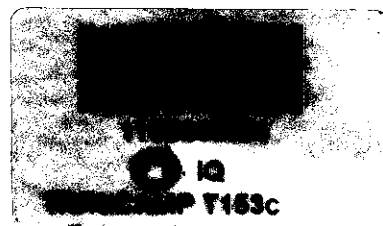


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA



CONSTITUINTES QUÍMICOS DE CINCO ESPÉCIES DE *ECHINODORUS*
E
AValiação DO BETA PINENO COMO SUBSTRATO PARA OBTENÇÃO DE
QUIRONS MAIS ELABORADOS

Clara Megumi Abe Tanaka
TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA
Profa. Dra. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI

Fevereiro - 2000



600101359

UNIDADE	I Q
N.º CHAMADA:	TJUNICAMP
	T153c
V.	Ex.
TOMBO BC/	43504
PROC.	16-392/01
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/01/01
N.º CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA**

CM-00153978-5

T153c

Tanaka, Clara Megumi Abe

Constituintes químicos de cinco espécies de *Echinodorus* e avaliação do beta-pineno como substrato para obtenção de quirons mais elaborados / Clara Megumi Abe Tanaka. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. *Echinodorus grandiflorus*. 2. Clerodanos.
3. Monoterpenos. I. Marsaioli, Anita Jocelyne.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

A DEUS pela vida

À minha mãe
Aos meus sogros
(in memorium)

Ao Aloísio, muito mais do que meu marido, amigo e companheiro de todos os momentos, por ter sido pai e mãe dos nossos filhos durante a minha ausência.

Aos meus filhos Leonardo e Lucas, meus amores, por terem compreendido a minha ausência nos momentos difíceis e por tudo que significam para mim.

AGRADECIMENTOS

À professora Anita Jocelyne Marsaioli pela orientação, pelo incentivo e apoio nos momentos mais difíceis, pela confiança depositada e por tudo que aprendi ao longo desses anos, meu muito obrigada.

À Maria Helena Sarragiotto pela inestimável ajuda no decorrer deste trabalho principalmente nesta fase final pela paciência na leitura desta tese, pelas sugestões e pela força amiga.

À Universidade Estadual de Maringá pela liberação para o Doutorado e ao Departamento de Química (DQI) pelo apoio prestado.

À CAPES/PICD pela bolsa de estudo

Aos professores Maria do Carmo e Volker (IB) pela coleta e identificação das plantas.

Aos Funcionários do Instituto de Química/UNICAMP e do Departamento de Química/Maringá pelos serviços prestados.

Ao Sr. Eugênio pela autorização para a coleta da planta em sua propriedade em Curitiba-PR.

À Cida, Emerson, Cláudio, Bernadete, Ignês, Margarida e Rui pela valiosa colaboração na coletas das plantas.

À Ivânia e Ana pelos espectros obtidos e pela amizade.

Ao André pela ajuda nos testes de bioautografia e principalmente pelo apoio e amizade.

À Elza, Kátia e Maria Alice pela acolhida, pelas palavras de conforto nos momentos de desânimo, pelos bons momentos e constante interesse.

Aos colegas e amigos: Bira, Cláudio, Denise, Gelson, Laverde, Paulo, Marisa, Marisinha, Regina, Samísia e Valéria pela amizade, estímulo e agradável convivência durante esses anos de luta.

À Cleuza e Cecília pela força e incentivo.

À Cida, Reni e Antonio amigos de tantos anos.

À D. Maria pelo incansável trabalho, dedicação e pelo carinho com que sempre trata a todos.

Ao meu pai, aos meus irmãos, sobrinhos e cunhados pela compreensão e carinho.

Enfim, quero agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE CINCO ESPÉCIES DE *ECHINODORUS* E AVALIAÇÃO DO BETA-PINENO COMO SUBSTRATO PARA OBTENÇÃO DE QUIRONS MAIS ELABORADOS.

Clara Megumi Abe Tanaka

Fundação Universidade Estadual de Maringá, DQI, Maringá 87020-900. PR, Brasil

Anita Jocelyne Marsaioli

Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 13081-970, SP, Brasil

Esta tese foi dividida em duas partes:

Na primeira parte, apresentamos o isolamento e identificação dos metabólitos secundários presentes nos pecíolos e folhas de *Echinodorus grandiflorus* coletada na região de Curitiba-PR. A partir dos estudos fitoquímicos convencionais isolamos e identificamos 11 compostos: o fitol (8), o ácido hardwickico (14) o ácido echinóico (16), quatro derivados clerodânicos 17a, 18, 19 e 20a, dois derivados esteroidais e dois ácidos graxos sendo os compostos 16, 18 e 20a inéditos. Determinou-se a configuração absoluta do clerodano 18 como sendo ácido (-)-16-hidroxicleroda-3,13-dien-16, 15-olide-18-óico, {4α, 6α, 8α)-1-carboxi-5(S)-[2(2,5-diidro-2-oxo-4-furanil)-etil-5, 6, 8a-trimetil-3, 4, 4a, 5, 6, 8, 8a-octaidronaftaleno]} pela síntese do padrão homoquiral a partir do composto de configuração absoluta conhecida, o (-)-ácido hardwickico (14).

Com o objetivo de otimizar um método rápido no controle da composição de *Echinodorus grandiflorus* e *Echinodorus macrophyllus* ambos conhecidos como “chapéu de couro” e utilizadas na medicina popular como diurético e no tratamento de reumatismo, estabelecemos inicialmente um método adequado para a derivatização do extrato metanólico bruto de *Echinodorus grandiflorus* por três métodos diferentes:

- 1) sililação com bis-(trimetilsililtrifluoroacetamida)

2) metilação com diazometano

3) metilação seguida por sililação,

A avaliação destes três métodos com *Echinodorus grandiflorus* revelou que a metilação produz artefatos pela adição da molécula do diazometano ao grupo carboxílico alfa-beta insaturado e lactona. A derivação com bis-(trimetilsililtrifluoroacetamida) foi considerada mais adequada.

A análise comparativa por CG/EM dos extratos metanólicos bruto de *Echinodorus macrophyllus*, *E. tenellus*, *E. longipetalus* e *E. aschersonianus* revelou que os clerodanos e cembranos são substâncias características de *E. grandiflorus*, enquanto que em outros membros deste gênero essas substâncias estão em menor quantidade ou traços.

A segunda parte desta tese trata da utilização do beta-pineno e seus produtos de oxidação com esqueletos ciclopentânico e cicloexânico para a obtenção de quirons. Os resultados experimentais revelaram que estes substratos não são candidatos adequados para novas transformações químicas devido a tendência de se rearranjarem

ABSTRACT

CHEMICAL CONSTITUENTS OF FIVE *ECHINODORUS* SPECIES AND EVALUATION OF BETA-PINENE AS STARTING MATERIAL FOR MORE ELABORATE CHIRONS

Clara Megumi Abe Tanaka

Fundação Universidade Estadual de Maringá, DQI, Maringá 87020-900, PR, Brasil

Anita Jocelyne Marsaioli

Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 13081-970, SP, Brasil

The present thesis has been divided into two sections

The first part concerns the isolation and identification of the secondary metabolites of the leaves and pecioles of *Echinodorus grandiflorus* from Curitiba –PR. Conventional phytochemical analysis resulted in the identification of 11 compounds : phytol (8), hardwickic acid, methyl ester (14a), echinoic acid (16), four clerodane derivatives 17a, 18, 19 and 20a, two steroid derivatives and two fatty acids. Compounds 16, 18 and 20a have not been previously reported in the literature. The absolute configuration of clerodane 18 was determined as (-)-16-hydroxycleroda-3,13-dien-16,15-olide-19oic acid, (4 α ,6 α ,8 α)-1-carboxy-5(S)-[2(2,5-dihydro-5-hidroxy-2-oxo-4-furanyl)-ethyl-5,6,8a-trimethyl-3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-octahydro-naphthalene by hemisynthesis using (-)-hardwickic acid , a natural compound of known absolute configuration, as starting material.

With the objctive of optimizing a rapid method to control the composition of *Echinodorus grandiflorus* and *Echinodorus macrophyllus* both known as “chapéu de couro” and applied in folk medicine as diuretic and to treat rheumatisms, we have first established a valid protocol derivatizing the crude methanolic extracts of *Echinodorus grandiflorus* in three different ways:

- 1) silylation with bis-(trimethylsilyltrifluoroacetamid)

- 2) methylation with diazomethane
- 3) methylation followed by silylation

Evaluation of the three methodologies with the *Echinodorus grandiflorus* revealed that the methylation produced artefacts by the addition of the diazomethane molecule to the alfa-beta unsaturated carboxylic acid and lactones moieties. The silylation with bis-(trimethylsilyltrifluoroacetamid) was the derivatization of our choice.

The comparison analysis of the GC/MS of the silylated crude extracts of *Echinodorus macrophyllus*, *E. tenellus*, *E. longipetalus*, *E. aschersonianus* revealed that clerodane and cembranes are characteristic compounds of *E. grandiflorus* while in the other members of this genus these compounds are in either minor or trace amounts.

The second part of this thesis deals with the application of beta pinene and its oxydation products possessing cyclopentane and cyclohexane moieties to the production of chirons. The experimental results reveal that these substrates are not adequate good candidates to further chemical transformations due to their tendency to rearrange.

CURRICULUM VITAE

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Clara Megumi Abe Tanaka

Filiação: Issamu Abe e Mitiko Abe

Nascimento: 29/10/1954, Londrina/PR – Brasil

Carteira de Identidade: 1018401 / Paraná/ PR / 11/01/1973

Endereço profissional: Universidade Estadual de Maringá – Centro de Ciências Exatas,
 Departamento de Química
 Av. Colombo, 5790 – bloco 16 – sala 13
 87020900 Maringá, PR – Brasil

Endereço residencial: Rua Vitório Sambati, 517
 J. Liberdade
 87407-240 Maringá, PR – Brasil

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

1981 – 1984 Mestrado em Química
 Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, São Paulo, Brasil
 Título: ESTUDO ESPECTROFOTOMÉTRICO EM
 HIPERBILIRRUBINEMIA: ANÁLISE DE BILIRRUBINA E ENZIMAS
 RELACIONADAS
 Orientador: Prof. Dr. Nelson Durán.

1977 –1980 Graduação em Química.
 Universidade Estadual de Maringá, UEM, Paraná, Brasil

3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

3.1. Trabalhos resumidos em eventos

Tanaka, Clara Megumi Abe; Marsaioli, Anita Jocelyne; Amaral, Maria do Carmo E. Diterpenos de *Echinodorus grandiflorus*, 20A REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, POÇOS DE CALDAS. 1997.

Tanaka, Clara Megumi Abe; Marsaioli, Anita Jocelyn; Amaral, Mara do Carmo E. Cembrano inédito de *Echinodorus grandiflorus*. 19A REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, POÇOS DE CALDAS. 1996

3.2. Artigos publicados

Costa, Marta; Tanaka, Clara Megumi Abe; Imamura, Paulo; Marsaioli, Anita Jocelyne. ISOLATION AND SYNTHESIS OF NEW CLERODANE FROM *Echinodorus grandiflorus* . *Phytochemistry*, v. 50, p. 117-122, 1999.

Tanaka, Clara Megumi Abe; Sarragiotto, Maria Helena; Schpector, Júlio Zukerman; Marsaioli, Anita Jocelyne. A CEMBRANE FROM *Echinodorus grandiflorus*. *Pytochemistry*, V. 44, N.8, p. 1547-1549, 1997.

ÍNDICE

PARTE I – CONSTITUINTES QUÍMICOS DE CINCO ESPÉCIES DE *ECHINODORUS*.

I. 1 – Introdução.....	01
I. 2 – Objetivos.....	07
I. 3 – Resultados e Discussão	
I.3.1 – Estudo químico de <i>Echinodorus grandiflorus</i>	08
I.3.2 – Estudo de cinco espécies das plantas do gênero <i>Echinodorus</i> por CG/EM	53
I.3.3 – Ensaio Bioautográficos.....	93
I. 4 – Conclusão.....	99

PARTE II – AVALIAÇÃO DO (-) – BETA - PINENO COMO SUBSTRATO PARA OBTENÇÃO DE QUIRONS MAIS ELABORADOS.

II.1 – Avaliação dos derivados de (-) - β - pineno na síntese de compostos bioativos contendo unidade ciclopentano ou ciclobutano.	
II.1.1 – Introdução e Objetivos.....	101
II.1.2 – Resultados e Discussão.....	106
II.2 – Avaliação dos derivados de (-) - β - pineno na síntese do auxiliar quiral para a indução assimétrica de Diels Alder.	
II.2.1 – Introdução e Objetivos.....	118
II.2.2 – Resultados e Discussão.....	120
II.3 – Conclusão.....	138

PARTE EXPERIMENTAL

1. Materiais e Métodos.....	139
2. Isolamento dos produtos naturais.....	142
2.1 – Isolamento dos constituintes dos pecíolos.....	142

2.2 – Isolamento dos constituintes das folhas.....	163
3. Sínteses.....	177
REFERÊNCIAS.....	195
ESPECTROS.....	203

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema I	Rota biossintética de alguns diterpenos.....	05
Esquema II	Rota biossintética dos cembranos.....	06
Esquema III	Proposta de fragmentação para a substância 14a, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.....	15
Esquema IV	Proposta de fragmentação para a substância 16, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.....	20
Esquema V	Proposta de fragmentação para a substância 17a, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.....	25
Esquema VI	Proposta de fragmentação para a substância 18, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.. ..	29
Esquema VII	Fotooxigenação regioseletiva do anel furano.....	31
Esquema VIII	Proposta de fragmentação para a substância 19, por impacto eletrônico no espectrômetro de massa.....	37
Esquema IX	Proposta de fragmentação para a substância 20a, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas... ..	44
Esquema X	Proposta de fragmentação para a substância 34a, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas... ..	63
Esquema XI	Proposta de fragmentação para a substância 35a, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.....	65
Esquema XII	Proposta de fragmentação para a substância 36a, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.....	67
Esquema XIII	Proposta de fragmentação para a substância 1, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.....	73
Esquema XIV	Proposta de fragmentação para a substância 40, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.....	74
Esquema XV	Proposta de fragmentação para as substâncias 18.1, 18.2 e 18.3, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.....	77
Esquema XVI	Proposta de fragmentação para as substâncias 18c,	

34b, 35b e 36b.....	79
Esquema XVII Proposta de fragmentação para . glicosídeo genérico 44 por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.....	83
Esquema XVIII Proposta de fragmentação para a substância 71 , por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.....	108
Esquema XIX Sugestão do mecanismo de reação para o formação da substância 71.....	111
Esquema XX Proposta de fragmentação para a substância 88, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.....	123

ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 01	Rota esquemática do estudo fitoquímico dos pecíolos de <i>E. grandiflorus</i>	09
Fluxograma 02	Rota esquemática do estudo fitoquímico das folhas de <i>E. grandiflorus</i>	10
Fluxograma 03	Derivação do extrato etanólico dos pecíolos.....	55
Fluxograma 04	Derivação do extrato etanólico das folhas.....	55
Fluxograma 05	Derivação do extrato metanólico dos pecíolos de <i>E. grandiflorus</i> (coletado em Curitiba-PR em 1998).....	68
Fluxograma 06	Derivação dos extratos metanólicos das folhas de <i>E. grandiflorus</i> (coletadas em Curitiba-PR em 1998).....	69
Fluxograma 07	Tratamento dos pecíolos.....	143
Fluxograma 08	Estudo das frações Fc.5 e Fc.6.....	145
Fluxograma 09	Estudo da fração Fc.8.....	153
Fluxograma 10.	Estudo da fração Fc.10.....	156
Fluxograma 11	Tratamento das folhas de <i>E. grandiflorus</i>	163
Fluxograma 12	Estudo das frações reunidas Ef(1 a 3) denominada fração D.1	165

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01	<i>Echinodorus grandiflorus</i> – (Colombo – Curitiba – PR).....	02
Figura 02	Compostos encontrados em espécies de plantas pertencentes ao gênero <i>Echinodorus</i> e <i>Sagittaria</i>	03
Figura 03	Estruturas diterpênicas.....	04
Figura 04	Compostos isolados de <i>Echinodorus grandiflorus</i>	11
Figura 05	Dados de RMN ¹³ C das substâncias 26, 27 e 28.....	13
Figura 06	(a) Dados de RMN ¹³ C, b) correlações ¹ H, ¹ H observadas no espectro RMN 1D e 2D do fitol (8).....	13
Figura 07	Dados de RMN ¹³ C de 29a e 29b.....	16
Figura 08	Estereoestrutura do (-) – ácido hardwickico (14).....	17
Figura 09	(a) Correlações: ¹ H ¹ H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), (b) dados de RMN ¹³ C para o hardwickicato de metila (14a).....	17
Figura 10	Estruturas proposta para as substâncias 16, 16i e 16ii.....	21
Figura 11	(a) Correlações ¹ H, ¹ H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), (b) dados de RMN ¹³ C para o ácido echinóico (16).....	22
Figura 12	Desenho ORTEP da substância 16 feito a partir dos dados da análise de difração de Raio X.....	22
Figura 13	(a) Correlações ¹ H, ¹ H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), (b) dados de RMN ¹³ C para o clerodano 17a.....	26
Figura 14	(a) Correlações ¹ H, ¹ H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), (b) deslocamentos químicos de RMN ¹³ C para a substância 18, (c) deslocamentos químicos de RMN ¹³ C para a substância 30.....	30
Figura 15	Rotação ótica de clerodanos da mesma série enantiomérica.....	30
Figura 16	Sistema para a reação de fotooxigenação do (-) - ácido hardwickico.(14).....	32
Figura 17	(a) Cromatograma CG/EM e produtos da fotooxigenação regioseletiva de (-) 14. (b) Espectro de massas da substância	

	18.1 (éster metílico). (b) Espectro de massas da substância	
	18.a.....	34
Figura 18	(a) Espectro de RMN ¹ H e de espectro de RMN ¹³ C/DEPT da substância (-) – 18 obtido por fotooxigenação regioseletiva do ácido hardwickico (14).....	35
Figura 19	(a) Correlações ¹ H, ¹ H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), (b) dados de RMN ¹³ C para a substância 19.....	38
Figura 20	Complexo dieno tricarbonila de ferro do mirceno.....	40
Figura 21	Espectros de RMN ¹ H (300 MHz; CDCl ₃ /TMS) e RMN ¹³ C /DEPT da substância 33.....	42
Figura 22	(a) Correlações ¹ H, ¹ H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), (b) deslocamentos químicos de RMN ¹³ C para a substância 20a.....	45
Figura 23	Unidades estruturais proposta para a substância 21.....	48
Figura 24	Dados de RMN ¹³ C para a substância 25.....	52
Figura 25	Cromatograma de CLAE do extrato etanólico das folhas de <i>E. grandiflorus</i> (coluna NovapaK C-18; eluente acetonitrila:H ₂ O, 60:40).....	54
Figura 26a	Cromatograma de CG/EM do extrato etanólico dos pecíolos de <i>Echinodorus grandiflorus</i> coletados em Curitiba - PR (coluna DB-5).....	57
Figura 27a	Cromatograma de CG/EM do extrato etanólico das folhas de <i>Echinodorus grandiflorus</i> coletada em Curitiba - PR (coluna DB-5).....	57
Figura 26b	Expansão da figura 26a.....	58
Figura 27b	Expansão da figura 27a.....	58
Figura 28	Compostos identificados por CG/EM presentes nos extratos etanólicos de <i>E. grandiflorus</i>	59
Figura 29	Cromatograma de CG/EM do extrato acetato etílico metilado e siliado (EAE ₂ MS) das folhas de <i>Echinodorus grandiflorus</i>	61
Figura 30	Esqueleto clerodânico.....	62

Figura 31	Espectro de massas da substância 34a.....	62
Figura 32	Espectro de massas da substância 35a.....	64
Figura 33	Fragmento de m/z 111 característico de clerodano substituído. em β	65
Figura 34	Espectro de massas da substância 36a.....	66
Figura 35	Cromatograma de CG/EM do EM _p MS de <i>Echinodorus grandiflorus</i> coletada em Curitiba-PR (coluna DB-5).....	70
Figura 36a	Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico metilado dos peciolos de <i>Echinodorus grandiflorus</i> (EM _p M.1)coletada em Curitiba-PR (coluna DB-17).....	71
Figura 36b	Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico metilado das folhas de <i>Echinodorus grandiflorus</i> (EM _f M.1) coletadas em Curitiba-PR (coluna DB-17).....	71
Figura 37	Espectro de massas da substância 1.....	72
Figura 38	Espectro de massas da substância 40.....	74
Figura 39	Expansão do cromatograma dos extratos: (a) EM _p M , (b) EM _f M).....	75
Figura 40	Prováveis produtos de adição do diazometano à substância 18....	76
Figura 41	Reação de adição do diazometano às substâncias 41, 42 e 43.....	78
Figura 42	Espectro de massas das substâncias 11b e 40b	80
Figura 43	Espectros de massas das substâncias (a) 18b, (b) 34b, (c) 35b (d) 36b.....	81
Figura 44a	Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado dos peciolos de <i>E. grandiflorus</i> (EM _p S.1) coletados em Curitiba-PR. (DB-5).....	84
Figura 44a1	Expansão da figura 44a.....	84
Figura 44b	Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado das folhas de <i>E. grandiflorus</i> (EM _f S.1) coletadas em Curitiba-PR (DB-5).....	85
Figura 44b1	Expansão da figura 44b.....	85
Figura 44c	Cromatograma de CG / EM do extrato metanólico sililado da	

	espécie <i>Echinodorus grandiflorus</i> (EMSi.2 pecíolos e folhas) coletada em Campinas-SP coluna DB-5).....	86
Figura 44c1	Expansão da figura 44c.....	86
Figura 44d	Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado da espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i> (EMSi _{EM} , pecíolos e folhas) coletada em Campinas-SP (coluna DB- 5).....	87
Figura 44d1	Expansão da figura 44d.....	87
Figura 44e	Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado da espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i> (comercial) (EMS _{Emc}) (coluna DB-5).....	88
Figura 44e1	Expansão da figura 44e.....	88
Figura 44f	Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado da espécie <i>Echinodorus ashersonianus</i> (EMS _{Ea} , pecíolos e folhas) coletada em Campinas-SP (coluna DB-5).....	89
Figura 44f1	Expansão do cromatograma 44f1.....	89
Figura 44g	Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado da espécie <i>Echinodorus longipetalus</i> (EMS _{Elo} , pecíolos e folhas) coletada em Campinas-SP (coluna DB-5).....	90
Figura 44g1	Expansão da figura 44g.....	90
Figura 44h	Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado da espécie <i>Echinodorus tenellus</i> (pecíolos e folhas) (EMS _{Et}) coletada em Campinas-SP.....	91
Figura 44h1	Expansão da figura 44h.....	91
Figura 45a	<i>Rhodococcus equi</i>	95
Figura 45b	<i>Staphylococcus aureus</i>	96
Figura 45c	<i>Bacillus subtilis</i>	97
Figura 45d	<i>Candida albicans</i>	98
Figura 46	Produtos naturais sintetizados a partir de terpenos quirais.....	102
Figura 47	(a) (+) –trans decalona (60), b) neo <i>trans</i> -clerodano (61).....	103
Figura 48	Oxidação do (-)-β-pineno (62).....	104
Figura 49	Obtenção das substâncias 68, 69 e 70.....	105

Figura 50	(a) Correlações ^1H , ^1H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), (b) dados de RMN ^{13}C para a substância 71.....	107
Figura 51	Desenho ORTEP da substância 71 feito a partir dos dados de análise de difração de raio X.....	107
Figura 52	Reação do (-)- β -pineno com N-bromosuccinimida.....	109
Figura 53	Cromatograma de CG em coluna quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- β -ciclodextrina da substância 71.....	110
Figura 54	Dados de RMN ^1H para o cetol (65).....	112
Figura 55	Proposta sintética para a obtenção de terpenos com unidade ciclopentano a partir de 66a e com unidade ciclobutano a partir de 69a.....	113
Figura 56	Cromatograma de CG das substâncias: (a) 65, (b) 68a, (c) 69a, (d) 68b, (e) 69b coluna quiral (hepakis -2, 6 – dimetil – 3 – pentil- β -ciclodextrina).....	115
Figura 57	Reação de bromação da substância 69a.....	117
Figura 58	Reação de Diels Alder do acrilato de (-)-8-fenilmentol (81) com ciclopentadieno.....	118
Figura 59	Auxiliares quirais de dicetopiperazina, oxazolidinona e sultam...	119
Figura 60	Rotas A e B propostas para a síntese de auxiliares quirais a partir de 69a.....	120
Figura 61	Auxiliares quirais de álcoois ciclohexanóis.....	121
Figura 62	Substância 87.....	122
Figura 63	Reação de redução de 69a.....	123
Figura 64	Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 89.....	124
Figura 65	Dados de RMN ^1H para a substância 90.....	125
Figura 66	Reação catalisada por paládio.....	125
Figura 67	Reação de 69a catalisada por paládio.....	126
Figura 68	Dados de: (a) RMN ^1H , (b) RMN ^{13}C da substâncias 93.....	127
Figura 69	Reação de 69a catalisada por paládio na presença do ácido fórmico.....	128

Figura 70	Rota C proposta para a obtenção do auxiliar quiral 98	128
Figura 71	Reação de redução do cetol (65).....	129
Figura 72	NOE dos compostos 99a e 99b	131
Figura 73	Proteção do cetol (65) com TBDPS.....	132
Figura 74	Proteção do cetol (65) com TMS/imidazol.....	132
Figura 75	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância 96b	133
Figura 76	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância 97b	134
Figura 77	Esterificação de 97b	135
Figura 78	Dados de RMN ¹ H da substância 98a	135
Figura 79	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para as substâncias 100a e 100b ...	136
Figura 80	Caminhos reacionais do ácido carboxílico com DCC/DMPA.....	137

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01	Relação das espécies do gênero <i>Echinodorus</i> conhecidas.....	01
Tabela 02	Deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C da substância 14a obtido de RMN 1D e 2D.....	18
Tabela 03	Deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C da substância 16 obtido de RMN 1D e 2D.....	23
Tabela 04	Deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C da substância 17a obtido de RMN 1D e 2D.....	27
Tabela 05	Deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C da substância 20a obtido de RMN 1D e 2D.....	46
Tabela 06	Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C das substâncias 20a , 20.1a e 20.1	47
Tabela 07	Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da substância 21 obtido de RMN 1D e 2D.....	50
Tabela 08	Índice de retenção das substâncias identificadas na planta <i>Echinodorus grandiflorus</i>	60
Tabela 09	Excesso enantiomérico das substâncias 65 , 68a , 68b , 69a e 69b ..	116
Tabela 10	Dados de RMN 13 e RMN ^1H das substâncias 99a , 99b	130
Tabela 11	Fracionamento do extrato EAc1.....	144
Tabela 12	Fracionamento da fração Fc.5s.....	147
Tabela 13	Fracionamento da fração Fc.6s.....	148
Tabela 14	Fracionamento da fração Fr.....	151
Tabela 15	Fracionamento da fração Fr.....	154
Tabela 16	Fracionamento da fração Fc. 10.....	157
Tabela 17	Fracionamento da fração Fc.11.....	161
Tabela 18	Fracionamento do extrato EAc2.....	164
Tabela 19	Fracionamento da fração D.1.....	166
Tabela 20	Fracionamento da fração D.1.B.....	167
Tabela 21	Fracionamento da fração D.1.C.....	169
Tabela 22	Fracionamento da fração D.1.(17-37).....	171

Tabela 23	Fracionamento da fração F.f.6.....	172
-----------	------------------------------------	-----

SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

Ac:	acetato de etila
CC:	cromatografia de coluna
CCD	cromatografia em camada delgada
CG:	cromatografia gasosa
CG/EM:	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
COSY:	espectro bidimensional de correlação homonuclear (HxH) a uma ligação.
DEPT:	melhoramento sem distorção por transferência de polarização.
d:	dubleto.
dd:	duplo dubleto.
DCC:	dicicloexilcarbodiimida
DIPEA:	diisopropiletilamina.
DMPA:	4-N-N-dimetilaminopiridina.
E:	espectro.
EAc1:	extrato acetato de etila de pecíolos obtido a partir do extrato etanólico
EAc2:	extrato acetato de etila de folhas obtido a partir do extrato etanólico
EM:	espectro de massas
EAcEp:	extrato acetato de etila de pecíolos
EAcEf:	extrato acetato de etila etílico de folhas
EAcEpMS	extrato acetato de etila metilado e sililado de pecíolos
EAcEpMS	extrato acetato de etila metilado e sililado de folhas.
EEpM:	extrato etanólico metilado de folhas.
EEpMA:	extrato etanólico metilado e acetilado de folhas
EEpMS:	extrato etanólico metilado e sililado de folhas.
EEpM:	extrato etanólico metilado de pecíolos.
EEpMA:	extrato etanólico metilado acetilado de pecíolos.
EEpMS:	extrato etanólico metilado e sililado de pecíolos.
EMpM:	extrato metanólico metilado de folhas.
EMpSi:	extrato metanólico sililado de folhas.
EMpM:	extrato metanólico metilado de pecíolos.

EM_pS:	extrato metanólico sililado de pecíolos.
EMSi-2:	extrato metanólico sililado de folhas e pecíolos de <i>E.grandiflorus</i> (coletados em Campinas)
EMSi_{EM}:	extrato metanólico sililado de folhas e pecíolos de <i>E. macrophyllus</i>
EMSi_{Ea}:	extrato metanólico sililado de folhas e pecíolos de <i>E.aschersonianus</i>
EMSi_{El0}:	extrato metanólico sililado de folhas e pecíolos de <i>E.longipetalus</i>
EMSi_{Et}:	extrato metanólico sililado de folhas e pecíolos de <i>E.tenellus</i>
HETCOR:	espectro bidimensional de correlação (C _x H) a n(N=1...n) ligações.
HMBC:	espectro de RMN bidimensional de correlações ¹³ C, ¹ H a 1 ligação (detecção direta)
HSQC:	espectro de RMN bidimensional de correlações ¹³ C, ¹ H a n ligação (detecção direta)
IV:	infravermelho.
J:	constante de acoplamento.
M⁺:	íon molécula
NOE:	efeito nuclear.overhauser
RMN ¹³C:	ressonância magnética nuclear de carbono treze.
RMN ¹H:	ressonância magnética nuclear de hidrogênio.
s:	singleto.
t:	triplete.
T_r:	tempo de retenção.
UV:	violeta ultra.
δ:	deslocamento químico em partes por milhões.
[α]_D:	rotação específica
THF:	tetraidrofurano.
TMS:	tetrametilsilano
TBDFS:	t-butildifenilsilano

PARTE I
CONSTITUINTES QUÍMICOS DE CINCO ESPÉCIES DE *Echinodorus*

I.1 INTRODUÇÃO

A planta *Echinodorus grandiflorus* é classificada da seguinte forma.¹

Família: *Alismataceae*

Gênero: *Echinodorus*

Espécie: *Echinodorus grandiflorus*

A família *Alismataceae* consiste de 11 gêneros e de aproximadamente 75 espécies, compreendendo dois gêneros principais: *Echinodorus* (26 espécies) (tabela 01) e *Sargittaria* (ca 25 espécies). Outros gêneros são constituídos por menos de 10 espécies cada um.¹

Espécies desta família servem de abrigo ou ninhos para aves canola e peixes do pântano. Seus tubérculos, bem como outras partes vegetativas e frutos, também servem como alimentos para muitas espécies de animais selvagens.

Tabela 01. Relação das espécies do gênero *Echinodorus* conhecidas¹

01. <i>E. nymphaeifolius</i>	12. <i>E. tunicatus</i>	19. <i>E. pubescens</i>
02. <i>E. tenellus</i>	13a <i>E. subalatus</i> ssp. <i>subalatus</i>	20a. <i>E. macrophyllus</i> ssp
03. <i>E. bolivianus</i>	13b. <i>E. subalatus</i> ssp. <i>andrieuxii</i>	<i>Macrophyllus</i>
04 <i>E. uruguayensis</i>	14. <i>E. berteroi</i>	20b. <i>E. macrophyllus</i> ssp <i>scaber</i>
05. <i>E. eglandulosus</i>	15a <i>E. cordifolius</i> ssp. <i>cordifolius</i>	21. <i>E. trialatus</i>
06. <i>E. grisebachii</i>	15b <i>E. cordifolius</i> ssp. <i>fluitans</i>	22. <i>E. paniculatus</i>
07. <i>E. martii</i>	16a <i>E. grandiflorus</i> ssp. <i>grandiflorus</i>	23. <i>E. lanceolatus</i>
08. <i>E. glandulosus</i>	16b. <u><i>E. grandiflorus</i> ssp. <i>aureus</i></u>	24. <i>E. aschersonianus</i>
09. <i>E. reticulatus</i>	17a. <i>E. bracteatus</i> ssp. <i>bracteatus</i>	25. <i>E. teretoscopus</i>
10. <i>E. longipetalus</i>	17b. <i>E. bracteatus</i> ssp. <i>efenestratus</i>	26. <i>E. virgatus</i>
11. <i>E. horizontalis</i>	18. <i>E. palaefolius</i>	

A espécie *Echinodorus grandiflorus* ssp *aureus* (figura 01), conhecida popularmente como chapéu de couro, encontra-se distribuída geograficamente entre Cuba, sul do México, América Central, Colômbia, Venezuela e Brasil. No Brasil, é encontrada no Acre, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo.

É uma planta aquática, encontrada principalmente em canais de drenagem, margem de lagoas e baixadas pantanosas em geral. É ocasionalmente cultivada como ornamental e muito empregada na farmacologia popular, pelas suas propriedades medicinais, como: depurativa, emoliente, tônica, diurética, contra reumatismo, sífilis, artrismo, doenças da pele e do fígado, ácido úrico, picada de cobra, e até, possivelmente, contra arteriosclerose.²⁻⁴

Uma revisão bibliográfica sobre gênero *Echinodorus*, revelou o isolamento do diterpeno echinol (1) a partir da espécie *E. grandiflorus* por Manns e Hartmann⁵, cuja planta foi coletada em Porto Alegre.

Como foi encontrado somente esta referência sobre o gênero, considerou-se adequado pesquisar os estudos fitoquímicos de espécies do gênero *Sagittaria*, o qual é taxonomicamente muito próximo à *Echinodorus*.



Figura 01. *Echinodorus grandiflorus* - (Colombo- Curitiba-PR).

Do gênero *Sagittaria*, foram isolados os diterpenos sagitariol (2a)^{6, 7} e 18-desoxisagitariol (2b)⁸ a partir da espécie *Sagittaria sagittifolia* Linn., trifolionas (3a, 3b, 3c e 3d), sagitariosídeos (4a e 4b.) e arabinolactosídeo (5) a partir de *Sagittaria trifolia* L^{9, 10}, e o N^ε (carboximetil)-L-lisina (6) a partir de *Sagittaria pygmaea*¹¹ (figura 02).

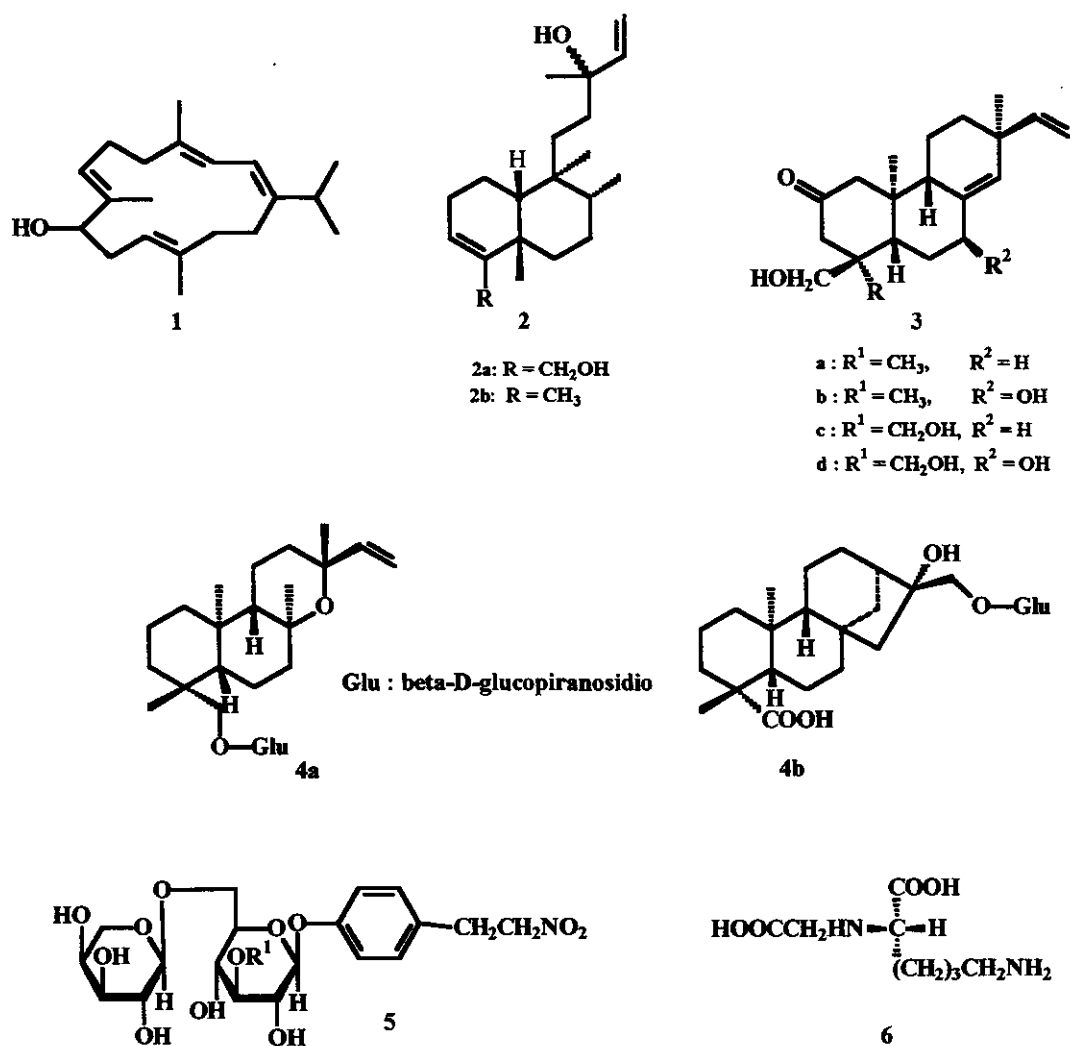


Figura 02. Substâncias encontradas em espécies de plantas pertencentes ao gênero *Echinodorus* e *Sagittaria*

Os diterpenos constituem uma classe importante de produtos naturais isolados a partir de organismos terrestres e marinhos e, o grande interesse nestes compostos reside no fato deles apresentarem propriedades antimicrobiana, e antineoplásica ¹²⁻¹⁷.

Os diterpenos formam um conjunto de compostos C₂₀, procedentes do metabolismo do pirofosfato de geranilgeranila (7). Podem ser lineares como o fitol (8), macrocíclicos (cembrano) (9), bicíclicos (clerodanos e labdanos), tricíclicos (pimaranos, abietanos) e tetracíclicos (kauranos, gibanos).

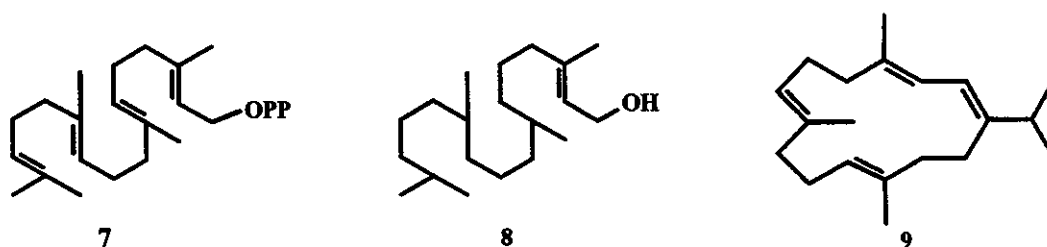
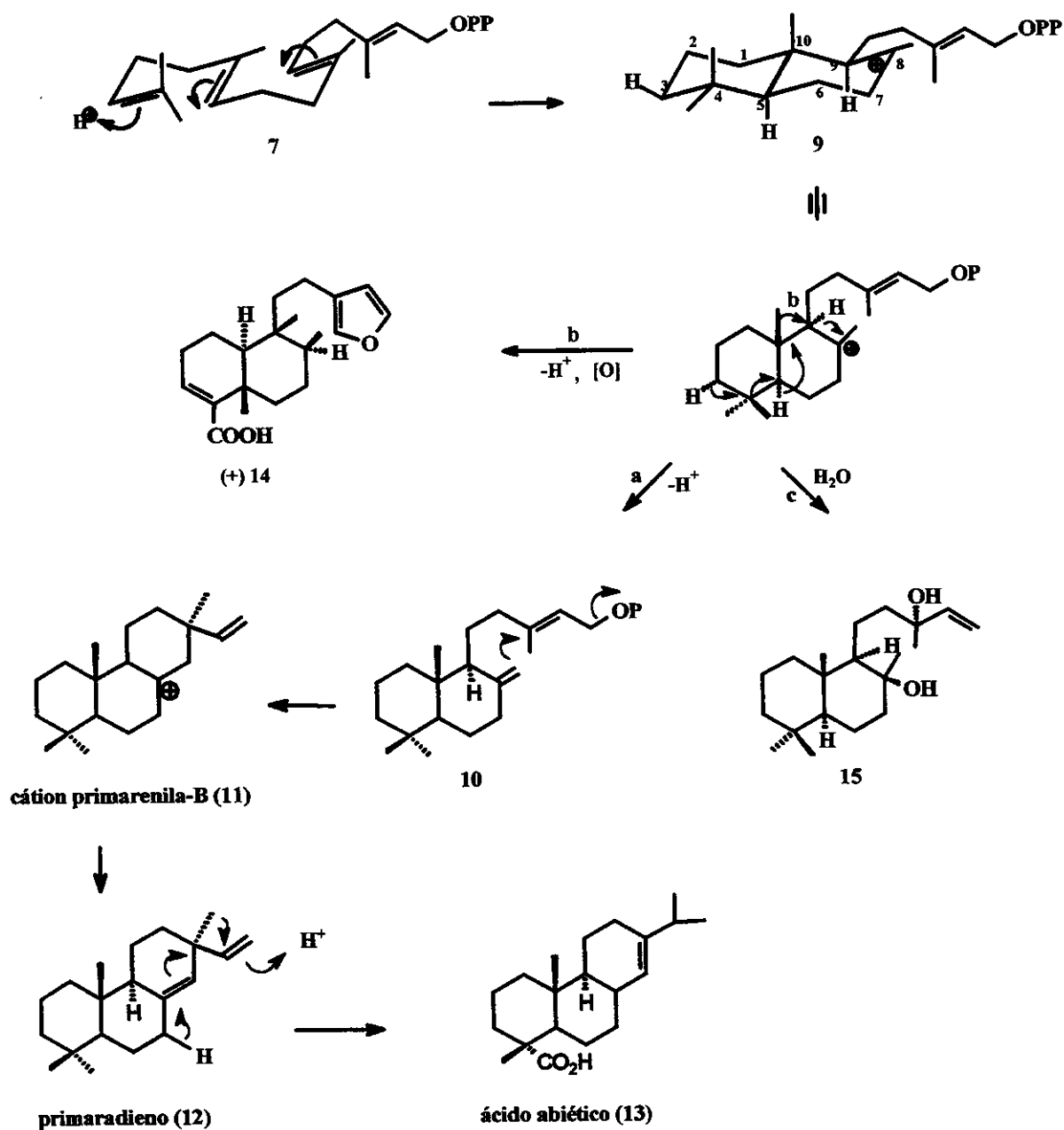


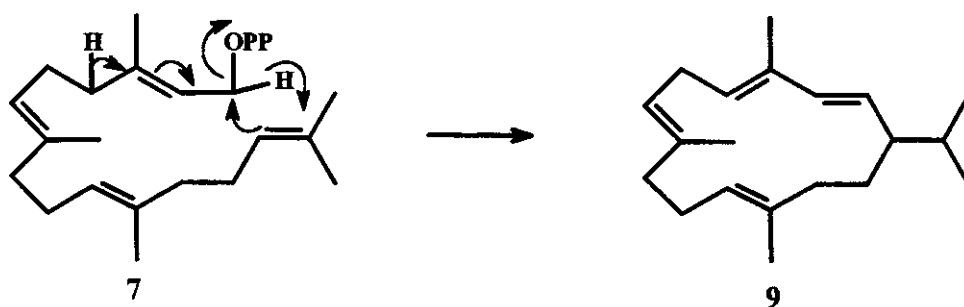
Figura 03. Estruturas diterpênicas

Os diterpenos policíclicos são produtos de ciclização de 7 por um caminho biossintético similar a biossíntese dos triterpenos, mas sem epoxidação prévia. Esta ciclização fornece um sistema do tipo decalínico (*cis* ou *trans*), o qual evolui via eliminação de um próton formando um intermediário importante, o pirofosfato de labdadienila (10). Este, após a solvólise do grupo pirofosfato, origina um carbocátion (rota a) que pode sofrer ataque do metileno exo e chegar assim, por uma série de combinações diferentes, a uma variedade de esqueletos policíclicos diterpênicos conhecidos ¹⁸. As configurações dos carbonos C5, C8, C9, e C10, são determinadas pelas cadeira flexível do *trans-trans*-geranilgeranila. O rearranjo sincronizado de Wagner-Meerwein via cinco passos e inversão de cada centro (rota b), leva à formação do ácido hardwickico (14) (esqueleto clerodânico) ¹⁹. A hidratação do íon carbônio C8, e rearranjo da cadeia lateral (rota c), fornece o esclareol (15) (Esquema I).



Esquema I. Rota biossintética de alguns diterpenos¹⁹

Diterpenos macrocíclicos como o cembrano (9), isolados de *Pinus sp* e de espécies marinhas, são biossintetizados por alquilação intramolecular do C-1 a C-14 de pirofosfato de geranil geranila (7) para formar aneis de 14 membros.¹⁹ (Esquema II).



Esquema II: Rota biossintética do cembrano¹⁹

I.2 – OBJETIVOS

Echinodorus grandiflorus e *macrophyllus* são citadas em várias literaturas de plantas medicinais como chapéu de couro e indicadas na medicina popular, principalmente como diuréticas e anti-reumáticas. No entanto, observa-se que a comercialização deste chá restringe-se a *Echinodorus macrophyllus*. Este fato, e o escasso estudo químico do gênero *Echinodorus* abundante no Brasil, nos levou a investigar plantas deste gênero. Assim esta parte do trabalho teve como objetivos:

- ♦ Isolamento e identificação dos metabólitos secundários presentes na planta *Echinodorus grandiflorus* por métodos químicos clássicos.
- ♦ Estudar uma metodologia adequada para detectar as substâncias isoladas de *Echinodorus grandiflorus*.
- ♦ Obter um método rápido para a verificação da composição de *Echinodorus grandiflorus* e *Echinodorus macrophyllus* e compará-los com os de *Echinodorus aschersonianus*, *Echinodorus longipetalus* e *Echinodorus tenellus*.
- ♦ Avaliar a atividade biológica da espécie *Echinodorus grandiflorus* coletada em Curitiba-PR.

I. 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

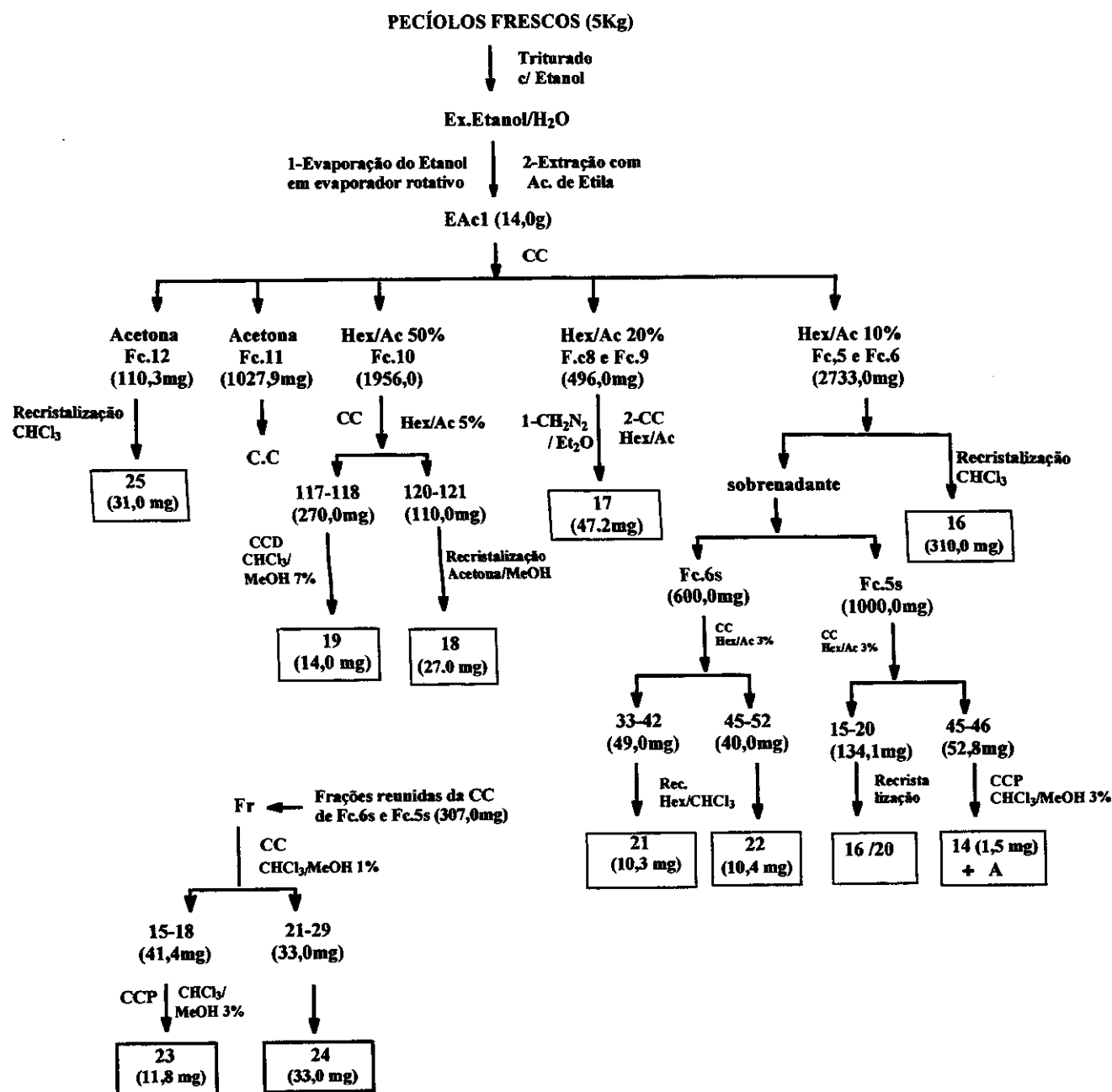
I.3.1 – ESTUDO QUÍMICO DE *Echinodorus grandiflorus*.

A primeira preocupação no estudo químico da planta *Echinodorus grandiflorus* foi a obtenção do extrato bruto. O método mais adequado foi a obtenção do extrato bruto a partir do material coletado fresco evitando a secagem prévia.

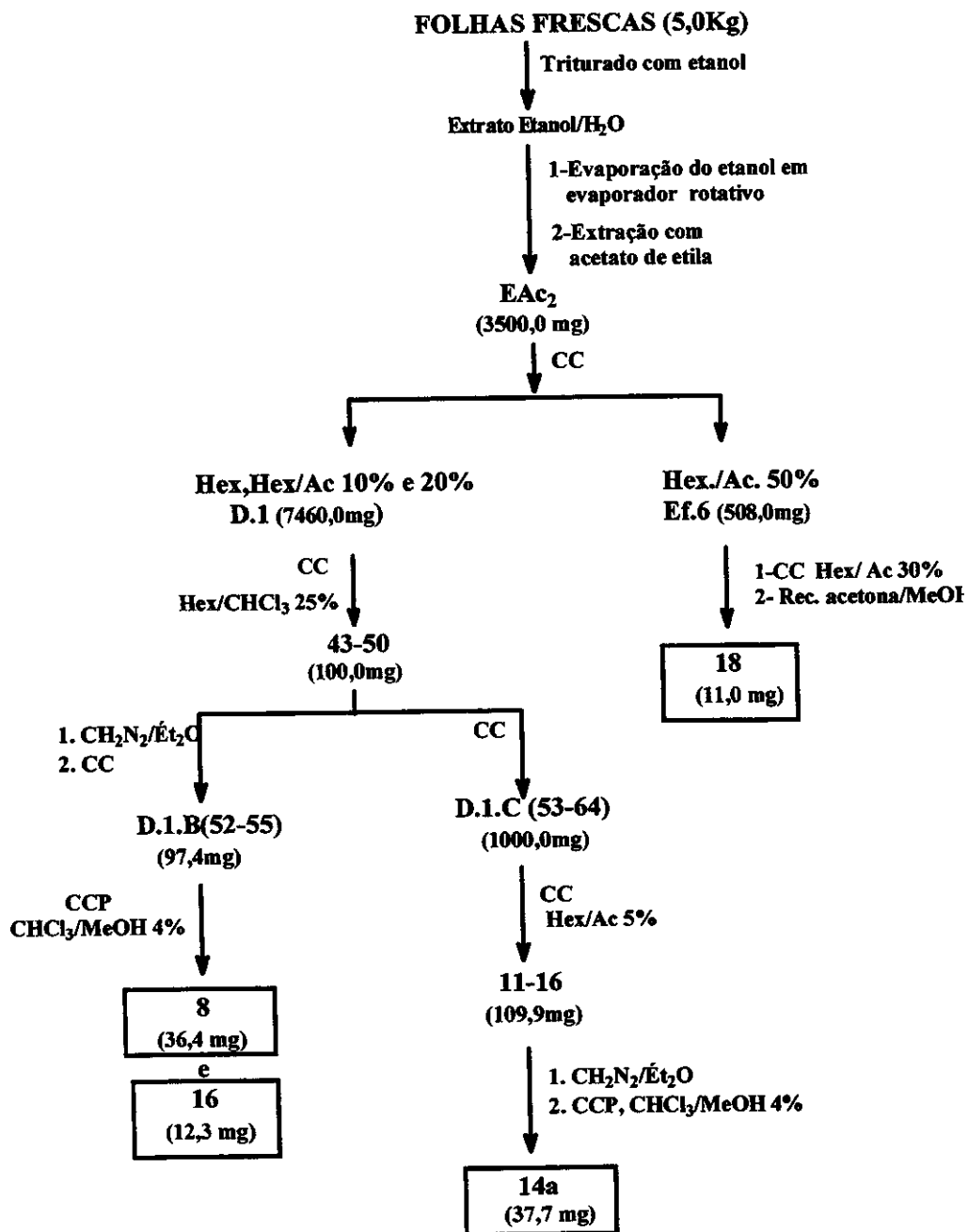
Uma análise comparativa dos extratos brutos das folhas e pecíolos por cromatografia em camada delgada mostrou que os mesmos continham substâncias distintas. Assim, os pecíolos e as folhas foram tratados separadamente, obtendo-se os extratos EAc1 e EAc2 respectivamente. Os extratos obtidos foram submetidos a um pré-fracionamento por coluna cromatográfica em sílica gel, utilizando-se hexano e misturas de hexano-acetato de etila, acetona, mistura de acetona-metanol e metanol como eluentes para o extrato EAc1, hexano e mistura de hexano-acetato de etila, acetato de etila e metanol para o extrato EAc2. (Fluxogramas 1 e 2).

Iniciamos o nosso trabalho pelo estudo dos pecíolos, o qual forneceu a substância 16 inédita. A partir das folhas isolamos as substâncias 8 e 14a na forma de éster metílico. Tentativas de isolamento da substância 1, como também a identificação de outros metabólitos secundários presentes não foram satisfatórias, devido à rápida decomposição e polimerização dos mesmos durante o processo de isolamento e purificação. Três novas coletas da planta, nos meses de janeiro de 1996, 1997 e 1998, foram necessárias para o isolamento e identificação desses metabólitos. Desta forma foi possível o isolamento dos derivados clerodânicos 17a (éster metílico), 19 e 20a (éster metílico) a partir dos pecíolos e o clerodano 18 a partir das folhas e pecíolos, sendo 18 e 20a inéditos. No entanto, não isolamos a substância 1.

Durante o isolamento destas substâncias, outros metabólitos foram isolados, tais como: 24-etilcolest-4-en-3,6-diona (21), mistura de esteróides 24-metilcolest-5-enol/ 24-etilcolest-5-22-dienol/ 24-etil-colest-5-enol (22a/22b/22c), ácido linolênico (23) ácido dodecanóico.(24), e 3 β -O- β -D-glicopiranosilsterol (25) (figura 04).



Fluxograma 01. Rota esquemática do estudo fitoquímico dos pecíolos de *Echinodorus grandiflorus*.



Fluxograma 02. Rota esquemática do estudo fitoquímico das folhas de *Echinodorus grandiflorus*.

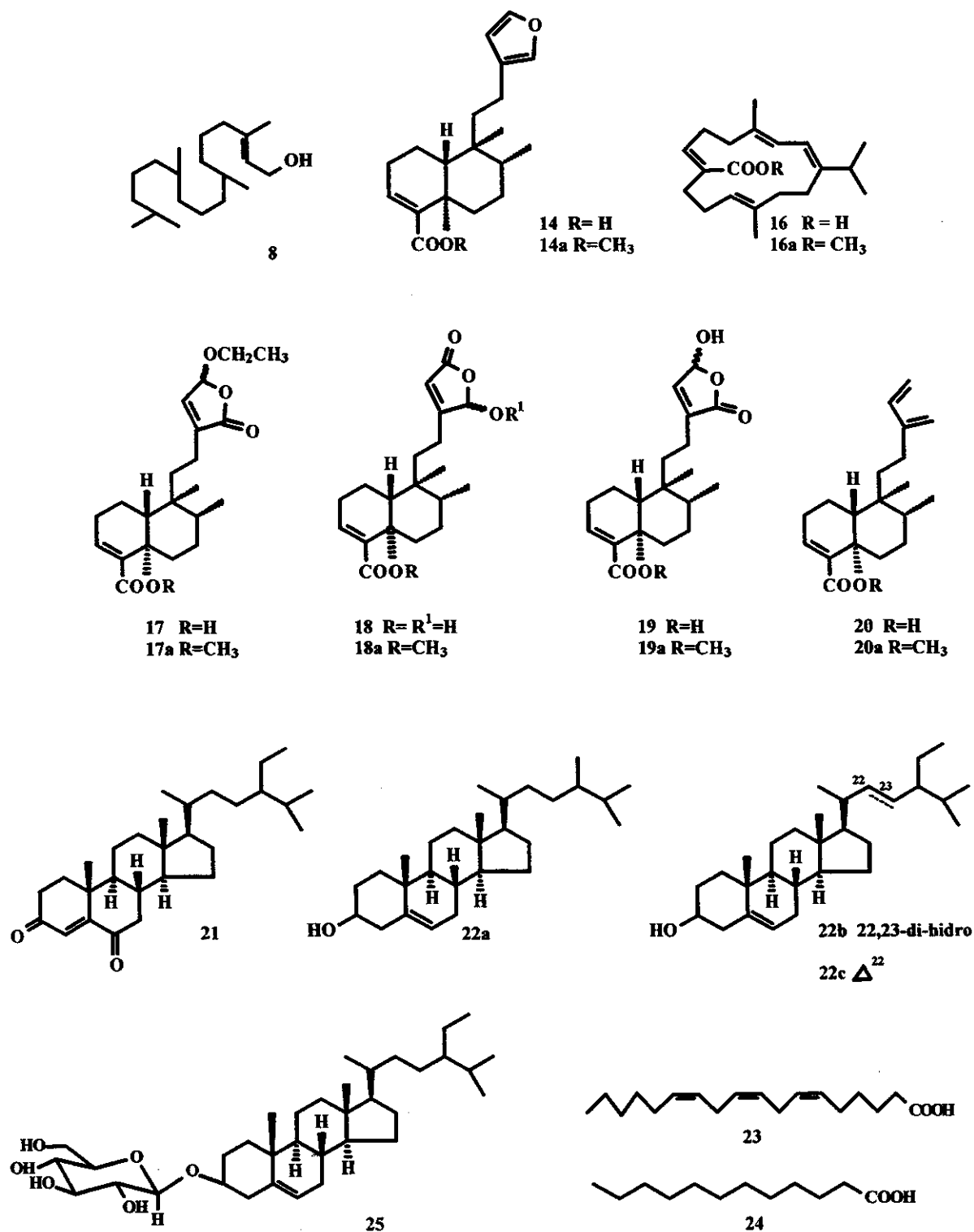
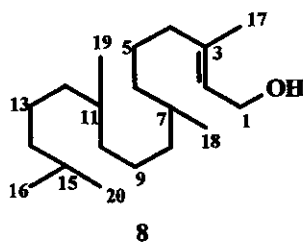


Figura 04. Substâncias isoladas de *Echinodorus grandiflorus*.

SUBSTÂNCIA 8



A substância 8, foi isolada a partir das folhas (fluxograma 02) como um óleo incolor. Análise do espectro de RMN¹H (E 01), mostrou sinais de prótons dos grupos CH₃ e CH₂ na região entre δ_H 0,88 a 2,0, sinal de metila ligada a dupla ligação em δ_H 1,68 (d, J= 1,0 Hz) e ainda sinais em δ_H 4,20 (d, J= 7,2Hz) e 5,40 (tq, J= 1,3 e 7,0 Hz) característicos de prótons carbinólicos (CH₂OH) e próton olefinico, respectivamente.

O espectro de RMN¹³C /DEPT (E 02 e 03) mostrou 20 sinais os quais puderam ser identificados como sinais de carbonos metínicos (4 x CH), metilênicos (10 x CH₂), metílicos (5 x CH₃) e carbono não ligado a hidrogênios. O sinal em δ_C 59,3 confirmou a presença do grupo CH₂OH.

Com base nestas informações sugeriu-se o esqueleto do terpenóide fitol (8) para a substância.

A configuração *E* da ligação dupla da substância foi determinada por comparação dos deslocamentos químicos de RMN¹³C obtidos para o fitol, com os de *Z*-cital (26), *E*-cital (27) e geraniol (28)²⁰ (figura 05).

Comparando-se os deslocamentos químicos de RMN¹³C do *Z* e *E*-cital (figura 05) observa-se que o C-4 ressona em δ_C 32,5 e para o isômero *Z* e em δ_C 40,5 para os isômeros *E*. A proteção do C-4 do *Z*-cital (26) é atribuída a interação γ do C-4 com o grupo CHO. Observa-se ainda, um efeito contrário quando comparado os deslocamentos químicos das metilas as quais absorvem em δ_C 24,4 e 17,0 para os isômeros *Z* e *E* respectivamente, neste caso, a interação do tipo γ ocorre entre CH₃ e CHO no isômero *E*.

A análise dos deslocamentos químicos do C-4 (δ_C 39,7) e Me-9 (δ_C 16,0) do geraniol (28) e dos demais carbonos mostram semelhanças com os do *E*-cital (27).

Estas informações permitiram comparar os deslocamentos químicos do C-4 (δ_C 39,8) e Me-17 (δ_C 16,0) do fitol com os do carbono correspondentes do geraniol, confirmando a estereoquímica *E* para fitol (8). Comparação dos dados espectrais de RMN ^{13}C da substância isolada com os da literatura ²⁰ para o *E*-fitol confirmaram a estrutura da substância 8.

As correlações homonuclear ^1H , ^1H (COSY, E 04, figura 06) e heteronuclear ^{13}C , ^1H (HETCOR, E 05) observadas no espectro de RMN 2D, permitiram a completa atribuição dos sinais de hidrogênios e carbonos e confirmar a estrutura proposta para 8.

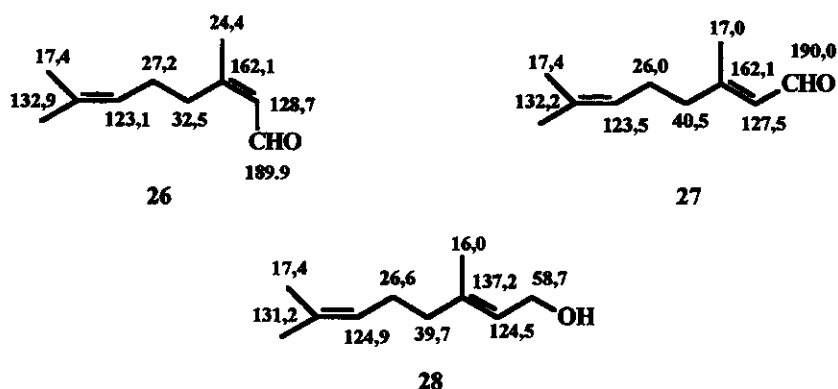


Figura 05. Dados de RMN ^{13}C das substâncias 26, 27 e 28 ²⁰.

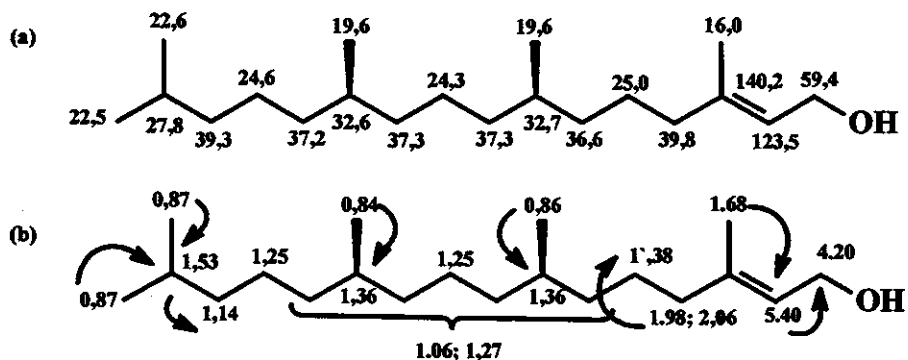
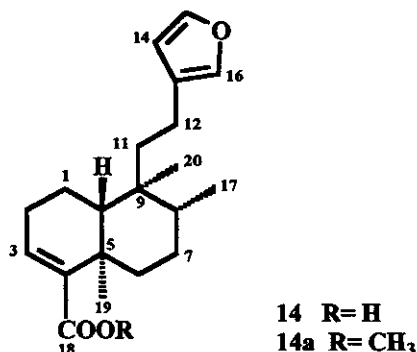


Figura 06. (a) Dados de RMN C^{13} , (b) correlações ^1H , ^1H observadas no espectro de RMN 2D do fitol (8).

SUBSTÂNCIA 14a



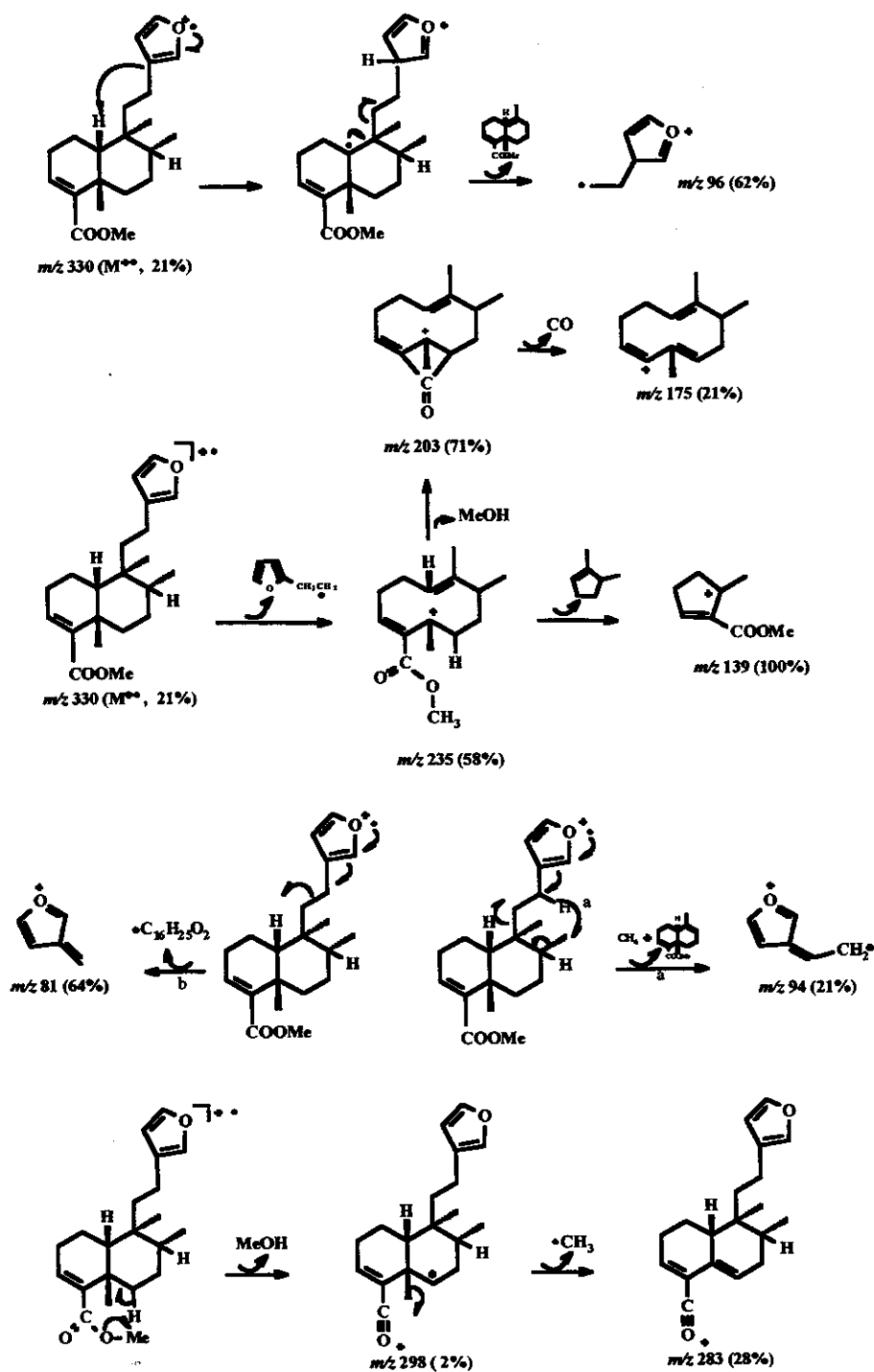
A substância **14a** foi isolada na forma de éster metílico como componente majoritário das folhas a partir da fração (43-50) (Fluxograma 02) metilada com diazometano em éter etílico.

O espectro de massas (E 13) de **14a** apresentou íon molecular de m/z 330 compatível com a fórmula molecular $C_{21}H_{30}O_3$ e exibiu picos de m/z 81, 94 e 96 coerente com fragmentos $[C_5H_5O]^+$, $[C_6H_6O]^{+*}$ e $[C_6H_8O]^{+*}$, respectivamente, característicos de uma unidade 3-alkuil furano (Esquema III).

O espectro de RMN 1H (E 07) apresentou sinais característicos de um grupo 3-alkuil furano a δ_H 6,25(dd, $J=1,7$ e $0,8$ Hz); δ_H 7,20 (d, $J = 1,2$ Hz), δ_H 7,35 (t, $J= 1,7$ Hz), de próton olefinico a δ_H 6,60 (t, $J= 3,6$ Hz) e ainda, sinais de metilas terciárias em δ_H 0,78 e 1,25 e metila secundária em δ_H 0,82. Os dados de RMN ^{13}C (E 08) confirmaram a presença do anel furânico a δ_C 125,6 (C_0); 111,0 (CH); 142,9 (CH) e 138,4 (CH). Os sinais em δ_C 136,9 (CH), 142,6 (C_0), 168,0 (C_0) e 51,1 (OCH_3) sugerem a presença de um éster carboxílico α - β -não saturado.

Os dados espectrais discutidos acima, caracterizaram a presença de um sistema decalínico de diterpenos clerodânicos com as três metilas ligadas ao anel decalínico e o grupo furano como substituinte da cadeia lateral.

A junção dos anéis A/B (*cis* ou *trans*) do sistema decalínico foi estabelecida comparando-se os deslocamentos químicos de carbono do modelo *cis*- metil-decalina (**29a**) e *trans*-metil-decalina (**29b**) os quais discutiremos a seguir.



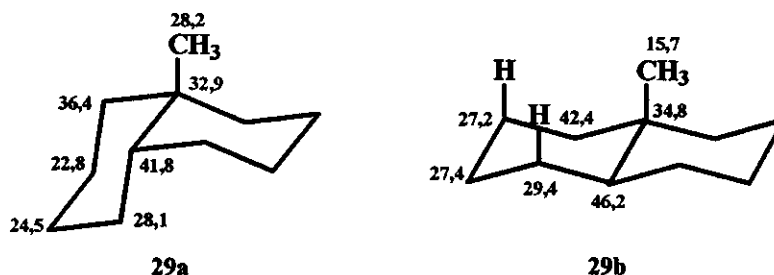


Figura 07. Dados de RMN ^{13}C das substâncias 29a e 29b.²⁰

Os estudos de RMN ^{13}C de *cis* e *trans*-metil-decalina²⁰ têm demonstrado que a metila (C-11) de *cis*-decalina absorve em δ_{C} 28,2 enquanto que a de *trans*-decalina em δ_{C} 15,7 (figura 07). A proteção de 12,5 ppm da metila C-11 para *trans*-decalina foi atribuída ao maior número de efeitos γ -gauche da metila C-11 com os carbonos do anel do que em *cis*-decalina.

Manabe e colaboradores²¹, em seus estudos referentes à stereoquímica de diterpenos *cis*-clerodânicos, têm demonstrado que o carbono C-19 do *cis*-clerodano absorve na região ao redor de δ_{C} 25,0 e o do *trans*-clerodano na região entre δ_{C} 11-19.

Portanto, no caso da substância **14a**, a ausência de sinais de RMN ^{13}C de metilas na região maior do que δ_{C} 21, sugere a stereoquímica da junção dos anéis A/B como sendo *trans*. Comparação dos dados espectrais com os de várias substâncias diterpênicas com junção *trans* dos anéis A/B permitiram identificar **14a** como o derivado éster do ácido hardwickico **14** (figura 08).

O ácido hardwickico pertence à classe de diterpênicos clerodânicos e foi isolado pela primeira vez como o enantiômero (-) ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} -100,3^{\circ}$) por Misra e colaboradores a partir de *Hardwickia pinnata*.²² O seu enantiômero, (+)-ácido hardwickico ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 125,0^{\circ}$), foi isolado por Cocker e colaboradores a partir da *Copaifera officinalis*.²³ A configuração absoluta do (-) - ácido hardwickico foi bem estabelecida por Sukh Dev e colaboradores, em 1964^{22, 24-25}, como sendo a apresentada na figura 08, e tem servido como substância de referência para a correlação química de vários outros produtos naturais diterpênicos clerodânicos.

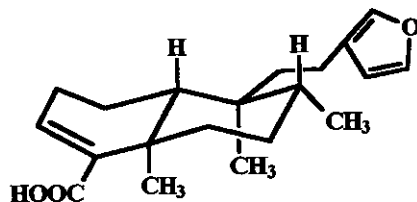


Figura 08. Estereoestrutura do (-)-ácido hardwickico (14).²⁴

O valor da rotação específica $[\alpha]_D^{25} = 113^0$ (CHCl_3 , c , 20), obtido para a substância **14a** na forma metilada concorda com o descrito por Missa e colaboradores para o (-)-ácido hardwickico, podendo-se concluir que a substância **14a** apresenta a mesma configuração absoluta de **14**.

As atribuições dos sinais dos prótons e carbonos foram feitas com base nas correlações ^1H , ^1H e ^{13}C , ^1H observadas nos espectros de RMN 2D COSY (E 10, figura 09) HETCOR (E 11) e HETCOR a longa distância (E 12, tabela 02) e comparados com os dados da literatura recente.²⁶

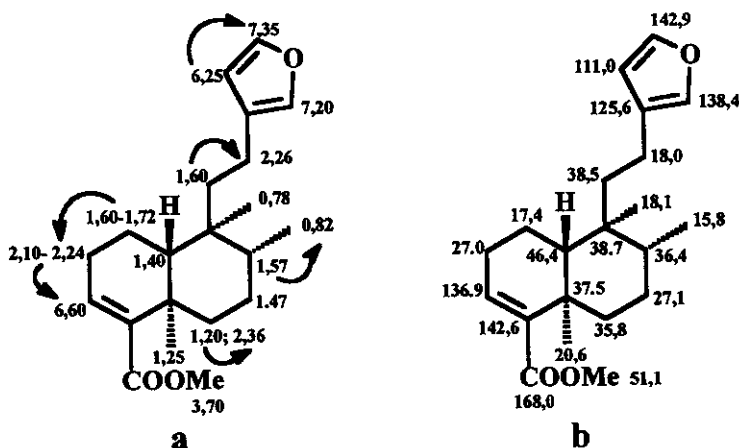


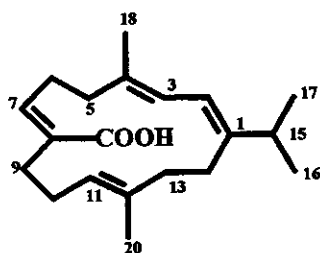
Figura 09. (a) Correlações ^1H , ^1H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), (b) dados de RMN ^{13}C para o hardwickicato de metila (**14a**)

Tabela 02. Deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C da substância 14a obtido de RMN 1D e 2D.

Nº	Hidrogênio (δ)	Carbono (δ)	Correlação C-H a longa distância (HETCOR)
01	1,60 - 1,72 (2H)	17,4 (CH_2)	1,40 (H-10)
02	2,10 - 2,24 (2H)	27,0 (CH_2)	1,40 (H-10)
03	6,60 (1H) t, J= 3,6	136,9 (CH)	2,10-2,24 (H-2)
04		142,6 (C_0)	1,25 (H-19)
05		37,5 (C_0)	1,25 (H-19); 2,36 (H-6'); 6,60 (H-3)
06	1,20 (1H) e 2,36 (1H)	35,8 (CH_2)	1,25 (H-19)
07	1,47 (2H)	27,1 (CH_2)	0,82 (H-17)
08	1,57 (1H)	36,4 (CH)	0,78 (H-20); 2,36 (H-6)
09		38,7 (C_0)	
10	1,40 (1H)	46,4 (CH)	0,78 (H-20); 1,25 (H-19); 2,10-2,24 (H-2)
11	1,60 (2H)	38,5 (CH_2)	0,78 (H-20); 1,40 (H-10)
12	2,26 (2H)	18,0 (CH_2)	1,60 (H-11)
13		125,6 (C_0)	7,20 (H-16)
14	6,25 (1H), dd, J= 1,7; 0,8	111,0 (CH)	7,35 (H-15)
15	7,35 (1H), t, J= 1,7	142,9 (CH)	7,20 (H-16)
16	7,20 (1H), d, J=1,2*	138,4 (CH)	6,25 (H-14); 7,35 (H-15); 2,26 (H-12)
17	0,82 (3H), d, J=6,4	15,8 (CH_3)	0,78 (H-20)
18		168,0 (C_0)	6,60 (H-3); 3,70 (OCH_3)
19	1,25 (3H), s	20,6 (CH_3)	1,20 (H-6); 1,40 (H-10)
20	0,78 (3H), s	18,1 (CH_3)	1,40 (H-10)
OCH_3	3,70 (3H)	51,1 (CH_3)	

* sinais sobrepostos

SUBSTÂNCIA 16.



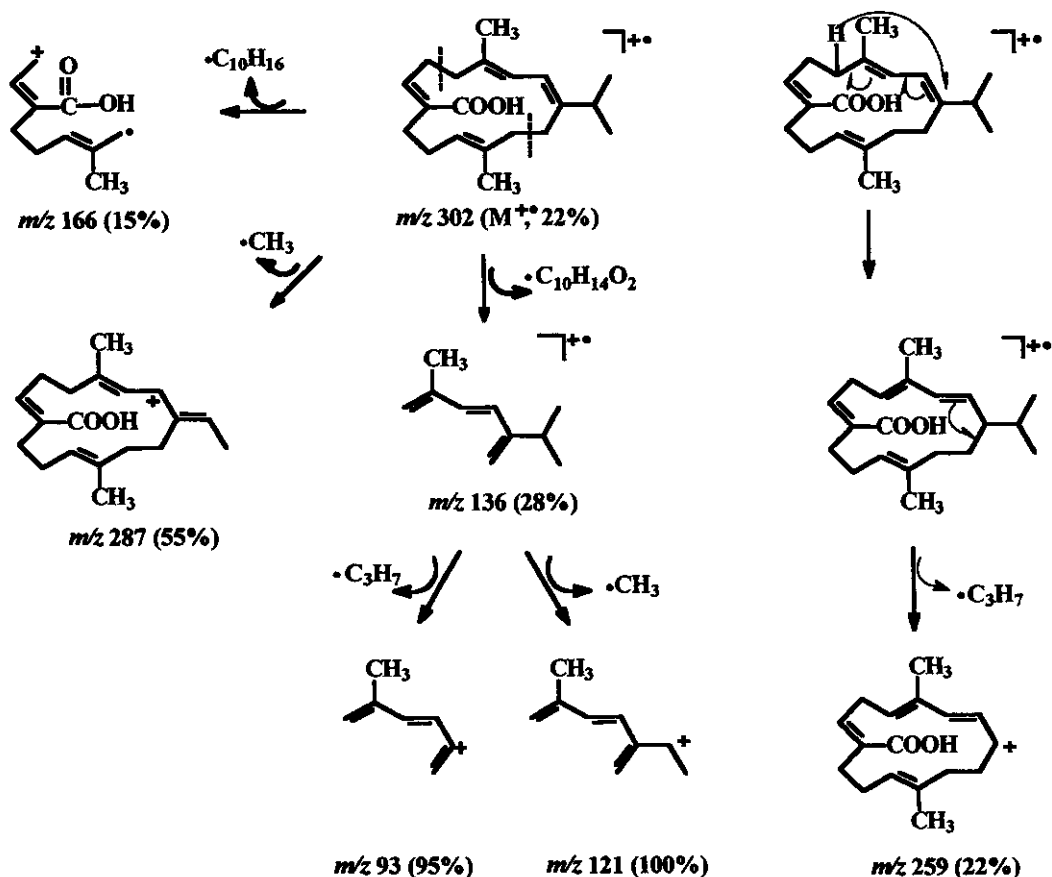
Cromatografia em coluna do extrato EAc1 (Fluxograma 01) com hexano acetato de etila a 10%, forneceu uma substância majoritária na forma de um sólido incolor de ponto de fusão 120°C.

A estrutura proposta para a substância 16, foi baseada nos dados espectroscópicos de UV, IV, EM e, principalmente, nos dados de RMN¹H e RMN¹³C/DEPT e nas correlações ¹H, ¹H e ¹³C, ¹H a uma e a várias ligações observadas nos espectros de RMN 2D.

A absorção no ultravioleta (E 20) em 255 cm⁻¹ foi atribuída à presença de um cromóforo do tipo ácido carboxílico α,β-não saturado.

O espectro de IV (E 21) apresentou bandas intensas características de hidroxilas e carbonilas de ácidos carboxílicos conjugados (3300-2500 e 1687 cm⁻¹).

O espectro de massas (E 22) apresentou íon molecular de *m/z* 302 com intensidade relativa de 22% e fragmentos principais de *m/z* 121 e 93 com intensidade relativas de 100% e 95 %, respectivamente (Esquema IV), consistente com a presença de sistemas não saturados.



Esquema IV. Proposta de fragmentação para a substância 16, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.

O espectro de RMN 1H (E 14) mostrou a presença de sinais correspondentes a quatro hidrogênios ligados ao carbono sp^2 em δ_H 6,04 (1H, d, $J = 11,5$ Hz), δ_H 5,93 (1H, dq, $J = 11,5$ e $0,5$ Hz), δ_H 5,00 (1H, t, $J = 6,4$ Hz), δ_H 5,88 (1H, t, $J = 6,8$ Hz), um grupo isopropila em δ_H 1,05 (6H, d, $J = 6,4$ Hz) e δ_H 2,38 (1H, m), dois grupos metila sobre a ligação dupla em δ_H 1,57 (3H, d, $J < 1$ Hz) e δ_H 1,76 (3H, d, $J < 1$ Hz).

O espectro de RMN ^{13}C (E 15) mostrou sinais para 20 carbonos confirmando a presença de carbonos sp^2 na região de δ_C 118,3 a 148,1 e de carbono carbonílico em δ_C 172,3.

Com base nos dados espectrais discutidos acima, sugeriu-se inicialmente a presença de um esqueleto terpenóide macrocíclico de 14 membros contendo quatro ligações duplas, duas metilas sobre a ligação dupla, um grupo isopropila e uma carbonila α , β - não saturada.

Através da comparação dos dados espectrais com os do cembrano echinol (1) ⁵ foi possível estabelecer a presença de uma unidade dieno conjugada para a substância.

A dificuldade na identificação da estrutura da substância 16 foi referente a determinação da posição das ligações duplas e a dos substituintes. Inicialmente foram propostas três estruturas: 16, 16i e 16ii (figura 10).

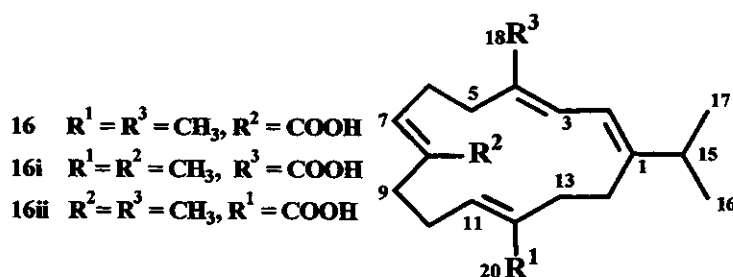


Figura 10. Estruturas proposta para as substâncias 16, 16i, 16ii.

As correlações ^{13}C , 1H a longa distância observadas no espectro de RMN 2D (COLOC, E 19, tabela 03) foram de grande importância na determinação da conexão do grupo isopropila com a unidade dienica. A absorção em δ_C 148,1 atribuída ao C-1, mostra correlação a longa distância com δ_H 1,05 (metilas do grupo isopropila), o C- 15 em δ_C 34,6 mostra correlação com H-2 em δ_H 6,04, e ainda, observa-se a correlação do C-3 em δ_C 121,4 com Me-18 em δ_H 1,76. Essas correlações, aliadas às correlações homonucleares $^1H, ^1H$ (COSY, E 17 15, figura.11) permitiram definir a estrutura da substância como sendo provavelmente a da substância 16.

No entanto a configuração *E*, *Z* da ligação dupla conjugada C-1 e C-3 não era óbvia. Assim, para o estabelecimento inequívoco da estrutura da substância 16, fez-se a análise de difração de Raio X (figura 12), a qual confirmou a configuração *E*, *E* das ligações duplas

conjugadas C-1, C-3 como também, mostrou que o grupo carboxílico está ligado ao carbono C-8 e não ao carbono C-4 ou C-12 como sugerido inicialmente, estabelecendo-se assim a estrutura inequívoca do ácido echinóico (16) como a da substância inédita (1*E*, 3*E*, 7*Z*, 11*E*)-8-carboxi-4,12-dimetil-1-isopropilciclotetradecateno.

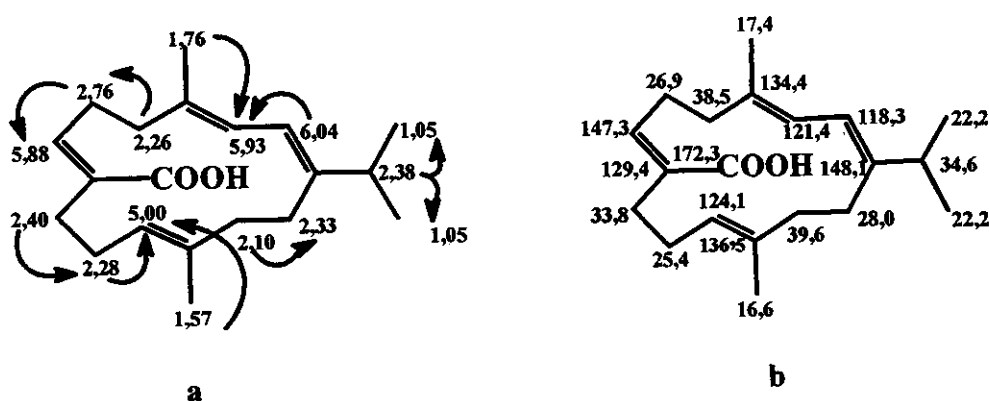


Figura 11. (a) Correlações ^1H , ^1H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), (b) dados de RMN ^{13}C para o ácido echinóico (16).

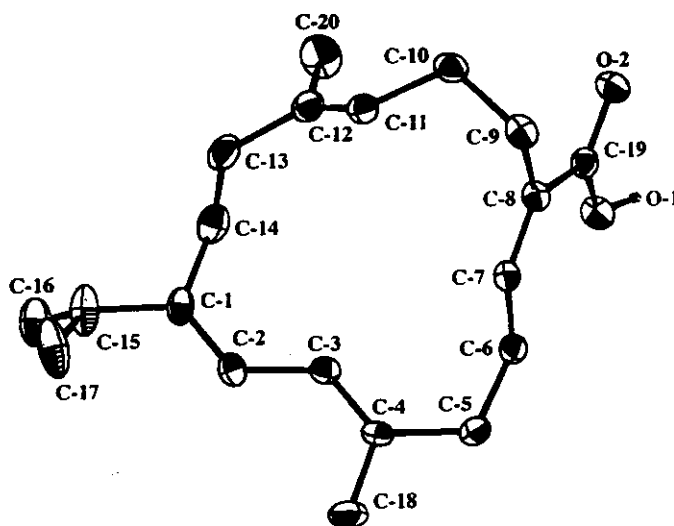
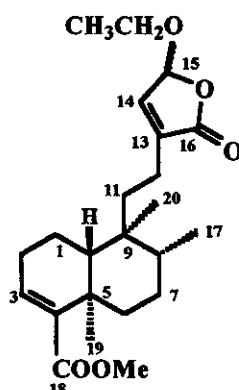


Figura 12. Desenho ORTEP da substância 16 feito a partir dos dados da análise de difração de Raio X.

Tabela 03.Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da substância 16 obtido de RMN 1D e 2D.

Nº	Hidrogênio (δ)	Carbono (δ)	Correlação C-H a longa distância (COLOC)
01		148,1 (C_0)	1,05 (H-17, H-18); 2,10 (H-13)
02	6,04 (1H), d, J= 11,5	118,3 (CH)	
03	5,93 (1H), dq, J= 11,5; <1	121,4 (CH)	1,76 (H-18); 2,26 (H-5)
04		134,4 (C_0)	1,76 (H-18); 2,26 (H-5)
05	2,26 (2H)	38,5(CH_2)	5,88 (H-7); 1,76 (H-18)
06	2,76 (2H), dt, J=6,8; 5,5	26,9 (CH_2)	2,26 (H-5)
07	5,88 (1H), t, J=6,8	147,3 (CH)	2,26 (H-5)
08		129,4 (C_0)	2,40 (H-9); 2,28 (H-10)
09	2,40 (2H)	33,8 (CH_2)	2,28 (H-10)
10	2,28 (2H)	25,4 (CH_2)	2,40 (H-9)
11	5,00 (1H), t, J=6,4)	124,1 (CH)	1,57 (H-20); 2,40 (H-9)
12		136,5 (C_0)	1,57 (H-20)
13	2,10 (2H)	39,6 (CH_2)	2,33 (H-14)
14	2,33 (2H)	28,0 (CH_2)	6,04 (H-2); 2,10 (H-13)
15	2,38 (1H), m	34,6 (CH)	6,04 (H-2); 1,05 (H-16 e H-17)
16	1,05 (3H), d, J=6,4	22,2 (CH_3)	
17	1,05 (3H), d, J=6,4	22,2 (CH_3)	
18	1,76 (3H), d, J<1	17,4 (CH_3)	
19		172,3 (C_0)	5,88 (H-7)
20	1,57 (3H), d, J<1	16,6 (CH_3)	

SUBSTÂNCIA 17a



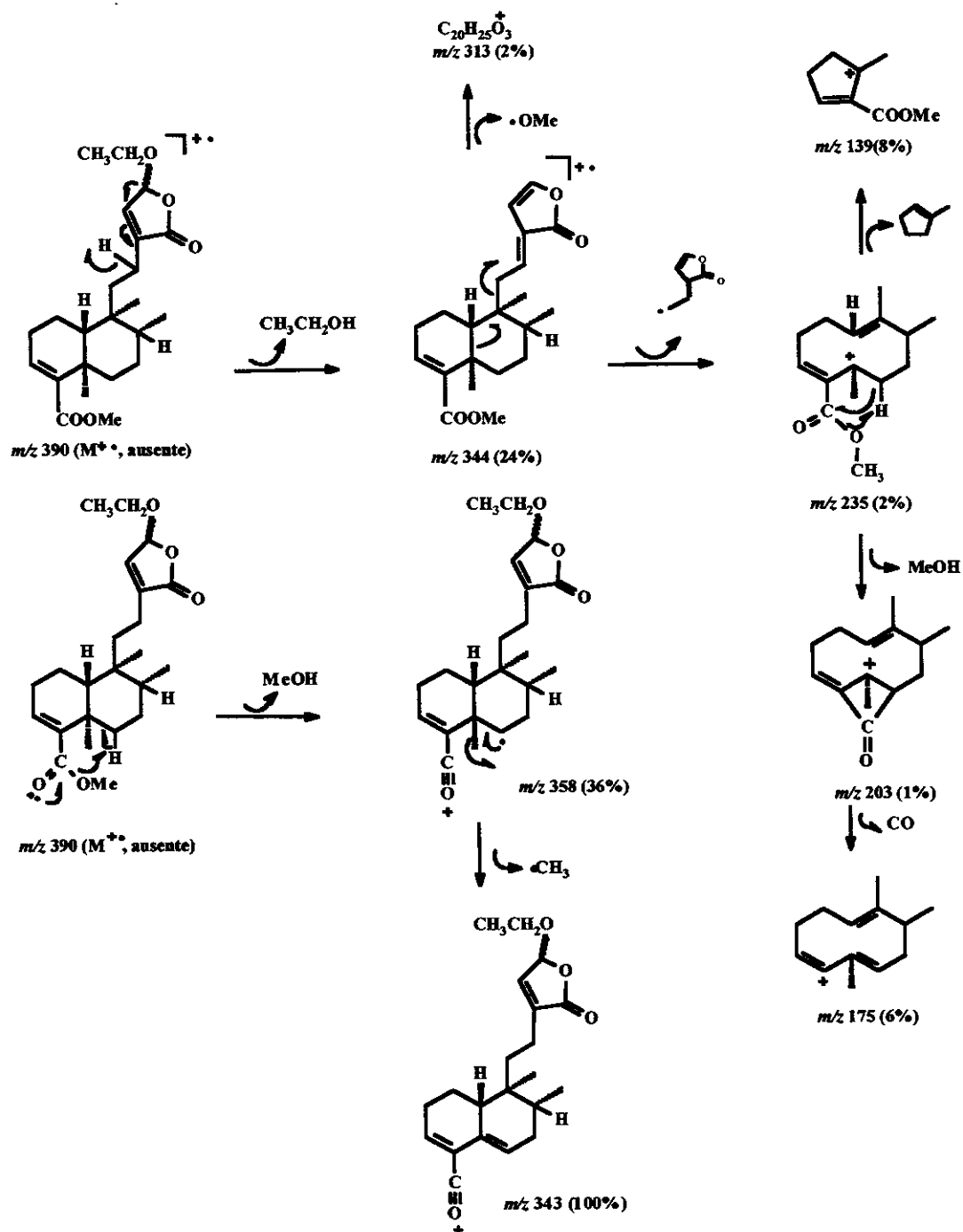
A substância 17a óleo incolor, $\{[\alpha]_D -80,6 \text{ (CHCl}_3, c \text{ 10,0)}\}$ foi obtida do extrato dos pecíolos a partir da fração hexano/acetato de etila 20% submetida à reação com diazometano em éter etílico (Fluxograma 01).

O espectro de massas (E 29) não mostrou o íon molecular e apresentou fragmentos de m/z 358 (49%) formado pela perda de CH_3OH a partir do íon molecular e de m/z 343 (100%), gerado pela perda do radical metila a partir do fragmento de m/z 358 (Esquema V).

A análise dos espectros de RMN ^1H (E 23) e RMN ^{13}C (E 24) mostraram tratar-se de uma mistura epimérica na proporção de (1:1) de derivados clerodânicos possuindo o anel A e B idênticos ao do hardwickicato de metila (14a). A principal diferença espectroscópica entre o clerodano 17a e hardwickicato de metila 14a foi referente aos sinais de RMN para o anel C dos quais serão discutido a seguir.

A presença de um multipeto no espectro de RMN ^1H (E 23) em δ_H 3,95-3,75 e de um tripleto em δ_H 1,30 ($J = 6,0 \text{ Hz}$) correlacionados (HETCOR E 27) aos carbonos em δ_C 66,0 (CH_2) e δ_C 14,9 (CH_3) respectivamente são característicos de um grupo etoxila.

Os sinais de RMN ^1H a δ_H 6,76 (d, $J = 1,2 \text{ Hz}$) e δ_H 5,80 (d, $J = 1,2 \text{ Hz}$) referente aos prótons H-14 e H-15 e os sinais de RMN ^{13}C (atribuídos ao C-13 (δ_C 139,3), C-14 (δ_C 141,6), C-15 (δ_C 101,6) e C-16 (δ_C 171,6) evidenciaram a presença de um fragmento butenolídio com um grupo alquila na posição α . Adicionalmente a correlação ^{13}C , ^1H a longa distância observada no espectro de RMN 2D (HETCOR LD, E. 28, tabela 04.) entre os carbonos em δ_C 139,3 (C-13); 101,6 (C-15) e hidrogênios em δ_H 6,76 (H-14) confirmaram a presença do grupo α -butenolídio.



Esquema V. Proposta de fragmentação para a substância 17a, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.

Uma revisão à literatura, revelou que os dados espectrais de RMN¹H obtidos para a substância 17a (figura 13), coincidem com aqueles discutidos para a substância análoga metoxilada.²⁷

As outras correlações ¹³C, ¹H (HETCOR, E 27 e HETCOR a longa distância (E 28, tabela 04) e correlação homonuclear ¹H, ¹H (COSY, E 26, figura 13) observadas no espectro de RMN 2D auxiliaram na atribuição correta dos sinais dos hidrogênios e carbonos e confirmaram a estrutura sugerida para a substância 17a.

A substância 17a, foi inicialmente considerada artefato devido a utilização do etanol durante a extração da planta. Com o objetivo de analisar melhor este fato, estudo dos extratos de acetato de etila e metanol da planta *E.grandiflorus* foram realizados por CG/EM os quais serão discutidos no capítulo I.3.2.

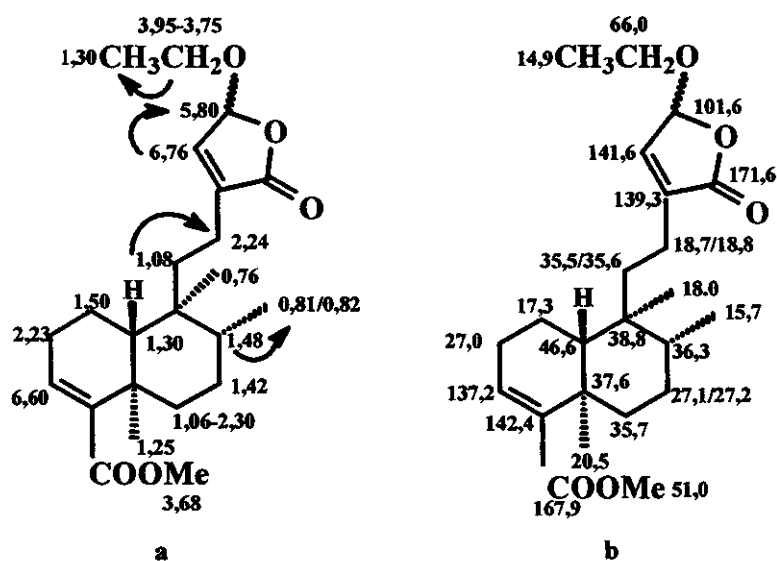


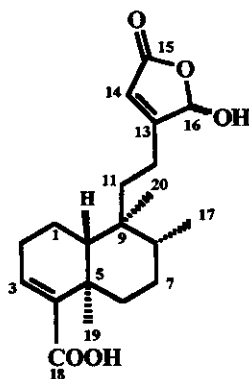
Figura 13. (a) Correlações ¹H, ¹H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), b) dados de RMN ¹³C para o clerodano 17a.

Tabela 04. Deslocamentos Químicos de ^1H , ^{13}C , da substância 17a obtido de RMN 1D e 2D.

Nº	Hidrogênio (δ)	Carbono (δ)	Correlação C-H a longa distância (HETCOR)
01	1,50 (2H)	17,3 (CH_2)	1,30 (H-10)
02	2,23 (2H)	27,0 (CH_2)	1,30 (H-10)
03	6,60 (1H), t, J=3,6	137,2 (CH)	
04		142,4 (C_0)	1,25 (H-19)
05		37,6 (C_0)	1,25 (H-19), 2,30 (H-6)
06	1,06 (1H); 2,30 (1H)	35,7 (CH_2)	1,25 (H-19)
07	1,42 (2H)	27,1/27,2 (CH_2)*	0,81/0,82 (H-17)
08	1,48 (1H)	36,3 (CH)	0,76 (H-20)
09		38,8 (C_0)	0,76 (H-20)
10	1,30 (1H)	46,6 (CH)	2,23 (H-2)
11	1,08 (2H), m	35,5/35,6 (CH_2)*	0,76 (H-20)
12	2,24 (2H)	18,7/18,8 (CH_2)*	
13		139,3 (C_0)	2,24 (H-12); 6,76 (H-14)
14	6,76 (1H), d, J=1,2	141,6 (CH)	2,24 (H-12)
15	5,80 (1H), d, J=1,2	101,6 (CH)	
16		171,6 (C_0)	6,76 (H-14)
17	0,82/0,81 (3H), d, J=6,1*	15,7 (CH_3)	
18		167,9 (C_0)	6,60 (H-3); 3,68 (OCH_3)
19	1,25 (3H), s	20,5 (CH_3)	
20	0,76 (3H), s	18,0 (CH_3)	
OCH_3	3,68 (3H)	51,0 (CH_3)	
OCH_2CH_3	3,95-3,75 (2H); 1,30 (3H), t, J= 6,0	66,02 (CH_2); 14,9 (CH_3)	

* com asterisco os sinais duplicados que evidenciam a mistura epimérica no C-15.

SSUBSTÂNCIA 18



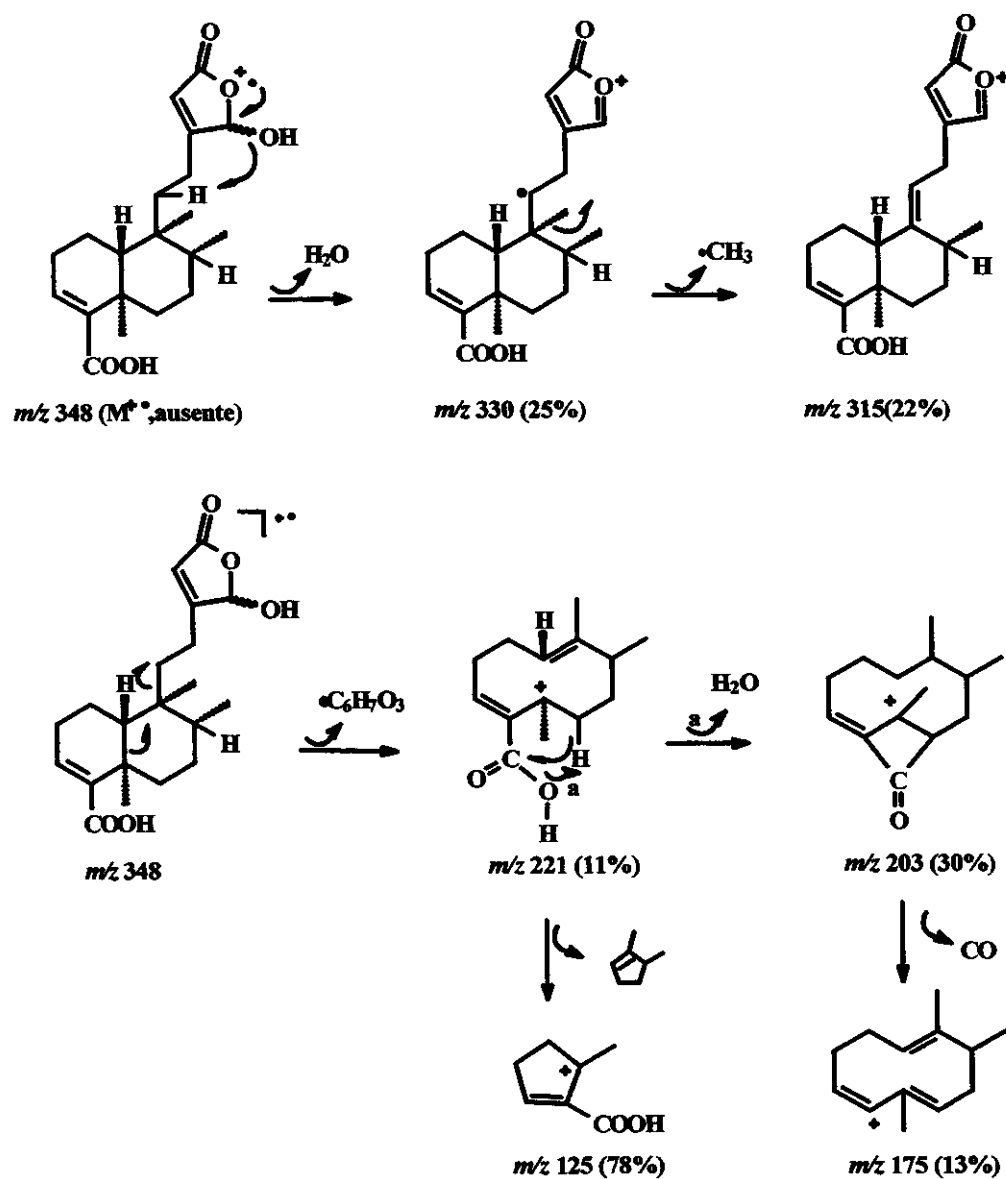
A substância **18**, {[α]_D -39,4⁰ (acetona, *c* 4,9); pf 164-167⁰C} foi isolada como componente minoritária de folhas e de pecíolos, a partir de colunas cromatográficas da fração hexano-acetato de etila 50%. (Fluxogramas 01 e 02)

O espectro de IV (E 35) apresentou uma banda de absorção larga na região de 3300-2500 cm⁻¹ e uma banda forte em 1681 cm⁻¹ sugerindo a presença de um grupo carbonila conjugada.

O espectro de massa (E 36) não apresentou o íon molecular, mostrou fragmento de *m/z* 330 com intensidade de 25% correspondendo a perda de molécula neutra de H₂O a partir do íon molecular e ainda fragmentos de *m/z* 221 (11%), 220 (4%), 125 (78%) (esquema VI).

O espectro de RMN¹H (E. 30) de **18** apresentou perfil semelhante ao do clerodano **17a**, com diferenças nos deslocamentos químicos dos prótons do grupo butenolídio, os quais absorvem em δ_H 5,93 (H-14) e δ_H 6,11 (H-16) para **18** e em δ_H 6,76 (H-14) e δ_H 5,80 (H-15), no caso da substância **17a**. Estes dados indicaram que em **18**, o grupo butenolídio encontra-se substituído na posição β . Isto foi evidenciado pelos sinais em δ_C 117,5/117,6; 171,7/171,8 e 100,0/100,1, correspondentes aos carbonos C-14, C-15 e C-16 no espectro de RMN¹³C, os quais se encontram duplicados pelo fato de **18** se uma mistura de epímeros no C-16.

A comparação dos sinais de RMN¹³C (E 31) obtidos para o clerodano **18** com os da literatura para a substância **30**²⁸ (figura 14), confirmaram a presença do grupo β -butenolídio. Os dados de correlação ¹H,¹H (COSY, E 33, figura 14) e ¹³C, ¹H (HETCOR, E 34) de RMN 2D confirmaram a estrutura do clerodano **18** inédito.



Esquema VI. Proposta de fragmentação para a substância 18, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas

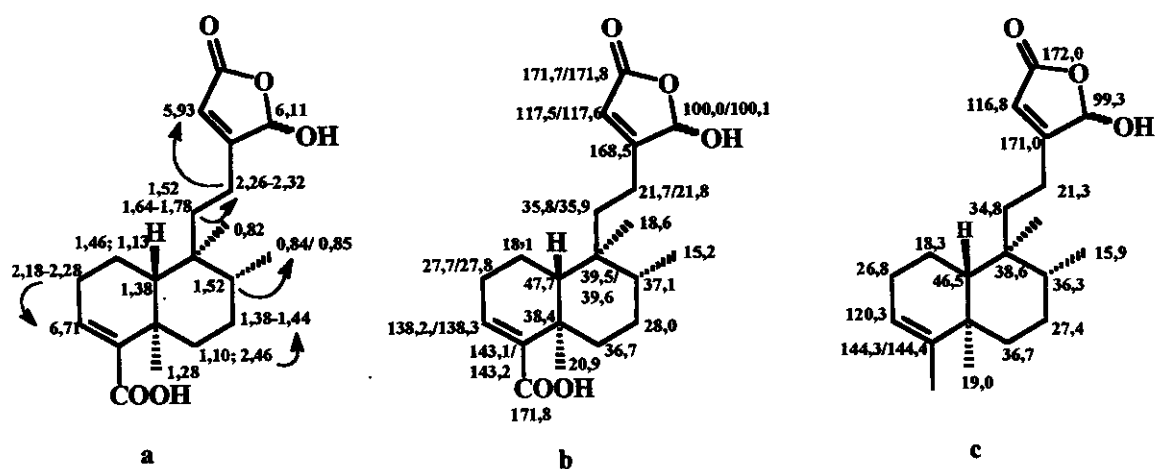


Figura 14. (a) Correlações ^1H , ^1H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), (b) deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para a substância 18, (c) deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para a substância 30.²⁸

A determinação da configuração absoluta do novo clerodano 18 por difração de raio X não foi possível pela qualidade do cristal e instabilidade da substância. A comparação da rotação ótica de alguns derivados clerodânicos²⁸ tem indicado que dentro da mesma série enantiomérica, o sinal da rotação ótica depende dos substituintes presentes na molécula.(figura 15).

