

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Rosangela Maria Ferreira

**Estigmasterol - Alterações estruturais nos anéis A e B e estudo de
atividade biológica**

Belo Horizonte

2014

UFMG/ICEx/DQ 1010^a

D 549^a

Rosangela Maria Ferreira

**Estigmasterol - Alterações estruturais nos anéis A e B e estudo de
atividade biológica**

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

Belo Horizonte
2014

F383e Ferreira, Rosangela Maria
2014 Estigmasterol - alterações estruturais nos anéis A
D e B e estudo de atividade biológica [manuscrito] /
 Rosangela Maria Ferreira. 2014.
 [x], 89 f. : il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.

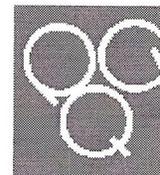
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.

Bibliografia: f. 77-83.

Inclui anexos: f. 84-89.

1. Química orgânica - Teses 2. Esteroides - Teses
3. Oxidação - Teses 4. Atividade antifúngica - Teses
5. Alzheimer, Doença de - Teses 6. Antibióticos -
Testes - Teses I. Takahashi, Jacqueline Aparecida,
Orientadora II. Título.

CDU 043



"Estigmasterol - Alterações Estruturais nos Anéis A e B e Estudo de Atividade
Biológica"

Rosângela Maria Ferreira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora
UFMG

Profa. Adriana Akemi Okuma
CEFET-MG

Profa. Lucienir Pains Duarte
UFMG

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2014.

*De que importa saber o fim da estrada, se o importante é a jornada!**

Da teoria à realidade, o caminho é vasto e nem sempre prazeroso, mas indispensável para o amadurecimento.

Primeiramente, agradeço à Deus pelo dom da vida, capacidade de aprendizado, conforto e fé que me permitiram persistir nas horas mais difíceis e saber esperar quando o tempo da vida foi diferente do meu tempo.

À professora Jacqueline, pela acolhida em um momento de incertezas e medos, bem como pelos delicados e importantes ensinamentos!

À professora Henriete, pela orientação e às muitas correções na dissertação e sua tentativa de me mostrar outro ponto de vista da vida e da Química Orgânica, até então desconhecidos!

Ao professor Eufrânio e seus alunos Guilherme, Emilay e Isadora, e demais colegas do laboratório, pelos ensinamentos práticos durante o período em que estive sob sua orientação.

Às professoras Rosemeire e Rossimiriam, pelas fantásticas e empolgantes aulas de Química Orgânica Avançada, que muito contribuíram para minha formação.

À professora Dorila, pelas ricas aulas de RMN e utilização do equipamento.

Ao professor Ângelo de Fátima, pelo apoio com textos, inspiração e ensinamentos.

Ao professor Robinson (UFV), pelas aulas empolgantes que me levaram a um mestrado na área de Química Orgânica.

Aos alunos Gabriel, Raquel, Bibiane e demais colegas do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, pela ajuda com as análises e acolhida no laboratório.

À Bárbara Patrícia pela amizade, ajuda nas análises microbiológicas, reagentes, conversas nem sempre tranquilas, mas estimulantes, bem como em muitos outros momentos.

Aos alunos Cleiton, Bruna, Leonardo, Lucas, Débora, Grazielle, Aline, Aretha e Felipe (RMN) e aos professores Ângelo e Adão pela doação de reagentes, dicas de metodologia, empréstimos de equipamentos, análise de espectrometria de massas, conversas de corredores inspiradoras entre outros que fazem a jornada torna-se mais leve.

Ao professor Gaspar e seus alunos Marcos e Kryssia, bem como os colegas Igor e Thais pelos reagentes, vidrarias, equipamentos, companheirismo e dicas de síntese que muito contribuíram para este trabalho.

Ao professor Ricardo (Farmácia, UFMG) e seu aluno Flaviano, pela utilização do IV e ajuda nas análises.

Aos técnicos do Depto de Química: Dra. Ivana, Dra. Vanny, Ricardo, Vladimir, Samuel, meninos da informática em especial ao Jacaré, Eurípides, Yuri e Edinho, pelas análises, ajuda com equipamentos, materiais de apoio, consertos de equipamentos entre outros.

Ao professor Donnici e suas alunas Marina e Graciane, pela utilização do espectrômetro de Infravermelho, ajuda na análise e doação de reagentes.

Aos professores José Dias e Isabel e todos os demais que contribuíram para que este mestrado fosse possível.

Ao meu futuro esposo, José Osmar (vulgo jacaré) e familiares: mãe, irmãos e sobrinhos, Tia Lu e Roberta pela paciência, amor e compreensão.

Aos órgãos de fomento CNPQ, CAPES, FAPEMIG pelo financiamento de bolsa, reagentes, entre outros.

Enfim, a todos os amigos, colegas, professores, funcionários e pessoas que contribuíram para que este momento fosse possível.

*Autor desconhecido.

**Este trabalho foi realizado
sob a orientação da Professora
Jacqueline Aparecida Takahashi**

Resumo

Este trabalho objetivou a síntese de derivados do estigmasterol para estudo de atividade biológica contra a enzima acetilcolinesterase e atividade bactericida e fungicida. O estigmasterol foi oxidado por reagente de Jones produzindo as cetonas em uma única etapa: estigmasta-5,22-dien-3-ona, estigmasta-4,22-dien-3-ona, estigmasta-4,22-dien-3,6-diona. Posteriormente foram sintetizadas as oximas estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima e estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, oxima. O estigmasterol e os derivados obtidos foram caracterizados por RMN de ^1H e de ^{13}C , espectrometria de massas e infravermelho. Os derivados obtidos são pouco citados na literatura pelo site busca scifinder, com apenas uma citação para a oxima e outra para a dioxima, bem como ausência de dados de RMN para a cetona estigmasta-5,22-dien-3-ona. As substâncias foram submetidas ao estudo de triagem em quintuplicata utilizando o método de placas ELISA para avaliação biológica da atividade contra as bactérias *Gram*-positivas: *Bacillus cereus* (**BC**, ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (**LM**, ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29212) e *Streptococcus sanguinis* (ATCC 49456); as bactérias *Gram*-negativas: *Citrobacter freundii* (**CF**, ATCC 8090), *Escherichia coli* (**EC**, ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (**PA**, ATCC 27853) e *Salmonella typhimurium* (**ST**, ATCC 14028); além das espécies de *Candida* sp: *Candida albicans* (**CA**, ATCC 18804), *Candida tropicalis* (**CT**, ATCC 750), *Candida glabrata* (**CG**, ATCC 90030), *Candida parapsilosis* (**CP**, ATCC 22019), *Candida lusitanae* (**CL**, CBS 6936) e *Candida dubliniensis* (**CD**, Isolado clínico 28) e atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (Alzheimer) pelo método ELISA. Os derivados oxidados estigmasta-4,22-dien-3-ona e estigmasta-5,22-dien-3-ona mostraram especificidade respectivamente para as classes bactérias e *Candida*. A estigmasta-4,22-dien,3,6-diona, oxima mostrou atividade ampla contra os microorganismos. A substância estigmasta-5,22-dien-3-ona mostrou atividade superior a 90% para inibição da enzima acetilcolinesterase.

Palavras chave: Estigmasterol; Oxidação de Jones; Estigmasta-4,22-dien-3-ona; Estigmasta-5,22-dien-3-ona; Estigmasta-4,22-dien-3,6-ona; Estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima; Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, oxima.

Abstract

This study aimed to the synthesis of Stigmasterol derivatives of stigmasterol to study biological activity against the enzyme acetylcholinesterase and bactericidal and fungicidal activities. Stigmasterol was oxidized with Jones reagent producing the ketones in a single step: stigmasta-5,22-dien-3-one, stigmasta-4,22-dien-3-one, stigmasta-4,22-dien-3,6-dione. Subsequently the oximes were synthesized stigmasta-4,22-dien-3-one, oxime and stigmasta-4,22-dien-3,6-dione, oxime. The stigmasterol and derivatives were characterized by ^1H and ^{13}C NMR, mass spectrometry and infrared. The derivatives obtained are not frequently reported in the literature on SciFinder search site with only one citation to the oxime and to dioxime are also scarce NMR data for ketone stigmasta-5,22-dien-3-one. The substances were subjected to the screening study by the ELISA method for biological assessment of activity against *Gram*-positive bacteria: *Bacillus cereus* (BC, ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (LM, ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (SA, ATCC 29212) and *Streptococcus sanguinis* (SS, ATCC 49456); *Gram*-negative bacteria: *Citrobacter freundii* (CF, ATCC 8090), *Escherichia coli* (EC, ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (PA, ATCC 27853) and *Salmonella typhimurium* (ST, ATCC 14028); addition to the species of *Candida*: *Candida albicans* (CA, ATCC 18804), *Candida tropicalis* (CT, ATCC 750), *Candida glabrata* (CG, ATCC 90030), *Candida parapsilosis* (CP, ATCC 22019), *Candida lusitaniae* (CL, CBS 6936) and *Candida dubliniensis* (CD, clinical Isolated 28) and inhibitory activity of the enzyme acetylcholinesterase (Alzheimer's) by ELISA. The oxidized derivatives stigmasta-4,22-dien-3-one and stigmasta-5,22-dien-3-one respectively showed specificity for bacteria and *Candida* classes. The stigmasta-4,22-dien-3,6-dione, oxime showed broad activity against the screened microorganisms. The substance stigmasta-5,22-dien-3-one showed activity greater than 90% inhibition of acetylcholinesterase.

Keywords: Stigmasterol; Jones oxidation; Stigmasta-4,22-dien-3-one; Stigmasta-5,22-dien-3-one; Stigmasta-4,22-dien-3-one; Stigmasta-4,22-dien-3,6-dione, oxime; Stigmasta-4,22-dien-3,6-dione, oxime.

Sumário

Estigmasterol - Alterações estruturais nos anéis A e B e estudo de atividade biológica	
Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas	iv
Lista de Siglas.....	v
1.0 - Introdução.....	01
1.1 - Importância dos produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos.....	01
1.2 - Doenças de Alzheimer.	02
1.3 - Doenças infecciosas.	03
1.4 - Esteroides.	09
1.5 - Colesterol.	10
1.6 - Fitoesteróis	12
1.7 - Estigmasterol: Fontes, descoberta e importância.	13
1.8 - Objetivo.....	16
2.0 - Síntese e caracterização.....	16
2.1 - Metodologia.	18
2.1.1 - Reação de oxidação do estigmasterol.....	19
2.1.1.a – Preparação do reagente de Jones (Eisenbraun <i>et al</i> , 1965).....	19
2.1.1.b - Reação de oxidação do estigmasterol em micro escala para análise em CG.....	19
2.1.1.c - Reação de oxidação do estigmasterol utilizado na síntese dos derivados oxidados em macro escala (Mori <i>et al</i> , 1982).....	20
2.1.1.d - Reação de conversão de cetona β -insaturada a cetonas α -insaturadas (Cui <i>et al</i> , 2009).....	21
2.1.2 - Reações de adição nucleofílica ao grupo carbonila (Lachman, 1930).....	21
2.1.2.a - Obtenção de oxima a partir de DE02.....	22
2.1.2.b - Obtenção de dioxima a partir de DE03.....	22
2.1.3 - Estudo da atividade biológica.....	23

2.1.3.a - Triagem de bactérias e fungos.....	23
2.1.3.b - Repique de bactérias e leveduras.....	23
2.1.3.c - Preparo de solução estoque dos compostos.....	24
2.1.3.d - Preparo de solução trabalho.....	24
2.1.3.e.1 - Preparo de inóculo de bactérias ou <i>cândida</i>	23
2.1.3.e.2 - Preparo de inóculo de fungos.....	24
2.1.3.f - Preparo de placas de triagem.....	24
2.1.3.f.1 - Controle do meio de cultura.....	24
2.1.3.f.2 - Controle dos micro-organismos.....	25
2.1.3.f.3 - Controle dos compostos (em cada poço).....	25
2.1.3.f.4 - Atividade dos compostos.....	25
2.1.3.g - Estufa.....	25
2.1.4 - Estudo da atividade biológica: MIC.	25
2.1.4.a - Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....	25
2.1.4.b - Controle dos compostos.....	26
2.1.4.c - Atividade dos compostos	26
2.1.4.d - Estufa.....	25
2.1.5 - Estudo de atividade em relação a enzima Acetilcolinesterase.....	26
2.1.5.a - Preparo da solução tampão <i>Tris</i> /HCl pH 8 (50 mM).....	26
2.1.5.b - Preparo da solução estoque de enzima 1000U/mL).....	26
2.1.5.c - Preparo da solução estoque de enzima 0,222U/mL).....	26
2.1.5.d - Preparo de solução trabalho.....	26
2.1.5.e - Preparo dos reagentes.....	26
2.1.5.f - Procedimentos de análise de atividade de inibição da enzima acetilcolinestearase.....	26
2.2 - Estigmasterol (E).....	29
2.3 - Estigmasta-5,22-dien-3-ona (DE01).....	30

2.4 - Estigmasta-4,22-dien-3-ona (DE02).....	31
2.5 - Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona (DE03)	32
2.6 - Estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima (DE04)	33
2.7 - Estigmasta-4,22-dien-,3,6-diona, oxima (DE05)	34
2.8 - Caracterizações estruturais dos compostos.....	35
2.8.a - Estigmasterol (E).....	35
2.8.b - Estigmasta-5,22-dien-3-ona (DE01)	39
2.8.c - Estigmasta-4,22-dien-3-ona (DE02).....	45
2.8.d - Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona (DE03).....	50
2.8.e - Estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima (DE04)	55
2.8.e- Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, oxima (DE 05).....	62
3.0 - Discussão dos resultados.	69
3.1 - Oxidação de álcoois secundários similares ao estigmasterol.....	69
3.2 - Formação de oximas.	73
3.3 - Atividade biológica.	75
3.3.a - Teste de atividade contra bactérias e <i>Candida</i>	75
3.3.b - Teste de atividade contra a enzima acetilcolinestearase.....	76
4.0- Conclusões.	77
Bibliografia.....	77
Anexos.....	84

Lista de Figuras

Figura 01 - Estrutura da talidomida (01).....	02
Figura 02 – Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento de diversas doenças causadas por bactérias e fungos.....	09
Figura 03 - Estrutura do esqueleto de esteroides (30).....	09
Figura 04 - Estrutura do colestanol (31) e do coprostanol (32) mostrando junções <i>trans</i> e <i>cis</i> respectivamente dos anéis A e B.....	10
Figura 05 – Biossíntese do colesterol e do estigmasterol.....	11
Figura 06 - Estrutura do colesterol (35) e dos principais fitoesteróis: brassicasterol (36), campesterol (37), β -sitosterol (38) e estigmasterol (39).....	13
Figura 07 - Derivados do estigmasterol com atividade contra células tumorais.....	15
Figura 08 - Estrutura dos derivados oxima, estigmasta-5,22-dien-3-ona (43) e imina, estigmasta-5,22-dien-3-ona, 2,4 dinitrofenilamina (44), patenteados por Yu e colaboradores (2012).....	15
Figura 09 - Imagem da placa de Elisa preparada com a eserina, o estigmasterol e derivados utilizada para testes de acetilcolinesterase.....	28
Figura 10 - Espectro na região de infravermelho do estigmasterol (E).....	35
Figura 11 - Espectro de RMN ^1H de E (CDCl_3 , 400 MHz).....	36
Figura 12 - Espectro de RMN ^{13}C de E (CDCl_3 , 100 MHz).....	37
Figura 13 - Sub espectro DEPT 135 de E (CDCl_3 , 100 MHz).....	37
Figura 14 - Espectro de massas de alta resolução por APCI do estigmasterol.....	38
Figura 15 - Espectro na região de infravermelho de DE01.....	39
Figura 16 - Espectro de RMN ^1H de DE01 (CDCl_3 , 400 MHz).....	40
Figura 17 - Espectro de RMN ^{13}C de DE01 (CDCl_3 , 100 MHz).....	41
Figura 18 - Sub espectro DEPT 135 de DE01 (CDCl_3 , 100 MHz).....	41

Figura 19 - Expansão do mapa de correlação HMQC de DE01 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	42
Figura 20 - Mapa de Contorno COSY de DE01 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	43
Figura 21 - Espectro de massas de alta resolução por APCI de DE01.....	44
Figura 22 - Espectro na região de infravermelho de DE02.....	45
Figura 23 - Espectro de RMN ¹ H de DE02 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	46
Figura 24 - Espectro de RMN ¹³ C de DE02 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	47
Figura 25 - Sub-espectro DEPT 135 de DE02 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	47
Figura 26 - Estrutura de ressonância da estigmasta-4,22-dien-3-ona.....	48
Figura 27 - Espectro de massas de alta resolução por APCI de DE02.....	49
Figura 28 - Espectro na região de infravermelho de DE03.....	50
Figura 29 - Espectro de RMN ¹ H de DE03 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	51
Figura 30 - Espectro de RMN ¹³ C de DE03 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	52
Figura 11- Espectro de RMN ¹³ C e de DE03 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	53
Figura 32 - Estrutura de ressonância da estigmasta-4,22-dien-3,6-diona.....	53
Figura 33 - Espectro de massas de alta resolução por APCI de DE03.....	54
Figura 34 - Espectro na região de infravermelho de DE04.....	55
Figura 35 - Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de DE04.....	56
Figura 36 - Espectro de RMN ¹³ C de DE04 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	57
Figura 37 - Sub espectro DEPT 135 de DE04 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	57
Figura 38 - Mapa de Correlação HMQC de DE04 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	58
Figura 39 - Ampliação do Mapa de Correlação HMQC de DE04 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	59
Figura 40 - Mapa de Contorno COSY de DE04 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	60
Figura 41 - Espectro de massas de alta resolução por APCI de DE04.....	61
Figura 42 - Espectro na região de infravermelho de DE05.....	62
Figura 43 - Espectro de RMN ¹ H de DE05 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	63

Figura 44 - Espectro de RMN de ^{13}C de DE05 (CDCl_3 , 100 MHz).....	64
Figura 45 - Sub-espectro DEPT 135 do DE05 (CDCl_3 , 100 MHz).....	65
Figura 46 - Mapa de Correlação HMQC de DE05 (CDCl_3 , 400 MHz).....	66
Figura 47 - Ampliação do Mapa de Correlação HMQC de DE05 (CDCl_3 , 400 MHz)...	67
Figura 48 - Espectro de massas de alta resolução por APCI de DE05.....	68
Figura 49 - Adaptação da proposta de mecanismo para oxidação do estigmasterol a partir da teoria de Li e Li (1998) em PDC.....	70
Figura 50 - Formação de oximas a partir de nitritos (Adaptação de Semon, 1930).....	73
Figura 51 - Estrutura da (E) estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima.....	74
Figura 52 - Estrutura da oxima: (3E, 6E) estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, oxima	74
Figura 53 - Mecanismo de formação da oxima à partir da cetona.....	75
Figura 54 - Mapa de Correlação HMQC de DE01 (CDCl_3 , 400 MHz).....	85
Figura 55 - Mapa de Contorno COSY de DE05 (CDCl_3 , 400 MHz).....	86
Figura 56 - Mapa de Contorno COSY de DE05 (CDCl_3 , 400 MHz).....	87

Lista de Tabelas

Tabela 01 - Doenças infecciosas causadas por fungos e bactérias e medicamentos utilizados no tratamento.....	04
Tabela 02 - Tempo de reação, relação reagente de Jones:estigmasterol e quantidade de reagente de Jones utilizado.....	19
Tabela 03 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de E com a literatura.....	38
Tabela 04 - Deslocamento químico dos átomos de carbono de DE01 no espectro de RMN de ^{13}C	44
Tabela 05 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de DE02 com a literatura.....	48
Tabela 06 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do DE03 com a literatura.....	54
Tabela 07 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de DE04 com a literatura.....	61
Tabela 08 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de DE05 com a literatura.....	68
Tabela 09 - Reações de oxidação do stigmasterol em micro escala variando-se a relação entre reagente de Jones, estigmasterol e o tempo reacional.....	72
Tabela 10 - Teor dos principais produtos obtidos das reações de oxidação do stigmasterol (RI e reações em micro escala) em relação ao tempo de retenção observados por análise de CG.....	72
Tabela 11 - Triagem de compostos contra os microorganismos: Bactérias e Candidas..	76
Tabela 12 - Estudo de atividade do stigmasterol e derivados em relação à enzima acetilcolinesterase.....	76
Tabela 13 - Comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio dos grupos metilas do stigmasterol e derivados obtidos.....	84
Tabela 14 - Comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono do stigmasterol e derivados.....	88

Lista de Siglas

AChE - Acetilcolinesterase

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

ATCC - *American Type Culture Collection* (Coleção de tipos de culturas americanas)

ATCI - Iodeto de Acetilcolina (*Acetylthiocholine iodide*)

BC - *Bacillus cereus*

CA - *Candida albicans*

CT - *Candida tropicalis*

CG - *Candida glabrata*

CP - *Candida parapsilosis*

CL - *Candida lusitanae*

CD- *Candidas dubliniensis*

CF - *Citrobacter freundii*

CG - Cromatografia a gás

CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior

CCDS – Cromatografia em camada delgada de sílica

COSY – *Correlation spectroscopy* (Espectroscopia de Correlação)

DE - Derivado do estigmasterol

DMF - Dimetilformamida

DTNB - 5',5-ditio-bis-(2-nitrobenzoato)

DEPT – Intensificação sem distorção por transferência de polarização.

EC - *Escherichia coli*

EPIC - *European Prospective Investigation into Cancer*

ESCF – *European Scientific Committee on Food*

FPP –difosfato de farnesila (*farnesyl pyrophosphate*)

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

HMQC - Correlação heteronuclear de múltiplos quanta

HSQC - Correlação heteronuclear de um único quantum

HIV – Human immunodeficiency virus infection (Vírus da imunodeficiência humana)

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IC₅₀ - Concentração inibitória para 50% dos microorganismos

IC₉₀ - Concentração inibitória para 90% dos microorganismos

IV – Espectroscopia no Infravermelho

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LM - *Listeria monocytogenes*

NADPH: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

PA - *Pseudomonas aeruginosa*

PDC - dicromato de piridínio

PCC - clorocromato de piridínio

PP – Difosfato (Pirofostato)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SA - *Staphylococcus aureus*

SS - *Streptococcus sanguinis*

ST - *Salmonella typhimurium*

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

RF – Fator de retenção

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

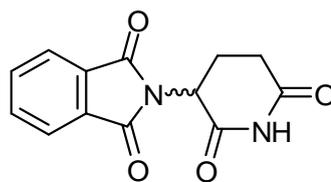
UFV - Universidade Federal de Viçosa

1.0 - Introdução

1.1 - Importância dos produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos

O conhecimento popular utiliza produtos naturais de origem aquática ou terrestre, dentre os quais se incluem animais e vegetais para tratar enfermidades diversas há séculos. O alho (*Allium sativum*) é descrito na literatura de 3000 a.C. pelos babilônicos como medicinal. O alho foi citado em 1893, por Dymock para tratamento de doenças do coração, flatulência, entre outros (Yusuf Ahmad, 1986). A morfina, utilizada como sedativo, foi isolada pelo alemão Friedrich Wilhelm Adam em 1804. Uma das maiores fontes destes medicamentos era e continua sendo as áreas tropicais do planeta Terra. Porém, a medicina conhecida no mundo atual teve sua evolução na Europa, em associação com o progresso da química orgânica, que possibilitou isolar e sintetizar os princípios ativos presentes nestes produtos naturais. Por meio da síntese orgânica, a partir da segunda guerra mundial, iniciou-se a síntese de derivados com eficácia muito superior. A identificação estrutural de tais princípios ativos possibilitou o processo de síntese em grande escala, reduzindo custos e logística. Sequencialmente, análogos destes princípios ativos foram sintetizados e produzidos em escala industrial, mostrando eficiência equivalente à dos produtos naturais, mas com menor custo de produção. Nascia desta forma, a indústria farmacêutica, com sedes na Europa e Estados Unidos.

Neste contexto, a evolução industrial levou à desvalorização dos produtos naturais junto à indústria farmacêutica por algumas décadas. Porém, a evolução do conhecimento em química orgânica, que favoreceu o desenvolvimento da indústria farmacêutica, também mostrou os desafios presentes neste processo, que incluíam efeitos adversos de medicamentos, tais como a talidomida (Figura 01, pág. 02). A talidomida foi industrializada em 1957 na Alemanha e rapidamente introduzida em muitos países, com exceção dos EUA. Em 1962, mais de dez mil casos de má formação fetal tinham sido identificados no mundo e associados ao uso de talidomida. A talidomida é derivada do ácido glutâmico com um único centro quiral, resultando em dois isômeros. O enantiômero R é responsável pelo efeito terapêutico do medicamento e, o enantiômero S, responsável pelos efeitos teratogênicos. Diante destes fatos, os governos de diversos países, em especial de países europeus e dos Estados Unidos, onde as grandes indústrias farmacêuticas estavam presentes, iniciaram um processo mais rigoroso de fiscalizar e regulamentar a produção, exigir testes de segurança e eficácia dos medicamentos a serem comercializados (Ando *et al*, 2002; Penna *et al*, 2005).



1

Figura 01 – Estrutura da talidomida (01).

As exigências para a industrialização de medicamentos ficaram cada vez maiores, tornando os produtos mais caros e o tempo necessário para sua aprovação cada vez mais longo. Atualmente, o lançamento de um novo medicamento custa até 500 milhões de dólares e gasta aproximadamente 15 anos, sem garantia de sucesso ao final do processo (Vieira e Ohayon, 2006). Na tentativa de reduzir o custo e o tempo de produção, a utilização de produtos naturais foi novamente visada para obtenção de novos fármacos. Em geral, muitos produtos naturais com função medicinal estão presentes em plantas e animais que são utilizados na alimentação dos homens ou animais, ou mesmo produzidos pelas plantas ou animais em pequenas doses, sem que sejam observados danos à espécie. Portanto, a busca de princípios ativos a partir de plantas é atrativa, devido à maior possibilidade de sucesso no processo, já que a cultura popular e a natureza testaram informalmente estas substâncias por centenas de anos.

Dentre os diversos medicamentos utilizados atualmente que são provenientes de plantas, podem-se citar os alcaloides: codeína, cânfora, atropina, pilocarpina, efedrina, cafeína e quinina. A morfina continua em uso atualmente para diminuir a dor em pacientes terminais de câncer (Barreiro, 2009).

Diversos derivados semissintéticos do colesterol são empregados na terapêutica medicinal, tais como a progesterona, pregnolona, cortisol, estradiol, testosterona com atividades anti-inflamatória, tratamento de osteoartrite, controle hormonal, etc. (Dewick, 2009).

Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é geralmente associada ao acúmulo da proteína β -amilóide ($A\beta$) na forma fibrilar. A deposição de $A\beta$ amilóide fibrilar leva à toxicidade e morte das células neuronais, causando falhas no sistema nervoso central, fato comumente observado

em portadores da doença de Alzheimer. Os principais sintomas consistem na perda de memória, seguida por perdas cognitivas e de raciocínio (Castillo, 1997).

O mal de Alzheimer não tem cura ou tratamento efetivo. O tratamento existente é sintomático e o tempo médio de vida dos pacientes é de 8 a 10 anos (Gauthier *et al*, 2013). Aproximadamente 4,6 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas com DA por ano atingindo-se gastos anuais de 148 bilhões (Seitz *et al*, 2013). As demências incluindo Alzheimer atingem cerca de 8% da população acima de 65 anos e 35% dos idosos acima de 85 anos (Canadian Study of Health and Aging Study Group, 1994; Seitz *et al*, 2013).

Em pacientes com Alzheimer é observada a diminuição dos níveis dos neurotransmissores acetilcolina, noradrenalina e serotonina. Diversos tratamentos são propostos utilizando inibidores de acetilcolinesterase, que aumentam o nível de acetilcolina no organismo (Trevisan *et al*, 1996).

Doenças infecciosas

As doenças infecciosas foram responsáveis por 45,7% das mortes em 1930, diminuindo para 4,9% em 2006 no Brasil. Atualmente, diversos esforços do Ministério da Saúde têm sido adotados para controle e erradicação de tais doenças (Mello, 2010). Classificam-se como doenças infecciosas, doenças causadas por vírus, fungos ou bactérias transmitidas por vetores animais, insetos ou pelo próprio homem, capazes de se propagarem de um indivíduo para o outro, ou do ambiente e de animais para o homem. Aproximadamente 25.000 pessoas morrem anualmente na Europa devido a infecções multi-resistentes causadas por bactérias (Masihi e Schäfer, 2011).

No Brasil prevalecem diversas doenças infecciosas (DIs), dentre as quais a AIDS, dengue, gripes, hepatites, entre outras. Pesquisas diversas tem sido feitas para desenvolvimento de fármacos, vacinas e tratamentos eficazes para eliminação de tais DIs. A Tabela 01 apresenta algumas doenças infecciosas causadas por fungos, e bactérias e os medicamentos atualmente utilizados para o tratamento seguido pela apresentação da estrutura química dos fármacos utilizados nos tratamento atualmente na figura 02pág.08.

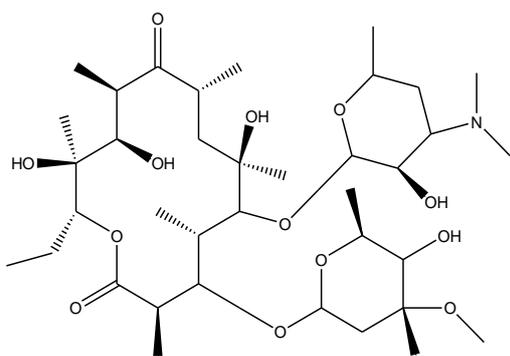
Tabela 01 – Doenças infecciosas causadas por fungos e bactérias e medicamentos utilizados no tratamento.

Doença	Agente etiológico	Fármacos utilizados no tratamento
Difteria	Bacilo Gram positivo <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Eritromicina (2), Penicilina G (3).
Infeções diversas em peles, mucosas, bacterímia, pneumonia, entre outros.	Bactéria Gram positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	Clindamicina (4), Oxacilina (5), Vancomicina (6), Teicoplanina, Linezolida (7).
Infeções urinárias	Bactéria Gram positiva <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Nitrofurantoína (8) , ceftriaxona (9).
Tétano acidental	Bacilo Gram positivo anaeróbio esporulado <i>Clostridium tetani</i>	Metronidazol (10) e Tetraciclina (11) G.
Diarréias e infecções urinárias	Bacilo Gram negativo <i>Escherichia coli</i>	Fosfomicina (12).
Infeções multirresistentes diversas em hospitais	Bactéria Gram negativa aeróbia <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amicacina (13), Imipenem (14), Meropenem (15).
Tracoma	Bactéria Gram negativa <i>Chlamydia trachomatis</i>	Tetraciclina (11), Azitromicina (16), Doxiciclina (17), Sulfadiazina (20).
Cólera	Bacilo Gram negativo <i>Vibrio cholerae</i>	Sulfametoxazol (18), Trimetropina (19).
Coqueluche	Bacilo Gram negativo não esporulado <i>Bordetella pertussis</i>	Eritromicina (2) (estolato).
Doenças meningocócicas	Bactéria Gram negativa <i>Neisseria meningitidis</i>	Ampicilina (21), Penicilina (3).

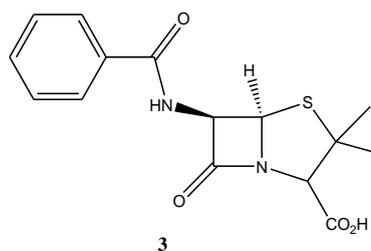
Cancro mole	Bacilo	Gram	negativo	Ciprofloxacina (22), Azitromicina (16).
Febre maculosa brasileira	Bactéria	Gram	negativa	Clorafenicol e Doxiciclina (17).
Gonorreia	Bacilo	Gram	negativo	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Ofloxacina, Ciprofloxacina (22), Ceftriaxona (9).
Meningite	Bacilo	Gram	negativo	Cloranfenicol (23) e Ceftriaxona (9).
Peste	Cocobacilo	Gram	negativo	Tetraciclina (11), Estreptomicina (24).
Shigelose	Bactéria	Gram	negativa	<i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Shigella boydii</i> e <i>Shigella sonni</i> . Sulfametaxazol (18), Trimetoprima (19).
Candidíase	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i>			Nistatina (25), Fluconazol (26), Isoconazol (27).
Coccidioidomicose	Fungo dimórfico	<i>Coccidioides immitis</i>		Anfotericina B (28), Itraconazol (29).
Criptococose	Fungo	<i>Cryptococcus neoformans</i>		Anfotericina B (28).

Paralelamente à evolução dos tratamentos com antibióticos, surgiu também a resistência dos micro-organismos aos antibióticos (Figueiredo *et al*, 2007). Tavares (2000) identificou que mais de 70% dos pacientes avaliados apresentaram o micro-organismo *Staphylococcus aureus* resistente a penicilinas naturais, amoxicilina e ampicilina. Adicionalmente grupos de alta sensibilidade tais como crianças, gestantes, pacientes internados e idosos demandam medicamentos adequados com eficácia e efeitos adversos menores, ampliando o campo de pesquisa e a necessidade de novos medicamentos que possam suprir tais nichos. A meningite causada pelo *Haemophilus influenzae* tipo B atinge principalmente crianças de até cinco anos, deixando sequelas graves tais como deficiência auditiva ou danos cerebrais maiores em aproximadamente 5% dos pacientes atingidos (Fiocruz). Cerca de 16% dos pacientes internados adquirem infecções hospitalares, causadas

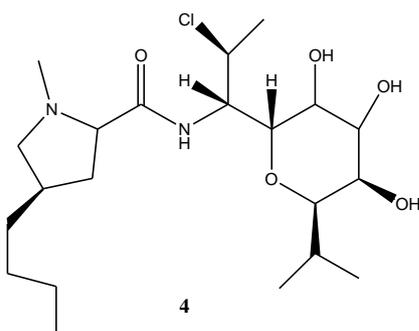
por micro-organismos presentes no próprio corpo, devido ao desequilíbrio entre a flora bacteriana e a baixa resistência do paciente. Podem também ser infectados pelo ambiente hospitalar ou mesmo por pessoas que circulam neste. Entre os pacientes contaminados com infecções diversas, 47% são causados por *Staphylococcus sp* (Chagas, 2011).



