

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Exatas  
Departamento de Química

Giovanni Gontijo de Souza

Isolamento de fungos da própolis, síntese e  
biotransformação de clovanos com fungos e  
avaliação da atividade biológica

Belo Horizonte

2012

GIOVANNI GONTIJO DE SOUZA

**Isolamento de fungos da própolis, síntese  
e biotransformação de clovanos com  
fungos e avaliação da atividade biológica**

Tese apresentada ao 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**

**2012**

S729i Souza, Giovanni Gontijo de  
2012 Isolamento de fungos da própolis, síntese e  
T biotransformação de clovanos com fungos e avaliação da  
atividade biológica /Giovanni Gontijo de Souza. 2012.  
xxxi, 276 f. : il.

Orientador: Jacqueline Aparecida Takahashi  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais. Departamento de Química.

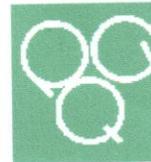
Bibliografia p.146-158

1. Química Orgânica - Teses 2. Propólis - Teses 3.  
Biotransformação - Teses I. Takahashi, Jacqueline  
Aparecida, Orientadora II. Título.

CDU 043



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



**"Isolamento de Fungos da Própolis, Síntese e Biotransformação de Clovanos  
com Fungos e Avaliação da Atividade Biológica"**

**Giovanni Gontijo de Souza**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora  
UFMG

Profa. Dâmaris Silveira  
UnB

Profa. Dênia Antunes Saúde Guimarães  
UFOP

Profa. Rosemeire Brondi Alves  
UFMG

Prof. Jarbas Magalhães Resende  
UFMG

Belo Horizonte, 30 de março de 2012.

Este trabalho foi elaborado sob a orientação da Professora Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Dedico este trabalho à Thays e a toda a nossa família.

# AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as conquistas da minha vida.

Agradeço à minha esposa Thays, por todo esse carinho, dedicação, amizade e amor imensurável, que tornam a minha vida muito mais bonita e especial. Obrigado por estar sempre ao meu lado.

Agradeço à minha família, esses anjos de Deus que guiam meus caminhos pela eternidade, por estarem sempre do meu lado, pelo carinho, pela amizade, e por esse amor especial que temos uns pelos outros.

Agradeço à Antônia, Benedito, Nathália e Lucas, pela amizade sincera e por me acolherem na sua família.

Agradeço à professora Jacqueline, pelas oportunidades, pelos ensinamentos e pela paciência.

Agradeço ao CNPq pelo financiamento do doutorado.

Agradeço à CAPES pelo financiamento do estágio de doutorado sanduíche na Espanha.

Agradeço aos professores Isidro, Rosário, Antonio e Rosa, da Universidad de Cádiz, pela orientação no estágio na Espanha.

Agradeço ao professor Ludwig, ao Lucas, ao Edson e à Mírian, pela ajuda com a identificação dos fungos.

Agradeço a todos os meus amigos e amigas. A amizade é verdadeiramente uma das coisas mais importantes de nossas vidas.

# SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxvi
RESUMO.....	xxviii
ABSTRACT .....	xxx
Introdução .....	1
1 Introdução .....	2
1.1 Biotransformações .....	2
1.2 Fontes promissoras de micro-organismos para reações de biotransformação.....	23
1.3 Objetivos do trabalho .....	26
Parte experimental .....	28
2 Parte experimental .....	29
2.1 Equipamentos .....	29
2.2 Reagentes.....	30
2.3 Coleta, isolamento e cultivo de fungos da própolis .....	31
2.3.1 Coleta e isolamento.....	31
2.3.2 Cultivo dos fungos em meio líquido.....	32
2.3.3 Extrações .....	33
2.4 Identificação dos fungos.....	33
2.4.1 Análise morfológica dos fungos .....	35
2.5 Determinação do perfil em CCD dos extratos dos fungos isolados da própolis.....	35
2.6 Síntese de sesquiterpenos clovânicos a partir do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ) ..	36
2.6.1 Síntese do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) .....	36
2.6.2 Síntese do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>126</b> ) .....	37
2.6.3 Síntese do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>127</b> ) .....	37
2.6.4 Síntese do 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>128</b> ) .....	38
2.6.5 Síntese do 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>129</b> ) .....	39
2.6.6 Síntese da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona ( <b>133</b> ) .....	40

2.6.7 Síntese da (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> )-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovan-9-lactona (134) a partir da 2β-metoxiclovan-9-ona (133) .....	40
2.6.8 Síntese do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol (135).....	41
2.6.9 Síntese do 5α-hidroxycariofil-4(12),8(13)-dieno (130).....	42
2.6.10 Síntese do (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-5-hidroxycariofil-8(13)-eno (131).....	43
2.6.11 Síntese do (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol.....	44
2.7 Biotransformação dos clovanos sintetizados .....	44
2.7.1 Preparo dos inóculos para as reações de biotransformação .....	44
2.7.2 Avaliação da toxicidade do 2β-metoxiclovan-9α-ol (73) sobre os fungos.....	46
2.7.3 Biotransformações sob agitação .....	47
2.7.4 Biotransformações sem agitação .....	48
2.7.4.1 Avaliação da influência de modificações das posições 2β e 9α do 2β-metoxiclovan-9α-ol (73) em reações de biotransformação com <i>P. minioluteum</i> ....	52
2.8 Bioensaio de inibição de crescimento do fungo <i>Botrytis cinerea</i> .....	53
2.9 Bioensaio de inibição de crescimento de sementes de <i>Lactuca sativa</i> .....	54
Resultados e discussão .....	56
3 Resultados e discussão .....	57
3.1 Identificação dos fungos isolados da própolis .....	57
3.2 Síntese de clovanos a partir do óxido de cariofileno .....	62
3.2.1 Análise estrutural.....	64
3.2.1.1 Óxido de cariofileno (125) .....	64
3.2.1.2 2β-Metoxiclovan-9α-ol (73) .....	65
3.2.1.3 2β-Etoxiclovan-9α-ol (126).....	70
3.2.1.4 2β-Propoxiclovan-9α-ol (127).....	73
3.2.1.5 2β-Butoxiclovan-9α-ol (128).....	77
3.2.1.6 2β-Pentoxiclovan-9α-ol (129).....	80
3.2.1.7 2β-Metoxiclovan-9-ona (133).....	83
3.2.1.8 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> )-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovan-9-lactona (134) .....	86
3.2.1.9 Acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol (135) .....	91
3.2.1.10 (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol (132) .....	94
3.2.1.11 2β-(2-(4-nitrofenoxi)etoxi)clovan-9α-ol (100).....	98
3.3 Biotransformações dos clovanos com os fungos <i>P. palustris</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. jackzewskii</i> e <i>P. minioluteum</i> .....	101

3.3.1 Biotransformações sob agitação .....	101
3.3.1.1 Clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol ( <b>75</b> ) .....	103
3.3.1.2 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ) .....	106
3.3.1.3 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol ( <b>137</b> ) .....	110
3.3.2 Biotransformações sem agitação .....	114
3.3.2.1 Biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) com o fungo <i>P. palustris</i> .....	114
3.3.2.1.1 Clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol ( <b>76</b> ) .....	115
3.3.2.1.2 Lactona ( <b>138</b> ) obtida na biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) com o fungo <i>P. palustris</i> por 10 dias .....	119
3.3.2.2 Biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) com o fungo <i>P. citrinum</i> .....	121
3.3.2.3 Biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) com o fungo <i>P. minioluteum</i> .....	122
3.3.2.4 Avaliação da influência da cadeia lateral de clovanos em reações de biotransformação com o fungo <i>P. minioluteum</i> .....	123
3.3.2.4.1 Biotransformação de clovanos substituídos em C-2 com o fungo <i>P. minioluteum</i> .....	125
3.3.2.4.2 Biotransformação do acetato de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>135</b> ) .....	129
3.3.2.5 Biotransformação da lactona <b>134</b> com o fungo <i>P. minioluteum</i> .....	132
3.4 Resultados dos bioensaios realizados com os clovanos .....	134
3.4.1 Resultados obtidos no bioensaio de inibição de crescimento do fungo <i>B. cinerea</i> .....	134
3.4.2 Resultados do bioensaio de inibição de crescimento de sementes de <i>Lactuca sativa</i> .....	137
Conclusões .....	141
4 Conclusões .....	142
Referências bibliográficas .....	145
5 Referências bibliográficas .....	146
Anexo 1 .....	158
Dados físico-químicos .....	159
Anexo 2 .....	168
Espectros e cromatogramas .....	169

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Condições gerais utilizadas nas biotransformações feitas com os fungos <i>P. palustris</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. jackzewskii</i> e <i>P. miniolutem</i> , sem agitação.....	49
<b>Tabela 2</b> – Gênero e espécie dos fungos isolados de própolis e massas obtidas dos extratos respectivos.....	61
<b>Tabela 3</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ , obtidos e da literatura, para o óxido de cariofileno ( <b>125</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz .....	65
<b>Tabela 4</b> – Dados de RMN uni e bidimensionais do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz. ....	68
<b>Tabela 5</b> – Dados de RMN uni e bidimensionais do $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>126</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz .....	72
<b>Tabela 6</b> – Dados de RMN uni e bidimensionais do $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>127</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz .....	76
<b>Tabela 7</b> – Dados de RMN uni e bidimensionais do $2\beta$ -butoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>128</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz .....	79
<b>Tabela 8</b> – Dados de RMN uni e bidimensionais do $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>129</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz .....	82
<b>Tabela 9</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ , obtidos e da literatura, para a $2\beta$ -metoxiclovan- $9$ -ona ( <b>133</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz.....	86
<b>Tabela 10</b> – Dados de RMN uni e bidimensionais da lactona ( <b>134</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz .....	90
<b>Tabela 11</b> – Dados de RMN uni e bidimensionais do acetato de $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>135</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz.....	93
<b>Tabela 12</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ obtidos e da literatura, para os compostos $5\alpha$ -hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno ( <b>130</b> ) e (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-5-hidroxicariofil-8(13)-eno ( <b>131</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz .....	95
<b>Tabela 13</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ , obtidos e da literatura, para o (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol ( <b>132</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz.....	97

<b>Tabela 14</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ , obtidos e da literatura, para o $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol ( <b>100</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz .....	100
<b>Tabela 15</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ , obtidos e da literatura, para o clovan- $2\beta$ - $9\alpha$ -diol ( <b>75</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz.....	104
<b>Tabela 16</b> – Dados de RMN uni e bidimensionais do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ , $10\alpha$ -diol ( <b>136</b> ) em $\text{CD}_3\text{OD}$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz.....	109
<b>Tabela 17</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do $2\beta$ -metoxiclovan- $7\beta$ , $9\alpha$ -diol ( <b>137</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz .....	112
<b>Tabela 18</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do clovan- $2\beta$ - $9\beta$ -diol ( <b>76</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz.....	117
<b>Tabela 19</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do rumfelclovano A ( <b>138</b> ) em $\text{CDCl}_3$ . Os valores de $J$ são apresentados em Hz.....	120
<b>Tabela 20</b> – Dados de CG-EM obtidos para <b>127</b> , <b>129</b> e <b>100</b> , e para produtos presentes nos extratos resultantes da biotransformação destes por <i>P. minioluteum</i> por 5 e 10 dias.....	126

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Síntese parcial da sitagliptina (1), de forma enzimática e química, utilizada pela indústria Merck & Co.....	2
<b>Figura 2</b> – Esquema da produção enzimática e química do ácido 6-aminopenicilânico (4) .....	3
<b>Figura 3</b> – Esquema da obtenção da vanilina (7) por duas reações de biotransformação diferentes.....	4
<b>Figura 4</b> – Exemplo da versatilidade estrutural gerada por biotransformação da (20S)-20-hidroximetilpregna-1,4-dien-3-ona (11) pelos fungos filamentosos <i>C. elegans</i> , <i>M. phaseolina</i> , <i>R. stolonifer</i> e <i>G. fujikuroi</i> .....	5
<b>Figura 5</b> – Esquema da rota de biotransformação proposta para a reação do 16-DPA (23) com o fungo <i>P. citrinum</i> .....	6
<b>Figura 6</b> – Rearranjo em compostos com esqueleto traquilobânico em biotransformações com os fungos <i>R. stolonifer</i> e <i>R. arrhizus</i> .....	7
<b>Figura 7</b> – Esquema da biotransformação da $\beta$ -amirina por <i>L. muscarium</i> , bem como o mecanismo proposto para o rearranjo de 34 em 36.....	8
<b>Figura 8</b> – Esquema da obtenção de 38 por biotransformação de 37 com <i>C. equimulata</i> , usado como intermediário na síntese de 39, precursor do antibiótico sarcomicina (40).....	9
<b>Figura 9</b> – Esquema da biotransformação do (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-mentol (41) pelo fungo <i>R. solani</i> , que resulta em três produtos com padrões diferentes de hidroxilação (42, 43 e 44).....	10
<b>Figura 10</b> – Reação de biotransformação do <i>R</i> -(+)-limoneno (45) com o fungo <i>Sphingobium sp.</i> para a obtenção do <i>R</i> -(+)- $\alpha$ -terpineol (46).....	10
<b>Figura 11</b> - Produtos obtidos na reação de biotransformação da esquamulosona (47) com <i>C. lunata</i> .....	11
<b>Figura 12</b> – Produtos obtidos na reação de biotransformação da esquamulosona (47) com <i>C. lunata</i> .....	12
<b>Figura 13</b> – Produtos obtidos na biotransformação dos ácidos betulínico (66) e betulônico (67) com os fungos <i>Chaetophoma sp.</i> , <i>Dematium sp.</i> , <i>Colletotrichum sp.</i> e <i>Arthrobotris sp.</i> .....	13
<b>Figura 14</b> – Estrutura química dos clovanos 74-78, obtidos por biotransformação de 73 por <i>B. cinerea</i> .....	14

<b>Figura 15</b> – Contaminação de uvas e morangos pelo fungo <i>B. cinerea</i> .....	15
<b>Figura 16</b> – Esquema da biossíntese do sesquiterpeno botridial ( <b>79</b> ) pelo fungo <i>B. cinerea</i> .....	16
<b>Figura 17</b> – Esquema da biotransformação dos clovanos <b>80</b> , <b>83</b> e <b>85</b> por <i>B. cinerea</i> .....	17
<b>Figura 18</b> – Estruturas dos clovanos <b>86-90</b> , testados frente ao crescimento do fungo <i>B. cinerea</i> .....	18
<b>Figura 19</b> – Estruturas químicas dos clovanos <b>91-105</b> , sintetizados e testados em relação a sua atividade antifúngica frente ao fungo <i>B. cinerea</i> .....	19
<b>Figura 20</b> – Esquema da biotransformação de <b>73</b> com o fungo <i>M. phaseolina</i> .....	20
<b>Figura 21</b> – Estrutura do fungicida procimidona ( <b>109</b> ).....	20
<b>Figura 22</b> – Estrutura dos antifúngicos tetraconazol ( <b>110</b> ), piraclostrobina ( <b>111</b> ) e PSC-B ( <b>112</b> ).....	21
<b>Figura 23</b> – Comparação entre as estruturas da prostratina ( <b>114</b> ) e do acetato de (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol ( <b>113</b> ), com destaque para os grupos hidrofílicos A, B e C e hidrofóbico (D).....	22
<b>Figura 24</b> – Representação da conversão do 2 $\alpha$ ,13( <i>R</i> )-di-hidroxiestemodano ( <b>115</b> ) em <b>116</b> pelo fungo <i>R. oryzae</i> .....	24
<b>Figura 25</b> – Representação da reação de redução da 1- <i>R</i> -(-)-canforquinona ( <b>117</b> ) por <i>M. plumbeus</i> .....	24
<b>Figura 26</b> – Esquema da biotransformação da hidrocortisona ( <b>121</b> ) pelo fungo <i>A. strictum</i> , isolado de solo .....	25
<b>Figura 27</b> – Esquema dos objetivos desse trabalho, incluindo as reações de síntese e biotransformação, bem como os testes de atividade biológica realizados..	27
<b>Figura 28</b> – Placa utilizada no cultivo de fungos coletados da própolis exemplificando o aspecto inicial das colônias obtidas.....	32
<b>Figura 29</b> – Aspecto do cultivo em meio líquido de um dos fungos isolados da própolis.....	33
<b>Figura 30</b> – Placas contendo fungos isolados da própolis, exemplificando a forma de inoculação usada na identificação dos mesmos .....	34
<b>Figura 31</b> – Esquema da síntese do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) a partir do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ).....	36

<b>Figura 32</b> – Esquema da síntese do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>126</b> ) a partir do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ).....	37
<b>Figura 33</b> – Esquema da síntese do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>127</b> ) a partir do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ).....	38
<b>Figura 34</b> – Esquema da síntese do 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>128</b> ) a partir do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ).....	39
<b>Figura 35</b> – Esquema da síntese do 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>129</b> ) a partir do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ).....	39
<b>Figura 36</b> – Esquema da síntese da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona ( <b>133</b> ) a partir do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ).....	40
<b>Figura 37</b> – Esquema da síntese da (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> )-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovan-9-lactona ( <b>134</b> ) a partir do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona ( <b>133</b> ) .....	41
<b>Figura 38</b> – Esquema de síntese do acetato de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) .....	42
<b>Figura 39</b> – Esquema da síntese do 5 $\alpha$ -hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno ( <b>130</b> ) a partir do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ).....	43
<b>Figura 40</b> – Esquema da síntese do (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-5-hidroxicariofila-8(13)-eno ( <b>131</b> ) a partir do 5 $\alpha$ -hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno ( <b>130</b> ).....	43
<b>Figura 41</b> - Esquema da síntese do (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol ( <b>132</b> ) a partir do (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-5-hidroxicariofila-8(13)-eno ( <b>131</b> ).....	44
<b>Figura 42</b> – A) Câmara de Neubauer. B) Ampliação de um dos lados da câmara ....	45
<b>Figura 43</b> – Estrutura do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) e dos produtos clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol ( <b>75</b> ), 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ) e 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ , 9 $\alpha$ -diol ( <b>137</b> ), obtidos na biotransformação de <b>73</b> com o fungo <i>P. palustris</i> com dois e quatro dias	48
<b>Figura 44</b> – Estrutura do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) e dos produtos clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol ( <b>75</b> ), clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol ( <b>76</b> ), 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ), 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ , 9 $\alpha$ -diol ( <b>137</b> ) e do rumfelclovano A ( <b>138</b> ), obtidos na biotransformação de <b>73</b> com o fungo <i>P. palustris</i> sem agitação, com cinco e dez dias.....	51
<b>Figura 45</b> – Estruturas do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>127</b> ), 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>129</b> ), 2 $\beta$ -(2-(4-nitrofenoxi)etoxi)clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ) e 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>135</b> ), incubados com <i>P. minioluteum</i> .....	53
<b>Figura 46</b> – Esporos dos fungos <i>Bipolaris hawaiiensis</i> , <i>Tetracoccusporium paxianum</i> e <i>Pestalotiopsis palustris</i> (da esquerda para a direita, na primeira fila,	

aumento de 1000 vezes), <i>Fusarium merismoides</i> , <i>Fusarium pionoti</i> e <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (da esquerda para a direita, na segunda fila, aumento de 400 vezes) vistos ao microscópio a partir de lâminas feitas com os fungos coletados da própolis.....	59
<b>Figura 47</b> – Reação de ciclização do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ) em presença de alcoóis com cadeias carbônicas lineares de C-1 a C-5.....	63
<b>Figura 48</b> – Estruturas do forbol ( <b>139</b> ), da prostatina ( <b>114</b> ) e do acetato de (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol ( <b>113</b> ). .....	64
<b>Figura 49</b> – Estrutura química do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ).....	66
<b>Figura 50</b> – Mecanismo da formação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) a partir do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ) .....	67
<b>Figura 51</b> – Algumas correlações visualizadas nos mapas de contornos HMBC (setas pretas) e COSY (traços azuis) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) .....	69
<b>Figura 52</b> – Estrutura química do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>126</b> ).....	71
<b>Figura 53</b> – Correlações do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>126</b> ) visualizadas no mapa contornos NOESY .....	72
<b>Figura 54</b> – Estrutura química do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>127</b> ).....	73
<b>Figura 55</b> – Proposta de fragmentação obtida do espectro de massas do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>127</b> ).. .....	75
<b>Figura 56</b> – Algumas correlações do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>127</b> ) visualizadas no mapa contornos NOESY .....	76
<b>Figura 57</b> – Estrutura química do 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>128</b> ).....	79
<b>Figura 58</b> – Algumas correlações do 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>128</b> ) visualizadas no mapa contornos NOESY .....	79
<b>Figura 59</b> – Estrutura química do 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>129</b> ).....	80
<b>Figura 60</b> – Algumas correlações do 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>129</b> ) visualizadas no mapa contornos NOESY .....	82
<b>Figura 61</b> – Estrutura química da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona ( <b>133</b> ).....	84
<b>Figura 62</b> – Estrutura química da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona ( <b>133</b> ) mostrando algumas correlações selecionadas, visualizadas no mapa de contornos HMBC .....	84
<b>Figura 63</b> – Estrutura química da lactona <b>134</b> , obtida pela oxidação da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona ( <b>133</b> ).....	87

<b>Figura 64</b> – Algumas correlações observadas nos mapas de contornos HMBC (setas pretas) e COSY (traços azuis) da lactona <b>134</b> .....	88
<b>Figura 65</b> – Correlações entre hidrogênios da lactona <b>134</b> visualizadas no mapa de contornos NOESY .....	90
<b>Figura 66</b> – Estrutura química do acetato de $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>135</b> ) .....	92
<b>Figura 67</b> – Algumas correlações do acetato de $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>135</b> ) visualizadas no mapa contornos NOESY .....	93
<b>Figura 68</b> – Esquema de síntese do (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol ( <b>132</b> ) a partir do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ) .....	95
<b>Figura 69</b> – Estrutura do $2\beta$ -(2-(4-nitrofenoxi)etoxi)clovan- $9\alpha$ -ol ( <b>100</b> ) .....	98
<b>Figura 70</b> – Correlações visualizadas no mapa de contornos HMBC para os carbonos C-1, C-4 e C-8 para <b>100</b> .....	99
<b>Figura 71</b> – Correlações visualizadas no mapa de contornos HMBC para os carbonos C-2 e C-3' do produto <b>100</b> . .....	100
<b>Figura 72</b> – Esquema da reação de biotransformação do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) sob agitação por dois e quatro dias com o fungo <i>P. palustris</i> . .....	102
<b>Figura 73</b> – Biotransformação do (+)-nootkatano ( <b>140</b> ) por <i>D. igniaria</i> .....	103
<b>Figura 74</b> – Proposta de fragmentação do clovan- $2\beta$ - $9\alpha$ -diol ( <b>75</b> ) por espectrometria de massas .....	105
<b>Figura 75</b> – Algumas correlações observadas nos mapas de contornos HMBC (setas pretas) e COSY (traços azuis) do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ , $10\alpha$ -diol ( <b>136</b> ) .....	107
<b>Figura 76</b> – Correlações visualizadas no mapa de contornos NOESY do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ , $10\alpha$ -diol ( <b>136</b> ) .....	108
<b>Figura 77</b> – Algumas correlações visualizadas nos mapas de contornos HMBC ( <b>A</b> , setas pretas) e COSY ( <b>B</b> , traços azuis) do $2\beta$ -metoxiclovan- $7\beta$ , $9\alpha$ -diol ( <b>137</b> ) .....	111
<b>Figura 78</b> – Correlações visualizadas no mapa de contornos NOESY do $2\beta$ -metoxiclovan- $7\beta$ , $9\alpha$ -diol ( <b>137</b> ) .....	112
<b>Figura 79</b> – Esquema da reação de biotransformação do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) sem agitação por 5 dias com o fungo <i>P. palustris</i> .....	114
<b>Figura 80</b> – Esquema da reação de biotransformação do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ), sem agitação, por 10 dias com o fungo <i>P. palustris</i> .....	115
<b>Figura 81</b> – Estruturas de clovanos precursores do produto <b>76</b> , seja por via sintética, ou por biotransformação .....	116

<b>Figura 82</b> – Proposta de fragmentação do clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol ( <b>76</b> ) por espectrometria de massa.....	118
<b>Figura 83</b> – Estrutura química da lactona <b>138</b> , identificada como sendo o rumfelclovano A.....	119
<b>Figura 84</b> – Biotransformação do ácido 13- <i>epi-ent</i> -pimara-9(11),15-dieno-19-oico por <i>G. fujikuroi</i> e da <i>R</i> -(-)-carvona por <i>T. cutaneum</i> .....	120
<b>Figura 85</b> – Esquema da reação de biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ), sem agitação, por 10 dias, com o fungo <i>P. citrinum</i> . ....	121
<b>Figura 86</b> – Esquema da reação de biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ), sem agitação, por 10 dias com o fungo <i>P. minioluteum</i> .....	122
<b>Figura 87</b> – Estruturas do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) e dos produtos clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol ( <b>75</b> ) e clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol ( <b>76</b> ), obtidos na biotransformação de <b>73</b> por <i>P. minioluteum</i> .....	124
<b>Figura 88</b> – Estruturas do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>127</b> ), 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>129</b> ) e 2 $\beta$ -(2-(4-nitrofenoxi)etoxi)clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ), incubados com <i>P. minioluteum</i> .....	124
<b>Figura 89</b> – Estrutura química do acetato de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>135</b> ), incubado com <i>P. minioluteum</i> .....	125
<b>Figura 90</b> – Substratos e produtos obtidos na biotransformação estereo-específica de taxanos por <i>A. coerulea</i> .....	131
<b>Figura 91</b> – Rota biossintética proposta por Chung e colaboradores (2010) para a formação do rumfelclovano A ( <b>138</b> ) em corais <i>Rumphella antiphaties</i> .....	132
<b>Figura 92</b> – Estruturas do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) e dos clovanos <b>75</b> e <b>76</b> (derivados de <b>73</b> por biotransformação) e <b>134</b> , derivado de <b>73</b> obtido por via sintética.....	133
<b>Figura 93</b> – Esquema das duas rotas diferentes para a obtenção do rumfelclovano A por biotransformação com os fungos <i>P. palustris</i> e <i>P. minioluteum</i> .....	134
<b>Figura 94</b> – Gráficos representando a comparação da porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>B. cinerea</i> pelos clovanos <b>73</b> e <b>126 - 129</b> com 24, 48, 72, 96 e 120 h de teste.....	136
<b>Figura 95</b> – Efeito dos produtos <b>73</b> e <b>126 - 129</b> na germinação de <i>L. sativa</i> . Os valores estão apresentados como diferenças de crescimento em relação ao controle, sendo o valor zero representando um valor observado igual ao controle,	

os valores positivos representando estímulo ao crescimento e, os negativos, inibição.....	138
<b>Figura 96</b> – Efeito dos produtos <b>73</b> e <b>126 - 129</b> no crescimento de raízes e caule de <i>L. sativa</i> . Os valores estão apresentados como diferenças de crescimento em relação ao controle, sendo o valor zero representando um valor observado igual ao controle, os valores positivos representando estímulo ao crescimento e, os negativos, inibição.....	139
<b>Figura 97</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ).....	170
<b>Figura 98</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 1,6 – 2,4.....	170
<b>Figura 99</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ).....	171
<b>Figura 100</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do óxido de cariofileno ( <b>125</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{C}}$ 15,0 – 44,0.....	171
<b>Figura 101</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ).....	172
<b>Figura 102</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 1,2 – 2,1.....	172
<b>Figura 103</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ).....	173
<b>Figura 104</b> – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ).....	173
<b>Figura 105</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ).....	174
<b>Figura 106</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ).....	174
<b>Figura 107</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 0,7 – 2,1.....	175
<b>Figura 108</b> – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ).....	176
<b>Figura 109</b> – Espectro na região do IV do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>73</b> ) (KBr).....	177
<b>Figura 110</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol ( <b>126</b> ).....	177

<b>Figura 111</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (126). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 1,43 – 1,77.....	178
<b>Figura 112</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (126).....	178
<b>Figura 113</b> – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (126).....	179
<b>Figura 114</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (126).....	179
<b>Figura 115</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (126).....	180
<b>Figura 116</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (126). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 0,6 – 2,0.....	180
<b>Figura 117</b> – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (126).....	181
<b>Figura 118</b> – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (126).....	182
<b>Figura 119</b> – Espectro na região do IV do $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (126) (KBr).....	182
<b>Figura 120</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (127).....	183
<b>Figura 121</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (127). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 1,44 – 1,76.....	183
<b>Figura 122</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (127).....	184
<b>Figura 123</b> – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (127).....	184
<b>Figura 124</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (127).....	185
<b>Figura 125</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (127). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 0,6 – 1,9.....	185
<b>Figura 126</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (127).....	186
<b>Figura 127</b> – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (127).....	187

<b>Figura 128-</b> Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-propoxiclovan-9α-ol (127).....	188
<b>Figura 129</b> – Cromatograma obtido por CG-EM para o 2β-propoxiclovan-9α-ol (127), utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min <sup>-1</sup> .....	188
<b>Figura 130</b> – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,50 min no cromatograma do 2β-propoxiclovan-9α-ol (127).....	189
<b>Figura 131</b> – Espectro na região do IV do 2β-propoxiclovan-9α-ol (127) (KBr).....	189
<b>Figura 132</b> – Espectro na região do IV do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128) (KBr).....	190
<b>Figura 133</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128).....	190
<b>Figura 134</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 1,44 – 1,74 .....	191
<b>Figura 135</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128).....	191
<b>Figura 136</b> – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128).....	192
<b>Figura 137</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128). Expansão da região entre δ <sub>C</sub> 13,0 – 52,0 .....	192
<b>Figura 138</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128). Expansão da região entre δ <sub>C</sub> 69,0 – 87,0 .....	193
<b>Figura 139</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128) .....	193
<b>Figura 140</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,6 – 2,0.....	194
<b>Figura 141</b> – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128) .....	195
<b>Figura 142</b> – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128).....	196
<b>Figura 143</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-pentoxiclovan-9α-ol (129).....	196

<b>Figura 144</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 1,44 – 1,74 .....	197
<b>Figura 145</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129) .....	197
<b>Figura 146</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129). Expansão da região entre 28,2 a 30,5. ....	198
<b>Figura 147</b> – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 28,1 – 30,5 .....	198
<b>Figura 148</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129) .....	199
<b>Figura 149</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129) .....	199
<b>Figura 150</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 0,6 – 2, .....	200
<b>Figura 151</b> – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129) .....	201
<b>Figura 152</b> – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129) .....	202
<b>Figura 153</b> – Espectro na região do IV do $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129) (KBr) .....	202
<b>Figura 154</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da $2\beta$ -metoxiclovan-9-ona (133) .....	203
<b>Figura 155</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da $2\beta$ -metoxiclovan-9-ona (133). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 1,55 – 2,65 .....	203
<b>Figura 156</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da $2\beta$ -metoxiclovan-9-ona (133) .....	204
<b>Figura 157</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da $2\beta$ -metoxiclovan-9-ona (133). Expansão da região entre $\delta_{\text{C}}$ 19,0 – 60,0 .....	204
<b>Figura 158</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da $2\beta$ -metoxiclovan-9-ona (133) .....	205
<b>Figura 159</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da $2\beta$ -metoxiclovan-9-ona (133). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 0,7 – 1,3 .....	205
<b>Figura 160</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da $2\beta$ -metoxiclovan-9-ona (133). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 1,3 – 2,0 .....	206

<b>Figura 161</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da 2β-metoxiclovan-9-ona ( <b>133</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,9 – 1,9 .....	206
<b>Figura 162</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da 2β-metoxiclovan-9-ona ( <b>133</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 2,20 – 2,70.....	207
<b>Figura 163</b> – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da metoxiclovan-9-ona ( <b>133</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,4 – 4,0 .....	208
<b>Figura 164</b> – Espectro na região do IV da 2β-metoxiclovan-9-ona ( <b>133</b> ) (KBr).....	209
<b>Figura 165</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona ( <b>134</b> ).....	209
<b>Figura 166</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona ( <b>134</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 1,5 – 3,4 .....	210
<b>Figura 167</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona ( <b>134</b> ).....	210
<b>Figura 168</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona ( <b>134</b> ). Expansão da região entre δ <sub>C</sub> 19,0 – 60,0.. .....	211
<b>Figura 169</b> – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona ( <b>134</b> ).....	211
<b>Figura 170</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona ( <b>134</b> ).....	212
<b>Figura 171</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona ( <b>134</b> ).....	212
<b>Figura 172</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona ( <b>134</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,7 – 2,2 .....	213
<b>Figura 173</b> – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona ( <b>134</b> ).....	214
<b>Figura 174</b> – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona ( <b>134</b> ).....	215
<b>Figura 175</b> – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona ( <b>134</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,7 – 2,1 .....	215

<b>Figura 176</b> – Espectro na região do IV da (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> )-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona ( <b>134</b> ) (KBr).....	216
<b>Figura 177</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>135</b> ).....	216
<b>Figura 178</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>135</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 1,05 – 2,00.....	217
<b>Figura 179</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>135</b> ).....	217
<b>Figura 180</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>135</b> ). Expansão da região entre δ <sub>C</sub> 19,0 – 95,0.....	218
<b>Figura 181</b> – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>135</b> ).....	218
<b>Figura 182</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>135</b> ).....	219
<b>Figura 183</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>135</b> ).....	219
<b>Figura 184</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>135</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 18 – 57 .....	220
<b>Figura 185</b> – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>135</b> ).....	221
<b>Figura 186</b> – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>135</b> ).....	222
<b>Figura 187</b> – Espectro na região do IV do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>135</b> ) (KBr).....	222
<b>Figura 188</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 5α-hidroxicariorofila-4(12),8(13)-dieno ( <b>130</b> ) .....	223
<b>Figura 189</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 5α-hidroxicariorofila-4(12),8(13)-dieno ( <b>130</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 1,45 – 2,60 .....	223
<b>Figura 190</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-5-hidroxicariorofil-8(13)-eno ( <b>131</b> ) .....	224
<b>Figura 191</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-5-hidroxicariorofil-8(13)-eno ( <b>131</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,8 – 3,9.....	224

<b>Figura 192</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol ( <b>132</b> ).....	225
<b>Figura 193</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol ( <b>132</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 0,7 – 2,1 .....	225
<b>Figura 194</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol ( <b>132</b> ).....	226
<b>Figura 195</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol ( <b>132</b> ).....	226
<b>Figura 196</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol ( <b>132</b> ).....	227
<b>Figura 197</b> – Mapa de contornos COSY (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol ( <b>132</b> ).....	228
<b>Figura 198</b> – Espectro na região do IV do (2 <i>S</i> ,9 <i>R</i> )-2-metoxiclovan-9,15-diol ( <b>132</b> ) (KBr).....	229
<b>Figura 199</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ).....	229
<b>Figura 200</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 0,8 – 4,3 .....	230
<b>Figura 201</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ).....	230
<b>Figura 202</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 43,5 – 51,0 .....	231
<b>Figura 203</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 0,6 – 2,0 .....	231
<b>Figura 204</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 3,0 – 4,4 .....	232
<b>Figura 205</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 3,6 – 8,8. ....	232
<b>Figura 206</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{C}}$ 2,4 – 5,7 .....	233
<b>Figura 207</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol ( <b>75</b> ).....	233

<b>Figura 208</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol ( <b>75</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 1,23 – 1,76 .....	234
<b>Figura 209</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol ( <b>75</b> ).....	234
<b>Figura 210</b> – Espectro na região do IV do clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol ( <b>75</b> ) (KBr).....	235
<b>Figura 211</b> – Cromatograma obtido por CG-EM para o clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol ( <b>75</b> ), utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .	235
<b>Figura 212</b> – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,26 min no cromatograma do clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol ( <b>75</b> ).....	236
<b>Figura 213</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2 $\beta$ -metoxiclovan- 9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ).....	236
<b>Figura 214</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2 $\beta$ -metoxiclovan- 9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 0,85 – 1,75.....	237
<b>Figura 215</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2 $\beta$ -metoxiclovan- 9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 3,15 – 4,00.....	237
<b>Figura 216</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2 $\beta$ -metoxiclovan- 9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ).....	238
<b>Figura 217</b> – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2 $\beta$ -metoxiclovan- 9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{C}}$ 0,8 – 1,8.....	238
<b>Figura 218</b> – Mapa de contornos HSQC (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2 $\beta$ -metoxiclovan- 9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ).....	239
<b>Figura 219</b> – Mapa de contornos HSQC editado (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2 $\beta$ - metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ).....	239
<b>Figura 220</b> – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2 $\beta$ -metoxiclovan- 9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 0,6 – 5,5.....	240
<b>Figura 221</b> – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2 $\beta$ -metoxiclovan- 9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 0,8 – 1,8.....	240
<b>Figura 222</b> – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2 $\beta$ -metoxiclovan- 9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ). Expansão da região entre $\delta_{\text{H}}$ 0,8 – 1,9.....	241
<b>Figura 223</b> – Mapa de contornos COSY (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2 $\beta$ -metoxiclovan- 9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol ( <b>136</b> ).....	242

<b>Figura 224</b> – Mapa de contornos COSY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do 2β-metoxiclovan-9α,10α-diol ( <b>136</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,7 – 2,1.....	243
<b>Figura 225</b> – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do 2β-metoxiclovan-9α,10α-diol ( <b>136</b> ).....	244
<b>Figura 226</b> – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do 2β-metoxiclovan-9α,10α-diol ( <b>136</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,6 – 1,9.....	244
<b>Figura 227</b> – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do 2β-metoxiclovan-9α,10α-diol ( <b>136</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,9 – 2,3.....	245
<b>Figura 228</b> – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do 2β-metoxiclovan-9α,10α-diol ( <b>136</b> ).....	245
<b>Figura 229</b> – Espectro na região do IV do 2β-metoxiclovan-9α,10α-diol ( <b>136</b> ) (KBr)	246
<b>Figura 230</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ).....	246
<b>Figura 231</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,8 – 2,2 .....	247
<b>Figura 232</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ).....	247
<b>Figura 233</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 67,0 – 78,5 .....	248
<b>Figura 234</b> – Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ).....	248
<b>Figura 235</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ).....	249
<b>Figura 236</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ).....	249
<b>Figura 237</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,7 – 2,1 .....	250
<b>Figura 238</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 1,4 – 2,1 .....	250
<b>Figura 239</b> – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,5 – 4,5 .....	251

<b>Figura 240</b> – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,5 – 2,8 .....	252
<b>Figura 241</b> – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ) .....	253
<b>Figura 242</b> – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,6 – 2,4 .....	253
<b>Figura 243</b> – Espectro na região do IV do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol ( <b>137</b> ) (KBr)	254
<b>Figura 244</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do clovan-2β-9β-diol ( <b>76</b> ).	254
<b>Figura 245</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do clovan-2β-9β-diol ( <b>76</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 1,00 – 1,85 .....	255
<b>Figura 246</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do clovan-2β-9β-diol ( <b>76</b> )	255
<b>Figura 247</b> – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do clovan-2β-9β-diol ( <b>76</b> ) .....	256
<b>Figura 248</b> – Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do clovan-2β-9β-diol ( <b>76</b> ) .....	256
<b>Figura 249</b> – Espectro na região do IV do clovan-2β-9β-diol ( <b>76</b> ) (KBr) .....	257
<b>Figura 250</b> – Cromatograma obtido por CG- EM para o clovan-2β-9β-diol ( <b>76</b> ), utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min <sup>-1</sup> .	257
<b>Figura 251</b> – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,25 min no cromatograma do clovan-2β-9β-diol ( <b>76</b> ) .....	258
<b>Figura 252</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do rumfelclovano A ( <b>138</b> )	258
<b>Figura 253</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do rumfelclovano A ( <b>138</b> ). Expansão da região entre δ <sub>H</sub> 0,9 – 2,5 .....	259
<b>Figura 254</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do rumfelclovano A ( <b>138</b> ) .....	259
<b>Figura 255</b> – Espectro na região do IV do rumfelclovano A ( <b>138</b> ) (KBr) .....	260
<b>Figura 256</b> – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>73</b> ) com <i>P. minioluteum</i> com 5 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min <sup>-1</sup> .	260
<b>Figura 257</b> – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,23 min no cromatograma do extrato da biotransformação do 2β-metoxiclovan-9α-ol ( <b>73</b> ) com <i>P. minioluteum</i> com 5 dias ..	261

- Figura 258** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 7,35 min no cromatograma do extrato da biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com *P. minioluteum* com 5 dias .. 261
- Figura 259** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 7,37 min no cromatograma do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**)..... 262
- Figura 260** – Cromatograma obtido por CG-EM para o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>. 262
- Figura 261** – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) com *P. minioluteum* com 5 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>. 263
- Figura 262** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,48 min no cromatograma do extrato da biotransformação do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) com *P. minioluteum* por 5 dias. 263
- Figura 263** – Cromatograma obtido por CG-EM para a combinação de frações obtidas com eluente hexano/acetato de etila 65:35 e 60:40 na biotransformação do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) com *P. minioluteum* com 10 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup> ..... 264
- Figura 264** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,25 min no cromatograma da combinação de frações obtidas com eluente hexano/acetato de etila 65:35 e 60:40 na biotransformação do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) com *P. minioluteum* com 10 dias..... 264
- Figura 265** – Cromatograma obtido por CG-EM para a combinação de frações obtidas com eluente hexano/acetato de etila 85:15 a 65:35 na biotransformação do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) com *P. minioluteum* com 10 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup> ..... 265
- Figura 266** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,46 min no cromatograma da combinação de frações obtidas com eluente hexano/acetato de etila 85:15 a 65:35 na biotransformação do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) com *P. minioluteum* com 10 dias..... 265

- Figura 267** – Cromatograma obtido por CG-EM para o  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129), utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  ..... 266
- Figura 268** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 15,14 min no cromatograma do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129)..... 266
- Figura 269** – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129) com *P. minioluteum* com 5 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . 267
- Figura 270** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 15,26 min no cromatograma do extrato da biotransformação do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129) com *P. minioluteum* com 5 dias 267
- Figura 271** – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129) com *P. minioluteum* com 10 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  ..... 268
- Figura 272** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 15,26 min no cromatograma do extrato da biotransformação do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129) com *P. minioluteum* com 10 dias..... 268
- Figura 273** – Cromatograma obtido por CG-EM para o  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (100), utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  ..... 269
- Figura 274** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 23,97 min no cromatograma do  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (100)..... 269
- Figura 275** – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (100) com *P. minioluteum* com 5 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  ..... 270
- Figura 276** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 23,86 min no cromatograma do extrato da

biotransformação do $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ) com <i>P. minioluteum</i> com 5 dias.....	270
<b>Figura 277</b> – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ) com <i>P. minioluteum</i> com 10 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min <sup>-1</sup> .....	271
<b>Figura 278</b> – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 23,87 min no cromatograma do extrato da biotransformação do $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> ) com <i>P. minioluteum</i> com 10 dias.....	271
<b>Figura 279</b> – Cromatograma obtido por CG-EM para o produto <b>135</b> , utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min <sup>-1</sup> .....	272
<b>Figura 280</b> – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 17,13 min no cromatograma do produto <b>135</b> .....	272
<b>Figura 281</b> – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do produto ( <b>135</b> ) com <i>P. minioluteum</i> com 5 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min <sup>-1</sup> .....	273
<b>Figura 282</b> – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 13,16 min no cromatograma do extrato da biotransformação do produto ( <b>135</b> ) com <i>P. minioluteum</i> com 5 dias.....	273
<b>Figura 283</b> – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do produto ( <b>135</b> ) com <i>P. minioluteum</i> com 10 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min <sup>-1</sup> .....	274
<b>Figura 284</b> – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 13,16 min no cromatograma do extrato da biotransformação do produto ( <b>135</b> ) com <i>P. minioluteum</i> com 10 dias.....	274
<b>Figura 285</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do extrato da biotransformação do acetato de $2\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>135</b> ) com <i>P. minioluteum</i> com 5 dias.....	275
<b>Figura 286</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do extrato da biotransformação do acetato de $2\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>135</b> ) com <i>P. minioluteum</i> com 10 dias .....	275

- Figura 287** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do extrato do controle da biotransformação do acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**135**) com *P. minioluteum* com 5 dias ..... 276
- Figura 288** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do extrato do controle da biotransformação do acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**135**) com *P. minioluteum* com 10 dias ..... 276

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMCPB	Ácido metacloroperbenzóico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
ddd	Duplo dupleto duplo
ddl	Dupleto duplo largo
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
dl	Dupleto largo
dq	Dupleto quádruplo
EM	Espectrometria de massas
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
m	Multipleteo
m/z	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
min	Minuto
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
Pág.	Página
PCC	Clorocromato de piridínio
q	Quarteto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
sl	simpleto largo
t	Tripleteo
<i>t</i> -BuOOH	Hidroperóxido de terc-butila
TCNE	Tetracianoetileno

tdd	Triplo duplete duplo
VO(acac) <sub>2</sub>	Acetilacetato de vanadila
$\delta$	Deslocamento químico

## RESUMO

Nesse trabalho foram isoladas 22 cepas de fungos sujeitos à exposição ultravioleta usando própolis como substrato. No processo de identificação desses micro-organismos chegou-se a gênero e espécie em 12 casos. Os fungos isolados foram avaliados quanto à viabilidade de sua utilização em reações de biotransformação.

Foram sintetizadas onze substâncias com esqueleto clovânico a partir do óxido de cariofileno. Dentre essas, o  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol foi utilizado como substrato para reações de biotransformação pelos fungos *Pestalotiopsis palustris* e *Penicillium citrinum*, isolados de ambiente exposto à radiação UV e pelos fungos *Penicillium janczewskii* e *Penicillium minioluteum*, isolados de solo. Nessas biotransformações foram obtidos produtos de hidroxilação, desmetilação e rearranjo do esqueleto carbônico. Os maiores rendimentos obtidos nessas biotransformações ocorreram ao se utilizar *P. minioluteum*, tendo sido estudado de forma mais aprofundada o metabolismo de outros clovanos por esse fungo:  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol,  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol e  $2\beta$ -(2-(4-nitrofenoxi)etoxi)clovan- $9\alpha$ -ol. Foi observado que o aumento da cadeia lateral ligada ao esqueleto clovânico influencia a interação do complexo enzimático do fungo com essa classe de substrato, já que apenas o  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol foi biotransformado por *P. minioluteum*. Em outro experimento, observou-se que a acetilação em C-9 do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol impede a biotransformação desse composto por esse fungo. Nesse trabalho também foi realizada a síntese quimioenzimática do rumfelclovano A pela ação do *P. minioluteum* sobre a (1S,2S,5S,8R)-8,9-seco-8-hidroxi-2-metoxiclovan-9-lactona, sintetizada pela oxidação do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol.

Os compostos  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol,  $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol,  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol,  $2\beta$ -butoxiclovan- $9\alpha$ -ol,  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol, (2S,9R)-2-metoxiclovano-9,15-diol, clovan- $2\beta$ - $9\alpha$ -diol, clovan- $2\beta$ - $9\beta$ -diol e o rumfelclovano A foram avaliados em testes de ativação de proteínas quinase C (PKC); os cinco primeiros compostos também foram avaliados quanto à sua ação

fungistática sobre o fitopatógeno *Botrytis cinerea* e ação na germinação e crescimento de *Lactuca sativa*.

## ABSTRACT

In this work it has been isolated 22 strains of fungi exposed to ultraviolet radiation using propolis as substrate. In the process of fungal identification it was possible to achieve genera and species for 12 strains. The isolated fungi were evaluated according to their viability for use in biotransformation reactions.

Compounds with a clovane backbone were synthesized starting from caryophyllene oxide. Among them,  $2\beta$ -methoxyclovan- $9\alpha$ -ol was used as the substrate for bioransformation reactions which employ UV radiation exposed fungi *Pestalotiopsis palustris* and *Penicillium citrinum*, and also the soil fungi *Penicillium janczewskii* and *Penicillium minioluteum*. Hydroxylation and demethylation products have been obtained as well as products resulted from the rearrangement of the carbon backbone. The higher yields were obtained for *P. minioluteum*, therefore, deeper studies concerning the metabolism of clovane derivatives  $2\beta$ -propoxyclovan- $9\alpha$ -ol,  $2\beta$ -pentoxyclovan- $9\alpha$ -ol and  $2\beta$ -(2-(4-nitrophenoxy)ethoxy)clovan- $9\alpha$ -ol obtained from these fungi have been performed. It was noted that the increasing of the side chain size bounded to the clovane backbone influences the interaction between the microorganism enzymes and this class of substrates, since only  $2\beta$ -propoxyclovan- $9\alpha$ -ol was biotransformed by *P. minioluteum*. It was observed from an assay that the acetylation at C-9 of  $2\beta$ -methoxyclovan- $9\alpha$ -ol does not allow the biotransformation of this compound by the fungus. The chemoenzymatic synthesis of rumphellclovane A by the action of *P. minioluteum* over (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hydroxy-2-methoxyclovan-9-lactone, synthesized from the oxidation of  $2\beta$ -methoxyclovan- $9\alpha$ -ol, has also been accomplished in this work.

The compounds  $2\beta$ -methoxyclovan- $9\alpha$ -ol,  $2\beta$ -ethoxyclovan- $9\alpha$ -ol,  $2\beta$ -propoxyclovan- $9\alpha$ -ol,  $2\beta$ -buthoxyclovan- $9\alpha$ -ol,  $2\beta$ -pentoxyclovan- $9\alpha$ -ol, (2*S*,9*R*)-2-methoxyclovano-9,15-diol, clovan- $2\beta$ - $9\alpha$ -diol, clovan- $2\beta$ - $9\beta$ -diol and rumphellclovane A were evaluated in bioassays for protein kinase C (PKC) activation. The first five compounds have also been evaluated as fungistatic

agents against the phytopathogen *Botrytis cinerea* and as agents for germination and growth of *Lactuca sativa*.

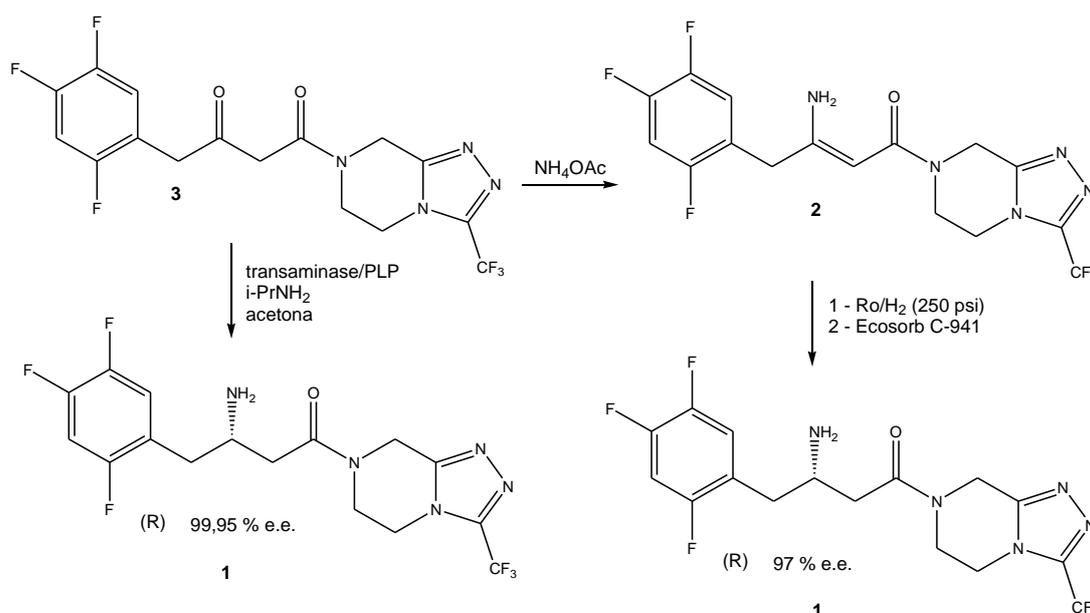
# Introdução

# 1 Introdução

## 1.1 Biotransformações

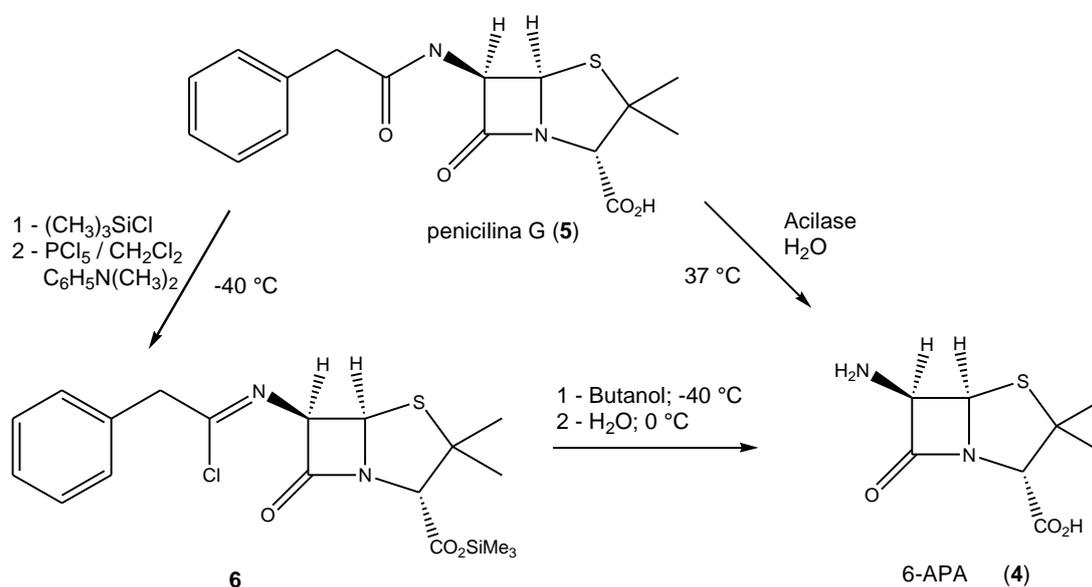
Biotransformações consistem de reações bioquímicas que podem ser utilizadas para a modificação da estrutura de uma substância utilizando células vegetais, animais, de micro-organismos ou enzimas isoladas.<sup>1</sup> Estas reações podem ser regio, diastereo e enantiosseletivas, ocorrendo usualmente em pH próximo a neutralidade e temperatura ambiente, o que as tornam boas opções para a modificação de substâncias orgânicas.<sup>2</sup>

Biotransformações têm sido usadas para modernizar a produção de fármacos, como ocorreu com a sitagliptina (**1**). Esta substância é o princípio ativo dos medicamentos Januvia<sup>®</sup> e Janumet<sup>®</sup>, produzidos pela indústria Merck & Co. e utilizados no tratamento do diabetes tipo II. A substituição do catalisador tradicional de ródio, usado na conversão da desidrositagliptina (**2**) em **1**, por uma rota em que uma enzima transaminase converte **3** em **1**, aumentou a eficiência do processo em mais de 50 %. Essa mudança reduziu 19 % dos rejeitos formados, eliminou metais pesados do processo e levou a Merck a uma premiação pela inovação (*2010 Presidential Green Chemistry Challenge Award for Greener Reaction Conditions*) (**Figura 1**).<sup>3</sup>



**Figura 1** – Síntese parcial da sitagliptina (**1**), de forma enzimática e química, utilizada pela indústria Merck & Co.

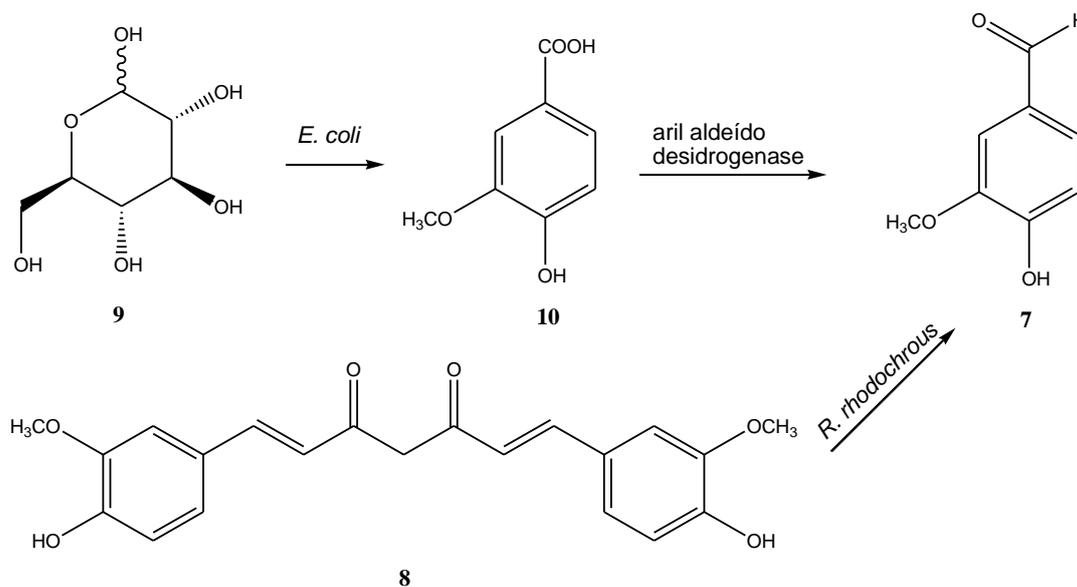
Outra reação na qual a rota por biocatálise apresenta grande aplicação é a síntese do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (**4**) (**Figura 2**), um intermediário chave na síntese de antibióticos da classe das penicilinas e cefalosporinas, que é obtido por hidrólise da penicilina G (**5**). Até meados da década de 80, o 6-APA era produzido por via sintética para a conversão de **5** no intermediário **6**. Eram utilizadas condições experimentais não atrativas, como uso de solventes clorados e temperatura de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, a clivagem de **5** foi realizada pelo emprego de uma enzima acilase em água a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A produção anual dessa substância é de milhares de toneladas, sendo a rota enzimática utilizada na maior parte do processo.<sup>4</sup>



**Figura 2** – Esquema da produção enzimática e química do ácido 6-aminopenicilânico (**4**).

O potencial econômico das biotransformações também pode ser exemplificado pela produção da vanilina (**7**), um aditivo importante de alimentos, bebidas, perfumes, dentre outros.<sup>5</sup> A vanilina natural é obtida da orquídea *Vanilla planifolia*, mas sua produção a partir dessa planta não supre a demanda mundial. A obtenção da vanilina por síntese envolve a produção de intermediários tóxicos, sendo desaconselhada.<sup>6</sup> A vanilina pode ser obtida pela biotransformação da curcumina (**8**), substância isolada da espécie *Curcuma longa* L. Essa biotransformação pode ser feita diretamente com o fungo *Rhodococcus rhodochrous*<sup>7</sup> ou pela combinação de duas etapas, sendo que a primeira faz uso da bactéria *E. coli* para a conversão da D-glicose (**9**) em ácido

vanílico (**10**) e a segunda faz uso de uma enzima desidrogenase para a conversão de **10** em **7** (**Figura 3**).<sup>8</sup>



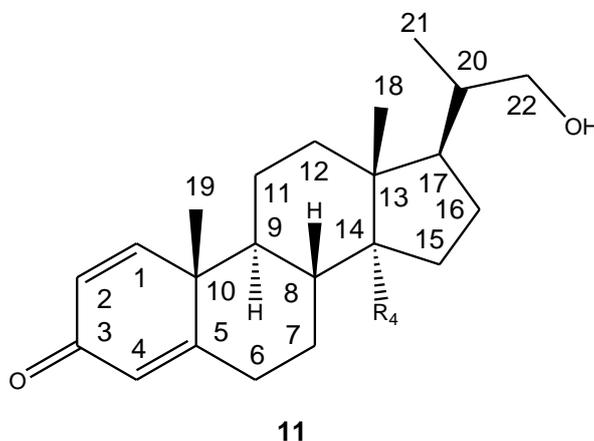
**Figura 3** – Esquema da obtenção da vanilina (**7**) por duas reações de biotransformação diferentes.

Muitas biotransformações são realizadas com enzimas isoladas. Essas enzimas apresentam seletividade em diversas reações e toleram bem a presença de co-solventes utilizados para solubilização de moléculas insolúveis em água.<sup>9</sup> No entanto, o uso de células íntegras ainda é vantajoso sob diversos aspectos. Nas células íntegras as enzimas atuam em seu ambiente natural e mudanças conformacionais, que poderiam levar à perda da atividade enzimática são minimizadas. Além disso, nessas células a regeneração de co-fatores ocorre naturalmente.<sup>10</sup>

Os fungos têm sido uma das classes de organismos mais utilizadas em reações de biotransformação com células íntegras. Um fator que colabora para o interesse nesses micro-organismos vem de estimativas, as quais apontam que apenas uma pequena parte dos fungos existentes é conhecida.<sup>11</sup>

As biotransformações podem ser utilizadas para a funcionalização de posições pouco reativas de determinadas moléculas.<sup>12</sup> A versatilidade das biotransformações pode ser exemplificada pela ação de diferentes fungos (*Cunninghamella elegans*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizopus stolonifer*, e *Gibberella fujikuroi*) sobre a (20S)-20-hidroxi metilpregna-1,4-dien-3-ona (**11**),

levando à obtenção de 11 derivados diferentes (**12-22**), hidroxilados nas posições  $6\beta$ ,  $7\beta$ ,  $11\alpha$ ,  $14\alpha$ ,  $15\beta$ ,  $16\beta$  e  $17\alpha$ , além da ocorrência de acetilação da posição 22 (**Figura 4**).<sup>13</sup>

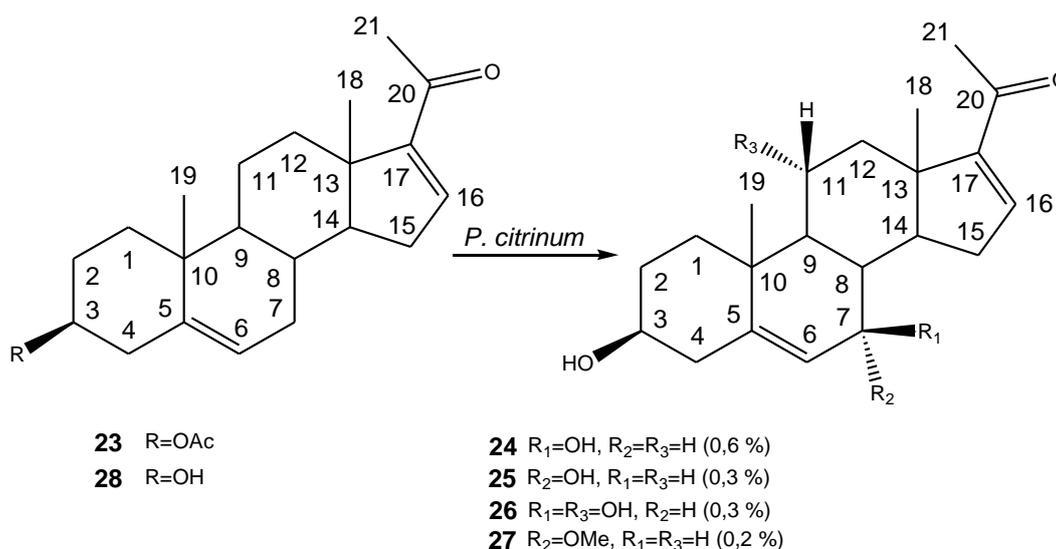


Produto	C-6	C-7	C-11	C-14	C-15	C-16	C-17	C-19
<b>12</b> (0,4 %)								OAc
<b>13</b> (1 %)							$\alpha$ -OH	
<b>14</b> (9 %)			$\alpha$ -OH					
<b>15</b> (1 %)	$\beta$ -OH		$\alpha$ -OH					
<b>16</b> (5 %)			$\alpha$ -OH		$\beta$ -OH			
<b>17</b> (0,4 %)			$\alpha$ -OH				$\alpha$ -OH	
<b>18</b> (0,4 %)				$\alpha$ -OH	$\beta$ -OH		$\alpha$ -OH	
<b>19</b> (1 %)		$\beta$ -OH						
<b>20</b> (1 %)					$\beta$ -OH			
<b>21</b> (1 %)		$\beta$ -OH			$\beta$ -OH			
<b>22</b> (1 %)						$\beta$ -OH		

**Figura 4** – Exemplo da versatilidade estrutural gerada por biotransformação da (20S)-20-hidroxi-metilpregna-1,4-dien-3-ona (**11**) pelos fungos filamentosos *C. elegans*, *M. phaseolina*, *R. stolonifer* e *G. fujikuroi*.

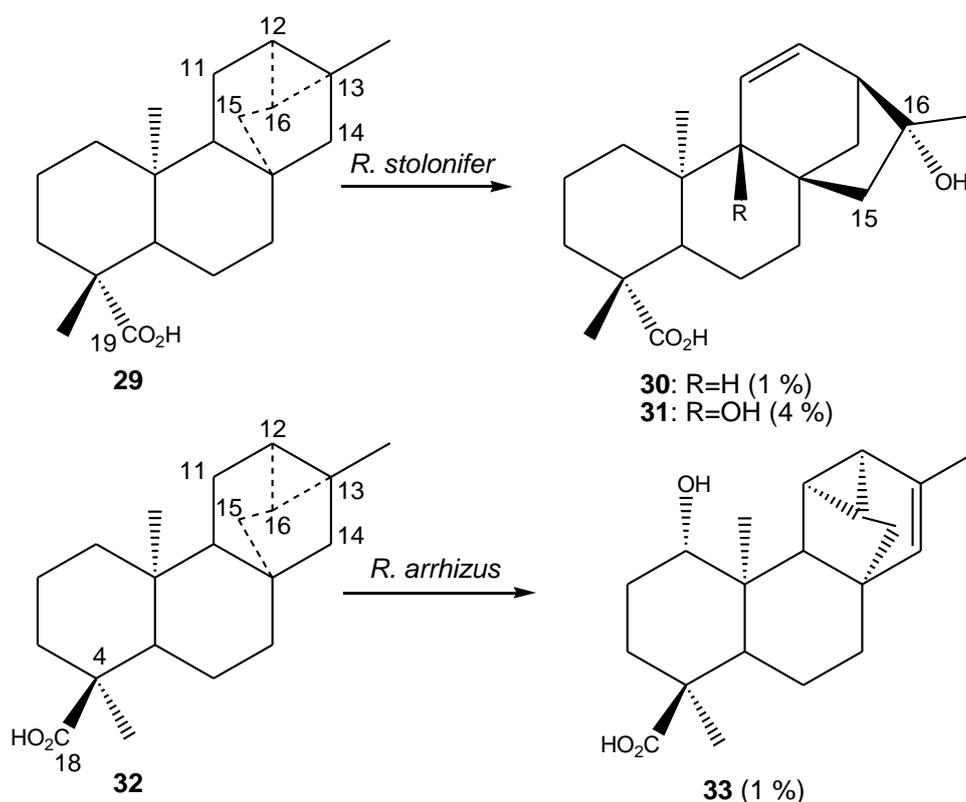
Os fungos são capazes de realizar outras modificações químicas além de hidroxilações. A incubação da  $3\beta$ -acetoxipregna-5,16-dieno-20-ona (**23**) (16-DPA) com *Penicillium citrinum*, uma espécie de fungo filamentososo, produziu, além das substâncias **24-26** (Figura 5), resultantes de hidroxilações, o derivado metoxilado **27**.<sup>22</sup> O 16-DPA (**23**) é um intermediário chave na síntese de esteróides biologicamente ativos.<sup>14-17</sup>

A rota proposta para essa reação sugere que a primeira etapa consiste da ruptura da ligação do grupo acetila presente na posição 3 de **23**, transformando-o em **28**, já que a biotransformação tanto de **23** quanto de **28** com esse micro-organismo gera os mesmos produtos (**24-27**). Posteriormente, o fungo transforma **28** em **24** e **25**, obtidos após 48 horas, hidroxilando as posições  $7\beta$  e  $7\alpha$  respectivamente. Após 72 horas, foram obtidos **26** e **27**, sendo o primeiro decorrente da hidroxilação da posição  $11\alpha$  de **24** e, o segundo, da metilação da hidroxila ligada a C-7 de **27**. Em biotransformações separadas, a incubação de **24** com *P. citrinum* resultou em **26**, e a de **25** também com esse fungo, resultou em **27**, o que corrobora a rota proposta. Outro ponto interessante dessa reação é que produtos diferentes foram obtidos com tempos de reação diferentes (nesse caso, **24** e **25** foram obtidos com 48 h, enquanto **26** e **27** com 72 h).<sup>18</sup>



**Figura 5** – Esquema da rota de biotransformação proposta para a reação do 16-DPA (**23**) com o fungo *P. citrinum*.

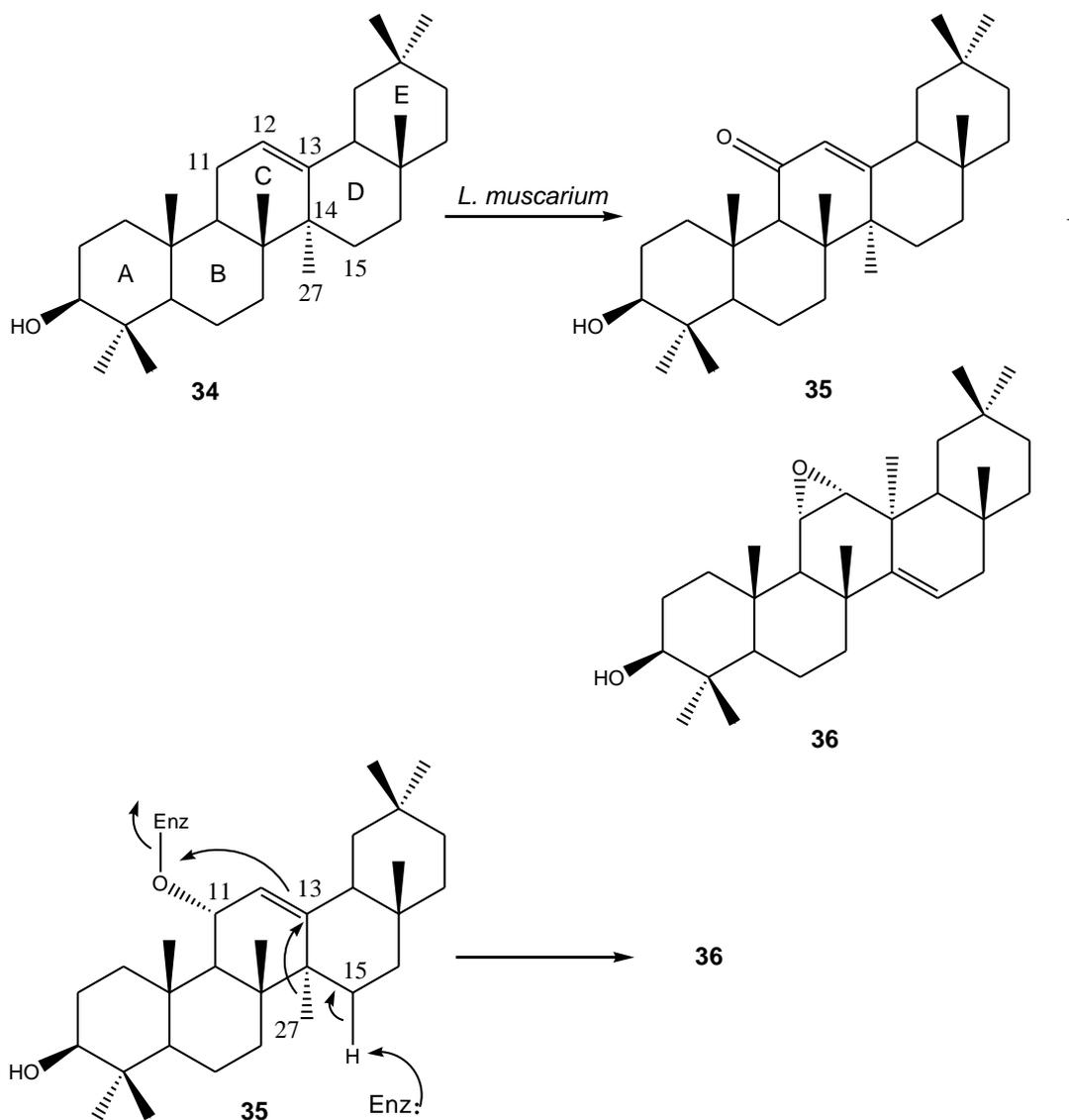
As biotransformações podem gerar rearranjos interessantes nos esqueletos carbônicos dos substratos. O ácido traquilobânico (**29**), isolado de sementes de *Xylopia sericea*, e que apresenta atividade antimicrobiana e antitumoral, dentre outras, foi biotransformado pelo fungo *Rhizopus stolonifer* levando aos derivados do tipo *ent*-16 $\beta$ -hidroxi-caur-11-eno **30** e **31**, rearranjados nas posições 15 e 16 (**Figura 6**).<sup>19</sup> Já a biotransformação com o fungo *Rhizopus arrhizus* de **32**, epímero de **29** na posição 18, resultou em outro produto rearranjado (**33**), como pode ser visto na **Figura 6**.<sup>20</sup>



**Figura 6** – Rearranjo em compostos com esqueleto traquilobânico em biotransformações com os fungos *R. stolonifer* e *R. arrhizus*.

Na biotransformação da  $\beta$ -amirina (**34**) pelo fungo *Lacanicillium muscarium*, foi observado o rearranjo no anel C dessa molécula, resultando em **35**. Pelo fato de ter sido isolado também o produto **36**, foi proposto para essa biotransformação o mecanismo apresentado na **Figura 7** (pág. 8). Moléculas com esse tipo de esqueleto carbônico são frequentemente oxidadas na posição 11 em reações com esse fungo. Foi então proposto que uma primeira enzima oxidaria a posição 11 de **34** e uma segunda enzima abstrairia o próton ligado

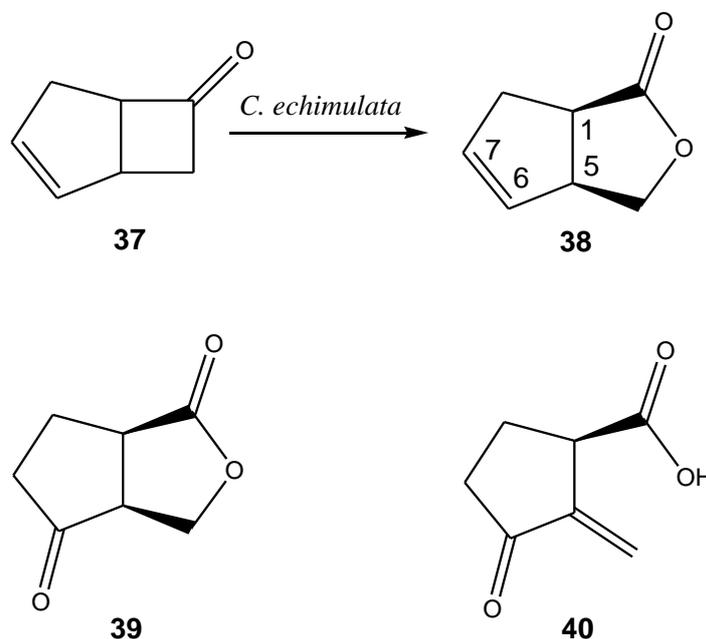
em C-15, formando a ligação dupla entre este carbono e C-14. Em seguida, o metaneto correspondente a C-27 migraria para o carbono vizinho (C-13). Os elétrons que constituíam a ligação dupla entre C-12 e C-13 passariam então a formar um anel epóxido nas posições 11 e 12, concomitantemente à liberação da enzima que oxidou a posição 11.<sup>21</sup>



**Figura 7** – Esquema da biotransformação da  $\beta$ -amirina por *L. muscarium*, bem como o mecanismo proposto para o rearranjo de **34** em **36**.<sup>21</sup>

Outro tipo de reação que pode ocorrer em biotransformações com fungos são as oxidações de Baeyer-Villiger, realizadas por mono-oxigenases presentes nesses micro-organismos.<sup>22</sup> O composto **37**, por exemplo, foi convertido em **38** pelo fungo *Cunninghamella echinulata* com rendimento de

35 %, obtendo-se 98 % de excesso enantiomérico (**Figura 8**). Essa molécula foi utilizada como intermediário na síntese da (-)-(1*R*,5*S*)-ciclosarcomicina (**39**), que, por tratamento ácido, resulta no antibiótico sarcomicina (**40**).<sup>23</sup>

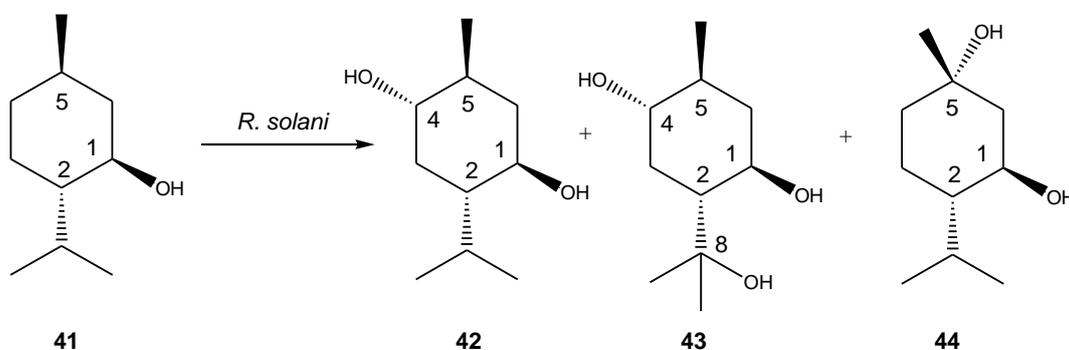


**Figura 8** – Esquema da obtenção de **38** por biotransformação de **37** com *C. echinulata*, usado como intermediário na síntese de **39**, precursor do antibiótico sarcomicina (**40**).

Como pode ser observado em alguns dos exemplos anteriores, os terpenos são uma classe de substâncias muito utilizada em reações de biotransformação<sup>24</sup> com fungos, bactérias, leveduras, microalgas e plantas, além de enzimas isoladas.<sup>25</sup> Eles constituem a mais variada classe de produtos naturais existente, com mais de 40000 tipos de compostos conhecidos, isolados de plantas, animais e micro-organismos.<sup>26</sup> Eles são formados por unidades de 5 átomos de carbono e divididos em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos com cadeias carbônicas de 10, 15, 20, 30 e 40 átomos, respectivamente.<sup>27</sup>

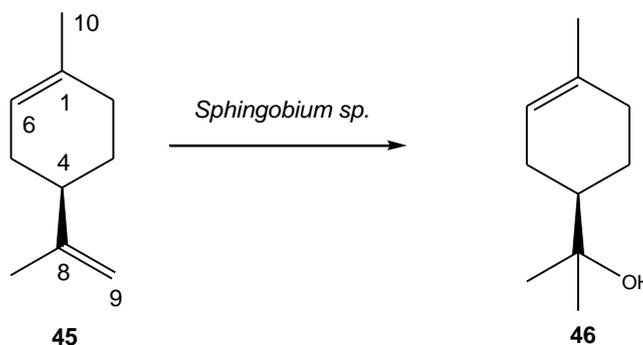
Muitos tipos de terpenos são utilizados industrialmente como aromatizantes<sup>28</sup> e flavorizantes<sup>29</sup> e alguns deles têm também atividades terapêuticas, como anticancerígena, antialérgica e anti-inflamatória, dentre outras.<sup>30</sup>

O monoterpeneo (1*R*,2*S*,5*R*)-mentol (**41**), utilizado na indústria de fragrâncias, foi biotransformado pelo fungo *Rhizoctonia solani*, levando a três produtos hidroxilados em posições distintas: **42**, **43** e **44**, com rendimentos de 65, 32 e 18 %, respectivamente (**Figura 9**).<sup>31</sup>



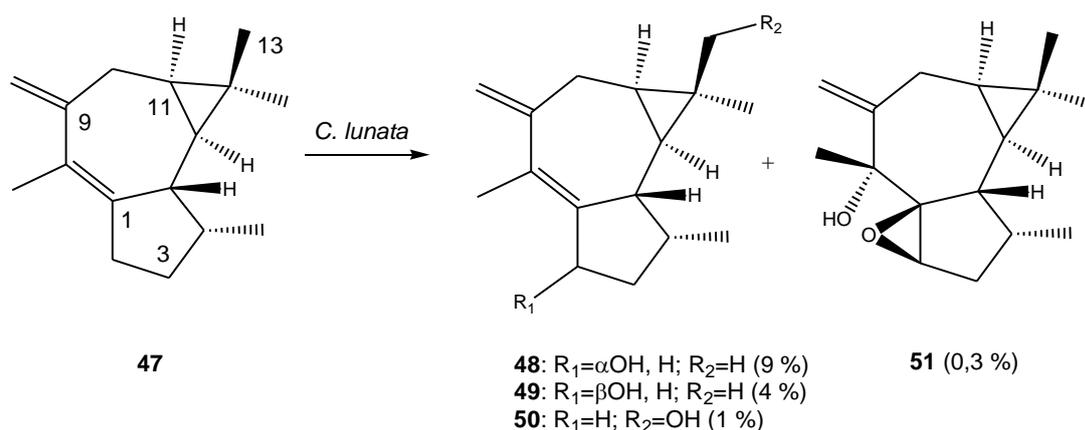
**Figura 9** – Esquema da biotransformação do (1*R*,2*S*,5*R*)-mentol (**41**) pelo fungo *R. solani*, que resulta em três produtos com padrões diferentes de hidroxilação (**42**, **43** e **44**).

O *R*-(+)-limoneno (**45**) é o monoterpeneo monocíclico encontrado em maior quantidade na natureza, constituindo 90 % do óleo da casca de laranja. Ele é um precursor barato e abundante para outros produtos de maior valor agregado. Um derivado oxigenado de **45**, o *R*-(+)- $\alpha$ -terpineol (**46**), que é utilizado em produtos domésticos, cosméticos e pesticidas, foi obtido a partir de **45** pelo uso de um sistema bifásico composto de uma fase aquosa contendo o fungo *Sphingobium sp.* e outra orgânica contendo óleo de girassol (**Figura 10**). Nesse processo foi obtido o composto **46** com rendimentos próximos a 100 %.<sup>32</sup>



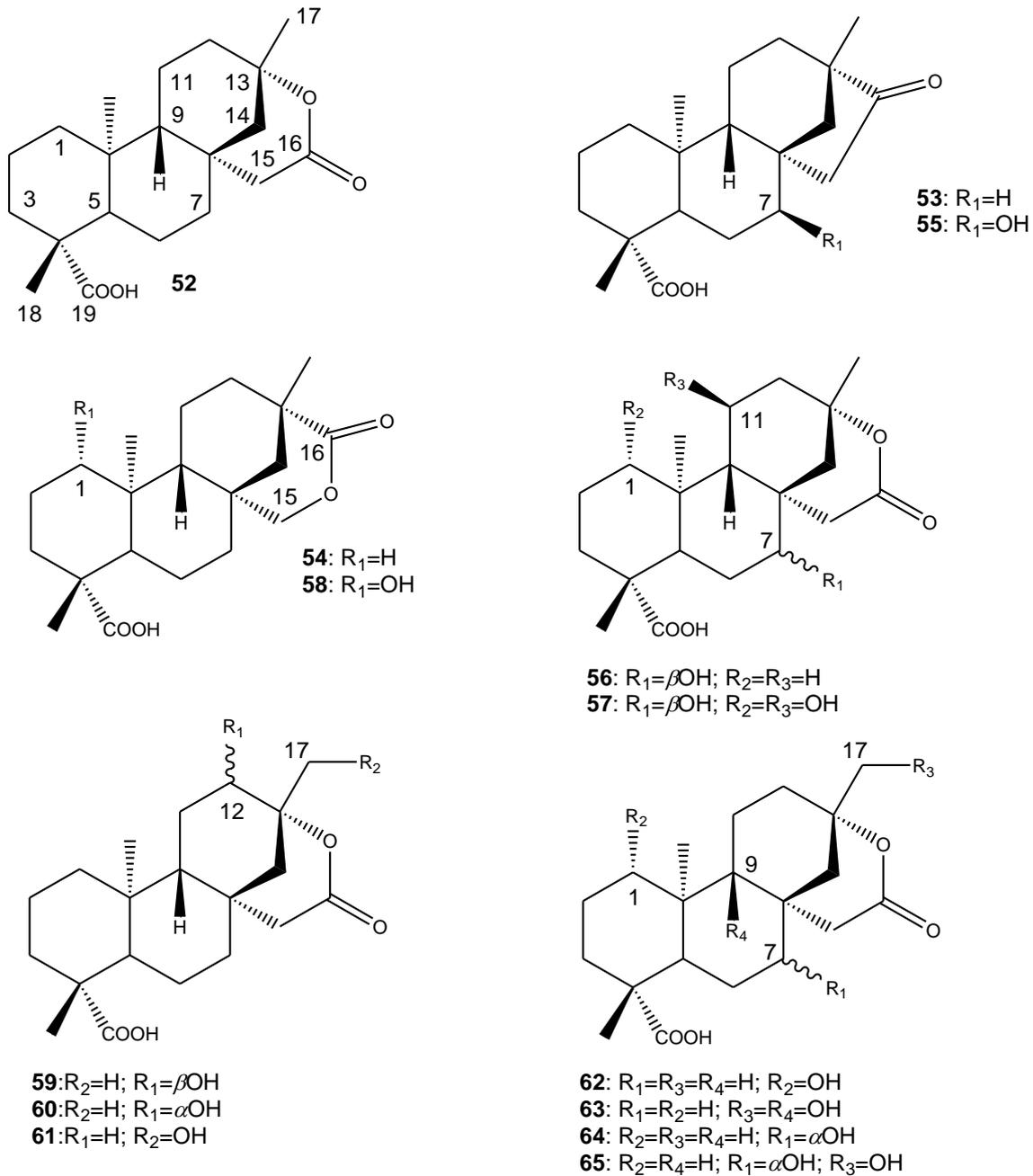
**Figura 10** – Reação de biotransformação do *R*-(+)-limoneno (**45**) com o fungo *Sphingobium sp.* para a obtenção do *R*-(+)- $\alpha$ -terpineol (**46**).

A esquamulosona (**47**), um sesquiterpeno isolado em grande quantidade da planta *Hyptis verticillata* Jacq, foi biotransformada pelo fungo *Curvularia lunata*, resultando nos derivados oxidados **48-51**. Esse composto (**47**) possui atividade inseticida em relação ao besouro *Cylas formicarius elegantulus*, a principal peste que ataca a batata doce. Os compostos **48-50** também apresentaram atividade inseticida, sendo **50** mais ativo que **47**, indicando que a hidroxilação feita pelo fungo em C-13 potencializou a atividade (**Figura 11**).<sup>33</sup>



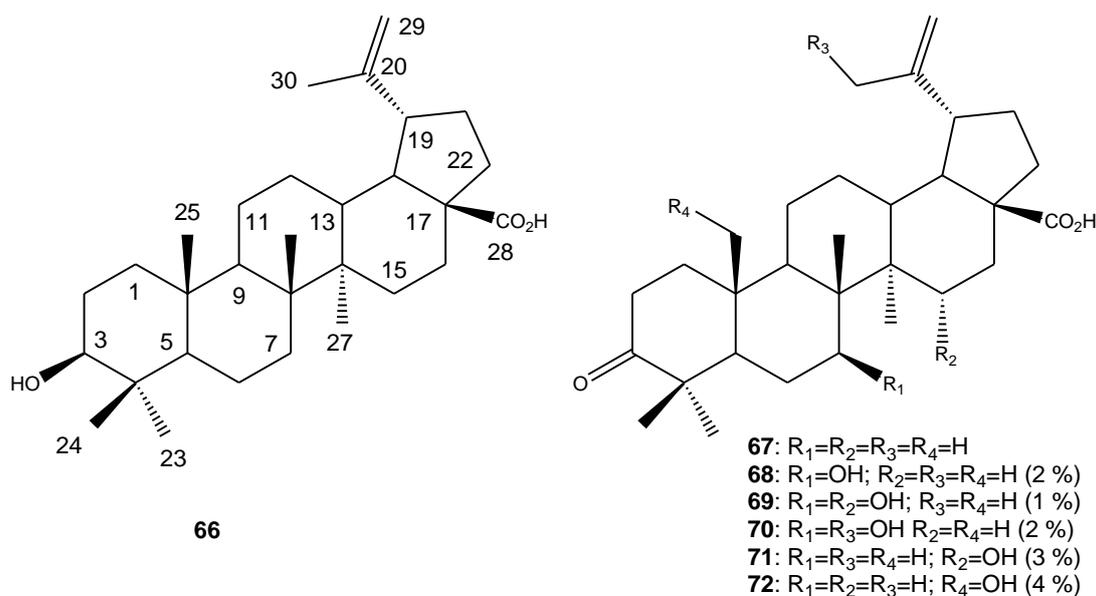
**Figura 11** – Produtos obtidos na reação de biotransformação da esquamulosona (**47**) com *C. lunata*.

Os fungos *Mucor recurvatus*, *A. niger* e *Absidia pseudocylindrospora* mostraram diferentes atividades sobre o diterpeno **52**, tendo sido obtidos treze produtos (**53-65**), dos quais seis inéditos (**60-65**). Da incubação de **52** com o *M. recurvatus* foram isolados os compostos **53-56** (4, 31, 5 e 0,3 %, respectivamente). Com *A. niger*, obtiveram-se os produtos **53** (4 %), **54** (31 %), **56** (1 %), **58** (1 %), **59** (0,4 %) e **62** (1 %) e, na biotransformação com *A. pseudocylindrospora*, foram isolados **59-61** (6, 1 e 0,2 %, respectivamente), além de **63** (1 %), **64** (4 %) e **65** (1 %) (**Figura 12**, pág. 12). Os compostos **52**, **54-56**, **58**, **59**, **61** e **64**, apresentaram atividade inibidora de AP-1, proteínas envolvidas em doenças inflamatórias como artrite reumatóide, psoríase e artrite psoriática. O composto **54** apresentou atividade maior do que o composto de referência (dexametasona) utilizado no bioensaio.<sup>34</sup>



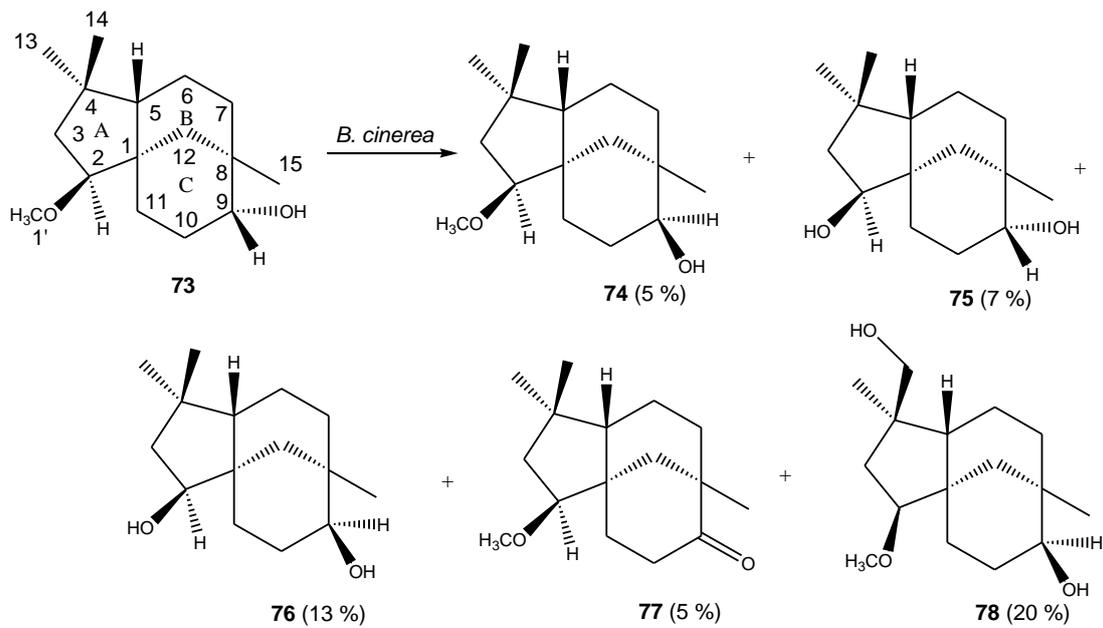
**Figura 12** – Produtos obtidos na reação de biotransformação da lactona (**52**), derivada do isosteviol (**53**), com os fungos *M. recurveratus*, *A. niger* e *A. pseudocylindrospora*.

Os ácidos betulínico (**66**) e betulônico (**67**), triterpenos que apresentam atividade antiviral e antimelanoma, foram biotransformados com os fungos *Chaetophoma* sp., *Dematium* sp., *Colletotrichum* sp. e *Arthrobotris* sp., sendo também obtidas funcionalizações de carbonos metílicos e metilênicos (produtos **68-72**, **Figura 13**, pág. 13).<sup>35</sup>



**Figura 13** – Produtos obtidos na biotransformação dos ácidos betulínico (**66**) e betulônico (**67**) com os fungos *Chaetophoma sp.*, *Dematium sp.*, *Colletotrichum sp.* e *Arthrobotris sp.*

Outra classe de terpenos utilizada anteriormente em reações de biotransformação é a dos clovanos. O  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**) foi biotransformado pelo fungo *Botrytis cinerea*, resultando nos metabólitos **74-78** (Figura 14, pág. 14). Os compostos **73-78** foram capazes de inibir o crescimento desse importante fitopatógeno em testes *in vitro*. Os compostos **74-78** apresentaram menor atividade fungistática do que **73**, sugerindo que a biotransformação de **73** em produtos hidroxilados pode ser uma rota de detoxificação de **73** pelo fungo.<sup>36</sup> A incubação do clovano **74** com *B. cinerea* resultou somente no isolamento dos derivados **76-78**, indicando que a detoxificação pode estar relacionada com a inversão da configuração de  $\alpha$  para  $\beta$  da hidroxila presente em C-9.



**Figura 14** – Estrutura química dos clovanos **74-78**, obtidos por biotransformação de **73** por *B. cinerea*.

Moléculas com esqueleto clovânico têm demonstrado inibir o crescimento do fungo *Botrytis cinerea*.<sup>37</sup> Espécies do gênero *Botrytis* são importantes patógenos de flores, frutas e vegetais,<sup>38</sup> sendo *B. cinerea* o mais importante dentre as mais de 20 espécies conhecidas desse gênero.<sup>39</sup> Esse fungo é o causador da podridão cinza, que infecta mais de 235 espécies de frutas e vegetais, como alface, tomate e morango, dentre outros, tornando necessário o desenvolvimento de técnicas de controle do mesmo.<sup>40</sup> A **Figura 15** (pág. 15) mostra dois exemplos de contaminações por *B. cinerea*.<sup>41-42</sup>

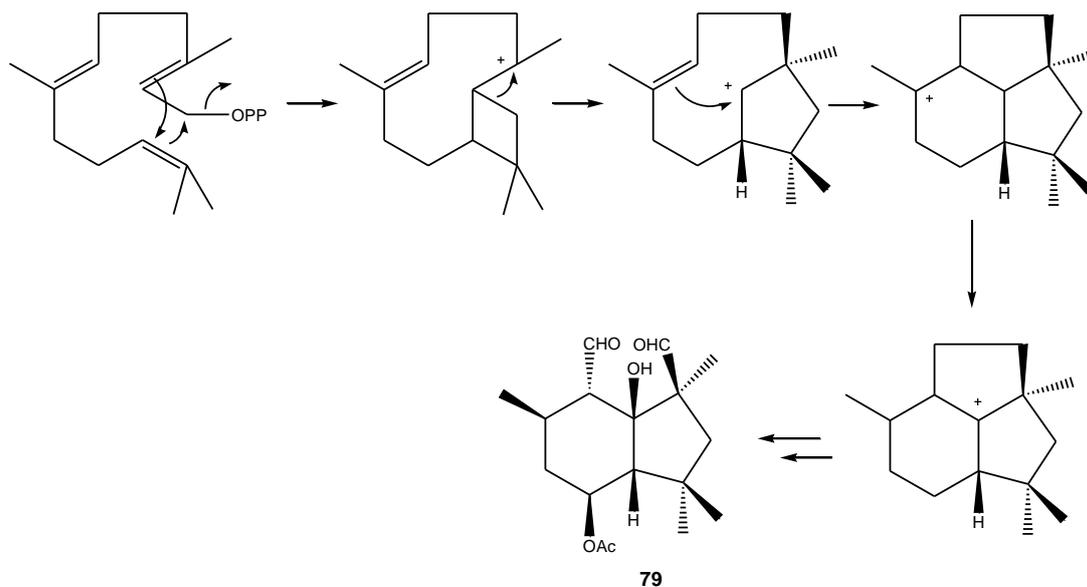


**Figura 15** – Contaminação de uvas e morangos pelo fungo *B. cinerea*.

<sup>41</sup>Fonte:<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/doenca.htm> Acessado em:01/12/2011

<sup>42</sup>Fonte:<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MorangoSemiHidroponico/doencas.htm> Acessado em:01/12/2011

O principal metabólito secundário produzido por esse fungo é o botridial (**79**), que é a maior arma desse fungo para a infecção das plantas.<sup>43</sup> Esse metabólito produz lesões em algumas plantas mesmo à concentração de 1ppm.<sup>40</sup> A **Figura 16** (pág. 16) mostra a biossíntese do botridial (**79**) pelo fungo *B. cinerea*.<sup>44</sup>



**Figura 16** – Esquema da biossíntese do sesquiterpeno botridial (**79**) pelo fungo *B. cinerea*.

Diversas biotransformações foram feitas no sentido de entender melhor o mecanismo de detoxificação de clovanos por esse fungo. Em um estudo feito por Deligeorgopoulou e colaboradores (2004),<sup>45</sup> o clovano **80** foi biotransformado em **81** e **82** por *B. cinerea*, sendo obtida a abertura do anel C nesse último produto. A biotransformação de **83**, por sua vez, levou a **84**, produto da oxidação da hidroxila ligada a C-10, enquanto *B. cinerea* biotransformou **85** em **76** por meio da desmetilação da posição 1' (**Figura 17**, pág. 17).

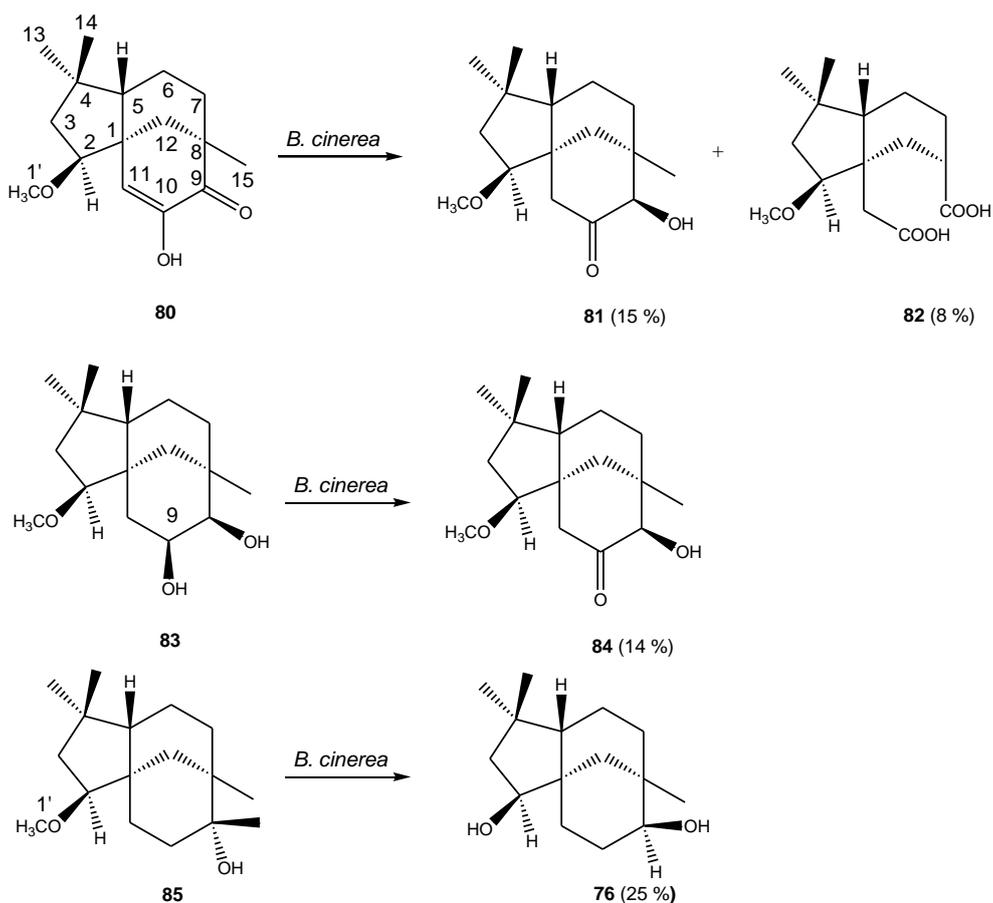
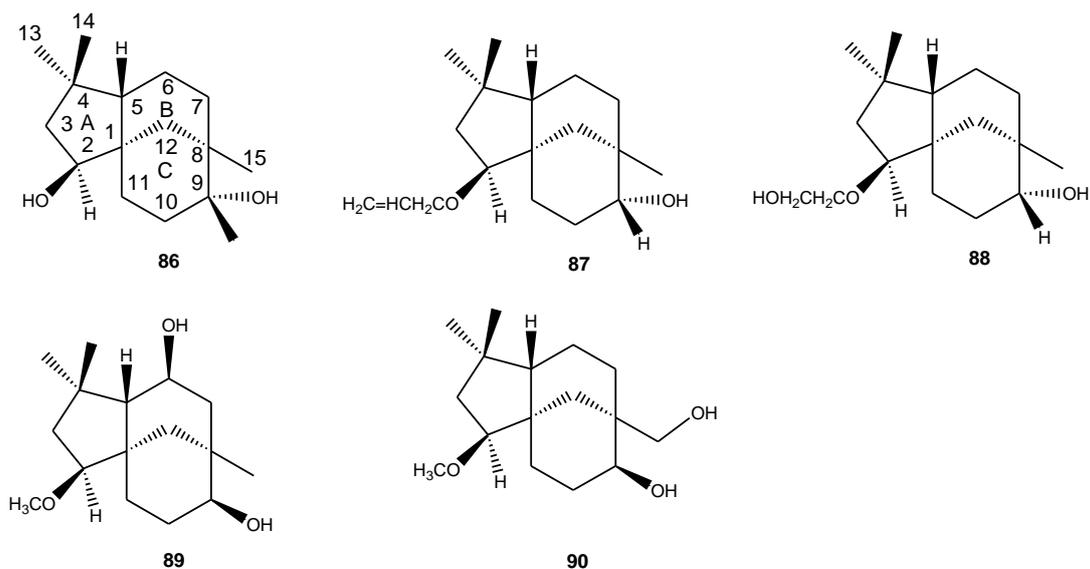


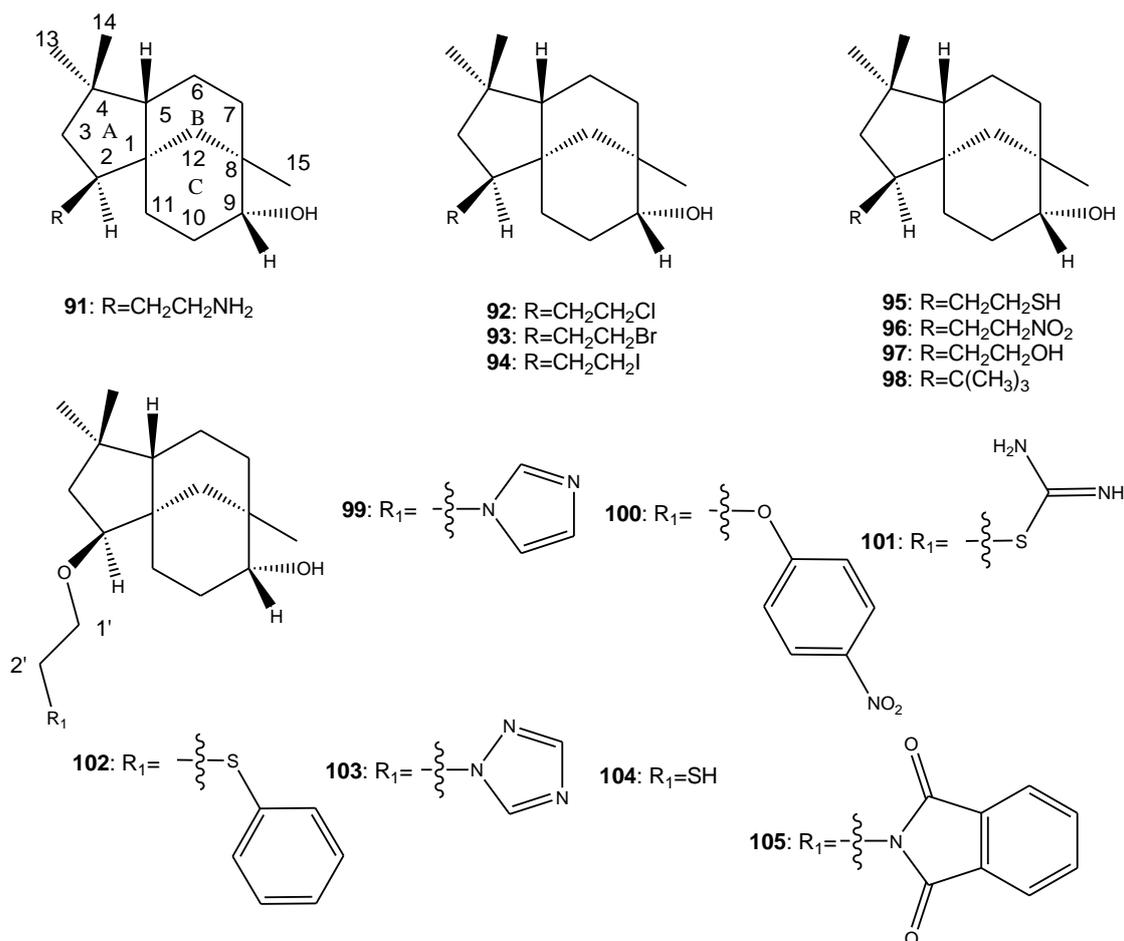
Figura 17 – Esquema da biotransformação dos clovanos **80**, **83** e **85** por *B. cinerea*.

Os clovanos **83** e **85**, bem como **86-90** (Figura 18, pág. 18), obtidos por via sintética, foram testados para avaliar o efeito de substâncias com diferentes padrões de oxidação do anel C na inibição do crescimento de *B. cinerea*. Concluiu-se que a presença de hidroxilas nesse anel diminui a atividade dos clovanos em relação a **73** (Figura 14, pág. 14). Observou-se também que a presença da hidroxila na posição  $9\alpha$  é importante para essa atividade e que a existência de uma cadeia lateral ligada a C-2 pode aumentar a atividade fungistática desses clovanos.<sup>45</sup>



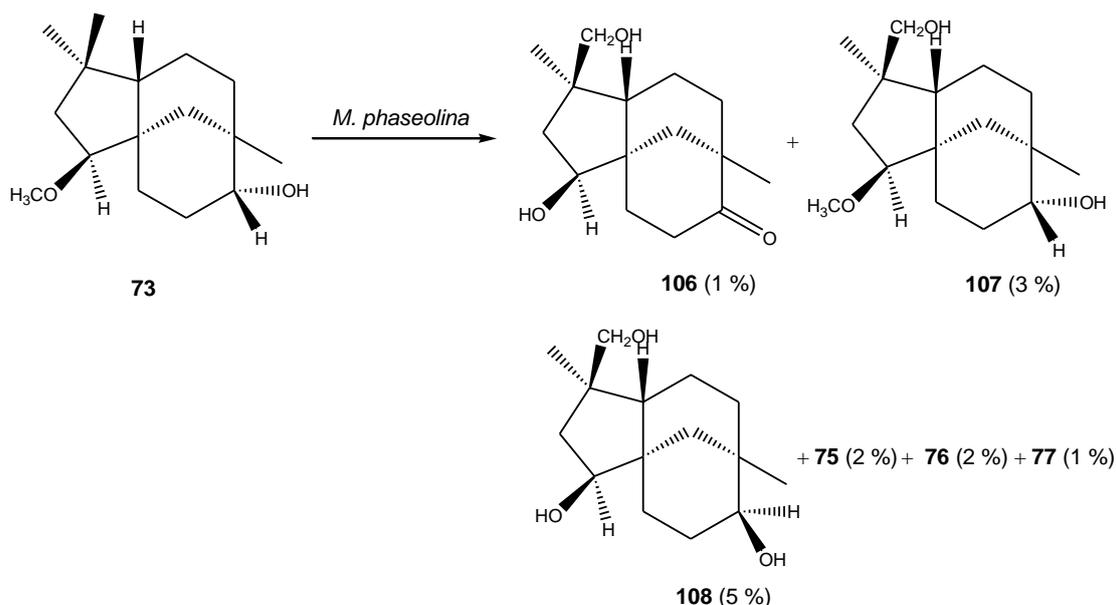
**Figura 18** – Estruturas dos clovanos **86-90**, testados frente ao crescimento do fungo *B. cinerea*.

Para avaliar melhor a influência da cadeia lateral ligada a C-2 sobre o crescimento de *B. cinerea*, os clovanos **73-78** (Figura 14, pág. 14), **87**, **88** e **90** (Figura 18) e **91-105** (Figura 19, pág. 19), substituídos nesta posição, foram sintetizados e testados. Os resultados confirmaram que modificações na cadeia lateral aumentam a eficiência da inibição de *B. cinerea* por essas moléculas. Observou-se que compostos com cadeias laterais nitrogenadas apresentavam atividade elevada, em contraste com os de cadeias laterais sulfuradas, que, em geral, foram pouco ativos. O composto **99**, duplamente nitrogenado na cadeia lateral, inibiu 98 % do crescimento de *B. cinerea*. Os compostos **91** e **101** apresentaram 97 % de inibição do crescimento desse fungo, enquanto compostos duplamente hidroxilados, como **75** e **76**, mesmo aqueles com uma cadeia lateral ligada a C-2, como **90**, apresentaram baixa atividade.<sup>37</sup>



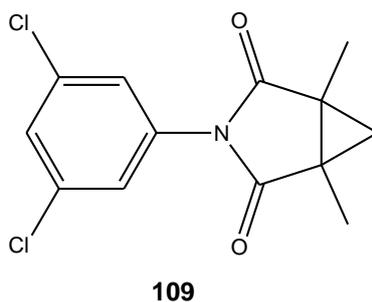
**Figura 19** – Estruturas químicas dos clovanos **91-105**, sintetizados e testados em relação a sua atividade antifúngica frente ao fungo *B. cinerea*.

A biotransformação de clovanos também já foi realizada com o fungo *Macrophomina phaseolina*. Nessa reação, o substrato **73** foi convertido nos produtos **75-77** e **106-108** (Figura 20, pág. 20), todos resultantes da oxidação de **73** em posições diferentes, ocorrendo a hidroxilação de C-14 (**106-108**), desmetilação da posição 1' (**106** e **108**), e oxidação da hidroxila ligada a C-9 (**106**). A atividade antifúngica desses compostos foi avaliada em relação a *B. cinerea*, no entanto, todos foram menos ativos que o substrato da biotransformação (**73**), confirmando a hipótese anterior de que hidroxilações no esqueleto clovânico tendem a diminuir a atividade dos mesmos frente a esse fungo.<sup>46</sup>



**Figura 20** – Esquema da biotransformação de **73** com o fungo *M. phaseolina*.

A existência de rotas de detoxificação de clovanos por *B. cinerea* é um indicativo de que, se usados como agentes no controle desse micro-organismo, os clovanos não vão persistir no ambiente por muito tempo, já que serão, aos poucos, metabolizados pelos fungos. Essa é uma vantagem dos clovanos sobre alguns fungicidas convencionais, como a procimidona (**109**, **Figura 21**),<sup>47</sup> que pode resistir no ambiente por muito tempo, sendo estável o bastante para ser detectada em vegetais, no solo, e até mesmo em peixes.<sup>45</sup>

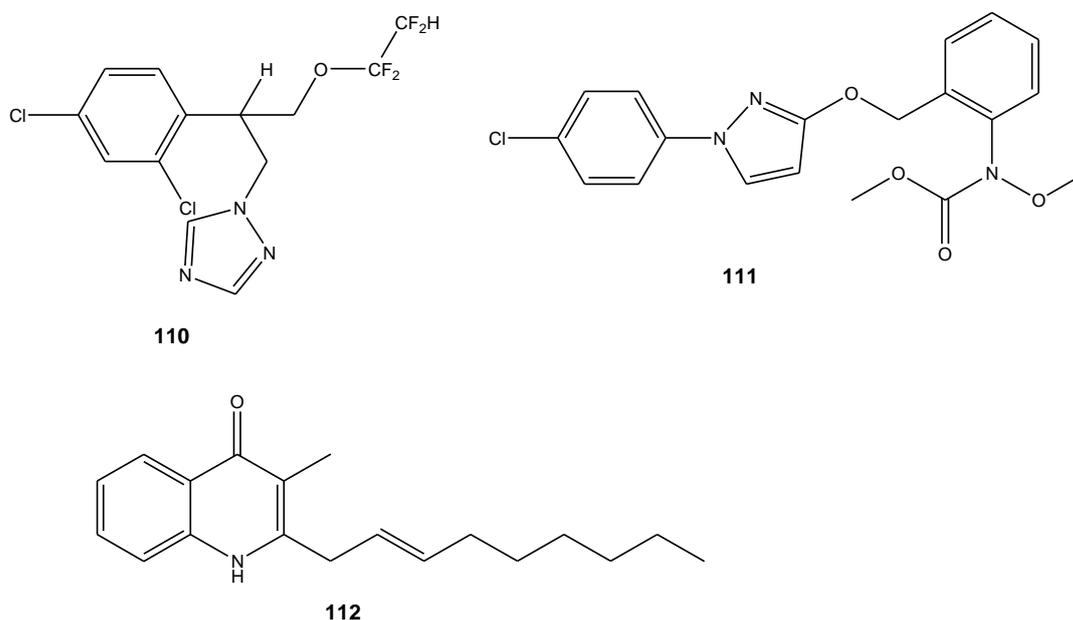


**Figura 21** – Estrutura do fungicida procimidona (**109**).

Outra característica desejável aos produtos utilizados como fungicidas é que os mesmos não afetem negativamente o crescimento dos vegetais nos quais são aplicados. Se, ao contrário, estimularem o seu desenvolvimento, o

efeito seria ainda melhor. Esse tipo de avaliação pode ser feito em laboratório por meio da avaliação da germinação de sementes e do crescimento de uma dada espécie de planta na presença de concentrações variadas do composto a ser testado.<sup>48</sup>

Em um estudo feito por Ronchi e colaboradores (1997), mostrou-se que o antifúngico tetraconazol (**110**)<sup>49</sup> (**Figura 22**) estimula os mecanismos de defesa do milho em relação ao estresse do ambiente, por indução da expressão de dois genes diferentes, um envolvido no fortalecimento da parede das células e outro com os mecanismos de resistência à seca.<sup>50</sup> Por sua vez, o fungicida piraclostrobina (**111**)<sup>51</sup> estimulou a produção de cereais tratados com o mesmo.<sup>52</sup> Já o composto PSC-B (**112**), isolado da bactéria *Pseudomonas cepacia*, apresentou, além de atividade fungicida contra os fitopatógenos *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*, estímulo ao crescimento de sementes de pimentas vermelhas (*Capsicum annuum*).<sup>53</sup>



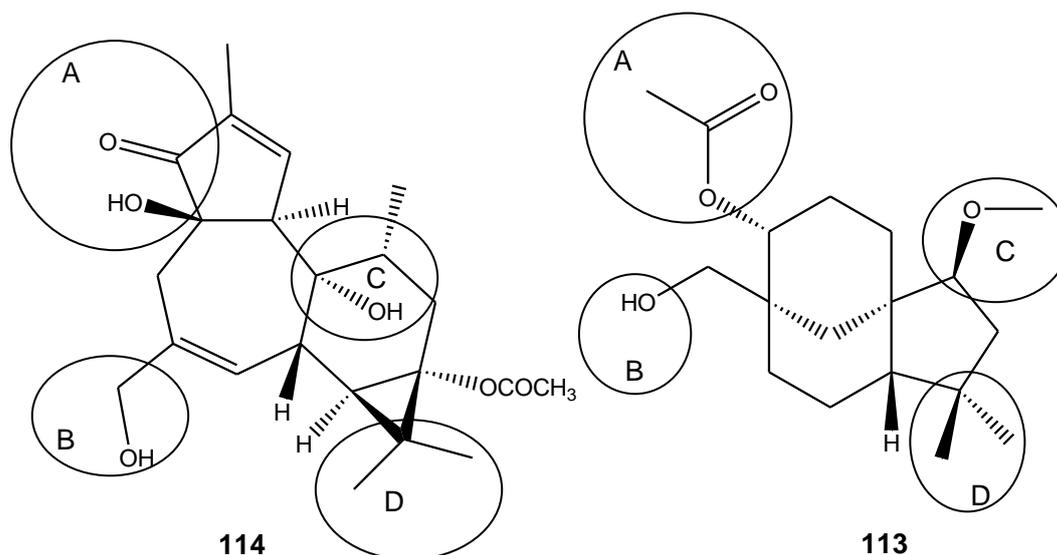
**Figura 22** – Estrutura dos antifúngicos tetraconazol (**110**), piraclostrobina (**111**) e PSC-B (**112**).

Apesar dos muitos esforços que têm sido feitos na avaliação do potencial de derivados clovânicos quanto à inibição do crescimento do fungo *B. cinerea*,<sup>54</sup> até o momento, não se encontram na literatura relatos de testes

alelopáticos realizados com essa classe de terpenos em relação à germinação e ao crescimento de plantas.

Mais recentemente, vem também chamando atenção a grande similaridade estrutural de moléculas com esqueleto clovânico com moléculas ativadoras de proteínas quinase C (PKC).<sup>55</sup> Essas enzimas atuam em diversos tipos de processos bioquímicos dentro da célula, como proliferação, diferenciação e apoptose, estando envolvidas em doenças como câncer,<sup>56</sup> mal de Alzheimer<sup>57</sup> e AIDS.<sup>58</sup>

Na **Figura 23** é apresentada uma comparação entre a estrutura do acetato de (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol (**113**), um terpeno da classe dos clovanos, e a prostratina (**114**), substância ativadora de PKC. O modelo de três pontos apresentado representa características estereoquímicas mínimas para ativação de proteínas quinase C. Nesse modelo, três grupos hidrofílicos estão dispostos como em um triângulo, na estrutura de **114**, separados por aproximadamente 6 Å.<sup>59</sup> Observa-se certa similaridade entre os pontos hidrofílicos (A, B e C) e a porção hidrofóbica (D) de **114** e do clovano **113**. Dessa forma, moléculas com esqueleto clovânico têm sido consideradas como potenciais moduladores de proteínas quinase C.



**Figura 23** – Comparação entre as estruturas da prostratina (**114**) e do acetato de (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol (**113**), com destaque para os grupos hidrofílicos A, B e C e hidrofóbico (D).

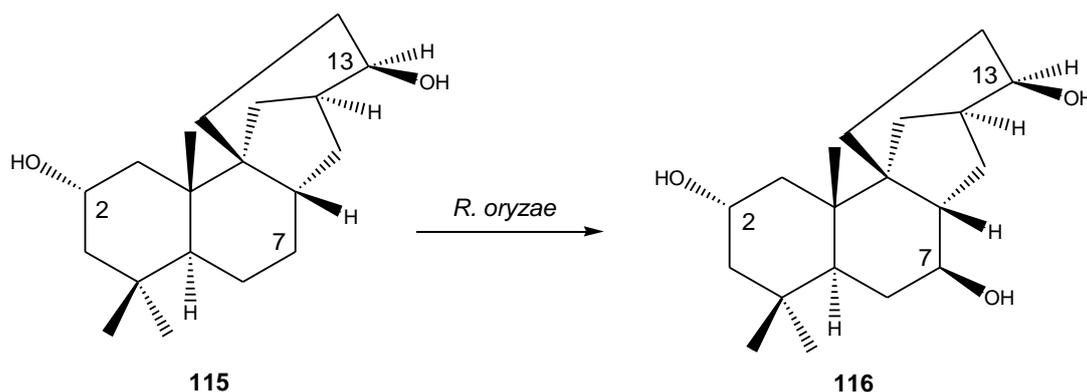
Em se tratando do vírus HIV, um dos obstáculos ao tratamento de pacientes infectados é a reativação do vírus em estado latente nas células infectadas.<sup>60</sup> O tratamento antiretroviral diminui fortemente o índice de HIV-1 no plasma, reduzindo assim a morbidade e a mortalidade. No entanto, uma reserva do vírus resiste em forma latente em células do tipo CD4<sup>+</sup>T. Caso o tratamento seja interrompido, o vírus pode se reativar e voltar a agir no organismo infectado.<sup>61</sup> Uma estratégia para a eliminação dos vírus dessas células é a sua reativação, para que os mesmos possam ser tratados convenientemente, uma vez que esses não respondem aos tratamentos existentes para essa doença quando em estado de latência.<sup>62</sup>

Evidências apontam que proteínas quinase C estão envolvidas no processo de ativação da expressão do vírus HIV-1.<sup>63</sup> Dessa forma, moléculas capazes de ativar essas enzimas e, conseqüentemente, ativar o vírus a partir do seu estado de latência, são um alvo no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da AIDS. A prostratina (**114**) é uma molécula com capacidade ativadora dessas proteínas,<sup>64</sup> para a qual testes feitos em ratos indicam a mesma como uma boa promessa para testes clínicos em humanos.<sup>65</sup>

## 1.2 Fontes promissoras de micro-organismos para reações de biotransformação

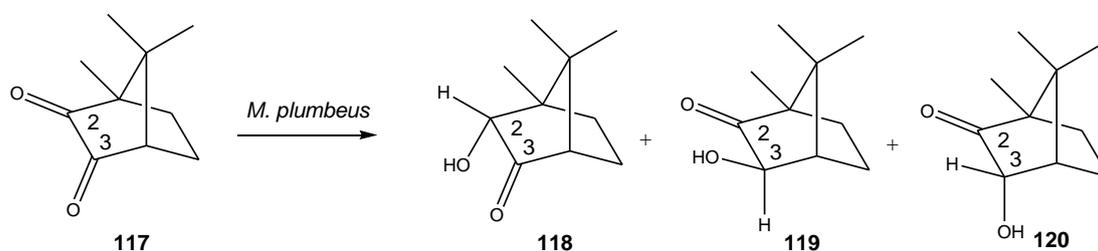
Os fungos são micro-organismos amplamente encontrados na natureza.<sup>66</sup> Estimativas apontam que menos de 10 % das mais de 1 milhão de espécies de fungos e bactérias são conhecidas.<sup>67</sup> Um grande número de micro-organismos habita o solo, em constante interação com o mesmo, influenciando parcialmente as características físicas, químicas e biológicas desse habitat.<sup>68</sup>

Fungos provenientes de amostras de solo têm sido isolados e utilizados em reações de biotransformação.<sup>69</sup> O fungo *Rhizopus oryzae*, por exemplo, biotransformou o 2 $\alpha$ ,13(*R*)-diidroxiestemodano (**115**) em **116**, hidroxilado no carbono 7 com 83 % de rendimento (**Figura 24**, pág. 24).<sup>70</sup>



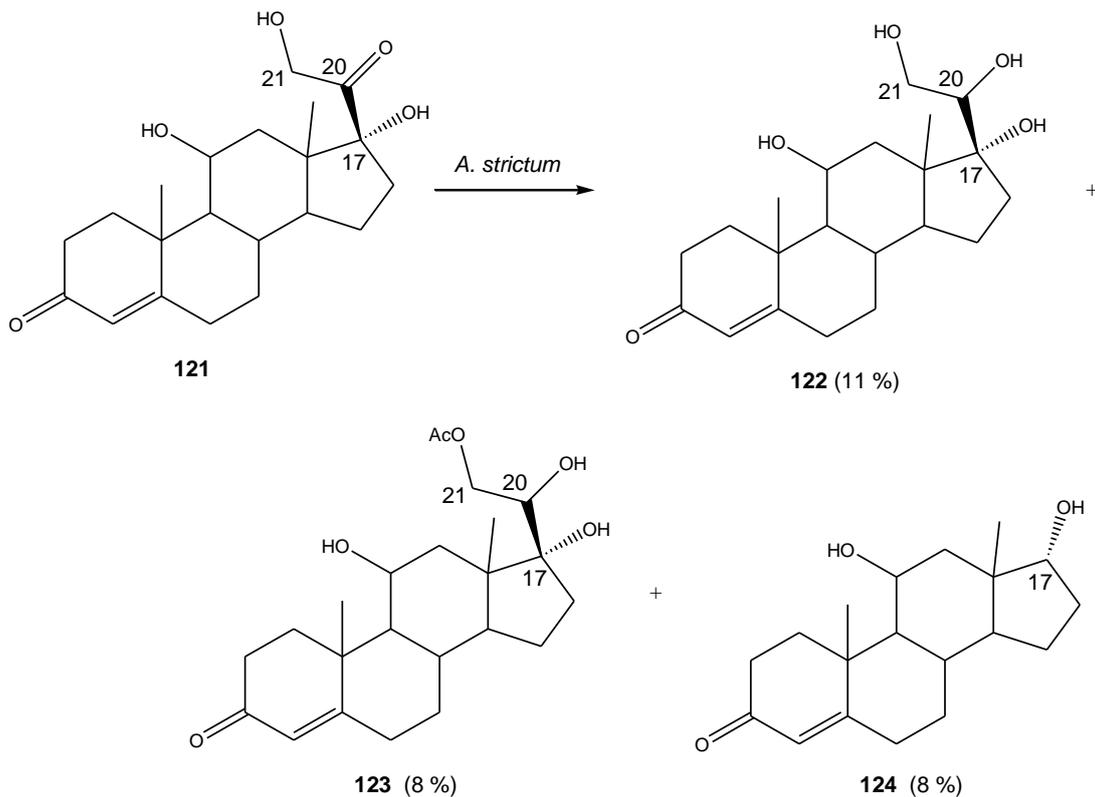
**Figura 24** – Representação da conversão do 2 $\alpha$ ,13(*R*)-di-hidroxiestemodano (**115**) em **116** pelo fungo *R. oryzae*.

Uma cepa do fungo *Mucor plumbeus*, isolada de solo, foi capaz de converter a 1-*R*-(-)-canforquinona (**117**) em três produtos de redução das carbonilas dessa molécula. Um destes, o produto **118**, foi obtido com 51 % de rendimento, resultado de uma hidroxilação na posição  $\alpha$  por redução da carbonila presente em C-2. Os outros produtos, **119** e **120**, (21 e 28 %, respectivamente), resultaram da hidroxilação das posições  $\beta$  e  $\alpha$  de C-3, respectivamente (**Figura 25**).<sup>71</sup>



**Figura 25** – Representação da reação de redução da 1-*R*-(-)-canforquinona (**117**) por *M. plumbeus*.

Outra reação em que se utilizou um fungo proveniente de solo foi a conversão da hidrocortisona (**121**) com o fungo *Acremonium strictum* nos derivados **122**, resultante da redução da carbonila ligada a C-20, **123**, por redução da carbonila e acetilação da hidroxila ligada a C-21, e **124**, com a quebra da cadeia lateral ligada a C-17 (**Figura 26**, pág. 25).<sup>72</sup>



**Figura 26** – Esquema da biotransformação da hidrocortisona (121) pelo fungo *A. strictum*, isolado de solo.

Inovações na área de biotransformação de terpenos têm incluído o uso de fungos provenientes de habitats diferenciados, tais como de ambientes marinhos,<sup>73</sup> regiões desérticas,<sup>74</sup> e geleiras.<sup>75</sup> As adaptações necessárias à sobrevivência de fungos nessas diferentes condições de temperatura, pH, pressão osmótica, dentre outras, presentes nesses habitats, resultam em cepas com metabolismos próprios. Assim, um fungo qualquer, por exemplo, *Aspergillus niger*, quando isolado de dois diferentes tipos de solo, pode apresentar diferentes atividades/perfis metabólicos. Um ambiente exótico para o isolamento desses micro-organismos é a própolis.

A própolis é um material natural, considerado o terceiro mais produzido por abelhas, após o mel e a cera. Essa substância resinosa, extraída das colméias, é muito utilizada na indústria de cosméticos<sup>76</sup> e apresenta uma gama de atividades biológicas, como atividade antitumoral *in vivo*,<sup>77</sup> ação contra progressão de aterosclerose<sup>78</sup> e também forte atividade antimicrobiana.<sup>79</sup>

A própolis é produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*, para proteção das colméias<sup>80</sup> e sua consistência depende altamente da flora da região onde é coletada.<sup>81</sup> Em sua composição são encontrados mais de 300 tipos de substâncias, entre polifenóis, flavonas, flavanonas, ácidos e ésteres fenólicos, terpenos, esteróides e açúcares.<sup>82,83</sup>

A ação da própolis contra micro-organismos já foi muito estudada,<sup>84,85</sup> o que indica que, fungos que a colonizam, apresentariam um metabolismo diferenciado. Gregoris e colaboradores (2011) mostraram que a própolis apresenta forte atividade antioxidante, além da capacidade de absorção das radiações ultravioleta A e B, sendo passível de ser adicionada a formulações cosméticas para a proteção em relação à radiação solar.<sup>86</sup> Isso indica que fungos isolados da própolis sejam diferenciados e capazes de produzir substâncias que absorvam a radiação UV. Essa hipótese pode ser racionalizada pelo fato de que a própolis é coletada pelas abelhas em flores e, por isso, está exposta à radiação solar, fazendo com que os micro-organismos que se desenvolvam na mesma se adaptem a esta exposição. Assim, fungos da própolis teriam rotas enzimáticas/metabólicas muito diferentes de fungos isolados de solo, onde a porcentagem de radiação UV presente é muito menor.

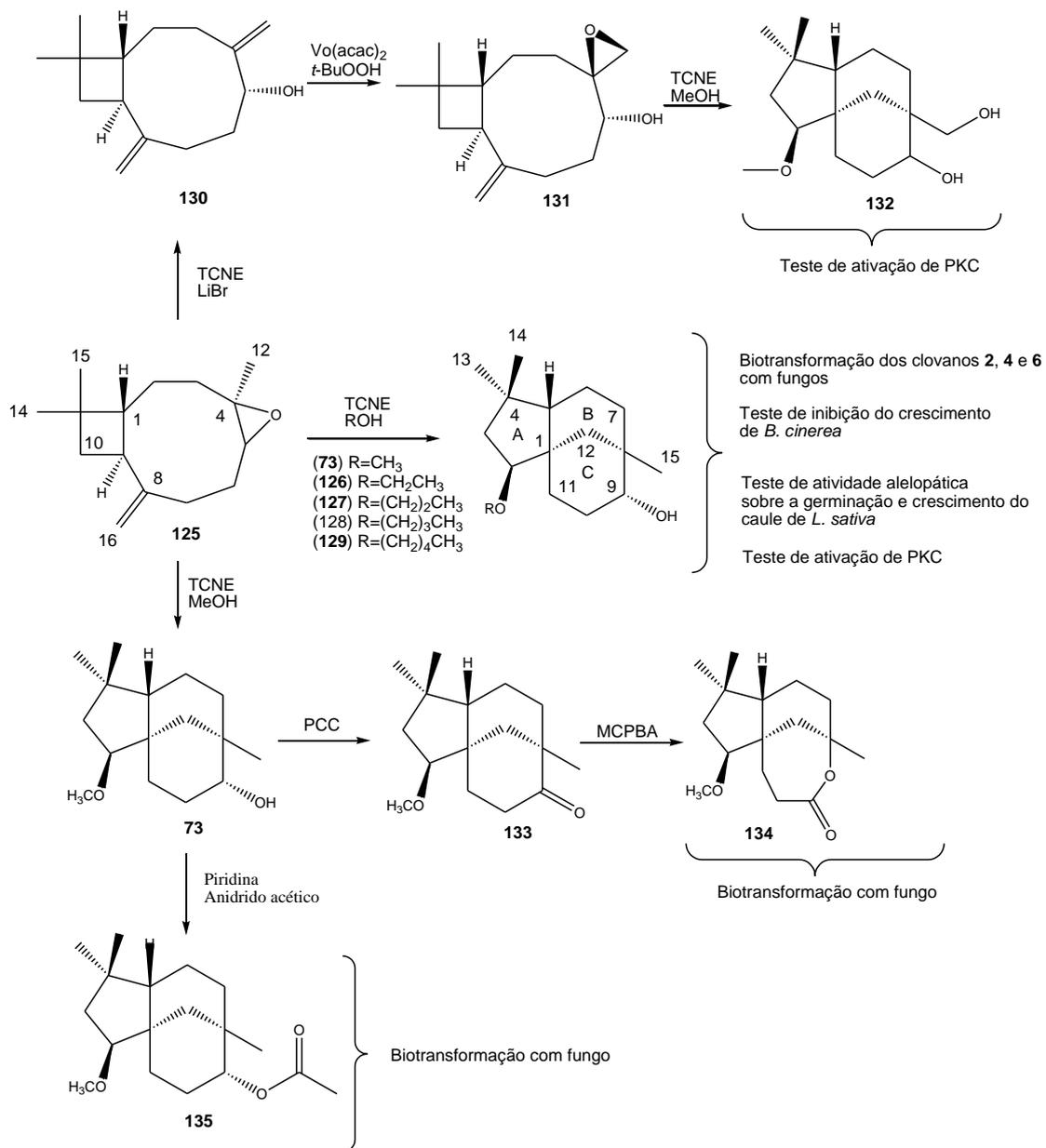
### 1.3 Objetivos do trabalho

Esse trabalho teve como objetivo o isolamento de fungos submetidos à exposição da radiação UV, a seleção daqueles mais promissores para uso em reações de biotransformação de terpenos, em comparação com biotransformações com fungos isolados de solo, disponíveis na coleção de fungos do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios da UFMG.

Outro objetivo foi a síntese de terpenos da classe dos clovanos, a partir do óxido de cariofileno (**125**) (**Figura 27**, pág. 27), para utilização nas reações de biotransformação com fungos e realização de ensaios biológicos com alguns desses clovanos, a fim de se avaliarem as suas capacidades de inibição do crescimento do fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Esses compostos também foram avaliados em testes alelopáticos de germinação e crescimento de raiz e

caule da espécie de alface *Lactuca sativa* e em testes de ativação de proteínas quinase C (PKC).

A **Figura 27** apresenta um resumo das reações de síntese e biotransformação realizadas neste trabalho, bem como os bioensaios desenvolvidos no mesmo.



**Figura 27** – Esquema dos objetivos desse trabalho, incluindo as reações de síntese e biotransformação, bem como os testes de atividade biológica realizados.

# Parte experimental

## 2 Parte experimental

### 2.1 Equipamentos

As pesagens foram realizadas em balança analítica da marca QUIMIS, modelo Q-ILA2104, 210g / 0,1 mg ou em balança da marca Digimed KN1000C, classe de exatidão II, série 04G6.

Para as esterilizações foi utilizada uma autoclave vertical da marca FANEN, modelo 415/3, série J03610. Os procedimentos feitos em ambiente estéril foram realizados em capela de fluxo laminar da marca VECO, modelo JLF 912, série FL 5799 ou em capela Bio 60 Faster.

Para a concentração de amostras foram utilizados evaporadores rotatórios das marcas Büchi Waterbath, modelo B – 480, Fisaton modelo 802, série 531782, Büchi Heating Bath B-490 ou Büchi R-200.

As análises por cromatografia em coluna foram feitas utilizando-se sílica gel 60PF<sub>254</sub> (60-100 mesh, Merck). As cromatografias em camada delgada foram feitas utilizando-se sílica 60 G (Vetec, Lote 0507764) ou placas Merck Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, com 0,2 mm de espessura. Foi utilizada, como revelador, uma solução de metanol:água:ácido sulfúrico concentrado (45:45:10), contendo 1% p/v de vanilina. Esse revelador foi utilizado também sem adição de vanilina.

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram obtidos em espectromêtros Varian Inova-400 e Varian Inova-600 MHz (Departamento de Química, Universidad de Cádiz), utilizando-se, como solventes, CDCl<sub>3</sub> e CD<sub>3</sub>OD (Merck). Em todos os mapas de contornos heteronucleares, a dimensão direta foi representada em F1 e a indireta em F2. Essa representação é contrária à representação internacional, entretanto, tais espectros foram processados na Universidad de Cádiz, onde se utiliza essa representação.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho binocular Reichert Thermovar tipo 300429, com reostato Reichert-Jung e termômetro RS 206-3722.

A rotatividade específica foi determinada em polarímetro Perkin Elmer modelo 341.

Os espectros no infravermelho foram obtidos em aparelho Perkin Elmer FT-IR System, Spectrum BX, série 69799.

Os pHs dos meios de cultura foram determinados utilizando pHmetro CRISON microph 2001.

As biotransformações em modo de agitação foram feitas em Shaker Bellco Glass VCSB2-266.

Para os procedimentos cromatográficos feitos em HPLC, utilizou-se um aparelho Merck Hitachi L-6200 A, Intelligent Pump, equipado com analisador de índice de refração R1-71 e detector UV-VIS L4250, com o software JMBS e a interface Hercule Lite. Foram utilizadas colunas semipreparativas LiChroCart<sup>®</sup> 250-10 e LiChrospher<sup>®</sup> Si 60 (10 $\mu$ m) e colunas analíticas LiChroCart<sup>®</sup> 250-4 e LiChrospher<sup>®</sup> Si 60 (5 $\mu$ m).

Os cromatogramas e espectros de CG-EM foram obtidos em aparelho Finnigan Voyager 70 eV. e os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em aparelho Micromass Autospec (70 eV).

## 2.2 Reagentes

Os solventes grau HPLC utilizados foram acetato de etila SDS (Carlo Erba Reactifs, Lote P0D018200E), acetona SDS (Carlo Erba Reactifs, Lote D0A073010B), diclorometano SDS (Carlo Erba Reactifs, Lote P910352291), hexano SDS (Carlo Erba Reactifs, Lote D0B013080C), metanol SDS (Carlo Erba Reactifs, Lote V9M868309M) e n-propanol SDS (Carlo Erba Reactifs).

Os solventes P.A. utilizados foram diclorometano ACS (CAQ – Casa da Química, Lote 06020259) e metanol (CRQ – Cromato Produtos Químicos LTDA, Lote 2229.12/05).

