

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

ALESSANDRA DUARTE ROCHA

**Produção de metabólitos bioativos por
biotransformações de diterpenos abundantes na natureza
e avaliação do potencial destes na germinação e no
crescimento de *L. sativa***

Belo Horizonte

2010

UFMG/ICEX/DQ – 838^a

T. 357^a

ALESSANDRA DUARTE ROCHA

**Produção de metabólitos bioativos por
biotransformações de diterpenos abundantes na natureza
e avaliação do potencial destes na germinação e no
crescimento de *L. sativa***

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

BELO HORIZONTE

2010

Rocha, Alessandra Duarte.

Produção de metabólitos bioativos por biotransformações de diterpenos abundantes na natureza e avaliação do potencial destes na germinação e no crescimento de *L. sativa* / Alessandra Duarte Rocha. 2010.

xxii, 269 f. : il.

Orientadora: Maria Amélia Diamantino
Boaventura.

Coorientadora: Jacqueline Aparecida
Takahashi.

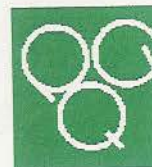
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Química orgânica - Teses 2. Diterpenos - Teses
3. Biotransformação - Teses 4. Atividade alelopática - Teses 5. Alface - Teses
I. Boaventura, Maria Amélia Diamantino, Orientadora
II. Takahashi, Jacqueline Aparecida, Coorientadora
III. Título.



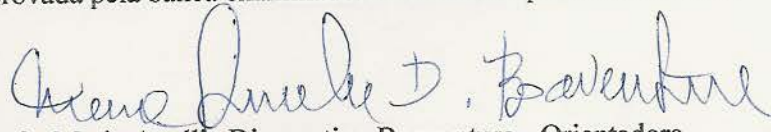
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



**"Produção de Metabólitos Bioativos por Biotransformações de Diterpenos
Abundantes na Natureza e Avaliação do Potencial destes na Germinação e no
Crescimento de *L. sativa*"**

Alessandra Duarte Rocha

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profa. Maria Amélia Diamantino Boaventura - Orientadora
UFMG

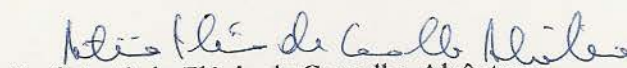


Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi - Co-Orientadora
UFMG


Profa. Eliane Augusto Ndiaye
UFMT


Prof. João Paulo Viana Leite
UFV


Profa. Lucienir Pains Duarte
UFMG


Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara
UFMG

Belo Horizonte, 06 de dezembro de 2010.

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

*“It is not the strongest of the species
that survive, nor the most intelligent,
but the one most responsive to change”*

Charles Darwin

**À minha família, em
especial, ao meu filho Frederico.**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por estar sempre me acompanhando.

À Professora Dra. Maria Amélia Diamantino Boaventura, a quem aprendi a conhecer e estimar durante o período do doutorado. Coerente e perfeccionista, transmite essas qualidades muito eficazmente aos seus orientandos. Muito obrigada pelo acolhimento, pela orientação, pela constante preocupação em transmitir o conhecimento, pelos conselhos pessoais e profissionais, pelas valiosas correções durante a escrita deste trabalho e pelos momentos agradáveis no laboratório.

À Professora Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi pela amizade, atenção, disponibilidade, estímulo, paciência, convívio agradável, pela co-orientação deste trabalho e pelas significativas sugestões durante todo o doutorado, e, sobretudo, pela presença constante nos desafios enfrentados neste período. Você é um dos meus exemplos de profissionalismo e entusiasmo em relação à pesquisa científica.

Ao meu filho, Frederico, meu amor mais puro. Muito obrigada por ser meu amigo, por seus puxões de orelha, por seu ombro nos momentos de cansaço, pela torcida permanente e por compreender que todas as minhas ausências foram por um motivo nobre. Que você trilhe o caminho do conhecimento e do bem por toda a sua vida.

À minha mãe, Rita, por seu amor, sua simplicidade, generosidade e compreensão, em todos os momentos. Sem você eu não seria nada.

Ao meu pai, Rui, por seu amor e por me ensinar a olhar adiante e perceber que, na vida, só o conhecimento prevalece.

Aos meus irmãos, Patrícia e Leonardo, que torcem, incondicionalmente, para que meus desejos se tornem conquistas, pela paciência, pelos incentivos, carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Professora Henriete da Silva Vieira por ter, gentilmente, cedido alguns dos materiais de partida para biotransformações realizadas neste trabalho, pela amizade, disponibilidade e pelas valiosas sugestões, especialmente na fase final deste trabalho.

Ao Professor Dr. Ludwig H. Pfenning (Departamento de Fitopatologia/UFLA) pelo fornecimento da cultura-mãe do fungo *Fusarium proliferatum*, utilizado neste trabalho.

Ao Professor Dr. José Dias de Souza Filho e, em especial, aos funcionários Ivana Lula e Ricardo Machado pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao Professor Dr. Nelson Gonçalves (DQ/UFMG) e ao seu orientando de iniciação científica Geandson Coelho dos Santos, pela realização do experimento de difração de raios-X.

Ao Professor Dr. Ricardo José Alves por ter, gentilmente, permitido a utilização do espectrômetro no IV do Laboratório de Química Farmacêutica da FAFAR/UFMG.

Ao Professor Dr. Adriano Pimenta (ICB/UFMG) e ao seu orientando de mestrado Victor Minelli, pela obtenção dos espectros de massas.

À Professora Dra. Lúcia Pinheiro dos Santos Pimenta e ao Professor Dr. Jarbas Magalhães Resende pelas contribuições e conselhos e pela amizade.

A todos os professores do Setor de Orgânica do DQ/UFMG que, de alguma forma, contribuíram para o aprimoramento dos meus conhecimentos e aos funcionários do DQ, em especial à Arlete e às secretárias da pós-graduação Kátia e Paullete, que contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

À Professora Dra. Alaíde Braga de Oliveira e ao Professor Dr. Fernão Castro Braga pelo incentivo em relação ao prosseguimento dos estudos acadêmicos.

Ao amigo Thiago Borgati pela amizade, disponibilidade constante, pela paciência inesgotável, pelas valiosas contribuições na realização dos ensaios

alelopáticos e pelos ensinamentos constantes em relação a todos os tipos de assuntos relacionados à Química e, principalmente, pela capacidade de tratar os assuntos mais sérios com o maior bom humor. Muito obrigada pela força! Sou sua maior fã!

À amiga Jociani Ascari, minha “irmãzinha” do Sul, que os anjos colocaram no meu caminho. Nossas horas de “desestressamento” foram essenciais para a conclusão deste trabalho! Valeu amiga!!!!

Ao meu eterno amigo Eduardo Bonato, que hoje mora com os anjos, mas está presente **todas** as vezes que a alegria, o carinho e o bom humor acontecem. Muito obrigada por todos os momentos que passamos juntos, pelas prosas animadas e engraçadas, por ser meu companheiro nos momentos de alegria. **Esteja em PAZ.**

Às amigas Eva Sousa, pela amizade, e Luiza Baptista Freitas pelo auxílio na realização de alguns ensaios biológicos, amizade e convívio agradável no laboratório.

À minha estagiária atual Gabriela Brum e aos estagiários antigos Thaís de Alcântara, Thaís Guedes, Larissa Ferreira, Júlia Penna, Luciana Lana e Saulo Fernandes, por terem contribuído para que o objetivo final deste trabalho fosse alcançado.

Aos colegas do DQ/UFMG Juan, Rondinelli, Laís, Tiago P., Silmara, Yuri, Adriane, Lucas, Giovanni, Mateus, Leonardo, Betânia, Willian, Felipe (Thi), Felipe (Jô), Diego, Leandro, Guilherme, Gisele, Vanessa, Fernando e Lilian pelo agradável convívio no decorrer do doutorado.

Aos estimados amigos Caterina, Cyntia, Marcinha, Katita, Michele (“Mil”), Michele (Mi - prima), Ana Marina, Ariadne, Lúcia, Daniele (“Dani”), Silvana (“Sil”), Fabiana, Arleide, Nelson, Brant, Leonardo F. (“Léo”), Bruno (“Brunin”), Fabrize (“Fafá”), Roberta e Ana Tereza pela torcida e presença constantes e aos amigos da “velha guarda” Eliana, Gorette, João, Celinho, Rodrigo, Betânia, Maurício, Rosângela, que são sempre tão queridos. Vocês moram no meu coração!

Ao estimado colega de trabalho e “companheiro de carona” Dr. Dênio que tanto torceu pela conclusão deste projeto, em nossas idas e vindas de Bom Despacho.

Aos novos colegas de trabalho da UNIPAC Bom Despacho, em especial aos colegas “caroneiros” Karina, Guilherme e Lúcio, pelos momentos de diversão e pela torcida.

Aos meus antigos e atuais alunos que sempre me estimulam na busca constante pelo conhecimento, me aperfeiçoando a cada dia.

A todos os amigos, presentes, que torceram por mim e me ajudaram a manter o equilíbrio emocional neste período.

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

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS.....	XVII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	XX
RESUMO.....	XXI
ABSTRACT.....	XXII
CAPÍTULO 1 Introdução.....	1
1.1 Diterpenóides	2
1.2 Biotransformações	6
1.2.1 A importância dos fungos	6
1.2.2 Biotransformações.....	9
1.2.3 Histórico da utilização de reações de biotransformação	14
1.2.4 O emprego de diterpenos caurânicos em biotransformações	20
1.3 Alelopatia.....	25
1.3.1 Determinação das potencialidades alelopáticas.....	27
1.3.2 Exemplos de estudos de determinação de potencial alelopático	28
1.4 Objetivos.....	30
1.5 Referências bibliográficas	31
CAPÍTULO 2 Parte experimental	38
2.1 Materiais e métodos	39
2.1.1 Procedimentos experimentais gerais	40
2.1.2 Cromatografia em coluna de sílica gel (CCS)	40
2.1.3 Cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDS)	40
2.1.4 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	40
2.1.5 Espectrometria de massas de alta resolução	41
2.1.6 Espectrometria na região do infravermelho (IV).....	41
2.1.7 Pontos ou faixas de fusão.....	41
2.1.8 Rotação ótica.....	41
2.1.9 Difração de raios-X (DRX)	42
2.1.10 Culturas de fungos	48
2.2 Coleta e identificação da espécie vegetal.....	42
2.3 Preparo do extrato etanólico	43
2.4 Fracionamento de parte do extrato EBWP-I por cromatografia em coluna de sílica gel (CCS).....	43
2.5 Tentativa de separação dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2), provenientes de WP-I-3-S1, por CCS impregnada com AgNO ₃ (CCS-AgNO ₃)	47
2.6 Fracionamento do restante do extrato EBWP-I por CCS.....	48
2.7 Síntese de derivados dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2).....	49
2.7.1 Preparação de <i>ent</i> -caur-16-en-19-oato de etila (81) e <i>ent</i> -caur-9(11),16- dien-19-oato de etila (82) ²	49
2.7.2 Preparação de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83) e <i>ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-oato de etila (84) ³	50
2.7.3 Preparação dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86).....	50

2.7.3.1 Metodologia adaptada de FRANCIS <i>et al.</i> , 1976 ⁴	50
2.7.3.2 Metodologia adaptada de BLAY <i>et al.</i> , 1991 ⁵	52
2.7.4 Purificação da mistura de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) e <i>ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89)	53
2.8 Procedimentos gerais empregados nas biotransformações	54
2.8.1 Repiques dos microrganismos para manutenção	54
2.8.1.1 Preparo dos meios de cultura sólidos e soluções	55
2.8.2 Preparo dos meios de cultura líquidos	56
2.8.2.1 Meio de cultura para <i>C. aphidicola</i> ⁶	56
2.8.2.2 Meio de cultura para <i>F. proliferatum</i>	57
2.8.2.3 Meio de cultura para <i>P. palustris</i>	57
2.8.3 Inóculo	57
2.8.3.1 Preparo do inóculo	57
2.8.3.2 Inoculação do meio de cultura	57
2.8.4 Reações de biotransformação	58
2.8.5 Materiais de partida empregados nas reações de biotransformação	58
2.9 Biotransformação do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90) por <i>C. aphidicola</i>	60
2.9.1 Purificação do grupo de frações G-5	61
2.10 Biotransformação do ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91) por <i>Fusarium proliferatum</i>	64
2.11 Biotransformação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) por <i>Fusarium proliferatum</i>	67
2.11.1 Purificação do grupo de frações NC-4	68
2.11.2 Purificação do grupo de frações NC-6	68
2.11.2.1 Purificação do grupo de frações NC-6.2	69
2.12 Biotransformação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89) por <i>F. proliferatum</i>	71
2.13 Biotransformação ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78) por <i>F. proliferatum</i>	72
2.14 Biotransformação do <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83) por <i>F. proliferatum</i>	73
2.15 Biotransformação de uma mistura dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86) por <i>F. proliferatum</i>	74
2.15.1 Fracionamento do resíduo em acetato de etila	74
2.15.1.1 Fracionamento do grupo de frações HA3	75
2.15.1.2 Fracionamento do grupo de frações HA4	75
2.15.1.3 Fracionamento do grupo de frações HA6	76
2.15.1.4 Purificação do grupo de frações HA7	76
2.15.2 Fracionamento do resíduo <i>n</i> -butanólico	77
2.16 Biotransformação da mistura dos ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico (2) por <i>P. palustris</i>	79
2.16.1 Fracionamento do resíduo em acetato de etila	79
2.16.2 Fracionamento do resíduo <i>n</i> -butanólico	80
2.17 Dados Físico-Químicos	82
2.17.1 Ácido <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1)	82
2.17.2 Ácido <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico (2)	82
2.17.3 3 β -friedelinol (77)	83
2.17.4 Ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78)	83

2.17.5 β -sitosterol (79)	84
2.17.6 Estigmasterol (80)	85
2.17.7 <i>Ent</i> -caur-16-en-19-oato de etila (81)	85
2.17.8 <i>Ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (82).....	86
2.17.9 <i>Ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83)	87
2.17.10 <i>Ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-oato de etila	87
2.17.11 Ácido <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85).....	88
2.17.12 Ácido <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86)	88
2.17.13 Ácido <i>ent</i> -16-formil-caur-15-en-19-óico (87)	89
2.17.14 Ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88)	89
2.17.15 Ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89)	90
2.17.16 <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90).....	91
2.17.17 Ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91)	91
2.17.18 <i>Ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxi-caurano (92).....	92
2.17.19 <i>Ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano (50)	93
2.17.20 <i>Ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano (93).....	93
2.17.21 Ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94)	94
2.17.22 Ácido <i>ent</i> -2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (95).....	94
2.17.23 <i>Ent</i> -2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico (96).....	95
2.18 Referências bibliográficas	96
CAPÍTULO 3 Resultados e discussão	97
3.1 Fracionamento do extrato etanólico de <i>Wedelia paludosa</i> (EBWP-I)	98
3.1.1 Identificação da mistura dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2) nos grupos de frações WP-I-3 e WP-I-4	98
3.1.2 Identificação de 3 β -friedelinol (77)	101
3.1.3 Identificação do ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78), isolado a partir do grupo de frações WP-I-7	103
3.1.4 Identificação de mistura de β -sitosterol (79) e estigmasterol (80), a partir do grupo de frações WP-I-9.....	106
3.2 Purificação de mistura de ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2) por CCS-AgNO ₃	108
3.3 Purificação da mistura dos ácidos <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) e <i>ent</i> -caur-16-oxo-17-nor-9(11)-en-19-óico (89)	108
3.4 Síntese de derivados caurânicos	111
3.4.1 Proposta de trabalho.....	111
3.4.2 Preparação e identificação de <i>ent</i> -caur-16-en-19-oato de etila (81) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (82)	112
3.4.3 Preparação de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83) e <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-9(11)-en-19-oato de etila (84).....	114
3.4.3.1 Identificação de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83). 114	
3.4.3.2 Identificação de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-9(11)-en-19-oato de etila (84)	116
3.4.4 Preparação dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86).....	119
3.4.4.1 Identificação dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-16-cauren-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86).....	121
3.4.4.2 Identificação do ácido <i>ent</i> -16-formil-caur-15-en-19-óico (87).....	124
3.5 Transformações fúngicas de diterpenos caurânicos.....	127
3.5.1 Biotransformação do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90) por C.	

<i>aphidicola</i>	128
3.5.1.1 Identificação do <i>ent-16β,17,19</i> -trihidroxicaurano (92)	128
3.5.1.2 Identificação do <i>ent-16β,19</i> -dihidroxicaurano (50)	133
3.5.2 Biotransformação do ácido <i>ent-3β-cinamato -caur-16-en-19-óico</i> (91) por <i>F. proliferatum</i>	139
3.5.2.1 Identificação do <i>ent-3β,15α,16α,19</i> -tetrahidroxicaurano (93).....	139
3.5.3 Biotransformação do ácido <i>ent-16-oxo-17-norcauran-19-óico</i> (88) por <i>F. proliferatum</i>	143
3.5.3.1 Ácido <i>ent-2α-hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico</i> (94).....	143
3.5.4 Biotransformação de uma mistura dos ácidos <i>ent-15α-hidroxicaur-16-en-19-óico</i> (85) e <i>ent-15α-hidroxicaur-9(11),16-dien-19-óico</i> (86) por <i>F. proliferatum</i>	148
3.5.4.1 Ácido <i>ent-2α,15α-dihidroxicaur-16-en-19-óico</i> (95)	148
3.5.5 Biotransformação da mistura dos ácidos <i>ent-caur-16-en-19-óico</i> (1) e <i>ent-caur-9(11),16-dien-19-óico</i> (2) por <i>P. palustris</i>	154
3.5.5.1 Identificação do ácido <i>ent-2α,3α,16α,17</i> -tetrahidroxicauran-19-óico (96)	154
3.6 Referências Bibliográficas	159
CAPÍTULO 4 Ensaio biológicos	165
4.1 Avaliação da atividade dos extratos em acetato de etila e butanol, obtidos das biotransformações e substâncias puras isoladas sobre a germinação das sementes e o crescimento de plantículas de <i>Lactuca sativa</i> (alface).....	166
4.1.1 Introdução.....	166
4.1.2 Metodologia.....	167
4.1.3 Resultados dos ensaios de crescimento do caule e da raiz e de germinação de <i>L. sativa</i>	170
4.1.3.1 Resultados dos ensaios de crescimento do caule e da raiz de <i>L. sativa</i>	170
4.1.3.1.1 Resultados dos ensaios de crescimento do caule e da raiz de <i>L. sativa</i> para os extratos A a K, provenientes das reações de biotransformação.....	170
4.1.3.1.2 Resultados dos ensaios de crescimento do caule e da raiz de <i>L. sativa</i> para os substratos L a S, utilizados nas reações de biotransformação.....	172
4.1.3.1.3 Resultados dos ensaios de crescimento do caule e da raiz de <i>L. sativa</i> para as substâncias puras provenientes das reações de biotransformação.....	174
4.1.3.2 Resultados dos ensaios de germinação de sementes da alface (<i>L. sativa</i>).....	176
4.1.3.2.1 Resultados dos ensaios germinação de sementes de <i>L. sativa</i> para os extratos A a K, provenientes das reações de biotransformação.....	176
4.1.3.2.2 Resultados dos ensaios de germinação de sementes de <i>L. sativa</i> para os substratos L a S, utilizados nas reações de biotransformação.....	179
4.1.3.2.3 Resultados dos ensaios de germinação de sementes de <i>L. sativa</i> para as substâncias puras provenientes das reações de biotransformação.....	180

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos em acetato de etila obtidos das biotransformações e substâncias isoladas.....	182
4.2.1 – Introdução.....	182
4.2.2 Experimental.....	183
4.2.2.1 Amostras testadas.....	183
4.2.2.2 Meios de cultura/soluções empregados.....	184
4.2.2.3 Metodologia de ensaio.....	184
4.2.3 Resultados e discussão dos resultados.....	185
4.3 Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase de extratos em acetato de etila obtidos das biotransformações e substâncias isoladas.....	185
4.3.1 Introdução.....	185
4.3.2 Experimental.....	185
4.3.2.1 Amostras testadas.....	186
4.3.2.2 Metodologia do ensaio.....	186
4.3.3 Resultados e discussão dos resultados.....	186
4.4 Referências bibliográficas.....	187
Conclusões.....	188
Anexo - Espectros.....	192

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Capítulo 1 – Introdução

Esquema 1.1 – Produção do piperonal por biotransformação empregando enzima peroxidase extraída do fungo <i>Paecilomyces</i> sp ³⁵	12
Esquema 1.2 – Acilação enzimática regioseletiva da ribavirina ³⁶	13
Esquema 1.3 – Exemplo de transformação microbiana enantiosseletiva ³⁶	13
Esquema 1.4 – Aplicações históricas das biotransformações ^{12,13}	15
Esquema 1.5 - Conversão sintética do ácido desoxicólico (24) em cortisona (25) em uma reação envolvendo várias etapas ¹⁹	15
Esquema 1.6 – Transformação microbiana da desoxicorticosterona (26) em corticosterona (27) ⁴²	16
Esquema 1.7 – Bioconversão da progesterona (28) em 11 α -progesterona (29). ^{19,32}	16
Esquema 1.8 – Bioconversão, por diferentes espécies de fungos, da cortexolona (33) em hidrocortisol (34) ³¹	17
Esquema 1.9 - Procedimentos empregados industrialmente na síntese da fluoxetina (39) - primeira etapa envolve biotransformação catalisada por <i>S. cerevisiae</i> ⁴⁴	19
Esquema 1.10 – Processos industriais na síntese da L-DOPA (40) catalisada por enzimas fúngicas ³⁶	19
Esquema 1.11 – Biotransformação do ácido <i>ent</i> -15-oxocaur-16-en-19-óico (42) pelo <i>C. aphidicola</i> ⁴⁶	20
Esquema 1.12 – Biotransformação de <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-en-15-ona (47) pelo <i>C. aphidicola</i> ⁴⁷	21
Esquema 1.13 – Bioconversão do <i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxicaurano (50) no triol (51) pelo <i>C. aphidicola</i> ⁴⁸	21
Esquema 1.14 – Conversões de cauranos pelo <i>R. stolonifer</i> ⁴⁹⁻⁵⁰	22
Esquema 1.15 – Produtos de biotransformação do candidiol (58) pelo <i>Mucor plumbeus</i> ⁵¹	23
Esquema 1.16 – Conversão do diterpeno caurânico (64) em derivado hidroxilado (65) e giberelina (66) pela <i>G. fujikuroi</i> ¹⁹	23
Esquema 1.17 – Produção de 15-oxo-giberelinas a partir do diterpeno caurânico (67) pela <i>Gibberella fujikuroi</i> ⁵³	24
Esquema 1.18 – Biotransformação do ácido <i>ent</i> -7 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (55) em <i>ent</i> -giban-7 α -formil-16-en-19-óico (70) por <i>G. fujikuroi</i> ⁵⁴	24
Esquema 1.19 - Biotransformação do <i>ent</i> -14 α ,19-dihidroxi-caur-15-eno (71) por <i>G. fujikuroi</i> ⁵⁵	24
Esquema 1.20 - Biotransformação do <i>ent</i> -7 β -hidroxi-caur-16-eno (73) por <i>G. fujikuroi</i> ⁵⁶	25

Capítulo 2 – Parte experimental

Esquema 2.1 - Obtenção do extrato etanólico bruto de <i>W. paludosa</i> e fracionamento de uma alíquota (EBWP- I, 185,98 g) deste extrato, por CCS.	47
Esquema 2.2 - CCS-AgNO ₃ de alíquota de WP-3-S1.	48
Esquema 2.3 - Purificação da mistura dos ácidos <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) e <i>ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89), derivados dos ácidos	

caurenóico (1) e grandiflorênico (2) por CCS <i>flash</i>	54
Esquema 2.4 - Purificação de substâncias da fração acetato de etila da biotransformação do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90) por <i>C. aphidicola</i>	63
Esquema 2.5 - Purificação da fração acetato de etila proveniente da biotransformação do ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91) por <i>F. proliferatum</i>	66
Esquema 2.6 - Purificação de substâncias da fração acetato de etila originada na biotransformação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) por <i>F. proliferatum</i>	70
Esquema 2.7 - Purificação das frações acetato de etila e butanólica originadas na biotransformação de mistura dos ácidos 85 e 86 por <i>F. proliferatum</i>	78
Esquema 2.8 - Purificação das frações acetato de etila e butanólica originadas na biotransformação da mistura dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2) por <i>P. palustris</i>	81

Capítulo 3 – Resultados e discussão

Esquema 3.1 – Modificações químicas de <i>ent</i> -cauranos realizadas neste trabalho.	112
Esquema 3.2 – Mecanismo para a oxidação alílica com SeO ₂ ³⁶	120
Esquema 3.3 – Obtenção do ácido <i>ent</i> -16-formil-caur-15-en-19-óico (87), por reação da mistura dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2) com SeO ₂	124
Esquema 3.4 – Correlações espaciais observadas no mapa de contornos ROESY de <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92).	130
Esquema 3.5 – Biotransformação do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90) em <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92) pelo fungo <i>C. aphidicola</i>	131
Esquema 3.6 – Biotransformação do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90) em <i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano (50) pelo fungo <i>C. aphidicola</i>	135
Esquema 3.7 – Correlações espaciais observadas no mapa de contornos ROESY de <i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano (50).	136
Esquema 3.8 – Biotransformação do <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91) em <i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano (93) pelo fungo <i>F. proliferatum</i>	139
Esquema 3.9 – Correlações espaciais observadas no mapa de contornos NOESY de <i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano (93).	141
Esquema 3.10 – Biotransformação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) no ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94) pelo <i>F. proliferatum</i>	143
Esquema 3.11 – Correlações espaciais observadas no mapa de contornos NOESY do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94).	145
Esquema 3.12 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos principais picos observados no espectro de massas do ácido 94.	146
Esquema 3.13 - Representação em perspectiva ORTEP da estrutura obtida por DRX para o ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94).	146
Esquema 3.14 – Biotransformação dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86) originando o ácido <i>ent</i> -2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (95) por <i>F. proliferatum</i>	148
Esquema 3.15 – Correlações espaciais observadas no mapa de contornos NOESY de o ácido <i>ent</i> -2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (95).	151
Esquema 3.16 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos	

principais picos observados no espectro de massas do ácido 95	153
Esquema 3.11 – Biotransformação dos ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico (2) levando ao produto ácido <i>ent</i> -2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico (96).	154
Esquema 3.17 - Correlações observadas no mapa de contornos NOESY do ácido <i>ent</i> -2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico (96).	157

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 – Introdução

Figura 1.1 – Origem biossintética dos terpenos ^{1,2} . Nos detalhes: unidade isoprênica C ₅ , molécula do isopreno e unidades isoprênicas ativas DMAPP (pirofosfato de dimetilalila) e IPP (pirofosfato de isopentenila).....	3
Figura 1.2 – Exemplos de substâncias representantes de algumas das diferentes classes de diterpenos e suas respectivas atividades biológicas ^{1,2,3}	4
Figura 1.3 - Biossíntese de diterpenos caurânicos tetracíclicos e sua conversão em giberelinas ¹	6
Figura 1.4 – Alguns representantes de diferentes classes de antibióticos ²⁴	7
Figura 1.5 – Tipos de reações microbianas ¹⁹ (Foto de uma cultura do fungo <i>Fusarium proliferatum</i>).	10
Figura 1.6 - Número de processos de biotransformação utilizados no setor industrial nos últimos anos ⁴³	18
Figura 1.7 - Utilização de biotransformações pelos diferentes setores industriais ⁴⁴	18
Figura 1.8 – Alguns aleloquímicos pertencentes a diferentes classes de produtos naturais ⁵⁷⁻⁷³	27

Capítulo 2 – Parte experimental

Figura 2.1 – Fotografia de <i>Wedelia paludosa</i> - planta inteira ¹	43
Figura 2.2 - Materiais de partida empregados nas biotransformações.	59

Figuras do Capítulo 3 – Resultados e Discussão (consultar seção Anexo)

Capítulo 4 – Ensaio Biológicos

Figura 4.1 - Efeito dos extratos A (extrato AcOEt da biotransformação entre <i>C. aphidicola</i> e o <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno, 90), B (extrato AcOEt da biotransformação entre <i>F. proliferatum</i> e o ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico, 88), C (extrato AcOEt da biotransformação entre <i>F. proliferatum</i> e o <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila, 83), D (extrato AcOEt da biotransformação entre <i>P. palustris</i> e os ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico, 1 e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico, 2), E (extrato AcOEt da biotransformação entre <i>F. proliferatum</i> e o ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico, 89) sobre o crescimento do caule e da raiz da alface (<i>L. sativa</i>).	171
Figura 4.2 - Efeito dos extratos F (extrato AcOEt da biotransformação entre <i>F. proliferatum</i> e o ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico, 91), G (extrato AcOEt da biotransformação entre <i>F. proliferatum</i> e ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico, 78), H (extrato BuOH da biotransformação entre <i>F. proliferatum</i> e o <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila, 83), I (extrato BuOH da biotransformação entre <i>P. palustris</i> e os ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico, 1 e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico, 2), J (extrato BuOH da biotransformação entre <i>F. proliferatum</i> e o ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico, 78) e K (extrato AcOEt da biotransformação entre <i>F.</i>	

- proliferatum* e os ácidos *ent-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico*, **85** e *ent-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico*, **86**) sobre o crescimento do caule e da raiz da alface (*L. sativa*). 172
- Figura 4.3** – Efeito dos materiais de partida das biotransformações **L** (*ent-19-hidroxi-caur-16-eno*, **90**), **M** (ácido *ent-16-oxo-17-norcauran-19-óico*, **88**), **N** (*ent-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila*, **83**), **O** (ácidos *ent-caur-16-en-19-óico*, **1** e *ent-caur-9(11),16-dien-19-óico*, **2**), **P** (ácido *ent-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico*, **89**) e **Q** (ácido *ent-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico*, **91**) e **R** (ácido *ent-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico*, **78**) e **S** (ácidos *ent-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico*, **85** e *ent-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico*, **86**) sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*). 174
- Figura 4.4** - Efeito das substâncias provenientes da purificação dos extratos das biotransformações **A.1** (*ent-16 β ,17,19-trihidroxicaurano*, **92**), **A.2** (*ent-16 β ,19-dihidroxi-caurano*, **50**), **B.1** (ácido *ent-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico*, **94**), **F.1** (*ent-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano*, **93**), **I.1** (ácido *ent-2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico*, **96**) e **K.1** (ácido *ent-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico*, **95**) sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*). 176
- Figura 4.5** - Efeito dos extratos **A** (extrato AcOEt da biotransformação entre *C. aphidicola* e o *ent-19-hidroxi-caur-16-eno*, **90**), **B** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e o ácido *ent-16-oxo-17-norcauran-19-óico*, **88**), **C** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e o *ent-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila*, **83**), **D** (extrato AcOEt da biotransformação entre *P. palustris* e os ácidos *ent-caur-16-en-19-óico*, **1** e *ent-caur-9(11),16-dien-19-óico*, **2**), **E** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e o ácido *ent-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico*, **89**) sobre a germinação de sementes da alface (*L. sativa*). 177
- Figura 4.6** – Efeito dos extratos **F** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e o ácido *ent-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico*, **91**), **G** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e ácido *ent-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico*, **78**), **H** (extrato BuOH da biotransformação entre *F. proliferatum* e o *ent-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila*, **83**), **I** (extrato BuOH da biotransformação entre *P. palustris* e os ácidos *ent-caur-16-en-19-óico*, **1** e *ent-caur-9(11),16-dien-19-óico*, **2**), **J** (extrato BuOH da biotransformação entre *F. proliferatum* e o ácido *ent-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico*, **78**) e **K** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e os ácidos *ent-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico*, **85** e *ent-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico*, **86**) sobre a germinação de sementes da alface (*L. sativa*). 178
- Figura 4.7** – Efeito dos materiais de partida das biotransformações **L** (*ent-19-hidroxi-caur-16-eno*, **90**), **M** (ácido *ent-16-oxo-17-norcauran-19-óico*, **88**), **N** (*ent-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila*, **83**), **O** (ácidos *ent-caur-16-en-19-óico*, **1** e *ent-caur-9(11),16-dien-19-óico*, **2**), **P** (ácido *ent-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico*, **89**) e **Q** (ácido *ent-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico*, **91**) e **R** (ácido *ent-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico*, **78**) e **S** (ácidos *ent-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico*, **85** e *ent-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico*, **86**) sobre a germinação de sementes da alface (*L. sativa*). 180
- Figura 4.8** – Efeito das substâncias provenientes da purificação dos extratos das biotransformações **A.1** (*ent-16 β ,17,19-trihidroxicaurano*, **92**),

A.2 (<i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano, 50), B.1 (ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico, 94), F.1 (<i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano, 93), I.1 (ácido <i>ent</i> -2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico, 96) e K.1 (ácido <i>ent</i> -2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico, 95) sobre a germinação de sementes da alface (<i>L. sativa</i>).	182
--	------------

Anexo – Espectros

Figura 3.1 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) da mistura dos ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico (2).	193
Figura 3.2 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) da mistura dos ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico (2). (A) Seção expandida entre δ_{H} 4,6 e 5,4.	193
Figura 3.3 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) da mistura dos ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico (2); (A) Seção expandida entre δ_{C} 37,5 e 50,5.	194
Figura 3.4 - Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) da mistura dos ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico (2).	195
Figura 3.5 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) de 3 β -friedelinol (77).	196
Figura 3.6 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de 3 β -friedelinol (77).	196
Figura 3.7 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de 3 β -friedelinol (77); (A) Seção expandida entre δ_{C} 28,0 e 42,0.	197
Figura 3.8 - Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) de 3 β -friedelinol (77).	198
Figura 3.9 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) do ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78).	199
Figura 3.10 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78); (A) Seção expandida entre δ_{H} 4,6 e 6,0.	199
Figura 3.11 – (A) Seção expandida entre δ_{H} 2,3 e 2,8 e (B) entre δ_{H} 0,87 e 2,07 do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78).	200
Figura 3.12 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78).	200
Figura 3.13 – Subespectro DEPT- 135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78).	201
Figura 3.14 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) da mistura de β -sitosterol (79) e estigmasterol (80).	202
Figura 3.15 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) da mistura de β -sitosterol (79) e estigmasterol (80).	202
Figura 3.16 – Espectro RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) da mistura de β -sitosterol (79) e estigmasterol (80).	203
Figura 3.17 – Subespectro DEPT-135 de (50 MHz, CDCl_3 , δ) da mistura de β -sitosterol (79) e estigmasterol (80).	203
Figura 3.18 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido	204

grandiflorênico (2).	
Figura 3.19 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) e (A) subespectro DEPT-135 do ácido grandiflorênico (2).	204
Figura 3.20 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88).	205
Figura 3.21 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88); (A) Seção expandida entre δ_{H} 0,0 e 2,5.	205
Figura 3.22 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) e (A) Subespectro DEPT- 135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88).	206
Figura 3.23 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89); (A) Seção expandida entre δ_{H} 0,0 e 3,0.....	207
Figura 3.24 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) e (A) Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89).	207
Figura 3.25 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) de <i>ent</i> -caur-16-en-19-oato de etila (81) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (82).....	208
Figura 3.26 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de <i>ent</i> -caur-16-en-19-oato de etila (81) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (82).....	208
Figura 3.27 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de <i>ent</i> -caur-16-en-19-oato de etila (81) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (82). (A) seção expandida entre δ_{C} 10 e 50.	209
Figura 3.28 – Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) de <i>ent</i> -caur-16-en-19-oato de etila (81) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (82).	209
Figura 3.29 – Mapa de contornos COSY (200 MHz, CDCl_3 , δ) de <i>ent</i> -caur-16-en-19-oato de etila (81) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (82).	210
Figura 3.30 – Mapa de contornos HSQC (200 MHz, CDCl_3 , δ) de <i>ent</i> -caur-16-en-19-oato de etila (81) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (82).	211
Figura 3.31 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83).	212
Figura 3.32 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83); (A) Seção expandida entre δ_{H} 0,0 e 5,0.	212
Figura 3.33 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83); (A) Seção expandida entre δ_{C} 10,0 e 61,0.	213
Figura 3.34 - Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83).	213
Figura 3.35 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-9(11)-en-19-oato de etila (84).	214
Figura 3.36 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-9(11)-en-19-oato de etila (84).	214
Figura 3.37 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) e (A) Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-9(11)-en-19-oato de etila (84).	215
Figura 3.38 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-	

9(11),16-dien-19-óico (86).	216
Figura 3.39 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86).	216
Figura 3.40 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86).	217
Figura 3.41 – Seção expandida entre δ_{C} 10 e 60 do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86).	217
Figura 3.42 – Subespectro DEPT- 135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86).	218
Figura 3.43 – Mapa de contornos HSQC (200 MHz, CDCl_3 , δ) dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86).	218
Figura 3.44 – Mapa de contornos HSQC (200 MHz, CDCl_3 , δ) dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86): seção expandida entre δ_{H} 3,5 e 7,5 e δ_{C} 75 a 120.	219
Figura 3.45 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -16-formil-caur-15-en-19-óico (87). (A) Seção expandida entre δ_{H} 0,6 – 2,4.	219
Figura 3.46 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -16-formil-caur-15-en-19-óico (87). (A) Seção expandida entre δ_{C} 15 – 60.	220
Figura 3.47 – Subespectro DEPT- 135 (100 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -16-formil-caur-15-en-19-óico (87).	220
Figura 3.48 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -16-formil-caur-15-en-19-óico (87).	221
Figura 3.49 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -16-formil-caur-15-en-19-óico (87): seção expandida entre δ_{C} 10 – 70 e δ_{H} 0,7 – 3,5.	221
Figura 3.50 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -16-formil-caur-15-en-19-óico (87).	222
Figura 3.51 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do do ácido <i>ent</i> -16-formil-caur-15-en-19-óico (87).	222
Figura 3.52 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent</i> -16-formil-caur-15-en-19-óico (87): seção expandida entre δ_{H} 0,5 - 3,5.	223
Figura 3.53 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90). (A) Seção expandida entre δ_{H} 0,6 e 2,3.	224
Figura 3.54 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) e (A) subespectro DEPT-135 do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90).	225
Figura 3.55 – Mapa de contornos COSY (200 MHz, CDCl_3 , δ) do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90).	226
Figura 3.56 – Mapa de contornos HSQC (200 MHz, CDCl_3 , δ) do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90).	226
Figura 3.57 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ) <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92).	227
Figura 3.58 – Seção expandida entre δ_{H} 0,5 a 4,2 do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ) do <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92) (A) Seção	

expandida entre δ_H 0,6 e 2,0.	227
Figura 3.59 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ) <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92).	228
Figura 3.60 - Subespectro DEPT- 135 (100 MHz, $CDCl_3$, δ) do <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92).	228
Figura 3.61 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92).	229
Figura 3.62 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92).	229
Figura 3.63 – Seção expandida entre δ_H 0,6 a 2,1 e δ_C 14 a 70 do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92).	230
Figura 3.64 – Mapa de contornos ROESY (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92).	231
Figura 3.65 – Espectro de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do <i>ent</i> -cauran-16 β ,19-diol (50). (A) Seção expandida entre δ_H 0,5 e 4,0.	232
Figura 3.66 – Espectro de RMN de ^{13}C e (A) subespectro DEPT-135 (100 MHz, $CDCl_3$, δ) do <i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano (50).	232
Figura 3.67 – Mapa de contornos HSQC do <i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano (50): seção expandida entre δ_H 0,5 a 3,3 e δ_C 15,0 a 65,0.	233
Figura 3.68 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do <i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano (50).	233
Figura 3.69 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do <i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano (50).	234
Figura 3.70 – Mapa de contornos ROESY (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do <i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano (50).	235
Figura 3.71 - Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) do ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91).	236
Figura 3.72 – Espectro de RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91).	236
Figura 3.73 – Seções expandidas do espectro de RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91).	237
Figura 3.74 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91).	237
Figura 3.75 - Subespectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91).	238
Figura 3.76 – Seção expandida do RMN de ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91).	238
Figura 3.77 – Seções expandidas do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91).	239
Figura 3.78 - Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) <i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (93).	239
Figura 3.79 - Espectro de RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD , δ) de <i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (93).	240
Figura 3.80 – Seção expandida do espectro de RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD , δ) de <i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (93).	240
Figura 3.81 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ) de <i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (93). (A) Seção expandida entre δ_C 56 e	

144.	241
Figura 3.82 – Subespectro DEPT 135 (100 MHz, CD ₃ OD, δ) de <i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano (93).	241
Figura 3.83 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD ₃ OD, δ) de <i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano (93).	242
Figura 3.84 – Seção expandida do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD ₃ OD, δ) de <i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano (93).	243
Figura 3.85 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD ₃ OD, δ) de <i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano (93).	244
Figura 3.86 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CD ₃ OD, δ) de <i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano (93).	245
Figura 3.87 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N, δ) do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94).	246
Figura 3.88 – Seção expandida (δ_H 1,00 a 4,20) do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N, δ) do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94). (A) seção expandida entre δ_H 1,90 e 2,35.	246
Figura 3.89 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N, δ) do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94): seção expandida entre δ_H 4,00 e 5,20.	247
Figura 3.90 – Seção expandida (δ_H 2,5 a 3,2) do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N, δ) do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94).	247
Figura 3.91 – Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, C ₅ D ₅ N, δ) do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94).	248
Figura 3.92 - Subespectro DEPT-135 (100 MHz, C ₅ D ₅ N, δ) do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94).	248
Figura 3.93 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, C ₅ D ₅ N, δ) do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94).	249
Figura 3.94 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, C ₅ D ₅ N, δ) do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94): seção expandida entre δ_H 2,0 - 6,5 e δ_C 15-75.	249
Figura 3.95 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, C ₅ D ₅ N, δ) do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94).	250
Figura 3.96 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, C ₅ D ₅ N, δ) do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94).	250
Figura 3.97 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, C ₅ D ₅ N, δ) do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94): seção expandida entre δ_H 1,0 - 2,5 e δ_C 15 - 75.	251
Figura 3.98 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, C ₅ D ₅ N, δ) do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94).	251
Figura 3.99 – Espectro de massas de alta resolução, obtido por ESI, do ácido <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94).	252
Figura 3.100 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) do ácido <i>ent</i> -2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (95).	253
Figura 3.101 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ , δ) do ácido <i>ent</i> -2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (95).	253
Figura 3.102 - Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃ , δ) do ácido <i>ent</i> -	

$2\alpha,15\alpha$ -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (95).	254
Figura 3.103 - Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,15\alpha$-dihidroxi-caur-16-en-19-óico</i> (95).	254
Figura 3.104 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do <i>ent-2$\alpha,15\alpha$-dihidroxi-caur-16-en-19-óico</i> (95).	255
Figura 3.105 – Seção expandida entre δ_{H} 0,5 - 5,5 e δ_{C} 10,0 – 110 do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,15\alpha$-dihidroxi-caur-16-en-19-óico</i> (95).	256
Figura 3.106 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,15\alpha$-dihidroxi-caur-16-en-19-óico</i> (95).	257
Figura 3.107 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,15\alpha$-dihidroxi-caur-16-en-19-óico</i> (95).	258
Figura 3.108 – Seção expandida entre δ_{H} 0,5 – 6,0 e δ_{C} 105,0 – 185,0 do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,15\alpha$-dihidroxi-caur-16-en-19-óico</i> (95).	259
Figura 3.109 – Seção expandida entre δ_{H} 0,5 – 5,5 e δ_{C} 10,0 – 90,0 do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,15\alpha$-dihidroxi-caur-16-en-19-óico</i> (95).	260
Figura 3.110 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,15\alpha$-dihidroxi-caur-16-en-19-óico</i> (95).	261
Figura 3.111 – Espectro de massas de alta resolução, obtido por ESI, do ácido <i>ent-2$\alpha,15\alpha$-dihidroxi-caur-16-en-19-óico</i> (95).	261
Figura 3.112 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,3\beta,16\alpha,17$-tetrahydroxi-cauran-19-óico</i> (96).	262
Figura 3.113 – Seção expandida do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,3\beta,16\alpha,17$-tetrahydroxi-cauran-19-óico</i> (96).	262
Figura 3.114 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,3\beta,16\alpha,17$-tetrahydroxi-cauran-19-óico</i> (96).	263
Figura 3.115 - Subespectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,3\beta,16\alpha,17$-tetrahydroxi-cauran-19-óico</i> (96).	263
Figura 3.116 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,3\beta,16\alpha,17$-tetrahydroxi-cauran-19-óico</i> (96).	264
Figura 3.117 – Seção expandida (δ_{H} 0,5 – 2,5 e δ_{C} 10-50) do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,3\beta,16\alpha,17$-tetrahydroxi-cauran-19-óico</i> (96).	265
Figura 3.118 – Seção expandida (δ_{H} 0,5 – 2,5 e δ_{C} 10-50) do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,3\beta,16\alpha,17$-tetrahydroxi-cauran-19-óico</i> (96).	266
Figura 3.119 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,3\beta,16\alpha,17$-tetrahydroxi-cauran-19-óico</i> (96).	266
Figura 3.120 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,3\beta,16\alpha,17$-tetrahydroxi-cauran-19-óico</i> (96).	267
Figura 3.121 – Seção expandida (δ_{H} 1-4 e δ_{C} 10-95) mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,3\beta,16\alpha,17$-tetrahydroxi-cauran-19-óico</i> (96).	268
Figura 3.122 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido <i>ent-2$\alpha,3\beta,16\alpha,17$-tetrahydroxi-cauran-19-óico</i> (96).	269

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Introdução

Tabela 1.1 - Tipo de reação bioquímica associada às diferentes classes de enzimas.....	11
---	-----------

Capítulo 2 – Parte experimental

Tabela 2.1 – Cromatografia em coluna de sílica gel de EBWP-I.....	44
Tabela 2.2 – Sólidos obtidos a partir da purificação de frações da CCS de EBWP-I.....	46
Tabela 2.3 – Massa de sólido obtido de frações oleosas isoladas do EBWP-I.....	49
Tabela 2.4 - Fracionamento por CCS do extrato etéreo proveniente da reação de oxidação alílica de mistura dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2).....	51
Tabela 2.5 - Fracionamento por CCS do grupo de frações reunidas 11-14 (178 mg) proveniente da CCS da 1ª reação de oxidação alílica de mistura dos ácidos 1 e 2.....	51
Tabela 2.6 - Fracionamento por CCS do grupo de frações reunidas 5-10 (72,3 mg) proveniente da reação de oxidação alílica de mistura dos ácidos 1 e 2.....	52
Tabela 2.7 – Fracionamento, por CCS, do resíduo em metanol (1,57 g) da 2ª reação de oxidação alílica de mistura dos ácidos 1 e 2.....	53
Tabela 2.8 – Fracionamento por CCS da fração acetato de etila (1,3 g) proveniente da biotransformação do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90) por <i>C. aphidicola</i>	60
Tabela 2.9 – Fracionamento do G-5, proveniente da biotransformação do <i>ent</i> -caur-16-en-19-ol (90) por <i>C. aphidicola</i> , por CCS.....	61
Tabela 2.10 – Fracionamento do G-5.2, proveniente da biotransformação do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90) por <i>C. aphidicola</i> , por CCS.....	62
Tabela 2.11 – Fracionamento do G-5.3, proveniente da biotransformação do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90) por <i>C. aphidicola</i> , por CCS.....	62
Tabela 2.12 – Fracionamento por CCS da fração 2 proveniente da biotransformação do ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91) por <i>F. proliferatum</i>	65
Tabela 2.13 – Fracionamento por CCS da fração acetato de etila (3,3 g) proveniente da biotransformação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) por <i>F. proliferatum</i>	67
Tabela 2.14 – Fracionamento por CCS da fração NC-4 proveniente da biotransformação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) por <i>F. proliferatum</i>	68
Tabela 2.15 – Fracionamento por CCS da fração NC-6 proveniente da biotransformação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) por <i>F. proliferatum</i>	69
Tabela 2.16 – Fracionamento por CCS de NC-6.2, proveniente da biotransformação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) por <i>F. proliferatum</i>	69

Tabela 2.17 – Fracionamento por CCS da fração acetato de etila proveniente da biotransformação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89) por <i>F. proliferatum</i>	71
Tabela 2.18 - Fracionamento por CCS da fração AcOEt (4,35 g), proveniente da biotransformação do ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78) por <i>F. proliferatum</i>	72
Tabela 2.19 - Fracionamento por CCS (39 g, 1,5 cm x 44 cm) da fração AcOEt (1,6 g) proveniente da biotransformação do <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83) por <i>F. proliferatum</i>	73
Tabela 2.20 - Fracionamento por CCS (18,5 g, 1 cm x 40 cm) da fração <i>n</i> -butanólica (277 mg) proveniente da biotransformação do <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83) por <i>F. proliferatum</i>	74
Tabela 2.21 – Fracionamento por CCS do resíduo AcOEt proveniente da biotransformação da mistura dos ácidos 85 e 86 por <i>F. proliferatum</i>	75
Tabela 2.22 – Fracionamento por CCS do grupo de frações HA3, proveniente da biotransformação da mistura dos ácidos 85 e 86 por <i>F. proliferatum</i>	75
Tabela 2.23 – Fracionamento por CCS do grupo de frações HA4, proveniente da biotransformação da mistura dos ácidos 85 e 86 por <i>F. proliferatum</i>	76
Tabela 2.24 – Fracionamento por CCS do grupo de frações HA6, proveniente da biotransformação da mistura dos ácidos 85 e 86 por <i>F. proliferatum</i>	76
Tabela 2.25 – Fracionamento por CCS do grupo HA7 proveniente da biotransformação da mistura de ácidos 85 e 86 pelo <i>F. proliferatum</i>	77
Tabela 2.26 – Fracionamento por CCS do resíduo <i>n</i> -butanólico proveniente da biotransformação da mistura dos ácidos 85 e 86 por <i>F. proliferatum</i>	78
Tabela 2.27 – Fracionamento por CCS do resíduo em AcOEt, proveniente da biotransformação da mistura dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2) por <i>P. palustris</i>	79
Tabela 2.28 – Fracionamento por CCS do resíduo <i>n</i> -butanólico proveniente da biotransformação dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2) por <i>P. palustris</i>	80

Capítulo 3 – Resultados e discussão

Tabela 3.1 - Deslocamentos químicos (δ) no espectro de RMN de ^{13}C e deslocamentos químicos (δ) mais relevantes do espectro de RMN de ^1H , observados para os ácidos 1 e 2 e comparação com aqueles da literatura ¹	100
Tabela 3.2 - Comparação dos deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C obtidos para 77 e comparação com aqueles descritos na literatura ⁵	102
Tabela 3.3 – Comparação dos deslocamentos químicos (δ) nos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C de 78 com aqueles descritos pela literatura ¹ para o ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico.....	105
Tabela 3.4 - Comparação dos deslocamentos químicos (δ) no espectro de RMN de ^{13}C da mistura de 79 e 80 com aqueles da literatura ^{1,5} para o β -sitosterol e estigmasterol.....	107
Tabela 3.5 - Comparação dos deslocamentos químicos (δ) dos espectros de	

RMN de ^{13}C de 88 e 89 com aqueles da literatura ¹ para os ácidos <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico e <i>ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico.....	110
Tabela 3.6 – Deslocamentos químicos (δ) observados para as substâncias 81 a 84 , nos espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H	118
Tabela 3.7 – Deslocamentos químicos, nos espectros de RMN de ^{13}C e de RMN de ^1H , obtidos para as substâncias 85 e 86 e aqueles descritos pela literatura ¹¹ para o ácido <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico.....	123
Tabela 3.8 – Deslocamentos químicos (δ), nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , dos ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1) e <i>ent</i> -16-formil-caur-15-en-19-óico (87).....	126
Tabela 3.9 – Deslocamentos químicos (δ), nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90) e do <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92), obtidos a partir de análise de correlações no mapa de contornos HSQC e dados do <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano fornecidos pela literatura ⁴⁹	132
Tabela 3.10 - Correlações espaciais observadas no mapa de contornos ROESY para <i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92).....	133
Tabela 3.11 - Correlações espaciais observadas no mapa de contornos ROESY para <i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano (50).....	136
Tabela 3.12 – Deslocamentos químicos (δ), nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , do <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90) e do <i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano (50), obtidos a partir de análises de correlações no HSQC e do <i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano obtido por Takahashi (1994) ¹¹	138
Tabela 3.13 – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e de ^{13}C do <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91) e do <i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxicaurano (93) obtidos a partir de análise de correlações no mapa de contornos HSQC.....	142
Tabela 3.14 – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C dos ácidos <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) e <i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94).....	147
Tabela 3.15 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (95).....	158
Tabela 3.16 – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C dos ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1) e <i>ent</i> -2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahidroxicauran-19-óico (96).....	181

Capítulo 4 – Ensaios biológicos

Tabela 4.1 – Extratos originados de biotransformação submetidas ao ensaio de avaliação da estimulação ou inibição do crescimento da raiz e do caule de <i>L. sativa</i>	168
Tabela 4.2 – Substratos de biotransformação submetidas ao ensaio de avaliação da estimulação ou inibição do crescimento da raiz e do caule de <i>L. sativa</i>	169
Tabela 4.3 – Substâncias isoladas a partir da purificação de frações de biotransformação submetidas ao ensaio de avaliação da estimulação ou inibição do crescimento da raiz e do caule de <i>L. sativa</i>	169

LISTA DE ABREVIATURAS

1D	unidimensional
2D	bidimensional
°C	graus Celsius
°GL	Graus Gay Lussac
ABD	ágar batata dextrosado (<i>PDA, Potato Dextrose Agar</i>)
AcOEt	acetato de etila
CCDS	cromatografia em camada delgada sílica gel
CCS	cromatografia em coluna de sílica gel
COSY	espectroscopia de correlação (<i>Correlation Spectroscopy</i>)
δ	deslocamento químico (RMN)
d	duplete
DCM	diclorometano
DEPT	aumento sem distorção por transferência de polarização com pulso de 135° (<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
dd	duplete duplo
DRX	difração de raios-X
EBWP	extrato bruto de <i>Wedelia paludosa</i>
EE	extrato etanólico
ESI	ionização por eletronspray
EtOH	etanol
Hertz	Hz
HMQC	transferência de coerência heteronuclear via múltiplo quantum (<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>)
HMBC	correlação heteronuclear via múltiplas ligações (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
IV	espectroscopia na região do infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento escalar
$\nu_{\text{máx}}$	número de onda
m	multiplete
NOESY	espectroscopia de efeito nuclear Overhauser (<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>)
OROT	rotação óptica
p.a.	pró-análise
ppm	partes por milhão
RMN	ressonância magnética nuclear
s	simpleto
SROT	rotação específica
t	tripleto
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TMS	tetrametilsilano

RESUMO

O presente trabalho compreende o isolamento dos diterpenos caurânicos ácidos caurenóico (**1**), grandiflorênico (**2**), do triterpeno 3β -friedelinol (**77**), do ácido *ent-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico* (**78**) e de uma mistura de β -sitosterol (**79**) e estigmasterol (**80**) a partir da espécie vegetal *Wedelia paludosa* e preparação, por modificação química de **1** e **2**, dos derivados *ent-caur-16-en-19-oato* de etila (**81**) e *ent-caur-9(11),16-dien-19-oato* de etila (**82**), *ent-16-oxo-17-norcauran-19-oato* de etila (**83**), *ent-16-oxo-17-norcauran-9(11)-en-19-oato* de etila (**84**), ácidos *ent-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico* (**85**), *ent-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico* (**86**) e *ent-16-formil-caur-15-en-19-óico* (**87**). Subsequentemente, alguns dos derivados obtidos por síntese e outros produtos isolados de *W. paludosa* foram submetidos a modificação biológica, empregando-se os fungos *Cephalosporium aphidicola*, *Fusarium proliferatum* e *Pestalotiopsis palustris* visando o isolamento de produtos com potencial atividade alelopática sobre a germinação e o crescimento da raiz e caule de *Lactuca sativa* (alface). Destas biotransformações foram isolados os seguintes metabólitos: os alcoóis *ent-16 β ,17,19-trihidroxi-caurano* (**92**), *ent-16 β ,19-dihidroxi-caurano* (**50**), *ent-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano* (**93**) e os ácidos *ent-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico* (**94**), *ent-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico* (**95**), *ent-2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico* (**96**), que apresentaram atividade alelopática.

No Capítulo (Introdução) apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre diterpenos e alelopátia. No Capítulo 2 (Parte experimental) descrevem-se as metodologias do isolamento de produtos naturais de *W. paludosa*, da preparação dos derivados caurânicos e das biotransformações realizadas. O Capítulo 3 (Resultados e discussão) trata da identificação espectrométrica (IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e EM) das substâncias isoladas de *W. paludosa*, daquelas utilizadas como materiais de partida das reações químicas e biológicas e dos respectivos produtos obtidos nestas reações. No Capítulo 4 (Ensaio biológicos) são apresentados os resultados dos testes biológicos realizados: teste de atividade alelopática sobre o crescimento e germinação da *L. sativa* (alface) e testes de atividade antimicrobiana e anticolinesterásica.

Palavras-chave: Diterpenos caurânicos, biotransformações, atividade alelopática, *L. sativa*.

ABSTRACT

This work comprises the isolation of kaurane diterpenes, kaurenoic (**1**) and grandiflorenic acids (**2**), of triterpene 3 β -friedelinol (**77**), of *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-oic acid (**78**) and a mixture of β -sitosterol (**79**) and estigmasterol (**80**) from vegetal species *Wedelia paludosa* and preparation, by chemical modification of **1** and **2**, of ethyl *ent*-kaur-16-en-19-oate (**81**), ethyl *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oate (**82**), ethyl *ent*-16-oxo-17-norkauran-19-oate (**83**), ethyl *ent*-16-oxo-17-norkauran-9(11)-en-19-oate (**84**), *ent*-15 α -hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (**85**), *ent*-15 α -hydroxy-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid (**86**) and *ent*-16-formyl-kaur-15-en-19-oic acid (**87**) derivatives. Subsequently, some derivatives obtained by synthesis and other products isolated from *W. paludosa* were submitted to biological modification with fungi *Cephalosporium aphidicola*, *Fusarium proliferatum* and *Pestalotiopsis palustris* aiming at isolating products with allelopathic potential on germination and growth of *Lactuca sativa* (lettuce) roots and stems. From the biotransformations the following metabolites were isolated: *ent*-16 β ,17,19-trihydroxykaurane (**92**), *ent*-16 β ,19-dihydroxy-kaurane (**50**), *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxykaurane (**93**) and *ent*-2 α -hydroxy-16-oxo-17-norkauran-19-oic acid (**94**), *ent*-2 α ,15 α -dihydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (**95**), *ent*-2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahydroxykauran-19-oic acid (**96**), which presented allelopathic activity.

In Chapter 1 (Introduction) it is presented a bibliographic survey on diterpenes and allelopathy. In Chapter 2 (Experimental part) it is described the methodology for the isolation of natural products from *W. paludosa*, preparation of kaurane derivatives and biotransformations performed. Chapter 3 (Results and discussion) reports the spectrometric analysis (IR, ^1H and ^{13}C NMR and MS) of the substances obtained of *W. paludosa*, of all substances used as starting materials and products of the chemical and biological reactions. In Chapter 4 (Biological assays) the results of bioassays carried out are showed: allelopathic biological activity on germination and growth of *L. sativa* (lettuce) and tests for acetylcholinesterase inhibition and antimicrobial activity.

Keywords: kaurane diterpenes, biotransformations, allelopathic activity, *L. sativa*.

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1 Diterpenos

Os terpenos constituem uma classe de metabólitos secundários extremamente complexos em termos estruturais, amplamente distribuídos na natureza¹.

Estes metabólitos são formados a partir de duas diferentes rotas biossintéticas: aquela dependente do mevalonato (MVA), proveniente da união de unidades de acetil coenzima A (acetil-CoA) e que ocorre no citoplasma, e outra, alternativa, que ocorre nos plastídeos e passa pelo intermediário 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP), formado a partir da reação entre o piruvato e o gliceraldeído-3-fosfato intermediada por enzimas sintase e descarboxilase². A partir de catálise enzimática, a molécula de DXP sofre um rearranjo na cadeia e o aldeído formado sofre redução dependente de NADPH para formar o 2-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), que representa o primeiro intermediário desta rota metabólica. Nas duas situações, ambos os precursores originarão as duas unidades isoprênicas (C₅) conhecidas como os ésteres pirofosfato de isopentenila (IPP) e pirofosfato de dimetil alila (DMAPP), que são os precursores ativos imediatos de todos os terpenos (**Figura 1.1**, página 3)^{1,2}.

A condensação de uma molécula de IPP a uma molécula de DMAPP, através do clássico modelo "cabeça-cauda"¹, inicia a formação dos diferentes tipos de esqueletos terpênicos, que são classificados de acordo com o número de unidades isopentânicas em monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀)¹ (**Figura 1.1**). Experimentos empregando carbono marcado radioativamente (¹⁴C) confirmaram que os diterpenos são sintetizados exclusivamente pela rota do 2-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP)^{1,2}.

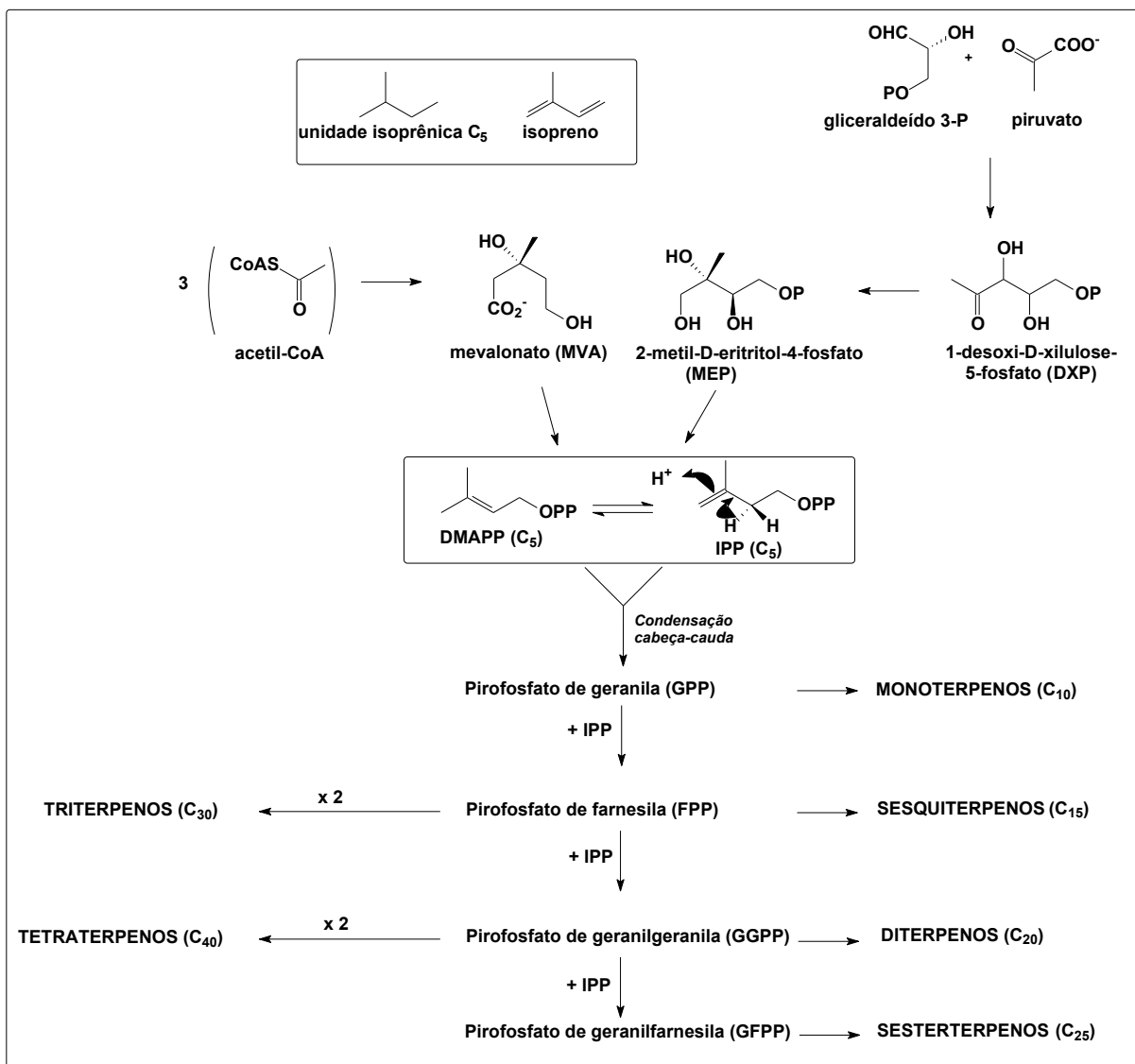


Figura 1.1 – Origem biossintética dos terpenos^{1,2}. Nos detalhes: unidade isoprênica C₅, molécula do isopreno e unidades isoprênicas ativas DMAPP (pirofosfato de dimetilalila) e IPP (pirofosfato de isopentenila).

Os diterpenos dividem-se em várias classes de acordo com o arranjo de seus esqueletos carbônicos¹. Assim, são conhecidos diterpenos acíclicos, bicíclicos dos tipos labdano e clerodano, tricíclicos dos tipos pimarano, abietano, vouacapano e tetracíclicos (grayanotoxinas, giberelinas, afidicolanos, estemodanos, caurenos, isocaurenos, beyerenos, traquilobanos, atisirenos e isoatisirenos)³ (**Figura 1.2**, página 4).

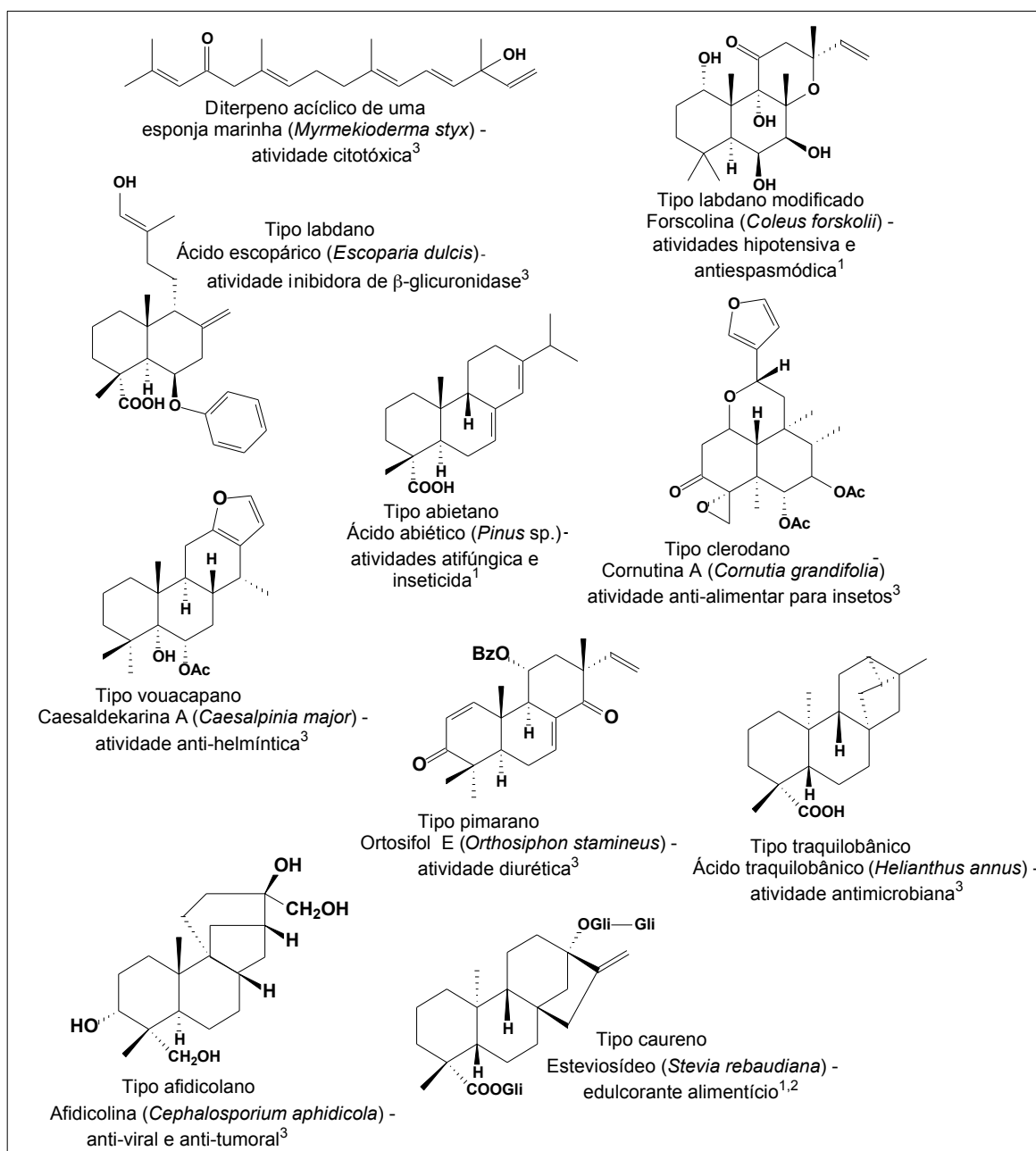
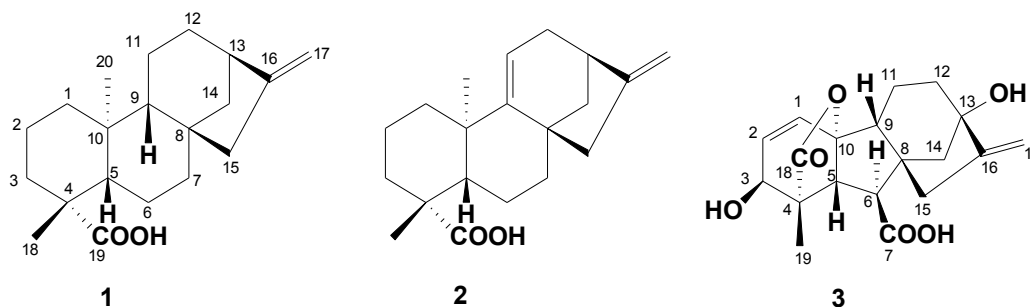


Figura 1.2 – Exemplos de substâncias representantes de algumas das diferentes classes de diterpenos e suas respectivas atividades biológicas^{1,2,3}.

Dentre os diterpenos, interesse especial tem sido observado em relação àqueles com esqueleto caurânico, como os ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (**1**) (ácido caurenóico) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico (**2**) (ácido grandiflorênico), pois apresentam uma variedade de atividades biológicas como antiparasitária⁴, fitotóxica⁵, hormonal⁶, antioxidante⁷, citotóxica⁸, antiviral⁹, antimicrobiana¹⁰ e funcionam como intermediários na biossíntese de muitos metabólitos de fungos e

plantas, incluindo as giberelinas¹¹, de distribuição restrita e importância comercial, como a giberelina A₃ (GA₃, **3**), conhecida como ácido giberélico. O ácido giberélico (**3**) é a giberelina mais importante e é a única que tem uso comercial mais significativo, sendo empregada como hormônio vegetal na lavoura de cana-de-açúcar, tomate e batata³ e na indústria de fermentação^{10,12}.



A biossíntese do esqueleto dos diterpenos tetracíclicos da série dos cauranos começa com a condensação de DMAPP e três moléculas de IPP, resultando no pirofosfato de geranylgeranila (GGPP). O GGPP é ciclizado e, em seguida, rearranjado em *ent*-caurenol que se oxida a ácido *ent*-caurenóico pelas monooxigenases microssomais². A conversão do *ent*-caurenol em giberelinas envolve, além da oxidação em C-19, a hidroxilação deste diterpeno em C-7 com posterior extrusão deste carbono em um rearranjo estrutural que converte o anel B, de seis membros, em um anel de cinco membros. Após diversas etapas envolvendo oxidações e hidroxilações por enzimas citosólicas o aldeído giberélico GA₁₂ é convertido nos inúmeros tipos de giberelinas^{11,13} (**Figura 1.3**, página 6).

O potencial bioativo de diterpenos caurânicos já conhecidos e o fato de algumas plantas, como aquelas dos gêneros *Beyena*, *Ricinocarpus* e *Wedelia*¹⁴⁻¹⁶, serem capazes de os produzirem em quantidades significativas, tornam de extrema relevância o emprego destas substâncias de abundância natural como fonte de substâncias inéditas, biologicamente ativas, a partir de ferramentas como síntese química e transformações microbiológicas.

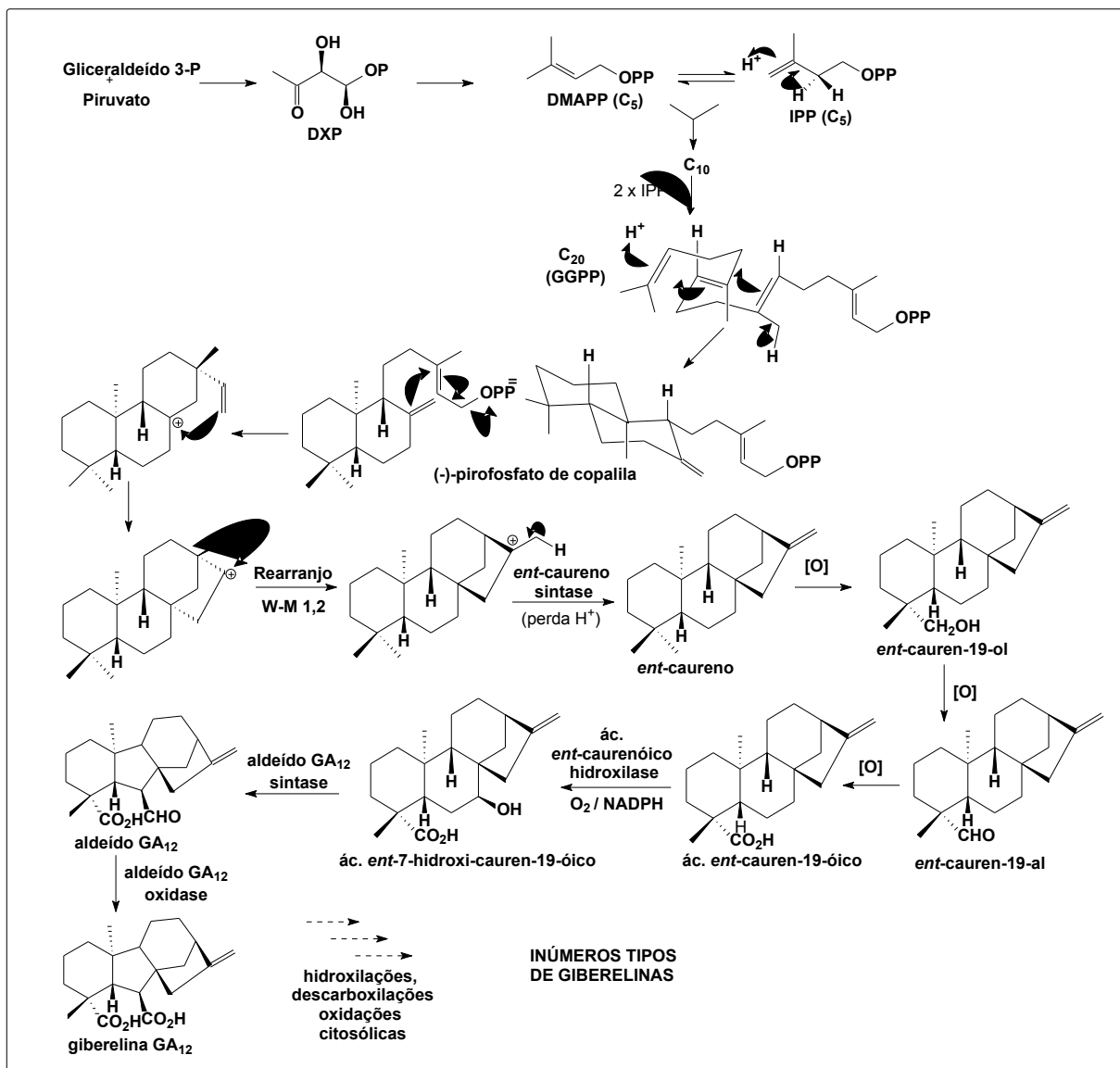


Figura 1.3 - Biossíntese de diterpenos caurânicos tetracíclicos e sua conversão em giberelinas¹.

1.2 Biotransformações

1.2.1 A importância dos fungos

Os fungos, seres heterotróficos aclorofilados pertencentes ao reino Fungi¹⁷, consistem em sistemas celulares de grande interesse biotecnológico para o desenvolvimento de processos e produtos de interesses econômico ou social¹⁸. Sua diversidade genética e metabólica tem sido explorada há milhares de anos, desde civilizações antigas, na fabricação de produtos alimentícios por fermentação, até os dias atuais visando a obtenção de diversos produtos biotecnológicos^{19,20}.

Até meados do século XIX, pesquisadores já haviam observado a ocorrência da fermentação em alguns produtos, mas não tinham fundamentos para provar a hipótese de que seres vivos participavam do processo fermentativo. Louis Pasteur, a partir de 1863, com seus trabalhos sobre vinho e cerveja, foi o responsável por comprovar que a acidificação do vinho ou o azedamento da cerveja ocorriam devido à presença de microrganismos vivos no ar, que, ao entrarem em contato com a bebida, realizavam sua fermentação²¹.

Um destes microrganismos de importância histórica e alto valor comercial para a indústria alimentícia é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que produz, via fermentação de açúcares como a glicose, produtos como dióxido de carbono e etanol¹⁷, os quais têm papel preponderante na panificação e na produção de bebidas alcoólicas como vinhos e cervejas²². Outros fungos proporcionam sabor e aroma distintos em diferentes tipos de queijos.

Tem se intensificado o consumo e, conseqüentemente, a produção comercial de fungos (cogumelos) comestíveis como o champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), o caetetuba ou cogumelo gigante (*Pleurotus ostreatus*) e o shiitake (*Lentinus edodes*)¹⁷, a produção de alimentos fermentados como o molho *shoyo*¹⁹, que envolve a fermentação de grãos de soja e trigo pelos fungos *Aspergillus oryzae*, *Pediococcus halophilus* e *S. rouxii*; e o *kefir*²³, um preparado feito a partir da fermentação, a baixas temperaturas, de leite de vaca, cabra, ovelha, búfala, égua ou camela por mais de quarenta tipos diferentes de microrganismos, entre eles, leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*S. omnisporus*, *S. cerevisiae* e *S. exiguus*).

Na indústria de produtos químicos, os fungos são bastante empregados também. Verificaram-se que 99% da produção de ácido cítrico, utilizado como aditivo em refrigerantes e medicamentos, é realizada por fermentação fúngica e 69% do álcool usado como combustível no Brasil é proveniente de fermentação da cana-de-açúcar por leveduras¹⁹.

Exemplo notável do valor de compostos derivados de fungos está na produção de antibióticos²⁴, como penicilinas e cefalosporinas pelos fungos *Penicillium chrysogenum* e *Cephalosporium chrysogenum*, macrolídeos e tetraciclina por diferentes espécies de *Streptomyces*. As ciclosporinas, isoladas do fungo do solo *Tolypocladium inflatum*, suprimem reações imunológicas em pacientes com órgãos transplantados reduzindo a probabilidade de rejeição e apresentam menos efeitos

colaterais que outras drogas empregadas para esse fim¹⁷. As estruturas químicas de alguns dos antibióticos empregados na terapêutica estão mostradas na **Figura 1.4**.

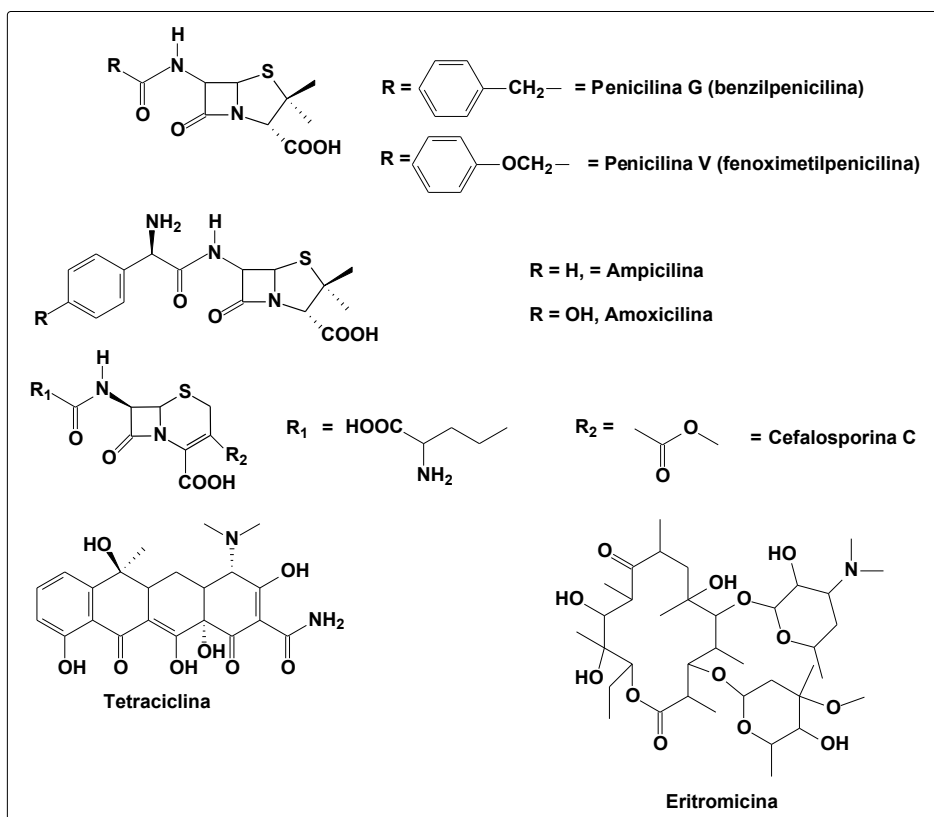
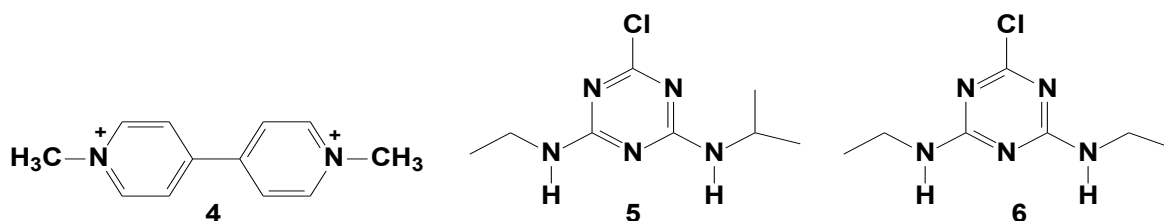


Figura 1.4 – Alguns representantes de diferentes classes de antibióticos²⁴.

O impacto ecológico dos fungos não pode ser subestimado. Aliados às bactérias heterotróficas, eles são os principais decompositores da biosfera¹⁷. A decomposição da matéria orgânica incorporada nos organismos promove a liberação de dióxido de carbono na atmosfera e permite que os compostos nitrogenados e outras substâncias retornem ao solo podendo ser reutilizados pelas plantas e animais¹⁷. Dessa forma, os fungos podem ser usados com sucesso na agricultura e para fertilização de solos²⁵ (fixação biológica de nitrogênio), para degradação de poluentes e para recuperação de ambientes contaminados por compostos químicos²⁶. Os fungos do gênero *Lipomyces*, por exemplo, são capazes de degradar herbicidas piridínicos como o *Paraquat*¹⁹ (1,1'-dimetil-4,4'-dipiridínio) (4) e triazínicos²⁷ como a atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-1,3,5-triazina) (5) e a simazina (2-cloro-4,6-bis-etilamina-1,3,5-triazina) (6) e os do gênero *Rhodotorula*^{19,28}, reagem com produtos químicos tóxicos como hidrocarbonetos de petróleo e compostos fenólicos convertendo-os em outros de baixas toxicidades.



Vários fungos são utilizados no controle biológico de pragas e doenças de plantas. Existem vários inseticidas biológicos à base de fungos (micoInseticidas) em diferentes países do mundo²⁹. No Brasil a produção destes fungos é realizada com o emprego do arroz cozido como substrato. Os principais fungos entomopatogênicos utilizados são *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Sporothrix insectorum* no controle da cigarrinha-da-folha-de-cana-de-acúcar, da broca-do-café e do percevejo-de-renda que ataca seringueiras, respectivamente²⁹.

Além disso, os fungos são utilizados como ferramentas biotecnológicas para produzir produtos intermediários que podem ser empregados nas indústrias farmacêutica, química e alimentícia e na obtenção de protótipos inéditos que poderão ser avaliados quanto as suas atividades biológica e farmacológica.

1.2.2 Biotransformações

A biotecnologia é uma ferramenta moderna amplamente utilizada no desenvolvimento de técnicas de melhoramento vegetal e regeneração *in vitro*, na estimulação da germinação e crescimento de plantas³⁰. Ela pode ser empregada também como uma alternativa interessante na obtenção de metabólitos secundários inacessíveis por métodos clássicos de síntese e na obtenção, a partir de biotransformações, de moléculas ativas que podem ser utilizadas como intermediários em síntese orgânica, na produção de medicamentos, ingredientes alimentícios e intermediários agroquímicos³¹.

As biotransformações são definidas como o uso de sistemas biológicos, microrganismos vivos ou enzimas isoladas destes, para realização de modificações químicas em compostos que não são seus substratos naturais¹³. A molécula orgânica pode ser modificada através de transformação funcional com degradação ou não do esqueleto carbônico³².

As reações microbianas podem ser divididas em dois grupos, as biotransformações biossinteticamente dirigidas e as de xenobióticos. Nas reações biossinteticamente dirigidas, o substrato deve ser análogo a um intermediário de uma rota biossintética natural do microrganismo e a biotransformação obedece às regras naturais deste caminho biossintético¹³. Um exemplo clássico deste tipo de reação microbiana é a transformação de diterpenos caurânicos em giberelinas, pelo fungo *Gibberella fujikuroi* (seção 1.2.4). Este método, além de possibilitar a síntese de giberelinas raras, fornece também informações estruturais sobre o sítio ativo das enzimas desta rota biossintética. Nas biotransformações de xenobióticos, o substrato é estranho ao microrganismo utilizado, existindo uma baixa especificidade deste em relação ao substrato. No entanto, observa-se em geral uma seletividade predominante, característica individual de cada organismo. Exemplo deste grupo de biotransformações está nas hidroxilações de esteróides¹⁹.

Estas reações, que podem ser oxidações, reduções, hidrólises, condensações, isomerizações, formação de ligação C-C ou introdução de heterofunção¹⁹ (Figura 1.5), realizam-se com organismos inteiros intactos ou sistemas de enzimas isoladas¹³. Estas enzimas são classificadas de acordo com a reação química que catalisam^{13, 32} (Tabela 1.1, página 11).

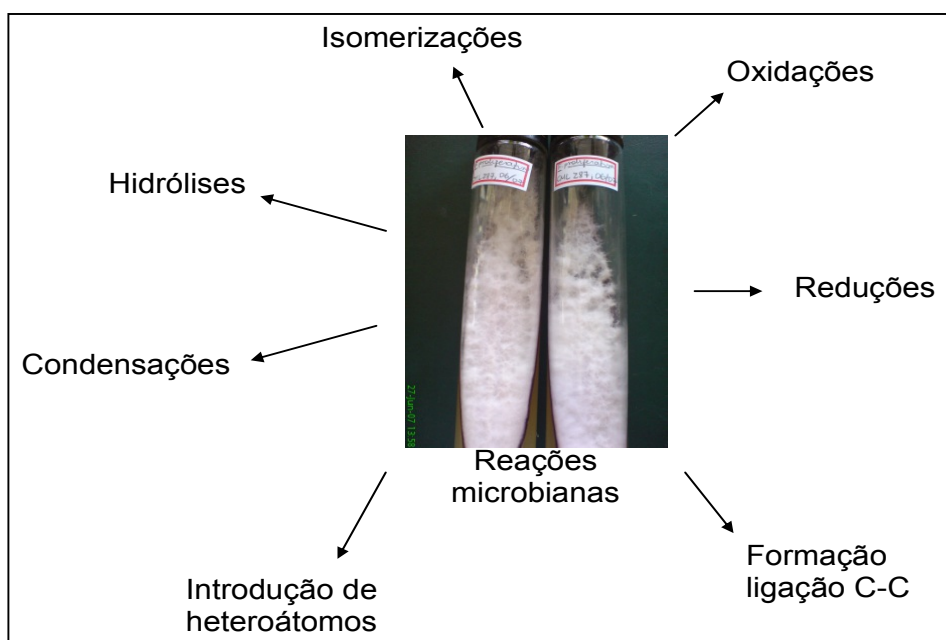


Figura 1.5 – Tipos de reações microbianas¹⁹ (Foto de uma cultura do fungo *Fusarium proliferatum*).

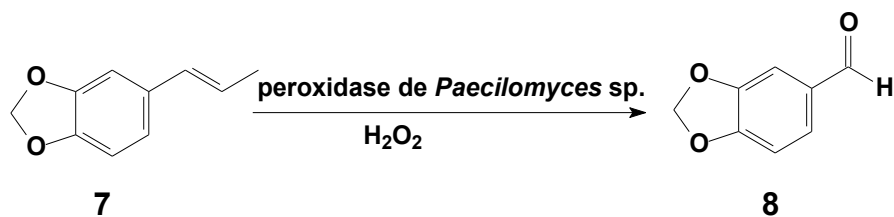
Tabela 1.1 - Tipo de reação bioquímica associada às diferentes classes de enzimas

Enzimas	
Classificação	Tipo de reação
a. Oxidoredutases	Oxidação e redução através da transferência de elétrons para o substrato, incluindo a inserção de oxigênio a ligações C-H e C-C, a adição de oxigênio a alquenos e adição ou remoção de hidrogênio.
b. Oxigenases b.1 dioxigenases b.2 monooxigenases ou hidroxilases	Incorporação de oxigênio molecular ao substrato: Incorporação de dois átomos de oxigênio; Incorporação de um átomo oxigênio ao substrato.
c. Transferases	Transferência de grupos funcionais.
d. Hidrolases	Hidrólise.
e. Liases	Fragmentação de moléculas grandes com eliminação de unidades pequenas.
f. Isomerases	Epimerização, racemização e outras reações de isomerização.
g. Ligases	Formação de ligações C-C, C-O, C-N e C-S.
h. Polimerases	Condensação.

O uso de células íntegras de microrganismos vivos (fungos, bactérias, algas ou células vegetais) cultivados em meios apropriados, onde toda a maquinaria enzimática está disponível, pode gerar uma mistura de produtos biotransformados¹³. No entanto, esta metodologia é frequentemente mais barata que o uso de sistemas enzimáticos isolados³³. Dentre todos os sistemas de células integrais existentes, os fungos têm sido tradicionalmente os mais empregados em biotransformações³⁴.

As preparações enzimáticas incluem extratos enzimáticos de microrganismos, plantas, protozoários e insetos, dentre outros. Atualmente, vários sistemas estão disponíveis comercialmente ou são de fácil isolamento e se apresentam estáveis e de fácil uso³⁵, originando, na maioria dos casos, apenas um produto. Podem-se utilizar ainda enzimas puras¹³, isoladas de diferentes fontes, muitas delas disponíveis comercialmente. Entretanto, essas últimas são bastante onerosas, uma vez que, além da enzima, é geralmente necessário o uso de um ou mais co-fatores para se regenerar a mesma^{32,34}. Como exemplo de biotransformação empregando

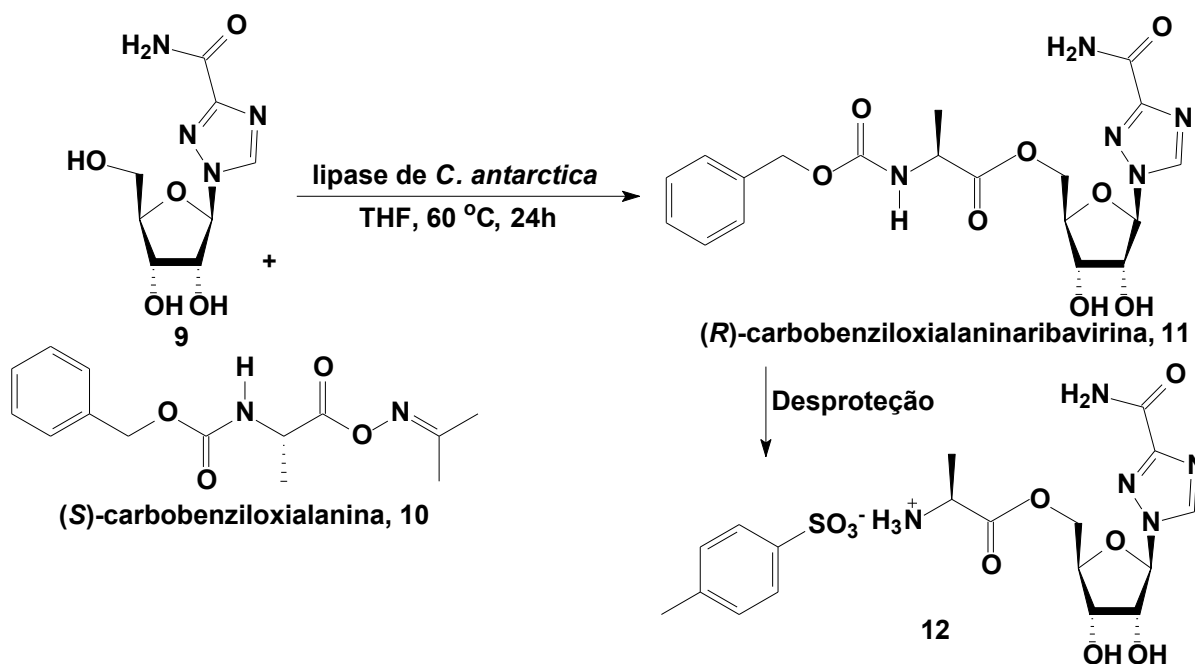
uma enzima pura isolada de fungo cita-se a conversão do fenilpropanóide isossafrol (7) a piperonal (8) pelas peroxidases de *Paecilomyces* sp.³⁵ (**Esquema 1.1**). Como consequência, catalisadores biomiméticos foram sintetizados e usados também nesta transformação, de modo a permitir alternativas industriais à ozonólise.



Esquema 1.1 – Produção do piperonal por biotransformação empregando enzima peroxidase extraída do fungo *Paecilomyces* sp.³⁵.

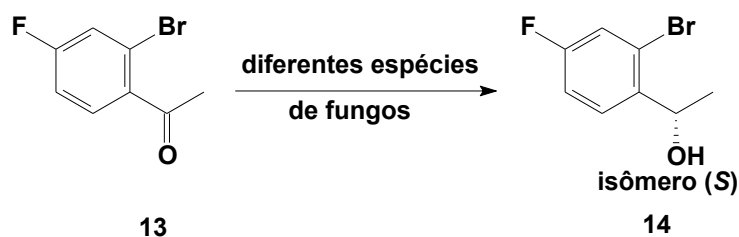
As biorreações apresentam vantagens em relação às reações químicas em que se utilizam reagentes puramente químicos, como, por exemplo, serem ecologicamente mais seguras²⁶ e apresentarem quimio-, regio- e estereosseletividade fornecendo produtos quirais a partir de misturas racêmicas, em posições totalmente inacessíveis para reagentes comuns¹³.

Para ilustrar a regioseletividade de uma biotransformação, é mostrada, a seguir (**Esquema 1.2**, página 13), a acilação enzimática regioseletiva, empregando lipase de *Candida antarctica*, realizada na produção do éster alanina da ribavirina (12), um pró-fármaco desenvolvido com o objetivo de melhorar o perfil farmacocinético e diminuir os efeitos colaterais apresentados pela ribavirina (9), fármaco antiviral usado para tratamento da hepatite C. Nesta transformação, o isômero (*S*)-carbобензилoxilalanina (10) é convertido ao isômero (*R*)-carbобензилoxilalanina-ribavirina (11) pela enzima fúngica com rendimento quantitativo³⁶.



Esquema 1.2 – Acilação enzimática regioseletiva da ribavirina (9)³⁶.

O intermediário quiral (S)-1-(2-bromo-4-fluoro fenil)etanol (14), um importante intermediário na síntese de fármacos anti-Alzheimer, foi preparado por redução microbiana enantiosseletiva da 2-bromo-4-fluoro acetofenona (13). Microrganismos dos gêneros *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Sphingomonas* reduziram 13 em 14 com rendimento superior a 90% e excesso enantiomérico de 99% (Esquema 1.3)³⁶.



Esquema 1.3 – Exemplo de transformação microbiana enantiosseletiva³⁶.

Outras vantagens das biotransformações estão relacionadas à velocidade das reações, condições de realização dos ensaios e versatilidade que estas se apresentam como catalisadores³⁷. Geralmente, as reações catalisadas por enzimas microbianas são mais rápidas do que aquelas realizadas por catálise química, as condições de reação são brandas, isto é, acidez do meio é ajustado entre pH 5 e 8, os experimentos são desenvolvidos a temperaturas entre 20 e 40° C e solventes aquosos são utilizados frequentemente. Além disso, as enzimas apresentam a

capacidade de minimizar reações indesejáveis como decomposição, isomerização, racemização ou rearranjos inoportunos que interferem frequentemente nas metodologias químicas³⁷.

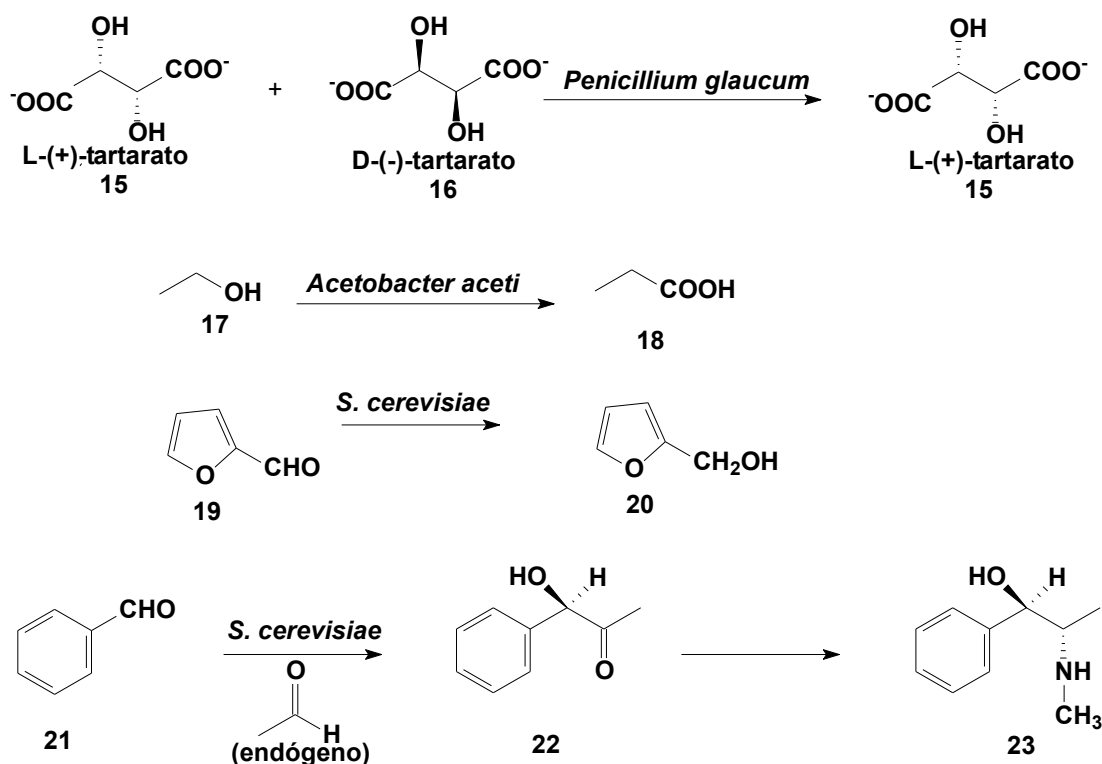
A principal desvantagem das reações microbianas é o rendimento, usualmente baixo. No entanto, os reagentes biológicos mostram-se muito versáteis e alterações na forma de cultivo (aeração, composição do meio, tempo e temperatura) ou no próprio reagente biológico (uso de outras espécies do gênero e de mutantes) podem levar a um aumento significativo do rendimento dos produtos¹³.

1.2.3 Histórico da utilização de biotransformações

As biotransformações têm sido utilizadas desde os tempos de Pasteur, que relatou, em 1858, o uso do fungo *Penicillium glaucum* para obter o *L*-tartarato de amônio (**15**) a partir do *DL*-tartarato de amônio através de “destruição” seletiva do *D*-enantiômero (**16**)¹³ e, posteriormente, a oxidação do álcool etílico (**17**) em ácido acético (**18**), usando uma cultura pura de *Acetobacter aceti*³⁸ (**Esquema 1.4**).

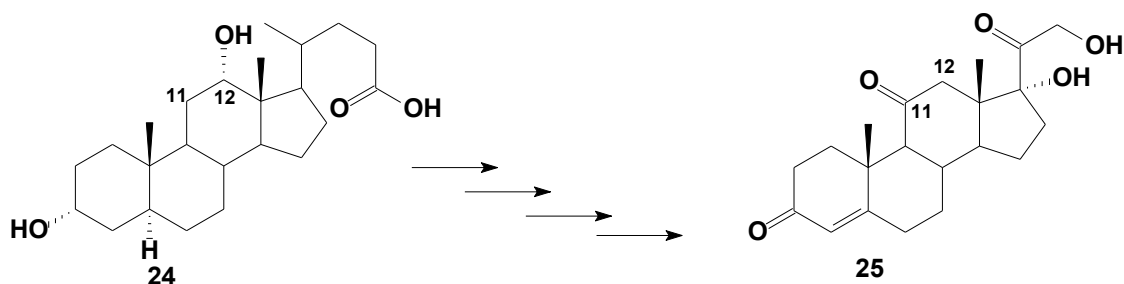
Do final do século XIX à primeira metade do século passado, observou-se o desenvolvimento de muitas biotransformações baseadas no emprego da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão). A ação redutora de *S. cerevisiae* foi observada pela primeira vez por Dumas, em 1874¹². Ele constatou que a adição de enxofre finamente pulverizado a uma suspensão fresca de fermento biológico em uma solução de açúcar desprendia sulfeto de hidrogênio. A redução de furfural (**19**) a álcool furfurílico (**20**) em condições anaeróbicas de fermentação na presença de *S. cerevisiae*^{39,40} (**Esquema 1.4**) foi demonstrada em 1898 por Windish¹³. Outras biotransformações empregando esta levedura surgiram de estudos direcionados à produção de acetona, glicerol e butanol durante a Primeira Guerra Mundial¹³.

O primeiro processo industrial combinando síntese microbiológica e química foi desenvolvido em 1921, em que o benzaldeído (**21**) foi adicionado a um meio contendo *S. cerevisiae*, originando o cetol intermediário (**22**) por condensação com acetaldeído endógeno. Este produto apresentou aplicação industrial na síntese comercial do alcalóide (-)-efedrina (**23**), em 1934¹³ (**Esquema 1.4**).



Esquema 1.4 – Aplicações históricas das biotransformações^{12,13}.

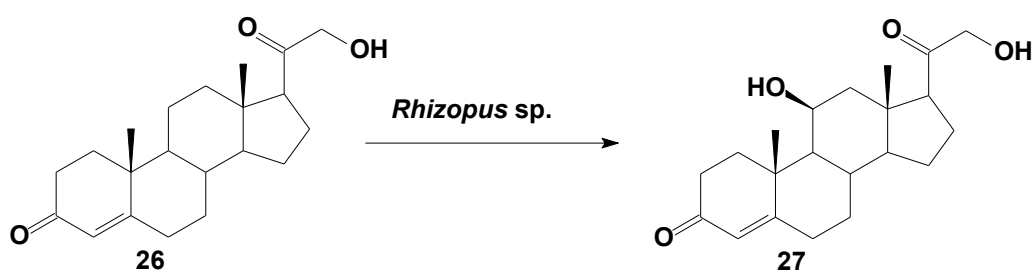
O progresso do uso de biotransformações foi relativamente lento até os anos 1950, quando o uso de microrganismos para modificar núcleos esteroidais foi estudado em laboratórios acadêmicos e industriais, despertando novamente o interesse na aplicação desses catalisadores biológicos em problemas da química orgânica sintética⁴¹. Em 1949, Hench e colaboradores anunciaram os efeitos antiinflamatórios notáveis da substância cortisona no tratamento da artrite reumatóide⁴². Inicialmente, a partir do ácido desoxicólico (**24**), a cortisona (**25**) foi produzida sinteticamente (**Esquema 1.5**) em uma rota que compreendia 31 etapas, tendo como etapa “crítica” a introdução de uma hidroxila na posição 11 do esqueleto esteroidal, o que tornara astronômico o preço do produto final¹⁹.



Esquema 1.5 - Conversão sintética do ácido desoxicólico (**24**) em cortisona (**25**) através de uma reação envolvendo várias etapas¹⁹.

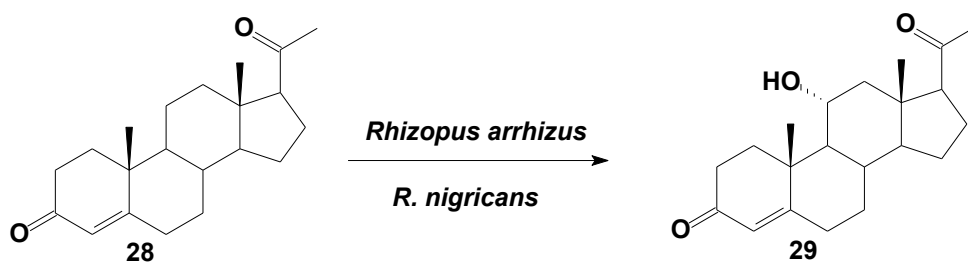
À medida que as aplicações terapêuticas da cortisona foram estendidas a outras doenças e relatos de sua impressionante eficácia foram sendo publicados, a demanda por esse medicamento cresceu e a busca por alternativas sintéticas tornou-se essencial.

Uma destas alternativas foi desenvolvida pelo grupo de Hench⁴². Eles conseguiram a funcionalização do C-11 do esqueleto esteroidal de maneira mais simples do que a proposta sintética inicial. A partir da desoxicorticosterona (**26**), realizaram-se a transformação microbiana da corticosterona (**27**), um derivado da cortisona, que exibia também ação antiinflamatória⁴² (**Esquema 1.6**). Este processo foi utilizado pelas indústrias farmacêuticas Merck (1949) e a Schering (1951)³².



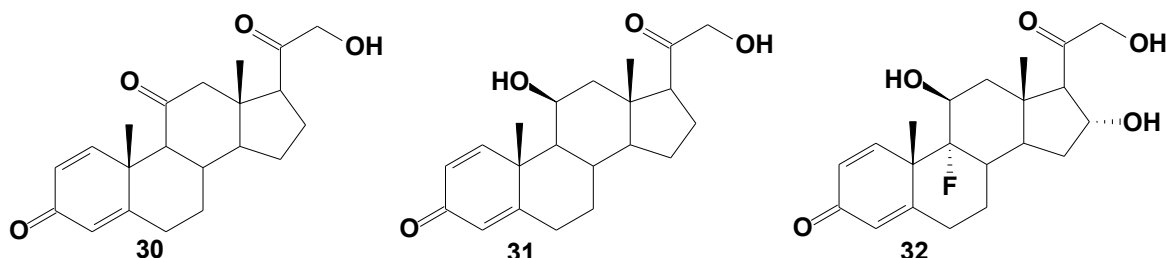
Esquema 1.6 – Transformação microbiana da desoxicorticosterona (**26**) em corticosterona (**27**)⁴².

Um outro grande avanço nesta busca por alternativas à síntese química de esteróides ocorreu em 1952, quando se conseguiu funcionalizar o C-11 do esqueleto esteroidal da progesterona (**28**) a partir da sua conversão a 11 α -progesterona (**29**) pelo fungo *Rhizopus arrhizus*^{19,32} (**Esquema 1.7**). Posteriormente, este fungo foi substituído por *R. nigricans* o que elevou o rendimento da hidroxilação microbiana. A inversão da configuração 11 α para 11 β , essencial para uma atividade ótima da progesterona, é realizado facilmente por meios químicos¹⁹.



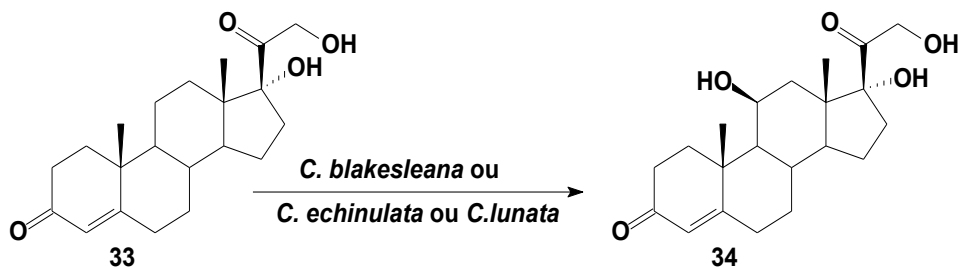
Esquema 1.7 – Bioconversão da progesterona (**28**) em 11 α -progesterona (**29**)^{19,32}.

Esta reação simplificou a síntese de hormônios adrenocorticóides como a cortisona e corticosterona, sendo decisiva para sua obtenção de forma economicamente viável^{19,31,32}, fornecendo interessantes possibilidades na preparação de derivados bioativos³¹ como a prednisona (**30**), prednisolona (**31**) e a triancinolona (**32**).



Atualmente, várias posições não funcionalizadas do núcleo esteroidal podem ser hidroxiladas, estereoespecificamente, pelo uso de diferentes microrganismos^{31,34} a partir de enzimas denominadas oxigenases, que catalisam a incorporação direta de oxigênio molecular em uma molécula orgânica^{19,32}. Cerca de 200 processos que empregam a metodologia de hidroxilação esteroidal pela via microbiana estão em uso pela indústria químico-farmacêutica⁴³.

Conversões de derivados glicocorticosteróides como a da cortexolona (**33**) a hidrocortisol (**34**) (**Esquema 1.8**) são realizadas atualmente empregando diferentes espécies de fungos (*Curvularia lunata*, *Cunninghamella blakesleana* e *C. echinulata*) para introduzir diretamente o grupamento hidroxila na posição 11- β do esqueleto esteroidal³¹.



Esquema 1.8 – Bioconversão por diferentes espécies de fungos da cortexolona (**33**) em hidrocortisol (**34**)³¹.

Segundo Straathof *et al.* (2002)⁴³, os processos de biotransformação em nível industrial têm apresentado um grande avanço no decorrer dos anos, tendo dado um grande salto em número de processos utilizados, como apresentado na **Figura 1.6**.

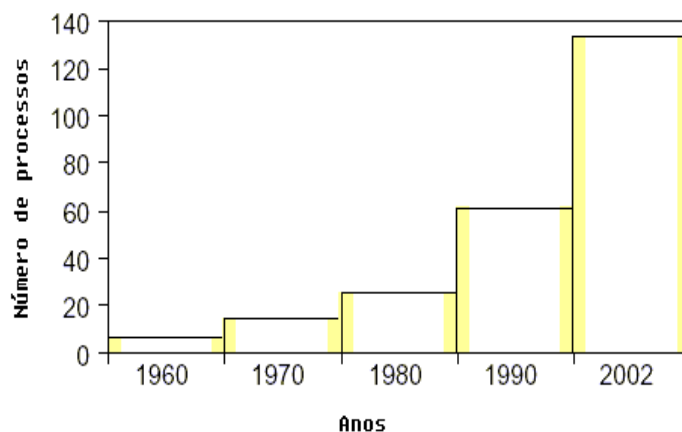


Figura 1.6 - Número de processos de biotransformação utilizados no setor industrial nos últimos anos⁴³.

O setor industrial que mais utilizou processos de biotransformação foi o farmacêutico⁴³ (**Figura 1.7**).