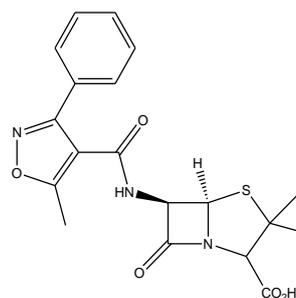
2



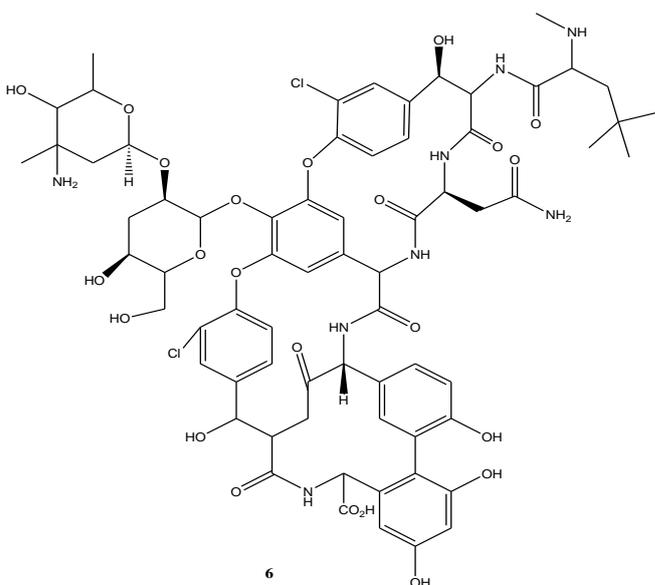
3



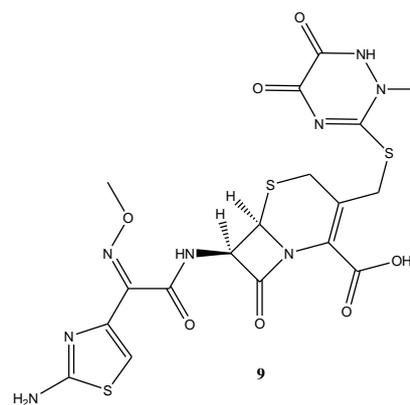
4



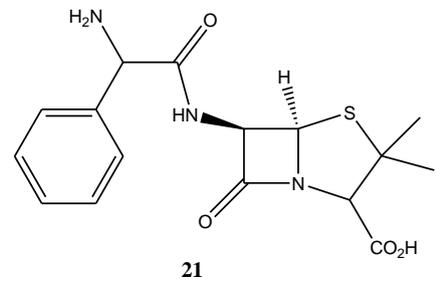
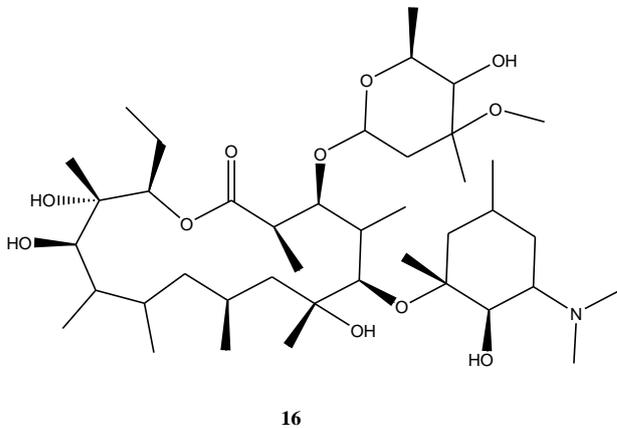
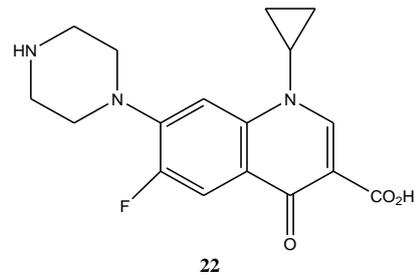
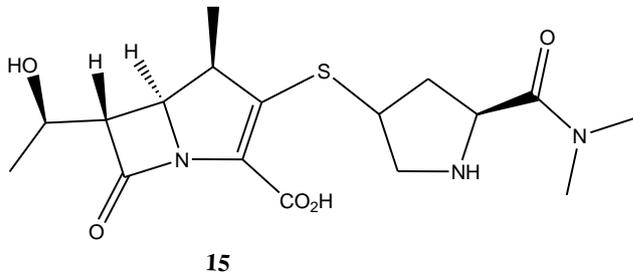
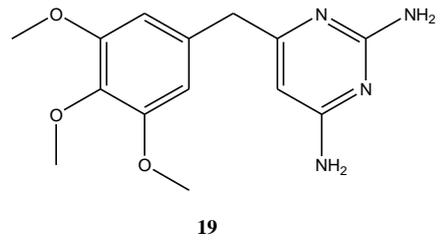
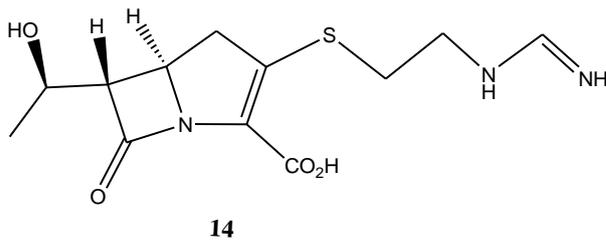
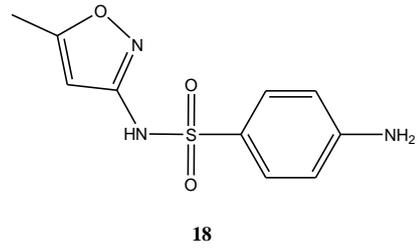
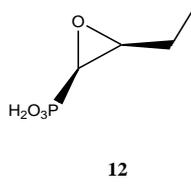
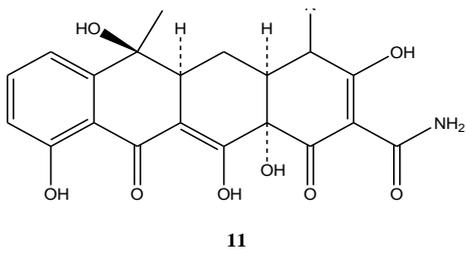
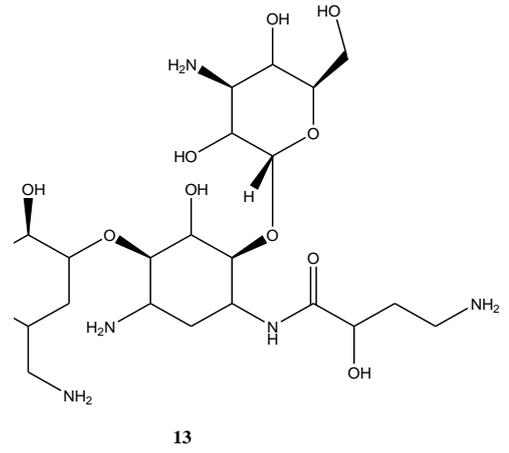
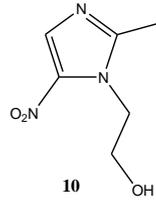
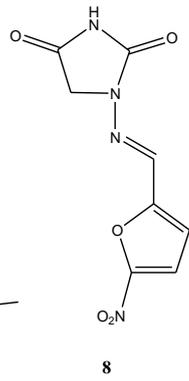
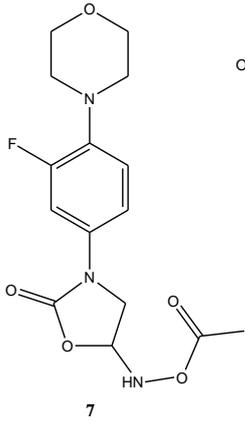
5

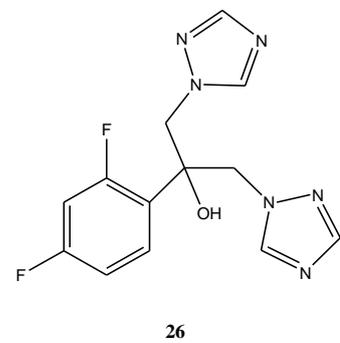
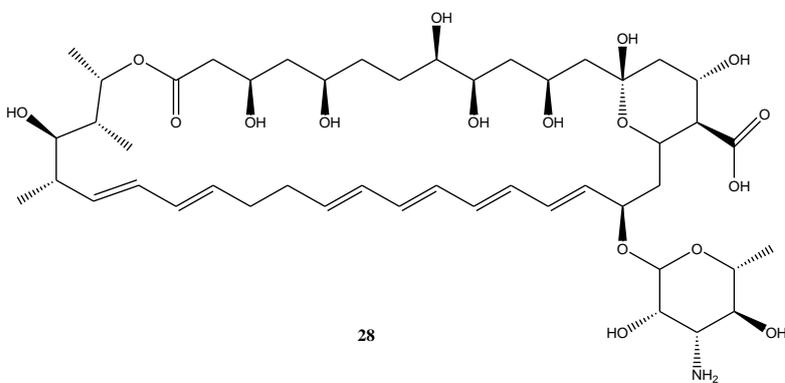
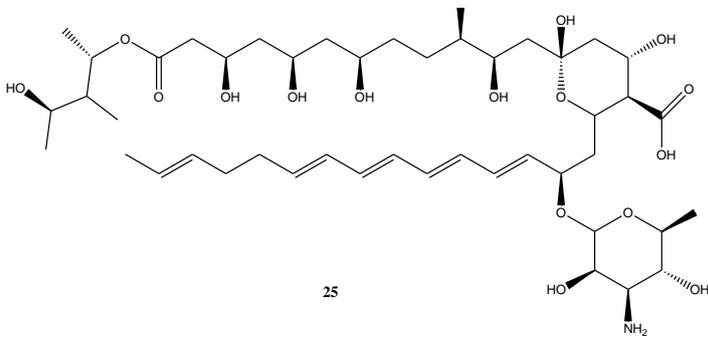
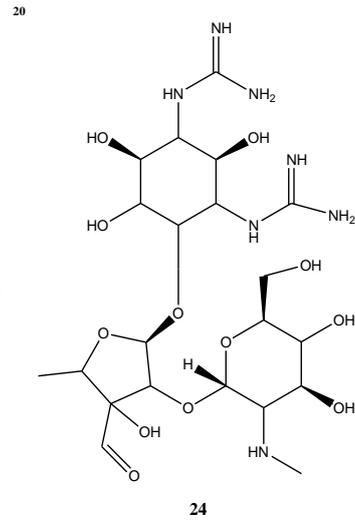
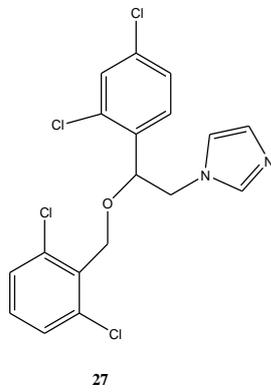
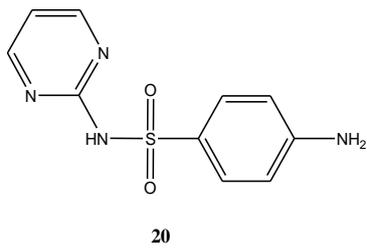
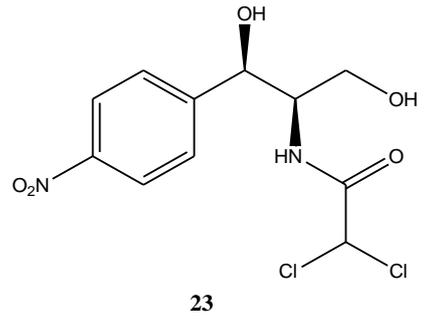
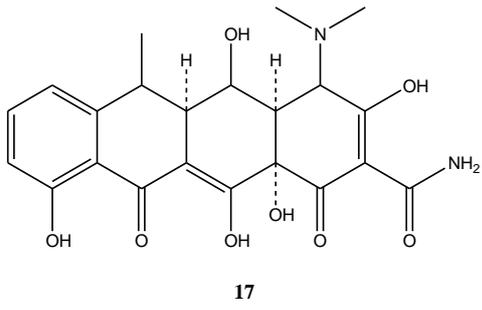


6



9





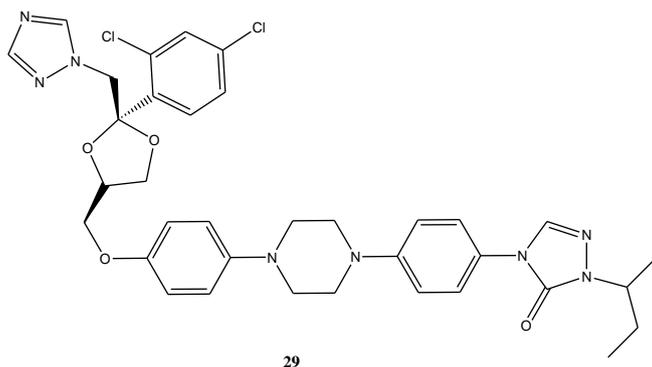


Figura 02 – Estruturas química dos fármacos utilizados no tratamento de diversas doenças causadas por bactérias e fungos.

Esteroides

Produtos naturais são derivados de metabolismo secundário dos seres vivos. São resultantes do metabolismo primário de ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídeos. A classificação dos produtos naturais é dependente da rota biossintética de origem. As principais classes de produtos naturais com potencial atividade biológica são alcaloides, terpenos, flavonoides, cumarinas, quinonas e esteroides (Clayden, 2001).

Os esteroides (Figura 03) são compostos presentes em animais e plantas com funções estruturais e hormonais. São substâncias caracterizadas pela fusão de três anéis de seis membros e um anel de cinco membros. A fusão dos anéis pode ser *cis* ou *trans*, porém os esteroides identificados até o momento possuem junção *trans*, conforme o colestanol (**31**), (Figura 04), exceto pela fusão do anel A e B que em alguns casos, pode ser *cis* conforme apresentado para o coprostanol (Clayden, 2001).

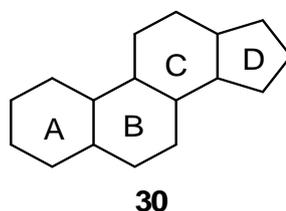


Figura 03 – Estrutura do esqueleto de esteroides (**30**).

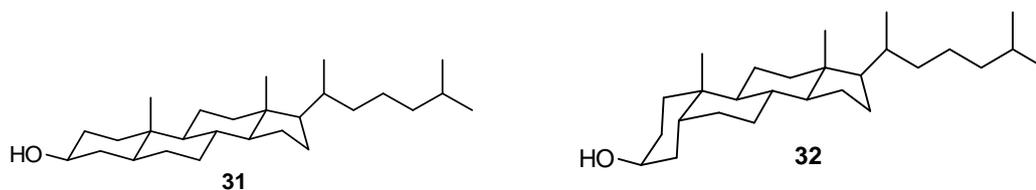


Figura 04 – Estrutura do colestanol (**31**) e do coprostanol (**32**) mostrando junções *trans* e *cis* respectivamente dos anéis A e B.

O colesterol

O colesterol (**36**), (Figura 06, pág.12) é um esteroide responsável por diversas funções no organismo humano tais como produção e regulação dos hormônios esteroidais, do ácido biliar, além da função regulatória e estrutural das membranas celulares. O colesterol está presente principalmente no cérebro, sangue, fígado e medula espinhal. Os animais produzem o colesterol, enquanto os vegetais produzem diversos fitoesteróis e/ou fitoestanois com função equivalente à do colesterol no organismo dos animais. O colesterol é produzido no organismo a partir do ácido mevalônico com diversas etapas enzimáticas até o esqualeno (**Figura 05, pág. 11**), que sofre oxidação e, em seguida, ciclização, gerando o intermediário lanosterol, diferentemente dos fitoesteróis, que preferencialmente é obtido do fosfato de metileritritol que tem como intermediário o cicloartenol (Lenton *et al*, 1971 e Goodwin *et al*, 1971).

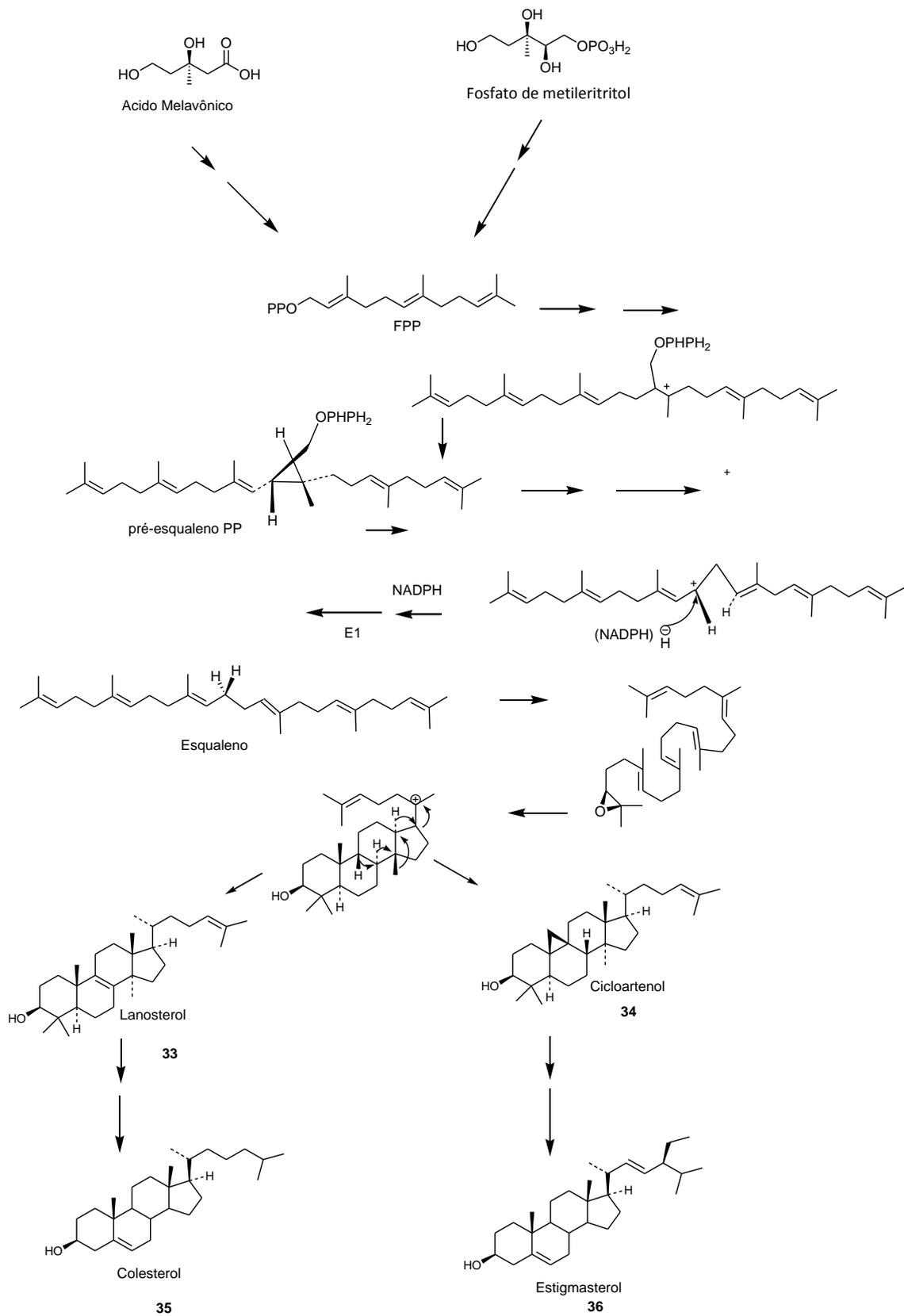


Figura 05 - Biossíntese do colesterol e do estigmasterol (Adaptado de Medicinal Natural Products, Dewick, 2009).

O colesterol também pode ser obtido a partir da alimentação, por absorção intestinal. Os teores de absorção do colesterol ingerido dos alimentos variam entre 35-70%. Os demais esteroides, com estrutura semelhante à do colesterol, tais como os fitoesteróis, são absorvidos em percentuais de 0,4-3,5%, enquanto que a absorção de fitoestanois gira em torno de 0,02-0,3%. Há uma competitividade pela absorção intestinal quando diversos esteroides estão presentes (Jong *et al*, 2003).

O colesterol proveniente de fontes externas, em geral, e mais especificamente o colesterol LDL [lipoproteína de baixa densidade], é responsável pelo aumento dos riscos de doenças cardiovasculares e aterosclerose (Goodwin, 1971; Simons e Ikonen, 2000).

Fitoesteróis

Os fitoesteróis estão presentes principalmente em sementes, nozes, cereais e grãos de diversas classes de vegetais, concentrados principalmente em óleos e sementes, como reservas para o crescimento de brotos e células (Otaegui-Arazola *et al*, 2010). Cerca de 250 diferentes fitoesteróis foram identificados. Ocorrem naturalmente associados aos fitoestanois, que se diferem apenas por serem saturados e, portanto, não estarem propensos à oxidação (del Castillo, 2013). O estigmasterol (**36**) é um dos quatro principais fitoesteróis (Figura 06, pág.12) presentes em maior quantidade e de maior ocorrência em vegetais, junto com o β -sitosterol (**38**), o campesterol (**37**) e o brassicasterol (**39**) (Otaegui-Arazola *et al*, 2010).

Estudos diversos indicam que o consumo diário de fitoesteróis e fitoestanois diminui a absorção intestinal do colesterol, levando à redução do colesterol LDL em até 15%, sem alterar o colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade) que é benéfico ao organismo dos mamíferos e, conseqüentemente, reduz o risco de arteriosclerose (Otaegui-Arazola *et al*, 2010). A redução de 1mmol/L de colesterol LDL em 1mmol/L de sangue resulta na redução de riscos cardiovasculares em 20% (Plana *et al*, 2008). A associação de fitoesteróis ou fitoestanois com estatinas foi descrita como mais eficiente do que a ingestão de uma dose dupla de estatinas (Eussen *et al*, 2011). Segundo a *European Prospective Investigation into Cancer* (EPIC, *Scientific Committee on Food*, 2002), o consumo de fitoesteróis no Ocidente é de 150-400 mg/dia. A partir de 1995, diversas empresas do ramo alimentício têm adicionado fitoesteróis e fitoestanois em alimentos, com apelo à redução do colesterol e de doenças do coração. A *European Scientific Committee on Food* (ESCF) recomenda que o uso diário de fitoesteróis seja limitado a 3 g/dia, dose a partir da qual não haveria aumento de eficiência na redução do colesterol e poderia reduzir os efeitos benéficos. (Kuhlmann *et al*, 2005).

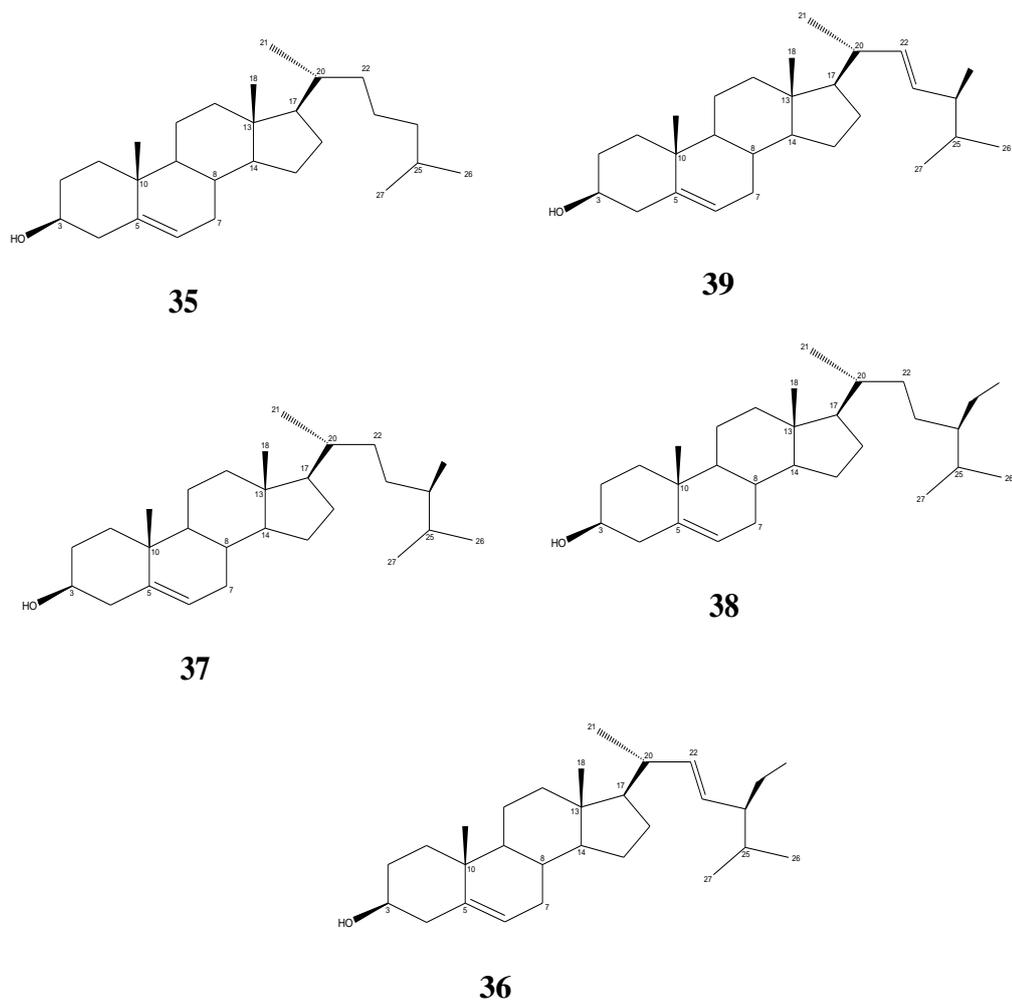


Figura 06 - Estrutura do colesterol (**35**) e dos principais fitoesteróis: brassicasterol (**39**), campesterol (**37**), β -sitosterol (**38**) e estigmasterol (**36**).

Estigmasterol: Fontes, descoberta e importância

O estigmasterol (**36**) é um fitoesterol de 29 carbonos contendo uma hidroxila no átomo de carbono 3 e duas insaturações. Foi descrito pela primeira vez em 1906 por Windhaus e Hauth, como metabólito de espécie de feijão Calabar (*Physostigma venenosum*) em associação com o β -Sitosterol (**38**), cuja única diferença estrutural é a ausência da ligação dupla entre os átomos de carbono 22 e 23 (Fernholz e Stavelly, 1940).

O estigmasterol, assim como os demais fitoesteróis, é encontrado na forma livre, esterificada ou glicosilada na hidroxila (Moreau *et al*, 2002). O estigmasterol, nas plantas, tem função estrutural e de crescimento, equivalentes à função do colesterol nos animais e do

ergosterol nos fungos (Mercer, 1993). A comprovação da eficiência do estigmasterol na redução do colesterol e doenças do coração, entre outras, potencializou o interesse no estudo de seus derivados como medicamentos (Plana, 2008).

O estigmasterol tem potencial atividade anti-inflamatória para tratamento da osteoartrite (Gabay *et al*, 2010; Chen *et al*, 2012) e, em 2010, foi patenteado para utilização para prevenção e tratamento de doenças do sistema nervoso do tipo amiloidose, como o mal de Alzheimer (Grimm *et al*, 2010). Modificações estruturais em derivados esteroidais como o estigmasterol estão sendo realizadas com a intenção de se obter moléculas com maior atividade biológica e baixa toxicidade. Algumas das modificações são realizadas nos anéis A e B do núcleo esteroidal e estão relacionadas à introdução de heteroátomos (principalmente nitrogênio e oxigênio). Muitos dos derivados obtidos apresentam atividades contra câncer (Gana *et al*, 2012), contra o HIV (Singh *et al*, 2000), antifúngica (Chung, 1998), anti-inflamatória, antibiótica e imunossupressora, dentre outras (Vida, 2012; Bhatti, 2012).

Brosa *et al* (1996) modificaram a estrutura do estigmasterol, introduzindo grupos hidroxila e lactamas com promissora atividade alelopática em arroz. Os mesmos autores, em 2004, introduziram grupos azida e amina no anel A, em adição à lactama no anel B. O estudo da atividade alelopática destes derivados foi inferior aos derivados sintetizados em 1996.

Cui *et al* (2009) estudaram a atividade anticancerígena de derivados do estigmasterol, sitosterol e colesterol frente a quatro linhagens de carcinoma: Sk-Hep-1 (câncer de fígado), H292 (câncer de pulmão humano), PC-3 (câncer de próstata) e Hey-1B (câncer de ovário). Inicialmente, os pesquisadores testaram derivados contendo oximas no anel A e B. A maioria dos derivados mostrou atividade em pelo menos uma das linhagens utilizadas. No caso do estigmasterol, os melhores resultados foram obtidos para o derivado substituído no átomo de carbono C-6 com grupo oxima e hidroxila no átomo de carbono C-3 (**40**) para células tumorais de fígado e de pulmão (Figura 07). Em outro estudo, os derivados preparados continham grupos sulfato nas posições 3 e 6 dos anéis A e B (Figura 07). Novamente todos os derivados apresentaram atividade. Os resultados mais promissores foram obtidos para o derivado dissulfatado (**41**) nas células de tumor de pulmão e de próstata (Cui, 2009b).

Em 2013, Huang e colaboradores estudaram a atividade anti-proliferativa de derivados contendo grupos sulfato e oxima do estigmasterol (**42**) frente a outras três linhagens de carcinoma: HeLa (carcinoma cervical), SMMC 7404 (câncer de fígado) e MGC 7901 (carcinoma gástrico). O derivado contendo o grupo sulfato no anel A e o grupo oxima no anel

B (**42**) mostrou o melhor resultado contra a linhagem de carcinoma cervical, com inibição maior ($IC_{50} = 14,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$), porém próxima daquela apresentada pela cisplatina, usada como controle positivo no experimento ($IC_{50} = 10,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

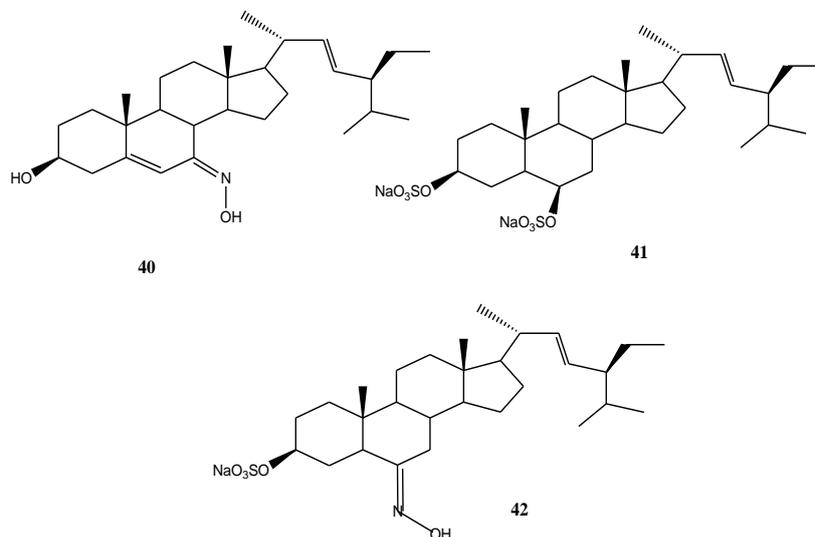


Figura 07 - Derivados do estigmasterol com atividade contra células tumorais.

Recentemente, Yu *et al* (2012) requisitaram uma patente relacionada à atividade antitumoral da oxima (**43**) e da imina, a 2,4-dinitrofenilamina (**44**), derivados do estigmasterol.

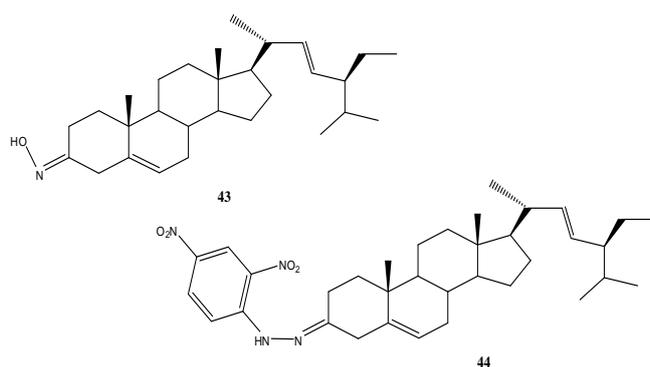


Figura 08 - Estrutura dos derivados estigmasta-5,22-dien-3-ona, oxima (**43**) e imina estigmasta-5,22-dien-3-ona, 2,4 dinitrofenilamina (**44**), patenteados por Yu *et al* (2012).

Objetivo

Sintetizar derivados oxigenados e nitrogenados a partir do estigmasterol para obtenção de compostos com atividades contra a enzima acetilcolinesterase e antimicrobiana.

2 – Síntese e caracterização

Equipamentos

- ✓ Espectrômetro Bruker *Avance DRX400* e *DPX200* (LAREMAR-UFMG)
- ✓ Espectrofotômetro ATR *Spectro One* Perkin Elmer (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG)
- ✓ Cromatografo a gás HP 7820A Agilent; Coluna HP5 30m x 0,32mm x 0,25µm Agilent.
- ✓ Ponto de fusão Gehaka modelo PF 1000
- ✓ Autoclave vertical Fanen, modelo 415/3, série J03610
- ✓ Balança analítica Quimis, modelo Q-ILA2104, 210g/ 0,0001gmg
- ✓ Balança eletrônica Digimed KN1000C, série 04G6
- ✓ Estufa de secagem Fanen Ltda Modelo 002 CB
- ✓ Evaporador rotativo Fisatom Modelo 803
- ✓ Capela VECO, modelo JLF 912, série FL 5799

Reagentes

- ✓ Sílica gel 63 a 200 µm para cromatografia em coluna *flash*
- ✓ Estigmasterol PA(Aldrich)
- ✓ Acetato de etila PA (VETEC)

- ✓ Hexano PA (Synth)
- ✓ Ácido Sulfúrico 98% PA (Synth)
- ✓ Clorofórmio PA (Synth)
- ✓ Acetona PA (Synth)
- ✓ Carbonato de sódio PA (Vetec)
- ✓ Oxalato de sódio PA (Synth)
- ✓ Cloridrato de hidroxilamina PA (Synth)
- ✓ Metanol/Diclorometano/DMSO PA
- ✓ Tampão Tris/HCl (pH 8,0) Fisiostigmina (*Physostigmine*) Galantamina (*Galantamine*)
- ✓ Iodeto de Acetilcolina PA (*Acetylthiocholine iodide*, ATCI)
- ✓ Acetilcolinesterase (*Acetylcholinesterase*) 3U/mL
- ✓ Albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*)
- ✓ DTNB (5',5-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) (Sigma, D-8130)

Cromatografia em coluna de sílica gel (CCS)

As separações cromatográficas em coluna *flash* foram realizadas em sílica gel 60 Sigma (63-230 mesh).

Cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDS)

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

As revelações cromatográficas foram realizadas sequencialmente com as metodologias descritas a seguir:

- Exposição da placa eluída em solventes: acetato, acetato/hexano a vapores de iodo ressublimado.

- Borrifação de solução aquosa de sulfato cérico em ácido sulfúrico seguida por aquecimento em estufa a 100 °C.

Crítérios de pureza

Os critérios de pureza adotados foram: visualização de uma única mancha em cromatoplasas eluídas com diferentes eluentes, faixa de fusão estreita, bandas bem definidas no espectro de absorção na região de IV e os sinais no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .

Faixa de fusão

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

Elucidação estrutural das substâncias

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

Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros no IV foram obtidos na região de 4000 a 600 cm^{-1} por medidas direta nas amostras.

Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN (^1H , ^{13}C , DEPT-135, HSQC, HMBC e COSY) foram obtidos pela utilização dos equipamentos *ADVANCE DPX 200* ou *DPR 400* utilizando como solvente o CDCl_3 e padrão interno o tetrametilsilano (TMS).

Espectrometria de massas

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos através do equipamento Shimadzu LCMS-IT-TOF acoplado a cromatografo. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio e diluídas em metanol. A fonte utilizada foi de ionização química sob pressão atmosférica (APCI).

2.1 - Metodologia

As metodologias apresentadas foram modificadas e adaptadas as condições do laboratório e todos os residuais gerados recolhidos para posterior tratamento.

2.1.1 - Reações de oxidação do estigmasterol

2.1.1.a - Preparação do reagente de Jones (Eisenbraun *et al*, 1965)

Em um balão de 125 mL, foram adicionados 5 g de trióxido de cromo (CrO_3), 15 mL de água destilada e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi deixada sob agitação por 5 minutos à temperatura ambiente. O reagente foi rotulado e guardado em frasco âmbar para utilização futura.

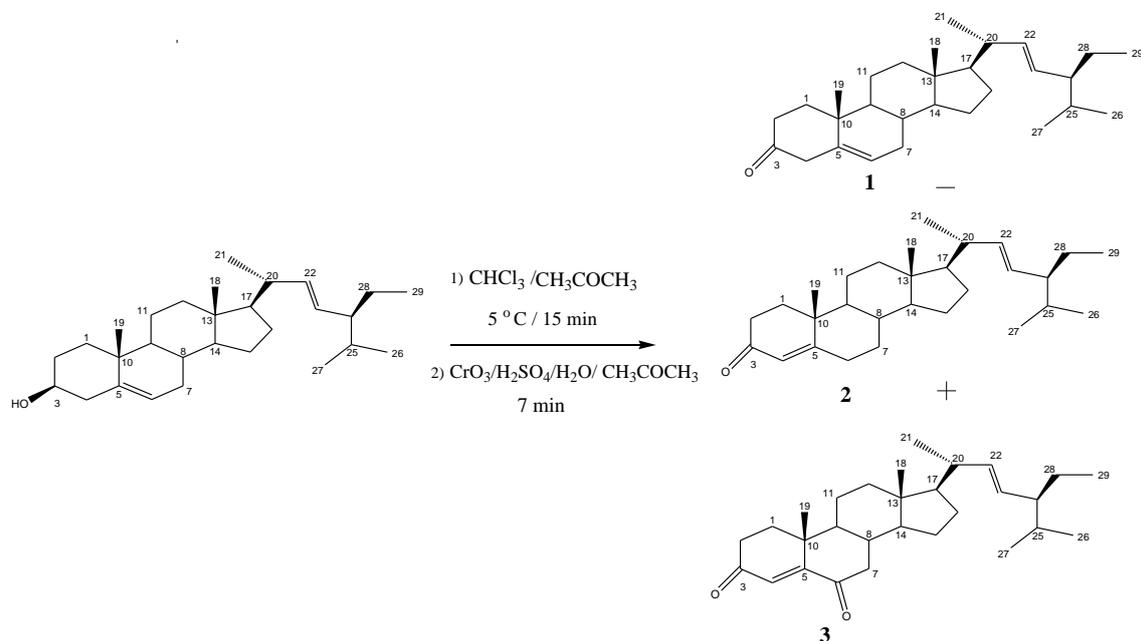
2.1.1.b - Reação de oxidação do estigmasterol em micro escala para análise em CG

Em um balão de 125 mL, foram adicionados 10 mg de estigmasterol ($2,42 \times 10^{-5}$ mol), 5 mL de clorofórmio e 5 mL de acetona. A solução foi deixada sob agitação por 15 minutos em banho de gelo a temperatura de 5 °C. Posteriormente foram adicionados, gota a gota, a alíquota de reagente de Jones previamente solubilizados em 10 mL de acetona, de acordo com a Tabela 02. A mistura foi mantida sob agitação pelo tempo determinado de acordo com a Tabela 02. Em seguida a reação foi finalizada adicionando-se 10 mL de solução de carbonato de sódio 10%. Os solventes foram retirados sob vácuo em evaporador rotatório. O resíduo foi extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com água destilada (5 porções de 5 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. Após filtração, o solvente foi removido sob vácuo em evaporador rotatório. Por CCDS (85% hexano /15% acetato de etila) evidenciou-se a presença de três produtos com maior RF que o material de partida, residual do reagente e outros produtos mais polares. As amostras foram identificados e enviados para análise.

Tabela 02 - Tempo de reação, relação reagente de Jones:estigmasterol e quantidade de reagente de Jones utilizado.