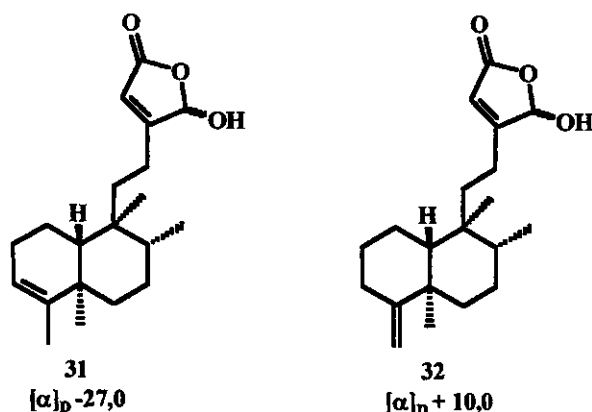
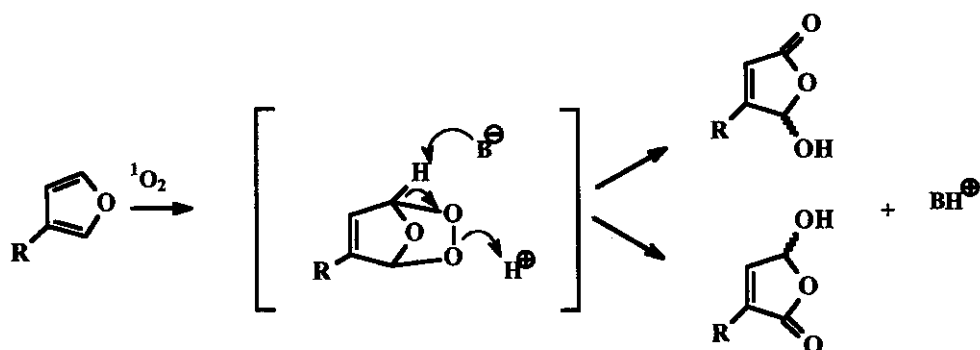


Figura 15. Rotação ótica de clerodanos da mesma série enantiomérica.²⁸

Assim, para estabelecer de forma inequívoca a configuração absoluta da substância **18**, propôs-se a síntese do padrão homoquiral a partir de um material de configuração absoluta conhecida e comparação dos dados de rotação ótica do produto obtido com os da substância natural **18**.

A metodologia para esta proposta foi a fotooxigenação regioseletiva do anel furano desenvolvida por Kernam e Faulkner²⁹ e otimizada pelo grupo do Prof. Dr. Paulo Imamura.²⁶ Esta metodologia baseia-se no emprego de rosa de bengala como catalisador em solução de CH₂Cl₂ na presença de uma base volumosa como 2,2,6,6-tetrametilpiperidina ou diisopropiletilamina (DIPEA) para a decomposição do endoperóxido formado (Esquema VII). O uso de uma base impedida tem como objetivo o aumento na regioseletividade da reação, uma vez que a decomposição do endoperóxido formado pode também levar à formação de α-butenolídio.



Esquema VII. Fotooxigenação regioseletiva do anel furano.²⁹

Em nosso trabalho, visualizamos o (-)-ácido hardwickico (14), de configuração absoluta conhecida e isolado a partir dos extratos etanólicos das folhas de *E. grandiflorus*, como material para a síntese do produto natural 18.

Assim a fração D.1 (43-50) contendo (-)-ácido hardwickico foi submetida a coluna cromatográfica utilizando-se gradiente de hexano/acetato de etila como eluente, isolando-se 200,0mg do (-)-ácido hardwickico (14), o qual foi submetido à reação de fotooxigenação, por 2,5h, mantendo-se o fluxo de oxigênio e a exposição à luz durante todo o período da reação utilizando o sistema mostrado na figura 16.

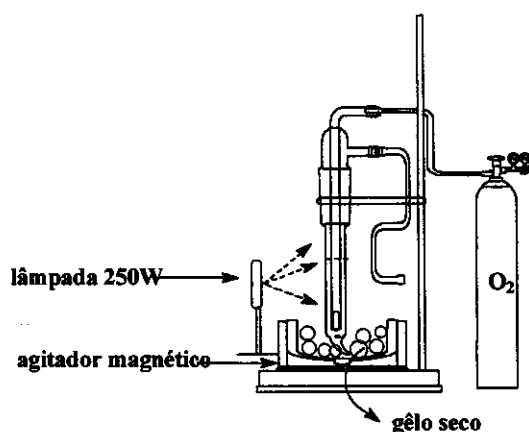


Figura 16. Sistema para a reação de fotooxigenação do (-)-ácido hardwickico (14).

A análise da reação por CCD, mostrou a presença de uma substância majoritária, mais polar. A análise da mistura reacional metilada, por GC/EM (figura 17a) revelou que o substrato foi consumido levando à formação de **18** e do provável **18.1** numa proporção de (10:1), substâncias estas identificadas pela presença do íon molecular de m/z 362 (E 36.1) e de m/z 360 (figura 17b) nos seus respectivos espectros de massas.

Após a purificação da mistura reacional obteve-se o produto natural (-)-**18**, com 3,8% de rendimento. O espectros de RMN¹H e RMN¹³C/DEPT (figura 18) da substância obtida mostraram-se idênticos ao do produto natural **18**. A rotação ótica da substância isolada ($\alpha_D - 36,4^0$) e o do produto sintético ($\alpha_D - 57,4^0$) resultante da fotooxigenação do (-)-ácido hardwickico, apresentaram o mesmo sinal negativo.

A diferença nos valores da rotação ótica pode ser atribuída a uma composição epimérica distinta no produto natural e no produto sintético.

Alternativamente uma variação nos excessos enantioméricos dos produtos naturais (-) **14** e (-) **18** poderiam ser a causa do desvio.

Este último comentário fundamenta-se no conhecimento de que algumas plantas produzem ambos enantiômeros.¹⁹

Assim o presente estudo teria sido completado com a comparação dos excessos enantioméricos das substâncias isoladas. Entretanto esta parte não foi investigada sendo postergado para trabalhos futuros.

Todas as considerações acima não invalidam entretanto a determinação da configuração absoluta da substância (-)-**18**.

Durante a purificação da reação e análise por CCD das frações cromatografadas observamos a presença de outras substâncias, este fato, sugere que o rendimento baixo obtido para o produto natural (-)-**18**, ocorre devido a decomposição do mesmo no processo de purificação.

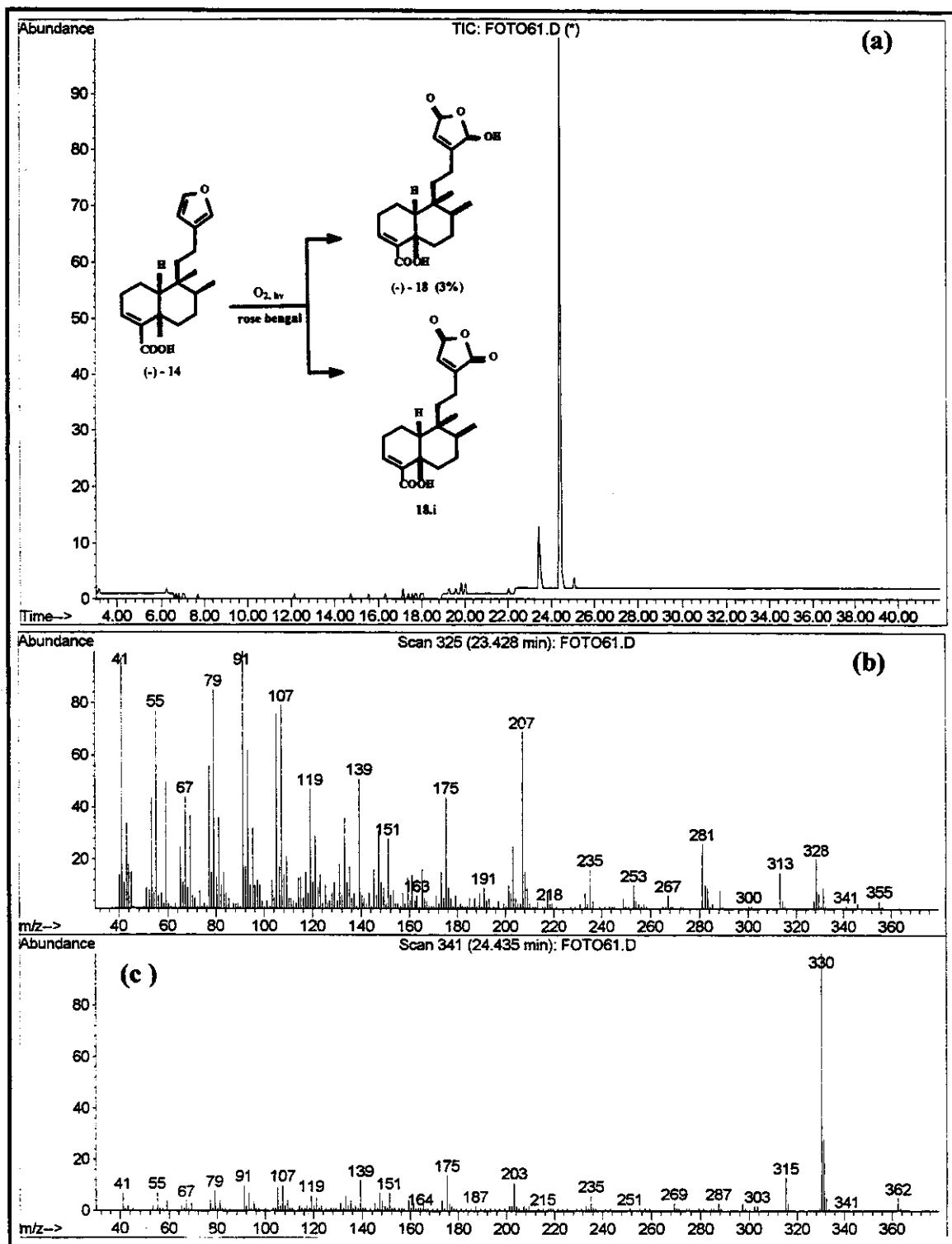


Figura 17. (a) Cromatograma (CG/EM) e produtos da fotooxigenação regioseletiva de (-)-14. (b) Espectro de massas da substância 18.1 (éster metílico). (c) Espectro de massas da substância 18a (éster metílico).

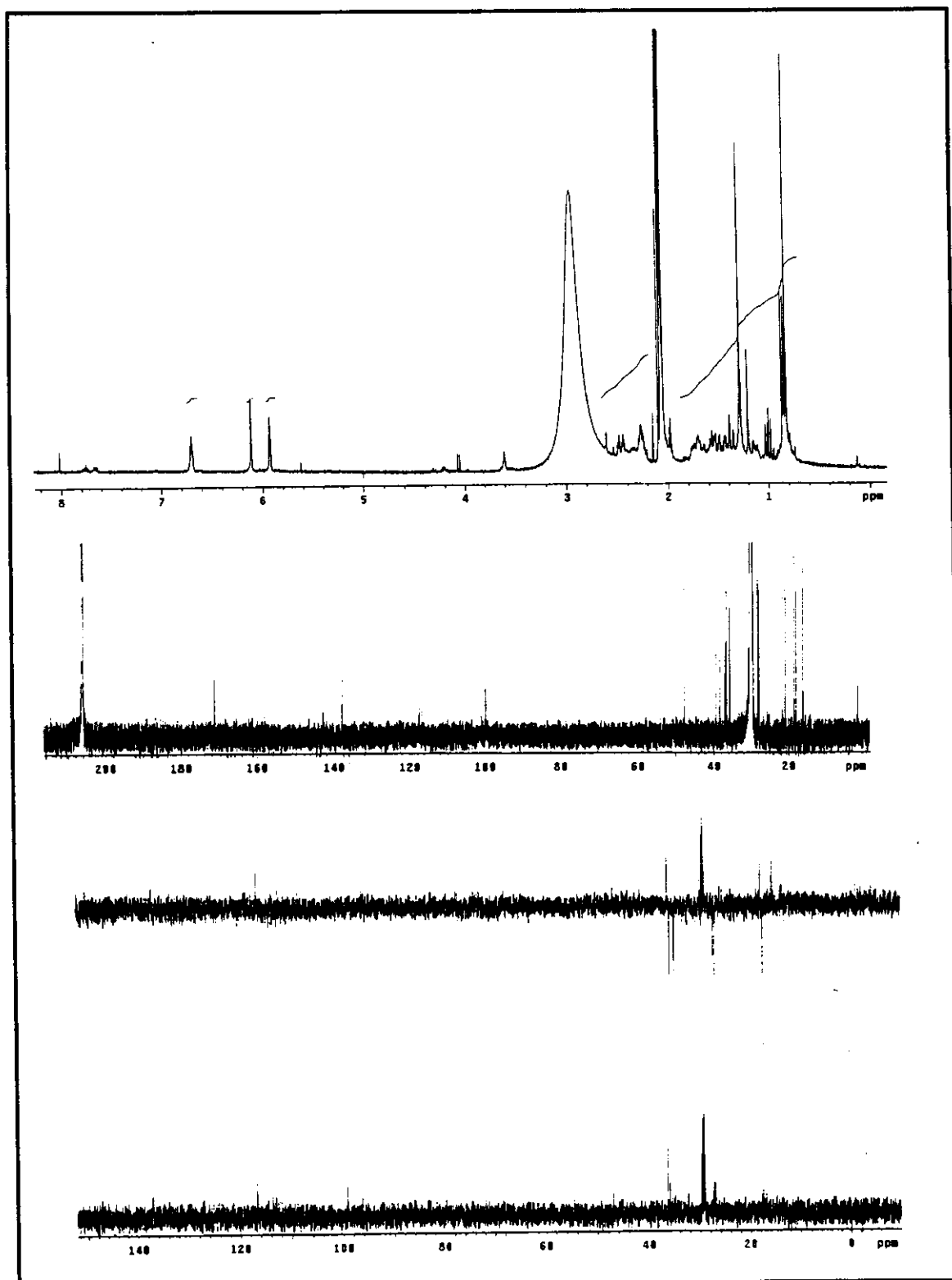
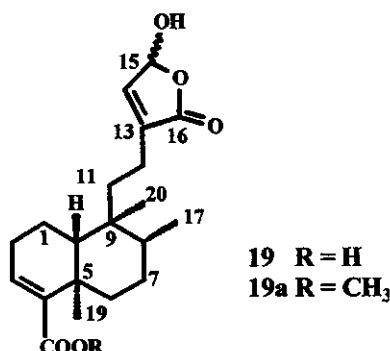


Figura 18. Espectros e RMN^1H e de $\text{RMN}^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ da substância (-) 18 obtido por fotooxigenação regioseletiva do ácido hardwickico.

SUBSTÂNCIA 19



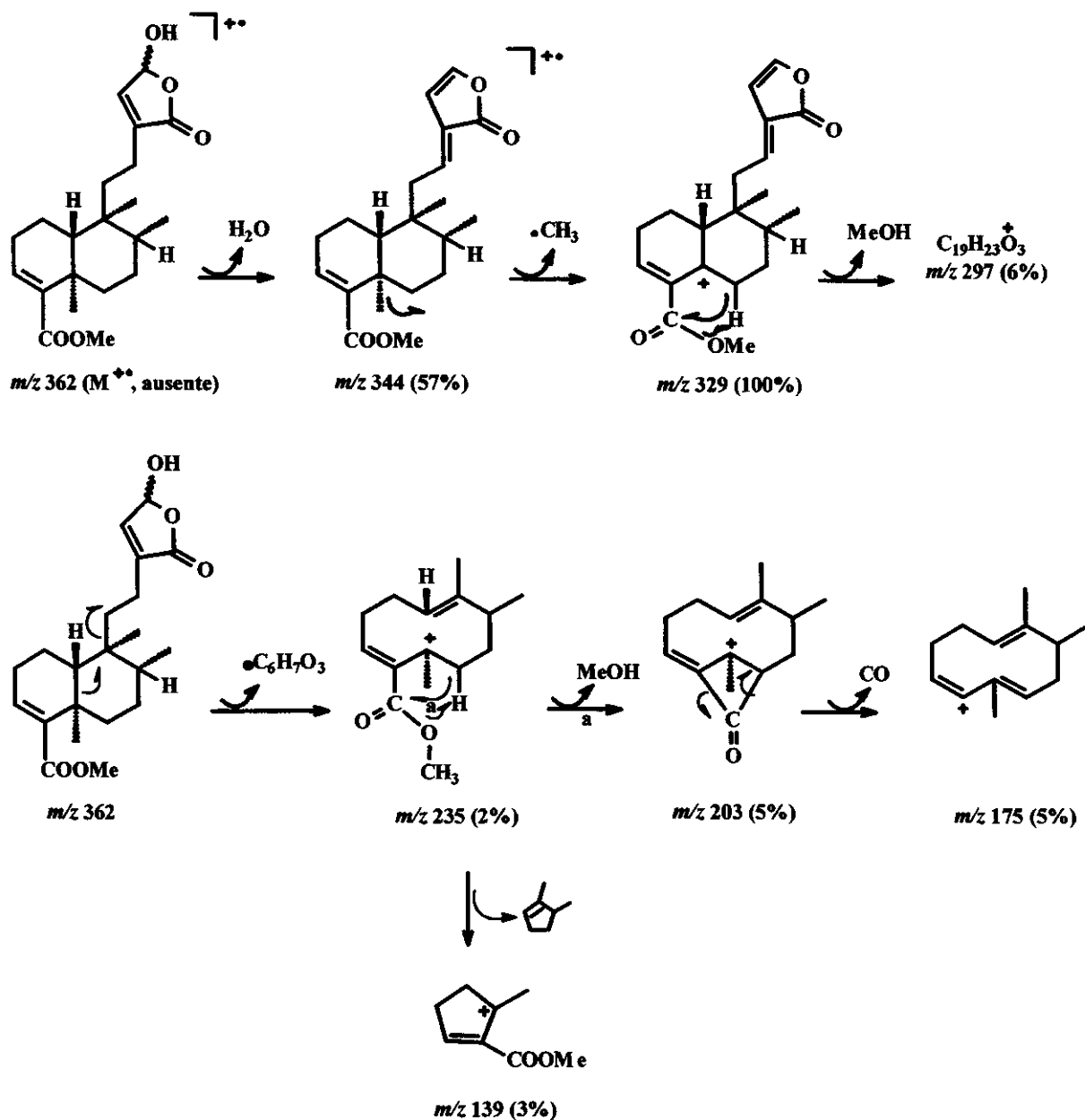
Clerodano **19**, foi isolado a partir da fração eluída com hexano acetato de etila 50% obtido da coluna cromatográfica do extrato EAc1 dos pecíolos (fluxograma 01).

O espectro de massas na forma metilada (E 42) não apresentou o íon molecular, apresentou fragmentos de m/z 344 (100%) e 329 (57%) originados pela perda de uma molécula neutra de H₂O e subsequente perda de radical metila a partir do íon molecular (Esquema VIII).

Pela análise dos dados de RMN¹H (E 37), RMN¹³C (E 38) e das correlações ¹H, ¹³C inferidas a partir do espectro de RMN 2D (HETCOR, E 41), observamos que a substância **19** apresentava todas as unidades estruturais já identificadas na substância **17a**, tendo como diferença fundamental a presença do grupo hidroxila, para a substância **19**, no lugar do grupo etoxila na substância **17a**.

O espectro de RMN¹H (E 37) exibiu sistemas muito semelhantes àqueles do clerodano **17a**, com exceção dos dois hidrogênios H-3 e H-14 que absorvem como singletos largos em δ_H 6,84, com integração correspondente a dois prótons, e do H-15 a δ_H 6,11 mais desprotegidos que aos correspondentes na substância **17a**.

Os espectros de RMN¹³C/DEPT (E 38 e 39) apresentaram absorções características de butenolídio α -substituído em δ_C 138,8; 140,6 e 97,2 atribuídos aos carbonos C-13, C-14 e C-15, respectivamente. Já para a substância **17a**, os valores dos deslocamentos químicos foram os seguintes: para C-13 (δ_C 139,3), C-14 (δ_C 141,6) e C – 15 (δ_C 101,6). Os demais deslocamentos químicos observados para os carbonos da substância **19** apresentaram valores muito próximos aos da substância **17a**.



Esquema VIII. Proposta de fragmentação para a substância 19, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.

Estas observações, e a análise das correlações de ^1H , ^1H a partir do espectro de RMN 2D (COSY E 40, figura 19), permitiram a completa atribuição dos sinais de hidrogênios e carbonos e confirmaram a estrutura sugerida para a substância 19.

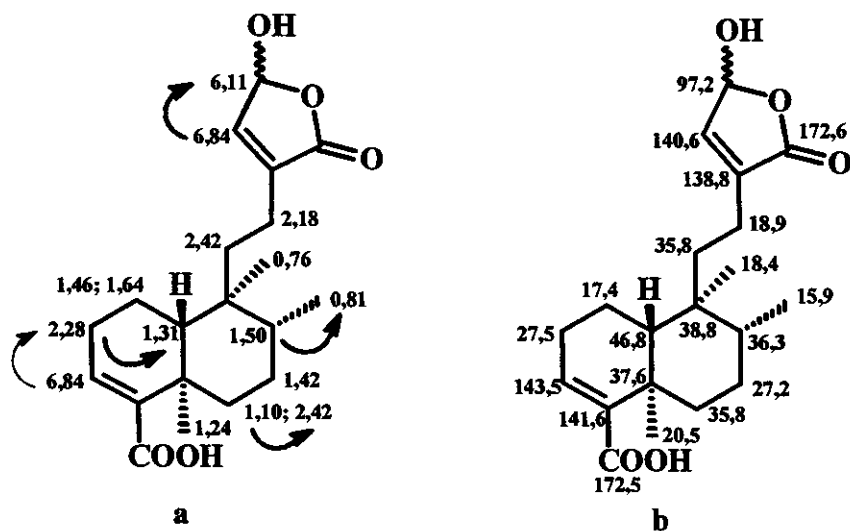
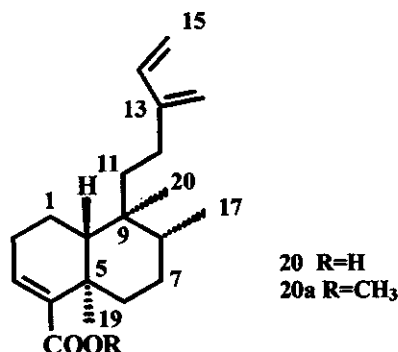


Figura 19. (a) Correlações ^1H , ^1H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), (b) dados de RMN ^{13}C para a substância 19.

SUBSTÂNCIA 20



A substância **20** foi detectada inicialmente na mistura das substâncias **16** e **20** eluída da coluna cromatográfica do extrato EAc1 dos pecíolos (fluxograma 01).

Os dados espectroscópicos de RMN¹H e ¹³C da mistura, mostraram a presença de duas substâncias com deslocamentos químicos distintos, uma delas contendo sistema semelhante aos do derivados clerodânicos. A comparação destes com os dados de RMN¹H e ¹³C das substâncias discutidas anteriormente, possibilitou a identificação de um dos componentes da mistura como sendo a substância **16**. Após a atribuição dos sinais da substância **16** foi possível propor a estrutura para a substância **20**, conforme discutido a seguir.

Os espectros de RMN¹H e RMN¹³C mostraram tratar-se de derivado clerodânico com os anéis A e B com fusão *trans* idênticas à das substâncias **14a**, **17a**, **18** e **19**, não apresentando, no entanto, sinais característicos dos grupos hidroxi-lactona ou do anel furânico. Observaram-se deslocamentos químicos de RMN ¹³C e RMN ¹H característicos de duas duplas terminais em [δ_C 115,6 (δ_H 5,00, 2H)] e [δ_C 113,0 (δ_H 5,16, 1H, dd, $J=17,5$; <1 Hz); (δ_H 5,20, 1H, dd, $J=10,8$; <1 Hz)].

A purificação da substância **20** não foi possível devido a sua rápida decomposição. A instabilidade da substância foi atribuída à presença de duplas terminais muito reativas na molécula.

Diante da dificuldade em isolar a substância na forma de dieno, optou-se em transformar a substância **20** em um derivado mais estável antes de submeter o extrato bruto ao

processo de isolamento. Assim, duas metodologias foram propostas na tentativa de isolamento da substância **20**: a) a reação com $\text{Fe}_2(\text{CO})_9$ ou $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$, e b) a reação com SO_2 .

Dienos conjugados como o butadieno e seus análogos de cadeia aberta, podem formar complexos com compostos organometálicos atuando como ligantes η^4 ³⁰. Tais complexos, são preparados a partir de complexos de ferro carbonila como o $\text{Fe}(\text{CO})_5$, $\text{Fe}_2(\text{CO})_9$ ou $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$ por substituição direta de dois CO por uma unidade diênica como a do mirceno (figura 20).

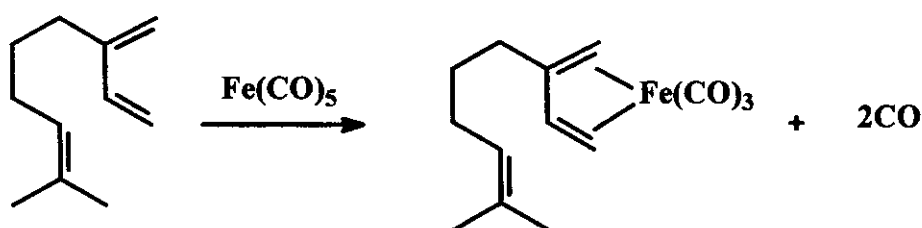


Figura 20. Complexo dieno tricarbonila de ferro do mirceno.

Os complexos dieno tricarbonila de ferro são sólidos coloridos estáveis facilmente identificados por cromatografia de camada delgada pela visualização da cor característica dos mesmos. Estas características do complexo poderiam facilitar o isolamento da substância **20** a partir do extrato bruto e/ou da fração contendo a substância **20** ao submetê-los à reação com $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$.

Assim, inicialmente realizamos a reação de complexação segundo a metodologia descrita por W. McFarlane e colaboradores³¹ utilizando o mirceno como reação modelo (figura 20). Ao aplicarmos a reação bruta em cromatografia de camada delgada não observamos a eluição da substância colorida, mas sim a formação de produto que ficava na origem da placa cromatográfica atribuída à decomposição do mirceno.

Apesar do insucesso obtido na reação do mirceno com $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$, resolvemos testar a reação com o extrato bruto, levando em consideração que provavelmente a metodologia utilizada não seria adequada para o mirceno.

Assim, nova coleta da planta foi realizada em janeiro de 1998. Os pecíolos e as folhas foram separadas e extraídas com metanol obtendo-se os extratos EM_p e EM_f dos pecíolos e folhas, respectivamente.

O extrato EM_p (500,0 mg) foi levado a reagir com $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$ em octano sob refluxo durante 20 min. Observou-se que a cor do meio reacional mudou de verde para marrom. Observou-se também, um composto com a coloração amarelada quando da aplicação da reação bruta em CCD, a qual poderia ser um indício da presença do complexo ferro carbonila. No entanto, ao separarmos a substância apresentando uma faixa amarela em CCP constatamos que a mesma não se tratava da substância **20**. O não isolamento da substância **20** na forma de dieno tricarbonila de ferro utilizando a metodologia descrita acima, foi atribuído à decomposição do dieno **20** presente no extrato, pela observação da formação de um material sólido escuro e insolúvel, no meio reacional. Assim o produto teria um comportamento análogo ao do mirceno.

A segunda metodologia referiu-se a reação de adição de SO_2 à unidade dieno conjugada formando 2,5-di-hidro-tiofeno 1,1-dióxido (sulfoleno), uma reação de cicloadição quelotrópica conhecida desde 1914.³²

Assim, realizamos a reação com SO_2 ³³, utilizando inicialmente o mirceno como reação modelo. Após a separação por CC do produto obtido, os dados de RMN^1H e $\text{RMN}^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ mostraram sinais referentes a hidrogênios metilênicos ligados aos carbonos adjacentes ao átomo de enxofre em [δ_{H} 3,68; 3,79 (δ_{C} 56,9; 57,8)] (figura 21), indicando a formação do sulfoleno **33**.

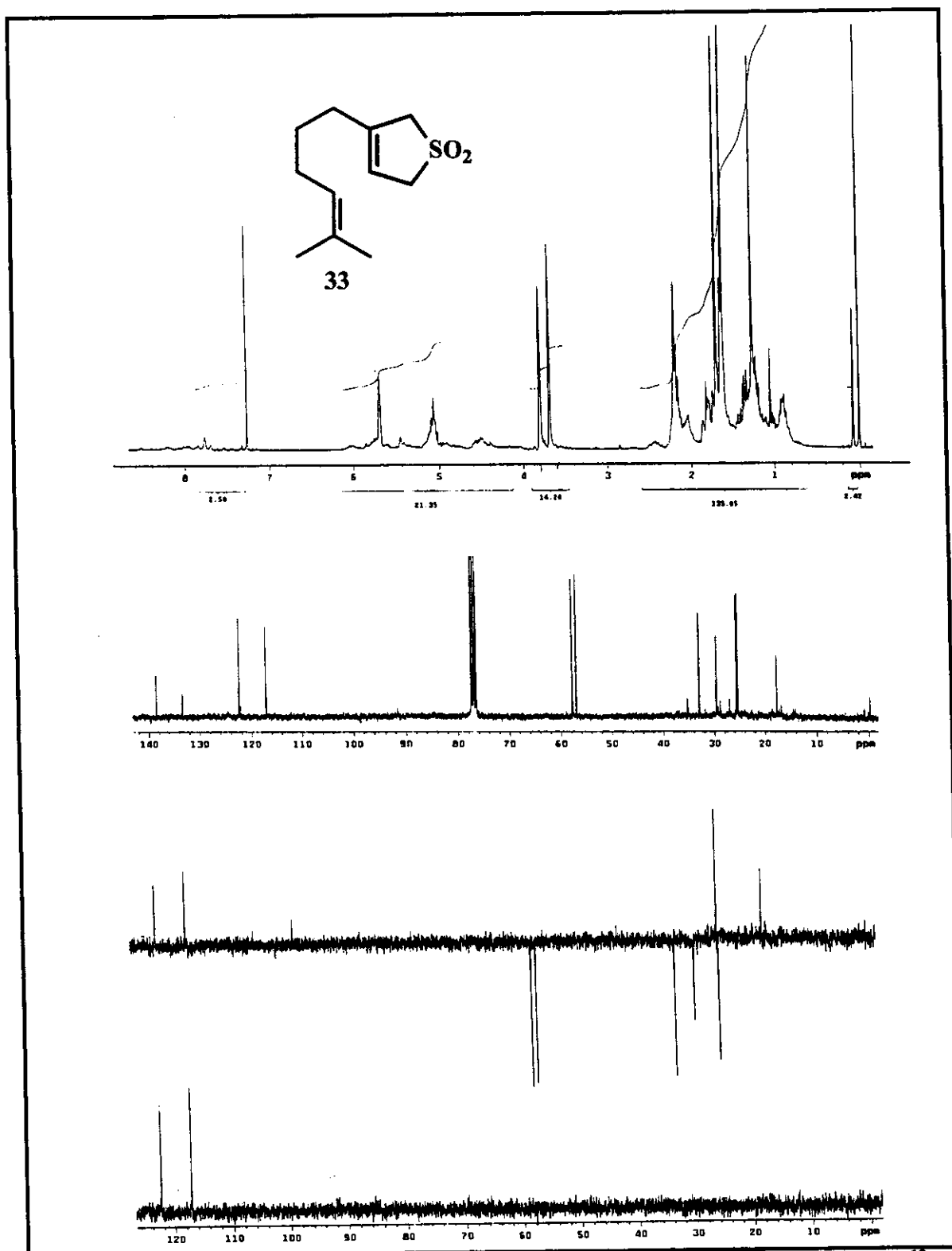


Figura 21. Espectros de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) e RMN ¹³C/DEPT (75,5 MHz, DCCl₃) da substância 33.

Com esse resultado o extrato EM_P foi submetido a um pré fracionamento e identificou-se por RMN¹H a fração contendo a substância **20** (denominada como F-20) com base na observação da presença de sinais na região de prótons olefinicos terminais. A fração F-20 foi levada a reagir com SO₂ gasoso, sob pressão, durante 6h, a -55°C. No entanto, não foi possível a separação do produto obtido pois o mesmo apresentou o mesmo R_f de várias outras substâncias presente na fração.

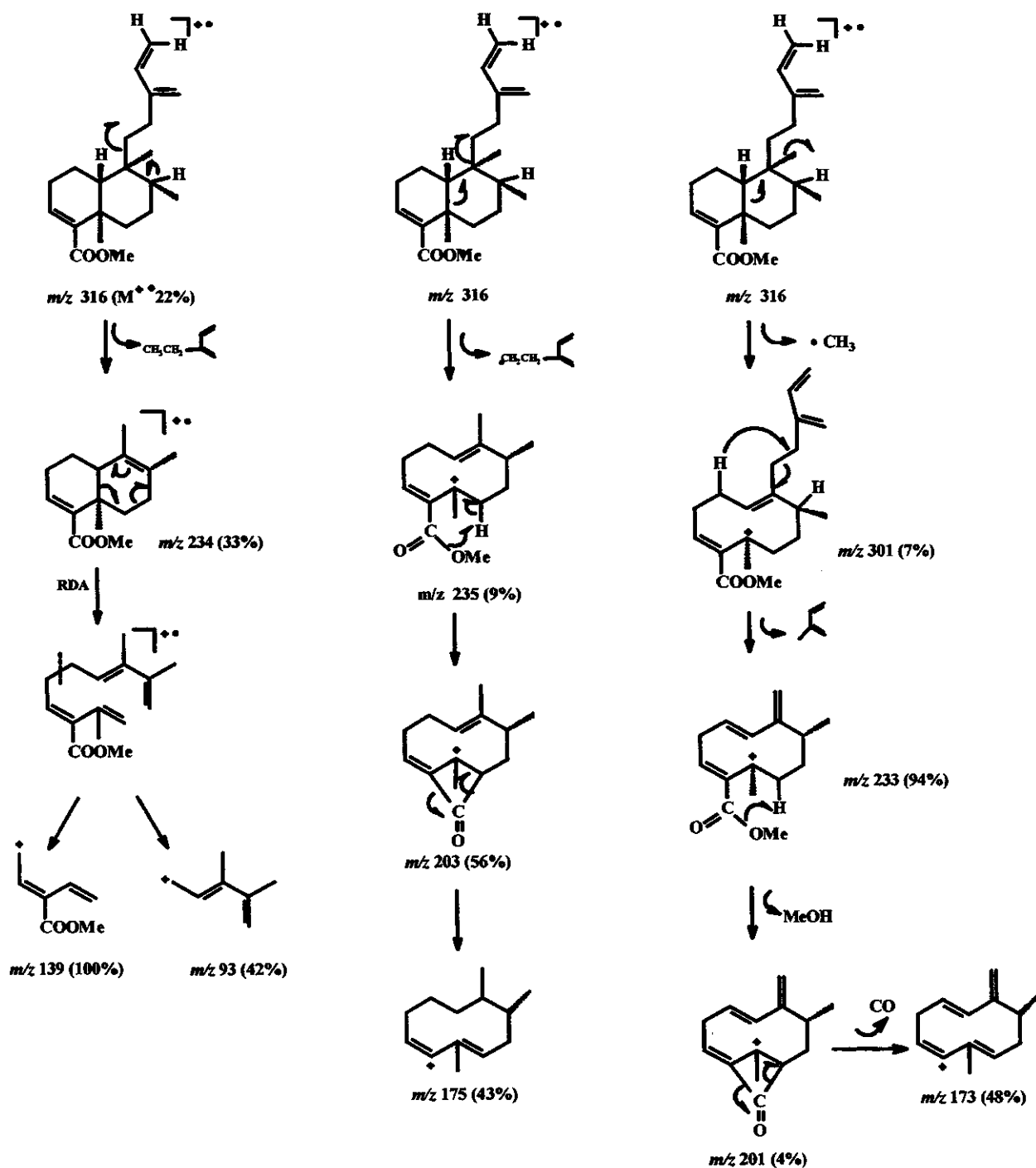
Numa nova tentativa de isolamento da substância **20** tratou-se a fração F-20 com diazometano em éter etílico, e observou-se que a substância na sua forma metilada não sofria decomposição quando submetida à cromatografia de placa preparativa preparada com AgNO₃. Assim, após a otimização das condições (AgNO₃ a 10%; eluente benzeno/acetato de etila a 2%.) isolou-se a substância **20** na sua forma metilada.

O espectro de IV (E 49) mostrou a presença de um grupo carbonílico em 1715,8 cm⁻¹. O espectro de massas de alta resolução (E 50) apresentou um íon molecular de m/z 316,240293 compatível com a fórmula molecular C₂₁H₃₂O₂ (valor calculado 316,25405), apresentando principais fragmentos de m/z .139 (100) e 233 (94), correspondendo aos íons [C₈H₁₁O₂]⁺ e [C₁₅H₂₁O₂]⁺, respectivamente (esquema IX).

Por análise do espectro de RMN¹H (E.43) observamos sinais que indicavam a presença de duas duplas terminais os quais apresentaram-se como um duplo dubleto em δ_H 5,05 (1H, J = 10,5 Hz e 0,5 Hz) e outro em δ_H 5,20 (1H, J= 17,5 Hz e 0,5 Hz) atribuídos aos hidrogênios H-15a e H-15b, respectivamente. Um dubleto em δ_H 4,98 (2H, J = 6,5 Hz.) atribuído ao hidrogênio H-16, um duplo dubleto em δ_H 6,37 (1H, J = 11,5 e 17,5 Hz) atribuído ao hidrogênio H-14. Observou-se, ainda, sinais de três grupos metila característicos do esqueleto clerodânico a δ_H 0,81 (3H d, J= 6,3 Hz), δ_H 0,74 (3H, s), δ_H 1,26 (3H, s) e sinal de grupo metoxila em δ_H 3,70.

Os sinais referentes aos carbonos sp² observados no espectro de RMN¹³C em δ_C 112,9 (CH₂), δ_C 115,6 (CH₂), δ_C 139,0 (CH) e δ_C 147,3(C₀) confirmaram a presença do dieno na molécula.

Essas informações, juntamente com os dados de correlações ¹H, ¹H e ¹³C, ¹H observadas no espectro de RMN 2D (COSY, E. 46 figura.22a, HSQC, E. 47.e HMBC, E 48, tabela 05)



Esquema IX. Proposta de fragmentação para a substância 20a, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.

permitiram a completa atribuição dos sinais dos hidrogênio e carbono e confirmar a estrutura sugerida para a substância inédita **20a**, na forma metilada.

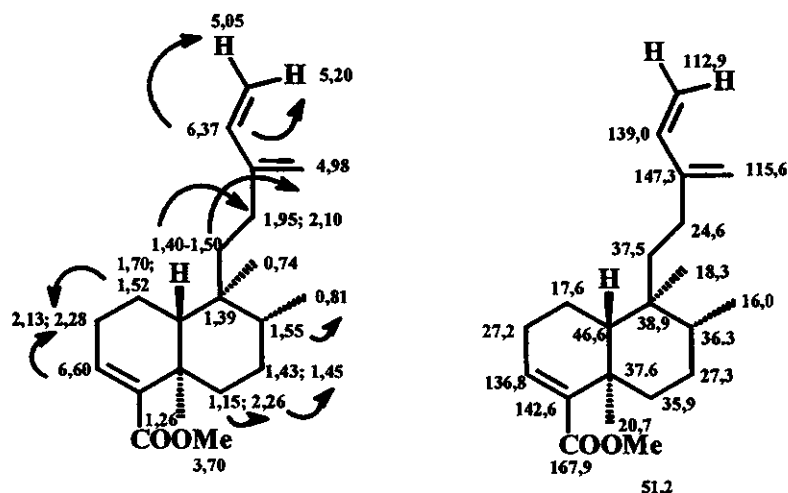


Figura 22. (a) Correlações ^1H , ^1H observadas no espectro de RMN 2D (COSY), (b) deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para a substância **20a**.

A partir de uma consulta à literatura, encontramos o isolamento de uma substância análoga com a fusão dos anéis A/B *cis*. Conforme discutido para o hardwickato de metila (**14a**) (página 16) os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de metilas da série dos clerodanos, em especial a metila C-19 são úteis para distinguir entre os diterpenos clerodânicos com junção dos anéis *cis* e *trans*. A metila C-19 de clerodano *cis* absorve na região de δ_{C} 25,0 enquanto que a do clerodano *trans*, na região entre δ_{C} 11,0 a 19,0.

A comparação dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C obtidos para a substância isolada na forma metilada **20a** com os da literatura para as substâncias na forma de ester **20.1a**³⁴ e na forma ácida **20.1**³⁵ (com fusão dos anéis A/B *cis*) mostraram uma proteção no C-19 de aproximadamente 12 ppm (tabela 06) para a substância **20a**, confirmando a fusão *trans* dos anéis A/B. Os demais deslocamentos químicos apresentaram valores próximos.

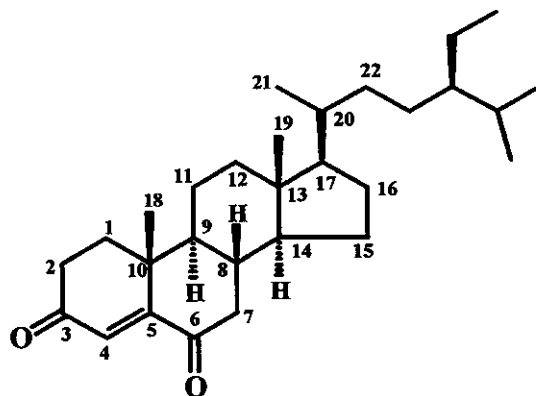
Tabela 05. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da substância 20a obtido de RMN 1D e 2D.

	H (δ)	C (δ)	HMBC
01	1,52 (1H _{eq}), dd, J= 5,0 e 2,0 1,70 (1H _{ax}), dd, J= 13,2 e 5,0	17,6 (CH ₂)	1,39 (H-10)
02	2,13 (1H); 2,28 (1H)	27,2 (CH ₂)	1,39 (H-10); 1,52; 1,70 (H-1)
03	6,60 (1H), t, J= 3,5	136,8 (CH)	1,70 (H-1); 2,13; 2,28 (H-2)
04		142,6 (C ₀)	1,15; 2,26 (H-6ax-H-6eq)
05		37,6 (C ₀)	0,74 (H-20); 1,26 (H-19); 1,30 (H-10); 1,52 H-1eq, 1,70 (H-1ax)
06	1,15 (1H _{ax}), dt, J= 12,9; 4,5 2,26 (1H _{eq})	35,9 (CH ₂)	1,26 (H-19); 1,45 (H-7); 1,55 (H-8)
07	1,43 (1H); 1,45 (1H)	27,3 (CH ₂)	0,81 (H-17)
08	1,55 (1H), m	36,3 (CH)	0,81 (H-17)
09		38,9 (C ₀)	0,74 (H-20); 0,81 (H-17); 1,39 (H-10); 1,52; 1,70 (H-1)
10	1,39 (1H), dd, J= 13,2; 2,0	46,6 (CH)	0,74 (H-20); 1,26 (H-19); 2,28 (H-2); 2,26 (H-5eq)
11	1,40-1,50 (2H)	37,5 (CH ₂)	0,74 (H-20); 1,95; 2,10 (H-12a, 12b)
12	1,95 (1H), dt, J= 13,2 e 5,0 2,10 (1H), dt, J= 13,2 e 5,0	24,6 (CH ₂)	1,52 (H _{eq} -1); 0,74 (H-20)
13		147,3 (C ₀)	1,95; 1,20 (H-12); 6,37 (H-14); 5,05; 5,20 (H-15)
14	6,37 (1H), dd, J= 11,5; 17,5	139,0 (CH)	2,10 (H-12); 5,20 (H-15) 4,98 (H-16)
15	5,05 (1H), dd, J= 10,5; 05; 5,20 (1H), dd, J= 17,5; 0,5	112,9 (CH ₂)	4,98 (H-16)
16	4,98 (2H), d, J= 6,5	115,6 (CH ₂)	1,95; 2,10 (H-12); 5,20 (H-15); 6,37 (H-14)
17	0,81 (3H), d, J=6,3	16,0 (CH ₃)	0,74 (H-20)
18		167,9 (C ₀)	
19	1,26 (3H), s	20,7 (CH ₃)	1,15 (H-6); 1,39 (H-10)
20	0,74 (3H), s	18,3 (CH ₃)	
Ome	3,70 (3H), s	51,2 (CH ₃)	

Tabela 06. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C das substâncias 20a, 20.1a e 20.1

C	20 ^a	20.1 ^a	20.1
01	17,6	17,0	16,9
02	27,2	24,1	24,6
03	136,8	139,1	142,2
04	142,6	138,7	137,7
05	37,6	36,4	40,4
06	35,9	37,0	36,8
07	27,3	28,6	28,6
08	36,3	37,8	37,7
09	38,9	40,4	36,3
10	46,6	45,3	45,5
11	37,5	37,4	37,3
12	24,6	24,7	24,4
13	147,3	147,5	147,37
14	139,0	138,8	138,9
15	112,9	113,0	112,9
16	115,6	115,6	115,5
17	16,0	16,1	16,03
18	167,9	168,7	173,4
19	20,7	33,6	33,1
20	18,3	18,0	18,0
	51,2	51,3	

SUBSTÂNCIA 21



A substância 21 $[\alpha]_D^{25}(-) 60,6^0$ foi isolada a partir da fração Fc.6 do extrato EAc.1 (fluxograma 01).

O espectro de IV (E 56) apresentou banda intensa em 1668 cm^{-1} característico de dicarbonilas α,β - não saturada.

O espectro de RMN ^1H (E 51) apresentou vários sinais na região de δ_H 0,70 a 2,80 característicos de substâncias triterpênicas ou esteroidais. As seis metilas em δ_H 0,72, 0,80; 0,82; 0,85; 0,92 e 1,16 são características de esteróides do tipo 24-etilcolesterano. O sinal simples em δ_H 6,17 e sinais em δ_C 199,8, δ_C 202,6, δ_C 125,5, δ_C 161,3 no espectro de RMN ^{13}C , confirmaram a presença de um sistema dicarbonílico α,β - não saturado anteriormente observado pelas absorções no IV. Essas informações permitiram propor as unidades estruturais (a) e (b) para a substância (figura 23).

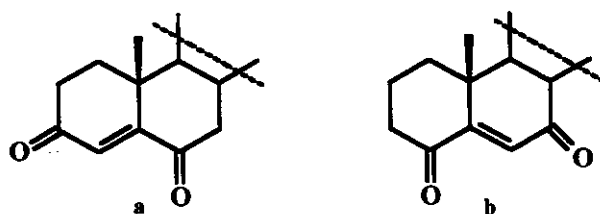


Figura 23. Unidades estruturais proposta para a substância 21.

A análise dos dados de correlações ^1H , ^1H (COSY, E 54) e ^{13}C , ^1H (HETCOR, E 55, tabela 07) de RMN 2D mostrou que a estrutura (a) é a mais provável. Isto, foi evidenciado pela presença das correlações entre o H-8 (δ_{H} 1,86)/ H-7(δ_{H} 2,68); H-8 (δ_{H} 1,86)/ H-14 (δ_{H} 1,10) e H-8 (δ_{H} 1,86)/ H-9((δ_{H} 1,36). Essas informações nos levaram a propor a estrutura da substância **21** como sendo o 24-etilcolest-4-ene-3,6-diona.

Substâncias esteroidais carboniladas como **21** são relatadas como produtos de oxidação de álcoois esteroidais.³⁶

Durante uma consulta à literatura encontramos o trabalho de Aiello, A. e colaboradores o qual relata o isolamento de 24(*R*)-24- etilcolest-4-ene-3,6-diona a partir da esponja marinha *Cinachyra tarentin*³⁶ e considera o mesmo um produto natural e não um artefato de oxidação do etil-colestano. No caso da substância **21**, consideramos como produto natural, pois a obtenção do extrato bruto foi realizada com a planta fresca, imediatamente após a sua coleta.

Comparação dos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância **21** com os da literatura para 24-(*R*)- 24 – etilcolest – 4 – ene – 3, 6 – diona³⁷ mostraram valores coincidentes.

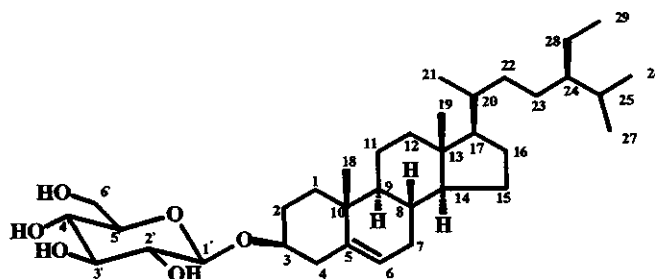
Aiello e colaboradores concluíram que a configuração relativa da substância isolada era idêntica à do 24-etil-colestano por comparação dos espectros do produto natural e do produto sintético obtido a partir da oxidação do 24-etilcolestanol.

A configuração absoluta foi citada, sem maiores explicações como igual à do 24(*R*)-colestanol.

Tabela 07.Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da substância 21 obtido de RMN 1D e 2D.

N ^o		Carbono (δ)	Hidrogênio (δ)	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ (COSY)
01	CH ₂	33,9	1,04 (1H), 1,26 (1H)	
02	CH ₂	33,7	2,48 (1H), dd, J=4,8; 13,9 (1H)	
03	C ₀	199,8		
04	CH	125,5	6,17 (1H), s	
05	C ₀	161,3		
06	C ₀	202,6		
07	CH ₂	46,7	2,68 (1H), dd, J= 3,6; 15,7; 2,0 (1H), d, J= 15,6	2,68 x 1,86 (H-8)
08	CH	34,1	1,86 (1H)	1,86 x 1,36 (H-9) x 2,68 (H-7) x 1,10 (H-14)
09	CH	50,9	1,36(1H)	1,36 x 1,86 (H-8)
10	C ₀	39,7		
11	CH ₂	20,7	0,80 (2H)	
12	CH ₂	39,0	1,20 (1H); 2,04 (1H)	
13	C ₀	42,4		
14	CH	55,8	1,10 (1H)	1,10 x 1,86 (H-8)
15	CH ₂	25,9	1,13 (2H)	
16	CH ₂	27,9	1,24 (1H); 1,89 (1H)	
17	CH	56,5	1,14 (1H)	
18	CH ₃	11,7	0,72 (3H)	
19	CH ₃	17,4	1,16 (3H)	
20	CH	35,9	1,34 (1H)	1,34 x 0,92 (H-21)
21	CH ₃	18,6	0,92 (3H)	
22	CH ₂	35,4	2,08 (2H)	2,08 x 1,58 (Hb-23)
23	CH ₂	23,8	1,12 (1H); 1,58 (1H)	
24	CH	45,7	0,82 (1H)	
25	CH	29,0	1,64 (1H)	1,64 x 0,81 (H-26)
26	CH ₃	18,9	0,86 (3H), d, J= 6,6	
27	CH ₃	19,7	0,81 (3H), d, J= 6,6	0,81 x 1,64 (H-25)
28	CH ₂	22,9	1,25 (2H)	
29	CH ₃	11,8	0,83 (3H), t, J=6,9	

SUBSTÂNCIA 25



A substância **25** foi isolada como um sólido branco a partir da fração Fc-12, do extrato dos pecíolos (fluxograma 01).

O espectro de massas (E 67) não apresentou o íon molecular, mostrou fragmento de m/z 397 com intensidade de 85% característico de íon $C_{29}H_{49}^+$.

O espectro de RMN^1H (E 64) mostrou absorções características de esteróide glicosilado, através dos sinais de metilas na região de δ_H 0,70 a 1,02, de hidrogênios carbinólicos da unidade glicosídica na região de δ_H 3,29 a 3,90, um dubleto a δ_H 4,40 ($J=7,9Hz$) correspondendo ao hidrogênio anomérico (H-1'). O valor da constante de acoplamento sugere uma relação trans-diaxial entre H-1'anomérico e H-2', indicando configuração β para a unidade glicopiranosídica. Observa-se também sinais dos hidrogênios H-6 como um dubleto largo na região de δ_H 5,38.

O espectro de $RMN^{13}C/DEPT$ (E 65 e E 66) mostrou vinte e nove sinais da porção esteroidal, 6 sinais referentes aos carbonos da unidade glicosídica em δ 62,4; 71,0; 74,4; 76,9; 77,4 correspondendo aos carbonos C-6', C-4', C-2', C-3'e C-5', respectivamente, e sinal do carbono anomérico em δ_H 101,9 (CH, C-1') (figura 24).

Observou-se também, sinais dos carbonos não saturados em δ_C 121,7 (CH) e 141,3 (C_0), referentes aos carbonos C-6 e C-5 respectivamente. A posição da ligação dupla $\Delta^{5,6}$ é confirmada pela absorção do C-19 em δ_C 19,6, enquanto que para esteróides Δ^7 o deslocamento químico para C-19 apresenta absorção na região de δ_C 13,0.³⁷

Comparação dos deslocamentos químicos de $RMN^{13}C$ obtidos para a substância **25**, com os valores de deslocamentos químicos encontrados na literatura para o 3- β -O- β -D-glicopiranosilistosterol³⁸ confirmaram a estrutura proposta para a substância **25**.

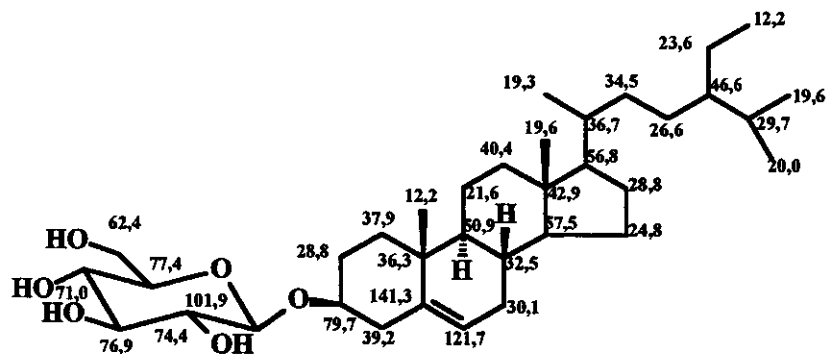


Figura 24. Dados de RMN¹³C para a substância 25.

Durante o isolamento das substâncias discutidas isolou-se também mistura de esteróides 24-metilcolest-5-enol (**22a**), 24-etilcolest-5-22-dienol (**22b**) e 24-colest-5-enol (**22c**) caracterizada por CG/EM e por dados de RMN¹H, as substâncias **23** e **24** identificadas por dados de RMN¹H e RMN¹³C/DEPT como ácido linolênico e ácido dodecanóico respectivamente.

I.3.2 – ESTUDO DE CINCO ESPÉCIES DAS PLANTAS DO GÊNERO *Echinodorus* POR CG/EM

O isolamento do ácido echinóico (16) dos pecíolos de *E. grandiflorus*, e o não isolamento do echinol (1) isolado em 1993 por D. Manns e colaboradores⁵ desta mesma espécie, e as dificuldades encontradas no isolamento e caracterização de clerodanos presentes na planta nos levou a desenvolver um método analítico com o qual fosse possível através da análise do perfil cromatográfico da planta, identificar os constituintes isolados, detectar os derivados clerodânicos bem como derivados do ácido echinóico.

Considerando ainda, que as concentrações do princípio ativo da planta de uma mesma espécie pode variar de uma região para a outra, e que apesar do fato de algumas literaturas referentes à plantas medicinais recomendarem a utilização tanto da espécie *E. grandiflorus* como *E. macrophyllus* como chá medicinal²⁻⁴ observa-se que a comercialização deste chá restringe-se a espécie *E. macrophyllus*, assim, esta parte do trabalho teve como objetivo também, o de comparar o perfil cromatográfico de *E. grandiflorus* coletada em Curitiba-PR com a coletada em Campinas-SP, com a espécie *E. macrophyllus* e com os de outras espécies: *E. aschersonianus*, *E. longipetalus* e *E. tenellus*.

A primeira técnica a ser testada para esse fim foi CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Inicialmente procuramos verificar a melhor combinação (coluna e eluente) para a separação das substâncias presente no extrato etanólico dos pecíolos. Foram utilizadas duas colunas: a coluna de fase reversa Bondapak C18 e Novapack C18 empregando-se como fase móvel gradiente de metanol/ H₂O e acetonitrila/H₂O. Das duas colunas, a coluna Novapack C-18 utilizando-se como eluente acetonitrila e H₂O (60:40) forneceu o melhor resultado para a separação do ácido echinóico (16) e uma separação razoável para o clerodano (18) (figura 25). Os demais compostos apresentaram tempo de eluição muito próximos uns em relação aos outros em todas as combinações de eluentes testadas com as duas colunas, não sendo possível, portanto, obter condições adequadas para a análise do perfil cromatográfico da planta.

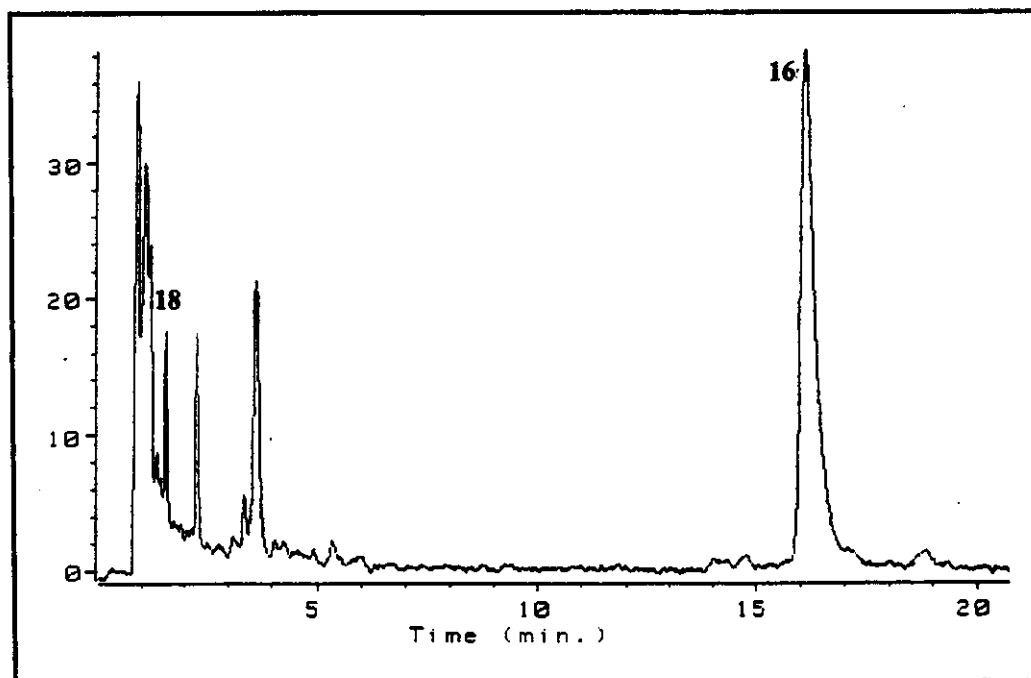
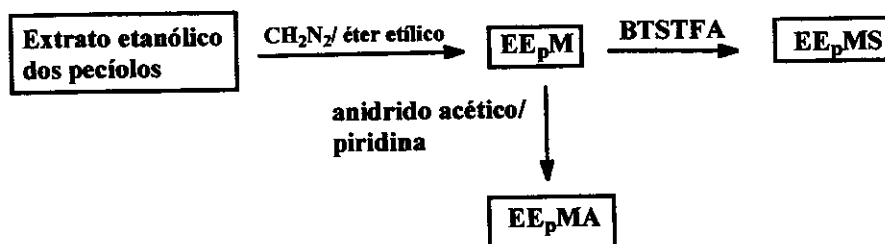


Figura 25. Cromatograma de CLAE do extrato etanólico das folhas de *E.grandiflorus* (coluna Novapack C-18; eluente acetonitrila/H₂O 60:40).

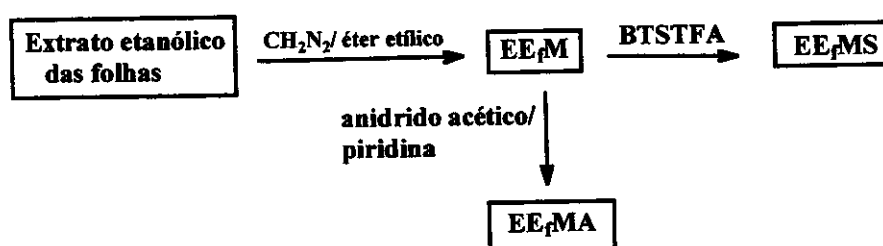
1.3.2.1. ANÁLISE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS DOS PECÍOLOS E DAS FOLHAS DE *Echinodorus grandiflorus* POR CG/EM.

Diante da dificuldade em analisar por CLAE, optou-se pela análise via CG/EM. As análises foram realizadas em espectrômetro de massa Hewlet Packard – VCD 5890A equipado com coluna capilar DB-5 J & W Scientific (25m x 0,25mm x 0,25µm). e posteriormente em espectrômetro de massa Shimadzu QP 2000A equipado com coluna capilar DB- 17 (30m x 0,25mm x 0,25µm).

Os extratos etanólicos das folhas e pecíolos (50,0mg) foram primeiramente tratados em uma pré-coluna, utilizando-se como eluente clorofórmio/metanol 40%. Em seguida os extratos etanólicos foram derivados segundo os fluxogramas 03 e 04.



Fluxograma 03. Derivação do extrato etanólico dos pecíolos.



Fluxograma 04. Derivação do extrato etanólico das folhas.

Os extratos derivados EE_pMS , EE_pMA , EE_fMS e EE_fMA ($1\mu l$, $30,0mg/ml$) foram analisados no espectrômetro HP-5790A equipado com a coluna DB-5. (condição nº 5). A análise dos espectros de massas das substâncias presentes nos extratos metilado sililado mostrou ser a forma mais adequada para a identificação das mesmas.

Observa-se no cromatograma dos extratos dos pecíolos (EE_pMS) a presença do ácido echinóico (**16a**) (éster metílico) e do clerodano **20a** (éster metílico) como componentes majoritários (nas condições analisadas ambos possuem o mesmo tempo de retenção), do clerodano **17a** (éster metílico) como componente minoritário, e do clerodano **18b** (éster metílico/O- sililado). Foram detectados, também, nesta análise o fitol (**8**) e ácidos graxos de cadeia longa como ésteres metílicos e ésteres etílicos. (figura 26a, 26b).

O cromatograma dos extratos das folhas mostrou a presença do ácido hardwickico (**14a**), como éster metílico, e do fitol (**8**) como componentes majoritários, do clerodano **18b** na forma de éster metílico/O-sililado como componente minoritário e, ainda, de ácidos graxos de cadeia longa como ésteres metílicos e etílicos e na forma de éster sililada. (figura 27a, 27b).

As substâncias identificadas em cada um dos extratos estão indicadas no cromatograma com os números de suas estruturas (Figura 28).

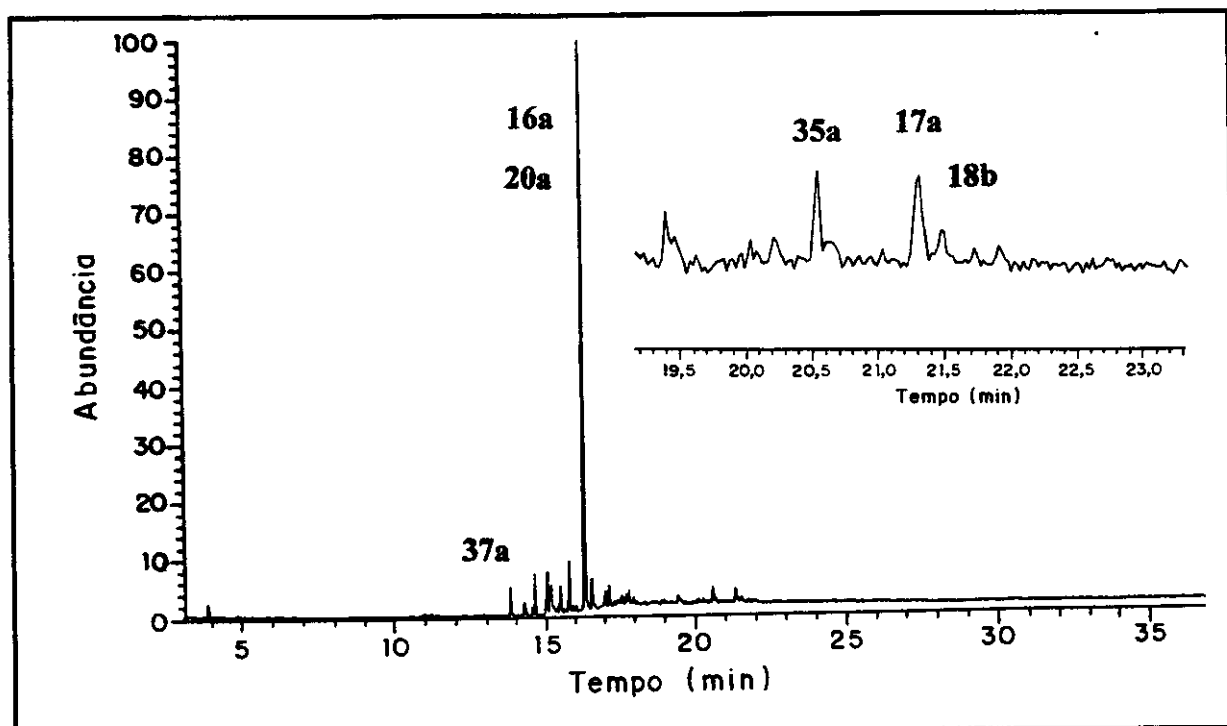


Figura 26a. Cromatograma de CG/EM do extrato etanólico dos pecíolos (EE_pMS) de *Echinodorus grandiflorus* coletados em Curitiba-PR (coluna DB-5).

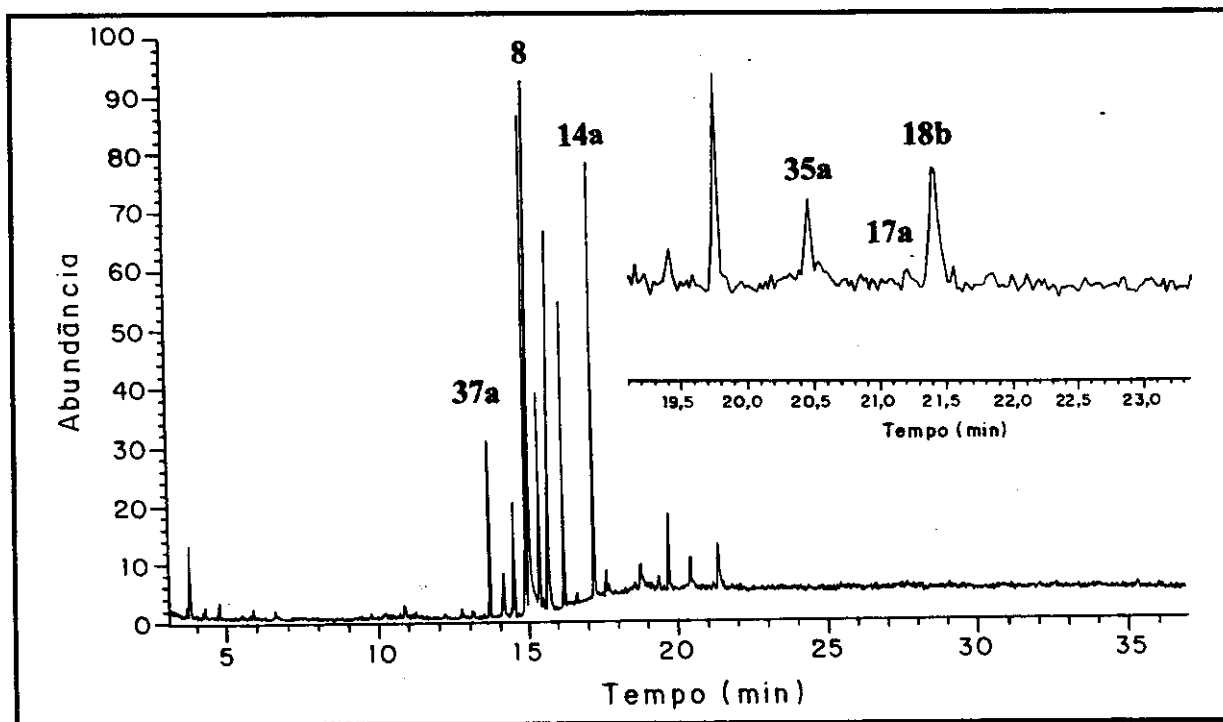


Figura 27a. Cromatograma de CG/EM do extrato etanólico das folhas (EE_fMS) de *Echinodorus grandiflorus* coletadas em Curitiba-PR (coluna DB-5).

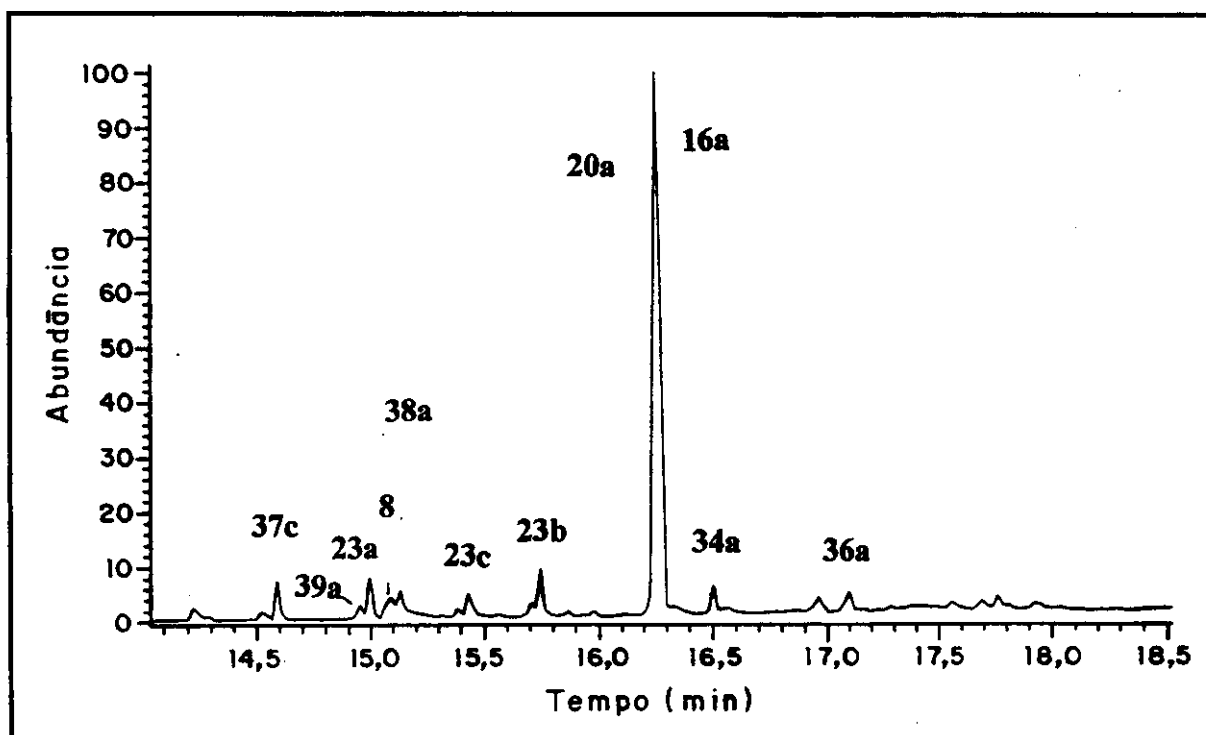


Figura 26b. Expansão da figura 26a.

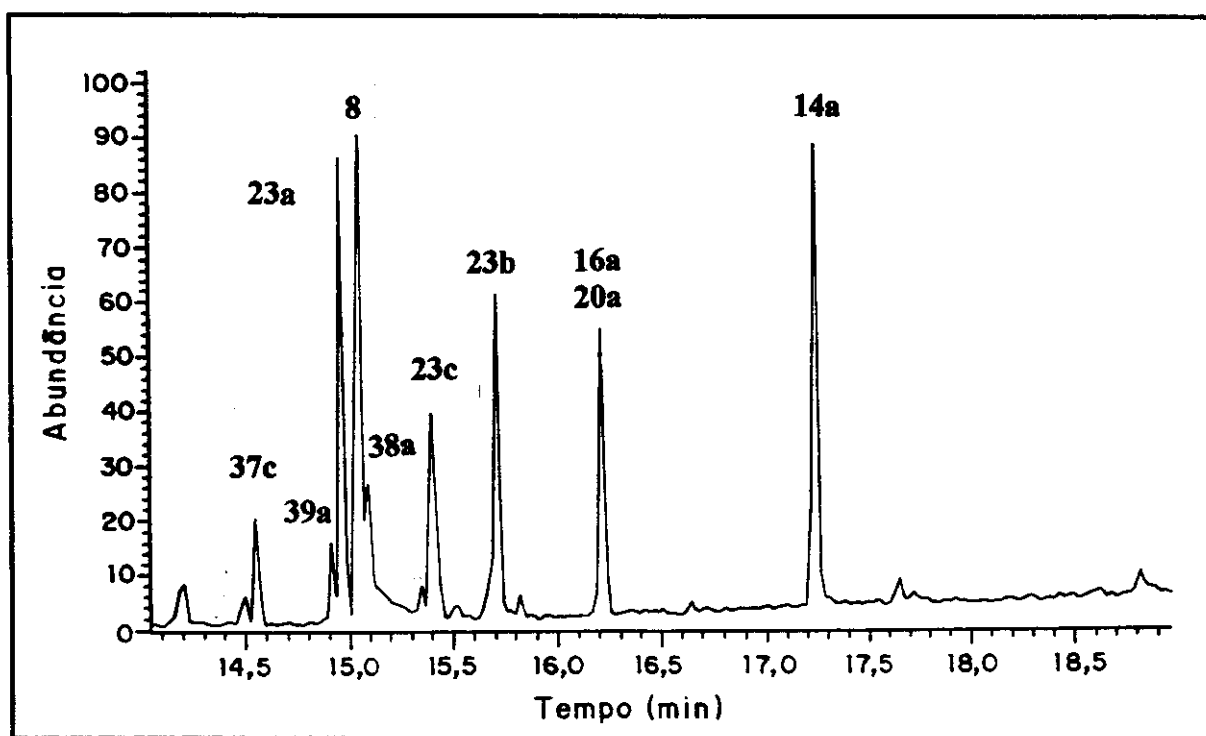


Figura 27b. Expansão da figura 27a

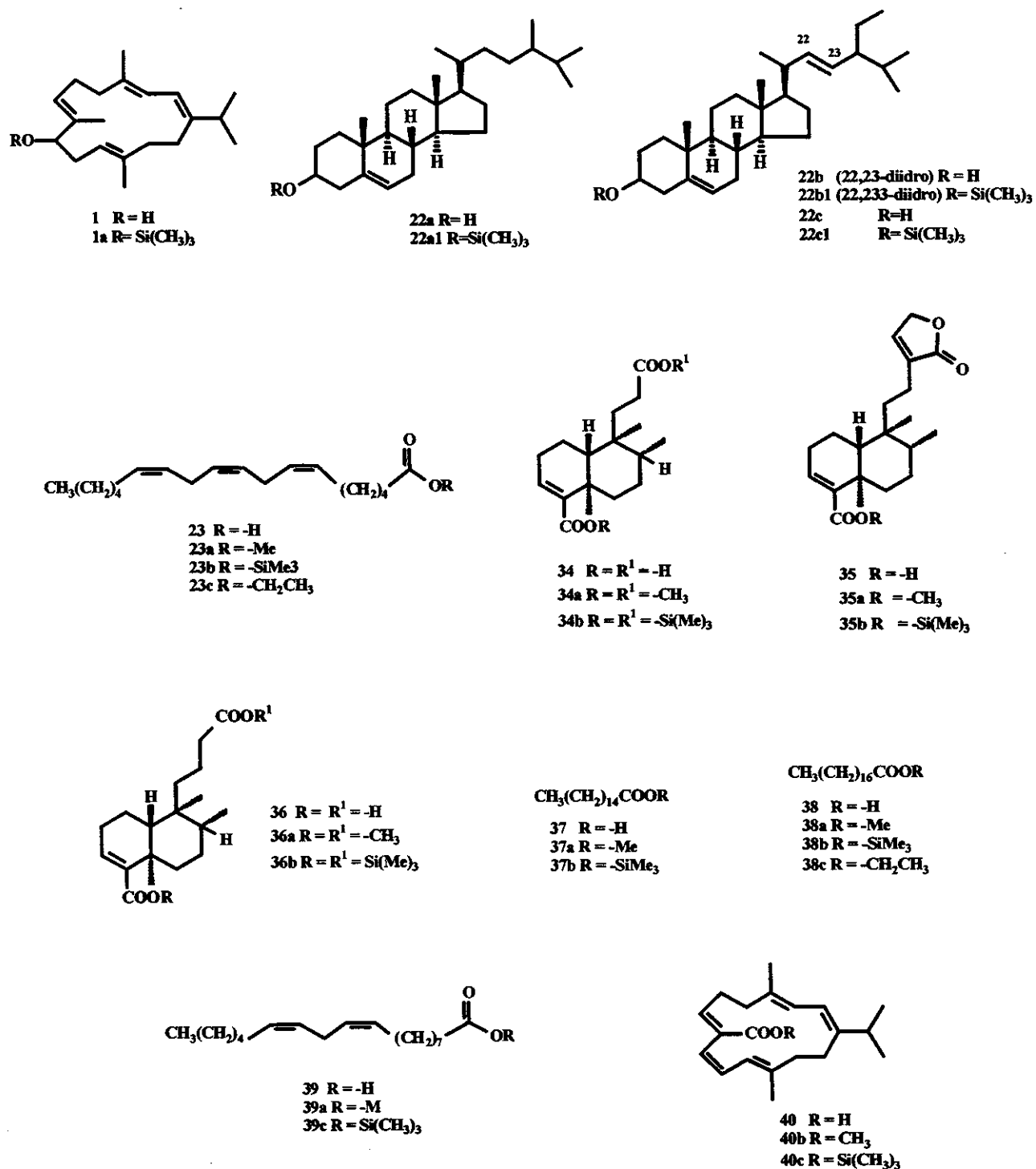


Figura 28. Substâncias identificadas por CG/EM presentes nos extratos etanólicos de *E. grandiflorus*.

A identificação das substâncias isoladas no cromatograma de CG/EM, baseou-se nas comparações dos espectros de massas e dos tempos de retenção das substâncias padrão. As demais substâncias foram identificadas por análise da fragmentação, comparação com os espectros da biblioteca Wiley e, em alguns casos, índice de retenção³⁹ (tabela 08)

Tabela 08. Índice de retenção das substâncias identificadas na planta *E.grandiflorus*. (coluna DB-5)

Substância	I _R	I _R Lit ⁴⁰	Substância	I _R	I _R Lit.
Hexadecanoato de metila (37a)	1931	1927	Clerodano 14a	2476	-
Linoleato de metila (39a)	2106	2092	Clerodano 17a	2984	-
<i>Trans</i> -fitol (8)	2119	1949	Clerodano 19a	2915	-
Octadecanoato de metila	2127	2128	Clerodano 18b	2999	-
Echinoato de metila (16 ^a)	2307	-	Clerodano 20a	2307	-

Na tabela 08 observa-se uma discrepância no valor do índice de retenção obtido para o *trans*-fitol (8) identificado nos extratos da planta *E. grandiflorus* com o da literatura ⁴⁰. No entanto, este valor coincide com o índice de retenção do *trans*-fitol (comercial, I_R 2114) obtido pelo grupo durante os estudos de óleos essenciais.

O clerodano 17a, contendo o grupo etoxila, foi inicialmente considerado um artefato conforme discutido no capítulo I.3.1 (página 26), uma vez que a literatura relata o isolamento de um clerodano análogo contendo um grupo metoxila²⁷ no lugar de etoxila. Visando solucionar esta questão, foram preparados extratos da planta utilizando-se acetato de etila como solvente. Os extratos EAcE_p (extrato acetato de etila dos pecíolos), EAcE_f (extrato acetato de etila das folhas) obtidos foram derivados com diazometano e bis (trimetilsililtrifluoroacetamida, BTSTFA) obtendo-se os estratos EAcE_pMS e EAcE_fMS e analisados por CG/EM.(espectômetro de massa HP-5890 equipado com coluna DB-5).

O cromatograma do EAcE_fMS mostrou a presença de uma substância com o mesmo tempo de retenção observado para a substância 17a nos extratos de EE_pMS (figura 29). O espectro de massas desta substância apresentou fragmentações idênticas às da substância 17a consequentemente considera-se que a substância etoxilado 17a é um produto natural.

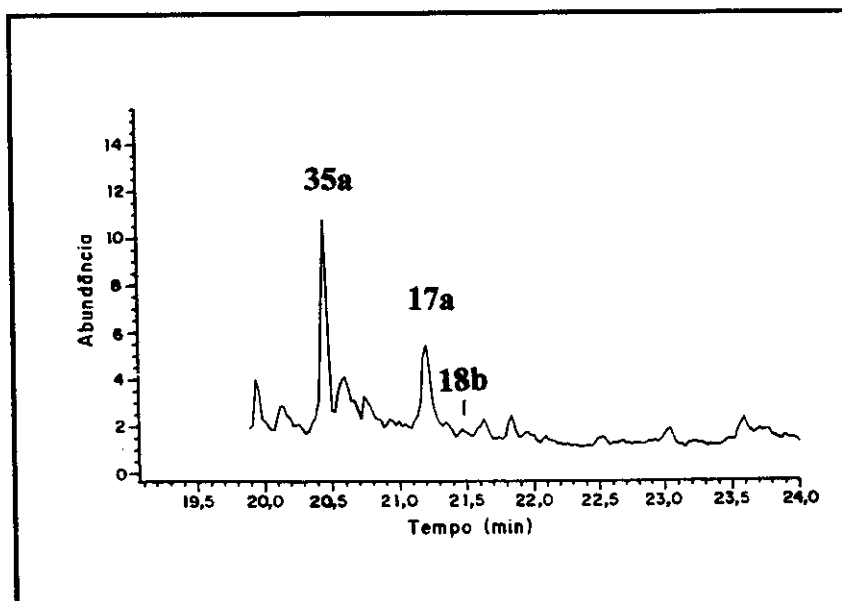


Figura 29. Cromatograma de CG/EM do extrato acetato de etila metilado sililado de folhas (EAcE_pMS) de *Echinodorus grandiflorus* (coluna DB-5).

A análise dos espectros de massas das substâncias não isoladas, detectadas no cromatograma EE_pMS e EE_pMS (extratos etanólicos), sugere a presença de diversos clerodanos semelhantes aos clerodanos isolados. As estruturas dessas substâncias foram sugeridas como 34a, 35a e 36a (ésteres metílicos). As estruturas propostas para essas substâncias basearam-se na análise de fragmentações e comparação com os espectros de massas dos clerodanos isolados, os quais iremos discutir a seguir.

Observa-se nos espectros de massas dos clerodanos 14a (E 13), 17a (E 29), 18a (E 36.1), 19a (E 42) e 20a (E 50) padrões de fragmentações muito semelhantes, apresentando fragmentos principais de m/z 235, 234, 203, 175 e 139, os quais são originados da clivagem C-9/C-11 a partir do íon molecular e perda subsequente de moléculas neutras conforme sugestão de fragmentação apresentada para as substâncias 14a, 17a, 18a, 19a e 20a (páginas 15, 25, 29, 37 e 44). Portanto, a presença de um conjunto de fragmentos de m/z 235, 203 e 175 e de m/z 235, 139 e/ou 234, 139, no espectro de massas de uma substância, são indícios fortes da presença do esqueleto clerodânicos como A (figura 30).

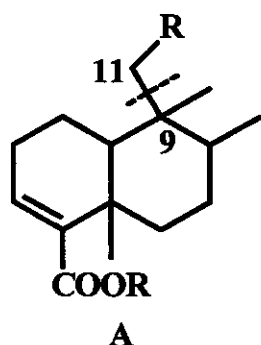


Figura 30:

Esqueleto

clerodânica

Outra característica observada foi a presença de um fragmento intenso correspondendo a perda de uma molécula neutra de CH_3OH ou H_2O conforme os espectros de massas dos clerodanos **17a** (E 29), **18a** (E 36.1) e **19a** (E 42).

No espectro de massas da substância **34a** (Figura 31), observa-se a presença do íon molecular de m/z 322 (1%) e um fragmento intenso de m/z 290 (100%) coerente com a perda de um fragmento neutro de MeOH a partir do íon molecular, para um composto de fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_4$. O conjunto de fragmentos de m/z 235 (8%), 203 (18%), 175 (22%) e de m/z 235 (8%), 139 (17%) e/ou 234 (1%), 139 (17%) permitiram propor a estrutura clerodânica **34a** para a substância (Esquema X).

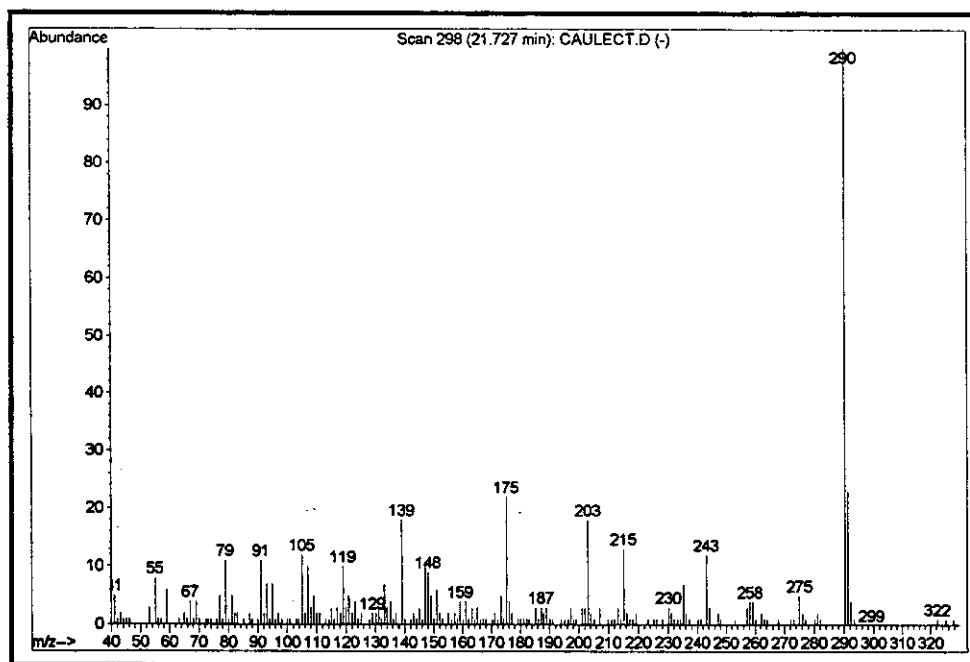
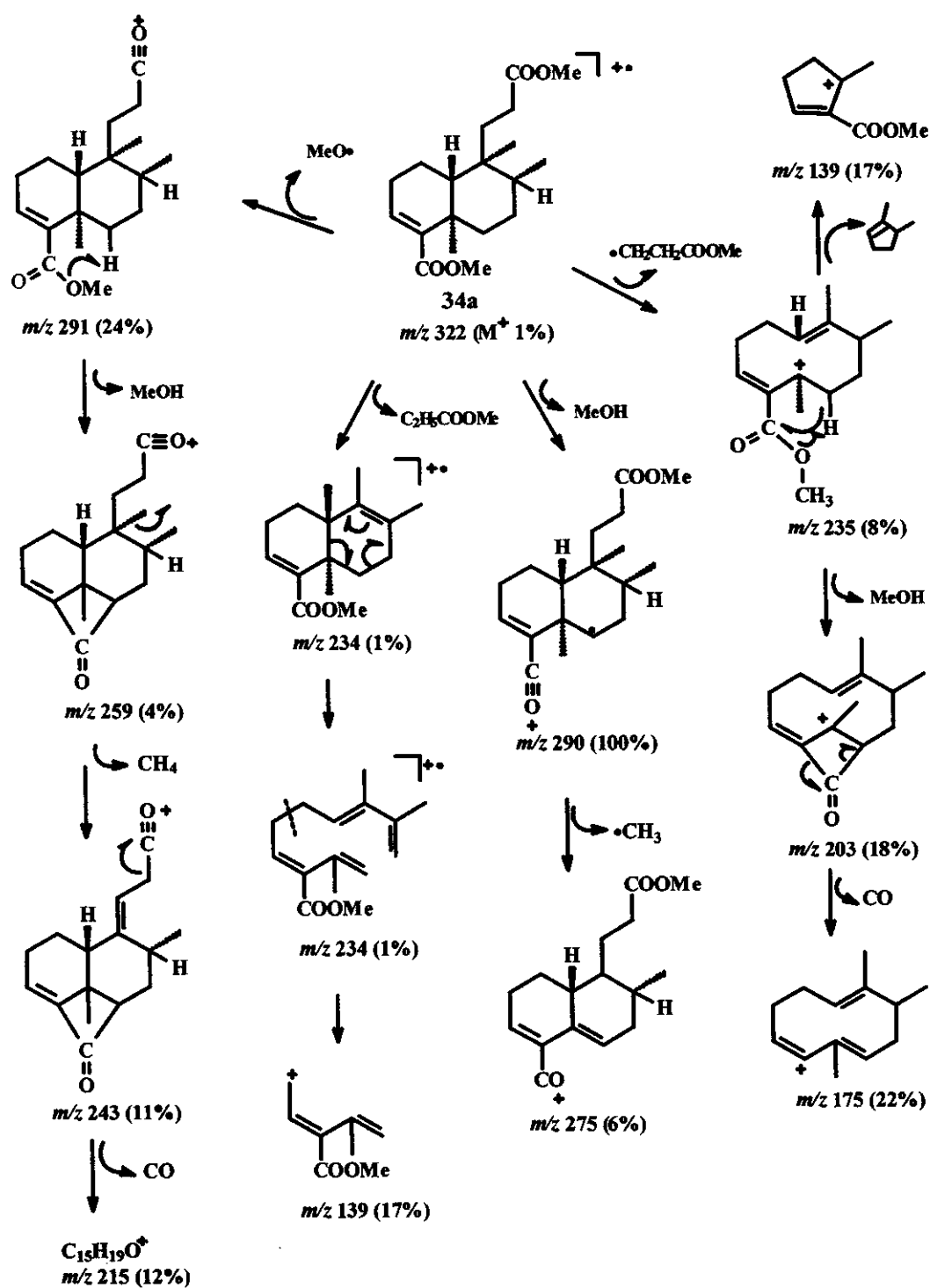


Figura 31. Espectro de massas da substância **34a**.



Esquema X. Proposta de fragmentação para a substância 34a, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.

Observa-se no espectro de massas da substância **35a** (figura 32) um fragmento intenso de m/z 314 (100%), correspondendo a perda de uma molécula neutra de MeOH a partir do íon molecular de m/z 346, o qual não é observado no espectro de massas. Observa-se ainda, fragmentos de m/z 235 (1%), 203 (5%), 175 (15%) e 139 (5%) sugerindo o esqueleto clerodânico com um substituinte butenolídio ($C_6H_7O_2$).

A ausência do fragmento intenso de m/z 111 correspondendo ao íon $[C_6H_7O_2]^+$ (estrutura B, figura 33), característico de diterpenos clerodânicos γ -butenolídio β -substituído⁴¹, sugere substituinte α -butenolídio de estrutura **35a**. A proposta de fragmentação para a substância **35a** está mostrada no esquema XI.

A comparação dos dados dos espectros de massas das substâncias **34a** e **35a** com os da literatura²⁷ correspondendo às substâncias ácido *nor* hardwíkico e ácido 16-*oxo*-15, 16 hardwíkico, respectivamente, mostraram fragmentos idênticos confirmando a estrutura proposta das substâncias **34a** e **35a**.

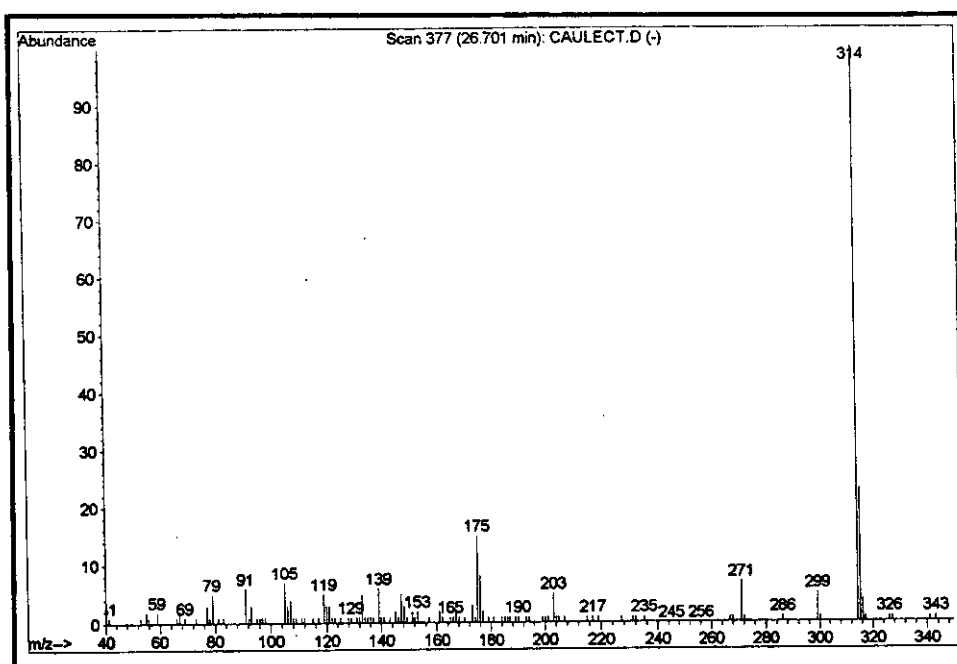


Figura 32. Espectro de massas da substância **35a**.

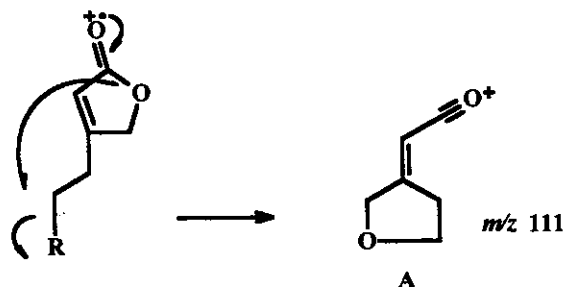
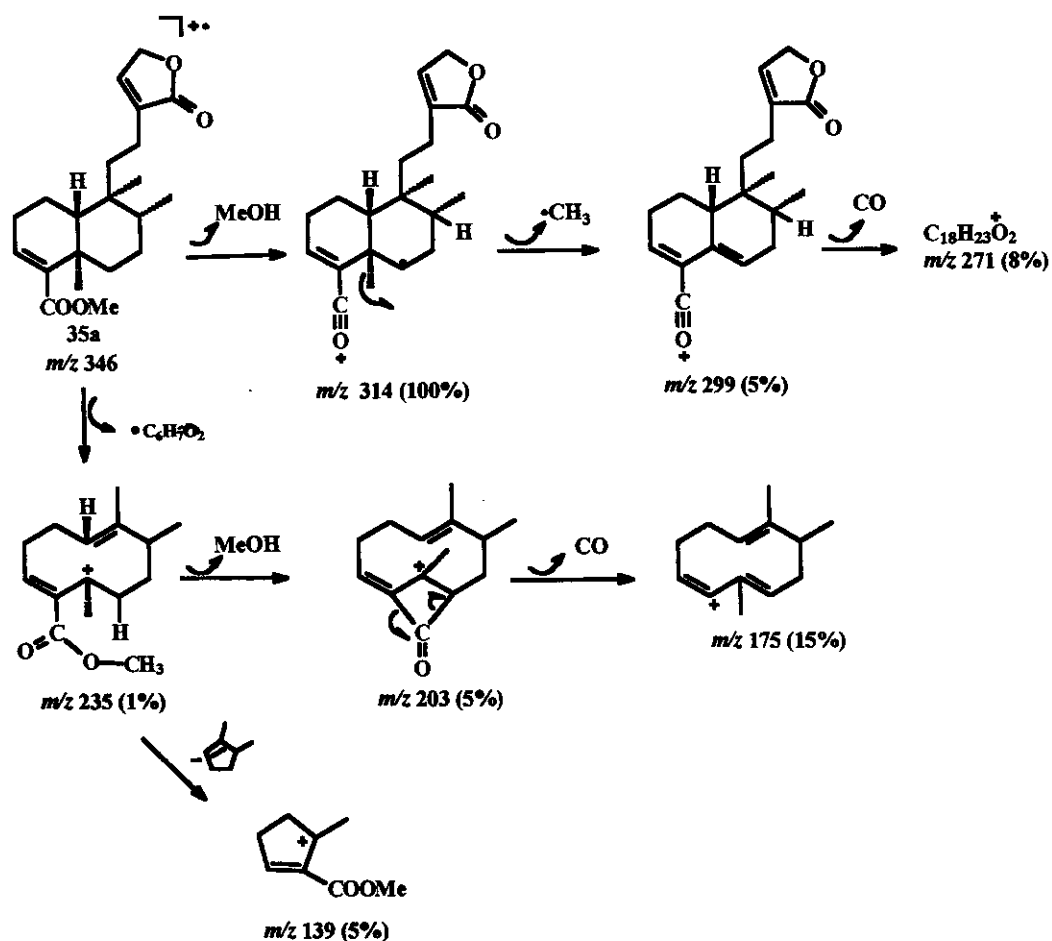


Figura 33. Fragmento de m/z 111 característico de clerodano- substituído em β .

O espectro de massas da substância **36a** (figura 34) apresentou fragmento intenso de m/z 304 (100%) correspondendo a perda de MeOH, a partir do íon molecular de m/z 336 (1%). Por comparação do espectro de massas com a da substância **34a** observa-se uma unidade a mais de CH_2 para o substância **36a** sugerindo substância clerodânica de fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4$ sustentando um substituinte ($\text{CH}_2\text{CHCH}_3\text{COOMe}$) ou ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$).

A perda de uma molécula neutra de MeOH a partir do íon molecular com subseqüentes perdas de radical metila e outra molécula neutra de MeOH caracterizadas pelos fragmentos de m/z 304 (100%), 289 (3%) e 257 (3%), respectivamente, e ainda fragmentos de m/z 235 (11%), 203 (15%) e 139 (12%) sugerem a estrutura **36a** para a substância (esquema XII).

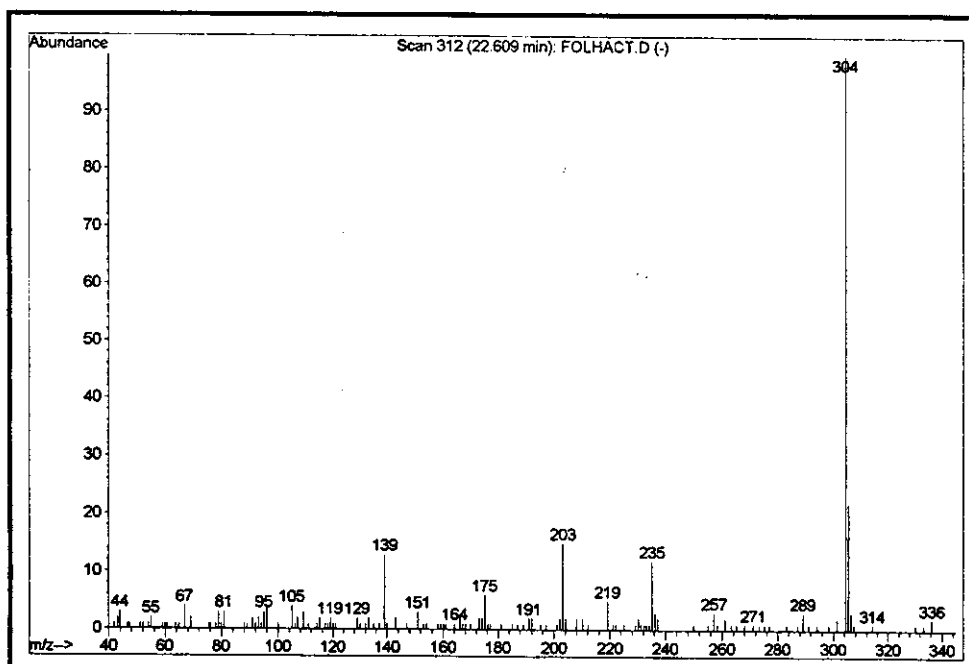
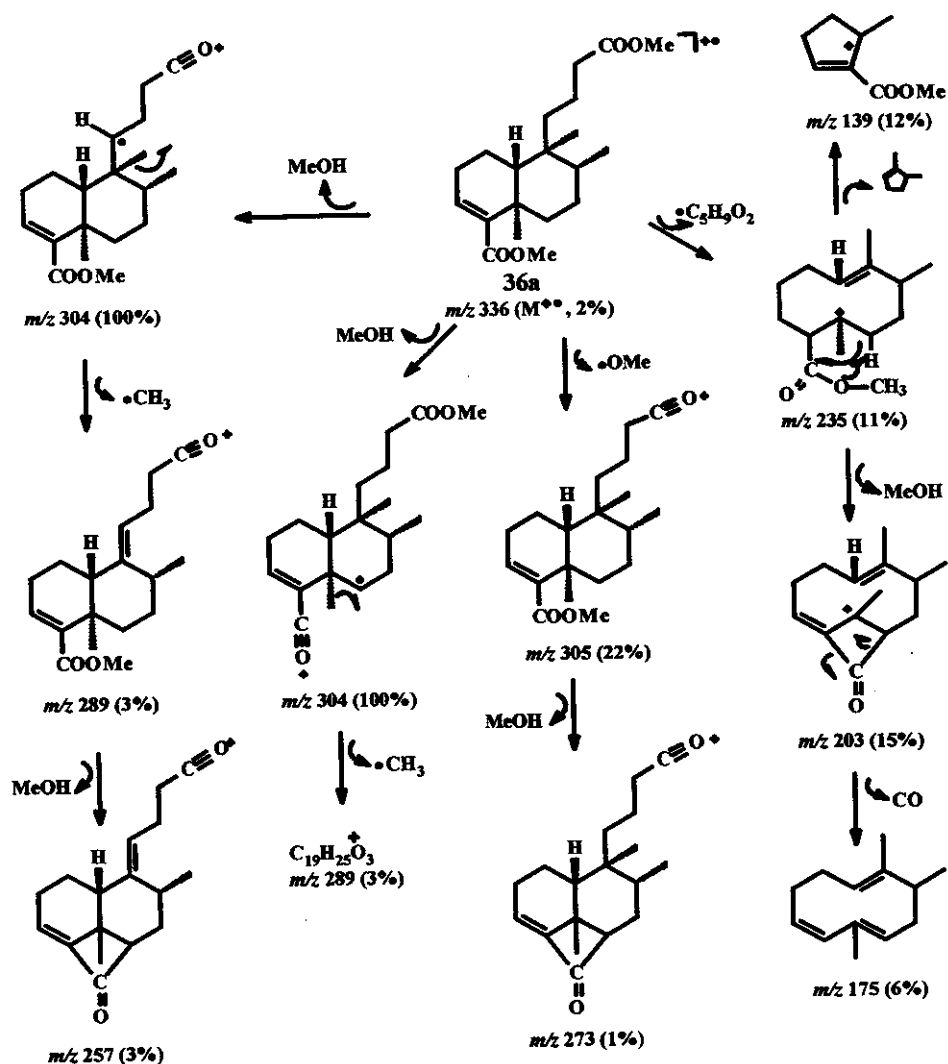


Figura 34. Espectro de massas da substância **36a**.



Esquema XII. Proposta de fragmentação para a substância 36a, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.

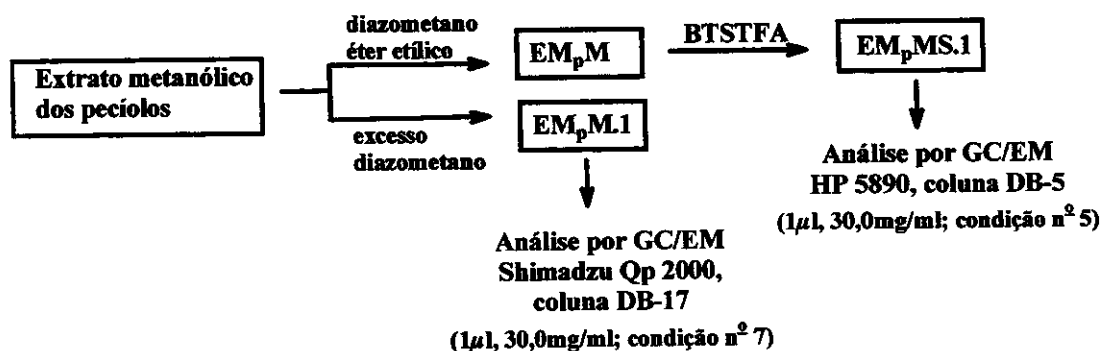
A análise do perfil cromatográfico do extrato etanólico metilado/sililado da planta *Echinodorus grandiflorus*, possibilitou verificar a presença dos clerodanos isolados como também de outros clerodanos não isolados conforme discutido acima. Foi observado adicionalmente, que algumas substâncias apresentavam-se tanto na forma de éster metílico e na forma O-sililada, outras como metilada/O-sililada, problema este que poderia ser sanado pelo uso do excesso de diazometano sem posterior derivação com BTSTFA.

1.3.2.2. ESTUDO DOS EXTRATOS METANÓLICOS BRUTOS DAS FOLHAS E DOS PECÍOLOS DE *Echinodorus grandiflorus* DERIVADOS COM DIAZOMETANO

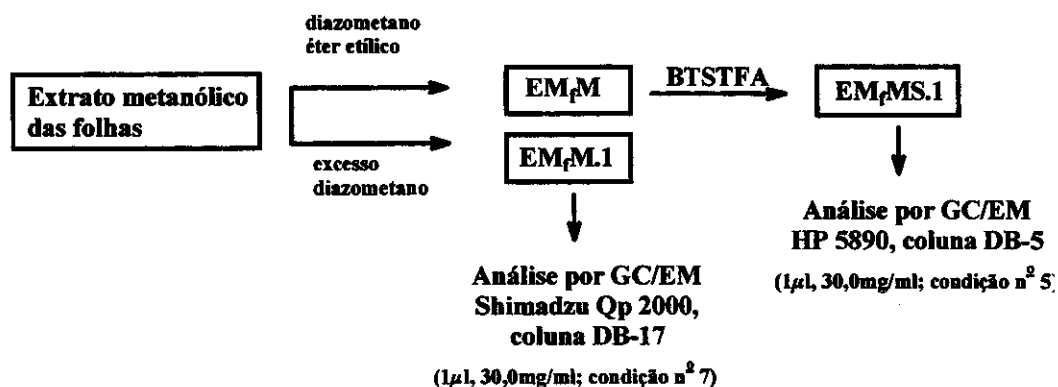
Para a análise do extrato metanólico da plantas por CG/EM derivados com excesso de diazometano as folhas e pecíolos de *E. grandiflorus* foram extraídos com metanol com o objetivo de confirmar a presença da substância 17a , sem a dúvida de ser um artefato.

Por problemas operacionais este estudo deveria ser executado utilizando coluna capilar DB-17 (30m x 0,25mm x 0,25µm).

Assim, por precaução, o desempenho das duas colunas e os dois procedimentos de derivação foram testados para extratos metanólicos das folhas e pecíolos coletadas em Curitiba-PR (1998), como descrito a seguir (fluxogramas 5 e 6).



Fluxograma 05. Derivação do extrato metanólico dos pecíolos de *Echinodorus grandiflorus* (coletados em Curitiba-PR em 1998).



Fluxograma 06. Derivação do extrato metanólico das folhas de *Echinodorus grandiflorus* (coletadas em Curitiba-PR em 1998.)

Os extratos metanólicos foram inicialmente analisados na forma metilado sililado (EM_pMS.1 e EM_fMS.1) por CG/EM, no espectrômetro de massa HP-5890 A equipado com coluna DB-5 para observar a presença da substância 17a como também a reprodutividade do perfil cromatográfico da planta.

O cromatograma dos extratos das folhas e pecíolos (EM_pMS.1 e EM_fMS.1) mostraram semelhanças com os dos obtidos da planta coletada em janeiro de 1996 (Figuras 26a e 27a). Observou-se ainda a presença da substância 17a no extrato EM_pMS.1 (figura 35). O espectro de massas desta substância mostrou fragmentos idênticos às da substância 17a confirmando, portanto, não ser um artefato.

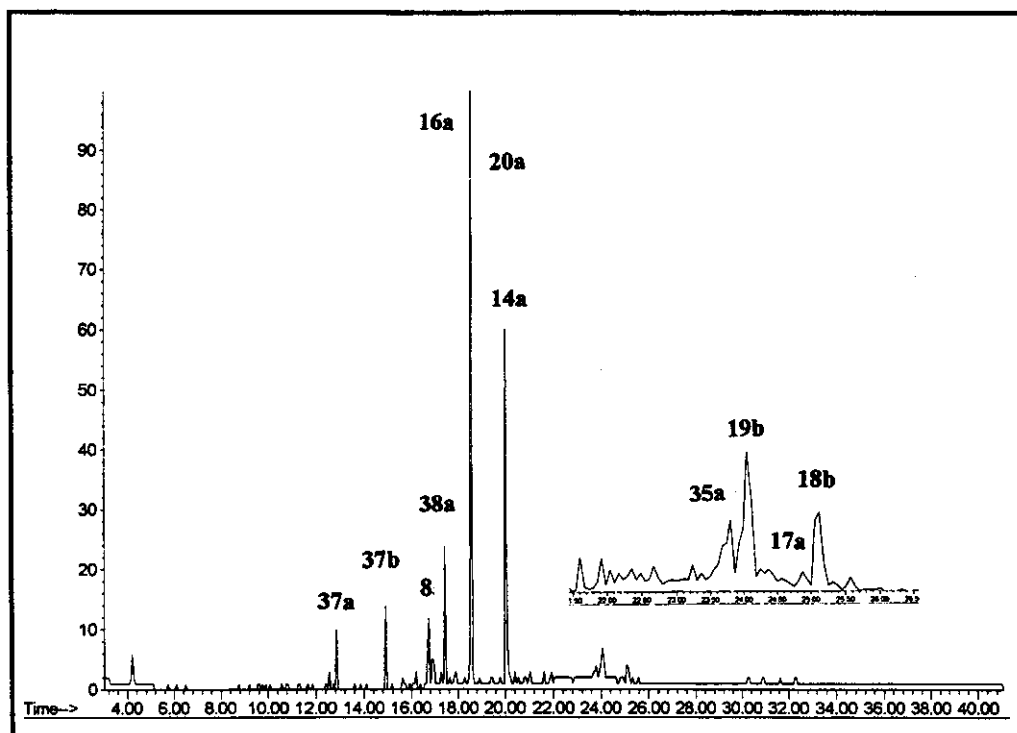


Figura 35. Cromatograma de CG/EM do extrato EM_pMS.1. de *Echinodorus grandiflorus* coletada em Cutitiba-PR em 1998 (Coluna DB-5).

