurenoico, foram consideravelmente superiores e respectivamente iguais a 74,4 e 87,7 %.

Perspectivas para este trabalho:

- Acompanhar as reações de biotransformação fazendo-se periodicamente micro-extrações seguida da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para acompanhar a formação do produto com maior precisão;
- Os métodos de purificação das reações de biotransformação poderiam ser realizados via HPLC. Geralmente a polaridade do produto de biotransformação é muito semelhante ao do material de partida e as quantidades de produtos obtidos são consideravelmente pequenas. Portanto, necessita-se de um método de purificação mais sensível do que CCS;
- Os derivados dos ácidos caurenoico e grandiflorênico, obtidos via modificação estrutural, revelaram-se como compostos interessantes para ampliação do estudo de atividade biológica, o que abre perspectivas para estudos de toxicidade.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLA, G.; CABAÑES, F.J. Ochratoxin production by strains of *Aspergillus niger*. Applied and Environmental Microbiology, v. 60, p. 2650–2652, 1994.

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

ALVES, I.A.; CAMARGO, F.P.; GOULART, L.S. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida sp.* Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 43, n. 5, p. 575-579, 2010.

- ANASTASIA, M.; ALLEVI, P.; CIUFFREDA, P.; FIECCHI, A.; SCALA, A. Synthesis of (2R, 3R, 22R,23R) and (2R, 3S, 22S,23S)-2,3,22,23-Tetrahydroxy-B-homo-7^a-oxa-5 α -ergostan-7-ones, two new Brassinolide analogues. *Journal Organic Chemistry*, v. 50, n. 3, p. 321-325, 1985.
- BACCARIN, T.; CZEPULA, A.I.; FERREIRA, R.A.; LUCINDA-SILVA, R.M. Análise morfoanatômica das partes aéreas de *Wedelia paludosa* DC. (*Acmela brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata*), Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 2, p. 612-616, 2009.
- BARBOSA FILHO, J.M.; VASCONCELOS, T.H.C.; ALENCAR, A.A.; BATISTA, L.M.; OLIVEIRA, R.A.G.; GUEDES, D.N.; FALCÃO, H.S.; MOURA, M.D.; DINIZ, M.F.F.M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 4, p. 392-413, 2005.
- BARBOSA FILHO, J.M.; MEDEIROS, K.C.P.; DINIZ, M. F.F.M.; BATISTA, L. M.; ATHAY FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS JUNIOR, L.J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 2, p. 258-285, 2006.
- BARREIRO, E.J. Biodiversidade: fonte de descoberta para novos fármacos. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BATISTA, R.; BRAGA, F.C.; OLIVEIRA, A.B. Quantitative determination by HPLC of *ent*-kaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* D.C. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 2, p. 119-125, 2005.
- BATISTA, R.; GARCIA, P.A.; CASTRO, M.A.; CORRAL, J.M.M.; FELICIANO, A.S.; OLIVEIRA, A.B. New Oxidized *ent*-Kaurane and *ent*-Norkaurane Derivatives from Kaurenoic Acid. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 3, p. 622-627, 2007.

- BATISTA, R.; BRANDÃO, G.C.; BRAGA, F.C.; OLIVEIRA, A.B. Cytotoxicity of *Wedelia paludosa* D.C. extracts and constituents. *Revista brasileira de farmacognosia*, v. 19, n. 1A, p. 36-40, 2009.
- BATISTA, R.; GARCIA, P.A.; CASTRO, M.A.; CORRAL, J.M.M.; FELICIANO, A.S.; OLIVEIRA, A.B. *iso*-Kaurenoic acid from *Wedelia paludosa* D.C. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, v. 82, n. 4, p. 823-831, 2010.
- BEZERRA, J.L.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; CARVALHO, I.C.D.S.; PATRÍCIO, F.J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F.M.M.; REBELO, J.M.M.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 631-637, 2006.
- BOECK, P.; SÁ, M.M.; SOUZA, B.S.; CERCENÁ, R.; ESCALANTE, A.M.; ZACHINO, S.A., CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. A Simple Synthesis of Kaurenoic Esters and other Derivatives and Evaluation of their Antifungal Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, n. 6B, p. 1360-1366, 2005.
- BRAGUINI, L.W.; GOMES, M.A.B.; OLIVEIRA, B.H.; CARNIERI, E.G.S.; ROCHA, M.E.M.; OLIVEIRA M.B.M. Activity of isosteviol lactone on mitochondrial metabolism. *Toxicology Letters*, v. 143, n. 1, p. 83-92, 2003.
- BRESCIANI, L.F.V.; YUNES, R.A.; BÜRGER C.; OLIVEIRA, L.E.; BÓF, K.L.; CECHINEL FILHO, V. Seasonal Variation of Kaurenoic Acid, a Hypoglycemic Diterpene Present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (*Asteraceae*). *Zeitschrift fur Naturforschung CA Journal of Biosciences*, v. 59c, n. 3, p. 229-32, 2004.
- BRESOLIN, B.M.Z.; DALL'STELLA, J.K.; SILVA, S.E.F.; Pesquisa sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mãos de manipuladores de alimentos em Curitiba. *Estudos de biologia*, v. 27, n. 59, p. 27-32, 2005.

- BUCHANAN, G.O.; REESE, P.B. Biotransformation of diterpenes and diterpene derivatives by *Beauveria bassiana* ATCC 7159. *Phytochemistry*, v. 56, n. 2, p. 141-151, 2001.
- BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Natural Product Reports*, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.
- BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*, v. 22, n. 2, p. 162-195, 2005.
- CAO, G.; ZHOU, Z.; WANG, Y. Synthesis and bioactivity of rotenone oxime O-ether derivatives. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, v. 26, n. 3 p. 421-428, 2012.
- CARLI, R.B.G.; SIQUEIRA, M.L.K.; FREITAS, R.A.; SOUZA, M.M.; CECHINEL FILHO, V.; SILVA, R.M.L. Topical Anti-inflammatory Effect of Creams containing Kaurenoic Acid Isolated from *Wedelia paludosa* in Mice. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, n. 4, p. 594-598, 2009.
- CARVALHO, G.J.A. Estudo químico de *Lafoensia glyptocarpa* Koehne (*Lytraceae*) e *Wedelia paludosa* D.C. *Asteraceae*. 1994. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química)- Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1994.
- CARVALHO, G.J.A.; CARVALHO, M.G. Diterpenos, Triterpenos e Esteróides das flores da *Wedelia paludosa*. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 24-26, 2001.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

- CHAVAN, M. J.; WAKTE, P.S.; SHINDE, D.B. Analgesic and anti-inflammatory activities of 18-acetoxy-ent-kaur-16-ene from *Annona squamosa* L. bark. *Inflammopharmacol*, v. 19, n. 2, p. 11–115, 2011.
- CHEN, K.E.; SHI, Q.; FUJIOKA, T. “Anti-aids agents. 19-neotripterifordin, a novel anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii* – isolation and structural elucidation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 3, n. 10, p. 1345-48, 1995.
- COENH, E.; KOCH, L.; THU, K.M.; RAHAMIMA, Y.; ALUMA, Y.; ILAN, M.; YARDEN, O.; CARMELI, S. Novel terpenoids of the fungus *Aspergillus insuetus* isolated from the Mediterranean sponge *Psammocinia* sp. collected along the coast of Israel. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 22, p. 6587–6593, 2011.
- COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. Substâncias Carboniladas e seus Derivados. Porto Alegre: Bookman, 2003.
- COTA, B.B.; OLIVEIRA, D.M; SIQUEIRA, E.P.; SOUZA-FAGUNDES, E.M; PIMENTA, A.M.C.; SANTOS, D.M.; RABELLO, A.; ZANI, C.L. New cassane diterpenes from *Caesalpinia echinata*. *Fitoterapia*, v. 82, n. 7, p. 969–975, 2011.
- CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L.; KRUSH, A.; SILVA, M.G.V. Volatile constituents of two *Wedelia* species. *Journal of Essential Oil Research*, v. 5, n. 4, p. 439-441, 1993.
- CRUZ, C.D.; MARTINEZ, M.B.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Alimentos e Nutrição*, v. 19, n. 2, p. 195-206, 2008.

- DAFFRE, S.; MIRANDA, A.; MIRANDA, M.T.M.; BULET, P.; JUNIOR, P.I.S.; MACHADO, A.; FOGAÇA, A.C.; LORENZINI, D.M.; PEREIRA, L.S.; FÁZIO, M.A.; ESTEVES, E.; BURGIERMAN, M.R. Peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 23, p. 48-55, 2001.
- DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2ª ed., New York: John Wiley and Sons, 2002.
- DHOLWANI K.K.; SALUJA, A.K.; GUPTA, A.R.; SHAH, D.R. A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian Journal Pharmacology*, v. 40, n. 2, p. 49-50, 2008.
- DI GIOVANNI, S.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P. A.; REIST, M. *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 33, p. 109-119, 2008.
- ELLMAN, G.L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95, 1961.
- ENZ, A.; AMSTUTZ, R.; BODDEKE, H.; GMELIN, G.; MALONOWSKI, J. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research*, v. 98, p. 431-445, 1993.
- FRAGA, B.M., HERNÁNDEZ, M.G.; GONZALEZ, P.; LÓPEZ, M.; SUÁREZ, S. Biotransformation of the diterpene ribenone by *Mucor plumbeus*. *Tetrahedron*, v. 57, n. 4, p. 761-770, 2001.
- FRAGA, B.M., GONZALEZ, P.; HERNÁNDEZ, M.G.; SUÁREZ, S. The biotransformation of the diterpene 2 β -hydroxy-*ent*-13-*epi*-manoyl oxide by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, v. 62, n. 1, p. 67-70, 2003.

- FRAGA, B.M., GONZALEZ, P.; HERNÁNDEZ, M.G.; SUÁREZ, S. Biotransformation of 7-oxo-*ent*-kaur-16-ene derivatives by *Gibberella fujikuroi*. *Tetrahedron*, v. 61, n. 23, p. 5623-5632, 2005.
- FRAGA, B.M., BRESSA, C.; GONZALEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M.G.; SUÁREZ, S. The microbiological transformation of 7 α -hydroxy-*ent*-kaur-16-ene derivatives by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, v. 68, n. 11, p. 1557-1563, 2007.
- FRAGA, B.M., GONZALEZ, P.; HERNÁNDEZ, M.G.; CHAMY, M.C.; GARBARINO, J.A. Microbiological transformation of an *ent*-pimaradiene hydrocarbon by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry Letter*, v. 2, n. 4, p. 201-203, 2009.
- FRAGA, B.M.; ALFONSO, I.; GONZALES-VALLEJO, V.; GUILLERMO, R. Microbial transformation of two 15 α -hydroxy-*ent*-kaur-16-ene diterpenes by *Mucor plumbeus*. *Tetrahedron*, v. 66, n. 1, p. 227-234, 2010a.
- FRAGA, B.M., GONZALEZ, P.; GONZALEZ-VALLEJO V.; GUILLERMO, R.; DIAZ, L.N. Biotransformation of 7 α -hydroxy- and 7-oxo-*ent*-atis-16-ene derivatives by the fungus *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, v. 71, n. 11, p. 1313–1321, 2010b.
- FRAGA, B.M.; BRESSA, C.; GONZÁLEZ-VALLEJO, V.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R. Biotransformation of *ent*-kaur-16-ene and *ent*-trachylobane 7 β -acetoxo derivatives by the fungus *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi*). *Phytochemistry*, v. 81, p. 60–70, 2012.
- GARCÍA, A.A.; CARRIL, E.P.U. Metabolismo secundário de plantas. *Reduca (Biologia) Serie Fisiología Vegetal*, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.
- GARCIA, P.A.; OLIVEIRA, A.B.; BATISTA, R. Occurrence, Biological Activities and Synthesis of Kaurane Diterpenes and their Glycosides. *Molecules*, v. 12, n. 3, p. 455-483, 2007.

- GHISALBERTI, E.L. The biological activity of naturally occurring kaurene diterpenes. *Fitoterapia*, v. 68, n. 4, p. 303-325, 1997.
- GHOUMARI H.; BENAJIBA, M.H.; GARCÍA-GRANADOS, A.; FERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ, A.; RIVAS, F.; ARIAS, J.M. Biotransformations of *ent*-18-acetoxy-6-ketomanoyl oxides epimers at C-13 with filamentous fungi. *Phytochemistry*, v. 67, n. 20, p. 2294–2302, 2006.
- GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinica and Translational Oncology*, v. 9, n. 12, p. 767-776, 2007.
- GROTHAUS, P.G.; CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plant Natural Products in Anticancer Drug Discovery. *Current Organic Chemistry*, v. 14, n. 16, p. 1781-1791, 2010.
- GRUNDY, J.; JAMES, B.G.; PATTENDEN, G. Esterification of sterically hindered. *Tetrahedron Letters*, v. 13, n. 9, p. 757-758, 1972.
- GUILLOPÉ, R.; ESCOBAR-KHONDIKER, M.; LAPRÉVOTE, O.; HÖGLINGER, G.U.; CHAMPY, P. Kaurenoic Acid from Pulp of *Annona cherimolia* in regard to Annonaceae-induced Parkinsonism. *Phytotherapy Research*, v. 25, n. 12, p. 1861-1864, 2011.
- HANSON, J.R. *An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry*. New York: Oxford University Press, 1995.
- HATTORI, E.K.O.; NAKAJIMA, J.N. A família Asteraceae na estação de pesquisa e desenvolvimento ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*, v. 59, n. 4, p. 687-749, 2008.

- HIPÓLITO, U.V.; ROCHA, J.T.; PALAZZIN, N.B.; RODRIGUES, G.J.; CRESTANI, C.C.; CORRÊA, F.M.; BONAVENTURA, D.; AMBROSIO, S.R.; BENDHACK, L.M.; RESSEL, L.B.; TIRAPELLI, C.R. The semi-synthetic kaurane ent-16 α -methoxykauran-19-oic acid induces vascular relaxation and hypotension in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 660, n. 2-3, p. 402-410, 2011.
- HUESO-FALCÓN, I.; GIRÓN, N.; VELASCO, P.; AMARO-LUIS, J.M.; RAVELO, A.G.; HERAS, B.; HORTELANO, S.; ESTEVEZ-BRAUN, A. Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of ent-kaurane derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 4, p. 1724–1735, 2010.
- ISHII, S. e SADOWSKY, M.J. *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes Environ*, v. 23, n. 2, p. 101–108, 2008.
- JACYNO, J.; HARWOOD, J.; CUTLER, H.; LEE, M. Isocladosporin, a biologically active isomer of cladosporin from *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of Natural Products*, v. 56, p. 1397–1401, 1993.
- JIANG, L.; WANG, H.; MU, W.; JI, Z.; CAO, P. Synthesis and Fungicidal Activity of 2-Acetyl-6-(un)substituted-1*H*-benzimidazole Oxime-ethers, v. 29, n. 3, p. 539–543, 2011.
- JUNG, H.J.; JUNG, H.A.; KANG, S.S.; LEE, J.H.; CHO, Y.S.; MOON, K.H.; CHOI, J.S. Inhibitory Activity of *Aralia continentalis* Roots on Protein Tyrosine Phosphatase 1B and Rat Lens Aldose Reductase. *Archives of Pharmacal Research*, v. 35, n. 10, p. 1771-1777, 2012.
- KINGSTON, D.G.I. The Chemistry of Taxol. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 52, n. 1, p. 1-34, 1991.

- KIRBY, J.; KEASLING, J.D. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. Annual review of plant biology, v. 60, p. 335-355, 2009.
- KO, H.H.; CHANG, W.L.; LU, T.M. Antityrosinase and antioxidant effects of *ent*-kaurane diterpenes from leaves of *Broussonetia papyrifera*. Journal of Natural Products, v. 71, n. 11, p. 1930-1933, 2008.
- KOENH, F.E. e CARTER, G.T. The evolving role of natural products drug Discovery. Nature Reviews, v. 4, n. 1, p. 206-220, 2005.
- LA MATTINA, J.L. e SULESKE, R.T. α -amino acetals:2,2-diethoxy-2-(4-pyridyl)ethylamine. Organic Syntheses, v. 8, p. 149-152, 1990.
- LÓPEZ, S.N.; RAMALLO, I.A.; SIERRA, M.G.; ZACCHINO, S.A.; FURLAN, R.L.E. Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 104, n. 2, p. 441-444, 2006.
- LOZANO, E.; BARRERA, P.; SALINAS, R.; VEJA, I.; NIETO, M.; TONN, C.; KEMMERLING, U.; MORTARA, R.A.; SOSA, M.A. Sesquiterpene lactones and the diterpene 5-epi-icetexone affect the intracellular and extracellular stages of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology International, v. 61, n. 4, p. 628–633, 2012.
- LUCAS, E.M.F.; CASTRO M.C.M.; TAKAHASHI, J.A. Antimicrobial properties of sclerotiorin isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian Cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* van Beyma. Brazilian Journal of Microbiology, v. 38, n. 4, p. 785-789, 2007.

- MARCOS, I.S.; GONZALEZ, J.L.; SEXMERO, M.J.; DÍEZ, D.; BASABE, P.; WILLIAMS, D.J.; SIMMONDS, M.S.J.; URONES J.G. Diterpenic α - and β -hydroxybutanolides with antifeedant activity: semisynthesis and absolute configuration. *Tetrahedron Letters*, v. 41, n. 15, p. 2553–2557, 2000.
- MARQUINA S.; PARRA J.L.; GONZÁLEZ M.; ZAMILPA A.; ESCALANTE J.; TREJO-HERNÁNDEZ M.R.; ÁLVAREZ L. Hydroxylation of the diterpenes *ent*-kaur-16-en-19-oic and *ent*-beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *Aspergillus niger*. *Phytochemistry*, v. 70, n. 17, p. 2017–2022, 2009.
- MEOTTI, F.C.; ROSA, J.M.; BROCARD, P.S.; BALZ, D.; WALTRICK, A.P.; BAGIO, A.; GOULART, E.C.; DAFRE, A.L.; RODRIGUES, A.L.S.; SANTOS, A.R.S. Protective effect of crude extract from *Wedelia paludosa* (Asteraceae) on the hepatotoxicity induced by paracetamol in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 58, n. 1, p. 137-142, 2006.
- MERMIN, J.; HOAR, B.; ANGULO, F.J. Iguanas and *Salmonella* marina infection in children: a reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. *Pediatrics*, v. 99, n. 3, p. 399–402, 1997.
- MIAO, Y.; HE, N.; ZHU, J.J. History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition. *American Chemical Society*, v. 110, p. 5216–5234, 2010.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- NARAYANAN, K.; SHANMUGAM, M.; JOTHIVEL, S; KABILAN, S. Design, synthesis, spectral and biological evaluation of novel 1-allyl substituted 2,6-diphenylpiperidin-4-ones and its derivatives of oximes/oxime ether. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, n. 21, p. 6602–6607, 2012.

- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.
- NILSSON, J.; GIDLÖF, R.; JOHANSSON, M.; STERNER, O. Lactam analogues of galiellalactone. *Tetrahedron*, v. 68, n. 16, p. 3336–3341, 2012.
- NOLDIN, V.F.; ISAIAS, D.B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 549-554, 2006.
- NORBERG, A.N.; SERRA-FREIRE, N.M. Caracterização da dose letal mínima por irradiação gama para *Penicillium citrinum*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 35, n. 6, p. 527-533, 1993.
- PAPPO, R.; ALLEN, J.R.; LEMIEUX, R.U.; JOHNSOK, W.S. Osmium Tetroxide-Catalyzed Periodate Oxidation of Olefinic Bonds. *Journal Organic Chemistry*, v. 21, n. 4, p. 478-479, 1956.
- PARYZEK, Z. e KOENIG, H. Stereoelectronic and steric effect in the Baeyer–Villiger rearrangement of steroidal α -chlorocyclobutanones. *Tetrahedron*, v. 68, n. 44, p. 9061–9067, 2012.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. Introdução à Espectroscopia. 4ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

- PENA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M.C.; MUÑOZ, J.D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MATINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. Journal of Ethnopharmacology, v. 77, p. 37-40, 2001.
- PINHEIRO, T.R. Obtenção de Compostos com ação biológica através da síntese e modificação estrutural de produtos naturais. Estudo de correlação estrutura-atividade. 2004. 142 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Química Nova, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.
- POZIOMCZYK, C.S.; KÖCHE, B.; BECKER, F.L.; DORNELLES, S.I.T.; BONAMIGO, R.R. Tinea pseudoimbricata por *M. gypseum* associada à escabiose crostosa. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 85, n. 4, p. 558-559, 2010.
- ROCHA, A.D. Produção de metabólitos bioativos por biotransformações de diterpenos abundantes na natureza e avaliação do potencial destes na germinação e no crescimento de *L. sativa*. 2010. 269 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- ROCHA, A.D.; SANTOS, G.C.; FERNANDES, N.G.; PFENNING, L.H.; TAKAHASHI, J.A.; BOAVENTURA, M.A.D. Hydroxylation at Carbon-2 of *ent*-16-oxo-17-norkauran-19-oic Acid by *Fusarium proliferatum*. Journal of Natural Products, v. 73, n. 8, p. 1431-1433, 2010.

- RODILLA, J.M.L.; SILVA, M.L.A.; DÍEZ, D.; URONES, J.G.; SANZ, F. *ent*-Hydrohalimic acid transformations: synthesis of a diterpenic bislactone. *Tetrahedron*, v. 15, n. 11, p. 1793–1799, 2004.
- RODRIGUES, K.L.; GOMES, J.P.; CONCEIÇÃO, R.C.; BROD, C.S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas-RS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 3, p. 447-452. 2003.
- RUIZ, Y.; RODRIGUES, J.; ARVELO, F.; USUBILLAGA, A.; MONSALVE, M.; DIEZ, N; GALINDO-CASTRO, I. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of *ent*-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzei*. *Phytochemistry*, v. 69, n. 2, p. 432-438, 2008.
- SARTORI, M.R.K.; PRETTO, J.B.; CRUZ, A.B.; BRESCIANI, L.F.V.; YUNES, R.A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.A.; CECHINEL FILHO, V. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Pharmazie*, v. 58, n. 8, p. 567-569, 2003.
- SARTORI, M.R.K. Atividade Antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia Paludosa*) (Asteraceae). 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.
- SCHNEIDER, L.J. Treatment of Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitors. *Clinical Geriatric Medicine*, v. 17, p. 337-339, 2001.
- SEIDL, C. Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da acetilcolinesterase. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

- SHAFIKOV, R.V.; URAZAEVA, Y.R.; AFON'KINA S.R.; SAVCHENKO, R.G.; KHALILOV, L.M.; ODINOKOV, V.N. 20-Hydroxyecdysone Oximes and Their Rearrangement into Lactams. Russian Journal of Organic Chemistry, v. 45, n. 10, p. 1456-1463, 2009.
- SILVA, C.J.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; MONTANARI, R.M.; FRANCINO, D.; MEIRA, R.M.S.A.; SOUZA, A.O. Chemical composition and histochemistry of *Sphagneticola trilobata* essential oil. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 22, n. 3, p. 482-489, 2012.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Spectrometric identification of organic compounds. 7^a ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5^a ed. Porto Alegre: UFSC, 2004.
- SINGH, S.B.; LI, X.; CHEN, T. Biotransformation of antifungal ilicicolin H. Tetrahedron Letters, v. 52, n. 46, p. 6190–6191, 2011.
- SOUZA, G.G. Isolamento de fungos da própolis, síntese e biotransformação de clovanos com fungos e avaliação da atividade biológica. 2012. 314 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- SOUZA, G.G.; OLIVEIRA, T.S.; TAKAHASHI, J.A.; COLLADO, I. G.; MACÍAS-SÁNCHEZ, A.J.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. Biotransformation of clovane derivatives. Whole cell fungi mediated domino synthesis of rumphellclovane A. Organic & Biomolecular Chemistry, v. 10, n. 16, p. 3315-3320, 2012.

- STEFANELLO, M.E.A.; SALVADOR, M.J.; ITO, I. Y.; MACARI, P.A.T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp. floccosa. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, n. 4, p. 525-530, 2006.
- SÜLSEN, V.P.; FRANK, F.M.; CAZORLA, S.I.; ANESINI, C.A.; MALCHIODI, E.L.; FREIXA, B.; VILA, R.; MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Trypanocidal and Leishmanicida Activities of Sesquiterpene Lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 52, n. 7, p. 2415–2419, 2008.
- TAKAHASHI, J.A.; VIEIRA, H.S.; BOAVENTURA, M.A.D.; HANSON, J.R.; HITCHCOCK, P.B.; OLIVEIRA, A.B. Mono and Diterpenes from seeds of *Xylopia sericea*. Química Nova, v. 24, n. 5, p. 616-618, 2001.
- TAKAHASHI, J.A.; VIEIRA, H.S.; SILVA, E.A.; BOAVENTURA, M.A.D.; OLIVEIRA, A.B.; CHIARI, E. Preparation and activity of diterpenoids against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 12, p. 118-120, 2002.
- TANG, C.; ZHANG, W.; WANG, X.; WANG, B.; ZHU, X.; HUANG, D.; DU, X.; QIAN, H.; HUANG W.; LI, J. Synthesis and Biological Evaluation of Andrographolide Derivatives as Potent Antibacterial Agents. Letters in Drug Design & Discovery, v. 8, n. 9, p. 816-821, 2011.
- TOTTÉ, N.; CHARON, L.; ROHMER, M.; COMPERNOLLE, F.; BABOEUF, I.; GEUNS, J.M.C. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an *ent*-kauren derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. Tetrahedron Letters, v. 41, p. 6407-6410, 2000.
- VA, P.; CAMPBELL, E.L.; ROBERTSON, W.M.; BOGER, D.L. Total synthesis and evaluation of a key series of C5-substituted vinblastine derivatives. American Chemical Society, v. 132, n. 24, p. 8489-8495, 2010.

- VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.
- VIEGAS JUNIOR, C.; NICASTRO, P.C.; FOSSALUZZA, P.C.; GOMES, C.P.; SANTOS, L.A.; BOLZANI, V.S.; PIVATTO, M.; SILVA, D.J.C.; MELO, G.M.A.; SILVA, Y.K.C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; COSTA, R.S.; AREAS, T.F.M.; CASTRO, N.G. Modificações estruturais na (-)-cassina e LASSBio-767: estratégias para a descoberta e otimização de novos candidatos a fármacos. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 2, p. 117-127, 2009.
- VIEIRA, H.S. Transformações químicas de diterpenos com atividade biológica. 2000. 331 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- VIEIRA, H.S.; TAKAHASHI, J.A.; OLIVEIRA, A.B.; CHIARI, E.; BOAVENTURA, M.A.D. Novel Derivatives of Kaurenoic Acid: Preparation and Evaluation of their Trypanocidal Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 13, n. 2, p. 151-157, 2002a.
- VIEIRA, H.S.; TAKAHASHI, J.A.; BOAVENTURA, M.A.D. Novel Derivatives of *ent*-17,19-Dihydroxy-16 β -H-kaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 13, p. 3704–3707, 2002b.
- VIEIRA, H.S.; TAKAHASHI, J.A.; GUNATILAKA, A.A.L.; BOAVENTURA, M.A.D. ^1H and ^{13}C NMR signal assignments of a novel Baeyer–Villiger originated diterpene lactone. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 44, n. 2, p. 146-150, 2006.

- WHALEN, J.G.; MULLY, T.W.; ENGLISH, J.C. Spontaneous *Citrobacter freundii* infection in an immunocompetent patient. Archives of dermatology, v. 143, n. 1, p. 124-125, 2007.
- WU, Y. C.; HUNG, Y.C.; CHANG, F.R.; COSENTINO, M.; WANG, H.K.; LEE, K.H. Identification of ent-16 β ,17-dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids annasquamosins A and B from *Annoma squamosa*. Journal of Natural Products, v. 59, n. 6, p. 635-637, 1996.
- XU, H.J.; ZHU, F.F.; SHEN, Y.Y.; WAN, X.; FENG, Y.S. Baeyer–Villiger Oxidation of Cyclobutanones with 10-Methylacridinium as an Efficient Organocatalyst. Tetrahedron, v. 68, n. 22, p. 4145–4151, 2012.
- XU, Y.; SHENG, C.; WANG, W.; CHE, X.; CAO, Y.; DONG, G.; WANG, S.; JI, H.; MIAO, Z.; YAO, J.; ZHANG, W. Structure-based rational design, synthesis and antifungal activity of oxime-containing azole derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 20, n. 9, p. 2942–2945, 2010.
- ZHANG, J.Y.; WU, F.H.; QU, W.; LIANG, J.Y. Two new cassane diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia sappan* Linn. Chinese Journal of Natural Medicines, v. 10, n. 3, p. 218-221, 2012.
- ZHI, N.; WEI, X.; XUE-MEI, N.; SHUANG-XI, M.; ZHONG-WEN, L.; CHAO-MING, L.; HAN-DONG, S. Diterpenoids from *Isodon enanderianus*. Phytochemistry, v. 60, n.1, p. 55-60, 2002.

7. ANEXOS- Espectros

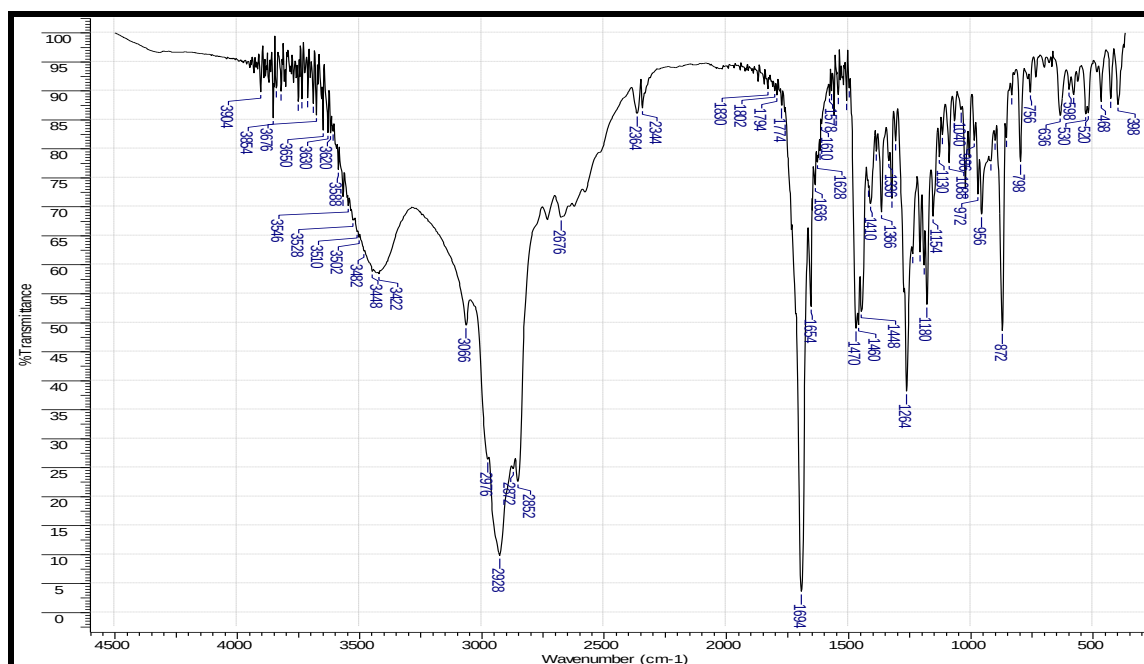


Figura 23: Espectro na região do IV (KBr) da mistura dos ácidos caurenoico (1) e grandiflorênico (2).

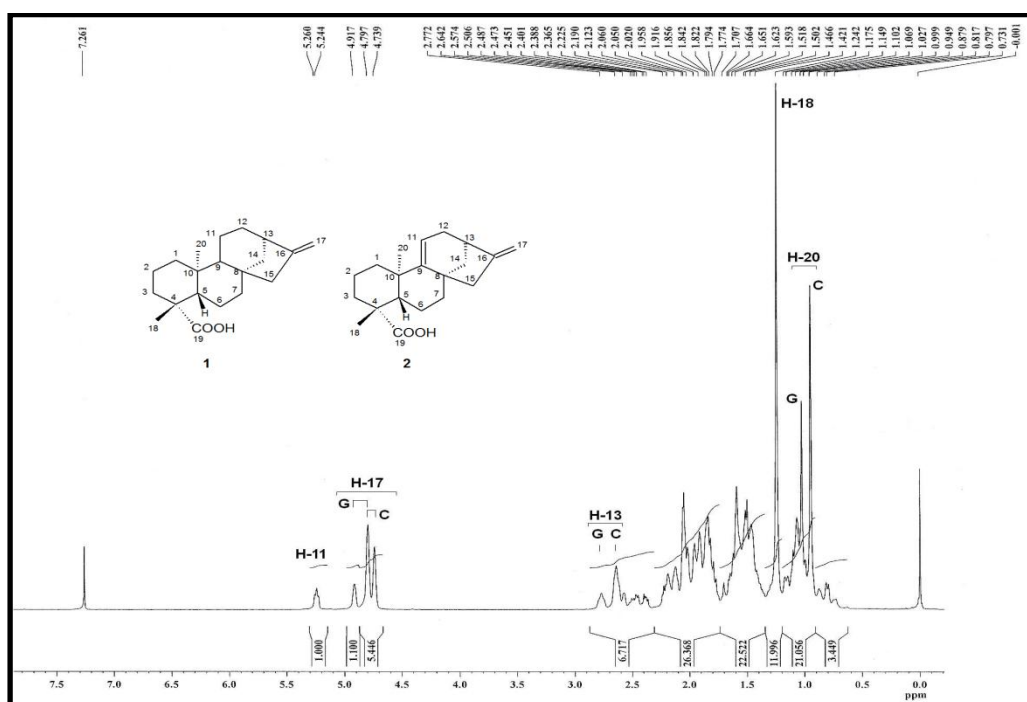


Figura 24: Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃). Em destaque alguns sinais de hidrogênio que caracterizam os ácidos caurenoico (C) e grandiflorênico (G).

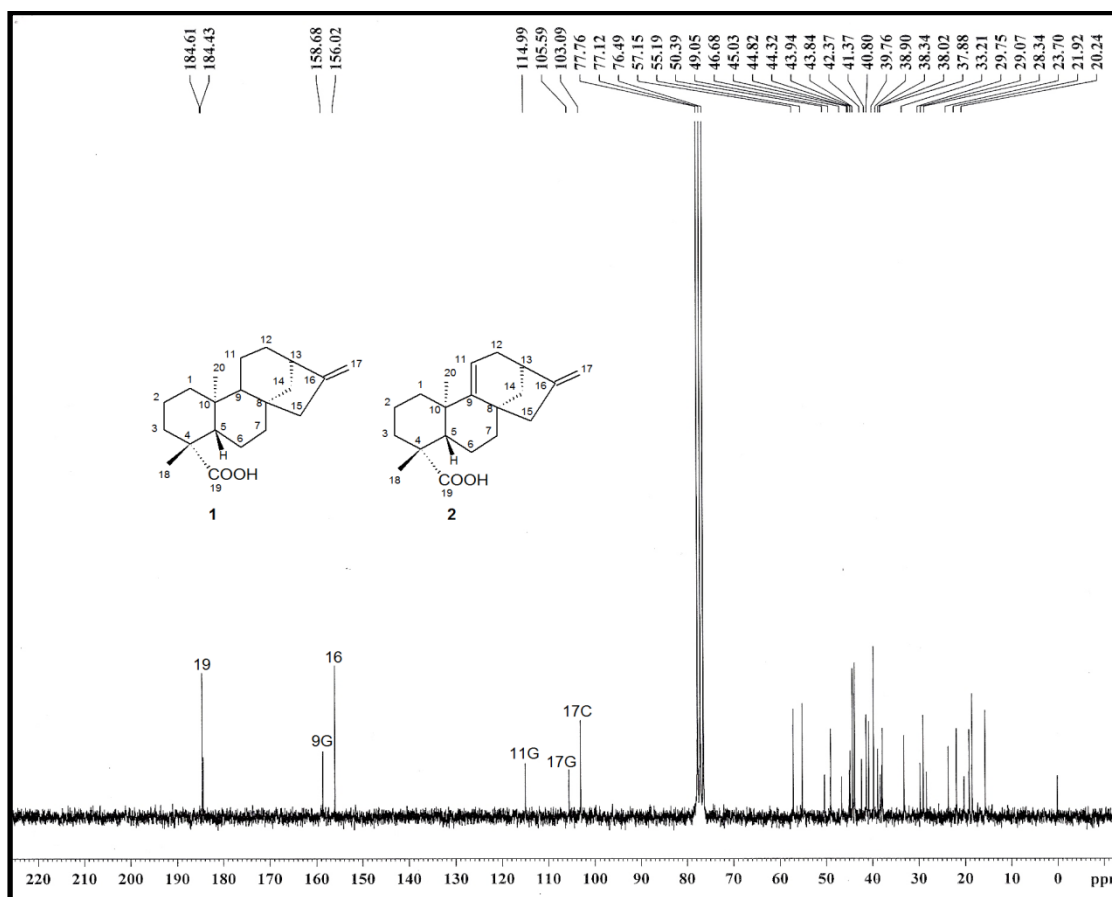


Figura 25: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da mistura dos ácidos caurênicos **1** (C) e **2** (G). Em destaque alguns sinais de carbono que caracterizam os ácidos caurenico (C) e grandiflorênico (G).