Reação	Tempo de Reação/min	Relação em mol Jones/estigmasterol	Quantidade de reagente Jones utilizado/mL
R4	1	1	0,015
R5	5	1	0,015
R6	7	1	0,015
R7	1	2	0,030
R8	5	2	0,030
R9	7	2	0,030

2.1.1.c - Reação de oxidação do estigmasterol utilizado na síntese dos derivados oxidados em macro escala (Mori *et al*, 1982)



Em um balão de 250 mL, foram adicionados 500 mg de estigmasterol (1,21 mol), 40 mL de clorofórmio e 40 mL de acetona. A solução foi deixada sob agitação por 15 minutos em banho de gelo a temperatura de 5°C . Posteriormente foram adicionados, gota a gota 1,5 mL (2,39 mmol) de reagente de Jones previamente solubilizados em 20 mL de acetona. A mistura foi mantida sob agitação por 7 minutos. Em seguida a reação foi finalizada adicionando-se 20 mL de solução de carbonato de sódio 10%. Após filtração, os solventes foram retirados sob vácuo em evaporador rotatório. O resíduo foi extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com água destilada (5 porções de 25 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. Após filtração o solvente foi removido sob vácuo em evaporador rotatório. Por CCDS (85% hexano /15% acetato de etila) evidenciou-se a presença três produtos com maior RF que o reagente e outros produtos mais polares com menor RF que o reagente inicial, em menor concentração. O bruto da reação (490 mg) foi submetido à cromatografia *flash* utilizando como único eluente a mistura de solventes (95% hexano/ 5% acetato de etila). Foram obtidas 16 frações de 50 mL reunidas conforme perfil cromatográfico. A fração reunida 3 a 4 denominada DE01 (60 mg, 20% do produto isolado) foi identificada como estigmasta-5,22-dien-3-ona; as frações reunidas 7 a 10 denominada DE02 (140 mg, 46,7% do produto isolado) foi identificada como estigmasta-4,22-dien-3-ona; as frações reunidas 13 a 15 denominada DE03 (100 mg, 33,3%

do produto isolado) identificados como estigmasta-4,22-dien-3,6-diona. A fração 16 continha material de partida e produtos com maior RF que o estigmasterol.

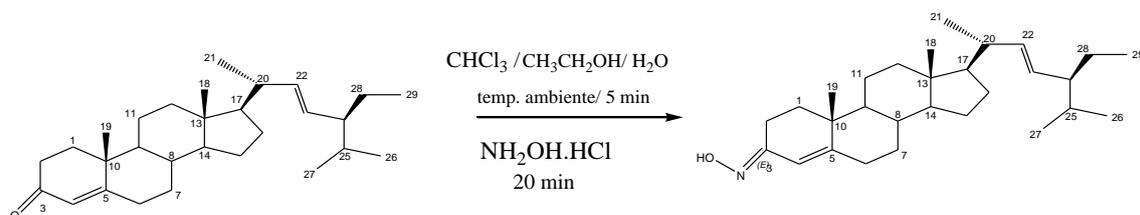
2.1.1.d - Reação de conversão de cetona β -insaturadas a cetonas α -insaturadas (Cui *et al*, 2009)

O mesmo procedimento utilizado no item 2.1.1.c, pág. 18, foi executado. A fase orgânica extraída com acetato de etila em 2.1.1.c, foi tratada com uma solução aquosa de ácido oxálico 15% (20 mL) e deixados sob agitação por 15 minutos. Após este período a fase orgânica foi lavada com água destilada (5 porções de 25 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. Após filtração, o solvente foi removido sob vácuo em evaporador rotatório. Por CCDS (85% hexano /15% acetato de etila) evidenciou-se a presença dois produtos com maior RF que o reagente, residual do reagente e outros produtos com menor RF que o estigmasterol em menor concentração. O bruto da reação (487 mg) foi submetido à cromatografia *flash* utilizando como único eluente a mistura de solventes (95% hexano/ 5% acetato de etila). Foram obtidas 16 frações de 50 mL reunidas conforme perfil cromatográfico. As frações reunidas resultaram em duas substâncias puras que foram identificadas pelos métodos espectrométricos descritos na caracterização. As frações reunidas 4 a 10 denominada DE02 (210 mg, 61,8% do produto isolado) identificadas como estigmasta-4,22-dien-3-ona; as frações reunidas 11 a 14 denominada DE03 (130 mg, 38,2% do produto isolado) identificadas como estigmasta-4,22-dien-3,6-diona.

2.1.2 - Reações de adição nucleofílica ao grupo carbonila (Lachman, 1930)

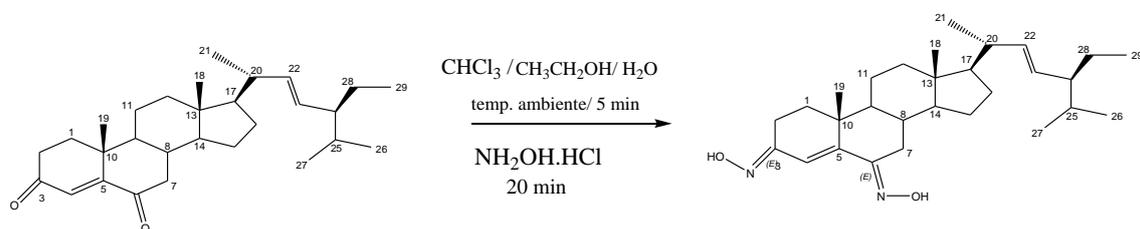
Em um balão de 125 mL, foram adicionados os produtos da oxidação DE02 (2.1.2a) ou DE03 (2.1.2b), 4 mL de clorofórmio, 32 mL de álcool etílico e 8 mL de água destilada. A solução foi deixada sob agitação à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foram adicionados cloridrato de hidroxilamina; A mistura foi deixada sob agitação por 20 minutos. A reação foi finalizada pela adição de 20 mL de solução de bicarbonato de sódio 10%. Os solventes foram removidos sob vácuo em evaporador rotatório. Os resíduos das reações foram extraídos com acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com água destilada (5 porções de 25 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. A concentração do produto foi feita sob vácuo em evaporador rotatório. O resíduo foi submetido à cromatografia CCDS conforme reação.

2.1.2.a - Obtenção de oxima a partir de DE02



Foram utilizados 340 mg de DE02 (0,83 mmol) e 450 mg de cloridrato de hidroxilamina (6,48 mmol) conforme procedimento 2.1.2 resultando em 347 mg de produto. Por CCDS (80% hexano /20% acetato de etila) evidenciou-se a presença de dois produtos com menor RF que o material de partida. O resíduo foi submetido à cromatografia *flash* utilizando como único eluente a mistura de solventes (92% hexano / 8% acetato de etila). Foram obtidas 16 frações de 50 mL reunidas conforme perfil cromatográfico. As frações reunidas 5 a 13 denominada DE04 (324 mg, 100% do produto isolado) identificadas como o produto: estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima.

2.1.2.b - Obtenção de dioxima a partir de DE03



Foram utilizados 220 mg de DE03 (0,52 mmol) e 800 mg de cloridrato de hidroxilamina (11,51 mmol) conforme procedimento 2.1.2 resultando em 202 mg de material bruto. A placa de CCDS (55% hexano /45% acetato de etila) revelou a presença de um produto com menor RF que o material de partida e o reagente inicial. O resíduo foi submetido à cromatografia *flash* utilizando como único eluente a mistura de solventes (65% hexano / 35% acetato de etila). Foram obtidas 16 frações de 50 mL reunidas conforme perfil cromatográfico. Na fração reunida 1 a 4 recuperou-se o material de partida DE03 (37 mg, 18,3 % do produto isolado); as frações reunidas 6 a 16 denominada DE05 (165 mg, 81,7 % do produto isolado), identificadas como a estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, oxima.

2.1.3 - Estudo da atividade biológica

2.1.3.a - Triagem de bactérias e fungos

O estigmasterol e os produtos das reações de oxidação e oximas: DE01, DE02, DE03, DE04, DE05 e DE06 foram submetidos ao estudo de triagem para avaliação biológica da atividade utilizando o método de placas ELISA para avaliação biológica da atividade contra as bactérias *Gram-positivas*: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29212) e *Streptococcus sanguinis* (ATCC 49456); as bactérias *Gram-negativas*: *Citrobacter freundii* (**CF**, ATCC 8090), *Escherichia coli* (**EC**, ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (**PA**, ATCC 27853) e *Salmonella typhimurium* (**ST**, ATCC 14028); além das espécies de *Candidas*: *Candida albicans* (**CA**, ATCC 18804), *Candida tropicalis* (**CT**, ATCC 750), *Candida glabrata* (**CG**, ATCC 90030), *Candida parapsilosis* (**CP**, ATCC 22019), *Candida lusitanae* (**CL**, CBS 6936) e *Candida dubliniensis* (**CD**, Isolado clínico 28) conforme literatura (Ferreira *et al*, 2012) e também os fungos: *Aspergillus flavus* (**AT**, CCT 4952), *Cladosporium cladosporioides* (**CC**). Os erros encontrados nos testes foram limitados a 3%. Os compostos foram solubilizados em DMF com baixa solubilidade e precipitações no solvente e meio. Todos os procedimentos foram executados dentro da capela devidamente esterilizada com álcool 70 °GL. Antes de iniciar o procedimento o bico de Bunsen foi ligado e os procedimentos foram executados próximos ao bico de Bunsen, proporcionando ambiente estéril durante todos os procedimentos. Todos os materiais utilizados foram esterilizados antes da utilização em autoclave e quando não foi possível os materiais foram colocados em solução de sabão e hipoclorito por 24 horas, seguido pelo banho de ácido nítrico 10% por no mínimo 24 horas e enxaguados com água destilada e autoclavada.

2.1.3.b - Repique de bactérias e leveduras

Em frascos de vidro de 10 mL, devidamente limpos e autoclavados foram adicionados aproximadamente 3 mL de meio de cultura BHI para bactérias e SDB para leveduras e 100 µL de suspensão do micro-organismo. As bactérias foram deixados em estufa a 35 °C e a temperatura ambiente para as leveduras por 48 horas para crescimento.

2.1.3.c - Preparo de solução estoque dos compostos

Em frascos de vidro de 10 mL foram pesados 12,5 mg individualmente de compostos estigmasterol, DE01 a DE06 e adicionados 1 mL de DMF. Os compostos apresentaram baixa solubilidade e foram colocados em ultra-som por aproximadamente dois minutos para melhor solubilizar os produtos. Os compostos formaram suspensões turvas devido à baixa solubilidade no meio, exceto pelas oximas DE04 e DE05.

2.1.3.d - Preparo de solução trabalho

Em frascos de vidro de 10 mL foram adicionados 40 µL de solução estoque anteriormente preparado (item 2.1.3.a) para cada 960 µL de meio de cultura BHI ou SDB estéreis para utilização em seguida.

2.1.3.e.1 - Preparo de inóculo de bactérias ou *candida*

Em um béquer contendo água previamente estéril foi adicionado à cultura de micro-organismo: bactérias ou leveduras (*candida*) para obtenção de transmitância de 74 a 75% em um comprimento de onda fixo de 600 nm.

2.1.3.e.2 - Preparo de inóculo de fungos

Em um tubo ensaio de 50 mL, contendo água previamente estéril foi adicionado a solução de cultura de fungos anteriormente preparada. A solução foi homogeneizada e uma gota foi adicionada a câmara de Neubauer. A câmara de Neubauer foi levada ao microscópio ótico utilizando a lente de aumento de 40x. Foi feita a contagem dos fungos e padronizados para 10^5 UFC (Zacchino, 2007).

2.1.3.f - Preparo de placas da triagem

2.1.3.f.1 - Controle do meio de cultura

Em uma placa de ELISA, foram adicionados 100 µL de meio de cultura estéril utilizado para os testes biológicos e 100 µL da água estéril utilizada para os testes biológicos em cada poço. Foram preparados 25 poços para cada meio utilizado.

2.1.3.f.2 - Controle dos micro-organismos

Em uma placa de ELISA, foram adicionados 100 µL de meio de cultura estéril utilizado para os testes biológicos e 100 µL do inóculo do micro-organismo a ser avaliado nos testes para cada poço. Foi preparada uma placa para cada micro-organismo.

2.1.3.f.3 - Controle dos compostos (em cada poço)

Em uma placa de ELISA, foram adicionados 100 µL de solução trabalho utilizado para os testes biológicos e 100 µL de água estéril em cada poço. Foi preparado uma quintuplicata para cada composto.

2.1.3.f.4 - Atividade dos compostos

Em uma placa de ELISA, foram adicionados 100 µL de solução trabalho utilizado para os testes biológicos e 100 µL do inóculo padronizado em água estéril, em cada poço. Foi preparado uma quintuplicata para cada composto.

2.1.3.g - Estufa

As placas preparadas foram levadas a estufa a 35 °C por 24 e 48 horas, tempo nos quais foram feitas análises no espectrofotômetro em comprimento de onda 490 nm. Os dados foram analisados.

2.1.4 - Estudo da atividade biológica: MIC

2.1.4.a - Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

As substâncias que apresentaram atividade superior a 50% foram avaliadas em relação à concentração inibitória mínima (MIC).

A solução estoque, a solução trabalho, o inóculo de micro-organismo foram preparados conforme descritos previamente nos itens 2.1.3.c a 2.1.3.e.

Os controles do meio de cultura, dos micro-organismos foram feitos conforme itens 2.1.3.g e 2.1.3.h.

2.1.4.b - Controle dos compostos

Os compostos foram microdiluídos em quintuplicata nas concentrações de 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,81, 3,91, 1,95, 0,98, 0,49, 0,24 e 0,12 µg/mL com avaliação em quintuplicata de cada item para controle dos compostos, com adição de 100 µL de água destilada e autoclavada em cada poço.

2.1.4.c - Atividade dos compostos

Os compostos foram microdiluídos em quintuplicata nas concentrações de 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,81, 3,91, 1,95, 0,98, 0,49, 0,24 e 0,12 µg/mL com avaliação em quintuplicata de cada atividade, com adição de 100 µL de inóculo em cada poço.

2.1.4.d - Estufa

As placas preparadas foram levadas a estufa a 35 °C por 24 e 48 horas, tempo nos quais foram feitas análise no espectrofotômetro em comprimento de onda 490 nm. Os dados foram analisados.

2.1.5 - Estudo de atividade em relação a enzima Acetilcolinesterase

2.1.5.a - Preparo de solução tampão *Tris/HCl* pH 8 (50mM):

Em um erlemeyer de 100 mL foram adicionados 398,08 mg de do sal Utrapure Tris Hydrochloride e 50 mL de água destilada. O valor do pH foi corrigido para 8,0 com solução de hidróxido de sódio 10% PA.

2.1.5.b - Preparo da solução estoque de enzima (1000U/mL):

Em um frasco de 1 mL foram adicionados 0,77 mg de enzima Acetilcolinesterase e solução tampão Tris/HCl pH 8,0 para formação de solução com concentração de 1000 U/mL. A solução foi deixada em repouso por 20 minutos seguido de agitação por 15 minutos.

2.1.5.c - Preparo da solução da enzima na concentração 0,222U/mL:

Em um frasco foi adicionado 1 µL da solução estoque (1000 U/mL) e 4,5 mL da solução Tris/HCl (50 mM). Em seguida foi adicionado a 4,5 mg de albumina sérica bovina 0,1% (p/v).

2.1.5.d - Preparo da solução de trabalho:

Em um frasco de 10 mL foram adicionados 5 mg do estigmasterol ou derivados e adicionado 250 µL de polisorbato 80 e 250 µL de solvente DMSO para formação de uma solução de 10 mg/mL.

2.1.5.e - Preparo dos reagentes:

Preparo de solução de ATCI (15 mM):

Em um béquer de 5mL, foram adicionados 4,08 mg de iodeto de acetilcolina e 1 ml de água destilada.

Preparo de solução de DTNB (3 mM):

Em um béquer de 5 mL foram adicionados 2,38 mg de DTNB e solubilizados em 2 mL de solução tampão Tris/HCl (pH 8,0). Em seguida foram adicionados 11,69 mg de NaCl (0,1 M) e 8,13 mg de MgCl₂.6H₂O (20mM).

2.1.5.f - Procedimento de análise de atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase

Foram feitos teste positivo utilizando a eserina com a mesma metodologia aplicada aos produtos em análise.

Foram adicionados a cada poço da placa de Elisa, 125 µL da solução de DTNB, 50 µL da solução de Tris/HCl (pH 8,0), 25 µL da solução de ATCI e 25 µL da solução trabalho de cada produto em análise, sendo os cinco primeiros poços utilizados para o branco e os cinco seguintes para a eserina (Figura 09).

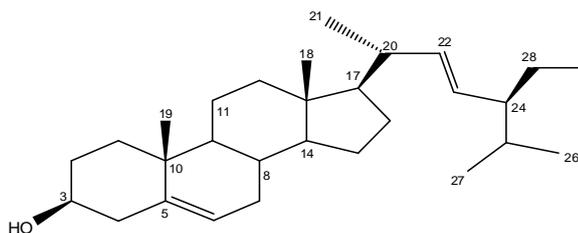
Foram feitas 8 medidas de absorbância a 405 nm a cada 1 minuto, com total de sete minutos . Em seguida foram adicionados 25 µL de solução AChE (0,226 U/mL) em Tris/HCl a cada poço e homogeneizados.

Foram feitas 10 medidas de absorbância em 405 nm a cada 1 minuto por 10 vezes, com início ao final da adição da enzima, com total de nove minutos.



Figura 09 - Imagem da placa de Elisa preparada com a eserina, o estigmasterol e derivados utilizada para testes de atividade contra a enzima acetilcolinesterase.

2.2 - Estigmasterol (E)



FM/MM: C₂₉H₄₈O / 412,69 g/mol

Aspecto: pó branco.

Faixa de Fusão: 163,5 – 165,0 °C (lit. 174 – 176 °C)

IV (v_{máx.}, ATR, cm⁻¹): 3350, 2934, 2866, 1457, 1366, 1053, 970, 961 {literatura (Silva, 2008): 3410, 2955, 2936, 2867, 1634, 1461, 1383, 1368, 1055, 971}.

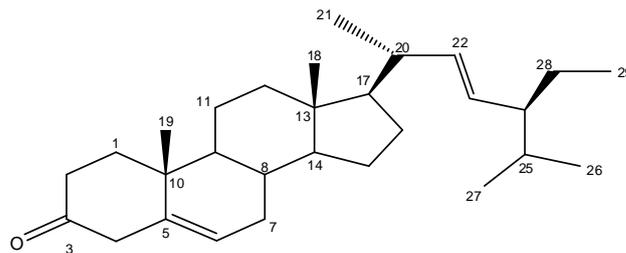
RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ:

5,36 (dl, 1H, *J*=8,8 Hz, H-6); 5,15 (dd, 1H, *J*=14,8Hz, 8,8Hz, H-22); 5,02 (dd, 1H, *J*=15,2Hz, 8,4Hz, H-23); 3,53 (m, 1H, H-3);

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ:

37,6 (C-1);	31,9 (C-2);	72,0 (C-3);	42,5 (C-4);	141,0 (C-5);
121,9 (C-6);	31,9 (C-7);	32,1 (C-8);	50,4 (C-9);	36,7 (C-10);
21,9 (C-11);	39,9 (C-12);	42,4 (C-13);	57,07 (C-14);	24,57 (C-15);
29,0 (C-16);	56,2 (C-17);	12,3 (C-18);	19,6 (C-19);	40,7 (C-20);
21,4 (C-21);	138,5 (C-22);	129,5 (C-23);	51,4 (C-24);	32,1 (C-25);
21,3 (C-26);	19,2 (C-27);	25,6 (C-28);	12,5 (C-29).	

2.3 - Estigmasta-5,22-dien-3-ona (DE01)



FM/MM: C₂₉H₄₇O / 410,67 g/mol

Aspecto: Sólido branco.

Faixa de Fusão: 122,6 - 123,5 °C (lit. 121 – 122 °C).

IV ($\nu_{\text{máx.}}$, **ATR**, **cm⁻¹**) : 2929, 2865, 1675, 1615, 1444, 1435, 1382, 970, 865 {literatura (Jones, 1973): 2969, 2937, 2871, 1679, 1619, 1462, 1446, 1435, 1384, 1270, 1229, 994, 961, 868}.

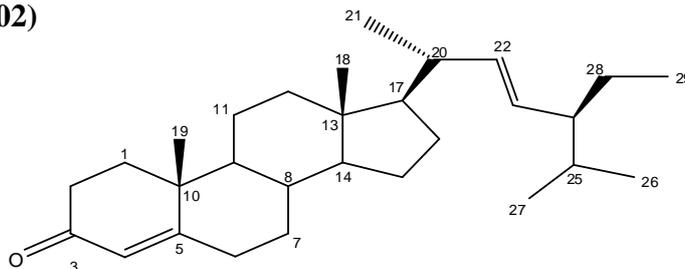
RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ :

5,34 (s, 1H, H-6); 5,15 (dd, 1H, $J=15,0$, 8,8 Hz, H-22); 5,02 (dd, 1H, $J=14,00$ Hz, 6,4/8,8 Hz, H-23); 3,28 (d, 1H, $J=16,0$ Hz, H-4); 2,82 (d, 1H, $J=16,4$ Hz, H-4); 2,49 (m, 1H, H-2); 2,05 (m, 1H, H-2);

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ :

37,09 (C-1);	37,87 (C-2);	210,63 (C-3);	48,58 (C-4);	138,73 (C-5);
123,11 (C-6);	32,00 (C-7);	32,09 (C-8);	49,38 (C-9);	37,13 (C-10);
21,54 (C-11);	39,76 (C-12);	42,47 (C-13);	56,90 (C-14);	24,55 (C-15);
29,12 (C-16);	56,11 (C-17);	12,30 (C-18);	21,43 (C-19);	40,71 (C-20);
21,31 (C-21);	138,44 (C-22);	129,56 (C-23);	51,44 (C-24);	32,09 (C-25);
19,39 (C-26);	19,19 (C-27);	25,62 (C-28);	12,47 (C-29).	

2.4 - Estigmasta-4,22-dien-3-ona (DE02)



FM/MM: C₂₉H₄₇O / 410,67 g/mol

Aspecto: Sólido branco levemente amarelo.

Faixa de Fusão: 115,9 – 116,8 °C (lit. 121 – 122 °C).

IV ($\nu_{\text{máx.}}$, **ATR**, cm^{-1}) : 2929, 2865, 1675, 1615, 1444, 1435, 1382, 970, 865 {literatura (Silva, 2008): 2969, 2937, 2871, 1679, 1619, 1462, 1446, 1435, 1384, 1270, 1229, 994, 961, 868}.

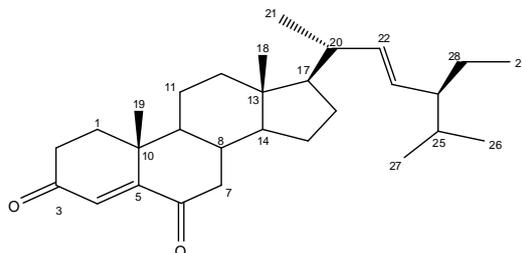
RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ :

5,72 (s, 1H, H-4); 5,15 (dd, 1H, $J=15,2, 8,4\text{Hz}$, H-22); 5,02 (dd, 1H, $J=15,2\text{ Hz}, 8,4\text{ Hz}$, H-23);

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ :

35,9	(C-1);	32,2	(C-2);	199,8	(C-3);	124,0	(C-4);	171,8	(C-5);
34,2	(C-6);	33,2	(C-7);	35,8	(C-8);	51,4	(C-9);	38,8	(C-10);
21,2	(C-11);	39,6	(C-12);	42,3	(C-13);	55,9	(C-14);	24,3	(C-15);
29,1	(C-16);	56,2	(C-17);	12,3	(C-18);	17,6	(C-19);	40,7	(C-20);
19,2	(C-21);	138,3	(C-22);	129,7	(C-23);	54,0	(C-24);	32,1	(C-25);
21,3	(C-26);	21,4	(C-27);	25,6	(C-28);	12,4	(C-29).		

2.5 - Estigmasta-4,22-dien-,3,6-diona (DE03)



FM/MM: C₂₉H₄₄O₂ / 424,66 g/mol

Aspecto: Sólido amarelo.

Faixa de Fusão: 129 – 130 °C (lit. 134 – 135°C).

IV ($\nu_{\text{máx.}}$, **ATR**, **cm⁻¹**): 2927, 2851, 2869, 1691, 1678, 1606, 1462, 1243, 1222, 973, 866
{literatura (Alliota, 1991): 2959, 1714, 1686, 1609, 969,864 **cm⁻¹**}.

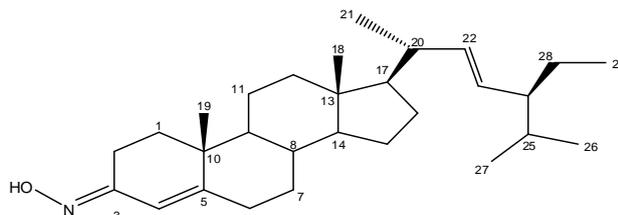
RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ :

6,17 (s, 1H, H-4); 5,15 (dd, 1H, $J=15,2\text{Hz}$, 8,4Hz, H-22); 5,04 (dd, 1H, $J=15,2\text{Hz}$, 8,4Hz, H-23);

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ :

35,7 (C-1);	34,2 (C-2);	199,7 (C-3);	125,7 (C-4);	161,3 (C-5);
202,6 (C-6);	47,0 (C-7);	34,4 (C-8);	51,2 (C-9);	40,0 (C-10);
21,1 (C-11);	39,2 (C-12);	42,6 (C-13);	55,9 (C-14);	24,2 (C-15);
28,9 (C-16);	56,8 (C-17);	12,3 (C-18);	17,7 (C-19);	40,6 (C-20);
21,3 (C-21);	138,0 (C-22);	129,9 (C-23);	51,4 (C-24);	32,1 (C-25);
21,4 (C-26);	19,2 (C-27);	25,6 (C-28);	12,5 (C-29).	

2.6 - Estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima (DE04)



FM/MM: C₂₉H₄₇NO / 425,69 g/mol

Aspecto: Sólido amorfo.

Faixa de Fusão: 157 - 158 °C (lit. 168 - 169 °C).

IV (ν_{máx.}, ATR, cm⁻¹): 3283, 2932, 2866, 1631, 1455, 1380, 1294, 1134, 1110, 994, 968, 932, 867 {literatura (Cui, 2009): 3285, 3046, 2951, 2883, 1629, 1466, 1437, 1372, 1295, 1237, 1218, 1126, 995, 930, 873}.

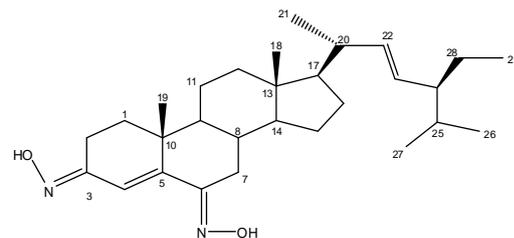
RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ:

5,77 (s, 1H, H-4); 5,14 (dd, 1H, J=15,2Hz, 8,4Hz, H-22); 5,01 (dd, 1H, J=15,0Hz, 8,8Hz, H-23); 3,05 (d, 1H, J=17,2Hz, H-2);

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ:

32,7	(C-1);	18,9	(C-2);	157,3	(C-3);	117,3	(C-4);	156,1	(C-5);
34,9	(C-6);	32,1	(C-7);	36,0	(C-8);	53,9	(C-9);	38,2	(C-10);
21,6	(C-11);	39,9	(C-12);	42,5	(C-13);	56,3	(C-14);	24,5	(C-15);
29,1	(C-16);	56,1	(C-17);	12,5	(C-18);	18,0	(C-19);	40,7	(C-20);
21,3	(C-21);	138,5	(C-22);	129,5	(C-23);	51,5	(C-24);	32,4	(C-25);
21,4	(C-26);	19,2	(C-27);	25,6	(C-28);	12,4	(C-29).		

2.7 - Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, oxima (DE05)



FM/MM: C₂₉H₄₄O₂ / 424,66 g/mol

Aspecto: Sólido amorfo.

Faixa de Fusão: 133 - 134°C (literatura 140–141 °C).

IV (ν_{máx.}, ATR, cm⁻¹): 3185, 2951, 2868, 1626, 1456, 1376, 1303, 1178, 1045, 960, 848, 813, 723, 697, 667 {literatura (Cui, 2009): 3317, 2953, 2864, 1629, 1454, 1376, 1298, 1176, 959 cm⁻¹}.

RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ:

6,52 (s, 1H, H-4); 5,15 (dd, 1H, *J*=15,2Hz, 8,4Hz, H-22); 5,04 (dd, 1H, 15,0Hz, *J*=8,4/8,8Hz, H-23); 3,34 (m, 1H H-7); 3,07 (m, 1H H-2); 2,15 (m, 1H H-2);

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ:

33,8	(C-1);	18,8	(C-2);	156,8	(C-3);	119,5	(C-4);	147,9	(C-5);
157,4	(C-6);	29,9	(C-7);	32,1	(C-8);	51,6	(C-9);	42,6	(C-10);
25,6	(C-11);	39,6	(C-12);	38,6	(C-13);	55,9	(C-14);	21,5	(C-15);
29,0	(C-16);	56,1	(C-17);	12,3	(C-18);	17,8	(C-19);	40,6	(C-20);
21,3	(C-21);	138,3	(C-22);	129,7	(C-23);	51,5	(C-24);	33,2	(C-25);
19,2	(C-26);	19,2	(C-27);	24,4	(C-28);	12,5	(C-29).		

2.8 - Caracterizações estruturais dos compostos

2.8.a - Estigmasterol (E)

No espectro na região do infravermelho (**Figura 10**) do estigmasterol (E) pode-se observar uma banda centrada em 3350 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H de álcoois com ligação de hidrogênio; bandas em 2934 cm^{-1} e 2866 cm^{-1} referentes ao estiramento simétrico e assimétrico de ligações C-H de compostos alifáticos; uma banda em 1053 cm^{-1} característica de estiramento axial da ligação C-O de álcool (Barbosa, 2007).

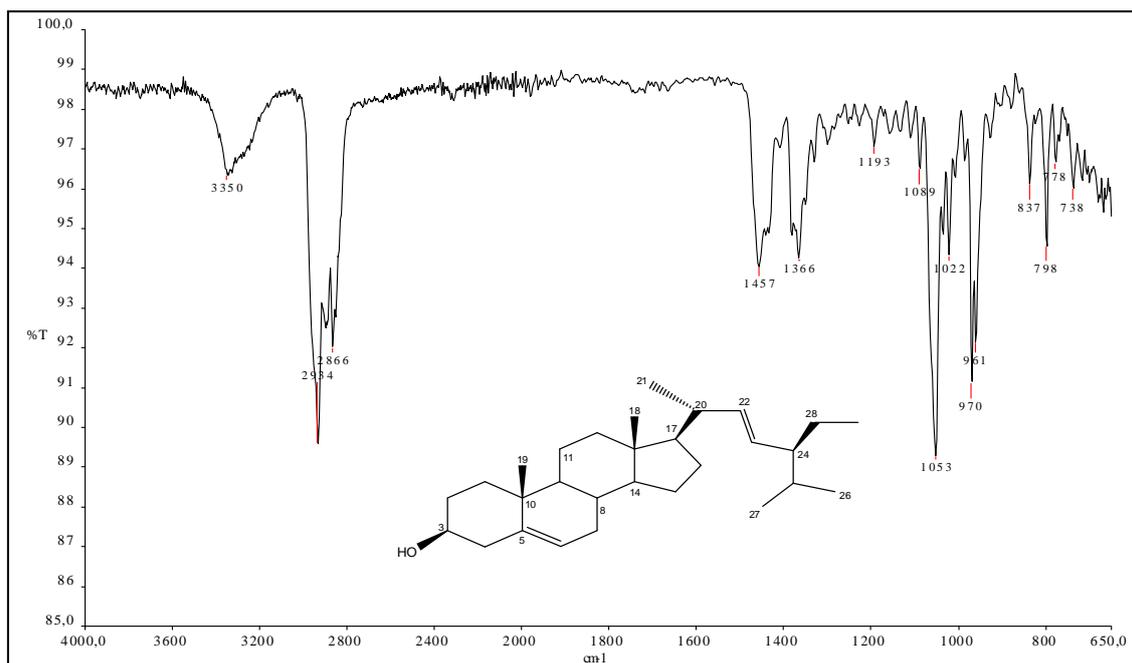


Figura 10: Espectro na região do infravermelho do estigmasterol (E).

No espectro de RMN de ^1H do estigmasterol (**Figura 11, pág.33**) pode se observar sinais na região de hidrogênio olefinico. O duplete em δ 5,36 (dl, 1H, $J=8,8\text{ Hz}$) foi atribuído ao átomo de hidrogênio H-6. O duplete duplo em δ 5,15 (dd, 1H, $J=14,8\text{ Hz}$, $8,8\text{ Hz}$) foi integrado para um átomo e foi atribuído ao átomo de hidrogênio H-22 e o duplete duplo em δ 5,02 (dd, 1H, $J=15,2\text{ Hz}$, $8,4\text{ Hz}$), também integrado para um átomo, foi atribuído ao átomo de hidrogênio H-23. O multiplete em δ 3,53 é característico de hidrogênio ligado ao carbono carbinólico C-3. Foram identificados os sinais referentes aos grupos metila (**Tabela 13, Anexo 01, pag. 84**) e comparados aos dados da literatura (Zubair *et al*, 2013 e Guo, 1995). Os sinais na faixa de δ 1,04 à δ 2,26 estão relacionados aos demais átomos do esqueleto do fitoesteróide.

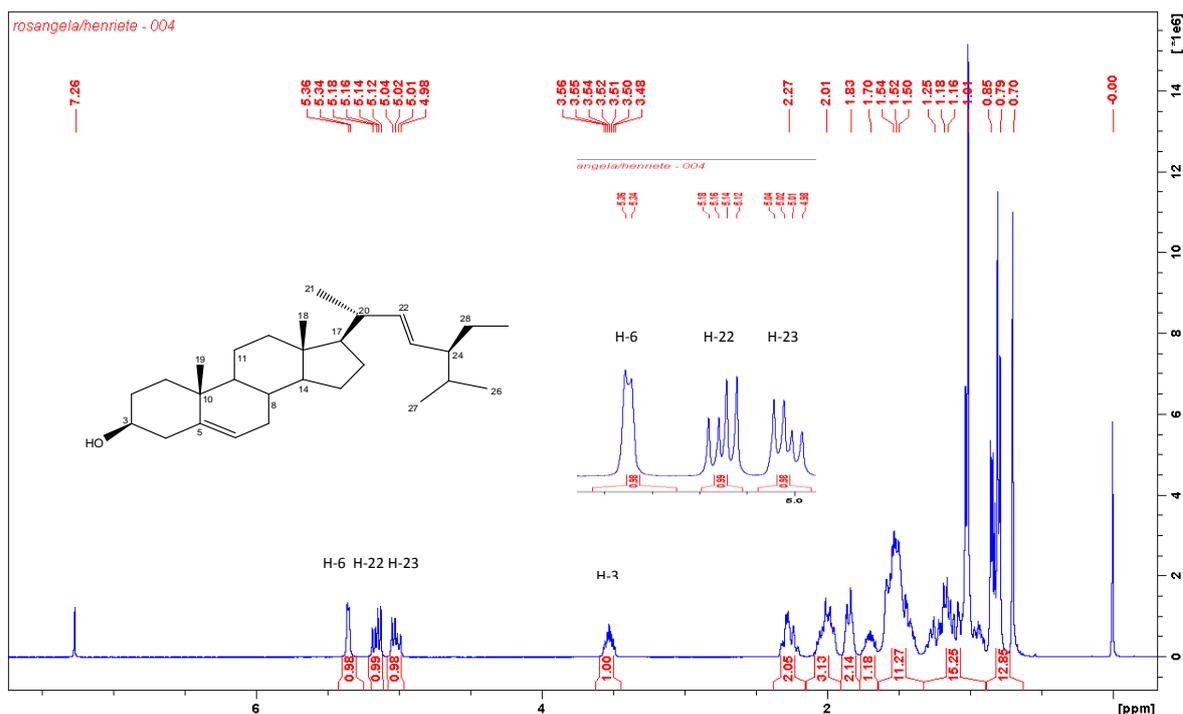


Figura 11: Espectro de RMN ^1H de E (CDCl_3 , 400 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C e com o auxílio do sub-espectro DEPT 135 (Figura 12 e 13) foi possível identificar 27 sinais de átomos de carbono, dos quais nove são metilênicos e três não hidrogenados. Os sinais dos átomos de carbono olefinicos foram observados no intervalo δ 140,97 a δ 121,93, sendo o sinal em δ 140,97 atribuído ao átomo de carbono não hidrogenado C-5. O sinal em δ 72,01 foi atribuído ao átomo de carbono C-3 ligado ao grupo hidroxila. Os sinais dos átomos de carbono C-2/C-7 e C-8/C-25 sobrepuseram-se em δ 31,87 e δ 32,11, respectivamente. A atribuição de todos os sinais de átomos de carbono (Tabela 03, pág. 35) foi realizada por comparação com os dados descritos na literatura (Jiang *et al*, 2013).