Os demais solventes utilizados foram ácido meta-cloro perbenzóico (Aldrich, Lote S22939-205), cloro-cromato de piridina (Fluka, Lote S3503521607B17), clorofórmio para espectroscopia (MERCK, Lote K36897547 711), clorofórmio deuterado (Merck, Lote S5035220 946), etanol comercial (92,8/NPM, Minasçúcar S/A, Lote 18), etanol (PRS Panreac, Lote 0000065/85),

glicerol (PRS Panreac, Lote 0000240033), n-butanol (Panrec, Lote 161675LR), n-pentanol (Sigma Aldrich, Lote S75353-209) e piridina (Merck, Lote K26046628 904).

Os reagentes utilizados na confecção dos meios de cultura e nas reações de síntese foram ágar (Merck, Lote K40186915 019), ágar batata dextrosado (Biobrás S.A., Lote 1191737<sup>A</sup>), cloreto de potássio P.A. – ACS (Synth, lote 26546), D - glicose anidra P.A. – ACS (Synth, Lote 47038), D-glicose anidra (PSR Panreac, Lote 0000239808), extrato de levedura (Biobrás Diagnósticos, Lote 757/06), extrato de malte (Merck, Lote VM098391 930), fosfato dibásico de potássio (Synth, Lote 512772), fosfato monobásico de potássio (ECIBRA, Lote 15956), fosfato monobásico de potássio (PRS Panreac, Lote 0000098596), nitrato de cobalto II P. A. (VETEC, Lote 961092), peptona bacteriológica (biobrás Diagnósticos, Lote 757/06), peptona (Merck, Lote V770516 615), sulfato de magnésio hepta-hidratado (Vetec, Lote 951240), sulfato de magnésio hepta-hidratado (PSR Panreac, Lote 110148JR), sulfato de cobre – ACS (Synth, Lote 50367), sulfato ferroso – ACS (Synth, Lote 28136), sulfato de zinco – ACS (Synth, Lote 28316), tetracianoetileno (Fluka, Lote 381000/1 13399) e óxido de cariofileno (Sigma-Aldrich, Lote S44467-169).

## 2.3 Coleta, isolamento e cultivo de fungos da própolis

### 2.3.1 Coleta e isolamento

A coleta foi feita em uma colméia em atividade, com o uso de roupas especiais, luvas e máscara, para evitar o contato com as abelhas. Inicialmente, uma amostra de própolis foi coletada e depositada na superfície de placas previamente esterilizadas contendo ágar malte (45 g/L) ou ágar batata (39 g/L) (quatro placas de cada).

Após a coleta, as placas foram deixadas em repouso, no escuro, até que fosse verificado o crescimento das colônias de micro-organismos. A **Figura 28** (pág. 32) exemplifica o aspecto inicial de algumas das colônias de fungos obtidas.



**Figura 28** – Placa utilizada no cultivo de fungos coletados da própolis exemplificando o aspecto inicial das colônias obtidas.

Após o crescimento das colônias, os fungos foram sucessivamente transferidos para outras placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura em que cresceram originalmente, até o isolamento de um tipo de micro-organismo em cada placa.

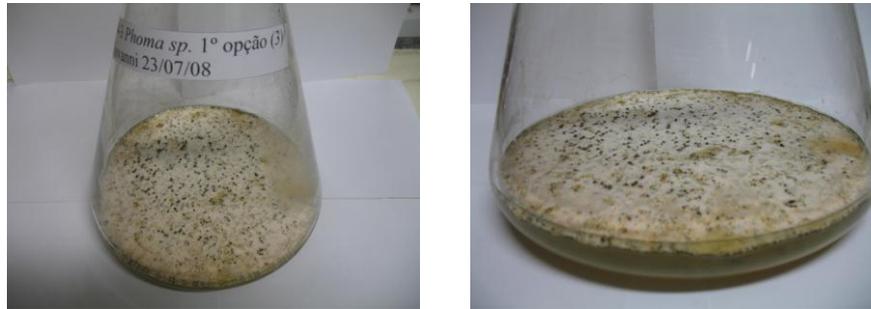
A transferência dos fungos para essas placas foi feita dentro de uma capela de fluxo laminar, previamente esterilizada com uma solução etanol/água 70% v/v. Para o manuseio dos fungos foi utilizada uma alça de platina também esterilizada na solução anterior. A partir dessas placas, os fungos foram transferidos para tubos com ágar inclinado.

### 2.3.2 Cultivo dos fungos em meio líquido

A partir dos tubos de ensaio, utilizados para armazenagem dos micro-organismos em geladeira, foram feitos cultivos em meio líquido de cada um dos fungos obtidos, sendo utilizado o seguinte meio de cultura: glicose (10 g/L), peptona (2,5 g/L), NaCl (2,5 g/L),  $K_2HPO_4$  (0,5 g/L) e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,25 g/L).

O procedimento para a inoculação dos meios de cultura líquidos obedeceu às mesmas condições de esterilidade citada nos procedimentos anteriores. Uma pequena alíquota de células fúngicas existentes em cada tubo foi transferida para um erlenmeyer contendo o meio líquido, de forma que em cada frasco existisse apenas um tipo de micro-organismo. Os fungos foram cultivados por 21 dias em repouso e à temperatura ambiente. A **Figura 29**

ilustra os resultados obtidos após esse crescimento para um dos micro-organismos.



**Figura 29** – Aspecto do cultivo em meio líquido de um dos fungos isolados da própolis.

### 2.3.3 Extrações

Passado o prazo de cultivo no meio líquido, foram feitas extrações do material obtido nos erlenmeyers. Todo o conteúdo de cada frasco foi filtrado e transferido para um funil de separação de 6 L, sendo adicionada, em seguida, uma alíquota de 300 mL de acetato de etila. Após agitação vigorosa, a fase orgânica foi separada da fase aquosa por diferença de densidade. Esta primeira fase, menos densa, foi transferida do funil de separação para um balão de fundo redondo de 500 mL. Esse procedimento foi repetido por três vezes para cada fungo, sendo que, na terceira extração, foram utilizados 200 mL de solvente. A fase orgânica obtida foi concentrada a 40 °C em um evaporador rotatório e transferida para um frasco de penicilina, tarado para as amostras para cada fungo.

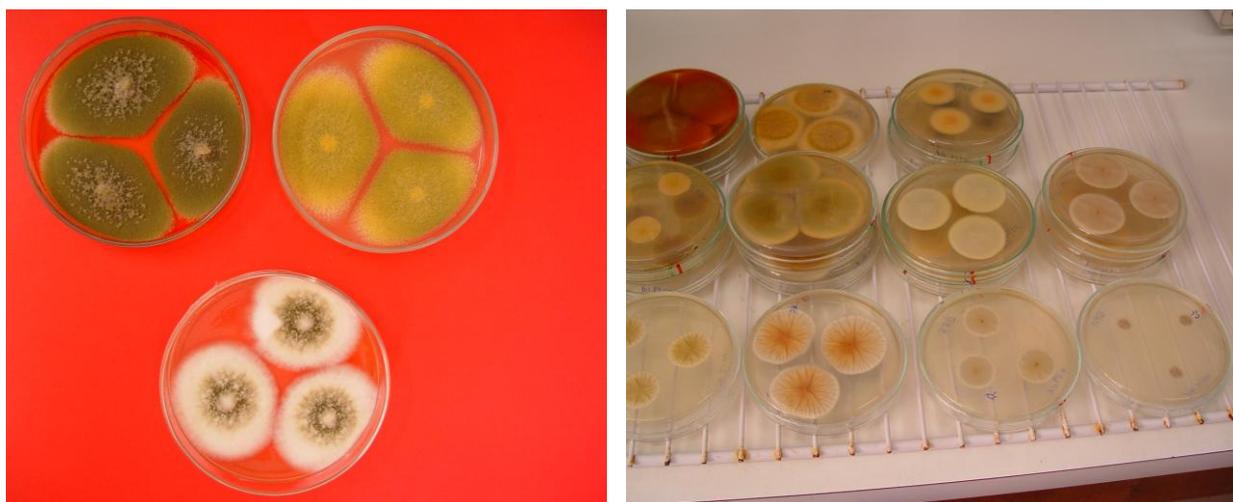
## 2.4 Identificação dos fungos

Os fungos isolados da própolis passaram por uma identificação inicial, determinando-se o número de espécies diferentes existentes, definindo-se essas espécies em alguns casos. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos da Universidade Federal de Lavras, sob a orientação do professor Ludwig H. Pfenning.

No processo de identificação, os fungos foram cultivados em meios de cultura padrão, em placas de Petri, sob as mesmas condições utilizadas

anteriormente (item 2.3.1), para avaliação das características morfológicas e de crescimento dos fungos, como o diâmetro das colônias, a cor do micélio, a coloração do fundo das placas, o aspecto macroscópico da colônia e também a presença de exsudação e de pigmentos solúveis no meio de cultura. Esse procedimento foi feito com o auxílio de protocolos pré-estabelecidos na literatura.<sup>87-89</sup>

Os fungos do gênero *Penicillium* foram cultivados por sete dias no escuro, a 25 °C, nos meios de cultura CYA, MEA e G25N, e também a 37 °C, no meio CYA. Os fungos do gênero *Aspergillus* foram cultivados seguindo o mesmo procedimento, substituindo-se, porém, o meio G25N por CY20S. As demais espécies foram cultivadas nos meios de cultura OA e MA. Os fungos foram inoculados nas placas em três pontos diferentes, como ilustrado na **Figura 30**.



**Figura 30** – Placas contendo fungos isolados da própolis, exemplificando a forma de inoculação usada na identificação dos mesmos.

A seguir, apresenta-se a composição dos meios de cultura citados anteriormente, utilizados no processo de identificação dos micro-organismos:

CY20S (Agar extrato de levedura Czapek com 20% de sacarose):  
 $K_2HPO_4$  (0,5 g/L), concentrado Czapek (10 mL/L), extrato de levedura em pó (5 g/L), sacarose (200 mg/L) e ágar (15 g/L).

CYA (Ágar extrato de levedura Czapek):  $K_2HPO_4$  (10 g/L), concentrado Czapek (10 mL/L), extrato de levedura em pó (5 g/L), sacarose (30 mg/L) e ágar (15 g/L).

G25N (Ágar glicerol nitrato 25 %):  $K_2HPO_4$  (0,75 g/L), concentrado Czapek (7,5 mL/L), extrato de levedura em pó (3,7 g/L), glicerol grau analítico (250 g/L) e ágar (12 g/L).

MEA (Agar malte): extrato de levedura em pó (20 g/L), peptona (1 g/L), glicose (20 g/L) e ágar (20 g/L).

Concentrado Czapek:  $NaNO_3$  (300 g/L), KCl (50 g/L),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (50 g/L),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (1 g/L),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (1 g/L) e  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0,5 g/L).

#### 2.4.1 Análise morfológica dos fungos

Após o crescimento das colônias, foram analisadas as características morfológicas e de crescimento das mesmas. Foi medido o diâmetro das colônias nas placas (média das três colônias, medidas no verso de cada placa), verificada a cor do micélio e a coloração de fundo das placas. Observou-se também o tipo de crescimento da colônia (velutinoso, cotonoso, sulcado, etc) e a presença de exsudação e de pigmento solúveis nos meios de cultura.

As características morfológicas dos micro-organismos foram avaliadas com auxílio de um microscópio. Utilizou-se o corante azul de metileno para a confecção das lâminas dos fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*.<sup>90</sup> Para as lâminas feitas com as demais espécies utilizou-se uma mistura água/glicerina 1:1.

#### 2.5 Determinação do perfil em CCD dos extratos dos fungos isolados da própolis

Após o cultivo dos fungos em meio líquido e extração do material resultante com acetato de etila, o perfil dos extratos foi determinado por cromatografia em camada delgada. Para tanto, foram feitas duas placas com cada extrato: uma com mistura de hexano/acetato de etila (80:20) como eluente e outra com acetato de etila. As placas foram reveladas com solução ácida de vanilina.

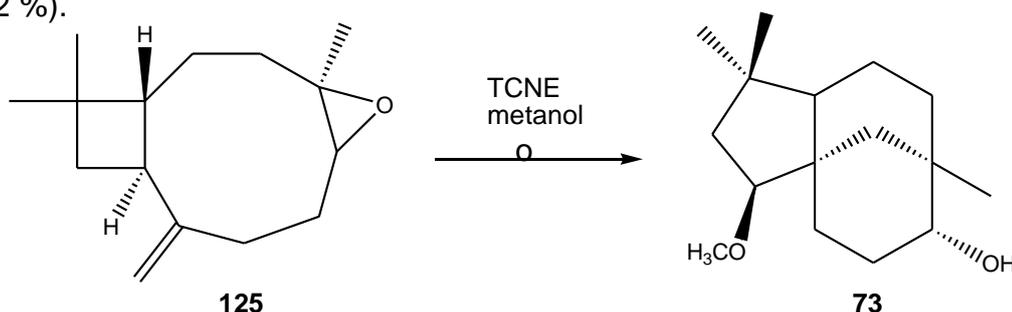
O intuito desse procedimento foi avaliar qualitativamente o perfil metabólico dos fungos ao serem cultivados em meio líquido, pois, para a realização de reações de biotransformação, a presença de muitos metabólitos dificulta o isolamento de produtos de biotransformação.

## 2.6 Síntese de sesquiterpenos clovânicos a partir do óxido de cariofileno (**125**)

O  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**) foi sintetizado de acordo com procedimento existente na literatura, o qual foi adaptado para a síntese do  $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**126**),  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**127**),  $2\beta$ -butoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**128**) e  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**).<sup>91</sup>

### 2.6.1 Síntese do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**)

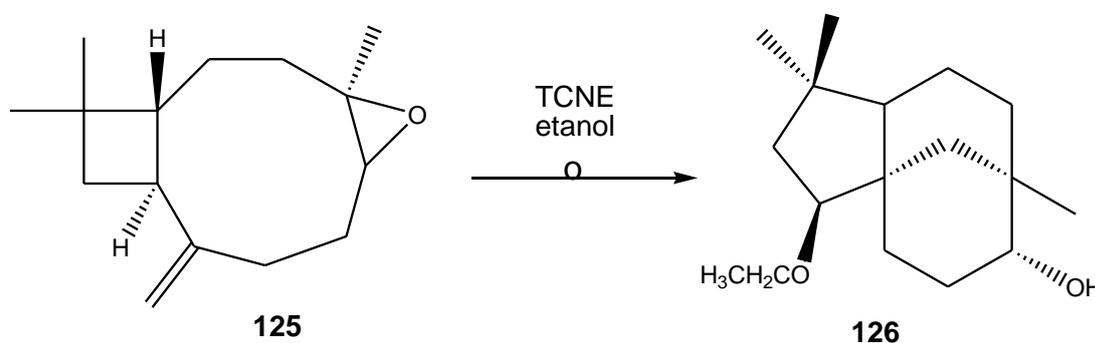
Nessa reação, 2,03 g (9,20 mmol) de óxido de cariofileno (**125**) e 0,13 g (0,98 mmol) de tetracianoetileno (TCNE) foram dissolvidos em 39,2 mL de metanol em um balão de fundo redondo, que foi tampado posteriormente e mantidos sob agitação por 12 h a 25 °C (**Figura 31**).<sup>91</sup> A reação foi monitorada por CCD. Após a verificação do término da mesma, o solvente foi retirado utilizando evaporador rotatório e o material resultante foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se, como eluente, um gradiente de hexano/acetato de etila. Uma mistura contendo majoritariamente o  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**) (935,9 mg) foi obtida (hexano/acetato de etila 85:15). A purificação final de **73** foi feita em CLAE, utilizando-se coluna semipreparativa (LiChroCart® 250-10 e LiChrospher® Si 60 (10 $\mu$ m), fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup> e fase móvel composta por hexano/acetato de etila 70:30 (eluição isocrática). Foram obtidos 511,4 mg (2,03 mmol, 22 %) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**), com tempo de retenção de 15,04 min. Foram recuperados 648 mg de **125** (32 %).



**Figura 31** – Esquema da síntese do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**) a partir do óxido de cariofileno (**125**).

### 2.6.2 Síntese do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (126)

Obteve-se o 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (126) a partir de 1,02 g (4,39 mmol) de óxido de cariofileno (125) e 0,06 g (0,48 mmol) de TCNE, dissolvidos em 19,6 mL de etanol (Figura 32) e mantidos em agitação em um balão de fundo redondo tampado por 36 h a 25 °C.<sup>91</sup> A reação foi acompanhada por CCD e, ao final, o material resultante foi concentrado em evaporador rotatório e cromatografado em coluna de sílica gel, utilizando-se gradiente de hexano/acetato de etila. A eluição com hexano/acetato de etila 90:10 forneceu o produto, 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (126) (346,9 mg), ainda impuro, sendo posteriormente purificado por CLAE, utilizando-se coluna semipreparativa e fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup>. Como eluentes, utilizaram-se sucessivamente, em três eluições isocráticas, misturas de hexano/acetato de etila nas proporções 73:27, 68:32 e, posteriormente, 85:15, concluindo-se assim a purificação do mesmo. Obtiveram-se 166,8 mg (0,63 mmol, 14 %) do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (126) (tempo de retenção 21,35 min), sendo recuperados 543,1 mg (53 %) de 125.

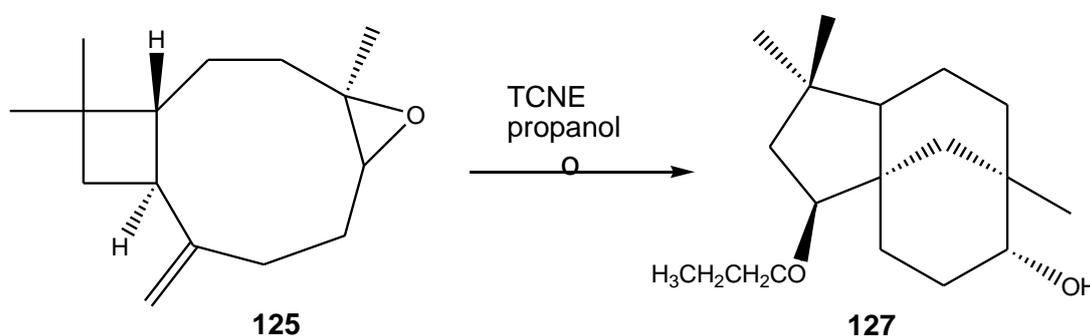


**Figura 32** – Esquema da síntese do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (126) a partir do óxido de cariofileno (125).

### 2.6.3 Síntese do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (127)

Nessa reação (Figura 33, pág. 38), 1,01 g (4,37 mmol) de óxido de cariofileno (125) e 0,06 g (0,45 mmol) de TCNE foram dissolvidos em 19,6 mL de propanol, mantidos em agitação por 18 h a 25 °C em um balão de fundo redondo tampado.<sup>91</sup> A reação foi monitorada por CCD e o solvente foi retirado em evaporador rotatório, sendo o material resultante cromatografado em

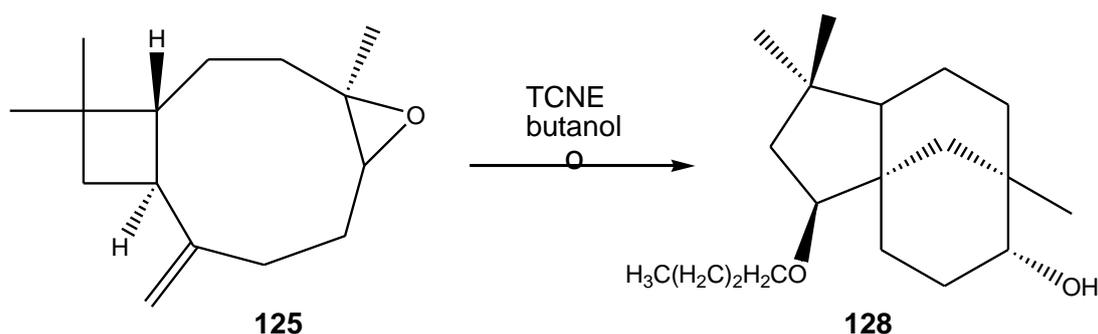
coluna de sílica gel, utilizando-se gradiente de hexano e acetato de etila. O 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) (529,6 mg) foi obtido impuro (hexano e acetato de etila 95:5 e 90:10) sendo purificado por CLAE (3 eluições), usando-se coluna semipreparativa, fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup> e, como fase móvel, inicialmente hexano/acetato de etila 75:25. Estando ainda impuro o produto, utilizou-se também como eluente hexano/acetato de etila 90:10 e, posteriormente, 85:15, com o qual obteve-se o 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) com tempo de retenção de 13,69 min (301,2 mg, 1,07 mmol, 25 %). Foram recuperados 285,6 mg (28 %) de **125**.



**Figura 33** – Esquema da síntese do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) a partir do óxido de cariofileno (**125**).

#### 2.6.4 Síntese do 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**)

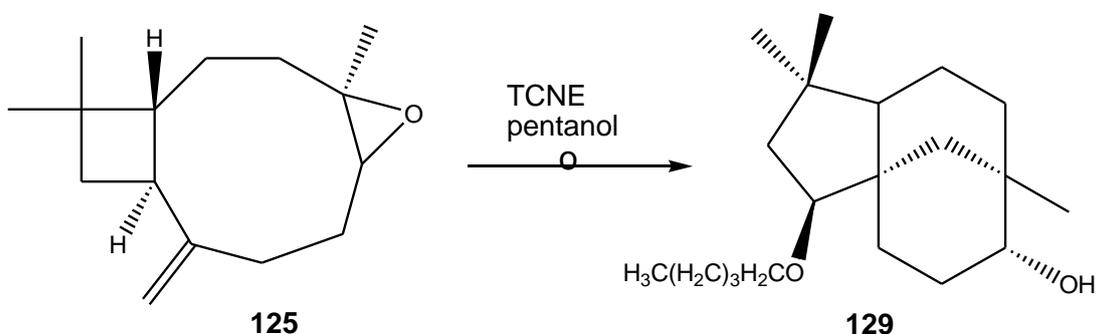
Para o preparo dessa substância foram utilizados 1,01 g (4,37 mmol) de óxido de cariofileno (**125**) e 0,06 g (0,47 mmol) de TCNE, dissolvidos em 19,6 mL de butanol (**Figura 34**, pág. 39), tendo sido a mistura reacional mantida sob agitação por 36 h a 40 °C em um balão de fundo redondo tampado.<sup>91</sup> O monitoramento da reação foi feito por CCD e, após seu término, o solvente foi retirado em evaporador rotatório e o material resultante foi cromatografado em coluna de sílica gel. O material eluído com hexano/acetato de etila 92:8 e 90:10 (383,5 mg) continha o 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**) ainda impuro. Prosseguiu-se a purificação por CLAE, utilizando-se coluna semipreparativa, com fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup> e fase móvel composta por hexano/acetato de etila 80:20. Foram obtidos 139,0 mg (0,47 mmol, 11 %) do produto, 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**), com tempo de retenção de 9,70 min. Nesse processo foram recuperados 223,4 mg (22%) de óxido de cariofileno (**125**).



**Figura 34** – Esquema da síntese do 2β-butoxiclovan-9α-ol (**128**) a partir do óxido de cariofileno (**125**).

### 2.6.5 Síntese do 2β-pentoxiclovan-9α-ol (**129**)

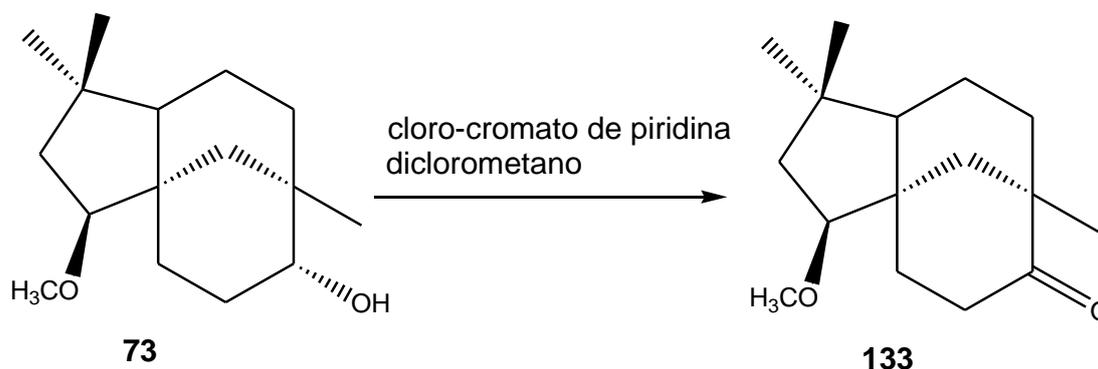
Para a obtenção do 2β-pentoxiclovan-9α-ol (**129**), foram diluídos, em 16 mL de pentanol, 1,00 g (4,33 mmol) de óxido de cariofileno (**125**) (**Figura 35**) e 0,06 g (0,48 mmol) de TCNE.<sup>91</sup> A mistura foi mantida em agitação por 18 h a 25 °C em balão de fundo redondo tampado, sendo a reação monitorada por CCD. Ao final do processo, o solvente foi evaporado e o material resultante foi cromatografado em coluna de sílica gel (hexano e acetato de etila). Da eluição com hexano/acetato de etila 92:8 foi obtida uma mistura contendo o produto, 2β-pentoxiclovan-9α-ol (**129**) (692,6 mg), que foi posteriormente purificado por CLAE, utilizando-se coluna semipreparativa com fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup> e eluente composto por hexano/acetato de etila 85:15. Obtiveram-se 283,8 mg (0,92 mmol, 21 %) de 2β-pentoxiclovan-9α-ol (**129**), com tempo de retenção de 11,60 min. Foram recuperados 216,1 mg (22 %) de **125**.



**Figura 35** – Esquema da síntese do 2β-pentoxiclovan-9α-ol (**129**) a partir do óxido de cariofileno (**125**).

### 2.6.6 Síntese da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**)

A preparação da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**) (**Figura 36**) foi realizada dissolvendo-se 385,2 mg (1,53 mmol) de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) em 40 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A esta mistura, mantida em agitação em um balão de fundo redondo tampado, foram adicionados 434,0 mg (1,97 mmol, 98% de pureza) de cloro-cromato de piridina (PCC).<sup>36</sup> A reação foi feita à temperatura ambiente e foi monitorada por CCD. Após 25 h, o solvente foi retirado em evaporador rotatório e o material resultante foi dissolvido em Et<sub>2</sub>O. Esta solução foi lavada com uma solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> e também com uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi posteriormente secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e o solvente retirado em evaporador rotatório. O material resultante foi submetido a uma coluna de sílica gel com gradiente de hexano/acetato de etila. Foram obtidos 327,5 mg (1,31 mmol, 86%) da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**7**) com o eluente hexano/acetato de etila 95:5.



**Figura 36** – Esquema da síntese da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**) a partir do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**).

### 2.6.7 Síntese da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovan-9-lactona (**134**) a partir da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**)

Para a síntese da lactona **134** (**Figura 37**, pág. 41), 327,5 mg (1,31 mmol) de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**) foram dissolvidos em 40 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> em um balão de fundo redondo tampado. O material foi mantido sob agitação e

resfriamento em banho de gelo. Foram adicionados à solução 2,65 mg (11,80 mmol) de ácido *meta*-cloro perbenzóico (AMCPB).<sup>92</sup> A reação foi acompanhada por CCD e o término da reação ocorreu após 25 h. O material foi lavado com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 vezes) em um funil de decantação. A fase orgânica resultante foi secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, sendo o solvente posteriormente retirado em um evaporador rotatório. O material resultante foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, sendo eluído com hexano/acetato de etila 90:10, obtendo-se 305,38 mg de material onde predominava o produto esperado. Esse material foi submetido a CLAE, utilizando-se coluna semipreparativa, fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup> e hexano/acetato de etila 80:20 como eluente. Foram obtidos 233,2 mg (0,88 mmol, 67%) da lactona **134**, com tempo de retenção de 33,50 min.

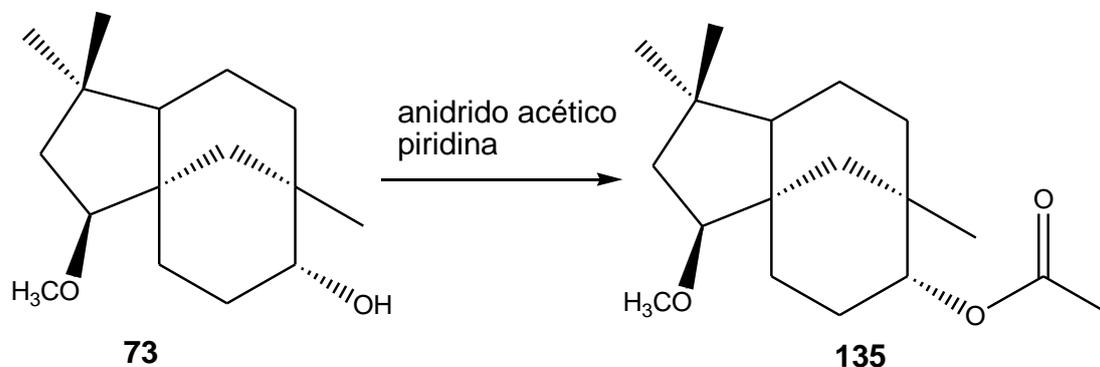


**Figura 37** – Esquema da síntese da (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovan-9-lactona (**134**) a partir do 2β-metoxiclovan-9-ona (**133**).

### 2.6.8 Síntese do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol (**135**)

Nessa reação (**Figura 38**, pág. 42), foram utilizados 104,2 mg (0,41 mmol) de 2β-metoxiclovan-9α-ol (**73**), dissolvidos em algumas gotas de piridina. A essa solução foi adicionado 0,30 mL de anidrido acético.<sup>93</sup> A reação foi mantida em agitação por 24 h à temperatura ambiente em um balão de fundo redondo tampado, sendo acompanhada por CCD. Ao final da reação, o material foi concentrado em evaporador rotatório e cromatografado em coluna de sílica gel. Nesse processo foi utilizado um gradiente de hexano/acetato de etila, sendo que, em frações coletadas com hexano/acetato de etila 95:5, foram

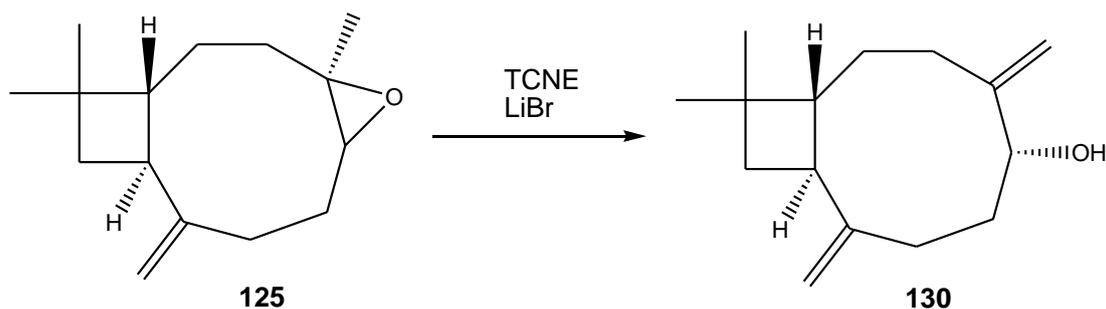
obtidos 128,7 mg de material contendo o produto pretendido. Esse material foi purificado por CLAE, utilizando-se coluna semipreparativa com fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup>, utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila 95:5. Foram obtidos 112,7 mg (0,38 mmol, 93%) de acetato de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**135**).



**Figura 38** – Esquema de síntese do acetato de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**).

### 2.6.9 Síntese do 5 $\alpha$ -hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (**130**)

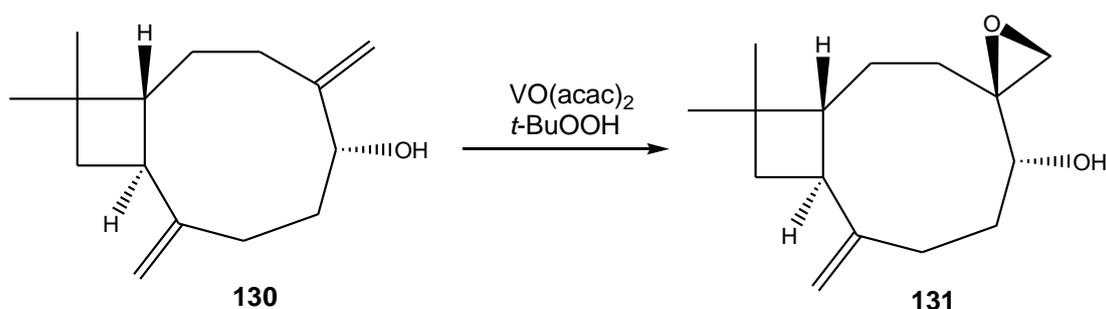
Para a síntese do 5 $\alpha$ -hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (**130**) (**Figura 39**, pág. 43), 2,51 g (11,38 mmol) de óxido de cariofileno (**125**) foram dissolvidos em 59,5 mL de acetona em um balão de fundo redondo, sendo adicionados 0,30 g (2,26 mmol) de TCNE e 4,94 g (56,93 mmol) de LiBr.<sup>91</sup> O balão foi tampado e a solução mantida sob agitação por 12 h à temperatura ambiente, sendo o processo acompanhado por CCD. Ao final da reação, o material foi concentrado em evaporador rotatório e cromatografado em coluna de sílica gel com gradiente de hexano/acetato de etila. Da combinação de frações obtidas com os eluentes hexano/acetato de etila 95:5 e 90:10, foram obtidos 954,0 mg de uma mistura contendo o produto impuro. Esse material foi novamente submetido à cromatografia em coluna com sílica gel, sendo obtidos 891,56 mg do produto pela combinação de frações obtidas com eluente hexano/acetato de etila 90:10, estando esse material com uma pequena quantidade de impureza. Foram recuperados 424,9 mg (17 %) de **125**.



**Figura 39** – Esquema da síntese do 5 $\alpha$ -hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (**130**) a partir do óxido de cariofileno (**125**).

### 2.6.10 Síntese do (4*S*,5*R*)-5-hidroxicariofila-8(13)-eno (**131**)

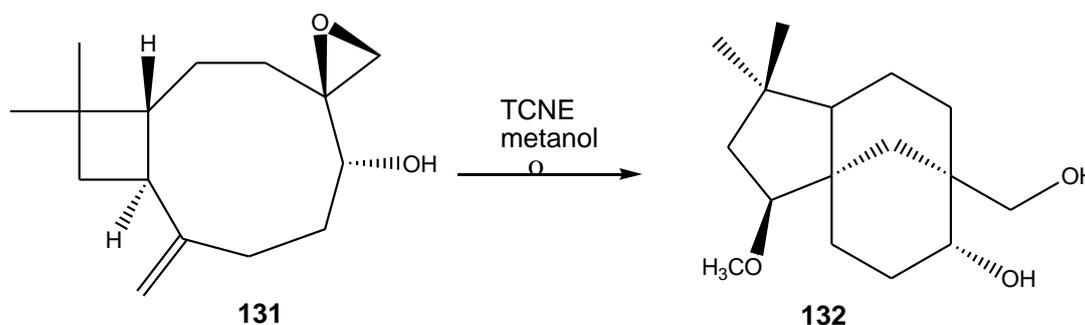
Nessa reação, apresentada na **Figura 40**, 891,56 mg de 5 $\alpha$ -hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (**130**) foram diluídos em 43,28 mL de benzeno, juntamente com 113,04 mg (0,41 mmol) de acetilacetato de vanadila, sendo esta solução colocada sob refluxo. Em seguida, foram adicionados 468  $\mu$ L (3,74 mmol) de uma solução de hidroperóxido de *tert*-butila.<sup>94</sup> A reação foi monitorada por CCD, sendo mantido o refluxo por 1 h. Após esse período e o posterior resfriamento da solução até a temperatura ambiente, a mesma foi lavada com solução saturada de NaCl em funil de separação e secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. O material resultante foi concentrado em evaporador rotatório e submetido a cromatografia em coluna de sílica gel com gradiente de hexano/acetato de etila. Pela combinação de frações obtidas com o eluente hexano/acetato de etila 90:10 obtiveram-se 343,0 mg (com uma pequena quantidade de impureza) de (4*S*,5*R*)-5-hidroxicariofila-8(13)-eno (**131**). Foram recuperados 393,4 mg (44 %) de **130**.



**Figura 40** – Esquema da síntese do (4*S*,5*R*)-5-hidroxicariofila-8(13)-eno (**131**) a partir do 5 $\alpha$ -hidroxicariofila-4(12),8(13)-dieno (**130**).

### 2.6.11 Síntese do (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol

Para a obtenção do (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol (**132**) (**Figura 41**), 343,0 mg de (4*S*,5*R*)-5-hidroxicariofil-8(13)-eno (**131**) foram dissolvidos em 70,0 mL de metanol em um balão de fundo redondo. Em seguida foram adicionados 16,40 mg (0,13 mmol) de TCNE a essa solução, sendo o balão posteriormente tampado.<sup>94</sup> O material foi mantido sob agitação por 24 h, sendo, a reação, acompanhada por CCD. Ao final, o solvente foi retirado em evaporador rotatório e o material resultante cromatografado em coluna de sílica gel com gradiente de hexano/acetato de etila. O produto (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol (**132**) (150,6 mg, 0,56 mmol) foi obtido pela combinação de frações eluídas com hexano/acetato de etila 50:50. Nesse processo foram recuperados 79,7 mg (23 %) de **131**.



**Figura 41** – Esquema da síntese do (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol (**132**) a partir do (4*S*,5*R*)-5-hidroxicariofila-8(13)-eno (**131**).

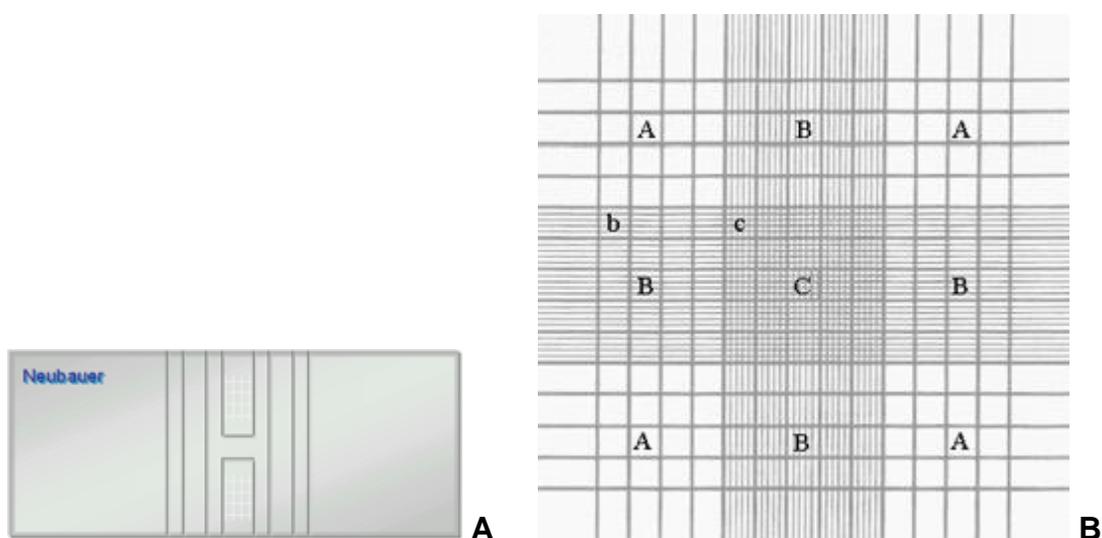
## 2.7 Biotransformação dos clovanos sintetizados

Dois dos fungos isolados das amostras de própolis foram utilizados em reações de biotransformação. Outros dois fungos utilizados nessas reações foram isolados anteriormente de amostras de solo.<sup>68</sup> Os fungos utilizados foram *Pestalotiopsis palustris* e *Penicillium citrinum* (própolis), *Penicillium jackzewskii* e *Penicillium miniolutem* (solo) e os substratos utilizados foram substâncias da classe dos clovanos.

### 2.7.1 Preparo dos inóculos para as reações de biotransformação

Os fungos utilizados nas reações de biotransformação foram inicialmente cultivados em placas de Petri, utilizando-se ágar malte para *P.*

*palustris*, e ágar batata para *P. citrinum*, *P. jackzewskii* e *P. miniolutem*, como descrito no item 2.3.1. Após a verificação do crescimento adequado das colônias, uma solução de glicerol/água 20:80 foi colocada nas placas, sendo as colônias raspadas com uma alça de Drigalski, para a obtenção de uma suspensão contendo os esporos, que foi coletada com micropipeta automática e armazenada em tubos plásticos hermeticamente fechados, a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar, às proximidades da chama do bico de Bunsen. A concentração da suspensão de esporos para cada fungo foi determinada em uma câmara de Neubauer (**Figura 42**).<sup>95</sup>



**Figura 42** - A) Câmara de Neubauer. B) Ampliação de um dos lados da câmara.<sup>95</sup>

A câmara e uma lamínula foram previamente limpas com solução etanol/água 70% v/v. Foi transferida uma alíquota de  $10\text{ }\mu\text{L}$  da suspensão de esporos para cada lado da câmara e colocou-se a lamínula sobre a mesma. Realizou-se a contagem dos esporos com auxílio do microscópio.

Essa contagem foi feita no quadrado grande central identificado como C na **Figura 42**, de ambos os lados da câmara. Após a contagem, limpou-se a lamínula e a câmara com solução etanol/água 70% v/v. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes para se alcançar confiabilidade na contagem para o cálculo do número de esporos. Como são conhecidas as dimensões da câmara, foi calculada a quantidade de esporos por mL de solução.<sup>95</sup>

Essa suspensão padronizada de esporos, denominada inóculo, foi utilizada para as reações de biotransformação.

### 2.7.2 Avaliação da toxicidade do $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**) sobre os fungos

Antes de se iniciarem as reações de biotransformação, fez-se uma avaliação da toxicidade do substrato sobre os micro-organismos.<sup>96</sup> Para tal, 100  $\mu$ L da suspensão de esporos de cada fungo armazenado na solução glicerol/água 80% foram transferidos para uma placa contendo o meio de cultura adequado ao crescimento de cada fungo (item 2.7.1), e espalhados com uma alça de Drigalski. Esse procedimento foi realizado para cada fungo a ser utilizado nas biotransformações.

Após o crescimento do fungo na placa, foram extraídos pequenos discos de meio de cultura, com cerca de 6 mm de diâmetro, contendo o micélio do fungo. Um disco com o mesmo diâmetro foi extraído do centro de uma placa contendo apenas o meio de cultura esterilizado, sem o micro-organismo. Este espaço da placa foi substituído pelo disco contendo o fungo. Esta placa foi utilizada como controle do experimento, para avaliar o crescimento do fungo sem interferência do substrato da biotransformação.<sup>97</sup>

Esse mesmo procedimento foi repetido em outras placas, mas, desta vez, ao meio de cultura foram adicionadas soluções de 100 ppm e 200 ppm do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**). Para tanto, o substrato **73**, dissolvido em etanol, foi adicionado ao meio de cultura ainda líquido, em um erlemeyer. Essa solução foi homogeneizada e vertida sobre as placas de Petri. Após a solidificação do meio de cultura na placa, o procedimento anterior para inoculação do fungo no centro da placa foi repetido, retirando-se um disco central de 6 mm e inserindo-se outro contendo o micélio, com o mesmo diâmetro.

Para que fosse avaliada a interferência do solvente utilizado na dissolução do substrato sobre o crescimento do fungo, preparou-se outro controle, contendo apenas o meio de cultura, o fungo e o solvente, sem o substrato.<sup>97</sup> Para tanto, foi realizado o mesmo procedimento anterior, sendo que, nesse caso, utilizou-se etanol para a inoculação no meio de cultura, sem a

presença do  $2\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**). Todo o procedimento foi realizado em triplicata para cada um dos fungos utilizados nas reações de biotransformação (item 2.7.1), sendo o halo de crescimento do fungo medido a cada 24 horas por sete dias consecutivos.

### 2.7.3 Biotransformações sob agitação

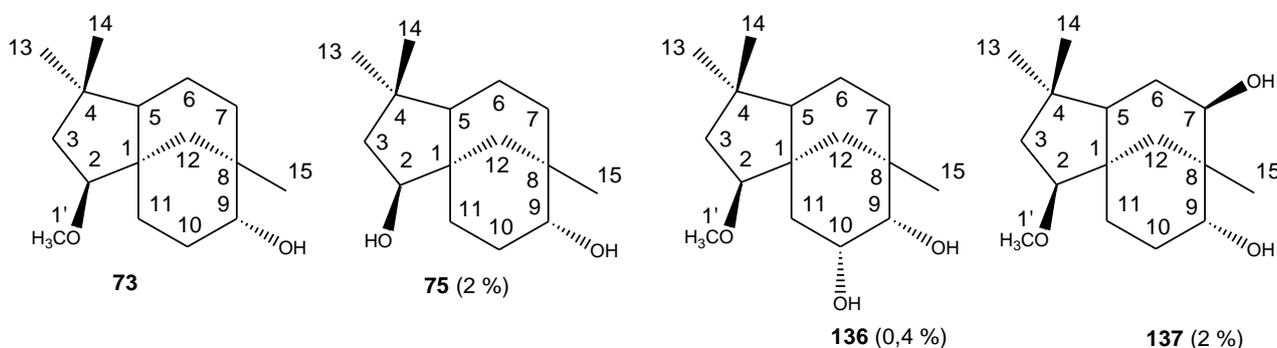
A biotransformação do  $2\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) sob agitação foi realizada, utilizando-se os fungos e meios de cultura seguintes: *P. palustris* (extrato de malte 30 g/L) e *P. janczewskii* [glicose (10 g/L), peptona (2,5 g/L), NaCl (2,5 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g/L), e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,25 g/L)].

Os meios de cultura foram distribuídos em erlenmeyers de 500 mL, sendo 250 mL em cada frasco. Os mesmos foram tampados e esterilizados em autoclave. Foram utilizados dezoito erlenmeyers, dos quais quinze foram inoculados com o micro-organismo e o substrato, um foi utilizado como controle positivo (inoculado apenas com o substrato) e dois foram utilizados como controles negativos (inoculados apenas com o fungo).<sup>98</sup>

A concentração utilizada para a inoculação foi de  $6-7 \times 10^6$  esporos para 200 mL de meio de cultura. Os frascos foram colocados sob agitação orbital (180 rpm), à temperatura de 25 °C, por dois dias, até o início do crescimento dos fungos. Após esse período se procedeu à inoculação do substrato  $2\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) dissolvido em etanol. Cada erlenmeyer foi inoculado com 25 mg de substrato, para se obter uma concentração final de 100 ppm por erlenmeyer.

Para o fungo *P. palustris*, cujo micélio teve um crescimento muito acelerado, as extrações foram feitas com dois dias (sete erlenmeyers e um controle negativo) e quatro dias (oito erlenmeyers, um controle negativo e um controle positivo) de reação. Para o *P. janczewskii*, as extrações foram feitas com quatro dias (sete erlenmeyers e um controle negativo) e sete dias (oito erlenmeyers, um controle negativo e um controle positivo) de reação. Todas as extrações foram realizadas com acetato de etila (item 2.3.3).

Após as extrações, os materiais resultantes foram submetidos à análise por CCD, para se verificar a presença de produtos de biotransformação. Foram visualizados produtos apenas para as biotransformações utilizando o *P. palustris*, cujos extratos foram submetidos à cromatografia por coluna de sílica gel, utilizando-se gradiente de hexano/acetato de etila/metanol. Na biotransformação realizada por dois dias, obteve-se o clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**) (2,7 mg; 2 %) (**Figura 43**), eluído inicialmente com hexano/acetato de etila 60:40. Estando ainda impuro, o mesmo foi purificado por CLAE, em coluna semipreparativa, fluxo de 3,0 mL.min<sup>-1</sup> e eluente hexano/acetato de etila 50:50 (tempo de retenção de 58,83 min). Na biotransformação feita com quatro dias, foram obtidos o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**) (0,8 mg; 0,4 %) e o 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (**137**) (3,4 mg; 2 %), eluídos inicialmente com hexano/acetato de etila 70:30 e 60:40 e, posteriormente, utilizando-se CLAE, com as mesmas condições utilizadas para purificação do produto anterior (**75**). As substâncias puras foram obtidas nas frações em tempos de retenção de 36,20 e 56,23 min, respectivamente. Foram recuperados 77,3 mg (44 %) de **73** da reação feita com 2 dias e 52,6 mg (26 %) da reação feita com 4 dias.



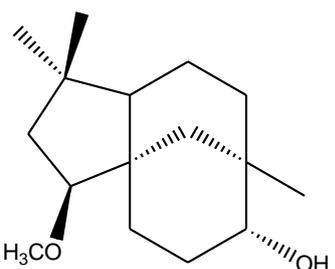
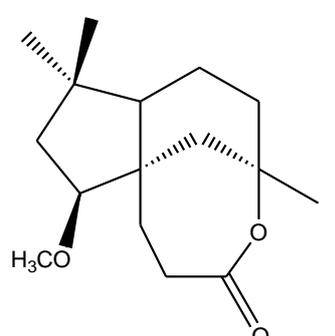
**Figura 43** - Estrutura do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) e dos produtos clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**), 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**) e 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ , 9 $\alpha$ -diol (**137**), obtidos na biotransformação de **73** com o fungo *P. palustris* com dois e quatro dias.

#### 2.7.4 Biotransformações sem agitação

As reações de biotransformação sem agitação foram feitas, utilizando-se garrafas tipo Roux,<sup>99</sup> com os fungos *P. palustris*, *P. citrinum*, *P. jackzewskii* e *P. miniolutem*. O processo de inoculação do fungo, adição do substrato e meios de cultura foram os mesmos descritos no item 2.7.3, com a diferença de que,

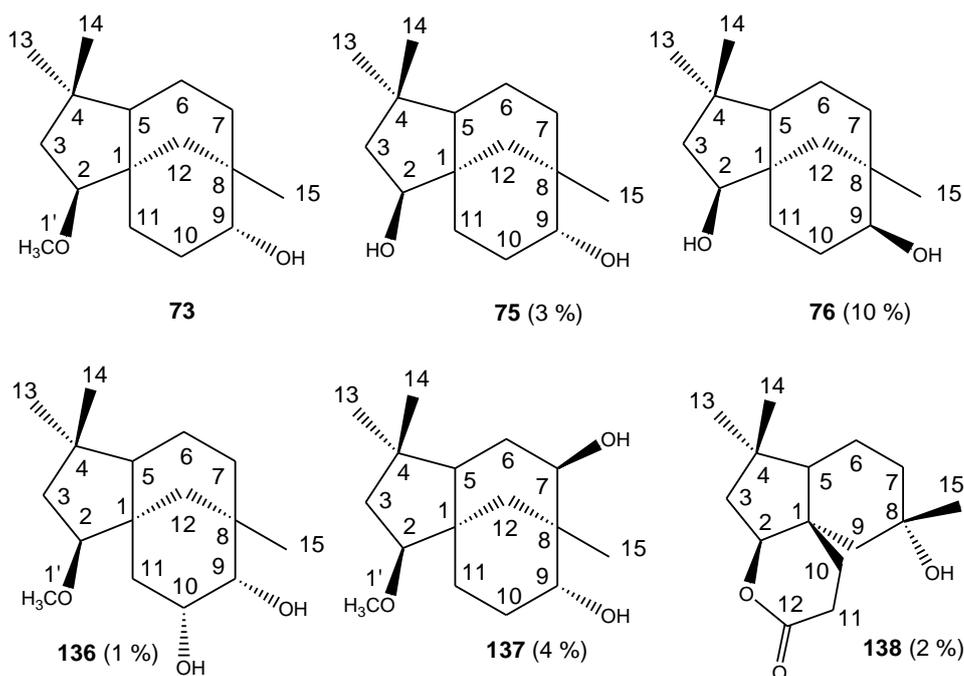
no caso de utilização das garrafas, foram usados 150 mL de meio de cultura para cada frasco. A **Tabela 1** mostra a quantidade de garrafas utilizadas, o número de dias de biotransformação e o substrato utilizado nas biotransformações realizadas sem agitação.

**Tabela 1** – Condições gerais utilizadas nas biotransformações feitas com os fungos *Pestalotiopsis palustris*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium janczewskii* e *Penicillium minioluteum*, sem agitação

Substrato	Fungo	Número de garrafas	Tempo de reação (dias)	Concentração do substrato (ppm)
 <p>(73)</p>	<i>P. palustris</i>	7	5	100
		8	10	
	<i>P. janczewskii</i>	7	5	100
		8	10	
<i>P. citrinum</i>	7	5	200	
	8	10		
<i>P. minioluteum</i>	7	5	200	
	8	10		
 <p>(134)</p>	<i>P. minioluteum</i>	8	10	200

As extrações foram feitas como descrito no item 2.3.3, utilizando-se acetato de etila como solvente. O material obtido após as extrações das biotransformações do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com os fungos *P. palustris*, *P. janczewskii*, *P. citrinum* e *P. minioluteum*, e da lactona **134** com *P. minioluteum*, foram submetidos a cromatografia em coluna de sílica gel com gradientes de hexano, acetato de etila e metanol.

Na reação de *P. palustris* com **73** como substrato, realizada com cinco dias, foram obtidos o clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**) (1,3 mg; 1 %) e o clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol (**76**) (1,0 mg; 1 %), ambos eluídos com hexano/acetato de etila 70:30 e 60:40 (**Figura 44**, pág. 51). Estando ainda impuros, os mesmos foram purificados por CLAE, em coluna semipreparativa, fluxo de 3,0 mL.min<sup>-1</sup> e fase móvel constituída por hexano/acetato de etila 50:50 (tempos de retenção 49,57 min e 36,08 min, respectivamente). Foram recuperados 83,2 mg (79 %) do substrato **73** nessa reação. Na biotransformação de **73** por 10 dias, foram obtidos os produtos **75** (3,4 mg; 3 %), **76** (11,0 mg; 10 %), 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**) (0,8 mg; 1 %), 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (**137**) (4,8 mg; 4 %) e a lactona **138** (2,3 mg; 2 %). Os produtos **75** e **76** foram eluídos com mistura de hexano/acetato de etila 70:30, **137** foi eluído com hexano/aceto de etila 60:40 e, os demais, com hexano/acetato de etila 70:30 e 60:40. A purificação final de **75**, **76** e **136-138** foi feita por CLAE, nas mesmas condições usadas para a purificação dos produtos obtidos com cinco dias de reação [tempos de retenção 44,94 (**75**), 34,99 (**76**), 33,12 (**136**), 48,48 (**137**) e 43,29 min (**138**)]. Na reação feita com 10 dias foram recuperados 52,7 mg (44 %) de **73**.



**Figura 44** - Estrutura do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) e dos produtos clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**), clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol (**76**), 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**), 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ , 9 $\alpha$ -diol (**137**) e do rumfelclovano A (**138**), obtidos na biotransformação de **73** com o fungo *P. palustris* sem agitação, com cinco e dez dias.

No experimento realizado com o fungo *P. citrinum* e o substrato **73**, com 5 dias, não foram obtidos produtos. A reação de *P. citrinum* e **73** com dez dias resultou no isolamento dos produtos **75** e **76**, provenientes da combinação das frações eluídas com hexano/acetato de etila 70:30 e 65:35, respectivamente. Como ambos estavam ainda impuros, esses foram purificados por CLAE com coluna semipreparativa, fluxo de 3,0 mL.min<sup>-1</sup>, e eluente hexano/acetato de etila 55:45, sendo obtidos os produtos puros nas frações coletadas em tempo de retenção de 52,34 (**75**) (2,9 mg; 1 %) e 38,43 min (**76**) (4,9 mg; 2 %). Foram recuperados 186,3 mg (89 %) de **73** nessa reação.

O material resultante da extração da biotransformação de **73** com *P. minioluteum* com cinco dias não foi submetido a cromatografia em coluna, mas teve o seu perfil determinado por CG-EM, sendo observada a presença dos produtos **75** e **76**, por comparação ao perfil em CG-EM obtido para esses produtos. Na biotransformação de **73** com *P. minioluteum* com 10 dias, foram obtidos, após cromatografia em coluna, os produtos **75** (72,5 mg; 32 %), eluído

com hexano/acetato de etila 60:40 e **76** (39,1 mg; 16 %), eluído com hexano/acetato de etila 70:30. Uma parte desse material foi purificado por CLAE com coluna semipreparativa, fluxo de 3,0 mL.min<sup>-1</sup>, e eluente hexano/acetato de etila 55:45. Nessa reação, foram recuperados 44 mg (18 %) de **73**.

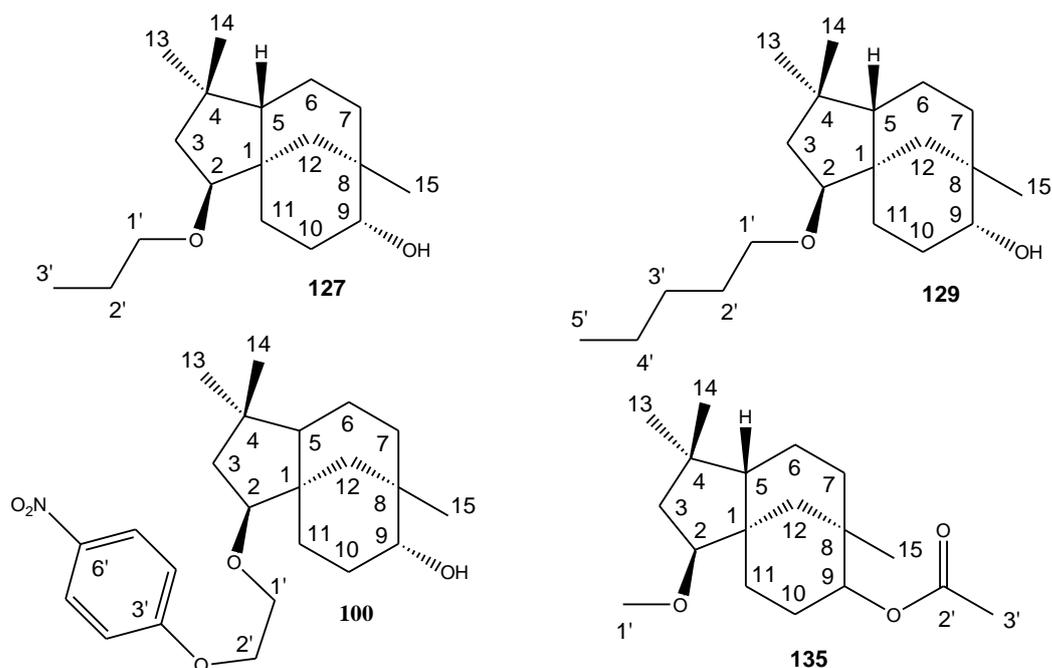
Na reação de biotransformação da lactona **134** com *P. minioluteum* foi obtido o produto **138** (35,3 mg; 16 %), o qual foi obtido por cromatografia em coluna com emprego dos eluentes hexano/acetato de etila 75:25, 70:30 e 60:40. A purificação final foi feita por CLAE com coluna semipreparativa e fase móvel de hexano/acetato de etila 45:55 e fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup>. Foram recuperados 10,2 mg (8 %) de **134**.

Não foram obtidos produtos de biotransformação nas reações utilizando-se o fungo *Penicillium janczewskii*.

#### 2.7.4.1 Avaliação da influência de modificações das posições 2 $\beta$ e 9 $\alpha$ do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) em reações de biotransformação com *P. minioluteum*

Nas biotransformações anteriores feitas nesse trabalho com o fungo *P. minioluteum* usando o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) como substrato (item 3.7.4), observou-se que este micro-organismo pode quebrar a ligação do grupo éter presente na posição 2 $\beta$  dessa molécula, bem com epimerizar a hidroxila presente na posição 9 $\alpha$ . Com o objetivo de avaliar a influência do tamanho da cadeia lateral ligada à posição 2 $\beta$  dessa molécula, bem como a influência da presença de um substituinte mais volumoso na posição 9 $\alpha$ , realizaram-se biotransformações dos substratos **127**, **129**, **135** e **100** (Figura 45, pág. 53) (200 ppm cada) com *P. minioluteum*. Essa última substância foi sintetizada por outro aluno do grupo de pesquisa.

As reações foram feitas sem agitação, em escala analítica (uma garrafa tipo Roux cada) durante cinco e dez dias. A extração seguiu os mesmos princípios descritos no item 2.7.4 para as outras reações sem agitação. O material resultante, em cada caso, foi analisado diretamente por CG-EM.



**Figura 45** – Estruturas do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**), 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**), 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)eto]clove-9 $\alpha$ -ol (**100**) e 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**135**), incubados com *P. minioluteum*.

## 2.8. Bioensaio de inibição de crescimento do fungo *Botrytis cinerea*

As substâncias 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**126**), 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**), 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**) e 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**) foram testadas em relação a sua capacidade de inibição de crescimento do fungo *Botrytis cinerea*, sendo avaliado comparativamente o efeito que o aumento da cadeia lateral teria sobre a atividade biológica desses clovanos.<sup>37</sup> Esse bioensaio foi realizado com a supervisão da professora Dra. Rosa Durán-Patrón, no Departamento de Química da Universidad de Cádiz, na Espanha.

Alíquotas de 100  $\mu$ L de uma suspensão contendo cerca de  $10^7$  esporos de *B. cinerea* foram espalhadas sobre placas de Petri contendo 20 mL de ágar malte previamente esterilizado em autoclave. A preparação seguiu o mesmo procedimento utilizado anteriormente (item 2.3.2). A placa foi incubada à temperatura de 25 °C até se verificar o desenvolvimento de uma camada fina de micélio.

Foram preparadas soluções (0,5 mM) dos produtos **73** e **126-129** em etanol. Em seguida, dentro da capela de fluxo laminar, 40  $\mu$ L dessa solução foram adicionados a 20 mL de ágar malte a temperatura de aproximadamente 50 °C, com uma micropipeta automática. O meio de cultura foi homogeneizado e vertido sobre uma placa de Petri, que foi deixada sobre a superfície da capela para resfriar.

A partir da solução de 0,5 mM anterior foram preparadas outras soluções com as concentrações de 0,25, 0,10, 0,05 e 0,025 mM, sendo repetido todo o processo anterior até o esfriamento das placas. Esse procedimento foi realizado em triplicata, resultando em 75 placas, sendo 15 para cada um dos cinco produtos a serem testados. Dessas 15, cada três possuía uma das cinco concentrações a serem testadas (0,5 até 0,025 mM).

Procedeu-se à inoculação do fungo com o ágar das placas à temperatura ambiente. Para tanto, como descrito no item 2.7.2, um disco de 6,0 mm de diâmetro foi retirado do centro de cada placa, sendo o mesmo substituído por outro contendo o micélio do fungo cultivado por 24 h.

Foram utilizadas três placas (15 cm de diâmetro) como controle. Para o preparo destas placas, 200  $\mu$ L de etanol foram adicionados a 100 mL de ágar malte. A mistura foi homogeneizada, vertida na placa e resfriada. Um disco central foi retirado e substituído por outro contendo o micélio do fungo, como feito anteriormente para as outras placas.

As placas foram incubadas invertidas à temperatura de 25 °C e o halo de crescimento do micélio foi medido a cada 24 h por 6 dias. Todo o procedimento foi realizado três vezes consecutivas.

## 2.9 Bioensaio de inibição de crescimento de sementes de *Lactuca sativa*

Foi avaliada a capacidade das substâncias  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**),  $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**126**),  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**127**),  $2\beta$ -butoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**128**) e  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**) de inibirem o crescimento de sementes de *L. sativa*. Esse bioensaio foi realizado sob a coordenação da professora Dra.

Maria Amélia Diamantino Boaventura, no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

Preparou-se inicialmente uma solução tampão de ácido 2-(morfolino)etanossulfônico, de concentração  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , dissolvendo-se 0,975 g do mesmo em 1 litro de água destilada. O pH foi ajustado para 6-6,5 com solução saturada de NaOH.<sup>100</sup> Preparou-se uma solução ( $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ) de cada produto em um balão volumétrico de 50 mL, utilizando-se, como solvente, a solução tampão anterior. Em cada caso, a massa de produto pesada foi dissolvida com algumas gotas de acetona para se transferir o material para o balão de 50 mL. O frasco foi lavado três vezes com a solução tampão. Antes de se completar o volume do balão, a acetona foi retirada em evaporador rotatório. Tendo sido completados os 50 mL do balão com a solução tampão, foram pipetados 0,5 mL com uma micropipeta automática e transferidos para outro balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado, resultando-se em uma solução de concentração de  $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ . O mesmo procedimento foi feito a partir dessa solução, para gerar uma solução com a concentração de  $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Como branco, foram preparadas três placas de Petri contendo um disco de papel Whatman número 1. A cada placa foram adicionados 10 mL da solução tampão, além de 25 sementes de *L. sativa*, sendo a placa tampada posteriormente.

O mesmo procedimento foi realizado para mais nove placas para cada um dos produtos testados, sendo que a solução tampão utilizada nos controles foi substituída por 10 mL da solução preparada do produto a ser testado. O bioensaio foi realizado em triplicata para cada concentração distinta de substrato ( $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ ).

As placas foram incubadas em câmara de germinação por cinco dias. Após o período de incubação, as placas foram destampadas e as plantas transferidas para um papel seco, onde foram medidos a raiz e o caule. Os dados obtidos com as medidas foram submetidos a tratamento estatístico para avaliar a eficiência de cada produto em relação à inibição do crescimento da planta.

# Resultados e discussão

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Identificação dos fungos isolados da própolis

A própolis é uma resina natural produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*, rica em flavonóides, triterpenos e óleos essenciais, além de outras substâncias,<sup>101-103</sup> que possuem atividades antimicrobiana,<sup>84</sup> anti-inflamatória, espasmolítica e antioxidante, dentre outras.<sup>86</sup> Devido a essas propriedades, é provável que fungos associados a esse material tenham características diferenciadas, já que poucos micro-organismos devem ser adaptados o suficiente para habitarem esse habitat inóspito, podendo ser capazes de realizar reações de biotransformação inusitadas. Fez-se, então, uma triagem de fungos presentes em uma amostra de própolis, sendo obtidas 22 cepas de fungos.

Para a identificação dos fungos, foram avaliadas características morfológicas e de crescimento dos mesmos, usando protocolos pré-estabelecidos na literatura.<sup>87-89</sup> Esse processo iniciou-se pela avaliação do crescimento dos fungos em placas de Petri. Visto que crescem de forma radial nessas placas, foi medido o diâmetro das respectivas colônias formadas, pois o tamanho das mesmas em meios de cultura, luminosidade e temperaturas controladas varia de fungo para fungo. Os valores dos diâmetros medidos foram comparados com aqueles tabelados nos manuais de referência.<sup>87-89</sup>

Outro aspecto macroscópico das colônias que é importante para a determinação estrutural é a coloração do micélio do fungo, que pode ser usada para caracterizar algumas espécies. A coloração deve ser observada tanto na parte superior quanto na parte inferior da placa. Guias para associar a coloração observada também são presentes nos manuais de identificação de fungos para as espécies mais comuns de fungos filamentosos.

O aspecto que as colônias de fungos apresentam após o crescimento (velutinoso, cotonoso, sulcado, etc) também é característico de cada espécie de fungo, e faz parte do processo de diferenciação das mesmas. A presença de exsudação sobre o micélio dos fungos pode auxiliar na identificação pela observação de um material líquido, com coloração característica para cada espécie. Além de exsudação, fungos podem produzir pigmentos solúveis no

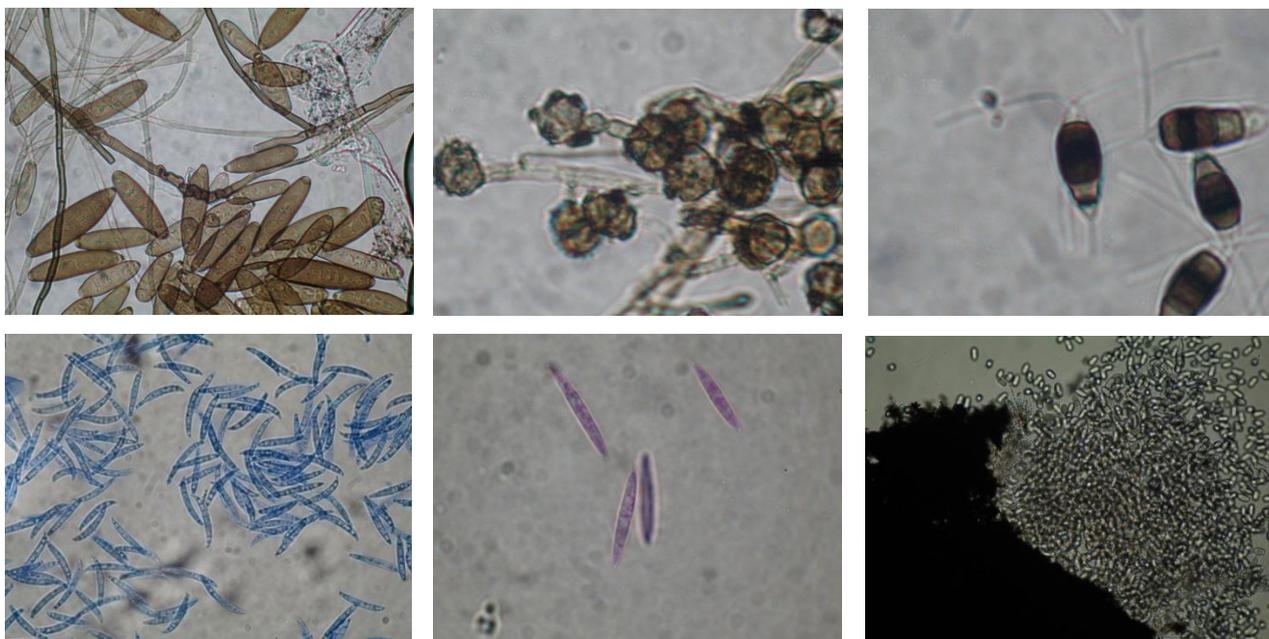
meio de cultura, fazendo com que esse meio adquira uma coloração característica para cada micro-organismo.

Todas estas características foram anotadas durante o crescimento dos fungos durante o processo de identificação. Tendo sido analisado o aspecto macroscópico das colônias de fungos, passou-se à observação das características microscópicas dos mesmos. Para tanto, uma pequena porção de cada um dos micélios dos fungos foi retirada das respectivas placas de Petri e transferida para pequenas lâminas de vidro. A esse material, dependendo de cada tipo de micélio, foram adicionadas gotas de uma solução glicerol:água (20:80) ou uma solução aquosa de azul de metileno. A análise dessas lâminas foi realizada em microscópio, para observar a morfologia dos esporos dos fungos. Cada tipo de fungo possui esporos característicos, como pode ser observado na **Figura 46** (pág. 59), na qual são mostrados alguns exemplos de lâminas preparadas com os fungos desse trabalho. Esses esporos são catalogados para as espécies já conhecidas, para que sejam feitas comparações no momento de identificação de fungos. Após esse procedimento, observou-se que se tratava de dezoito espécies diferentes de micro-organismos, sendo a análise conclusiva para gênero e espécie em doze casos (**Tabela 2**, pág. 60).

O fungo com código GP-4 foi classificado durante a avaliação inicial como sendo tipo *Humicola*, mas, durante o processo de identificação posterior, quando se chegou a conclusões definitivas quanto a gênero e espécie dos micro-organismos, o mesmo não apresentou esporulação, impossibilitando a sua identificação final. O fungo GP-10, identificado inicialmente como tipo *Geotrichum*, foi contaminado durante o processo de identificação final, não sendo possível então a definição exata do seu gênero e espécie. Já para o fungo GP-22, após a análise final das características macroscópicas e microscópicas, verificou-se ser esta idêntica à GP-16. No entanto, não foi possível a identificação da espécie das mesmas.

Alguns gêneros de micro-organismos são muito heterogêneos. Esse fato levou os taxonomistas a agruparem algumas espécies em seções, por apresentarem certa similaridade morfológica, porém não o bastante para serem

considerados da mesma espécie. Por isso, os fungos *Phoma* Seção *plenodomus* e *Penicillium* Seção *fasciculado* foram classificados nesse trabalho em seções, por não se ter conseguido informação suficiente para classificá-los quanto a gênero e espécie, mas somente quanto a gênero e seção, que é uma informação a mais em relação a gênero.



**Figura 46** – Esporos dos fungos *Bipolaris hawaiiensis*, *Tetracoccusporium paxianum* e *Pestalotiopsis palustris* (da esquerda para a direita, na primeira fila, aumento de 1000 vezes), *Fusarium merismoides*, *Fusarium pionoti* e *Lasiodiplodia theobromae* (da esquerda para a direita, na segunda fila, aumento de 400 vezes) vistos ao microscópio a partir de lâminas feitas com os fungos coletados da própolis.

Essas espécies foram cultivadas em meio líquido, e os metabólitos produzidos foram extraídos com acetato de etila após 21 dias de crescimento. O intuito desse procedimento foi avaliar o perfil em CCD dos extratos, pois fungos que produzem muitos metabólitos secundários não são de uso aconselhável para biotransformação, já que esses metabólitos dificultam o isolamento de produtos. Avaliando-se esse perfil e também as massas dos extratos obtidos, foram escolhidos dois desses fungos para serem posteriormente utilizados nas reações de biotransformação feitas nesse trabalho. A **Tabela 2** (pág. 60) apresenta a identificação dos fungos e as massas dos extratos obtidos nos cultivos.

Visto que a própolis é um material coletado pelas abelhas na superfície das flores, este material está na natureza em constante exposição ao sol; fungos ali presentes devem estar adaptados a essa condição, e espera-se que produzam substâncias que absorvam a radiação UV, capazes de auxiliar no processo de proteção dos mesmos. De fato, isso foi observado no perfil por CCD dos extratos desses fungos quando analisados sob a lâmpada de luz UV.

O fungo *Pestalotiopsis palustris* foi escolhido para dar continuidade aos trabalhos por apresentar baixa produção de metabólitos secundários, como foi observado no perfil do extrato obtido para esse fungo em CCD e também pela massa desse extrato (**Tabela 2**, pág. 61). A produção de muitos metabólitos por um fungo pode prejudicar a purificação de possíveis produtos de biotransformação com esse micro-organismo. Já o *Penicillium citrinum* foi escolhido porque, mesmo o extrato obtido no seu cultivo tendo apresentado grande massa, o número de metabólitos produzidos também foi pequeno, como observado por CCD.

Além desses dois fungos, foram escolhidos também o *Penicillium janczewskii* e o *Penicillium minioluteum* para que fossem feitas reações de biotransformação. Esses fungos já pertenciam à coleção de fungos do laboratório, sendo provenientes do cerrado do estado de Minas Gerais. Os mesmos foram escolhidos, bem como os citados anteriormente, também devido ao fato de um número muito pequeno de reações de biotransformação terem sido feitos com os mesmos, como observado na literatura. Esses microrganismos, por serem selvagens e estarem expostos a um ambiente hostil, podem apresentar propriedades diferenciadas em reações de biotransformação, devido ao seu metabolismo adaptado às suas condições de existência.

**Tabela 2** – Gênero e espécie dos fungos isolados de própolis e massas obtidas dos respectivos extratos

Código	Gênero	Espécie	Massa (g)
GP-1	<i>Phoma</i>	Seção <i>plenodomus</i>	0,065
GP-2	<i>Phoma</i>	Seção <i>plenodomus</i>	0,082
GP-3	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>palustris</i>	0,048
GP-4	Tipo <i>Humicula</i>	ni	0,056
GP-5	<i>Penicillium</i>	sp	0,067
GP-6	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	0,369
GP-7	<i>Phoma</i>	Seção <i>plenodomus</i>	0,066
GP-8	<i>Bipolaris</i>	<i>hawaiiensis</i>	0,125
GP-9	<i>Penicillium</i>	<i>purpurogenum</i>	0,107
GP-10	ds	ds	0,122
GP-11	<i>Tetracoccusporium</i>	<i>paxianum</i>	0,079
GP-12	<i>Penicillium</i>	<i>crustosum</i>	0,200
GP-13	<i>Fusarium</i>	<i>pionoti</i>	0,292
GP-14	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	0,237
GP-15	<i>Trichoderma</i>	<i>koningii</i>	0,155
GP-16	<i>Penicillium</i> (=GP-22)	Seção <i>fasciculado</i>	0,353
GP-17	<i>Fusarium</i>	<i>merismoides</i>	0,069
GP-18	<i>Penicillium</i>	<i>janthinellum</i>	0,073
GP-19	<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i>	0,648
GP-20	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>theobromae</i>	0,156
GP-21	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>palustris</i>	0,050
GP-22	<i>Penicillium</i> (=GP-16)	Seção <i>fasciculado</i>	0,330

ni: não identificado; ds: desconhecido (fungo perdido durante o processo).

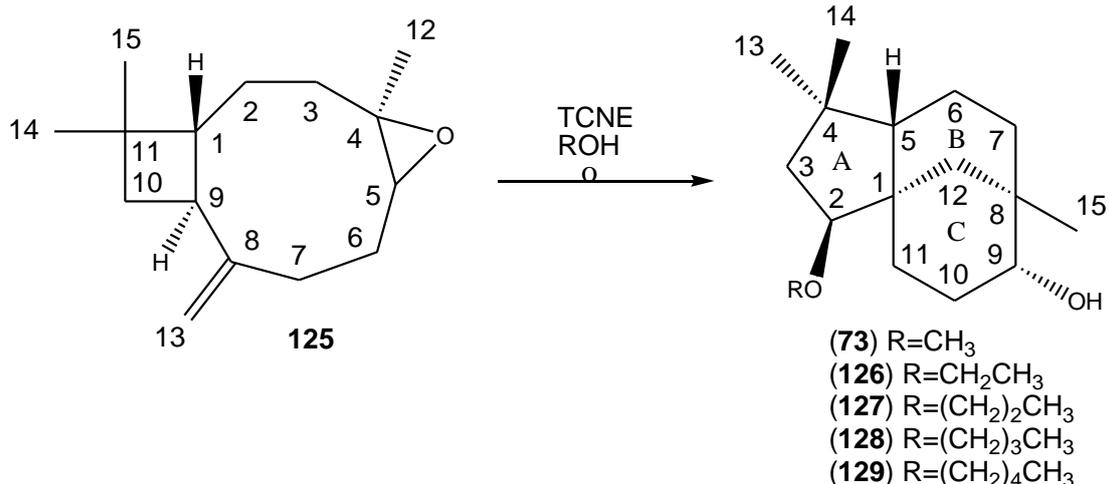
### 3.2 Síntese de clovanos a partir do óxido de cariofileno

O fungo *B. cinerea* é uma espécie que tem sido identificada como patógeno de mais de 235 espécies de plantas, incluindo frutas e verduras.<sup>40</sup> Esse fitopatógeno produz, em suas rotas metabólicas, toxinas da classe dos botrianos,<sup>43</sup> responsáveis pela virulência desse micro-organismo aos diversos cultivos contaminados pelo mesmo.<sup>104,105</sup>

Visto que esse fungo tem adquirido resistência aos fungicidas comerciais, a busca por novas moléculas ativas em relação a esse micro-organismo é de grande importância para um controle mais efetivo do mesmo.<sup>36</sup> O 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) (**Figura 47**, pág. 63) foi descrito anteriormente como tendo atividade fungistática moderada em relação a esse fungo. No entanto, essa atividade diminui com o tempo à medida que o composto é metabolizado pelo fungo.<sup>94</sup>

Nesse trabalho foram sintetizados novos clovanos com similaridade estrutural ao 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), tendo, como material de partida, o óxido de cariofileno (**125**) (**Figura 47**, pág. 63), para a obtenção de moléculas potencialmente ativas na inibição do crescimento do fungo *B. cinerea*. Os produtos 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) e 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**), bem como produtos de oxidação e acetilação de **73**, foram utilizados em reações de biotransformação.

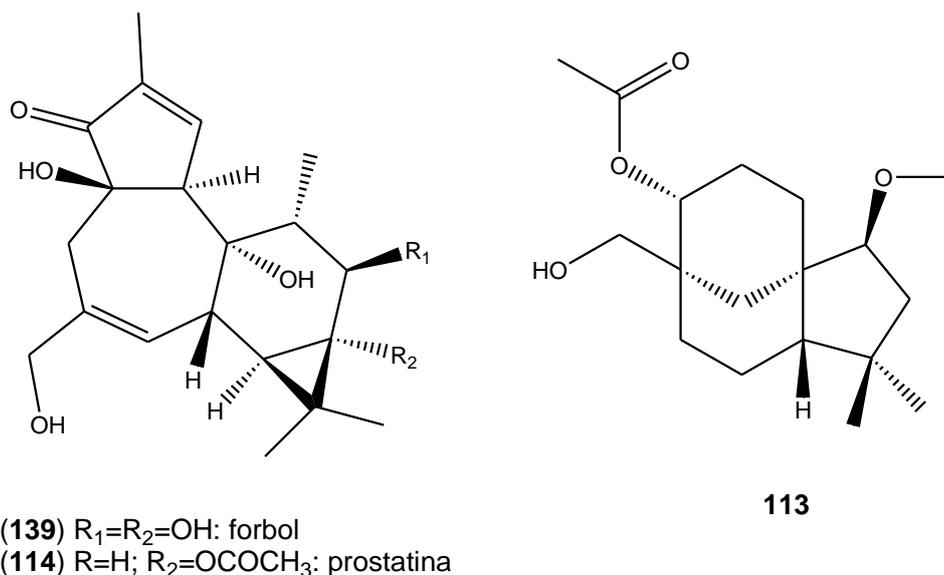
As substâncias obtidas neste trabalho tiveram suas estruturas químicas determinadas, utilizando-se técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais, espectrometria no infravermelho, espectrometria de massas de baixa e de alta resolução. O ponto de fusão e a rotação específica das substâncias também foram determinados quando possível.



**Figura 47** – Reação de ciclização do óxido de cariofileno (**125**) em presença de alcoóis com cadeias carbônicas lineares de C-1 a C-5.

Essas substâncias com esqueleto clovânico foram também avaliadas frente a suas capacidades de ativação de proteínas quinase C (PKC), por apresentarem semelhança estrutural com derivados do forbol (**139**) (**Figura 48**, pág. 64), visto que análogos a **139** têm se mostrado ativadores dessas enzimas.<sup>106,107</sup> Dessa forma, outras substâncias com similaridades estruturais ao mesmo, como distribuição espacial dos átomos, presença de determinadas partes hidrofóbicas e heteroátomos formadores de ligações de hidrogênio são potenciais ativadores de PKC.<sup>59</sup>

Na **Figura 48** (pág. 64) pode-se observar a semelhança estrutural entre substâncias com esqueleto clovânico e derivados do forbol (**139**), como a prostatina (**114**) (molécula com atividade reativadora da latência do vírus HIV)<sup>65,108</sup> e o acetato de (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol (**113**), evidenciando assim o potencial modulador de PKC's por sesquiterpenos clovânicos.



**Figura 48** – Estruturas do forbol (139), da prostatina (114) e do acetato de (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol (113).

Outro ensaio biológico feito com essas substâncias foi o teste alelopático sobre germinação e crescimento de sementes da espécie de alface *Lactuca sativa*. Esse tipo de estudo é de grande importância no desenvolvimento de novos tipos de herbicidas e fungicidas, visto que os atualmente usados têm causado resistência em algumas espécies a serem controladas.<sup>48</sup> Uma característica desejável aos fungicidas, é que não sejam danosos às espécies de plantas em que são usados.

### 3.2.1 Análise estrutural

#### 3.2.1.1 Óxido de cariofileno (125)

O óxido de cariofileno (125) (Figura 47, pág. 63) é uma substância presente nos óleos essenciais de diversos tipos de plantas, como orégano, cravo, canela, goiaba e pimenta preta, e para a qual há relatos de atividade anti-inflamatória, antipirética e antiartrite.<sup>109</sup> O mesmo foi utilizado nesse trabalho para a síntese de derivados clovânicos, sendo obtido comercialmente com alto grau de pureza. Anteriormente à síntese das moléculas nas quais 125 foi usado como material de partida, foram obtidos dados experimentais de RMN de <sup>1</sup>H (Figuras 97 e 98, pág. 170, anexo 2) e de <sup>13</sup>C (Figuras 99 e 100, pág. 171, anexo 2) para o mesmo, os quais foram comparados aos dados existentes na literatura, mostrando-se consistentes, como pode ser visto na Tabela 3.<sup>110</sup>

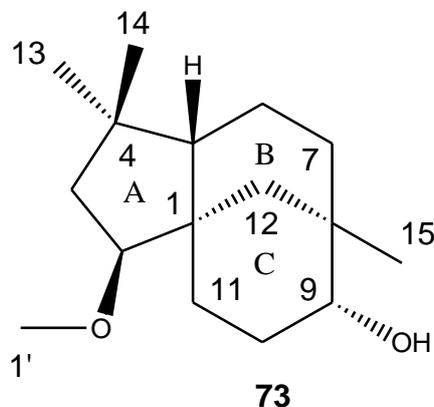
**Tabela 3** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , obtidos e da literatura, para o óxido de cariofileno (**125**) em  $\text{CDCl}_3$ . Os valores de  $J$  são apresentados em Hz

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz) <sup>111</sup>	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz) <sup>111</sup>
1 $\beta$	1,76 (t, $J=10,0$ )	1,76 (t, $J=10,0$ )	50,7	50,8
2	1,39-1,47 (m)	1,43 (tdd, $J=4,0$ ; 10,5; 13,5)	27,2	27,2
2'	1,58-1,70 (m)	1,65 (dddd, $J=1,0$ ; 3,5; 5,0; 13,5)		
3	0,92-0,98 (m)	0,97 (td, $J=5,0$ ; 13,0)	39,1	39,2
3'	2,06-2,14 (m)	2,09 (dt, $J=3,5$ ; 13,0)		
4	-	-	59,8	59,8
5	2,87 (dd, $J=4,0$ ; 10,6)	2,87 (dd, $J=4,0$ ; 11,0)	63,7	63,7
6	1,27-1,38 (m)	1,32 (dddd, $J=4,5$ ; 8,0; 11,0; 12,5)	30,2	30,3
6'	2,21-2,28 (m)	2,25 (ddt, $J=4,0$ ; 8,0; 12,0)		
7	2,06-2,14 (m)	2,11 (ddd, $J=4,5$ ; 8,0; 12,5)	29,8	29,8
7'	2,34 (ddd, $J=4,5$ ; 8,2; 12,8)	2,34 (ddd, $J=4,5$ ; 8,0; 12,5)		
8	-	-	151,8	151,8
9 $\alpha$	2,61 (q, $J=10,0$ )	2,62 (dt, $J=9,5$ ; 10,0)	48,7	48,7
10	1,61 (t, $J=10,0$ )	1,69 (t, $J=10,0$ )	39,7	39,8
10'	1,68 (dd, $J=8,4$ ; 10,0)	1,62 (dd, $J=8,0$ ; 10,0)		
11	-	-	34,0	34,1
12	1,19 (s)	1,20 (s)	17,0	17,0
13	4,85 (s)	4,86 (s)	112,7	112,8
13'	4,97 (s)	4,97 (s)		
14	1,00 (s)	1,01 (s)	21,6	21,7
15	0,98 (s)	0,98 (s)	29,9	29,9

### 3.2.1.2 2 $\beta$ -Metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**)

O 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) (**Figura 49**, pág. 66), uma substância que apresenta atividade fungistática contra o fungo *B. cinerea*,<sup>36</sup> foi obtido a partir de **125**, porém com um rendimento baixo (22 %), em relação ao descrito na literatura para essa reação (40 %).<sup>91</sup> O composto **73** foi obtido como um sólido branco após etapas de cromatografia em coluna de sílica gel (eluído com hexano/acetato de etila 85:15) e purificação final por CLAE (coluna semipreparativa, fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup> e fase móvel composta por hexano/acetato de etila 70:30, sendo obtido com tempo de retenção de 15,04

min). Foram recuperados 16 % **125** nesse processo. A atribuição dos sinais de RMN obtidos a partir dos dados espectroscópicos experimentais para essa molécula é apresentada na **Tabela 4** (pág. 68).<sup>91</sup>



**Figura 49** – Estrutura química do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**).

O mecanismo para a reação de ciclização e rearranjo de **125**, que resultou na formação de **73**, pode ser racionalizado como sendo iniciado pela transferência de um elétron não ligante do oxigênio do grupo epóxido do óxido de cariofileno (**125**) para o sistema  $\pi$  do tetracianoetileno (TCNE, um catalisador ácido), por meio de um complexo de transferência de carga. Essa transferência de carga gera um carbono carregado positivamente, que é atacado de forma intramolecular por elétrons da ligação dupla exocíclica pertencente a essa molécula. O carbocátion formado nesse processo é, então, atacado pelo álcool, formando o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) (**Figura 50**, pág. 67).<sup>111</sup>

As **Figuras 101** e **102** (pág. 172, anexo 2) apresentam os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para **73**. Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 103**, pág. 173, anexo 2) mostraram a presença de 16 sinais de carbono, sendo três oxigenados, correspondendo a um carbono hidroxilado (C-9,  $\delta$  75,2 ppm), um grupo éter (C-2,  $\delta$  90,1 ppm) e uma metoxila (C-1',  $\delta$  58,3 ppm). Pela análise do subespectro DEPT-135 (**Figura 104**, pág. 173, anexo 2), observou-se a presença de quatro carbonos primários (C-13, C-14, C-15 e C-1'), seis carbonos secundários (C-3, C-6, C-7, C-10, C-11 e C-12), três terciários (C-2, C-5 e C-9) e três quaternários (C-1, C-4 e C-8). As correlações entre os

hidrogênios e os respectivos carbonos foram determinadas utilizando-se o mapa de contornos HSQC (Figura 105, pág. 174, anexo 2).

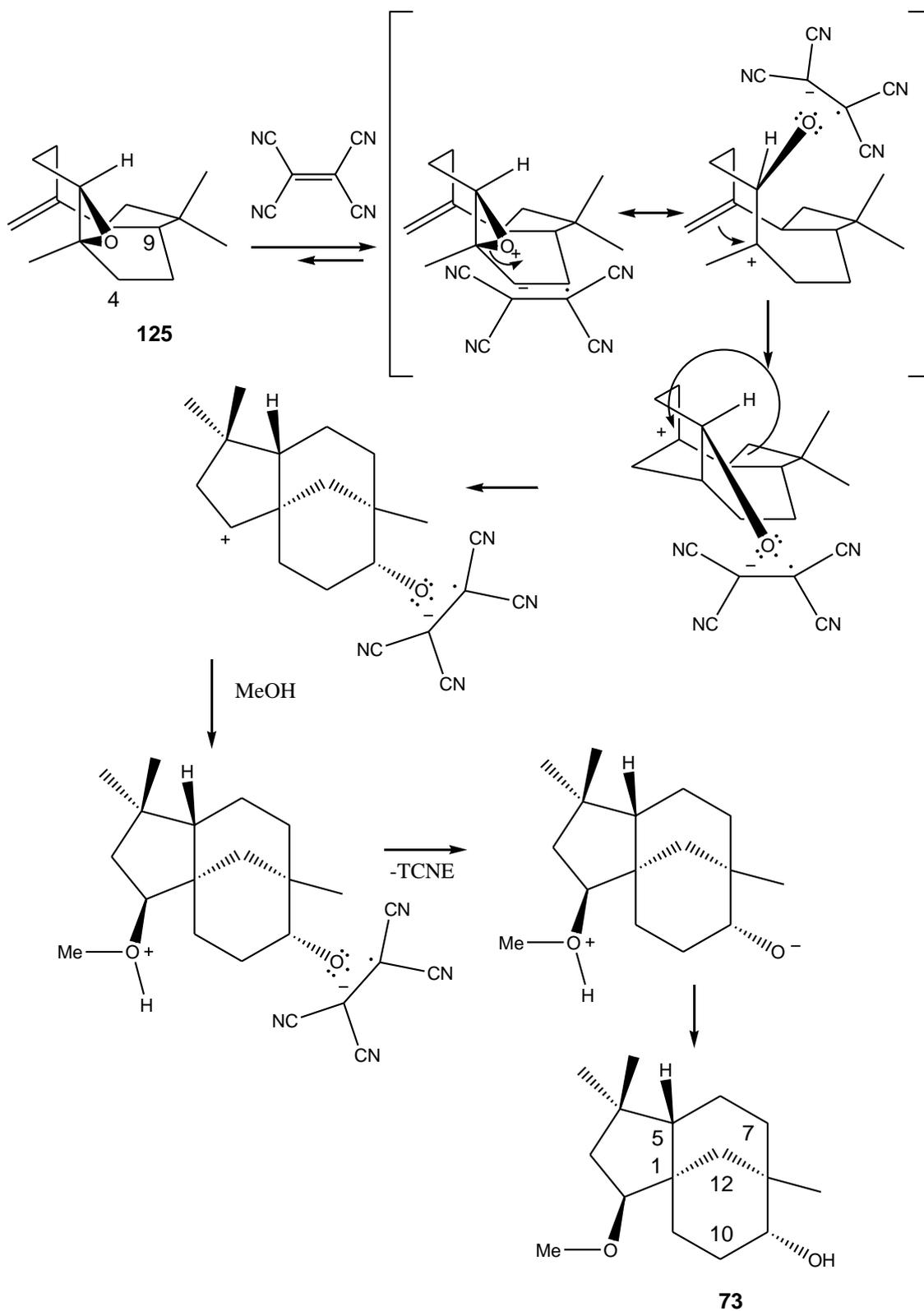


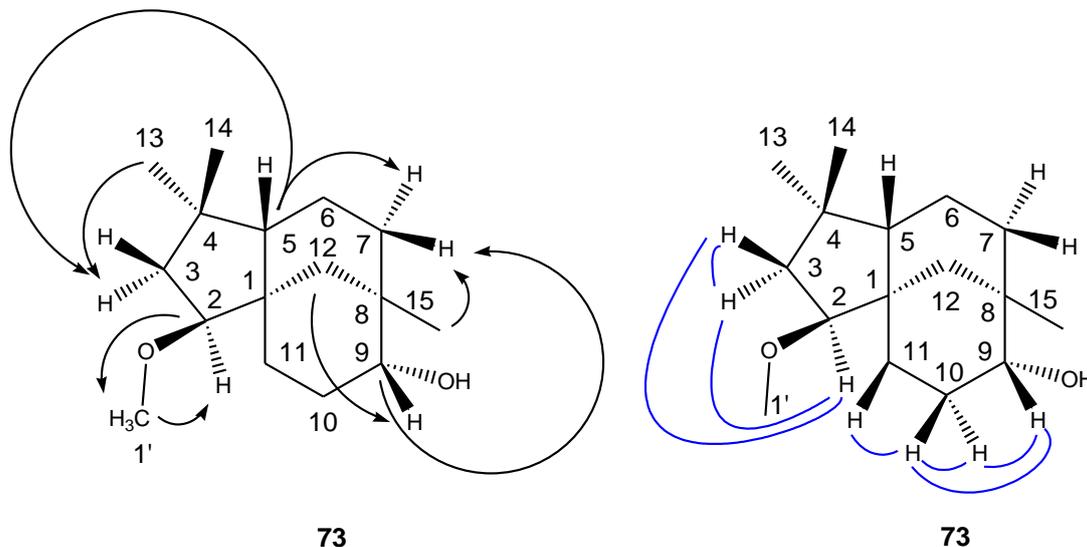
Figura 50 – Mecanismo da formação do 2β-metoxiclovan-9α-ol (73) a partir do óxido de cariofileno (125).<sup>111</sup>

**Tabela 4** – Dados de RMN uni e bidimensionais do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) em CDCl<sub>3</sub>. Os valores de *J* são apresentados em Hz

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	HMBC	<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY
1	-	44,2	-	-
2 $\alpha$	3,30-3,34 (m)	90,1	C-1', C-3, C-11, C-12	H-3 $\alpha$ , H-3 $\beta$
3 $\beta$	1,46 (dd, <i>J</i> =10,8; 11,6)	44,1	C-2	H-2 $\beta$ , H-3 $\alpha$
3 $\alpha$	1,71 (dd, <i>J</i> =5,4; 11,6)		C-1, C-2, C-4, C-5, C-13	H-2 $\beta$ , H-3 $\beta$
4	-	37,0	-	-
5 $\beta$	1,36-1,43 (m)	50,6	C-4, C-13, C-14	-
6	1,28-1,33 (m)	20,6	C-5	-
6'	1,36-1,43 (m)		C-8	-
7 $\beta$	1,06-1,14 (m)	33,1	C-9, C-15	-
7 $\alpha$	1,36-1,43 (m)		C-5, C-6, C-9	-
8	-	34,7	-	-
9 $\beta$	3,30-3,31 (m)	75,2	C-11, C-12	H-10 $\alpha$ , H-10 $\beta$
10 $\alpha$	1,56-1,62 (m)	26,0	C-9	H-9 $\beta$ , H-10 $\beta$
10 $\beta$	1,98 (tdd, <i>J</i> =3,2; 5,2; 14,1)		-	H-9 $\beta$ , H-10 $\alpha$ , H-11 $\alpha$ , H-11 $\beta$
11 $\alpha$	1,06-1,14 (m)	26,5	C-9, C-12	H-11 $\beta$ , H-10 $\beta$
11 $\beta$	1,64-1,72 (m)		C-1, C-5	H-11 $\alpha$ , H-10 $\beta$
12	0,98-1,01 (m)	36,5	C-2, C-9	H-12'
12'	1,61 (d, <i>J</i> =12,8)		C-1, C-5, C-7	H-12
13 $\alpha$	0,85 (s)	25,4	C-3, C-4, C-5, C-14	-
14 $\beta$	1,02 (s)	31,3	C-3, C-4, C-5, C-13	-
15	0,95 (s)	28,4	C-7, C-8, C-9, C-12	-
1'	3,35 (s)	58,3	C-2	-

Observou-se, no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, a presença de um multipletto correspondente ao H-2 $\alpha$  ( $\delta$  3,32 ppm). O sinal deste hidrogênio apresentou correlação com o carbono C-3 (<sup>2</sup>*J*) e correlações da ordem de três ligações com C-11, C-12 e C-1' (**Figura 51**, pág. 69) no mapa de contornos HMBC (**Figuras 106 e 107**, pág. 174 e 175, anexo 2) e com os hidrogênios H-3 $\alpha$  e H-3 $\beta$  no mapa de contornos <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (**Figura 108**, pág. 176, anexo 2). Este último hidrogênio, por sua vez, apresentou correlação com C-2 (<sup>2</sup>*J*) no mapa de

contornos HMBC e correlações com H-2 $\beta$  e com H-3 $\alpha$  no mapa de contornos COSY.



**Figura 51** – Algumas correlações visualizadas nos mapas de contornos HMBC (setas pretas) e COSY (traços azuis) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**).

O hidrogênio H-3 $\alpha$  apresentou correlações com C-2 ( $^2J$ ), C-4 ( $^2J$ ), C-1 ( $^3J$ ), C-5 ( $^3J$ ) e C-13 ( $^3J$ ), no mapa de contornos HMBC. Os hidrogênios correspondentes ao grupo metila C-13, apresentaram correlação com C-4 ( $^2J$ ), C-3 ( $^3J$ ), C-5 ( $^3J$ ) e C-14 ( $^3J$ ). De forma semelhante, os hidrogênios H-14 correlacionaram-se com C-4 ( $^2J$ ), C-3 ( $^3J$ ), C-5 ( $^3J$ ) e C-13 ( $^3J$ ). Finalizando as correlações dos hidrogênios do anel A (**Figura 49**, pág. 66), foram observadas correlações no mapa de contornos HMBC entre H-5 $\beta$  e os carbonos C-4, C-13 e C-14.

O carbono C-5, que pertence tanto ao anel A quanto ao anel B, apresentou correlação no mapa de contornos de HMBC com H-6. Já o H-6' correlacionou-se com C-8, que é quaternário e está na junção dos anéis B e C. Não foi definida a orientação espacial dos hidrogênios H-6 e H-6' e, na literatura, os mesmos também não são diferenciados.<sup>91</sup> Ainda no anel B, o H-7 $\alpha$  apresentou correlação com C-6 ( $^2J$ ), C-5 ( $^3J$ ) e C-9 ( $^3J$ ). Já o H-7 $\beta$  mostrou apenas correlações com C-9 ( $^3J$ ) e também com C-15 ( $^3J$ ), cujos hidrogênios apresentaram, por sua vez, correlações com C-8 ( $^2J$ ) e com C-7 ( $^3J$ ), C-9 ( $^3J$ ) e C-12 ( $^3J$ ). O hidrogênio H-9 $\beta$  (anel C) apresentou correlações com C-11 ( $^3J$ ) e

C-12 ( $^3J$ ) (esse último presente na junção dos anéis B e C) no mapa de contornos HMBC e também com H-10 $\alpha$  e H-10 $\beta$  no mapa de contornos COSY.

Foram observadas, no mapa de contornos COSY, correlações entre H-10 $\alpha$  e H-10 $\beta$ , H-10 $\beta$  e H-11 $\alpha$ , H-10 $\beta$  e H-11 $\beta$ , H-12 e H-12' e também entre H-11 $\alpha$  e H-11 $\beta$ . Sabe-se que H-11 $\alpha$  apresentou ainda correlações no mapa de contornos HMBC com C-9 (anel C) e com C12. Já o H-11 $\beta$  correlacionou-se, no mapa de contornos HMBC, com os carbonos C-1 (junção dos anéis A, B e C) e C-5 (anéis A e B). No mapa de contornos HMBC, H-12 correlacionou-se com C-2 e C-9 e o H-12' correlacionou-se com C-1, C-5 e C-7, este último no anel B.

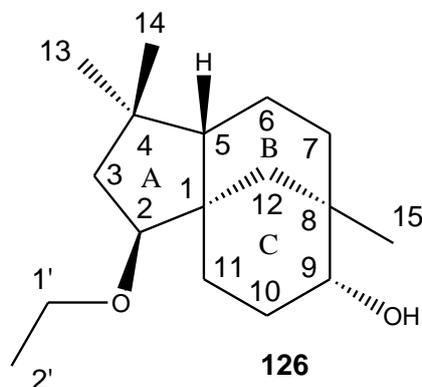
No espectro no infravermelho (**Figura 109**, pág. 177, anexo 2) foram observadas as bandas em 2930 e 2860  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação C-H de carbono saturado. A banda referente à hidroxila ligada a C-9 foi observada em 3399  $\text{cm}^{-1}$ . A banda observada em 1116  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento assimétrico de ligação C-O.

### 3.2.1.3 2 $\beta$ -Etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**126**)

Na reação de formação do produto inédito 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**126**), cuja estrutura está apresentada na **Figura 52** (pág. 71), o mesmo foi obtido com rendimento de 14 %. Na purificação por CLAE, inicialmente se utilizou coluna semipreparativa e fluxo de 3,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , e, como eluente, uma mistura de hexano/acetato de etila 73:27. Estando ainda impuro o produto, utilizou-se também esse eluente na proporção 68:32 e, em sequência, 85:15, obtendo-se, assim, **126**, como um sólido branco, com tempo de retenção 21,35 min. Foram recuperados 53 % de **125** nessa reação.

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **126** estão apresentados nas **Figuras 110 e 111**, na pág. 177 e 178 (anexo 2). Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , obtidos para o produto **126**, mostraram a presença de 17 sinais de carbono, que, pelo subspectro DEPT-135, correspondem a quatro carbonos primários: C-13, C-

14, C-15 e C-2'; sete secundários: C-3, C-6, C-7, C10, C-11, C-12 e C-1'; três terciários: C-2, C-5 e C-9 e três quaternários: C-1, C-4 e C-8. Dentre esses carbonos, três são oxigenados: C-2 ( $\delta$ 88,1 ppm), C-9 ( $\delta$ 75,3 ppm) e C-1' ( $\delta$  65,8 ppm) (**Figuras 112 e 113**, pág. 178 e 179, anexo 2).

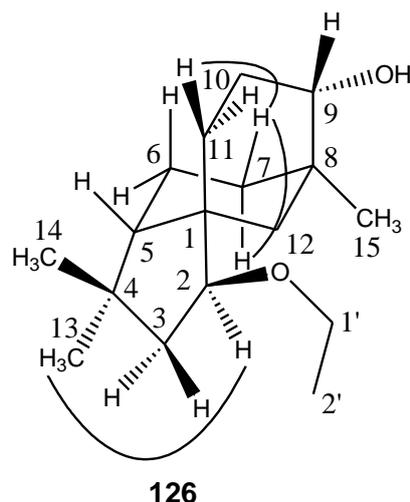


**Figura 52** – Estrutura química do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**126**).

Os hidrogênios correspondentes a cada carbono foram atribuídos com o auxílio do mapa de contornos HSQC (**Figuras 114**, pág. 179, anexo 2). A ordem de conexão entre os carbonos foi atribuída com a ajuda do mapa de contornos HMBC (**Figuras 115 e 116**, pág. 180, anexo 2). Utilizou-se, ainda, o mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, sendo a disposição espacial dos átomos confirmada por NOESY (**Figuras 117 e 118**, pág. 181 e 182, anexo 2). A **Tabela 5** (pág. 72) mostra os dados de RMN obtidos para **126**.

A estrutura do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**126**) é muito semelhante à de **73** (ítem 4.2.1.2), diferindo apenas pela presença de um carbono secundário adicional (C-1') na cadeia lateral de **126**. A presença deste carbono foi confirmada pelas correlações entre H-2 $\alpha$  e C-1' ( $^3J$ ), entre H-1' e C-2 ( $^3J$ ) e entre H-1' e C-2' ( $^2J$ ) e também entre H-2' e C-1' ( $^2J$ ) no mapa de contornos HMBC.

A disposição tridimensional dos átomos foi confirmada pelas correlações entre H-2 $\alpha$  e H-13 $\alpha$ , H-10 $\alpha$  e H-10 $\beta$ , H-12 e H-12', H-12 e H-15, e do H-7 $\beta$  com H-7 $\alpha$  e com H-11 $\beta$  no mapa de contornos NOESY (**Figura 53**, pág. 72).



**Figura 53** – Correlações do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**126**) visualizadas no mapa contornos NOESY.

A banda referente ao estiramento da ligação OH foi observada em 3422  $\text{cm}^{-1}$  no espectro no infravermelho (**Figura 119**, pág. 182, anexo 2). Foram também observadas bandas em 2927 e 2864  $\text{cm}^{-1}$ , referentes a estiramentos de ligações C-H de carbono saturado, e em 1107  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento assimétrico de ligação C-O. O espectro de massas de alta resolução obtido para **126** apresentou pico  $M^{+}$  com  $m/z$  266,2268 (valor calculado para  $C_{17}H_{30}O_2 = 266,4189$ ).

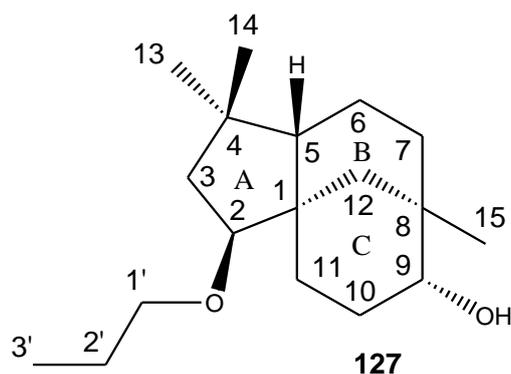
**Tabela 5** – Dados de RMN uni e bidimensionais do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**126**) em  $CDCl_3$ . Os valores de  $J$  são apresentados em Hz

Posição	$\delta_H$ (400 MHz)	$\delta_C$ (100 MHz)	HMBC	$^1H$ - $^1H$ COSY	NOESY
1	-	44,1	-	-	-
2 $\alpha$	3,41 (dd, $J=5,6; 10,6$ )	88,1	C-4, C-11, C-12, C-1'	H-3 $\alpha$ , H-3 $\beta$	H-13 $\alpha$
3 $\beta$	1,49 (m)	44,9	C-2, C-4, C-14	H-2 $\alpha$ , H-3 $\alpha$	-
3 $\alpha$	1,67 (dd, $J=5,6; 11,9$ )		C-1, C-2, C-4, C-5	H-2 $\alpha$ , H-3 $\beta$	-
4	-	36,9	-	-	-
5 $\beta$	1,38-1,43 (m)	50,6	C-6	-	-
6	1,28-1,33 (m)	20,5	C-5	-	-
6'	1,35-1,43 (m)		C-5	H-7 $\beta$	-

7 $\beta$	1,07-1,14 (m)	33,1	C-6, C-9, C-15	H-6', H-7 $\alpha$	H-7 $\alpha$ , H-11 $\beta$
7 $\alpha$	1,35-1,40 (m)		C-6, C-9, C-15	H-7 $\beta$	H-7 $\beta$
8	-	34,7	-	-	-
9 $\beta$	3,31 (sl)	75,3		H-10 $\beta$	-
10 $\alpha$	1,56-1,61 (m)	26,0	C-9, C-11	H-10 $\beta$	H-10 $\beta$
10 $\beta$	1,98 (tdd, $J=3,2$ ; 2,5; 14,1)		-	H-9 $\beta$ , H-10 $\alpha$ , H-11 $\alpha$	H-10 $\alpha$
11 $\alpha$	1,07-1,14 (m)	26,7	C-9	H-10 $\beta$ , 11 $\beta$	-
11 $\beta$	1,67-1,73 (m)		C-10	11 $\alpha$	7 $\beta$
12	0,97-1,00 (m)	36,6	C-2, C-8, C-9	H-12'	H-12', H-15
12'	1,60 (d, $J=12,8$ )		C-5, C-7	H-12	H-12
13 $\alpha$	0,84 (s)	25,3	C-3, C-4, C-5, C-14	-	2 $\alpha$
14 $\beta$	1,01 (s)	31,2	C-3, C-4, C-5, C-13	-	-
15	0,95 (s)	28,4	C-8, C-9, C-12	-	H-12
1'	3,44-3,57 (m)	65,8	C-2, C-2'	-	-
2'	1,17 (t, $J=7,0$ )	15,7	C-1'	-	-

#### 3.2.1.4 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**)

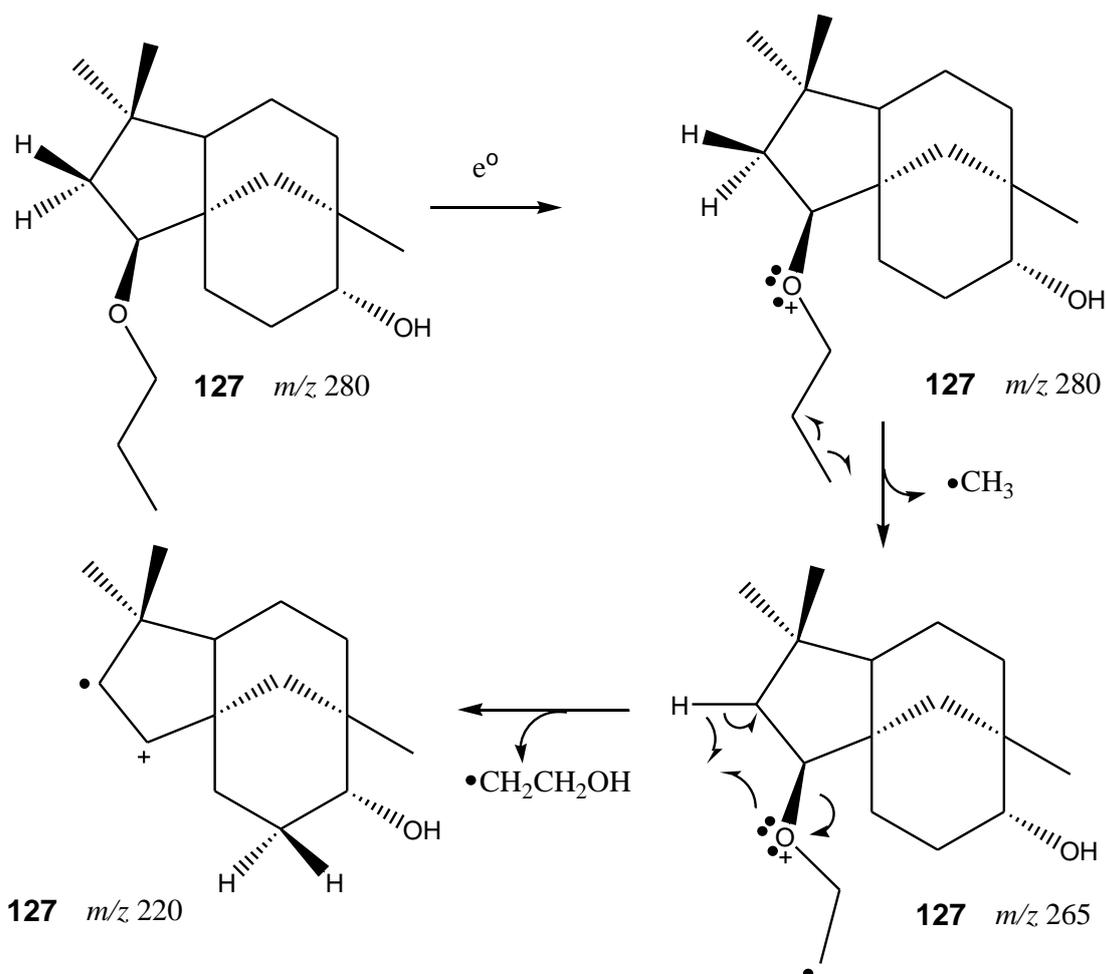
O produto inédito 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) (**Figura 54**, pág. 73) foi obtido com rendimento de 25 % (foram recuperados 28 % de **125**). A purificação se iniciou por cromatografia em coluna de sílica gel, sendo obtida uma mistura contendo **127** (529,6 mg) eluída com hexano/acetato de etila 95:5 e 90:10. A purificação foi finalizada por CLAE, usando-se coluna semipreparativa, fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup> e, como fase móvel, inicialmente hexano/acetato de etila 75:25. Estando o produto **127** ainda impuro, foi utilizado, em uma etapa posterior, hexano/acetato de etila 90:10 como eluente e, posteriormente, na proporção 85:15, sendo obtido o 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) (sólido branco) com tempo de retenção de 13,69 min. A elucidação estrutural foi feita com o auxílio de espectros de RMN uni e bidimensionais. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C, o subespectro DEPT-135, e os mapas de contornos HSQC, HMBC, COSY e NOESY estão apresentados respectivamente nas **Figuras 120 a 128**, pág. 183 a 188, anexo 2.



**Figura 54** – Estrutura química do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**).

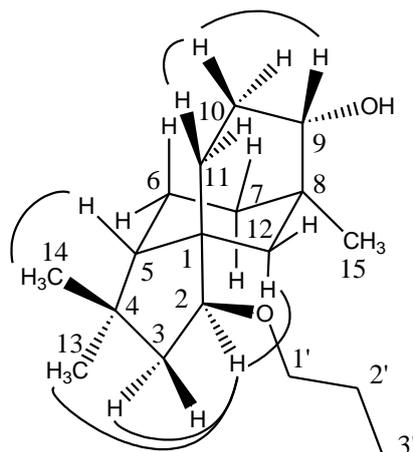
Pela análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , verificou-se a presença de 18 sinais de carbono, como apresentado na **Tabela 6** (pág. 76), sendo três oxigenados, C-2 ( $\delta$  88,3 ppm), C-9 ( $\delta$  75,3 ppm), e C-1' ( $\delta$  72,3 ppm). Dentre os carbonos, detectou-se a presença de quatro primários (C-13, C-14, C-15 e C-3'), oito secundários (C-3, C-6, C-7, C-10, C-11, C-12, C-1' e C-2'), três terciários (C-2, C-5 e C-9) e três quaternários (C-1, C-4 e C-8), como verificado pelo subespectro DEPT-135.

O 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) apresenta dois átomos de carbono secundários adicionais em relação ao 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), em sua cadeia lateral. A presença dos mesmos pôde ser confirmada pelas correlações entre H-2 $\alpha$  e C-1' ( $^3J$ ), H-1' e C-2 ( $^3J$ ), H-1' e C-3' ( $^3J$ ) e entre H-3' e C-1' ( $^3J$ ), e, também, pelas correlações entre H-1' e C-2' ( $^2J$ ), H-2' e C-1' ( $^2J$ ), H-2' e C-3' ( $^2J$ ) e também entre H-3' e C-2' ( $^2J$ ) no mapa de contornos HMBC. A **Figura 55** (pág. 75) mostra a proposta de fragmentação da cadeia lateral dessa molécula, a partir dos dados do espectro de massas (**Figuras 129 e 130**, pág. 188 e 189, anexo 2). No espectro de massas em alta resolução, foi obtido o pico  $[\text{M}]^{++}$  com  $m/z$  280,2422, sendo calculado o valor de 280,4455 para  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ .



**Figura 55** – Proposta de fragmentação obtida do espectro de massas do 2β-propoxiclovan-9α-ol (127).

A disposição espacial dos átomos foi determinada pelas correlações observadas no mapa de contornos NOESY (**Figura 56**, pág. 76). Nesse mapa foram observadas correlações entre H-2 $\alpha$  e H-3 $\alpha$ , H-2 $\alpha$  e H-13 $\alpha$ , entre H-5 $\beta$  e H-14 $\beta$ , e também entre H-7 $\beta$  e H-9 $\beta$ , H-7 $\beta$  e H-11 $\beta$ , H-9 $\beta$  e H-10 $\beta$  e entre H-10 $\beta$  e H-11 $\beta$ , entre outras (**Tabela 6**, pág. 76).



127

**Figura 56** – Algumas correlações do 2β-propoxiclovan-9α-ol (**127**) visualizadas no mapa contornos NOESY.

Foi observada, no espectro no infravermelho (**Figura 131**, pág. 189, anexo 2), a banda em  $3447\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento da ligação OH. Ao estiramento assimétrico de ligação C-O foi atribuída a banda observada em  $1105\text{ cm}^{-1}$  e aquelas observadas em  $2950$  e  $2865\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico de ligação C-H de carbono saturado.

**Tabela 6** – Dados de RMN uni e bidimensionais do 2β-propoxiclovan-9α-ol (**127**) em CDCl<sub>3</sub>. Os valores de *J* são apresentados em Hz

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	HMBC	<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY	NOESY
1	-	44,3	-	-	-
2 $\alpha$	3,34-3,44 (m)	88,3	C-1, C-11, C-12, C-1'	H-3 $\alpha$ , H-3 $\beta$	H-3 $\alpha$ , H-12 $\alpha$ , H-13 $\alpha$
3 $\beta$	1,49 (dd, <i>J</i> =10,4; 11,8)	44,7	C-2, C-4, C-13, C-14	H-2 $\alpha$ , H-3 $\alpha$	-
3 $\alpha$	1,67 (dd, <i>J</i> =6,0; 11,8)		C-1, C-2, C-4, C-5, C-13	H-2 $\alpha$ , H-3 $\beta$	H-2 $\alpha$ , H-13 $\alpha$
4	-	37,0	-	-	-
5 $\beta$	1,35-1,43 (m)	50,6	-	-	H-14 $\beta$
6	1,25-1,33 (m)	20,6	C-5,	-	-
6'	1,35-1,43 (m)		-	-	-
7 $\beta$	1,06-1,14 (m)	33,2	C-9, C-15	-	H-9 $\beta$ , H-11 $\beta$ , H-12 $\beta$

7 $\alpha$	1,35-1,43 (m)		C-5, C-6, C-8, C-9	-	-
8		34,7	-	-	-
9 $\beta$	3,31 (m)	75,3	-	-	H-7 $\beta$ , H-10 $\beta$ , H-15
10 $\alpha$	1,57-1,62 (m)	26,1	C-1, C-9	H-10 $\beta$	H-12 $\alpha$
10 $\beta$	1,98 (tdd, $J=3,2$ ; 4,8; 14,2)		-	H-9 $\beta$ , H-10 $\alpha$ , H-11 $\alpha$ , H-11 $\beta$	H-9 $\beta$ , H-11 $\beta$
11 $\alpha$	1,10-1,14 (m)	26,7	C-9	H-10 $\beta$ , H-11 $\beta$	-
11 $\beta$	1,69-1,74 (dd, $J=4,8$ ; 13,7)		-	H-10 $\beta$ , H-11 $\alpha$	H-7 $\beta$ , H-10 $\beta$
12 $\alpha$	0,96-1,00	36,5	C-1, C-2, C-8, C-9	H-12 $\beta$	H-2 $\alpha$ , H-10 $\alpha$
12 $\beta$	1,59 (d, $J=13,2$ )		C-1, C-5, C-7	H-12 $\alpha$	H-7 $\beta$
13 $\alpha$	0,85 (s)	25,4	C-3, C-4, C-5, C-14	-	H-2 $\alpha$ , H-3 $\alpha$
14 $\beta$	1,01 (s)	31,3	C-3, C-4, C-5, C-13	-	H-5 $\beta$
15	0,95 (s)	28,4	C-8, C-9, C-12	-	H-9 $\beta$
1'	3,34-3,44 (m)	72,3	C-2, C-2', C-3'	-	H-2'
2'	1,56 (m)	23,4	C-1', C-3'	H-3'	H-1'
3'	0,91 (t, $J=6,8$ )	10,7	C-1', C-2'	H-2'	-

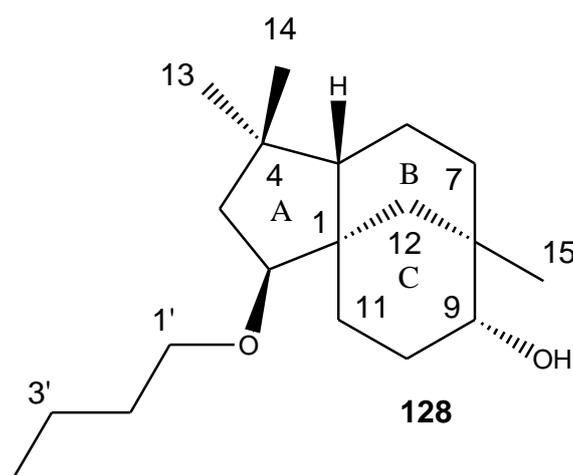
### 3.2.1.5 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**)

O 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**) (**Figura 57**, pág. 79), inédito, foi obtido com rendimento de 11 %. A purificação inicial de **128** foi feita em coluna de sílica gel, sendo eluída com hexano/acetato de etila (92:8 e 90:10). Posteriormente, por CLAE, utilizando-se coluna semipreparativa, fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup> e fase móvel composta por hexano/acetato de etila 80:20, foi obtido, como um sólido branco, o produto 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**), com tempo de retenção de 9,70 min. Foram recuperados 22 % de **125** nessa reação.

No espectro no infravermelho (**Figura 132**, pág. 190, anexo 2) obtido para essa substância foi observada a banda em 3406 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento da ligação OH. Outras bandas foram observadas em 1106 cm<sup>-1</sup>,

atribuída ao estiramento assimétrico de ligação C-O e, em 2931 e 2865  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento de C-H de carbono saturado.

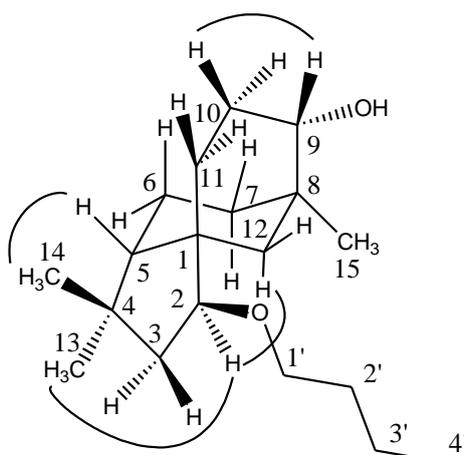
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para essa molécula estão apresentados nas **Figuras 133 e 134** (pág. 190 e 191, anexo 2). A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para o  $2\beta$ -butoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**128**) (**Figura 135**, pág. 191, anexo 2) mostrou a presença de 19 sinais de carbono (**Tabela 7**, pág. 79), os quais, no subespectro DEPT-135, mostraram ser quatro carbonos primários (C-13, C-14, C-15 e C-4'), nove secundários (C-3, C-6, C-7, C-10, C-11, C-12, C-1', C-2' e C-3'), três terciários (C-2, C-5 e C-9) e três quaternários (C-1, C-4 e C-8). Um dos carbonos secundários é oxigenado (C-1',  $\delta$  70,3 ppm) bem como dois dos carbonos terciários (C-2,  $\delta$  88,3 ppm e C-9,  $\delta$  75,4 ppm) (**Figura 136**, pág. 192, anexo 2).



**Figura 57** – Estrutura química do  $2\beta$ -butoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**128**).

Os hidrogênios pertencentes a esta molécula foram atribuídos com a ajuda do mapa de contornos HSQC (**Figuras 137 e 138**, pág. 192 e 193, anexo 2). O  $2\beta$ -butoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**128**) possui três átomos de carbono adicionais em sua cadeia lateral em relação ao  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**). No mapa de contornos HMBC (**Figuras 139 e 140**, pág. 193 e 194, anexo 2) observou-se correlação entre H- $2\alpha$  e C-1' ( $^3J$ ), pertencente à cadeia lateral da molécula. Foram observadas correlações também entre H-1' e C-2 ( $^3J$ ), C-2' ( $^2J$ ), C-3' ( $^3J$ ), entre H-2' e C-1' ( $^2J$ ), C-3' ( $^2J$ ), C-4' ( $^3J$ ), entre H-3' e C-1' ( $^3J$ ) e C-4' ( $^2J$ ) e entre

H-4' e C-2' ( $^3J$ ) e C-3' ( $^2J$ ), determinando-se, assim, a conectividade entre os átomos. No mapa de contornos COSY (Figura 141, pág. 195, anexo 2) foram observadas correlações entre H-1' e H-2' e entre H-3' e H-4'. A disposição espacial dos átomos foi determinada utilizando o mapa de contornos NOESY (Figura 142, pág. 196, anexo 2). Observaram-se correlações entre H-2 $\alpha$  e H-13 $\alpha$ , H-3 $\beta$  e H-14 $\beta$ , H-7 $\beta$  e H-7 $\alpha$ , H-7 $\beta$  e H-9 $\beta$  e também entre H-9 $\beta$  e H-10 $\beta$ , o que está de acordo com o esperado para **128**. Na Figura 58 são apresentadas algumas das correlações observadas no mapa de contornos NOESY.



128

**Figura 58** – Algumas correlações do 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**) visualizadas no mapa contornos NOESY.

**Tabela 7** – Dados de RMN uni e bidimensionais do 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**) em CDCl<sub>3</sub>. Os valores de  $J$  são apresentados em Hz

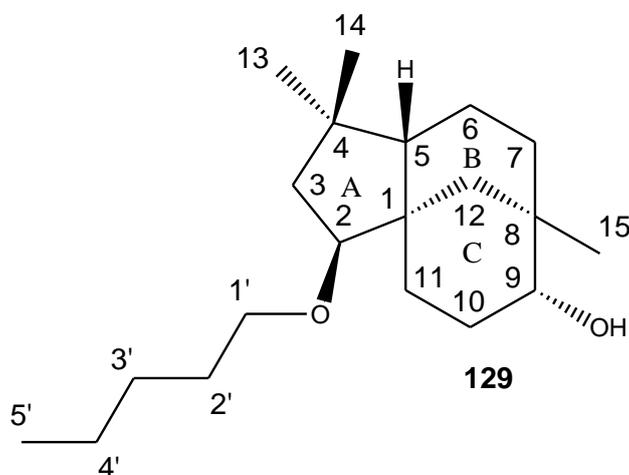
Posição	$\delta_H$ (400 MHz)	$\delta_C$ (100 MHz)	HMBC	$^1H$ - $^1H$ COSY	NOESY
1	-	44,3	-	-	-
2 $\alpha$	3,37 (dd, $J=5,6; 10,2$ )	88,3	C-1, C-11, C-12, C-1'	H-3 $\alpha$ , H-3 $\beta$	H-12 $\alpha$ , H-13 $\alpha$
3 $\beta$	1,45-1,52 (m)	44,7	C-1, C-2, C-4, C-13, C-14	H-2 $\alpha$	H-14 $\beta$
3 $\alpha$	1,66 (dd, $J=5,6; 12,0$ )		C-1, C-2, C-4, C-5, C-13	H-2 $\alpha$	H-13 $\alpha$
4	-	37,0	-	-	-
5 $\beta$	1,35-1,43 (m)	50,5	-	-	H-14 $\beta$
6	1,24-1,34 (m)	20,6	C-1, C-4, C-5	-	-
6'	1,35-1,43 (m)		C-1, C-5	-	-
7 $\beta$	1,07-1,14 (m)	33,2	C-6, C-9, C-15	-	H-7 $\alpha$ , H-

					9 $\beta$ , H-10 $\beta$ , H-11 $\beta$ H-7 $\beta$
7 $\alpha$	1,33-1,40 (m)		C-6, C-8, C-9, C-15	-	
8	-	34,7	-	-	-
9 $\beta$	3,30 (sl)	75,3	C-11	H-10 $\beta$	H-7 $\beta$ , H-10 $\beta$ , H-15
10 $\alpha$	1,55-1,61 (m)	26,1	-	H-10 $\beta$	H-12 $\alpha$
10 $\beta$	1,97 (tdd, $J=3,2; 5,0; 14,2$ )		-	H-9 $\beta$ , H-10 $\alpha$ , H-11 $\alpha$ , H-11 $\beta$	H-7 $\beta$ , H-9 $\beta$
11 $\alpha$	1,07-1,14 (m)	26,7	C-9	H-10 $\beta$ , H-11 $\beta$	-
11 $\beta$	1,64-1,73 (m)		-	H-10 $\beta$ , H-11 $\alpha$	H-7 $\beta$
12 $\alpha$	0,95-0,99 (m)	36,5	C-1, C-2, C-9, C-11, C-15	H-12 $\beta$	H-2 $\alpha$ , H-10 $\alpha$
12 $\beta$	1,58 (d, $J=12,8$ )		C-1, C-5, C-7, C-8, C-9, C-15	H-12 $\alpha$	-
13	0,84 (s)	25,4	C-3, C-4, C-5, C-14	-	H-2 $\alpha$ , H-3 $\alpha$
14	1,01 (s)	31,3	C-3, C-4, C-5, C-13	-	H-3 $\beta$ , H-5 $\beta$
15	0,95 (s)	28,4	C-7, C-8, C-9, C-12	-	H-9 $\beta$
1'	3,40-3,45 (m)	70,3	C-2, C-2', C-3'	H-2'	-
2'	1,47-1,53 (m)	32,3	C-1', C-3', C-4'	H-1'	-
3'	1,31-1,40 (m)	19,4	C-1', C-4'	H-4'	H-4'
4'	0,90 (t, $J=7,2$ )	14,0	C-2', C-3'	H-3'	H-3'

### 3.2.1.6 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**)

O produto 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**) (**Figura 59**), inédito, foi obtido com rendimento de 21 %. O mesmo foi purificado inicialmente por cromatografia em coluna de sílica gel, sendo eluída uma mistura (692,6 mg) contendo **129** com hexano/acetato de etila 92:8. A purificação final foi feita por CLAE, utilizando-se coluna semipreparativa, fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup> e eluente composto por hexano/acetato de etila 85:15, sendo obtido o 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**) (sólido branco) com tempo de retenção de 11,60 min. Foram recuperados 22 % do material de partida (**125**).

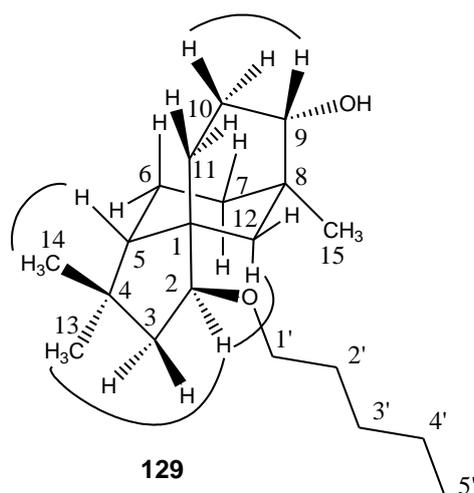
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , o subespectro DEPT-135, e os mapas de contornos HSQC, HMBC, COSY e NOESY de **129** são apresentados nas **Figuras 143 a 152**, pág. 196 a 202, anexo 2. Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , observaram-se sinais correspondentes a 20 carbonos, sendo oxigenados C-2 ( $\delta$  88,3 ppm), C-9 ( $\delta$  75,3 ppm) e C-1' ( $\delta$  70,6 ppm). Pela análise do subespectro DEPT-135 dessa substância, observaram-se que quatro carbonos são primários (C-13, C-14, C-15 e C-5'), dez secundários (C-3, C-6, C-7, C-10, C-11, C-12, C-1', C-2', C-3' e C-4'), três terciários (C-2, C-5 e C-9) e três quaternários (C-1, C-4 e C-8).



**Figura 59** – Estrutura química do 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**).

O composto **129** possui uma cadeia lateral com cinco átomos de carbono. A ligação dessa cadeia lateral com o anel A da molécula foi comprovada pelas correlações entre H-2 $\beta$  e C-1' e também entre H-1' e C-2 no mapa de contornos HMBC. O hidrogênio H-2' apresentou correlações com os carbonos C-1', C-3' e C-4'. O carbono C-3', por sua vez, correlaciona-se com H-1', H-4' e H-5' e, o carbono C-4', com H-3' e também com H-5'.

A disposição espacial dos átomos nessa molécula foi determinada utilizando-se o mapa de contornos NOESY, no qual foram observadas correlações entre H-2 $\alpha$  e H-13 $\alpha$ , H-3 $\beta$  e H-14 $\beta$ , H-7 $\beta$  e H-7 $\alpha$ , H-7 $\beta$  e H-9 $\beta$ , H-9 $\beta$  e H-10 $\beta$  e entre H-7 $\beta$  e H-11 $\beta$ . Na **Figura 60** (pág. 82) são apresentadas algumas das correlações observadas no mapa de contornos NOESY de **129**.



**Figura 60** – Algumas correlações do 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**) visualizadas no mapa contornos NOESY.

No espectro no infravermelho de **129** (**Figura 153**, pág. 202, anexo 2) foi observada a banda referente ao estiramento da ligação OH em 3443  $\text{cm}^{-1}$ . Os estiramentos assimétrico e simétrico de ligações C-H de carbono saturado foram associados às bandas em 2937 e 2865  $\text{cm}^{-1}$ . Foi ainda observada uma banda relativa ao estiramento assimétrico de ligação C-O em 1105  $\text{cm}^{-1}$ .

No espectro de massas de alta resolução foi observado o pico  $[M]^{++}$  com  $m/z$  294,2520 (o valor calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$  corresponde a 294,4721). A **Tabela 8** mostra os dados de RMN obtidos para **129**.

**Tabela 8** – Dados de RMN uni e bidimensionais do 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**) em  $\text{CDCl}_3$ . Os valores de  $J$  são apresentados em Hz

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	HMBC (H-C)	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	NOESY
1	-	44,3	-	-	-
2 $\alpha$	3,35-3,39 (m)	88,3	C-1, C-11, C-12, C-1'	H-3 $\alpha$ , H-3 $\beta$	H-12 $\alpha$ , H-13 $\alpha$
3 $\beta$	1,48 (dd, $J=10,0$ ; 11,9)	44,7	C-2, C-4, C-13, C-14	H-2 $\alpha$	H-14 $\beta$
3 $\alpha$	1,66 (dd, $J=5,6$ ; 11,9)		C-1, C-2, C-4, C-5, C-13	H-2 $\alpha$	H-13 $\alpha$
4	-	37,0	-	-	-

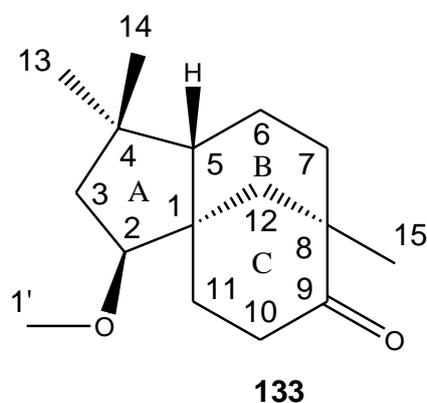
5 $\beta$	1,34-1,42 (m)	50,6	C-6	-	H-14 $\beta$
6	1,28-1,42 (m)	20,6	C-5	H-7 $\beta$	H-13 $\alpha$
6'	1,28-1,42 (m)		C-5	H-7 $\beta$	H-13 $\alpha$
7 $\beta$	1,06-1,14 (m)	33,2	C-9	H-6, H-6'	H-7 $\alpha$ , H-9 $\beta$ , H-10 $\beta$ , H-11 $\beta$
7 $\alpha$	1,34-1,42 (m)		C-9	-	H-7 $\beta$ , H-15
8	-	34,7	-	-	-
9 $\beta$	3,30 (sl)	75,3	C-11	H-10 $\beta$	H-7 $\beta$ , H-10 $\beta$ , H-15
10 $\alpha$	1,55-1,62 (m)	26,1	C-1, C-9	H-10 $\beta$	H-12 $\alpha$
10 $\beta$	1,97 (tdd, $J=3,2$ ; 5,0; 14,2)		-	H-9 $\beta$ , H-10 $\alpha$ , H-11 $\alpha$ , H-11 $\beta$	H-7 $\beta$ , H-9 $\beta$
11 $\alpha$	1,06-1,14 (m)	26,7	C-9	H-10 $\beta$ , H-11 $\beta$	-
11 $\beta$	1,67-1,73 (m)		C-1, C-5	H-10 $\beta$ , H-11 $\alpha$	H-7 $\beta$
12 $\alpha$	0,95-0,99 (m)	36,5	C-1, C-2, C-9	H-12 $\beta$	H-10 $\alpha$ , H-2 $\alpha$
12 $\beta$	1,58 (d, $J=12,8$ )		C-1, C-5, C-7	H-12 $\alpha$	-
13 $\alpha$	0,84 (s)	25,4	C-3, C-4, C-5, C-14	-	H-2 $\alpha$ , H-3 $\alpha$ , H-6
14 $\beta$	1,01 (s)	31,3	C-3, C-4, C-5, C-13	-	H-3 $\beta$ , H-5 $\beta$
15	0,95 (s)	28,4	C-7, C-8, C-9, C-12	-	H-7 $\alpha$ , H-9 $\beta$
1'	3,37-3,46 (m)	70,6	C-2, C-3'	H-2'	-
2'	1,51-1,55 (m)	29,9	C-1', C-3', C-4'	H-1', H-3'	-
3'	1,28-1,33 (m)	28,4	C-4'	H-2'	-
4'	1,28-1,33 (m)	22,6	C-3'	H-5'	-
5'	0,89 (t, $J=7,0$ )	14,1	C-3', C-4'	H-4'	-

### 3.2.1.7 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (133)

Na oxidação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com PCC foi obtida a 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**) (**Figura 61**, pág. 84), com rendimento de 86 %. O mesmo, que possui estado físico oleoso, foi purificado em coluna de sílica gel com eluente hexano/acetato de etila (95:5). Esse produto foi utilizado em reações de biotransformação com o fungo *B. cinerea* em estudos anteriores,

tendo sido obtidos produtos de desmetilação da posição 1', hidroxilação da posição 14 e redução da posição 9.<sup>36</sup>

A cetona **133** foi sintetizada na etapa inicial da obtenção da lactona **134** (item 3.2.1.8), que foi utilizada posteriormente como substrato em uma reação de biotransformação com o fungo *P. minioluteum*. A atribuição dos sinais obtidos dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C para essa molécula (**Figuras 154 a 157**, pág. 203 e 204, anexo 2) foi feita por comparação com dados pré-existentes na literatura e confirmadas pelo mapa de contornos HSQC (**Figura 158**, pág. 205, anexo 2). Foram observadas algumas diferenças em relação aos dados espectroscópicos anteriormente publicados (**Tabela 9**, pág. 86).<sup>36</sup>



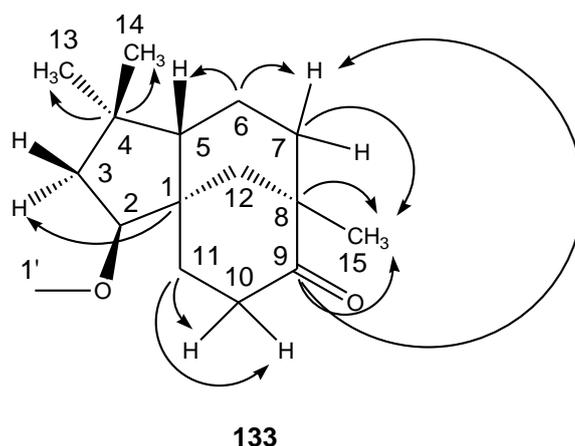
**Figura 61** – Estrutura química da 2β-metoxiclovan-9-ona (**133**).