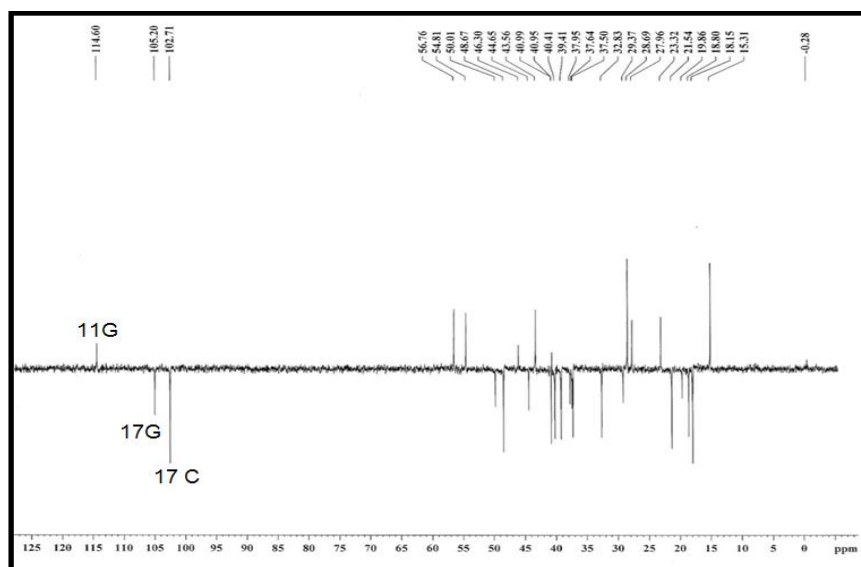


Figura 26: Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3) da mistura dos ácidos caurênicos **1** (C) e **2** (G).

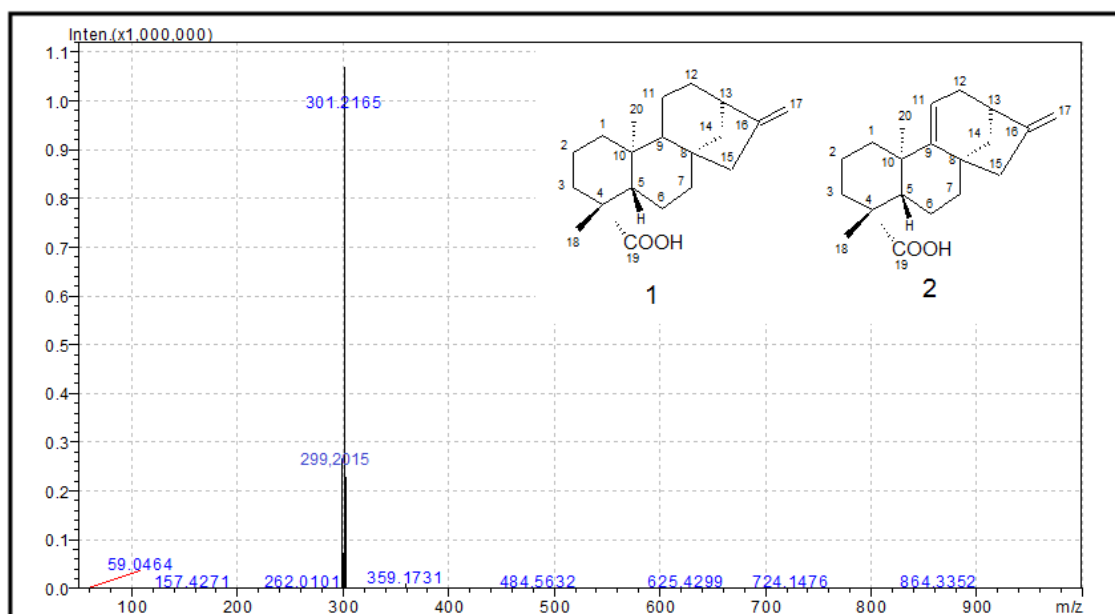


Figura 27: Espectro de massas com ionização por *electrospray* da mistura dos ácidos caurânicos **1** e **2**.

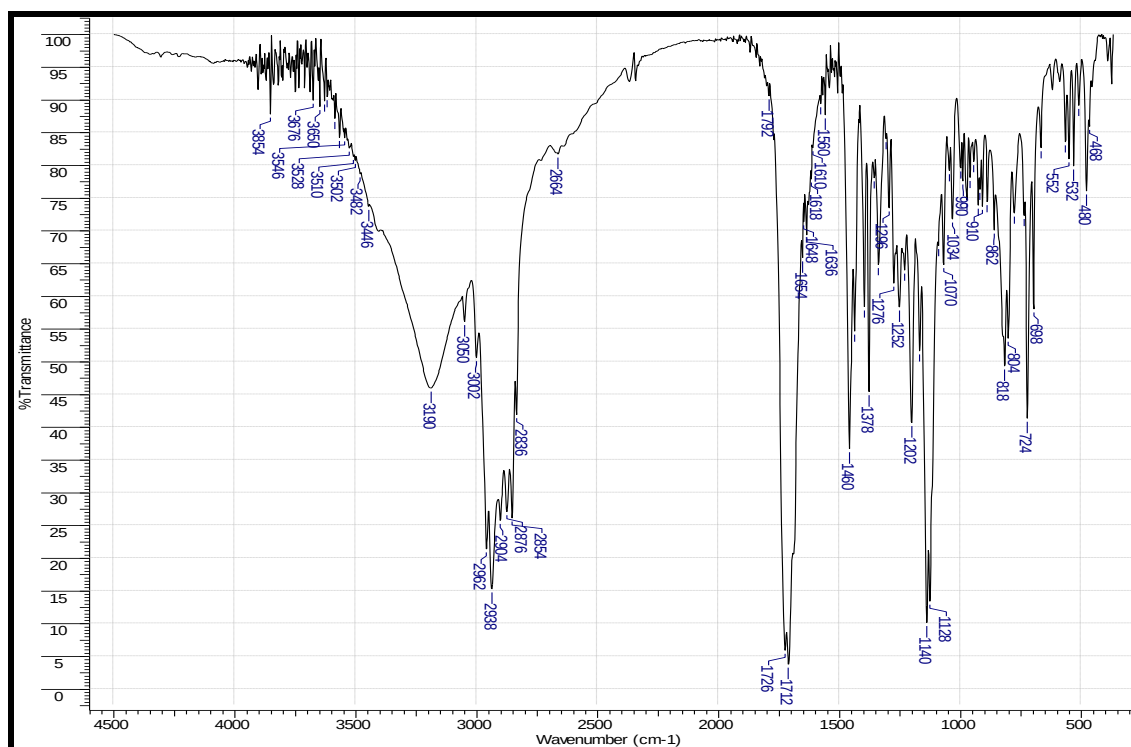


Figura 28: Espectro na região do IV (KBr) do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (**26**).

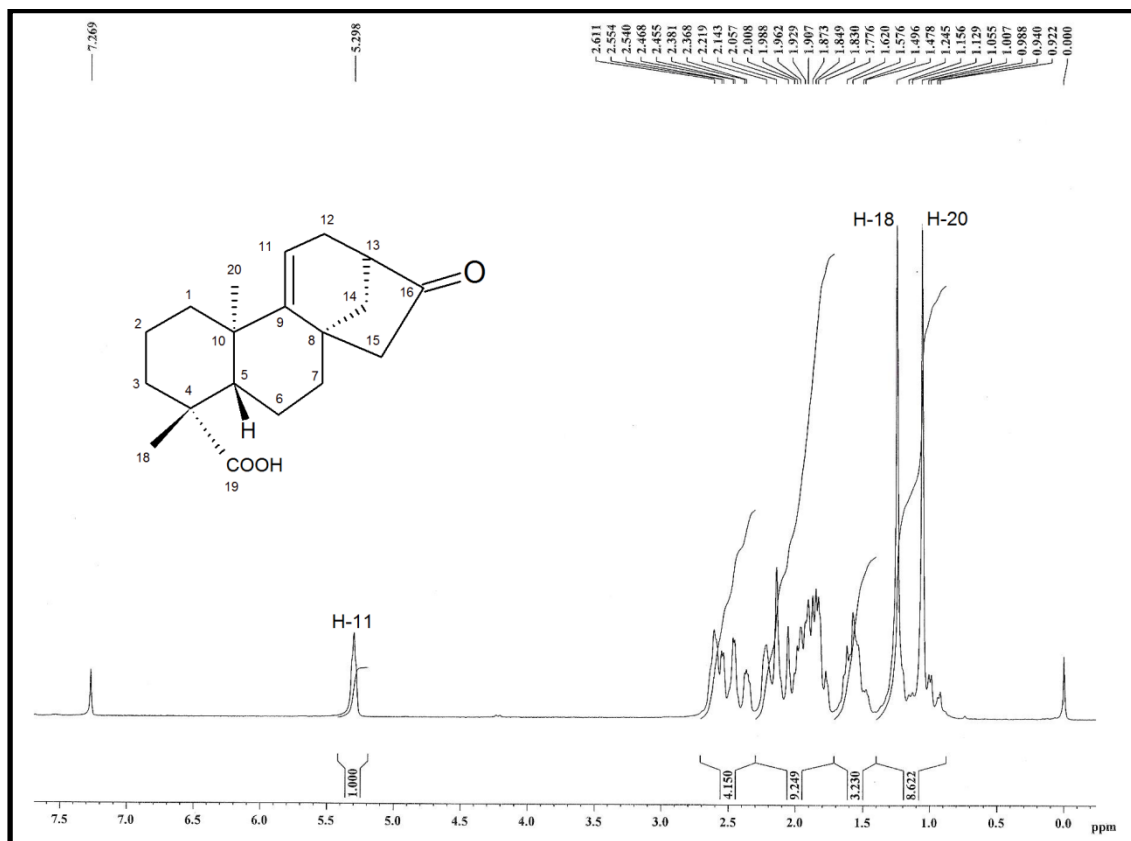


Figura 29: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (**26**).

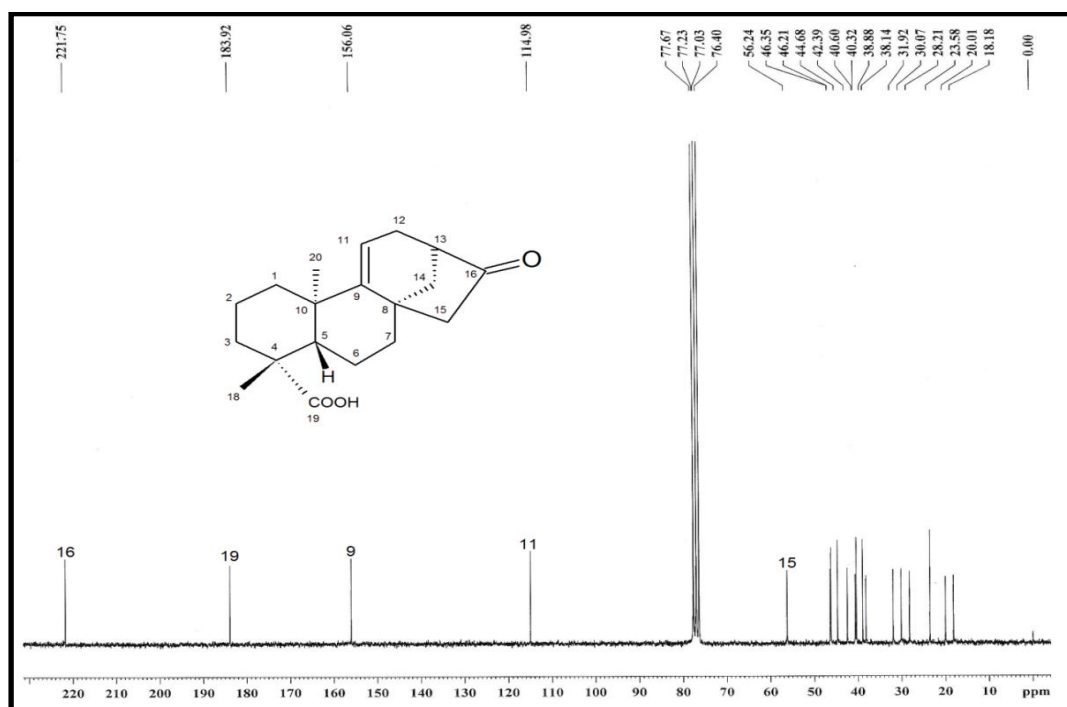


Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (**26**).

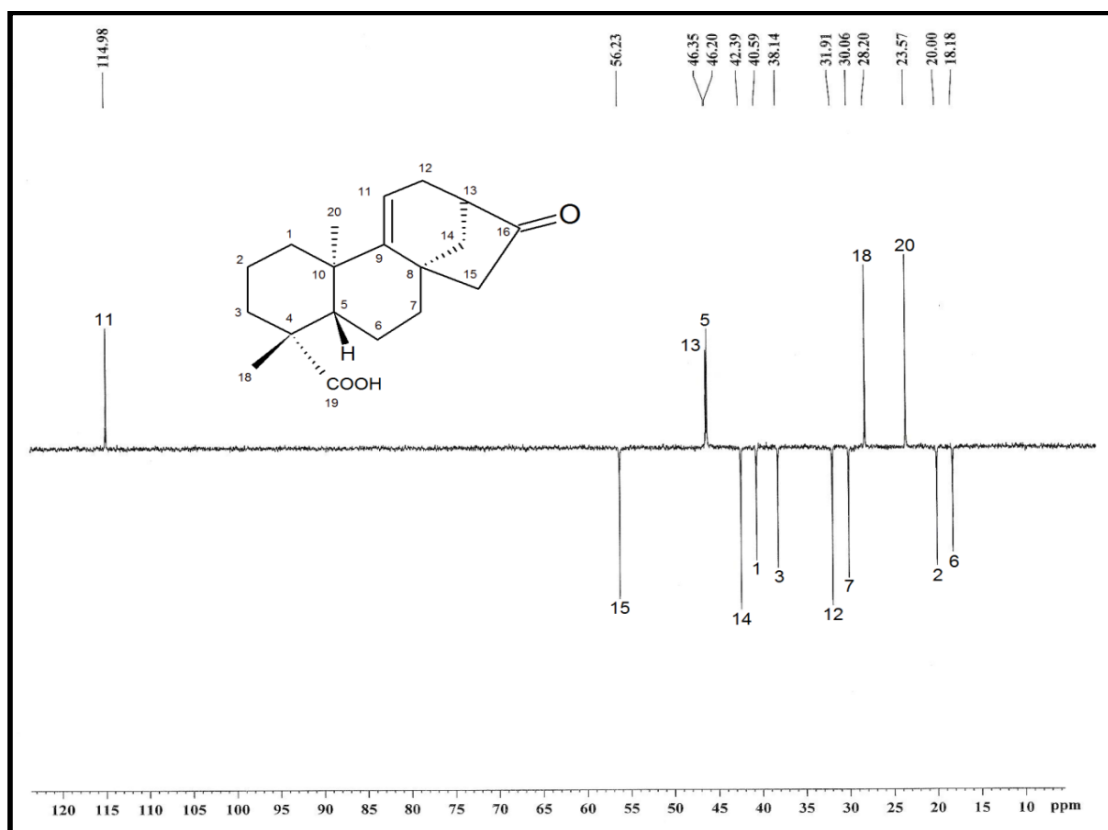


Figura 31: Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3) do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (26).

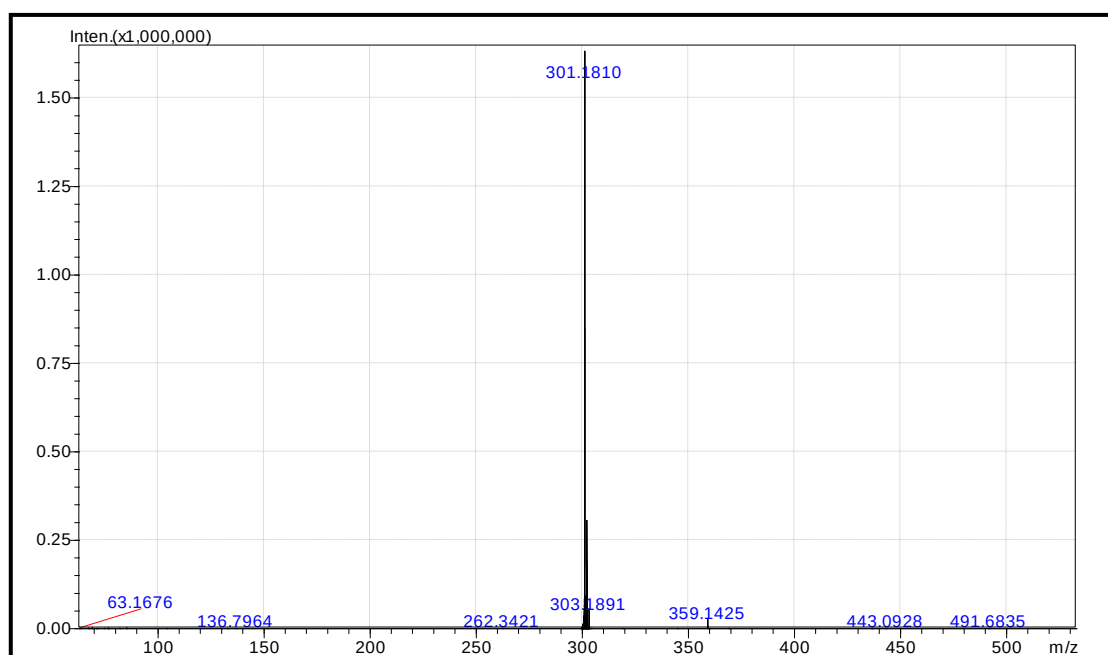


Figura 32: Espectro de massas com ionização por *electrospray* do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-caur-9(11)-en-19-oico (26).