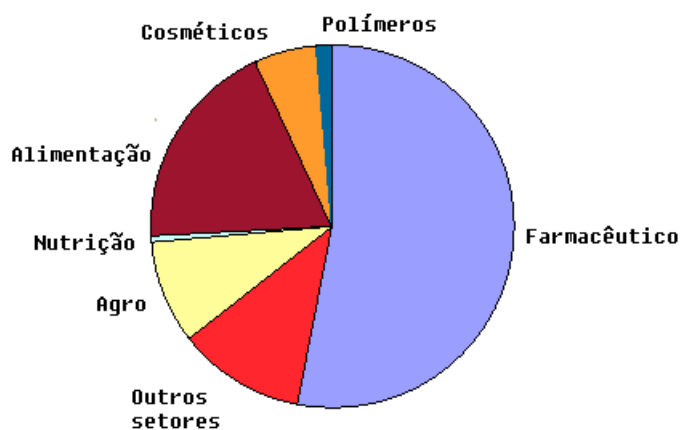
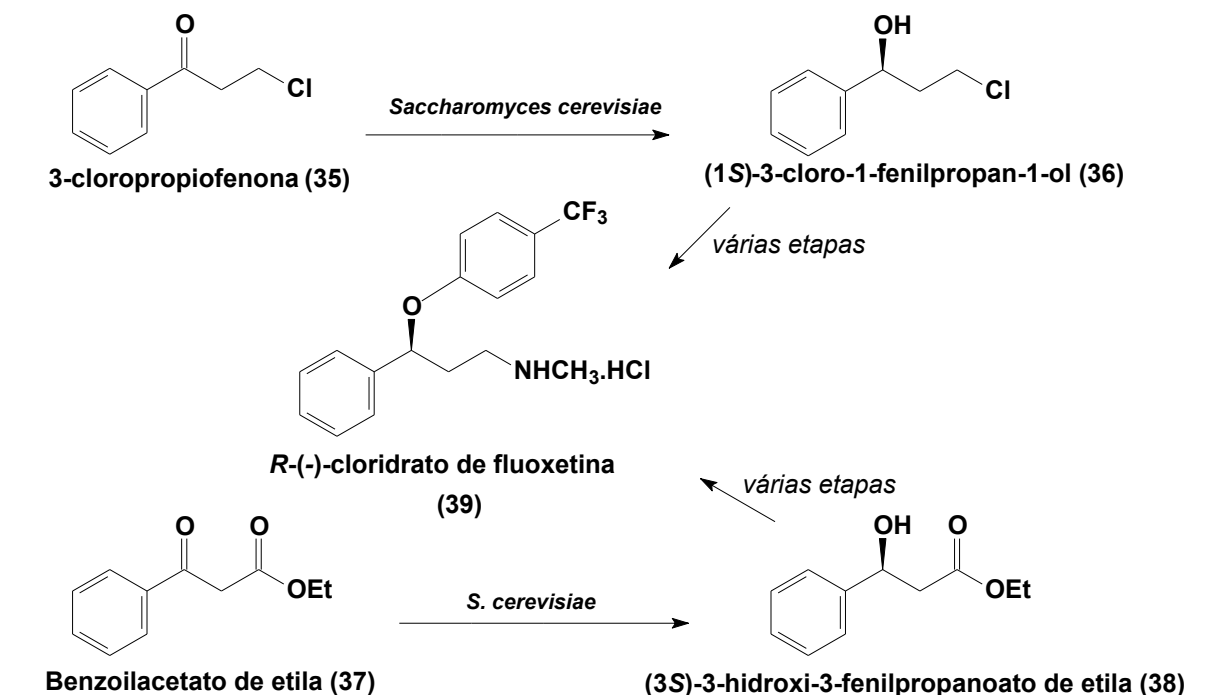


Figura 1.7 - Utilização de biotransformações pelos diferentes setores industriais⁴⁴.

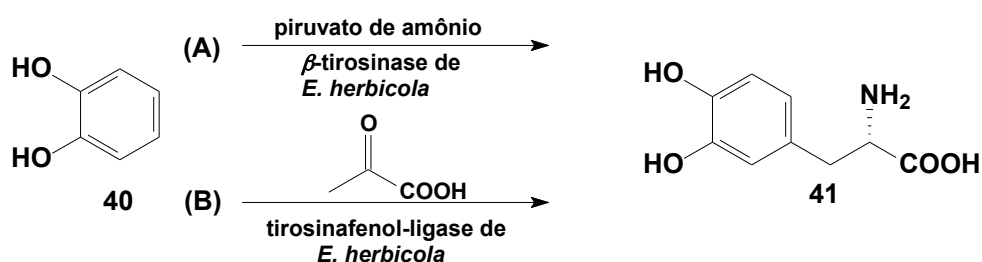
Um exemplo do emprego desta metodologia na produção industrial de fármacos advém do uso da levedura *S. cerevisiae*. A levedura *S. cerevisiae* continua sendo utilizada como o mais popular biocatalisador, destacando-se sua alta enantioespecificidade, rendimentos químicos satisfatórios, a ampla disponibilidade e a não necessidade de adição de co-fatores dispendiosos. Dentre as reações em que se usa essa levedura destacam-se as reduções e condensações para a produção de sítios quirais usados na síntese de fármacos em indústrias farmacêuticas⁴⁴. Para ilustrar, pode-se citar a síntese do cloridrato de fluoxetina, princípio ativo do medicamento antidepressivo Prozac[®]. A droga pode ser sintetizada empregando-se dois procedimentos (**Esquema 1.9**): a partir da 3-cloropropiofenona (**35**) ou do benzoilacetato de etila (**37**), seguindo uma etapa inicial de bioconversão catalisada

pela levedura *S. cerevisiae*⁴⁴ e gerando os respectivos intermediários (1S)-3-cloro-1-fenilpropan-1-ol (**36**) ou (3S)-3-hidroxi-3-fenilpropanoato de etila (**38**), que sofrem várias conversões até resultarem no *R*-(-)-cloridrato de fluoxetina (**39**).



Esquema 1.9 - Procedimentos empregados industrialmente na síntese da fluoxetina (**39**) - primeira etapa envolve biotransformação catalisada por *S. cerevisiae*⁴⁴.

A síntese da *L*-DOPA (**41**), substância com atividade contra a Síndrome de Parkinson, produzido no Japão⁴⁵, representa outro exemplo da utilização de biotransformação para a obtenção de fármacos. Em um de seus processos de obtenção, reage-se, em um fermentador, o catecol (**40**) com piruvato de amônio na presença da enzima β -tirosinase do fungo *Erwinia herbicola*. Em outro processo emprega-se, como catalisador, a tirosinafenol-ligase de *E. herbicola*³⁶ (**Esquema 1.10**), enzima capaz de formar ligações C-N. Mais de 125 toneladas de *L*-DOPA são produzidas por ano usando processos de biotransformações microbianas³⁶.



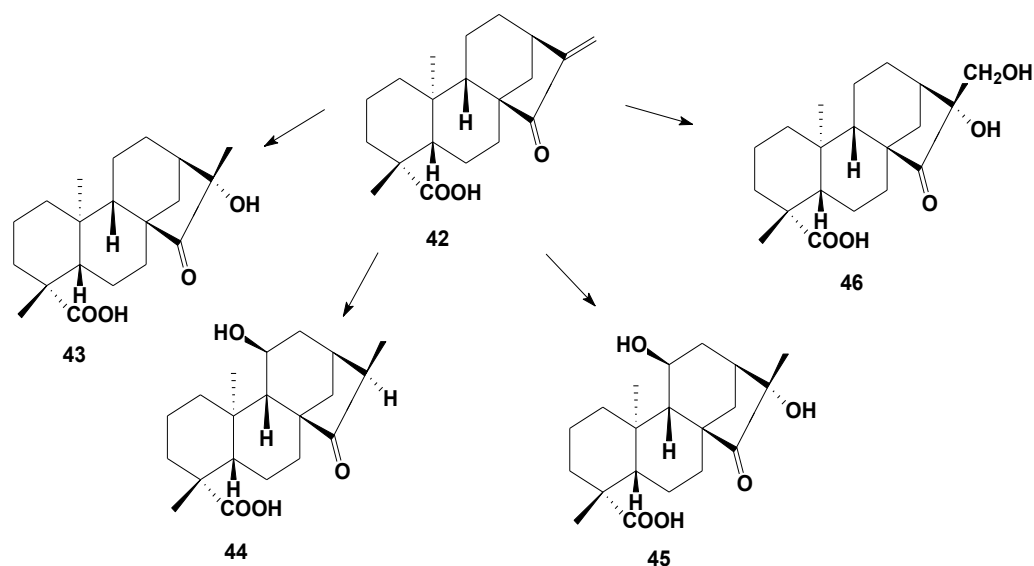
Esquema 1.10 – Processos industriais na síntese da *L*-DOPA (**41**) catalisada por enzimas fúngicas³⁶.

1.2.4 O emprego de diterpenos caurânicos em biotransformações

Os diterpenos caurânicos, como o ácido caurenóico (**1**) e seus derivados, são excelentes substratos para os processos de biotransformação⁴⁶⁻⁵⁶. Os exemplos mostrados a seguir comprovam que a utilização de cauranos em conversões microbiológicas é de extrema importância para a obtenção de novas substâncias com atividade biológica.

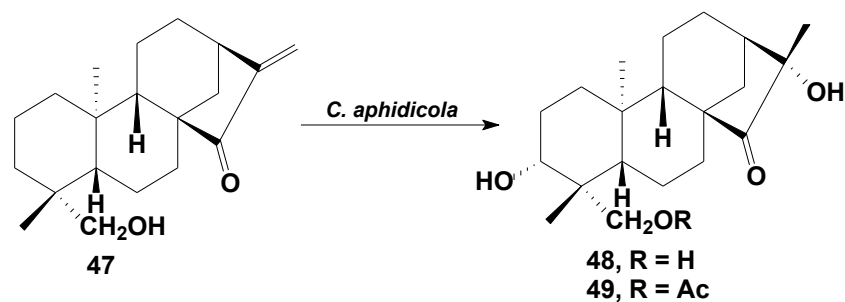
A espécie fúngica *Cephalosporium aphidicola*^{46,47,48} é um eficiente promotor de hidroxilações nos esqueletos de substâncias orgânicas de diferentes classes, sendo amplamente empregada em transformações microbianas de cauranos.

Em muitos casos, este fungo promoveu a hidroxilação na posição 16 do esqueleto caurânico, como observado na biotransformação do ácido *ent*-15-oxocaur-16-en-19-óico (**42**) que originou os ácidos *ent*-16 β -hidroxi-15-oxocauran-19-óico (**43**) (6,06% de bioconversão), *ent*-11 α -hidroxi-15-oxocauran-19-óico (**44**) (3% de bioconversão), *ent*-11 α ,16 β -dihidroxi-15-oxocauran-19-óico (**45**), *ent*-16 β ,17-dihidroxi-15-oxocauran-19-óico (**46**) (8,13% de bioconversão) (**Esquema 1.11**)⁴⁶.



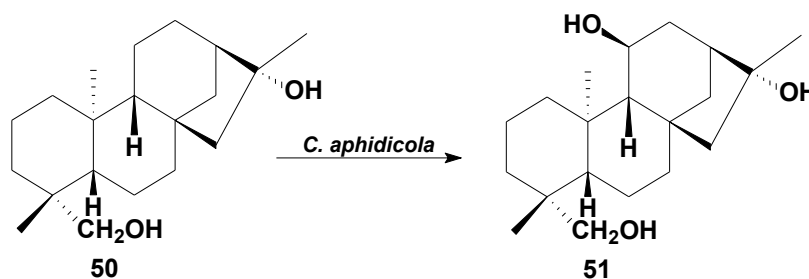
Esquema 1.11 – Biotransformação do ácido *ent*-15-oxocaur-16-en-19-óico (**42**) por *C. aphidicola*⁴⁶.

Boaventura e colaboradores, em 1994, incubaram o substrato *ent*-19-hidroxi-caur-16-en-15-ona (**47**) com o fungo *C. aphidicola* e obtiveram a *ent*-3 β ,16 β ,19-trihidroxi-cauran-15-ona (**48**), como produto majoritário, e a *ent*-19-acetoxi-3 β ,16 β -dihidroxi-cauran-15-ona (**49**) (**Esquema 1.12**), como produto minoritário, com 20,3 e 3,6% de bioconversão, respectivamente⁴⁷.



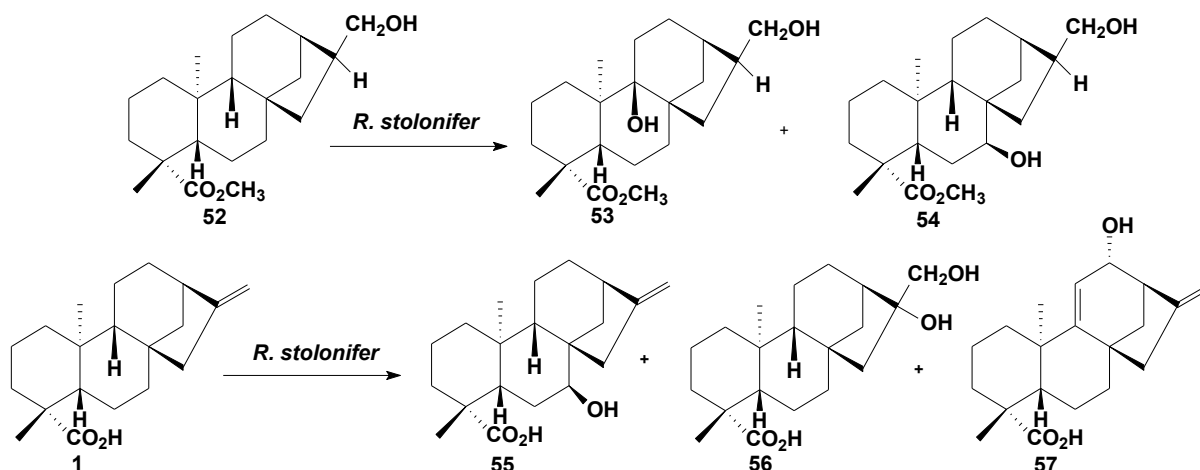
Esquema 1.12 – Biotransformação de *ent*-19-hidroxi-caur-16-en-15-ona (**47**) por *C. aphidicola*⁴⁷.

O derivado *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**) já foi convertido também por *C. aphidicola* no derivado *ent*-11 α ,16 β ,19-trihidroxi-caurano (**51**) (9,5 % de bioconversão) (**Esquema 1.13**)⁴⁸.



Esquema 1.13 – Bioconversão de *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**) no triol (**51**) por *C. aphidicola*⁴⁸.

Outros fungos são também bons promotores de modificações em esqueletos caurânicos⁴⁹⁻⁵². *Rhizopus stolonifer* promoveu a conversão do substrato *ent*-17-hidroxi-cauran-19-oato de metila (**52**) em *ent*-9 α ,17-dihidroxi-cauran-19-oato de metila (**53**) e em *ent*-7 α ,17-dihidroxi-cauran-19-oato de metila (**54**)⁴⁹. Além disto, realizou a transformação do ácido caurenóico (**1**) em três produtos principais: os produtos de mono e dihidroxilação, ácidos *ent*-7 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**55**) e *ent*-16 β -17-dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**56**) e o produto de hidroxilação e desidrogenação *ent*-12 β -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**57**)⁵⁰ (**Esquema 1.14**, página 22).

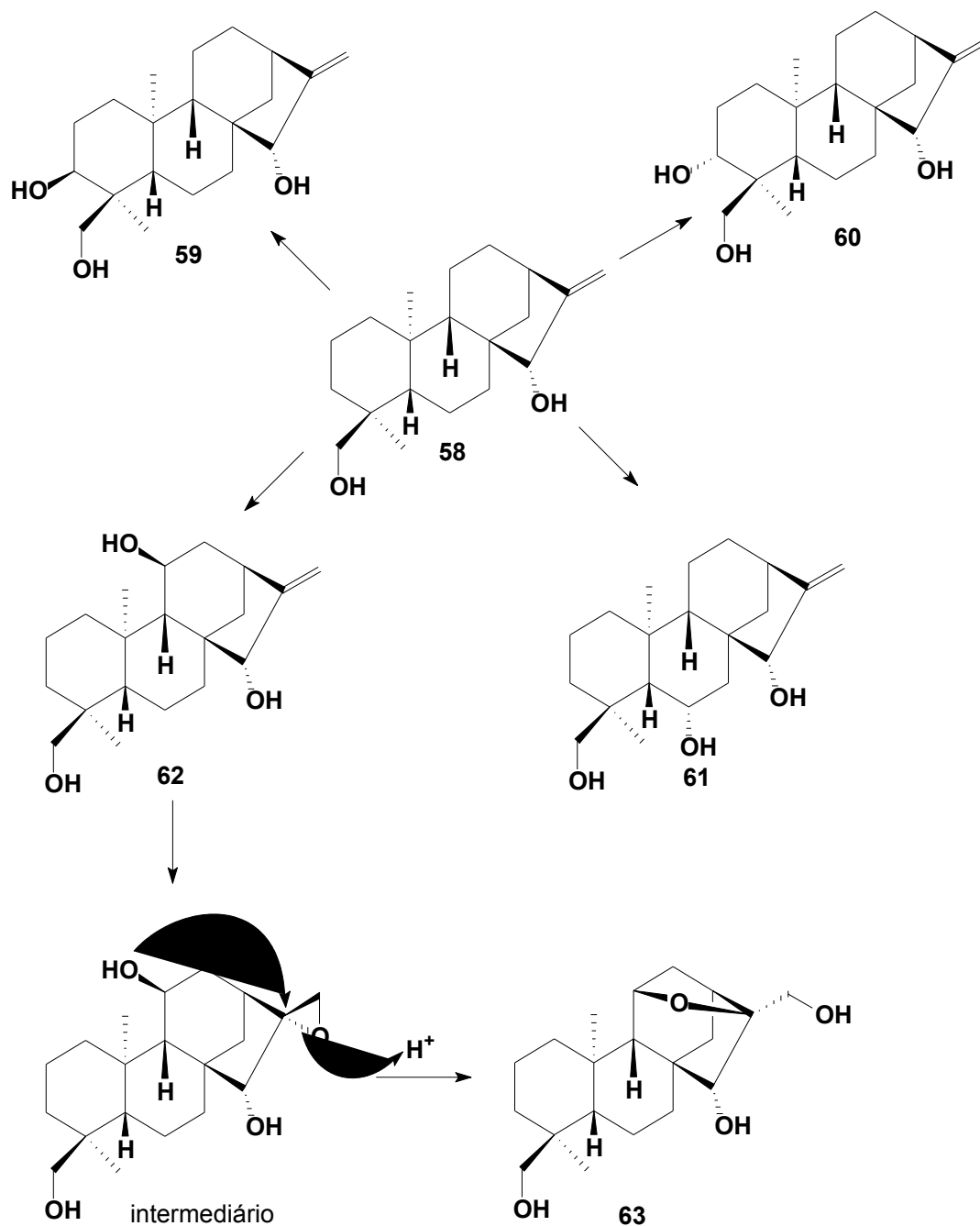


Esquema 1.14 – Conversões de cauranos por *R. stolonifer*⁴⁹⁻⁵⁰.

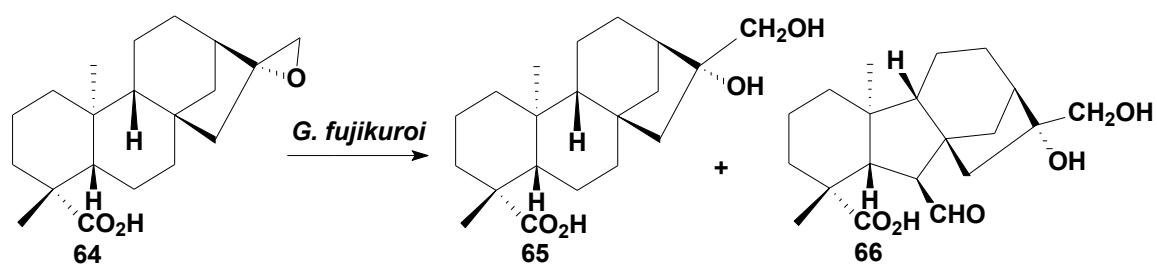
O fungo *Mucor plumbeus* apresenta alta especificidade por esqueletos de diterpênicos^{51,52}. A transformação microbiológica do candidiol, *ent*-15 β ,18-dihidroxi-caur-16-eno (**58**), por *Mucor plumbeus* (**Esquema 1.15**, página 23) originou vários produtos, dentre eles *ent*-3 α ,15 β ,18-trihidroxi-caur-16-eno (**59**), *ent*-3 β ,15 β ,18-trihidroxi-caur-16-eno (**60**), *ent*-6 β ,15 β ,18-trihidroxi-caur-16-eno (**61**), *ent*-11 α ,15 β ,18-trihidroxi-caur-16-eno (**62**), *ent*-15 β ,17,18-trihidroxi-11 α ,16 α -epoxi-caurano (**63**)⁵¹. Fraga *et al.* propuseram que **63** possa ter sido formado a partir de **62**, passando por um intermediário oxirano. A abertura deste anel e neutralização do carbocátion formado em C-16 por ataque do grupo 11 β -hidroxi, levaria ao produto **63**⁵¹.

A utilização do fungo *Gibberella fujikuroi* em biotransformações de derivados caurânicos têm sido amplamente relatada. Alguns exemplos são mostrados a seguir.

O fungo *G. fujikuroi* promoveu a transformação do ácido *ent*-16 β ,17-epoxi-cauran-19-óico (**64**) em ácido *ent*-16 β ,17-dihidroxi-cauran-19-óico (**65**) e ácido *ent*-16 β ,17-dihidroxi-7 α -formil-giberelan-19-óico (**66**) (**Esquema 1.16**, página 23)¹⁹.

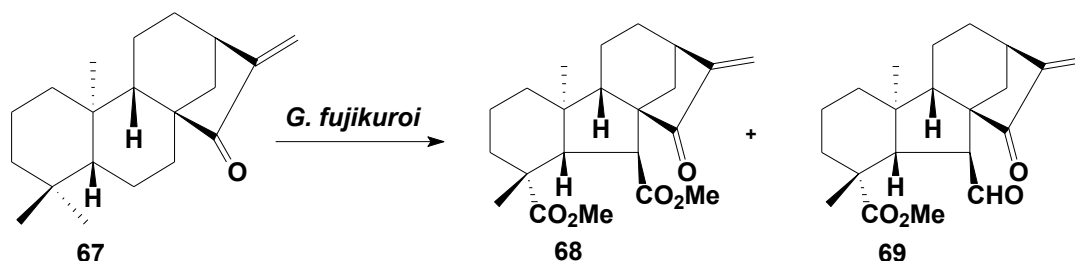


Esquema 1.15 – Produtos da biotransformação do candiol (**58**) por *Mucor plumbeus*⁵¹.



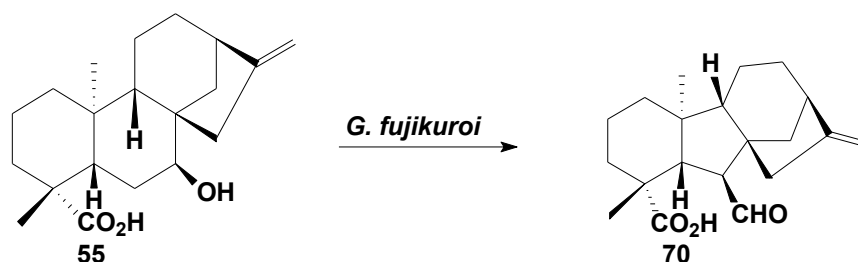
Esquema 1.16 – Conversão do diterpene caurônico **64** em derivado hidroxilado (**65**) e giberelina (**66**) por *G. fujikuroi*¹⁹.

Giberelinas naturais com um grupo oxo em C-15 foram produzidas por métodos microbiológicos empregando *G. fujikuroi* e derivados de *ent*-caur-15-oxo-16-eno (**67**) como material de partida⁵³ (**Esquema 1.17**), sendo obtidas, dentre outros produtos, as giberelinas *ent*-giban-16 α ,17-dihidro-15-oxo-7 α ,19-dioato de metila (**68**) e *ent*-giban-16 α ,17-dihidro-15-oxo-7 α -formil-19-oato de metila (**69**), respectivamente.



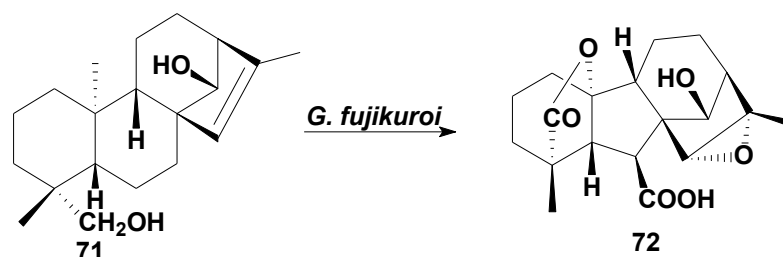
Esquema 1.17 – Produção de 15-oxo-giberelinas a partir do diterpeno caurânico (**67**) por *G. fujikuroi*⁵³.

A conversão do ácido *ent*-7 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**55**) por *G. fujikuroi* levou à contração do anel B do esqueleto caurânico, fornecendo o ácido *ent*-giban-7 α -formil-16-en-19-óico (**70**) (**Esquema 1.18**).



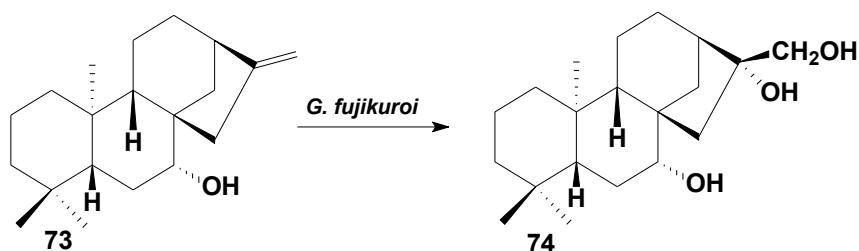
Esquema 1.18 – Biotransformação do ácido *ent*-7 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**55**) em *ent*-giban-7 α -formil-16-en-19-óico (**70**) por *G. fujikuroi*⁵⁴.

Fraga e colaboradores⁵⁵ relataram a transformação microbiana do *ent*-14 α ,19-dihidroxi-caur-15-eno (**71**) por *G. fujikuroi* (**Esquema 1.19**) levando à obtenção da giberelina *ent*-14 α -hidroxi-15 β ,16 β -epoxi-GA₁₅ (**72**).



Esquema 1.19 - Biotransformação do *ent*-14 α ,19-dihidroxi-caur-15-eno (**71**) por *G. fujikuroi*⁵⁵.

A conversão de *ent-7 β -hidroxi-caur-16-eno* (*epi-candol A*, **73**) por *G. fujikuroi* levou a diferentes produtos, dentre eles *ent-7 β ,16 β ,17-trihidroxi-caurano* (**74**) (**Esquema 1.20**)⁵⁶. Acredita-se que a hidroxilação na posição 7 do substrato tenha inibido a formação de giberelinas⁵⁶.



Esquema 1.20 - Biotransformação do *ent-7 β -hidroxi-caur-16-eno* (**73**) por *G. fujikuroi*⁵⁶.

1.3 Alelopatia

Certas substâncias produzidas por plantas podem interagir com outras espécies vegetais, quando liberadas no meio ambiente⁵⁷. Estas interações, diversas e complexas, fornecem muitas vantagens adaptativas às plantas que liberam esses metabólitos e, por outro lado, afetam benéfica ou maleficamente, as outras espécies de plantas^{58,59} e são denominadas de alelopatia⁶⁰.

Os mecanismos de defesa inata das plantas são conhecidos há mais de 2000 anos. Em 300 a.C., Theophrastus, um botânico grego, foi, provavelmente, o primeiro a reconhecer as propriedades alelopáticas de plantas ao observar e registrar que espécimes de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) exauriam o solo e destruíam plantas daninhas⁶¹. O naturalista romano Plinius Secundo publicou, em 79 d.C., *Naturalis Historia*, descrevendo os efeitos inibitórios da noqueira (*Juglans nigra* e *J. regia*) no crescimento de plantas cultivadas em sua proximidade, devido aos agentes tóxicos de suas folhas^{61,62}.

Hans Molisch criou, em 1937, o termo alelopatia, uma palavra originada do latim *allelon* que significa “de um para o outro” e *pathos*, significando “prejuízo”⁶², e o utilizou para descrever todas as interações bioquímicas benéficas ou prejudiciais entre plantas e microrganismos⁶³. Rice⁶⁰ ampliou o conceito, definindo-a como “qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico, que uma planta exerce sobre outra ou que microrganismos exercem sobre uma planta, mediante produção de compostos químicos (aleloquímicos) liberados ao ambiente”.

A definição de alelopatia aceita atualmente pela Sociedade Internacional de Alelopatia (IAS, 1996) é “qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias ou fungos que influenciam o crescimento e o desenvolvimento de sistemas biológicos”⁶⁴.

Os aleloquímicos podem ser encontrados em concentrações variadas durante o ciclo de vida da planta e em diferentes partes como folhas, caule, raízes ou frutos. As formas de liberação para o ambiente variam e incluem volatilização pelas folhas, se forem aleloquímicos mais voláteis como os componentes de óleos essenciais, como os mono e sesquiterpenóides. A água das chuvas e o orvalho provocam a lixiviação de aleloquímicos como derivados benzóicos e cinâmicos das folhas da planta emissora. Outras substâncias alelopáticas, como quinonas, flavonóides e taninos, podem entrar em contato com o solo a partir da exsudação das raízes e rizomas ou partes das plantas que caem ao solo e que estão em processo de decomposição^{65,66,67}.

No solo estes aleloquímicos podem ser adsorvidos, ficando retidos, metabolizados por reações químicas e enzimáticas durante seu movimento no solo ou serem adsorvidos pela planta receptora, o que pode afetar o seu desenvolvimento. A concentração de aleloquímicos na água do solo é um fator determinante para sua atividade na planta receptora. Esta concentração é afetada por diversos fatores como a temperatura, o regime de chuvas, o pH e a composição do solo, o estágio de crescimento e fatores relacionados à fisiologia e bioquímica vegetal⁶⁶.

Vários tipos de substâncias orgânicas pertencentes a diversas classes de metabólitos secundários⁵⁷⁻⁷³, dentre elas terpenóides, ácidos graxos, alcalóides, ácidos fenólicos simples, flavonóides, derivados de quinonas e taninos foram identificados como aleloquímicos produzidos por plantas superiores ou microrganismos. Algumas destas substâncias são apresentadas na **Figura 1.8**⁵⁹⁻⁷³ (página 27).

A eficiência da agroindústria mundial depende do controle de uma variedade de doenças e pestes, em especial as plantas daninhas, aquelas que crescem descontroladamente e em locais não desejados, competindo com as culturas de interesse por nutrientes, diminuindo seu rendimento e as contaminando com sementes, o que perpetua o problema para novas estações⁶⁵. O uso de pesticidas e herbicidas sintéticos na agricultura é intenso, provocando impacto ao meio ambiente e aumentando os gastos com o cultivo, o que se reflete no valor final dos produtos

agroindustriais. Por outro lado, herbicidas naturais são considerados menos agressivos ao ambiente por possuírem meia-vida mais curta e por serem, pelo menos parcialmente, solúveis em água, exibindo atividade mesmo em baixas concentrações. Além disso, os aleloquímicos naturais operam por mecanismos de ação diferentes daqueles dos herbicidas sintéticos comerciais⁶⁴.

Desta maneira, grandes esforços têm sido realizados para diminuir o uso de agentes herbicidas sintéticos, reduzindo o impacto ambiental e a quantidade de resíduos de pesticidas nos alimentos⁶² e estimular a busca por novas substâncias bioativas naturais com potencial aplicação industrial como aleloquímicos⁶⁵.

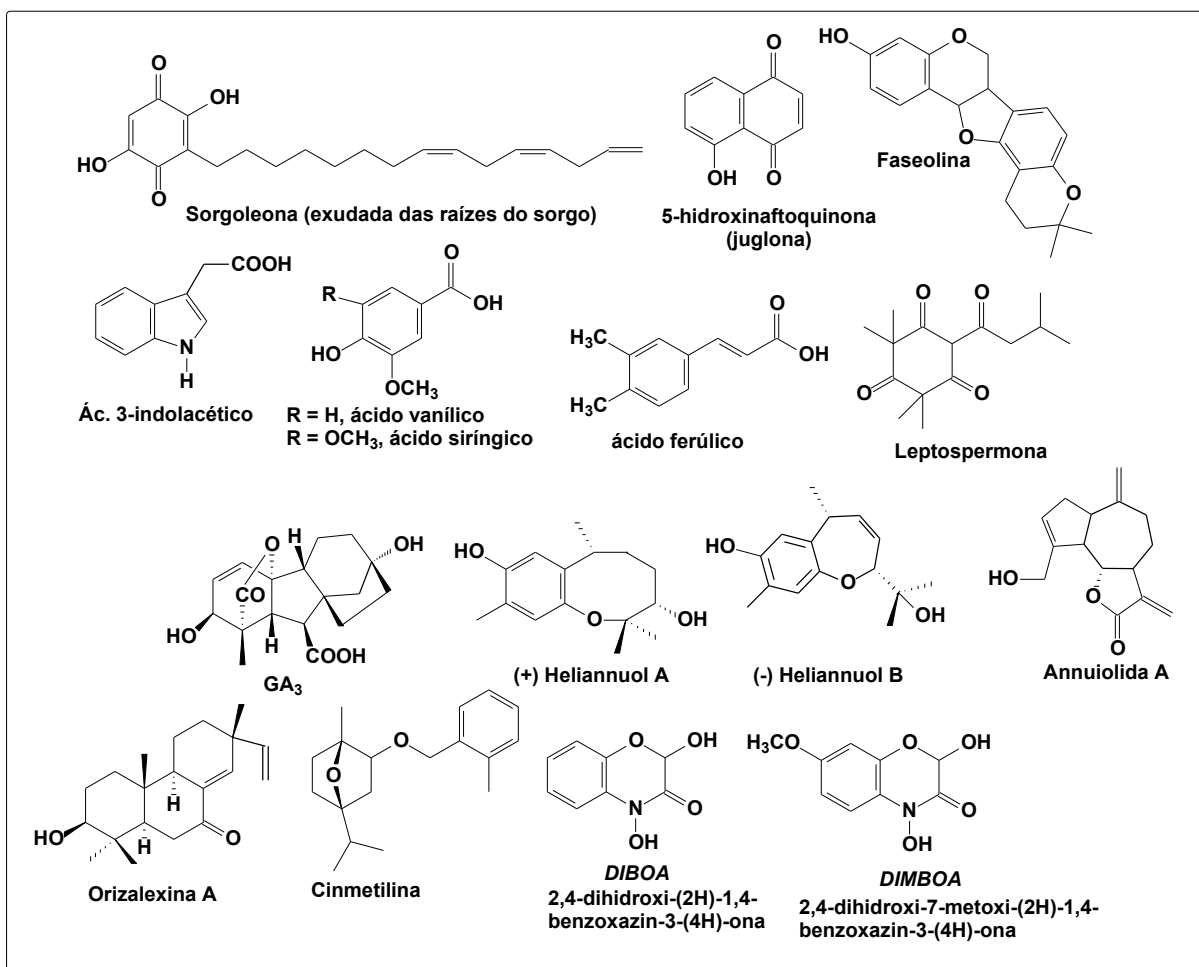


Figura 1.8 – Alguns aleloquímicos pertencentes a diferentes classes de produtos naturais⁵⁷⁻⁷³.

1.3.1 Determinação das potencialidades alelopáticas

Há inúmeros fatores a serem analisados para se estabelecer o fenômeno da alelopatia^{65,70}. Os ensaios biológicos empregados para avaliação do efeito alelopático são germinação de sementes e estudos do crescimento de plântulas⁶⁴. A

taxa de germinação e o crescimento das plântulas são monitorados frente a um controle⁶⁴.

A germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula, porém a sua quantificação é muito mais simples, pois pode-se avaliar a ocorrência ou não de germinação para cada semente. A metodologia dos testes de germinação é simples, no entanto há uma série de cuidados a serem tomados para que se obtenham respostas reprodutíveis, por exemplo, os controles precisos da temperatura, da concentração do substrato e da umidade do ambiente influenciam a germinação das sementes⁷¹.

O crescimento das plântulas é muito mais sensível aos aleloquímicos que a germinação, induzindo o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns⁷¹. Assim, a utilização deste parâmetro para determinação do potencial alelopático é muito importante, avaliando-se se crescimentos anormais são originados pela ação dos aleloquímicos nas plântulas. Para avaliar a emergência da plântula e seu crescimento realiza-se, por exemplo, a medida do comprimento e a determinação da massa seca de raiz e da parte aérea (geralmente do caule)⁷².

Uma das considerações mais importantes no desenvolvimento do ensaio é a escolha da espécie alvo⁶⁴. As sementes empregadas no teste devem ser de boa qualidade e provenientes de espécies encontradas facilmente, bastante sensíveis a vários aleloquímicos⁷³ e devem exibir altas taxas de germinação⁷⁴ como *Solanum lycopersicum* (tomate), *Raphanus sativus* (rabanete), *Allium cepa* (cebola) e *Lactuca sativa* (alface)⁷⁵.

1.3.2 Exemplos de estudos de determinação de potencial alelopático

Os extratos de plantas com propriedades alelopáticas afetam outras plantas a partir da inibição ou da promoção da germinação de sementes e da inibição ou estimulação dos crescimento de plantículas^{70,71,73}.

Quando o efeito alelopático de um extrato for a inibição da germinação das sementes e do desenvolvimento das plantículas, este extrato pode ser empregado potencialmente no controle de plantas invasoras e este uso assume maior importância a medida em que aumentam as limitações econômicas e ecológicas ao uso de herbicidas disponíveis comercialmente⁷³.

Por outro lado, a estimulação da germinação de sementes e do crescimento de outras plantas por um extrato vegetal ou microbiano é interessante para aplicação

na preservação de espécies ameaçadas de extinção e para acelerar a germinação de sementes de espécies comercialmente valiosas, como por exemplo, as orquídeas.

Estudos envolvendo o efeito alelopático inibitório ou estimulante de extratos de espécies vegetais ou substâncias isoladas de plantas têm sido descritos na literatura⁷⁰⁻⁷⁵.

Carvalho & Fontanétti⁷⁶ verificaram efeitos inibidores significativos da germinação de sementes de alface⁷¹ pelas espécies de leguminosas *Canavalia ensiformes* (feijão-de-porco) e *Stilozobium aterrimum* (mucuna-preta) que são empregadas na preparação de adubos verdes.

Extratos aquosos dos frutos e folhas de *Mimosa bimucronata* (maricá) foram testados quanto aos possíveis efeitos alelopáticos na germinação das sementes e crescimento das radículas de alface, arroz, cenoura, chicória, couve, pepino, repolho e tomate. Os extratos dos frutos verdes e maduros não inibiram a germinação; porém os primeiros inibiram o crescimento da radícula. Os extratos das folhas secas inibiram a germinação de alface, cenoura, chicória e tomate e também o crescimento das radículas nas oito espécies testadas⁷⁷.

O efeito hormonal do ácido giberélico (GA₃, **3**) sobre frutos imaturos de soja foi avaliado por Nascimento e colaboradores⁷⁸. Primeiramente, os frutos imaturos de soja foram cultivados em meios com diferentes concentrações de um inibidor da biossíntese de giberelinas (paclobutrazol, PBZ) observando-se inibição no crescimento dos frutos de até 80%. Em seguida, estes frutos de soja cultivados com PBZ foram adicionados de GA₃ (**3**) e o crescimento foi restabelecido, evidenciando que **3** está envolvido, provavelmente, no crescimento de frutos imaturos de soja⁷⁸.

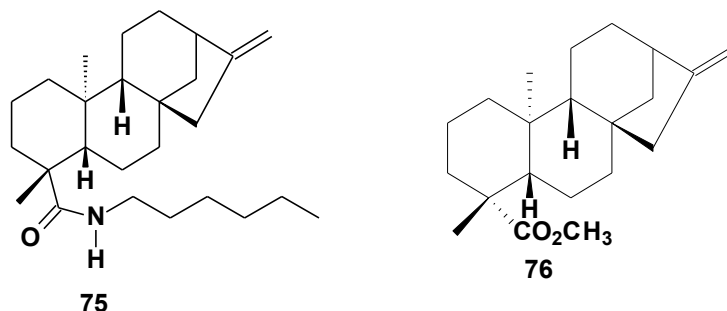
Testes sobre diferentes concentrações do extrato dos frutos verdes de *Solanum crinitum* permitiram verificar elevada atividade do extrato sobre a germinação e o desenvolvimento das plântulas de alface (*L. sativa*)⁷⁹.

Monoamidas, como a **75**, derivadas dos ácidos caurenóico e grandiflorênico isolados de *Wedelia paludosa*, foram testadas frente à germinação e crescimento de plantículas de *L. sativa* (alface) nas concentrações de 10⁻³, 10⁻⁵ e 10⁻⁷ mol/L. Observou-se efeito inibitório significativo no crescimento das raízes e caules das plantículas nas concentrações maiores⁵.

A espécie vegetal *Dodonaea viscosa* L., conhecida popularmente como vassoura-vermelha, dificulta o estabelecimento de outros vegetais sob suas copas. Assim, a investigação do potencial alelopático de seus extratos foi realizada,

utilizando alface como planta alvo. A inibição do desenvolvimento inicial das plântulas e a redução significativa no comprimento das radículas e caulículos de alface indicaram a existência de efeitos alelopáticos para esta espécie, que apresenta, em sua composição, taninos e saponinas, substâncias químicas possivelmente inibitórias da germinação e crescimento⁵⁸.

A atividade alelopática de representantes dos diterpenos caurânicos foi relatada. O ácido caurenóico (**1**), seu éster metílico (**76**) e o ácido grandiflorênico (**2**) estimularam o crescimento das raízes e caules de alface⁷⁵.



1.4 Objetivos

Isolar diterpenos caurânicos, principalmente os ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**), a partir da espécie *Wedelia paludosa*, preparar derivados destes (como, por exemplo, alcoóis, ésteres e norcetonas) e/ou empregar derivados caurânicos disponíveis no laboratório de bioensaios e biotecnologia (Departamento de Química/ UFMG) e submetê-los a reações utilizando fungos de espécies diferentes, objetivando a obtenção de derivados bioativos inéditos.

Testar os extratos e os produtos puros de biotransformação quanto à sua atividade alelopática, inicialmente sobre a germinação de sementes de *L. sativa* e, em trabalho posterior, sobre germinação e crescimento de outras espécies.

1.5 Referências bibliográficas

1. DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**. 2. ed., Chichester: John Wiley & Sons, 2002.
2. TOTTE, N.; CHARON, L.; ROHMER, M.; COMPERNOLLE, F. BABOEUF, I.; GEUNS, J. M. C. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an *ent*-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. **Tetrahedron Letters**, n. 41, pp. 6407-6410, 2000.
3. VIEIRA, H. S. **Transformações químicas de diterpenos com atividade biológica**. Belo Horizonte: UFMG, 2000. 331 p. TESE (Doutorado em Ciências – Química) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.
4. TAKAHASHI, J. A.; VIEIRA, H. S.; SILVA, E. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B.; CHIARI, E. Preparation and activity of diterpenoids against trypanostigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, pp. 118-120, 2002.
5. BOAVENTURA, M. A. D.; PEREIRA, R. G.; FREITAS, L. B. O.; REIS, L. A.; VIEIRA, H. S. Preparation and phytotoxicity of novel kaurane diterpene amides with potential use as herbicides. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, n. 9, pp. 2985–2988, 2008.
6. TORRENEGRA, R.; GOMEZ, D. L.; TELLEZ, A. N. Gibberelic activity of diterpenes derivatives of kaurenes isolated from *Espeletopsis santanderensis* Cuatr. **Actualidades Biológicas** v. 23, n. 75, 19-22, 2001.
7. 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, pp. 1930-1933, 2008.
8. 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, pp. 432-438, 2008.
9. WU, Y.-C.; HUNG, Y.-C.; CHANG, F.-R.; COSENTINO, M.; WANG, H.-K.; LEE, K.-H. Identification of *ent*-16 α ,17-dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, pp. 635-637, 1996.
10. 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, pp. 525-530, 2006.

11. HEDDEN, P. The oxidases of gibberelin biosynthesis: their function and mechanism. **Physiologia plantarum**, v. 101, pp. 709-719, 1997.
12. DUMAS, J. B.; **Annales of Chimie at de Physique**, v. 5, n. 3, 1874. In: RODRIGUES, J. A. R. & MORAN, P. J. S. Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão. **Química Nova**, v. 24, n. 6, São Paulo, 2001.
13. HANSON, J. R. **An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry**, W. H. Freeman/Spectrum and Co. Ltd, New York, 92 pp., 1995.
14. VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituents from aerial parts of *Wedelia paludosa*. **Fitoterapia**, v. 72, pp. 854-856, 2001.
15. CARVALHO, G. J. A. DE; CARVALHO, M. G. DE; FERREIRA, D. T., FARIA, T. DE J.; BRAZ-FILHO, R. Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de *Wedelia paludosa*. **Química Nova**, v. 24, n. 1, pp. 24-26, 2001.
16. 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.1, 2009.
17. RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 906p.
18. AZEVEDO, J. L. Fungos. Genética e melhoramento de fungos na biotecnologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio01/1hp-5.pdf>. Acessado em 17 de agosto de 2010.
19. TAKAHASHI, J. A. **Estudo fitoquímico de *Xylopiá frutescens* Aubl. e transformações microbianas de cauranos, afidicolanos e estemodanos**. Belo Horizonte: UFMG, 1994. 363 p. TESE (Doutorado em Ciências – Química) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.
20. BEATRIZ, A.; LIMA, D. P.; MARQUES, M. R. Biotransformações com microrganismos em Mato Grosso do Sul: Histórico e Perspectivas. **Revista Agora**. Campo Grande, v.1, n.4, 2005. Disponível em: www.fes.br/revistas/agora/ojs. Acessado em 15 de novembro de 2007.
21. LEITE, Z. T. C.; VAITSMAN, D. S.; DUTRA, P. B.; GUEDES, A. Leite e alguns de seus derivados – da antiguidade à atualidade. **Química Nova**, v. 29, n. 4, pp. 876-880, 2006.
22. LEGRAS, J.-L., MERDINOGLU, D.; CORNUET, J.-M. KARST, F. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. **Molecular Ecology**, v.16, n.10, pp. 2091-2102, 2007.
23. GARROTE G. L.; ABRAHAM A. G.; DE ANTONI G. L. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. **Journal of Food Protein**, v. 63, n. 3, pp. 364-369, 2000.

24. TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, 1807-1813, 2008.
25. BURITY, H. A.; LYRA, M. D. C. C. P. DE; SOUZA, E. S. DE; MERGULHÃO, A. C. DO E. S.; SILVA, M. L. R. B. DA. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.4, pp. 801-807, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2000000400018&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 17 de agosto de 2010.
26. BOAVENTURA, M. A. D.; LOPES, R. F. A. P.; TAKAHASHI, J. A. Microorganisms as tools in modern chemistry: the biotransformation of 3-indolylacetonitrile and tryptamine by fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, pp. 345-347, 2004.
27. NISHIMURA, K.; YAMAMOTO, M.; NAKAGOMI, T.; TAKIGUCHI, Y. NAGANUMA, T.; UZUKA, Y. Biodegradation of triazine herbicides on polyvinylalcohol gel plates by the soil yeast *Lipomyces starkeyi*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 58, pp. 848-852, 2002.
28. MARGESIN, R. Alpine Microorganisms: Useful Tools for Low-Temperature. **The Journal of Microbiology**, v. 45, n.4, pp. 281-285, 2007.
29. FARIA, M. R. DE; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil - Situação atual e perspectivas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 22, pp. 18-21, 2001. Disponível em: <http://www.novastecnologias.com.br/revista/bio22/fungos.pdf>. Acessado em: 17 de agosto de 2010.
30. CABRAL, G. B.; PIRES, M. V. V.; LACERDA, A. L.; CARNEIRO, V. T. C. Introdução *in vitro*, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp., **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Comunicado técnico 101, 1. ed., 2003.
31. BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; DURÁN-PATRÓN R.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoseletive biotransformation using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, pp. 385-397, 2009.
32. BASTOS, D. Z. L. **Biotransformações por fungos do ácido betulínico e derivados**. Curitiba: UFPR, 2005. TESE (Doutorado em Química Orgânica) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 2005.
33. FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**, 3 ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1997.
34. ALEU, J.; COLLADO, I. G. Biotransformations by *Botrytis species*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 13, pp. 77-93, 2001.
35. ANTUNES, O. A. C. Interfaces com a indústria. **Química Nova**, v. 28, suplemento, S64-S75, 2005.

36. PATEL, R. N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis – Review. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, pp. 659–701, 2008.
37. AZERAD, R. Application of biocatalysts in organic synthesis. **Bulletin de la Societe Chimique de France**, v.132, pp. 71-51. 1995.
38. RODRIGUES, J. A. R. & MORAN, P. J. S. Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão. **Química Nova**, v.24, n. 6, São Paulo, 2001.
39. WINDISCH, W.; **Chem. Centr.** v. 1, p. 1214, 1898, In: RODRIGUES, J. A. R. & MORAN, P. J. S. Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão. **Química Nova**, v. 24, n. 6, São Paulo, 2001.
40. LITNER, C. J.; VON LIEBIG, H. J. Z., **Physiology**, v. 72, p. 449, 1911. *In*: Reduções enantiosseletivas de cetonas utilizando-se fermento de pão. **Química Nova**, v.24, n. 6, São Paulo, 2001.
41. HOLLAND, H. L. **Organic Synthesis With Oxidative Enzymes**. Weinheim: VCH, 1992.
42. HARDMAN J. G., LIMBIRD L. E, GILMAN A. G. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw-Hill, 2001.
43. STRAATHOF, A. J. J., PANKE, S., SCHIMID, A. The Production of Fine Chemical by Biotransformation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, pp. 548-556, 2002.
44. PEREIRA, R. S. Projeto e construção de um bioreator para síntese orgânica assimétrica catalisada por *Saccharomyces cerevisiae* (fermento biológico de padaria). **Química Nova**, v. 20, n. 5, pp. 551-554, 1997.
45. SOUZA, G. G. DE. **Estudo da Incubação da Canforquinona e do Fujenal com Fungos como Modelo para Biotransformação de Terpenos**. Belo Horizonte: UFMG, 2008. 139 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.
46. OLIVEIRA, A. B.; HANSON, J. R.; TAKAHASHI, J. A. The biotransformation of *ent*-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid and its methyl ester by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 2, pp. 439-442, 1995.
47. BOAVENTURA, M. A. D.; HANSON, J. R.; HITCHCOCK P. B.; TAKAHASHI, J. A. The biotransformation of *ent*-19-hydroxykaur-16-en-15-one by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 2, pp. 387-389, 1994.
48. HANSON, J. R.; HITCHCOCK P. B.; TAKAHASHI, J. A. Biotransformation of *ent*-16 β -19-dihydroxykaurane by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 3, pp. 797-800, 1995.

49. VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Biotransformation of methyl *ent*-17-hydroxy-16 β -kauran-19-oate by *Rhizopus stolonifer*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, pp. 601-604, 2000.
50. SILVA, E. A.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B. The biotransformation of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. **Phytochemistry**, v. 52, pp. 397-400, 1999.
51. FRAGA, B. M.; ALFONSO, I. DE; GONZÁLEZ-VALLEJO, V.; GUILLERMO, R. Microbial transformation of two 15 α -hydroxy-*ent*-kaur-16-ene diterpenes by *Mucor plumbeus*. **Tetrahedron**, v. 66, pp. 227-234, 2010.
52. BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B.; HANSON, J. R.; HITCHCOCK P. B.; TAKAHASHI, J. A. The biotransformation of methyl *ent*-15-oxokaur-16-en-19-oate by *Rhizopus stolonifer* and *Mucor plumbeus*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, pp. 1667-1669, 1995.
53. FRAGA, B. M.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M. G.; PERALES, A. The chemical and microbiological preparation of 15-oxo-gibberelin derivatives. **Tetrahedron**, v. 51, n. 36, pp. 10053-10064, 1995.
54. ALAM, M.; HANSON, J. R.; SARAH, F. The biotransformation of some 6-substituted *ent*-kaur-16-enes by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v.30, n. 3, pp. 807-809, 1991.
55. FRAGA, B. M.; HERNÁNDEZ, M. G.; GARCIA-TELLADO, F.; GONZÁLEZ, P.; PERALES, A. The biotransformation of two *ent*-15 β ,16 β -epoxy-kaurane derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, pp. 133-138, 1993.
56. FRAGA, B. M.; BRESSA, C.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M. G.; SUÁREZ, S. The microbiological transformation of 7 α -hydroxy-*ent*-kaur-16-ene derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, n. 68, pp. 1557–1563, 2007.
57. MACÍAS, F. A.; GALINDO, J. L. G.; GALINDO, J. C. G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, pp. 2917–2936, 2007.
58. MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies de *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. **Iheringia Série Botânica**, v. 60, n.1, pp.91-98, 2005.
59. HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4. ed. London: Academic Press, 318 pp., 1993.
60. RICE, E. **Allelopathy**. 2. ed. New York: Academic Press, 422 pp., 1984.
61. WEIR, T. L.; PARK, S.-W.; VIVANCO, J. M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, pp. 472-479, 2004.
62. FOMSGAARD, I. G. Chemical ecology in wheat Plant-pest interactions. How the use of modern techniques and a multidisciplinary approach can throw new light on a well-know phenomenon: allelopathy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, pp. 987-990, 2006.

63. PUTNAM, A. R.; DUKE, W. B. Allelopathy in agrosystems. **Annual Review of Phytopathology**, v.16, pp.431-451, 1978.
64. VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, pp. 1631-1646, 2002.
65. MACÍAS, F. A.; OLIVEROS-BASTIDAS A.; MARÍN, D.; CARRERA, C.; CHINCHILLA, N.; MOLINILLO, J. M. G. Plant biocomunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potencial use as herbicide models. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, pp. 179-194, 2008.
66. KOBAYASHI, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. **Weed Biology and Management**, v. 4, 1-7, 2004.
67. TOYOMASU, T.; KAGAHARA, T.; OKADA, K.; KOGA, J.; HASEGAWA, M.; MITSUHASHI, W.; SASSA, T.; YAMANE, H. Diterpene phytoalexins are biosynthesized in and exuded from the roots of rice seedlings. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 72 (2), 562–567, 2008.
68. EINHELLIG, F. A.; SOUZA, I. F. Phytotoxicity of sorgoleone found in grain *Sorghum* root exudates. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 1, pp. 1573-1561, 1992.
69. OLIVEIRA, B. H.; SATO, C. T. Obtenção de giberelinas em escala laboratorial através de fermentação por fungos do gênero *Fusarium*. **Química Nova**, v.18, n.5, 1995.
70. GATTI, A. B. **Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Ktze e *Ocotea odorífera* (Vell) Rohwer na germinação de *Lactuca sativa* e *Raphanus sativus* L.** São Carlos: UFSCAR, 2003. 149 p. DISSERTAÇÃO (Mestrado – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – área de concentração Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, 2003.
71. MANO, A.R.O. **Efeito alelopático do extrato aquoso de sementes de cumaru (*Amburana cearensis* S.) sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carrapicho.** 2006. 102p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
72. REZENDE, C. de P.; PINTO, J. C.; EVANGELISTA, A. R.; SANTOS, I. P. A. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. **Boletim Agropecuário**, Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, n. 54, pp.1-55, maio, 2003.
73. SOUZA FILHO, A. P. D. S.; RODRIGUES, T. D. Inibição da germinação e alongamento da radícula de invasoras pelos extratos aquosos de gramíneas forrageiras tropicais. **Pasturas Tropicais**, v. 19, n. 1, pp. 45-50, 1997.
74. BORGATTI, T. F. **Síntese e atividade alelopática de carboxamidas indólicas.** Belo Horizonte: UFMG, 2010. 91 p. Dissertação

(Mestrado) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

75. VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Effects of kaurane diterpene derivatives on germination and growth of *Lactuca sativa* seedlings. **Zeitschrift Für Naturforschung C**. v. 60, pp. 72-78, 2005.

76. CARVALHO, G.J.; FONTANÉTTI, A; CANÇADO, C.T. Potencial alelopático do feijão de porco (*Canavalia ensiformes*) e da mucuna preta (*Stilozobium aterrimum*) no controle da tiririca (*Cypeurs rotundus*). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.26, n.3, pp. 647-651, 2002.

77. JACOBI, U.S.; FERREIRA, A.G. Efeitos alelopáticos de *Mimosa bimucronata* (DC) OK sobre espécies cultivadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, pp. 935-943, 1991.

78. NASCIMENTO, R. DO; MOSQUIM, P. R. Efeito do ácido giberélico e diferentes aminoácidos sobre as atividades da sintetase da glutamina e sintase do glutamato e sobre o crescimento de frutos de soja. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n.1, pp. 63-70, 2004. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042004000100008&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 10 de outubro de 2007.

79. ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; NETO, J. Atividade alelopática de alcalóides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. **Revista Floresta e Ambiente**, v. 10, n.1, pp. 93-97, 2003.

CAPÍTULO 2

Parte

experimental

2.1 Materiais e métodos

2.1.1 Procedimentos experimentais gerais

Os solventes empregados, acetato de etila, acetona, álcool metílico, clorofórmio, diclorometano, dioxano, éter de petróleo, *n*-hexano, tetrahidrofurano, apresentaram grau de pureza p. a. O álcool etílico a 96 ou 92 °GL, utilizado para extração de produto natural, apresentou grau de pureza comercial.

Os reagentes empregados na síntese de derivados e no preparo de meios de cultura para crescimento de fungos foram de grau p. a. e estão listados a seguir: ágar batata dextrosado, ágar malte, carbonato de potássio, D-glicose anidra, cloreto de potássio, dihidrogeno fosfato de potássio, dióxido de selênio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, glicina, molibdato de amônio, nitrato de cobalto, nitrato de prata, nitrato de sódio, peptona bacteriológica, periodato de sódio, sulfato de dietila, sulfato de magnésio heptahidratado, sacarose anidra, sulfato de cobre pentahidratado, sulfato de manganês heptahidratado, sulfato de sódio, sulfato de zinco heptahidratado, sulfato ferroso heptahidratado, tetróxido de ósmio e uréia.

O K_2CO_3 foi calcinado em mufla a 600 °C, por 3 h; a acetona anidra foi obtida por refluxo com sulfato de cálcio e destilada antes do uso e o sulfato de dietila foi submetido à agitação magnética com carbonato de potássio. Em seguida, realizou-se lavagem com água até reação neutra com papel indicador de pH e posterior secagem com carbonato de potássio calcinado.

Nos critérios de pureza das amostras foram adotadas a observação de mancha única em cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDS), variando-se a fase móvel, ponto ou faixa de fusão e as análises dos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C das amostras.

As pesagens foram realizadas em balança analítica Mettler/Toledo, modelo AB 104 ou balança eletrônica Micronal, modelo B 160.

As soluções foram concentradas por destilação do solvente, sob pressão reduzida, em evaporadores rotatórios da marca Büchi.

Os materiais e reagentes utilizados nos experimentos de biotransformação foram esterilizados em autoclave vertical Fanem, modelo 415 a temperatura de 121 °C por 15 minutos. Para descontaminação do material empregou-se o tempo de 20 minutos a mesma temperatura.

Os procedimentos microbiológicos como repique e inóculo de fungos foram realizados em capela equipada com fluxo laminar Labconco, modelo 36210, série 8138 E, classe II e luz germicida.

2.1.2 Cromatografia em coluna de sílica gel (CCS)

Para separações cromatográficas em coluna foram utilizadas sílica gel 60 Merck (70-230 mesh, 0,063-0,200 mm, artigo 7734, ASTM) e sílica gel 60 Merck (70-230 mesh, ASTM) impregnada com nitrato de prata a 20% p/p.

Para separações cromatográficas *flash* empregou-se sílica gel 60 Merck (230-400 mesh, artigo 9385, ASTM).

Empregou-se uma série eluotrópica usual: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

2.1.3 Cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDS)

Para cromatografia em camada delgada foi utilizada sílica gel 60 G, Merck (artigo 7731), na espessura de 0,25 mm. Quando necessário utilizou-se esta mesma sílica impregnada em solução aquosa de nitrato de prata 20% p/p.

As revelações cromatográficas foram feitas por irradiação no UV (comprimentos de onda 254 ou 366 nm) e/ou exposição a vapores de iodo e/ou solução aquosa ácida de sulfato cérico seguida por aquecimento.

2.1.4 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , subespectros DEPT-135 e mapas de contornos (COSY, HMBC, HSQC e NOESY) foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance DPX-200 (200 MHz) ou DRX 400 (400 MHz), do Laboratório de ressonância magnética nuclear de alta resolução do Departamento de Química (DQ) do Instituto de Ciências Exatas (ICEx), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os solventes deuterados empregados na solubilização das amostras foram CDCl_3 , CD_3OD ou $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, da marca Aldrich. Como referência interna foram utilizados o sinal do tetrametilsilano (TMS) presente no clorofórmio deuterado (δ_{H} e δ_{C} 0,00), os sinais do metanol (δ_{H} 3,31 e δ_{C} 49,00) ou os sinais da piridina (δ_{H} 8,71; 7,55 e 7,19 e δ_{C} 123,5, 135,5 e 149,2). Os deslocamentos químicos (δ) foram

expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz).

2.1.5 Espectrometria de massas de alta resolução

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em equipamento ESI Q-TOF Micro equipado com fonte de ionização por spray eletrostático, do Laboratório de venenos e toxinas animais (LVTA) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, pelo Prof. Dr. Adriano Pimenta. As condições de análise empregadas foram vaporização da amostra a 80 °C, voltagem do capilar a 1600 V, voltagem no cone da amostra a 35 V e, no cone de extração, a 2,0 V. Os dados foram analisados usando o software Masslynx 4.0 da Micromass para experimentos ESI. A amostra foi solubilizada em metanol-TFA 0,1% e analisada no modo positivo ou negativo.

2.1.6 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do IV foram obtidos em um espectrômetro da marca Perkin-Elmer, modelo *Spectrum One SP-IR* (Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG), por inserção direta da amostra.

2.1.7 Pontos ou faixas de fusão

Os pontos e/ou faixas de fusão foram determinados em aparelho digital da marca Microquímica, modelo MQAPF - 301 (Departamento de Química, UFMG) e não foram corrigidos.

2.1.8 Rotação ótica

Os valores de rotação óptica (OROT) e rotação específica (SROT) foram obtidos em um polarímetro Perkin Elmer, modelo 341, do Departamento de Química da UFMG. As amostras foram preparadas na concentração de 0,75 g%.

2.1.9 Difração de raios-X (DRX)

Inicialmente a amostra foi cuidadosamente recristalizada a partir da evaporação lenta de uma solução metanólica saturada, obtendo-se cristais prismáticos incolores. Um monocristal foi montado no difratômetro Oxford Gemini Atlas Ultra, equipado com monocromador de grafite, $\lambda(\text{CuK}\alpha) = 1,541838 \text{ \AA}$ do Laboratório de cristalografia da UFMG, pelo Prof. Dr. Nelson G. Fernandes. O

Software CrisAlisPro foi utilizado para coleta e processamento dos dados. As intensidades das reflexões foram usadas para resolver, por métodos diretos, e refinar as estruturas, utilizando o pacote de programas de computador WINGX. Todos os átomos de hidrogênio foram localizados a partir de mapas de diferença e incluídos nos refinamentos. Ao todo 14003 reflexões foram medidas e 5626 reflexões independentes foram obtidas, $R_{\text{int}} = 0,029$, 423 parâmetros refinados, $R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0,033$, $wR(F^2) = 0,086$, $S = 1,04$, $(\Delta/\sigma)_{\text{max}} = 0,001$, $\Delta\rho_{\text{min}} = -0,17$, $\Delta\rho_{\text{max}} = 0,23$ e Å^{-3} , parâmetro Flack = 0,02(14). A estrutura absoluta foi determinada, fornecendo um parâmetro Flack de 0,01(15). Os dados cristalográficos da estrutura foram depositados no *Cambridge Crystallographic Data Center*.

2.1.10 Culturas de fungos

- Culturas de *Cephalosporium aphidicola* (CCT 2163) e *Pestalotiopsis palustres* (P-001) do Laboratório de biotecnologia e bioensaios do Departamento de Química do ICEX, UFMG.
- Cultura de *Fusarium proliferatum* (CML 287) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning do Laboratório de micologia, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.2 Coleta e identificação da espécie vegetal

O material vegetal, *Wedelia paludosa* (planta inteira), foi coletado no canteiro interno da sede da USIMINAS, situada à Rua Professor José Vieira de Mendonça, 3011, Bairro Engenho Nogueira, Pampulha, Belo Horizonte, na manhã de 4 de agosto de 2006. Uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Botânica do ICB da UFMG, sob o número BHCB 19033.



Figura 2.1 – Fotografia de *Wedelia paludosa* - planta inteira com destaque para folhas e flores¹.

2.3 Preparo do extrato etanólico

Extrato etanólico bruto de WP-I (EBWP-I)

O material vegetal foi seco sob ventilação à temperatura ambiente e pulverizado em moinho de facas, obtendo-se 26,80 kg de pó.

Parte do material pulverizado (12,09 kg) foi submetido, então, à percolação exaustiva com etanol a 92,8 °GL (130 L). A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotatório, sob pressão reduzida e temperatura máxima de 60 °C, até completa remoção do solvente, obtendo-se o extrato etanólico bruto EBWP-I (1,02 kg).

2.4 Fracionamento do extrato EBWP-I por cromatografia em coluna de sílica gel (CCS)

Uma alíquota do extrato etanólico bruto de *W. paludosa*, EBWP-I (185,98 g), foi submetida a um fracionamento preliminar por CCS (0,80 kg; 6,4 x 57). Procedeu-se à eluição com solventes da série eluotrópica usual, com polaridades crescentes, obtendo-se 235 frações de 500 mL. Estas frações foram analisadas por CCDS e reunidas em 23 grupos, de acordo com a semelhança de seus perfis cromatográficos

(Tabela 2.1). Os reveladores empregados nesta análise foram vapores de iodo, solução aquosa ácida de sulfato cérico e luz UV.

Tabela 2.1 – Cromatografia em coluna de sílica gel de EBWP-I

Coluna	Eluente	Volume (L)	Fração	Reunido	Massa (g)
EBWP-I	<i>n</i> -hexano (Hex)	33,5	1 a 66	WP-I-1: 1-22 WP-I-2: 23-66	2,51 2,08
	Hex/diclorometano (DCM) (1:1)	13	67 a 92	WP-I-3: 67 WP-I-4: 68-71 WP-I-5: 72-75 WP-I-6: 76-92	18,10 15,63 10,88 9,76
	DCM	6,5	93 a 105	WP-I-7: 93 WP-I-8: 94-98 WP-I-9: 99-112	9,89 3,87 4,43
	DCM/acetato de etila (AcOEt) (1:1)	26,5	106 a 158	WP-I-10: 113-131 WP-I-11: 132-140 WP-I-12: 141-161	4,85 7,95 5,24
	AcOEt	19,5	159 a 197	WP-I-13: 162 WP-I-14: 163-179 WP-I-15: 180-198	1,25 6,35 9,93
	AcOEt/metanol (MeOH) (1:1)	10	198 a 217	WP-I-16: 199 WP-I-17: 200-201	0,82 1,52
	MeOH	5,5	218 a 228	WP-I-18: 202-213 WP-I-19: 214-216 WP-I-20: 215-224 WP-I-21: 225-229	12,14 1,23 10,88 6,79
	MeOH/H ₂ O	2,5	229 a 233	WP-I-22: 230-233	5,75
	H ₂ O	1,0	234 e 235	WP-I-23: 234-235	3,42
	Total	118		Total	155,27

Somente os grupos de frações WP-I-3, WP-I-4, WP-I-5, WP-I-7 e WP-I-9 foram trabalhados, visando o isolamento de seus constituintes majoritários. Os grupos apolares (WP-I-1 e WP-I-2) e aqueles de maiores polaridades (WP-I-10 a WP-I-23) foram analisados por CCDS e apresentaram-se como misturas complexas de componentes.

Grupo de frações WP-I-3 e WP-I-4

Os grupos de frações denominados WP-I-3 e WP-I-4, eluídos com hexano/DCM (1:1), apresentaram-se como uma mistura de um sólido branco imerso em um óleo amarelo denso. Aos dois grupos foram realizadas, separadamente, diversas lavagens com éter de petróleo, proporcionando a separação de sólidos brancos (WP-I-3-S1 e WP-I-4-S1), livres de óleo (Tabela 2.2, página 46). Alíquotas destes sólidos foram enviadas para análises, objetivando-se a elucidação estrutural

dos mesmos. Eles foram identificados como misturas dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2).

Grupo de frações WP-I-5

As frações 72 a 75, eluídas com hexano/DCM (1:1) e reunidas a partir da análise por CCDS, foram denominadas WP-I-5 (10,88 g) e apresentaram-se como uma mistura de um sólido branco imerso em um óleo amarelo denso. Essa amostra foi submetida a uma precipitação com éter de petróleo, resultando em 1,42 g de um sólido branco brilhante (WP-I-5-S1) (**Tabela 2.2**, página 46), que apresentou duas manchas majoritárias em análises por CCDS. Uma alíquota de 0,43 g de WP-I-5-S1 foi submetida a uma CCS para purificação destes constituintes. Empregou-se a série eluotrópica usual e obtiveram-se 64 frações de 50 mL. As frações foram analisadas por CCDS e reunidas de acordo com a semelhança de seus perfis cromatográficos. O sólido branco brilhante isolado das frações 21-24 (145,53 mg, código WP-I-5-S1.1), eluídas com mistura dos solventes hexano/DCM (8:2), e o sólido branco opaco obtido das frações 28-39 (143,40 mg, código WP-I-5-S1.2) eluídas com mistura de hexano/diclorometano (7:3), apresentaram-se como manchas únicas através de análise por CCDS. WP-I-5-S1.1 foi identificado como o triterpeno 3β -friedelinol (77) e WP-I-5-S1.2 como uma mistura dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2).

Grupo de frações WP-I-7

A fração 93 (9,89 g) denominada WP-I-7, eluída com DCM, apresentou-se com aspecto resinoso, de coloração castanho-esverdeada. Essa fração foi submetida a uma precipitação com éter de petróleo, resultando em 0,39 g de um sólido branco (WP-I-7-S1), impuro, que foi lavado novamente com éter de petróleo, originando 0,32 g de um sólido branco opaco (WP-I-7-S2) (**Tabela 2.2**, página 46), que mostrou mancha única em análises por CCDS. As análises espectroscópicas e comparação com dados da literatura mostraram ser WP-I-7-S2 o ácido *ent*- 3β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78).

Grupo de frações WP-I-9

O grupo de frações denominado WP-I-9 (4,43 g), referente às frações 99 a 112, foi submetido também a tratamento com éter de petróleo, resultando na precipitação

de 2,86 g de um sólido opaco esverdeado (WP-I-9-S1). Deste sólido, 103,80 mg foram submetidas à recristalização empregando-se a mistura de metanol e gotas de diclorometano como solvente. Após 24 h., observou-se formação de cristais brancos em forma de agulha (23,80 mg) que foram separados da água-mãe por filtração a pressão reduzida.

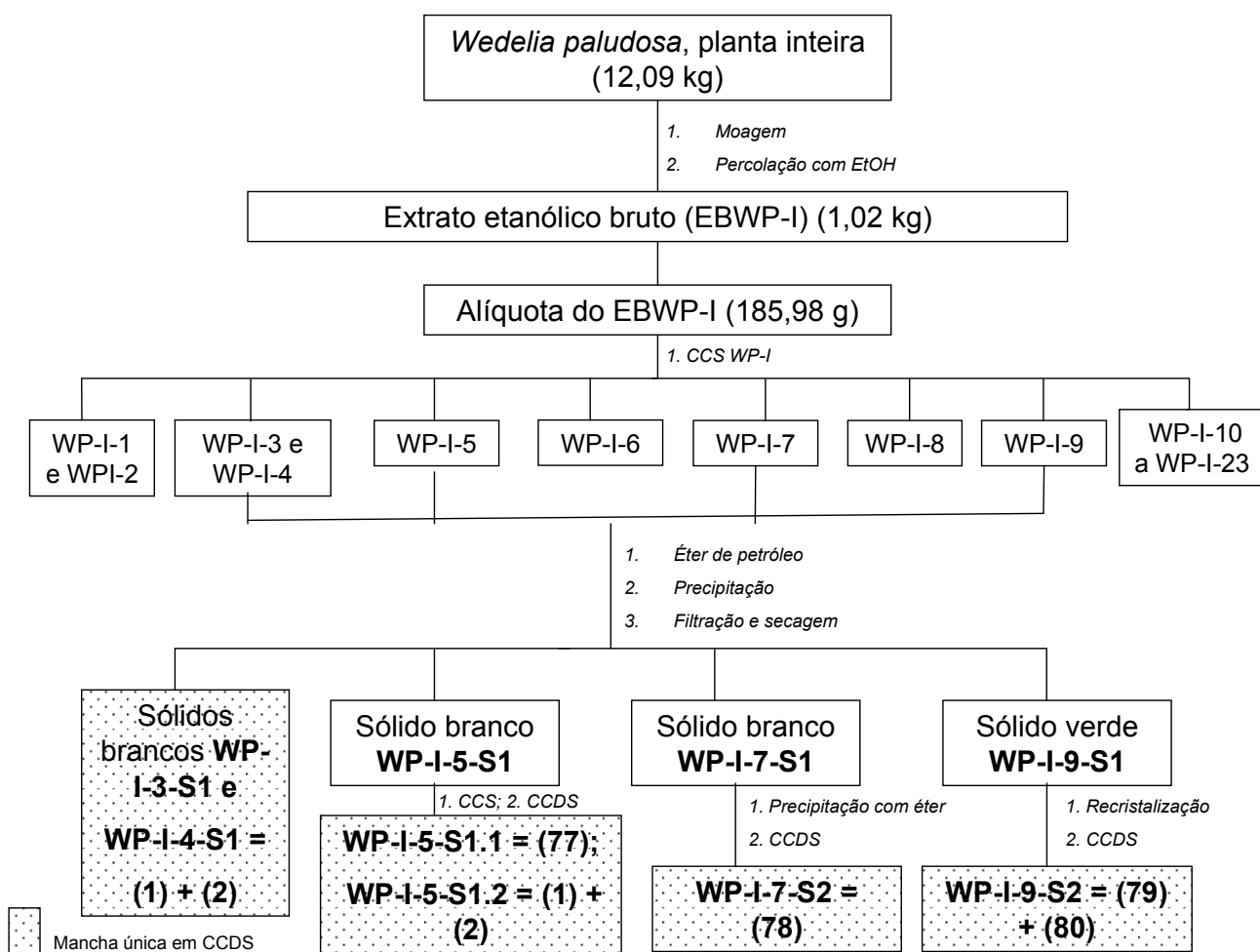
Estes cristais, denominados WP-I-9-S2 (**Tabela 2.2**), foram solubilizados em DCM e comparados, através de CCDS (eluente hexano/ AcOEt 7:3), com uma amostra autêntica da mistura dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol, empregando-se o sulfato cérico como revelador.

O perfil cromatográfico, as análises espectroscópicas e comparação com dados da literatura confirmaram que WP-I-9-S2 era constituído por uma mistura de β -sitosterol (**79**) e estigmasterol (**80**).

Tabela 2.2 – Sólidos provenientes de purificação de frações da CCS de EBWP-I

Grupos	Massa total das frações reunidas (g)	Código/massa (g) dos sólidos provenientes da primeira precipitação com éter de petróleo	Código/massa (g) dos sólidos provenientes de segunda precipitação, CCS ou recristalização	Substâncias ou mistura de substâncias identificadas
WP-I-3	18,10	WP-I-3-S1 (11,34)	-	Mistura dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2)
WP-I-4	15,63	WP-I-4-S1 (3,25)	-	Mistura de (1) e (2)
WP-I-5	10,88	WP-I-5-S1 (1,42)	WP-I-5-S1.1 (0,145)	3β-friedelinol (77)
			WP-I-5-S1.2 (0,143)	Mistura de (1) e (2).
WP-I-7	9,89	WP-I-7-S1 (0,39)	WP-I-7-S2 (0,32)	ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78)
WP-I-9	4,43	WP-I-9-S1 (2,86)	WP-I-9-S2 (0,0238)	Mistura de β -sitosterol (79) e estigmasterol (80)

O **Esquema 2.1** (página 47) apresenta os tratamentos a que foi submetida a alíquota do material vegetal (12,09 kg) levando a obtenção das substâncias **1**, **2**, **77**, **78**, **79** e **80**.



Esquema 2.1 - Obtenção do extrato etanólico bruto de *W. paludosa* e fracionamento de uma alíquota (EBWP- I, 185,98 g) deste extrato, por CCS.

2.5 Tentativa de separação dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2), provenientes de WP-I-3-S1, por CCS impregnada com AgNO₃ (CCS-AgNO₃)

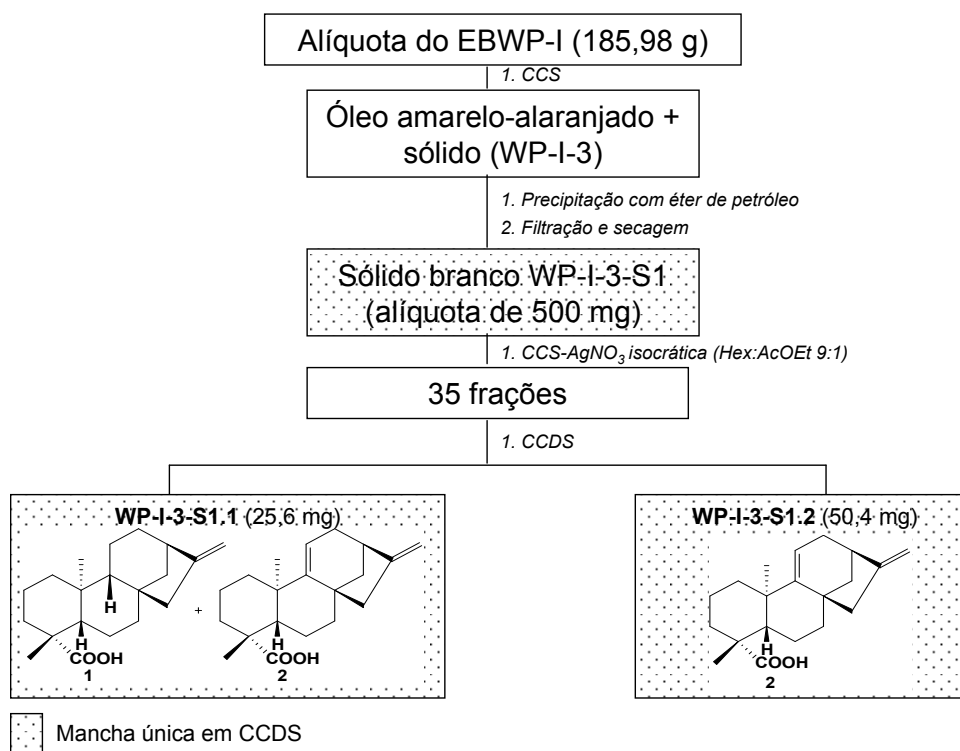
Uma alíquota do sólido WP-I-3-S1 (500 mg), obtido a partir de lavagens com éter de petróleo de WP-I-3 e identificado por RMN de ¹H como uma mistura dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2), foi submetida a uma tentativa de purificação por CCS (1,5, d.i. x 30 cm) impregnada por AgNO₃ (CCS-AgNO₃) a 20% p/p.

No preparo da fase estacionária da coluna, o nitrato de prata (6,75 g) foi solubilizado, primeiramente, em mistura equivolúmica de etanol e metanol sob aquecimento. Em seguida, adicionou-se sílica gel (27 g) à solução de nitrato de prata e evaporou-se o solvente com auxílio de evaporador rotatório, a 60 °C, sob

pressão reduzida. Ao empacotar-se a coluna tomou-se o cuidado de revestir a coluna com papel alumínio, evitando possível oxidação pela luz.

Realizou-se eluição isocrática empregando-se mistura de hexano/acetato de etila (9:1). Recolheram-se 35 frações de 100 mL cada. As análises destas frações por CCDS-AgNO₃ e revelação sob vapores de iodo demonstraram que os grupos de frações 3-4 (25,6 mg) e 27-28 (50,4 mg), denominados WP-I-3-S1.1 e WP-I-3-S1.2, respectivamente, apresentaram-se como manchas únicas (**Esquema 2.2**).

Através de análises dos espectros de RMN, o sólido WP-I-3-S1.1 foi identificado como uma mistura dos ácidos **1** e **2** e WP-I-3-S1.2, como o ácido grandiflorênico (**2**).



Esquema 2.2 - CCS-AgNO₃ de alíquota de WP-I-3-S1.

2.6 Fracionamento do restante do extrato EBWP-I por CCS

O objetivo principal destas cromatografias foi o isolamento da mistura dos ácidos **1** e **2**, a partir do extrato EBWP-I de *W. paludosa*. Assim sendo, 5 fracionamentos consecutivos em coluna de sílica gel foram realizados empregando o restante do EBWP-I (250,3; 113,1; 118,6; 115,8 e 232,5 g) utilizando, como eluentes, hexano e diclorometano, com polaridades crescentes. As frações oleosas que continham a mistura dos ácidos **1** e **2** foram purificadas através de lavagens com

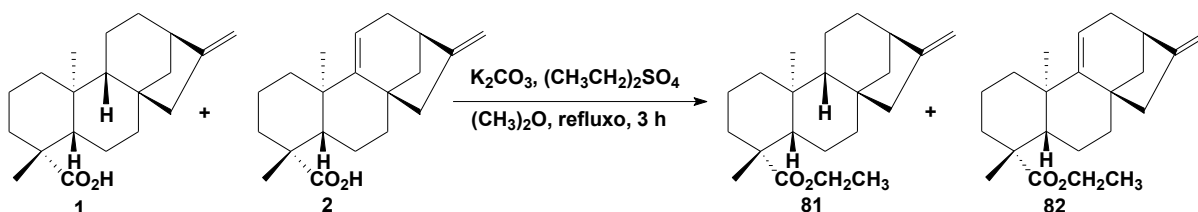
éter de petróleo, proporcionando a separação de sólidos brancos livres de óleo (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Massa de sólido obtido de frações oleosas isoladas de EBWP-I

Massa da alíquota para CCS (g)	Massa óleo + sólido (g)	Massa de sólido isolado (g) contendo mistura dos ácidos 1 e 2
250,3	19,7	5,2
113,1	13,2	1,0
118,6	14,5	1,6
115,8	21,8	8,6
232,5	46,5	13,5

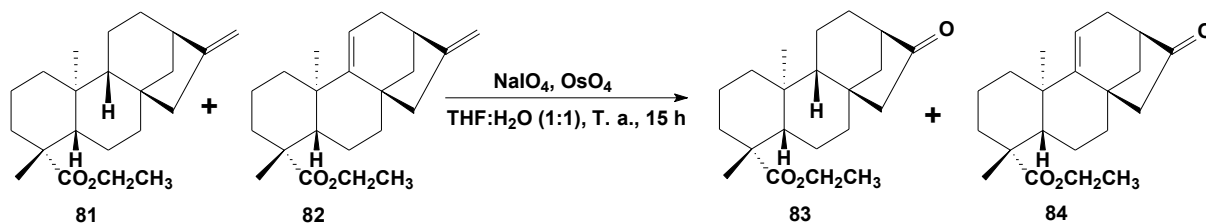
2.7 Síntese de derivados dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2)

2.7.1 Preparação de *ent*-caur-16-en-19-oato de etila (81) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (82)²



A mistura dos ácidos (14,0 g; 46,3 mmol) foi adicionada a uma mistura de carbonato de potássio calcinado (6,94 g; 51,03 mmol) e sulfato de dietila tratado (445 mL, 51,03 mmol) e acetona anidra (482 mL). A mistura resultante foi refluxada por 3 horas. Após este período observou-se por CCDS, empregando hexano/diclorometano (1:1), o completo desaparecimento do material de partida e o aparecimento de uma mancha de Rf maior. O produto da reação foi resfriado até a temperatura ambiente e filtrado. A acetona foi evaporada sob pressão reduzida e o resíduo foi extraído com éter etílico. A fase orgânica foi lavada com solução aquosa de bicarbonato de sódio a 5%, água destilada e, em seguida, foi secada com sulfato de sódio anidro. Após concentração sob pressão reduzida, obteve-se um resíduo escuro (15,69 g) que foi purificado em coluna filtrante de sílica gel (60 g), empregando éter de petróleo como eluente. O produto foi obtido como um óleo incolor (11,66 g) com 76% de rendimento.

2.7.2 Preparação de *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**) e *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-oato de etila (**84**)³

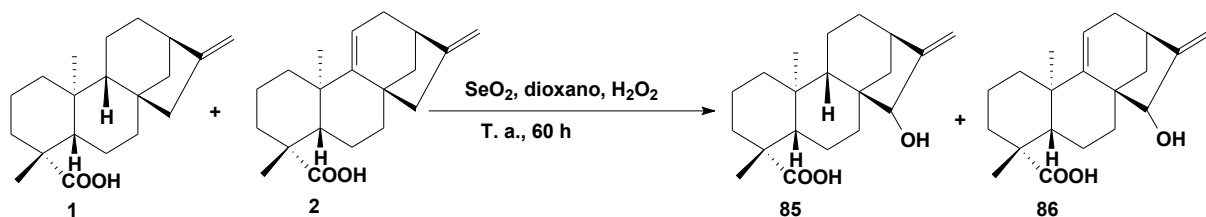


A uma suspensão constituída pela mistura dos ésteres (**81**) e (**82**) (22,17 mmol; 7,31 g) e NaIO_4 (110,84 mmol; 23,71 g), em $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) (693,0 mL), adicionou-se um cristal de OsO_4 ³. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 15 horas à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCDS e observou-se o completo desaparecimento do material de partida ao final do tempo previsto. A elaboração do produto de reação foi feita adicionando-se bissulfito de sódio (1,0 g) e lavando-se, exaustivamente, com solução aquosa de tiosulfato de sódio a 10% (240 mL). Extraíu-se a fase aquosa com DCM e evaporou-se a fase orgânica em evaporador rotatório sob pressão reduzida, à temperatura inferior a 60 °C.

Obtiveram-se 12,42 g de um material oleoso de coloração caramelo que foi submetido a sucessivos fracionamentos cromatográficos, empregando-se a série eluotrópica usual, objetivando a purificação das norcetonas. A norcetona do éster etílico do ácido caurenóico (**83**) foi obtida como um sólido branco em formato de agulhas finas (3,60 g) e aquela do ácido grandiflorênico (**84**), como uma resina de cor caramelo (2,17 g), com rendimentos de 49,3 e 29,7%, respectivamente.

2.7.3 Preparação dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**)

2.7.3.1 Metodologia adaptada de FRANCIS *et al.*, 1976⁴



Uma amostra dos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**) (0,5 g; 1,66 mmol), em dioxano (8 mL), foi agitada com SeO₂ (0,184 g; 1,66 mmol) e água oxigenada (3,1 mL, 30%) à temperatura ambiente por 60 horas. Após este período, a elaboração da reação foi realizada por diluição da mistura reacional em água e extração com éter, em funil de separação. A fase etérea foi secada com sulfato de sódio, por 12 horas, e concentrada, em evaporador rotatório, até secura. Na CCDS, empregando hexano/acetato de etila (7:3), esta fração apresentou-se como uma mistura contendo o material de partida e substâncias de maior polaridade.

A mistura obtida (1,124 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel objetivando-se a separação do produto majoritário (**Tabela 2.4**). Empregou-se a série eluotrópica usual e foram recolhidas 19 frações, de aproximadamente 100 mL cada, que foram concentradas sob pressão reduzida e comparadas, por CCDS, com o material de partida da reação. Como o produto majoritário se encontrava ainda em uma mistura complexa nas frações reunidas 11-14 (178 mg), uma nova purificação por CCS foi realizada (**Tabela 2.5**).

Tabela 2.4 - Fracionamento por CCS do extrato etéreo proveniente da oxidação alílica da mistura dos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**)

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Massa (mg)
1-3	Hex	300	1-7	325,3
4-5	Hex/DCM (1:1)	300	8-10	194,5
6-8	DCM	250	11-14	178,0
9-10	DCM/AcOEt (1:1)	300	15-19	132,1
11-13	AcOEt	300	-	-
14-17	AcOEt/MeOH	400	-	-
18-19	MeOH	200	-	-
-	Total	2050	Total	829,9

Tabela 2.5 - Fracionamento por CCS do grupo de frações reunidas 11-14 (178 mg) proveniente da CCS da 1^a oxidação alílica de mistura dos ácidos **1** e **2**

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Massa (mg)
1-3	Hex/AcOEt (1:1)	100	1-2	22,6
4-10	Hex/AcOEt (6:4)	180	3-4	23,8
11-13	Hex/AcOEt (3:7)	100	5-10	72,3
14-20	Hex/AcOEt (2:8)	150	11-21	56,4
21	AcOEt	100	-	-
-	Total	700	Total	175,1

Por CCDS, visualizou-se que o grupo de frações 5-10 (72,3 mg) apresentava material mais polar que o material de partida, no entanto ainda se encontrava impuro.

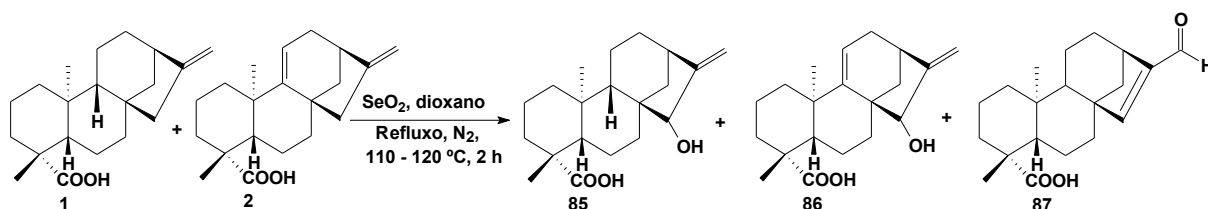
Através de nova CCS (**Tabela 2.6**), foi possível isolar 2,6 mg de um produto mais polar, porém, ainda impuro (fração 15), que apresentou duas manchas por CCDS.

Tabela 2.6 - Fracionamento por CCS do grupo de frações reunidas 5-10 (72,3 mg) proveniente da oxidação alílica de mistura dos ácidos **1** e **2**

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Massa (mg)
1-6	Hex/DCM (1:1)	300	1-11	6,1
7-8	DCM	100	12-14	50,2
9-11	DCM/AcOEt (1:1)	150	15	13,1
12-16	AcOEt	200	16-21	2,6
17-21	AcOEt/MeOH	150	-	-
-	Total	1000	Total	72,0

Assim, nova metodologia foi tentada, visando a hidroxilação alílica da mistura de ácidos **1** e **2**.

2.7.3.2 Metodologia adaptada de BLAY *et al.*, 1991⁵



Um excesso de SeO_2 (0,46 g; 4,19 mmol) foi adicionado a uma mistura dos ácidos caurenóico e grandiflorênico (1,0 g; 3,31 mmol). O balão de reação foi colocado sob refluxo de nitrogênio e, em seguida foi adicionado dioxano (30 mL; 352,7 mmol). A mistura resultante foi refluxada por 2 horas, a 110-120 °C, sob agitação magnética. Após este período observou-se, por CCDS, empregando hexano/ acetato de etila (1:1), o completo desaparecimento do material de partida e o aparecimento de uma mancha de R_f menor. O produto da reação foi resfriado até a temperatura ambiente e filtrado. O dioxano foi evaporado, sob pressão reduzida, e o resíduo (1,57 g) foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (70 g)

empregando a série eluotrópica usual (**Tabela 2.7**), originando 25 frações de aproximadamente 100 mL cada.

A fração 14 (30,60 mg), com apenas uma mancha por CCDS, apresentou-se como um sólido amarelo claro opaco e foi identificado como um subproduto da reação, o ácido *ent*-16-formil-caur-15-en-19-óico (**87**).

A fração 15 (560 mg), ainda impura, foi, então, submetida a uma CCS flash (48,3 g) empregando-se eluição isocrática com hexano/ acetato de etila (4:1), sendo recolhidas 30 frações de 20 mL. Nas frações 4 a 15, a mistura dos produtos de hidroxilação alílica (**85**) e (**86**) foi obtida como um sólido amarelo escuro (503,5 mg) com 50,4% de rendimento.

Tabela 2.7 – Fracionamento, por CCS, do resíduo em metanol (1,57 g) da 2ª oxidação alílica de mistura dos ácidos **1** e **2**

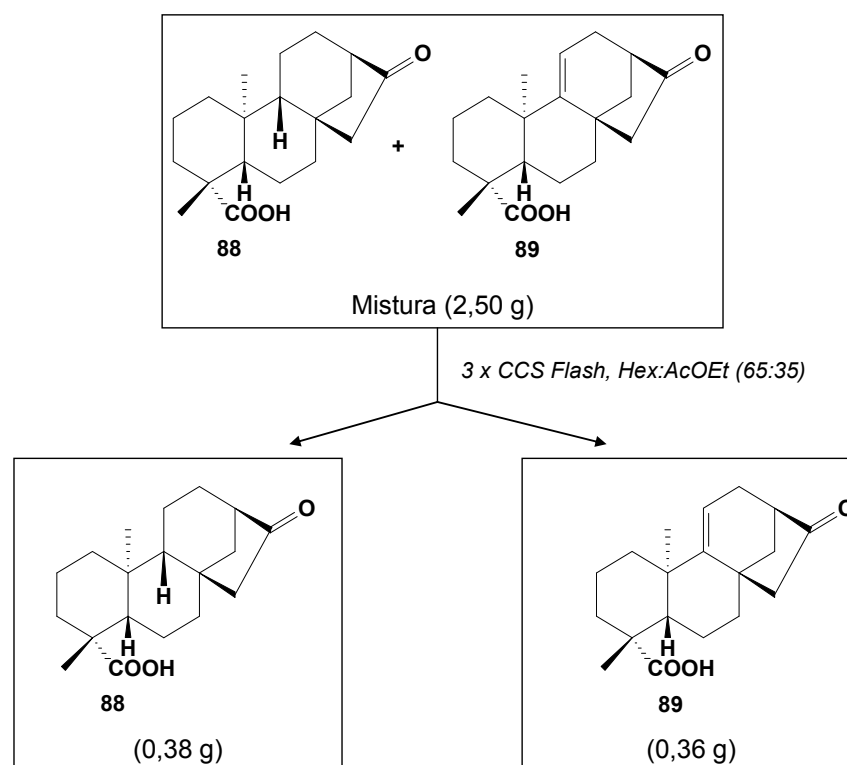
Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Massa (mg)
1-2	Hex	200	1-7	100,4
3-7	Hex/DCM (1:1)	600	8-13	305,6
8-12	DCM	400	14	30,6
13-14	DCM/AcOEt (9:1)	200	15	560,0
15	DCM/AcOEt (8:2)	200	16-25	440,3
16-18	DCM/AcOEt (1:1)	400	-	-
19-21	AcOEt	200	-	-
22-23	AcOEt/MeOH	200	-	-
24-25	MeOH	50	-	-
-	Total	2.450	Total	1.436,9

2.7.4 Purificação da mistura dos ácidos *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) e *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (**89**)

Uma mistura de (**88**) e (**89**) proveniente da oxidação de uma mistura dos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**) por OsO₄/NaIO₄ e cedida, gentilmente, pela Profa. Dra. Henriete da Silva Vieira (DQ, UFMG), foi submetida à purificação por CCS *flash* (**Esquema 2.3**, página 54).

Primeiramente, selecionou-se o eluente hexano/AcOEt (65:35) que forneceu um R_f adequado (0,35) à separação das substâncias presentes na mistura e se conduziu a cromatografia de acordo com o especificado na literatura².

Para a separação de 2,50 g da mistura foram realizadas três cromatografias flash, obtendo-se, ao final, 0,38 g do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) e 0,36 g do ácido *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (**89**) puros.



Esquema 2.3 - Purificação da mistura dos ácidos *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) e *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (**89**), derivados dos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**) por CCS *flash*.

2.8 Procedimento geral empregado nas biotransformações

2.8.1 Repiques dos microrganismos para manutenção

Procedeu-se à assepsia do fluxo laminar com solução de etanol a 70% e a circulação de ar foi realizada 30 minutos antes do repique. O procedimento de repique dos fungos foi realizado estritamente dentro da câmara de fluxo laminar, com o bico de Bünsen aceso.

Aos tubos de ensaio com meio sólido contendo as culturas-mãe de *Cephalosporium aphidicola* e *Pestalotiopsis palustres* e *Fusarium proliferatum*, foi adicionado 0,5 mL de salina peptonada estéril, seguindo-se por homogeneização e repique para novos tubos contendo meio sólido ágar batata dextrosado (ABD) inclinado.

A alça de platina, flambada e resfriada, foi introduzida no tubo contendo a cultura e uma amostra do fungo foi retirada e transferida para outro tubo contendo meio estéril, através da técnica puntual. Este procedimento foi realizado em

duplicata para cada fungo e os tubos foram incubados à temperatura ambiente, por 4 a 7 dias.

As culturas padronizadas foram mantidas em geladeira, sendo realizado um repique mensal para renovação das mesmas. O repique foi realizado de forma a manter um tubo (cultura-mãe) apenas para os repiques mensais e outro (cultura-filha) para ser empregado nos bioensaios.

2.8.1.1 Preparo dos meios de cultura sólidos e soluções

✓ Meio de cultura sólido ABD (ágar batata dextrosado)

Ágar batata dextrosado	39 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A mistura foi aquecida à temperatura máxima de 50 °C, com agitação até translucidez e evitando a fervura.

✓ Preparo do ágar com o tubo inclinado

O meio foi distribuído em tubos de ensaio, tampados e, em seguida, autoclavados a 121 °C, por 15 min. Ainda quentes, os tubos foram mantidos inclinados, em ângulo de 30°, para resfriamento. Após solidificação do meio, os tubos foram conservados em geladeira por um período máximo de 15 dias.

✓ Solução salina peptonada

Cloreto de sódio	0,9 g
Peptona bacteriológica	0,1 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Os componentes foram dissolvidos em balão volumétrico de 100 mL, do qual foram pipetados 9,0 mL para tubos de 18 cm x 1,5 cm. Esterilizaram-se os tubos, em autoclave, a 121 °C, por 15 minutos, rotulando-os adequadamente.

2.8.2 Preparo dos meios de cultura líquidos

Nas biotransformações realizadas sob agitação, empregando os fungos *C. aphidicola* e *F. proliferatum*, foram adicionados 200 mL do meio de cultura líquido adequado ao crescimento de cada fungo empregado em 28 erlenmeyers de 500 mL. Na biotransformação estática, empregando o fungo *P. palustris*, foram adicionados 200 mL do meio de cultura líquido adequado ao crescimento do fungo em 32 erlenmeyers de 500 mL. Os erlenmeyers foram tampados com rolhas de algodão hidrófobo, recobertos com papel “kraft” e, em seguida, autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento, foram retirados da autoclave e inoculados. Os meios de cultura empregados para cada fungo foram preparados como descrito a seguir.

2.8.2.1 Meio de cultura para *C. aphidicola*⁶

Glicose.....	25,0 g
Fosfato de potássio monobásico.....	5,0 g
Sulfato de manganês hexahidratado.....	2,0 g
Cloreto de potássio.....	1,0 g
Glicina.....	2,0 g
Solução de elementos-traço	2,0 mL
H ₂ O q.s.p.	1000 mL

Solução de elementos-traço

Nitrato de cobalto	0,10 g
Sulfato ferroso heptahidratado.....	1,00 g
Sulfato de cobre pentahidratado.....	0,15 g
Sulfato de zinco heptahidratado.....	1,61 g
Sulfato de manganês hexahidratado.....	0,10 g
Molibdato de amônio.....	1,00 g
H ₂ O q.s.p.	1000 mL

Os sais foram solubilizados, a frio, em água destilada. Alíquotas desta solução (90 mL) foram transferidas para erlenmeyers de 125 mL, que foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos e rotulados adequadamente. A acidez da solução de elementos-traço foi ajustada para 5,0 com NaOH a 10%.

2.8.2.2 Meio de cultura para *F. proliferatum*

Sulfato ferroso heptahidratado.....	0,01 g
Sulfato de magnésio heptahidratado.....	0,50 g
Cloreto de potássio	0,50 g
Fosfato de potássio dibásico.....	1,00 g
Nitrato de sódio.....	3,00 g
Sacarose.....	30,00 g
H ₂ O q.s.p.	1000 mL

2.8.2.3 Meio de cultura para *P. palustris*

Ágar malte.....	30,00 g
H ₂ O q.s.p.	1000 mL

2.8.3 Inóculo**2.8.3.1 Preparo do inóculo**

A suspensão de fungos que se inocula ao meio de cultura é chamada de inóculo. Foram adicionados 10 mL de água destilada e esterilizada no tubo com a cultura do fungo em meio sólido ágar batata dextrosado inclinado, produzindo uma suspensão que foi transferida para 2 erlenmeyers com o meio líquido, previamente esterilizado. Estes erlenmeyers foram mantidos sob agitação, em condições estéreis, até o momento da inoculação do meio de cultura.

2.8.3.2 Inoculação do meio de cultura

O inóculo foi distribuído em condições estéreis entre os frascos contendo o meio de cultura líquido autoclavado. A cada erlenmeyer foi administrado cerca de 0,5 mL do inóculo. Em seguida, os frascos foram transferidos para a mesa de agitação, onde é realizado o crescimento fúngico (experimentos utilizando *C. aphidicola* e *F. proliferatum*) ou foram mantidos em repouso sobre a bancada (experimento empregando *P. palustris*). Um dos erlenmeyers, em cada experimento, não recebeu o inóculo, sendo reservado para ser o controle do substrato.

2.8.4 Biotransformações

Cada amostra da substância foi dissolvida em etanol a 96 °GL. A quantidade de substância inoculada em cada experimento variou, dependendo de sua disponibilidade no laboratório, sendo de aproximadamente 500 mg. Após dissolução completa da substância, a solução e todo o material utilizado na inoculação do substrato foram mantidos sob luz UV, em câmara estéril, por 15 minutos. Depois a luz UV foi desligada, passando-se a trabalhar próximo ao bico de Bunsen. Distribuiu-se 0,5 mL da solução contendo a substância a ser biotransformada entre os erlenmeyers contendo o inóculo do fungo, empregando-se uma seringa estéril. Um dos erlenmeyers não recebeu a amostra (controle do fungo), mas o erlenmeyer que não foi inoculado com o fungo recebeu a amostra (controle do substrato).

Após o período de incubação, o meio foi filtrado, utilizando papel de filtro qualitativo Whatman nº 1. O micélio, retido no papel de filtro, foi lavado exaustivamente com acetato de etila. Posteriormente, ele foi autoclavado e descartado.

O filtrado foi extraído várias vezes com acetato de etila. As fases acetato de etila e aquosa foram separadas através de funil de decantação. Os extratos orgânicos combinados foram lavados com solução saturada de cloreto de sódio, secos com sulfato de sódio anidro, filtrados e, posteriormente, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. A fração em acetato de etila obtida foi purificada por CCS.

Em algumas biotransformações realizadas, o filtrado aquoso, além de ser extraído com acetato de etila foi extraído também com *n*-butanol. Após separação do meio aquoso, secagem sob sulfato de sódio, filtração e concentração sob pressão reduzida, ambas as frações obtidas foram submetidas a fracionamentos por CCS.

2.8.5 Materiais de partida empregados nas reações de biotransformação

O *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (caurenol) (**90**) e o ácido *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (**91**), empregados nas reações de biotransformação foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Henriete da Silva Vieira (DQ, UFMG).

O ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (**78**) e a mistura dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (**1**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico (**2**) foram isolados a partir de fracionamento por CCS de extratos brutos de *W. paludosa* (item **2.4**).

Os ácidos *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) e *ent*-16-oxo-17-norcauran-9(11)-en-19-óico (**89**), empregados nas biotransformações, foram purificados por CCS *flash* (item 2.7.4).

Os derivados caurânicos *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**) e a mistura dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**) foram obtidos por transformação química (itens 2.7.2 e 2.7.3).

As estruturas químicas destas substâncias são apresentadas na **Figura 2.2**.

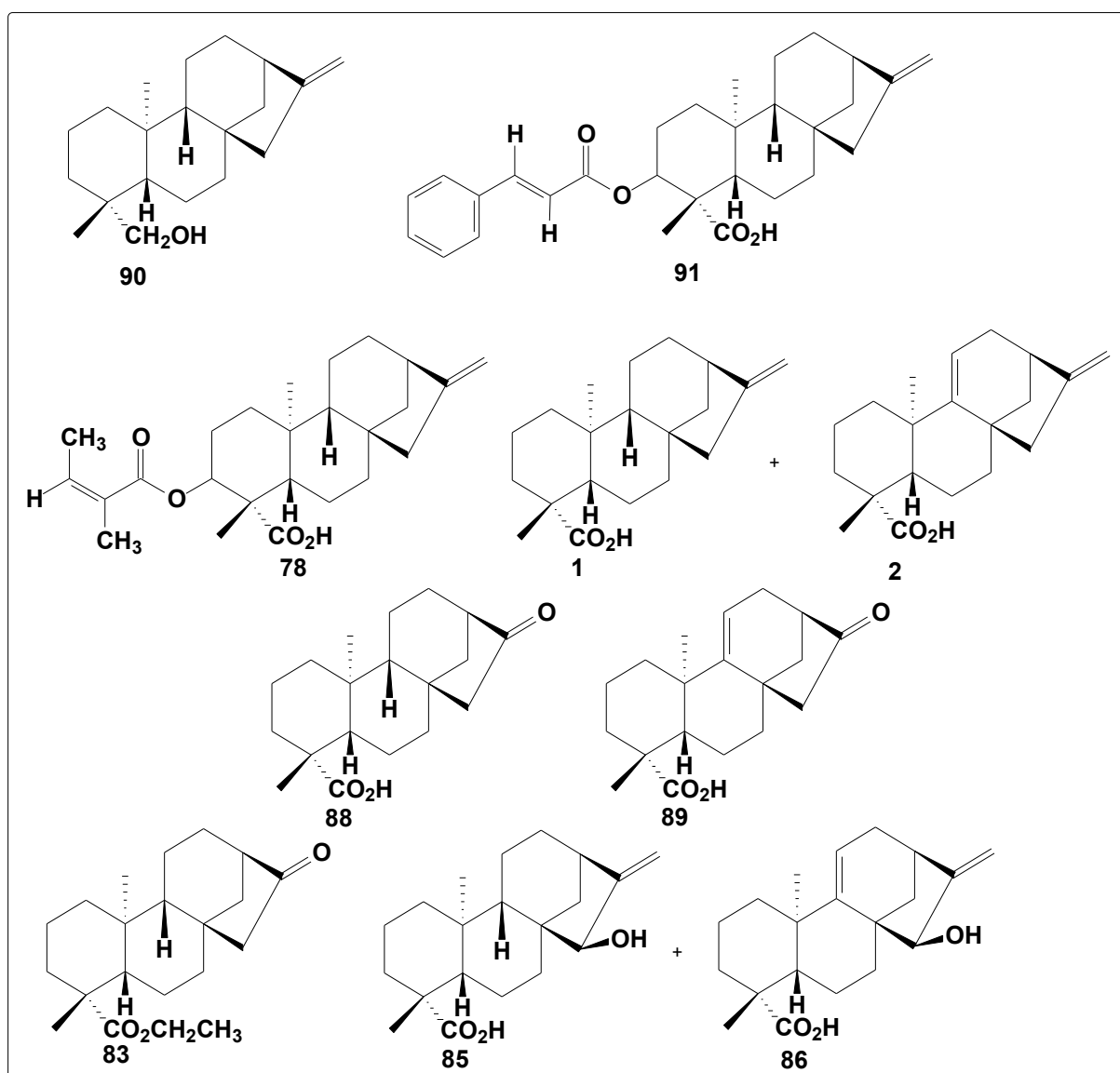


Figura 2.2 - Materiais de partida empregados nas biotransformações.

2.9 Biotransformação do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (90) por *C. aphidicola*

- ✓ Quantidade de material inoculado: 0,69 g
- ✓ Solvente para dissolução da amostra: EtOH (13 mL)
- ✓ Concentração da substância no meio de cultura: 0,14 g/L
- ✓ Dia da inoculação e duração do experimento: 6º dia, 15 dias.
- ✓ Volume de meio utilizado: 5,2 L (200 mL em cada frasco: 24 frascos de experimento; 1 controle positivo; 1 controle negativo).
- ✓ Massa da fração obtida após extração e evaporação do solvente: 1,37 g

A fração oleosa de coloração castanho-escura obtida após extração e evaporação do solvente acetato de etila foi cromatografada em coluna de sílica gel (21,5 g, 1,6 cm x 30 cm), empregando-se a série eluotrópica usual. Obtiveram-se 49 frações, de 100 mL cada, que foram reunidas em 6 grupos, de acordo com sua semelhança em análises por CCDS (**Tabela 2.8**).

Tabela 2.8 – Fracionamento por CCS da fração acetato de etila (1,3 g) proveniente da biotransformação do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (90) por *C. aphidicola*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-9	Hex	900	G-1	1-9	94,5
10-21	Hex/DCM (1:1)	1.200	G-2	10	444,5
22-27	DCM	600	G-3	11-13	160,0
28-38	DCM/AcOEt (1:1)	1.100	G-4	14-24	178,9
39-43	AcOEt	500	G-5	25-28	81,5
44-47	AcOEt/MeOH (1:1)	400	G-6	26-49	95,1
48-49	MeOH	200	-	-	-
	Total	4.900	-	Total	960,1

Por CCDS, verificou-se que a fração 10 (G-2), 444,5 mg, continha apenas o caurenol (90), o substrato da biotransformação recuperado; portanto a quantidade do material de partida que efetivamente participou do experimento de biotransformação foi de 245,5 mg.

O G-5 (81,5 mg) apresentou manchas, por CCDS (eluente hexano/AcOEt 7:3), que se mostraram diferentes daquelas do material de partida e do controle do fungo, sendo consideradas potenciais produtos de biotransformação. Dessa forma, este

grupo foi submetido a cromatografias sucessivas a fim de se isolar seus constituintes.

2.9.1 Purificação do grupo de frações G-5

O grupo G-5 (81,5 mg) foi submetido a CCS empregando-se a série eluotrópica usual e as frações obtidas foram reunidas de acordo com a semelhança de seus perfis por CCDS, resultando em 4 grupos. A **Tabela 2.9** mostra os dados deste fracionamento.

Tabela 2.9 – Fracionamento por CCS do grupo G-5 proveniente da biotransformação do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) por *C. aphidicola*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-3	Hex/DCM (1:1)	130	G-5.1	1-6	4,6
4-6	DCM	100	G-5.2	7	25,0
7-9	DCM/AcOEt (1:1)	100	G-5.3	8	17,0
10-19	AcOEt	300	G-5.4	9-19	27,1
-	Total	630	-	Total	73,7

A fração 7, denominada G-5.2 (25 mg), foi submetida a nova CCS (eluente: hexano/AcOEt 75:25), originando 5 grupos de frações, como descrito na **Tabela 2.10** (página 62). Dentre estes grupos de frações, o grupo denominado G-5.2.2 (4,3 mg), referente à reunião das frações 17 a 21, apresentou mancha única nas análises por CCDS. Este material foi codificado como AR-1 e foi identificado por IV e RMN de ^1H e de ^{13}C mono e bidimensionais como *ent*-16 β ,17,19-trihidroxi-caurano (**92**), 1,75% de bioconversão.

O grupo G-5.2.4 (3,7 mg, frações 24-27), denominado AR-2, apresentou-se como um sólido branco amorfo que mostrou mancha única em análise por CCDS, empregando o eluente hexano/AcOEt (75:25). Esta substância foi identificada como o *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**), correspondendo a 1,51% de bioconversão.

Os demais grupos, G-5.2.1 a G-5.2.3 e G-5.2.5 apresentaram composição muito complexa e não foram trabalhados.

Tabela 2.10 – Fracionamento por CCS do G-5.2 proveniente da biotransformação do *ent-caur-16-en-19-ol* (**90**) por *C. aphidicola*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem (código)	Massa (mg)
1-45	Hex/AcOEt (75:25)	240	G-5.2.1	1-16	4,9
46-51	Hex/AcOEt (70:30)	40	G-5.2.2	17-21 (AR-1)	4,3
52-54	Hex/AcOEt (1:1)	70	G-5.2.3	22-23	1,7
55-58	AcOEt	50	G-5.2.4	24-27 (AR-2)	3,7
-	-	-	G-5.2.5	28-58	3,9
-	Total	400	-	Total	18,5

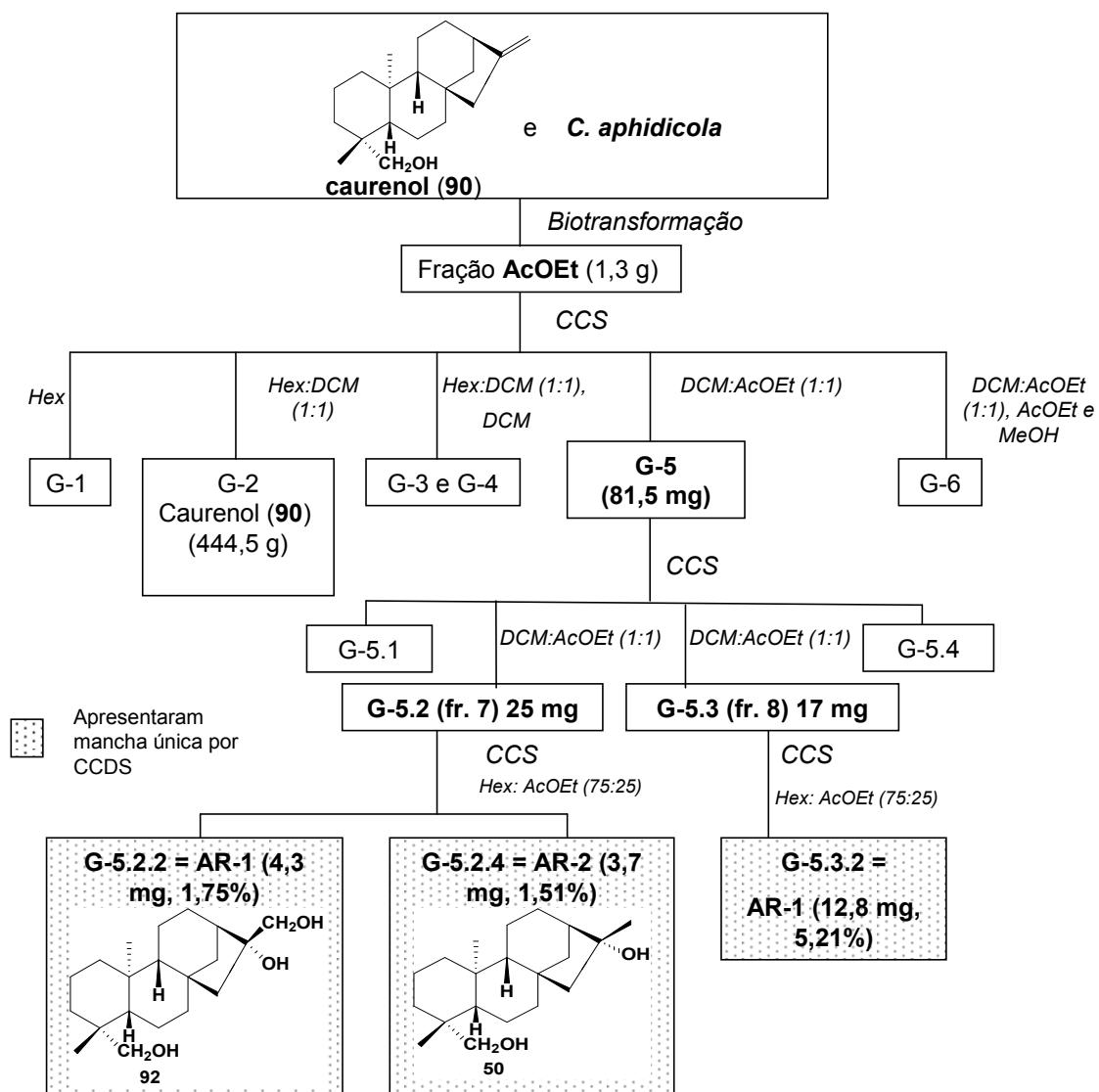
O grupo de frações G-5.3 (17 mg) (**Tabela 2.9**, página 61) foi submetido a nova CCS empregando-se eluição isocrática (eluente – hexano/AcOEt 75:25), de onde recolheram-se 70 frações de aproximadamente 5 mL, cada (**Tabela 2.11**). As frações analisadas por CCDS foram reunidas pela semelhança de seus perfis, resultando em 3 grupos. O grupo G-5.3.2 (12,8 mg), um sólido branco cristalino correspondente às frações 19-32, apresentou mancha única por CCDS e, em comparação com o sólido obtido anteriormente, foi identificado como quantidade adicional de AR-1, *ent-16 β ,17,19*-trihidroxi-caurano (**92**), 5,21% de bioconversão. Dessa forma foram obtidos 17,1 mg de **92**, o que representa 6,97 % de bioconversão total.