Os valores dos deslocamentos químicos referentes aos carbonos C-1, C-4 e C-8, todos quaternários, foram publicados como valores intercambiáveis ( $\delta$  44,8, 44,4 e 38,3 ppm, respectivamente). No presente trabalho, a correlação visualizada no mapa de contornos HMBC entre o carbono com  $\delta$  44,4 ppm e os hidrogênios ligados ao carbono C-15, mostrou que esse sinal refere-se ao carbono C-8. Foram também observadas correlações entre o sinal do carbono em  $\delta$  38,3 ppm com H-13 e H-14, evidenciando que este sinal é o do carbono C-4. As correlações entre o sinal do carbono em  $\delta$  44,7 ppm e os hidrogênios H-3 $\alpha$ , H-3 $\beta$  e também H-11 mostraram que este é o deslocamento químico do carbono C-1 (**Figura 159**, pág. 205, anexo 2).

Também os deslocamentos químicos dos carbonos C-6, C-7, C-11 e C-12 foram relatados como possuindo valores intercambiáveis. No mapa de

contornos HMBC, o carbono C-6 ( $\delta$  20,5 ppm) correlacionou-se com H-7, H-7' e H-5 $\beta$ . Foram observadas correlações entre C-7 ( $\delta$  34,0 ppm) e H-15, além de C-9 com H-7 ou H-7' (os hidrogênios ligados ao carbono C-7 foram atribuídos com a ajuda do mapa de contornos HSQC). O sinal de carbono em  $\delta$  32,5 ppm se correlacionou com H-10 e H-10', sendo este o carbono C-11. Dessa forma, o carbono em  $\delta$  42,7 ppm corresponde a C-12, que se correlaciona com H-15 no HMBC. Foram observadas também correlações entre os hidrogênios ligados a C-10 e C-11 no mapa de contornos COSY, mostrando que os mesmos são hidrogênios vicinais (**Figuras 159 a 163**, pág. 205 a 208, anexo 2).

A **Figura 62** mostra algumas das correlações visualizadas que permitiram a atribuição correta dos sinais de C-1, C-4, C-6, C-7, C-8, C-11 e C-12.



**Figura 62** – Estrutura química da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**) mostrando algumas correlações selecionadas, visualizadas no mapa de contornos HMBC.

No espectro no infravermelho obtido para esta cetona foi verificada a ausência da banda correspondente ao estiramento da ligação OH presente no espectro no infravermelho do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) (3399  $\text{cm}^{-1}$ ) e a presença de uma banda correspondente ao estiramento da ligação entre o carbono e o oxigênio da carbonila (1704  $\text{cm}^{-1}$ ), indicando a oxidação dessa molécula (**Figura 164**, pág. 209, anexo 2).

**Tabela 9** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , obtidos e da literatura, para a 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (133) em  $\text{CDCl}_3$ . Os valores de  $J$  são apresentados em Hz

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz) <sup>36</sup>	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz) <sup>36</sup>
1	-	-	44,7	44,8 <sup>a</sup>
2 $\alpha$	3,37 (dd, $J=5,4; 7,8$ )	3,45 (dd, $J=5,5; 12,8$ )	89,1	89,1
3 $\beta$	1,59 - 1,62 (m)	1,57 (dd, $J=12,8; 12,8$ )	44,0	44,0
3 $\alpha$	1,81 (dd, $J=12,7; 5,4$ )	1,79 (dd, $J=12,8; 5,5$ )		
4	-	-	38,3	44,4 <sup>a</sup>
5 $\beta$	1,69-1,74 (m)	-	50,9	50,9
6	1,43-1,61 (m)	1,4-1,6 (m)	20,5	20,5 <sup>b</sup>
6'	1,43-1,61 (m)	1,4-1,6 (m)		
7	1,43-1,61 (m)	1,4-1,6 (m)	34,0	32,5 <sup>b</sup>
7'	1,43-1,61 (m)	1,4-1,6 (m)		
8	-	-	44,4	38,3 <sup>a</sup>
9	-	-	216,4	216,3
10	2,35 (ddd, $J=16,3; 2,3; 6,6$ )	2,33 (ddd, $J=16,4; 2,4; 6,8$ )	35,7	35,7
10'	2,58-2,67 (ddd, $J=7,7; 12,4; 16,3$ )	2,61 (ddd, $J=16,4; 12,4; 7,8$ )		
11	1,69-1,74 (m)	-	32,5	34,0 <sup>b</sup>
11'	1,88 (ddd, $J=13,0; 12,4; 6,6$ )	1,86 (ddd, $J=13,6; 12,4; 6,8$ )		
12	1,43-1,61 (m)	1,4-1,6 (m)	42,7	42,7 <sup>b</sup>
12'	1,43-1,61 (m)	1,4-1,6 (m)		
13 $\alpha$	0,97 (s)	0,95 (s)	26,2	26,2
14 $\beta$	1,08 (s)	1,06 (s)	32,0	32,0
15	1,02 (s)	1,00 (s)	24,9	24,9
1'	3,31 (s)	3,29 (s)	57,7	57,7

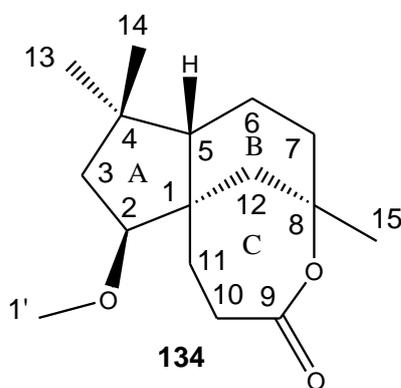
<sup>a, b</sup> Sinais publicados como intercambiáveis

### 3.2.1.8 (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona (134)

A lactona **134** (inérita) (**Figura 63**, pág 87) foi obtida a partir da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**) por uma reação de Baeyer-Villiger com AMCPB. O rendimento obtido foi de 67 %. A purificação inicial foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel, usando-se hexano/acetato de etila (90:10) como fase móvel. O produto foi purificado posteriormente por CLAE, utilizando-se coluna semipreparativa, fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup> e hexano/acetato de etila (80:20) como

eluente, sendo o produto obtido como um sólido branco, que foi coletado na fração com tempo de retenção de 33,50 min.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  são apresentados nas **Figuras 165 e 166** (pág. 209 e 210, anexo 2). Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figuras 167 e 168**, pág. 210 e 211, anexo 2), em conjunto ao subespectro DEPT-135 (**Figura 169**, pág. 211, anexo 2), mostraram a presença de 16 sinais de carbono, dos quais quatro são não hidrogenados (C-1, C-4, C-8 e C-9), dois são terciários (C-2 e C-5), seis são secundários (C-3, C-6, C-7, C-10, C-11 e C-12) e quatro primários (C-13, C-14, C-15 e C-1'). Os carbonos C-2 ( $\delta$  90,7 ppm), C-8 ( $\delta$  80,0 ppm) e C-1' ( $\delta$  58,3 ppm) são oxigenados, enquanto que C-9 ( $\delta$  174,7 ppm) corresponde a uma carbonila de lactona.

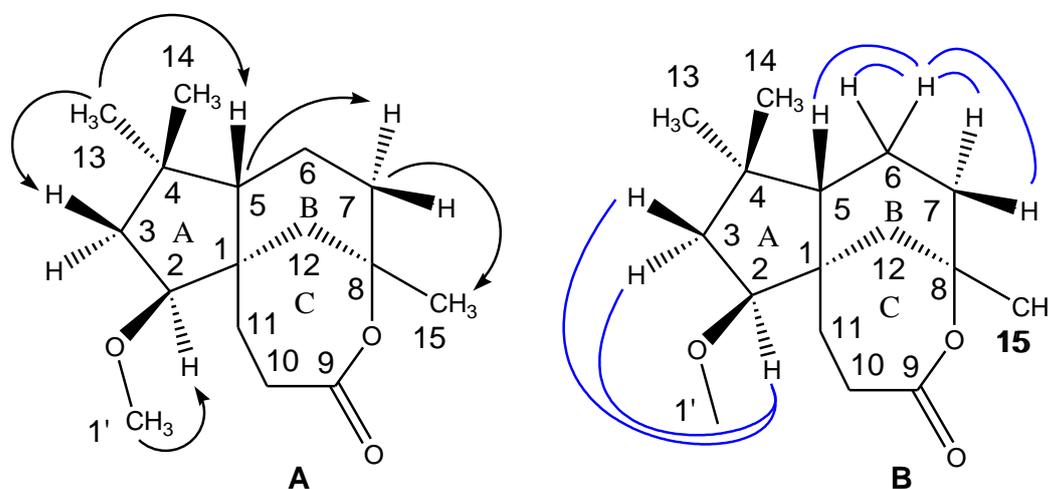


**Figura 63** – Estrutura química da lactona **134**, obtida pela oxidação da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**).

Utilizando-se o mapa de contornos HSQC (**Figura 170**, pág. 212, anexo 2) foi possível correlacionarem os sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  aos sinais dos respectivos carbonos. Pelos mapas de contornos HMBC e  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (**Figuras 171, 172 e 173** respectivamente, pág. 212 a 214, anexo 2) determinou-se a posição de cada carbono e seus respectivos hidrogênios. Para os hidrogênios pertencentes ao anel de 5 membros (anel A), observaram-se as correlações no mapa de contornos HMBC entre H-2 $\alpha$  e C-1, C-11, C-12 e C-1', além de correlações entre H-3 $\alpha$  e C-1, C-2, C-4 e C-13. Já o H-3 $\beta$  correlacionou-se com C-2, C-4, C-13 e C-14. O hidrogênio H-5 $\beta$  (na junção dos anéis A e B) correlacionou-se com os carbonos C-1, C-4, C-13 e C-6, esse último localizado no anel B. O sinal correspondente a H-13 $\alpha$  apresentou

correlação com os sinais de C-3, C-4, C-5 e C-14, e os hidrogênios H-14 $\beta$  apresentaram correlação com C-3, C-4, C-5 e C-13, conforme esperado. Os hidrogênios pertencentes à cadeia lateral, H-1' ( $\delta$  3,32 ppm), correlacionaram-se com o carbono C-2, confirmando a presença do grupo metoxila em C-2. Algumas das correlações observadas no mapa de contornos HMBC são apresentadas na **Figura 64** (estrutura **A**)

Com relação aos hidrogênios ligados aos carbonos C-2 e C-3 foram observadas correlações entre H-2 $\alpha$  e H-3 $\alpha$  e entre H-2 $\alpha$  e H-3 $\beta$  no mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (**Figura 64**, **B**).



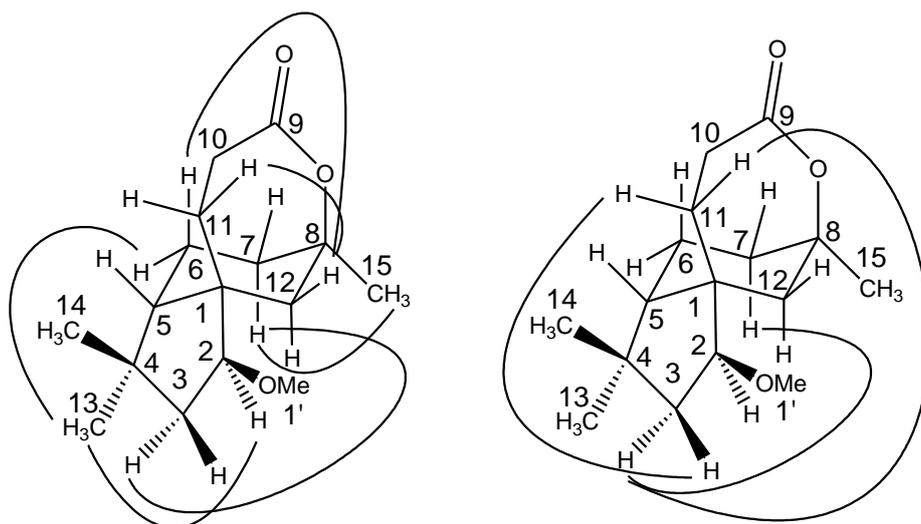
**Figura 64** – Algumas correlações observadas nos mapas de contornos HMBC (setas pretas) e COSY (traços azuis) da lactona **134**.

As correlações observadas no mapa de contornos HMBC para os átomos do anel de seis membros (anel B) (H-7 $\alpha$  e C-5; H-7 $\alpha$  e C-8; H-7 $\beta$  e C-6), também se mostraram coerentes com a estrutura proposta para a lactona **134**. Já o H-12 $\alpha$ , que pertence aos anéis B e C, apresentou correlações com os carbonos C-1, C-5, C-7 do anel B, C-8, de ambos anéis B e C, e com C-11, do anel C. O H-12 $\beta$  mostrou correlação tanto com C-1 e C-2 do anel A, quanto com C-11, do anel C, evidenciando a proximidade entre C-12 e C-11, conforme a estrutura proposta. Os hidrogênios H-15 mostraram correlação com C-7, C-8 e C-12 no mapa de contornos HMBC.

Em relação aos átomos do anel B, foram observadas as correlações entre os hidrogênios H-5 $\beta$  e H-6 $\beta$ ; H-6 $\alpha$  e H-6 $\beta$ ; H-7 $\alpha$  e H-6 $\alpha$ , H-7 $\alpha$  e H-7 $\beta$ ; H-7 $\beta$  e H-6 $\beta$ ; H-12 $\alpha$  e H-12 $\beta$  no mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. Já no anel lactônico (anel C), foram observadas correlações ( $^3J$ ) no mapa de contornos HMBC entre H-10 e C-1, H-11 $\beta$  e C-9, H-11 $\alpha$  e C-9 e também entre H-11 $\beta$  e C-5 e C-9. As posições dos hidrogênios H-10, H-10', H-11 $\beta$  e H-11 $\alpha$  foram confirmadas pelas correlações entre H-11 $\alpha$  e H-10 e / ou H-10', H-11 $\alpha$  e H-11 $\beta$  e também entre H-11 $\beta$  e H-10 e / ou H-10' no mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY.

A estereoquímica da molécula foi determinada pelo mapa de contornos NOESY (**Figuras 174 e 175**, pág. 215, anexo 2). Algumas das principais correlações observadas ao se realizar esse experimento podem ser visualizadas na **Figura 62** (pág. 85). Sabendo-se que as duas etapas de oxidação realizadas para a conversão de **73** em **134** não afetavam o anel de 5 membros, para se determinar a estereoquímica de **134**, partiu-se da orientação  $\alpha$  de H-2 e  $\beta$  de H-5, provenientes do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**). Observaram-se correlações entre o hidrogênio H-2 $\alpha$  ( $\delta$  3,35 ppm), um dos hidrogênios H-12 $\alpha$  ( $\delta$  1,97 ppm) e os hidrogênios do grupo metila C-13, mostrando terem todos a mesma orientação ( $\alpha$ ). Este último apresentou correlação com um dos hidrogênios do carbono metilênico C-6 ( $\delta$  1,57-1,61 ppm) e com um dos hidrogênios de C-3 ( $\delta$  1,75-1,79 ppm), mostrando que esses também se encontram na orientação  $\alpha$ .

O H-3 $\alpha$ , por sua vez, apresentou correlação com um dos hidrogênios H-7 ( $\delta$  1,99-2,04 ppm) e um hidrogênio H-11 ( $\delta$  1,42-1,47 ppm) indicando que os mesmos também estão na mesma face da molécula. Tendo sido estabelecido que este último sinal refere-se a H-11 $\alpha$ , pôde-se determinar que o sinal de H-3 em  $\delta$  1,42-1,47, corresponde a H-3 $\beta$ , já que sua correlação com o outro H-11 (H-11 $\beta$ ) foi observada no mapa de correlações NOESY. Esses dados corroboram a manutenção da orientação espacial dos hidrogênios do produto inicial da síntese, o 2 $\beta$ -methoxyclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), na lactona, como observado na **Figura 65** (pág. 90).



**Figura 65** – Correlações entre hidrogênios da lactona **134** visualizadas no mapa de contornos NOESY.

No espectro no infravermelho obtido para essa molécula (**Figura 176**, pág. 216, anexo 2) a presença da lactona foi associada à banda em  $1712\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento da ligação C=O da carbonila e, em  $1108\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento da ligação C-O.

A atribuição completa dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para **134**, bem como um resumo das correlações encontradas para esta lactona nos mapas de contornos HMBC, COSY e NOESY são apresentados na **Tabela 10**.

**Tabela 10** – Dados de RMN uni e bidimensionais da lactona (**134**) em  $\text{CDCl}_3$ . Os valores de  $J$  são apresentados em Hz

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	HMBC	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	NOESY
1	-	44,8	-	-	-
$2\alpha$	3,35 (dd, $J=5,0; 10,0$ )	90,7	C-1, -11, -12, -1'	H- $3\alpha$ , H- $3\beta$	H- $12\alpha$ , H- $13\alpha$ ,
$3\alpha$	1,75-1,79 (m)	43,8	C-1, -2, -4, -13	H- $2\alpha$	H- $3\beta$ , H- $7\alpha$ , H- $11\alpha$ , H- $13\alpha$
$3\beta$	1,42-1,47 (m)		C-2, -4, -13, -14	H- $2\alpha$	H- $3\alpha$ , H- $11\beta$ ,
4	-	36,8	-	-	-
$5\beta$	1,52-1,58 (m)	51,0	C-1, -4, -6, -13	H- $6\beta$	-
$6\alpha$	1,57-1,61 (m)	20,3	-	H- $6\beta$	H- $12\alpha$ , H-

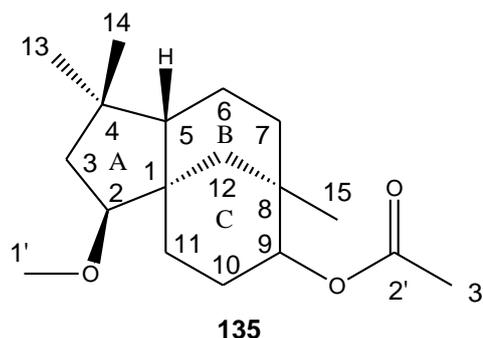
6 $\beta$	1,02-1,15 (m)	-	-	H-5 $\beta$ , H-6 $\alpha$ , H-7 $\alpha$ , H-7 $\beta$	13 H-12 $\beta$
7 $\alpha$	1,99-2,04 (m)	35,5	C-5, -8	H-6 $\beta$ , H-7 $\beta$	H-3 $\alpha$ , H-15
7 $\beta$	1,75-1,82 (m)	-	C-6	H-6 $\beta$ , H-7 $\alpha$	-
8	-	80,0	-	-	-
9	-	174,7	-	-	-
10 e 10'	2,70-2,83 (m, 2H)	32,8	C-1, -9, -11	H-11 $\alpha$ , H-11 $\beta$	H-5 $\beta$
11 $\alpha$	1,42-1,47 (m)	30,7	C-9	H-10, H-10', H-11 $\beta$	H-3 $\alpha$ , H-11 $\beta$ , H-12 $\beta$
11 $\beta$	1,81-1,89 (m)	-	C-5, -9	H-10, H-10', H-11 $\alpha$	H-3 $\beta$ , H-11 $\alpha$
12 $\alpha$	1,97(d, $J=16,0$ )	46,9	C-1, -5, -7, -8, -11	H-12 $\beta$	H-2, H-6 $\alpha$
12 $\beta$	1,60 (m)	-	C-1, -2, -11	H-12 $\alpha$ ,	H-6 $\beta$ , H-11 $\alpha$
13 $\alpha$	0,87 (s)	25,5	C-3, -4, -5, -14	-	H-2, H-3 $\alpha$ , H-6 $\alpha$ , H-14 $\beta$
14 $\beta$	1,07 (s)	31,0	C-3, -4, -5, -13	-	H-13 $\alpha$
15	1,39 (s)	32,2	C-7, -8, -12	-	H-7 $\alpha$
1'	3,32 (s)	58,3	C-2	-	-

### 3.2.1.9 Acetato de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**135**)

A acetilação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) resultou no produto inédito **135** (Figura 66, pág. 92) com 93 % de rendimento. O mesmo, de aspecto oleoso, foi purificado inicialmente por cromatografia em coluna de sílica gel com o eluente hexano/acetato de etila (95:5), sendo obtidos 128,7 mg de uma mistura contendo o produto **135**. Esta mistura foi submetida a CLAE, utilizando-se coluna semipreparativa, fluxo de 3,5 mL.min<sup>-1</sup> e fase móvel hexano/acetato de etila (95:5), levando à obtenção de **135**.

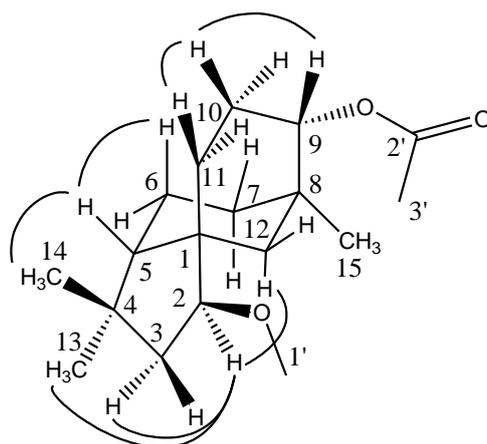
A Tabela 11 (pág. 93) apresenta os dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C obtidos para o produto **135**, bem como as correlações visualizadas para o mesmo nos mapas de contornos HMBC, COSY e NOESY. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H é apresentado nas Figuras 177 e 178, pág. 216 e 217 (anexo 2). O espectro de RMN de <sup>13</sup>C obtido para **135** mostrou a presença de 18 sinais de carbono, dos

quais cinco primários (C-13, C-14, C-15, C-1' e C-3'), seis secundários (C-3, C-6, C-7, C-10, C-11 e C-12), três terciários (C-2, C-5 e C-9) e quatro carbonos não hidrogenados (C-1, C-4, C-8 e C-2'), como evidenciado pelo subespectro DEPT-135 (**Figura 179 a 181**, pág. 217 e 218, anexo 2). Os carbonos C-2 ( $\delta$ 90,0 ppm), C-1' ( $\delta$ 58,1 ppm), C-9 ( $\delta$ 77,1 ppm) e C-2' ( $\delta$ 170,9 ppm) são oxigenados, sendo estes dois últimos pertencentes a um grupamento éster.



**Figura 66** – Estrutura química do acetato de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**135**).

A conexão entre os átomos de carbono e hidrogênio foi feita através do mapa de contornos HSQC (**Figura 182**, pág. 219, anexo 2). Como esperado, a única mudança no produto obtido dessa reação (**135**) em relação ao material de partida (**73**) foi a acetilação de C-9, o que está de acordo com as correlações entre C-2' e H-3' ( $^2J$ ) e C-2' e H-9 $\beta$  ( $^3J$ ) observadas no mapa de contornos HMBC (**Figuras 183 e 184**, pág. 219 e 220, anexo 2). As correlações visualizadas nos mapas de contornos COSY e NOESY (**Figuras 185 e 186**, pág. 221 e 222, anexo 2, respectivamente) também estão de acordo com a estrutura proposta. Na **Figura 67** (pág. 93) são apresentadas algumas das correlações observadas no mapa de contornos NOESY de **135**.



135

**Figura 67** – Algumas correlações do acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**135**) visualizadas no mapa contornos NOESY.

No espectro no infravermelho (**Figura 187**, pág. 222, anexo 2) foram observadas bandas em  $1735\text{ cm}^{-1}$  (estiramento da ligação C=O), referente ao éster formado, e  $1108\text{ cm}^{-1}$  (estiramento de ligação C-O). A ausência da banda em  $3399\text{ cm}^{-1}$  observada no espectro no infravermelho do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**), correspondente ao estiramento da ligação OH presente no material de partida, corrobora com a acetilação de C-9.

**Tabela 11** – Dados de RMN uni e bidimensionais do acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**135**) em  $\text{CDCl}_3$ . Os valores de J são apresentados em Hz

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	HMBC	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	NOESY
1	-	44,0	-	-	-
$2\alpha$	3,30-3,34 (m)	90,0	C-1, C-3, C-4, C-11, C-12, C-1'	H- $3\alpha$ , H- $3\beta$	H- $3\alpha$ , H- $11\alpha$ , H-12, H- $13\alpha$
$3\beta$	1,36-1,48 (m)	43,9	C-1, C-2, C-4, C-13, C-14	H- $2\alpha$ , H- $3\alpha$	-
$3\alpha$	1,73 (dd, $J=8,0; 11,9$ )		C-1, C-2, C-4, C-5, C-13	H- $2\alpha$ , H- $3\beta$	H- $2\alpha$ , H- $6\alpha$ , H- $13\alpha$
4	-	37,0	-	-	-
$5\beta$	1,36-1,48 (m)	50,5	C-2, C-6, C-7	-	H- $6\beta$ , H-

6 $\beta$	1,24-1,34 (m)	20,4	C-1, C-5, C-7, C-8	-	14 $\beta$ H-5 $\beta$
6 $\alpha$	1,36-1,48 (m)		C-1, C-7	-	H-3 $\alpha$ , H- 13 $\alpha$
7 $\beta$	1,08-1,22 (m)	32,8	C-6, C-9	H-7 $\alpha$	H-7 $\alpha$ , H- 9 $\beta$
7 $\alpha$	1,36-1,48 (m)		C-5, C-9, C-15	H-7 $\beta$	H-7 $\beta$
8	-	33,7	-	-	-
9 $\beta$	4,52 (s)	77,1	C-2'	H-10 $\beta$ , H- 10 $\alpha$	H-7 $\beta$ , H- 10 $\beta$ , H- 11 $\beta$ , H- 15
10 $\alpha$	1,54-1,68 (m)	23,3	-	H-9 $\beta$ , H-10 $\beta$	-
10 $\beta$	1,87-1,96 (tdd, $J=3,2$ ; 5,5; 14,2)		-	H-9 $\beta$ , H- 10 $\alpha$ , H-11 $\alpha$	H-9 $\beta$ , H- 11 $\beta$ ,
11 $\alpha$	1,08-1,22 (m)	27,2	C-9	H-10 $\beta$	H-2 $\alpha$
11 $\beta$	1,54-1,68 (m)		C-1, C-5, C-9, C-10	-	H-9 $\beta$ , H- 10 $\beta$ ,
12 $\alpha$	1,02-1,06 (m)	37,4	C-2, C-8, C-9	H-12	H-2 $\alpha$
12 $\beta$	1,62 (d, $J=12$ )		C-1, C-5, C-7, C-8, C-11	H-12'	H-13 $\alpha$
13 $\alpha$	0,85 (s)	25,4	C-3, C-4, C-5, C-14	-	H-2 $\alpha$ , H- 6 $\alpha$ , H- 12', H- 13 $\alpha$
14 $\beta$	1,02 (s)	31,3	C-3, C-4, C-5, C-13	-	H-5 $\beta$
15	0,85 (s)	28,1	C-7, C-8, C-9	-	H-9 $\beta$
1'	3,35 (s)	58,1	C-2	-	-
2'	-	170,9	-	-	-
3'	2,05 (s)	21,3	C-2'	-	-

### 3.2.1.10 (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol (**132**)

O composto (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol (**132**) foi sintetizado com o objetivo de avaliar a sua capacidade de ativação de proteínas quinase C, em comparação ao 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), já que o primeiro possui uma hidroxila adicional em relação a **73**, ligada ao carbono C-15.

Para a síntese de **132**, partiu-se do óxido de cariofileno (**125**) que, por reação com LiBr em presença de TCNE, levou ao 5 $\alpha$ -hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (**130**), que foi epoxidado levando ao (4*S*,5*R*)-5-hidroxicariofil-8(13)-eno (**131**) (**Figura 68**, pág. 95). A comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras**

188 a 191, pág. 223 e 224, anexo 2) obtidos para 130 e 131 com os dados obtidos da literatura é apresentada na Tabela 12.<sup>91, 94</sup>

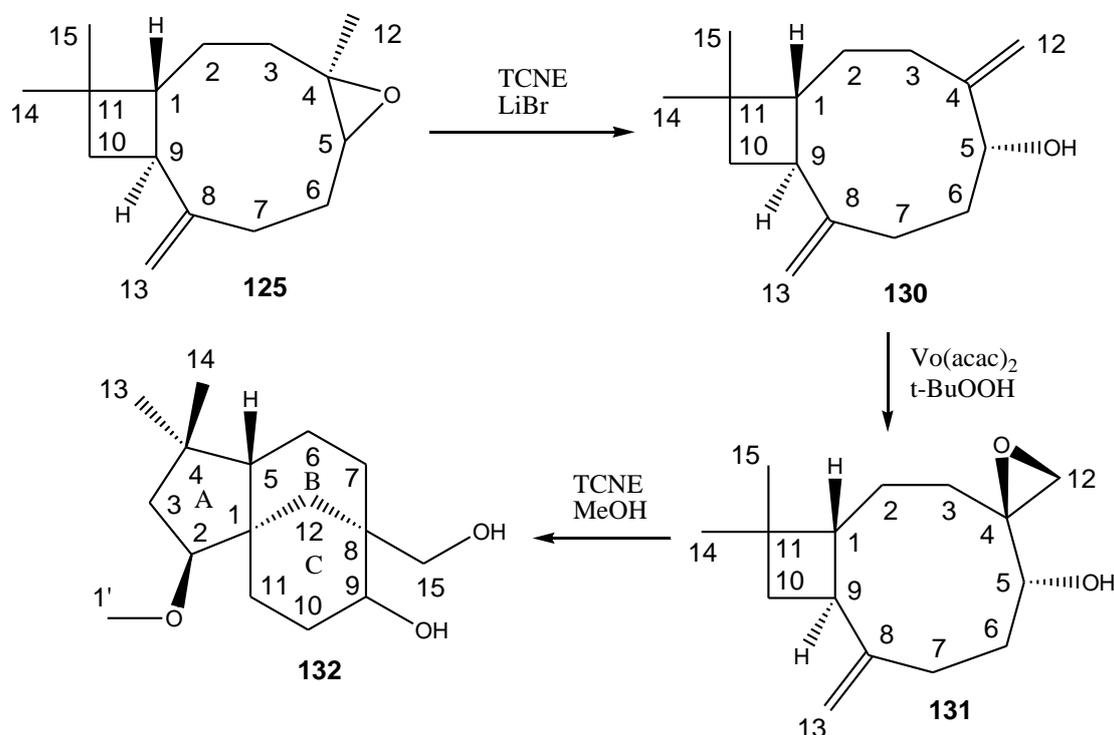


Figura 68 – Esquema de síntese do (2S,9R)-2-metoxiclovan-9,15-diol (132) a partir do óxido de cariofileno (125).

Tabela 12 – Dados de RMN de <sup>1</sup>H obtidos e da literatura, para os compostos 5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (130) e (4S,5R)-5-hidroxicariofil-8(13)-eno (131) em CDCl<sub>3</sub>. Os valores de *J* são apresentados em Hz

Posição	5α-hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (130)		(4S,5R)-5-hidroxicariofil-8(13)-eno (131)	
	δ <sub>H</sub> (400 MHz)	δ <sub>H</sub> (400 MHz) <sup>91</sup>	δ <sub>H</sub> (400 MHz)	δ <sub>H</sub> (400 MHz) <sup>94</sup>
1β	1,51-2,06 (m)	1,50-2,10	1,39-1,78 (m)	1,67 (dd l, <i>J</i> =9,8; 9,8)
2	1,51-2,06 (m)	1,50-2,10	1,39-1,78 (m)	1,40-1,80
2'	1,51-2,06 (m)	1,50-2,10	1,39-1,78 (m)	1,40-1,80
3	1,51-2,06 (m)	1,50-2,10	1,39-1,78 (m)	1,40-1,80
3'	2,50-2,55 (m)	2,51 (ddd l, <i>J</i> =3,9; 3,8; 13,5)	1,39-1,78 (m)	1,40-1,80
5	4,09-4-11 (m)	4,08 (dd, <i>J</i> =3,6; 8,9)	3,83 (t, <i>J</i> =4,9)	3,82 (dd, <i>J</i> =5,0; 5,0)
6β	1,51-2,06 (m)	1,50-2,10	1,39-1,78 (m)	1,78 (dddd, <i>J</i> =10,0; 4,5; 5,1;

6 $\alpha$	1,51-2,06 (m)	1,50-2,10	1,84 (dq, $J=4,9; 9,8$ )	5,0) 1,84 (dddd, $J=10,0; 10,0;$ 5,0; 10,0)
7 $\alpha$	1,51-2,06 (m)	1,50-2,10	2,04-2,10 (m)	2,06 (ddd, $J=12,0; 10,0;$ 4,5)
7 $\beta$	2,28-2,40 (m)	2,28 (m)	2,39-2,49 (m)	2,45 (ddd, $J=12,0; 10,0;$ 5,1)
9 $\alpha$	2,28-2,40 (m)	2,32 (ddd, $J=8,5; 8,5; 8,5$ )	2,39-2,49 (m)	2,42 (ddd, $J=9,8; 9,8; 9,8$ )
10	1,51-2,06 (m)	1,50-2,10	1,39-1,78 (m)	1,40-1,80
10'	1,51-2,06 (m)	1,50-2,10	1,39-1,78 (m)	1,40-1,80
12	4,96 (s)	4,95 (s)	2,64 (d, $J=4,7$ )	2,63 (d, $J=4,7$ )
12'	5,05 (s)	5,04 (s)	2,95 (d, $J=4,7$ )	2,94 (d, $J=4,7$ )
13	4,77 (s)	4,77 (s)	4,93 (s)	4,92 (s)
13'	4,79 (s)	4,78 (s)	4,93 (s)	4,92 (s)
14 $\alpha$	0,98 (s)	0,97 (s)	0,99 (s)	0,98 (s)
15 $\beta$	0,98 (s)	0,97 (s)	1,00 (s)	0,99 (s)

A ciclização de **131** para a formação de **132** e os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  obtidos para o produto (**Figuras 192 a 194**, pág. 225 e 226, anexo 2) foram comparados com os dados existentes na literatura para o (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol (**132**).<sup>94</sup> Verificaram-se algumas discrepâncias na atribuição dos valores de deslocamento químico para os hidrogênios H-6', H-7, H-10 $\alpha$  e H-10 $\beta$ , bem como em relação ao hidrogênio H-11', cuja atribuição não consta na literatura. Os demais dados obtidos correspondem aos já anteriormente publicados, como pode ser visto na **Tabela 13** (pág. 97). Os valores discrepantes foram atribuídos com a ajuda do mapa de contornos HSQC (**Figura 195**, pág. 226, anexo 2).

Os valores de deslocamento químico atribuídos aos carbonos C-1, C-4 e C-8 (carbonos não hidrogenados) foram publicados como intercambiáveis ( $\delta$  38,5, 43,5 e 36,9 ppm, respectivamente).<sup>94</sup> No entanto, com a ajuda do mapa de contornos HMBC (**Figura 196**, pág. 227, anexo 2), foram observadas correlações entre o carbono com deslocamento químico  $\delta$  36,8 ppm com os hidrogênios H-13 $\alpha$  e H-14 $\beta$ , sendo, portanto, esse sinal atribuído a C-4. Já o carbono em  $\delta$  38,5 ppm apresentou correlações com os hidrogênios H-15 e H-

15', e foi atribuído a C-8. Dessa forma, C-1 foi atribuído ao sinal em  $\delta$  43,5 ppm.

Os deslocamentos químicos de C-6, C-7, C-10 e C-11 também foram relatados anteriormente como intercambiáveis.<sup>94</sup> No entanto, o sinal em  $\delta$  28,5 ppm apresentou correlação no mapa de contornos HMBC com os sinais de H-6 e H-12 $\alpha$ , sendo atribuído ao carbono C-7. O sinal de H-6 correlacionou com o sinal do carbono em  $\delta$  20,2 ppm no mapa de contornos HSQC, sendo este sinal, portanto, relativo a C-6.

Os deslocamentos químicos dos carbonos C-10 e C-11 foram atribuídos como sendo  $\delta$  26,2 e 26,6 ppm, respectivamente. No entanto, como são muito próximos, esses valores podem ser trocados um pelo outro. A atribuição do hidrogênio em  $\delta$  1,94 (tdd) como H-10 $\beta$  foi possível devido à correlação no mapa de contornos COSY com H-9 $\beta$  e H-10 $\alpha$  (**Figura 197**, pág. 228, anexo 2). A atribuição completa dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para o produto **132** é apresentada na **Tabela 13**.

No espectro no infravermelho do (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol (**132**) foi observada uma banda intensa em 3399  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento da ligação O-H das hidroxilas ligadas a C-9 e C-15 (**Figura 198**, pág. 229, anexo 2).

**Tabela 13** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , obtidos e da literatura, para o (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovan-9,15-diol (**132**) em  $\text{CDCl}_3$ . Os valores de  $J$  são apresentados em Hz

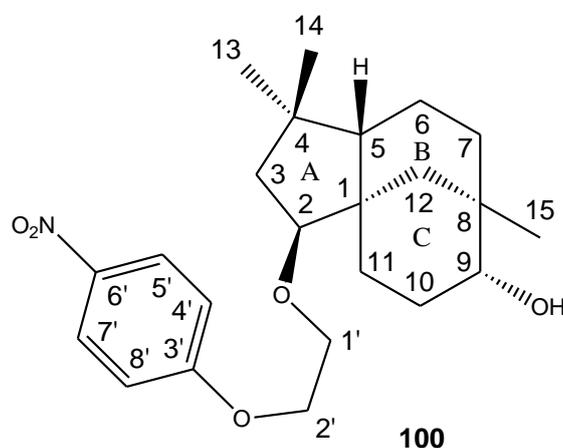
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz) <sup>94</sup>	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz) <sup>94</sup>
1	-	-	43,5	38,5 <sup>a</sup>
2 $\alpha$	3,30-3,40 (m)	3,30-3,40 (m)	90,0	90,0
3 $\beta$	1,38-1,48 (m)	1,44 (dd, $J=11,1; 14,3$ )	44,0	44,0
3 $\alpha$	1,72 (dd, $J=5,6; 11,8;$ )	1,72 (dd, $J=5,8; 11,1$ )		
4	-	-	36,8	43,5 <sup>a</sup>
5 $\beta$	1,38-1,48 (m)	1,39 (m)	51,4	51,4
6	1,12-1,32 (m)	1,10-1,30 (m)	20,2	26,6 <sup>b</sup>
6'	1,38-1,48 (m)	1,10-1,30 (m)		

7	0,86-0,94 (m)	1,10-1,30 (m)	28,5	28,5 <sup>a</sup>
7'	1,12-1,32 (m)	1,10-1,30 (m)		
8	-	-	38,5	36,9 <sup>a</sup>
9 $\beta$	3,65 (sl)	3,66 (sl)	75,6	75,7
10 $\beta$	1,52-1,58 (m)	1,54 (dl, $J=13,4$ )	26,4	20,2 <sup>b</sup>
10 $\alpha$	1,94 (tdd, $J=3,0; 4,8; 14,2$ )	1,76 (ddd, $J=4,7; 13,5; 13,5$ )		
11	1,05-1,10 (m)	1,08 (dl, $J=13,2$ )	26,6	26,6 <sup>b</sup>
11'	1,78 (dd, $J=4,8; 13,5$ )	-		
12 $\alpha$	2,00 (d, $J=12,7$ )	2,00 (d, $J=12,8$ )	31,4	31,4
12 $\beta$	0,98-1,02 (m)	0,95 (d, $J=12,8$ )		
13 $\alpha$	0,84 (s)	0,83 (s)	25,2	25,3
14 $\beta$	1,02 (s)	1,02 (s)	31,1	31,1
15	3,30-3,40 (m)	3,30-3,40 (m)	73,0	73,2
15'	3,57 (d, $J=10,7$ )	3,58 (d)		
1'	3,36 (s)	3,36 (s)	58,3	58,4
OH (C)	-	2,55 (sl)	-	-
OH (C)	-	2,98 (sl)	-	-

<sup>a, b</sup> Sinais publicados como intercambiáveis

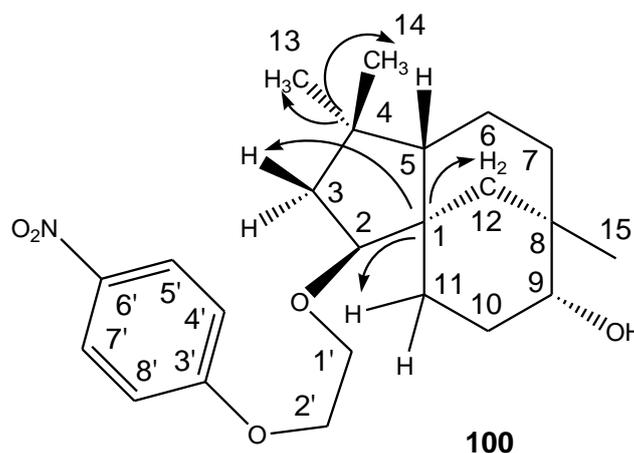
### 3.2.1.11 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**100**)

O 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**100**) (**Figura 69**) foi sintetizado por outro aluno do grupo de pesquisa<sup>37</sup> e, nesse trabalho, foi utilizado para uma biotransformação com o fungo *P. minioluteum*. Esse composto foi testado anteriormente frente à inibição do crescimento do fungo *B. cinerea*, apresentando atividade semelhante à do composto **73**, um dos primeiros clovanos testados para este fim, e que apresenta atividade fungistática comprovada em relação a esse micro-organismo. Nesse estudo, observou-se que clovanos com a cadeia lateral nitrogenada, como **100**, apresentam maior atividade em relação aos sulfurados.<sup>37, 40</sup>



**Figura 69** – Estrutura do 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**100**).

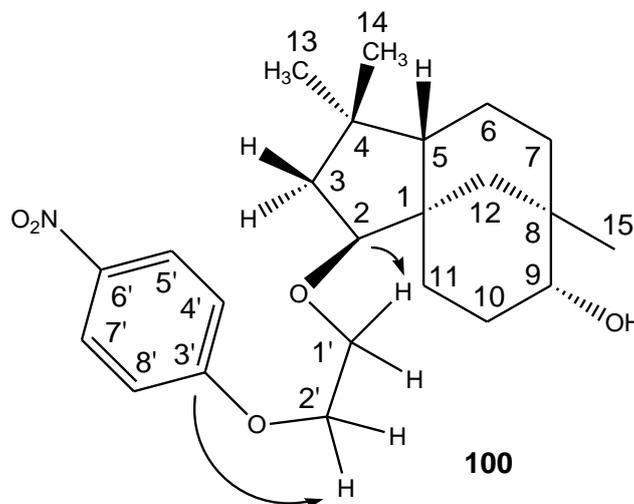
Para a confirmação da estrutura química de **100**, a atribuição dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  obtidos para o mesmo (**Figuras 199 a 202**, pág. 229 a 231, anexo 2) foi feita por comparação com os dados existentes na literatura (**Tabela 14**, pág. 100).<sup>37</sup> Os deslocamentos químicos dos carbonos C-1, C-4 e C-8, relatados como intercambiáveis, puderam ser atribuídos ( $\delta$  44,3, 37,0 e 34,6 ppm, respectivamente) no presente trabalho, utilizando-se o mapa de contornos HMBC (**Figura 203**, pág. 231, anexo 2). O carbono com deslocamento químico 44,4 ppm apresentou correlação com os hidrogênios H-12 $\beta$ , H-3 $\beta$  e H-11 $\beta$ , sendo este o carbono C-1. O sinal do carbono em  $\delta$  37,1 ppm correlacionou com os sinais de H-13 $\alpha$  e H-14 $\beta$ , sendo este o sinal de C-4 e, assim, o sinal do carbono em  $\delta$  34,7 ppm corresponde a C-8. Essas correlações podem ser visualizadas na **Figura 70**.



**Figura 70** – Correlações visualizadas no mapa de contornos HMBC para os carbonos C-1, C-4 e C-8 para **100**.

Por análise do mapa de contornos HMBC (**Figuras 204 e 205**, pág. 232, anexo 2), observou-se que os valores de deslocamento químico atribuídos aos hidrogênios H-1' ( $\delta$  3,78-3,84 ppm) e H-2' ( $\delta$  4,14-4,18 ppm) estavam trocados na literatura, o que é confirmado pela correlação entre C-2 ( $\delta$  89,3 ppm) e H-1' e a correlação entre o carbono em  $\delta$  164,1 ppm (C-3') e o hidrogênio em  $\delta$  4,20 ppm (H-2'). Essas correlações podem ser visualizadas na **Figura 71** (pág. 100). Dessa forma, concluiu-se que o carbono em  $\delta$  141,5 ppm corresponde a C-6'. Os carbonos C-3' e C-6', também haviam sido relatados na literatura como possuindo deslocamentos químicos intercambiáveis. Os valores de

deslocamento químico de C-1' e C-2' foram atribuídos com base no mapa de contornos HSQC (Figura 206, pág. 233, anexo 2).



**Figura 71** – Correlações visualizadas no mapa de contornos HMBC para os carbonos C-2 e C-3' do produto **100**.

**Tabela 14** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , obtidos e da literatura, para o 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**100**) em  $\text{CDCl}_3$ . Os valores de  $J$  são apresentados em Hz

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz) <sup>37</sup>	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz) <sup>37</sup>
1	-	-	44,4	44,3 <sup>a</sup>
2 $\alpha$	3,49 (dd, $J=5,6$ ; 10,1)	3,51 (dd, $J=5,6$ ; 4,4)	89,3	89,2
3 $\alpha$	1,53 (dd, $J=10,1$ ; 12,0)	1,50-1,54 (m)	44,5	44,4
3 $\beta$	1,65-1,73 (m)	1,50-1,54 (m)		
4	-	-	37,1	37,0 <sup>a</sup>
5 $\beta$	1,21-1,44 (m)	1,31-1,38 (m)	50,5	50,4
6 $\alpha$	1,21-1,44 (m)	1,22-1,30 (m)	20,6	20,5
6 $\beta$	1,21-1,44 (m)	1,31-1,38 (m)		
7 $\alpha$	1,04-1,16 (m)	1,22-1,30 (m)	33,0	32,9
7 $\beta$	1,21-1,44 (m)	1,31-1,38 (m)		
8	-	-	34,7	34,6 <sup>a</sup>
9 $\beta$	3,31 (sl)	3,28 (sl)	75,1	75,0
10 $\alpha$	1,51-1,57 (m)	1,50-1,54 (m)	26,0	25,9
10 $\beta$	1,97 (tdd, $J=3,2$ ; 5,0; 14,2)	1,93 (m)		
11 $\alpha$	1,04-1,16 (m)	1,08 (m)	26,7	26,6
11 $\beta$	1,65-1,73 (m)	1,66 (m)		
12 $\alpha$	0,96-1,00 (m)	0,96 (d, $J=12,6$ )	36,5	36,4
12 $\beta$	1,59 (d, $J=12,7$ )	1,56 (d, $J=12,6$ )		
13 $\alpha$	0,86 (s)	0,82 (s)	25,4	25,3

14 $\beta$	1,02 (s)	0,98 (s)	31,3	31,2
15	0,94 (s)	0,91 (s)	28,3	28,3
1'a	3,79-3,88 (m)	3,78-3,84 (m)	68,6	68,4
1'b	3,79-3,88 (m)	3,78-3,84 (m)		
2'a	4,18-4,21 (m)	4,14-4,18 (m)	68,5	68,5
2'b	4,18-4,21 (m)	4,14-4,18 (m)		
3'	-	-	141,5	140,2
4'	6,98 (d, $J=9,4$ )	6,95 (d, $J=9,4$ )	114,7	114,6
5'	8,19 (d, $J=9,4$ )	8,15 (d, $J=9,4$ )	125,8	125,7
6'	-	-	164,0	164,0
7'	8,19 (d, $J=9,4$ )	8,15 (d, $J=9,4$ )	125,8	125,7
8'	6,98 (d, $J=9,4$ )	6,95 (d, $J=9,4$ )	114,7	114,6

<sup>a</sup> Sinais publicados como intercambiáveis

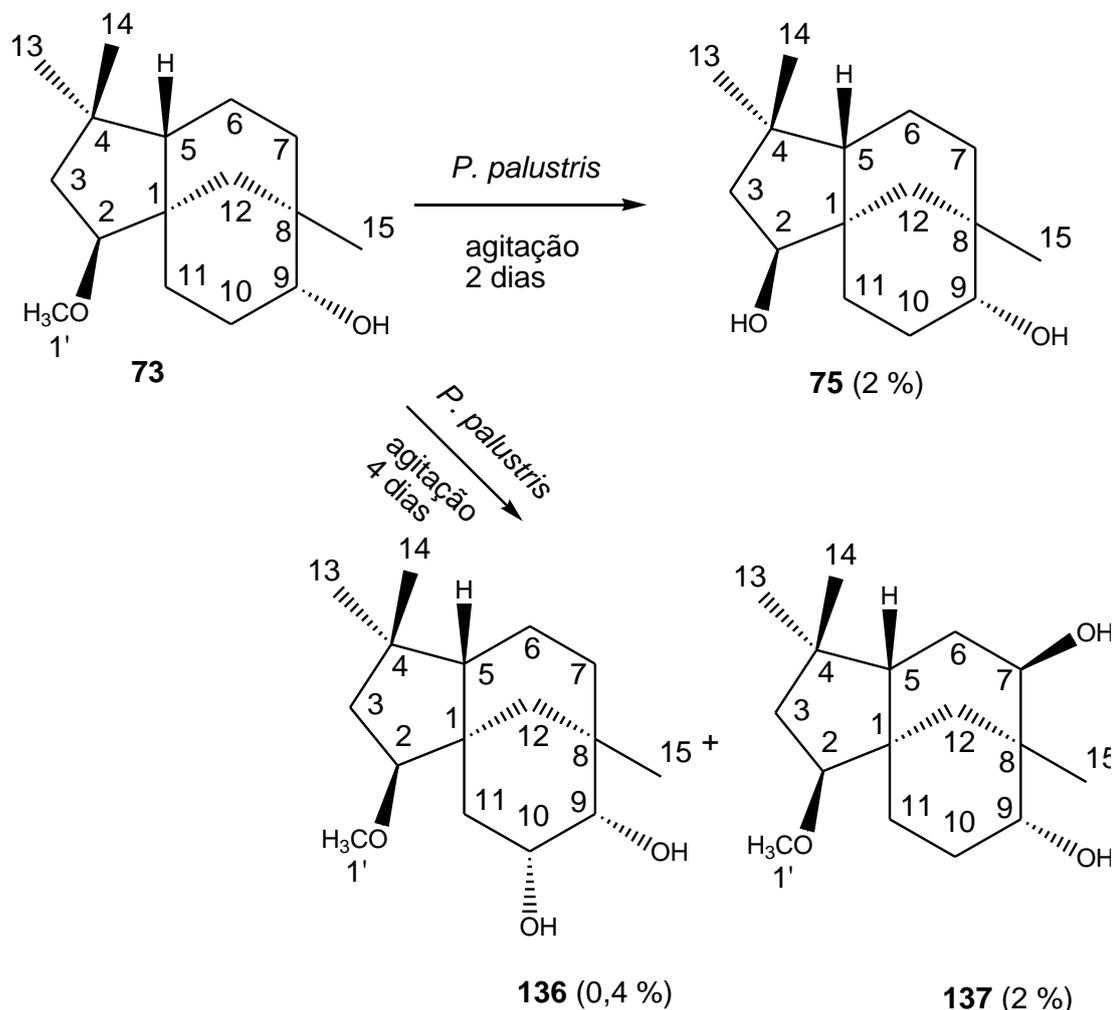
### 3.3 Biotransformações dos clovanos com os fungos *P. palustris*, *P. citrinum*, *P. jackzewskii* e *P. minioluteum*

#### 3.3.1 Biotransformações sob agitação

Foram feitas duas biotransformações sob agitação, uma com o fungo *P. palustris* e outra com *P. janczewskii*, sendo utilizado, em ambas, o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) como substrato. Os meios de cultura dessas biotransformações, assim como as demais realizadas nesse trabalho, foram extraídos com acetato de etila. Um bioensaio realizado anteriormente às reações de biotransformação para avaliar a toxicidade do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) frente os micro-organismos (item 3.9.2) mostrou que, na concentração de 200 ppm, o crescimento do fungo foi fortemente inibido pelo substrato. Dessa forma, procederam-se estas biotransformações com o substrato em uma concentração menor (100 ppm).

Na biotransformação de **73** com o fungo *P. palustris* por dois dias, obteve-se, como produto, o clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**) (2,7 mg; 2 %),<sup>36</sup> resultante da desmetilação da posição 1' do substrato. Já com quatro dias, foram obtidos dois produtos que ainda não tinham sido descritos na literatura, o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**) (0,8 mg; 0,4 %), resultante da hidroxilação do carbono 10 do substrato na posição  $\alpha$ , e o 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ , 9 $\alpha$ -diol (**137**) (3,4 mg; 2 %), proveniente da hidroxilação do carbono C-7 na posição  $\beta$ , como

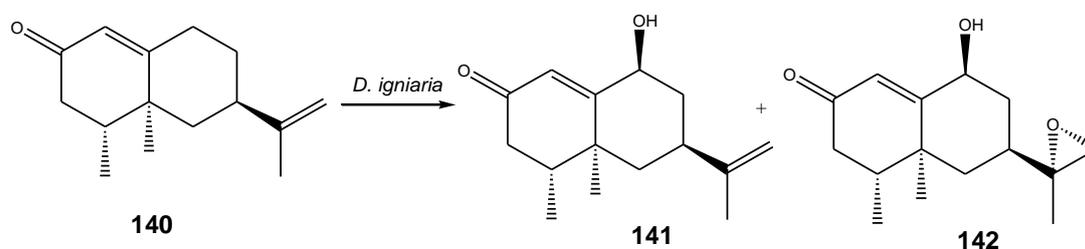
pode ser visto na **Figura 72**. Na biotransformação realizada por dois dias foram recuperados 77,3 mg (44 %) do substrato **73** e, por quatro dias, 52,6 mg (26 %).



**Figura 72** – Esquema da reação de biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) sob agitação por dois e quatro dias com o fungo *P. palustris*.

A purificação do produto **75** foi iniciada por cromatografia em coluna de sílica gel, sendo eluído, ainda impuro, com hexano/acetato de etila (60:40). A purificação final foi feita por CLAE, com coluna semipreparativa, fluxo de 3,0 mL.min<sup>-1</sup> e eluente hexano/acetato de etila (50:50), sendo o mesmo obtido na fração coletada em tempo de retenção de 58,83 min. Esse produto já havia sido obtido anteriormente da biotransformação de **73** com o fungo *B. cinerea*, com rendimentos pequenos (4 e 7 %), no entanto, maiores que o obtido com *P. palustris* sob agitação.<sup>36</sup> O composto **75** também já foi obtido pelo tratamento ácido do óxido de cariofileno (**125**) com rendimento de 50%.<sup>112</sup>

Os produtos **136** e **137**, também foram obtidos por cromatografia em coluna de sílica gel, sendo eluídos inicialmente com hexano/acetato de etila (70:30 e 60:40). Estando ainda impuros, foram purificados por CLAE, com coluna semipreparativa, fluxo de 3,0 mL.min<sup>-1</sup> e eluente hexano/acetato de etila 50:50 (tempos de retenção de 36,20 e 56,23 min, respectivamente). Os rendimentos obtidos também foram baixos (0,4 % para **136**, e 2 % para **137**). No entanto, há relatos de hidroxilações de sesquiterpenos com fungos com rendimentos elevados, como a conversão do (+)-nootkatano (**140**), encontrado em uvas, pelo fungo *Didymosphaerya igniaria*, nos produtos **141** e **142**, com rendimentos de 70 e 19 % respectivamente (**Figura 73**),<sup>113</sup> indicando que rendimentos melhores podem ser obtidos, desde que sejam otimizadas as condições.



**Figura 73** – Biotransformação do (+)-nootkatano (**140**) por *D. igniaria*.<sup>113</sup>

As biotransformações de **73** com o fungo *P. janczewskii* (quatro e sete dias de incubação), não levaram à produção de derivados, conforme avaliação por CCD.

### 3.3.1.1 Clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**)

Os dados de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C (**Figuras 207 a 209**, pág. 233 e 234, anexo 2) obtidos para **75** foram atribuídos por comparação com os dados da literatura,<sup>36</sup> (**Tabela 15**, pág. 104), corroborando a desmetilação da posição 1' do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**).

No espectro no infravermelho obtido para esse produto (**Figura 210**, pág. 235, anexo 2) foi observada uma banda intensa em 3413 cm<sup>-1</sup> devido ao estiramento da ligação O-H referente à hidroxila ligada a C-9 e também àquela formada pela desmetilação da posição 1' de **73**. Não foi observada a banda intensa em 1116 cm<sup>-1</sup> observada no espectro no infravermelho do 2 $\beta$ -

metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), referente ao estiramento assimétrico de ligação C-O dessa molécula.

O composto **75** foi submetido à análise por CG-EM. O tempo de retenção observado para o mesmo foi de 8,26 min, como visualizado no cromatograma obtido (**Figura 211**, pág. 235, anexo 2). O espectro de massas obtido para o mesmo é apresentado na **Figura 212** (pág. 236, anexo 2). Na **Figura 74** (pág. 105) é apresentada uma proposta de fragmentação de **75** a partir dos principais picos observados nesse espectro.

**Tabela 15** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , obtidos e da literatura, para o clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**) em  $\text{CDCl}_3$ . Os valores de  $J$  são apresentados em Hz

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz) <sup>36</sup>	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz) <sup>36</sup>
1	-	-	44,2	44,6
2	3,79 (dd, $J=10,0$ ; 5,8)	3,79 (dd, $J=10,5$ ; 5,5)	80,9	80,8
3 $\beta$	1,51 (dd, $J=10,0$ ; 12,0)	1,51 (dd, $J=11,5$ ; 10,0)	47,6	47,5
3 $\alpha$	1,72 (dd, $J=12,0$ ; 5,8)	1,71 (dd, $J=11,5$ ; 5,5)		
4	-	-	37,2	37,1
5 $\beta$	1,25-1,68 (m)	1,42 (m)	50,5	50,6
6	1,25-1,68 (m)	1,32 (m)	20,7	20,7
6'	1,25-1,68 (m)	1,35 (m)		
7	1,06-1,15 (m)	1,11 (m)	33,1	33,2
7'	1,25-1,68 (m)	1,50 (m)		
8	-	-	34,7	34,7
9 $\beta$	3,33 (sl)	3,32 (sl)	75,1	75,1
10 $\beta$	1,95-2,05 (m)	1,99 (m)	26,0	26,0
10 $\alpha$	1,25-1,68 (m)	1,64 (m)		
11 $\beta$	1,06-1,15 (m)	1,07 (m)	26,4	26,4
11 $\alpha$	1,59-1,68 (m)	1,66 (m)		
12 $\beta$	0,91-0,94 (m)	0,91 (br d, $J=12,5$ )	35,5	35,6
12 $\alpha$	1,55 (d, $J=12,7$ )	1,56 (d, $J=12,5$ )		
13 $\alpha$	0,86 (s)	0,86 (s)	25,4	25,4
14 $\beta$	1,04 (s)	1,04 (s)	31,5	31,4
15	0,96 (s)	0,96 (s)	28,3	28,4

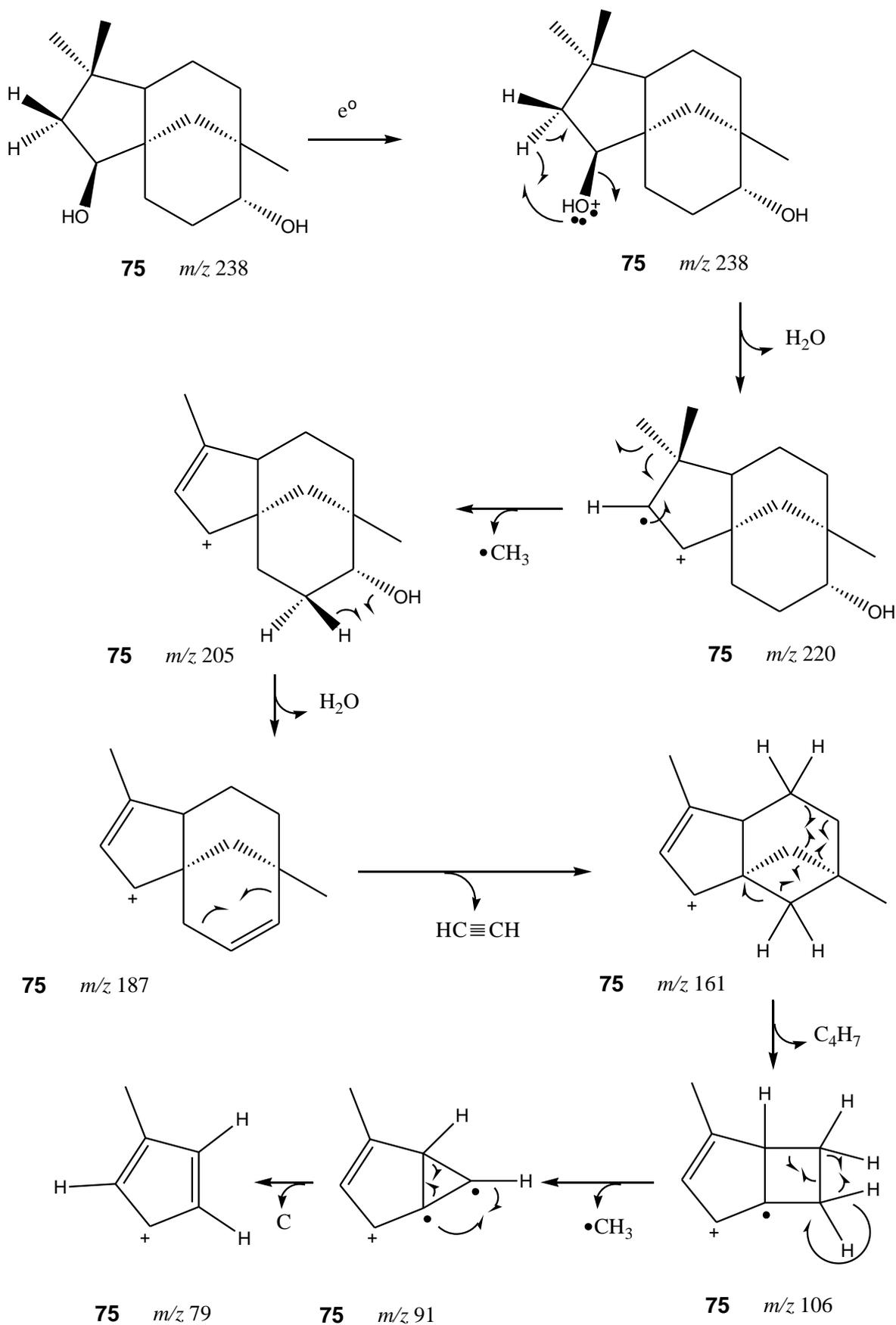


Figura 74 – Proposta de fragmentação do clovan-2β-9α-diol (75) por espectrometria de massas.

### 3.3.1.2 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**)

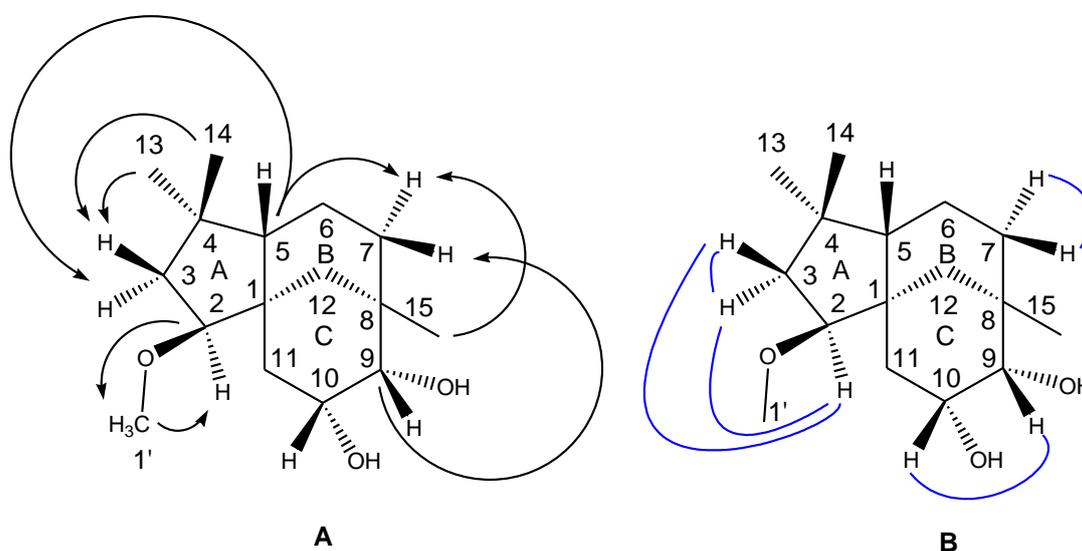
O produto 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**) teve a sua estrutura elucidada com base nos espectros unidimensionais de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (**Figuras 213 a 216**, pág. 236 a 238, anexo 2) e bidimensionais HSQC (**Figuras 217 e 218**, pág. 238 e 239) (na **Figura 219**, pág. 239, anexo 2, está apresentado também um experimento de HSQC editado, no qual os sinais são indicados de acordo com o número de hidrogênios ligados ao respectivo átomo de carbono, sendo que, carbonos ligados a um ou três hidrogênios apresentam fase positiva, carbonos ligados a dois átomos de hidrogênio fase negativa e carbonos não hidrogenados não apresentam correlação),<sup>114</sup> HMBC (**Figuras 220 a 222**, pág. 240 a 241), COSY (**Figuras 223 e 224**, pág. 242 e 243), e NOESY (**Figuras 225 a 227**, pág. 244 e 245). Os experimentos foram realizados em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , com o aparelho operando a 600 MHz para  $^1\text{H}$ , exceto o experimento NOESY, apresentado na **Figura 228** (pág. 245, anexo 2), que foi obtido em  $\text{CDCl}_3$ , a 400 MHz.

A análise inicial dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostrou a presença de 16 sinais de carbono, sendo que o valor do deslocamento químico do carbono C-10 ( $\delta$  26,0 ppm no substrato **73**), passou para  $\delta$  68,0 ppm no produto obtido, indicando uma oxidação desse carbono (terciário no produto, de acordo com o mapa de contornos HSQC editado).

Pela análise do mapa de contornos HSQC editado observou-se a presença de quatro sinais de carbonos primários (C-13, C-14, C-15 e C-1'), cinco secundários (C-3, C-6, C-7, C-11 e C-12), quatro carbonos terciários (C-2, C-5, C-9 e C-10), sendo dois oxigenados (C-9, com  $\delta$  78,5 ppm e C-10, com  $\delta$  68,0 ppm) e três quaternários (C-1, C-4 e C-8). Os carbonos C-2 ( $\delta$  90,9 ppm) e C-1' ( $\delta$  58,5 ppm) apresentaram  $\delta$  correspondentes a de carbonos oxigenados.

Através do mapa de contornos HSQC foi estabelecida a conectividade entre os átomos de carbono e hidrogênio, confirmada posteriormente pelos mapas de contornos HMBC e COSY. No HMBC, as correlações entre o hidrogênio H-2 $\alpha$  e o carbono C-1' ( $^3J$ ) e entre H-1' e C-2 ( $^3J$ ) confirmaram a

manutenção do grupo metila C-1' em **136**, indicando não ter ocorrido desmetilação, como ocorreu na biotransformação de **73** por *P. palustris* por dois dias, formando **75**. O hidrogênio H-3 $\alpha$  apresentou correlações com os carbonos C-1, C-2, C-4, C-5 e C-13, e H-3 $\beta$  com C-1, C-2, C-4, C-13 e C-14. Os hidrogênios H-13 $\alpha$  e H-14 $\beta$ , por sua vez, correlacionaram-se com C-3, C-4 e C-5, da mesma forma que H-13 $\alpha$  com C-14 $\beta$  ( $^3J$ ) e H-14 $\beta$  com C-13 ( $^3J$ ). Algumas das correlações observadas estão apresentadas na **Figura 75 (A)**. Foram observadas, no mapa de contornos COSY, correlações entre H-3 $\alpha$  e H-3 $\beta$ , e de H-2 $\alpha$  com esses dois hidrogênios (**Figura 75, B**).



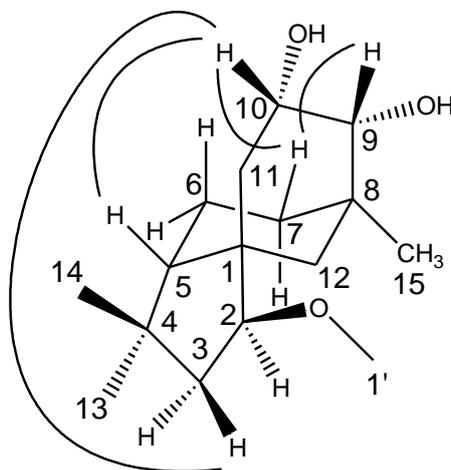
**Figura 75** – Algumas correlações observadas nos mapas de contornos HMBC (setas pretas) e COSY (traços azuis) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**).

No anel B, no mapa de contornos HMBC, foram observadas, dentre outras, correlações entre H-5 $\beta$  e C-6 e H-5 $\beta$  e C-12. No mapa de contornos COSY foram observadas correlações entre H-7 $\beta$  e H-6 e / ou H-6', H-7 $\beta$  e H-7 $\alpha$  e também entre este último hidrogênio e H-6 e / ou H-6', mostrando que os carbonos metilênicos C-6 e C-7 não são hidroxilados em **136**. Os deslocamentos químicos de H-6 e H-6' não puderam ser definidos com o auxílio do mapa de contornos HSQC. No entanto, os valores foram atribuídos com base nos deslocamentos químicos obtidos para esses hidrogênios para o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) (**Tabela 4**, pág. 68), 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**126**) (**Tabela 5**, pág. 72), 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) (**Tabela 6**, pág. 76), 2 $\beta$ -

butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**) (Tabela 7, pág. 79) e 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**) (Tabela 8, pág. 82), estruturalmente homólogos a **136**. Essa atribuição, entretanto, não é inequívoca, por falta de dados para a sua comprovação.

Já no anel C foram observadas correlações no mapa de contornos HMBC entre o carbono hidroxilado C-9 ( $\delta$  78,5 ppm) e os hidrogênios H-7 $\beta$ , H-11 $\beta$ , H-11 $\alpha$ , H-12' e H-15 (todos do tipo  $^3J$ ). O carbono C-10 ( $\delta$  68,0 ppm), também hidroxilado, correlacionou-se com os hidrogênios H-11 $\beta$  ( $^2J$ ) e H-11 $\alpha$  ( $^2J$ ). No mapa de contornos COSY foram observadas ainda correlações entre H-10 $\beta$  e H-9 $\beta$ , H-10 $\beta$  e H-11 $\beta$ , H-10 $\beta$  e H-11 $\alpha$ , H-11 $\beta$  e H-11 $\alpha$  e também entre H-12 e H-12'.

A posição da hidroxila presente em C-10 foi determinada como  $\alpha$  devido às correlações observadas para H-10 $\beta$  com H-3 $\beta$ , H-5 $\beta$  e H-7 $\beta$ , no mapa de contornos NOESY, como pode ser visualizado na Figura 76. Outras correlações importantes observadas foram aquelas entre H-7 $\alpha$  e H-13 $\alpha$  e também entre H-3 $\beta$  e H-14 $\beta$ . Como pode ser observado na Tabela 16 (pág. 109), o alto valor da constante de acoplamento entre H-10 $\beta$  e H-11 $\alpha$  (12,3 Hz) corrobora a posição diaxial desses átomos na molécula.



**136**

**Figura 76** – Correlações visualizadas no mapa de contornos NOESY do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**).

A banda referente ao estiramento da ligação O-H foi observada em 3420  $\text{cm}^{-1}$  no espectro no infravermelho (Figura 229, pág. 246, anexo 2) e, em 2928 e 2867  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes aos estiramentos assimétrico e simétrico de C-H

de carbono saturado. A banda referente ao estiramento assimétrico de ligação C-O foi observada em  $1100\text{ cm}^{-1}$ .

Foi observado, por espectrometria de massas de alta resolução o íon  $[M]^+$  com  $m/z$  268,2024 para **136** (calculado 268,3906 para  $C_{16}H_{28}O_3$ ). Os dados de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  obtidos para o produto **136**, assim como as correlações visualizadas para o mesmo nos mapas de contornos HMBC, COSY e NOESY podem ser visualizados na **Tabela 16**.

**Tabela 16** – Dados de RMN uni e bidimensionais do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ ,  $10\alpha$ -diol (**136**) em  $CD_3OD$ . Os valores de  $J$  são apresentados em Hz

Posição	$\delta_H$ (600 MHz)	$\delta_C$ (150 MHz)	HMBC	$^1H$ - $^1H$ COSY	NOESY
1	-	45,9	-	-	-
$2\alpha$	3,38 (dd, $J=5,6;$ 10,2)	90,9	C-1'	H- $3\alpha$ , H- $3\beta$	-
$3\alpha$	1,72 (dd, $J=5,6;$ 12,0)	45,2	C-1, C-2, C-4, C-5, C-13	H- $2\alpha$ , H- $3\beta$	H- $3\beta$
$3\beta$	1,44-1,51 (m)		C-1, C-2, C-4, C-13, C-14	H- $2\alpha$ , H- $3\alpha$	H- $3\alpha$ , H- $14\beta$ , H- $10\beta^*$
4	-	38,4	-	-	-
$5\beta$	1,44-1,51 (m)	52,7	C-6, C-12		H- $10\beta^*$
6 e 6'	1,32-1,41 (m)	21,4	C-1, C-7	H- $7\beta$	-
$7\alpha$	1,32-1,41 (m)	33,6	C-5, C-6, C-8, C-15	H- $7\beta$	H- $7\beta^*$ , H- $13\alpha$
$7\beta$	1,17-1,19 (m)		C-6, C-9	H-6, H-6', H- $7\alpha$	H- $7\alpha^*$ , H- $9\beta$ , H- $10\beta^*$
8	-	36,1	-	-	-
$9\beta$	3,21 (d, $J=3,5$ )	78,5	-	H- $10\beta$	H- $7\beta$
$10\beta$	3,94 (ddd, $J=3,5;$ 5,4; 12,3)	68,0	-	H- $9\beta$ , H- $11\beta$ , H- $11\alpha$	H- $3\beta^*$ , H- $5\beta^*$ , H- $7\beta^*$

11 $\beta$	1,32-1,41 (m)	36,7	C-1, C-9, C-10	H-10 $\beta$ , H-11 $\alpha$	H-11 $\alpha$ , H-1'
11 $\alpha$	1,54 (t, $J=12,3$ )		C-1, C-5, C-9, C-10, C-12	H-10 $\beta$ , H-11 $\beta$	H-11 $\beta$
12	0,96 (dl, $J=12,7$ )	36,6	C-1, C-2	H-12'	H-12'
12'	1,59 (d, $J=12,7$ )		C-1, C-5, C-7, C-8, C-9	H-12	H-12
13 $\alpha$	0,86 (s)	25,7	C-3, C-4, C-5, C-14	-	H-7 $\alpha$
14 $\beta$	1,03 (s)	31,6	C-3, C-4, C-5, C-13	-	H-3 $\beta$
15	0,98 (s)	28,9	C-7, C-9	-	-
1'	3,33 (s)	58,5	C-2	-	H-11 $\beta$

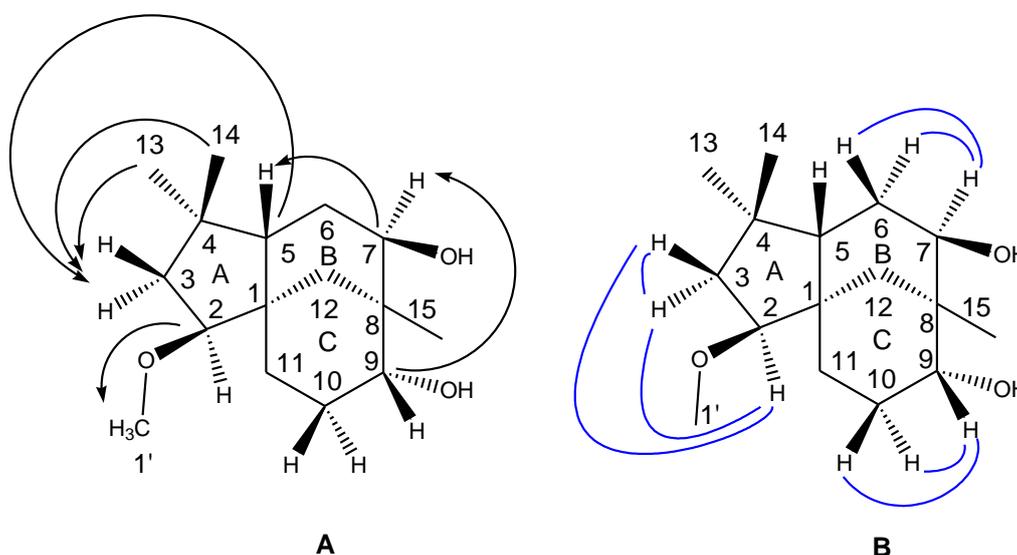
\* Dados obtidos em CDCl<sub>3</sub>, com experimentos realizados a 400 MHz.

### 3.3.1.3 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (**137**)

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H (**Figuras 230 e 231**) e de <sup>13</sup>C (**Figuras 232 e 233**), subespectro DEPT-135 (**Figura 234**) apresentados nas pág. 246 a 248, anexo 2, do 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (**137**), mostraram semelhança com aqueles do material de partida [carbonos C-2 ( $\delta$  89,8 ppm), C-7 ( $\delta$  76,5 ppm), C-9 ( $\delta$  68,5 ppm) e C-1' ( $\delta$  57,2 ppm)], exceto pela presença de um carbono oxigenado ( $\delta$  76,5 ppm) adicional. Não foi observada a presença do sinal do carbono metilênico C-7 ( $\delta$  33,1 ppm no material de partida, **73**), tendo-se proposto ter ocorrido a hidroxilação de C-7.

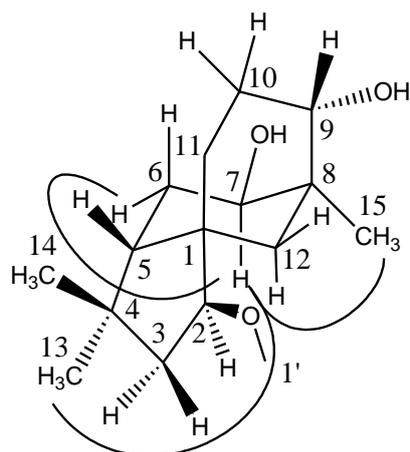
Os mapas de contornos HSQC, **Figura 235**, HMBC, **Figuras 236 a 238**, COSY, **Figuras 239 e 240**, e NOESY, **Figuras 241 e 242**, são apresentados nas pág. 249 a 253, respectivamente. No mapa de contornos HMBC, o carbono metilênico C-3 apresentou correlações com H-13 (<sup>3</sup> $J$ ) e H-14 (<sup>3</sup> $J$ ). Já o carbono C-10 correlacionou-se com H-11(<sup>2</sup> $J$ ), e C-11 com H-10 $\beta$  (<sup>2</sup> $J$ ). No mapa de contornos COSY, foram obtidas correlações entre H-2 $\alpha$  e H-3 $\alpha$ , H-2 $\alpha$  e H-3 $\beta$ , e entre H-9 $\beta$  e H-10 $\alpha$ , H-9 $\beta$  e H-10 $\beta$ , H-10 $\alpha$  e H-10 $\beta$ , além de H-10 $\beta$  e H-11.

O carbono C-7 se correlacionou, no mapa de contornos HMBC, com os hidrogênios H-5 $\beta$ , H-6 $\alpha$ , H-6 $\beta$ , H-12 $\beta$  e H-15. O hidrogênio H-7 $\alpha$ , também no mapa de contornos HMBC, correlacionou-se com C-9. O sinal de H-7 $\beta$  se correlacionou no mapa de contornos COSY com os de H-6 $\beta$  e H-6 $\alpha$ . Algumas das correlações obtidas para **137** estão apresentadas na **Figura 77** (**A**, visualizadas no mapa de contornos HMBC e **B**, visualizadas no mapa de contornos COSY). Na **Tabela 17** (pág. 112) estão apresentadas as demais correlações observadas para **137** nos mapas de contornos HMBC, COSY e NOESY, bem como os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 77** – Algumas correlações visualizadas nos mapas de contornos HMBC (**A**, setas pretas) e COSY (**B**, traços azuis) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (**137**).

O valor alto da constante de acoplamento entre H-7 $\alpha$  e H-6 $\alpha$  (7,6 MHz), indica que esses átomos poderiam estar em posição diaxial. No entanto, utilizando-se o mapa de contornos NOESY, determinou-se a hidroxilação em C-7 como sendo na posição  $\beta$ , observando-se as correlações entre H-7 $\alpha$  e H-6 $\alpha$ , H-7 $\alpha$  e H-13 $\alpha$ , H-6 $\alpha$  e H-13 $\alpha$ , além das correlações entre H-2 $\alpha$  com H-3 $\alpha$  e H-2 $\alpha$  com H-13 $\alpha$ , e também de H-14 $\beta$  com H-5 $\beta$  (**Figura 78**, pág.112).



137

**Figura 78** – Correlações visualizadas no mapa de contornos NOESY do 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (**137**).

Observou-se no espectro de massas de alta resolução de **137**, o pico do íon molecular com  $m/z$  268,1979. O valor calculado para C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> é de 268,3906.

No espectro no infravermelho (**Figura 243**, pág. 254, anexo 2) foi observada a banda em 3411 (estiramento da ligação O-H) referente às hidroxilas ligadas a C-9 e C-7. As bandas observadas em 2930 e 2867 cm<sup>-1</sup>, correspondem aos estiramentos assimétrico e simétrico de C-H de carbono saturado. A banda em 1048 cm<sup>-1</sup> foi atribuída ao estiramento assimétrico de ligação C-O.

**Tabela 17** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C para o 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (**137**) em CDCl<sub>3</sub>. Os valores de  $J$  são apresentados em Hz.

Posição	$\delta_H$ (400 MHz)	$\delta_C$ (100 MHz)	HMBC	<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY	NOESY
1	-	46,5	-	-	-
2 $\alpha$	3,19 (dd, $J=4,0$ ; 5,4)	89,8	C-4, C-5	H-3 $\alpha$ , H-3 $\beta$	H-3 $\alpha$ , H-12 $\alpha$ , H-13 $\alpha$
3 $\alpha$	1,73-1,81 (m)	44,2	C-1, C-2, C-4, C-5, C-13,	H-2 $\alpha$ , H-3 $\beta$	H-2 $\alpha$ , H-

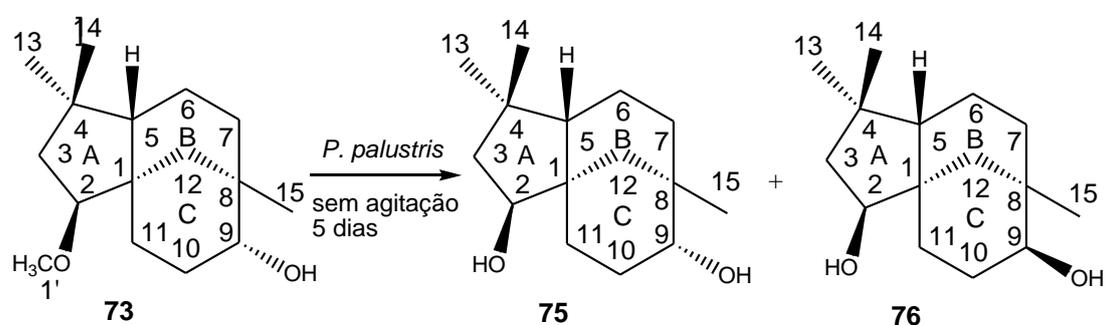
			C-14		3 $\beta$ , H-13 $\alpha$
3 $\beta$	1,59-1,68 (m)		C-1, C-2, C-4, C-5	H-2 $\alpha$ , H-3 $\alpha$	H-3 $\alpha$
4	-	39,9	-	-	-
5 $\beta$	1,84-1,86 (m)	50,8	C-1, C-4, C-7	-	H-14 $\beta$
6 $\alpha$	1,94 (ddd, J=1,6; 7,6; 14,8)	31,7	C-1, C-7, C-8	H-7 $\alpha$	H-7 $\alpha$ , H-13 $\alpha$
6 $\beta$	1,59-1,68 (m)		C-4, C-7	H-7 $\alpha$	-
7 $\alpha$	3,70 (dd, J=7,6; 11,0)	76,5	C-9	H-6 $\alpha$ , H-6 $\beta$	H-6 $\alpha$ , H-13 $\alpha$ , H-15
8	-	40,2	-	-	-
9 $\beta$	3,88-3,89 (m)	68,5	-	H-10 $\alpha$ , H-10 $\beta$	H-10 $\beta$ , H-15
10 $\alpha$	1,73-1,81 (m)	30,0	-	H-9 $\beta$ , H-10 $\beta$	H-10 $\beta$
10 $\beta$	2,04-2,14 (m)		C-11	H-9 $\beta$ , H-10 $\alpha$ , H-11	H-9 $\beta$ , H-10 $\alpha$
11	1,59-1,68 (m)	27,9	C-2, C-9, C-10	H-10 $\beta$	-
12 $\beta$	0,94-0,98 (m)	38,4	C-1, C-2, C-8, C-9	H-12 $\alpha$	H-12 $\alpha$
12 $\alpha$	1,54 (dd, J=1,6; 13,3)		C-1, C-5, C-7, C-8	H-12 $\beta$	H-2 $\alpha$ , H-12 $\beta$
13 $\alpha$	0,98 (s)	27,2	C-3, C-4, C-5, C-14	-	H-2 $\alpha$ , H-3 $\alpha$ , H-6 $\alpha$ , H-7 $\alpha$
14 $\beta$	1,01 (s)	32,7	C-3, C-4, C-5, C-13	-	H-5 $\beta$
15	1,07 (s)	25,5	C-7, C-8, C-9, C-12	-	H-7 $\alpha$ , H-9
1'	3,27 (s)	57,2	C-2	-	-

---

### 3.3.2 Biotransformações sem agitação

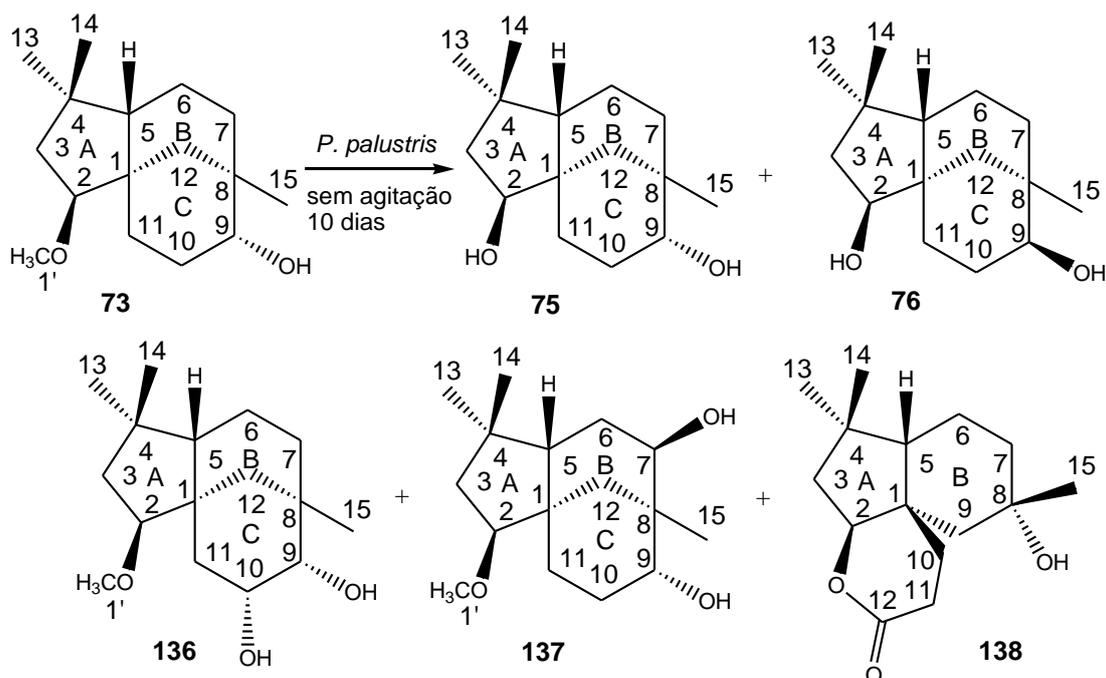
#### 3.3.2.1 Biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com o fungo *P. palustris*

A reação de biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com o fungo *P. palustris* sem agitação foi realizada por 5 e 10 dias. Para a reação com 5 dias, foram obtidos dois produtos da desmetilação de **73**, clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**) (1,3 mg; 1 %) e clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol (**76**) (1,0 mg; 1 %), este último tendo, também, sido epimerizado em C-9 (**Figura 79**).<sup>28</sup> Foram recuperados 83,2 mg do substrato da reação (79 %).



**Figura 79** – Esquema da reação de biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) sem agitação por 5 dias com o fungo *P. palustris*.

Realizando-se esta mesma biotransformação, porém com 10 dias de incubação do substrato, obtiveram-se, além de **75** (3,4 mg; 3 %) e **76** (11,0 mg; 10 %), três outros produtos, 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**) (0,8 mg; 1 %), 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ , 9 $\alpha$ -diol (**137**) (4,8 mg; 4 %) e a lactona **138** (2,3 mg; 2 %), como pode ser visto na **Figura 80** (pág. 115). Na reação realizada com 10 dias, recuperaram-se 52,7 mg de **73** (44 %).



**Figura 80** – Esquema da reação de biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), sem agitação, por 10 dias com o fungo *P. palustris*.

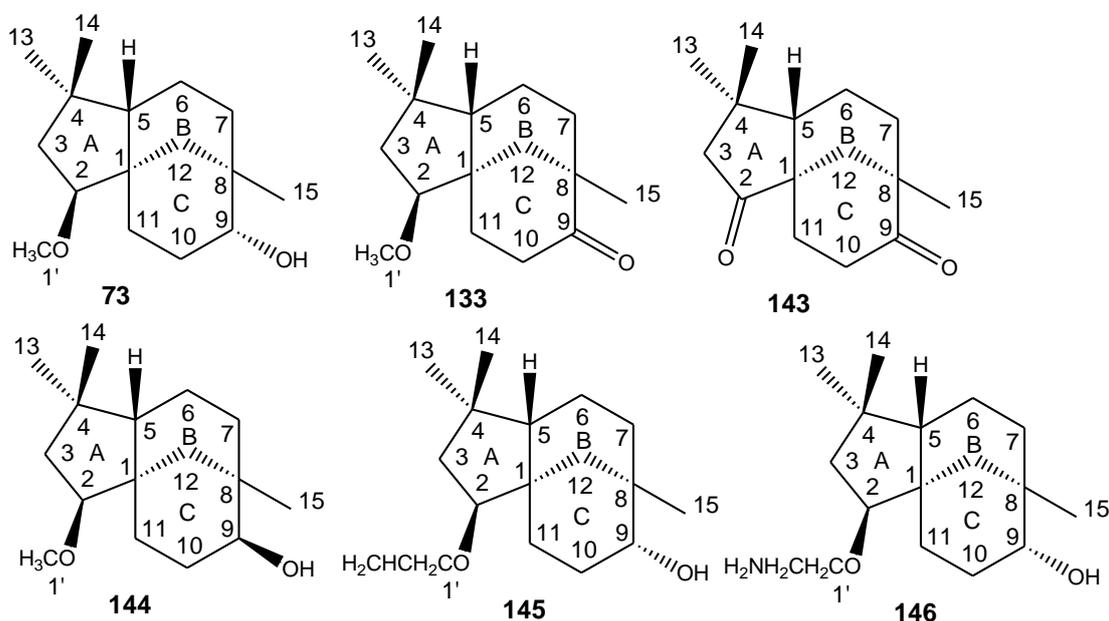
Observou-se que, além de ser capaz de hidroxilar posições pouco reativas do anel clovânico (**Figura 80**), como é o caso dos carbonos C-10 (**136**) e C-7 (**137**), de desmetilar a posição 1', e de epimerizar a hidroxila ligada a C-9 (produtos **75** e **76**), o fungo *P. palustris* também foi capaz de romper a ligação entre os carbonos C-8 e C-9, ocasionando um rearranjo do esqueleto carbônico do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), levando à formação da lactona **138**.

### 3.3.2.1.1 Clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol (**76**)

A análise dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol (**76**) mostrou a presença de 15 sinais de carbono, um a menos em relação ao substrato da reação, o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**). A comparação dos espectros de RMN (**Figuras 244 a 246**, pág. 254 e 255, anexo 2) com dados da literatura (**Tabela 18**, pág. 117), mostrou ter ocorrido a epimerização da hidroxila ligada a C-9.<sup>36</sup>

Esse produto foi obtido anteriormente por redução da clovan-2,9-diona (**143**, **Figura 81**, pág. 116) com boro hidreto de sódio.<sup>36</sup> No entanto, o rendimento da reação foi baixo (5 %) em comparação ao do produto **75**, também obtido nessa reação (82 %). Por biotransformação, **75** também foi

obtido por incubação dos substratos **73**, **133**, **144**, **145** e **146** com o fungo *Botrytis cinerea*, sendo obtidos, em alguns casos, rendimentos maiores (18, 17, 10, 1 e 1 %, respectivamente).<sup>37</sup>



**Figura 81** – Estruturas de clovanos precursors do produto **76**, seja por via sintética, ou por biotransformação.

Collado *et al.* (1998), ao descreverem os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para **76**, não foram capazes de diferenciar os carbonos C-1, C-4 e C-8 ( $\delta$  43,9, 37,3 e 35,2 ppm, respectivamente) apontados por esses autores como tendo valores intercambiáveis.<sup>112</sup> No entanto, a análise do mapa de contornos HMBC (**Figura 247**, pág. 256, anexo 2), realizada nesse trabalho, mostrou a correlação entre o carbono em  $\delta$  37,2 ppm e os hidrogênios H-13 $\alpha$  e H-14 $\beta$ , sendo, portanto, esse carbono correspondente a C-4. O carbono em  $\delta$  35,2 ppm apresentou correlação com H-15, sendo este o carbono C-8 e, dessa forma, C-1 foi atribuído como sendo o carbono cujo deslocamento químico é 43,9 ppm.

Também foram observadas discrepâncias entre os deslocamentos químicos atribuídos para os hidrogênios H-10 $\beta$ , H-11 e H-11' de acordo com o mapa de contornos HSQC (**Figura 248**, pág. 256, anexo 2) em relação à literatura.<sup>36</sup>

Foi observada no espectro no infravermelho (**Figura 249**, pág. 257, anexo 2) uma banda referente ao estiramento da ligação OH em 3407  $\text{cm}^{-1}$ . Não foi observada a banda referente ao estiramento assimétrico de ligação C-

O ( $1116\text{ cm}^{-1}$ ) presente no espectro no infravermelho do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**).

**Tabela 18** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol (**76**) em  $\text{CDCl}_3$ . Os valores de  $J$  são apresentados em Hz.

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (400 MHz) <sup>112</sup>	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (100 MHz) <sup>112</sup>
1	-	-	43,9	43,9 <sup>a</sup>
2 $\alpha$	3,81 (dd, $J=5,7$ ; 10,1)	3,80 (dd, $J=5,5$ ; 12,0)	80,3	80,2
3 $\beta$	1,42-1,57 (m)	1,45 (dd, $J=12,0$ ; 12,0)	47,9	47,9
3 $\alpha$	1,72 (dd, $J=5,7$ ; 12,0)	1,71 (dd, $J=5,6$ ; 12,0)		
4	-	-	37,2	37,3 <sup>a</sup>
5 $\beta$	1,34-1,41 (m)	1,28-1,40 (m)	51,3	51,3
6	1,16-1,25 (m)	1,15-1,25 (m)	20,3	20,3
6'	1,42-1,57 (m)	1,40-1,50 (m)		
7	1,26-1,31 (m)	1,15-1,25 (m)	31,1	31,1
7'	1,42-1,57 (m)	1,40-1,50 (m)		
8	-	-	35,2	35,2 <sup>a</sup>
9 $\alpha$	3,21 (dd, $J=10,8$ ; 4,9)	3,20 (dd, $J=10,8$ ; 4,8)	78,0	78,0
10 $\beta$	1,70-1,80 (m)	1,53 (m)	27,8	27,8
10 $\alpha$	1,70-1,80 (m)	1,76 (dddd, $J=12,8$ ; 4,8; 3,3; 3,3)		
11	1,16-1,25 (m)	1,28-1,40 (m)	27,2	27,2
11'	1,42-1,57 (m)	1,28-1,40 (m)		
12	1,05 (d, $J=12,9$ )	1,02 (d, $J=12,8$ )	42,0	42,0
12'	1,24 (d, $J=12,9$ )	1,23 (d, $J=12,8$ )		
13 $\alpha$	0,86 (s)	0,85 (s)	25,5	25,5
14 $\beta$	1,05 (s)	1,05 (s)	31,5	31,5
15	1,00 (s)	0,99 (s)	28,7	28,7

<sup>a</sup> Sinais publicados como intercambiáveis

A exemplo de **75**, o produto **76** também foi submetido à análise por CG-EM, sendo o cromatograma obtido apresentado na **Figura 250** (pág. 257, anexo 2). Nesse cromatograma, observa-se que o tempo de retenção de **76** é 8,25 min. Na **Figura 251** (pág. 258, anexo 2), é apresentado o espectro de massas obtido para **76**, no qual pode ser observado o pico  $[\text{M}]^{+\bullet}$  com  $m/z$  238,0, como esperado para o mesmo ( $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$ ). A proposta de fragmentação para **76** é apresentada na **Figura 82** (pág. 118).

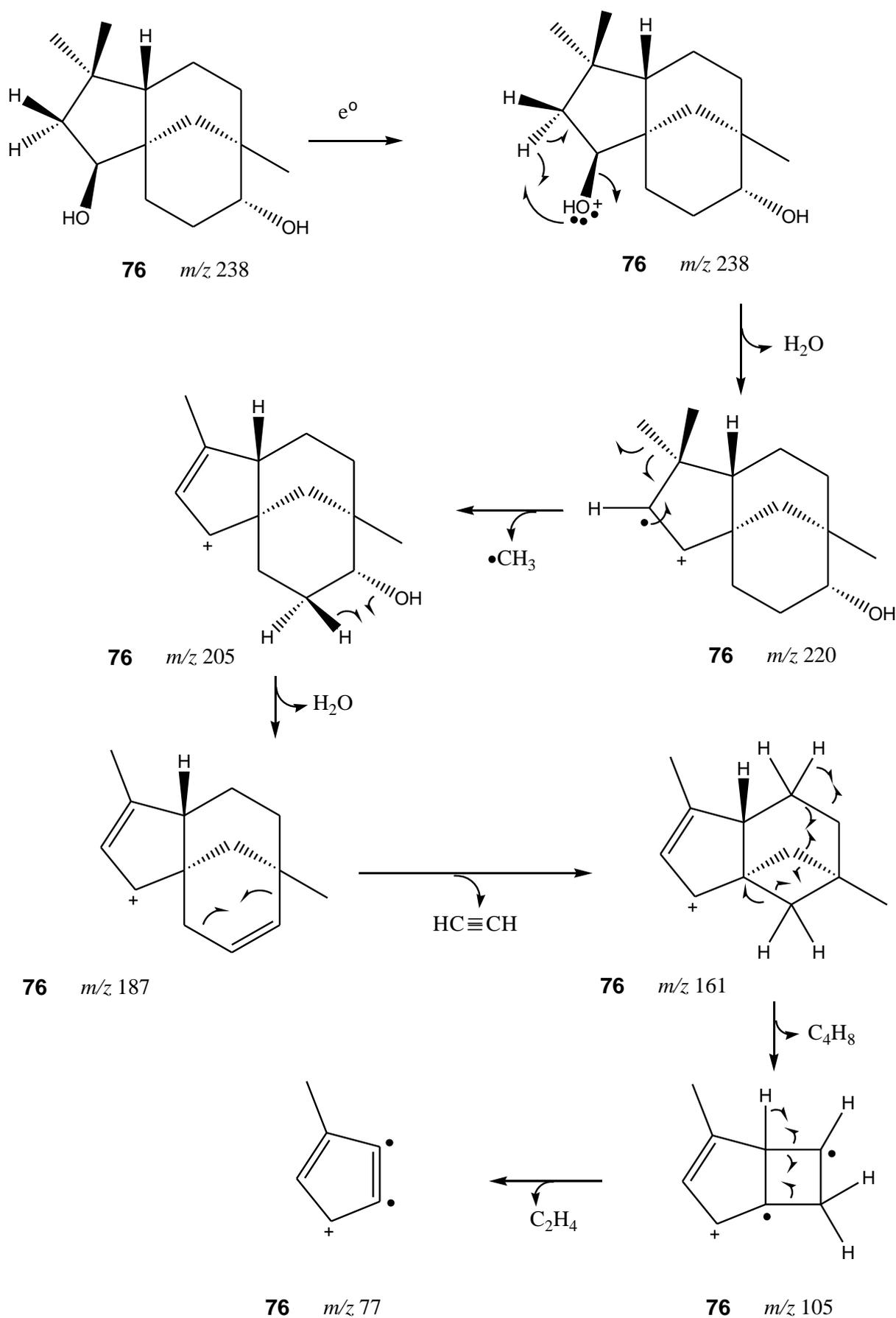
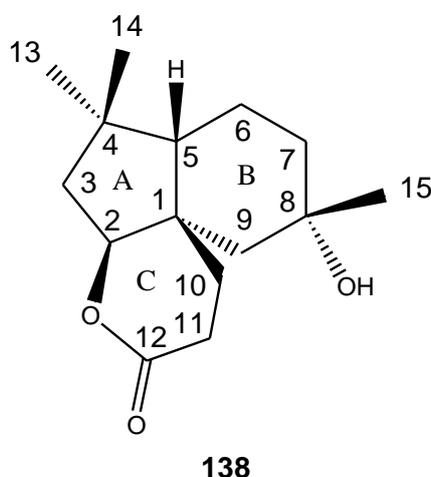


Figura 82 – Proposta de fragmentação do clovan-2β-9β-diol (76) por espectrometria de massas.

### 3.3.2.1.2 Lactona (138) obtida na biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (73) com o fungo *P. palustris* por 10 dias

A lactona **138** (**Figura 83**), proveniente da biotransformação de **73** com o fungo *P. palustris*, foi isolada anteriormente como um metabólito secundário do coral *Rumphella antipathies*, sendo apontada para a mesma atividade inibitória na liberação de elastase por neutrófilos humanos.<sup>115</sup> Este foi o primeiro relato de isolamento de clovanos a partir de organismos marinhos. Essa molécula foi denominada rumfelclovano A e os dados de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C de **138** (**Figuras 252 a 254**, pág. 258 e 259, anexo 2) estão de acordo com a literatura (**Tabela 19**, pág. 120).

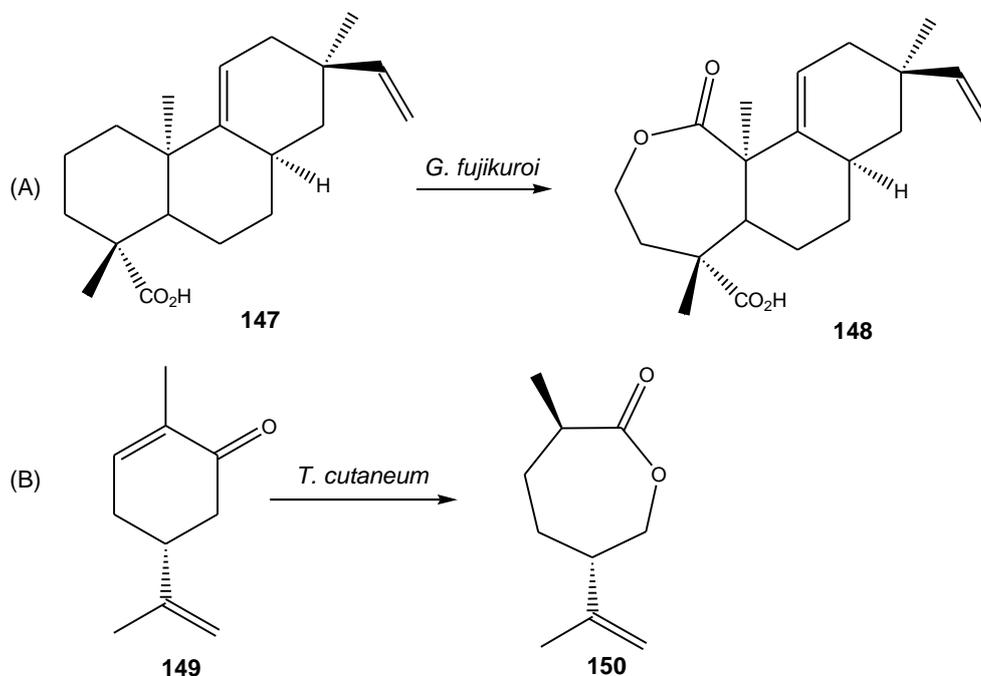
A presença de uma hidroxila em **138** foi evidenciada pela banda de absorção intensa em 3443 cm<sup>-1</sup> observada no espectro no infravermelho (**Figura 255**, pág. 260, anexo 2). Uma banda de absorção em 1730 cm<sup>-1</sup>, característica de estiramento da ligação C=O da carbonila de lactonas foi observada.



**Figura 83** – Estrutura química da lactona **138**, identificada como sendo o rumfelclovano A.

Existem outros relatos de rearranjos de esqueletos carbônicos de terpenos em biotransformações por fungos, incluindo-se aí as oxidações de Baeyer-Villiger. O fungo *Gibberella fujikuroi*, por exemplo, converteu o diterpeno **147** na lactona **148** (**Figura 84 A**, pág. 120), sendo esta a primeira reação deste tipo publicada com esse micro-organismo.<sup>116</sup> Já o fungo

*Trichosporum cutaneum* converteu a *R*-(-)-carvona (**149**) no produto **150**, seguindo uma regioseletividade não esperada para uma oxidação de Baeyer-Villiger, na qual o oxigênio, por via sintética, seria inserido entre a carbonila e o carbono mais substituído (**Figura 84 B**).<sup>117</sup>



**Figura 84** – Biotransformação (A) do ácido 13-*epi-ent*-pimara-9(11),15-dieno-19-oico por *G. fujikuroi* e (B) da *R*-(-)-carvona por *T. cutaneum*.<sup>116,117</sup>

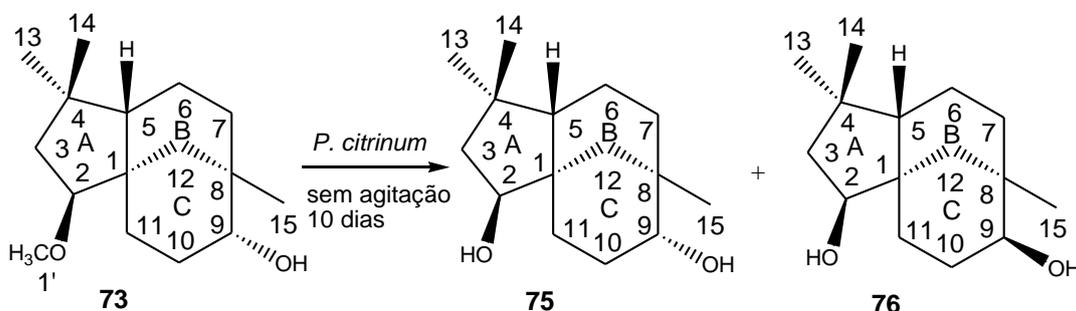
**Tabela 19** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C obtidos para o rumfelclovano A (**138**) em CDCl<sub>3</sub>. Os valores de *J* são apresentados em Hz.

Posição	$\delta_H$ (400 MHz)	$\delta_H$ (400 MHz) <sup>115</sup>	$\delta_C$ (100 MHz)	$\delta_C$ (100 MHz) <sup>115</sup>
1	-	-	42,4	42,4
2	4,35 (t, <i>J</i> =6,6)	4,34 (dd, <i>J</i> =6,8; 6,8)	89,4	89,4
3 $\beta$	1,67 (dd, <i>J</i> =13,8; 6,6)	1,65 (dd, <i>J</i> =13,6; 6,8)	48,0	48,1
3 $\alpha$	2,07 (dd, <i>J</i> =13,8; 6,6)	2,06 (dd, <i>J</i> =13,6; 6,8)		
4	-	-	39,7	39,7
5 $\beta$	1,59-1,70 (m)	1,69 (m)	51,3	51,4
6 $\alpha$	1,81-1,91 (m)	1,87 (m)	18,0	18,1
6 $\beta$	1,45-1,54 (m)	1,52 (m)		
7 $\beta$	1,59-1,70 (m)	1,61 (m)	35,6	35,7
7 $\alpha$	1,45-1,54 (m)	1,50 (m)		
8	-	-	70,0	70,1
9 $\beta$	1,79 (dl, <i>J</i> =14,5)	1,79 (d, <i>J</i> =14,8)	45,8	45,9

9 $\alpha$	1,32 (d, $J=14,5$ )	1,31 (d, $J=14,8$ )		
10 $\beta$	1,96 (ddd, $J=4,9; 8,8; 14,0$ )	1,95 (m)	32,3	32,4
10 $\alpha$	2,21 (ddd, $J=5,2; 7,9; 14,0$ )	2,21 (m)		
11	2,33-2,47 (m)	2,39 (m)	27,5	27,6
11'	2,33-2,47 (m)	2,39 (m)		
12	-	-	173,7	173,7
13 $\alpha$	0,98 (s)	0,98 (s)	26,4	26,5
14 $\beta$	1,09 (s)	1,09 (s)	31,2	31,3
15	1,25 (s)	1,25 (s)	32,8	32,9

### 3.3.2.2 Biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com o fungo *P. citrinum*

Assim como na biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com *P. janczewskii* (com 5 e 10 dias de reação), na biotransformação de **73** com o fungo *P. citrinum* por 5 dias não foram obtidos produtos. A biotransformação do substrato **73** com *P. citrinum* por 10 dias resultou nos produtos clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**) (2,9 mg; 1 %) e clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol (**76**) (4,9 mg; 2 %) (**Figura 85**), sendo recuperados 186,3 mg de **73** (89 %). Os clovanos **75** e **76** também foram isolados da biotransformação de **73** com *P. palustris* por 5 dias, com rendimentos de 1 (**75**) e 1 % (**76**), e também da reação por 10 dias, com rendimentos de 3 (**75**) e 10 % (**76**). Como pode ser observado, nas condições utilizadas, o *P. palustris* é mais eficiente do que o *P. citrinum* para a conversão de **73** em **76**, visto que, com 10 dias de reação, o rendimento com o primeiro fungo é de quase quatro vezes maior do que aquele obtido utilizando-se *P. citrinum*.

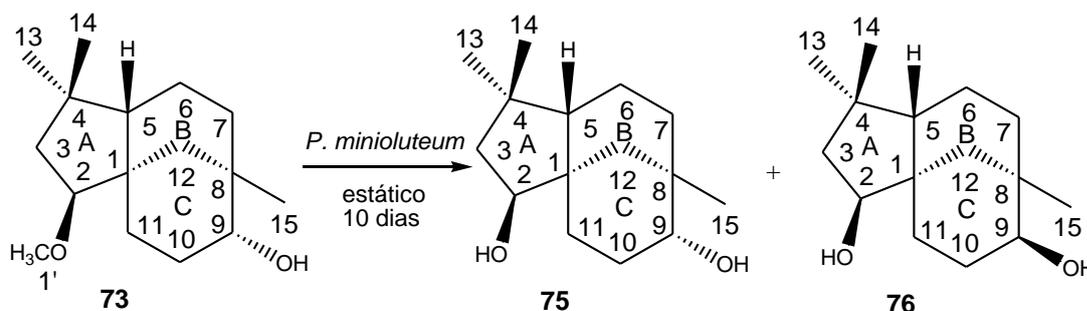


**Figura 85** – Esquema da reação de biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), sem agitação, por 10 dias, com o fungo *P. citrinum*.

### 3.3.2.3 Biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com o fungo *P. minioluteum*

A biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com o fungo *P. minioluteum* foi realizada por 5 dias e 10 dias. Os extratos dessas biotransformações foram comparados por CCD e mostram perfis semelhantes. Ambos foram comparados também por CCD com o produto **75**, sendo observada uma mancha nesses extratos com o mesmo RF que aquele apresentado por **75**. Estando a mancha mais intensa no extrato da biotransformação realizada por 10 dias, somente esse extrato foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel.

Desse processo, resultou o isolamento dos produtos **75** (72,5 mg; 32 %) e **76** (31,6 mg; 14 %) (**Figura 86**), sendo recuperados 16 % de **73** (39,1 mg). Porém, a obtenção dos produtos exigiu, além de purificação por cromatografia em coluna, a recromatografia de frações utilizando CLAE (eluente hexano/acetato de etila 55:45). Nessa biotransformação, os rendimentos obtidos foram consideravelmente altos, o que evidenciou a grande capacidade desse fungo em realizar a desmetilação da posição 1' de **73**, bem como de epimerizar a hidroxila presente na posição 9 (produto **76**).



**Figura 86** – Esquema da reação de biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), sem agitação, por 10 dias com o fungo *P. minioluteum*.

Sabendo-se que o extrato da biotransformação realizada por 5 dias possuía perfil em CCD semelhante ao daquela mantida por 10 dias, decidiu-se avaliar a primeira por CG-EM, com o intuito de confirmar a presença dos produtos **75** e **76**.

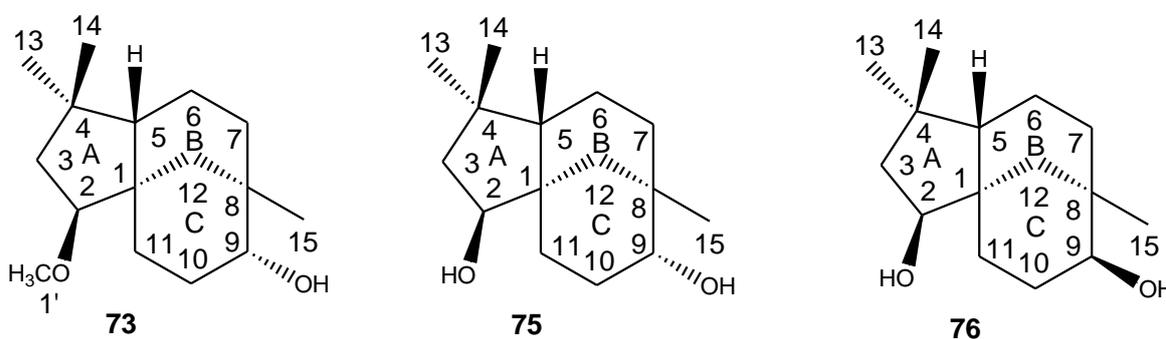
Como observado nos cromatogramas obtidos para **75** e **76** (**Figuras 211** e **250**, pág. 235 e 257, anexo 2), o tempo de retenção obtido para essas moléculas, que diferem apenas na configuração espacial da hidroxila ligada a C-9, é muito semelhante, sendo 8,26 min para o clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**) e 8,25 min para o clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol (**76**), o que tornou difícil a diferenciação dessas moléculas por cromatografia gasosa. Os espectros de massas também são muito semelhantes, como pode ser visto na **Figura 212** (pág. 236, anexo 2) para **75**, na **Figura 251** (pág. 258, anexo 2) para **76** e nas propostas de fragmentação para alguns dos picos principais obtidos para **75** e **76** (**Figura 74**, pág. 105 e **Figura 82**, pág. 118).

No cromatograma obtido para o extrato da biotransformação de **73** com *P. minioluteum* por cinco dias (**Figura 256**, pág. 260, anexo 2) foi observado um pico com tempo de retenção 8,23 min (muito próximo ao tempo de retenção encontrado para o **75** e o **76**, 8,26 e 8,25 min respectivamente). O espectro de massas (**Figura 257**, pág. 261, anexo 2) obtido para esse pico, apresentou grande semelhança com os espectros de massas de **75** e de **76**, porém não foi possível definir qual deles (ou se ambos) estaria presente no extrato resultante da biotransformação em questão. Por sua vez, o espectro de massas obtido para a substância com tempo de retenção 7,35 min, observado no cromatograma da reação (**Figura 258**, pág. 261, anexo 2), apresentou grande semelhança com o espectro de massas (**Figura 259**, pág. 262, anexo 2) obtido para a substância com tempo de retenção 7,37 min presente no cromatograma do material de partida (**73**) (**Figura 260**, pág. 262, anexo 2), indicando a recuperação parcial do substrato da reação.

#### 3.3.2.4 Avaliação da influência da cadeia lateral de clovanos em reações de biotransformação com o fungo *P. minioluteum*

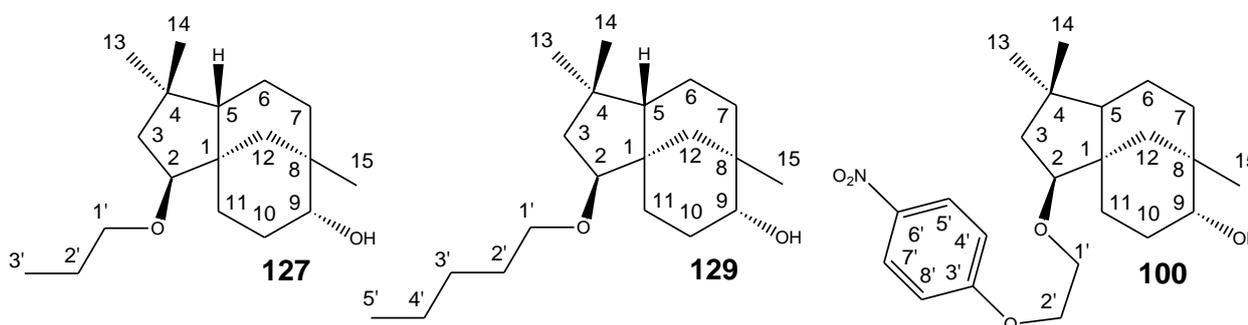
O fungo *P. minioluteum* biotransformou o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) nos produtos **75** e **76**, sendo o primeiro obtido em maior quantidade (32,0 e 14 % de rendimento respectivamente) (item 3.3.2.3). Nessa reação, houve a quebra

da ligação entre o carbono C-1' e o oxigênio ao qual este carbono está conectado em **73**, como observado na **Figura 87**.



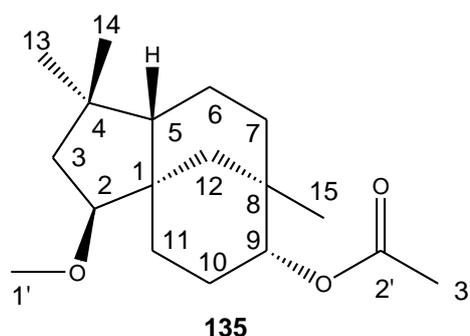
**Figura 87** – Estruturas do 2β-metoxiclovan-9α-ol (**73**) e dos produtos clovan-2β-9α-diol (**75**) e clovan-2β-9β-diol (**76**), obtidos na biotransformação de **73** por *P. minioluteum*.

Devido aos bons rendimentos obtidos nessa reação, foram realizados experimentos para avaliar a capacidade desse fungo de quebrar ligações envolvendo cadeias laterais de tamanhos maiores. Para tanto, sintetizaram-se clovanos contendo cadeias de tamanhos diferentes e realizou-se a incubação destes com *P. minioluteum*. Avaliou-se então se, assim como **73**, também esses clovanos seriam convertidos em **75** e **76**. Os clovanos utilizados como substrato destas biotransformações foram o 2β-propoxiclovan-9α-ol (**127**), o 2β-pentoxiclovan-9α-ol (**129**) e o 2β-[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9α-ol (**100**), apresentados na **Figura 88**.



**Figura 88** – Estruturas do 2β-propoxiclovan-9α-ol (**127**), 2β-pentoxiclovan-9α-ol (**129**) e 2β-[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9α-ol (**100**), incubados com *P. minioluteum*.

Esse fungo também apresentou bom rendimento na epimerização da hidroxila ligada ao carbono C-9 do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), como observado em **76**. Por isso, modificou-se também a posição 9 de **73** e fez-se a incubação do produto **135** (**Figura 89**), proveniente da acetilação de **73**, com *P. minioluteum*, a fim de avaliar o efeito de um grupo mais volumoso na interação dessa molécula com o complexo enzimático do micro-organismo.



**Figura 89** – Estrutura química do acetato de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**135**), incubado com *P. minioluteum*.

Essas reações foram realizadas por 5 e 10 dias. Como os experimentos foram feitos em pequena escala, os extratos obtidos dos mesmos não foram submetidos à cromatografia em coluna, sendo os resultados avaliados por cromatografia em camada delgada e por CG-EM.

#### 3.3.2.4.1 Biotransformação de clovanos substituídos em C-2 com o fungo *P. minioluteum*

As incubações de **127**, **129** e **100** com *P. minioluteum* foram conduzidas por 5 e 10 dias. Pelo fato de os experimentos terem sido feitos em pequena escala, os mesmos não foram submetidos a cromatografia em coluna. Dessa forma, após a secagem e pesagem do material extraído, a presença ou não de produtos foi avaliada por CCD e CG-EM, sem purificação prévia. A única exceção foi a reação de biotransformação de **127**, realizada por 10 dias, cujo extrato resultante foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel. Algumas combinações de frações provenientes desta cromatografia, nas quais se detectou por CCD manchas referentes a possíveis produtos de biotransformação, foram avaliadas por CG-EM.

Para que pudessem ser feitas comparações de **127**, **129** e **100** com os extratos obtidos das biotransformações, os mesmos tiveram o seu perfil em CG-EM definidos, sendo os dados obtidos apresentados na **Tabela 20**.

**Tabela 20** – Dados de CG-EM obtidos para **127**, **129** e **100**, e para produtos presentes nos extratos resultantes da biotransformação destes por *P. minioluteum* por 5 e 10 dias.

Material	TR (CG) (min)	m/z (EM) ([M] <sup>+</sup> )
2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>127</b> )	8,50	280,1
Extrato da biotransformação de <b>127</b> com <i>P. minioluteum</i> por 5 dias	8,48	280,1
Extrato da biotransformação de <b>127</b> com <i>P. minioluteum</i> por 10 dias	8,25	338,2
	8,46	280,2
2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>129</b> )	15,14	308,3
Extrato da biotransformação de <b>129</b> com <i>P. minioluteum</i> por 5 dias	15,26	308,2
Extrato da biotransformação de <b>129</b> com <i>P. minioluteum</i> por 10 dias	15,26	308,2
2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol ( <b>100</b> )	23,97	403,1
Extrato da biotransformação de <b>100</b> com <i>P. minioluteum</i> por 5 dias	23,86	403,1
Extrato da biotransformação de <b>100</b> com <i>P. minioluteum</i> por 10 dias	23,87	403,1
clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol ( <b>75</b> )	8,25	238,1
clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol ( <b>76</b> )	8,26	238,0

O cromatograma obtido por CG para **127** (**Figura 129**, pág. 188, anexo 2) aponta o tempo de retenção de 8,50 min, cujo respectivo espectro de massas (**Figura 130**, pág. 189, anexo 2), mostra o pico do íon molecular com  $m/z$  280,1 (**Tabela 20**, pág.126). No cromatograma obtido para o extrato da reação de biotransformação dessa substância com *P. minioluteum* por 5 dias (**Figura 261**, pág. 263, anexo 2) foi observado apenas um pico, com tempo de retenção 8,48 min e perfil do espectro de massas idêntico àquele do  $2\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**Figura 262**, pág. 263, anexo 2), com pico do íon molecular em  $m/z$  280,1, indicando que não houve biotransformação do composto **127** nessas condições.

Na biotransformação de **127** por 10 dias, o material resultante da extração da mesma foi submetido a um fracionamento em coluna de sílica gel. Foram combinadas frações obtidas com os eluentes hexano/acetato de etila (65:35 e 60:40), já que a análise por CCD das mesmas mostrou a existência de uma mancha com RF igual ao de **75**. O material resultante dessa combinação foi analisado por CG-EM. No cromatograma obtido (**Figura 263**, na pág. 264, anexo 2), foi observado um pico com tempo de retenção de 8,25 min, idêntico ao obtido para **76**, e, muito próximo ao de **75** (8,25 e 8,26 min respectivamente). Pela análise do espectro de massas correspondente a esse pico (**Figura 264**, na pág. 264, anexo 2), não foi possível diferenciar se se tratava de **75** ou **76** (**Figuras 212 e 251**, pág. 236 e 258, anexo 2), ou mesmo de uma mistura deles.

Frações obtidas com os eluentes hexano/acetato de etila (85:15 a 65:35) foram combinadas por apresentarem perfis semelhantes por CCD. Essas frações apresentaram manchas com RF semelhante ao de **127**. O material resultante dessa combinação foi submetido à análise por CG-EM (**Figura 265**, pág. 265, anexo 2), evidenciando a recuperação de parte do substrato da reação (**127**, tempo de retenção 8,46 min). O espectro de massas associado a esse pico (**Figura 266**, pág. 265, anexo 2) apresentou o pico do íon molecular ( $m/z$  280,2), um pico com  $m/z$  264,9 (perda do grupo metila da cadeia lateral), outro pico com  $m/z$  219,9 (perda de um radical  $\bullet\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) além dos outros

picos observados na fragmentação do 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) (**Figura 130**, pág. 189, anexo 2).

O 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**) apresentou, por CG-EM (**Figura 267**, pág. 266, anexo 2), tempo de retenção igual a 15,14 min, cujo espectro de massas (pico do íon molecular com  $m/z$  308,3), corresponde ao esperado para **129** (**Figura 268**, pág. 266, anexo 2). Os extratos das biotransformações de **129** com o fungo *P. minioluteum* por cinco e dez dias foram também submetidos à análise por CG-EM. No cromatograma obtido para o extrato da reação cuja duração foi de cinco dias (**Figura 269**, pág. 267, anexo 2) foi observado o pico com tempo de retenção 15,26 min, que corresponde a **129**. Esse fato foi corroborado pela presença do pico com  $m/z$  308 no espectro de massas obtido para o mesmo (**Figura 270**, pág. 267, anexo 2). No cromatograma obtido para a reação realizada por 10 dias (**Figura 271**, pág. 268, anexo 2), também obteve-se um pico com tempo de retenção de 15,26 min, correspondendo à recuperação de **129**, corroborado pelo respectivo espectro de massas (**Figura 272**, pág. 268, anexo 2). Conclui-se, dessa forma, que não houve biotransformação de **129** por *P. minioluteum*.

O composto 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**100**) também foi submetido à análise por CG-EM (**Figura 273**, pág. 269, anexo 2), tendo sido observado um pico com tempo de retenção 23,97 min. No respectivo espectro de massas (**Figura 274**, pág. 269, anexo 2), foi observado o pico do íon molecular ( $m/z$  403,1). Para o material do extrato da biotransformação de **100** com *P. minioluteum* (cinco dias) foi obtido o cromatograma (**Figura 275**, pág. 270, anexo 2), referente à análise por CG-EM, tendo sido observado para **100** o tempo de retenção 23,86 min, cujo correspondente espectro de massas (**Figura 276**, pág. 270, anexo 2) mostra o pico com  $m/z$  403,1. Dessa forma, conclui-se que, também nesse caso, houve a recuperação de **100**, sem formação dos produtos **75** ou **76**. O mesmo aconteceu na biotransformação de **100** após dez dias de contato com o fungo, como mostram os respectivos cromatograma (**Figura 277**, pág. 271, anexo 2) e espectro de massas (**Figura 278**, pág. 271, anexo 2), este último apresentando inclusive o pico do íon

molecular com  $m/z$  403,1. Portanto, não houve biotransformação de **100** por *P. minioluteum* após cinco ou dez dias de reação.

Tendo sido observado que nas biotransformações de **127**, **129** e **100** com *P. minioluteum* apenas ocorre a quebra da cadeia lateral ligada a C-2 para a primeira molécula, como ocorreu com o  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**), pode-se concluir que, para esse tipo de clovano, à medida que aumenta a cadeia lateral nessa posição, não se observa mais a quebra da ligação da função éter, como observado para **73** e **127**, que possuem cadeias laterais com um e três átomos de carbono respectivamente. O mesmo não foi detectado para o  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**) e o  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**100**), que possuem cadeias laterais maiores, indicando que, à medida que essa cadeia lateral torna-se mais volumosa, o impedimento estérico bloqueia a interação desses clovanos com as enzimas responsáveis pela quebra da ligação.

#### 3.3.2.4.2 Biotransformação do acetato de $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**135**)

Na biotransformação do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**) com *P. minioluteum*, foram obtidos os produtos **75** e **76** (item 3.3.2.3), por desmetilação da posição 2 e, no caso de **76**, por epimerização da hidroxila presente na posição 9 de **73**. Para avaliar a importância da posição 9 nessa reação, a substância **135**, resultante da acetilação de **73**, foi submetida à biotransformação com *P. minioluteum* por cinco e dez dias, com o objetivo de se determinar se a substituição da hidroxila por um grupo mais volumoso afetaria a desmetilação de **73** e epimerização da hidroxila ligada a C-9 nessa substância. O experimento foi conduzido em pequena escala e as análises realizadas por CCD e CG-EM, não tendo sido os extratos das biotransformações submetidos a fracionamento em coluna.

Inicialmente, a substância **135** foi analisada por CG-EM (**Figura 279**, pág. 272, anexo 2), apresentando tempo de retenção 17,13 min. No respectivo espectro de massas obtido (**Figura 280**, pág. 272, anexo 2), foi observado o pico do íon molecular com  $m/z$  294,1.

O extrato da biotransformação de **135** com *P. minioluteum* por 5 dias foi analisado por CCD, não tendo sido visualizados produtos. Esse extrato, quando analisado por CG-EM, (**Figura 281**, pág. 273, anexo 2), apresentou um pico com tempo de retenção 13,16 min. Esse valor é diferente do encontrado para **135** (17,13 min). No entanto, o perfil do espectro de massas obtido para esse pico (**Figura 282**, pág. 273, anexo 2) mostrou-se muito semelhante ao de **135**, inclusive com a presença do pico do íon molecular ( $m/z$  294,1), corroborando não terem sido formados produtos de biotransformação nessa reação.

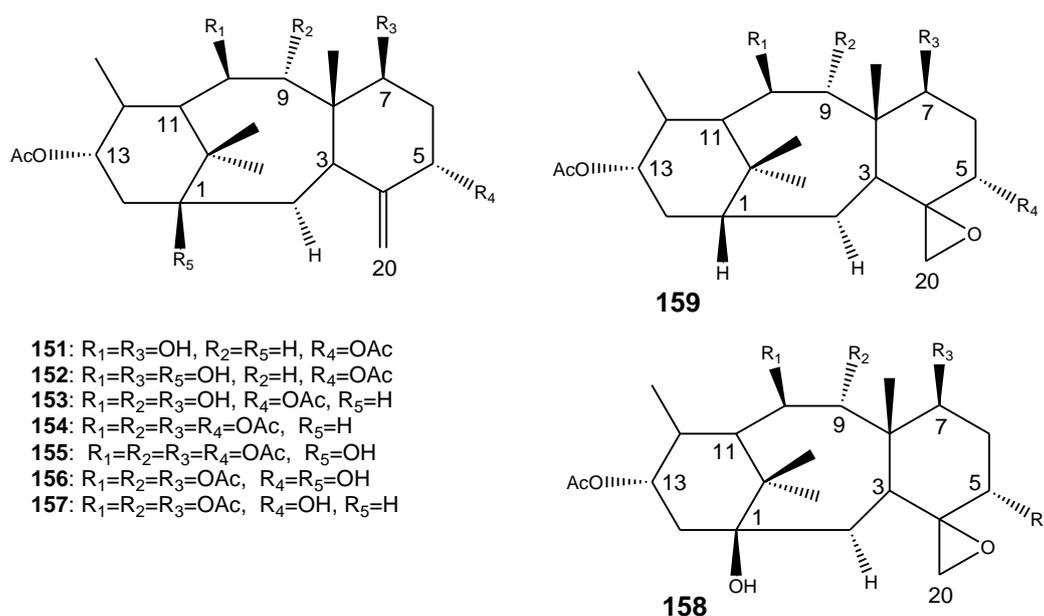
Na biotransformação de **135** por dez dias, a análise do extrato da mesma por CCD também indicou a ausência de produtos, embora não tenha sido esclarecido pelas análises por CG (**Figura 283**, pág. 274, anexo 2), foi corroborado pela análise por espectrometria de massas (**Figura 284**, pág. 274, anexo 2). Portanto, não houve biotransformação de **135** por *P. minioluteum* mesmo após dez dias de reação.

A análise por RMN feita dos extratos das reações de **135** com *P. minioluteum* corrobora que não houve biotransformação do mesmo. Nas **Figuras 285** e **286** (pág. 275, anexo 2) estão apresentados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das reações feitas com 5 e 10 dias, respectivamente. Comparando-se esses espectros com o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **135** puro (**Figura 177**, pág. 216, anexo 2), pode ser observado que os sinais de hidrogênio correspondentes a essa substância permanecem nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  correspondentes aos extratos dessas biotransformações. Os sinais que não correspondem a **135**, e que estão presentes nesses espectros, podem ser observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos controles das reações, extraídos com 5 e 10 dias (**Figuras 287** e **288**, respectivamente, pág. 276, anexo 2). Esses controles são constituídos dos meios de cultura utilizados nas biotransformações e do fungo *P. minioluteum*, sem a presença do substrato **135**.

Pode-se concluir que o grupo acetila impediu a biotransformação de **135** por *P. minioluteum*. Essa reação, quando realizada utilizando-se o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) como substrato, gera produtos com rendimentos

consideravelmente altos (32 %, **75** e 14 %, **76**) (item 3.3.2.3), indicando ser importante a presença da hidroxila na posição 9 de moléculas com esqueleto clovânico, ou mesmo de um grupo menos volumoso que o acetila para a formação de **75** e **76**. A modificação dessa posição, possivelmente, prejudicou a interação do substrato com o complexo enzimático do fungo, impedindo que esse fosse modificado.

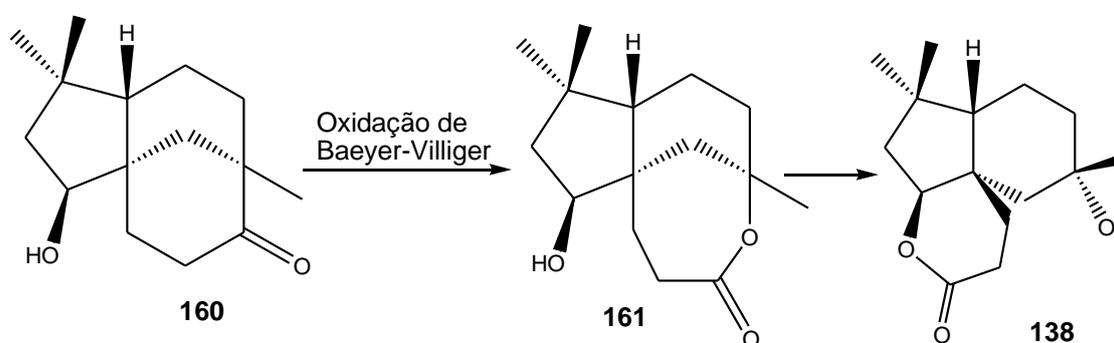
As biotransformações realizadas com fungos são, em geral, estereoespecíficas, gerando produtos que dependem da estrutura química do substrato utilizado.<sup>118</sup> A biotransformação de quatro diterpenoides taxanos pelo fungo *Absidia coerulea*, por exemplo, resultou em hidroxilações específicas nas posições  $1\beta$  e  $9\alpha$ . Usando-se **151** como substrato (**Figura 90**), obtiveram-se **152** (58 %) e **153** (8 %), sendo a hidroxilação na posição  $1\beta$  aquela obtida com maior rendimento. No entanto, a presença de um grupo acetila na posição 9, leva à formação apenas do produto **152**. O rendimento da reação, nesse caso, depende do padrão de substituição do taxano usado como substrato. A incubação de **154**, com as posições 5, 7, 9, 10 e 13 acetiladas, resulta em maior rendimento da hidroxilação da posição  $1\beta$  (**155** é obtido com 12 %) em relação às demais reações (menos de 1% para **156**, resultante da incubação de **157** e 5 % para **158**, proveniente da incubação de **159**). Esse fato mostra que as oxigenases desse micro-organismo são altamente seletivas.<sup>119</sup>



**Figura 90** – Substratos e produtos obtidos na biotransformação estereoespecífica de taxanos por *A. coerulea*.<sup>119</sup>

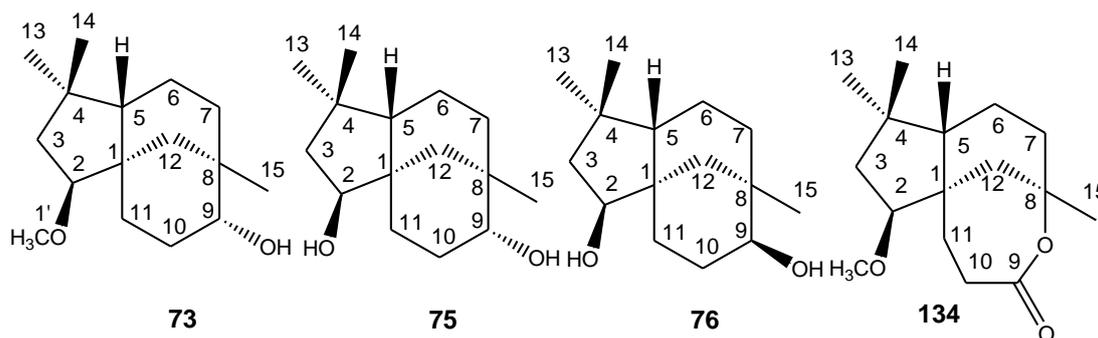
### 3.3.2.5 Biotransformação da lactona **134** com o fungo *P. minioluteum*

A obtenção de **138** a partir de um coral do gênero *Rumphella antipathies* representou o primeiro isolamento de clovanos a partir de espécies marinhas, tendo sido isolado em conjunto com a 2 $\beta$ -hidroxiclovan-9-ona (**160**). Ambos possuem atividade inibitória na liberação de elastase por neutrófilos humanos.<sup>115</sup> Devido à importância dessa substância, foi proposta uma rota biossintética para **138**, passando por **160** e também pelo intermediário **161**, proveniente da oxidação de Baeyer-Villiger de **160** (Figura 91).<sup>29</sup>



**Figura 91** – Rota biossintética proposta por Chung e colaboradores (2010) para a formação do rumfelclovano A (**138**) em corais *Rumphella antipathies*.<sup>29</sup>

Em biotransformações anteriores feitas nesse trabalho com o fungo *P. minioluteum*, tendo o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) como substrato, observou-se a capacidade desse micro-organismo de quebrar as ligações entre o carbono C-1' dessa molécula e o oxigênio ligado a este carbono, e também entre C-9 e o oxigênio pertencente à hidroxila ligada a C-9, resultando em **75** e **76** (Figura 92, pág. 133). Por isso, preparou-se a lactona **134** (Figura 92, pág. 133), por oxidação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com PCC, seguida da lactonização por meio de reação de Baeyer-Villiger com AMCPB, com o objetivo de verificar como *P. minioluteum* atuaria sobre essa lactona.