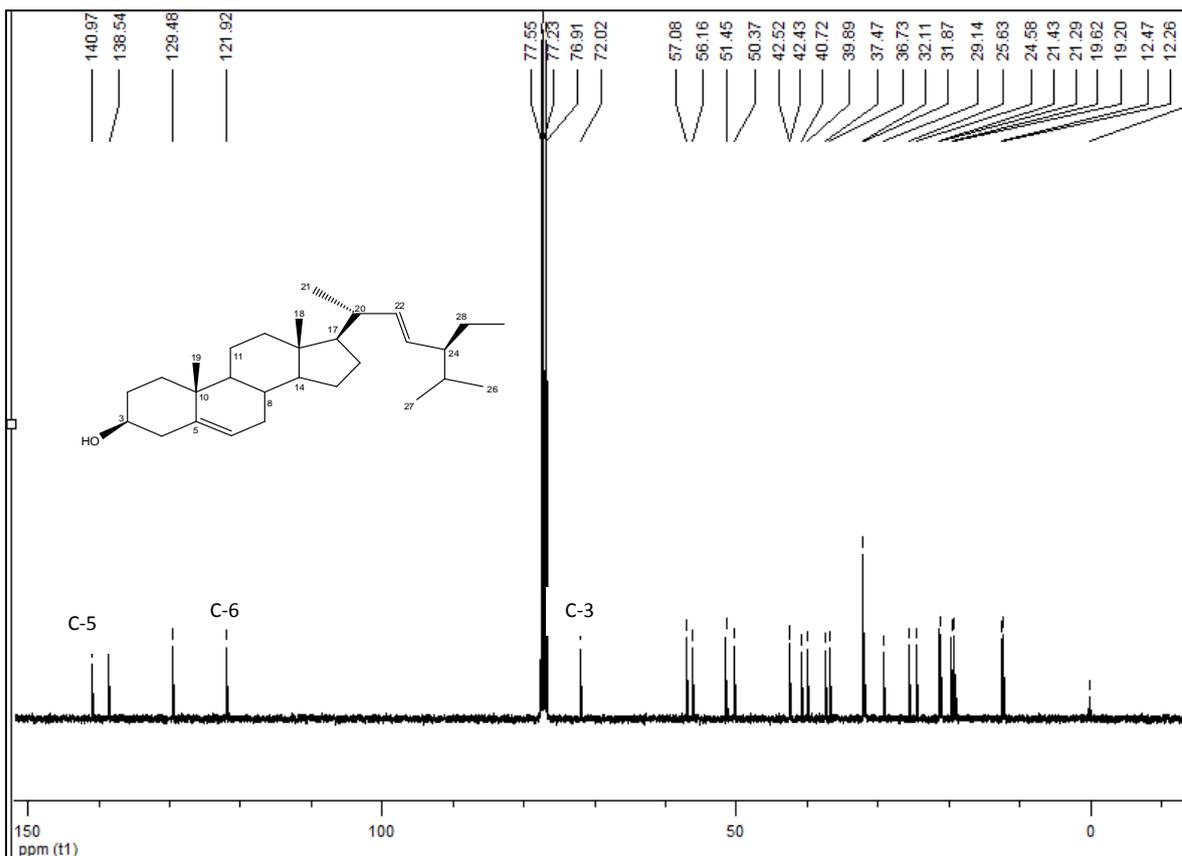


Figura 12: Espectro de RMN ^{13}C de E (CDCl_3 , 100 MHz).

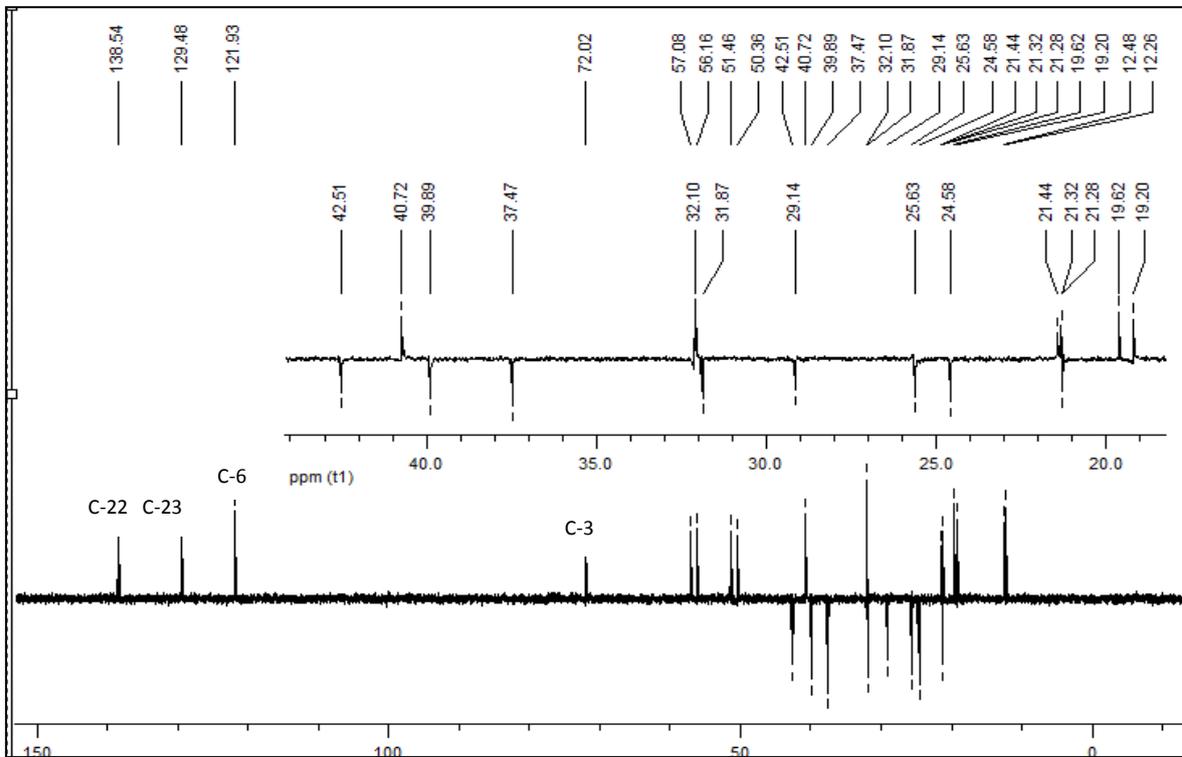
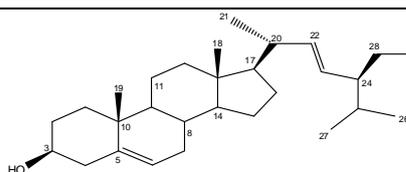


Figura 13: Sub-espectro DEPT 135 de E (CDCl_3 , 100 MHz).

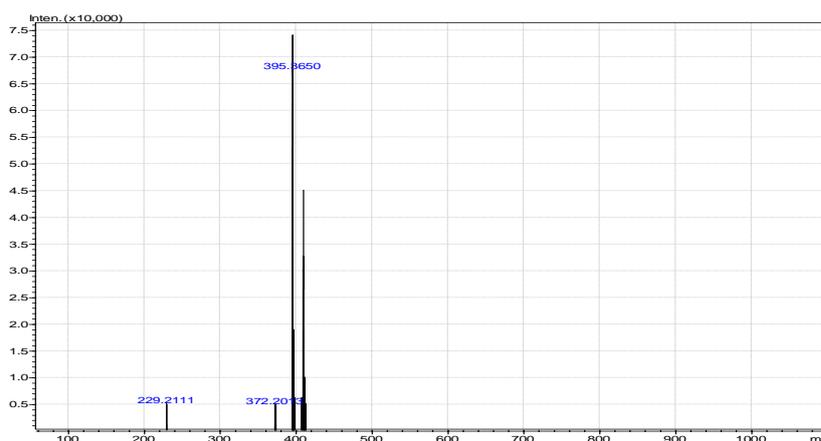
Tabela 03: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de E com a literatura.



C	Literatura	E	C	Literatura	E
1	38,4	37,6	16	29,9	29,0
2	32,8	31,9	17	57,0	56,2
3	71,8	72,0	18	12,5	12,3
4	43,5	42,5	19	19,9	19,6
5	142,5	141,0	20	41,4	40,7
6	121,0	121,9	21	21,8	21,4
7	32,8	31,9	22	139,0	138,5
8	32,6	32,1	23	130,0	129,5
9	51,4	50,4	24	52,3	51,4
10	37,5	36,7	25	32,9	32,1
11	21,9	21,3	26	21,5	21,3
12	40,7	39,9	27	19,5	19,2
13	43,1	42,4	28	26,2	25,6
14	57,9	57,1	29	12,7	12,5
15	25,1	24,6			

Referência: Jiang, 2013.

O espectro de massas de alta resolução de E (Figura 14) apresentou um pico base [M+1-18] correspondendo ao produto da desidratação do estigmasterol 395,3650 m/z (valor teórico 395,3672 m/z), correspondendo à molécula proposta, visto que sua massa molecular equivale a 412,3705 $g\ mol^{-1}$. O erro inerente a medida foi de 5,6 ppm, em relação ao pico base.



Event#: 1 MS(C+) Ret. Time : 0.373 -> 0.453 - 0.013 -> 0.240 Scan# : 57 -> 69 - 3 -> 37

Figura 14: Espectro de massas de alta resolução do Estigmasterol por APCI.

2.8.b – Estigmasta-5,22-dien-3-ona (DE01)

No espectro na região do infravermelho de DE01 (**Figura 15, pág. 36**) pode-se observar a modificação química realizada devido à ausência da banda característica do grupo hidroxila em 3350 cm^{-1} e a presença da banda em 1717 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O de cetonas (Barbosa, 2007).

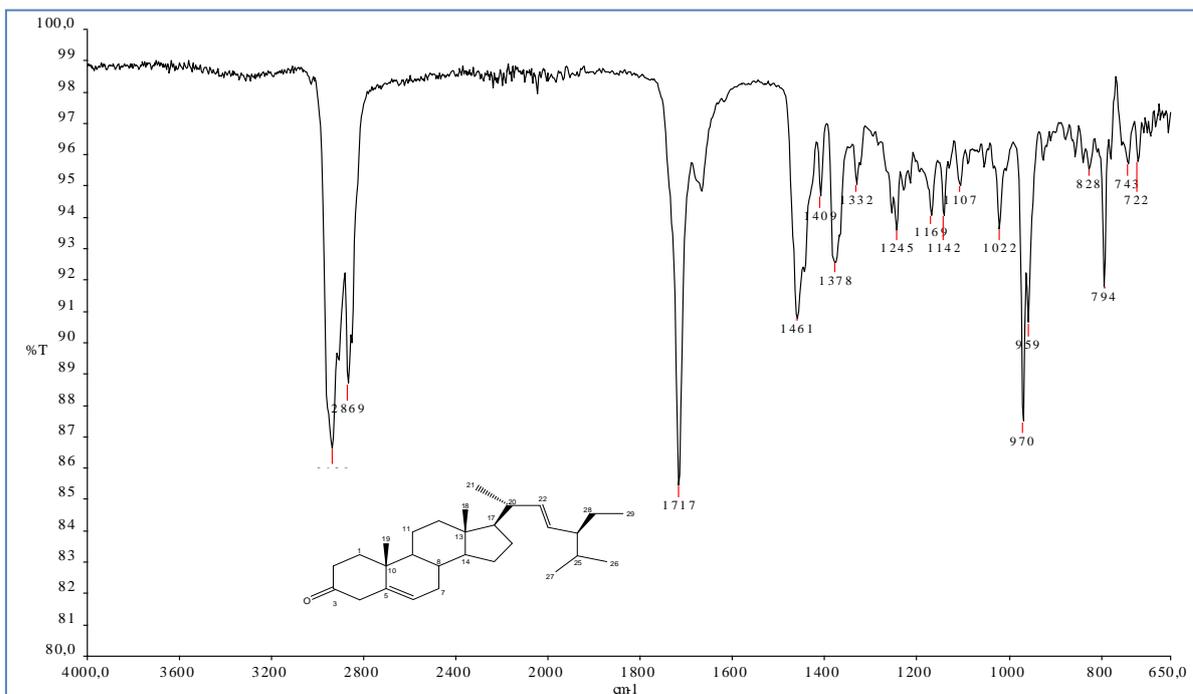


Figura 15: Espectro na região do infravermelho de DE01.

No espectro de RMN de ^1H de DE01 (Figura 16, pág. 37) pode se observar ausência do sinal em δ 3,53 atribuído ao átomo de hidrogênio H-3 ligado ao carbono carbinólico de E. Os sinais referentes aos hidrogênios olefinicos foram observados em δ 5,34 (sl, 1H) atribuído ao átomo de hidrogênio H-6, com modificação do sinal de duplete para simpleto em relação ao estigmasterol; em δ 5,15 (1H, dd, $J=15,0\text{ Hz}$, $8,8\text{ Hz}$) foi integrado para um átomo atribuído aos hidrogênios H-22 e em δ 5,02 (1H, dd, $J=14,0\text{ Hz}$, $8,6\text{ Hz}$) foi integrado para um átomo atribuído aos hidrogênios H-23. Pode se observar também a presença de dois dupletos em δ 3,28 (1H, d, $J=16,0\text{ Hz}$) e δ 2,82 (1H, d, $J=16,4\text{ Hz}$) referente aos átomos de hidrogênios ligados ao átomo de carbono C-4; os multipletos centrados em δ 2,49 (1H, m, H-2) e em δ 2,05 (1H, m, H-2) foram atribuídos aos átomos de hidrogênio ligados ao átomo de carbono C-2, com auxílio dos espectros de ^{13}C , sub-espectros DEPT e mapas de correlação HMQC e COSY discutidos a seguir.

Os sinais referentes aos átomos de hidrogênio dos grupos metilas foram identificados conforme Tabela 13 (Anexo 01, pág. 80). Os sinais na faixa de δ 1,10 a δ 2,40 estão relacionados aos demais átomos do esqueleto do fitoesteróide.

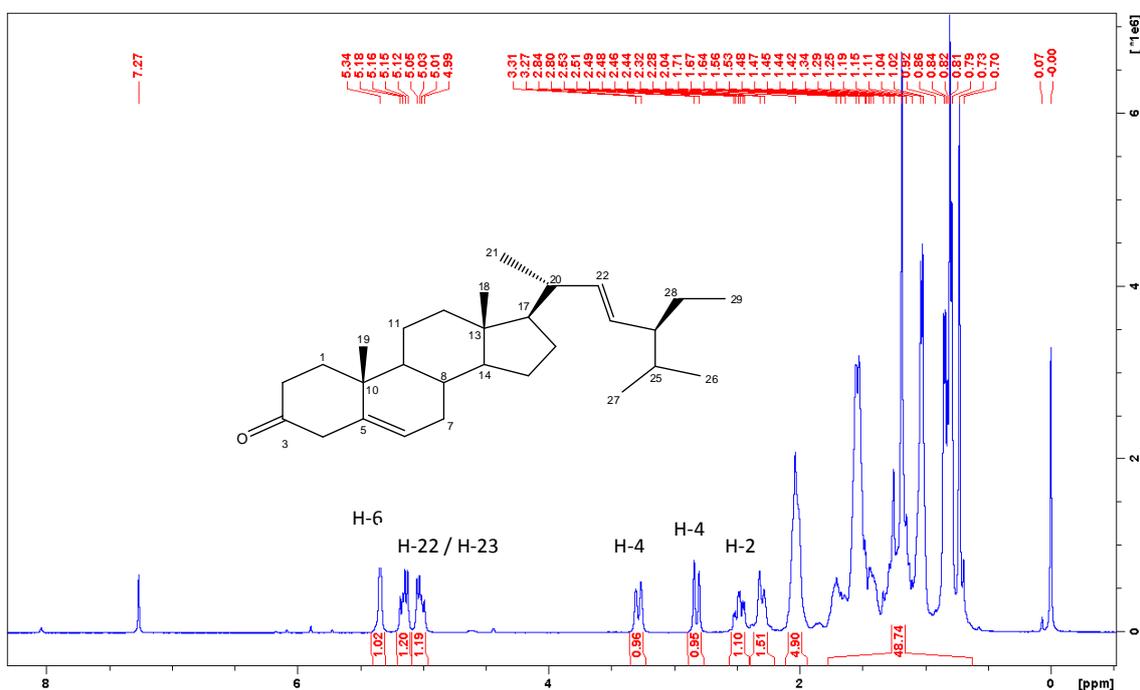


Figura 16: Espectro de RMN ¹H de DE01 (CDCl₃, 400 MHz).

No espectro de RMN de ¹³C e com o auxílio do sub-espectro DEPT 135 de DE01 (Figura 17 e 18, pág. 38) foi possível identificar 28 sinais de carbonos, sendo 9 de carbonos metilênicos e 4 de carbonos não hidrogenados; a ausência do sinal em δ 72,00 referente ao carbono carbinólico de E, e a presença de um novo sinal em δ 210,63 (região característica de carbono carbonílico) comprovam a oxidação da hidroxila no estigmasterol. Pode-se observar ainda a desblindagem do carbono C-2 com mudança do sinal de δ 31,87 (E) para δ 37,87 (DE01), bem como a desblindagem do carbono C-4 com mudança do sinal de deslocamento inicial de δ 42,51 (E) para δ 48,52 (DE01) evidenciando o efeito anisotrópico do grupo carbonila em C-3. Os sinais dos átomos de carbono C-8/C-25 sobrepuseram-se em δ 32,09. A atribuição de todos os sinais dos átomos de carbono da substância DE01 foi realizada por comparação com os dados obtidos para o estigmasterol (E) conforme tabela 04, pág. 41 e tabela 14, anexo 02, pág. 84.

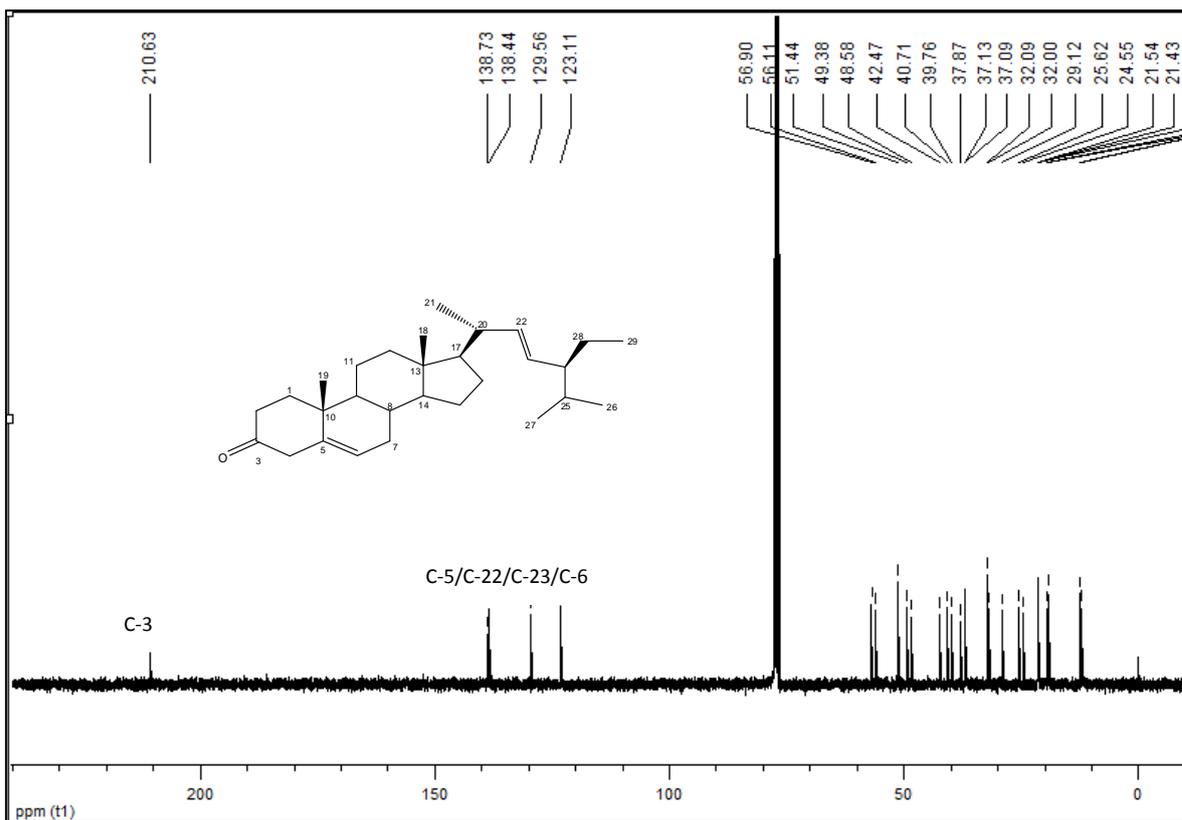


Figura 17: Espectro de RMN ^{13}C de DE01 (CDCl₃, 100 MHz).

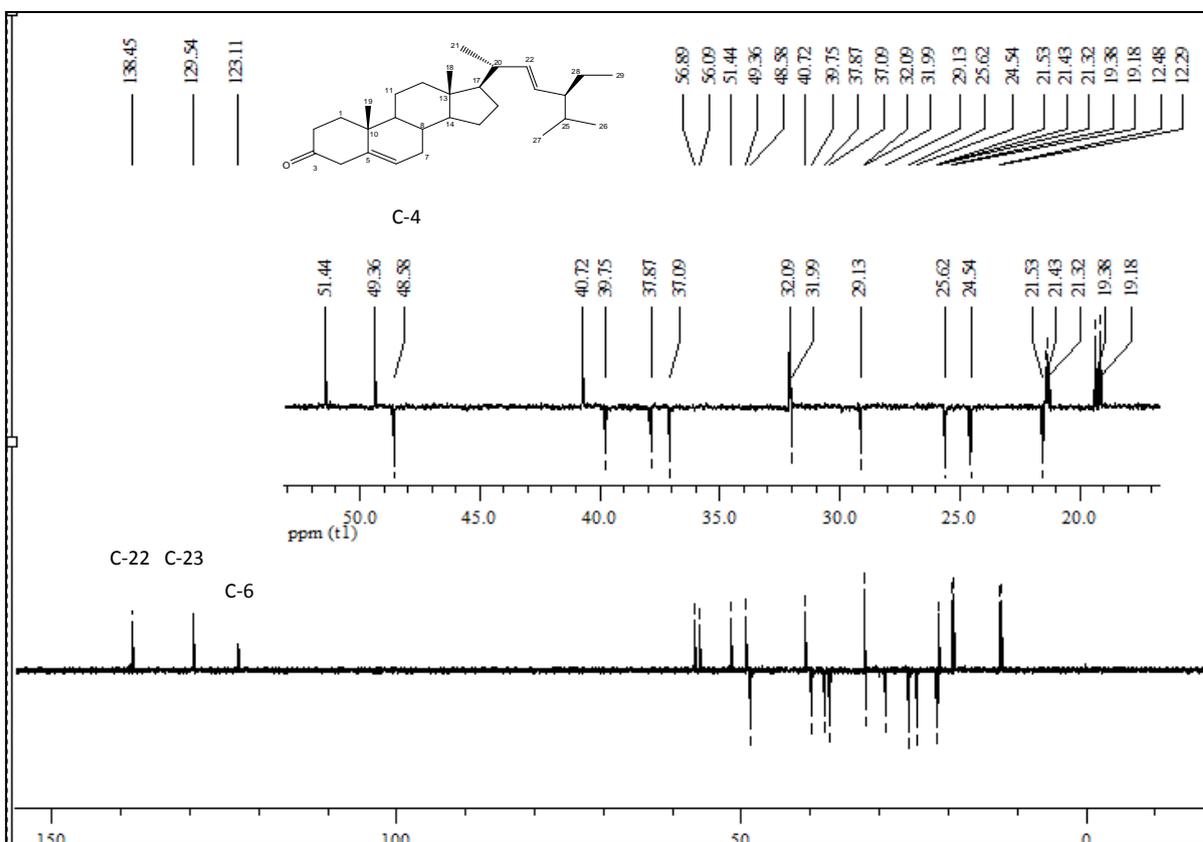


Figura 18: Sub-espectro DEPT 135 de DE01 (CDCl₃, 100 MHz).

A expansão do mapa de Correlações bidimensional HMQC (Figura 19) possibilitou determinar a correlação entre os átomos de carbono e hidrogênio. Os dupletos em δ_H 3,28 (1H, d, 16,0 Hz) e δ_H 2,82 (1H, d, 16,4 Hz) correlacionaram-se ao sinal referente ao átomo de carbono C-4 (δ_C 48,58) e os multipletos em δ_H 2,49 e δ_H 2,32 foram correlacionados ao átomo de carbono C-2 (em δ_C 37,87).

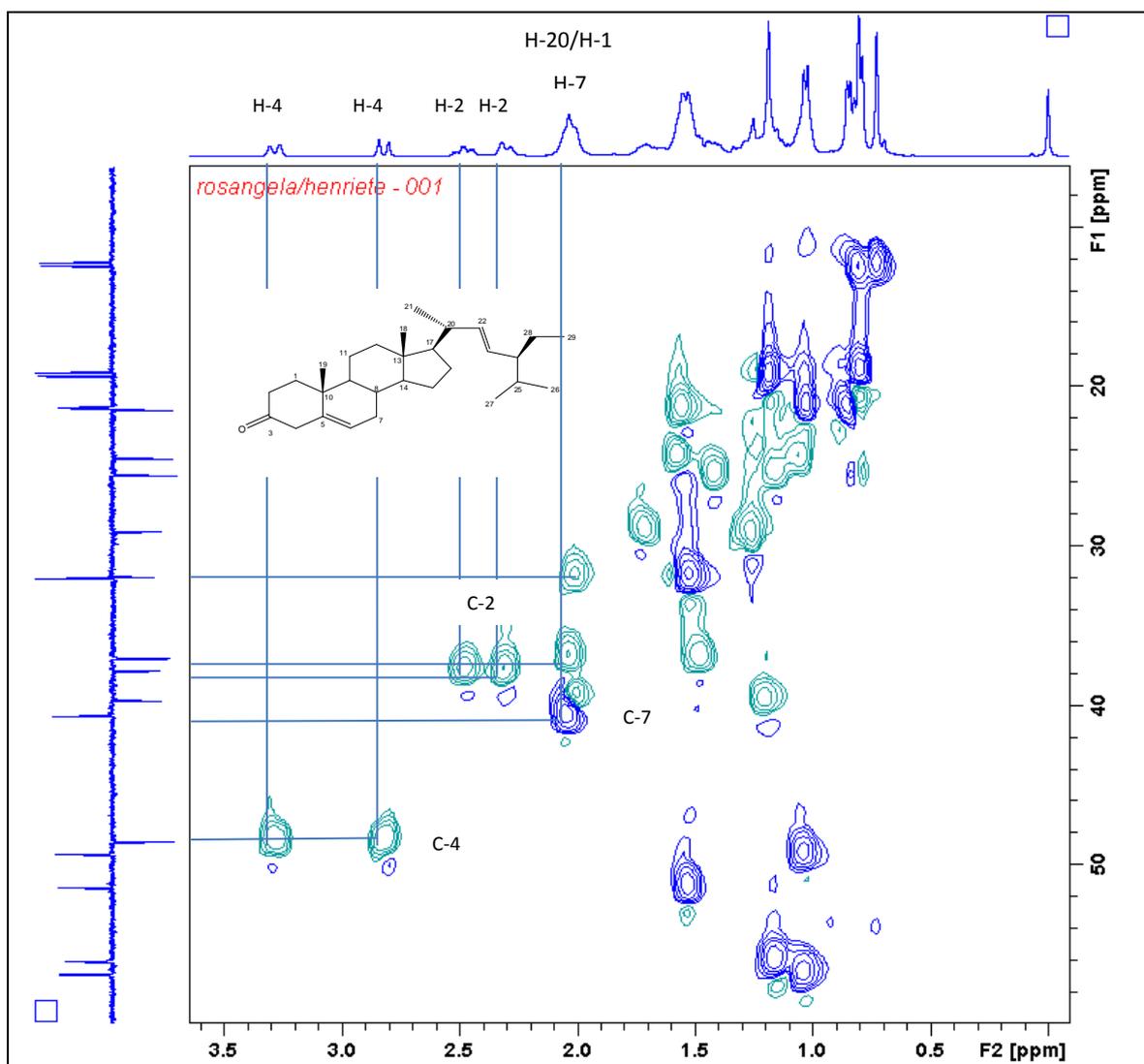


Figura 19: Expansão do mapa de correlações HMQC de DE01 ($CDCl_3$, 400 MHz).

O mapa de Contornos COSY (Figura 20, pág. 40) possibilitou a observação da correlação entre os átomos de hidrogênio H-2 (δ_H 2,49 e δ_H 2,32). Pode-se observar também a correlação entre os átomos de hidrogênio H-4 (δ_H 3,28, 1H, d, $J=16,0$ Hz) e (δ_H 2,82, 1H, d, $J=16,4$ Hz).

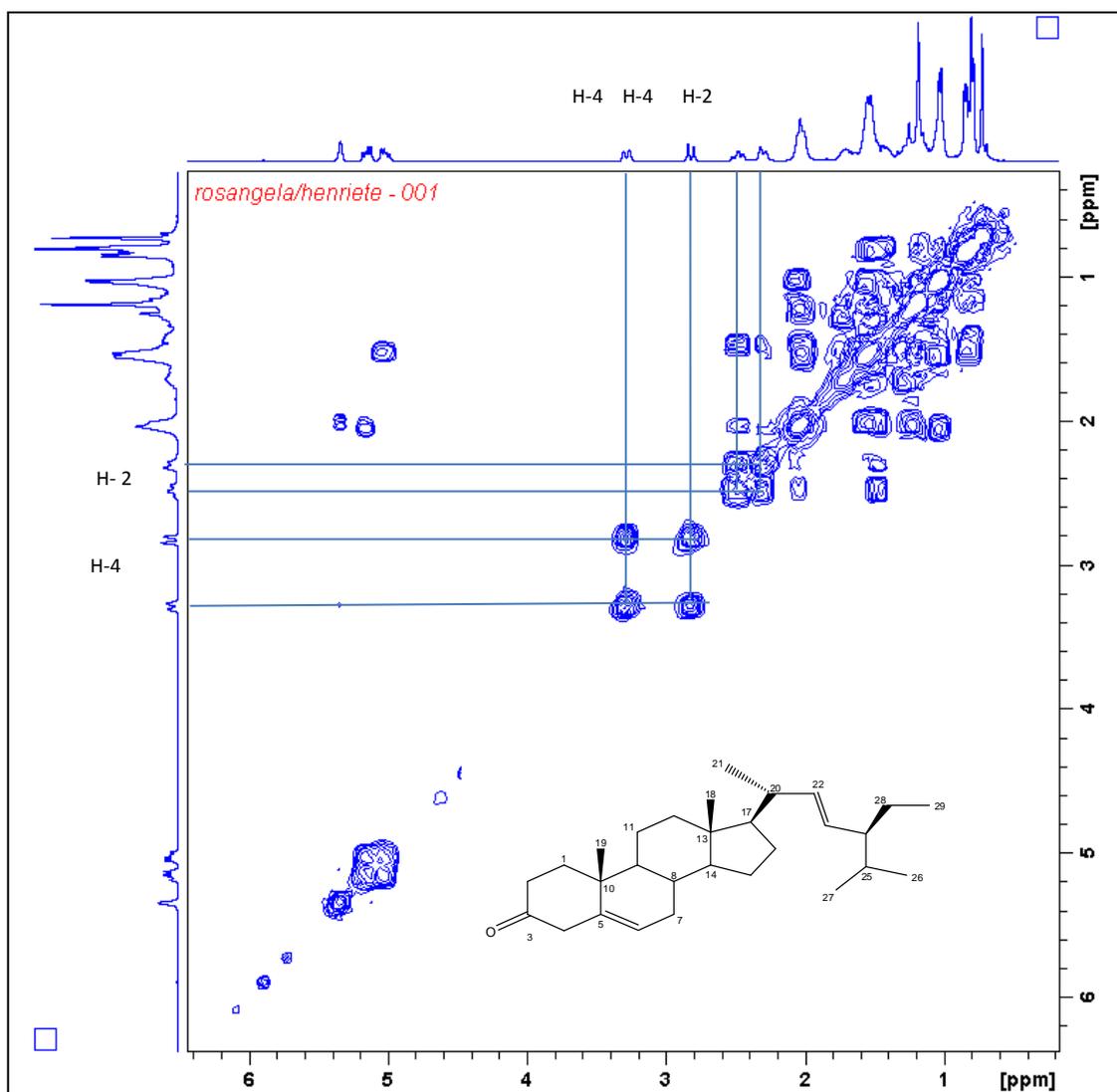


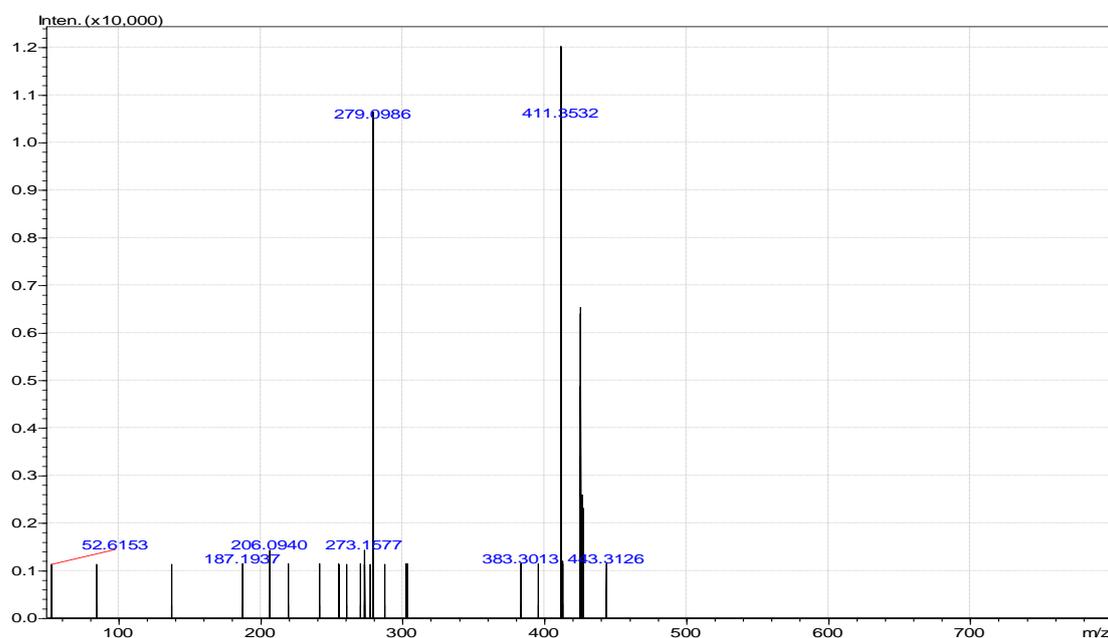
Figura 20: Mapa de Contorno COSY de DE01 (CDCl₃, 400 MHz).

A atribuição de todos os sinais de carbonos (Tabela 04) foi realizada por comparação com os dados descritos para o estigmasterol (E) associados aos espectros de COSY e HMQC. A substância DE01 foi identificada como estigmasta-5,22-dien-3-ona.

Tabela 04: Deslocamento químico dos átomos de carbono de DE01 no espectro de RMN de ^{13}C .

C	DE01	C	DE01
1	37,1	16	29,1
2	37,9	17	56,1
3	210,6	18	12,3
4	48,6	19	21,4
5	138,7	20	40,7
6	123,1	21	21,3
7	32,0	22	138,4
8	32,1	23	129,6
9	49,4	24	51,4
10	37,1	25	32,1
11	21,5	26	19,4
12	39,8	27	19,2
13	42,5	28	25,6
14	56,9	29	12,5
15	24,6		

O espectro de massas de alta resolução de DE01 (Figura 21) apresentou um pico base $[\text{M}+1]^+$ de m/z 411,3532 correspondendo ao produto estigmasta-5,22-dien-3-ona, visto que sua massa exata equivale a m/z 410,3549 e a espécie protonada tem massa exata de m/z 411,3582. O erro inerente a medida em relação ao pico base foi de 12 ppm.



Event#: 1 MS(C+) Ret. Time : 0.347 -> 0.747 Scan# : 53 -> 113

Figura 21: Espectro de massas de alta resolução de DE01 por APCI.

2.8.c – Estigmasta-4,22-dien-3-ona (DE02)

No espectro na região do infravermelho de DE02 (**Figura 22**) pode-se observar a modificação química realizada devido à ausência da banda característica do grupo hidroxila em 3350 cm^{-1} e a presença da banda em 1675 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O de cetonas. A banda em 1675 cm^{-1} com valor inferior em relação a DE01 (1717 cm^{-1}) sugere conjugação com a ligação dupla provocando o enfraquecimento da ligação C=O devido à deslocalização dos elétrons π por ressonância (Barbosa, 2007). A banda em 1615 cm^{-1} refere-se à ligação C=C para a forma *s-trans* de cetonas α, β -insaturadas (Barbosa, 2007).

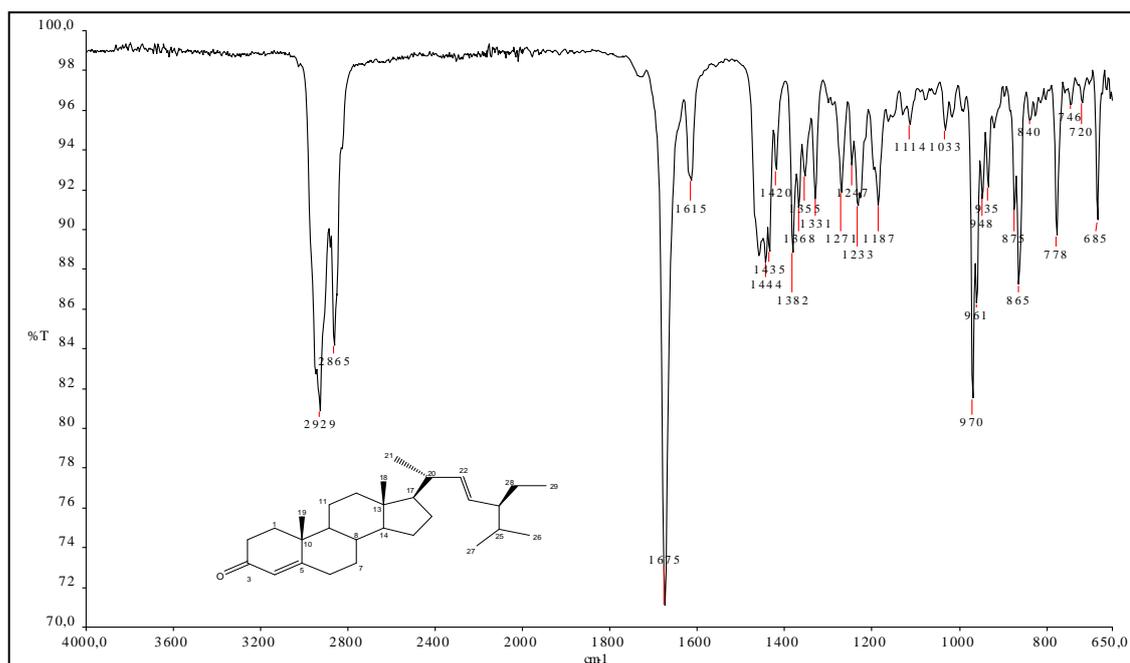


Figura 22: Espectro na região de infravermelho de DE02.