Os demais grupos, G-5.3.1 e G-5.3.3, apresentaram-se por CCDS, como misturas complexas de constituintes e não foram mais trabalhados.

Tabela 2.11 – Fracionamento por CCS do G-5.3 proveniente da biotransformação do *ent-19*-hidroxi-caur-16-eno (**90**) por *C. aphidicola*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem (código)	Massa (mg)
1-60	Hex/AcOEt (75:25)	240	G-5.3.1	1-18	3,3
61-63	Hex/AcOEt (1:1)	20	G-5.3.2	19-32 (AR-1)	12,8
64-70	AcOEt	30	G-5.3.3	33-70	8,6
-	Total	330	-	Total	24,7

O **Esquema 2.4**, a seguir, apresenta as purificações a que foi submetida a fração em acetato de etila, proveniente da biotransformação do *ent-19*-hidroxi-caur-16-eno (**90**) por *C. aphidicola*.



Esquema 2.4 - Purificação de substâncias da fração acetato de etila da biotransformação do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) por *C. aphidicola*.

2.10 Biotransformação do ácido *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91) por *Fusarium proliferatum*

- ✓ Quantidade de material inoculado: 0,35 g.
- ✓ Solvente para dissolução da amostra: EtOH (22 mL).
- ✓ Concentração da substância no meio de cultura: 0,073g/L.
- ✓ Dia da inoculação e duração do experimento: 4º dia, 18 dias.
- ✓ Volume de meio utilizado: 5,0 L (200 mL em cada frasco: 23 frascos de experimento; 1 controle positivo; 1 controle negativo).
- ✓ Massa da fração AcOEt 1, obtida após extração e evaporação do solvente: 2,04 g.
- ✓ Massa da fração AcOEt 2 (micélio), obtida após extração e evaporação do solvente: 1,29 g.

A fração AcOEt 1 (2,04 g), obtida por extração da fase líquida com acetato de etila, seguido por evaporação do solvente sob pressão reduzida, foi cromatografada em coluna de sílica gel (100,0 g, 2,4 cm x 50 cm), empregando-se a série eluotrópica usual. Originaram-se 27 frações de 100 mL cada, que foram reunidas em 8 grupos, de acordo com a semelhança de seus perfis cromatográficos em análises por CCDS (**Esquema 2.5**, página 66). No entanto, estes grupos apresentaram-se como uma mistura complexa de substâncias identificadas também no controle do fungo, não sendo purificados.

A fração AcOEt 2 (1,29 g), proveniente de lavagens do micélio do fungo *Fusarium proliferatum* com acetato de etila, seguido por destilação deste sob pressão reduzida, foi submetida também a CCS (50,0 g, 1,5 cm x 54 cm) empregando-se a série eluotrópica usual (**Tabela 2.12**, página 65). Obtiveram-se 27 frações de 100 mL cada, que foram reunidas em 5 grupos de acordo com a semelhança de seus perfis cromatográficos por CCDS.

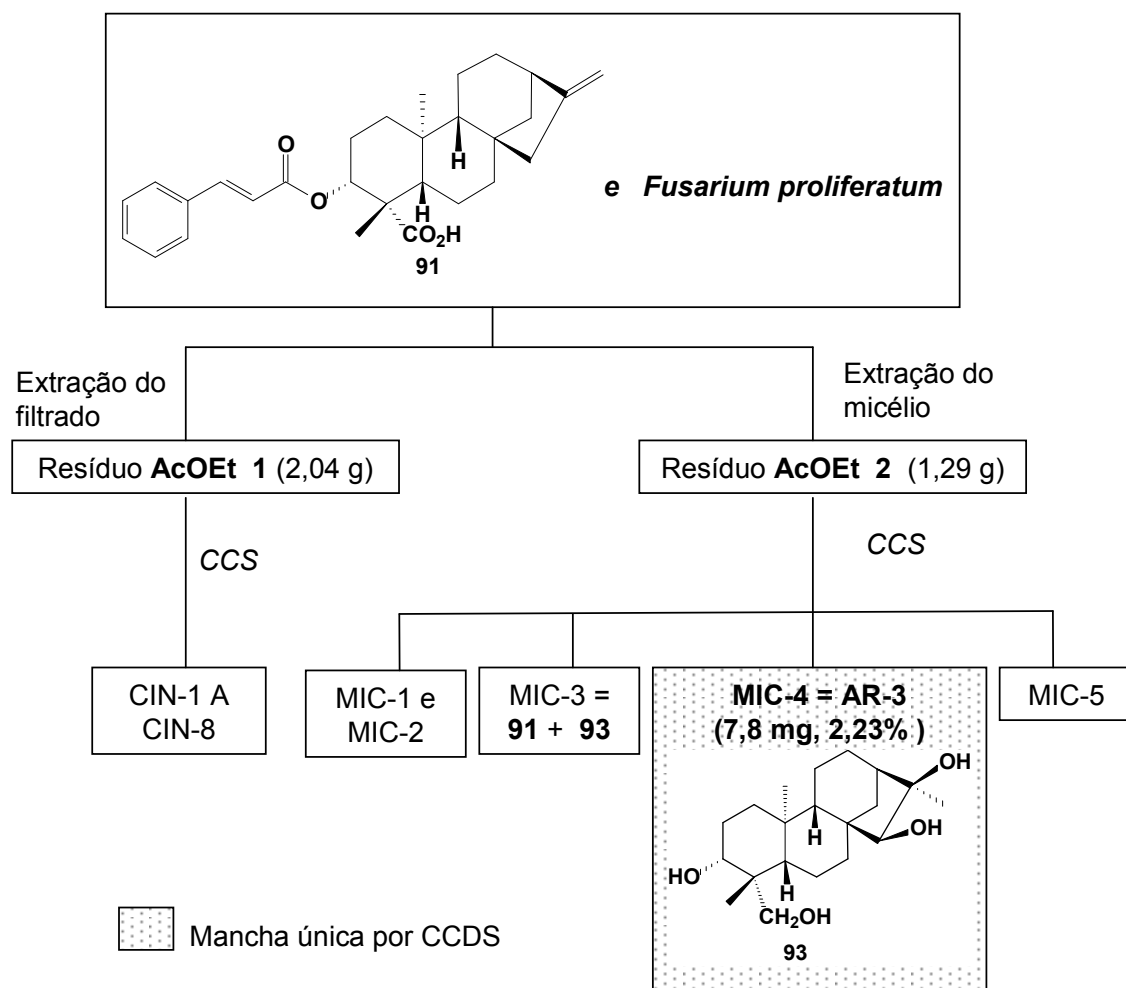
Tabela 2.12 – Fracionamento por CCS da fração 2 proveniente da biotransformação do ácido *ent-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91)* por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem (código)	Massa (mg)
1-3	Hex	300	MIC-1	1-5	854,7
4-6	Hex/DCM (1:1)	400	MIC-2	6-17	191,0
7-10	DCM	400	MIC-3	18	7,3
11-14	DCM/AcOEt (1:1)	400	MIC-4	19 (AR-3)	7,8
15-19	AcOEt	500	MIC-5	20-27	106,9
20-23	AcOEt/MeOH (1:1)	400	-	-	-
24-27	MeOH	400	-	-	-
-	Total	2.800	-	Total	1.167,7

Os grupos de frações MIC-1 e MIC-2 apresentaram-se como óleos densos incolores e se mostraram, por CCD, como uma mistura complexa de constituintes, semelhantes à composição do controle do meio, por isso, não foram trabalhados.

A fração 19 eluída com acetato de etila e denominada MIC-4 (7,8 mg), apresentou-se como um sólido opaco amarelado, mostrando apenas uma mancha castanho-amarelada quando submetida à CCDS [hexano/ AcOEt (3:7)], empregando-se solução ácida de sulfato cérico como revelador. Desse modo, foi codificada como **AR-3** e identificada por RMN de ^1H e de ^{13}C e IV como *ent-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (93)* com 2,23 % de bioconversão (**Esquema 2.5**). A fração 18 MIC-3 (7,3 mg) apresentou a mancha referente a **93**, contaminada com o material de partida **91**.

O grupo MIC-5 apresentou-se como uma resina constituída por uma mistura de substâncias polares e não foi trabalhado.



Esquema 2.5 - Purificação da fração acetato de etila proveniente da biotransformação do ácido *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (**91**) por *Fusarium proliferatum*.

2.11 Biotransformação do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) por *F. proliferatum*

- ✓ Quantidade de material inoculado: 0,37 g
- ✓ Solvente para dissolução da amostra: EtOH (11,5 mL)
- ✓ Concentração da substância no meio de cultura: 0,076 g/L
- ✓ Dia da inoculação e duração do experimento: 4º dia, 14 dias.
- ✓ Volume de meio utilizado: 5,0 L (200 mL em cada frasco: 23 frascos de experimento; 1 frasco do controle positivo; 1 frasco do controle negativo).
- ✓ Massa da fração obtida pela extração da fase líquida com acetato de etila, seguido de destilação do solvente sob pressão reduzida: 3,32 g

A fração obtida nesta biotransformação foi fracionada por CCS (215,8 g; 4,0 cm x 35 cm), empregando-se a série eluotrópica usual. Obtiveram-se 79 frações, de 100 mL cada, que foram reunidas em 7 grupos, de acordo com a semelhança de seus perfis em análises por CCDS (**Tabela 2.13**).

Tabela 2.13 – Fracionamento por CCS da fração acetato de etila (3,3 g) proveniente da biotransformação do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-22	Hex	2.200	NC-1	1-26	343,3
23-43	Hex/DCM (1:1)	2.100	NC-2	27-30	1.562,6
44-49	DCM	600	NC-3	31-48	147,9
50-61	DCM/AcOEt (1:1)	1.200	NC-4	49	365,5
62-67	AcOEt	700	NC-5	50-60	338,2
68-76	AcOEt/MeOH (1:1)	480	NC-6	61-67	143,2
77-79	MeOH	300	NC-7	68-79	126,6
-	Total	7.580	-	Total	3.027,3

O grupo NC-2 apresentou manchas, por CCDS, análogas àquelas do controle do fungo. Os grupos NC-4 e NC-6 apresentaram manchas diferentes daquelas citadas acima e também diferentes daquela do substrato. Ambos foram submetidos a purificação por CCS. Os demais grupos apresentaram-se como misturas complexas de substâncias e não foram trabalhados.

2.11.1 Purificação do grupo de frações NC-4

O grupo eluído com diclorometano e denominado NC-4 (365,5 mg), referente à fração 49 (**Tabela 2.13**, página 67), apresentou-se como cristais brancos imersos em um óleo amarelado. Parte deste material (330,2 mg) foi submetida à CCS (1,7 cm x 50 cm) empregando-se a série eluotrópica usual e recolhendo-se 21 frações em torno de 50 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis por CCDS resultando em 3 grupos (**Tabela 2.14**).

Tabela 2.14 – Fracionamento por CCS da fração NC-4 proveniente da biotransformação do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-5	Hex/DCM (1:1)	250	NC-4.1	1-5	10,8
6-10	DCM	250	NC-4.2	6-8	120,5
11-14	DCM/AcOEt (1:1)	200	NC-4.3	9-21	145,7
15-21	AcOEt	300	-	-	-
-	Total	1000	-	Total	277,0

Uma alíquota (40,4 mg) do grupo de frações reunidas NC-4.2, após recristalização em mistura de metanol e gotas de diclorometano, levou a um sólido (3,7 mg), que apresentou mancha única por CCDS, empregando o eluente hexano/AcOEt (7:3). A análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C deste sólido levou à conclusão de que o produto era um ácido graxo e, sendo assim, não poderia ser um produto de biotransformação do diterpeno **88**.

2.11.2 Purificação do grupo de frações NC-6

O grupo NC-6 (frações reunidas 61-67, 143,2 mg, **Tabela 2.13**, página 67), mostrou-se como cristais branco-amarelados, apresentando mancha única nas análises por CCDS.

Uma alíquota de NC-6 (125,9 mg) foi submetida à CCS (16,4 g; 1,2 cm x 35,5 cm), empregando-se a série eluotrópica usual recolhendo-se 22 frações de cerca de 50 mL cada. As frações obtidas foram reunidas, de acordo com seus perfis por CCDS, em 4 grupos (**Tabela 2.15**, página 69).

A fração 13, denominada de NC-6.3 (19,1 mg) mostrou mancha única por CCDS, sendo codificada como AR-4 e identificada como sendo o ácido *ent*-2 α -

hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**), por IV, RMN de ^1H e de ^{13}C (1D e 2D) e EM.

Tabela 2.15 – Fracionamento por CCS da fração NC-6 proveniente da biotransformação do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem (código)	Massa (mg)
1-8	DCM	400	NC-6.1	1-10	14,2
9-13	DCM/AcOEt (1:1)	200	NC-6.2	11-12	62,8
14-17	AcOEt	200	NC-6.3	13 (AR-4)	19,1
18-22	AcOEt/MeOH (1:1)	250	NC-6.4	14-22	43,9
-	Total	1050	-	Total	140,0

2.11.2.1 Purificação do grupo de frações NC-6.2

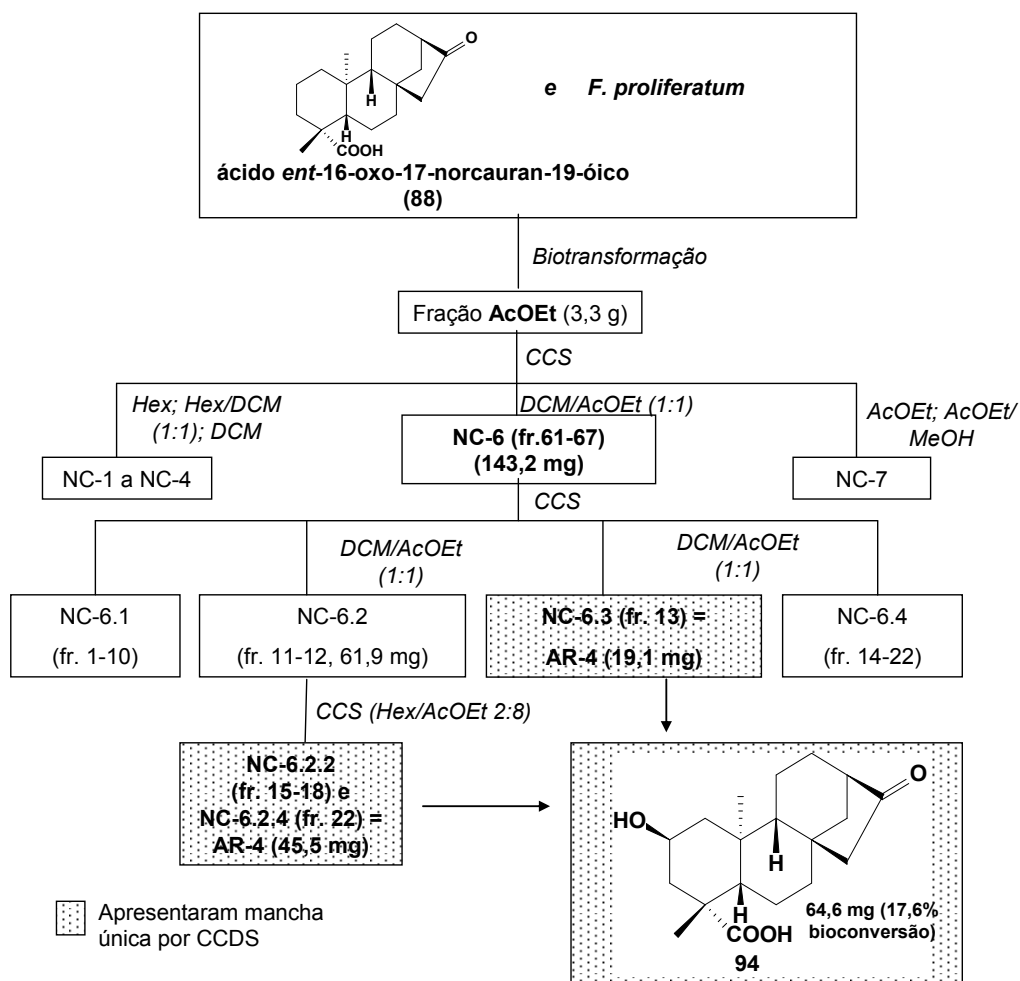
O grupo de frações NC-6.2 (62,8 mg), referente ao grupo de frações 11-12 (**Tabela 2.15**), teve uma alíquota (61,9 mg) submetida à CCS (18,0 g; 0,9 cm x 48 cm) (**Tabela 2.16**).

As frações 15-18 (NC-6.2.2, 34,1 mg) e 22 (NC-6.2.4, 11,4 mg) apresentaram-se como cristais brancos brilhantes em formato de agulhas finas e exibiram a mesma mancha única em CCDS, empregando solução ácida de sulfato cérico como revelador. Uma alíquota destes cristais foi submetida às análises usuais [IV, RMN de ^1H e de ^{13}C (1D e 2D)]. Por meio destas comprovou-se que os mesmos eram quantidades adicionais de AR-4: o ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**) (64,6 mg; 17,6% de bioconversão). A confirmação da estrutura proposta foi realizada por cristalografia de raios-X.

Tabela 2.16 – Fracionamento por CCS de NC-6.2, proveniente da biotransformação do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem (código)	Massa (mg)
1-9	Hex/AcOEt (1:1)	150	NC-6.2.1	1-14	7,8
10-20	Hex/AcOEt (2:8)	150	NC-6.2.2	15-18 (AR-4)	34,1
21-24	Hex/AcOEt (1:9)	50	NC-6.2.3	19-21	1,5
25-26	AcOEt	50	NC-6.2.4	22 (AR-4)	11,4
27-32	AcOEt/MeOH (1:1)	100	NC-6.2.5	23-34	23,5
33	MeOH	25	-	-	-
-	Total	525	-	Total	78,5

O **Esquema 2.6**, a seguir, sumariza os processos de purificação a que foi submetido o extrato em acetato de etila obtido da biotransformação do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) por *F. proliferatum*.



Esquema 2.6 - Purificação de substâncias da fração acetato de etila originada na biotransformação do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) por *F. proliferatum*.

2.12 Biotransformação do *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89) por *F. proliferatum*

- ✓ Quantidade de material inoculado: 0,31 g.
- ✓ Solvente para dissolução da amostra: EtOH (23,0 mL).
- ✓ Concentração da substância no meio de cultura: 0,064 g/L.
- ✓ Dia da inoculação e duração do experimento: 3º dia, 10 dias.
- ✓ Volume de meio utilizado: 5,0 L (200 mL em cada frasco: 23 frascos de experimento; 1 frasco do controle positivo; 1 frasco do controle negativo).
- ✓ Massa da fração obtida após extração e evaporação do AcOEt: 5,62 g.

Uma alíquota (4,8 g) da fração oleosa, castanho-avermelhada obtida após remoção do solvente foi cromatografada em coluna de sílica gel (166,0 g; 2,7 cm x 62,5 cm), empregando-se a série eluotrópica usual. Obtiveram-se 34 frações, com volumes variando entre 100 mL e 225 mL cada, que foram reunidas em 10 grupos, codificados como NG, de acordo com a semelhança de seus perfis em análises por CCDS (**Tabela 2.17**).

Tabela 2.17 – Fracionamento por CCS da fração acetato de etila proveniente da biotransformação do ácido *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89) por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-3	Hex	2.200	NG-1	1-4	25,9
4-7	Hex/DCM (1:1)	2.100	NG-2	5-6	723,5
8-12	DCM	600	NG-3	7-12	185,3
13-17	DCM/EtOAc (1:1)	1.200	NG-4	13	833,4
18-22	AcOEt	700	NG-5	14-15	253,7
23-26	AcOEt/MeOH (1:1)	480	NG-6	16-17	762,9
27-31	MeOH	300	NG-7	18-22	499,6
32-34	MeOH/H ₂ O	200	NG-8	23-24	1.455,9
-	-	-	NG-9	25-33	282,0
-	-	-	NG-10	34	27,7
-	Total	8.100	-	Total	4.550,3

Os grupos NG-4, NG-6, NG-8 e NG-10 foram submetidos à tentativa de purificação por sucessivas CCS, mas nenhum produto de biotransformação foi isolado.

2.13 Biotransformação do ácido *ent-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico* (**78**) por *F. proliferatum*

- ✓ Quantidade de material inoculado: 0,28 g.
- ✓ Solvente para dissolução da amostra: EtOH (11,5 mL).
- ✓ Concentração da substância no meio de cultura: 0,061 g/L.
- ✓ Dia da inoculação e duração do experimento: 4º dia, 14 dias.
- ✓ Volume de meio utilizado: 4,8 L (200 mL em cada frasco: 22 frascos de experimento; 1 frasco do controle positivo; 1 frasco do controle negativo).
- ✓ Massa da fração obtida após extração e evaporação do AcOEt: 4,4 g.

A fração obtida após extração e evaporação do solvente acetato de etila foi cromatografada em coluna de sílica gel (149,0 g, 2,5 cm x 59 cm), empregando-se a série eluotrópica usual. Obtiveram-se 39 frações, de 100 – 130 mL cada, que foram reunidas em 5 grupos, de acordo com sua semelhança em análises por CCDS (**Tabela 2. 18**).

Tabela 2.18 - Fracionamento por CCS da fração AcOEt (4,35 g), proveniente da biotransformação do ácido *ent-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico* (**78**) por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-6	Hex	850	ANG1	1-18	2.154
7-13	Hex/DCM (1:1)	700	ANG2	19-21	597,4
14-20	DCM	900	ANG3	22-33	1.066
21-26	DCM/EtOAc (1:1)	800	ANG4	31	3,7
27-30	AcOEt	850	ANG5	34-39	4,2
31-34	AcOEt/MeOH (1:1)	500	-	-	-
35-39	MeOH	500	-	-	-
-	Total	5.100	-	Total	3.825,3

Nos grupos de frações reunidas sob os códigos ANG1 e ANG2 observaram-se substâncias com o mesmo perfil cromatográfico visualizado no controle do fungo e no controle do substrato, respectivamente.

Comparação, por CCDS, do perfil cromatográfico dos grupos ANG3 e ANG5 e amostra de glicose, demonstrou que estes grupos possuíam este açúcar em sua composição, além de substâncias presentes também no controle do fungo. O grupo ANG4 (fração 31) apresentou-se como uma mancha cinza arredondada que não

aparecia em nenhum dos dois controles. No entanto, devido à pequena quantidade isolada da substância e à sua baixa solubilidade mesmo em diferentes solventes orgânicos (metanol, piridina, acetona) não foi possível obter espectro de RMN adequado à elucidação estrutural.

2.14 Biotransformação do *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83) por *F. proliferatum*

- ✓ Quantidade de material inoculado: 0,41 g.
- ✓ Solvente para dissolução da amostra: EtOH (9,2 mL).
- ✓ Concentração da substância no meio de cultura: 0,089 g/L.
- ✓ Dia da inoculação e duração do experimento: 4º dia, 14 dias.
- ✓ Volume de meio utilizado: 4,8 L (200 mL em cada frasco: 22 frascos de experimento; 1 frasco do controle positivo; 1 frasco do controle negativo).
- ✓ Massa da fração obtida após extração e evaporação do AcOEt: 1,6 g.
- ✓ Massa da fração obtida após extração e evaporação do *n*-BuOH: 0,3 g.

As CCS das frações acetato de etila (**Tabela 2.19**) e butanólica (**Tabela 2.20**, página 74) foram realizadas. As frações obtidas, reunidas de acordo com sua semelhança em análises por CCDS, apresentaram-se como misturas complexas de substâncias e não proporcionaram o isolamento de nenhum produto de biotransformação.

Tabela 2.19 - Fracionamento por CCS (39 g, 1,5 cm x 44 cm) da fração AcOEt (1,6 g) proveniente da biotransformação do *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83) por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-3	Hex	300	E1	1-4	564,9
4-6	Hex/DCM (1:1)	300	E2	6	148,1
7-12	DCM	600	E3	5-15	438,4
13-18	DCM/EtOAc (1:1)	650	E4	16-20	124,4
19-20	AcOEt	280	E5	21-24	270,0
21-22	AcOEt/MeOH (1:1)	200	-	-	-
23-24	MeOH	200	-	-	-
-	Total	2.530	-	Total	1.545,8

Tabela 2.20 - Fracionamento por CCS (18,5 g, 1 cm x 40 cm) da fração *n*-butanólica (277 mg) proveniente da biotransformação do *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**) por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-2	Hex	100	EBu1	1-7	175,6
3-4	Hex/DCM (1:1)	100	EBu2	8-13	45,0
5-8	DCM	260	EBu3	14-18	50,2
9-11	DCM/EtOAc (1:1)	150	-	-	-
12-14	AcOEt	150	-	-	-
15-17	AcOEt/MeOH (1:1)	160	-	-	-
18-20	MeOH	150	-	-	-
-	Total	1070	-	Total	170,8

2.15 Biotransformação de uma mistura dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**) por *F. proliferatum*

- ✓ Quantidade de material inoculado: 0,36 g.
- ✓ Solvente para dissolução da amostra: EtOH (9,2 mL).
- ✓ Concentração da substância no meio de cultura: 0,077 g/L.
- ✓ Dia da inoculação e duração do experimento: 4º dia, 14 dias.
- ✓ Volume de meio utilizado: 4,8 L (200 mL em cada frasco: 22 frascos de experimento; 1 frasco do controle positivo; 1 frasco do controle negativo).
- ✓ Massa da fração obtida após extração e evaporação do AcOEt: 4,28 g.
- ✓ Massa da fração obtida após extração e evaporação do *n*-BuOH: 3,67 g.

2.15.1 Fracionamento da fração em acetato de etila

Uma alíquota da fração obtida pela extração com acetato de etila (4,2 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel (100,0 g; 2,5 cm x 58 cm), empregando-se a série eluotrópica usual. Obtiveram-se 30 frações, variando entre 100 e 150 mL, que foram reunidas em 8 grupos, de acordo com a semelhança de seus perfis em análises por CCDS (**Tabela 2.21**, página 75).

O grupo HA2 (16,3 mg), um óleo incolor, apresentou mancha única em análises por CCDS. Através de análises dos espectros no IV e de RMN concluiu-se que HA2 tratava-se de um ácido graxo e não de um produto de biotransformação e, portanto, não foi identificado.

Os grupos HA3, HA4, HA6 e HA7 foram submetidos a novas purificações.

Tabela 2.21 – Fracionamento por CCS do resíduo AcOEt proveniente da biotransformação da mistura dos ácidos **85** e **86** por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-4	Hex	400	HA1	1-9	1.024,7
5-11	Hex/DCM (1:1)	950	HA2	10-11	16,3
12-14	DCM	400	HA3	12-15	217,6
15-21	DCM/AcOEt (1:1)	660	HA4	16	144,0
22-23	AcOEt	200	HA5	17-19	162,2
24-25	AcOEt/MeOH (1:1)	220	HA6	20-21	649,9
26-30	MeOH	550	HA7	22-23	1265,0
-	-	-	HA8	24-30	409,2
-	Total	3.380	-	Total	3.888,9

2.15.1.1 Fracionamento do grupo de frações HA3

217,6 mg do grupo HA3 foram submetidos à CCS (12,3 g; 1,5 cm x 32 cm), tendo sido obtidas 15 frações de 40 mL cada (**Tabela 2.22**, página 76). As frações foram reunidas de acordo com seus perfis por CCDS em 2 grupos, HA3.1 e HA3.2. HA3.1 apresentou-se como uma mistura de substâncias apolares e HA3.2 apresentou perfil por CCDS comparável ao encontrado para o ácido graxo HA2.

Tabela 2.22 – Fracionamento por CCS do grupo de frações HA3, proveniente da biotransformação da mistura dos ácidos **85** e **86** por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-2	Hex/DCM (3:7)	80	HA3.1	1-6	102,1
3-5	DCM	120	HA3.2	7-15	74,3
6-7	DCM/AcOEt (9:1)	80	-	-	-
8-10	DCM/AcOEt (75:25)	120	-	-	-
11-15	DCM/AcOEt (1:1)	200	-	-	-
-	Total	600	-	Total	176,4

2.15.1.2 Fracionamento do grupo de frações HA4

O grupo HA4 (144,0 mg) apresentou mancha similar à do material de partida por CCDS e, por CCS (8,5 g, 1 cm x 22,5 cm) (**Tabela 2.23**, página 76), foram recuperados 30,4 mg (grupo HA4.3) do ácido *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**).

Tabela 2.23 – Fracionamento por CCS do grupo de frações HA4, proveniente da biotransformação da mistura dos ácidos **85** e **86** por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-8	DCM	70	HA4.1	1-7	12,1
9-13	DCM/AcOEt (9:1)	70	HA4.2	8-10	6,8
14-22	DCM/AcOEt (7:3)	140	HA4.3	12-13	30,4
23-26	DCM/AcOEt (1:1)	70	HA4.4	14-25	24,6
27-29	AcOEt	40	HA4.5	26-29	35,2
-	Total	600	-	Total	109,1

2.15.1.3 Fracionamento do grupo de frações HA6

594,2 mg deste grupo de frações foram submetidas à CCS (17,7 g; 1,1 x 35 cm) originando 30 frações de aproximadamente 10 mL cada (**Tabela 2.24**). Nas frações 14 a 28 foi observada a presença de um sólido em forma de agulhas finas, brilhante, imerso em óleo marrom claro. Este material foi identificado como um contaminante.

As demais frações apresentavam material comparável ao identificado no controle fúngico.

Tabela 2.24 – Fracionamento por CCS do grupo de frações HA6, proveniente da biotransformação da mistura dos ácidos **85** e **86** por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-10	DCM	100	HA6.1	1-13	256,7
11-14	DCM: AcOEt (7:3)	50	HA6.2	14-28	154,3
15-28	DCM: AcOEt (1:1)	150	HA6.3	29-30	42,0
29-30	AcOEt	30	-	-	-
-	Total	330	-	Total	453,0

2.15.1.4 Purificação do grupo de frações HA7

O grupo denominado HA7 (1,265 g) apresentou-se como um sólido branco imerso em um óleo marrom escuro. A análise por CCDS desta fração, empregando-se sulfato cérico como revelador, demonstrou ser, este, uma mistura de substâncias diferentes dos controles do fungo e substrato. Parte deste material (1,2 g) foi submetido a CCS (25,0 g; 1,5 cm x 38 cm), pela utilização da série eluotrópica usual, sendo recolhidas 25 frações com volume em torno de 50 mL, cada. As frações foram

reunidas, de acordo com a semelhança de seus perfis por CCDS, resultando em 7 grupos (**Tabela 2.25**).

Tabela 2.25 – Fracionamento por CCS do grupo HA7 proveniente da biotransformação da mistura de ácidos **85** e **86** pelo *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-7	DCM	300	HA7.1	1-10	152,3
8-16	DCM/AcOEt (1:1)	400	HA7.2	11-12	90,1
17-21	AcOEt	200	HA7.3	13-16 (AR-5)	95,1
22-23	AcOEt/MeOH (1:1)	100	HA7.4	17-21	32,4
24-25	MeOH	100	HA7.5	22-25	863,9
-	Total	1000	-	Total	1.233,8

O grupo HA7.3, codificado como AR-5 (95,1 mg), referente às frações reunidas 13 a 16 se apresentou como um sólido opaco amarelo ouro, com mancha única em CCDS, sendo identificado como o ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**) (26,78 % de bioconversão) (**Esquema 2.7**, página 78), através de análise dos espectros no IV, RMN de ^1H e de ^{13}C (1D e 2D) e EM.

Os grupos HA7.2 e HA7.4 mostraram-se, por CCDS, como uma mistura de AR-5 e dos materiais de partida da biotransformação.

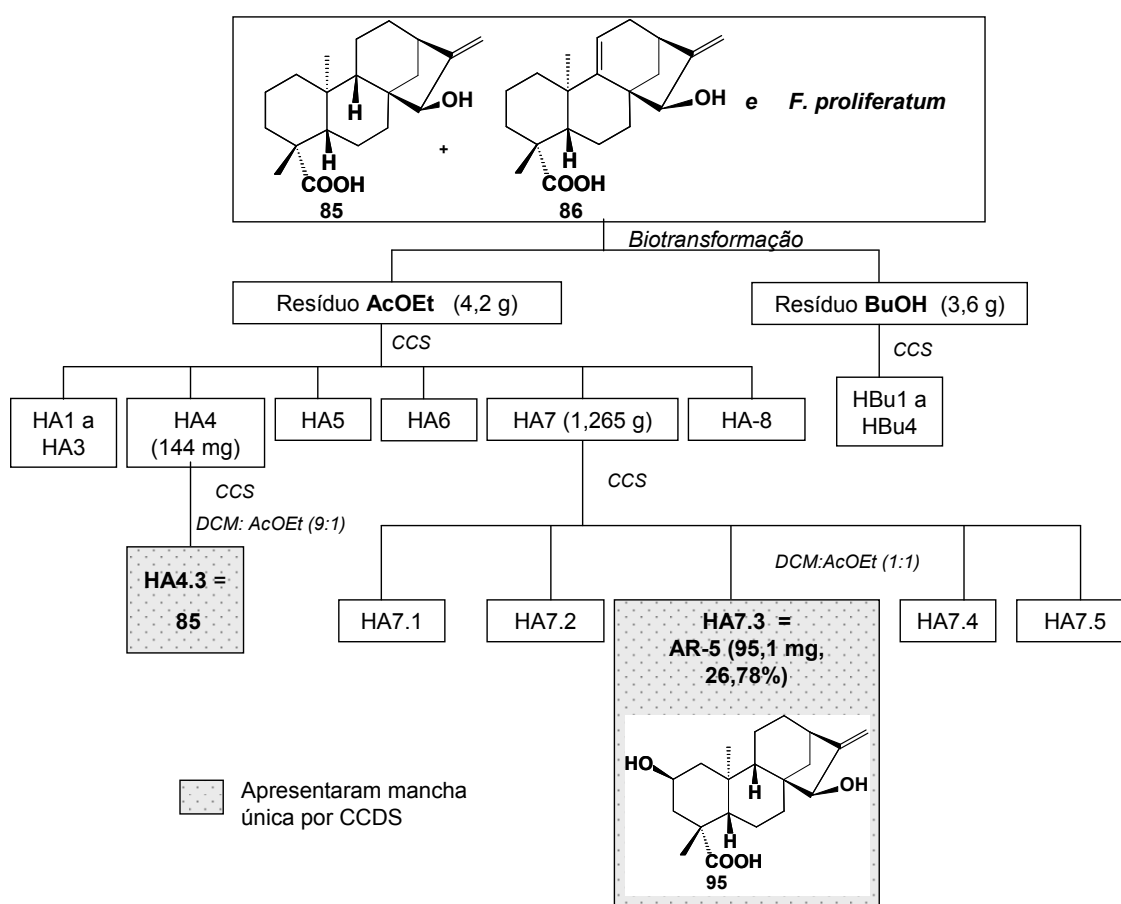
HA7.1 e HA7.5 apresentaram constituintes semelhantes aos visualizados, por CCDS, no controle do meio.

2.15.2 Fracionamento da fração *n*-butanólica

A fração *n*-butanólica (3,6 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel (120,0 g, 2,5 cm x 44 cm), empregando-se a série eluotrópica usual. Obtiveram-se 20 frações de 100 a 200 mL, que foram reunidas em 4 grupos, de acordo com a semelhança de seus perfis em análises por CCDS (**Tabela 2.26**, página 78). No entanto, não se identificou nenhum produto de biotransformação nestas frações (**Esquema 2.7**, página 78).

Tabela 2.26 – Fracionamento por CCS do resíduo *n*-butanólico proveniente da biotransformação da mistura dos ácidos **85** e **86** por *F. proliferatum*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-2	Hex	365	HBu1	1-11	34,4
3-6	Hex/DCM (1:1)	400	HBu2	12-16	261,9
7-10	DCM	400	HBu3	17-18	20,3
11-13	DCM/AcOEt (1:1)	400	HBu4	19-20	154,8
14-15	AcOEt	400	-	-	-
16-17	AcOEt/MeOH (1:1)	400	-	-	-
18-20	MeOH	400	-	-	-
-	Total	2.765	-	Total	471,4



Esquema 2.7 - Purificação das frações acetato de etila e butanólica originadas na biotransformação de mistura dos ácidos **85** e **86** por *F. proliferatum*.

2.16 Biotransformação da mistura dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (1) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico (2) por *P. palustris*

- ✓ Quantidade de material inoculado: 0,5 g
- ✓ Solvente para dissolução da amostra: EtOH (29,0 mL)
- ✓ Concentração da substância no meio de cultura: 0,09 g/L
- ✓ Dia da inoculação e duração do experimento: 4º dia, 15 dias.
- ✓ Volume de meio utilizado: 6,0 L (200 mL em cada frasco: 28 frascos de experimento; 1 frasco do controle positivo; 1 frasco do controle negativo).
- ✓ Massa da fração obtida após extração e evaporação do AcOEt: 0,77 g
- ✓ Massa da fração obtida após extração e evaporação do *n*-BuOH: 0,99 g

2.16.1 Fracionamento da fração em acetato de etila

Parte da fração (0,70 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel (24,0 g, 1,5 cm x 35 cm), empregando-se a série eluotrópica usual. Obtiveram-se 23 frações, com volumes variando entre 100 e 125 mL, que foram reunidas em 4 grupos, de acordo com a semelhança de seus perfis em análises por CCDS (**Tabela 2.27**).

Tabela 2.27 – Fracionamento por CCS da fração em AcOEt, proveniente da biotransformação da mistura dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2) por *P. palustris*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-4	Hex	420	PpA1	1-11	390,5
5-6	Hex/DCM (1:1)	300	PpA2	12	31,3
7-8	DCM	250	PpA3	13-15	43,2
9-12	DCM/AcOEt (1:1)	500	PpA4	16-23	457,0
13-16	AcOEt	400	-	-	-
17-18	AcOEt/MeOH (1:1)	250	-	-	-
19-23	MeOH	450	-	-	-
-	Total	2.570	-	Total	922,0

Os grupos PpA2 e PpA3 foram submetidos ao refractionamento por CCS objetivando a purificação de substâncias, mas nenhum produto de biotransformação foi isolado.

2.16.2 Fracionamento da fração *n*-butanólica

Uma alíquota (0,75 g) da fração *n*-butanólica foi cromatografada em coluna de sílica gel (30,0 g, 1,9 cm x 38 cm), empregando-se a série eluotrópica usual. Obtiveram-se 18 frações de 100 a 125 mL, que foram reunidas em 5 grupos, de acordo com a semelhança de seus perfis em análises por CCDS (**Tabela 2.28**).

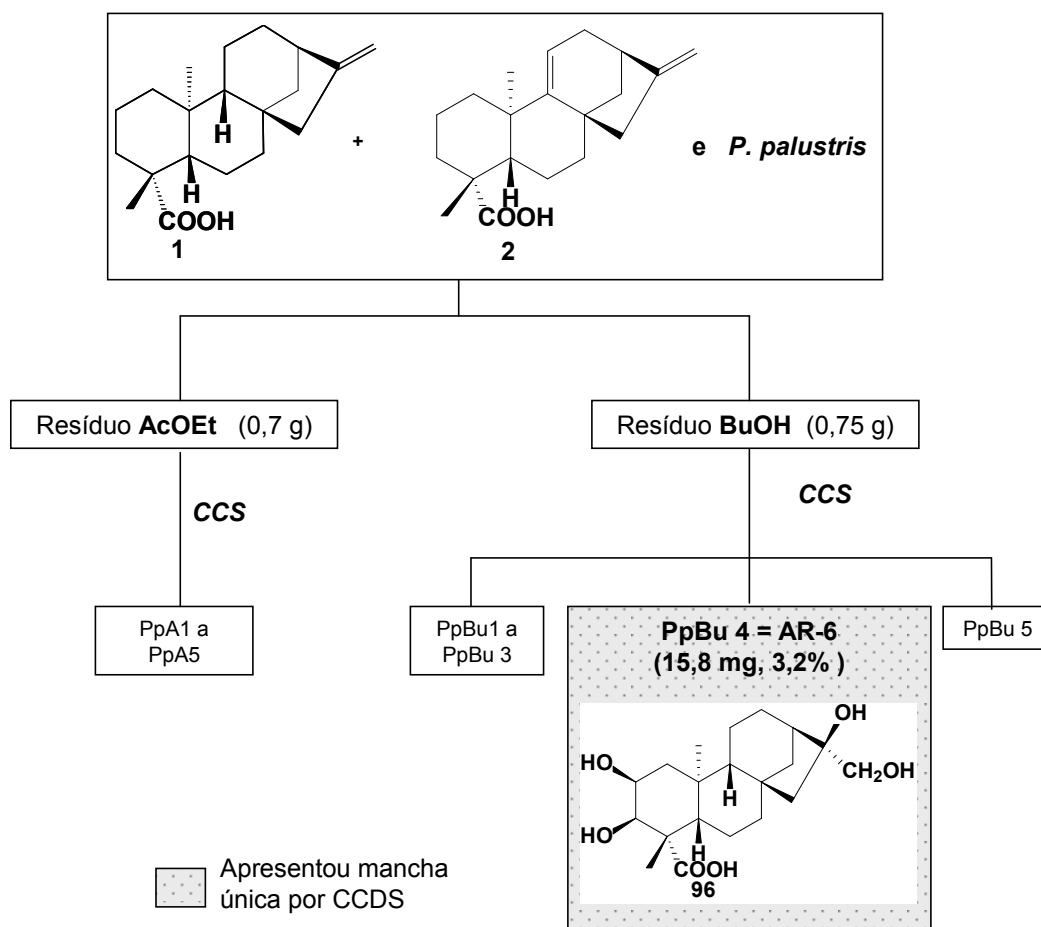
Tabela 2.28 – Fracionamento por CCS da fração *n*-butanólico proveniente da biotransformação dos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**) por *P. palustris*

Fração	Eluente	Volume (mL)	Grupo	Fração de origem	Massa (mg)
1-2	Hex	180	PpBu1	1-6	8,6
3	Hex/DCM (1:1)	150	PpBu2	7	20,5
4-5	DCM	200	PpBu3	8-9	68,4
6-8	DCM/AcOEt (1:1)	350	PpBu4	10-11 (AR-6)	15,8
9-11	AcOEt	350	PpBu5	12-18	908,0
12-15	AcOEt/MeOH (1:1)	400	-	-	-
16-18	MeOH	350	-	-	-
-	Total	1980	-	Total	952,9

A fração 7 (20,5 mg, PpBu2) apresentou, nas análises por CCDS empregando o eluente hexano/ AcOEt (1:1), duas manchas, aquela referente ao material de partida e outra, marrom arredondada, mais polar do que primeira. Assim, objetivando isolar esta substância, realizou-se uma coluna flash. Empregou-se, na eluição isocrática, hexano: acetato de etila (1:1), recolhendo-se 20 frações de 5 mL. O grupo de frações 14 a 20 (7,0 mg), solúvel em clorofórmio, apresentou apenas a mancha marrom escuro. Análise por RMN de ^1H e de ^{13}C mostrou que a substância não se tratava de um diterpeno. Sendo assim, não se prosseguiu com a identificação.

A fração reunida 10-11 (15,8 mg, PpBu4), codificada como AR-6, apresentou mancha única em análises por CCDS, sendo identificado como o ácido *ent*-2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahydroxi-cauran-19-óico (**96**) (3,2 % de bioconversão), através de análise dos espectros no IV, RMN de ^1H e de ^{13}C (1D e 2D).

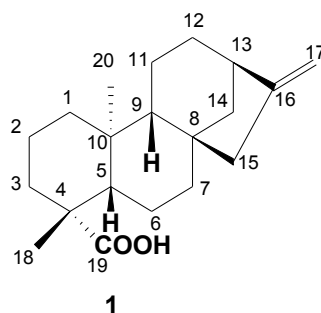
O **Esquema 2.8** (página 81) apresenta os fracionamentos a que foram submetidas os extratos em acetato de etila e butanólico, provenientes da biotransformação da mistura dos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**) por *P. palustris*.



Esquema 2.8 - Purificação das frações acetato de etila e butanólica originadas na biotransformação da mistura dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2) por *P. palustris*.

2.17 Dados físico-químicos

2.17.1 Ácido *ent*-caur-16-en-19-óico (1)



Aspecto: cristais brancos opacos.

FM (MM): C₂₀H₃₀O₂ (302 g/mol).

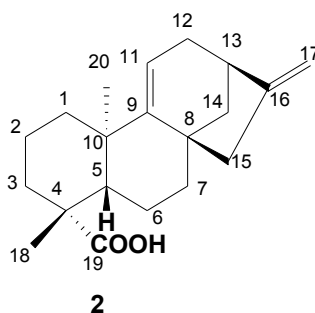
Faixa de fusão: 167 -182 °C (lit.⁷: 179-180 °C).

IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 2926 e 2855 (C-H, O-H), 1685 (C=O), 1655 (C=CH₂), 872 (C-H).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ): 0,95 (s, 3H, H-20); 1,24 (s, 3H, H-18); 2,57 (m, 1H, H-13); 4,74 (sl, 1H, H-17a); 4,80 (sl, 1H, H-17b).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz, δ): 40,70 (C-1); 19,09 (C-2); 37,77 (C-3); 43,76 (C-4); 57,06 (C-5); 21,83 (C-6); 41,28 (C-7); 44,23 (C-8); 55,10 (C-9); 38,80 (C-10); 18,43 (C-11); 33,11 (C-12); 43,84 (C-13); 39,66 (C-14); 48,96 (C-15); 155,90 (C-16); 103,00 (C-17); 28,98 (C-18); 184,69 (C-19); 15,59 (C-20).

2.17.2 Ácido *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico (2)



Aspecto: cristais brancos opacos.

FM (MM): C₂₀H₂₈O₂ (300 g/mol).

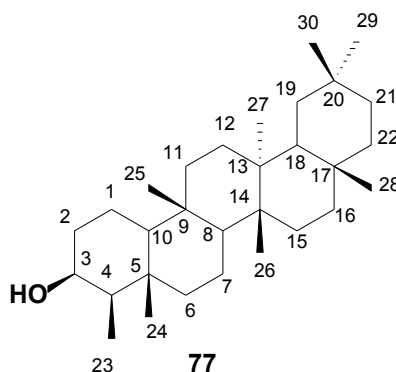
Faixa de fusão: 157,3-159,6 °C (lit.⁷: 157-159 °C).

IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 3000-2900 (O-H; C-H), 1690 (C=O), 1650 (C=CH₂), 850 (C-H).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ): 1,03 (s, 3H, H-20); 1,24 (s, 3H, H-18); 2,64 (m, 1H, H-13); 4,80 (sl, 1H, H-17a); 4,91 (sl, 1H, H-17b); 5,24 (tl, 1H, H-11, J 3,26).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz, δ): 40,70 (C-1); 20,13 (C-2); 38,23 (C-3); 44,73 (C-4); 46,59 (C-5); 20,00 (C-6); 29,66 (C-7); 42,27 (C-8); 158,56 (C-9); 38,80 (C-10); 114,90 (C-11); 37,92 (C-12); 41,24 (C-13); 44,94 (C-14); 50,30 (C-15); 155,95 (C-16); 105,49 (C-17); 28,24 (C-18); 184,52 (C-19); 23,60 (C-20).

2.17.3 3β -Friedelinol (77)



Aspecto: sólido branco brilhante.

FM (MM): $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}$ (428 g/mol).

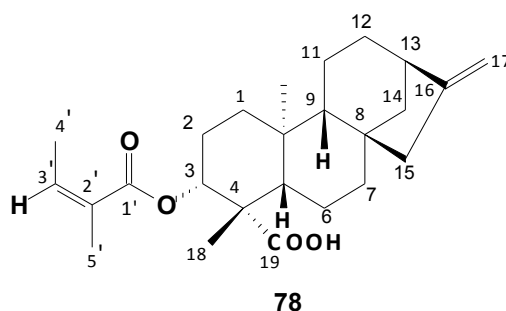
Faixa de fusão: 276-279 °C (lit.⁷: 279-280 °C).

IV (ν_{max} , cm^{-1}): 3619 e 3472 (O-H), 2924 e 2869 cm^{-1} (C-H) 1650 (O-H), 1450-880 1450 e 980 (C-H).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz, δ): 3,74 (sl, 1H, H-3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz, δ): 15,78 (C-1); 35,17 (C-2); 72,76 (C-3); 49,16 (C-4); 37,82 (C-5); 41,71 (C-6); 17,54 (C-7); 53,18 (C-8); 37,09 (C-9); 61,33 (C-10); 35,33 (C-11); 30,63 (C-12); 38,36 (C-13); 39,66 (C-14); 32,32 (C-15); 36,07 (C-16); 30,02 (C-17); 42,80 (C-18); 35,54 (C-19); 28,18 (C-20); 32,80 (C-21); 39,28 (C-22); 11,63 (C-23); 16,39 (C-24); 18,25 (C-25); 18,66 (C-26); 20,12 (C-27); 32,09 (C-28); 31,79 (C-29); 35,03 (C-30).

2.17.4 Ácido *ent*- 3β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78)



Aspecto: sólido branco opaco.

FM (MM): C₂₅H₃₆O₄ (400 g/mol).

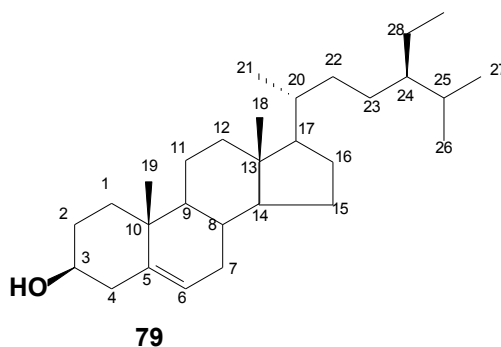
Faixa de fusão: 175-178 °C (lit.⁷: 173-175 °C).

IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 2927 e 2854 (O-H, C-H), 1698 (C=O), 1454 (C=CH; C=CH₂), 1260 - 870 (C-H).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ): 1,05 (s, 3H, H-20); 1,30 (s, 3H, H-18); 2,64 (sl, 1H, H-13); 4,62 (dd, $J = 4,57$ e $12,04$ Hz, 1H, H-3); 4,75 (sl, 1H, H-17a); 4,81 (sl, 1H, H-17b), 6,09 (qq, $J = 1,35$ e $7,25$, 1H, H-3'); 1,99 (dl, $J = 7,33$, 3H, H-4'); 1,89 (s, 3H, H-5').

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz, δ): 39,49 (C-1); 24,10 (C-2); 78,68 (C-3); 47,94 (C-4); 55,13 (C-5); 21,49 (C-6); 40,96 (C-7); 43,89 (C-8); 56,42 (C-9); 39,36 (C-10); 18,49 (C-11); 33,03 (C-12); 43,73 (C-13); 38,72 (C-14); 48,71 (C-15); 155,32 (C-16); 103,28 (C-17); 23,95 (C-18); 180,86 (C-19); 15,69 (C-20); 167,73 (C-1'); 127,98 (C-2'); 138,07 (C-3'); 15,30 (C-4'); 20,66 (C-5').

2.17.5 β -sitosterol (79)



Aspecto: sólido branco.

FM (MM): C₂₉H₅₀O (414g/mol).

Faixa de fusão: 156-163 °C (lit.⁸: 126,7-130,2 °C).

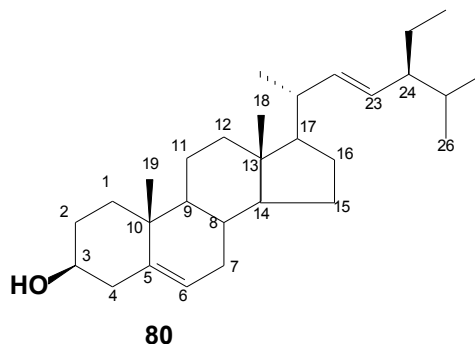
IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 3469 e 3286 (O-H), 2933 - 2863 (C-H), 1456, 1382 e 1367 1260 (C-H), 1051 e 1023 (O-H).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ): 5,34 (dl, $J = 4,6$ Hz, 1H; H-6), 3,52 (m, 1H, H-3), 1,03 (s, 3H, H-19), 0,69 (s, 3H, H-18).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz, δ): 37,23 (C-1); 31,61 (C-2); 71,78 (C-3); 42,26 (C-4); 140,72 (C-5); 121,69 (C-6); * (C-7); 31,86 (C-8); 50,12 (C-9); 36,48 (C-10); 21,05 (C-11); 39,66 (C-12); 42,18 (C-13); 56,83 (C-14); 24,34 (C-15); 28,91 (C-16); 55,91 (C-17); 11,85 (C-18); 19,38 (C-19); 40,49 (C-20); 21,09 (C-21); * (C-22); * (C-23); 51,22

(C-24); 29,20 (C-25); 21,21 (C-26); 18,96 (C-27); 25,39 (C-28); 12,25 (C-29). *não determinado

2.17.6 Estigmasterol (80)



Aspecto: sólido branco.

FM (MM): C₂₉H₄₈O (412 g/mol).

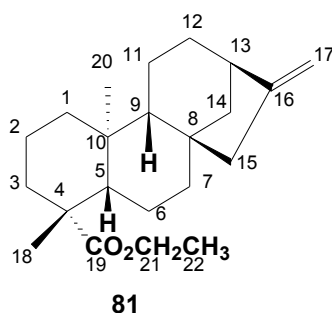
Faixa de fusão: 156-163 °C (lit.⁸: 156-157 °C).

IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 3469 e 3286 (O-H), 2933 - 2863 (C-H), 1456, 1382 e 1367 1260 (C-H), 1051 e 1023 (O-H).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ): 5,34 (dl, J = 4,6 Hz, 1H; H-6), 3,52 (m, 1H, H-3), 1,03 (s, 3H, H-19), 0,69 (s, 3H, H-18), 5,10 (m, 2H, H-22 e H-23).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz, δ): 37,23 (C-1); 31,61 (C-2); 71,78 (C-3); 42,26 (C-4); 140,72 (C-5); 121,69 (C-6); * (C-7); 31,86 (C-8); 50,12 (C-9); 36,48 (C-10); 21,05 (C-11); 39,66 (C-12); 42,18 (C-13); 56,83 (C-14); 24,34 (C-15); 28,91 (C-16); 55,91 (C-17); 12,02 (C-18); 19,38 (C-19); 40,49 (C-20); 21,09 (C-21); 138,31 (C-22); 129,23 (C-23); 51,22 (C-24); 29,20 (C-25); 21,21 (C-26); 18,96 (C-27); 25,39 (C-28); 12,25 (C-29). *não determinado

2.17.7 *Ent*-caur-16-en-19-oato de etila (81)



Aspecto: óleo incolor.

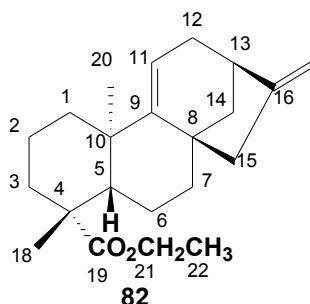
FM (MM): C₂₂H₃₄O₂ (330 g/mol)

IV (ν , cm⁻¹): 3065 - 2800 (C-H), 1719 (COOCH₂CH₃), 1655 - 1350 (C=CH₂), 1170 - 1140 (C-H, C-O).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ): 0,86 (s, 3H, H-18); 1,18 (sl, 3H, H-22); 1,24 (s, 3H, H-20); 2,64 (m, 1H, H-13); 4,12 (sl, 2H, H-21); 4,74 (sl, 1H, H-17a); 4,80 (sl, 1H, H-17b).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz, δ): 40,83 (C-1); 19,18 (C-2); 37,94 (C-3); 42,27 (C-4); 57,09 (C-5); 20,91 (C-6); 41,27 (C-7); 44,23 (C-8); 55,08 (C-9); 39,65 (C-10); 18,60 (C-11); 33,11 (C-12); 44,73 (C-13); 38,43 (C-14); 48,97 (C-15); 155,96 (C-16); 102,98 (C-17); 23,73 (C-18); 177,64 (C-19); 14,15 (C-20); 59,93 (C-21); 28,87 (C-22).

2.17.8 *Ent*-caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (82)



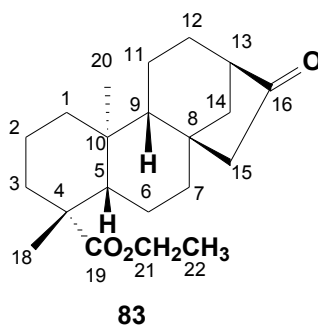
Aspecto: óleo incolor.

FM (MM): C₂₂H₃₂O₂ (328 g/mol).

IV (ν , cm⁻¹): 3065 - 2800 (C-H), 1719 (COOCH₂CH₃), 1655 - 1350 (C=CH₂), 1170 - 1140 (C-H, C-O).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ): 0,96 (s, 3H, H-20), 1,18 (sl, 3H, H-22), 1,24 (s, 3H, H-18), 2,64 (m, 1H, H-13), 4,12 (sl, 2H, H-21), 4,80 (sl, 1H, H-17a), 4,91 (sl, 1H, H-17b), 5,23 (d, 1H, H-11).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz, δ): 40,83 (C-1); 20,25 (C-2); 37,94 (C-3); 42,27 (C-4); 46,59 (C-5); 20,82 (C-6); 41,27 (C-7); 44,94 (C-8); 158,62 (C-9); 39,65 (C-10); 114,82 (C-11); 29,78 (C-12); 43,83 (C-13); 38,28 (C-14); 50,31 (C-15); 155,96 (C-16); 105,40 (C-17); 23,62 (C-18); 183,67 (C-19); 14,15 (C-20); 59,93 (C-21); 28,96 (C-22).

2.17.9 Ent-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83)

Aspecto: sólido branco em forma de agulhas.

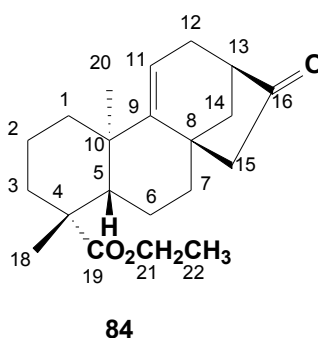
FM (MM): C₂₁H₃₂O₃ (332 g/mol).

Faixa de fusão: 90-92,2 °C.

IV (ν , cm⁻¹): 2949 e 2853 (C-H); 1737 (C=O de éster); 1720 (C=O de cetona); 1460-1300 (C-H).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ): 0,92 (s, 3H, H-18); 1,20 (s, 3H, H-20); 1,29 (t, 3H, $J = 7,0$, H-22); 2,39 (sl, 1H, H-13); 4,12 (q, 2H, $J = 13,9$ e 6,7, H-21).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz, δ): 40,70 (C-1); 19,07 (C-2); 37,25 (C-3); 42,75 (C-4); 53,95 (C-5); 20,77 (C-6); 41,10 (C-7); 43,73 (C-8); 56,80 (C-9); 39,62 (C-10); 18,74 (C-11); 29,47 (C-12); 47,75 (C-13); 37,92 (C-14); 54,95 (C-15); 222,65 (C-16); 16,14 (C-18); 177,35 (C-19); 14,14 (C-20); 60,02 (C-21); 28,84 (C-22).

2.17.10 Ent-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-oato de etila (84)

Aspecto: Resina de cor caramelo.

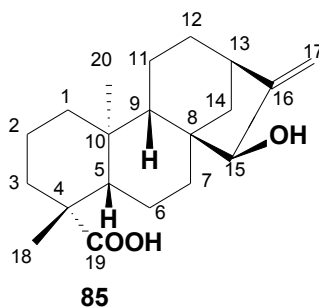
FM (MM): C₂₁H₃₀O₃ (330 g/mol).

IV (ν , cm⁻¹): 2949 e 2853 (C-H); 1774 (C=O de éster); 1715 (C=O de cetona); 1460-1300 (C-H).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ): 0,98 (s, 3H, H-18); 1,18 (s, 3H, H-20); 1,28 (sl, 3H, H-22); 2,60 (sl, 1H, H-13); 4,13 (q, 2H, $J = 14,1$ e 7,0, H-21); 5,29 (sl, 1H, H-11).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz, δ): 40,71 (C-1); 18,32 (C-2); 38,32 (C-3); 44,70 (C-4); 49,86 (C-5); 20,13 (C-6); 42,42 (C-7); 40,35 (C-8); 156,23 (C-9); 38,84 (C-10); 114,87 (C-11); 29,49 (C-12); 46,27 (C-13); 31,93 (C-14); 56,27 (C-15); 221,87 (C-16); 23,69 (C-18); 177,26 (C-19); 14,07 (C-20); 60,13 (C-21); 28,20 (C-22).

2.17.11 Ácido *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85)



Aspecto: sólido amarelo opaco.

FM (MM): $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$ (316 g/mol).

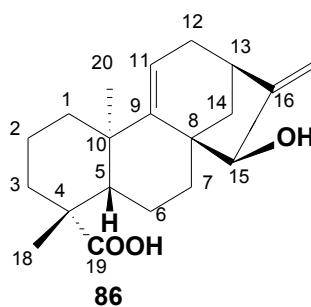
Faixa de fusão da mistura: 162-166 °C (lit.⁶ 203-205 °C).

IV (ν , cm^{-1}): 3473 (O-H); 2956-2936 (C-H); 1689 (C=O); 1460-700 (C-O).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz, δ): 3,74 (s, 1H, H-15); 2,69 (sl, 1H, H-13); 5,01 (sl; 1H, H-17a); 5,13 (sl, 1H, H-17b), 1,19 (s, 3H, H-18); 0,89 (s, 3H, H-20).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz, δ): 39,58 (C-1); 19,81 (C-2); 36,63 (C-3); 42,61 (C-4); 52,22 (C-5); 17,9 (C-6); 35,10 (C-7); 46,60 (C-8); 55,87 (C-9); 38,69 (C-10); 17,16 (C-11); 31,45 (C-12); 41,18 (C-13); 34,11 (C-14); 81,59 (C-15); 159,11 (C-16); 107,23 (C-17); 27,83 (C-18); 182,91 (C-19); 14,71 (C-20).

2.17.12 Ácido *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86)



Aspecto: sólido amarelo opaco.

FM (MM): $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$ (314 g/mol).

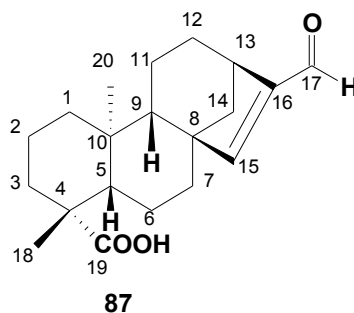
Faixa de fusão da mistura: 162-166 °C.

IV (ν , cm^{-1}): 3473 (O-H); 2956-2936 (C-H); 1689 (C=O); 1460-700 (C-O).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz, δ): 5,26 (sl, 1H, H-11); 5,13 (sl, 1H, H-17a); 5,14 (sl, 1H, H-17b), 4,05 (s, 1H, H-15); 2,69 (sl, 1H, H-13); 1,19 (s, 3H, H-18); 1,00 (s, 3H, H-20).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz, δ): 39,91 (C-1); 19,04 (C-2); 37,11 (C-3); 43,61 (C-4); 46,26 (C-5); 17,05 (C-6); 36,24 (C-7); 45,42 (C-8); 153,53 (C-9); 37,68 (C-10); 116,07 (C-11); 22,22 (C-12); 38,45 (C-13); 39,20 (C-14); 78,64 (C-15); 161,81 (C-16); 109,23 (C-17); 27,13 (C-18); 182,73 (C-19); 23,06 (C-20).

2.17.13 Ácido *ent*-16-formil-caur-15-en-19-óico (87)



FM (MM): $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$ (316 g/mol).

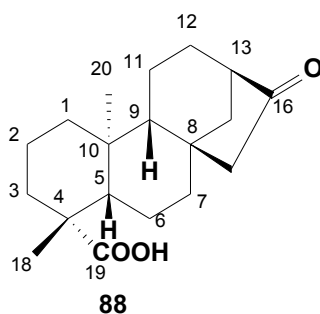
Aspecto: sólido amarelo claro opaco.

Faixa de fusão: 165,6-168,2 °C.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, δ): 9,73 (s, 1H, H-17); 6,58 (s, 1H, H-15); 3,04 (sl, 1H, H-13); 2,18 (d, $J = 10,8$, 2H, H-14); 1,26 (s, 3H, H-18); 1,01 (s, 3H, H-20).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, δ): 40,61 (C-1); 18,96 (C-2); 37,70 (C-3); 43,72 (C-4); 56,54 (C-5); 20,23 (C-6); 38,15 (C-7); 50,91 (C-8); 48,88 (C-9); 40,06 (C-10); 18,67 (C-11); 25,08 (C-12); 37,81 (C-13); 43,01 (C-14); 161,55 (C-15); 148,65 (C-16); 189,49 (C-17); 28,89 (C-18); 183,77 (C-19); 15,45 (C-20).

2.17.14 Ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (88)



Aspecto: sólido branco amorfo.

FM (MM): C₁₉H₂₈O₃ (304 g/mol).

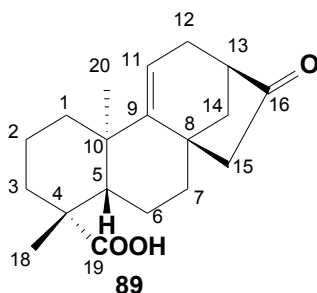
Faixa de fusão: 228-230 °C (lit.⁷ 229-230 °C).

IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 2980 - 2960 (O-H; C-H), 1723 (C=O cetona), 1650 (C=O ácido carboxílico). 1450 - 800 (C-H).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ): 1,01 (s, 3H, H-20); 1,26 (s, 3H, H-18); 2,40 (m, 1H, H-13).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz, δ): 40,79 (C-1); 18,95 (C-2); 37,84 (C-3); 43,93 (C-4); 56,94 (C-5); 20,90 (C-6); 41,21 (C-7); 42,65 (C-8); 54,15 (C-9); 39,95 (C-10); 19,18 (C-11); 29,68 (C-12); 47,94 (C-13); 37,50 (C-14); 55,12 (C-15); 222,91 (C-16); 29,14 (C-18); 184,45 (C-19); 16,26 (C-20).

2.17.15 Ácido *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89)



Aspecto: sólido branco amorfo.

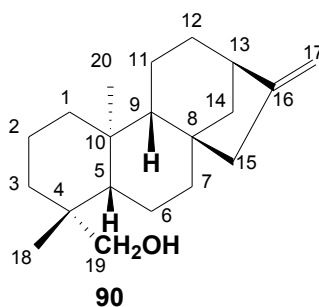
FM (MM): C₁₉H₂₆O₃ (302 g/mol).

Faixa de fusão: 168,6-169,4 °C (lit.⁷ 169-170 °C).

IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 3100 - 2900 (O-H; C-H), 1725 (C=O cetona), 1680 (C=O ácido carboxílico), 1600 (HC=CH₂), 1450 - 800 (C-H)

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ): 1,05 (s, 3H, H-20); 1,24 (s, 3H, H-18); 2,60 (m, 1H, H-13); 5,26 (t, *J* = 3,2, 1H, H-11).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz, δ): 40,80 (C-1); 18,37 (C-2); 32,10 (C-3); 40,51 (C-4); 46,39 (C-5); 20,20 (C-6); 42,58 (C-7); 44,87 (C-8); 156,26 (C-9); 39,07 (C-10); 115,16 (C-11); 30,26 (C-12); 46,55 (C-13); 38,32 (C-14); 56,42 (C-15); 221,90 (C-16); 28,39 (C-18); 184,30 (C-19); 23,76 (C-20).

2.17.16 *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (90)

Aspecto: sólido branco brilhante em forma de agulhas finas.

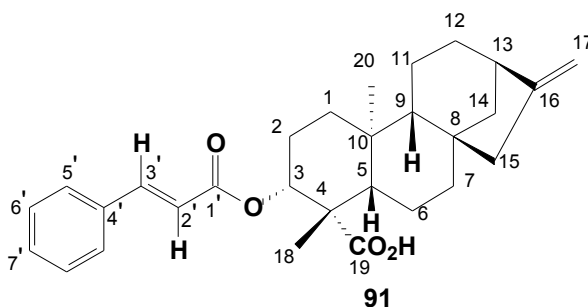
FM (MM): C₂₀H₃₂O (288 g/mol).

Faixa de fusão: 138-140 °C (lit.⁷ 140-141 °C).

IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 3400 (O-H); 1650 (C=C); 880 (C-H).

RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz, δ): 1,01 (s, 3H, H-20); 0,96 (s, 3H, H-18); 2,63 (m, 1H, H-13); 4,73 (sl, 1H, H-17a); 4,79 (sl, 1H, H-17b); 3,44 (d, J = 10,9 Hz, 1H, H-19a); 3,75 (d, J = 10,9 Hz, 1H, H-19b).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 50 MHz, δ): 40,5 (C-1); 18,3 (C-2); 35,6 (C-3); 38,7 (C-4); 56,2 (C-5); 20,5 (C-6) 41,6 (C-7); 44,2 (C-8); 56,8 (C-9); 39,2 (C-10); 18,2 (C-11); 33,2 (C-12); 43,9 (C-13); 39,6 (C-14); 49,1 (C-15); 155,9 (C-16); 102,9 (C-17); 27,1 (C-18); 65,5 (C-19); 18,1 (C-20).

2.17.17 Ácido *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91)

Aspecto: sólido branco amorfo.

FM (MM): C₂₉H₃₀O₄ (448 g/mol).

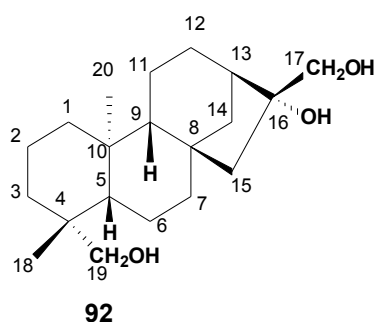
Faixa de fusão: 186-187 °C (lit.⁷ 186-187 °C)

IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 3300, 2900 (O-H), 1700 (C=O), 1650 (C=O), 1580 (C=C), 1500 – 1450 (C-O; C-H).

RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz, δ): 4,73 (sl, 1H, H-17a); 4,79 (sl, 1H, H-17b); 1,34 (s, 3H, H-18); 1,08 (s, 3H, H-20); 6,54 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H-2'); 7,67 (d, $J = 16,0$ Hz; 1H, H-3'); 7,62 (m, 1H, H-5') 7,41-7,43 (m, 1H, H-6').

RMN de ^{13}C (CD_3OD , 50 MHz, δ): 38,6 (C-1); 24,77 (C-2); 80,17 (C-3); 47,78 (C-4); 56,7 (C-5); 22,23 (C-6) 40,01 (C-7); 43,91 (C-8); 55,73 (C-9); 39,89 (C-10); 18,96 (C-11); 33,58 (C-12); 44,51 (C-13); 39,45 (C-14); 49,33 (C-15); 155,98 (C-16); 103,49 (C-17); 23,99 (C-18); 176,87 (C-19); 15,6 (C-20), 167,41 (C-1'); 119,01 (C-2'); 145,45 (C-3') 135,16 (C-4'); 128,79 (C-5'); 129,6 (C-6'); 131,01 (C-7').

2.17.18 *Ent*-16 β ,17,19-trihidroxi-caurano (92)



Aspecto: sólido branco cristalino (17,1 mg; 6,97 % de bioconversão).

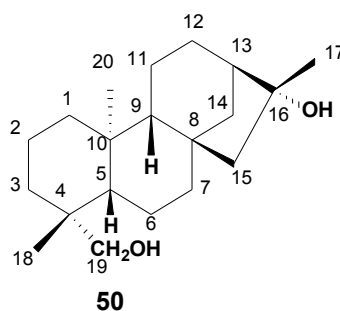
FM (MM): $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$ (322 g/mol).

Faixa de fusão: 228-231 °C.

IV (ν_{max} , cm^{-1}): 3400 (O-H); 880 (C-H).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, δ): 0,93 (s, 3H, H-18), 1,31 (s, 3H, H-20), 3,71 (d, $J = 10,9$, H-19a); 3,37 (d, $J = 10,9$, H-19b), 4,03 (d, 2 H, H-17a e H-17b), 1,81 (1H, m, H-13).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, δ): 40,52 (C-1); 18,32 (C-2); 35,75 (C-3); 38,79 (C-4); 56,85 (C-5); 20,66 (C-6); 42,53 (C-7); 45,28 (C-8); 57,14 (C-9); 39,29 (C-10); 18,12 (C-11); 26,86 (C-12); 48,92 (C-13); 37,55 (C-14); 58,04 (C-15); 78,69 (C-16); 71,77 (C-17); 27,33 (C-18); 64,70 (C-19); 18,31 (C-20).

2.17.19 Ent-16 β ,19-dihidroxi-caurano (50)

Aspecto: sólido branco amorfo (3,7 mg; 1,51% de bioconversão).

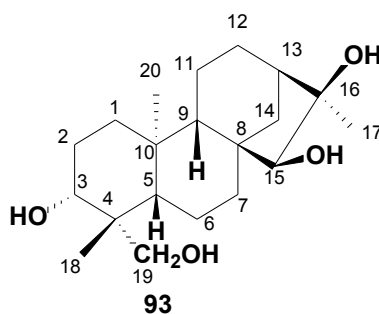
FM (MM): C₂₀H₃₄O₂ (306 g/mol).

Faixa de fusão: 210-214 °C.

IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 3400 (O-H); 880 (C-H).

RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ): 1,01 (s, 3H, H-20); 0,95 (s, 3H, H-18); 1,83 (m, 1H, H-13); 1,36 (s, 3H, 17-CH₃); 3,44 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H, H-19a); 3,72 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H, H-19b).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, δ): 40,45 (C-1); 18,25 (C-2); 35,68 (C-3); 39,26 (C-4); 56,78 (C-5) 20,68 (C-6); 42,46 (C-7); 45,31 (C-8); 57,04 (C-9); 38,64 (C-10); 18,05 (C-11); 26,79 (C-12); 49,02 (C-13); 37,55 (C-14); 57,92 (C-15); 79,28 (C-16); 24,47 (C-17); 27,04 (C-18); 65,58 (C-19); 18,23 (C-20).

2.17.20 Ent-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (93)

Aspecto: sólido opaco amarelado (7,8 mg; 2,23 % de bioconversão).

FM (MM): δ : C₂₀H₃₅O₄ (339 g/mol).

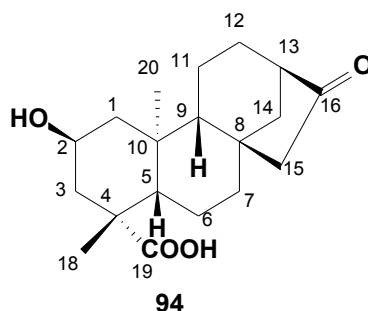
Faixa de fusão: 162-176 °C.

IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 3330 - 2900 (O-H; C-H); 1700 (C=O); 1650 (C=C).

RMN de ¹H (CD₃OD, 400 MHz, δ): 3,6 (sl, 2H, H-19); 3,94 (s, H-15); 3,51 (sl, 1H, H-3); 1,03 (s, 3H, H-17); 0,61 (s, 3H, H-20); 1,02 (s, 3H, H-18); 2,04 (m, 1H, H-13).

RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz, δ): 40,40 (C-1); 24,17 (C-2); 74,36 (C-3); 38,30 (C-4); 57,52 (C-5) 23,15 (C-6); 40,86 (C-7); 44,83 (C-8); 56,04 (C-9); 39,13 (C-10); 24,17 (C-11); 34,05 (C-12); 41,90 (C-13); 40,72 (C-14); 68,50 (C-15); 77,02 (C-16); 19,04 (C-17); 21,83 (C-18); 71,9 (C-19); 12,98 (C-20).

2.17.21 Ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94)



Aspecto: sólido branco em forma de agulhas finas (64,6 mg; 17,6 % de bioconversão).

FM (MM): $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_4$ (320,4 g/mol).

Faixa de fusão: 261-265 °C.

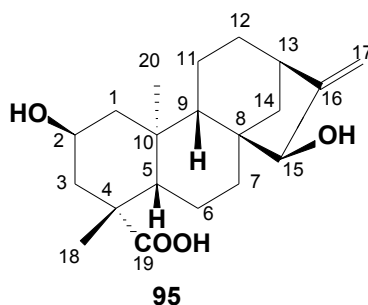
$[\alpha]_D^{25}$: 34,8 (c 0,75 g/100mL).

IV (ν_{max} , cm^{-1}): 3496, 2941 (O-H); 1711 (C=O), 1243, 1191, 1024 (C-H).

RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz, δ): 4,81 (m, 1H, H-2); 2,52 (dd, $J = 12,3$ Hz; $J = 2,7$ Hz, H-1 α); 1,10 (s, 1H, H-1 β); 3,07 (dd, $J = 12,3$ Hz; $J = 2,7$ Hz, H-3 α); 1,39 (s, 1H, H-1 β); 1,19 (s, 3H, H-20); 1,44 (s, 3H, H-18); 2,31 (m, 1H, H-13).

RMN de ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 100 MHz, δ): 50,89 (C-1); 63,99 (C-2); 48,68 (C-3); 45,50 (C-4); 56,66 (C-5); 21,59 (C-6); 41,64 (C-7); 42,77 (C-8); 54,27 (C-9); 41,43 (C-10); 19,37 (C-11); 29,90 (C-12); 48,27 (C-13); 37,68 (C-14); 55,32 (C-15); 221,30 (C-16); 29,65 (C-18); 180,41 (C-19); 17,90 (C-20).

2.17.22 Ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (95)



Aspecto: sólido opaco amarelo ouro (95,1 mg, 26,78% de bioconversão).

FM (MM): C₂₀H₃₀O₄ (334 g/mol).

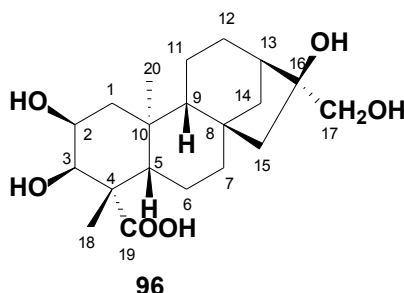
Faixa de fusão: 159-162 °C.

IV (ν_{\max} , cm⁻¹): 3346 (O-H); 2930 (C-H); 1695 (C=O); 1435 - 771 (C-O e C-C).

RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz, δ): 2,22 (dd, $J = 12,8$ Hz; $J = 2,8$ Hz; 1H, H-1); 4,05 (m, 1H, H-2); 2,41 (dd, $J = 12,8$ Hz; $J = 2,8$ Hz, H-3); 2,73 (sl, 1H, H-13); 3,75 (s, 1H, H-15); 5,20 (sl, 1H, H-17a); 5,09 (sl, 1H, H-17b); 1,28, s (s, 3H, H-18) 0,97 (s, 3H, H-20).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, δ): 49,37 (C-1); 64,07 (C-2); 46,73 (C-3); 44,86 (C-4); 56,48 (C-5); 20,96 (C-6); 35,38 (C-7); 47,87 (C-8); 53,42 (C-9); 41,28 (C-10); 18,57 (C-11); 32,69 (C-12); 42,41 (C-13); 36,37 (C-14); 82,65 (C-15); 159,43 (C-16); 108,67 (C-17) 28,97 (C-18); 180,42 (C-19); 16,95 (C-20).

2.17.23 Ácido *ent*-2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahydroxi-cauran-19-óico (96)



Aspecto: resina caramelo (15,8 mg; 3,2 % de bioconversão).

FM (MM): C₂₀H₃₁O₆ (367 g/mol).

RMN de ¹H (CD₃OD, 400 MHz, δ): 3,60 (sl, 1H, H-17a); 3,70 (sl, 1H, H-17b); 2,04 (sl, 1H, H-13); 4,14 (m, 1H, H-2); 3,95 (d, 1H, $J = 2,8$ Hz); 1,82 (s, 1H, H-1 β); 1,00 (s, 3H, H-20); 1,28 (s, 3H, H-18); 2,04 (m, 1H, H-13).

RMN de ¹³C (CD₃OD, 100 MHz, δ): 43,60 (C-1); 67,16 (C-2); 75,13 (C-3); 45,87 (C-4); 49,03 (C-5); 22,81 (C-6); 38,36 (C-7); 41,61 (C-8); 57,14 (C-9); 30,88 (C-10); 19,76 (C-11); 27,34 (C-12); 46,38 (C-13); 43,34 (C-14); 53,87 (C-15); 82,97 (C-16); 67,00 (C-17), 24,98 (C-18); 180,94 (C-19); 17,31 (C-20).

2.18 Referências bibliográficas

1. ROCHA, A. D. **Wedelia paludosa. Planta inteira com destaque para folhas e flores.** 1 fotografia color. 2009.
2. GRUNDY, J.; JAMES, B. G.; PATTENDEN, G. Esterification of sterically hindered carboxylic acids using dimethyl sulphate. **Tetrahedron Letters**, v. 13, n. 9, pp. 757-758, 1972.
3. CASTELLARO, S. J., DOLAN, S. C., MACMILLAN, Jake, WILLIS, C. L. Deuterium labelling of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid at carbon-6 and -7. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, 1823-1831, 1990.
4. BLAY, G.; CARDONA, M. L.; GARCIA, B.; PEDRO, J. R. Functionality transfer from C6 to C8 in sesquiterpenes. Synthesis of 8-epi-ivangustin and 8-epi-isoivangustin from santonin. **Journal of Organic Chemistry**, 1991, v. 56, n.21, pp. 6172–6175.
5. FRANCIS, M. J., GRANT, P. K., LOW, K. S., WEAVERS, R. T. Diterpene chemistry – VI – SeO₂/H₂O₂ oxidations of exocyclic olefins. **Tetrahedron**. v. 32, pp. 95-101, 1976.
6. TAKAHASHI, J. A. **Estudo fitoquímico de *Xylopiia frutescens* Aubl. e transformações microbianas de cauranos, afidicolanos e estemodanos.** Belo Horizonte: UFMG, 1994. 363 p. TESE (Doutorado em Ciências – Química) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.
7. VIEIRA, H. S. **Transformações químicas de diterpenos com atividade biológica.** Belo Horizonte: UFMG, 2000. 331 p. TESE (Doutorado em Ciências – Química) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.
8. MIRANDA, R. R. S. **Estudo Fitoquímico e avaliação do potencial farmacológico de *Maytenus salicifolia* Reissek.** Belo Horizonte: UFMG, 2007. 351 p. TESE (Doutorado em Ciências – Química) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

CAPÍTULO 3

Resultados e

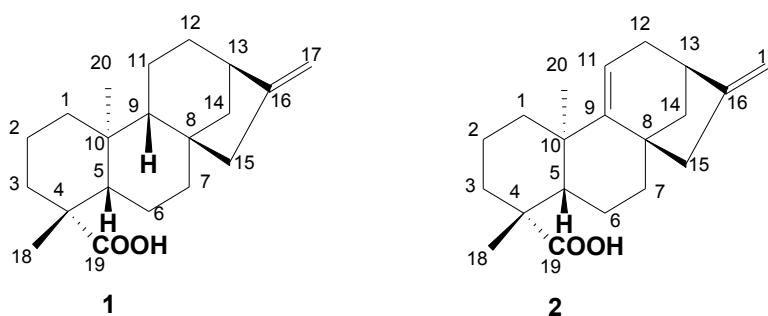
discussão

3.1 Fracionamento do extrato etanólico de *Wedelia paludosa* (EBWP-I)

Estudos anteriores^{1,2} mostraram que os ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**) podem ser isolados em quantidades apreciáveis a partir do extrato etanólico de *Wedelia paludosa* (Asteraceae). Estes ácidos foram utilizados como material de partida, no presente trabalho, para preparação de derivados a serem submetidos a biotransformações.

Dessa forma, parte do extrato etanólico bruto (EBWP-I, 185,98 g) de *W. paludosa*, obtido por percolação a frio, foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel (CCS), empregando-se eluentes de polaridade crescente, levando à obtenção de 235 frações que foram agrupadas de acordo com a semelhança de seus perfis por CCDS (**Tabela 2.1**, página 44). Os grupos de frações iniciais (WP-I-3 e WP-I-4) eram constituídos apenas da mistura dos ácidos **1** e **2**; WP-I-5 ainda continha um pouco destes ácidos. A partir dos grupos WP-I-5, WP-I-7 e WP-I-9 foram isolados e identificados o 3 β -friedelinol (**77**), o ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (**78**) e uma mistura de β -sitosterol (**79**) e estigmasterol (**80**)¹⁻⁴ (**Esquema 2.1**, página 47).

3.1.1 Identificação da mistura dos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**) nos grupos de frações WP-I-3 e WP-I-4



Estes grupos de frações apresentaram-se como óleos amarelos densos contendo um sólido, que foi separado por precipitação com éter de petróleo, seguido por filtração sob pressão reduzida. Os sólidos brancos amorfos obtidos, WP-I-3-S1 e WP-I-4-S1, foram identificados por CCDS, RMN de ¹H e de ¹³C, como misturas dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (**1**, ácido caurenóico), e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico (**2**, ácido grandiflorênico), apresentando faixas de fusão entre 167 e 181 °C (WP-I-3-S1: 167-180 °C; WP-I-4-S1: 168-181 °C).

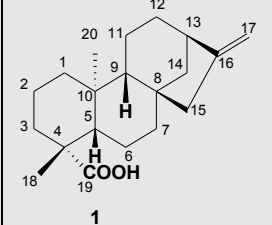
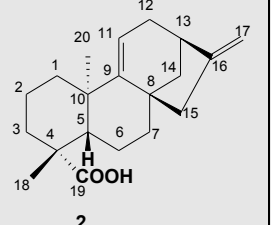
No espectro no IV (**Figura 3.1**, página 193), obtido para a mistura dos ácidos **1** e **2** observaram-se bandas de deformação axial da ligação C-H (2926 e 2855 cm^{-1}), uma banda de deformação axial da ligação C=O de ácido carboxílico em 1687 cm^{-1} , banda fraca de deformação axial de ligação C=CH₂ (1655 cm^{-1}) e bandas de deformação angular de C-H na região compreendida entre 1460 a 872 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ¹H (**Figura 3.2**, página 193) obtido para a mistura registrou o sinal do grupo metila C-20 do ácido caurenóico como um simpleto em δ_{H} 0,95 e o do grupo metila C-20 do ácido grandiflorênico em δ_{H} 1,03 (s). O sinal dos hidrogênios metílicos ligados ao C-18 dos dois ácidos foi observado como um simpleto, em δ_{H} 1,24. Os sinais dos hidrogênios olefínicos ligados ao C-17 dos dois ácidos podem ser observados em δ_{H} 4,74, 4,80 e 4,91 (sl) e aquele relativo ao H-11 do ácido grandiflorênico em δ_{H} 5,24 (t, 1H, *J* 3,26).

No espectro de RMN de ¹³C (**Figura 3.3**, página 194) e subespectro DEPT-135 (**Figura 3.4**, página 195) foram observados sinais referentes a carbonos carbonílicos (δ_{C} 184,69 e 184,52) e carbonos olefínicos metilênicos (δ_{C} 105,49 e 103,00), metínico (δ_{C} 114,90) e não hidrogenados (158,56; 155,90 e 155,95).

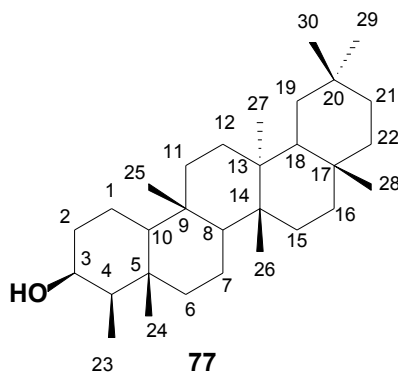
Os dados referentes aos deslocamentos químicos para os ácidos **1** e **2** estão compilados na **Tabela 3.1** e foram comparados com dados da literatura¹.

Tabela 3.1 - Deslocamentos químicos (δ) no espectro de RMN de ^{13}C e deslocamentos químicos (δ) mais relevantes do espectro de RMN de ^1H , observados para os ácidos **1** e **2** e comparação com aqueles da literatura¹

		 1 ent-caur-16-en-19-óico		ent-caur-16-en-19-óico¹		 2 ent-caur-9(11),16-dien-19-óico		ent-caur-9(11),16-dien-19-óico¹	
Posição	mult.	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	CH ₂	40,70	-	40,70	-	40,70*	-	40,80	-
2	CH ₂	19,09	-	19,10	-	20,13**	-	20,2	-
3	CH ₂	37,77	-	37,80	-	38,23	-	38,30	-
4	C	43,76	-	43,80	-	44,73	-	44,70	-
5	CH	57,06	-	57,10	-	46,59	-	46,60	-
6	CH ₂	21,83	-	21,80	-	20,00	-	18,50	-
7	CH ₂	41,28	-	41,30	-	29,66	-	29,7	-
8	C	44,23	-	44,20	-	42,27	-	42,3	-
9	CH	55,10	-	55,10	-	158,56	-	158,50	-
10	C	38,80*	-	39,70	-	38,80	-	38,8	-
11	CH ₂	18,43	-	18,40	-	114,90	5,24	114,80	5,24
12	CH ₂	33,11	-	33,10	-	37,92	-	37,9	-
13	CH	43,84	2,57	43,70	2,63	41,24	2,64	41,3	-
14	CH ₂	39,66	-	39,70	-	44,94	-	44,9	-
15	CH ₂	48,96	-	48,90	-	50,30	-	50,3	-
16	C	155,90	-	155,80	-	155,95	-	155,9	-
17	CH ₂	103,00	4,74; 4,80	102,9	4,74; 4,79	105,49	4,80; 4,91	105,5	4,79; 4,91
18	CH ₃	28,98	1,24	28,90	1,24	28,24	1,24	28,3	1,24
19	C	184,69	-	184,9	-	184,52	-	184,4	-
20	CH ₃	15,59	0,95	15,6	0,95	23,60	1,03	23,6	1,00

*sinais sobrepostos; ** sinal presente apenas no subespectro DEPT-135.

3.1.2 Identificação de 3 β -friedelinol (77)



Este sólido branco brilhante de faixa de fusão 276-279 °C foi identificado como sendo o 3 β -friedelinol (**77**) a partir de análises dos espectros no IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C e por comparação com dados obtidos na literatura⁵.

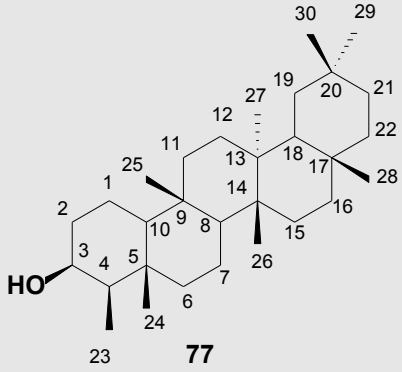
O espectro no IV (**Figura 3.5**, página 196) apresentou bandas de absorção em 3619 e 3472 cm^{-1} , características de deformação axial da ligação O-H de alcoóis e bandas em 2924 e 2869 cm^{-1} , referentes à deformação axial de ligações C-H⁶. A banda em 1200 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular de ligação C-O. Bandas na região entre 1449 e 979 cm^{-1} do espectro foram atribuídas à deformação angular de ligações C-H.

O espectro de RMN de ^1H de **77** (**Figura 3.6**, página 196) apresentou um sinal em δ_{H} 3,74 (sl, 1H), característico de hidrogênio ligado a carbono hidroxilado⁶, sendo atribuído ao H-3.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 3.7**, página 197) e do subespectro DEPT-135 de **77** (**Figura 3.8**, página 198) evidenciou a presença de 31 átomos de carbono, sendo 8 metílicos, 12 metilênicos, 5 metínicos e 6 carbonos não hidrogenados. O sinal em δ_{C} 72,76 foi atribuído ao carbono carbinólico C-3. O sinal em δ_{H} 29,70 foi atribuído a uma impureza graxa, presente na amostra. Assim sendo, a amostra possui 30 átomos de carbonos, típicos de triterpenóides. A ausência de sinais referentes a carbonos olefínicos sugere que a substância possui o esqueleto triterpênico saturado, como os da série dos friedelanos.

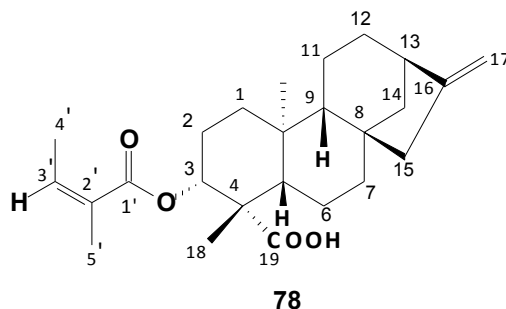
A comparação dos dados de RMN obtidos para **77** com dados de RMN disponíveis na literatura para o triterpeno 3 β -friedelinol⁵ (**Tabela 3.2**, a seguir) levou à constatação de que a substância em análise se tratava deste triterpeno.

Tabela 3.2 - Comparação dos deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^{13}C obtidos para **77** e comparação com aqueles descritos na literatura⁵



	3β- friedelinol (77)	3β- friedelinol⁵		3β- friedelinol (77)	3β- friedelinol⁵
Posição	δ_{C}	δ_{C}	Posição	δ_{C}	δ_{C}
1	15,78	15,94	16	36,07	35,60
2	35,17	36,11	17	30,02	30,03
3	72,76	72,29	18	42,80	42,86
4	49,16	49,36	19	35,54	35,36
5	37,82	38,38	20	28,18	28,18
6	41,71	41,83	21	32,80	32,85
7	17,54	17,60	22	39,28	39,29
8	53,18	53,23	23	11,63	11,78
9	37,09	37,13	24	16,39	16,44
10	61,33	61,48	25	18,25	18,28
11	35,33	35,45	26	18,66	18,66
12	30,63	30,66	27	20,12	20,12
13	38,36	37,93	28	32,09	32,10
14	39,66	39,66	29	31,79	31,82
15	32,32	32,35	30	35,03	35,03

3.1.3 Identificação do ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (**78**), isolado a partir do grupo de frações WP-I-7



A fração 93 (WP-I-7, 9,89 g), diclorometânica, apresentou-se com aspecto resinoso, de coloração castanho-esverdeada e grande quantidade de sólido incorporado neste material. Após precipitações sucessivas com éter de petróleo isolou-se um sólido branco amorfo (320 mg, **Tabela 2.2** e **Esquema 2.1**, página 47), que apresentou mancha castanha única, por CCDS empregando-se solução ácida de sulfato cérico, como revelador e que foi identificado como o ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (**78**), isolado anteriormente de *Wedelia paludosa*¹.

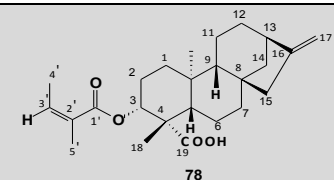
No espectro no IV de **78** (**Figura 3.9**, página 199) verificaram-se bandas de absorção que foram atribuídas à deformação axial de ligação C-H alifática (2927 e 2854 cm⁻¹), deformação axial de ligação C=O de ácido carboxílico (1698 cm⁻¹). A deformação axial de ligação C-O e deformação angular de ligações C-H e C=C-H foram observadas na região entre 1260 e 870 cm⁻¹.

No espectro de RMN de ¹H de **78** (**Figura 3.10**, página 199) e em suas expansões (**Figura 3.11**, página 200) evidenciou-se feição espectral típica de esqueleto caurênico, com a presença de dois simpletos em δ_H 1,05 e 1,30, referentes a átomos de hidrogênio metílicos ligados a carbonos tetra-substituídos, e pelos simpletos largos em δ_H 4,75 e 4,81 característicos dos átomos de hidrogênio olefínicos da dupla C=C exocíclica. O duplete duplo em δ_H 4,58 - 4,66 ($J = 4,57$ e 12,04 Hz), pode ser associado a um hidrogênio metínico em carbono oxigenado vizinho a um carbono metilênico (H-3). Este espectro apresentou um quarteto quádruplo distorcido centrado em δ_H 6,09 ($J = 1,35$ e 7,25), relativo a um hidrogênio olefínico, vizinho a dois grupos metila, o que justifica sua multiplicidade. Este foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-3'. O sinal em δ_H 1,99 (dl, $J = 7,33$) foi atribuído aos hidrogênios metílicos H-4' e aquele em δ_H 1,89 (sl) a H-5'.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 3.12**, página 200) e do subespectro DEPT-135 (**Figura 3.13**, página 201) de **78** revelou sinais referentes a 25 carbonos sendo 4 metílicos, 9 metilênicos (sendo 1 destes, olefínico), 5 metínicos (sendo 1 deles olefínico) e 7 não hidrogenados, dentre eles 2 olefínicos e 2 carbonílicos, referentes a ácido carboxílico e a éster, respectivamente. Os sinais relativos a estes últimos aparecem em δ_{C} 180,86 (C-19) e δ_{C} 167,73 (C-1') e aqueles em δ_{C} 155,33 e 103,28 foram atribuídos aos carbonos olefínicos da dupla exocíclica, C-16 e C-17, respectivamente. Dois sinais de carbonos olefínicos foram observados em δ_{C} 127,98 (carbono tetra-substituído) e δ_{C} 138,07 e foram atribuídos aos C-2' e C-3'. Além disso, pode-se observar o sinal do carbono metínico C-3 (confirmado pelo subespectro DEPT-135) oxigenado em δ_{C} 78,69. Os deslocamentos químicos observados para os carbonos C-4' e C-5' foram δ_{C} 15,30 e 20,66 respectivamente.

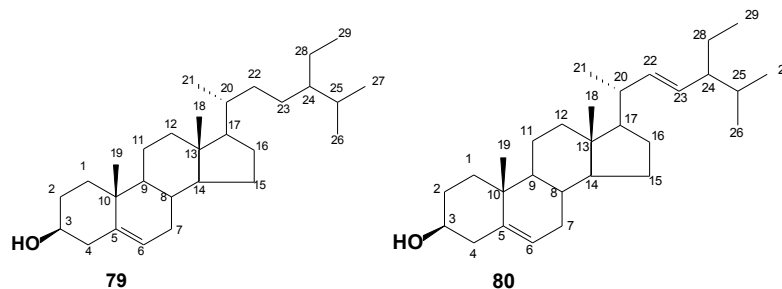
Estes dados estão de acordo com os deslocamentos químicos observados para o ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (**78**) descritos pela literatura¹ (**Tabela 3.3**).

Tabela 3.3 – Comparação dos deslocamentos químicos (δ) nos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C de **78** com aqueles descritos pela literatura¹ para o ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico

Posição	Multiplicidade	 78		Ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico ¹	
		δ_{C}^{**}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	CH ₂	39,49	-	39,5	-
2	CH ₂	24,10	-	24,1	-
3	CH	78,68	4,62 dd	78,7	4,62 dd
4	C	47,94	-	47,9	-
5	CH	55,13	-	55,1	-
6	CH ₂	21,49	-	21,5	-
7	CH ₂	40,96	-	40,7	-
8	C	43,89	-	43,7	-
9	CH	56,42	-	56,4	-
10	C	39,36	-	39,4	-
11	CH ₂	18,49	-	18,5	-
12	CH ₂	33,03	-	33,0	-
13	CH	43,73	2,64 sl	43,9	*
14	CH ₂	38,72	-	38,7	-
15	CH ₂	48,71	-	48,7	-
16	C	155,33	-	155,3	-
17	CH ₂	103,28	4,75 sl, H _a ; 4,81 sl, H _b	103,3	4,75 sl, H _a ; 4,81 sl, H _b
18	CH ₃	23,95	1,30 s	23,9	1,30 s
19	CH ₂	180,86	-	180,3	-
20	CH ₃	15,69	1,05 s	15,7	1,05 s
1'	C	167,73	-	167,7	-
2'	C	127,98	-	127,9	-
3'	CH	138,07	6,09 qq	137,9	6,08 qq
4'	CH ₃	15,30	1,99 dl	15,3	1,98 dl
5'	CH ₃	20,66	1,89 sl	20,6	1,88 sl

*não determinado; **alguns sinais foram identificados a partir do subspectro DEPT-135.

3.1.4 Identificação de mistura de β -sitosterol (**79**) e estigmasterol (**80**), a partir do grupo de frações WP-I-9



Cristais em forma de agulha, brancos (23,8 mg) obtidos após purificação de uma alíquota (103,8 mg) de WP-I-9-S1 (**Item 2.4**, página 43; **Tabela 2.2**, página 46); apresentaram, por comparação por CCDS (hexano/AcOEt 7:3), mancha análoga àquela de uma amostra autêntica de mistura de β -sitosterol (**79**) e estigmasterol (**80**). A análise dos espectros no IV, de RMN de ^1H e de ^{13}C e a comparação com dados da literatura confirmaram a atribuição^{1,5,7,8}.

No espectro no IV da mistura (**Figura 3.14**, página 202) verificaram-se bandas de absorção em 3469 e 3286 cm^{-1} que foram atribuídas à deformação axial de ligação O-H, bandas de absorção em 2933 e 2863 cm^{-1} , atribuídas à deformação axial de ligação C-H, absorção em 1688, característica de deformação axial de ligação C=C e absorções em 1456, 1382 e 1367 cm^{-1} referentes à deformação angular de ligação C-H de grupos metílicos e metilênicos. As absorções em 1051 e 1023 cm^{-1} foram atribuídas à deformação axial de ligação C-O de álcoois⁶.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 3.15**, página 202) apresentou aspecto típico de esteróides¹⁻⁸ com sinais em δ_{H} 5,34 (dl, $J = 4,6$ Hz, 1H; H-6), δ_{H} 3,53 (m, 1H, H-3), δ_{H} 1,03 (s, 3H, CH_3 -19), δ_{H} 0,69 (s, 3H, CH_3 -18) e sinais na região correspondente a δ_{H} 0,77 a 1,01, referentes aos demais hidrogênios metílicos do esqueleto esteroidal de **79** e **80**. O multiplete em δ_{H} 5,10 foi atribuído aos hidrogênios olefínicos H-22 e H-23 presentes no esqueleto de **80**.

Os deslocamentos químicos dos carbonos nos espectros de RMN de ^{13}C (**Figura 3.16**, página 203) e no subespectro DEPT-135 (**Figura 3.17**, página 203) revelaram-se análogos àqueles registrados na literatura^{1,5}. Os sinais em δ_{C} 140,72 e 121,69 foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-5 e C-6, respectivamente e o sinal em δ_{C} 71,78 foi atribuído ao carbono metínico C-3.

Tabela 3.4 - Comparação dos deslocamentos químicos (δ) do espectro de RMN de ^{13}C da mistura de **79** e **80** com aqueles da literatura^{1,5} para o β -sitosterol e estigmasterol

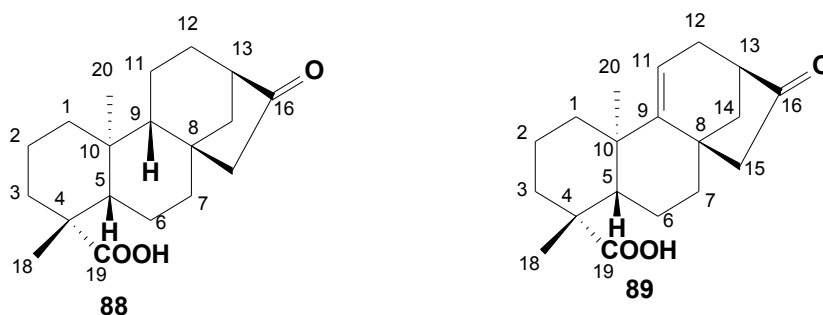
Posição	Mult.	79	β -sitosterol ⁵	80	Estigmasterol ¹
		δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	CH ₂	37,23	37,25	37,23	37,1
2	CH ₂	31,61	31,65	31,61	31,6
3	CH	71,78	71,80	71,78	71,8
4	CH ₂	42,26*	42,32	42,26*	42,3
5	C	140,72	140,75	140,72	140,7
6	CH	121,69	121,72	121,69	121,7
7	CH ₂	**	31,89	**	31,9
8	CH	31,86	31,92	31,86	31,9
9	CH	50,12	50,13	50,12	50,1
10	C	36,48	36,50	36,48	36,5
11	CH ₂	21,05*	21,08	21,05*	21,1
12	CH ₂	39,66*	39,77	39,66*	39,7
13	C	42,18	42,32	42,18	42,2
14	CH	56,83	56,76	56,83	56,8
15	CH ₂	24,34	24,31	24,34	24,3
16	CH ₂	28,91	28,25	28,91	28,9
17	CH	55,91	56,05	55,91	55,9
18	CH ₃	11,85*	11,86	12,02	12,0
19	CH ₃	19,38	19,40	19,38	19,4
20	CH	**	36,15	40,49	40,5
21	CH ₃	21,09*	18,78	21,09*	21,1
22	CH ₂	**	33,94		138,3
	CH			138,31	
23	CH ₂	**	26,06		129,2
	CH			129,23	
24	CH	**	45,89	51,22	51,2
25	CH	29,20	29,14	29,20	31,8
26	CH ₃	**	19,83	21,21*	21,2
27	CH ₃	18,96	19,03	18,96	18,9
28	CH ₂	25,39	23,06	25,39	25,4
29	CH ₃	12,25	11,98	12,25	12,2

*observado no subespectro DEPT-135; **não visualizado; obs.: sinais de mesmo valor para **79** e **80** são sinais que apresentaram-se sobrepostos.

3.2 Purificação de mistura de ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2) por CCS-AgNO₃

Vieira, em sua Tese de Doutorado¹, utilizou a metodologia descrita por Hugel e colaboradores⁹ e realizou a cromatografia em coluna de sílica impregnada com nitrato de prata (CCS-AgNO₃) a 20% para separar uma mistura dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2), que apresentam o mesmo R_f por CCDS. A complexação das duas duplas ligações do ácido 2 com a prata faz com que este fique mais retido que o ácido 1, com apenas uma insaturação. Dessa forma, tentou-se o fracionamento de uma alíquota da mistura desses dois ácidos (500 mg), através de CCS-AgNO₃ a 20% p/p. Este fracionamento forneceu dois grupos de frações que se apresentaram como manchas únicas em CCDS também impregnada com AgNO₃: WP-I-3-S1.1 (57,6 mg) e WP-I-3-S1.2 (39,8 mg). A análise dos espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C dos sólidos WP-3-S1.1 e WP-I-3-S1.2 mostrou que o primeiro grupo de frações era constituído por uma mistura dos dois ácidos, enquanto o segundo grupo continha apenas o ácido grandiflorênico (2) (Figuras 3.18 e 3.19, página 204). Assim, a utilização desta metodologia na separação dos ácidos caurenóico (1) e grandiflorênico (2) foi pouco eficaz, visto que somente uma das substâncias foi purificada, representando 7,96% da massa total de mistura introduzida na coluna.

3.3 Purificação da mistura dos ácidos *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89)



A separação da mistura dos ácidos *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89), norcetonas em C-16 dos ácidos caurenóico e grandiflorênico, respectivamente, foi realizada por sucessivas cromatografias em coluna *flash*¹⁰. O rendimento desta separação não foi alto, sendo

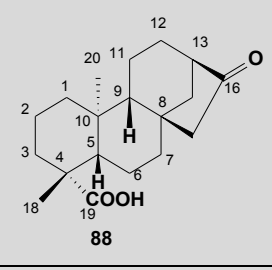
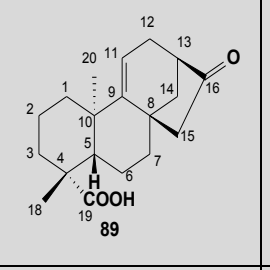
obtidos, a partir de 2,5 g da mistura, apenas 0,38 g (15,37%) de **88** e 0,36 g (14,6%) de **89**.

O espectro no IV obtido para **88** (**Figura 3.20**, página 205) apresentou bandas de absorção em 2874 a 2983 cm^{-1} referentes à deformação axial de ligações C-H e absorções na região compreendida entre 1445 e 800 cm^{-1} atribuídas à deformação angular de ligações C-H. A banda de deformação axial C=O de ácido, que ocorre geralmente em torno 1650 cm^{-1} , apresentou-se encoberta pela banda alargada e intensa de cetona (1723 cm^{-1}).

A análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de cada um desses dois ácidos (**Figuras 3.21 a 3.24**, páginas 205 a 207) indicou a obtenção de cada um desses ácidos em sua forma pura. No espectro no RMN de ^1H de **88** (**Figura 3.21**, página 205) observaram-se simpletos em δ_{H} 1,26 (s, 3H, 18- CH_3), δ_{H} 1,01 (s, 3H, 20- CH_3) e um sinal largo em δ_{H} 2,40 (m, 1H, H-13), não se observando nenhum sinal na região de átomos de hidrogênio olefínico, referente aos átomos de hidrogênio metilênicos associados ao C-17. No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 3.22**, página 206), a ausência da dupla olefínica foi confirmada pelo desaparecimento do sinal de carbono em torno de δ_{C} 105. O sinal em δ_{C} 222,91 referente a um carbono não hidrogenado revelou a presença da carbonila. O sinal referente ao H-11 do composto **89** não foi visualizado também no espectro deste produto, mostrando que o mesmo apresentava-se puro. Nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **89** foram identificados sinais comparáveis aos obtidos para **88**, e ainda aqueles referentes ao hidrogênio metínico em δ_{H} 5,26 (t, $J = 3,2$, 1H, H-11) e aos carbonos olefínicos em δ_{C} 156,25 (C-9) e δ_{C} 115,16 (C-11).

Os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^{13}C obtidos para **88** e **89** encontram-se relacionados na **Tabela 3.5**, que se segue.

Tabela 3.5 - Comparação dos deslocamentos químicos (δ) dos espectros de RMN de ^{13}C de **88** e **89** com aqueles da literatura¹ para os ácidos *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico e *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico

Posição	Mult.		ácido <i>ent</i>-16-oxo-17-norcauran-19-óico		ácido <i>ent</i>-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico¹
		δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	CH ₂	40,79	40,60	40,80	40,60
2	CH ₂	18,95	18,90	18,37	18,10
3	CH ₂	37,84*	37,60	32,10	31,90
4	C	43,93	43,70	40,51	40,30
5	CH	56,94	56,70	46,39	46,20
6	CH ₂	20,90	20,70	20,20	20,00
7	CH ₂	41,21	41,00	42,58	42,40
8	C	42,65	42,40	44,87	44,70
9	CH	54,15	53,90	156,26	156,00
10	C	39,95	39,70	39,07	38,90
11	CH ₂	19,18	18,70	115,16	114,90
12	CH ₂	29,68	29,50	30,26	30,00
13	CH	47,94	47,70	46,55	46,40
14	CH ₂	37,50	37,30	38,32	38,10
15	CH ₂	55,12	54,90	56,42	56,20
16	C	222,91	222,50	221,90	221,50
17	-	-	-	-	-
18	CH ₃	29,14	28,90	28,39	28,20
19	C	184,45	184,00	184,31	183,80
20	CH ₃	16,26	16,00	23,76	23,60

*Sinal identificado a partir do subspectro DEPT-135.