**Figura 92** – Estruturas do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) e dos clovanos **75** e **76** (derivados de **73** por biotransformação) e **134**, derivado de **73** obtido por via sintética.

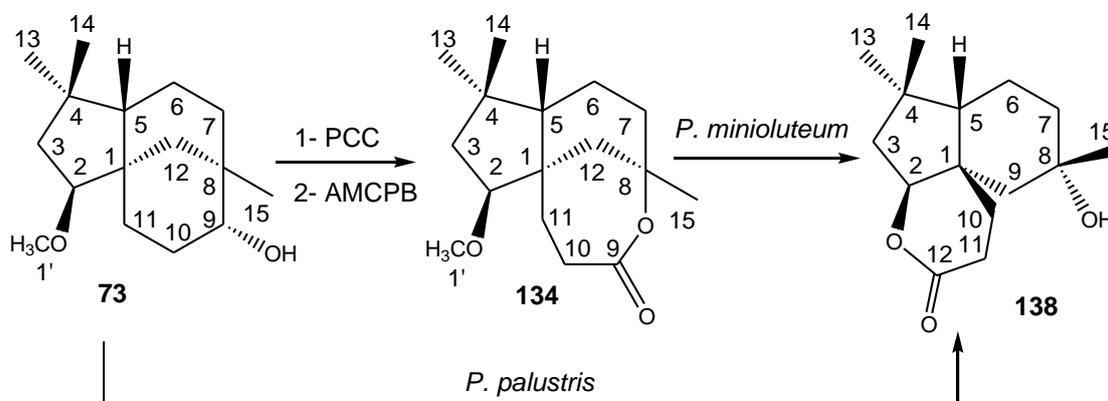
Essa reação foi realizada sem agitação e, após 10 dias de incubação e extração do material resultante com acetato de etila, foi verificada por CCD a existência de um produto de biotransformação. Após o fracionamento do material obtido por cromatografia em coluna de sílica gel com gradientes de hexano/acetato de etila/metanol, foram obtidos 109 mg de uma mistura contendo o produto ainda impuro, posteriormente purificado por CLAE. Para tal, utilizou-se uma coluna semipreparativa e fase móvel constituída por uma mistura de hexano/acetato de etila (45:55), com um fluxo de 3,5 mL/min.

A análise dos espectros de RMN unidimensionais para esse produto mostrou total concordância com os dados anteriormente publicados para o rumfelclovano A (**138**).<sup>115</sup> Essa molécula foi obtida com 16 % de rendimento (35,3 mg). A mesma já havia sido obtida também na biotransformação de **73** com o fungo *P. palustris* sem agitação, com 10 dias de reação (item 3.3.2.1), porém com rendimento muito reduzido (2 %).

Nesse experimento foi obtida uma rota quimioenzimática para a produção do rumfelclovano A (**138**), combinando etapas iniciais de síntese, indo desde o óxido de cariofileno, para a obtenção do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), passando pela 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**) até a lactona **134** e, posteriormente, culminando com a biotransformação desta última pelo fungo *P. minioluteum*, obtendo-se então **138** de forma planejada (**Figura 93**, pág. 134).

Essa rota encontrada para a obtenção de **138** reforça a proposta anterior de biossíntese (**Figura 91**, pág. 132), na qual a formação dessa molécula

passa sucessivamente por uma cetona e por uma lactona. Posteriormente, de forma enzimática, ocorreu a quebra do anel lactônico inicial, com rearranjo do esqueleto carbônico e formação de outra lactona.



**Figura 93** – Esquema das duas rotas diferentes para a obtenção do rumfelclovano A por biotransformação com os fungos *P. palustris* e *P. minioluteum*.

### 3.4 Resultados dos bioensaios realizados com os clovanos

Os clovanos **73** e **126-129**, obtidos a partir do óxido de cariofileno (**125**), foram utilizados em bioensaios de inibição de crescimento do fungo *B. cinerea* e também em testes alelopáticos frente à espécie *L. sativa*. Os resultados desses testes são apresentados nos itens 3.4.1 e 3.4.2. Esses clovanos, juntamente com o (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovano-9,15-diol (**132**), clovan-2*β*-9*α*-diol (**75**), clovan-2*β*-9*β*-diol (**76**) e o rumfelclovano A (**138**), tiveram também suas atividades avaliadas em relação à ativação de PKC's. Esse último teste foi realizado na indústria Vivacell Biotechnology España S. L., no entanto, nenhuma das moléculas apresentou atividade no mesmo.

#### 3.4.1 Resultados obtidos no bioensaio de inibição de crescimento do fungo *B. cinerea*

Existe um grande interesse na busca por novas moléculas capazes de inibir o crescimento do fungo *B. cinerea*,<sup>104</sup> já que este é um fitopatógeno que causa grandes perdas em diversos tipos de cultivos agrícolas em várias partes do mundo.<sup>40,105.</sup>

Nesse sentido, diversos tipos de terpenos têm sido avaliados em ensaios biológicos.<sup>38,54,120</sup> Um sesquiterpeno com atividade fungistática relatada sobre *B. cinerea* é o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**).<sup>94</sup> Derivados de **73** modificados na posição 2 foram testados anteriormente em relação ao crescimento desse fungo, mostrando que modificações nessa posição podem potencializar a sua atividade antifúngica.<sup>37</sup>

Nos bioensaios realizados nesse trabalho, avaliou-se a atividade das substâncias 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**126**), 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**), 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**) e 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**) em inibir parcial ou totalmente o crescimento do fungo *B. cinerea*. Avaliou-se também o efeito do aumento da cadeia lateral na posição 2 sobre a atividade biológica desses clovanos. O procedimento foi realizado de acordo com Patil e colaboradores (1986).<sup>121</sup> O teste é feito em placas de Petri, nas quais a substância a ser avaliada é adicionada ao meio de cultura sobre o qual o fungo será colocado para crescer. Mediu-se o diâmetro da colônia do fungo a cada 24 h após a inoculação do mesmo na placa. O crescimento observado foi posteriormente comparado ao do fungo em uma placa controle, na qual não foram adicionadas substâncias que inibiam o seu crescimento. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente e obteve-se a porcentagem de inibição que a substância teste provoca no crescimento do fungo.

A **Figura 94** (pág. 136) apresenta os gráficos de inibição desse fungo pelas moléculas testadas a cada 24 horas. Observou-se, nesses gráficos, que a atividade inibitória do crescimento do fungo *B. cinerea* pelos clovanos testados cresceu com o aumento da concentração dos mesmos. Apenas o 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**) apresentou maior inibição na concentração de 0,25 mM em relação a 0,50 mM com 24 horas de teste e atividades praticamente iguais para essas duas concentrações com 96 e 120 h de teste. Observou-se também, nesses testes, que a capacidade de inibição do crescimento desse fungo pelos clovanos estudados cresceu com o aumento da cadeia lateral até um certo número de átomos, sendo maior para o 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**). Nas concentrações maiores (0,5 e 0,25 mM), nos quatro primeiros dias, uma atividade maior foi evidenciada para o 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**), sendo

que, com 5 dias, esta atividade foi praticamente igual à do 2β-butoxiclovan-9α-ol (**128**). Para a concentração de 0,1 mM, a atividade de **128** foi superior em todos os cinco dias de teste. Nas concentrações menores, a atividade de **128** foi superior nos quatro primeiros dias na concentração de 0,05 mM, sendo igual à do 2β-pentoxiclovan-9α-ol (**129**) com cinco dias. Na concentração de 0,025 mM, o 2β-butoxiclovan-9α-ol (**128**) apresentou atividade maior nos dois primeiros dias de teste, sendo esta atividade igual à de **129** no terceiro dia, que apresentou atividade maior do que **128** nos dois últimos dias.

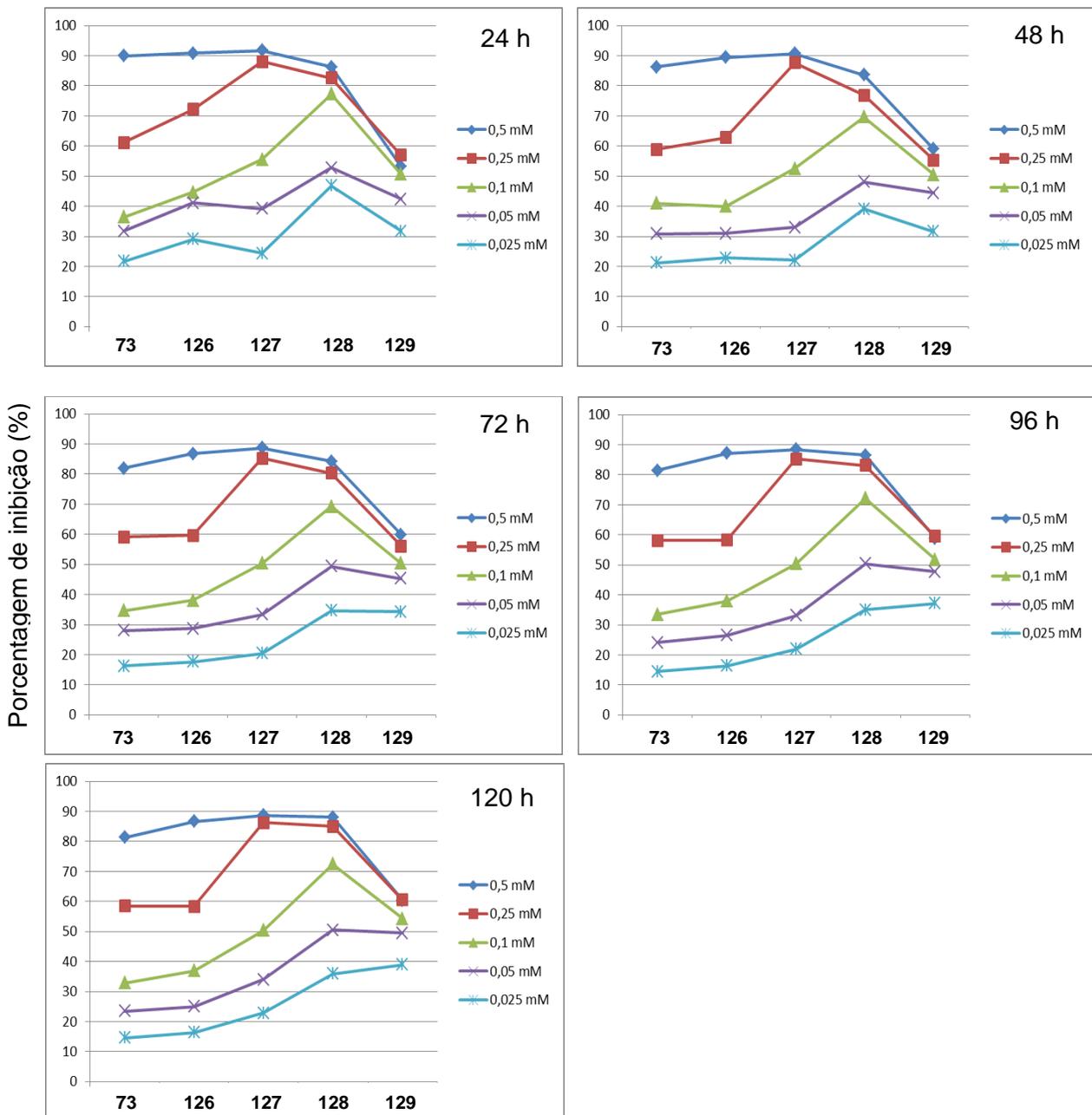


Figura 94 – Gráficos representando a comparação da porcentagem de inibição do crescimento do fungo *B. cinerea* pelos clovanos **73** e **126 - 129** com 24, 48, 72, 96 e 120 h de teste.

Após esse estudo, observou-se que, ao se variar o tamanho da cadeia lateral ligada ao carbono C-2 do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), variou-se também a atividade biológica desses clovanos. Decorridos os cinco dias de bioensaio, observou-se que a atividade inibitória dessas moléculas em relação ao crescimento do fungo *B. cinerea* foi maior para o 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**), com cadeia lateral de quatro átomos de carbono, que, na maioria dos prazos e concentrações estudados, apresentou atividade maior ou igual aos outros clovanos testados. Esse fato foi verificado anteriormente por Saiz-Urra e colaboradores (2009), quando foi testada a atividade de 23 clovanos modificados na posição 2. Foi verificado que essa atividade varia de acordo a cadeia lateral ligada a C-2. Observou-se também que clovanos com a cadeia lateral nitrogenada possuem atividade mais pronunciada, ao contrário de moléculas que possuem enxofre nessa parte da molécula.<sup>37</sup>

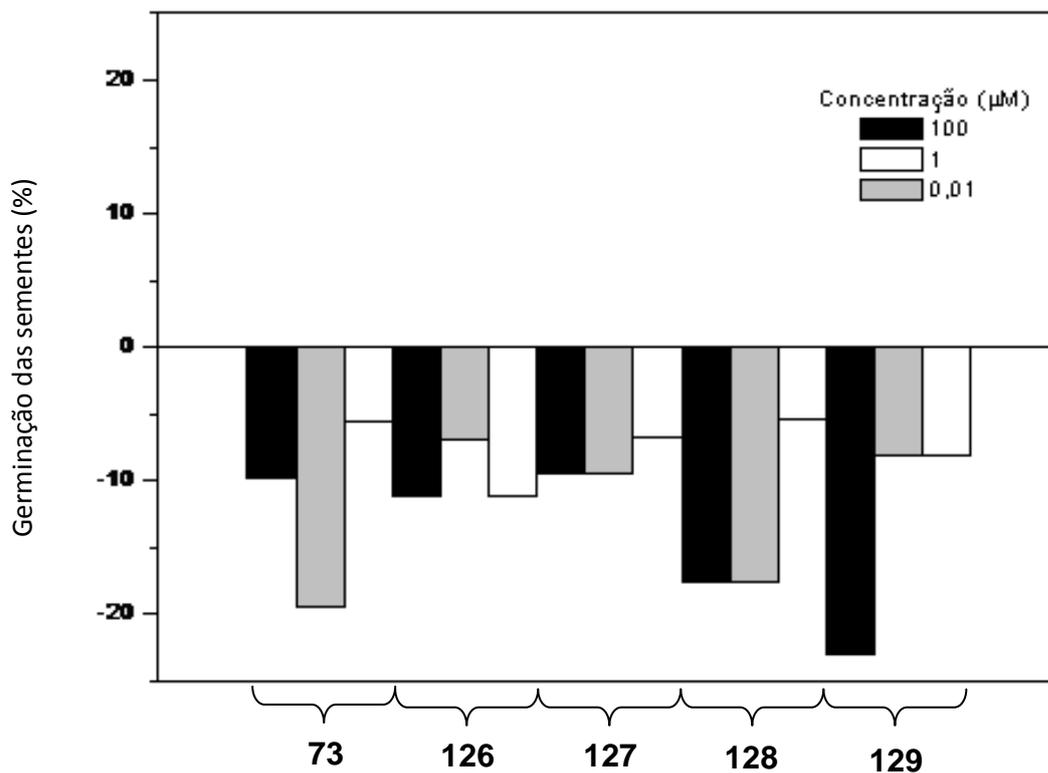
### 3.4.2 Resultados do bioensaio de inibição de crescimento de sementes de *Lactuca sativa*

Na busca por novas moléculas bioativas em relação à inibição do crescimento do fitopatógeno *B. cinerea*, que tivessem menos impacto no ambiente em relação aos fungicidas atualmente presentes no mercado,<sup>122,123</sup> as substâncias **73** e **126 - 129** foram avaliadas em testes de atividade fungicida sobre esse micro-organismo (item 3.4.1). Foi demonstrada inibição do crescimento de *B. cinerea*, sendo esse efeito variável de acordo com o tamanho da cadeia lateral ligada à substância teste. No entanto, no caso de fungicidas para uso em fitopatógenos, uma característica desejável é que os fungicidas não prejudiquem o crescimento da planta em que serão aplicados. Nesse sentido, bioensaios que avaliam a germinação de sementes e desenvolvimento das plântulas são uma ferramenta inicial interessante para a avaliação do efeito fitotóxico de moléculas sob condições controladas em laboratório.<sup>124</sup>

No presente estudo, sementes de *L. sativa* foram incubadas em câmara de germinação, em placas de Petri, imersas em solução contendo cada

substância teste. Avaliou-se o efeito das substâncias **73** e **126 - 129** sobre a germinação das sementes, bem como o efeito sobre o crescimento da raiz e do caule daquelas que germinaram. As análises foram realizadas em relação a um controle, no qual as sementes foram incubadas na ausência das substâncias a serem testadas.

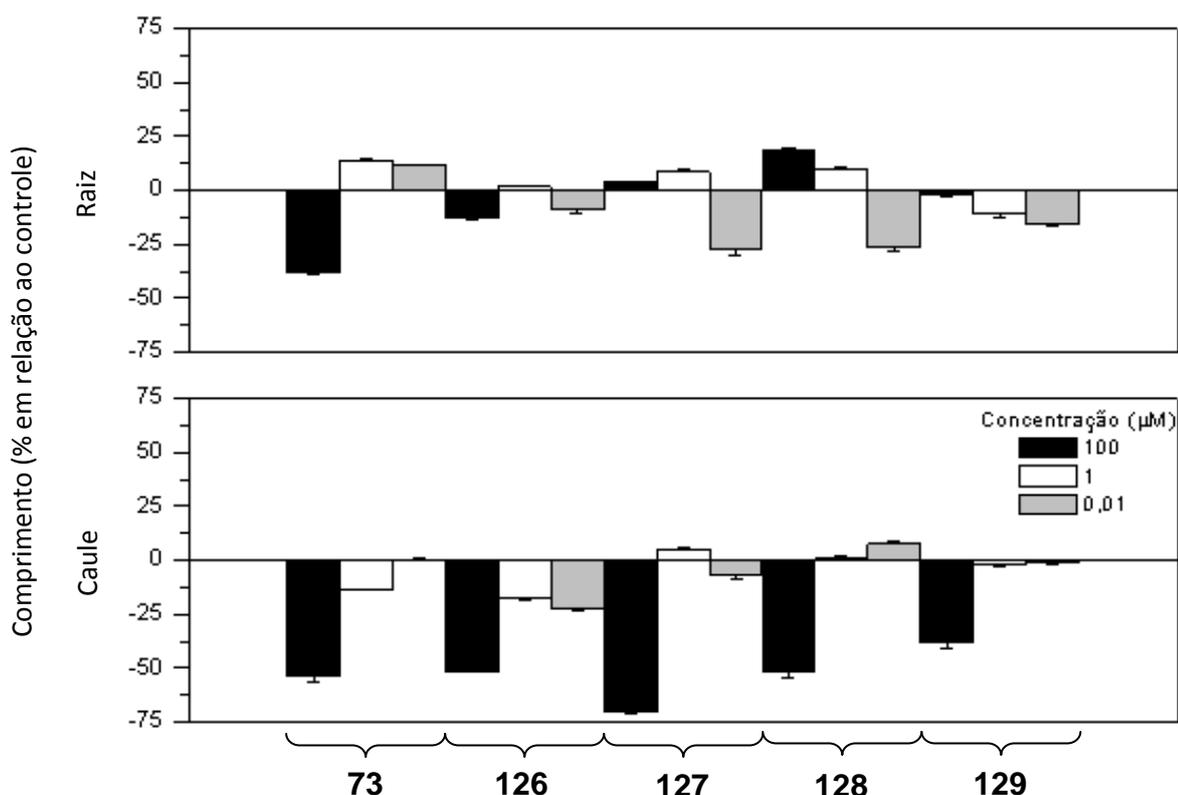
De acordo com os resultados encontrados, foi observada, para os produtos testados, inibição acentuada na germinação de *L. sativa*, como é mostrado no gráfico da **Figura 95**. Em concentrações maiores, o aumento da cadeia carbônica acentuou a inibição da germinação das sementes. O  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**) apresentou atividade acentuadamente maior na dose de  $100\ \mu\text{M}$  em relação aos outros produtos com cadeias laterais menores. Nessa concentração, **129** inibiu a germinação em mais de 20 %.



**Figura 95** – Efeito dos produtos **73** e **126 - 129** na germinação de *L. sativa*. Os valores estão apresentados como diferenças de crescimento em relação ao controle, sendo o valor zero representando um valor observado igual ao controle, os valores positivos representando estímulo ao crescimento e, os negativos, inibição.

Em relação ao crescimento da raiz e do caule, observou-se um efeito predominantemente inibitório (**Figura 96**). Os produtos **73** e **126** apresentaram maior efeito inibitório sobre o crescimento da raiz na maior concentração (100  $\mu\text{M}$ ), ao contrário de **128**, que, nessa concentração, estimulou o crescimento da raiz. As moléculas **127**, **128** e **129** apresentaram maior efeito inibitório na menor concentração testada (0,01  $\mu\text{M}$ ).

Todos os produtos testados apresentaram efeito inibitório em mais de 35 % sobre o crescimento do caule na maior concentração utilizada no ensaio (100  $\mu\text{M}$ ), destacando-se o  $2\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**), que inibiu em cerca de 70 % esse crescimento a 100 ppm.



**Figura 96** – Efeito dos produtos **73** e **126** - **129** no crescimento de raízes e caule de *L. sativa*. Os valores estão apresentados como diferenças de crescimento em relação ao controle, sendo o valor zero representando um valor observado igual ao controle, os valores positivos representando estímulo ao crescimento e, os negativos, inibição.

Dessa forma, como observado também no bioensaio de crescimento do fungo *B. cinerea* (item 3.4.1), observou-se que o aumento da cadeia lateral ligada ao 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) influencia a atividade de clovanos frente à inibição do crescimento de raízes e caule da espécie de alface *L. sativa*, e também a etapa de germinação. Por esse estudo, observou-se que **73**, com a cadeia lateral contendo um átomo de carbono, apresentou maior inibição do crescimento da raiz de *L. sativa*, na concentração de 100 mM, e o 2 $\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) foi o que apresentou maior atividade frente ao crescimento do caule dessa espécie, nessa mesma concentração. Já a inibição da germinação das sementes foi mais acentuada para o 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**), com cinco átomos de carbono na cadeia lateral, novamente na concentração de 100 mM.

Dessa forma, observa-se que esses clovanos, apesar de inibirem o crescimento do fungo *B. cinerea* (item 3.4.1), também prejudicam o crescimento da planta que poderia ser a hospedeira do fungo, de forma que seu uso não seria adequado durante o período de crescimento das plantas.

# Conclusões

## 4 Conclusões

Nesse trabalho foram isoladas 22 cepas de fungos, das quais foram identificados até o nível de espécie os fungos *Pestalotiopsis palustris*, *Alternaria alternata*, *Bipolaris hawaiiensis*, *Penicillium purpurogenum*, *Tetracoccusporium paxianum*, *Penicillium crustosum*, *Fusarium pionoti*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma koningii*, *Fusarium merismoides*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium citrinum* e *Lasiodiplodia theobromae*. Os fungos *P. palustris*, *P. citrinum*, *Penicillium janczewskii* e *Penicillium minioluteum* foram utilizados em reações de biotransformação com substratos clovânicos, sintetizados a partir do óxido de cariofileno (**125**).

Foram sintetizados os clovanos  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**),  $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**126**),  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**127**),  $2\beta$ -butoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**128**),  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**),  $2\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**), (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovan-9-lactona (**134**), acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**135**),  $5\alpha$ -hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno (**130**), (4*S*,5*R*)-5-hidroxicariofil-8(13)-eno (**131**) e (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovano-9,15-diol (**132**).

Da biotransformação de **73** com *P. palustris* obtiveram-se os produtos clovan- $2\beta$ - $9\alpha$ -diol (**75**), clovan- $2\beta$ - $9\beta$ -diol (**76**),  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ , $10\alpha$ -diol (**136**),  $2\beta$ -metoxiclovan- $7\beta$ ,  $9\alpha$ -diol (**137**) e o rumfelclovano A (**138**). Os fungos *P. citrinum* e *P. minioluteum* biotransformaram **73** em **75** e **76**.

O fungo *P. minioluteum* apresentou capacidade de desmetilar a posição 1' de **73** e epimerizar a hidroxila ligada a C-9 desse substrato, resultando nos produtos **75** e **76** com 32,0 e 14 % de rendimento, respectivamente. No entanto, a incubação dos substratos **127**, **129** e do  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**100**), com cadeias laterais maiores ligadas à posição 1', com *P. minioluteum*, levou à clivagem apenas do derivado **127**, cuja cadeia lateral possui três átomos de carbono. Esse fato indica que o aumento da cadeia lateral impede a interação do complexo enzimático desse fungo com substratos com esqueleto clovânico. A incubação do acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**135**), resultante da acetilação de **73**, com esse fungo, não

resultou em produtos, indicando que a hidroxila em C9 também é importante para a interação do substrato com as enzimas desse fungo.

O rumfelclovano A (**138**) foi obtido a partir da oxidação de **73** em  $2\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**), que foi lactonizada a (1S,2S,5S,8R)-8,9-seco-8-hidroxi-2-metoxiclovan-9-lactona (**134**) e esta última substância convertida em **138** por *P. minioluteum* em uma rota quimioenzimática

Os compostos sintetizados **73**, **126** - **129** e **132**, bem como os produtos de biotransformação **75**, **76** e **138**, foram testados frente suas capacidades de ativação de proteínas quinase C (PKC). Os testes foram realizados na indústria Vivacell Biotechnology España S. L., porém todos foram inativos no teste.

As substâncias **73**, **126** - **129** foram testadas em relação à inibição do crescimento do fitopatógeno *Botrytis cinerea*. A atividade desses clovanos cresceu com o aumento da concentração dos mesmos, sendo maior na concentração de 0,5 mM. Observou-se também que a capacidade de inibição do crescimento desse fungo pelas substâncias testadas aumentou de acordo com o crescimento da cadeia lateral ligada ao carbono C-2 do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**). O composto com maior atividade inibitória foi o  $2\beta$ -butoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**128**), cuja cadeia lateral possui quatro átomos de carbono, uma vez que **128** apresentou atividade maior ou igual aos outros clovanos testados na maioria das condições testadas.

Os clovanos **73**, **126** - **129** foram testados também em relação à germinação e ao crescimento de sementes de *Lactuca sativa*. Foi observado efeito inibitório sobre a germinação das sementes em todas as concentrações testadas, para todos os compostos. O  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**), com cinco átomos de carbono na cadeia lateral, apresentou maior efeito inibitório (100 mM). Efeito predominantemente inibitório foi observado também nos estudos de crescimento da raiz e do caule de *L. sativa*. O composto **73**, cuja cadeia lateral contém um átomo de carbono, apresentou maior inibição do crescimento da raiz da espécie teste, na concentração de 100 mM. Já o  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**127**) foi o que apresentou maior atividade frente ao crescimento do caule de *L. sativa*, na concentração de 100 mM.

Os clovanos **73, 126 - 129**, apesar de inibirem o crescimento do fungo *B. cinerea*, prejudicaram tanto a germinação quanto o crescimento da espécie vegetal testada, o que torna o uso dessas substâncias inadequado durante o período de crescimento das plantas.

# Referências bibliográficas

## 5 Referências bibliográficas

1. Baiping, M.; Bing, F.; Hongzhi, H.; Yuwen, C. Biotransformation of chinese herbs and their ingredients. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*, **2010**, 12, 150 – 154.
2. de Carvalho, C. C. C. R. Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes. *Biotechnology Advances*, **2011**, 29, 75 – 83.
3. Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A.; Kragl, U. Industrial biotechnology – the future of green chemistry? *Green Chemistry*, **2011**, 13, 3007 – 3047.
4. Illanes, A. Enzyme Biocatalysis. Principles and applications. Springer Science + Business Media B. V., **2008**, p 398.
5. Priefert, H.; Rabenhorst, J.; Steinbüchel, A. Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology Biotechnology*, **2001**, 56, 296 – 314.
6. Liese, A.; Filho, M. V. Production of fine chemicals using biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, **1999**, 10, 595 – 603.
7. Bharti, A. A. L. N.; Gupta, R. K. Indian Journal of Chemistry, **2011**, 50, 1119 – 1122.
8. Li, K.; Frost, J. W. Synthesis of Vanillin from Glucose. *Journal of American Chemical Society*, **1998**, 120, 10545 – 10546.
9. Black, G. W.; Gregson, T.; McPake, C. B.; Perry, J. J.; Zhang, M. Biotransformation of nitriles using the solvent-tolerant nitrile hydratase from *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. *Tetrahedron Letters*, **2010**, 51, 1639 – 1641.
10. de Carvalho, C. C. C. R.; Fatal, V.; Alves, S. S.; da Fonseca, M. M. R. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells to high concentrations of toluene. *Applied Microbiology Biotechnology*, **2007**, 76, 1423 – 1430.
11. Jaeger, K-E.; Reetz, M. T. Directed evolution of enantioselective enzymes for organic Chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2000**, 4, 68 – 73.
12. Loughlin, W. A. Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology*, **2000**, 7449 – 7462.

13. Choudhary, M. I.; Erum, S.; Atif, M.; Malik, R.; Khan, N. T.; Atta-ur-Rahman. Biotransformation of (20S)-20-hydroxymethylpregna-1,4-dien-3-one by four filamentous fungi. *Steroids*, **2011**, 76, 1288 – 1296.
14. Goswami, A.; Kotoky, R.; Rastogi, R. C.; Ghosh, A. C. A one-pot efficient process for 16-dehydropregnenolone acetate. *Organic Process Research & Development*, **2003**, 7, 306 – 308.
15. Hazra, B. G.; Basu, S.; Bahule, B. B.; Pore, V. S.; Vyas, B. N.; Ramraj, V. M. Stereoselective synthesis of a new hexanor(C<sub>23</sub>-C<sub>28</sub>)castasterone-20,22-ethyl diether from 16-dehydropregnenolone acetate and its plant growth promoting activity. *Tetrahedron*, **1997**, 13, 4909 – 4920.
16. Vronen, P. J. E.; Kovalb, N.; de Groot, A. The synthesis of 16-dehydropregnenolone acetate (DPA) from potato glycoalkaloids. *Arkivoc*, **2004**, 2, 24 – 50.
17. Shingate, B. B.; Hazra, B. G.; Pore, V. S.; Gonnade, R. G.; Bhadbhade, M. M. Stereoselective syntheses of 20-epi cholanic acid derivatives from 16-dehydropregnenolone acetate. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 5622 – 5635.
18. Gao, J-M.; Shen, J-W.; Wang, J-Y.; Yang, Z.; Zhang, A-L. Microbial transformation of 3 $\beta$ -acetoxypregna-5,16-diene-20-one by *Penicillium citrinum*. *Steroids*, **2011**, 76, 43 – 47.
19. Silva, E. A.; Takahashi, J. A.; Oliveira, A. B. An interesting backbone rearrangement and novel derivatives from the biotransformation of trachyloban-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **2002**, 13, 101 – 105.
20. Leverrier, A.; Martin, M-T.; Servy, C.; Ouazzani, J.; Retailleau, P.; Awang, K.; Mukhtar, M. R.; Guéritte, F.; Litaudon, M. Rearranged diterpenoids from the biotransformation of *ent*-trachyloban-18-oic acid by *Rhizopus arrhizus*. *Journal of Natural Products*, **2010**, 73, 1121 – 1125.
21. Martins, L. R.; Takahashi, J. A. Rearrangement and oxidation of  $\beta$ -amyrin promoted by growing cells of *Lecanicillium muscarium*. *Natural Products Research*, **2010**, 24, 767 – 774.
22. Kamerbeek, N. M.; Janssen, D. B.; van Berkel, W. J. H.; Fraaije, M. W. Baeyer-Villiger monooxygenases, an emerging family of flavin-dependent biocatalysts. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2003**, 345, 667 – 678.

23. Andrau, L.; Lebreton, J.; Viazzo, P.; Alphand, V.; Furstoss, R. An integrated chemoenzymatic synthesis of enantiopure (-)-(1*R*,5*S*)-cyclosarkomycin: a sarkomycin precursor. *Tetrahedron Letters*, **1997**, 38, 825 – 826.
24. Demyttenaere, J. C. R. Biotransformations of terpenoids by microorganisms. *Studies in Natural Products Chemistry*, **2001**, 25, 125 – 178.
25. de Carvalho, C. C. C. R.; da Fonseca, M. M. R. Biotransformation of terpene. *Biotechnology Advances*, **2006**, 24, 134 – 142.
26. Misawa, N. Pathway engineering for functional isoprenoids. *Current Opinion in Biotechnology*, **2011**, 22, 627 – 633.
27. Degenhardt, J.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, **2009**, 70, 1621 – 1637.
28. Bhatia, S. P.; McGinty, D.; Letizia, C. S.; Api, A. M. Fragrance material review on p-mentha-1,8-dien-7-ol. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46, S197 – S200.
29. Belsito, D.; Bickers, D.; Bruze, M.; Calow, P.; Greim, H.; Hanifin, J. M.; Rogers, A. E.; Saurat, J.H.; Sipes, I.G.; Tagami, H. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46, S1 – S71.
30. Schewe, H.; Mirata, M. A.; Holtmann, D.; Schrader, J. Biooxidation of monoterpenes with bacterial monooxygenases. *Process Biochemistry*, **2011**, 46, 1885 – 1899.
31. Miyazawa, M.; Kawazoe, H.; Hyakumachi, M. Biotransformation of *l*-menthol by twelve isolates of soil-borne plant pathogenic fungi (*Rhizoctonia solani*) and classification of fungi. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2003**, 78, 620 – 625.
32. Bicas, J. L.; Fontanille, P.; Pastore, G. M.; Larroche, C. A bioprocess for the production of high concentrations of *R*-(+)- $\alpha$ -terpineol from *R*-(+)-limonene. *Process Biochemistry*, **2010**, 45, 481 – 486.

33. Collins, D. O.; Buchanan, G. O.; Reynolds, W. F.; Reese, P. B. Biotransformation of squamulosone by *Curvularia lunata* ATCC 12017. *Phytochemistry*, **2001**, 57, 377 – 383.
34. Chou, B-H.; Yang, L-M.; Chang, S-F.; Hsu, F-L.; Lo, C-H.; Lin, W-K.; Wang, L-H.; Liu, P-C.; Lin, S-J. Fungal transformation of isosteviol lactone and its biological evaluation for inhibiting the AP-1 transcription factor. *Phytochemistry*, **2009**, 70, 759 – 764.
35. Bastos, D. Z. L.; Pimentel, I. C.; de Jesus, D. A.; de Oliveira, B. H. Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. *Phytochemistry*, **2007**, 68, 834 – 839.
36. Collado, I. G.; Hanson, J. R.; Macías-Sánchez, A. J.; Mobbs, D. The biotransformation of some clovanes by *Botrytis cinerea*. *Journal of Natural Products*, **1998**, 61, 1348 – 1351.
37. Saiz-Urra, L.; Racero, J. C.; Macías-Sánchez, A. J.; Hernández-Galán, R.; Hanson, J. R.; Perez-Gonzalez, M.; Collado, I. G. Synthesis and quantitative structure-antifungal activity relationships of clovane derivatives against *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 2420 – 2428.
38. Aleu, J.; Hanson, J. R.; Galán, R. H.; Collado, I. G. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoids patchoulol, ginsenol, cedrol and globulol by *Botrytis cinerea*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 329 – 334.
39. Rosslénbroich, H-J.; Stuebler, D. *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, **2000**, 19, 557 – 561.
40. Collado, I. G.; Sánchez, A. J. M.; Hanson, J. R. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Natural Products Reports*, **2007**, 24, 674 – 686.
41. Fonte: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/doenca.htm> Acessado em: 01/12/2011.
42. Fonte: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MorangoSemiHidroponico/doencas.htm> Acessado em: 01/12/2011.

43. Colmenares, A. J.; Aleu, J.; Durán-Patrón, R.; Collado, I. G.; Hernández-Galán, R. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology*, **2002**, 28, 997 – 1005.
44. Hanson, J. R. The biosynthesis of some sesquiterpenoids. *Pure and Applied Chemistry*, **1981**, 53, 1155 – 1162.
45. Deligeorgopoulou, A.; Macías-Sánchez, A. J.; Mobbs, D. J.; Hitchcock, P. B.; Hanson, J. R.; Collado, I. G.; Structure-activity relationships in the fungistatic activity against *Botrytis cinerea* of clovanes modified on ring C. *Journal of Natural Products*, **2004**, 67, 793 – 798.
46. Musharraf, S. G.; Najeeb, A.; Ali, R. A.; Ali, A. A.; Choudhary, M. I. Metabolites of the fungistatic agent 2 $\beta$ -methoxyclovan-9 $\alpha$ -ol by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 3234 – 3238.
47. Cengiz, M. F.; Certel, M.; Karakaş, B.; Göçmen, H. Residue contents of captan and procymidone applied on tomatoes grown in greenhouses and their reduction by duration of a pre-harvest interval and post-harvest culinary applications. *Food Chemistry*, **2007**, 100, 1611 – 1619.
48. Macías, F. A.; Castellano, D.; Molinillo, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2000**, 48, 2512 – 2521.
49. Wu, Y. S.; Lee, H. K.; Li, S. F. Y. High-performance chiral separation of fourteen triazole fungicides by sulfated  $\beta$ -cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **2001**, 912, 171 – 179.
50. Ronchi, A.; Farina, G.; Gozzo, F.; Tonelli, C. Effects of a triazolic fungicide on maize plant metabolism: modifications of transcript abundance in resistance-related pathways. *Plant Science*, **1997**, 130, 51 – 62.
51. Esteve-Turrillas, F. A.; Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A.; Development of immunoaffinity columns for pyraclostrobin extraction from fruit juices and analysis by liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218, 4902 – 4909.

52. Venancio, W. S.; Rodrigues, M. A. T.; Begliomini, E.; de Souza, N. L.; Physiological effects of strobilurin fungicides on plants. *UEPG*, **2003**, 9, 59 – 68.
53. Moon, S-S.; Kang, P. M.; Park, K. S.; Kim, C. H. Plant growth promoting and fungicidal 4-quinolinones from *Pseudomonas cepacia*. *Phytochemistry*, **1996**, 42, 365 – 368.
54. Daoubi, M.; Hernández-Galán, R.; Benharref, A.; Collado, I. G.; Screening study of lead compounds for natural product-based fungicides: antifungal activity and biotransformation of 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy- $\beta$ -himachalene by *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 6673 – 6677.
55. Newton, A. C. Protein kinase C: poised to signal. *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism*, **2010**, 298, E395 – E402.
56. Kang, J-H.; Asai, D.; Toita, R.; Kitazaki, H.; Katayama, Y. Plasma protein kinase C (PKC) $\alpha$  as a biomarker for the diagnosis of cancers. *Carcinogenesis*, **2009**, 30, 1927 – 1931.
57. Cole, G.; Dobkins, K. R.; Hansen, L. A.; Terry, R. D.; Saitoh, T. Decreased levels of protein kinase C in Alzheimer brain. *Brain Research*, **1988**, 452, 165 – 174.
58. El-Mekawy, S.; Meselhy, M. R.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Kawahata, T.; Otake, T. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry*, **2000**, 53, 457 – 464.
59. Kishi, Y.; Rando, R. R. Structural basis of protein kinase C activation by tumor promoters. *Accounts of chemical research*, **1998**, 31, 163 – 172.
60. Hoque, M.; Shamanna, R. A.; Guan, D.; Pe'ery, T.; Mathews, M. B. HIV-1 replication and latency are regulated by translational control of cyclin T1. *Journal of Molecular Biology*, **2011**, 410, 917 – 932.
61. Kauder, S. E.; Bosque, B.; Lindqvist, A.; Planelles, V.; Verdin, E. Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *Plos Pathogens*, **2009**, 5, 1 – 15.
62. Reuse, S.; Calao, M.; Kabeya, K.; Guiguen, A.; Gatot, J-S.; Quivy, V.; Vanhulle, C.; Lamine, A.; Vaira, D.; Demonte, D.; Martinelli, V.; Veithen, E.; Cherrier, T.; Avettand, V.; Poutrel, S.; Piette, J.; de Launoit, Y.; Moutschen, M.; Burny, A.; Rouzioux, C.; de Wit, S.; Herbein, G.; Rohr,

- O.; Collette, Y.; Lambotte, O.; Clumeck, N.; Lint, C. V. Synergistic activation of HIV-1 expression by deacetylase inhibitors and prostratin: implications for treatment of latent infection. *Plos One*, **2009**, 4, 1 – 19.
63. Le Douce, V.; Herbein, G.; Rohr, O.; Schwartz, C. Molecular mechanisms of HIV-1 persistence in the monocyte-macrophage lineage *Retrovirology*, **2010**, 7, 1 – 16.
64. Wayengera, M. Targeting persistent HIV infection: where and how, if possible? *HIV & AIDS Review*, **2011**, 10, 1 – 8.
65. Kulkosky, J.; Culnan, D. M.; Roman, J.; Dornadula, G.; Schnell, M.; Boyd, M. R.; Pomerantz, R. J. Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood*, **2001**, 98, 3006 – 3015.
66. Fokkens, W. J.; Ebbens, F.; van Drunen, C. M. Fungus: a role in pathophysiology of chronic rhinosinusitis, disease modifier, a treatment target, or no role at all? *Immunology And Allergy Clinics of North America*, **2009**, 29, 677 – 688.
67. Lee, S-H.; Kim, C-G.; Kang, H. Temporal dynamics of bacterial and fungal communities in a genetically modified (GM) rice ecosystem. *Microbial Ecology*, **2011**, 61, 646 – 659.
68. Takahashi, J. A.; de Castro, M. C. M.; de Souza, G. G.; Lucas, E. M. F.; Bracarense, A. A. P.; Abreu, L. M.; Marriel, I.E.; Oliveira, M. S.; Floreano, M. B.; Oliveira, T. S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *Journal de Mycologie Médicale*, **2008**, 18, 198 – 204.
69. Guiraud, P.; Bonnet, J.L.; Boumendjel, A.; Kadri-Dakir, M.; Dusser, M.; Bohatier, J.; Steiman, R. Involvement of *Tetrahymena pyriformis* and selected fungi in the elimination of anthracene, and toxicity assessment of the biotransformation products. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2008**, 69, 296 – 305.
70. Martin, G. D. D.; Reynolds, W. F.; Reese, P. B. Investigation of the importance of the C-2 and C-13 oxygen functions in the transformation of

- stemodin analogues by *Rhizopus oryzae* ATCC 11145. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 2211 – 2217.
71. de Souza, G. G.; Anconi, C. P. A.; Cornelissen, S.; De Almeida, W. B.; Dos Santos, H. F.; Fortes, I. C. P.; Takahashi, J. A. Selective activity of *Mucor plumbeus* reductase towards (-)-camphorquinone. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2009**, 36, 1023 – 1027.
72. Faramarzi, M. A.; Yazdi, M. T.; Shafiee, A.; Zarrini, G. Microbial transformation of hydrocortisone by *Acremonium strictum* PTCC 5282. *Steroids*, **2002**, 67, 869 – 872.
73. Carballeira, J. D.; Valmaseda, M.; Alvarez, E.; Gago, J. V. S. *Gongronella butleri*, *Schizosaccharomyces octosporus* and *Diplogelasinospora grovesii*: novel microorganisms useful for the stereoselective reduction of ketones. *Enzyme and Microbial Technology*, **2004**, 34, 611 – 623.
74. Wang, S.; Marcone, M. F. The biochemistry and biological properties of the world's most expensive underground edible mushroom: truffles. *Food Research International*, **2011**, 44, 2567 – 2581.
75. Trytek, M.; Fiedurek, J.; Skowronek, M. Biotransformation of (R)-(+)-limonene by the psychrotrophic fungus *Mortierella minutissima* in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxygenated culture. *Food Technology and Biotechnology*, **2009**, 47, 131 – 136.
76. Baumann, L. S. Less-known botanical cosmeceuticals. *Dermatologic Therapy*, **2007**, 20, 330-342.
77. Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, **1998**, 36, 347 – 363.
78. Daleprane, J. B.; Freitas, V. S.; Pacheco, A.; Rudnicki, M.; Faine, L. A.; Dörr, F. A.; Ikegaki, M.; Salazar, L. A.; Ong, T. P.; Abdalla, D. S. P. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. doi:10.1016/j.jnutbio. 2011.02.012.
79. Packer, J. F.; da Luz, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista brasileira de farmacognosia*, **2007**, 17, 102 – 107.

80. Ramos, A. F. N.; Miranda, J. L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, **2007**, 13, 697 – 710.
81. Melliou, E.; Stratis, E.; Chinou, I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece - antimicrobial activity. *Food Chemistry*, **2007**, 103, 375 – 380.
82. Lotfy, M. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **2006**, 7, 22 – 31.
83. Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinou L, Karathanos VT. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, **2009**, 112, 452 – 461.
84. Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernandez-Lopez, J.; Perez-Alvarez, J. A. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Sciences*, **2008**; R117 – R124.
85. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, **1999**, 65, 235 – 40.
86. Gregoris, E.; Fabris, S.; Bertelle, M.; Grassato, L.; Stevanato, R. Propolis as potential cosmeceutical sunscreen agent for its combined photoprotective and antioxidant properties. *International Journal of Pharmaceutics*, **2011**, 405, 97 – 101.
87. Domsch, K. H.; Gams, W.; Anderson, T. H. Compendium of soil fungi. London: Academic Press, **1980**. 2v. Reprint 1993
88. Ellis, M. B. Dematiaceous hyphomycetes. Wallingford: CAB International, **1971**. 608 p.
89. Ellis, M. B. More dematiaceous hyphomycetes. Wallingford: CAB International, **1976**. 507 p.
90. Moxham, S. E.; Buczacki, S. T. Chemical composition of the resting spore wall of *Plasmodiophora brassicae*. *Transactions of the British Mycological Society*, **1983**, 80, 297 – 304.
91. Collado, I. G.; Hanson, J. R.; Macías-Sánchez, A. J. The cleavage of caryophyllene oxide catalysed by tetracyanoethylene. *Tetrahedron*, **1996**, 52, 7961 – 7972.

92. Thomas, A. F.; Rey, F. The Baeyer-Villiger reaction of pinanones (bicyclo[3.1.1]heptanones), *Tetrahedron*, **1992**, 48, 1927 – 1942.
93. Cakici, M.; Catir, M.; Karabuga, S.; Kilic, H.; Ulukanli, S.; Gulluce, M.; Orhan, F. Synthesis and biological evaluation of (S)-4-aminoquinazoline alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 2027 – 2031.
94. Collado, I. G.; Hanson, J. R.; Hitchcock, P. B.; Macías-Sánchez, A. J. Stereochemistry of epoxidation of some caryophyllenols. *Journal of Organic Chemistry*, **1997**, 62 (7), 1965 – 1969.
95. Nielsen, L. K.; Smyth, G. K.; Greenfield, P. F.; Hemacytometer cell count distributions: implications of non-poisson behavior. *Biotchnology Progress*, **2001**, 7, 560 – 566.
96. Aleu, J.; Hernández-Galán, R.; Collado, I. G. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoid isoprobotryan-9 $\alpha$ -ol by *Botrytis cinerea* *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2002**, 16, 249 – 253.
97. Aleu, J.; Hanson, J. R.; Galán, R. H; Collado, I. G. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoids patchoulol, ginsenol, cedrol and globulol by *Botrytis cinerea*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 329 – 334.
98. Pinedo-Rivilla, C.; Aleu, J.; Collado, I. G. Enantiomeric oxidation of organic sulfides by the filamentous fungi *Botrytis cinerea*, *Eutypa lata* and *Trichoderma viride*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2007**, 49, 18 – 23.
99. Bustillo, A. J.; Aleu, J.; Hernández-Galán, R.; Collado, I. G. Biotransformation of the fungistatic compound (R)-(+)-1-(4'-chlorophenyl)propan-1-ol by *Botrytis cinerea*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2003**, 21, 267 – 271.
100. 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* seedings. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, **2005**, 60, 72-78.
101. Trusheva, B.; Trunkova, D.; Bankova, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study, *Chemistry Central Journal*, **2007**, 1 – 4.

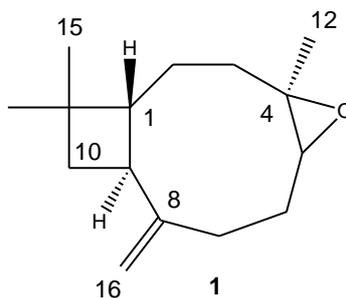
102. Shrestha, S. P.; Narukawa, Y.; Takeda, T. Chemical constituents of Nepalese propolis: isolation of new dalbergiones and related compounds. *Journal of Natural Medicines*, **2007**, 61, 73 – 76.
103. Li, F.; Awale, S.; Zhang, H.; Tezuka, Y.; Esumi, H.; Kadota, S. Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer cell line. *Journal of Natural Products*, **2009**, 72, 1283 – 1287.
104. Rebordinos, L.; Cantoral, J. M.; Prieto, M. V.; Hanson, J. R.; Collado, I. G. The phytotoxic activity of some metabolites of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, **1996**, 42, 383 – 387.
105. Deighton, N.; Muckenschnabel, I.; Colmenares, A. J.; Collado, I. G.; Williamson, B. Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, **2001**, 57, 689 – 692.
106. Pettersen, R. C.; Ferguson, G. The structure and stereochemistry of phorbol, diterpene parent of co-carcinogens of croton oil. *Chemical Communications*, **1967**, 716 – 717.
107. Márquez, N.; Calzado, M. A.; Sánchez-Duffhues, G.; Pérez, M.; Minassi, A.; Pagani, A.; Appendino, G.; Diaz, L.; Muñoz-Fernández, M. A.; Muñoz, E. Differential effects of phorbol-13-monoesters on human immunodeficiency virus reactivation. *Biochemical pharmacology*, **2008**, 75, 1370 – 1380.
108. Trushin, S. A.; Bren, G. D.; Asin, S.; Pennington, K. N.; Paya, C. V.; Badley, A. D. Human immunodeficiency virus reactivation by phorbol esters or T-Cell receptor ligation requires both PKC  $\alpha$  and PKC  $\theta$ . *Journal of Virology*, **2005**, 79, 9821 – 9830.
109. Park, K-R.; Nama, D.; Yun, H-M.; Lee, S-G.; Jang, H-J.; Sethi, G.; Cho, S. K.; Ahn, K. S.  $\beta$ -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Letters*, **2011**, 312, 178 – 188.
110. Heymann, H.; Tezuka, Y.; Kikuchi, T.; Supriyatna, S. Constituents of *Sindora sumatrana* MIQ. I. Isolation and NMR spectral analysis of sesquiterpenes from the dried pods. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **1994**, 42, 138 – 146.

111. Macías-Sánchez, A. J. Síntesis de análogos de los intermedios metabólicos en la biosíntesis de botridial, **1996**.
112. Tsui, W-Y.; Brown, G. Acid-catalysed rearrangement of caryophyllene oxide. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* , **1996**, 2507 – 2509.
113. Gliszczynska, A.; Lysek, A.; Janeczko, T.; Switalska, M.; Wietrzyk, J.; Wawrzencyk, C. Microbial transformation of (+)-nootkatone and the antiproliferative activity of its metabolites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2011**, 19, 2464 – 2469.
114. Wilker, W.; Leibfrtz, D.; Kerssebaum, R.; Bernel, W. Gradient selection in inverse heteronuclear spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **1993**, 31, 287 – 292.
115. Chung, H-M.; Chen, Y-H.; Hwang, T-L.; Chuang, L-F.; Wang, W-H.; Sung, P-J. *Tetrahedron letters*, **2010**, 51, 2734 – 2736.
116. Fraga, B. M.; Guillermo, R.; Hernández, M. G.; Chamy, M. C.; Garbarino, J. A. Biotransformation of two *ent*-Pimara-9(11),15-diene derivatives by *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Natural Products*, **2009**, 72, 87 – 91.
117. Pinheiro, L.; Marsaioli, A. J. Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2007**, 44, 78 – 86.
118. Borges, K. B.; Borges, W. S.; Durán-Patrón, R.; Pupo, M. T.; Bonato, P. S.; Collado, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 385 – 397.
119. Hu, S.; Sun, D-A.; Tian, X.; Fang, Q. Regio and stereoselective hydroxylation of taxoids by filamentous fungi. *Chirality*, **2002**, 14, 495 – 497.
120. Collado, I. G.; Aleu, J.; Macías-Sánchez, A. J.; Hernández-Galán, R. Inhibition of *Botrytis cinerea* by new sesquiterpenoid compounds obtained from the rearrangement of isocaryophyllene. *Journal of Natural Products*, **1994**, 57, 738 – 746.
121. Patil, I. S.; Kulkarni, S.; Hedge, R. K. Bioassay of fungicides against *Drechslera sorokiniana* (Sacc). *Pesticides*, **1986**, 20, 30 – 31.

122. Macías, F. A.; Galindo, J. C. G.; Castellano, D.; Velasco, R. F. Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models (I): *trans,trans*-Germacranolides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **1999**, 47, 4407 – 4414.
123. Bhowmik, P. C.; Inderjit. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. *Crop Protection*, **2003**, 22, 661 – 671.
124. Ding, L.; Jing, H.; Qin, B.; Qi, L.; Li, J.; Wang, T.; Liu, G. Regulation of cell division and growth in roots of *Lactuca sativa* L. seedlings by the ent-kaurene diterpenoid rabdosin B. *Journal of Chemical Ecology*, **2010**, 36, 553 – 563.

# Anexo 1

## Dados físico-químicos

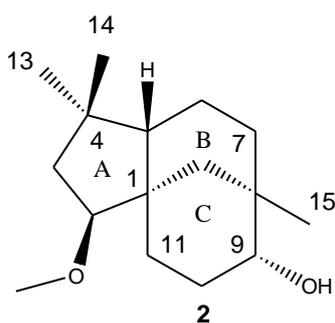
Óxido de cariofileno<sup>23</sup>

**FM/MM:** C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O / 220 g.mol<sup>-1</sup>

**Aspecto físico:** sólido; **Faixa de fusão:** 108-110 °C

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ<sub>H</sub>):** pág. 49.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ<sub>C</sub>):** pág. 49.

2β-Metoxiclovan-9α-ol<sup>24</sup>

**FM/MM:** C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub> / 252 g.mol<sup>-1</sup>

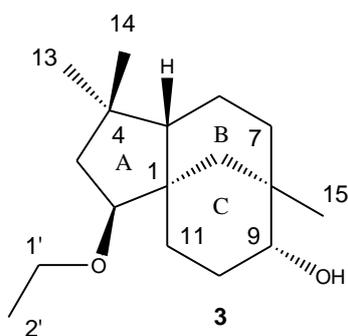
**Aspecto físico:** sólido; **Faixa de fusão:** 51-52°C

**[α]<sup>25</sup><sub>D</sub> +6** (c 0,005, CHCl<sub>3</sub>)

**IV (KBr, ν̄ cm<sup>-1</sup>):** 3399; 2930; 2860; 1463; 1348; 1116.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ<sub>H</sub>):** pág. 52.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ<sub>C</sub>):** pág. 52.



2β-Etoxiclovan-9α-ol

**FM/MM:** C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> / 266 g.mol<sup>-1</sup>

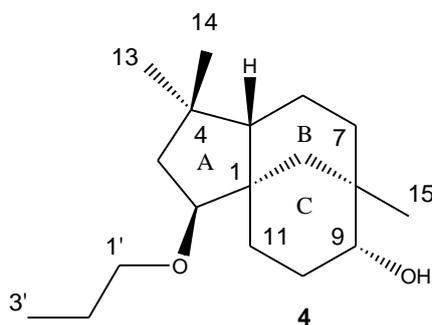
**Aspecto físico:** sólido; **Faixa de fusão:** 51-52°C

**EMAR:** 266,2268 *m/z* (calc.: 266,4189); [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> +1,5 (c 0,38, CHCl<sub>3</sub>)

**IV (KBr,  $\bar{\nu}$  cm<sup>-1</sup>):** 3422; 2927; 2864; 1459; 1365; 1107.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ<sub>H</sub>):** pág. 56.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ<sub>C</sub>):** pág. 56.



2β-Propoxiclovan-9α-ol

**FM/MM:** C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> / 280 g.mol<sup>-1</sup>

**Aspecto físico:** sólido; **Faixa de fusão:** 68-70 °C

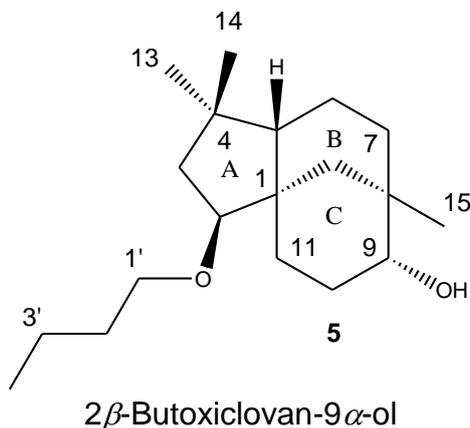
**EMAR:** 280,2422 *m/z* (calc.: 280,4455); [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> +9,25 (c 0,38, CHCl<sub>3</sub>)

**IV (KBr,  $\bar{\nu}$  cm<sup>-1</sup>):** 3447; 2950; 2865; 1463; 1361; 1105.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ<sub>H</sub>):** pág. 58.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ<sub>C</sub>):** pág. 58.

## Anexo 1



**FM/MM:**  $C_{19}H_{34}O_2$  /  $294 \text{ g.mol}^{-1}$

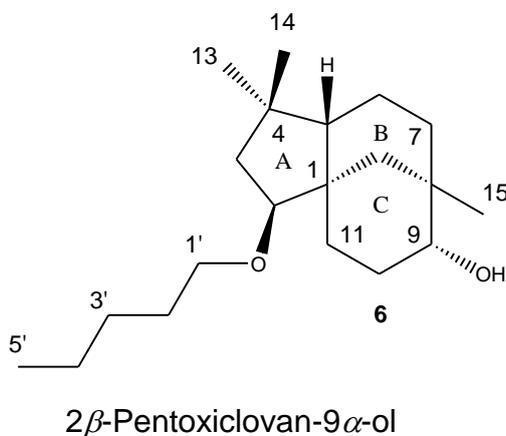
**Aspecto físico:** sólido; **Faixa de fusão:**  $50-52 \text{ }^\circ\text{C}$

**EMAR:**  $294,2520 \text{ m/z}$  (calc.:  $294,4721$ );  $[\alpha]^{25}_D +10,0$  (c 0,38,  $\text{CHCl}_3$ )

**IV (KBr,  $\bar{\nu} \text{ cm}^{-1}$ ):** 3407; 2931; 2865; 1463; 1362; 1106.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $\delta_H$ ):** pág. 61.

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz,  $\delta_C$ ):** pág. 61.



**FM/MM:**  $C_{20}H_{36}O_2$  /  $308 \text{ g.mol}^{-1}$

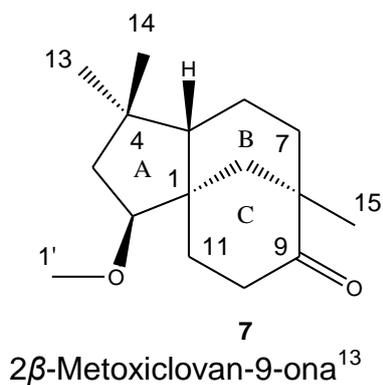
**Aspecto físico:** sólido; **Faixa de fusão:**  $35-38 \text{ }^\circ\text{C}$ ;

**EMAR:**  $308,2662 \text{ m/z}$  (calc.:  $308,4986$ );  $[\alpha]^{25}_D +11,25$  (c 0,38,  $\text{CHCl}_3$ )

**IV (KBr,  $\bar{\nu} \text{ cm}^{-1}$ ):** 3443; 2937; 2865; 1463; 1363; 1105.

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $\delta_H$ ):** pág. 63.

**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz,  $\delta_C$ ):** pág. 63.



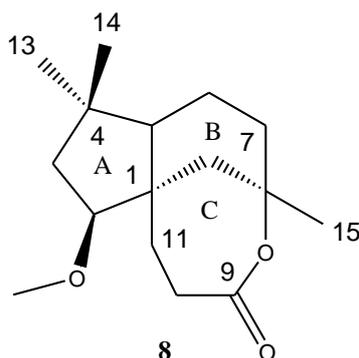
**FM/MM:** C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub> / 250 g.mol<sup>-1</sup>

**Aspecto físico:** oleoso; [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> -63,9 (c 0,013, CHCl<sub>3</sub>)

**IV (KBr,  $\bar{\nu}$  cm<sup>-1</sup>):** 2938; 2860; 1704; 1455; 1100.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ<sub>H</sub>):** pág. 66.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ<sub>C</sub>):** pág. 66.



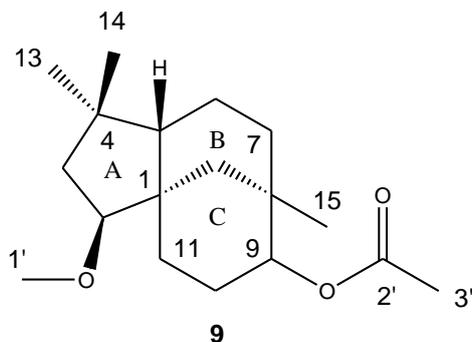
**FM/MM:** C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub> / 266 g.mol<sup>-1</sup>

**Aspecto físico:** sólido; [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> -21,4 (c 0,38, CHCl<sub>3</sub>)

**IV (KBr,  $\bar{\nu}$  cm<sup>-1</sup>):** 2930; 2868; 1712; 1108.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ<sub>H</sub>):** pág. 69.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ<sub>C</sub>):** pág. 69.



Acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol

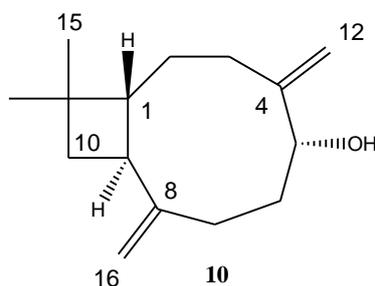
**FM/MM:** C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub> / 294 g.mol<sup>-1</sup>

**Aspecto físico:** oleoso; [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> -26,8 (c 0,001 CHCl<sub>3</sub>)

**IV (KBr, ν̄ cm<sup>-1</sup>):** 2938; 2860; 1735; 1108.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ<sub>H</sub>):** pág. 71.

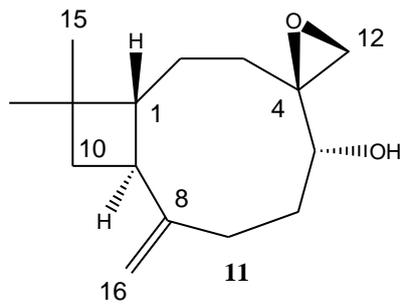
**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ<sub>C</sub>):** pág. 71.

5α-Hidroxicariofil-4(12),8(13)-dieno<sup>26</sup>

**FM/MM:** C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O / 220 g.mol<sup>-1</sup>

**Aspecto físico:** oleoso; [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> +25,0 (c 0,011 CHCl<sub>3</sub>)

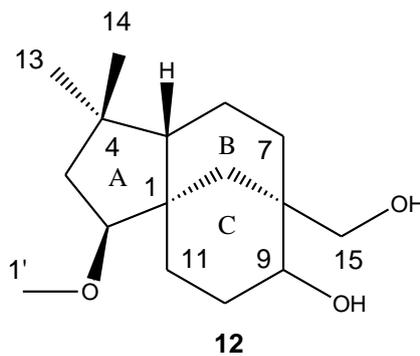
**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ<sub>H</sub>):** pág. 73.

(4*S*,5*R*)-5-Hidroxicariofil-8(13)-eno<sup>26</sup>

**FM/MM:** C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub> / 236 g.mol<sup>-1</sup>

**Aspecto físico:** sólido; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -10,0 (c 1,85 CHCl<sub>3</sub>)

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ<sub>H</sub>):** pág. 73.

(2*S*,9*R*)-2-Metoxiclovan-9,15-diol<sup>24</sup>

**FM/MM:** C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> / 268 g.mol<sup>-1</sup>

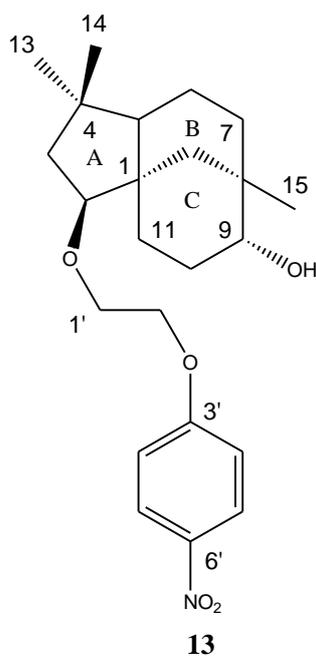
**Aspecto físico:** sólido; **Faixa de fusão:** 52-53 °C

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -2,0 (c 0,78 CHCl<sub>3</sub>)

**IV (KBr, ν̄ cm<sup>-1</sup>):** 3399; 2938; 2868; 1642; 1463.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ<sub>H</sub>):** pág. 75.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ<sub>C</sub>):** pág. 75.



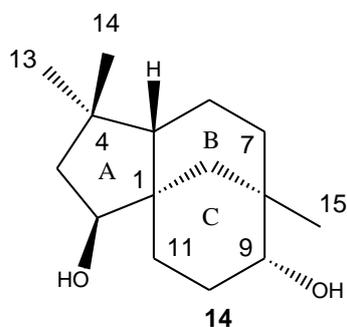
$2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol

**FM/MM:** C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>5</sub> / 404 g.mol<sup>-1</sup>

**Aspecto físico:** oleoso;  $[\alpha]^{25}_D$  -4,0 (c 6,4 CHCl<sub>3</sub>)

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz,  $\delta_H$ ):** pág. 77.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz,  $\delta_C$ ):** pág. 77.



Clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol<sup>28</sup>

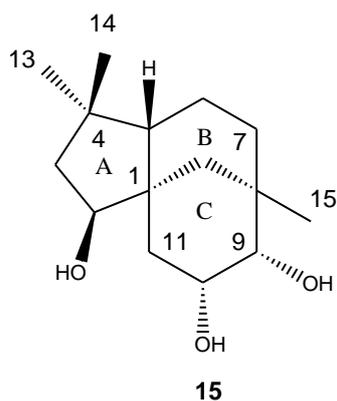
**FM/MM:** C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub> / 238 g.mol<sup>-1</sup>

**Aspecto físico:** sólido;  $[\alpha]^{25}_D$  (c 0,005, CHCl<sub>3</sub>)

**IV (KBr,  $\bar{\nu}$  cm<sup>-1</sup>):** 3413; 2944; 2863; 1461.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz,  $\delta_H$ ):** pág. 80.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz,  $\delta_C$ ):** pág. 80.



*2β*-Metoxiclovan-9 $\alpha$ , 10 $\alpha$ -diol

**FM/MM:** C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> / 268 g.mol<sup>-1</sup>

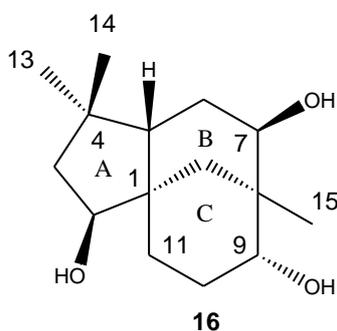
**Aspecto físico:** oleoso; **EMAR:** 268,2024 *m/z* (calc.: 268,3906)

**[ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub>** +4,5 (c 0,001, MeOH)

**IV (KBr,  $\bar{\nu}$  cm<sup>-1</sup>):** 3420; 2928; 2867; 1462; 1100.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz,  $\delta$ <sub>H</sub>):** pág. 84.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz,  $\delta$ <sub>C</sub>):** pág. 84.



*2β*-Metoxiclovan-7 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol

**FM/MM:** C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> / 268 g.mol<sup>-1</sup>

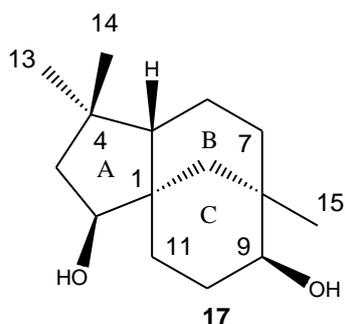
**Aspecto físico:** sólido; **Faixa de fusão:** 77-80 °C

**EMAR:** 268,1979 *m/z* (calc.: 268,3906); **[ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub>** -11,5 (c 0,001, MeOH)

**IV (KBr,  $\bar{\nu}$  cm<sup>-1</sup>):** 3411; 2930; 2867; 1462; 1049.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz,  $\delta$ <sub>H</sub>):** pág. 87.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz,  $\delta$ <sub>C</sub>):** pág. 87.

Clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol<sup>13</sup>

**FM/MM:** C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub> / 238 g.mol<sup>-1</sup>

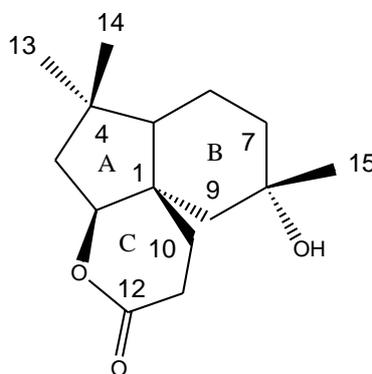
**Aspecto físico:** sólido; **Faixa de fusão:** 172-174 °C

**[ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub>** +15,3 (c 0,0028 CHCl<sub>3</sub>)

**IV (KBr,  $\bar{\nu}$  cm<sup>-1</sup>):** 3407; 2938; 2860; 1459.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz,  $\delta$ <sub>H</sub>):** pág. 91.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz,  $\delta$ <sub>C</sub>):** pág. 91.



18

Rumfelclovano A<sup>29</sup>

**FM/MM:** C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub> / 252 g.mol<sup>-1</sup>

**Aspecto físico:** oleoso; **[ $\alpha$ ]<sup>23</sup><sub>D</sub>** +11,0 (c 0,025 CHCl<sub>3</sub>)

**IV (KBr,  $\bar{\nu}$  cm<sup>-1</sup>):** 3444; 2927; 2869; 1730; 1463.

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz,  $\delta$ <sub>H</sub>):** pág. 93.

**RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz,  $\delta$ <sub>C</sub>):** pág. 93.

# Anexo 2

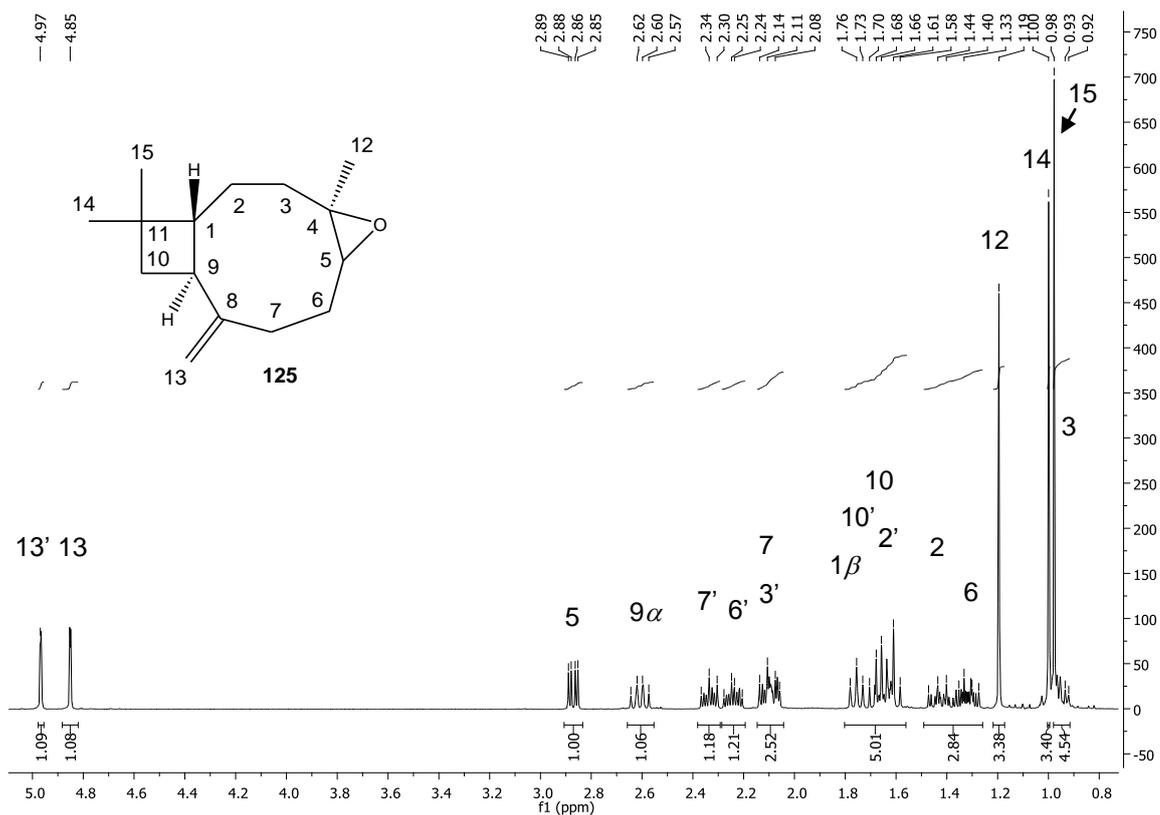


Figura 97 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do óxido de cariofileno (125).

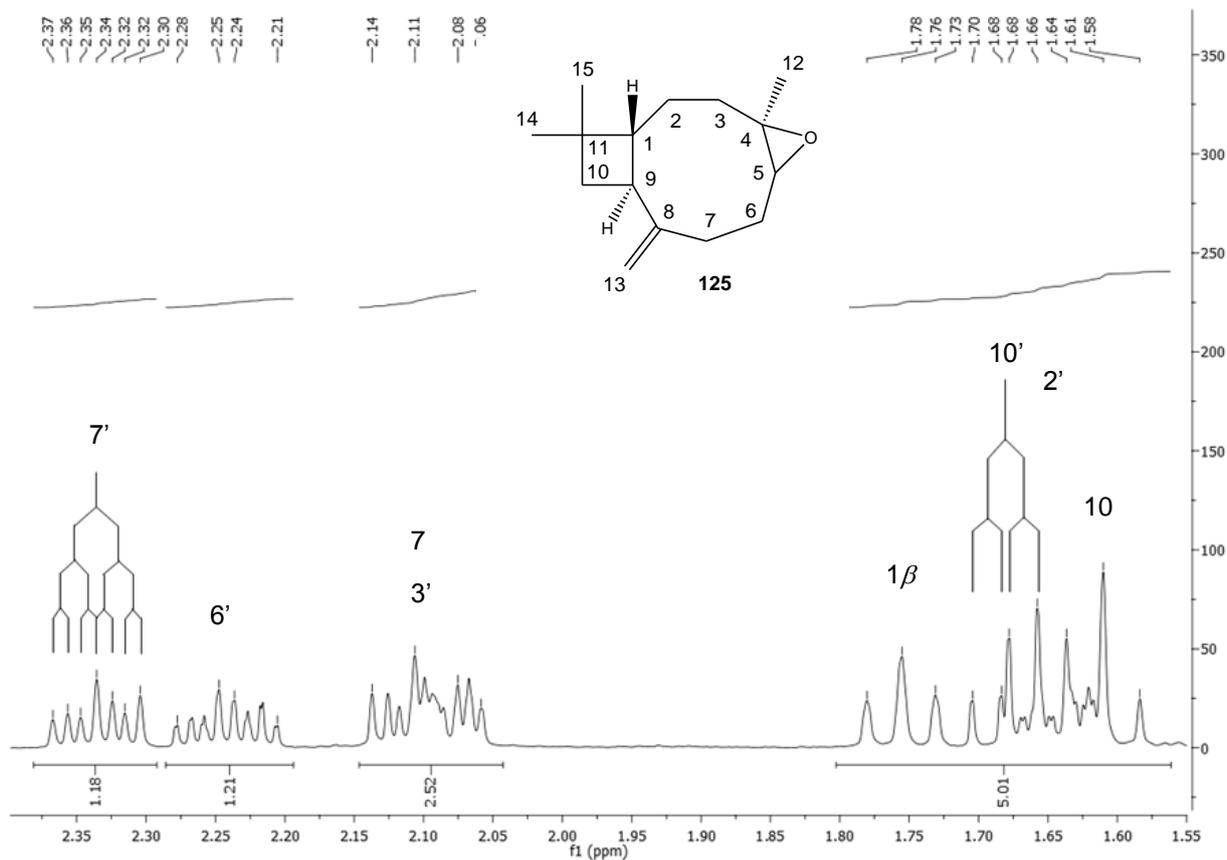


Figura 98 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do óxido de cariofileno (125). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,6 – 2,4.

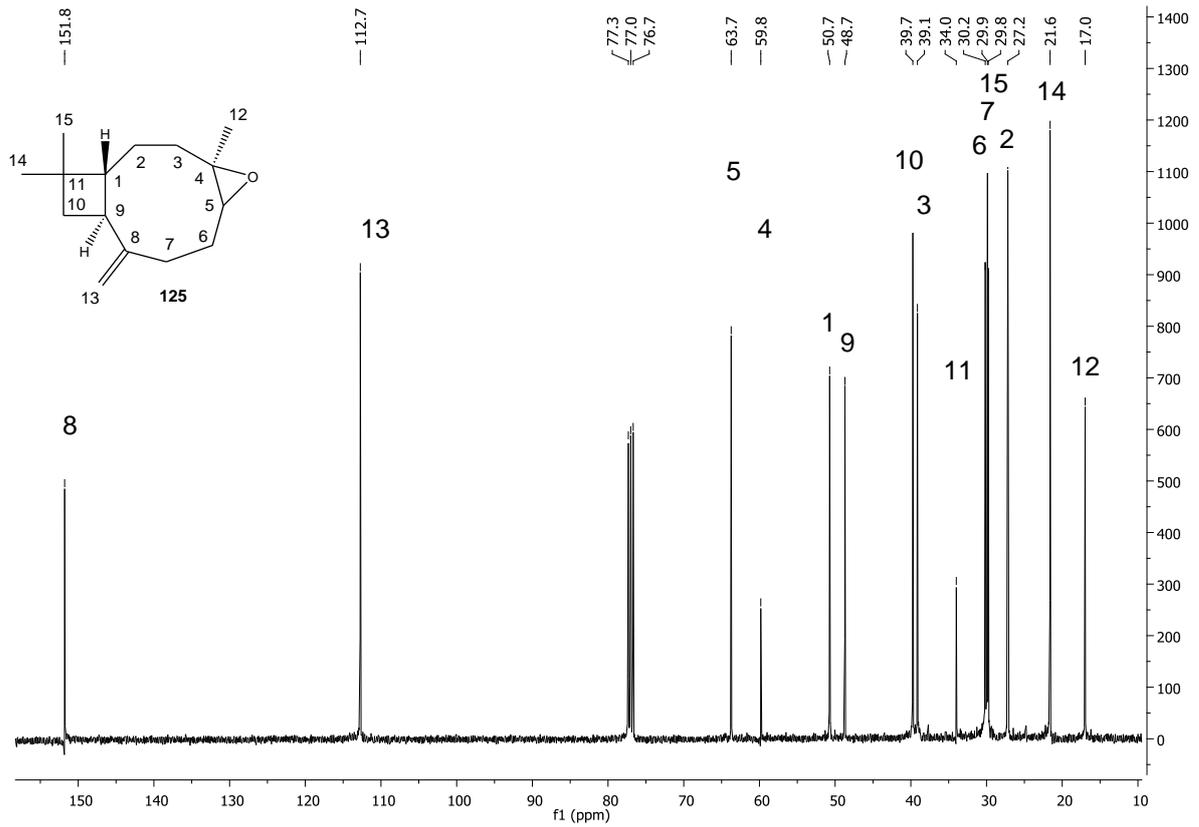


Figura 99 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do óxido de cariofileno (125).

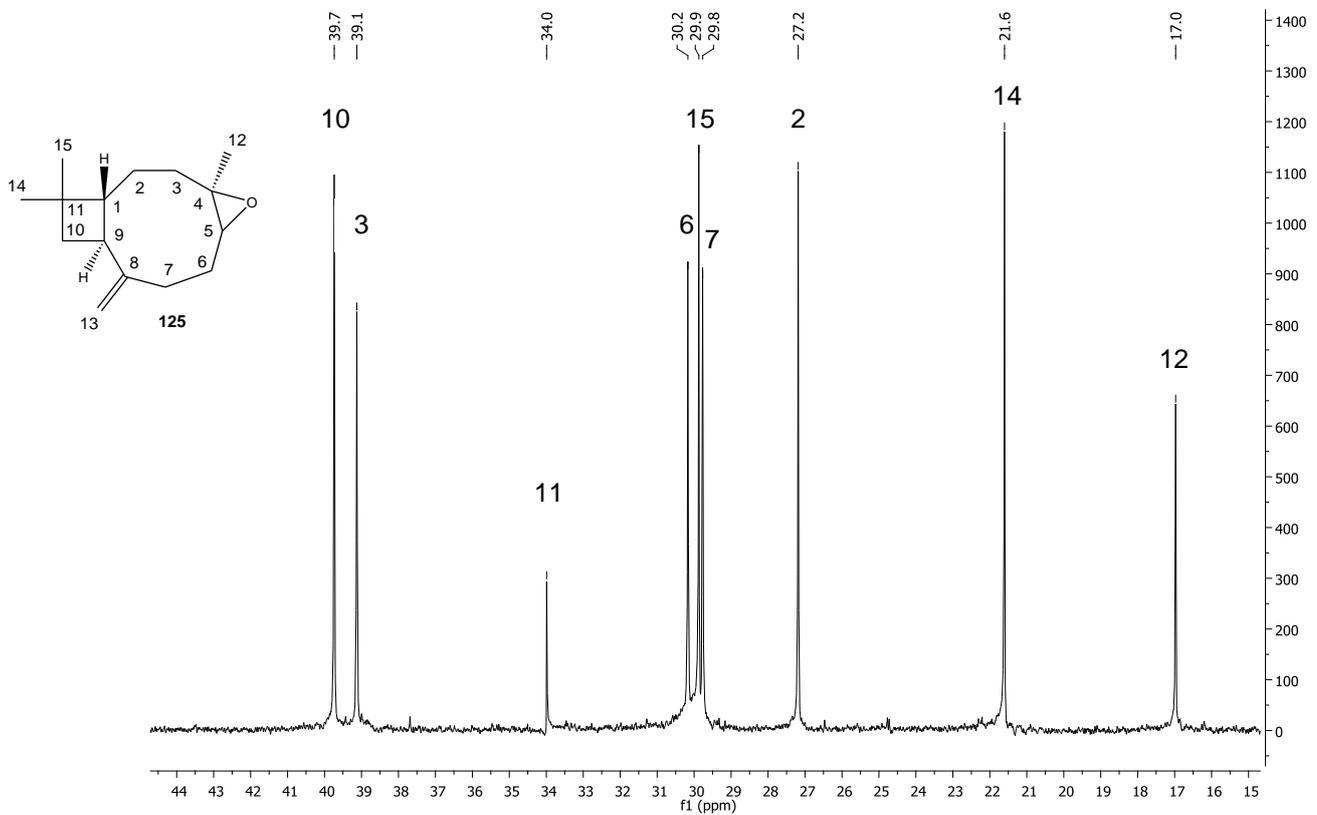


Figura 100 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do óxido de cariofileno (125). Expansão da região entre  $\delta_c$  15,0 – 44,0.

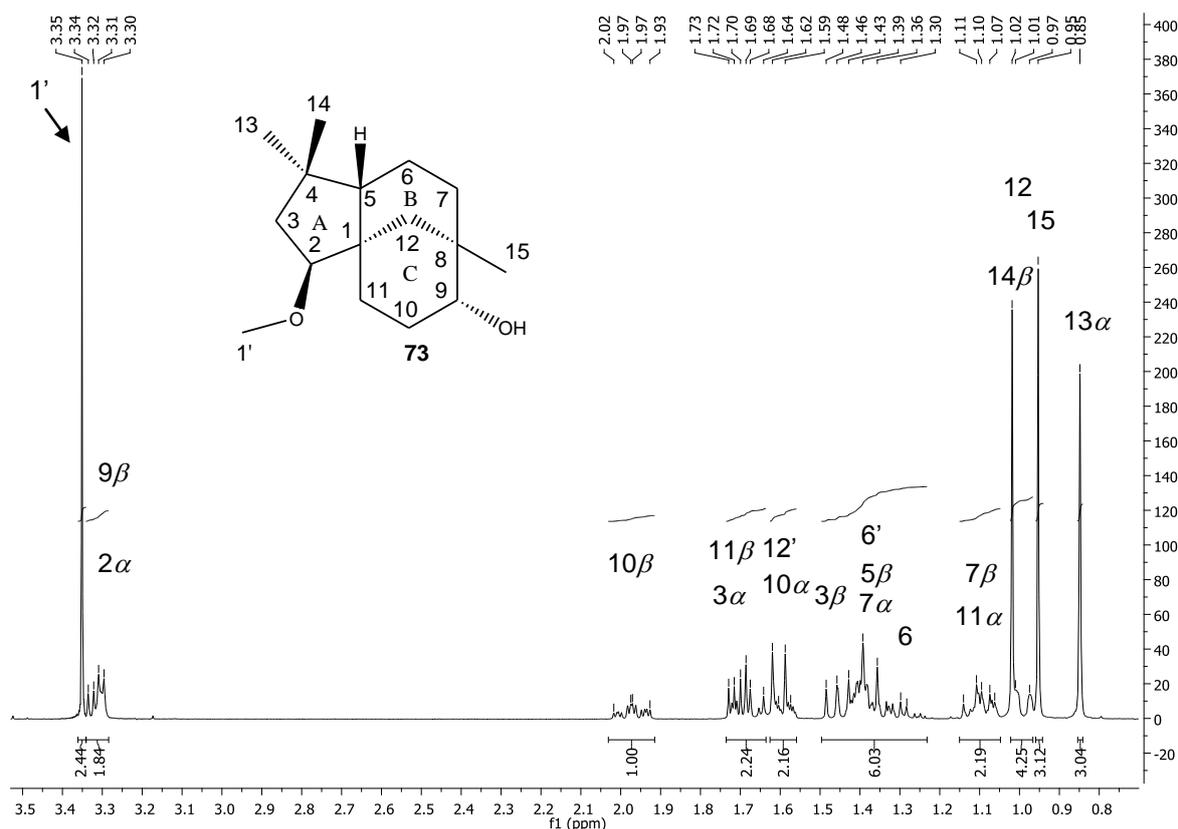


Figura 101 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**).

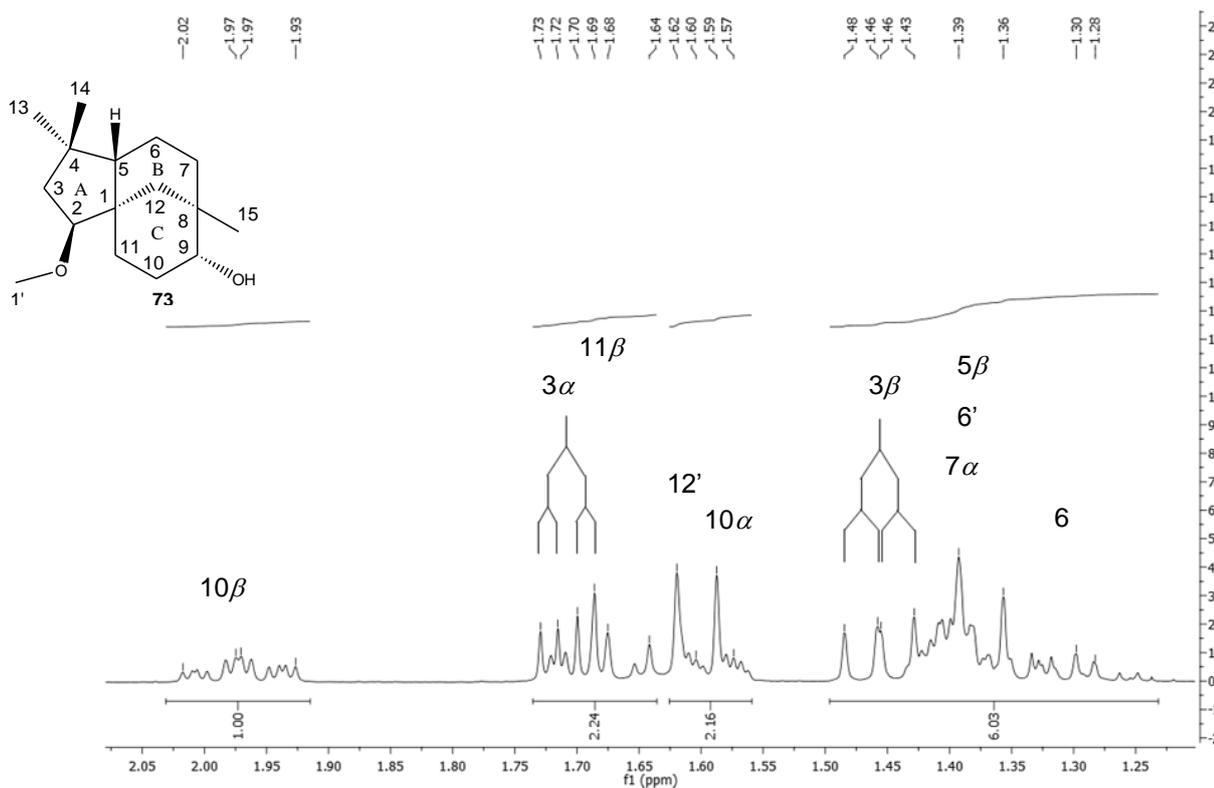


Figura 102 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**).  
Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,2 – 2,1.

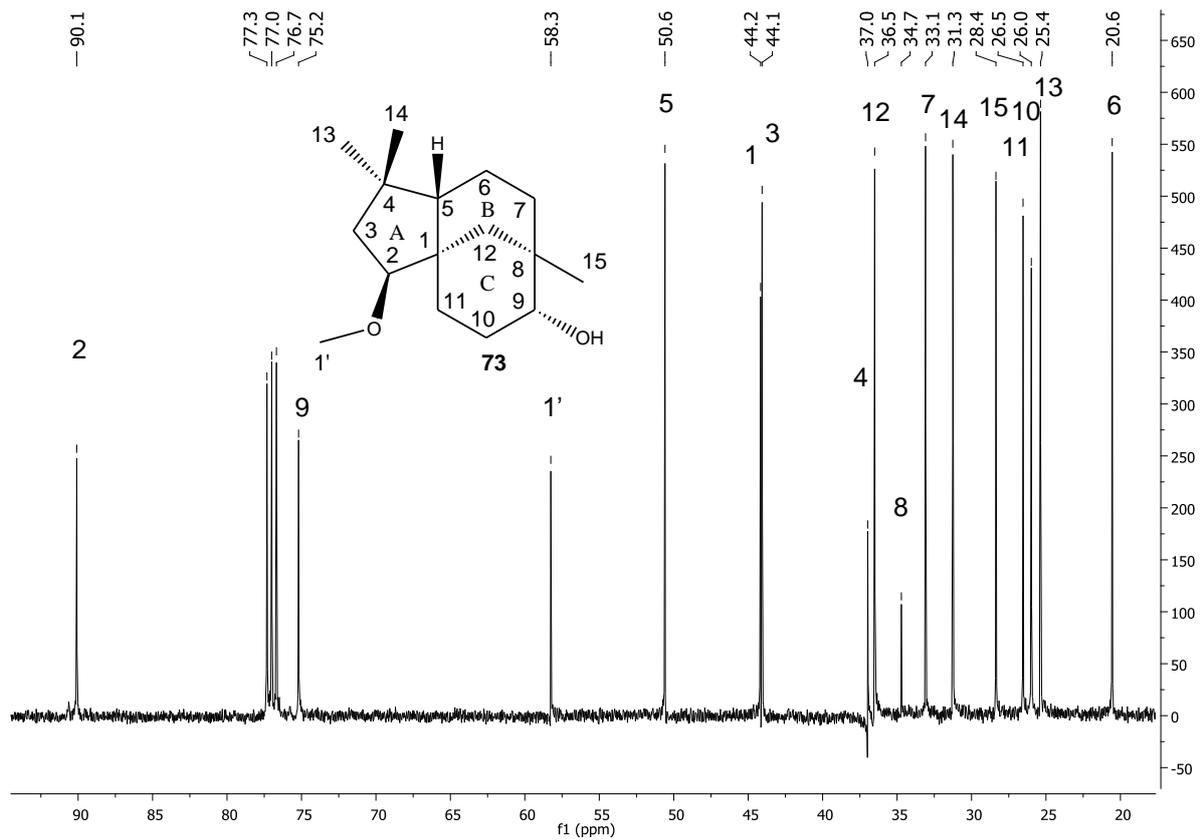


Figura 103 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**).

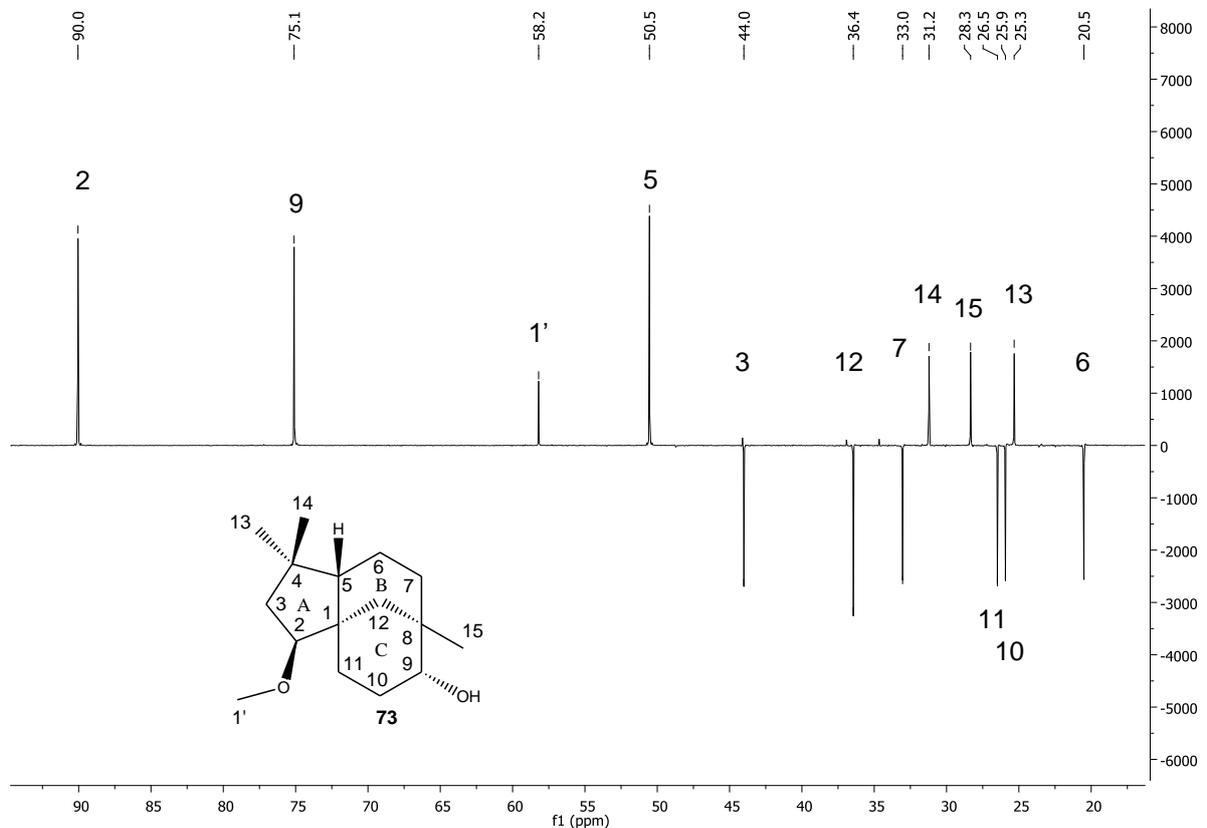


Figura 104 – Subespectro DEPT-135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**).

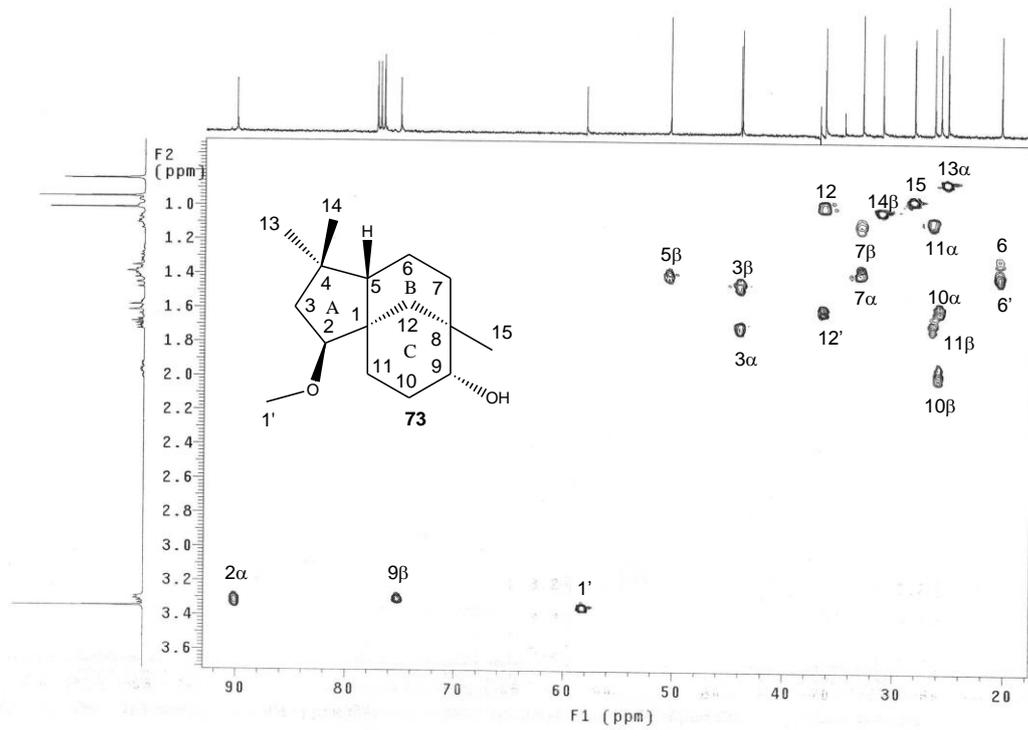


Figura 105 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-metoxiclovan-9α-ol (73).

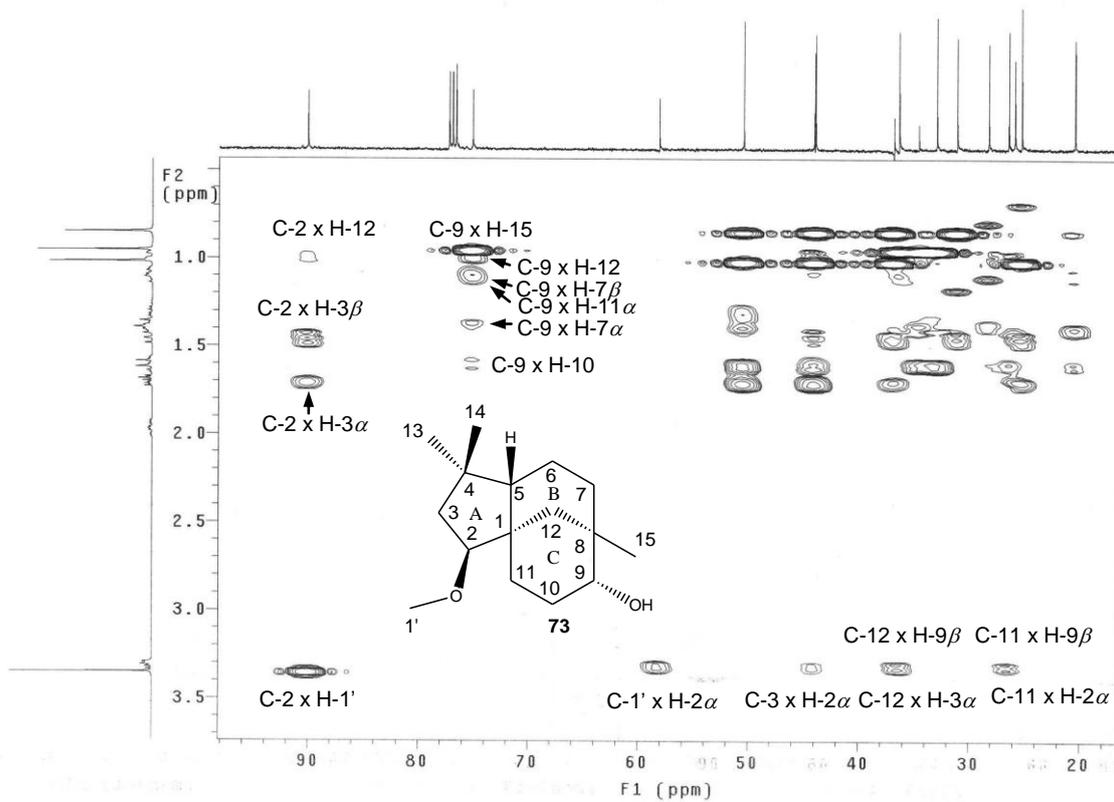
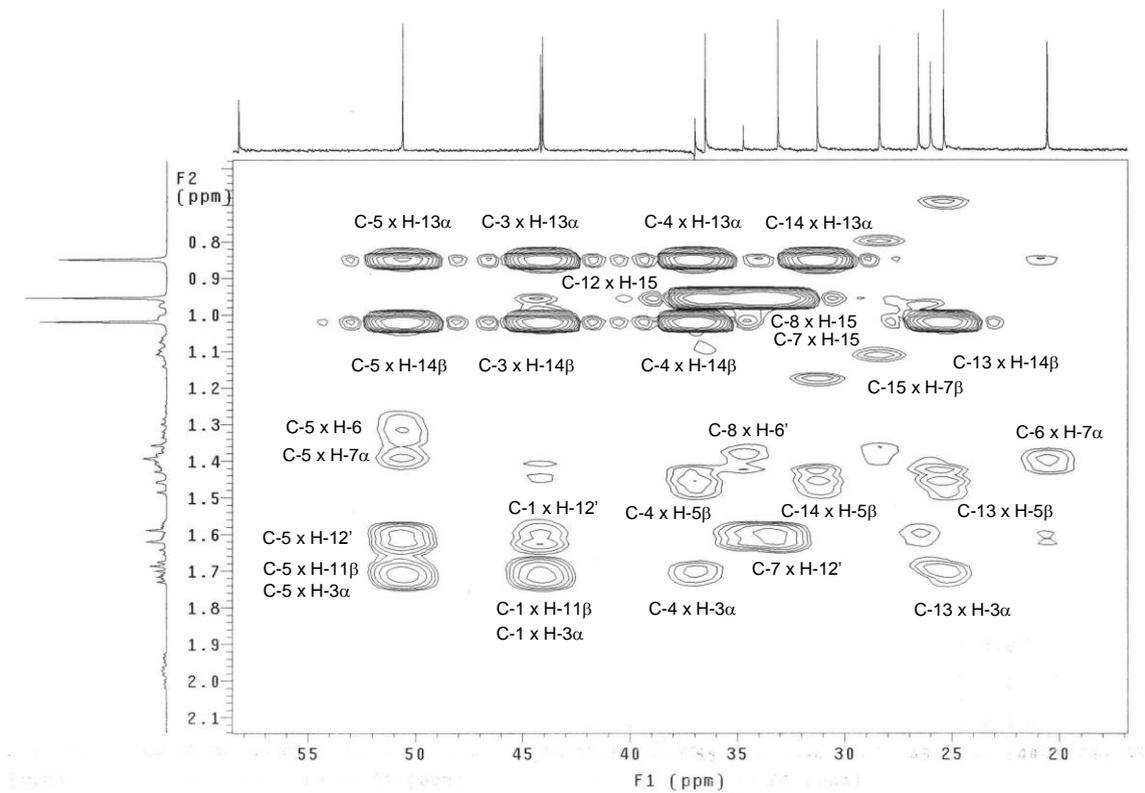
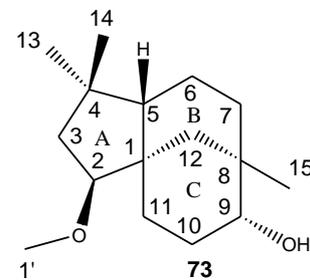


Figura 106 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-metoxiclovan-9α-ol (73).



**Figura 107** - Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**73**).  
Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,7 – 2,1.



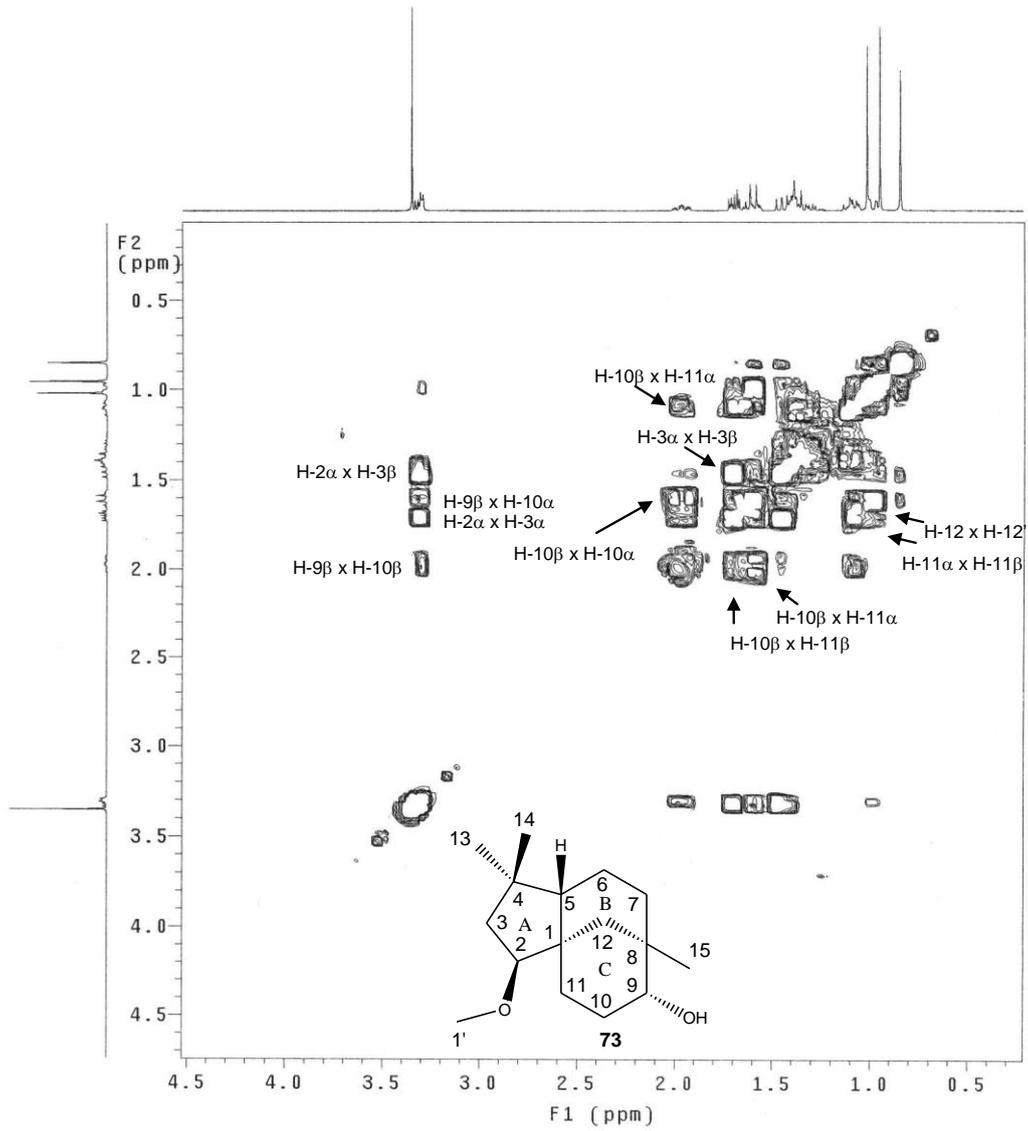


Figura 108 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (73).

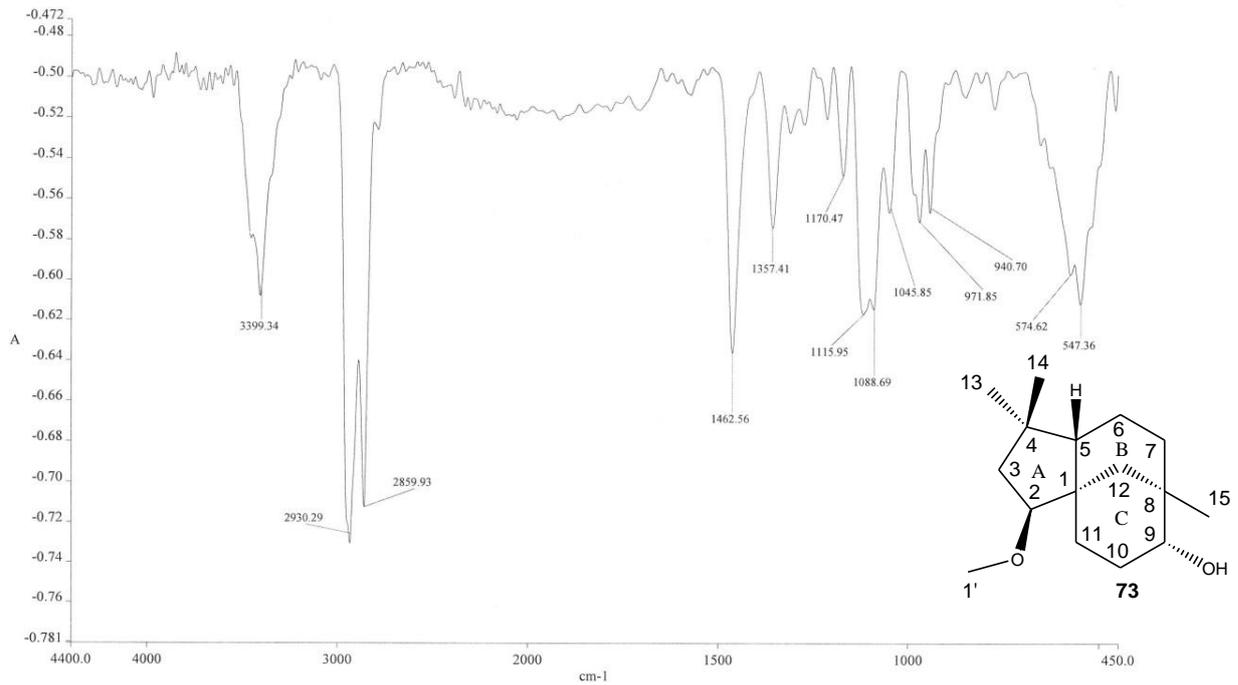


Figura 109 – Espectro na região do IV do 2β-metoxiclovan-9α-ol (73) (KBr).

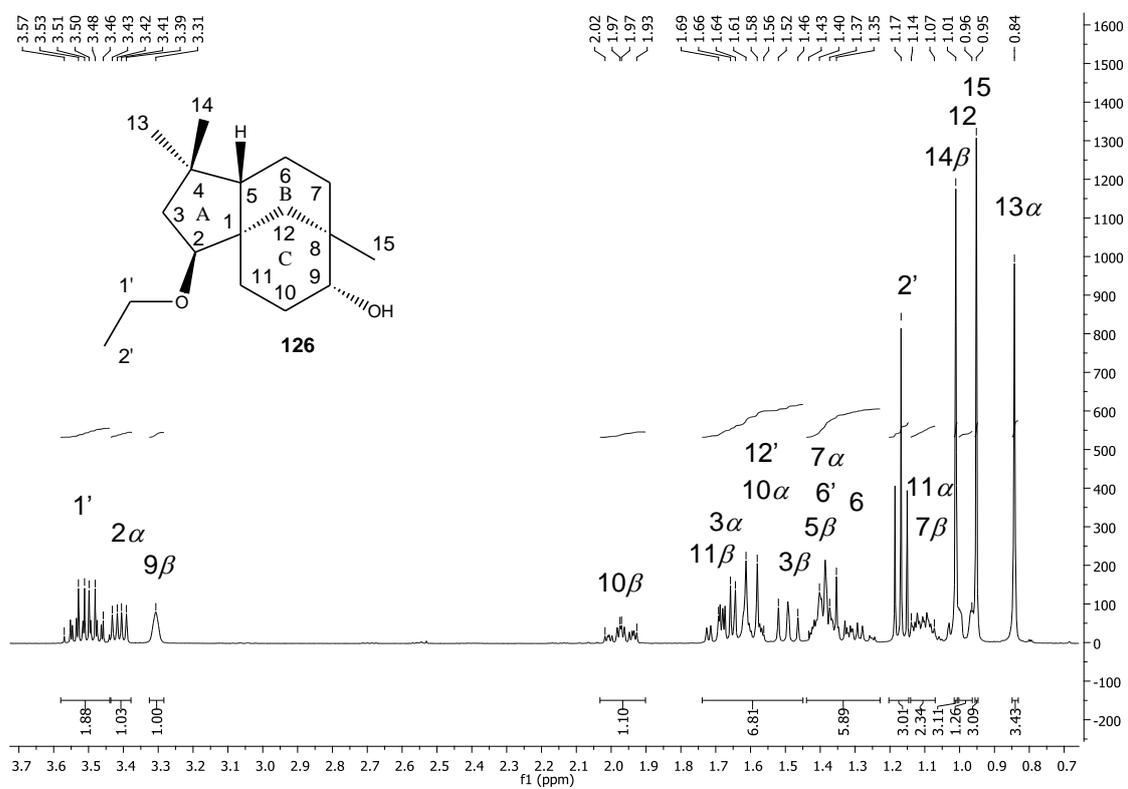
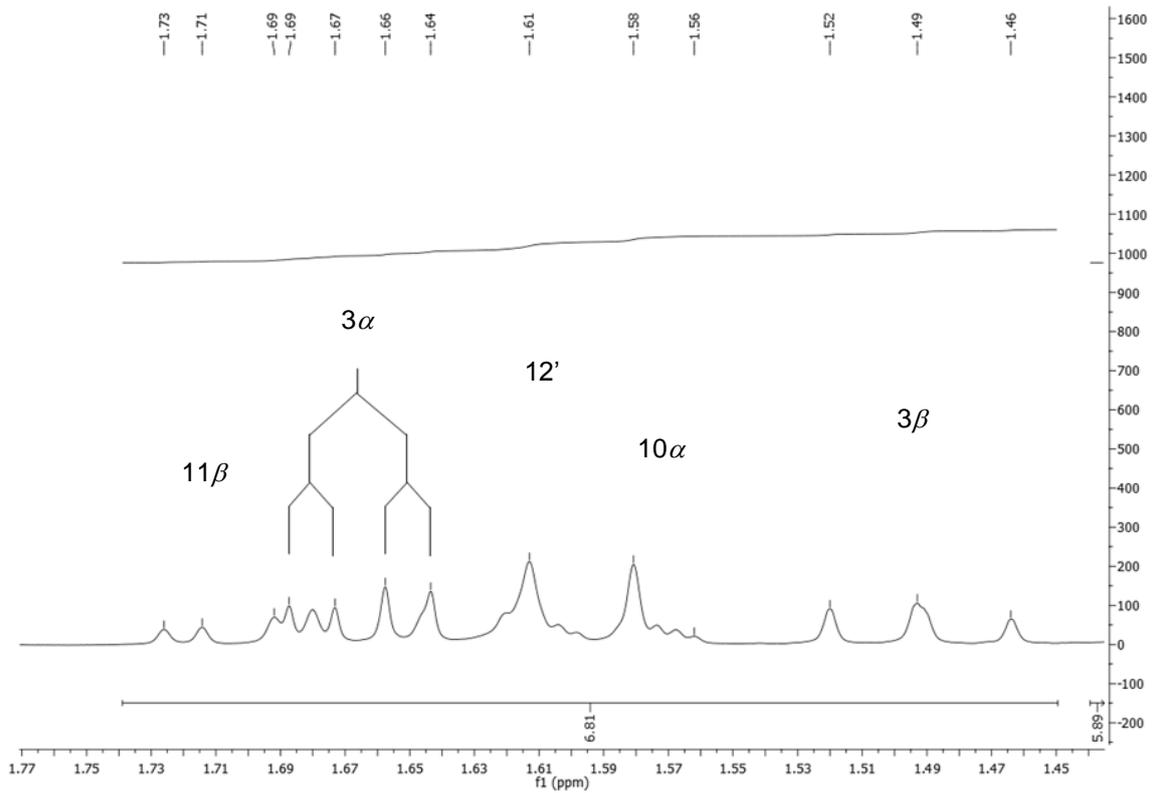
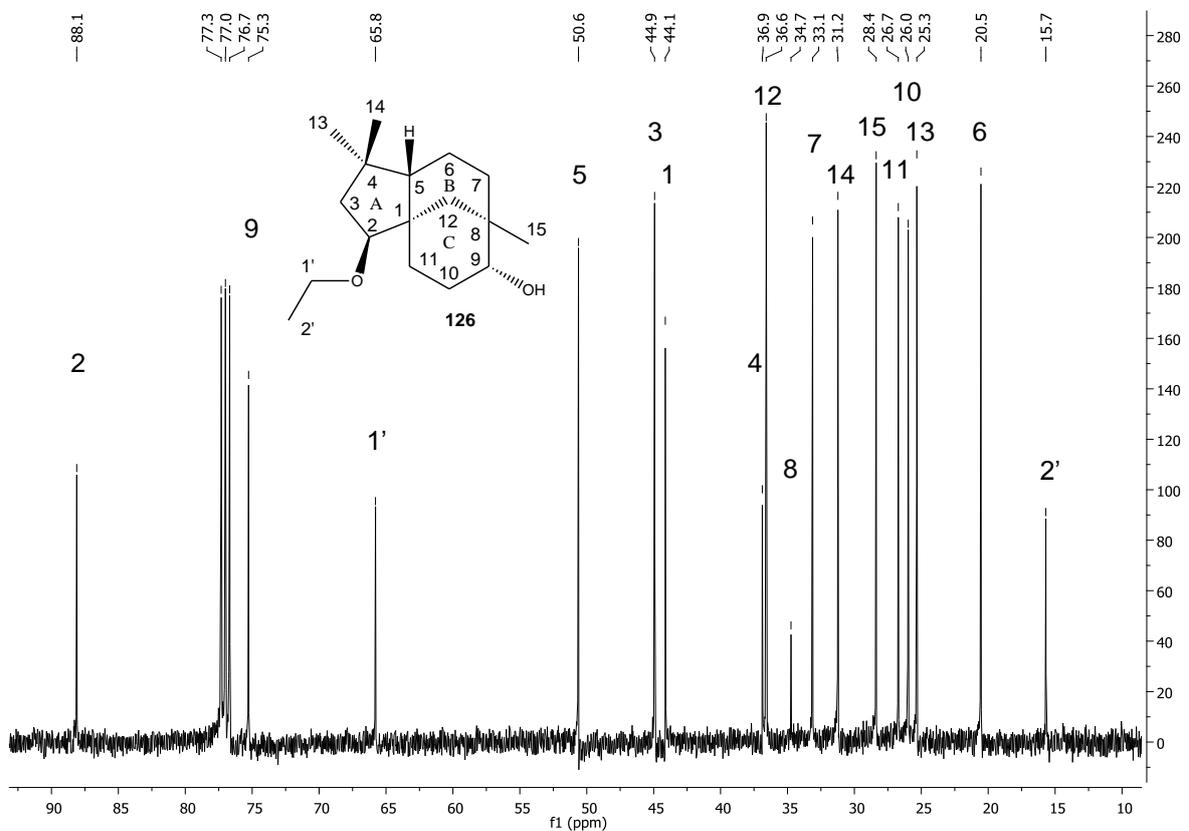


Figura 110 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2β-etoxiclovan-9α-ol (126).



**Figura 111** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (126). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,43 – 1,77.



**Figura 112** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (126).

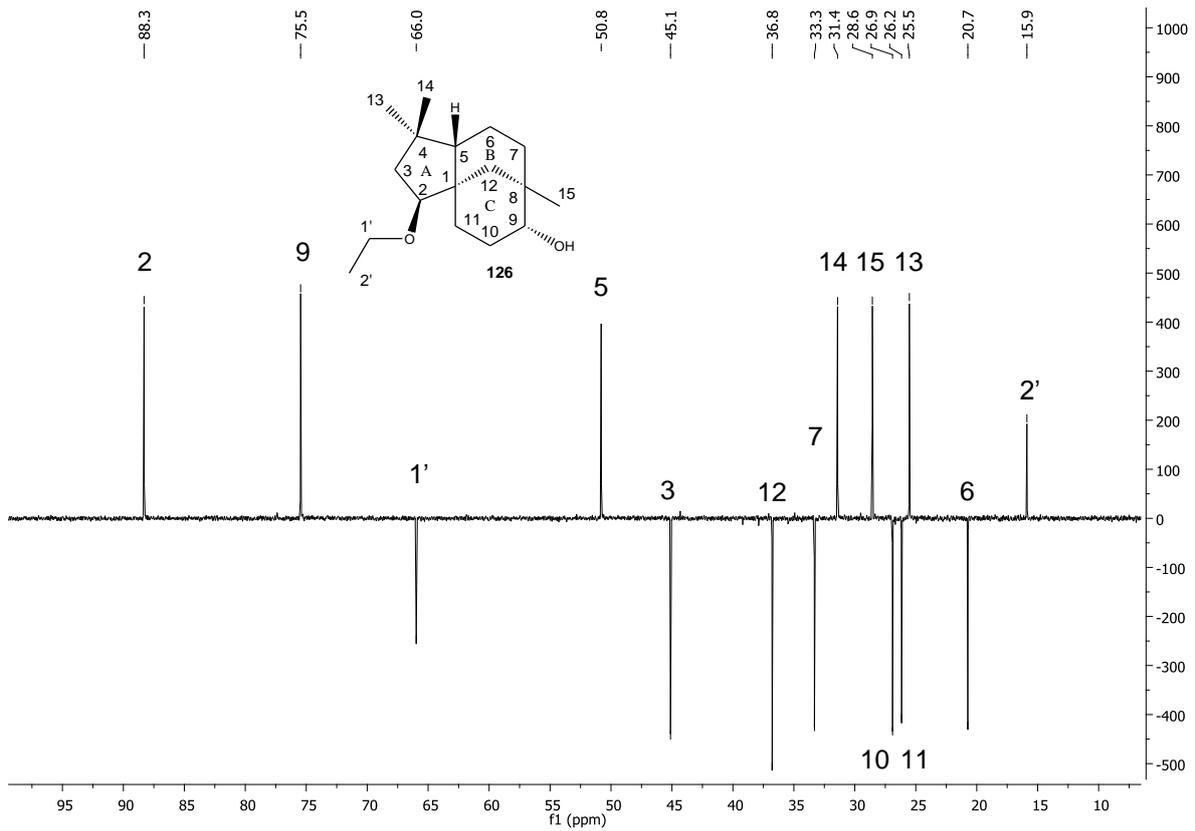


Figura 113 - Subespectro DEPT-135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**126**).

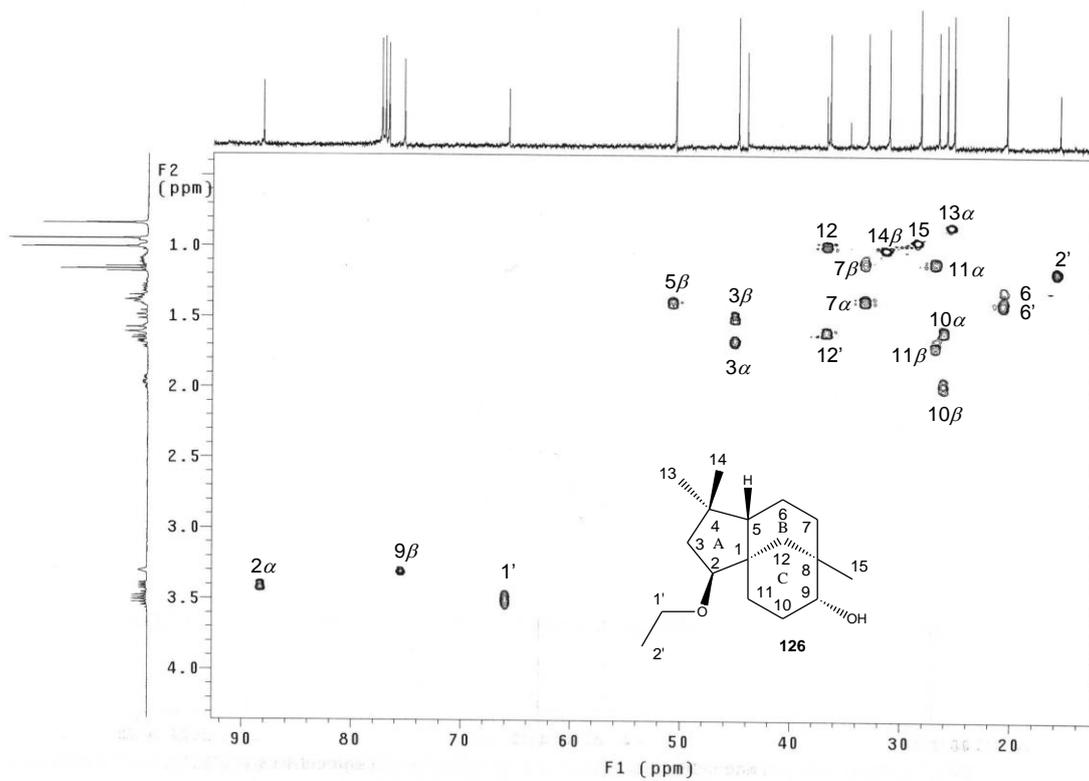


Figura 114 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**126**).

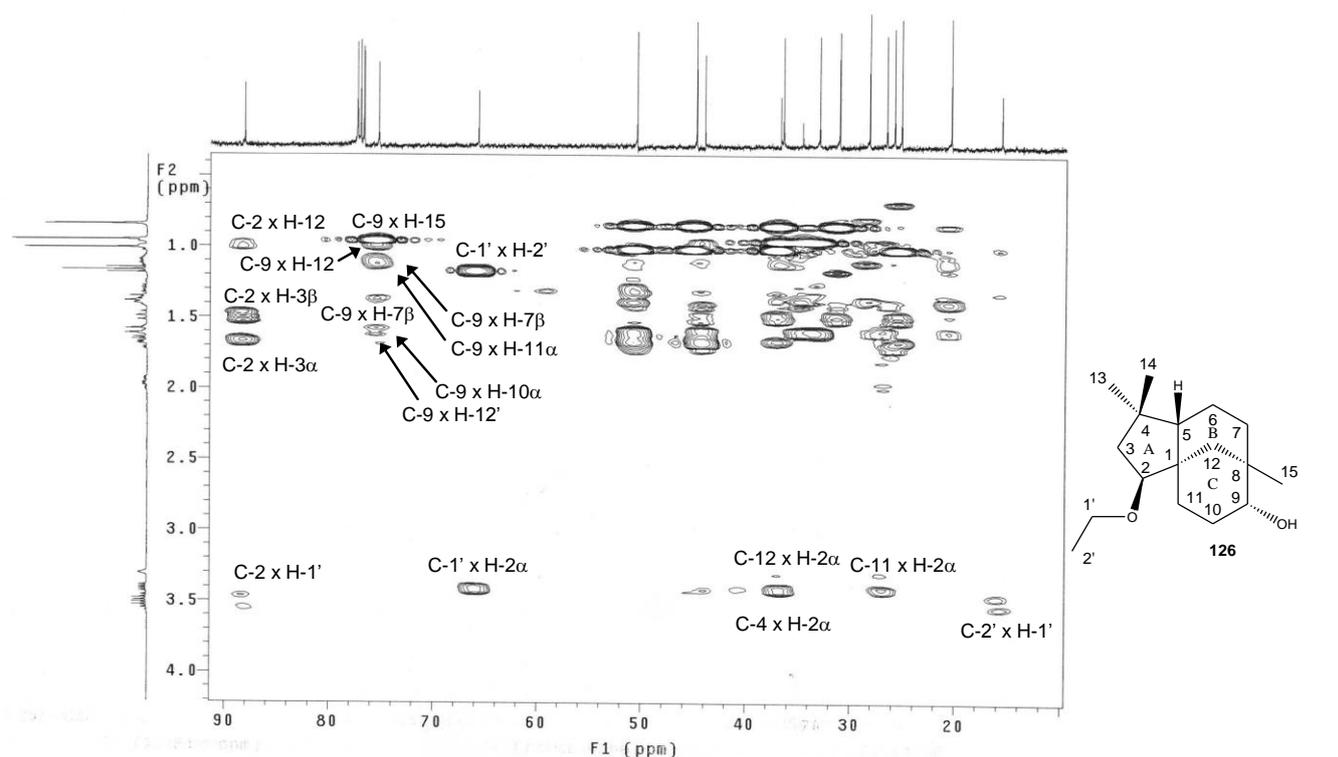


Figura 115 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (126).

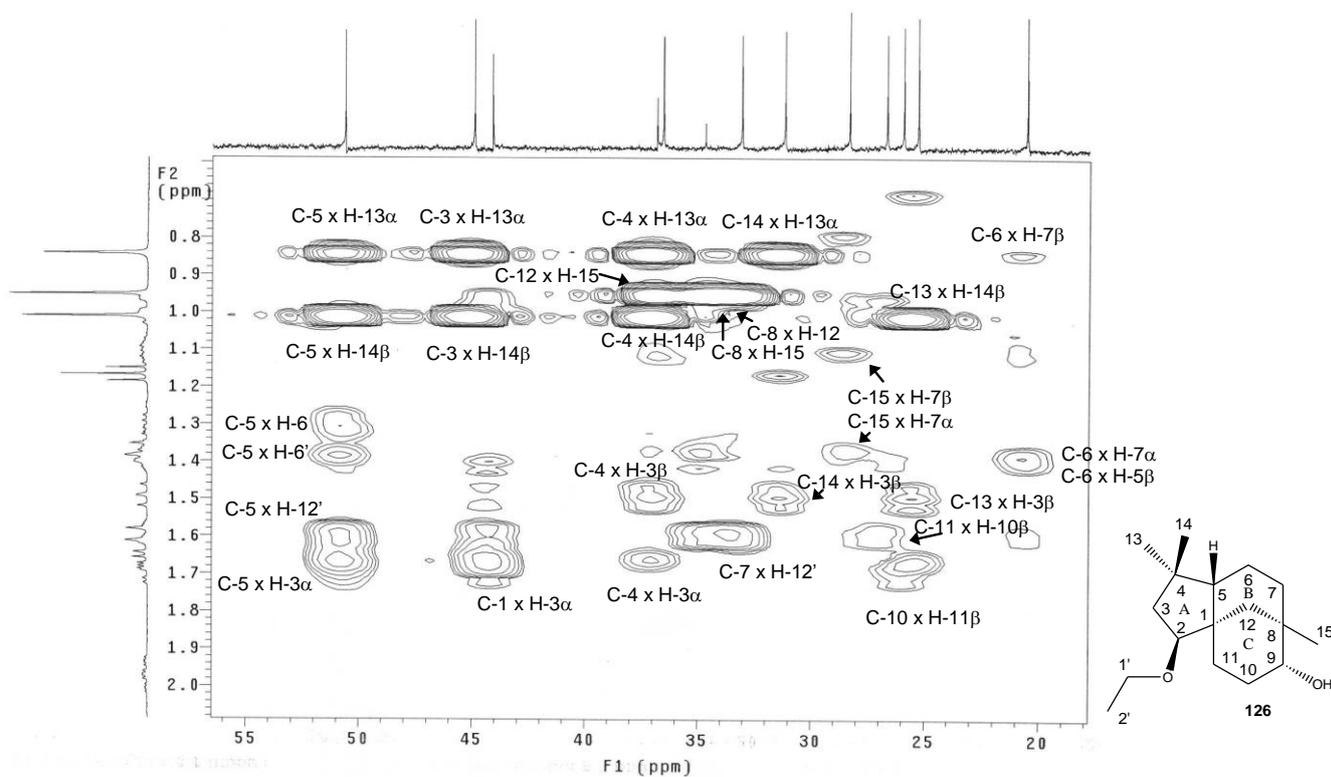


Figura 116 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (126). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,6 – 2,0.

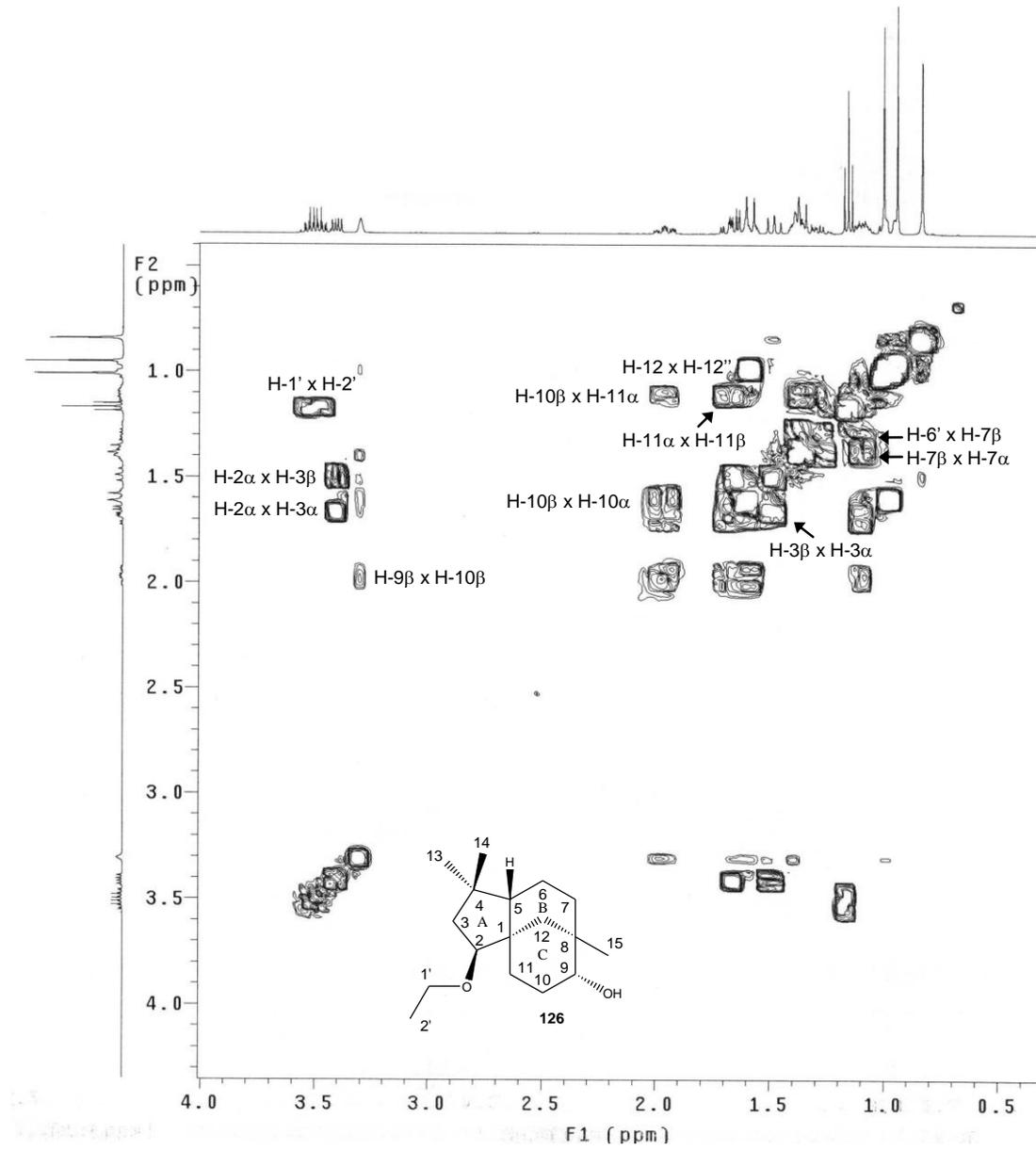


Figura 117 – Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -etoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (126).