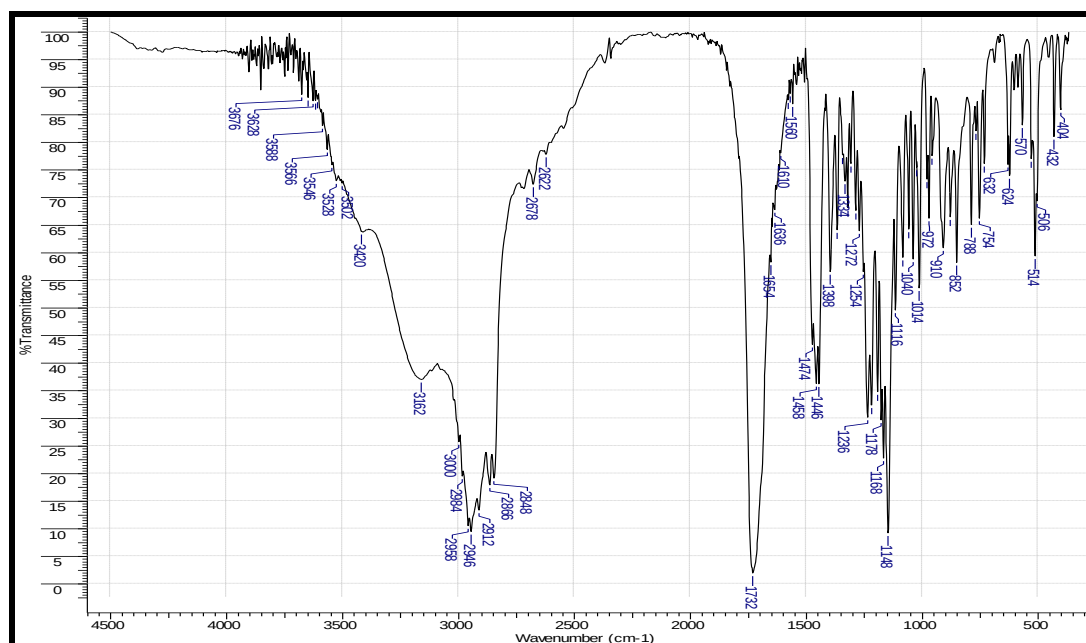


Figura 33: Espectro na região do IV (KBr) do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27).

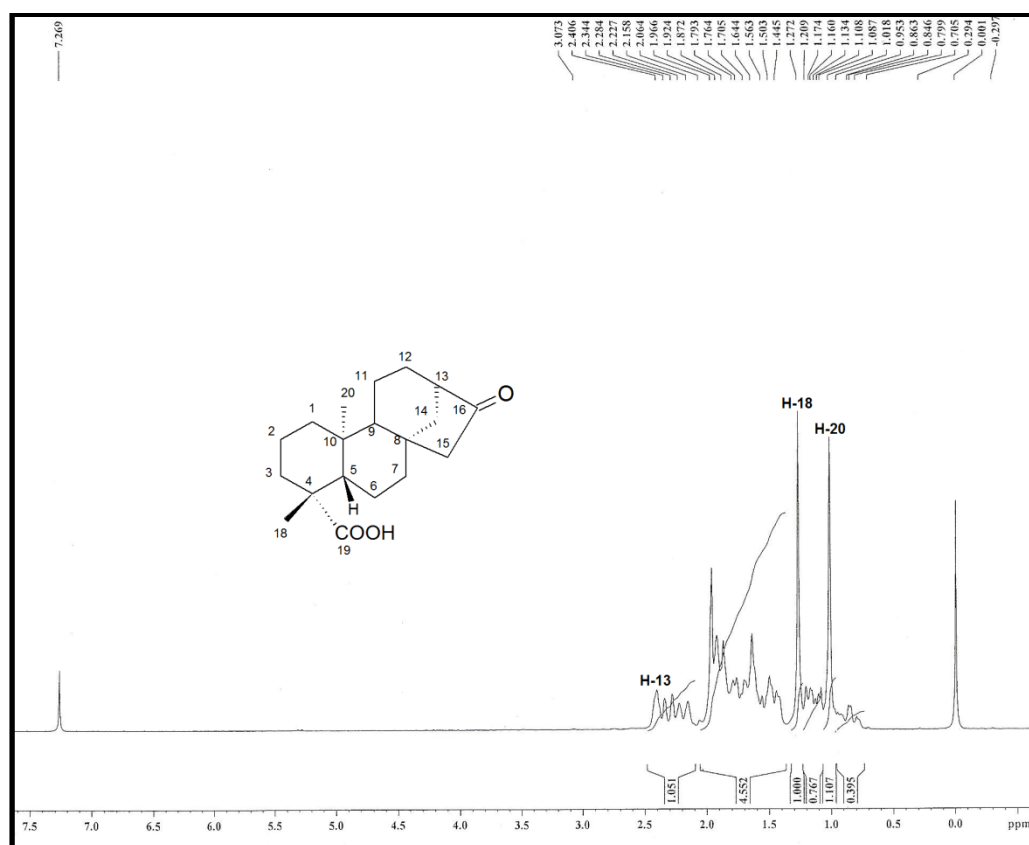


Figura 34: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27).

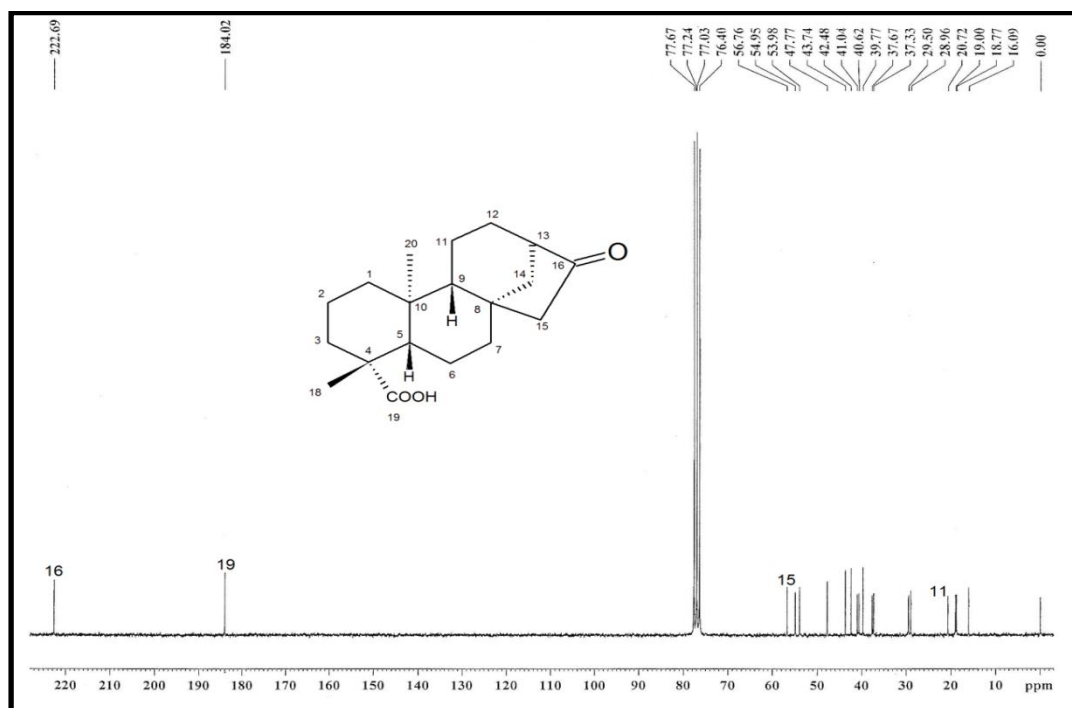


Figura 35: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (**27**).

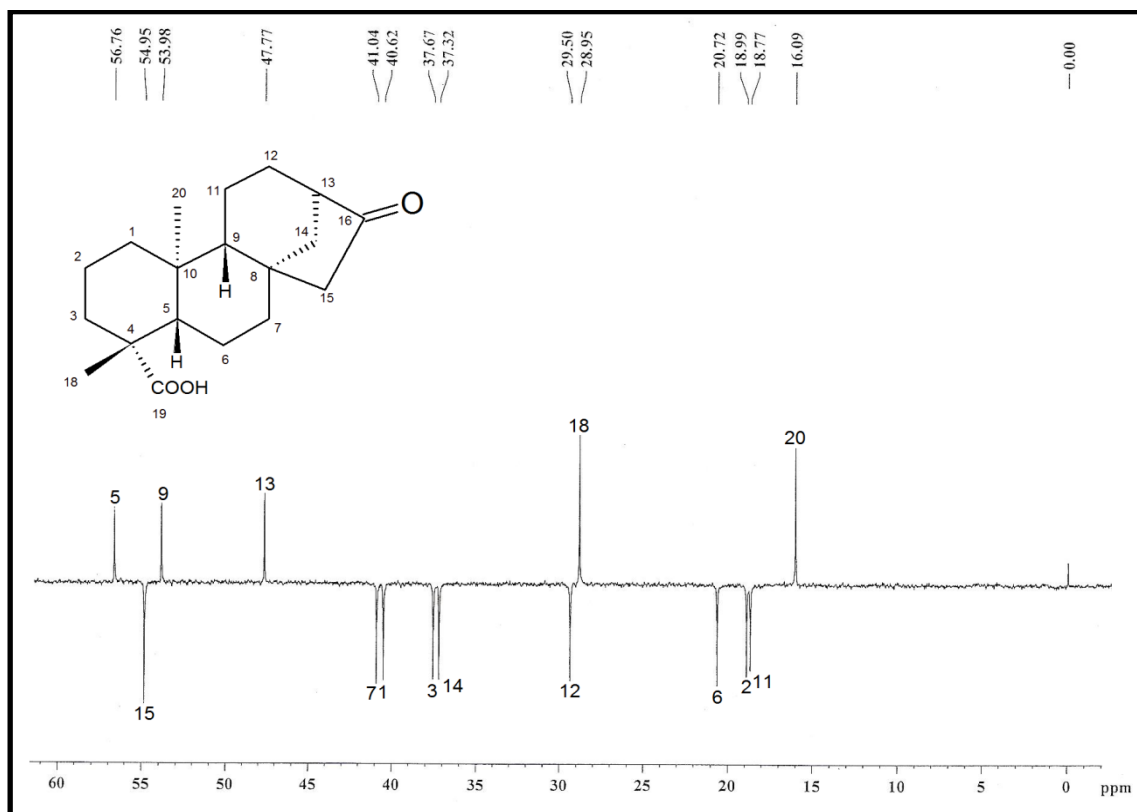


Figura 36: Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3) do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (**27**).

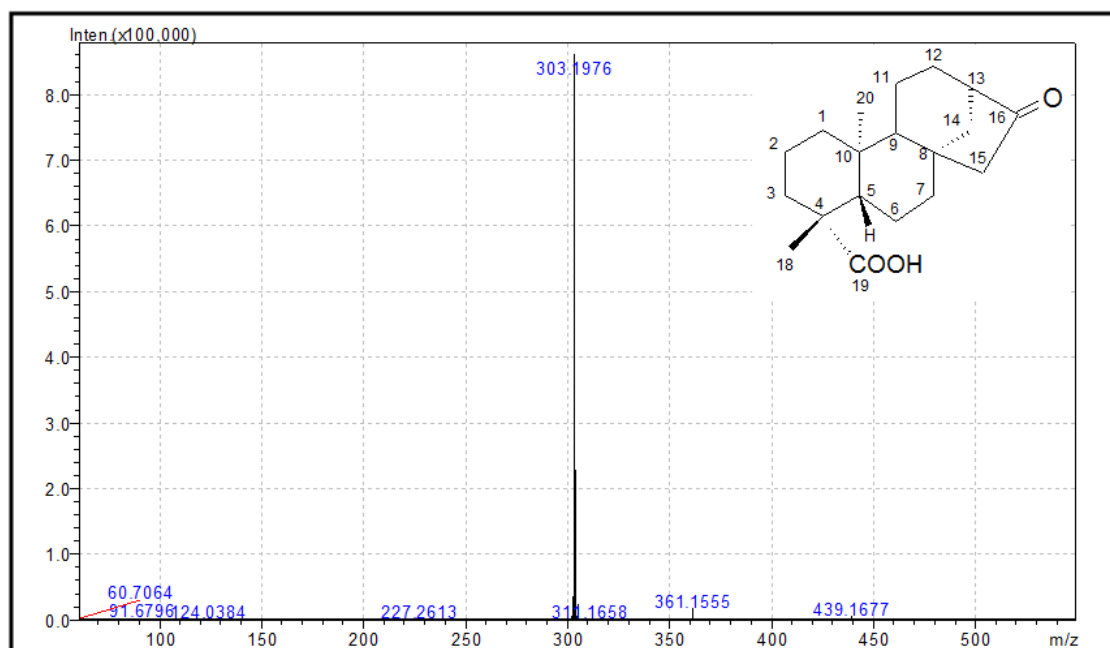


Figura 37: Espectro de massas com ionização por *electrospray* do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oico (27).

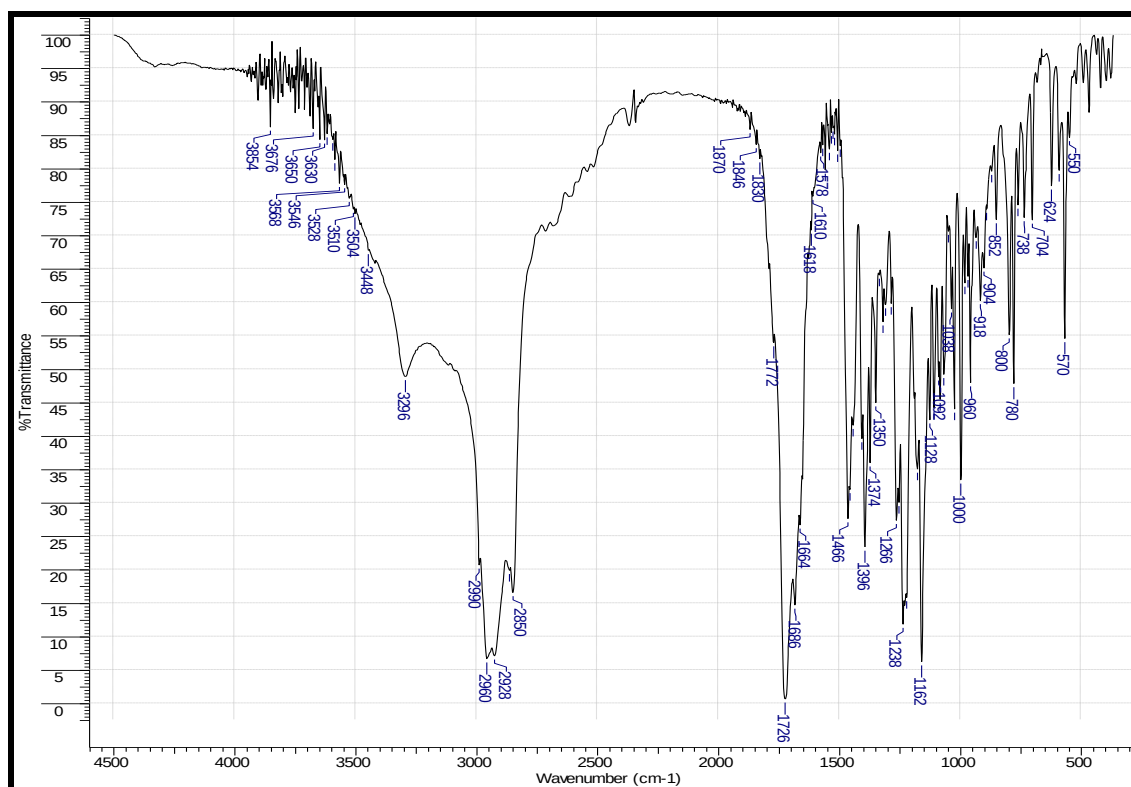


Figura 38: Espectro na região do IV (KBr) do ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (28).

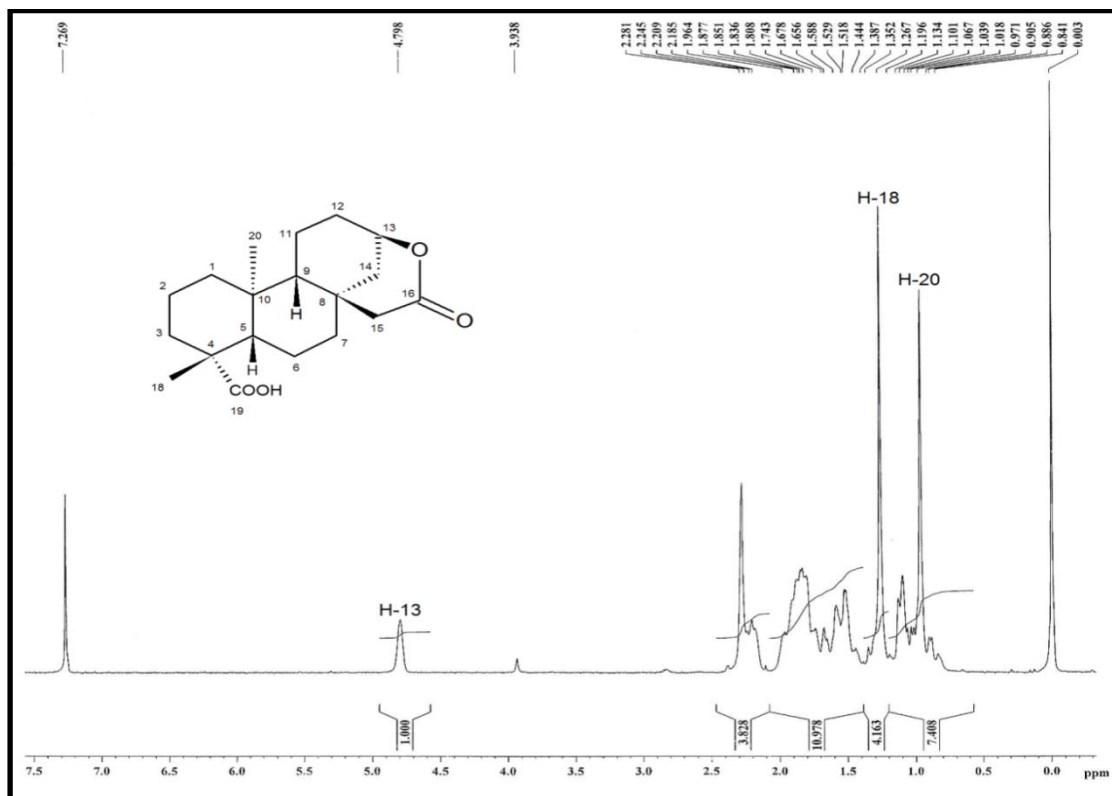


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (**28**).