3.4 Síntese de derivados caurânicos

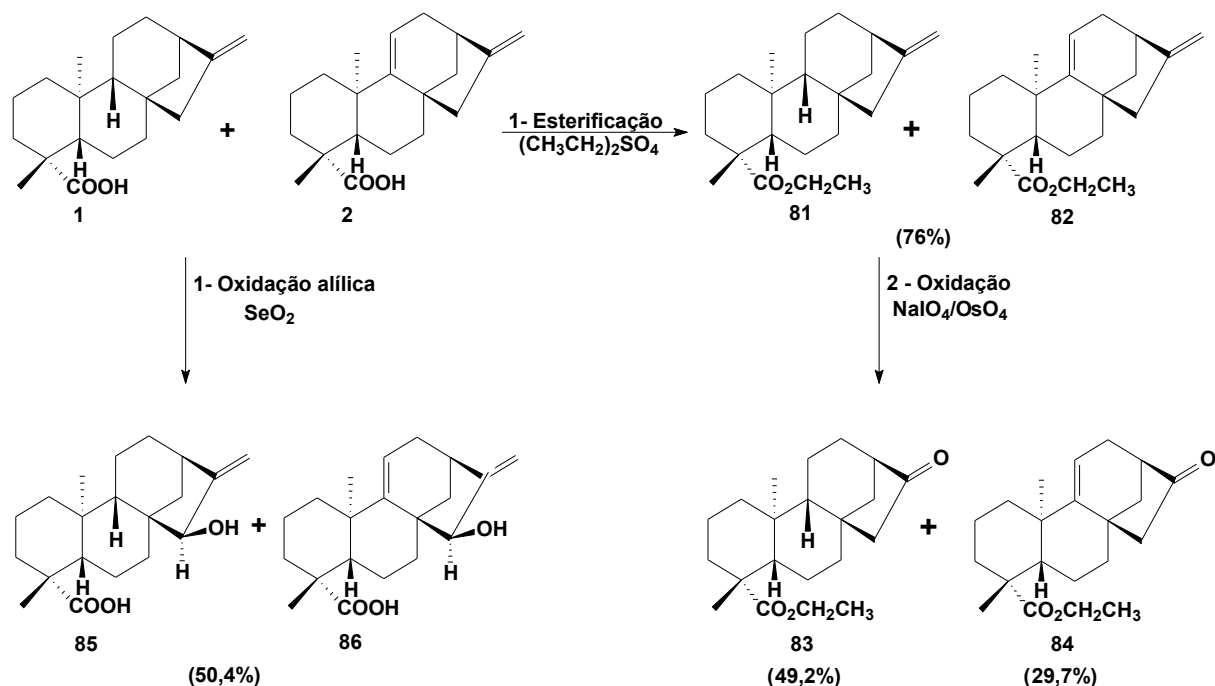
A modificação química de diterpenos caurânicos abundantes na natureza é uma das estratégias de obtenção de novos análogos com potencial atividade biológica^{11,12}. Estas substâncias podem ser empregadas também como substratos em processos de modificação biotecnológica¹³⁻¹⁵.

O ácido caurenóico, um diterpenóide isolado em grandes quantidades de várias espécies vegetais e, particularmente, de *W. paludosa*, e seus derivados obtidos por síntese, são conhecidos por exibir atividades farmacológicas e biológicas interessantes como antimicrobiana¹⁶, antiparasitária^{17,18}, citotóxica^{19,20}, antiviral²¹ e alelopática²². Tem sido discutido que, quanto maior for a oxigenação do terpenóide, maior será a sua atividade biológica^{12,23}.

3.4.1 Proposta de trabalho

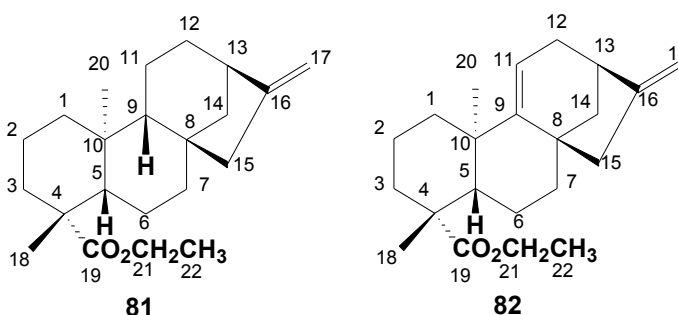
Objetivando a busca de novas substâncias ativas inéditas, primeiramente realizou-se a preparação de derivados diterpenoídicos caurânicos (**81** a **86**, **Esquema 3.1**, a seguir), a partir de modificações químicas efetuadas sobre os diterpenos naturais ácido caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**), extraídos de *W. paludosa* e disponíveis em quantidade considerável.

Subsequentemente, alguns dos derivados obtidos foram submetidos a modificação biológica, empregando-se cepas de fungos utilizadas por nosso grupo de pesquisa, visando o isolamento de produtos com potencial atividade alelopática sobre a germinação e o crescimento da raiz e caule de alface (*L. sativa*).



Esquema 3.1 – Modificações químicas de *ent*-cauranos realizadas neste trabalho.

3.4.2 Preparação e identificação de *ent*-caur-16-en-19-oato de etila (81) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (82)



Os ésteres **81** e **82** foram obtidos com rendimento de 76% a partir da mistura dos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**), em uma etapa, através de esterificação empregando sulfato de dietila em meio básico²⁴. O sulfato de dietila é um reagente útil em esterificações quando o meio ácido deve ser evitado e quando há impedimento estérico. No entanto, pode ocorrer hidrólise do reagente pelo meio básico e hidrólise do éster formado. Assim, para evitar estas reações, otimizando o rendimento, utilizou-se um excesso de 10% da base (carbonato de potássio).

A comparação do espectro no IV dos ésteres **81** e **82** (Figura 3.25, página 208) com os do material de partida, os ácidos **1** e **2** (Figura 3.1, página 193) mostrou que a banda de deformação axial de ligação C=O deslocou de 1687 cm^{-1} , característico de ácido carboxílico 1719 cm^{-1} , característico de carbonila de éster.

O espectro de RMN de ^1H obtido para a mistura de **81** e **82** (**Figura 3.26**, página 208) apresentou feição espectral típica de terpenos. Verificou-se grande número de sinais na região entre δ_{H} 0,8 e 2,8 ppm. Estes produtos preservaram dos ácidos utilizados como material de partida na síntese, **1** e **2** os sinais de simpletos em δ_{H} 0,86 e δ_{H} 0,96 referentes aos H-18 e em δ_{H} 1,24 (sinal sobreposto) correspondentes aos hidrogênios metílicos H-20 dos dois ésteres **81** e **82**, respectivamente. Os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos associados aos C-17 dos dois ácidos **1** e **2** (sl, δ_{H} 4,74, δ_{H} 4,80 e δ_{H} 4,91) e o sinal referente ao hidrogênio metínico 11 (sl, 1H, δ_{H} 5,23) do ácido grandiflorênico (**2**) foram preservados também. Adicionalmente ao espectro do material de partida, o espectro de RMN de ^1H dos ésteres **81** e **82** apresentaram sinais referentes aos hidrogênios do grupamento etila que foi introduzido. O sinal dos hidrogênios metilênicos H-21 foi identificado em δ_{H} 4,12 (sl, 2H) e o simpleto referente aos hidrogênios metílicos H-22 foram observados em δ_{H} 1,18.

A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 3.27**, página 209) e subspectro DEPT-135 (**Figura 3.28**, página 209) e dos mapas de contornos COSY e HSQC (**Figuras 3.29 e 3.30**, páginas 210 e 211), verificou-se que os sinais de hidrogênio em δ_{H} 4,12 (sl, 2H) e δ_{H} 1,18 (s, 3H) correlacionavam-se entre si e com os sinais de carbonos em δ_{C} 59,93 e δ_{C} 28,87 (**81**) ou δ_{C} 28,96 (**82**), respectivamente, que foram, então, atribuídos a C-21 e C-22. Observaram-se os sinais dos carbonos carbonílicos C-19 (δ_{C} 177,64 e δ_{C} 183,67), dos carbonos não hidrogenados C-16 sobrepostos (δ_{C} 155,96) e dos carbonos metilênicos olefínicos C-17 (δ_{C} 102,98 e 105,44) dos dois ésteres **81** e **82**, respectivamente. Os sinais referentes aos C-9 (δ_{C} 158,62) e C-11 (δ_{C} 114,82) do produto **82** foram identificados. A correlação entre os sinais do hidrogênio metínico em δ_{H} 2,64 e do carbono em 44,73 atribuído ao C-13 de **81** foi observada também. A **Tabela 3.6** (página 118) mostra os deslocamentos químicos obtidos para os ésteres **81** e **82**.

Dessa forma, confirmou-se que os ésteres *ent*-caur-16-en-19-oato de etila (**81**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (**82**) foram devidamente obtidos a partir dos ácidos **1** e **2**.

Em uma pesquisa bibliográfica realizada não se identificou relatos da obtenção dos ésteres etílicos dos ácidos caurenóico e grandiflorênico na posição 19 do

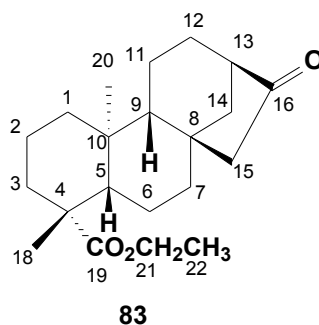
esqueleto caurânico. Os ésteres metílicos do ácido caurenóico já foram obtidos por modificação química^{1,11}.

3.4.3 Preparação de *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**) e *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-oato de etila (**84**)

Os ceto-ésteres **83** e **84** foram obtidos segundo a metodologia descrita por CASTELLARO *et al.*²⁵, a partir da oxidação da mistura dos ésteres **81** e **82**, preparados anteriormente (itens **2.7.2**, página 51 e **3.4.2**, página 112) com periodato de sódio, em presença de quantidades catalíticas de tetróxido de ósmio em THF/H₂O, à temperatura ambiente. Após purificação, por sucessivas cromatografias em coluna de sílica gel, *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**) e *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-oato de etila (**84**) foram obtidos com rendimento de 49,2 e 29,7%, respectivamente.

Os dados de RMN de ¹H e ¹³C foram utilizados para a elucidação estrutural dos dois produtos desta modificação química.

3.4.3.1 Identificação de *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**)



O derivado *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**) foi isolado como um sólido branco em forma de agulhas (3,60 g, 49,3%) e apresentou fusão na faixa de 90-92,2 °C.

O espectro no IV (**Figura 3.31**, página 212) de **83** apresentou bandas de absorção em 2949 e 2853 cm⁻¹ que foram atribuídas a deformação axial de ligação C-H. As bandas de absorção intensas localizadas em 1737 e 1720 cm⁻¹ podem ser atribuídas a deformação axial de ligação C=O de éster e de cetona, respectivamente. Bandas de deformação angular de ligações C-O e de ligações C-H

de grupos metílicos e metilênicos foram observadas na região compreendida entre 1460 e 1300 cm^{-1} .

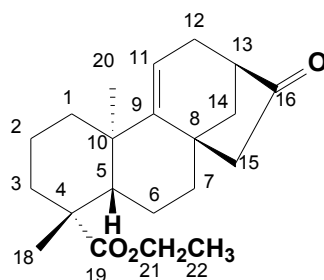
Na comparação dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H obtidos para **83** (Figura 3.32, página 212) com aqueles do material de partida, a mistura dos ésteres **81** e **82** (Figura 3.26, página 208), verificou-se que o produto preservou os simpletos em δ_{H} 0,92 e δ_{H} 1,20 referentes aos hidrogênios metílicos em C-18 e C-20 e o tripleto centrado em δ_{H} 1,29 (3H, $J = 7,0$) correspondente aos hidrogênios metílicos H-22, vizinho ao CH_2 -21. O sinal dos hidrogênios metilênicos (q centrado em δ_{H} 4,12, 2H, $J = 13,9$ e 6,7) associados ao C-21 foram conservados também em relação ao material de partida. Observou-se que os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos olefínicos em δ_{H} 4,74 e δ_{H} 4,80, associados ao C-17, no material de partida, estavam ausentes no espectro de **83**, comprovando a ocorrência da oxidação nesta posição do esqueleto caurânico.

No espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (Figuras 3.33 e 3.34, página 213) observaram-se 21 sinais de carbonos, sendo 3 metílicos, 10 metilênicos, 3 metínicos e 5 não hidrogenados, um carbono metilênico a menos e um carbono não hidrogenado a mais que no material de partida. No espectro de RMN de ^{13}C estes dados foram confirmados a partir da visualização do aparecimento de um sinal de carbono não hidrogenado em δ_{C} 222,65, característico de carbono carbonílico de cetona, e do desaparecimento do sinal de C metilênico olefínico C-17, presente no material de partida em δ_{C} 102,98. O sinal referente à carbonila de éster, em δ_{C} 177,35, foi mantido em relação aos ésteres originais.

No espectro de RMN de ^{13}C , observou-se, ainda, em relação ao éster **81**, o afastamento do TMS dos sinais do C-13 (de δ_{C} 44,73 para δ_{C} 47,75) e C-15 (de δ_{C} 48,09 para δ_{C} 54,95), vizinhos ao grupamento carbonila, e o deslocamento para perto do TMS dos carbonos 12, 14 e 8 devido ao efeito γ -gauche sobre o C-12 (de δ_{C} 33,11 para δ_{C} 29,47) e um efeito *anti* sobre o C-14 (de δ_{C} 38,43 para δ_{C} 37,92) e C-8 (de δ_{C} 44,23 para δ_{C} 43,73)²⁶.

Estes dados espectrométricos corroboram com a estrutura proposta para **83** (Tabela 3.6, página 118).

3.4.3.2 Identificação de *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-oato de etila (**84**)

**84**

O produto *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-oato de etila (**84**) foi obtido como uma resina de coloração caramelo (2,17 g, 29,7%). Após várias tentativas, sem sucesso, de purificação por CCS, **84** foi isolado como uma mistura com **83**.

O espectro no IV (**Figura 3.35**, página 214) mostrou-se análogo àquele obtido para **83**.

A análise comparativa entre os espectros de RMN de ^1H obtidos para a mistura dos ésteres **81** e **82** (**Figura 3.26**, página 208), material de partida nesta reação, e aqueles obtidos para **84** (**Figura 3.36**, página 214) mostrou que, no espectro de **84**, ocorreu a preservação dos simpletos em δ_{H} 0,98 e δ_{H} 1,18 referentes aos hidrogênios metílicos H-18 e H-20. Foram mantidos, ainda, os sinais em δ_{H} 1,28 (sl, 3H) e em δ_{H} 4,13 (q, 2H, $J = 14,1$ e $7,0$) correspondentes aos hidrogênios metílicos associados ao C-22 e metilênicos associados ao C-21, respectivamente. O sinal do hidrogênio olefínico H-11 foi observado em δ_{H} 5,28-5,30 (m, 1H). Assim como em **83**, observou-se que os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos olefínicos em δ_{H} 4,80 e δ_{H} 4,91, associados ao C-17 de **82**, estavam ausentes no espectro de **84**, mostrando a ocorrência da oxidação do alqueno na posição 16 do esqueleto diterpênico.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de **84** (**Figura 3.37**, página 215) confirmou estes dados a partir da identificação do aparecimento de um sinal de C não hydrogenado em δ_{C} 221,87, característico de carbono carbonílico de cetona²⁶, e do desaparecimento do sinal de C metilênico olefínico C-17, presente no material de partida em δ_{C} 105,44. Observaram-se, ainda, neste espectro, os sinais referentes à carbonila de éster, em δ_{C} 177,26 (C-19) e aos carbonos olefínicos C-9 e C-11. Como ocorrido no ceto-éster *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**), observou-se para **84**, em relação ao éster **82** o afastamento do TMS dos sinais do C-13 (de δ_{C} 43,83 para δ_{C} 46,27) e C-15 (de δ_{C}

50,31 para δ_C 56,27), vizinhos ao grupamento carbonila, um efeito γ -gauche sobre o C-12 de (δ_C 29,78 para δ_C 29,49) e um efeito *anti* sobre os C-14 (de δ_C 38,28 para δ_C 31,93) e C-8 (de δ_C 44,94 para 40,35) deslocando-os para mais próximo do TMS¹, no espectro de RMN de ¹³C.

A comparação dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ¹³C e deslocamentos mais relevantes do espectro de RMN de ¹H obtidos para as substâncias **81** a **84** estão compilados na **Tabela 3.6**, a seguir.

Tabela 3.6 – Deslocamentos químicos (δ) observados para as substâncias **81** a **84**, nos espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H

Posição	81		82		83		84	
	δ_{C} mult.	δ_{H}	δ_{C} mult.	δ_{H}	δ_{C} mult.	δ_{H}	δ_{C} mult.	δ_{H}
1	40,83	-	40,83*	-	40,70	-	40,71	-
2	19,18	-	20,25**	-	19,07	-	18,32	-
3	37,94	-	37,94*	-	37,25	-	38,32	-
4	42,27	-	42,27*	-	42,75	-	44,70	-
5	57,09	-	46,59	-	53,95	-	49,86**	-
6	20,91**	-	20,82**	-	20,77	-	20,13	-
7	41,27	-	41,27*	-	41,10	-	42,42	-
8	44,23	-	44,94	-	43,73	-	40,35	-
9	55,08	-	158,62	-	56,80	-	156,23	-
10	39,65	-	39,65*	-	39,62	-	38,84	-
11	18,60**	-	114,82	5,23	18,74	-	114,87	5,29
12	33,11	-	29,78**	-	29,47	-	29,49**	-
13	44,73	2,64	43,83	-	47,75	2,39	46,27	2,60
14	38,43**	-	38,28**	-	37,92	-	31,93	-
15	48,97	-	50,31**	-	54,95	-	56,27	-
16	155,96	-	155,96*	-	222,65	-	221,87	-
17	102,98	4,74; 4,80	105,40	4,80; 4,91	-	-	-	-
18	23,73	0,86	23,62**	0,96	16,14	0,92	23,69	0,98
19	177,64	-	183,67	-	177,35	-	177,26	-
20	14,15	1,24	14,15*	1,24*	14,14	1,20	14,07	1,18
21	59,93	4,12	59,93*	4,12*	60,02	4,12	60,13	4,13
22	28,87	1,18	28,96**	1,18*	28,84	1,29	28,20	1,28

Correlações ^{13}C - ^1H obtidas a partir do espectro HSQC; * sinais referentes a **82** sobrepostos aos de **81**; **sinais observados apenas no subespectro DEPT-135.

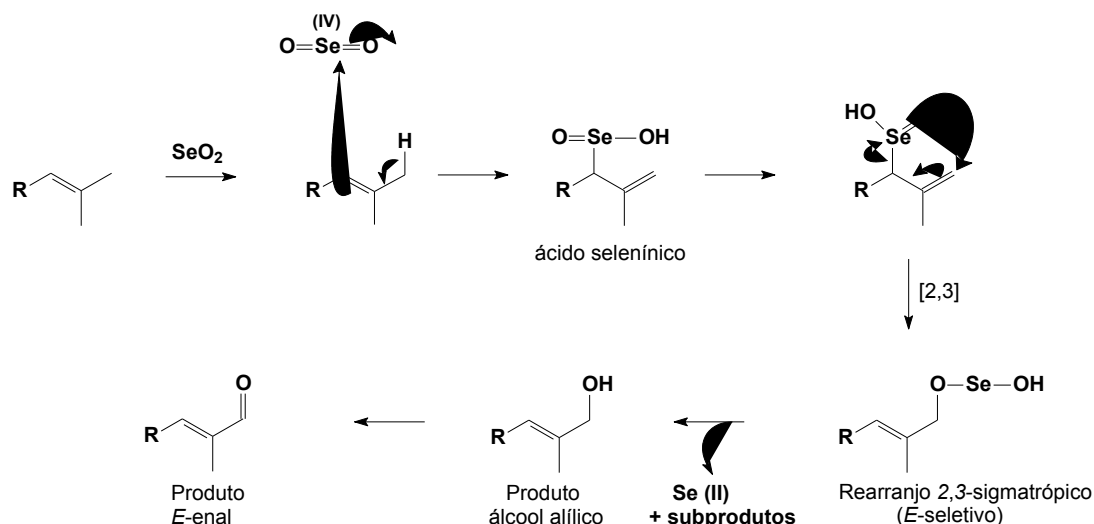
3.4.4 Preparação dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86)

A oxidação alílica define-se como a oxidação, habitualmente por formação de uma nova ligação C-O (cetonas, álcoois, ésteres, éteres, entre outros) em posição alílica a um grupo funcional, geralmente uma dupla ligação C=C^{27,28}.

A oxidação alílica e a epoxidação são dois processos competitivos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Tipicamente, os produtos da oxidação alílica ocorrem quando a abstração do hidrogênio predomina em relação ao ataque eletrofílico à dupla ligação. Em contraste com a epoxidação, a oxidação alílica permite que se mantenha a dupla ligação no produto o que permite funcionalizações posteriores. O predomínio da oxidação alílica sobre outras reações competitivas como a epoxidação, é muito dependente da natureza da olefina usada e da estabilidade relativa do radical alílico intermediário formado²⁹.

Diferentes reagentes têm sido utilizados em oxidações alílicas. O acetato de chumbo é muito usado, entretanto pode provocar formação de acetatos isoméricos como subprodutos, dificultando a purificação do produto principal¹². O uso de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxido de *t*-butila associados a óxidos de metais como o cromo ou bismuto³⁰⁻³⁵ permite a obtenção de derivados Δ^5 -7-oxoesteróides com rendimentos elevados, sendo que a epoxidação da dupla ligação pode ocorrer como reação secundária. Dióxido de manganês, acetatos de mercúrio, titânio e paládio têm sido usados também para obtenção de derivados alcoólicos, aldeídos e cetonas α,β insaturadas a partir de oxidações alílicas¹².

Neste trabalho, optou-se por empregar o dióxido de selênio para a realização da oxidação alílica da mistura de alquenos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**). Nesta metodologia, o SeO₂ reage com os alquenos levando a um ácido selenínico alílico³⁶ que sofre rearranjo a um intermediário que rapidamente se decompõe em álcool alílico (**Esquema 3.2**, a seguir). Em alguns casos, a oxidação continua, fornecendo um aldeído ou cetona³⁶.



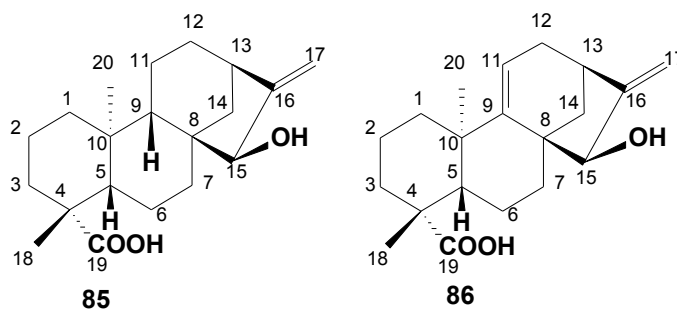
Esquema 3.2 – Mecanismo para a oxidação alílica com SeO_2 ³⁶.

A oxidação alílica de alquenos empregando o reagente dióxido de selênio é um assunto intensamente investigado desde o século passado^{30,37,38} e que continua sendo de amplo emprego¹². Aparício e colaboradores¹², em 2007, empregaram a mistura de SeO_2 e água oxigenada em dioxano na oxidação alílica de três derivados caurânicos, o ácido caurenóico, seu éster metílico e o caurenol. Como produtos obtiveram-se derivados hidroxilados na posição 15 do esqueleto caurânico (56% de rendimento) e outros subprodutos dihidroxilados na posição 15 e 17 ou epóxidos nas posições 15 e 16.

Num primeiro momento, tentou-se obter o derivado 15-OH a partir da mistura dos ácidos **1** e **2**, empregando-se a metodologia descrita por Francis *et al.*³⁰ e também por Aparício *et al.*¹². Partiu-se de 500 mg de amostra e, após sucessivos fracionamentos por CCS, não se conseguiu a purificação de nenhum produto de oxidação devido ao produto reacional ter sido obtido como uma mistura complexa de constituintes, provavelmente devido a formação de inúmeros subprodutos da reação com SeO_2 e, também, com a H_2O_2 , que é substância que apresenta anfoterismo redox, comportando-se tanto como agente redutor quanto como agente oxidante^{39,40}.

Dessa maneira, a obtenção do derivado hidroxilado na posição 15 do esqueleto dos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**) empregando-se SeO_2 foi realizada de acordo Blay e colaboradores⁴¹ cuja metodologia emprega um excesso de SeO_2 e não utiliza H_2O_2 .

3.4.4.1 Identificação dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**)



A mistura dos derivados caurânicos hidroxilados em C-15, **85** e **86** foi obtida como um sólido amarelo com rendimento de 50,4% e apresentou faixa de fusão em 162-166 °C. Os dois ácidos foram identificados a partir da análise espectroscópica no IV e de RMN de ^1H e ^{13}C mono e bidimensionais (**Figuras 3.38** a **3.44**, páginas 216 a 219) e comparação com dados descritos na literatura¹¹.

O espectro no IV (**Figura 3.38**, página 216) apresentou bandas de deformação axial de ligações O-H (3473 cm^{-1}), C-H (2956 e 2936 cm^{-1}) e C=O (1689 cm^{-1}). Bandas referentes a deformação angular de ligações C-H e C-O foram observadas na região compreendida entre 1460 e 700 cm^{-1} .

A partir da integral do sinal em δ_{H} 5,26 (sl, 1H) referente ao H-11 de **86**, no espectro RMN de ^1H (**Figura 3.39**, página 216), verificou-se que a mistura apresentava-se na proporção de 2:1 do derivado hidroxilado **86** em relação ao derivado **85**. Assim, todos os sinais de maior intensidade nos espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e subespectro DEPT-135 foram atribuídos a **86** e os demais a **85**.

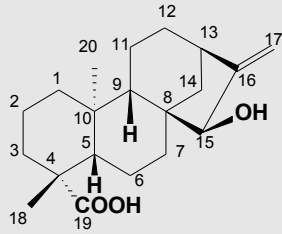
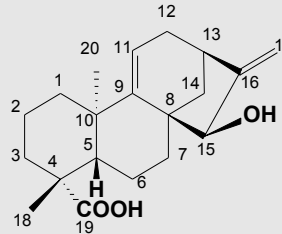
Comparando-se o espectro de RMN de ^1H de **85** e **86** ao obtido para o material de partida da síntese, uma diferença observada foi o aparecimento de dois sinais em δ_{H} 4,05 e δ_{H} 3,74, sugerindo a ocorrência de monohidroxilação de **1** e **2**. Verificou-se, ainda, que os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos associados ao carbono 17 de **85** (δ_{H} 5,01 e 5,13) e **86** (δ_{H} 5,13 e 5,14) estavam deslocados para uma região mais desblindada do espectro, em relação àqueles de **1** e **2**.

Na comparação entre os espectros de RMN de ^{13}C e subespectros DEPT-135 da mistura de **1** e **2** (**Figura 3.3**, página 194) e da mistura de **85** e **86** (**Figuras 3.40** a **3.42**, páginas 217 e 218), observou-se, nos espectros referentes aos produtos da reação, o aparecimento de sinais de carbonos metínicos em δ_{C} 78,64 e δ_{C} 81,59, deslocamentos químicos característicos de carbonos oxigenados. Estes sinais correlacionavam-se, no mapa de contornos HSQC (**Figuras 3.43** e **3.44**, páginas 218 e 219), com os sinais dos hidrogênios em δ_{H} 4,05 e δ_{H} 3,74, respectivamente.

Dessa forma, comprovou-se que a hidroxilação no carbono 15 do esqueleto caurânico dos ácidos **1** e **2** ocorreu com sucesso. Não foi feita, neste momento, a determinação da estereoquímica da hidroxila na posição 15, por meio do NOESY. Esta determinação foi realizada com o produto de biotransformação da mistura.

Todos os demais sinais observados nos espectros de RMN de ^{13}C foram atribuídos e encontram-se compilados na **Tabela 3.7**, a seguir.

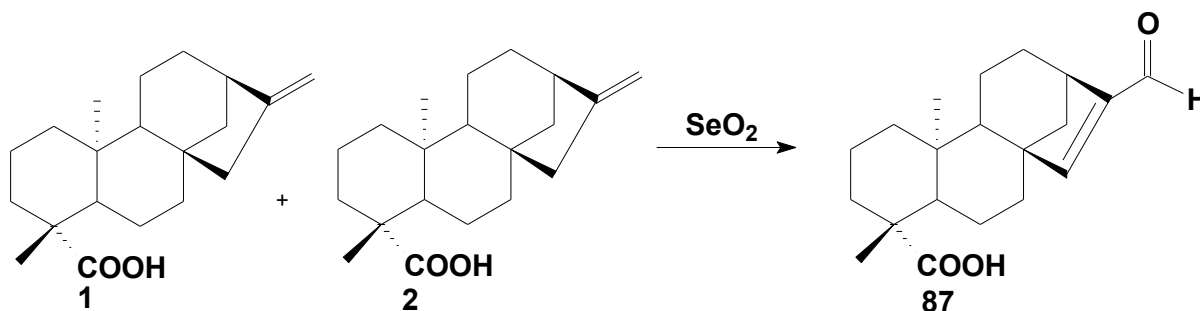
Tabela 3.7 – Deslocamentos químicos, nos espectros de RMN de ^{13}C e de RMN de ^1H , obtidos para as substâncias **85** e **86** e aqueles descritos pela literatura¹¹ para o ácido *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico

Posição	Ácido <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico ¹¹		 Ácido <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85)		 Ácido <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86)	
	δ_{C} mult.	δ_{H}	δ_{C} mult.	δ_{H}	δ_{C} mult.	δ_{H}
1	40,6	-	39,58	-	39,91	-
2	19,1	-	19,81	-	19,04	-
3	38,8	-	36,63	-	37,11	-
4	43,7	-	42,61	-	43,61	-
5	45,4	-	52,22	-	46,26	-
6	21,5	-	17,95	-	17,05	-
7	37,9	-	35,10	-	36,24	-
8	45,6	-	46,60	-	45,42	-
9	56,3	-	55,87	-	153,53	-
10	39,0	-	38,69	-	37,68	-
11	18,2	-	17,16	-	116,07	5,26
12	33,0	-	31,45	-	22,22	-
13	40,0	2,67	41,18	2,69*	38,45	2,69*
14	36,2	-	34,11	-	39,20	-
15	82,4	3,77	81,59	3,74	78,64	4,05
16	158,4	-	159,11	-	161,81	-
17	104,7	4,97; 5,10	107,23	5,01; 5,13*	109,23	5,13*; 5,14
18	28,7	1,25	27,83	1,19*	27,13	1,19*
19	178,0	-	182,91	-	182,73	-
20	15,4	0,97	14,71	0,89	23,06	1,00

*sinais sobrepostos

3.4.4.2 Identificação do ácido *ent*-16-formil-caur-15-en-19-óico (**87**)

O ácido *ent*-16-formil-caur-15-en-19-óico (**87**) foi isolado como um sólido amarelo opaco (30,6 mg) a partir da oxidação com dióxido de selênio da mistura dos ácidos **1** e **2** (**Esquema 3.3**) e apresentou faixa de fusão em 165,6-168,2 °C.



Esquema 3.3 – Obtenção do ácido *ent*-16-formil-caur-15-en-19-óico (**87**), por reação da mistura dos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**) com SeO₂.

Este aldeído foi identificado a partir da análise espectroscópica de RMN de ¹H e ¹³C mono e bidimensionais e comparação com dados obtidos para o ácido caurenóico (**1**), o material de partida da reação.

No espectro RMN de ¹H (**Figura 3.45**, página 219), verificou-se, em comparação com o material de partida da síntese, a presença de um simpleto em δ_H 9,73, região característica de hidrogênio de aldeído⁶. Não se observaram sinais entre δ_H 4,7 e 5,0, região referente aos hidrogênios olefínicos H-17a e H-17b presentes no material de partida. Adicionalmente, observou-se um sinal de hidrogênio em δ_H 6,58 (s, 1H), característico de dupla ligação endocíclica.

Na comparação entre os espectros de RMN de ¹³C e subespectros DEPT-135 de **87** e **1** (**Figuras 3.46** e **3.47**, página 220) observou-se, nos espectros referentes ao produto **87**, o aparecimento de um sinal adicional de carbono não hidrogenado em δ_C 189,49. Este sinal correlacionava-se, no mapa de contornos HSQC (**Figuras 3.48** e **3.49**, página 221), com o sinal do hidrogênio aldeídico em δ_H 9,73. No mapa de contornos COSY (**Figura 3.50**, página 222) este sinal em δ_H 9,73 correlacionava-se aos sinais em δ_H 6,58, δ_H 3,04 e δ_H 2,18 (d, 2H, $J = 10,8$).

Observou-se que o sinal do carbono não hidrogenado C-16 apresentou-se em δ mais protegido (δ_C 148,65) que no material de partida. Um sinal de carbono metínico adicional foi identificado em δ_C 161,55. Este sinal correlacionava-se no HSQC

(**Figura 3.48**) ao hidrogênio olefínico δ_C 6,58. Na comparação dos demais sinais de carbonos do material de partida **1** e do produto **87** (**Tabela 3.8**, página 126), só não foi localizado o sinal na região de δ_C 45-55 de **1**, referente ao C-15. Dessa forma, o sinal em δ_C 161,55 foi atribuído ao C-15, concluindo-se então que a dupla ligação rearranjou-se, sendo localizada entre C-15/C-16, obtendo-se assim um aldeído conjugado. Na oxidação alílica de duplas ligações empregando o SeO_2 é descrito que o produto inicial pode se decompor em um álcool alílico e, em alguns casos, a oxidação continua, fornecendo um aldeído ou cetona³⁶.

No mapa de contornos HSQC observou-se ainda correlação entre o sinal largo em δ_H 3,04 e o carbono metínico em δ_C 37,81, atribuído a C-13 e entre o sinal de hidrogênio em δ_H 2,18 e o carbono metilênico em δ_C 43,01, atribuído ao C-14. No espectro bidimensional COSY este hidrogênio (δ_H 2,18) correlacionava-se ao hidrogênio atribuído a H-15 em δ_H 6,58.

No HMBC (**Figura 3.51**, página 222) verificou-se a correlação entre os sinais de carbonos em δ_C 189,49 e em δ_C 148,65 ao sinal do hidrogênio em δ_H 6,58. O sinal do carbono em δ_C 148,65 também apresentou correlação com o sinal do hidrogênio em δ_H 2,18, atribuído a um dos hidrogênios metilênicos associados ao C-14 e com o sinal do hidrogênio aldeídico em δ_H 9,73. Dessa forma, o sinal em δ_C 148,65 foi atribuído a C-16 e o sinal em δ_C 189,48 ao C-17, tendo acontecido a oxidação do carbono metilênico olefínico inicial levando a um aldeído. Uma correlação entre o sinal do carbono em δ_C 50,91, atribuído ao C-8 e o sinal do hidrogênio H-15 (δ_H 6,58) foi observada também.

Todos os demais sinais observados nos espectros de RMN de ^{13}C de **87** foram atribuídos e encontram-se compilados na **Tabela 3.8**, que se segue.

Tabela 3.8 – Deslocamentos químicos (δ), nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (**1**) e *ent*-16-formil-caur-15-en-19-óico (**87**)

Posição					
	δ_{C} mult.	δ_{H}	δ_{C} mult.	δ_{H}	HMBC ^a
1	40,7 CH ₂	-	40,61	1,92; 0,85	10
2	19,1 CH ₂	-	18,96	1,88; 1,58	3
3	37,8 CH ₂	-	37,70	2,16; 1,04	18
4	43,74 C	-	43,72	-	18
5	57,1 CH	-	56,54	1,1	6; 18; 20
6	21,3 CH ₂	-	20,23	1,97; 1,75	7a
7	39,6 CH ₂	-	38,15	1,72; 1,05	-
8	44,2 C	-	50,91	-	6; 7; 9; 15
9	55,1 CH	-	48,88	0,99	20
10	38,8 C	-	40,06	-	9; 18; 20
11	18,4 CH ₂	-	18,67	1,6; 1,57	9
12	29,7 CH ₂	-	25,08	-	9; 14
13	43,85 CH	2,77	37,81	3,04	17; 15; 14a
14	41,2 CH ₂	-	43,01	2,18; 1,5	15
15	48,97 CH ₂	-	161,55	6,58	14
16	155,95 C	-	148,65	-	14a; 15; 17
17	102,98 CH ₂	4,73; 4,79	189,49	9,73	15
18	28,9 CH ₃	1,24	28,89	1,26	20; 2
19	184,5 C	-	183,77	-	18; 20
20	15,6 CH ₃	1,02	15,45	1,01	1; 9; 5

^a correlações $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$

3.5 Transformações fúngicas de diterpenos caurânicos

As biotransformações representam uma alternativa interessante na obtenção de metabólitos secundários ativos, muitas vezes, inacessíveis por métodos clássicos de síntese⁴² e seu emprego tem apresentado um grande avanço nas últimas décadas^{43,44}.

Elas consistem na utilização de organismos vivos ou enzimas isoladas destes para converter uma substância química em outra⁴⁵ por meio de reações, tais como oxidações, reduções, hidrólises, condensações, isomerizações formação de ligação carbono-carbono e introdução de heteroátomos. As reações de introdução de heterofunção e formação de ligação C-C apresentam uso limitado, enquanto que as demais reações, principalmente aquelas envolvendo oxidações e hidroxilações em carbonos não funcionalizados, têm sido bastante exploradas e apresentam-se potencialmente úteis^{13, 46, 47}.

O uso de diterpenos caurânicos, como substratos de transformações fúngicas, visando a obtenção de derivados biologicamente ativos tem atraído de maneira crescente os pesquisadores¹³⁻¹⁵. Enquanto que, até o início da década de 90, o objetivo da maioria das transformações microbianas, descritas na literatura, para compostos caurânicos, restringia-se a questões relacionadas à biossíntese e ao grau de receptividade de diferentes substratos pelos microrganismos¹¹, no fim da década de 90 e neste início de século, muitos dos trabalhos relatam a potencialidade destes diterpenos como agentes bioativos⁴⁸.

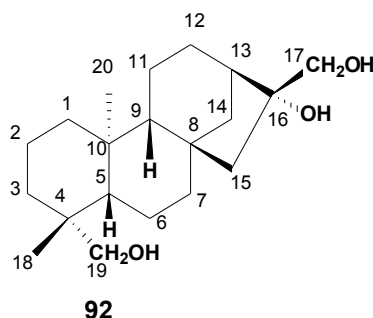
Visto isso e mediante o interesse de nosso grupo de pesquisa em biotransformações de cauranos, substratos naturais ou derivados sintéticos (**Figura 2.2**, página 61) dos diterpenos caurânicos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**), obtidos em quantidade considerável a partir da *W. paludosa*, foram empregados em experimentos de transformação microbiana visando a obtenção de produtos com potencial atividade alelopática.

3.5.1 Biotransformação do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) por *C. aphidicola*

O experimento de biotransformação do álcool *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) foi realizado visando a familiarização com a metodologia empregada neste tipo de experimento e o manuseio de fungos. *Cephalosporium aphidicola* é excelente promotor de hidroxilações sobre o esqueleto caurânico⁴³.

Este substrato foi incubado com o fungo *C. aphidicola* e, após purificação do extrato obtido, foram isolados dois produtos de biotransformação, AR-1 e AR-2 (**Esquema 2.4**, página 66), identificados como o *ent*-16 β ,17,19-trihidroxi-caurano (**92**) e o *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**).

3.5.1.1 Identificação do *ent*-16 β ,17,19-trihidroxi-caurano (**92**)



O *ent*-16 β ,17,19-trihidroxi-caurano (**92**) (17,1 mg 6,97% de bioconversão) foi isolado como cristais brancos em forma de agulhas que apresentaram faixa de fusão entre 228-231 °C. Em análises por CCDS, esta substância se revelou como mancha única rosada utilizando-se solução ácida de sulfato cérico.

A identificação de **92** foi realizada com base na análise dos espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C mono e bidimensionais (**Figuras 3.57 a 3.64**, páginas 227 a 231), por comparação desses dados com aqueles do material de partida *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) (**Figuras 3.53 a 3.56**, páginas 224 a 226) e com aqueles fornecidos pela literatura⁴⁹.

O espectro de RMN de ¹H de **92** (**Figuras 3.57 e 3.58**, página 227) apresentou o padrão típico de diterpenos caurânicos¹, com a maioria dos sinais de hidrogênios aparecendo entre δ_H 0,81 e 1,98. Os simpletos em δ_H 0,93 e 1,31 foram atribuídos a átomos de hidrogênio dos dois grupos metila CH₃-18 e CH₃-20, respectivamente. Por comparação com o espectro de RMN de ¹H do substrato da biotransformação **90**, observou-se que os dois dupletos em δ_H 3,71 (d, H_{19a}; J = 10,9) e δ_H 3,37 (d, H_{19b};

$J = 10,9$) atribuídos a hidrogênios metilênicos em C-19¹², foram preservados no produto **92**. Um novo sinal de duplete em δ_H 4,03 foi observado e atribuído a hidrogênios metilênicos ligados ao C-17, a partir da correlação observada no mapa de contornos HSQC (**Figura 3.62**, página 229). Estas atribuições estão sumariadas na **Tabela 3.9** (página 132).

A partir da análise dos dados do espectro de RMN de ¹³C e subespectro DEPT-135 de **92** (**Figuras 3.59 e 3.60**, página 228) foi possível identificar e estabelecer a multiplicidade dos sinais de carbonos como sendo três carbonos metínicos, dois carbonos metílicos e onze metilênicos, sendo dois desses ligados a oxigênio, por apresentarem deslocamento químico na região característica de álcoois⁶, entre δ_C 50-90 (δ_C 64,70 e δ_C 71,77).

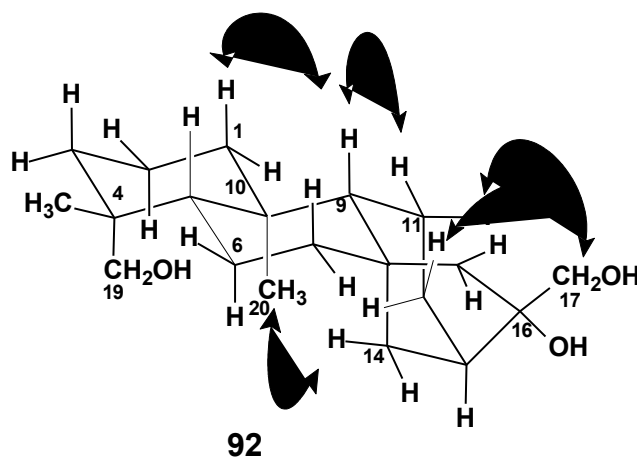
A identificação de quatro carbonos não hidrogenados em **92** se deu pela diferença entre os sinais observados no espectro monodimensional de RMN de ¹³C e aqueles no subespectro DEPT-135. Dos quatro carbonos não associados à hidrogênios presentes em **92**, um deles apresentou-se ligado a oxigênio (δ_C 78,69). Comparando-se este espectro com aquele de **90**, observou-se o desaparecimento dos sinais em δ_C 155,93 e δ_C 102,99, referentes aos carbonos olefínicos C-16 e C-17. No lugar destes, verificou-se o aparecimento de dois sinais de carbonos oxigenados, um metilênico em δ_C 71,77 e um não hidrogenado em δ_C 78,69. Dessa forma, estes sinais foram atribuídos aos C-17 e C-16, respectivamente, indicando que a dupla exocíclica do material de partida foi di-hidroxilada pelo fungo *C. aphidicola*, levando a um álcool primário em C-17 (R-CH₂OH, δ_C 71,77) e a um álcool terciário em C-16 (R₃-C-OH, δ_C 78,69). O outro sinal de carbono metilênico oxigenado, em δ_C 64,70, foi atribuído a C-19, por comparação com o espectro de RMN de ¹³C do material de partida (**Figura 3.54**, página 225).

O mapa de contornos COSY (**Figura 3.61**, página 229) apresentou correlação entre os dupletos dos hidrogênios metilênicos H-19a e H-19b e entre esses e o simpleto em δ_H 0,96, referente aos hidrogênios metílicos associados ao C-18.

No mapa de contornos HSQC (**Figuras 3.62 e 3.63**, páginas 229 e 230) de **92** observaram-se correlações entre os sinais em δ_H 3,71 (d, H_{19a}; $J = 10,9$) e δ_H 3,37 (d, H_{19b}; $J = 10,9$) e o sinal em δ_C 64,70 (C-19), confirmando a atribuição dos hidrogênios metilênicos de álcool⁴³. Foi confirmada, também, a correlação entre o sinal do hidrogênio em δ_H 4,03 (d, 2 H, H_{17 a, b}) e o sinal do carbono em δ_C 71,77

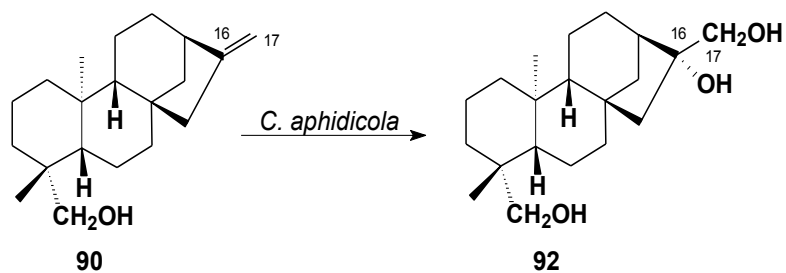
($\text{CH}_2\text{-OH}$), atribuído a C-17. O sinal em δ_{H} 1,52, atribuído ao hidrogênio metilênico H-15b, apresentou manchas de correlação com o sinal em δ_{C} 58,03. Os simpletos em δ_{H} 0,89, δ_{H} 0,93 e δ_{H} 1,31 apresentaram-se correlacionados com os sinais em δ_{C} 56,85, δ_{C} 27,33 e δ_{C} 18,31, atribuídos, respectivamente aos carbonos C-5, C-18 e C-20. O mapa de contornos HSQC possibilitou a visualização de correlação entre o multipletto centrado em δ_{H} 1,81 e o sinal do carbono metínico em δ_{C} 48,92 atribuído ao C-13. Correlacionavam-se, ainda, os sinais de hidrogênios em δ_{H} 1,51 e δ_{H} 0,95 com os carbonos em δ_{C} 26,8 e δ_{C} 57,12, referentes aos C-12 e C-9, respectivamente.

A estereoquímica relativa *ent*-16 β -OH do triol (**92**) foi estabelecida por análise minuciosa do mapa de contornos ROESY (**Figura 3.64**, página 231), principalmente devido à correlação observada entre H-11 β (δ_{H} 1,48) e 17- CH_2OH (δ_{H} 4,03), o que confirma a posição *ent*- α para o substituinte CH_2OH em C-16 e, portanto, evidencia que a hidroxila em C-16 estava localizada na posição *ent*- β . Outras correlações observadas neste mapa de contornos estão listadas na **Tabela 3.10** (página 133) e algumas delas indicadas no esquema **Esquema 3.4**.



Esquema 3.4 – Correlações espaciais observadas no mapa de contornos ROESY de *ent*-16 β ,17,19-trihidroxi-caurano (**92**).

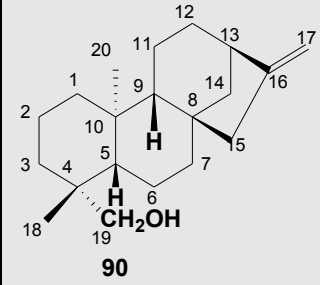
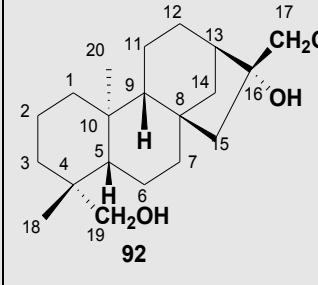
Com base nestes dados, a estrutura da substância codificada como AR-1 foi elucidada como sendo o *ent*-16 β ,17,19-trihidroxi-caurano (**92**) (**Esquema 3.5**).



Esquema 3.5 – Biotransformação do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) em *ent*-16β,17,19-trihidroxi-caurano (**92**) pelo fungo *C. aphidicola*.

Esta substância foi isolada como produto natural a partir das folhas e galhos de *Ozothamnus hookeri* (Asteraceae)⁵⁰, das partes aéreas de *Bahia glandulosa*⁵¹ e dos brotos jovens de *Lindsaea javanensis*, como um 19-*O*-β-D-glicopiranosídeo⁴⁹. Foi isolado, ainda, como um produto de síntese a partir do ácido caurenóico¹¹.

Tabela 3.9 – Deslocamentos químicos (δ), nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) e do *ent*-16 β ,17,19-trihidroxi-caurano (**92**), obtidos a partir de análise de correlações no mapa de contornos HSQC e dados do *ent*-16 β ,17,19-trihidroxi-caurano fornecidos pela literatura⁴⁹

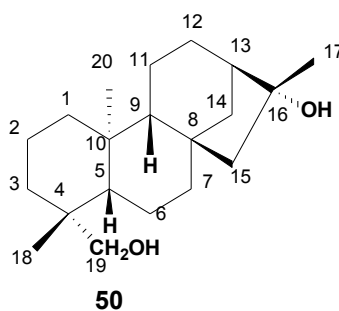
Posição	Mult.									<i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxi-caurano ⁴⁹		
		δ_{C}	δ_{H}		δ_{C}	δ_{H}		δ_{C}	δ_{H}			
			H α	H β		H α	H β		H α			H β
1	CH ₂	40,48	1,77	0,80	40,52	1,76	0,71	40,7	-	-		
2	CH ₂	18,32	1,42	1,56	18,32	1,35	1,54	18,7	-	-		
3	CH ₂	35,62	1,74	0,92	35,75	1,79	0,84	36,2	-	-		
4	C	38,68	-	-	38,79	-	-	39,3	-	-		
5	CH	56,2	1,07		56,85	0,89		56,9	-			
6	CH ₂	20,48	1,61	1,26	20,66	1,61	1,27	21,1	-	-		
7	CH ₂	41,65	1,55	1,4	42,53	1,55	1,38	43,1	-	-		
8	C	44,19	-	-	45,28	-	-	44,9	-	-		
9	CH	56,85	0,96**		57,14	0,95		57,3	-			
10	C	39,24	-	-	39,29	-	-	39,6	-	-		
11	CH ₂	18,23	1,40	1,48	18,12	1,36	1,48	18,7	-	-		
12	CH ₂	33,20	1,33	1,54	26,86	*	1,51	26,7	-			
13	CH	43,99	2,63		48,92	1,81		46,0	-			
14	CH ₂	39,67	1,57	1,84	37,55	1,57	1,84	37,7	-	-		
15	CH ₂	49,07	2,05	*	58,04	*	1,52	54,0	-			
16	C	155,93	-		78,69	-		81,5	-			
17	CH ₂	102,99	4,73	4,79	71,77	4,03	4,03	66,4	4,03	4,17		
18	CH ₃	27,10	0,96**		27,33	0,93		28,1	1,04			
19	CH ₂	65,53	3,44	3,75	64,70	3,37	3,71	64,1	3,64	4,02		
20	CH ₃	18,14	1,01		18,31	1,31		18,6	1,20			

*não identificado; **sinais sobrepostos

Tabela 3.10 - Correlações espaciais observadas no mapa de contornos ROESY para *ent*-16 β ,17,19-trihidroxi-caurano (**92**)

<i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxi-caurano (92)	
H (δ ^1H)	Correlação - H (δ ^1H)
1 α (1,76)	9 (0,95)
3 α (1,78)	18 (0,93)
3 α (1,78)	5 (0,88)
3 β (0,84)	19 (3,7)
6 α (1,6)	20 (1,31)
7 β (1,38)	14 α (1,57)
9 (0,95)	11 α (1,36)
9 (0,95)	15 β (1,52)
11 β (1,48)	17 (4,03)
12 α (1,51)	17 (4,03)
13 (1,81)	15 β (1,52)
14 α (1,56)	20 (1,31)
14 β (1,84)	15 β (1,52)

3.5.1.2 Identificação do *ent*-16 β ,19-dihidroxicaurano (**50**)



O produto de transformação microbiana **50** (3,7 mg, 1,51% de bioconversão) apresentou-se como um sólido opaco, de coloração branca e faixa de fusão entre 210-214 °C, mostrando mancha rosa única em análises por CCDS, ao empregar-se solução ácida de sulfato cérico como revelador.

A identificação de **50** foi realizada com base na análise dos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C mono e bidimensionais (**Figuras 3.65 a 3.70**, páginas 232 a 235), por comparação desses dados com aqueles do material de partida *ent*-19-

hidroxi-caur-16-eno (**90**) (**Figuras 3.53 a 3.56**, páginas 224 a 226) e com aqueles fornecidos pela literatura¹¹.

O padrão espectral de RMN de ^1H de **50** (**Figura 3.65**, página 232), típico de diterpeno caurânico^{1,11}, apresentou-se muito semelhante ao do material de partida (**Figura 3.53**, página 224), no entanto os sinais dos hidrogênios metilênicos da dupla exocíclica, presentes no material de partida em δ_{H} 4,73 e 4,79 não foram observados.

A maioria dos sinais de hidrogênios metilênicos de **50** encontrou-se na região de deslocamento químico entre δ_{H} 0,90 e δ_{H} 1,91, sendo que os simpletos relativos aos hidrogênios dos dois grupos metila H-18 e H-20 foram observados em δ_{H} 0,95 e δ_{H} 1,01. Outro simpleto foi observado em δ_{H} 1,36, valor de deslocamento químico típico de grupo metila em um carbono ligado a um grupo hidroxila⁵².

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 3.66**, página 232) de **50** permitiu observar a presença de sinais referentes a 20 átomos de carbono. Pelo subespectro DEPT-135 (**Figura 3.66**, página 232), a multiplicidade destes foi estabelecida como sendo três carbonos metílicos, dez metilênicos, sendo um desses ligado a oxigênio, por apresentar deslocamento químico em δ_{C} 65,58, característico de álcoois primários⁵³, e três carbonos metínicos. A diferença observada em relação ao número de sinais entre os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 indicou a existência de quatro sinais correspondentes a átomos de carbono quaternários, sendo um carbono sp^3 oxigenado (δ_{C} 79,28) e três carbonos sp^3 inseridos num esqueleto carbônico (δ_{C} 39,26, 45,3 e 38,64) atribuídos aos carbonos do esqueleto caurânico C-4, C-8 e C-10, respectivamente.

O sinal em δ_{C} 65,58, metilênico, foi atribuído a C-19, comparável ao do material de partida, *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**), que mostrou o sinal referente a este carbono em δ_{C} 65,53 (**Figura 3.54**, página 225).

Comparando-se os espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de **50** (**Figura 3.66**, página 232) com os do material de partida (**Figura 3.54**, página 225), observou-se o desaparecimento dos sinais em δ_{C} 155,93 e δ_{C} 102,98, referentes aos carbonos olefínicos C-16 e C-17 e aparecimento de sinais referentes a um carbono oxigenado não hydrogenado em δ_{C} 79,28 e um carbono metílico em δ_{C} 24,47.

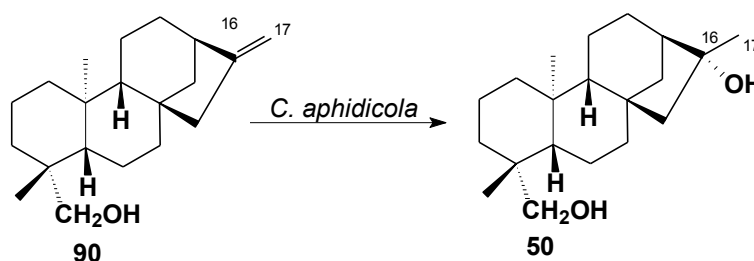
A análise do mapa de contornos HSQC (**Figuras 3.67**, página 233) mostrou correlação entre o sinal em δ_{C} 24,47 e o do simpleto em δ_{H} 1,36. No mapa de

contornos HMBC (**Figura 3.68**, página 233), o sinal do carbono quaternário oxigenado em δ_C 79,28 mostrou-se correlacionado ao simpleto do metila em δ_H 1,36, sugerindo que a hidroxila encontrava-se no carbono C-16.

No espectro de RMN de 1H de **50** foram preservados, do material de partida, os dois dupletos com deslocamento químico em δ_H 3,72 (d, H_a ; $J = 10,9$) e δ_H 3,44 (d, H_b ; $J = 10,9$), correlacionados entre si no mapa de contornos COSY (**Figura 3.69**, página 234), relativos aos hidrogênios metilênicos em C-19, cujo sinal do carbono no espectro de RMN de ^{13}C apareceu em δ_C 65,58. Foi preservado, ainda, o multiplete centrado δ_H 1,83 que foi atribuído ao hidrogênio metínico ligado ao C-13 que, no mapa de contornos HSQC apareceu correlacionado com sinal em δ_C 49,02.

Outras atribuições foram realizadas ou confirmadas a partir de correlações observadas no mapa de contornos HSQC. Um sinal com deslocamento químico em δ_H 1,55, de multiplicidade não determinada, foi atribuído aos dois hidrogênios metilênicos H-15 (δ_C 57,92). Os simpletos em δ_H 0,95 (3H), δ_H 1,01 (3H) apresentaram-se correlacionados com os sinais em δ_C 27,04 e δ_C 18,23, atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-18 e C-20.

Essas atribuições, associadas à comparação com dados obtidos na literatura¹¹, permitiram confirmar a hidratação da dupla ligação exocíclica do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) pelo *C. aphidicola* (**Esquema 3.6**).



Esquema 3.6 – Biotransformação do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) em *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**) pelo fungo *C. aphidicola*.

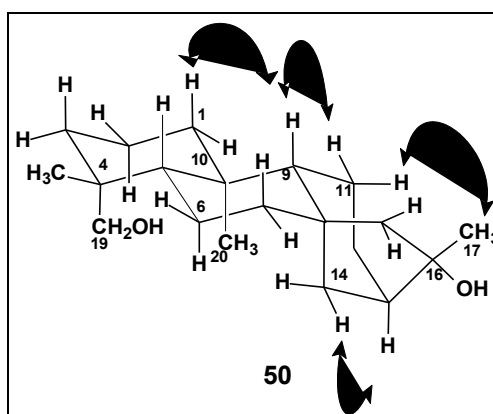
A configuração do carbono 16 foi estabelecida pela análise do espectro bidimensional ROESY (**Figura 3.70**, página 235) onde a correlação entre o sinal atribuído aos hidrogênios metílicos em C-17 (δ_H 1,36) e o sinal do H-11 β (δ_H 1,48) foi observada. O sinal dos hidrogênios metílicos H-17 correlacionava-se, ainda, com os

sinais do H-15 (δ_H 1,55) e do H-12 β (δ_H 1,54). Assim sendo, o CH₃-17 foi atribuído à posição *ent*- α (**Esquema 3.7**).

Outras correlações foram estabelecidas a partir da análise dos dados do espectro ROESY como aquela entre o H-1 α em δ_H 1,79 e o H-9 (δ_H 0,99) (**Tabela 3.11**).

Tabela 3.11 - Correlações espaciais observadas no mapa de contornos ROESY para *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**)

<i>ent</i>-16β,19-dihidroxi-caurano (50)	
H (δ ¹H)	Correlação - H (δ ¹H)
1 α (1,79)	9 (0,99)
11 α (1,43)	9 (0,99)
11 β (1,48)	17 (1,36)
15 (1,55)	17 (1,36)
12 β (δ_H 1,54)	17 (1,36)
13 (1,83)	14 α (1,58)



Esquema 3.7 – Correlações espaciais observadas no mapa de contornos ROESY de *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**).

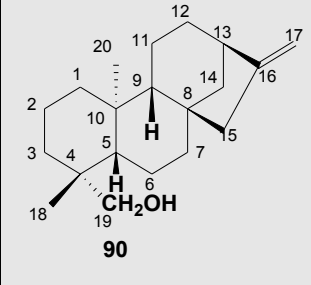
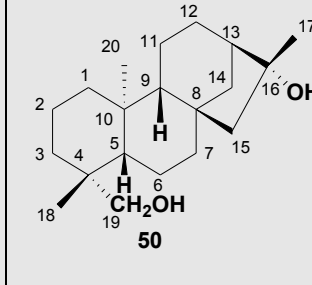
Dessa forma, a hidroxila associada ao C-16 se encontrava, obrigatoriamente, na posição *ent*- β . Assim, este produto foi elucidado como sendo o álcool *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**) (**Esquemas 3.6**, página 135 e **3.7**).

Esta substância já foi isolada como um produto natural a partir dos galhos de *Aristolochia rodriguesii*⁵⁴ e das folhas e galhos de *Ozothamnus hookeri* (Asteraceae)⁵⁰. **50** foi obtido como também por modificação química do ácido *ent-caur-16-en-19-óico*^{1,11}.

Os dados de RMN de ¹H e de ¹³C obtidos para **50**, em comparação com aqueles obtidos para o substrato da biotransformação **90** e aqueles do *ent-cauran-16 β ,19-diol*¹¹, obtidos pela literatura, encontram-se compilados na **Tabela 3.12**, a seguir.

É a primeira vez que se descreve a obtenção de *ent-16 β ,19-dihidroxi-caurano* (**50**) e *ent-16 β ,17,19-trihidroxicaurano* (**92**) a partir da biotransformação do *ent-19-hidroxi-caur-16-eno* (**90**) pelo *C. aphidicola*.

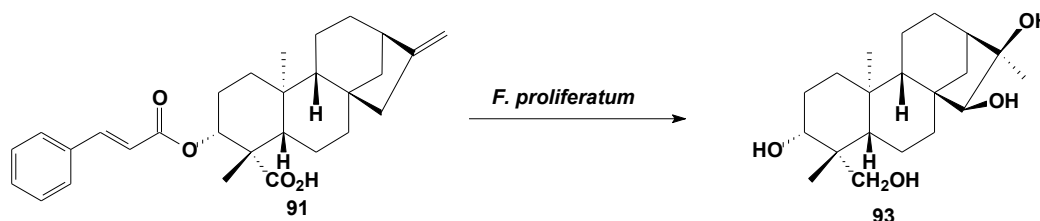
Tabela 3.12 – Deslocamentos químicos (δ), nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) e do *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**), obtidos a partir de análises de correlações no HSQC e do *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano obtido por Takahashi (1994)¹¹

Posição	Mult.							<i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano ¹¹		
		δ_{C}	δ_{H}		δ_{C}	δ_{H}		δ_{C}	δ_{H}	
			H α	H β		H α	H β		H α	H β
1	CH ₂	40,48	1,77	0,80	40,45	1,79	0,81	40,4	-	-
2	CH ₂	18,32	1,42	1,56	18,25**	1,42	1,58*	18,2	-	-
3	CH ₂	35,62	1,74	0,92	35,68	1,75	0,90	35,6	-	-
4	C	38,68	-	-	39,26	-	-	38,6	-	-
5	CH	56,2	1,07		56,78	0,92		57,0	-	
6	CH ₂	20,48	1,61	1,26	20,68	1,65	1,31	20,6	-	-
7	CH ₂	41,65	1,55	1,4	42,46	1,62	1,45	42,4	-	-
8	C	44,19	-	-	45,31	-	-	45,3	-	-
9	CH	56,85	0,96**		57,04	0,99		56,7	-	
10	C	39,24	-	-	38,64	-	-	39,2	-	-
11	CH ₂	18,23	1,40	1,48	18,05	1,43	1,48	18,0	-	-
12	CH ₂	33,20	1,33	1,54	26,79	1,27	1,54	26,8	-	
13	CH	43,99	2,63		49,02	1,83		49,0	-	
14	CH ₂	39,67	1,57	1,84	37,55	1,58*	1,88	37,5	-	-
15	CH ₂	49,07	2,05	*	57,92	1,55		57,8	-	
16	C	155,93	-	-	79,28	-	-	79,3	-	-
17	CH ₂ / CH ₃	102,99	4,73	4,79	24,47	1,36		24,4	1,36	
18	CH ₃	27,10	0,96**		27,04	0,95		27,0	1,02	
19	CH ₂	65,53	3,44	3,75	65,58	3,44	3,72	65,5	3,45	3,73
20	CH ₃	18,14	1,01		18,23	1,01		18,2	0,96	

*H₂ β = 1,5838 e H-14 α = 1,5756; **sinais sobrepostos e observados apenas no subespectro DEPT-135.

3.5.2 Biotransformação do ácido *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (**91**) por *F. proliferatum*

A incubação do ácido **91** com *F. proliferatum* possibilitou a obtenção de um sólido amarelado amorfo, codificado como AR-3 (7,8 mg, 2,23% de bioconversão) e identificado como o *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano (**93**).



Esquema 3.8 – Biotransformação do *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (**91**) em *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano (**93**) pelo fungo *F. proliferatum*.

3.5.2.1 Identificação do *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano (**93**)

A estrutura desta substância foi elucidada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos nos espectros no IV e de RMN (^1H , ^{13}C , DEPT, HMBC, HSQC, NOESY) e por comparação com os dados espectroscópicos do material de partida (**91**) (Figuras 3.71 a 3.77, páginas 236 a 239).

O espectro no IV de **93** (Figura 3.78, página 239) apresentou uma banda larga em 3330 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação OH e bandas em torno de 2900 cm^{-1} referentes a deformação axial de ligação C-H. Não foram observadas bandas características de deformação axial de C=O, nem de deformação axial de dupla exocíclica, assim como aquelas referentes ao estiramento de ligação C=C de sistemas aromáticos, presentes no espectro no IV do material de partida, o ácido *ent*-caur-3 β -cinamato-16-en-19-óico (**91**) (Figura 3.71, página 236), sugerindo a ocorrência de hidrólise do éster em C-3, além de reação sobre o grupamento ácido em C-19 e sobre a ligação dupla em C-16/C-17. Foram observadas, ainda, bandas intensas em 1087 e 1045 cm^{-1} , características de deformação angular de ligação C-O.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 3.79, página 240) foram visualizados simpletos em δ_{H} 1,02 e 0,61 correspondentes aos átomos de hidrogênio metílicos H-18 e H-20, respectivamente, que foram conservados no produto **93**, em relação ao material de partida. Um sinal de simpleto adicional, em δ_{H} 1,03, foi observado neste

espectro. Na seção expandida entre δ_H 3,40 e 5,30 do espectro de RMN de 1H (**Figura 3.80**, página 240) observou-se o aparecimento de sinais em δ_H 3,51, 3,60 e 3,94, relativos a hidrogênios em carbonos oxigenados.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 3.81**, página 241) de **93** observou-se o desaparecimento dos sinais da carboxila, dos dois carbonos olefínicos e de carbonos aromáticos, presentes no espectro do material de partida **91**, confirmando a ocorrência de hidrólise do grupo cinamoíla. Sinais na região compreendida entre δ_C 115,0 -145,0 foram identificados como impureza presente na amostra.

A multiplicidade dos sinais de carbono foi estabelecida a partir da análise do subspectro DEPT-135 (**Figura 3.82**, página 241): 3 carbonos metílicos, 8 metilênicos, 5 metínicos e 4 quaternários, indicando haver quatro carbonos oxigenados: um metilênico (δ_C 71,90), dois metínicos (δ_C 68,50 e δ_C 74,36) e um quaternário (δ_C 77,02). Além disso, neste espectro pode ser visto sinal relativo a um carbono metílico (δ_C 19,04) a mais em relação ao material de partida, além daqueles atribuídos aos C-18 e 20, em δ_C 21,83 e δ_C 12,98, respectivamente.

A análise do espectro bidimensional HSQC (**Figuras 3.83 e 3.84**, páginas 242 e 243) possibilitou relacionar o carbono metínico em δ_C 74,36 atribuído ao C-3, por comparação com o material de partida, com o hidrogênio em δ_H 3,51; o carbono metilênico oxigenado (δ_C 71,90) foi correlacionado ao sinal de hidrogênio em δ_H 3,60 (sl, 2H), que foi atribuído ao C-19, tendo então ocorrido a redução do grupo carboxila do esqueleto caurânico. Também foi observada uma correlação entre o sinal do carbono metínico oxigenado em δ_C 68,50 com o hidrogênio em δ_H 3,94. A comparação dos sinais dos carbonos de **93** com aqueles do material de partida **91** permitiu concluir que estes sinais poderiam ser atribuídos aos C-15 e H-15 do esqueleto caurânico de **93**.

Algumas outras correlações foram observadas ainda no mapa de contornos HSQC e as atribuições foram realizadas por comparação com os dados espectroscópicos do material de partida. Observaram-se correlações entre os sinais em δ_H 2,04 e δ_C 41,90 (C-13); entre os sinais em δ_H 2,06 e δ_C 40,72 (C-14); entre os sinais em δ_H 1,67 e 1,31 e em δ_C 40,86 (C-7); entre os sinais em δ_H 1,92 e δ_C 56,04 (C-9); e entre os sinais em δ_H 1,29 e δ_C 57,4 (C-5).

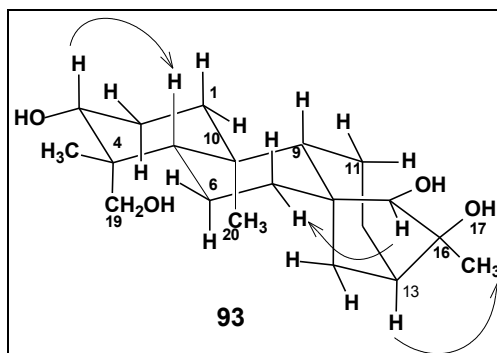
No mapa de contornos HMBC (**Figura 3.85**, página 244), observaram-se correlações J^2 entre o carbono quaternário em δ_C 77,02 e os hidrogênios metílicos

em δ_H 1,03 que no HSQC correlacionava-se ao carbono em δ_C 19,04. Assim, o carbono em δ_C 77,02 foi atribuído ao C-16 e o carbono em δ_C 19,04 ao C-17, comprovando a ocorrência da hidratação da ligação dupla C-16/C-17, presente no material de partida. Observou-se também que estes hidrogênios metílicos (δ_H 1,03, H-17) apresentaram correlação J^3 ao carbono em δ_C 41,90, atribuído ao C-13. Foram observadas correlações entre os hidrogênios metílicos H-18 (δ_H 1,02, s) com C-4 (δ_C 38,30) e C-5 (δ_C 57,52). Correlações entre os hidrogênios metílicos do C-20 (δ_H 0,6, s) com C-5 (δ_C 57,52), C-8 (δ_C 44,83) e C-9 (δ_C 56,04) também puderam ser visualizadas.

A análise do mapa de contornos NOESY (**Figura 3.86**, página 245) evidenciou a correlação entre o H-3 (δ_H 3,51) e H-5 β (δ_H 1,29), confirmando a posição *ent*- β do grupo hidroxila em C-3. A configuração da hidroxila em C-16 foi estabelecida como *ent*- α , visto que os hidrogênios do grupamento metila (δ_H 1,03) ligado ao C-16 mostraram correlação com os hidrogênios 13 (δ_H 2,04, sl) e 14 (δ_H 2,06).

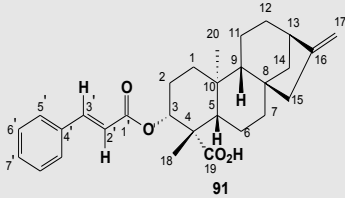
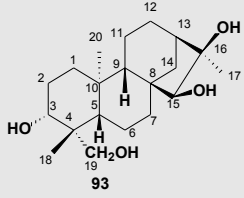
A análise das correlações obtidas no mapa de contornos NOESY também permitiu a determinação da configuração da hidroxila no carbono 15 do esqueleto caurânico do produto **93**. Observou-se, primeiramente, que o hidrogênio metínico em δ_H 3,94, associado ao C-15 (δ_C 68,50), não apresentou correlação com o H-9 (δ_H 1,92). Em seguida, foi identificada a correlação entre o H-15 (δ_H 3,94) e o hidrogênio H-7 (δ_H 1,67), comprovando que o H-15 encontrava-se na posição *ent*- β . Dessa forma, concluiu-se que a hidroxila apresentava a configuração *ent*-15 α .

Estas correlações no NOESY estão mostradas no **Esquema 3.9**. A atribuição dos sinais de carbono e hidrogênio de **93** está sumarizada na **Tabela 3.13**.



Esquema 3.9 – Correlações espaciais observadas no mapa de contornos NOESY de *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (**93**).

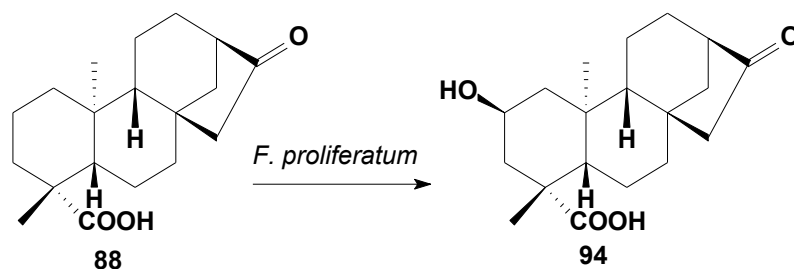
Tabela 3.13 – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e de ^{13}C do *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (**91**) e do *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (**93**) obtidos a partir de análise de correlações no mapa de contornos HSQC

Posição						
	δ_{C} mult.	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C} mult.	δ_{H}	HMBC ^a	NOESY ^b
1	38,63 CH ₂	-	40,40	-	-	-
2	24,77 CH ₂	-	24,17 ^d	1,55	1; 3; 20	-
3	80,17 CH	4,10-4,70 ^c	74,36	3,51	-	5
4	47,79 C	-	38,30	-	20, 18	-
5	56,70 CH	-	57,52	1,29	-	-
6	22,23 CH ₂	-	23,15	1,56	-	-
7	40,02 CH ₂	-	40,86	1,31; 1,67	-	-
8	43,92 C	-	44,83	-	-	-
9	55,73 CH	-	56,04	1,92	-	-
10	39,89 C	-	39,13	-	20	-
11	18,97 CH ₂	-	24,17 ^d	-	-	-
12	33,58 CH ₂	-	34,05	1,58	11; 14	-
13	44,51 CH	2,62, sl	41,90	2,04, sl	11	-
14	39,45 CH ₂	-	40,72	2,06	13; 15; 20	-
15	49,33 CH ₂	-	68,50 CH	3,94	-	7
16	155,98 C	-	77,02	-	17	-
17	103,49 CH ₂	4,80, sl; 4,74, sl	19,04 CH ₃	1,03, s	16, 13	13
18	24,00 CH ₃	1,34, s	21,83	1,02, s	3; 4; 5	-
19	176,87 C	-	71,90 ^e	3,60, sl	20	-
20	15,64 CH ₃	1,08, s	12,98	0,61, s	5; 9; 8	-
1'	167,41 C	-	-	-	-	-
2'	119,02 CH	6,54, d (16,0)	-	-	-	-
3'	145,46 CH	7,67, d (16,0)	-	-	-	-
4'	135,17 C	-	-	-	-	-
5'	128,79 CH	7,62, m	-	-	-	-
6'	129,60 CH	7,41-7,43, m	-	-	-	-
7'	131,02 CH	7,41-7,43, m	-	-	-	-

^aCorrelações HMBC a partir do hidrogênio associado ao carbono indicado. ^bCorrelações NOESY (1H – 1H).
^cSinal encoberto pelo sinal do solvente (CD₃OD). ^dSinais sobrepostos. ^eIdentificado no subespectro DEPT-135.

3.5.3 Biotransformação do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) por *F. proliferatum*

O ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) foi incubado com o fungo *F. proliferatum* por 14 dias, sob agitação a temperatura ambiente. O extrato obtido foi submetido a purificação (item **2.11**, página 70), possibilitando o isolamento de um produto inédito, resultante da hidroxilação do material de partida na posição 2 do esqueleto caurânico: o ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**) (Esquema 3.7).



Esquema 3.10 – Biotransformação do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) no ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**) pelo *F. proliferatum*.

3.5.3.1 Ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**)

O composto **94** foi isolado como cristais brancos em forma de agulhas finas (64,6 mg; 17,6% de bioconversão), de ponto de fusão 261-265 °C.

A estrutura desta substância foi elucidada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos nos experimentos mono e bidimensionais de RMN (^1H , ^{13}C , DEPT, HMBC, HSQC, NOESY) (**Figuras 3.87 a 3.98**, páginas 246 a 251) e por espectrometria de massas de alta resolução (**Figura 3.99**, página 252). A confirmação estrutural foi realizada a partir da análise dos resultados obtidos no experimento de difração de raios-X. Além disso, todos os sinais dos átomos de hidrogênio foram atribuídos a partir de comparação com dados espectroscópicos encontrados na literatura para o material de partida²⁶.

No espectro de RMN de ^1H e suas ampliações (**Figura 3.87 a 3.90**, páginas 246 e 247), os simpletos em δ_{H} 1,44 e 1,19 correspondentes aos átomos de hidrogênio metílicos associados aos C-18 e C-20, respectivamente, foram conservados no produto **94**, em relação ao material de partida **88** (**Figura 3.21**, página 205). Na seção expandida entre δ_{H} 4,00 e 5,20 deste espectro (**Figura 3.89**,

página 247), observou-se o aparecimento de um multipletto em δ_{H} 4,91 (m, 1H), com integração referente a um hidrogênio, sugerindo ter ocorrido uma monohidroxilação do substrato original **88** (**Esquema 3.10**, página 143).

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 3.91**, página 248) de **94** foram identificados sinais referentes a 19 átomos de carbono e sua multiplicidade foi estabelecida, a partir do subespectro DEPT-135 (**Figura 3.92**, página 248), como sendo dois átomos de carbono metílicos, oito metilênicos, quatro metínicos e cinco quaternários, indicando haver um carbono metínico oxigenado, (δ_{C} 63,99), a mais e um carbono metilênico a menos que no substrato da biotransformação **88** (**Tabela 3.14**, página 147). O produto da transformação microbiana **94** preservou a carbonila cetônica em C-16 (δ_{C} 221,30) e a carbonila de ácido carboxílico em C-19 (δ_{C} 180,41) do material de partida **88** (**Figura 3.22**, página 206).

A atribuição dos sinais no espectro RMN de ^{13}C e a análise do espectro bidimensional HSQC (**Figuras 3.93 e 3.94**, página 249) possibilitaram relacionar esta hidroxilação ao carbono metínico oxigenado 2 (δ_{C} 63,99), tendo os sinais dos carbonos metilênicos C-1 e C-3 sido deslocados para um maior valor (δ_{C} 50,89 e δ_{C} 48,68, respectivamente) em relação aos sinais observados para C-1 (δ_{C} 40,79) e C-3 (δ_{C} 37,84) no espectro de RMN de ^{13}C do substrato da biotransformação (**Tabela 3.14**). Estes sinais em δ_{C} 50,89 e 48,68 mostraram correlação no mapa de contornos HSQC aos sinais em δ_{H} 2,54 (dd, 1H, J 12,3 e 2,7) e δ_{H} 3,07 (dd, 1H, J 12,3 e 2,7) (**Figura 3.94**, página 249), respectivamente, referentes aos hidrogênios axiais H-1 e H-3.

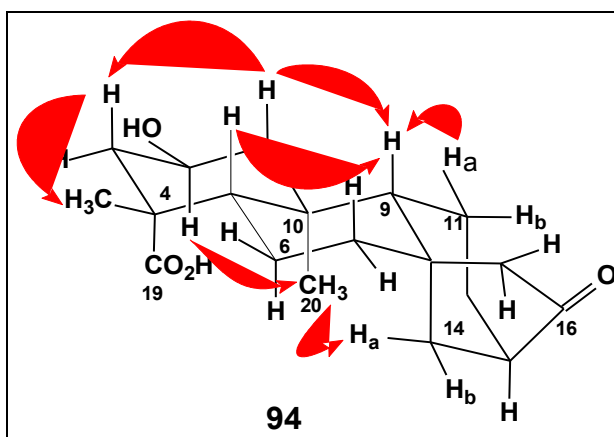
Além disso, outras correlações foram observadas no mapa de contornos HSQC por comparação com os dados espectroscópicos do material de partida. Observaram-se correlações entre os sinais em δ_{H} 2,31 e δ_{C} 48,8, atribuído a C-13; entre os sinais em δ_{H} 1,68 e 1,57 e o sinal δ_{C} 19,3 (C-11); entre os sinais em δ_{H} 2,1 e 1,27 e o sinal em δ_{C} 37,54 (C-14). A correlação entre o sinal em δ_{H} 1,17 e o sinal em δ_{C} 54,27, atribuído ao C-9, e entre o sinal em δ_{H} 1,13 e o sinal em δ_{C} 56,66, atribuído ao C-5, também foram encontradas.

No espectro bidimensional COSY (**Figura 3.95**, página 250) foi possível observar as correlações entre o multipletto em δ_{H} 4,91 (m, 1H) e os sinais em δ_{H} 2,54 (dd, 1H, J 12,3 e 2,7) e δ_{H} 3,07 (dd, 1H, J 12,3 e 2,7), respectivamente, referentes aos átomos de hidrogênio axiais H-1 e H-3.

Dessa forma, **94** foi identificado como um produto de monohidroxilação na posição 2 do esqueleto caurânico do material de partida (**Esquema 3.10 e Tabela 3.14**).

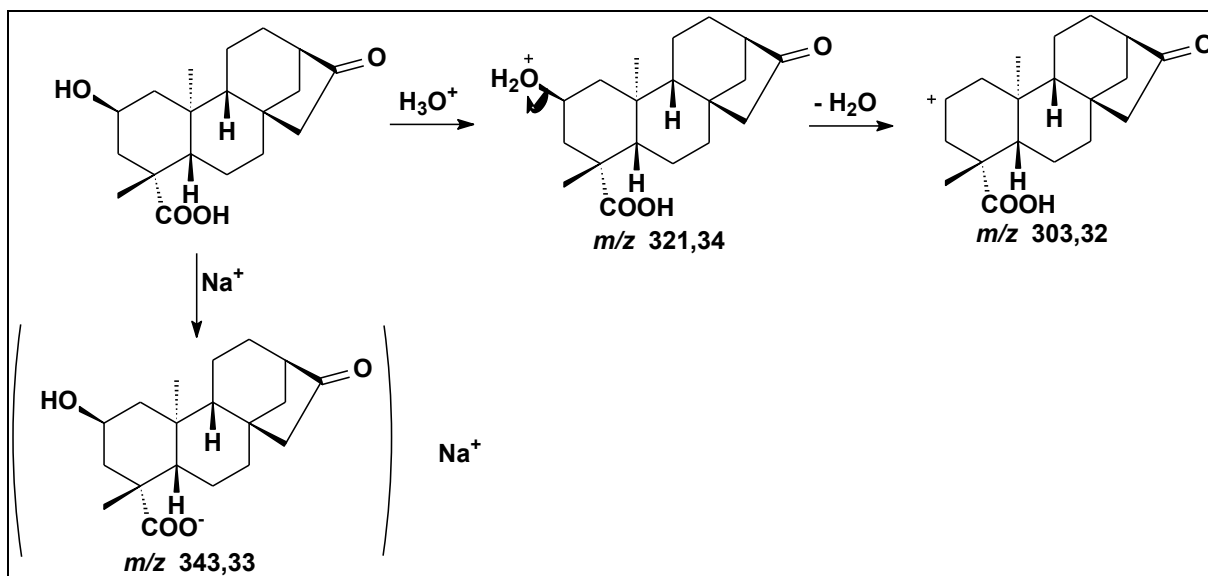
No mapa de contornos HMBC (**Figuras 3.96 e 3.97**, páginas 250 e 251), observaram-se correlações J^{β} entre o C-2 e os átomos de hidrogênio metilênicos do C-1 (δ_{H} 2,54) e C-3 (δ_{H} 3,07). Foram identificadas, ainda, correlações entre o C-3 (δ_{C} 48,68) e os átomos de hidrogênio metílicos ligados ao C-18 (δ_{H} 1,44, s, 3H), entre o C-1 (δ_{C} 50,89) e os átomos de hidrogênio metilênicos no C-3 (δ_{H} 3,07, dd).

A configuração da hidroxila em C-2 foi estabelecida a partir de análises do mapa de contornos NOESY (**Figura 3.98**, página 251), onde foi observada a correlação do H-2, em δ_{H} 4,91 com o CH₃-20 (δ_{H} 1,19). Se o sinal do H-2 acopla com os átomos de hidrogênio do C-20 significa que o átomo de hidrogênio encontra-se na posição *ent-2 β* e, conseqüentemente, a hidroxila em C-2 localiza-se na posição *ent-2 α* (**Esquema 3.11**).



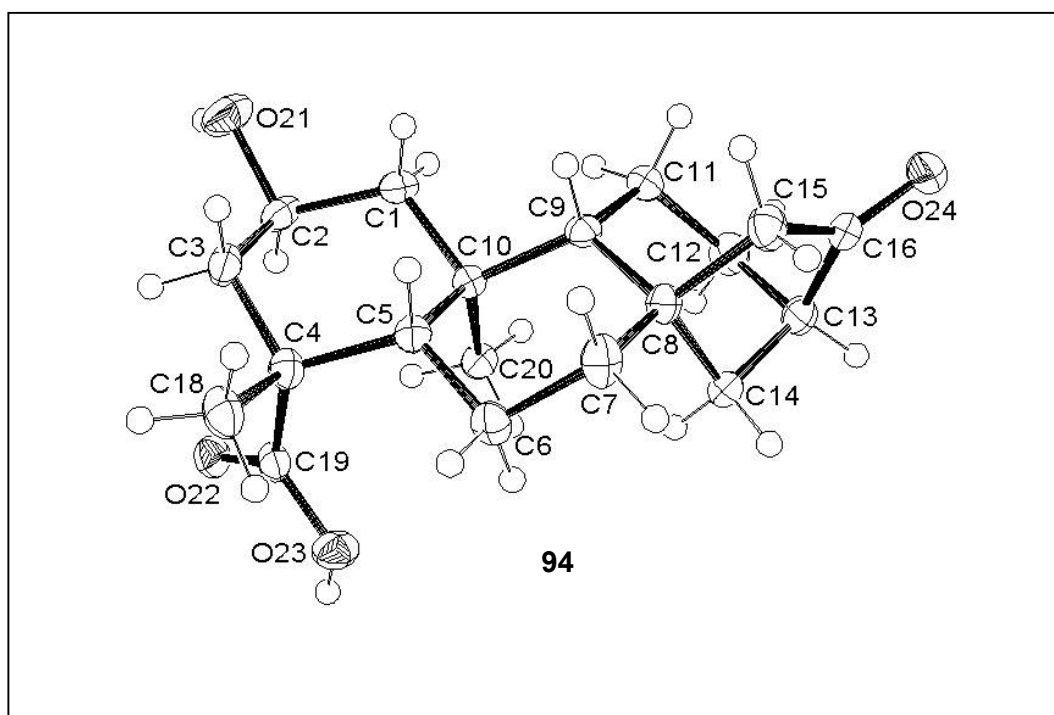
Esquema 3.11 – Correlações espaciais observadas no mapa de contornos NOESY de o ácido *ent-2 α* -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**).

O espectro de massas de alta resolução obtido por ESI de **94** (**Figura 3.99**, página 252) forneceu um pico de m/z 321,34, atribuído ao íon molecular $[M^+ + 1]^+$, compatível com a fórmula molecular C₁₉H₂₈O₄. O pico de m/z 343,33 se refere ao fragmento $[M^+ + Na]^+$. O pico de m/z 303,32 foi atribuído ao fragmento $[M^+ - H_2O]^+$ (**Esquema 3.12**).



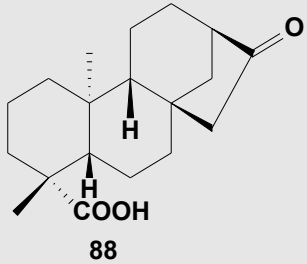
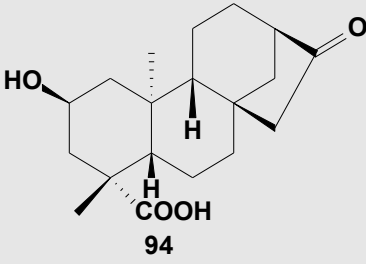
Esquema 3.12 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos principais picos observados no espectro de massas do ácido **94**.

A estrutura de **94** foi confirmada através de análise por cristalografia de raios-X (**Esquema 3.13**).



Esquema 3.13 - Representação em perspectiva ORTEP da estrutura obtida por DRX para o ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**).

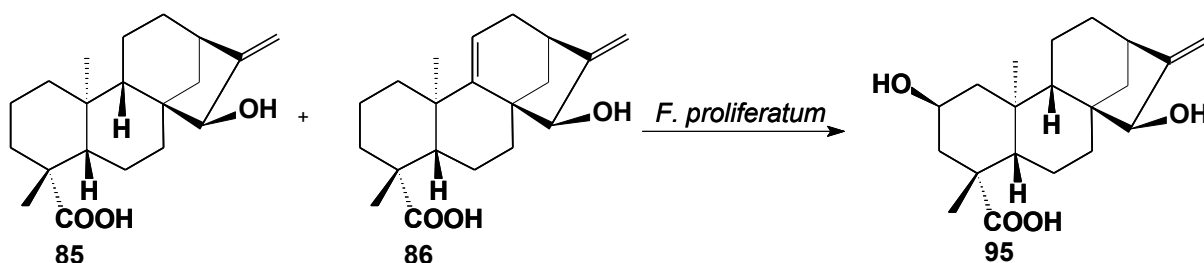
Tabela 3.14 – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C dos ácidos *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) e *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**)

Posição	 Ácido <i>ent</i>-16-oxo-17-norcauran-19-óico (88)		 Ácido <i>ent</i>-2α-hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94)			
	δ_{C} mult.	δ_{H}	δ_{C} mult.	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)	HMBC ^a	NOESY ^b
1	40,79 CH ₂	1,85; 0,85, m	50,89	2,52, dd (12,3; 2,7); 1,1	3; 20	2; 5; 9; 11; 20
2	18,95 CH ₂	1,46; 1,90, m	63,99 CH	4,81, m	1; 3	1; 3; 18; 20
3	37,84 CH ₂	2,18; 1,04, m	48,68	3,07, dd (12,3; 2,7); 1,39	18	2; 18
4	43,90 C	-	45,50	-	3; 5; 18	
5	56,94 CH	1,12, s	56,66	1,13, s	1; 3; 20; 18	9; 18
6	20,90 CH ₂	1,89; 1,94, m	21,59	2,03; 2,22, m	5; 9	20
7	41,21 CH ₂	1,66; 1,60, m	41,64	1,71; 1,42, m	11; 15; 5	
8	42,65 C	-	42,77	-	7; 15	
9	54,15 CH	1,18, sl	54,27	1,17, sl	11; 14; 15; 20	11; 15
10	39,95 C	-	41,43	-	20	
11	19,18 CH ₂	1,68; 1,58, m	19,37	1,68; 1,57, m	12; 20	
12	29,68 CH ₂	1,59; 1,79, m	29,90	1,59; 1,93, m	11; 14	
13	47,94 CH	2,40, m	48,27	2,31, m	11	14; 15; 20
14	37,50 CH ₂	2,3; 1,46, sl	37,68	2,10, dd (12,0 e 3,8); 1,25	13; 15; 20	15; 20
15	55,12 CH ₂	1,96; 1,99, sl	55,32	1,96; 2,00, sl	14	
16	222,91 C	-	221,30	-	15	
17	-	-	-	-	-	
18	29,14 CH ₃	1,26, s	29,65	1,44, s	3; 4; 20	
19	184,45 C	-	180,41	-	20	
20	16,26 CH ₃	1,01, s	17,90	1,19, s	1; 2; 5; 18	

^aCorrelações HMBC a partir do hidrogênio associado ao carbono indicado. ^bCorrelações NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$).

3.5.4 Biotransformação de uma mistura dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**) por *F. proliferatum*

A mistura dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**), preparada a partir da hidroxilação alílica do ácido caurenóico (**1**) empregando SeO₂ (Item 2.7.3.2, página 54) foi incubada com o fungo *Fusarium proliferatum*. A partir de purificação da fração em acetato de etila, foi possível o isolamento de um produto inédito, resultante da monohidroxilação do substrato *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) na posição 2 do esqueleto caurânico: o ácido (**95**) (Esquema 3.14).



Esquema 3.14 – Biotransformação dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**) originando o ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**) por *F. proliferatum*.

3.5.4.1 Ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**)

O produto de transformação microbiana **95** foi isolado como um sólido opaco amarelo ouro (95,1 mg; 26,78% de bioconversão), de faixa de fusão 159-162 °C. Apresentou mancha única em análises por CCDS empregando-se o eluente hexano/AcOEt (1:9).

A estrutura desta substância foi determinada a partir da análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos no espectro no IV, nos experimentos mono e bidimensionais de RMN (¹H, ¹³C, DEPT, HMBC, HSQC, NOESY), por espectrometria de massas de alta resolução e por comparação com dados espectroscópicos encontrados na literatura¹¹ para o substrato da biotransformação (**85**).

No espectro no IV de **95** (Figura 3.100, página 253) observaram-se bandas características dos grupos funcionais presentes na molécula: banda larga e arredondada referente à deformação axial de ligação O-H (3346 cm⁻¹), banda larga

de deformação axial de ligação C-H (2930 cm^{-1}), banda intensa de deformação axial de ligação C=O (1695 cm^{-1}) e bandas referentes à deformação angular de ligações C-O e C-C (1435 , 1253 , 1191 , 1048 e 771 cm^{-1}).

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 3.101**, página 253) de **95**, os sinais em δ_{H} 5,20 e δ_{H} 5,09, correspondentes aos hidrogênios metilênicos olefínicos associados ao C-17 (δ_{C} 108,67) foram preservados do substrato da biotransformação **85**. O sinal em δ_{H} 3,75, referentes ao hidrogênio metínico associado ao C-15 e os sinais em δ_{H} 1,28 e δ_{H} 0,97 dos hidrogênios metílicos ligados a C-18 e C-20, respectivamente, também foram conservados no produto **95**, em relação ao material de partida **85**.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 3.102**, página 254) de **95** foram identificados sinais referentes a 20 carbonos. A multiplicidade destes carbonos foi estabelecida, a partir do subespectro DEPT-135 (**Figura 3.103**, página 254), como sendo 2 carbonos metílicos, 8 metilênicos, 5 metínicos e 5 quaternários, indicando haver dois carbonos metínicos oxigenados, (δ_{C} 82,65 e δ_{C} 64,07), o que significa um carbono metínico a mais e um carbono metilênico a menos que no material de partida da biotransformação **85** (**Tabela 3.15**, página 152). O produto da transformação microbiana **95** preservou do material de partida **85**, além da hidroxila em C-15 (δ_{C} 82,65), a ligação dupla em C-16 (δ_{C} 159,43), a carbonila de ácido carboxílico em C-19 (δ_{C} 180,43).

A análise do espectro bidimensional HSQC e sua expansão (**Figuras 3.104 e 3.105**, páginas 255 e 256) possibilitou a visualização de uma mancha de correlação entre o carbono em δ_{C} 64,07 e o sinal em δ_{H} 4,05 referente a um hidrogênio que, no espectro de RMN de ^1H mostrou-se encoberto pelo sinal de água⁶, presente como impureza do solvente empregado. Esta correlação sugere que o fungo tenha realizado uma hidroxilação do substrato original **85** (**Esquema 3.14**, página 148).

A atribuição dos sinais no espectro de RMN de ^{13}C e a análise do espectro bidimensional HSQC possibilitaram inferir que esta hidroxilação tenha ocorrido no carbono 2 (δ_{C} 64,07), visto que todos os demais carbonos tiveram os sinais atribuídos, por comparação com os sinais obtidos para o material de partida (**85**) no espectro de RMN de ^{13}C . Constatou-se ainda que os sinais dos carbonos metilênicos C-1 e C-3 apresentaram-se deslocados para um maior valor (δ_{C} 49,37 e δ_{C} 46,73, respectivamente) em relação aos sinais observados para C-1 (δ_{C} 39,58) e C-3 (δ_{C} 36,63) no espectro de RMN de ^{13}C do substrato da biotransformação

(**Tabela 3.15**). Estes sinais, em δ_C 49,37 e δ_C 46,73, mostraram correlação, no espectro HSQC, com sinais em δ_H 2,22 (dd, $J = 12,8; 2,8; 1H$) e δ_H 2,41 (dd, $J = 12,8; 2,8; 1H$), respectivamente, referentes aos hidrogênios axiais H-1 e H-3.

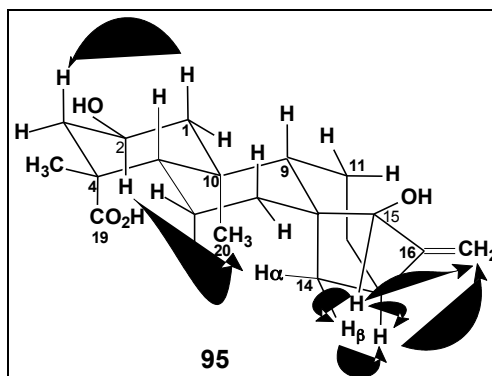
Outras correlações foram observadas no mapa de contornos HSQC por comparação com os dados espectroscópicos do material de partida. Observaram-se correlações entre os sinais de hidrogênio em δ_H 2,73 e de carbono em δ_C 42,41, atribuído a C-13; entre os sinais em δ_H 1,58 e 1,48 e o sinal em δ_C 18,57 (C-11); entre os sinais em δ_H 1,89 e 1,44 e o sinal em δ_C 36,37 (C-14). Correlações entre o sinal a δ_H 1,07 e o sinal em δ_C 53,42, atribuído ao C-9, e entre o sinal em δ_H 1,05 e o sinal em δ_C 56,48, atribuído ao C-5, também foram identificadas.

Os sinais referentes aos hidrogênios axiais H-1 (δ_H 2,22, dd, $J = 12,8; 2,8; 1H$) e H-3 (δ_H 2,41, $J = 12,8; 2,8; dd, 1H$) apresentaram correlação com o sinal em δ_H 4,1, atribuído ao H-2 no mapa de contornos COSY (**Figura 3.106**, página 257).

Dessa maneira, **95** foi identificado como um produto de hidroxilação na posição 2 do esqueleto caurânico do material de partida **85** (**Esquema 3.14** e **Tabela 3.15**).

No mapa de contornos HMBC e nas suas seções expandidas (**Figuras 3.107 a 3.109**, página 258 a 260) observaram-se correlações J^3 entre o C-2 e os hidrogênios metilênicos do C-1 (δ_H 0,70) e C-3 (δ_H 2,40 e δ_H 0,93). Foram identificadas, ainda, correlações entre o C-3 (δ_C 46,73) e os hidrogênios metílicos ligados ao C-18 (δ_H 1,28, s, 3H), entre o C-1 (δ_C 49,37) e o hidrogênio metilênico no C-3 (δ_H 0,93), os CH_3 -20 (δ_H 0,97, s, 3H) e o hidrogênio metínico no C-9.

A configuração da hidroxila em C-2 foi estabelecida a partir de análises do mapa de contornos NOESY (**Figura 3.110**, página 261), onde a correlação do H-2, em δ_H 4,05, com o CH_3 -20 (δ_H 0,97) foi observada, confirmando que a hidroxila apresentava configuração *ent-2 α* . (**Esquema 3.15**, a seguir).



Esquema 3.15 – Correlações espaciais observadas no mapa de contornos NOESY de o ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

A análise das correlações obtidas no espectro bidimensional NOESY permitiram também identificar a configuração da hidroxila no carbono 15 do esqueleto caurânico, tanto do material de partida **85**, quanto do produto **95**. Observou-se, primeiramente, que o hidrogênio metilênico em δ_{H} 3,75, associado ao C-15 (δ_{C} 82,65) não apresentou correlação com o H-9 (δ_{H} 1,07). Em seguida, foram identificadas as correlações entre o H-15 e os hidrogênios H-13 (δ_{H} 2,73), H-14 equatorial (δ_{H} 1,44) e H-17 (δ_{H} 5,20), respectivamente, comprovando que o H-15 encontrava-se na posição axial. Dessa forma, concluiu-se que a hidroxila encontrava-se na posição equatorial, apresentando, portanto, a configuração *ent*-15 α .

A atribuição completa dos dados espectroscópicos de RMN obtidos para **95** em comparação com os dados de **85** é apresentada na **Tabela 3.15**, que se segue.

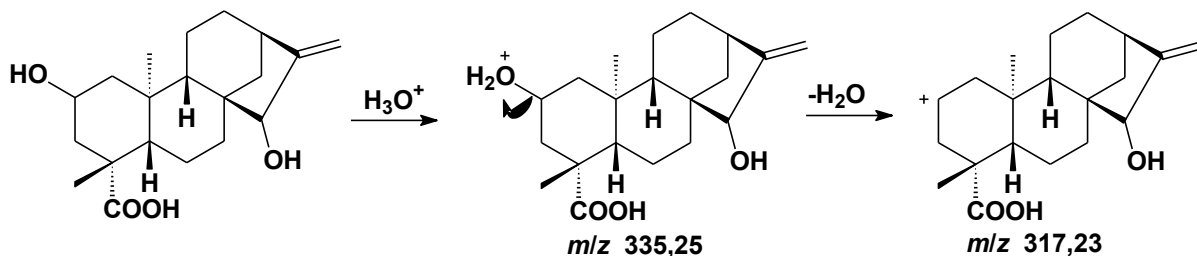
Tabela 3.15 – Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**)

Posição						
	δ_{C} mult.	δ_{H}	δ_{C} mult.	δ_{H}	HMBC ^a	NOESY ^b
1	39,58 CH ₂	1,88; 1,12	49,37	2,22, dd; 0,7	3; 20, 5, 9	3
2	19,81 CH ₂	1,82; 1,44, m	64,07 CH	4,05, m	1; 3; 20	20
3	36,63 CH ₂	2,1; 0,96, m	46,73	2,41, dd; 0,93	18	1; 18
4	42,61 C	-	44,86	-	3; 18	
5	52,22 CH	-	56,48	1,05, s	3; 7; 18; 20	1
6	17,95 CH ₂	1,81; 1,64	20,96	1,93; 1,82, m	5; 7	-
7	35,10 CH ₂	2,35; 1,86	35,38	1,76; 1,36, m	5; 6	-
8	46,60 C	-	47,87	-	6; 9; 12	-
9	55,87CH	-	53,42	1,07	1; 5; 7; 12; 14; 15; 20	-
10	38,69 C	-	41,28	-	1; 11; 20	-
11	17,16 CH ₂	2,42; 1,89	18,57	1,58; 1,48, m	7; 9; 12	1
12	31,45 CH ₂	1,55; 1,4	32,69	1,60; 1,50, m	9	-
13	41,18 CH	2,68, sl	42,41	2,73, sl	14; 15; 17, 17	15, 14; 17
14	34,11 CH ₂	1,75; 1,28	36,37	1,89; 1,44	9; 15	-
15	81,59 CH	3,74	82,65	3,75	9; 14; 17,	13; 14; 17
16	159,11 C	-	159,43	-	12; 14; 17	-
17	107,23 CH ₂	5,13; 5,01	108,67	5,20; 5,09	15	-
18	27,83 CH ₃	1,19, s	28,97	1,28, s	3; 4; 20	-
19	182,91 C	-	180,42	-	18; 20	-
20	14,71 CH ₃	0,88, s	16,95	0,97, s	1; 5	2

^aCorrelações HMBC a partir do hidrogênio associado ao carbono indicado. ^bCorrelações NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$).

O espectro de massas de alta resolução obtido por ESI de **95** (Figura 3.111, página 261) mostrou um pico de m/z 335,25 atribuído ao íon molecular $[\text{M}^+ + 1]^+$,

compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_4$. O pico de m/z 317,23 refere-se ao fragmento $[M^+ - H_2O]^+$ (**Esquema 3.16**).



Esquema 3.16 – Proposta de fragmentação que origina os íons relativos aos principais picos observados no espectro de massas do ácido **95**.

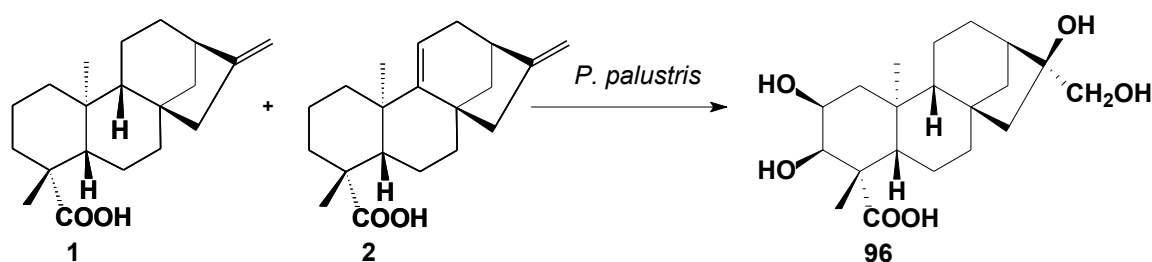
A pesquisa bibliográfica realizada demonstrou que não há relatos de hidroxilação do grupo metilênico inativo C-2 por transformação microbiana neste tipo de esqueleto diterpênico. Sendo assim, também este produto de biotransformação é inédito.

É interessante ressaltar que a cepa do fungo *F. proliferatum*, utilizado nos dois experimentos, promoveu a reação de hidroxilação do carbono metilênico 2 do esqueleto caurânico de dois diferentes substratos, os ácidos *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**), resultando em produtos alcoólicos de configuração *ent*-2 α . Isso evidencia que estas biotransformações foram regio e estereosseletivas e podem ser empregadas futuramente na obtenção de produtos ativados nesta posição a partir de substratos caurânicos diferentes.

As reações de biotransformação são, frequentemente, quimio, régio e estereosseletivas, envolvendo hidroxilações sobre centros inativados e produzindo uma ampla variedade de substâncias, que podem ser empregadas como intermediários e/ou drogas, ingredientes alimentares e ingredientes de agroquímicos⁵⁵. Diversos autores relataram a hidroxilação de terpenóides. Ela ocorre comumente nas posições C-3, C-7, C-11 e C-13^{44,56,57} do esqueleto caurânico. As posições C-15, C-16, C-18 C-19⁴² C-7, C-13 e C-14⁵⁸ também são igualmente frequentemente hidroxiladas. Algumas outras posições do esqueleto caurânico como a posição 1⁵⁹ podem ser raramente hidroxiladas. A hidroxilação na posição 2 do esqueleto caurânico está sendo relatada pela primeira vez, neste trabalho.

3.5.5 Biotransformação da mistura dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (**1**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico (**2**) por *P. palustris*

A mistura dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (**1**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico (**2**) foi incubada com o fungo *P. palustris*. A partir do extrato em *n*-butanol, isolaram-se 15,8 mg do ácido *ent*-2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico (**96**), proveniente da biotransformação do ácido **1**, representando 3,2 % de bioconversão (Esquema 3.11).



Esquema 3.11 – Biotransformação dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (**1**) e *ent*-caur-9(11)-16-dien-19-óico (**2**) levando ao produto ácido *ent*-2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico (**96**).

3.5.5.1 Identificação do ácido *ent*-2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico (**96**)

A estrutura do ácido *ent*-2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico (**96**), isolado como um material resinoso de coloração caramelo, foi elucidada através da análise espectros obtidos no RMN de ¹H e ¹³C (1D e 2D).

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C mostraram que o material encontrava-se contaminado com açúcar. Todos os carbonos do açúcar (glicose) foram atribuídos, mas a intensidade destes sinais era bem menor que a daqueles referentes ao esqueleto caurânico, sugerindo que uma glicosilação não aconteceu durante o processo.

No espectro de RMN de ¹H de **96** (Figura 3.112, página 262) e sua expansão (Figura 3.113, página 262), observou-se perfil característico de diterpenos caurânicos, com a maioria dos sinais ocorrendo na região entre δ_H 0,5 e 3,0. Como o sinal referente ao hidrogênio olefínico H-11 (δ_H 5,24) presente no ácido grandiflorênico (**2**) não foi identificado no espectro de RMN de ¹H do produto **96**, verificou-se que este se tratava de um produto de biotransformação do ácido

caurenóico (**1**). Os hidrogênios metilênicos olefínicos, presentes no material de partida **1** em δ_H 4,74; 4,79, também não foram observados no espectro de RMN de 1H de **96**. Apenas os simpletos em δ_H 1,28 e δ_H 1,00, atribuídos aos hidrogênios dos dois grupos metila CH_3 -18 e CH_3 -20, respectivamente, foram conservados no produto **96**, em relação ao material de partida **1**. Diferentemente do material de partida foram observados sinais na região de hidrogênios associados a carbonos oxigenados em δ_H 4,14 (m, 1H), δ_H 3,95 (d, 1H, J 2,8), δ_H 3,60 (sl, 1H) e δ_H 3,70 (sl, 1H).

Os espectros de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (**Figuras 3.114 e 3.115**, página 263) de **96** apresentaram 20 sinais de carbonos majoritários, sendo possível a identificação dos carbonos do esqueleto caurânico: dois carbonos metílicos, oito metilênicos, cinco metínicos e cinco quaternários. Dentre esses carbonos, quatro eram carbonos oxigenados, por apresentarem deslocamento químico na região entre δ_C 50-90⁶. A multiplicidade dos carbonos oxigenados foi estabelecida como sendo um carbono metilênico (δ_C 67,00), dois metínicos (δ_C 75,13 e δ_C 67,16) e um não hidrogenado (δ_C 82,97), o que significa dois carbonos metínicos a mais e dois carbonos metilênicos a menos que no material de partida **1**.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C mostrou, ainda, que o produto da transformação microbiana **96** conservou, do material de partida **1**, a carbonila de ácido carboxílico em C-19 (δ_C 180,94), mas não preservou a dupla ligação em C-16/C-17. Assim, dois dos carbonos oxigenados, um metilênico em δ_C 67,00 e um quaternário, em δ_C 82,97, foram atribuídos aos C-17 e C-16, respectivamente, indicando a ocorrência de di-hidroxilação da ligação dupla do material de partida pelo fungo *P. palustris*, levando a um álcool primário em C-17 (R- $\underline{C}H_2OH$, δ_C 67,0) e a um álcool terciário em C-16 (R- \underline{C}_3-OH , δ_C 82,97). Estas atribuições estão sumariadas na **Tabela 3.16** (página 158).

No espectro bidimensional HSQC (**Figuras 3.116 a 3.118**, páginas 264 a 266) observaram-se correlações entre o sinal em δ_C 67,00 (C-17) e os sinais em δ_H 3,60 (sl, H_{17a}) e δ_H 3,70 (sl, H_{17b}), confirmando a atribuição dos hidrogênios metilênicos ligados a carbono oxigenado⁴³. Observaram-se correlações entre os sinais de carbonos em δ_H 67,16 ($\underline{C}H-OH$) e δ_C 75,13 ($\underline{C}H-OH$) e os sinais de hidrogênios em δ_H 4,14 (m, 1H) e em δ_H 3,95 (1H), respectivamente. Como todos os demais carbonos tiveram os sinais atribuídos, por comparação com os sinais obtidos para o

material de partida (**1**) no espectro de RMN de ^{13}C , estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios metílicos H-2 e H-3, respectivamente. A verificação de que o deslocamento químico do sinal atribuído ao C-1 (δ_{C} 43,4) apareceu em uma região de menor blindagem em relação aos sinais observados para o C-1 (δ_{C} 40,70), no espectro de RMN de ^{13}C do material de partida (substrato) (**Tabela 3.16**), corroborou com esta proposição. Outras correlações foram observadas neste espectro a partir de comparação com os dados espectroscópicos do material de partida, como aquelas entre os sinais de carbonos em δ_{C} 17,31, δ_{C} 24,98, δ_{C} 46,38, δ_{C} 49,03 e δ_{C} 57,14 e os sinais de hidrogênios em δ_{H} 1,00 (3H, s), δ_{H} 1,28 (3H, s), δ_{H} 2,04 (1H, sl), δ_{H} 1,46 (1H), e δ_{H} 1,09 (1H), atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-20, C-18, C-13, C-5 e C-9. O sinal do carbono metilênico em δ_{C} 43,60, atribuído ao C-1 apresentou-se correlacionado com os sinais de hidrogênios em δ_{H} 1,82 e δ_{H} 1,14. Demais correlações visualizadas no espectro HSQC estão indicadas na **Tabela 3.16**.

Os sinais referentes aos hidrogênios atribuídos ao H-2 (δ_{H} 4,14, m, 1H) e H-3 (δ_{H} 3,95, d, 1H) apresentaram correlação entre si no mapa de contornos COSY (**Figura 3.119**, página 266). O sinal do H-2 correlacionou-se ainda com os sinais de hidrogênios em 1,82 e 1,14, atribuídos ao H-1. Os hidrogênios H-17a (δ_{H} 3,60, sl, 1H) e H-17b (δ_{H} 3,70, sl, 1H) também mostraram correlação no mapa de contornos COSY.

A análise do espectro bidimensional HMBC (**Figuras 3.120 e 3.121**, páginas 267 e 268) confirmou as atribuições realizadas demonstrando correlações à longa distância entre os sinais de carbonos em δ_{C} 43,60, δ_{C} 67,16 e δ_{C} 49,03, atribuídos, respectivamente, aos C-1, C-2 e C-5 ao hidrogênio em δ_{H} 3,95, atribuído ao H-3. Observaram-se ainda correlações J^3 dos δ_{C} 180,94 (C-19), δ_{C} 75,13 (C-3) e δ_{C} 49,03 (C-5) com os hidrogênios metílicos em δ_{H} 1,28 (H-18). Visualizaram-se também correlações J^2 entre os sinais atribuídos ao C-16 (δ_{C} 82,97) e ao C-13 (δ_{C} 46,38) e o sinal do hidrogênio metilênico H-17a (δ_{H} 3,60). Todas as atribuições realizadas a partir da análise do mapa de contornos HMBC estão representadas na **Tabela 3.16**.