No espectro de RMN de ^1H de DE02 (Figura 23, pág. 43) pode se observar ausência do sinal referente ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico C-3 (δ_{H} 3,53) e a desblindagem do hidrogênio olefinico com modificação do sinal de δ 5,36 (1H, d, $J= 8,8$ Hz) para δ 5,72 (1H, s) em relação ao estigmasterol. A desblindagem e a modificação do sinal de duplete para simpleto evidenciam a modificação química na vizinhança do hidrogênio olefinico confirmando a informação obtida no espectro na região de IV: a ocorrência de uma ligação dupla conjugada a um grupo carbonila, portanto este sinal foi atribuído ao átomo de hidrogênio H-4. Os demais sinais olefinicos também foram observados: δ 5,15 (1H, dd, $J=15,2$ Hz, 8,4 Hz, H-22); δ 5,02 (dd, 1H, $J=15,2$ Hz, 8,4 Hz, H-23).

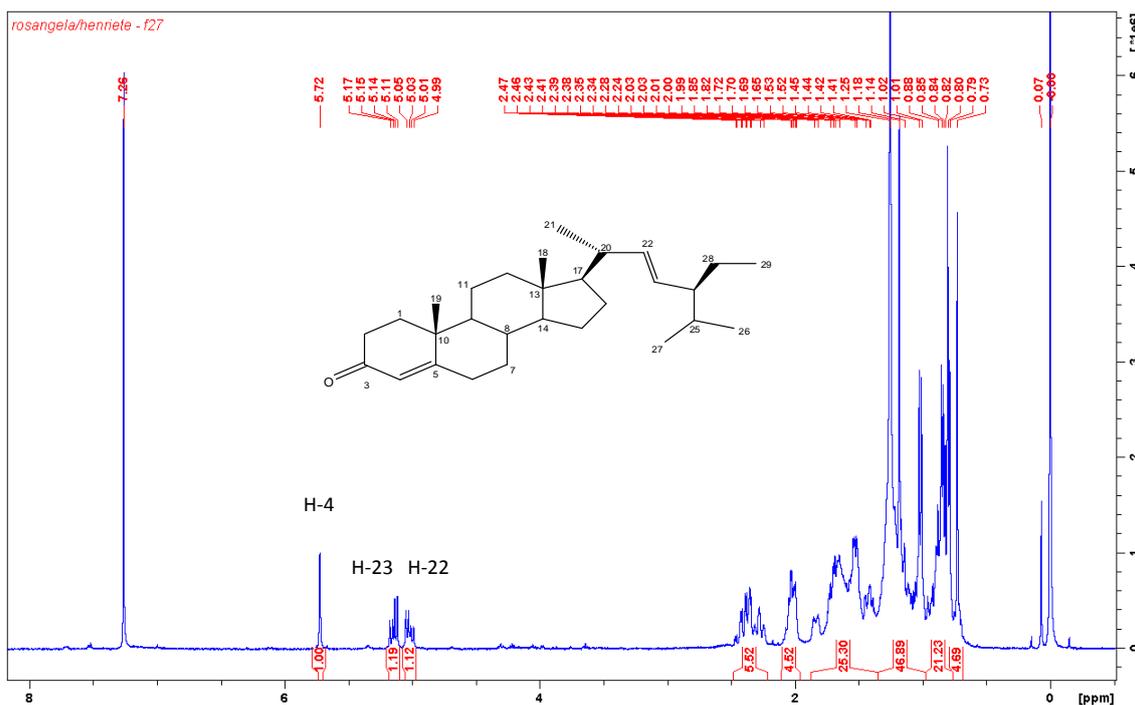


Figura 23: Espectro de RMN ^1H de DE02 (CDCl_3 , 400 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C e com o auxílio do sub-espectro DEPT 135 (Figura 24 e 25) foi possível identificar 29 sinais de carbonos sendo 9 sinais de carbonos metilênicos e 4 sinais de carbonos não hidrogenados.

A ausência do sinal em δ 72,00 referente ao átomo de carbono carbinólico e a presença do sinal em δ 199,80 referente ao átomo de carbono carbonílico (C-3) comprova a oxidação da hidroxila no estigmasterol. Pela comparação do deslocamento químico do carbono carbonílico de DE01 (δ 210,63) e DE02 (δ 199,80) é observada uma blindagem do sinal de DE02 em relação a DE01. Este fato confirma a ocorrência da conjugação da ligação dupla com o grupo carbonila evidenciando a migração da ligação dupla da posição C-5/C-6 para a posição C-4/C-5 conforme observado no espectro na região de IV e de RMN de ^1H . A conjugação da ligação dupla diminui a deficiência de elétrons do carbono da carbonila pela doação de densidade eletrônica da ligação dupla ao átomo de carbono C-3 e portanto há uma blindagem deste. Em concordância com este fato, é observada a desblindagem do sinal do átomo de carbono não hidrogenado C-5 pois o sinal em δ 140,97 desloca-se para δ 171,83. Os efeitos descritos acima podem ser observados pela estrutura de ressonância apresentado na Figura 26, pág. 45.

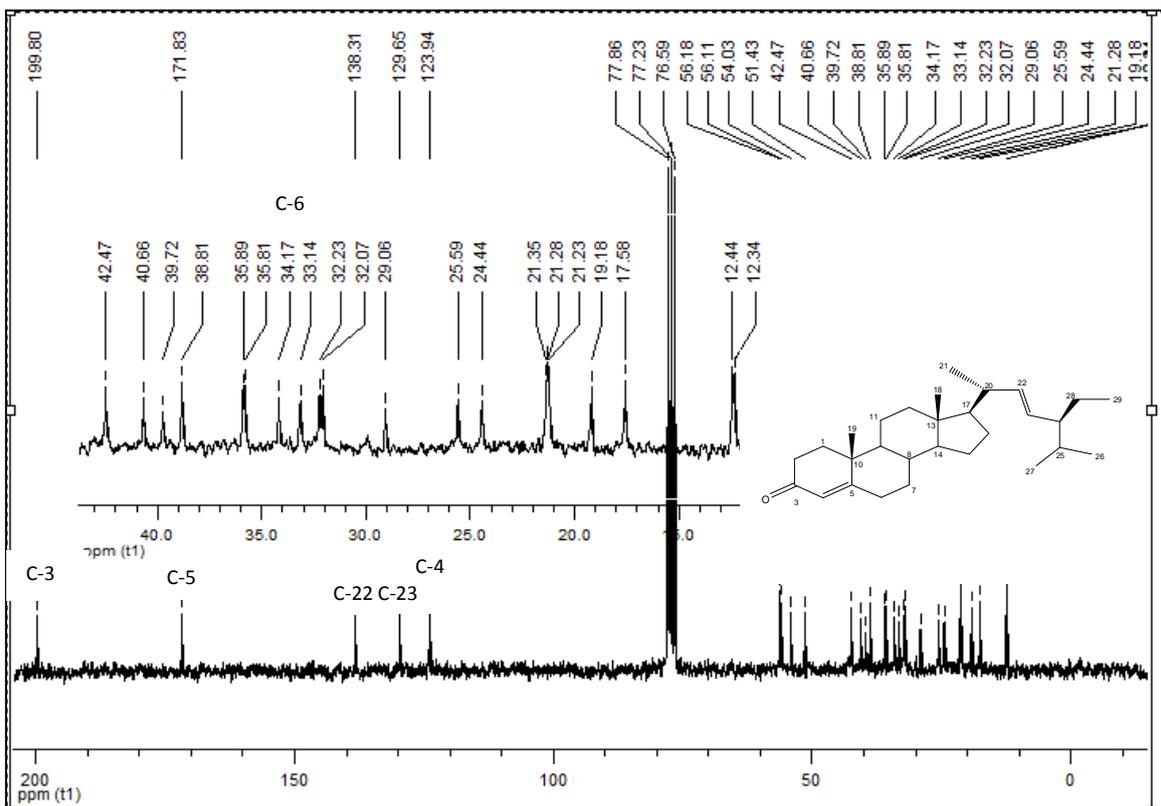


Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C de DE02 (CDCl_3 , 100 MHz).

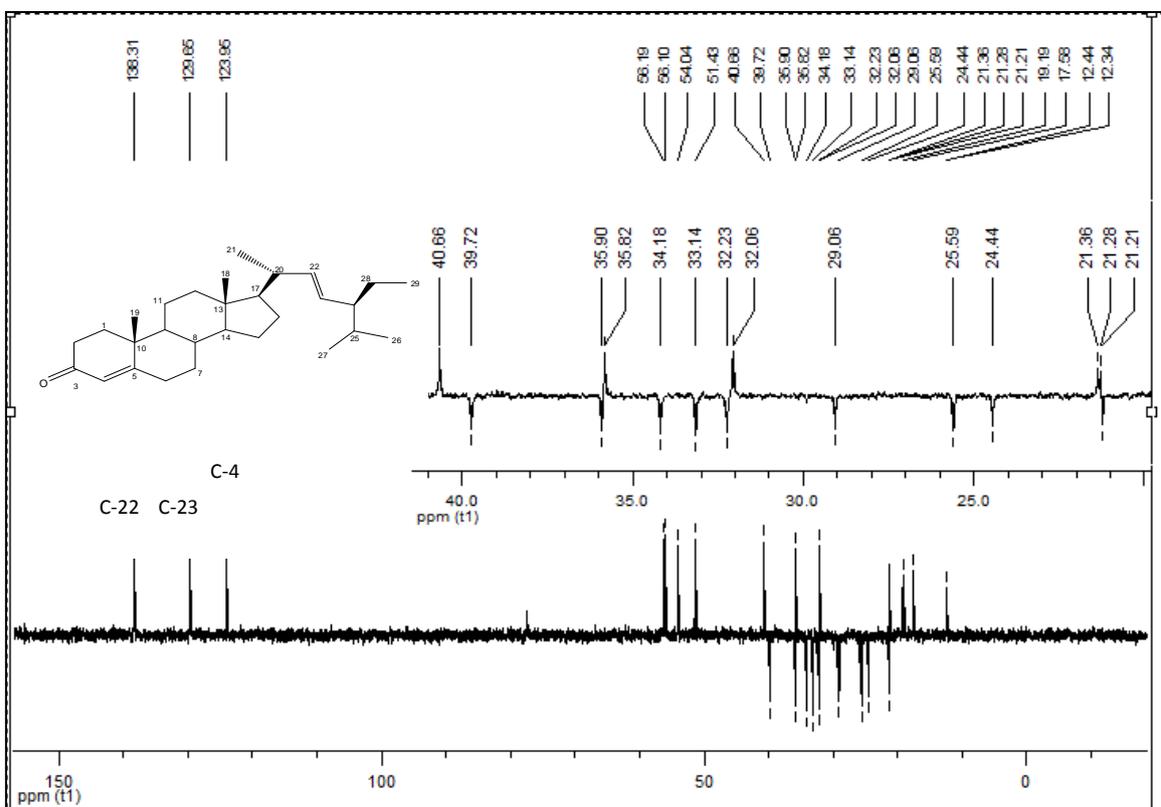


Figura 25: Sub-espectro DEPT 135 de DE02 (CDCl_3 , 100 MHz).

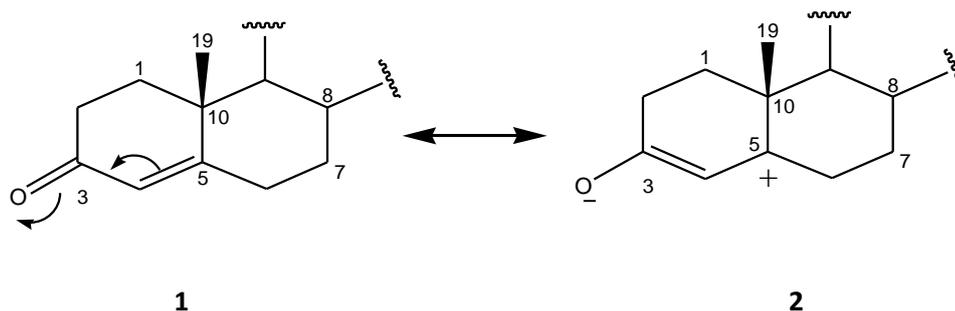
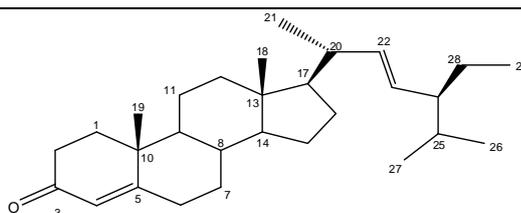


Figura 26 – Estrutura de ressonância da estigmasta-4,22-dien-3-ona.

A atribuição de todos os sinais de carbonos (Tabela 05) foi realizada por comparação com os dados descritos na literatura (SILVA, 2008). A substância DE02 foi identificada como estigmasta-4,22-dien-3-ona.

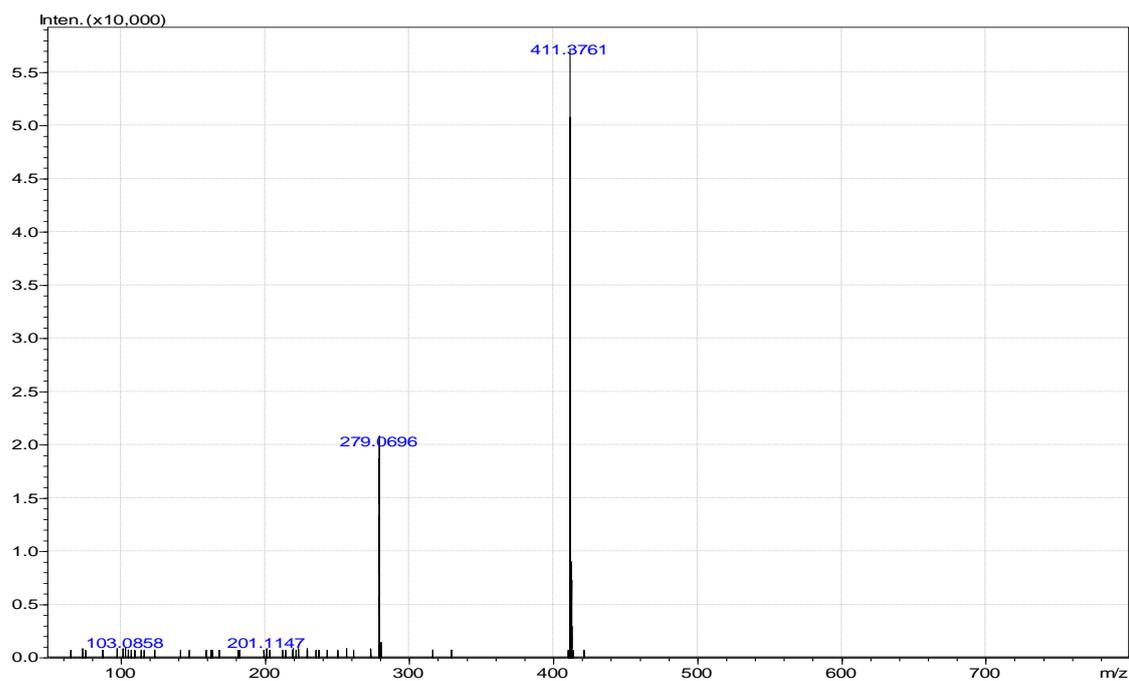
Tabela 05: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de DE02 com a literatura.



C	Literatura	DE02	C	Literatura	DE02
1	35,7	35,9	16	28,9	29,1
2	32,1	32,2	17	56,0	56,2
3	199,3	199,8	18	12,2	12,3
4	123,6	124,0	19	17,5	17,6
5	171,4	171,8	20	40,5	40,7
6	34,0	34,2	21	19,1	19,2
7	33,0	33,2	22	138,0	138,3
8	35,7	35,8	23	129,3	129,7
9	51,2	51,4	24	53,8	54,0
10	38,6	38,8	25	31,9	32,1
11	21,2	21,2	26	21,1	21,3
12	39,6	39,7	27	21,2	21,4
13	42,3	42,5	28	25,5	25,6
14	55,9	56,2	29	12,3	12,4
15	24,3	24,4			

Referência: (SILVA, 2008).

O espectro de massas de alta resolução de DE02 (Figura 27) apresentou um pico base $[M+1]^+$ de m/z 411,3761 correspondendo ao produto estigmasta-4,22-dien-3-ona, visto que sua massa exata equivale a m/z 410,3549 e a espécie protonada tem massa exata de m/z 411,3582. O erro inerente a medida foi de 43 ppm em relação ao pico base, valor superior ao aceito de 20 ppm. A molécula apresentou-se como pouco ionizável e o resultado obtido deve ser repetido utilizando outra técnica.



Event#: 1 MS(C+) Ret. Time : 2.627 -> 3.280 Scan# : 395 -> 493

Figura 27: Espectro de massas de alta resolução de DE02 por APCI.

2.8.d – Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona (DE03)

No espectro na região do infravermelho de DE03 (**Figura 28**) pode-se observar duas bandas em 1681 e 1678 cm^{-1} referente ao estiramento C=O de cetonas e a ausência da banda característica do grupo hidroxila em 3350 cm^{-1} . A redução do valor observado para as bandas de cetonas em relação a DE01 (1717 cm^{-1}) sugere o enfraquecimento da ligação C=O devido à deslocalização dos elétrons π por ressonância com a ligação dupla evidenciando a presença de duas cetonas α,β -insaturadas (Barbosa, 2007). A banda em 1609 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação C=C de cetonas α,β -insaturadas (Barbosa, 2007).

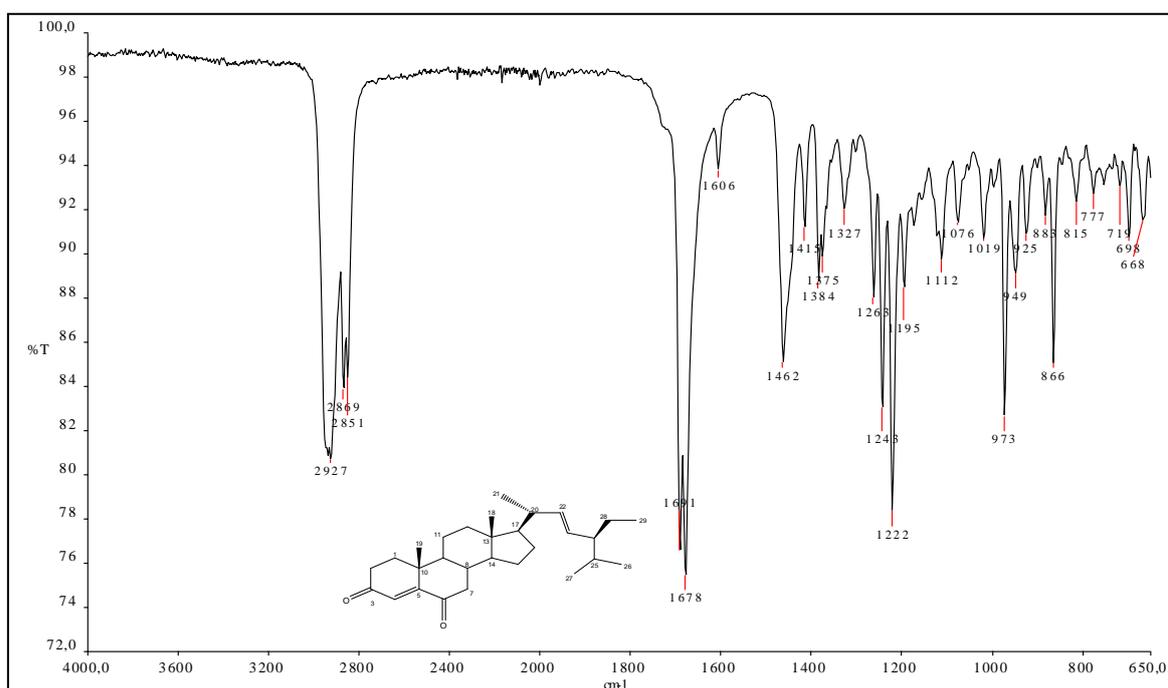


Figura 28: Espectro na região de infravermelho de DE03.

No espectro de RMN de ^1H de DE03 (Figura 29, pág. 48) pode se observar ausência do sinal referente ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono carbinólico C-3 (δ_{H} 3,52) do estigmasterol. O átomo de hidrogênio olefínico foi observado em δ 6,17 (s, 1H, H-4). A desblindagem em relação ao estigmasterol (δ 5,36) e em relação a DE02 (δ 5,72) evidencia a modificação química da vizinhança confirmando a informação obtida no espectro na região de IV, onde foi verificada a ocorrência de ligação dupla conjugada a dois grupos carbonilas. Os demais sinais olefínicos também foram observados: o duplo duplete centrado em δ 5,15 (1H, dd, $J=15,2$ Hz, 8,4 Hz, H-22); o duplo duplete centrado em δ 5,04 (1H, dd, $J=15,2$ Hz, 8,4 Hz, H-23).

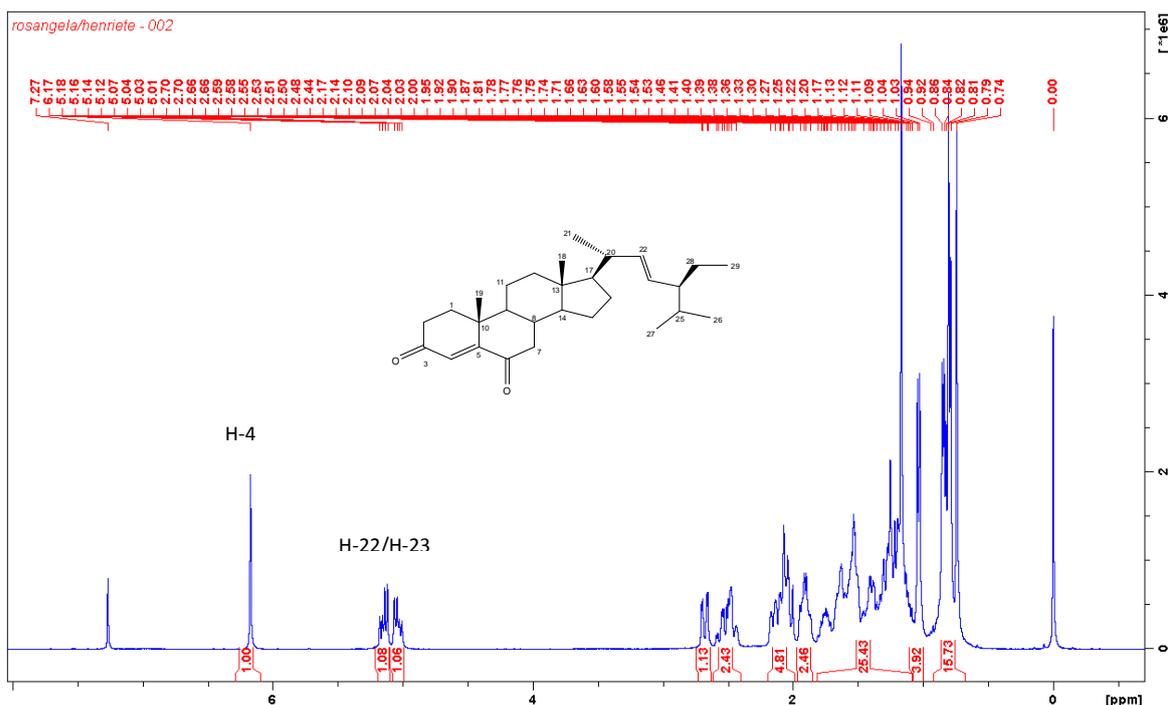


Figura 29: Espectro de RMN ^1H de DE03 (CDCl_3 , 400 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C e com o auxílio do sub-espectro DEPT 135 (**Figura 30 e 31, pág. 49 e 50**) foi possível identificar 29 sinais referentes aos carbonos, sendo 8 sinais de carbono metilênicos e 5 sinais referentes a carbonos não hidrogenados. A oxidação do carbono C-3 pode ser evidenciada pela presença do sinal, em δ 199,74 e ausência do sinal em δ 72,00 presente no reagente inicial estigmasterol. A presença de outro sinal em δ 202,58 característico de grupo carbonila e a ausência no sub-espectro DEPT de um átomo de carbono metilênico evidenciou uma nova modificação química. A comparação de DE03 com os dados descritos para o estigmasterol (E) mostra a ausência do sinal do átomo de carbono metilênico C-6, sugerindo esta posição para a segunda carbonila. Associado a esta informação, há uma desblindagem do átomo de carbono C-7 de δ 31,90 (E) para δ 47,00 (DE03), evidenciando o efeito anisotrópico da carbonila e uma menor desblindagem do sinal do átomo de carbono olefínico não hidrogenado C-5 (δ 161,24) em relação à substância DE02 (δ 171,83) quando avaliados em relação ao estigmasterol (δ 141,00). A última descrição parece incoerente inicialmente, entretanto ao analisarmos as densidades eletrônicas das estruturas há uma justificativa plausível. A substância DE02 somente permite duas estruturas de ressonância, onde há uma estrutura de ressonância sem cargas e uma estrutura com densidade de cargas positiva sobre a átomo de carbono C-5 conforme Figura 26, pág. 50. Quando analisamos a substância DE03 há o efeito de ressonância cruzada, reduzindo a densidade positiva sobre o átomo de carbono C-5, tornando-o mais blindado em relação a DE02 (Figura 32). Este fato

também explica a maior desblindagem do átomo de hidrogênio H-4 em DE03 (δ 6,17) em relação ao átomo de hidrogênio H-4 em DE02 (δ 5,72). A substância DE03 foi identificada como estigmasta-4,22-dien-3,6-diona e todos os dados estão de acordo com a literatura (Alliota, 1991) descritos na Tabela 06.

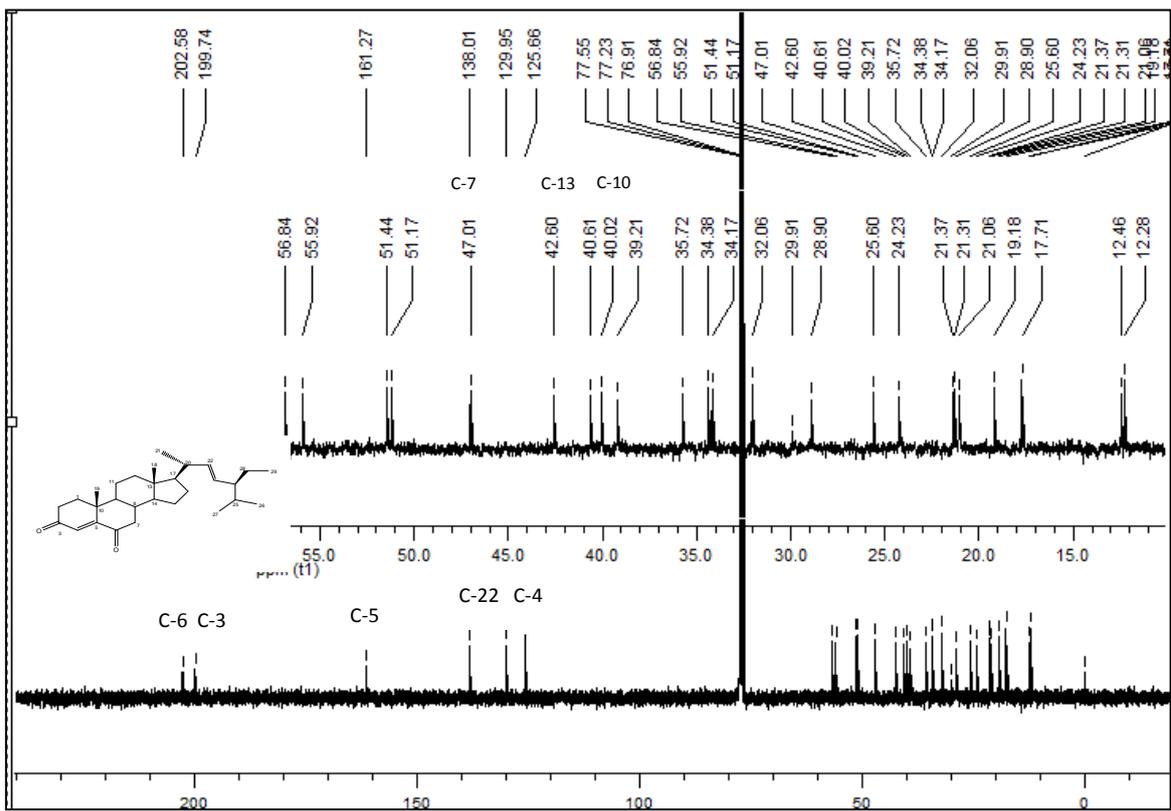


Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C de DE03 (CDCl_3 , 100 MHz).

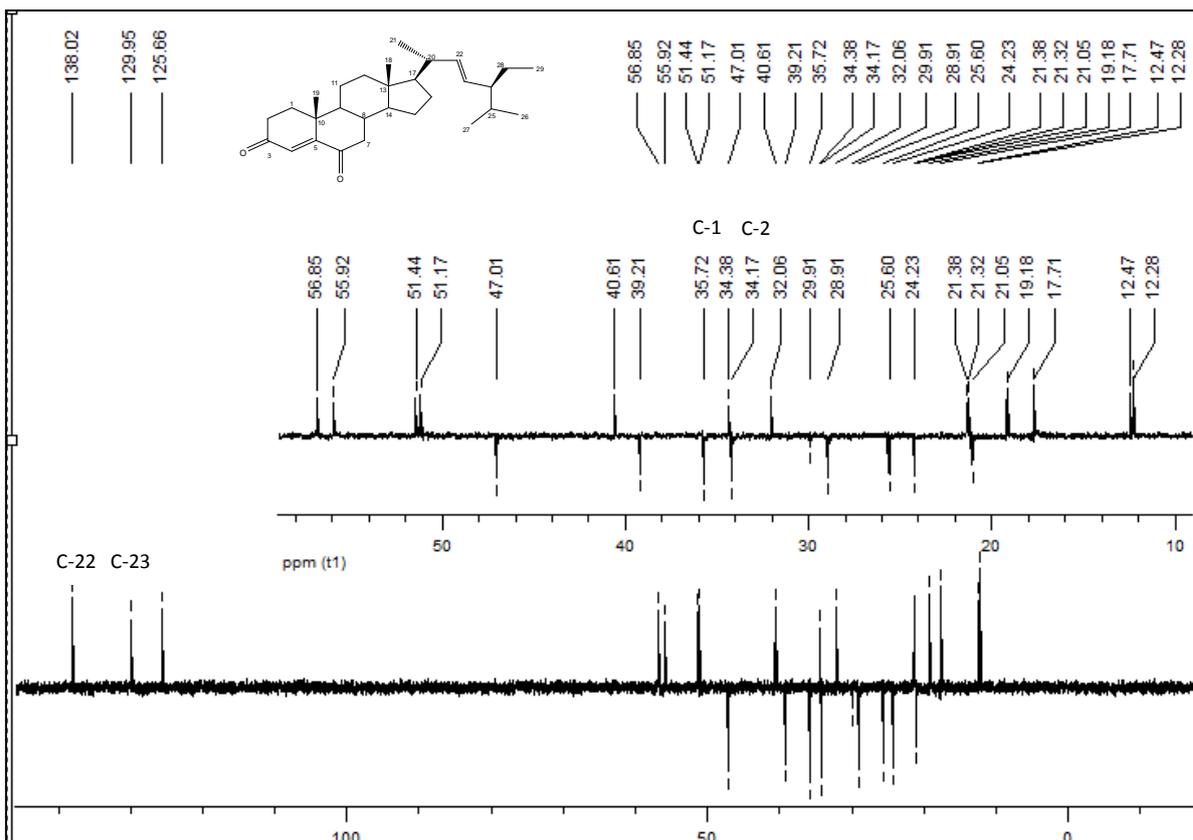


Figura 31: Sub-espectro DEPT 135 de DE03 (CDCl₃, 100 MHz).

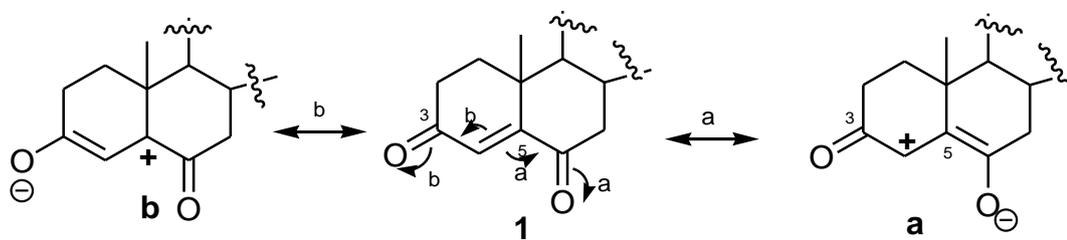
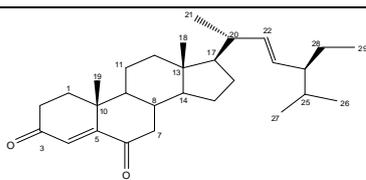


Figura 32 – Estruturas de ressonância da estigmasta-4,22-dien-3,6-diona.

Tabela 06: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do DE03 com a literatura.



C	Literatura	DE03	C	Literatura	DE03
1	35,5	35,7	16	27,9	28,9
2	33,9	34,2	17	56,6	56,8
3	199,5	199,7	18	11,9	12,3
4	125,4	125,7	19	17,4	17,7
5	161,1	161,3	20	40,5	40,6
6	202,3	202,6	21	21,1	21,3
7	46,8	47,0	22	138,3	138,0
8	39,1	34,4	23	129,3	129,9
9	50,9	51,2	24	51,3	51,4
10	34,2	40,0	25	31,9	32,1
11	20,8	21,1	26	21,2	21,4
12	39,9	39,2	27	19,1	19,2
13	42,5	42,6	28	25,4	25,6
14	55,8	55,9	29	12,3	12,5
15	23,9	24,2			

Referência: (Alliota, 1991).

O espectro de massas de alta resolução de DE03 (Figura 27) apresentou um pico base $[\text{M}+1]^+$ de m/z 425,3486 correspondendo ao produto estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, visto que sua massa exata equivale a m/z 424,3341 e a espécie protonada tem massa exata de m/z 425,3375. O erro inerente ao pico base foi de 26 ppm.

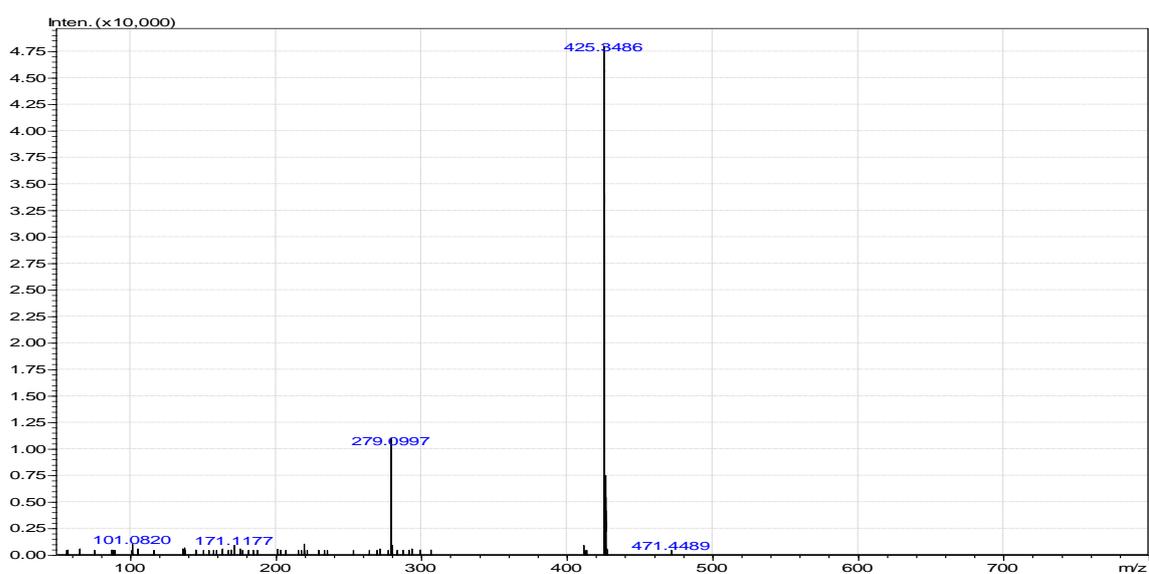


Figura 33: Espectro de massas de alta resolução de DE03 por APCI.