Em seguida os extratos metanólicos (EM_pM.1 e EM_fM.1, metilados com excesso de diazometano) foram analisados apenas na forma metilada por CG/EM utilizando o espectrômetro de massa Shimadzu QP 2000 A equipado com coluna DB-17, com o objetivo de obter um cromatograma adequado para possibilitar a comparação do perfil cromatográfico dos extratos da planta *E. grandiflorus* com os de outras espécies do gênero *Echinodorus*.

Após a otimização das condições o cromatograma de CG/EM dos extratos EM_fM.1 e EM_pM.1 mostraram a presença de todas as substâncias diterpênicas isoladas na forma de ésteres metílicos com exceção da substância 18a no extrato das folhas (EM_fM.1). Observou-se, ainda, a presença das substâncias 34a, 35a e 36a em ambos os extratos (figura 36a e 36b) como também as substâncias 1 e 40 no extrato EM_pM.1 não detectadas na análise anterior, cujos espectros massas, apresentaram fragmentos característicos do ácido echinóico (16) caracterizados principalmente pelos fragmentos de m/z 136, 121 e 93.

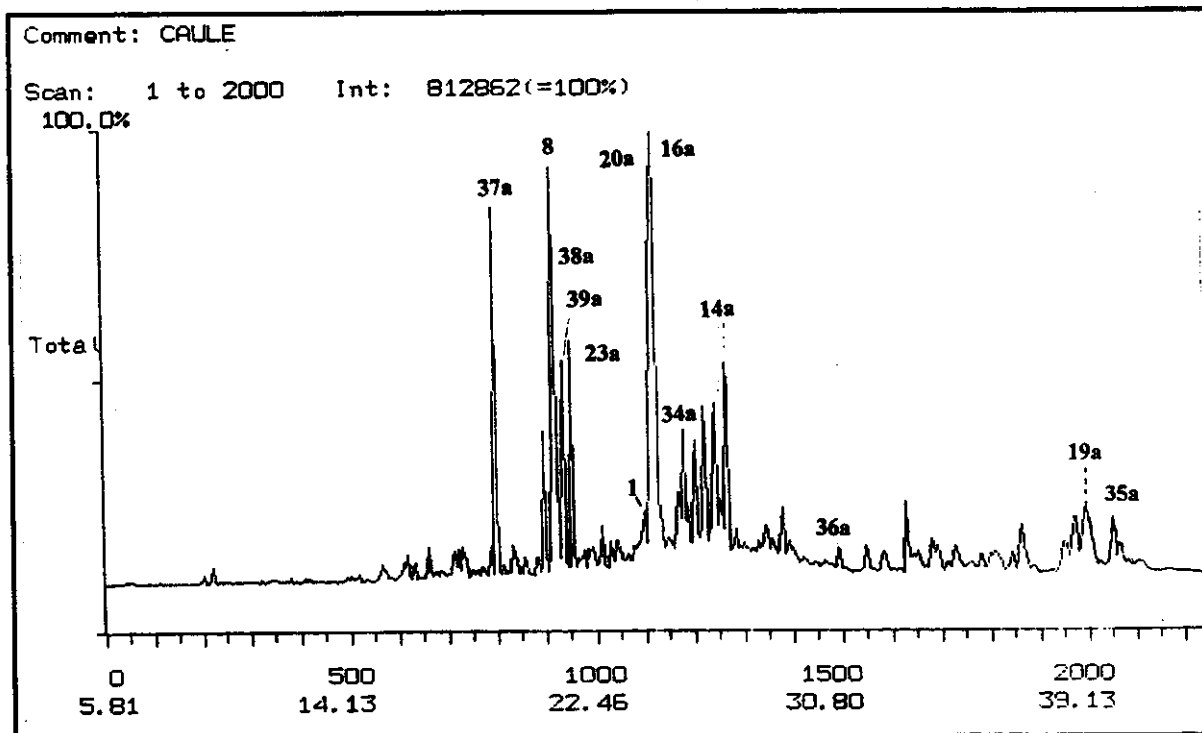


Figura 36a. Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico metilado dos pecíolos de *E. grandiflorus* (EM_pM.1) coletados em Curitiba-PR (Coluna DB-17).

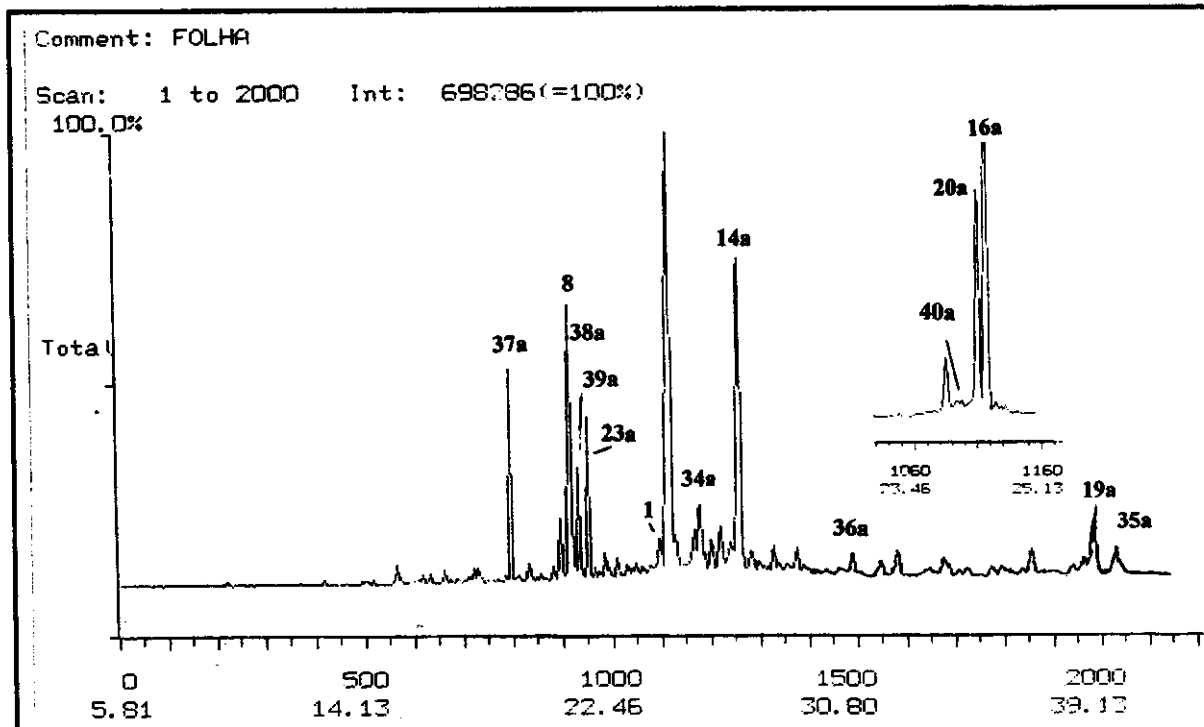


Figura 36b. Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico metilado das folhas de *Echinodorus grandiflorus* (EM_fM.1) coletadas em Curitiba-PR (coluna DB-17)

O espectro de massas de 1 (figura 37) apresentou íon molecular de m/z 288 sugerindo a substância de fórmula molecular $C_{20}H_{32}O$. Apresentou fragmentos de m/z 245 e 136 originados pela perda do radical isopropila e radical $C_{10}H_{16}O$ respectivamente, a partir do íon molecular e ainda, fragmentos de m/z 121 e 93 sugerem a estrutura 1 para a substância (esquema XIII). Comparação dos dados do espectro de massa da substância com os da literatura para o echinol (1) isolado por Manns e colaboradores apresentaram fragmentos semelhantes confirmando, portanto, a estrutura da substância 1.

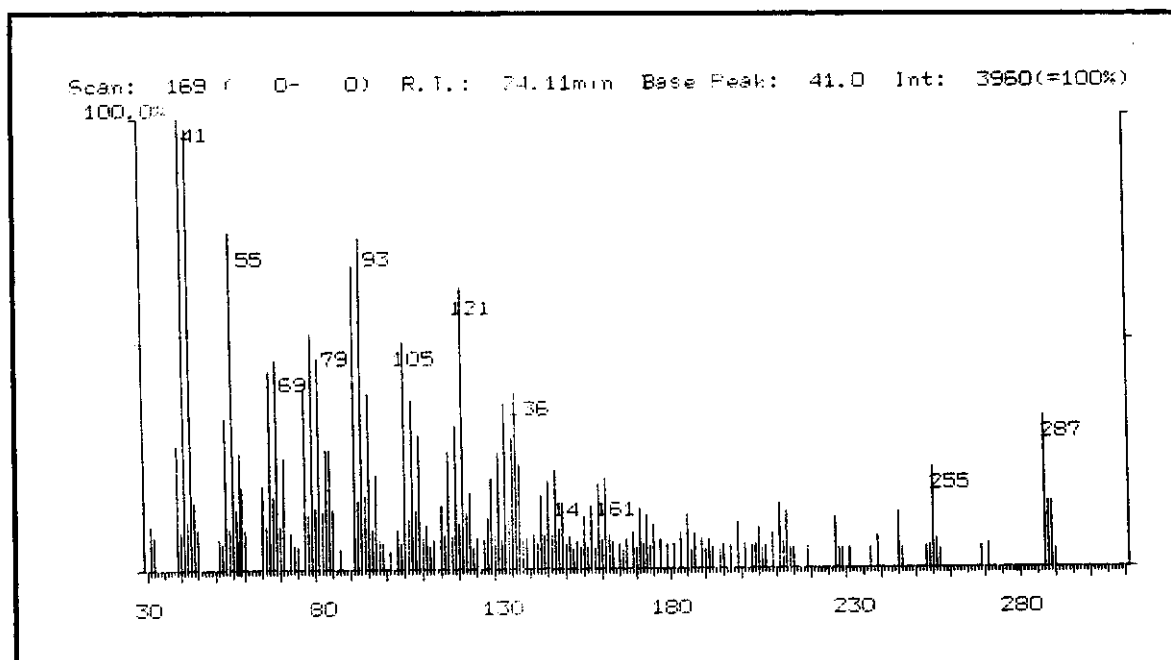
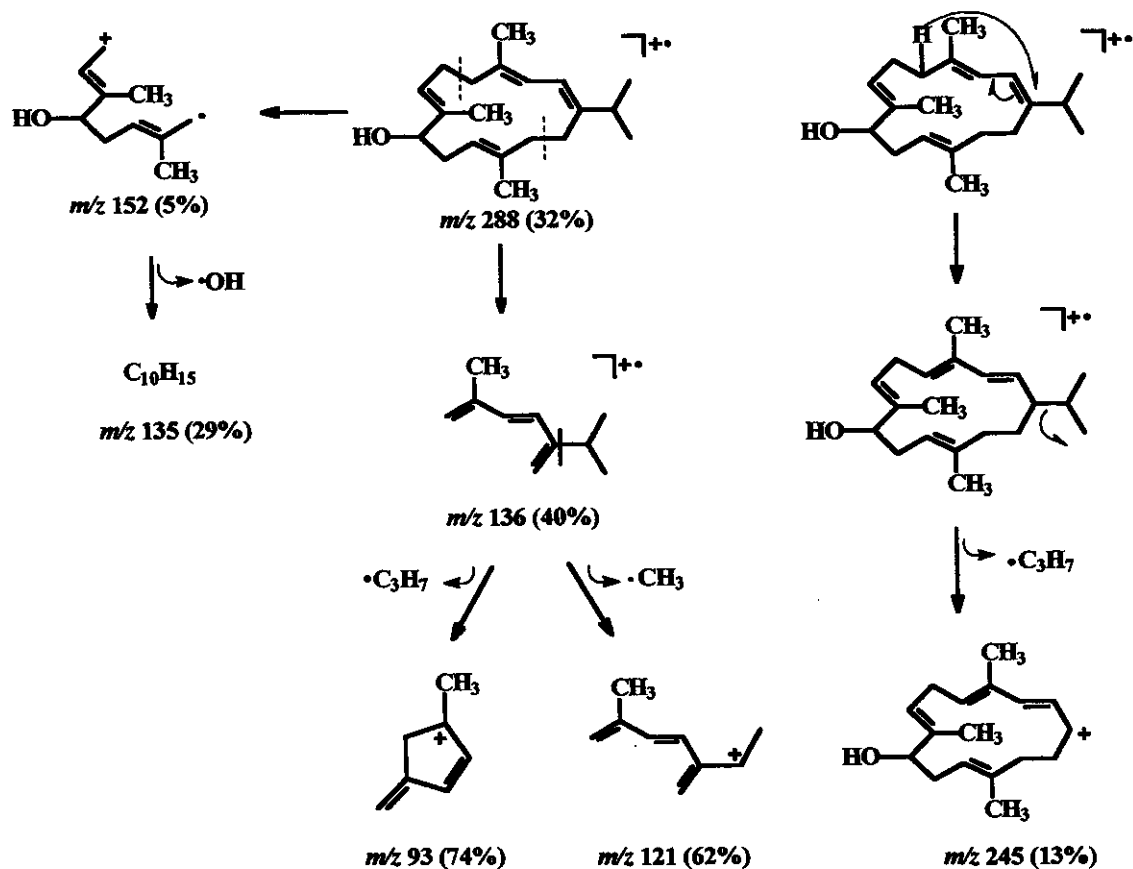


Figura 37. Espectro de massas da substância 1.



Esquema XIII. Proposta de fragmentação para a substância 1, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.

O espectro de massas da substância 40a (figura 38) mostrou o íon molecular de m/z 314 compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$. A presença dos fragmentos de m/z 136 característico da clivagem C5-C6/C13-C14 a partir do íon molecular, de m/z 271 originado pela perda do radical isopropila e ainda fragmentos de m/z 121 e 93 originados pela perda do radical metila e isopropila, respectivamente, a partir do fragmento de m/z 136, possibilitou propor a estrutura da substância como sendo a 40 (esquema XIV).

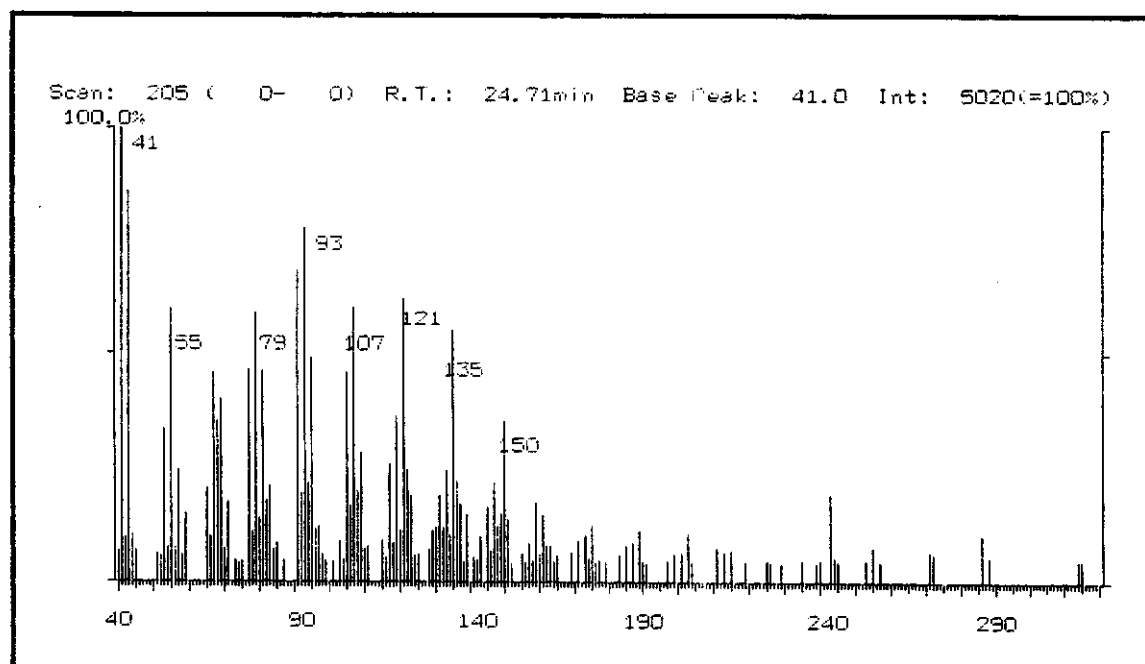
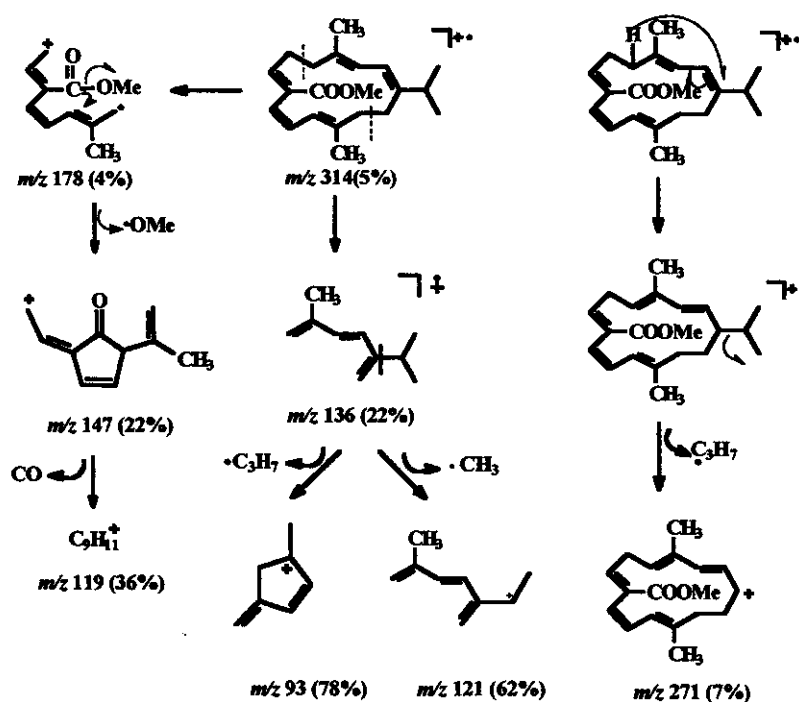


Figura 38 Espectro de massas da substância 40a.



Esquema XIV. Proposta de fragmentação para a substância 40a, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.

A análise de CG/EM dos EE_pMS (extrato etanólico metilado sililado dos pecíolos), EE_fMS (extrato etanólico metilado sililado das folhas) mostrou a presença do clerodano β -butenolídio (**18b**) apenas na forma de éster metílico/O-sililado (figuras 26a e 27a). Não o detectamos na forma de éster metílico, uma vez que o espectro de massas da substância na forma de éster metílico apresentou uma característica distinta, principalmente pela presença de um fragmento intenso de m/z 330 (100%), e de m/z 387 (100%) na sua forma éster metílico/O-sililada. Observamos, também, que o cromatograma do EM_pM mostrou apenas traços da substância **18a** e ausência da mesma no extrato EM_fM , enquanto que o cromatograma do extrato metilado sililado das folhas ($EM_fMSi.1$) mostrou a presença da substância **18b** (figura 39). Este fato sugere que substâncias clerodânicas como a **18**, na presença de excesso de diazometano, podem sofrer além da reação de metilação a reação de adição de diazometano

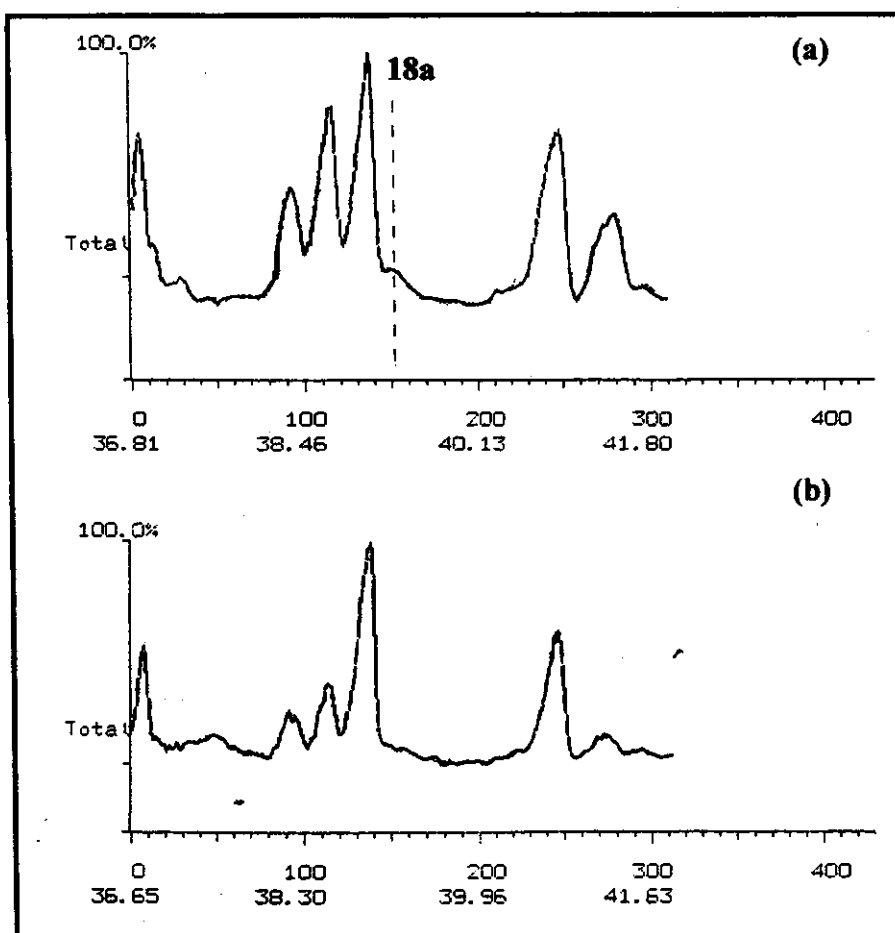


Figura 39. Expansão do Cromatograma dos extratos: a) EM_pM , b) EM_fM .

Assim, para analisar este fato, a substância 18 foi levada a reagir com excesso de diazometano em éter etílico. O cromatograma de GC/EM da reação mostrou a presença de vários produtos, sendo que dois produtos A e B apresentaram fragmento de m/z 372, coerente com perda de uma molécula neutra de MeOH a partir do íon molecular de m/z 404 sugerindo a formação dos produtos de fórmula molecular $C_{22}H_{32}O_5N_2$ (produtos 18.1 e 18.2). Um terceiro produto apresentou fragmento intenso de m/z 358, fragmento este que poderia ser proveniente do íon molecular de m/z 376 pela perda de uma molécula neutra de água sugerindo, também, a formação do produto de fórmula molecular $(C_{22}H_{32}O_5)$ produto 18.3 (figura 40). No esquema XV está mostrada a proposta de fragmentação para as substâncias 18.1, 18.2 e 18.3.

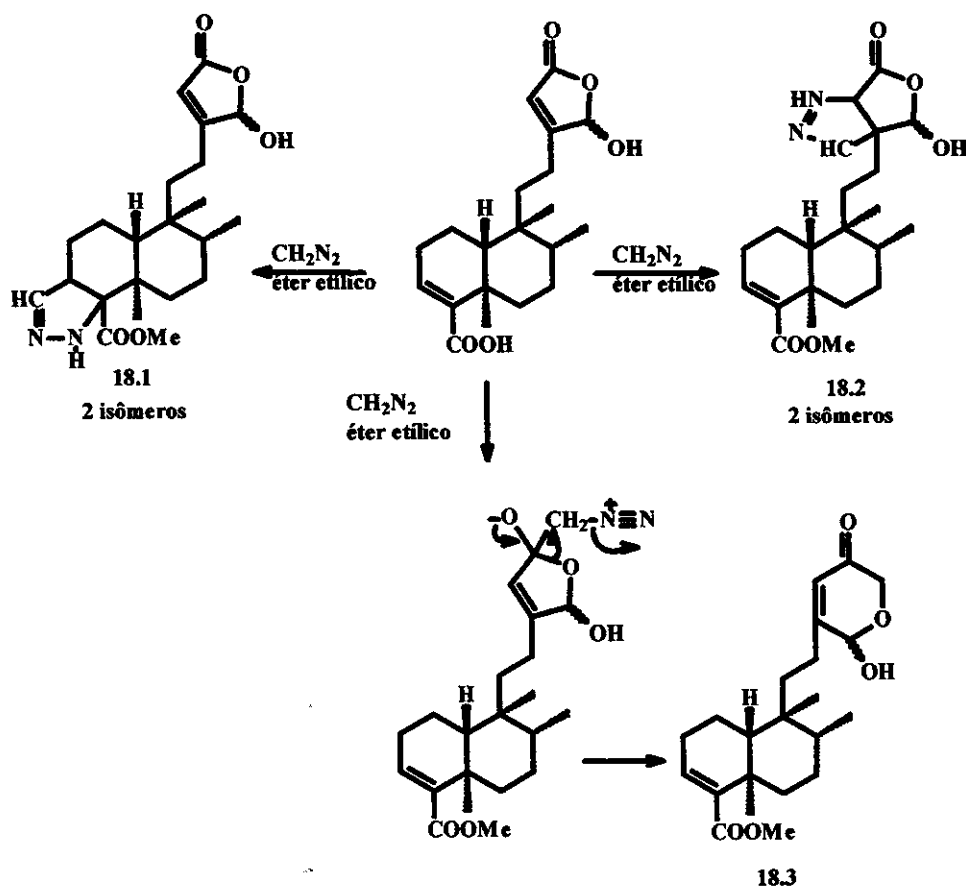
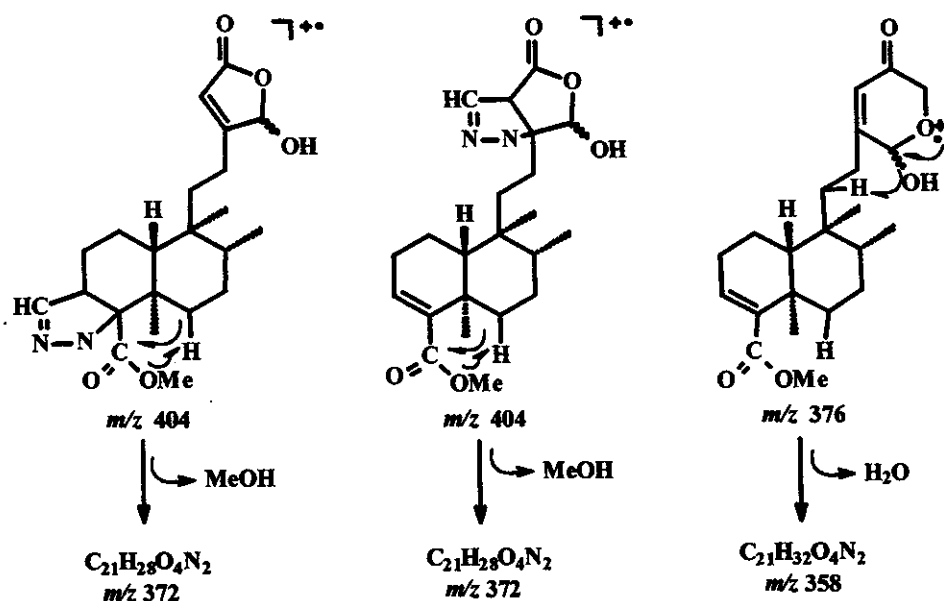


Figura 40 . Prováveis produtos de adição do diazometano à substância 18.



Esquema XV. Proposta de fragmentação para as prováveis substâncias 18.1, 18.2 e 19.3, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.

A reação de adição do diazometano às substâncias diterpênicas foi observada também por Mahato e colaboradores,⁴² durante o isolamento da substância 41 a partir da espécie *Conyza Stricte*, por Bohlmann e colaboradores,⁴³ durante o isolamento da substância 42 a partir de *Acritopappus confertus* (figura 41) e por Devi e colaboradores,⁴⁴ ao tratar a substância 43, isolada de *Anisomeles malabarica*, com diazometano.

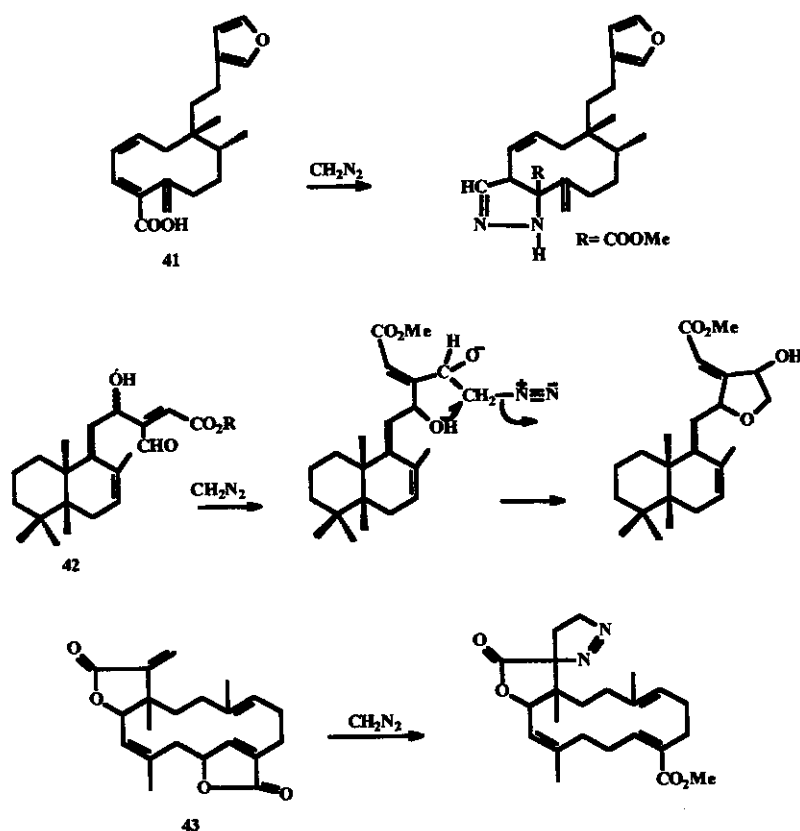


Figura 41. Reação de adição do diazometano às substâncias 41⁴², 42⁴³ e 43⁴⁴.

1.3.2.3. ESTUDO DOS EXTRATOS METANÓLICOS BRUTOS DAS FOLHAS E PECÍOLOS DE *Echinodorus grandiflorus* DERIVADOS COM BTSTFA.

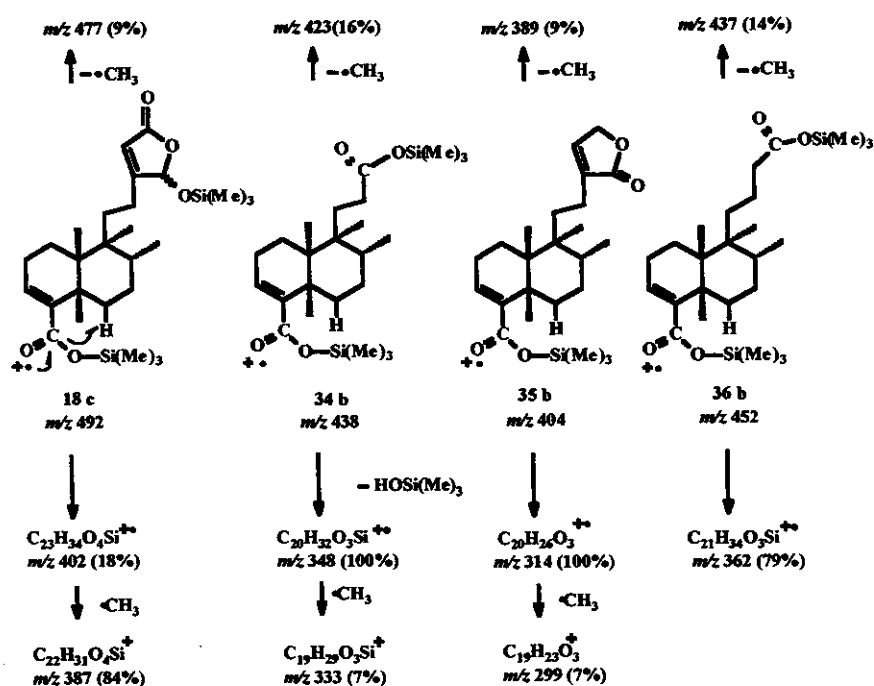
A inconveniência do uso de excesso do diazometano para a análise dos compostos butenolídios nos levou a verificar o comportamento destes apenas na forma sililada. Assim, os extratos metanólicos das folhas e pecíolos de *E. grandiflorus* coletada em Curitiba –PR (1998) foram sililados com BTMSTFA obtendo-se os extratos EM_pS.1 e EM_fS.1, os quais foram analisados (1µl, 30,0mg/ml) no espectrômetro de GC/EM equipado com coluna DB-5 (condição nº 5) e DB-17(condição nº 7).

O cromatograma de CG/EM do extrato EM_fSi obtido utilizando-se a coluna DB-17 mostrou que as substâncias 18c e 19c eluem juntas, enquanto que utilizando-se a coluna DB-5,

ocorreu uma perfeita separação das substâncias 18c e 19c confirmando, portanto, que a análise dos extratos derivados com excesso de diazometano apresenta inconveniência para a identificação de substâncias com esqueleto butenolídio. Já as substâncias 16b e 20b não mostraram uma separação adequada utilizando-se ambas as colunas.

Os derivados sililados do ácido hardwickico (14b) (E 13.1), ácido cembranóico (16b) (E 22.2), echinol (1b) (figura 42), clerodano 20b e do derivado cembranóico 40b (figura 42) foram identificados pela presença dos respectivos íons moleculares de m/z 388, 374, 360, 374 e 372 compatíveis com as fórmulas moleculares $C_{23}H_{36}SiO_3$; $C_{23}H_{38}SiO_2$; $C_{23}H_{40}SiO$; $C_{23}H_{38}O_2Si$, $C_{23}H_{36}SiO_2$, respectivamente

As substâncias 18c, 34b, 35b e 36b foram identificadas principalmente pela presença de fragmentos caracterizados pela perda de molécula neutra de $HOSi(CH_3)_3$ a partir do íon molecular (o qual não aparece no espectro de massas) e subsequente perda do radical metila e ainda pelo fragmento de m/z 73 característico de íon $Si(CH_3)_3$ (esquema XVI, figura 43).



Esquema XVI. Proposta de fragmentação para as substâncias 18c, 34b, 35b e 36b, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.

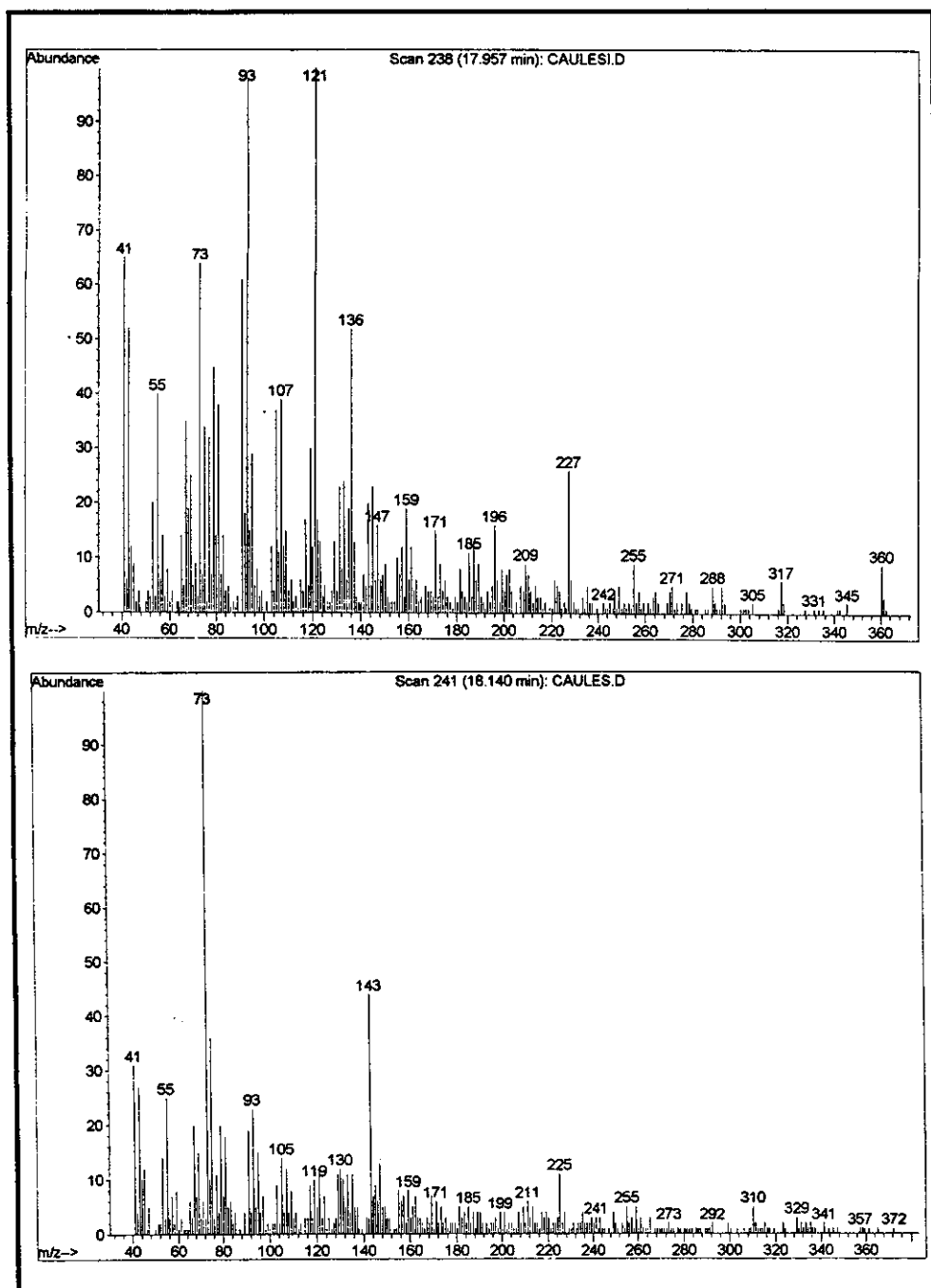


Figura 42. Espectro de massas das substâncias 1b e 40b.

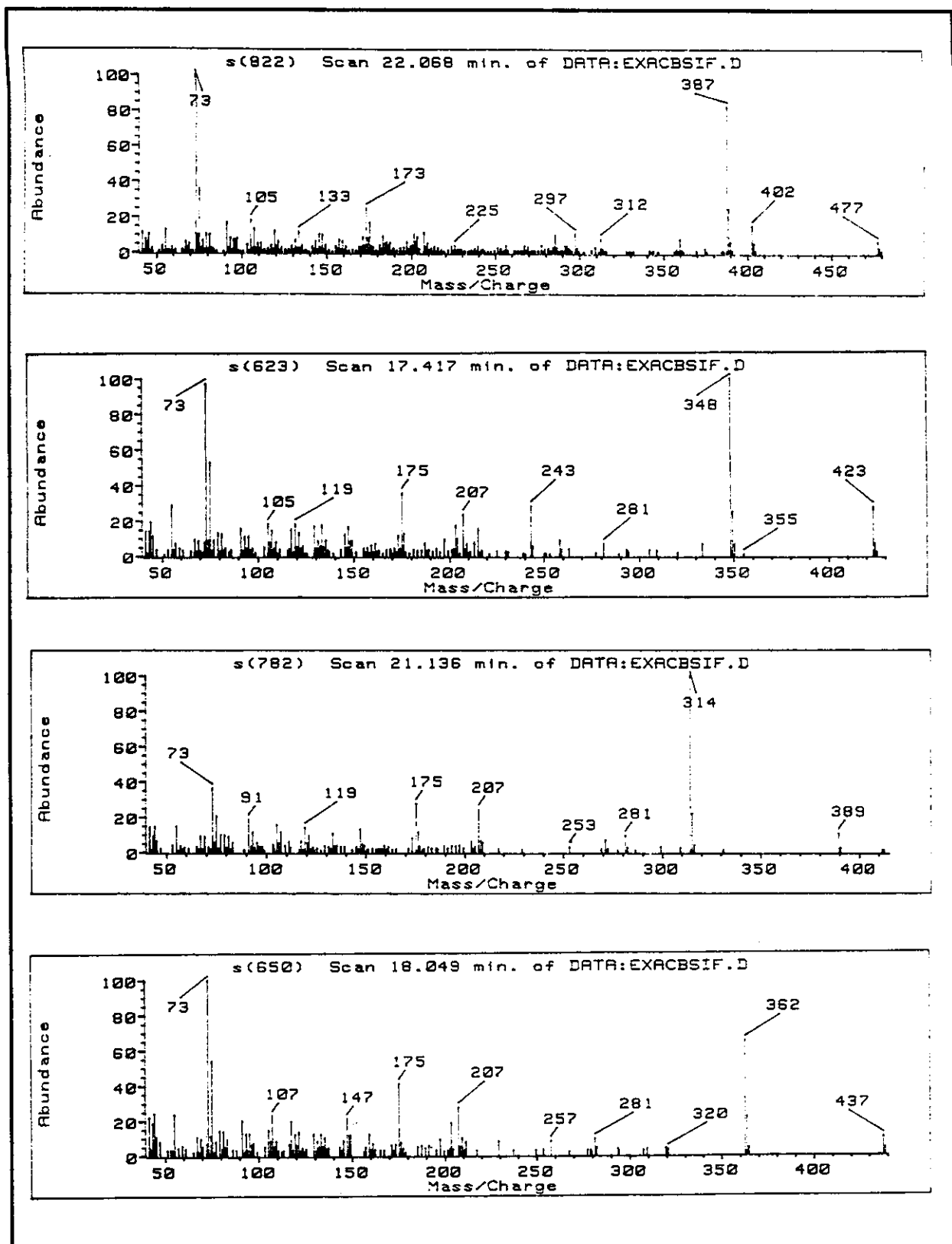


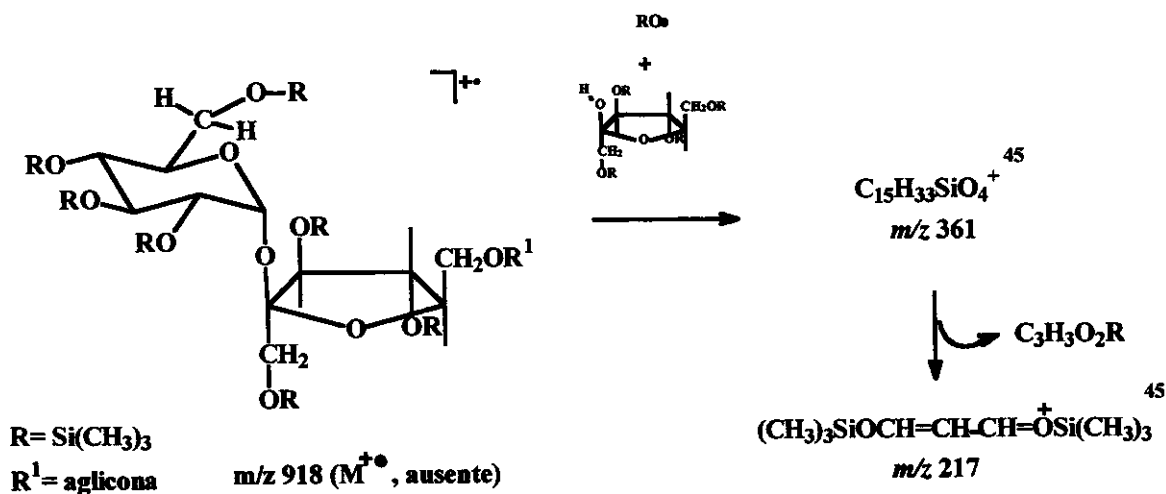
Figura 43. Espectro de massas das substâncias (a) 18b, (b) 34b, (c) 35b e (d) 36b.

A substância **17b** foi identificada pela presença dos fragmentos de m/z 359 e m/z 402 originados pela perda do radical $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$ e perda de molécula neutra de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ respectivamente, a partir do íon molecular.

A substância **19b** foi identificada pela presença dos fragmentos de m/z 402 e 387, correspondendo à perda de $\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3$ e subsequente perda de radical CH_3 a partir do íon molecular como também, pela presença dos fragmentos de m/z 329 e 344 (E 42.1).

Identificou-se as substâncias silil hexadecanóico (**37b**), silil octadecanóico (**38b**) e silil linolenato (**23b**) pela presença nos respectivos espectros de massas do íon molecular de m/z 328, 356 e 350 e ainda, pela presença de fragmentos de m/z 132 originados do rearranjo McLafferty a partir do íon molecular.

Observamos adicionalmente, a presença das substâncias **22a1**, **22b.1** e **22c.1** caracterizadas pela presença do íon molecular de m/z 472, 484 e 486 coerentes com as formulas moleculares $\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{SiO}$, $\text{C}_{32}\text{H}_{56}\text{SiO}$ e $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{SiO}$, respectivamente. A presença de substâncias que eluíram entre 20 a 22min apresentaram fragmentos característicos de glicosídeos **44** contendo dissacarídeos do tipo da sucrose sililada (esquema XVII). Para confirmação estrutural seria necessário estudar a fração polar que não foi o alvo deste estudo, entretanto notificar a presença do mesmo é importante para trabalhos futuros principalmente devido ao fato de ter sido observada uma grande abundância destes glicosídeos na espécie *Echinodorus macrophyllus*.



Esquema XVII. Proposta de fragmentação para glicosídeos genéricos contendo duas unidades de carboidrato, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.

1.3.2.4.COMPARAÇÃO DOS EXTRATOS METANÓLICOS SILILADOS DE *Echinodorus grandiflorus* COM OS DE OUTRAS ESPÉCIES.

O estudo comparativo de diversas espécies de *Echinodorus* foi norteado pelos erros e acertos das análises anteriores.

Assim, foi escolhido o metanol como solvente para obtenção dos extratos das plantas, a derivação dos extratos com bis – (trimetilsililtrifluoroacetamida) e a análise por CG/EM no espectrômetro HP 5790 equipado com coluna DB-5.

As espécies analisadas foram: *E. grandiflorus* (coletada em Campinas-SP), *E. macrophyllus* (extrato fresco e comercial), *E. arsesonianus*, *E. longipetalus* e *E. tenellus*. Todas as amostras foram coletadas em Campinas-SP (1999) e imediatamente extraídas com metanol e derivadas com BTMSTFA.

As figuras 44a-44g mostram os cromatogramas dos extratos analisados. As substâncias identificadas estão indicadas nos cromatogramas com os números de suas estruturas.

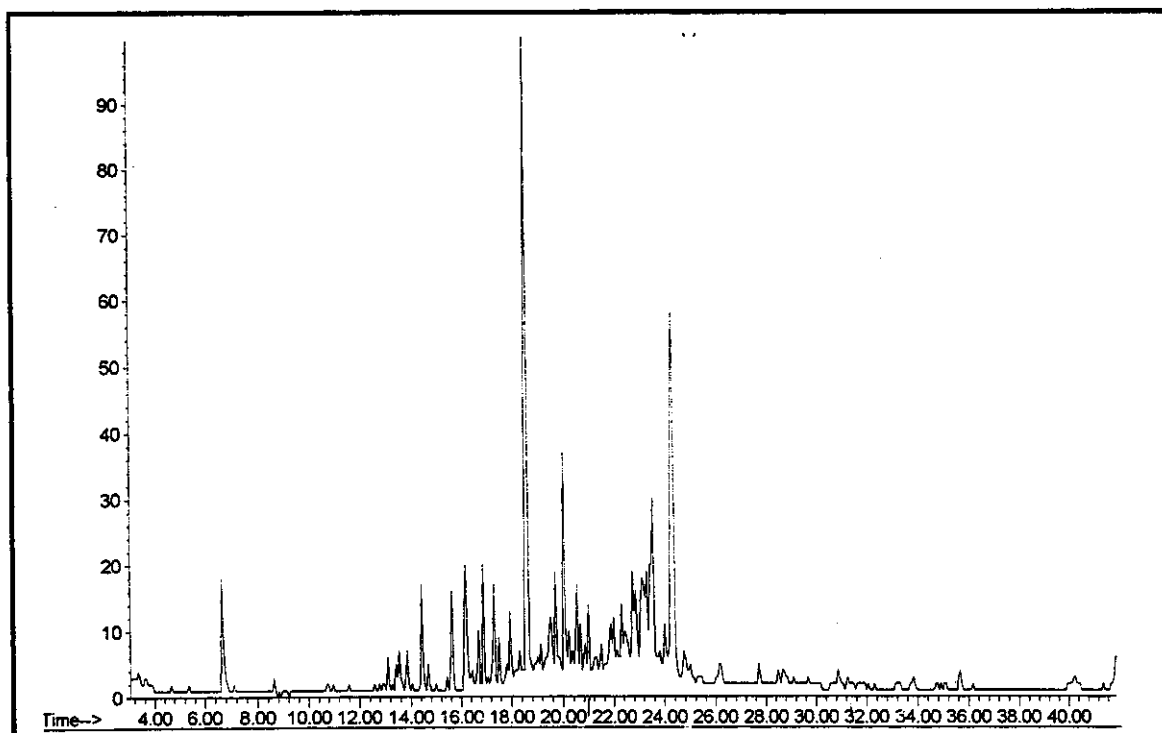
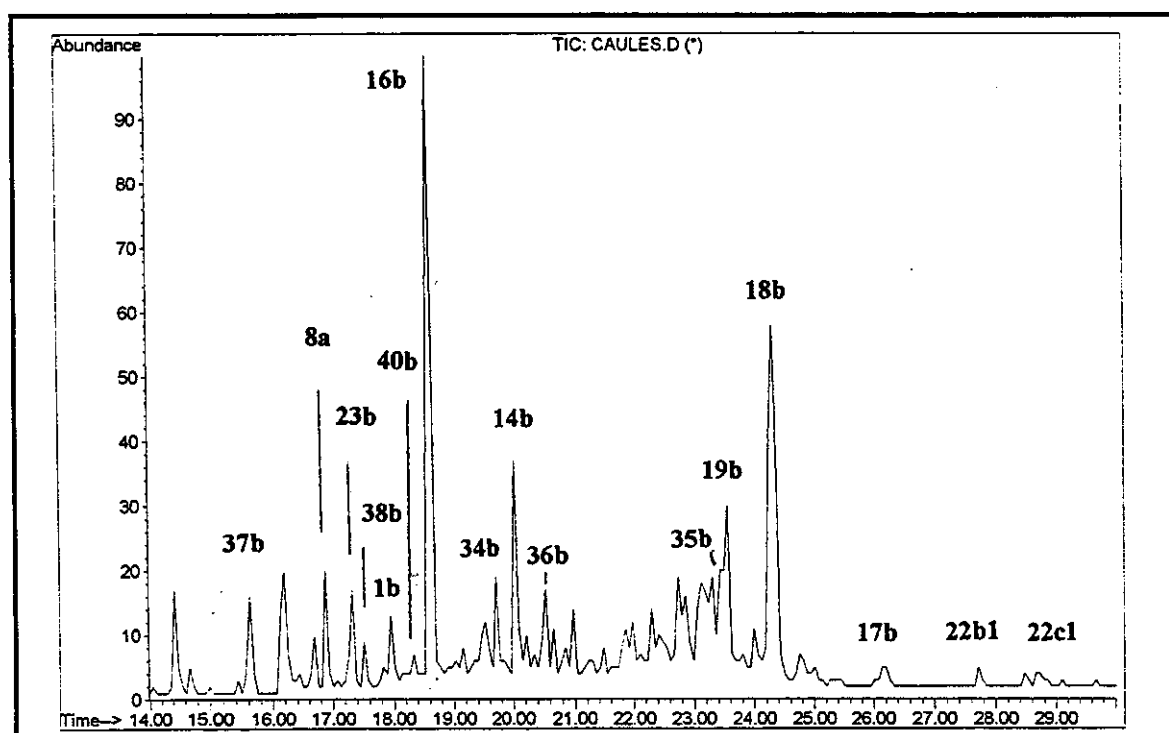


Figura 44a. Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado dos pecíolos de *Echinodorus grandiflorus* (EM_pSi) coletados em Curitiba-PR. (coluna DB-5).



44a.1-Expansão da figura 44a.

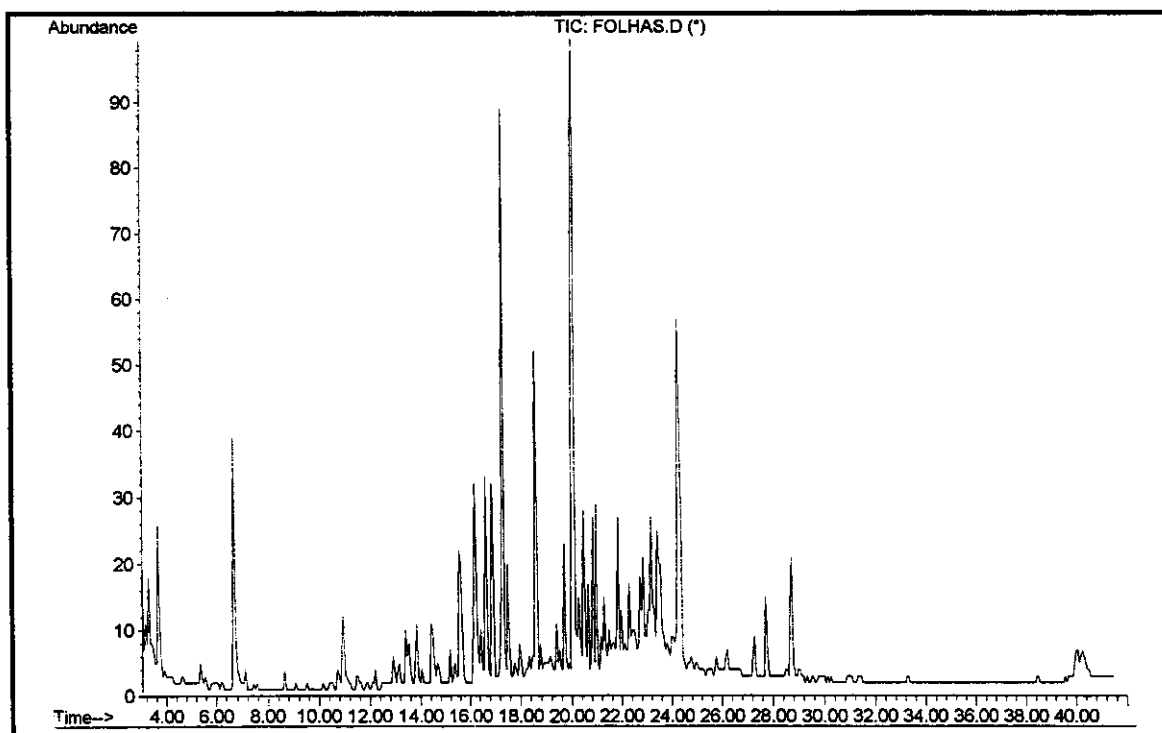


Figura 44b. Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico siliado das folhas de *Echinodorus grandiflorus* coletadas em Curitiba-PR (coluna DB-5).

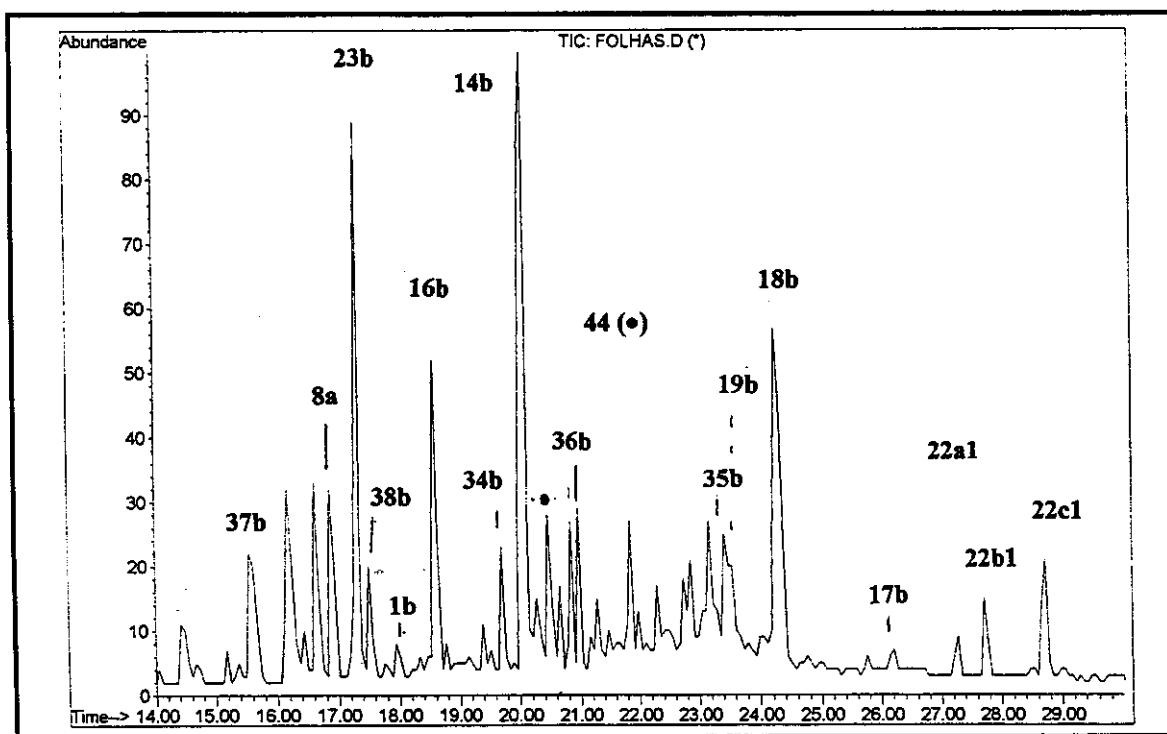


Figura 44b.1. Expansão da figura 44b.

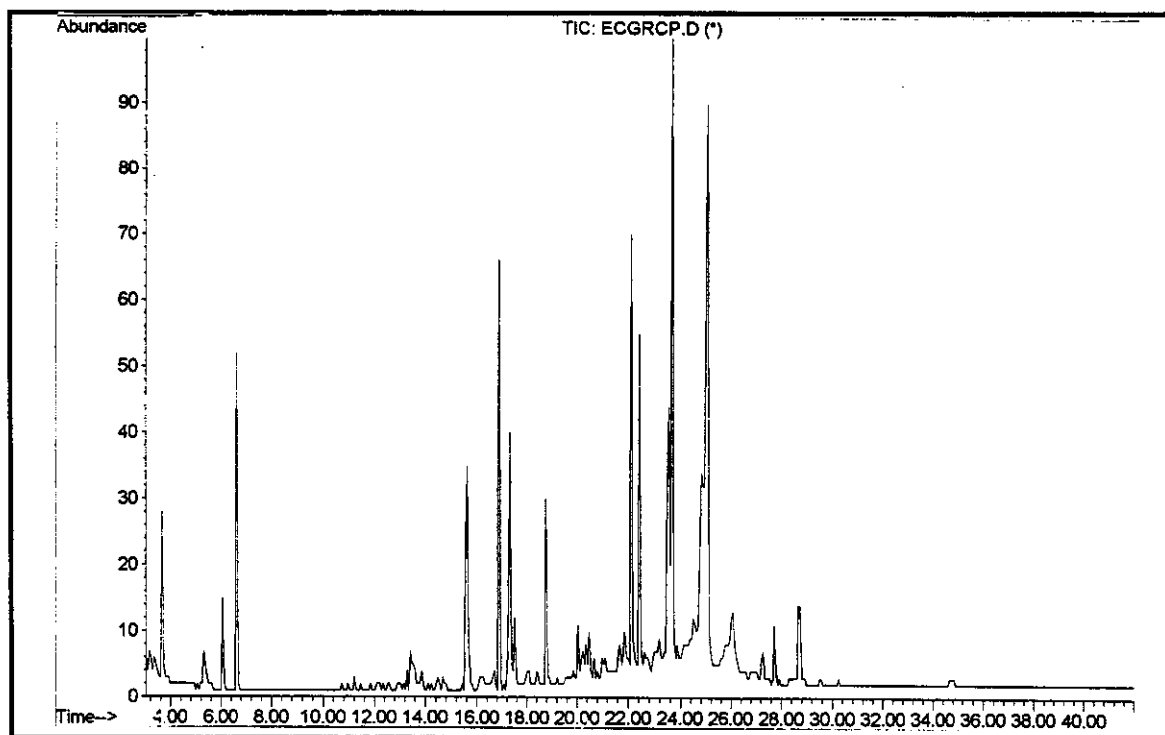


Figura 44c. Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado da espécie *Echinodorus grandiflorus* (EMSi -2, folhas e pecíolos) coletada em Campinas-SP (coluna DB-5).

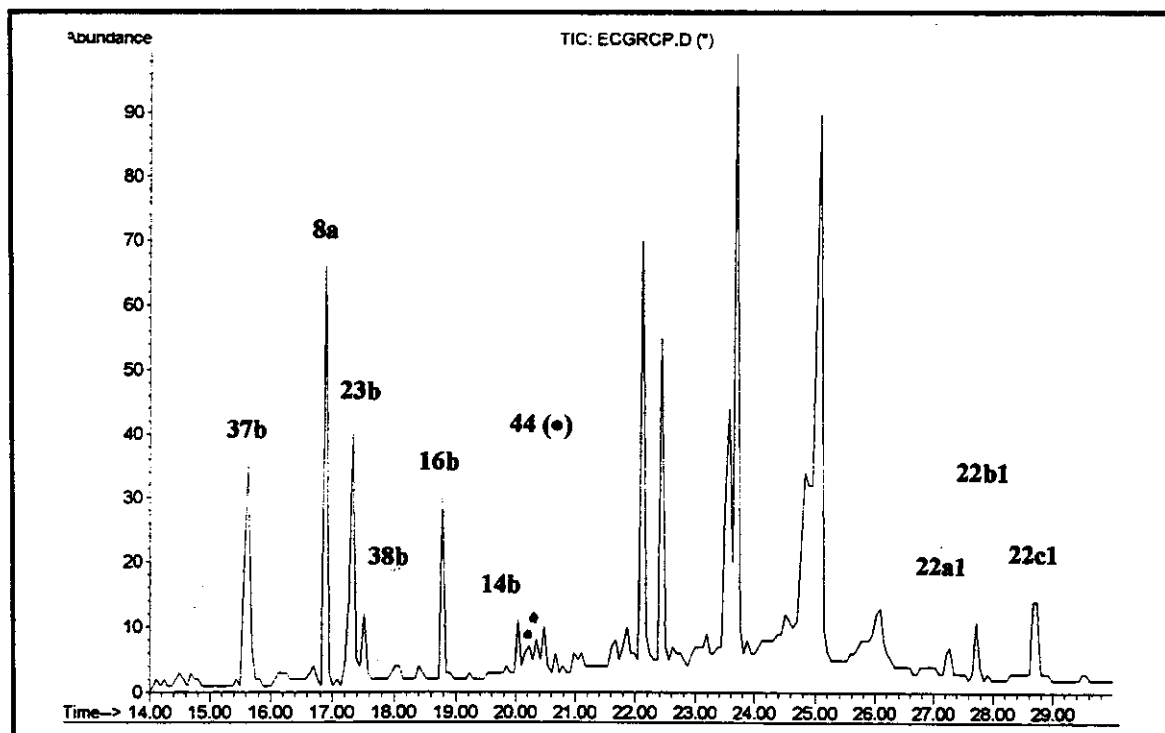


Figura 44c.1. Expansão da figura 44c.

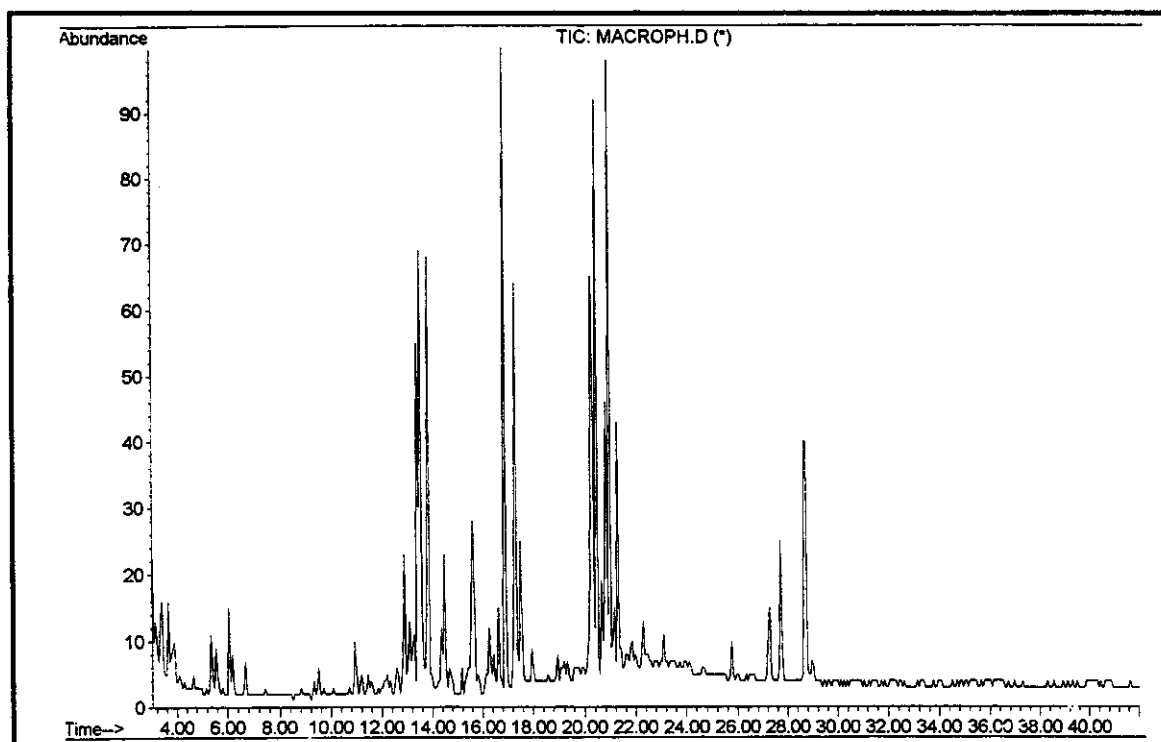


Figura 44d. Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado da espécie *Echinodorus macrophyllus* (EMSi_{EM}, folhas e peíolos) coletada em Campinas-SP (coluna DB-5).

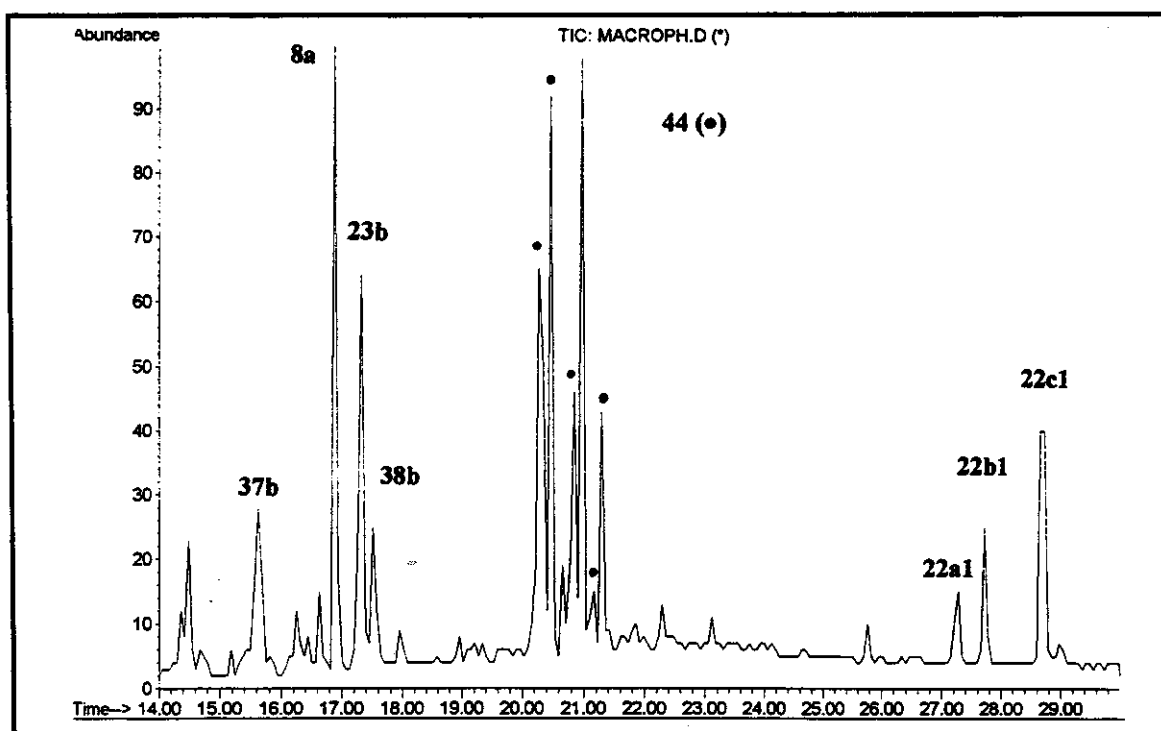


Figura 44d.1. Expansão da figura 44d.

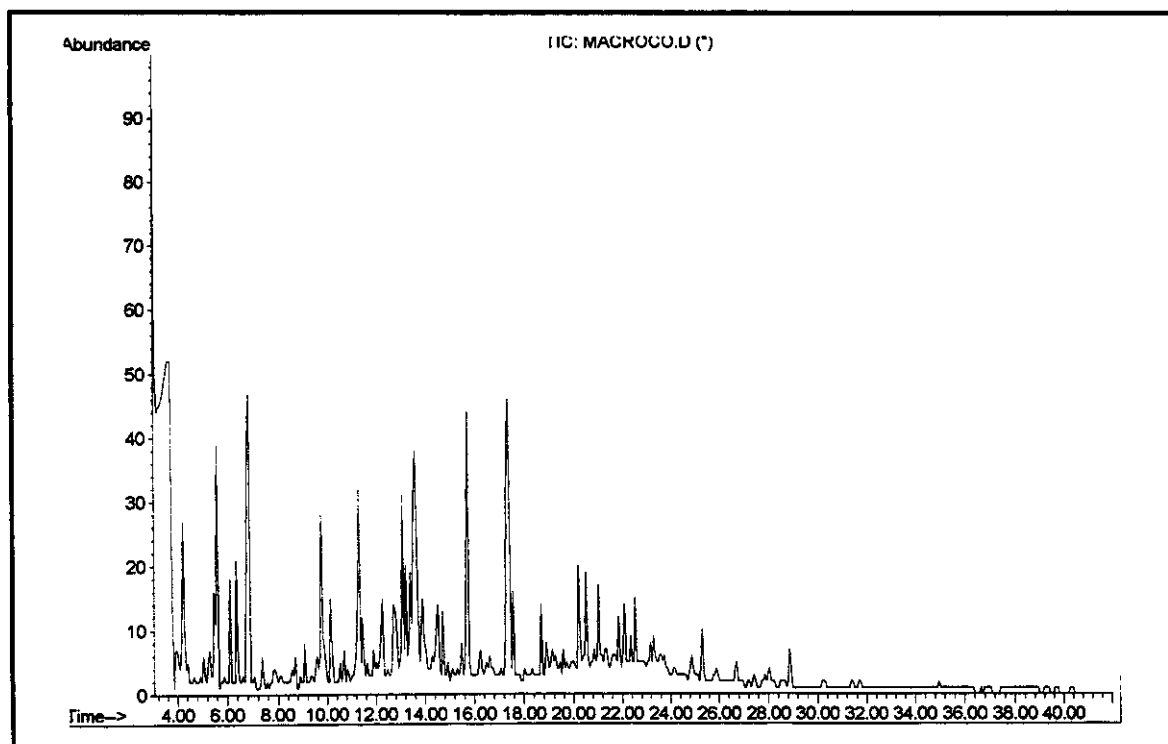


Figura 44e. Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado da espécie *Echinodorus macrophyllus* (EMSi_{EMC}, comercial) - Campinas-SP (coluna DB-5).

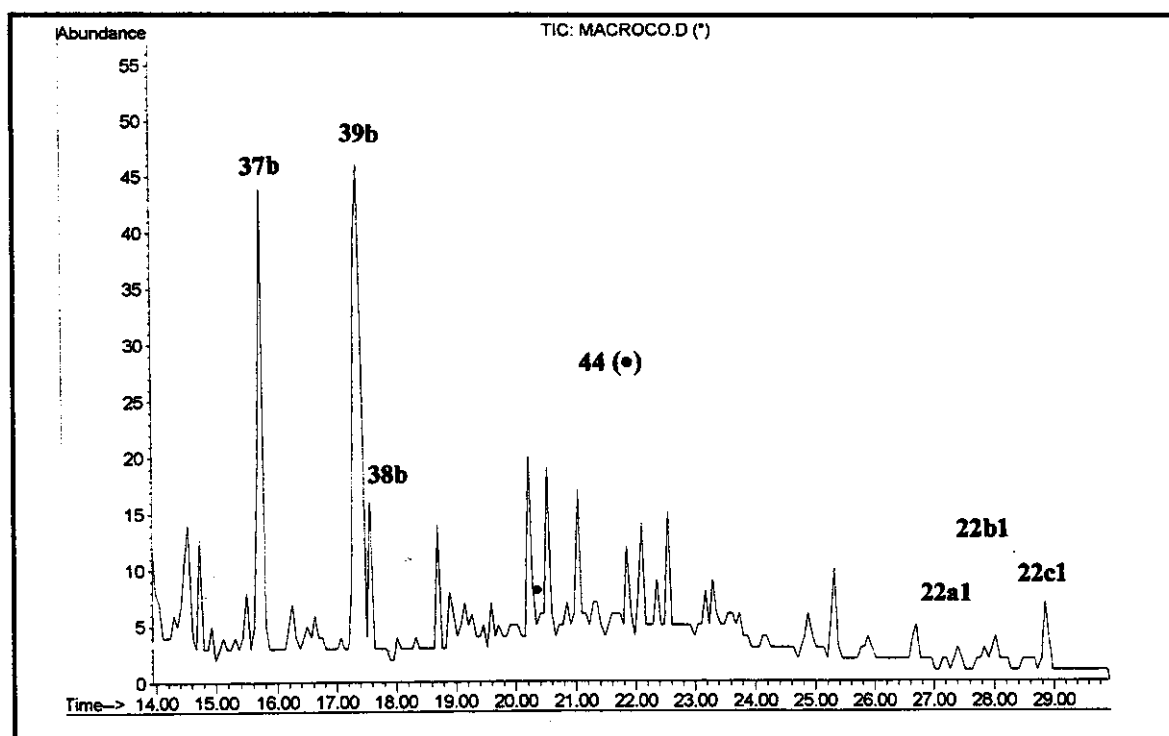


Figura 44e.1. Expansão da figura 44e.

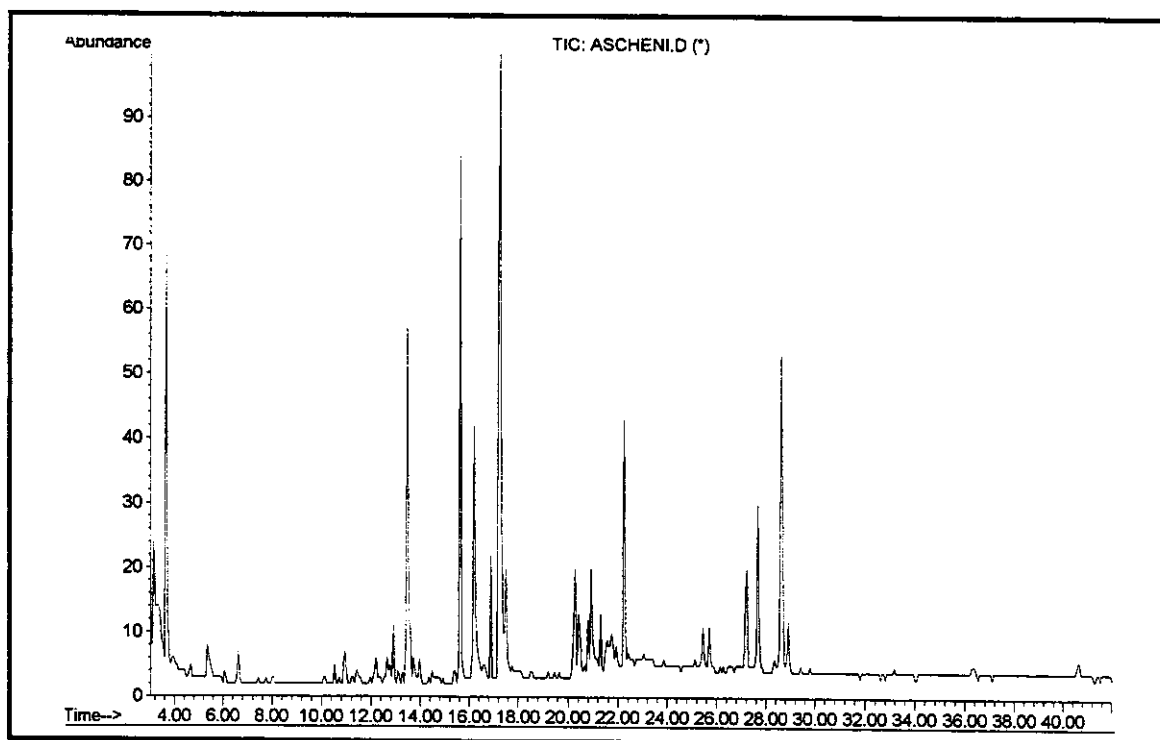


Figura 44f. Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado da espécie *Echinodorus aschersonianus* (EMSi_{EA}, folhas e pecíolos) coletada em Campinas-SP (coluna DB-5).

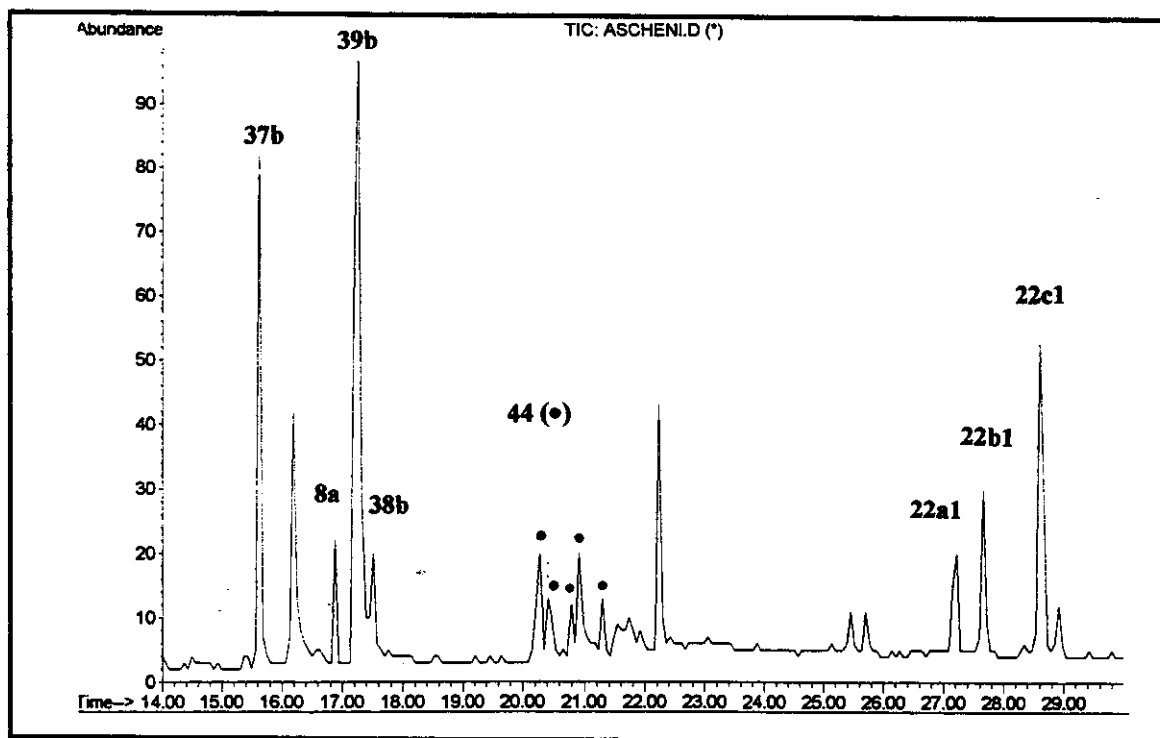


Figura 44f.1. Expansão da figura 44f.

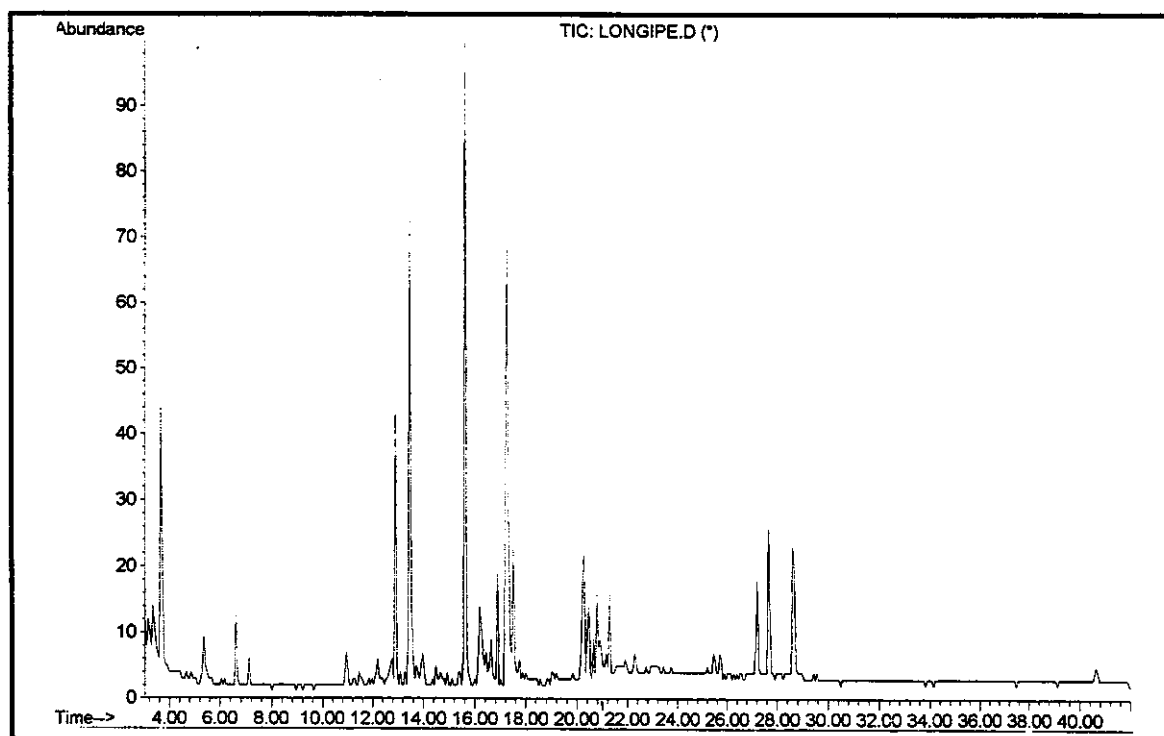


Figura 44g. Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico sililado da espécie *Echinodorus longipetalus* (EMS_{Elo}, folhas e pecíolos) coletada em Campinas-SP (coluna DB-5).

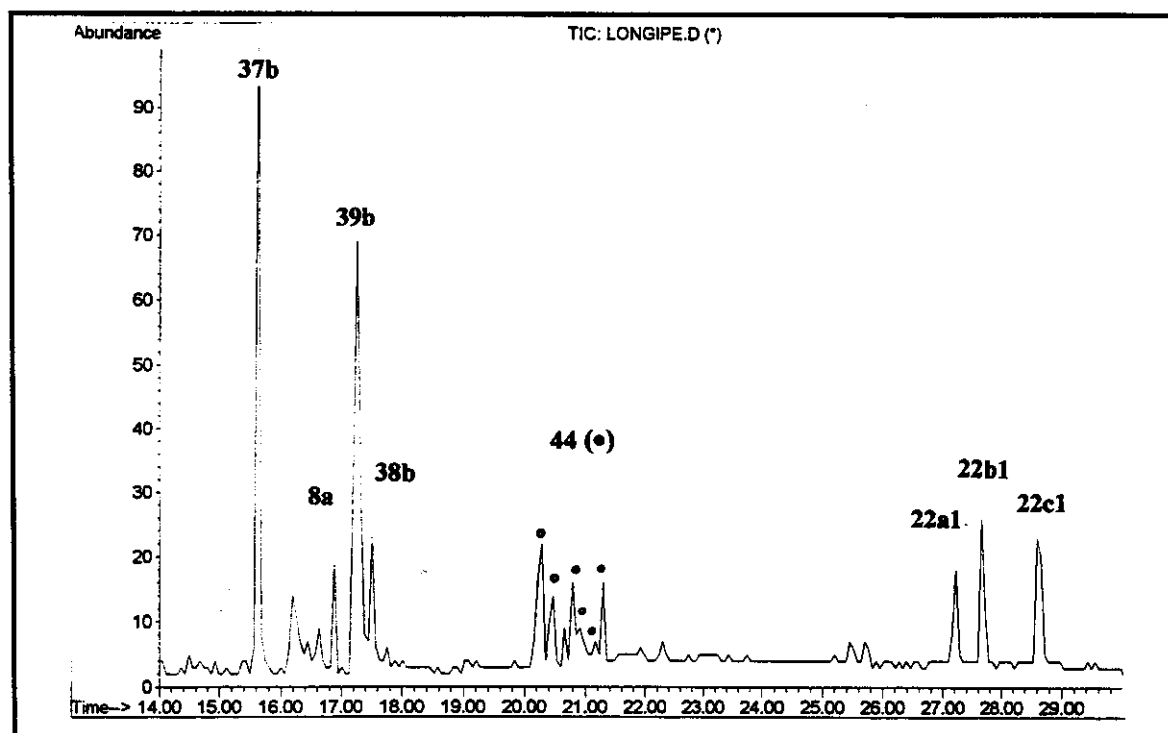


Figura 44g.1. Expansão da figura 44g.

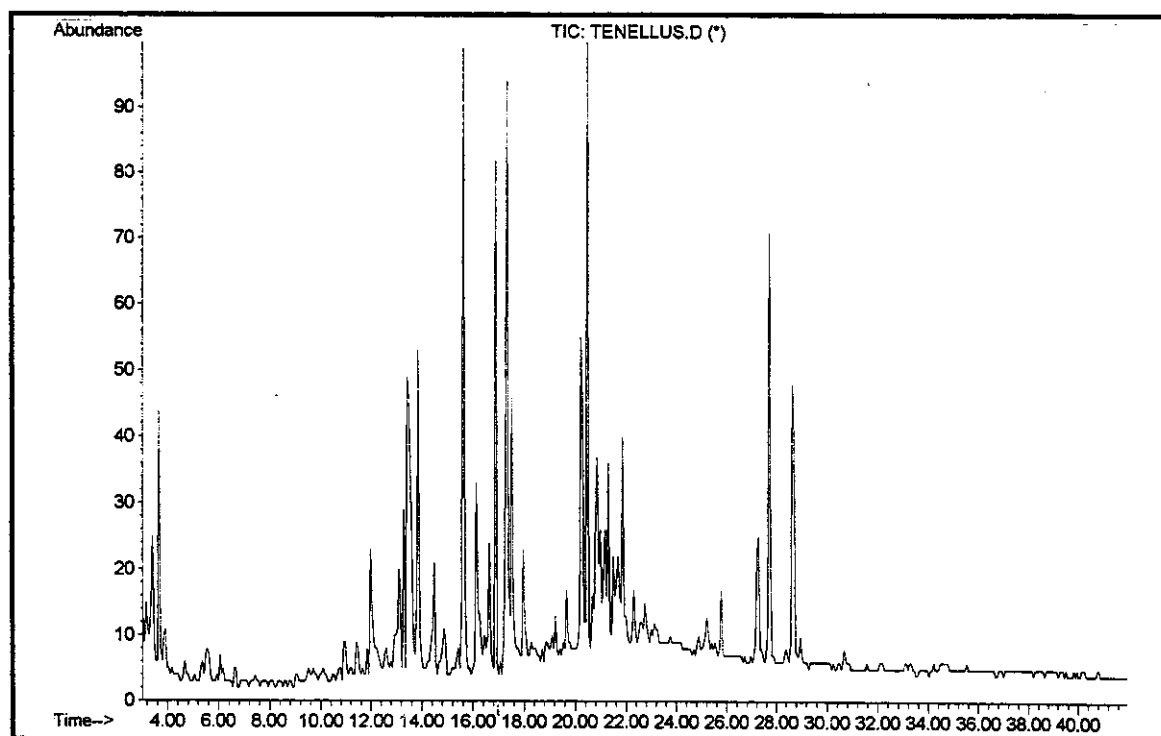


Figura 44h. Cromatograma de CG/EM do extrato metanólico siliado da espécie *Echinodorus tenellus* (EMSi_{En}, folhas e pecíolos) coletada em Campinas-SP (coluna DB-5).

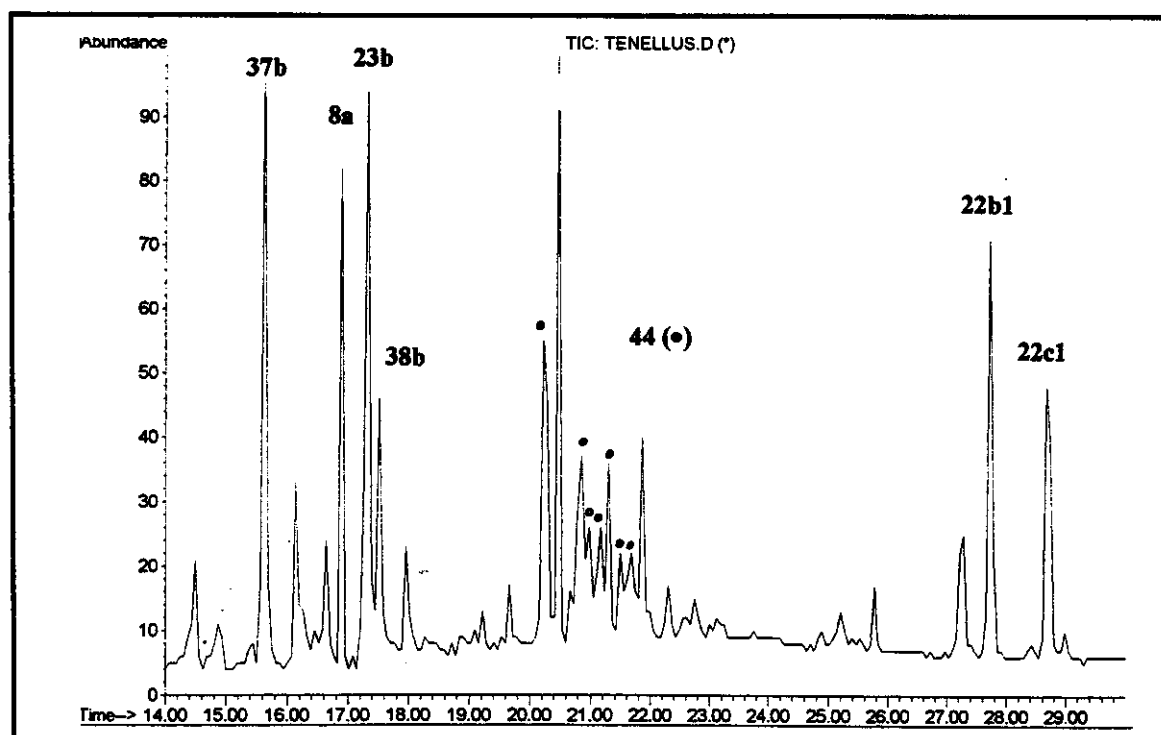


Figura 44h.1. Expansão da figura 44h.

O cromatograma do extrato metanólico sililado da espécie *E. grandiflorus* (EMSi .2) coletada em Campinas-SP., mostrou a presença dos derivados sililados do ácido cembranóico (16b) e ácido hardwickico (14b) como componentes minoritários, do fitol (8a), dos ácidos graxos 23b, 37b e 38b, dos esteróides 22a1, 22b.1 e 22c.1. As substâncias majoritárias eluídas com tempo de retenção entre 22,00min e 24,00min, apresentaram em seus respectivos espectros de massas fragmentos de m/z 93 e 121 que caracterizam os derivados cembranóicos. A ausência de fragmento de m/z 73 de radical trimetilsilila sugerem esqueletos cembranóicos sustentando grupo(s) lactona (s) para essas substâncias como por exemplo a substância 43.

Os extratos metanólicos sililados de *Echinodorus macrophyllus*, *E. aschersonianus*, *E. longipetalus* e *E. tenellus* apresentaram perfil cromatográfico semelhantes constituídos principalmente por derivados sililados de ácidos graxos, derivados glicosilados e esteróides. É importante salientar que a não identificação das substâncias clerodânicas e cembranóicas nestas espécies, não invalida a presença das mesmas pois este estudo foi realizado com o extrato bruto e estando as substâncias presentes como minoritárias ou apenas traços dificultaria a identificação apenas por seus espectros de massas.

A comparação dos extratos de *E. macrophyllus* coletada em Campinas-SP. com o *E. macrophyllus* comercial obtida no comércio em cápsula não mostrou uma correlação com as substâncias identificadas nas diversas espécies estudadas, o que poderia indicar uma adulteração do produto ou um baixo controle da matéria prima.

I.3.3 – ENSAIOS BIOAUTOGRÁFICOS

Como foi mencionado na introdução, a literatura relaciona uma variedade de propriedades medicinais da planta *Echinodorus grandiflorus*. No entanto, observa-se que a comercialização como chá encontra-se restrita a *Echinodorus macrophyllus*. Diante destes fatos e a observação na diferença da composição química entre *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus*, durante os estudos da planta do gênero *Echinodorus* por CG/EM, tornou-se importante investigar a atividade biológica da espécie *Echinodorus grandiflorus* coletada em Curitiba-PR.

Para realizar os testes de atividade biológica escolhemos o método de bioautografia, otimizado e utilizado pelo grupo há algum tempo.⁴⁶

A bioautografia é um método para detectar a atividade antibacteriana de uma determinada substância em análise, por cromatografia.

A detecção da atividade biológica é realizada em Cromatografia de Papel (CP) ou Cromatografia em Camada Delgada, através da visualização de halos que se formam sobre a superfície, exatamente sobre as substâncias que inibem ou promovem o crescimento do microorganismo a qual foram expostas.

Estes testes foram realizados aplicando-se 8µl dos extratos metanólicos dos pecíolos e folhas de *E. grandiflorus* (5,0mg/mL), do cembrano (16) (2,0mg/mL) da substância 71 (2,0mg/mL) (ver página 106) e 0,5µl da substância de referência cloranfenicol (0,4%). em uma placa de CCD suportada em folha de alumínio.

As culturas dos microorganismos empregados para estes testes, bem como os meios de cultura, foram adquiridos na Fundação Tropical André Tosello em Campinas. Os microorganismos escolhidos foram: as bactérias *Rhodococcus equi* (gram +) (CCT 0541), *Staphylococcus aureus* (gram +) (CCT 4295), *Bacillus subtilis* (gram +) (CCT 0089) e a levedura *Candida albicans* (CCT 0776)

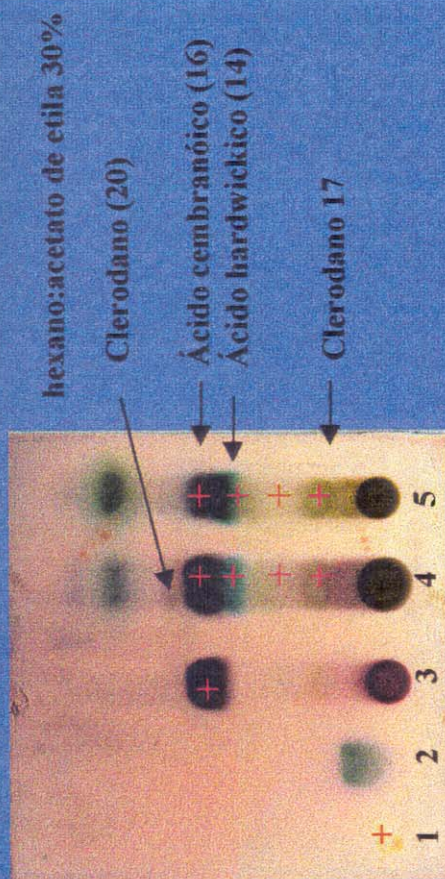
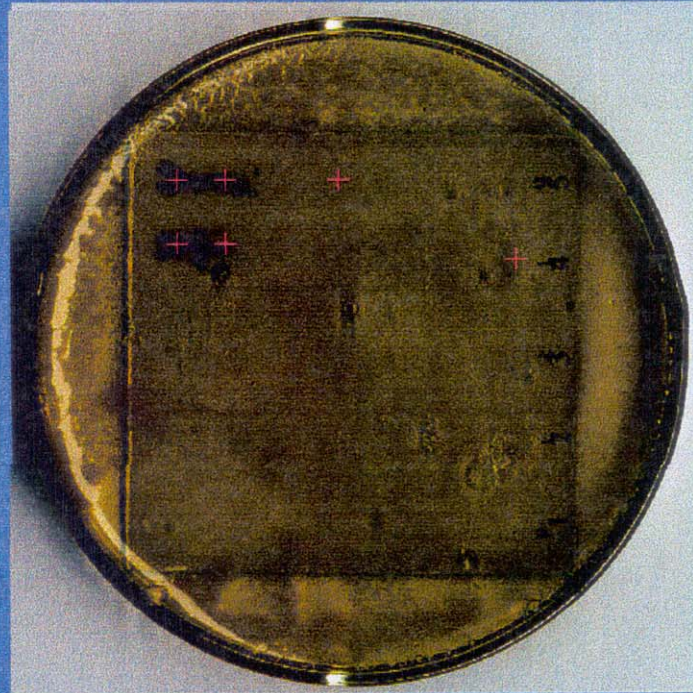
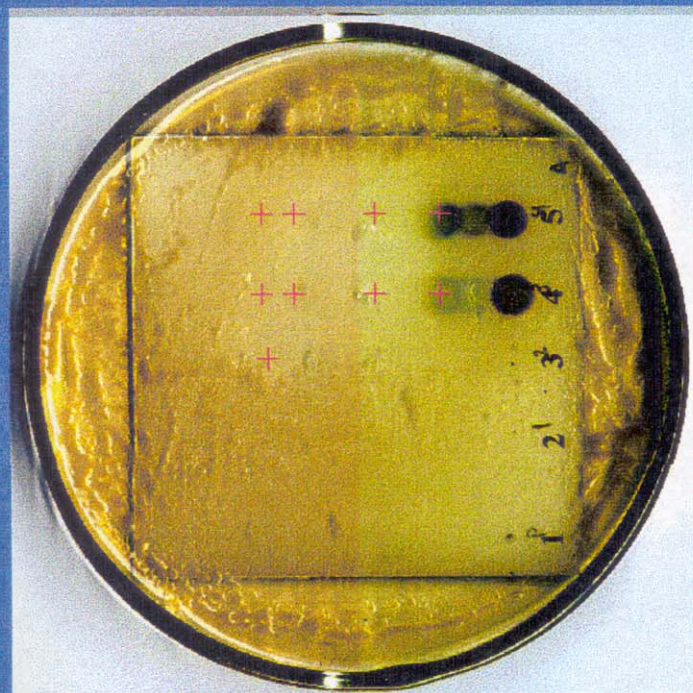
A análise dos testes de atividade biológica revelou que os extratos das folhas e pecíolos são ativos contra os microorganismos *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Com relação a levedura *Candida albicans*, tais extratos apresentaram uma moderada atividade.

Foi comprovada a atividade do ácido cembranóico (16) contra os microorganismos *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (figuras 45a, 45b e 45c).

O clerodano 20 apresenta R_f muito próximo ao do ácido cembranóico (16) (0,48 x 0,45 em hexano:acetato de etila 30%) e ao do ácido hardwickico (14) (0,40 em hexano:acetato de etila 30%), sendo pois difícil dizer se a inibição observada nesta região com os microorganismos *Rhodococcus equi* (figura 45a), *Staphylococcus aureus* (figura 45b) e *Bacillus subtilis* (figura 45c) se deve também ao clerodano 20. No entanto, a presença do halo de inibição um pouco superior à região de eluição do cembrano nos extratos dos pecíolos e folhas na presença destes microorganismos, permite sugerir que a substância 20 também possui atividade contra os microorganismos *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Os clerodanos 18 e 19 são difíceis de serem revelados na presença do revelador utilizado para teste de atividade biológica: o revelador para terpenos (anisaldeído:metanol:ácido sulfúrico). São visualizados levemente na presença do revelador universal (metanol: ácido sulfúrico, 50%) o que possibilitou obter o valor do R_f no eluente clorofórmio metanol 30% como sendo 0,7. Concluiu-se que as substâncias 18 e 19 inibem o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* de maneira 2 vezes (halo de 1,00cm) maior do que uma alíquota de (0,5µl) da substância cloranfenicol (halo de 0,5cm).

Observou-se também a atividade da substância 17 contra os microorganismos *Staphylococcus aureus* (figura 45b), *Bacillus subtilis* (figura 45c) e *Rhodococcus equi* (figura 45d) em aproximadamente a mesma proporção à da cloranfenicol.