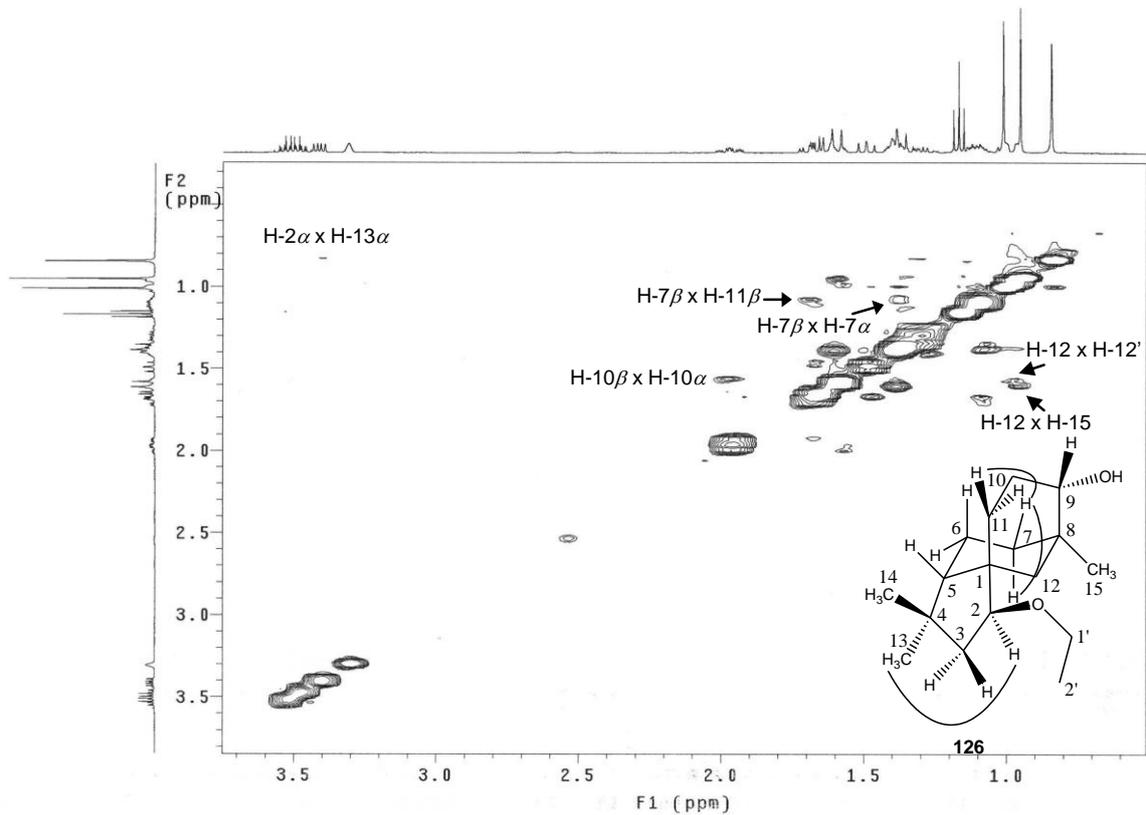


Figura 118 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**126**).

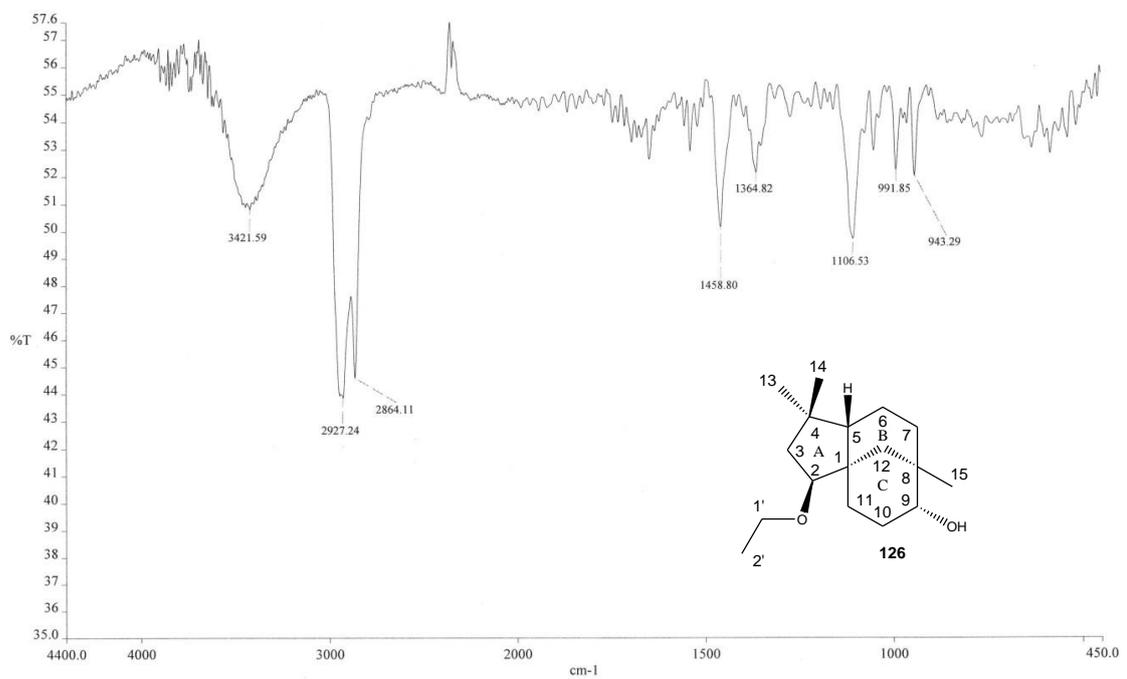


Figura 119 – Espectro na região do IV do  $2\beta$ -etoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**126**) (KBr).

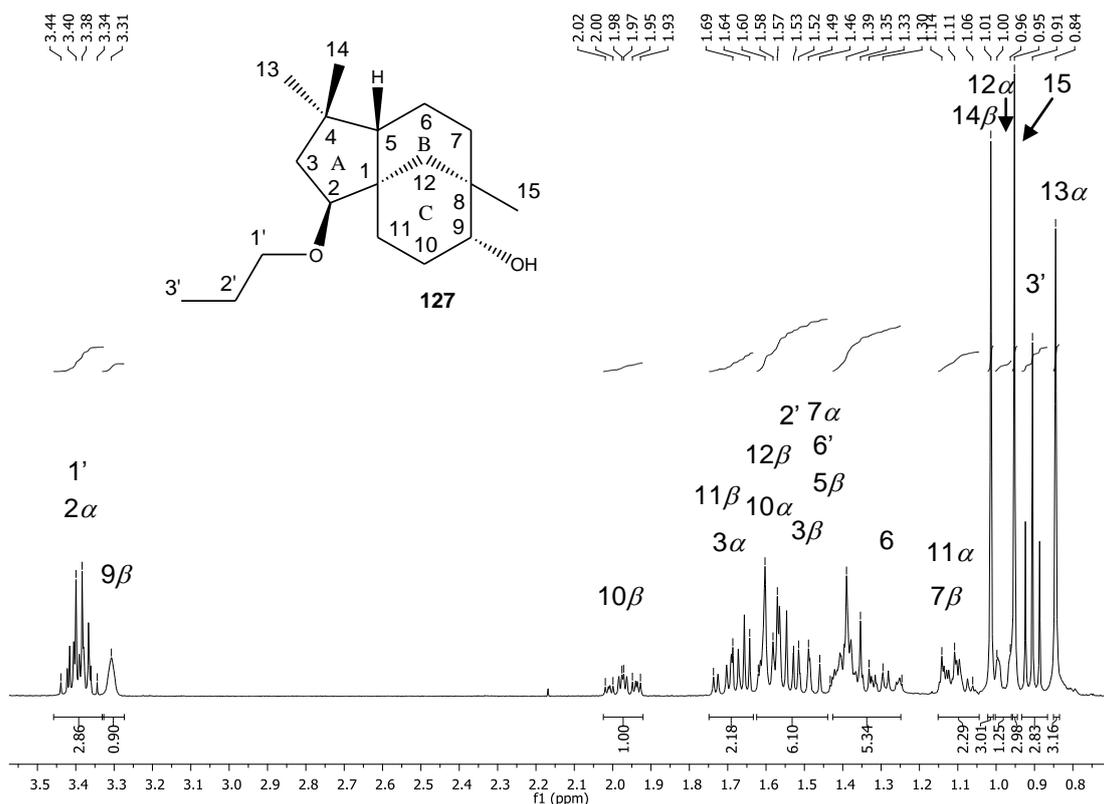


Figura 120 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**127**).

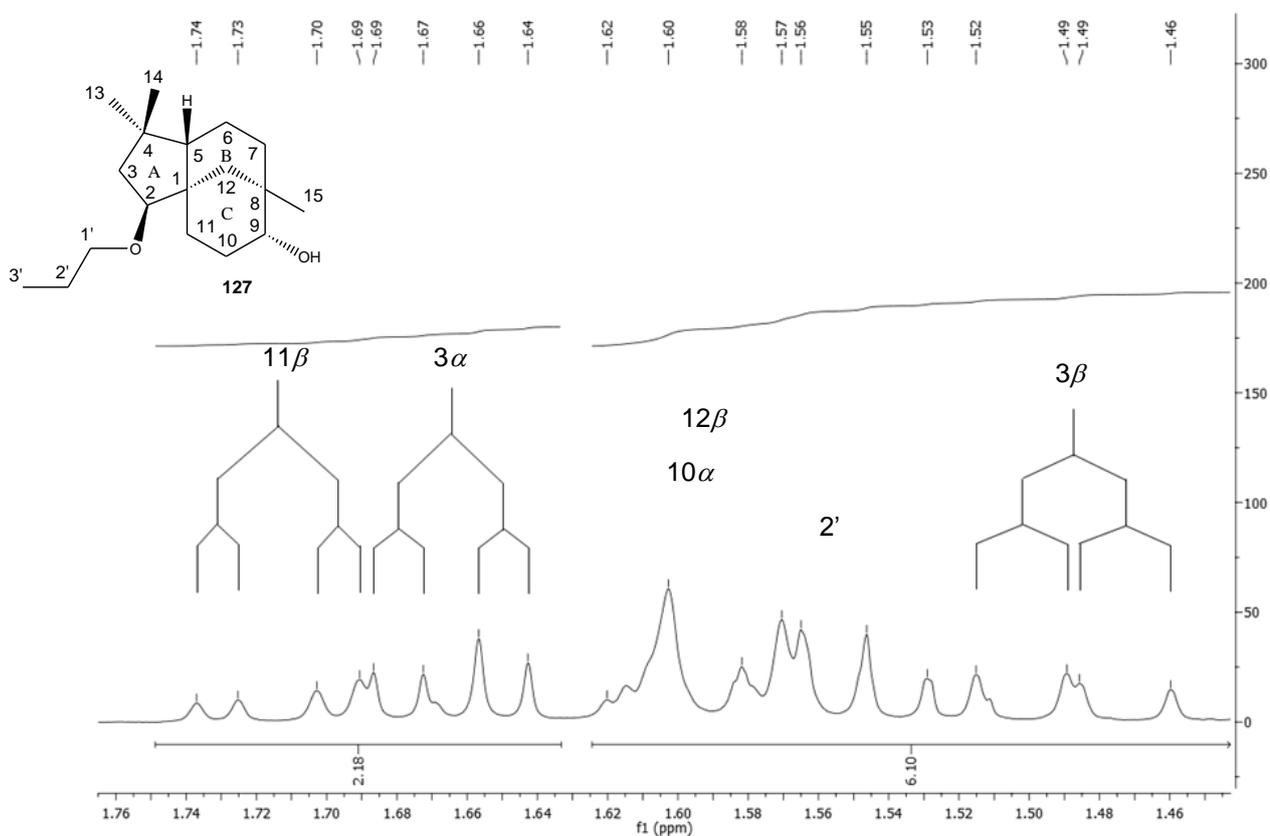


Figura 121 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**127**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,44 – 1,76.

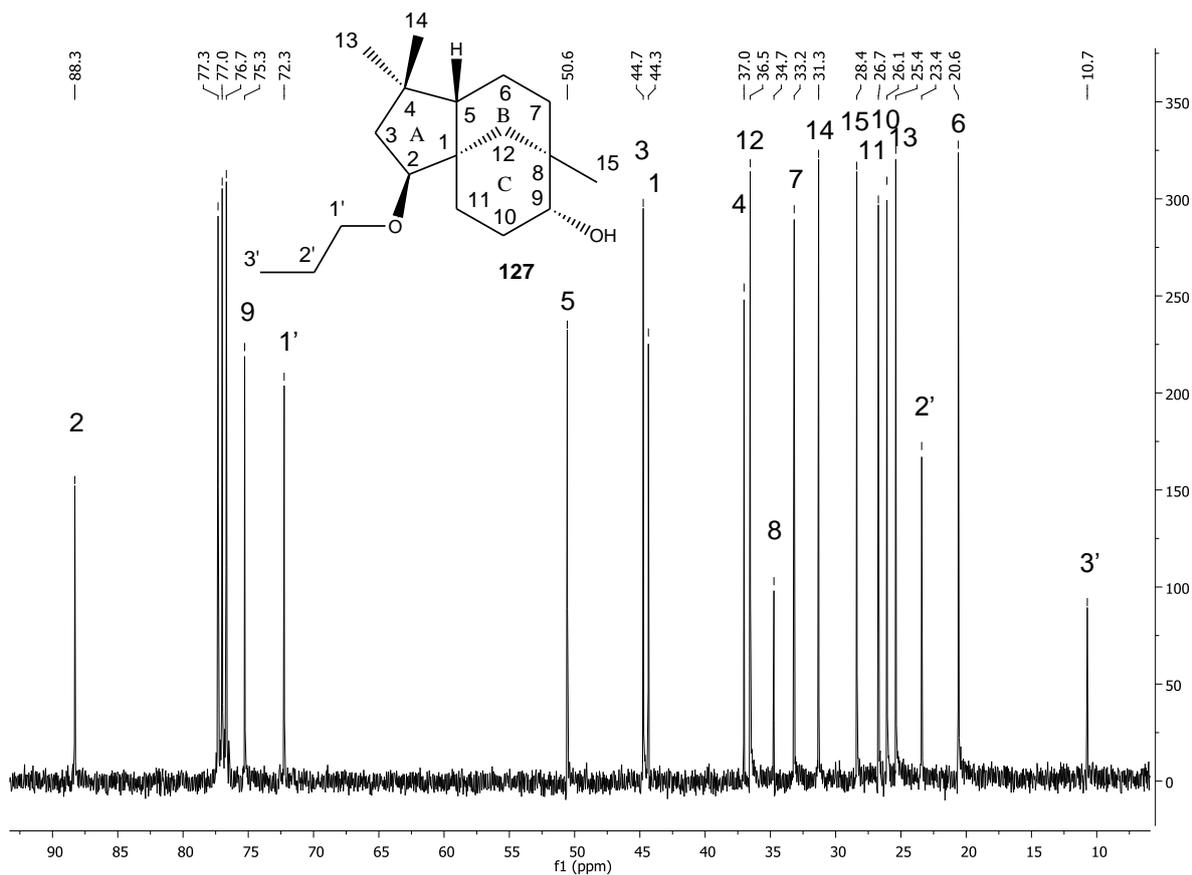


Figura 122 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**127**).

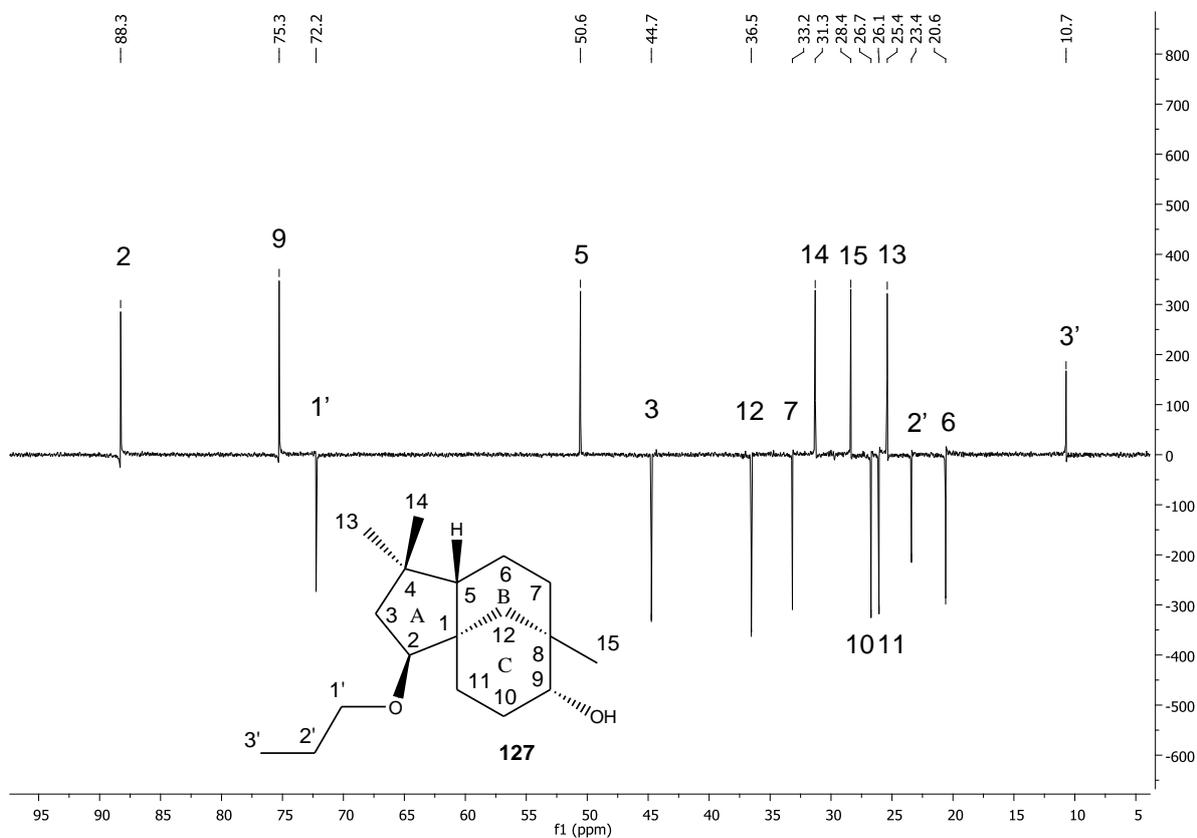


Figura 123 - Subespectro DEPT-135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**127**).

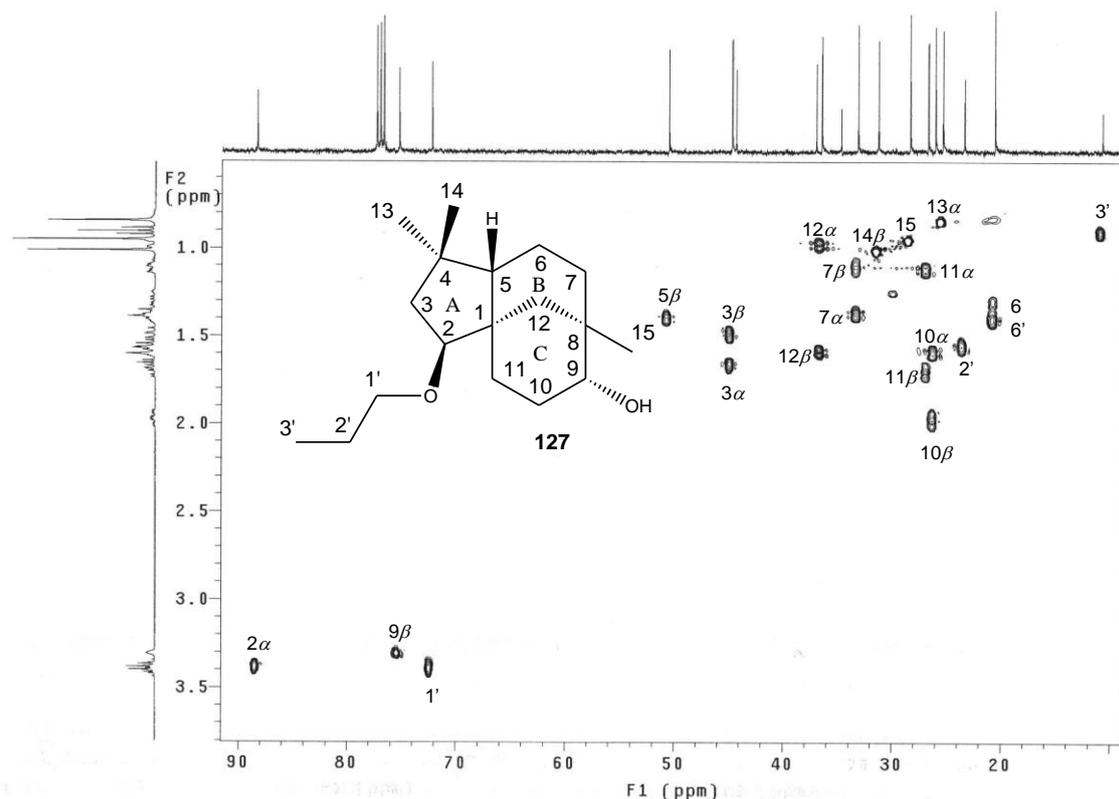


Figura 124 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-propoxiclovan-9α-ol (127).

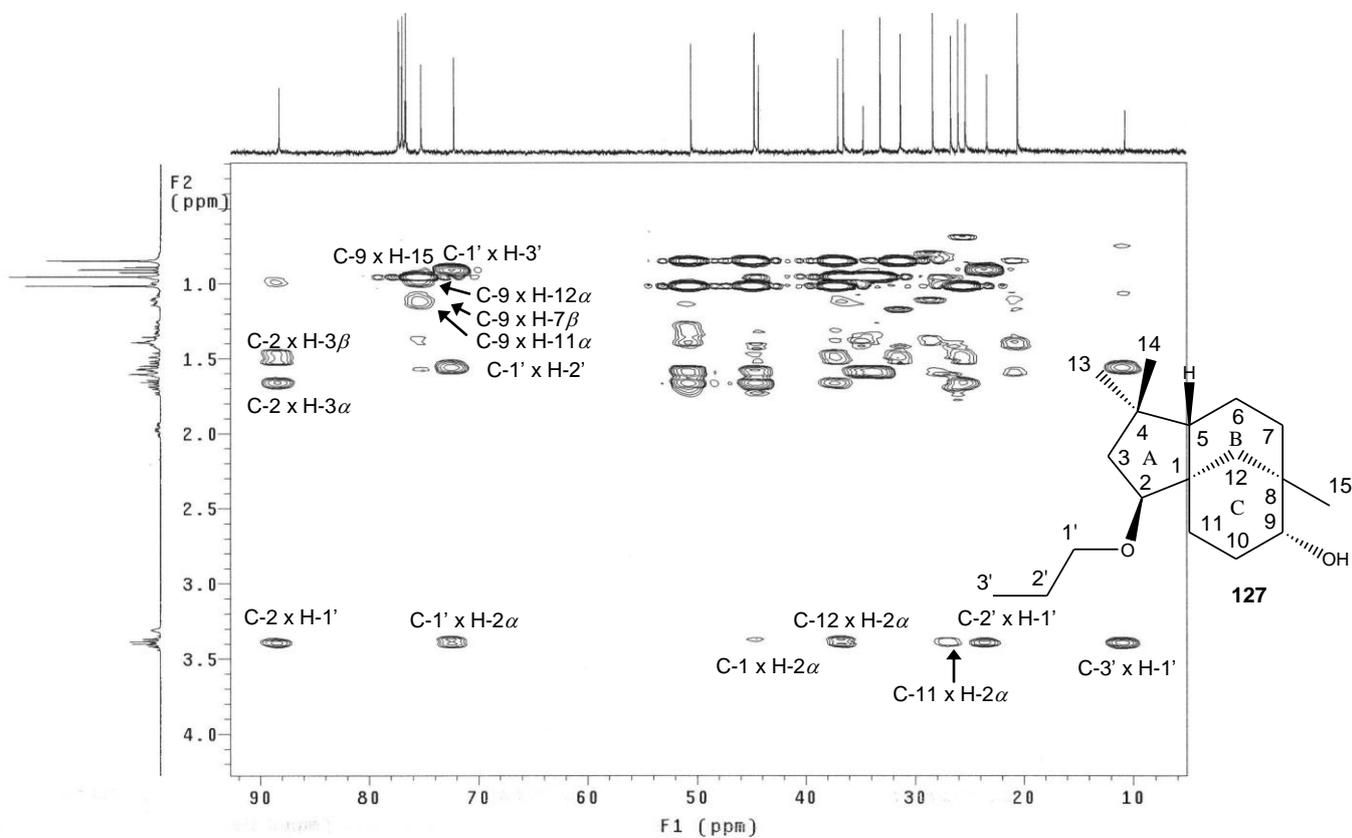
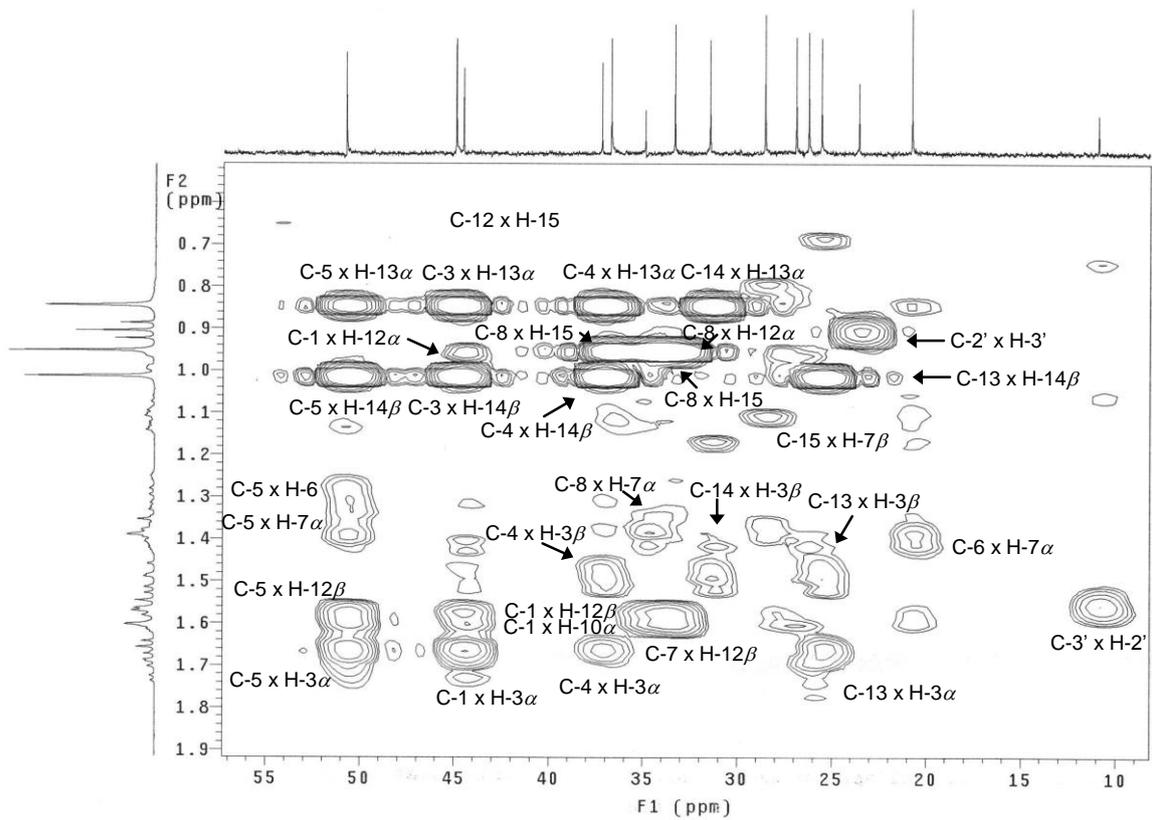
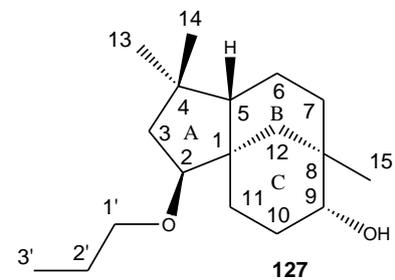


Figura 125 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-propoxiclovan-9α-ol (127).



**Figura 126** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (127). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,6 – 1,9.



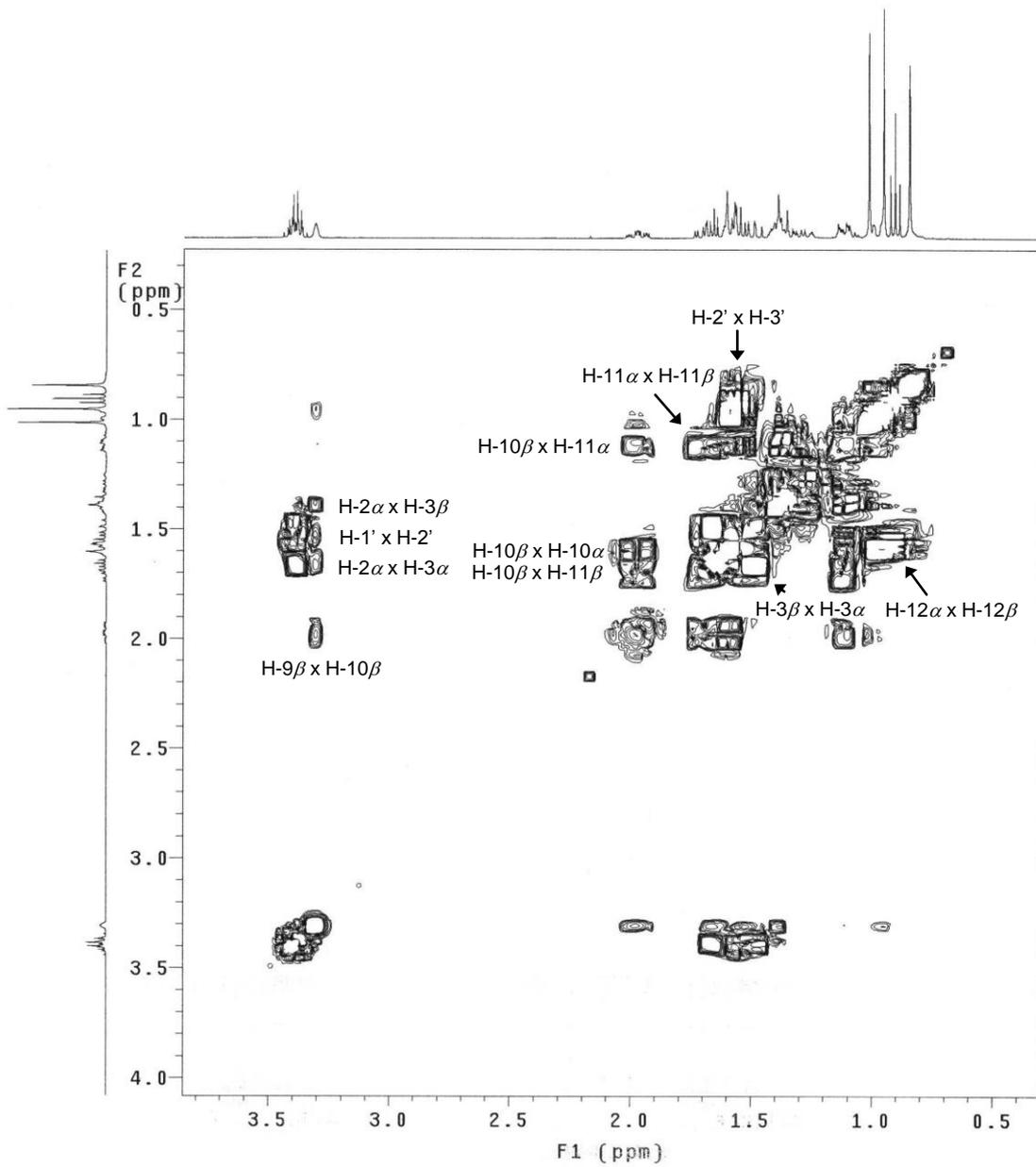
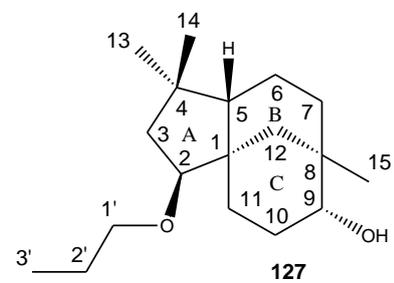


Figura 127 – Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (127).



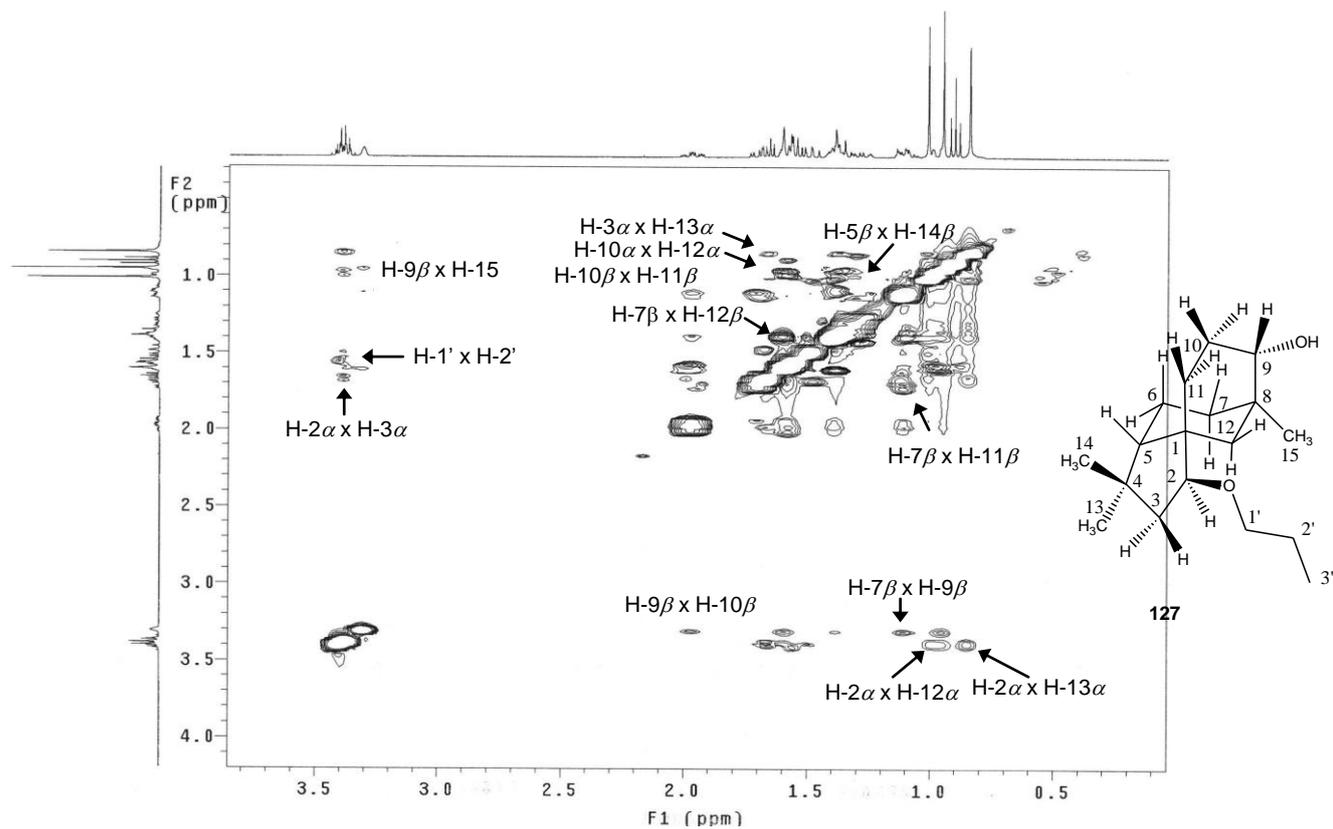


Figura 128 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-propoxiclovan-9α-ol (127).

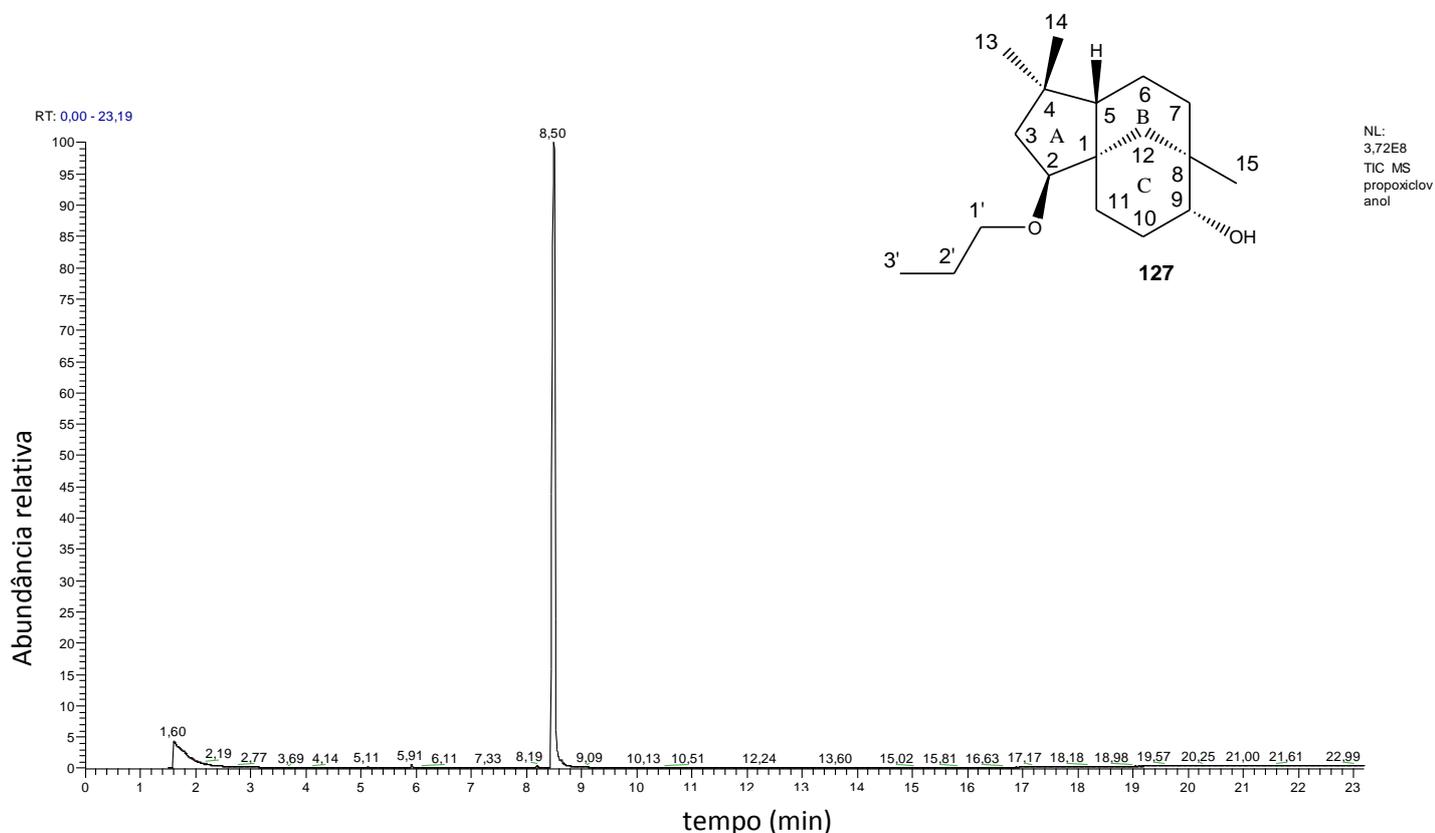
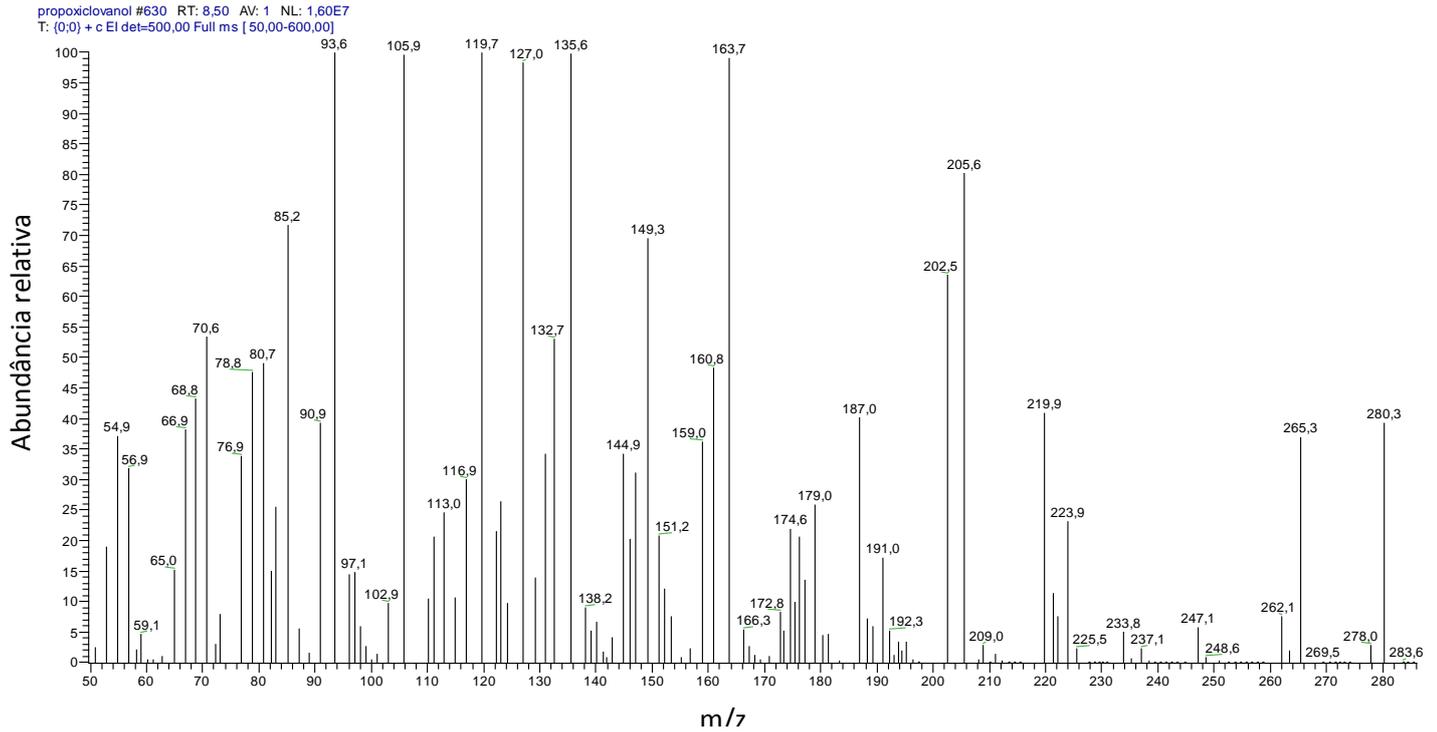
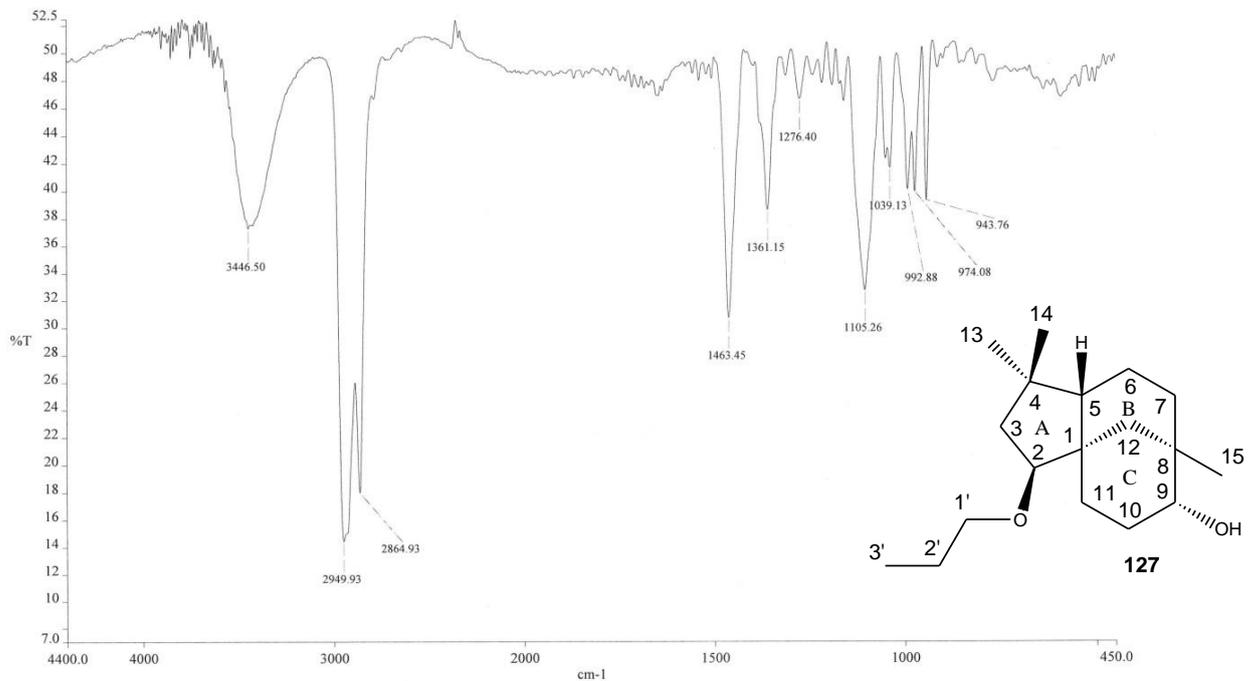


Figura 129 – Cromatograma obtido por CG-EM para o 2β-propoxiclovan-9α-ol (127), utilizando-se coluna capilar DB-5, Hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>



**Figura 130** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,50 min no cromatograma do  $2\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**).



**Figura 131** – Espectro na região do IV do  $2\beta$ -propoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**127**) (KBr).

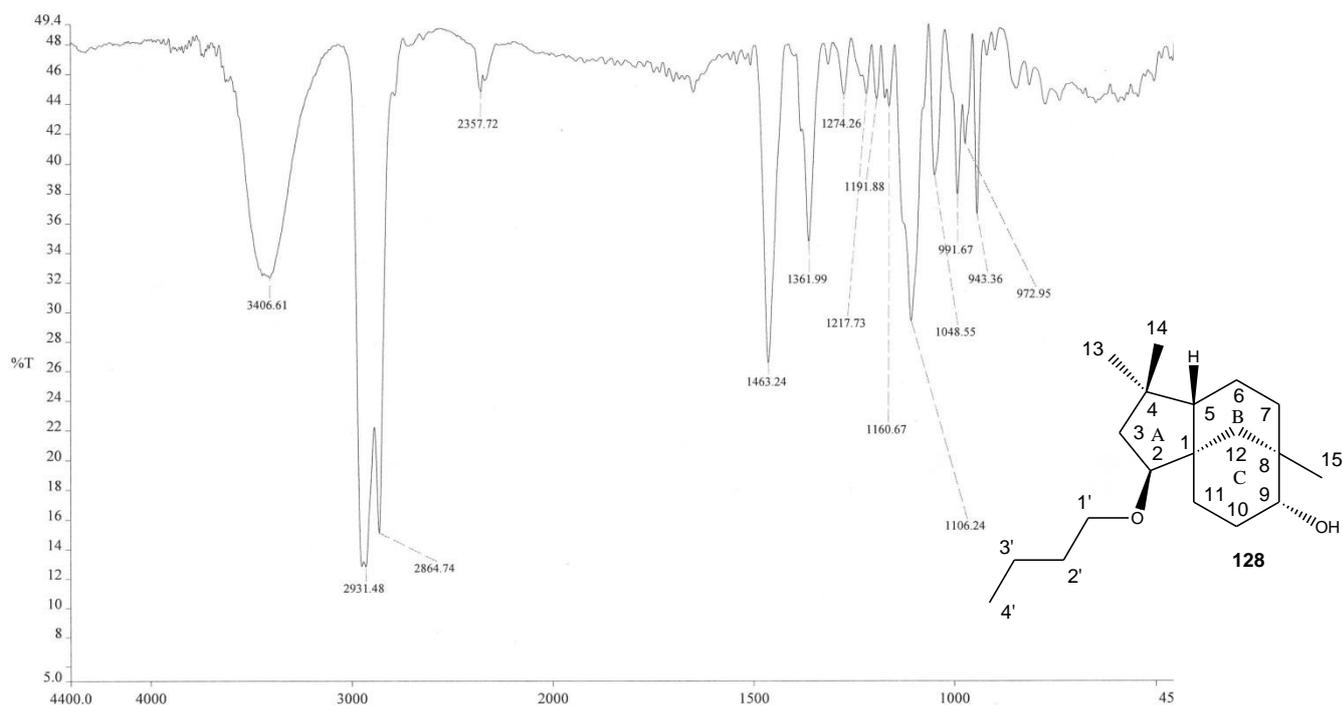


Figura 132 – Espectro na região do IV do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128) (KBr).

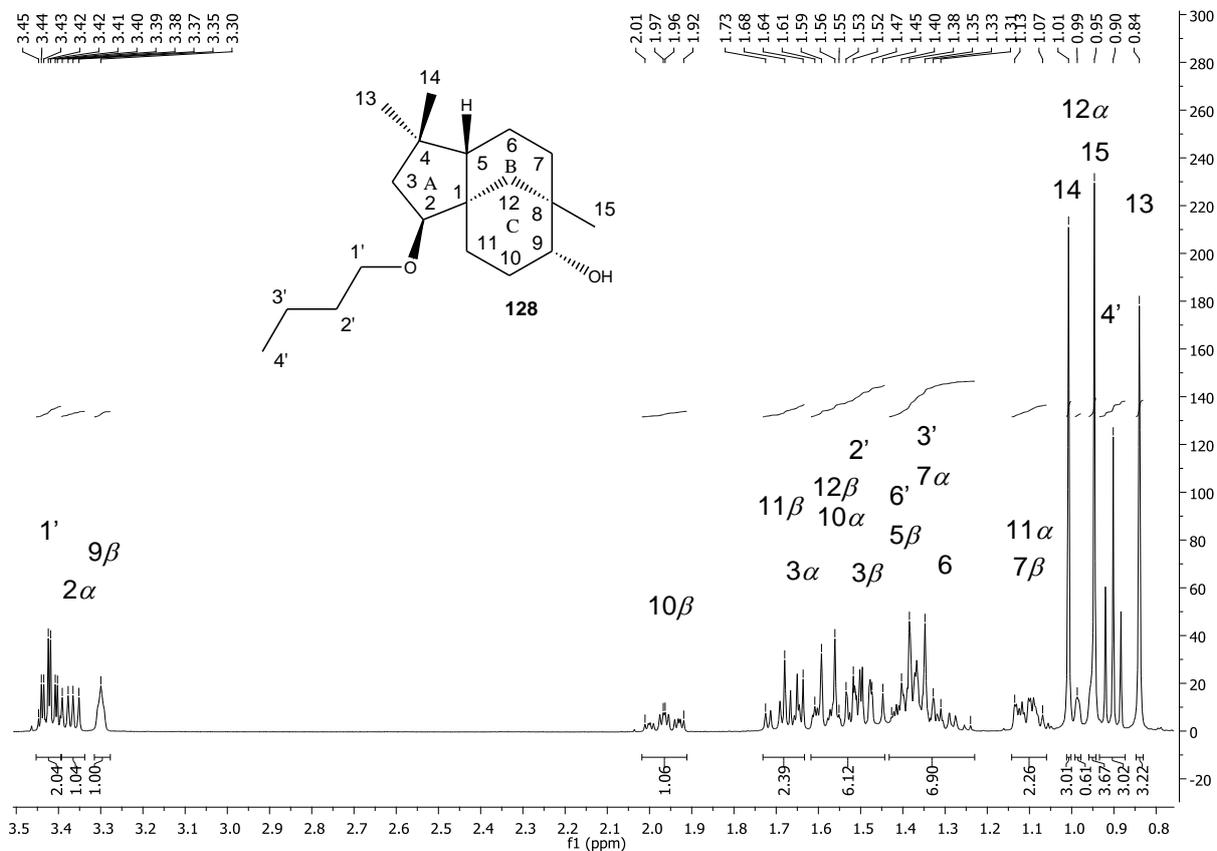


Figura 133 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128).

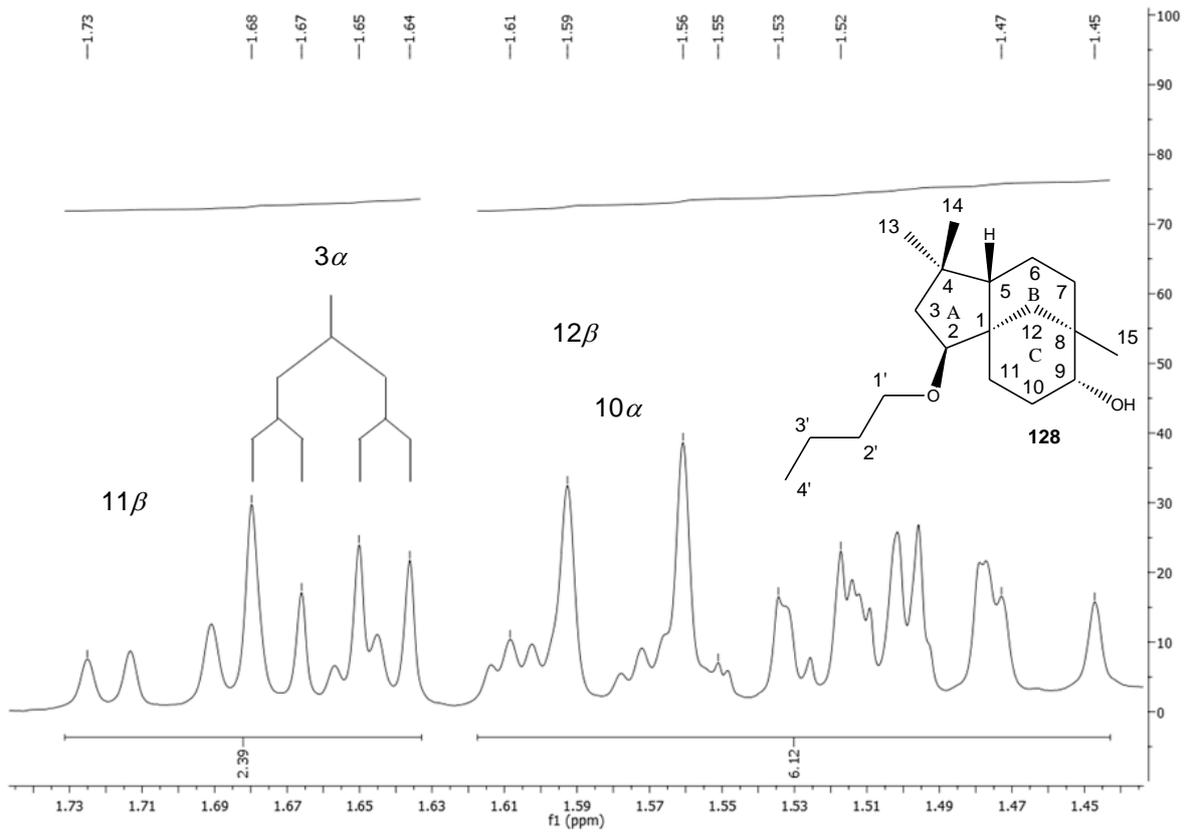


Figura 134 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,44 – 1,74.

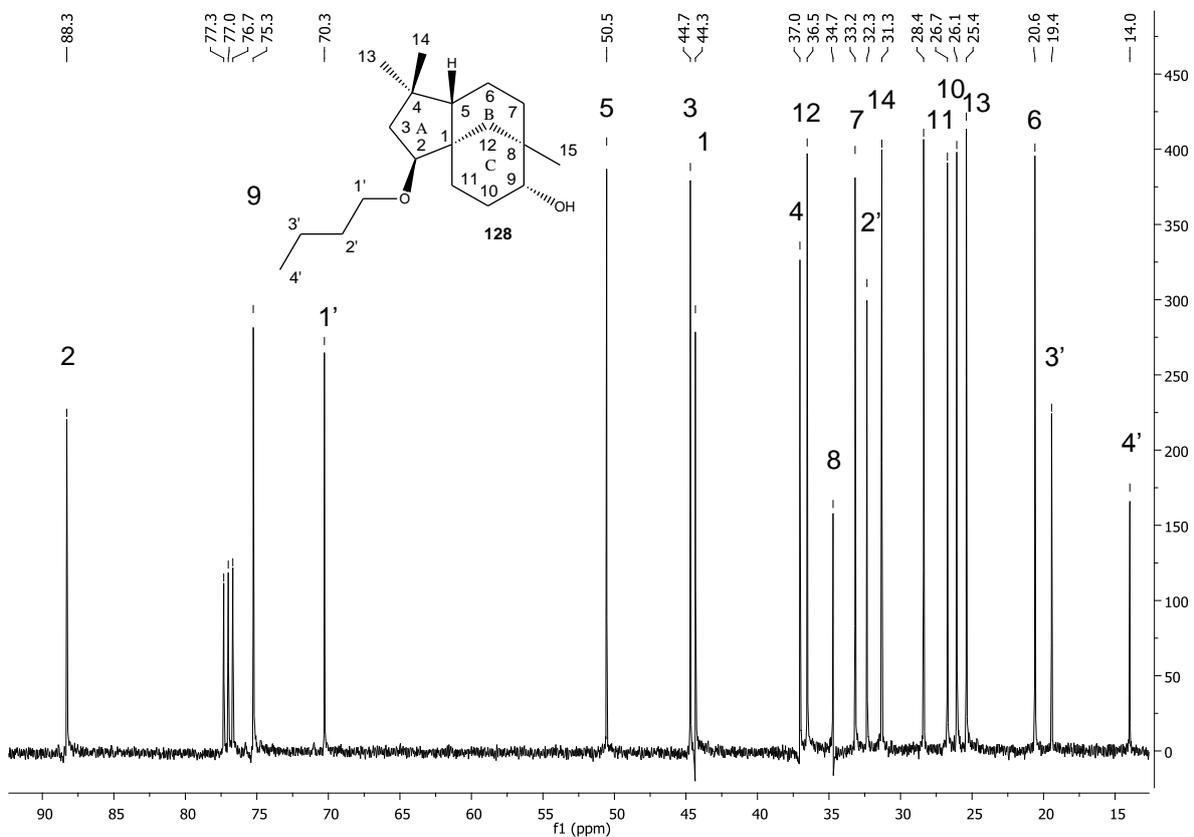


Figura 135 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128).

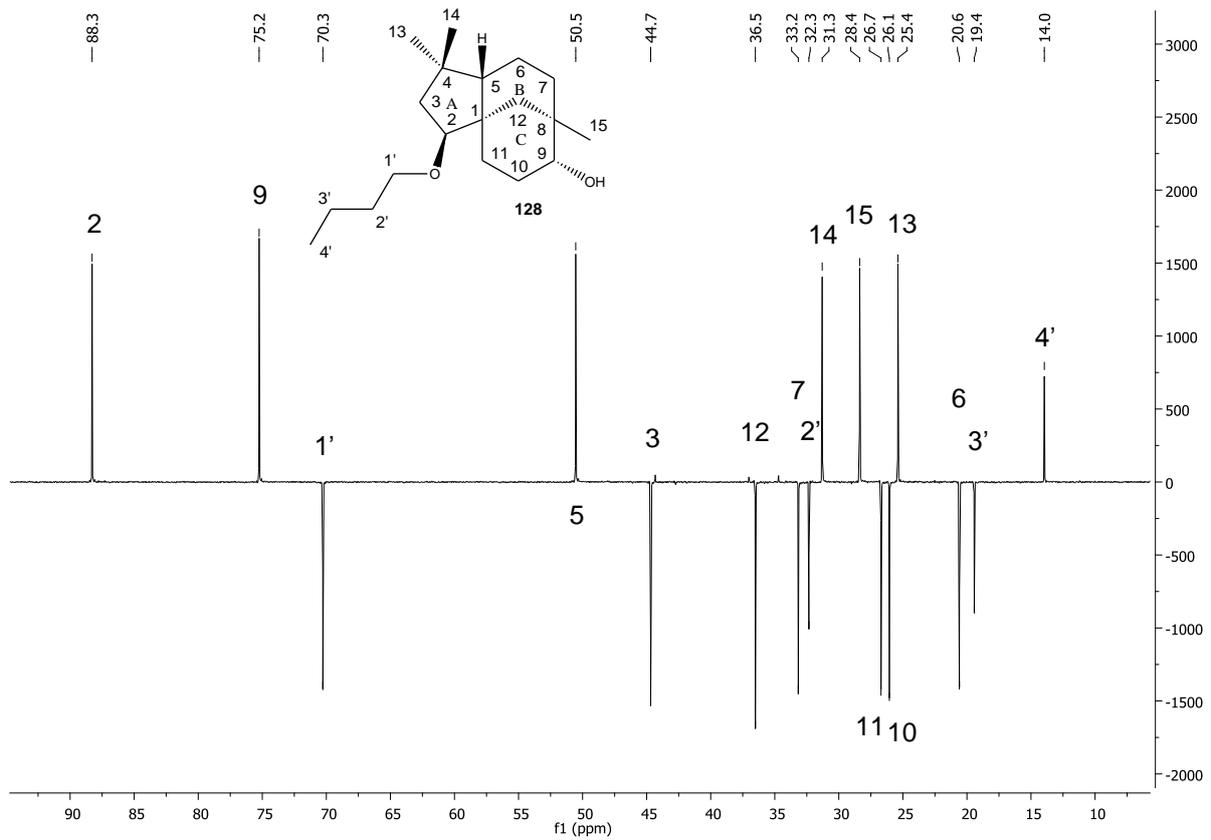


Figura 136 - Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128).

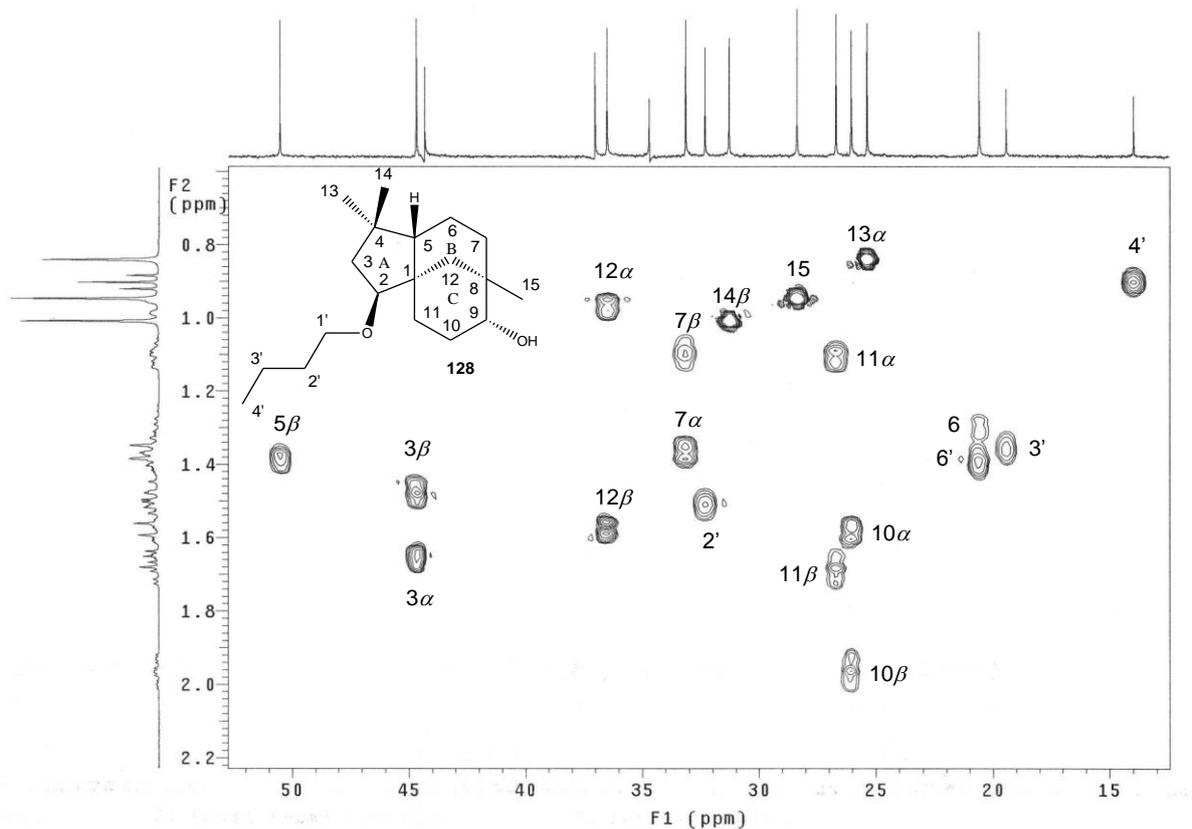
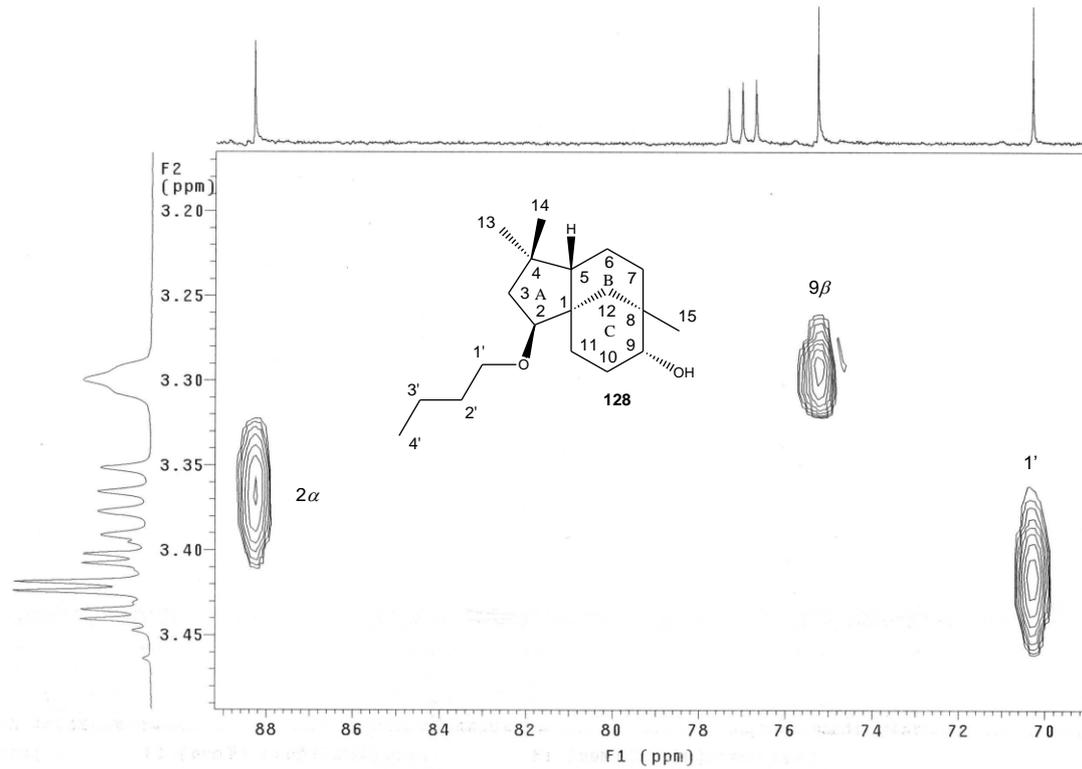
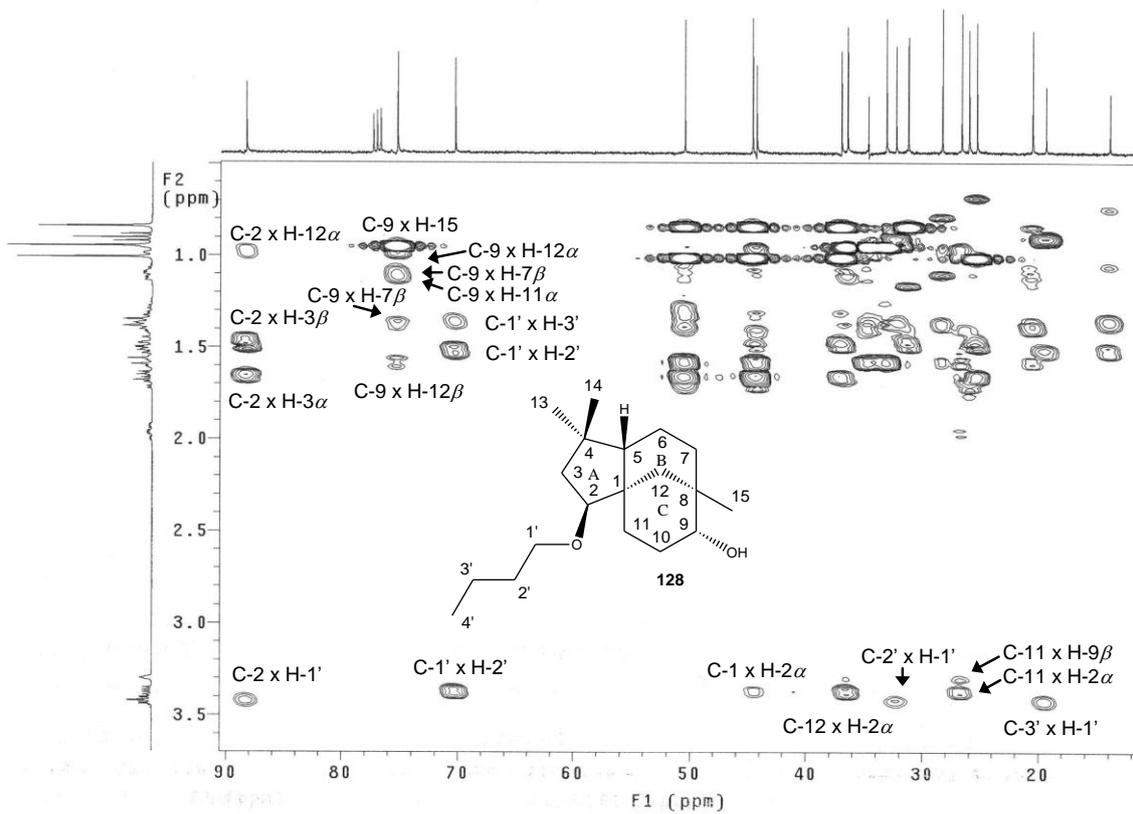


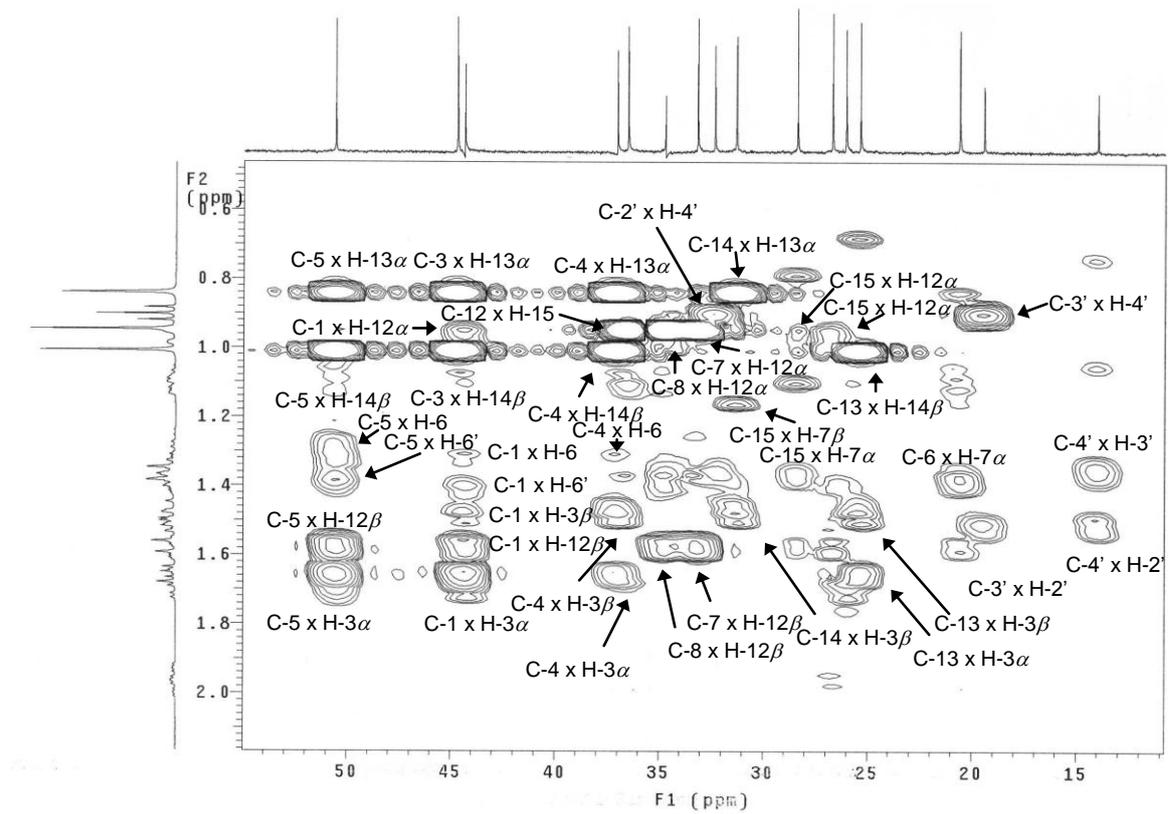
Figura 137 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-butoxiclovan-9α-ol (128). Expansão da região entre δ<sub>c</sub> 13,0 – 52,0.



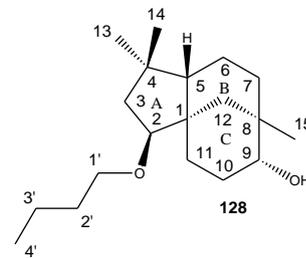
**Figura 138** - Mapa de contornos HSQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -butoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**128**). Expansão da região entre  $\delta_c$  69,0 – 87,0.



**Figura 139** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -butoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**128**).



**Figura 140** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**128**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,6 – 2,0.



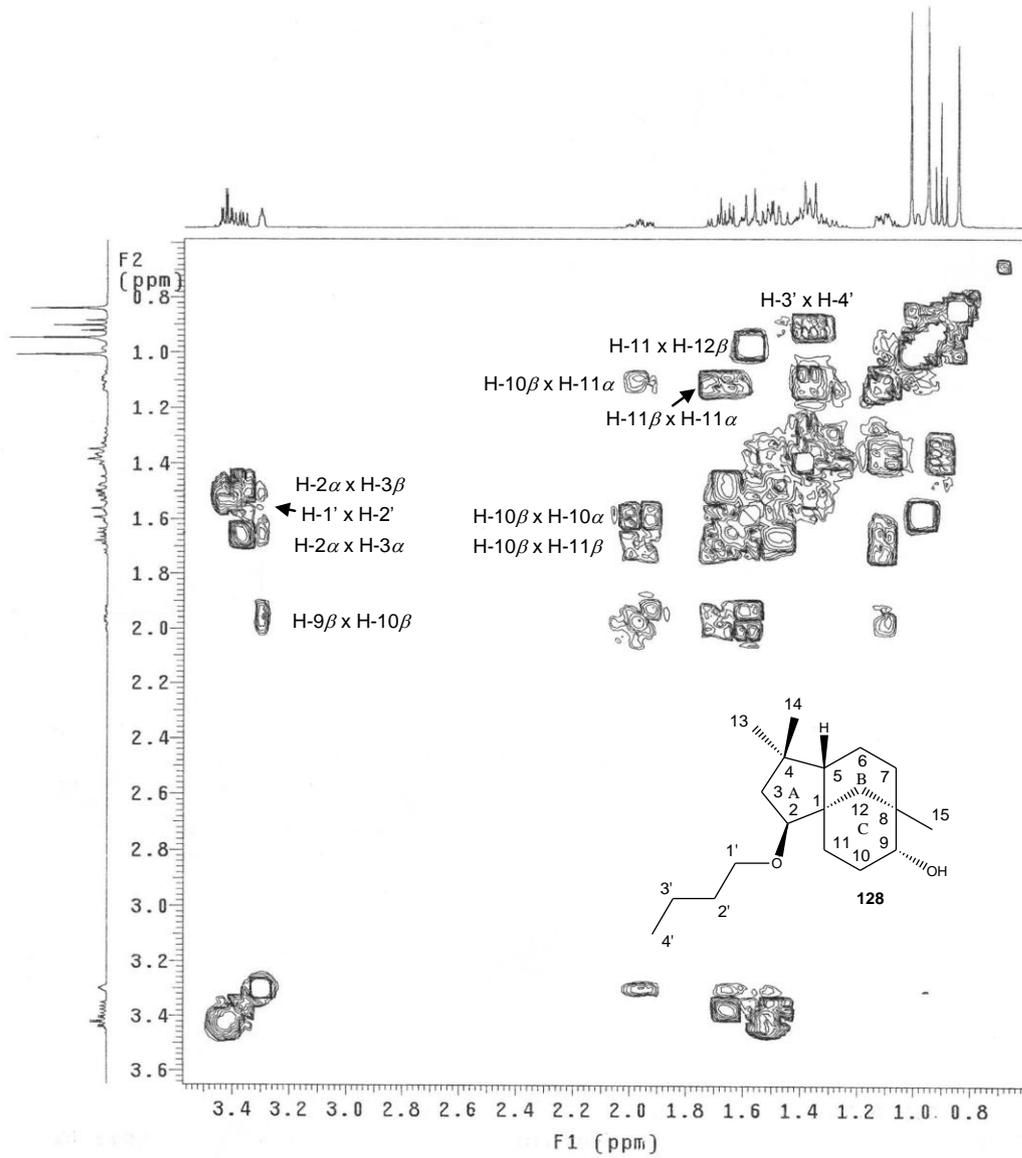


Figura 141 – Mapa de contornos COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (128).

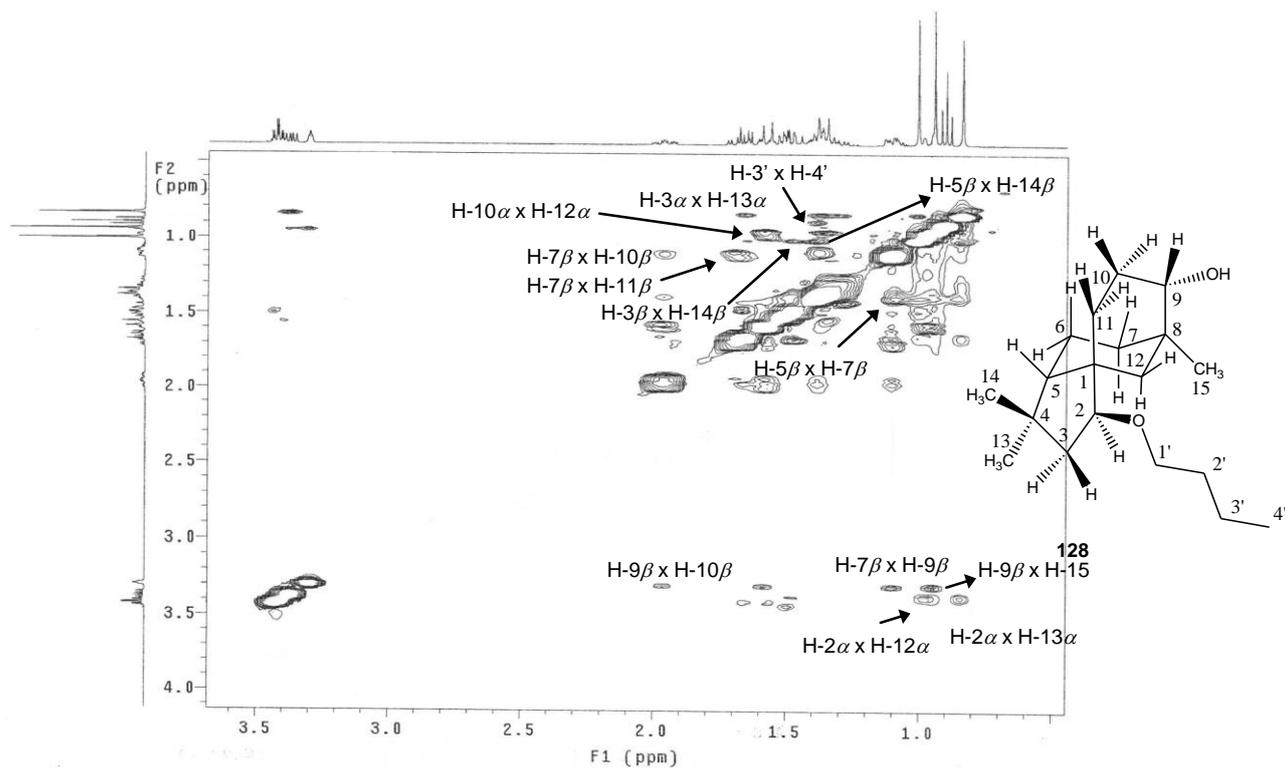


Figura 142 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -butoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (128).

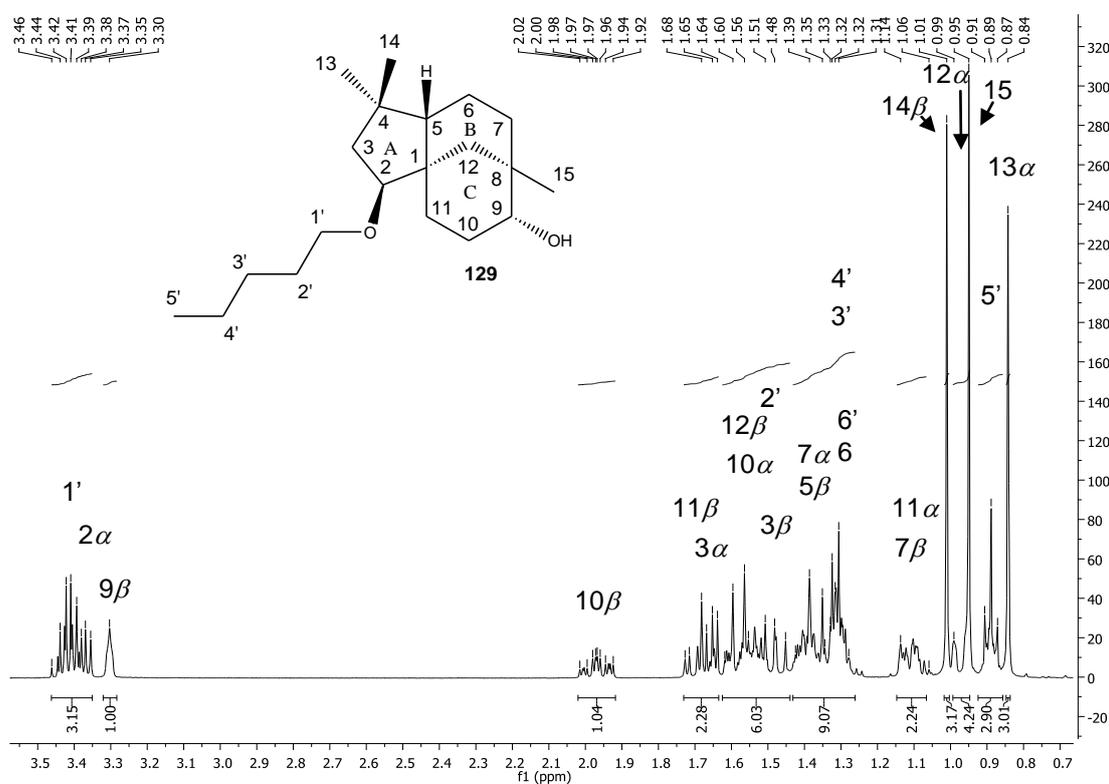
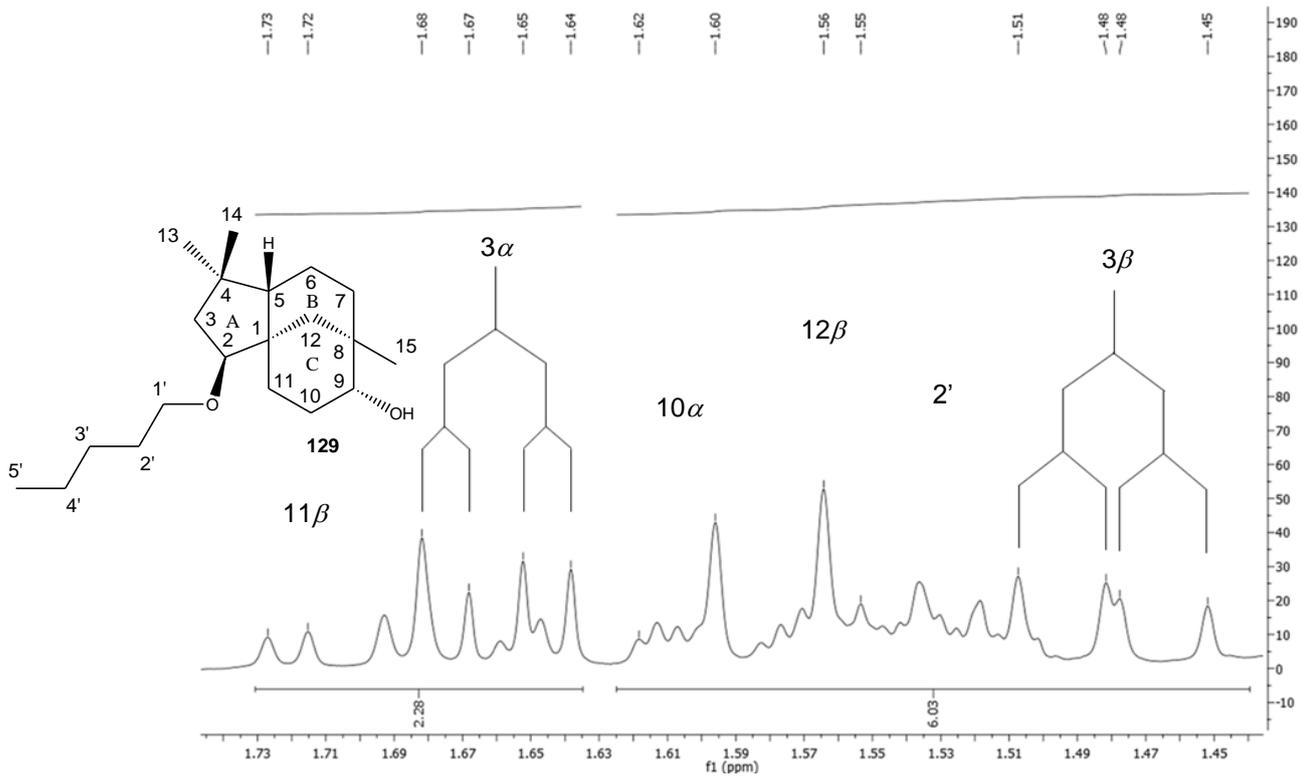
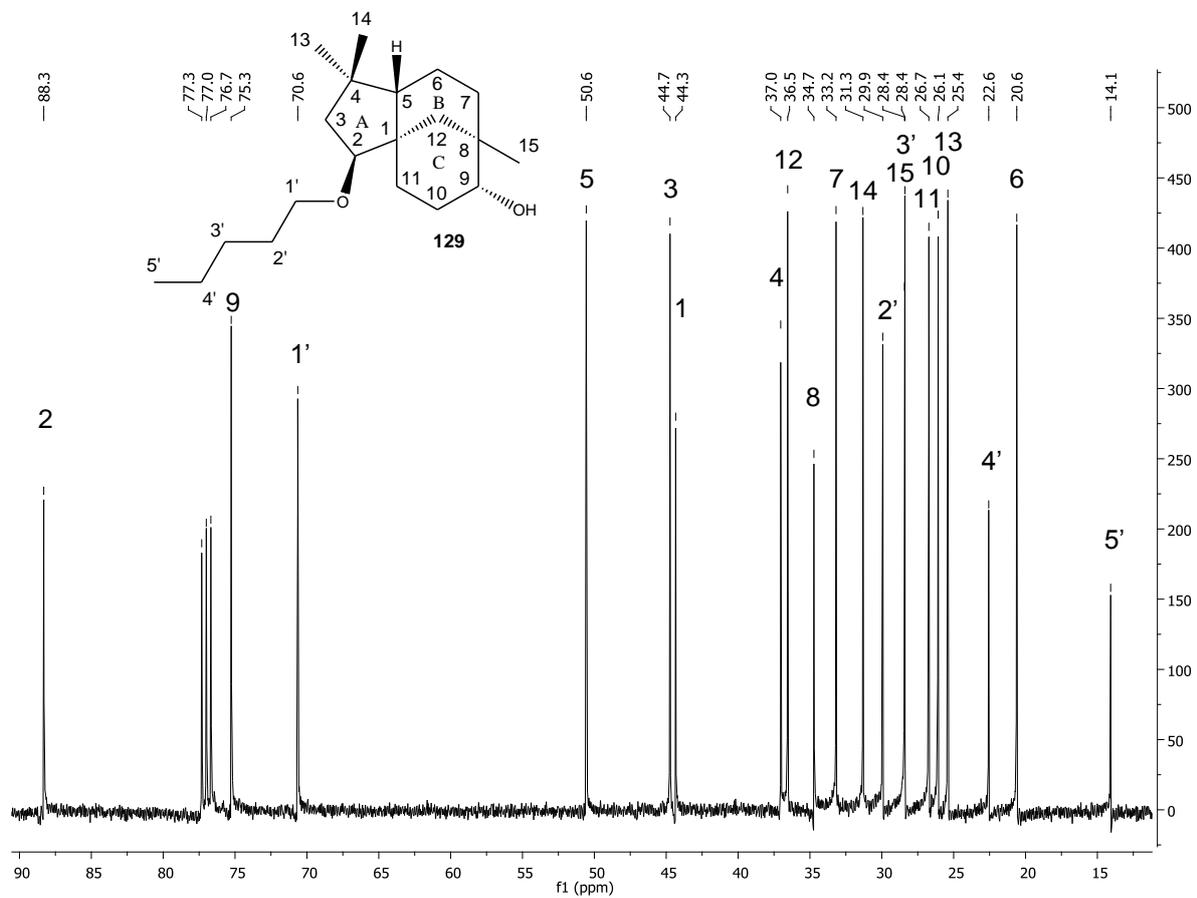


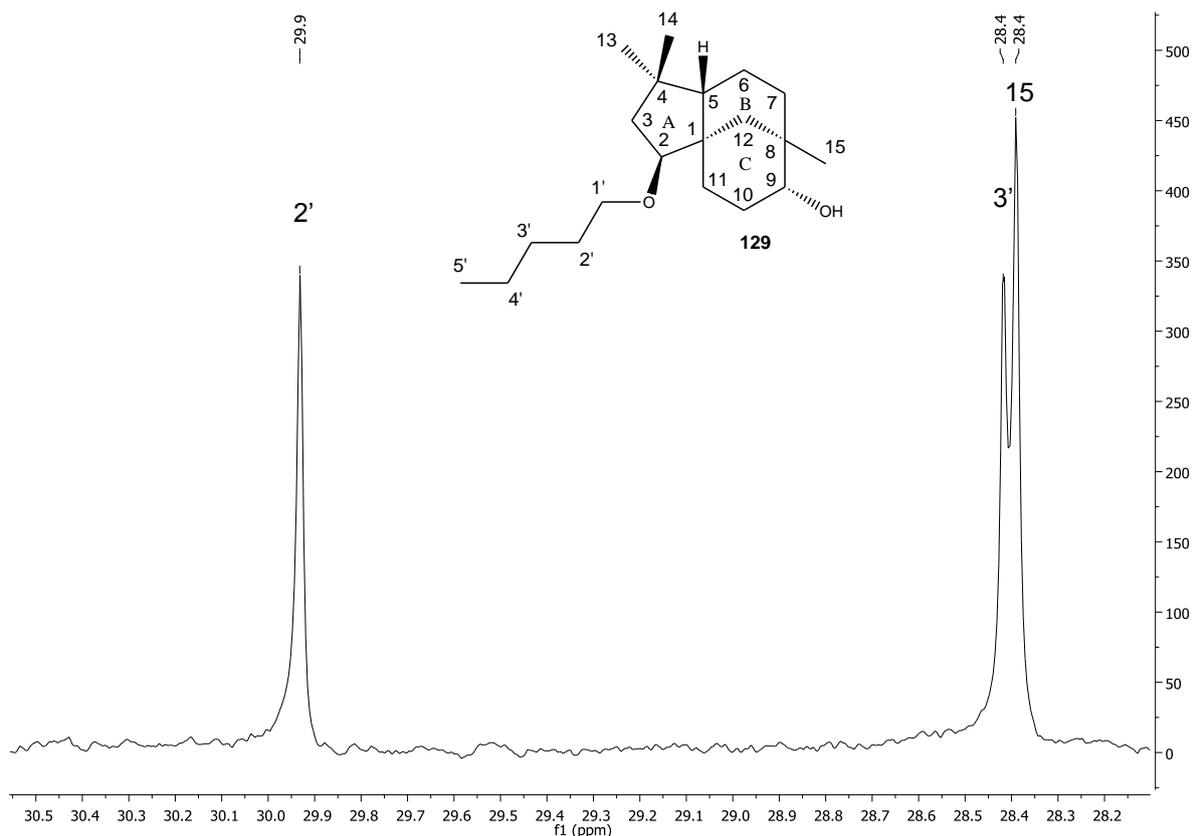
Figura 143 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (129).



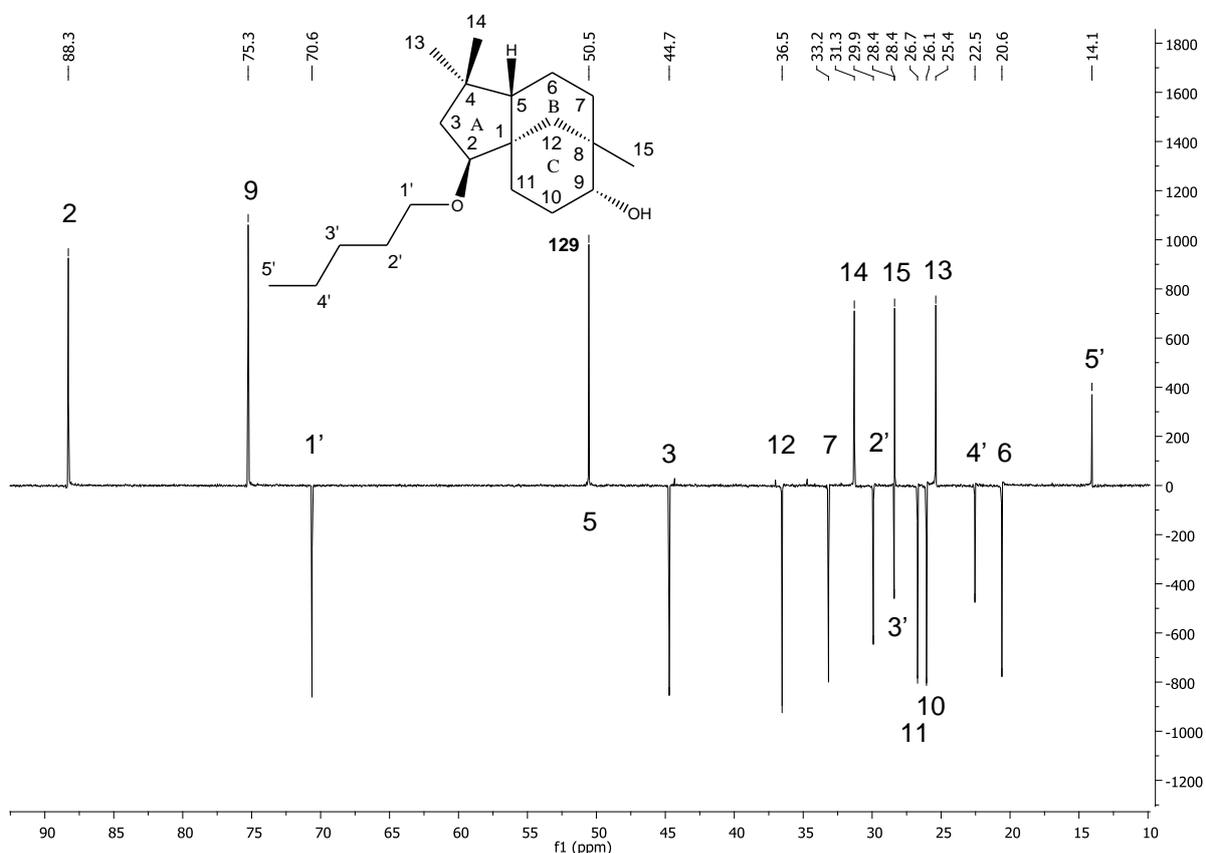
**Figura 144** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**).  
Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,44 – 1,74.



**Figura 145** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 2 $\beta$ -pentoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**129**).



**Figura 146** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -pentociclovan- $9\alpha$ -ol (**129**).  
Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  28,2 a 30,5.



**Figura 147** - Subespectro DEPT-135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -pentociclovan- $9\alpha$ -ol (**129**).  
Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  28,1 – 30,5.

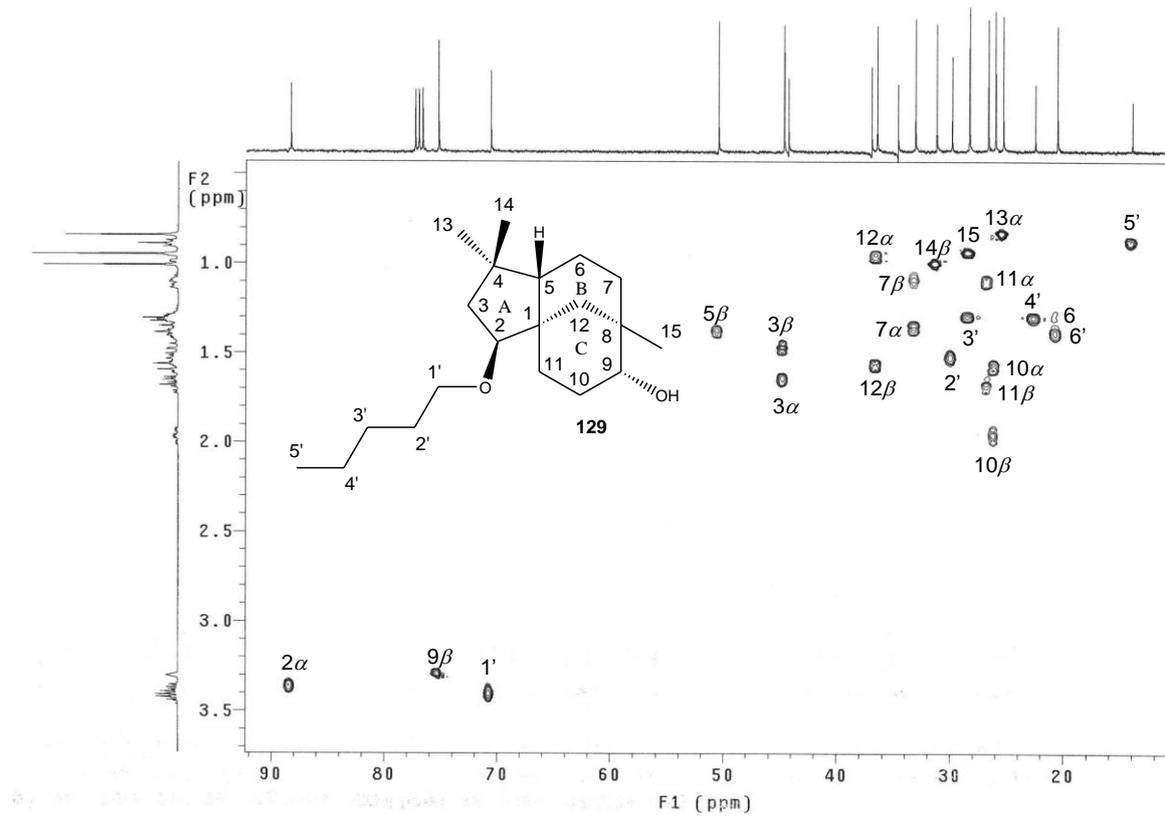


Figura 148 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-pentoxiclovan-9α-ol (129).

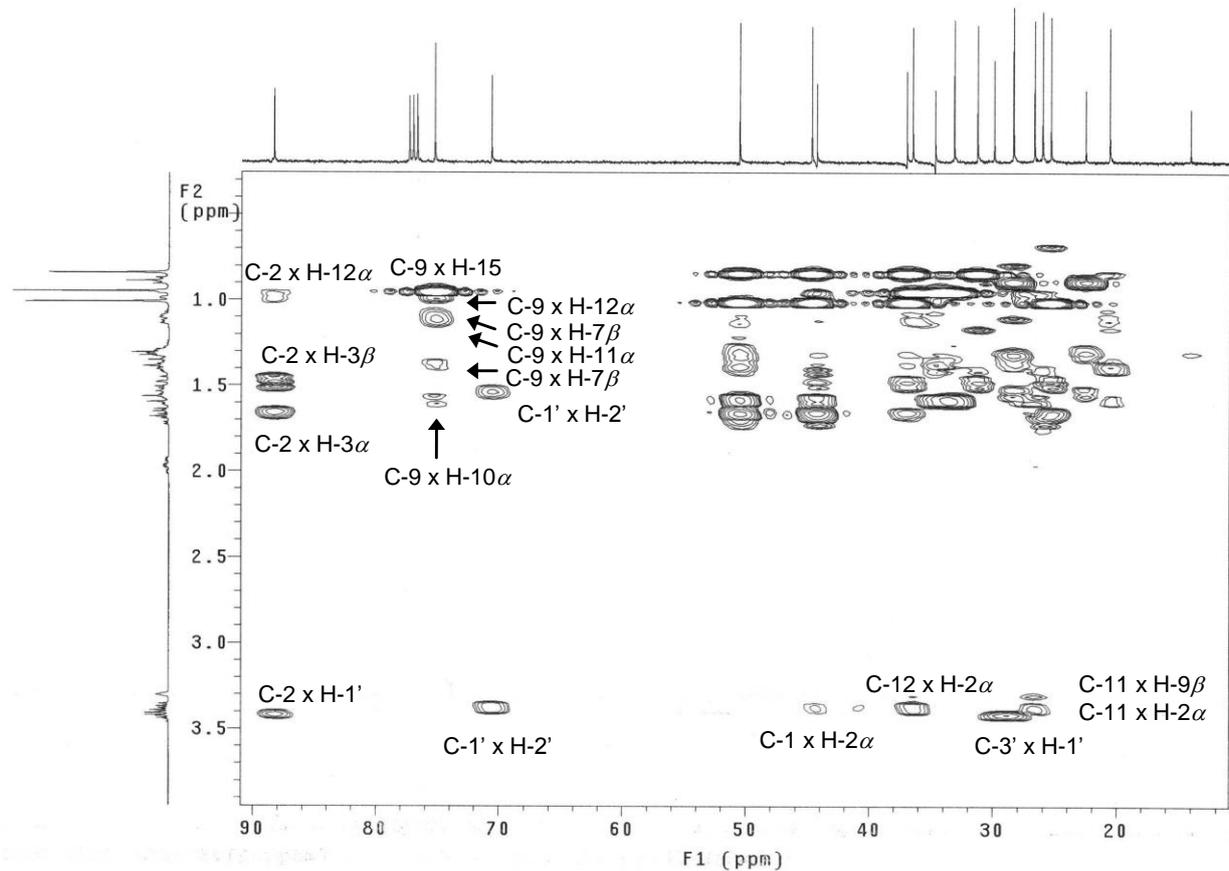
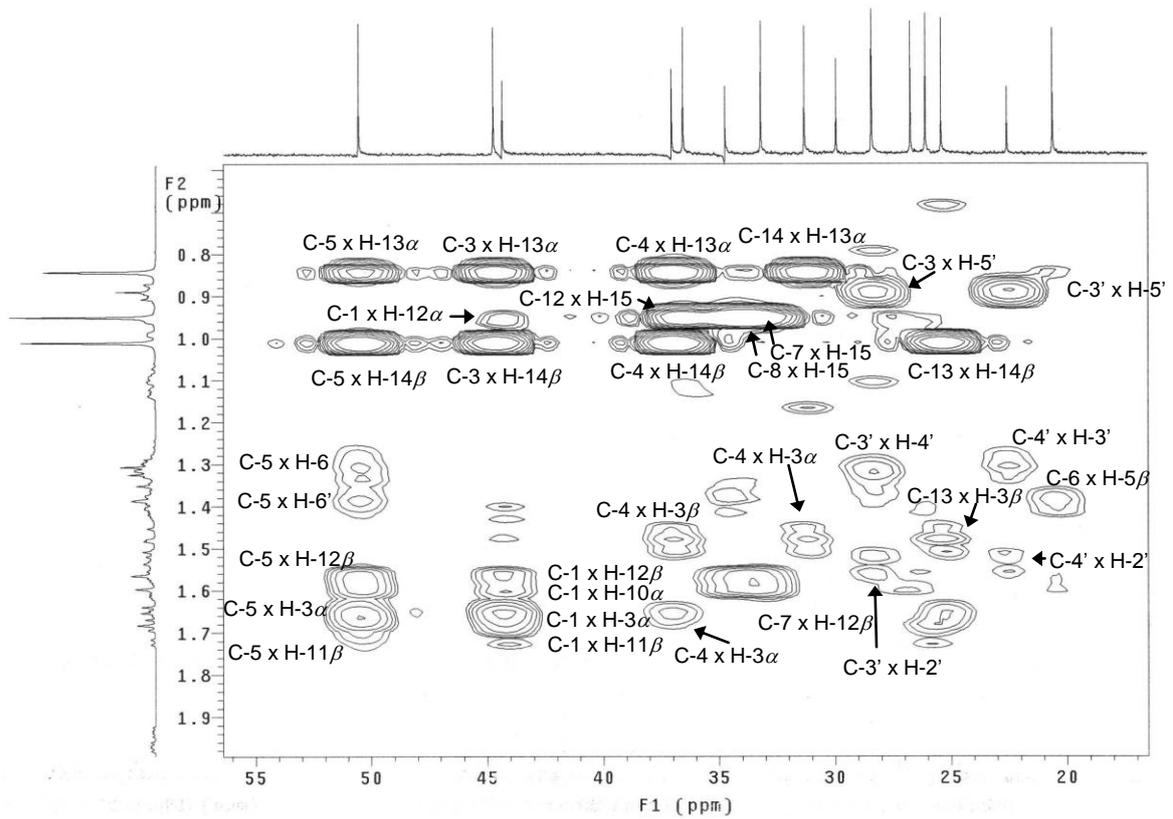
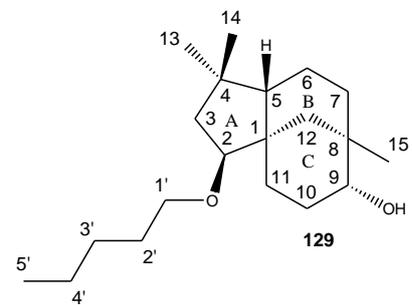


Figura 149 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-pentoxiclovan-9α-ol (129).



**Figura 150** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,6 – 2,0.



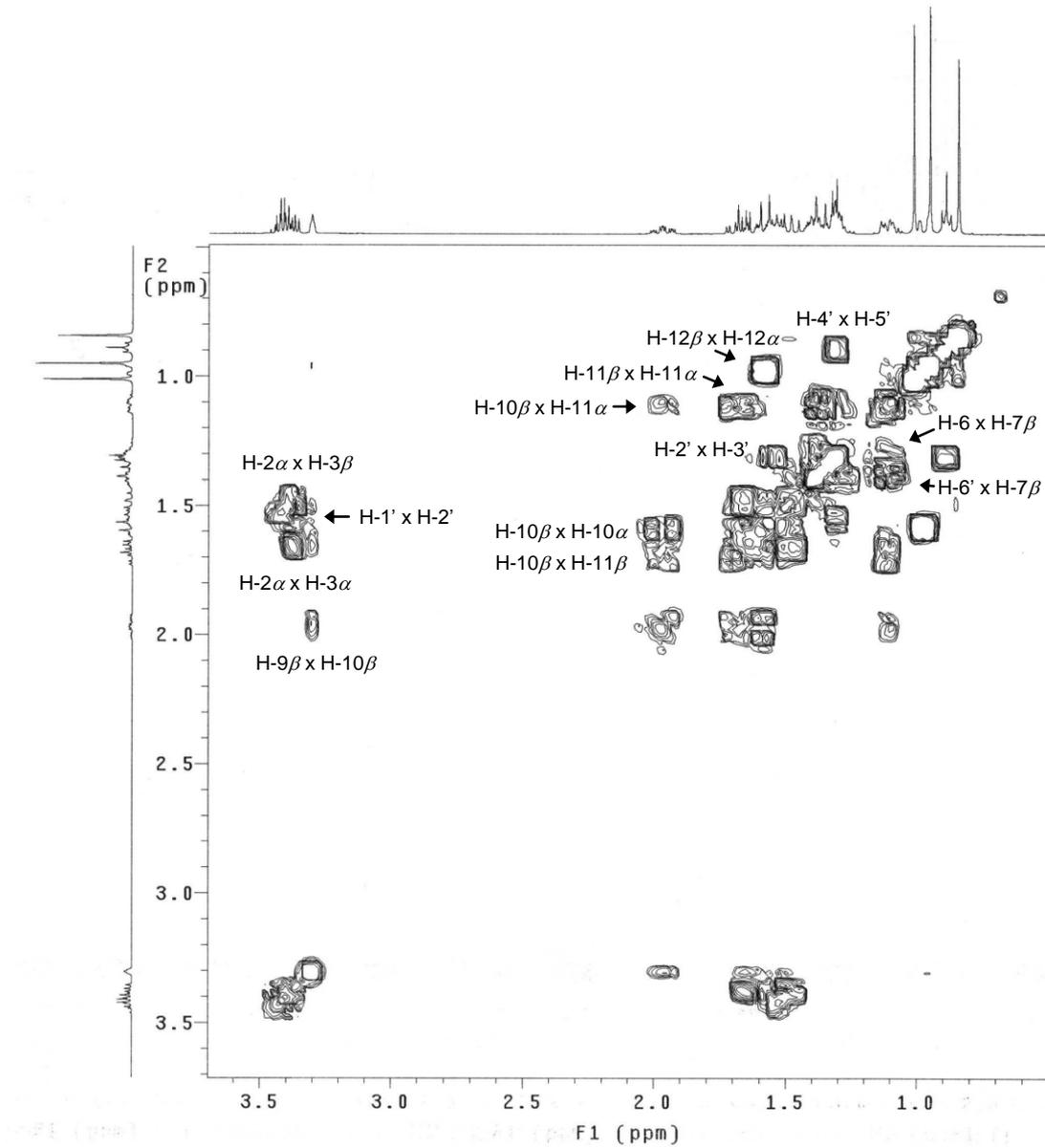
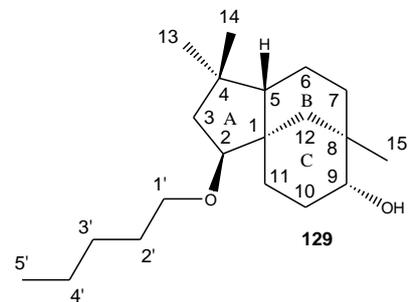


Figura 151 – Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (129).



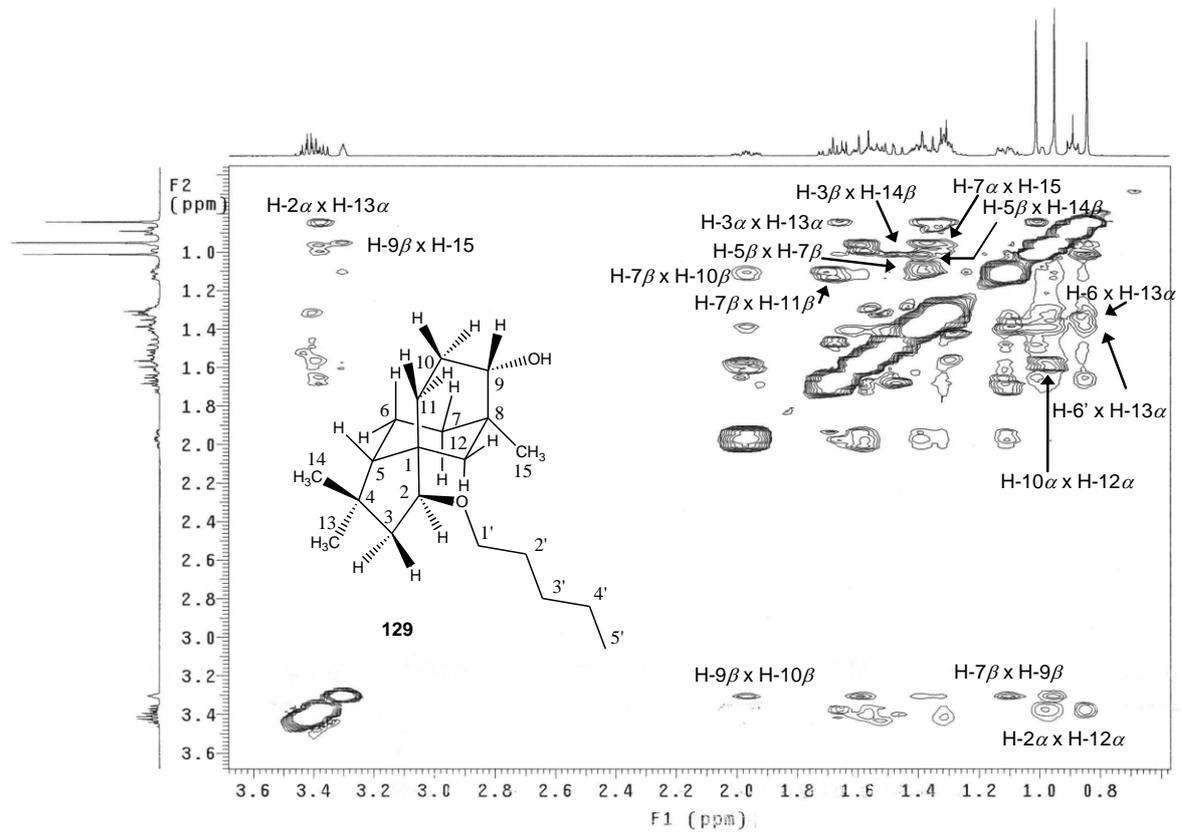


Figura 152 – Mapa de contornos NOESY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**).

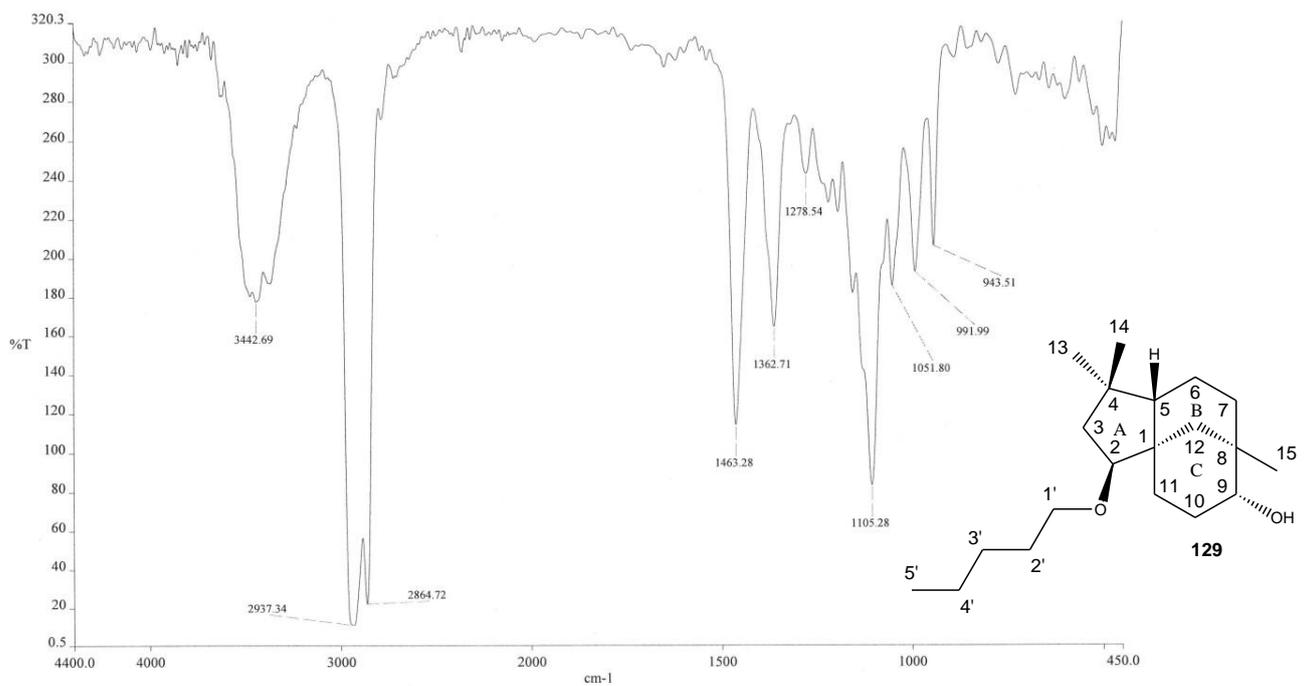


Figura 153 – Espectro na região do IV do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**) (KBr).

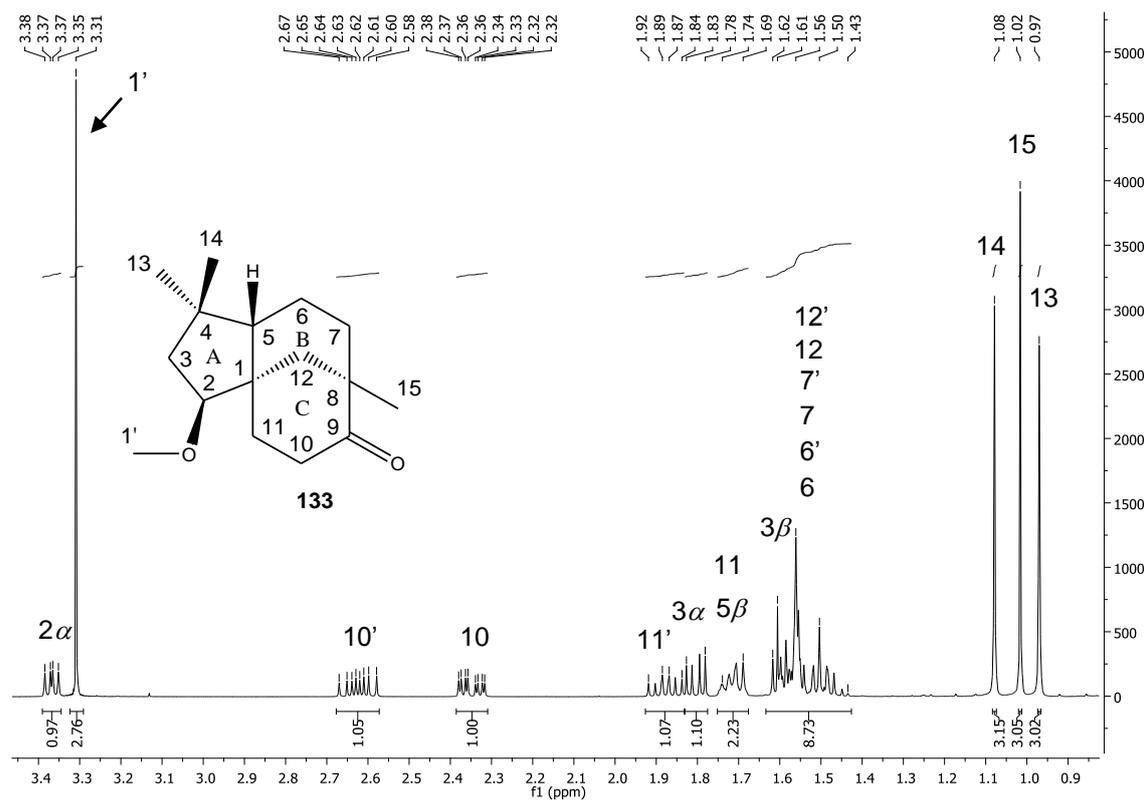


Figura 154 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da  $2\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**).

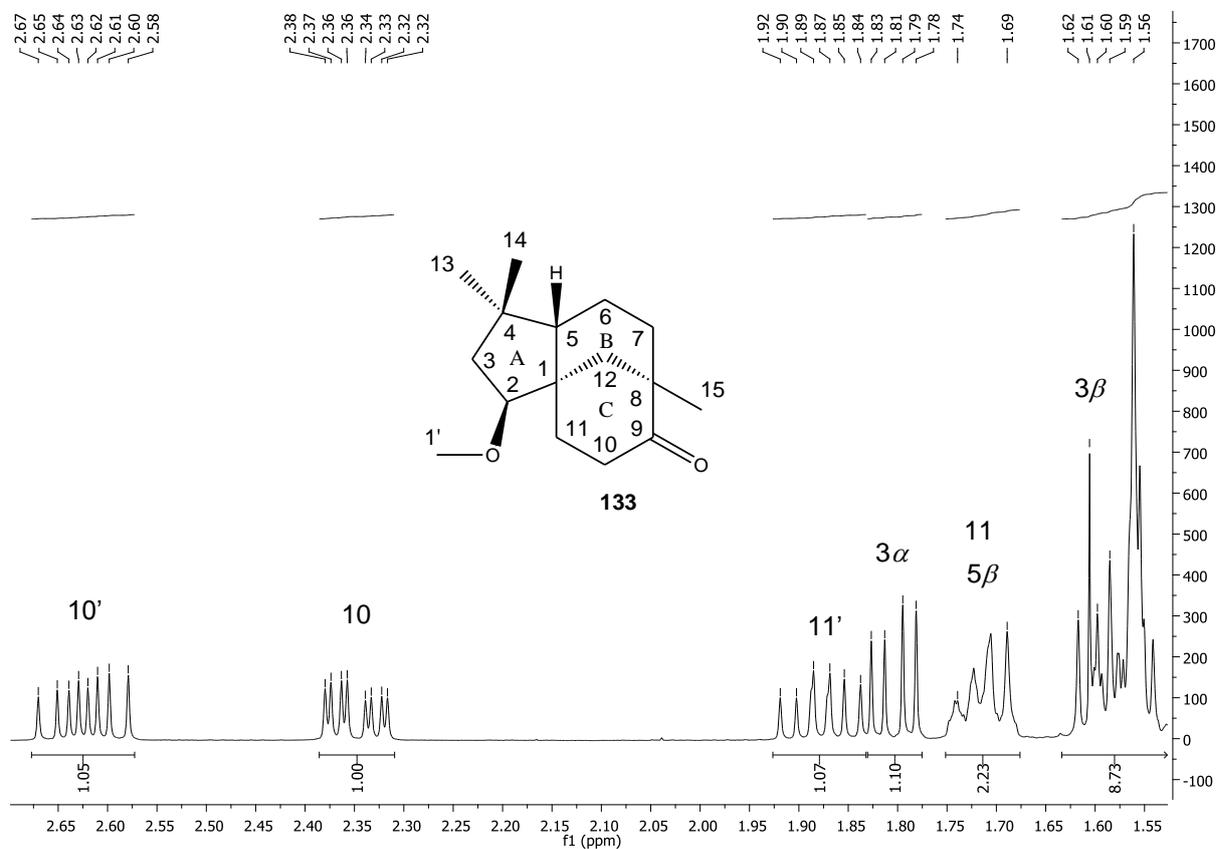


Figura 155 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da  $2\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,55 – 2,65.

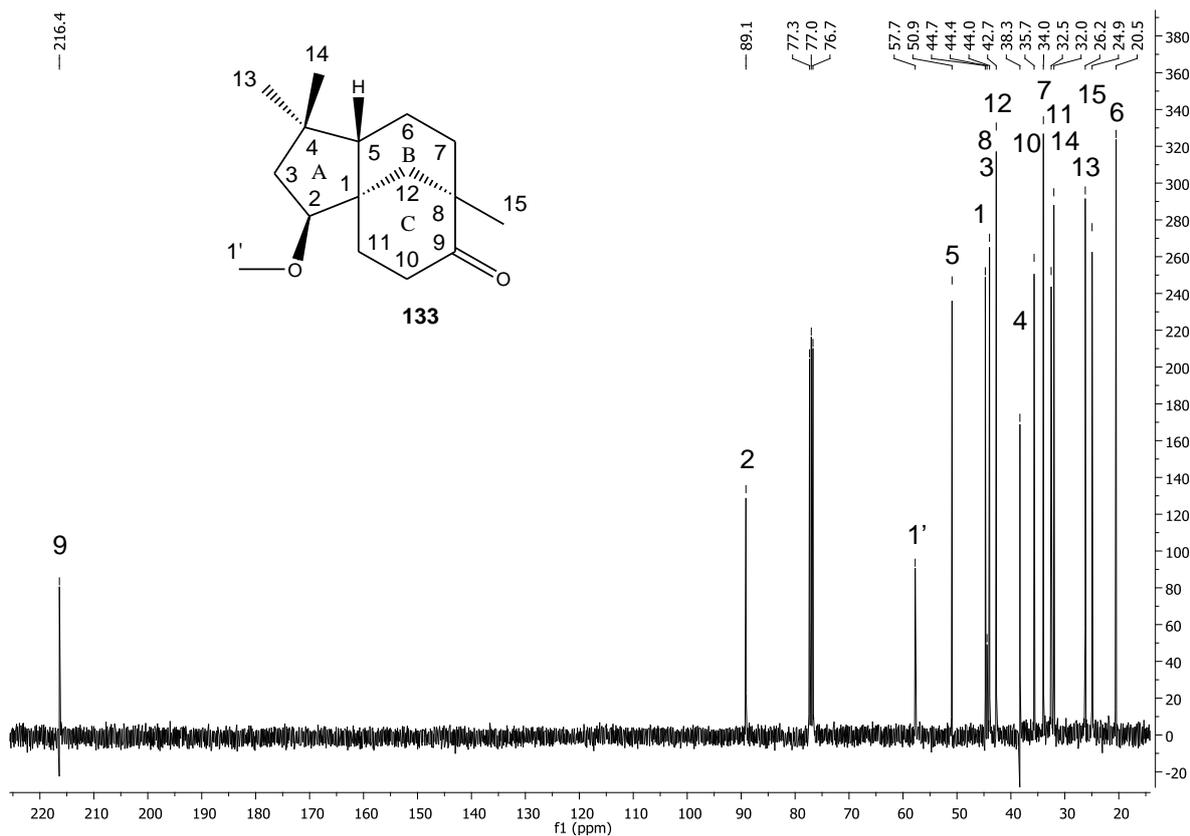


Figura 156 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 2β-metoxiclovan-9-ona (133).

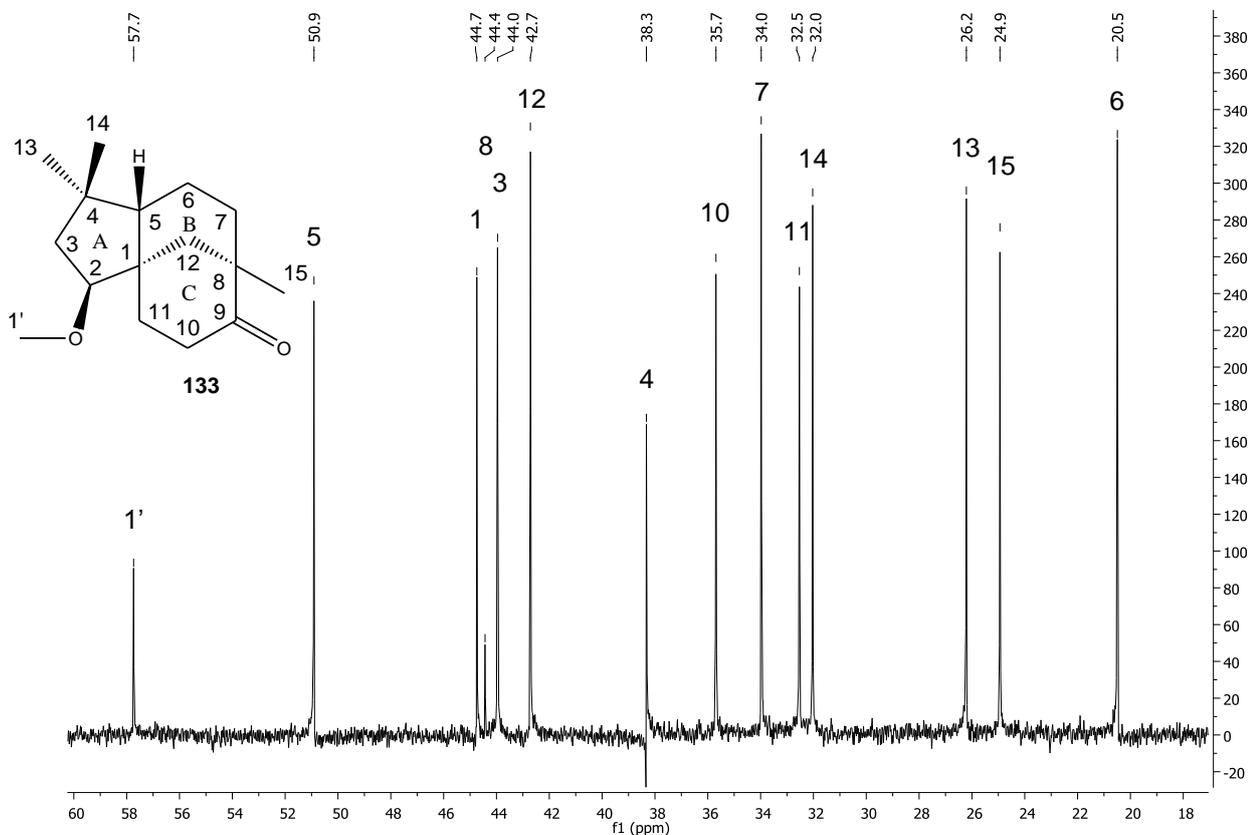


Figura 157 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 2β-metoxiclovan-9-ona (133). Expansão da região entre  $\delta_{\text{C}}$  19,0 – 60,0.

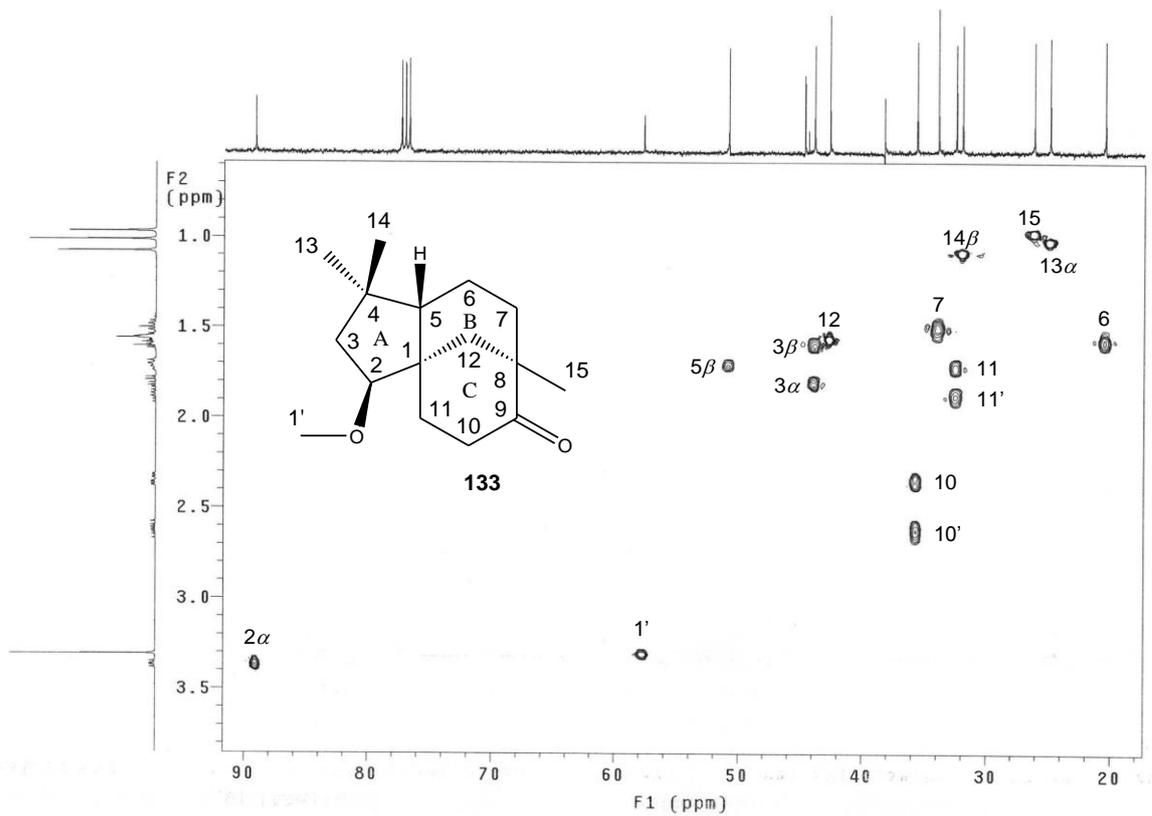


Figura 158 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**).