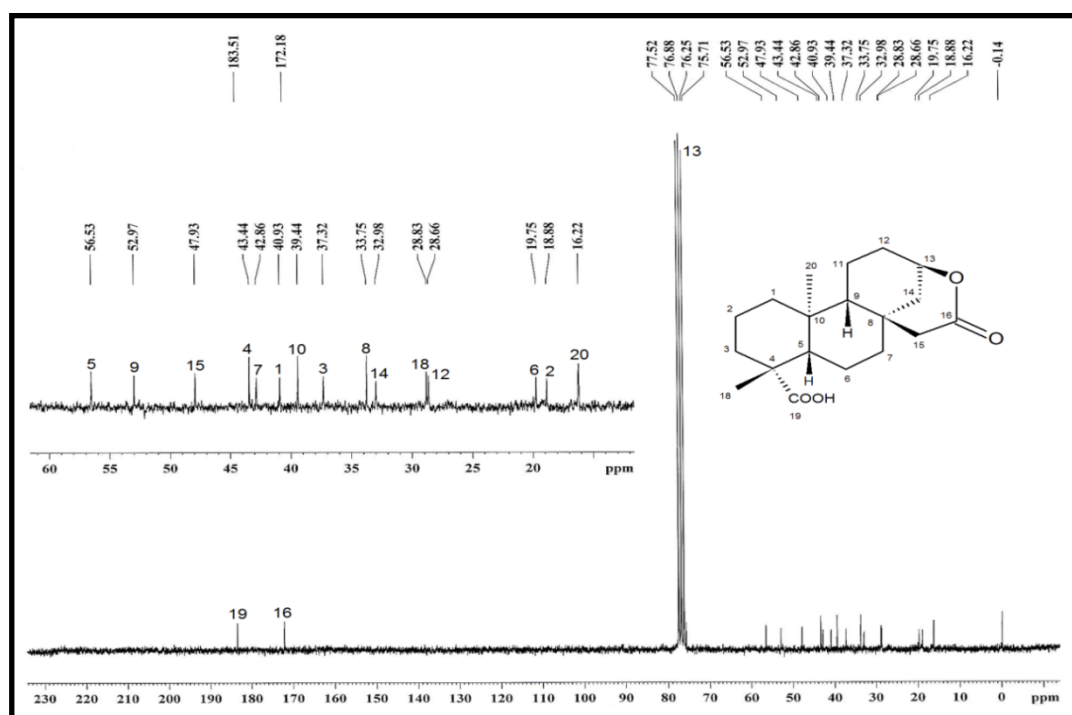


Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (**28**).

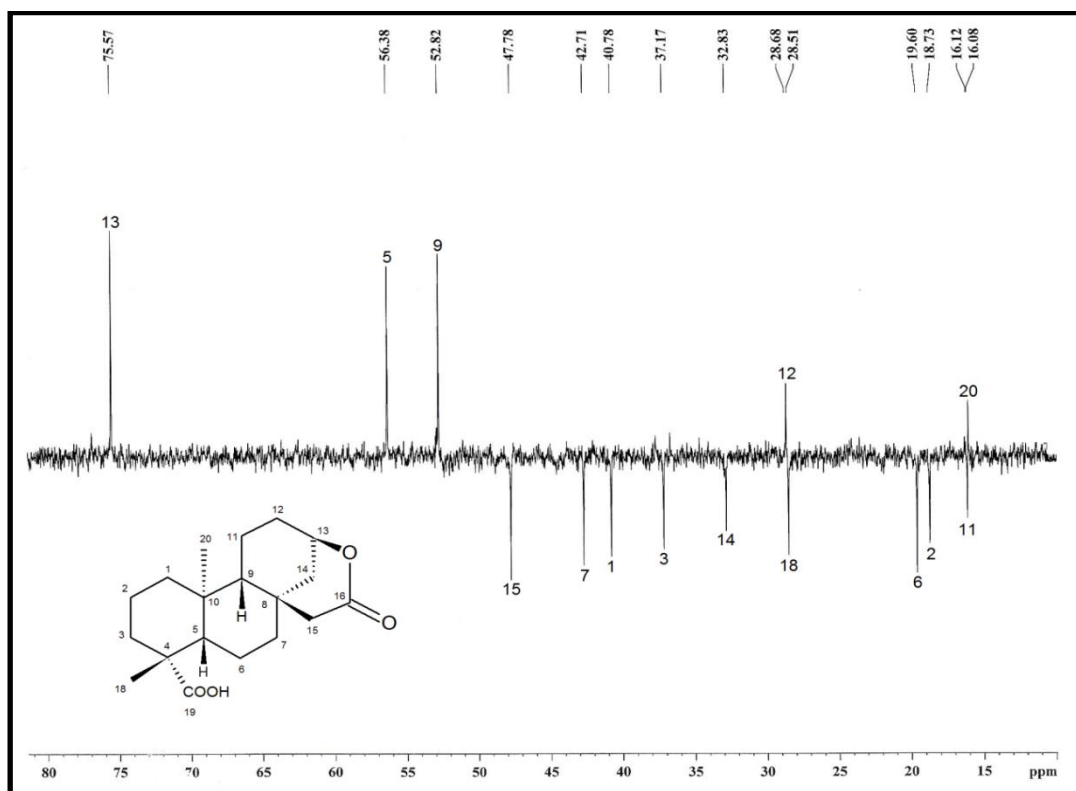


Figura 41: Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3) do ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (**28**).

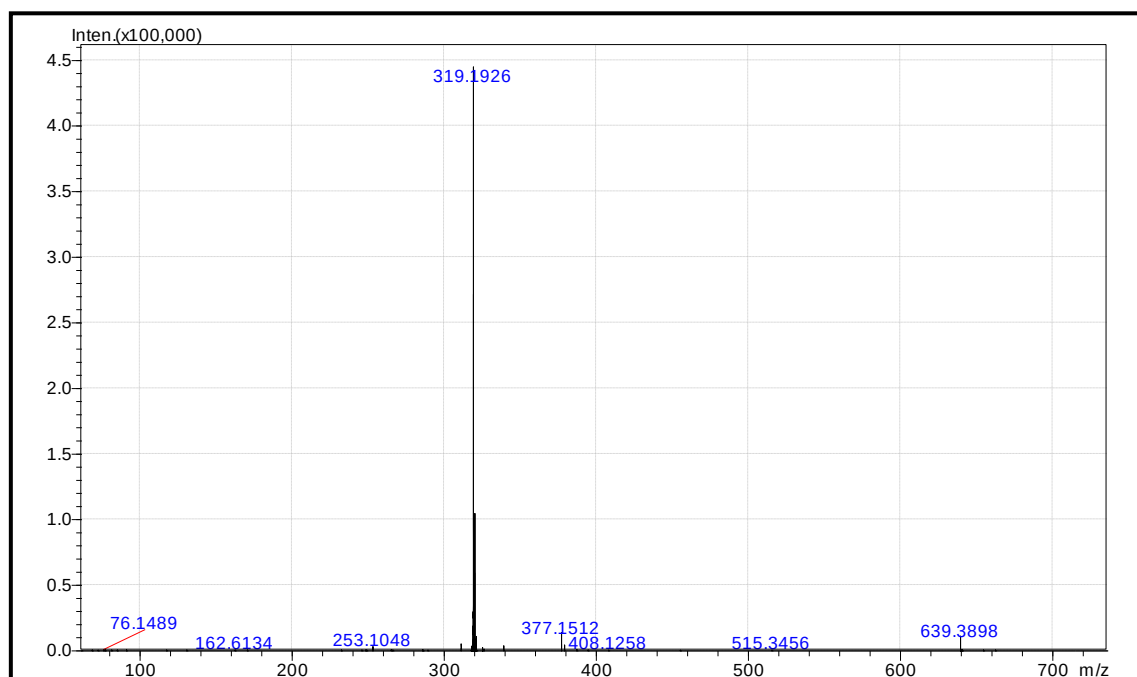


Figura 42: Espectro de massas com ionização por *electrospray* do ácido *ent*-13 α -hidroxi-17-nor-13,16-seco-cauran-19-oico-16 $\rightarrow$ 13-lactona (**28**).

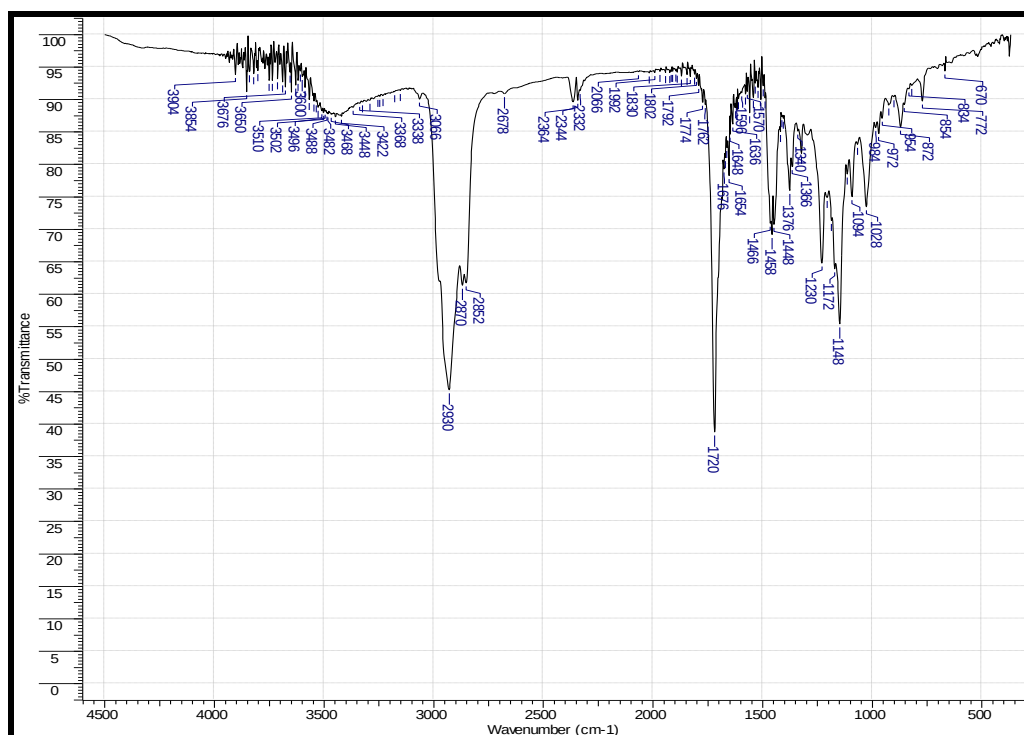


Figura 43: Espectro na região do IV (KBr) da mistura dos ésteres caurânicos **37** e **38**.

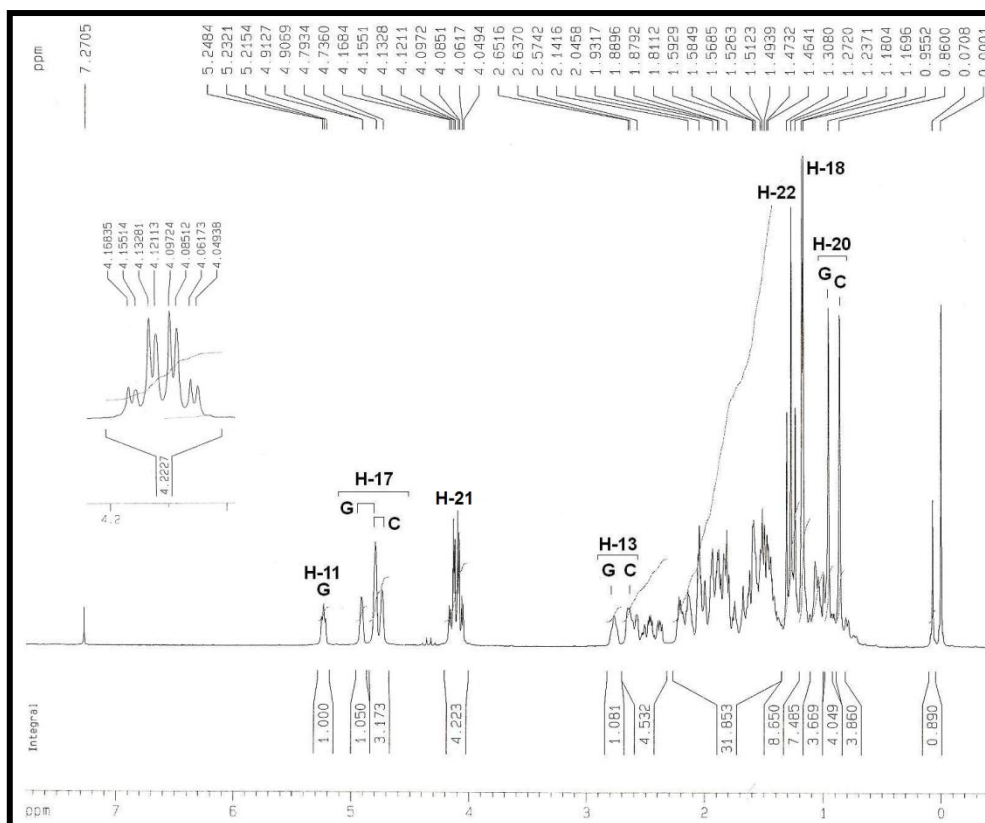


Figura 44: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da misturas dos ésteres etílicos **37** (derivado do ácido caurenoico **C**) e **38** (derivado do ácido grandiflorênico **G**).

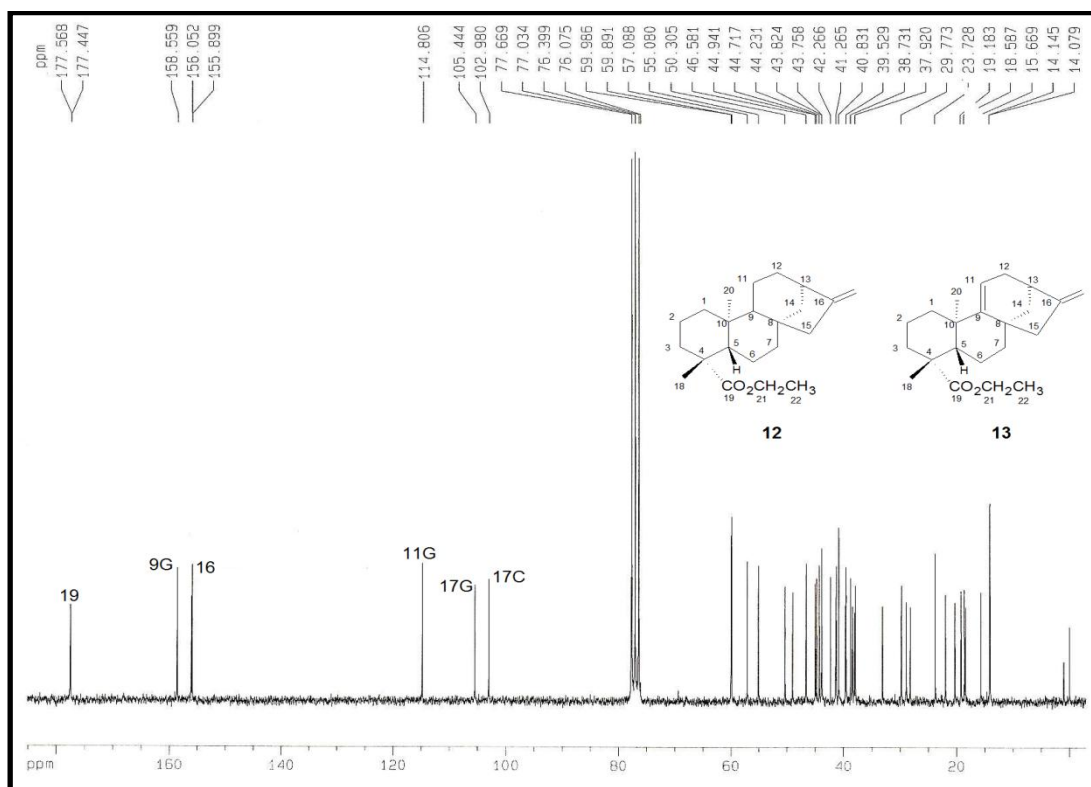


Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) da mistura dos ésteres etílicos **37** (derivado do ácido caurenico **C**) e **38** (derivado do ácido grandiflorênico **G**).

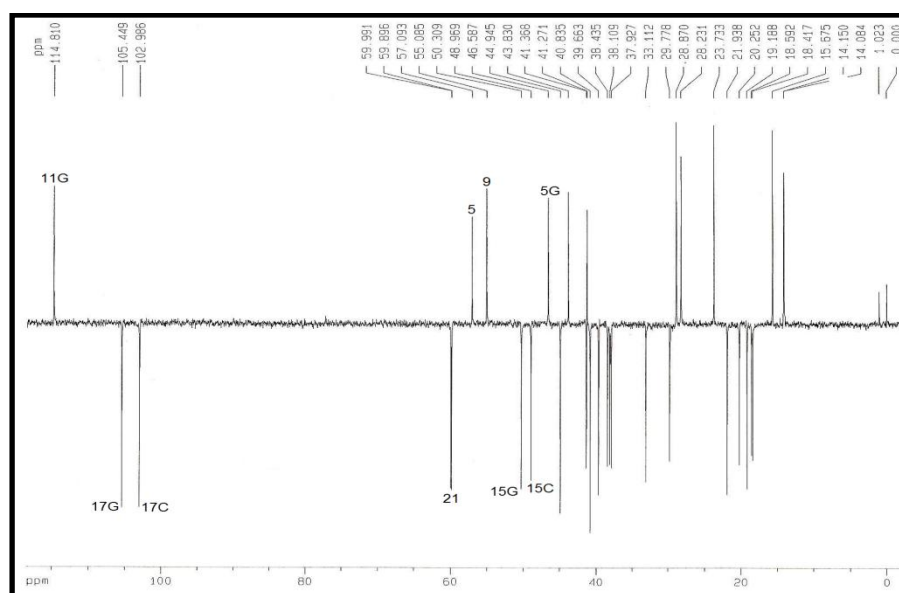


Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da mistura dos ésteres etílicos **37** (derivado do ácido caurenico **C**) e **38** (derivado do ácido grandiflorênico **G**).