- 1- cloranfenicol
- 2- composto 71
- 3- ácido cembranólico (16)
- 4- extrato metanólico de *E. grandiflorus* - caule
- 5- extrato metanólico de *E. grandiflorus* - folhas

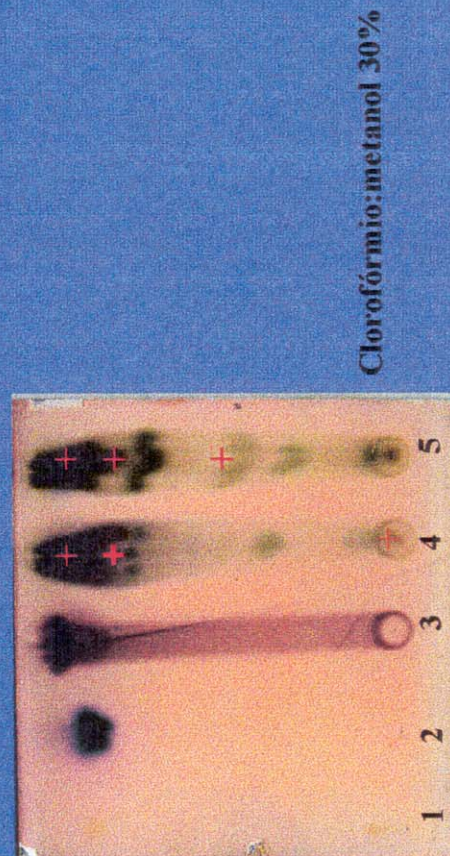
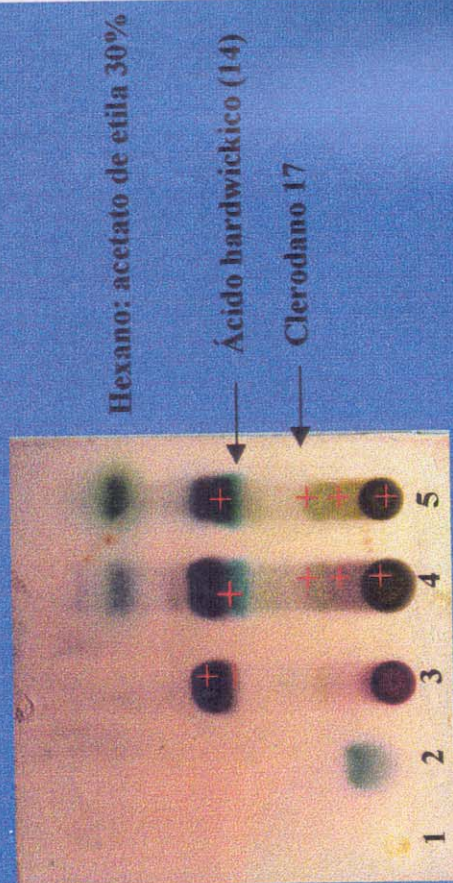
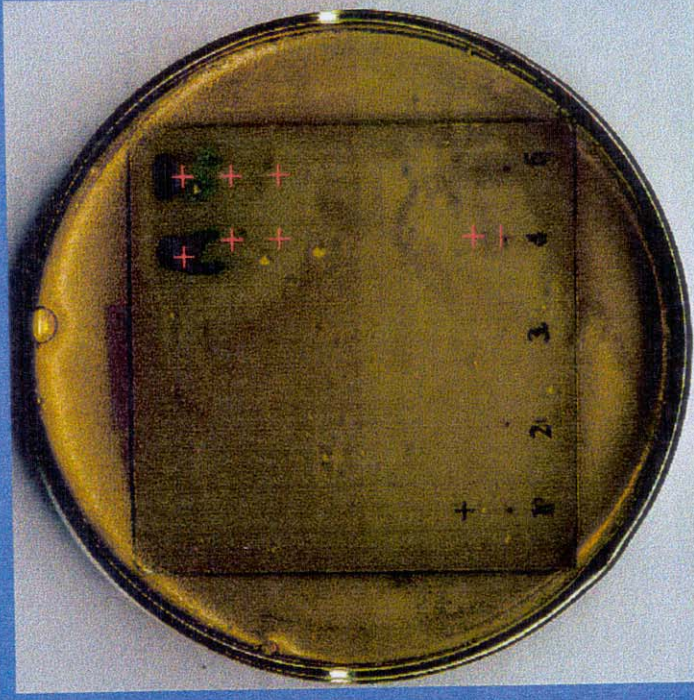
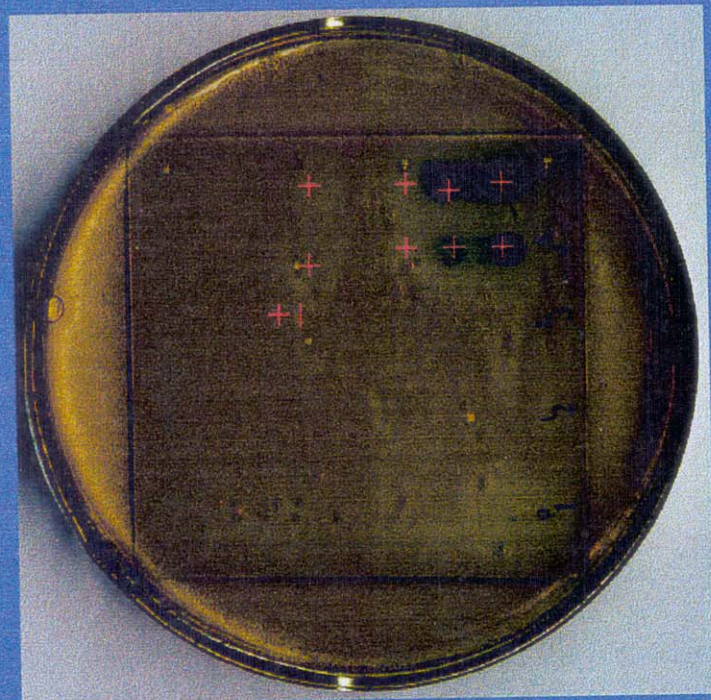


Figura 45a: Ensaio bioautográfico de *E. grandiflorus* e dos compostos 16 e 71 com *Rhodococcus equi* (CCT 0541)



- 1- cloranfenicol
- 2- composto 71
- 3- ácido cembranólico (16)
- 4- extrato metanólico de *E. grandiflorus* - caule
- 5- extrato metanólico de *E. grandiflorus* - folhas

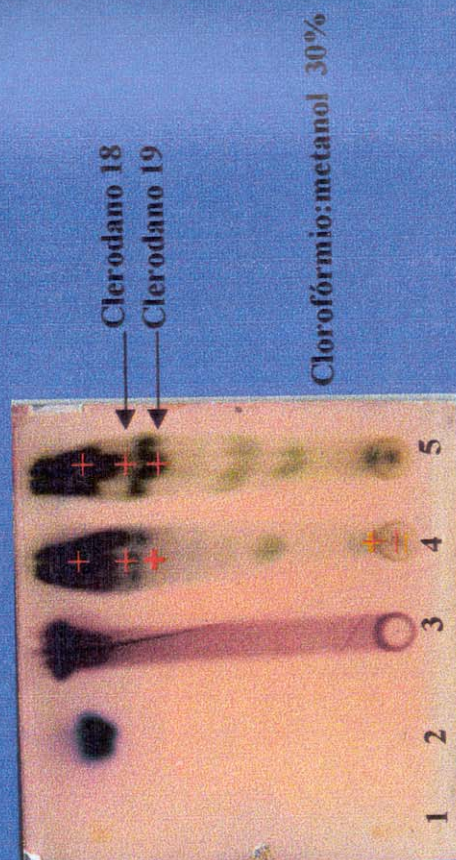
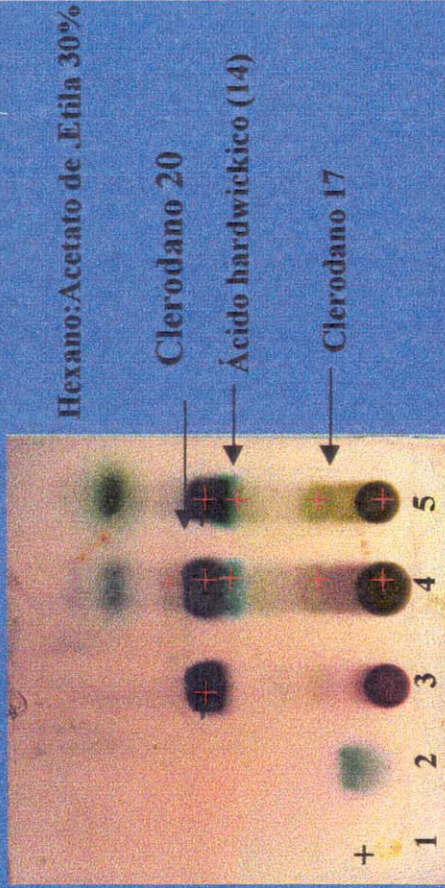
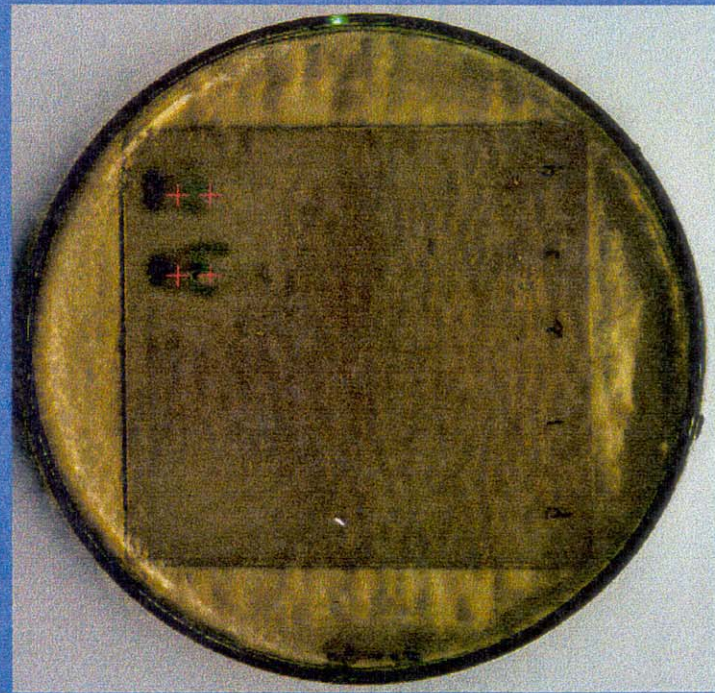
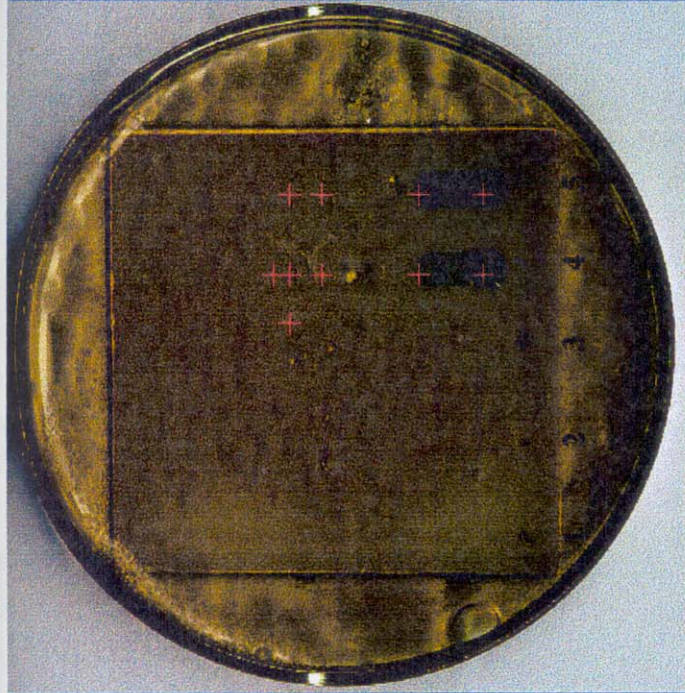


Figura 45b: Ensaio bioautográfico de *E. grandiflorus* e dos compostos 16 e 71 com *Staphylococcus aureus* (CCT 4295)



- 1- cloranfenicol
- 2- composto 71
- 3- ácido cembranóico (16)
- 4- extrato metanólico de *E. grandiflorus* - caule
- 5- extrato metanólico de *E. grandiflorus* - folhas

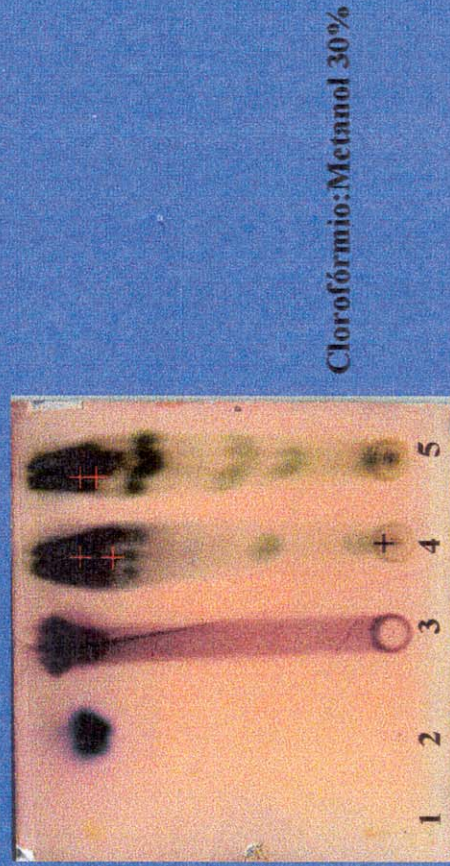
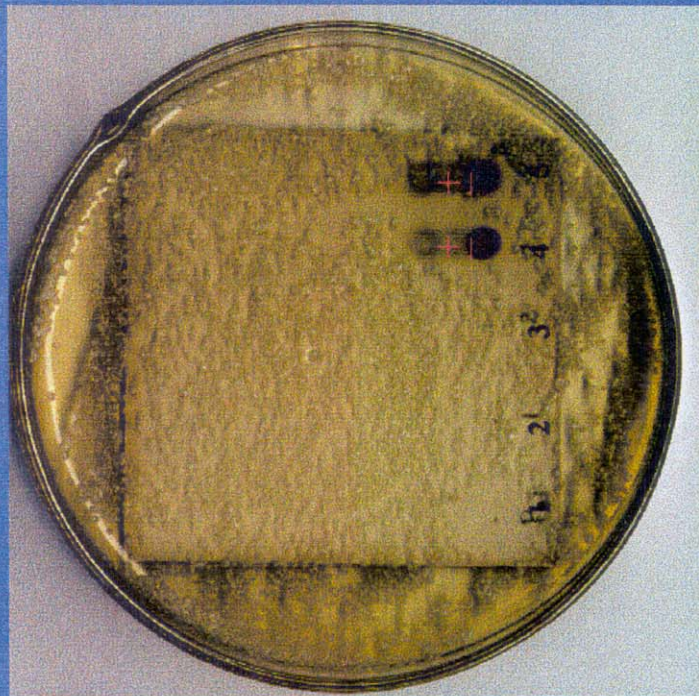
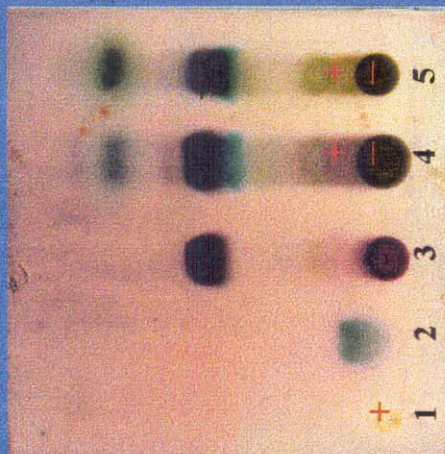


Figura 45c: Ensaio bioautográfico de *E. grandiflorus* e dos compostos 16 e 71 com *Bacillus subtilis* (CCT 0089)



Hexano: acetato de etila 30%



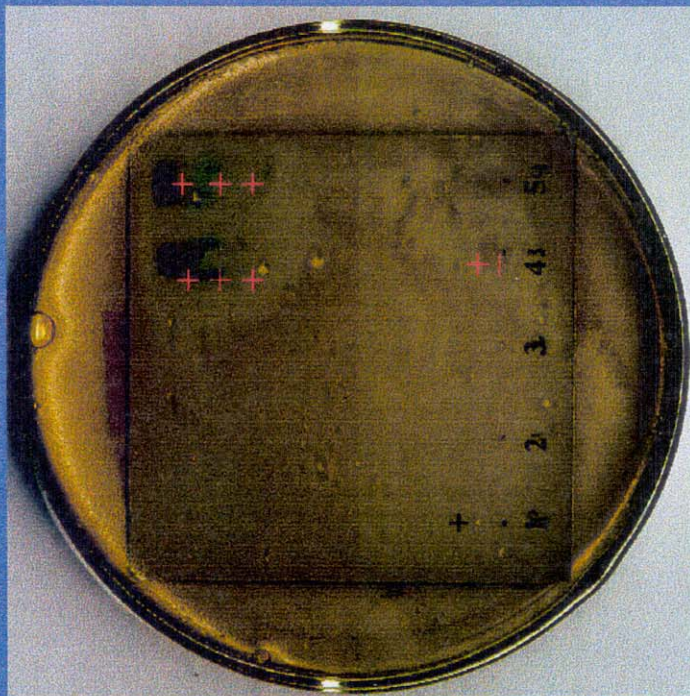
1- cloranfenicol

2- composto 71

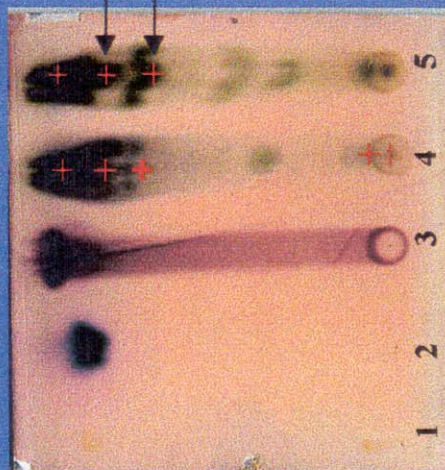
3- ácido cembranólico (16)

4- extrato metanólico de *E. grandiflorus* - pecíolo

5- extrato metanólico de *E. grandiflorus* - folha



Clorofórmio: metanol 30%



Clerodano 18

Clerodano 19

Figura 45d: Ensaio bioautográfico de *E. grandiflorus* e dos compostos 71 e 16 com *Candida albicans* (CCT 0776)

1.4 CONCLUSÃO

O estudo químico de *Echinodorus grandiflorus* coletada em Curitiba- PR, revelou a presença de várias substâncias entre elas: o fitol (8), o (-) hardwickiato de metila (14a), o ácido echinóico (1E, 3E, 7Z, 11E)-8-carboxi-1-isopropil-4,12-dimetilciclotetradecatetraeno) (16), os derivados clerodânicos ácido (-)-16-etoxicleroda-3,13-dien-15,16-olide-18-oato de metila, (4α, 6α, 8α)-1-carboxi-5 (S)-[2 (2, 5-diidro-5-etoxi-2-oxo-3-furaniletil-5, 6, 8a-trimetil-3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-octaidronaftaleno] (17a), ácido (-)-6-hidroxicleroda-3,13 -dien-16, 15-olide-18-oico, (4α, 6α, 8α)-1-carboximetil-5(S)-[(3-metileno-4-pentenil)-5, 6, 8a-trimetil-3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-octaidronaftaleno] (18), ácido (-)-16-hidroxicleroda-3, 13-dien-16, 15-olide-18-oico, (4α, 6α, 8α)-1 - carboxi-5 (S)-[2 (2,5-diidro-5-hidroxi-2-oxo-3-furaniletil-5, 6, 8a-trimetil-3, 4, 4a, 5, 6, , 8, 8a-octaidronaftaleno] (19) e ácido (-)- cleroda-3, 13(16), 14 trien-18-oato de metila, (4α, 6α, 8α)-1-carboximetil-5(S)-(3-metileno-4-pentenil)-5, 6, 8a-trimetil-3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-octaidronaftaleno] (20), os derivados esteroidais o etilcolest-4-en-3, 6-dienona (21) e 3 -β- O - β- D - glicopiranosil sitosterol (25) e os ácidos graxos o ácido linolênico (23) e ácido dodecanóico) (24) sendo as substâncias 16, 18 e 20a inéditas.

A presença da substância 17a nos extratos de *E. grandiflorus* preparados com acetato de etila e metanol elimina a possibilidade da mesma ser um artefato.

Determinou-se a configuração absoluta da substância (-)-18 por comparação de seus dados de rotação ótica com a da substância sintetizada a partir da substância de configuração absoluta conhecida o (-) ácido hardwickico (14), pela fotooxigenação regioseletiva do anel furânico.

Para a realização dos estudos por CG/EM dos extratos brutos de *E. grandiflorus* objetivando a identificação das substâncias isoladas, detecção dos derivados clerodânicos e cembranóicos e comparação do perfil cromatográfico de *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus* com os de outras espécies, três métodos de derivação dos extratos de *E. grandiflorus* foram testados:

- reação com diazometano seguida por bis-(trimetilsililtrifluoroacetamida)
- reação com diazometano
- reação com bis-(trimetilsililtrifluoroacetamida)

A avaliação das três derivações mostrou que a metilação com excesso de diazometano produz artefatos pela adição do diazometano à unidade do ácido carboxílico e à lactona α , β não saturada dos derivados clerodânicos, enquanto que a sililação mostrou ser a derivação mais adequada para análise das plantas do gênero *Echinodorus* por CG/EM equipada com coluna DB-5.

A comparação por CG/EM dos extratos metanólicos brutos sililados de *Echinodorus macrophyllus*, *Echinodorus aschersonianus*, *Echinodorus longipetalus* e *Echinodorus tenellus* revelou que clerodanos e cembranos são substâncias características de *Echinodorus grandiflorus* enquanto que nas demais espécies estas substâncias apresentam-se como minoritárias ou apenas traços. Comparação da espécie *E. macrophyllus* coletada fresca e adquirida no comércio revelou que *E. macrophyus* comercial difere da coletada fresca, bem como com as de outras espécies analisadas, evidenciando uma possível adulteração.

Apesar da derivação dos extratos com diazometano apresentar inconveniências para identificação de clerodanos butenolídios, os extratos metilados foram importantes para a identificação das substâncias 1, 34, 35, 36 e 40.

A utilização de quantidades pequena do extrato e a rapidez na obtenção do perfil cromatográfico da planta por GC/EM, torna este método útil para analisar a presença de substâncias ativas presentes nas plantas de regiões diferentes, auxiliando no controle de qualidade das plantas medicinais, uma vez que podem surgir diferenças significativas nas concentrações dos princípios ativos quando nativas de uma região (aclimatada) ou quando cultivadas, devido a influência do solo.

Estudos da atividade biológica mostraram que os extratos de *E. grandiflorus* coletada em Curitiba-PR, são ativos principalmente contra *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi* e *Bacillus subtilis* e contra *Candida albicans*.

As substâncias 14, 16, 17 e 20 mostraram atividade contra os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi* e *Bacillus subtilis* e as substâncias 18 e 19 contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

PARTE II
AVALIAÇÃO DO (-)- β -PINENO COMO SUBSTRATO PARA OBTENÇÃO DE
QUIRONS MAIS ELABORADOS.

II.1 AVALIAÇÃO DOS DERIVADOS DO (-)-BETA-PINENO NA SÍNTESE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS CONTENDO UNIDADE CICLOPENTANO OU CICLOBUTANO.

II.1.1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.

A abundância de monoterpenos acíclicos, monocíclicos e bicíclicos, e algumas vezes a disponibilidade de ambos os isômeros óticos, tornou-os candidatos mais comumente empregados na síntese de substâncias enantiomericamente puras.

Uma variedade muito grande de produtos naturais (figura 46) tem sido elaborada a partir de terpenos quirais como o (+)-(*R*)-limoneno), (-)-(2*S*,5*R*)-mentol, (+)-(*R*) pulegona, (-)-(*R*)-carvona e β-(-)-pineno, entre outros.⁴⁷⁻⁶⁰

Kato e col⁶¹ têm utilizado o (-)-β-pineno como material quiral na síntese de produtos naturais. Estes estudos resultaram na síntese estereocontrolada de (+)-*trans*-decalona 60 como intermediário na síntese de neo-*trans*-clerodanos 61 (figura 47).

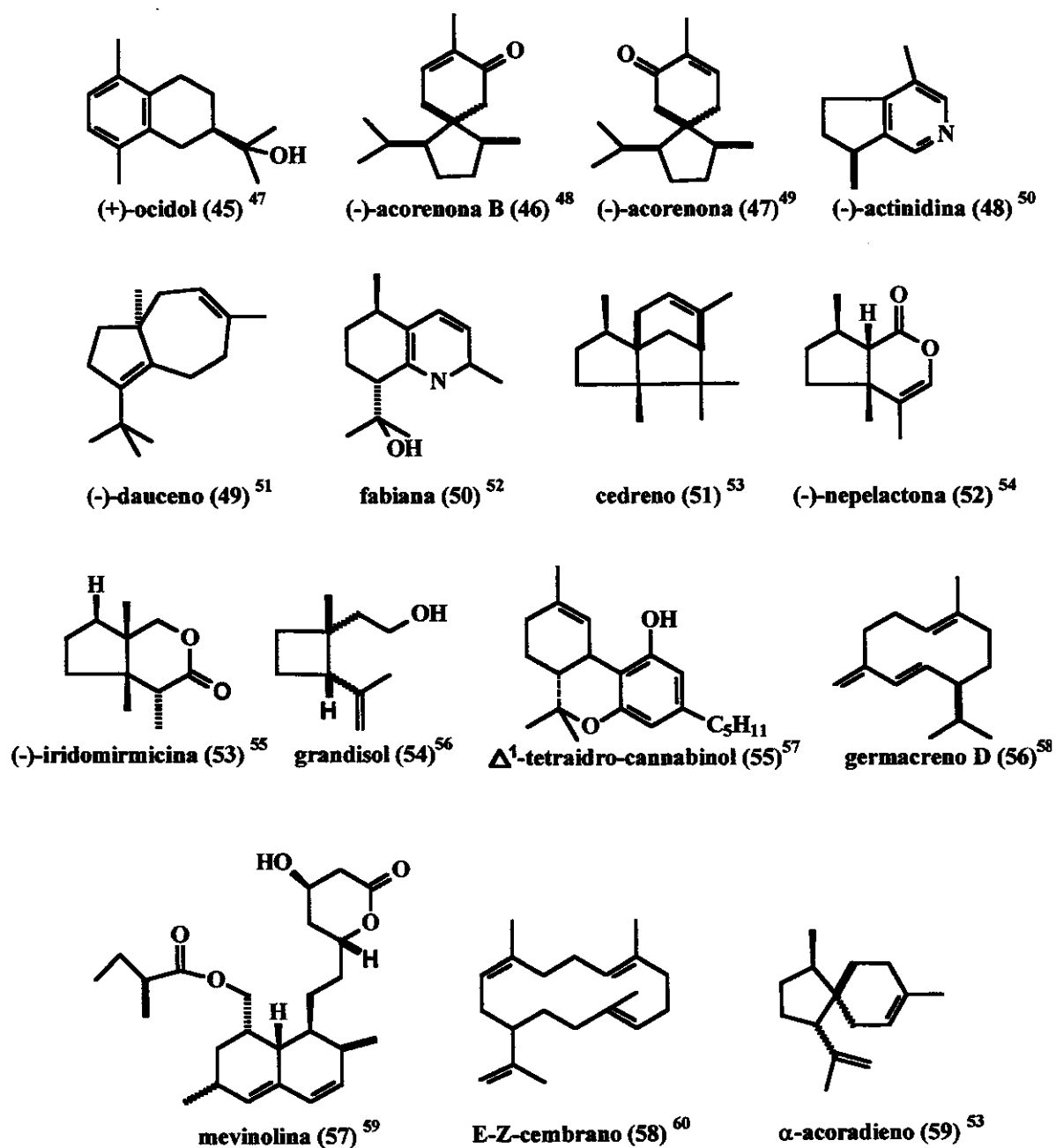


Figura 46. Produtos naturais sintetizados a partir de terpenos quirais

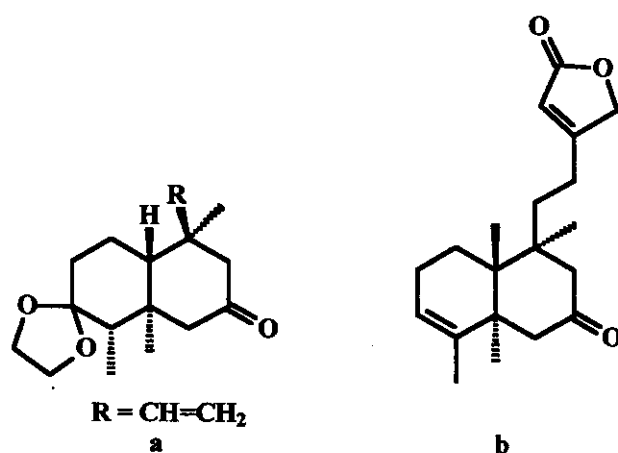


Figura 47. a) (+)-*trans* decalona (60), b) neo-*trans*-clerodano (61).

Há alguns anos o nosso grupo vem investigando a potencialidade da reação de oxidação do (S)(-)- β -pineno (62) a qual constitui um método clássico na obtenção de (-)-nopinona (63), (-)-ácido nopínico (64)⁶² e o (-)-cetol (65).⁶³

Durante o desenvolvimento de nossos estudos, verificamos a formação de outros dois produtos, além de 63, 64 e 65, pelo tratamento do β -pineno com $\text{KMnO}_4/\text{NaIO}_4$ e KMnO_4 /piridina. Tais produtos foram identificados como sendo a lactona (66)⁶⁴ e o éter (67)⁶⁵ (figura 48). A proporção entre os produtos varia, dependendo das condições empregadas na reação.

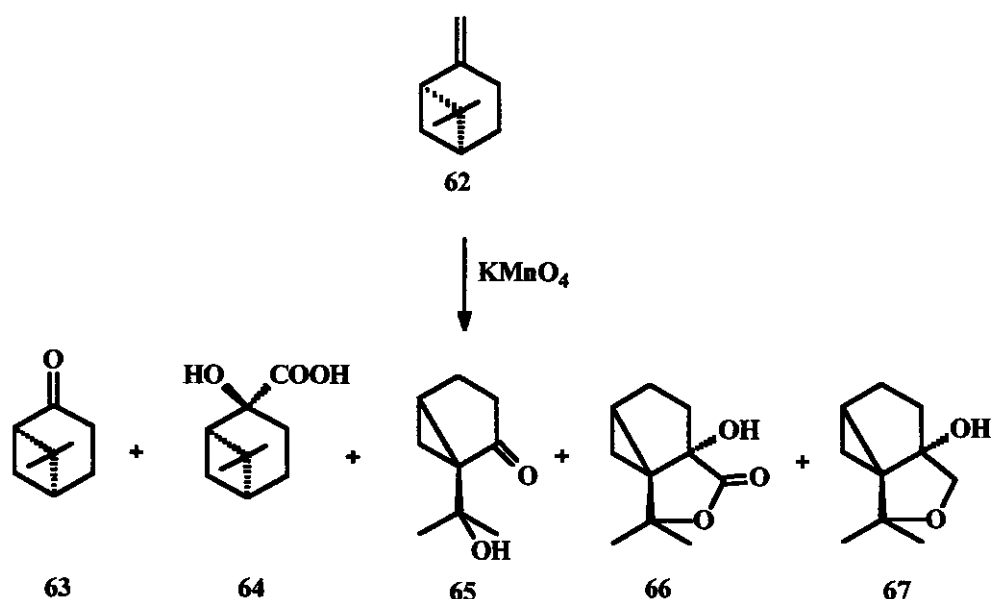


Figura 48. Oxidação do (-)-β-pineno (62).

Analisando as estruturas dos produtos 65 a 67, formados na reação de oxidação do (S)-(-)-β-pineno (62) visualizamos que os mesmos poderiam servir como intermediários quirais ou precursores destes, na síntese de certas classes de produtos naturais (figura 46).

Um primeiro projeto desenvolvido pelo grupo referiu-se à utilização da lactona (66) como intermediário para sínteses de substâncias com esqueleto orto-mentanos. A partir da reação da lactona (66) com ácido perclórico foi possível a obtenção de substâncias diméricas.⁶⁶

Num segundo momento, estudos da potencialidade do cetol (65) levaram à obtenção das substâncias 68 e 69⁶⁷ (figura 49). Observou-se também, o rearranjo α-halocetona no tratamento de 68a com hidreto de sódio obtendo-se a substância 70⁶⁷ (figura 49).

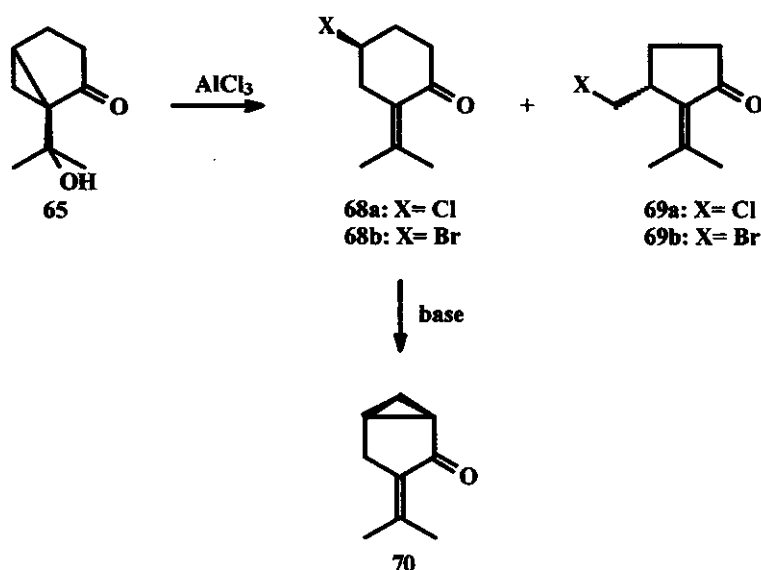


Figura 49. Obtenção das substâncias 68, 69 e 70.

Analisando as estruturas dos produtos 68 e 69, visualizamos que alterações estruturais poderiam dar origem às unidades quirais semelhantes ao esqueleto carbônico de uma variedade de produtos naturais tais como (-)-dauceno (49), cedreno (51), grandisol (54), e acoradieno (59) (figura 46).

Assim, devido à relevância da pesquisa de novos intermediários quirais e em continuidade a esta linha de pesquisa, propusemos a otimização da reação e a síntese de intermediários quirais a partir de derivados de (-)- β -pineno (62) para posterior utilização destes na preparação de substâncias bioativas contendo unidades ciclopentânicos ou ciclobutânicos.

II.1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando a utilização das substâncias **65**, **68** e **69** na síntese de produtos naturalmente ativos, concentramos inicialmente a nossa atenção na otimização da reação para a obtenção do cetol (**65**) em quantidades de 10,0 a 20,0 g, sendo necessário para isto aprimorar a metodologia. Vários métodos na otimização da reação de oxidação do (-)- β -pineno (**62**) foram testados em estudos anteriores ⁶⁵ para a obtenção de orto-tujanos oxidados e produtos de clivagem oxidativa. Dentre estes, dois métodos apresentaram resultados satisfatórios na obtenção do cetol **65**: a) a reação com $\text{KMnO}_4/\text{NaIO}_4/\text{K}_2\text{CO}_3$ em meio aquoso, b) a reação com KMnO_4 /piridina em meio aquoso.

Para decidirmos qual a metodologia adequada para o nosso caso, testamos várias condições reacionais utilizando as duas metodologias.

Vale a pena citar que o emprego de KMnO_4 /piridina com adição de ácido clorídrico na etapa de neutralização da base resultou na formação de um produto inesperado **71** além das substâncias **63**, **65**, **66** e **67**.

O espectro de IV (E 85) da substância **71** apresentou bandas de absorção em 3404 cm^{-1} característico de estiramento da ligação OH, além da absorção em 635 e 594 cm^{-1} característico de estiramento C-Cl.

O espectro de RMN^1H (E 80) da substância **71** apresentou dois dubletos na região de δ_{H} 3,74 ($J = 12,0\text{ Hz}$) e 3,96 ($J = 12,0\text{ Hz}$) indicando a presença de prótons metilênicos e um singlete largo em δ_{H} 4,21 característico de próton carbinólico. Apresentou também, dois singletos em δ_{H} 1,20 e 1,22 com integração de seis prótons caracterizando a presença de duas metilas.

Essas informações e análise dos dados de RMN^{13}C (E 81) e correlação homonuclear $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ($\text{RMN } 2\text{D COSY}$, E 83, figura 50) e dados de difração de raio X (figura 50) da substância obtida, confirmaram como sendo a da substância **71**.

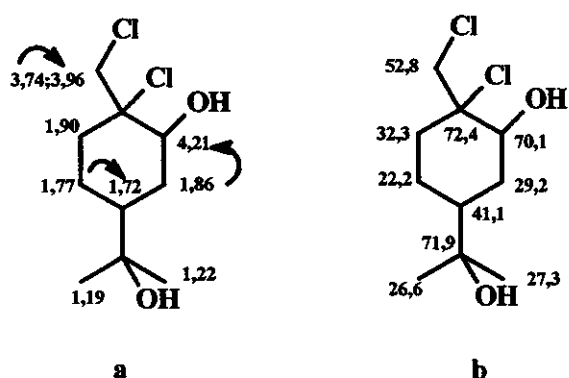


Figura 50. (a) Correlções ^1H ^1H observadas no espectro de RMN 2D (COSY) (b) dados de RMN ^{13}C para a substância 71.

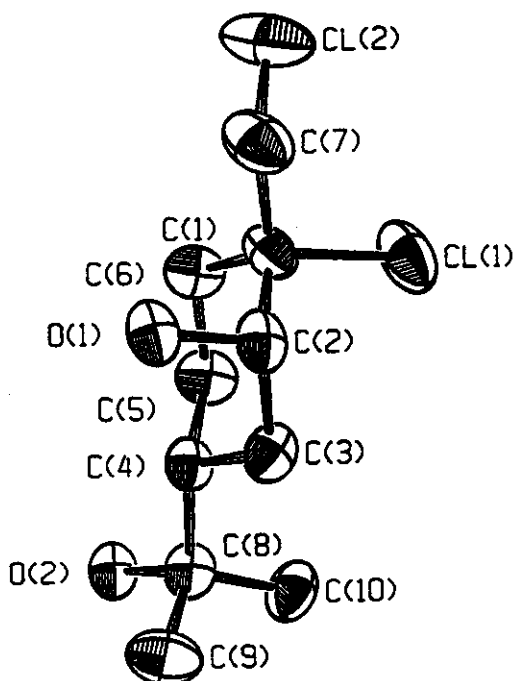
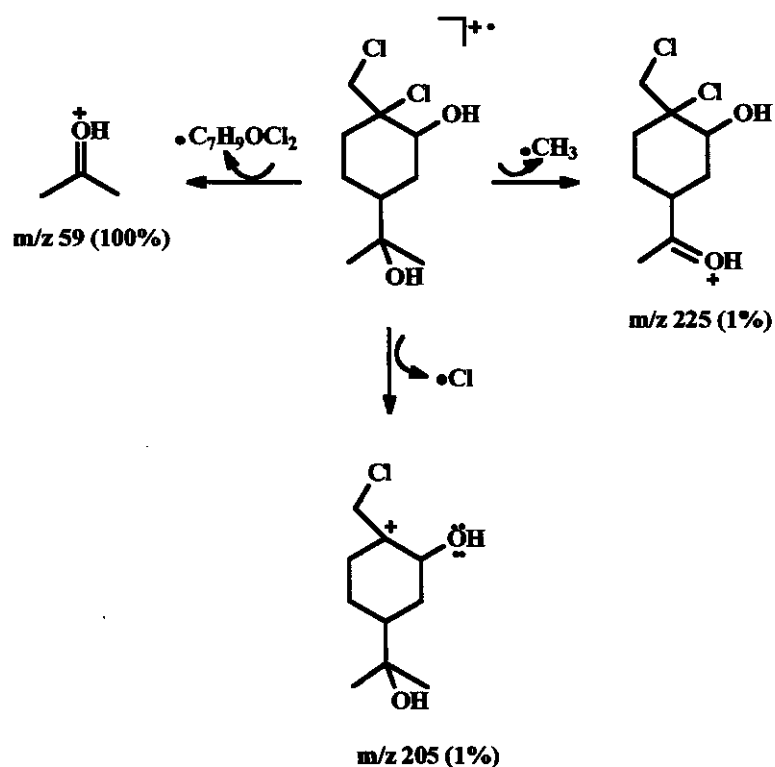


Figura 51. Desenho ORTEP da substância 71 feito a partir dos dados da análise de difração de Raio X.

O espectro de RMN¹³C (E 81) mostrou 10 sinais de carbonos, os quais foram atribuídos, utilizando a teoria dos deslocamentos químicos, informações obtidas no espectro do tipo DEPT (E 82) e no espectro de RMN 2D de correlações heteronuclear HETCOR (E 84).

O espectro de massas (E 86) não apresentou o íon molecular. Observa-se fragmento de m/z 225 característico de perda da metila a partir do íon molecular, fragmento de m/z 205 característico de perda do cloro e ainda pico base de m/z 59 (Esquema XVIII).



Esquema XVIII. Proposta de fragmentação para a substância 71, por impacto eletrônico no espectrômetro de massas.

A partir de uma consulta à literatura encontramos o trabalho de S.D.Bull e colaboradores⁶⁸ o qual relata a síntese da substância análoga o (-)-1*R*, 2*R*, 4*S*-1,7-dibromo-*p*-

mentano-2,8 diol (73), obtida como produto secundário durante a síntese de δ -terpineol (72), a partir de β -pineno (62) utilizando-se N-bromosuccinimida em acetona (figura 52).

A formação da substância 73 foi atribuída à reação δ -terpineol (72) como indicada na figura 52.

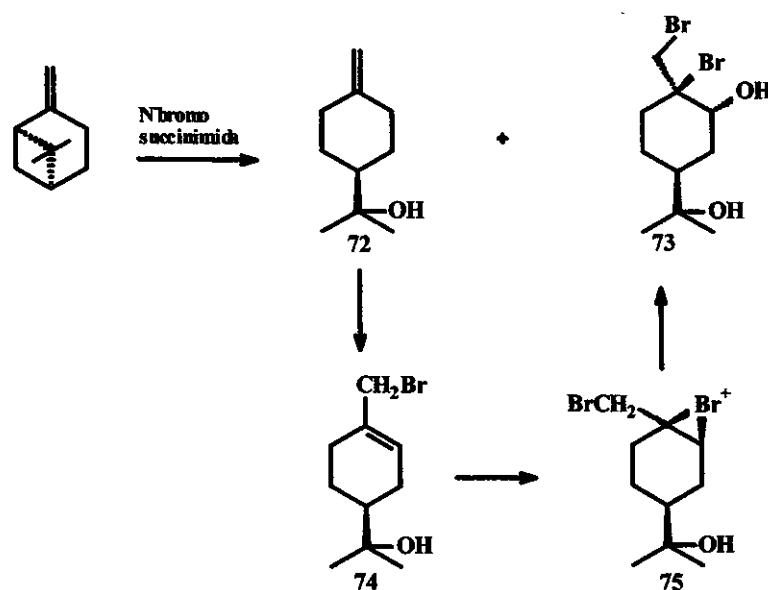


Figura 52. Reação do (-)- β -pineno com N-bromosuccinimida ⁶⁸

A análise da substância 71 em CG equipada com coluna quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- β - ciclodextrina, mostrou dois sinais muito próximos na proporção de aproximadamente 40:60 indicando mistura de enantiômeros (figura 53). Este fato sugere um mecanismo como apresentado no esquema XIX, onde a dupla exocíclica do (-)- β -pineno sofre oxidação por KMnO_4 formando o diol, subsequente ataque nucleofílico de H_2O e abertura do ciclo butano, leva ao intermediário álcool alílico. Neste estágio, o álcool alílico pode sofrer nova oxidação na presença do excesso de KMnO_4 (caminho a) formando a substância 71 ou sofrer isomerização levando ao enantiômero 71a (caminho b).

É importante observar que o (-)- β -pineno utilizado tinha excesso enantiomérico acima de 90%.

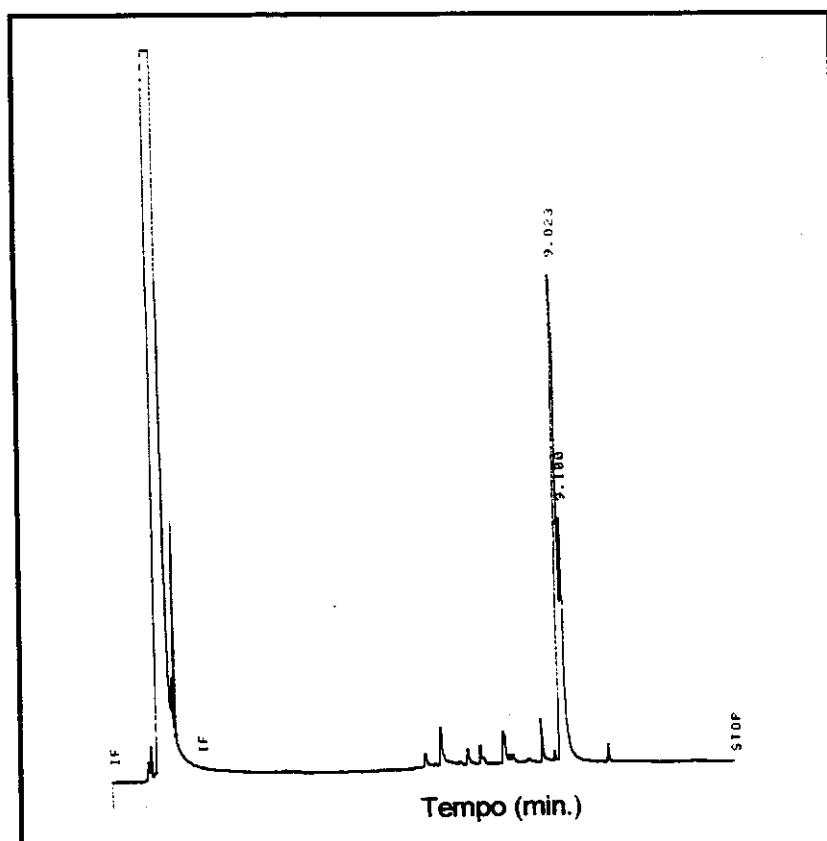
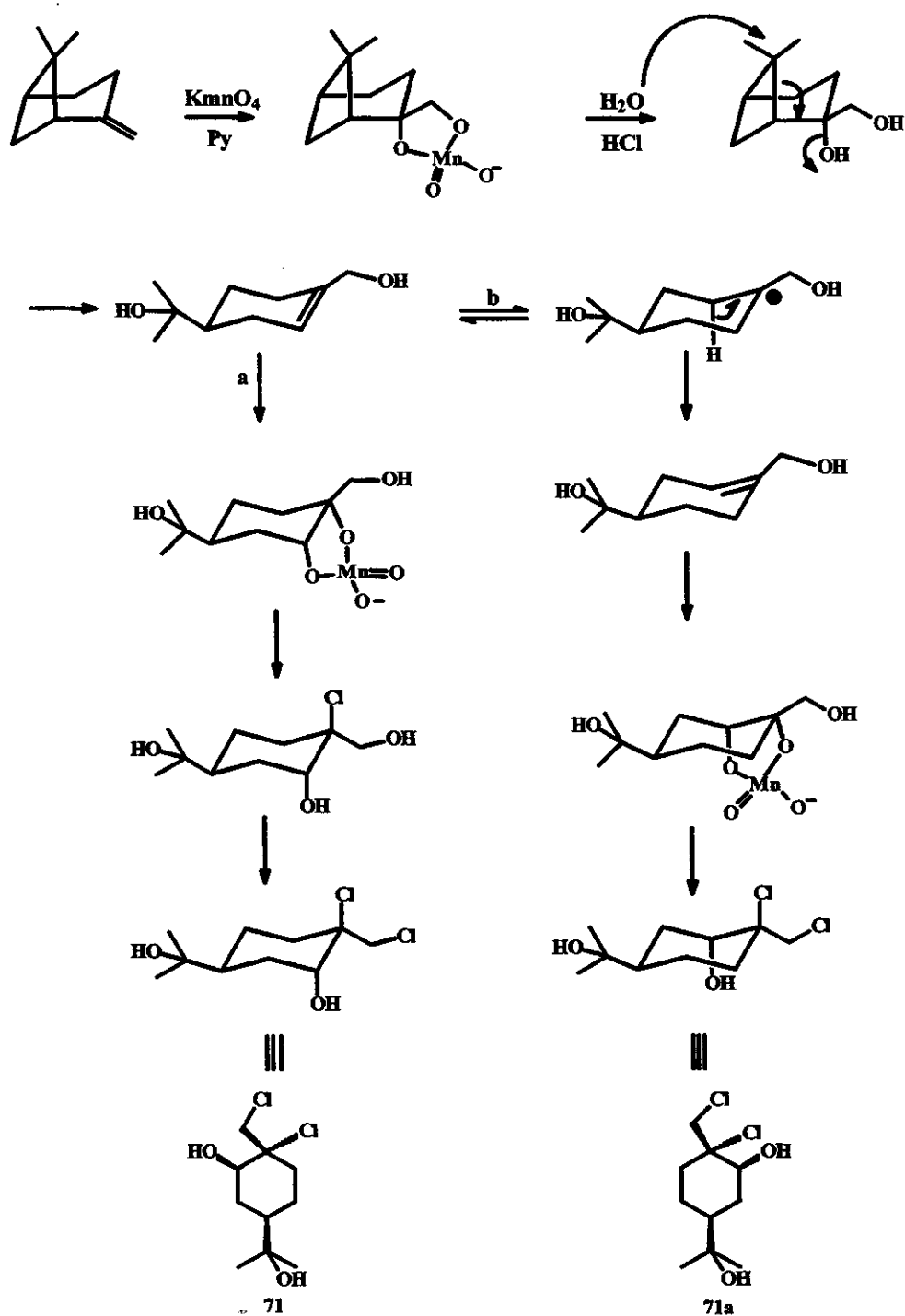


Figura 53. Cromatograma de CG coluna quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil) - β - ciclodextrina da substância 71.



Esquema XIX. Sugestão do mecanismo de reação para a formação da substância

71.

Nas demais condições, foram obtidas as substâncias **63**, **65**, **66** e **67**, sendo que a oxidação com $\text{KMnO}_4/\text{NaIO}_4/\text{H}_2\text{O}$ em tetracloreto de carbono à temperatura ambiente, forneceu o melhor rendimento (20-27%) para o cetol (**65**).

Os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN^1H (**69**) para o cetol estão de acordo com os descritos na literatura.⁶³ (figura 54).

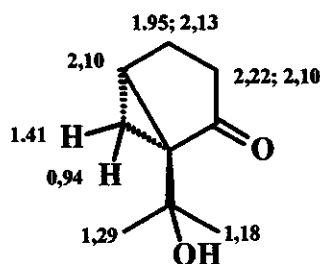


Figura 54. Dados de RMN^1H para o cetol (**65**).

Após a otimização das condições para a obtenção de **65**, passamos à etapa de preparação dos intermediários **68** e **69**. Como citado na parte introdutória, visualizamos a substância **68a** como material para a síntese de intermediários quirais do tipo biciclo-lactona **77.1** (figura 55), os quais, por sua vez serviriam como sintons para obtenção de terpenos naturais contendo unidade ciclopentano. A partir da substância **69a** poderiam ser preparados intermediários para síntese de monoterpenos contendo a unidade ciclobutano (análogos ao grandisol (**54**) (figura 46) em seus esqueletos, utilizando-se como etapa-chave o rearranjo α -halocetona (Figura 55).

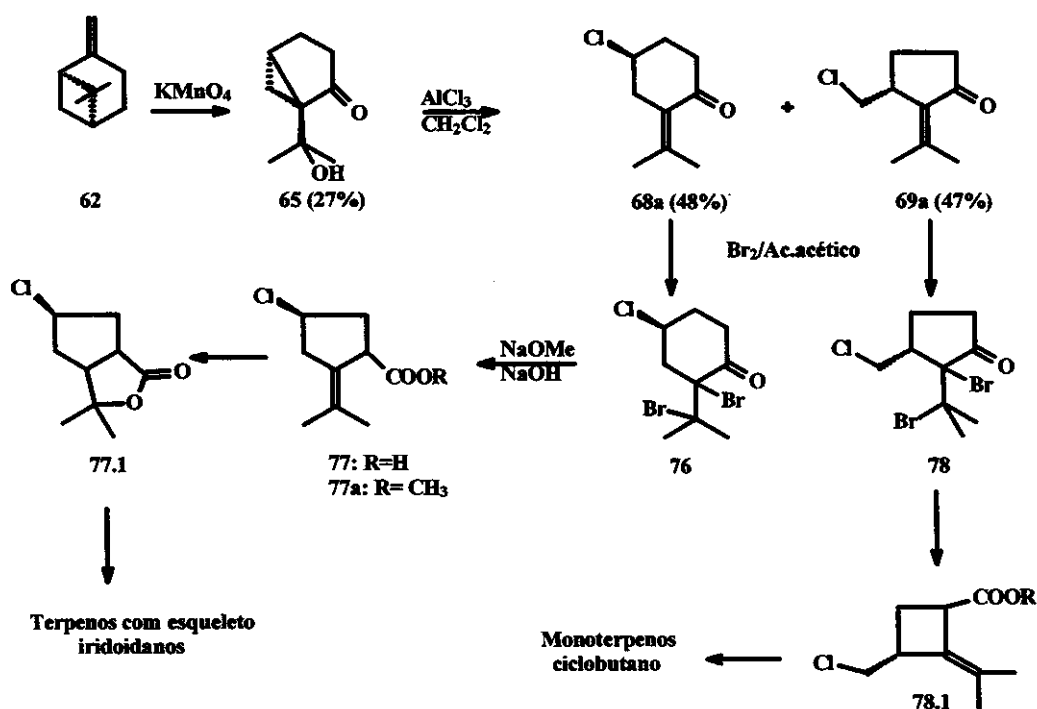


Figura 55. Proposta sintética para a obtenção de terpenos com unidade ciclopentano a partir de 68a e com unidade ciclobutano a partir de 69a.

O cetol (65) foi então submetido à reação com AlBr_3 e AlCl_3 em benzeno⁶⁷ para a preparação das substâncias 68a, 68b, 69a e 69b. Apesar da obtenção dos produtos desejados, observamos que as substâncias, mesmo após serem separadas, apresentaram em cromatografia de camada delgada impurezas com os mesmos R_f do produto. Várias colunas cromatográficas em sílica foram feitas com intenção de purificá-las. No final, os rendimentos obtidos foram baixos. A observação por CG/EM de que a impureza continha cloro (cloro benzeno) permitiu atribuir à impureza a reação do solvente com AlCl_3 . Para resolvermos este problema testamos outros solventes como tolueno, tetraidrofurano e diclorometano. A utilização de diclorometano como solvente forneceu apenas os produtos 68a (48%), 68b (38%), 69a (47%) e 69b (39%). Os dados espectrocópicos de RMN^1H das substâncias 68a (E 71), 68b (E 73), 69a (E 74) e 69b (E 78) foram concordantes com os da literatura relatada anteriormente⁶⁷.

A determinação do excesso enantiomérico das substâncias **65**, **68a**, **69a** utilizando agente de resolução com SAMP (para **65**) e Eu(tfc)₃ (para **68a** e **69a**) como agente de deslocamento em RMN ¹H e da substância **69b** utilizando RMN ¹⁹F e ¹H do éster de Mosher mostraram excesso enantiomérico de 95%.⁶⁷ Porém, como estas técnicas apresentaram baixa resolução, resolvemos determinar novamente o excesso enantiomérico das mesmas e a da substância **68b** utilizando-se a metodologia CG (fases estacionárias quirais), uma vez que a aquisição de coluna quiral tornou esta técnica acessível.

O valor do excesso enantiomérico pode ser calculado pela eq. 01, onde [R] = concentração do enantiômero R na mistura (moles/L) e [S] = concentração do enantiômero S na mistura (moles/L).

$$\text{excesso enantiomérico (ee)} = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \times 100$$

Assim as substâncias **65**, **68a**, **68b**, **69a** e **69b** foram analisadas em cromatógrafo a gás equipado com coluna quiral heptakis- (2,6 – dimetil – 3 – pentil) - β - ciclodextrina.

Observa-se no cromatograma CG do cetol (**65**) figura 56a que os enantiômeros foram completamente separados apresentando excesso enantiomérico de 93% (ee). Observa-se ainda, que a resolução enantiomérica de **69a** e **69b** são melhores quando comparada com as das substâncias **68a** e **68b** (figuras 56b,c,d e f), o excesso enantiomérico calculado para essas substâncias estão na tabela 09.

É importante lembrar, que a determinação do excesso enantiomérico (ee) utilizando –se a metodologia CG (fases estacionárias quirais) deveria ser acompanhado paralelamente pela comparação com os índice de retenção dos enantiômeros de **65**, **68a**, **68b**, **69a** e **69b** os quais poderiam ser obtidos a partir do (+)-β-pineno. A impossibilidade na obtenção desses enantiômeros nos levou a comparar o excesso enantiomérico obtido com os obtidos em experimentos de RMN ¹H e ¹⁹F, cujos valores apresentaram-se semelhantes.

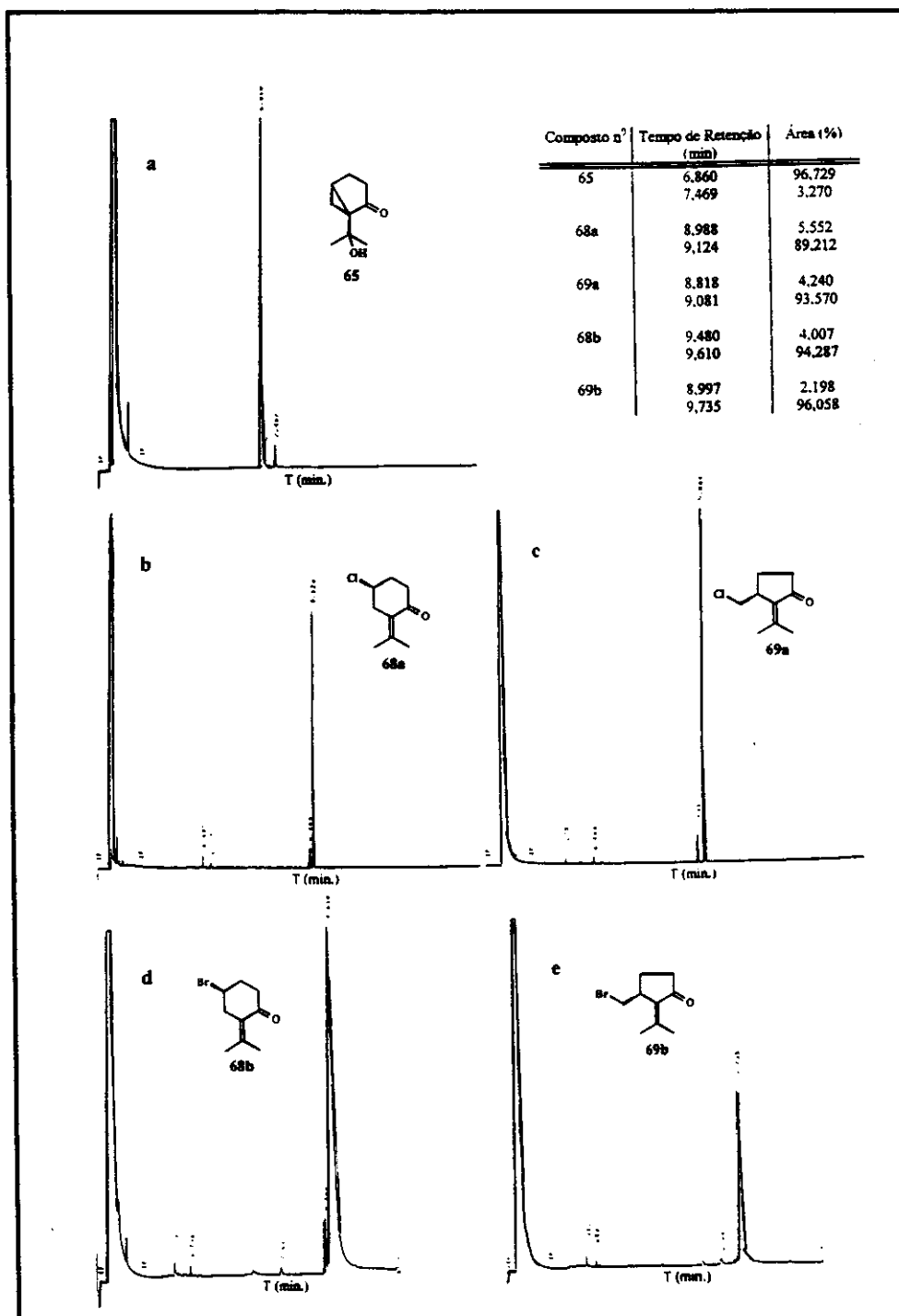


Figura 56. Cromatograma de CG das substâncias: (a) 65, (b) 68a, (c) 68b, (d) 69a, (e) 69b {coluna quiral [hepakis-(2,6-dimetil-3-pentil)- β -ciclodextrina]}.

Tabela 09. Excesso enantiomérico das substâncias 65, 68a, 68b, 69a e 69b

Substância	65	68a	68b	69a	69b
ee %	93	88	92	91	95

Finalmente, a substância **68a** foi tratada com Br₂ em ácido acético, obtendo-se o produto dibromado **76**. A identificação da substância **76** foi feita apenas por análise de massa CG/EM e o mesmo foi submetido, sem purificação prévia ⁶⁹, à reação com NaOMe em metanol seguida da neutralização da base com H₂SO₄ (diluído). Após a destilação do produto bruto da reação à pressão reduzida, o destilado foi submetido à reação com diazometano. Tentativas de purificação dos produtos formados não foram satisfatórias obtendo-se o composto **79** impuro. O espectro de RMN ¹H (E 87) da substância impura **79** apresentou sinais a δ_H 5,87 e 6,40, característicos de hidrogênios ligados ao carbono sp². Este fato e o desaparecimento do sinal a δ_H 4,31 atribuído ao hidrogênio H-4 para a substância de partida **68a** e, em conjunto com a presença no espectro de massas do íon molecular de *m/z* 166, sugerem eliminação do cloro obtendo-se provavelmente mistura das substâncias **79a** e **79b** e não o produto esperado **77**.

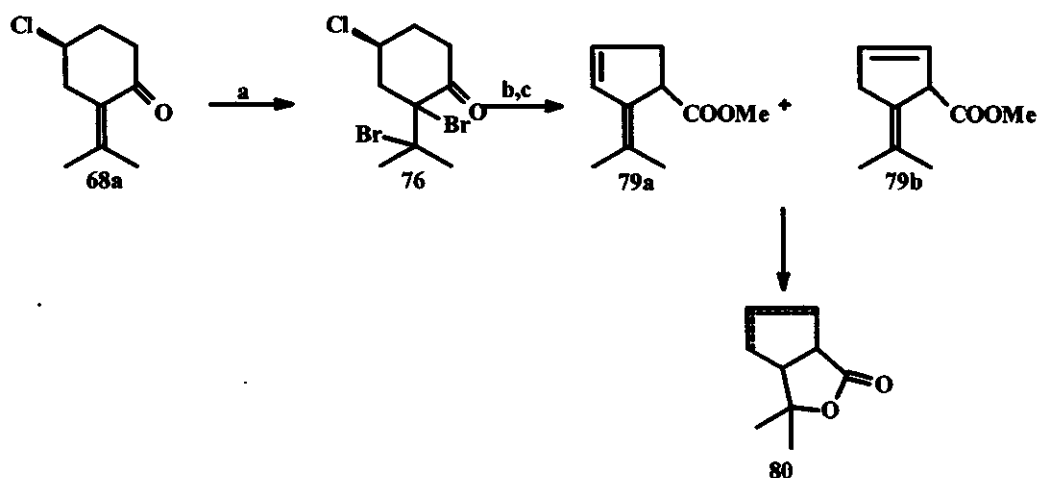


Figura 57. Reação de bromação da substância **68a** . a) Br_2 , ácido. acético, 0°C , b) NaOMe , metanol, 2h, 3%, c) CH_2N_2 , éter, 90%.

Apesar da substância **79** não ser o produto esperado, o seu esqueleto apresentou funcionalização adequado para lactonização e preparação da lactona **80** (figura 57). No entanto, como o rendimento da reação de obtenção de **79a** e **79b** foi muito baixo, tornou-se inviável a continuidade desta rota sintética.

A mesma reação descrita acima para **68a**, foi realizada com a substância **69b** com o objetivo de obter substâncias contendo a unidade ciclobutano (figura 55). A obtenção de um produto tribromado a partir de **69b** foi verificada por análise em CG/EM pela presença do íon molecular de m/z 330 e $\text{M}^{++} + 2$ e $\text{M}^{++} + 4$ no espectro de massas,. No entanto, após a realização do passo seguinte, isto é, o tratamento com NaOMe em metanol seguido da neutralização da base com ácido, não foi possível a detecção de nenhum produto puro o suficiente para as análises espectroscópicas.

Em vista dos resultados acima, resolvemos interromper esta rota sintética e verificar a potencialidade dessas substâncias como auxiliares quirais em reações assimétricas de Diels-Alder, conforme apresentado a seguir.

II.2. AVALIAÇÃO DOS DERIVADOS DE (-)- β -PINENO NA SÍNTESE DO AUXILIAR QUIRAL PARA A INDUÇÃO ASSIMÉTRICA DE DIELS ALDER

II.2.1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Um dos primeiros relatos da indução assimétrica na reação de Diels Alder foi a adição de acrilato de (-)-8-fenilmentol (**81**) ao ciclopentadieno na presença de cloreto de titânio, fornecendo (2*R*)-norboneno (**82**) com 90% de indução assimétrica⁷⁰⁻⁷¹ (figura 58)

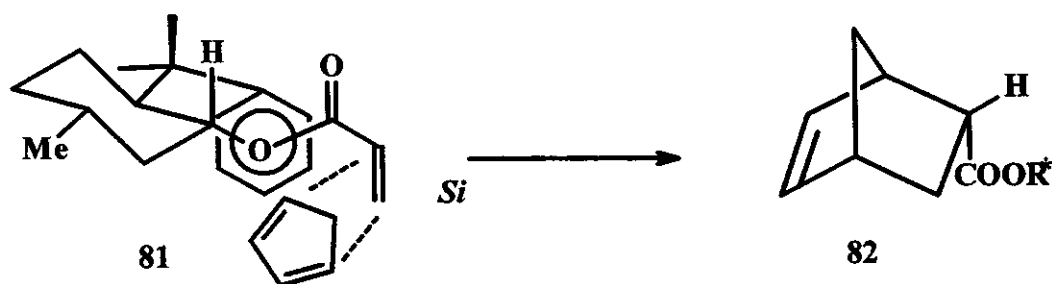


Figura 58. Reação de Diels Alder do acrilato de (-)-8-fenilmentol (**81**) com ciclopentadieno

A propriedade do fenilmentol como auxiliar quiral tem estimulado as pesquisas dirigidas para o desenvolvimento de novos auxiliares quirais, tais como os sultans de Oppolzer⁷²⁻⁷⁶ e 2-oxazolidinonas de Evans⁷⁷, os quais são exemplos de auxiliares quirais eficientes em reações de Diels-Alder. Recentemente auxiliares quirais como 2,5-dicetopiperazina⁷⁸ e derivados de oxazolidinona⁷⁹ e sultam⁸⁰ (figura 59) foram sintetizados e suas aplicações em reação de Diels-Alder avaliadas.

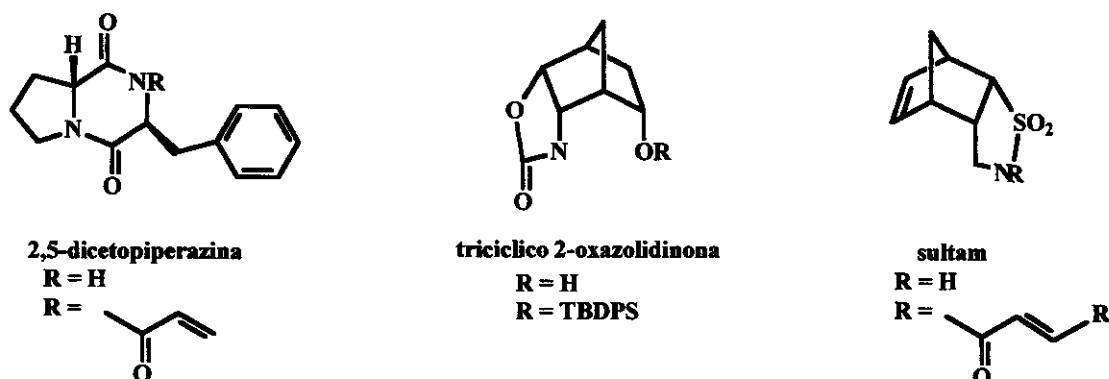


Figura 59. Auxiliares quirais dicetopiperazina, oxazolidinona e sultam.

Assim, a pesquisa de novos auxiliares quirais que possam ser utilizados na indução assimétrica em reações de Diels-Alder ⁸¹ constitui um tópico muito importante na área de síntese orgânica.

O nosso interesse por esta área de pesquisa, associado à disponibilidade dos materiais resultantes de transformações do (-)- β -pineno **62**, tais como **65** e **69a**, nos levou a explorar a potencialidade destes como auxiliares quirais para indução assimétrica. A opção pelos intermediários **65** e **69a** baseou-se no fato de que os mesmos apresentam esqueleto apropriado para a obtenção de auxiliares quirais análogo à do 8-fenilmentol. Em função disto, desenvolvemos esta parte do nosso trabalho que teve por objetivo a síntese de auxiliares quirais a partir de **65** e **69a**.

II.2.2.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a preparação de um possível auxiliar quiral a partir do derivado **69a**, visualizamos as rotas sintéticas mostradas na figura 60 (rotas A e B).

O objetivo da rota A foi o de obter o provável auxiliar quiral **84**, pela redução de **69a** e introdução de um grupo carboxílico α,β não saturado em **83** e, em seguida, verificar se os auxiliares quirais contendo esqueleto ciclopentânico como a da substância **84** podem induzir uma diferenciação facial significativa em reações de Diels-Alder.

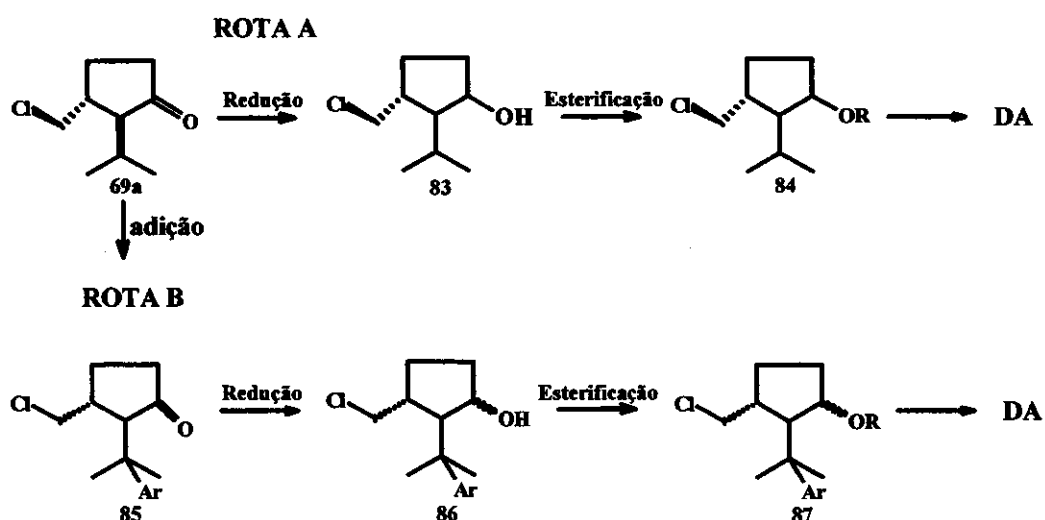


Figura 60. Rotas A e B propostas para a síntese de auxiliares quirais a partir de **69a**.

A excelente diastereosseletividade observada para (-)-8-fenilmentol (**81**) com ciclopentadieno, foi atribuída à conformação do auxiliar quiral a qual dispõe o grupo carbonila numa relação antiplanar com o carbono da olefina, este por sua vez dispõe-se numa relação *syn* planar com o carbono que sustenta o grupo alcóxi e hidrogênio (figura 58). Com o auxiliar quiral nesta conformação, o grupo α -*trans*-1-fenil-1-metiletil protege o carbono C α pela face *Re* da

unidade éster, por sobreposição do orbital π , π direcionando assim o ataque do dieno à face *Si* menos impedida. O modelo do estado de transição para a etapa da transferência da quiralidade, (figura 58) permite compreender e prever com certa segurança a estereoquímica do produto. Assim, as pesquisas realizadas por Oppolzer e colaboradores, com auxiliares quirais derivados de ciclohexanois, os quais possuem conformações preferenciais como em I, II e ciclopentanois conformacionalmente rígidos como III a VI, mostraram que os auxiliares quirais I, III e IV direcionam a adição do dieno à face *Si* e os auxiliares quirais II, V e VI à face *Re*⁷⁷ (figura 61).

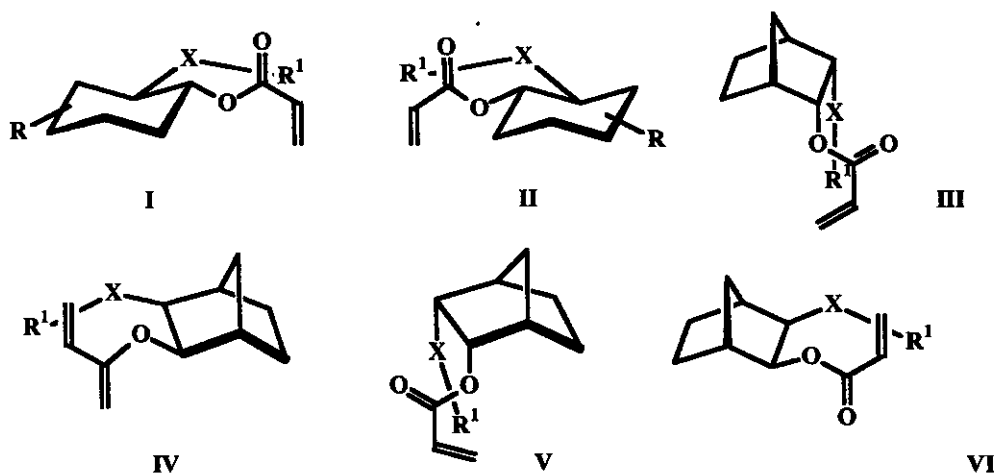


Figura 61. Auxiliares quirais de álcoois ciclohexanóis

Assim, propôs-se também a rota **B** com o objetivo de introduzir um grupo volumoso como o grupo fenil à substância **69a**, para a obtenção do auxiliar quiral **87** (figura 62) e, comparar o resultado da indução assimétrica com o obtido a partir de **84**. Neste caso a substância **87** (um dos isômeros esperado) poderia direcionar a adição do dieno em uma das faces (face *Re*).

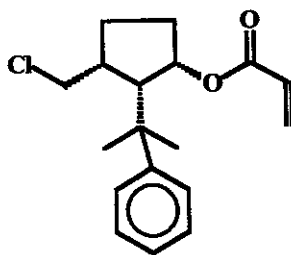
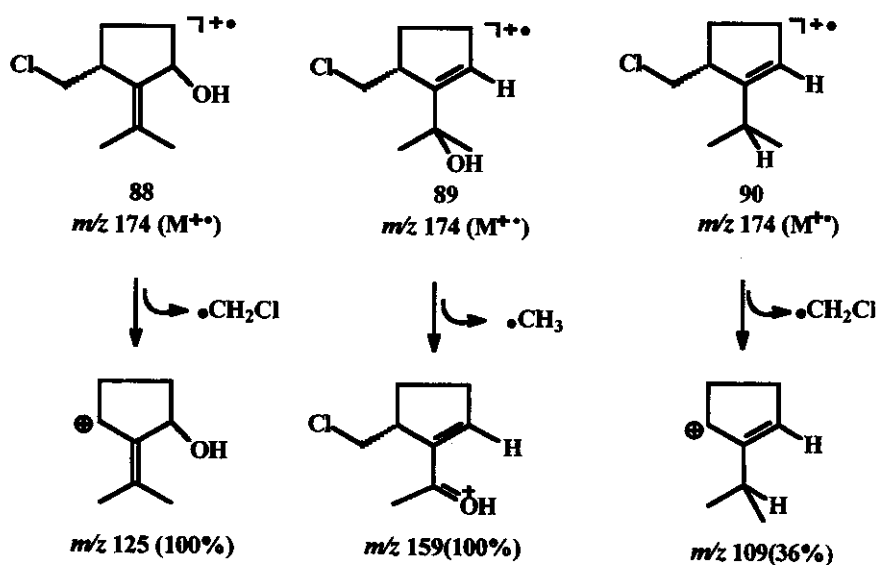


Figura 62. Substância 87.

Iniciou-se o estudo da rota A levando a substância 69a a reagir com Zn/KOH em etanol/água como solvente. A análise da reação por CG/EM, indicou a formação do produto de redução de um dos grupos funcionais pela presença do íon molecular de m/z 174, acompanhada por outros produtos de difícil separação. Procurou-se, então, outro reagente como, por exemplo, o hidreto de boro e sódio em metanol como reagente redutor, o que forneceu uma mistura de produtos.

O cromatograma de CG/MS da reação bruta, mostrou a formação do produto de redução pela presença do íon molecular de m/z 174 e pico base de m/z 125 característico de perda do fragmento CH_2Cl sugerindo a estrutura 88 para a substância (figura 63a). No entanto, ao submeter a reação bruta para à purificação do produto reduzido por coluna cromatográfica em sílica gel, foram obtidos dois outros produtos 89 (7,9mg, 3%) e 90 (1,8mg, 1%) ao invés da substância 88 (figura 63).



Esquema XX. Proposta de Fragmentação de massas para as substâncias 88, 89 e 90.

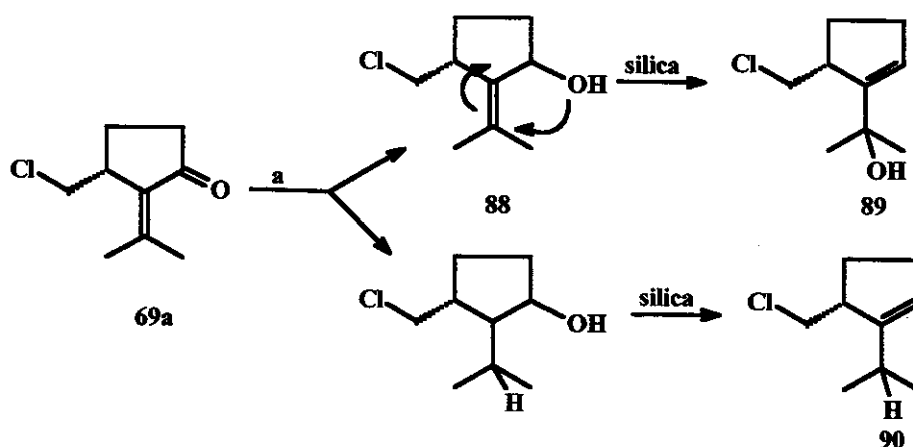


Figura 63. Reação de redução de 69a. a) $NaBH_4$, metanol 89 (3%), 90 (1%).

O espectro de massas da substância **89** (E 92) apresentou íon molecular de m/z 174 compatível com a fórmula molecular $C_9H_{15}OCl$ e e pico base de m/z 159 (100%) característico do fragmento $C_8H_{12}OCl^+$ (esquema XX).

O espectro de RMN¹H (E 89) da substância **89**, apresentou um multipeto em δ_H 5,75 característico de hidrogênio ligado ao carbono sp^2 , dois duplos dubletos em δ_H 3,92 ($J = 3,2$; 10,5 Hz) e δ_H 3,64 ($J = 7,6$; 10,5 Hz) característicos de prótons metilênicos halogenados e ainda sinais a δ_H 1,36 e 1,45 de metilas ligadas ao carbono carbinólico. O espectro de RMN ¹³C (E 90) apresentou sinais referentes a CH (sp^2) em δ_C 128,1 ; CH (sp^3) em δ_C 47,4 e C quaternário em δ_C 70,6 coerentes com a estrutura **89** para o produto obtido.

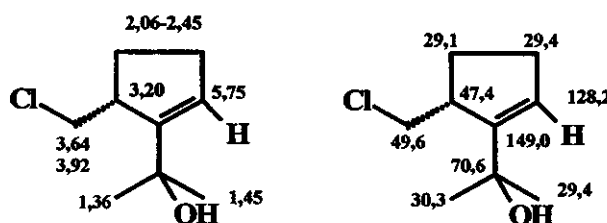


Figura 64. Dados de RMN¹H e ¹³C da substância **89**.

A formação do produto **89** pode ser racionalizado como rearranjo alílico do grupo OH após a redução da carbonila (figura 63).

O espectro de massa da substância **90** (E 94) apresentou íon molecular de m/z 158 compatível com a fórmula molecular $C_9H_{15}Cl$ e fragmentos de m/z 109 (39%) correspondendo ao provável fragmento $C_8H_{12}^+$ (esquema XX).

Observa-se no espectro de RMN¹H (93) da substância **90** dois dubletos na região de δ_H 0,97 e 1,00 ($J = 1,5$ Hz) característicos de metilas do grupo isopropila, multipeto em δ_H 4,30 de próton ligado ao carbono sp^2 , duplo dubleto na região de δ_H 3,38 ($J = 7,6$ e 10,6 Hz) e δ_H 3,68 ($J = 3,2$ e 10,6 Hz) referente aos prótons do grupo clorometila e multipeto em δ_H 2,23, referente ao próton H-5. Estas informações sugerem a estrutura **90** para a substância formada provavelmente pela redução simultânea da carbonila e do carbono não saturado com subsequente desidratação.

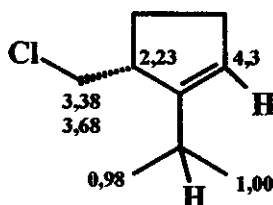


Figura 65. Dado de RMN¹H para a substância 90.

Devido aos resultados inesperados obtidos, concentramos nossa atenção no desenvolvimento da rota B.

Para o desenvolvimento da rota B, dentre os vários métodos de adição a ligações duplas, optamos pela reação catalisada por paládio⁸², por apresentar uma metodologia simples. A reação envolve a reação do complexo σ -aril e σ -vinil paládio com dupla ligação carbono carbono. Dependendo das condições de reação, obtém-se o produto de substituição vinílica III através de syn adição/syn eliminação (caminho a) ou ainda o produto de adição IV, (caminho b) (Figura 66).

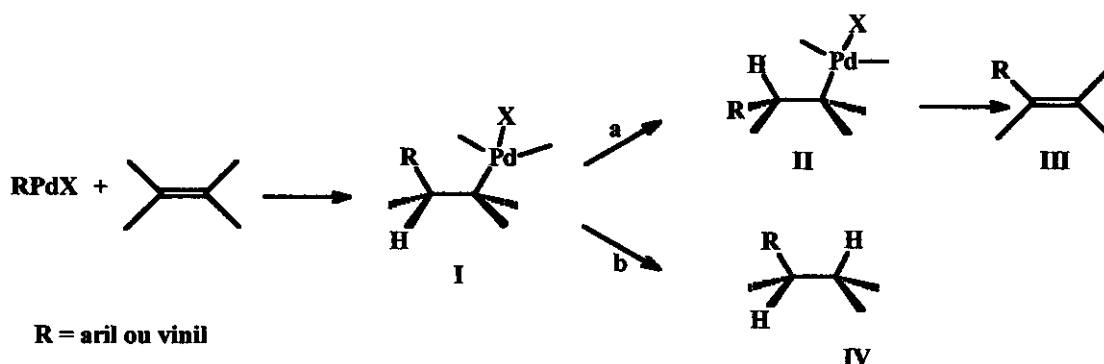


Figura 66. Reação catalisada por paládio.

Assim, resolvemos inicialmente verificar o comportamento do substrato frente à reação catalisada por paládio utilizando-se o ácido- 2-bromo-fenilacético (91), como agente arilante.

O ácido-2-bromo-fenilacético (**91**) foi primeiro submetido à reação com diazometano em éter etílico obtendo-se o produto metilado **92**. Em seguida, a substância **69a** foi levada a reagir com **92** na presença de $\text{Pd}(\text{OAc})_2/\text{PPh}_3$, a 80°C , por 3 dias (figura 67).

Após tentativas na separação do produto da reação, o espectro de RMN ^1H (E 96) do produto obtido **93**, e não o esperado **94**, apresentou-se como mistura com **92**.

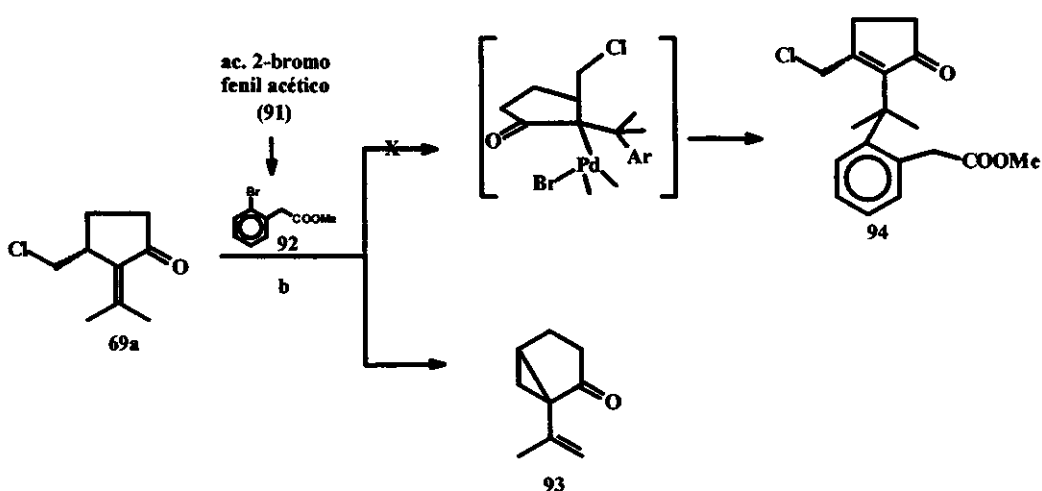


Figura 67. Reação de **69a** catalisada por paládio a) CH_2N_2 , éter . b) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, PPh_3 , acetonitrila, 80°C

O espectro de RMN ^1H (E 96) da mistura apresentou absorções características dos prótons do anel aromático de **92** na região de δ_{H} 7,2-7,6 e de metilas do grupo metoxila em δ_{H} 3,72. A formação da substância **93** foi sugerida principalmente pela presença de um tripleto em δ_{H} 1,14 ($J = 4,8 \text{ Hz}$) e um duplo dubleto em δ_{H} 1,38 ($J = 4,8 \text{ Hz}$ e $7,5 \text{ Hz}$) referente aos prótons $\text{H-6}_{\text{trans}}$ e H-6_{cis} do ciclopropan e ainda pela presença de um dubleto em δ_{H} 1,82 ($J = 1,3 \text{ Hz}$) característico de metila sobre dupla, atribuído a H-8 , um quarteto complexo em δ_{H} 4,89 ($J = 1,7 \text{ Hz}$) e um quinteto complexo em δ_{H} 4,97 ($J = 1,5 \text{ Hz}$) característicos de prótons olefinicos atribuído a H-9 .

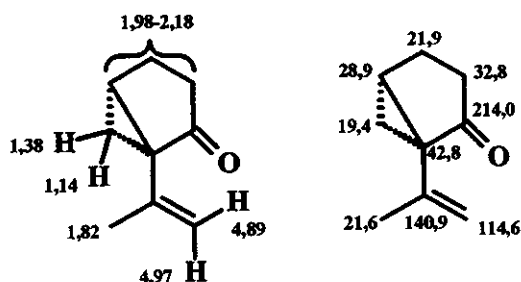


Figura 68. (a) Dados de RMN ^1H , (b) RMN ^{13}C da substância 93.

A substância 93 foi, obtida também, anteriormente, na reação de desidratação do cetol (65) e durante a ação do ácido α -metóxi- α -trifluorometilfenil acético (MTPA) sobre a substância 69b ⁶⁷. A comparação do dados espectroscópicos do composto 93, obtido pelas duas rotas, confirmaram a estrutura proposta 93.

Em seguida, realizou-se a reação catalisada por paládio utilizando-se o ácido fórmico para direcionar a formação do produto de adição via caminho b (figura 66).

Após 5 dias de reação, a formação do produto desejado não foi observada. A análise por CG/EM mostrou a presença da substância de partida 69a e traços de um produto com íon molecular de m/z 264 sugerindo inserção de C_7H_8 ao invés do esperado C_6H_6 , para formar o produto 95. (figura 69).

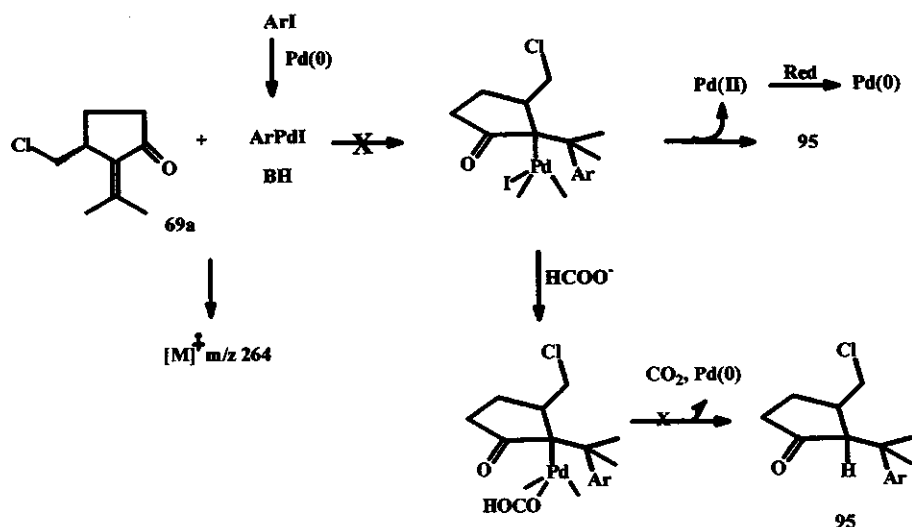


Figura 69 Reação de 69a catalisada por paládio, na presença do ácido fórmico.

Uma vez que as rotas A e B não forneceram resultados satisfatórios, não sendo possível a preparação de auxiliares quirais a partir de 69a, visualizamos como alternativa a obtenção destes a partir do cetol (65) (rota C, figura 70). Neste caso, a proteção do grupo hidroxila por grupo volumoso como cloreto de t-butildifenilsilano poderia fornecer condições adequadas na proteção de uma das faces, auxiliando na seletividade facial.

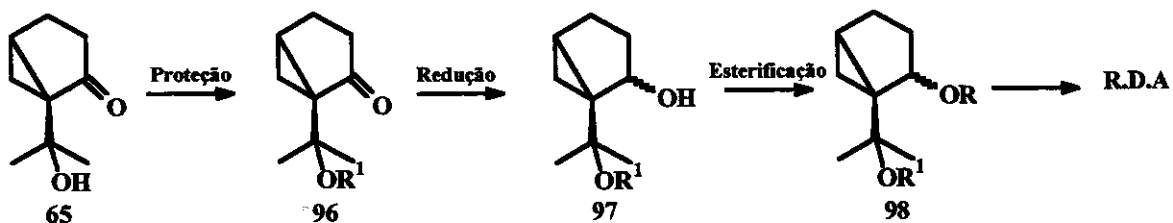


Figura 70. Rota C proposta para a obtenção do auxiliar quiral 98.

Recentemente Nakamura e colaboradores sintetizou uma nova classe de auxiliar quiral, o conformacionalmente rígido 2-oxazolidinona sustentando um grupo protetor como o TBDPS.⁷⁹

Para o desenvolvimento da rota C, o cetol (65) foi primeiro submetido à reação de redução com hidreto de boro e sódio em metanol. A reação forneceu os dois produtos reduzidos **99a** (44%), **99b** (20%) como esperado pelo ataque do hidreto à face *Re* e *Si* do cetol (65). (figura 71).

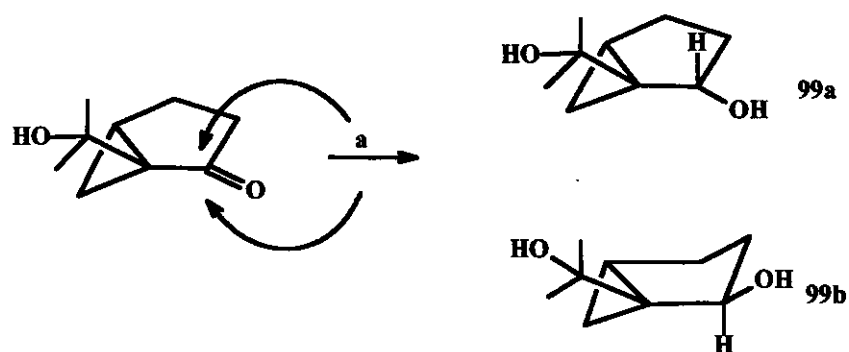


Figura 71. Reação de redução do cetol (65), (a) NaBH₄, metanol, 1/2h, **99a (44%), **99b** (20%)**

As atribuições para as substâncias **99a** e **99b** foram feitas de acordo com os dados espectroscópicos de RMN¹H e RMN¹³C e correlações homonuclear ¹H,¹H(COSY) e heteronuclear ¹³C,¹H (HETCOR, tabela 10).

Tabela 10 Dados de RMN¹³C e RMN¹H das substâncias 99a e 99b.

	99a		99b	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	40,2		39,4	
2	74,9	4,75 (t,8,2)	76,4	4,48
3	29,6	1,20; 1,96	31,6	1,48
4	24,6	1,70	25,0	1,68
5	22,1	1,18	20,4	1,69
6	6,9	0,72 (d, 5,8)	11,3	0,22(dd, 5,5 e 8,2); 0,42(dd, 5,5 e 4,1)
7	72,4		73,3	
8	27,7	1,12	27,3	0,99
9	28,0	1,38	28,5	1,53

Os isômeros **99a** e **99b** foram identificados através do experimento de diferença de NOE. Ao irradiarmos o próton H-2 (δ 4,75) da substância **99a** (E 115), foram perturbados os prótons metílicos H-8 (δ_H 1,38)(2,68%), o próton H-4 (δ_H 1,70) (0,92%) e o próton H-3 (δ_H 1,96) (2,51%) indicando que o hidrogênio H-2 está *trans* ao anel do ciclo propano. Portanto, a substância **99a** é o produto formado pelo ataque do hidreto pela face *Re* menos impedida (Figura 72).

O espectro de diferença de NOE (E 123) da substância **99b** revelou que, quando irradiado o próton H- 2 (δ 4,48), são perturbados o próton H-6 *trans* (δ_H 0,22) (1,25%), o próton metílico H-9 (δ_H 1,53) e o próton H-3 (δ_H 1,48) (6,10%). A perturbação do próton H-6 indica que o próton H-2 está *cis* ao ciclo propano, confirmando o ataque do hidreto pela face *Si* mais impedida. (Figura 72).

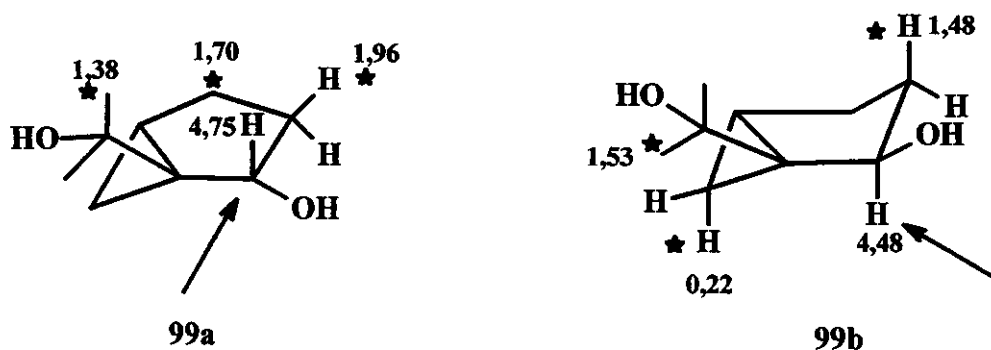


Figura 72. NOE das substâncias 99a e .99b.

Em seguida, o cetol (**65**) foi submetido à reação com cloreto de t-butildifenil silano e imidazol em DMF⁸³. A proteção do grupo hidroxila do cetol (**65**) não ocorreu como esperado. A análise do produto bruto da reação por CG/EM mostrou a presença de três substâncias: duas apresentando íon molecular de m/z 172 cujas fragmentações foram idênticas aos dos compostos **68a** e **69a**, a terceira substância apresentando íon molecular de m/z 256 indicando a formação do composto **96a**. Este fato, sugere a ocorrência da proteção do grupo hidroxila com a liberação de ânions cloreto a partir do cloreto de t-butildifenilsilano, estes ânions atacam provavelmente o ciclopropano do cetol provocando a abertura do mesmo com simultânea desidratação dando origem às substâncias **68a** e **69a** (Figura 73).

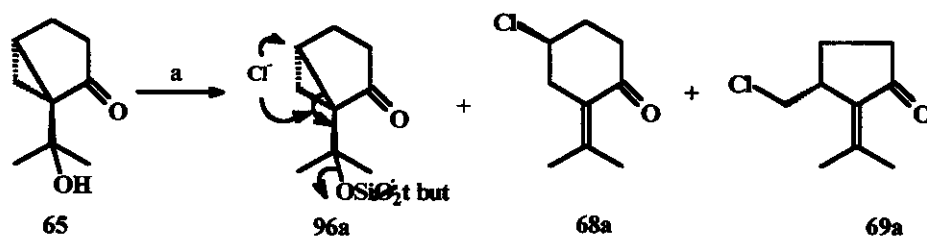


Figura 73. Proteção do cetol (65) com TBDFS, a) TBDFS, imidazol, DMF, 12h.

Assim, resolvemos utilizar um reagente protetor isento de grupos halogenados como, por exemplo, o trimetilsilil-imidazol (TMS-imidazol) o qual é, segundo a literatura, considerado como reagente protetor muito útil para álcoois terciários ⁷⁸. A utilização do TMS-imidazol, forneceu 75,5% do cetol protegido 96b (figura 74).

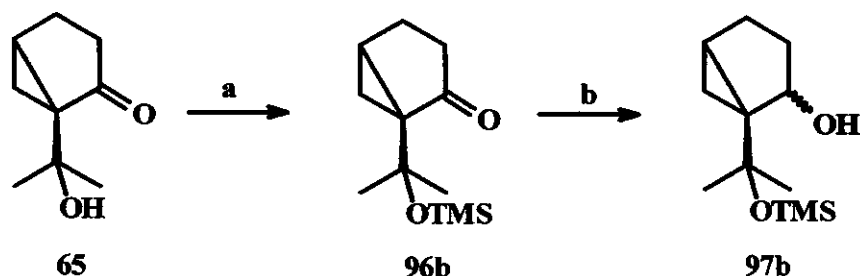


Figura 74. Proteção do cetol com TMS, a) TMS/imidazol, THF, (75,5%); b) NaBH₄, metanol (38,9%).

O espectro e massas da substância 96b (E 102) apresentou fragmento de m/z 211 correspondendo a perda de uma metila a partir do íon molecular e fragmento de m/z 73(100%) característico de íons TMS⁺.

O espectro de RMN ^1H (E 99) mostrou absorção a δ_{H} 0,15 referente a três metilas ligadas ao Si. Os demais deslocamentos químicos apresentaram semelhança e multiplicidade parecidas a obtida para o cetol(65).

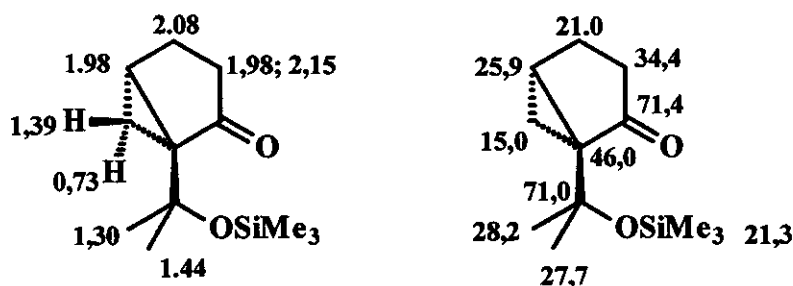


Figura 75. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância 96b.

A substância 96b foi submetida à reação de redução com hidreto de boro e sódio em metanol à temperatura ambiente, obtendo-se 38,9% do composto reduzido 97b (Figura 74) juntamente com um produto desprotegido e reduzido.

O espectro de RMN ^1H (E 103) da substância 97b apresentou um dubleto a δ_{H} 0,70 ($J= 5,4$ Hz) referente a H-6, um triplete a δ_{H} 4,70 ($J= 8,0$ Hz) referente ao próton H-2 esses dados são coincidentes com os obtidos para a substância 99a conforme tabela 10. Portanto, a redução da substância ocorre exclusivamente pela face *Re* menos impedida.. Nenhum produto originado do ataque pela face Si foi observado.

O espectro de RMN ^1H do produto de desproteção e redução apresentou similaridade com a da substância obtida anteriormente na redução do cetol (65), a substância 99a.

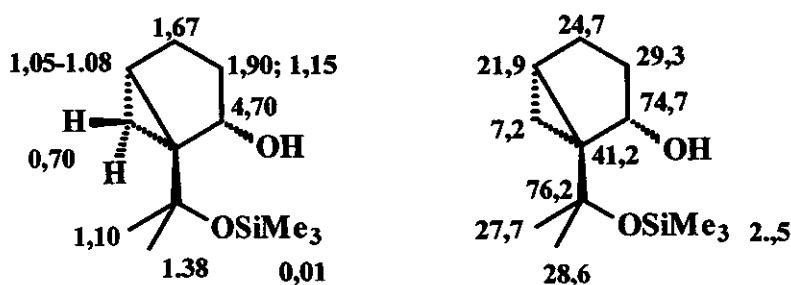


Figura.76. Dados de RMN¹H e ¹³C para a substância 97b.

Obtido a substância 97b, o passo seguinte foi a esterificação da mesma. O ácido tíglico e o ácido acrílico foram eleitos como reagentes apropriados para a introdução do grupo éster α , β - não saturado.

A preparação de acrilatos e a preparação de tiglatos normalmente são feitas utilizando-se cloretos de acrilóila ou tigloila em amina.⁷⁷

Considerando-se que a presença de ânions halogenetos seria problemática para o esqueleto em questão, conforme discussão acima, preferimos o emprego da metodologia descrita por Hassner A. e colaboradores.⁸⁵

A reação baseia-se na utilização de dicicloexilcarbodiimida (DCC) e aminopiridina como catalisador, a qual é uma modificação da reação de ácidos monocarboxílicos com DCC formando anidrido, uréia N,N-dissubstituída e/ou uréia N-acil-N,N dissubstituída, dependendo das condições de reação.⁸⁶

A substância 97b foi submetida à reação com dicicloexilcarbodiimida e dimetil-amino piridina, como catalisador, na presença de ácido tíglico e éter etílico como solvente. O progresso da reação foi acompanhado por CG/EM. Observou-se que, após 3 dias de reação, o perfil da reação não se alterou. Tratamento da reação forneceu 5,9mg do provável ester 98a, a substância de partida e uréia N-acil-N,N-dissubstituída 86, como produto majoritário (Figura 77). A formação do éster 98a foi sugerida a partir da análise por CG/EM e dos dados de RMN¹H e RMN¹³C.

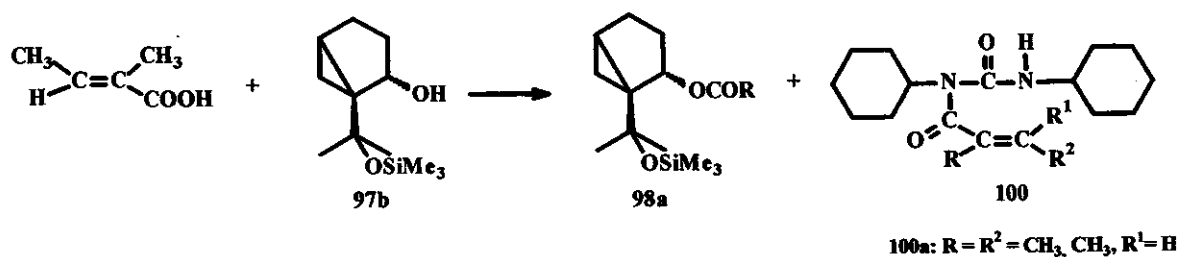


Figura 77. Esterificação de 97b, a) DCC, DMPA, éter, 3 dias, 97b.(3%), 85 (47%).

O espectro de RMN¹H (E 108) da substância 98a apresentou um singleto em δ_{H} 0,05 referente a três metilas do grupo SiMe₃, um um quinteto complexo em δ_{H} 6,84 característico de prótons α,β -não saturado, um triplete em δ_{H} 5,48 característico de próton carbinólico, um dubleto em δ_{H} 0,80 com integração de dois prótons indicando a presença de hidrogênios metilênicos do ciclo propano. Observou-se ainda um duplo duplo dubleto em δ_{H} 1,78 ($J = 1,7$ e $7,0$ Hz) e um quinteto complexo em δ_{H} 1,84 característicos de metilas do grupo α,β -não saturado.

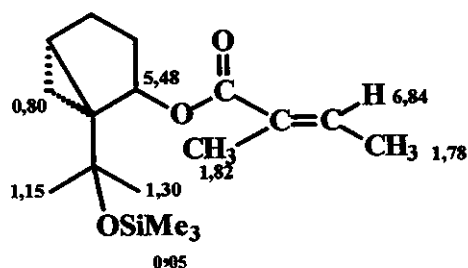


Figura 78. Dados de RMN¹H para a substância 98a.

Essas informações e os dados do espectro de massas (E 109) o qual apresentou íon molecular de m/z 310 e fragmento de m/z 295 referente à perda de CH_3 a partir do íon molecular, sugerem a formação do éster **98a**. No entanto as análises dos espectros de RMN^1H e ^{13}C mostraram também a presença de impurezas. Nova purificação da substância não foi possível devido à pouca quantidade do material.

Reações com o ácido acrílico também forneceram a N-acil-uréia (**100b**) como principal produto.

A justificativa para o insucesso da reação de esterificação do álcool **97b** com ácidos α,β -não saturados, utilizando-se a dicicloexilcarbodiimida como reagente, está no fato de que o intermediário O-acil-uréia rearranja-se muito mais rapidamente à N-acil-uréia do que reage com o ácido para formar o anidrido do ácido (figura 80).

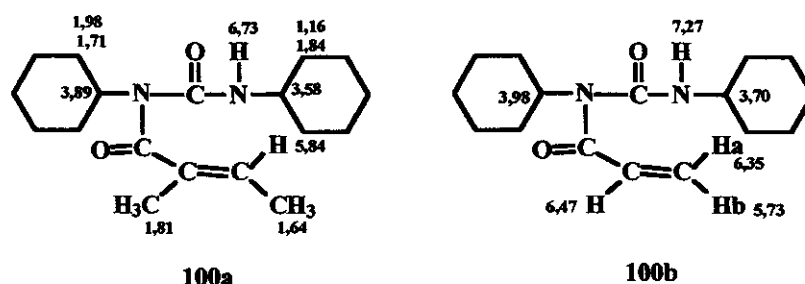


Figura 79. Dados de RMN^1H para as substâncias **100a** e **100b**.

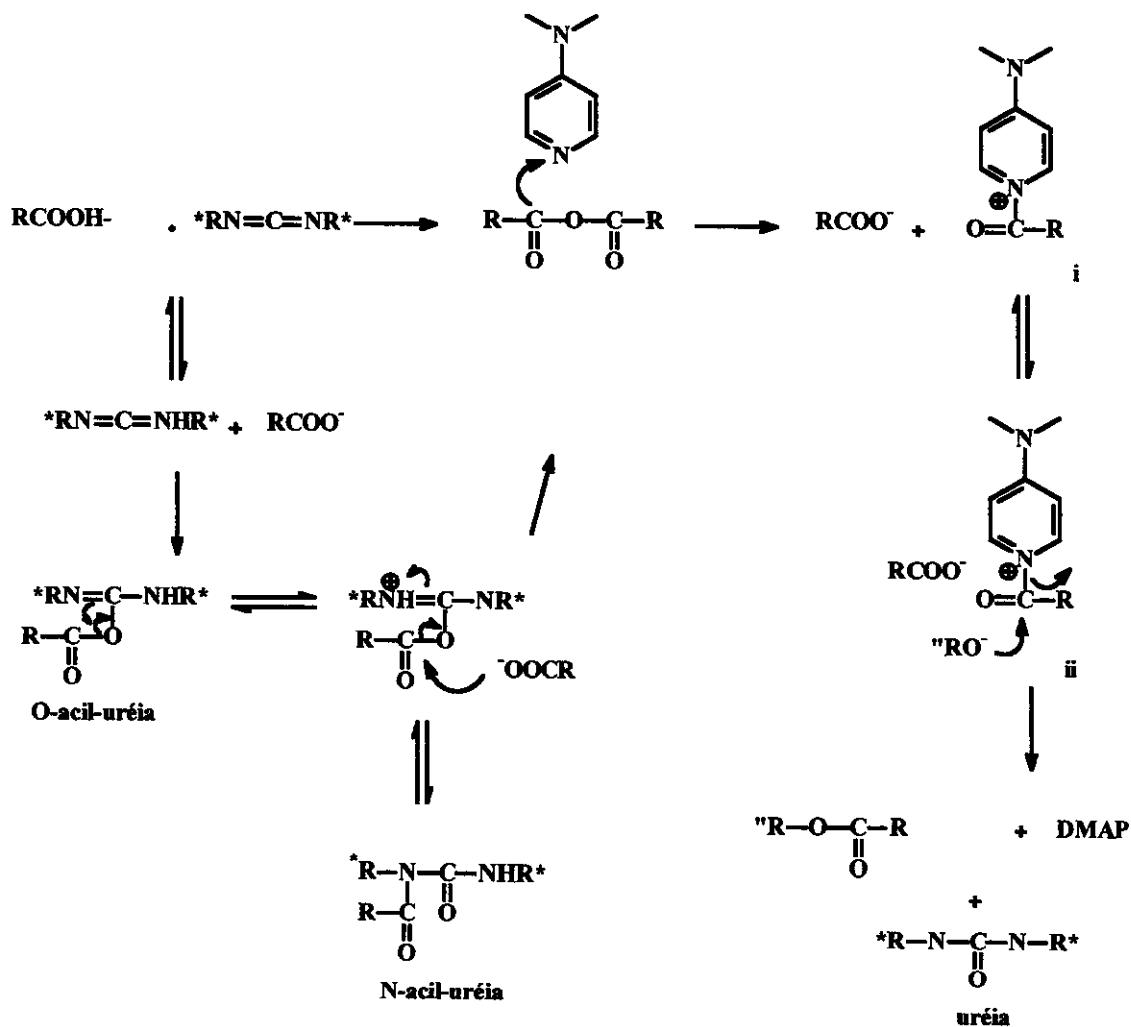


Figura 80. Caminhos reacionais do ácido carboxílico com DCC/DMPA

II.3. CONCLUSÃO

A conclusão desta etapa do trabalho é que o uso do (-)- β -pineno e seus produtos oxidados como intermediários sintéticos homquirais mais elaborados, resultam em vários rearranjos e reações inesperadas tornando os pouco recomendáveis para sínteses ou como indutores assimétricos de Diels Alder com a presente estratégia.

PARTE EXPERIMENTAL

1 - MATERIAIS E MÉTODOS

Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento, tipo Kofler, instalada em um microscópio modelo Thermopan (C. Reichert Optische Werke A G.) e não sofreram correção.

Os valores de rotação ótica $[\alpha]_D$ foram determinados num polarímetro Polamat A – Polarímetro Automático de Rutina Carl Zeiss com lâmpada de mercúrio com precisão de $0,05^\circ$, utilizando clorofórmio, acetona e acetato de etila como solventes

O cálculo da rotação ótica específica em função do comprimento de onda de sódio¹⁰⁴, foi obtido segundo as relações abaixo recomendadas pelo fabricante.

$$[\alpha]_{Hg} = 1,17543 [\alpha]_{Na}$$

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{[\alpha]_D^{20}}{c(g/mL) \times 1 dm}$$

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{[\alpha]_{Hg}^{20}}{1,17543c \times 1}$$

onde: $[\alpha]_D^{20}$ = rotação específica

$[\alpha]_D^{20}$ = rotação lida no aparelho

$c(g/mL)$ = concentração da amostra

(dm) = comprimento da cela (0,1)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em cela de KBr ou em pastilha de KBr para sólidos, em espectrofotômetro Perkin-Elmer 298 e 1600 FTIR utilizando-se como referência interna a absorção em 1601 cm^{-1} de filme de poliestireno.

Os espectros de RMN¹H foram obtidos em espectrômetros Bruker AC 300P (300MHz), Gemini 300 – Varian (300MHz) e Inova 500 (500MHz) Varian. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm utilizando o TMS (0,0 ppm) ou o CHCl₃ 7,32 ppm) como referência interna. Os sinais foram caracterizados como s = singlete, d = dubleto, t = tripleto, q = quarteto, dd = duplo dubleto, ddd = duplo duplo dubleto, dt = duplo tripleto, dq = duplo quarteto.

Os espectros de RMN¹³C foram obtidos em espectrômetros Bruker AC 300P (75,5MHz), Gemini 300 – Varian (75,5 MHz) e Inova 500 (125MHz) Varian. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, sendo 0,0 ppm para o TMS e 77,2 ppm para o CDCl₃.

A interpretação dos dados foi realizada com a ajuda da técnica DEPT, onde; CH₃/CH = sinal positivo (+), CH₂ = sinal negativo (-), C (não ligado a hidrogênio) = sinal de intensidade zero (C_{quat}) e por espectros de RMN 2D de correlações homonucleares H,H (COSY, NOESY) e heteronucleares ¹H, ¹³C (COLOC, HETCOR, HSQC e HMBC).

A análises por CG foram realizadas em cromatógrafo a gás Hewlett Packard – VCD 5890 A, com detector de ionização de chama, equipado com coluna capilar quiral heptakis-(2,6-dimetil-3-pentil)-β-ciclodextrina (30m x 0,25mm x 0,25 μm), Utilizou-se como gás de arraste o H₂. A injeção foi da ordem de 0,1 μl. e as condições utilizadas foram: **condição nº 1:** 120° – 2° C / min – (8min); **condição nº 2:** 100° – 5° C / min – (10min). **condição nº 3:** 80° – 20° C / min (10min);. **Condição nº 4:** 50° – 20° C / min (10min).

As análises por CG/EM foram realizadas em:

Espectrômetro de massas HP 5790 – MSD conectado a cromatógrafo a gás Hewlett Packard –VCD 5890 A, equipado com coluna capilar DB – 5 J & W Scientific (30m x 0,25mm x 0,25 μm).. Utilizou-se Hélio como gás de arraste (1 mL/min). A injeção foi da ordem de 0,1 μl de solução.e as condições utilizadas foram: **Condição nº 5 :** 0,89min-50° – 10° C / min, **condição nº 6 :** 0,89min – 50° – 15° C / min, **condição nº 7:** 0,89min - 80° C – 10° C / min, **condição nº 8:** 0,89 – 80° – 15° C / min, **condição nº 9:** 0,0 – 80° – 10° / min.

Espectrômetro SHIMADZU – CG / MS modelo QP 2000A, a 70 eV, equipado com sonda para sólidos. Para os espectros obtidos por CG/MS utilizou-se coluna capilar DB-17 (30m.x0,25mm, 0,25μm) nas **condições.nº 10:** 0,89min – 100° – 10°/min) e coluna SE-30 (50m x 0,25mmx0,25μm) nas **condições nº 11:** 0,89-100° – 10°/min, **condições nº12 :** 0,89 – 100 – 5°/min.

Métodos cromatográficos

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 da Merck, granulometria 0,05-0,20, 70-230 e solventes apenas destilados. O diâmetro interno e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material a ser cromatografada.(1:30).

Para a cromatografia em placa preparativa ou camada espessa (CCE) foram utilizadas placas de vidro 20x20 cm, com uma camada de sílica gel G e PF₂₅₄, na proporção de 2:1 e com 0,1 mm de espessura. Utilizou-se também placas prontas de sílica sobre alumínio.

Para a cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se placas de vidro 5x20 cm, cobertas com uma camada de sílica gel HF ou CF₂₅₄, na proporção de 1:1 e com 0,25 mm de espessura.

O controle das frações coletadas nas CC foi mediante CCD e a visualização dos compostos em CCD e CCE foi feita sob irradiação com lâmpada de UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm e ou/ por pulverização com revelador específico seguido de aquecimento.

Revelador de terpeno: p-anisaldeído : H₂SO₄ : ácido acético (0,5; 1,0; 0,5 mL).

Revelador Universal: H₂SO₄:MeOH (1,0:1,0 mL).⁸⁷

Revelador KMnO₄: 3,0g KMnO₄/2,0g K₂CO₃/6,0mL NaOH 6%/300mL H₂O

Reagentes e Solventes

Os reagentes foram utilizados como adquiridos e os solventes foram purificados segundo Perrin e colaboradores⁸⁷

02. ISOLAMENTO DOS PRODUTOS NATURAIS

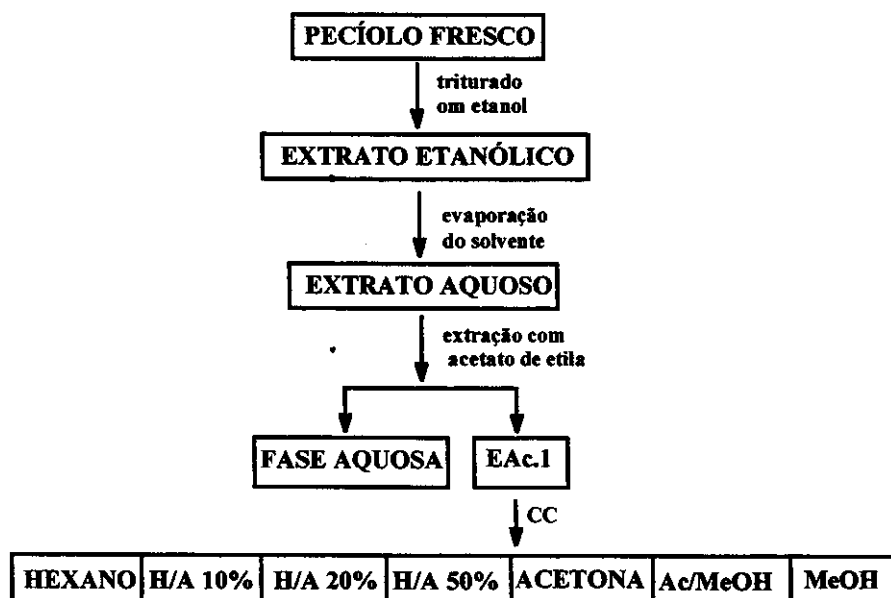
Echinodorus grandiflorus foi coletada em Curitiba-PR.

Especimens Voucher estão depositadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas # UEC 807481 por M.C.E. Amaral responsável pela identificação.

O material coletado fresco (10.0kg), foi separado em duas partes: pecíolos e folhas e estudados separadamente. Os fluxogramas 01 e 02 (paginas 09 e 10) mostram o procedimento geral no isolamento dos constituintes dos pecíolos e folhas, respectivamente. Detalhes dos procedimento serão apresentados neste capítulo.

2.1. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DOS PECÍOLOS.

Os pecíolos coletados em janeiro de 1996, foram desintegrados em um liquidificador utilizando etanol como solvente. Após filtração o solvente foi evaporado à pressão reduzida. O extrato contendo 10% de água foi extraído com acetato de etila fornecendo 14,0g do extrato acetato etílico EAc1 (fluxograma 07).