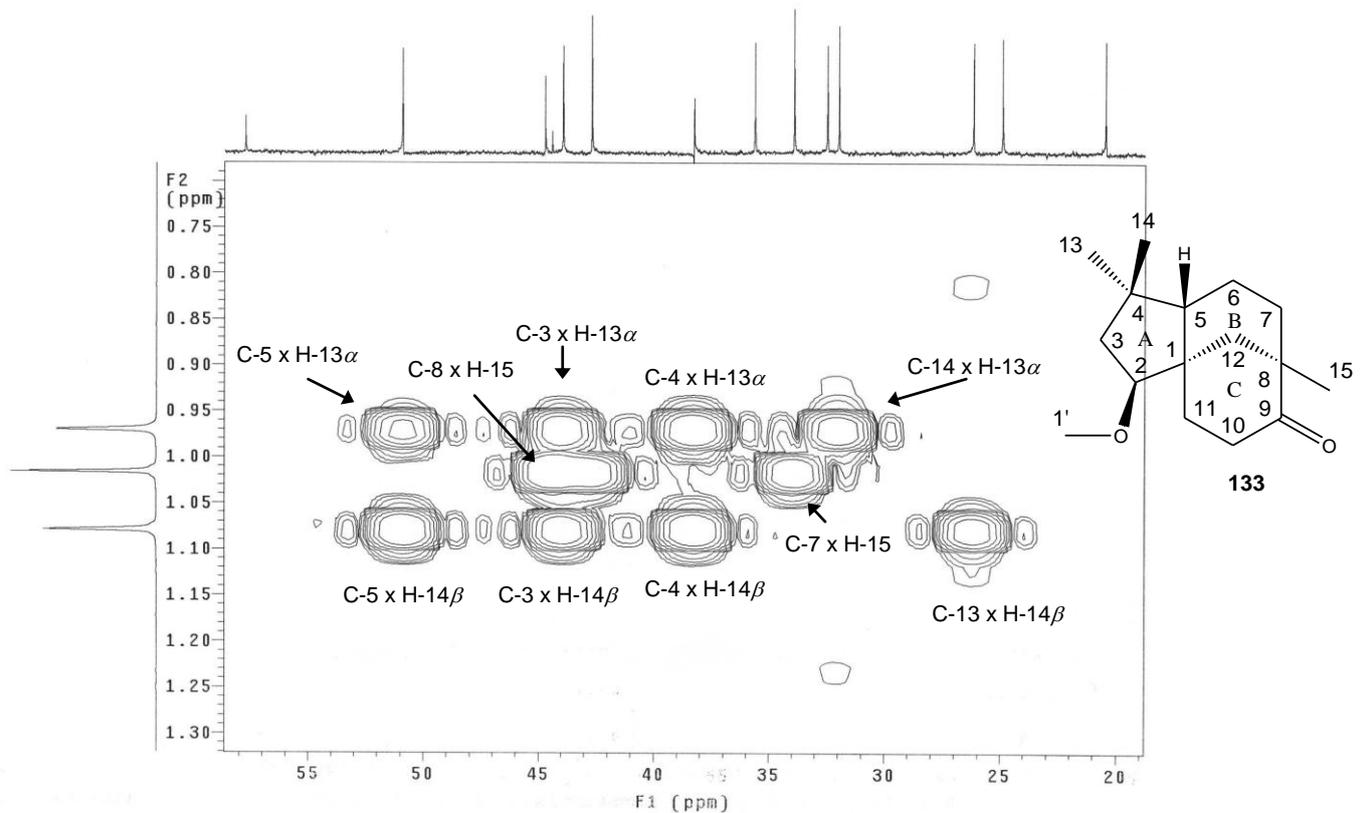
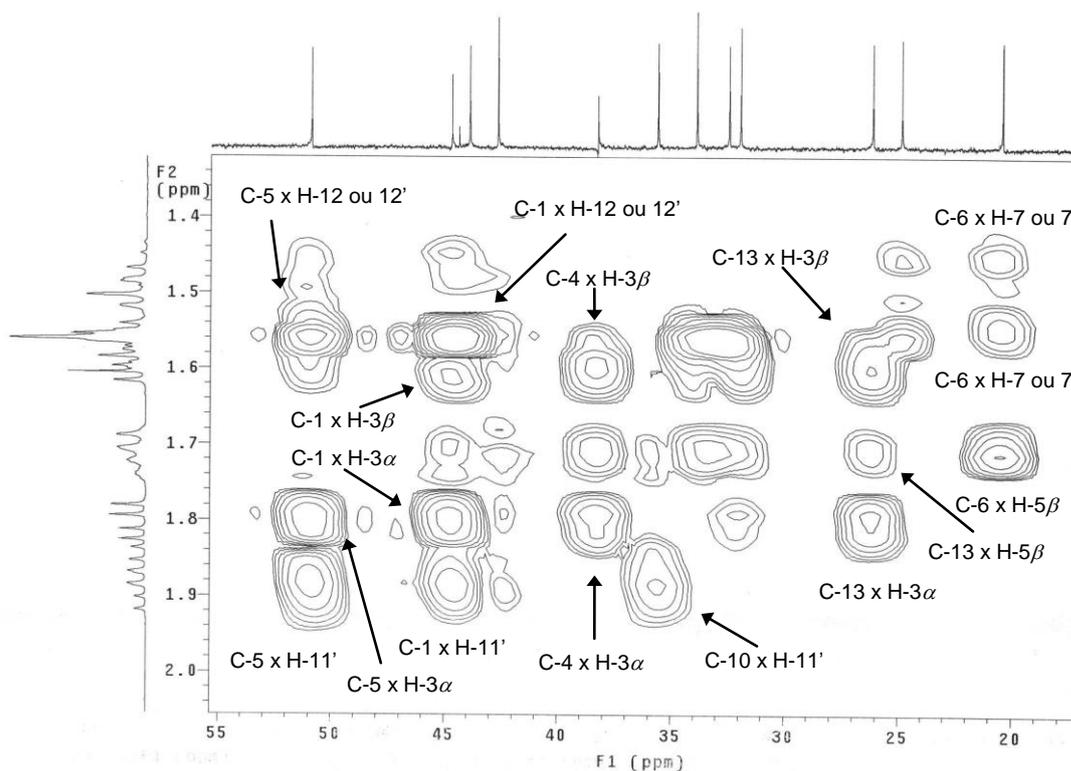
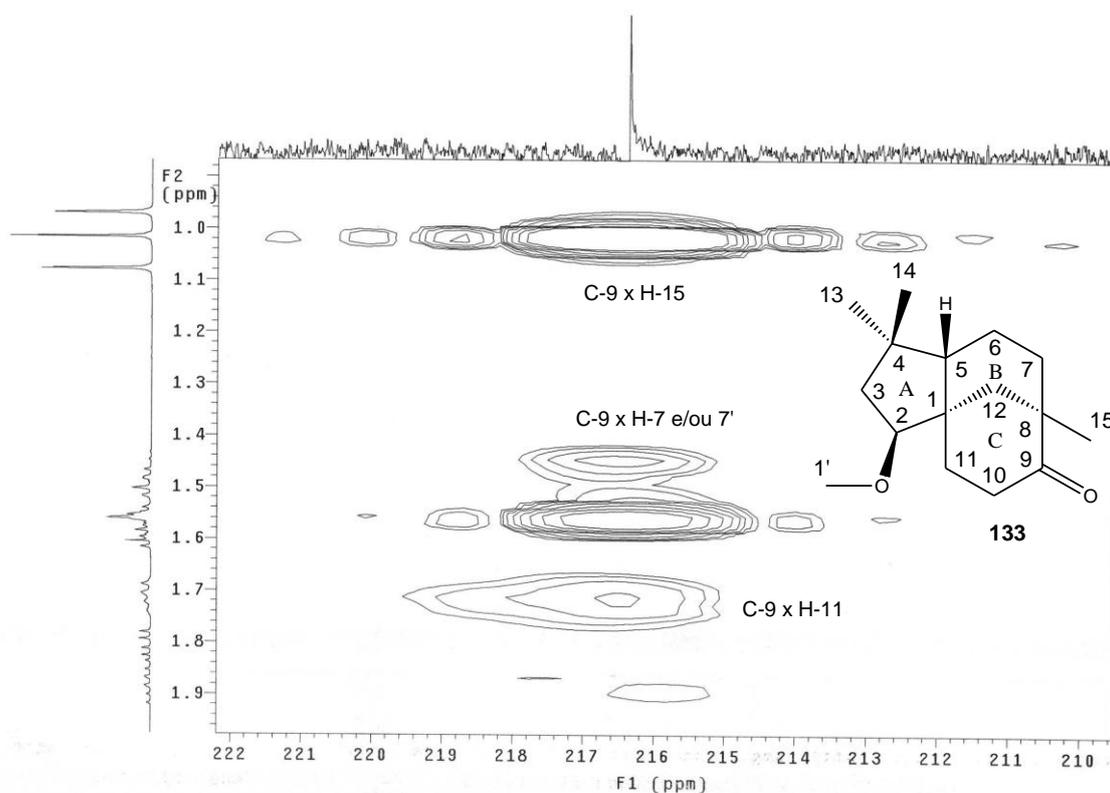


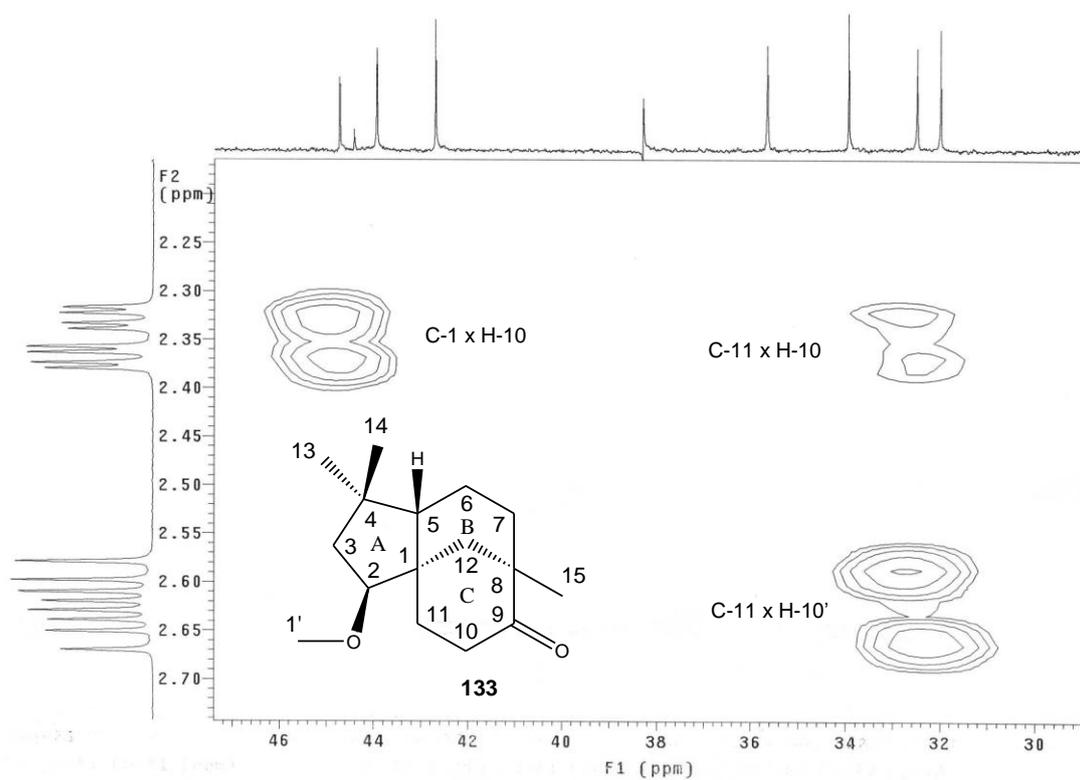
Figura 159 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (**133**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,7 – 1,3.



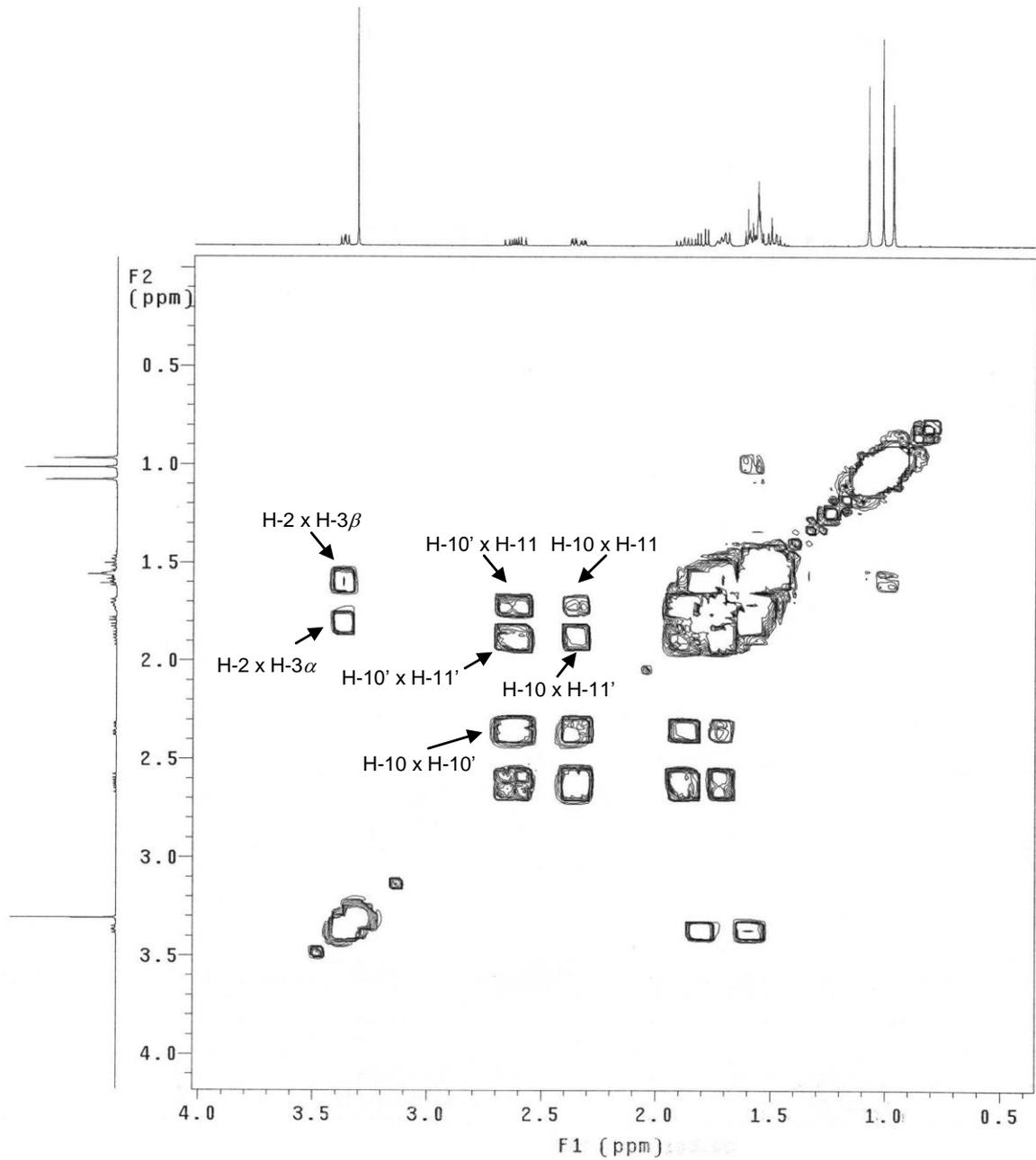
**Figura 160** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (133). Expansão da região entre  $\delta_H$  1,3 – 2,0.



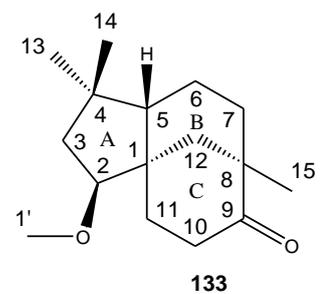
**Figura 161** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 2 $\beta$ -metoxiclovan-9-ona (133). Expansão da região entre  $\delta_H$  0,9 – 1,9.



**Figura 162** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da 2β-metoxiclovan-9-ona (133). Expansão da região entre δ<sub>H</sub> 2,20 – 2,70.



**Figura 163** – Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da metoxiclovan-9-ona (**133**).  
Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,4 – 4,0.



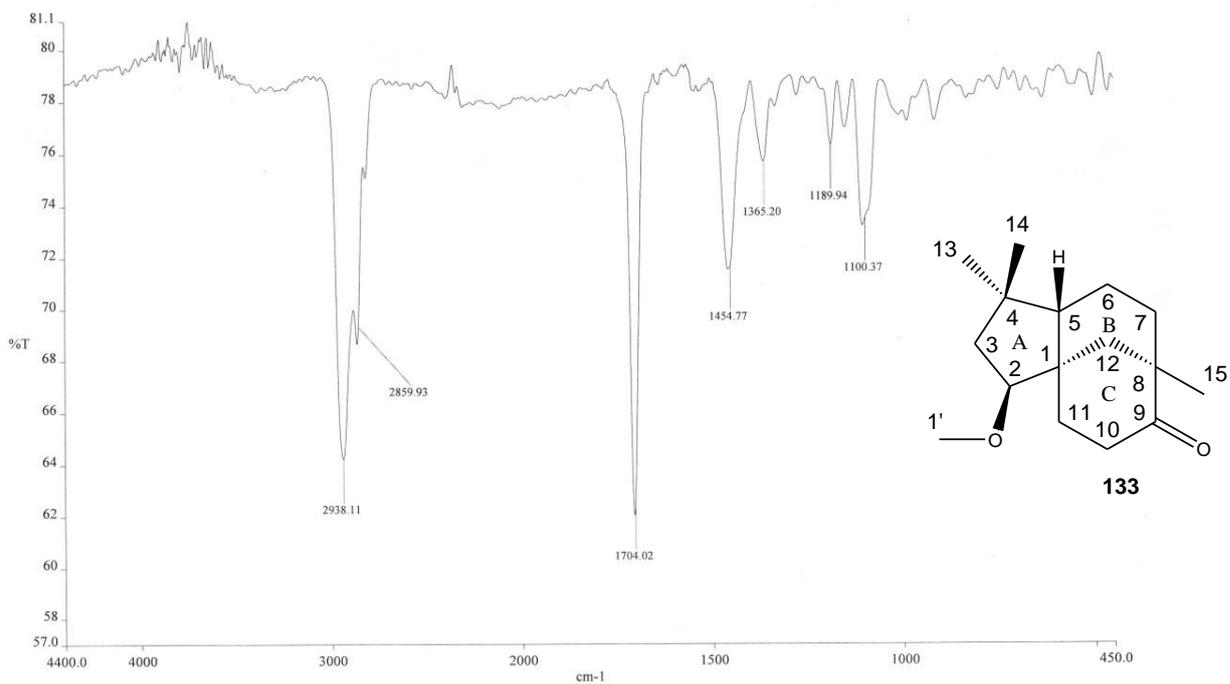


Figura 164 – Espectro na região do IV da 2β-metoxiclovan-9-ona (**133**) (KBr).

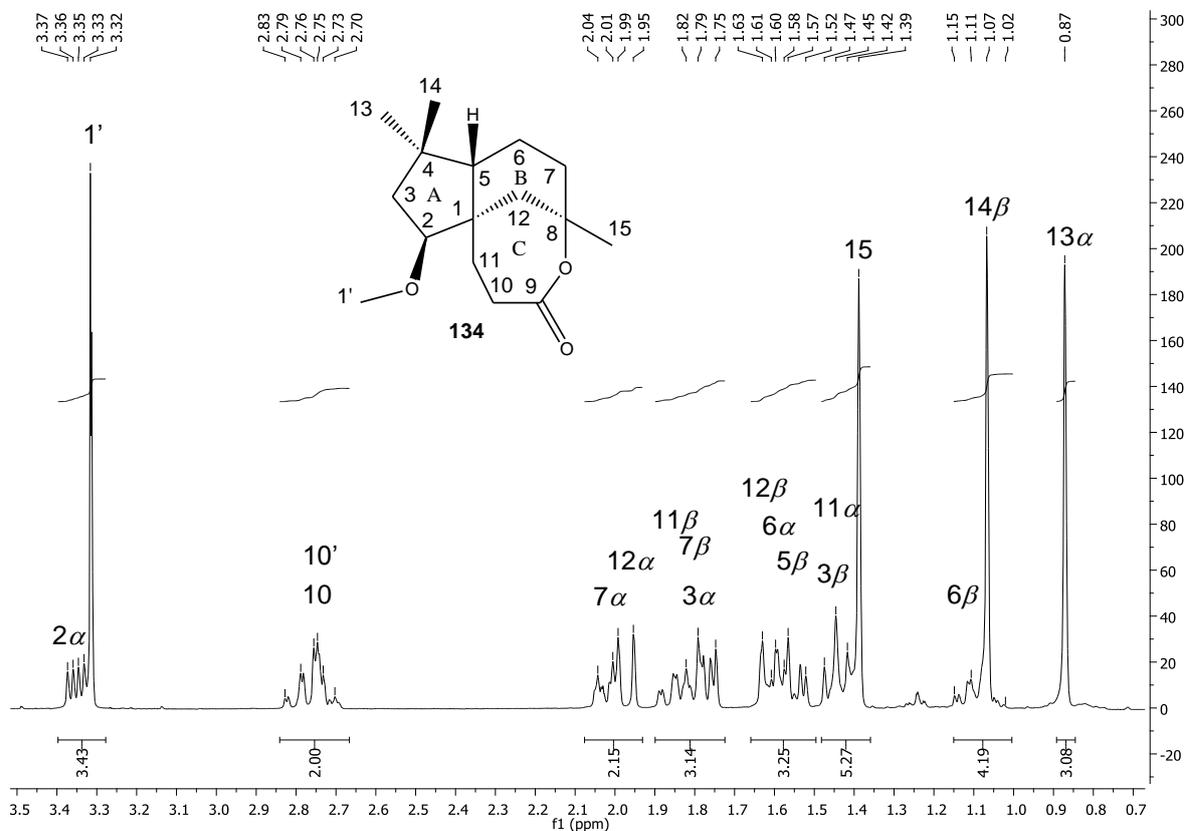
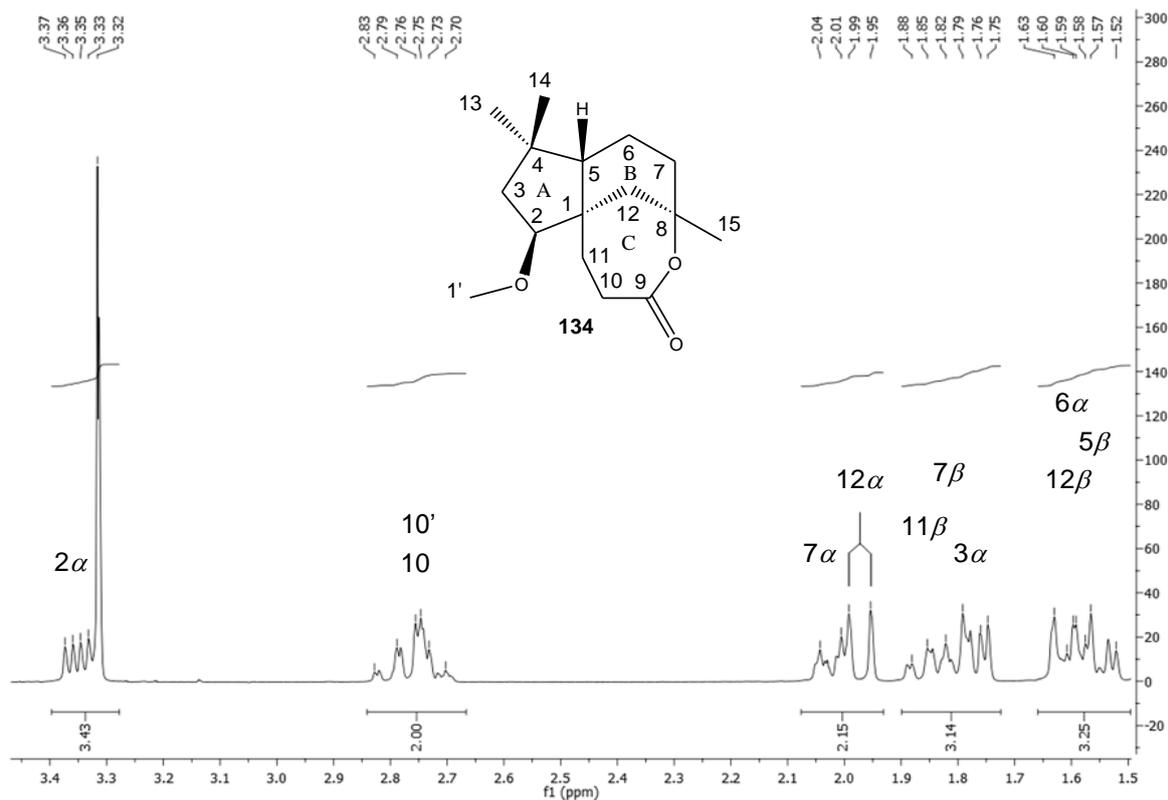
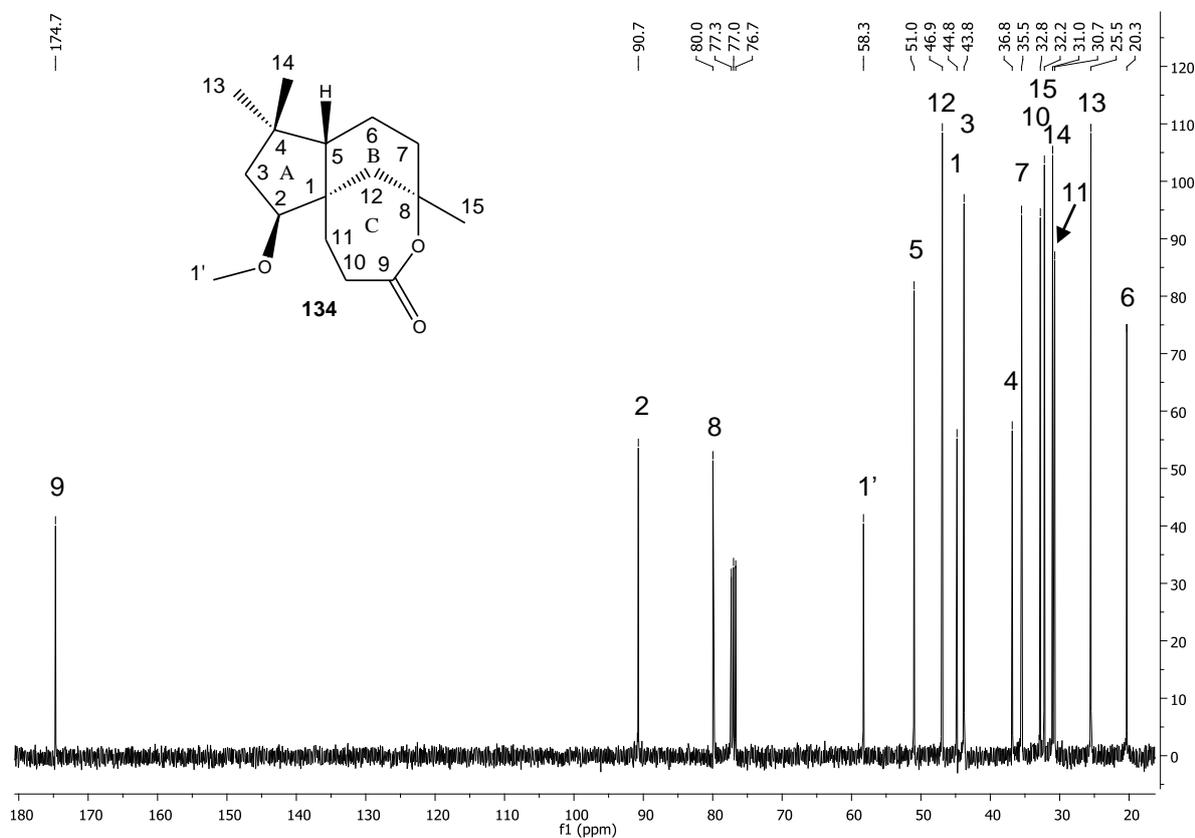


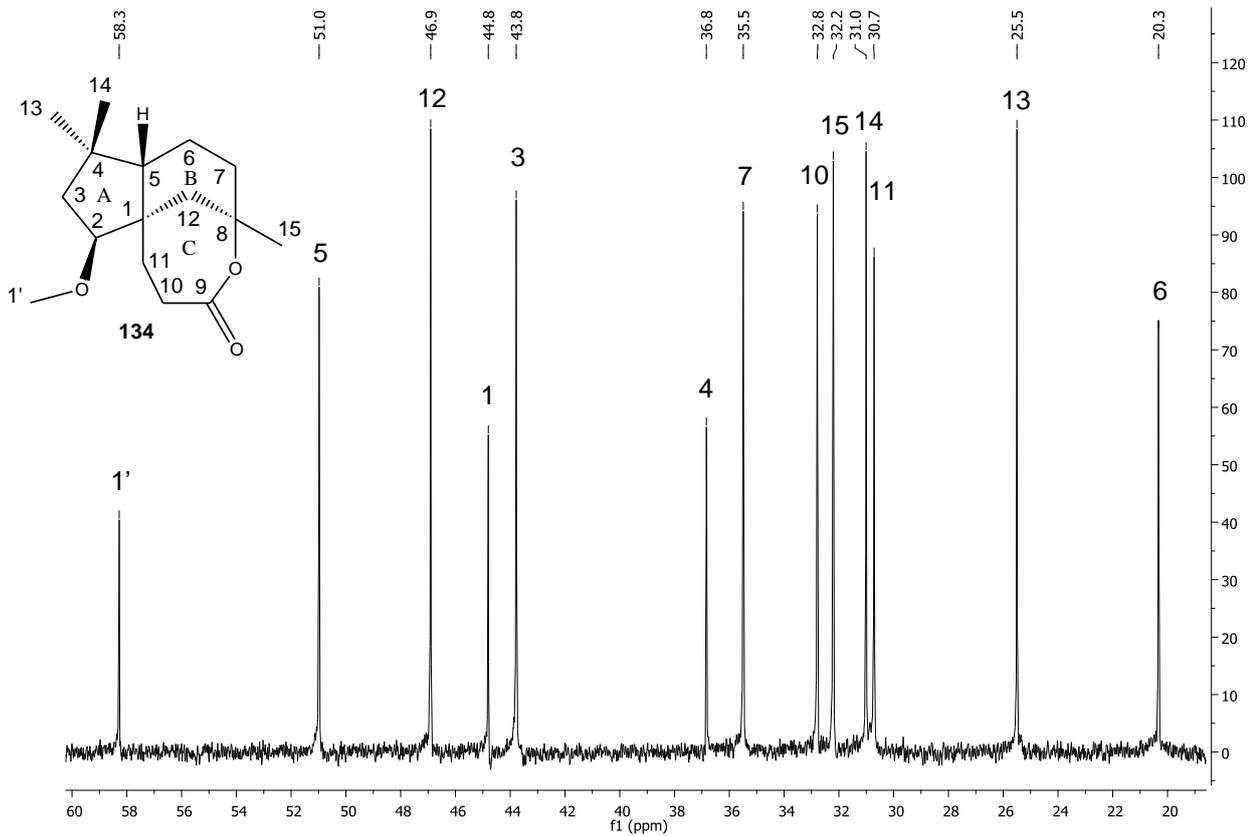
Figura 165 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da (1S,2S,5S,8R)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovan-9-lactona (**134**).



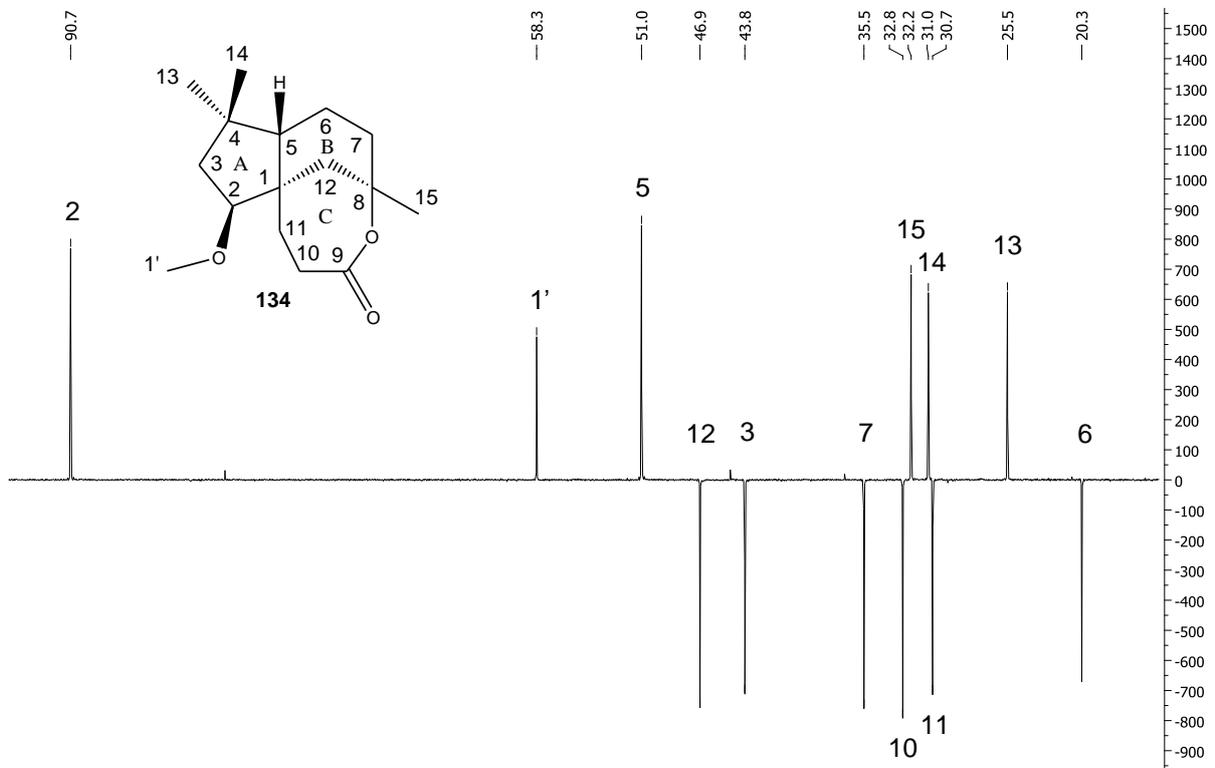
**Figura 166** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona (**134**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,5 – 3,4.



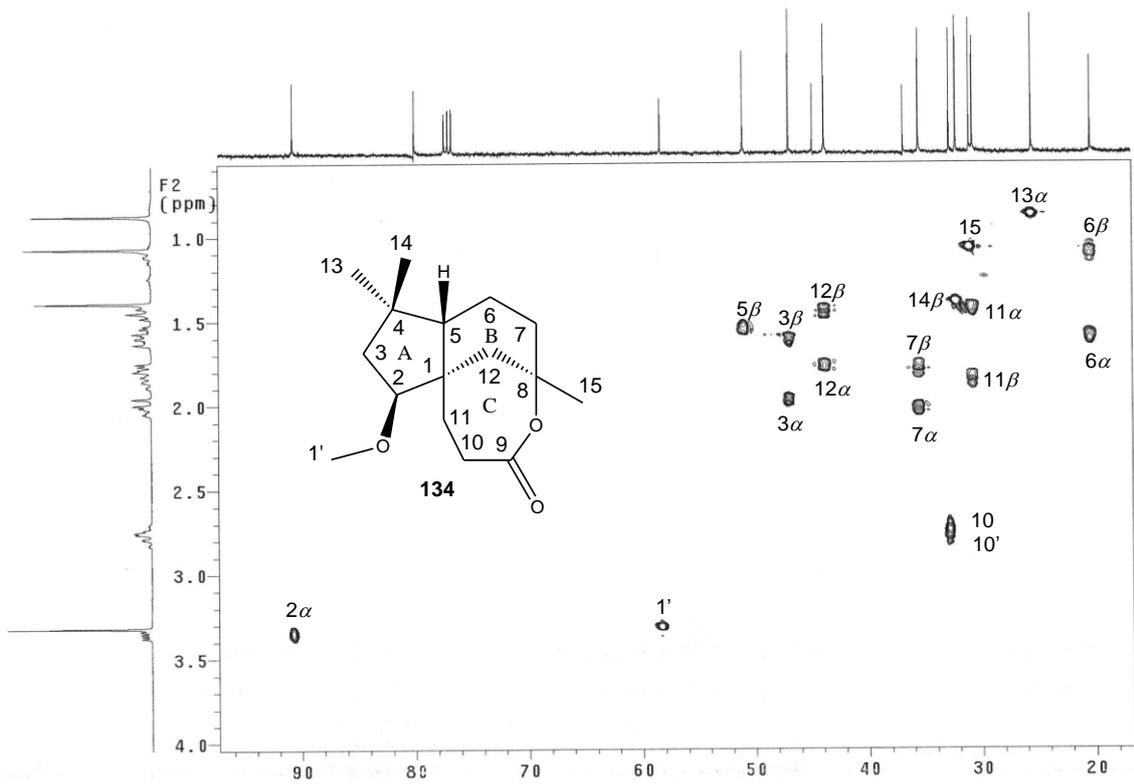
**Figura 167** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona (**134**).



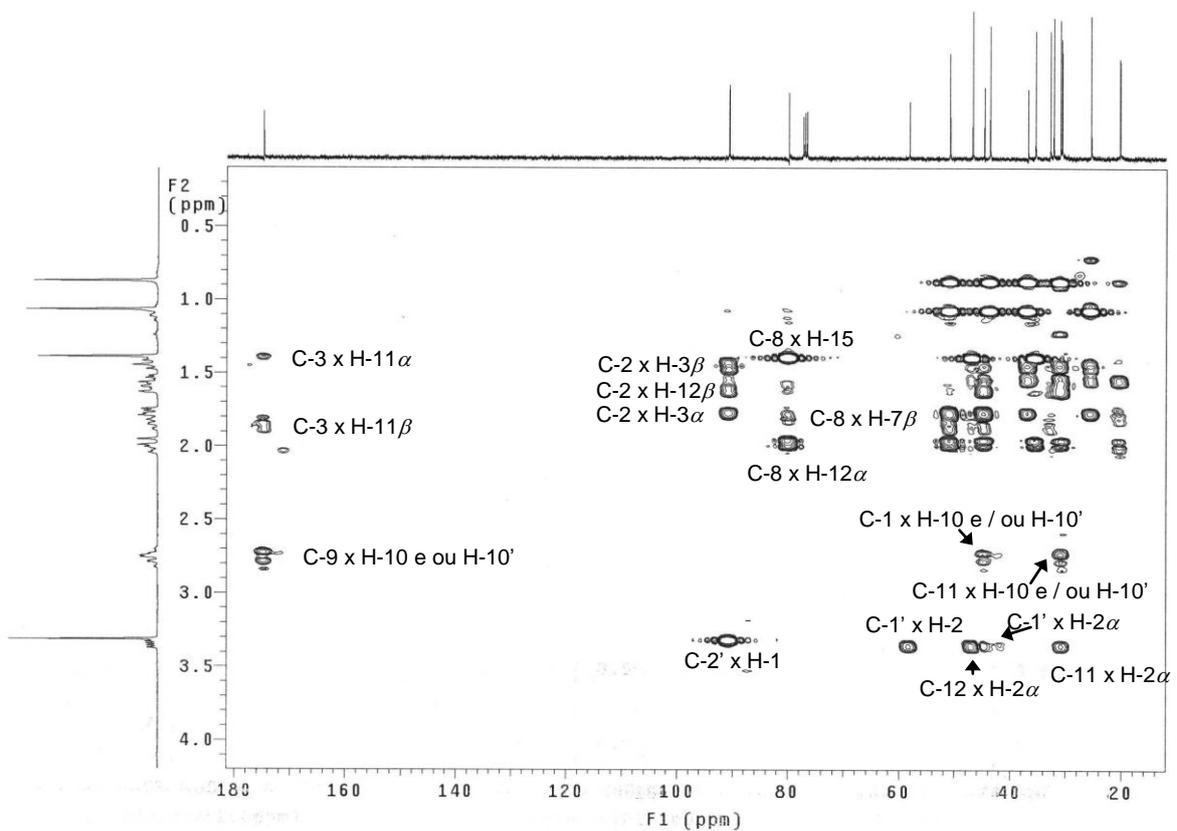
**Figura 168** - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona (**134**). Expansão da região entre δ<sub>C</sub> 19,0 – 60,0.



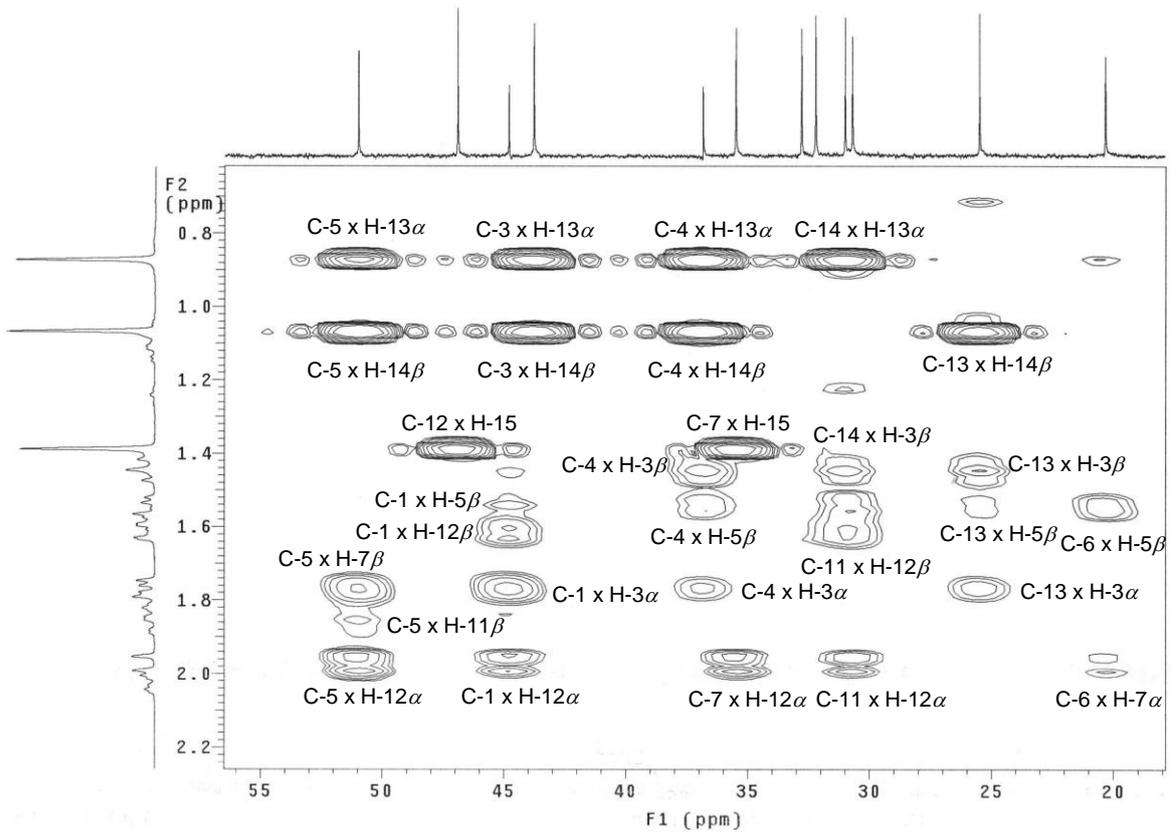
**Figura 169** - Subespectro DEPT-135 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona (**134**).



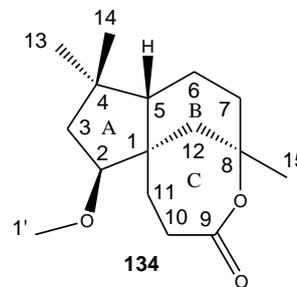
**Figura 170** - Mapa de contornos HSQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona (**134**).

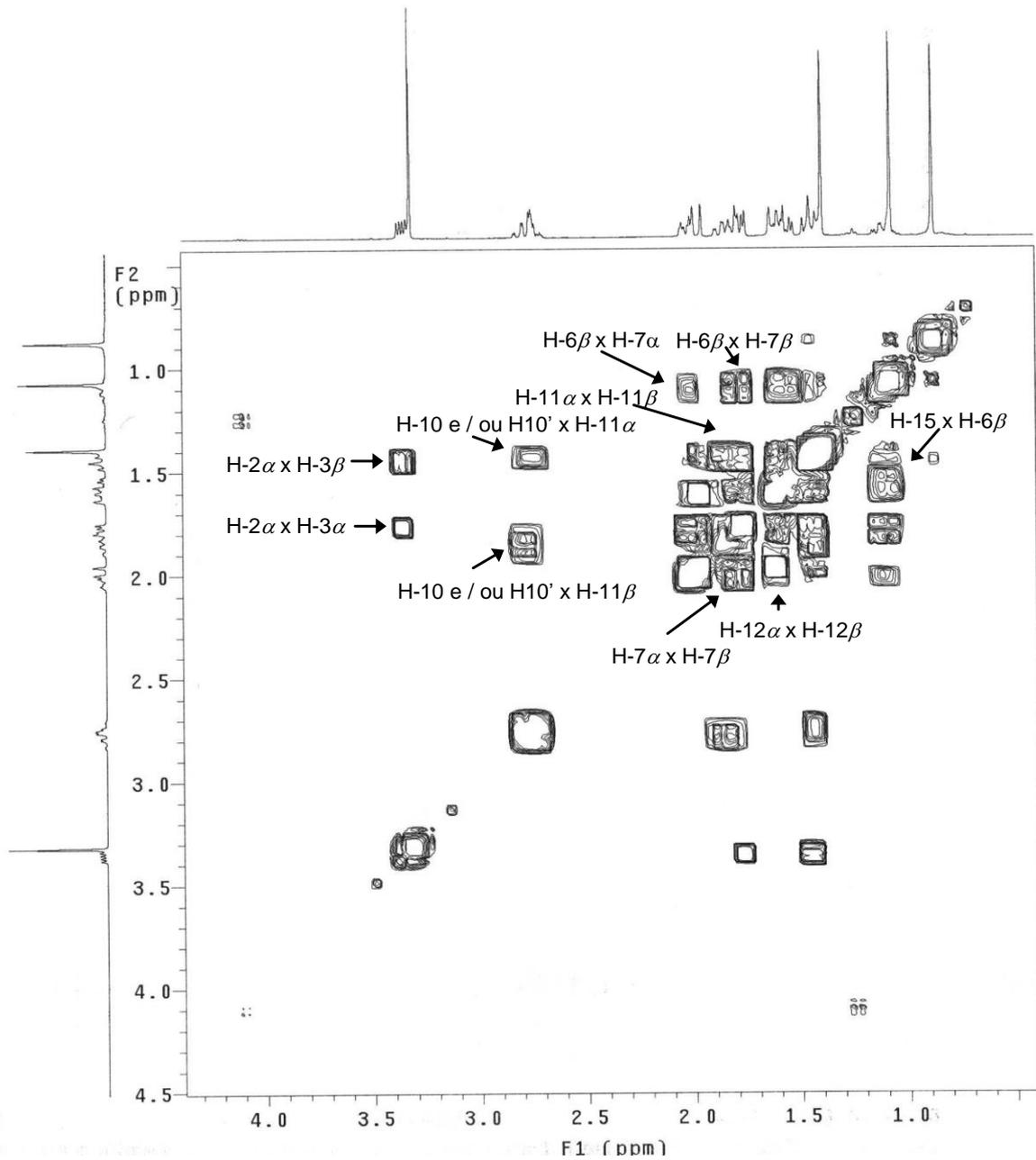


**Figura 171** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona (**134**).

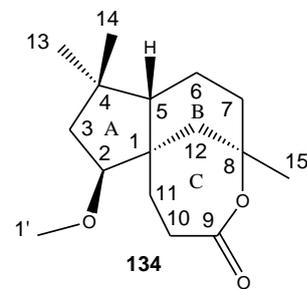


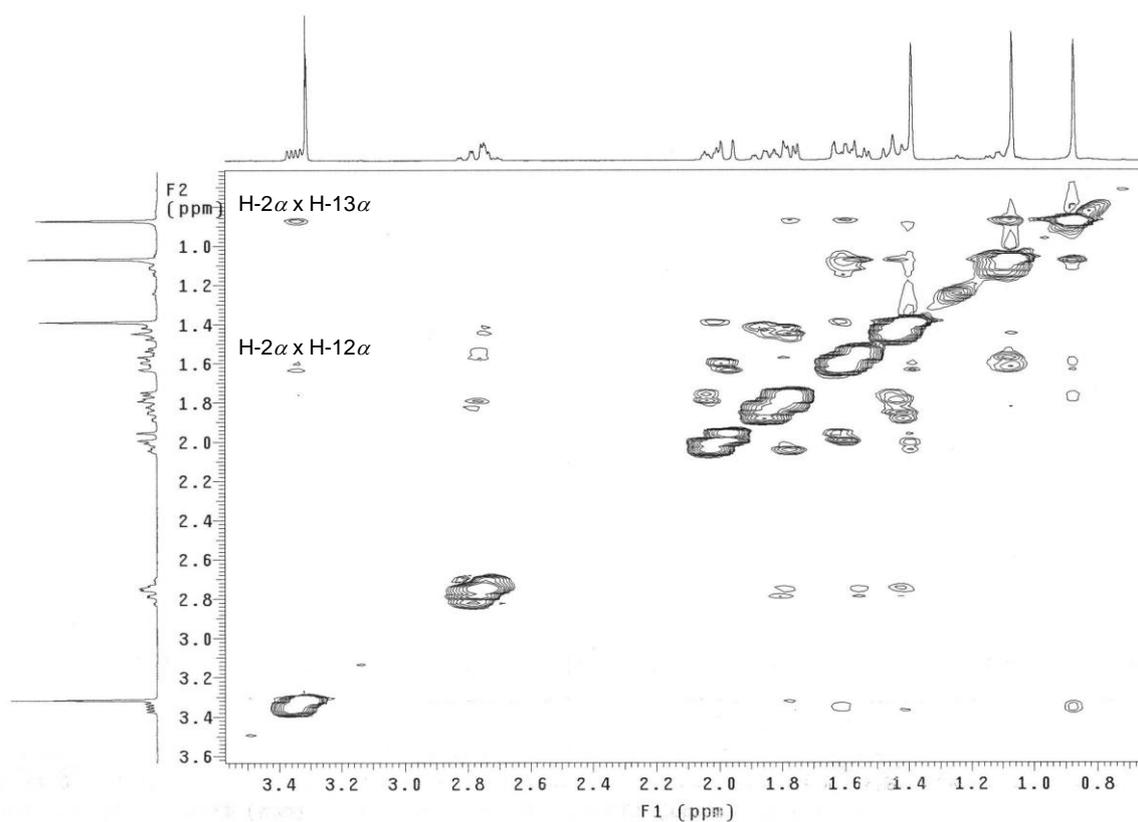
**Figura 172** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona (**134**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,7 – 2,2.



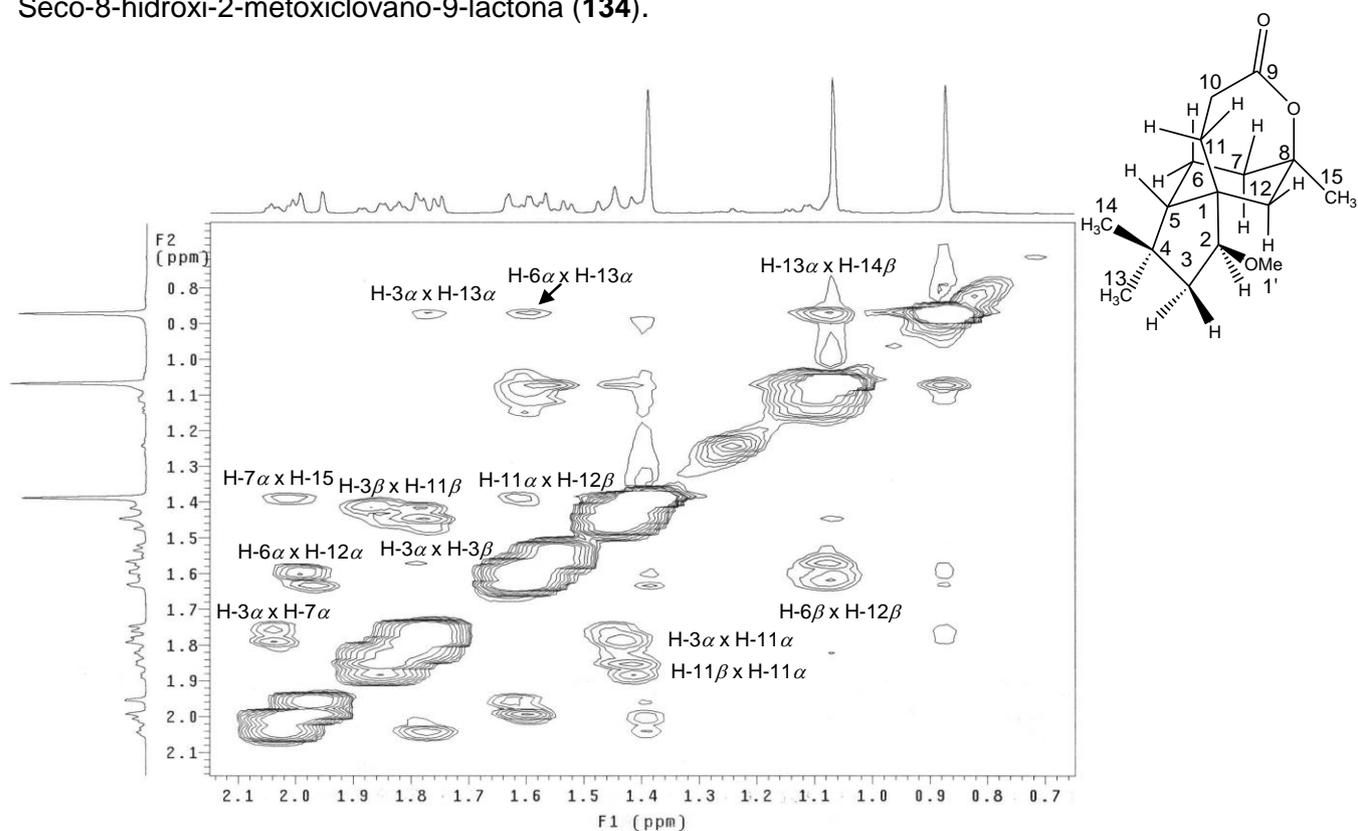


**Figura 173** – Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona (**134**).

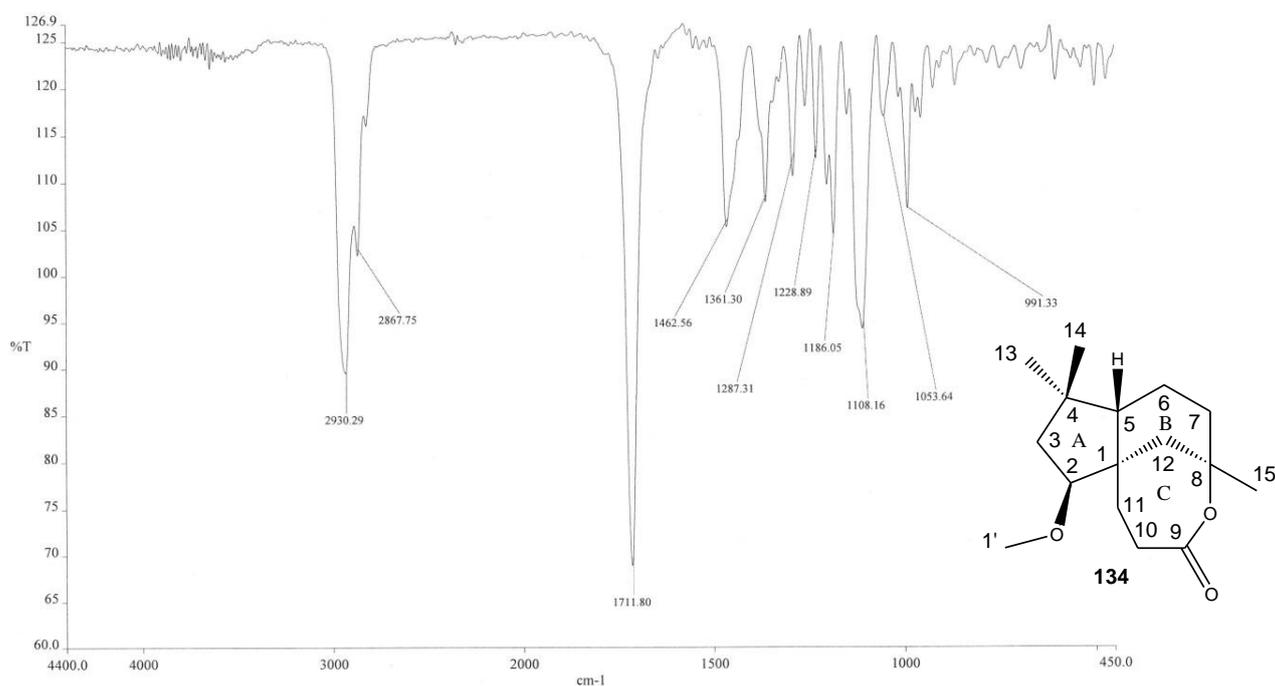




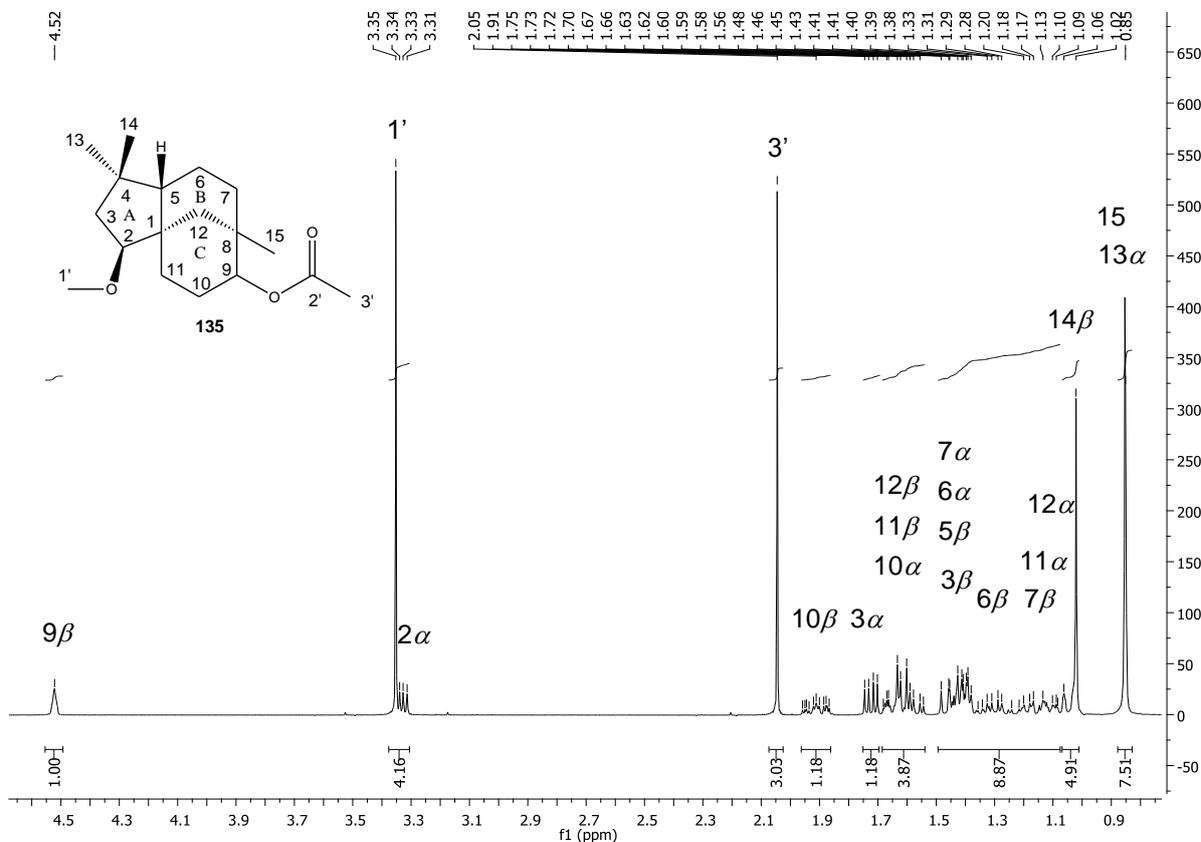
**Figura 174** – Mapa de contornos NOESY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona (**134**).



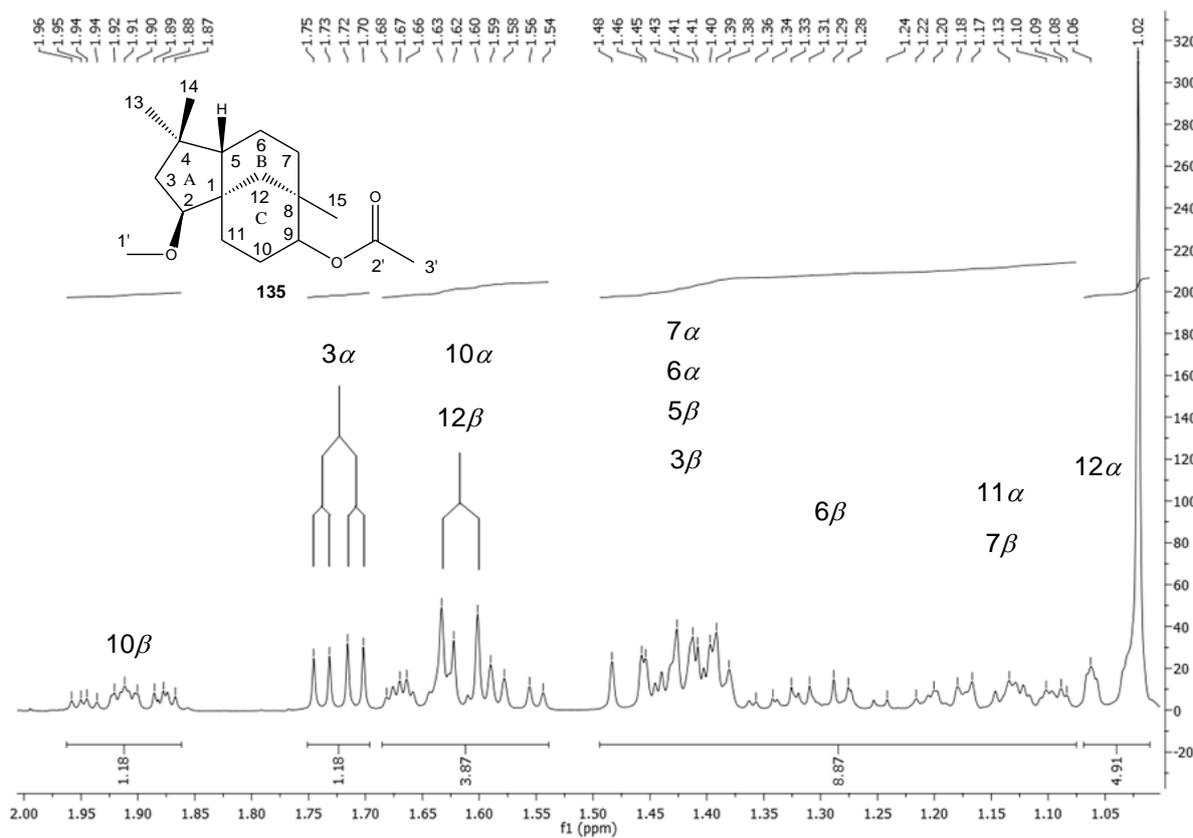
**Figura 175** – Mapa de contornos NOESY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovano-9-lactona (**134**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,7 – 2,1.



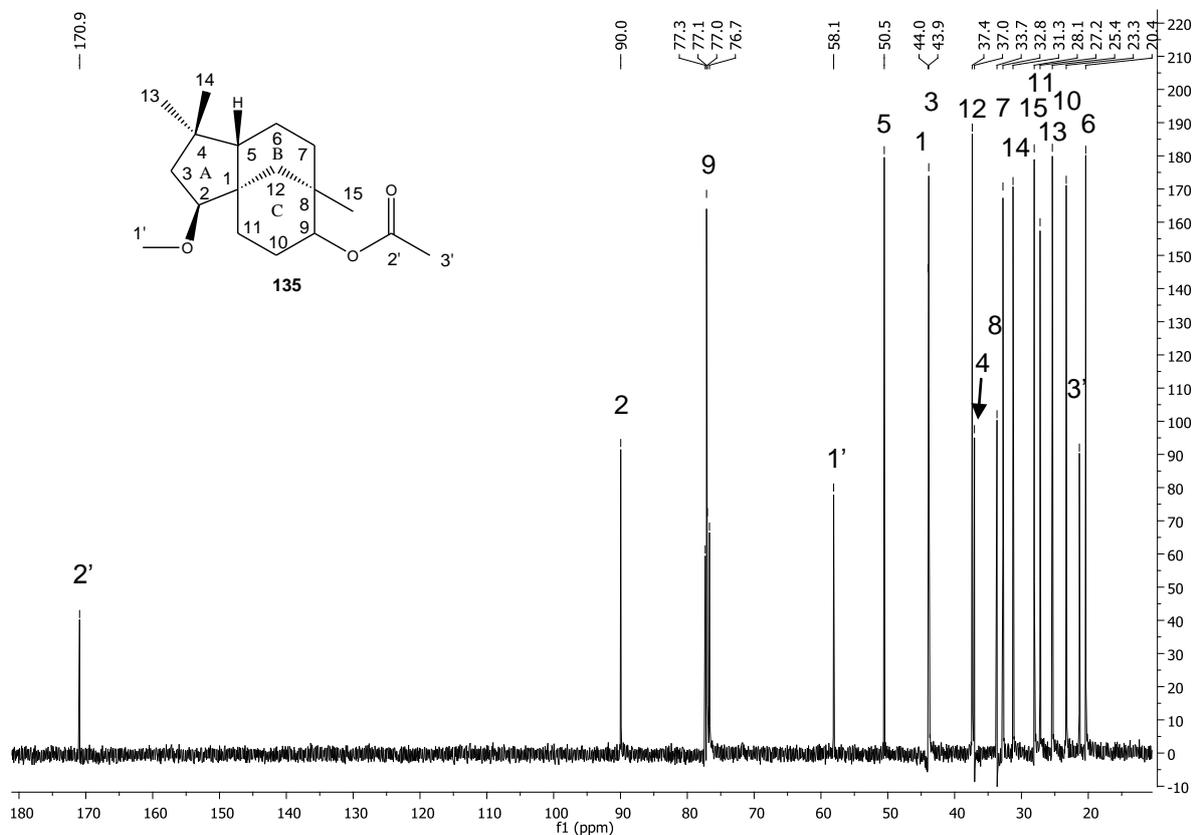
**Figura 176** – Espectro na região do IV da (1*S*,2*S*,5*S*,8*R*)-8,9-Seco-8-hidroxi-2-metoxiclovan-9-lactona (**134**) (KBr).



**Figura 177** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**135**).



**Figura 178** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**135**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,05 – 2,00.



**Figura 179** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**135**).

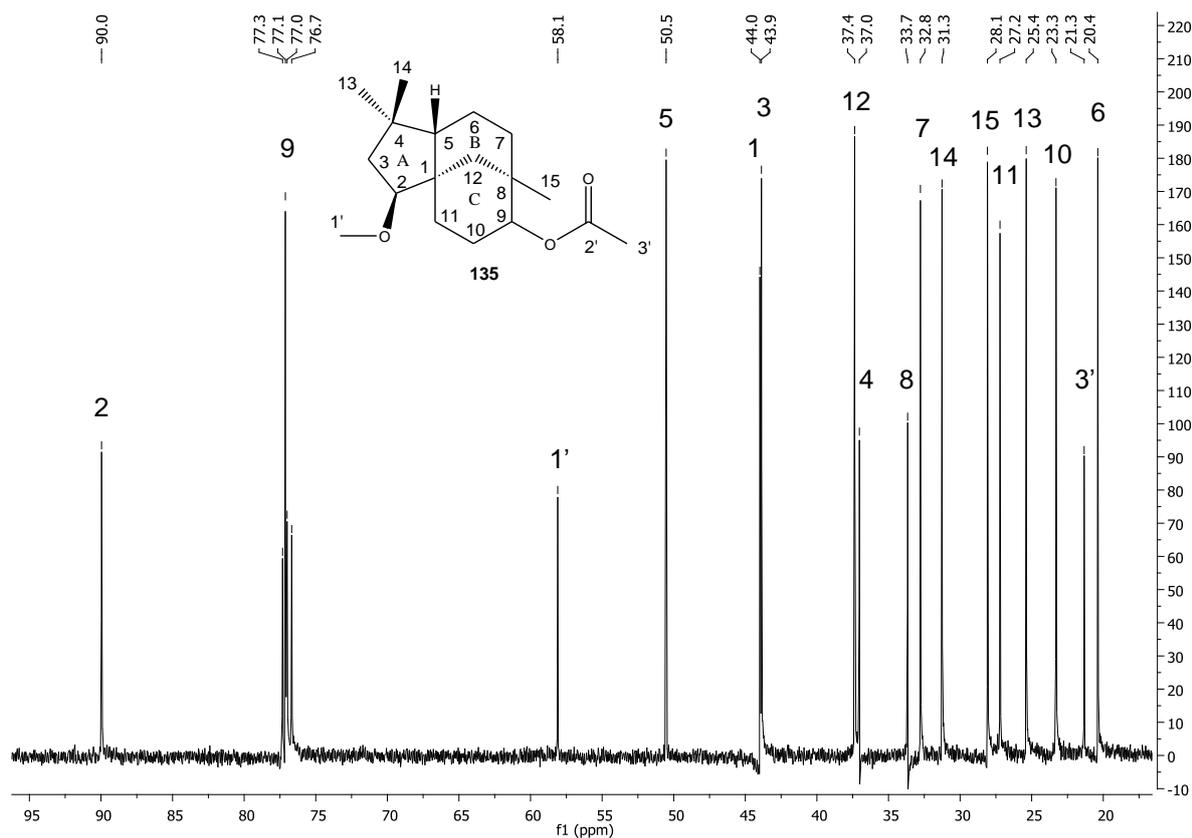


Figura 180 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (135). Expansão da região entre  $\delta_{\text{C}}$  19,0 – 95,0.

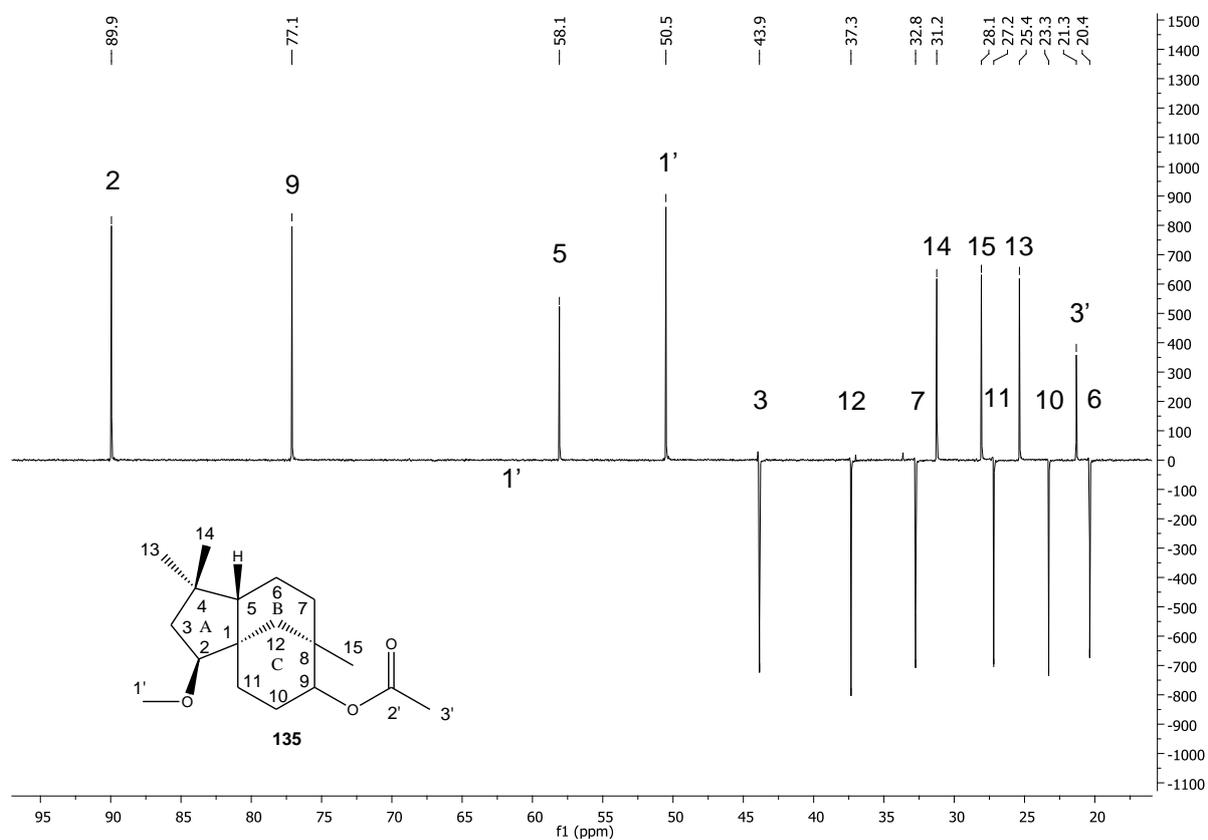


Figura 181 - Subespectro DEPT-135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (135).

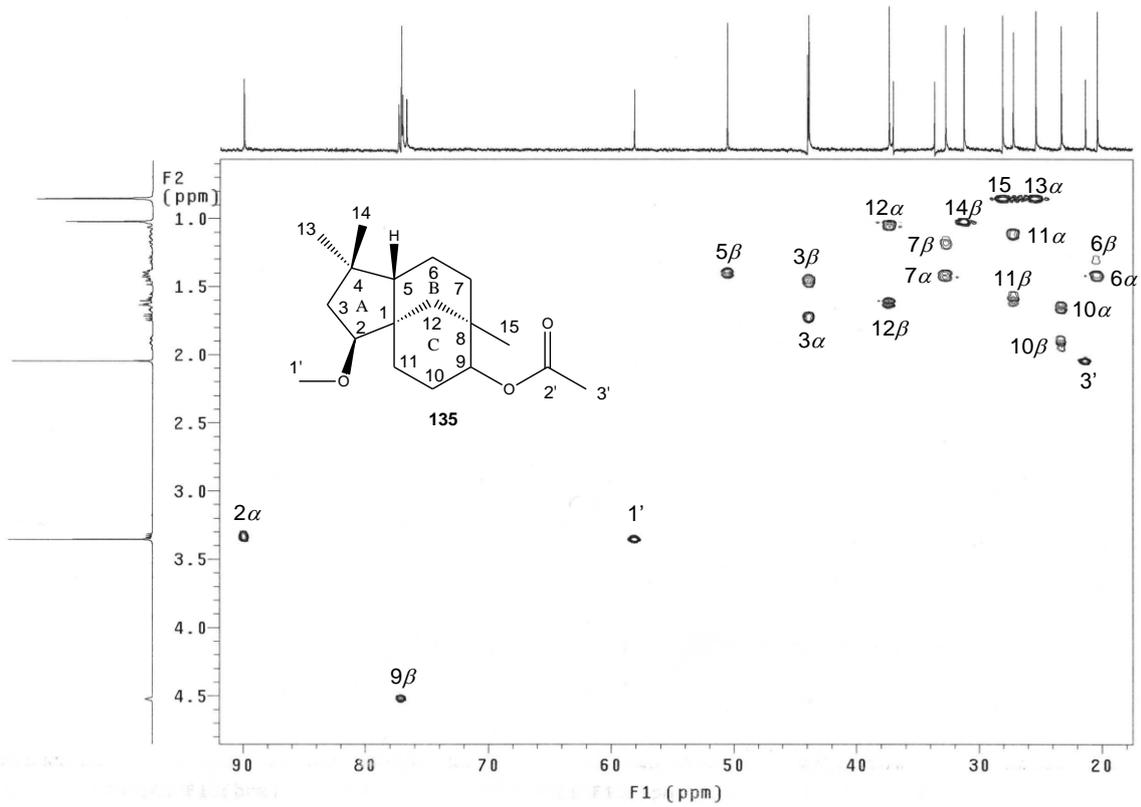


Figura 182 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol (135).

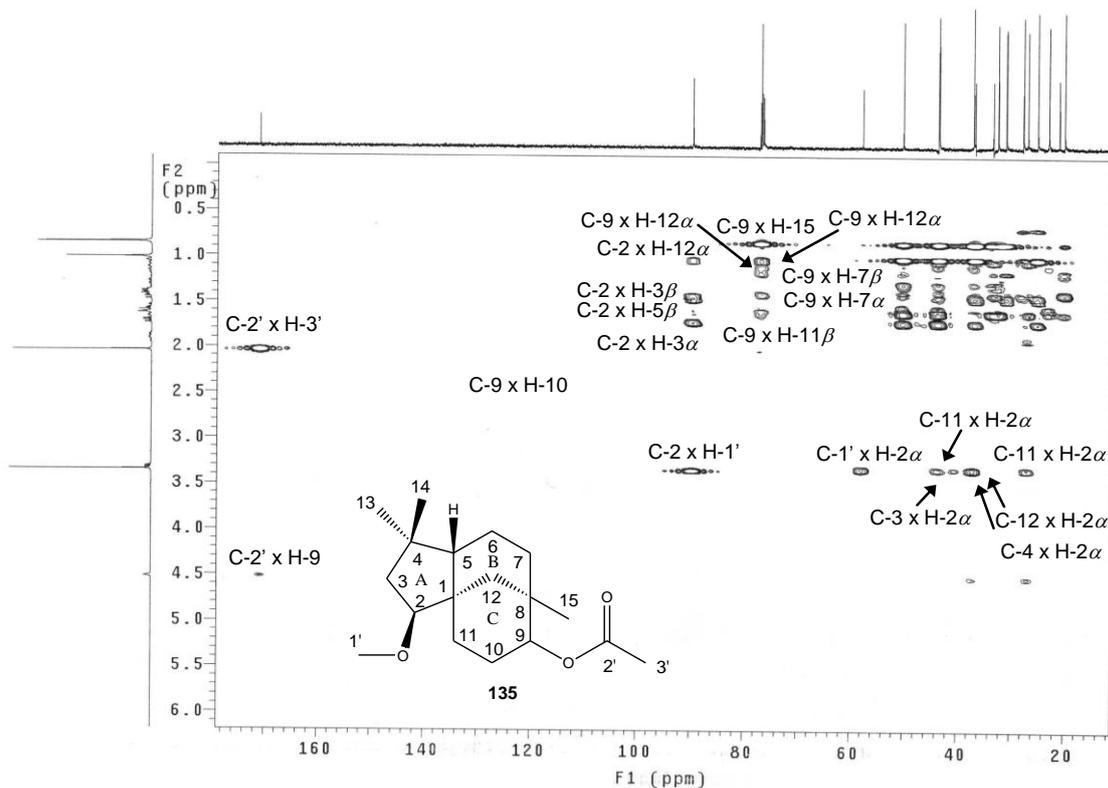
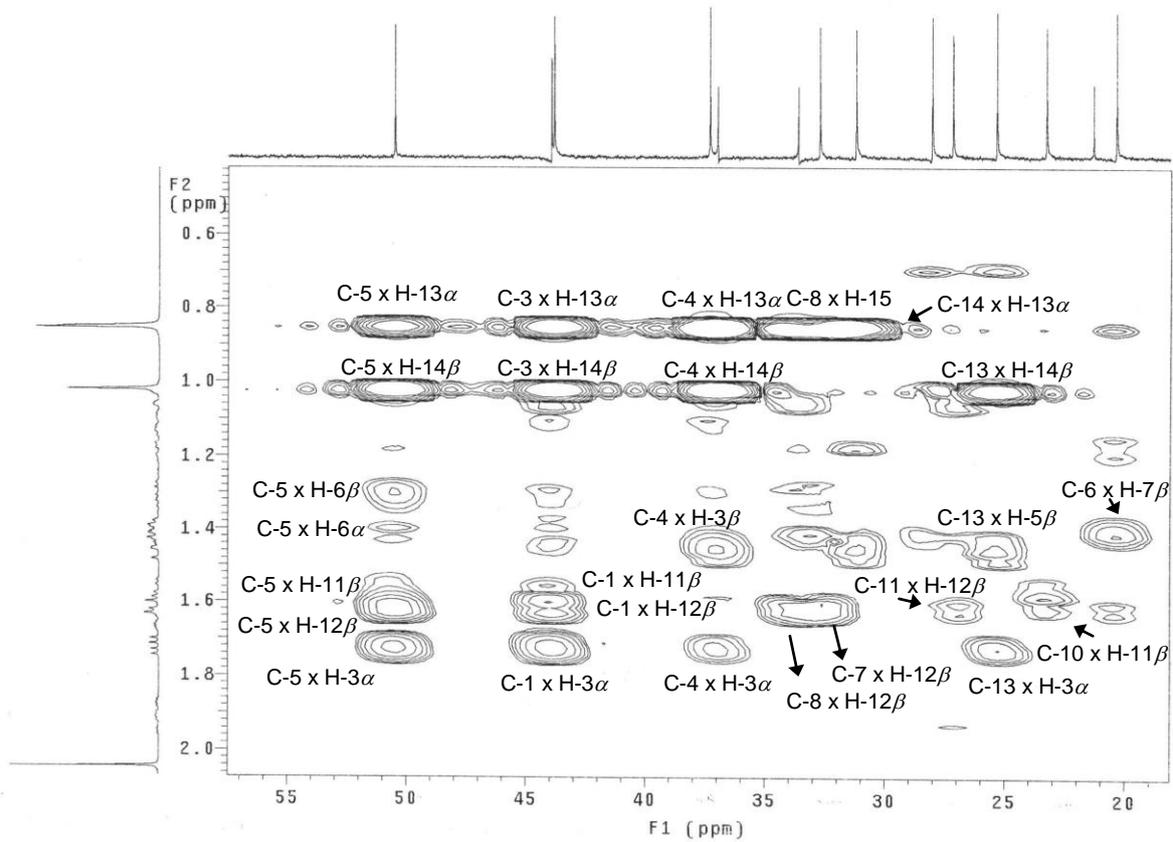
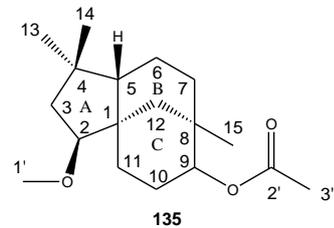
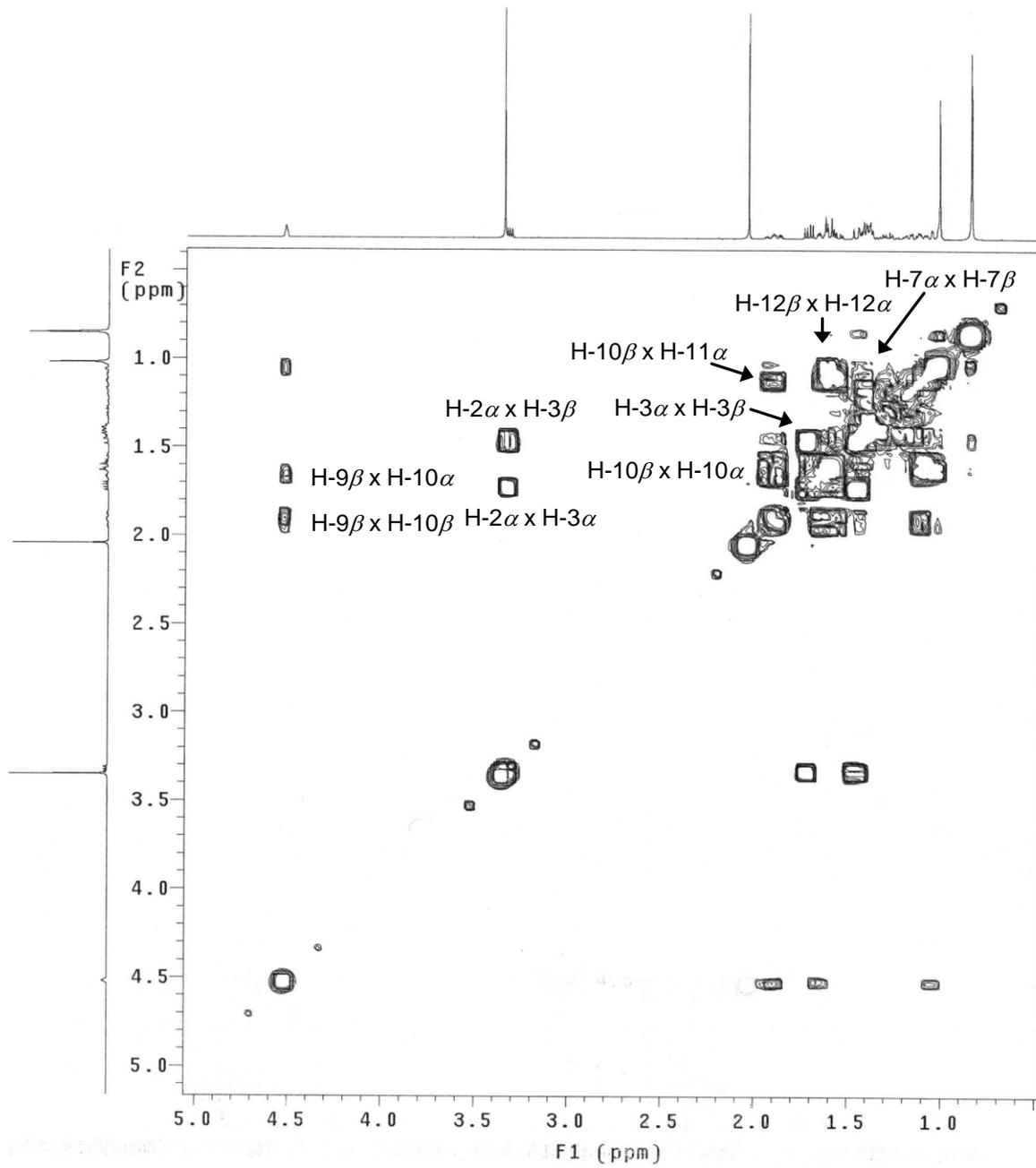


Figura 183 - Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol (135).

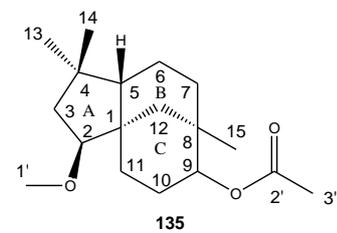


**Figura 184** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**135**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  18 – 57.





**Figura 185** – Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**135**).



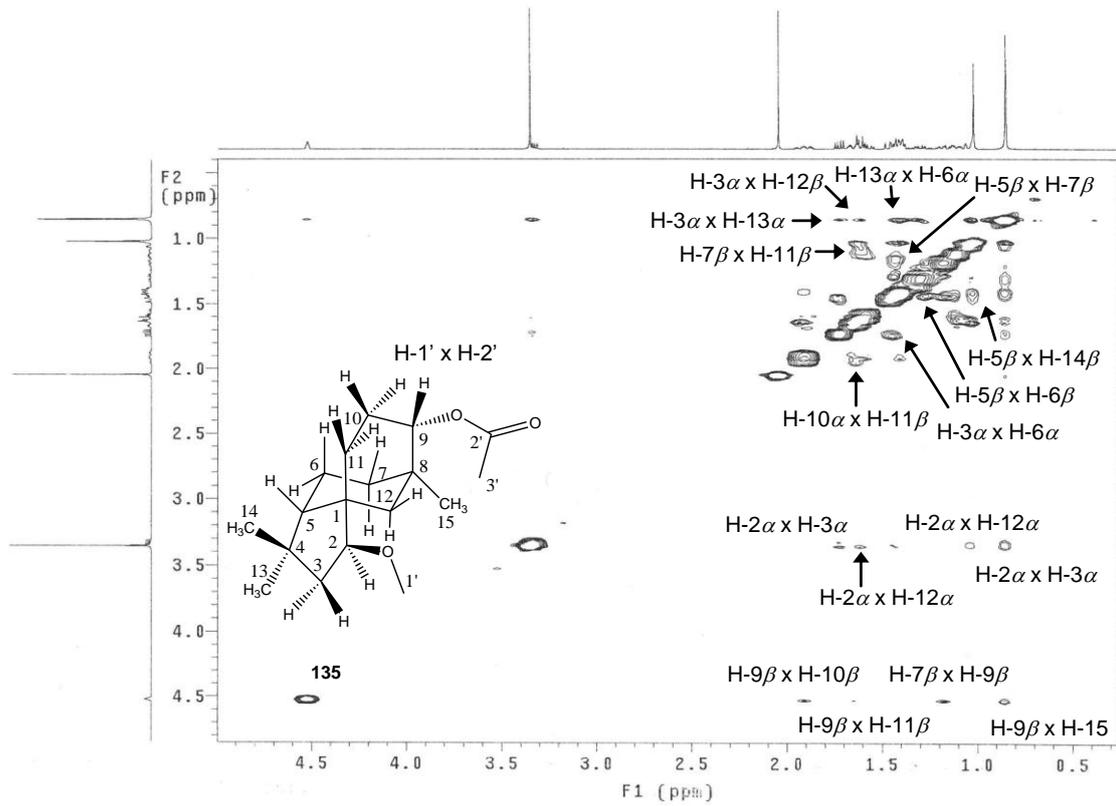


Figura 186 - Mapa de contornos NOESY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**135**).

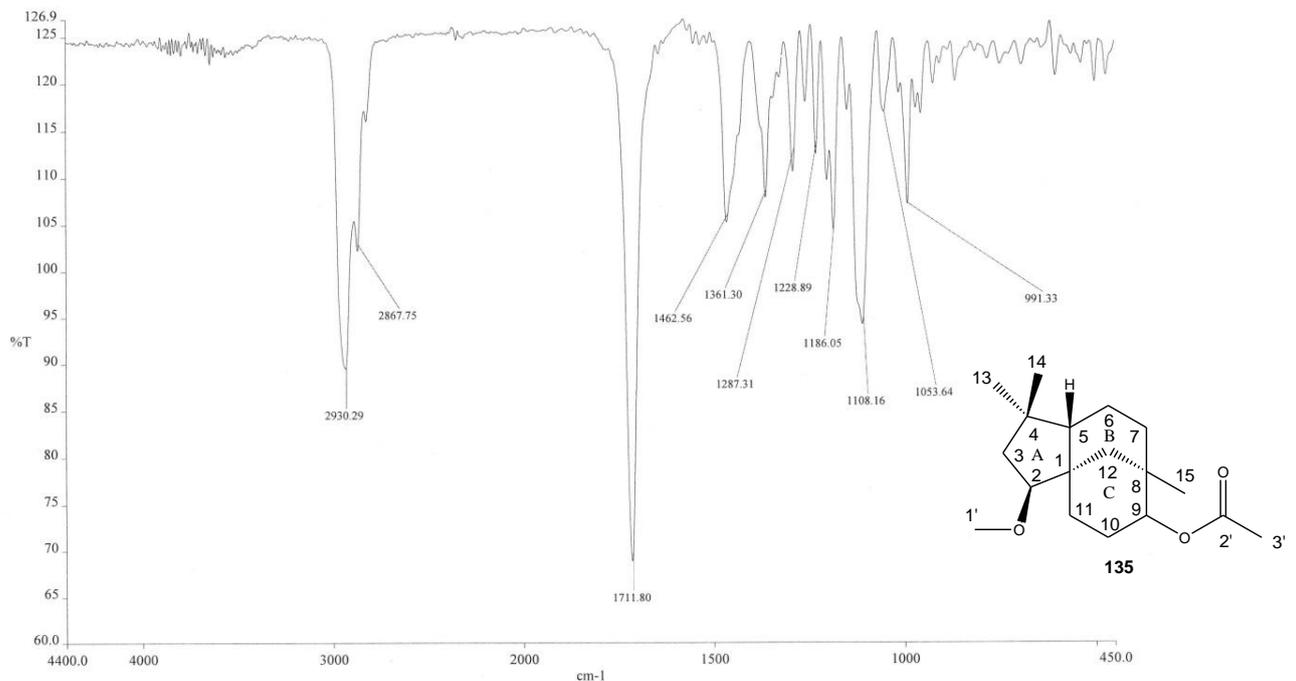


Figura 187 – Espectro na região do IV do acetato de  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**135**) (KBr).

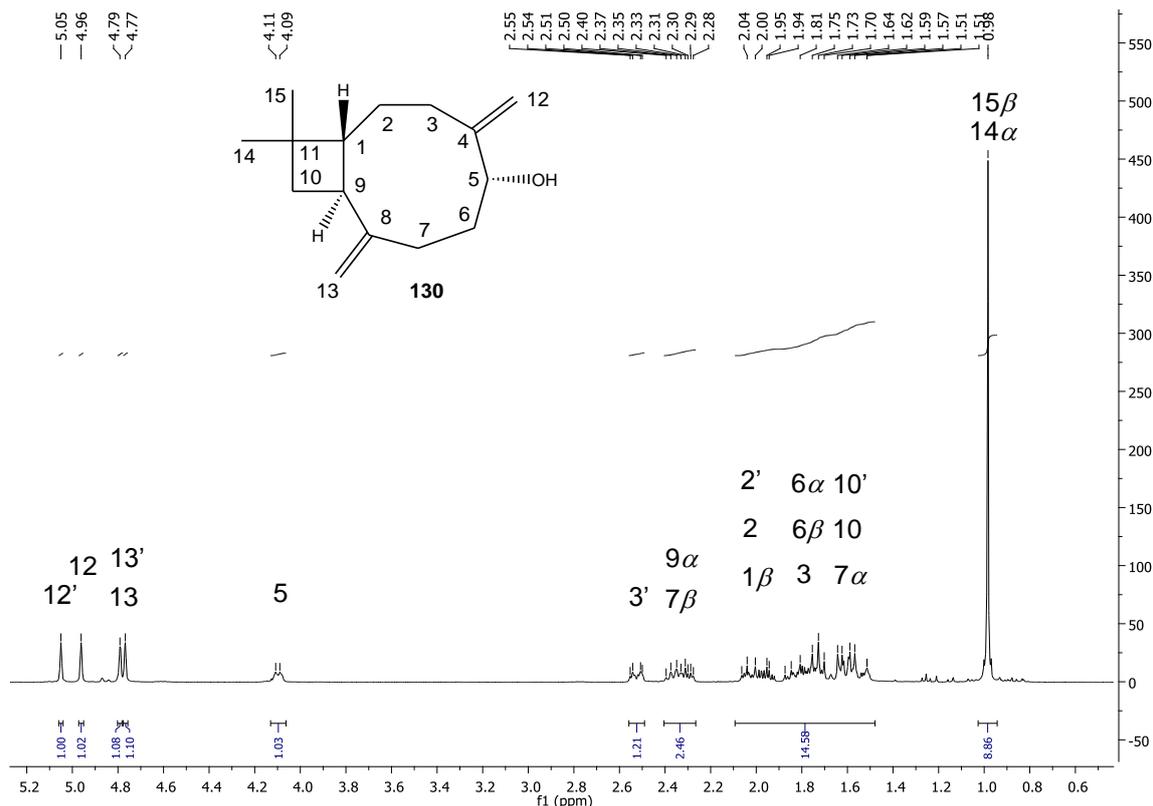


Figura 188 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 5 $\alpha$ -hidroxycariofil-4(12),8(13)-dieno (130).

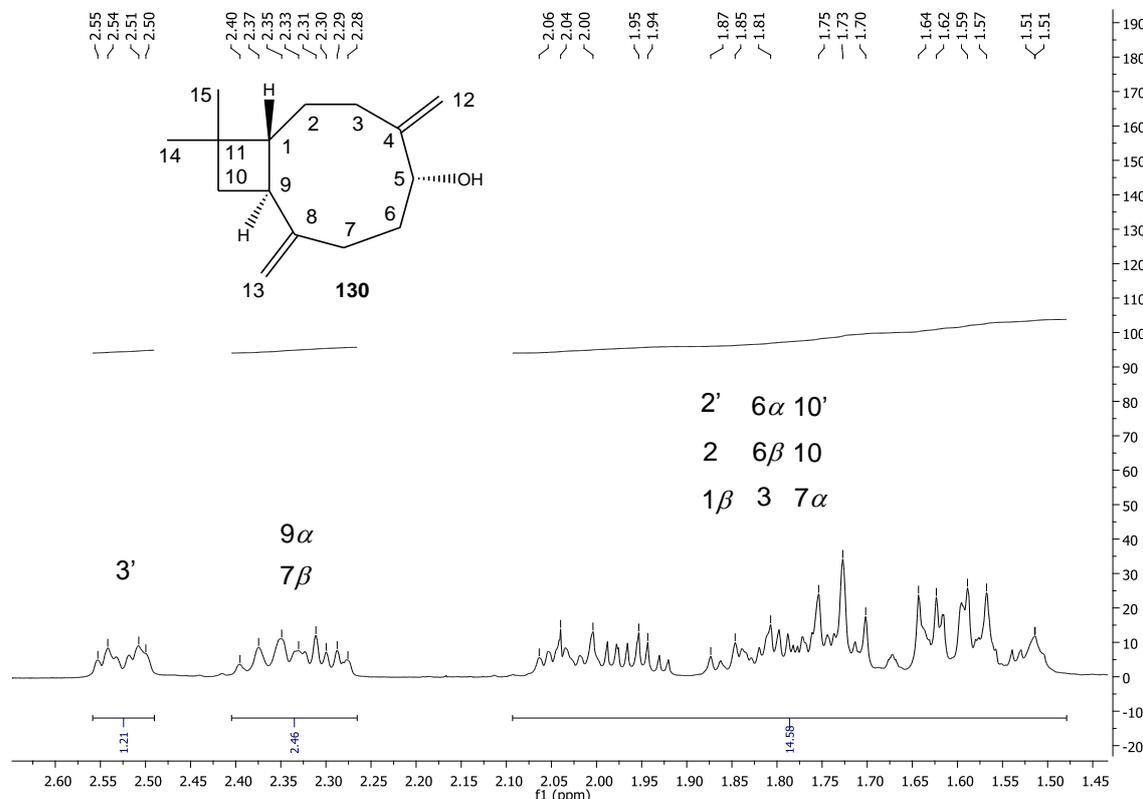


Figura 189 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do 5 $\alpha$ -hidroxycariofil-4(12),8(13)-dieno (130). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,45 – 2,60.

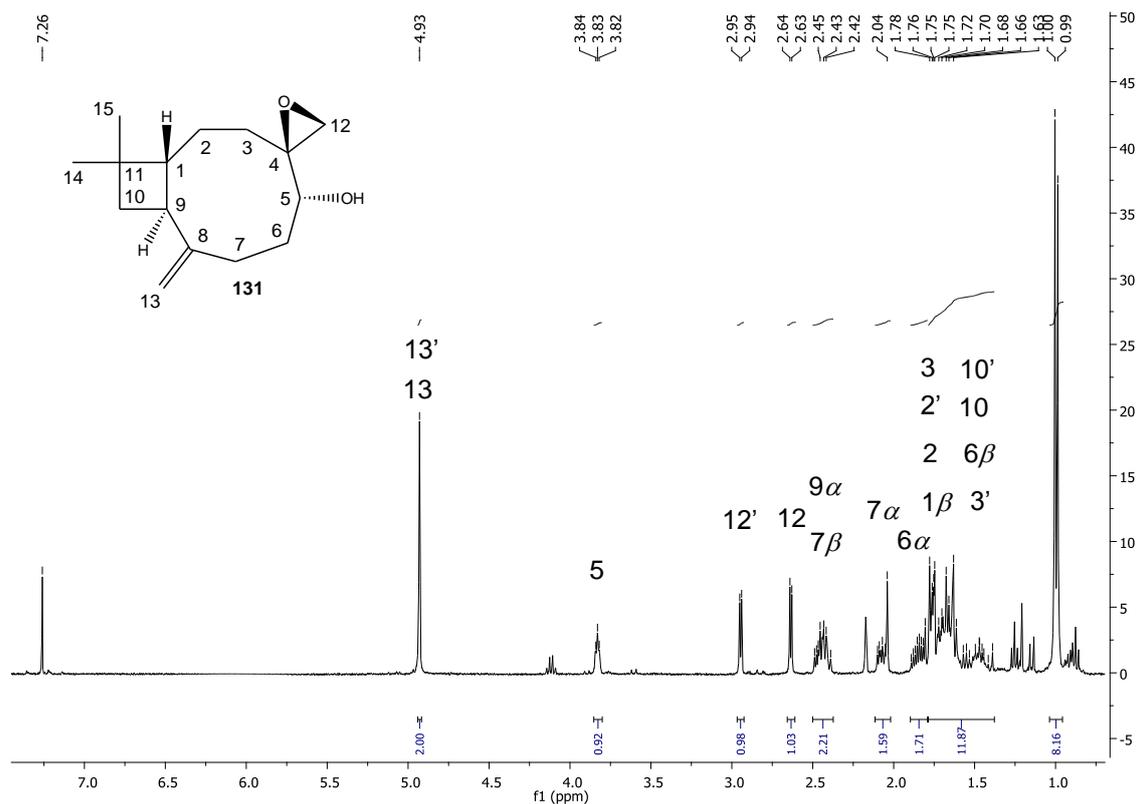


Figura 190 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (4*S*,5*R*)-5-hidroxicariofil-8(13)-eno (**131**).

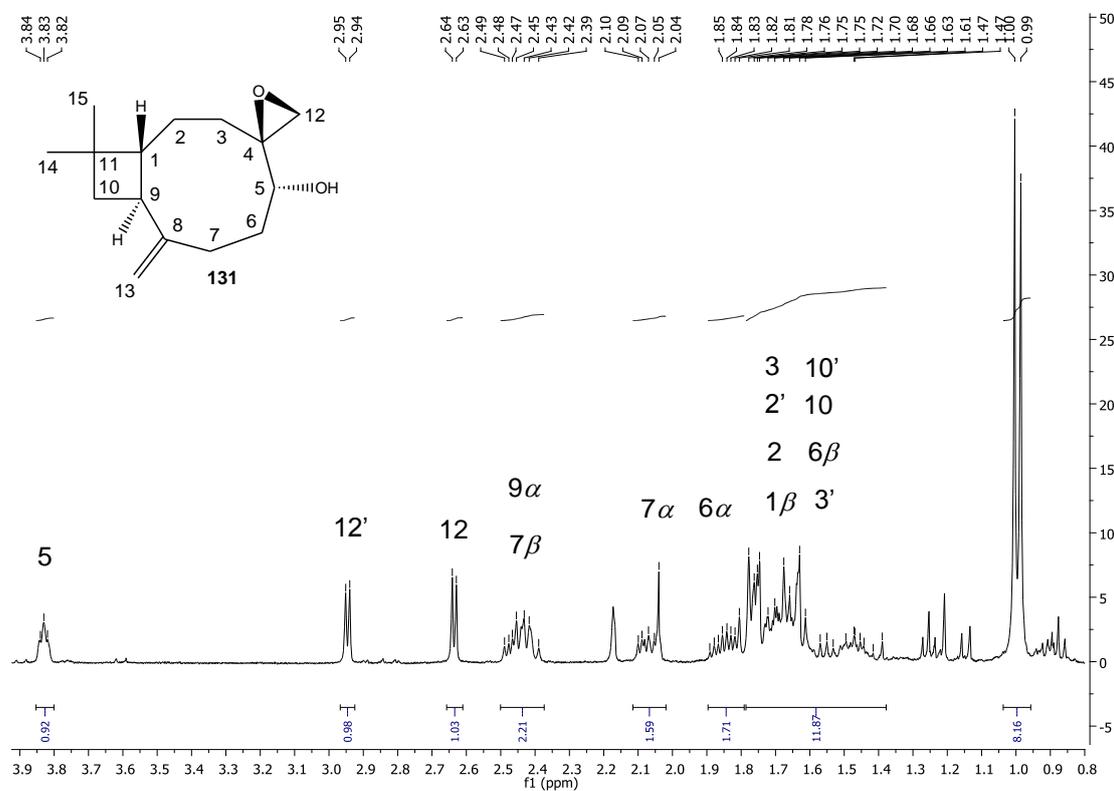


Figura 191 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (4*S*,5*R*)-5-hidroxicariofil-8(13)-eno (**131**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,8 – 3,9.

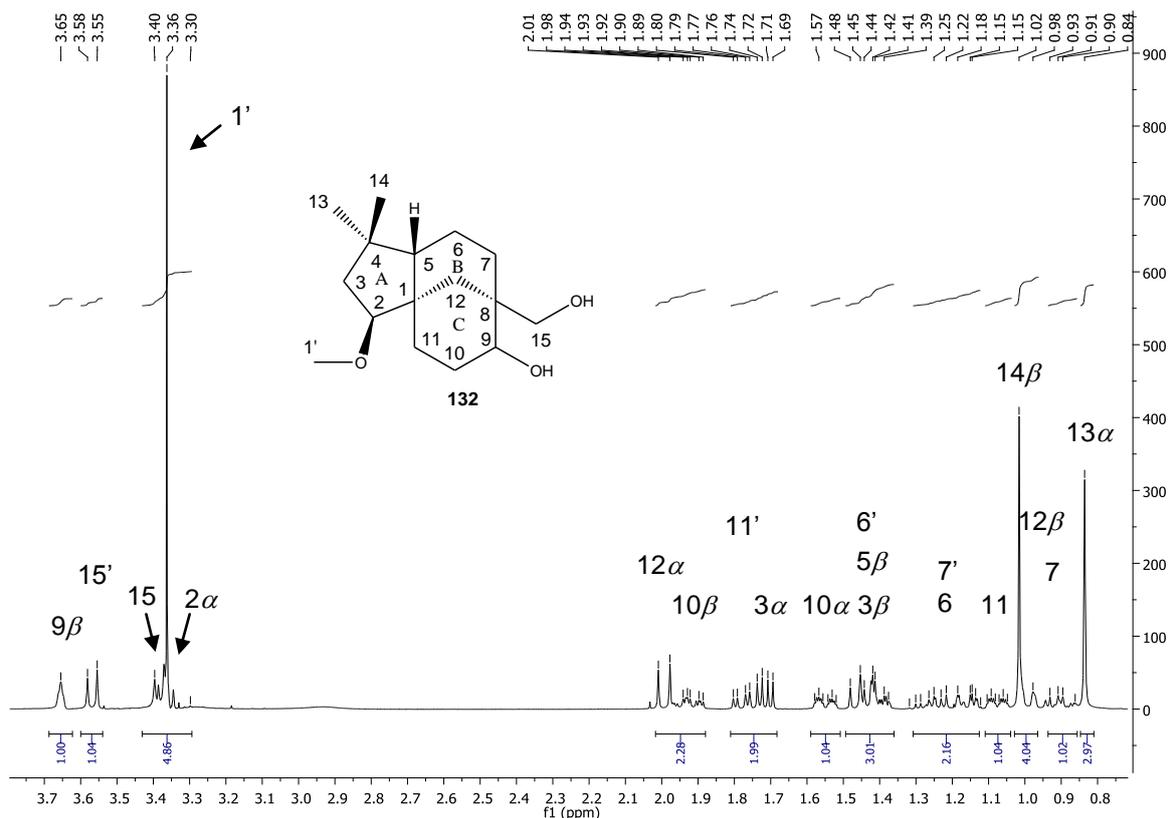


Figura 192 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (2S,9R)-2-metoxiclovano-9,15-diol (132).

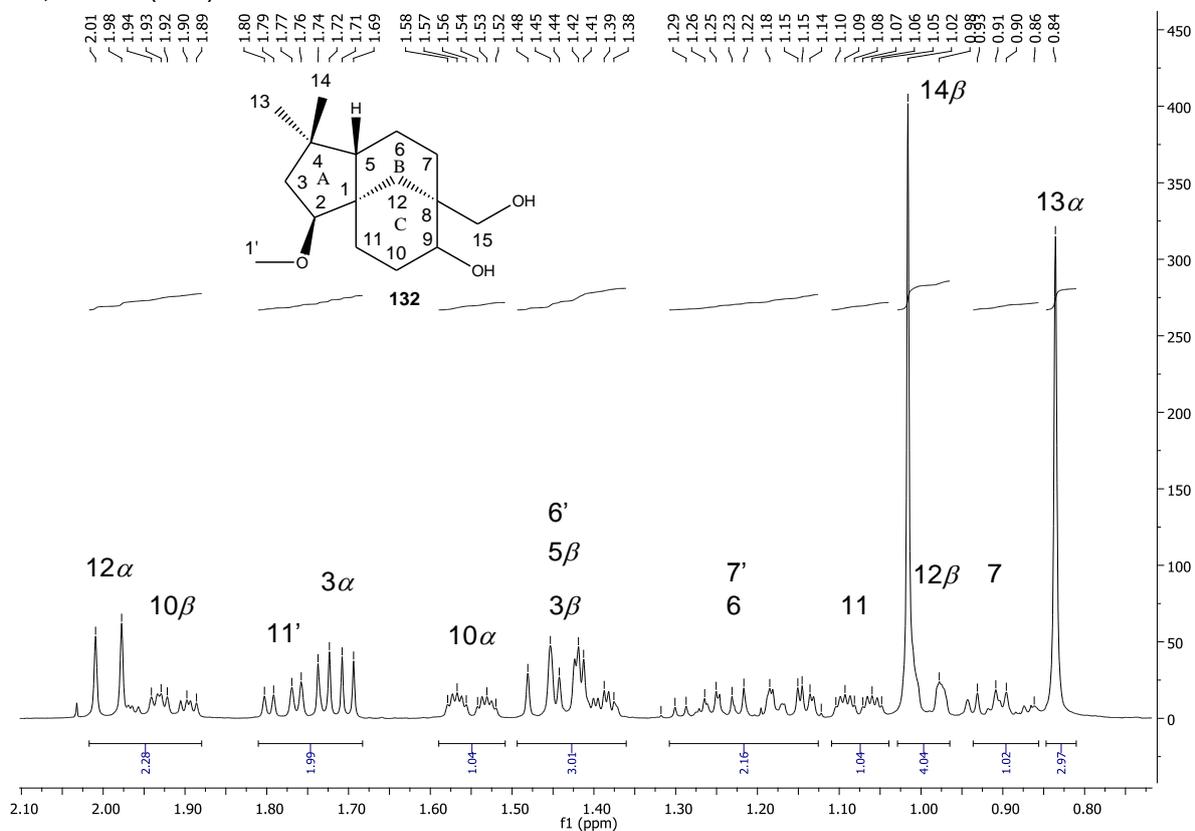


Figura 193 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (2S,9R)-2-metoxiclovano-9,15-diol (132). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,7 – 2,1.

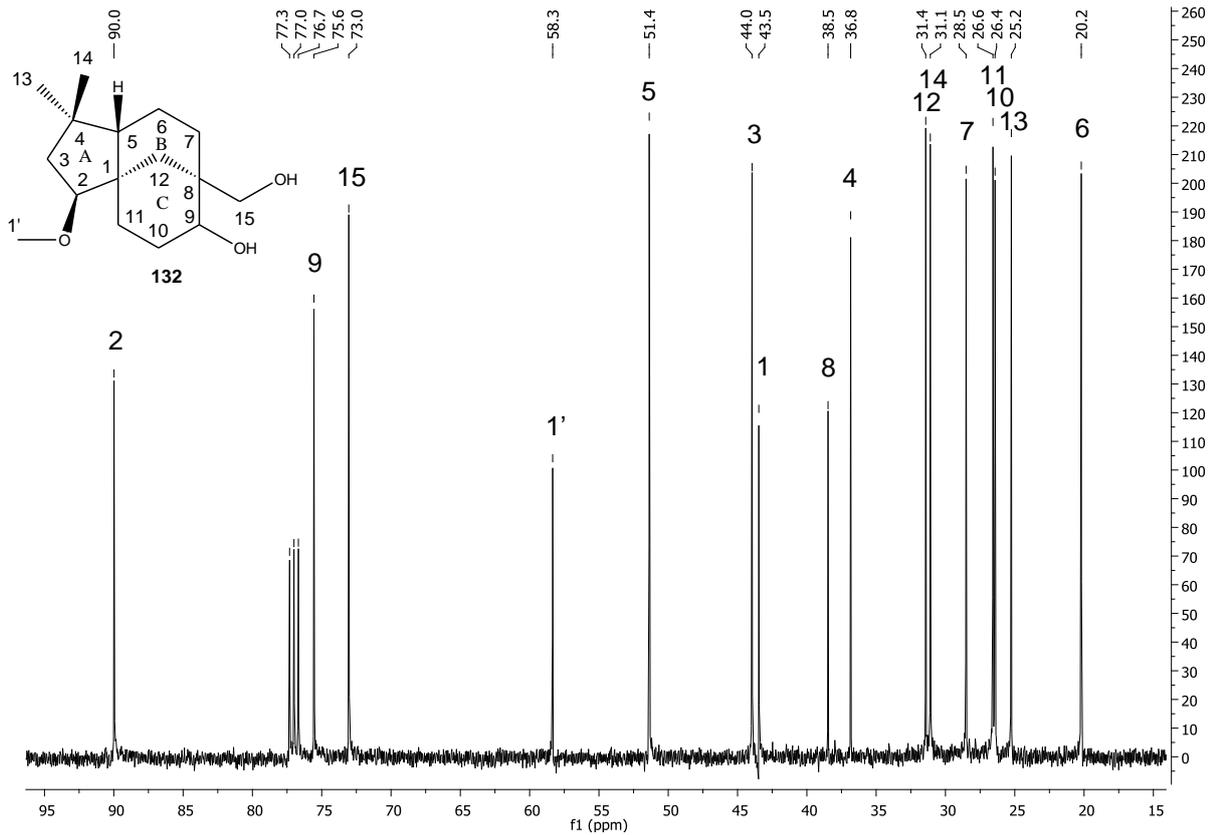


Figura 194 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovano-9,15-diol (132).

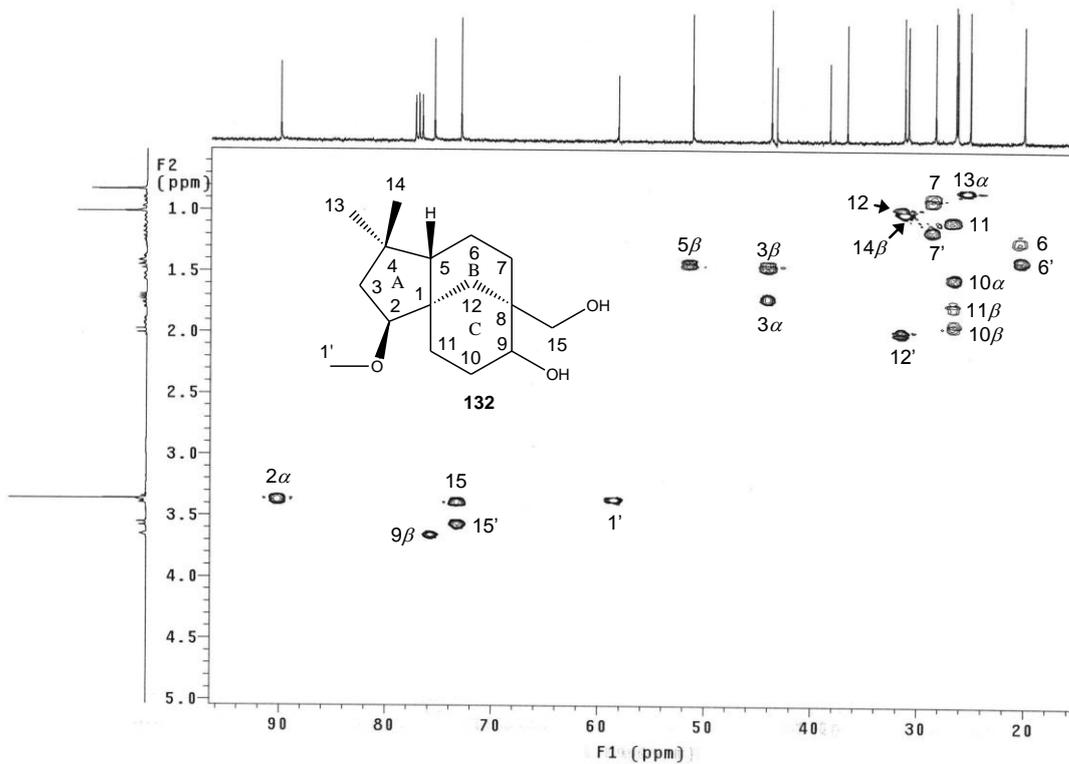
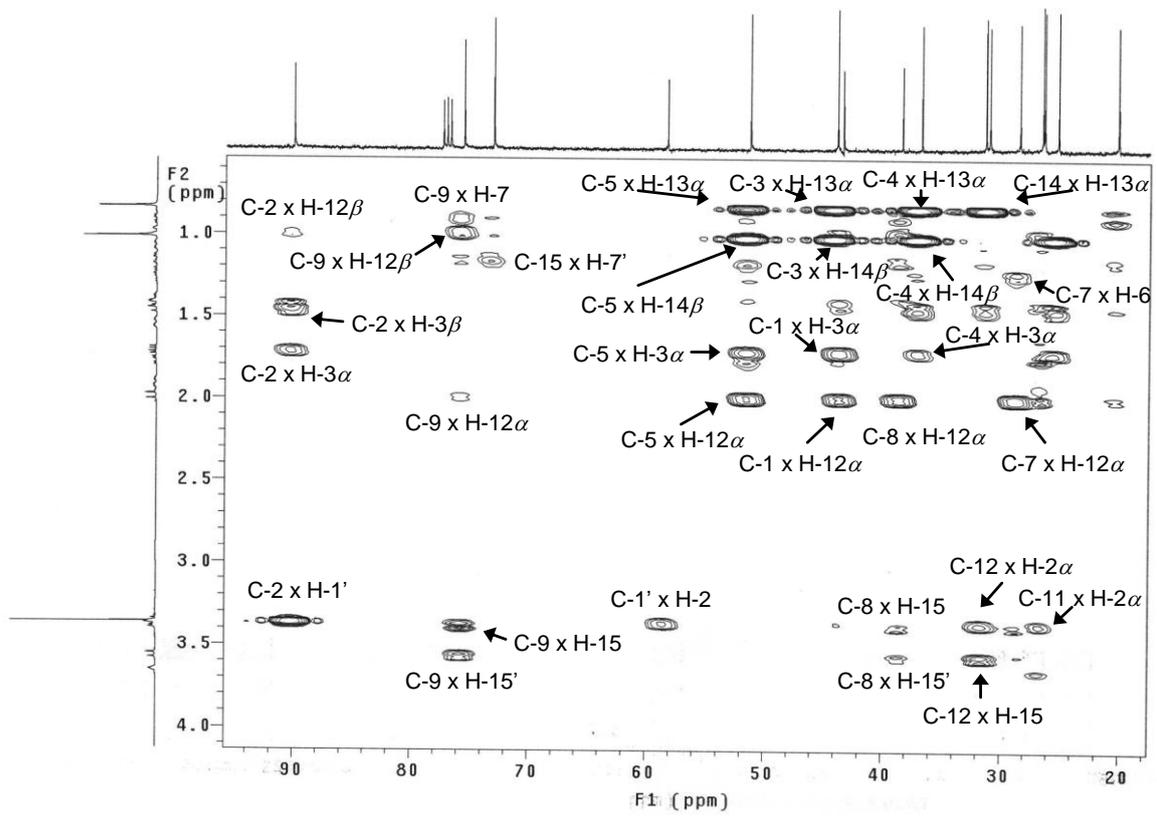
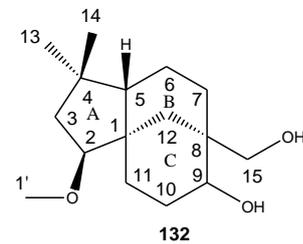
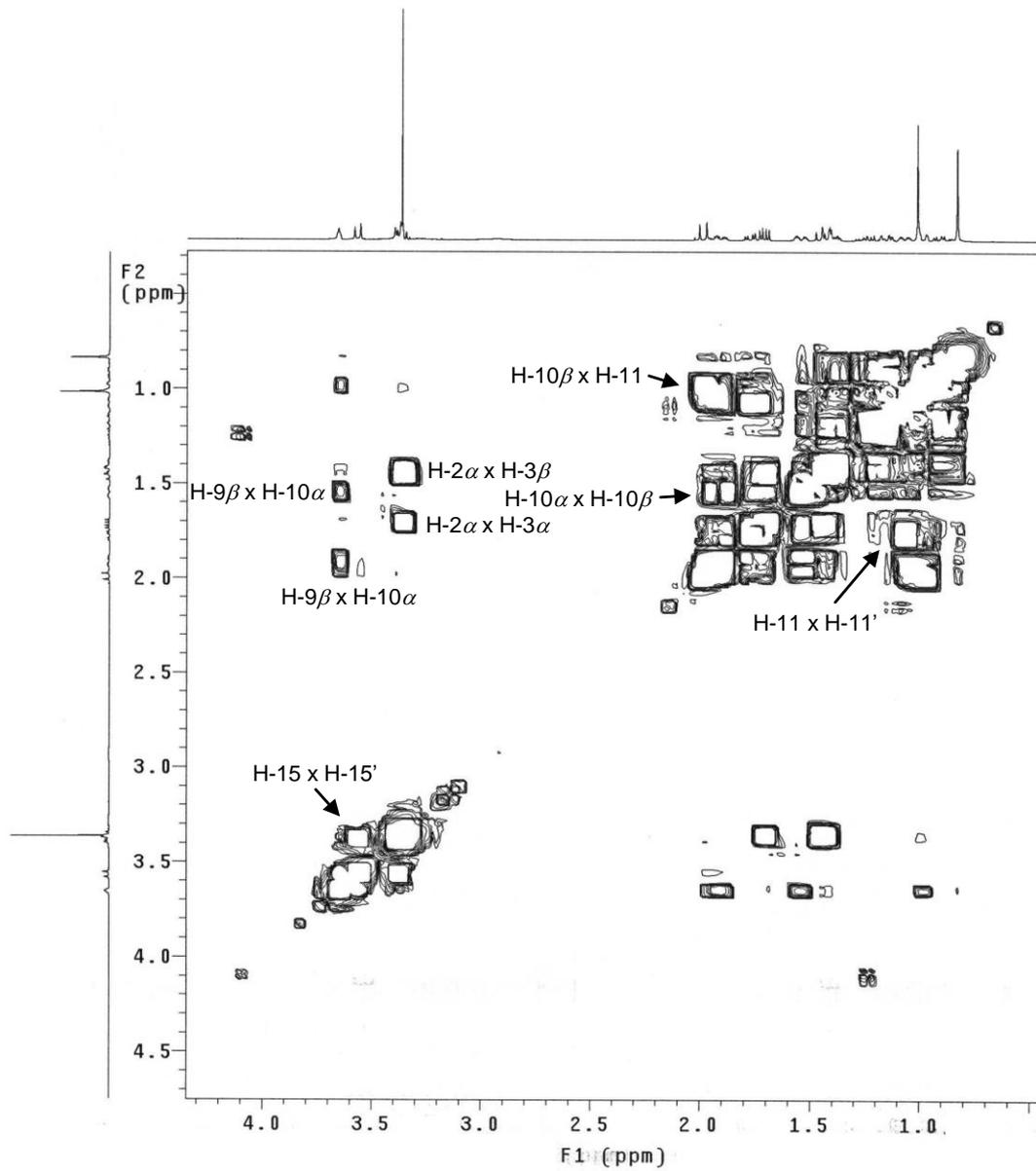


Figura 195 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovano-9,15-diol (132).

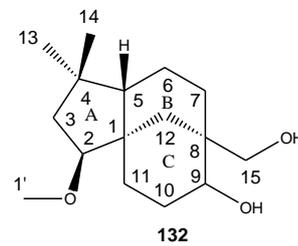


**Figura 196** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovano-9,15-diol (**132**).





**Figura 197** – Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovano-9,15-diol (**132**).



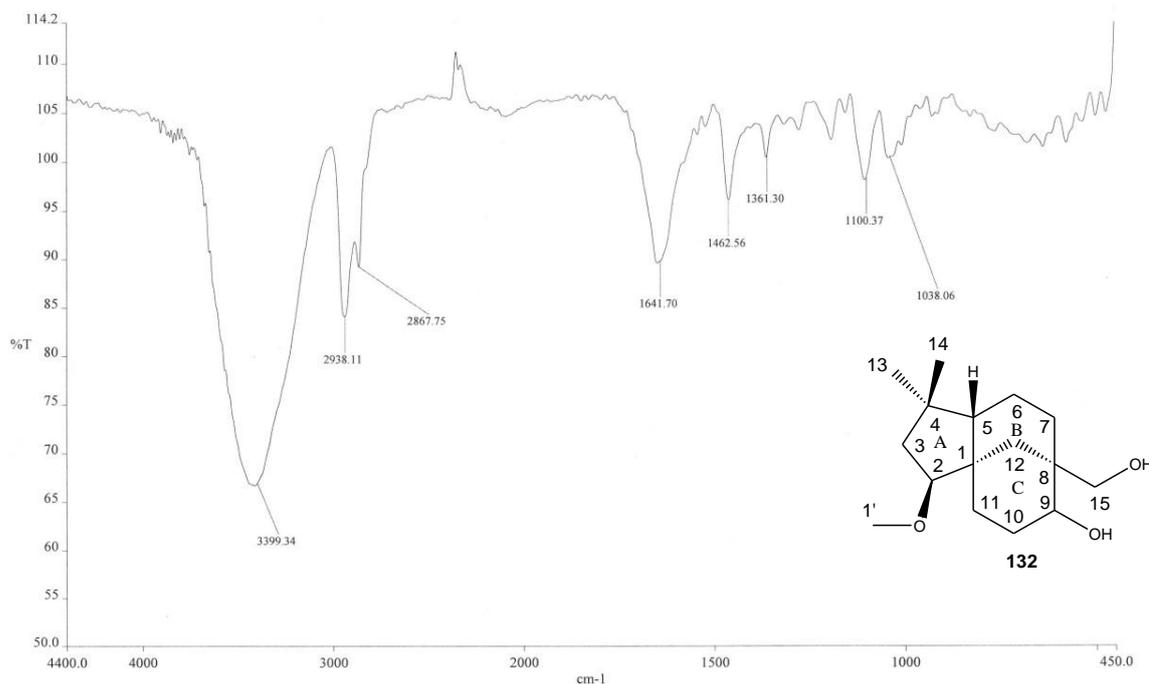


Figura 198 – Espectro na região do IV do (2*S*,9*R*)-2-metoxiclovano-9,15-diol (**132**) (KBr).

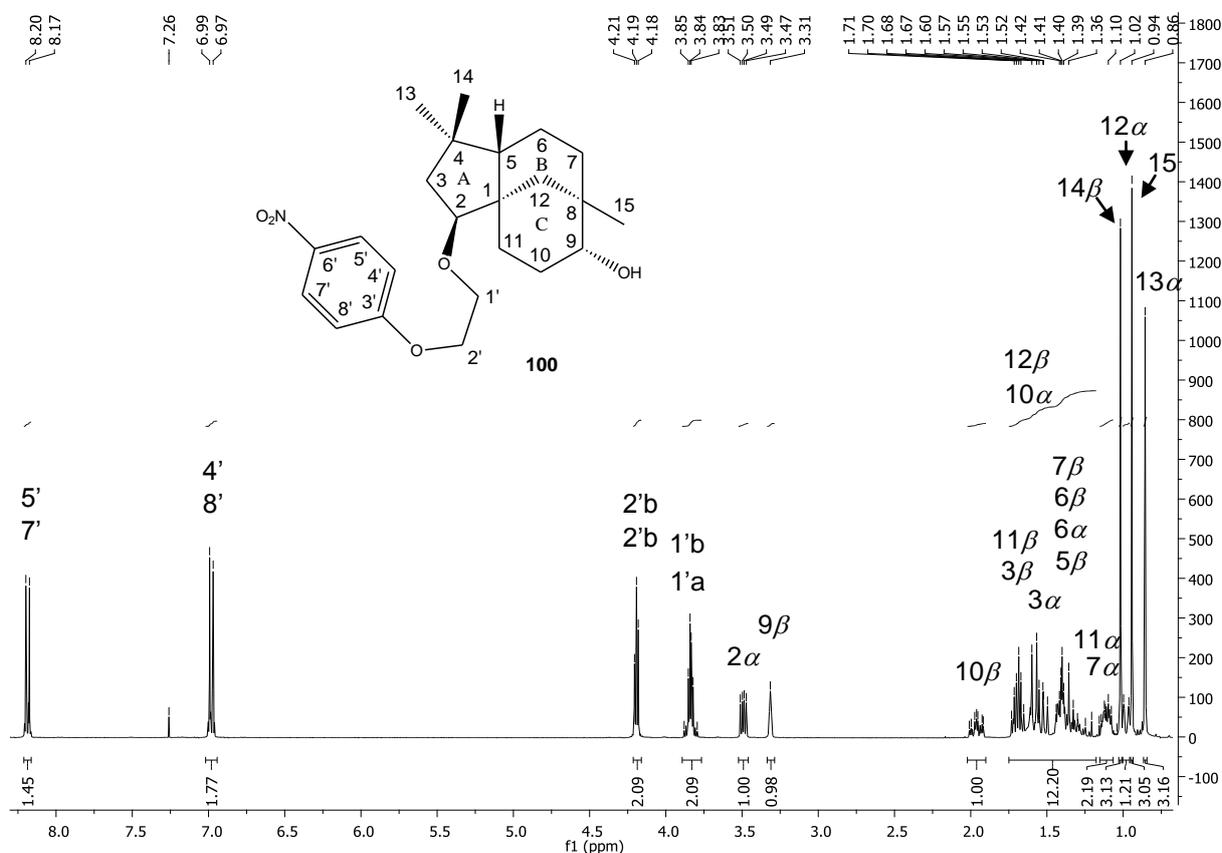


Figura 199 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9α-ol (**100**).

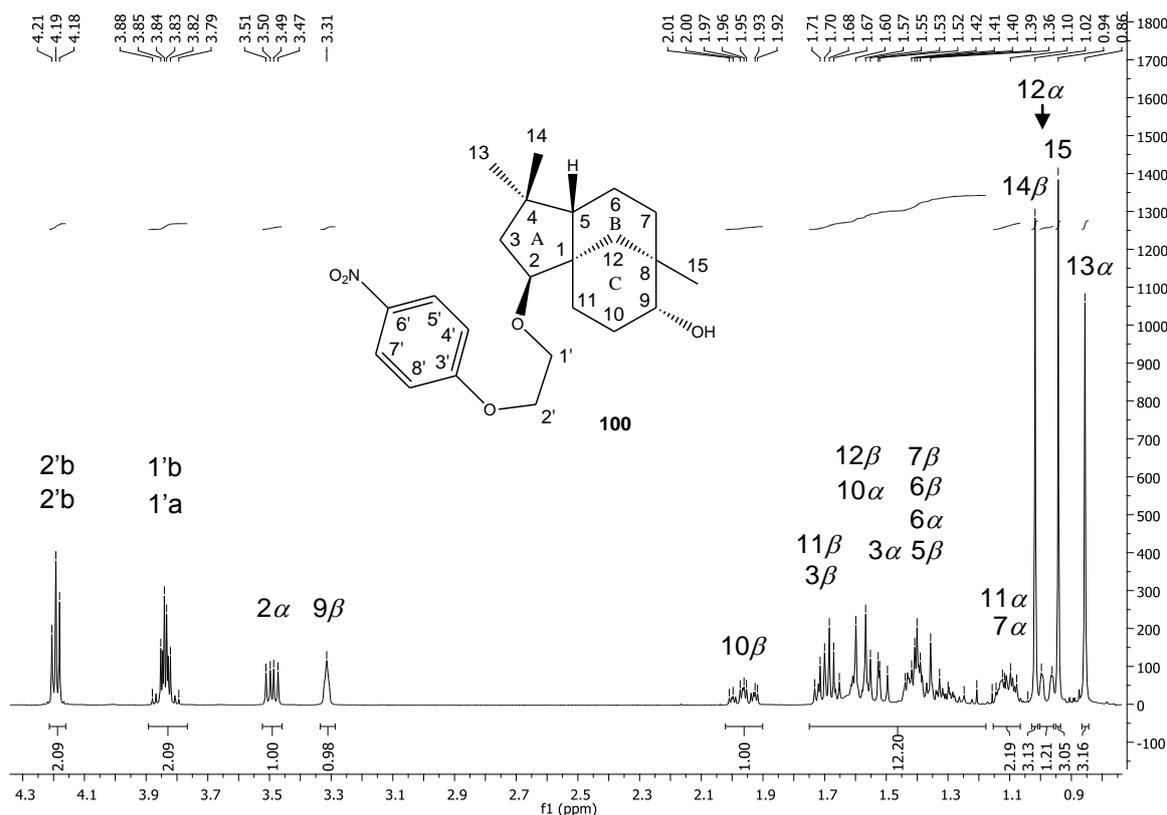


Figura 200 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**100**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,8 – 4,3.

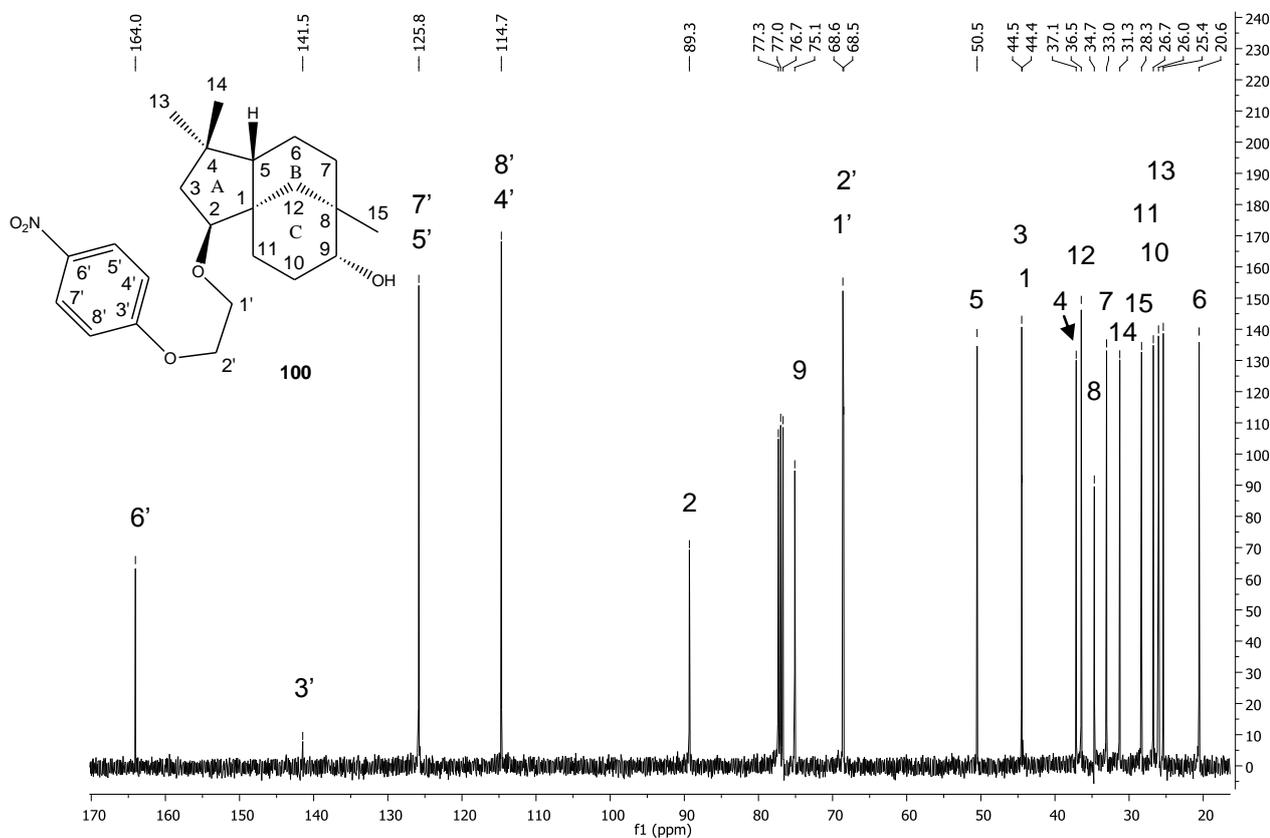
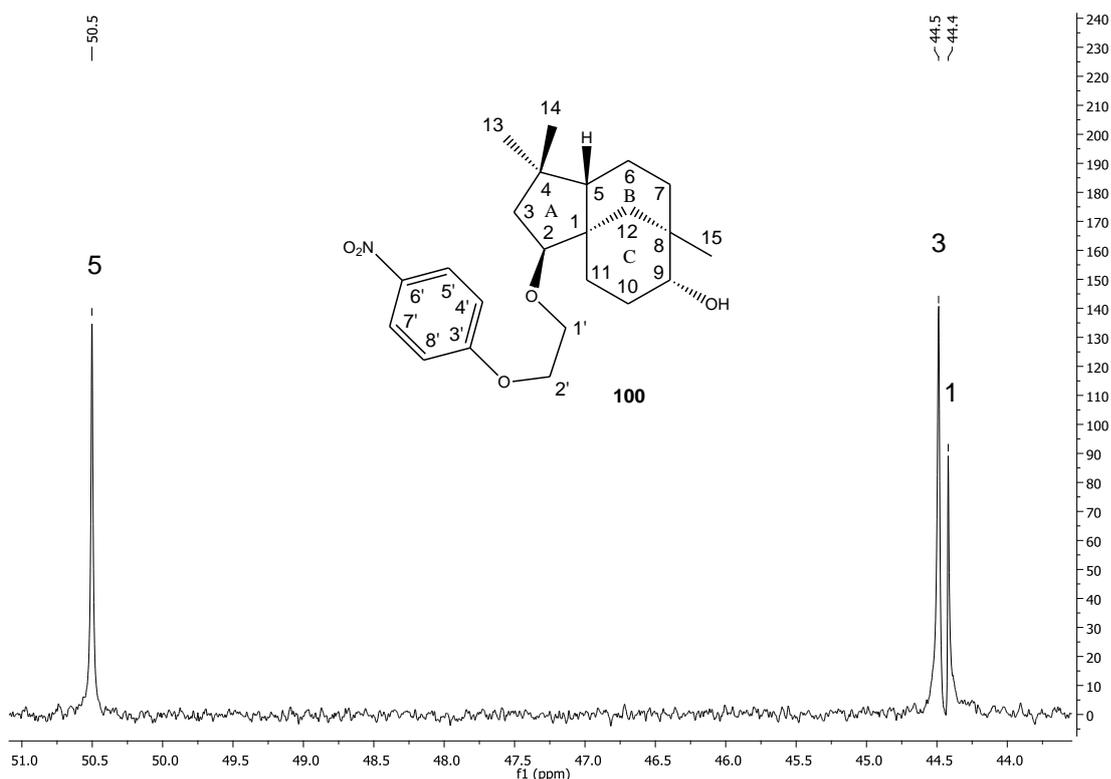
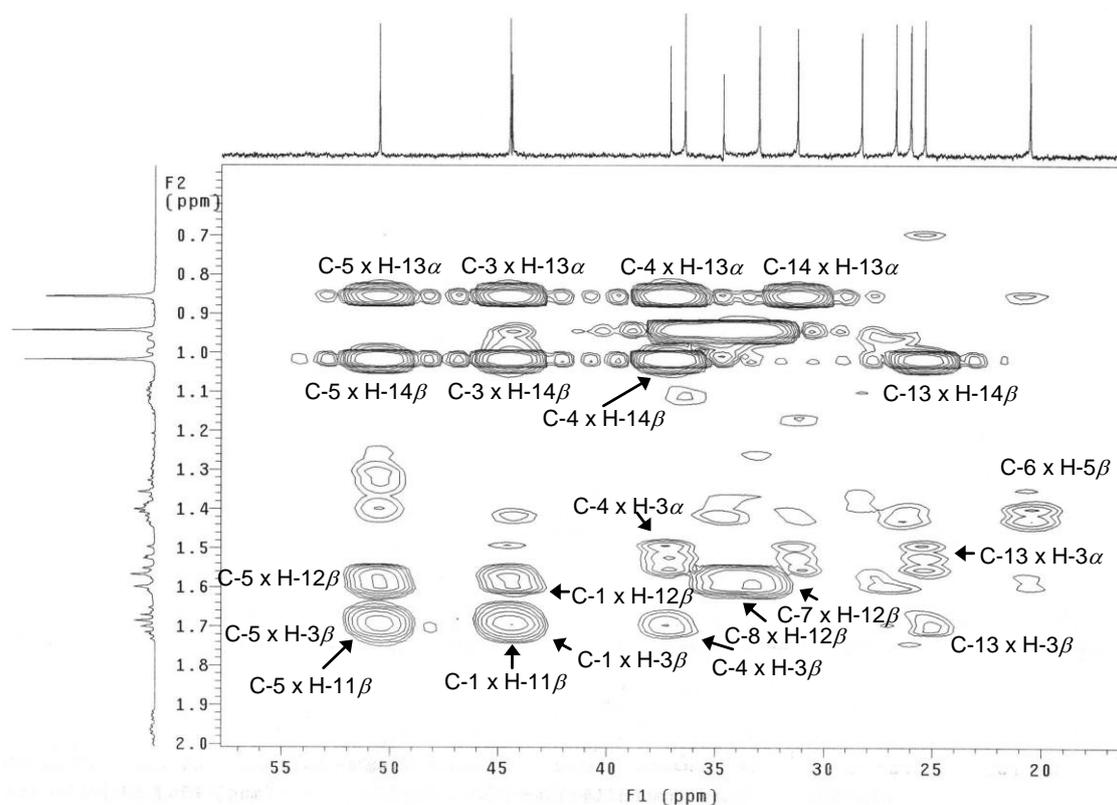


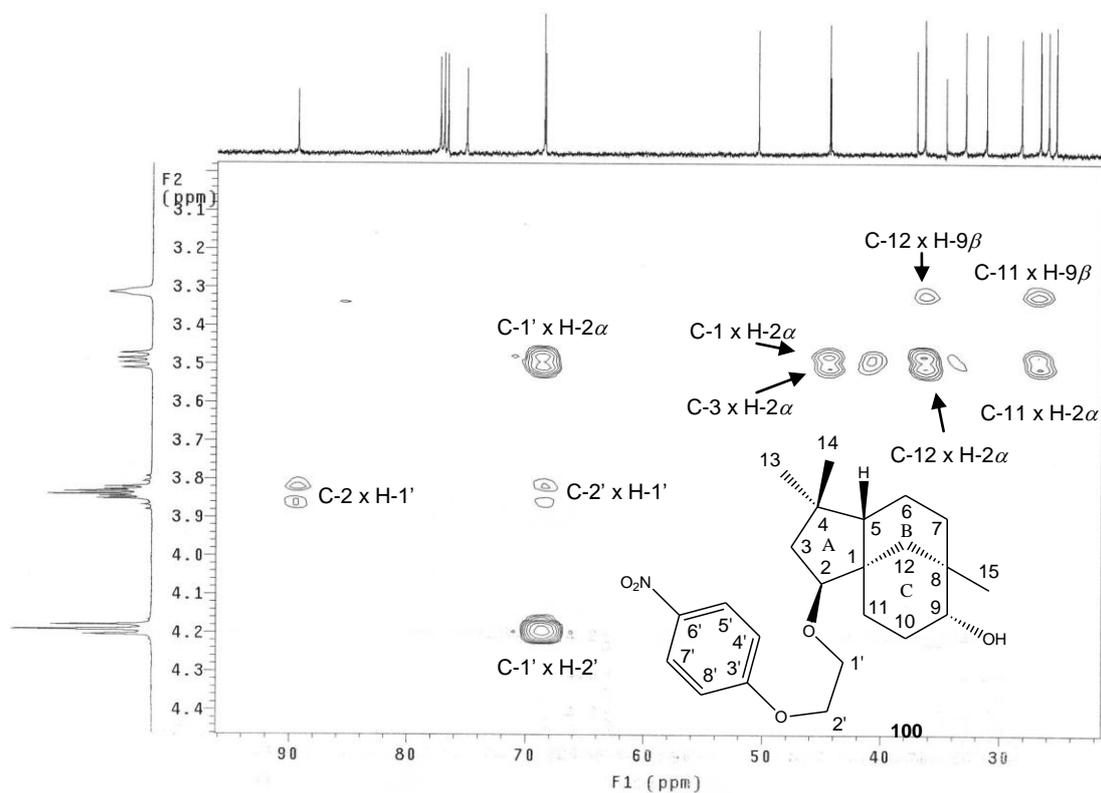
Figura 201 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**100**).