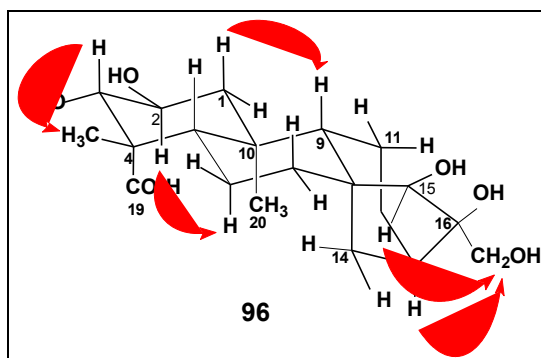
A estereoquímica relativa das hidroxilas em C-2, C-3 e C-16 foi estabelecida a partir de análise minuciosa do mapa de contornos NOESY (**Figura 3.122**, página 269), onde, primeiramente, observou-se a correlação do sinal do hidrogênio em δ_{H} 4,14 (H-2) com os hidrogênios metílicos CH_3 -20 (δ_{H} 1,00), confirmando que a

hidroxila apresentava configuração *ent*-2 α . (**Esquema 3.17**). Outra correlação observada no NOESY foi aquela entre os sinais de hidrogênio em δ_H 1,82 (H-1) e δ_H 1,09, atribuído ao H-9, o que corrobora com a proposta de que o hidrogênio em δ_H 1,8 apresenta configuração axial.

A análise das correlações obtidas no espectro bidimensional NOESY permitiu, também, determinar a configuração da hidroxila no carbono 3 como *ent*- α , já que o hidrogênio metínico em δ_H 3,95 (H-3), apresentou correlação com os hidrogênios metílicos em δ_H 1,28 (CH₃-18) e não apresentou correlação com o hidrogênio em δ_H 1,46, atribuído ao H-5.

A estereoquímica relativa *ent*-16 α -OH de **96** foi estabelecida principalmente devido à correlação observada, no espectro bidimensional NOESY, entre o hidrogênio atribuído ao H-13 (δ_H 2,04) e o hidrogênio 17-CH₂OH (δ_H 3,70). Além dessa, observou-se correlações entre os hidrogênios metilênicos CH₂-15 e os 17-CH₂OH (δ_H 3,60 e 3,70), o que confirmou a posição *ent*-16 β para o substituinte CH₂OH em C-16 e, portanto, evidenciou que a hidroxila em C-16 estava localizada na posição *ent*-16 α .

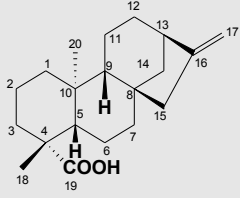
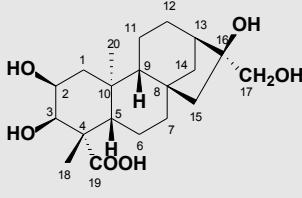
Correlações observadas no mapa de contornos NOESY podem ser visualizadas no **Esquema 3.17**.



Esquema 3.17 - Correlações observadas no mapa de contornos NOESY do ácido *ent*-2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico (**96**).

A atribuição completa dos dados espectroscópicos de RMN obtidos para **96** em comparação com os dados de **1** está apresentada na **Tabela 3.16**, a seguir.

Tabela 3.16 – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (**1**) e *ent*-2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahydroxi-cauran-19-óico (**96**)

Posição						
	δ_{C} mult.	δ_{H}	δ_{C} mult.	δ_{H} (J em Hz)	HMBC ^a	NOESY ^b
1	40,70 CH ₂	-	43,60	1,14; 1,82	3	-
2	19,09 CH ₂	-	67,16 CH	4,14, m	3	20
3	37,77 CH ₂	-	75,13 CH	3,95, d (2,8)	18	18
4	43,76 C	-	45,87	-	-	-
5	57,06 CH	-	49,03 ^c	1,46, sl	3; 18	-
6	21,83 CH ₂	-	22,81	-	-	-
7	41,28 CH ₂	-	38,36	1,65; 1,89	-	-
8	44,23 C	-	41,61	-	-	-
9	55,10 CH	-	57,14	1,09	-	1b
10	38,80 C	-	30,88	-	-	-
11	18,43 CH ₂	-	19,76	-	-	-
12	33,11 CH ₂	-	27,34	1,5; 1,64	-	-
13	43,84 CH	2,77	46,38	2,04, sl	17a	17b
14	39,66 CH ₂	-	43,34	1,46; 1,62	-	-
15	48,96 CH ₂	-	53,87	1,41; 1,55	14	17 b
16	155,90 C	-	82,97	-	14; 17a	-
17	103,00 CH ₂	4,73; 4,79	67,00	3,60; 3,70	-	-
18	28,98 CH ₃	1,24	24,98	1,28, s	-	-
19	184,69 C	-	180,94	-	18	-
20	15,59 CH ₃	1,02	17,31	1,00, s	-	-

^aCorrelações HMBC $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$; ^bCorrelações NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$); ^cSinal encoberto pelo sinal do metanol presente como impureza no solvente CD₃OD.

Todos os espectros discutidos neste capítulo (**Figuras 3.1 a 3.122**) estão apresentados na seção **Anexo**, à página 192.

3.6 Referências bibliográficas

1. VIEIRA, H. S. **Transformações químicas de diterpenos com atividade biológica**. Belo Horizonte: UFMG, 2000. 331 p. *TESE* (Doutorado em Ciências – Química) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.
2. VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituents from aerial parts of *Wedelia paludosa*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, pp. 854-856, 2001.
3. CARVALHO, G. J. A. DE; CARVALHO, M. G. DE; FERREIRA, D. T.; FARIA, T. DE J.; BRAZ-FILHO, R. Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de *Wedelia paludosa*. **Química Nova**, v. 24, n. 1, pp. 24-26, 2001.
4. CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. *et al.* Extraction of sterols in fruits of *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae, with liquefied gas. **Química Nova** [online]. 2003, v. 26, n. 6 [cited 2007-11-22], pp. 803-806. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000600004&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0100-4042. Acesso: 26-Nov-2007.
5. MIRANDA, R. R. S. **Estudo Fitoquímico e avaliação do potencial farmacológico de *Maytenus salicifolia* Reissek**. Belo Horizonte: UFMG, 2007. 351 p. *TESE* (Doutorado em Ciências – Química) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
6. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora S. A., 2006, 490p.
7. CARVALHO, M. G. DE, VELANDIA, J. R., DE OLIVEIRA, L. F. E BEZERRA, F. B. Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae). **Química Nova**, v. 21, n. 6, pp 740-743, 1998.
8. PAULA, V. F. de; BARBOSA, L. C. A.; PILÓ-VELOSO, D.; DEMUNER, A. J.; HOWARTH, O. Constituintes químicos da casca de *Ochroma lagopus* swartz (Bombacaceae). **Ecletica Química**, v. 23, 1998.
9. HUGEL, G; LODS, L; MELLOR, J. M.; THEOBALD, D. W.; OURISSON, G. Diterpenes de *Trachylobium* – Introduction générale. Isolement du Kauranol et de huit diterpenos nouveaux. **Bulletin de la Societe Chimique de France**, v. 10, pp. 2882-7, 1965.
10. STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 14, pp. 2923-2925, 1978.

11. TAKAHASHI, J. A. **Estudo fitoquímico de *Xylopiá frutescens* Aubl. e transformações microbianas de cauranos, afidicolanos e estemodanos.** Belo Horizonte: UFMG, 1994. 363 p. *TESE* (Doutorado em Ciências – Química) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.
12. APARICIO, R.; BAHASAS, A.; USUBILLAGA, A. Allylic oxidation of *ent*-kaurenic acid, *ent*-kaurenic acid methyl ester e *ent*-kaurenol. **Avances em Química**, v. 2, n. 3, pp. 3-7, 2007.
13. VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Biotransformation of methyl *ent*-17-hydroxy-16 β -kauran-19-oate by *Rhizopus stolonifer*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, pp. 601-604, 2000.
14. SILVA, E. A.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B. The biotransformation of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. **Phytochemistry**, v. 52, pp. 397-400, 1999.
15. BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B.; HANSON, J. R.; HITCHCOCK P. B.; TAKAHASHI, J. A. The biotransformation of methyl *ent*-15-oxokaur-16-en-19-oato by *Rhizopus stolonifer* and *Mucor plumbeus*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, pp. 1667-1669, 1995.
16. URZÚA, A.; REZENDE, M. C.; MASCAYANO, C.; VÁSQUEZ, L. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. **Molecules**, v. 13, pp. 882-891, 2008.
17. BATISTA, R.; HUMBERTO, J. L.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B. Synthesis and trypanocidal activity of *ent*-kaurane glycosides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, pp. 381-391, 2007.
18. TAKAHASHI, J. A.; VIEIRA, H. S.; SILVA, E. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B.; CHIARI, E. Preparation and activity of diterpenoids against trypanomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, pp. 118-120, 2002.
19. 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 schultzii*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, pp. 432-438, 2008.
20. 17. MORALES, A.; PÉREZ, P.; MENDOZA, R.; COMPAGNONE, R.; SUAREZ, A.; ARVELO, F.; RAMÍREZ, J. L.; GALINDO-CASTRO, I. Cytotoxic and proapoptotic activity of *ent*-16 β ,17 α -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. **Cancer Letters**, v. 218, pp. 109-116, 2005.
21. WU, Y.; HUNG, Y.; CHANG, F. R.; COSENTINO, M.; WANG, H. K.; LEE, K.-H. Identification of *ent*-16 α ,17-dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids Annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, pp. 635-637, 1996.

22. BOAVENTURA, M. A. D.; PEREIRA, R. G.; FREITAS, L. B. O.; REIS, L. A.; VIEIRA, H. S. Preparation and phytotoxicity of novel kaurane diterpene amides with potential use as herbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, pp. 2985–2988, 2008.
23. TORRENEGRA, R.; GOMEZ, D. L.; TELLEZ, A. N. Gibberelic activity of diterpenes derivatives of kaurenes isolated from *Espeletiaopsis santanderensis* Cuatr. **Actualidades Biologicas**, v. 23, n. 75, 19-22, 2001.
24. GRUNDY, J.; JAMES, B. G.; PATTENDEN, G. Esterification of sterically hindered carboxylic acids using dimethyl sulphate. **Tetrahedron Letters**, v. 13, n. 9, pp. 757-758, 1972.
25. CASTELLARO, S. J.; DOLAN, S. C.; MACMILLAN, J.; WILLIS, C. L. Deuterium labelling of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid at carbon-6 and -7. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, 1823-1831, 1990.
26. TAN, R. X.; WANG, W. Z.; WU, S. X. YANG, L. NMR assignments and absolute configuration of kauranoids. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 33, pp. 749-754, 1995.
27. SHELDON, R. A.; KOCHI, J. K. **Metal-Catalyzed Oxidations of Organic Compounds**. New York: Academic Press, 1981.
28. BULMAN PAGE, P. C.; MCCARTHY, T. J. Oxidation adjacent to C=C bonds. In: TROST, B.M.; FLEMMING, I. **Comprehensive Organic Synthesis**. Oxford: Pergamon Press, v. 7, pp. 83-117. 1991.
29. MURPHY E.F.; MALLAT T.; BAIKER A. Allylic oxofunctionalization of cyclic olefins with homogeneous and heterogeneous catalysts. **Catalysis Today**, v. 57, n. 1-2, pp. 115-126, 2000.
30. FRANCIS, M. J., GRANT, P. K., LOW, K. S., WEAVERS, R. T. Diterpene chemistry – VI – SeO₂/H₂O₂ oxidations of exocyclic olefins. **Tetrahedron**, v. 32, pp. 95-101, 1976.
31. MUZART, J. Synthesis of unsaturated carbonyl compounds via a chromium-mediated allylic oxidation by 70% *tert*.butyl hydroperoxide, **Tetrahedron Letters**, v. 28, pp. 4665-4668, 1987.
32. MUZART, J. Bimetallic oxidation catalysts: oxidations with *tert*.butylhydroperoxide mediated by bis-(tributyltin oxide) dioxochromium(VI), **Synthetic Communications**, v. 19, pp. 2061-2067, 1989.
33. MUZART, J. Chromium IV complexes mediated oxidations with *tert*.butyl hydroperoxide. **New Journal of Chemistry**, v. 13, pp. 9-11, 1989.

34. FOUSTERIS, M. A.; KOUTSOUREA, A. I.; NIKOLAROPOULOS, S. S.; RIAHI, A.; MUZART, J. Improved chromium-catalyzed allylic oxidation of Δ^5 -steroids with *t*-butyl Hydroperoxide. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 250, pp. 70-74, 2006.
35. SALVADOR, J. A. R.; SILVESTRE, S. M. Bismuth-catalyzed allylic oxidation using *t*-butyl hydroperoxide. **Tetrahedron Letters**, v. 46, pp. 2581-2584, 2005.
36. CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, pp. 1270-1271, 2001.
37. JOSHEL, L. M.; PALKIN S. The oxidation of β -pinene with selenium dioxide. **Journal of American Chemical Society**, v. 64, n. 4, pp. 1008-1009, 1942.
38. MANN, R. S.; YAO, K. C. Oxidation of isobutene over selenium dioxide-modified copper oxide catalysts. **Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development**, v. 6, n. 4, pp. 263-266, 1967.
39. ATKINS, P.; JONES, L. Reações Redox. In: **Princípios de Química**. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.
40. VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**. 5. ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981.
41. BLAY, G.; CARDONA, M. L.; GARCIA, B.; PEDRO, J. R. Functionality transfer from C6 to C8 in sesquiterpenes. Synthesis of 8-epi-ivangustin and 8-epi-isoivangustin from santonin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 21, pp. 6172-6175, 1991.
42. FRAGA, B. M.; BRESSA, C.; GONZÁLEZ, P.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M. G.; SUÁREZ, S. The microbiological transformation of 7α -hydroxy-*ent*-kaur-16-ene derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v. 68, pp. 1557-1563, 2007.
43. HANSON, J. R.; HITCHCOCK P. B.; TAKAHASHI, J. A. Biotransformation of *ent*-16 β -19-dihydroxykaurane by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 3, pp. 797-800, 1995.
44. FRAGA, B. M.; GUILLERMO, R.; HERNÁNDEZ, M. G. The microbiological transformation of two 15 β -hydroxy-*ent*-kaurane diterpenes by *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Natural Products**, v. 67, pp. 64-69, 2004.
45. HANSON, J. R. **An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry**. New York: W. H. Freeman/Spectrum and Co. Ltd., 1995.
46. 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, pp 3704–3707, 2002.

47. HANSON, J. R. Diterpenoids. **Natural Products Report**, v.21, pp. 312-320, 2004.
48. ROCHA, A. D.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Di-and tri-hydroxylated kaurane derivatives from microbial transformation of ent-kaur-16-en-19-ol by *Cephalosporium aphidicola* and their allelopathic activity on *Lactuca sativa* (Lettuce). **Eclética Química**, v. 34, p. 57-62, 2009.
49. SATAKE, T.; MURAKAMI, R.; SAIKI, Y.; CHEN, C. M., Chemical and Chemotaxonomical studies on Filices. XLIII. Chemical studies on the constituents of *Lindsaea javanensis* BL., *L. japonica* (BAK.) DIELS and *Tapeinidium pinnatum* (CAV.) C. CHR. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n.11, pp. 3865-3871, 1983.
50. RUMBERO, A.; ARRIAGA-GINER, F. J.; WOLLENWEBER, E. New constituents of the leaf and stem exudate of *Ozothamnus hookeri* (asteraceae). **Journal of Biosciences**, v. 55, n. 5/6, pp. 318-322, 2000.
51. PÉREZ-CASTORENA, A. L.; MARTÍNEZ-VASQUÉZ, M.; VIVAR, A. R. Diterpenes of *Bahia glandulosa*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, pp. 729-734, 1997.
52. RAFFAUF, R. F.; MENACH; MENACHERY, M. D.; LE QUESNE, P. W. Antitumor plants. 11. Diterpenoid and flavonoid constituents of *Bromelia penguin* L. **Journal of Organic Chemistry**, v. 46, pp. 1094 – 1098, 1981.
53. VELANDIA J. R.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Ácido ent-16 β ,17-diidroxicauran-19-óico isolado de *Ouratea semiserrata* e os desafios estereoquímicos dos carbonos quirais C-4 e C-16. **Química Nova**, v. 21, n. 4, pp. 397-404, 1998.
54. CORREA, M. S.; GUILHON, G. M. S. P.; CONSERVA, L. M. Kauranoids from *Aristolochia rodriguesii*. **Fitoterapia**, v. 69, n. 3, 277-278, 1998.
55. BORGES, K. B.; BORGES, W. S. DE; DURAN-PATRÓN, R.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymetry**, v. 20, pp. 385-397, 2009.
56. FRAGA, B. M.; CONZÁLEZ, P.; HERNÁNDEZ, M. G.; SUÁREZ, S. Biotransformation of 7-oxo-ent-kaur-16-ene derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Tetrahedron**, v. 61, pp. 5623-5632, 2005.
57. BARRERO, A. F.; OLTRA, J. E.; OLMEDO, E. C.; ÁVALOS, J.; JUSTICIA, J. Microbial transformation of ent-kaurenoic acid and its 15-hydroxy derivatives by SG 138 mutant of *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Natural Products**, v. 64, pp. 222-225, 2001.
58. FRAGA, B. M.; HERNANDEZ, M. G.; GUILLERMO, R. The biotransformation of two 3,5-oxigenate ent-kaurane derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Natural Products**, v. 59, pp. 952-957, 1996.

59. MARQUINA, S.; PARRA, J. L.; GONZALEZ, M.; ZAMILPA, A.; ESCALANTE, J.; TREJO-HERNANDEZ, M. R.; ALVAREZ, L. Hydroxylation of the diterpenes *ent*-kaur-16-en-19-oic and *ent*-beyer-15-en-19-oic by the fungus *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v. 70, pp. 2017-2022, 2009.

CAPÍTULO 4

Ensaïos

biológicos

4.1 Avaliação da atividade dos extratos em acetato de etila e butanol, obtidos das biotransformações e substâncias puras isoladas sobre a germinação das sementes e o crescimento de plantículas de *Lactuca sativa* (alface)

4.1.1 Introdução

As estratégias para a descoberta de aleloquímicos são análogas àquelas utilizadas para a descoberta de substâncias bioativas na indústria farmacêutica e envolvem a avaliação da atividade de extratos brutos e substâncias puras sobre um determinado sistema biológico (bioensaio) e, desde os trabalhos pioneiros da década de 1940¹, numerosos bioensaios têm sido desenvolvidos e utilizados.

Os bioensaios preliminares em laboratório precisam ser rápidos, econômicos e relevantes para o sistema em questão, sendo úteis para se estabelecer o potencial alelopático de uma substância pura ou um extrato, mas devendo ser seguidos por estudos em casas de vegetação e em campo a fim de se constatar se as observações iniciais são reprodutíveis no meio natural.

O ensaio para aleloquímicos utilizado mais amplamente é aquele que monitora a germinação e crescimento de plantículas (raiz e caule) de uma dada espécie. As sementes da espécie vegetal selecionada são colocadas geralmente sobre papel de filtro ou ágar em uma placa de Petri e tratadas com a solução do aleloquímico a ser testado em concentrações variadas (geralmente entre 10^{-3} e 10^{-9} mol/L)². A germinação e o crescimento da raiz e do caule da plantícula são monitorados em relação a um branco (solução sem o aleloquímico).

A consideração mais importante, no entanto, no desenvolvimento de um bioensaio para o estudo alelopático, é a seleção da espécie vegetal a ser testada. Espécies vegetais, denominadas "plantas indicadoras", são o fator crucial para a determinação acurada do impacto alelopático, nessa avaliação preliminar da atividade. *Lactuca sativa* L. (alface), *Raphanus sativus* L. (rabanate) e *Lepidium sativum* (agrião) têm sido as mais utilizadas nessa etapa da avaliação, devido principalmente à grande sensibilidade e alta taxa de germinação¹.

4.1.2 Metodologia

A avaliação da atividade alelopática dos extratos em acetato de etila e/ou butanol obtidos nas biotransformações realizadas (**Tabela 4.1**, página 176), dos materiais de partida (substratos) das biotransformações (**Tabela 4.2**, página 177) e das substâncias isoladas a partir da purificação daquelas frações (**Tabela 4.3**, página 177) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Boaventura *et al.* (2008)³.

Foram empregadas sementes de *Lactuca sativa* L. var. Grands Rapids da marca Isla. Todas as sementes menores ou danificadas foram desprezadas. Adicionaram-se 25 sementes de alface sobre cada placa de Petri de 100 mm, contendo papel Whatman nº 1, de 90 mm, e 10 mL das soluções teste (nas concentrações de 1, 0,01 e 0,0001 mg/mL dos extratos obtidos nas biotransformações e de 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} mol/L dos materiais de partida e das substâncias isoladas das biotransformações) e da solução controle (branco). As soluções teste foram preparadas por dissolução das substâncias em água destilada [tamponada com 10 mmol/L do ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico e a acidez ajustada para 6,0-6,5 com solução de NaOH]. As concentrações mais baixas que 1 mg/mL (no caso dos extratos) ou 10^{-4} mol/L (substâncias), nas soluções teste, foram obtidas por diluição desta. O teste foi realizado em triplicata para cada concentração e para o controle. As placas de Petri foram fechadas e incubadas, no escuro, a 25 °C por 5 dias. Em seguida, foram medidos o comprimento de cada raiz e caule³.

Tabela 4.1 – Extratos originados de biotransformação submetidos ao ensaio de avaliação da estimulação ou inibição do crescimento da raiz e do caule de *L. sativa*.

Código	Extrato	Origem
A	Acetato de etila	Biotransformação de <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90) por <i>C. aphidicola</i>
B	Acetato de etila	Biotransformação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) por <i>F. proliferatum</i>
C	Acetato de etila	Biotransformação de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83) por <i>F. proliferatum</i>
D	Acetato de etila	Biotransformação da mistura dos ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico (2) por <i>P. palustris</i>
E	Acetato de etila	Biotransformação de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89) por <i>F. proliferatum</i>
F	Acetato de etila	Biotransformação do ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91) por <i>F. proliferatum</i>
G	Acetato de etila	Biotransformação do ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78) por <i>F. proliferatum</i>
H	Butanólico	Biotransformação de <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83) por <i>F. proliferatum</i>
I	Butanólico	Biotransformação da mistura dos ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico (2) por <i>P. palustris</i>
J	Butanólico	Biotransformação do ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78) por <i>F. proliferatum</i>
K	Acetato de etila	Biotransformação da mistura dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86) por <i>F. proliferatum</i>

Tabela 4.2 – Substratos de biotransformação submetidos ao ensaio de avaliação da estimulação ou inibição do crescimento da raiz e do caule de *L. sativa*.

Código	Substância
L	<i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90)
M	ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88)
N	<i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (83)
O	ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico (2)
P	<i>ent</i> -16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (89)
Q	ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91)
R	ácido <i>ent</i> -3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (78)
S	ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86)

Tabela 4.3 – Substâncias isoladas a partir da purificação de extratos de biotransformação submetidas ao ensaio de avaliação da estimulação ou inibição do crescimento da raiz e do caule de *L. sativa*.

Código	Substância	Origem
A.1	<i>ent</i> -16 β ,17,19-trihidroxicaurano (92)	Biotransformação de <i>ent</i> -19-hidroxi-caur-16-eno (90) por <i>C. aphidicola</i>
A.2	<i>ent</i> -16 β ,19-dihidroxi-caurano (50)	
B.1	<i>ent</i> -2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (94)	Biotransformação do ácido <i>ent</i> -16-oxo-17-norcauran-19-óico (88) por <i>F. proliferatum</i>
F.1	<i>ent</i> -3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano (93)	Biotransformação do ácido <i>ent</i> -3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91) por <i>F. proliferatum</i>
I.1	ácido <i>ent</i> -2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico (96)	Biotransformação da mistura dos ácidos <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (1) e <i>ent</i> -caur-9(11),16-dien-19-óico (2) por <i>P. palustris</i>
K.1	<i>ent</i> -2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (95)	Biotransformação da mistura dos ácidos <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (85) e <i>ent</i> -15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (86) por <i>F. proliferatum</i>

4.1.3. Resultados dos ensaios de crescimento do caule e da raiz e de germinação de *L. sativa*

Os resultados obtidos nos experimentos que avaliaram o efeito dos extratos, substratos e substâncias obtidas das biotransformações (**Tabelas 4.1 a 4.3**, às páginas 176 e 177) sobre o crescimento e germinação de plantículas de alface (*L. sativa*) são apresentados nas **Figuras 4.1 a 4.8**.

Os valores são apresentados como diferenças a partir do controle, zero representa um valor observado idêntico ao controle, um valor positivo representa estimulação e um valor negativo representa inibição.

4.1.3.1 Resultados dos ensaios de crescimento do caule e da raiz de *L. sativa*

4.1.3.1.1 Resultados dos ensaios de crescimento do caule e da raiz de *L. sativa* para os extratos A a K, provenientes das reações de biotransformação

Em relação ao crescimento do caule:

Os extratos **E, F, G, J e K** apresentaram resultado similar entre si, com forte inibição do crescimento do caule a 1 mg/mL, fraca inibição a 0,01 mg/mL e fraca estimulação a 0,0001 mg/mL. Para os extratos **A, C, D e H**, nas duas maiores diluições, observou-se um progressivo estímulo do crescimento, enquanto que, na menor diluição, observou-se forte inibição do crescimento do caule. O efeito dos extratos **B e I** sobre o crescimento do caule da alface foi de inibição na maior e na menor diluição e de estimulação na concentração intermediária (**Figuras 4.1 e 4.2**, páginas 179 e 180).

Em relação ao crescimento da raiz:

Os extratos em acetato de etila **A, C, D, E, F, G, J e K**, na concentração de 1 mg/mL, provocaram forte inibição (acima de 80%) do crescimento da raiz, sendo esta inibição bastante reduzida a 0,01 mg/mL (**Figuras 4.1 e 4.2**). O extrato **B** apresentou inibição nas concentrações de 1 mg/mL (100%) e 0,0001 mg/mL (~10%) e pequena estimulação a 0,01 mg/mL (**Figura 4.1**, página 179). O extrato **G** apresentou forte inibição a 1 mg/mL e fraca estimulação a 0,01 e 0,0001 mg/mL

(Figura 4.2). Somente os extratos **H** e **I** apresentaram inibição do crescimento da raiz nas três concentrações avaliadas (Figura 4.2, página 180). A 0,0001 mg/mL observou-se um pequeno estímulo no crescimento nos extratos **A**, **E**, **F**, **J** e **K**.

Comparação de resultados – crescimento de caule e raiz

Para os extratos **F**, **J** e **K** os resultados de estimulação ou inibição do crescimento do caule foram similares aos de estimulação ou inibição do crescimento da raiz, nas três concentrações: forte inibição na maior concentração, fraca inibição na concentração intermediária e fraca estimulação na menor concentração (Figura 4.2, página 180).

O extrato **B** apresentou também resultados similares em relação ao crescimento do caule e raiz (Figura 4.1)

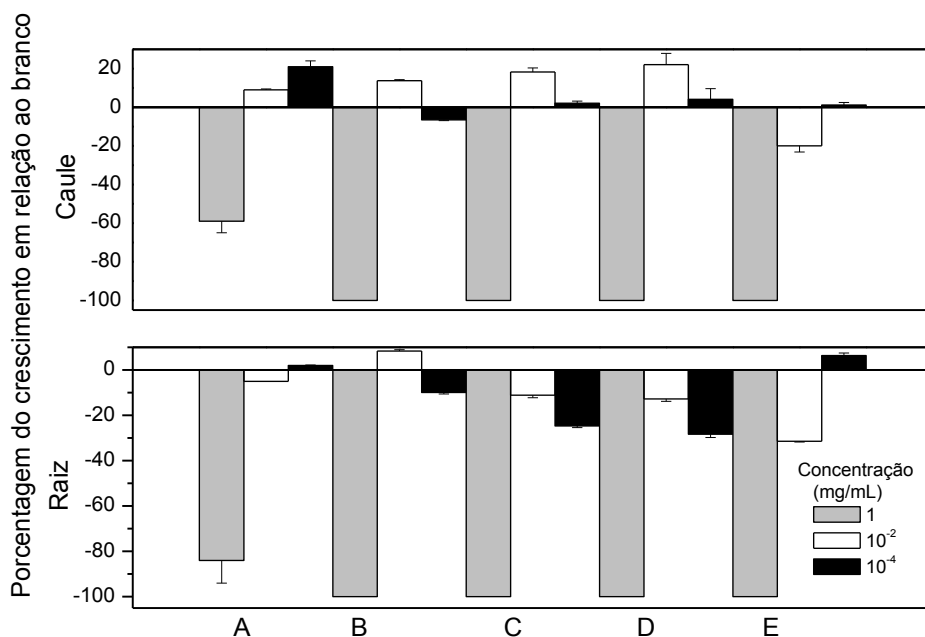


Figura 4.1 - Efeito dos extratos **A** (extrato AcOEt da biotransformação entre *C. aphidicola* e o *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno, **90**), **B** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e o ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico, **88**), **C** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e o *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila, **83**), **D** (extrato AcOEt da biotransformação entre *P. palustris* e os ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico, **1** e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico, **2**), **E** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e o ácido *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico, **89**) sobre o crescimento do caule e da raiz da alfaca (*L. sativa*).

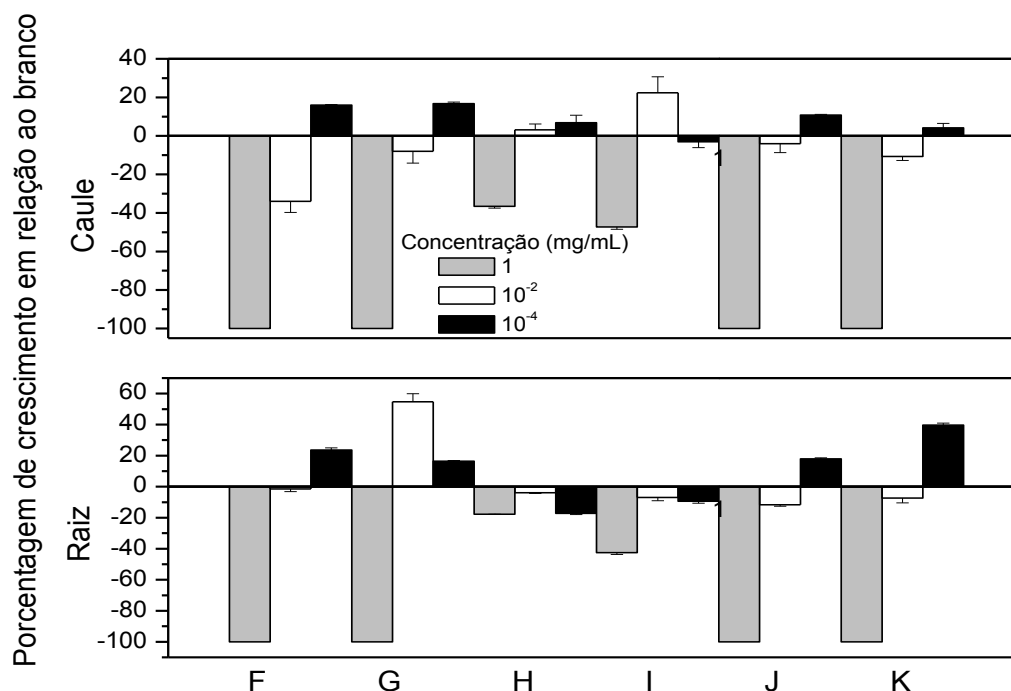


Figura 4.2 - Efeito dos extratos **F** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e o ácido *ent-3 β* -cinamato-caur-16-en-19-óico, **91**), **G** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e ácido *ent-3 β* -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico, **78**), **H** (extrato BuOH da biotransformação entre *F. proliferatum* e o *ent-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila*, **83**), **I** (extrato BuOH da biotransformação entre *P. palustris* e os ácidos *ent-caur-16-en-19-óico*, **1** e *ent-caur-9(11),16-dien-19-óico*, **2**), **J** (extrato BuOH da biotransformação entre *F. proliferatum* e o ácido *ent-3 β* -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico, **78**) e **K** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e os ácidos *ent-15 α* -hidroxi-caur-16-en-19-óico, **85** e *ent-15 α* -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico, **86**) sobre o crescimento do caule e da raiz da alfaca (*L. sativa*).

4.1.3.1.2 Resultados dos ensaios de crescimento do caule e da raiz de *L. sativa* para os materiais de partida L a S, utilizados nas reações de biotransformação

Com relação ao crescimento do caule:

Na concentração de 10^{-4} mol/L todos os materiais de partida demonstraram inibição de até 60% do crescimento do caule em relação ao branco, exceto no caso do substrato **O**, que não apresentou estimulação nem inibição em relação ao branco e do substrato **R**, que exibiu pequena estimulação nas 3 concentrações testadas (Figura 4.3, página 182).

Nas duas menores concentrações avaliadas, 10^{-6} e 10^{-8} mol/L, os substratos **M**, **Q** e **S** apresentaram fraca inibição do crescimento do caule e os substratos **N**, **O** e **P** se mostraram estimuladores deste crescimento. Somente no extrato **L** ocorreu crescimento na concentração intermediária e inibição na maior diluição.

Com relação ao crescimento da raiz:

O perfil de crescimento da raiz de *L. sativa*, quando em contato com os substratos **L** a **S**, na concentração de 10^{-4} mol/L, foi contrário ao observado para o caule. Todas as substâncias empregadas como substratos nas biotransformações estimularam o crescimento da raiz de *L. sativa* na maior concentração avaliada (10^{-4} mol/L), sendo que os substratos **L**, **R**, **Q** exibiram apenas uma fraca estimulação (menor que 15%), **M**, **N** e **O** uma estimulação intermediária (em torno de 50%) e os substratos **R** e **S** apresentaram uma forte estimulação (maior que 60%) do crescimento da raiz. Uma fraca estimulação foi observada também na concentração de 10^{-6} mol/L, exceto para o substrato **N**, que inibiu fracamente o crescimento da raiz da alface.

Na maior diluição, 10^{-8} mol/L, todos os substratos apresentaram fraca inibição do crescimento da raiz, exceto **O** e **P**, que mostraram fraca estimulação.

A comparação entre os resultados observados para os extratos (**Figuras 4.1** e **4.2**, páginas 179 e 180) e para os substratos (**Figura 4.3**, página 182) mostrou que, no geral, os extratos provocaram efeito de inibição do crescimento da raiz e do caule da alface, enquanto que as substâncias empregadas como substratos das transformações microbianas apresentaram efeito predominantemente estimulatório do crescimento do caule e raiz da alface.

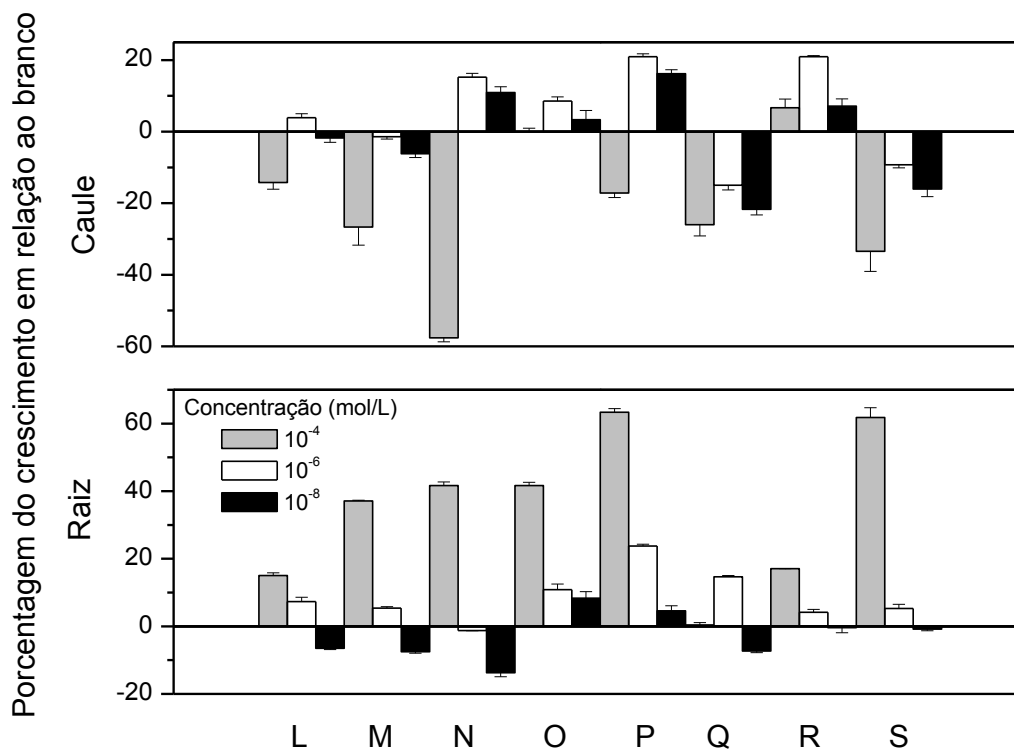


Figura 4.3 – Efeito dos materiais de partida das biotransformações **L** (*ent*-19-hidroxi-caur-16-eno, **90**), **M** (ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico, **88**), **N** (*ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila, **83**), **O** (ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico, **1** e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico, **2**), **P** (ácido *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico, **89**) e **Q** (ácido *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico, **91**) e **R** (ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico, **78**) e **S** (ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico, **85** e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico, **86**) sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*).

4.1.3.1.3 Resultados dos ensaios de crescimento do caule e da raiz de *L. sativa* para as substâncias provenientes das biotransformações

Os efeitos das substâncias **A.1**, **A.2**, **B.1**, **F.1**, **I.1** e **K.1**, purificadas a partir dos extratos em acetato de etila ou butanol obtidos nas biotransformações, no crescimento da raiz e caule das plantículas de *L. sativa*, nas três diferentes concentrações testadas, estão mostrados na **Figura 4.4**, à página 184.

Substâncias A.1 e A.2 - O efeito das substâncias *ent*-16 β ,17,19-trihidroxicaurano (**92**) e *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**) no crescimento do caule foi estimulatório nas concentrações de 10⁻⁴ mol/L e 10⁻⁶ mol/L. Na concentração de 10⁻⁸ mol/L,

ambos produtos de biotransformação inibiram o crescimento do caule. A melhor concentração para obter efeito estimulatório do crescimento foi 10^{-6} mol/L.

No crescimento da raiz das plantículas de *L. sativa* ambos triol e diol inibiram o crescimento da raiz nas três concentrações e os melhores resultados foram observados para o triol na concentração de 10^{-4} mol/L.

Substância B.1 – o ácido *ent-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico* (**94**) exibiu um efeito levemente inibitório no crescimento do caule, na maior concentração e um efeito estimulatório nas demais concentrações. O efeito sobre o crescimento da raiz da substância **B.1**, foi predominantemente estimulatório, atingindo uma estimulação de aproximadamente 30%, comparado ao controle, na concentração de 10^{-4} mol/L.

Substância F.1 – um efeito inibitório sobre o crescimento do caule (em torno de 40%), na maior concentração, foi observado para a substância **F.1**, *ent-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano* (**93**). Nas demais concentrações, 10^{-6} e 10^{-8} mol/L, observou-se uma leve estimulação do crescimento do caule. O efeito sobre o crescimento da raiz foi levemente inibitório nas concentrações de 10^{-4} e 10^{-8} mol/L e fracamente estimulatório na diluição intermediária.

Substância I.1 – o efeito sobre o crescimento do caule da substância **I.1**, ácido *ent-2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico*, (**96**), foi predominantemente estimulatório. Nas concentrações de 10^{-6} e 10^{-8} mol/L estimulou o crescimento em aproximadamente 30%, comparado ao controle. Um efeito levemente estimulatório foi observado para o crescimento da raiz na maior concentração e, nas concentrações menores, observou-se efeito inibitório leve.

Substância K.1- o ácido *ent-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico* (**95**) promoveu a inibição do crescimento do caule e da raiz nas três concentrações avaliadas, sendo que na concentração de 10^{-4} mol/L ocorreu o bloqueio total do crescimento do caule e da raiz da alface, quando comparado ao controle.

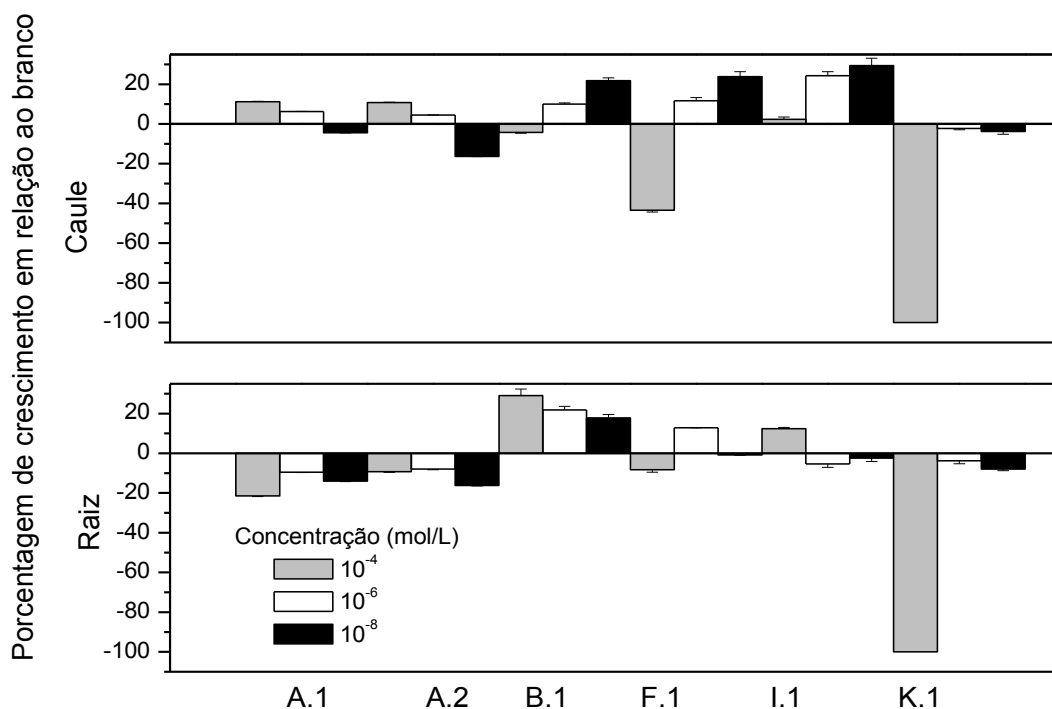


Figura 4.4 - Efeito das substâncias provenientes da purificação dos extratos das biotransformações **A.1** (*ent-16 β ,17,19*-trihidroxicaurano, **92**), **A.2** (*ent-16 β ,19*-dihidroxi-caurano, **50**), **B.1** (ácido *ent-2 α* -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico, **94**), **F.1** (*ent-3 β ,15 α ,16 α ,19*-tetrahidroxi-caurano, **93**), **I.1** (ácido *ent-2 α ,3 α ,16 α ,17*-tetrahidroxi-cauran-19-óico, **96**) e **K.1** (ácido *ent-2 α ,15 α* -dihidroxi-caur-16-en-19-óico, **95**) sobre o crescimento da raiz e caule da alface (*L. sativa*).

4.1.3.2 Resultados dos ensaios de germinação de sementes da alface (*L. sativa*)

4.1.3.2.1 Resultados dos ensaios germinação de sementes de *L. sativa* para os extratos A a K, provenientes das reações de biotransformação

Os efeitos dos extratos **A** a **K** testados sobre a germinação das sementes de *L. sativa* estão apresentados nas **Figuras 4.5** e **4.6**, às páginas 185 e 186, respectivamente.

Com exceção dos extratos **H** e **I**, que proveram efeito estimulatório de aproximadamente 20% (**Figura 4.6**), todos os demais extratos testados apresentaram forte inibição da germinação das sementes da alface na maior

concentração (1 mg/mL), sendo que nos extratos **C**, **D**, **E**, **F**, **G**, **J** e **K** ocorreu 100% de inibição (**Figuras 4.5** e **4.6**).

Na concentração intermediária, 0,01 mg/mL, o efeito inibitório persistiu em todos os extratos avaliados, com exceção do **J** (**Figura 4.6**, página 186), para o qual observou-se uma fraca estimulação (em torno de 4%) da germinação. Também na maior diluição, 0,0001 mg/mL, observou-se fraca estimulação para os extratos **A** e **F** (2,1 e 4,2%, respectivamente) além de fraca inibição (menor de 30%) para os demais extratos avaliados.

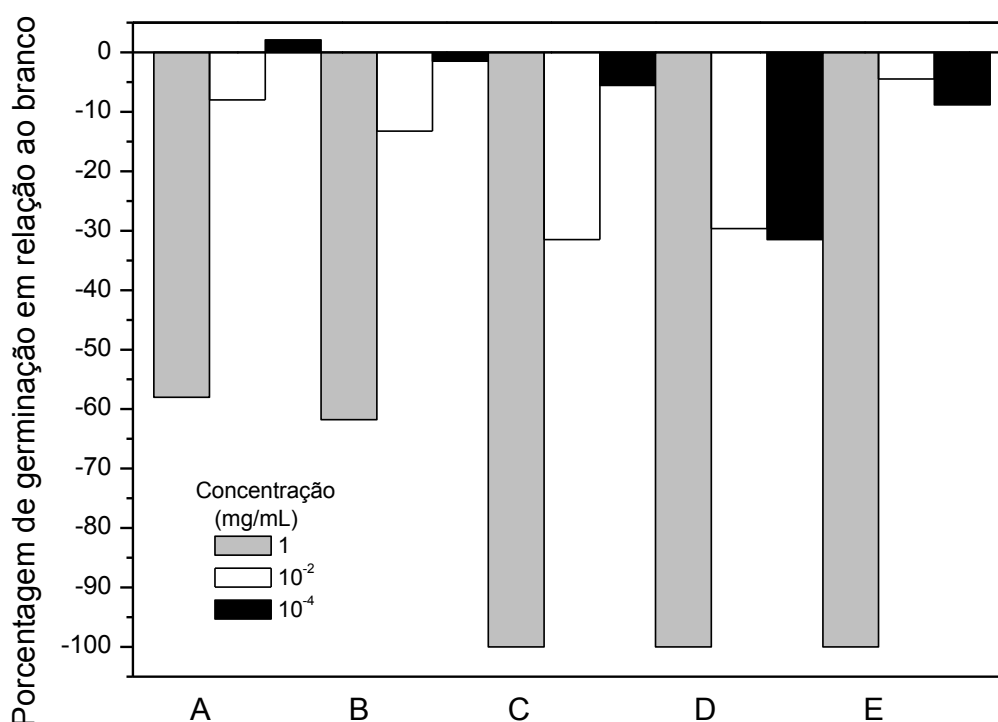


Figura 4.5 - Efeito dos extratos **A** (extrato AcOEt da biotransformação entre *C. aphidicola* e o *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno, **90**), **B** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e o ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico, **88**), **C** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e o *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila, **83**), **D** (extrato AcOEt da biotransformação entre *P. palustris* e os ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico, **1** e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico, **2**), **E** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e o ácido *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico, **89**) sobre a germinação de sementes da alface (*L. sativa*).

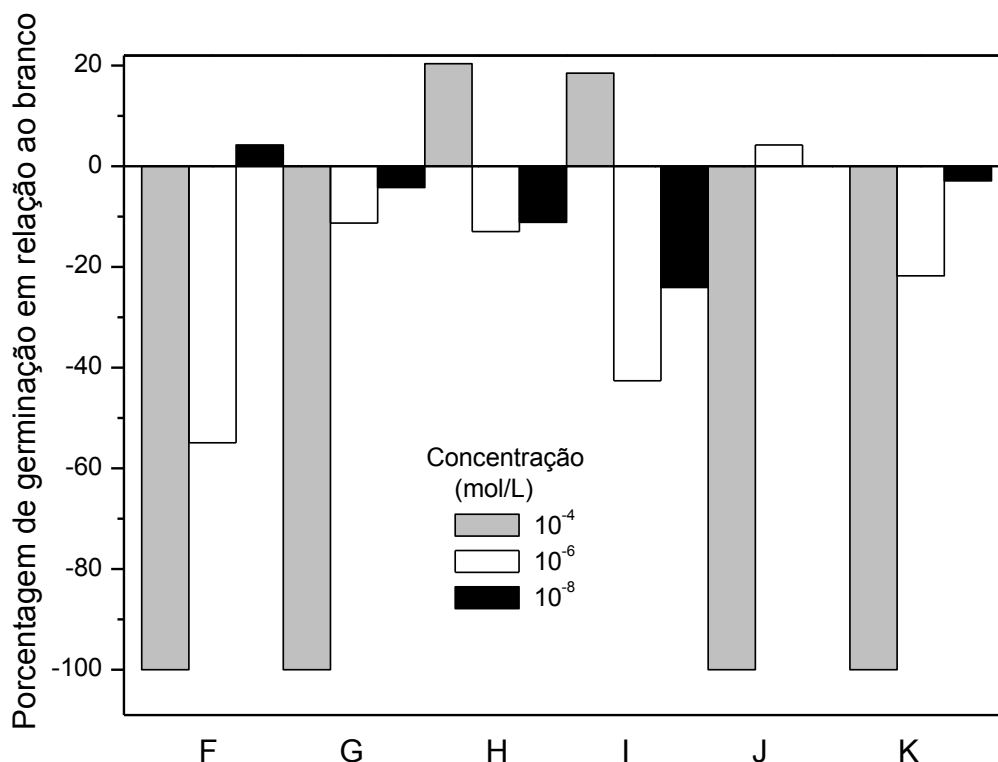


Figura 4.6 – Efeito dos extratos **F** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e o ácido *ent-3 β* -cinamato-caur-16-en-19-óico, **91**), **G** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e ácido *ent-3 β* -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico, **78**), **H** (extrato BuOH da biotransformação entre *F. proliferatum* e o *ent-16-oxo-17-norcauran-19-oato* de etila, **83**), **I** (extrato BuOH da biotransformação entre *P. palustris* e os ácidos *ent-caur-16-en-19-óico*, **1** e *ent-caur-9(11),16-dien-19-óico*, **2**), **J** (extrato BuOH da biotransformação entre *F. proliferatum* e o ácido *ent-3 β* -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico, **78**) e **K** (extrato AcOEt da biotransformação entre *F. proliferatum* e os ácidos *ent-15 α* -hidroxi-caur-16-en-19-óico, **85** e *ent-15 α* -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico, **86**) sobre a germinação de sementes da alfaca (*L. sativa*).

4.1.3.2.2 Resultados dos ensaios de germinação de sementes de *L. sativa* para os substratos L a S, utilizados nas reações de biotransformação

Os efeitos dos materiais de partida das biotransformações realizadas, substratos L a S, sobre a germinação das sementes de *L. sativa* podem ser visualizados na **Figura 4.7** (página 180). Pode-se observar que todos os efeitos, tanto estimulatórios quanto inibitórios, foram de baixa intensidade.

O caurenol (**90**), substrato L, inibiu ligeiramente (~ 5%) a germinação das sementes de alface nas três concentrações testadas, 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} mol/L, enquanto que o substrato N, o *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**), exibiu efeito estimulatório (~ 3%) da germinação nas três concentrações.

Além disso, na maior concentração testada (10^{-4} mol/L) observou-se que M (ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico, **88**) e S (ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico, **85** e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico, **86**) inibiram a germinação e os demais substratos apresentaram efeito oposto.

Na concentração intermediária observou-se que, além de A, somente O (ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico, **1** e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico, **2**) inibiu a germinação e, na maior diluição, P (ácido *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico, **89**), Q (ácido *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico, **91**) e S apresentaram também fraco efeito inibitório.

Em alguns casos não se observou diferença entre a amostra e o branco sobre a germinação das plantículas da alface, como no ensaio empregando o material de partida M na concentração de 10^{-8} mol/L, e os substratos Q e S na concentração de 10^{-6} mol/L.

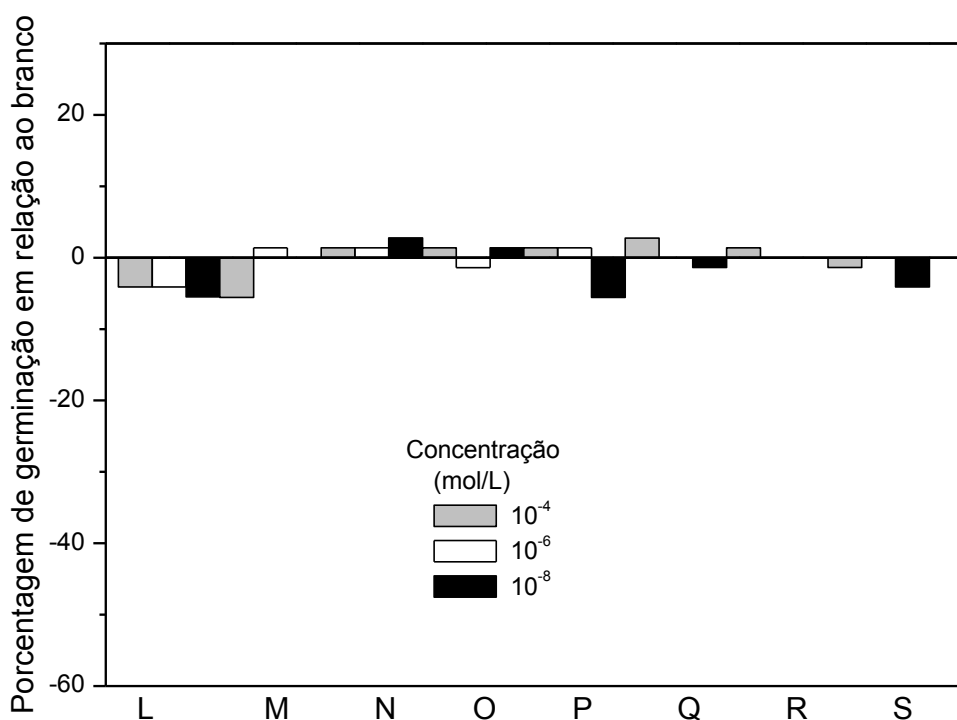


Figura 4.7 – Efeito dos materiais de partida das biotransformações **L** (*ent*-19-hidroxi-caur-16-eno, **90**), **M** (ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico, **88**), **N** (*ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila, **83**), **O** (ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico, **1** e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico, **2**), **P** (ácido *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico, **89**) e **Q** (ácido *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico, **91**) e **R** (ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico, **78**) e **S** (ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico, **85** e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico, **86**) sobre a germinação de sementes da alfaca (*L. sativa*).

4.1.3.2.3 Resultados dos ensaios de germinação de sementes de *L. sativa* para as substâncias puras provenientes das reações de biotransformação

A **Figura 4.8** (página 190) apresenta o efeito das substâncias isoladas a partir da purificação de extratos obtidos nas reações de biotransformação sobre a germinação de sementes da alfaca.

Verificou-se que o efeito das substâncias foi predominantemente inibitório da germinação, sendo que os melhores resultados foram observados na concentração de 10⁻⁴ mol/L, onde a substância **K.1** (ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-16-cauren-19-óico, **95**) bloqueou completamente a germinação, seguida por

inibição intermediária provocada pelas substâncias **A.2** (*ent*-cauran-16- β ,19-diol, **50**) e **A.1** (*ent*-cauran-16- β ,17,19-triol, **92**) de 49,3 % e 45,1%, respectivamente. Nas demais concentrações avaliadas, **K.1**, **A.2** e **A.1** exibiram apenas um efeito inibitório fraco.

B.1 (ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico, **94**) apresentou efeito ligeiramente inibitório da germinação nas concentrações maior e menor (menor que 15%) e efeito levemente estimulatório na concentração intermediária (aproximadamente 20%).

As substâncias **F.1** (*ent*-3 β ,15 β ,16 β ,19-tetrahidroxi-cauranol, **93**) e **I.1** (ácido *ent*-2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahidroxi-16-cauran-19-óico) provocaram efeitos pouco intensos de inibição ou estimulação na germinação das plantículas de *L. sativa* nas três concentrações testadas.

Comparando-se os resultados dos efeitos sobre a germinação da alfaca exibidos pelas substâncias isoladas de biotransformação (**Figura 4.8**, página 190) e pelos extratos dos quais elas foram purificadas (**Figuras 4.5** e **4.6**, páginas 185 e 186), observou-se que as substâncias **A.1** e **A.2** e o extrato **A** apresentaram predominantemente efeitos de forte inibição da germinação, na maior concentração. Tanto a substância **K.1** quanto o extrato **K** proveram bloqueio total na germinação das sementes, também nesta concentração. Os efeitos das demais substâncias sobre a germinação, em relação aos extratos de origem foram antagônicos.

A comparação com os resultados exibidos pelos substratos (**Figura 4.7**, página 188) demonstrou, de maneira geral, que as substâncias biotransformadas (**Figura 4.8**, página 190) apresentaram atividades mais intensas sobre a germinação de *L. sativa*.

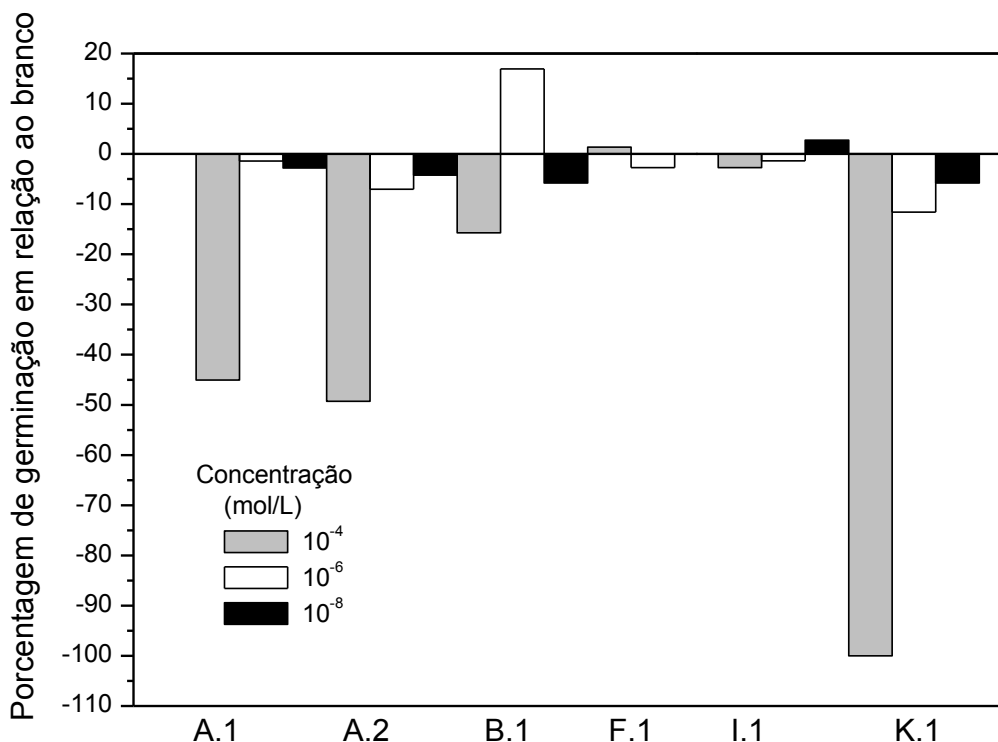


Figura 4.8 – Efeito das substâncias provenientes da purificação dos extratos das biotransformações **A.1** (*ent*-16 β ,17,19-trihidroxicaurano, **92**), **A.2** (*ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano, **50**), **B.1** (ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico, **94**), **F.1** (*ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahidroxi-caurano, **93**), **I.1** (ácido *ent*-2 α ,3 α ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico, **96**) e **K.1** (ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico, **95**) sobre a germinação de sementes da alface (*L. sativa*).

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos em acetato de etila obtidos das biotransformações e substâncias isoladas

4.2.1 – Introdução

Antibióticos são substâncias produzidas por microorganismos (fungos ou bactérias) que suprimem o crescimento de outros⁴, mas substâncias sintéticas e isoladas de plantas têm apresentado também atividade antimicrobiana. A descoberta da penicilina e dos diversos antibióticos pós-penicilina levou a um êxito tão grande no combate às doenças infecciosas que, na década de 80, se acreditava que a guerra contra as infecções estava ganha, resultando em um declínio da pesquisa nesta área por parte das indústrias farmacêuticas. Na década seguinte, o avanço das técnicas de triagem robotizadas de grande porte (*High Throughput Screening*), associadas à disponibilidade de volumosos bancos

de moléculas resultantes da química combinatória, colaborou ainda mais para o declínio na busca de novos antibióticos, principalmente a partir de fontes naturais⁵.

O uso irracional destes fármacos, tal como sua venda irrestrita com ausência de prescrição médica, seu emprego por tempo insuficiente e em subdosagens, levou ao desenvolvimento de resistência microbiana aos antibióticos existentes. Além disso, outros fatores como o surgimento de novos alvos bacterianos, a evolução de doenças infecciosas nos últimos 20 anos, a toxicidade de alguns antibióticos em uso clínico, a demanda por melhor adequação da antibioticoterapia a indivíduos imunossuprimidos, portadores do vírus HIV, idosos, recém-nascidos, alérgicos, entre outros, pressupõem um retorno do interesse na busca por novos compostos com atividade antibiótica. Além disso, substâncias biologicamente ativas frente a fungos e bactérias podem ser utilizadas na agricultura diminuindo prejuízos econômicos relacionados à contaminação das lavouras, grãos e frutas armazenados por diferentes tipos de microrganismos⁵.

Sendo assim, alguns dos extratos e substâncias provenientes das reações de biotransformação realizadas tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada, na busca por possíveis agentes antimicrobianos.

4.2.2 Experimental

O ensaio foi conduzido sob a coordenação da Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi, do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG, empregando-se o método de difusão em disco⁶.

Os seguintes microorganismos foram utilizados: *Staphylococcus aureus* (Gram +) (ATCC 29212), *Bacillus cereus* (Gram +) (ATCC 11778), *Escherichia coli* (Gram -) (ATCC 25922), *Salmonella thyphimurium* (Gram -) ATCC 14028 e *Candida albicans* (levedura) (ATCC 18804).

4.2.2.1 Amostras testadas

Foram avaliadas as substâncias isoladas de biotransformações *ent*-16 β ,17,19-trihidroxicaurano (**92**); *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**) e ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**) e os extratos AcOEt provenientes das biotransformações *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) por *C. aphidicola* e do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) por *F. proliferatum*.

4.2.2.2 Meios de cultura/soluções empregados

Agar semi-sólido

Ágar antibiótico
Água destilada..... q.s.p.

Meio BHI

BHI..... 37,0 g/L
Água destilada..... q.s.p.

Solução Salina

NaCl..... 9,0 g/L
MgSO₄.7H₂O..... 0,5 g/L
Água destilada..... q.s.p.

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

4.2.2.3 Metodologia de ensaio

A metodologia descrita a seguir foi empregada neste ensaio de atividade⁷.

A discos de papel estéreis, com diâmetro de 6,0 mm, foram adicionadas soluções (2,0 g/L) das amostras a serem testadas, perfazendo 100,0 µg de cada uma das amostras aplicadas a cada discos. Foram utilizados, como controle positivo, discos impregnados com o antibacteriano cloranfenicol (30,0 mg/disco) e o antifúngico nistatina (30 mg/disco). Como controle negativo, foram utilizados discos impregnados com os solventes utilizados na solubilização das amostras. Após a secagem dos solventes em estufa a 37 °C, cada disco foi colocado sobre placas de petri contendo 7,5 mL do meio solidificado, inoculado com os microorganismos (0,3 mL da suspensão salina do microorganismo). Esta solução foi preparada da seguinte forma: inicialmente inocularam-se as culturas de microorganismos em tubos contendo 2,0 mL do meio BHI. Estes tubos, contendo os microorganismos no meio de manutenção, foram então incubados em estufa a 37 °C, durante 18 horas. Alíquotas destes meios foram transferidas para uma cubeta contendo solução salina na quantidade necessária para que a transmitância da solução ficasse entre 74-75 % (600 nm) para os inóculos bacterianos e 75-76% (530 nm) para o inóculo do fungo. As placas contendo as amostras e os controles foram incubadas a 37 °C, por 48 horas. A sensibilidade dos microorganismos frente aos produtos foi avaliada pela medida do diâmetro do

halo de inibição (em mm), quando formado, após o período de incubação. Foram consideradas ativas as amostras que causaram halos de inibição iguais ou superiores a 7 mm, já que os discos de papel apresentam diâmetro de 6 mm.

4.2.3 Resultados e discussão dos resultados

Nenhuma das amostras testadas apresentou atividade antimicrobiana, na concentração do ensaio, sobre as espécies de microorganismos utilizadas, uma vez que não foram observados halos de inibição.

4.3 Avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase de extratos em acetato de etila obtidos das biotransformações e substâncias puras isoladas

4.3.1 Introdução

As doenças neurodegenerativas tais como as doenças de Alzheimer, Parkinson e desordens cerebrovasculares constituem-se em uma das principais causas de morbidade e de mortalidade na vida adulta. O mal de Alzheimer atinge primeiramente a memória e, posteriormente, a capacidade de raciocínio e a comunicação. O quadro de sinais e sintomas dessas doenças está associado à redução de neurotransmissores cerebrais, como acetilcolina, noradrenalina e serotonina e a terapêutica consiste justamente na tentativa de restauração da função colinérgica. Fármacos inibidores da acetilcolinesterase, como a galantamina, a fisostigmina e a tacrina, são amplamente usados no tratamento da doença, mas estão disponíveis no mercado a um preço relativamente oneroso⁸. Sendo assim, a busca por novos inibidores da acetilcolinesterase representa uma alternativa interessante.

4.3.2 Experimental

O ensaio foi realizado sob a coordenação da Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi, do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG empregando-se a metodologia de bioautografia, descrita por Marston *et al*⁹.

4.3.2.1 Amostras testadas

Foram avaliadas as substâncias isoladas de biotransformações *ent*-16 β ,17,19-trihidroxicaurano (**92**); *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**) e ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**) e os materiais de partida que as deram origem *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) e ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**).

4.3.2.2 Metodologia do ensaio

O ensaio de bioautografia se baseia na aspersão de uma suspensão da enzima acetilcolinesterase sobre um cromatograma preparado com as amostras a serem testadas, no qual se avalia a zona de inibição, se houver, à luz natural ou após a aplicação de um corante⁹.

Alíquotas de 100 μ g e 50 μ g das amostras testes, dissolvidas em solvente volátil foram aplicadas em placas de cromatografia em sílica gel. Após a eluição, as placas foram borrifadas com uma solução de iodeto de acetilcolina e 5,5'-ditiobis [2,2 ácido nitrobenzóico] a 5 mmol/L. Após a secagem, as placas foram borrifadas com 3U/mL da enzima acetilcolinesterase tipo VI S-liofilizada, dissolvidas em 50 mmol/L de tampão *tris* HCl, pH 8,0, a 37 °C. Após a incubação, o desenvolvimento de coloração amarela nas placas indicou resultado positivo para inibição da acetilcolinesterase. Galantamina e cafeína foram utilizadas como controles positivos.

4.3.3 Resultados e discussão dos resultados

Uma mancha de inibição da enzima acetilcolinesterase provocada pelo ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**) foi observada apenas na concentração de 100 μ g/placa. O resultado foi negativo para esta substância na concentração de 50 μ g/placa e para todas as demais amostras avaliadas.

4.4 Referências bibliográficas

1. MACÍAS F. A., CASTELLANO D.; MOLINILLO J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, pp. 2512-2521, 2000.
2. VIEIRA, H. S.; TAKAHASHI, J. A.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Effects of kaurane diterpene derivatives on germination and growth of *Lactuca sativa* seedlings. **Zeitschrift Für Naturforschung C**. v. 60, pp. 72-78, 2005.
3. BOAVENTURA M. A. D., PEREIRA R. G., FREITAS L. B. O., REIS L. A., VIEIRA H. S. Preparation and phytotoxicity of novel kaurane diterpene amides with potential use as herbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, pp.2985-2988, 2008.
4. GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., 1647 p., 2003.
5. TAKAHASHI, J. A. & LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, pp. 1807-1813, 2008.
6. BAUER, S.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J.C. E THURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. **American Journal of Pathology**, v. 45, pp. 493-496, 1966.
7. LANA, E.J.L., CARAZZA, F., TAKAHASHI, J.A. Antibacterial evaluation of some new 2-aryl-3,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, pp. 2053-2056, 2006.
8. TREVISAN, M. T. S; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P.; FEITOSA, C. M.; VERPOORTE, R.; BRAZ FILHO, R. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, pp. 415-418, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000300002&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 29 de setembro de 2010. doi: 10.1590/S0100-40422006000300002.
9. MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, pp. 51-54, 2002.

Conclusões

Conclusões

Na primeira parte deste trabalho, que compreendeu o fracionamento de extrato etanólico bruto da espécie vegetal *W. paludosa* visando, principalmente, o isolamento dos ácidos caurenóico (**1**) e grandiflorênico (**2**), isolaram-se e identificaram-se, além destes, as substâncias 3β -friedelinol (**77**), o ácido *ent*-caur- 3β -angeloiloxi-16-en-19-óico (**78**) e uma mistura de β -sitosterol (**79**) e estigmasterol (**80**).

Em seguida, foram preparados, por modificação química a partir da mistura dos ácidos **1** e **2**, os derivados *ent*-caur-16-en-19-oato de etila (**81**), *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (**82**), *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**), *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-oato de etila (**84**), ácidos *ent*- 15α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*- 15α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**) e *ent*-16-formil-caur-15-en-19-óico (**87**).

Subsequentemente, alguns dos derivados obtidos por síntese e outros produtos isolados de *W. paludosa* foram submetidos a biotransformação visando o isolamento de produtos com potencial atividade alelopática sobre a germinação e o crescimento da raiz e caule de alface (*L. sativa*). A primeira delas, empregando-se o fungo *C. aphidicola* e o substrato *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**) levou aos produtos *ent*- 16β ,17,19-trihidroxi-caurano (**92**) e *ent*- 16β ,19-dihidroxi-caurano (**50**), ambos isolados anteriormente a partir de extratos vegetais ou como produtos de síntese química.

Três biotransformações foram realizadas utilizando-se o *Fusarium proliferatum* sobre os ácidos *ent*- 3β -cinamato-caur-16-en-19-óico (**91**), *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**) e *ent*- 15α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**). Foram isolados, a partir destas reações, os metabólitos *ent*- 3β , 15α , 16α ,19-tetrahidroxi-caurano (**93**), ácidos *ent*- 2α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**) e *ent*- 2α , 15α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**), respectivamente.

O *F. proliferatum* promoveu, na primeira reação, redução e hidroxilação do esqueleto caurânico e nas últimas a hidroxilação do carbono metilênico 2 do esqueleto caurânico de **88** e **85**. Ambos os produtos hidroxilados (**94**) e (**95**) apresentaram configuração *ent*- 2α -hidroxi. Isso evidencia que estas biotransformações empregando este fungo foram regio e estereosseletivas e

podem ser empregadas na obtenção de produtos ativados nesta posição a partir de substratos caurânicos diferentes. A hidroxilação na posição 2 do esqueleto caurânico está sendo relatada pela primeira vez, neste trabalho.

A modificação biológica do ácido caurenóico (**1**) por *P. palustris* levou à obtenção do ácido *ent-2 α ,3 α ,16 α ,17*-tetrahidroxicauran-19-óico (**96**), a partir da purificação da fração *n*-butanólica.

Todas as substâncias utilizadas como substratos das biotransformações, os extratos resultantes da partição do meio aquoso fúngico com acetato de etila ou *n*-butanol e as substâncias isoladas foram avaliados nos ensaios de atividade alelopática sobre o crescimento e germinação da *Lactuca sativa* (alface). A maioria dos extratos apresentou intensa atividade inibitória do crescimento de *L. sativa*, na maior concentração testada, e apenas um pequeno efeito estimulatório nas outras concentrações. O resultado relativo à estimulação mais interessante observado foi aquele obtido para os extratos em AcOEt da biotransformação do ácido *ent-3 β* -angeloiloxi-16-cauren-19-óico (**78**) por *F. proliferatum* e em AcOEt da biotransformação dos ácidos *ent-15 α* -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent-15 α* -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico, (**86**) por *F. proliferatum*, que mostraram percentuais de estimulação do crescimento da raiz da alface de 60 e 40%, em relação ao branco, nas concentrações de 10^{-2} e 10^{-4} mg/mL, respectivamente. Outro resultado interessante observado foi o grande estímulo (~60% em relação ao branco) apresentado pela maioria dos materiais de partida, sobre o crescimento da raiz de *L. sativa*, na maior concentração utilizada e um pequeno efeito inibitório nas menores concentrações. O que se observa, em geral, é o inverso.

Os produtos de biotransformação apresentaram apenas efeitos inibitórios ou estimulatórios fracos do crescimento da raiz e caule de *L. sativa*, com exceção do ácido *ent-2 α ,15 α* -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**), que inibiu em 100% o crescimento da raiz e do caule, na maior concentração (10^{-4} mol/L). O *ent-3 β ,15 β ,16 β ,19*-tetrahidroxi-caurano (**93**) apresentou uma inibição do crescimento do caule de *L. sativa* em torno de 50% em relação ao branco.

Quanto à germinação das sementes de *L. sativa*, observou-se uma forte inibição provocada pelos extratos, em todas as concentrações testadas, principalmente a 10^{-4} mol/L. O efeito estimulatório mais marcável foi aquele apresentado pelo produto de biotransformação **94**, que estimulou a germinação

de *L. sativa* em ~20% em relação ao branco. Os outros produtos de biotransformação apresentaram efeito predominantemente inibitório.

Assim, os resultados obtidos sobre os extratos e produtos das biotransformações poderiam ser utilizados em pesquisa de herbicidas naturais, uma classe de substâncias de alto interesse comercial atualmente.

Nas condições dos ensaios de atividade antimicrobiana e de inibição a enzima acetilcolinesterase, as amostras avaliadas não exibiram atividade com exceção do ácido *ent-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico* (**94**) que apresentou atividade sobre a enzima acetilcolinesterase na concentração de 100 $\mu\text{g/placa}$.

A n e x o

E s p e c t r o s

I - Espectros

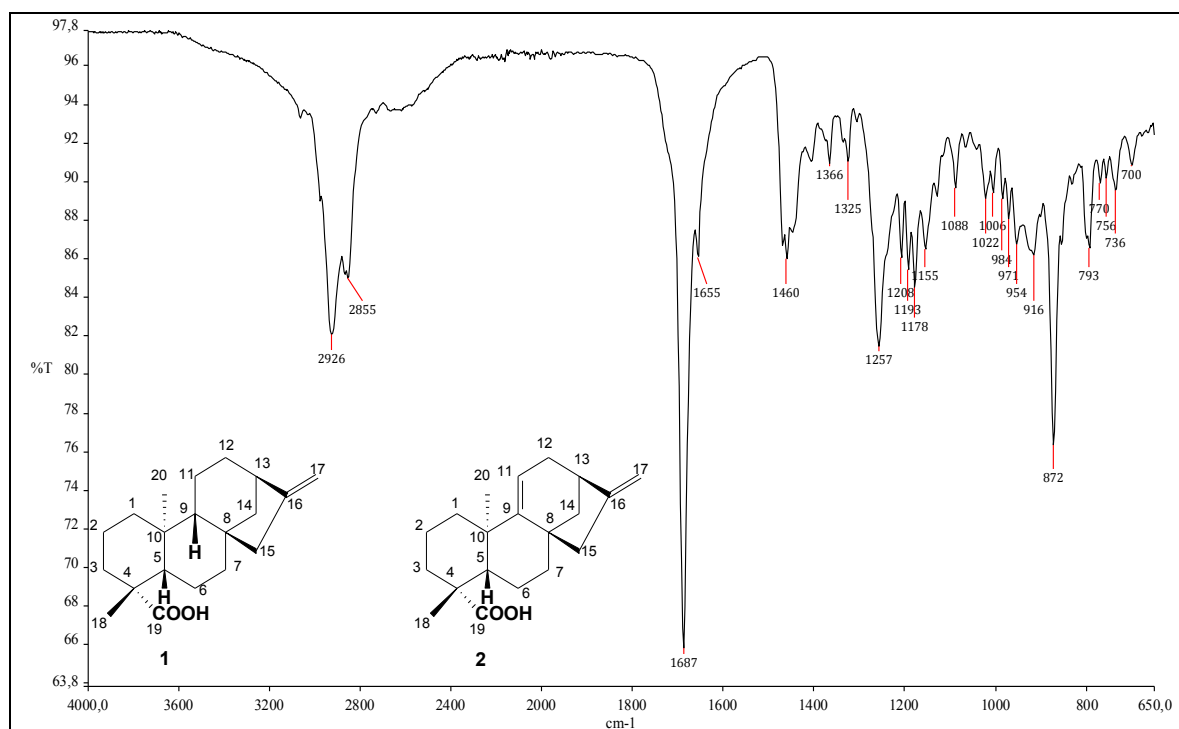


Figura 3.1 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) da mistura dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (1) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico (2).

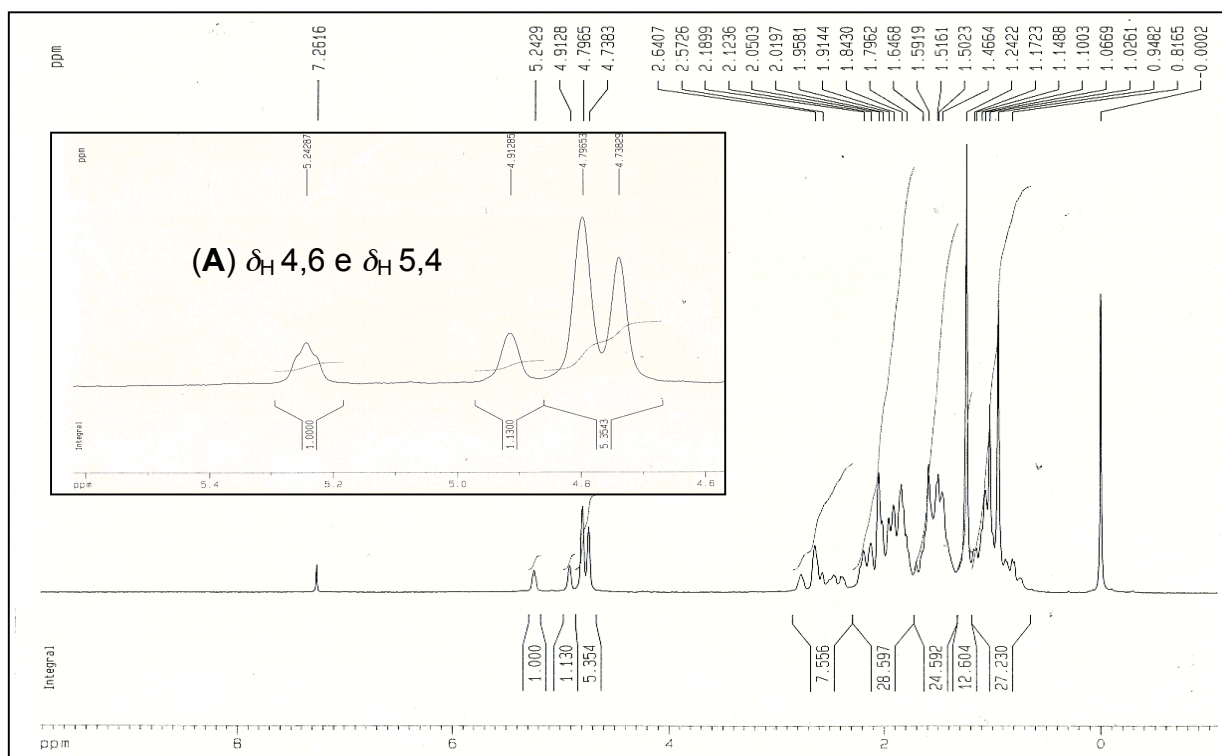


Figura 3.2 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) da mistura dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (1) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico (2); (A) Seção expandida entre δ_{H} 4,6 e δ_{H} 5,4.

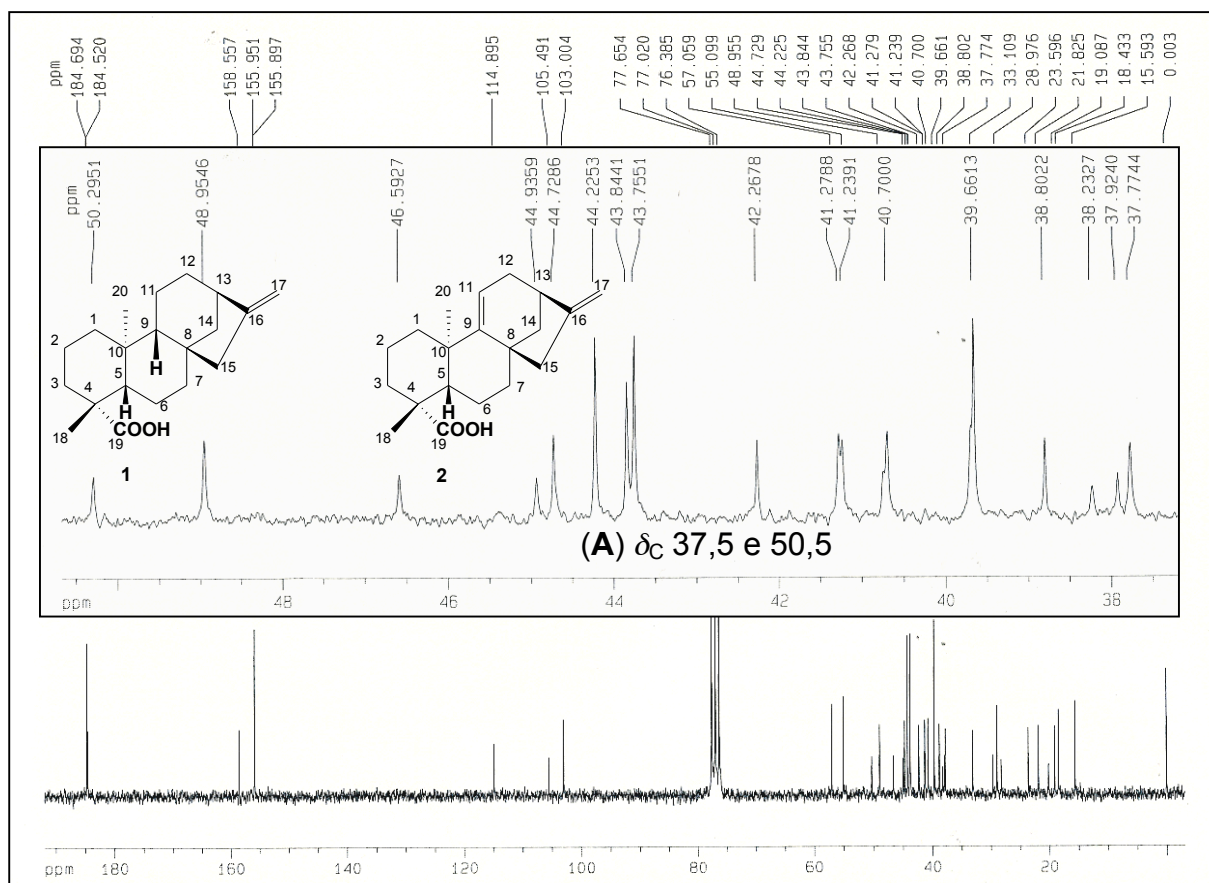


Figura 3.3 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) da mistura dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (**1**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico (**2**); (A) Seção expandida entre δ_C 37,5 e 50,5.

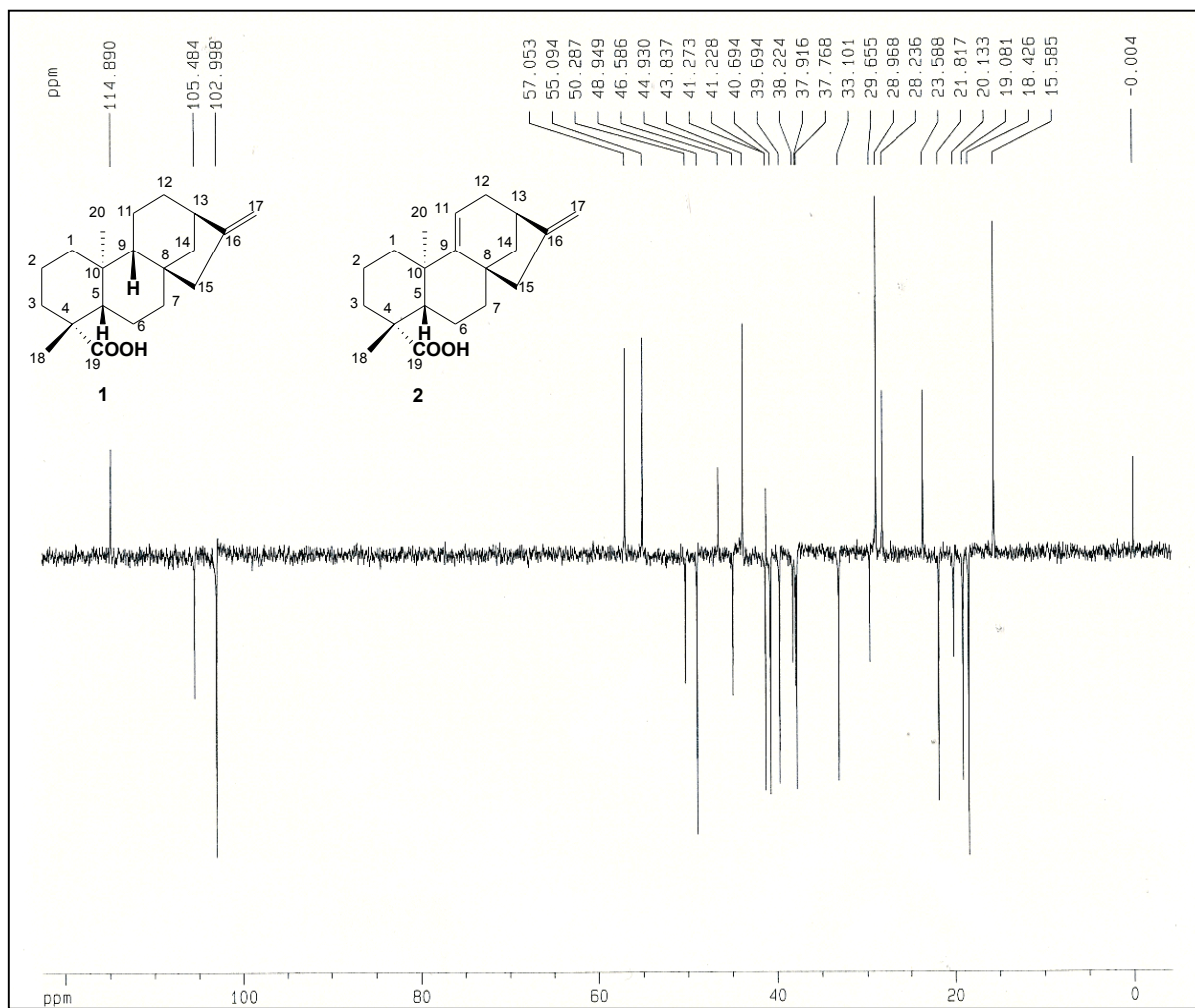


Figura 3.4 - Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl₃, δ) da mistura dos ácidos *ent*-caur-16-en-19-óico (**1**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-óico (**2**).

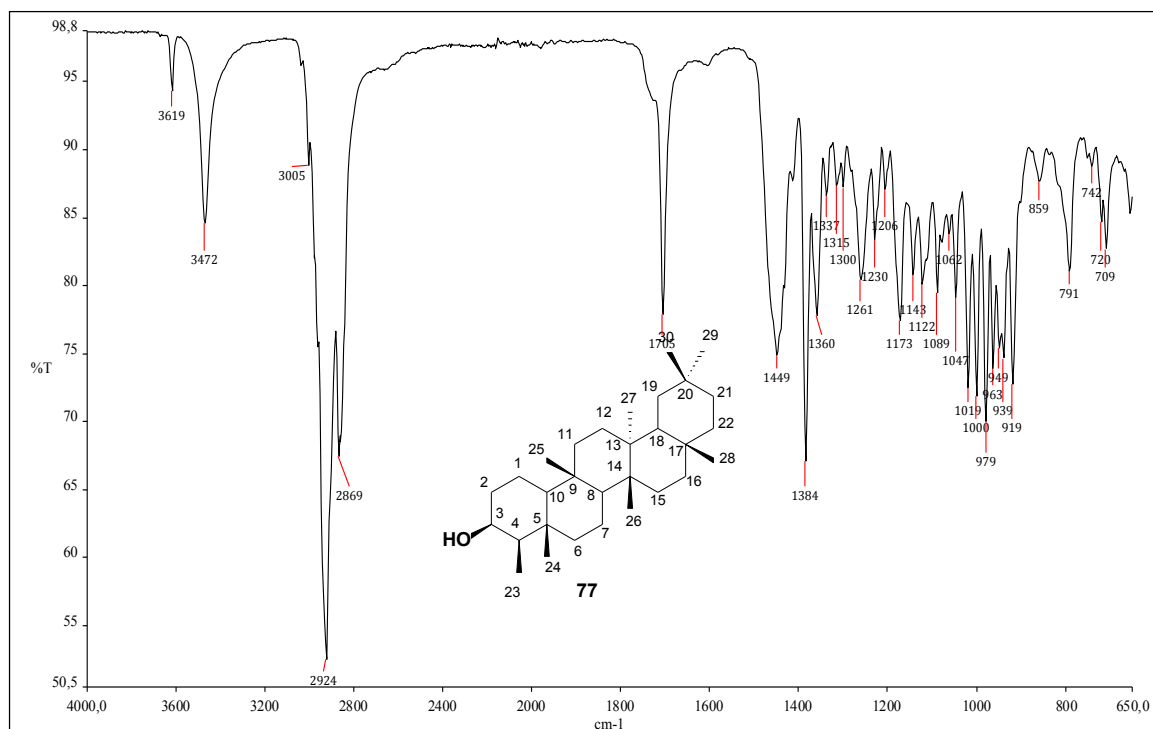


Figura 3.5 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) de 3β-friedelinol (77).

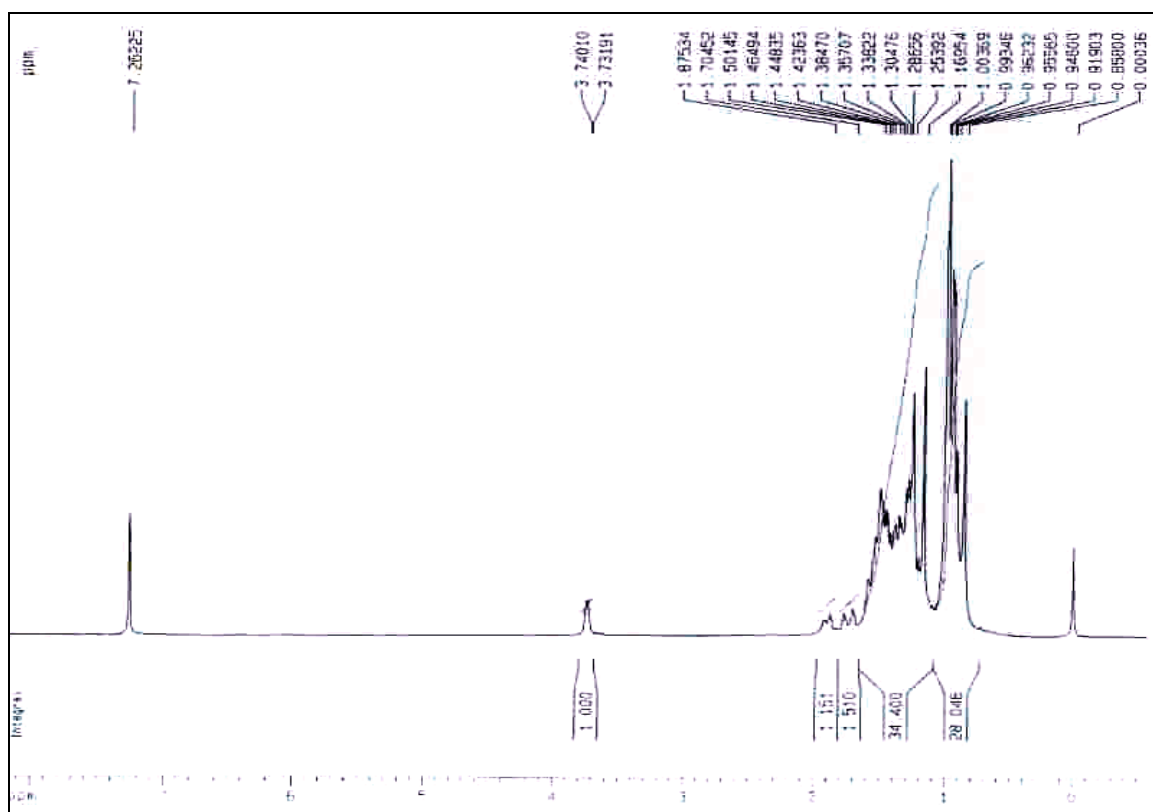


Figura 3.6 – Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) de 3β-friedelinol (77).

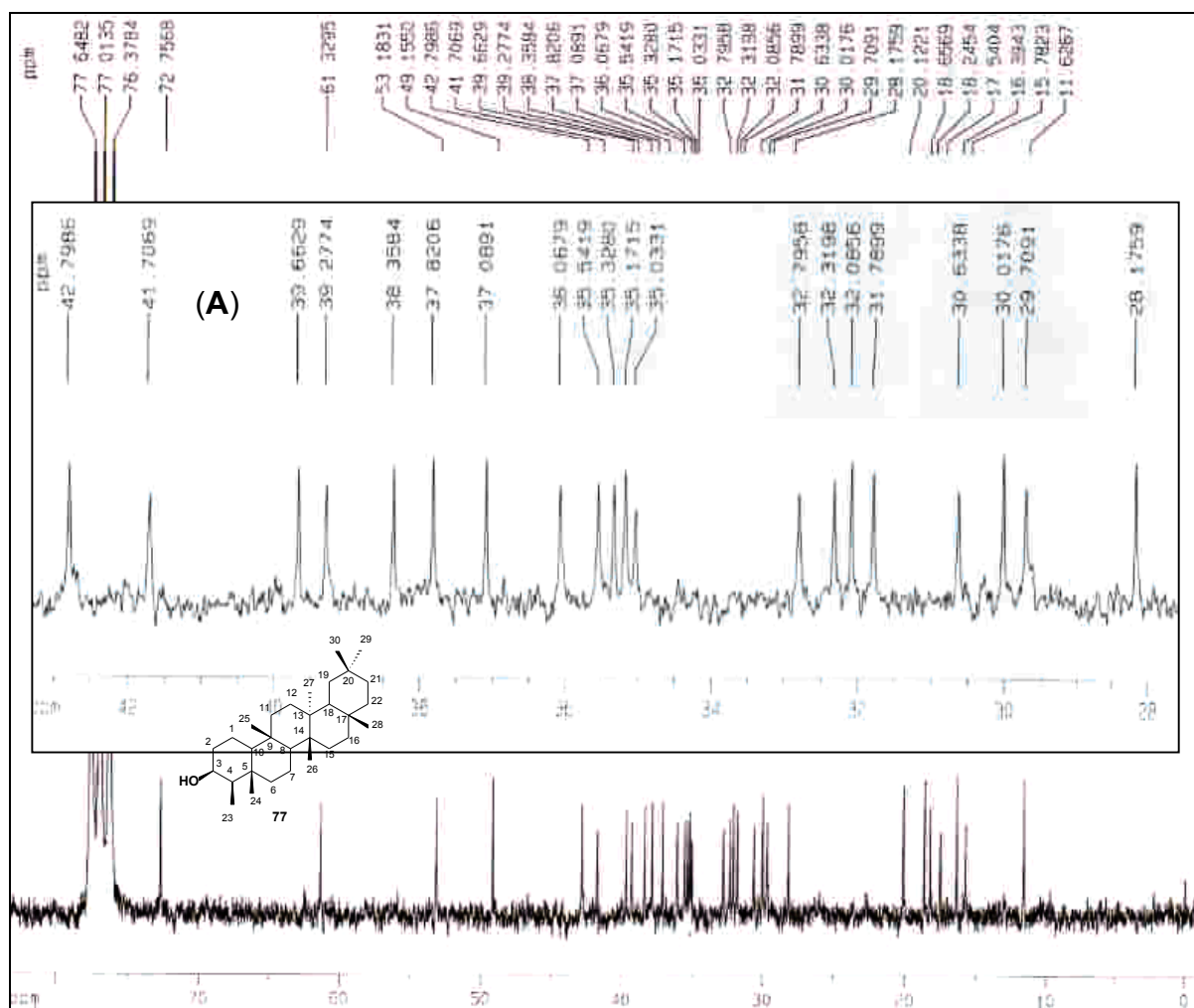


Figura 3.7 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de 3 β -friedelinol (**77**);
 (A) Seção expandida entre δ_{C} 28,0 e 42,0.

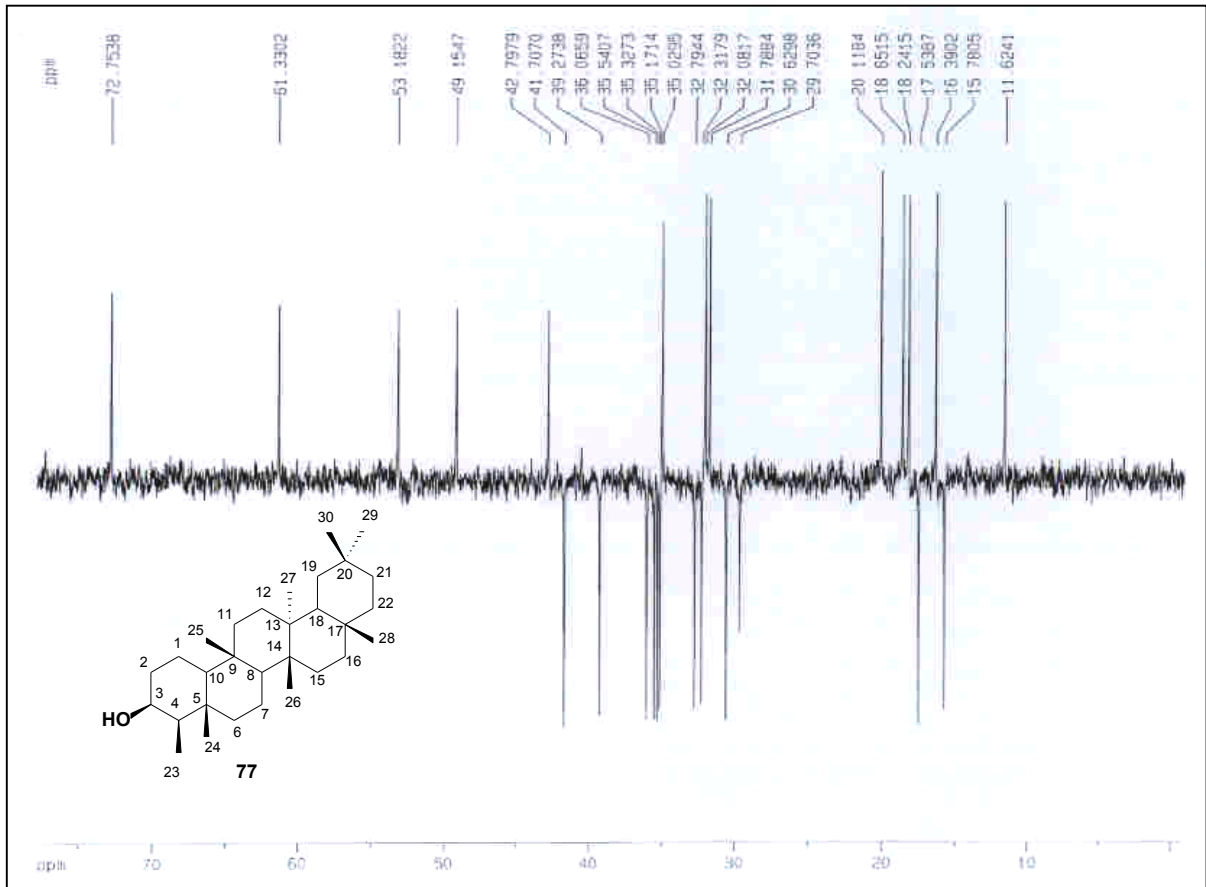


Figura 3.8 - Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) de 3 β -friedelinol (77).

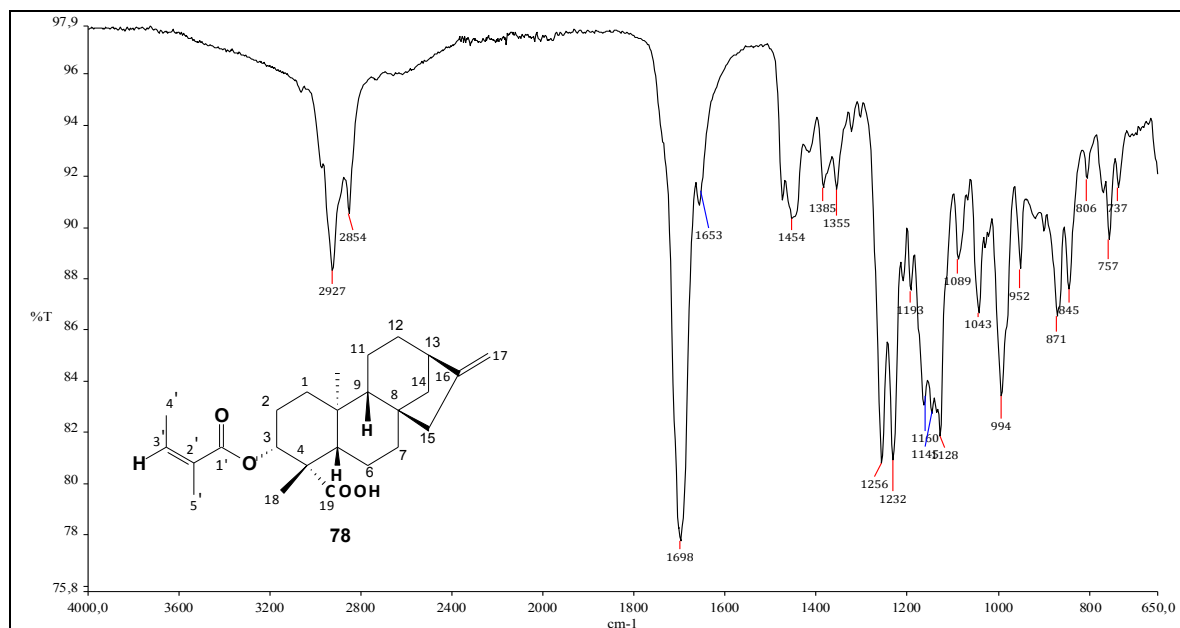


Figura 3.9 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) do ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (**78**).

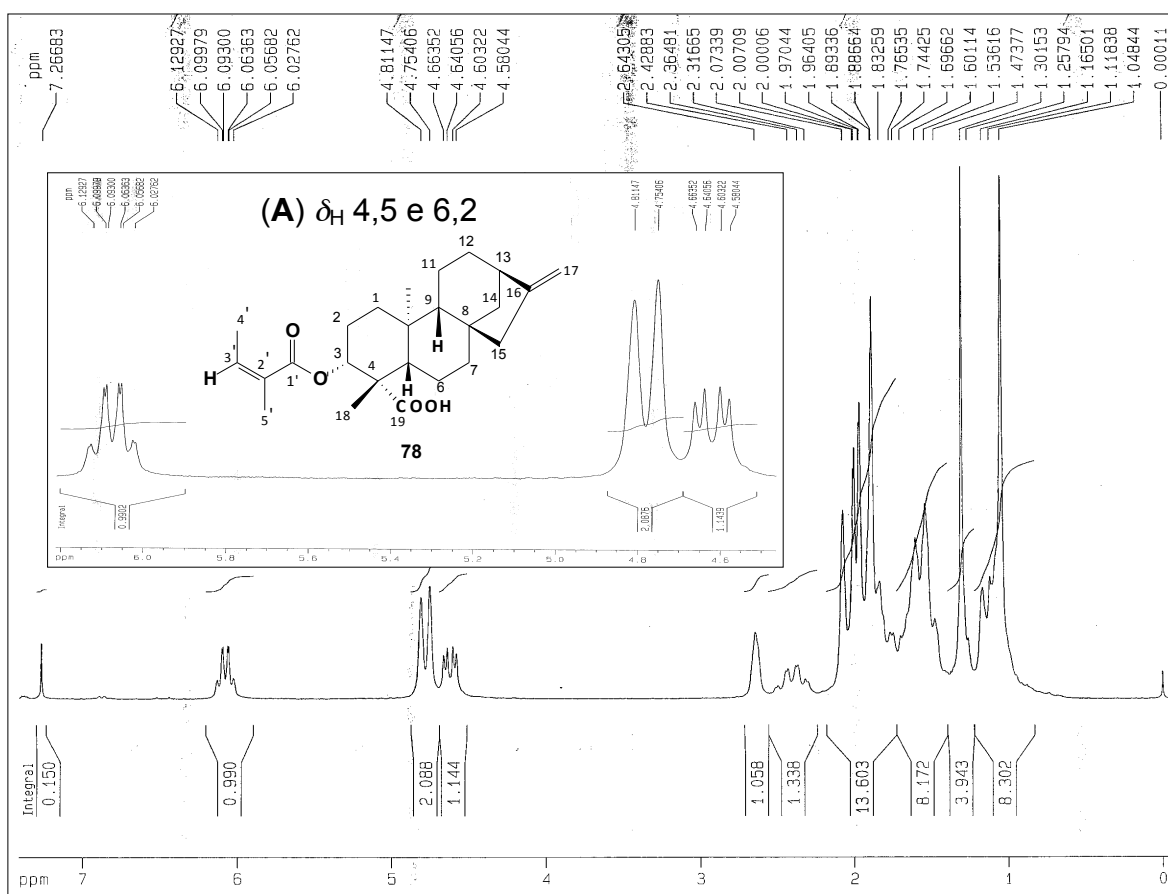


Figura 3.10 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (**78**); **(A)** Seção expandida entre δ_{H} 4,5 e 6,2.

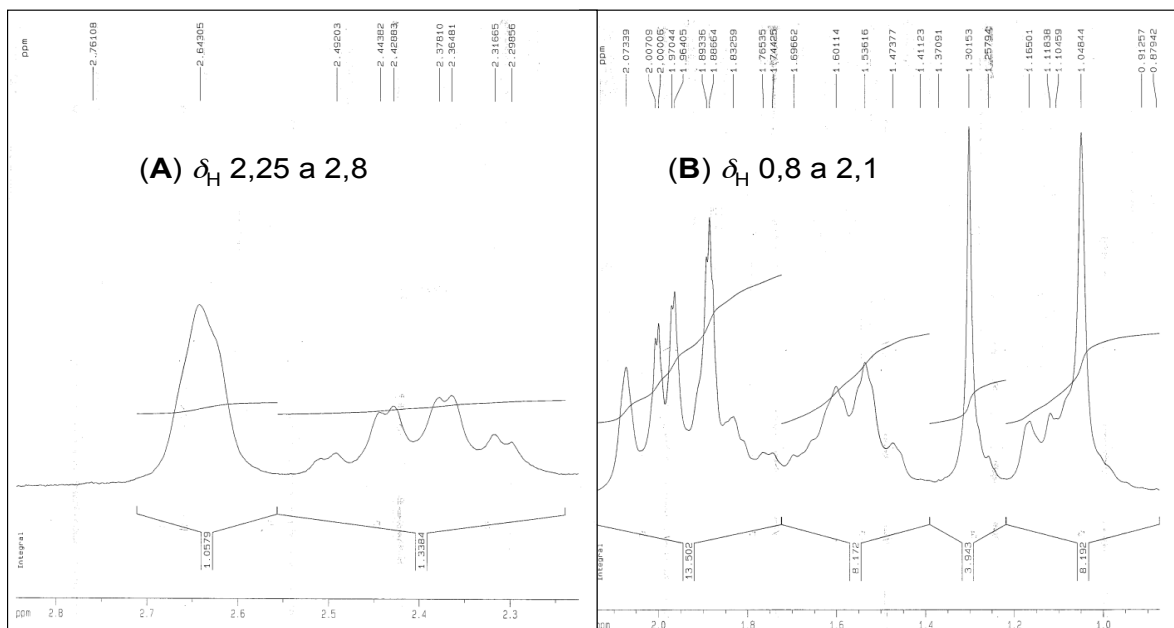


Figura 3.11 – (A) Seção expandida entre δ_H 2,25 e 2,8 e (B) entre δ_H 0,8 e 2,1 ppm do espectro de RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$, δ) do ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (**78**).

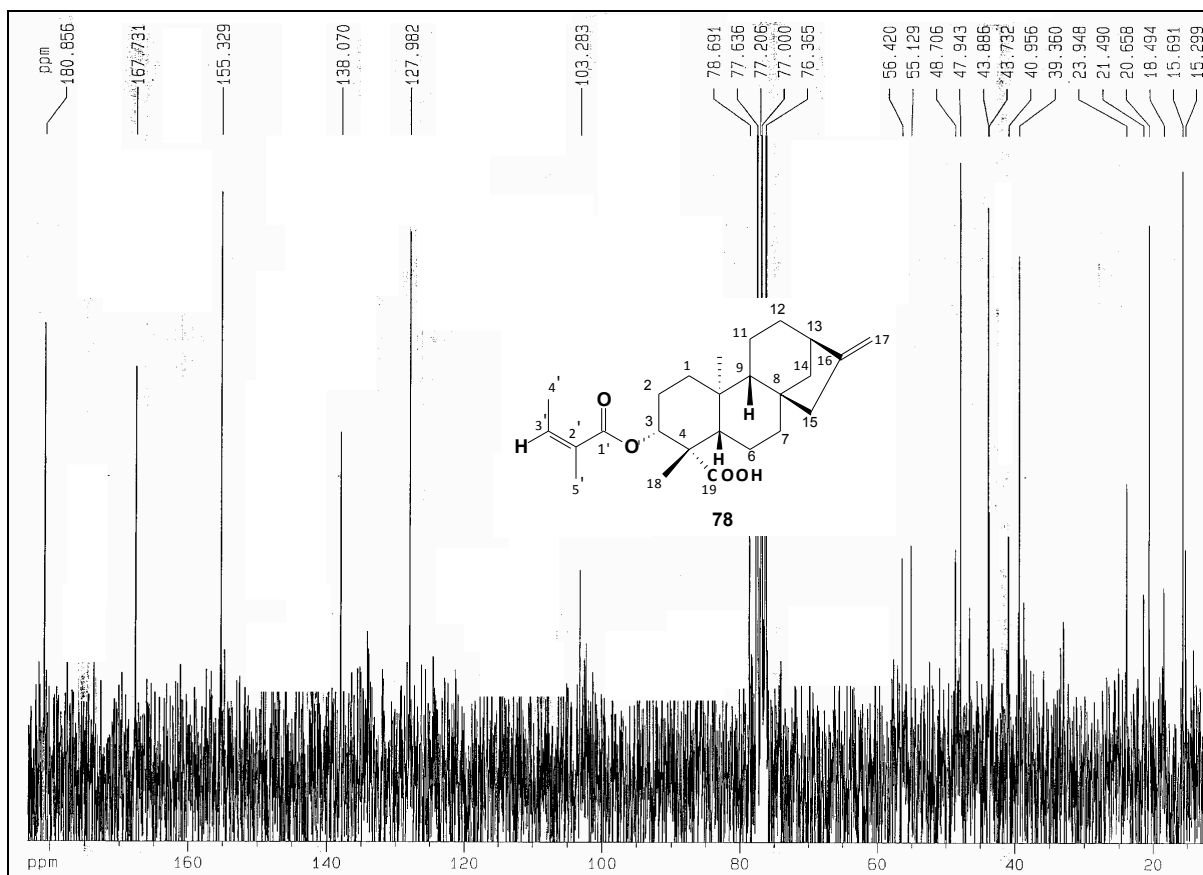


Figura 3.12 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$, δ) do ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (**78**).

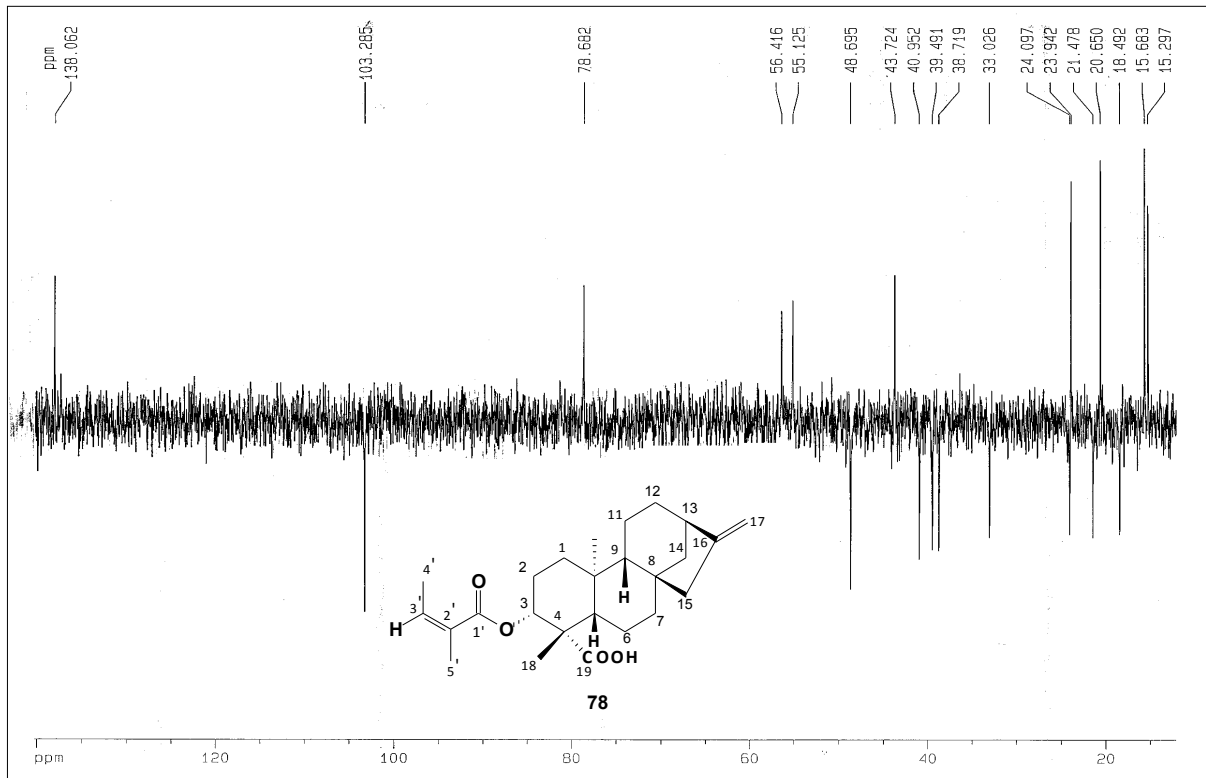


Figura 3.13 – Subespectro DEPT- 135 (50 MHz, CDCl₃, δ) do ácido *ent*-3 β -angeloiloxi-caur-16-en-19-óico (**78**).