Fluograma 07. Tratamento dos pecíolos

O extrato EAc1 (14.0g) foi fracionado em coluna cromatográfica (m_{si} = 14,0g; $\varnothing_{col}$ = 5,5cm) usando-se hexano como eluente de empacotamento e, como eluente hexano; hexano/acetato de etila 10%, 20%, 50%, acetona ; acetona/metanol 50% e metanol.

Foram coletadas 20 frações de 200mL cada. As frações recolhidas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas por análise em CCD. A evaporação do solvente, resultou em 16 frações, com recuperação de 69,1% de massa inicial.

Tabela 11. Fracionamento do Extrato EAc1

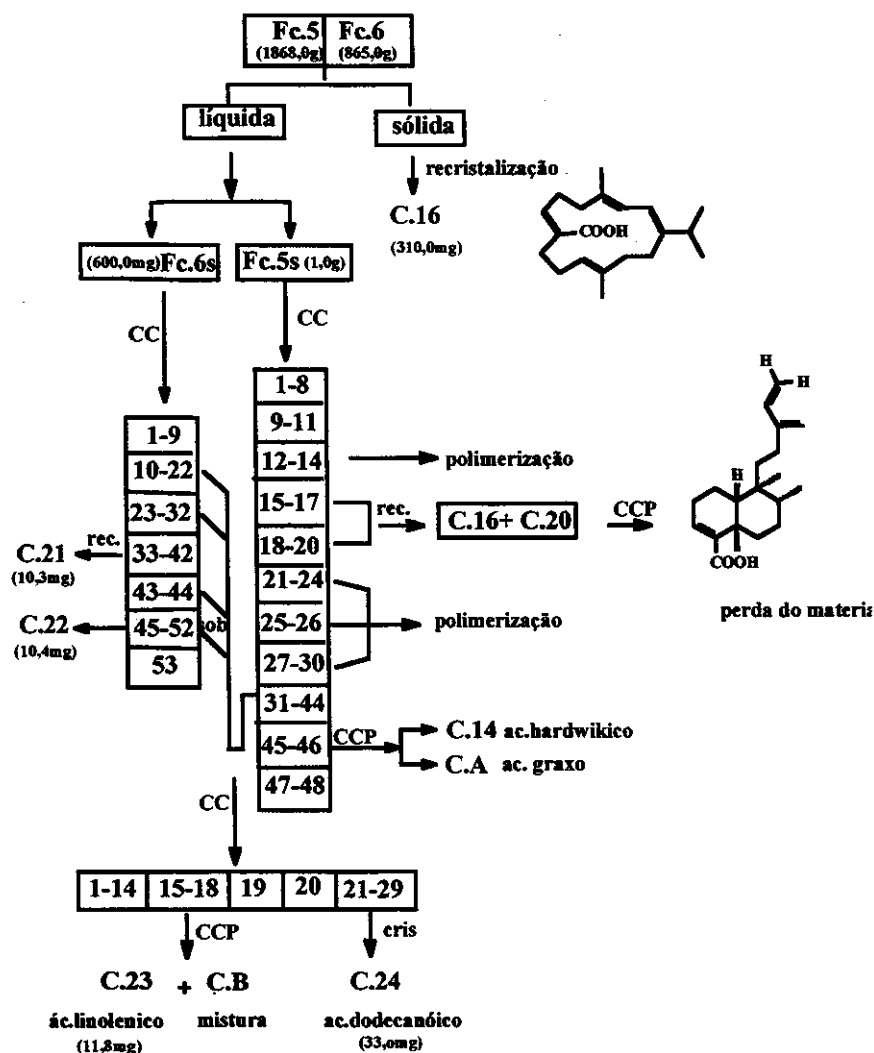
Eluente	Frações		Massa (mg)
Hexano	Fc.1	01	5,0
Hexano	Fc.2	02	46,2
Hexano	Fc.3	03	25,9
Hexano	Fc.4	04 a 07	9,8
Hex./Ac.Etila 10%	Fc.5	08*	1868,0
Hex./Ac.Etila 10%	Fc.6	09 *	865,0
Hex/ac.Etila 20%	Fc.7	10	335,8
Hex./Ac.Etila 20%	Fc.8	11 a 12 *	346,0
Hex./Ac.Etila 20%	Fc.9	13 *	150,0
Hex./ac.etila 50%	Fc.10	14 *	1956,0
Acetona	Fc.11	15 *	1027,9
Acetona	Fc.12	16	110,3
Acetona/MeOH 50%	Fc.13	17	230,0
Acetona/Metanol 50%	Fc.14	18	865,4
MeOH	Fc.15	19	218,0
MeOH	Fc.16	20	1620,0

* Frações estudadas

Em seguida, as frações foram estudadas e purificadas por CC (Cromatografia em Coluna) e/ou CCP (Cromatografia de Camada Preparativa). A ordem de prioridade para prosseguir a análise de cada fração foi estabelecida com base na quantidade de material e menor complexidade da mistura.

A seguir, serão apresentados os fluxogramas que esquematizam o estudo das frações, os métodos utilizados para a purificação dos compostos e os dados espectrais das substâncias isoladas.

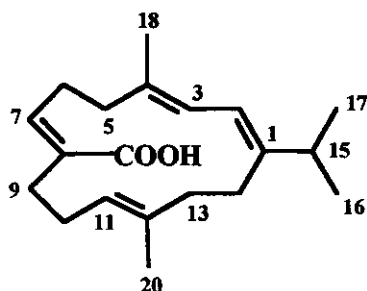
2.1.1. ESTUDO DAS FRAÇÕES Fc.5 e Fc.6



Fluxograma 08. Estudo das frações Fc.5 e Fc.6

As frações Fc.5 e Fc.6 apresentaram um material sólido, o qual após várias recristalizações com clorofórmio, forneceu a substância 16 (310,0mg), identificada por dados espectroscópicos e Raio X como o ácido echinóico (16).

ÁCIDO ECHINÓICO (16). (1E, 3E, 7Z, 11E)-8-CARBOXI-1-ISOPROPIL-4,12-DIMETILCICLOTETRADECATETRAENO



$C_{20}H_{30}O_2$,

Massa molar: 302

Forma física: sólido incolor

Ponto de fusão: 120⁰

R_f 0,5 (Hexano/Acetato de etila 30%, Sílica gel)

IV (film : ν_{max} cm⁻¹ (E 21): 2928, 1687, 1637.

CG/EM (70eV. m/z %) (sonda para sólido) (E 22): 302 (M⁺⁺, 22), 259 (22), 166 (15), 149 (8), 136 (28), 135 (28), 121 (100), 107 (59), 93 (95), 77 (52).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) (E 14) δ : 1,05 (6H, d, J = 6,4 Hz, H-16 e H-17), 1,57 (3H, d, J $\leq$ 1 Hz, H-20), 1,76 (3H, d, J $\leq$ 1 Hz, H-18), 2,10 (2H, H-13), 2,26 (2H, H-5), 2,28 (2H, H-10), 2,33 (2H, H-14), 2,38 (1H, H-15), 2,40 (2H, m, H-9), 2,76 (2H, dt, J = 6,8; 5,5 Hz, H-6), 5,00 (1H, t largo, J = 6,4 Hz, H-11), 5,88 (1 H, t, J = 6,8 Hz, H-7), 5,93 (1H, dq, J = 11,5 e <1 Hz, H-3), 6,04 (1H, d, J = 11,5 Hz, H-2).

RMN ¹³C (75,5 Hz, CDCl₃/TMS) (E 15) δ : 16,6 (CH₃, C-20), 17,4 (CH₃, C-18), 22,2 (2 xCH₃, C-16 e C-17), 25,4 (CH₂, C-10), 26,9 (CH₂, C-6), 28,0 (CH₂, C-14), 33,8 (CH₂, C-9), 34,6 (CH, C-15), 38,5 (CH₂, C-5), 39,6 (CH₂, C-13), 118,3 (CH, C-2), 121,4 (CH, C-3), 124,1 (CH, C-11), 129,4 (C₀, C-8), 134,4 (C₀, C-4), 136,5 (C₀, C-12), 147,3 (CH, C-7), 148,1 (C₀, C-1), 172,3 (C₀, C-19).

O sobrenadante da fração **Fc.5** denominado **Fc5s** (1.0g) foi submetido a coluna cromatográfica utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila 3%.

Foram coletadas 48 frações de 20mL cada. As frações recolhidas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD e os solventes evaporados, resultando em 11 frações, com recuperação de 95,2% de massa.

Tabela 12. Fracionamento da fração **Fc.5s**.

Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)
Hexano/Ac.Etila 3%	1 a 8	102.0
Hexano/Ac.Etila 3%	9 a 10	132.0
Hexano/Ac.Etila 3%	12 a 14 *	103
Hexano/Ac.Etila 3%	15 a 17*	56.1
Hexano/Ac.Etila 3%	18 a 20 *	78.0
Hexano/Ac.Etila 3%	21 a 24 *	60.3
Hexano/Ac.Etila 3%	25 a 26 *	135.2
Hexano/Ac.Etila 3%	27 a 30 *	50,1
Hexano/Ac.Etila 3%	31 a 44 *	73.0
Hexano/Ac.Etila 3%	45 a 46 *	52.8
Acetato de Etila	47 a 48	110.0

*frações estudadas

Das frações **Fc.5s** (15 a 17) e **Fc.5s** (18 a 20), após recristalização com hexano, isolou-se uma mistura de duas substâncias com o mesmo R_f . O espectro de RMN¹H da mistura apresentou sinais característicos da substância **16** e de substância clerodânica contendo duplas terminais.

Na tentativa de separar as duas substâncias fez-se placa preparativa, utilizando como eluente cloroformio/metanol 2%. Não ocorreu a separação e houve perda do material, recuperando-se apenas 1% do material de partida.

As frações **Fc.5s** (12 a 14), **Fc.5s** (21 a 24) **Fc.5s** (25 a 26) e **Fc.5s**. (27 a30) foram tratadas com acetona, observou-se a formação de um precipitado insolúvel provavelmente devido a polimerização do material.

A fração **Fc.5s** (45 a 46) (52,8mg), foi submetida a coluna cromatográfica de placa preparativa, utilizando-se como eluente clorofórmio/metanol 3%. Isolou-se 5,5mg da substância **14** (ácido hardwickico) e 1.5mg da substância **A** (ácido graxo de cadeia longo) o qual não foi analisado.

O sobrenadante da fração **Fc.6s** (600.0mg) foi submetido a coluna cromatográfica utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila 3%. Foram coletadas 53 frações de 20mL cada. As frações recolhidas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas por CCD obtendo-se 7 frações, com recuperação de 92,0% da massa.

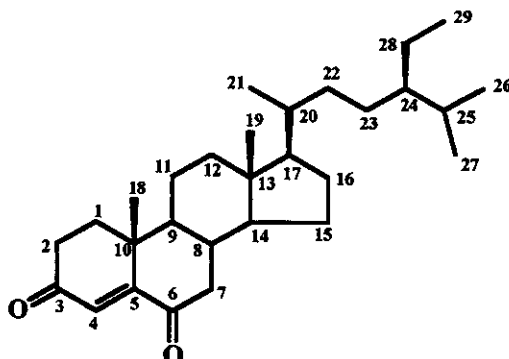
Tabela 13 Fracionamento da fração **Fc.6s**

Eluente	Frações	Massa (mg)
Hexano/Ac.Etila3%	1 a 9	173,0
Hexano/Ac.Etila3%	10 a 22*	91,0
Hexano/Ac.Etila3%	23 a 32*	63,0
Hexano/Ac.Etila3%	33 a 42*	49,0
Hexano/Ac.Etila3%	43 a 44	40,0
Hexano/Ac.Etila3%	45 a 52*	40,0
Acetato de Etila	53	96,0

* frações estudadas

As frações **Fc.6s** (33 a 42) e **Fc.6s** (45 a 52) após recristalização com hexano/CHCl₃ 5% forneceram as substâncias **21** (10,3mg) e **22** (10,4mg). O espectro de RMN¹H de **22** sugere a presença de uma mistura de campesterol (**22a**), β -sitosterol (**22b**) e estigmasterol (**22c**) e o da substância **21**, 24-etil colest-4-en-3,6-dienona.

COMPOSTO 21 – ETILCOLEST-4-EN-3,6-DIENONA



$C_{29}H_{46}O_2$

Massa molar: 426

Forma física: sólido

Rf: 0,48 (hexano/acetato de etila 40%, sílica gel)

$[\alpha]_D^{25}$: -60,7 ($CHCl_3$, c, 9,0)

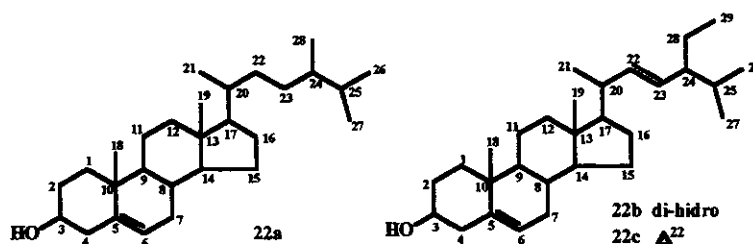
CG/EM (70eV, m/z (%)) (E 57): 285(20), 243(34), 1337(57), 109(3)), 81(42), 69(56), 55(100).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3/TMS$) (E 51) δ : 0,72 (3H, H-18), 0,80 (2H, H-11), 0,81 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-27), 0,82 (1H, H-24), 0,83 (3H, t, $J = 6,9$ Hz, H-29), 0,86 (3H, H-26), 0,92 (3H, H-21), 1,04; 1,26 (2H, H-1), 1,10 (1H, H-14), 1,13 (2H, H-15), 1,14 (1H, H-17), 1,16 (3H, H-19), 1,20 e 2,04 (2H, H-12), 1,25 (2H, H-28), 1,04 e 1,26 (2H, H-1), 1,34 (1H, H-20), 1,12 e 1,58 (2H, H-23), 1,24 e 1,89 (2H, H-16), 1,64 (1H, H-25), 1,86 (1H, H-8), 2,08 (2H, H-22), 2,48 (2H, dd, $J = 4,8$ e $13,9$ Hz, H-2), 2,0 e 2,68 (2H, d, $J = 12,3$; dd, $J = 3,6$ e $J = 15,7$, H-7), 6,17 (1H, H-4).

RMN ^{13}C (75,5 Hz, $CDCl_3/TMS$) (E 52) δ 11,7 (CH_3 , C-18), 11,8 (CH_3 , C-29), 17,4 (CH_3 , C-19), 18,6 (CH_3 , C-21), 18,9 (CH_3 , C-26), 19,7 (CH_3 , C-27), 20,7 (CH_2 , C-11), 22,9 (CH_2 , C-28), 23,8 (CH_2 , C-23), 25,9 (CH_2 , C-15), 27,9 (CH_2 , C-16), 29,0 (CH , C-25), 33,9 (CH_2 , C-1), 33,7 (CH_2 , C-2), 34,1 (CH , C-8), 35,4 (CH_2 , C-22), 35,9 (CH , C-20), 39,0 (CH_2 , C-12),

39,7 (C₀, C-10), 42,4 (C₀, C-13), 45,7 (CH, C-24), 46,7 (CH₂, C-7), 50,9 (CH, C-9), 55,8 (CH, C-14), 56,5 (CH, C-17), 125,5 (CH, C-4), 161,6 (C₀, C-5), 199,8 (C₀, C-3), 202,6 (C₀, C-6).

COMPOSTO **22a/22b/22c** **(CAMPESTEROL/** **SITOSTEROL**
ESTIGMASTEROL)



Forma física: Sólido

R_f 0,41 (hexano/acetato de etila 40%, sílica gel)

CG/EM (70eV, *m/z* (%)): **22a:** 401 (M⁺, 21), 43 (100), **22b:** 413 (M⁺, 16), 55 (100), **22c:** 415 (M⁺, 21), 43 (100).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS): δ : **22a, 22b, 22c:** 0,69-1,02 (18 x CH₃ H-18, H-19, H-21, H-26, H-27, H-28, H-29), 5,50 (m, H-3), 5,36 (H-6), 5,00-5,20 (H-22, H-23, **22b**).

RMN ¹³C (75,5 Hz, CDCl₃/TMS) δ : **22a:** 11,8 (C-18), 18,6 (C-26 e H-28), 18,9 (C-21), 19,3 (C-19), 19,7 (C-27), 20,9 (C-11), 24,3 (C-15), 28,2 (C-16), 28,8 (C-23), 29,6 (C-25), 31,6 (C-2), 33,7 (C-22), 36,0 (C-20), 36,4 (C-10), 37,2 (C-1), 39,7 (C-12), 42,1 (C-13), 42,2 (C-4), 50,0 (C-9), 56,7 (C-14), 55,8 (C-17), 55,9 (C-24), 77,8 (C-3), 121,8 (C-8), 140,8 (C-5). **22b:** 11,7 (C-18), 12,1 (C-29), 18,9 (C-26), 19,0 (C-27), 19,3 (C-19), 21,1 (C-21), 20,9 (C-11), 24,2 (C-15), 25,3 (C-28), 28,2 (C-16), 31,6 (C-2), 31,7 (C-25), 31,8 (C-8), 36,4 (C-10), 37,2 (C-1), 39,6 (C-12), 39,7 (C-7), 41,2 (C-20), 42,2 (C-4), 42,2 (C-13), 50,1 (C-9), 51,1 (C-24), 55,9 (C-17), 56,8 (C-14), 77,8 (C-3), 121,8 (C-6), 129,3 (C-23), 138,4 (C-22), 140,8 (C-5). **22c:** 11,7 (C-

18), 11,9 (C-29), 18,7 (C-26), 18,9 (C-21), 19,3 (C-19), 19,7 (C-27), 20,9 (C-11), 22,9 (C-28), 24,1 (C-15), 28,1 (C-16), 29,0 (C-25), 29,6 (C-23), 31,5 (C-2), 31,7 (C-7, C-8), 33,8 (C-22), 36,0 (C-20), 36,4 (C-10), 37,2 (C-1), 39,7 (C-12), 42,1 (C-13), 42,2 (C-4), 45,7 (C-24), 50,0 (C-9), 56,0 (C-17), 56,7 (C-14), 77,8(C-3), 121,8(C-6), 140,8(C-5).

Como as frações **Fc.5s** (31 a 34), **Fc.6s** (10 a 22), **Fc.6s** (23 a 32), **Fc.6s** (43 a 44) e sobrenadante de **Fs.6s** (45 a 52), apresentaram em CCD semelhanças em uma das manchas, as mesmas foram reunidas obtendo-se a fração (**Fr**) (307.0mg), a qual foi submetida a coluna cromatográfica utilizando-se como eluente clorofórmio/metanol 1%. Foram coletadas 29 frações. As frações recolhidas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD, obtendo-se 5 frações, com recuperação de 51,4% da massa.

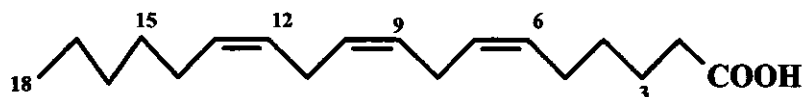
Tabela 14. Fracionamento da fração **Fr**

Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)
CHCl ₃ /MeOH 1%	1 a 14	40,0
	15 a 18 *	41,4
	19	39,0
	20	35,2
	21 a 29 *	33,0

* frações estudadas

A fração **Fr** (15 a 18) apresentou em CCD compostos com R_f muito próximos. Assim fez-se placa preparativa utilizando-se como eluente CHCl₃/MeOH 3%. Isolou-se a substância **23** (11,8mg, ácido de cadeia longa) e mistura (**B**) de 3 substâncias. O espectro de RMN ¹H e ¹³C de **23** sugere ácido graxo com 20 átomo de carbono e três insaturações. O espectro de RMN ¹H de **B** mostrou tratar-se de mistura de ácido hardwikico (**14**), como componente majoritário e como componentes minoritário o ácido cembranóico (**16**) e derivado clerodânico. **18**.

ÁCIDO LINOLÊNICO (23)



$C_{18}H_{30}O_2$

Massa Molar: 278

Forma física: sólido branco

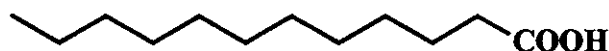
R_f : 0,76 (clorofórmio/metanol 4%, sílica gel)

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3/TMS$) (E R^1 58), δ : 0,98 (3H, H-18); 2,34 (2H, H-2); 5,36 (8H, m, H-6, H-7, H-9, H-10, H-12, H-13 H-15), 1.3-2,79(9 x CH_2).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3/TMS$) (E C^{13} 59), δ : 14,3 (CH_3 , C-18); 24,7 (CH_2); 25,6 (CH_2); 25,7 (CH_2); 29,0 (CH_2); 29,1 (CH_2); 29,2 (CH_2); 29,4 (CH_2); 29,6 (CH_2); 29,7 (CH_2); 33,9 (CH_2); 127,9 (CH); 128,1 (CH), 128,5 (CH); 130,3 (CH), 130,5 (CH), 132,2 (CH); 179,4 (C_0 , C-1).

Da fração Fr (21 a 29) obteve-se o composto 24 (33.0mg) (ácido graxo de 12 carbonos)

ÁCIDO DODECANÓICO (24)



$C_{12}H_{24}O_2$

Massa molar: 200

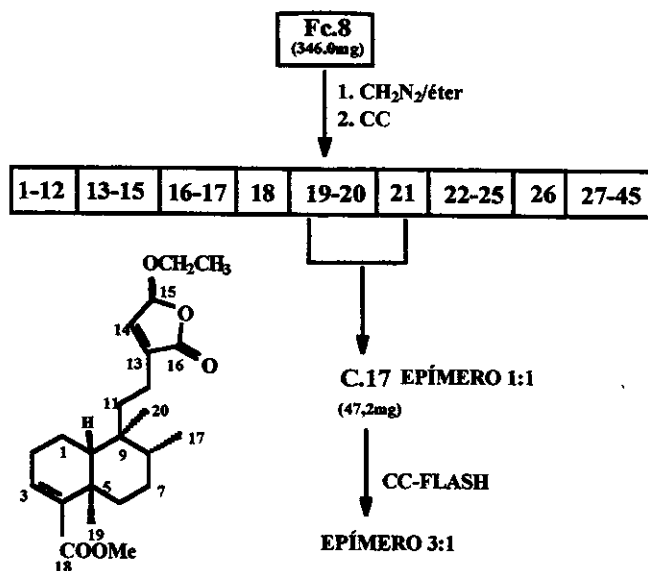
Forma física: sólido

R_f : 0,90 (clorofórmio/metano 4%, sílica gel)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) (E R¹ 61), δ : 0,94 (3H, t, CH_3); 1,30 (18H, 9x CH_2); 1,62 (2H, m, CH_2); 2,34 (2H, t, CH_2 , H-2).

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3/TMS) (E C¹³62), δ : 14,0 (CH_3); 22,6 (CH_2); 24,6 (CH_2); 28,9 (CH_2); 29,1 (CH_2); 29,2 (CH_2); 29,3 (CH_2); 29,5 (CH_2); 29,6 (CH_2); 31,8 (CH_2); 33,8 (CH_2); 179,4 (C_0).

2.1.2. ESTUDO DA FRAÇÃO Fc.8.



Fluxograma 09. Estudo da fração Fc.8

A fração Fc.8 (346.0mg) foi metilada e submetida a coluna cromatografica utilizando-se como eluente hexano/ acetato de etila 3% a 5%. Foram coletadas 45 frações de 25mL cada.. As frações recolhidas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD, os solventes foram evaporados em evaporador rotativo resultando em 12 frações, com recuperação de 56,6% de massa.

Da fração Fc.8. (19 a 20) (34.2mg) e Fc.8 (21) (13.0mg) isolou-se a substância 17, como mistura de epímeros, na proporção de 1:1.

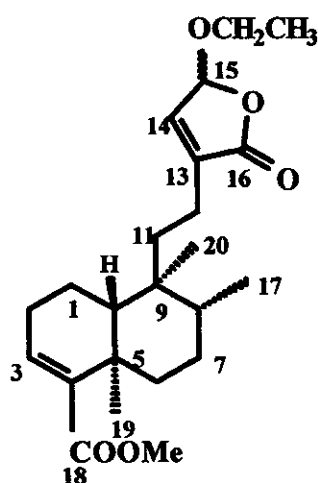
Tabela 15 Fracionamento da fração Fc.8

Eluente	Fações reunidas	Massa(mg)
Hexano/Ac.Etila 03%	1 a 12	9.7
Hexano/Ac.Etila 3%	13 a 15	7,9
Hexano/Ac.Etila 3%	16 a 17	8.1
Hexano/Ac.Etila 5%	18	12,0
Hexano/Ac.Etila 5%	19 a 20 *	34.0
Hexano/Ac.Etila 5%	21 *	13.0
Hexano/Ac.Etila 5%	22 a 25	78.0
Hexano/Ac.Etila 5%	26	12.0
Hexano/Ac.Etila 5%	27 a 45	21.3

* frações estudadas

Com o objetivo de separar os dois epímeros a substância **17a** foi submetido a coluna cromatográfica flash em sílica gel utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila 1%. Esta tentativa não foi satisfatória.

SUBSTÂNCIA 17a. (-)-15-ETOXICLERODA 3, 13-DIEN-15, 16-OLIDE-18-OATO DE METILA, {4 α , 6 α , 8 α }-1-CARBOXIMETIL- 5(S)-[2 (2, 5-DIIDRO-5-ETOXI-2-OXO-3-FURANIL) ETIL-5, 6, 8 α -TRIMETIL-3 ,4, 4 α , 5, 6, 7, 8, 8 α -OCTAIDRO-NAFTALENO}.



C₂₃H₃₄O₅

Massa molar: 390

Forma física: óleo incolor

[α]_D: -80 (CHCl₃, c. 10,0)

R_f: 0,62 (hexano/acetato de etila 20%, sílica gel)

CG/EM [70eV, *m/z* (%)] (E 29): 358 (M⁺ - MeOH, 39), 3444 (23), 343 100), 253 (4), 235 (2), 234 (2), 207 (32), 203 (4), 175 (11), 173 (14), 139 (14), 105 (20), 55(23).

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS), (E 23). δ : 0,76 (3H, s, H-20), 0,81/0,82 (3H, d, J = 6,1 Hz, H-17), 1,06-2,30 (2H, H-6), 1,08 (2H, m, H-11), 1,10-1,50 (2H, m, H-1), 1,25 (3H, s, H-19), 1,30 (3H, t, J = 6,0 Hz, OCH₂CH₃), 1,30 (1H, H-10), 1,42 (2H, H-7), 1,48 (1H, H-8), 2,23 (2H, H-2), 2,24 (2H, H-12), 3,68 (3H, s, OCH₃), 3,95 -3,75 (2H, m, OCH₂CH₃), 5,80 (1H, d, J = 1,2 Hz, H-15), 6,60 (1H, t, J = 3,6 Hz, H-3), 6,76 (1H, d, J = 1,2 Hz, H-14).

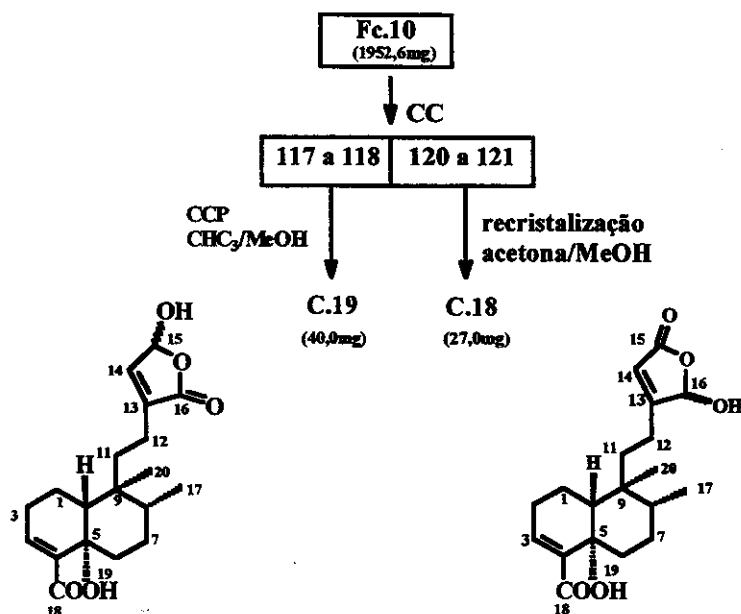
RMN¹³C (75,5 MHz, CDCl₃), (E 24). δ : 14,9 (CH₃, OCH₂CH₃); 15,7 (CH₃, H-17); 17,3 (CH₂, C-1); 18,0 (CH₃, C-20); 18,7/18,8 (CH₂, C-12); 20,5 (CH₃, C-19); 27,0 (CH₂, C-2); 27,1-27,2 (CH₂, C-7); 35,5/35,6 (CH₂, C-11); 35,7 (CH₂, C-6); 36,3 (CH, C-8); 37,6 (C₀, C-5); 38,8 (C₀, C-9); 46,6 (CH, C-10); 51,0 (OCH₃); 66,0 (CH₂, OCH₂); 101,6 (CH, C-15);

137,2 (CH, C-3); 139,3 (C₀, C-13); 141,6 (CH, C-14); 142,4 (C₀, C-4); 167,9(C₀, C-18); 171,6 (C₀, C-16).

2.1.3. ESTUDO DA FRAÇÃO Fc.9

A fração Fc.9 (150.0mg), por apresentar em CCD o composto 17, foi metilada com diazometano em éter etílico e submetida a coluna cromatográfica utilizando-se como eluente hexano /acetato de etila a 2%, 5%, 10%. Isolou-se a substância 17 (20,1mg) novamente como mistura epimérica. Na tentativa de isolar os epímeros, o material foi recromatografado em coluna flash, utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila 1%, sem sucesso, recuperando-se 18,6mg do material de partida.

2.1.4. ESTUDO DA FRAÇÃO Fc.10



Fluxograma 10. Estudo da fração Fc.10.

A fração **Fc.10** (1956.2mg) foi submetida a coluna cromatográfica utilizando-se como eluente gradiente de clorofórmio/metanol, não havendo a separação das substâncias. Reuniu-se então todas as frações (1340,0mg) e recromatografou-se novamente utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila a 10%, 15% e 20%. Foram coletadas 124 frações de 25mL cada. As frações foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD resultando em 18 frações, com recuperação de 49,3% de massa.

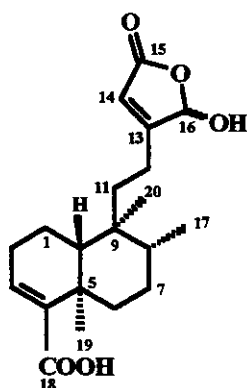
Tabela 16. Fracionamento da fração Fc.10

Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)
Hexano/Ac.Etila 10%	1 a 6	4.4
Hexano/Ac.Etila 10%	7 a 10	8.0
Hexano/Ac.Etila 10%	11 a 12	5.4
Hexano/Ac.Etila 15%	13 a 19	8.2
Hexano/Ac.Etila 15%	20 a 24	23.5
Hexano/Ac.Etila 15%	25 a 28	13.3
Hexano/AC.Etila 15%	29 a 47	12.4
Hexano/Ac.Etila 15%	48 a 54	3.8
Hexano/Ac.Etila 20%	55 a 69	2.4
Hexano/Ac.Etila 20%	70 a 77	12.2
Hexano/Ac.Etila 20%	78 a 94	119.4
Hexano/Ac.Etila 20%	95 a 98	10.1
Hexano/Ac.Etila 20%	100 a 106	74.5
Hexano/Ac.Etila 20%	107 a 116	183.7
Hexano/Ac.Etila 20%	117 a 118 *	270.0
Hexano/Ac.Etila 20%	120 a 121 *	110.0
Hexano/Ac.Etila 20%	122	40,5
Hexano/Ac.Etila 20%	123 a 124	63,2

- frações estudadas

A partir da fração **Fc.10** (120 a 121) após várias recristalizações com acetona/metanol isolou-se a substância **18** (27,0mg). A fração **Fc.10** (117 a 118) (100,0mg) foi submetida a CCP utilizando-se como eluente clorofórmio/metanol a 7%, isolando-se a substância **19** (40,0mg).

SUBSTÂNCIA 18: ÁCIDO - (-)-(16)-HIDROXI-CLERODA-3-13-DIEN-16-15-OLIDE-18-OICO, {4 α , 6 α , 8 α)-ÁCIDO-1-CARBOXI-(S)-[2(2,5-DIIDRO-5-HIDROXI-2-OXO-4-FURANIL)-ETIL-5, 6, 8 α -TRIMETIL-3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a - OCTAIDRONAFTALENO



C₂₀H₂₈O₅

Massa Molar: 348

Forma física: sólido, incolor

Ponto de fusão: 146-147⁰C.

[α]_D: -39,4 (CHCl₃, c 4,0)

IV (KBr) $\nu_{\max}$. cm⁻¹: (E 35): 2948, 2911. 1716, 1363. 1165, 767

CG/EM [70eV.(m/z %)] (E 36): 330 (M⁺ - H₂O, 25), 315 (22), 221 (11), 220 (4), 175(13), 203 (30), 125 (78), 105 (33), 91 (52), 55 (71), 41 (100).

RMN ¹H (300 MHz, (CD₃)₂CO/TMS), (E 30), δ : 0,82 (3H, s, H-20); 0,84/0,85 (3H, d, J= 6,3 Hz, H-17); 1,10 e 2,46 (1H, dt, J = 12,9; 3 Hz; H_a; 1H, H_b-6); 1,28 (3H, s, H-19), 1,38 (1H, dd, J = 12,0; 1 Hz, H-10), 1,38-1,44 (2H, m, H-7), 1,13-1,46: (2H, m, H-1), 1,52; 1,64-

1,78 (2H, H-11), 1,58 (1H, m, H-8), 2,18 –2,28 (2H,m, H-2), 2,26-2,32 (2H, m, H-12), 5,93 (1H, s, H-14), 6,11 (1H, s, H-16), 6,71 (1H, t, J = 3,1 Hz, H-3).

RMN ^{13}C (75,5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$), (E 31) δ : 15,2 (CH_3 , C-17); 18,1 (CH_2 , C-1), 18,6 (CH_3 , C-20), 20,9 (CH_3 , C-19), 21,7/21,8 (CH_2 , C-12) 27,7/27,8 (CH_2 , C-2); 28,0 (CH_2 , C-7), 35,8/35,9 (CH_2 , C-11), 36,7 (CH_2 , C-6), 37,1 (CH , C-8), 38,4 (C_0 , C-5), 39,5/39,6 (C_0 , C-9), 47,7 (CH , C-10), 100,0/100,1 (CH , C-16), 117,5/117,6 (CH , C-14), 138,2/138,3 (CH , C-3), 143,1/143,2 (CH , C-4), 168,5 (C_0 , C-13), 171,7/171,8 (C_0 , C-15); 171,8 (C_0 , C-18).

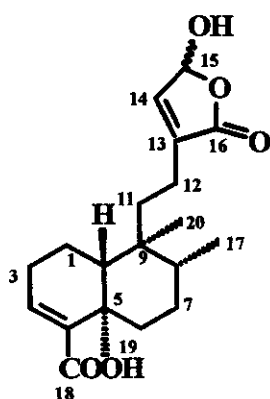
2.1.4.a SÍNTESE DA SUBSTÂNCIA 18.

Uma solução de 90,0mg (0,248mmol) do ácido hardwickico (14) em diclorometano (50,0mL) contendo diisopropiletil-amina (0,45mL) e 4,30mg do catalisador rosa de bengala (suportado em poliestireno), foi irradiada com lâmpada de halogênio (tungstênio) de 250W, à -78°C , sob fluxo constante de oxigênio e agitação durante 2 horas. O banho de resfriamento foi retirado e após a temperatura ambiente, a solução foi filtrada sob celite e o resíduo lavado repetidas vezes com uma mistura de hexano/acetato de etila 50% e acetona. O filtrado foi concentrado e o produto cromatografado em coluna de sílica gel, usando gradiente de hexano/acetato de etila 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e acetato de etila, para fornecer 3,8mg (0,01mmol) Da substância 18 em 3,8 % de rendimento.

Os dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN $^{13}\text{C/DEPT}$ apresentaram-se idênticos com os dados do produto natural 18

$[\alpha]_{\text{D}} = -57,2$ (acetona, c, 5,2)

SUBSTÂNCIA 19. ÁCIDO-(-)-15-HIDROXICLERODA-3,13-DIEN-16, 15-OLIDE-18-OICO, {(4 α , 6 α , 8 α)-ÁCIDO-1-CARBOXI-5 (S)-{2(2,5-DIIDRO-5-HIDROXI-2-OXO-3-FURANIL) ETIL-5, 6, 8a-TRIMETIL-3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-OCTAIDRONAFTALENO.



C₂₀H₂₈O₅

Massa molar: 348

Forma física: sólido, incolor

R_f: 0,78 (clorofórmio/metanol 5%, sílica gel); 0,34 (clorofórmio/metanol 30%, sílicagel)

CG/EM (70eV, *m/z* %) (E 42): 344(M⁺-H₂O, 57), 329(100), 297(6), 235(1), 203(5), 175(5), 139(3).

RMN ¹H (300 MHz, (CD₃)₂CO/TMS), (E 37), δ : 0,76 (3H, s, H-20); 0,81 (3H, d, J= 6,3Hz, H-17); 2,42 (2H, m, H-11); 1,24 (3H, s, H-19), 1,31 (1H, m, H-10), 1,46-1,64 (2H, m, H-1), 1,42 (2H, H-7), 1,50 (1H, m, H-8); 2,18 (2H, H-12); 2,28 (2H, H-2), 1,10 e 2,42 (1H,d, J= 13,0 Hz, H_{ax}-6; 1H, H_{eq}-6); 6,11 (1H, s, H-15), 6,84 (1H, s, H-14), 6,84 (1H, s, H-3).

RMN ¹³C (75,5 MHz, (CD₃)₂CO/TMS), (E 38) δ : 15,9 (CH₃, C-17); 17,4 (CH₂, C-1), 18,4 (CH₃, C-20), , 18,9 (CH₂, C-12); 20,5 (CH₃, C-19); 27,2 (CH₂, C-7);27,5 (CH₂, C-2); , 35,8 (CH₂, C-11), 35,8 (CH₂, C-6), 36,3 (CH, C-8), 37,6 (C₀, C-5), 38,8 (C₀, C-9), 46,8 (CH, C-10); 97,2 (CH, C-15); 143,5 (CH, C-3), 140,6 (CH, C-14); 138,8 (CH, C-13); 141,6 (C₀, C-4),172,6 (C₀, C-16); 172,5 (C₀, C-18).

2.1.5. ESTUDO DA FRAÇÃO Fc 11

A fração Fc11 (1027.9mg), foi submetida a coluna cromatográfica utilizando-se como eluente gradiente de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ de onde foram coletadas 30 frações. As frações foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD, resultando em 7 frações, com recuperação de 33% de massa..

Tabela 17. Fracionamento da fração Fc.11

Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)
Gradiente	1 a 9	19,3
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	10 a 13	13,2
	14 a 18	27,0
	19 a 23	15,0
	24 a 26 *	50,1
	27 a 29	42,0
	30	36,4

*fração estudada

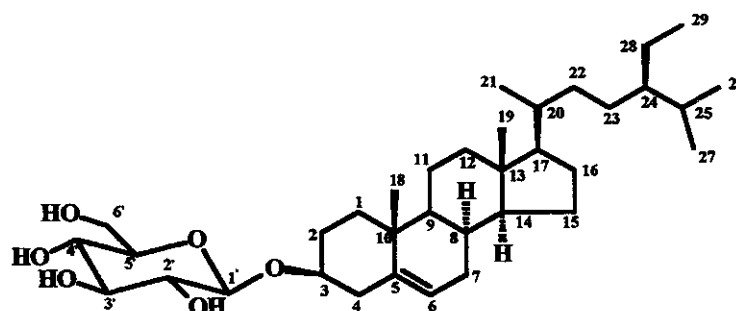
A fração Fc11 (24 a 26) (50.0mg) foi submetida a cromatografia de placa preparativa utilizando-se como eluente cloroformio/metanol 10%. Isolou-se a substância C.(4.8mg) com características de ácidos graxos glicosilados conforme espectro de RMN. No entanto não foi possível caracterizá-lo devido a quantidade do material.

2.1.6. ESTUDO DA FRAÇÃO Fc.12

Da fração Fc.12 após recristalização com cloroformio isolou-se a substância 25 (31,0mg). O espectro de RMNH^1 mostrou a presença de unidades glicosídicas. Tratou-se a

substância **25** com anidrido acético/piridina e após, purificação em coluna cromatográfica obteve-se o composto acetilado **25a**.

3-O- β -GLICOPIRANOSIL SITOSTEROL.(25)



$C_{35}H_{60}O_6$

Massa molar: 576

Forma física: Sólido amorfo, branco

CG/EM [70eV (m/z %)], sonda para sólidos (E 67): 397(M^+ - $C_6H_{11}O_6$, 85), 43(100).

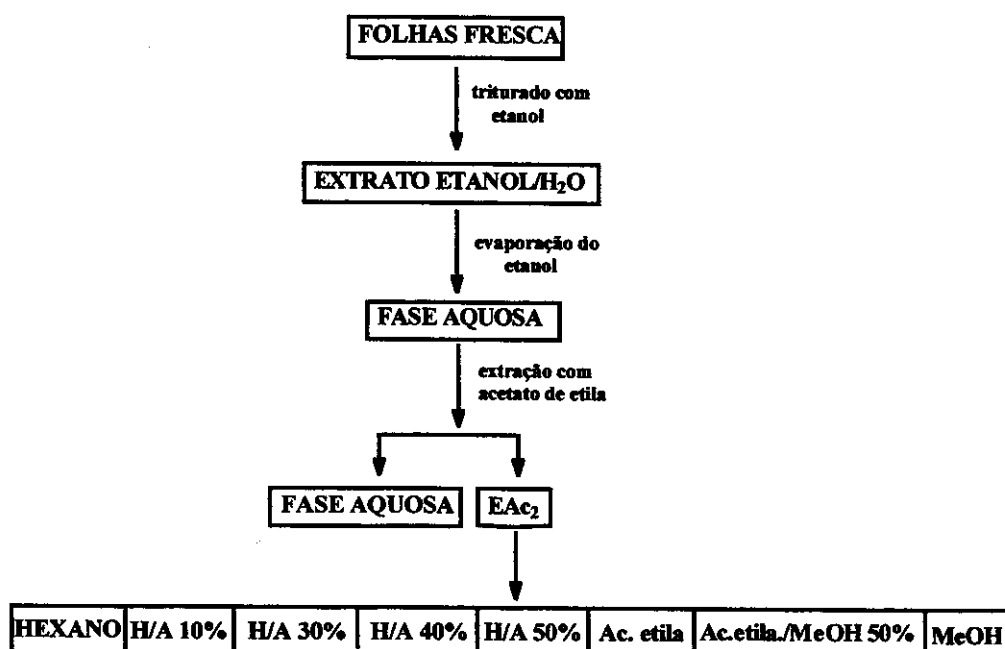
RMN 1H (300 MHz, $(CD_3)_2CO/TMS$), (E 64), δ : 0,70 (3H, s, H-18), 0,84 (3H, t, $J=6,6Hz$, H-29), 0,85 (6H, d, 6,7 Hz, H-26 e H-27), 0,94 (3H, d, $J=6,7Hz$, H-21), 1,02 (3H, s, H-19), 3,29-3,90 (6H, H 2', 3', H-4', H-5', H-6'), 4,40 (1H, d, $J=7,9 Hz$, H-1'), 5,38 (1H, d largo, H-6).

RMN ^{13}C (75,5 MHz, $(CD_3)_2CO/TMS$), (E 65) δ : 12,2 (CH_3 , C-18 e C-29), 19,6 (CH_3 , C-26), 19,3 (CH_3 , C-21), 19,6 (CH_3 , C-19), 20,0 (CH_3 , C-27), 21,6 (CH_2 , C-11), 23,6 (CH_2 , C-28), 24,8 (CH_2 , C-15); 26,6 (CH_2 , C-23), 28,8 (CH_2 , C-16 e C-2), 29,7 (CH , C-25), 30,1 (CH_2 , C-7), 32,5 (CH , C-8), 34,5 (C_0 , C-22), 36,3 (C_0 , C-10), 36,7 (CH , C-20), 37,9 (CH_2 , C-1), 39,2 (CH_2 , C-4), 40,4 (CH_2 , C-12), 42,9 (C_0 , C-13), 46,6 (CH , C-24), 50,9 (CH , C-9), 56,8 (CH ,

C-17), 57,5 (CH, C-14), 79,7 (CH, C-3), 121,7 (CH, C-6), 141,3 (C₀, C-5), 62,4 (CH₂, C-6'); 71,0 (CH, C-4'), 74,4 (CH, C-2'), 76,9 (CH, C-3'), 77,4 (CH, C-5'), 101,9 (CH, C-1').

2.2 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DAS FOLHAS

As folhas coletadas em janeiro de 1996, foram trituradas com etanol em um liquidificador e o solvente foi evaporado à pressão reduzida. O extrato contendo 10% de água foi extraído com acetato de etila fornecendo 35,0g do extrato EAc2.(fluxograma 06)



Fluxograma.11. Tratamento das folhas de *E. grandiflorus*

O extrato EAc2, foi fracionado em coluna cromatografica ($m_{si} = 250.0g$; $\varnothing = 5.0cm$) usando hexano como eluente de empacotamento, eluida com hexano, hexano/acetato de etila a 10%, 20%, 30%, 40%, 50%; acetato de etila e metanol.

Foram coletadas 9 frações de 500mL de cada eluente, com recuperação de 43,9% de massa inicial.

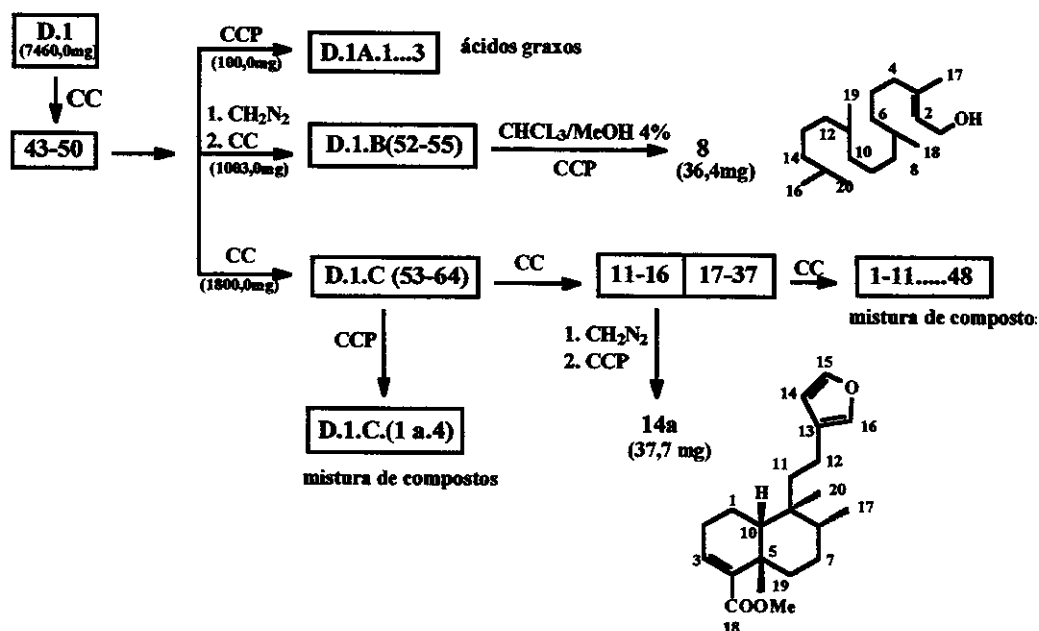
Tabela 18. Fracionamento do Extrato EAc2.

Eluente	Frações		Massa (mg)
Hexano/Ac.Et.10%	Ff	2*	7460.0
Hexano/Ac.Et.20%	Ff	3*	
Hexano/Ac.Et. 30%	Ff	4	700.7
Hexano/Ac.Et. 40%	Ff	5	959.2
Hexano/Ac.Et. 50%	Ff	6 *	1078.3
Acetato de. Etila	Ff	7 e 8	2060.3
MeOH	Ff	9	974.0

- frações estudadas

As frações **Ff.1** a **Ff.3** foram reunidas por apresentar semelhanças em CCD, obtendo-se a fração **Ff.1-3** (7.46g), denominada **D.1**.

2.2.1 ESTUDO DA FRAÇÃO D.1



Fluxograma 12. Estudo das frações reunidas Ef (1 a 3) denominada fração D.1.

A fração **D.1** (7,46g), foi fracionada em coluna cromatográfica (m_{si} = 80,0g, $\varnothing$ = 3,0cm) usando-se hexano e hexano/cloroformio 25% como eluente. Foram coletadas 51 frações de 25mL cada. As frações recolhidas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas por análise em CCD e o solvente evaporado, resultando em 8 frações com recuperação de 78,6% da massa inicial.

Tabela 19 Fracionamento da fração D.1

Eluente	Frações reunidas	massa(mg)
Hexano	1 a 7	15.6
Hexano	8 a 12	71.7
Hexano/CHCl ₃ 25%	13 a 16	138.1
Hexano/CHCl ₃ 25%	17 a 19	50.9
Hexano/CHCl ₃ 25%	20 a 35	273.4
Hexano/CHCl ₃ 25%	36 a 42	6.6
Hexano/CHCl ₃ 25%	43 a 50	5300.0
Hexano/CHCl ₃ 25%	51	13.3

A fração **D.1(43-50)** apresentou em CCD substâncias com fluorêscencia e características de ácidos. Para a separação dessas substâncias a fração foi dividida em 3 partes e analisadas em separado.

a- TRATAMENTO 1

A fração **D.1(43 a 50)**(100mg), foi cromatografada em cromatografia em camada preparativa utilizando-se como eluente CHCl₃/MeOH 3%, fornecendo as frações **D.1.A.1** (33,1mg); **D.1.A.2** (10,0mg) e **D.1.A.3** (13,0mg).

A fração **D.1.A.1**, apresentou dois componentes ácidos em CCD. As frações **D.1.A.2** e **D.1.A.3**, apresentaram características de misturas de ácidos graxos de cadeia longa conforme espectro de RMNH¹. não sendo portanto, caracterizados.

b - TRATAMENTO 2.

As frações **D.1.A.1** (33,1mg) e **D.1(43 a 50)** (1.0g) foram reunidas, (total de massa 1,33g) e metiladas com reagente diazometano em éter. Em seguida o material metilado

(denominado **D.1.B**) foi fracionado em coluna cromatográfica usando-se como eluentes hexano, hexano/acetato a 1%, 2% e 5%.

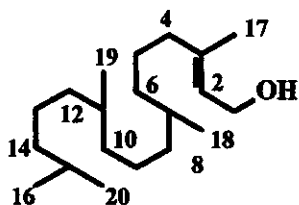
Foram coletadas 72 frações de 25mL cada. As frações foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD e evaporados o solvente, resultando em 15 frações, com recuperação de 89,9% da massa inicial.

Tabela 20. Fracionamento da fração D.1.B.

Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)
Hexano	1 a 12	112.6
Hexano/Ac.Etila 1%	13 a 20	185.9
Hexano/Ac.Etila 1%	30 a 31	9.6
Hexano/Ac.Etila 1%	32 a 33	108.4
Hexano/Ac.Etila 1%	34 a 35	92.9
Hexano/Ac.Etila 1%	36 a 37	23.8
Hexano/Ac.Etila 1%	38 a 40	69.5
Hexano/Ac.Etila 2%	41 a 49	117.5
Hexano/Ac.Etila 2%	50 a 51	19.0
Hexano/Ac.Etila 2%	*52 a 55	97.4
Hexano/Ac.Etila 2%	56 a 58	43.3
Hexano/Ac.Etila 5%	59 a 61	49.7
Hexano/Ac.Etila 5%	62 a 69	152.4
Hexano/Ac.Etila 5%	70	138.1
Hexano/Ac.Etila 5%	71 a 72	79.5

A fração **D.1.B**(52 a 55) (97.4mg), por apresentar menos complexa e compostos fluorescentes foi tratada por CCP, utilizando-se como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ a 4%. Obteve-se as substâncias **C.8** (36,4mg) e **C.16a** (12,3mg), caracterizadas por dados espectroscópicos como fitol e ácido cembranóico (metil éster), respectivamente.

FITOL(8). 3, 7, 11, 15-TETRAMETIL-2-HEXADECEN-1-OL.



C₂₀H₄₀O

Massa molar: 296

Forma física: líquido incolor

R_f 0,45 (hexano/acetato de etila 20%, sílica gel)

CG/EM [70eV, *m/z* (%)] (E. 06): 281(M⁺, -CH₃, 1), 123 (42), 81 (49), 71 (100).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) (E 01), δ: 0,84 (3H, d, J = 6,3Hz, H-19), 0,86 (3H, d, J = 6,3 Hz, H-18), 0,87 (6H, d, J = 6,8 Hz, H-16, H-20), 1,06-1,27 (8H, m, H-6, H-8, H-10, H-12), 1,14 (2H, H-14), 1,25 (4H, H-9, H-13), 1,36 (2H, H-7 e H-11), 1,38 (2H, H-5), 1,53 (1H, m, H-15), 1,68 (3H, d, J = 1,0 Hz, H-17), 1,98; 2,06 (2H, H-4a e H-4b), 4,20 (2H, d, J = 7,2 Hz, H-1), 5,40(1H, tq, J = 1,3 e J = 7,0 Hz, H-2).

RMN¹³ C (75,5 MHz, CDCl₃/TMS) (E 02), δ: 16,0 (CH₃, C-17). 19,5 (CH₃, C-19), 19,6 (CH₃, C-18), 22,5 (CH₃, C-16), 22,6 (CH₃, C-20), 24,3 (CH₂, C-9), 24,6 (CH₂, C-13), 25,0 (CH₂, C-5), 27,8 (CH, C-15), 32,6 (CH, C-11), 32,7 (CH, C-7), 36,6 (CH₂, C-6), 37,2 (CH₂, C-12), 37,3 (CH₂, C-10), 37,3 (CH₂, C-8), 39,3 (CH₂, C-14), 39,8 (CH₂, C-4), 59,4 (CH₂, C-1), 123,5 (CH, C-2), 140,2 (C₀, C-3).

A fração **D.1.B (56 a 58)**, apresentou em CCD apenas uma mancha. No entanto, ao submetê-la a RMN¹H verificou-se tratar de misturas complexas, não sendo portanto estudadas.

c- TRATAMENTO 3

A fração **D.1 (43 a 50)** (1.8g), foi cromatografada em coluna de sílica-gel utilizando-se como eluente hexano; hexano/ CHCl_3 a 1%, 2%, 5% e 10%. hexano/acetato. etila/ MeOH a 8:10:1. Coletou-se 67 frações. Não houve a separação dos componentes.

Na tentativa de separação das substâncias, as frações contendo os componentes de interesse (53 a 64) (1,0g) foram reunidas, obtendo se a fração **D.1.C.** e recromatografados novamente por a) CCP e b) CC.

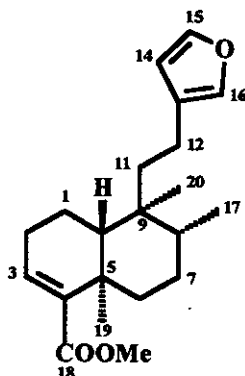
a- A fração **D.1.C** (90,0mg), foi tratada por CCP utilizando-se como eluente clorofórmio/metanol 4%. Obteve-se as frações **D.1.C.1** (11,7mg); **D.1.C.2** (4.6mg); **D.1.C.3** (5.5mg) e **D.1.C.4** (26,6mg) todas apresentando misturas de compostos. O espectro de RMN^1H de **D.1.C.1** mostrou a presença do ácido hardwikico como composto majoritário dessa fração.

b- A fração **D.1.C** (800,0mg), foi cromatografada em coluna de sílica-gel utilizando-se como eluente hexano; hexano/acetato.de etila 5%. Coletou-se 45 frações, com recuperação de 88,3 % da massa. As frações contendo substâncias ácidos foram reunidas **D.1.C** (11-16) (100.0mg) e metiladas com diazometano em éter, e em seguida cromatografada em CCP, utilizando se como eluente clorofórmio/metanol 4%. Obteve-se o composto **14a** ,ácido hardwikico (37.7mg), isolado na sua forma metilada.

Tabela 21. Fracionamento da fração D.1.C.

Eluente	Frações reunidas	massa (mg)
Hexano	1 a 8	8.2
Hexano	9 a 10	16.5
Hexano./Ac.Etila 5%	11 a 16*	109.9
Hexano/Ac.Etila 5%	17 a 37*	497.2
Hexano/Ac.Etila 5%	38 a 44	163.1
Hexano/Ac.Etila 5%	45	72,0

COMPOSTO 14a HARDWICKICATO DE METILA.



$C_{21}H_{30}O_3$

Massa molar: 330

Forma física : óleo incolor

R_f : 0,60 (hexano/acetato de etila 30%, sílica gel)

$[\alpha]_D$: -113 ($CHCl_3$, c . 20)

CG/EM [70 eV, m/z (%)] (E 13) δ : 330 (M^{+} , 21), 283 (28), 235 (58), 203 (71), 139 (100), 96 (62), 84 (21%), 81 (64).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3/TMS$), (E 07), δ : 0,78 (3H, s, Me-20), 0,83 (3H, d J = 6,0 Hz, Me-17), 1,20 (1H, H-6a), 1,25 (3H, s, Me-19); 1,40 (1H, H-10), 1,47 (2H, H-7), 1,57 (1H, H-8), 1,60 (2H, H-11), 1,60-1,72 (2H, H-1), 2,10-2,24 (2H, H-2), 2,36 (1H, H-6b), 2,26 (2H, H-12), 3,36 (3H, -OCH₃), 6,25 (1H, dd, J = 1,7 e 0,8 Hz, H-14), 6,60 (1H, t, J = 3,6 Hz, H-3), 7,19 (1H, d, J = 1,2 Hz, H-16), 7,34 (1H, t, J = 1,7 Hz, H-15).

RMN ^{13}C (75,5 MHz, $CDCl_3/TMS$) (E 08) δ : 15,8 (CH₃, C-17), 17,4 (CH₂, C-1), 18,0 (CH₂, C-12), 18,1 (Me, C-20), 20,6 (Me, C-19), 27,0 (CH₂, C-2), 27,1 (CH₂, C-7), 35,8 (CH₂, C-6), 36,1 (CH, C-8), 37,5 (C₀, C-5), 38,5 (CH₂, C-11), 38,7 (C₀, C-9), 46,4 (CH, C-10), 51,1 (OMe), 111,0 (CH, C-14), 125,7 (C₀, C-13), 136,9 (CH, C-3), 138,5 (CH, C-16), 142,6 (C₀, C-4), 142,8 (CH, C-15), 168,0 (C₀, C-18).

A fração **D.1.C.(17-37)**(497,2mg), foi submetida a coluna cromatográfica de sílica-gel .Foram coletadas 48 frações de 15ml cada. As frações foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD, resultando em 6 frações, com recuperação de 95,4 % da massa inicial

Tabela 22. Fracionamento da fração D.1.C.(17-37)

Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)
Hex./Ac.Etila 1%	1 a 11	7,8
Hex./Ac.Etila 1%	12 a 15	12,5
Hex./Ac.Etila 1%	16 a 23*	56.3
Hex./Ac.Etila 1%	24 a 26*	58,0
Hex./Ac.Etila 1%	27 a 47	330.0
Hex./Ac.Etila 1%	48	10,.0

Nova tentativa na separação dos constituintes foram realizadas com as frações D.1.C.(17 -37)(16-23) e D.1.C.(17-37)(24-26), por CCP e CCD, sem sucesso, pois todas as frações apresentaram-se como misturas muito complexas.

2.2.2 ESTUDO DA FRAÇÃO Ff.6

A fração Ff.6 (508.0mg), foi submetida a coluna cromatográfica usando-se como eluente hexano/acetato de etila a 10%, 15%,20% e 30%. Foram coletadas 101 frações de 25mL cada. As frações foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD, resultando em 15 frações, com recuperação de 90,4 % da massa.

Da fração D.6.(73 a 83), após recristalização com acetona /clorofórmio, isolou-se o composto 18 (11.0mg).

Tabela 23. Fracionamento da fração Ff.6

Eluente	Frações reunidas	massa (mg)
Hexano/Ac. Etila 10%	1 a 5	9,5
Hexano/Ac.Etila 10%	6	6,7
Hexano/Ac.Etila 10%	7 a 8	6,9
Hexano/Ac.Etila 10%	9 a 12	13,0
Hexano/Ac.Etila 10%	13 a 25	90,0
Hexano/Ac. Etila 15%	26 a 42	114,4
Hexano/Ac.Etila 15%	43 a 46	47,0
Hexano/Ac.Etila 15%	47 a 52	26,4
Hexano/Ac. Etila 20%	53 a 55	11,0
Hexano/Ac.Etila 20%	56 a 58	22,7
Hexano/Ac.Etila 20%	59 a 72	63,2
Hexano/Ac. Etila 30%	73 a 83 *	18,5
Hexano/Ac.Etila 30%	84 a 93	19,7
Hexano/Ac.Etila 30%	94 a 100	5,1
Acetato de. Etila	101	5,3

2.3. ISOLAMENTO DO COMPOSTO 20

Os pecíolos de *Echinodorus grandiflorus* coletado fresco em Curitiba-Pr. (1998), foram extraídos com metanol em um liquidificador. Após a evaporação do solvente obteve-se 2,4g do extrato metanólico (ExM.P). O extrato ExMP (1,0g) foi submetido a um pré fracionamento utilizando-se como eluente: hexano, hexano/acetato de etila 5%, 10%, 20%, 40%, acetato de etila e acetato de etila/metanol 10%.

A presença do composto 20 foi analisada por RMN¹H. Observou-se a presença do mesmo na fração eluída com com hexano/acetato de etila 5% (286,0mg). Esta fração foi denominada de F-20 e utilizada para isolar o composto 20.

2.3.1. REAÇÃO COM $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$

Em um balão de 100,0mL foi adicionado o extrato ExMP (500,0mg) e 15,0 ml de octano sob gás argônio. Em seguida, adicionou-se 100,0mg de $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$ e deixou-se sob refluxo por 20 minutos. A cor verde da solução inicial tornou-se marrom e formou-se um precipitado escuro. A reação foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. A reação bruta foi submetida a cromatografia em placa preparativa utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila 5%, não foi observado a formação do produto complexo dieno ferro carbonila.

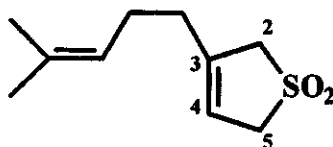
2.3.2. REAÇÃO COM SO_2

a) Mirceno como modelo

20,0mg do mirceno foram dissolvidas em 2,0mL de diclorometano anidro sob argônio e resfriado a -55°C . Em seguida adicionou-se gás SO_2 e deixou-se sob agitação por 3,0h. Após este período a temperatura foi aumentada gradativamente e o solvente evaporado.

A purificação da reação bruta em coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando-se como eluente hexano/acetato de etila 3% e 5%, forneceu o a substância 33.

SUBSTÂNCIA **33.** **3-(4-METIL-3-PENTENIL)-2,5-DIIDRO-1,1-DIÓXIDOTIOFENO.**



C₁₀H₁₆SO₂

Massa molar: 200

RMN¹H (300MHz, CCl₄/TMS) δ : 2,00-2,20 (4H, H-4, H-6), 1,62 (6H, s, H-1, H-11), 3,68 (2H, d, J= 0,72 Hz, H-2), 3,79 (2H, d, J= 0,89 Hz, H-5), 5,10 (1H, m, H-8), 5,68 (1H, d, J= 1,6Hz, H-4).

RMN¹³C (75,5 MHz, CCl₄/TMS) δ : 25,3 (CH₂, C-7), 25,5 (2CH₃, C-10, C-11), 32,9 (CH₂, C-6), 56,9 (CH₂, C-2), 57,8 (CH₂, C-5), 117,1 (CH, C-8), 122,4 (CH, C-4), 133,3 (C₀, C-9), 138,5 (C₀, C-3).

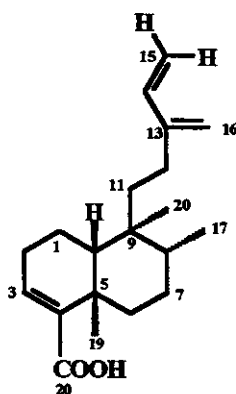
b). Reação da fração F-20 com SO₂

100,0mg da fração **F-20** foram dissolvidas em diclorometano anidro (10,0mL) sob argônio e esfriado a -55⁰C. Em seguida foi adicionado gás SO₂ e deixou-se sob agitação por 6,0h. Após este período aumentou-se a temperatura gradativamente e o solvente evaporado. Não foi possível a separação do produto esperado.

2.3.3. ISOLAMENTO DA SUBSTÂNCIA 20 POR CROMATOGRAFIA DE PLACA PREPARATIVA IMPREGNADA COM AgNO₃.

20,0mg da fração F-20 foram submetidas à reação com diazometano em éter etílico e em seguida cromatografado em placa preparativa preparada com 10% de AgNO₃ e eluída com benzeno/acetato de etila 2% (3x). Isolou-se 12,0mg da mistura dos compostos 16a e 20a. A mistura foi novamente recromatografada nas mesmas condições, isolando-se 5,6 mg do composto 20a.

COMPOSTO 20a ÁCIDO-(-)-CLERODA-3, 13(16), 14 TRIEN-19-OATO DE METILA, (4α, 6α, 8α)-1-CARBOXIMETIL-5(S)-(3-METILENO-4-PENTENIL)-5, 6, 8a-TRIMETIL-3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-OCTAHIDRONAFTALENO.



$C_{21}H_{32}O_2$

Massa Molar: 316

Forma física: óleo incolor

R_f : 0,34 (hexano/AcE 10%, sílica gel).

α_D : -106,2 (acetato de etila, c, 5,6)

I.V. (filme: $\nu_{max} \text{ cm}^{-1}$ (E 49): 2922, 1715, 1593.1457.

CG/EM [(70eV (m/z %)) (alta resolução) (E 50): 316 (M^{+} , 22), 301 (7), 235 (9), 234 (33), 233 (94), 203 (56), 201 (4), 175 (43), 173 (48), 139 (100), 121 (20), 119 (30), 105 (66), 93 (42), 81 (33), 69 (32), 67 (38), 55 (60).

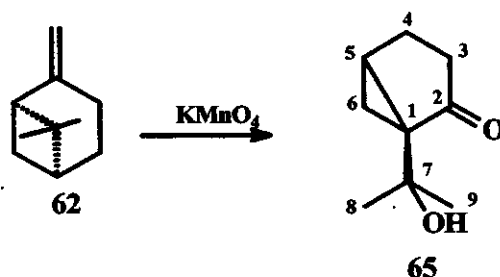
RMN¹H (500MHz, CCl₄/TMS) (E 43) δ : 0,74 (3H, s, H-20), 0,81 (3H, d, J= 6,3 Hz, H-17), 1,15 (1H, dt, J= 12,9 e 4,5 Hz, H-6_{ax}), 1,26 (3H, s, H-19), 1,39 (1H, dd, J= 13,2 e 2,0, H-10), 1,40-1,50 (2H, H-11), 1,43 e 1,45 (2H, H-7), 1,52 (1H, dd, J= 5,0 e 2,0 Hz, H-1_{eq}), 1,55 (1H, H-8), 1,70 (1H, dd, J= 13,2 e 5,0 Hz, H-1_{ax}), 1,95 (1H, dt, 13,2 e 5,0 Hz, H-12a), 2,10 (1H,

dt, $J = 13,2$ e $4,5$ Hz, H-12b), 2,13 e 2,28 (2H, H-2), 2,26 (1H, H-6_{eq}), 3,70 (OMe), 4,98 (2H, d, $J = 6,5$ Hz, H-16), 5,05 (1H, dd, $J = 10,5$ e $J = 0,5$ Hz, H-15a), 5,20 (1H, dd, $J = 17,5$ e $J = 0,5$ Hz, H-15b), 6,37 (1H, dd, $J = 10,5$ e $17,5$ Hz, H-14), 6,60 (1H, t, $J = 3,5$ Hz, H-3).

RMN¹³C (125MHz, CCl₄/TMS) (E 44) δ : 16,0 (CH₃, C-17), 17,6 (CH₂, C-1), 18,3 (CH₃, C-20), 20,7 (CH₃, C-19), 24,6 (CH₂, C-12), 27,2 (CH₂, C-2), 27,3 (CH₂, C-7), 35,9 (CH₂, C-6), 36,3 (CH, C-8), 37,5 (CH₂, C-11), 37,6 (C₀, C-5), 38,9 (C₀, C-9), 46,6 (CH, C-10), 51,2 (OMe), 112,9 (CH₂, C-15), 115,6 (CH₂, C-16), 136,8 (CH, -C3), 139,0 (CH, C-14), 142,6 (C₀, C-4), 147,3 (C₀, C-13), 167,9 (C₀, C-18).

3 - SÍNTESES

3.01. PREPARAÇÃO DO CETOL (65)



$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_2$

Massa molar: 154

Em um erlemmayer de 2L foi adicionado uma suspensão de permanganato de potássio (1,3g; 8,0mmol), meta-periodato de sódio (40,4g; 189,0mmol) e carbonato de potássio (17,4g; 63,0mmol) em 1L de água de água destilada. À mistura foi adicionado (-)-β-pineno **62** (7,1g; 63,0mmol).

O sistema foi resfriado durante a adição dos reagentes com um banho de gelo, a uma temperatura de 10°C e mantido sob vigorosa agitação.

O meio foi mantido sob agitação por um período de 60,0h à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 200mL de tetracloreto de carbono mantendo sob agitação por 4,0h.

A mistura foi então filtrada. As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com uma solução saturada de NaCl e tratada com Na_2SO_4 anidro. A fase orgânica foi concentrada à vácuo em evaporador rotativo (3,4g).

A purificação do produto bruto da reação em coluna cromatográfica de média pressão, eluída com hexano/acetato de etila a 1%, 5% e 10%, forneceu a (+)-nopinona (**63**), o cetol (**65**) (20-27%) e lactona (**66**)

1-(1-HIDROXI-1-METILETIL)-BICICLO-[3.1.0]-HEXAN-2-ONA (65)

(líquido viscoso incolor)

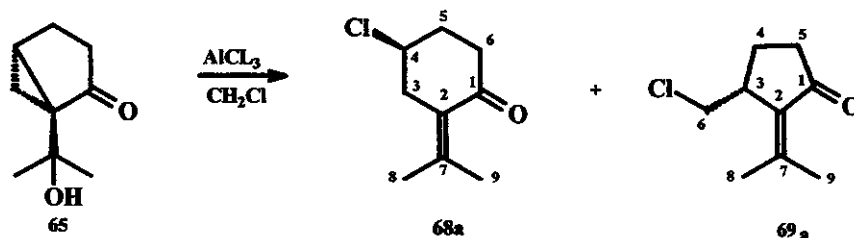
R_f : =0,3 (hexano/acetato de etila 25%, sílica Gel G)

$[\alpha]_D$: = -18,0°

CG/EM [70 eV, m/z (%)] (E 70): 139 (M-15, 100); 111 (9); 59 (32); 43 (93).

RMN¹H (300MHz, CCl₄/TMS) (E 69) δ : 0,94 (1H,dd, J = 4,0 e 4,0Hz, H-6-trans); 1,18 (3H, s, H-9); 1,29 (3H, s, H-8); 1,41 (1H, dd, J = 4,0Hz e 8,6 Hz, H-6cis); 1,95 (1H, m, H-4); 2,10 (2H, m, H-5 e H-3); 2,13 (1H, m, H-4b) e 2,22 (1H, m, H-3b).

3.02. SÍNTESE DE 68a E 69a



Formula molecular: C₉H₁₃OCl

Massa molar: 172

Em um balão (500mL) de 2 bocas, equipado com um condensador de refluxo e uma rolha esmerilhada, foi adicionado o (+)-cetol (65) (1,3g; 8,2mmol) em diclorometano (200mL) sob agitação constante, a temperatura ambiente. Em seguida o AlCl₃ (3,16g; 23,7mmol) foi adicionado rapidamente sob atmosfera de argônio e vigorosa agitação, o meio tornou-se amarelado.

A mistura reacional foi mantida nestas condições por um período de 1h e a coloração tornou-se mais intensa. O meio foi diluído com diclorometano (200mL) e lavado com solução saturada de NaHCO₃ até neutralização. A fase orgânica foi concentrada a pressão

reduzida e submetida a uma purificação por cromatografia em coluna de sílica gel, tendo como eluente (hexano/acetato de etila 3%) fornecendo as substâncias **68a** (676,0mg: 48%) e **69a** (535,0mg: 38%).

4-CLORO-2-(1-METILETILIDENO)-CICLOEXANONA (68a)

R_f : 0,5 (hexano/acetato de etila 20%, sílica Gel G)

CG/EM [70 eV, m/z (%)] (72): 172(M^{+} , 51); 157 (30); 137 (12); 109 (85); 82 (37) e 67 (100).

R.M.N.¹H. (300 MHz, CDCl₃/TMS) (E 71) δ : 1,80 (s, 3H, H-8), 2,36 (m, H-6ax), 2,70 (m, H-6eq), 2,82 (dd, J= 16,7Hz e 6,5 Hz, H-3ax), 2,92 (dd, J= 16,7Hz e < 1Hz, H-3eq), 4,31 (m, H-4).

3-CLOROMETIL-2-(1-METILETILIDENE)-CICLOPENTANONA (69a).

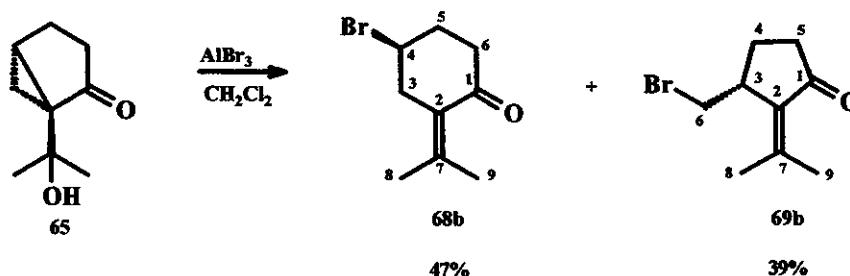
R_f : 0,6 (hexano/acetato de etila 20%, sílica Gel G)

CG/EM [70 eV, m/z (%)], (E 77): 172 (M^{+} , 24); 123 (100), 95 (19), 81 (15), 67 (36).

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) (E 74), δ : 1,94 (3H, s, H-8); 2,25 (3H, s, H-9); 2,10-2,56 (4H, 2H-4 e 2H-5); 3,32 (1H, m, H-3); 3,39 (1H, t, J = 10,4 Hz, H-6a); 3,55 (1H, dd, J= 10,4 e 4,0 Hz e, H-6b).

RMN¹³C (75,5 MHz, CDCl₃/TMS), (E 75) δ : 20,7 (CH₃, C-9), 22,2 (CH₂, C-4), 24,3 (CH₃, C-8), 37,1 (CH, C-3), 43,3 (CH₂, H-5), 46,2 (CH₂, H-6), 132,3 (C₀, C-2), 151,6 (C₀, C-7).

3.03. SÍNTESE DE 68b e 69b



Fórmula Molecular : $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{OBr}$

Massa molar : 216

Em um balão (250mL) de 2 bocas equipado com condensador de refluxo e uma rolha esmerilhada, foi adicionado o (+)-cetol (65) (300,0mg; 1,95mmol) em diclorometano (100mL) sob agitação magnética a uma temperatura de 0°C . Em seguida, o AlBr_3 (104,0mg; 3,90 mmol) foi adicionado sob atmosfera de argônio.

A mistura foi mantida sob vigorosa agitação por 1,5h, em seguida o meio foi diluído com diclorometano (100mL) e extraído com solução saturada de NaHCO_3 até neutralização.

A fase orgânica foi concentrada em evaporador rotativo e submetida a uma purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel, tendo como eluente (hexano/acetato de etila 3%), que forneceu os compostos as substâncias 68b (197,0mg; 47%) e 69b (163,0mg; 39%).

4-BROMO-2-(1-METILETILIDENO)-CICLOEXANONA (68b)

R_f : 0,6 (hexano/acetato de etila 20%, sílica gel G)

RMN¹H (300MHz , CDCl_3/TMS) (E 73), δ : 1,80 (3H, s, H-8); 2,02 (3H, s, H-9); 2,18-2,45 (3H, m, 2H-5 e 1H-6); 2,68 (1H, dd, $J = 8,1$ e $16,1$ Hz, H-6); 3,02 (2H, m, H-3); 4,57 (1H, m, H-4).

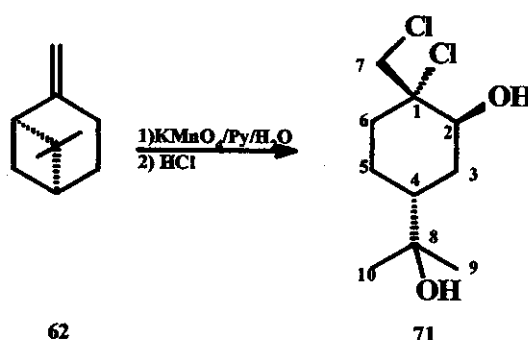
3-BROMOETIL-2-(1-METILETILIDENO)-CICLOPENTANONA (69b)

R_f : 0,5 (hexano/acetato de etila 20%, sílica gel G)

CG/EM[70eV, m/z (%)] (E 79): 216 (M^{+*} , 12), 137 (17), 123 (100), 95 (24), 67 (38).

RMN¹H (300MHz, CDCl₃/TMS) (E 78), δ : 1,93 (s, 3H, H-8); 2,23 (s, 3H, H-9); 2,15-2,45 (m, 4H, 2H-4 e 2H-5); 3,45 (dd, 1H, J = 10,8 Hz e 2,1 Hz, H-6); 3,27 (1H, dd, J= 9,6 Hz e 10,2 Hz, H-6); 3,35 (m, 1H, H-3).

3.04. OBTENÇÃO DA SUBSTÂNCIA 71



Formula Molecular: C₁₀H₁₈O₂Cl₂

Massa molar: 240

À uma mistura de (-)-β-pineno (62) (500,0mg; 3,6mmol), piridina (0,5mL; 6,2mmol) e 100mL de água, mantida sob agitação vigorosa à temperatura de 50^oC, foi adicionado permanganato de potássio (12g; 7,6mmol) dividido em quatro porções de 3,0g a cada hora da reação. Após 4 horas de reação e filtração do dióxido de manganês, a solução contendo piridina foi acidificada com HCl concentrado até obtenção de pH 1 e extraída com clorofórmio (6 x 5mL). Esta fase orgânica foi agitada com NaHCO₃ 1M (3 x 50mL) e uma vez separada a fase aquosa, a

fase clorofórmio foi lavada com água tratada com sulfato de sódio anidro e concentrada a pressão reduzida, fornecendo um óleo amarelo.

A purificação do produto bruto com gradiente de hexano/acetato de etila forneceu além das substâncias conhecidas nopinona (63), cetol (65), lactona (66), e éter (67) a substância 71 (13,5mg, 1,5%).

1,7-DICLORO-P-MENTAN-2,8-DIOL (71)

Forma física: Sólido branco

R_f: 0,10 (hexano/acetato de etila 35%, Sílica Gel G))

[α]_D: -4,68° (Acetato de Etila, c.10)

I.V. (filme/KBr) (E.85), ν_{max} (cm⁻¹): 3404 (estiramento OH), 635 a 594 (estiramento C-Cl).

CG/EM [70 eV, m/z (%)] (E 86) : 225 (M-15, 1); (205 (1); 129 (21); 93 (26); 79 (33); 59 (100); 43 (89); 31 (29).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) (E 80), δ: 1,19 (3H, s, H-9); 1,22 (3H, s, H-10); 1,72 (1H, m, H-4); 1,77 (2H, H-5); 1,86 (2H, d largo, J= 2,8Hz, H-3); 1,90 (2H, t, J = 3,0Hz, H-6); 3,74 (1H, d, J = 11,7 Hz, H-7a); 3,96 (1H, d, J = 11,7 Hz, H-7b); 4,21 (1H, s, largo, H-2)

RMN ¹³C (75,5MHz, CDCl₃/TMS) (E 81) δ: 22,2 (CH₂, C-5); 26,6 (CH₃, C-9); 27,3 (CH₃, C-10); 29,2 (CH₂, C-3); 32,3 (CH₂, C-6); 41,1 (CH, C-4); 52,8 (CH₂, C-7); 70,1 (CH, C-2); 71,9 (C₀, C-8); 72,4 (C₀, C-1).

3.05. PREPARAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 76



Formula Molecular : $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{OClBr}_2$

Massa molar : 330

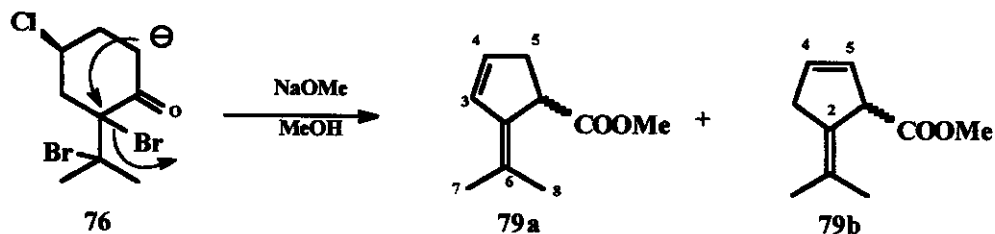
À uma solução de **68a** (200,0mg; 1,16mmol) em ácido acético (0,3mL) esfriada em banho de gelo e sal, foi adicionada gota a gota, bromo (185,6mg, 1,16mmol) sob agitação constante por um período de 30min. Em seguida foi adicionado pedaços de gelo à mistura reacional(forma-se um óleo denso e marrom). O óleo (dibromado) foi lavado com solução diluída de NaHCO_3 (5mL). A fase aquosa foi extraída com éter de petróleo (3 x 5mL). A fase orgânica foi reunida com o óleo dibromado e tratada com MgSO_4 anidro.

A identificação do dibromado **76** (100%,) foi realizada apenas por CG/EM, o qual foi imediatamente utilizado para a reação do rerarranjo de Favorskii.

2-BROMO-2-(1-BROMO-1-METILETIL) -4-CLORO-CICLOEXANONA
(76)

CG/EM [(70 eV, m/z (%))]: 330 (M^{+}); 332 (M^{+2}); 334 (M^{+4}), 336 (M^{+6}).

3.06 - REARRANJO FAVORSKII DO DIBROMADO 76



Fórmula Molecular : $C_{10}H_{14}O_2$

Massa molar : 166

À uma solução de metóxido de sódio (181,0mg em 2mL de MeOH) sob agitação constante, foi adicionado lentamente o dibromado 76 (recém preparado) e a mistura refluxada por 2h. Em seguida foi adicionada solução de KOH (0,5mL; 0,1M) e refluxada por mais 2h. Após esse período a mistura foi submetida à destilação. O destilado foi extraído com éter etílico e acidificado com solução diluída de ácido sulfúrico. A mistura resultante foi extraída com éter etílico (5 x 5ml). O solvente foi evaporado em evaporador rotativo, resultando em um óleo amarelo. O óleo foi metilado com diazometano em éter etílico e submetido a purificação por cromatografia em coluna de sílica-gel, utilizando-se como eluente (hexano/acetato de etila 5%), fornecendo mistura de isômeros 79a e 79b (5,9mg; 3%) inseparáveis.

SUBSTÂNCIAS (79a)/ (79b)

CG/EM [70 eV, m/z (%)] (88): 166 (M^{+} , 36), 123 (2), 107 (100), 91 (83), 79 (24).

RMN¹H. (300MHz, $CDCl_3$ /TMS) (E 87), δ : 1,75 (3H, s, H-8); 1,82 (3H, s, H-9); 4,35 (3H, OMe), 5,50 e 6,40 (m, H-olefínicos).

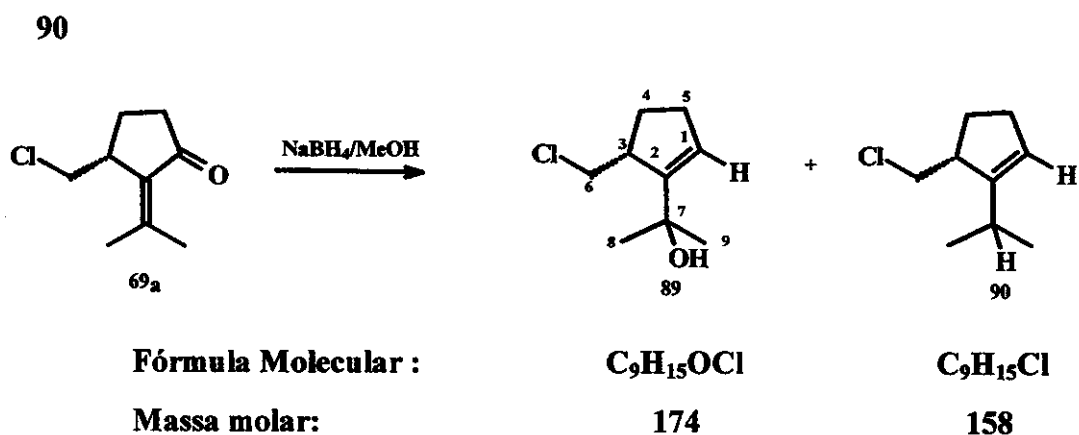
3.7. TENTATIVAS PARA A REDUÇÃO DA SUBSTÂNCIA 68a

3.7.1 – Redução com Zinco.

Em um balão (5mL) de 2 bocas equipado com um condensador de refluxo e septo foi introduzido zinco em pó (18,5mg), hidróxido de potássio (7,3mg; 0,13mmol), etanol 95% (0,1mL) e água (0,050mL). A mistura foi refluxada, seguida da adição de 68a (17,2mg; 8,1mmol em etanol) gota a gota com uma seringa e mantida sob refluxo por 2h.

O resíduo sólido foi separado por filtração, o solvente evaporado e a fração aquosa extraída com hexano (3 x 2mL). A fase orgânica foi concentrada e análise por CG/EM mostrou a formação do provável produto de redução pela presença do íon molecular em m/z 174, juntamente com uma mistura complexa de produtos, os quais não foram isolados.

3.7.2 – REDUÇÃO COM NaBH_4 - OBTENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS 89 E 90



258,0 mg; (1,5mmol) do composto 69a em 5mL de MeOH foram resfriadas a -10°C . Em seguida foi adicionada lentamente, sob constante agitação NaBH_4 (192,6mg; 5,1mmol). A reação foi acompanhada por CCD. Após término da reação o solvente foi evaporado. A reação bruta foi tratada com acetona e filtrada numa pré coluna. Purificação por coluna cromatografica em silica-gel utilizando gradiente de hexano/acetato de etila resultou em 7,9mg (3%) Da substância 89 e 4,8mg (1,8%) de 90.

SUBSTÂNCIA 89

CG/EM [70 eV, m/z (%)] (92): 174 (M^{+} , 7); 159 (100); 81 (30), 59 (28).

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) (E 89), δ : 1,36 (3H, d, J = 0,3 Hz, H-8); 1,45 (3H, d, J = 0,4 Hz, H-9); 3,20 (1H, m, H-5); 3,64 (1H, dd, J = 10,5 Hz e 7,6 Hz, H-6a); 3,92 (1H, dd, J = 10,5 Hz e 3,2 Hz, H-6b); 5,75 (1H, H-2).

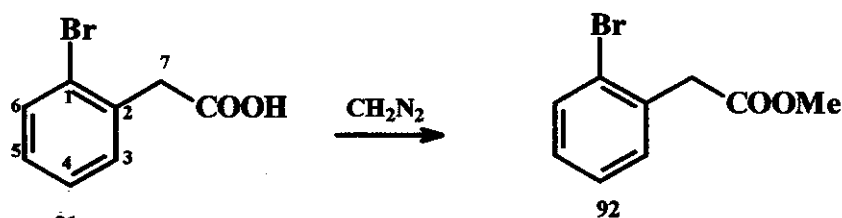
RMN¹³C (75,5 MHz, CDCl₃/TMS) (E 90), δ : 29,1 (CH₂, C-4); 29,4 (CH₃, C-9 e CH₂, C-3); 30,3 (CH₃, C-8); 47,4 (CH, C-5); 49,6 (CH₂, C-6); 70,6 (C₀, C-7); 128,2 (CH, C-2); 149,4 (C₀, C-1)

SUBSTÂNCIA. 90

CG/EM [70eV, m/z (%)] (E 94): 158 (M^{+} , 1), 109 (35), 96 (100), 84 (23). 67 (45), 57 (76), 41 (88).

RMN¹³H (300 MHz, CDCl₃/TMS) (E 93), δ : 0,98 (3H, d, J = 1,5 Hz, H-8); 1,00 (3H, d, J = 1,5 Hz, H-9); 2,23 (1H, H-3); 3,38 (1H, d, J = 7,6 e 10,6 Hz, H-6a); 3,68 (1H, d, J = 3,2 e 10,6 Hz, H-6b); 4,30 (1H, H-

3.8 -. PREPARAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 92



Fórmula Molecular : C₉H₉O₂Br

Massa molar : 228

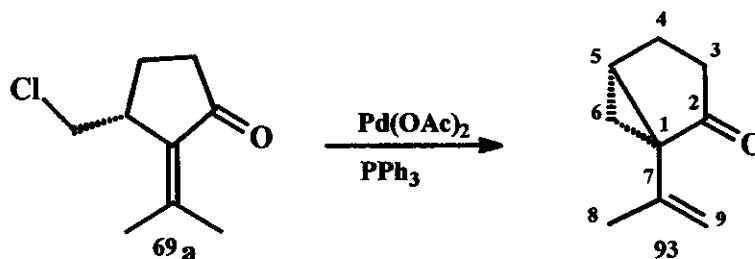
50,0mg (0,23 mmol) do composto **91** foi metilada com 5mL de uma solução etérea de CH_2N_2 recém preparada. Depois de 15min de reação o solvente foi evaporado resultando em 53,3 mg (100%) Da substância metilada **92**.

2-BROMOFENIL-ETANOATO DE METILA (92)

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3/TMS) (E **95**), δ : 3,72 (3H, s, Ome); 3,80 (2H, s, H-7), 7,15 (1H, dddd, $J = 3,9\text{Hz}$, $4,5\text{Hz}$, e $8,2\text{Hz}$, H-6), 7,28 (2H, m, H-4 e H-5), 7,57 (1H, d, $J = 7,6\text{Hz}$, H-3).

3.9.- REAÇÃO COM PALÁDIO NA AUSÊNCIA DE HCOOH

3.9.1 - OBTENÇÃO DA SUBSTÂNCIA **93**



Fórmula Molecular: $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}$

Massa molar : 136

Em um balão de 25mL foi adicionado $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (2,5mg, 11,0mmol), trifetil fosfina (11,0mg, 0,04mmol), brometo de tetrabutil amônio (13,0mg, 0,04mmol), trietilamina (179,0mg, 1,8mmol) e dimetilformamida (2mL). O meio foi saturado com gás N_2 (seco) por 4min. e a solução alaranjada tornou-se mais escura. Em seguida foi adicionado o composto **69a** (30,0mg, 0,17mmol) em DMF (3mL) e metanol (0,01mL).

O meio foi saturado com gás N₂ até o total escurecimento. Em seguida o balão foi vedado e a reação mantida por 80°C, durante 3 dias. Após esse período a reação foi filtrada em uma pré coluna de sílica-gel, celite e carvão ativo. O resíduo foi submetido a purificação em uma coluna cromatográfica de sílica-gel, tendo como eluente hexano/acetato de etila 3% e 5%, a qual forneceu o composto **93** (11,1mg) como uma mistura com **92**.

SUBSTÂNCIA **93**

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) (**E 96**), δ: 1,14 (1H, t, J = 4,8 Hz, H-6-trans); 1,38 (1H, dd, J = 4,8 Hz e 7,5 Hz, H-6-cis); 1,82 (3H, d, J = 1,3 Hz, H-8); 2,00-2,18 (5H, m, 1H-5, 2H-4 e 2H-3); 4,89 (1H, q. complexo, J = 1,7 Hz, H-9) e 4,97 (1H, quinteto, J = 1,5 Hz, H-9).

RMN ¹³C.(75,5 MHz, CDCl₃/TMS) (**E 97**), δ : 19,4 (CH₂, C-6); 21,6 (CH₃, C-8); 21,9 (CH₂, C-4); 28,9 (CH, C-5); 32,8 (CH₂, C-3); 42,8 (C₀, C-1); 114,6 (CH₂, C-9); 140,9 (C₀, C-7) e 214,0 (C₀, C-2)

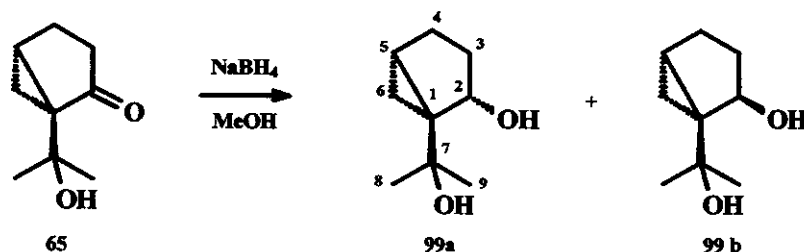
3.10 – REAÇÃO COM PALÁDIO NA PRESENÇA DE HCOOH

Em um balão (25mL) foi adicionado Pd(Oac)₂ 39,7mg, 0,018mmol); trifetil fosfina (19,3mg, 0,074mmol); trietilamina (479,6mg, 4,7mmol) e o meio saturado com N₂.

Ao meio foi adicionado acetonitrila (3mL) e novamente saturado com gás N₂ por 5min (a solução inicial alaranjada torna-se alaranjada escura). Em seguida foi adicionado iodo benzeno (367,0mg, 1,8mmol) sob agitação magnética e mantendo o meio saturado com N₂ por mais 5min. Após, foi adicionado ácido fórmico (80,9mg, 0,066 mmol) e o balão rapidamente fechado. A mistura foi mantida sob agitação a 80°C por 5 dias.

Após esse período a mistura reacional foi filtrada em uma pré coluna de sílica-gel, celite e carvão ativo. Análise por CG/EM, não mostrou alteração no material de partida.

3.11 – OBTENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS 99a e 99b



Fórmula Molecular : $C_9H_{16}O_2$

Massaa molar : 156

À uma solução de **65** (100,0mg, 0,65mmol) em metanol (10mL), foi adicionado $NaBH_4$ dividido em 5 porções ($5 \times 24,5mg = 122,5mg$, 3,25mmol), sob constante agitação, a temperatura ambiente. Após 1/2h de reação o solvente foi removido em evaporador rotativo. O resíduo foi tratado com acetona e filtrado em uma pré coluna de sílica-gel e o solvente evaporado. Purificação do produto bruto da reação em coluna cromatográfica eluída com hexano/acetato de etila 5% forneceu as substâncias **99a** (44,4 mg, 44%), **99b** (20,2mg, 20%).

1-(1-HIDROXI-1METILETIL)-BICICLO-[3.1.0]- (99a) 2(S)-CICLOEXANOL

CG/EM [70eV, m/z (%)] (116): 141 (M-15, 11), 123 (16), 95 (15), 79 (25). 59 (28), 58 (5), 43 (100).

RMN 1H .(300 MHz, $CDCl_3$ /TMS) (E 110), δ : 0,72 (2H, d, $J=5,8$ Hz, H-6); 1,18 (1H, m, H-5); 1,70 (2H, m, H-4); 1,12 (3H, s, H-8); 1,38 (3H, s, H-9); 1,20-1,96 (2H, H-3); 4,75 (1H, t, $J = 8,2$ Hz, H-2).

RMN ^{13}C .(75,5 MHz, CDCl_3/TMS) (E 111), δ : 6,87 (CH_2 , C-6); 22,1 (CH , C-5); 24,6 (CH_2 , C-4); 27,7 (CH_3 , C-8); 28,0 (CH_3 , C-9); 29,6 (CH_2 , C-3); 40,1 (C_0 , C-1); 72,4 (C_0 , C-7); 74,9 (CH , C-2).

**1-(1-HIDROXI-1METILETIL)-BICICLO-[3.1.0]- 2(R)-CICLOEXANOL
(99b)**

CG/EM [70 eV, (%)] (E 124): 141(M^{++} -15, 11), 1233(15), 95(15), 79(25), 59(28), 43(100).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) (E 117), δ : 0,22 (1H, dd, $J = 5,5$ e $8,2$ Hz, H-6a); 0,42 (1H, dd, $J = 5,5$ e $4,1$ Hz, H-6b); 1,60 (1H,m, H-5) ; 1,68 e 2,02-2,06 (2H, , H-4); 0,99 (3H, H-8); 1,53 (3H, s H-9);1,48 (2H, H-3); 4,48 (1H, d, $J = 4,4$, H-2).

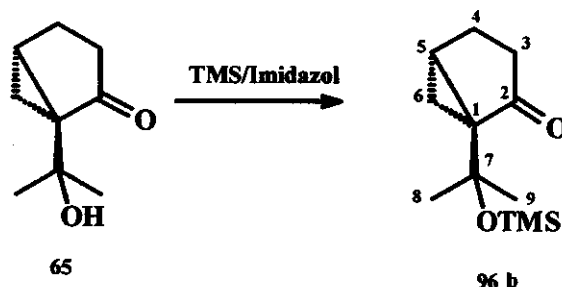
RMN ^{13}C .(75,5 MHz, CDCl_3/TMS) (E 118), δ : 11,3 (CH_2 , C-6); 20,4(CH , C-5); 25,0 (CH_2 , C-4); 27,3 (CH_3 , C-8); 28,5 (CH_3 , C-9); 31,6 (CH_2 , C-3); 39,4 (C_0 , C-1) 73,3 (C_0 , C-7); 76,4 (CH , C-2).

3.12. REAÇÃO DE PROTEÇÃO DO CETOL (65)

3.12.1.- Reação com TBDFS

À uma solução do cetol (65) (100,0mg, 065mmol) em DMF (1,2mL) foi adicionado imidazol (59,0mg, 0,86mmol) e t-butil-cloro-fenil-silano (0,22mL, 0,83 mmol). A mistura reacional foi agitada durante 12h a 25°C e em seguida foi diluída com éter etílico (10mL) e tratada com solução saturada de NaHCO_3 (4mL). A fase orgânica foi separada e a fase aquosa extraída com éter etílico (3 x 2mL). Após a reunião da fase orgânica o solvente foi concentrado em evaporador rotativo. Análise por CG/EM apresentou a formação das substâncias 68a e 69a e o material de partida foi recuperado.

3.12.2 – OBTENÇÃO DA SUBSTÂNCIA 96b



Fórmula Molecular : $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{Si}$

Massa molar : 226

À uma solução de cetol (**65**) (100,0mg, 0,65mmol) em THF, foi adicionado gota a gota, TMS-Imidazol (0,3mL). A mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por 3h. O resíduo foi filtrado numa pré coluna de sílica-gel com hexano/acetato de etila 15% e o solvente concentrado em um evaporador rotativo. Purificação da reação bruta por coluna cromatográfica eluída com hexano/acetato de etila 1% forneceu 81,7mg (56%) do cetol protegido **96b**.

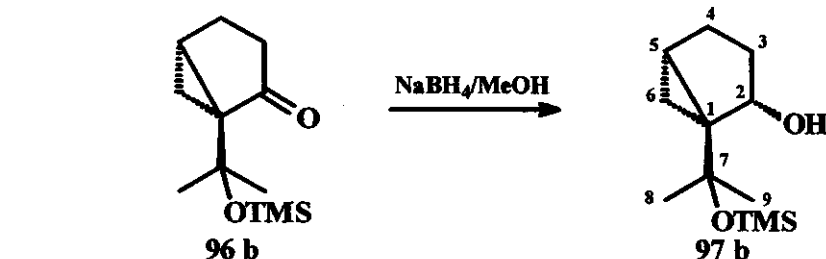
SUBSTÂNCIA 96b

CG/EM [70 eV.,m/z (%)] (E 102) : 211 (M-15, 77); 195 (8); 151 (8); 131 (8); 73 (100).

RMN ^1H .(300 MHz, CDCl_3/TMS) (E 99), δ : 0,73 (1H,t, $J =$ Hz, H-6); 1,30 (3H, s, H-9); 1,44 (3H, s, H-8); 1,39 (1H, dt, $J =$, H-6-cis); 1,84 (1H, m, H-4); 1,98 (2H, m, H-3 e H-5); 2,08 (1H, m, H-4); 2,15 (1H, m, H-3).

RMN ^{13}C . (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) (E 100), δ : 2,1 (3 CH_3 , Me_3Si); 15,4 (CH_2 , C-6); 21,0 (CH_2 , C-4); 25,9 (CH, C-5) 27,7 (CH_3 , C-9); 28,2 (CH_3 , C-8); 34,4 (CH_2 , C-3); 46,0 (C_0 , C-1); 71,0 (C_0 , C-7) e 214,1 (C_0 , C-2).

3.13 – OBTENÇÃO DA SUBSTÂNCIA 97b



Fórmula Molecular : $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{Si}$

Massa molar : 228

À uma solução de **96b** (81,7mg, 0,56mmol) em metanol (5mL), foi adicionado sob constante agitação NaBH_4 em pequenas porções ($5 \times 7,5\text{mg} = 37,5\text{mg}$, 0,99 mmol). Após 1h de reação, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo, o resíduo foi tratado com acetona e filtrado em uma pré coluna utilizando hexano/acetato de etila 10% como solvente. Purificação da reação bruta em coluna cromatográfica utilizando hexano/acetato de etila 1% como eluente, forneceu 31,8 mg (38%) da substância **97b**.

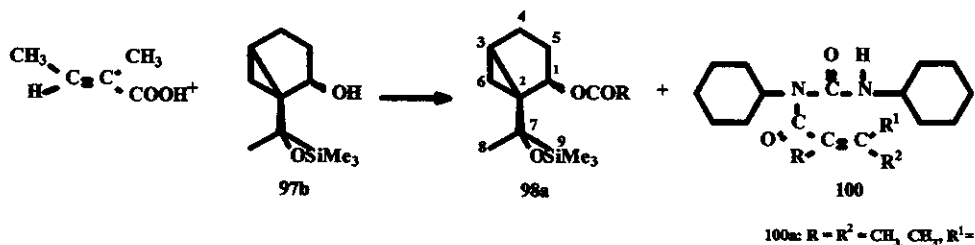
SUBSTÂNCIA. 97b

CG/EM. [70 eV. m/z (%)] (E 107): 213 (M-15, 15); 173 (24); 157 (15), 123 (30); 93 (15); 73 (677) e 43 (100).

RMN ^1H . (300 MHz, CDCl_3/TMS) (E103), δ : 0,01 (6H, t, Me_3Si); 0,70 (2H, d, $J = 5,4$ Hz, H-6); 1,05-1,08 (1H, m, H-5); 1,10 (3H, s, H-8); 1,15 e 1,90 (2H, H-3a e H-3b); 1,38 (3H, s, H-9); 1,67 (2H, m, H-4); 4,70 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, H-2).

RMN ^{13}C . (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) (E 104), δ : 2,5 (CH_3 , Me_3Si); 7,2 (CH_2 , C-6); 21,9 (CH , C-5); 24,7 (CH_2 , C-4); 27,7 (CH_3 , C-8); 28,6 (CH_3 , C-9); 29,3 (CH_2 , C-3); 41,2 (C_0 , C-1); 74,7 (CH , C-2); 76,2 (C_0 , C-7).

3.14 – TENTATIVAS PARA A ESTERIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 97b



Fórmula Molecular :

C₁₇H₃₀O₃Si

C₁₈H₂₉O₂N₂

Massa molar :

310

305

À uma solução de ácido tíglico (34,0mg, 0,34mmol) e N,N-diciclohexilcarbodiimida (81,4mg, 0,39mmol em éter etílico (5mL) foi adicionado o composto 97b (80,0mg, 0,35mmol) e dimetilaminopiridina (5,3mg, 0,035mmol). O meio reacional foi agitado a temperatura ambiente por 3 dias. O resíduo N,N-diciclohexiluréia foi filtrado e lavado com água (3 x 5mL), extraído com CHCl₃ (3 x 5mL) e seco com MgSO₄. O solvente foi evaporado em um evaporador rotativo. Purificação do resíduo reacional em coluna cromatográfica de sílica-gel forneceu 3,8mg (3%) da substância impuro 98a e 40,0mg (38%) da substância 100a como produto principal.

SUBSTÂNCIA. 98a

CG/EM [70eV, *m/z* (%)] (109): 310 (M⁺, 2), 295 (4), 195 (32), 157 (18), 121 (18), 83 (100), 73 (59).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS) (E 108), δ: 0,02 (9H, Si Me₃), 1,15 (3H, s, H-8), 1,30 (3H, s, H-9), 1,78 (1H, dd, J= 1,7Hz e J= 7,0 Hz, H-13), 1,82 (1H, dd, J= 3,0Hz e 1,7Hz, H-14), 5,50 (1H, t, J= 7,9 Hz, H-2), 6,84 (1H, m, H-12).

SUBSTÂNCIA. 100a

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) (E 125), δ : 1,20-1,80; 1,16 e 1,84; 1,60-1,20; 1,98 e 1,71; 1,64 (dd, $J=6,7\text{ Hz}$, $J=1,7\text{ Hz}$); 1,81 (dd, $J=1,7\text{ Hz}$, $J=1,5\text{ Hz}$); 3,58 (m); 3,89 (dt, $J=3,5\text{ Hz}$); 5,84 (d q, $J=6,7$ e $J=1,5\text{ Hz}$).

RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) (126), δ : 13,2 (CH_3), 13,5 (CH_3), 24,5 (CH_2), 25,1 ($2\times\text{CH}_2$), 25,3 (CH_2), 26,2 ($2\times\text{CH}_2$), 30,6 ($2\times\text{CH}_2$), 32,6 ($2\times\text{CH}_2$), 49,4 (CH), 57,4 (CH), 127,4 (CH), 133,9 (C_0), 154,6 (C_0), 174,6 (C_0).

SUBSTÂNCIA. 100b

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) (E 130), δ : 3,70 (1H), 3,98 (1H), 5,73 (1H), 6,35 (1H), 6,47 (1H), 7,27 (N-H).

RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) (E 131), δ : 24,5 (CH_2), 25,2 (CH_2), 25,3 ($2\times\text{CH}_2$), 26,1 ($2\times\text{CH}_2$), 30,7 ($2\times\text{CH}_2$), 32,5 ($2\times\text{CH}_2$), 49,7 (CH), 56,4 (CH), 128,9 (CH), 129,8 (CH), 153,8 (C_0), 168,8 (C_0).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 01 R. R. Haynes e L. B. Holm.-Nielsen, **The Alismataceae, Flora Neotropica**, Monograph 64. New York Botanical Garden, New York, 1994.
- 02 H. Lorenzi. **Plantas Daninhas do Brasil: Terrestres, Aquáticas, Parasitas, Tóxicas e Medicinais**. Editora Plantarum Ltda, Nova Odessa-SP, 1991
- 03 M. Pio Corrêa. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, Ministério da Agricultura Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, V. II, 1984,
- 04 C.A.M. Santos, K.R Torres, R. Leonart, **Plantas Medicinais (herbarium, flora et scientia)**, Editora Ícone, São Paulo, 1988.
- 05 D. Manns e R. Hartmann, **Echinol: A New Cembrene Derivative from *Echinodorus grandiflorus*, *Planta Médica*, 1993, 59, 465-466.**
- 06 S.C.Sharma, J.S.Tandon e M.M. Dhar, **Sagittariol: A New Diterpene from *Sagittaria Sagittifolia*, *Phytochemistry*, 1975, 14, 1055-1067.**
- 07 S.C. Sharma, J. S. Tandon, B. Porter, M. S.Raju, E. Wenkert, **The Structure of Sagittariol, *Phytochemistry*, 1984, 23, 1194-1196.**
- 08 R.K. Juneja, S. C. Sharma e J. S. Tandon, **18-Deoxysagittariol from *Sagittaria sagittifolia* Linn, *Indian Journal of Chemistry*, 1986, 25B, 748-749.**
- 09 M. Yoshikawa, S. Yamaguchi, T. Murakami, H. Matsuda, J. Yamahara e N. Murakami, **Absolute Stereostructures of Trifoliones A, B,C, and D, New Biologically Active Diterpenes from the Tuber of *Sagittaria Trifolia* L., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1993, 41, 1677-1679.**
- 10 M. Yoshikawa, S. Yamaguchi, T. Murakami, H. Matsuda, J. Yamahara e N. Murakami, **Medicinal Foodstuffs II. On the Bioactive Constituents of the Turber of *Sagittaria trifolia* L. (Kuwai, Alismataceae): Absolute Estereostructures of Trifoliones A, B, C and D sagittariosides a and b arabinothalictoside. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 1996, 44, 492-499.**
- 11 H. Matsutani, S. Kusumoto, R., Koizumi e T. Shiba, **N^ε-(Carboxymethyl)-L-Lysine in the Acid Hydrolysate of *Sagittaria pigmaea*, *Phytochemistry*, 1979, 18, 661-662.**
- 12 J.R. Hanson, **Diterpenoids, *Natural Product Reports*, 1993, 10, 159-174.**

- 13 J.R. Hanson, **Diterpenoids**, *Natural Product Reports*, 1994, 11, 265-274.
- 14 B.M. Fraga, **Natural Sesquiterpenoids**, *Natural Product Reports*, 1994, 11, 533-554.
- 15 A. D. Rodríguez, **The Natural Products Chemistry of West Indian Gorgonian Octocorals**, *Tetrahedron*, 1995, 51, 4571-4618.
- 16 D. J. Faulkner, **Marine Natural Products**, *Natural Product Reports*, 1995, 12, 223-269.
- 17 J. R. Hanson, **The Sesquiterpenoids**, *Natural Product Reports*, 1992, 12, 481-489.
- 18 J. Bruneton, **Elementos de Fitoquímica Y de Farmacognosia**, Editorial ACRIBIA, S.A 1a Ed., 1991.
- 19 K.B. G. Torssell, **Natural Product Chemistry. A Mechanistic and Biosynthetic Approach to Secondary Metabolism**, John Willlley & Sons Limited, New York, 1983.
- 20 E. Breitmaier, W. Voelter, **Carbono-13 NMR Spetroscopy-High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry**, 3ª Ed., VCH, New York, 1987.
- 21 S. Manabe e C. Nishino, **Stereochemistry of cis-Clerodane Diterpenes**, *Tetrahedron*, 1986, 42, 3461-3470.
- 22 R. Misra, R. C. Pandey e S. Dev, **The Chemistry of the Oleo Resin from *Hardwickia pinnata*: A Series of New Diterpenoids**, *Tetrahedron Letters*, 1964, 49, 3751-3759.
- 23 W. Cocker, A L. Moore, A C. Pratt, **Dextrorotatory Hardwickiic Acid an Extractive of *Copaifera officinalis***, *Tetrahedron Letters*, 1965, 24, 1983-1985.
- 24 R. Misra, R. C. Pandey e S. Dev, **The Absolute Stereochemistry of Hardwickiic Acid and its Congeners**, *Tetrahedron Letters*, 1968, 22, 2681-2684.
- 25 R. Misra, R. C. Pandey e S. Dev, **Diterpenoids from the Oleoresin of *Hardwickia pinnata* part 1: Hardwickiic Acid**, *Tetrahedron*, 1979, 35, 2301-2310.
- 26 M. Costa, **Síntese de Terpenos com Esqueleto $\Delta^{5(10)}$ –Octalina e de Diterpenos Hidroxibutenolidos e Estudo de RMN ^{13}C de Clerodanos**, *Tese de Doutorado*, IQ/ UNICAMP CAMPINAS, SP, 1997.
- 27 P. Singh, S. Jain, J. Jakupovic, **Clerodane Derivatives from *Grangea maderaspatana***, *Phytochemistry*, 1988, 27, 1537-11539.
- 28 N. Hara, H. Asaki, Y. Fujimoto, Y.K. Gupta, A. K. Singh e M.Sahai, **Clerodane and ent-halimane Diterpenes from *Polyalthia longifolia***, *Phytochemistry*, 1995, 38, 189-194.
- 29 M. R. Kernan e D.J. Faulkner, **Regioselective Oxidation of 3-alky-4-hydroxybutenolides**, *Journal of the Organic Chemistry*, 1988, 53, 2773-2776.