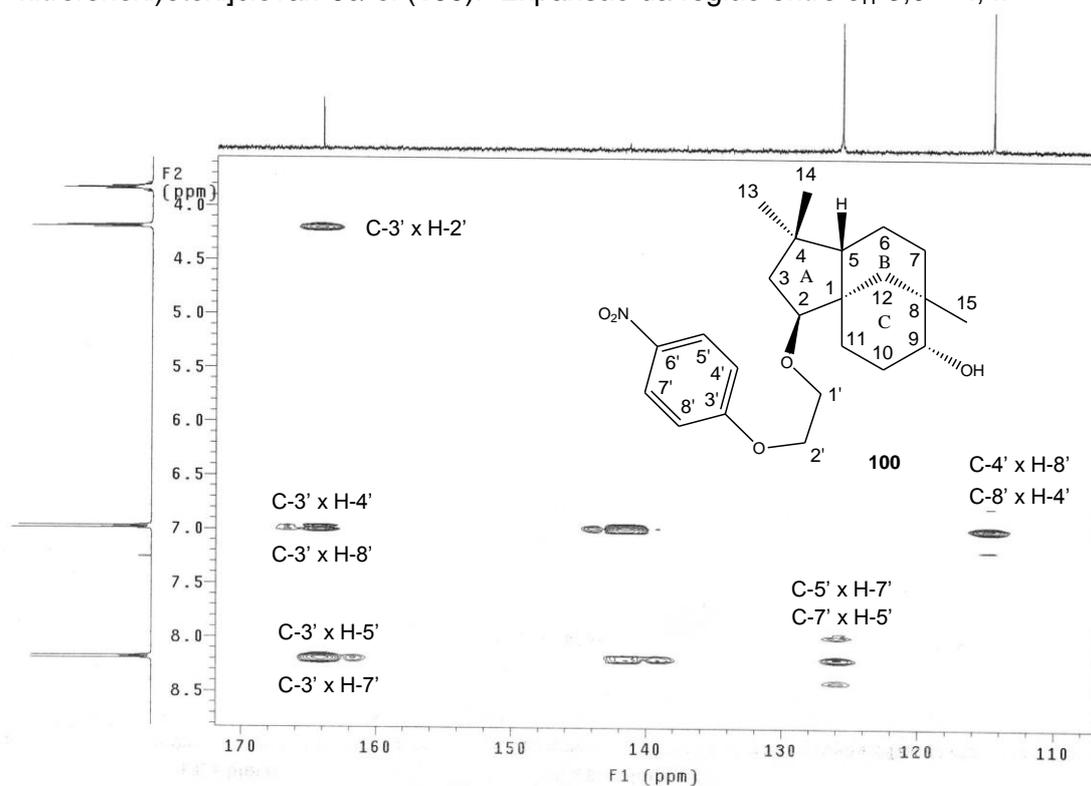
**Figura 202** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**100**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  43,5 – 51,0.



**Figura 203** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**100**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,6 – 2,0.



**Figura 204** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**100**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  3,0 – 4,4.



**Figura 205** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**100**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  3,6 – 8,8.

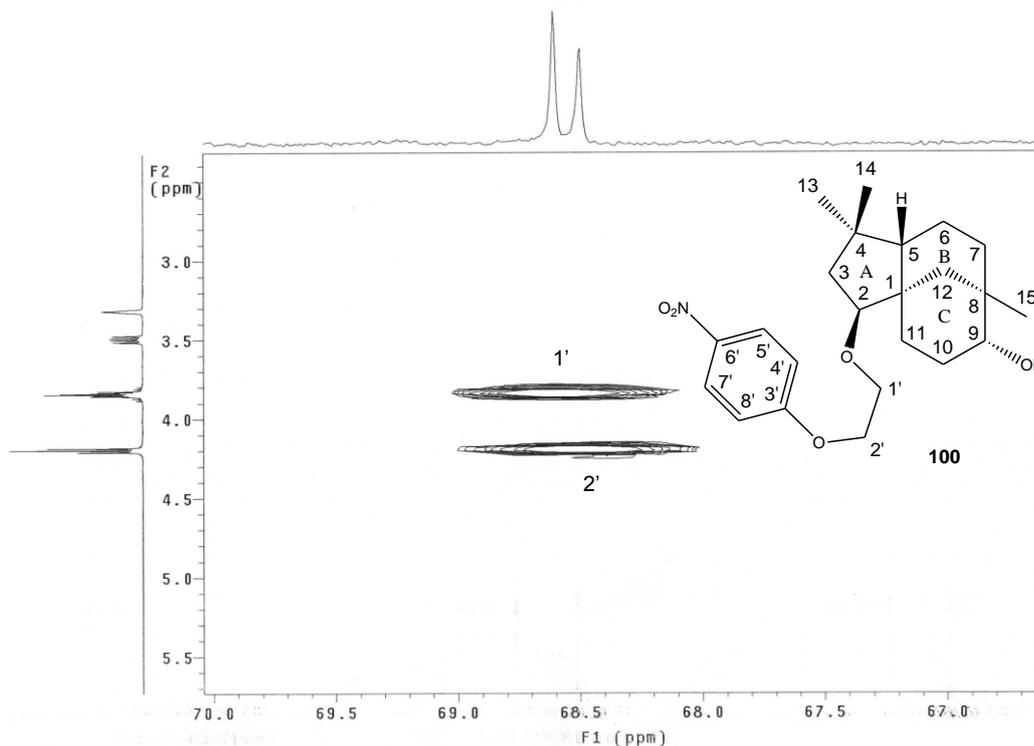


Figura 206 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9α-ol (**100**). Expansão da região entre δ<sub>C</sub> 2,4 – 5,7.

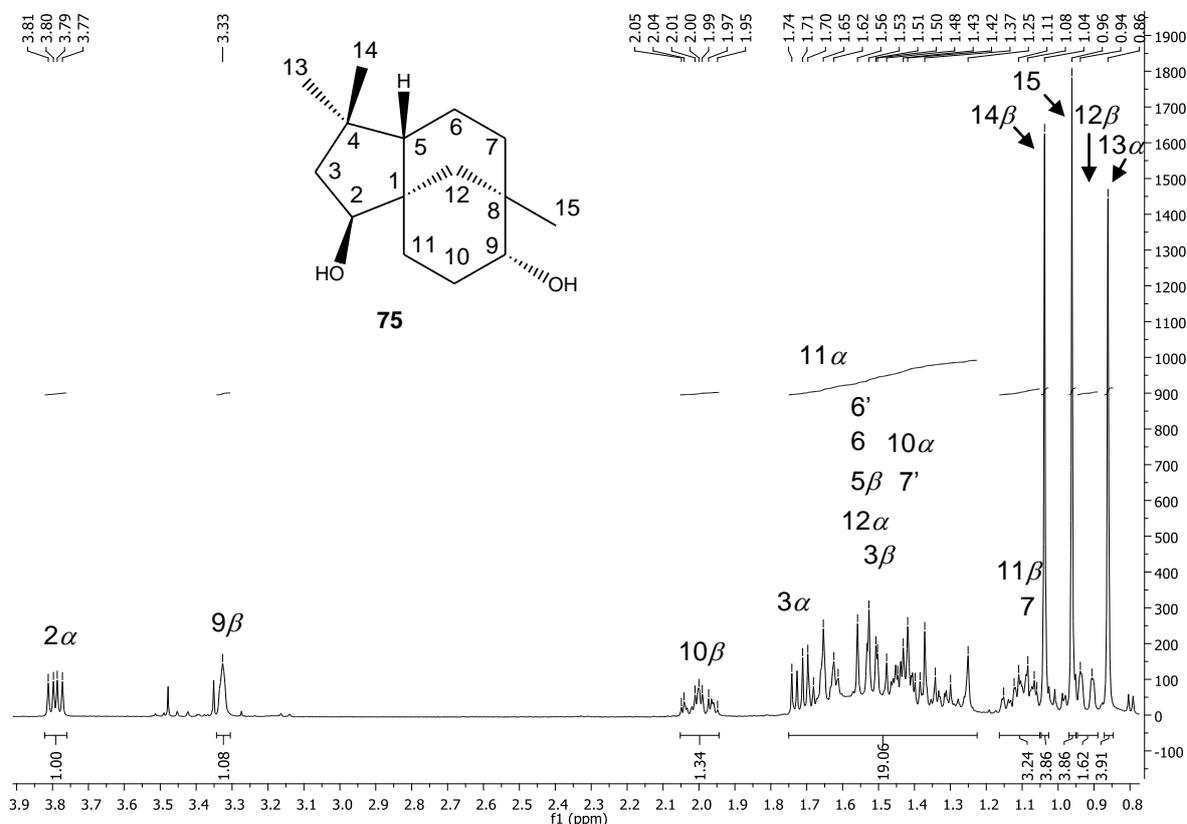


Figura 207 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do clovan-2β-9α-diol (**75**).

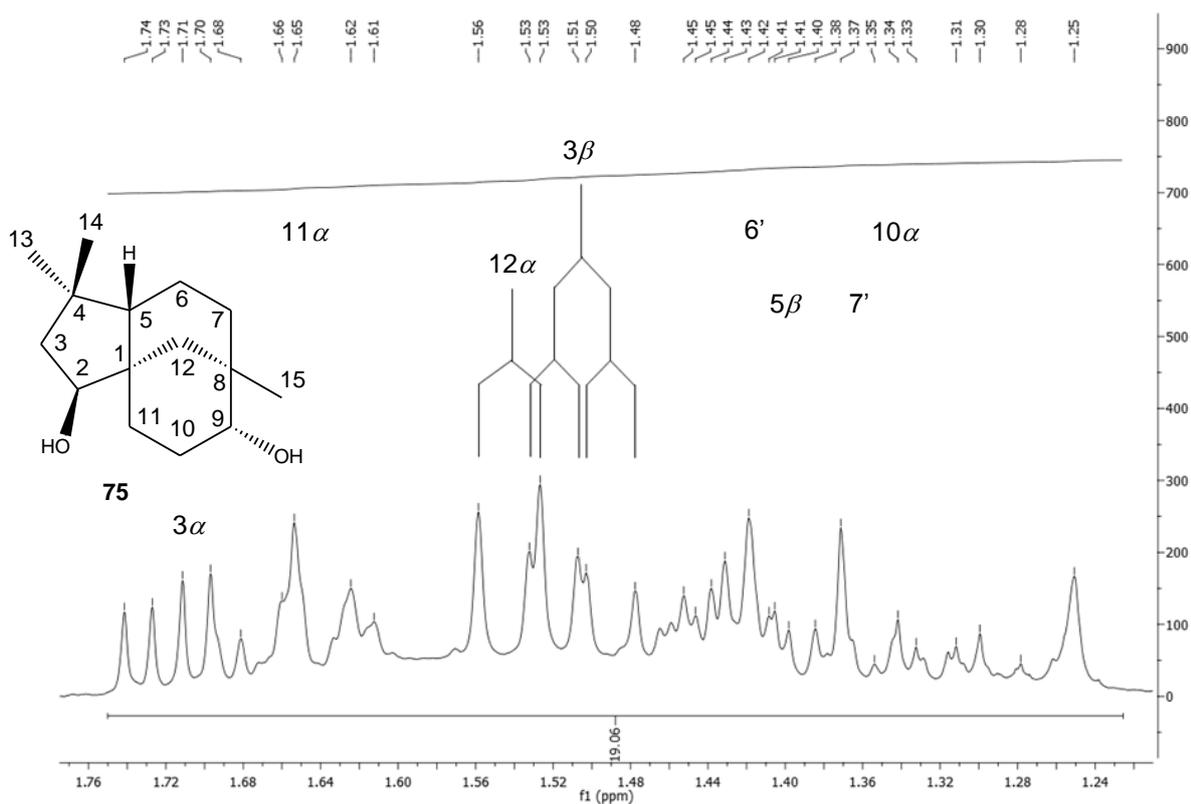


Figura 208 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,23 – 1,76.

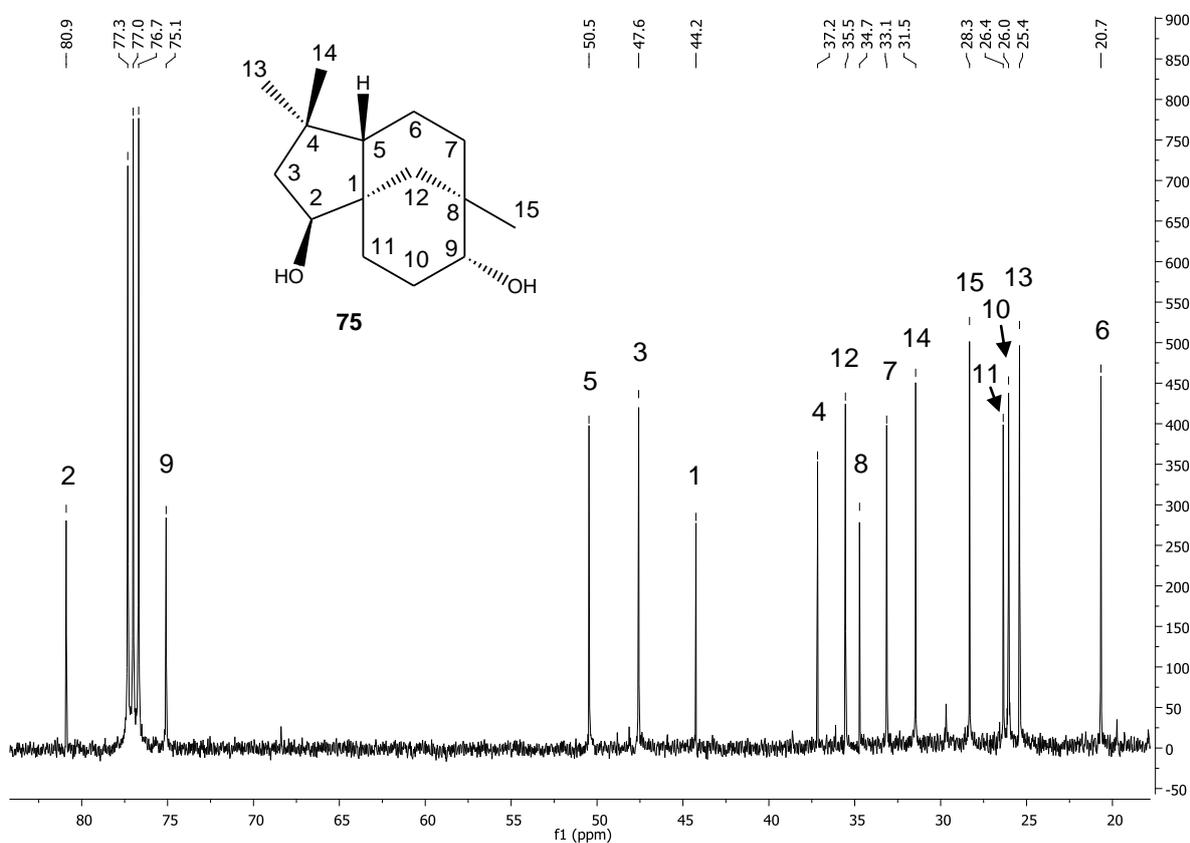


Figura 209 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**).

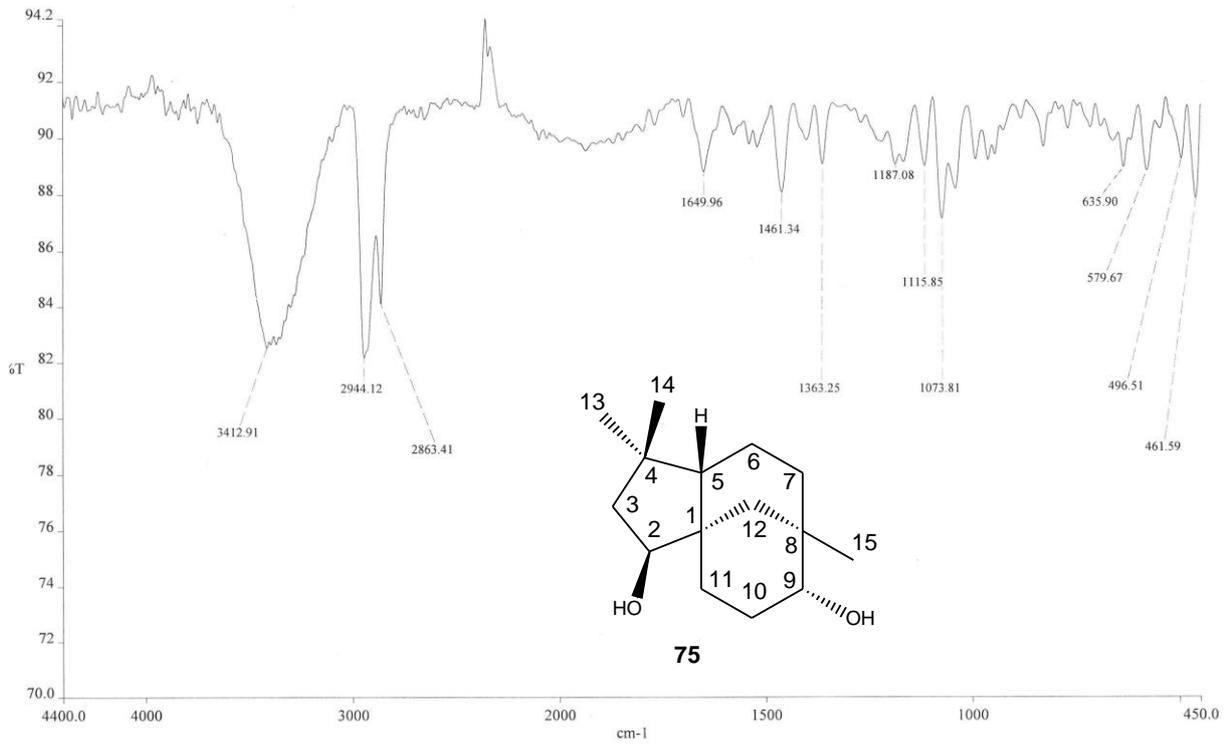


Figura 210 – Espectro na região do IV do clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**) (KBr).

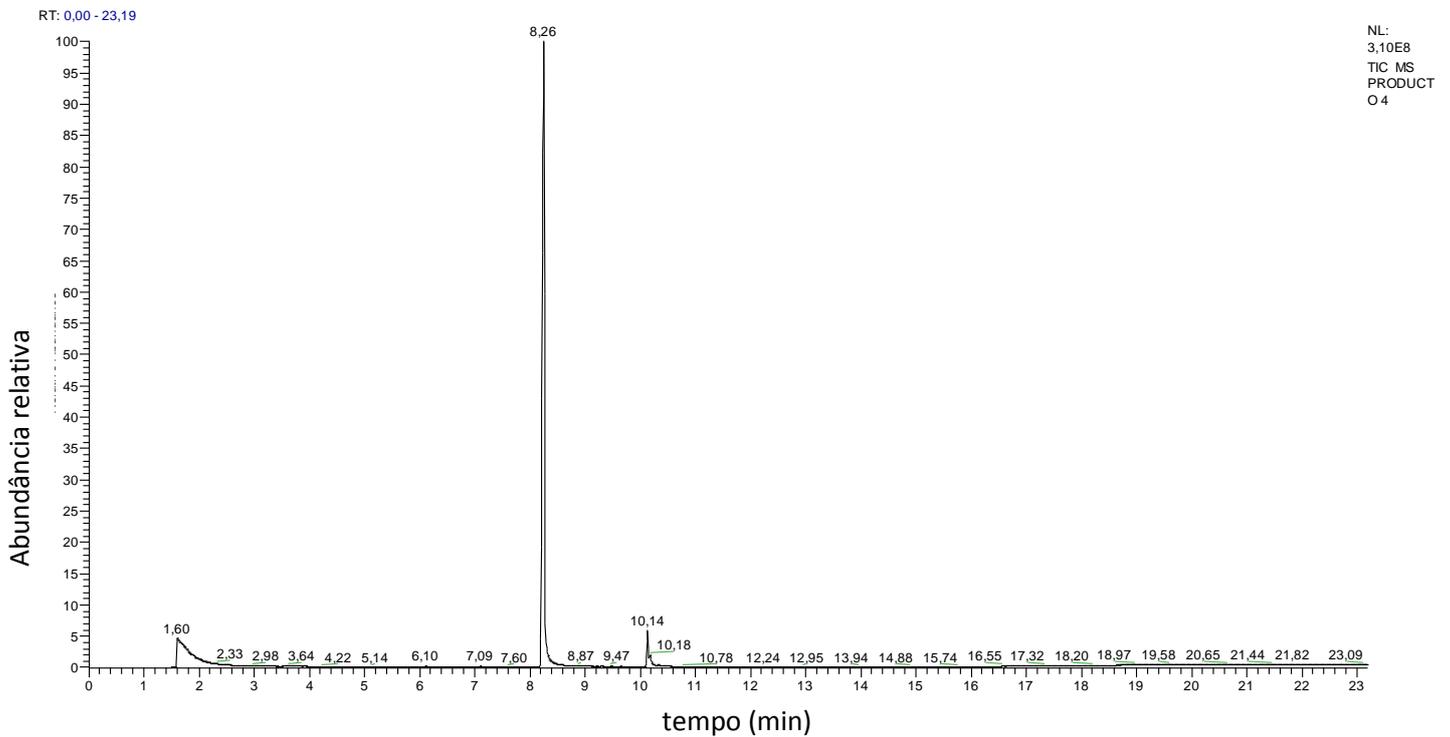


Figura 211 – Cromatograma obtido por CG-EM para o clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**), utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

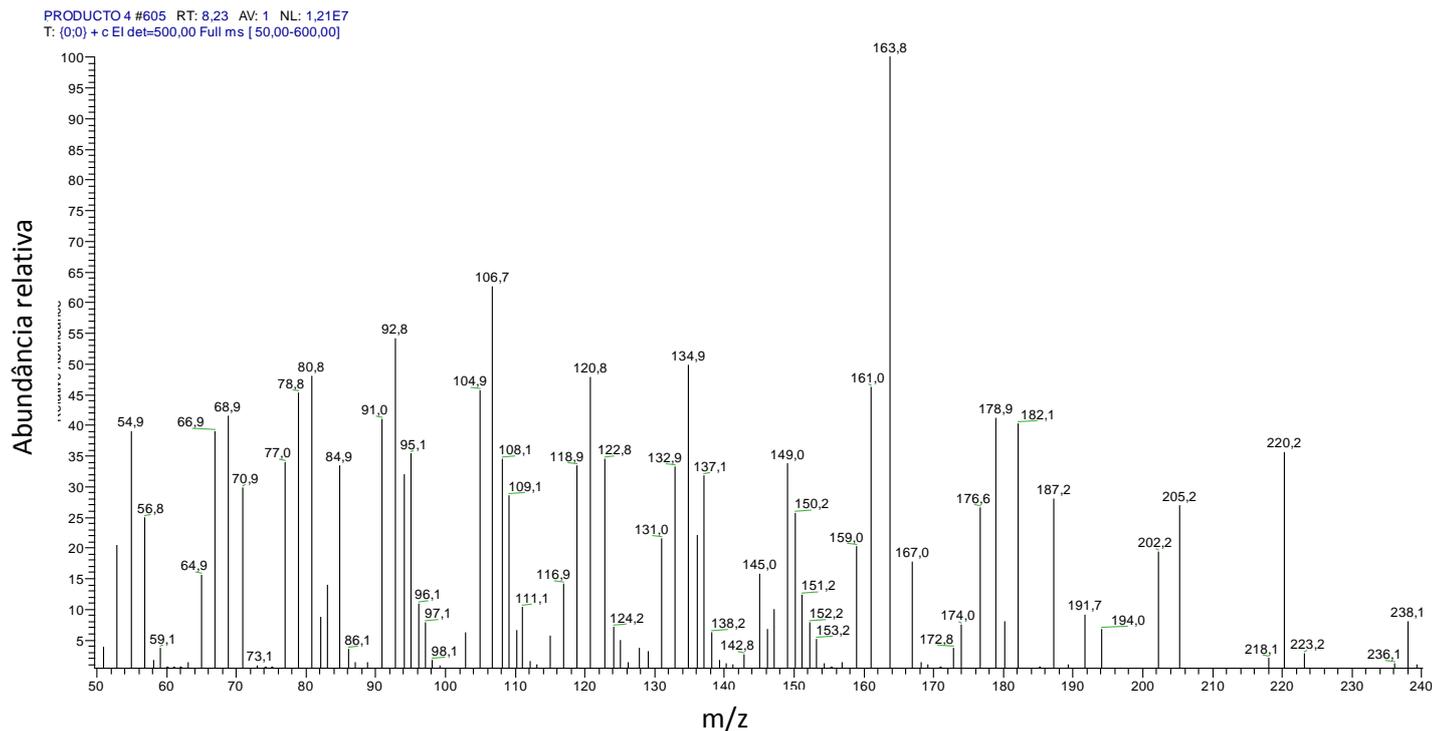


Figura 212 – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,26 min no cromatograma do clovan-2 $\beta$ -9 $\alpha$ -diol (**75**).

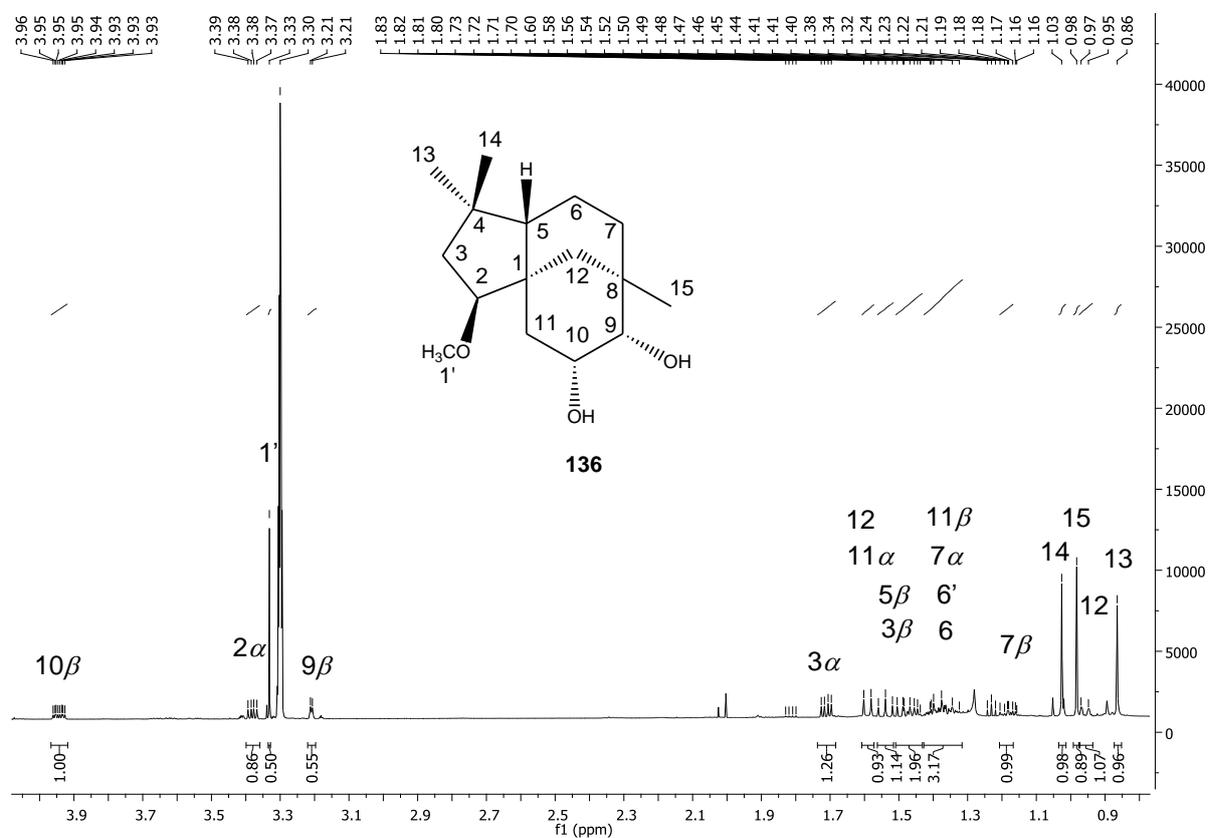


Figura 213 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**).

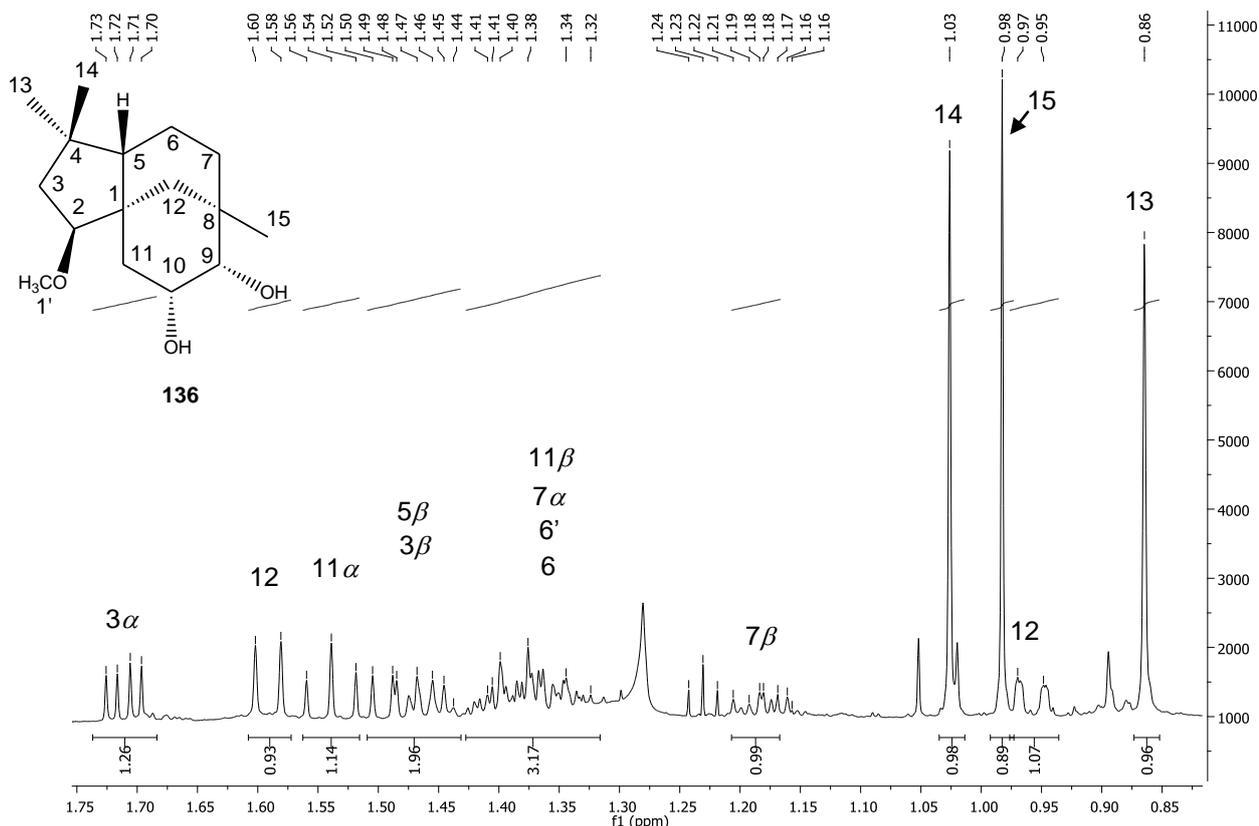


Figura 214 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2β-metoxiclovan-9α,10α-diol (136). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,85 – 1,75.

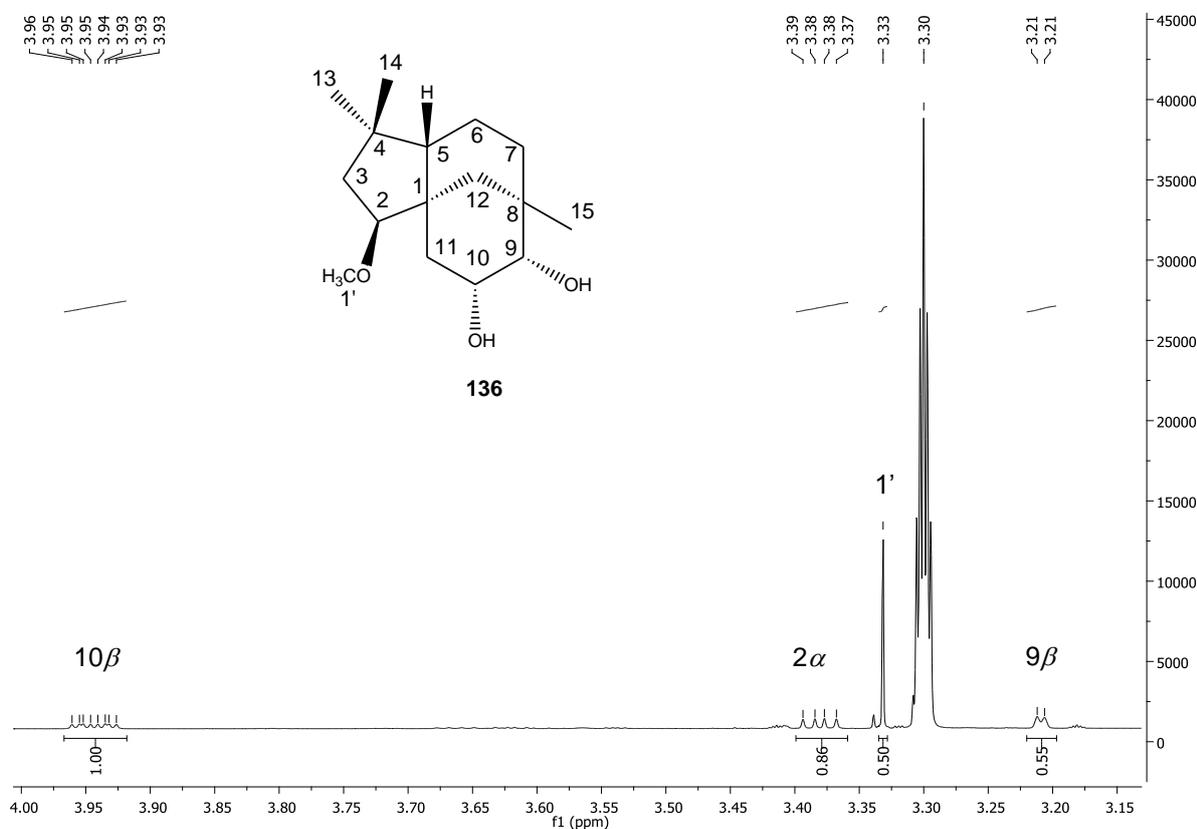
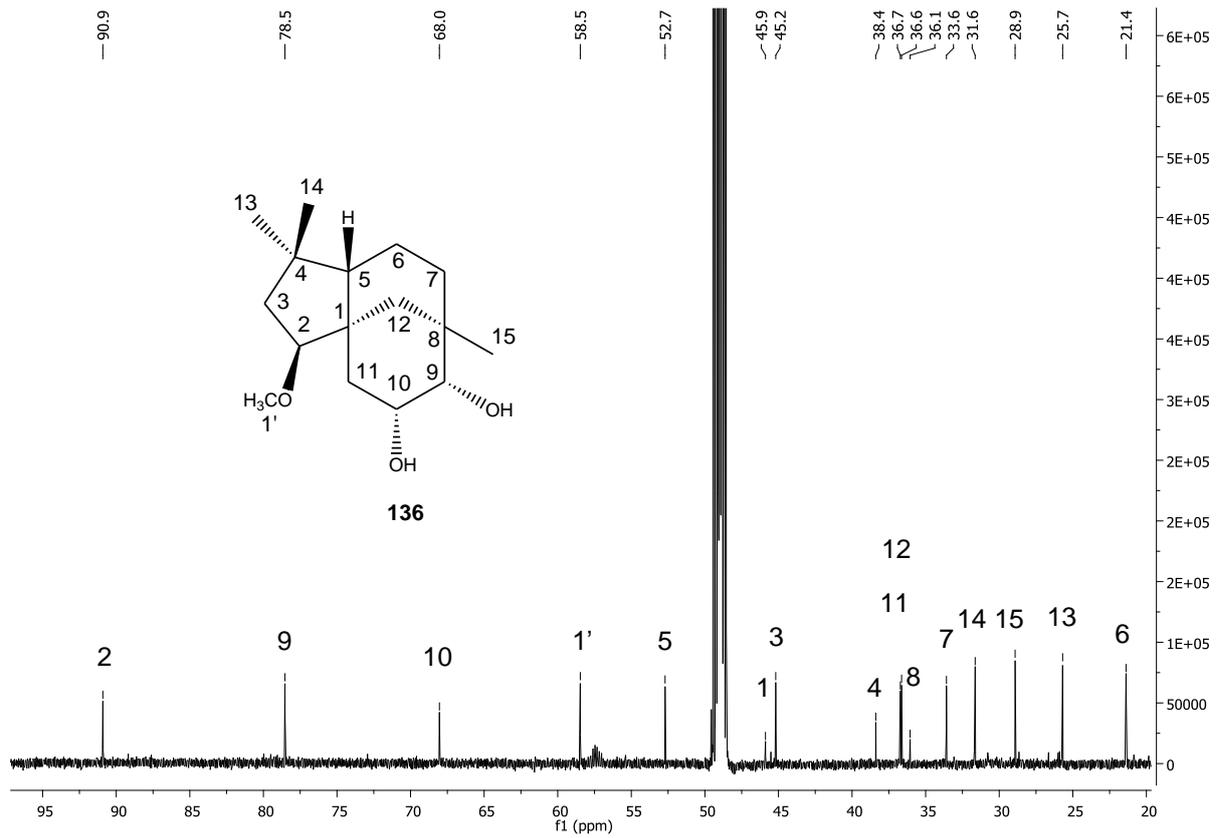
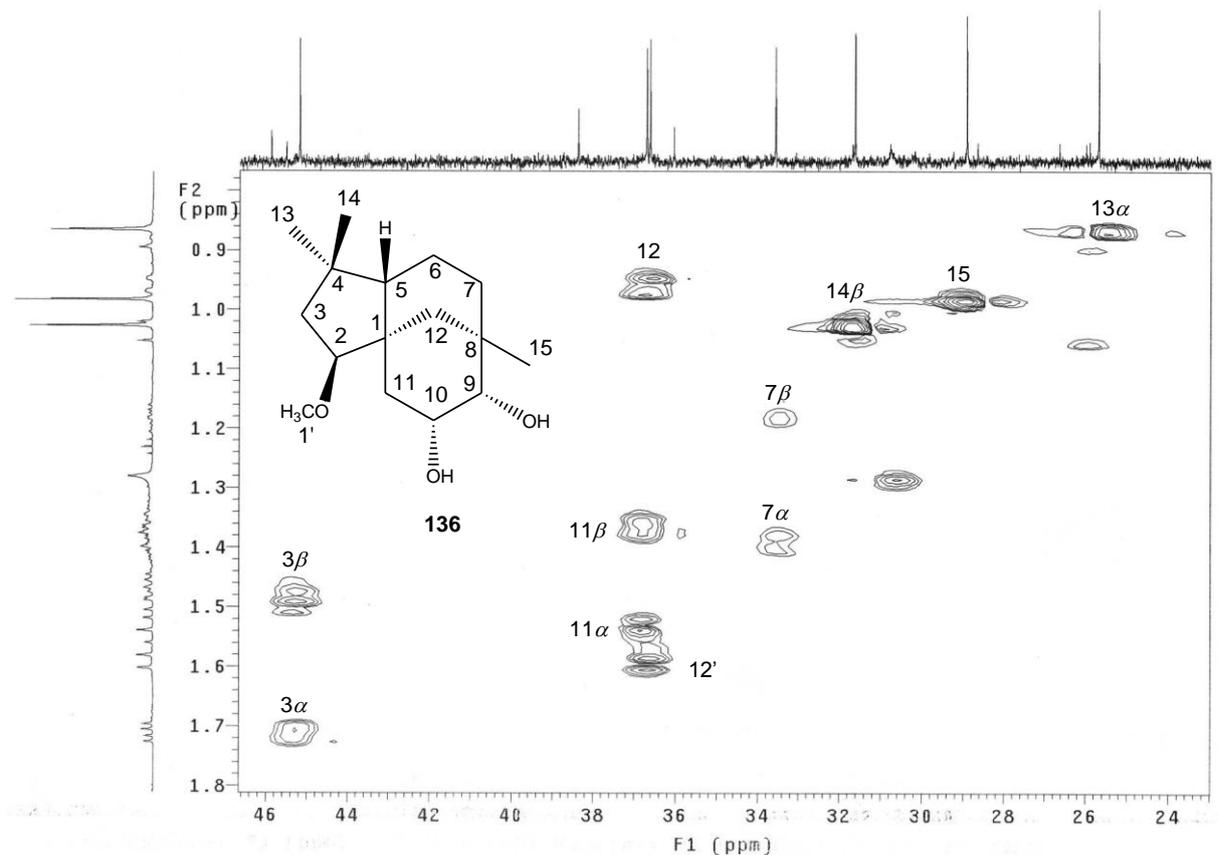


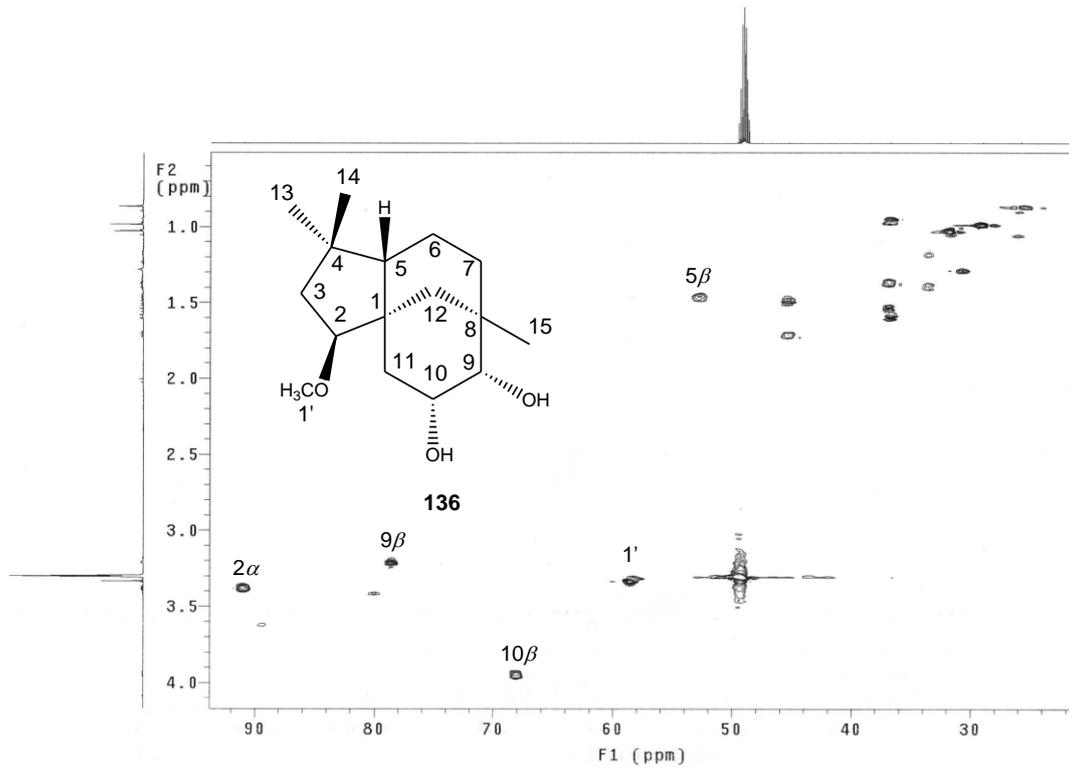
Figura 215 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2β-metoxiclovan-9α,10α-diol (136). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  3,15 – 4,00.



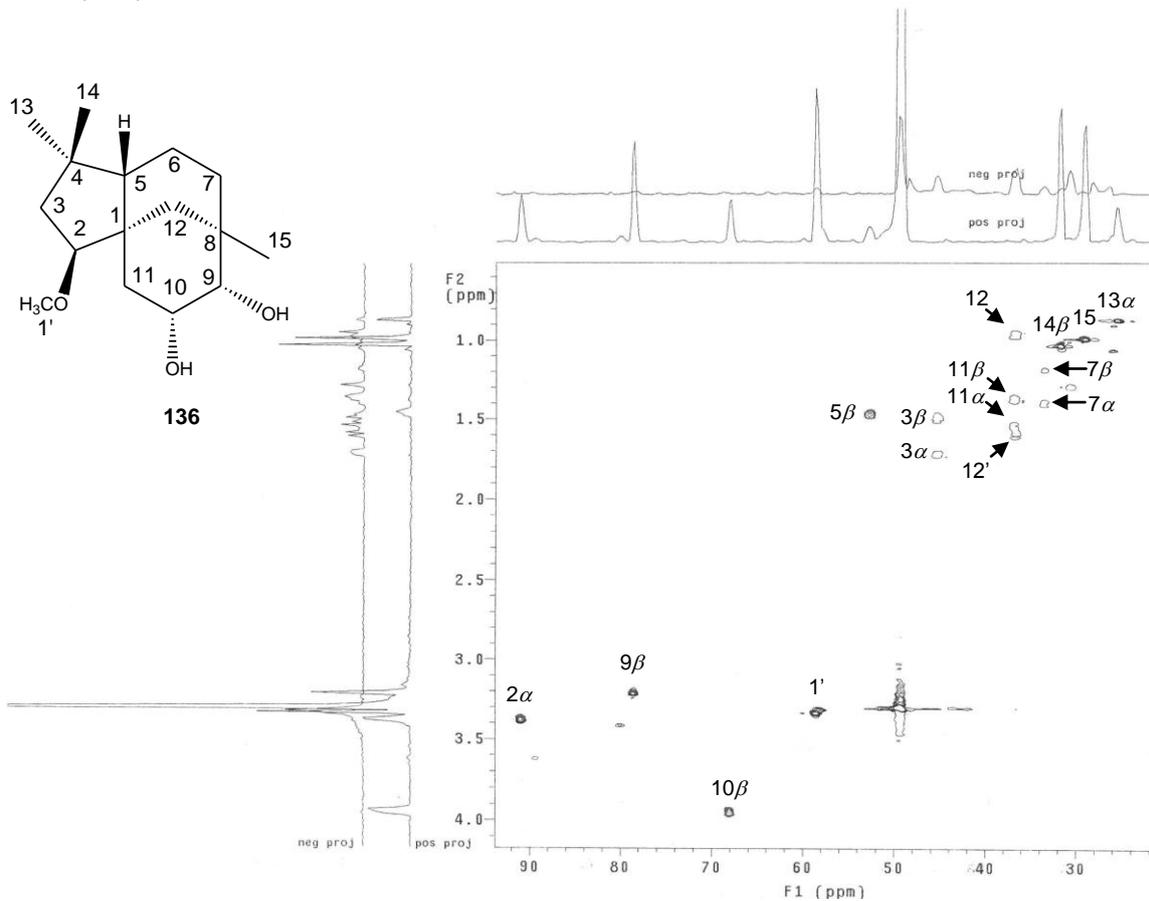
**Figura 216** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2β-metoxiclovan-9α,10α-diol (136).



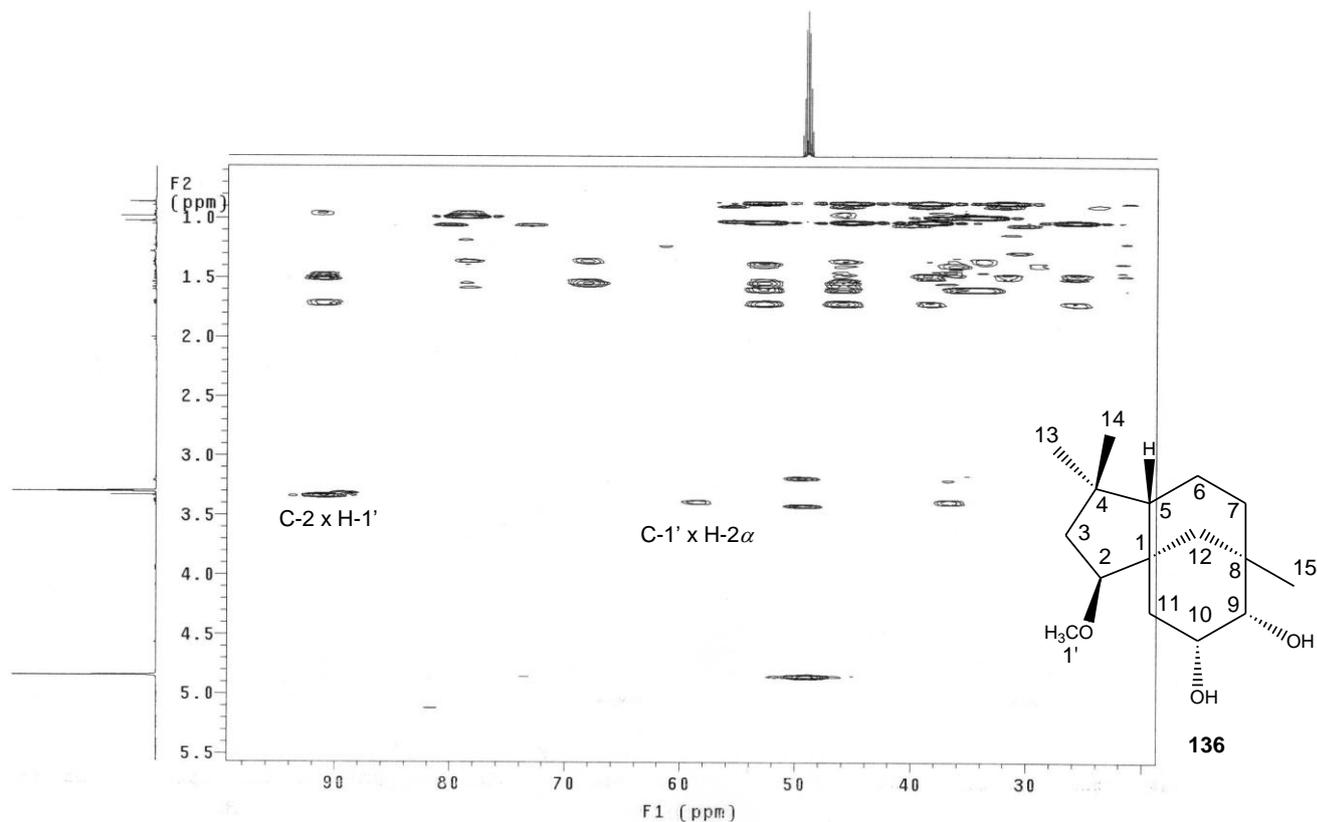
**Figura 217** - Mapa de contornos HSQC (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do 2β-metoxiclovan-9α,10α-diol (136). Expansão da região entre  $\delta_{\text{C}}$  0,8 – 1,8.



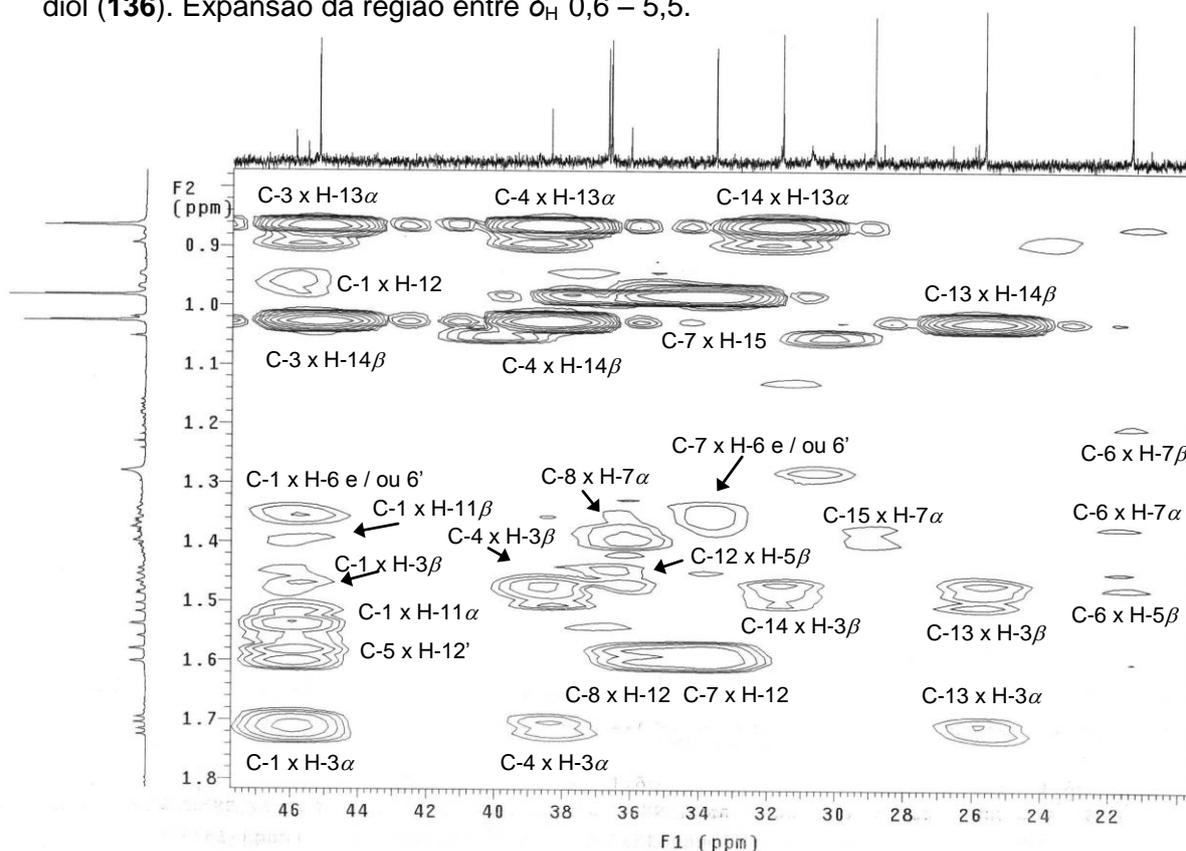
**Figura 218** - Mapa de contornos HSQC (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha,10\alpha$ -diol (**136**).



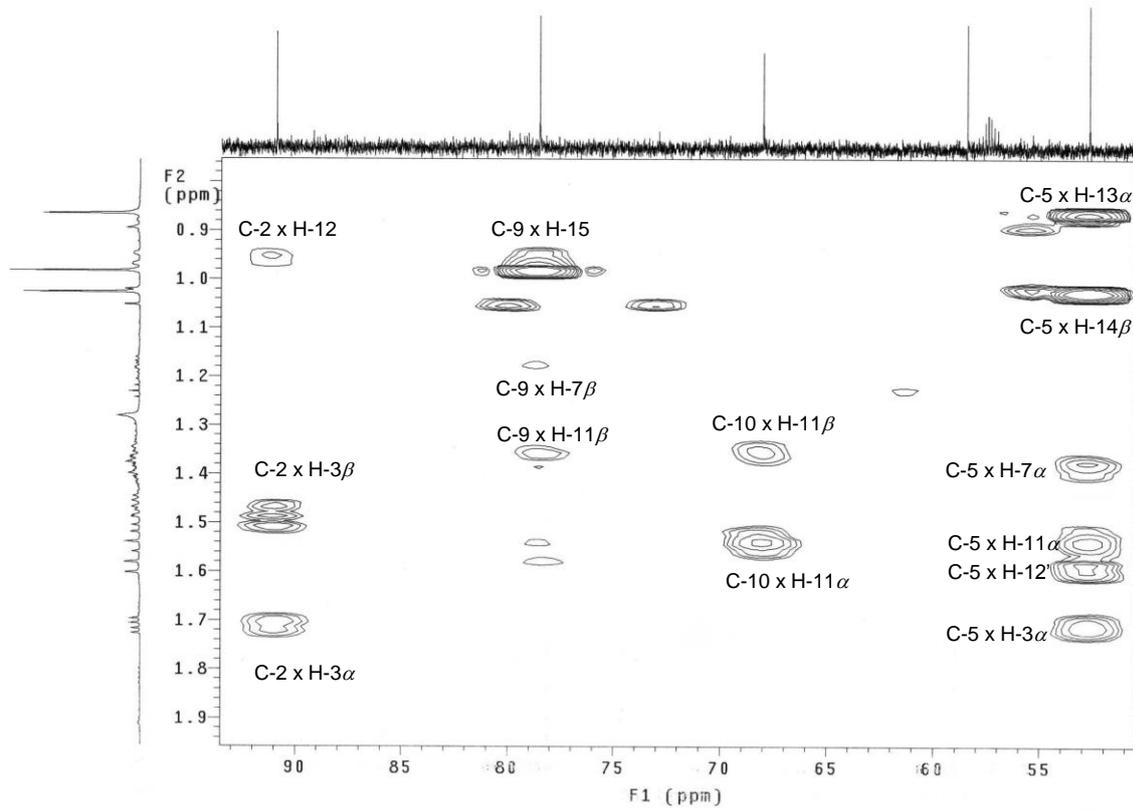
**Figura 219** - Mapa de contornos HSQC editado (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha,10\alpha$ -diol (**136**).



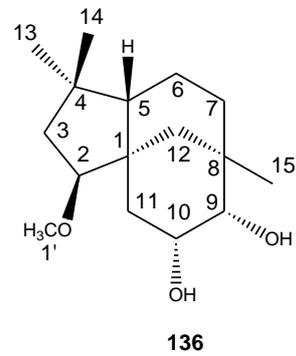
**Figura 220** – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**). Expansão da região entre  $\delta_H$  0,6 – 5,5.

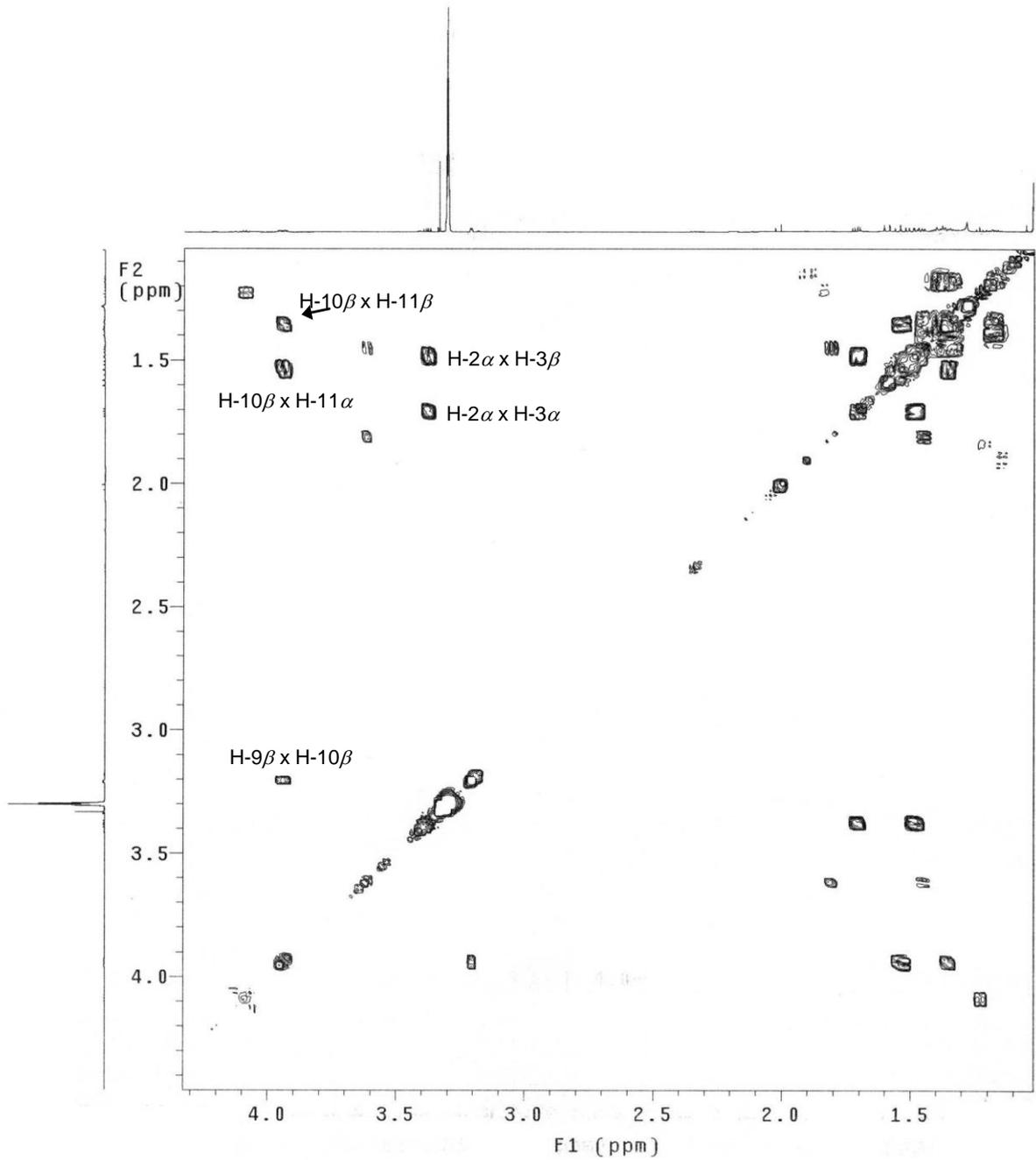


**Figura 221** – Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**). Expansão da região entre  $\delta_H$  0,8 – 1,8.

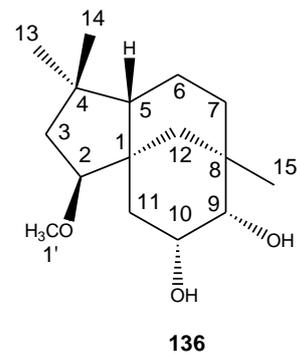


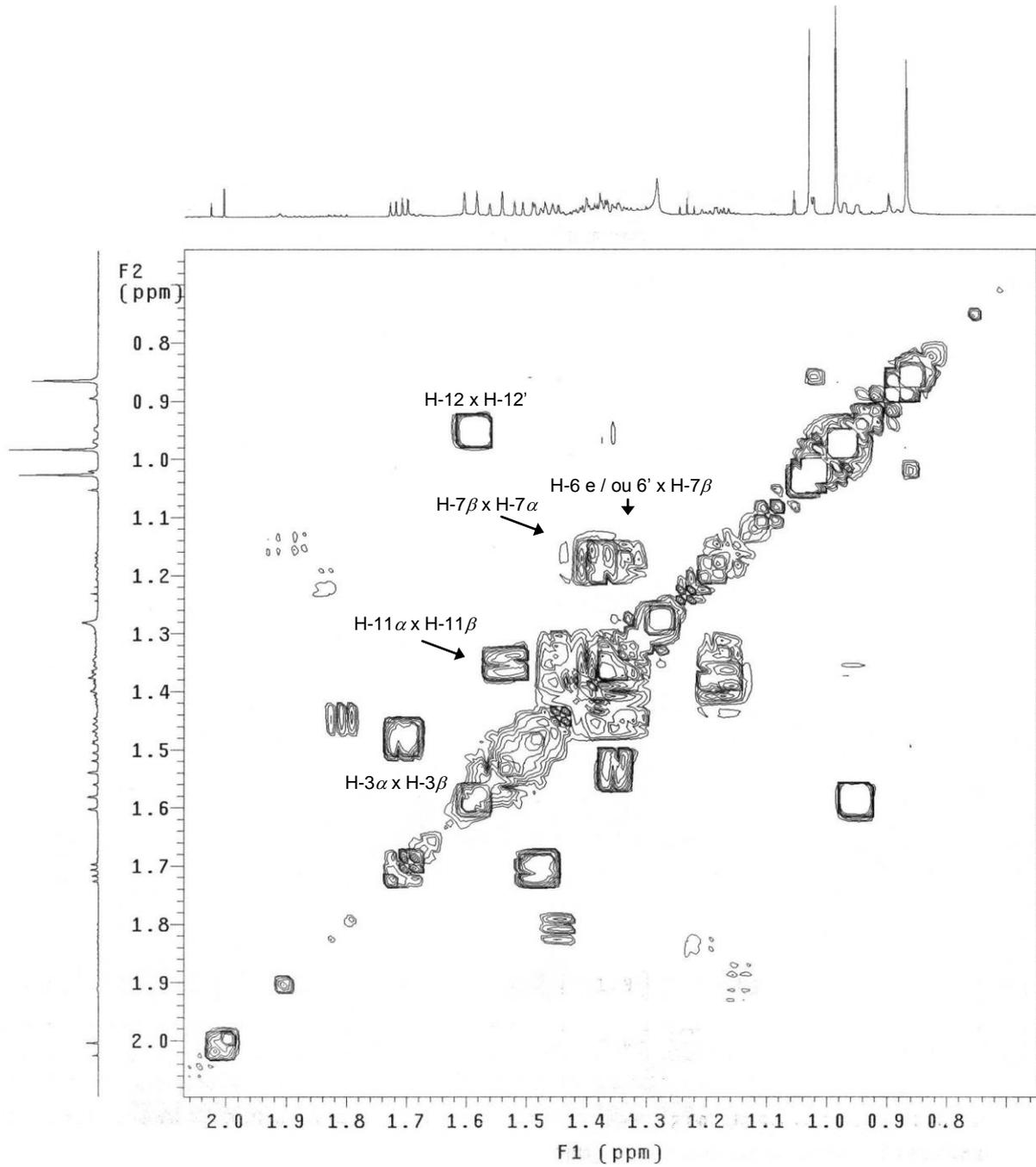
**Figura 222** – Mapa de contornos HMBC (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $9\alpha,10\alpha$ -diol (**136**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,8 – 1,9.



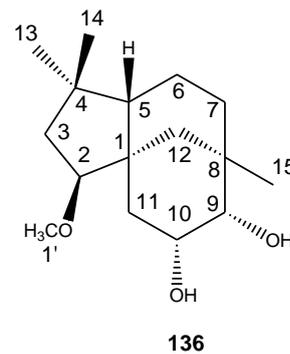


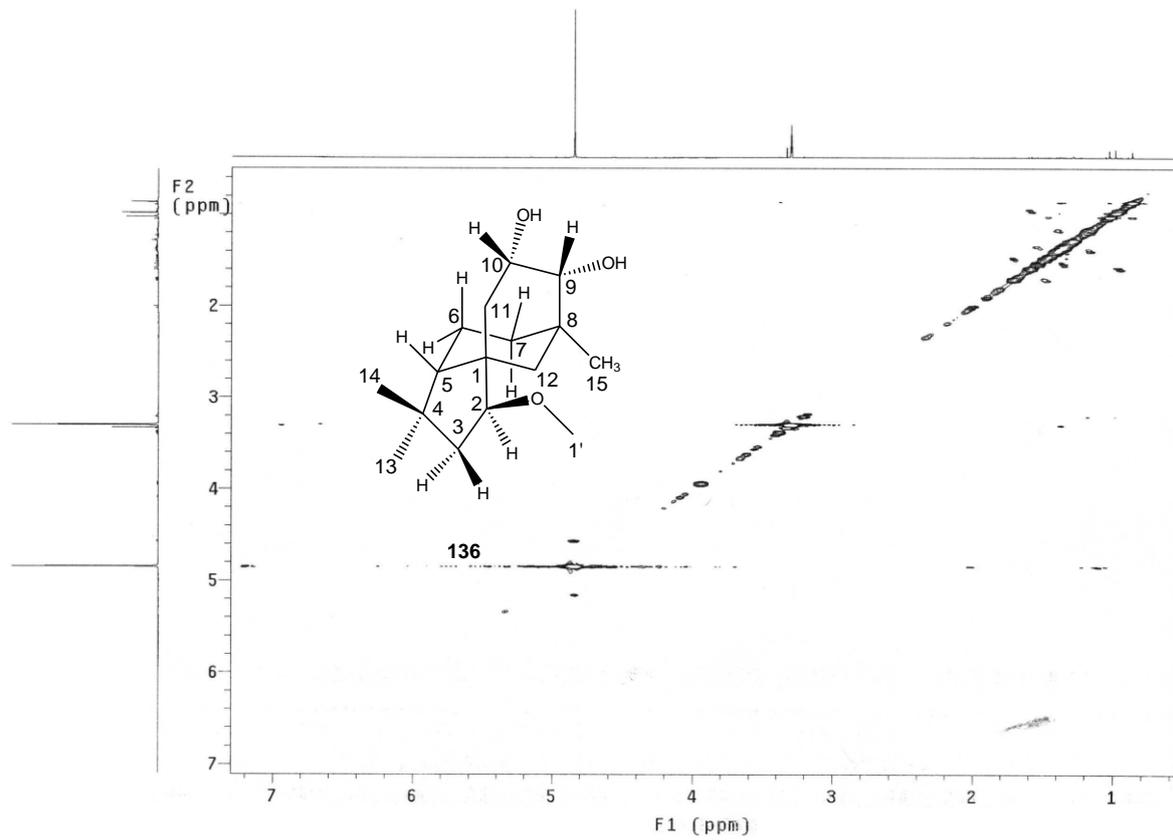
**Figura 223** – Mapa de contornos COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do 2β-metoxiclovan-9α,10α-diol (136).



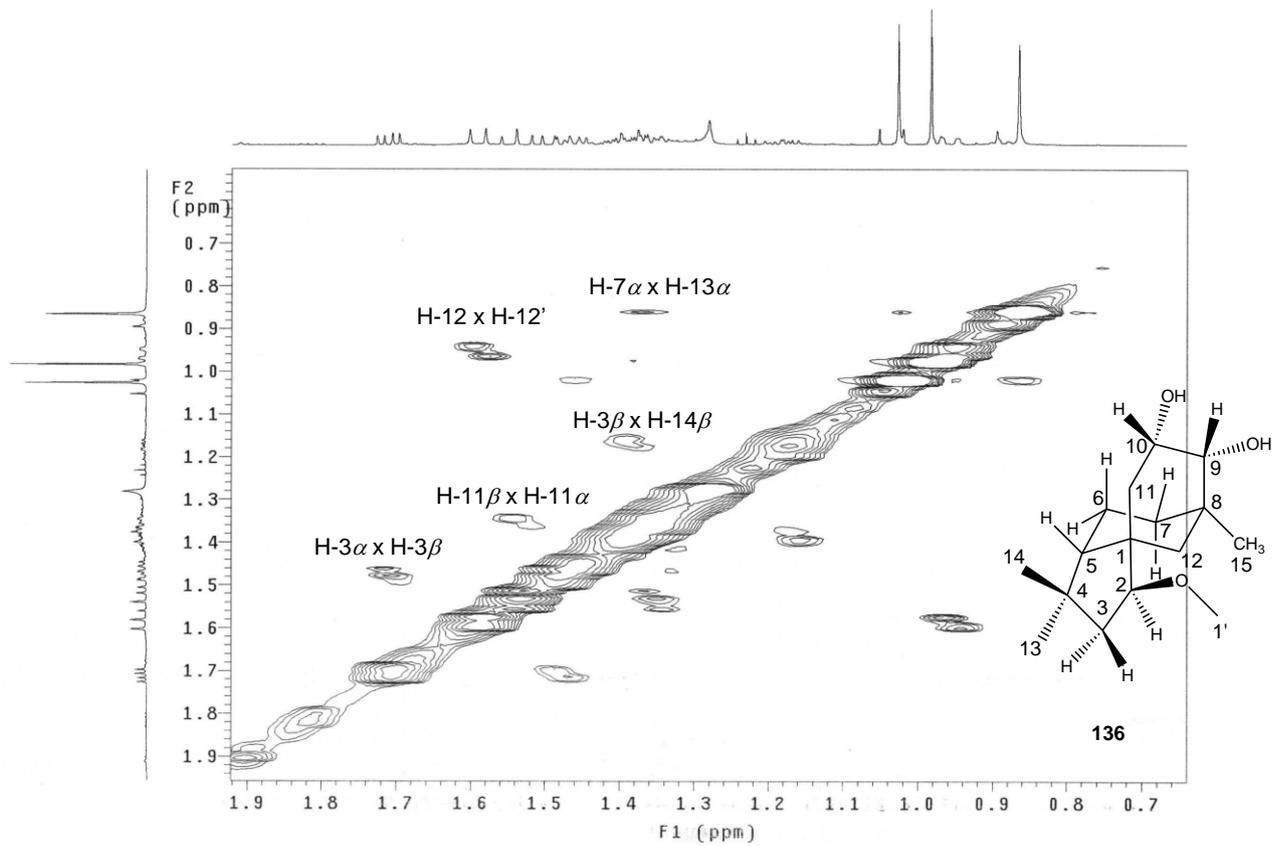


**Figura 224** – Mapa de contornos COSY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,7 – 2,1.

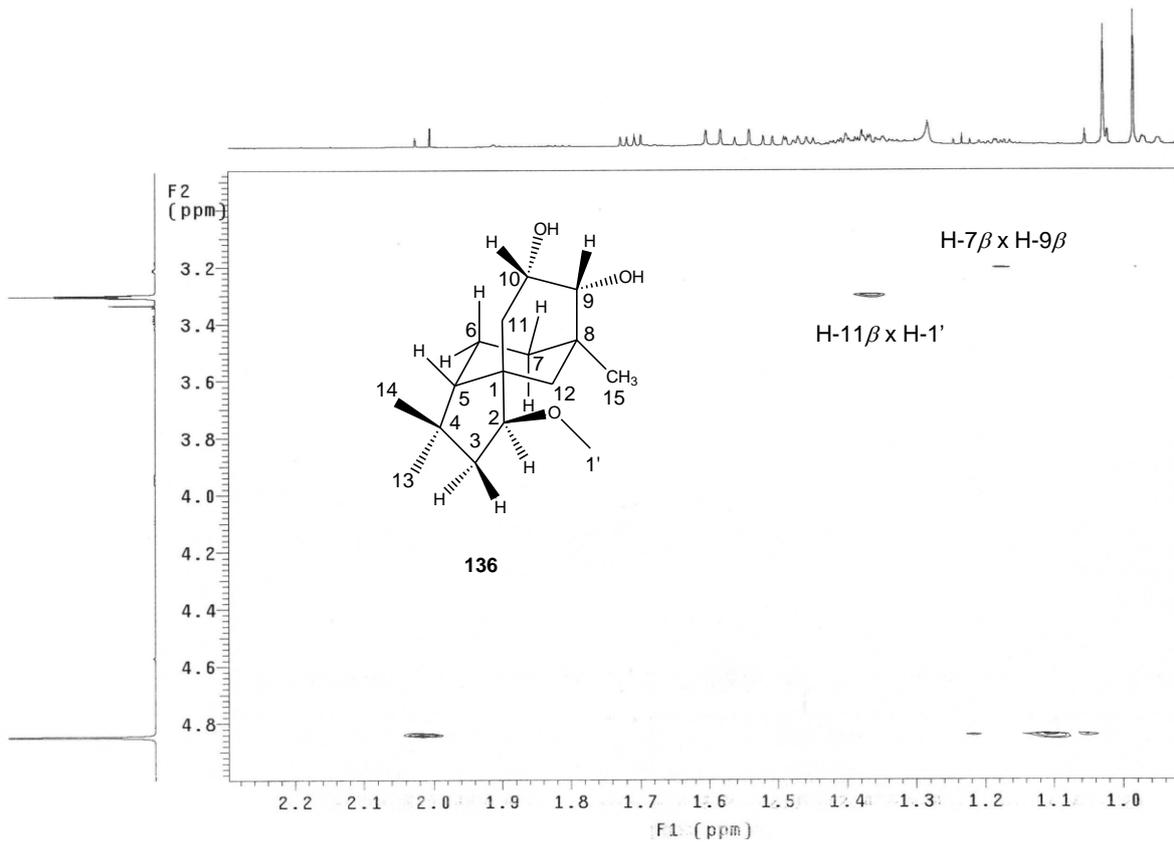




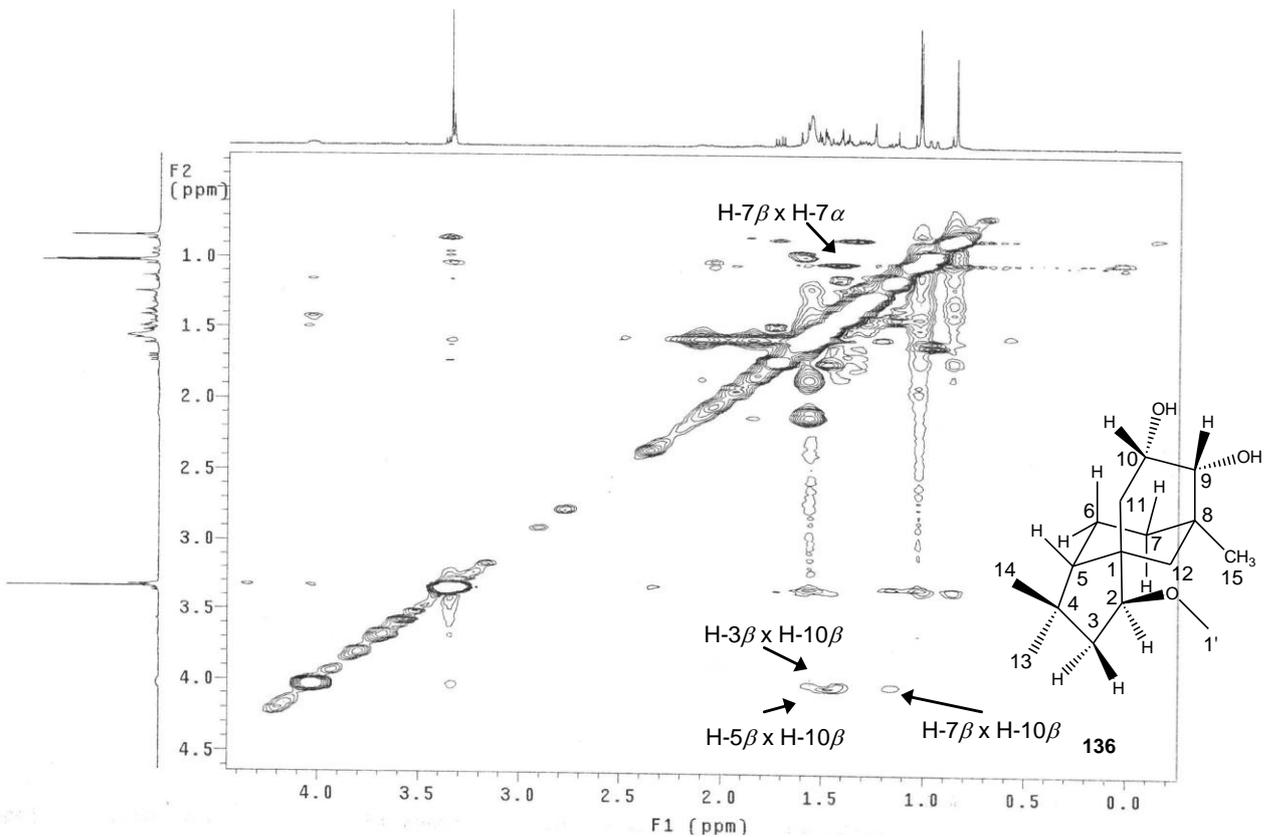
**Figura 225** – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**).



**Figura 226** – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,6 – 1,9.



**Figura 227** – Mapa de contornos NOESY (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**). Expansão da região entre  $\delta_H$  0,9 – 2,3.



**Figura 228** – Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (**136**).

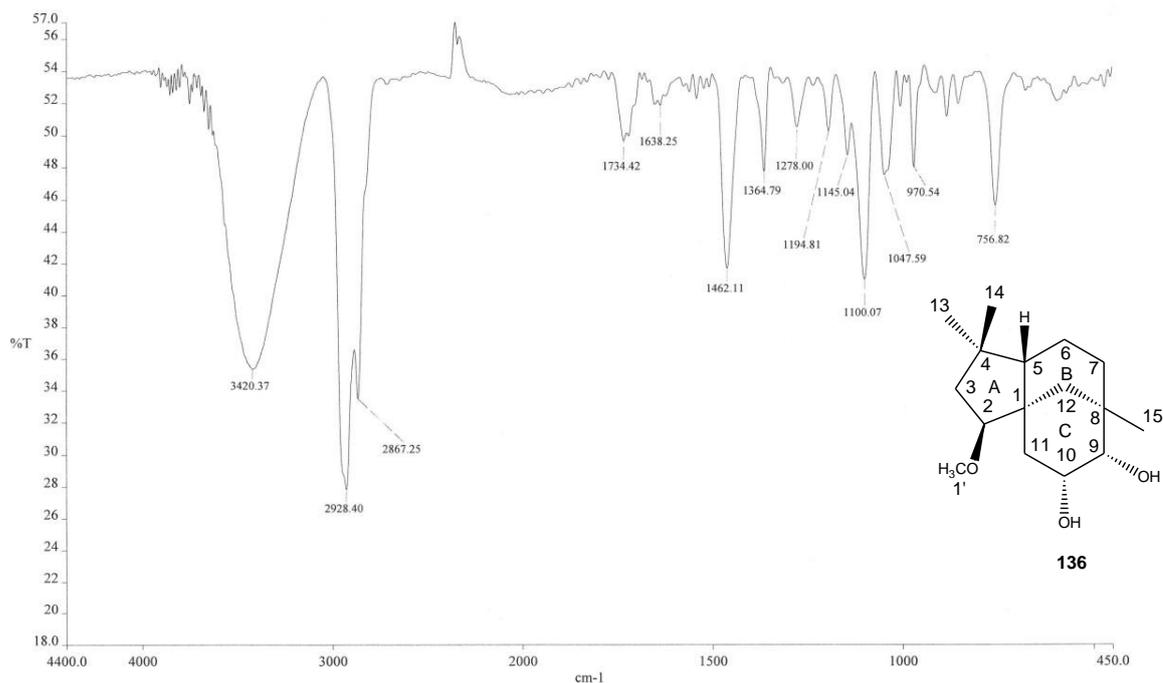


Figura 229 – Espectro na região do IV do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -diol (136) (KBr).

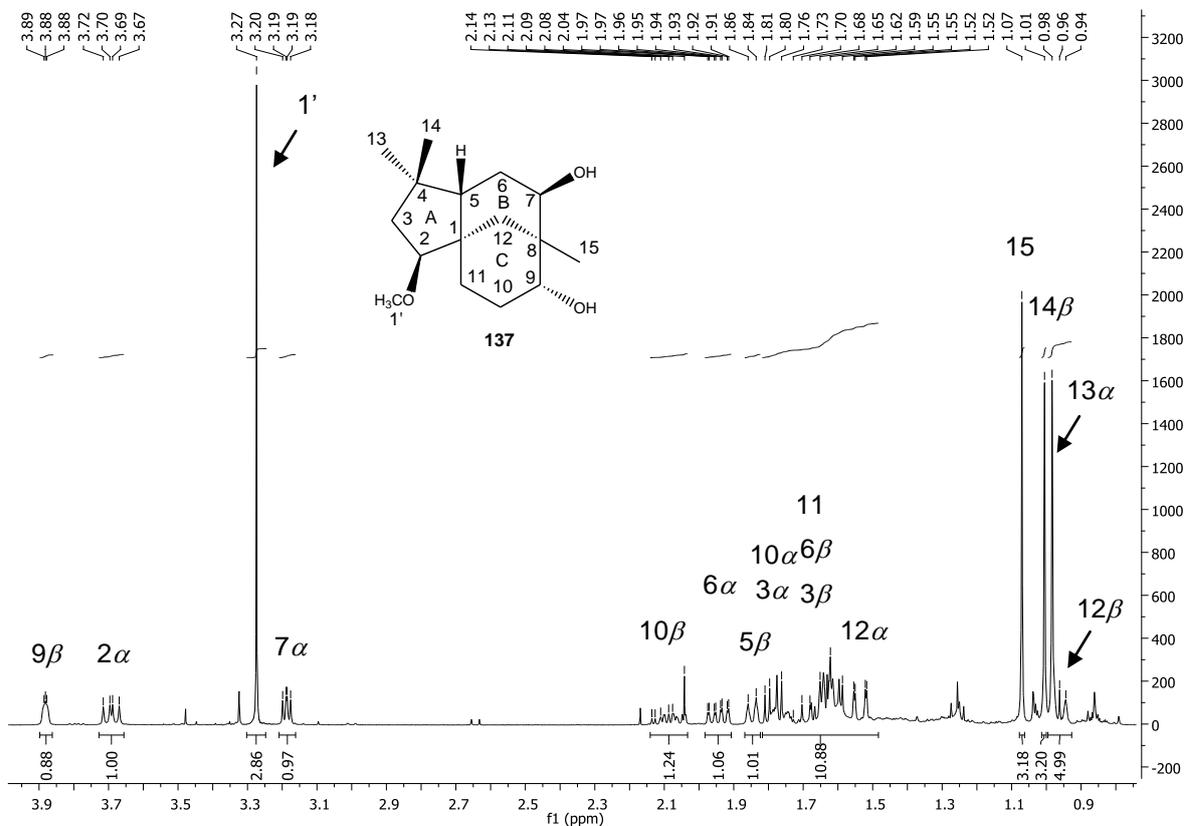


Figura 230 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diol (137).

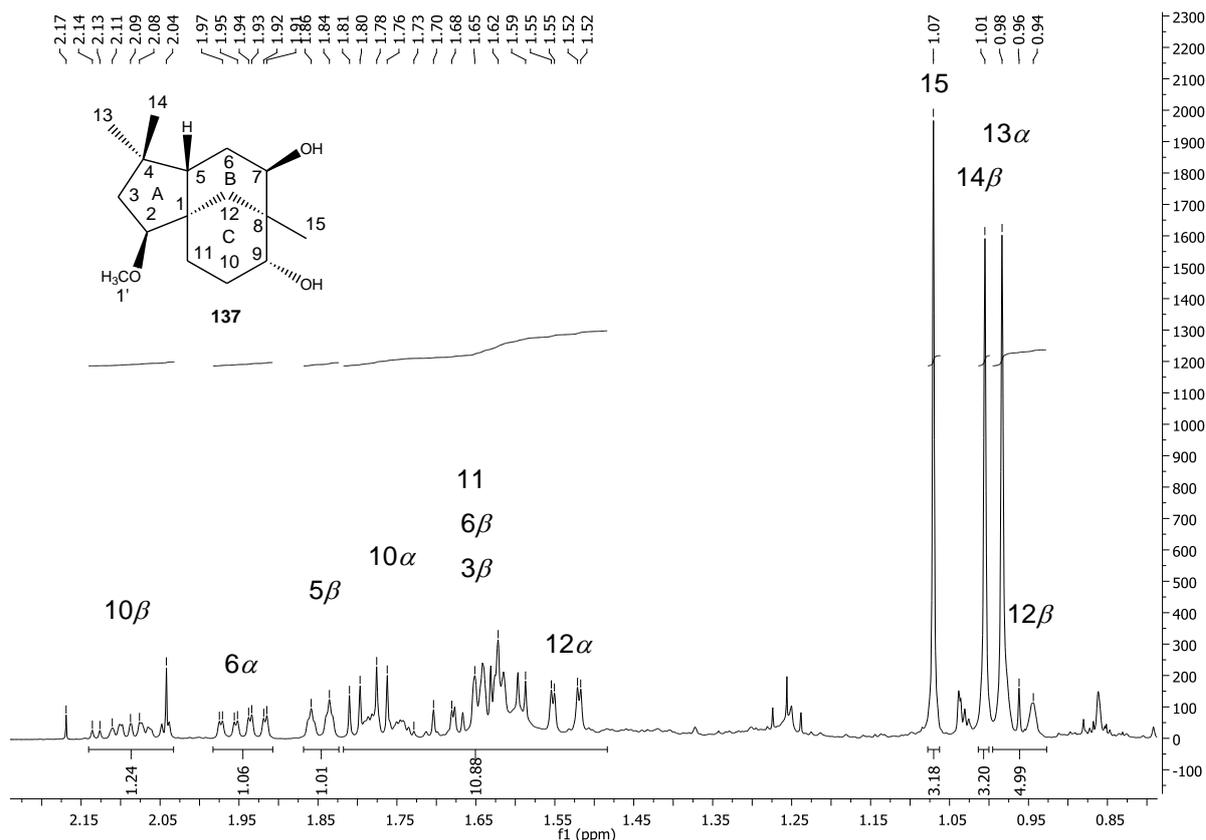


Figura 231 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $7\beta$ ,  $9\alpha$ -diol (137). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,8 – 2,2.

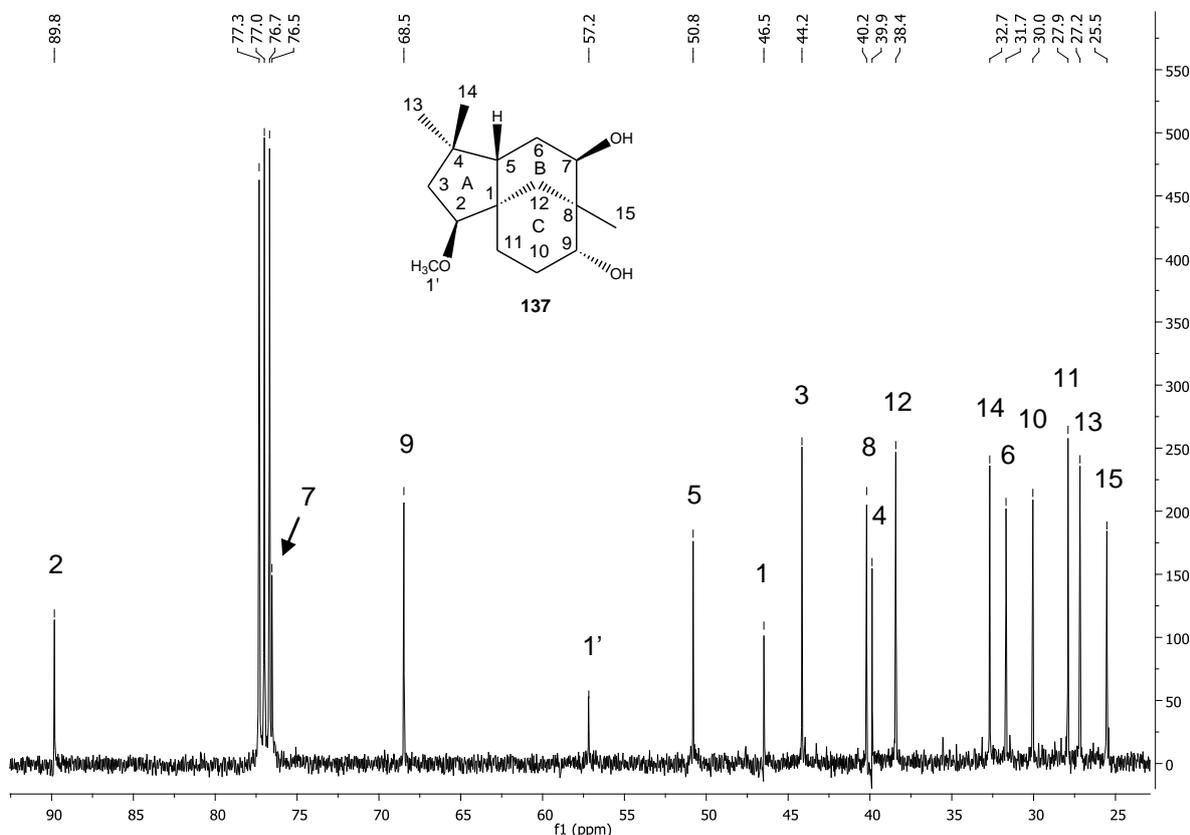
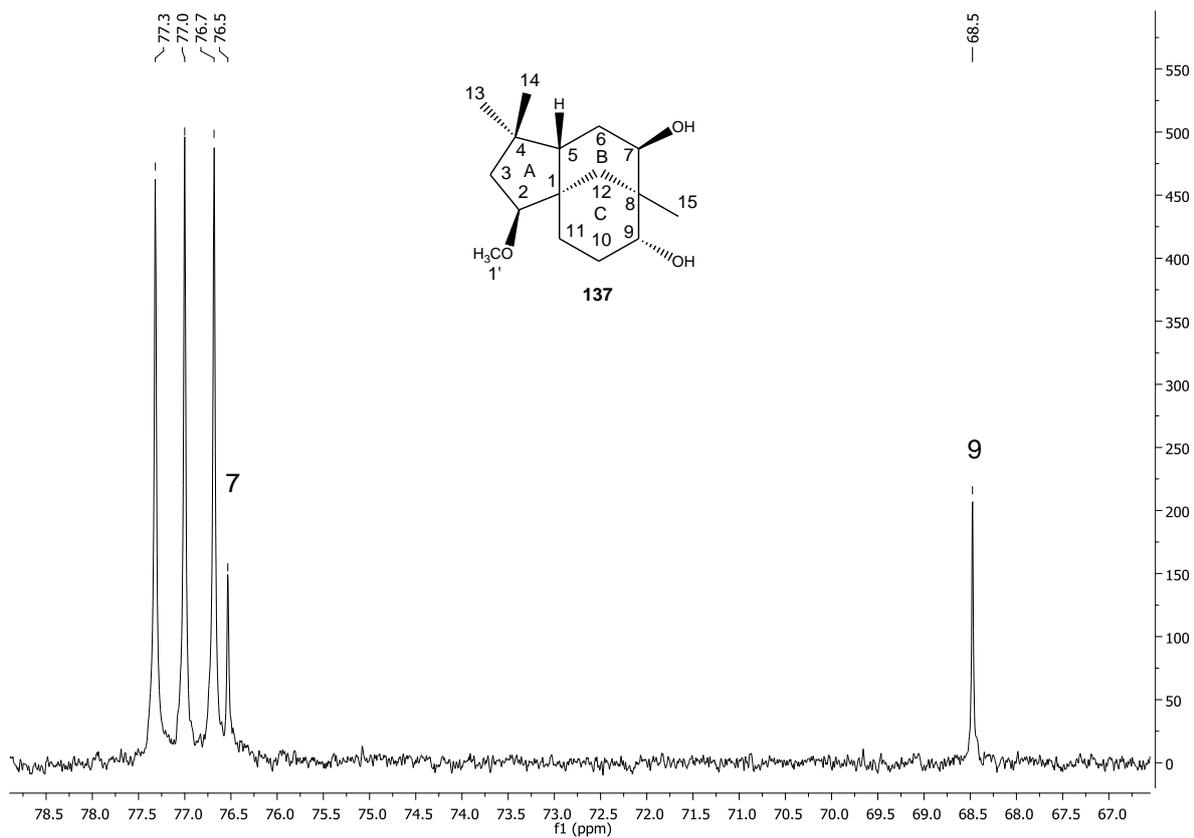
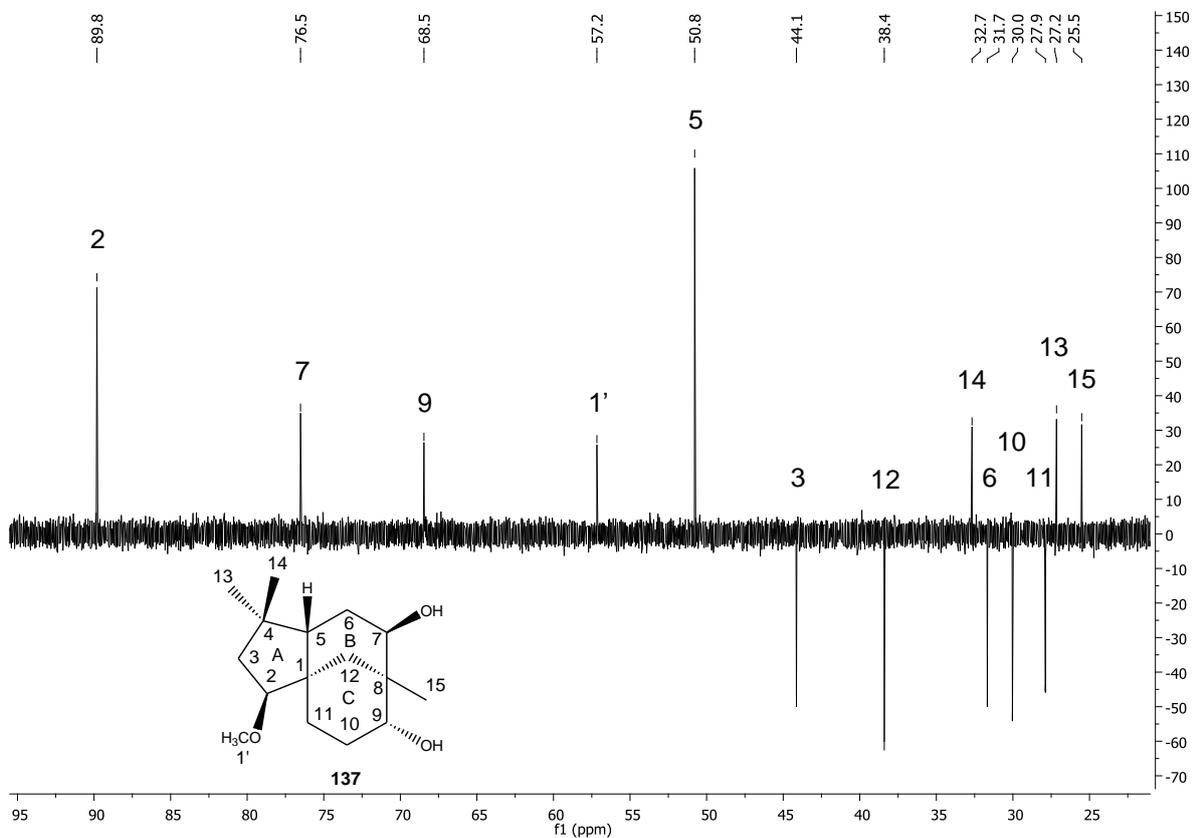


Figura 232 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $7\beta$ ,  $9\alpha$ -diol (137).



**Figura 233** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $7\beta$ ,  $9\alpha$ -diol (137). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  67,0 – 78,5.



**Figura 234** - Subespectro DEPT-135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $7\beta$ ,  $9\alpha$ -diol (137).

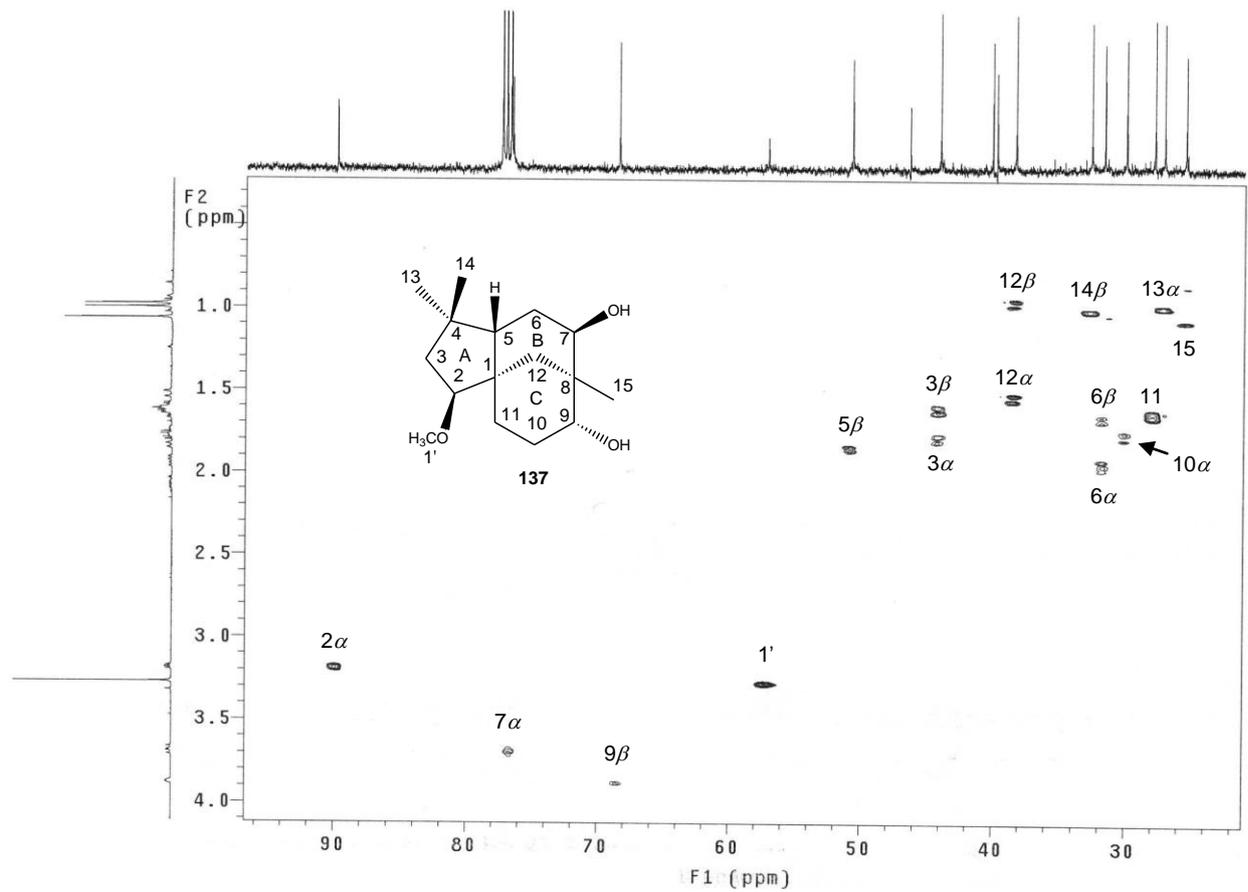


Figura 235 - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol (137).

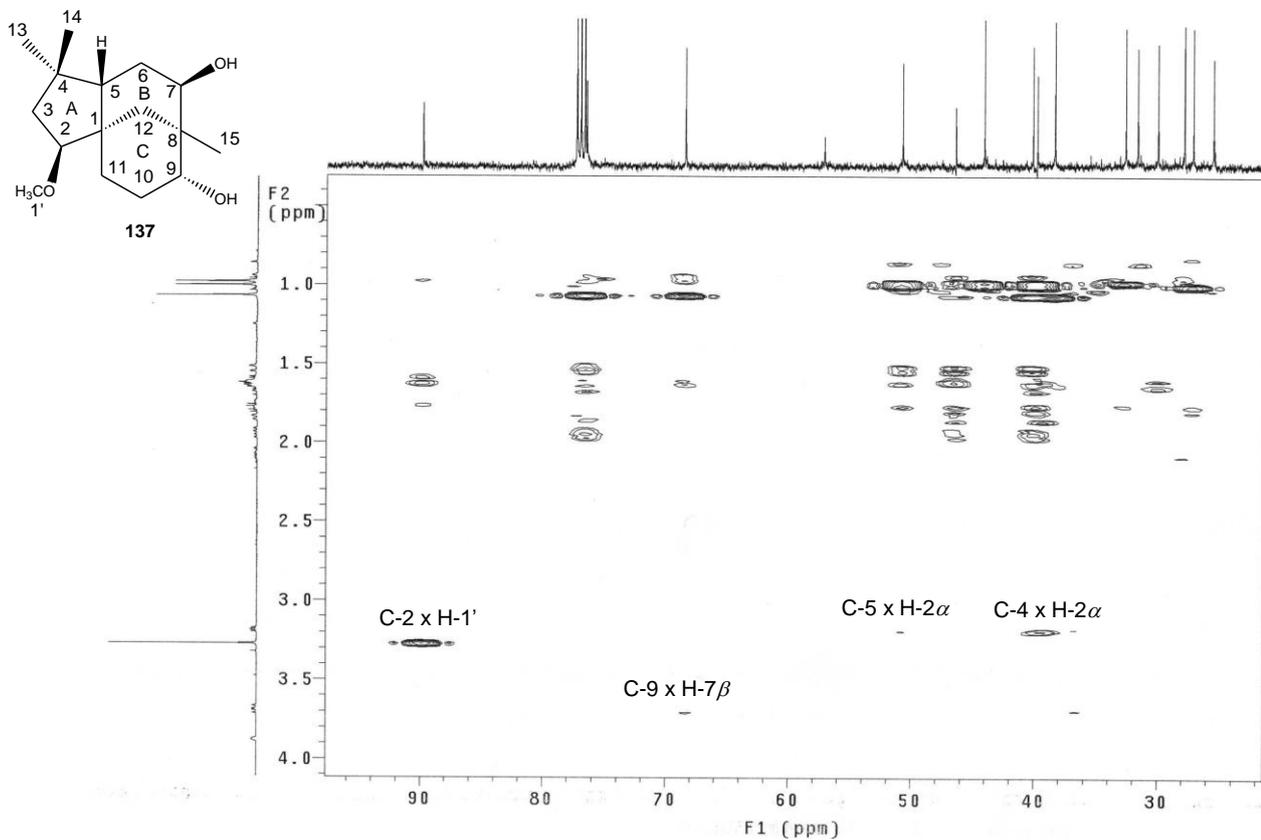
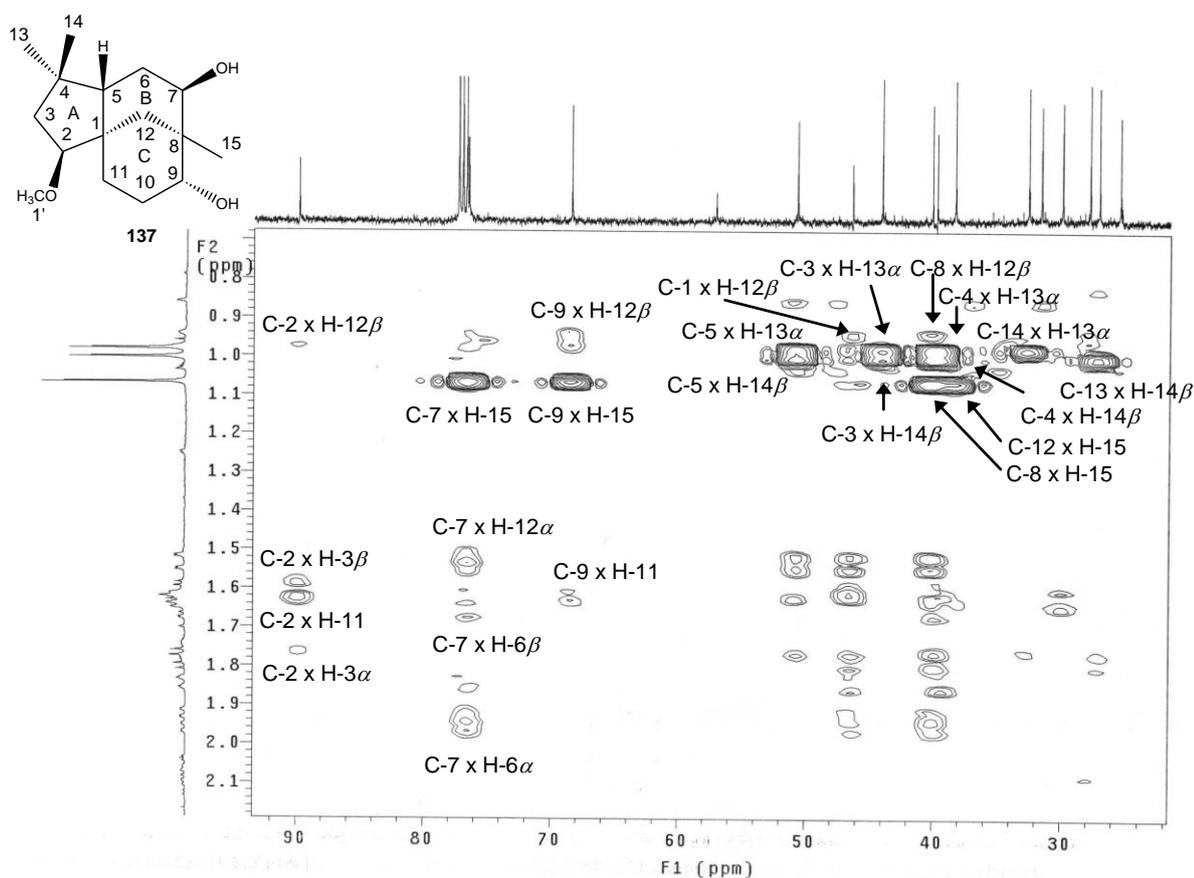
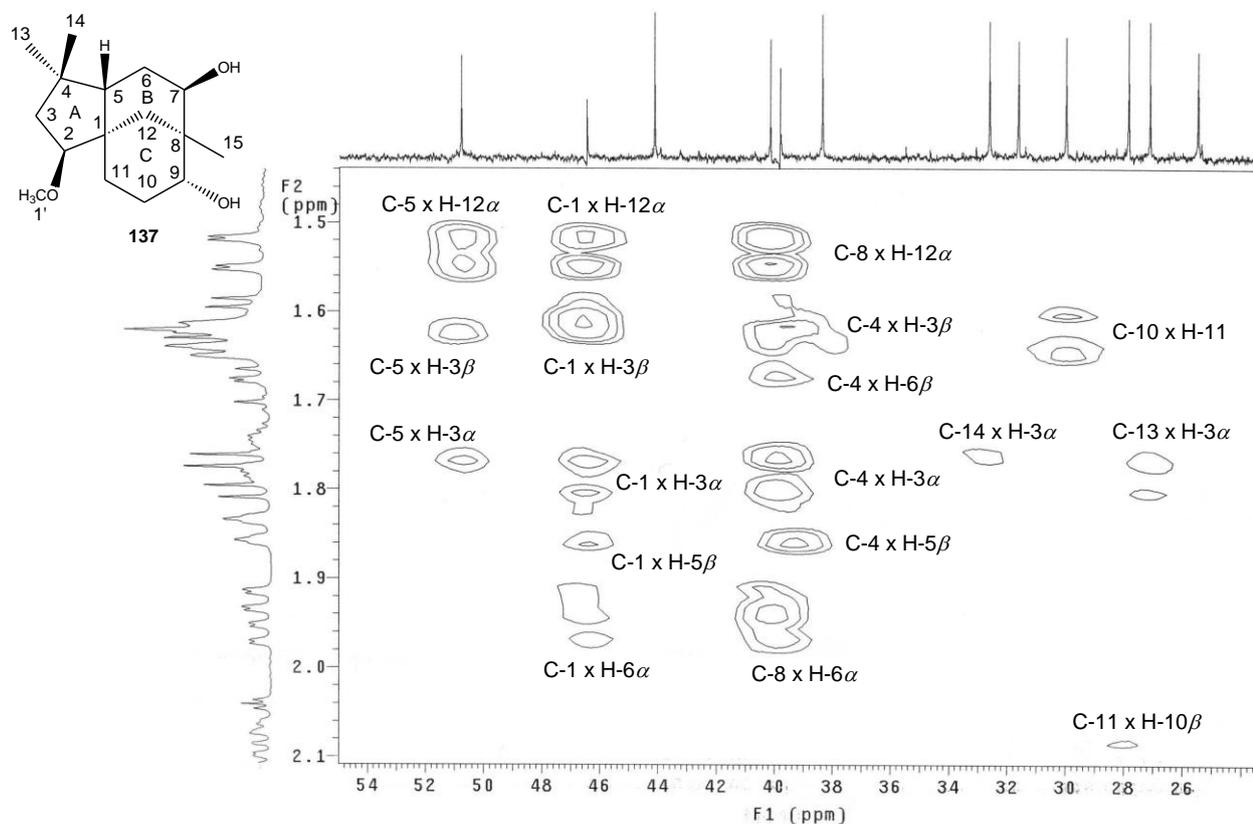


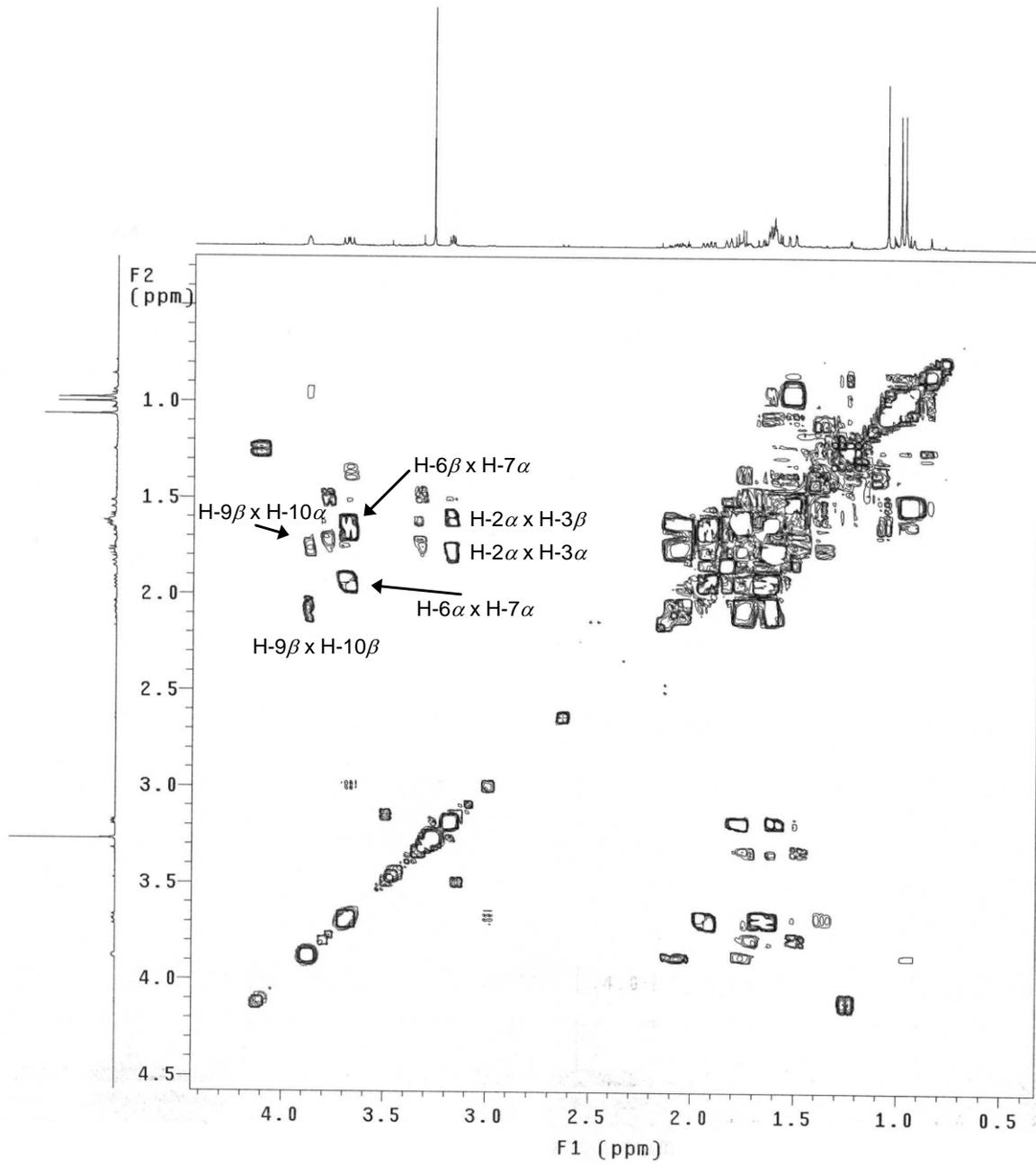
Figura 236 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol (137).



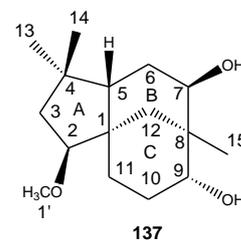
**Figura 237** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol (137). Expansão da região entre δ<sub>H</sub> 0,7 – 2,1.

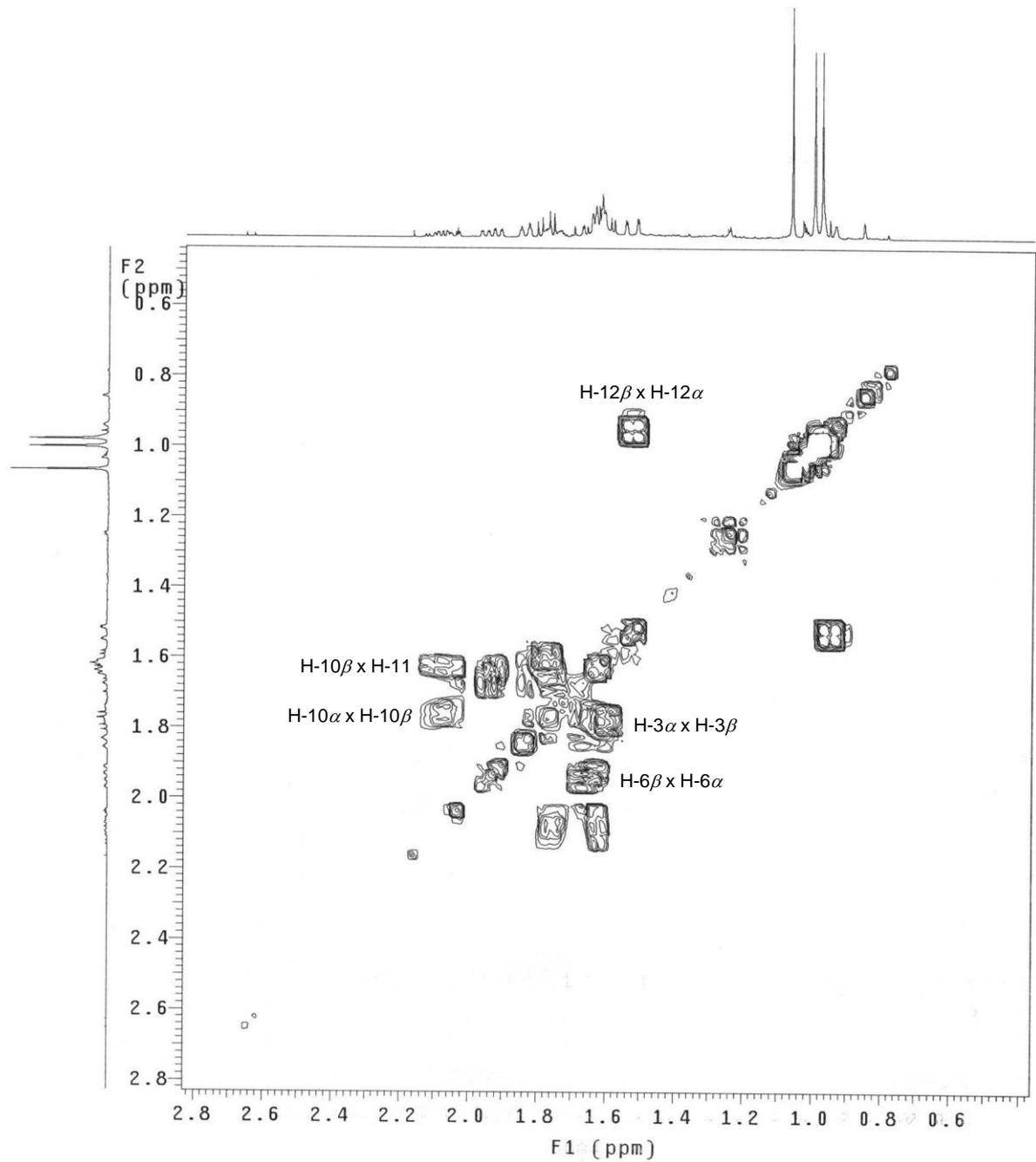


**Figura 238** – Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do 2β-metoxiclovan-7β, 9α-diol (137). Expansão da região entre δ<sub>H</sub> 1,4 – 2,1.

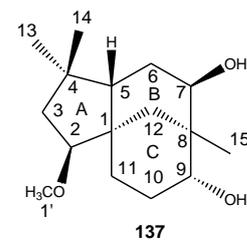


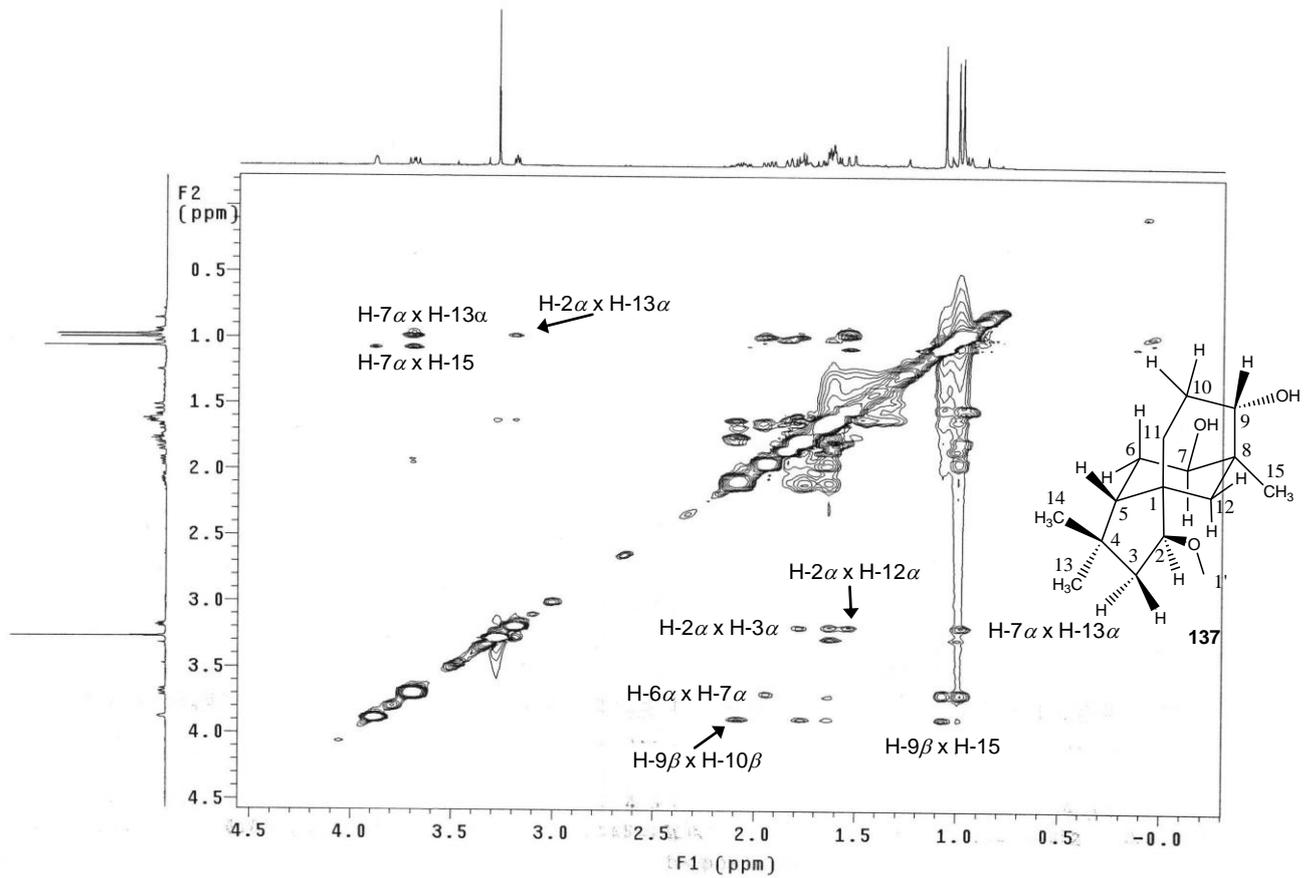
**Figura 239** – Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $7\beta$ ,  $9\alpha$ -diol (**137**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,5 – 4,5.



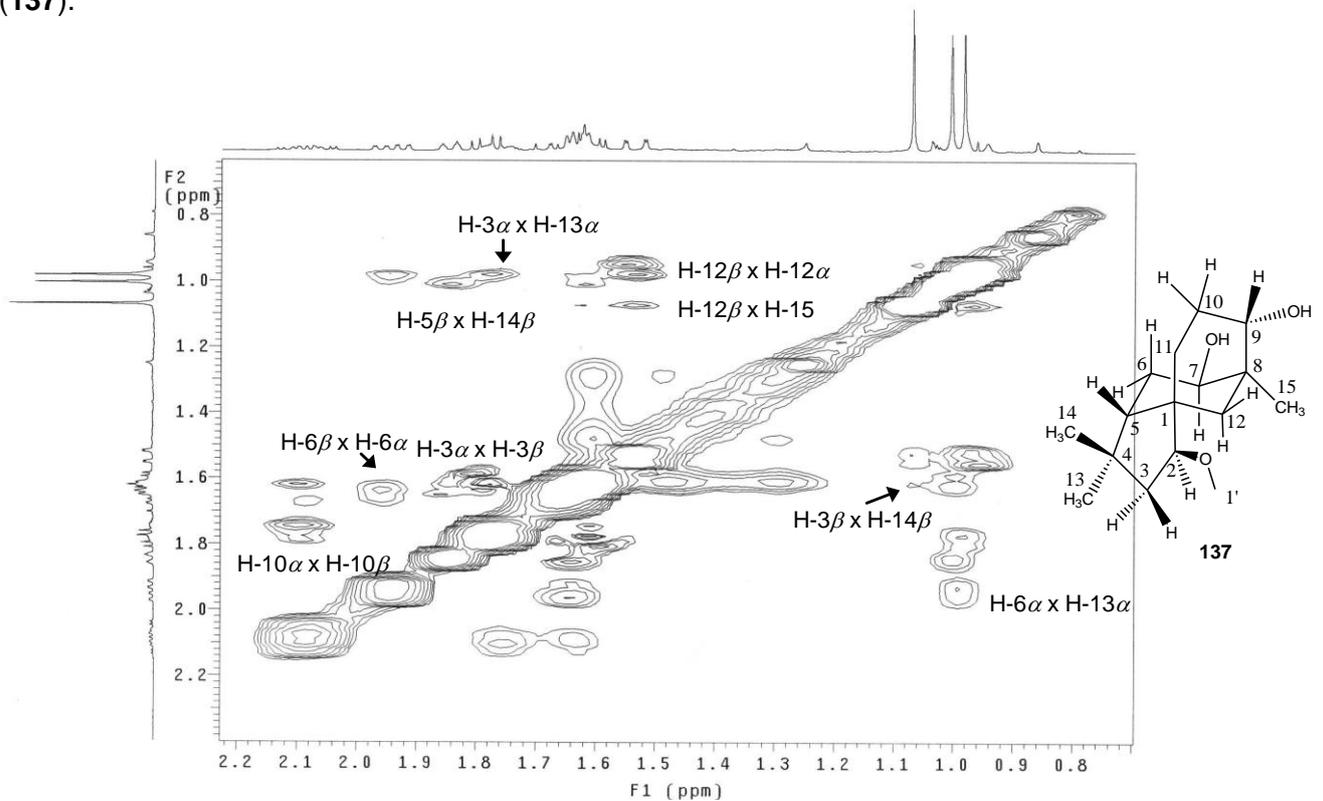


**Figura 240** – Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $7\beta$ ,  $9\alpha$ -diol (**137**). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,5 – 2,8.





**Figura 241** – Mapa de contornos NOESY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $7\beta$ ,  $9\alpha$ -diol (137).



**Figura 242** – Mapa de contornos NOESY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $2\beta$ -metoxiclovan- $7\beta$ ,  $9\alpha$ -diol (137). Expansão da região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,6 – 2,4.

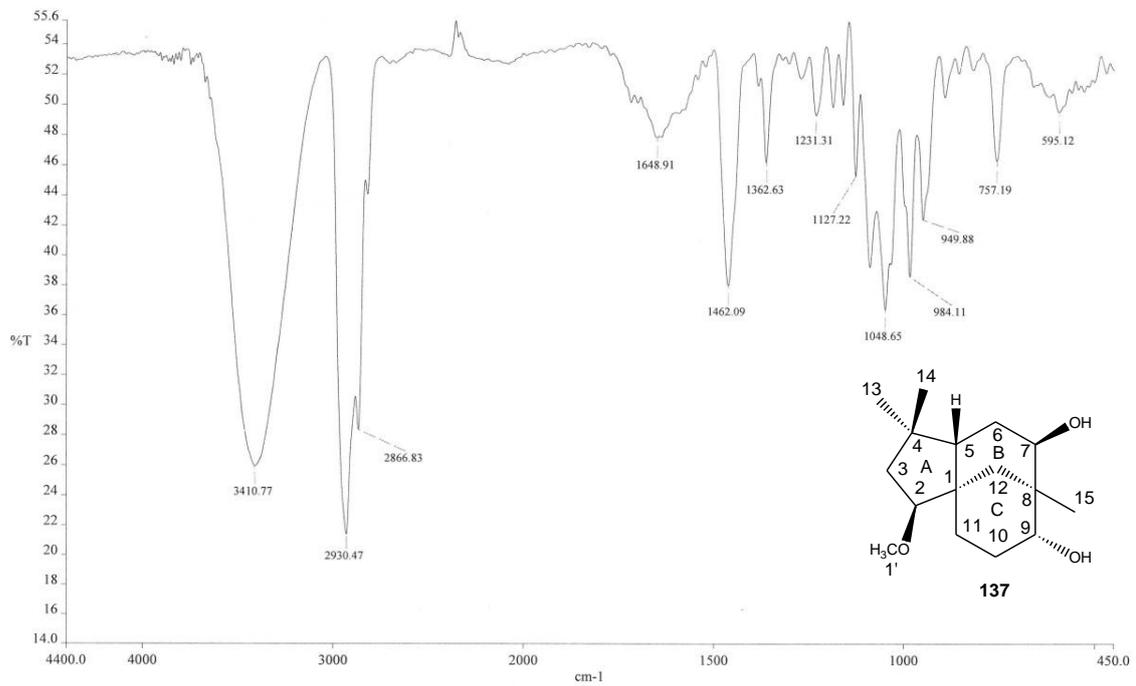


Figura 243 – Espectro na região do IV do 2 $\beta$ -metoxiclovan-7 $\beta$ , 9 $\alpha$ -diol (**137**) (KBr).

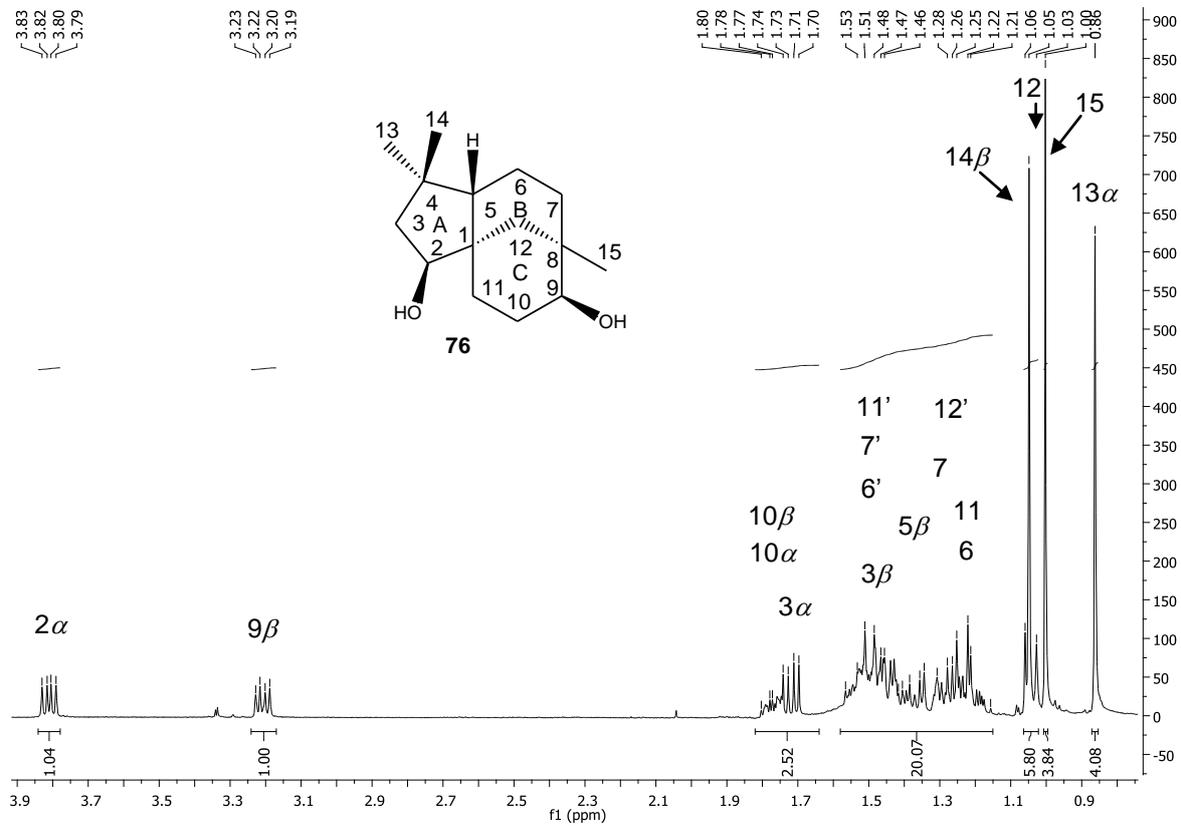


Figura 244 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol (**76**).

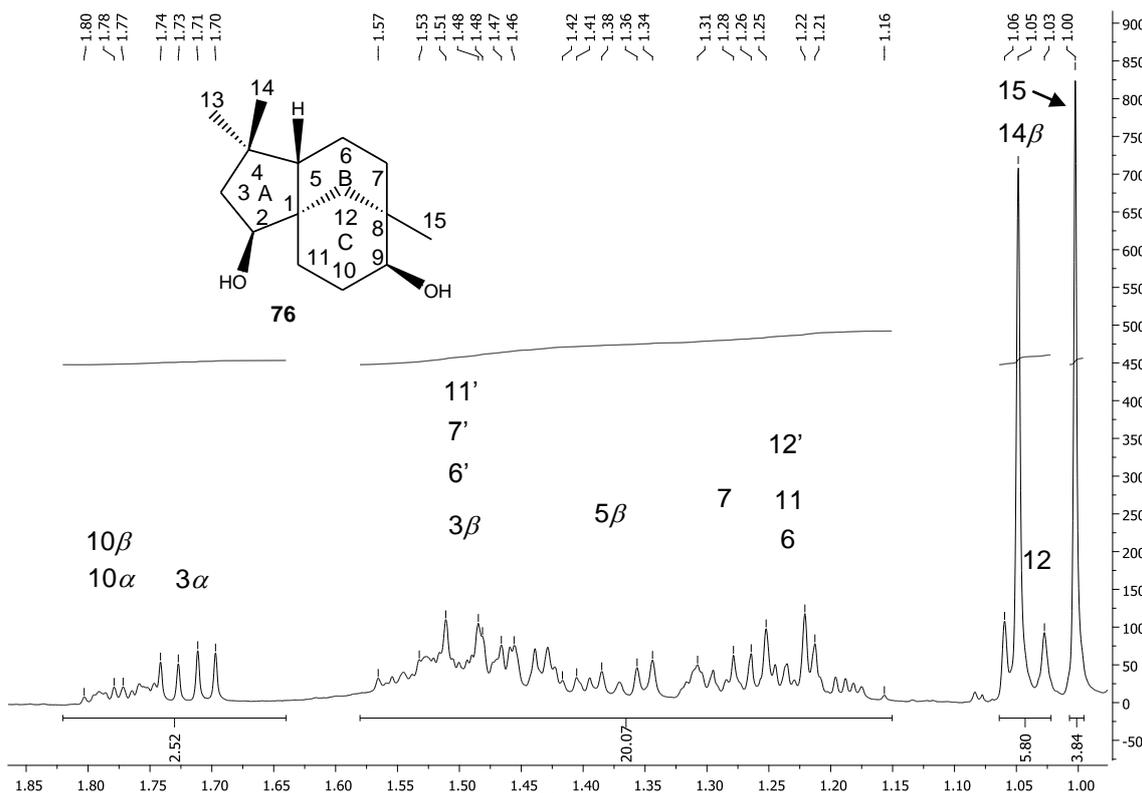


Figura 245 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do clovan-2β-9β-diol (76). Expansão da região entre δ<sub>H</sub> 1,00 – 1,85.

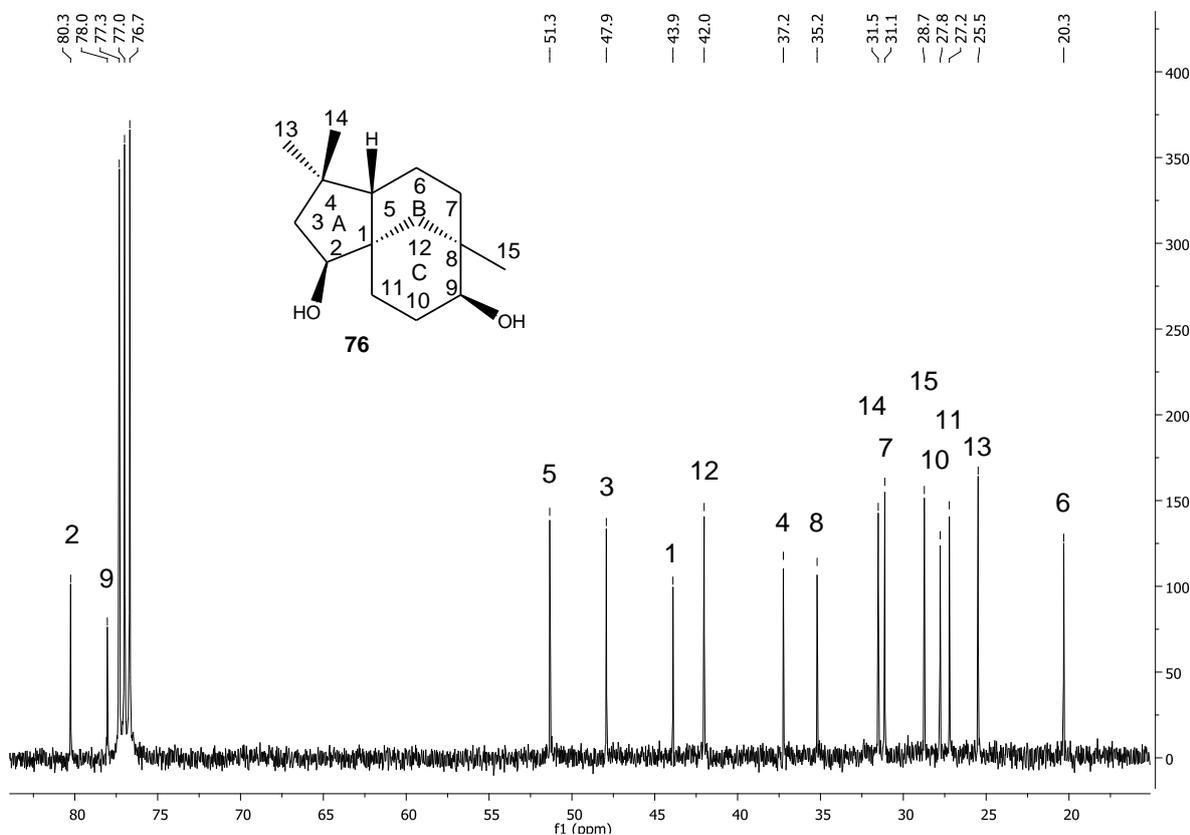


Figura 246 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do clovan-2β-9β-diol (76).