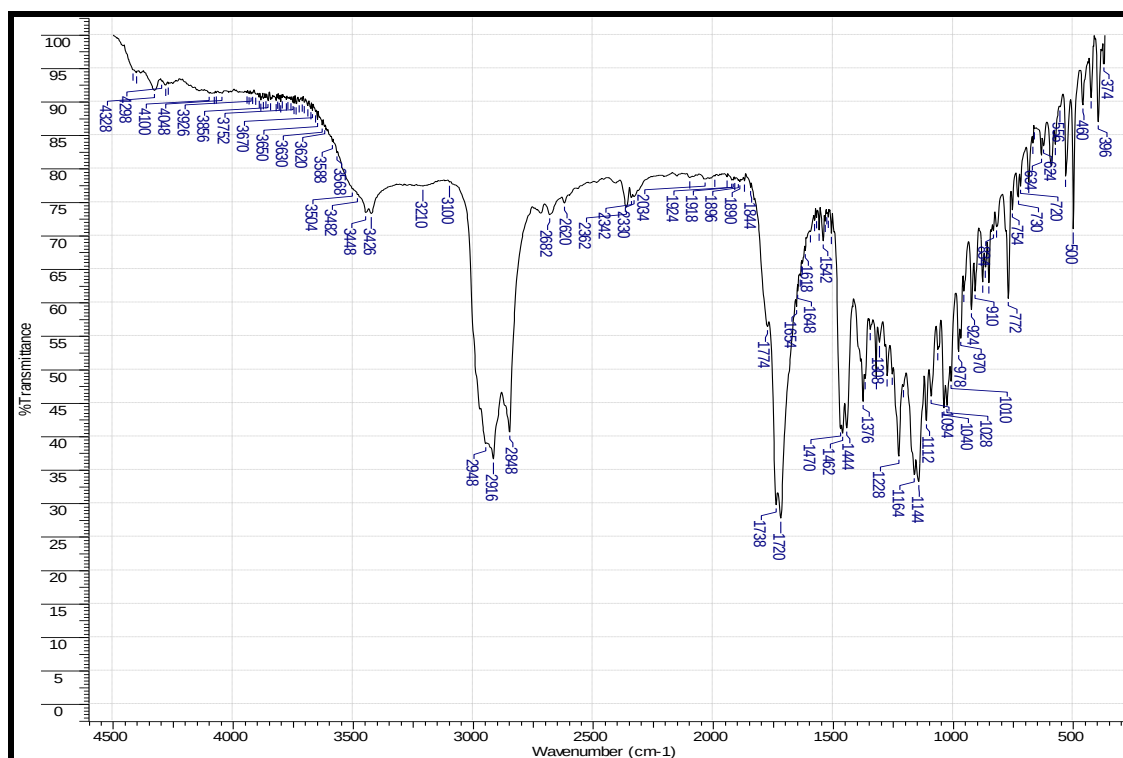


Figura 47: Espectro na região do IV (KBr) do *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (**39**).

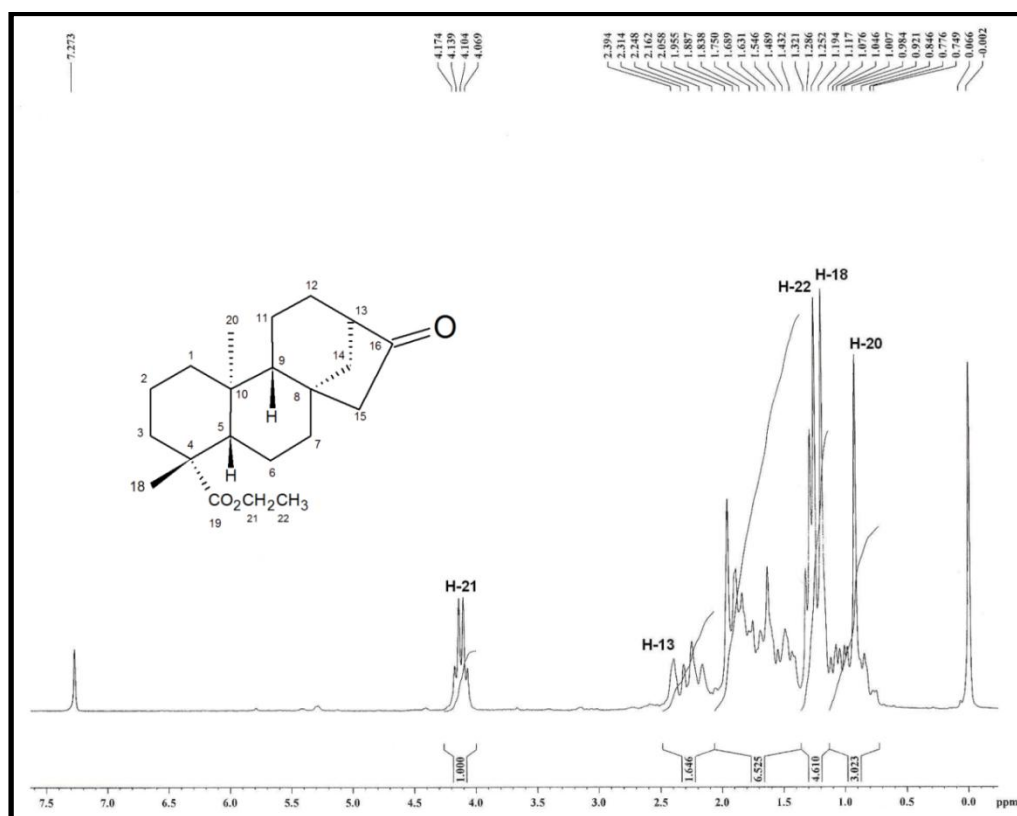


Figura 48: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (**39**).

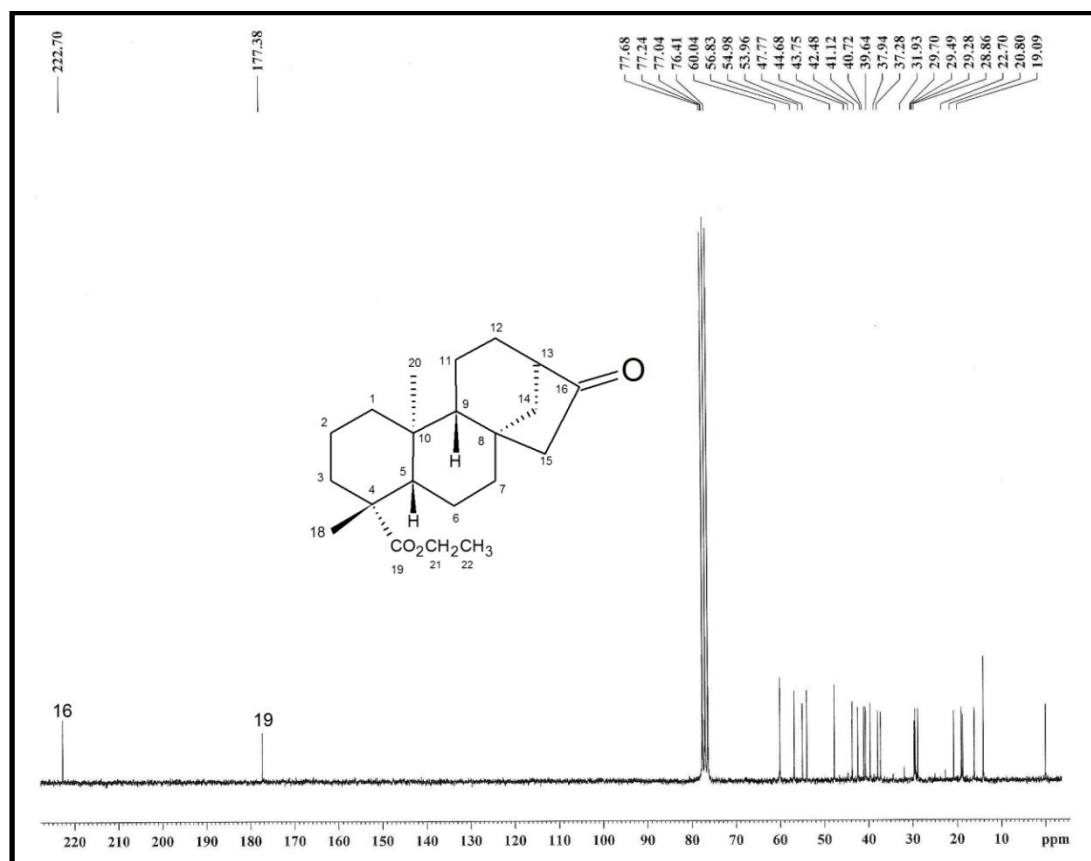


Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (**39**).

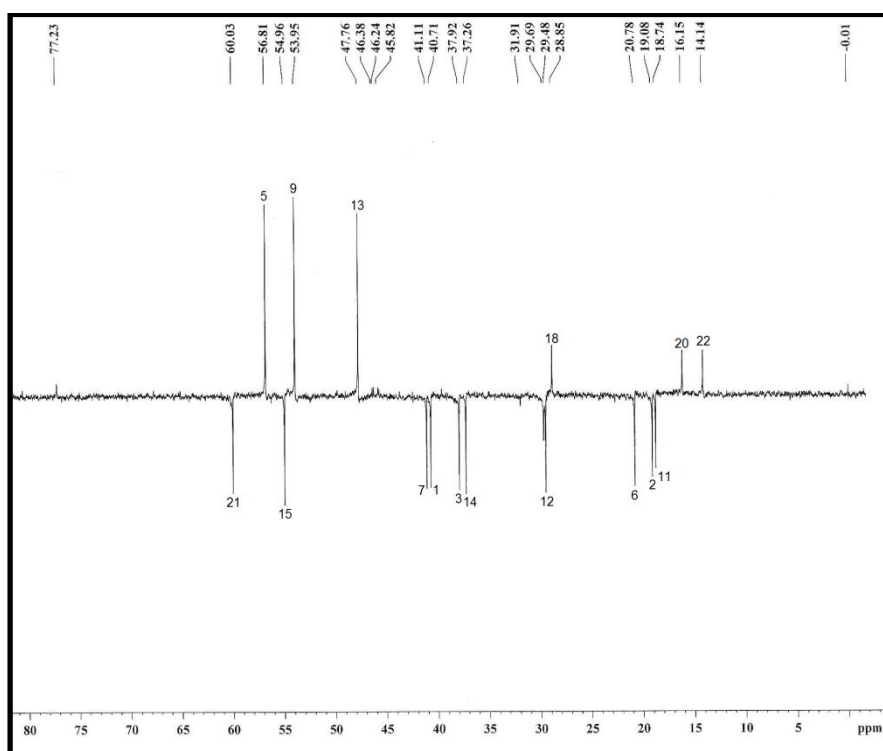


Figura 50: Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3) do *ent*-16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (**39**).

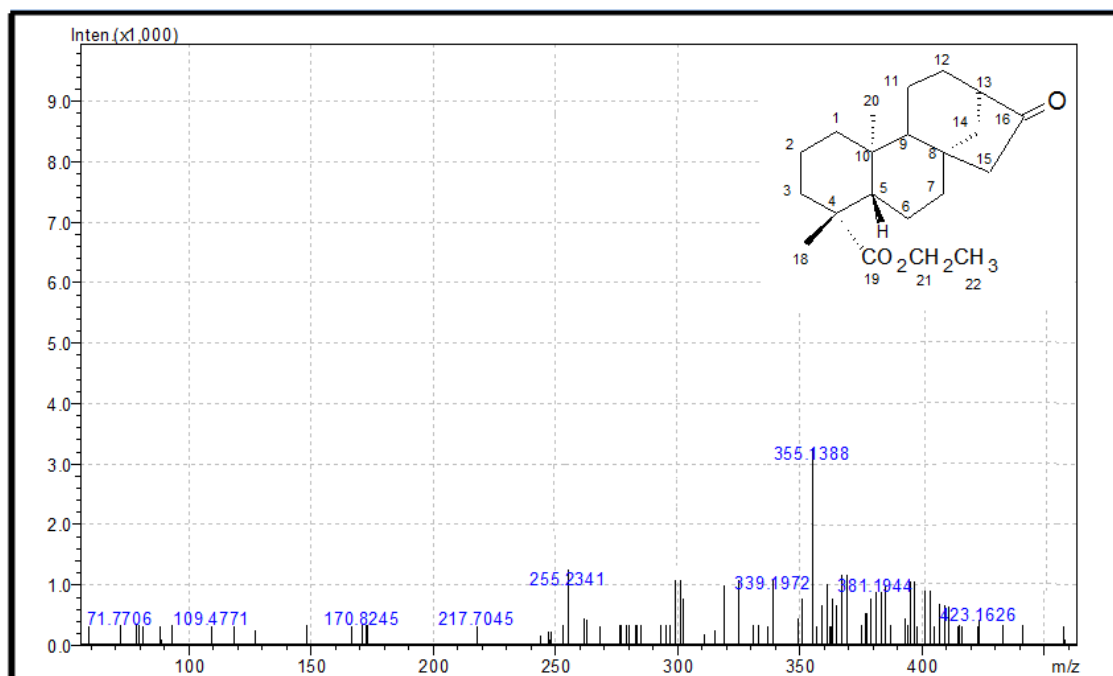


Figura 51: Espectro de massas com ionização por *electrospray* do ent-16-oxo-17-nor-cauran-19-oato de etila (39).

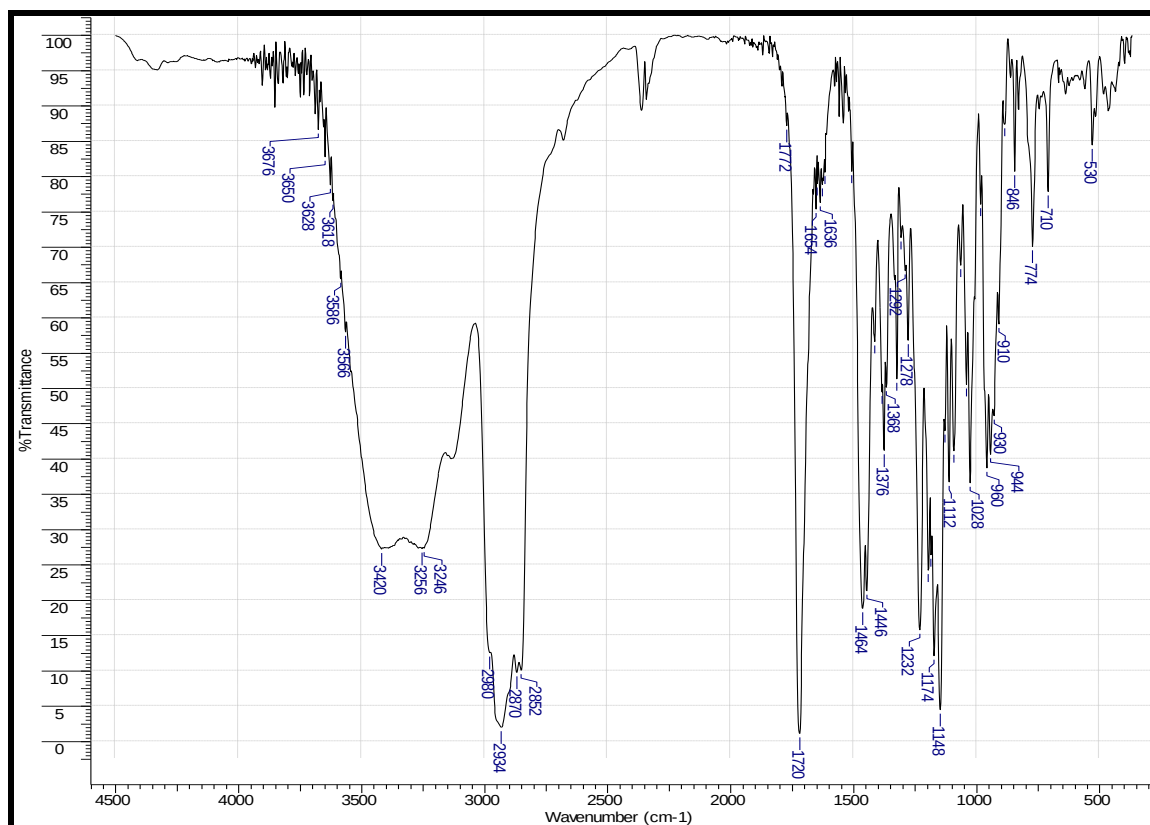


Figura 52: Espectro na região do IV (KBr) do ent-16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (40).

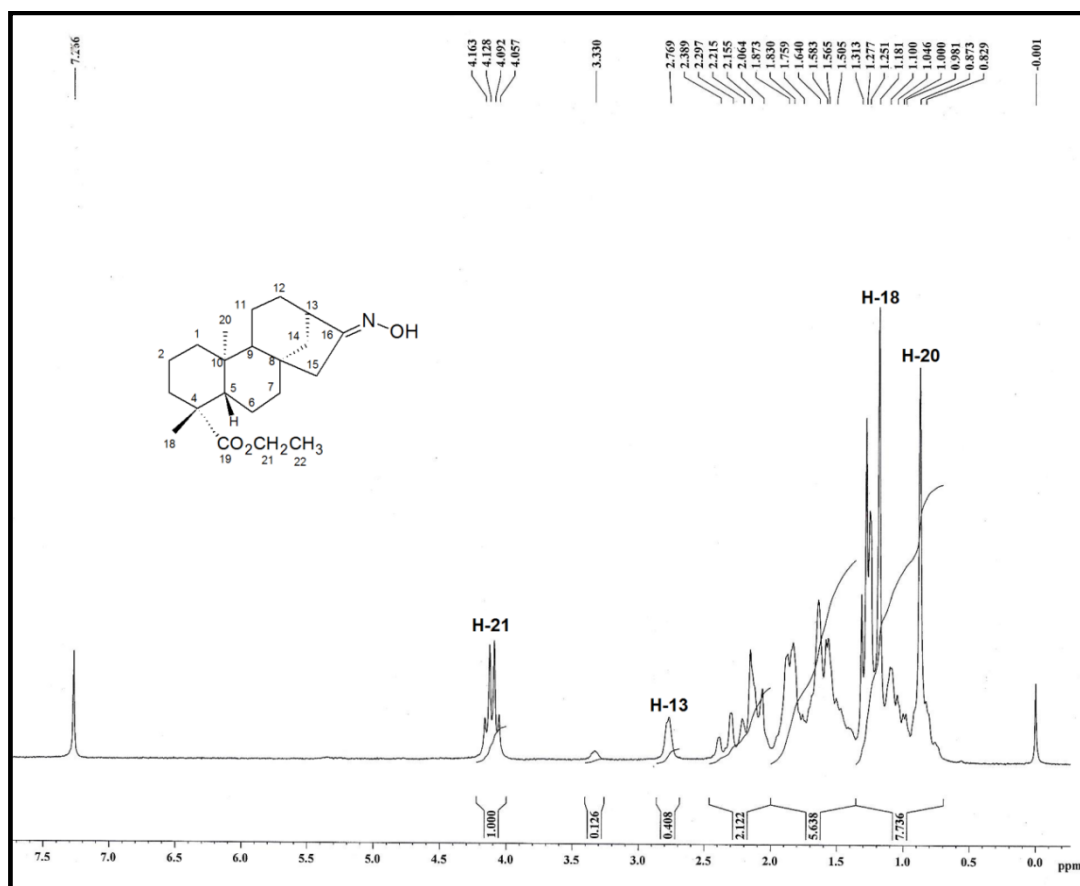


Figura 53: Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) do *ent*-16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (40).