- 30 N. Greenwood e A. Eornshaw, **Chemistry of the Elements**, Butterworth-Heinemann, 2^a Ed., 1997.
- 31 W. McFarlane e G. Wilkinson, Tricarbonyl(cyclooctatetraene)iron, *Inorganic Synteses*, 1966, 8, 184-185.
- 32 B. Deguin e P. Vogel, Hetero-Diels-Alder Addition of Sulfur Dioxide to 1,3-Dienes. Suprafaciality, Regioselectivity, and Stereoselectivity, *Journal of the American Chemical Society*, 1992, 114, 9210-9211.
- 33 B. Deguin e P. Vogel, Site- and Regioselectivity of the Hetero-Diels-Alder and Cheletropic Additions of Sulfur Dioxide to a 2,3,6,7-Tetramethylidenebicyclo[3.2.1]octane Derivative, *Tetrahedron Letters*, 1993, 39, 6269-6270.
- 34 J.A. Chen, C. D. Huang, C. L. Wee, Clerodane-Type Diterpenoids from the Taiwanese Liverwort *Schistochila acuminata*, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 1992, 39, 263-266.
- 35 F. Nagashima, M. Tori e Y. Asakawa, Diterpenoids from the East Malaysian Liverwort *Schistochila aligera*, *Phytochemistry*, 1991, 30, 849-851.
- 36 A. Aiello, E. Fattorusso, S. Magno, M. Menna, Steroids of the Marine Sponge *Cinachyra tarentina*: Isolation of Cholest-4-ene-3,6-dione and (2R)-24-Ethylcholest-4-ene-3,6-dione, *Journal of Natural Products*, 1991, 54, 281-285.
- 37 R. Braz Filho, H. E. Gotlerb, A P. Mourão e C.A.S. Miranda, 3 β -O- β -D-Glicopiranosilespinasterol, um Novo Glicosídeo Esteroidal Isolado de *Amarthospermum schomburghinana* (Miq.) Bachni, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 1986, 58, 363-368.
- 38 A. K. Matida, M. H. Rossi, E. E. Blumenthal, I.T.A. Schuquel, A. Matheus, E. J. Vidotti, 3- β -O- β -D-Glucopyranosylsitosterol in Species of Labiatae, Verbenaceae and Apocynaceae. *Anais da Associação Brasileira de Química*, 1996, 45, 147-151.
- 39 H. Van Den Dool e P. D. J. Kratz, A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography, *Journal of Chromatography*, 1963, 11, 463-471.

- 40 R. P. Adams, **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography Mass Spectroscopy**, Allured Publishing Corporation, USA, 1995.
- 41 F. Faini, P. Rivera, M. Mahú e M. Castilho, **Neo-Clerodane Diterpenoids and Other Constituents From *Baccharis* Species**, *Phytochemistry*, 1987, 26, 3281-3283.
- 42 S. B. Mahato, A. K. Sen, P. C. Mazumdar, K. Yamasaki, **Diterpenes of *Conyza stricta*, Identification of Conyzic Acid, Secconidoresedasaure and Strictic Acid**, *Phytochemistry*, 1981, 20, 850-851.
- 43 F. Bohlmann, C. Zdero, J. Jakupovic, R. M. King e H. Robinson, **Diterpenes from *Acrítoppus confertus***, *Phytochemistry*, 1983, 22, 2243-2252.
- 44 G.Devi, R.S. Kapil & S.P. Popli, **Chemical Investigation of *Anisomeles malabarica*: Part I-Strutures of Macrocyclic Diterpenes, Anisomelolide, Malabaric Acid, 2-Acetoxy malabaric Acid, Anisomethyl Acetate & Anisomelol**, *Indian Journal of Chemistry*, 1978, 16B, 441-445.
- 45 F. G. Kitson, B. Larsen. **Gas Chromatografhy and Mass Spectrometry by Gas Chromatography**, Academic Press, NY, 1996.
- 46 A L. M. Porto, **Tese de Mestrado, A Química das Interações Ecológicas de *Clusias* e Seus Polinizadores**, IQ/UNICAMP, Campinas, SP 1997.
- 47 B. D. MacKenzie, M. M. Angelo e J. Wolinsk, **Acylation –Cycloalkylation. A New Annellation Route to Eudesmanes**, *Journal of Organic. Chemistry*, 1979. 44, 4042-4046.
- 48 J. D. White, J. F. Ruppert, M. A. Avery, S. Toriis, J. Nokami, **Spiroannellation via Intramolecular Ketocarbenoid Addition Stereocontrolled Synthesis of (-)-Acorenone B and (±)-α-Chamigrene**, *Journal of the American Chemical Society*, 1981, 103, 1813-1821.
- 49 G. L. Lange, E. E. Neidert, W. J. Orrom, D. J. Wallace, **Synthesis of the Spirosesquiterpene (-)-acorenone and Related Cyclopentanoid Monoterpenes**, *Can. J. Chem.*, 1978, 56, 1628-1633. (b) S. W. Baldwin, J. E. Fredericks **Spiro[4,5]Decanes by Photoannellation. Total Synthesis of (-)-Acorenone**, *Tetrahedron Letters*, 1982, 23, 1235-1238.
- 50 J. D. Wuest, A. M. Madonik e D. C. Gordon, **Vinylketenes, Synthesis of (+)-Actinidine**, *Journal of Organic Chemistry*, 1977, 42, 2111-2113.

- 51 G. Mehta, N. Krishnamurthy, **An Enantioselective Approach to Dolastane Diterpenes. Total Synthesis of Marine Natural Products (+)-Isoamidiol and (+)-Dolasta-1[(15),7,9-Trien-14-ol**, *Tetrahedron Letters*, 1987, 28, 5945-5948.
- 52 Hse-Lok, Ho, **Enantioselective Synthesis: Natural Products From Chiral Terpenes**, John Wiley & Sons, Inc. USA, 1992.
- 53 D. Solas e J. Wolinsky, **Total Synthesis of (-)- α -Acoradiene and (-)- α -Cedrene**, *Journal of Organic Chemistry*, 1983, 48, 670-673.
- 54 S. A. Achmad e G. W. Cavill, **Stereospecific Synthesis of the Enantiomer of Natural Iridodial and of Natural Nepetalactone**, *Proceeding Chemical. Society*, 1963, 166.
- 55 J. Wolinsky, T. Gibson, D. Chan e H. Wolf, **Stereospecific Syntheses of Iridomyrmecin and Related Iridolactones**, *Tetrahedron*, 1965, 21, 1247-1261.
- 56 H. R. Sonawane, B. S. Nanjundiah e M. U. Kumar, **Synthesis of ($\pm$) Grandisol from (+)- Δ^2 -Carene: An Application of Photo-Induced Vinylcyclopropane Rearrangement**, *Tetrahedron Letters*, 1984, 25, 2245-2246.
- 57 R. Mechoulam, P. Braun e Y. Gaoni, **Syntheses of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol and Related Cannabinoids**, *Journal of the American Chemical Society*, 1972, 94, 6159-6165.
- 58 S. L. Schreiber, R. C. Hawley, **Conformational Control of Enolate Geometry: A Short Synthesis of Germacrene-D**, *Tetrahedron Letters*, 1985, 26, 5971-5974.
- 59 P. M. Wovkulich, P. C. Tang, N. K. Chadha, A D. Batcho, J. C. Barrish, R. M. R. Uskokovic, **Remote Diastereoselection in the Asymmetric Total Synthesis of Mevinolin**, *Journal of the American Chemical Society*, 1989, 111, 2596-2599.
- 60 P. A. Wender e D. A. Holt, **Macroexpansion Methodology. 3. Eight-Step Synthesis of (-)-(3Z)-Cembrene A**, *Journal of the American Chemical Society*, 1985, 107, 7771-7772.
- 61 M. Kato, H. Kosugi, A. Kodaira, H. Hagiwara e B. Vogler, **Stereocontrolled Synthesis of the Key Intermediate for the Enantioselective Synthesis of Clerodane Natural Products**, *Tetrahedron Letters*, 1997 38, 6845-6848.
- 62 O. Wallach, A. Bulmann, **Terpenes and ethereal oils (LXXXVII) nopinone**, *Chem. Abstr.*, 1908, 2, 277. b) S. Winstein e N. J. Holness, **Neighboring Carbon and Hydrogen XVIII. Solvolysis of the Nopinyl p-Bromobenzenesulfonates**, *Journal American Chemical Society*, 1955, 77, 3054-3061.

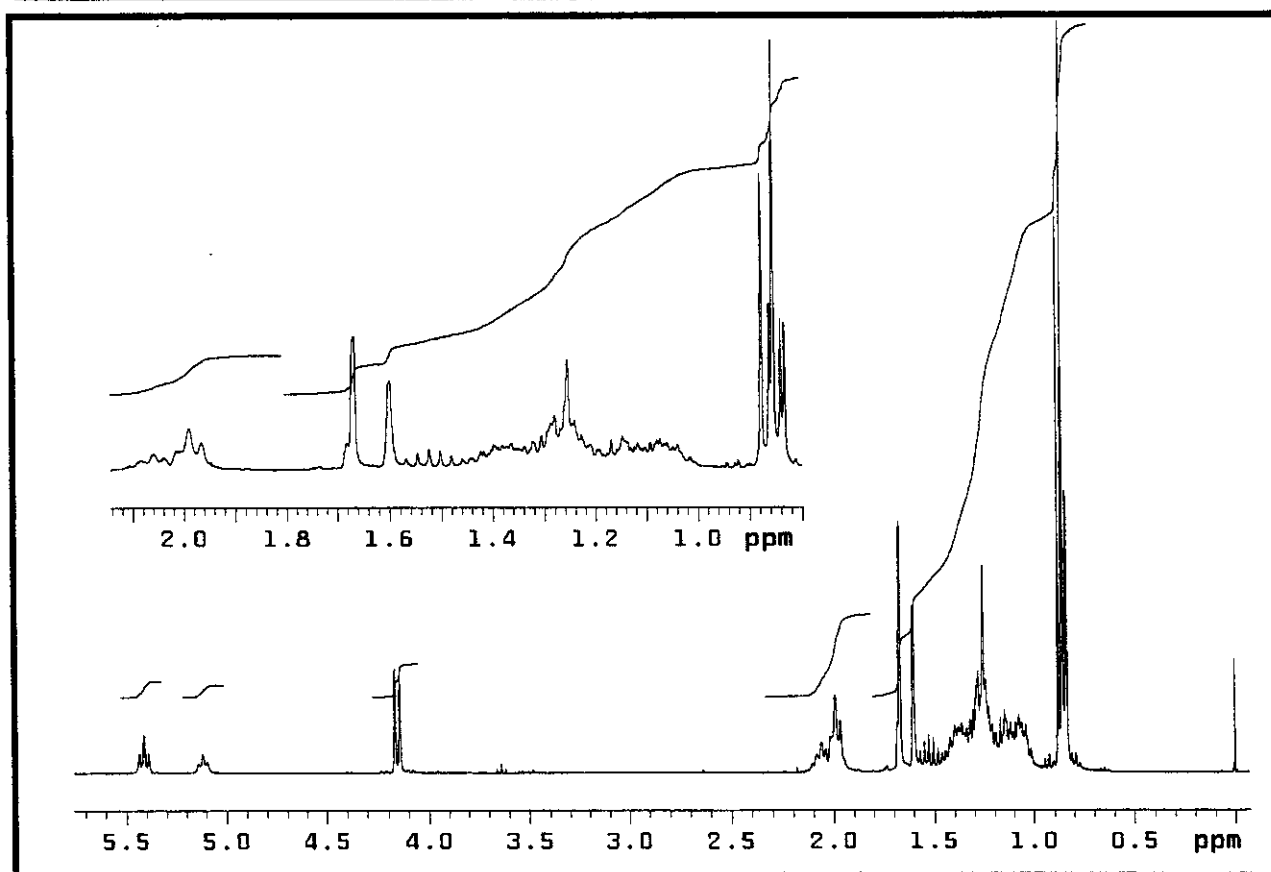
- 63 C. W. Jefford, A. Roussel, S. M. Evans, **Anomalous Oxidation of β -Pinene**, *Helvetica Chimica Acta.*, 1975, 58, 2151-2160.
- 64 M. H. Sarragiotto, **Estudo de Rotas Sintéticas Visando a Obtenção de Terpenos Nitrogenados**, *Tese de Doutorado*, IQ/UNICAMP, CAMPINAS, SP 1987.
- 65 V. Numberg, **Estudo Fitoquímico de *Baccharis myriocephala***, *Tese de Mestrado*, IQ/UNICAMP, CAMPINAS, SP. 1997.
- 66 A. J. Marsaioli, V. Numberg, M. H. Sarragiotto e E. G. Castelano, **Envisaging on Old Reaction from a New Point of View**, *Journal of Organic Chemistry*, 1989, 54, 5838.
- 67 L. A. B. Moraes, **Utilização do (-)- β -Pineno na Síntese de Produtos Naturais e na Obtenção de Sintons Quirais**, *Tese de Mestrado*, IQ/UNICAMP, CAMPINAS, SP. 1995.
- 68 S.D. Bull e R. M. Carman, **Chemistry Around δ -Terpineol**, *Australian Journal of Chemistry*, 1993, 46, 1869-1879.
- 69 S. A. Achmad e G. W. K. Cavill, **Favorskii Rearrangement of Pulegone Dibromide and Pulegone Epoxide**, *Australian Journal of Chemistry*, 1963, 16, 858-868.
- 70 E. J. Corey e H. E. Ensley, **Preparation of an Optically Active Prostaglandin Intermediate via Asymmetric Induction**, *Journal of the American Chemical Society*, 1975, 97, 6908-6909.
- 71 W. Oppolzer, M. Kurth, D. Reichlin, C. Chapuis, M. Mohnhaupt e F. Moffatt, **Asymmetric Induction in *Diels-Alder* Reactions to Acrylates Derived from Chiral *sec*-Alcohols**, *Helvetica Chimica Acta*, 1981, 64, 2802-2811.
- 72 W. Oppolzer, C. Chapuis, G. Bernardinelli, **Asymmetric *Diels-Alder* Reactions: Facile Preparation and Structure of Sulfonamido-Isobornyl Acrylates**, *Tetrahedron Letters*, 1984, 25, 5885-5888.
- 73 W. Oppolzer, **Asymmetric *Diels-Alder* and Ene Reactions in Organica Synthesis**, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1984, 96, 840-854.
- 74 W. Oppolzer, C. Chapuis, D. Dupuis, M. Guo, **Asymmetric *Diels-Alder* Reaction of Neopentyl-Éter-Shielded Acrylates and Allenic Esteres. Synthesis of (-)-norbonenone and (-)- β -Santalene**, *Helvetica Chimica Acta*, 1985, 69, 2100-2114.

- 75 W. Oppolzer, M. Wills, M. J. Kelly, M. Signer, J. Blagg, **Chiral Toluene-2,α-Sultam Auxiliaries Asymmetric Diels-Alder Reactions of N-Enoyl Derivatives**, *Tetrahedron Letters*, **1990**, *31*, 5015-5018.
- 76 W. Oppolzer, I. Rodriguez, C. Starkemann, E. Walther, **Chiral Toluene-2,α-Sultam Auxiliaries: Asymmetric Alkylations, Acylations and Aldolizations of N-Acyl Derivatives**, *Tetrahedron Letters*, **1990**, *31*, 5019-5022.
- 77 D. A. Evans, D. T. Chapman, J. Bisaha, **Asymmetric Diels-Alder Cycloaddition Reactions with Chiral α, β-Unsaturated N-Acyloxazolidinones**, *Journal of the American Chemical Society*, **1988**, *110*, 1238-1256.
- 78 T. X. H. Le, J. C. Bussolari, W. V. Murray, **2,5-Diketopiperazines, New Chiral Auxiliaries for Asymmetric Diels-Alder Reactions**, *Tetrahedron Letters*, **1997**, *138*, 3849-3852.
- 79 T. Nakamura, N. Hashimoto, T. Ishizuka, T. Kunieda, **Sterically Constrained Tricyclic 2-Oxazolidinone as Excellent Chiral Auxiliary**, *Tetrahedron Letters*, **1997**, *38*, 559-562.
- 80 W. H. Chan, A. W. M. Lee, L. S. Jiang e T. C. W. Mak, **New Chiral Sultam Auxiliaries: Preparation and their Application in Asymmetric Diels-Alder Reactions**, *Tetrahedron Asymetry*, **1997**, *15*, 2501-2504.
- 81 Para revisão em reações assimétricas de *Diels Alder*: (a) W. Oppolzer, **Asymmetry Diels-Alder and Ene Reactions in Organic Synthesis**, *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1984**, *23*, 876-889, (b) G. Helmchen, R. Karge, J. Weetman,. In **Modern Synthetic Methods**. Scveffold, R.Ed.; Springer; Berlin **1986**; vol 4, 262.
- 82 S. Cacchi, **The Palladium-Catalyzed hydroarylation and Hydrovinylation of Carbon-Carbon Multiple Bonds: New Perspectives in Organic Synthesis**, *Pure & Applied Chemistry*, **1990**, *62*, 713-722.
- 83 K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, P.G. Nantermet, C. F. Claiborne, J. Renaud, R. K. Guy e K. Shibayama, **Total Synthesis of Taxol. 3. Formation of Taxol's ABC Ring Skeleton**, *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, *117*, 645-652.
- 84 D. F. Maynard, W. G. Trankle, A.W. Norman e W. H. Okamura, **14-Epi Stereoisomers of 25-Hyddroxy-and 1α,25-Ddihydroxyvitamin D₃: Synthesis, Isomerization to Previtamins, and Biological Studies**, *Journal of Medicinal Chemistry*,. **1994**, *37*, 2387-2393.

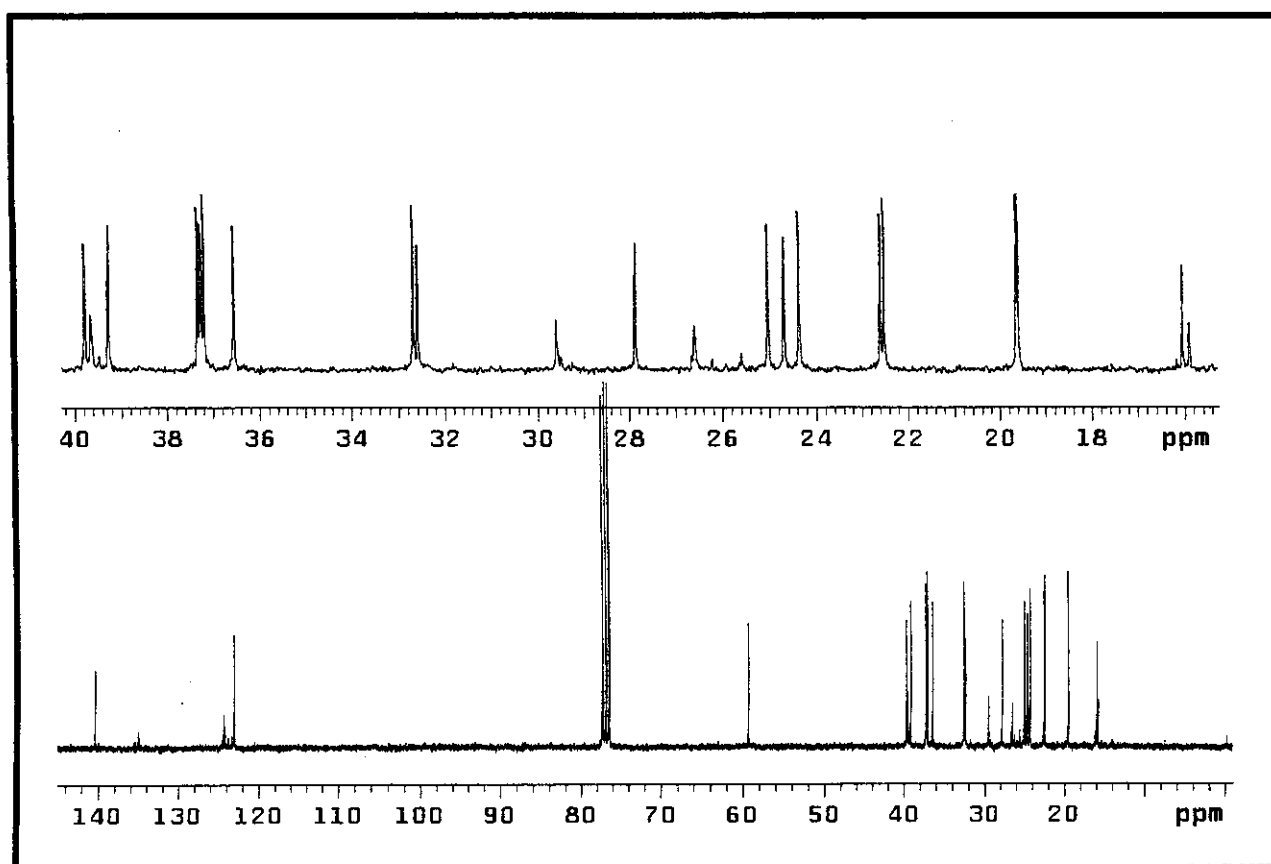
- 85 A Hansser e V. Alexanian, **Direct Room Temperature Esterification of Carboxylic Acids**, *Tetrahedron Letters*, **1978**, 46, 4475-4478.
- 86 M .Mikolajczyk e P. Kielbasinski, **Recent Developments in the Carbodiimide Chemistry**, *Tetrahedron*, **1981**, 37, 233-284.
- 87 D.D. Perrin, W.L.F.Armacego e D.R.Perrin, **"Purification of Laboratory Chemicals"**, second edition, A.Wheaton & Co Ltda, Great Britain, **1980**.

ESPECTROS

Espectros

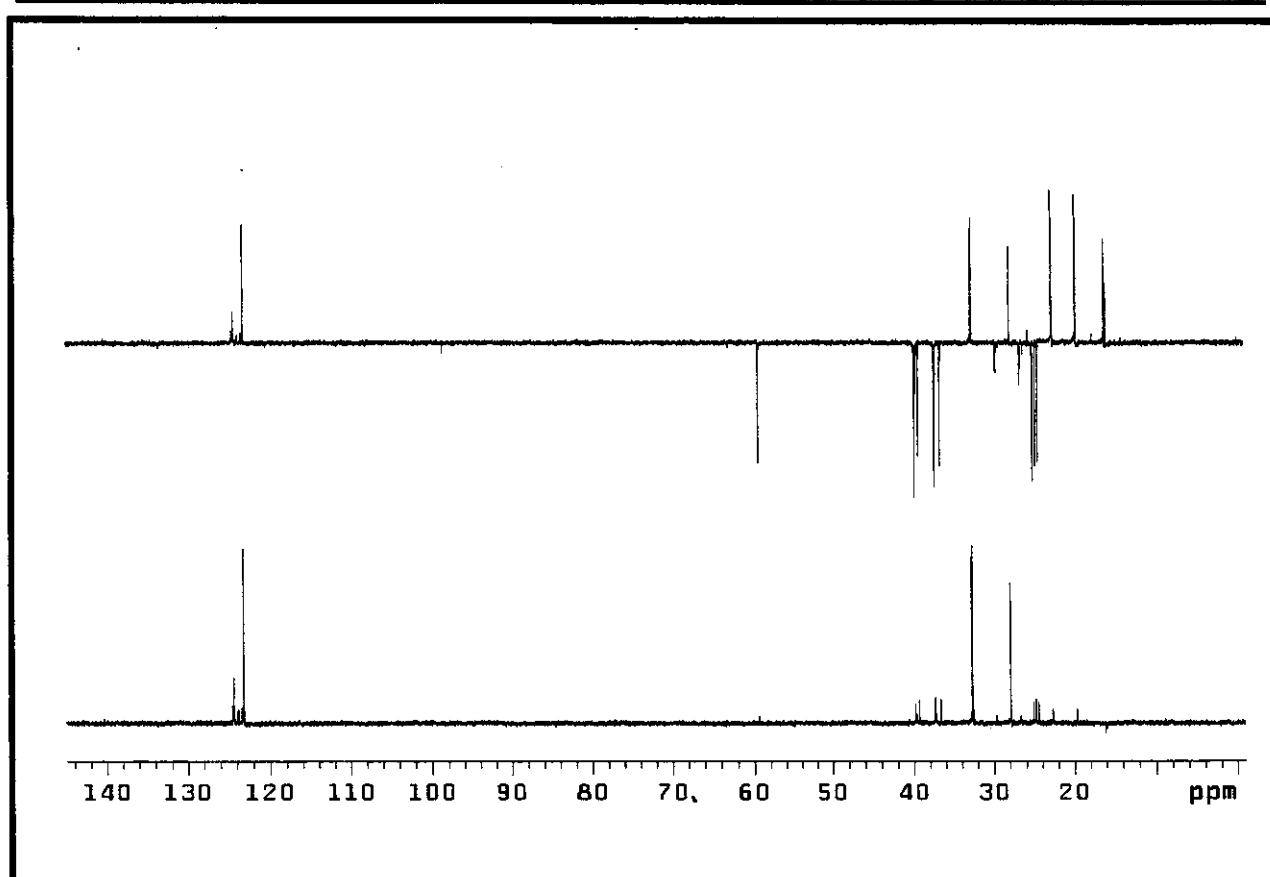


E 01 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 08.

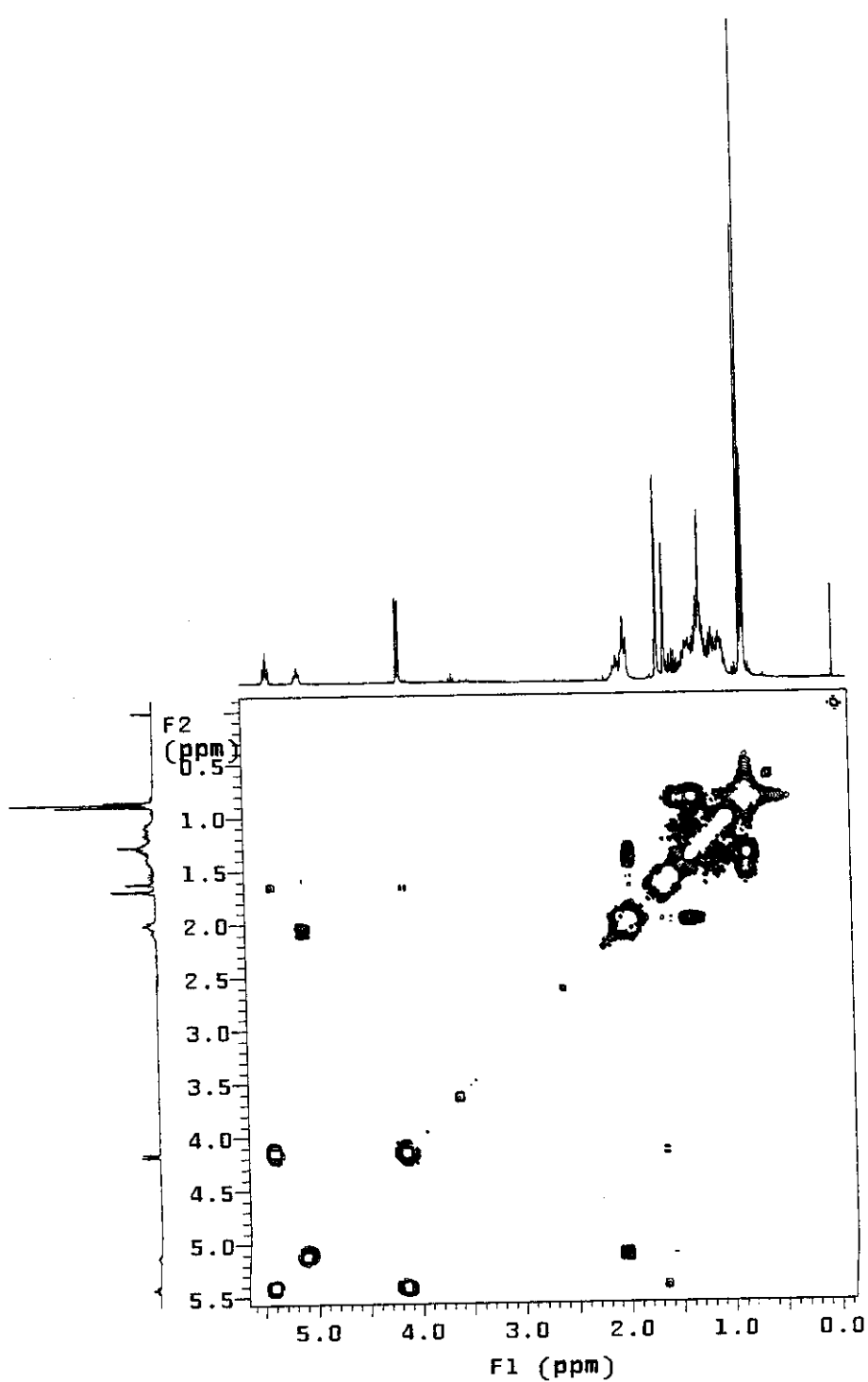


E 02 - Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 08.

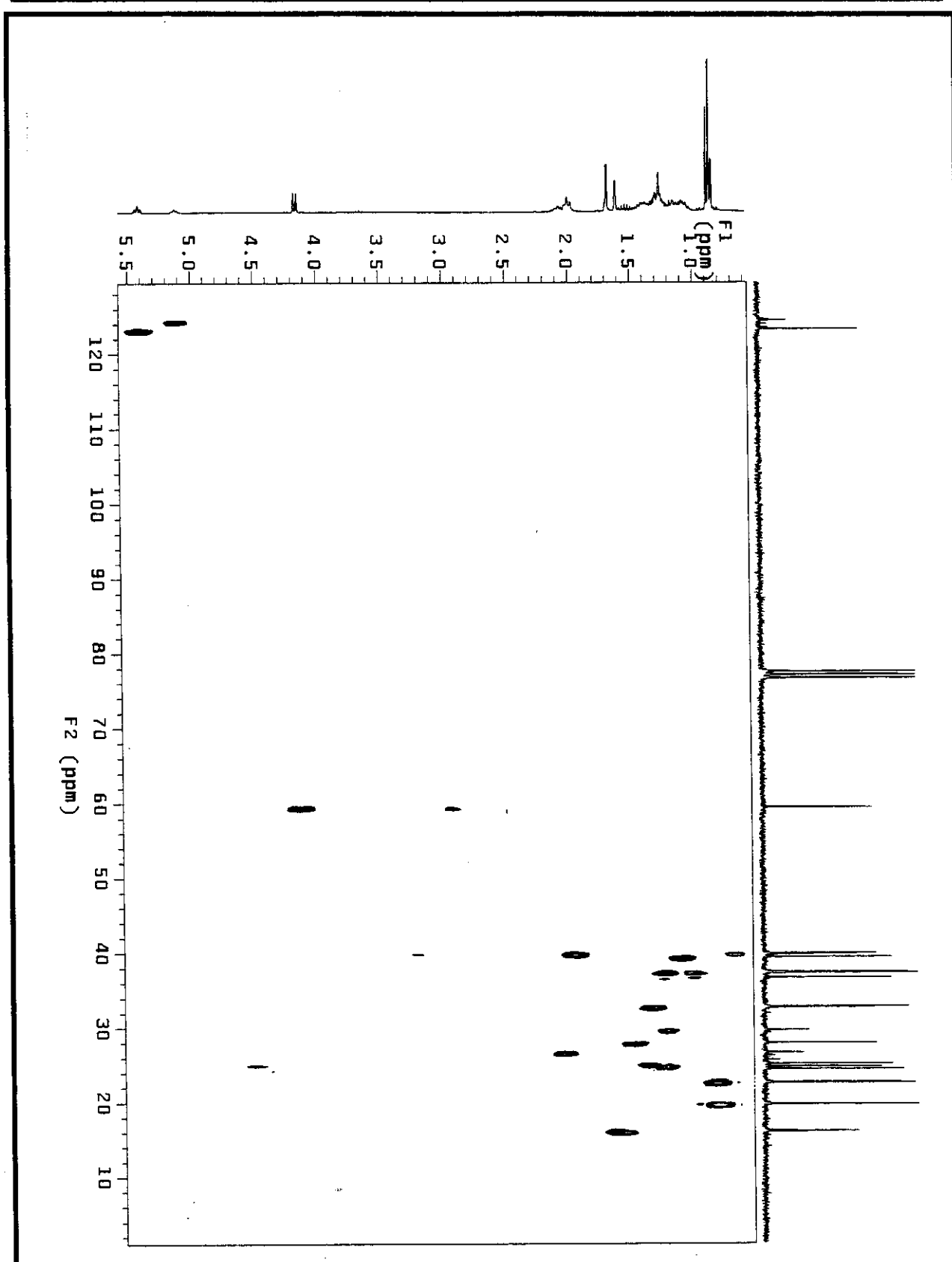
Espectros



E. 03. Espectro DEPT (135° e 90°) do produto natural 08.

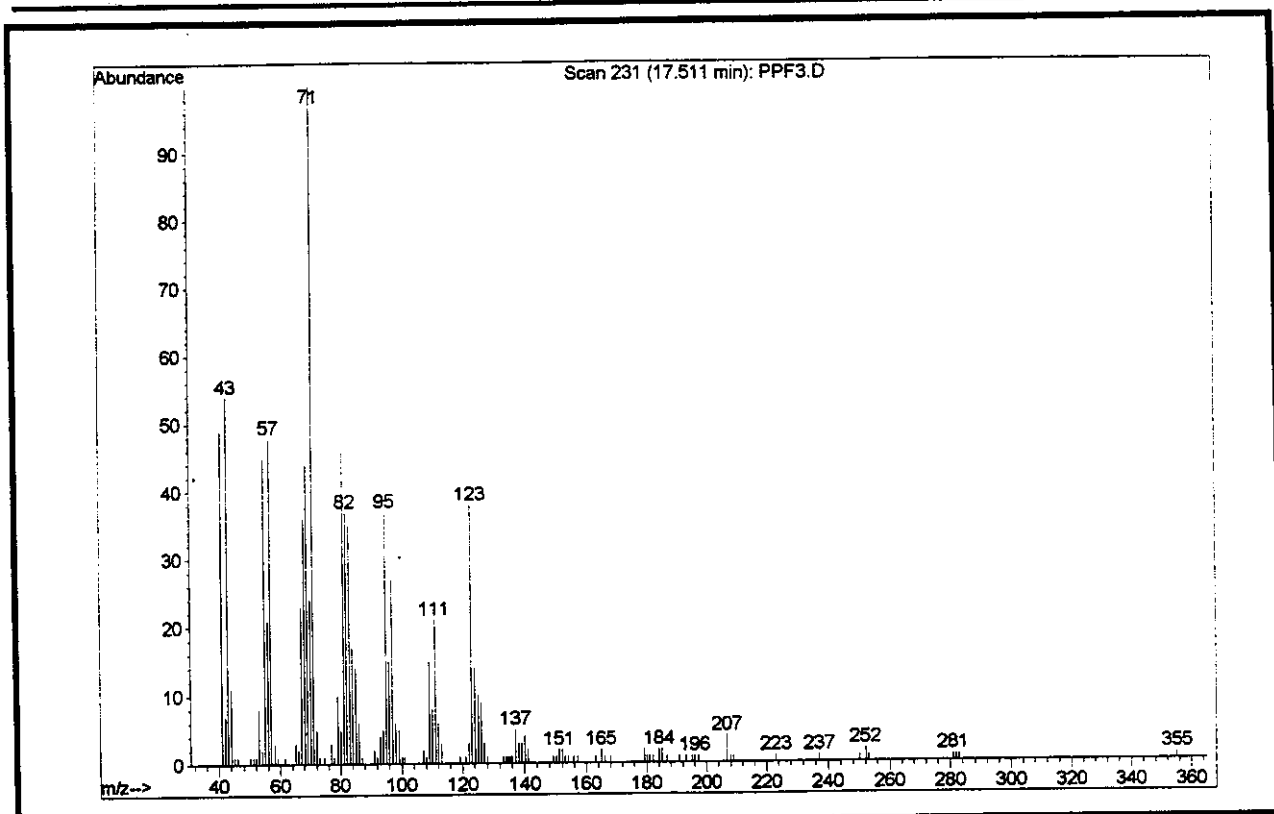


E 04 – Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear (^1H , ^1H – COSY) do produto natural 08.

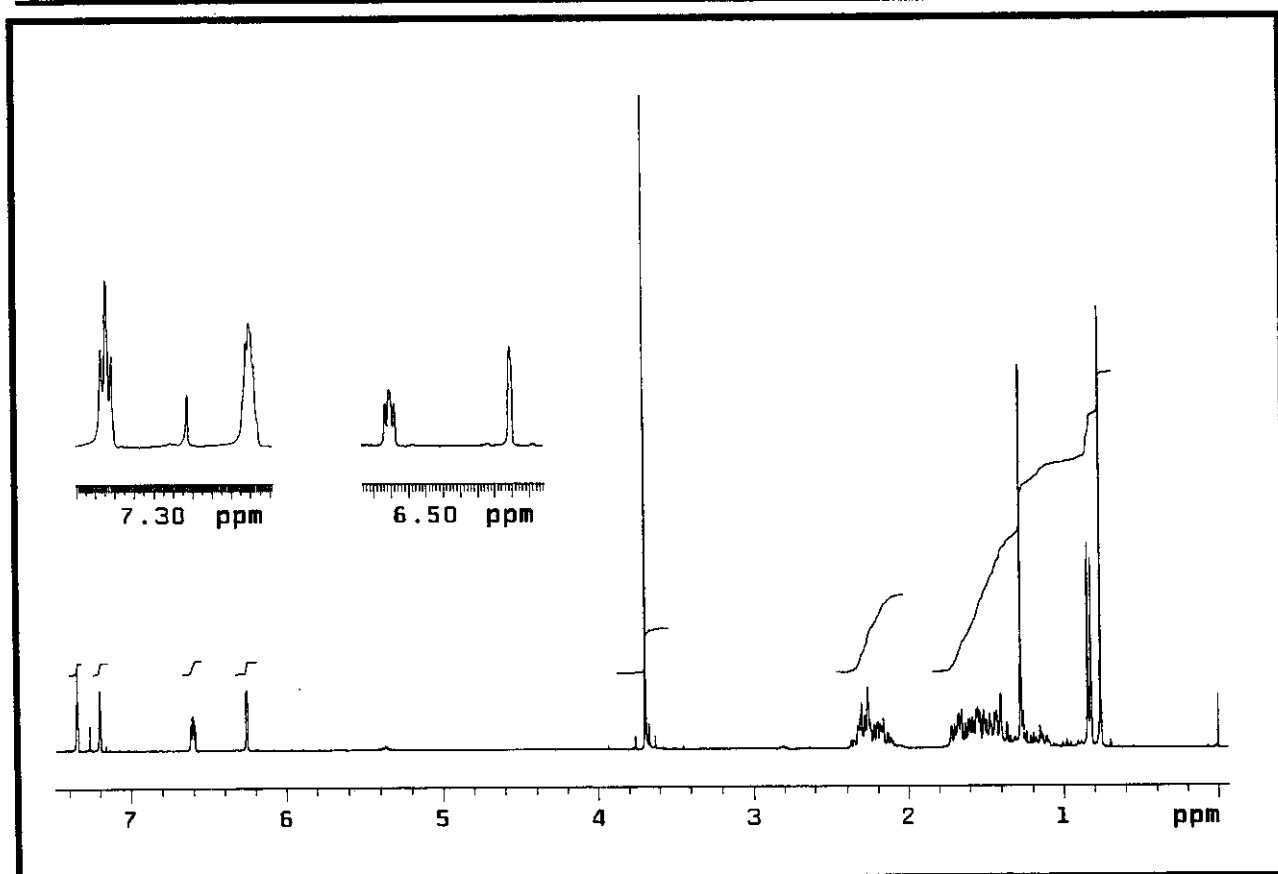


E 05 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR) do produto natural 08.

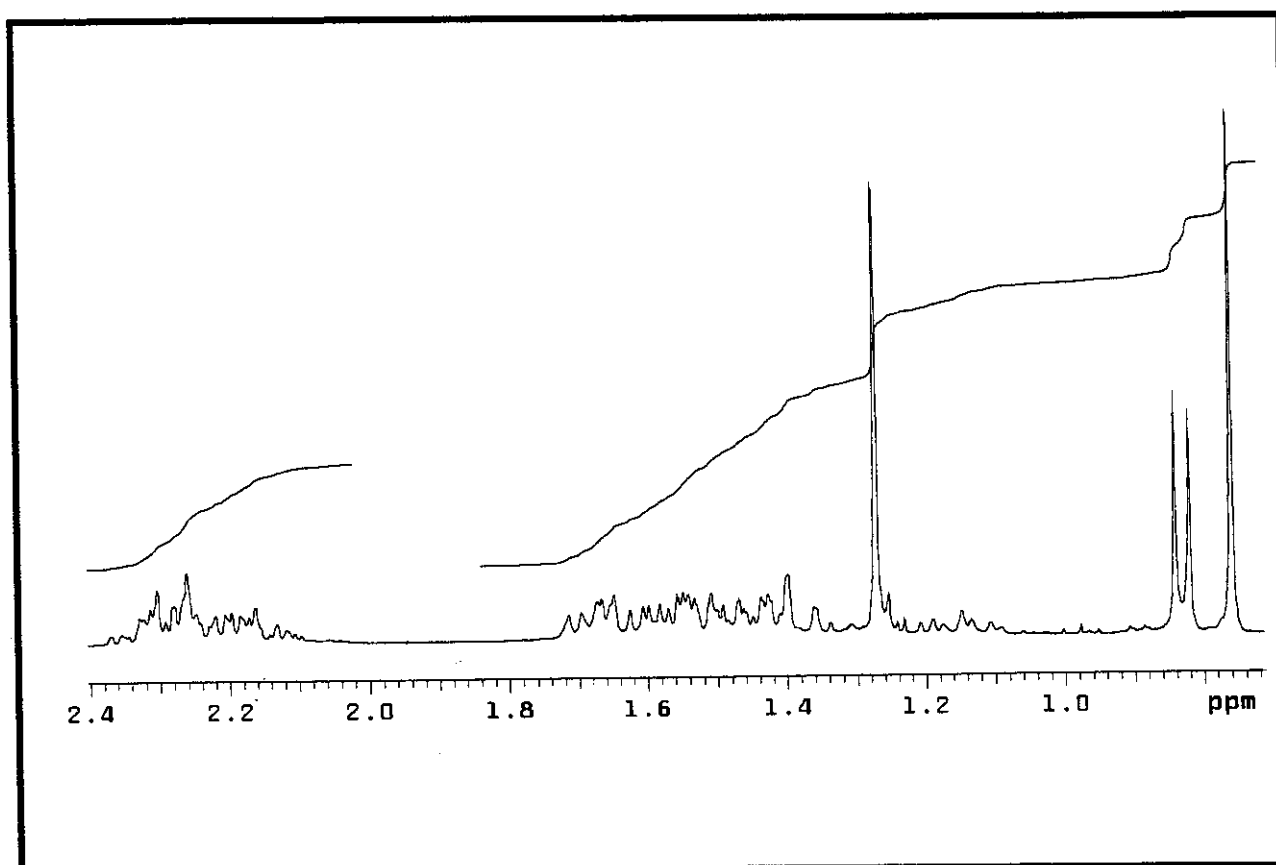
Espectros



E 06 – Espectro de massas (70 eV) do produto natural 08.

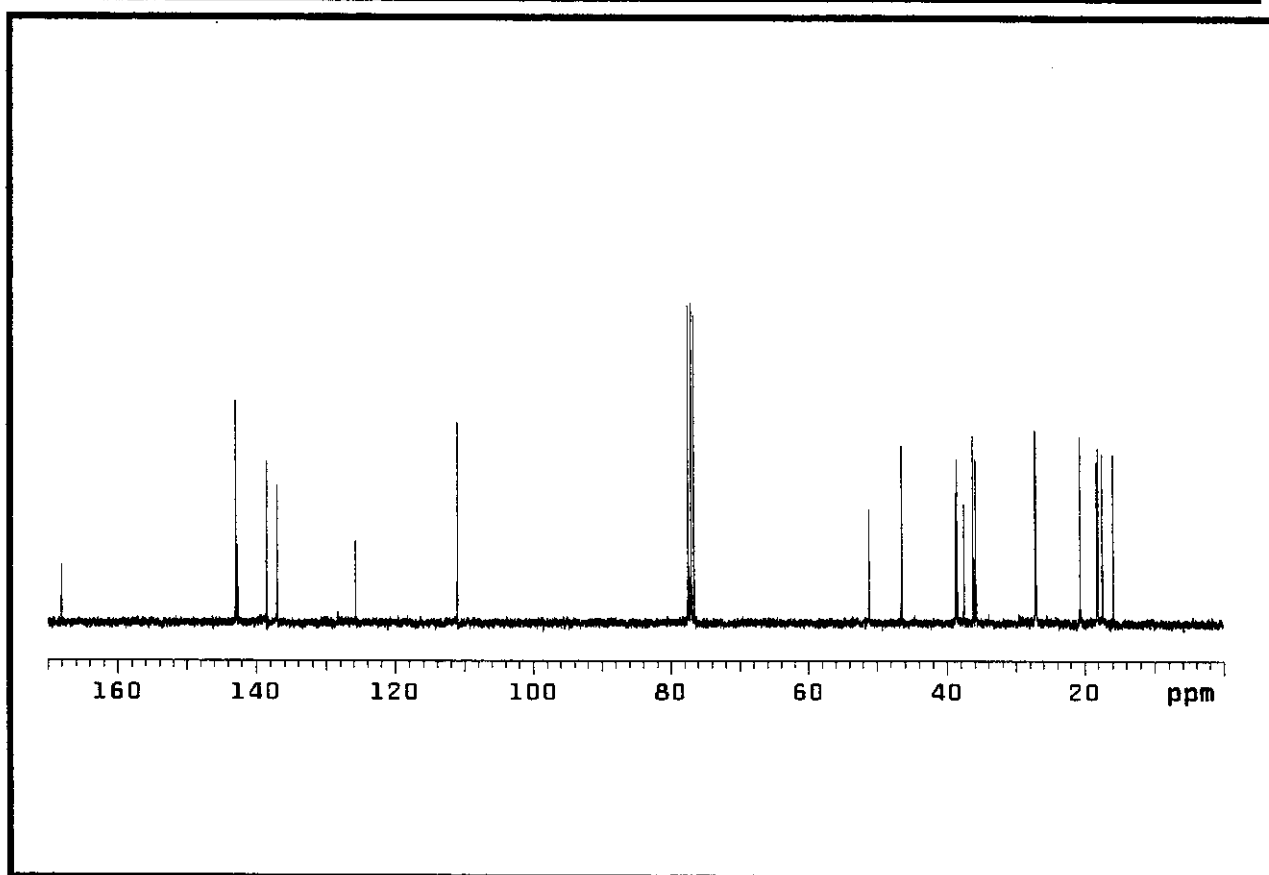


E 07 - Espectro de RMN^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 14a.

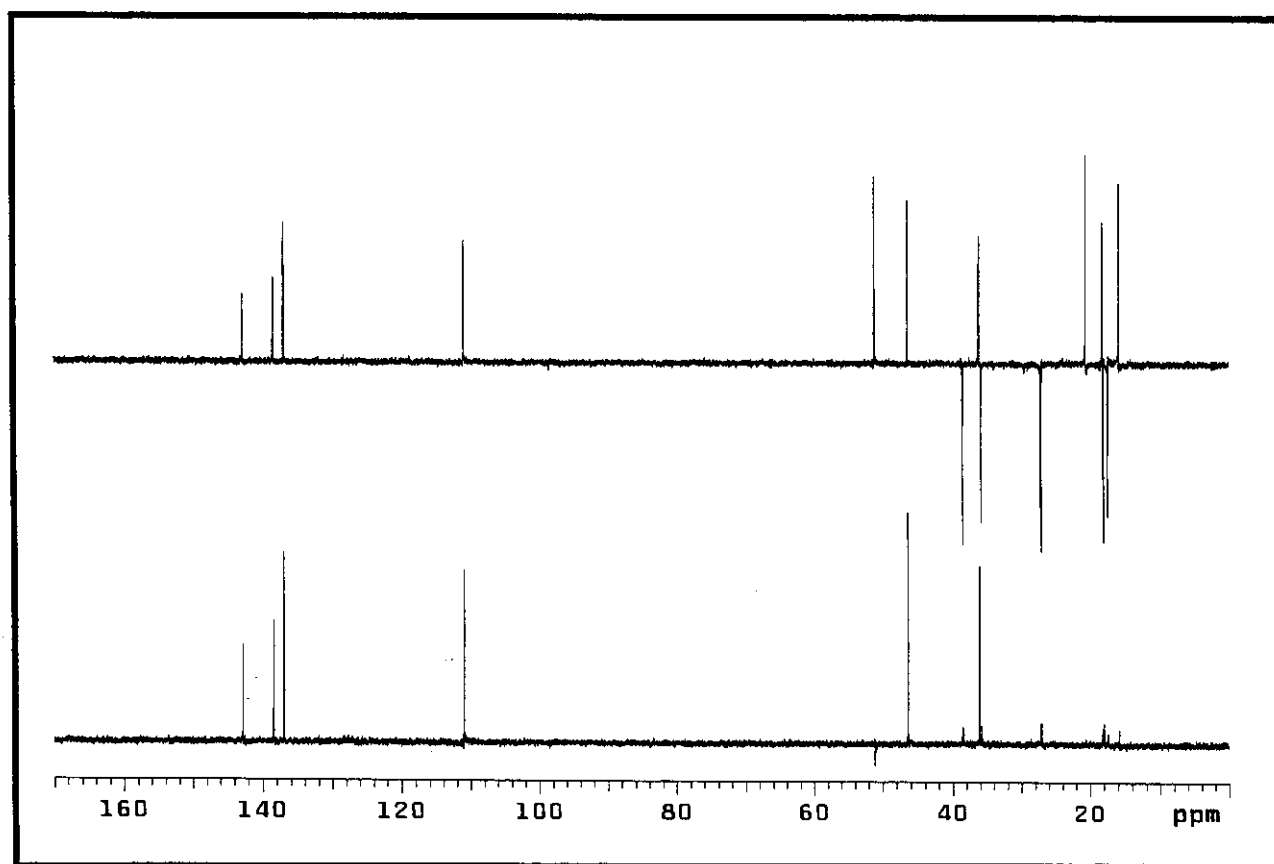


E 07a – Expansão do espectro de E 07 do produto natural 14a .

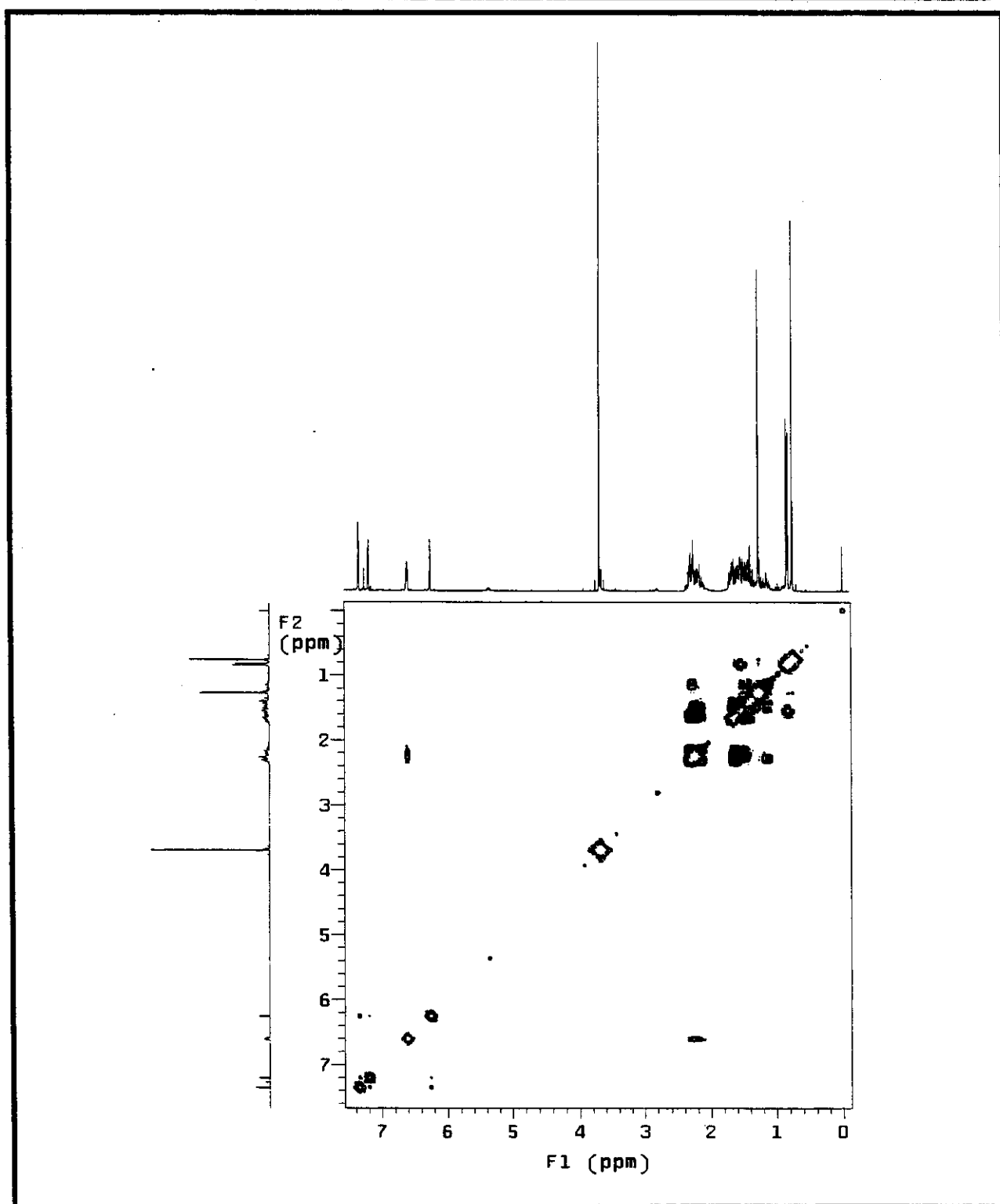
Espectros



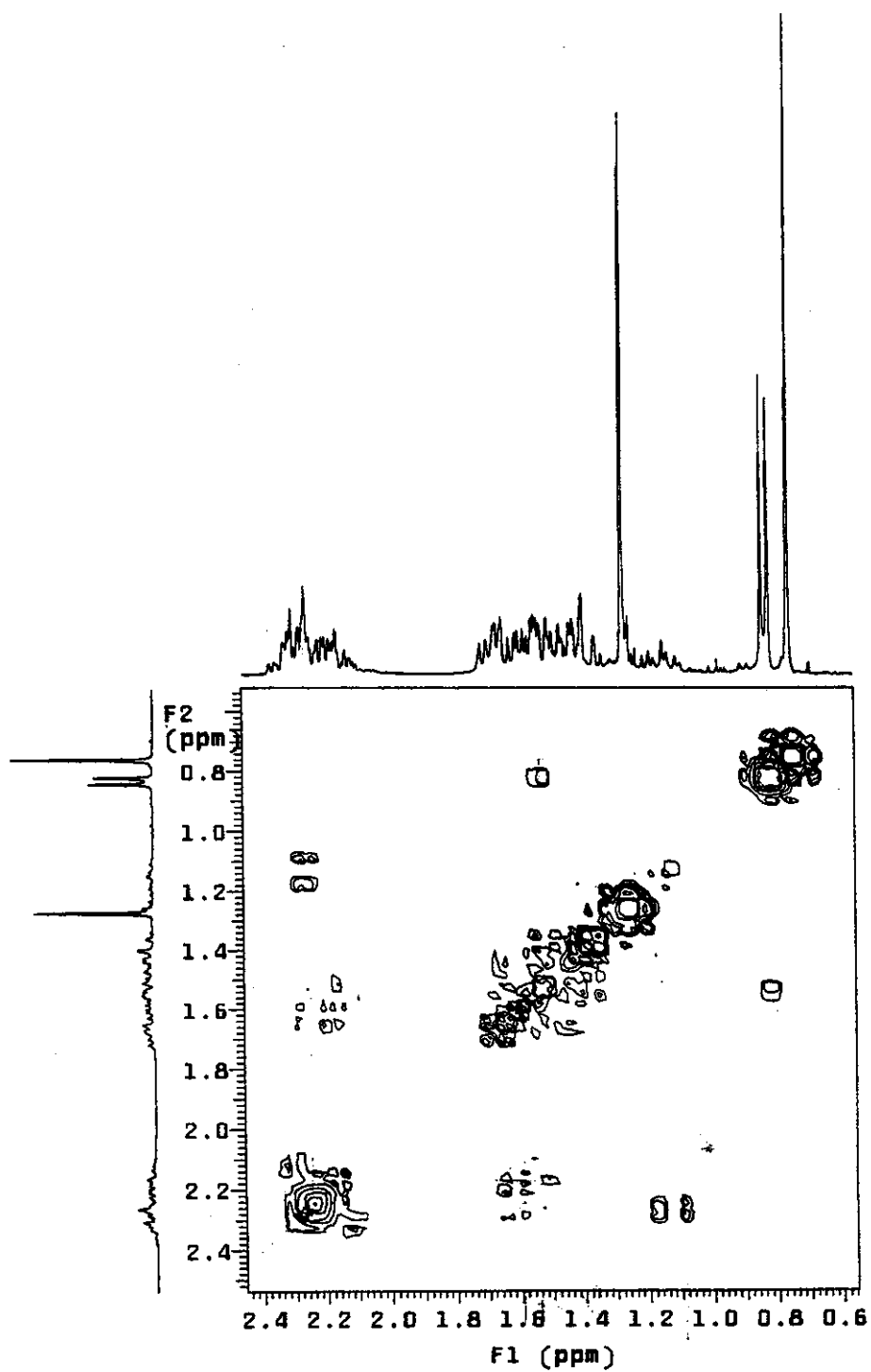
E 08 – Espectro de RMN ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃) do produto natural 14a.



E 09 – Espectro DEPT (135° e 90°) do produto natural 14a.

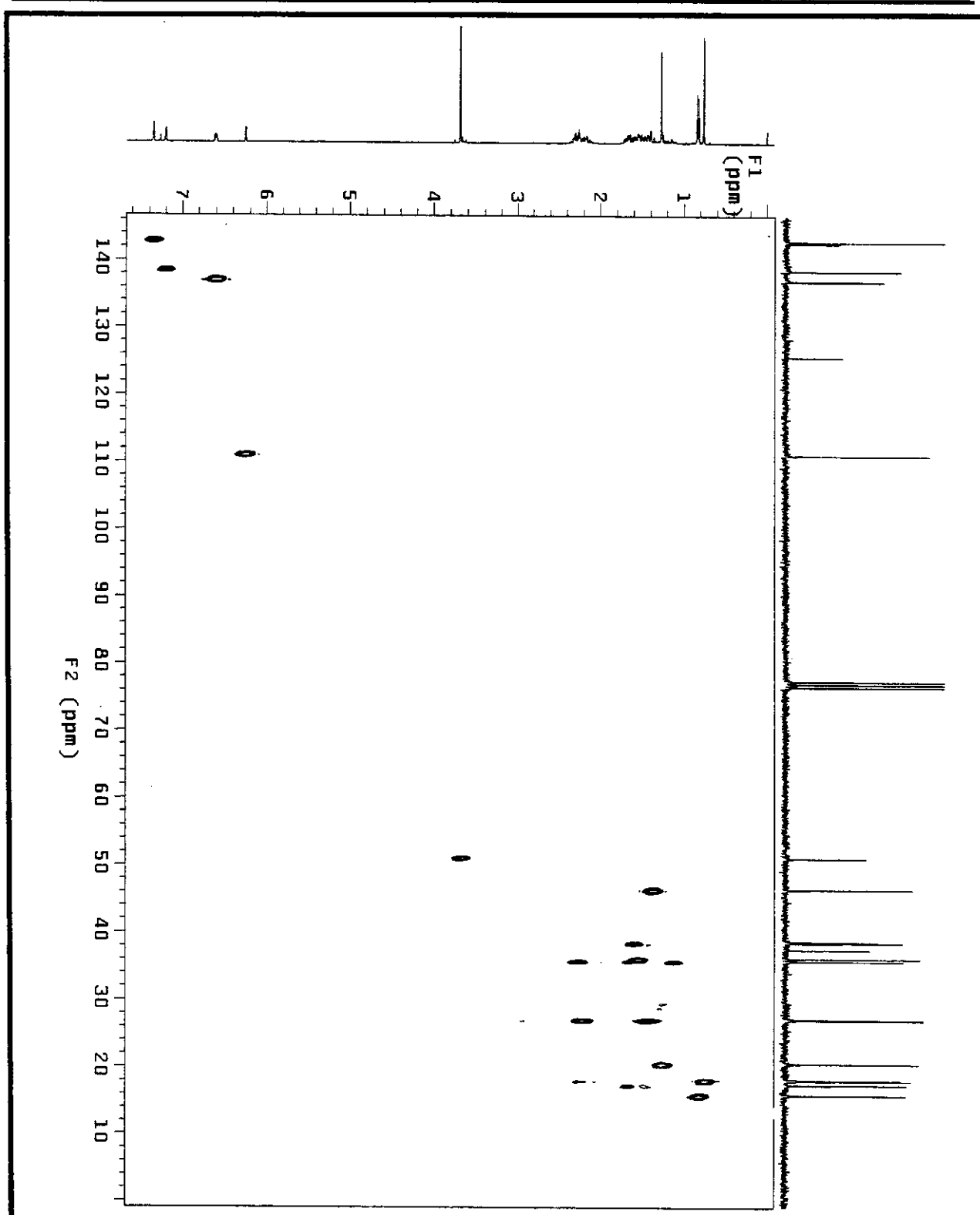


E 10 – Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear (^1H , ^1H – COSY) do produto natural 14a.

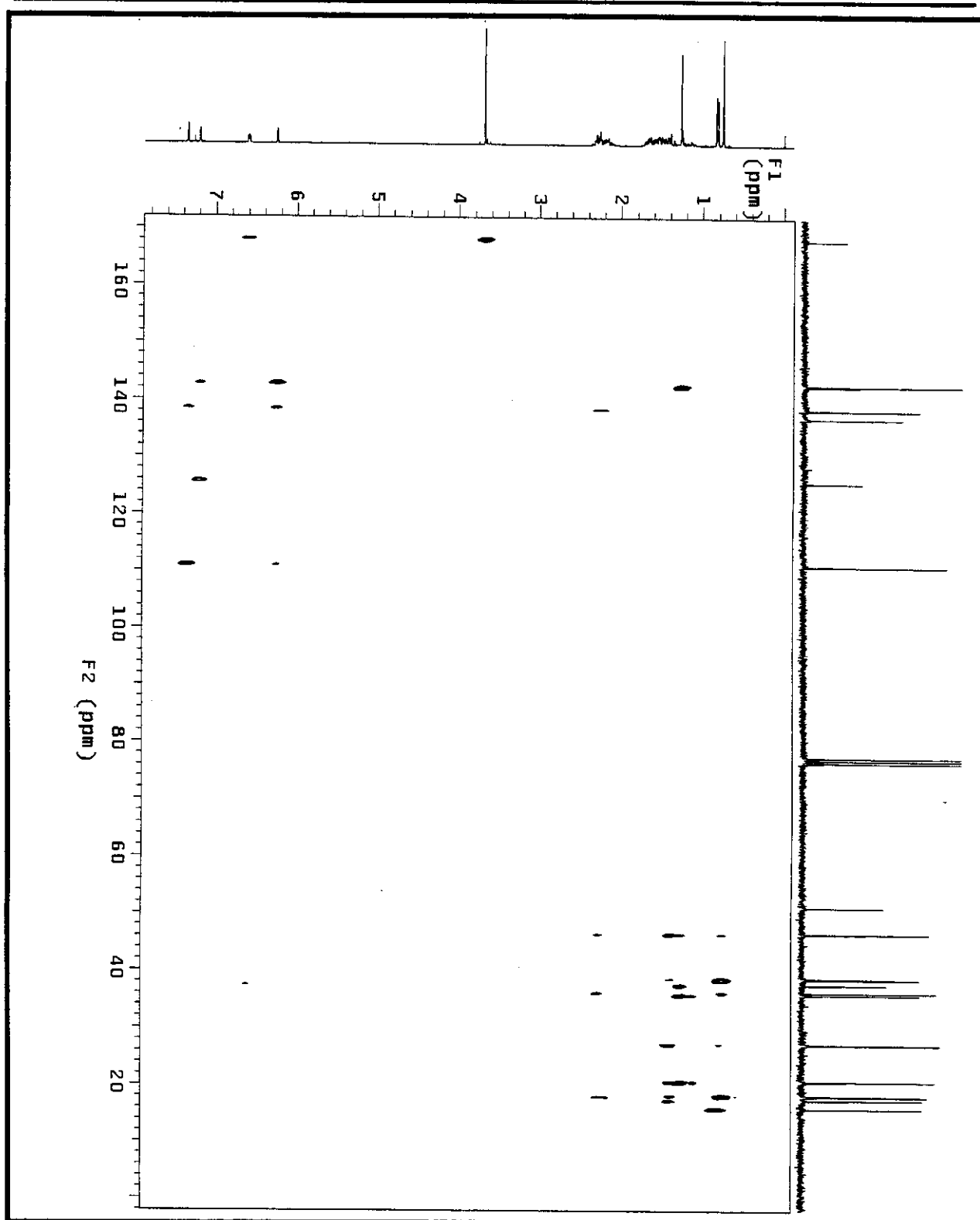


E 10a – Expansão do espectro E 10 do produto natural 14a.

Espectros

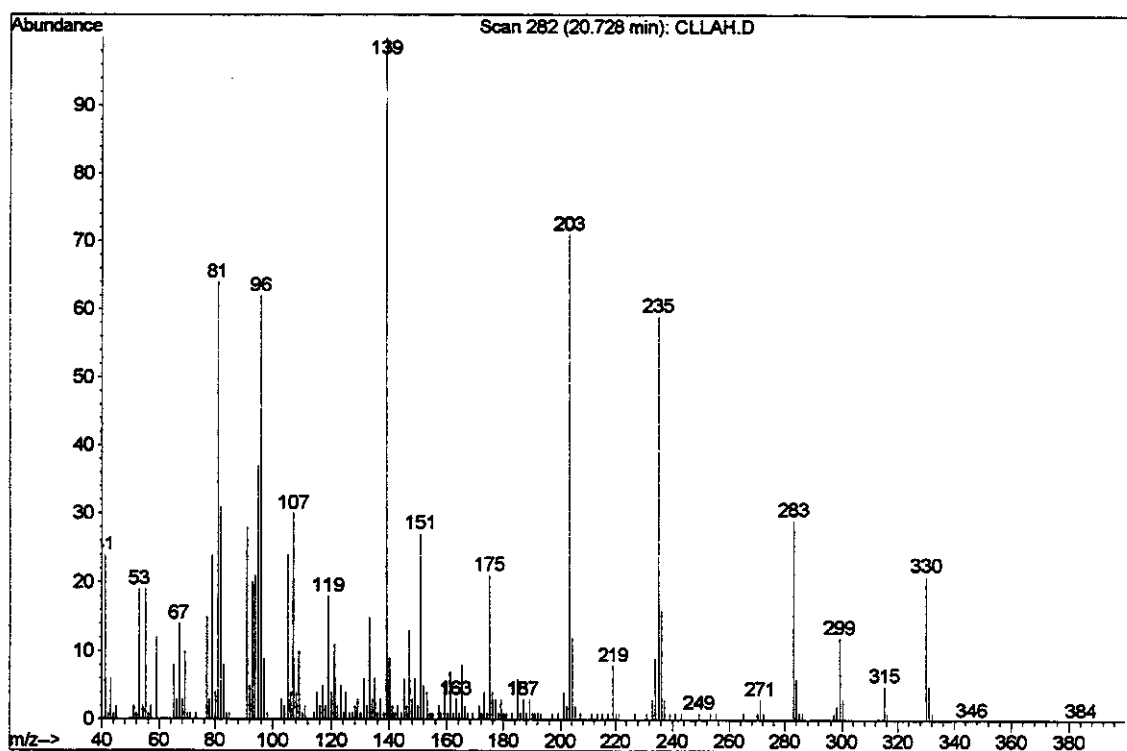


E 11 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C - HETCOR) do produto natural 14a.

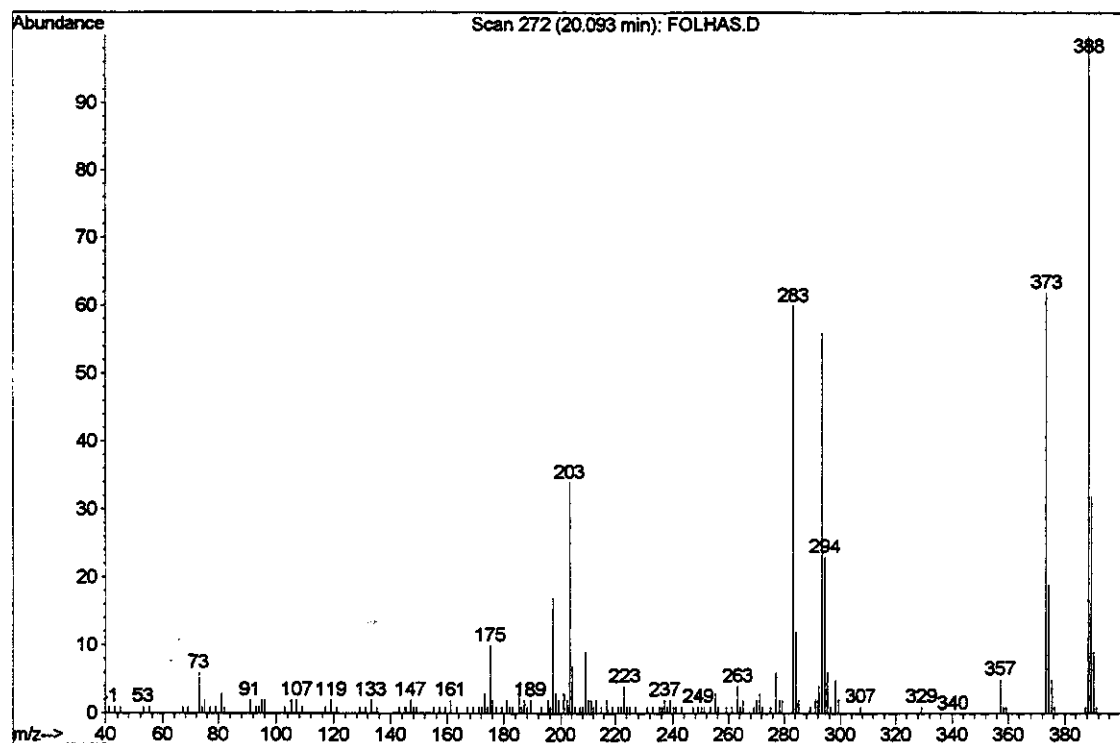


E 12 – Espectro RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR L.D.) do produto natural 14a.

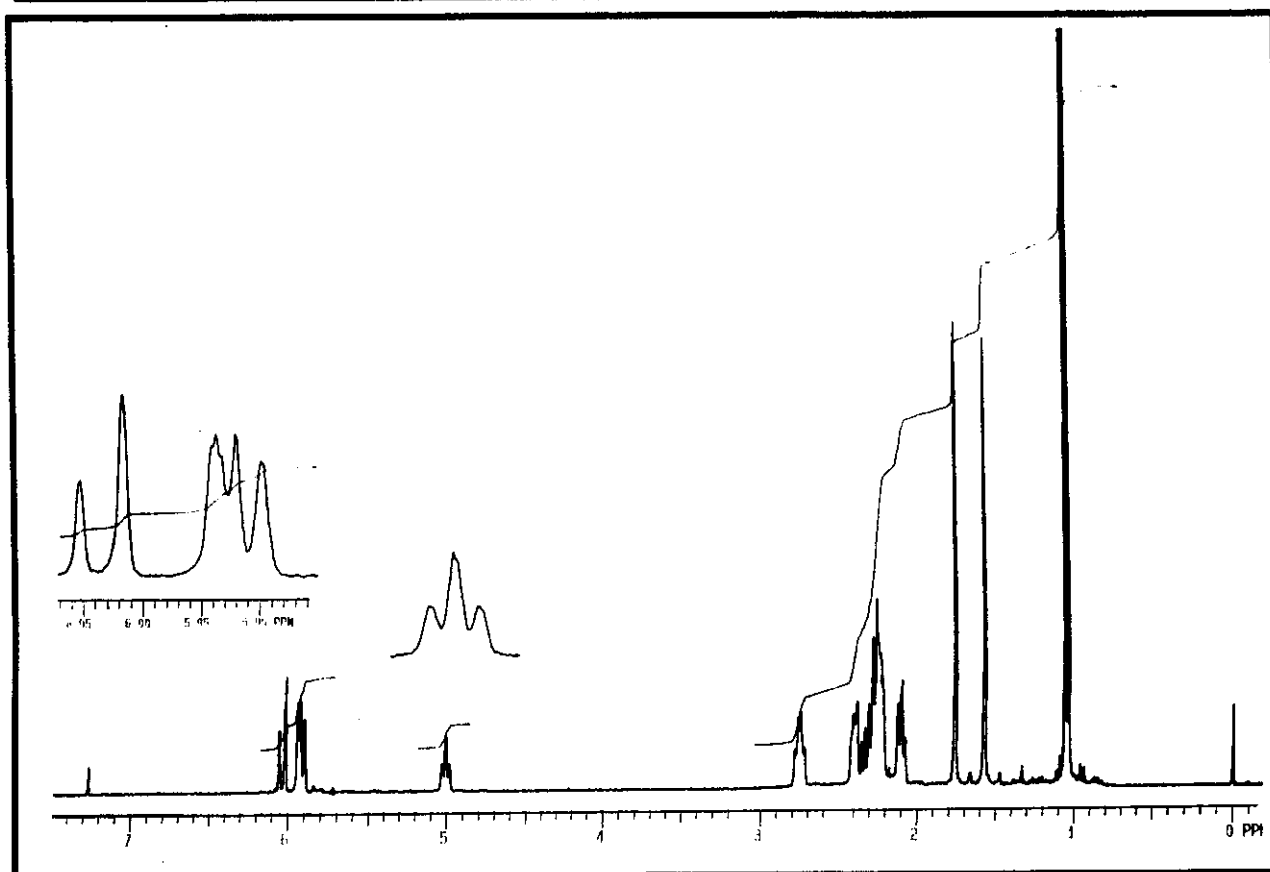
Espectros



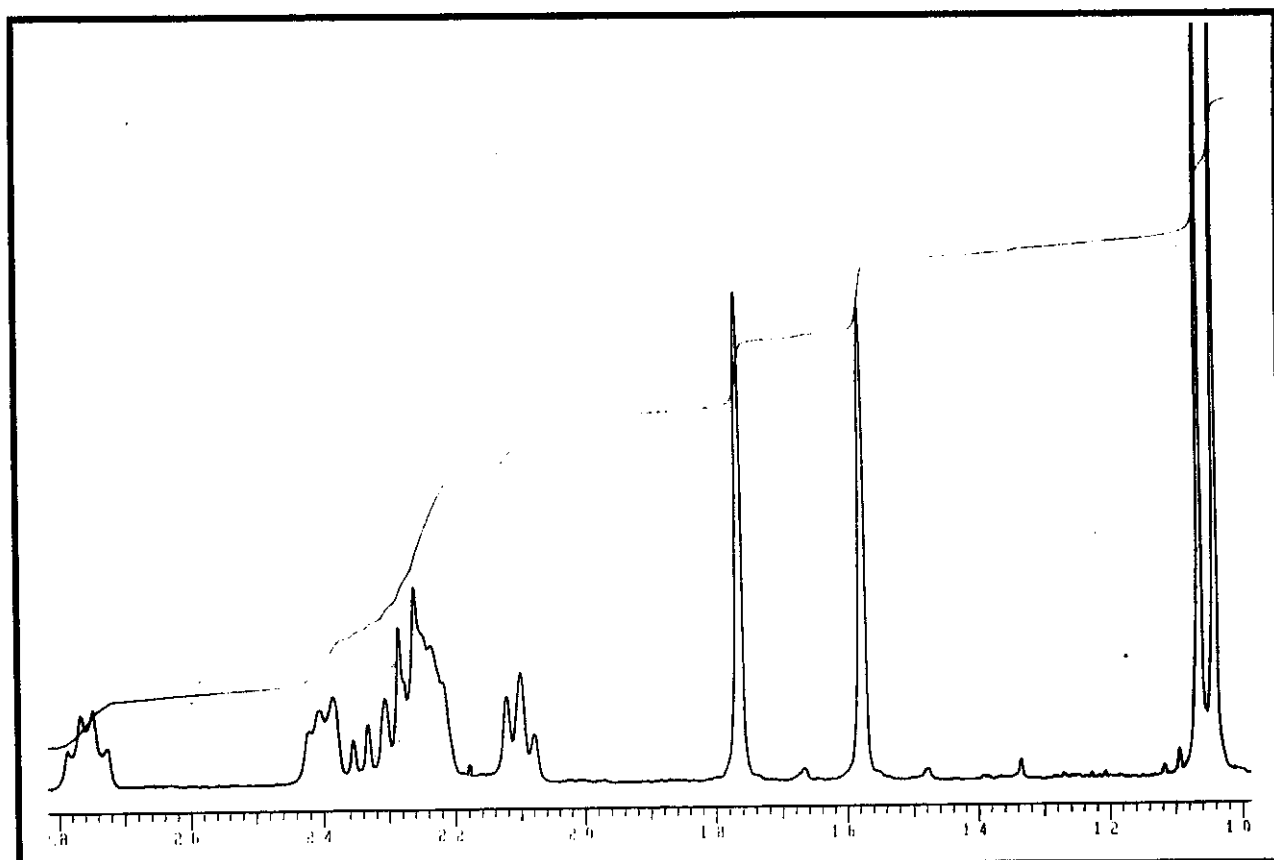
E 13 – Espectro de massas (70 eV) do produto natural 14a.



E 13.1 – Espectro de massas (70 eV) do produto natural 14b

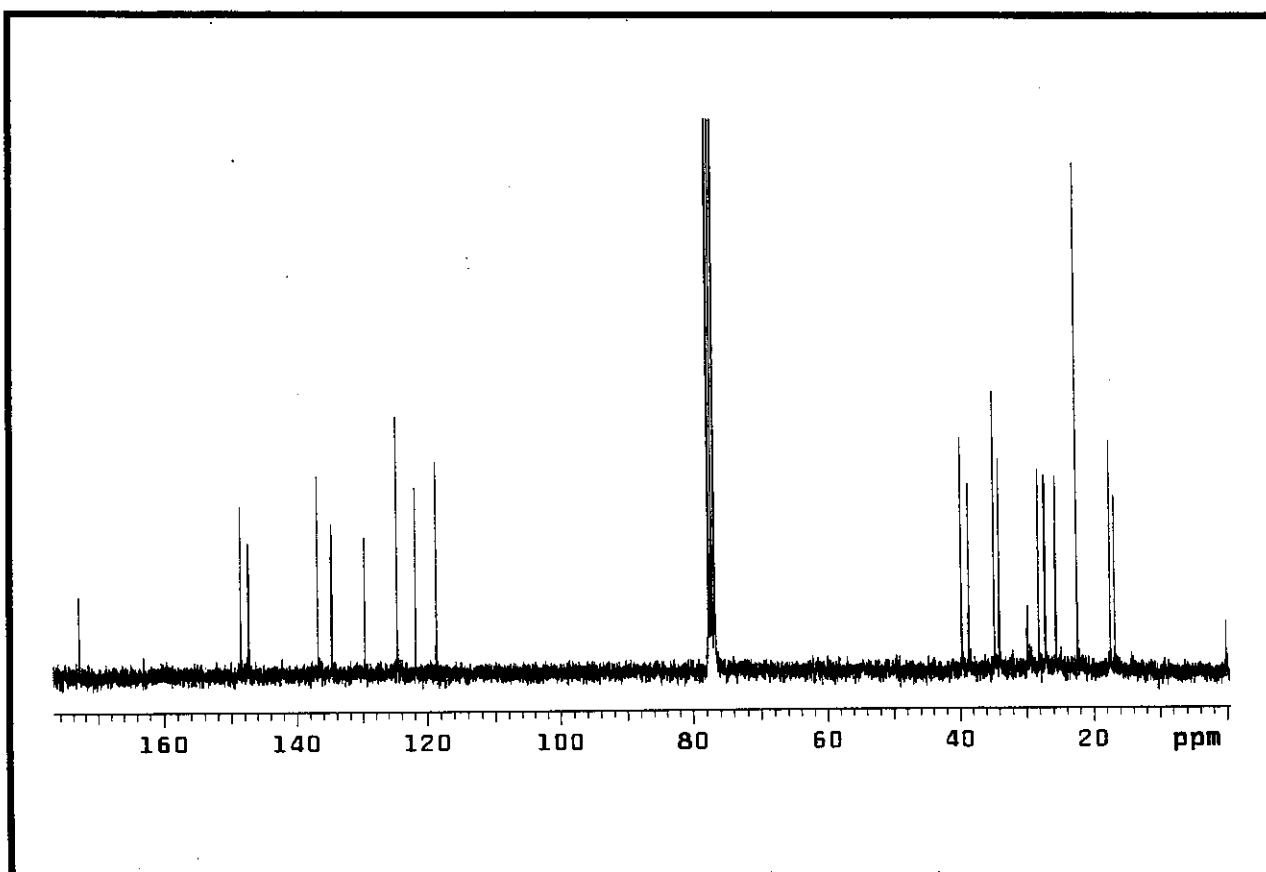


E 14 – Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 16.

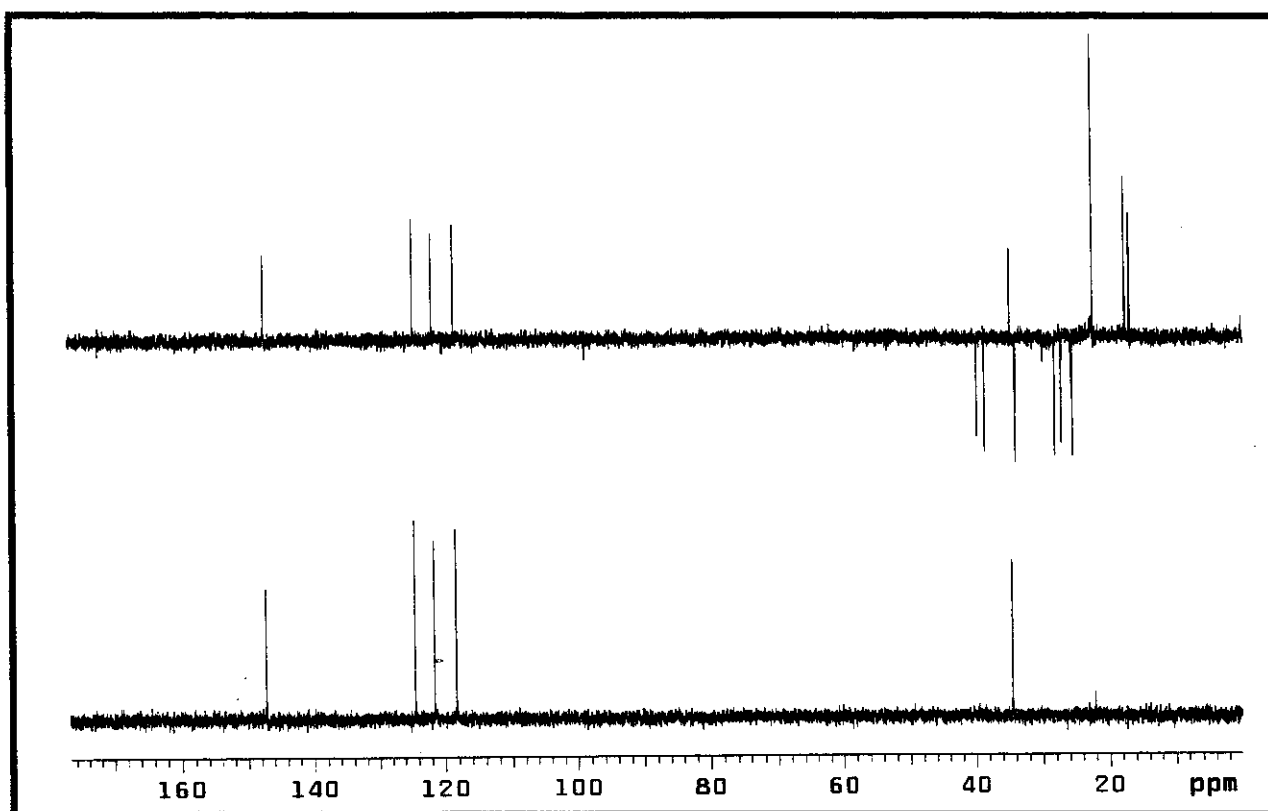


E 14a – Expansão do espectro de E 14 do produto natural 16.

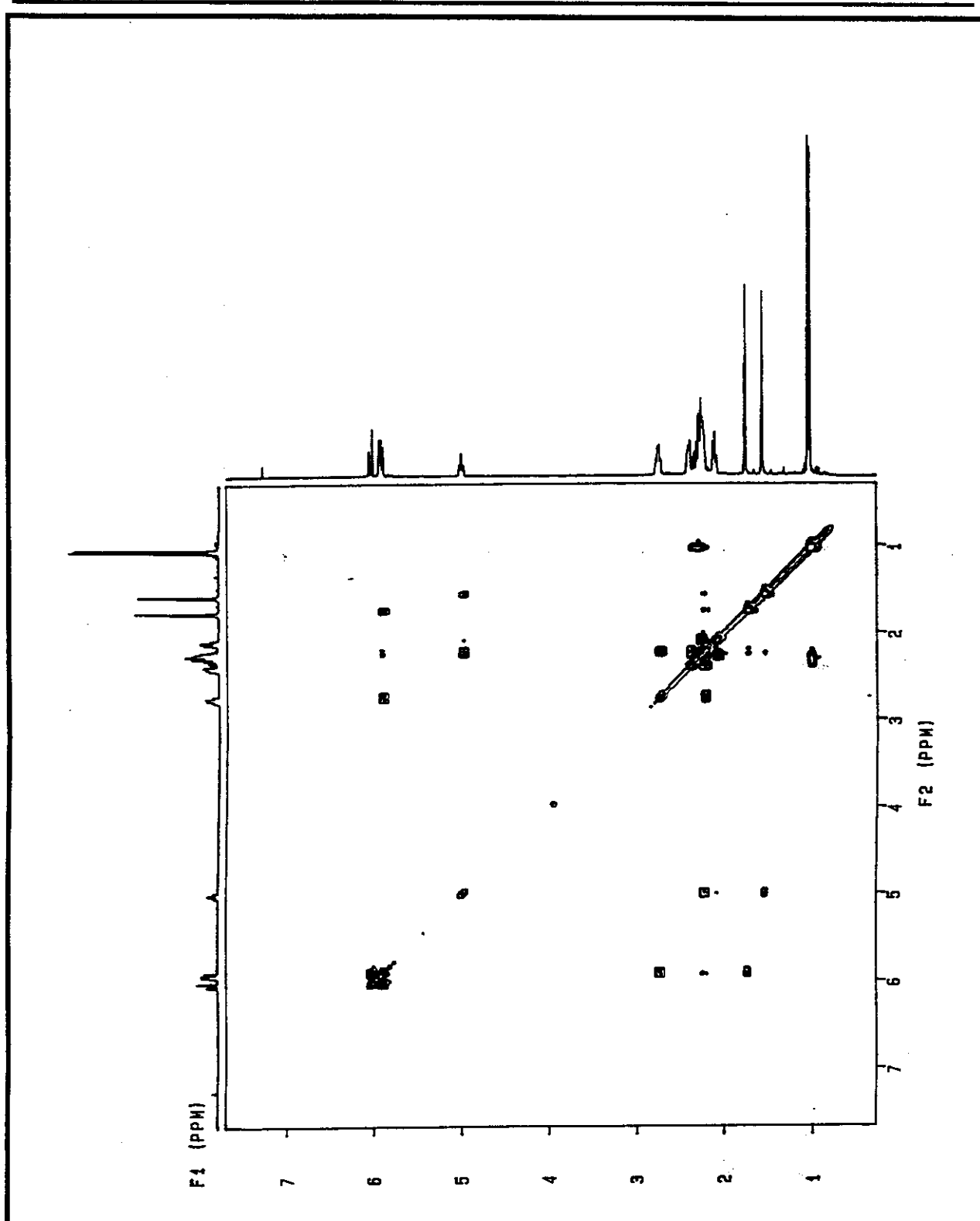
Espectros



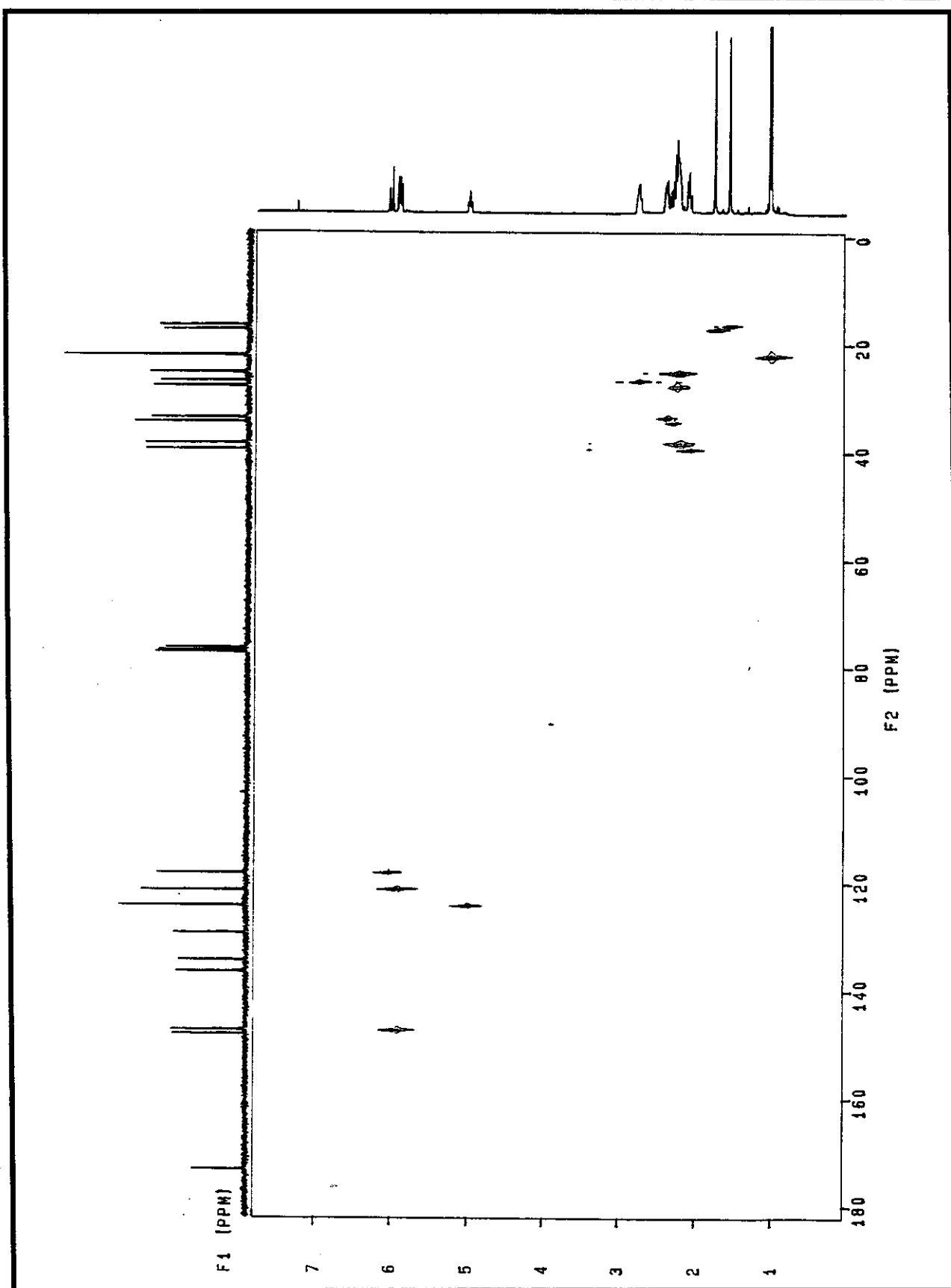
E 15 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 Hz, CDCl_3/TMS) do produto natural 16.



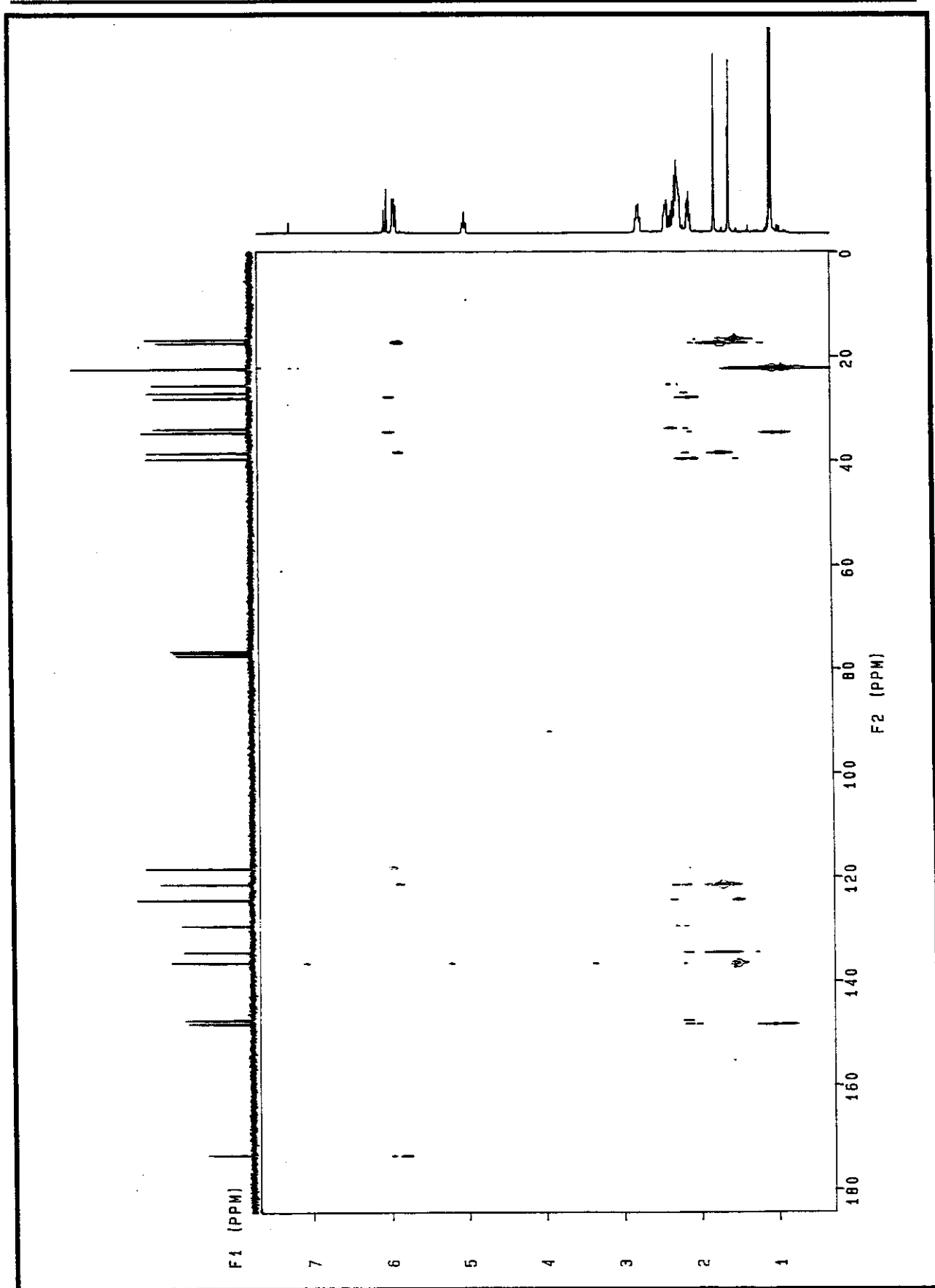
E 16 – Espectro DEPT (135° e 90°) do produto natural 16.



E 17 – Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear (^1H , ^1H – COSY) do produto natural 16.

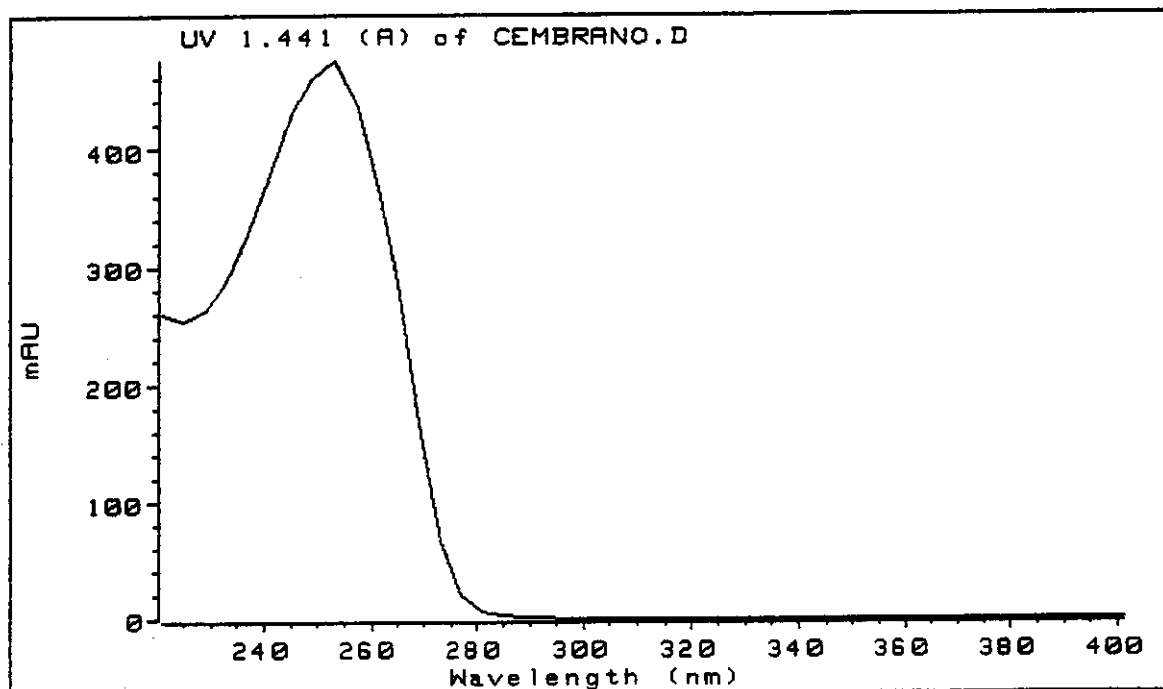


E 18 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR) do produto natural 16

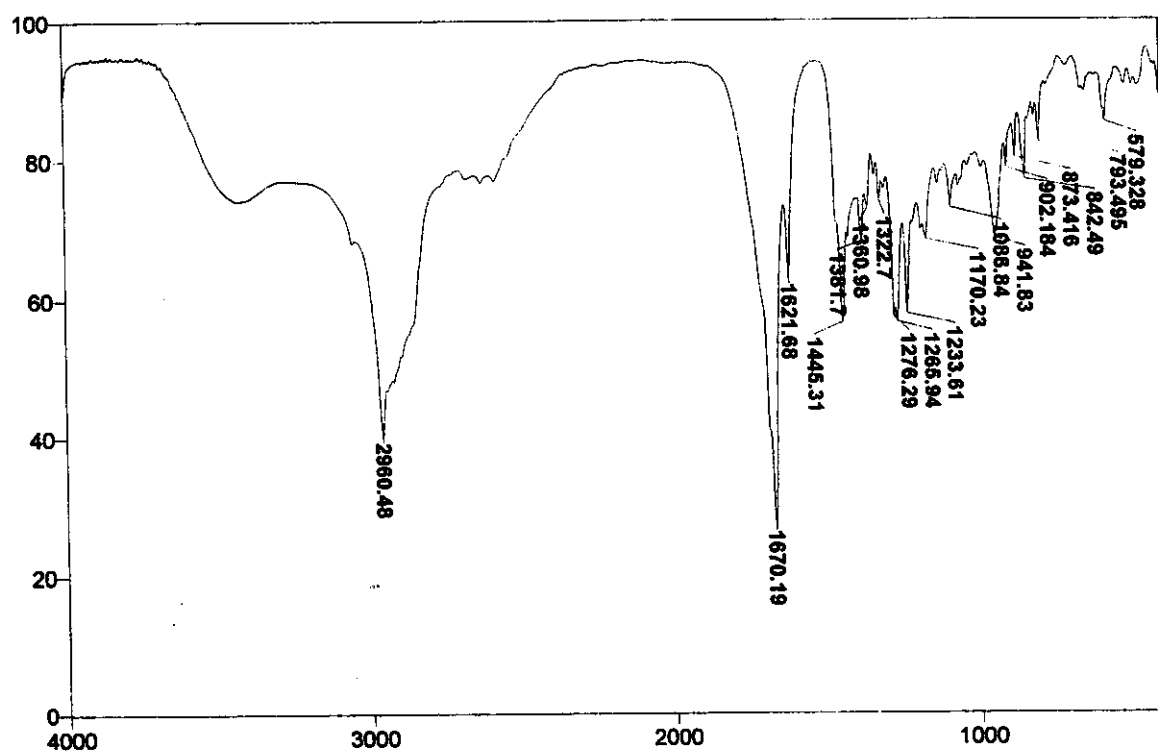


E 19 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – COLOC) do produto natural

16

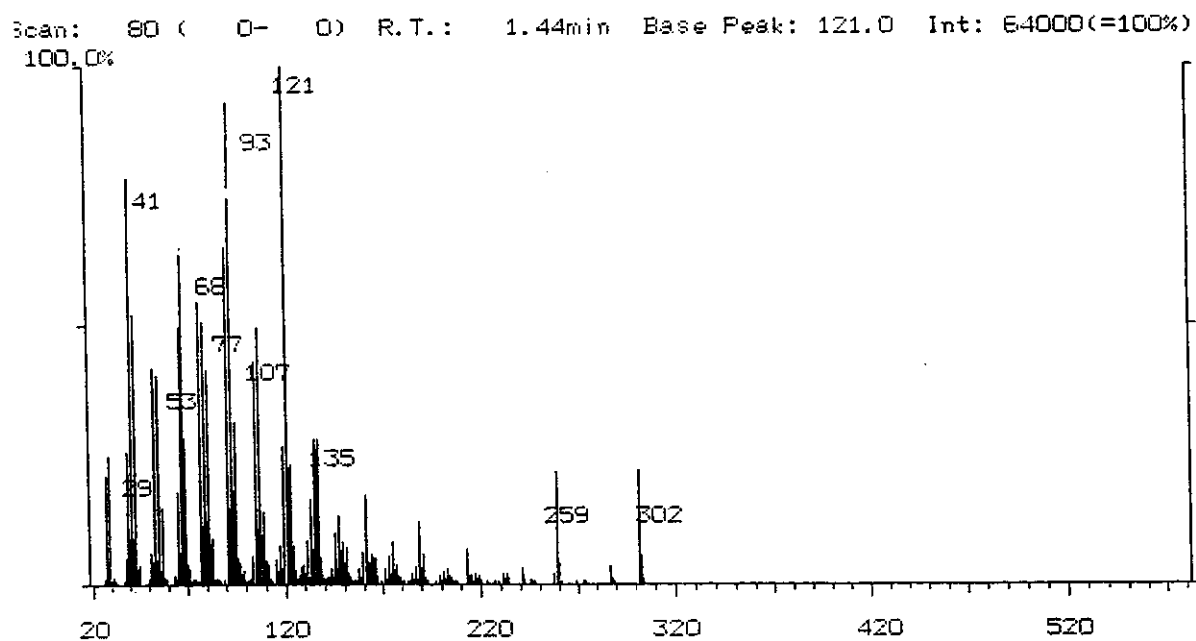


E 20 – Espectro de UV (CH_3CN) do produto natural 16.

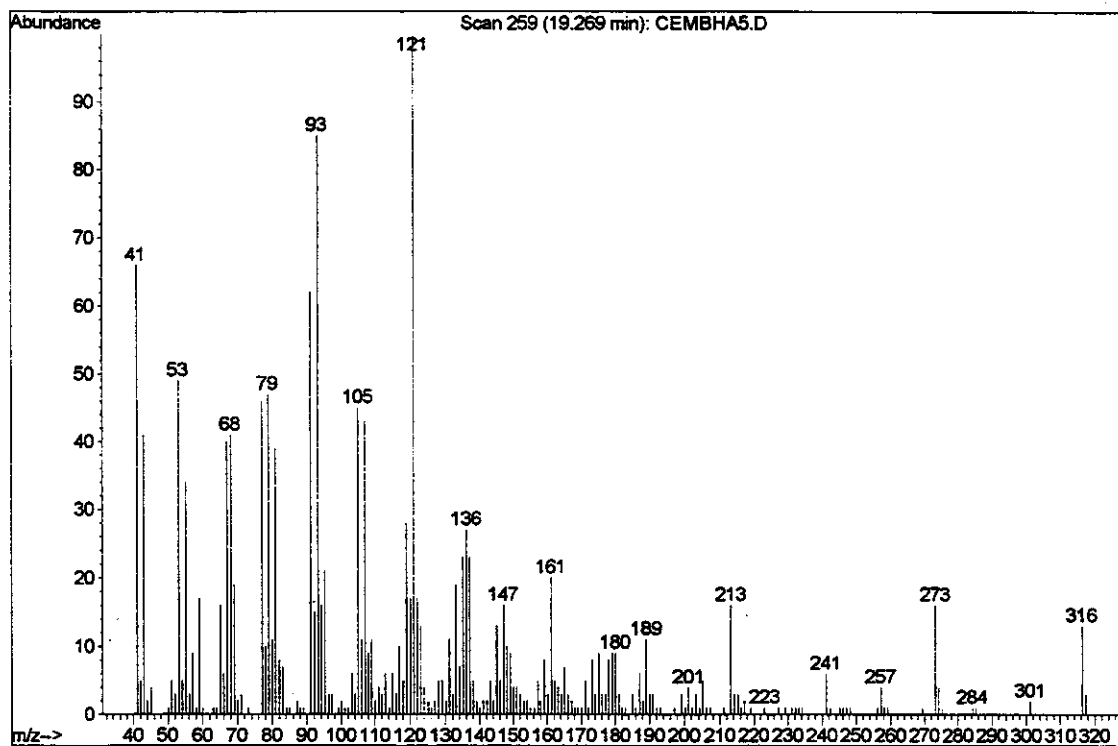


E 21 – Espectro de IV (filme) do produto natural 16.

Espectros

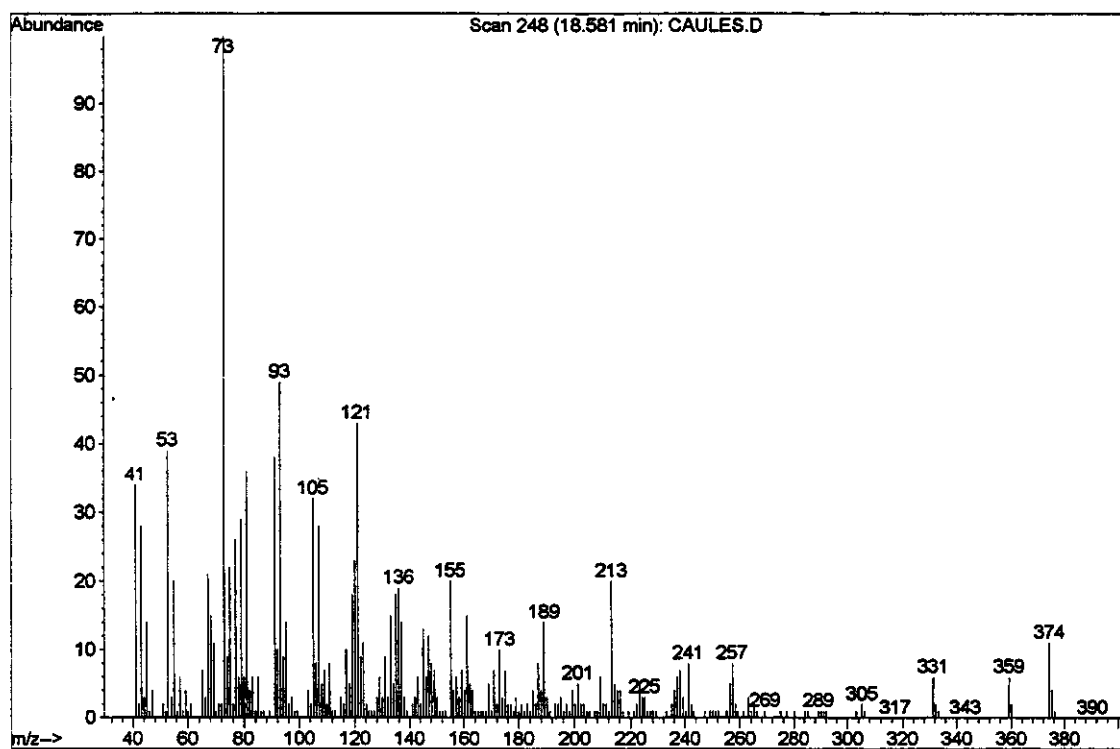


E 22 – Espectro de massas (70 eV) do produto natural 16.