2.8.e - Estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima (DE04)

A substância DE04 foi obtida a partir de DE02 por reação de formação de oximas. No espectro na região do infravermelho de DE04 (Figura 34) pode-se observar ausência da banda referente ao estiramento da ligação C=O (1675 cm^{-1}) de DE02, bem como a presença de uma banda larga centrada em 3283 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação OH e uma banda em 1631 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=N (Barbosa, 2007 e Pavia, 2010).

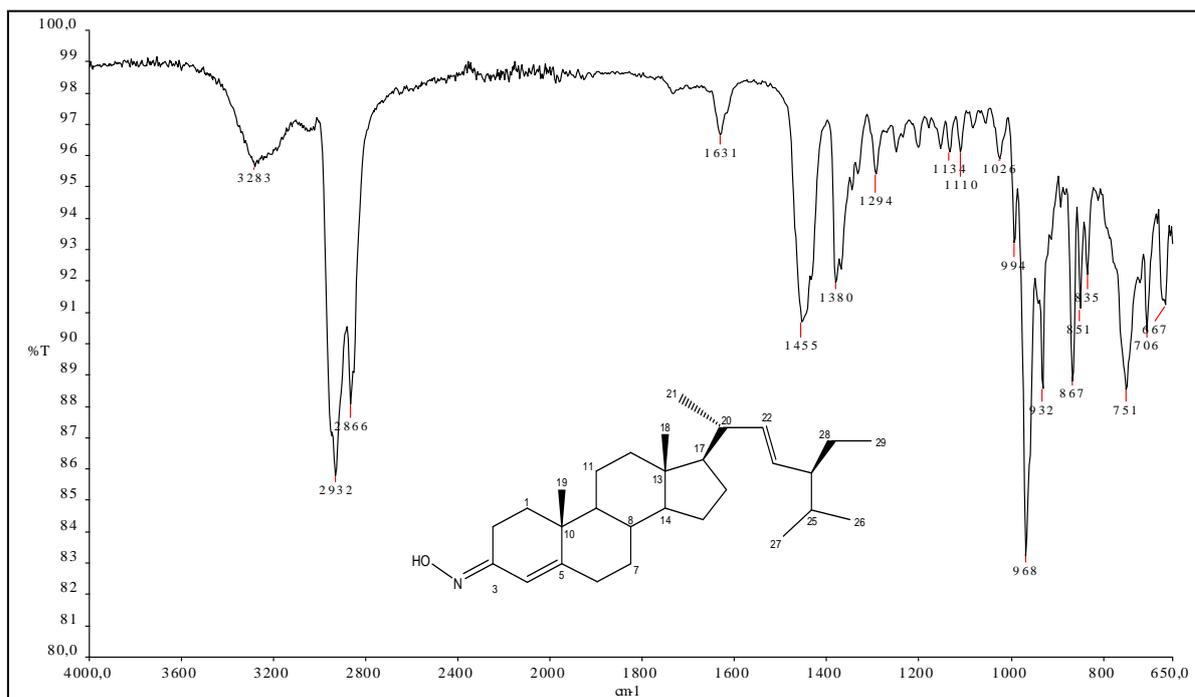


Figura 34: Espectro na região de infravermelho de DE04.

No espectro de RMN de ^1H de DE04 (Figura 35) pode se observar a presença de um duplete em δ 3,05 (1H, d, 17,2 Hz) ausente no material de partida DE02. Cui *et al* atribui este sinal ao átomo de hidrogênio H-2. Devido a ligação dupla carbono-nitrogenio é possível identificar a formação de dois isômeros para as oximas: o isômero *Z*, onde o carbono de maior prioridade (no caso carbono C-4) esta em posição *CIS* ao grupo hidroxila e o isômero *E*, onde o carbono de maior prioridade esta em posição *TRANS* ao grupo hidroxila. Sabe-se que a presença do grupo hidroxila exerce um efeito sobre o grupo em posição *CIS*: ocorre uma desblindagem do átomo de hidrogênio e consequentemente uma blindagem do átomo de carbono (Silverstein *et al*, 1991). No caso de DE04 (isômero *E*), a hidroxila é *CIS* ao grupo CH_2 na posição 2, o que pode ser confirmado pela presença do sinal desblindado do átomo de hidrogênio H-2 em δ 3,05. Observa-se o sinal do hidrogênio vinílico H-4 em δ 5,77 (s, 1H) semelhante ao material de partida da reação (DE02, pag. 46).

O sinal em δ 6,47 (s, 1H) com valor de integral inferior a 1 (ou seja um contaminante) foi atribuído a presença da oxima Z, como impureza. Neste caso o grupo hidroxila é *CIS* ao grupo CH vinílico na posição 4 ocasionando a desblindagem observada para o átomo de hidrogênio H-4 (de δ 5,72 em DE02 para δ 6,47 em DE04. Os demais sinais dos átomos de hidrogênio olefinicos foram identificados em δ 5,14 (1H, dd, $J=15,2$ Hz, 8,4 Hz, H-22); em δ 5,01 (dd, 1H, $J=15,0$ Hz, 8,8 Hz, H-23), conforme literatura (Cui *et al*, 2009).

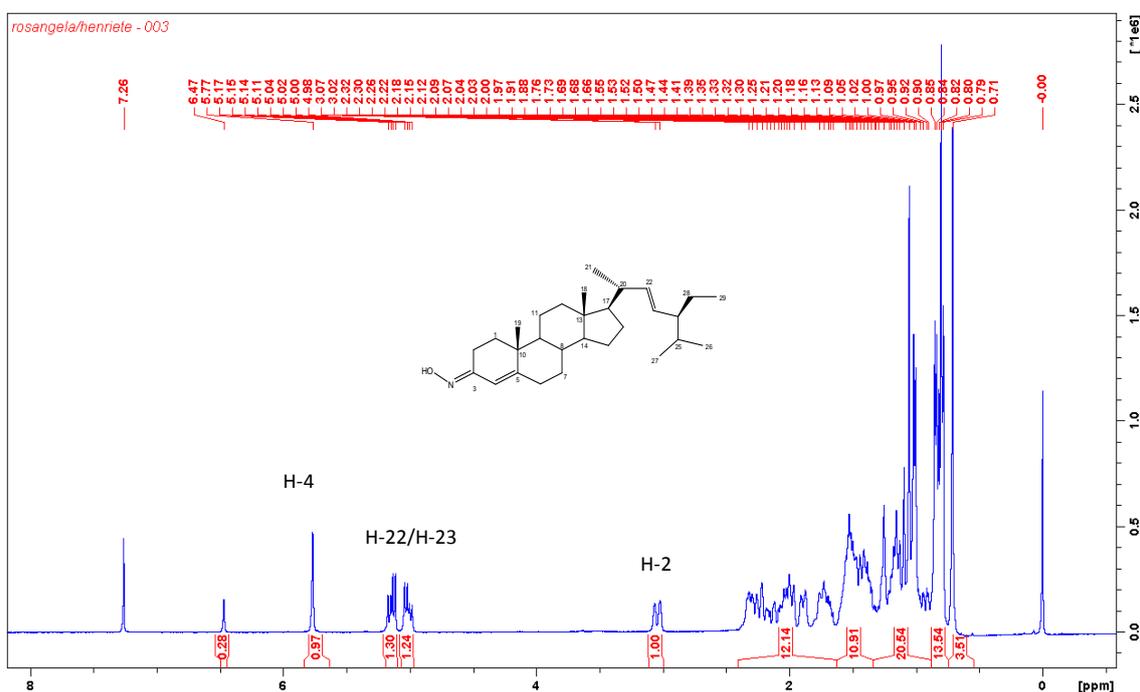


Figura 35: Espectro de RMN ^1H de DE04 (CDCl_3 , 400 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C e com o auxílio do sub-espectro DEPT 135 (Figura 36 e 37) foi possível identificar 29 sinais referentes aos átomos de carbono de DE04, sendo nove sinais de carbono metilênicos e quatro sinais de carbonos não hidrogenados. A ausência do sinal de carbono carbonílico em δ 199,83 (DE02) e a presença de um sinal em δ 157,30 (DE04), região característica de oximas, evidenciam a modificação da ligação química $\text{C}=\text{O}$ para a ligação química $\text{C}=\text{N}$. A análise dos dados de deslocamentos químicos de DE04 em relação ao material de partida da reação (DE02) mostra uma blindagem dos sinais de carbonos na vizinhança da ligação $\text{C}=\text{N}$: átomo de carbono C-2 (δ 32,20 para δ 18,94); átomo de carbono C-4 (δ 123,95 para δ 117,25) e átomo de carbono C-5 (δ 171,80 para δ 156,13).

Segundo Silverstein *et al*, 1991 é possível distinguir os isômeros Z e E de oximas, pois o substituinte mais impedido (*cis* em relação ao grupo OH) é mais blindado. Ao observamos os deslocamentos químicos dos átomos de carbono C-2 e C-4 em DE04 é perceptível que houve um maior efeito de blindagem em relação a DE02 dos sinais dos átomos de carbono C-2 (δ 32,20 para δ 18,94) com variação de 13,26 ppm o que sugere que este carbono esteja em posição *cis* a hidroxila, neste caso teremos os grupos de maior prioridade para lados opostos a ligação C=N caracterizando o isômero E. Tais fatos associados ao IV, espectro de RMN de ^1H e literatura comprovam a formação do produto (3E) estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima como produto principal da mistura. A atribuição de todos os sinais de carbonos (Tabela 07, pág. 57) foi realizada por comparação com os dados descritos na literatura (Cui *et al*, 2009).

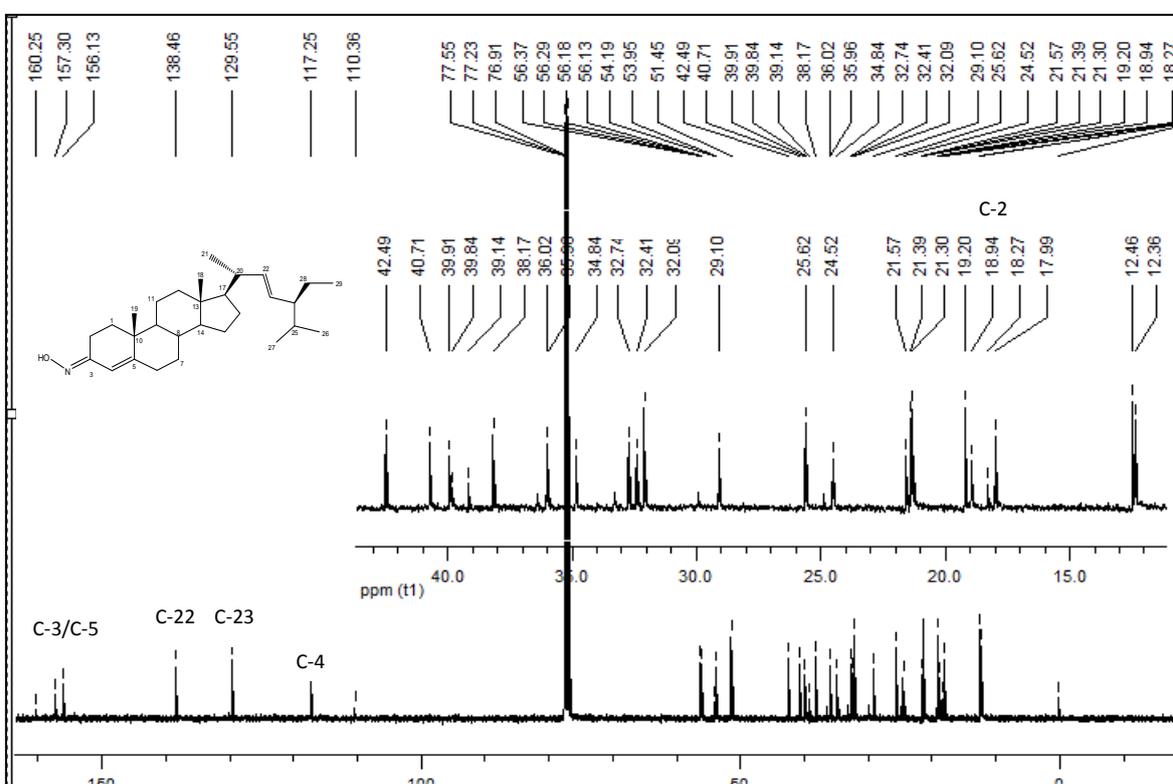


Figura 36: Espectro de RMN de ^{13}C de DE04 (CDCl_3 , 100 MHz).

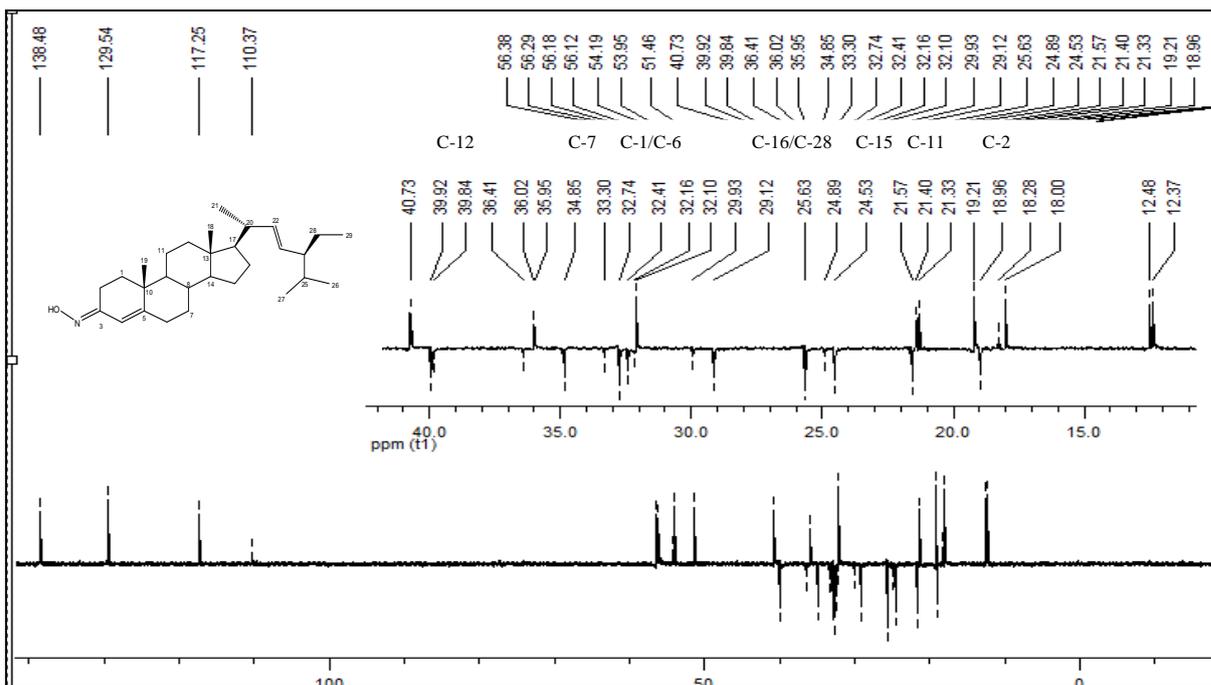


Figura 37: Sub-espectro DEPT 135 de DE04 (CDCl₃, 100 MHz).

O mapa de correlação bidimensional HMQC (Figura 38 e 39) possibilitou determinar a correlação entre os átomos de carbono e hidrogênio. O simpleto em δ_H 5,77 foi correlacionado ao sinal em δ_C 117,27 atribuído ao átomo de carbono olefinico C-4, bem como os sinais dos átomos de hidrogênios olefinicos (δ_H 5,14 e δ_H 5,01) foram correlacionados aos átomos de carbono C-22 e C-23 (δ_C 138,46 e δ_C 129,55), respectivamente, conforme Figura 38. O duplete em δ_H 3,05 (1H, d, $J=17,2$ Hz) foi correlacionado ao sinal referente ao átomo de carbono C-2 em δ_C 18,94.

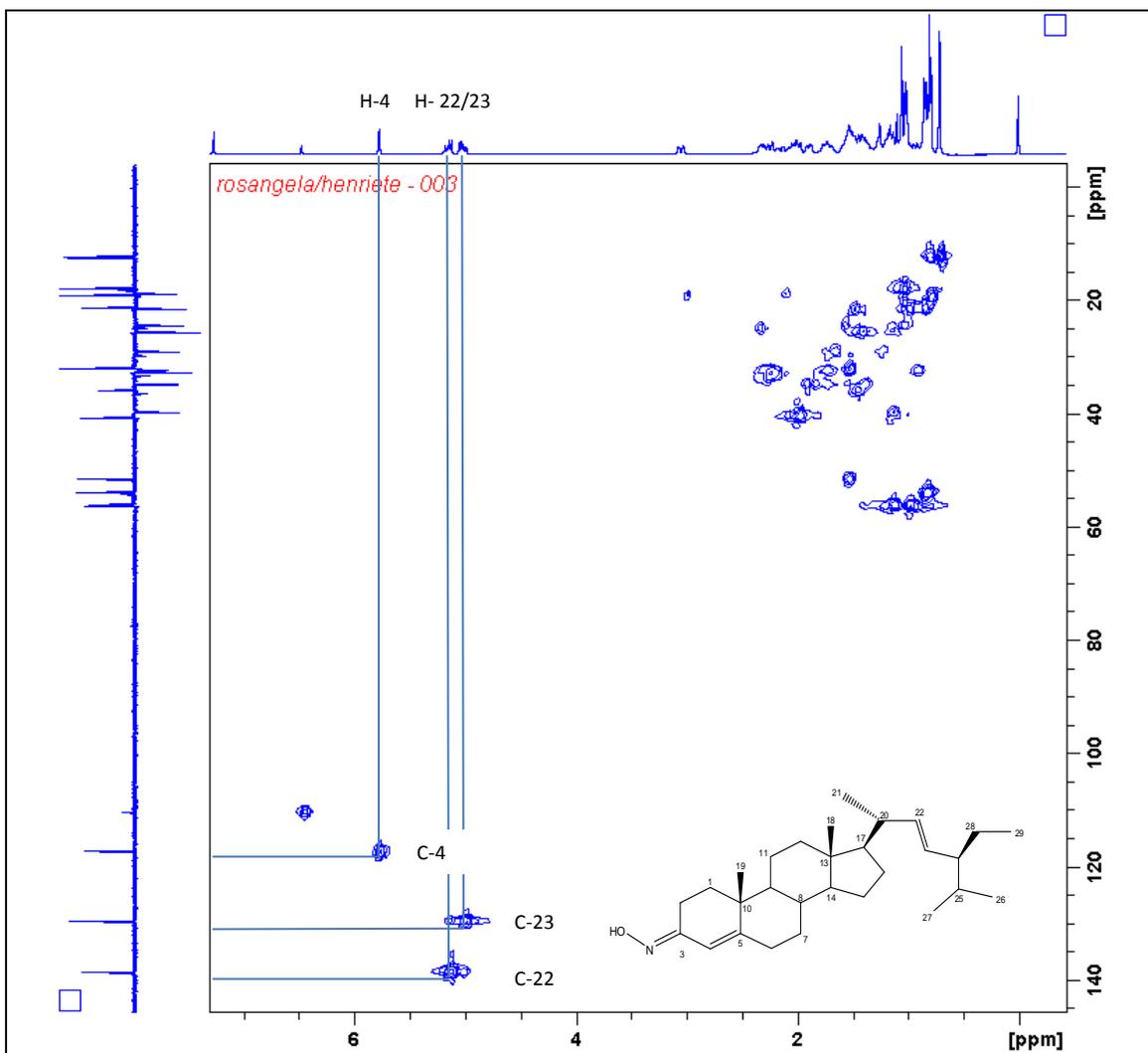


Figura 38: Mapa de Correlação HMQC de DE04 (CDCl₃, 400 MHz).

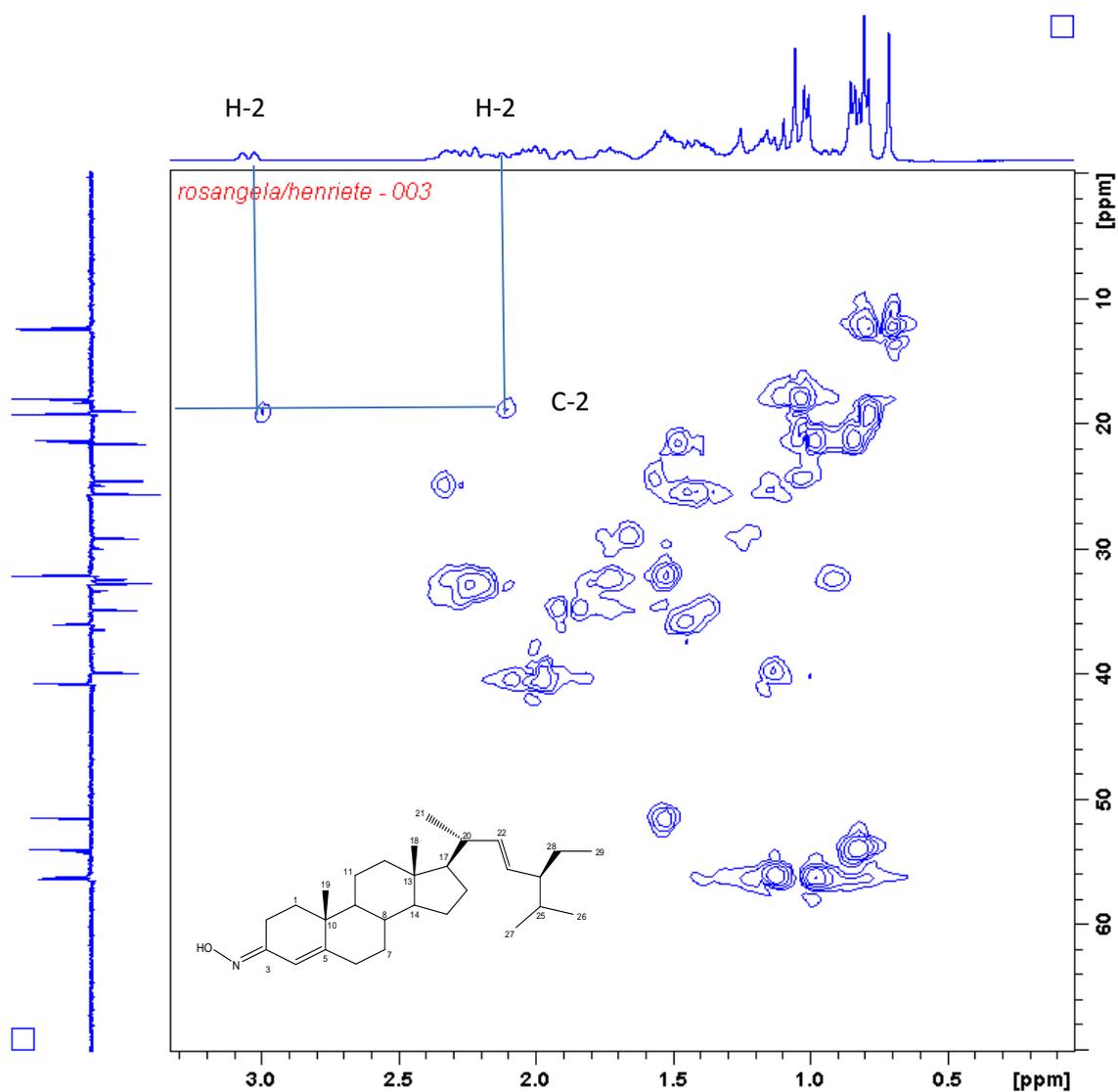


Figura 39: Mapa de Correlação HMBC de DE04 (CDCl₃, 400 MHz).

O mapa de Contornos COSY (**Figura 40**) possibilitou a observação de correlações entre os átomos de hidrogênio H-2 em δ_H 3,05 e δ_H 2,10; entre os átomos de hidrogênio H-23 em (δ_H 5,01) e H-24 (δ_H); entre os átomos de hidrogênio H-22 em (δ_H 5,15) e H-20 (δ_H); e entre os átomos de hidrogênio H-22 em (δ_H 5,15) e H-23 (δ_H 5,01) conforme Figura 40.

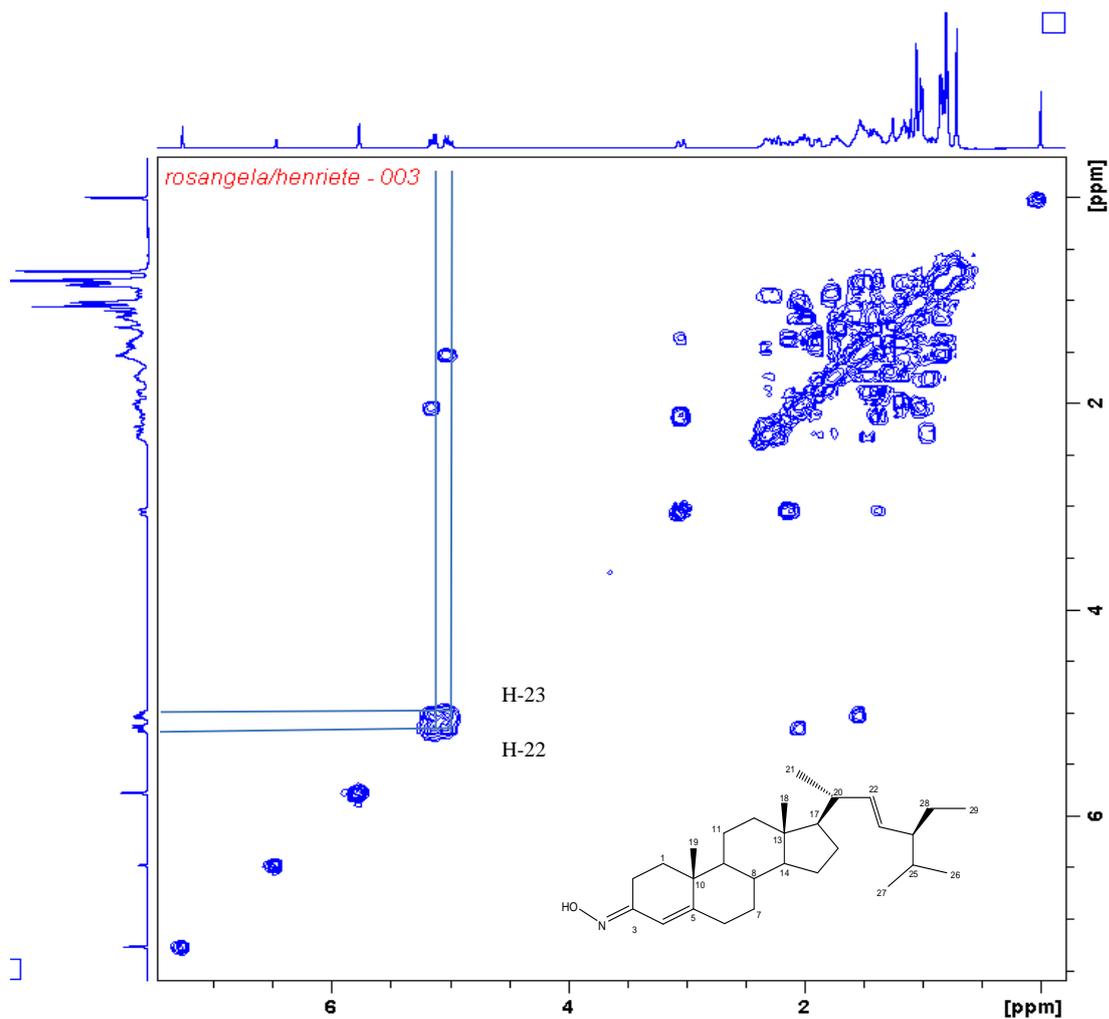
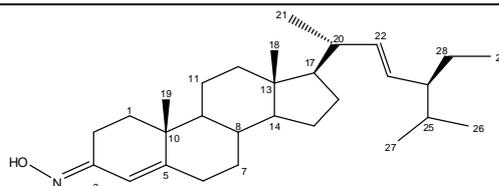


Figura 40: Mapa de Contorno COSY de DE04 (CDCl₃, 400 MHz).

A análise dos mapas de HMQC e COSY mostrou valores diferentes das descritas na literatura conforme Tabela 07, porém quando comparadas ao material de partida DE02, os valores atribuídos aos átomos são coerentes com o esperado, conforme comparação na Tabela 14 (Anexo 02, pág. 84). A substância DE04 foi identificada como estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima.

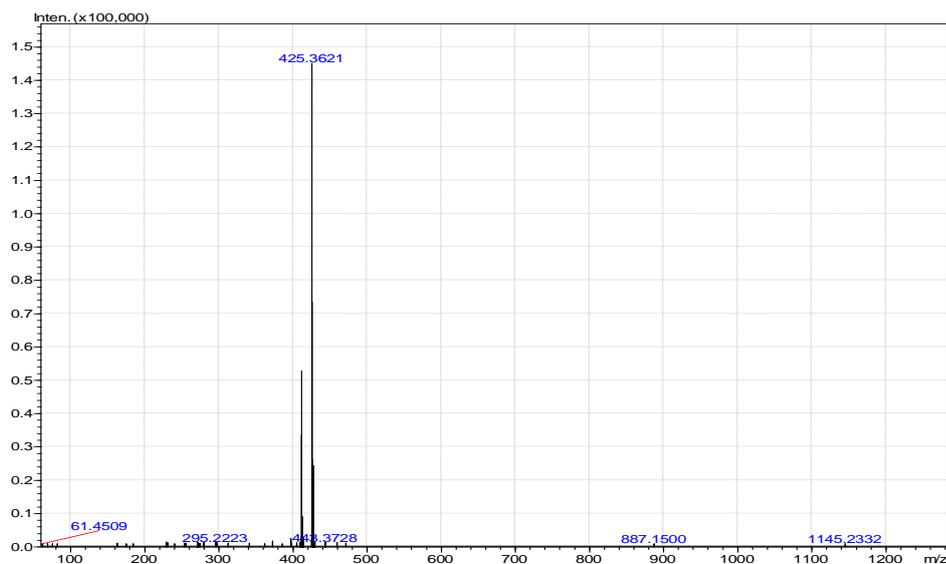
Tabela 07: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de DE04 com a literatura.



C	Literatura	DE04	C	Literatura	DE04
1	32,6	32,7	16	24,3	29,1
2	28,9	18,9	17	56,0	56,1
3	157,2	157,3	18	12,3	12,5
4	117,1	117,3	19	18,7	18,0
5	155,9	156,1	20	39,8	40,7
6	31,9	34,9	21	21,1	21,3
7	34,7	32,1	22	138,2	138,5
8	35,9	36,0	23	129,4	129,5
9	53,8	54,0	24	51,3	51,5
10	40,5	38,2	25	32,3	32,4
11	21,2	21,6	26	17,8	21,4
12	38,0	39,9	27	19,0	19,2
13	42,3	42,5	28	25,4	25,6
14	56,2	56,3	29	12,2	12,4
15	21,4	24,5			

Referência: Cui, 2009.

O espectro de massas de alta resolução por APCI de DE04 (Figura 41) apresentou um pico de íon molecular correspondendo ao produto DE04 m/z 425,3621, correspondendo a molécula proposta, visto que sua massa exata equivale a $425,3658 \text{ g mol}^{-1}$.



Event#: 1 MS(C+) Ret. Time : 0.400 -> 0.787 Scan# : 61 -> 119

Figura 41: Espectro de massas de alta resolução de DE04 por APCI.

2.8.e- Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, oxima (DE 05)

A substância DE05 foi obtida a partir da substância DE03 por reação de formação de oximas. No espectro na região do infravermelho da substância DE05 (**Figura 42**) pode-se observar a ausência das bandas referente ao estiramento C=O de cetonas α,β -insaturadas observadas no material de partida DE03 (1691 e 1678 cm^{-1}), e a presença de uma banda larga centrada em 3185 cm^{-1} , referente ao estiramento de ligação O-H e uma banda em 1626 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=N (Barbosa, 2007 e Pavia, 2010).

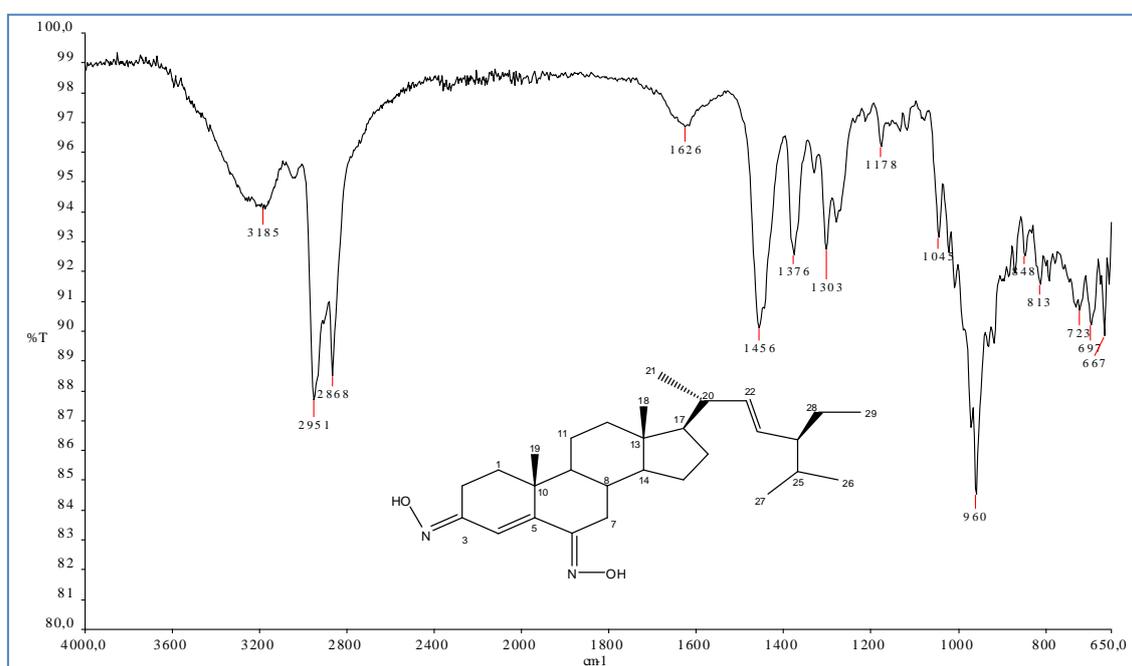


Figura 42: Espectro na região de infravermelho de DE05.

No espectro de RMN de ^1H de DE05 (Figura 43, pág. 60) pode se observar a desblindagem do sinal de hidrogênio olefínico H-4 de δ 6,17 em DE03 para δ 6,52 em DE05, característico de oxima E (Cui *et al*, 2009) e dos hidrogênios metilênicos vizinhos a C-3 e C-6: um dos átomos de hidrogênio H-7, anteriormente apresentava sinal em δ 2,67 (dd, 1H) para DE03 foi deslocado para δ 3,34 (m, 1H) em DE05; os átomos de hidrogênio H-2 e H-7 anteriormente com sinal em δ 2,55 (m, 2H) para DE03 apresentaram sinais distintos em δ 3,07 (m, 1H) e δ 2,15 (m, 1H) atribuído ao átomo de hidrogênio H-2 evidenciando a modificação da vizinhança. Foi observado, ainda os sinais dos átomos de hidrogênios olefínicos em δ 5,15 (1H, dd, $J=15,2$ Hz, 8,4 Hz, H-22); e em δ 5,04 (1H, dd, $J=15,0$ Hz, 8,4/8,8 Hz, H-23).

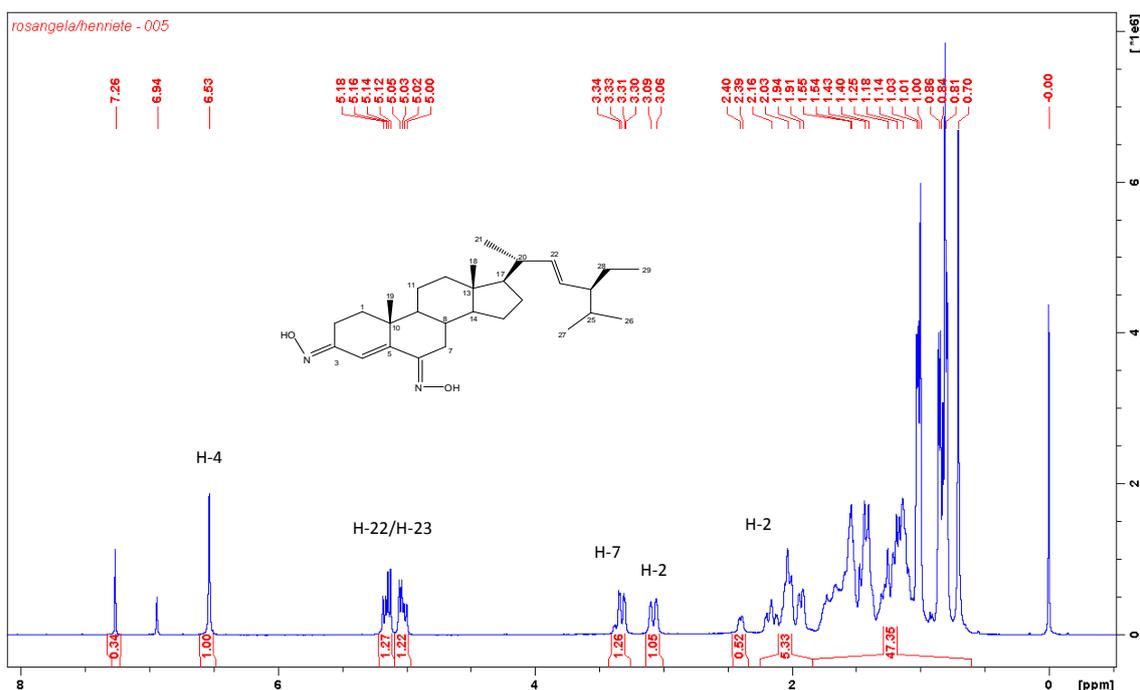


Figura 43: Espectro de RMN ^1H de DE05 (CDCl_3 , 400 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C e com o auxílio do sub-espectro DEPT 135 (Figura 44 e 45, pág. 62) foi possível identificar os 29 sinais referentes aos átomos de carbono, sendo oito sinais de carbono metilênicos e cinco sinais referentes aos átomos de carbonos não hidrogenados.