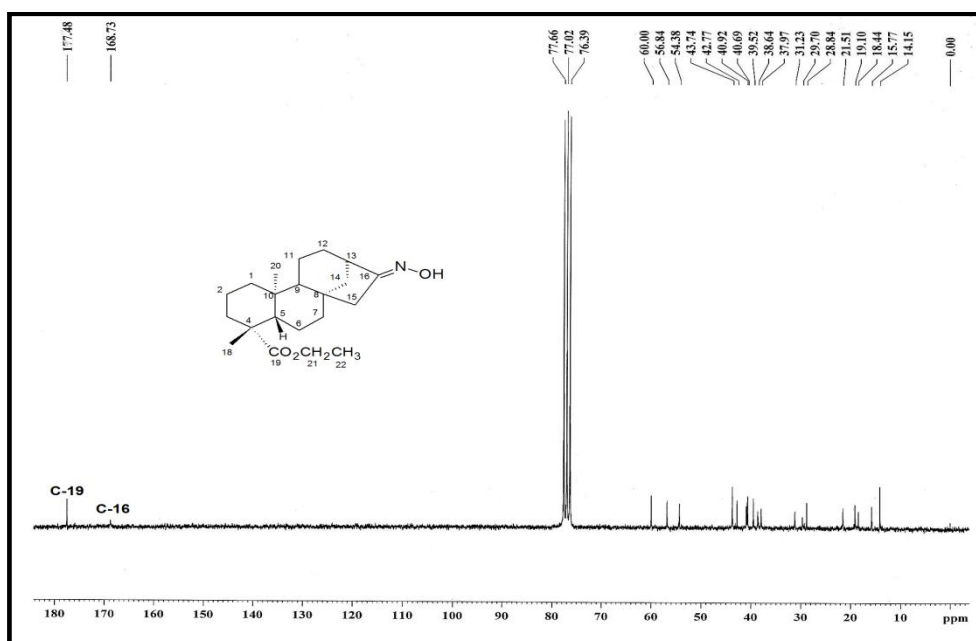


Figura 54: Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) do *ent*-16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (40).

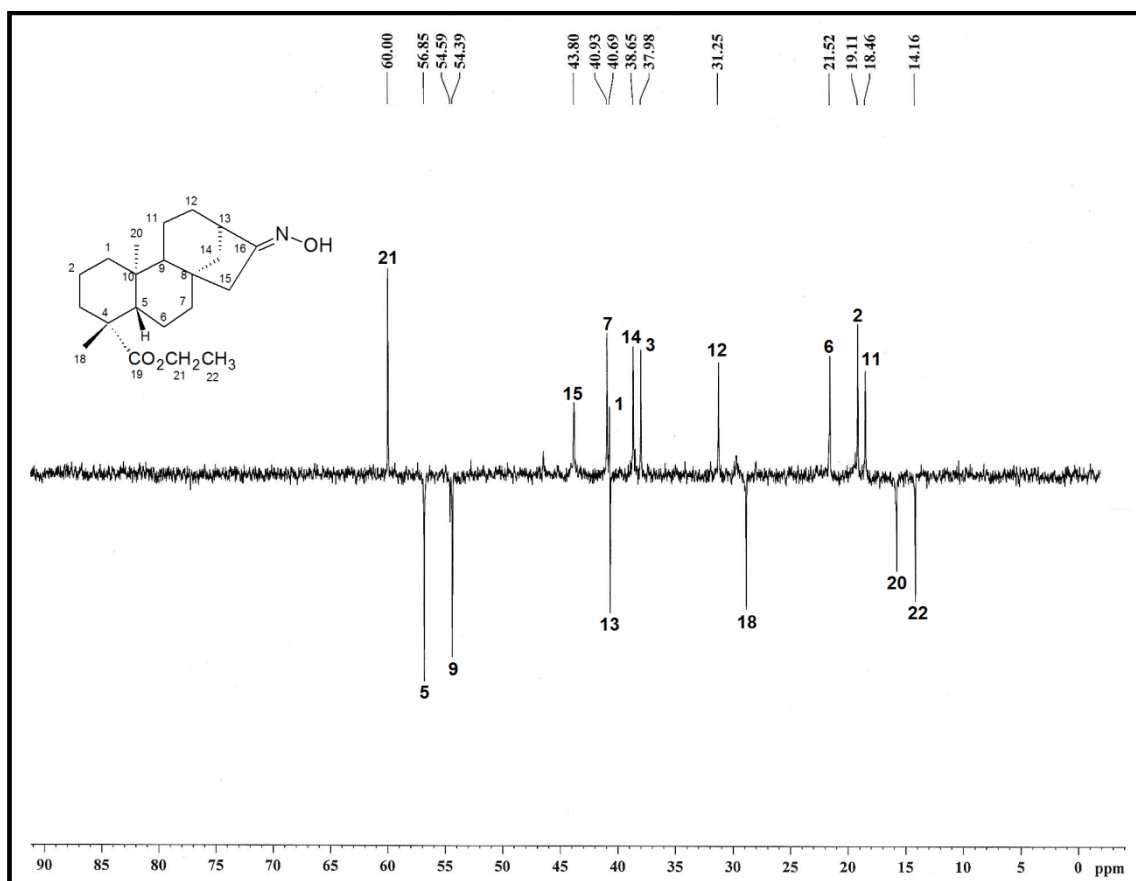


Figura 55: Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl₃) *ent*-16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (40).

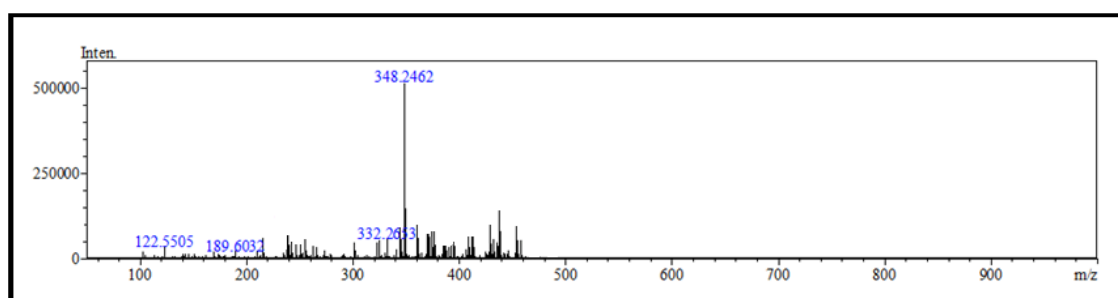


Figura 56: Espectro de massas com ionização por *electrospray* do *ent*-16-E-oxima-17-nor-cauran-19-oato de etila (40).

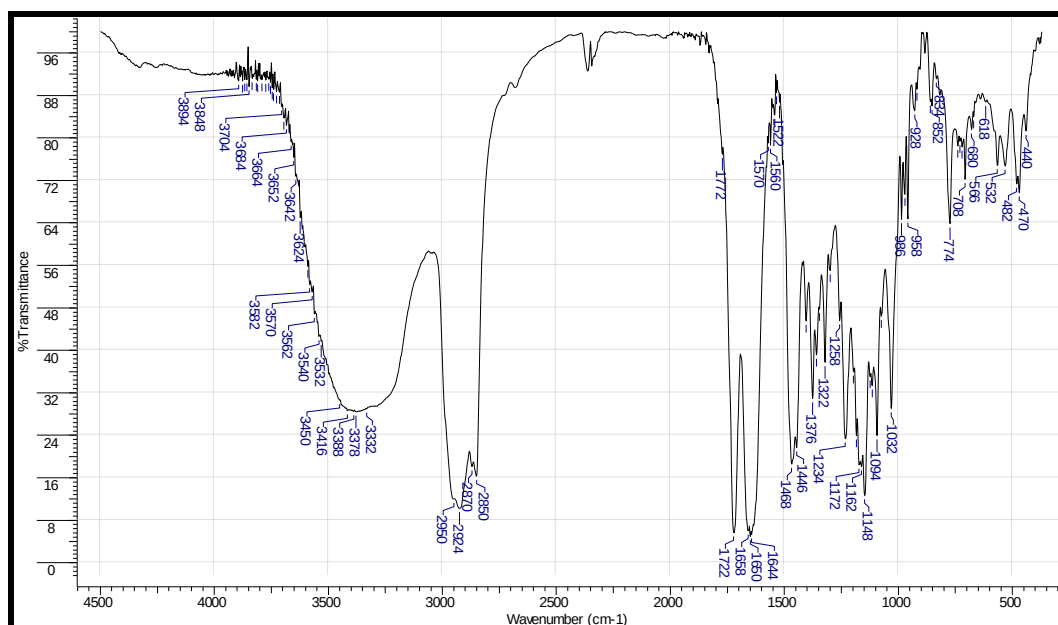


Figura 57: Espectro na região do IV do *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (**42**).

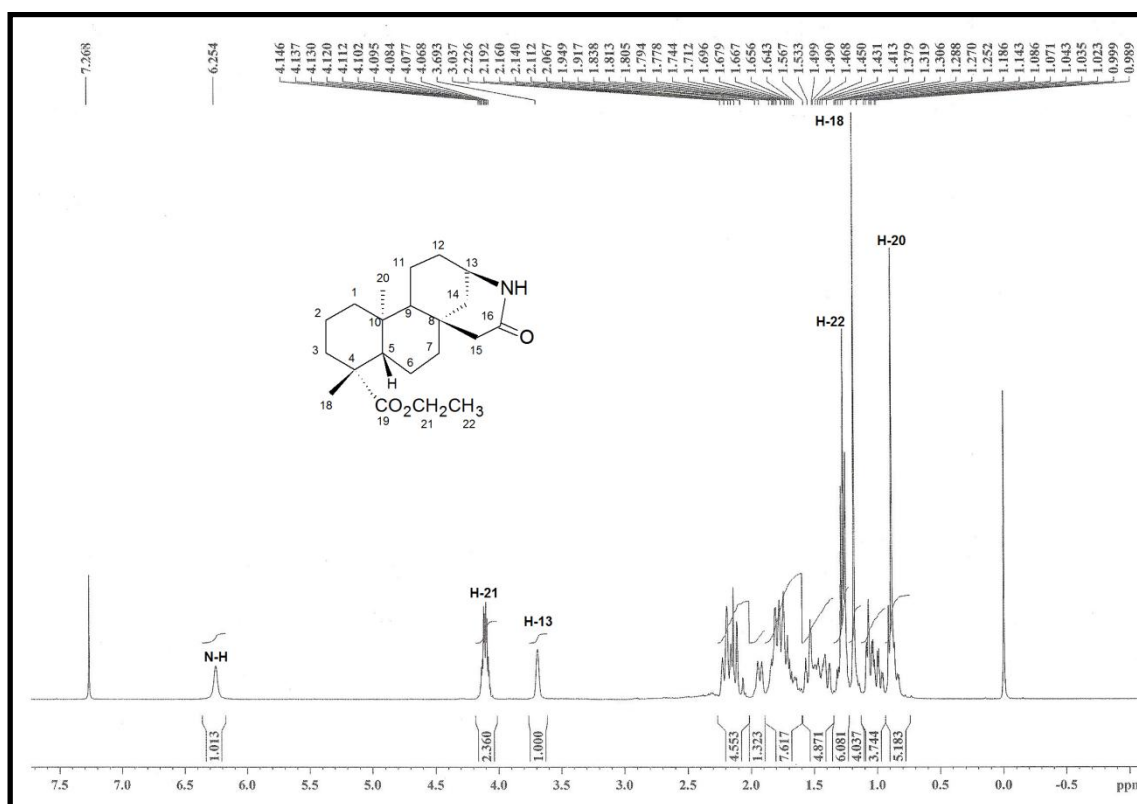


Figura 58: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (**42**).

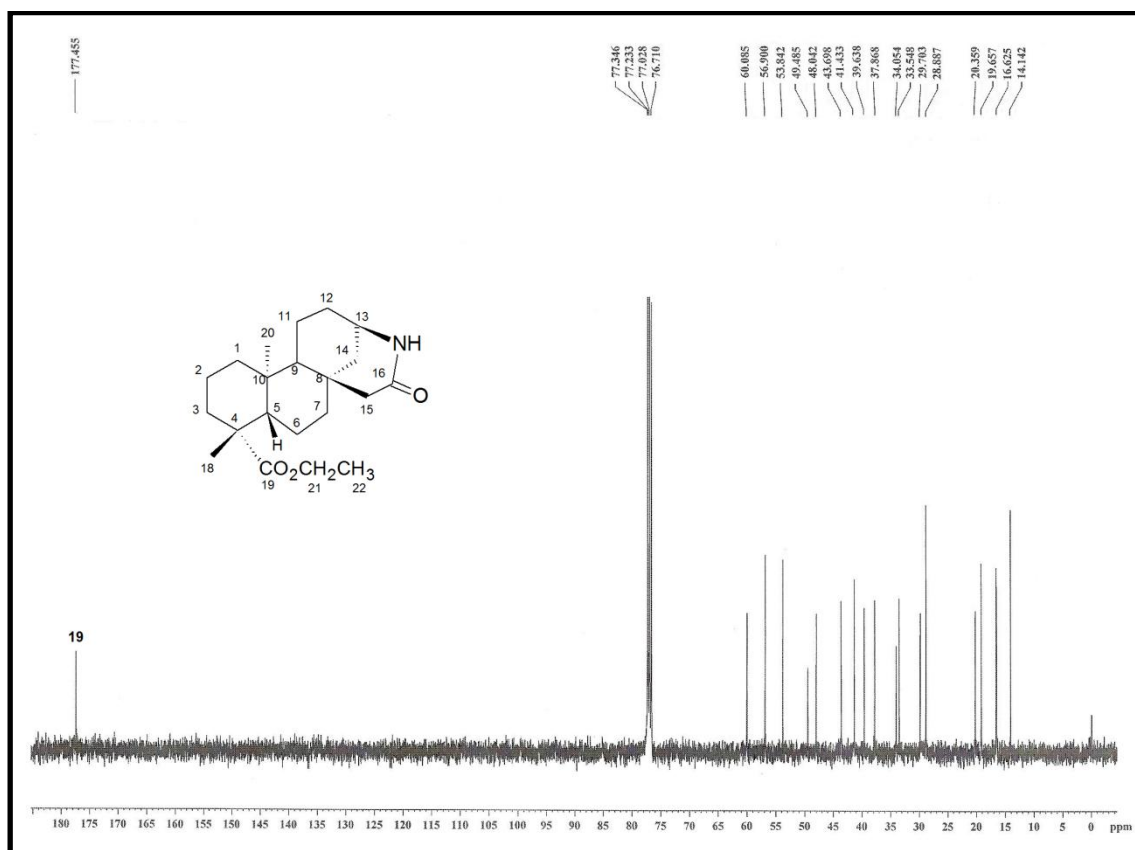


Figura 59: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (**42**).

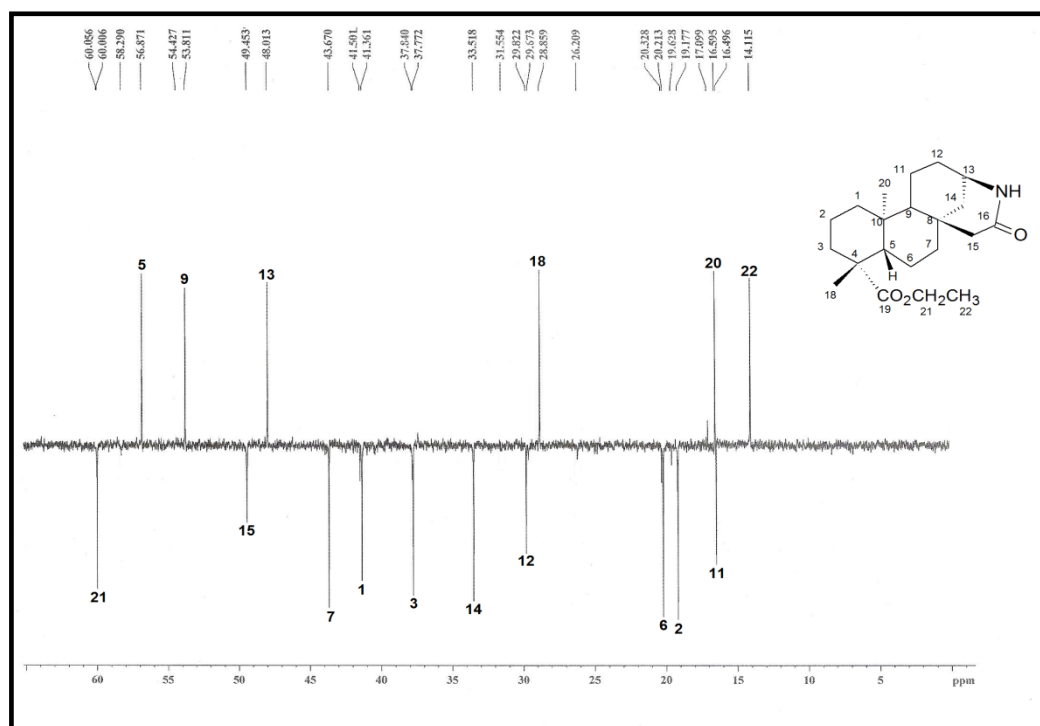


Figura 60: Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) do *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (**42**).

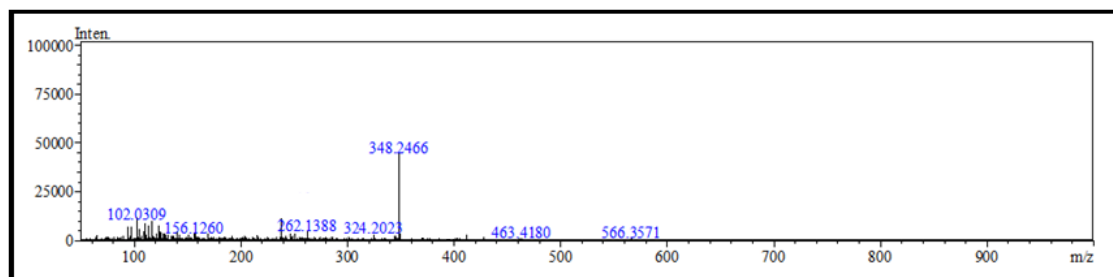


Figura 61: Espectro de massas com ionização por *electrospray* do *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (**42**).