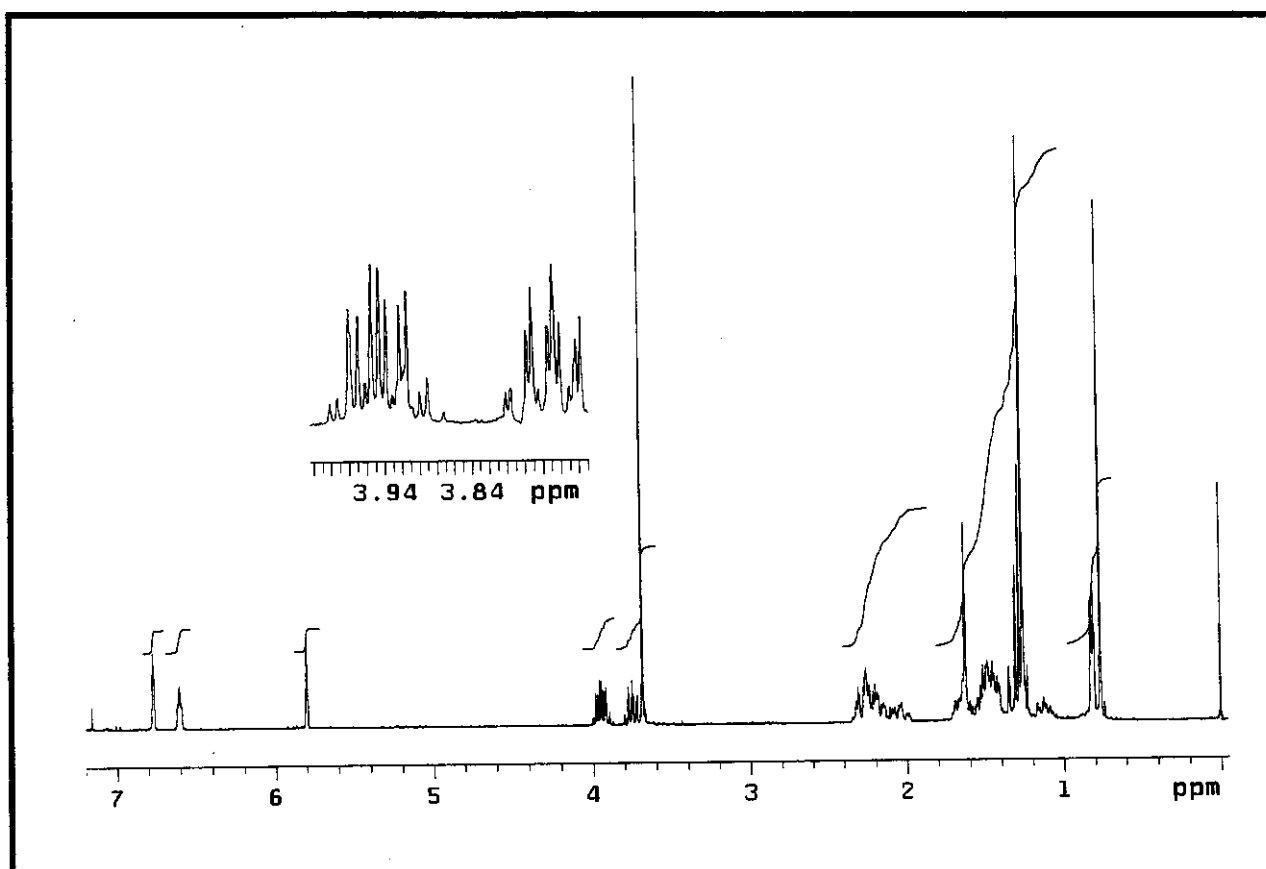
E 22.1 – Espectro de massas (70 eV) do produto natural 16a.

Espectros

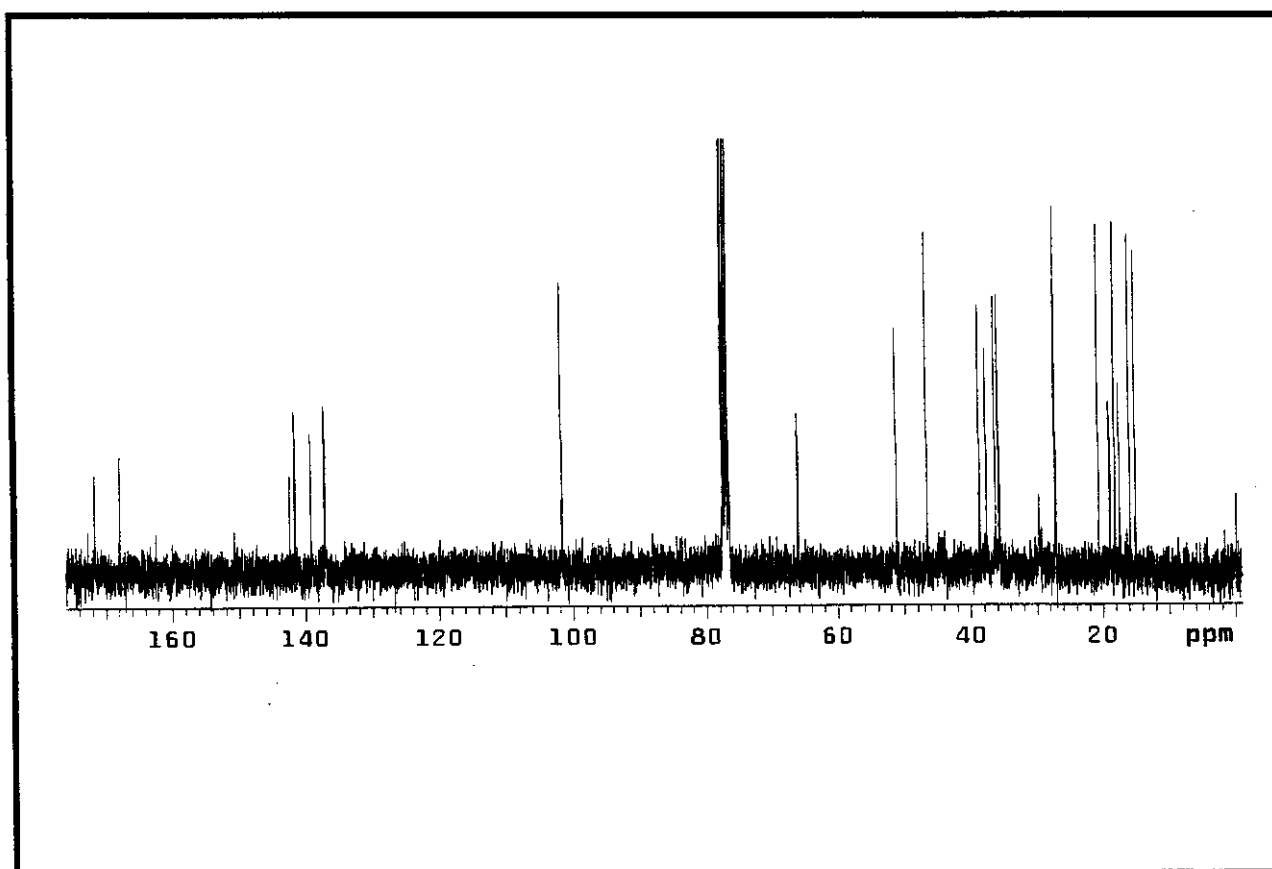


E 22.2 – Espectro de massas (70 eV) do produto natural 16b.

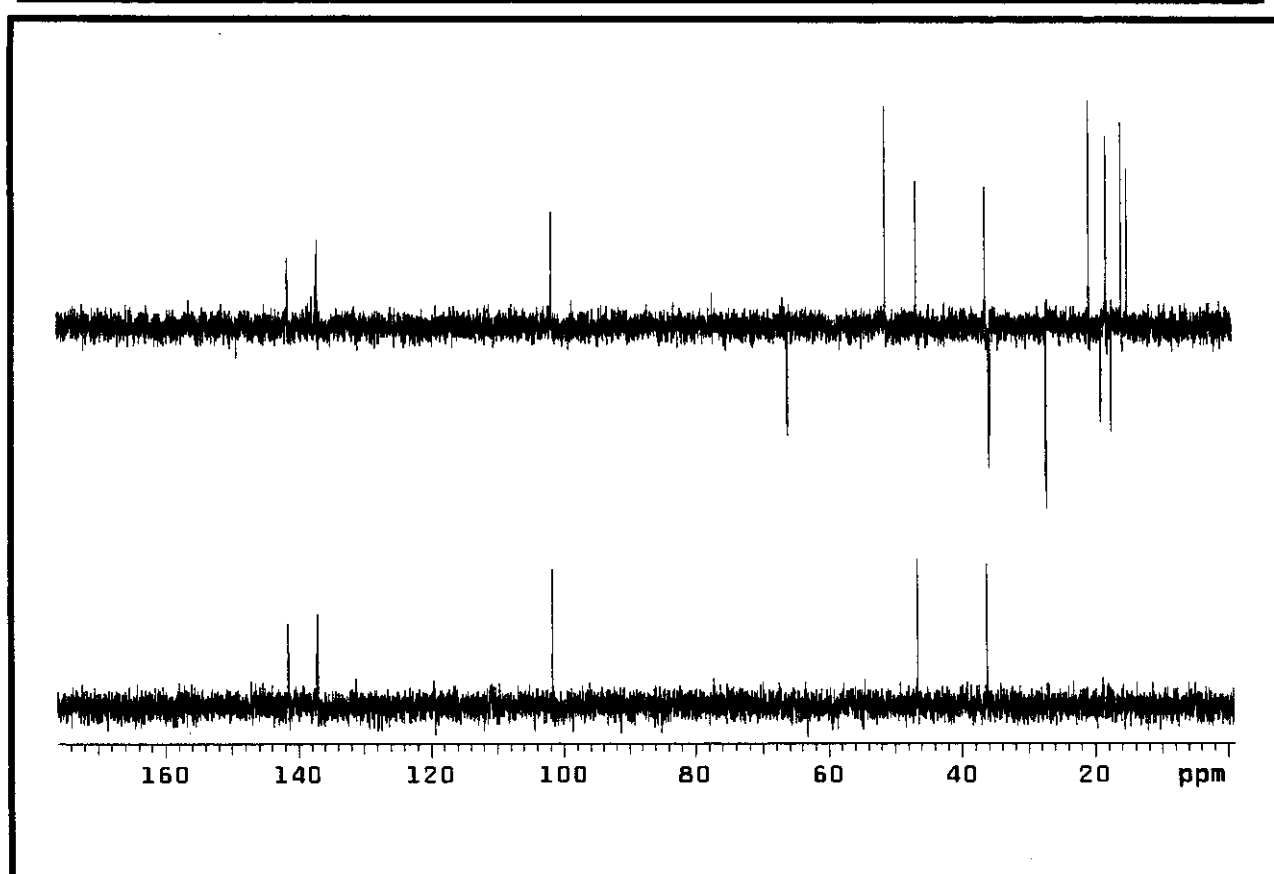
Espectros



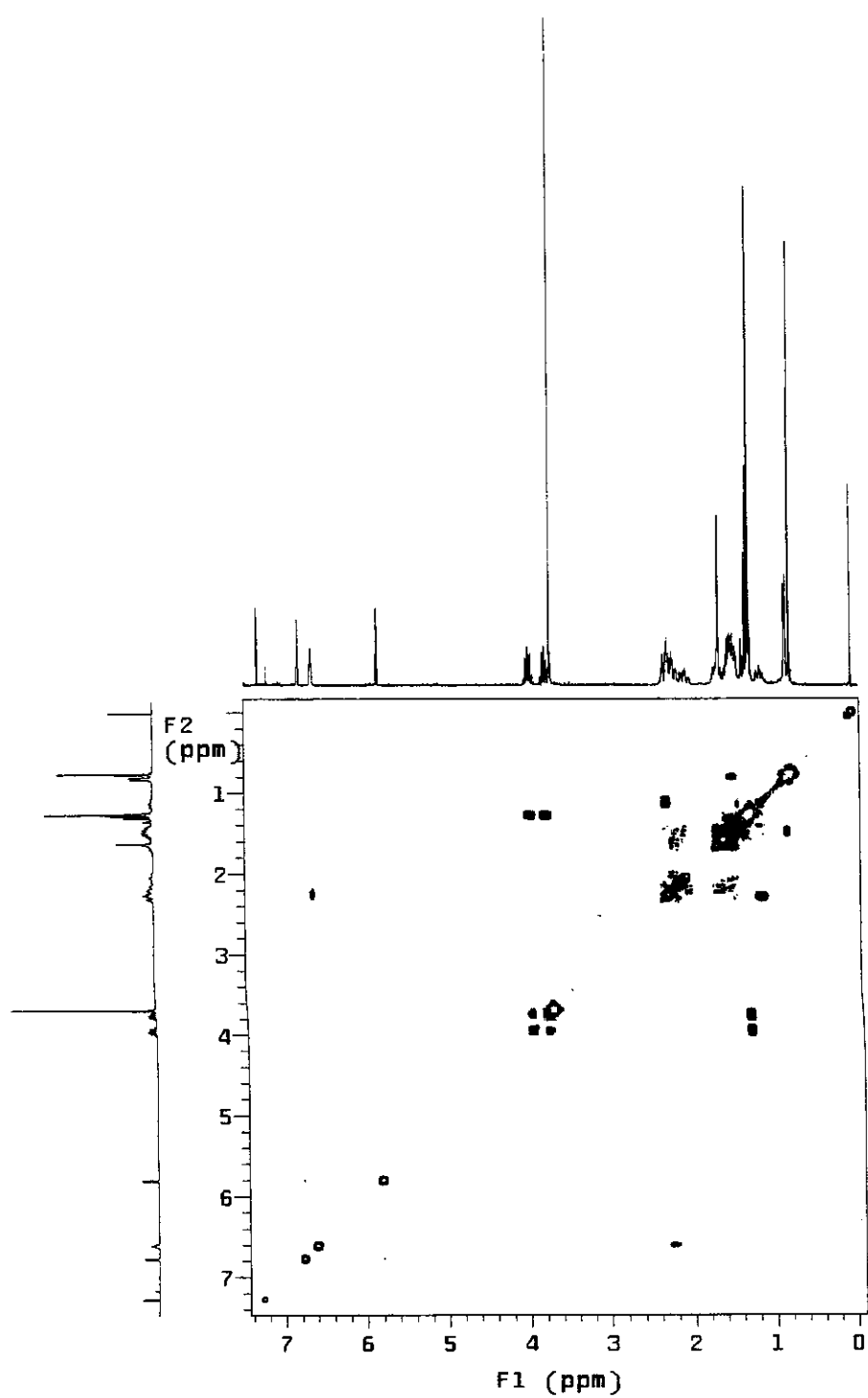
E 23 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do produto natural 17a.



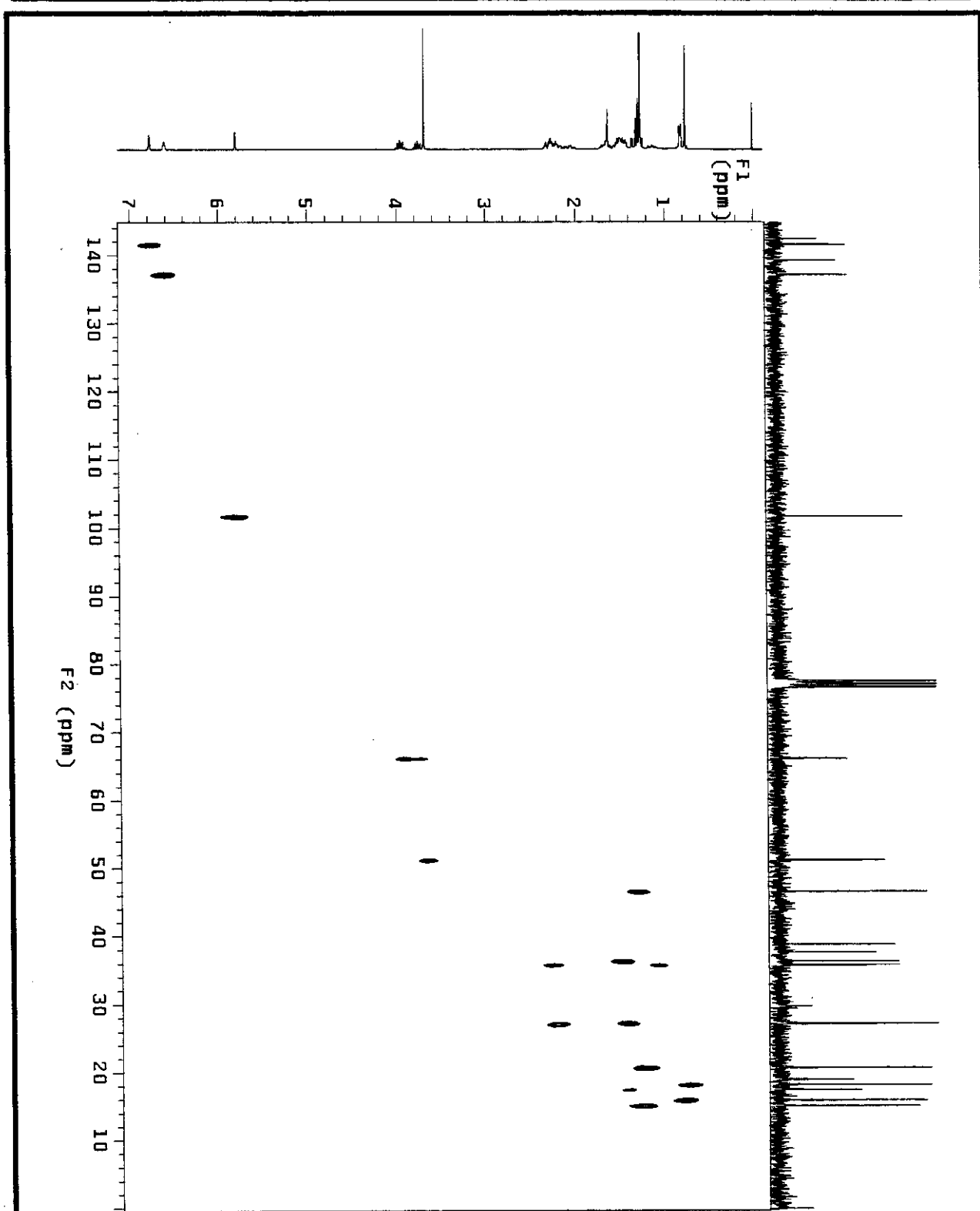
E 24 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 17a.



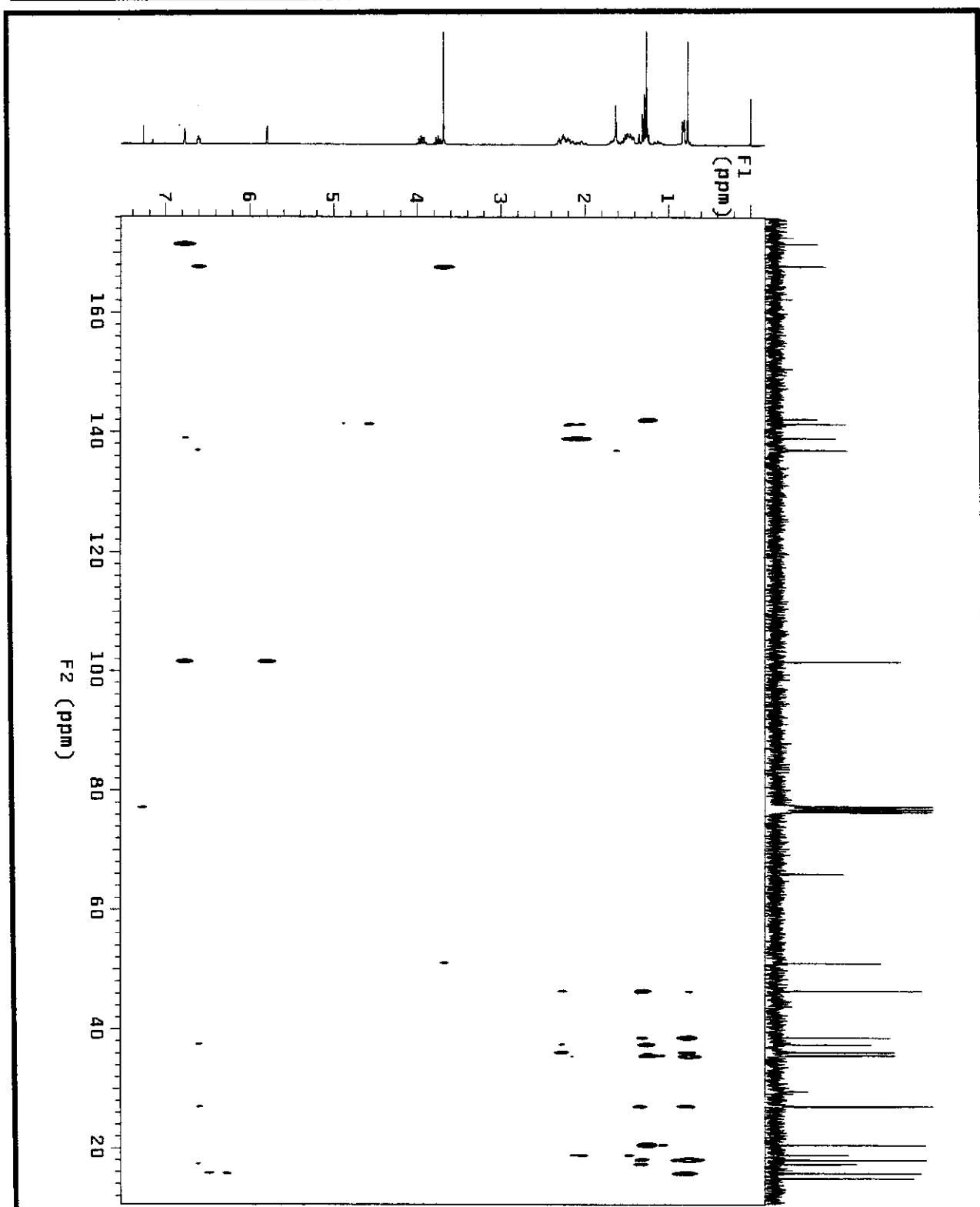
E 25 – Espectro DEPT (135° e 90°) do produto natural 17a.



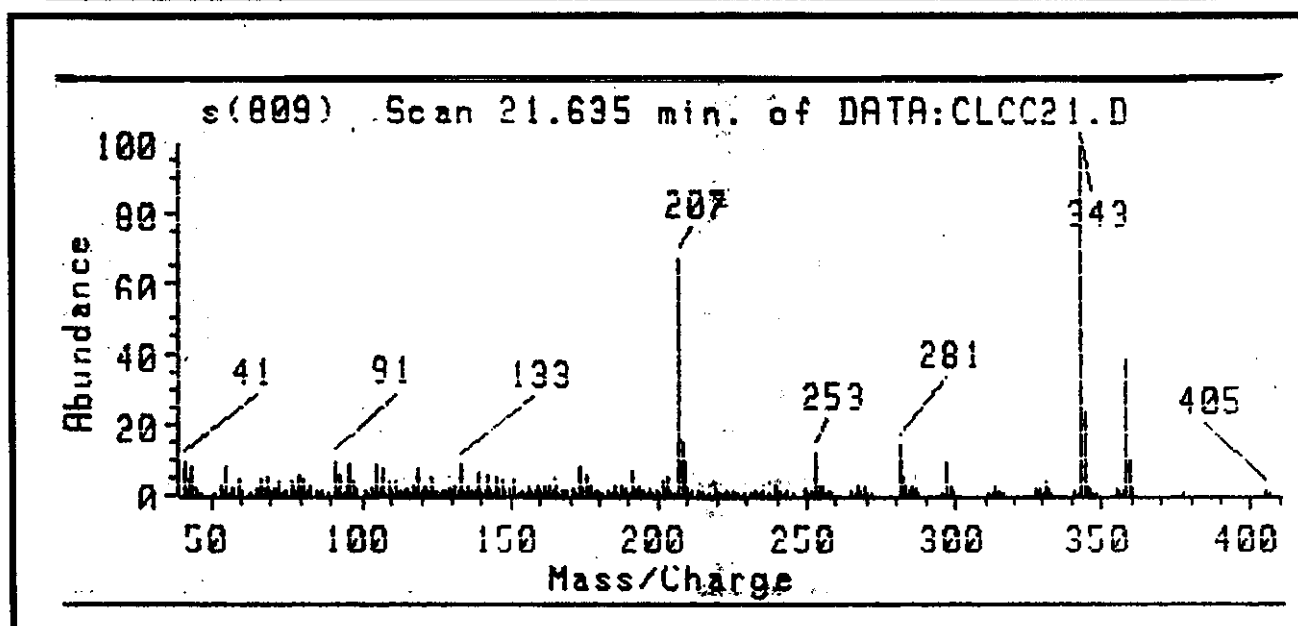
E 26 – Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear (^1H , ^1H - COSY) do produto natural 17a.



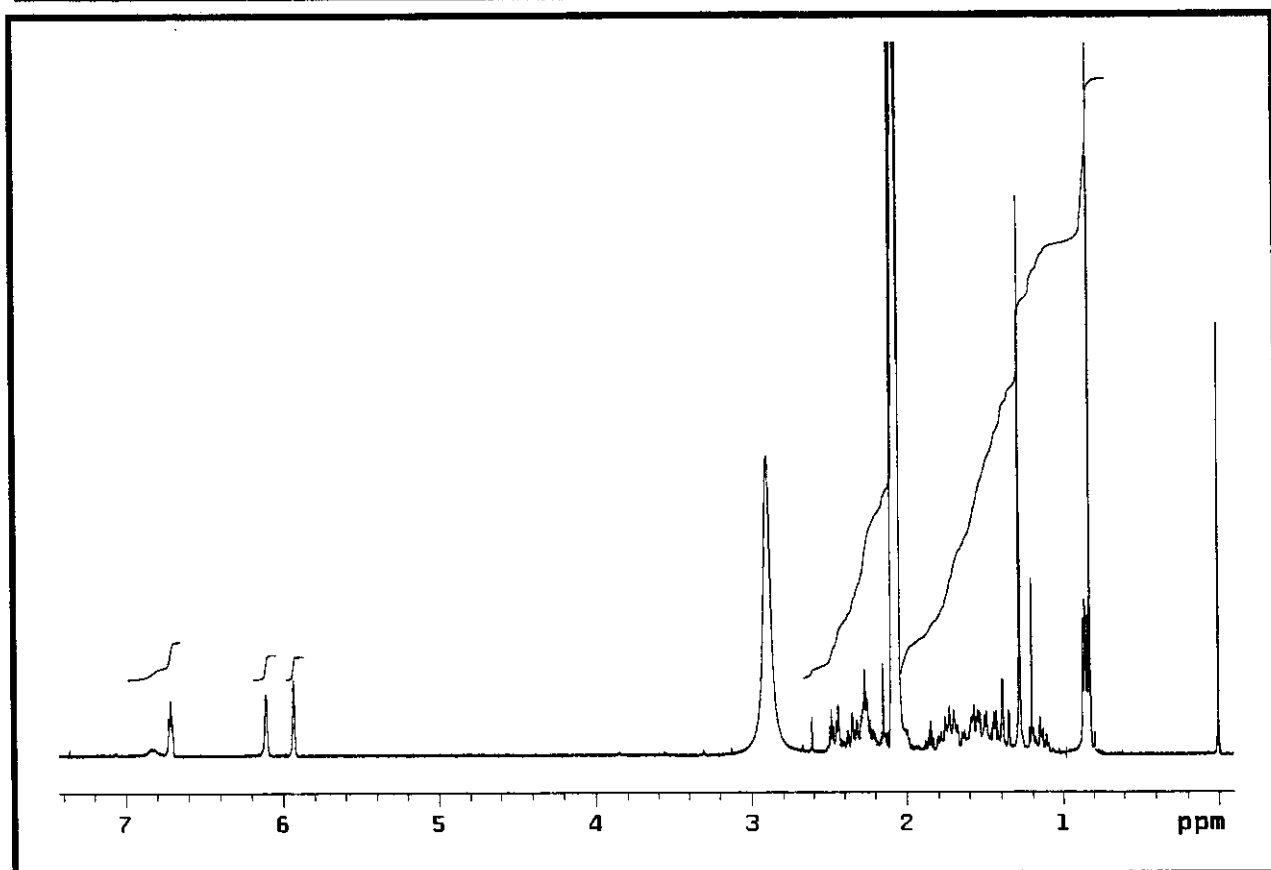
E 27 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR) do produto natural 17a.



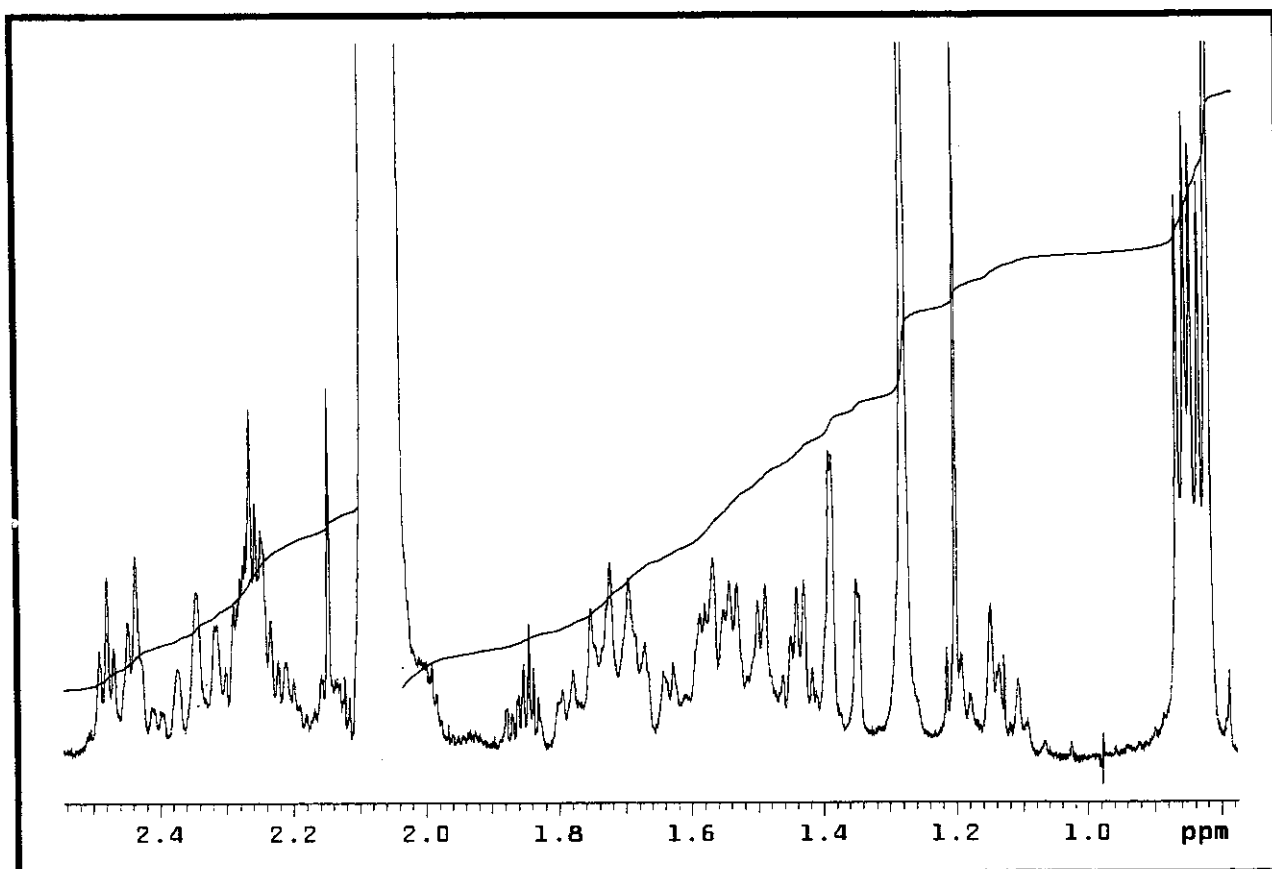
E 28 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR L. D.) do produto natural 17a.



E 29 – Espectro de massas (70 eV) do produto natural 17a.

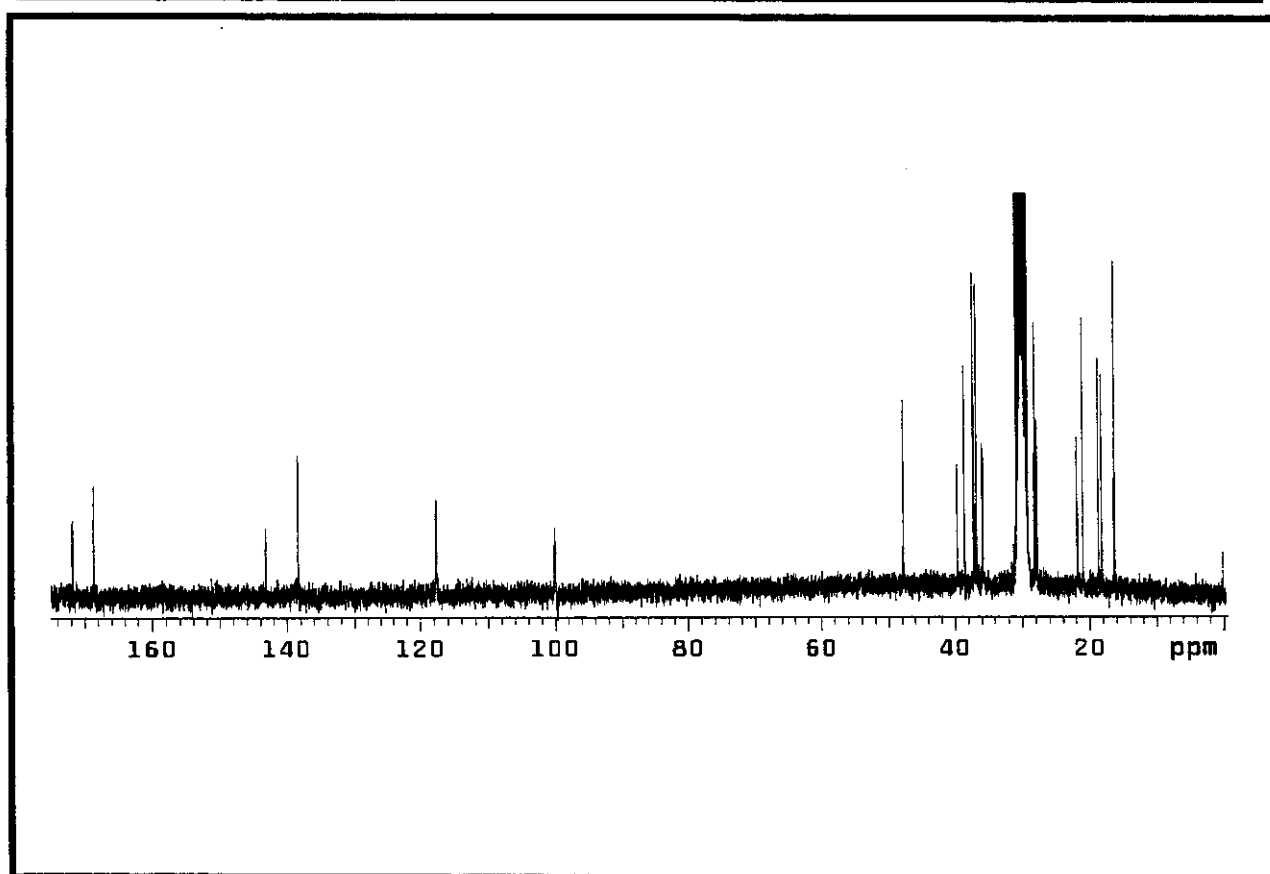


E 30 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}/\text{TMS}$) do produto natural 18.

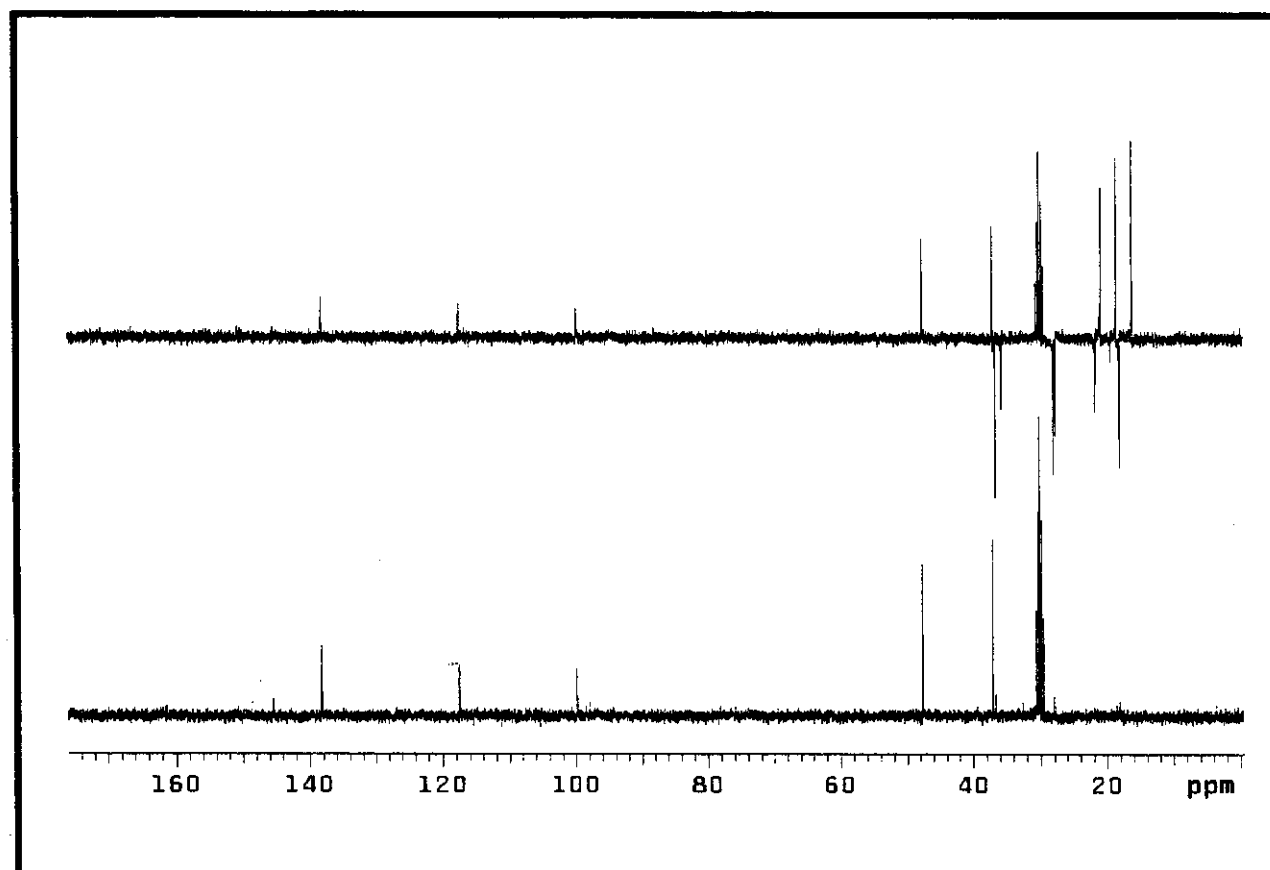


E 30a – Expansão do espectro E 33 do produto natural 18.

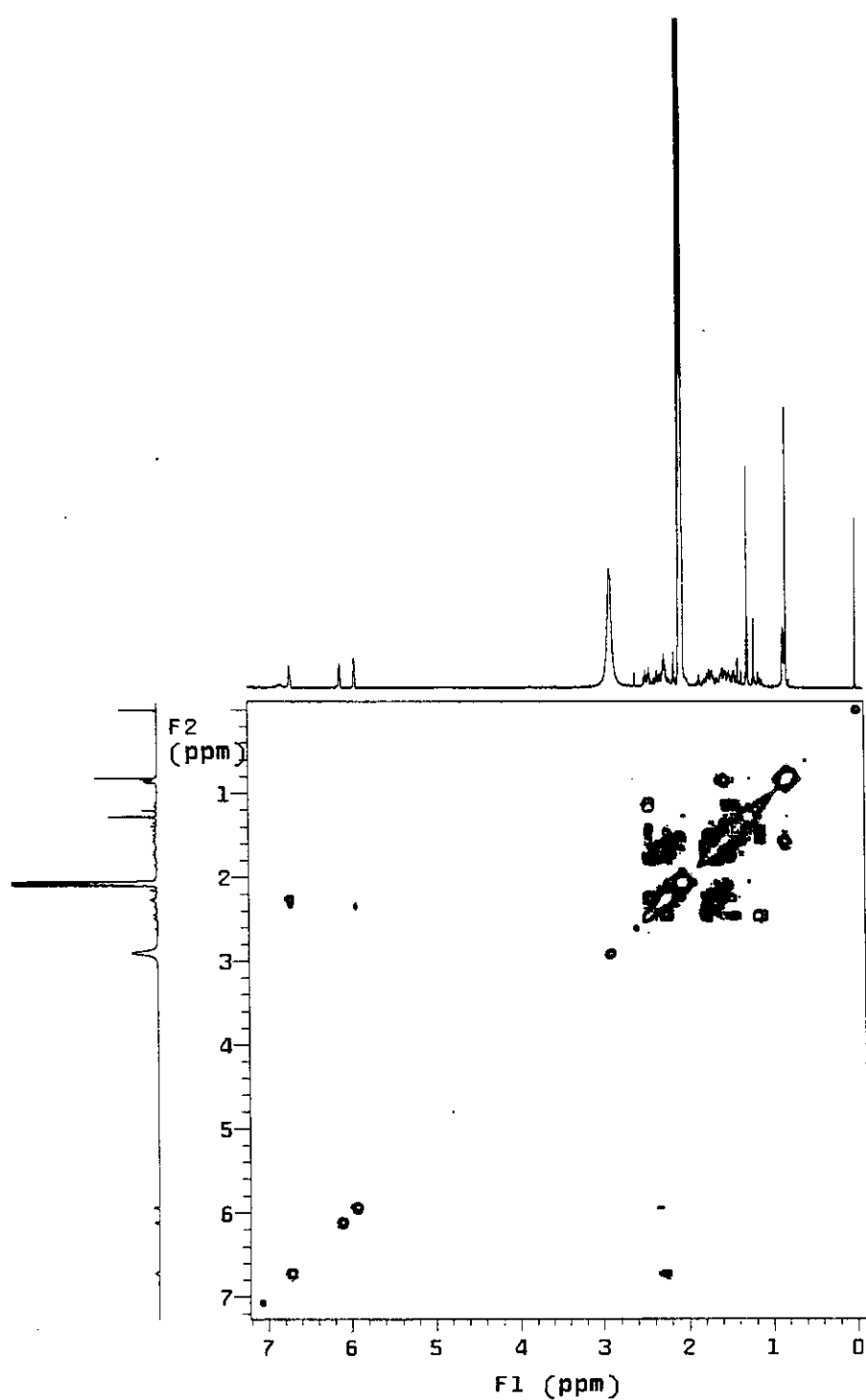
Espectros



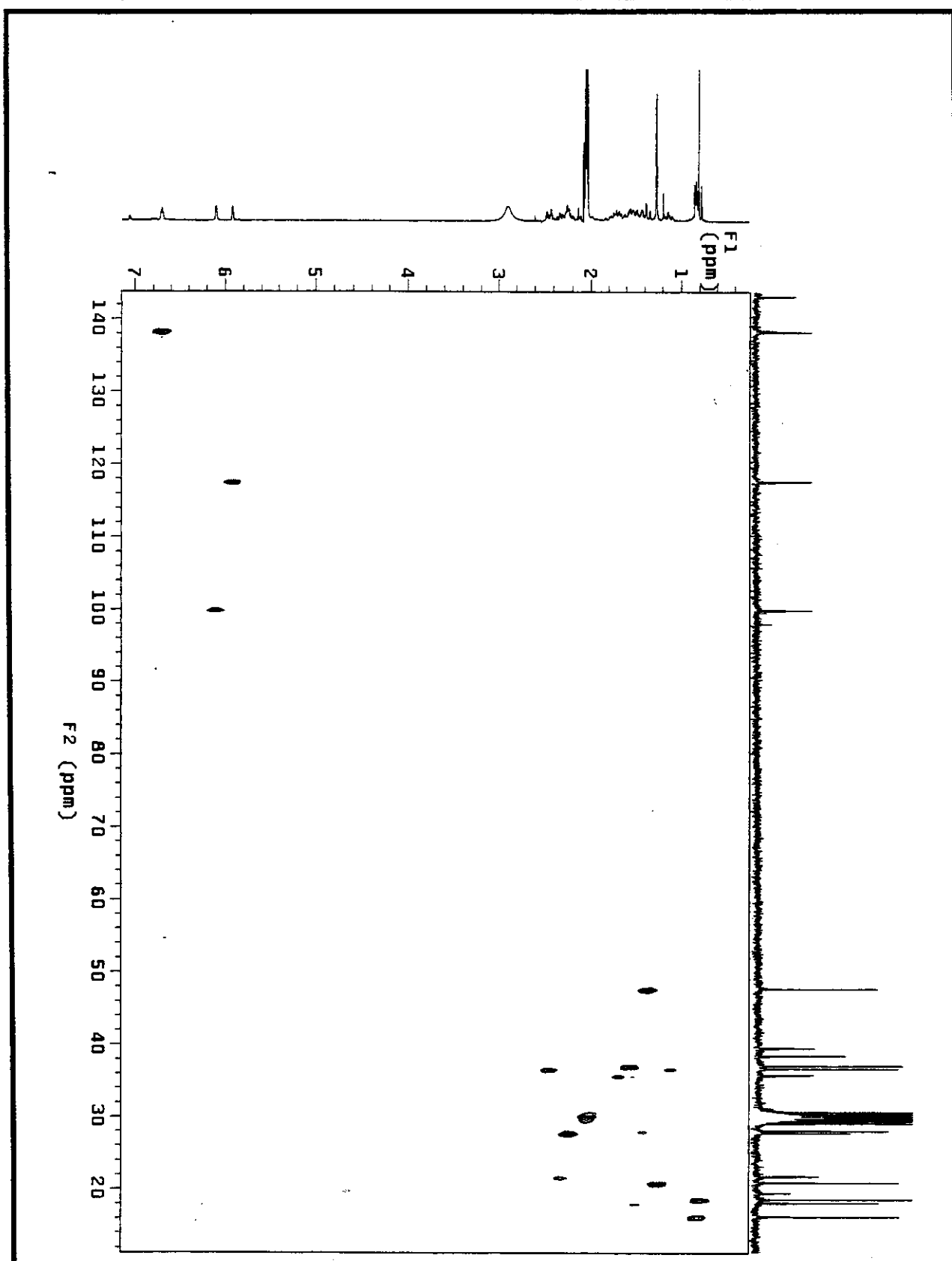
E 31 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}/\text{TMS}$) do produto natural 18.



E 32 – Espectro DEPT (135° e 90°) do produto natural 18

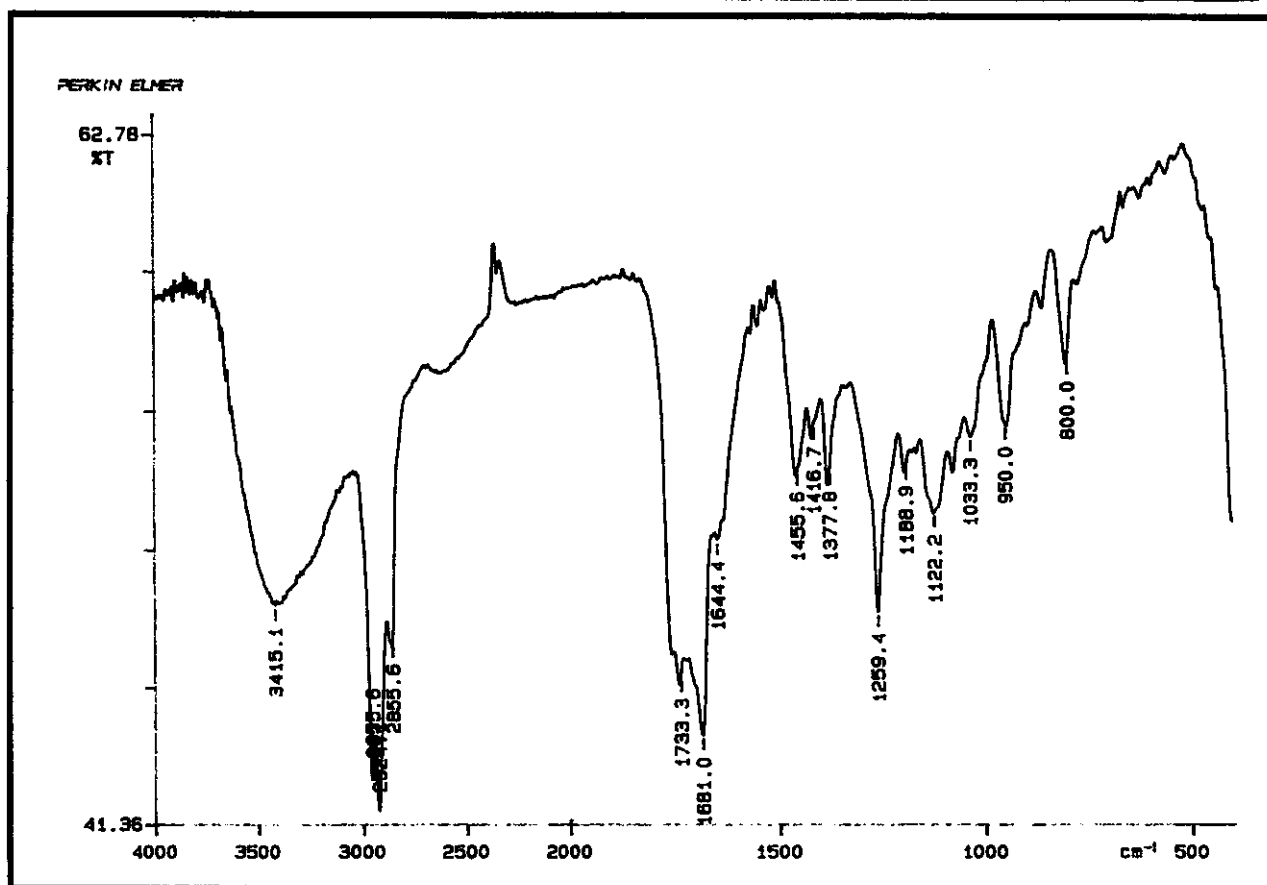


E 33 – Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear (^1H , ^1H – COSY) do produto natural 18.

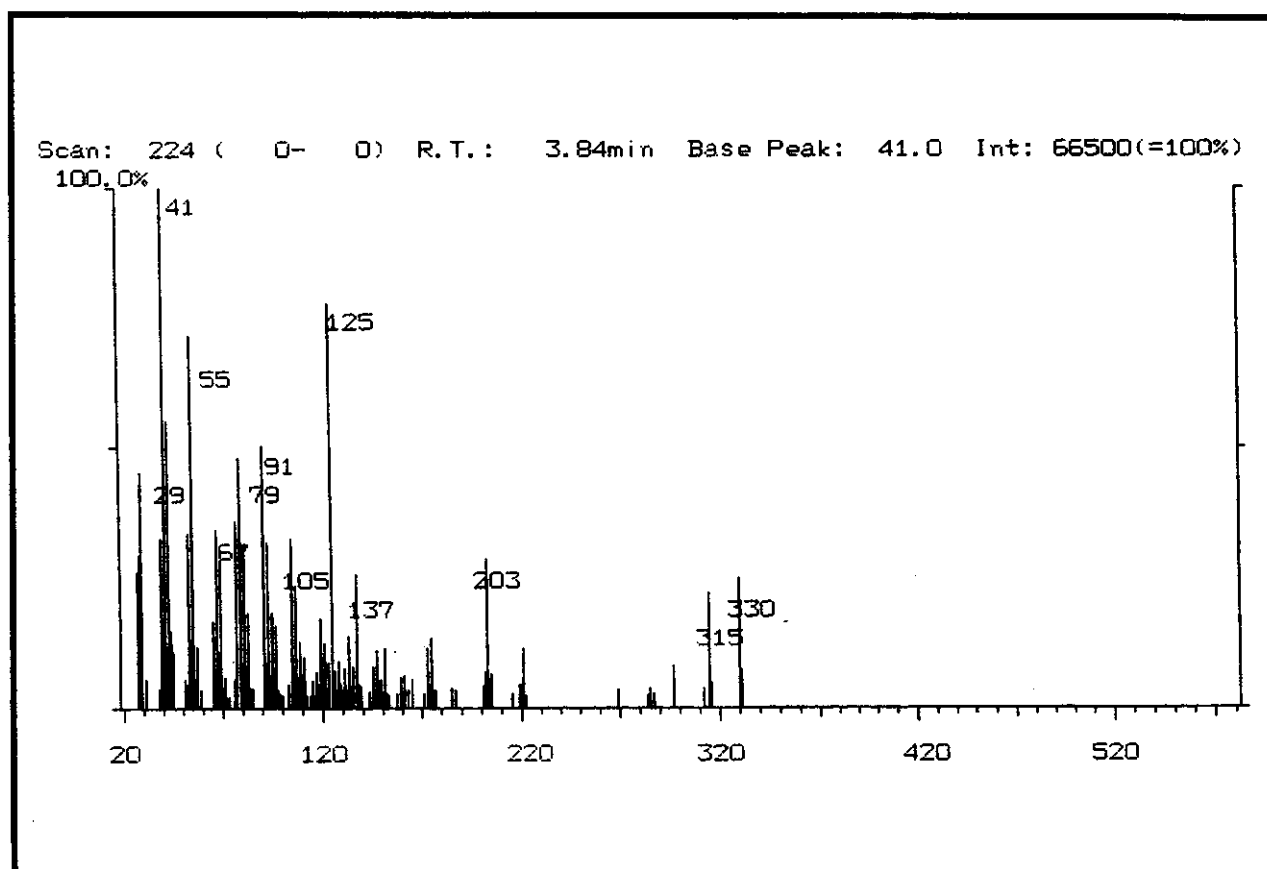


E 34 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR) do produto natural 18.

Espectros

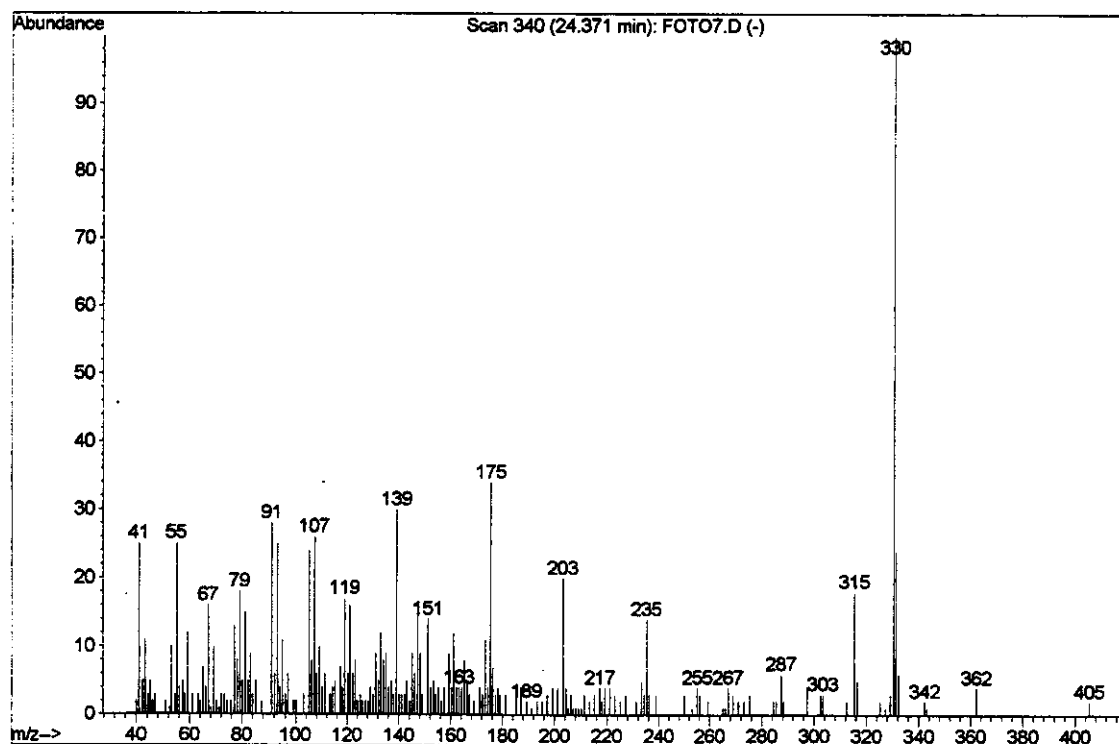


E 35 – Espectro de IV (filme) do produto natural 18.

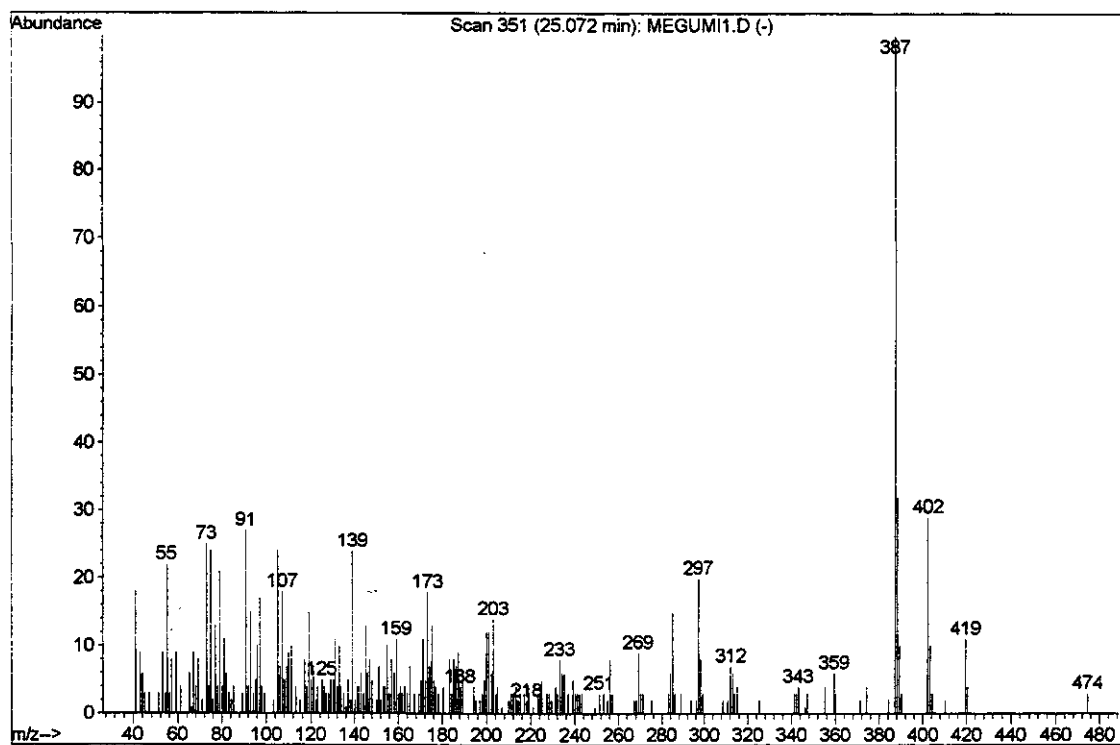


E 36 – Espectro de massas (70eV) do produto natural 18.

Espectros

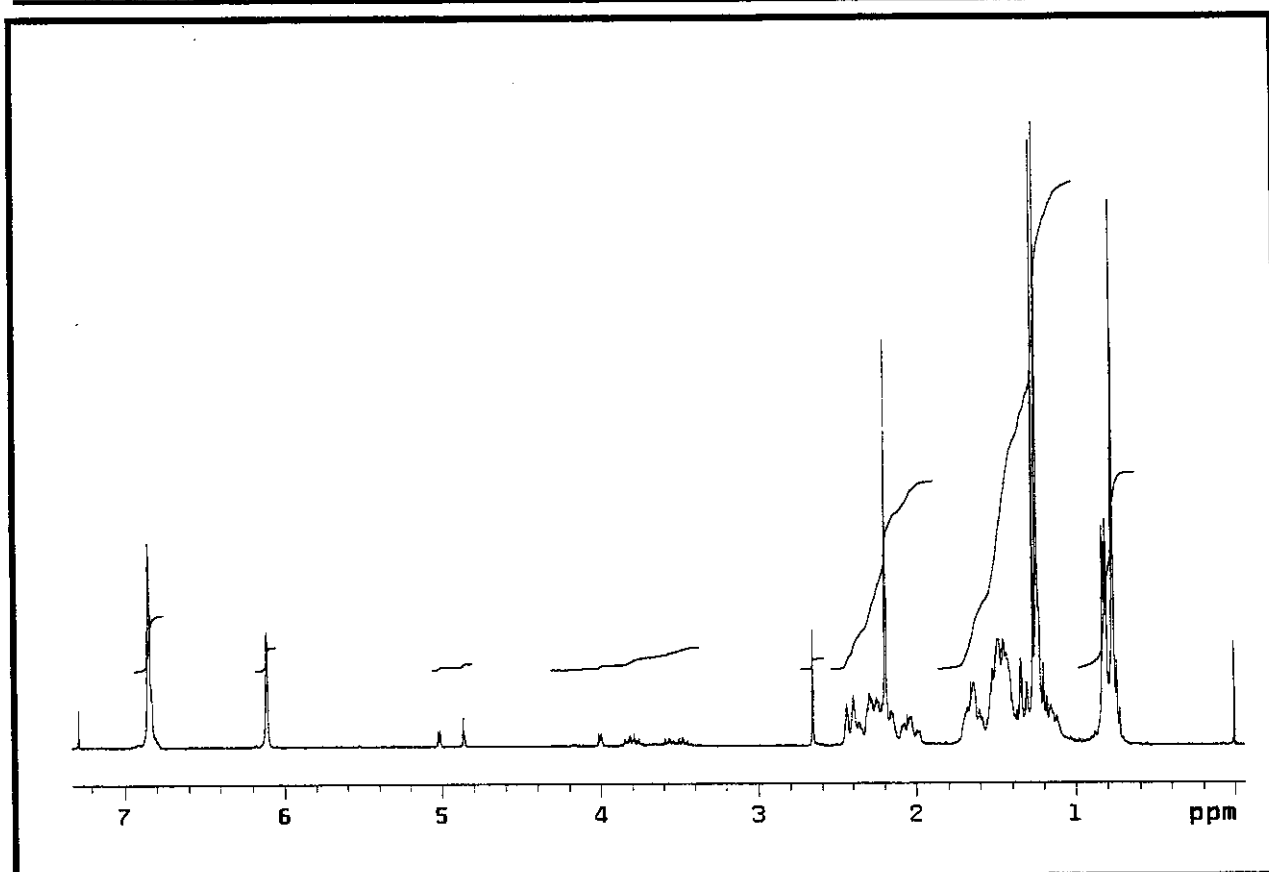


E 36.1 – Espectro de massas (70eV) do produto natural 18a.

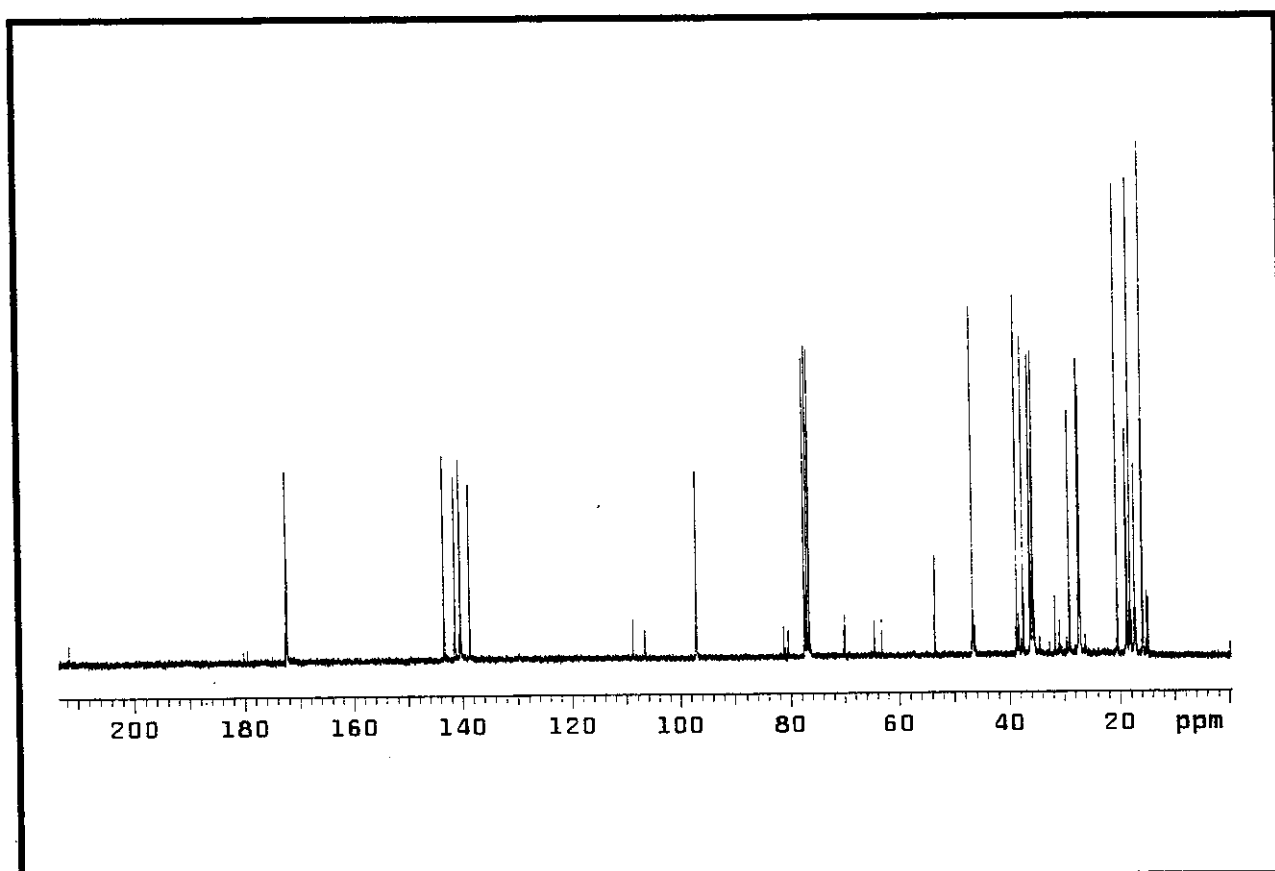


E 36.2 – Espectro de massas (70eV) do produto natural 18b.

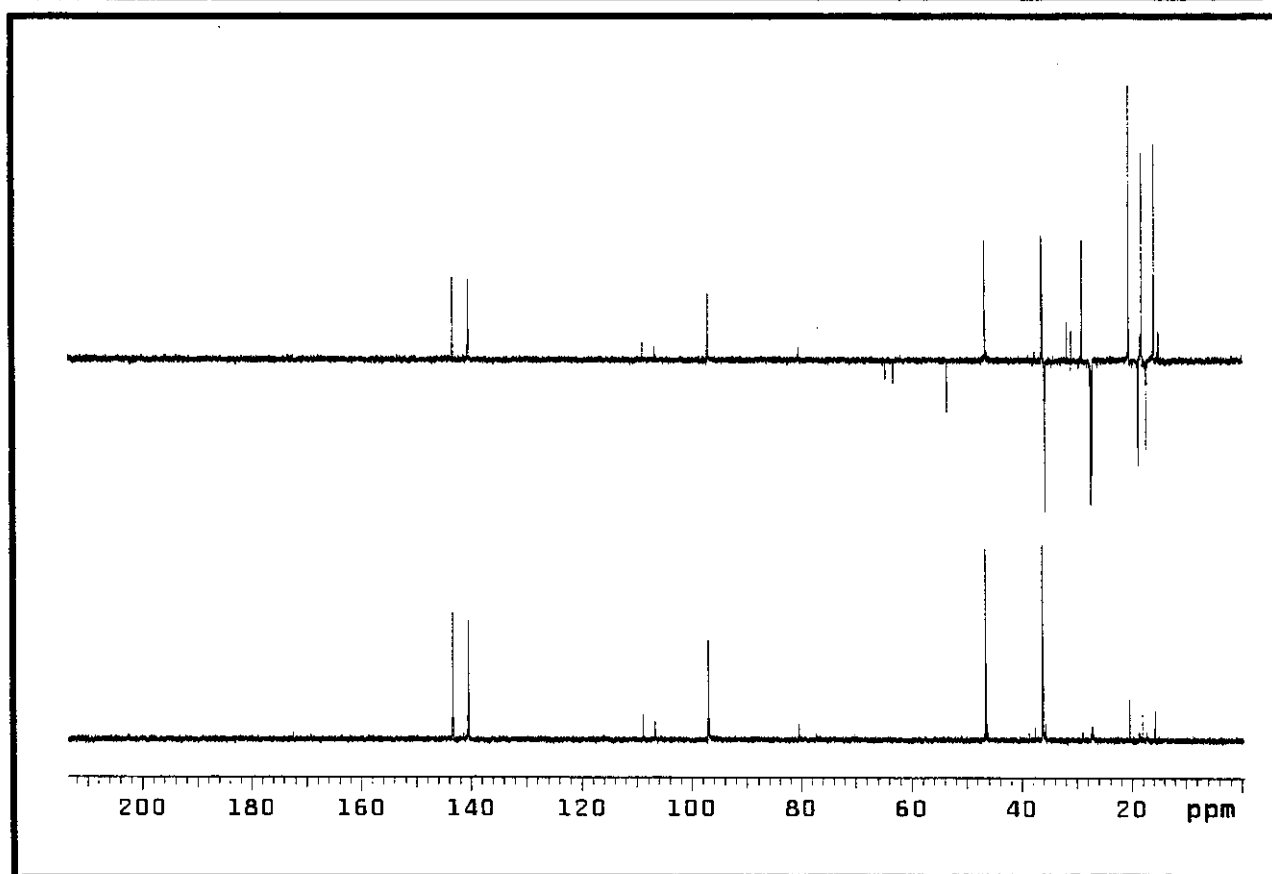
Espectros



E 37 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 19.

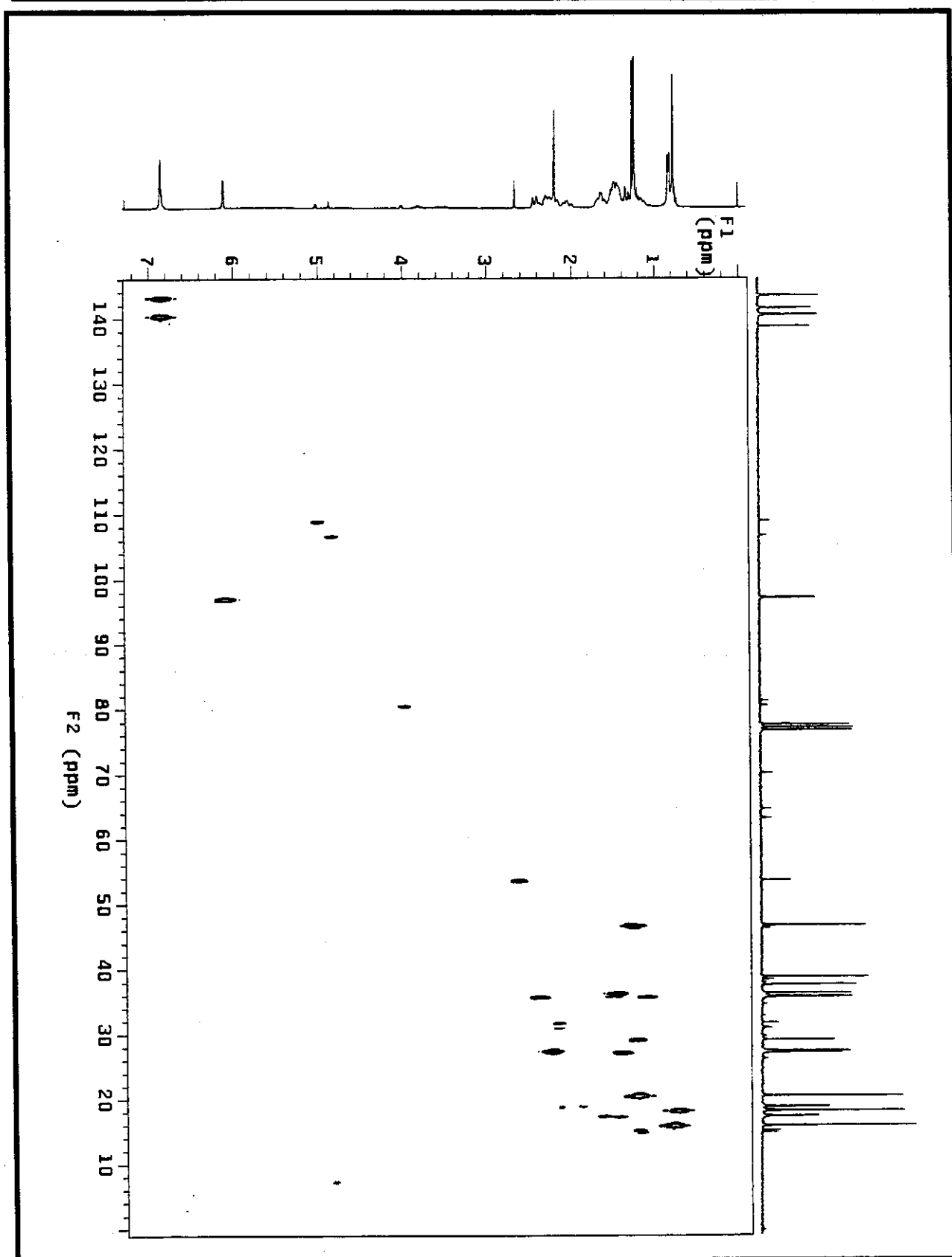


E 38 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 19.



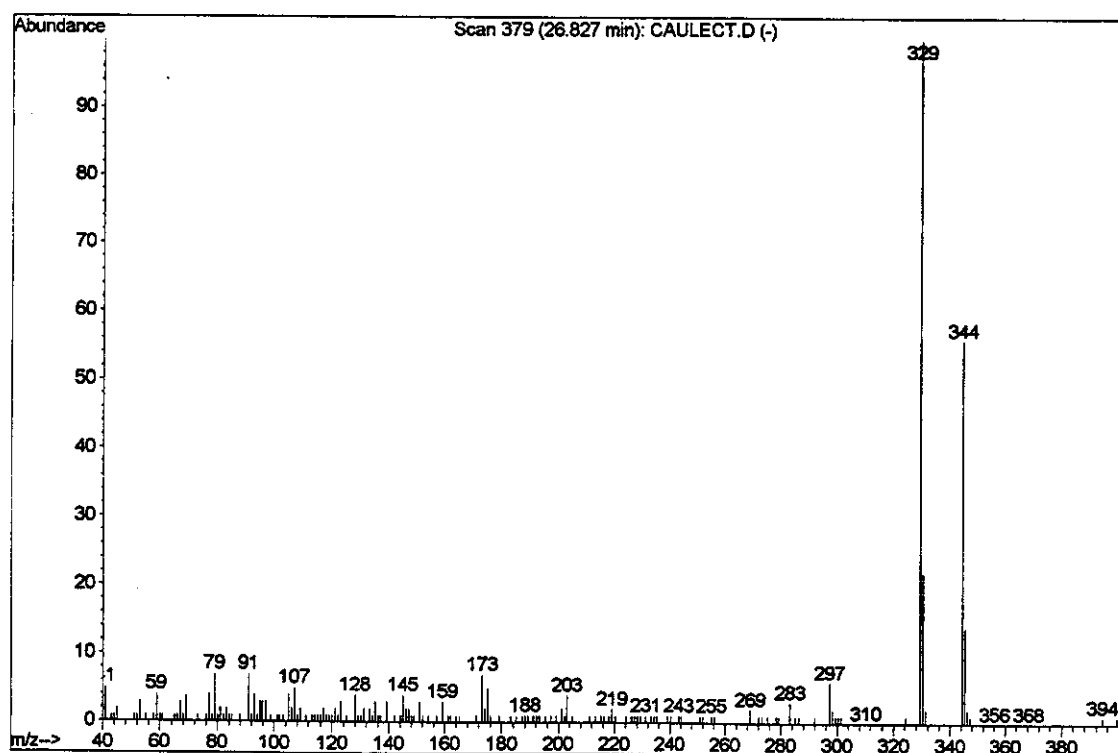
E 39 – Espectro DEPT (135° e 90°) do produto natural 19.

- 237 -

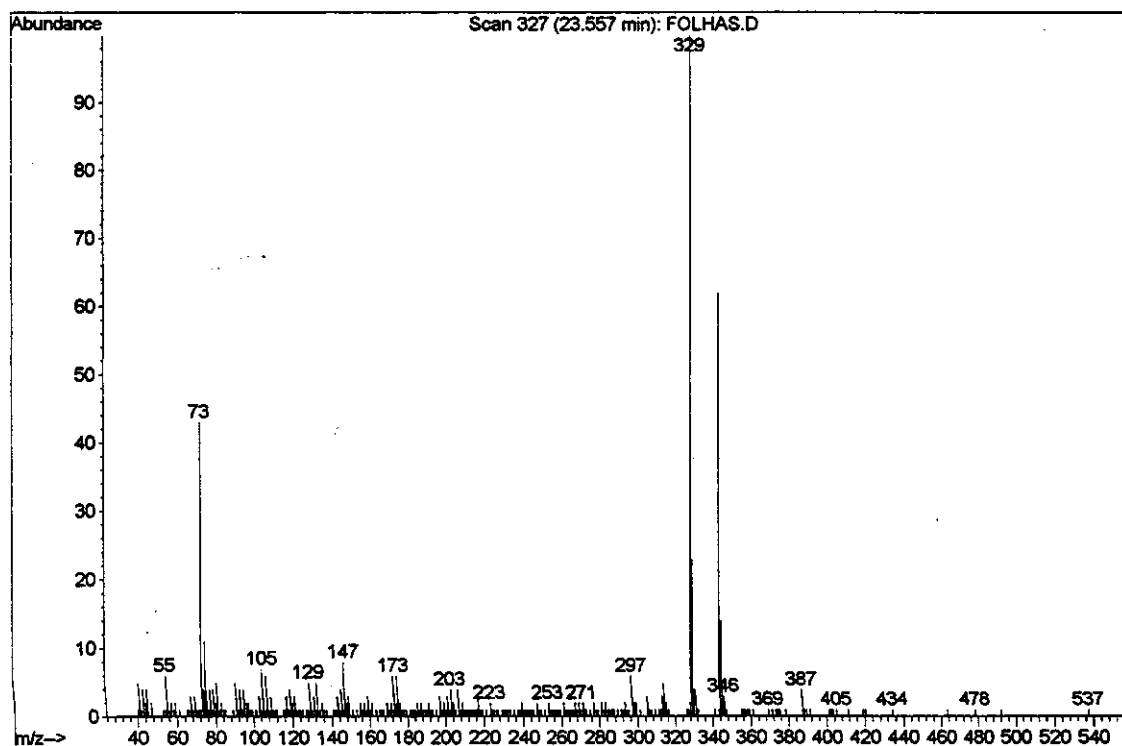


E 41 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR) do produto natural 19.

Espectros

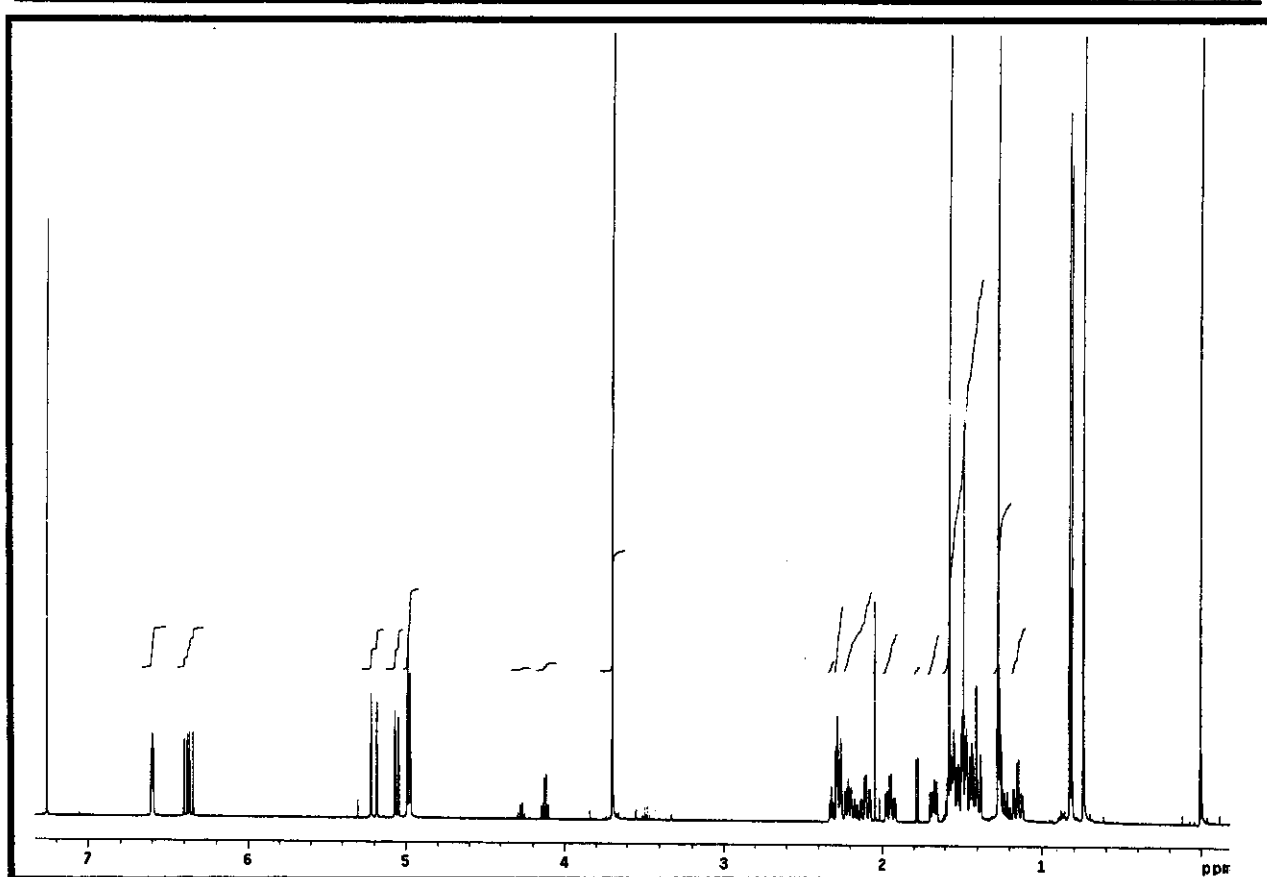


E 42– Espectro de massas (70 eV) do produto natural 19a.

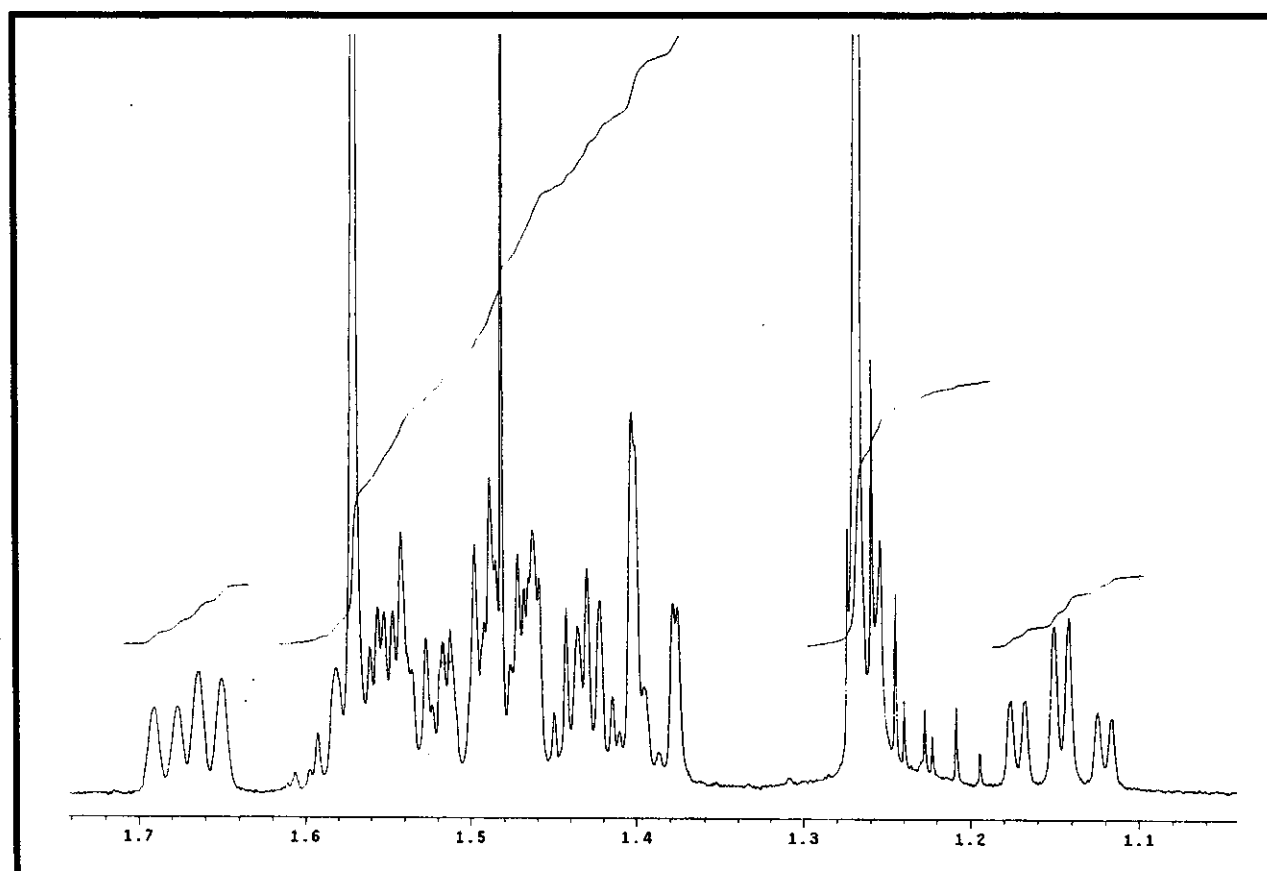


E 42.1– Espectro de massas (70 eV) do produto natural 19b.

Espectros

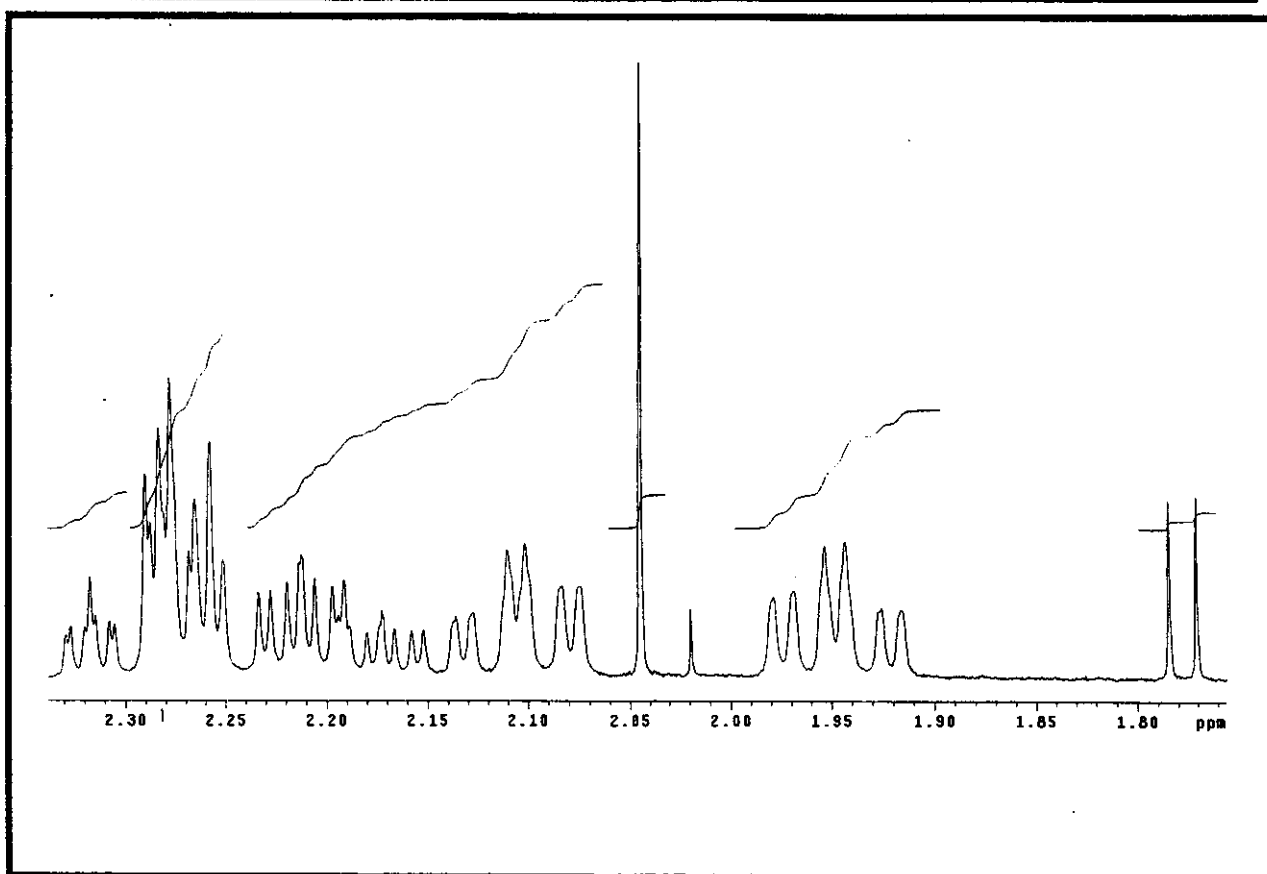


E 43 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 20a.

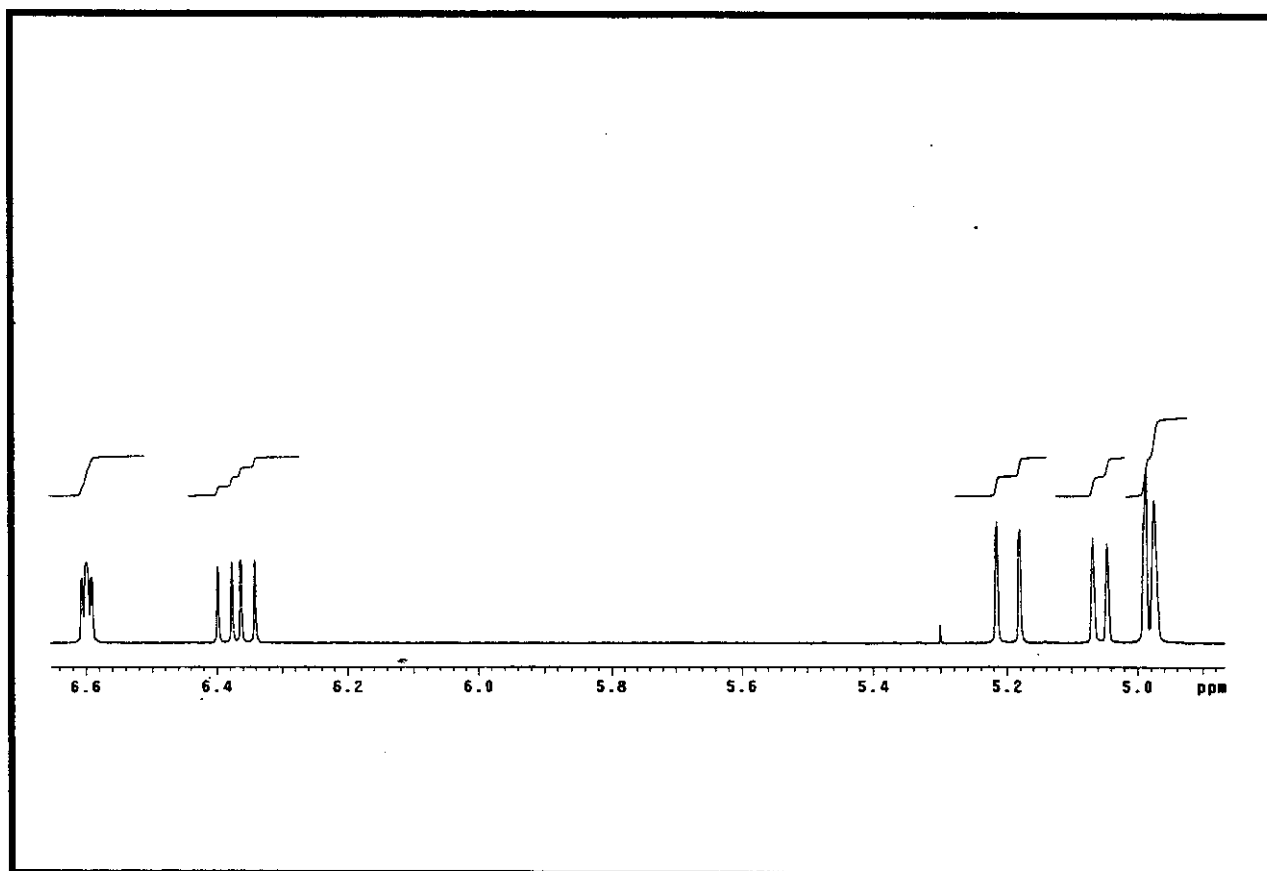


E 43a - Expansão do espectro E 43 do produto natural 20a.

Espectros

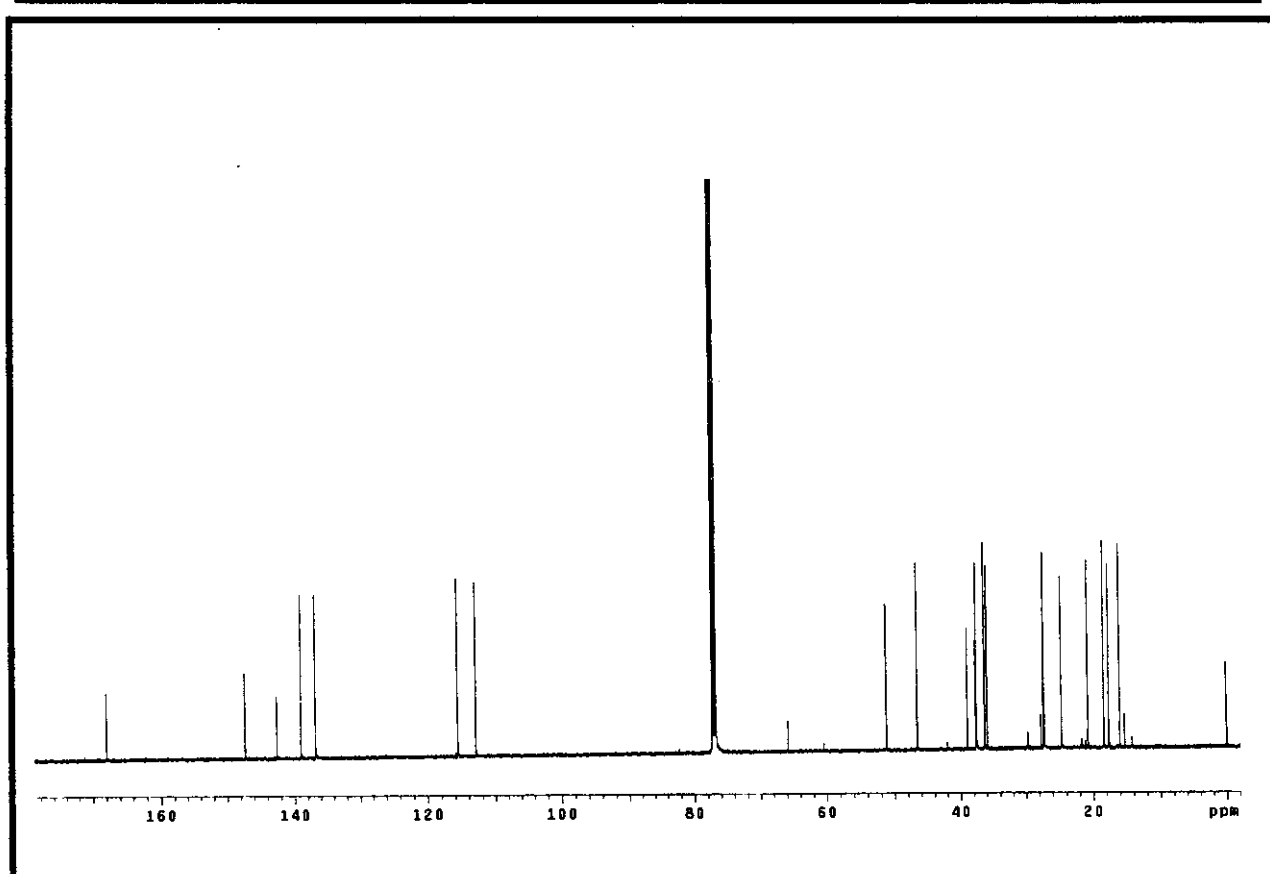


E 43b – Expansão do espectro E 43 do produto natural 20a.

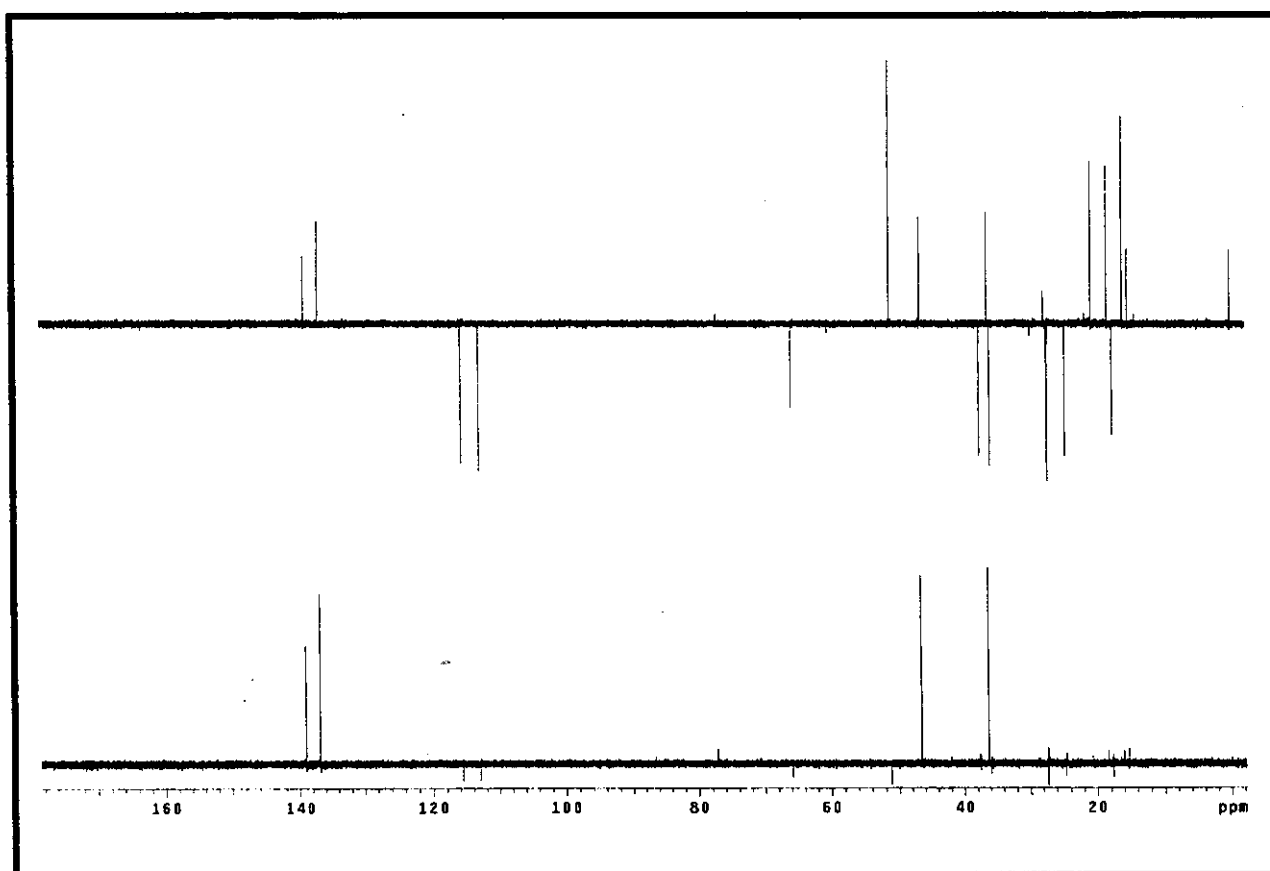


E 43c – Expansão do espectro E 43 do produto natural 20a.

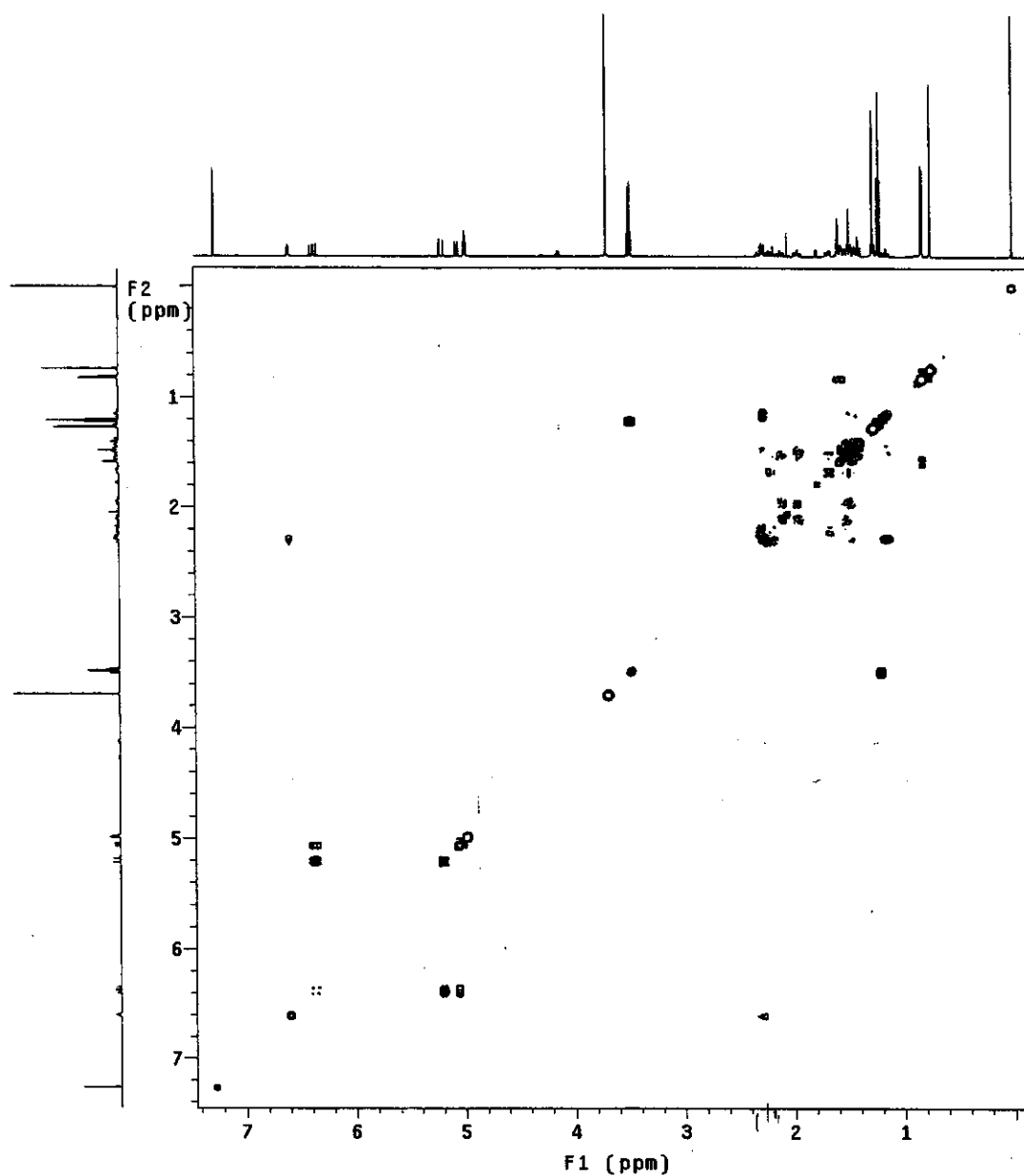
Espectros



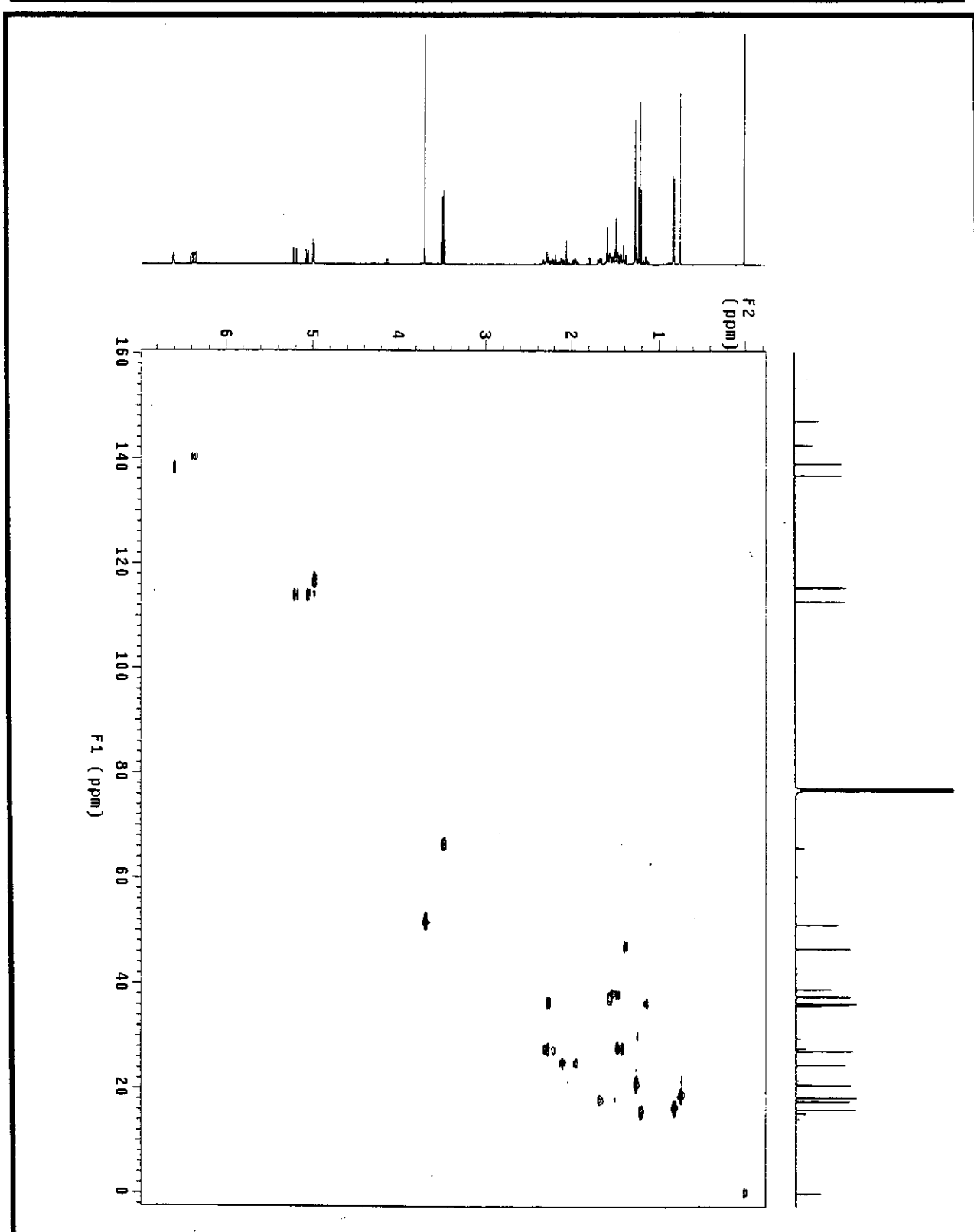
E 44 – Espectro de RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 20a.



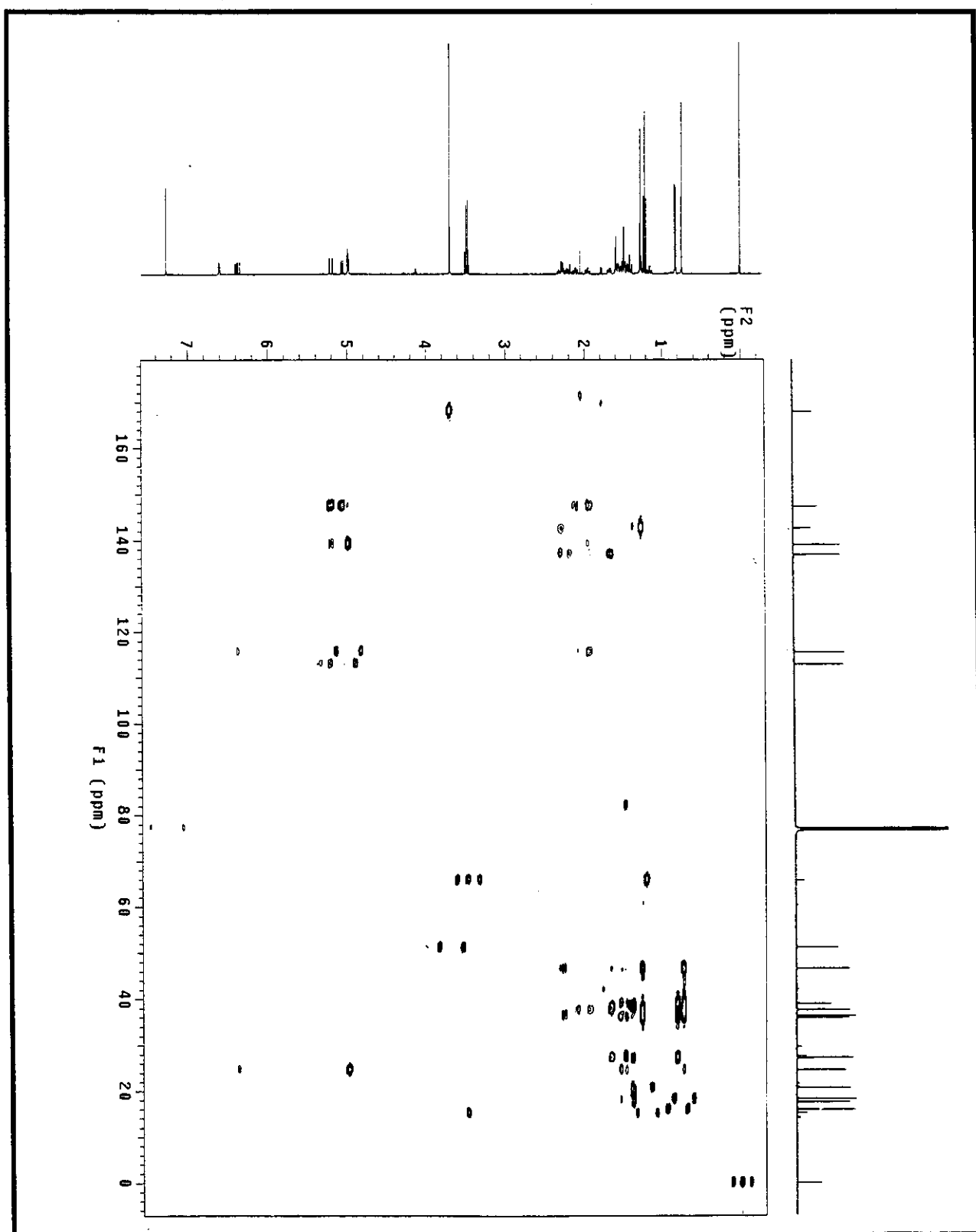
E 45 – Espectro DEPT (135° E 90°) do produto natural 20a.