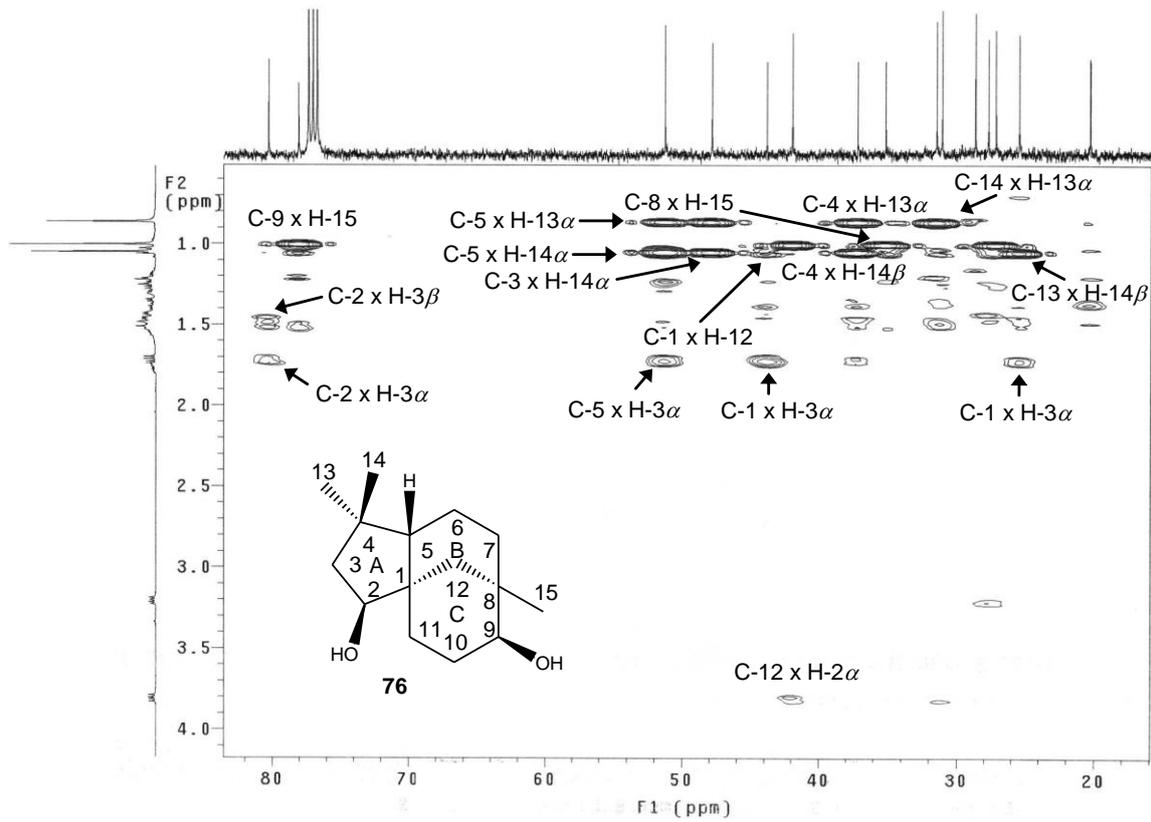


Figura 247 – Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol (**76**).

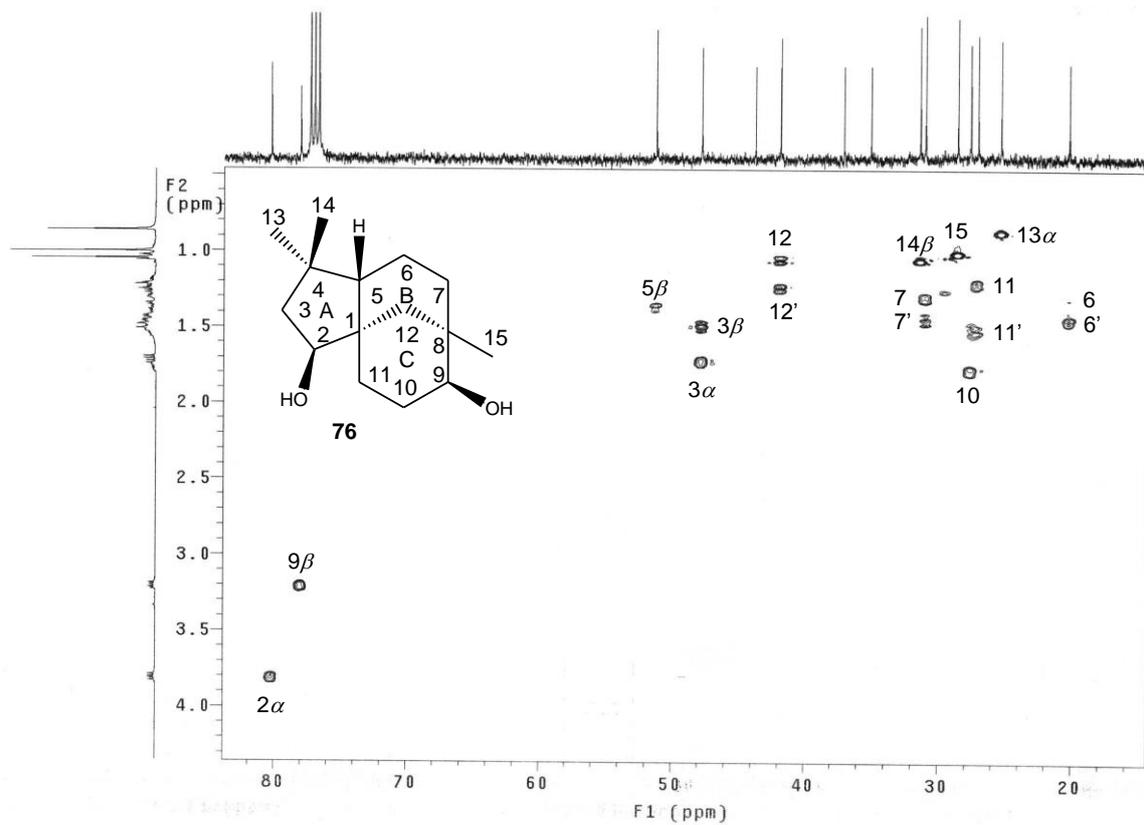


Figura 248 – Mapa de contornos HSQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol (**76**).

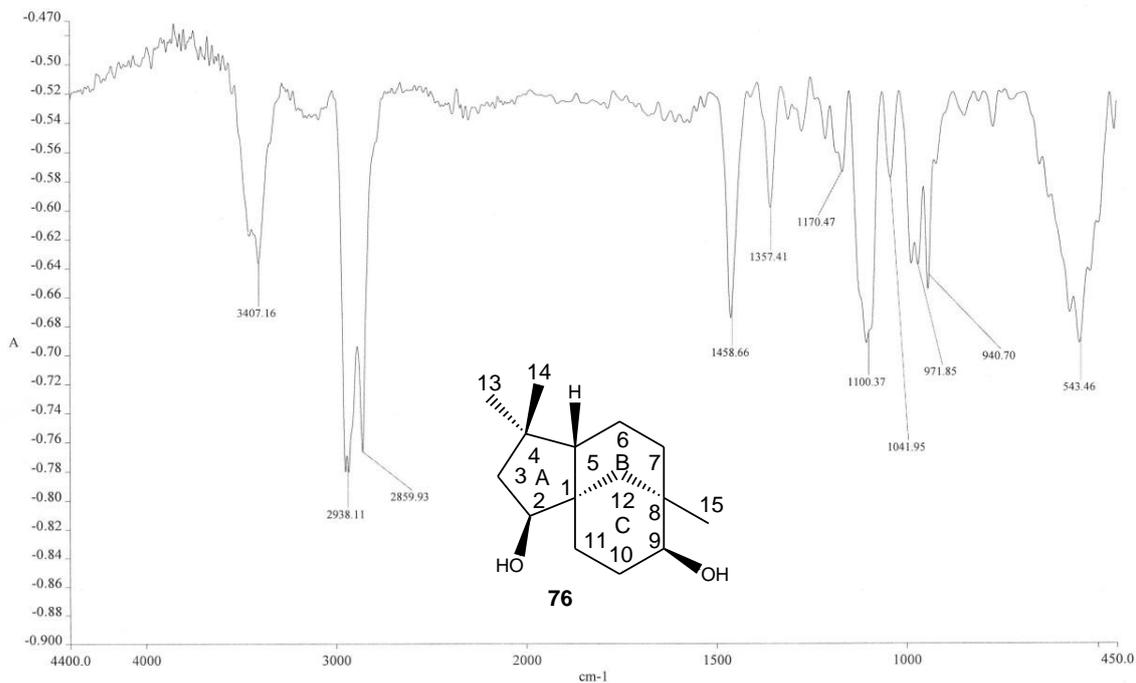


Figura 249 – Espectro na região do IV do clovan-2β-9β-diol (**76**) (KBr).

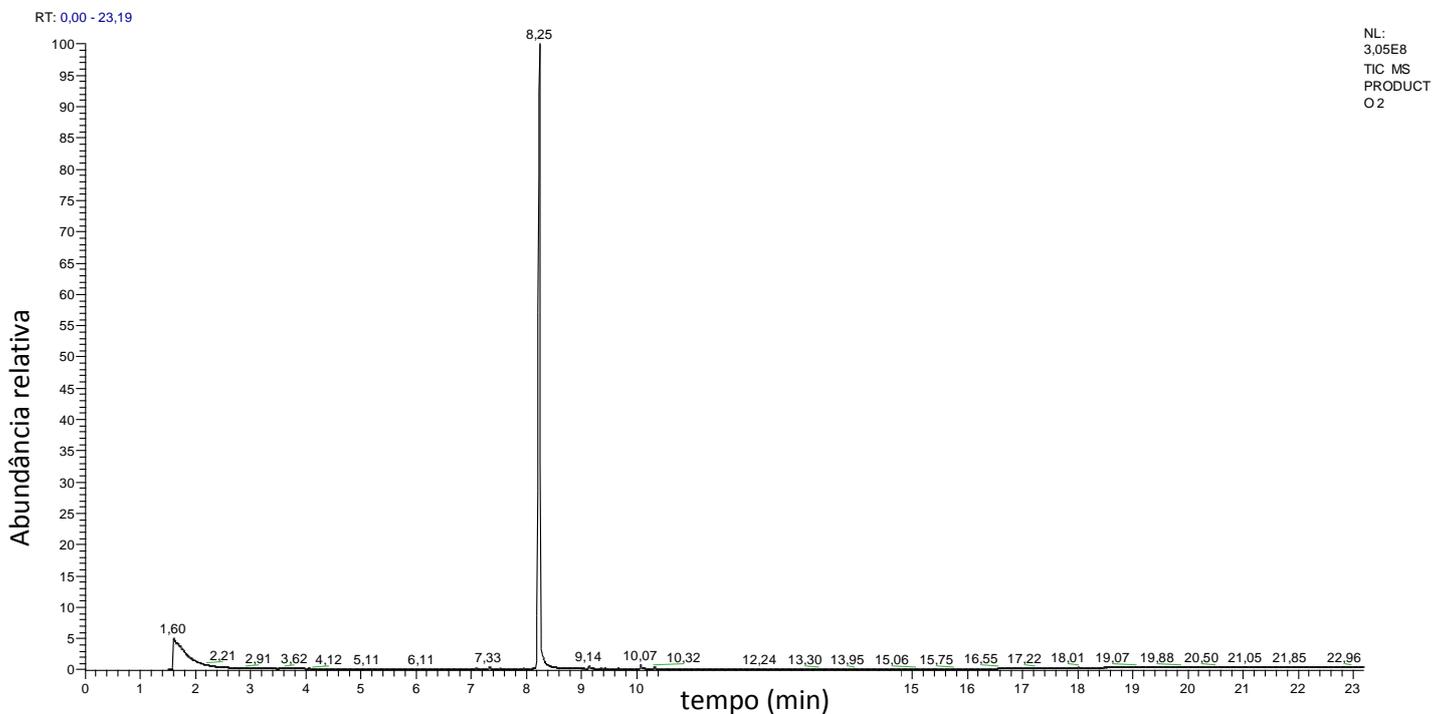


Figura 250 – Cromatograma obtido para o clovan-2β-9β-diol (**76**), utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>.

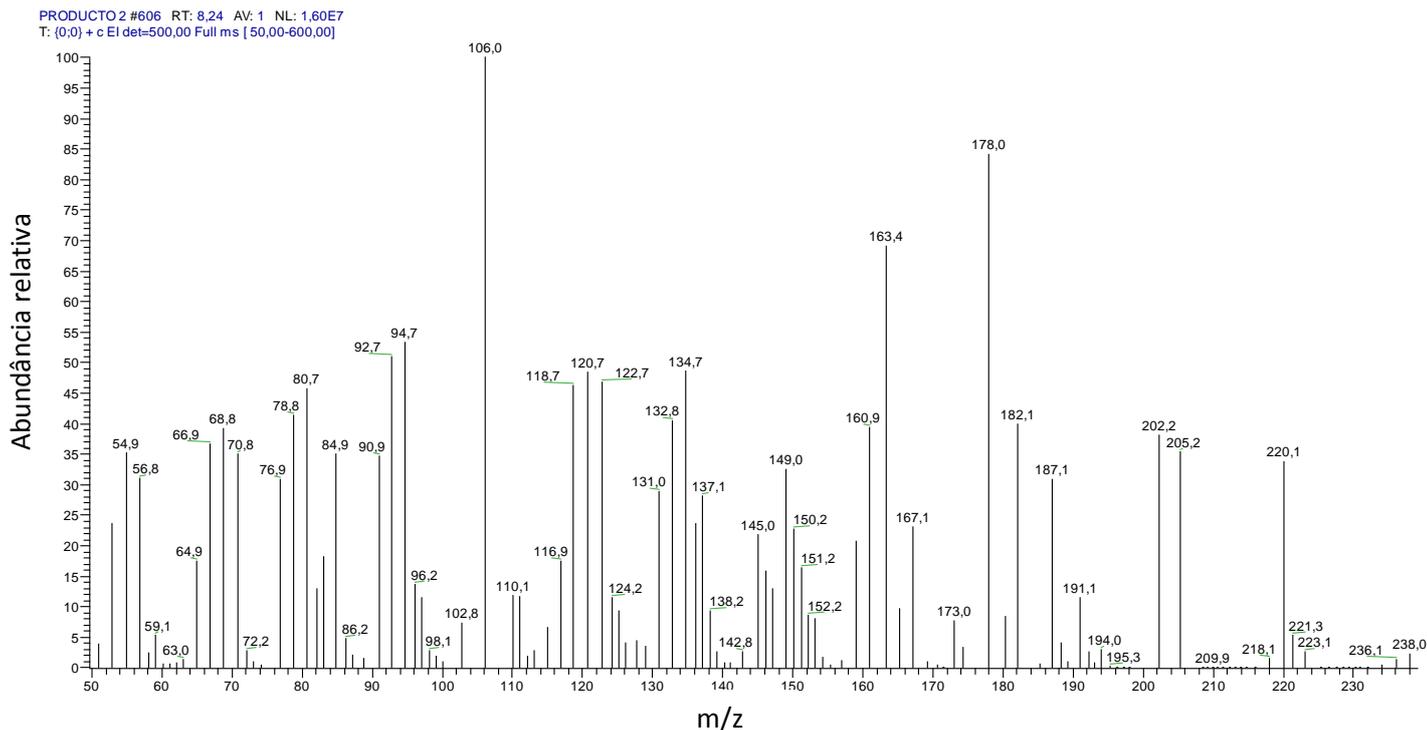


Figura 251 – Espectro de massas obtido para a tração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,25 min no cromatograma do clovan-2 $\beta$ -9 $\beta$ -diol (76).

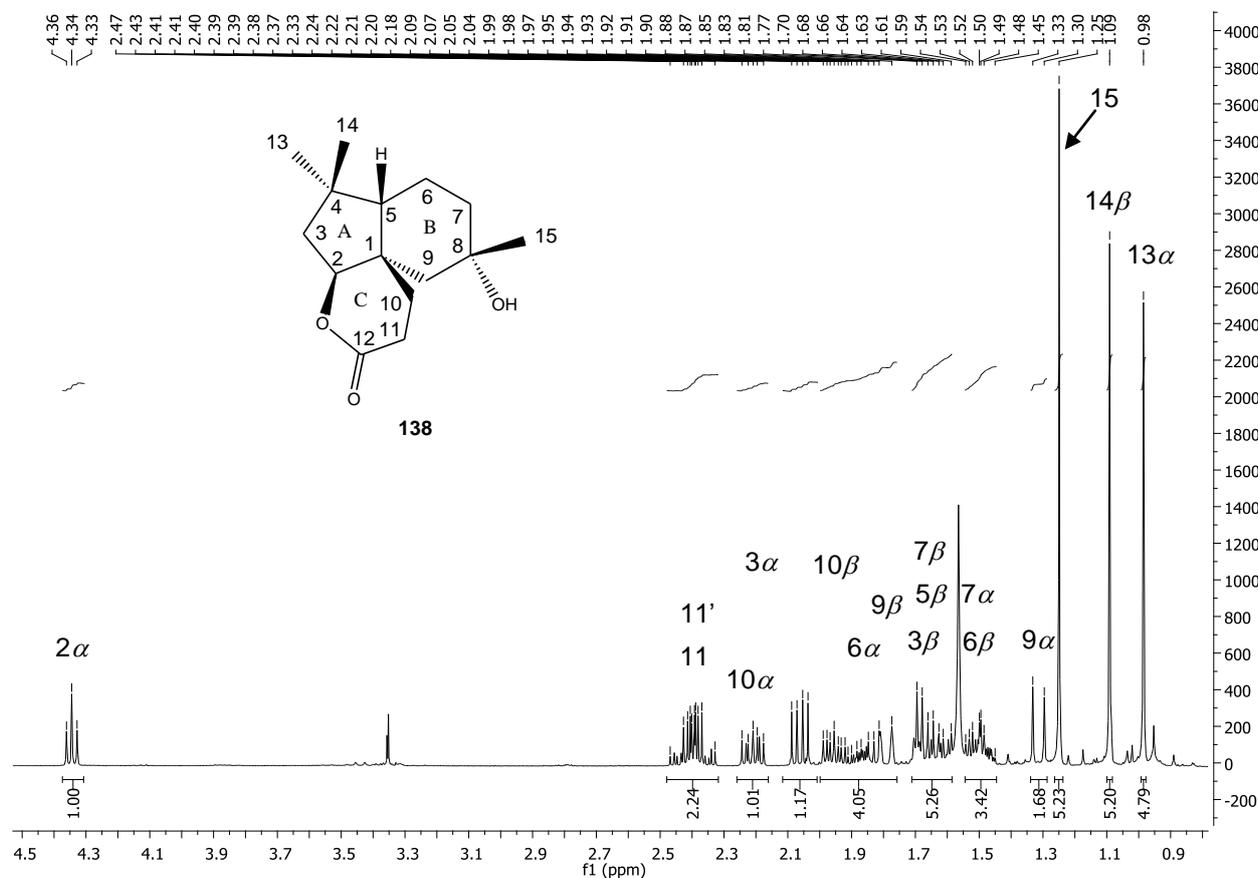


Figura 252 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do rufelclovano A (138).

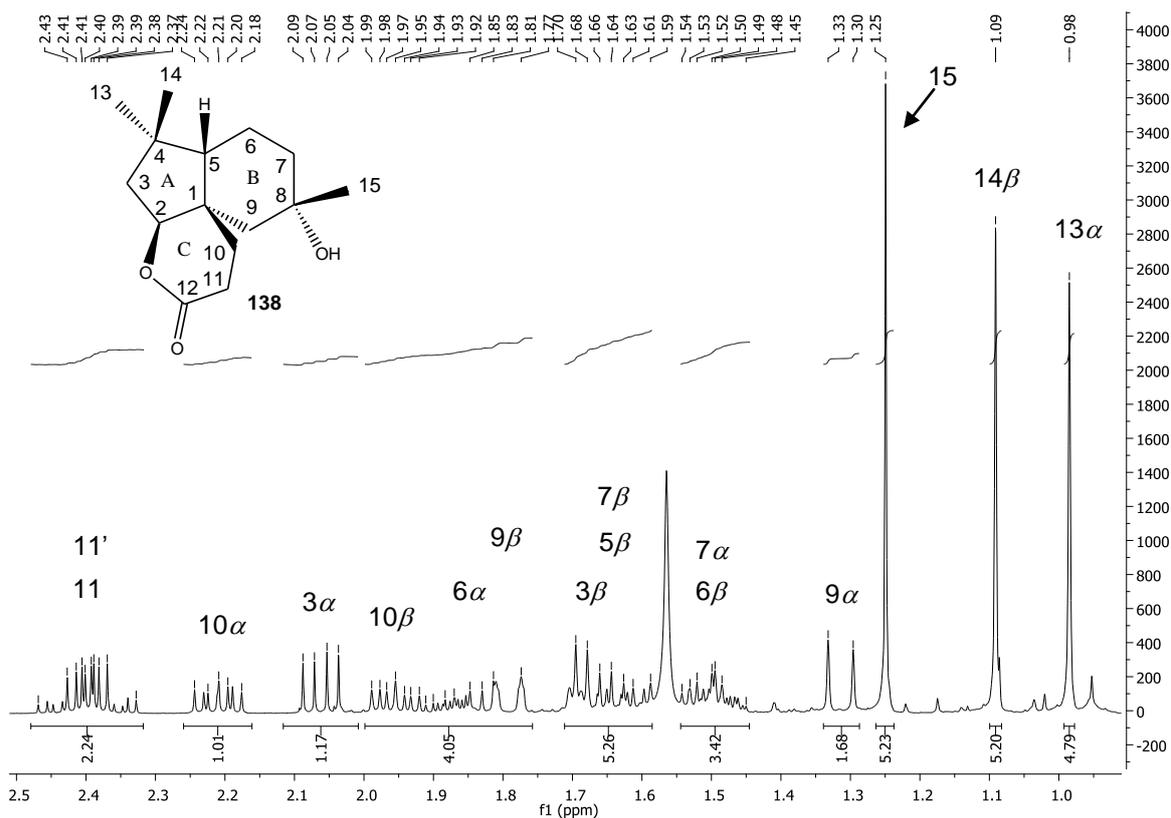


Figura 253 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do rumfelclovano A (138).

Expansão da região entre δ<sub>H</sub> 0,9 – 2,5.

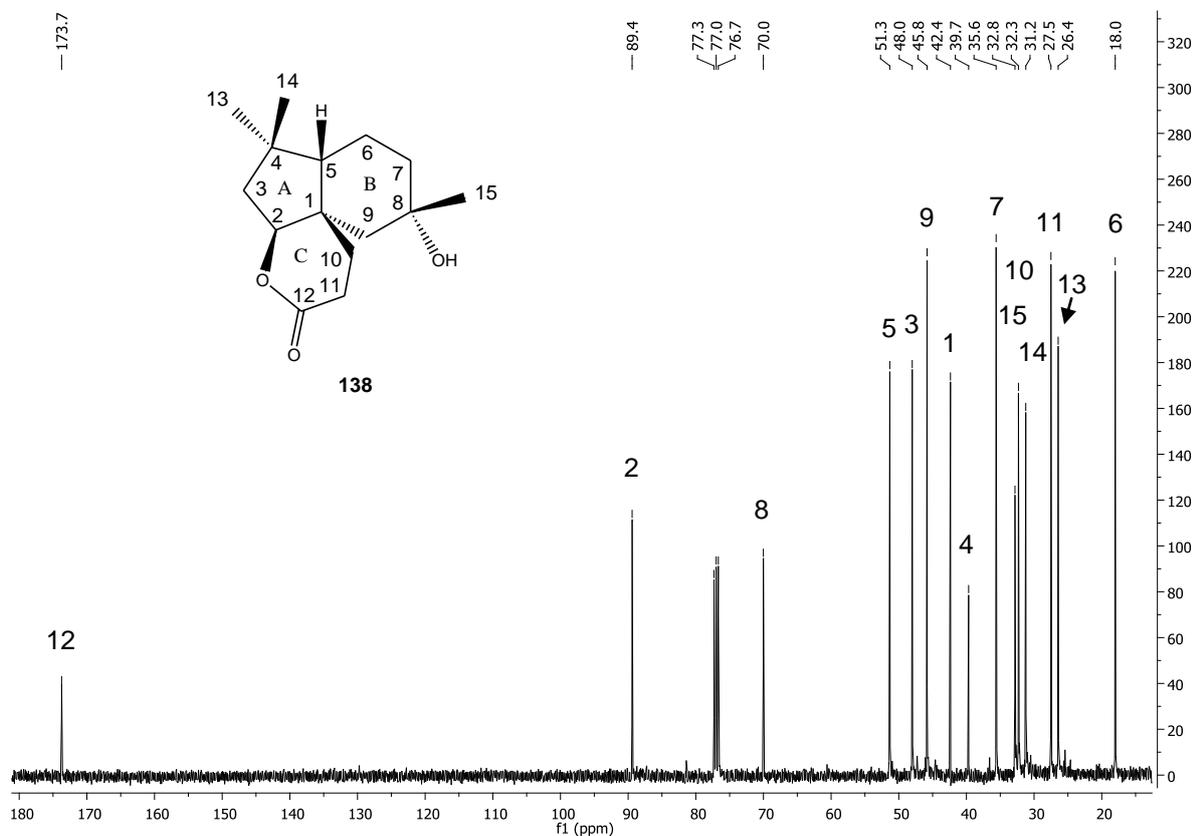


Figura 254 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do rumfelclovano A (138).

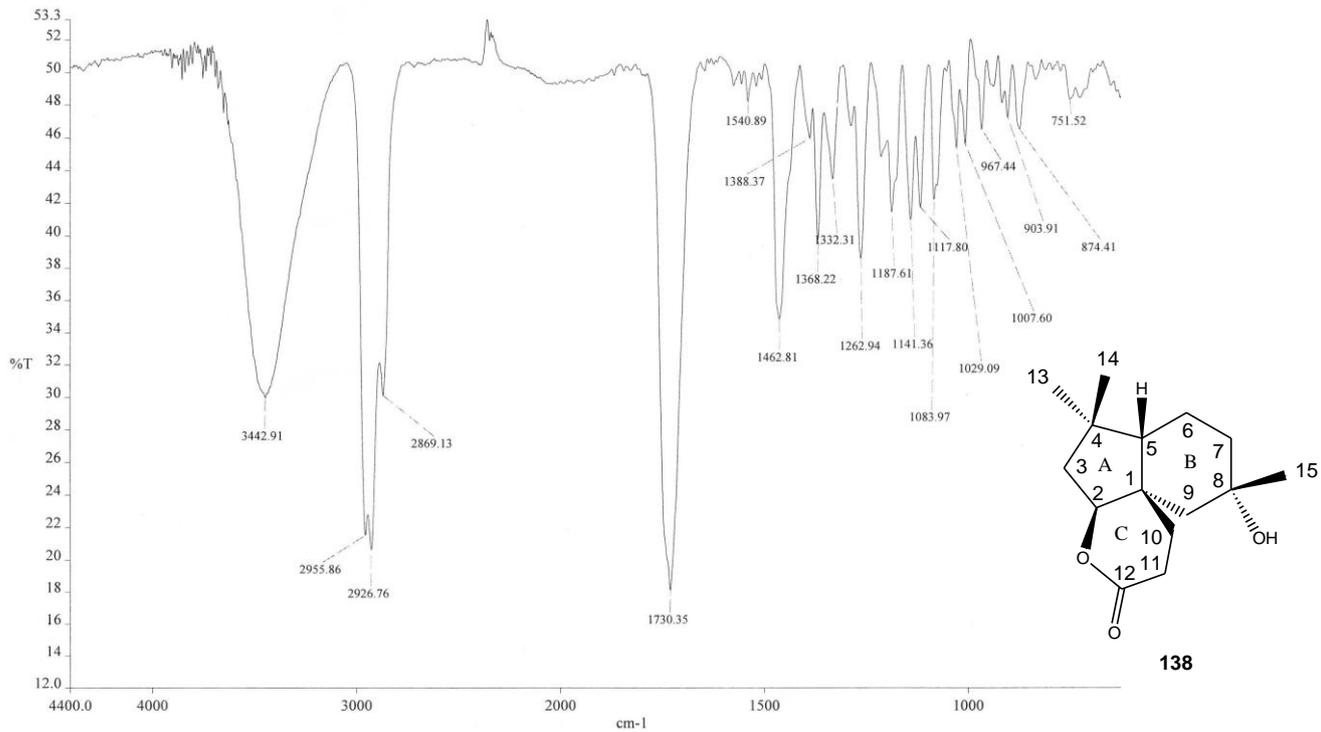


Figura 255 – Espectro na região do IV do rumfelclovano A (**138**) (KBr).

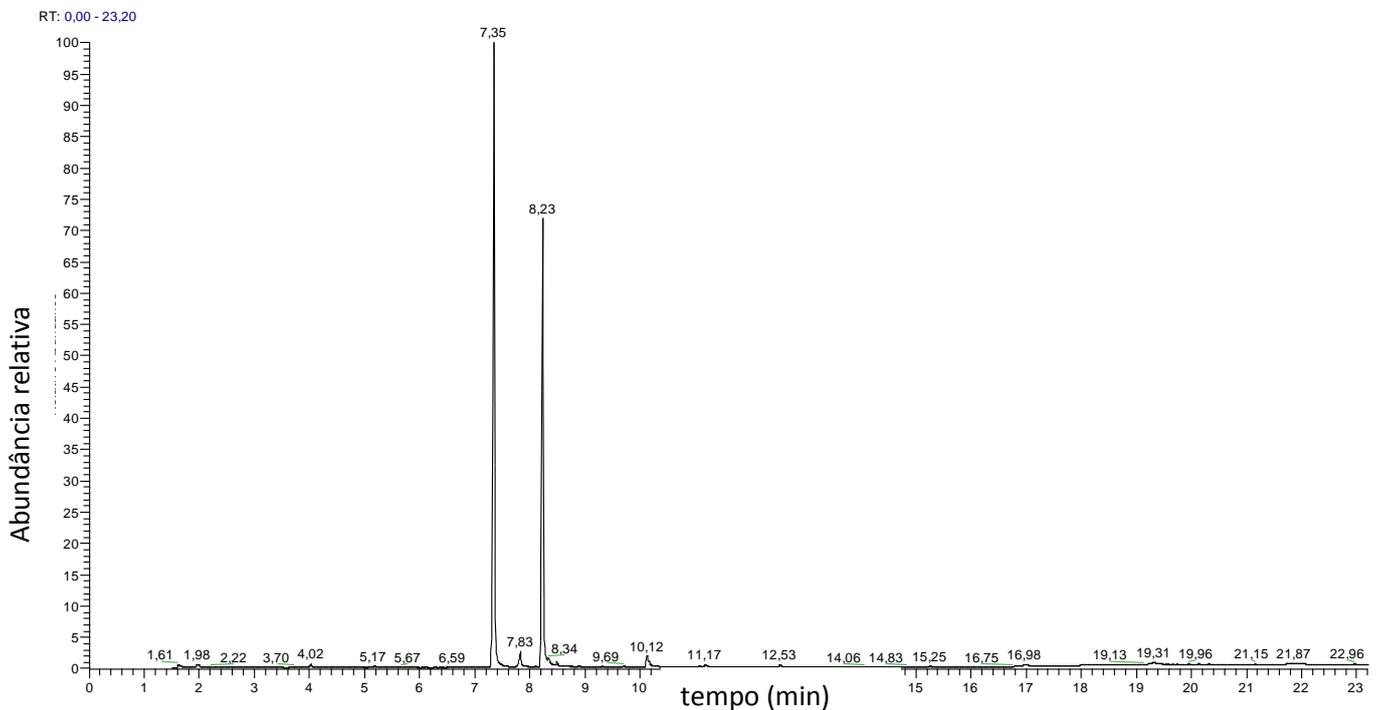
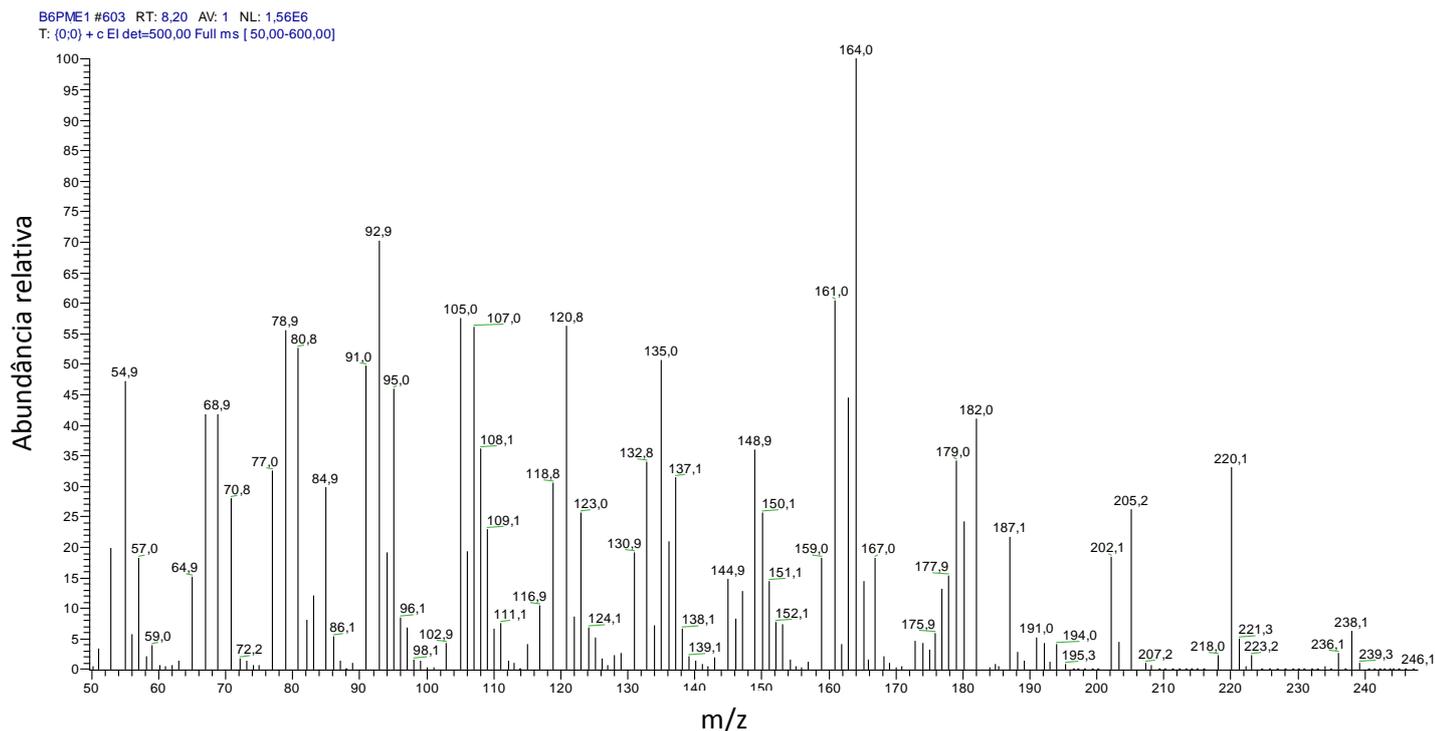
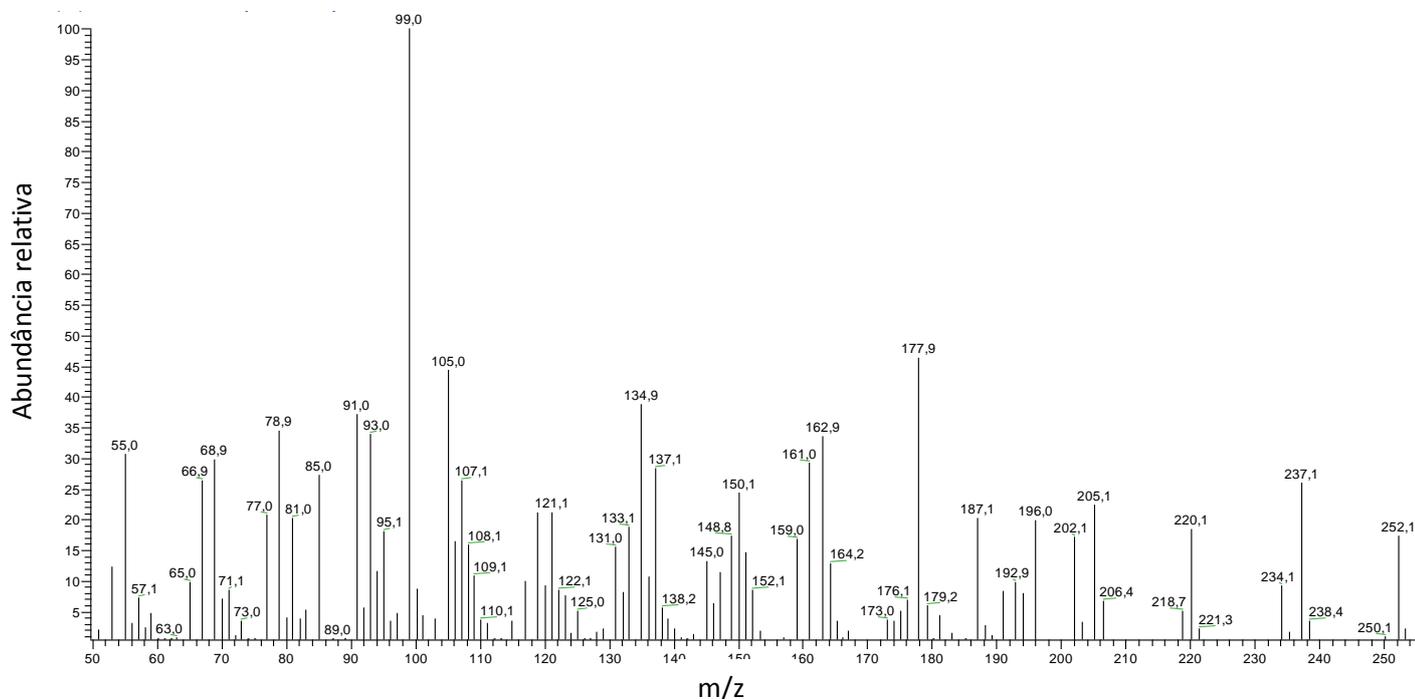


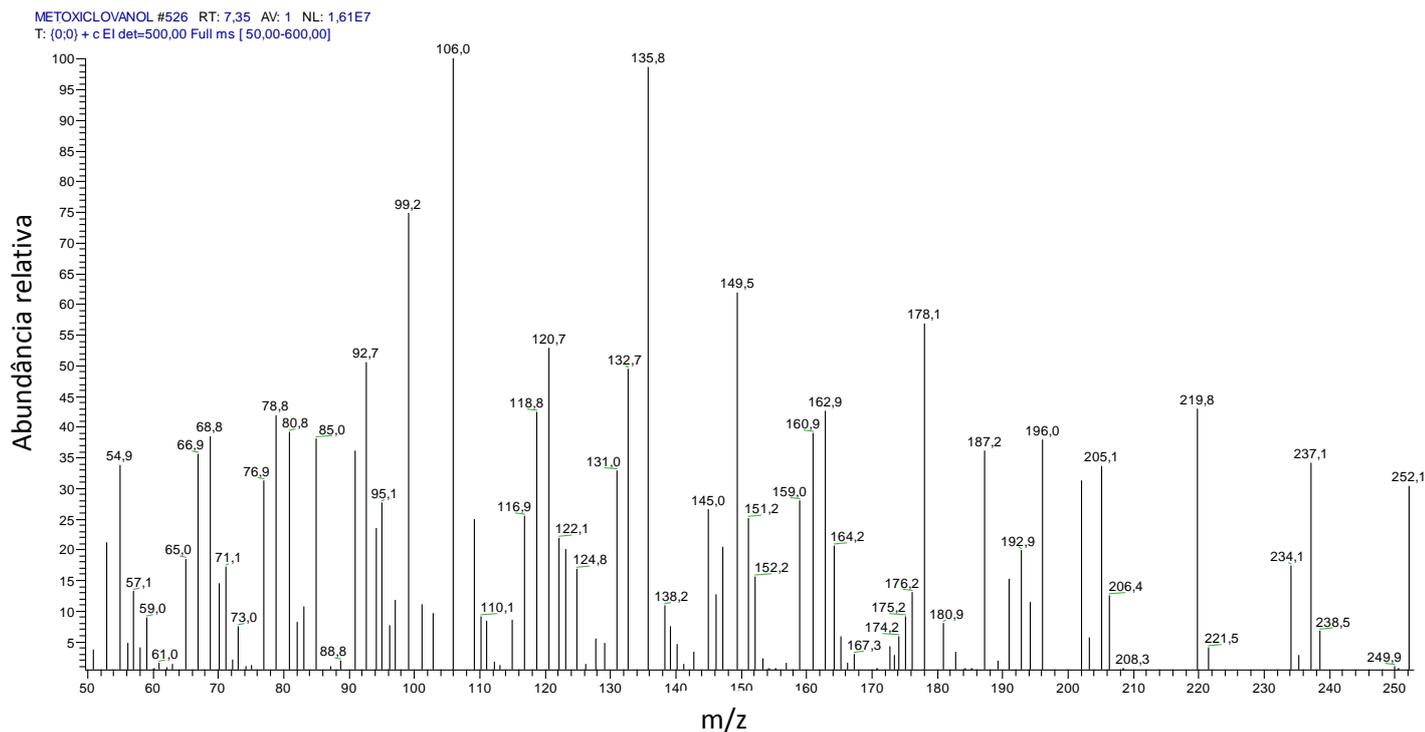
Figura 256 – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com *P. minioluteum* com 5 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>.



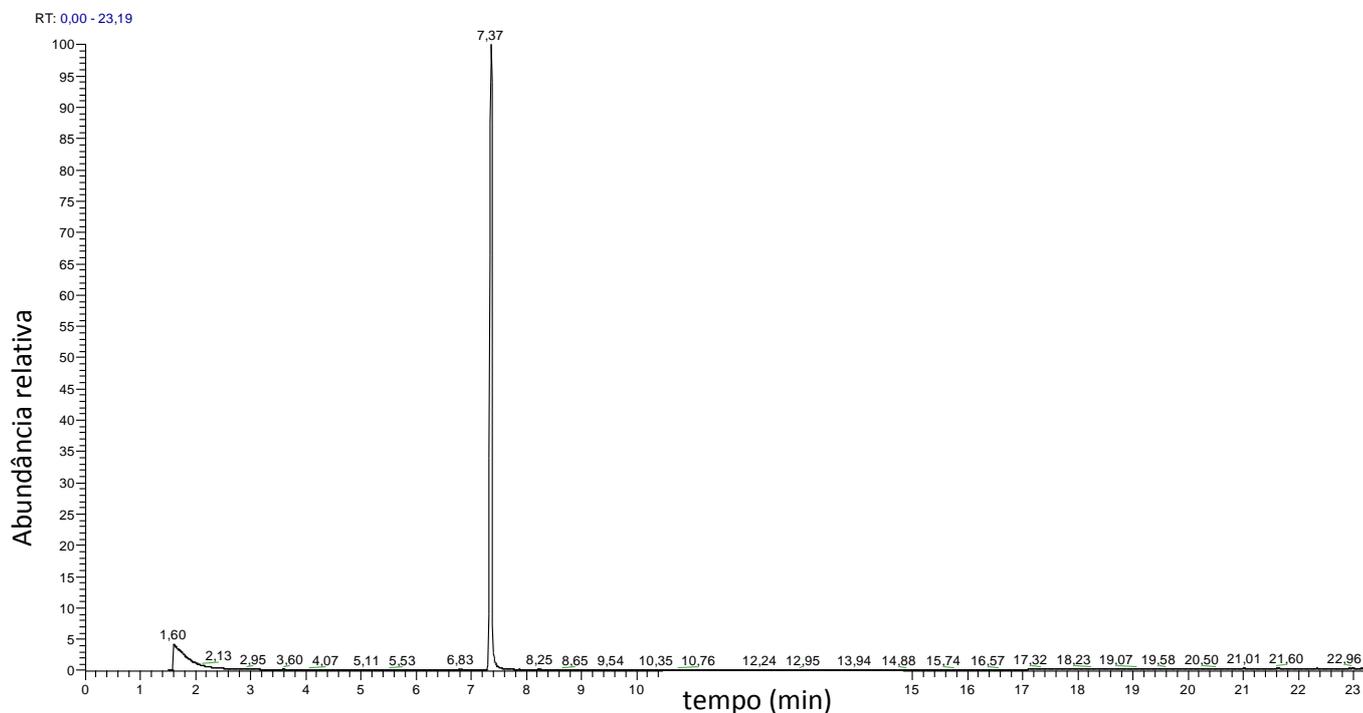
**Figura 257** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,23 min no cromatograma do extrato da biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com *P. minioluteum* com 5 dias.



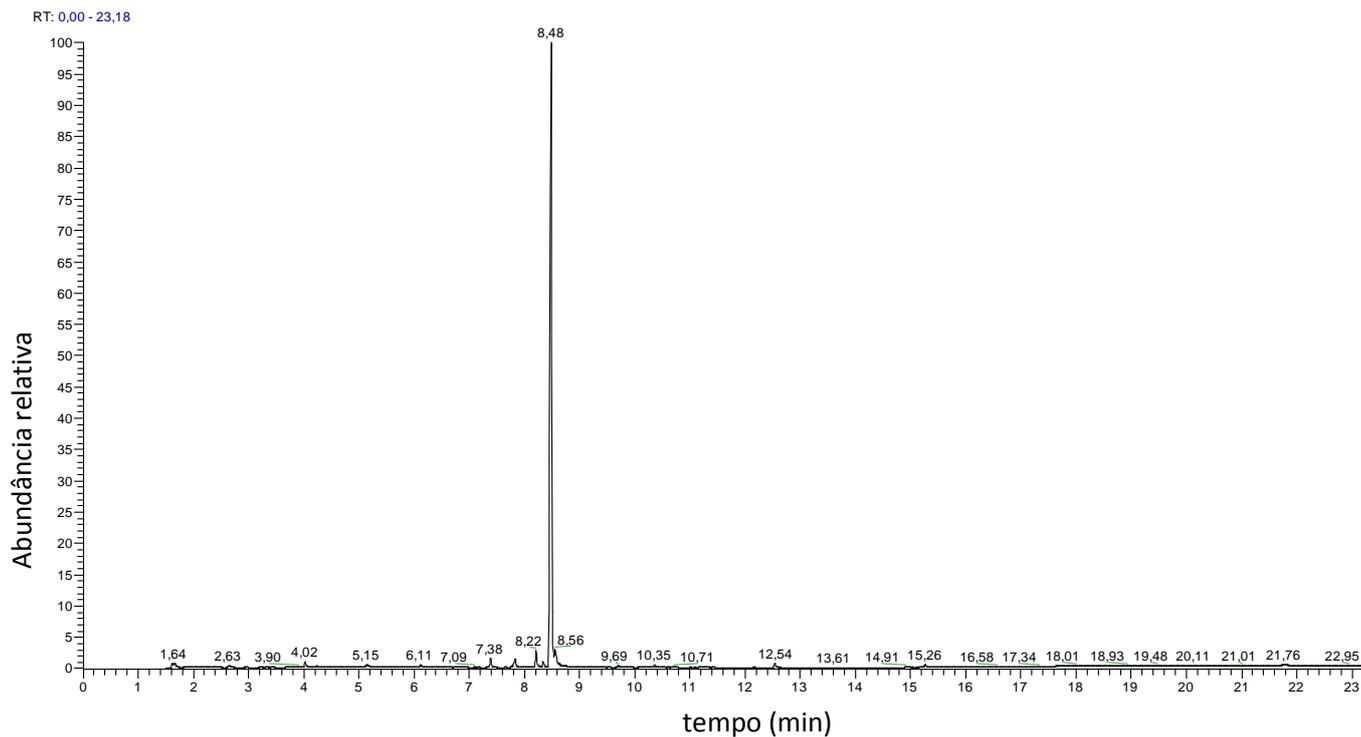
**Figura 258** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 7,35 min no cromatograma do extrato da biotransformação do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**) com *P. minioluteum* com 5 dias.



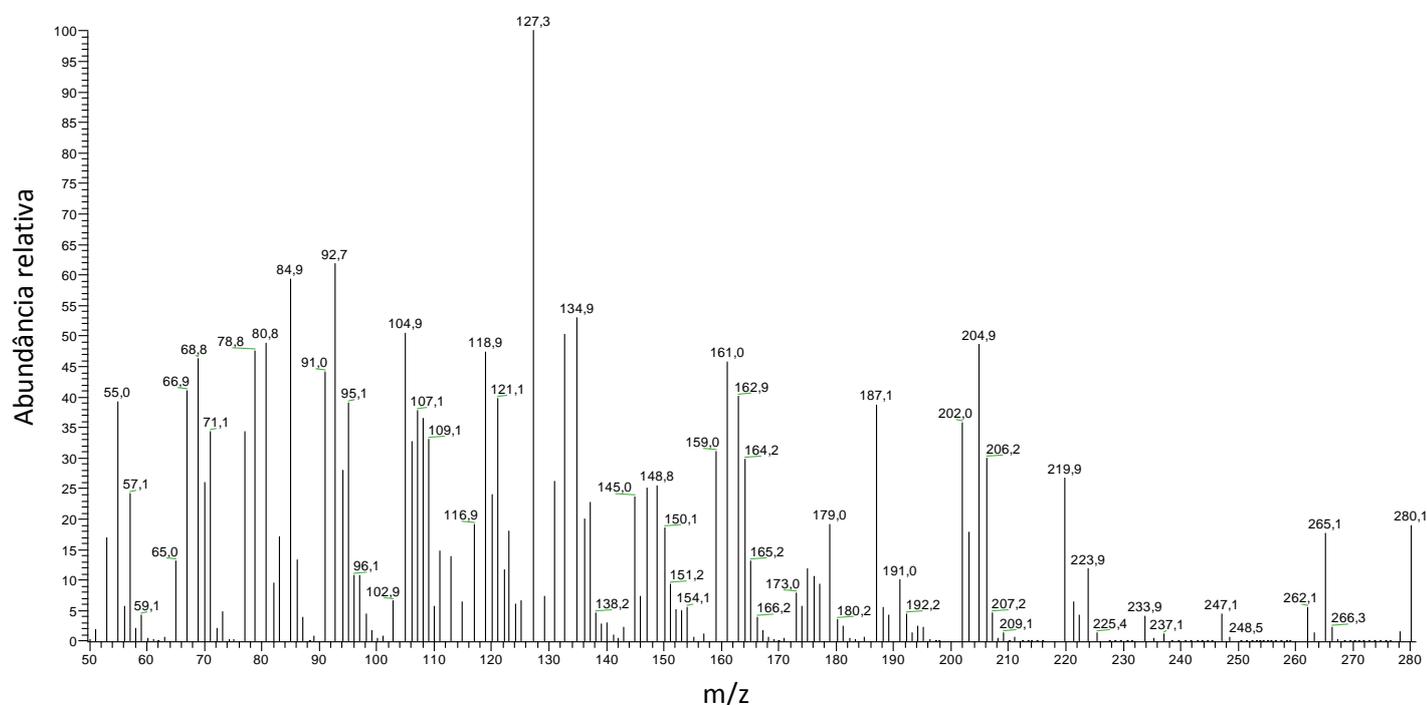
**Figura 259** – Espectro de massas obtido para a tração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 7,37 min no cromatograma do 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**).



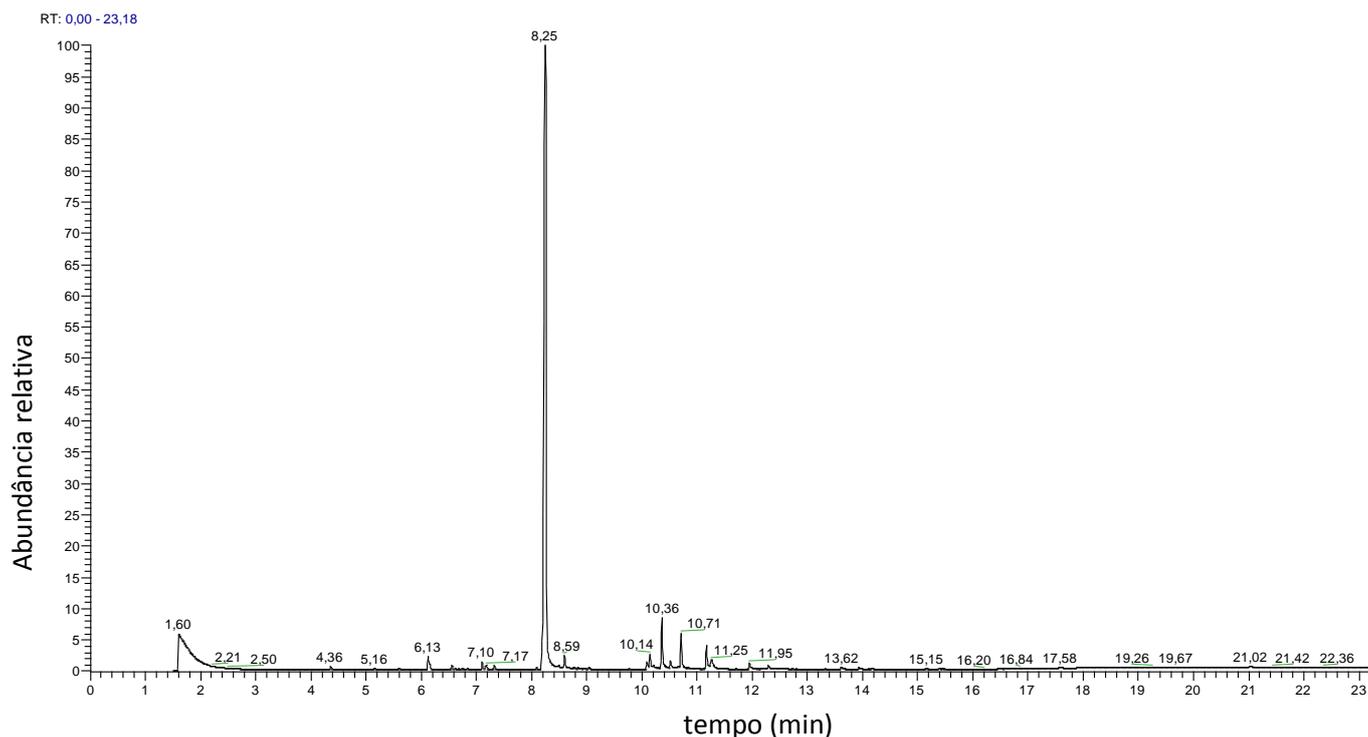
**Figura 260** – Cromatograma obtido por CG-EM para a o 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**73**), utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>.



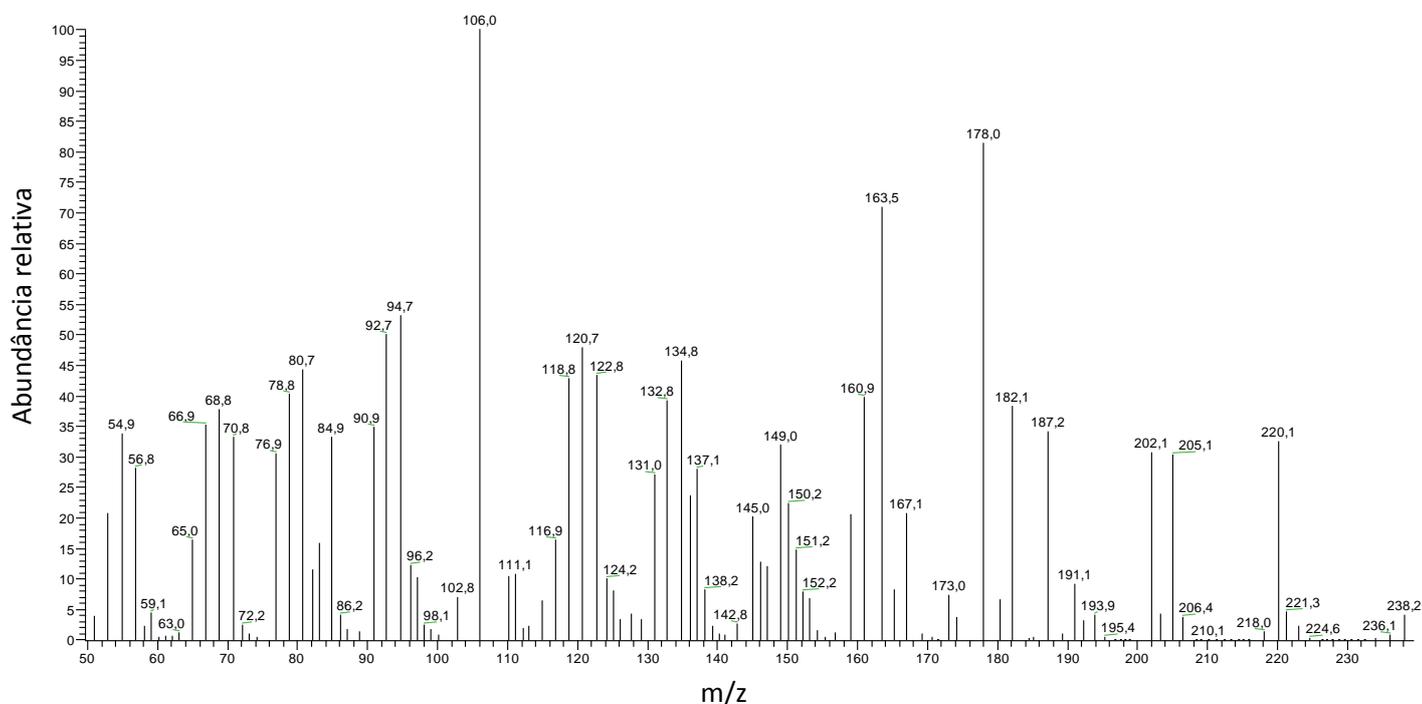
**Figura 261** – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do 2 $\beta$ -propoxiclován-9 $\alpha$ -ol (**127**) com *P. minioluteum* com 5 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>.



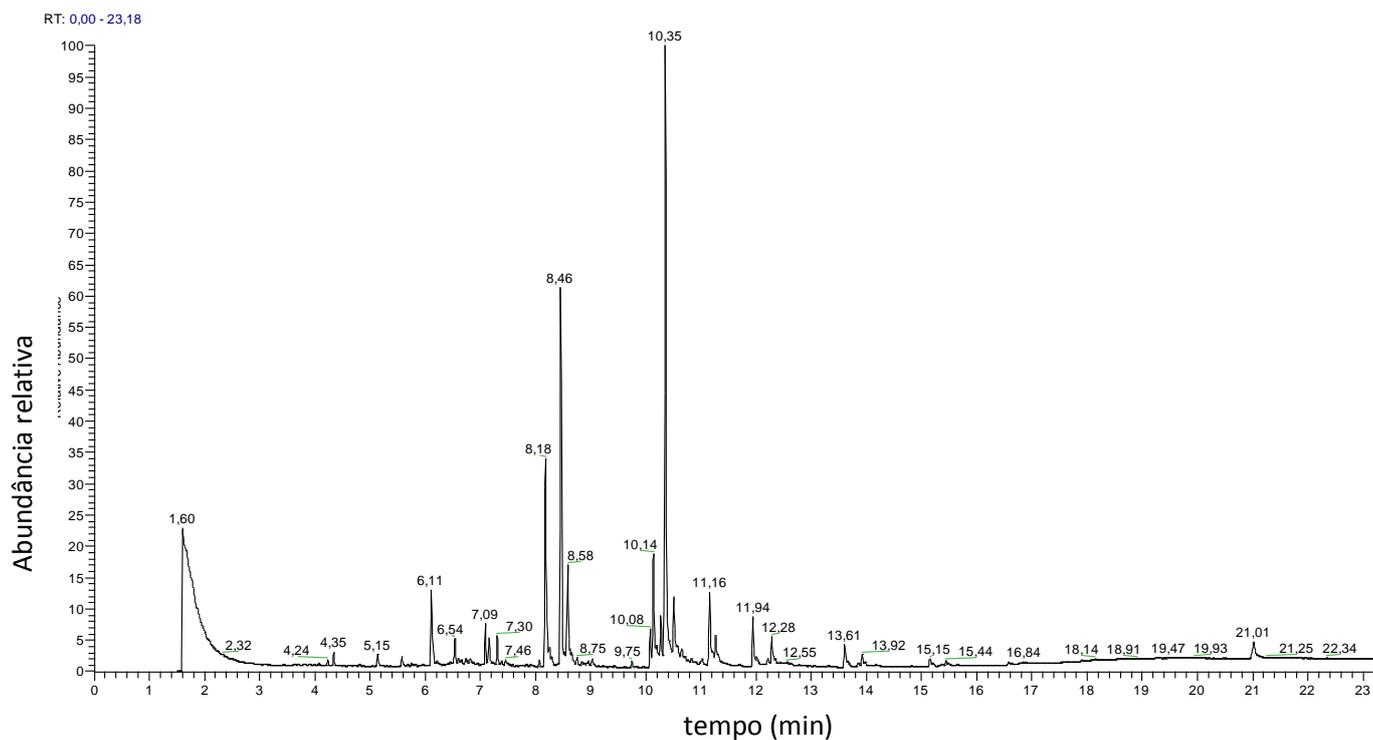
**Figura 262** – Espectro de massas obtido para a tração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,48 min no cromatograma do extrato da biotransformação do 2 $\beta$ -propoxiclován-9 $\alpha$ -ol (**127**) com *P. minioluteum* por 5 dias.



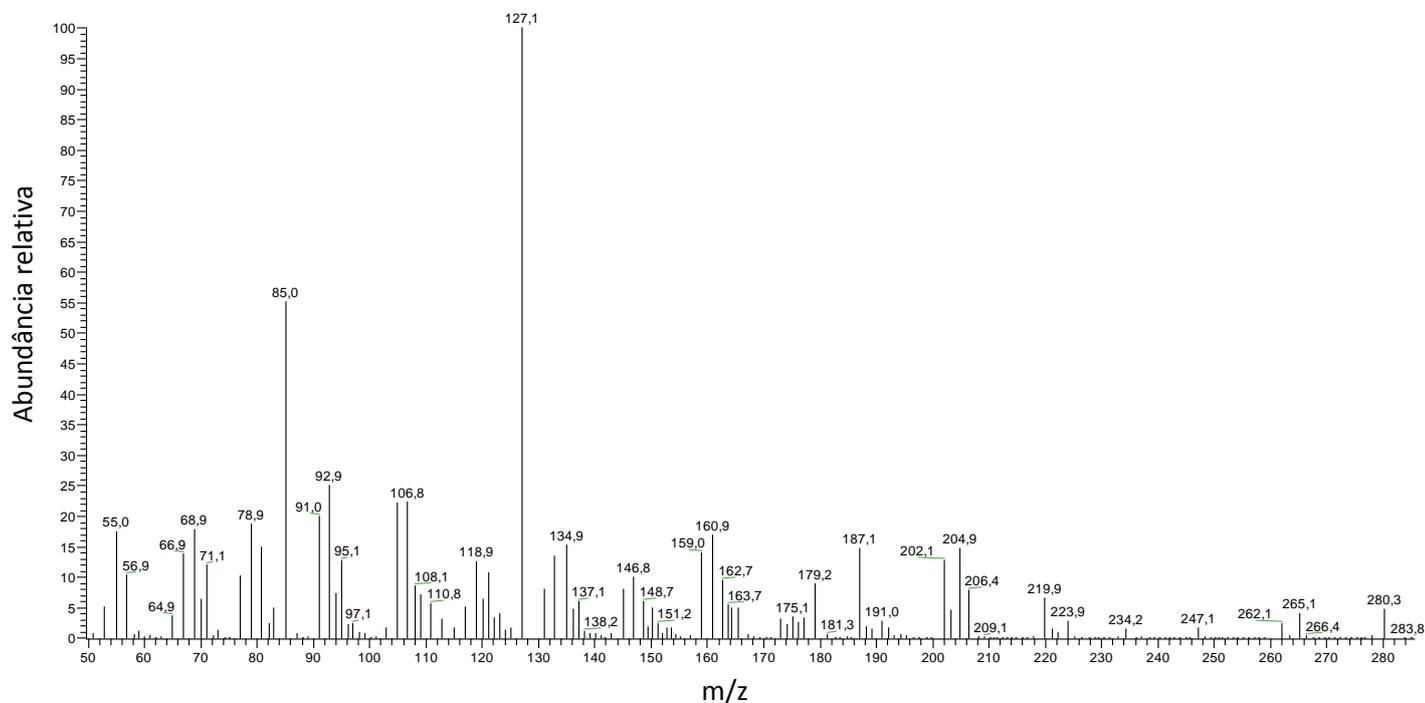
**Figura 263** – Cromatograma obtido por CG-EM para a combinação de frações obtidas com eluente hexano/acetato de etila 65:35 e 60:40 na biotransformação do  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**127**) com *P. minioluteum* com 10 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .



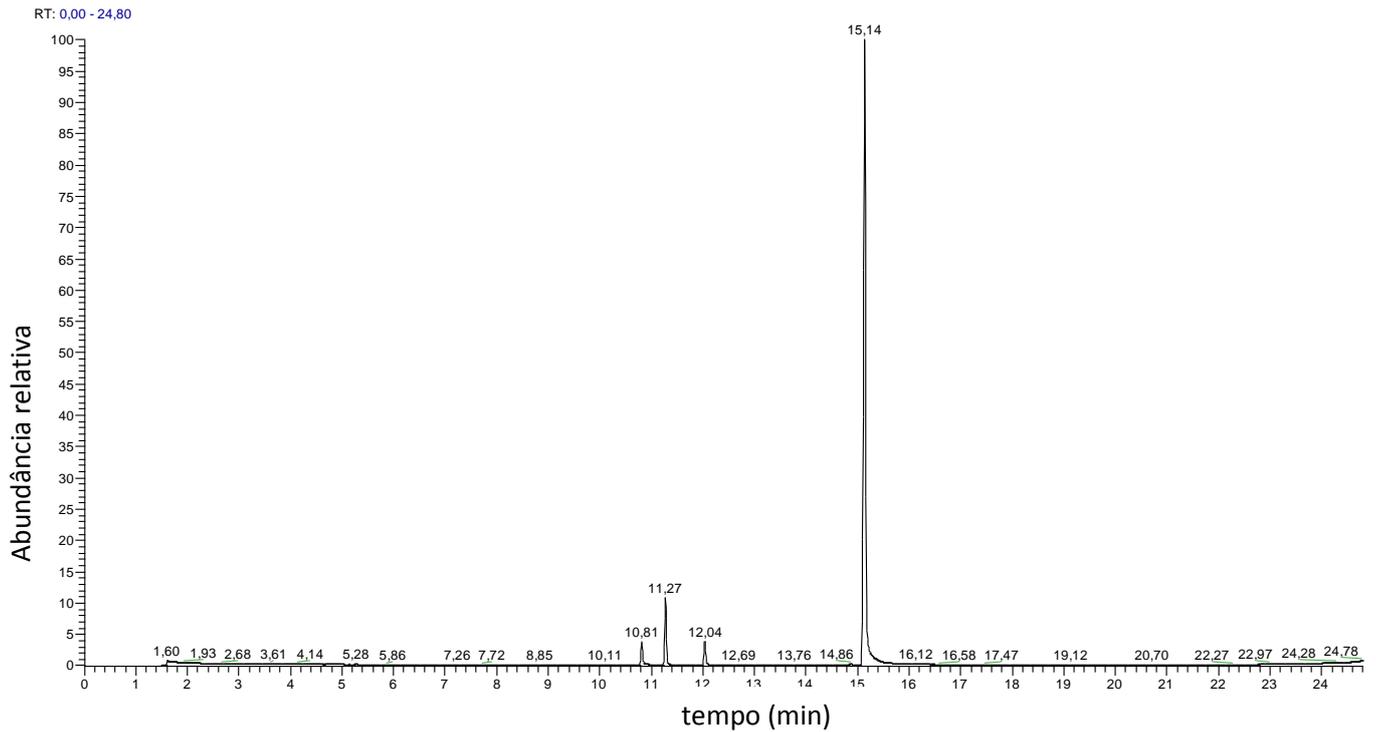
**Figura 264** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,25 min no cromatograma da combinação de frações obtidas com eluente hexano/acetato de etila 65:35 e 60:40 na biotransformação do  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**127**) com *P. minioluteum* com 10 dias.



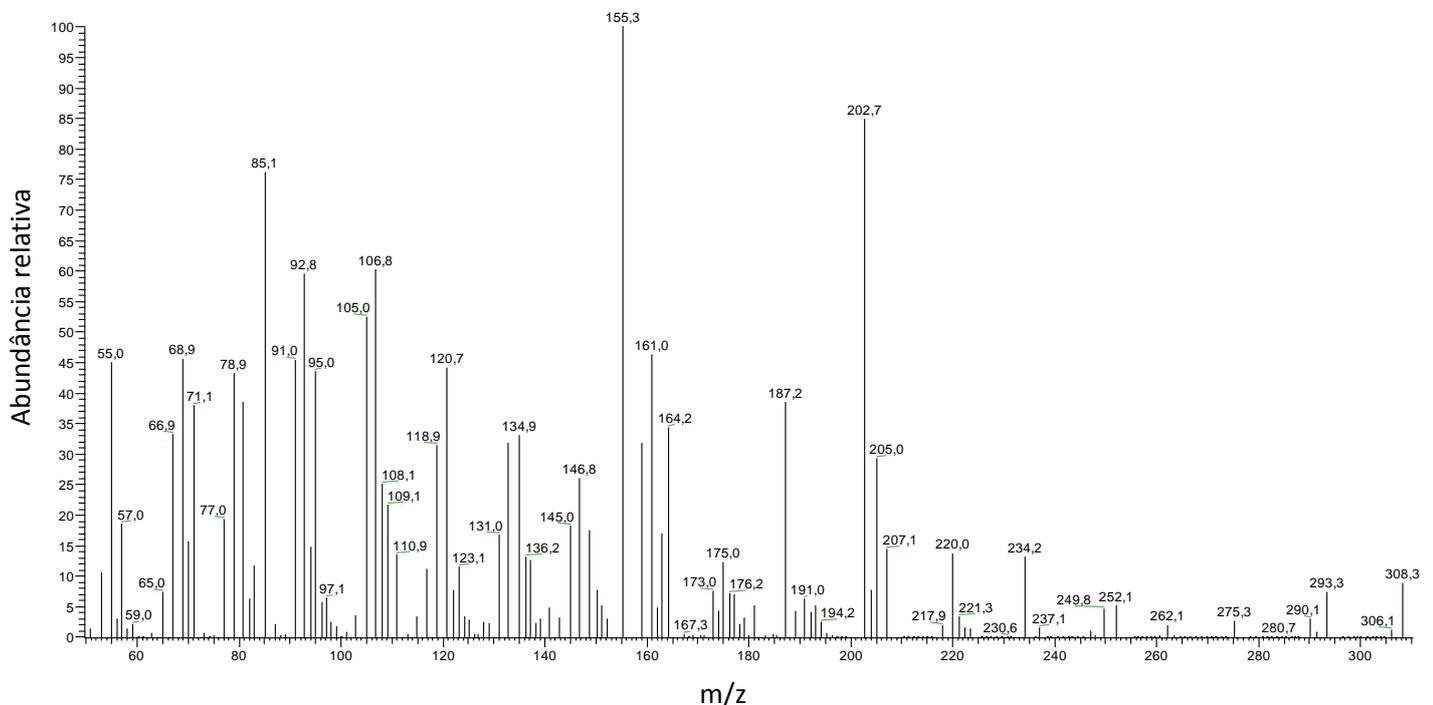
**Figura 265** – Cromatograma obtido por CG-EM para a combinação de frações obtidas com eluente hexano/acetato de etila 85:15 a 65:35 na biotransformação do  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**127**) com *P. minioluteum* com 10 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .



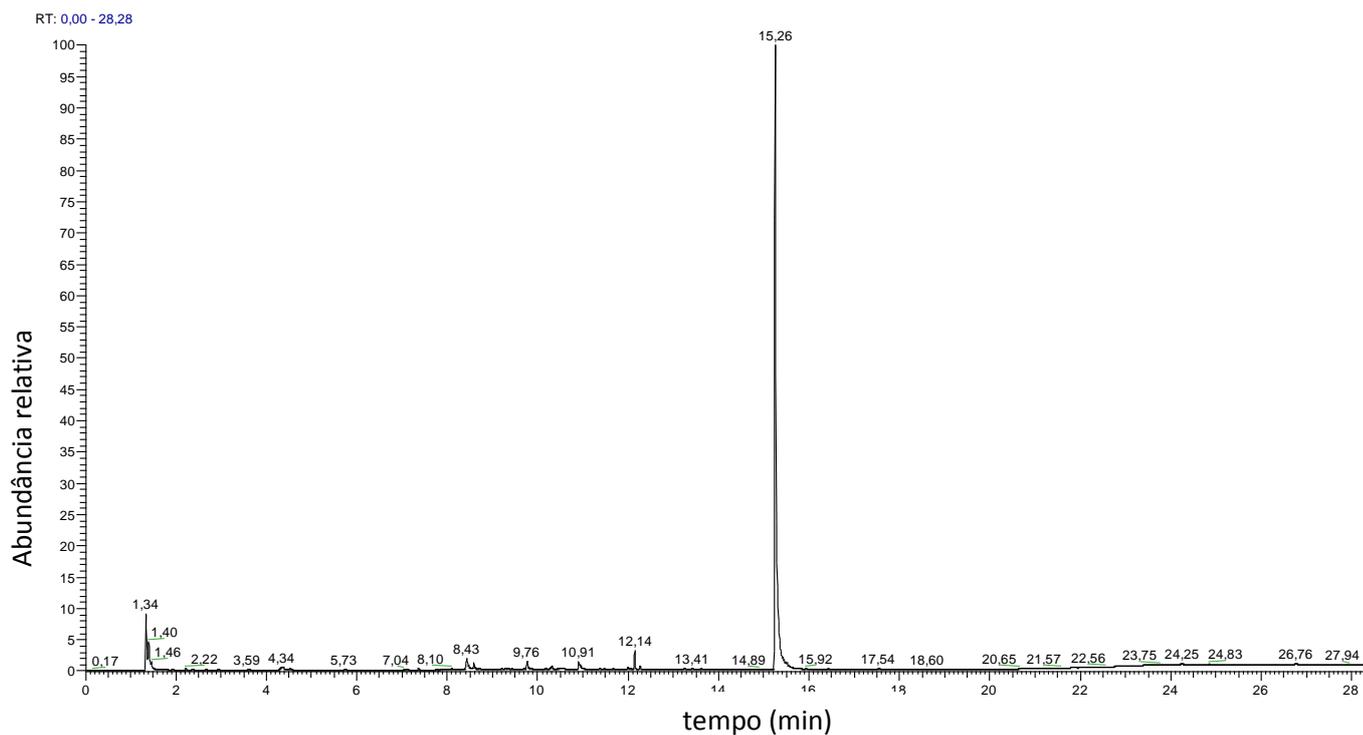
**Figura 266** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 8,46 min no cromatograma da combinação de frações obtidas com eluente hexano/acetato de etila 85:15 a 65:35 na biotransformação do  $2\beta$ -propoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**127**) com *P. minioluteum* com 10 dias.



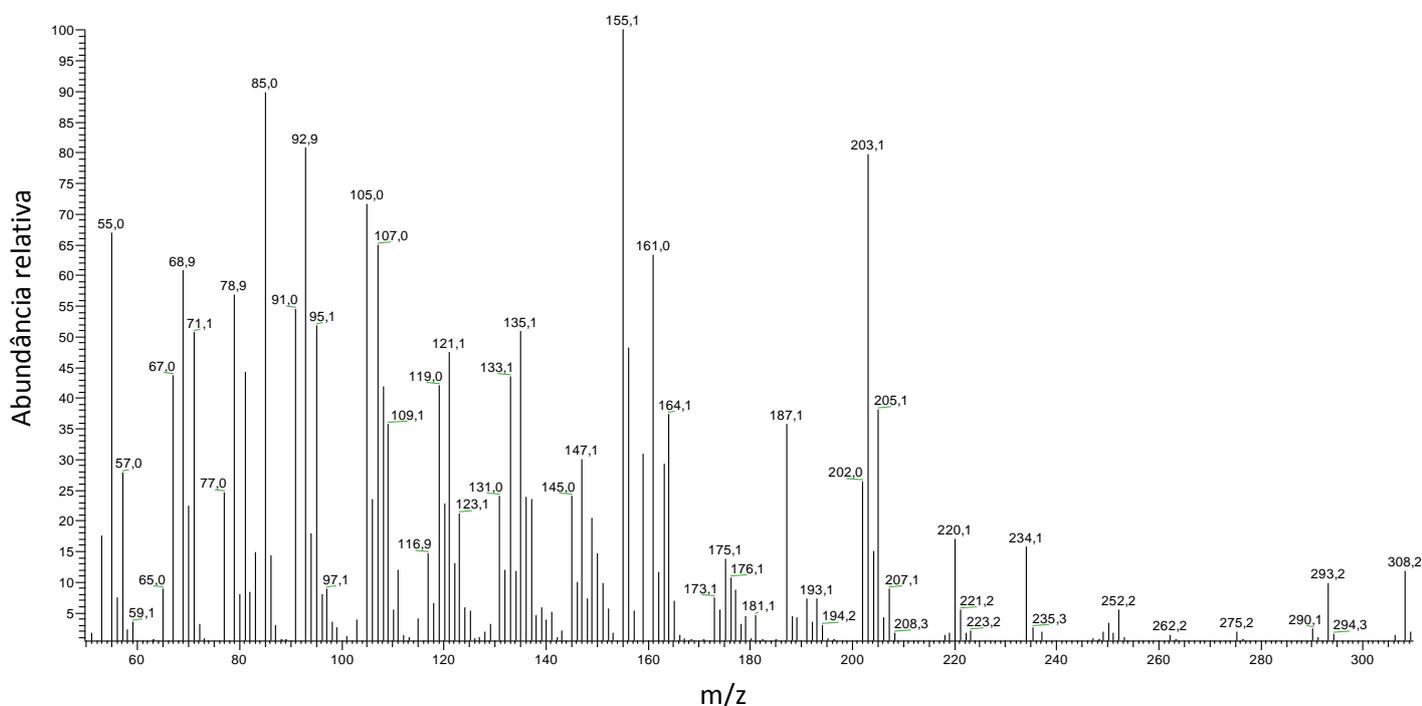
**Figura 267** – Cromatograma obtido por CG-EM para o  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**), utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .



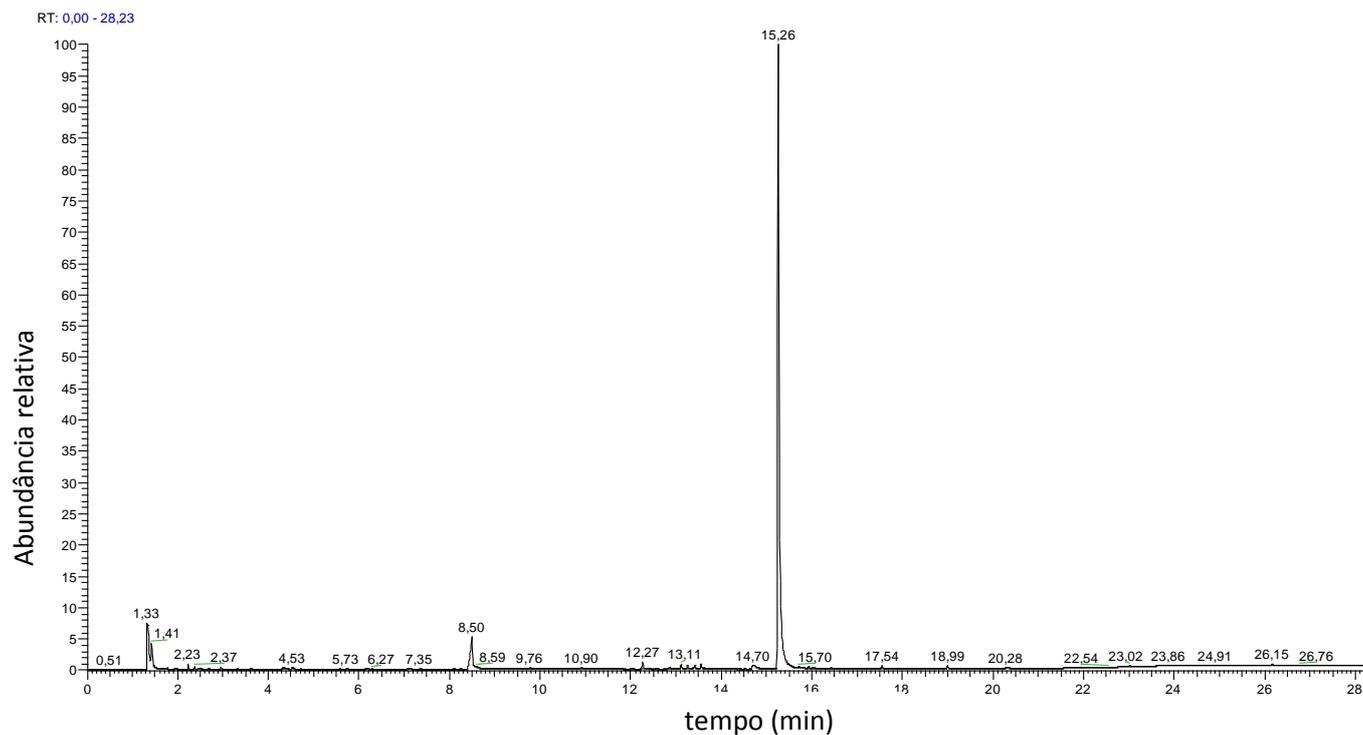
**Figura 268** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 15,14 min no cromatograma do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**).



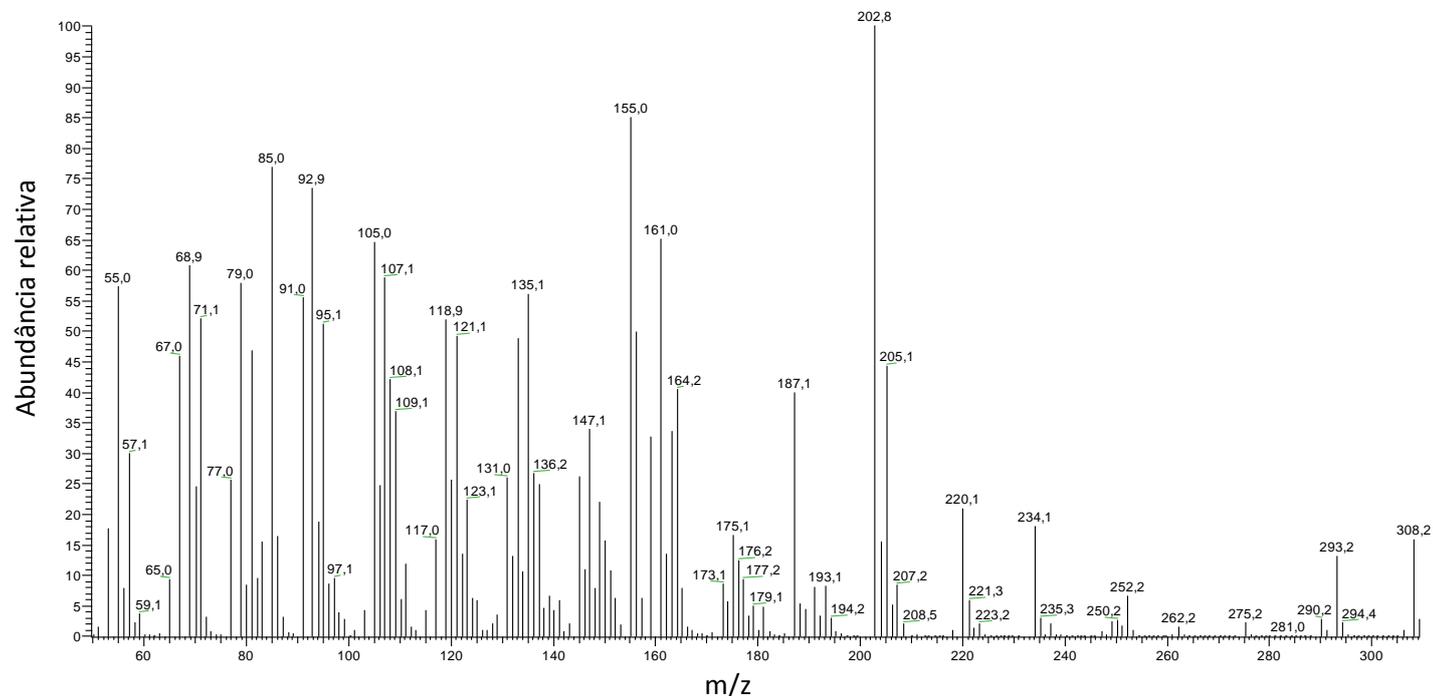
**Figura 269** – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**) com *P. minioluteum* com 5 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .



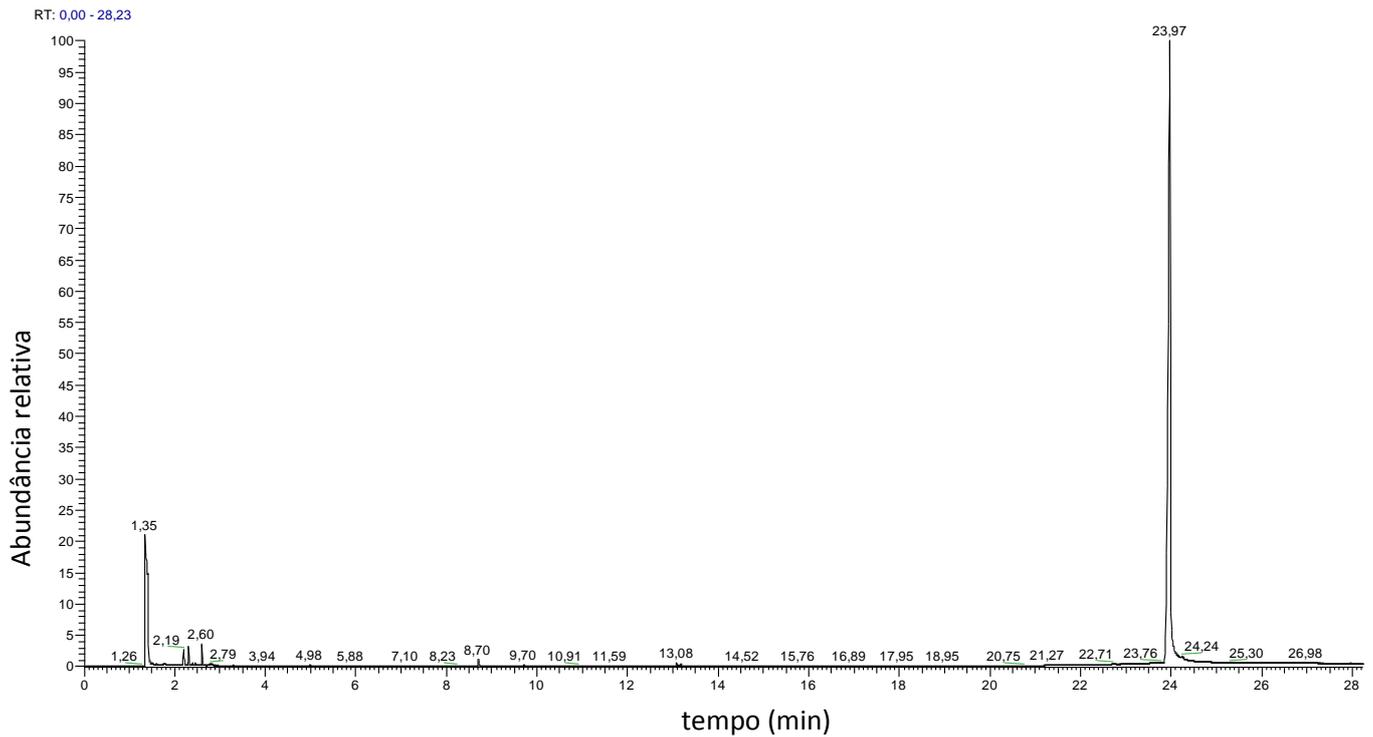
**Figura 270** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 15,26 min no cromatograma do extrato da biotransformação do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**) com *P. minioluteum* com 5 dias.



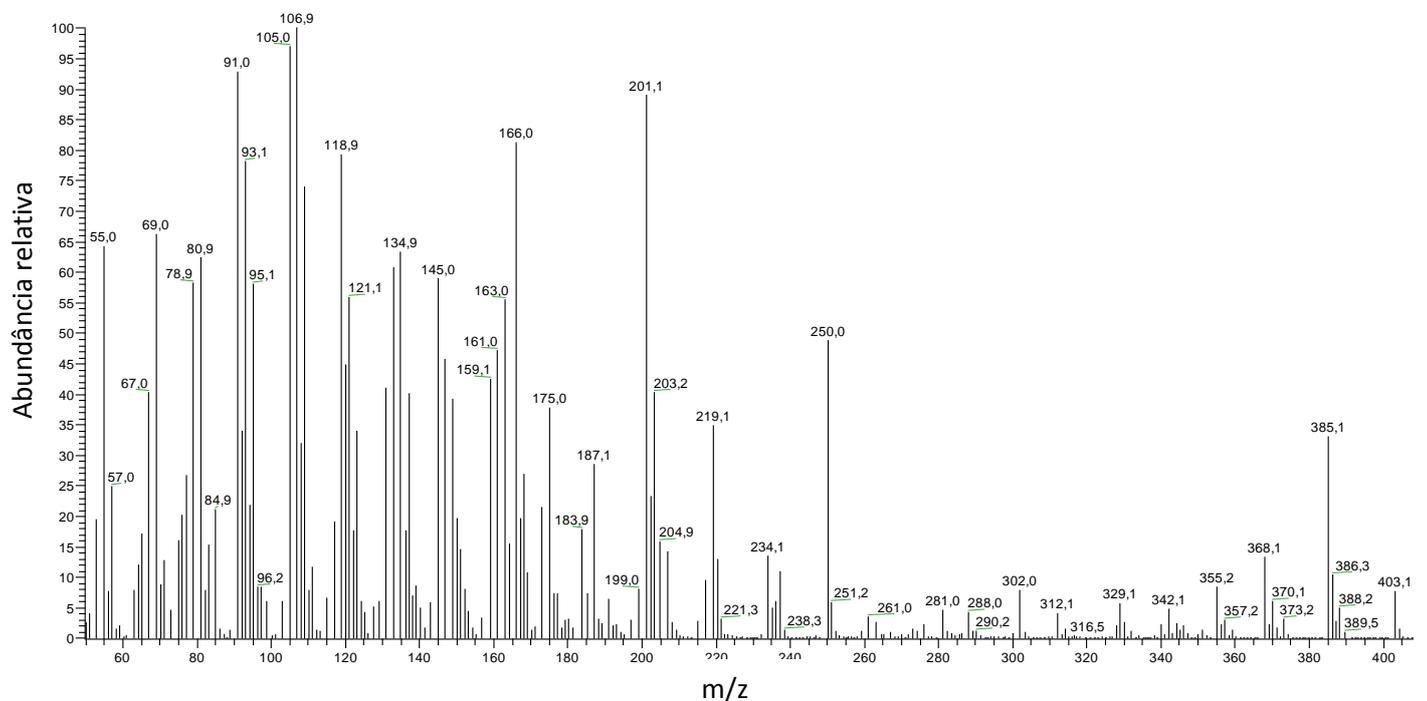
**Figura 271** – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**) com *P. minioluteum* com 10 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .



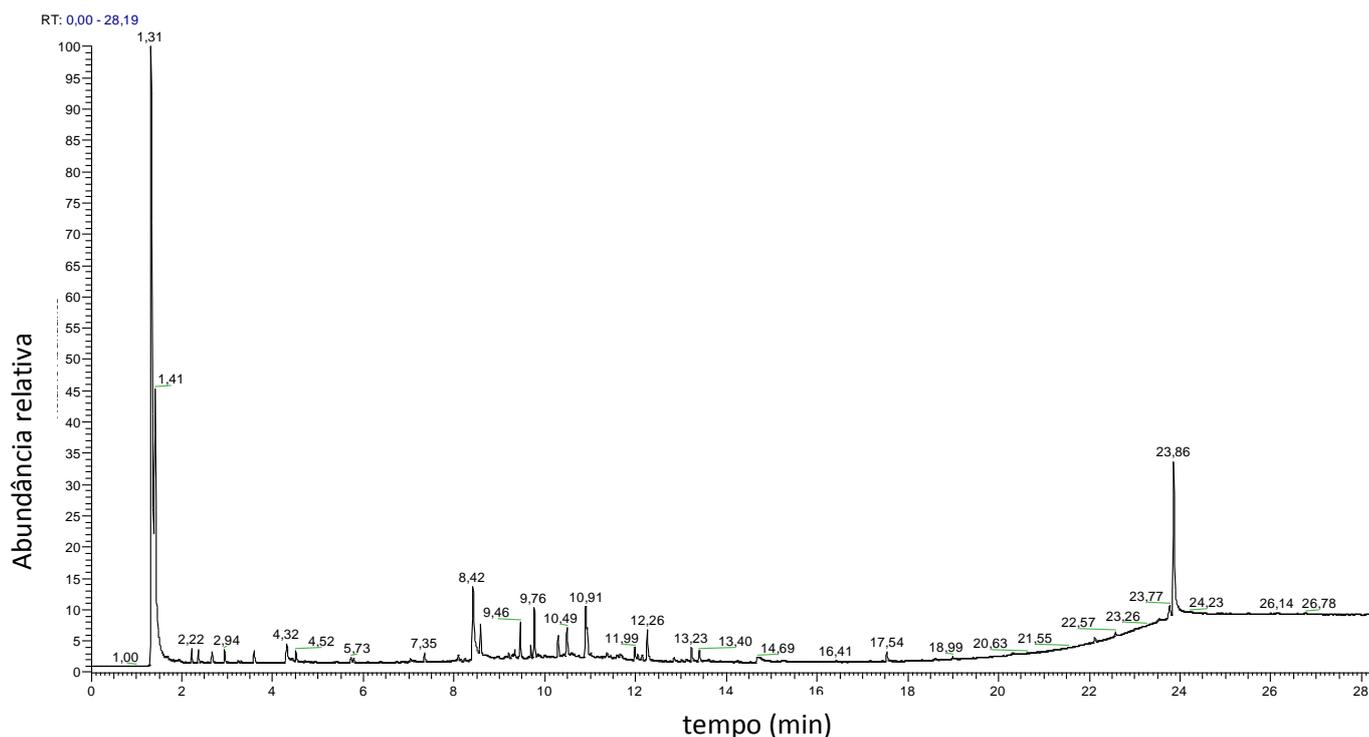
**Figura 272** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 15,26 min no cromatograma do extrato da biotransformação do  $2\beta$ -pentoxiclovan- $9\alpha$ -ol (**129**) com *P. minioluteum* com 10 dias.



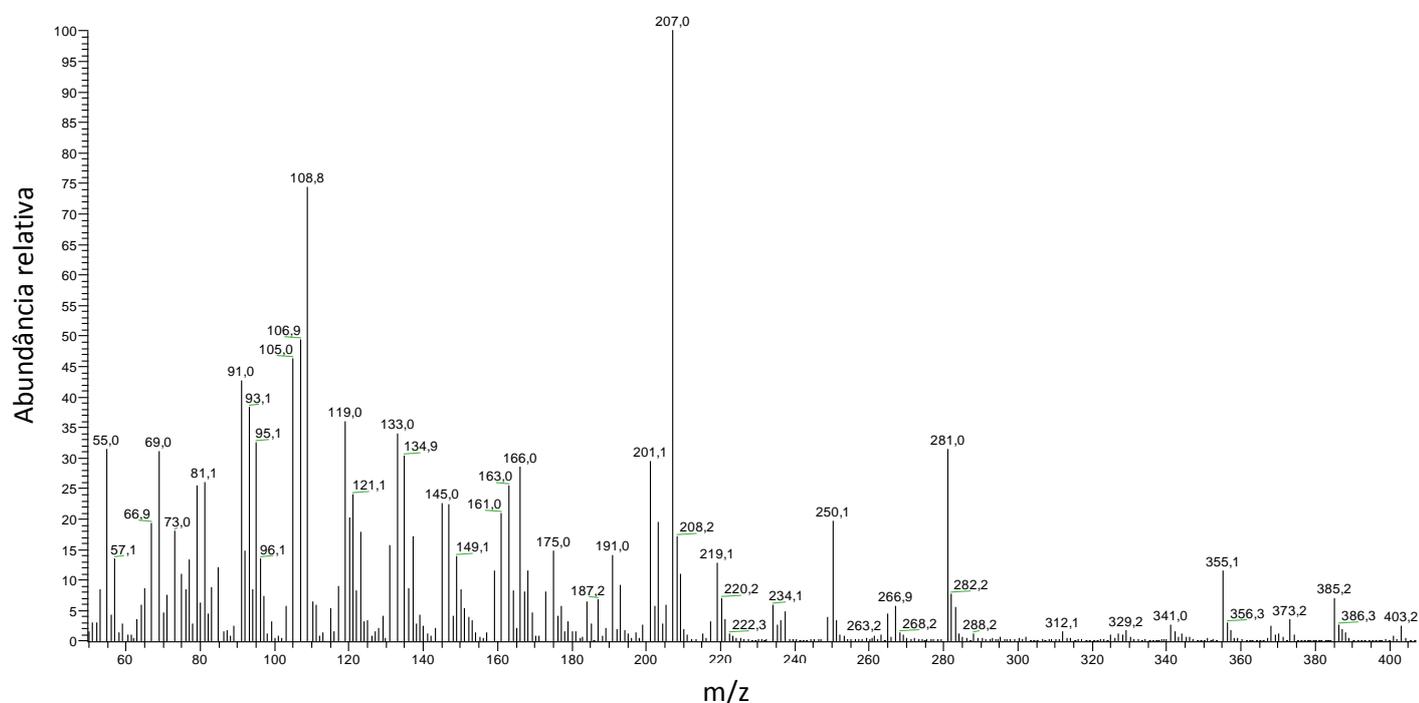
**Figura 273** – Cromatograma obtido por CG-EM para o  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**100**), utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .



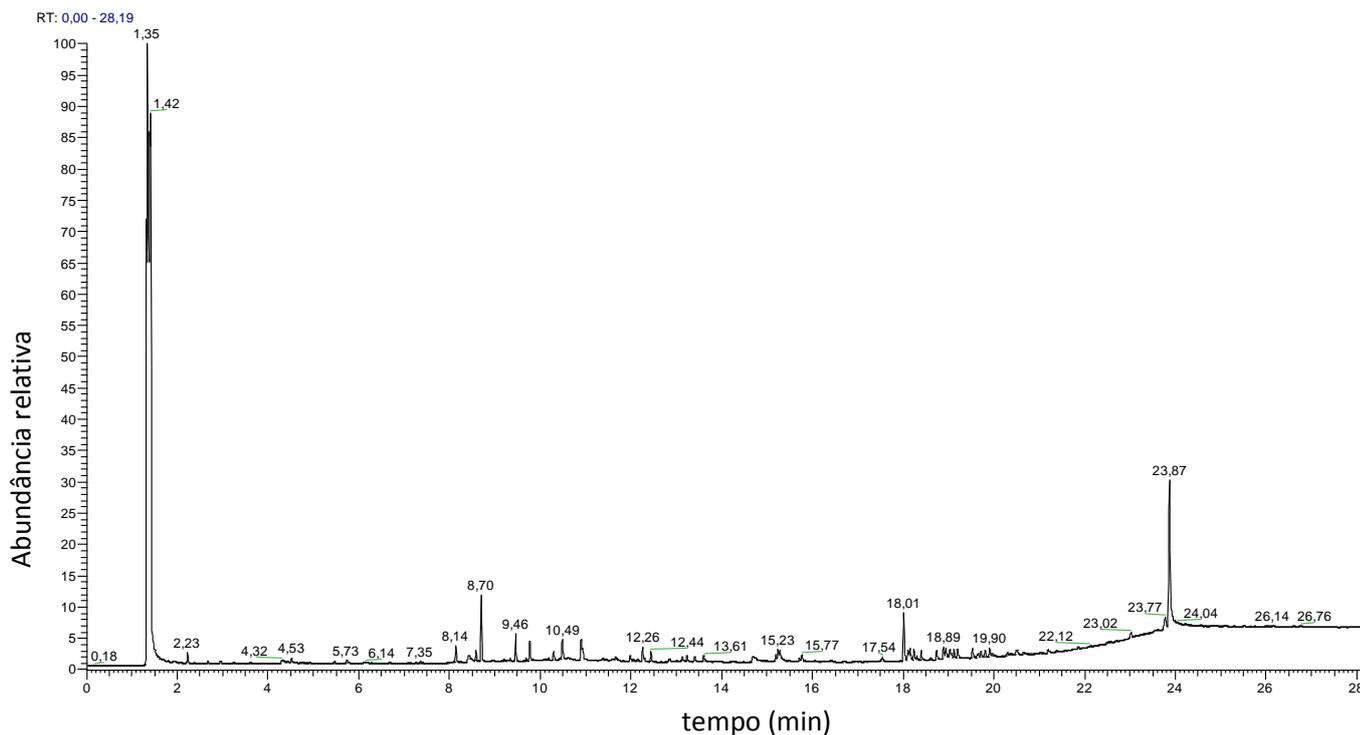
**Figura 274** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 23,97 min no cromatograma do  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**100**).



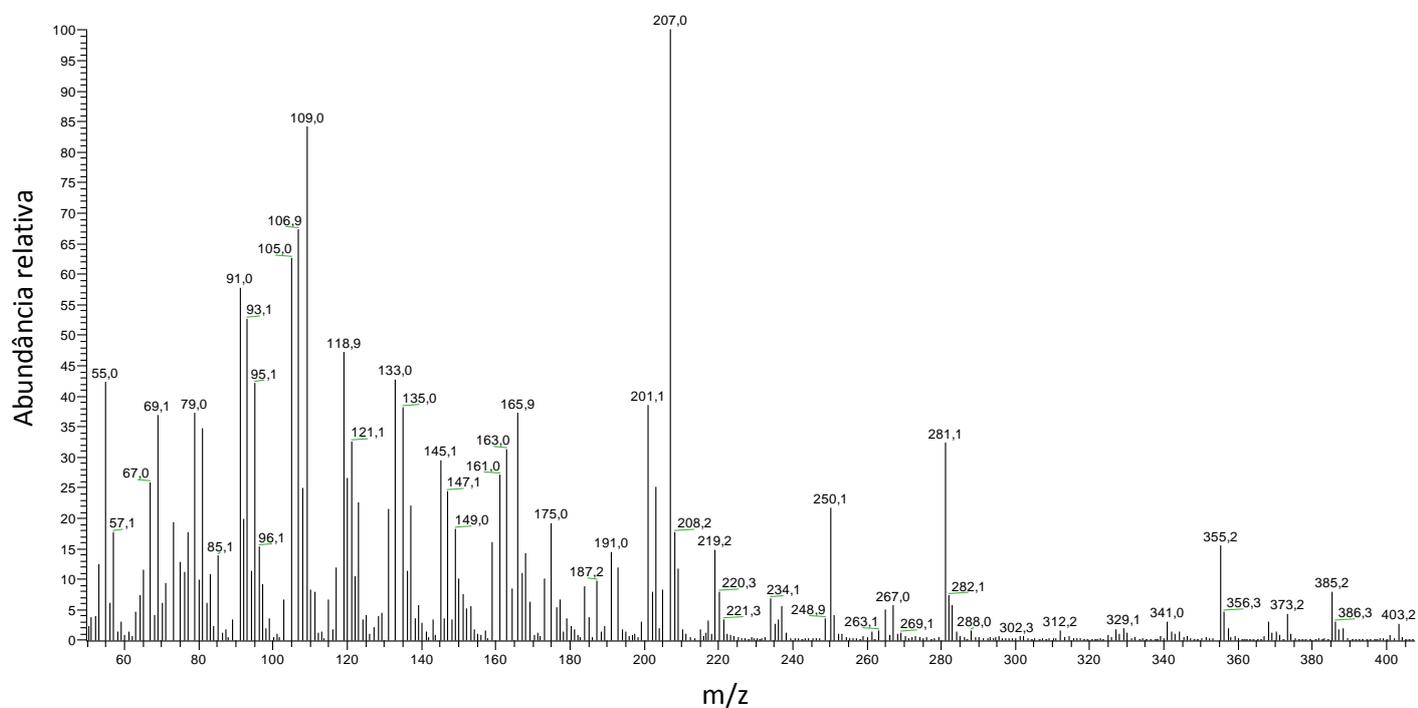
**Figura 275** – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**100**) com *P. minioluteum* com 5 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .



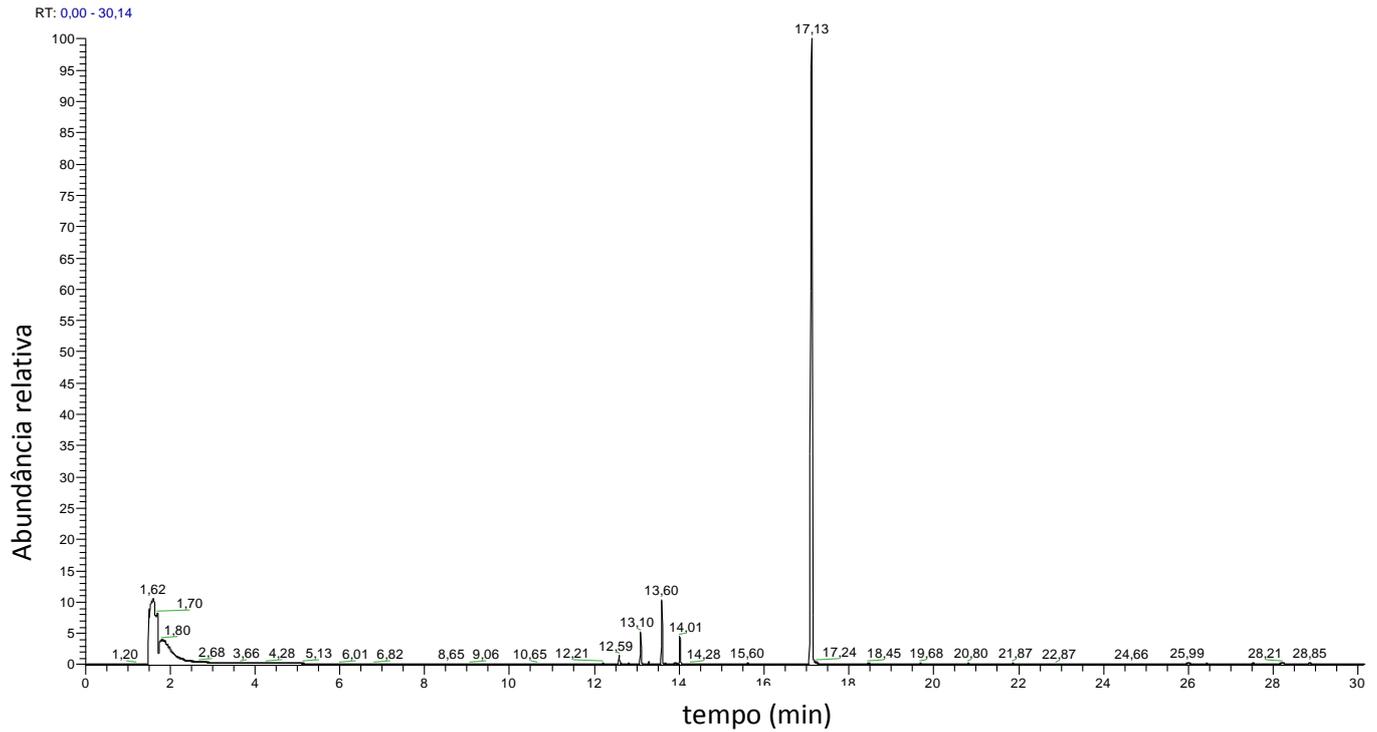
**Figura 276** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 23,86 min no cromatograma do extrato da biotransformação do  $2\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan- $9\alpha$ -ol (**100**) com *P. minioluteum* com 5 dias.



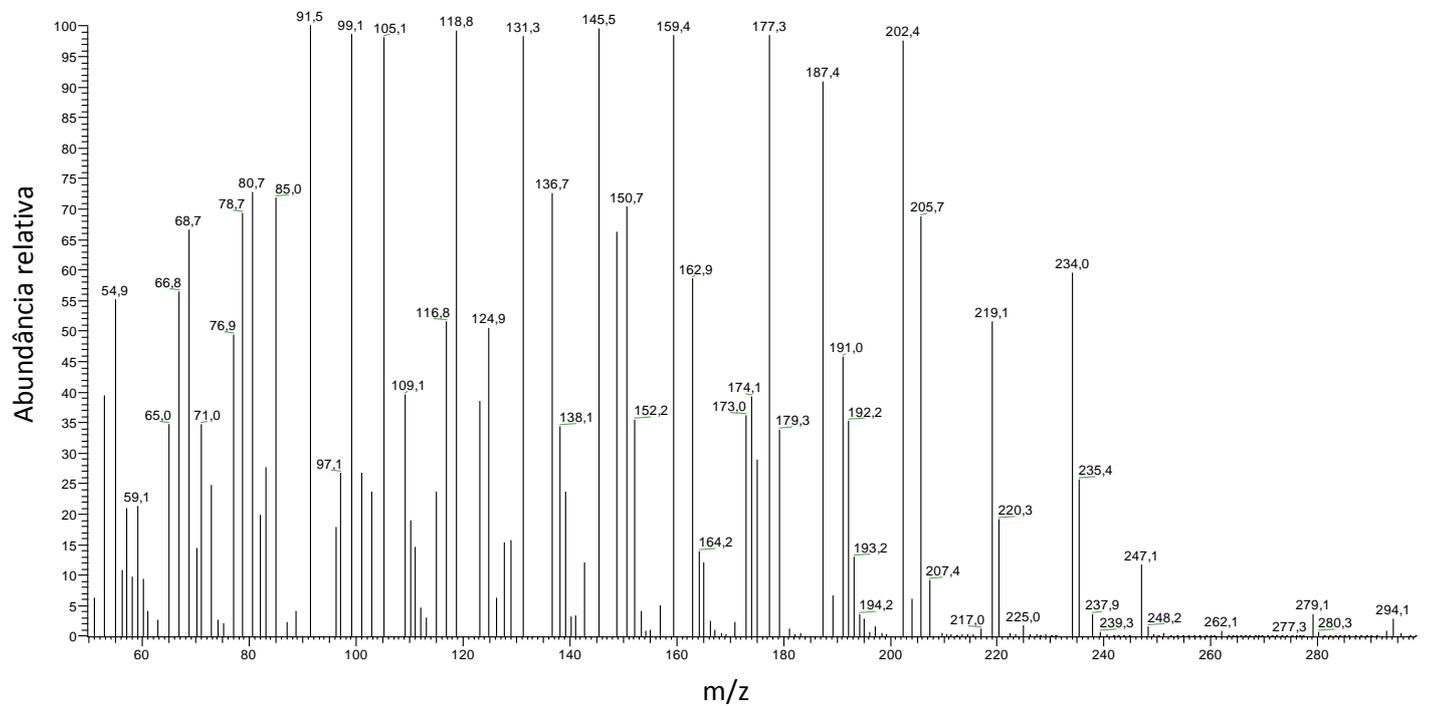
**Figura 277** – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**100**) com *P. minioluteum* com 10 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>.



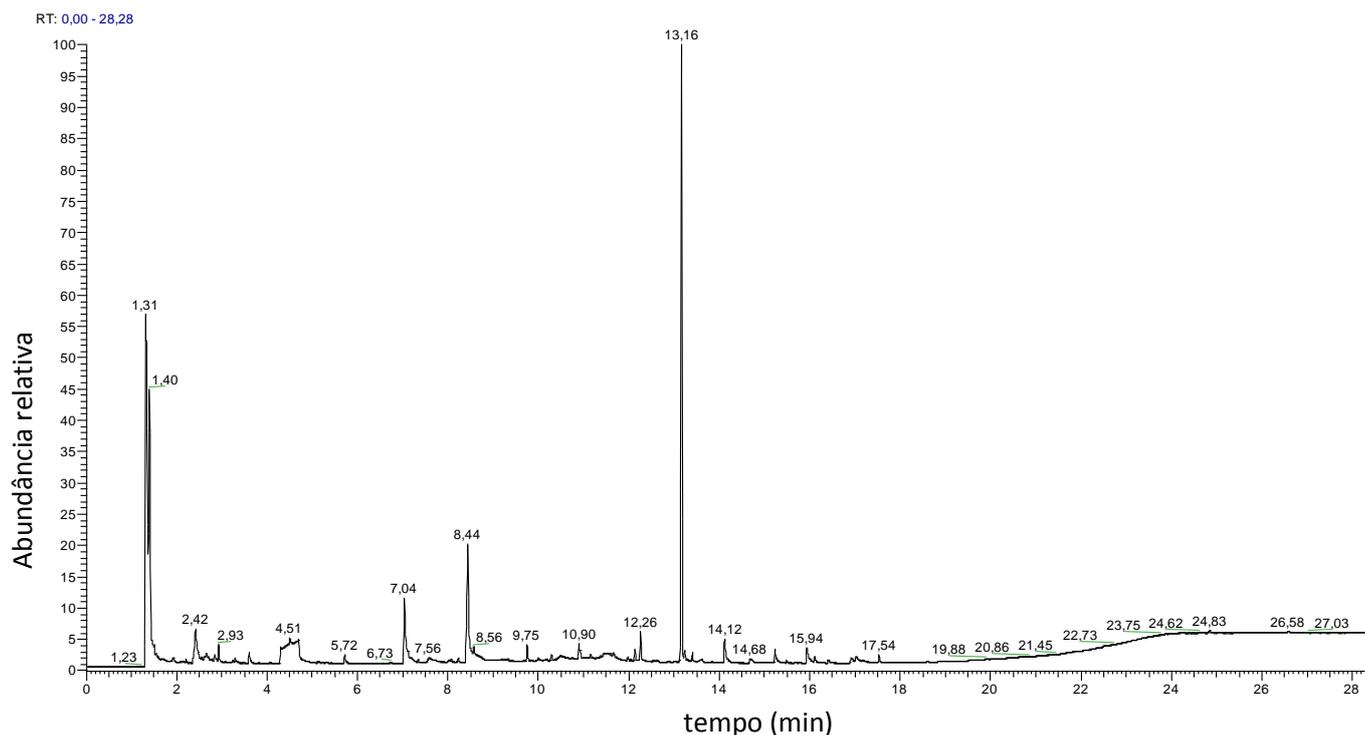
**Figura 278** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 23,87 min no cromatograma do extrato da biotransformação do 2 $\beta$ -[2-(4-nitrofenoxi)etoxi]clovan-9 $\alpha$ -ol (**100**) com *P. minioluteum* com 10 dias.



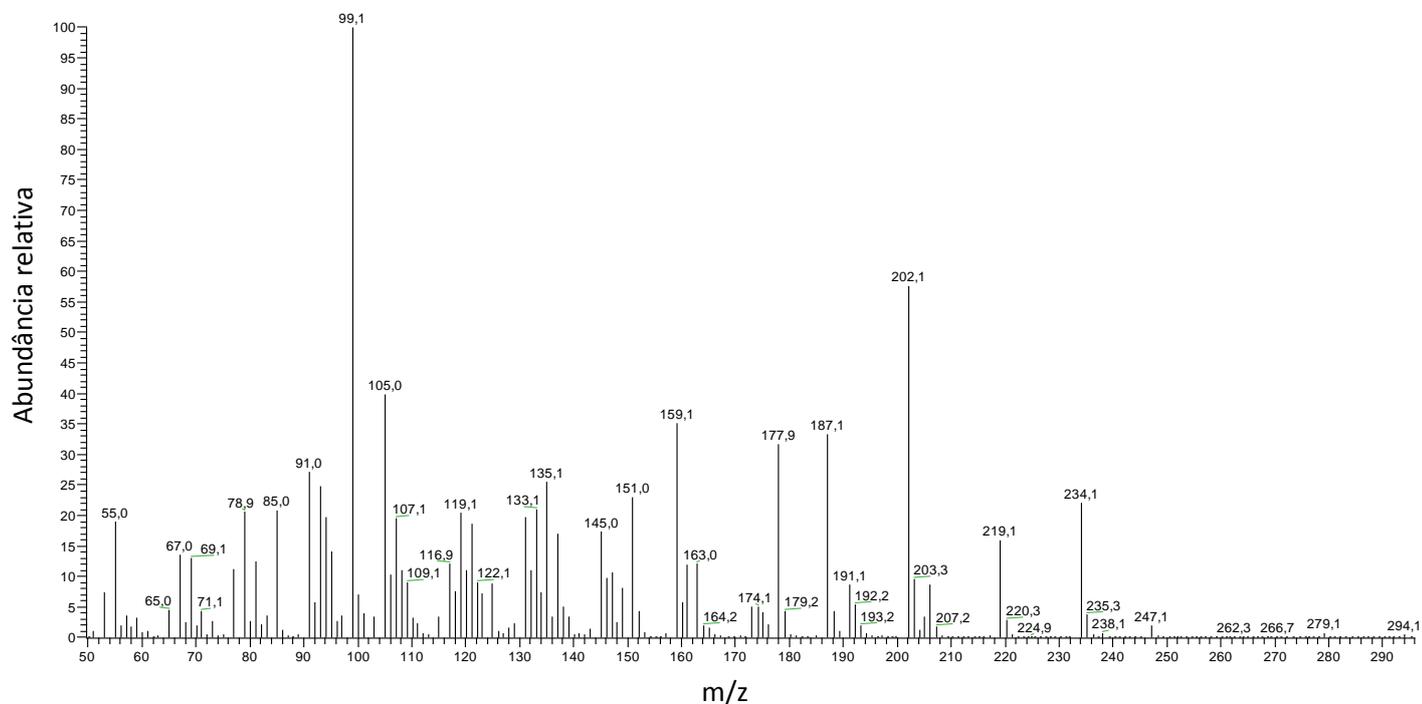
**Figura 279** – Cromatograma obtido por CG-EM para o produto **135**, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .



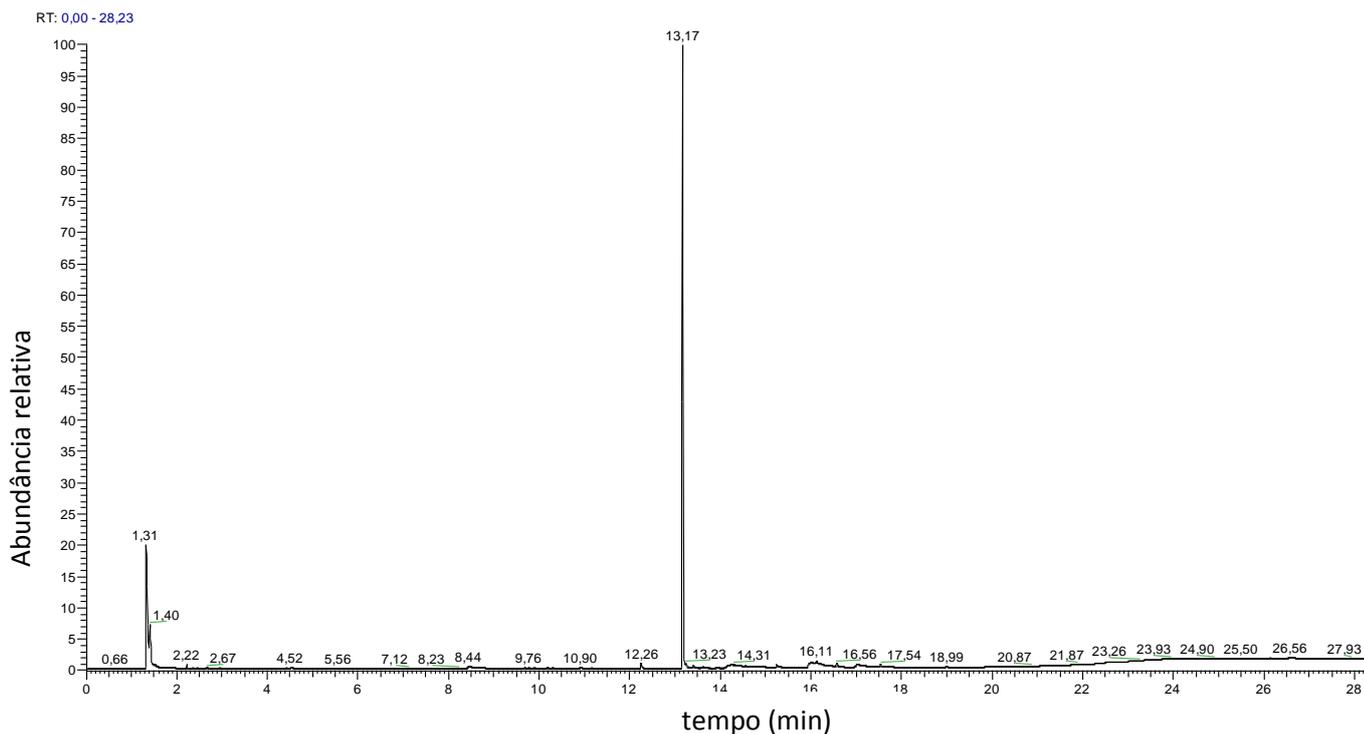
**Figura 280** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 17,13 min no cromatograma do produto **135**.



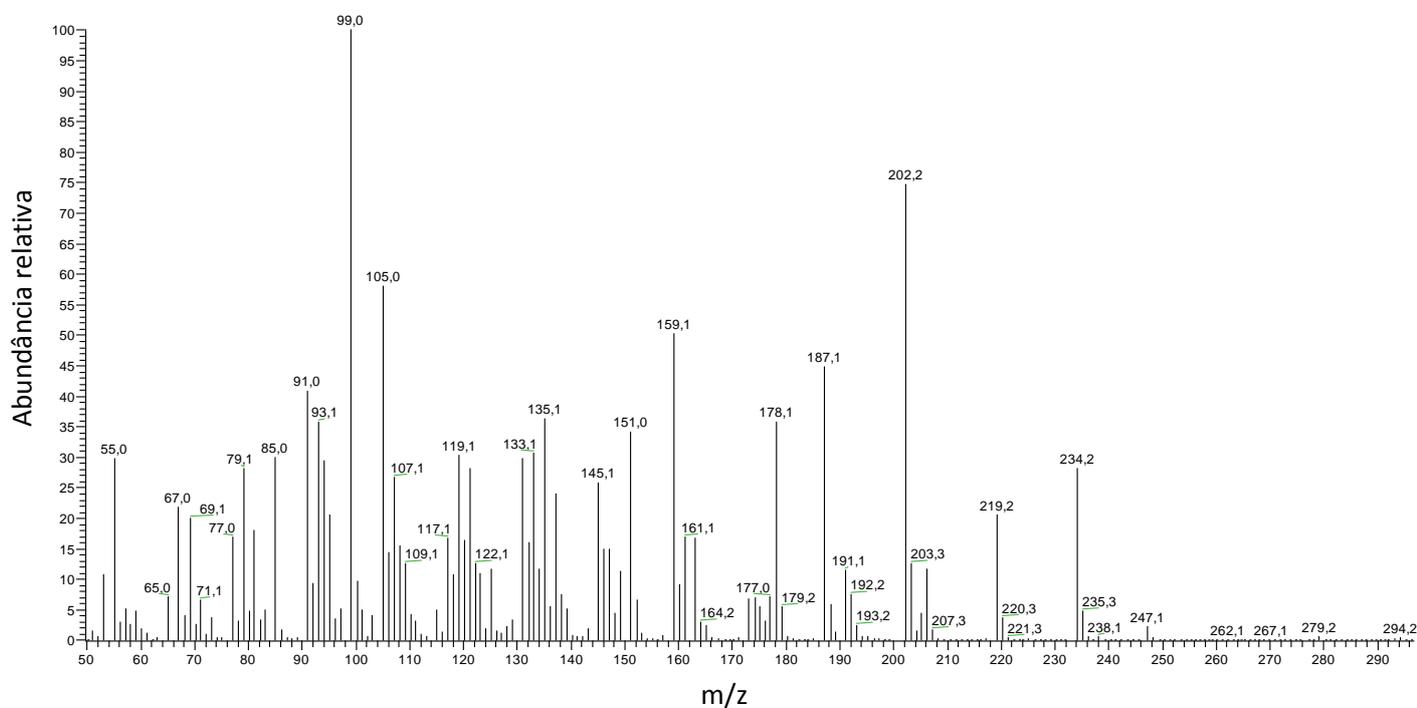
**Figura 281** – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do produto (135) com *P. minioluteum* com 5 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>.



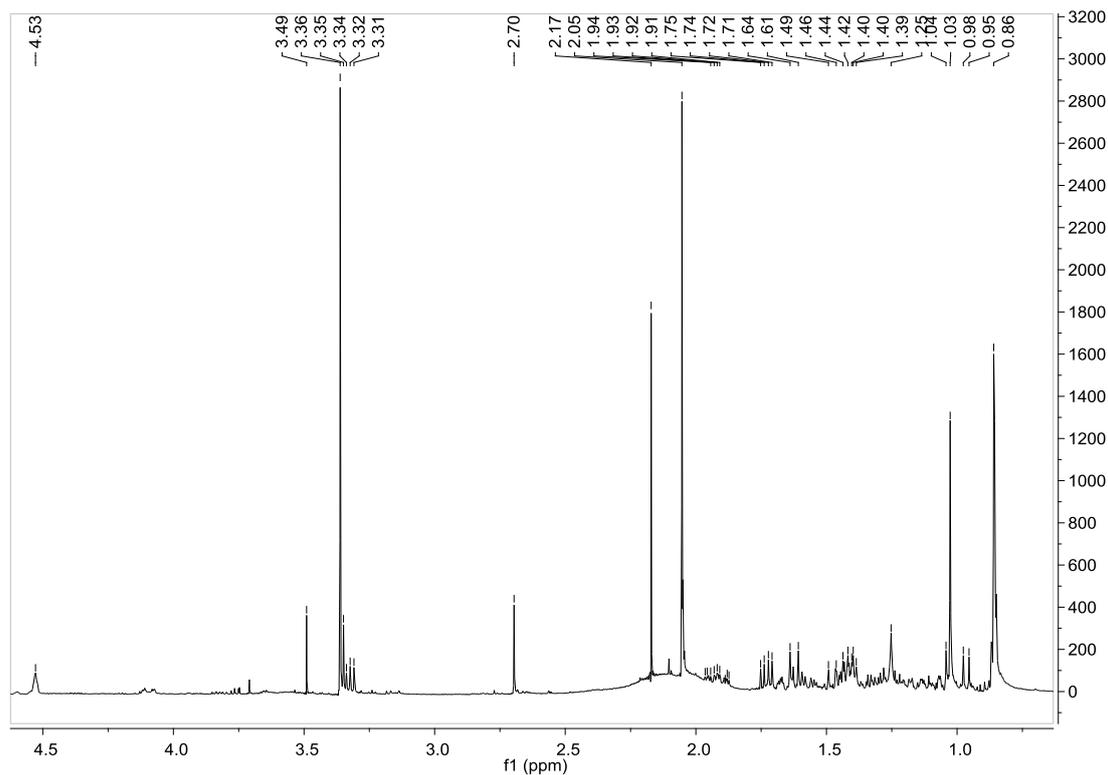
**Figura 282** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 13,16 min no cromatograma do extrato da biotransformação do produto (135) com *P. minioluteum* com 5 dias.



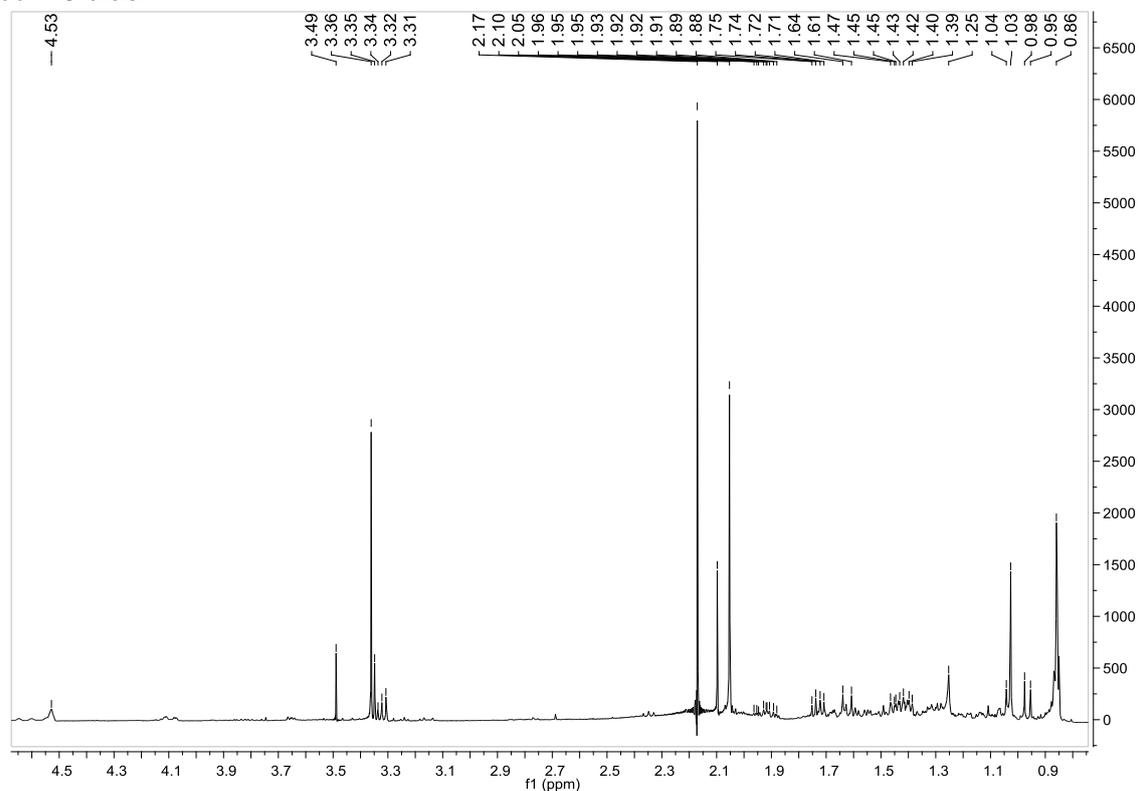
**Figura 283** – Cromatograma obtido por CG-EM para o extrato da biotransformação do produto (135) com *P. minioluteum* com 10 dias, utilizando-se coluna capilar DB-5, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 ml.min<sup>-1</sup>.



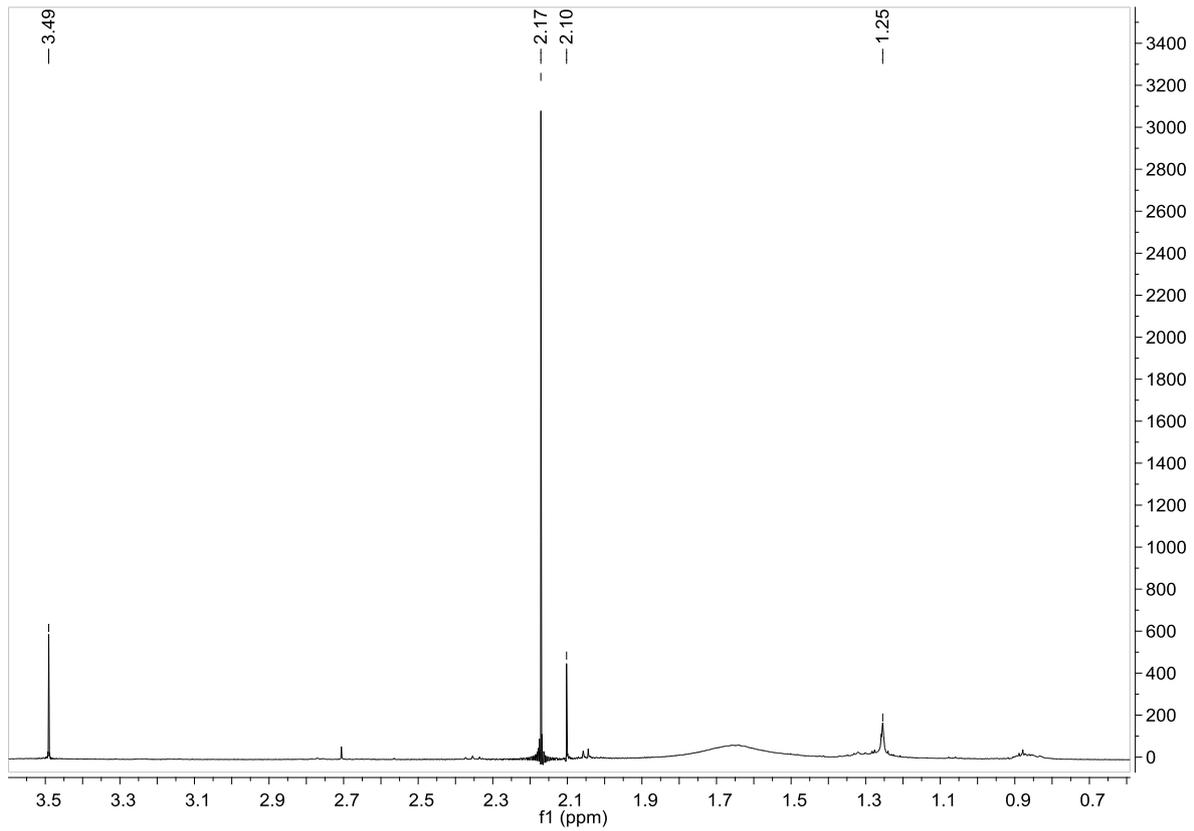
**Figura 284** – Espectro de massas obtido para a fração correspondente ao pico observado em tempo de retenção 13,16 min no cromatograma do extrato da biotransformação do produto (135) com *P. minioluteum* com 10 dias.



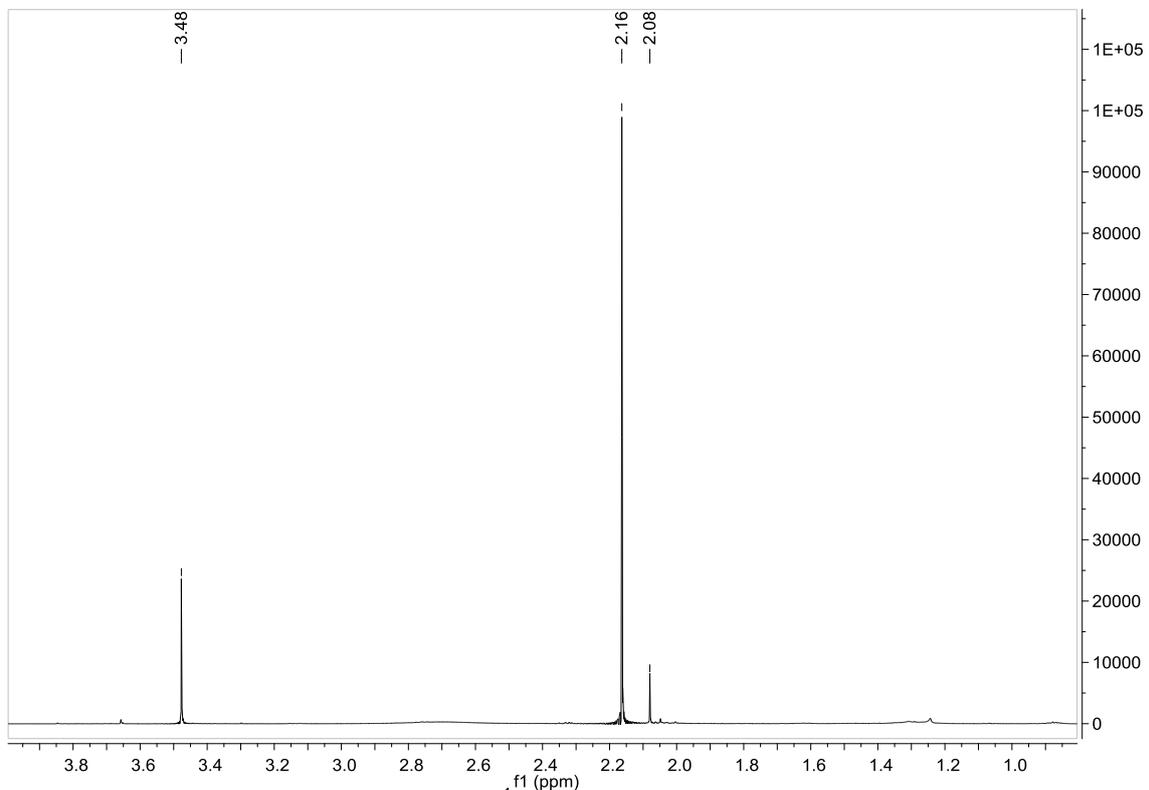
**Figura 285** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do extrato da biotransformação do acetato de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**135**) com *P. minioluteum* com 5 dias.



**Figura 286** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do extrato da biotransformação do acetato de 2 $\beta$ -metoxiclovan-9 $\alpha$ -ol (**135**) com *P. minioluteum* com 10 dias.



**Figura 287** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do extrato do controle da biotransformação do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol (**135**) com *P. minioluteum* com 5 dias.



**Figura 288** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do extrato do controle da biotransformação do acetato de 2β-metoxiclovan-9α-ol (**135**) com *P. minioluteum* com 10 dias.