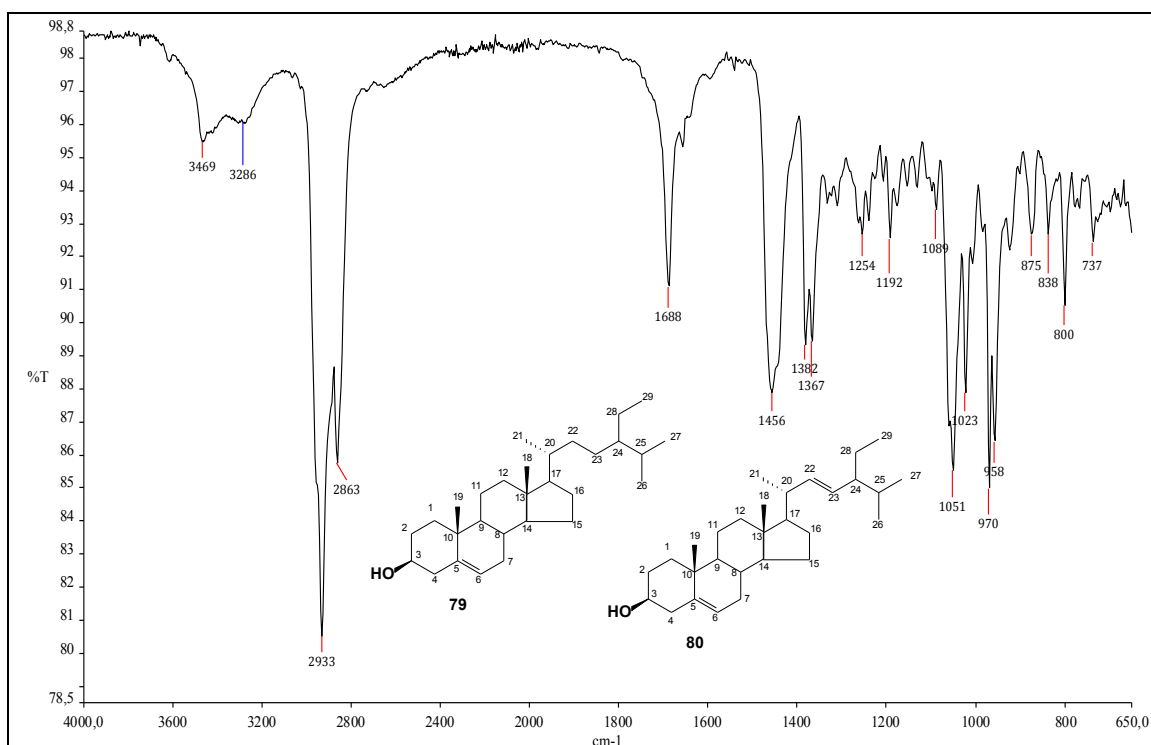


Figura 3.14 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) da mistura de β -sitosterol (79) e estigmasterol (80)

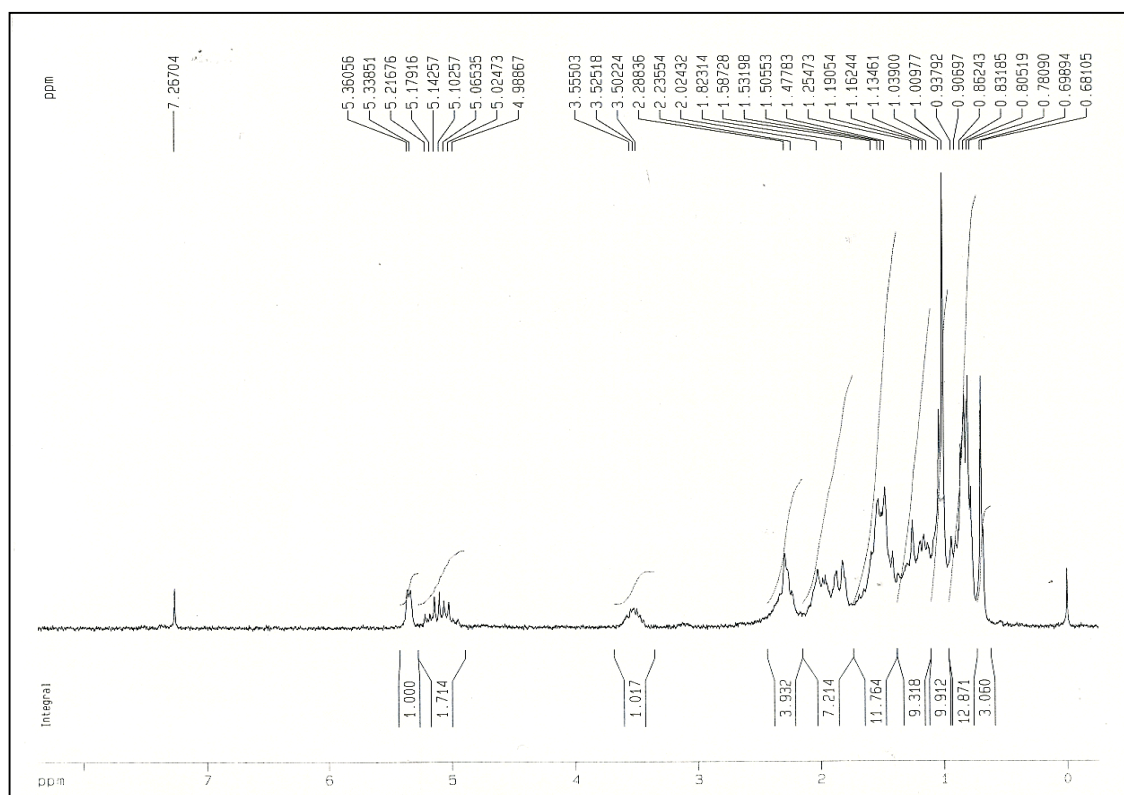


Figura 3.15 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) da mistura de β -sitosterol (79) e estigmasterol (80).

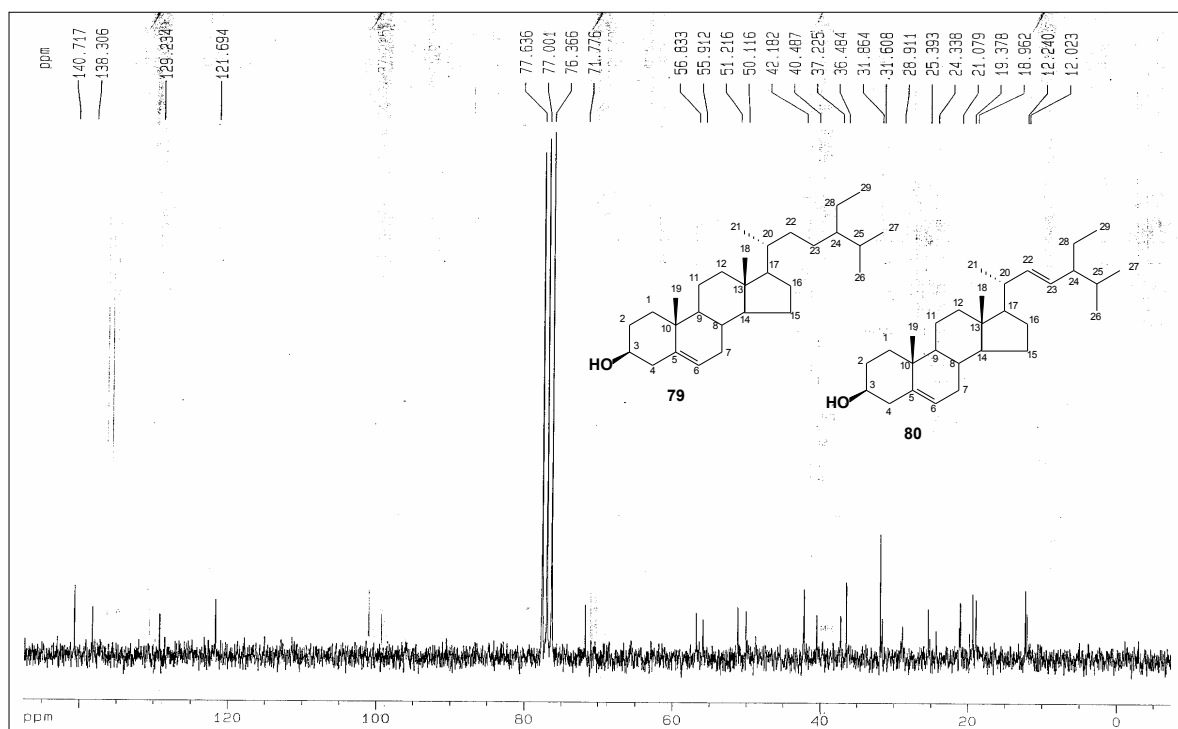


Figura 3.16 – Espectro RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) da mistura de β -sitosterol (79) e estigmasterol (80).

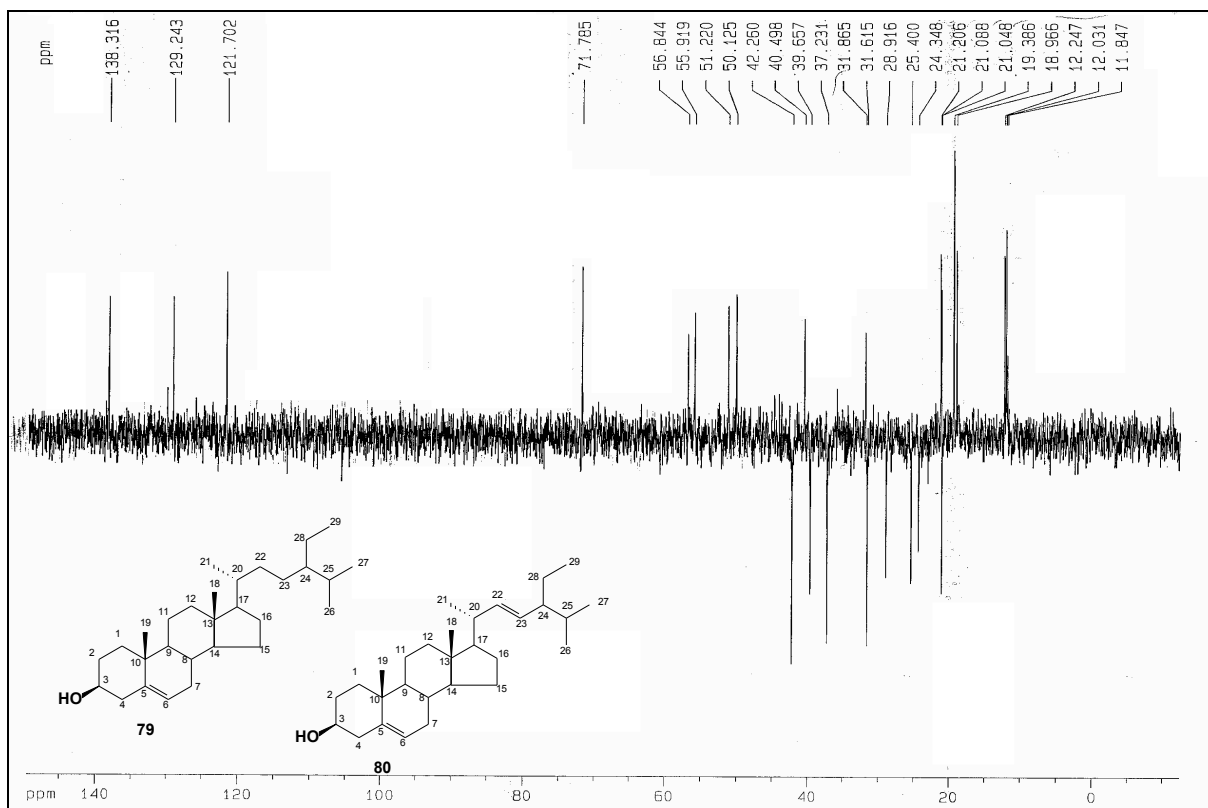


Figura 3.17 – Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) da mistura de β -sitosterol (79) e estigmasterol (80).

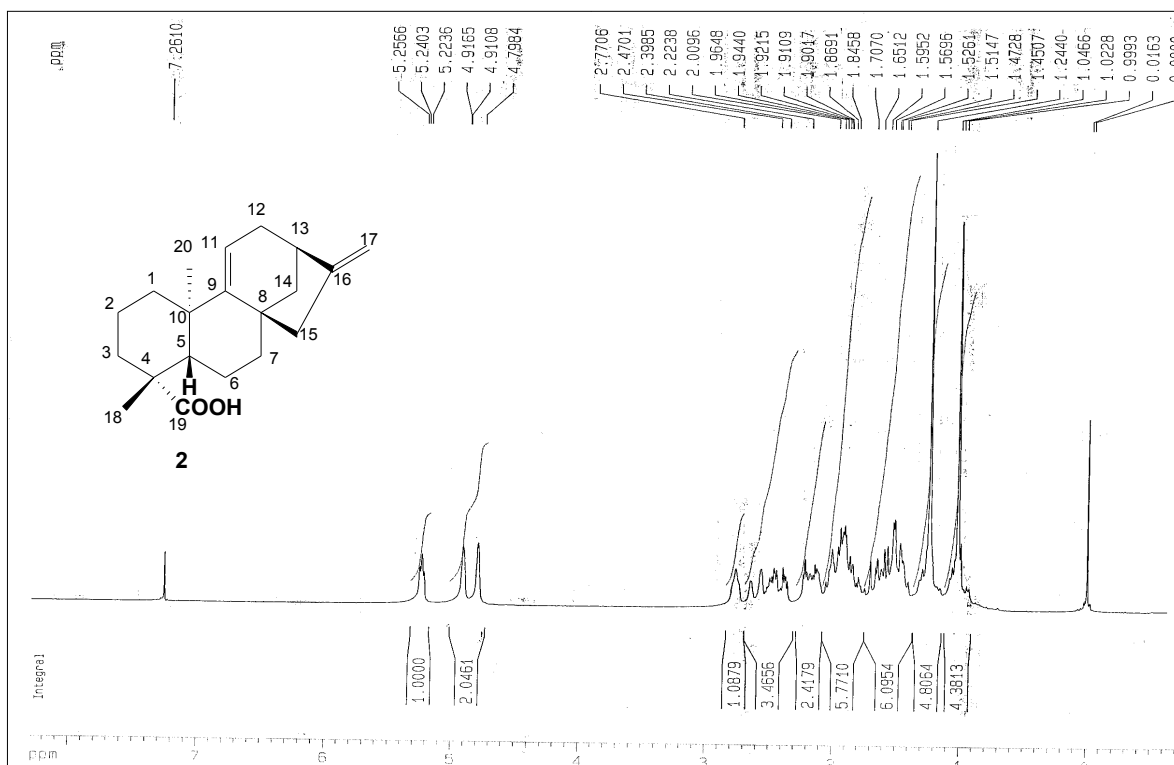


Figura 3.18 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido grandiflorênico (2).

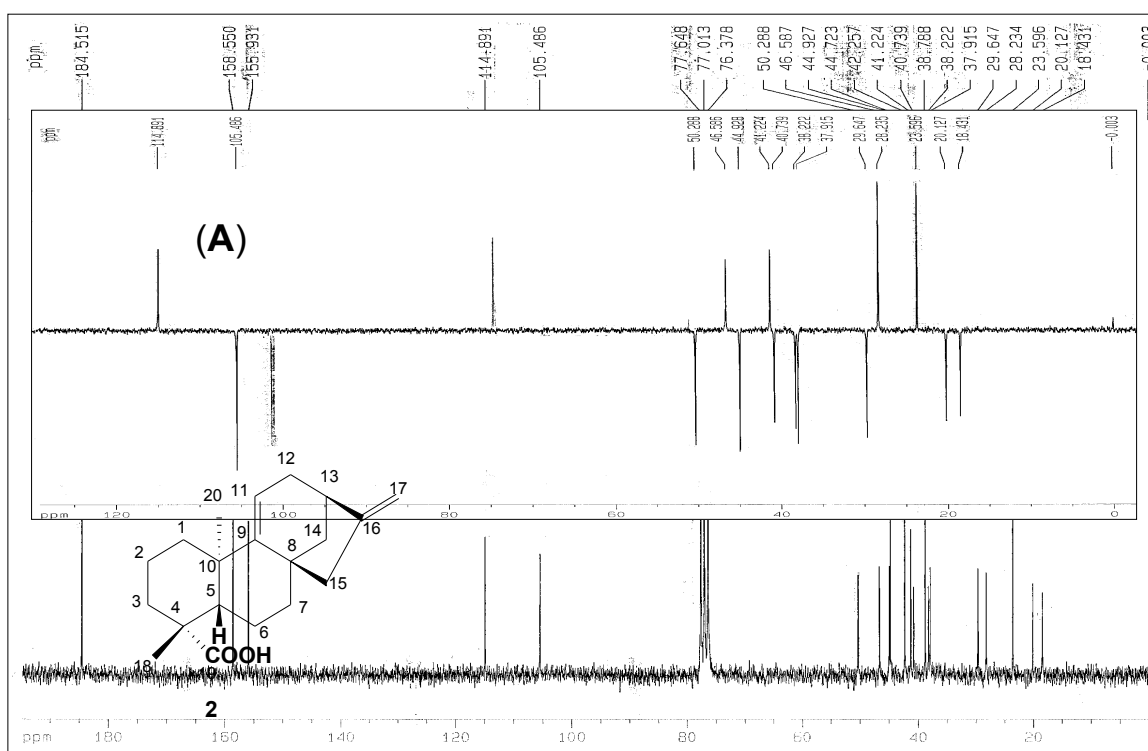


Figura 3.19 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) e (A) subespectro DEPT-135 do ácido grandiflorênico (2).

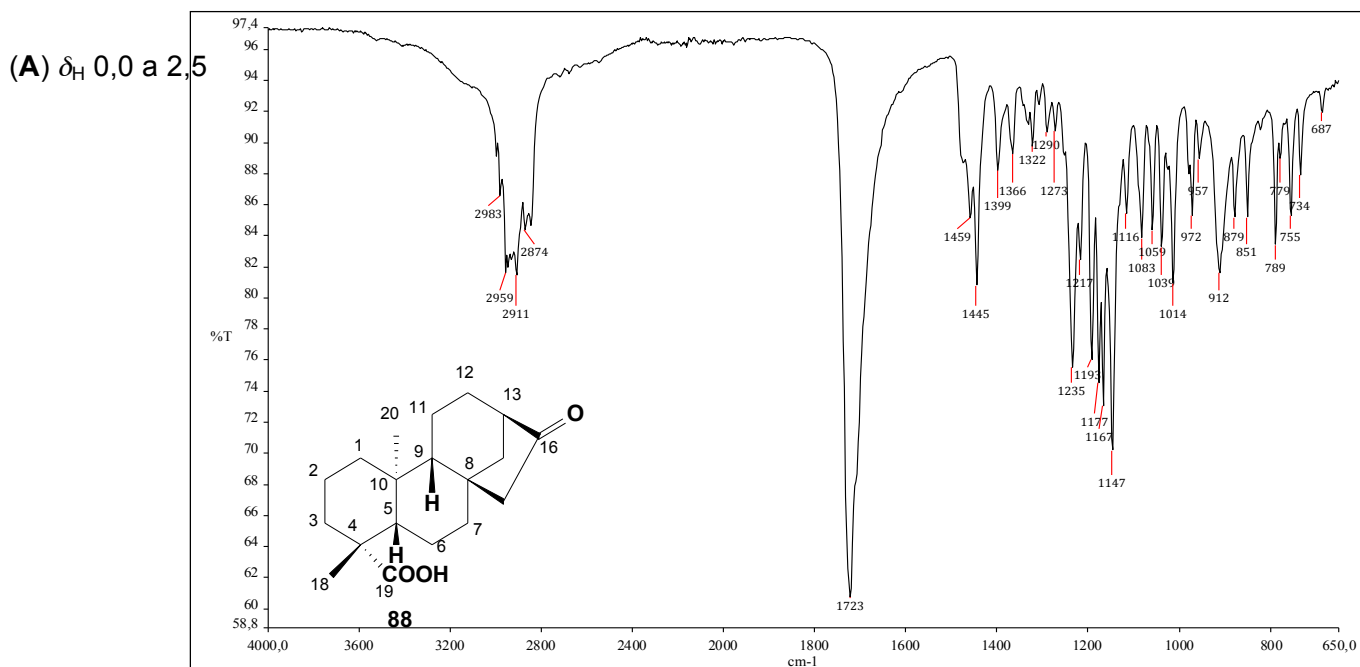


Figura 3.20 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**).

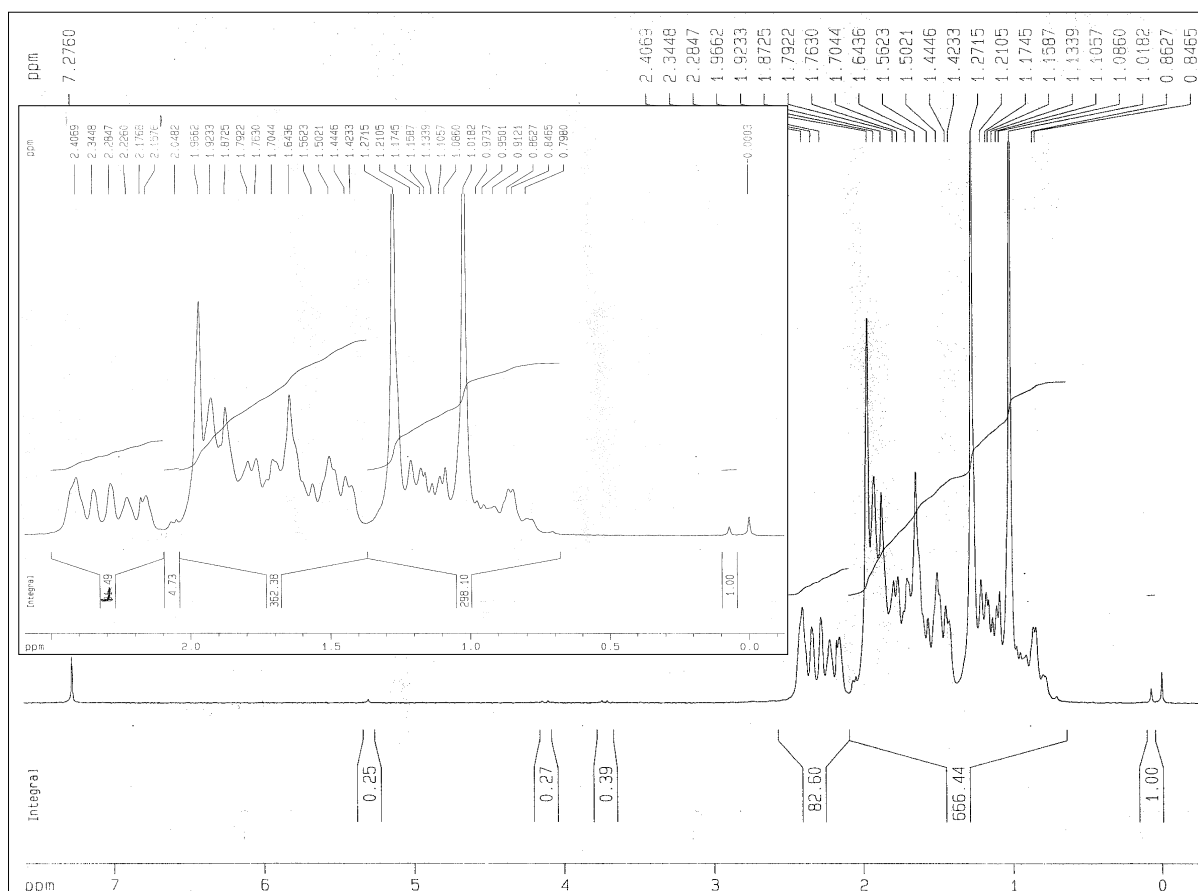


Figura 3.21 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**88**); (A) Seção expandida entre δ_H 0,0 e 2,5.

(A)

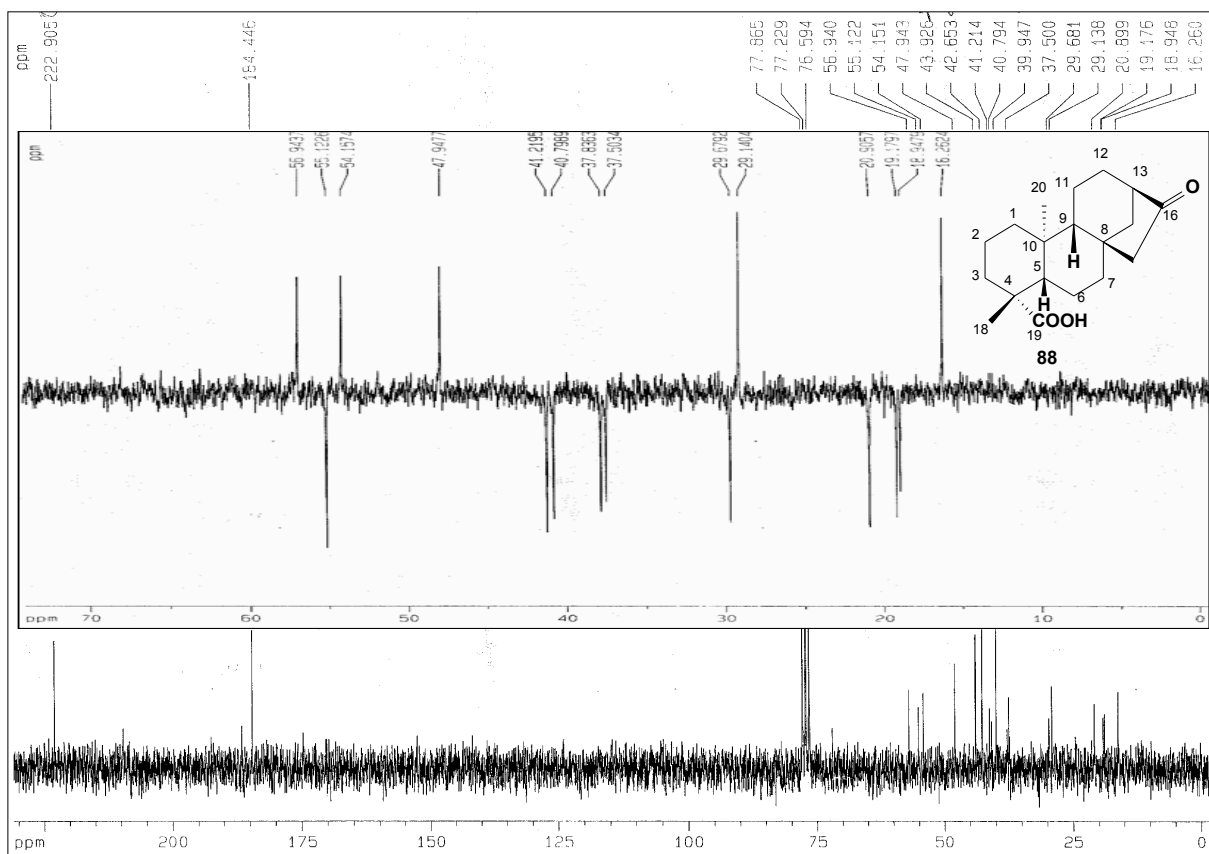


Figura 3.22 – Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) e **(A)** Subespectro de DEPT-135 (50 MHz, CDCl₃, δ) do ácido *ent*-16-oxo-17-nor-19-caurenóico (**88**).

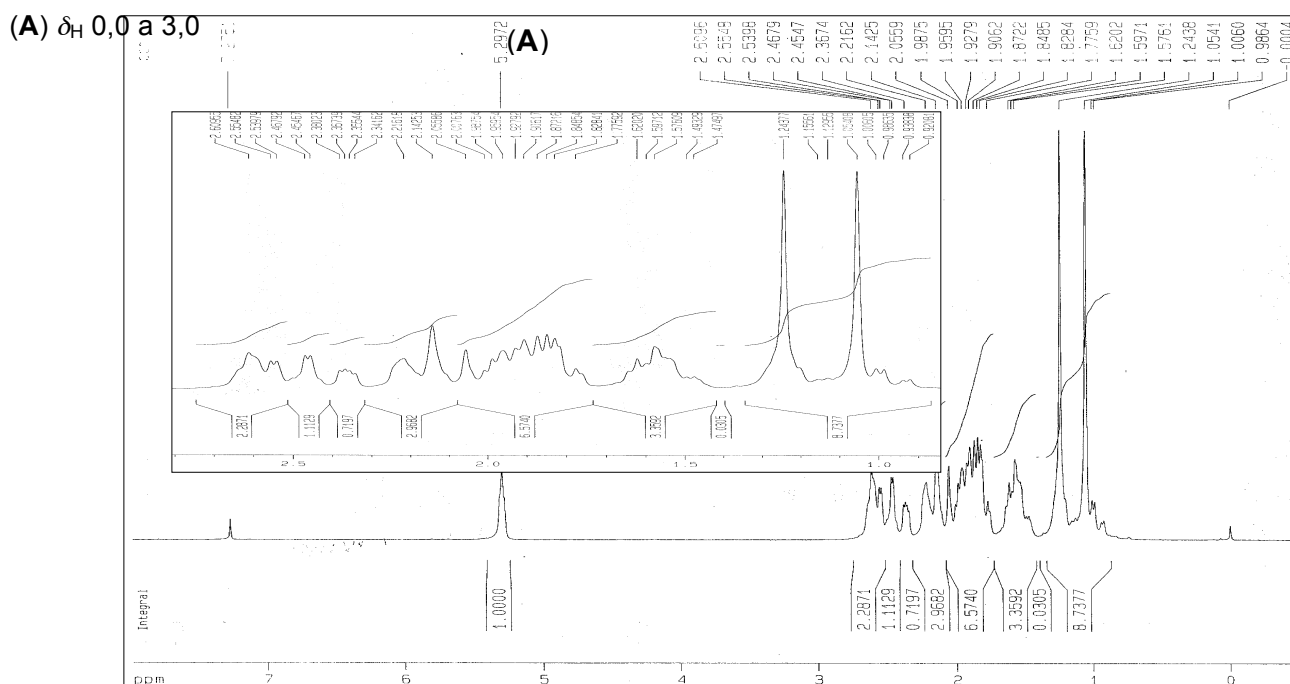


Figura 3.23 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (**89**); (A) Seção expandida entre δ_H 0,0 e 3,0.

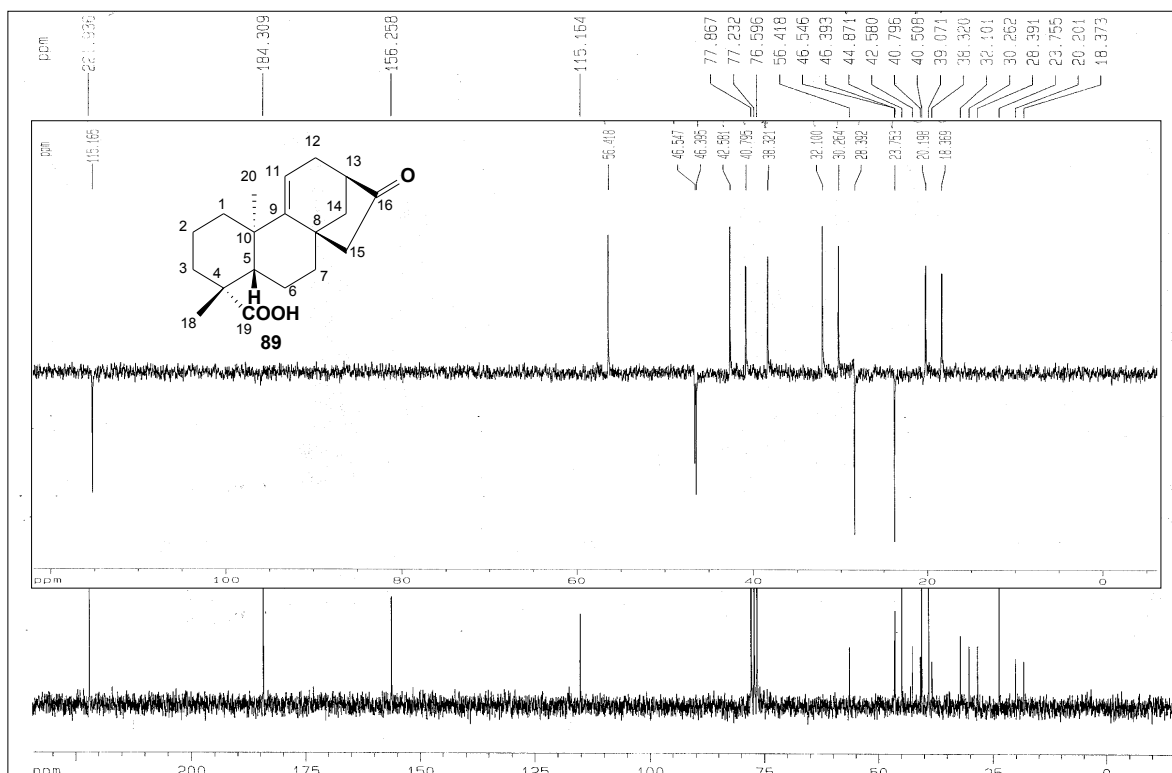


Figura 3.24 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) e (A) Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-16-oxo-17-norcaur-9(11)-en-19-óico (**89**).

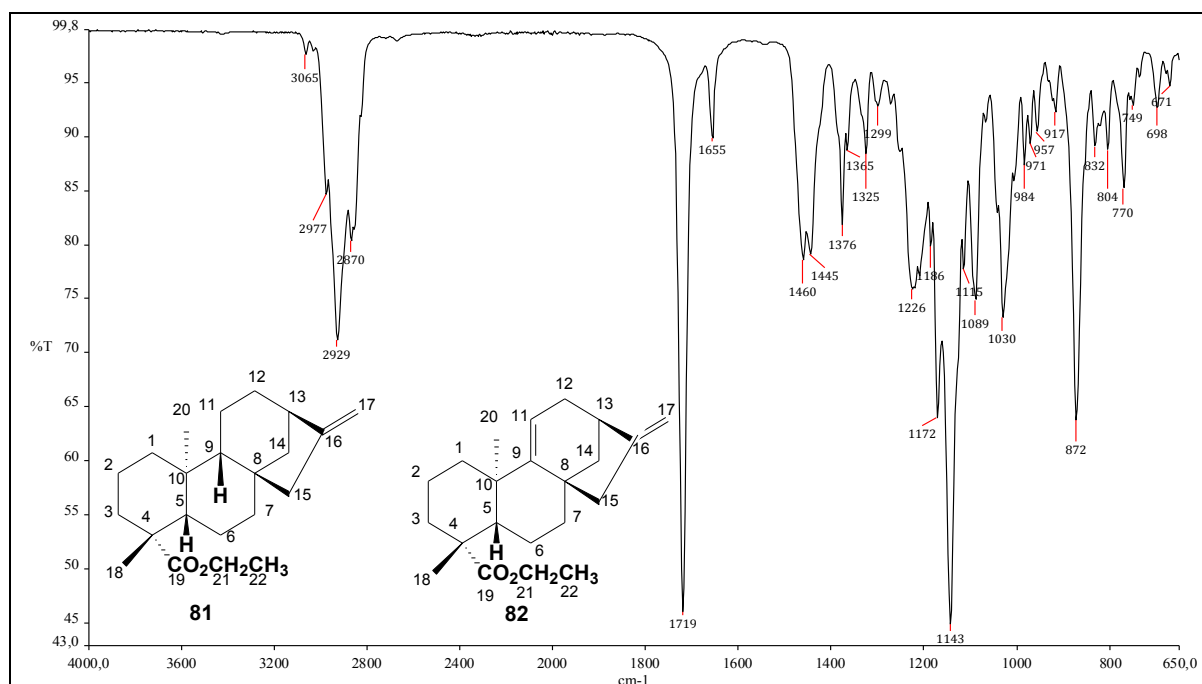


Figura 3.25 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) de *ent*-caur-16-en-19-oato de etila (**81**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (**82**).

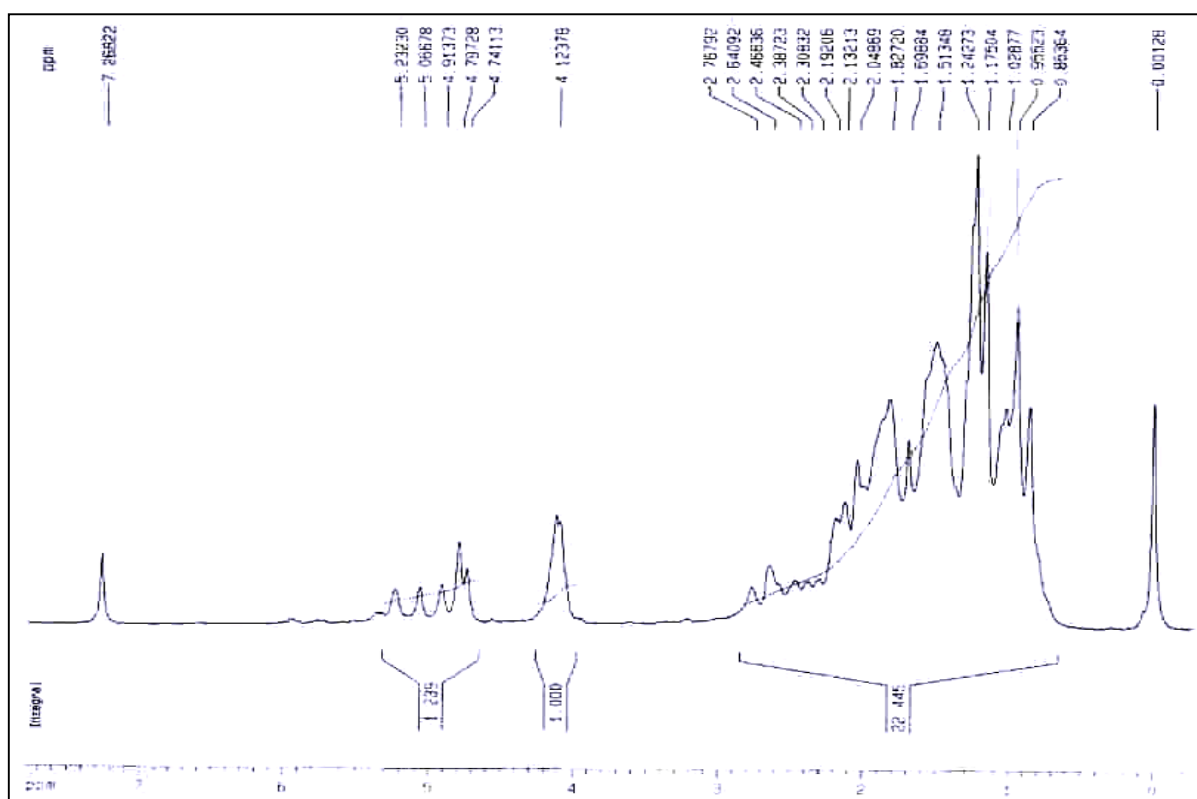


Figura 3.26 – Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) de *ent*-caur-16-en-19-oato de etila (**81**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (**82**).

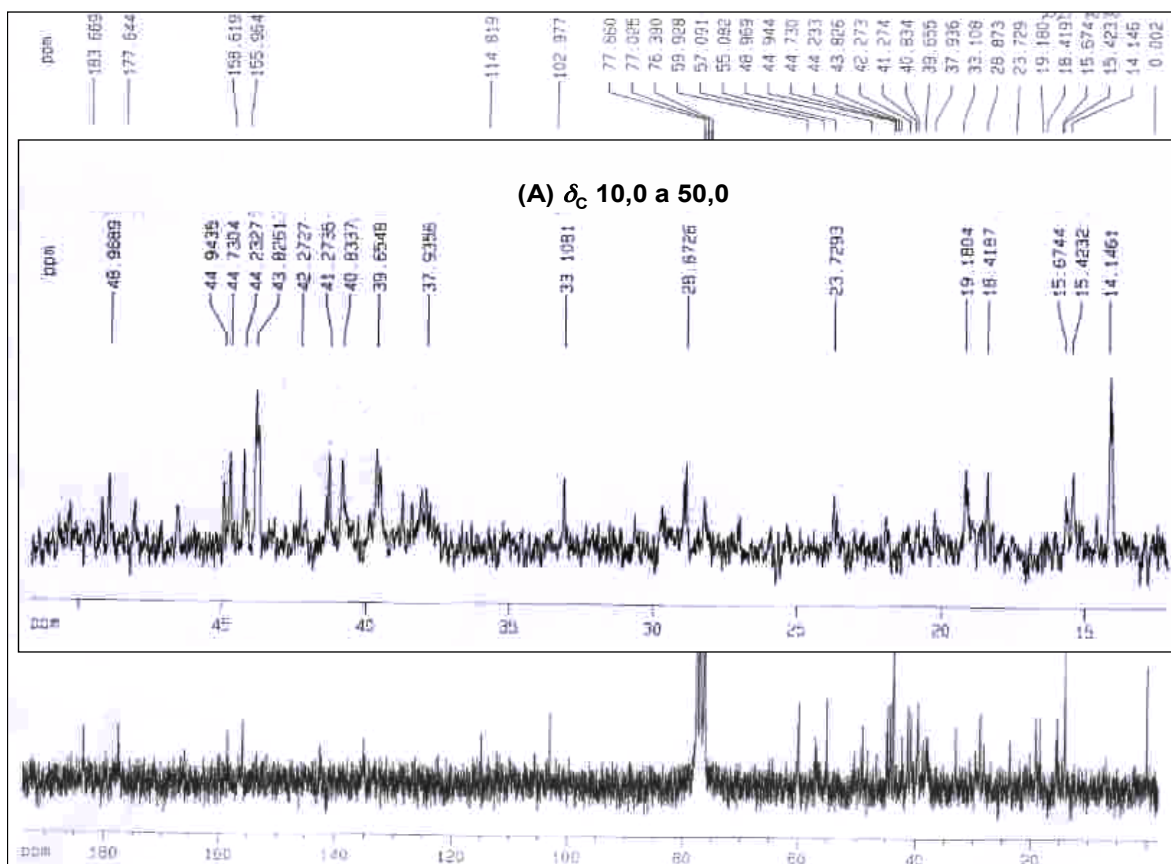


Figura 3.27 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) de *ent*-caur-16-en-19-oato de etila (**81**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (**82**). (A) seção expandida entre δ_c 10 e 50.

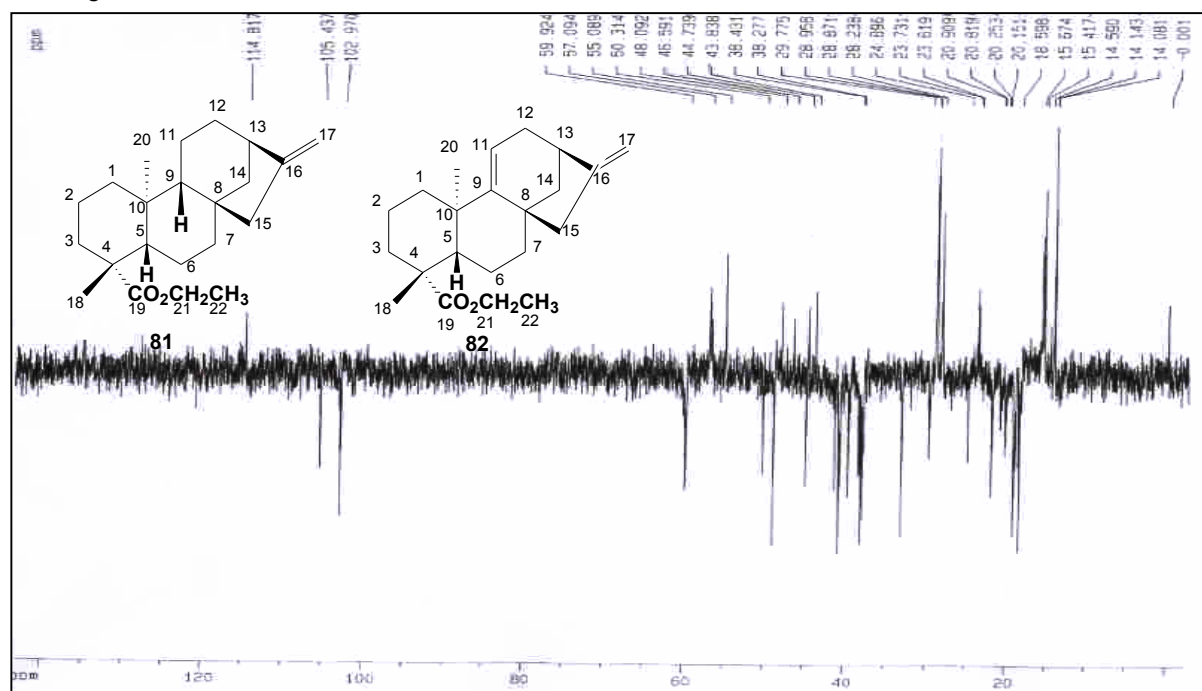


Figura 3.28 – Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) de *ent*-caur-16-en-19-oato de etila (**81**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (**82**).

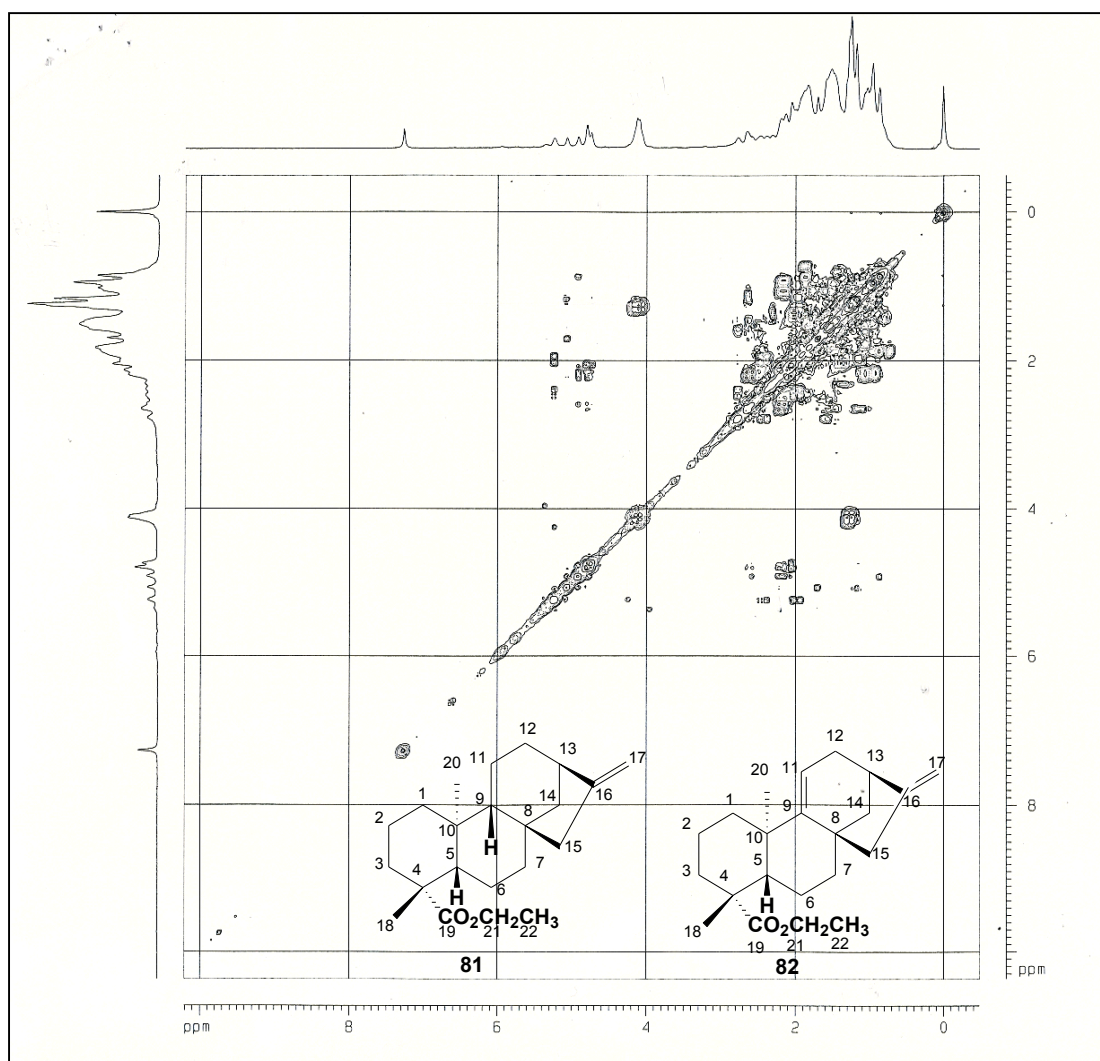


Figura 3.29 – Mapa de contornos COSY (200 MHz, CDCl₃, δ) de *ent*-caur-16-en-19-oato de etila (**81**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (**82**).

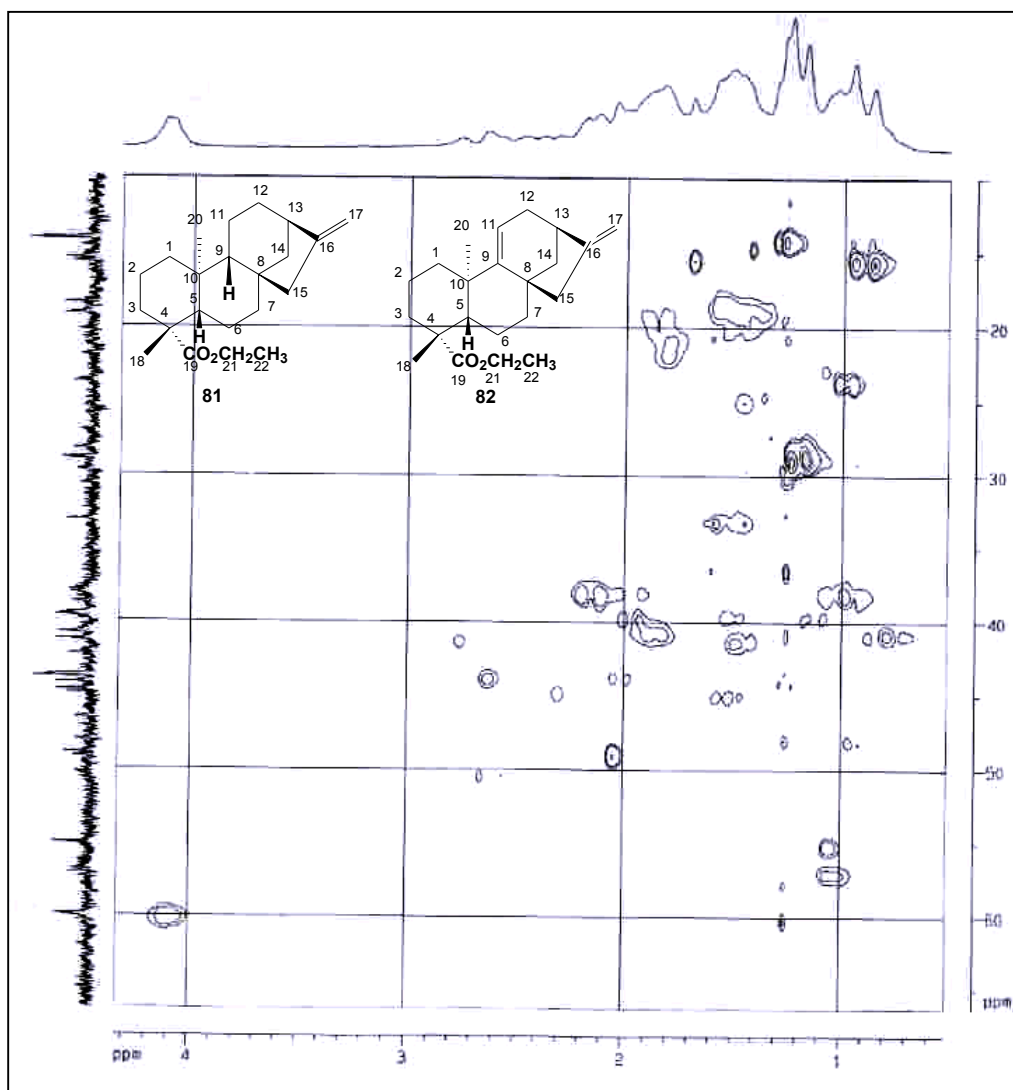


Figura 3.30 – Mapa de contornos HSQC (200 MHz, CDCl₃, δ) de *ent*-caur-16-en-19-oato de etila (**81**) e *ent*-caur-9(11),16-dien-19-oato de etila (**82**).

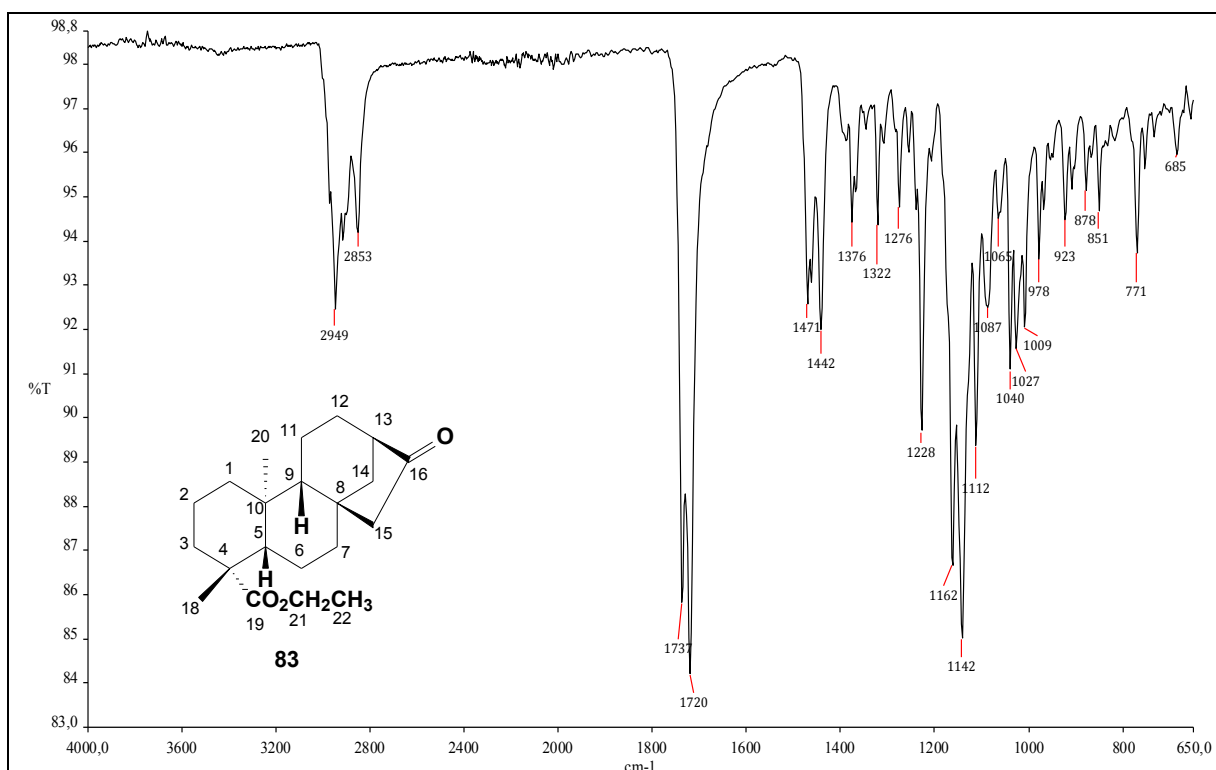


Figura 3.31 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) de *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**).

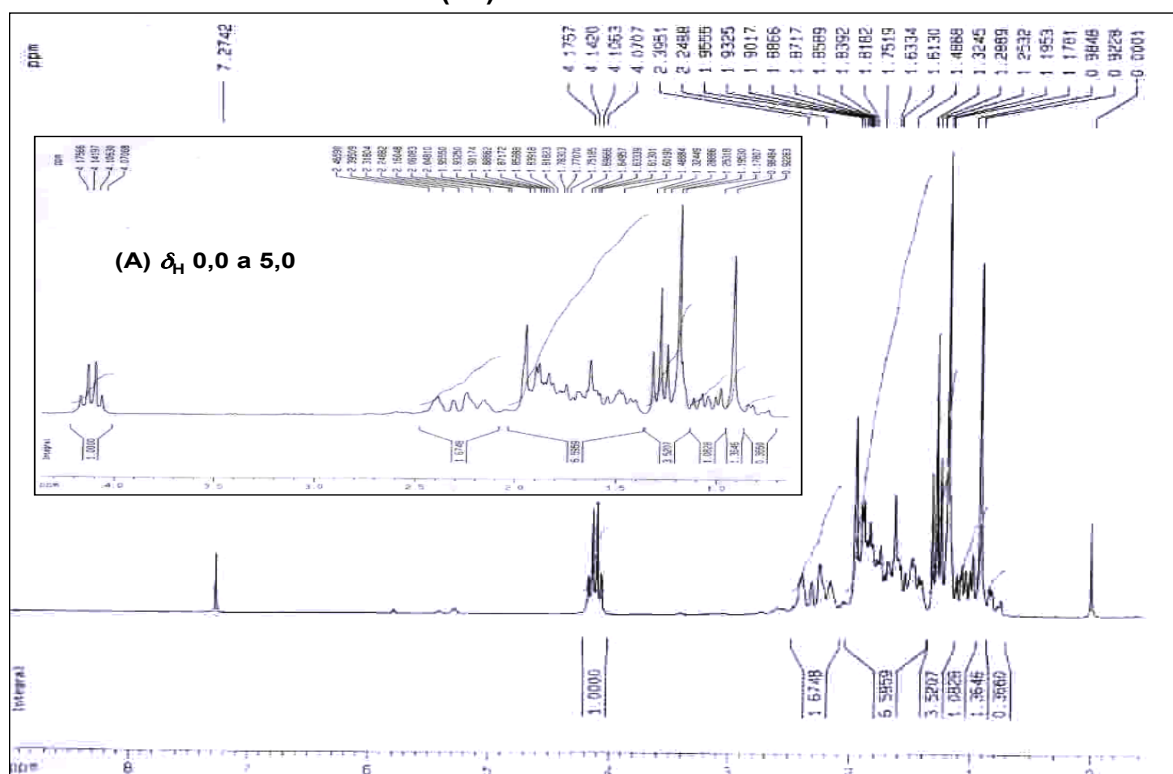


Figura 3.32 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) de *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**); (A) Seção expandida entre δ_{H} 0,0 e 5,0.

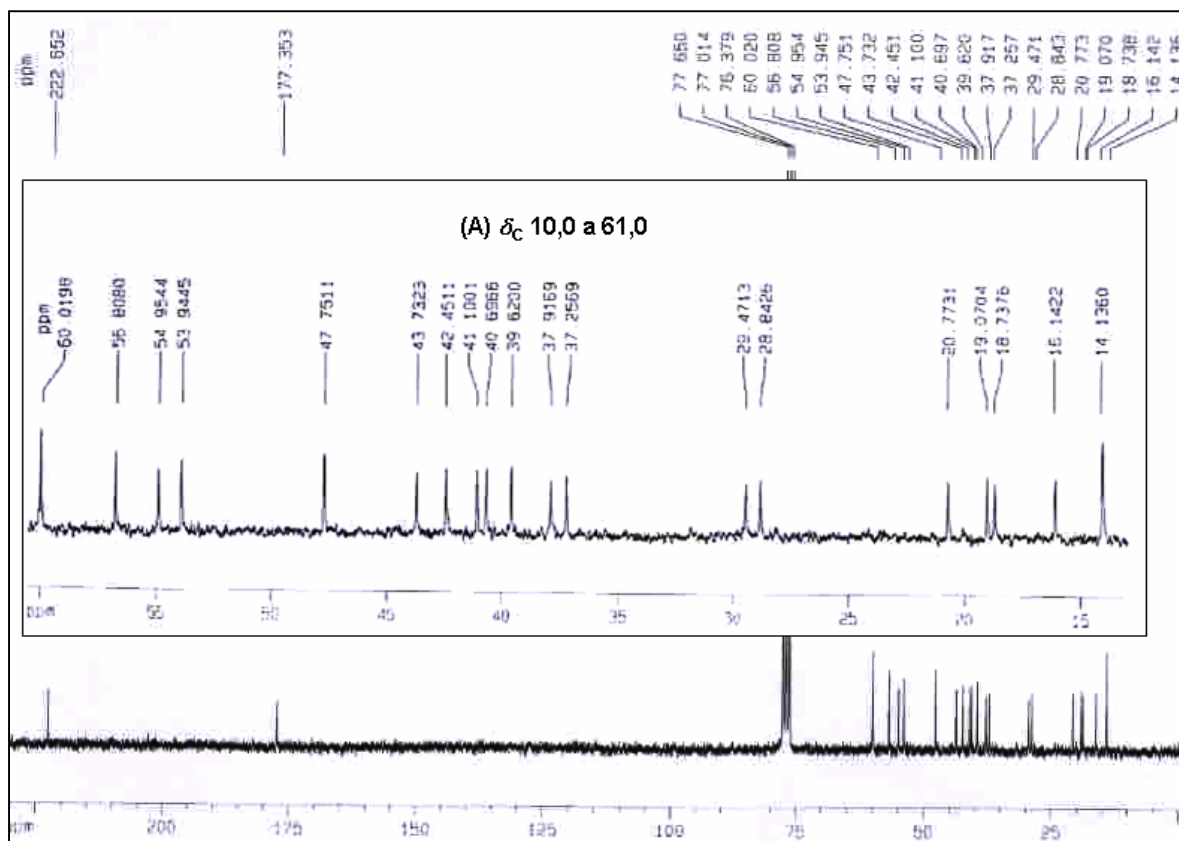


Figura 3.33 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**); (A) Seção expandida entre δ_{C} 10,0 e 61,0.

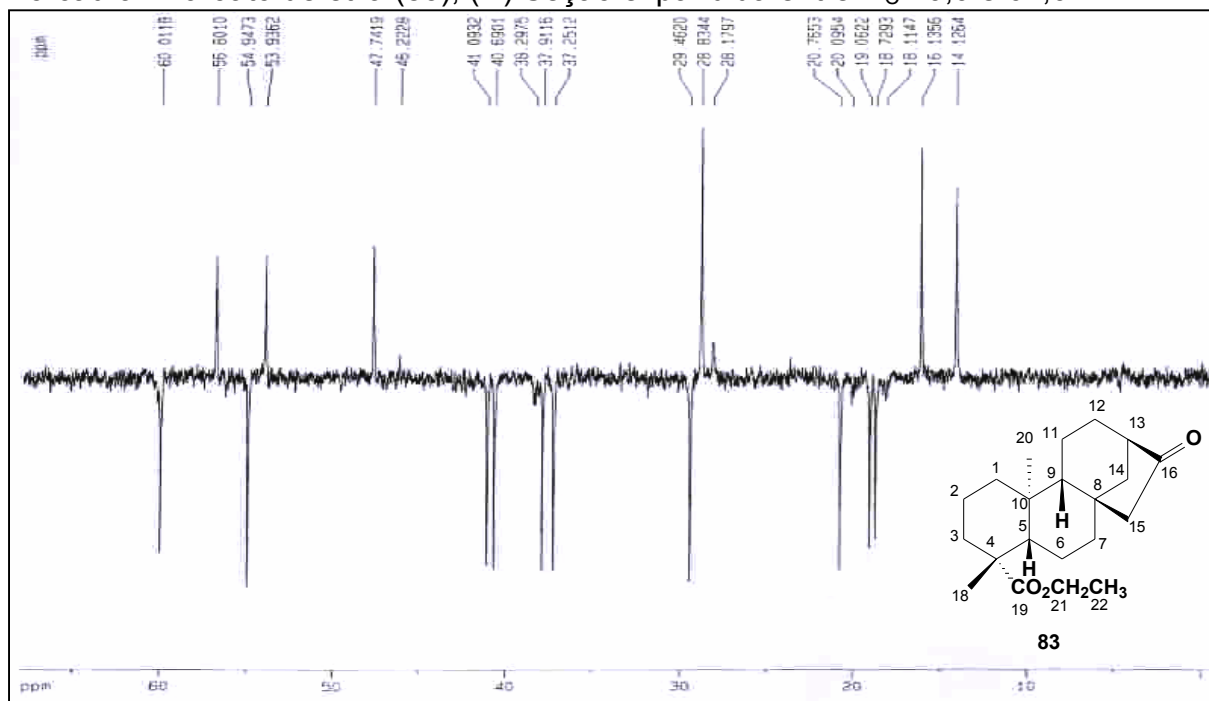


Figura 3.34 - Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) de *ent*-16-oxo-17-norcauran-19-oato de etila (**83**).

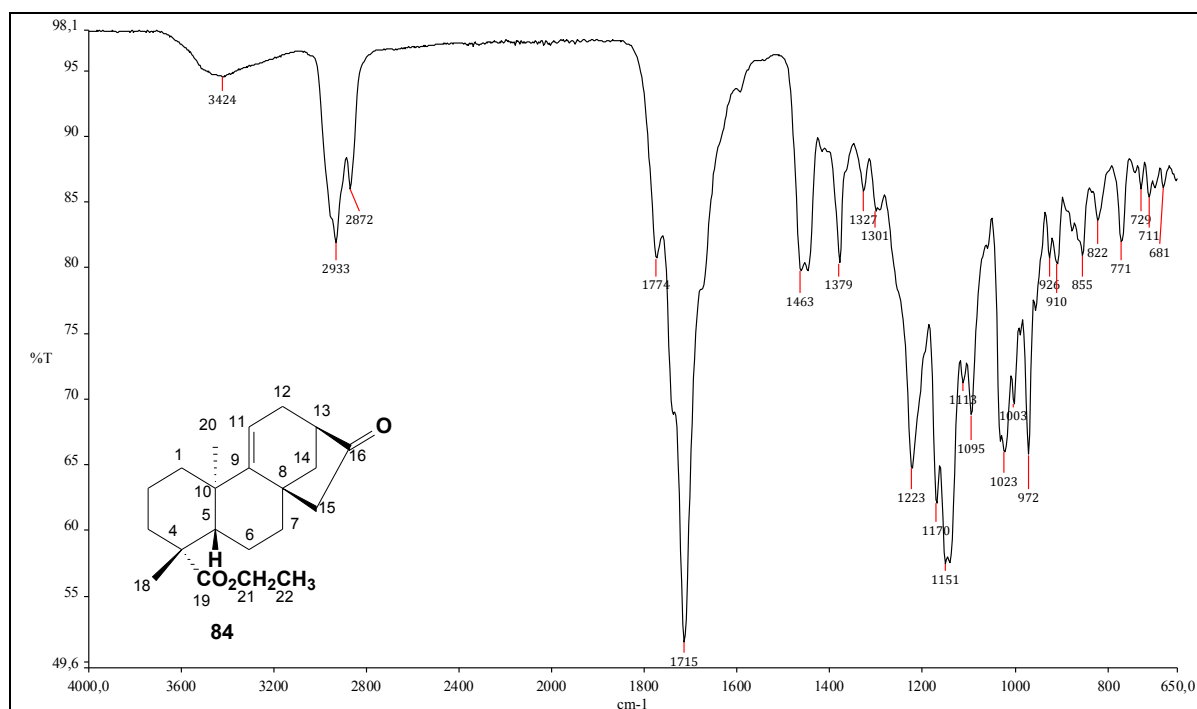


Figura 3.35 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) de *ent*-16-oxo-17-norcauran-9(11)-en-19-oato de etila (**84**).

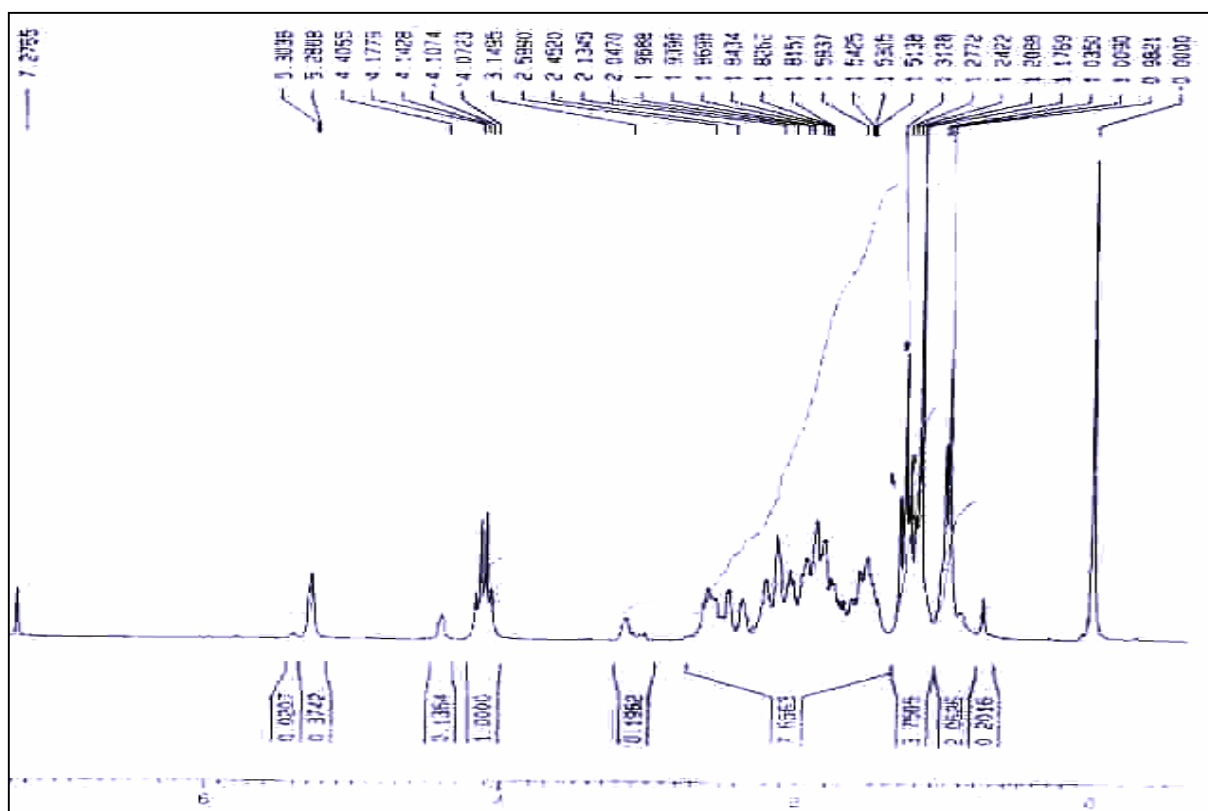


Figura 3.36 – Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ) de *ent*-16-oxo-17-norcauran-9(11)-en-19-oato de etila (**84**).

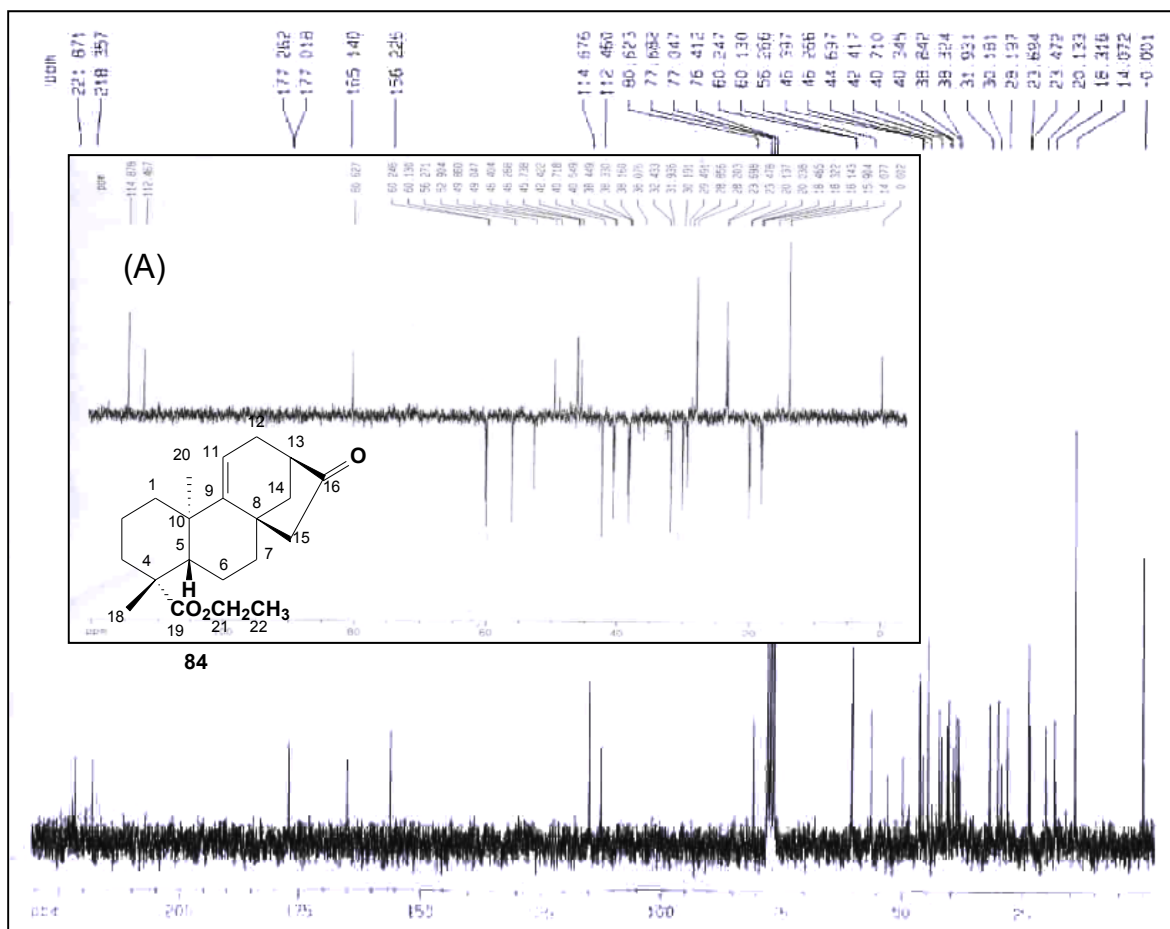


Figura 3.37 - Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) e (A) Subespectro DEPT-135 (50 MHz, CDCl_3 , δ) de *ent*-16-oxo-17-norcauran-9(11)-en-19-oato de etila (**84**).

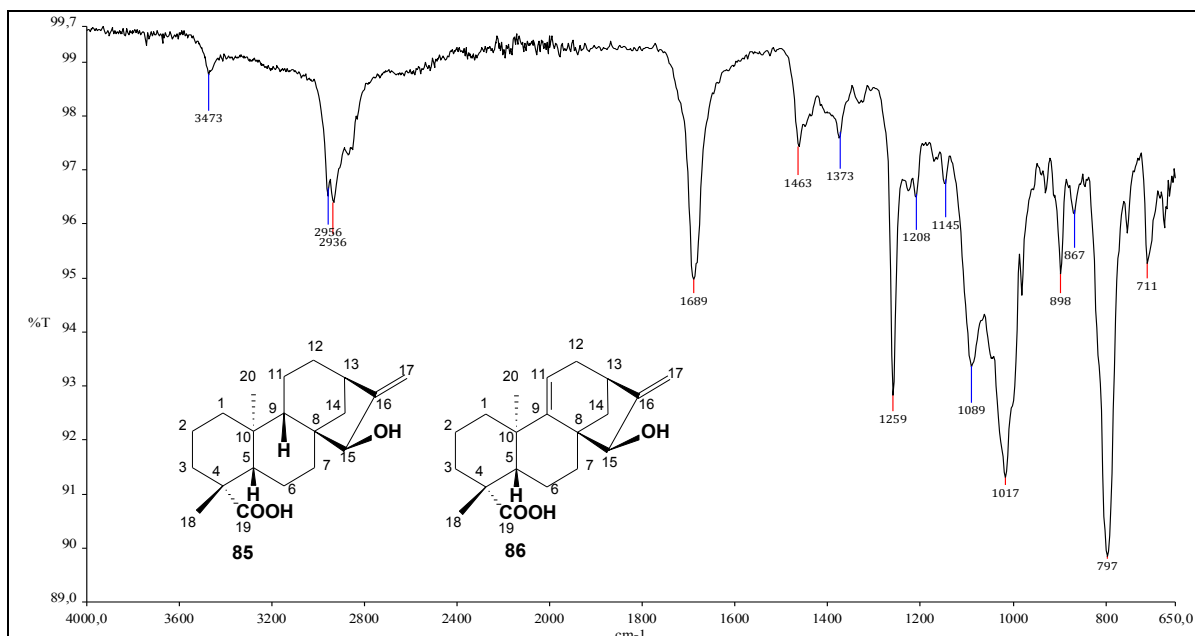


Figura 3.38 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**).

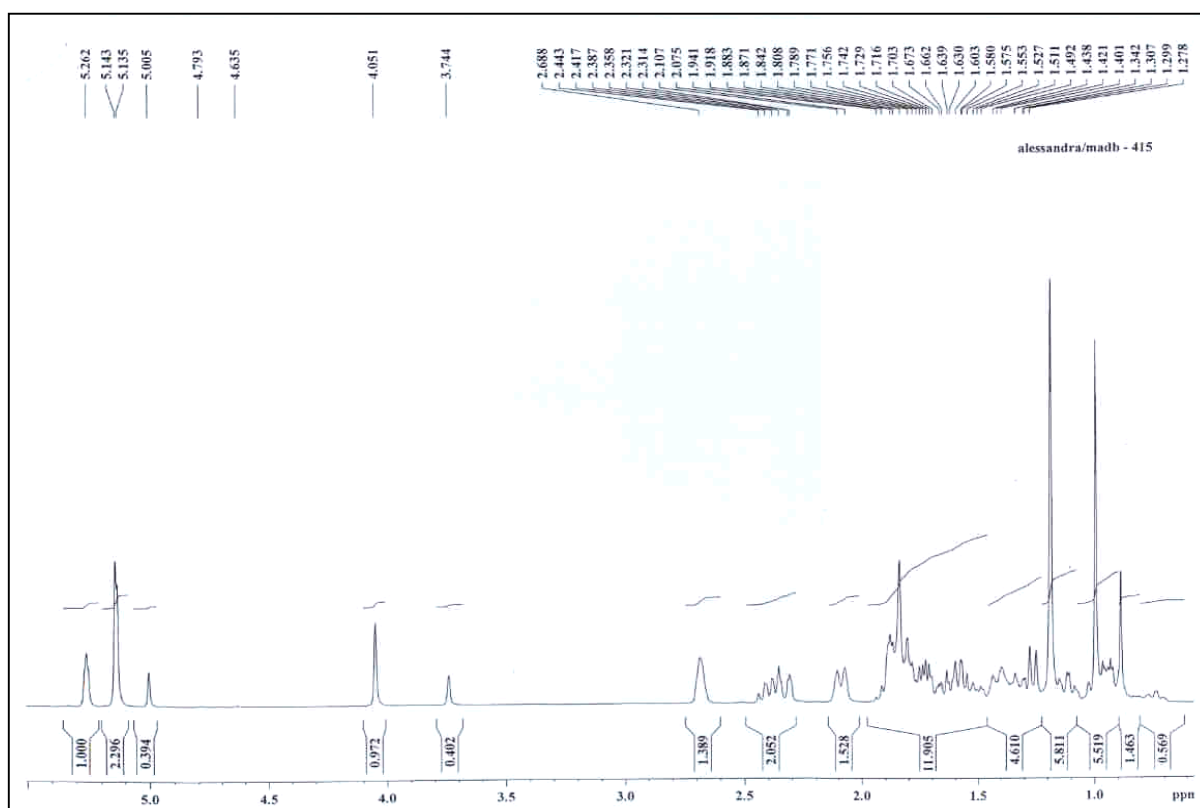


Figura 3.39 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**).

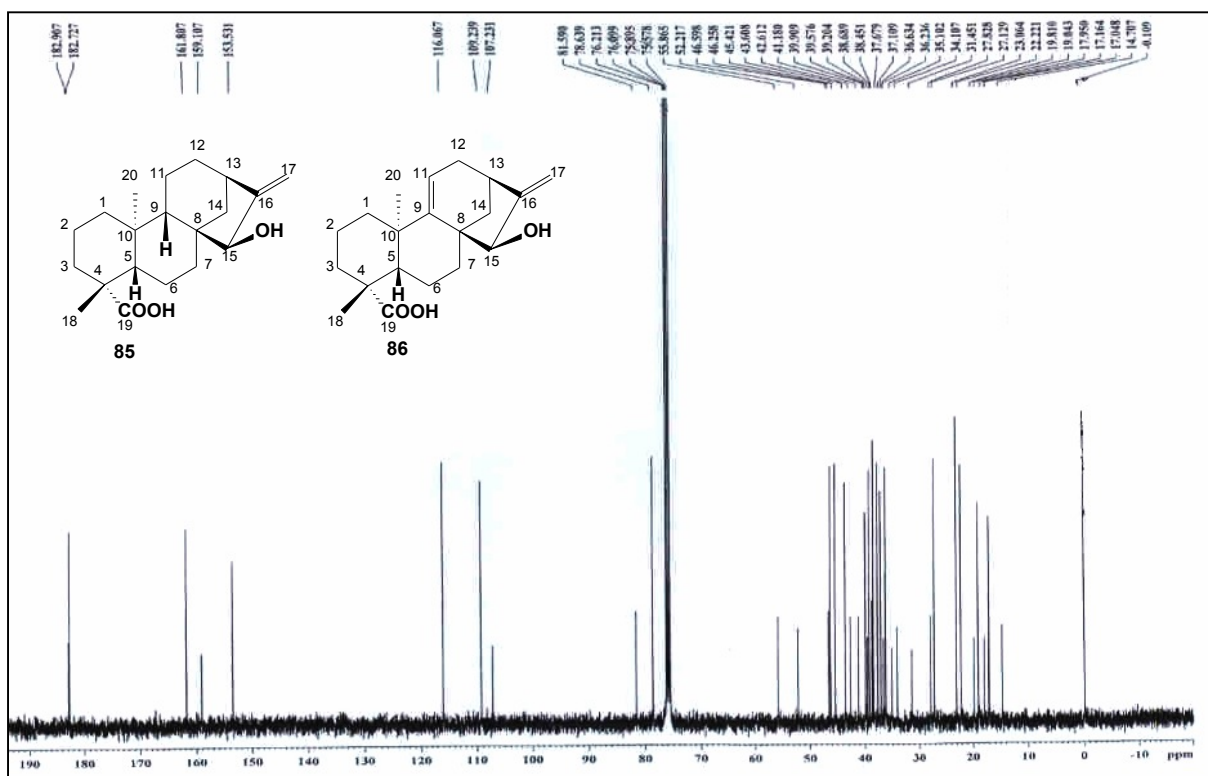


Figura 3.40 – Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**).

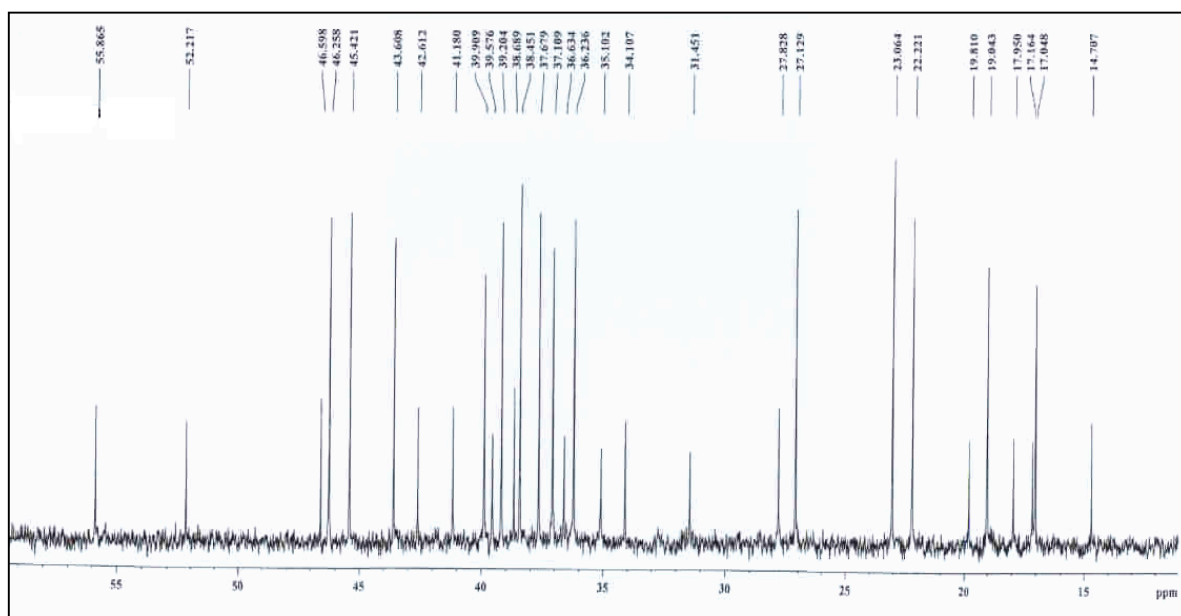


Figura 3.41 – Seção expandida entre δ_{C} 10 e 60 do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ) dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**).

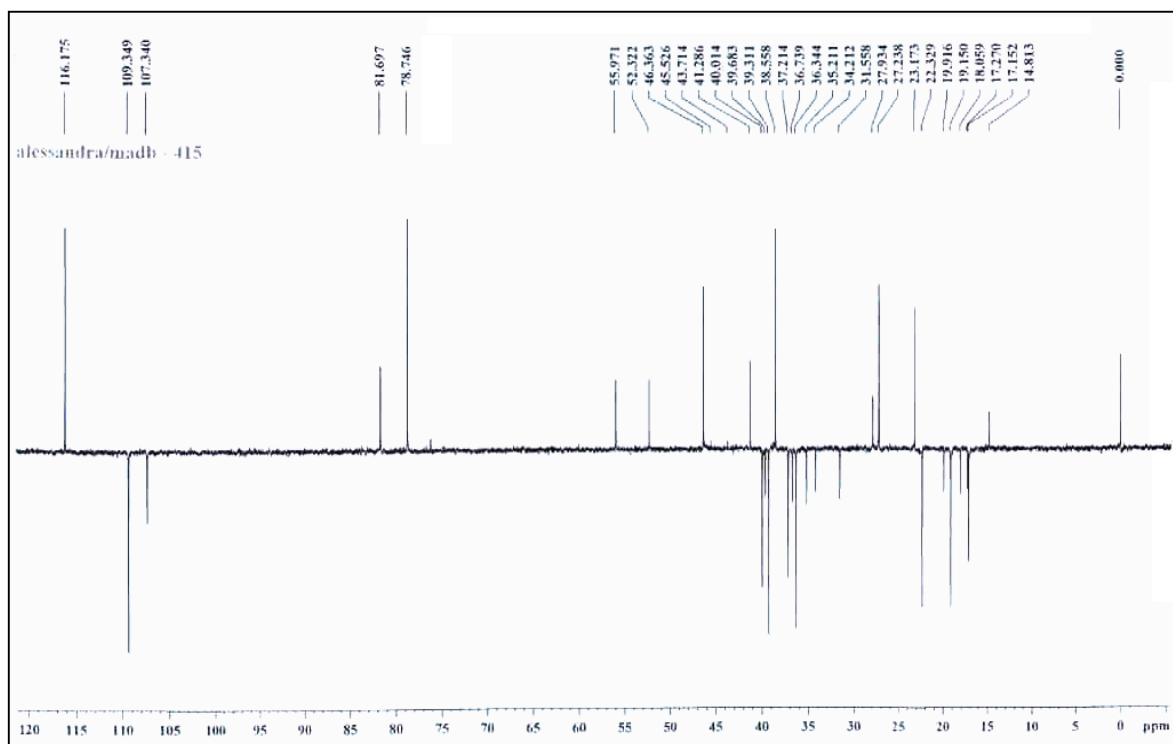


Figura 3.42 – Subespectro DEPT- 135 (50 MHz, CDCl₃, δ) dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**).

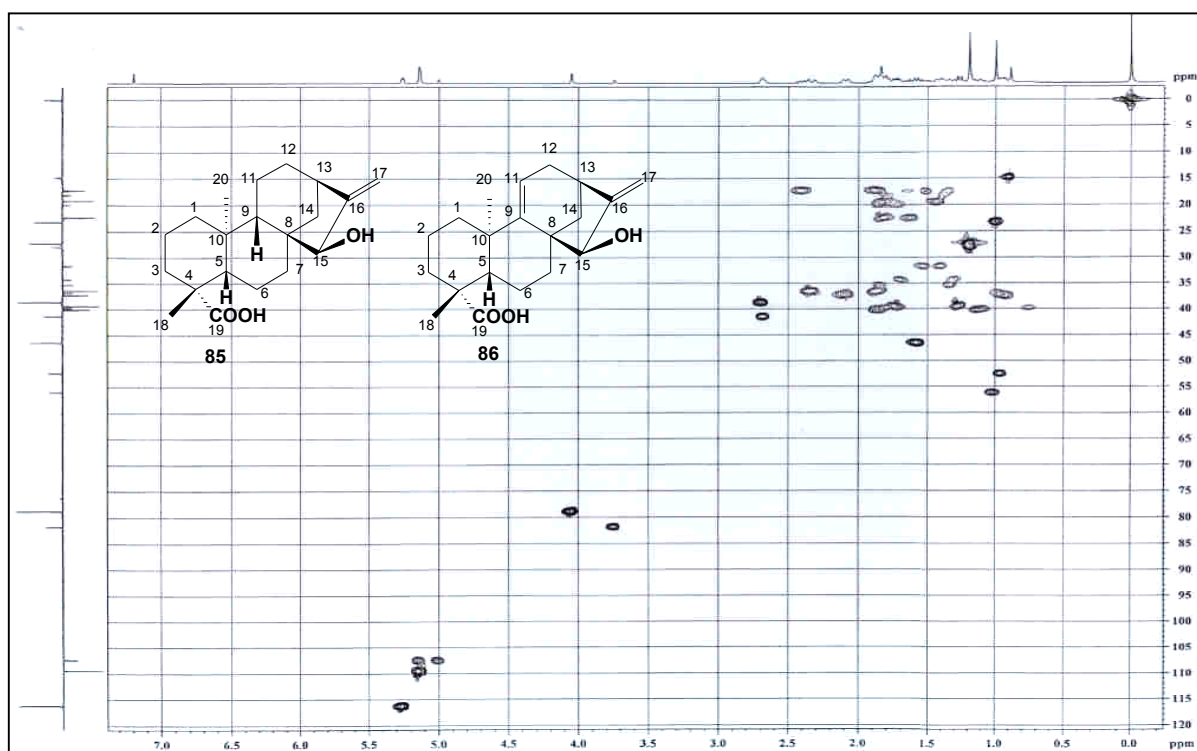


Figura 3.43 – Mapa de contornos HSQC (200 MHz, CDCl₃, δ) dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**).

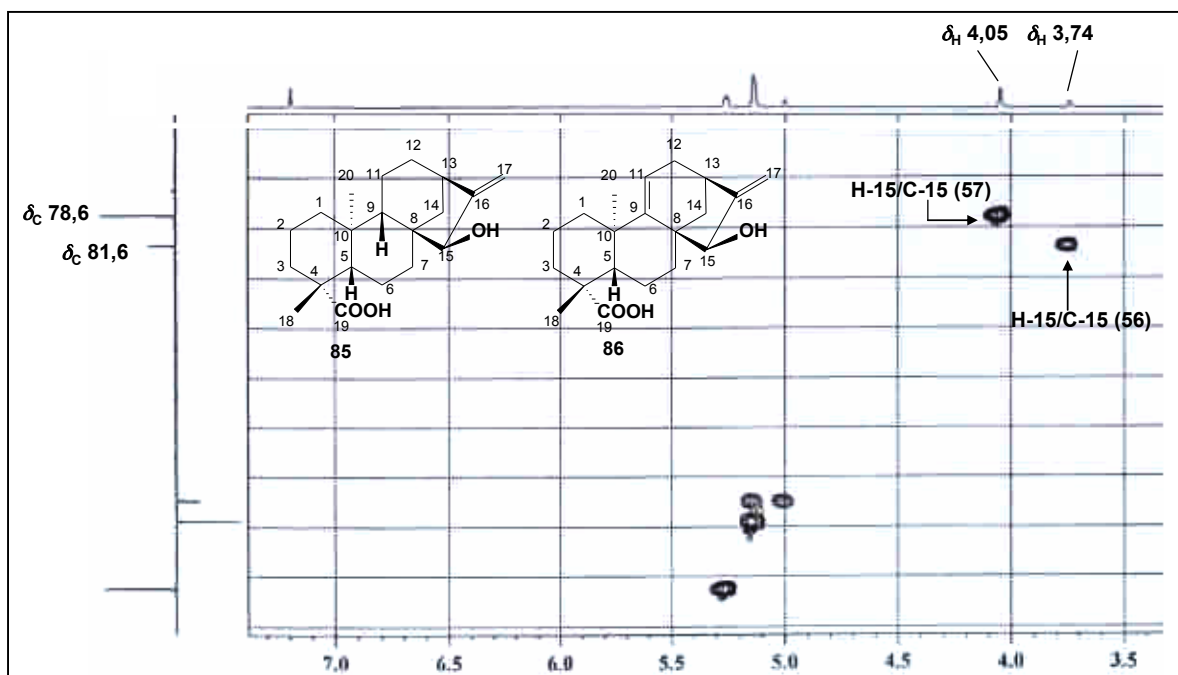


Figura 3.44 – Mapa de contornos HSQC (200 MHz, CDCl_3 , δ) dos ácidos *ent*-15 α -hidroxi-caur-16-en-19-óico (**85**) e *ent*-15 α -hidroxi-caur-9(11),16-dien-19-óico (**86**): seção expandida entre δ_{H} 3,5 e 7,5 e δ_{C} 75 a 120.

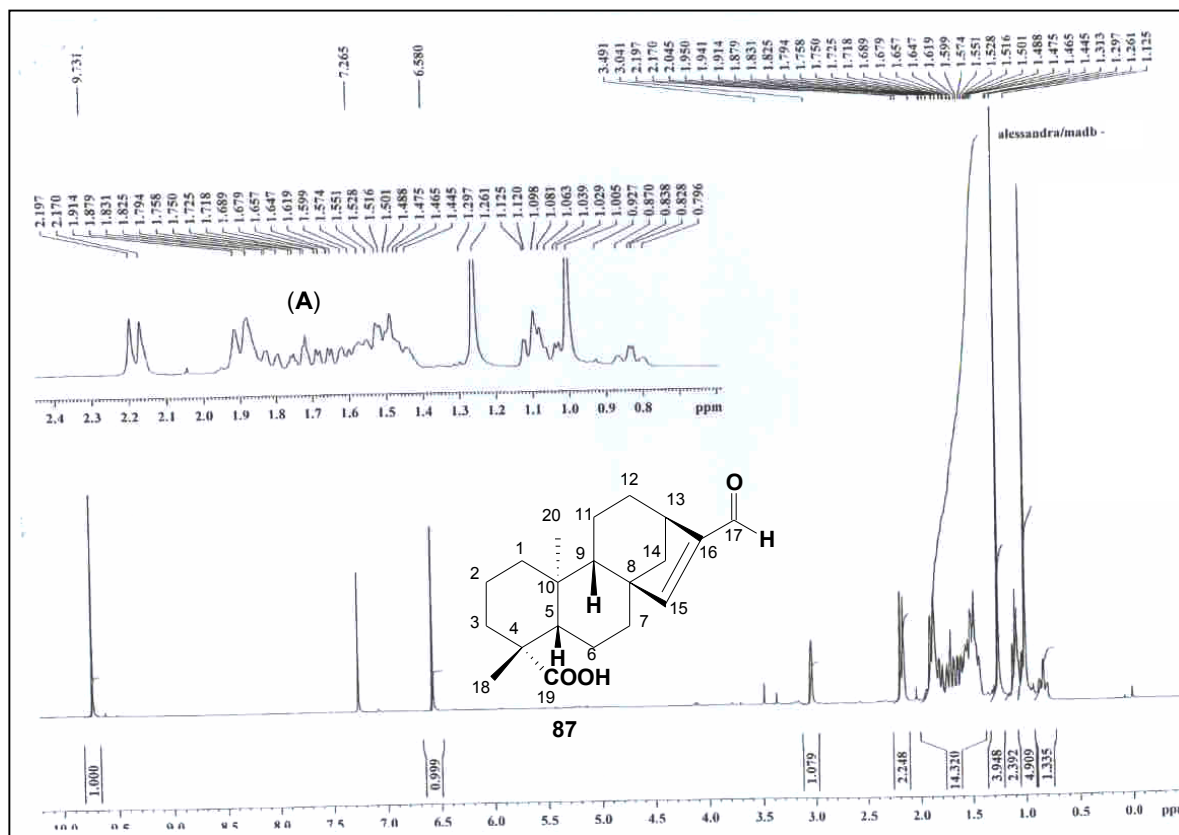


Figura 3.45 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-16-formil-caur-15-en-19-óico (**87**). (A) Seção expandida entre δ_{H} 0,6 – 2,4.

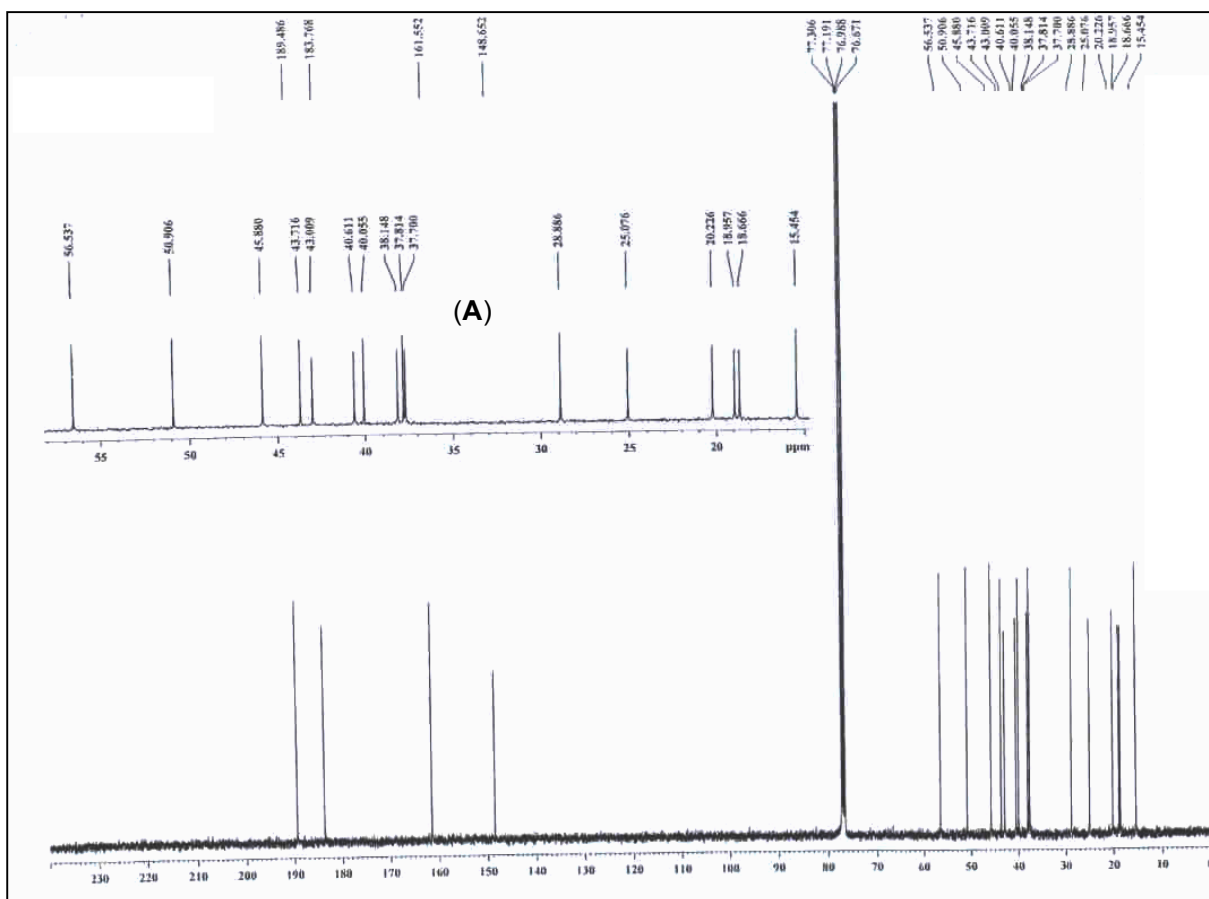
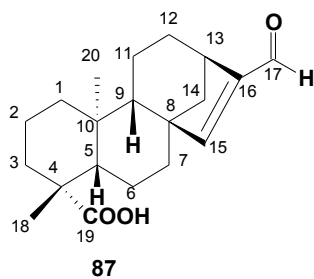


Figura 3.46 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-16-formilcaur-15-en-19-óico (**87**). (A) Seção expandida entre δ_{C} 15 – 60.



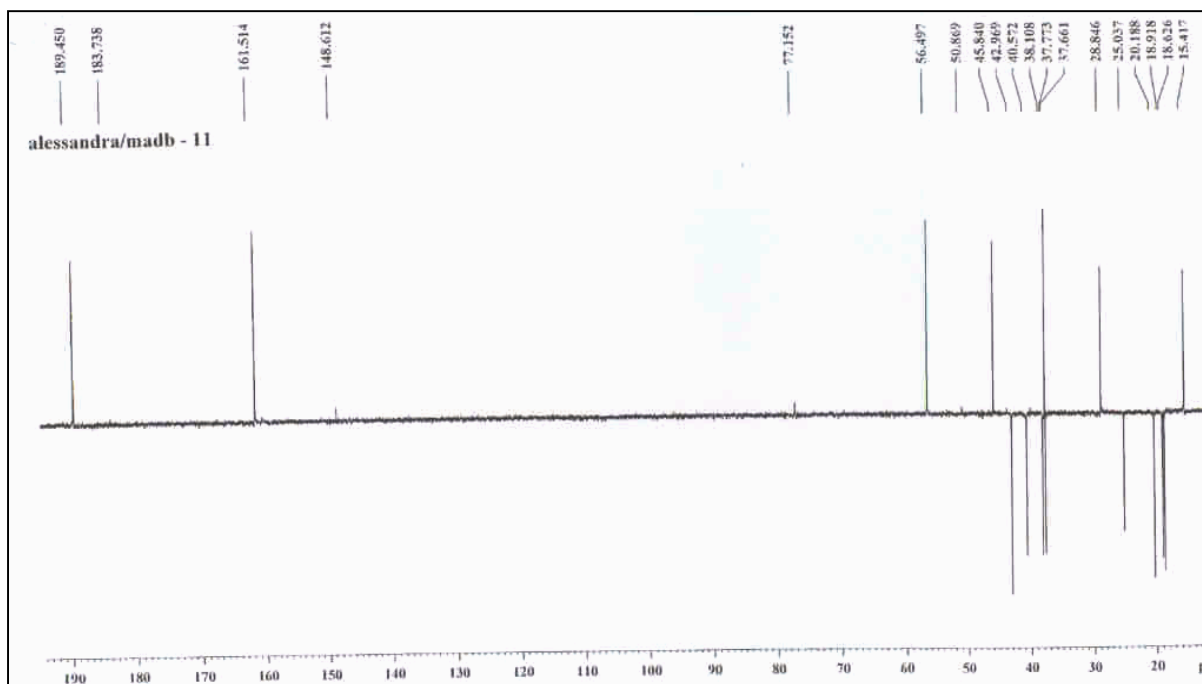


Figura 3.47 – Subespectro DEPT- 135 (100 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-16-formilcaur-15-en-19-óico (**87**).

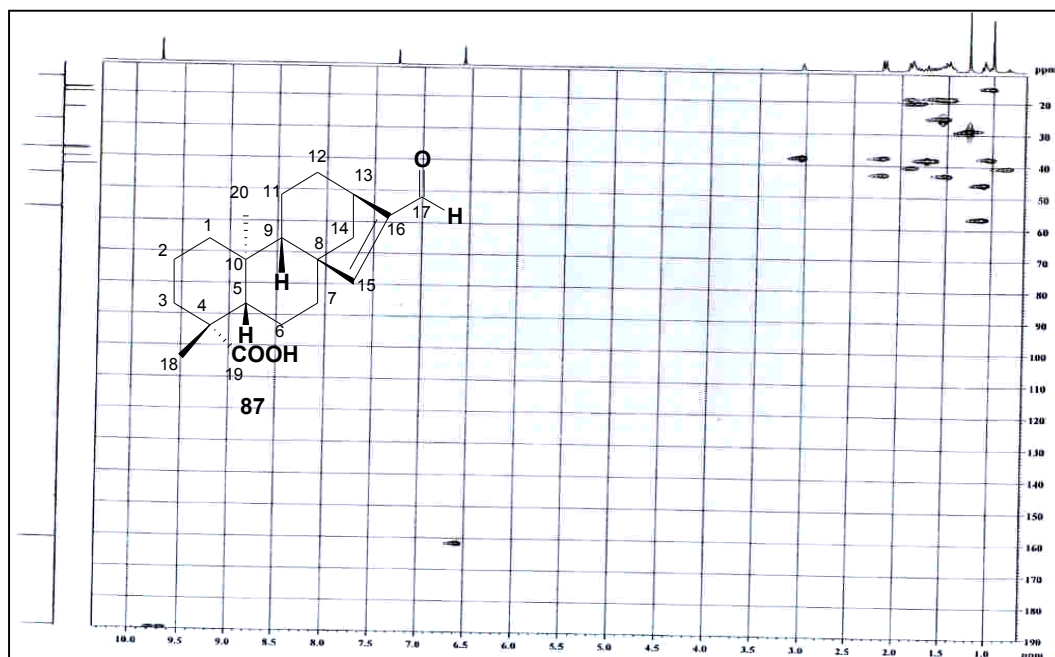


Figura 3.48 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-16-formilcaur-15-en-19-óico (**87**).

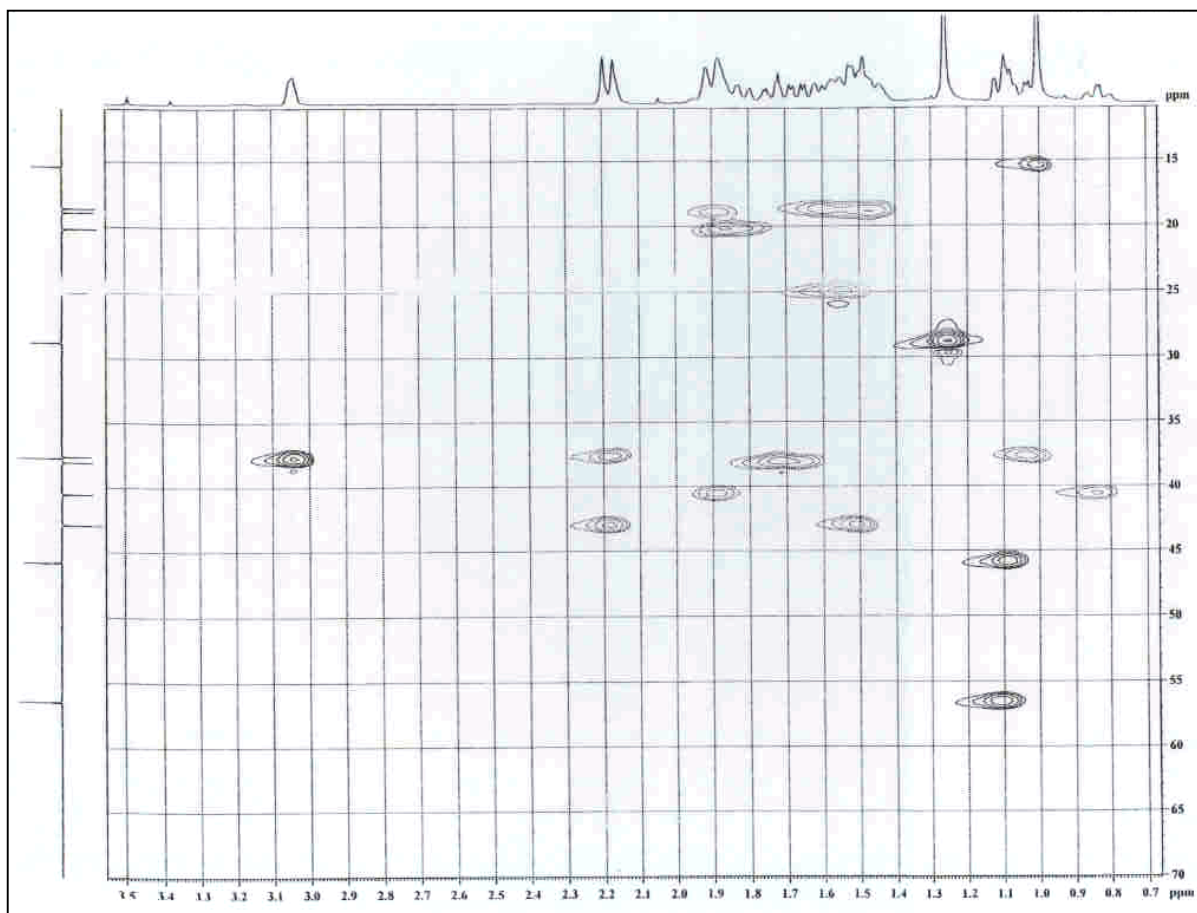


Figura 3.49 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do ácido *ent*-16-formil-caur-15-en-19-óico (**87**): seção expandida entre δ_C 10 – 70 e δ_H 0,7 – 3,5.

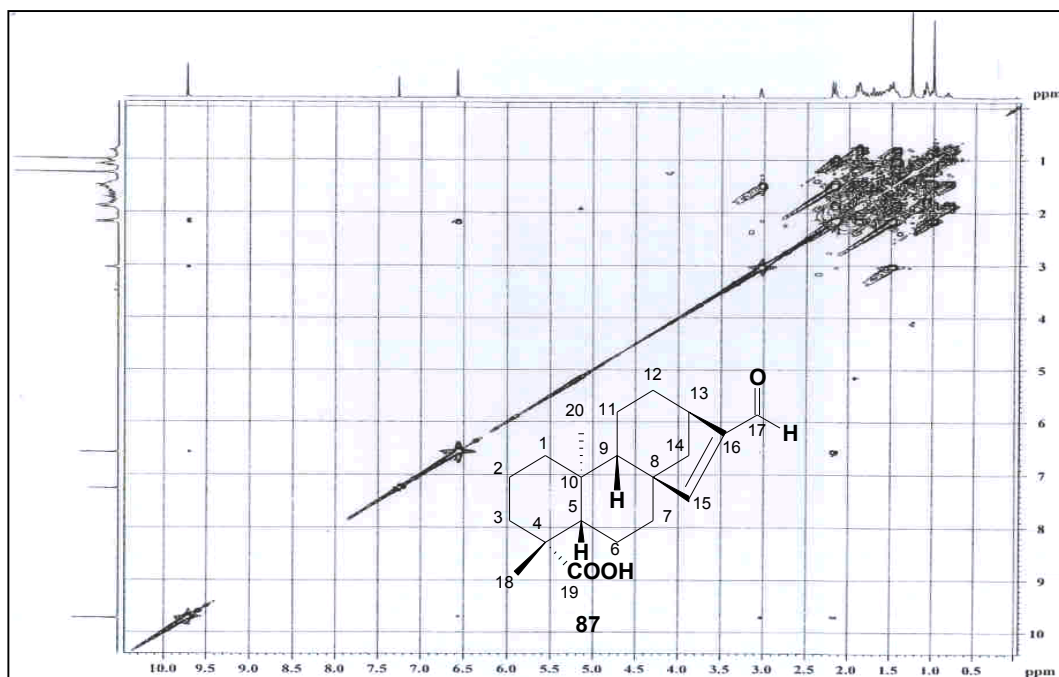


Figura 3.50 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do ácido *ent*-16-formil-caur-15-en-19-óico (**87**).