A presença dos sinais em δ 157,36 e δ 156,83 em DE05 e a ausência dos sinais em δ 202,58 e δ 199,74 atribuídos aos átomos de carbono C-3 e C-6 em DE03 evidenciam a modificação da ligação química C=O para uma ligação C=N. As blindagens observadas para os sinais dos átomos de carbono C-2 (δ 34,17 em DE03 para δ 18,82 em DE05); C-4 (δ 125,66 em DE03 para δ 119,51); C-5 (δ 161,27 em DE03 para δ 147,87) e C-7 (δ 47,00 em DE03 para δ 29,87) reforçam a modificação química da vizinhança e acordam com a literatura para formação de oxima E (Cui *et al*, 2009). Segundo Silverstein, (Silverstein *et al*, 1991) é possível distinguir os isômeros Z e E de oximas, pois o átomo de carbono do substituinte mais impedido (*cis* em relação ao grupo OH) é mais blindado. Ao observarmos os deslocamentos químicos dos átomos de carbono C-2 e C-4 em DE05 é perceptível que houve um maior efeito de blindagem em relação a DE03 dos sinais dos átomos de carbono C-2 (δ 34,17 para δ 18,82) com variação de 15,35 ppm o que sugere que este carbono esteja em posição *cis* a hidroxila,

neste caso teremos os grupos de maior prioridade para lados opostos a ligação C=N caracterizando o isômero E. A aplicação do mesmo conceito para os deslocamentos dos átomos de carbono C-5 e C-7 em DE05 mostra que houve maior efeito de blindagem em relação a DE03 dos sinais dos átomos de carbono C-7 (δ 47,00 para δ 29,87) com variação de 17,13 ppm o que sugere que este carbono esteja em posição *cis* a hidroxila, neste caso teremos os grupos de maior prioridade para lados opostos a ligação C=N caracterizando o isômero E novamente.

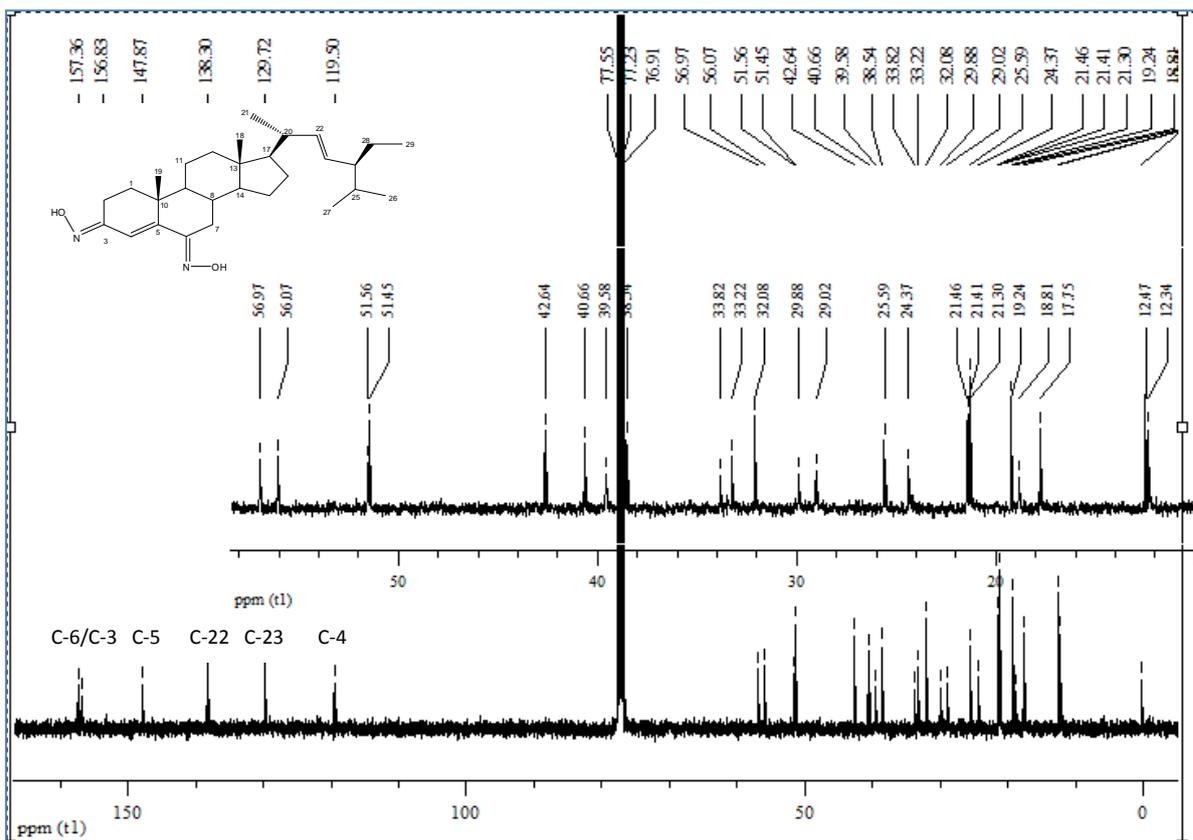


Figura 44: Espectro de RMN de ^{13}C de DE05 (CDCl_3 , 100 MHz).

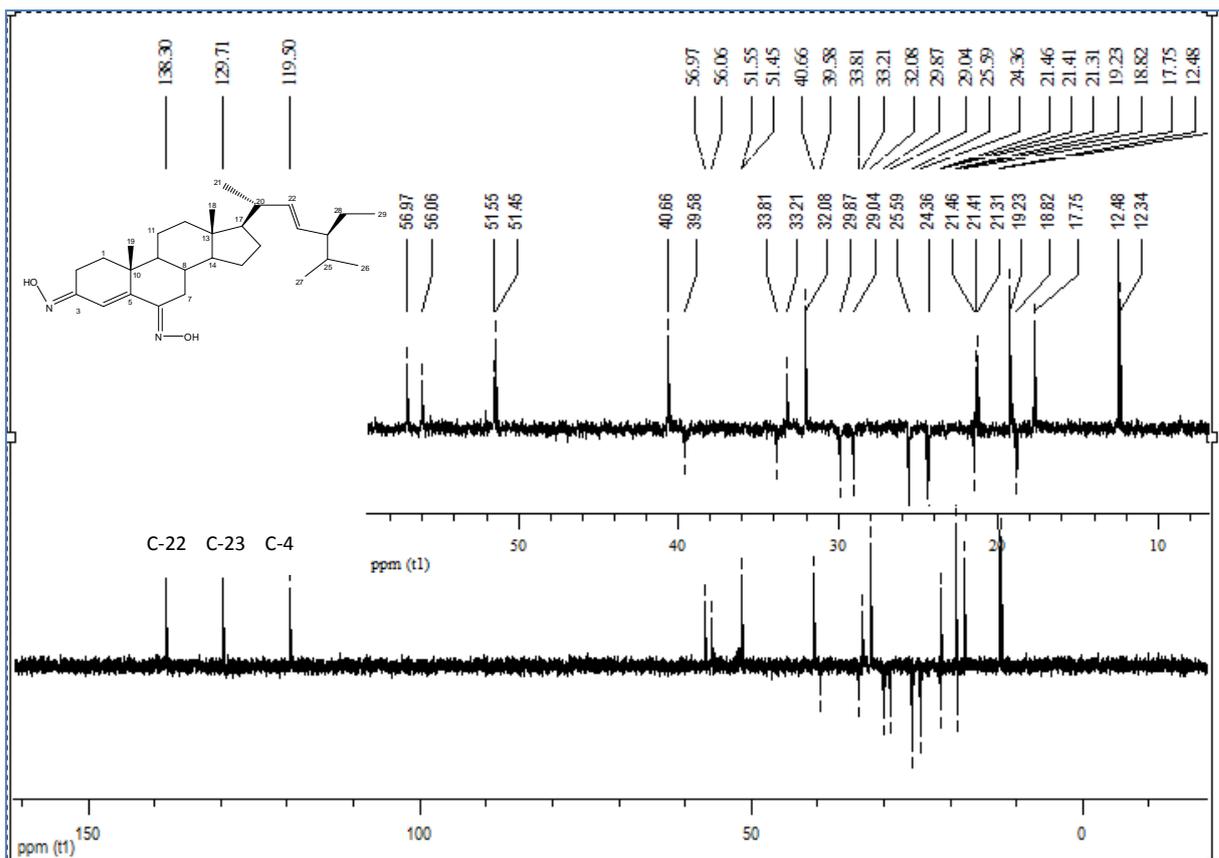


Figura 45: Sub-espectro DEPT 135 do DE05 (CDCl_3 , 100 MHz).

O mapa de correlação bidimensional HMQC (Figura 46, pág. 64) possibilitou determinar a correlação entre os átomos de carbono e hidrogênio. Destacam-se a atribuição dos sinais dos átomos de hidrogênio no intervalo de δ_{H} 3,0 a δ_{H} 3,50 onde foram observadas as correlações entre o multipletto centrado em δ_{H} 3,07 e o sinal referente ao átomo de carbono C-2 em δ_{C} 18,82 e o multipletto centrado em δ_{H} 3,35 e o sinal do átomo de carbono C-7 em δ_{C} 29,87.

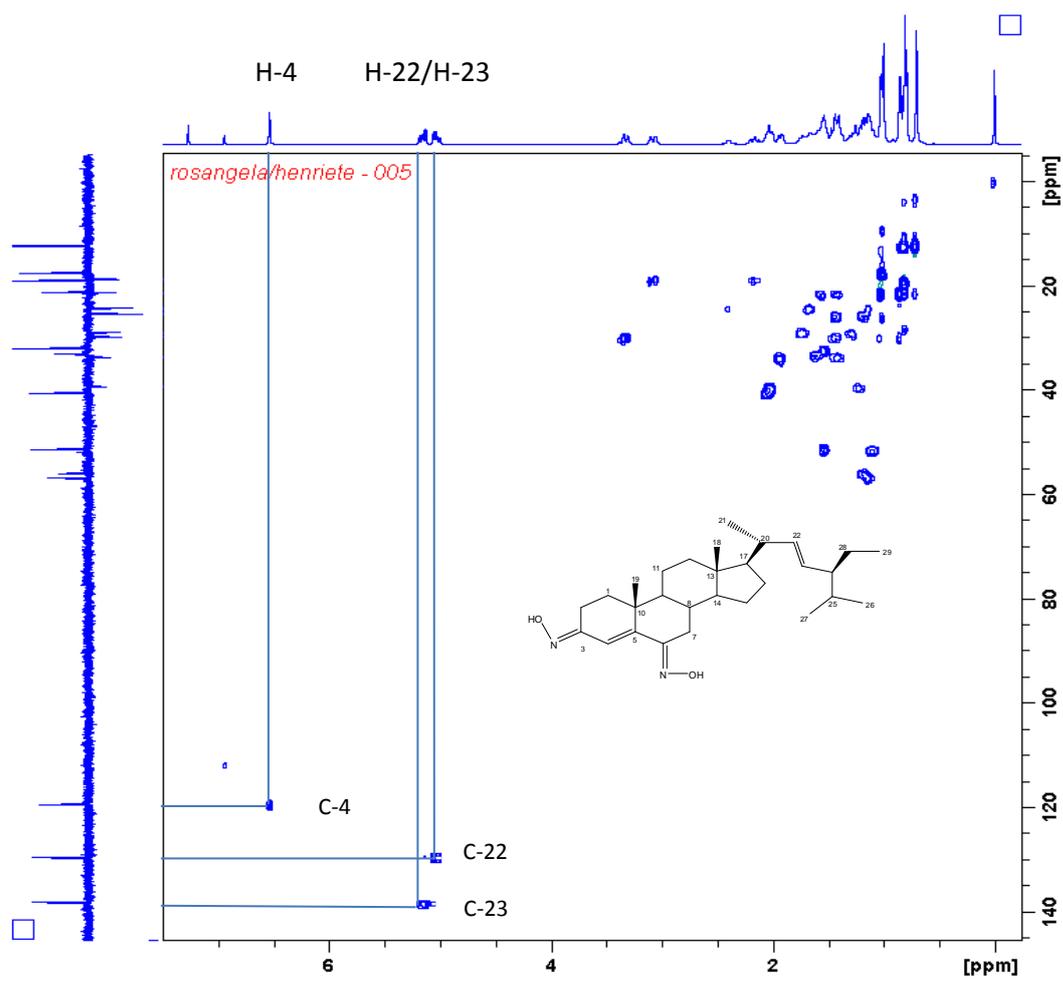


Figura 46: Mapa de Correlação HMQC de DE05 (CDCl₃, 400 MHz).

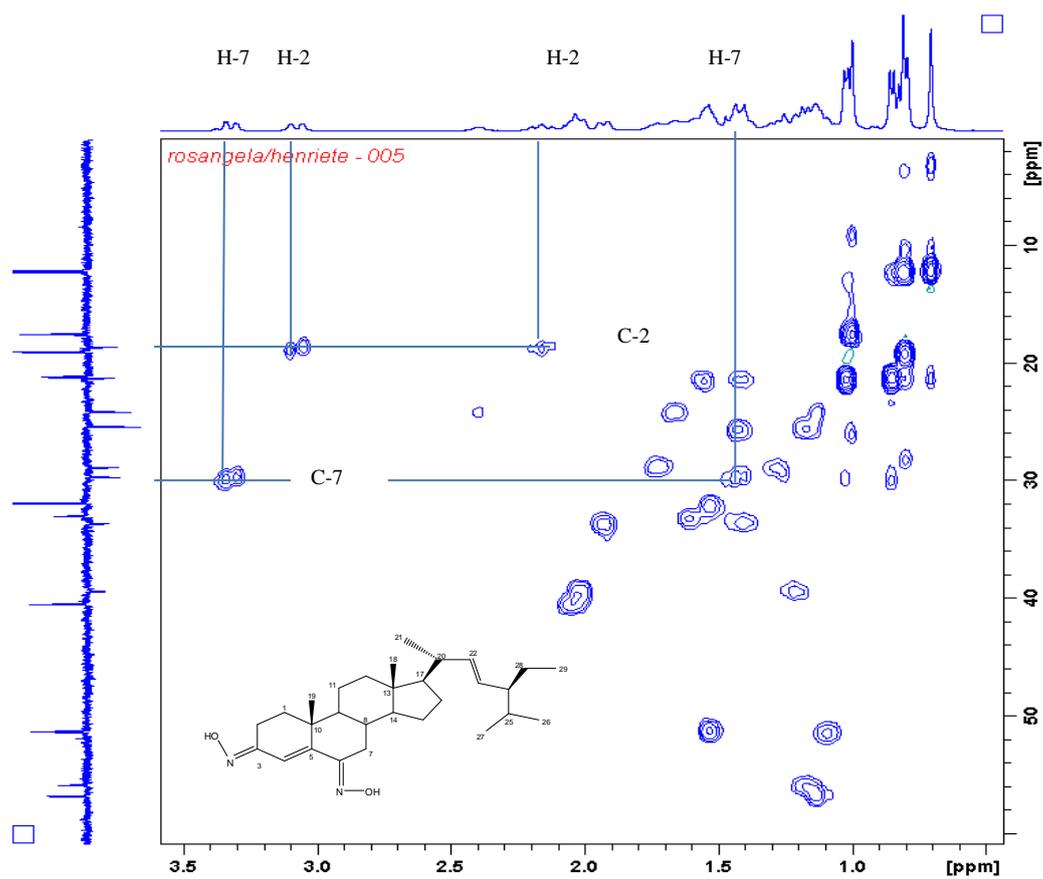
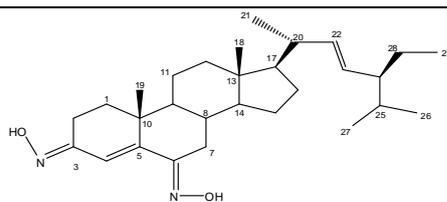


Figura 47: Mapa de Correlações HMBC de DE05 (CDCl₃, 400 MHz).

Tais dados associados ao espectro na região de IV, espectro de RMN de ¹H e literatura comprovam a formação da dioxima (3*E*, 6*E*) estigmasta-4,22-dien-3,6-ona, oxima (Cui *et al*, 2009). A atribuição de todos os sinais de carbonos (Tabela 08) foi realizada por comparação com os dados descritos na literatura e ao material de partida DE03 e os valores diferentes da literatura foram confirmados pelos mapas de HMBC, COSY e por comparação aos valores encontrados para o material de partida conforme tabela 14, anexo 02, pág.84.

Tabela 08: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de DE05 com a literatura.



C	Literatura	DE05	C	Literatura	DE05
1	31,9	33,8	16	29,7	29,0
2	28,8	18,8	17	55,9	56,1
3	156,6	156,8	18	12,3	12,3
4	119,3	119,5	19	18,6	17,8
5	147,6	147,9	20	39,4	40,7
6	157,2	157,4	21	21,2	21,3
7	25,4	29,9	22	138,1	138,3
8	33,1	32,1	23	129,6	129,7
9	51,4	51,6	24	51,3	51,5
10	42,5	42,6	25	33,7	33,2
11	21,1	25,6	26	17,6	19,2
12	38,4	39,6	27	19,1	19,2
13	40,4	38,6	28	24,2	24,4
14	56,8	56,9	29	12,2	12,5
15	21,3	21,5			

Referência: Cui *et al*, 2009.

O espectro de massas de alta resolução por APCI de DE05 (Figura 48) apresentou um pico $[\text{M}+\text{H}]$ correspondendo ao produto DE05 com adição de um próton m/z 455,3647, correspondendo a molécula proposta, visto que sua massa exata equivale a $454,3559 \text{ g mol}^{-1}$.

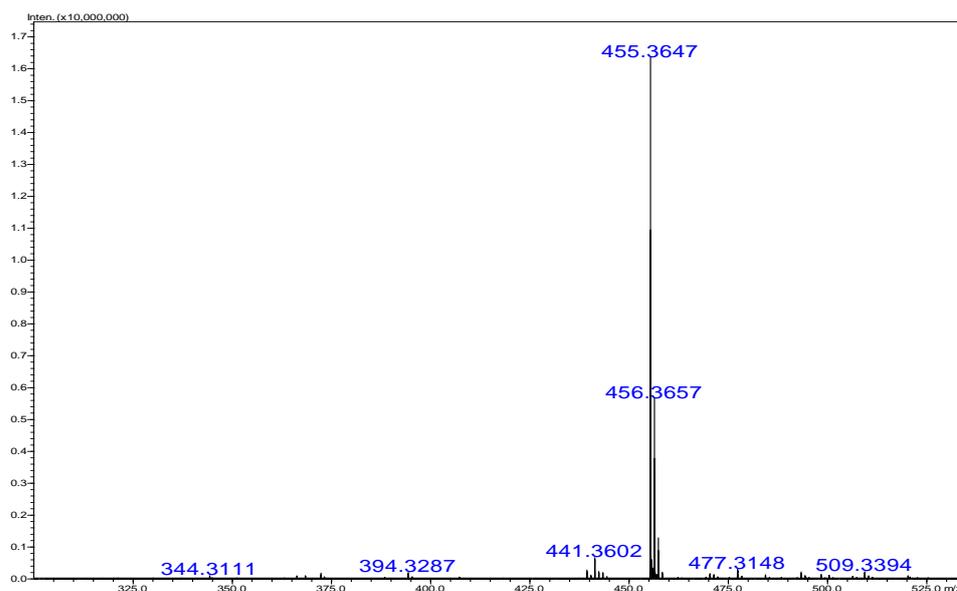


Figura 48: Espectro de massas de alta resolução por APCI de DE05.

3 - Discussão dos resultados

3.1 - Oxidação de álcoois secundários similares ao estigmasterol

Álcoois secundários de estruturas similares ao estigmasterol podem ser oxidados a cetonas por diversos reagentes [dicromato de piridínio (PDC), clorocromato de piridínio (PCC), {Patro *et al*, 1984}; cloreto de oxalila/Me₂SO {Mancuso *et al*, 1978}; ácido iodoxobenzóico (IBX), {Frigerio *et al*, 1994}, hidroperóxido de *ter*-butila (TBHP)/Cu(I) ou Cu(II) {Parish *et al*, 2004}; Al(i-PrO)₃ {Oppenauer, 1937}, entr outros) sendo relatado na literatura uma variedade de rendimentos que chegam a 95% (Mancuso *et al*, 1978), dependendo muitas vezes do material de partida e ou reagentes ou combinações de reagentes utilizados.

Diversos autores destacam a instabilidade do derivado oxidado de moléculas análogas ao estigmasterol no átomo de carbono C-3 em relação à ligação dupla na posição 5,6 (cetona β-insaturada) {Li e Li, 1998}. De acordo com relatos da literatura (Jones e Baskevitch, 1973) a reação de oxidação gera como produto principal o derivado oxidado na posição 3 com migração parcial e simultânea da ligação dupla da posição 5,6 para a posição 4,5 gerando uma mistura de cetonas β-insaturada e α-insaturada (cetona com dupla migrada) com predominância de α-insaturada. Este fato é justificado, pois há formação de uma espécie mais estável devido à estabilização por ressonância da ligação dupla com a carbonila.

Ringold e Malhotra (1962) utilizaram o colesterol e outras moléculas com esqueletos equivalentes ao estigmasterol para entender a migração da dupla. A conversão de cetonas α-insaturadas à β-insaturada com rendimentos superiores a 90% foi realizada utilizando-se *tert*-butoxido de potássio em *t*-butanol, atmosfera de nitrogênio, temperatura ambiente (1,5 horas), seguida pela rápida adição de ácido acético 10% à mistura reacional. O autor identificou a presença da cetona α-insaturada, em condições reacionais mais brandas ou mesmo a partir de produtos já isolados de cetonas β-insaturada, evidenciando a facilidade de migração da dupla na molécula.

Adicionalmente a formação das cetonas α,β-insaturadas, há também a formação da dicetona α,β-insaturada (carbonila na posição C-3 e na posição C-6 e de dupla ligação na posição C-4/5) em reações envolvendo derivados de CrO₃. Sheng-Hui Li e Tong-Shuang Li (1998) utilizaram o colesterol e a pregnolona como material de partida para a reação de

oxidação com o PDC em DMF, atmosfera de nitrogênio, temperatura ambiente, até a formação da dicetona α,β -insaturada. Inicialmente foi obtido como produto principal a cetona β -insaturada e, em pequenas quantidades, a cetona α -insaturada e a dicetona α,β -insaturada. Posteriormente a reação evoluiu para a formação da dicetona e o desaparecimento das cetonas β -insaturada e α -insaturada. Diante deste fato, o autor realizou o mesmo experimento utilizando-se apenas a cetona α -insaturada como material de partida para a reação de oxidação e não obteve como produto a dicetona α,β -insaturada. Assim os autores propuseram um mecanismo para a reação de oxidação no qual a cetona β -insaturada (não migrada) é um intermediário na formação da dicetona α,β -insaturada (Figura 49, pág. 67).

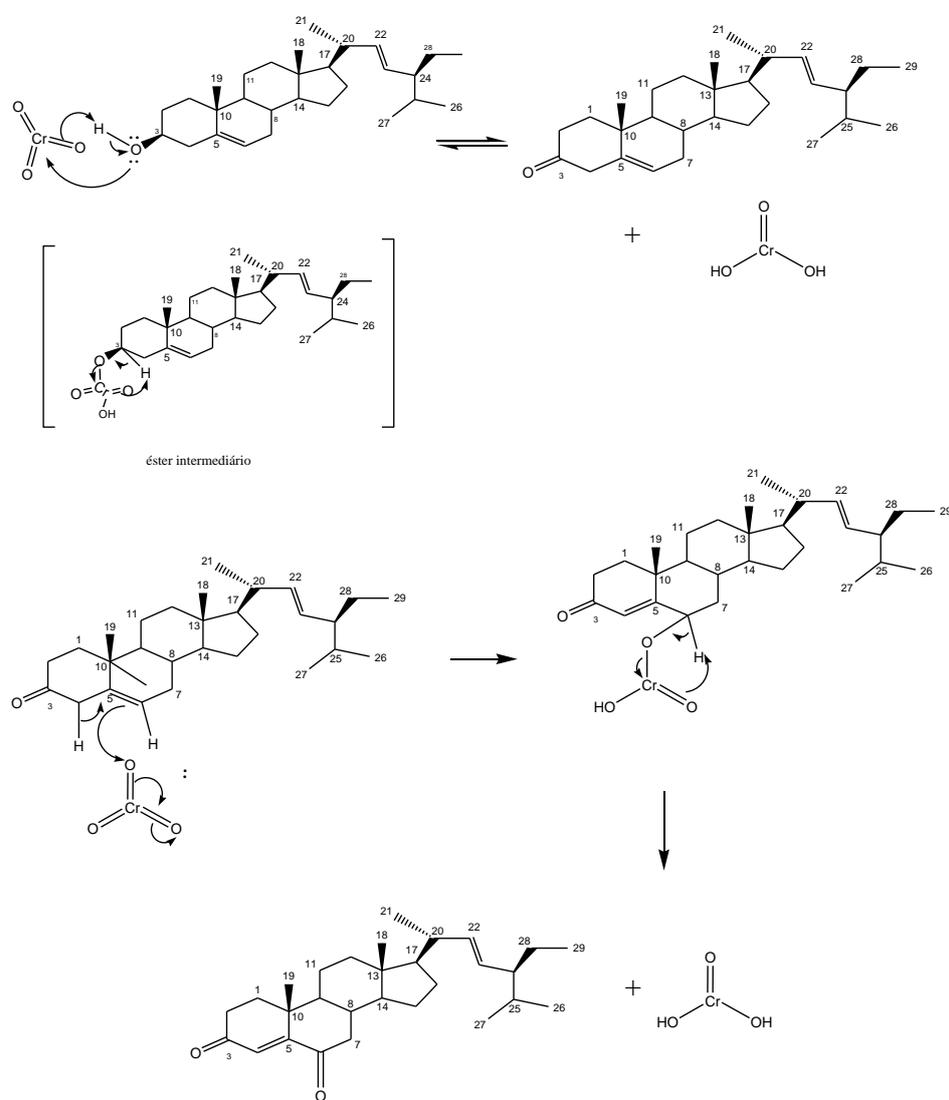


Figura 49 - Adaptação da proposta de mecanismo para oxidação do estigmasterol a partir da teoria de Li e Li (1998) em PDC.

Dong *et al* (2007) estudaram a oxidação com reagente de Jones e ácido sulfúrico em diversas proporções para determinar os possíveis intermediários e produtos da oxidação do colesterol. Soluções diversas de ácido crômico e ácido sulfúrico foram utilizadas para oxidação do colesterol em acetona em tempos 0,5-32 minutos a temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por HPLC e inicialmente foi detectado dois produtos identificados como a dicetona α,β -insaturada e a cetona α -insaturada (cetona migrada). Posteriormente foi detectado somente a dicetona α,β -insaturada sugerindo que a cetona α -insaturada (cetona migrada) como intermediária da dicetona α,β -insaturada. O resultado obtido pelos autores contrasta com o resultado oposto ao observado por Sheng-Hui Li e Tong-Shuang Li (1998) utilizando como reagente o PDC.

As reações de oxidação do estigmasterol e/ou análogos apresentam ainda limitações devido à rápida conversão da cetona β -insaturada na cetona α -insaturada ao se tentar utilizar a sílica gel para purificar o produto da reação (Li e Li, 1998). Jones e Baskevitch, 1973 relatam ainda que a modificação ocorre inclusive com o passar do tempo, espontaneamente se o meio contiver traços de ácidos. Na tentativa de obtenção de apenas uma das cetonas, Cui *et al* introduziram mais uma etapa após a oxidação com o objetivo de promover a conversão da cetona β -insaturada na cetona α -insaturada reduzindo-se assim a formação de subprodutos. Esta etapa é feita pela adição de uma solução de ácido oxálico em etanol (Cui *et al*, 2009).

Tais fatores concordam com os precários relatos do isolamento da cetona β -insaturada para este tipo de esqueleto a partir da síntese, em quantidades que possibilitem a completa caracterização da substância e portanto para este derivado do estigmasterol não foi encontrado dados disponíveis de RMN na literatura.

A primeira tentativa de oxidação do estigmasterol realizada com reagente de Jones, neste trabalho, conforme executado no procedimento 2.1.1.b, com excesso de reagente de Jones foi denominada RI (Reação inicial) permitiu a observação por CCDS (Cromatografia de camada delgada em sílica) de três produtos. Devido a este fato e aliado aos dados relatados anteriormente, optou-se por realizar a oxidação do estigmasterol com o reagente clássico de Jones em microescala para se determinar a melhor condição reacional para obtenção de um produto majoritário. As reações foram realizadas em banho de gelo utilizando-se 10 mg de estigmasterol em 5 ml de acetona variando-se a quantidade de reagente de Jones e o tempo reacional conforme Tabela 09.

Tabela 09 – Reações de oxidação do estigmasterol em microescala variando-se a relação entre Reagente de Jones e estigmasterol e o tempo de reacional.

	Tempo de Reação/min	Relação Reagente de Jones/estigmasterol
R4	1	1
R5	5	1
R6	7	1
R7	1	2
R8	5	2
R9	7	2

Os produtos obtidos dessas reações, juntamente com a reação inicial (RI) foram analisados por CG e os resultados podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10: Teor dos principais produtos obtidos das reações de oxidação do estigmasterol (RI e reações em microescala) em relação ao tempo de retenção observados por análise por CG.

TR/min	E	RI	R4	R5	R6	R7	R8	R9
3,567	97,31	0,00	74,07	36,02		49,52		
3,175		21,32	1,62	3,65	5,62	9,37	23,50	7,63
3,712	2,18	33,60	7,01	10,28	53,85	16,23	33,33	16,37
4,758		27,58	10,84	40,14	27,87	16,62	30,46	53,11

TR= tempo de retenção dos produtos obtidos das reações e do padrão de estigmasterol;

E = Estigmasterol; RI= Reação Inicial; R4 a R9 = reações em microescala

O único padrão disponível era o estigmasterol e a partir dos dados obtidos por CG observamos que a reação inicial (RI) consumiu todo o estigmasterol usado gerando 03 produtos em percentual similar. Em relação às reações realizadas em microescala (R4 a R9) pode-se observar que dois produtos principais eram obtidos, um com RT= 3,712 (53,85% condição R6) e outro com RT= 4,758 (53,11% condição R9), sendo teoricamente possível direcionar a produção majoritária de um deles variando-se a proporção entre estigmasterol e reagente de Jones.

A reação inicial (RI) foi purificada por cromatografia em coluna de sílica *flash* obtendo-se 03 produtos por ordem de eluição denominados RI1, RI2, e RI3. Estes foram posteriormente identificados pelos métodos espectroscópicos como sendo, respectivamente, estigmasta-5,22-dien-3-ona (DE01), estigmasta-4,22-dien-3-ona (DE02) e estigmasta-5,22-dien-3,6-diona (DE03). Estas amostras foram avaliadas por CG, juntamente com uma a

amostra inicial de RI e padrão de estigmasterol, nas mesmas condições do experimento anterior. Dessa forma foi possível associar o RI1 ao RT= 3,175, o RI2 ao RT= 3,712 e o RI3 ao RT= 4,758. Os resultados obtidos direcionaram as reações seguintes para as condições R6, com objetivo de obtenção de um produto majoritário com RT= 3,712.

Entretanto as reações realizadas posteriormente com maior quantidade do estigmasterol (500 mg) nas condições de R6, após CC de sílica *flash*, não reproduziram os resultados obtidos em microescala. Após CC em sílica *flash* eram obtidos sempre três produtos, a β -cetona (DE01), a α -cetona (DE02) e a dicetona (DE03), em concentrações variáveis observando-se um predomínio da cetona migrada (DE02).

3.2 - Formação de oximas

As oximas podem ser sintetizadas pela reação de condensação de uma cetona com hidroxilamina (Lachman, 1930) ou pela reação de nitritos com reagentes contendo hidrogênio ácido conforme Figura 50 (Semon, 1930).

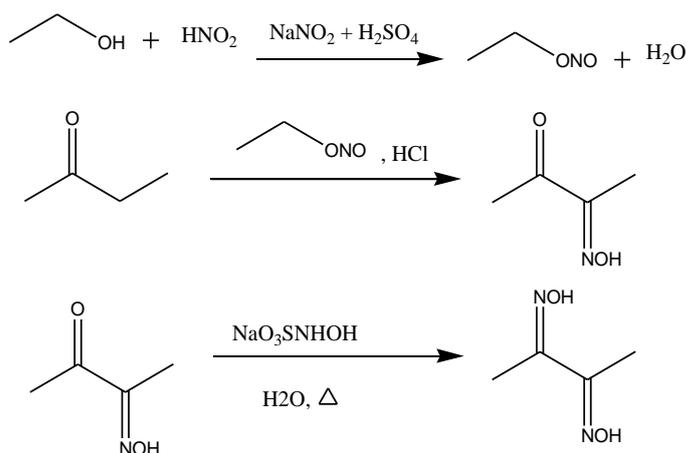


Figura 50 – Formação de oximas a partir de nitritos (Adaptação de Semon, 1930).

As reações envolvendo nitritos geram produtos e subprodutos que são tóxicos e apresentam odor desagradável enquanto as reações envolvendo hidroxilamina e cetonas são rápidas e eficientes com conversão superiores a 87% para derivados do estigmasterol (Cui *et al*, 2009), portanto a rota utilizando hidroxilamina foi escolhida para utilização neste trabalho. O mecanismo proposto para esta reação é apresentado na Figura 53, pág. 73. A obtenção preferencial da oxima (E) estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima (Figura 51, pág. 71) pode ser explicada pelo menor impedimento estérico causado pelo átomo de hidrogênio da hidroxila ao interagir espacialmente com o hidrogênio do átomo de carbono C-2 em relação a interação do

hidrogênio da hidroxila em relação ao átomo de hidrogênio ligado ao átomo de carbono C-4, devido a menor distância entre este átomo de hidrogênio e o átomo de hidrogênio ligado ao átomo de carbono C-4, portanto as interações negativas de van der Waals serão reduzidas quando for formada a oxima E.

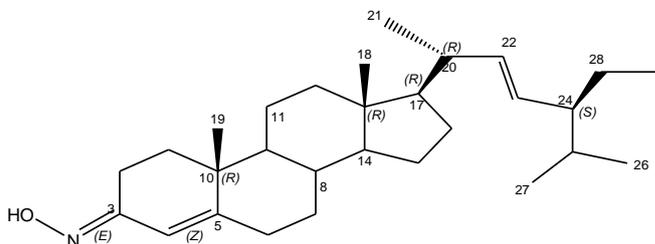


Figura 51 – Estrutura da oxima: (3E) estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima.

A estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, oxima (Figura 52), foi obtida única e preferencialmente como E. Este fato pode ser explicado como descrito para a oxima E, formada anteriormente com adição de uma nova oxima na cetona do átomo de carbono C-6, novamente as interações negativas de van der Waals são minimizadas pela formação da oxima E, onde a interação do átomo de hidrogênio ligado a hidroxila será menor com o átomo de hidrogênio ligado ao átomo de carbono C-7, somado ao fato que as ligações C=N devem estar no plano com a ligação dupla dos átomos de carbonos C-4/C-5 e, portanto a formação das oximas Z seriam extremamente desfavoráveis devido à proximidade dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila entre si e com o átomo de hidrogênio ligado ao átomo de carbono C-4.

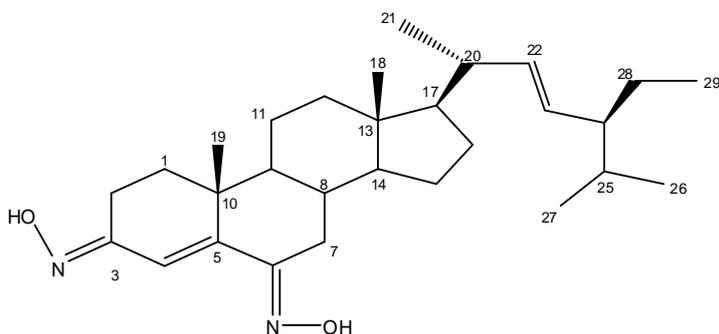


Figura 52 – Estrutura da dioxima: (3E, 6E) estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, oxima.

3.3 - Atividade biológica

3.3.a - Teste de atividade contra bactérias e *Candida*

Os procedimentos de avaliação de atividade foram executados conforme procedimento 2.1.3 (pág. 23). A cetona α -insaturada (DE02) apresentou tendência a toxicidade frente às bactérias e a cetona β -insaturada (DE01) frente às espécies de *Candida* sem especificidade para as espécies de *Candida* (Tabela 11). A maior atividade encontrada contra as bactérias foi contra a espécie *citrobacter freundii* (CF) com 82,4% em 24 horas e 91,7% em 48 horas. Em relação às espécies de *Candida*, o maior valor em atividade foi contra a espécie *Candida parapsilosis* (CP) com 96,7% em 24 horas e 54,7% em 48 horas, mostrando tendência a efeito bacteriostático. A bactéria CF e a *Candida* CP mostrou-se sensível a todos os derivados. A dioxima também mostrou efetiva contra quase todos os micro-organismos, exceto contra os micro-organismos EC, BC, LM e *Candida* CA e CT. Os micro-organismos *A. flavus* e *C. cladosporoides* não apresentaram atividade superiores a 30% e não foram apresentados.