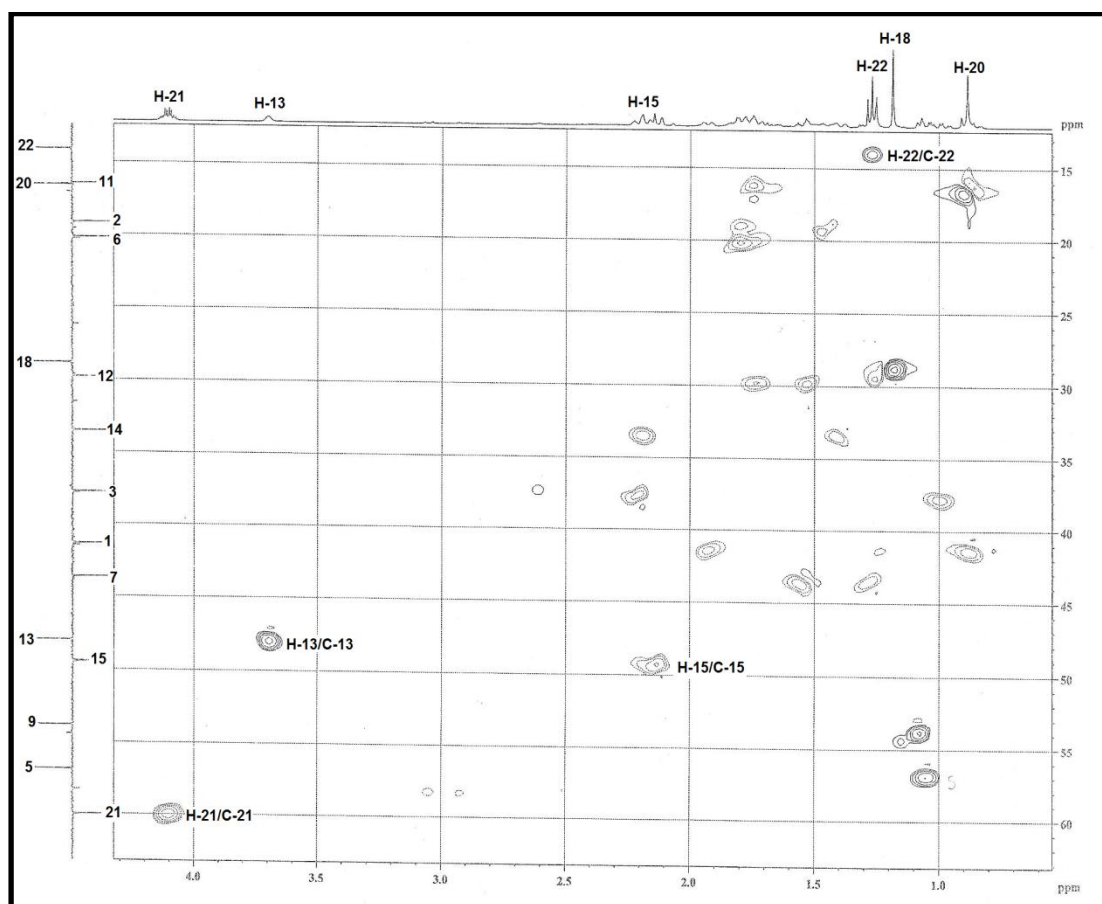


Figura 62: Mapa de contornos HSQC (100 MHz, CDCl₃) do *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (**42**).

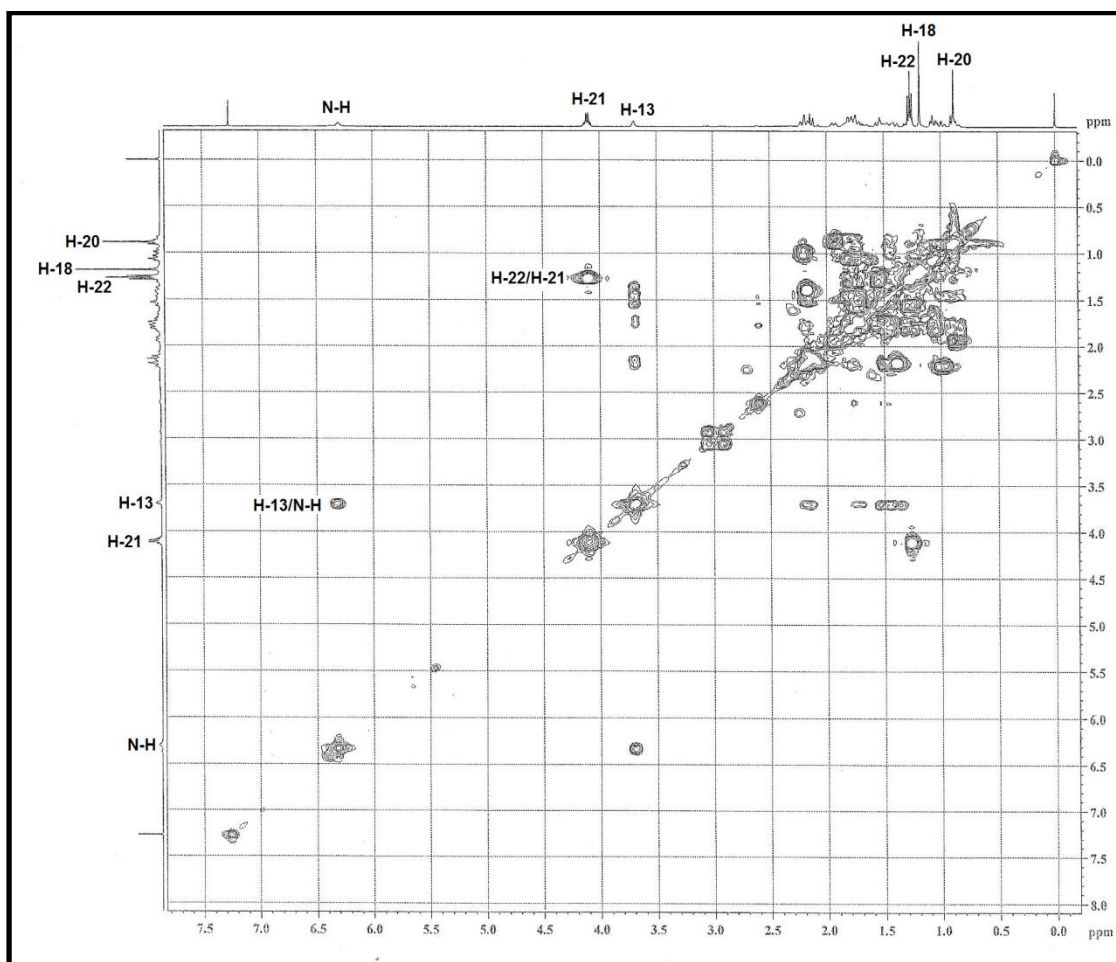


Figura 63: Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl₃) do *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (**42**).

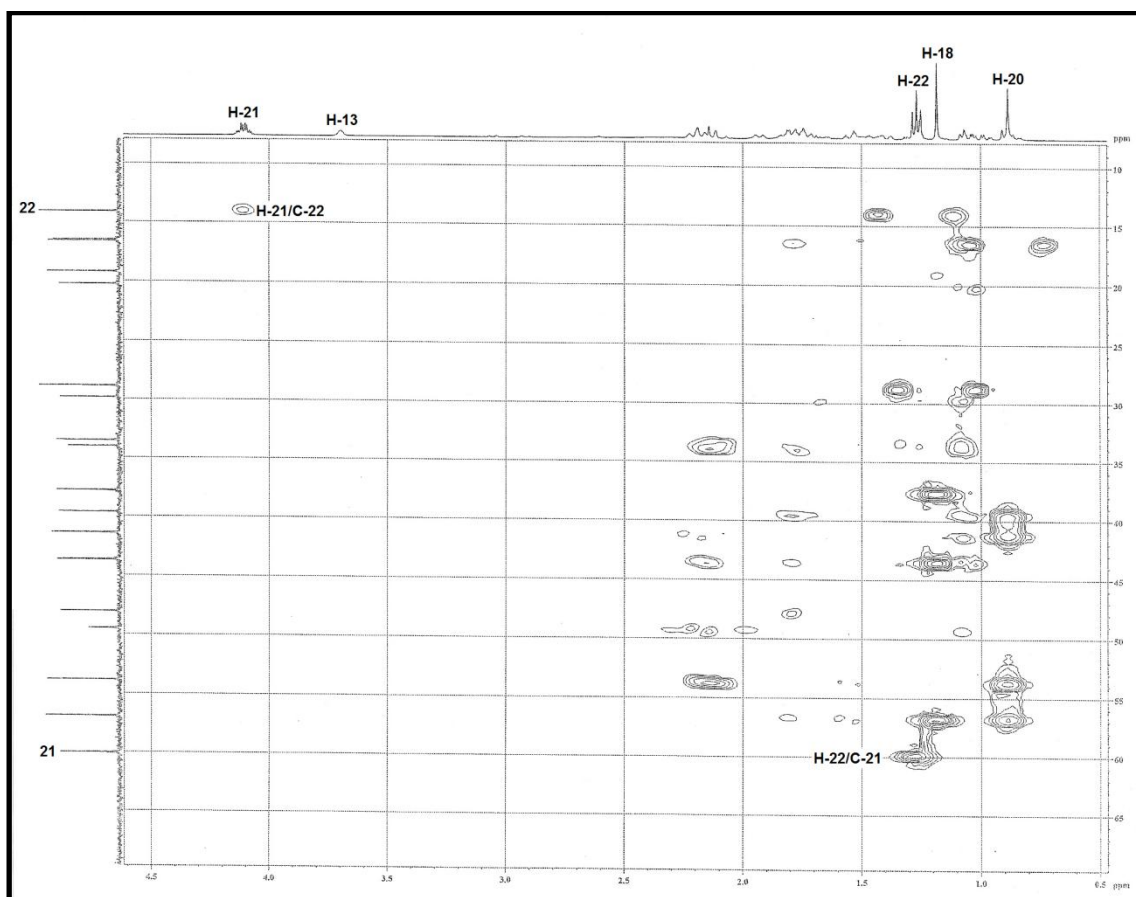


Figura 64: Mapa de contornos HMBC (100 MHz, CDCl_3) do *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (**42**).

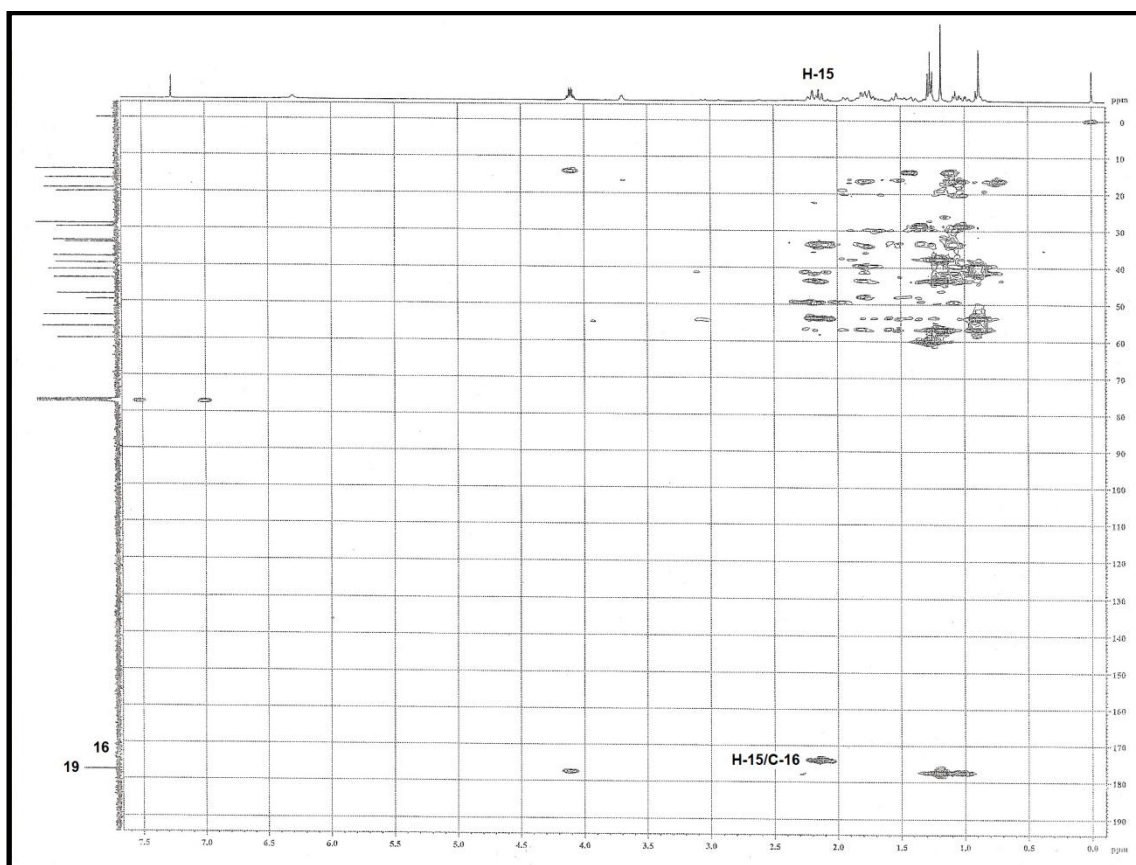


Figura 65: Ampliação do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl₃) do *ent*-13-lactam-13a-aza-cauran-19-oato de etila (**42**).

8- ANEXO- Tabelas comparativas de dados de RMN

Tabela 20: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δ_{C}) da mistura dos ácidos e da mistura dos ésteres etílicos com os dados obtidos da literatura (VIEIRA, 2000)

	Ácido caurenóico* (1)	Ácido grandiflorênico* (2)	Mistura dos ácidos 1 e 2		Mistura dos ésteres etílicos 37 e 38	
			1	2	37	38
1	40,7	40,8	40,8	40,8	40,8	40,8
2	19,1	20,2	20,2	20,2	19,2	19,2
3	37,8	38,3	37,9	38,3	37,9	38,7
4	43,8	44,7	43,9	44,8	43,8	44,7
5	57,1	46,6	57,1	46,7	57,1	46,6
6	21,8	18,5	21,9	18,5	21,9	18,6
7	41,3	29,7	41,3	29,7	41,3	29,8
8	44,2	42,3	44,3	42,3	44,2	42,3
9	55,1	158,5	55,1	158,68	55,1	158,6
10	39,7	38,8	39,7	38,9	39,5	38,4
11	18,4	114,8	18,15	115,0	18,6	114,8
12	33,1	37,9	33,2	37,9	33,1	37,9
13	43,7	41,3	43,9	41,4	43,8	41,4
14	39,7	44,9	39,7	45,0	39,7	44,9
15	48,9	50,3	49,0	50,4	48,9	50,3
16	155,8	155,9	156,0	156,0	155,9	156,0
17	102,9	105,5	103,9	105,6	103,0	105,4
18	28,9	28,3	29,1	28,3	28,8	28,2
19	184,9	184,4	184,6	184,4	177,6	177,4
20	15,6	23,6	15,3	23,7	15,7	23,7
21	-	-	-	-	60,0	59,9
22	-	-	-	-	14,1	14,1

*VIEIRA, 2000

Tabela 21: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δ_{C}) das norcetonas **26** e **27** com os dados obtidos da literatura (VIEIRA, 2000)

	Mistura dos ácidos 1 e 2		Norcetona 27	Norcetona 27*	Norcetona 26	Norcetona 26 *
	1	2				
1	40,8	40,8	40,6	40,6	40,6	40,6
2	20,2	20,2	19,0	18,9	20,0	20,0
3	37,9	38,3	37,7	37,6	38,1	38,1
4	43,9	44,8	43,7	43,7	44,7	44,7
5	57,1	46,7	56,8	56,7	46,2	46,2
6	21,9	18,5	20,7	20,7	18,1	18,2
7	41,3	29,7	41,0	41,0	30,1	30,1
8	44,3	42,3	42,5	42,4	40,3	40,3
9	55,1	158,68	54,0	53,9	156,1	156,1
10	39,7	38,9	39,8	39,8	38,9	38,7
11	18,15	115,0	18,8	18,7	115,0	114,9
12	33,2	37,9	29,5	29,5	31,9	31,9
13	43,9	41,4	47,8	47,7	46,3	46,4
14	39,7	45,0	37,3	37,3	42,4	42,4
15	49,0	50,4	55,0	54,9	56,2	56,2
16	156,0	156,0	222,7	222,5	221,8	221,5
17	103,9	105,6	-	-	-	-
18	29,1	28,3	29,0	28,9	28,2	28,2
19	184,6	184,4	184,0	184,0	183,9	183,7
20	15,3	23,7	16,1	16,10	23,6	23,5

*VIEIRA, 2000

Tabela 22: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δ_{C}) da lactona **28** com os dados obtidos da literatura (VIEIRA, 2000)

	Norcetona 27	Lactona 28	Lactona 28*
1	40,6	40,9	40,9
2	20,0	18,9	18,9
3	38,1	37,3	37,3
4	44,7	43,4	43,5
5	46,2	56,5	56,6
6	18,2	19,8	19,8
7	30,1	42,9	42,9
8	40,3	33,8	33,8
9	156,1	53,0	53,0
10	38,9	39,4	39,5
11	115,0	16,2	16,3
12	31,9	28,6	28,7
13	46,4	75,7	75,8
14	42,4	33,0	33,0
15	56,2	47,9	47,9
16	221,8	172,2	172,4
17	-	-	-
18	28,2	28,8	28,9
19	183,9	183,5	184,1
20	23,6	16,2	16,3

*VIEIRA, 2000

Tabela 23: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (δ_{C}) da mistura dos ésteres **12** e **13** com os dados obtidos para o ceto-éster **39**, oxima **40** e lactama **42**

	Mistura dos ésteres etílicos 37 e 38		Ceto-éster 39	Oxima 40	Lactama inédita 42
	37	38			
1	40,8	40,8	40,7	40,7	41,7
2	19,2	19,2	19,0	19,1	19,2
3	37,9	38,7	37,9	38,0	37,8
4	43,8	44,7	43,7	42,8	43,7
5	57,1	46,6	56,8	56,9	56,9
6	21,9	18,6	20,8	21,5	20,2
7	41,3	29,8	41,1	40,9	43,7
8	44,2	42,3	42,5	43,7	34,0
9	55,1	158,6	54,0	54,4	53,9
10	39,5	38,4	39,6	39,5	39,6
11	18,6	114,8	18,7	18,4	16,6
12	33,1	37,9	29,5	31,2	29,7
13	43,8	41,4	47,8	40,7	48,0
14	39,7	44,9	37,3	38,6	33,5
15	48,9	50,3	55,0	43,7	49,4
16	155,9	156,0	222,7	168,7	177,4
17	103,0	105,4	-	-	-
18	28,8	28,2	28,9	28,8	28,9
19	177,6	177,4	177,4	177,5	117,4
20	15,7	23,7	16,1	15,8	16,5
21	60,0	59,9	60,0	60,0	60,0
22	14,1	14,1	14,1	14,1	14,1