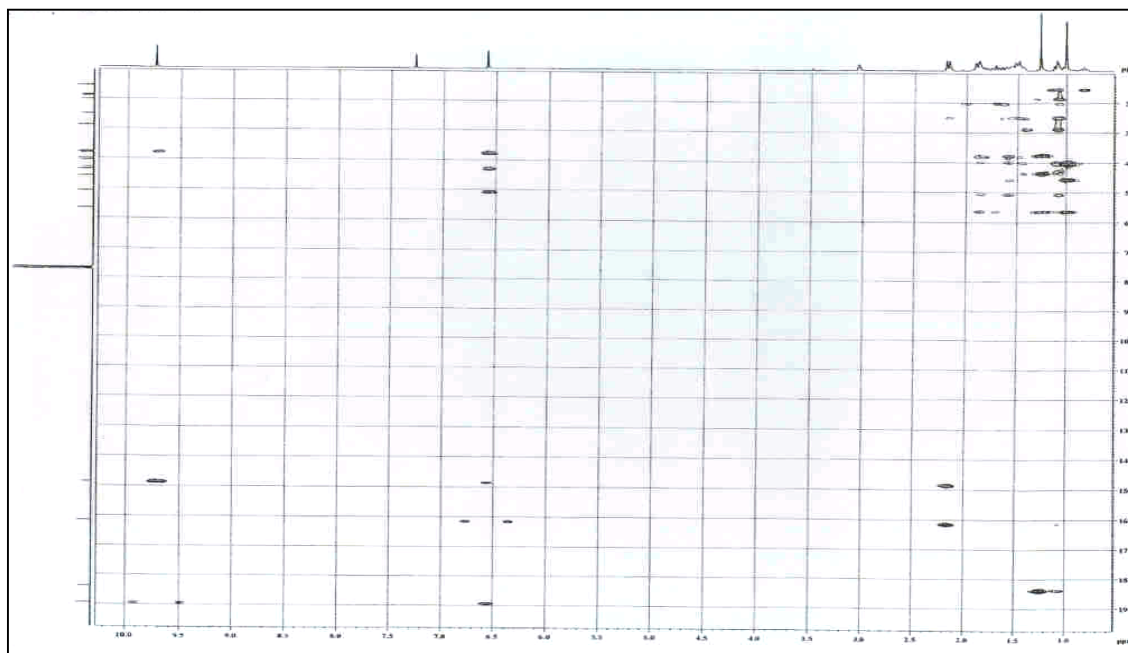


Figura 3.51 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do do ácido *ent*-16-formil-caur-15-en-19-óico (**87**).

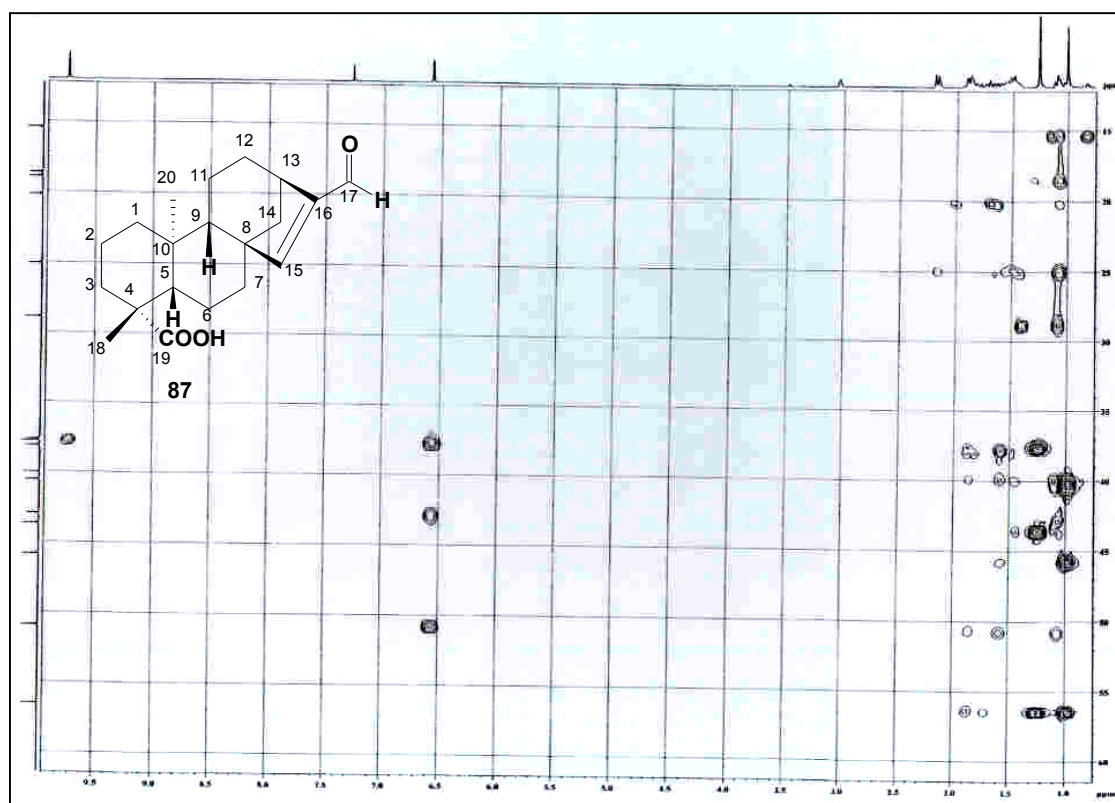


Figura 3.52 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-16-formil-caur-15-en-19-óico (**87**): seção expandida entre δ_H 0,5 - 3,5.

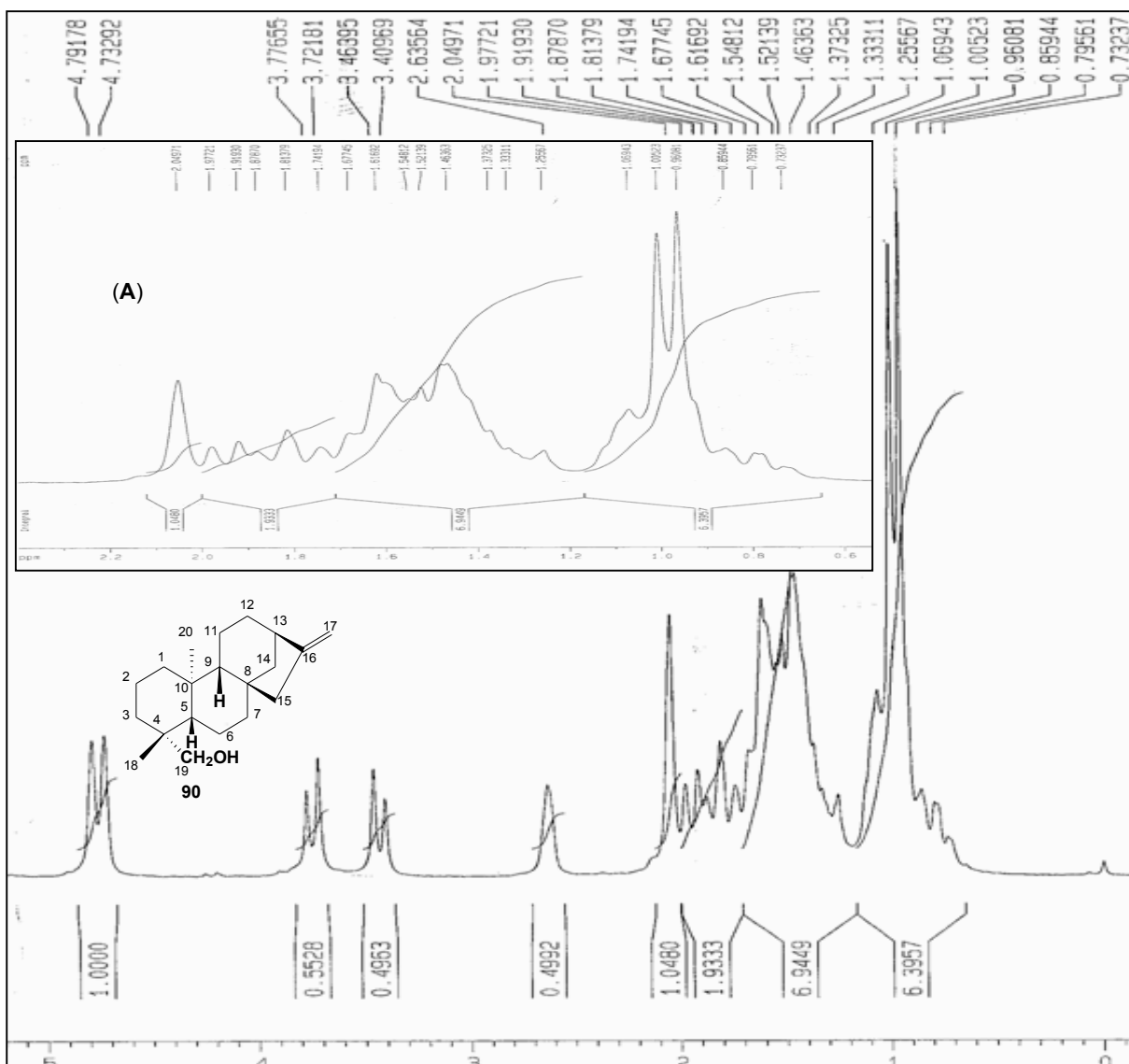


Figura 3.53 – Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ) do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**). (A) Seção expandida entre δ_{H} 0,6 e 2,3.

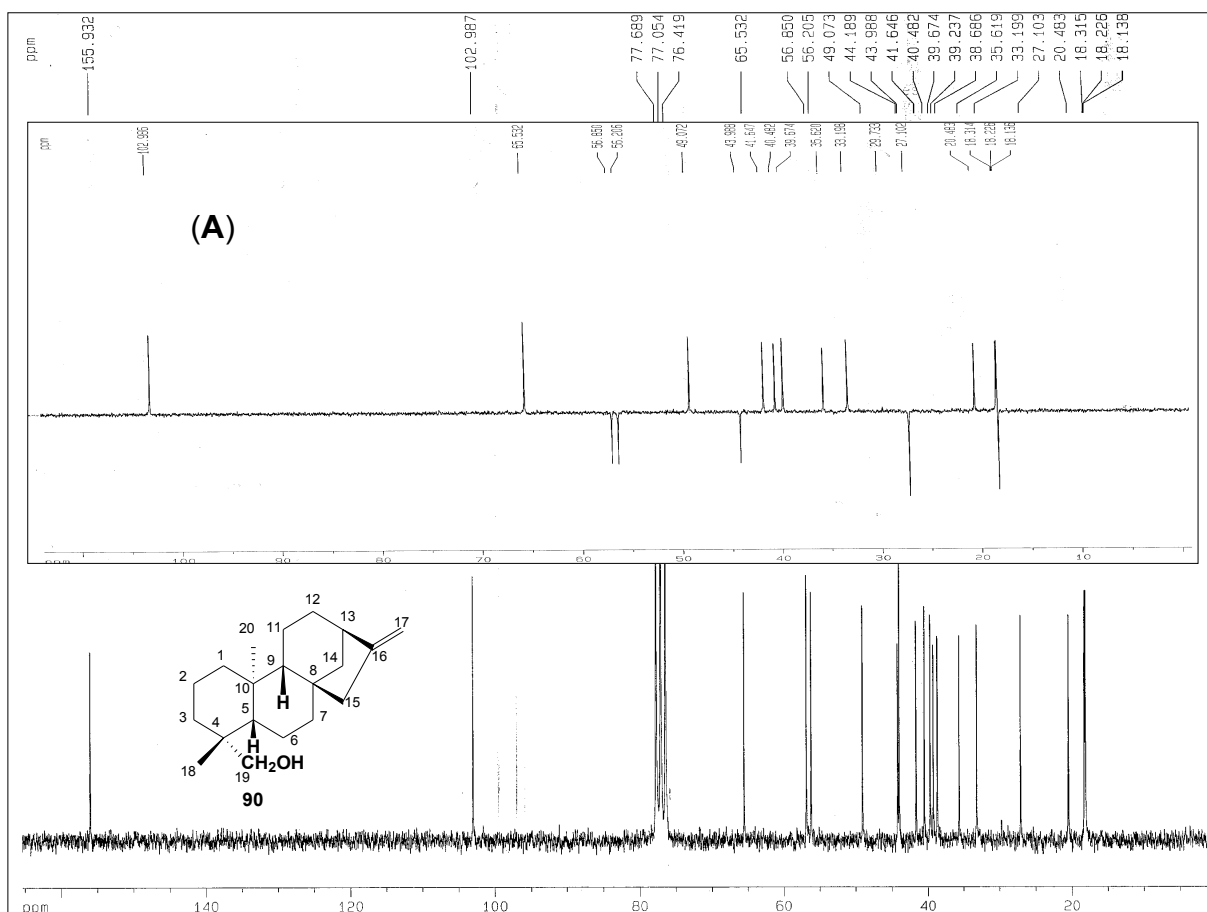


Figura 3.54 – Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃, δ) e (A) subspectro DEPT-135 do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (**90**).

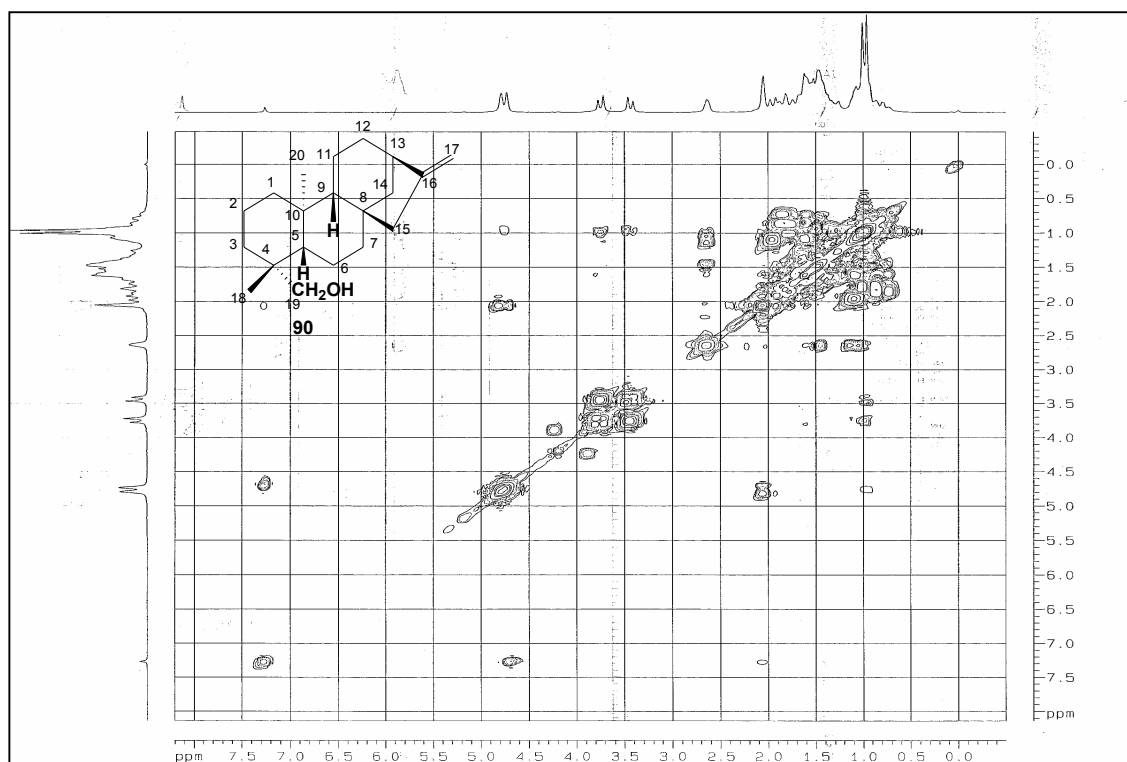


Figura 3.55 – Mapa de contornos COSY (200 MHz, CDCl_3 , δ) do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (90).

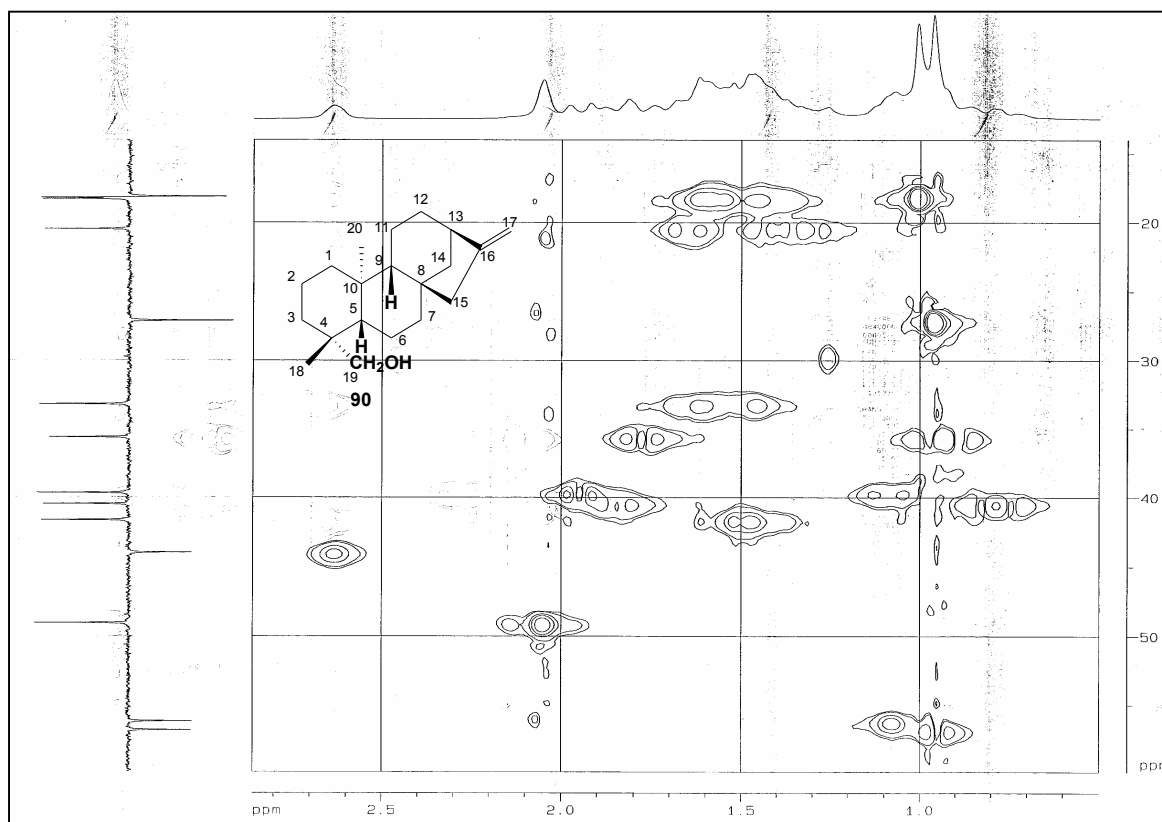


Figura 3.56 – Mapa de contornos HSQC (200 MHz, CDCl_3 , δ) do *ent*-19-hidroxi-caur-16-eno (90).

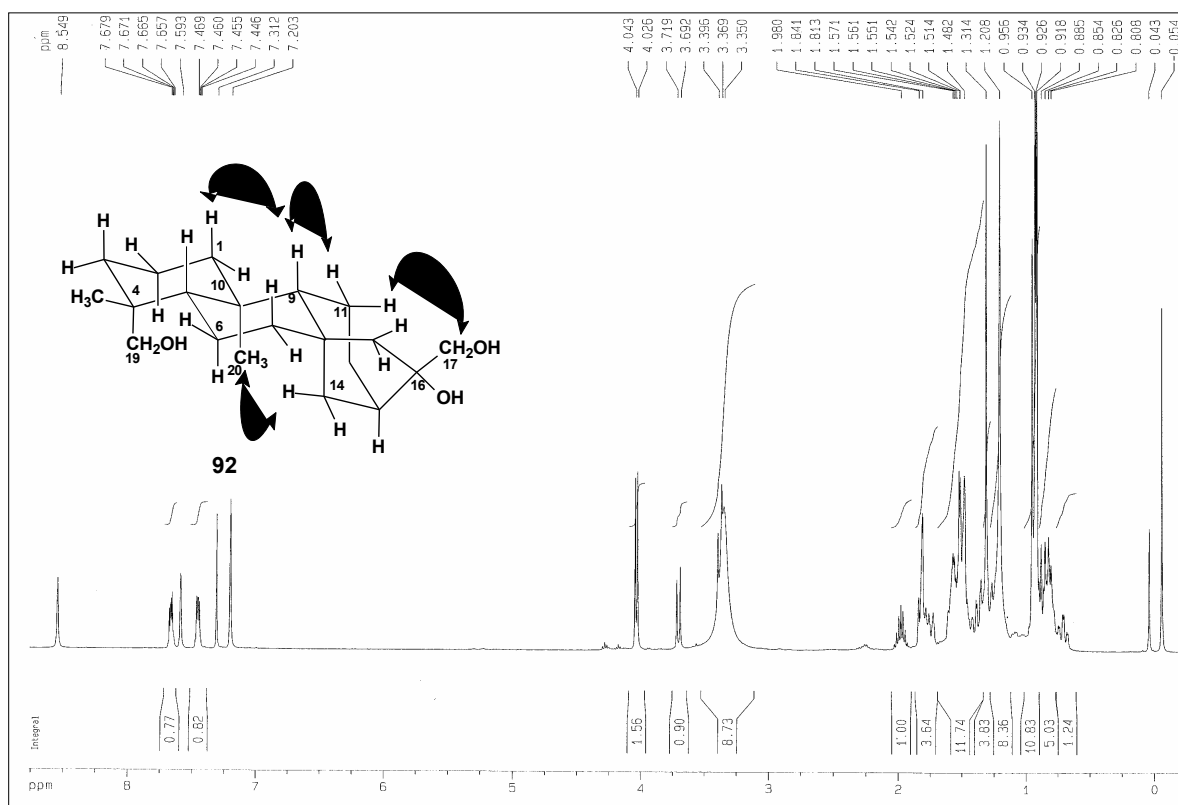


Figura 3.57 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ) ent-16 β ,17,19-trihidroxicaurano (**92**). (Região acima de δ_{H} 7,0 – impureza)

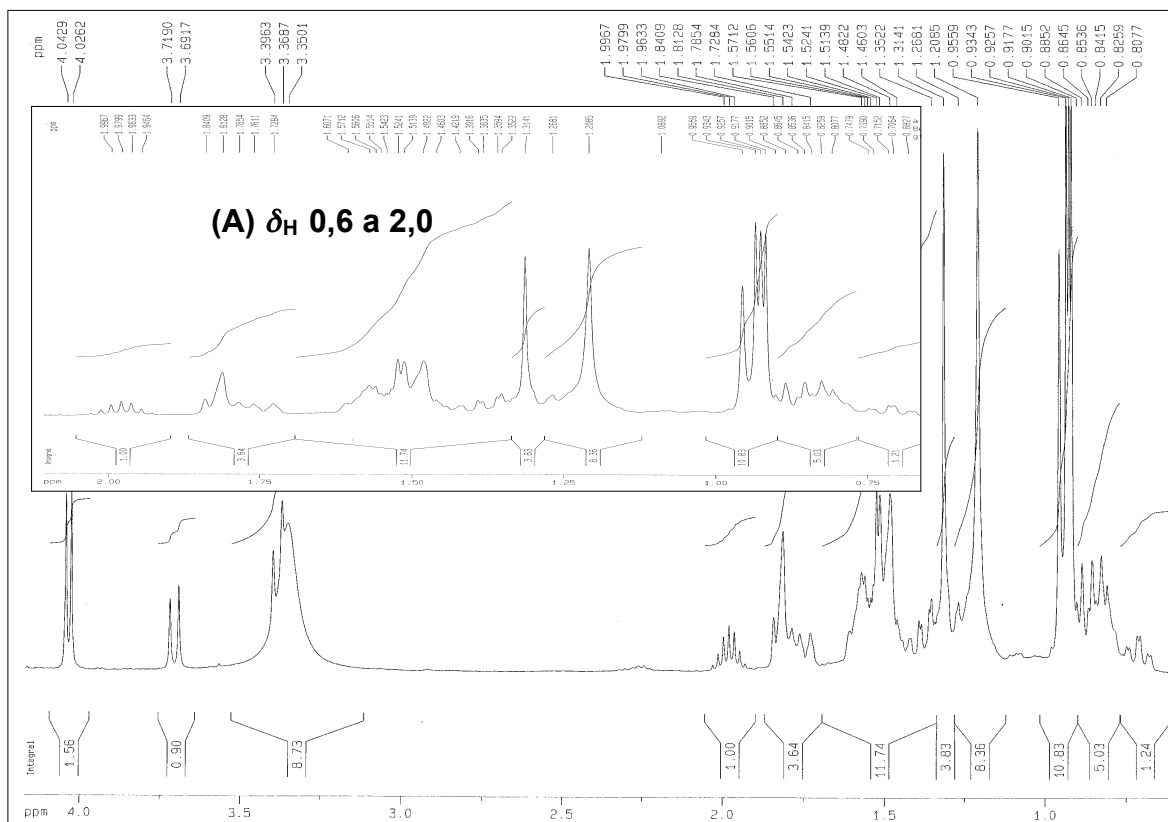


Figura 3.58 – Seção expandida entre δ_{H} 0,5 a 4,2 do espectro de RMN de ^1H (400

MHz, CDCl_3 , δ) do *ent*-16 β ,17,19-trihidroxicaurano (**92**) (A) Seção expandida entre δ_{H} 0,6 e 2,0.

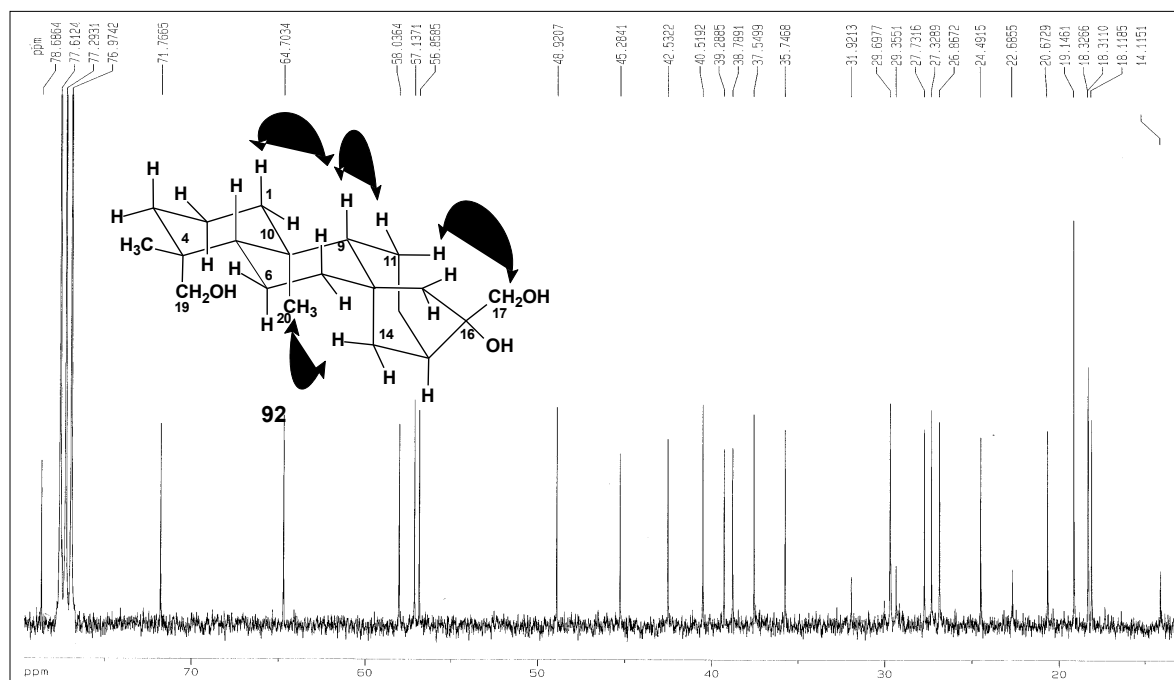
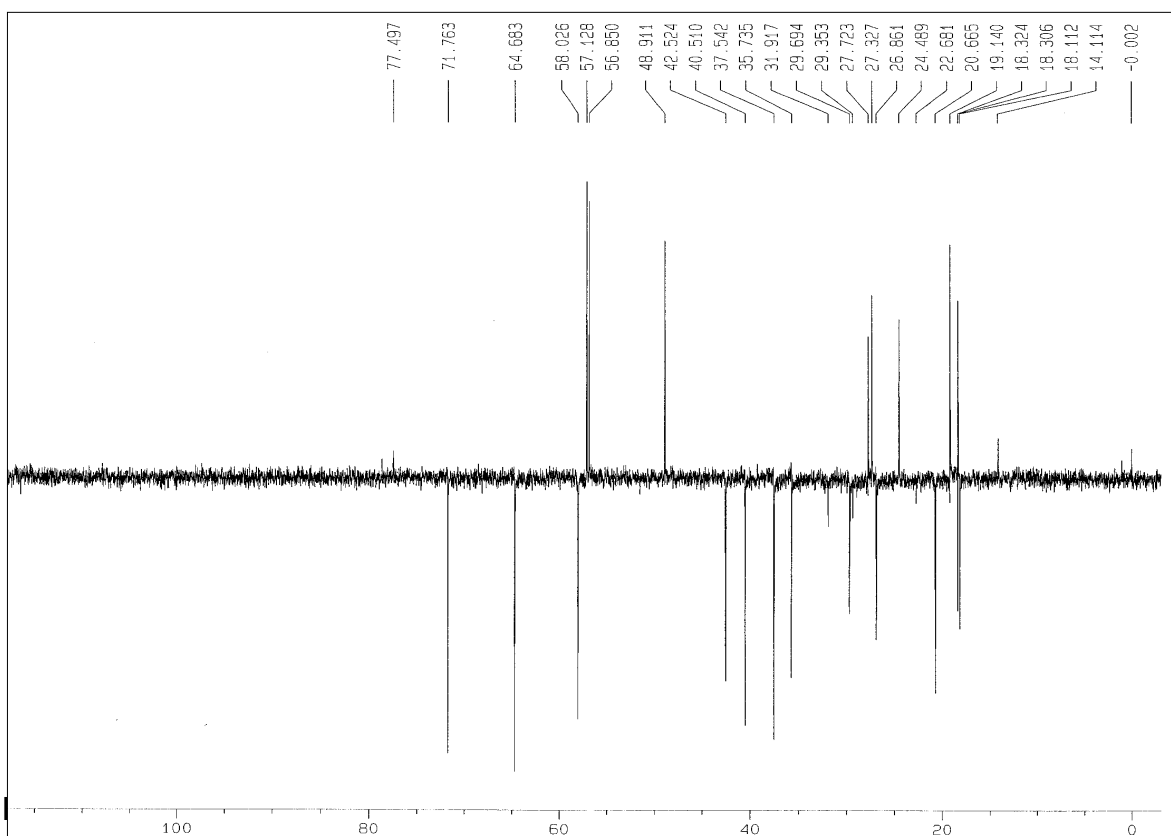


Figura 3.59 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ) *ent*-16 β ,17,19-trihidroxicaurano (**92**)*. *Carbonos não atribuídos são referentes a impureza graxa.



trihidroxicaurano (**92**)*. *Carbonos não atribuídos são referentes a impureza graxa.

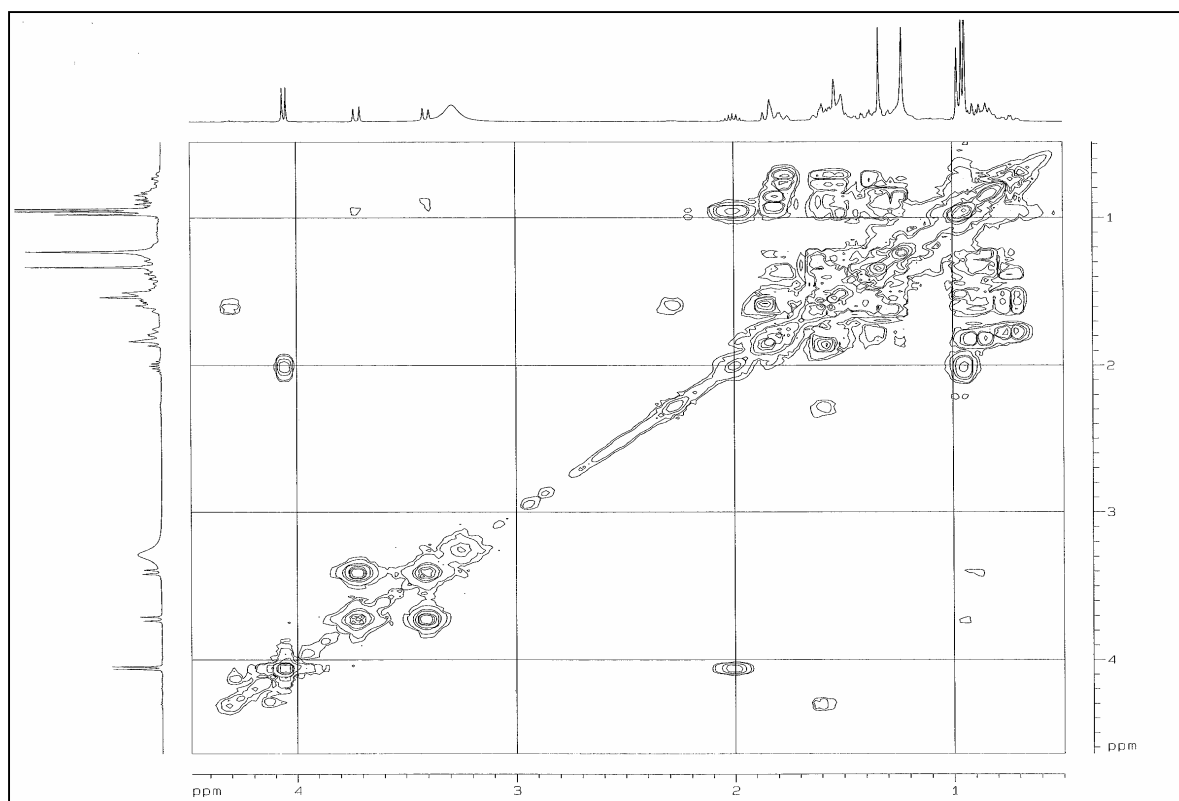


Figura 3.61 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl₃, δ) do *ent*-16β,17,19-trihidroxicaurano (**92**).

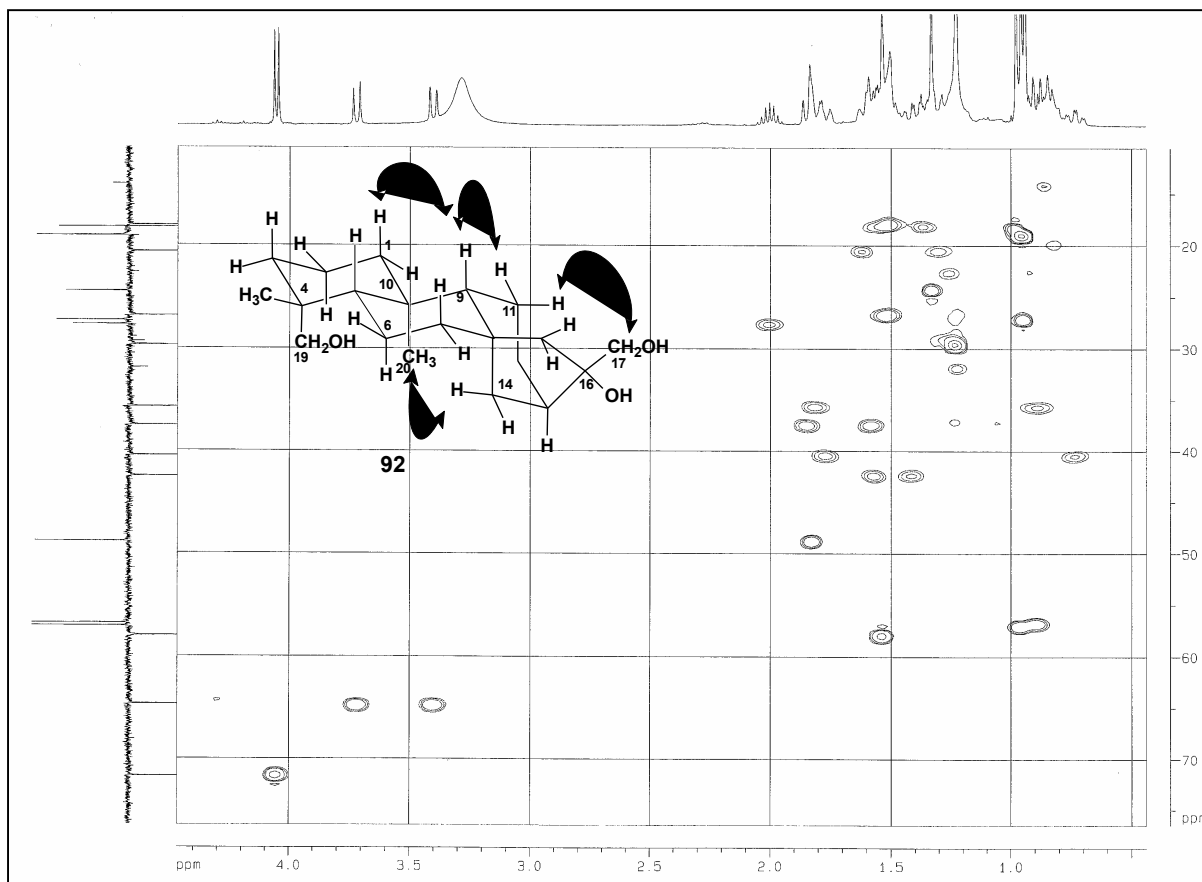


Figura 3.62 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl₃, δ) do *ent*-16β,17,19-trihidroxicaurano (**92**).

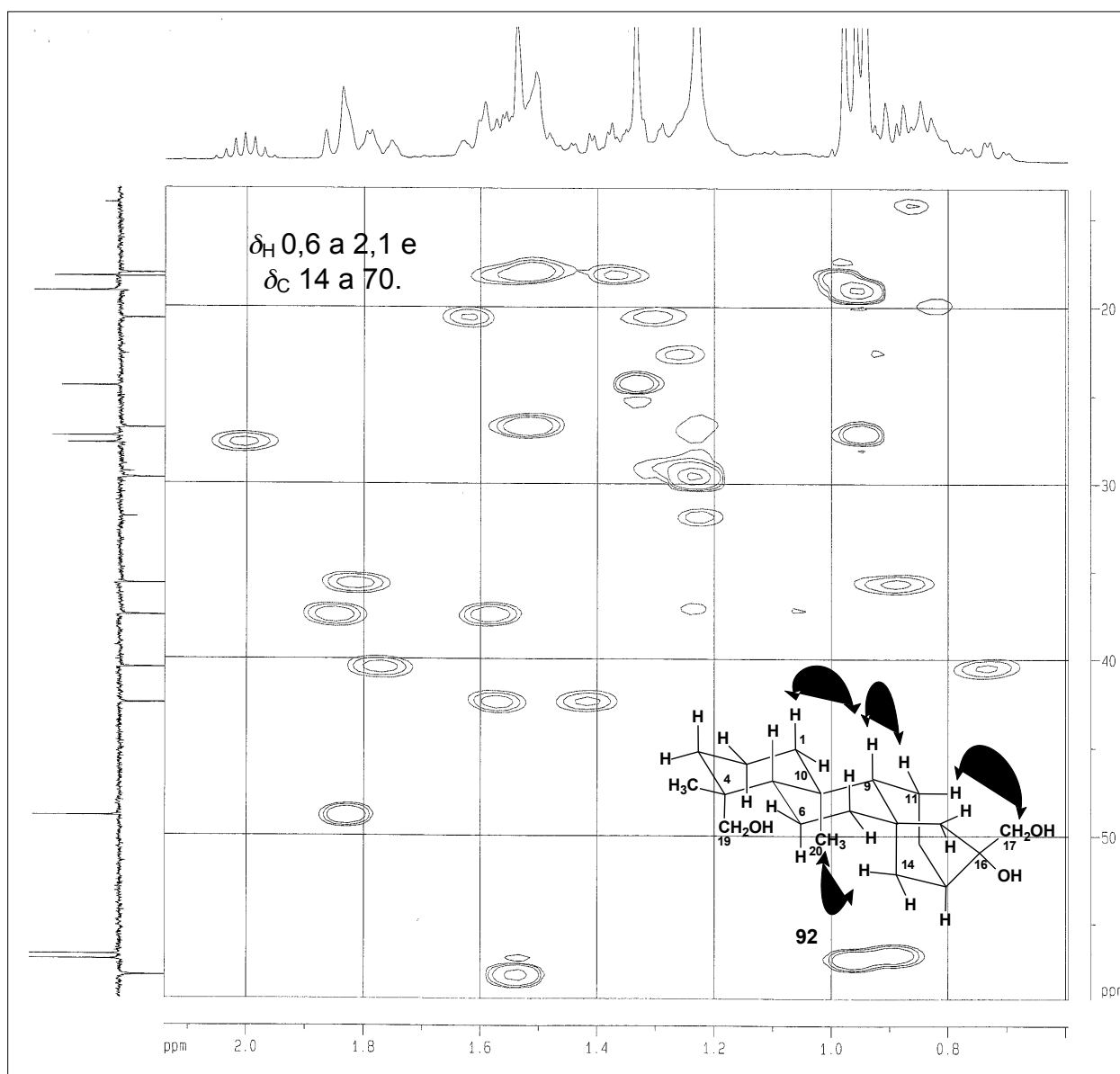


Figura 3.63 – Seção expandida entre δ_H 0,6 a 2,1 e δ_C 14 a 70 do mapa de contornos HSQC (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do *ent*-16 β ,17,19-trihidroxicaurano (**92**).

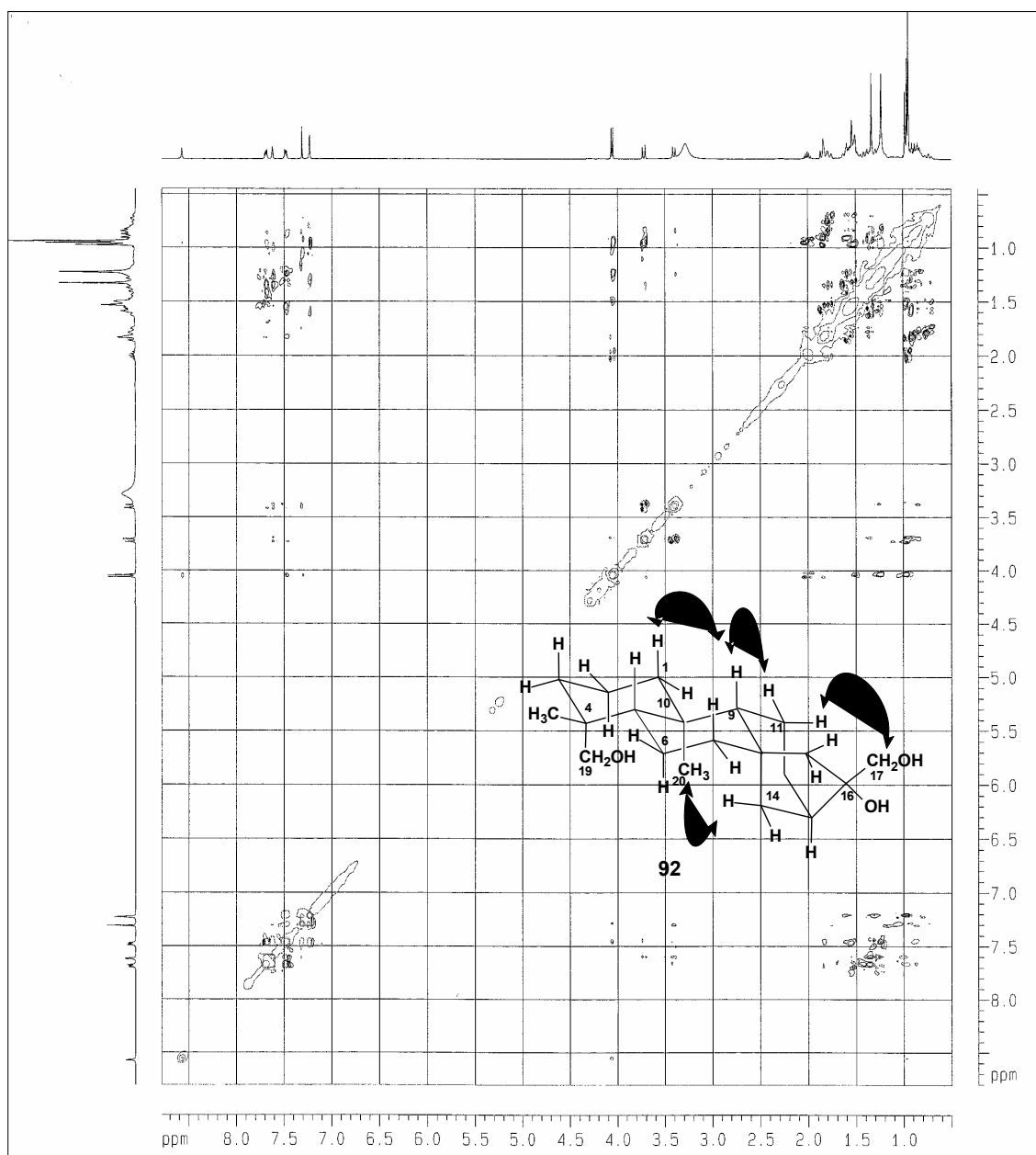


Figura 3.64 – Mapa de contornos ROESY (400 MHz, CDCl₃, δ) do *ent*-16 β ,17,19-trihidroxicaurano (**92**).

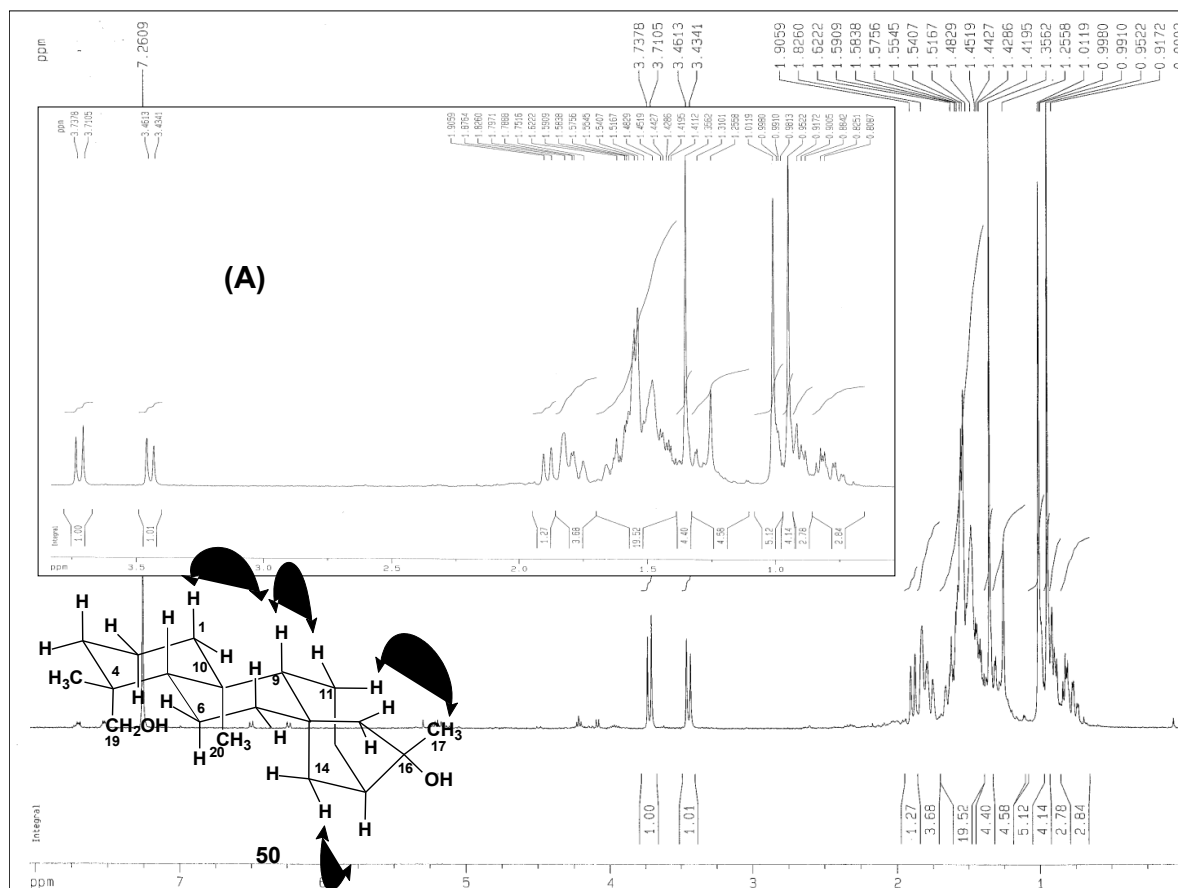


Figura 3.65 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ) do *ent*-cauran-16 β ,19-diol (**50**). (A) Seção expandida entre δ_{H} 0,5 e 4,0.

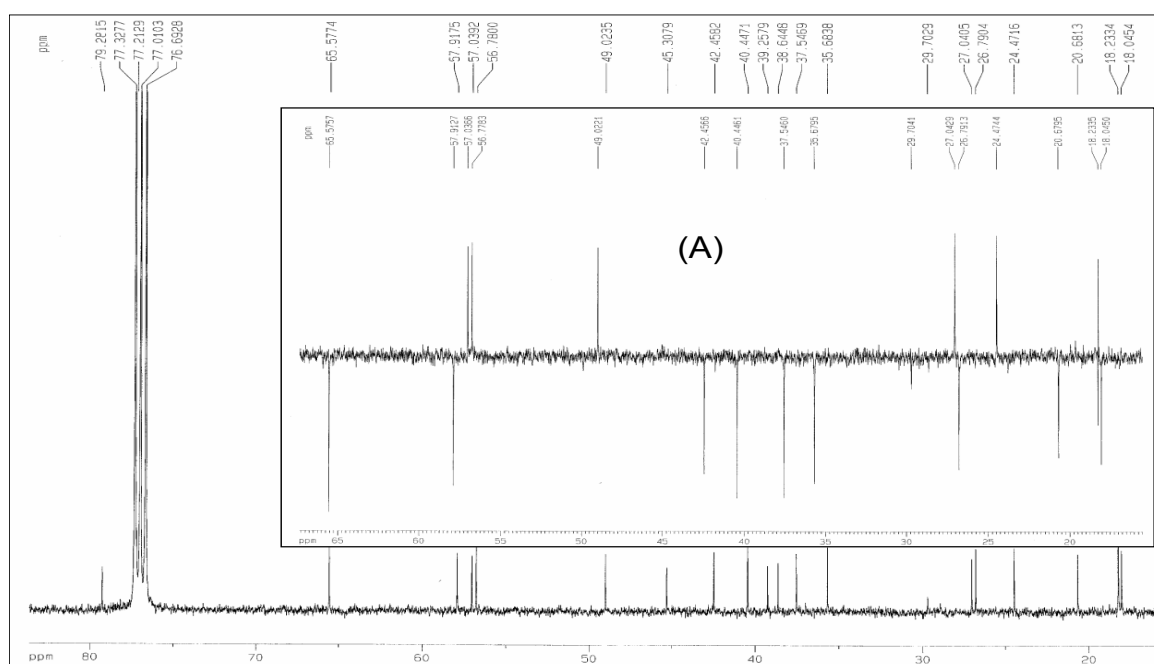


Figura 3.66 – Espectro de RMN de ^{13}C e (A) subspectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3 , δ) do *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**).

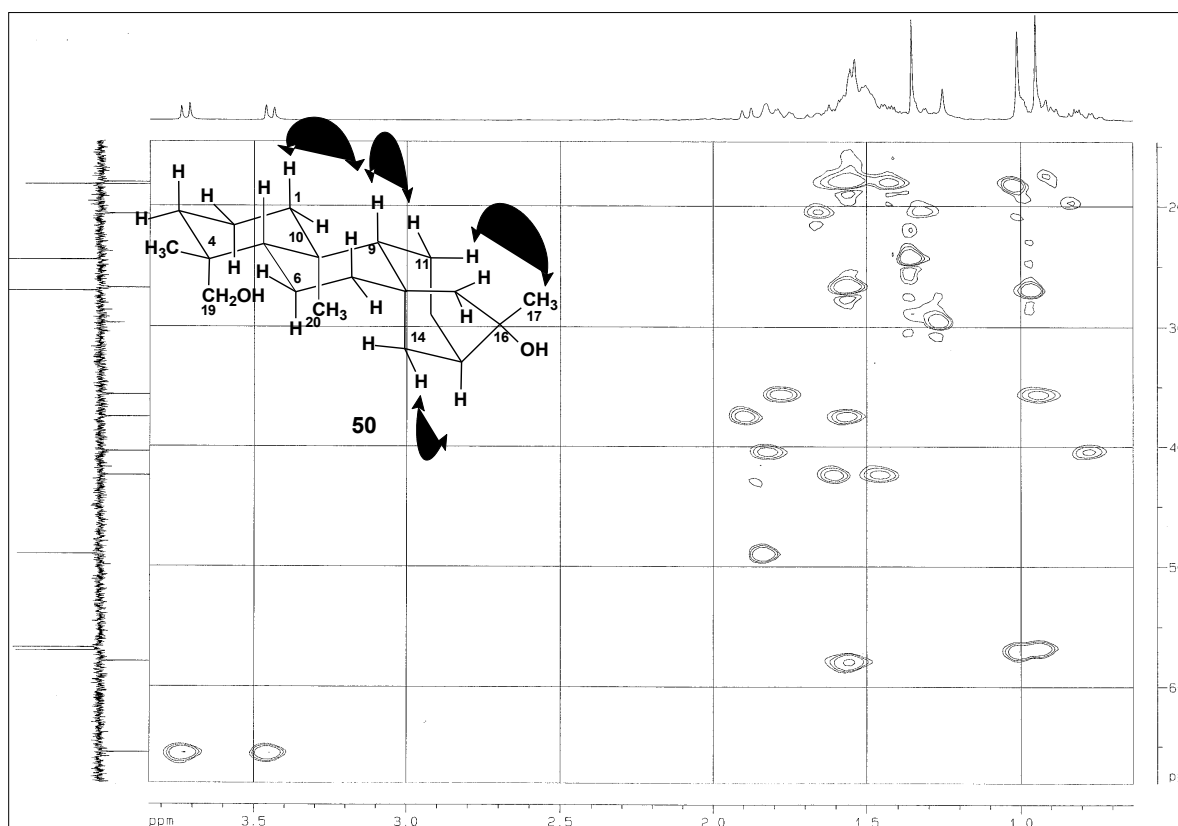


Figura 3.67 – Mapa de contornos HSQC do *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**): seção expandida entre δ_H 0,5 a 3,3 e δ_C 15,0 a 65,0.

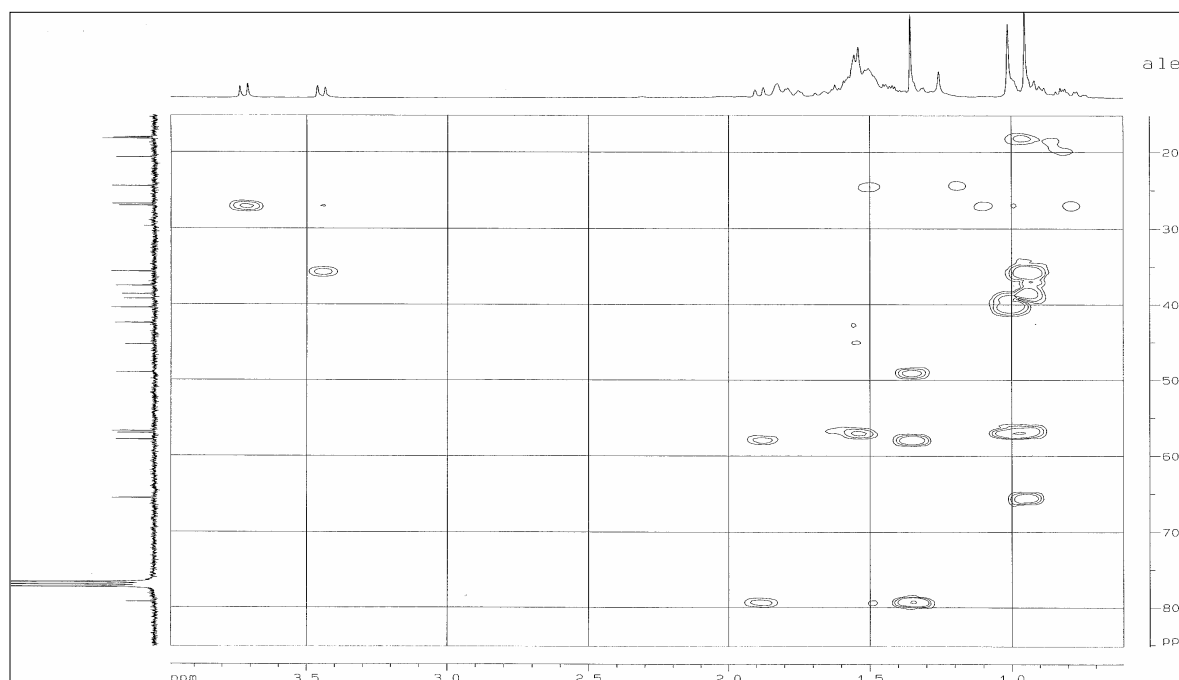


Figura 3.68 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**).

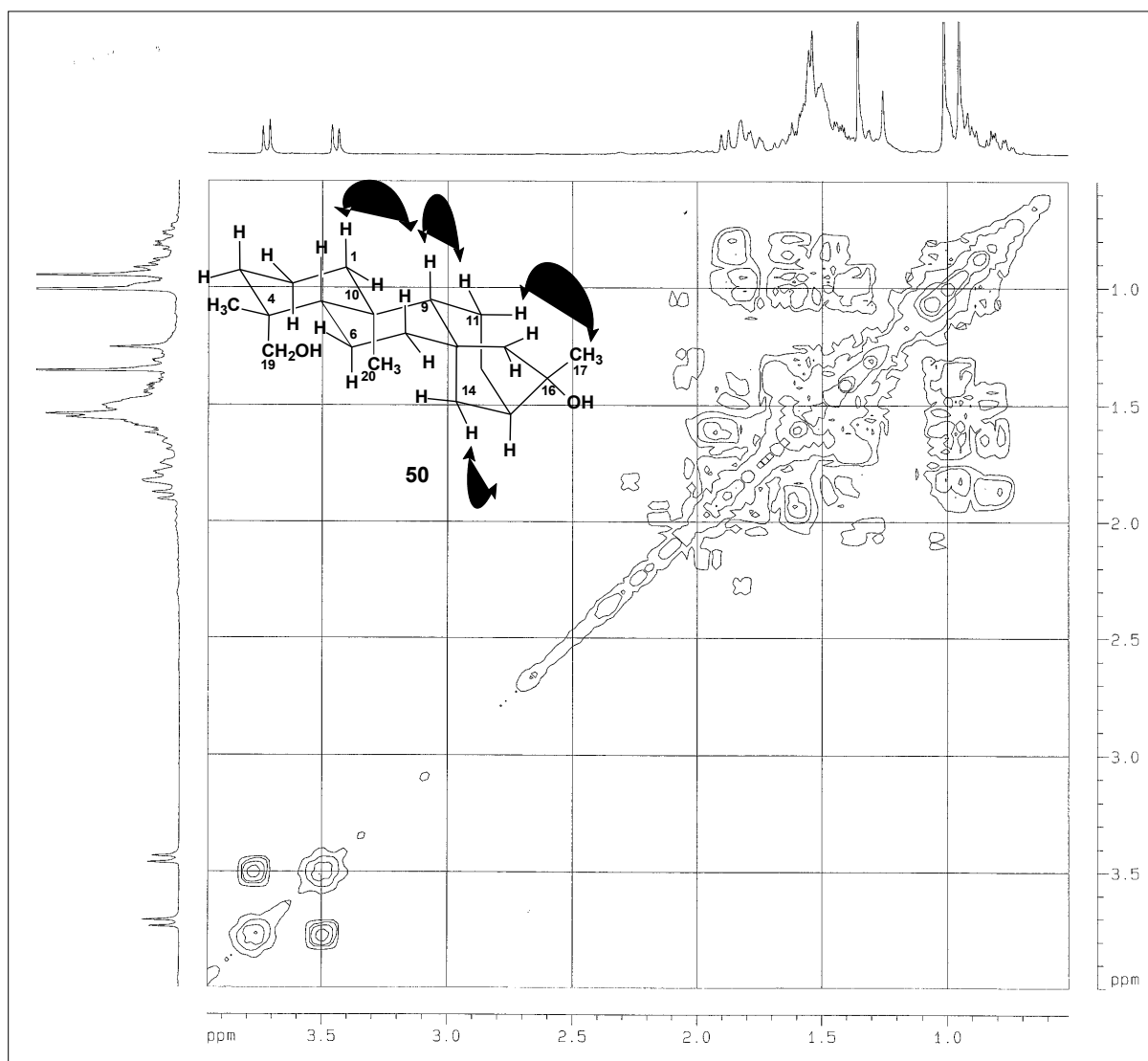


Figura 3.69 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl₃, δ) do *ent*-16β,19-dihidroxi-caurano (**50**).

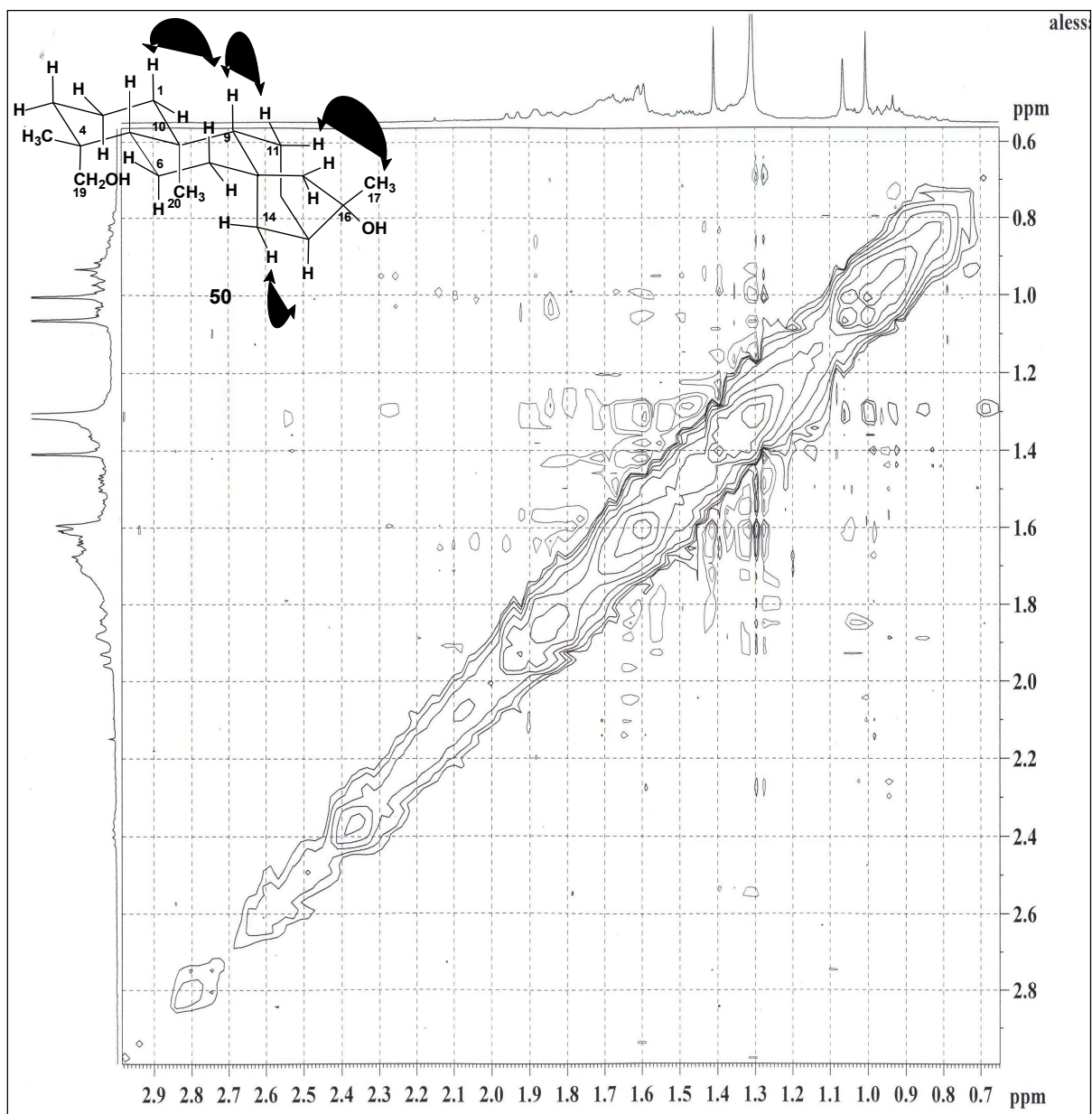


Figura 3.70 – Mapa de contornos ROESY (400 MHz, CDCl₃, δ) do *ent*-16 β ,19-dihidroxi-caurano (**50**).

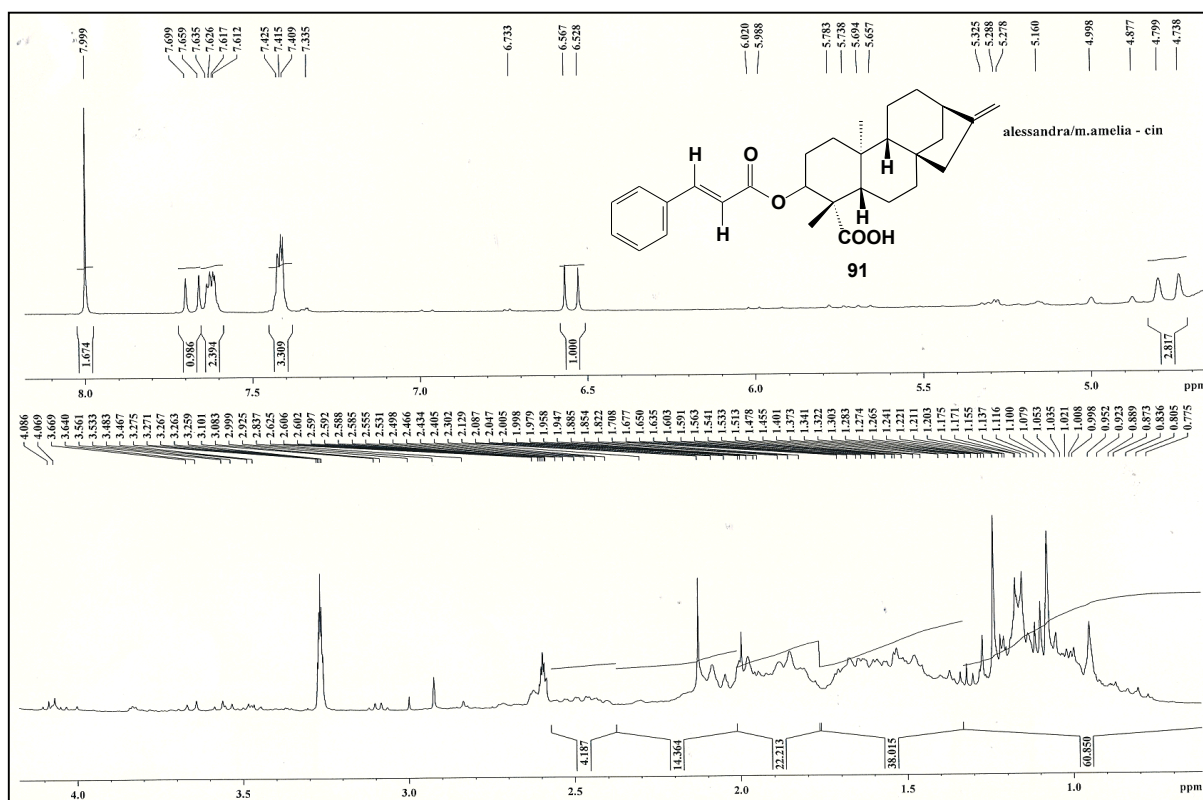


Figura 3.73 – Seções expandidas do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (**91**).

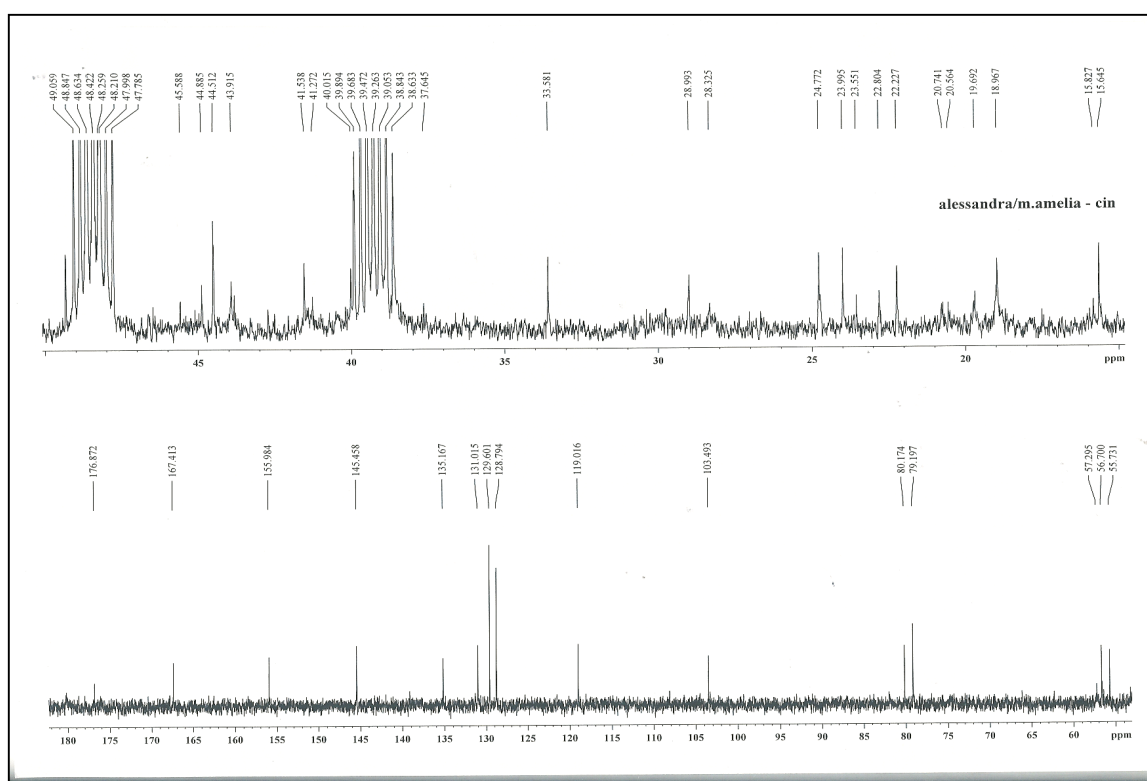


Figura 3.74 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ) do ácido *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (**91**).

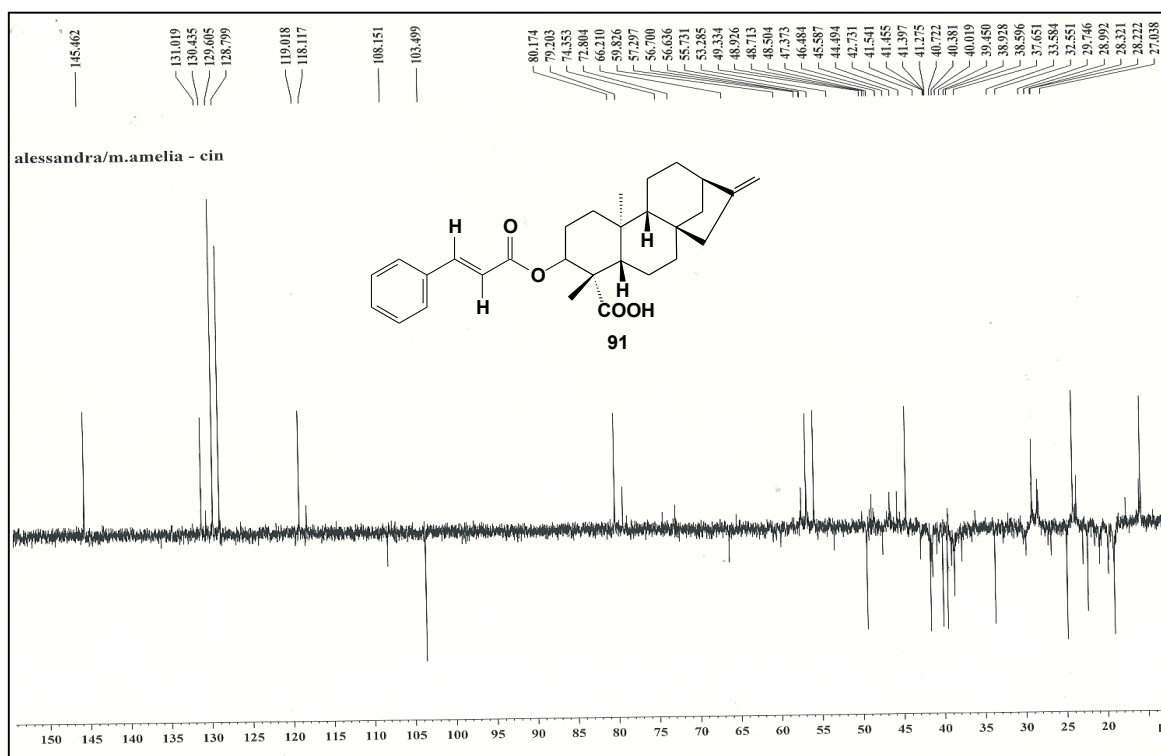


Figura 3.75 - Subespectro de RMN de ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD , δ) do ácido *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91).

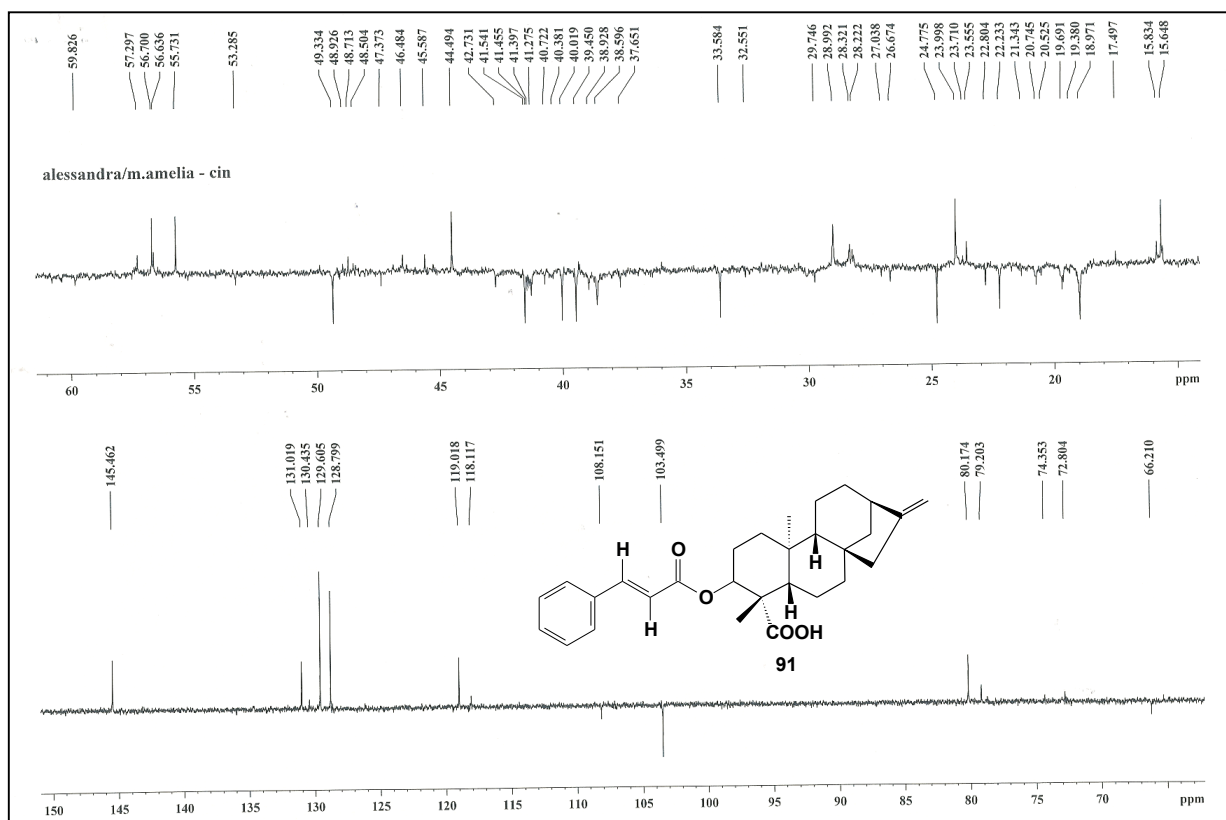


Figura 3.76 – Seção expandida do RMN de ^{13}C DEPT-135 (100 MHz, CD_3OD , δ) do ácido *ent*-3 β -cinamato-caur-16-en-19-óico (91).

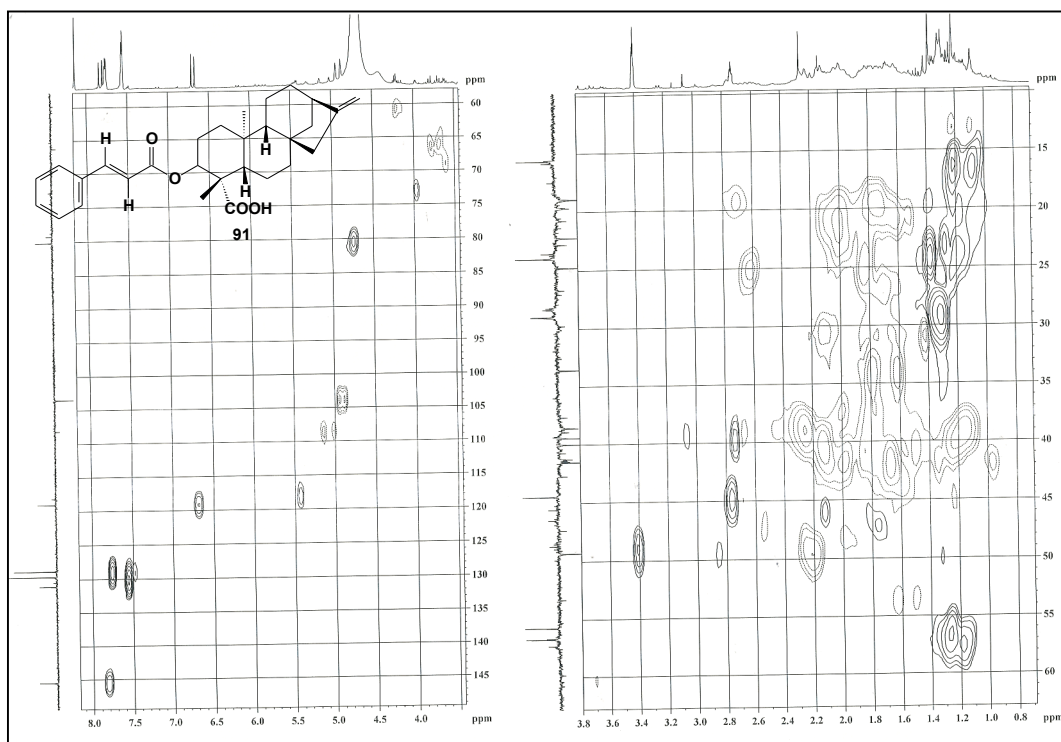


Figura 3.77 – Seções expandidas do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD₃OD, δ) do ácido *ent*-3 β -cinamato-caur 16-en-19-óico (**91**).

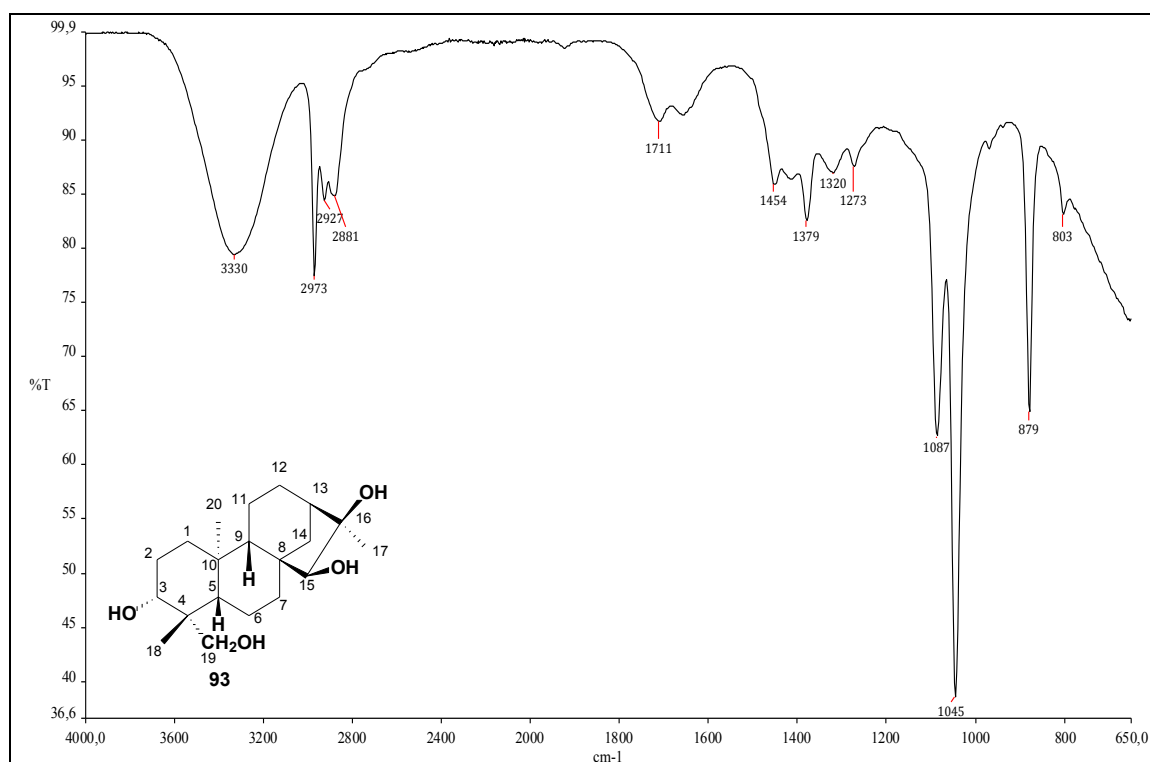


Figura 3.78 - Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (**93**).

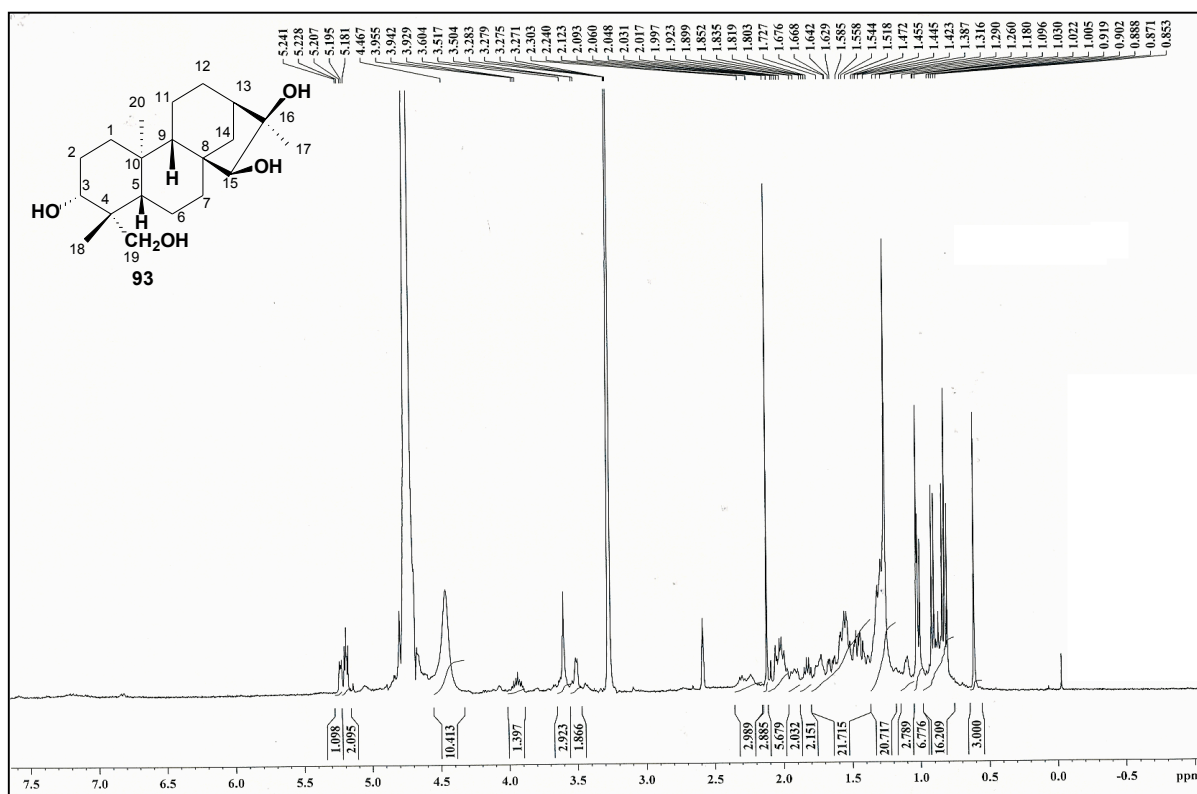


Figura 3.79 - Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD, δ) de ent-3β,15α,16α,19-tetrahydroxi-caurano (**93**).

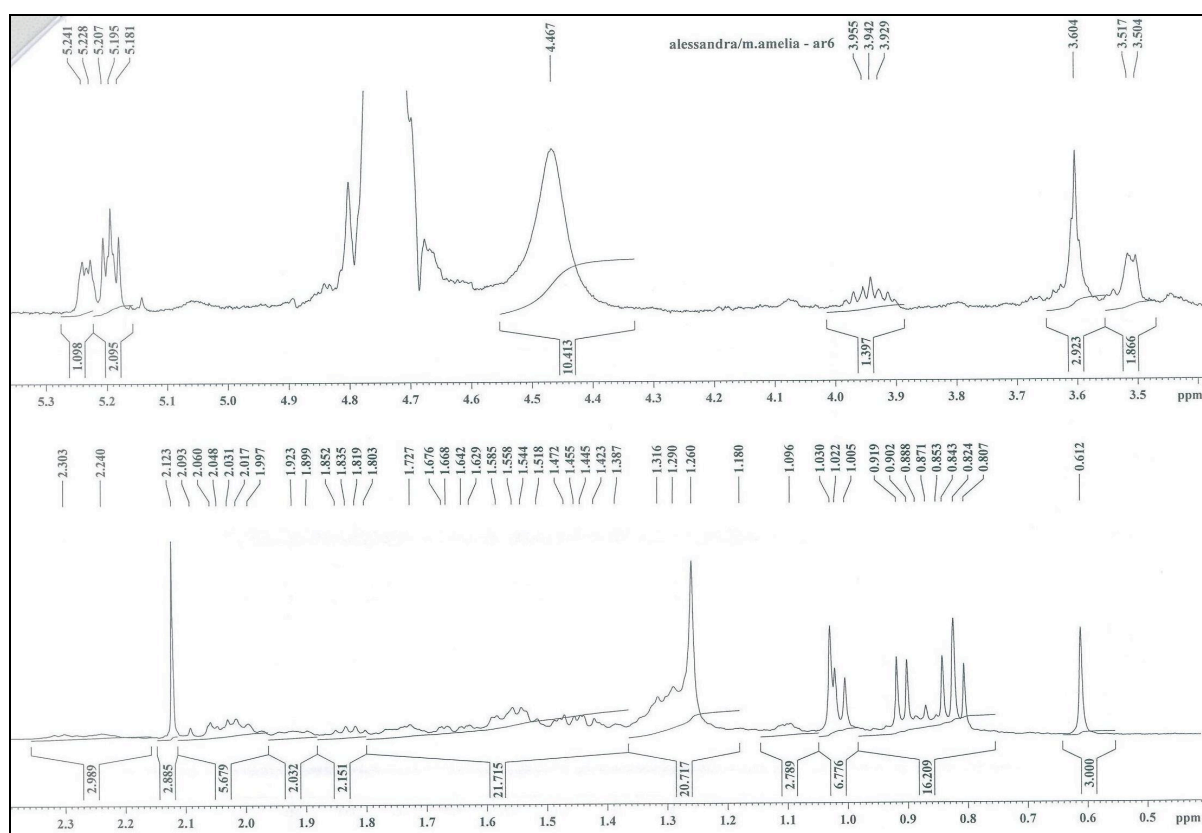


Figura 3.80 – Seções expandidas do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD, δ) de ent-3β,15α,16α,19-tetrahydroxi-caurano (**93**).

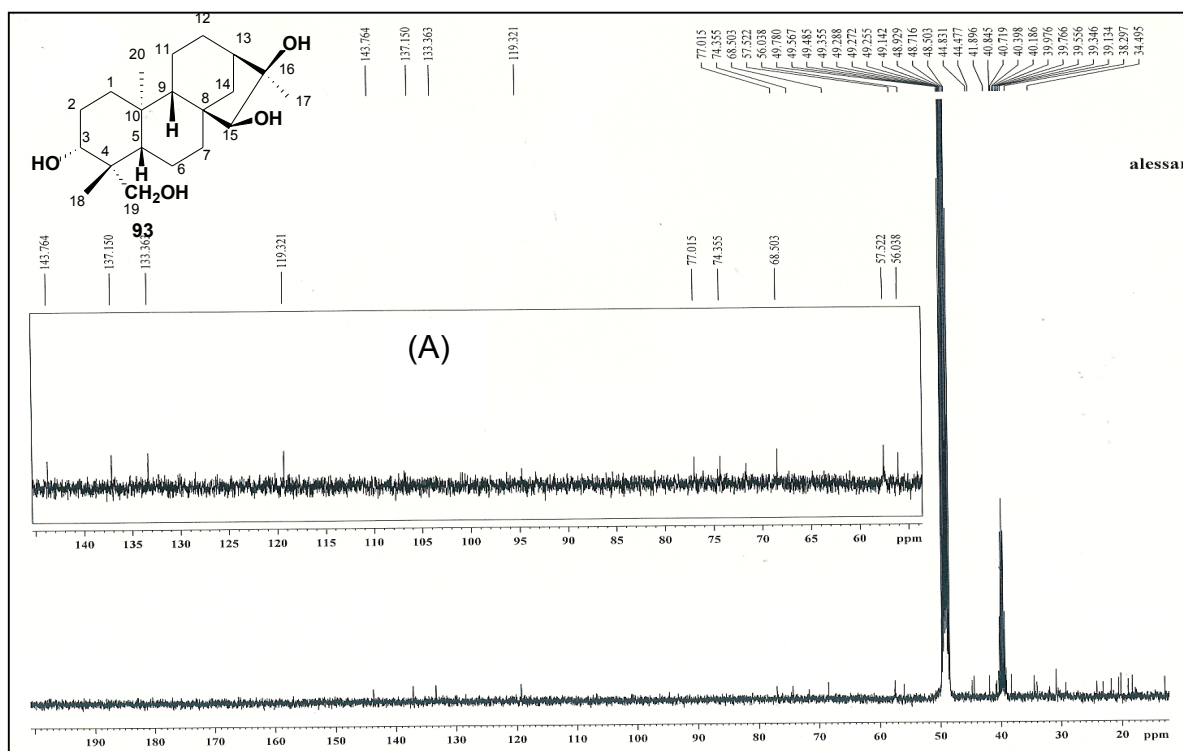


Figura 3.81 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ) de *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (**93**)*. (A) Seção expandida entre δ_C 56 e 144.

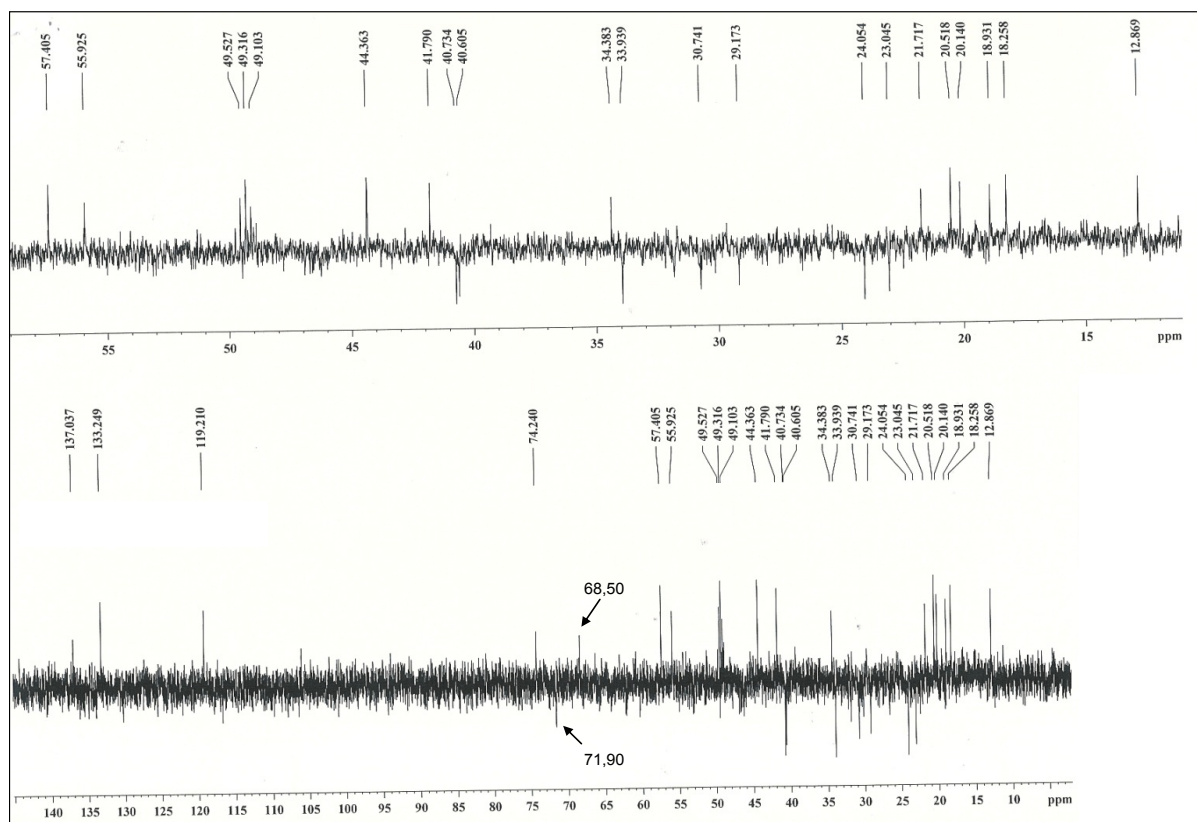


Figura 3.82 – Subespectro DEPT 135 (100 MHz, CD_3OD , δ) de *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (**93**)*.

*Sinais em δ_C 115-145 e alguns sinais em δ_C 20-45 referentes a graxa.

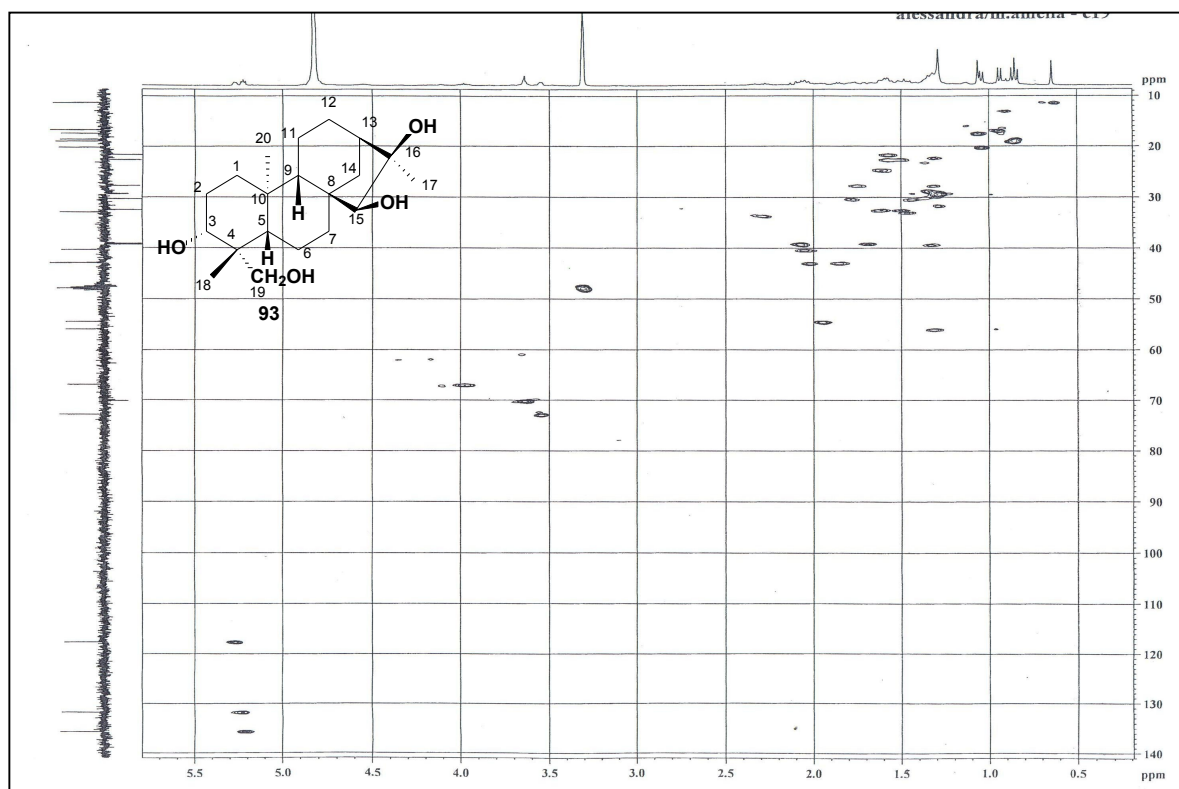


Figura 3.83 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD₃OD, δ) de *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (**93**).

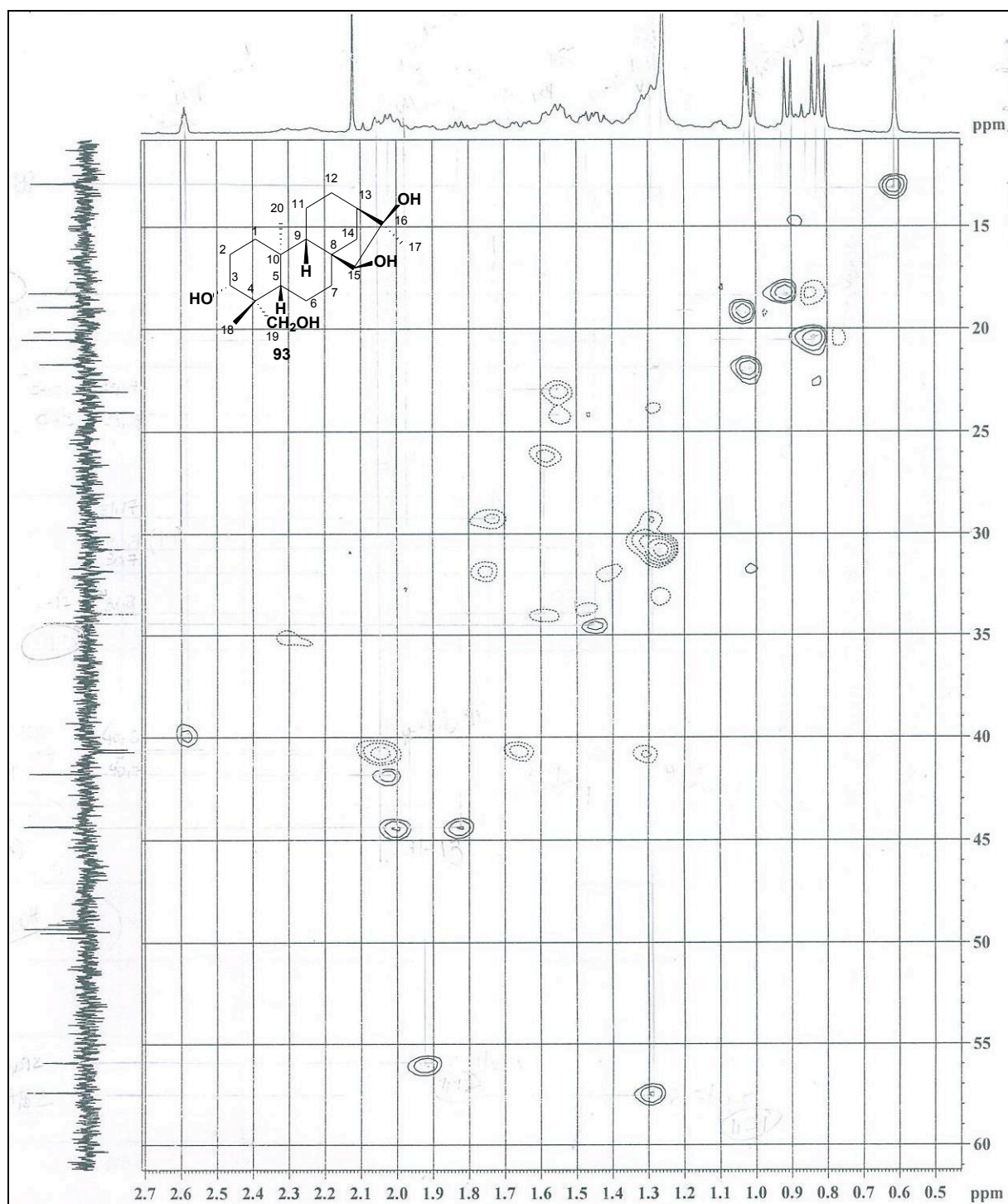


Figura 3.84 – Seção expandida do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD₃OD, δ) de *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (**93**).

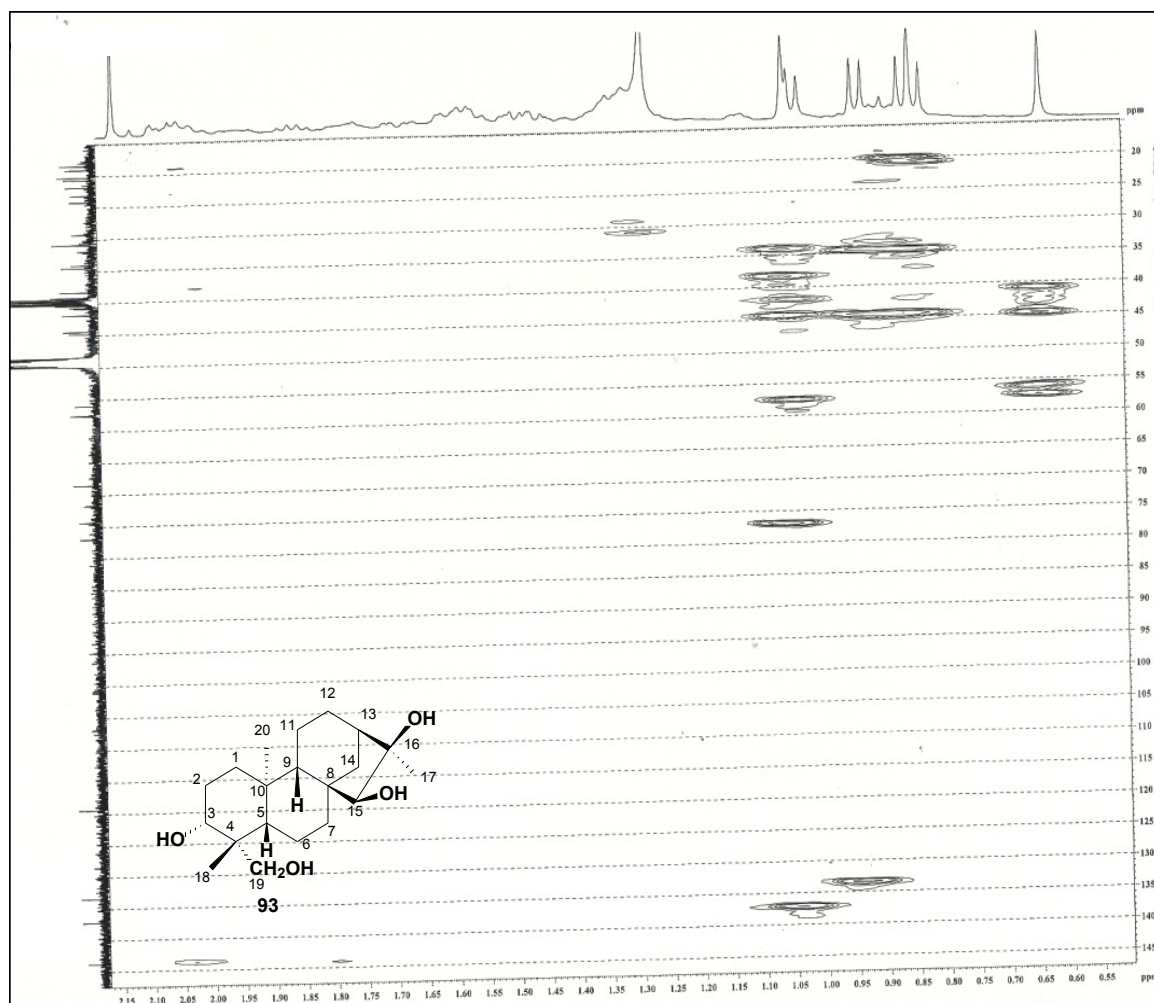


Figura 3.85 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ) de *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (**93**).

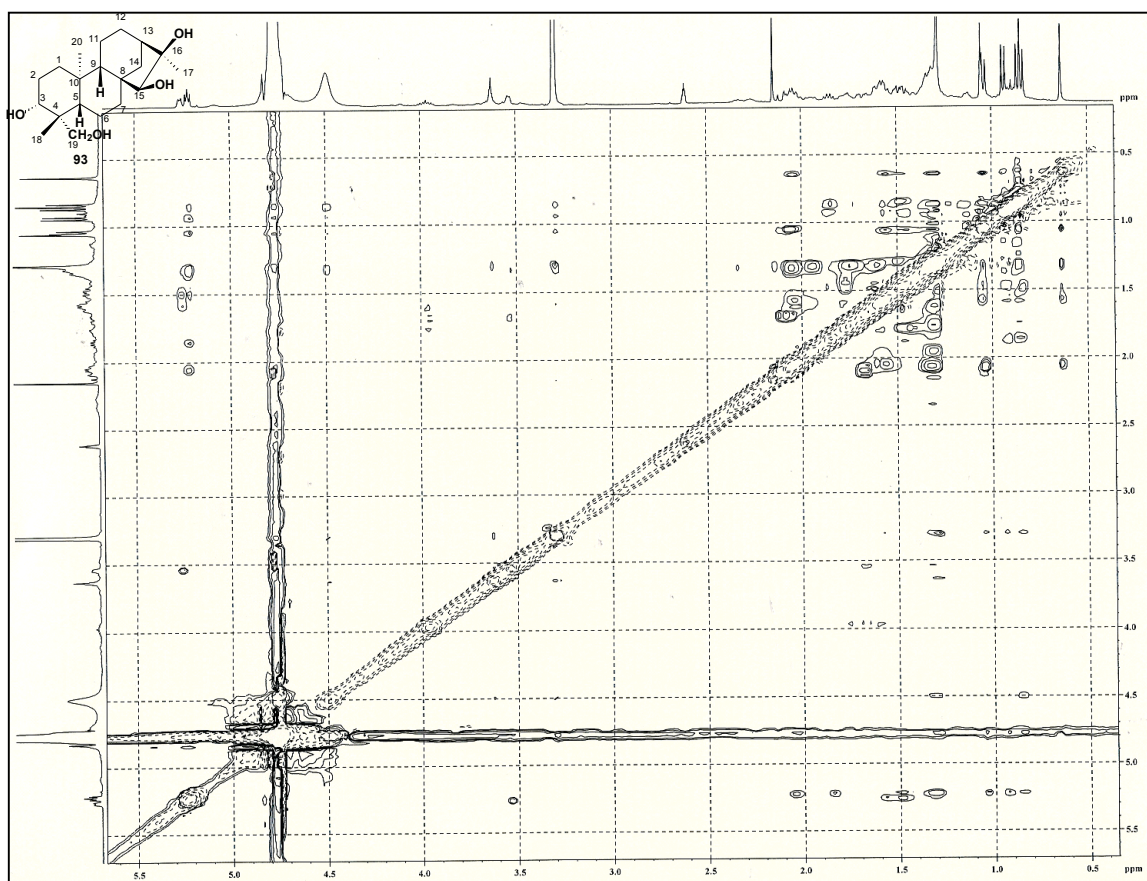


Figura 3.86 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CD₃OD, δ) de *ent*-3 β ,15 α ,16 α ,19-tetrahydroxi-caurano (**93**).

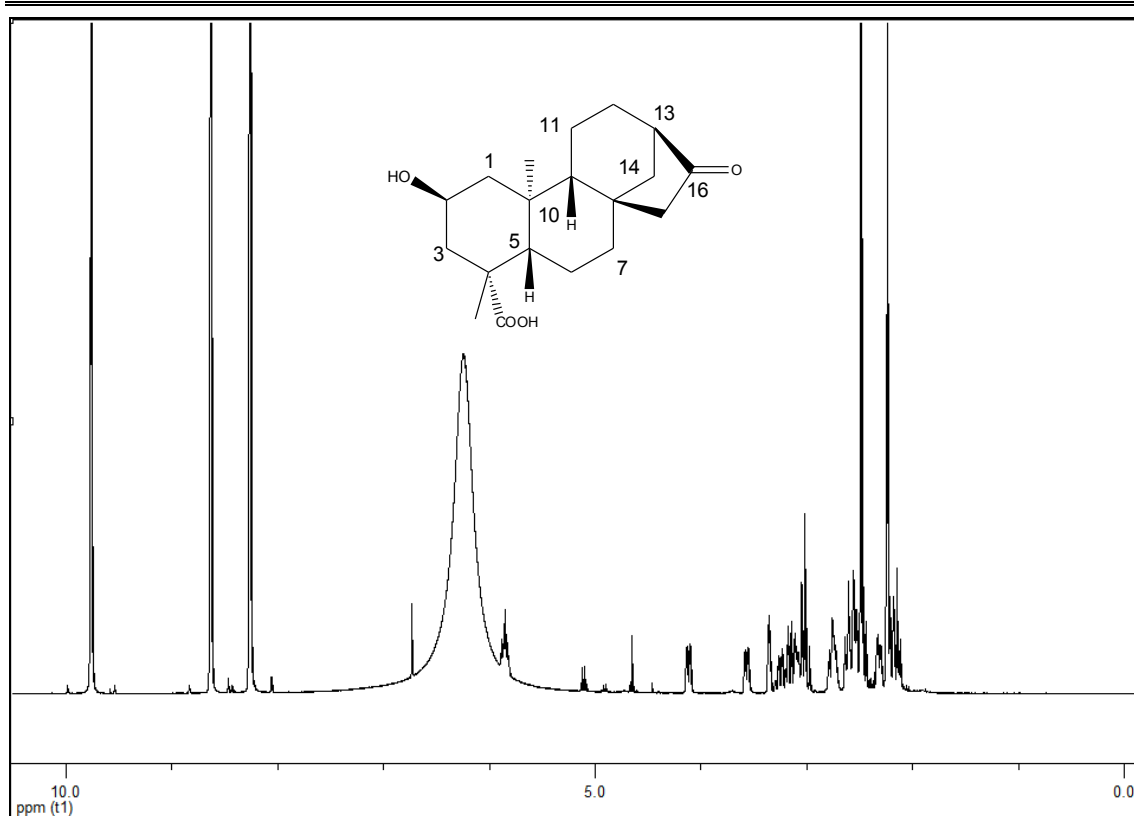


Figura 3.87 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ) do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**).