Testes de IC_{50} e IC_{90} estão em andamento para os compostos que apresentaram atividade superior a 50% de inibição.

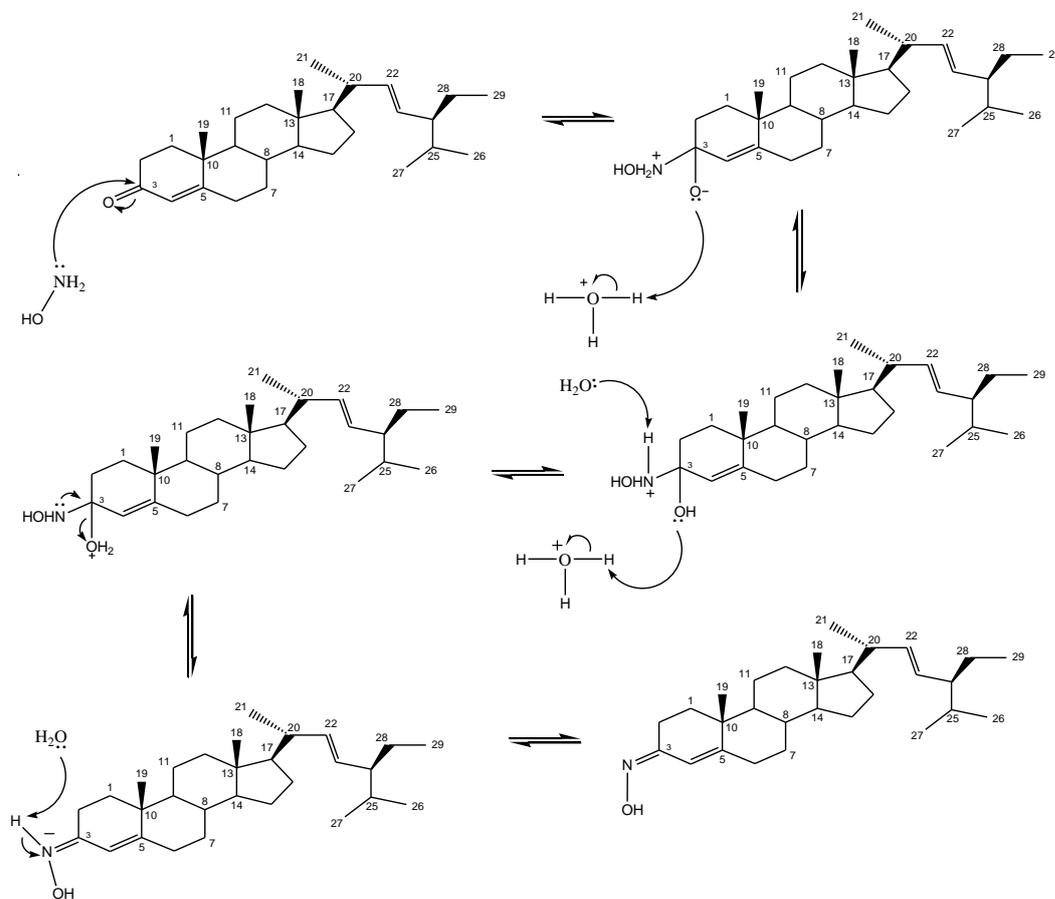


Figura 53 - Mecanismo de formação da oxima a partir da cetona.

Tabela 11 – Percentual de inibição do estigmasterol e derivados - triagem de compostos contra bactérias e *candida*.

	% / 24 HORAS							% / 48 HORAS						
	E	DE01	DE04	DE05	DE02	DE06	DE03	E	DE01	DE04	DE05	DE02	DE06	DE03
PA	38,4	26,3	33,2	55,0	74,8	37,4		24,3	31,0	10,5	40,0	54,8	20,3	
EC	7,4	1,8	5,7	19,8	45,2	14,2		9,9	-0,8	4,0	31,2	54,9	10,3	
BC	27,2	18,2	2,2	45,5	64,7	21,3		24,6	8,2	4,3	-9,5	44,1	99,4	
LM	33,6	15,4	12,0	42,9	58,9	20,0		36,9	11,1	14,3	56,2	67,1	14,3	
CF	59,5	53,3	46,9	68,3	82,4	54,8		37,0	22,3	11,6	59,6	91,7	22,5	
ST	34,6	28,5	28,4	54,3	64,8	39,9		32,5	18,1	17,0	62,2	83,6	28,7	
SS	21,5	14,8	13,8	51,3	61,0	6,4		51,5	34,4	16,2	104,2	81,7	1,4	
SA	32,3	28,5	13,1	56,1	74,8	32,1		61,9	27,3	20,2	73,8	99,6	44,1	
CA	19,9	59,1	23,1	33,4	15,9	15,8	22,4	21,7	58,8	28,2	36,0	14,8	17,7	23,1
CT	-8,8	49,0	2,1	26,3	-19,2	-10,8	-3,0	12,8	46,9	21,3	40,0	4,9	8,1	14,0
CD	19,3	72,6	21,9	48,9	7,7	6,2	21,8	13,9	56,0	21,4	30,6	14,6	11,6	22,4
CP	64,5	96,7	63,2	64,4	43,8	48,7	46,9	28,0	76,1	33,2	54,7	18,4	19,7	22,2
CG	33,2	80,1	34,8	55,9	16,0	24,6	30,6	-16,4	58,2	16,0	9,1	-2,4	14,0	-16,2
CL	15,9	70,9	25,3	51,2	9,1	14,0	24,0	8,0	38,8	18,0	9,4	12,4	13,7	15,3

E=Estigmasterol; DE01=Estigmasta-5,22-dien-3-ona; DE02= Estigmasta-4,22-dien-3-ona; DE03=Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona; DE04=Estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima; DE05= Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, oxima; DE06= Estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima mesilada;

3.3.b - Teste de atividade contra a enzima acetilcolinesterase

Os testes de atividade em relação à enzima acetilcolinesterase mostraram resultados iniciais promissores, principalmente em relação a DE01 (β -cetona) com inibição de $(91,39 \pm 4,30)$ %. A utilização do emulsionante polisorbato 80 possibilitou a formação de uma emulsão das substâncias em DMSO e água, porém o estigmasterol foi a única substância que apresentou turvação excessiva, o que pode ter comprometido o resultado frente a análise pelo método ELISA da atividade frente à enzima. O teste de acetilcolinesterase deverá ser repetido para confirmação dos valores de todas as substâncias e para reduzir o desvio para valores inferiores a 5,0% conforme literatura.

Tabela 12: Estudo de atividade do estigmasterol e derivados em relação à enzima acetilcolinesterase.

	E	DE01	DE02	DE03	DE04	DE05	DE06	DE07
% INIBIÇÃO	33,50	91,39	48,94	59,60	72,72	64,20	48,28	77,25
DESVIO	9,77	4,30	7,47	9,46	9,97	9,25	3,36	7,72

E=Estigmasterol; DE01=Estigmasta-5,22-dien-3-ona; DE02= Estigmasta-4,22-dien-3-ona; DE03=Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona; DE04=Estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima; DE05= Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, oxima; DE06=Estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima mesilada;

4.0 - Conclusões

A metodologia utilizando reagente de Jones para oxidação do estigmasterol mostrou eficiente na formação dos três derivados cetônicos DE01, DE02 e DE03. A cetona estigmasta-5,22-dien-3-ona (DE01) foi obtida e caracterizada por RMN, espectrometria de massas e IV, mostrando-se estável as condições ambientes, contrariando as expectativas da literatura descrita na discussão dos resultados que não descreve os dados de RMN e descreve a substância como altamente instável. A reação de formação das oximas concorda com as previsões teóricas de obtenção do isômero *E* com rendimentos superiores a 80%.

O estudo da atividade biológica em relação aos micro-organismos apontou especificidade da cetona α -insaturada (DE02) para bactérias e β -insaturada (DE01) para *Candida* sp. A dioxima (DE05) apresentou citotoxicidade superior a 50% conforme observado na tabela 11, pág. 76, contra quase todas as espécies avaliadas mostrando eficiente como possível antibiótico para amplo espectro. O estudo da atividade em relação à enzima acetilcolinesterase mostrou inibição superior a 90% para a cetona β -insaturada (DE01). Estudos complementares estão em andamento para complementação e confirmação dos valores obtidos. Estudos complementares para obtenção de IC₅₀ e IC₉₀ das substâncias em relação aos micro-organismos com teor de inibição superior a 50% estão em andamento.

Bibliografia:

Ando, Y.; Fuse, E.; Figg, W. D.; Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily; *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research* **8**, 1964–73; 2002.

Barbosa, L. C.; A.; Espectroscopia no Infravermelho, Ed. UFV, 2007.

Bhatti, H. N.; Khera, R. A.; Biological transformations of steroidal compounds: A review; *Steroids* **77**, 1267–1290, 2012.

Barreiro, E. J.; Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos, *Quim. Nova* **32**, 679-688, 2009.

Castillo, G.; Patente: PCT/US98/10239 – Composition and Methods for Treating Alzheimer`s Disease and Other Amyloidoses; 1997.

Chagas, M. C. B.; Desenvolvimento de kit diagnóstico rápido para detecção de resistência a meticilina em cepas de estafilococcus; tese de mestrado: FIOCRUZ; 2011.

- Chen, W-P.; Yu, C.; Hu, P-F; Bao, J-B; Tang, J-L; Wu, L-D; Stigmasterol blocks cartilage degradation in rabbit model of osteoarthritis *Acta biochimica polonica* 59, 2012.
- Chung S.K.; Ryoo, C. H.; Yang H. W.; Shim, J.Y.; Kang M.G.; Lee, K.W.; Kang, H.I.; Synthesis and Bioactivities of Steroid Derivatives as Antifungal Agents; *Tetrahedron* 54, 15899–914, 1998.
- Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P.; *Organic chemistry*, Ed. Oxford, 2000.
- Cui, J. G.; Fan, L.; Huang, L.L.; Liu, H.L.; Zhou, A. M.; Synthesis and evaluation of some steroidal oximes as cytotoxic agents: Structure/activity studies (I), *steroids* 74, 62–72, 2009.
- Cui ; J.; Wang, H.; Huang, Y.; Xin, Y.; Zhou, A.; Synthesis and cytotoxic analysis of some disodium 3,6-dihydroxysterol disulfates; *Steroids* 74, 1057–1060, 2009b.
- del Castillo, M.D.; Martínez-Saez, N.; Amigo-Benavent, M.; Silvan, J.M.; Phytochemomics and other omics for permitting health claims made on foods, *Food Research International* 2013.
- Dewick, P. M.; *Medicinal Natural Products, A biosynthetic approach*, 3^a edição, 2009.
- Dong, J.; Chen, W.; Wang, S.; Zhang, J.; Li, H.; Guo, H.; Man, Y.; Chen, B.; Jones oxidation and high performance liquid chromatographic analysis of cholesterol in biological samples; *Journal of Chromatography B* 858, 239–246, 2007.
- Eisenbraun, E. J.; Corey, E. J.; Hamanaka, E.; Cyclooctanone, *Organic Syntheses, Coll. Vol. 5*, 310, 1973; 45, 28, 1965.
- Eussen, S. R.B.M.; Rempelberg, C. J. M.; Klungel, O. H.; van Eijkeren, J. C. H.; Modelling approach to simulate reductions in LDL cholesterol levels after combined intake of statins and phytosterols/-stanols in humans; *Lipids in Health and Disease* 10,187, 2011.
- Farnsworth, N. R.; Bingel, A. S.; Problems and prospects of discovering new drugs from higher plants by pharmacological screening;; *New Natural Products and plants drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*; Editor: H. Wagner; P. Wolff; Ed. Springer-Verlag, 1977.
- Fernholz, E.; Stavely, H. E.; On Brassicasterol, the characteristic sterol of rapeseed oil; *Journal of the American Chemical Society* 62, 1875-7, 1940.
- Ferreira, I. P.; Lima, G. M.; Paniago, E. B.; Rocha, W. R.; Takahashi, J. A.; Pinheiro, C. B.; Ardisson, J.D.; Design, structural and spectroscopic elucidation, and the in vitro biological

activities of new diorganotin dithiocarbamates; *European Journal of Medicinal Chemistry* 58, 493-503, 2012.

Figueiredo, E. A. P.; Heloisa Ramos; Maria Amélia Vieira Maciel; Maria do Carmo Monteiro Vilar; Noel Gomes Loureiro; Rodrigo Gomes Pereira; *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE; *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 421, 19, Outubro-Dezembro, 2007.

Fiocruz, (www.bio.fiocruz.br/index.php/hib-haemophilus-influenzae-tipo-b-sintomas-transmissao-e-prevencao).

Frigerio, M.; Santagostino, M.; A mild oxidizing reagent for alcohols and 1,2-diols: o-iodoxybenzoic acid (IBX) in DMSO; *Tetrahedron Letters* 35, 43 8019-8022, 1994.

Gabay, O.; Sanchez, C; Salvat, C.; Chevy, F.; Breton, M.; Nourissat, G.; Wolf, C. ; Jacques C.; Berenbaum, F. ; Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties; *Osteoarthritis and Cartilage* 18, 106 – 116, 2010.

Gan, C.; Fan, L; Cui, J.; Huang, Y.; Jiao Y.; Wei, W.; Synthesis and *in vitro* antiproliferative evaluation of some ring B abeo-sterols; *Steroids* 77, 1061-1068, 2012.

Gauthier, S.; Leuzya, A.; Racine, E.; Rosa-Neto, P.; Diagnosis and management of Alzheimer's disease: Past, present and future ethical issues; *Progress in Neurobiology* 110 102–113, 2013.

Gibbons GF, Goad LJ, Goodwin TW, Nes WR.; *J Biol Chem.* 246, 3967-76, 1971.

Goodwin, T. W.; Biosynthesis of Carotenoids and Plant Triterpenes, *Biochem. J.* 123, 293-329, 1971.

Goodwin, T. W.; The Utilization of Potential Phytosterol Precursors by *Ochromonas malhamensis*; *Archives of Biochemistry and Biophysics* 14, 664-674, 1971.

Grimm, M. O. W.; Hartmann, T.; Frieb-Javorkova, P.; Laufs, U.; Weingartner, O.; Patente: PCT/NL2009/050315 – Stigmasterol for the treatment of Alzheimer's Disease; 2009.

Guo, D.; Venkatramesh, M.; Nes, W., D.; Developmental Regulation of Sterol Biosynthesis in *Zea mays*, *Lipids* 30, 203-219, 1995.

Huang, Y.; Cui, J.; Li, Y; Fan, L.; Jiao, Y.; Su, S.; Syntheses and antiproliferative activity of some sulfated hydroximinosterols, *Med Chem Res* 22, 409–414, 2013.

Jiang, G.; Lin, S.; Wen, L.; Jiang, Y.; Zhao, M.; Chen, F.; Prasad, K. N.; Duan, X.; Yang, B.; *Food Chemistry* 136, 563–568, 2013.

Jones, J. B.; Baskevitch, N.; Steroids and steroidases XX (1). Aggregation in aqueous solution of steroids with stigmastane type C-17 side chains and its influence on their enzymic transformations; *Steroids* 4, 525-38, 1973.

Jong, A.; Plat, J.; Mensink, R. P.; Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review); *Journal of Nutritional Biochemistry* 14, 362–369, 2003.

Kuhlmann, K.; Lindtner, O.; Bauch, A.; Ritter, G.; Woemer, B.; Niemann, B.; Simulation of prospective phytosterol intake in Germany by novel functional foods. *Br. J. Nutr.* 93, 377–385, 2005.

Lachman, A.; Benzophenoneoxime, *Org. Synth. Coll. Vol. 2*, 234, 10, 1930.

Li, S-H.; Li, T-S.; Steroidal 5-en-3-ones, intermediates of the transformation of steroidal 5-en-3-ols to steroidal 4-en-3,6-diones oxidized by pyridinium dichromate and pyridinium chlorochromate; *Steroids* 63, 76-79, 1998.

Mercer, E. I.; Inhibitors of sterol biosynthesis and their applications, *Prog. Lipid Res.* 32, 357-416, 1993.

Mori, K.; Sakakibara, M.; Ichikawa, Y.; Ueda, H.; Okada, K.; Umemura, T.; Yabuta, G.; kuwahara, S.; Kondo, M.; Synthesis of (22S, 23S)-homobrassinolide and brassinolide from stigmasterol; *Tetrahedron* 38, 14, 2099-2109, 1982.

Mancuso, A. J.; Huang, Shui-Lung; Swern, D.; Oxidation of Long-chain and Related Alcohols to Carbonyls by Dimethyl Sulfoxide “Activated” by Oxalyl Chloride; *J. Org. Chem.* 43, 12, 2480-2482, 1978.

Masihi, K. N.; Schäfer, H.; Overview of biologic response modifiers in infectious disease; *Infect Dis Clin N Am* 25, 723–731, 2011.

Mello, R. C. P. (Revisora); Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/Ministério da Saude, Secretaria de Vigilância em Saude, Departamento de Vigilância Epidemiológica – 8 ed. revisada – Brasília: Ministério da Saude, 448 paginas, 2010.

Mercer, E. I.; Inhibitors of sterol biosynthesis and their applications, *Prog. Lipid Res.* 32, 4, 357-416, 1993.

Moreau, R. A.; Whitaker, B. D.; Hicks, K. B.; Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses; *Progress in Lipid Research* 41, 457–500, 2002.

Mori, K.; Sakakibara, M.; Ichikawa, Y.; Ueda, H.; Okada, K.; Umemura, T.; Yabuta, G.; Kuwahara, S.; Kondo, M.; Synthesis of (22S, 23S)-homobrassinolide and brassinolide from stigmasterol; *Tetrahedron* 38, 14, 2099-2109, 1982.

Otaegui-Arrazola, A.; Menendez-Carreno, M.; Ansorena, D.; Astiasaran I.; Oxysterols: A world to explore, *Food and Chemical Toxicology* 48, 3289–3303, 2010.

Oppenauer, R. V. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 56, 137-144, 1937.

Parish, E. J.; Kizito, S. A.; Oiu, Z.; Review of Chemical Syntheses of 7-keto- Δ^5 -sterols, *Lipids* 39, 801–804, 2004.

Patro, D. M.; Panda, R.; Panigrahy, A. K.; Mahapatro, S. N.; The Nature of the Reduction Product in Pyridinium Chlorochromate and Pyridinium Dichromate Oxidations, *Inorganica Chimica Acta* 86, 1984.

Pavia, D., L.; Lampman, G., M.; Kriz, G.; S.; *Introdução a Espectroscopia*, Ed. Cengage, 2010.

Penna, G. O.; Martelli, C. M. T.; Stefani, M. M. A.; Macedo, V. O.; Maroja, M. F.; Chaul, A.; Talidomida no tratamento do eritema nodoso hansênico: revisão sistemática dos ensaios clínicos e perspectivas de novas investigações; *An Bras Dermat.* 80, 5, 511-22, 2005.

Plana, N.; Nicolle, C.; Ferre, R.; Camps, J.; Cos, R.; Villoria, J.; Masana, L.; Plant sterol-enriched fermented milk enhances the attainment of LDL-cholesterol goal in hypercholesterolemic subjects; *Eur J Nutr* 47, 32–39, 2008.

Ringold, H. J.; Malhotra, S. K.; Deconjugation of α , β -unsaturated ketones; *Tetrahedron Letters* 15, 669-672, 1962.

Sandjo, L. P.; Rincheval, V.; Ngadjui, B. T.; Kirsch, G.; Cytotoxic effect of some pentacyclic triterpenes and hemisynthetic derivatives of stigmasterol, *Chemistry of Natural Compounds* 47, 5, 731-734, 2011.

Seitz, D. P.; Reimer, C. L.; Siddiqui, N. ; A review of epidemiological evidence for general anesthesia as a risk factor for Alzheimer's disease; *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 47, 122–127, 2013.

Semon, W.L.; Damerell, V. R.; Gilman, H.; Fothergill, E; *Organic Syntheses, Coll. 2*, 204,1943; 10, 22, 1930.

Silva, A. A.; Estudos geoquímicos com evidências paleoambientais, maturação e biodegradação dos óleos de diferentes origens da Bacia Potiguar, Brasil; Síntese de biomarcadores de esteróis – Campinas, SP, 2008.

Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; Spectrometric Identification of Organic Compounds, 5th. ed., John Wiley & Sons: New York, 1991.

Simons, K., Ikonen, E., 2000. How cells handle cholesterol; *Science* 290, 1721–1726, 2000.

Singh, S.B.; Zink, D. L.; Hazuda, D. J.; Felock, P. J.; Polishook, J. D.; Dombrowski, A. W. From PCT Int. Appl., Patente: WO 2000036132 A1 20000622, 2000.

Tavares, W.; Problem Gram-positive bactéria: resistance in *staphylococci*, *enterococci*, and *pneumococci* to antimicrobial drugs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba-MG 33, 3, 281-301, 2000.

Trevisan, M.T.S; Bezerra, , M. Z. B.; Santiago, G. M.P; Feitosa, C.M; Atividades Larvicida e anticolinesterasica de plantas do gênero *Kalanchoe*; *Quim. Nova* 29, 415-418, 2006.

Uekawa, T.; Ishigami, K.; Kitahara, T.; Short-step Synthesis of Chenodiol from Stigmasterol; *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 68, 6, 1332-1337, 2004.

Vida, N.; Svobodova H., Rarova L.; Drasar, P.; Saman, D.; Cvacka, J.; Wimmer, Z.; Polyamine conjugates of stigmasterol; *Steroids* 77, 1212–1218, 2012.

Vieira, V. M. M. ; Ohayon, P.; Innovation for pharmaceuticals and drugs: state of the art in Brazil and R&D policies; *Revista Economia & Gestão da PUC Minas* 6, 13, 2006.

Windhaus; Hauth; Stigmasterol, a New Phytosterol from Calabar Beans; *Journal Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 39, 4378-84, 1907;

Wattal, C.; Neeraj, G.; Infectious disease Emergencies in returning travelers; *Med Clin N Am* 96 ,1225–1255, 2012.

Yu, L.; Chen, J.; Yu, B.; Shi, G.; Imine-like stigmasterol derivative and its application as antitumor agents; Patente: CN 102633852 A 20120815, 2012.

Yusaf Ahmad; Hypcholesterolemic Effect of *Allium sativum* Linn. and its Potential Protective Action Against Coronary Heart Disease; Natural Product Chemistry; Proceedings of the First International Symposium and Pakistan-U.S. Binational Workshop, Karachi, Pakistan; 23-44; 1986.

Zacchino, E.; Detección de antifúngicos que dañan la membrana o que se unen al ergosterol. En: Manual de Técnicas in vitro para la búsqueda de comp. antifúng, Ed. Corpus (Rosario), pp. 129-133, 2007.

Zubair, Muhammad; Anwar, Farooq; Ashraf, Muhammad; Uddin, Kamal; Characterization of High-Value Bioactives in Some Selected Varieties of Pakistani Rice (*Oryza sativa* L.), Int. J. Mol. Sci. 14, 1698-1712, 2013.

Anexos

Tabela 13 – Comparação dos deslocamentos químicos de alguns sinais de hidrogênio do estigmasterol e derivados obtidos.

	E	DE01	DE02	DE03	DE04	DE05
H-18	δ 0,70 (s, 3H)	δ 0,73 (s, 3H)	δ 0,73 (s, 3H)	δ 0,74 (s, 3H)	δ 0,71 (s, 3H)	δ 0,70 (s, 3H)
H-19	δ 1,01 (s, 3H)	δ 1,02 (s, 3H)	δ 1,18 (s, 3H)	δ 1,17 (s, 3H)	δ 1,05 (s, 3H)	δ 1,00 (s, 3H)
H-21	δ 1,02 (d, 3H, J = 8,0 Hz)	δ 1,02 (d, 3H, J = 8,0 Hz)	δ 1,02 (3H, d, J = 6,8 Hz)	δ 1,03 (3H, d, J = 6,8 Hz)	δ 1,01 (3H, d, J = 6,4 Hz)	δ 1,02 (3H, d, J = 6,4 Hz)
H-26	δ 0,85 (d, 3H, J = 6,0 Hz)	δ 0,85 (d, 3H, J = 5,6 Hz)	δ 0,85 (3H, d, J = 6,4 Hz)	δ 0,85 (3H, d, J = 6,4 Hz)	δ 0,84 (3H, d, J = 5,6 Hz)	δ 0,85 (3H, d, J = 6,4 Hz)
H-27	δ 0,80 (d, 3H, J = 6,8 Hz)	δ 0,80 (3H, d, J = 6,4 Hz)	δ 0,80 (3H, d, J = 6,4 Hz)	δ 0,80 (3H, d, J = 6,4 Hz)	δ 0,79 (3H, d, J = 6,4 Hz)	δ 0,80 (3H, d, J = 5,6 Hz)
H-29	δ 0,81 (t, 3H, J = 7,2 Hz)	δ 0,81 (3H, t, J = 14,0 Hz, 7,6 Hz)	δ 0,81 (3H, t, J = 6,8 Hz)	δ 0,81 (3H, t, J = 6,8 Hz)	δ 0,80 (3H, t, J = 6,8 Hz)	δ 0,81 (3H, t, J = 6,2 Hz)

E=Estigmasterol; DE01=Estigmasta-5,22-dien-3-ona; DE02= Estigmasta-4,22-dien-3-ona; DE03=Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona; DE04=Estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima; DE05= Estigmasta-4,22-dien-3,6-diona, oxima; DE06=Estigmasta-4,22-dien-3-ona, oxima mesilada;

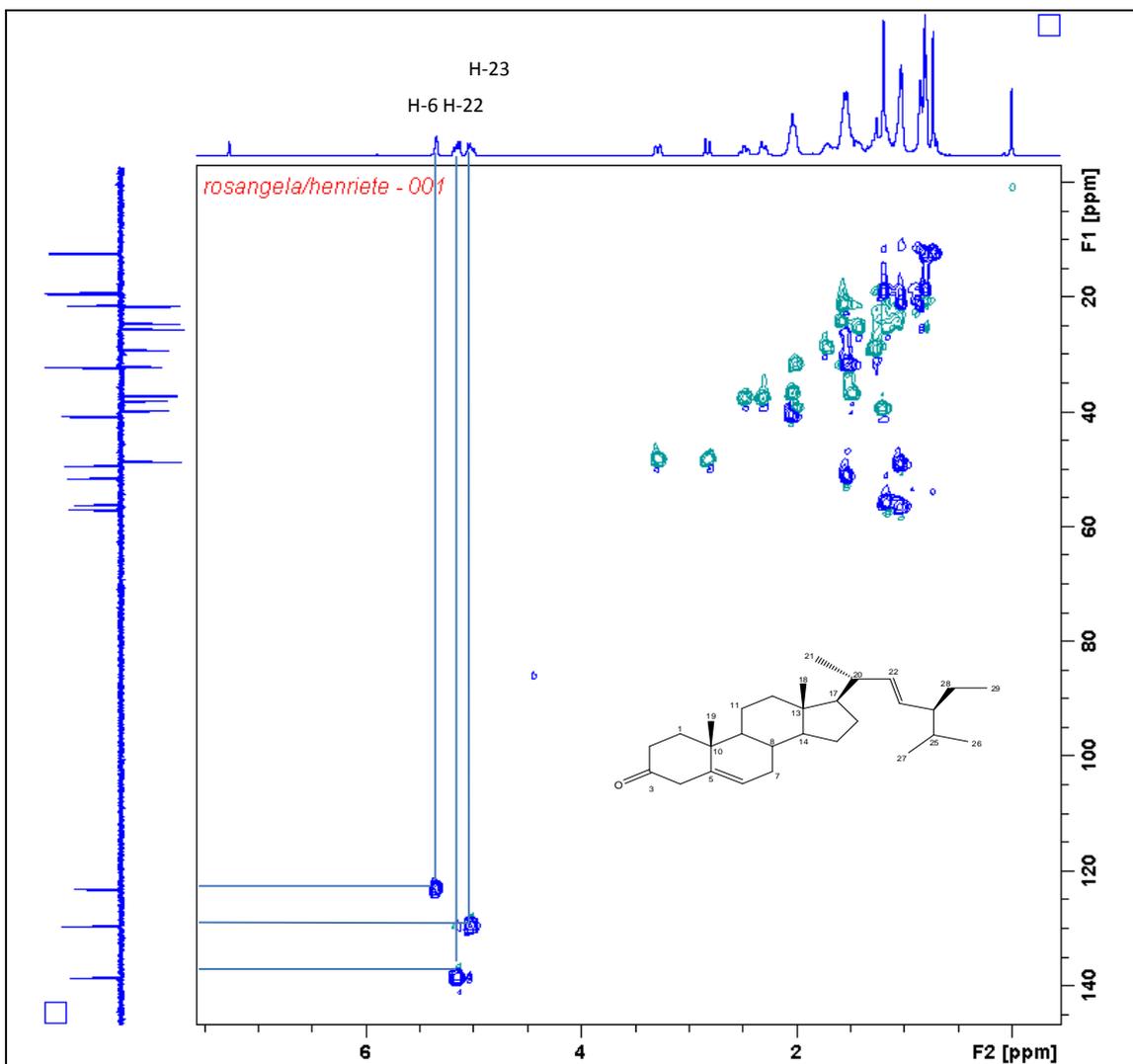


Figura 54: Mapa de Correlação HMQC de DE01(CDCl₃, 400 MHz).

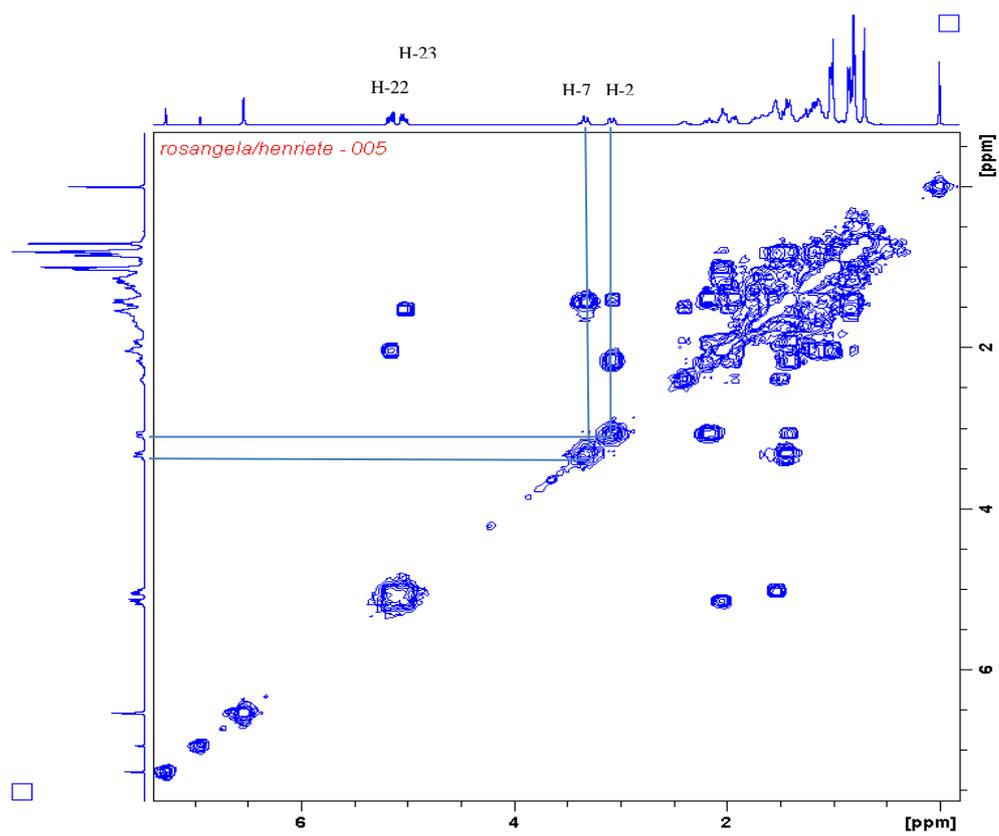


Figura 55: Mapa de Contorno COSY de DE05 (CDCl₃, 400 MHz).

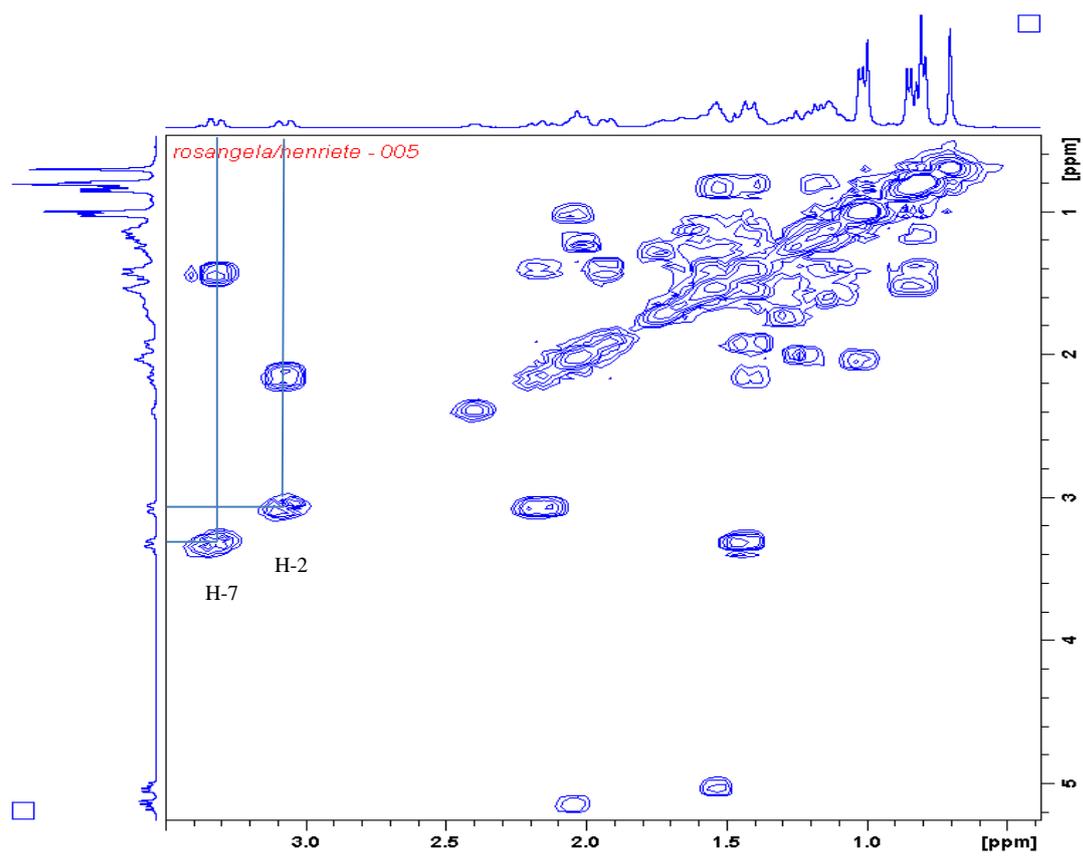


Figura 56: Mapa de Contorno COSY de DE05 (CDCl₃, 400 MHz).

Tabela 14 - Comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono do estigmasterol e derivados DE01, DE02, DE03, DE04 e DE05.

C	E	DE01	DE02	DE03	DE04	DE05
1	37,6	37,1	35,9	35,7	32,7	33,8
2	31,9	37,9	32,2	34,2	18,9	18,8
3	72,0	210,6	199,8	199,7	157,3	156,8
4	42,5	48,6	124	125,7	117,3	119,5
5	141,0	138,7	171,8	161,3	156,1	147,9
6	121,9	123,1	34,2	202,6	34,9	157,4
7	31,9	32,0	33,2	47,0	32,1	29,9
8	32,1	32,1	35,8	34,4	36,0	32,1
9	50,4	49,4	51,4	51,2	53,9	51,6
10	36,7	37,1	38,8	40,0	38,2	42,6
11	21,3	21,5	21,2	21,1	21,6	25,6
12	39,9	39,8	39,7	39,2	39,9	39,6
13	42,4	42,5	42,5	42,6	42,5	38,6
14	57,1	56,9	56,2	55,9	56,3	56,9
15	24,6	24,6	24,4	24,2	24,5	21,5
16	29,0	29,1	29,1	28,9	29,1	29,0
17	56,2	56,1	56,2	56,8	56,1	56,1
18	12,3	12,3	12,3	12,3	12,5	12,3
19	19,6	21,4	17,6	17,7	18,0	17,8
20	40,7	40,7	40,7	40,6	40,7	40,7
21	21,4	21,3	19,2	21,3	21,3	21,3
22	138,5	138,4	138,3	138,0	138,5	138,3
23	129,5	129,6	129,7	129,9	129,5	129,7
24	51,4	51,4	54	51,4	51,5	51,5
25	32,1	32,1	32,1	32,1	32,4	33,2
26	21,3	19,4	21,3	21,4	21,4	19,2
27	19,2	19,2	21,4	19,2	19,2	19,2
28	25,6	25,6	25,6	25,6	25,6	24,4
29	12,5	12,5	12,4	12,5	12,4	12,5