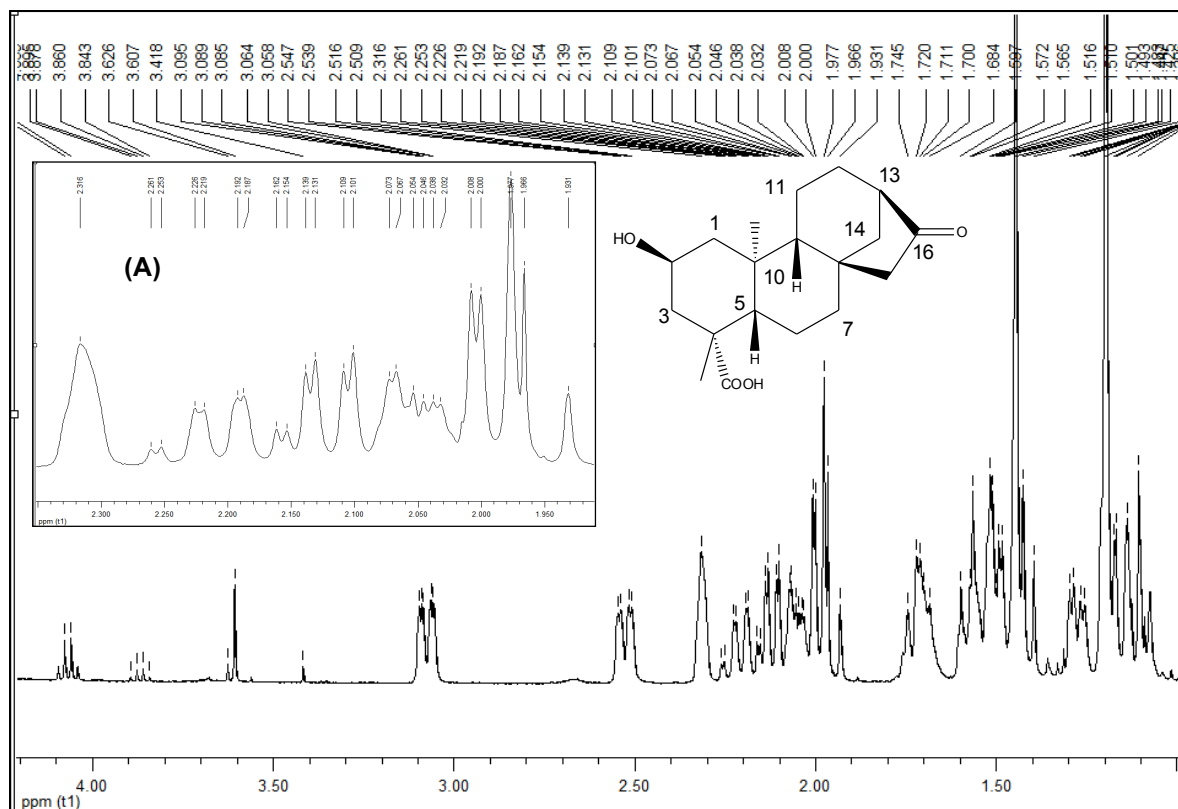


Figura 3.88 – Seção expandida (δ_{H} 1,00 a 4,20) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ) do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**). (A) seção expandida entre δ_{H} 1,9 e 2,35.

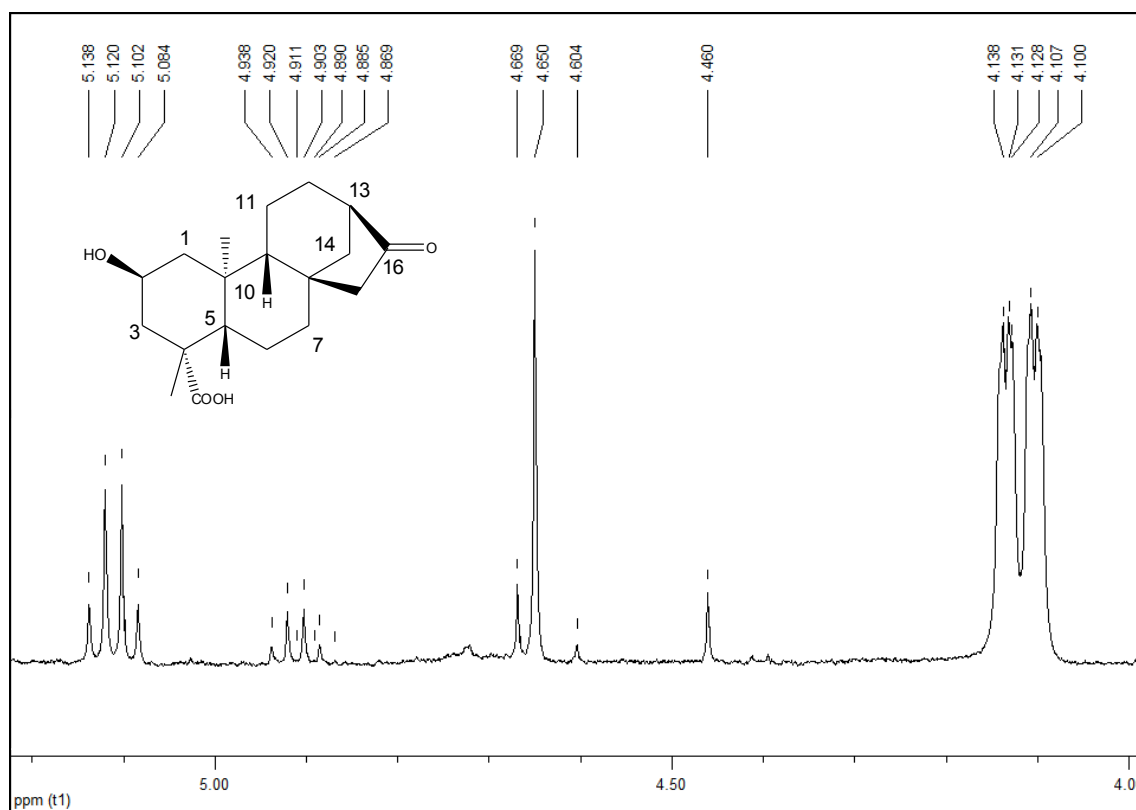


Figura 3.89 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ) do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**): seção expandida entre δ_{H} 4,00 e 5,20.

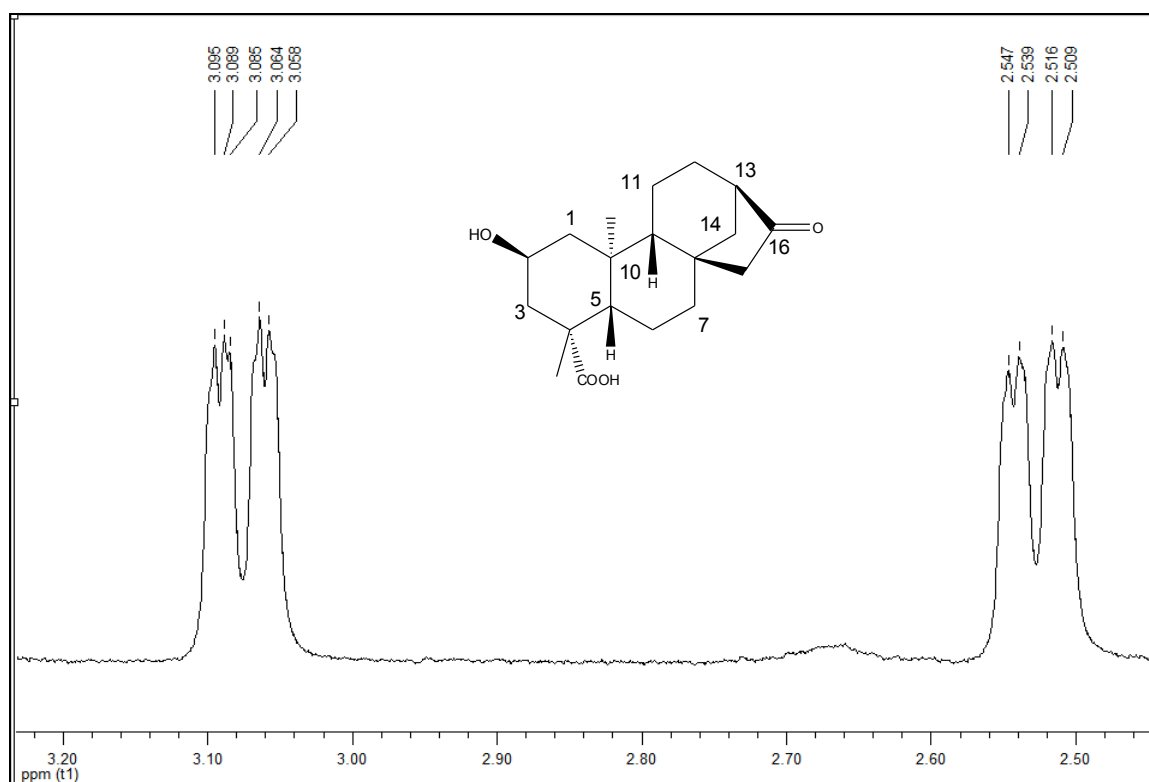


Figura 3.90 – Seção expandida (δ_{H} 2,5 a 3,2) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ) do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**).

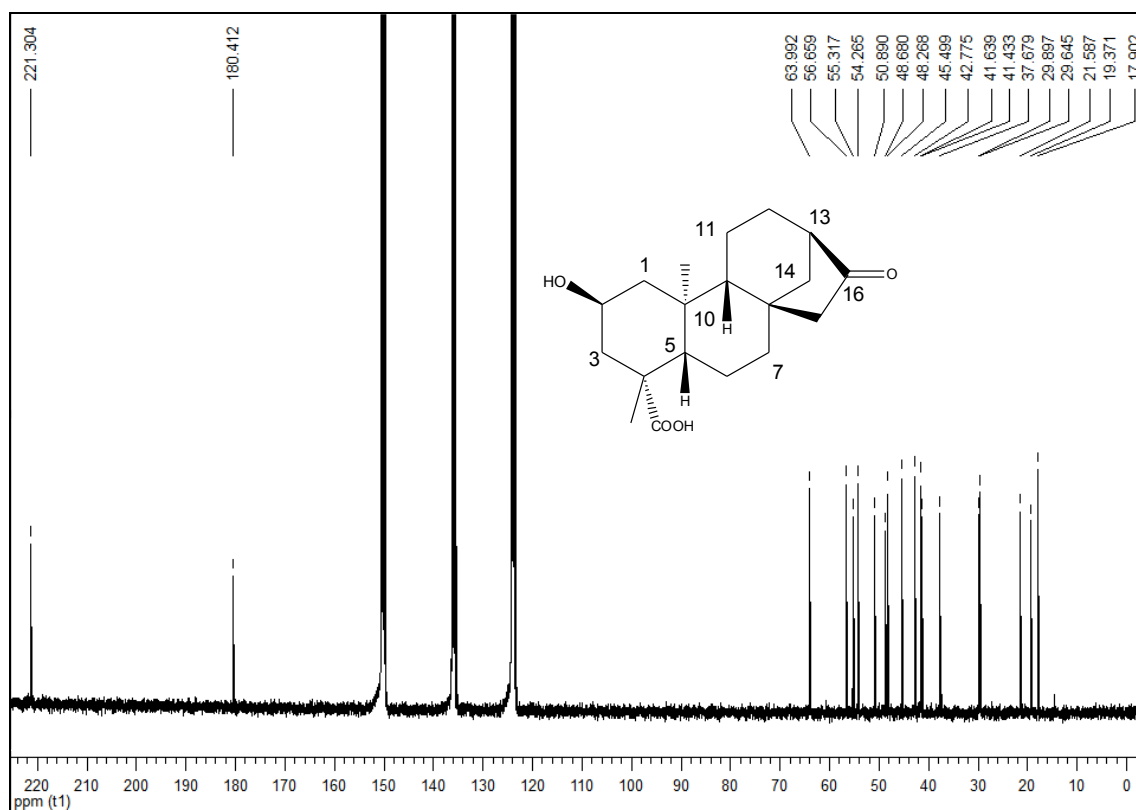


Figura 3.91 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ) do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**).

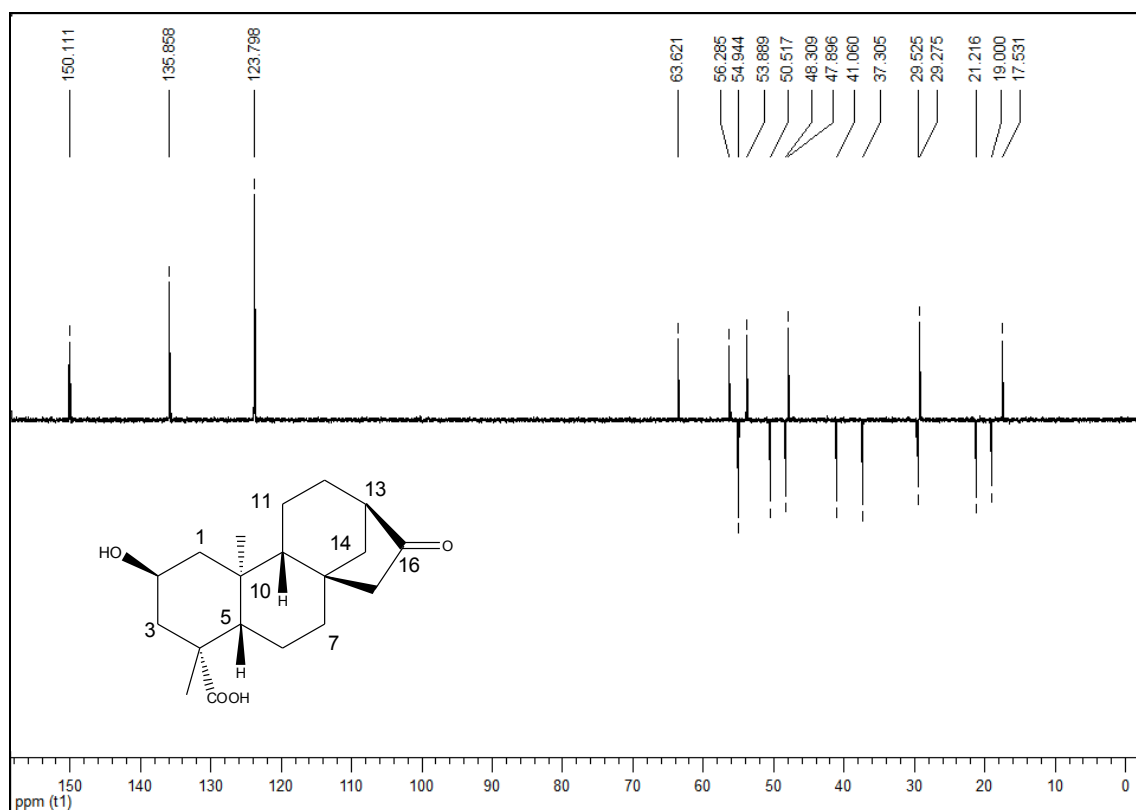


Figura 3.92 - Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ) do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**).

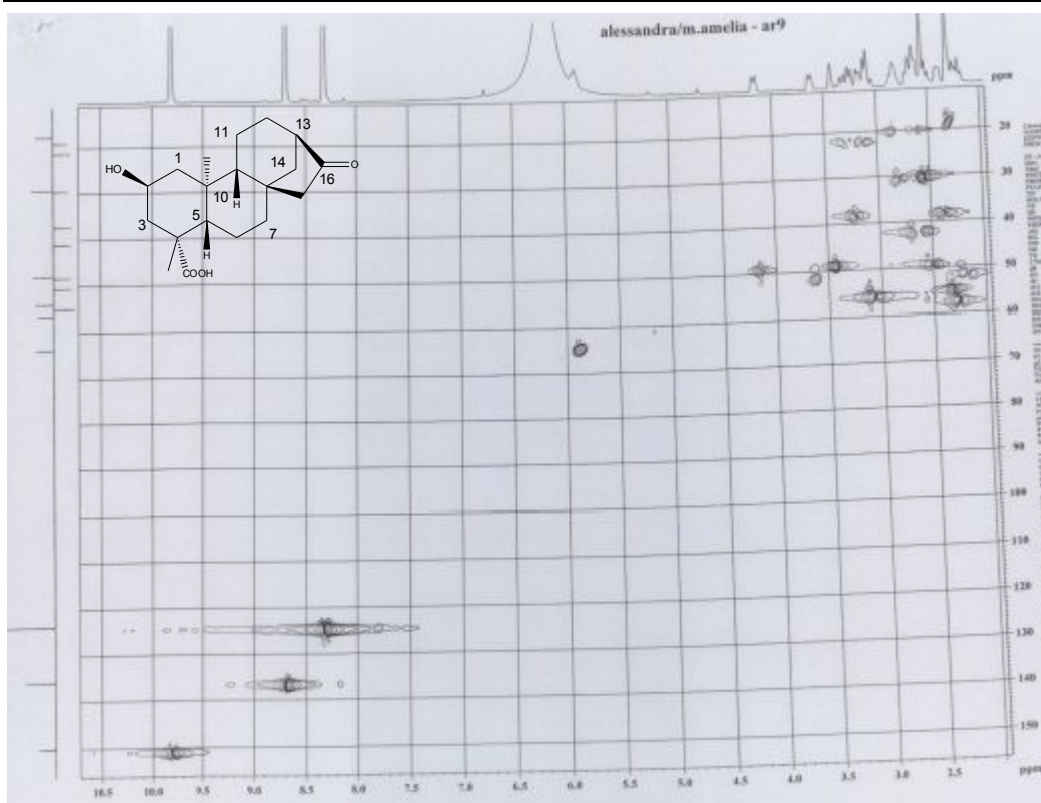


Figura 3.93 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, C_5D_5N , δ) do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**).

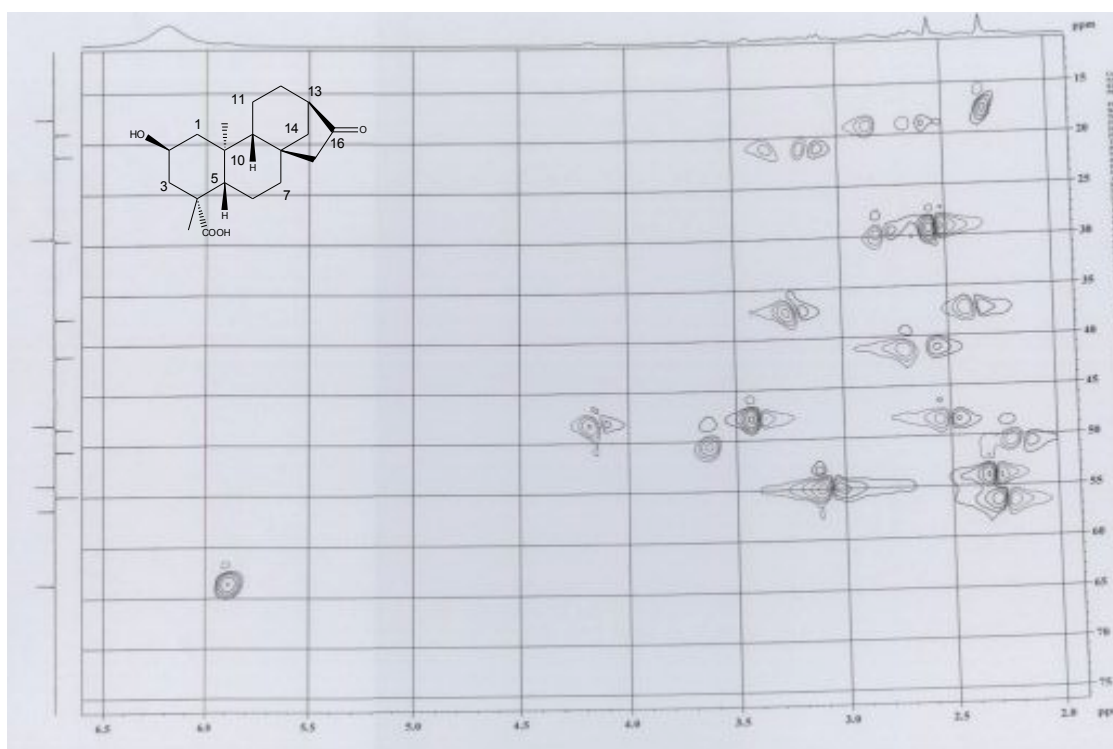


Figura 3.94 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, C_5D_5N , δ) do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**): seção expandida entre δ_H 2,0 - 6,5 e δ_C 15-75.

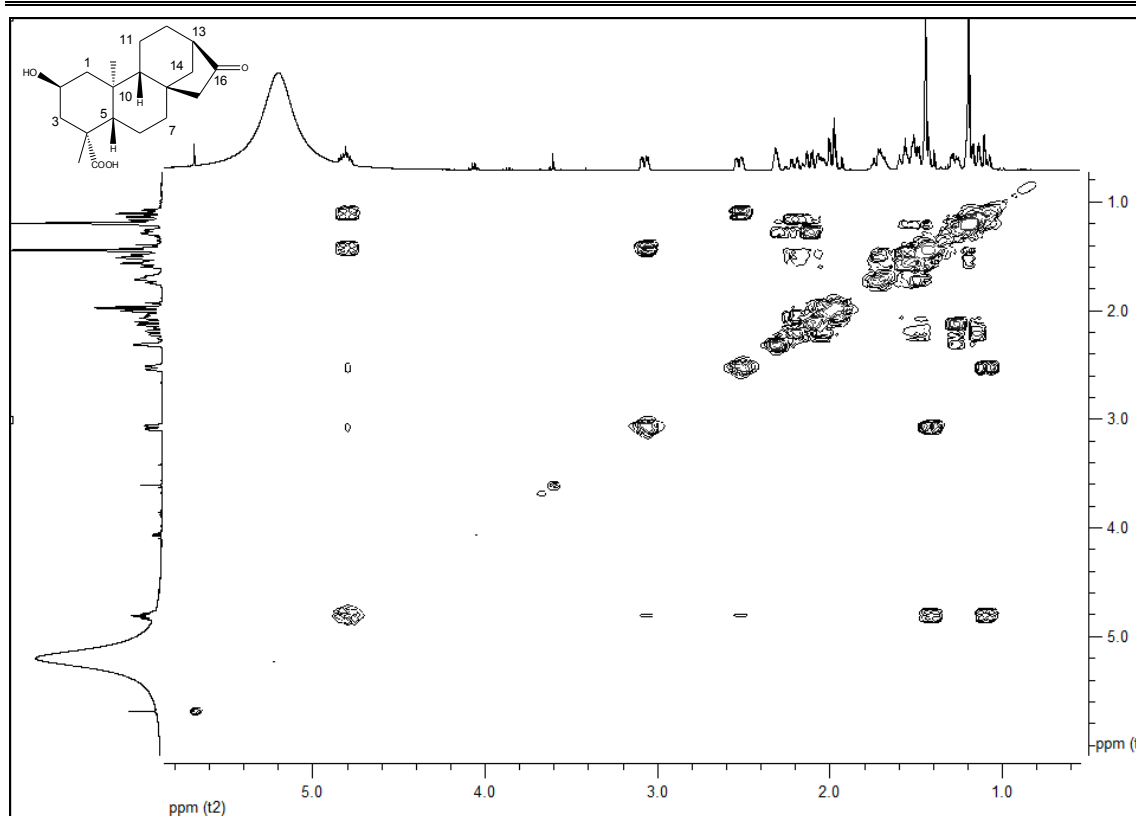


Figura 3.95 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, C₅D₅N, δ) do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**).

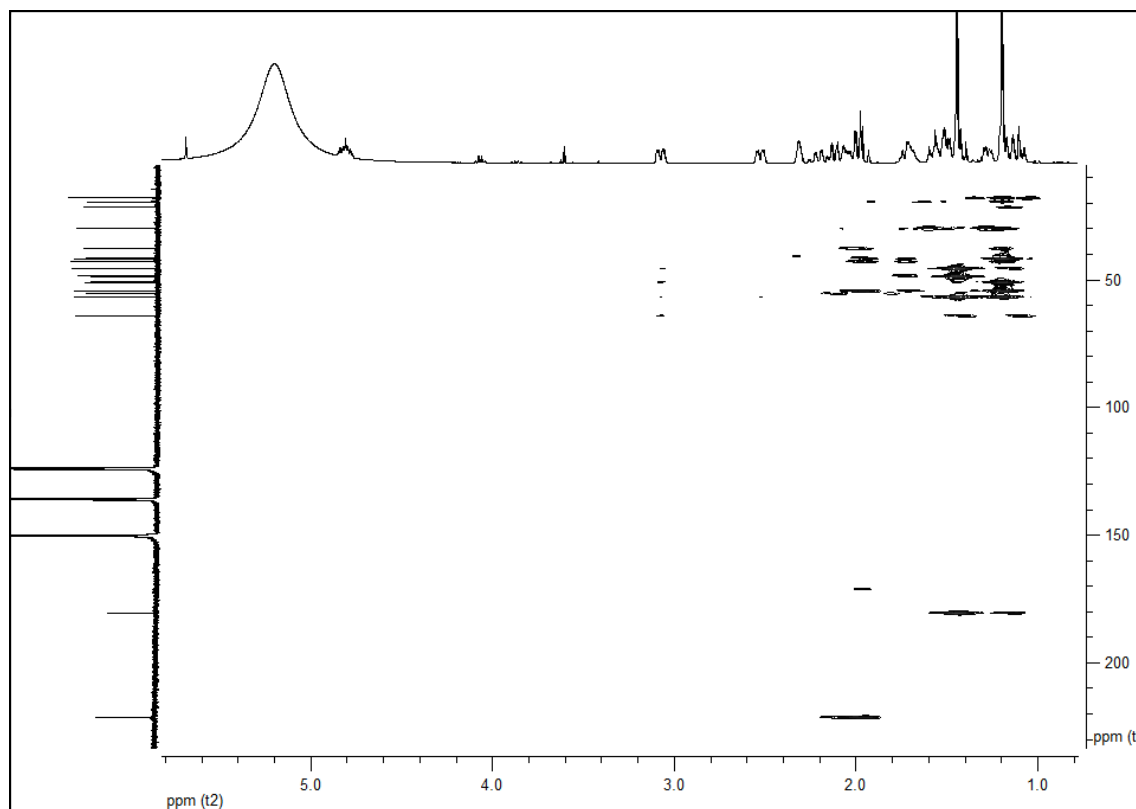


Figura 3.96 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, C₅D₅N, δ) do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**).

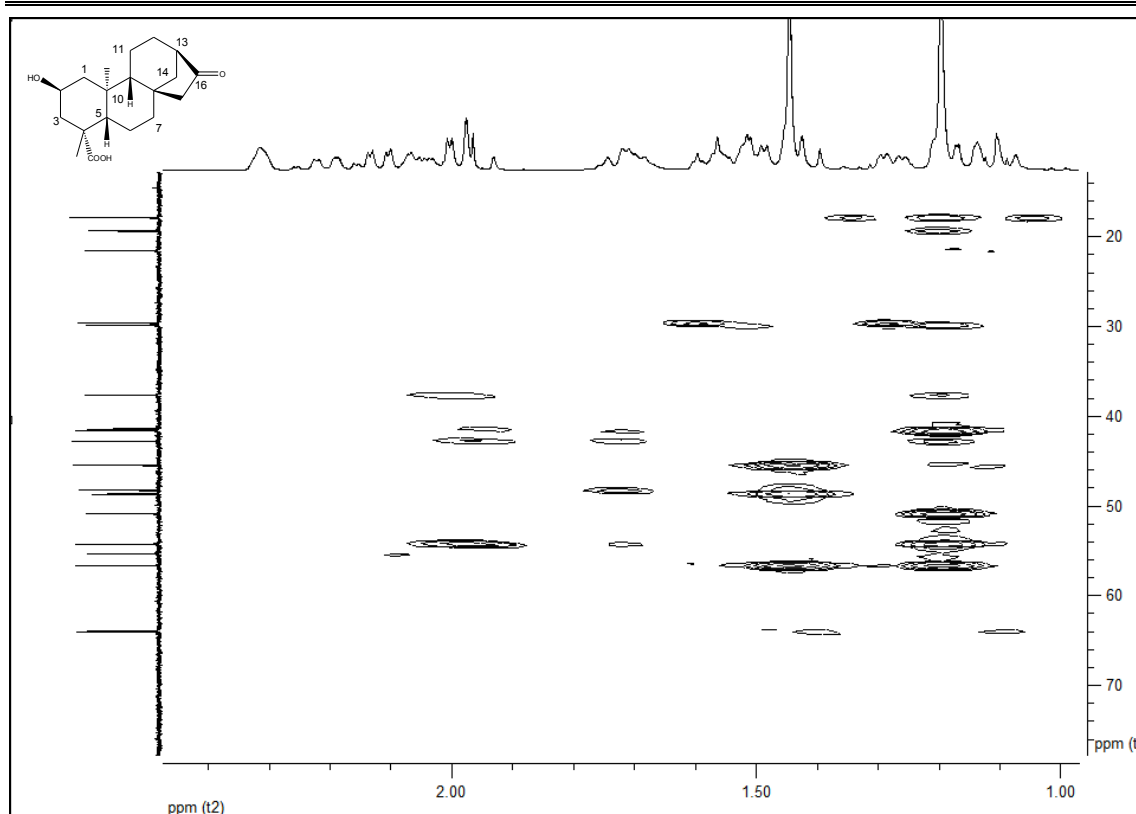


Figura 3.97 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, C₅D₅N, δ) do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**): seção expandida entre δ_H 1,0 – 2,5 e δ_C 15 – 75.

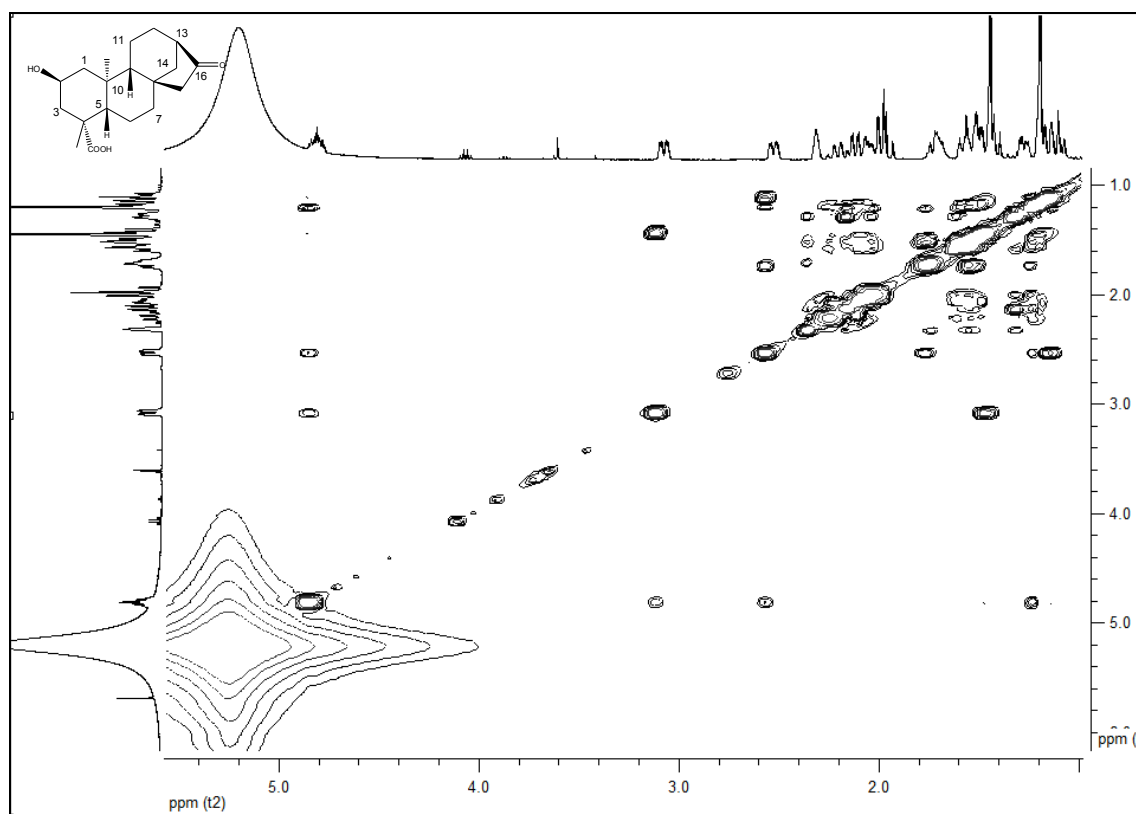


Figura 3.98 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, C₅D₅N, δ) do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**).

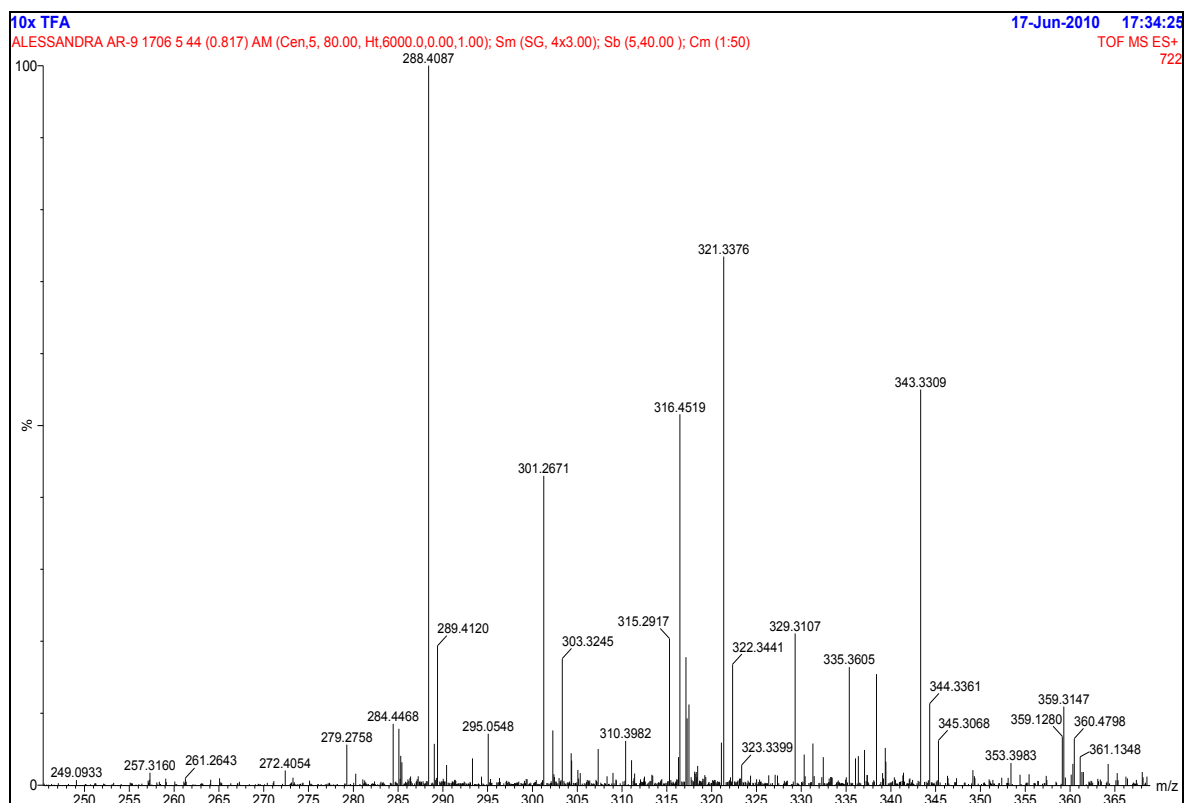


Figura 3.99 – Espectro de massas de alta resolução, obtido por ESI, do ácido *ent*-2 α -hidroxi-16-oxo-17-norcauran-19-óico (**94**).

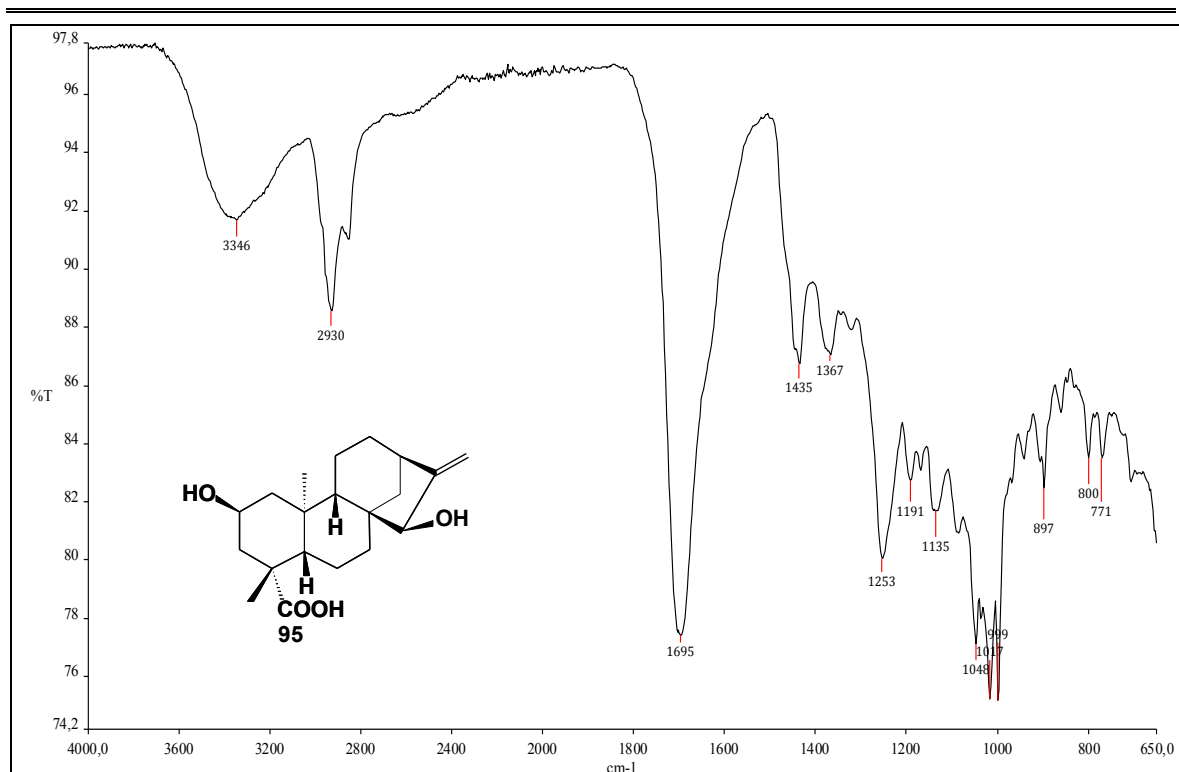


Figura 3.100 – Espectro de absorção na região do IV (inserção direta) do ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

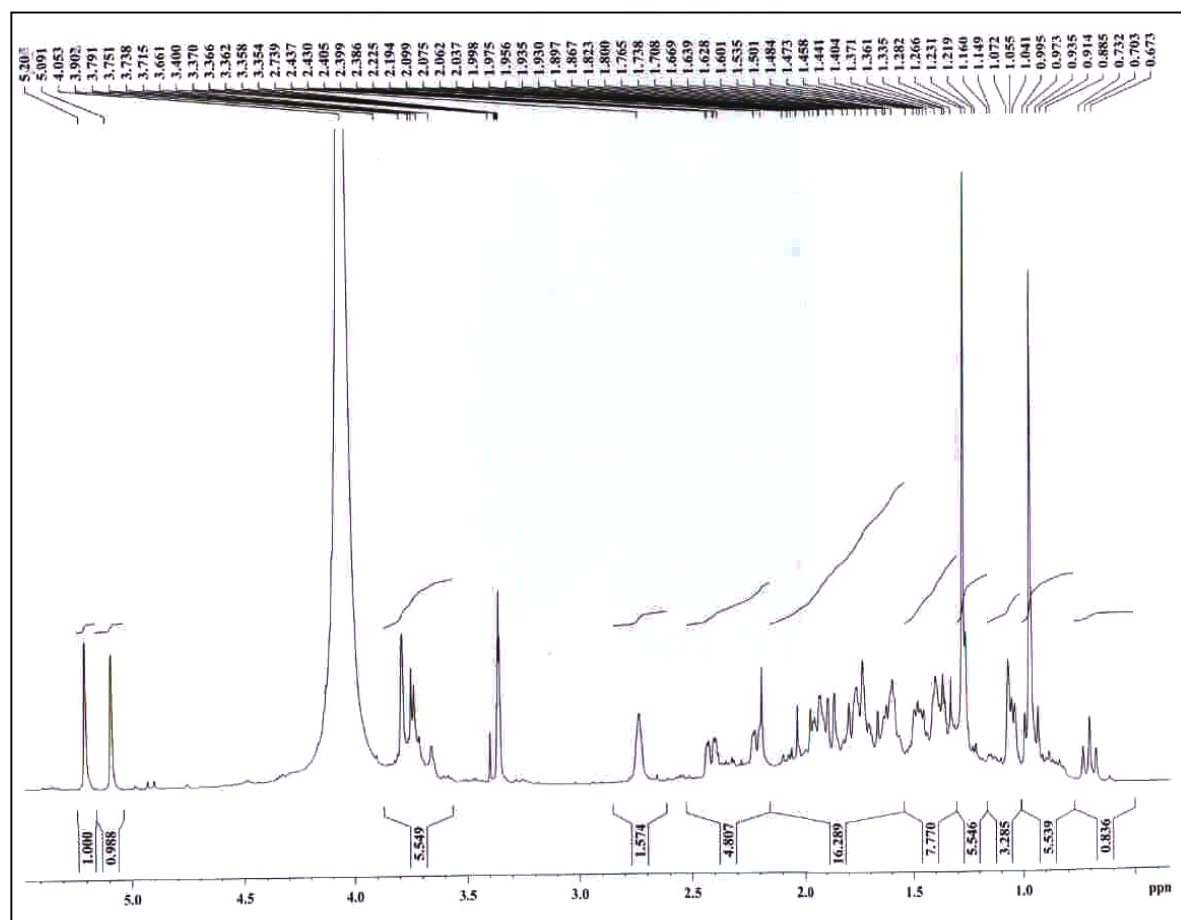


Figura 3.101 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

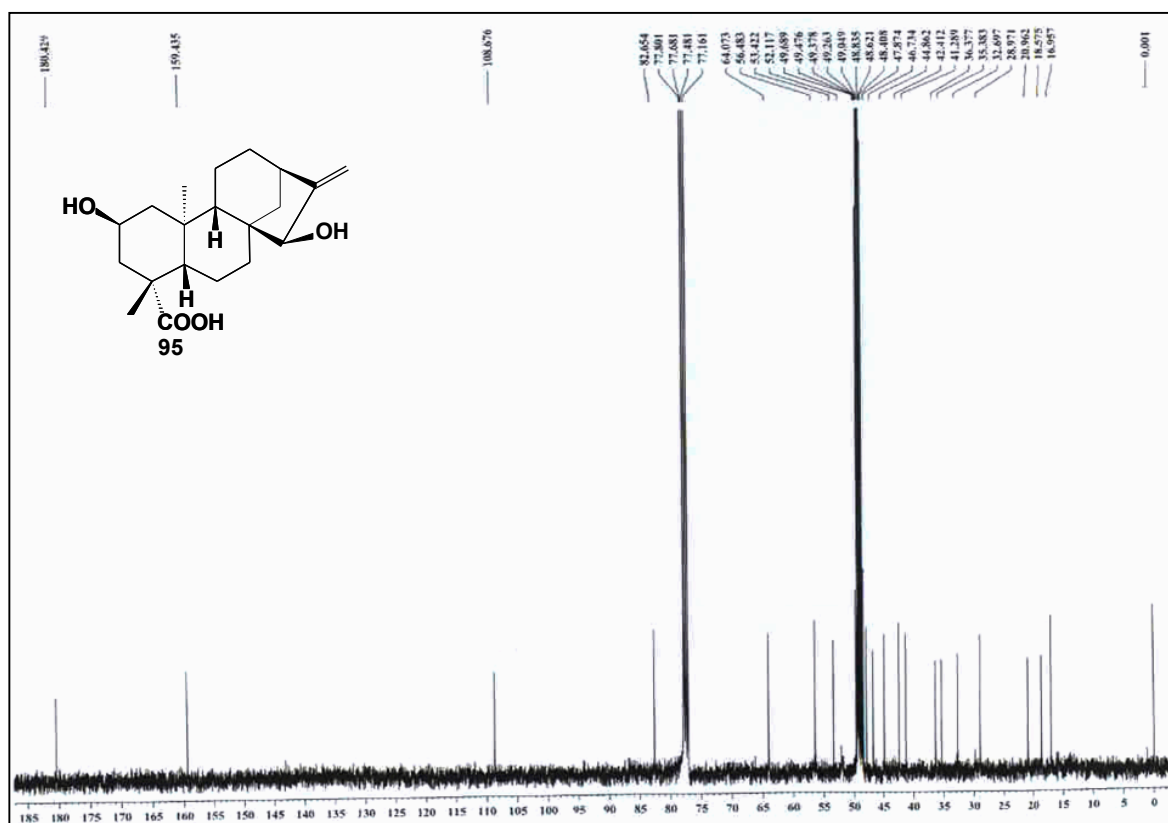


Figura 3.102 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

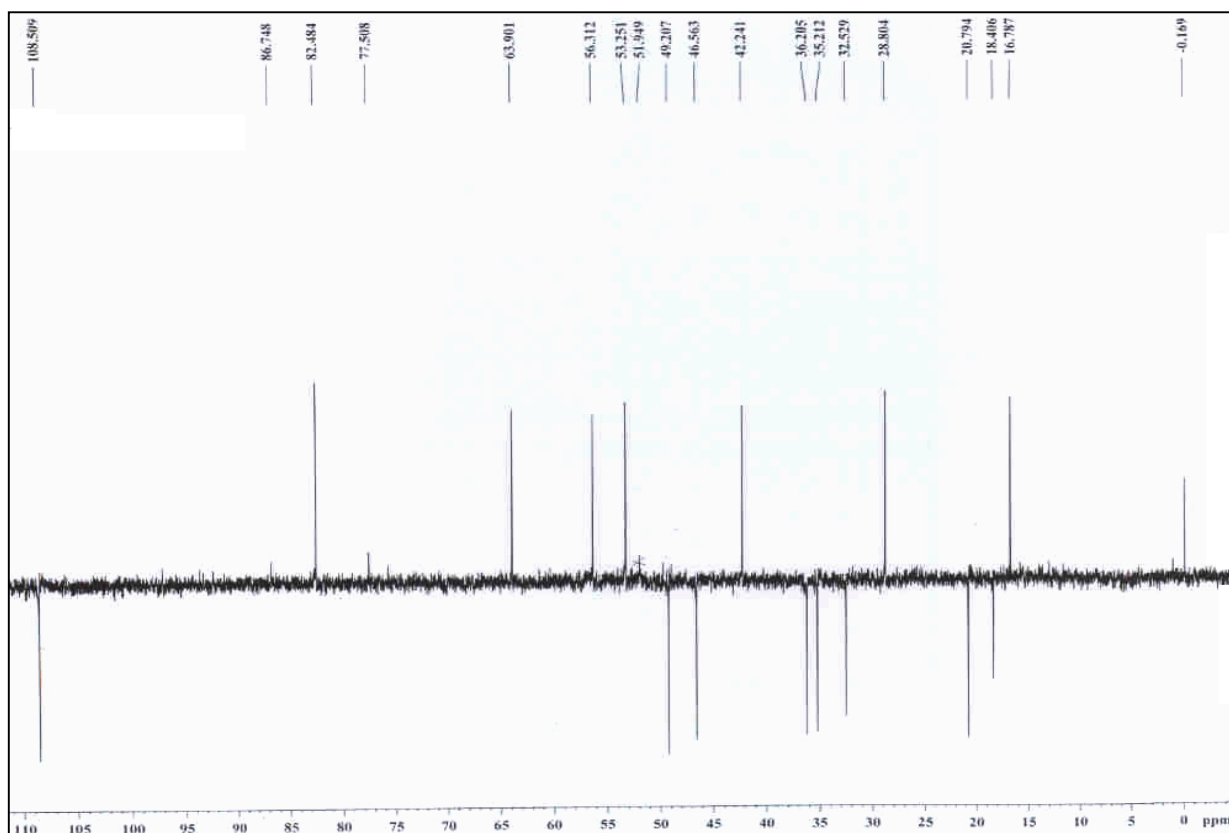


Figura 3.103 - Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

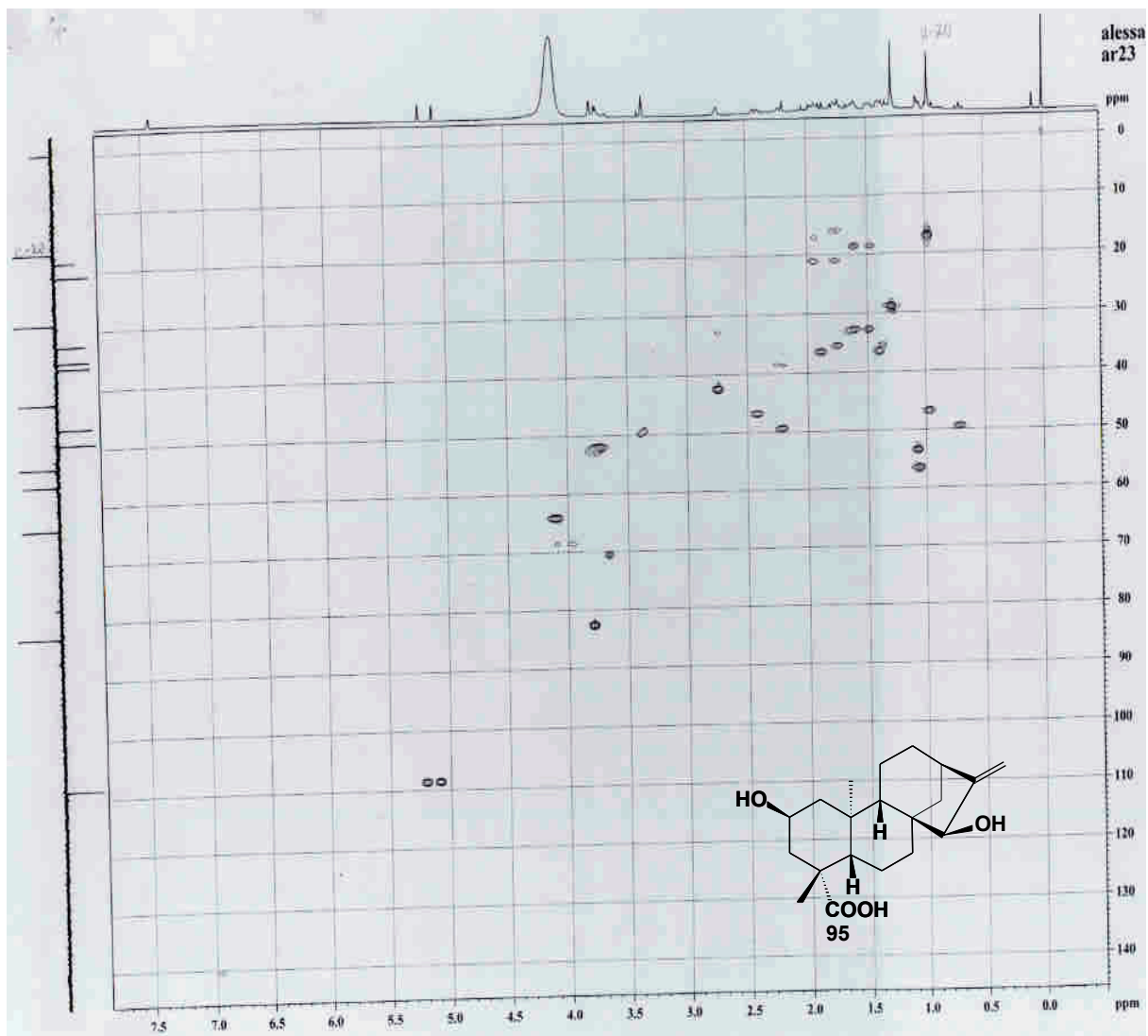


Figura 3.104 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl₃, δ) do *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

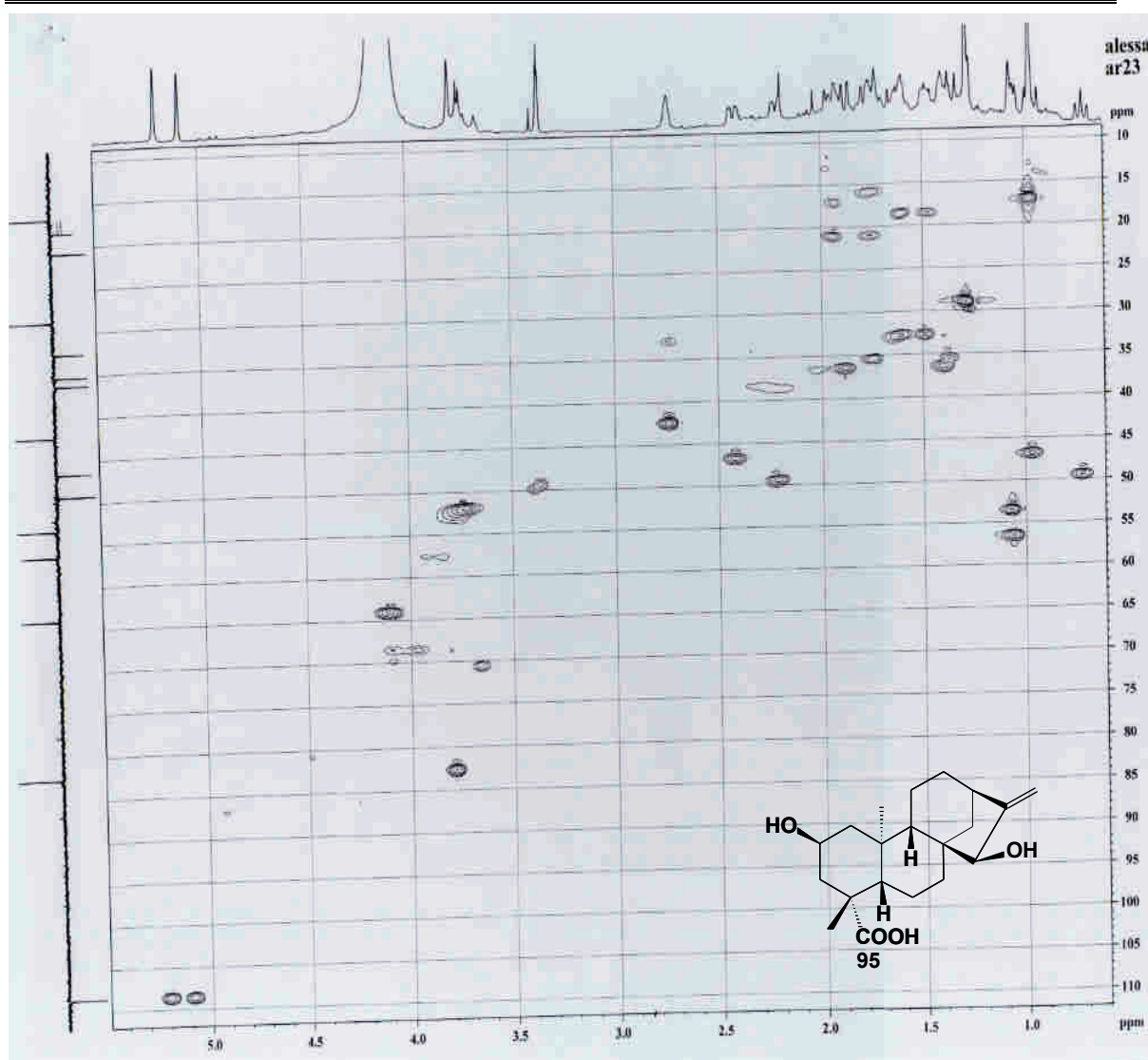


Figura 3.105 – Seção expandida entre δ_{H} 0,5 - 5,5 e δ_{C} 10,0 – 110,0 do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl_3 , δ) do ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

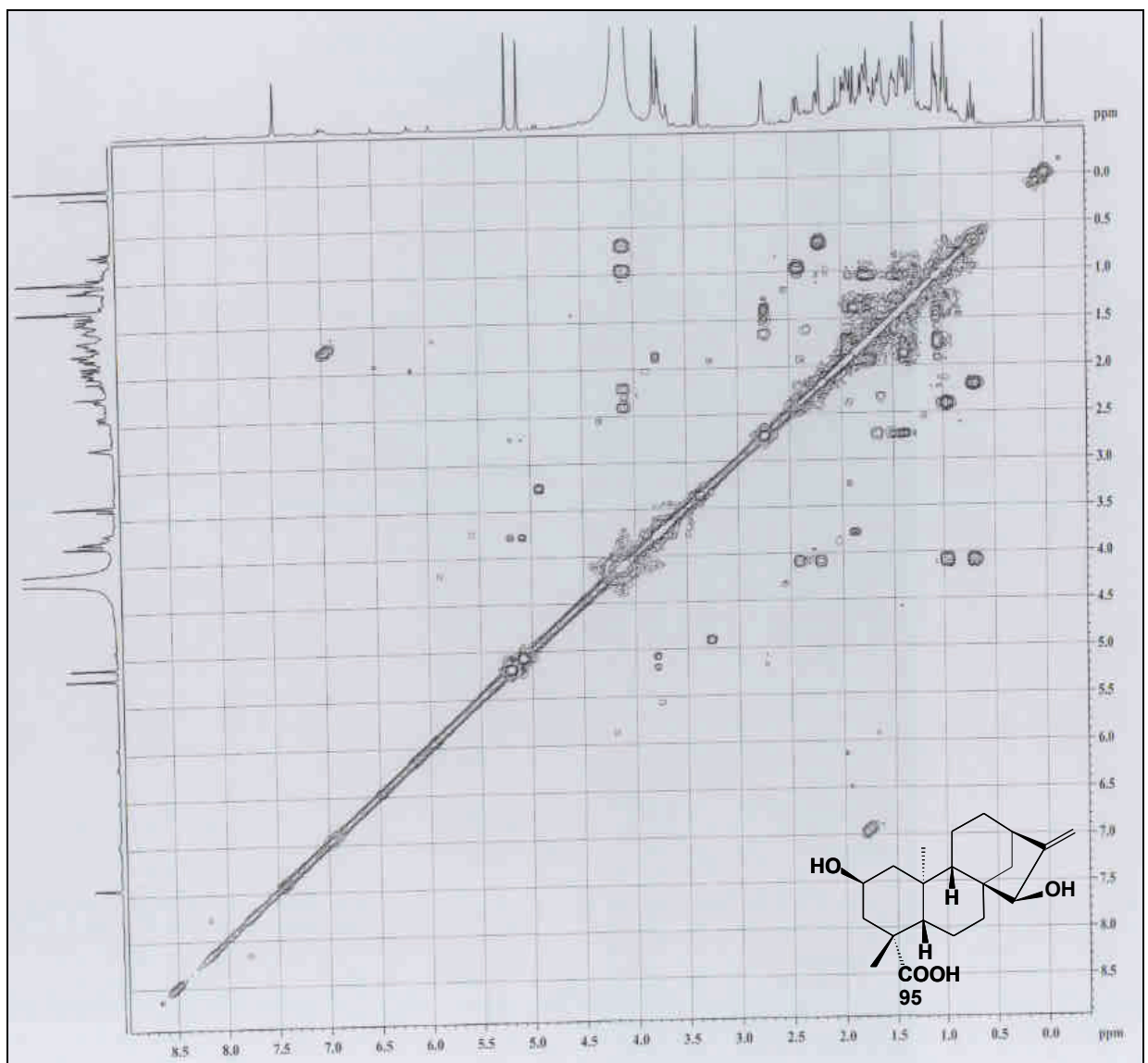


Figura 3.106 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl₃, δ) do ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

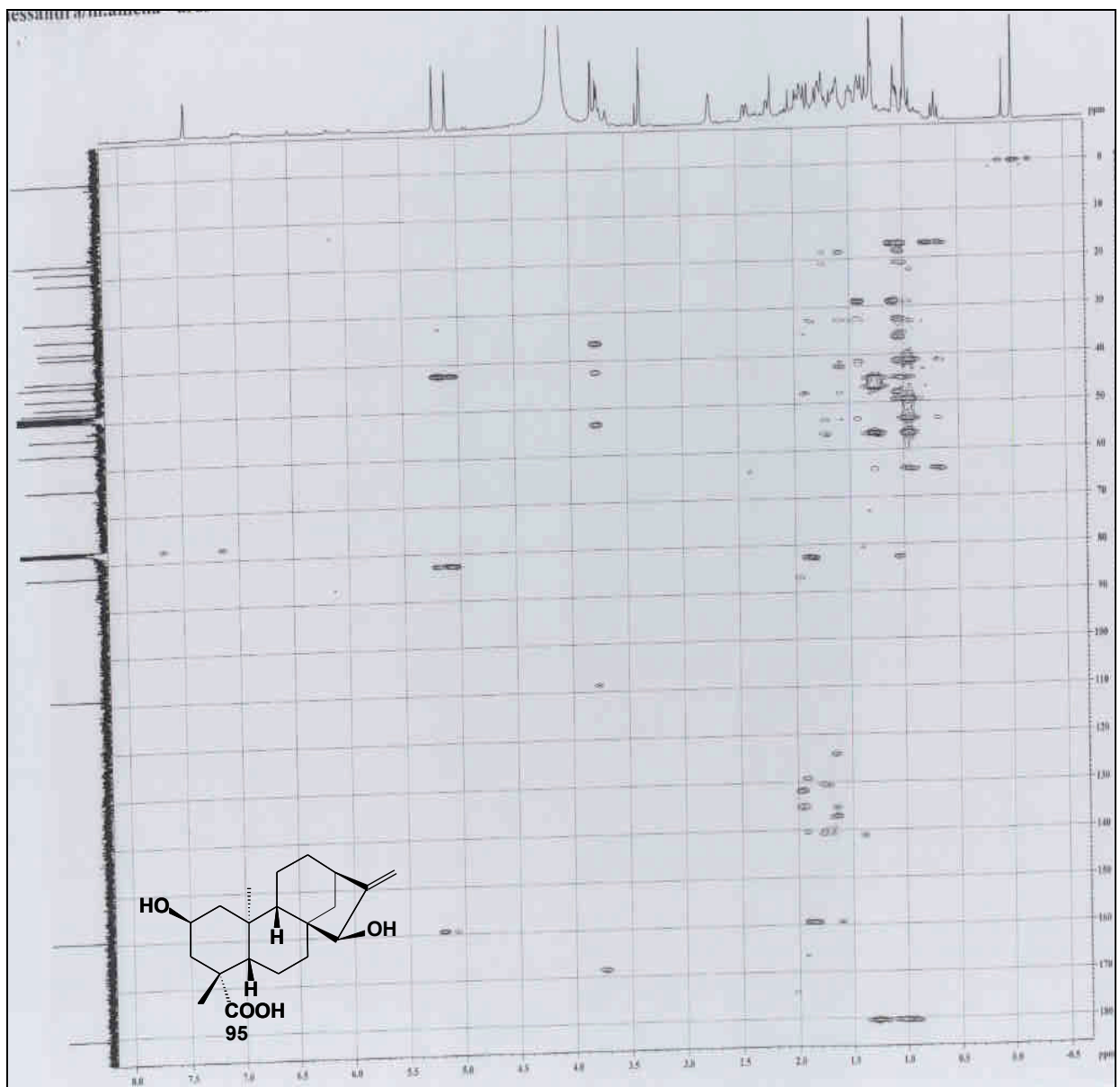


Figura 3.107 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl₃, δ) do ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

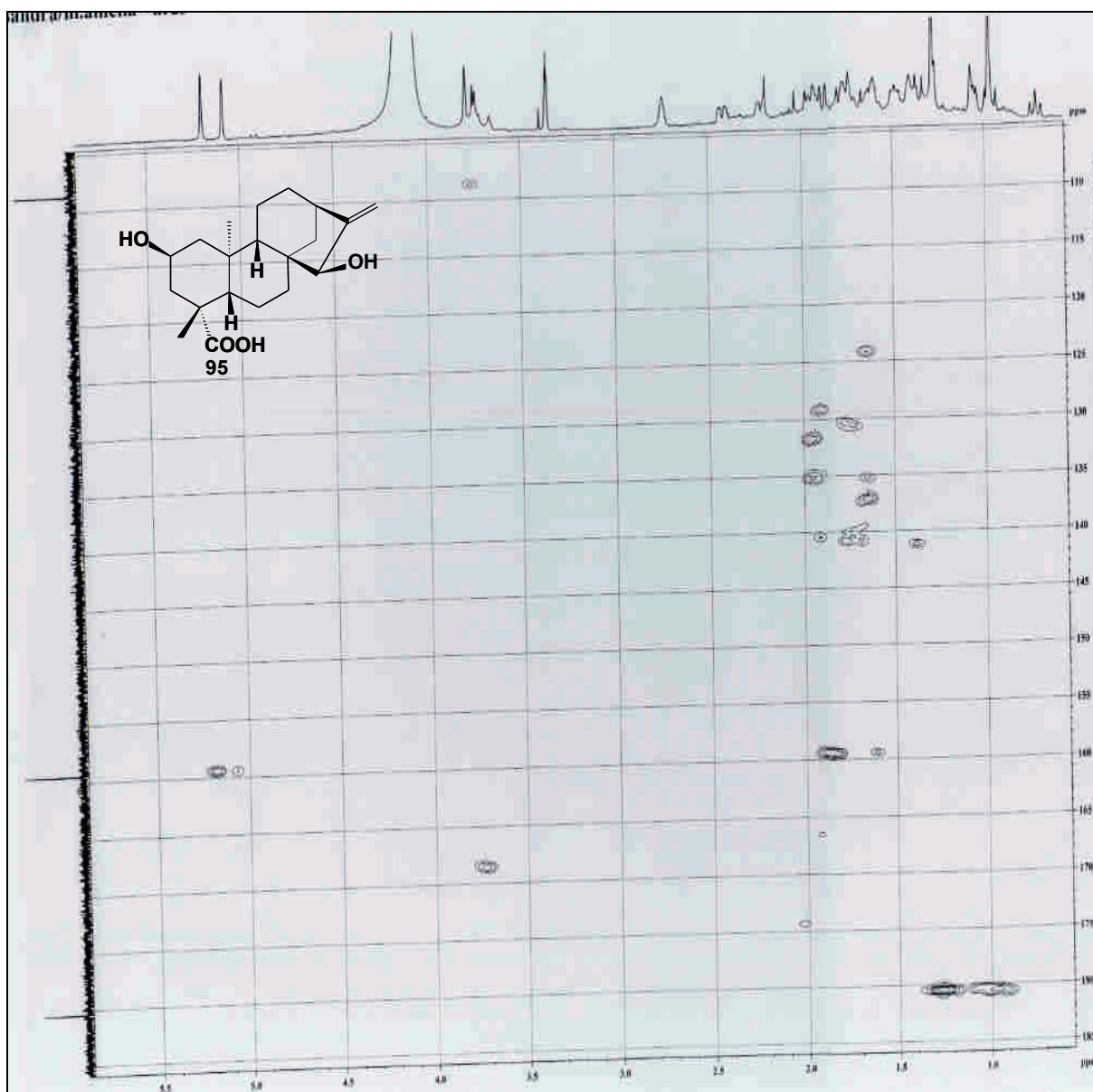


Figura 3.108 – Seção expandida entre δ_H 0,5 – 6,0 e δ_C 105,0 – 185,0 do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

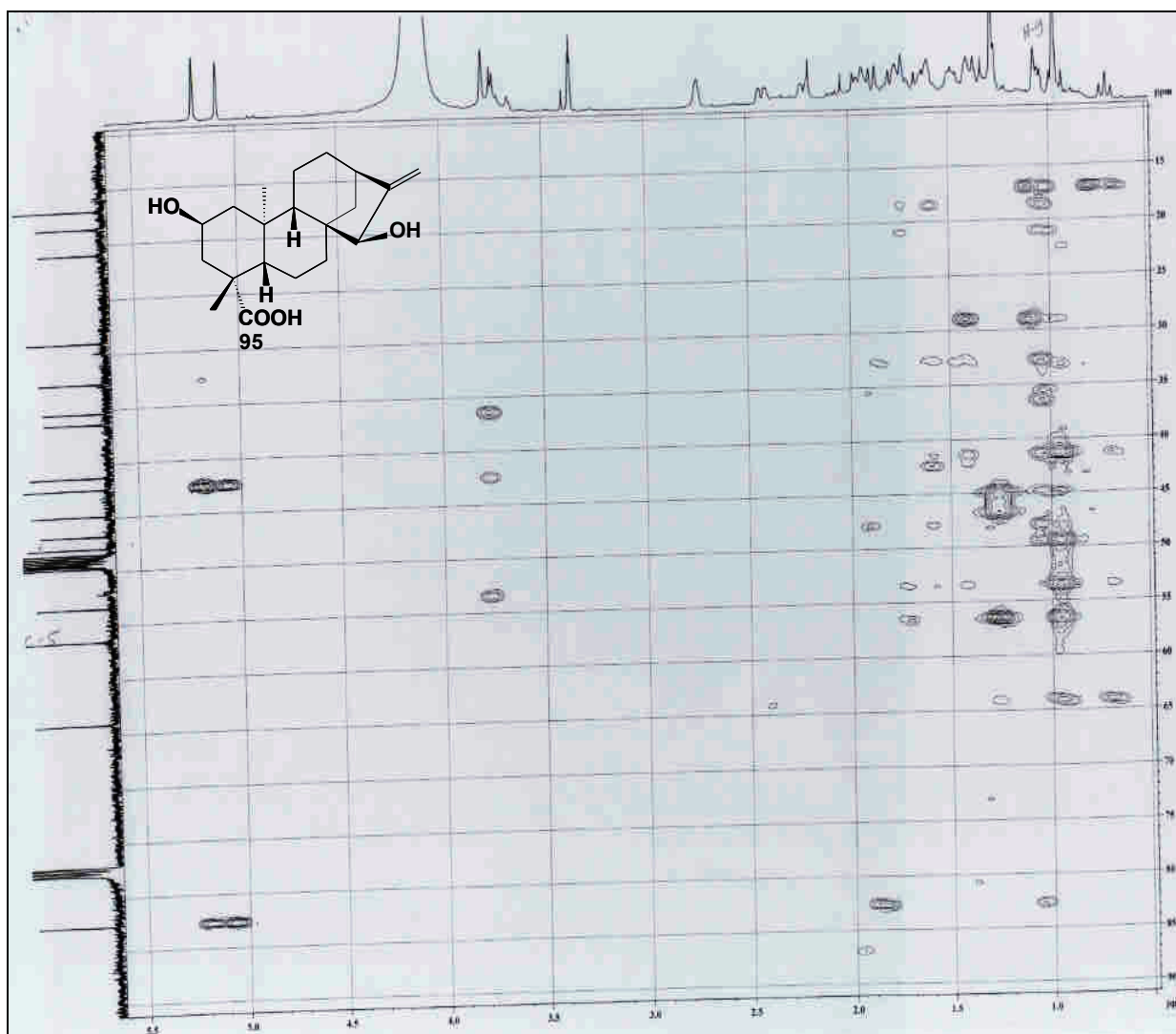


Figura 3.109 – Seção expandida entre δ_H 0,5 – 5,5 e δ_C 10,0 – 90,0 do mapa de contornos HMBC (400 MHz, $CDCl_3$, δ) do ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

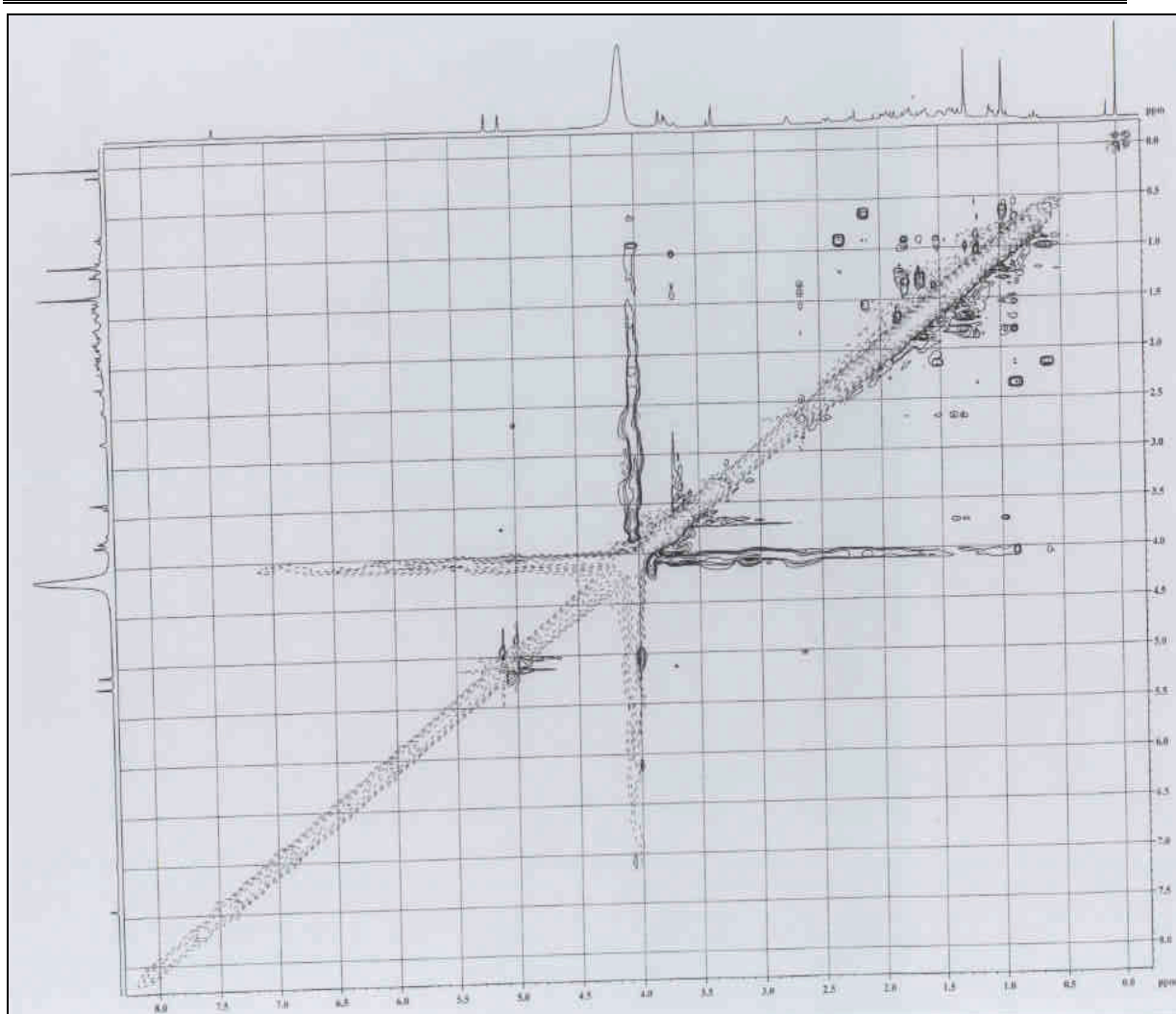


Figura 3.110 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl₃, δ) do ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

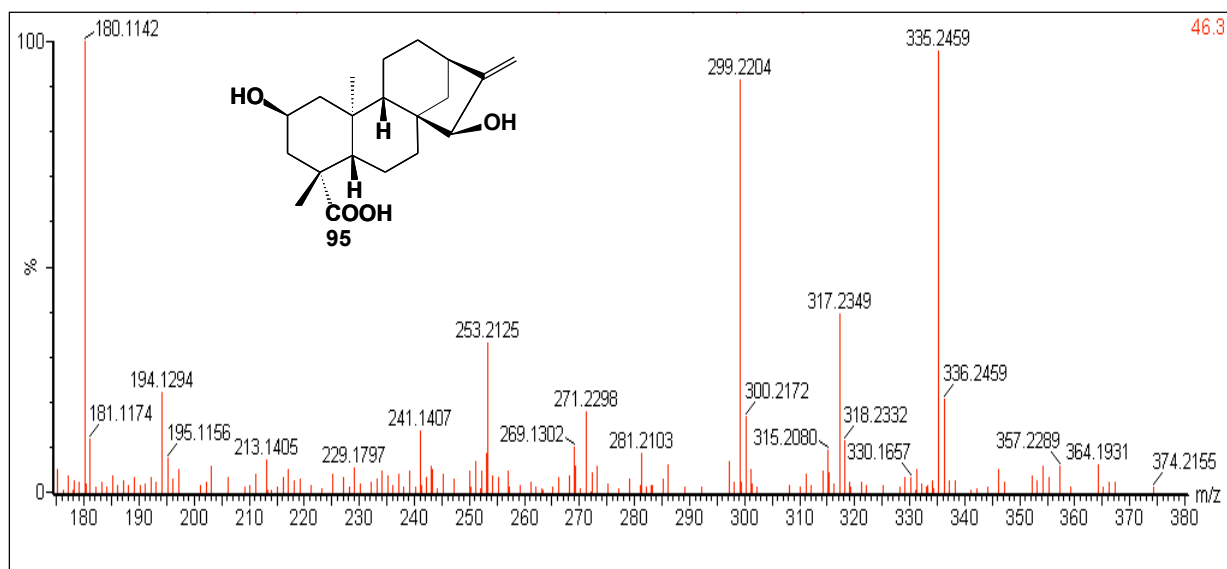


Figura 3.111 – Espectro de massas de alta resolução, obtido por ESI, do ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-caur-16-en-19-óico (**95**).

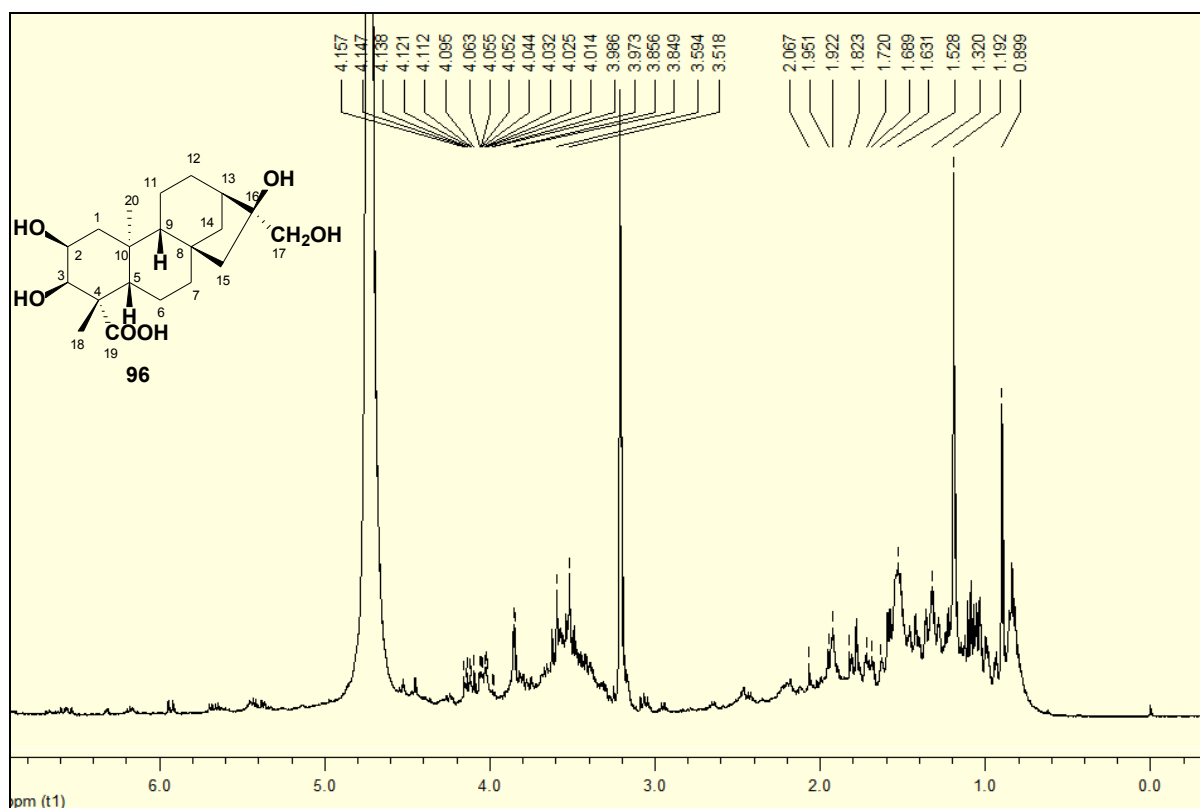


Figura 3.112 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido *ent*- $2\alpha,3\beta,16\alpha,17$ -tetrahydroxi-cauran-19-óico (**96**).

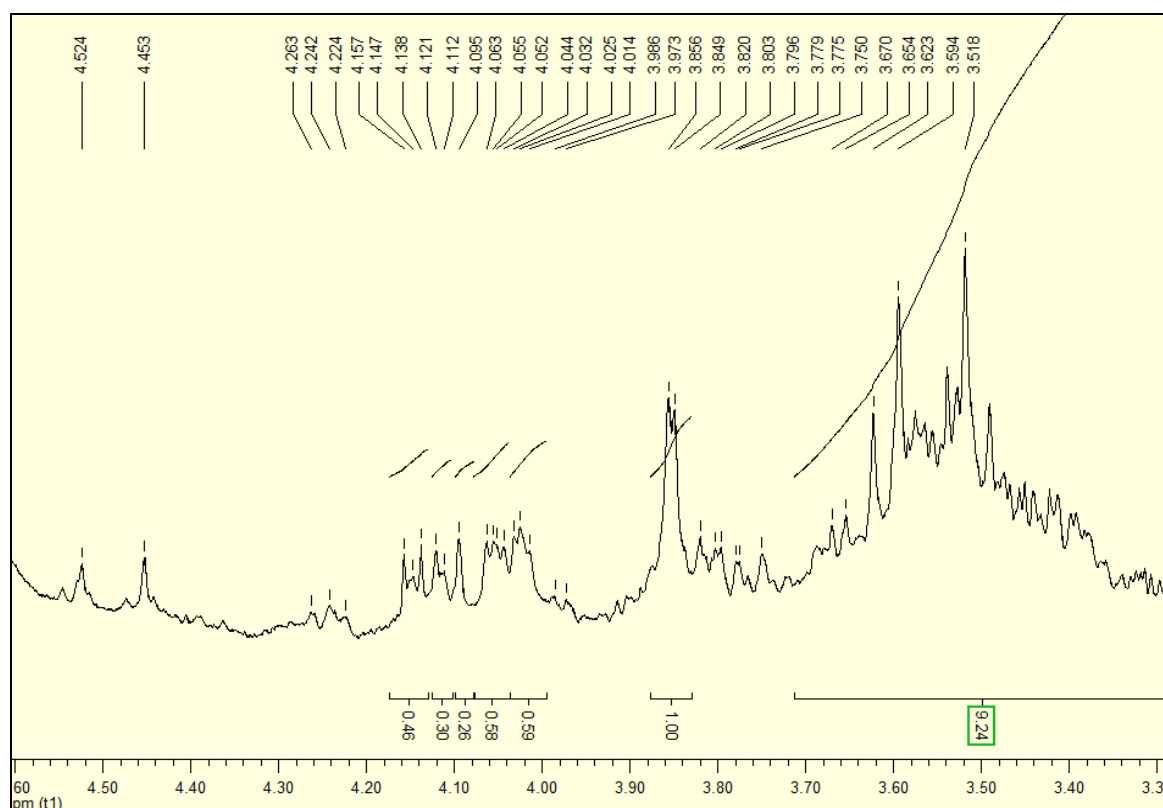


Figura 3.113 – Seção expandida do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido *ent*- $2\alpha,3\beta,16\alpha,17$ -tetrahydroxi-cauran-19-óico (**96**).

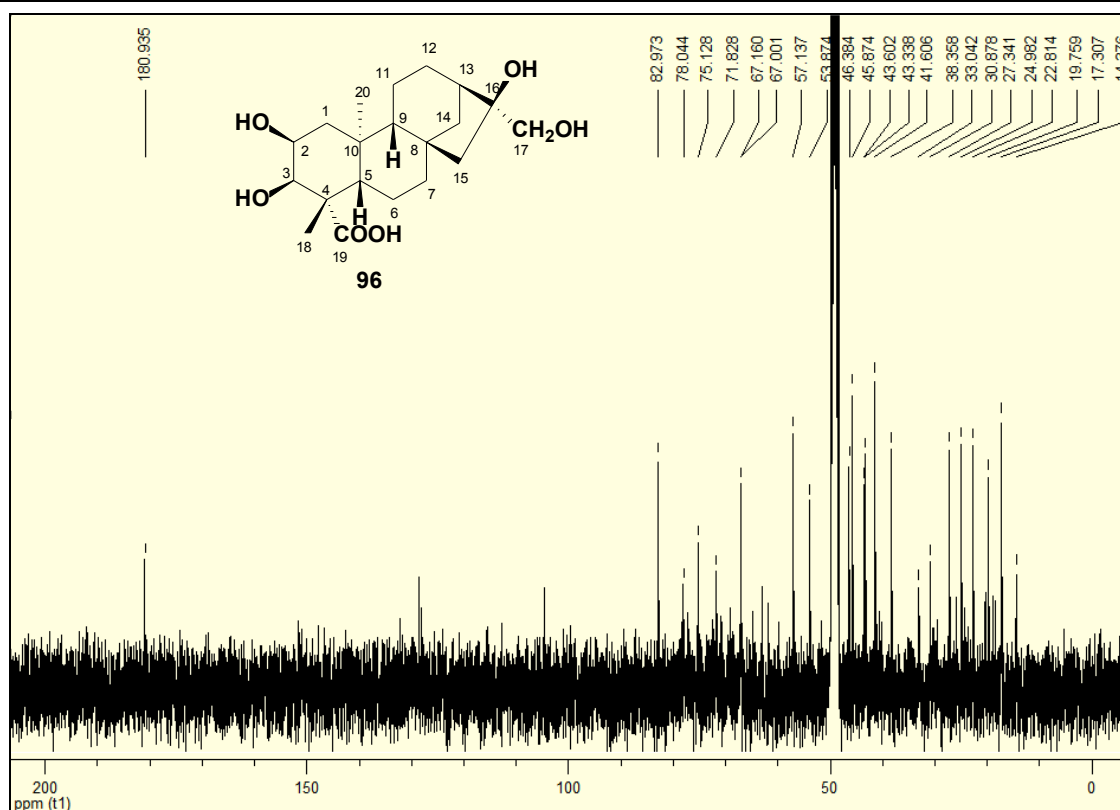


Figura 3.114 - Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD, δ) do ácido *ent*-2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahydroxi-cauran-19-óico (**96**).

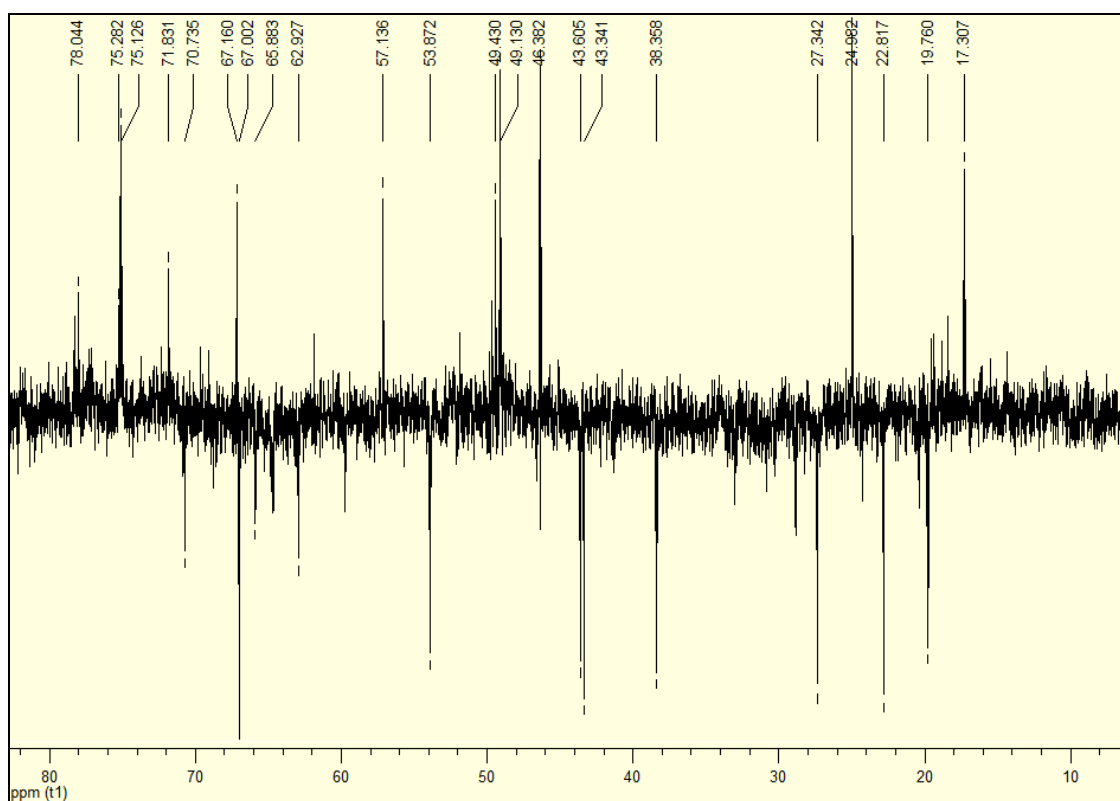


Figura 3.115 - Subespectro de RMN de ¹³C DEPT-135 (100 MHz, CD₃OD, δ) do ácido *ent*-2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahydroxi-cauran-19-óico (**96**).

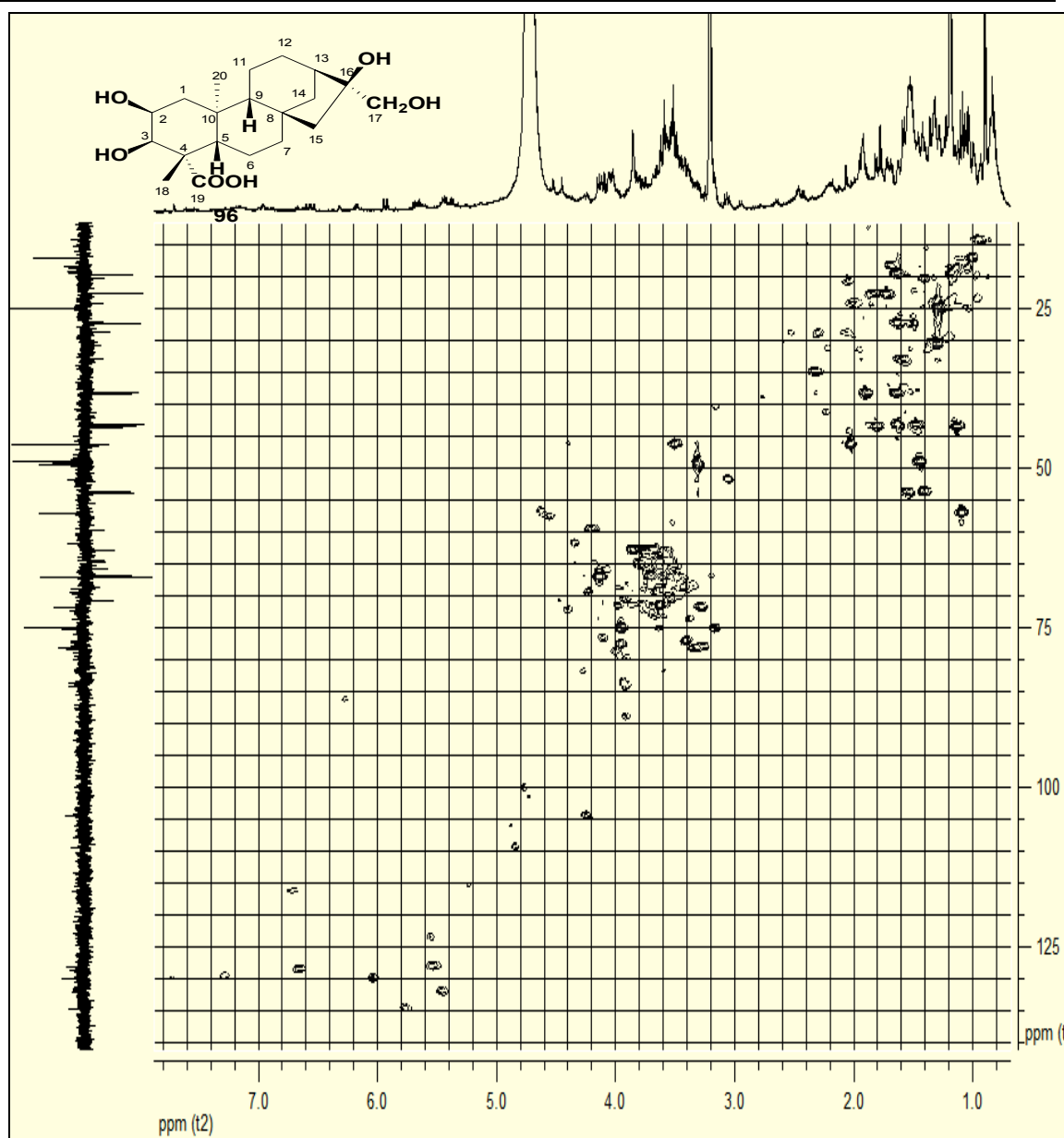


Figura 3.116– Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD₃OD, δ) do ácido *ent*-2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahydroxi-cauran-19-óico (**96**).

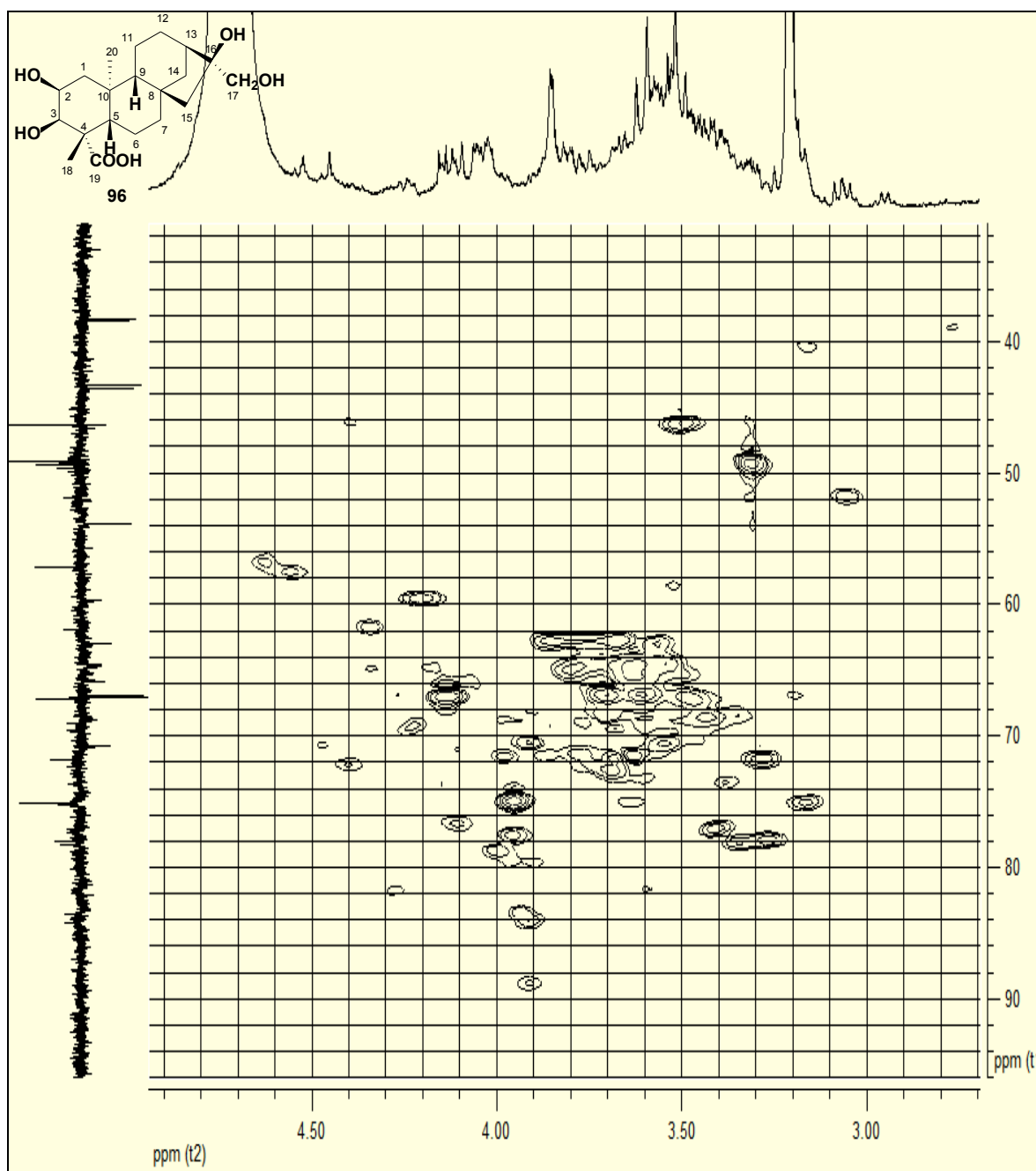


Figura 3.117 – Seção expandida (δ_{H} 0,5 – 2,5 e δ_{C} 10-50) do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido *ent*-2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico (96).

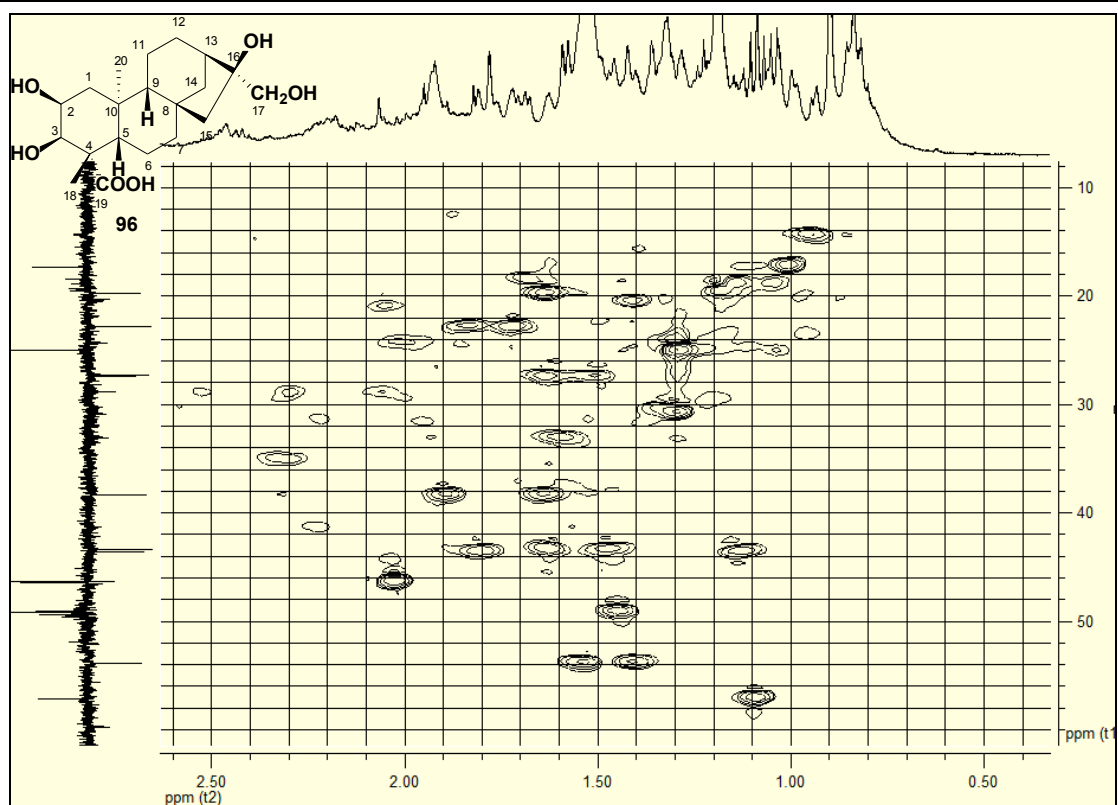


Figura 3.118 – Seção expandida (δ_H 0,5 – 2,5 e δ_C 10-50) do mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD₃OD, δ) do ácido *ent*-2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahydroxi-cauran-19-óico (96).

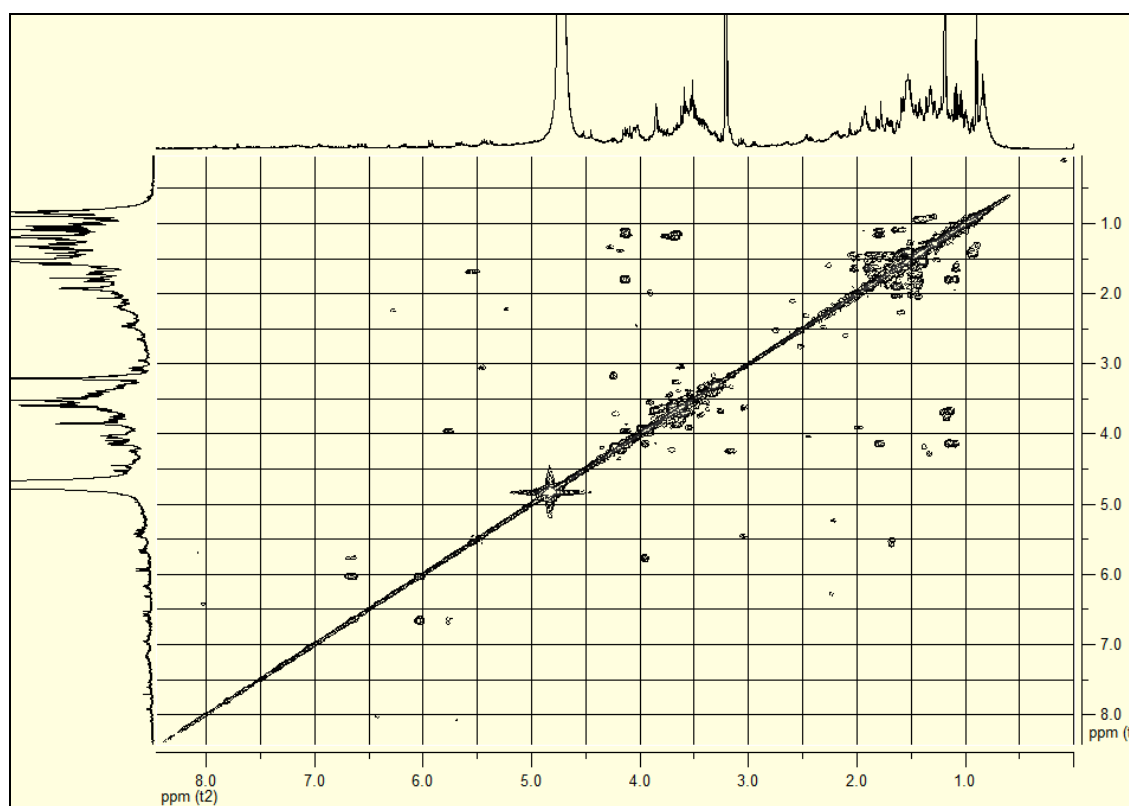


Figura 3.119 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD₃OD, δ) do ácido *ent*-2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahydroxi-cauran-19-óico (96).

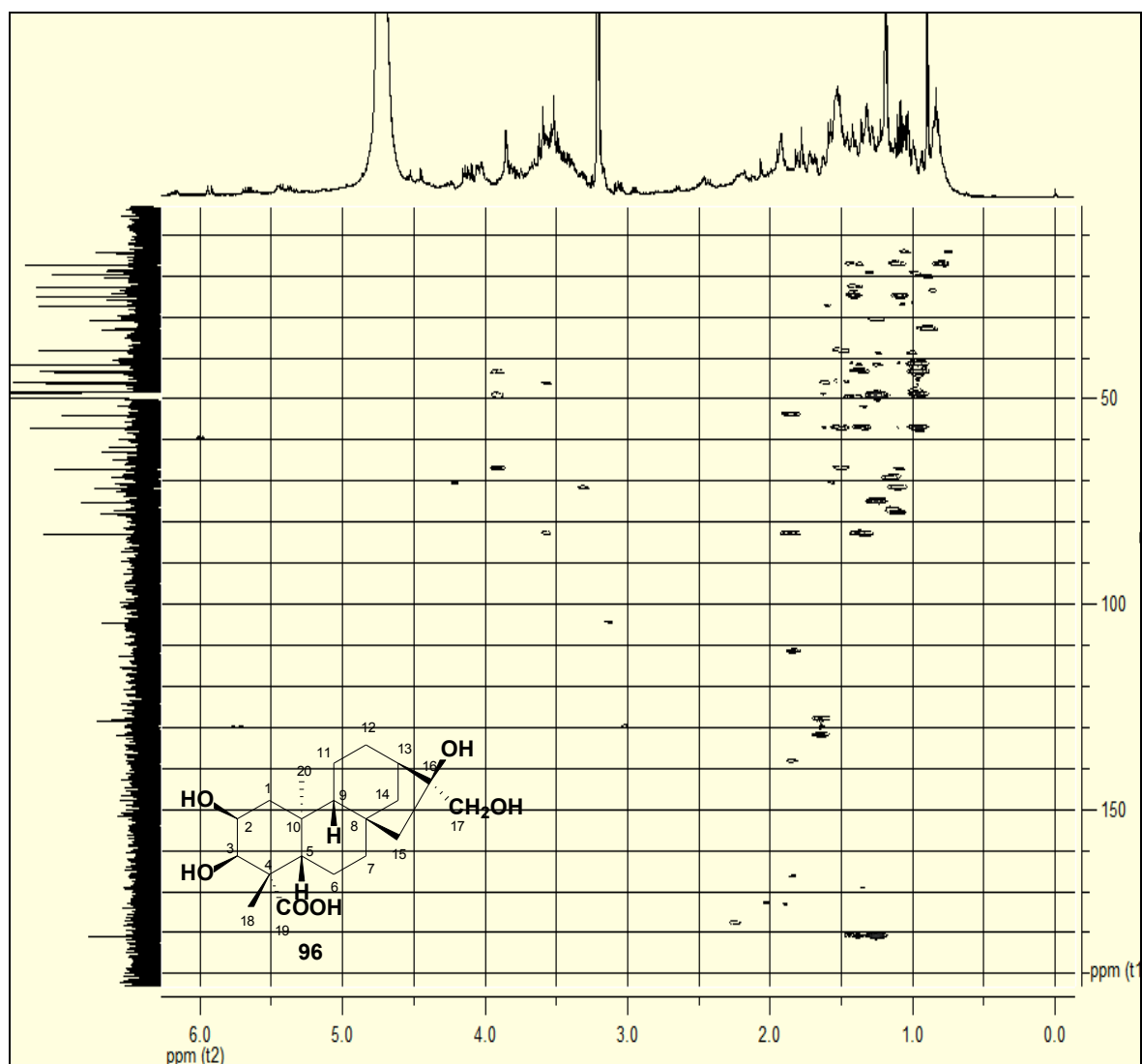


Figura 3.120 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ) do ácido *ent*-2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahydroxi-cauran-19-óico (**96**).

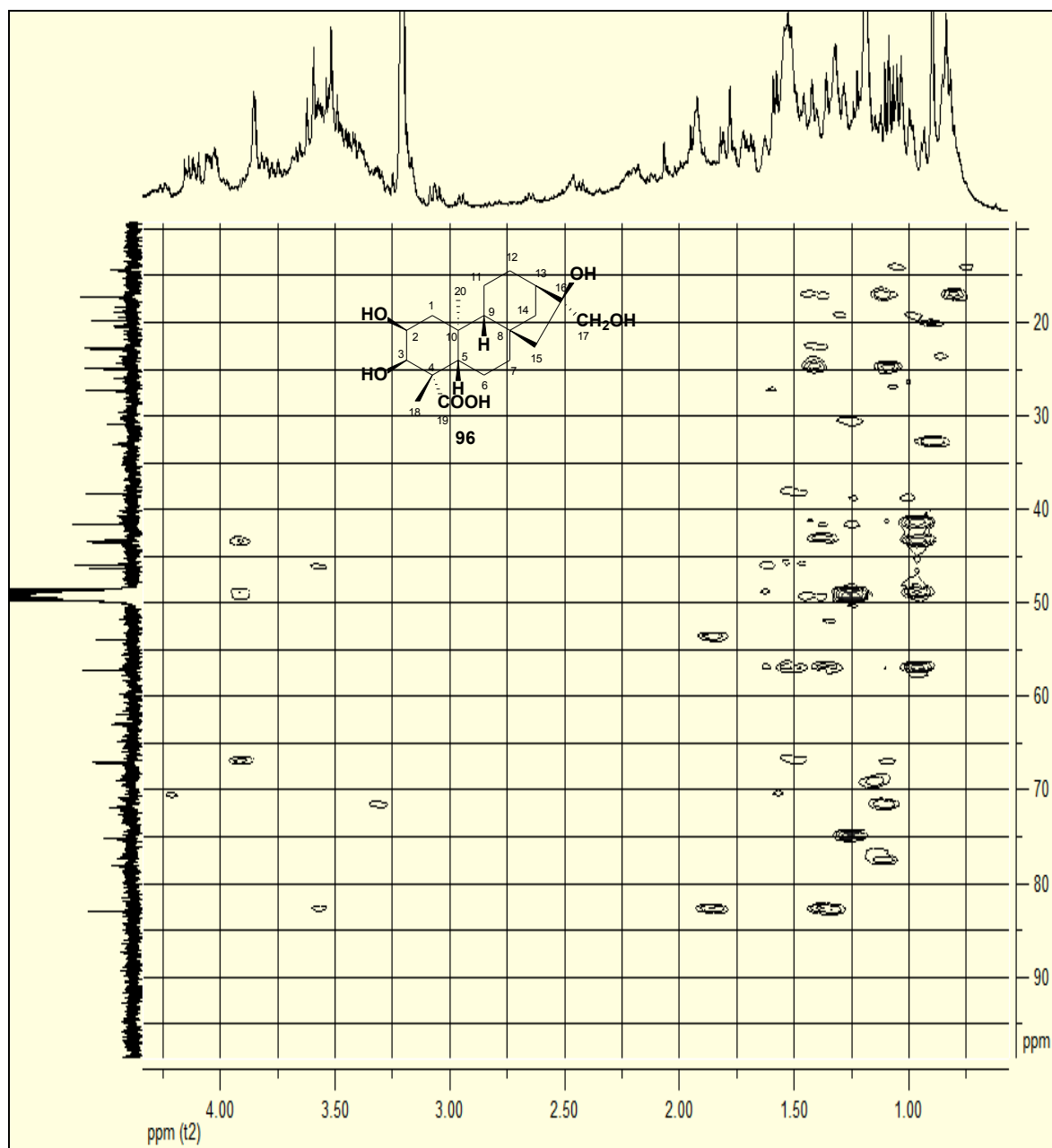


Figura 3.121 – Seção expandida (δ_H 1-4 e δ_C 10-95) mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3OD , δ) do ácido *ent*-2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahidroxi-cauran-19-óico (**96**).

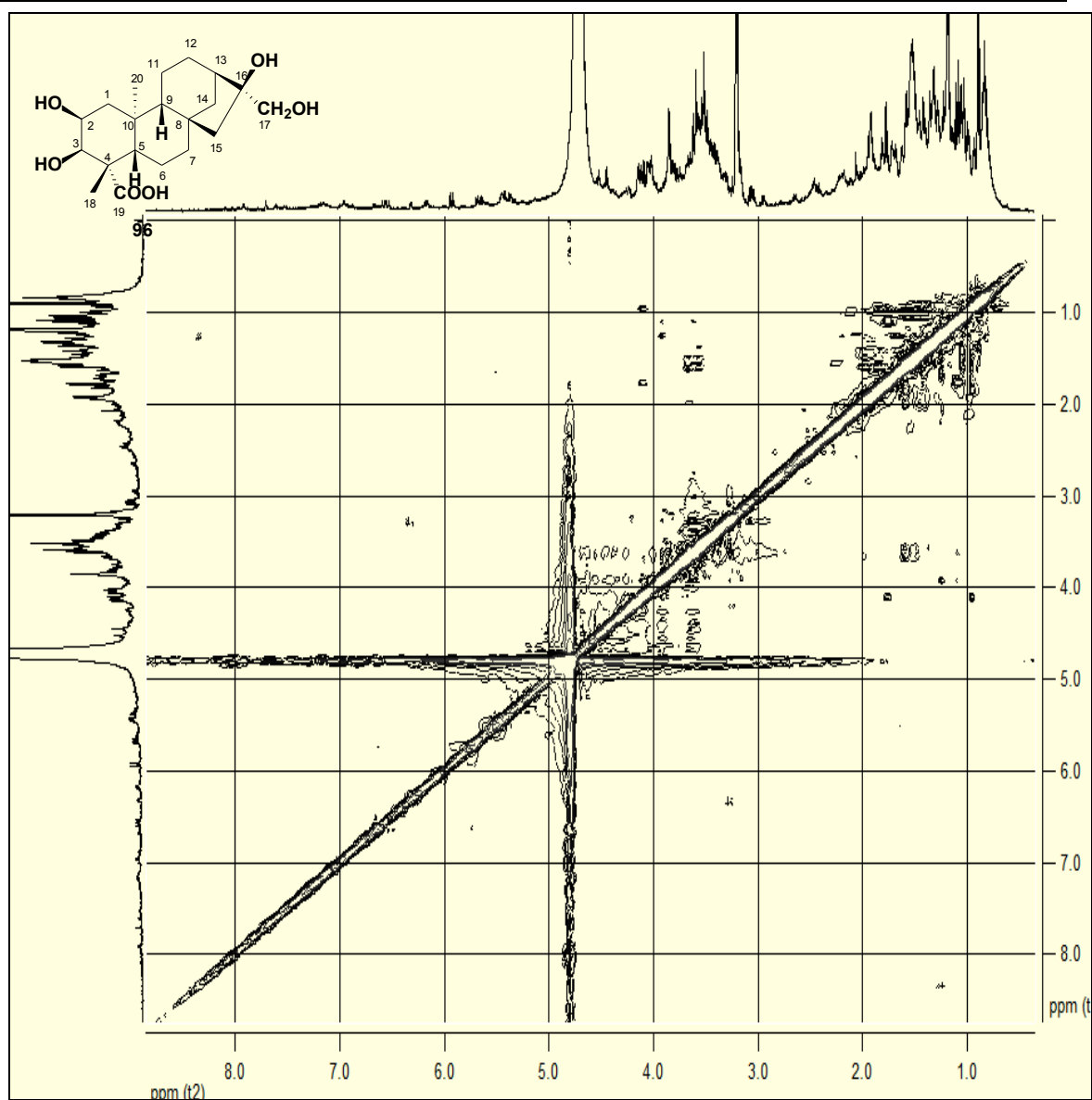


Figura 3.122 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CD₃OD, δ) do ácido *ent*-2 α ,3 β ,16 α ,17-tetrahydroxi-cauran-19-óico (**96**).