E 46 – Espectro de RMN 2D de correlações homonucleares (^1H , ^1H – COSY) do produto natural 20a.

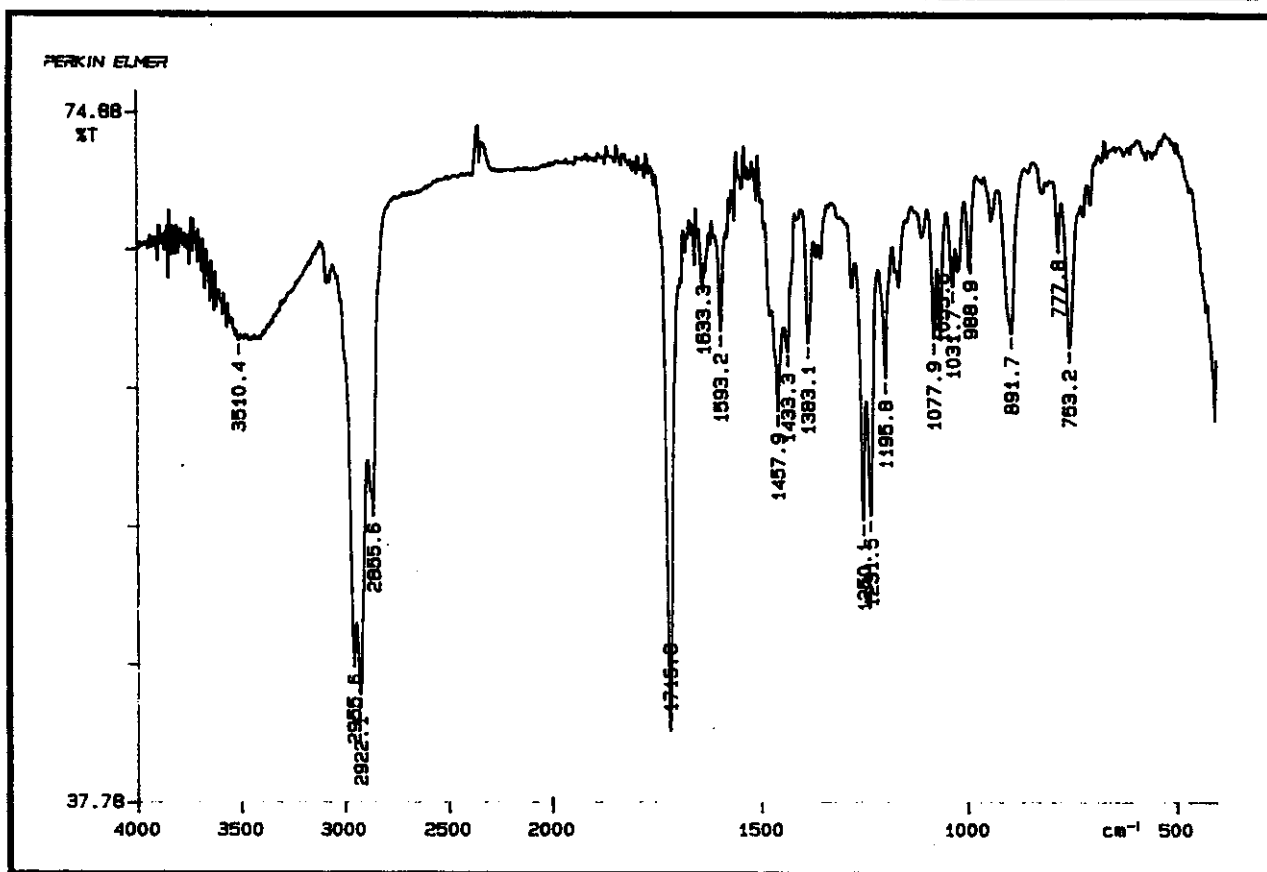


E 47 - Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HSQC) do produto natural 20a.

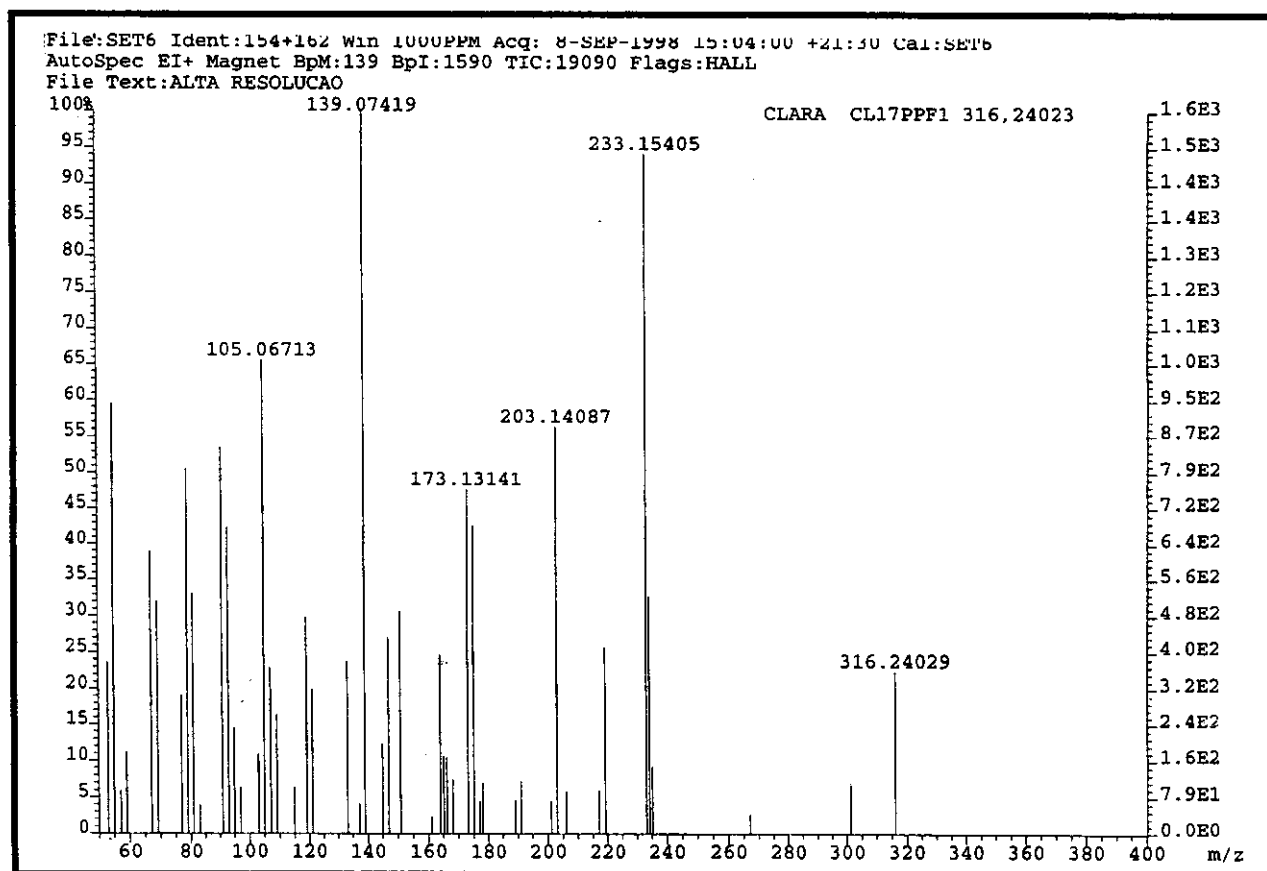


E 48 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HMBC) do produto natural 20a.

Espectros

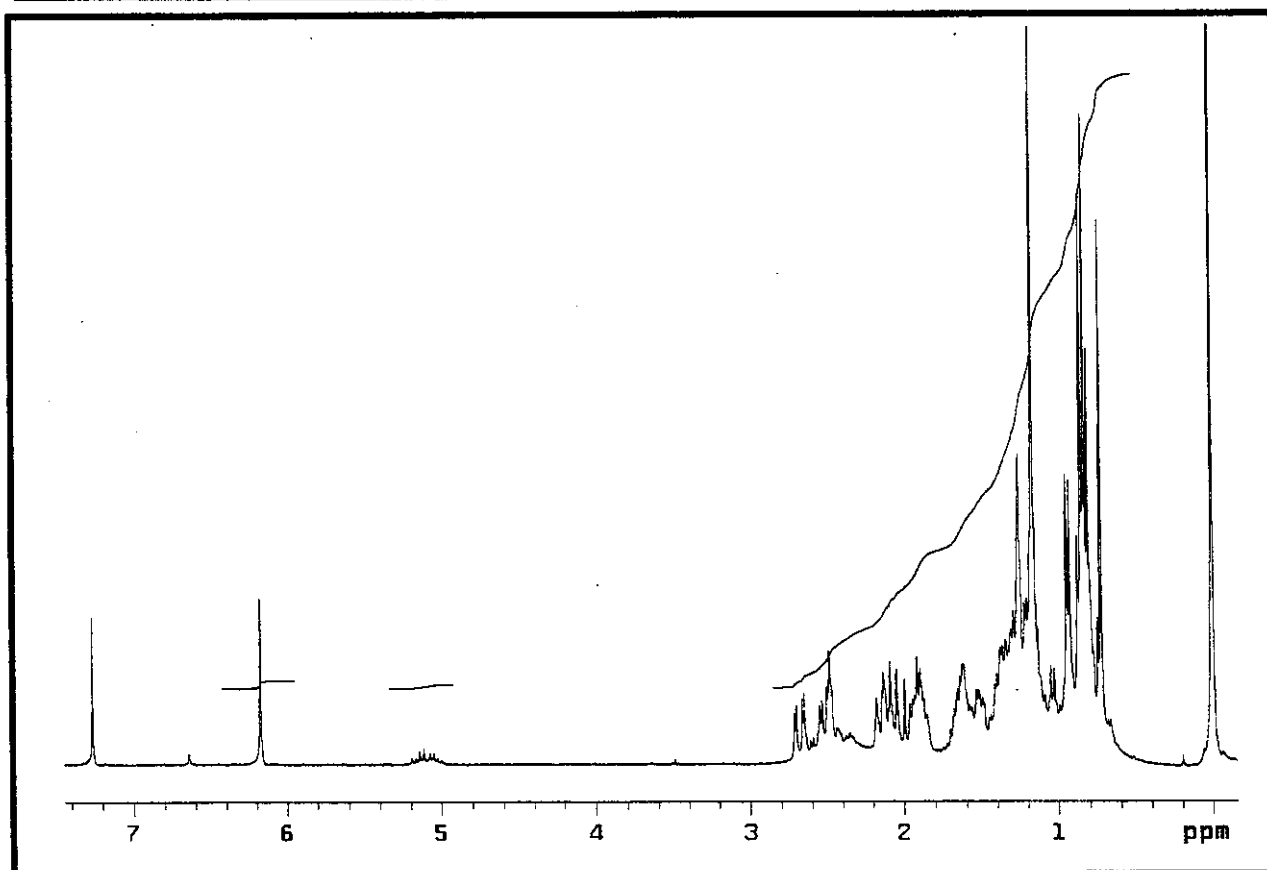


E 49 – Espectro de IV(filme) do produto natural 20a.

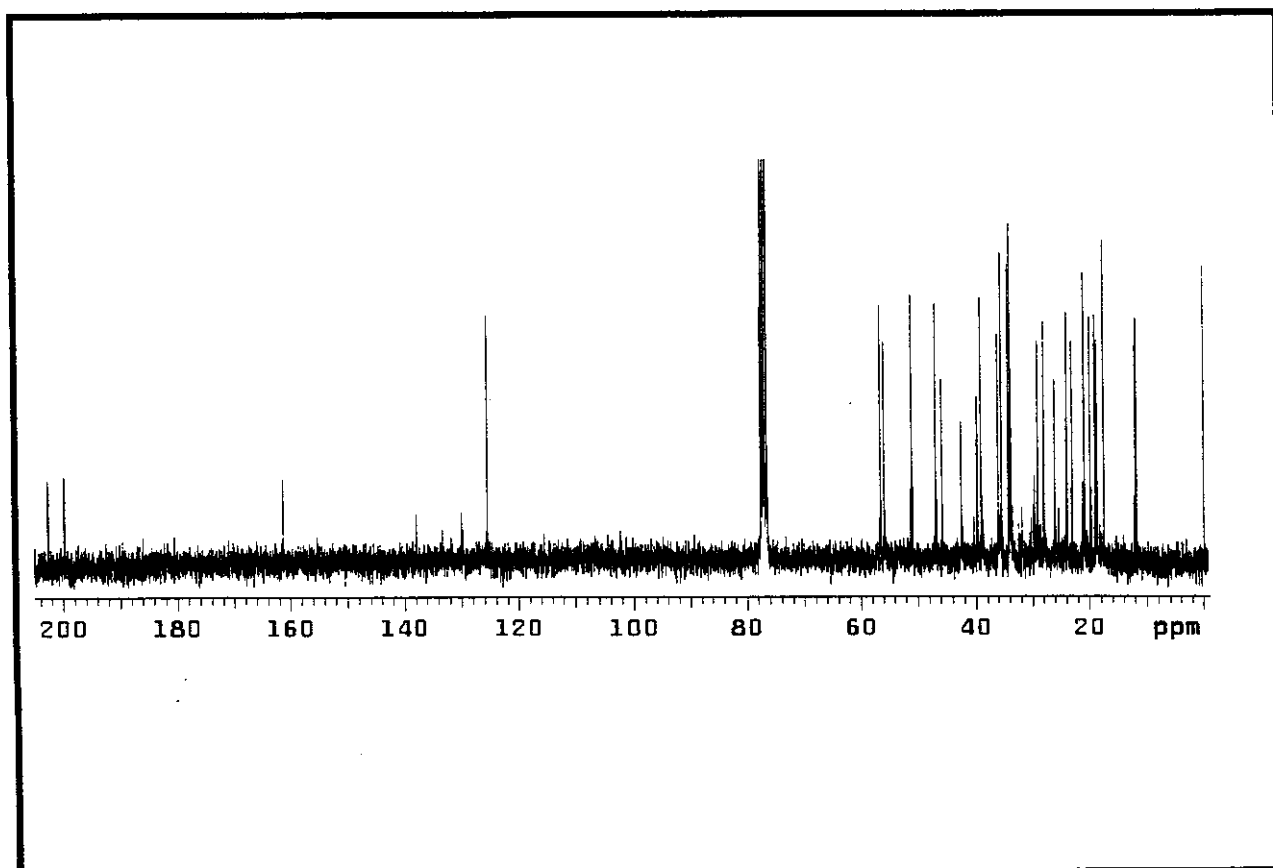


E 50 – Espectro de massas (70 eV) do produto natural 20a.

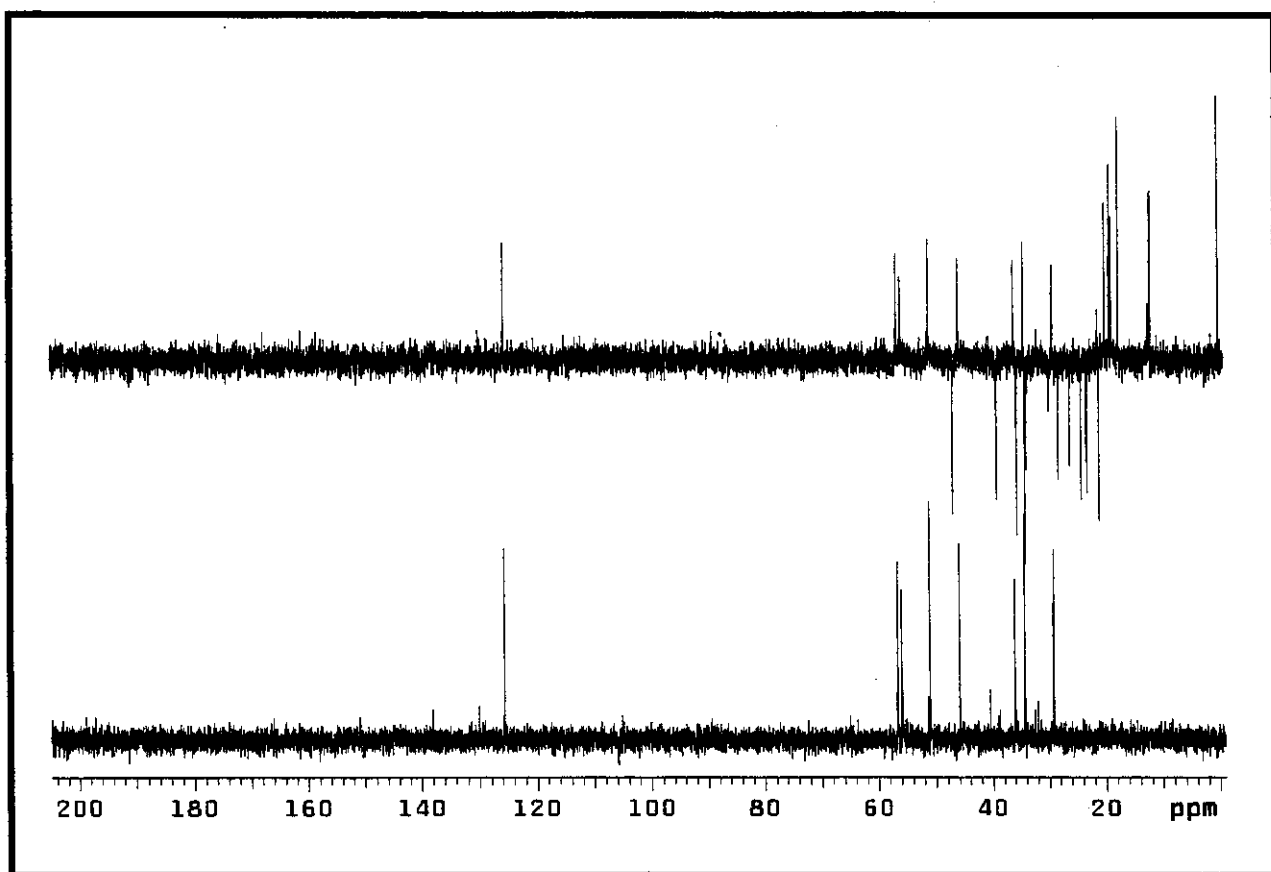
Espectros



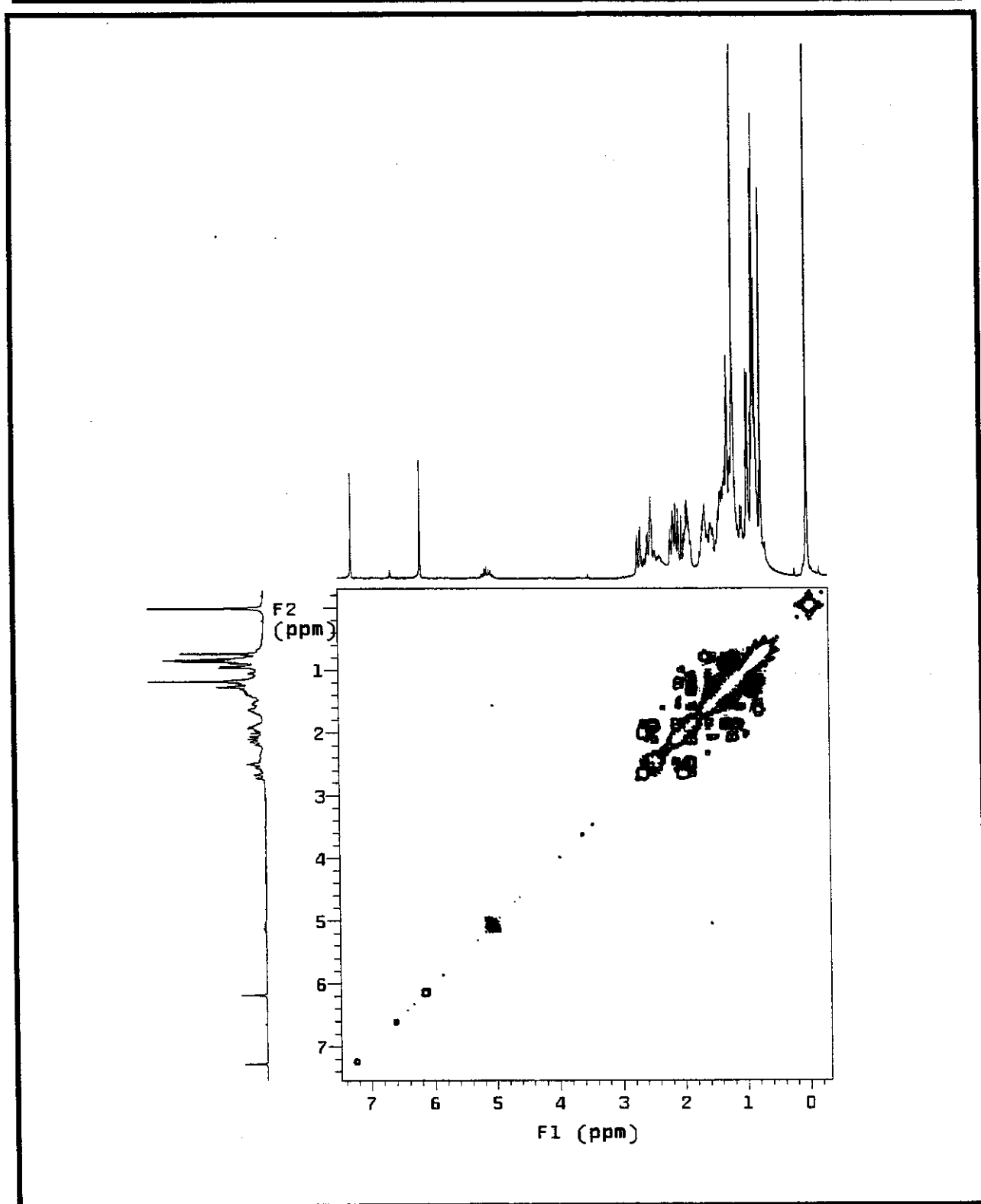
E 51 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, MeOD/TMS) do produto natural 21.



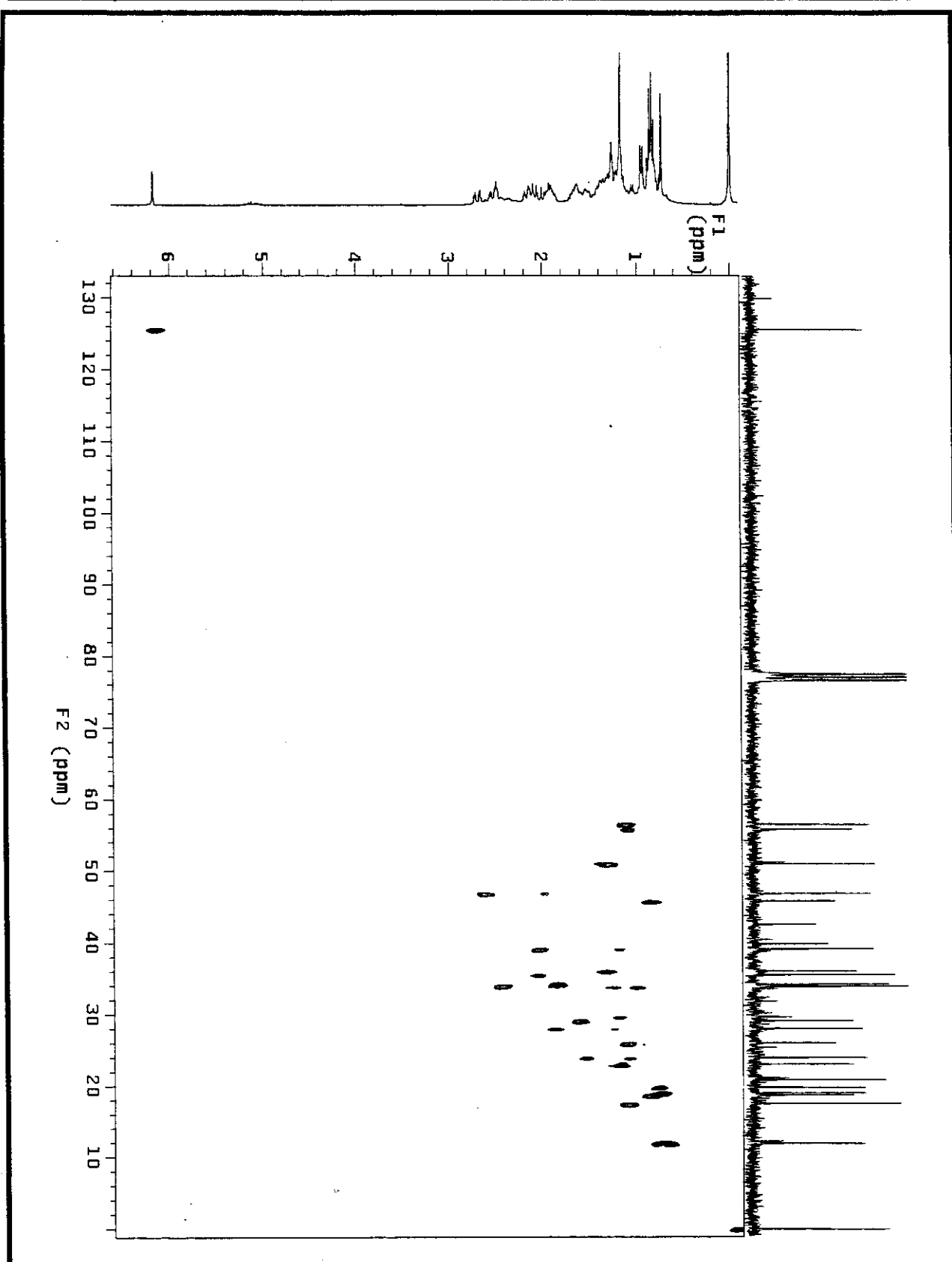
E 52 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, MeOD/TMS) do produto natural 21.



E 53 – Espectro DEPT (135° e 90°) do produto natural 21.

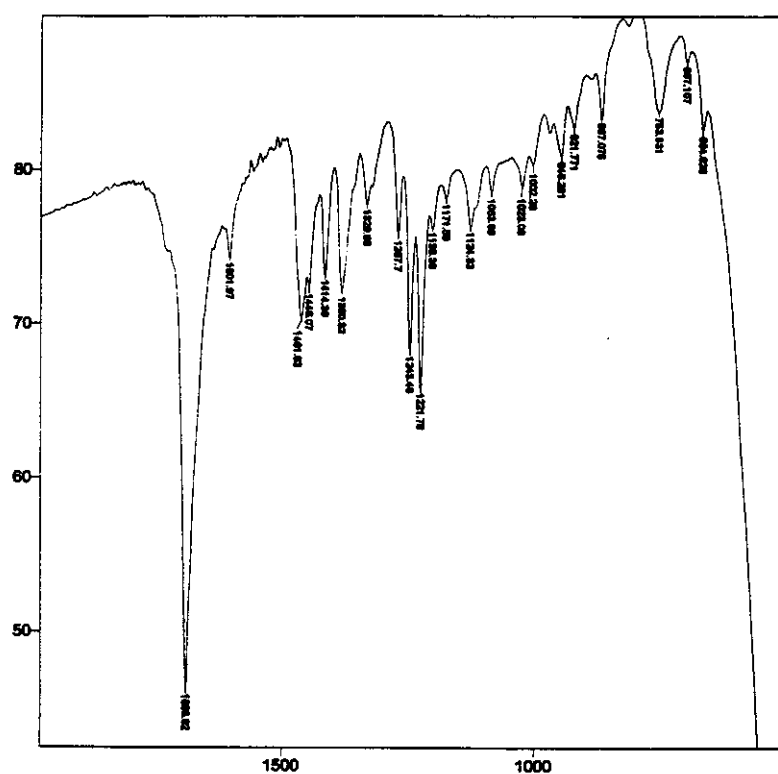


E 54 – Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear (^1H , ^1H – COSY) do produto natural 21.

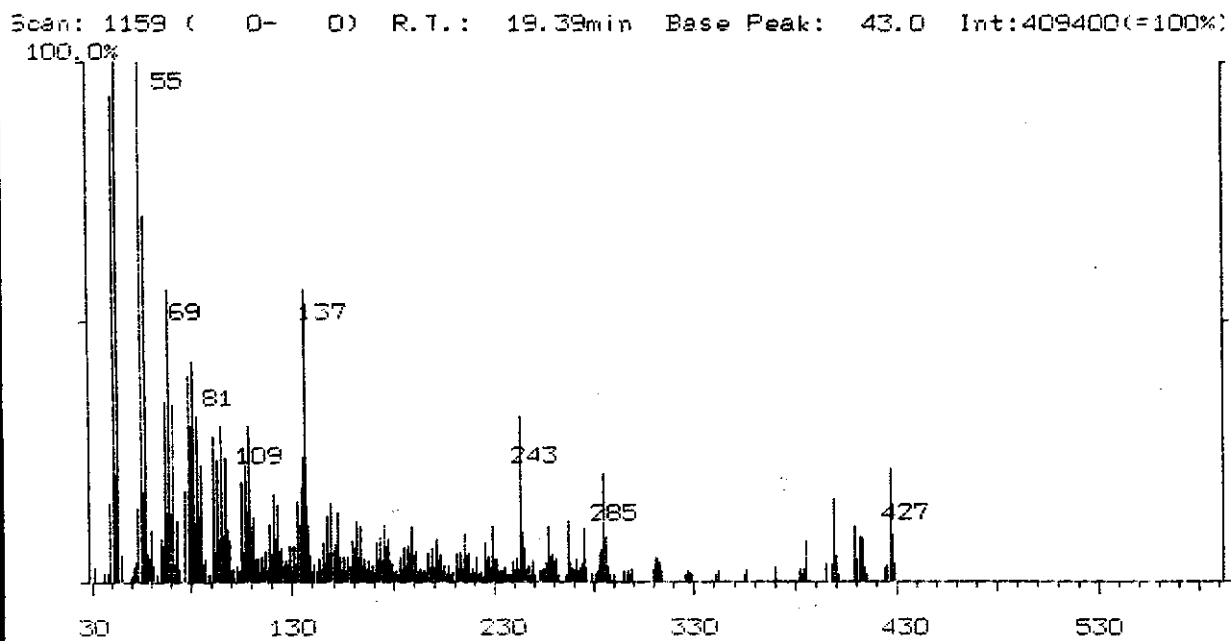


E 55 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR) do produto natural 21.

Espectros

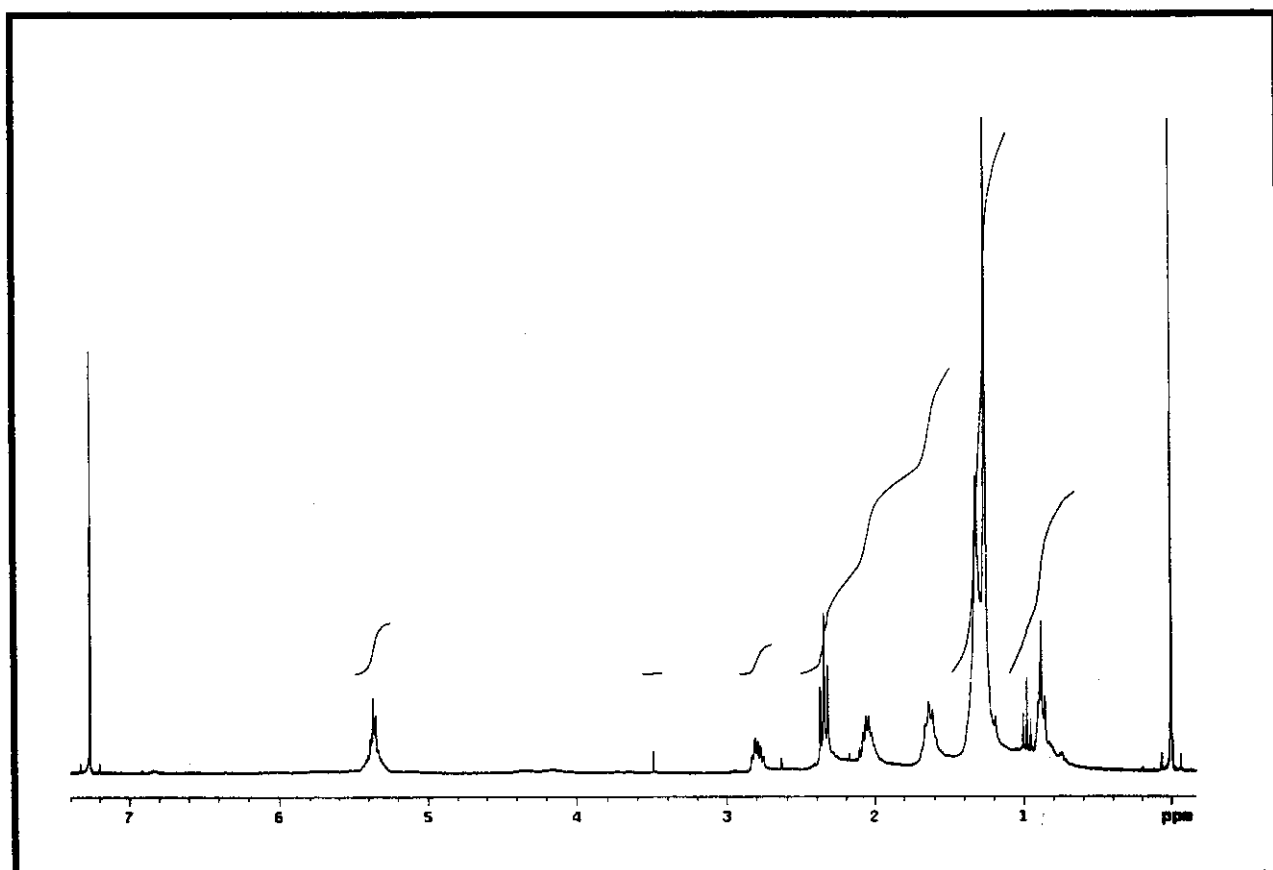


E 56 – Espectro de IV(filme) do produto natural 21.

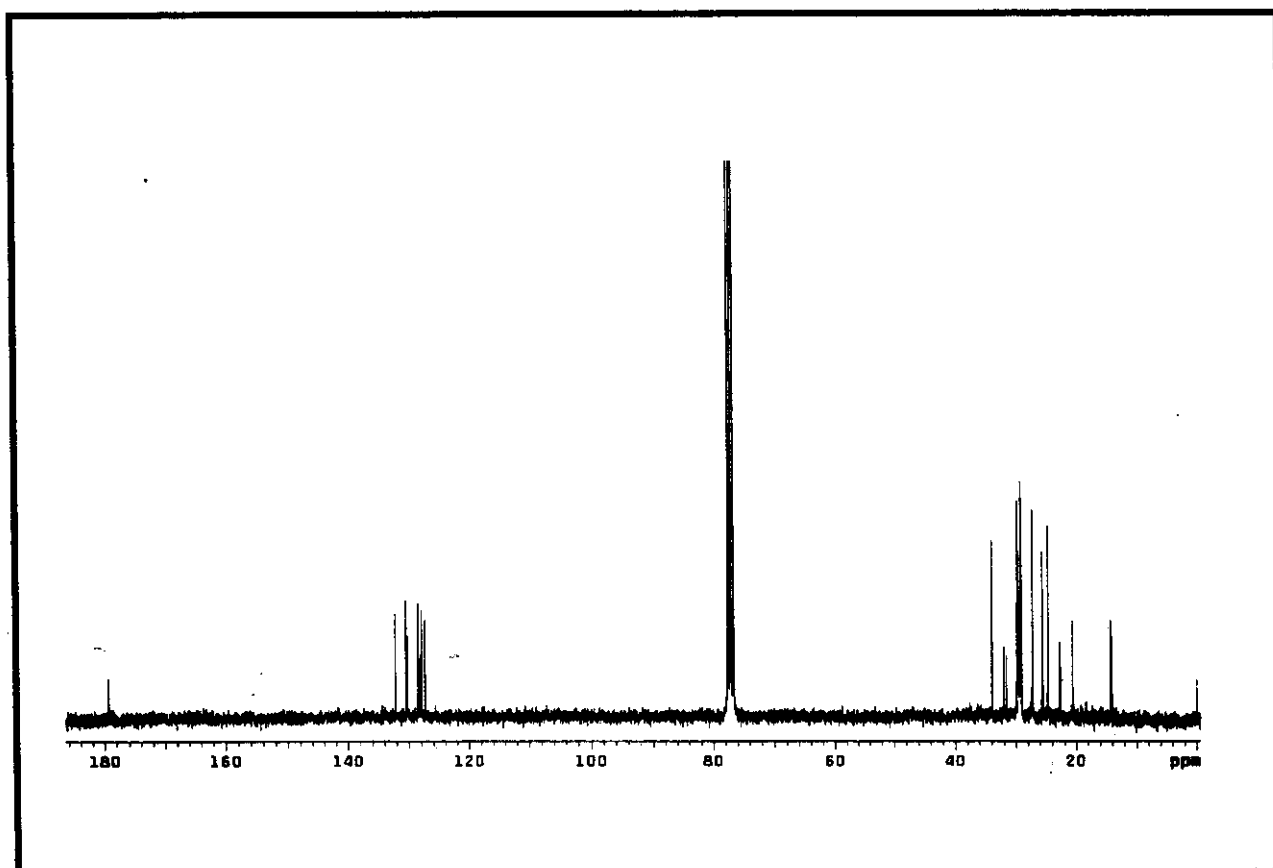


E 57 – Espectro de massas (70 eV) do produto natural 21.

Espectros

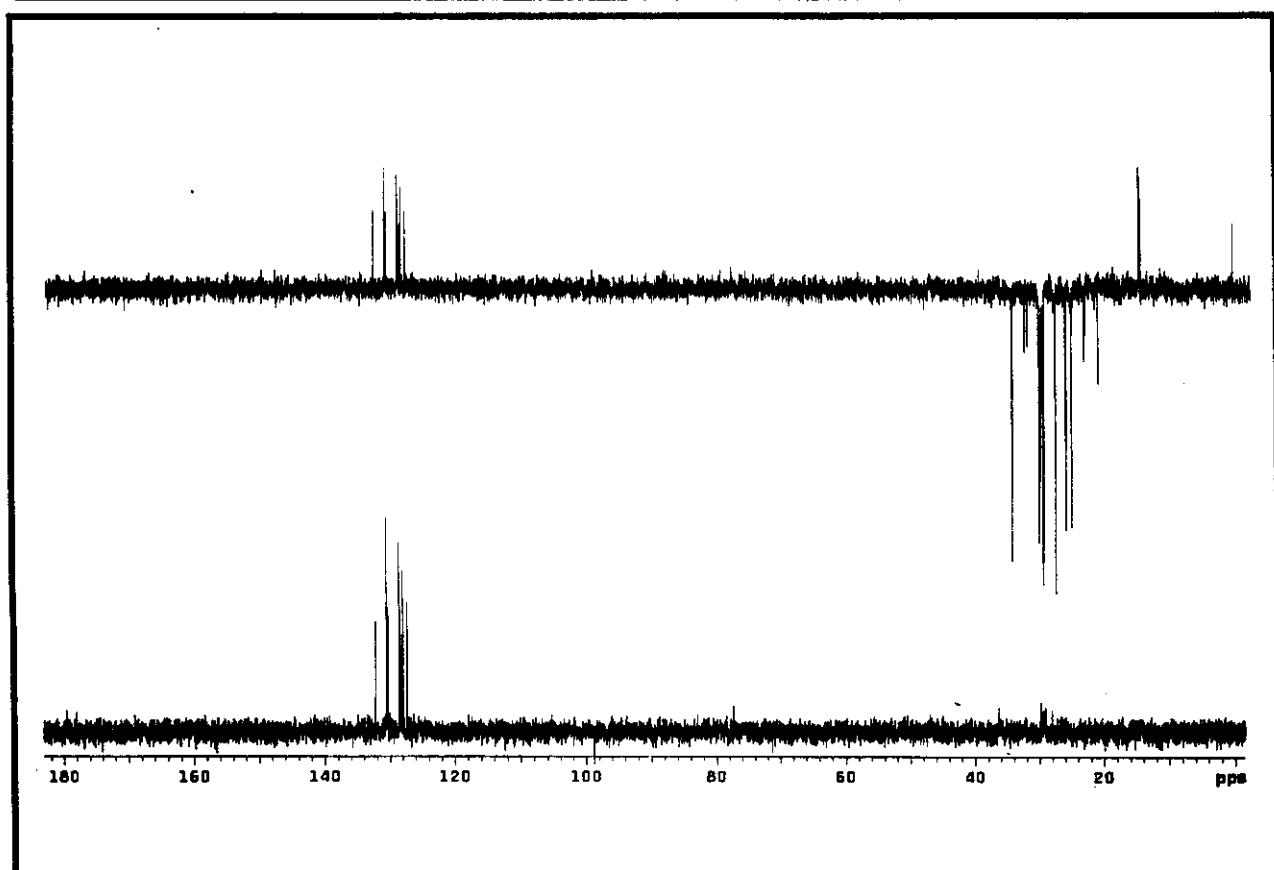


E 58 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 23.

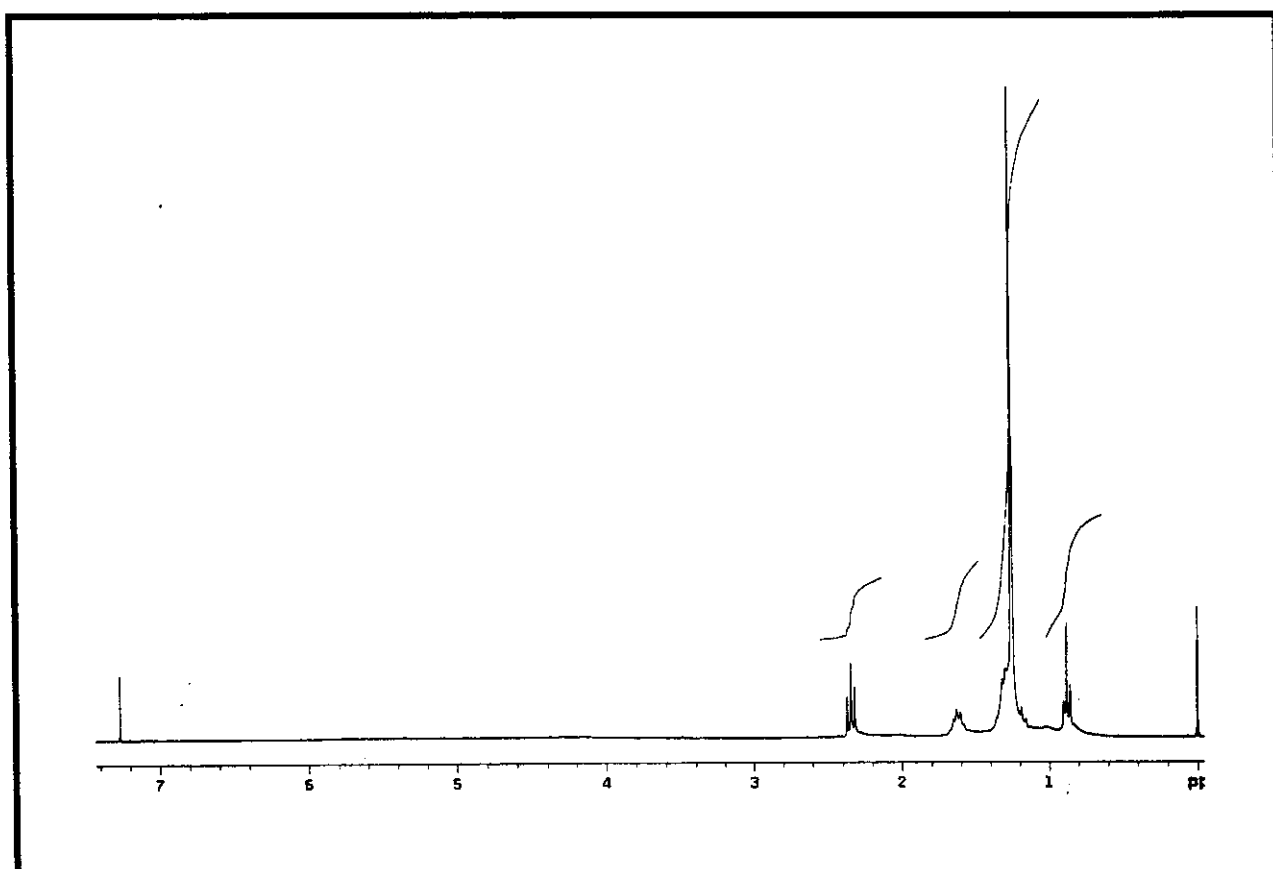


E 59 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 23.

Espectros

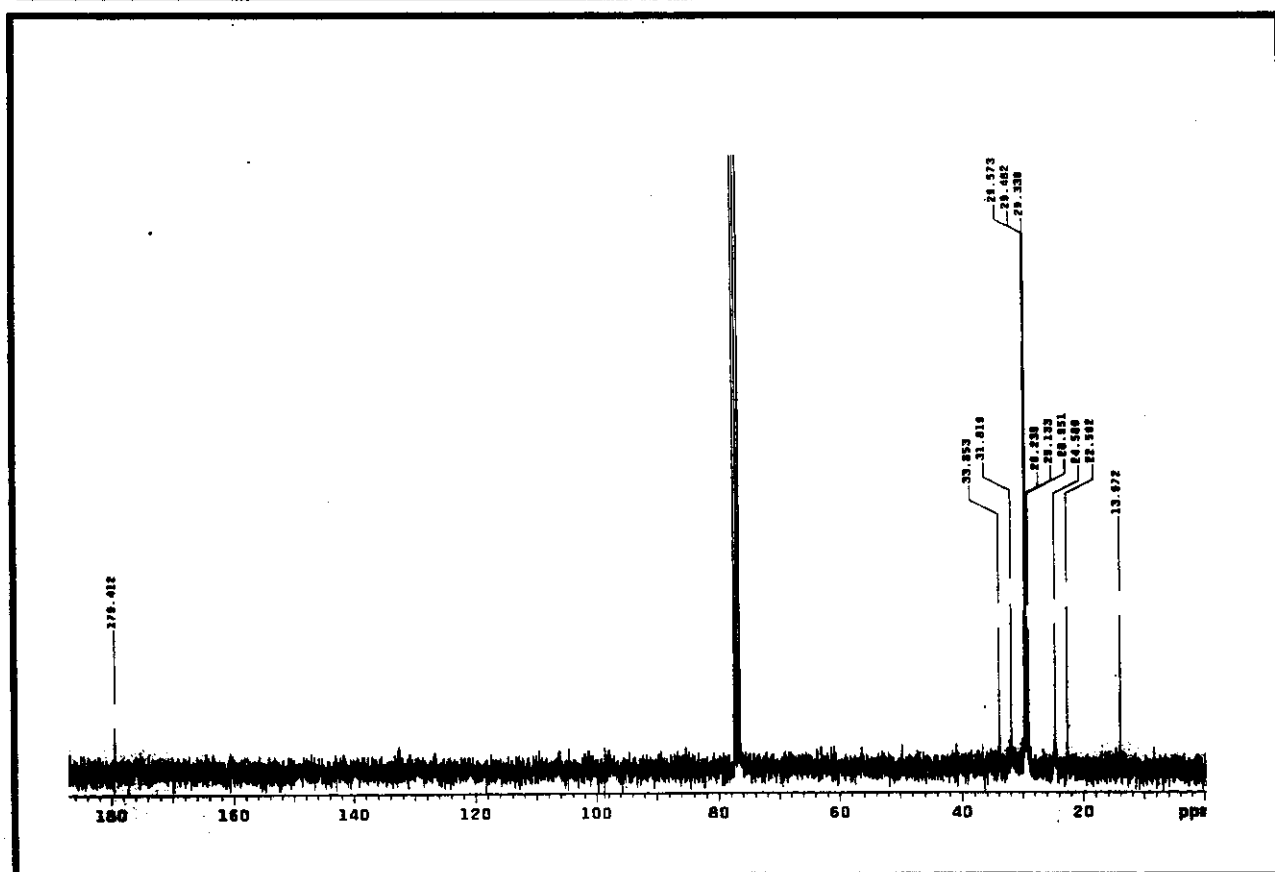


E 60 – Espectro DEPT (135° e 90°) do produto natural 23.

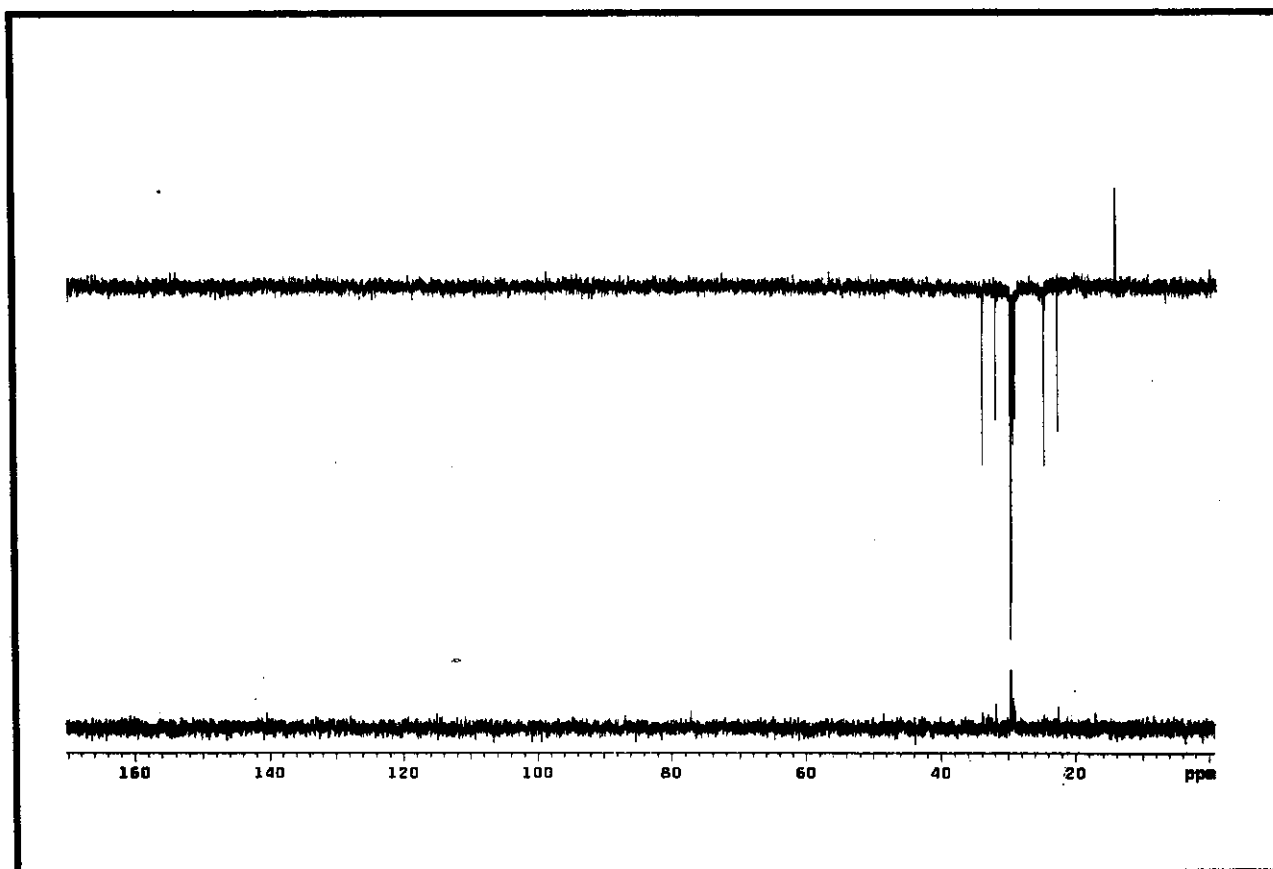


E 61 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 24.

Espectros

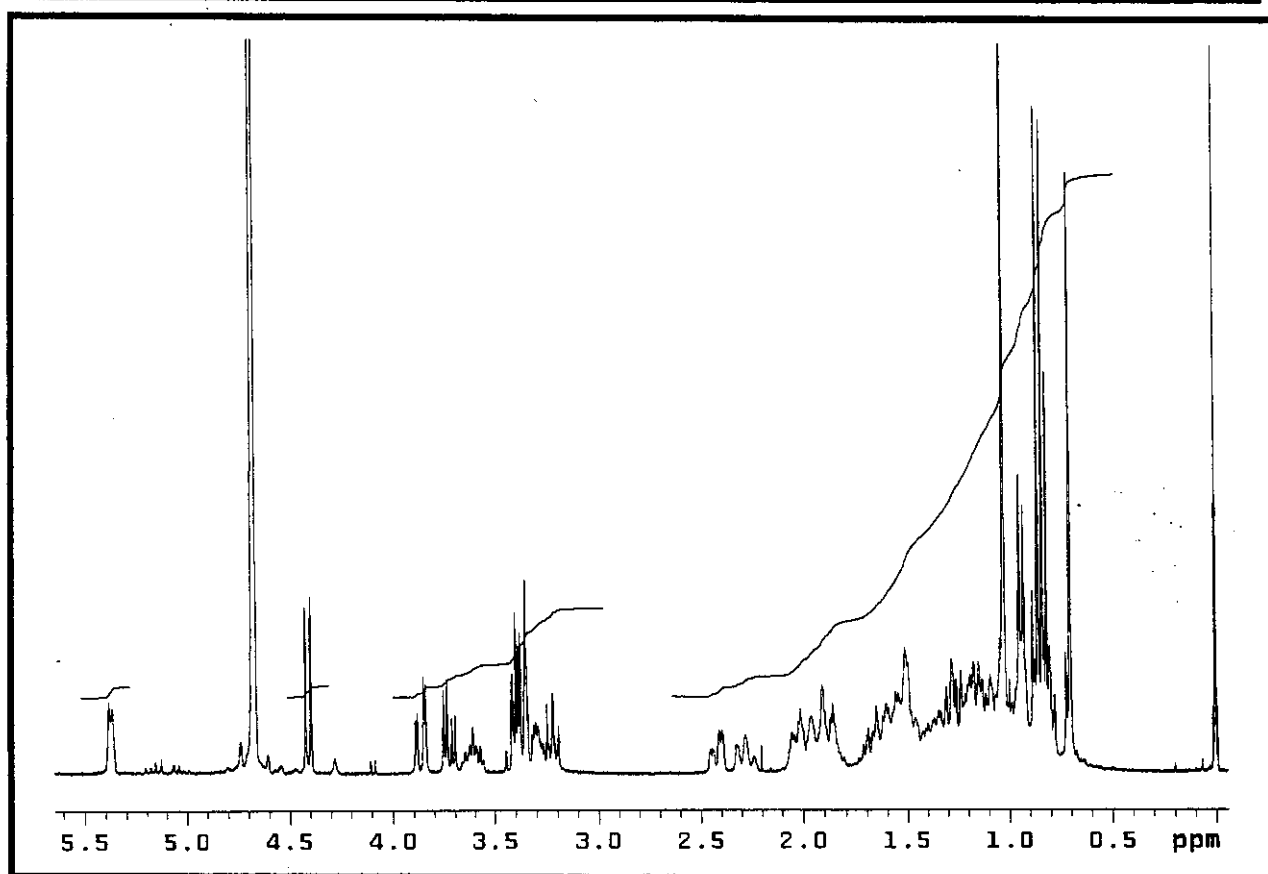


E 62 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) do produto natural 24

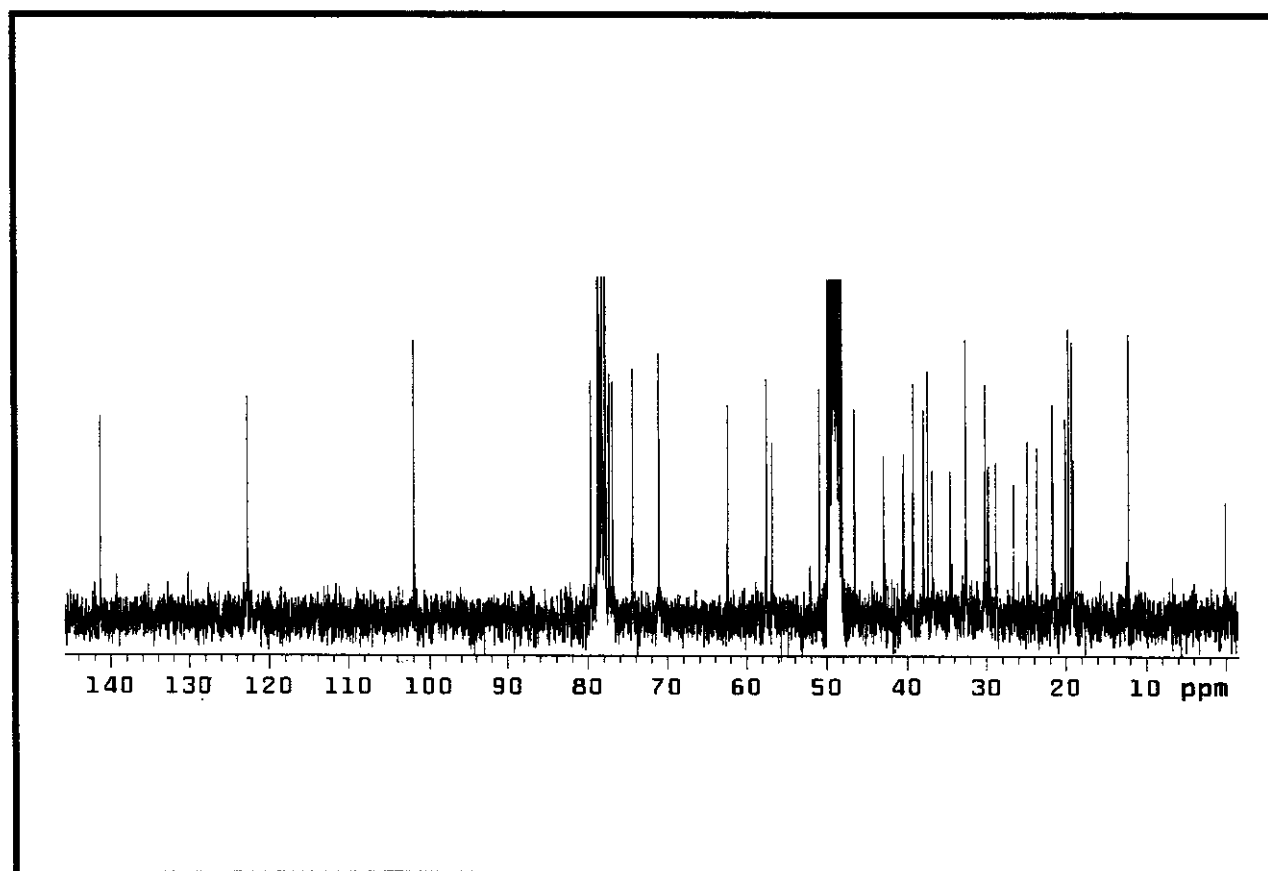


E 63 – Espectro DEPT (135° e 90°) do produto natural 24.

Espectros

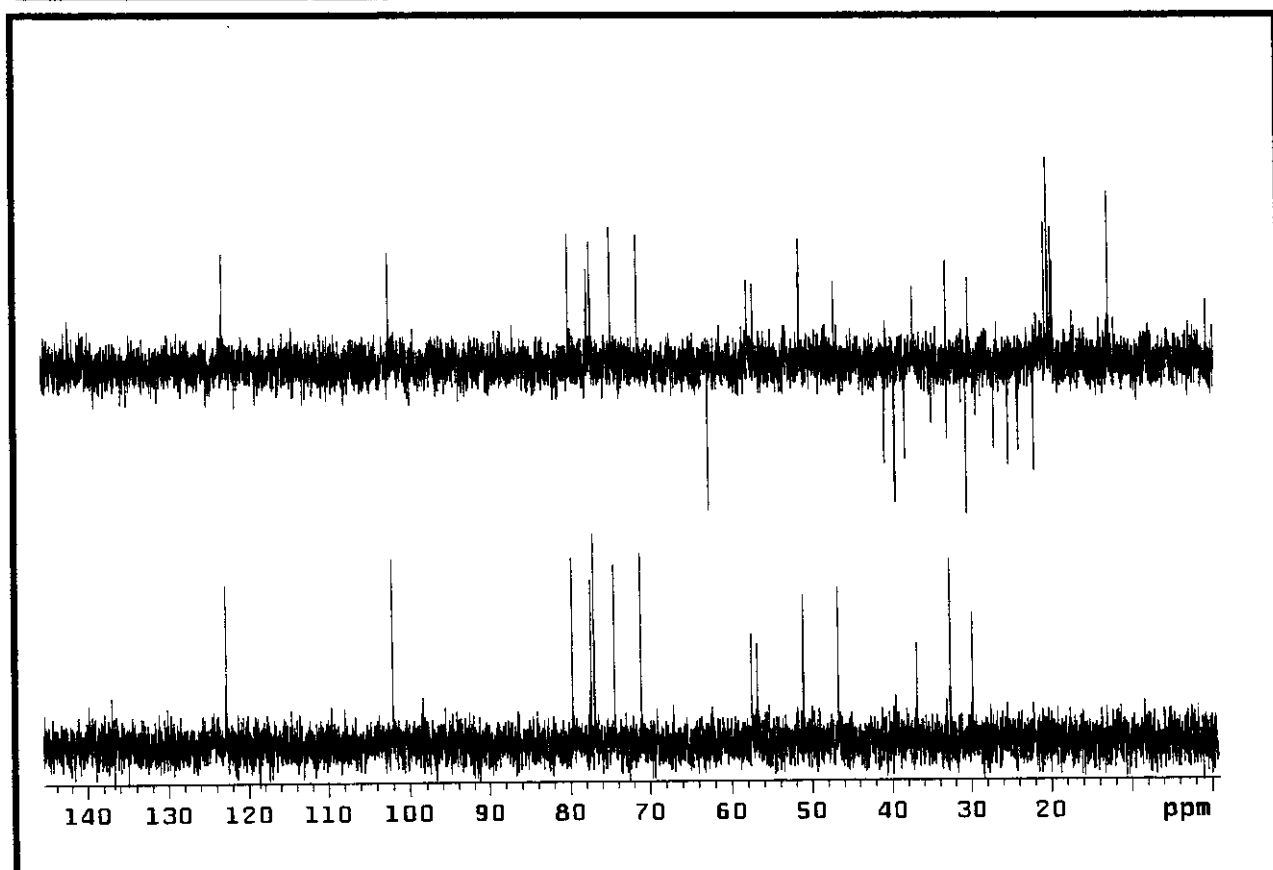


E 64 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, MeOD/TMS) do produto natural 25.

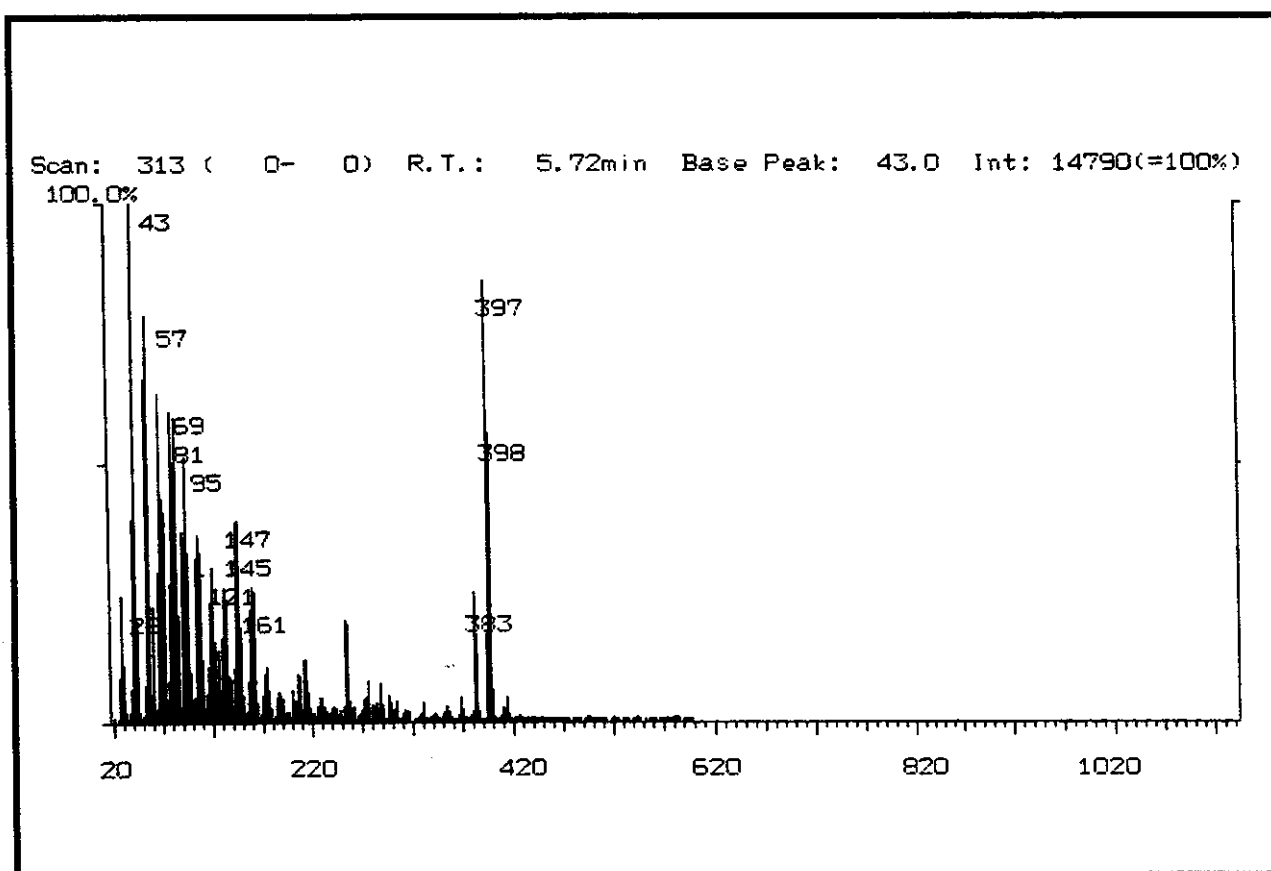


E 65 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, MeOD/TMS) do produto natural 25.

Espectros

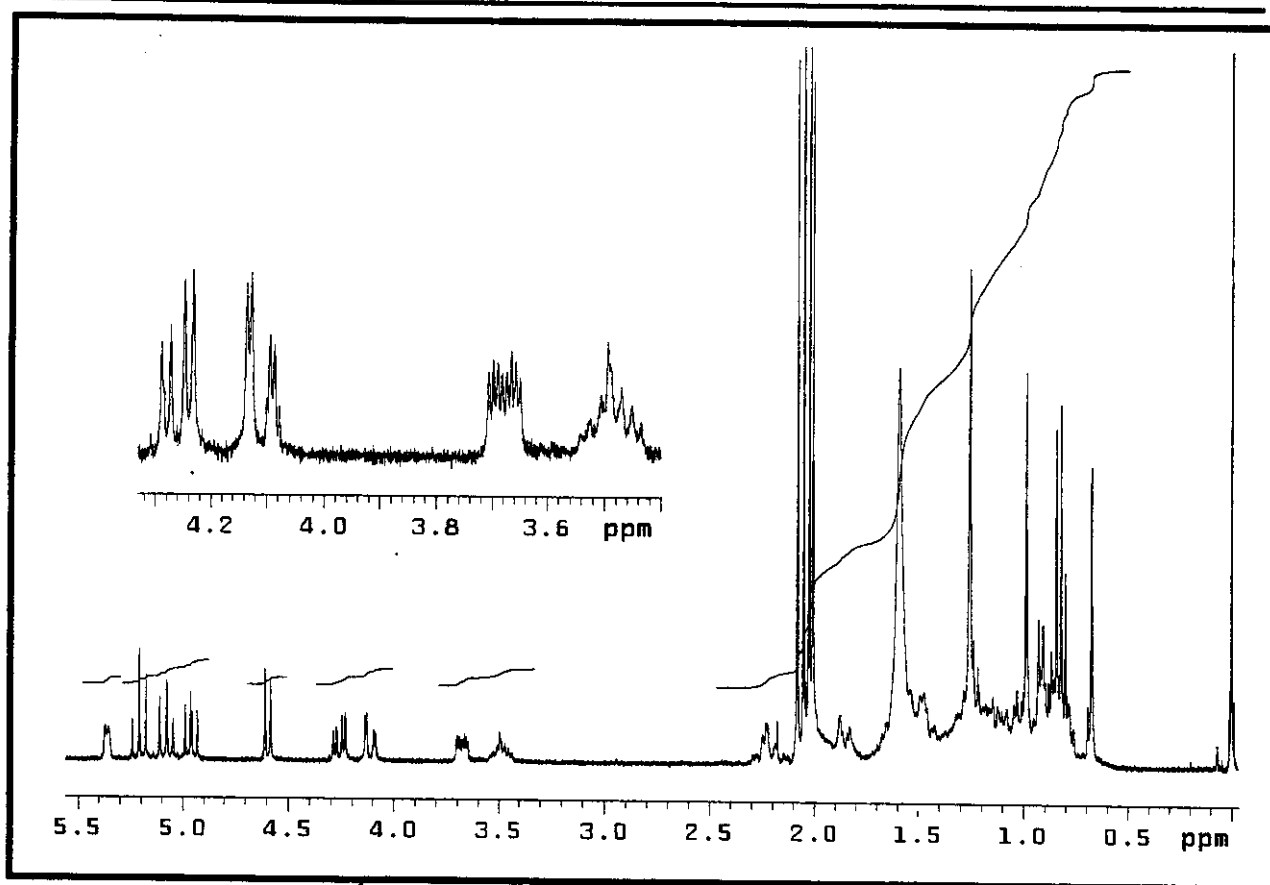


E 66 – Espectro DEPT (135° e 90°) do produto natural 25.



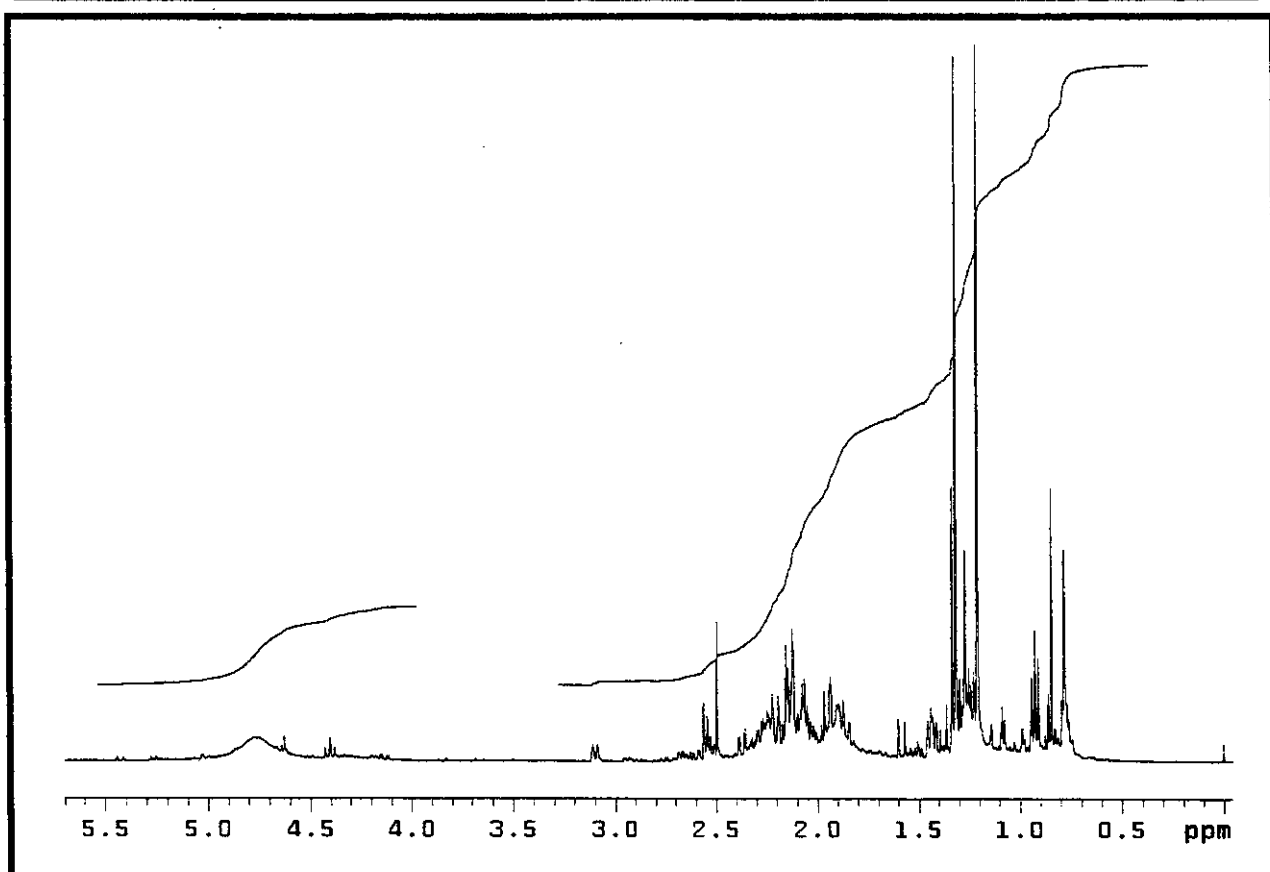
E 67 – Espectro de massas (70 eV) do produto natural 25.

Espectros

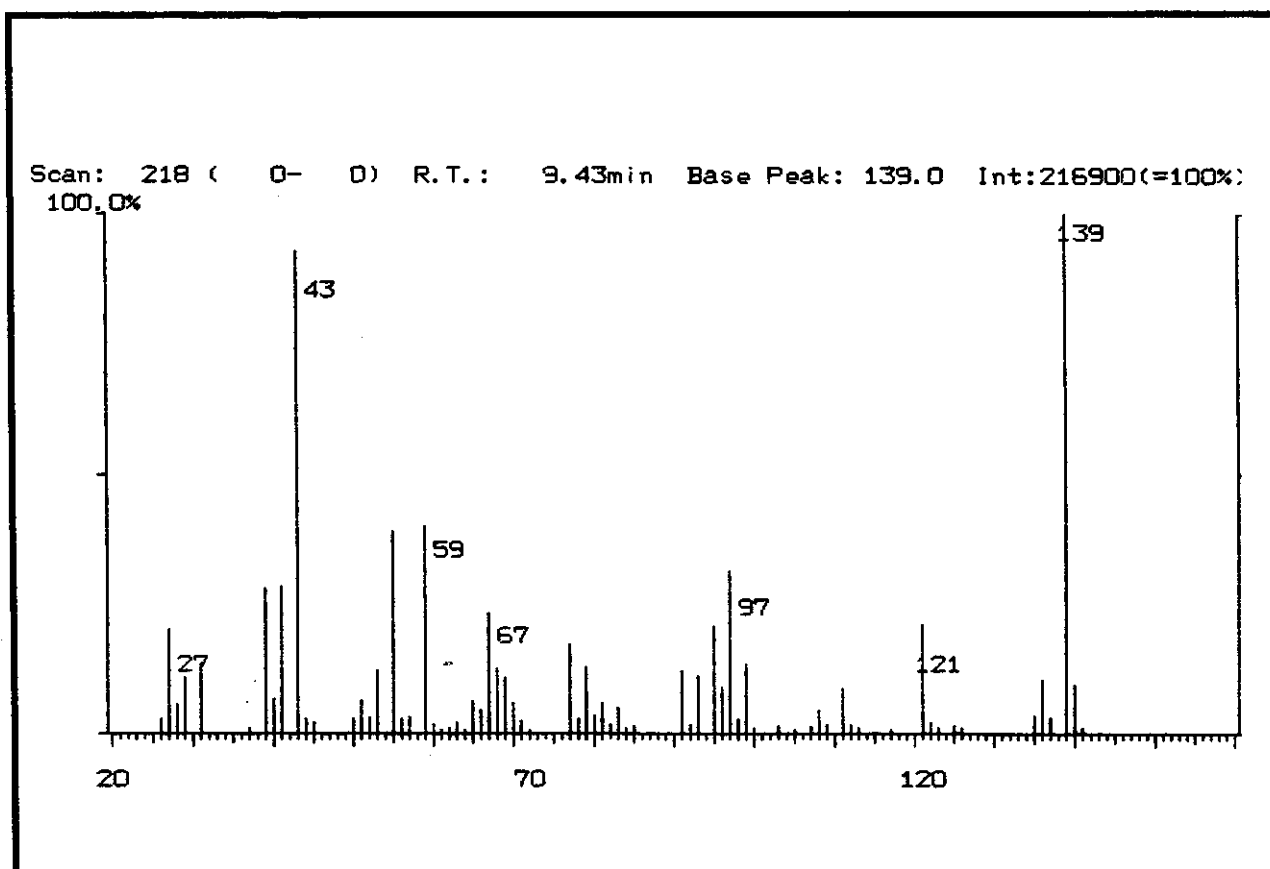


E 68 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) do produto acetilado **25a**.

Espectros

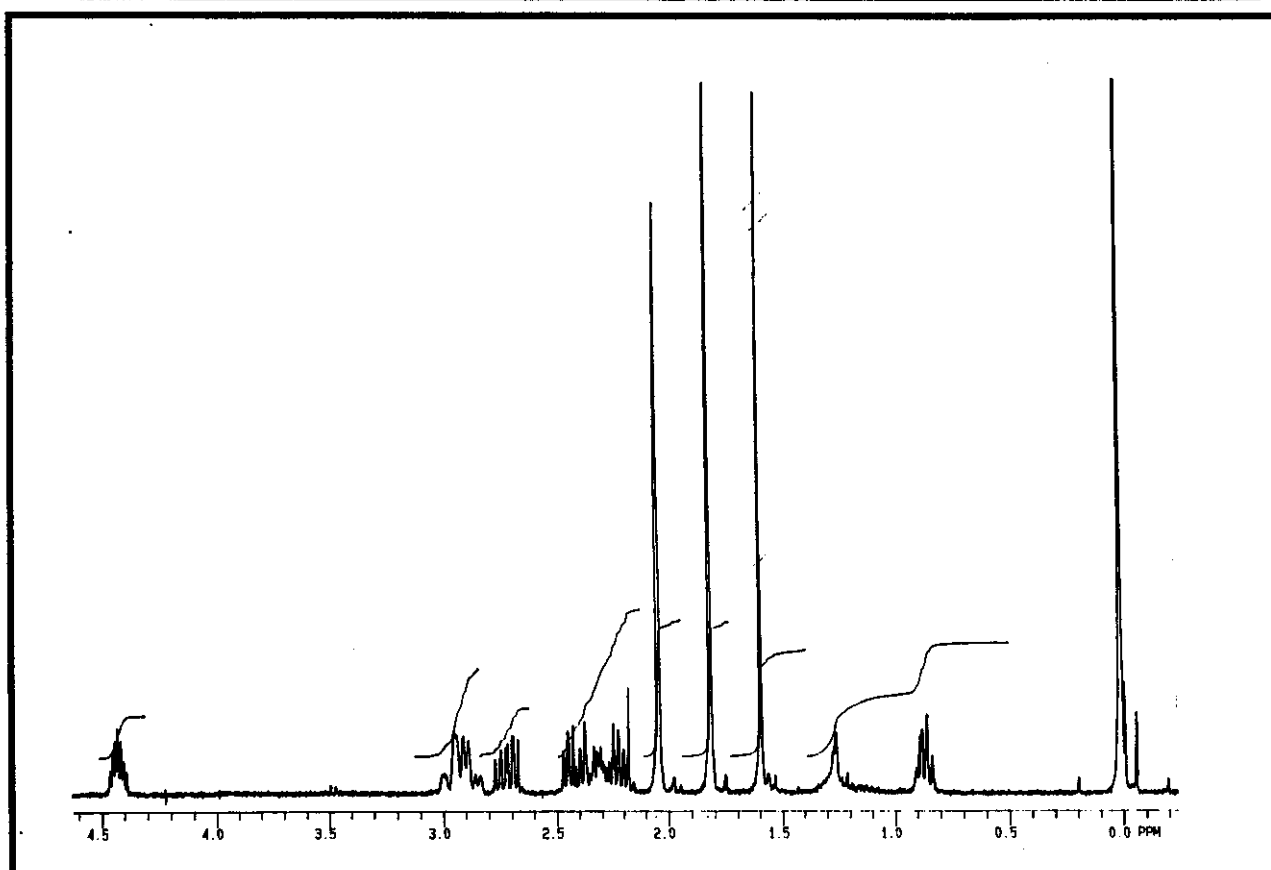


E 69 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 65.

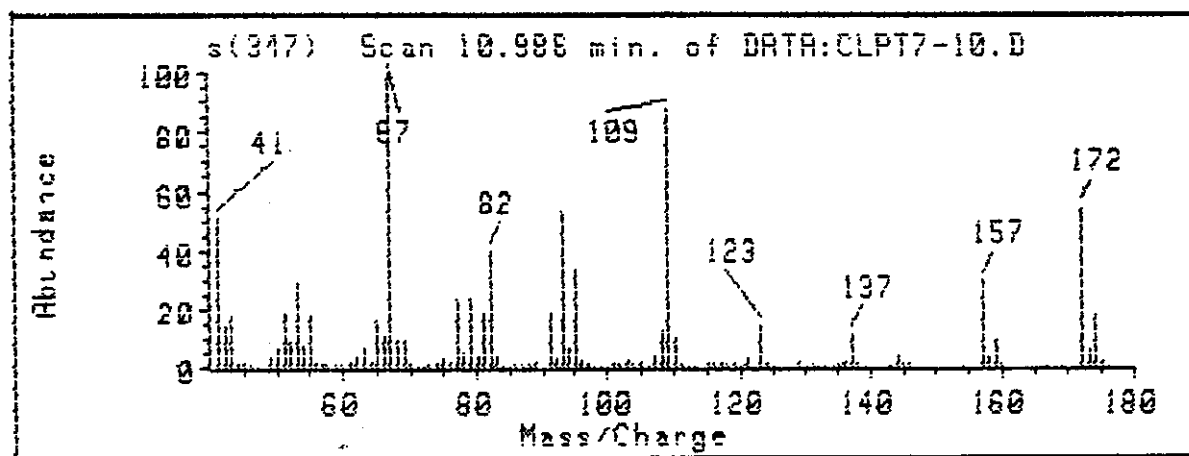


E 70 – Espectro de massas (70 eV) da substância 65.

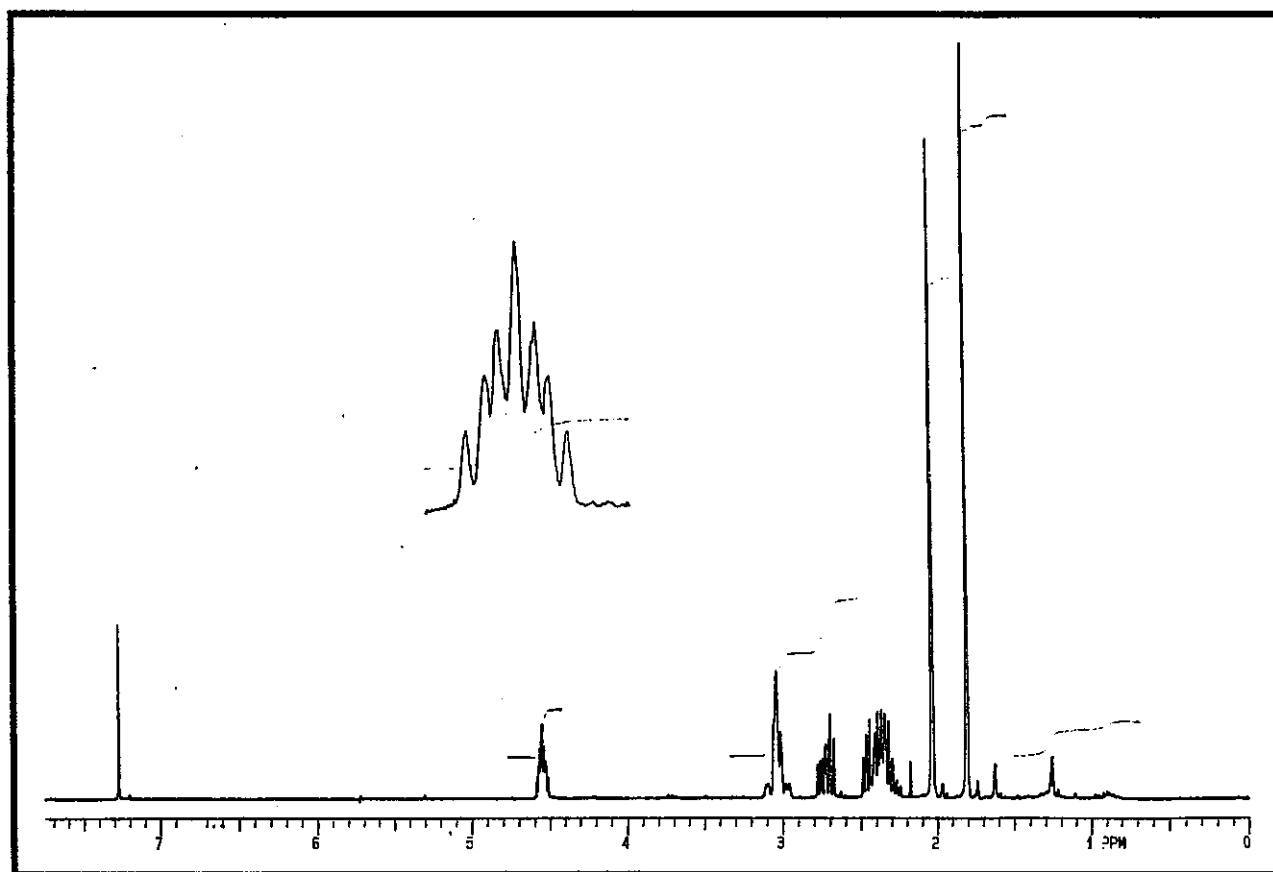
Espectros



E 71 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 68a.

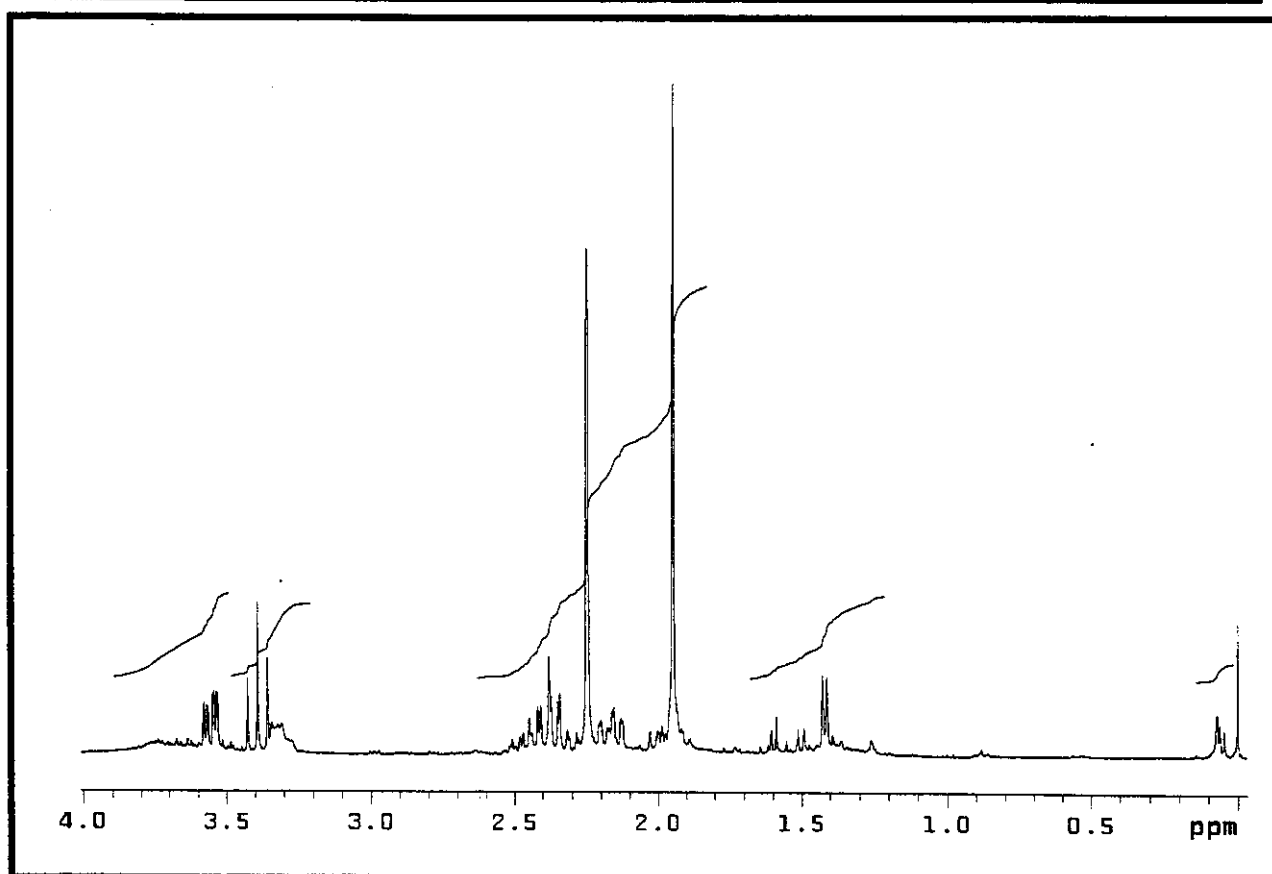


E 72 – Espectro de massas (70 eV) da substância 68a.

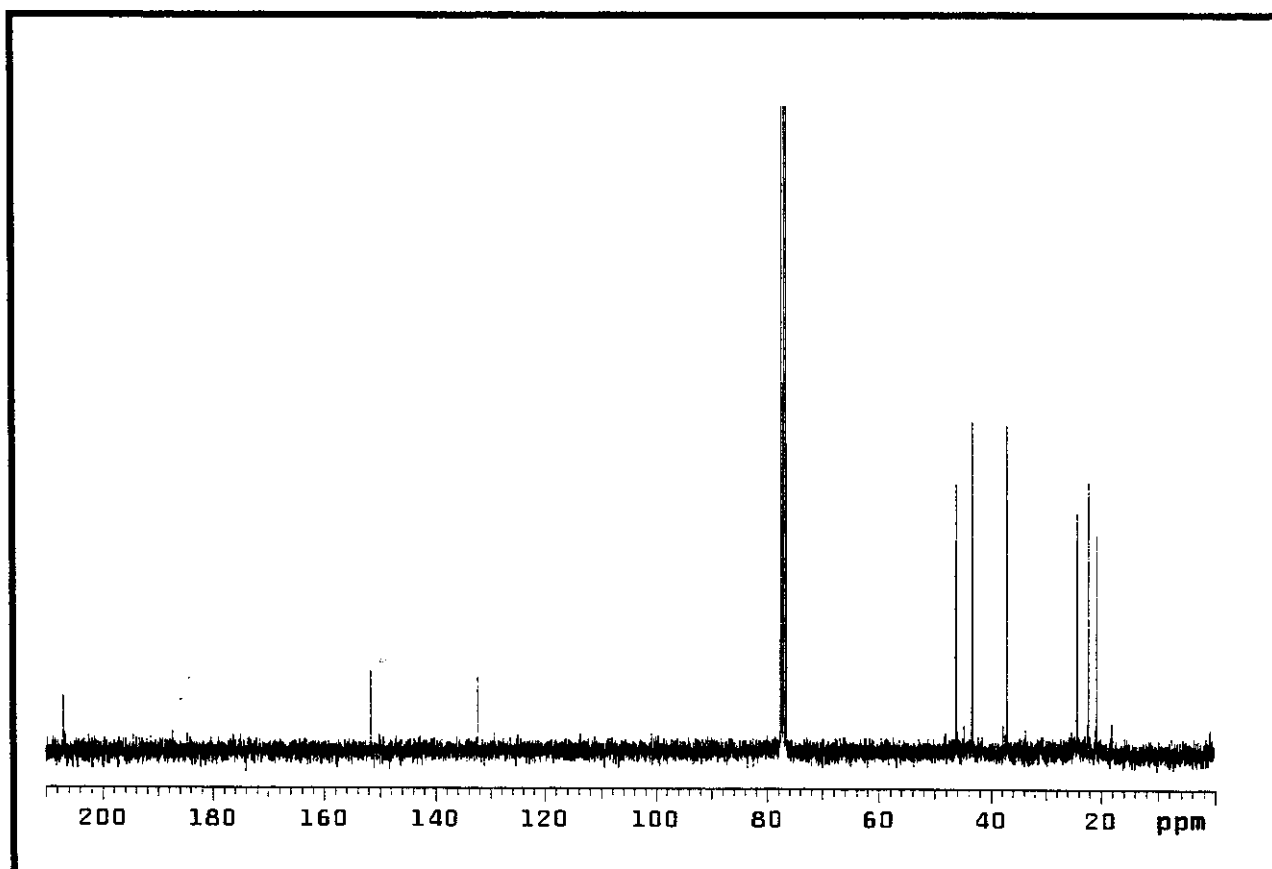


E 73 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância **68b**

Espectros

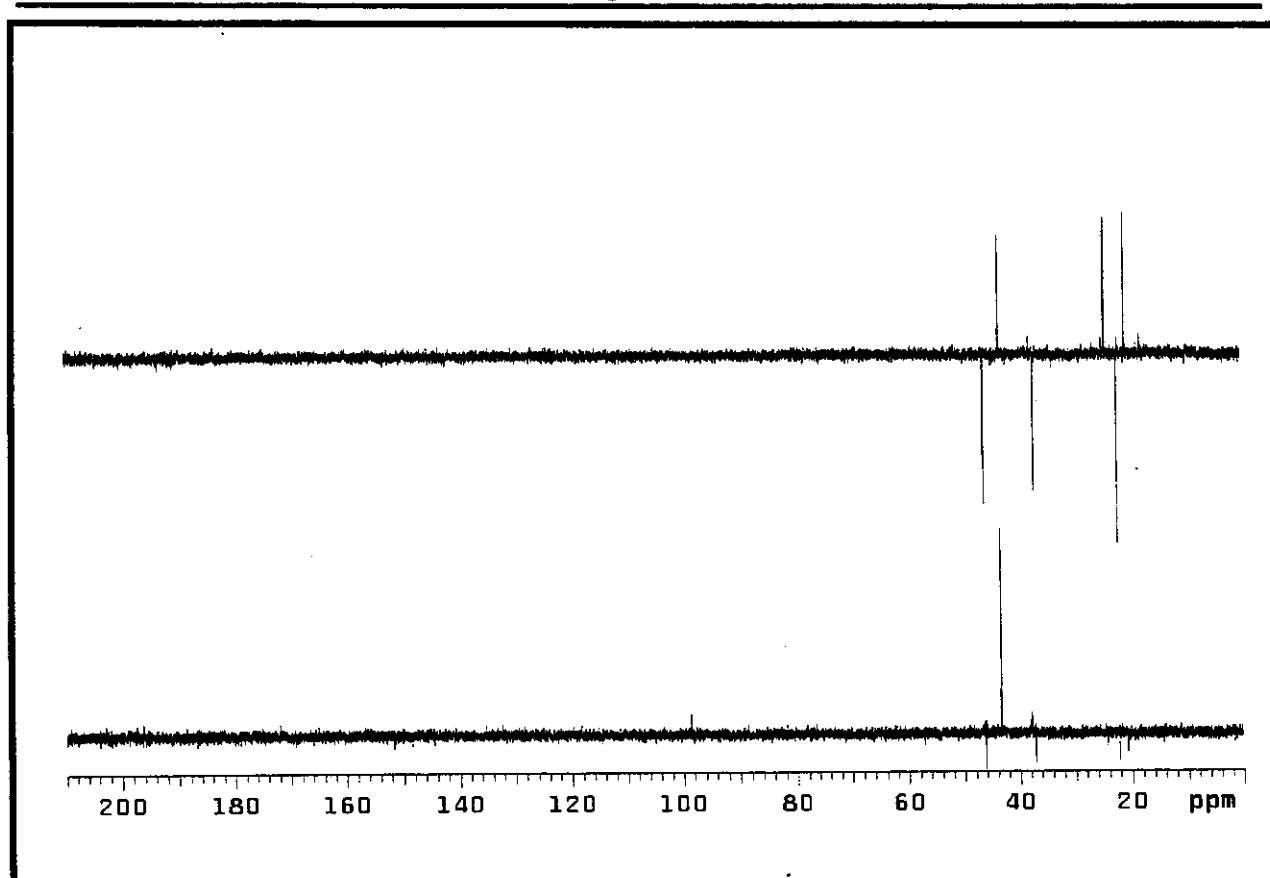


E 74 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 69a.

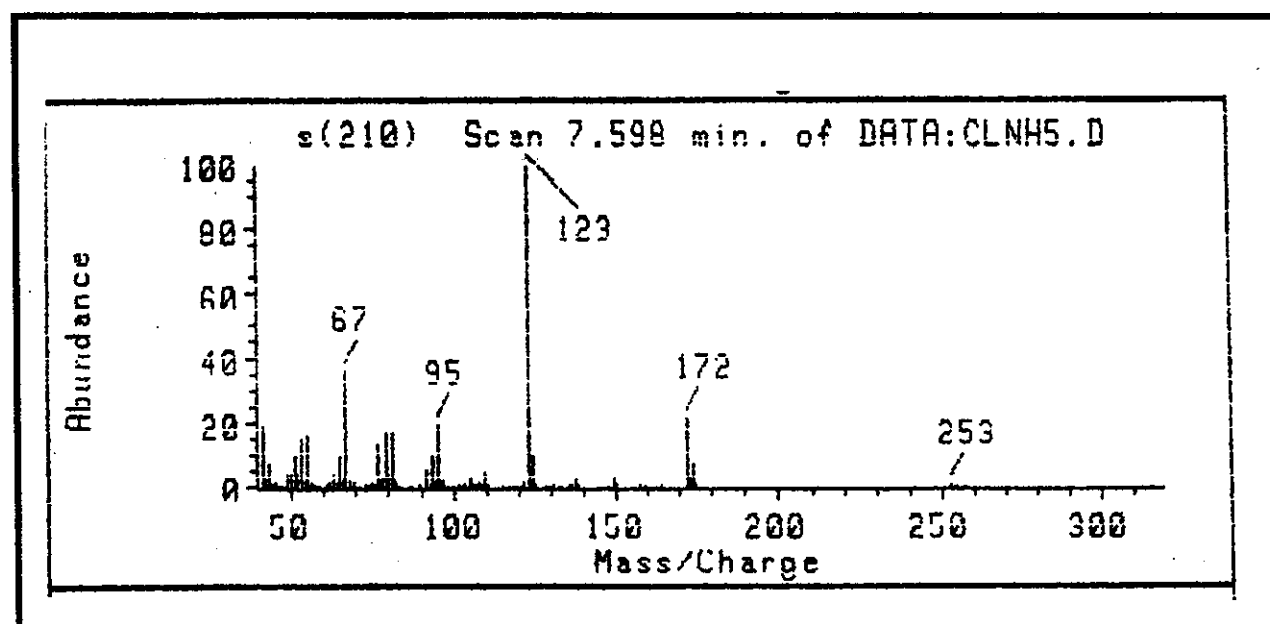


E 75 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, MeOD/TMS) da substância 69a.

Espectros

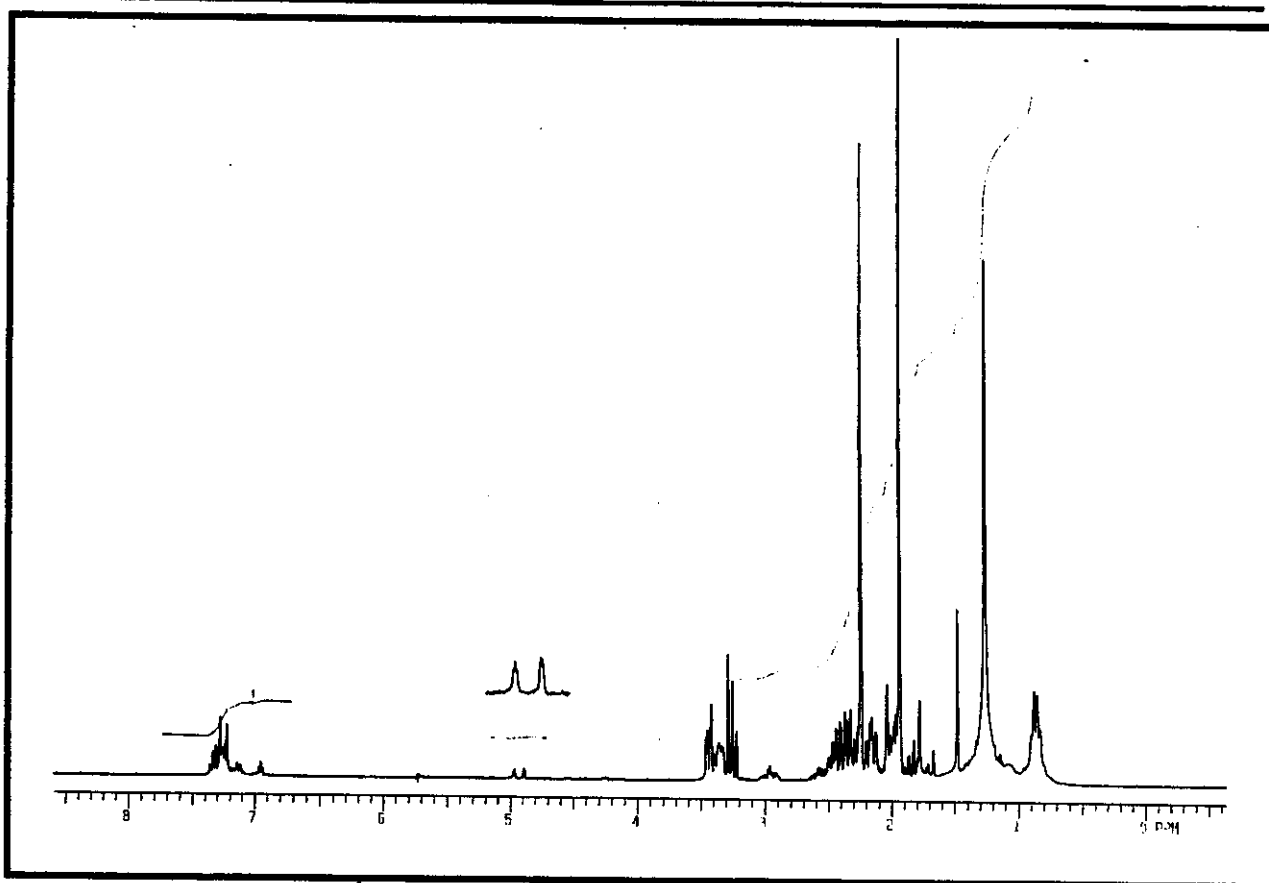


E 76 – Espectro DEPT (135° e 90°) da substância 69a.

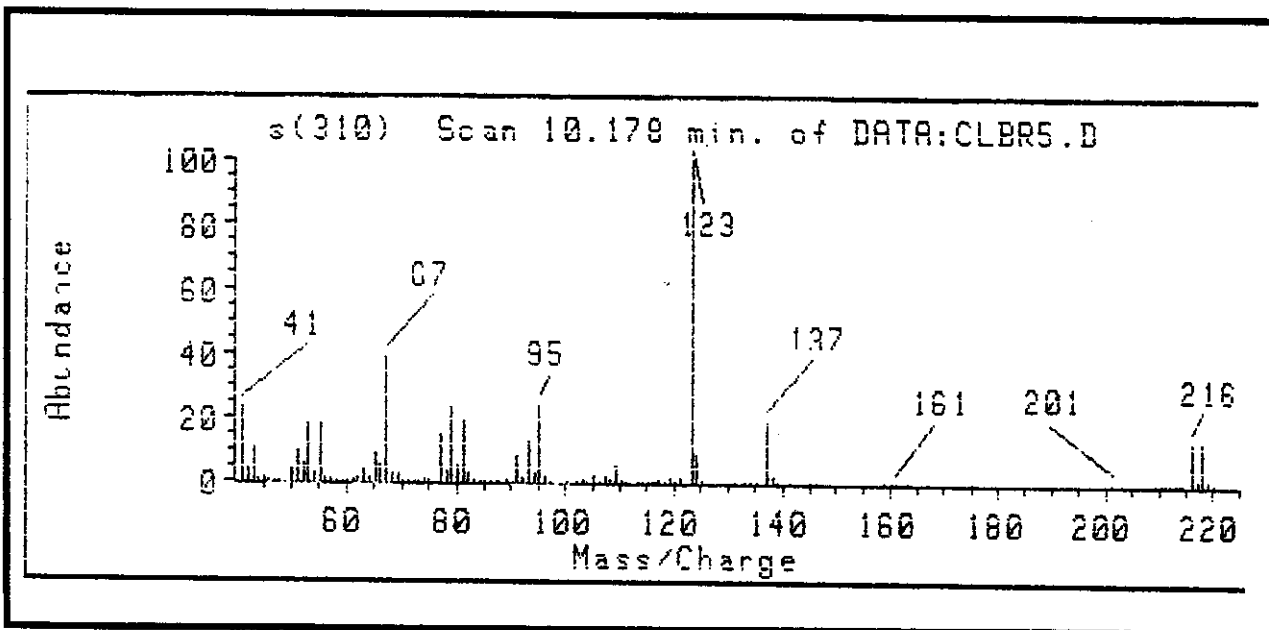


E 77 – Espectro de massas (70 eV) da substância 69a.

Espectros

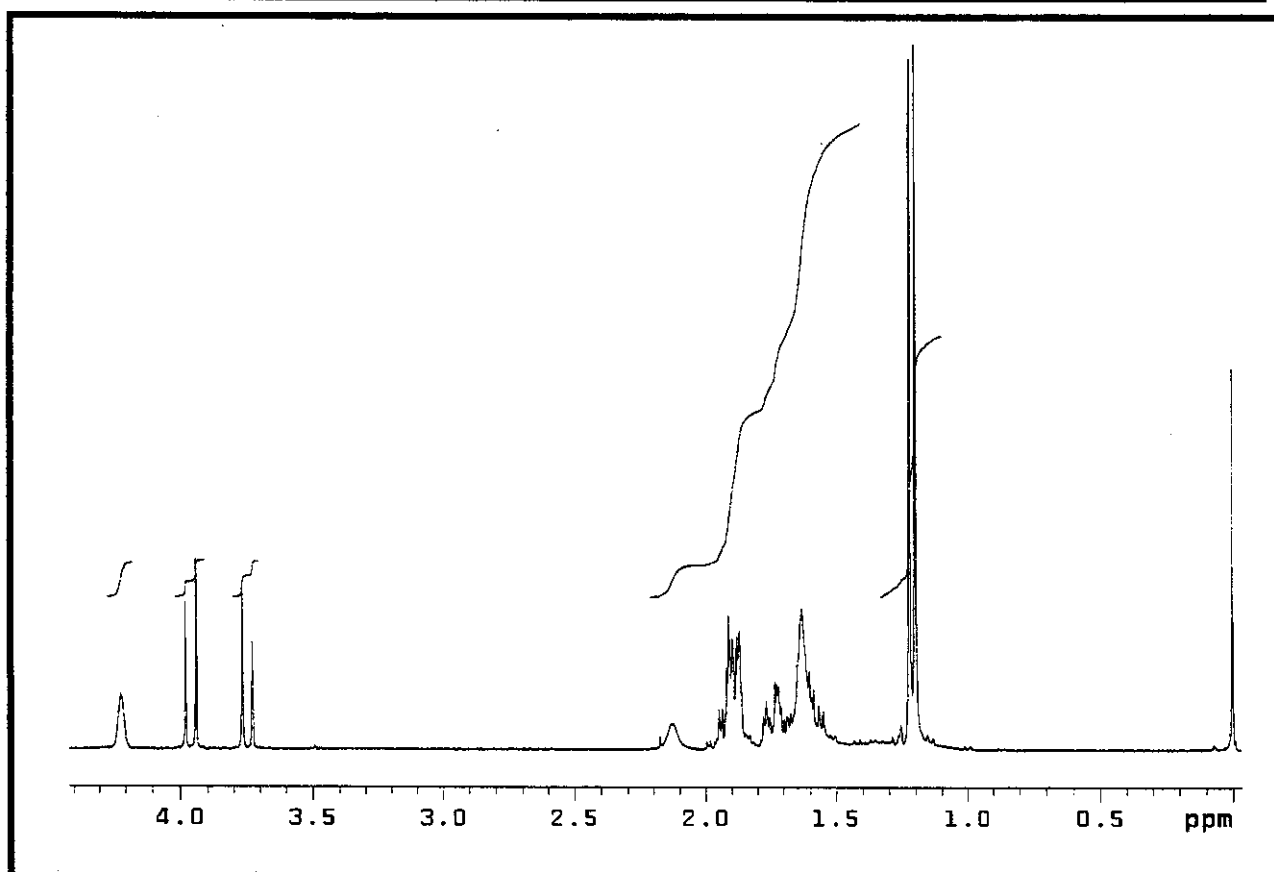


E 78 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 69b.

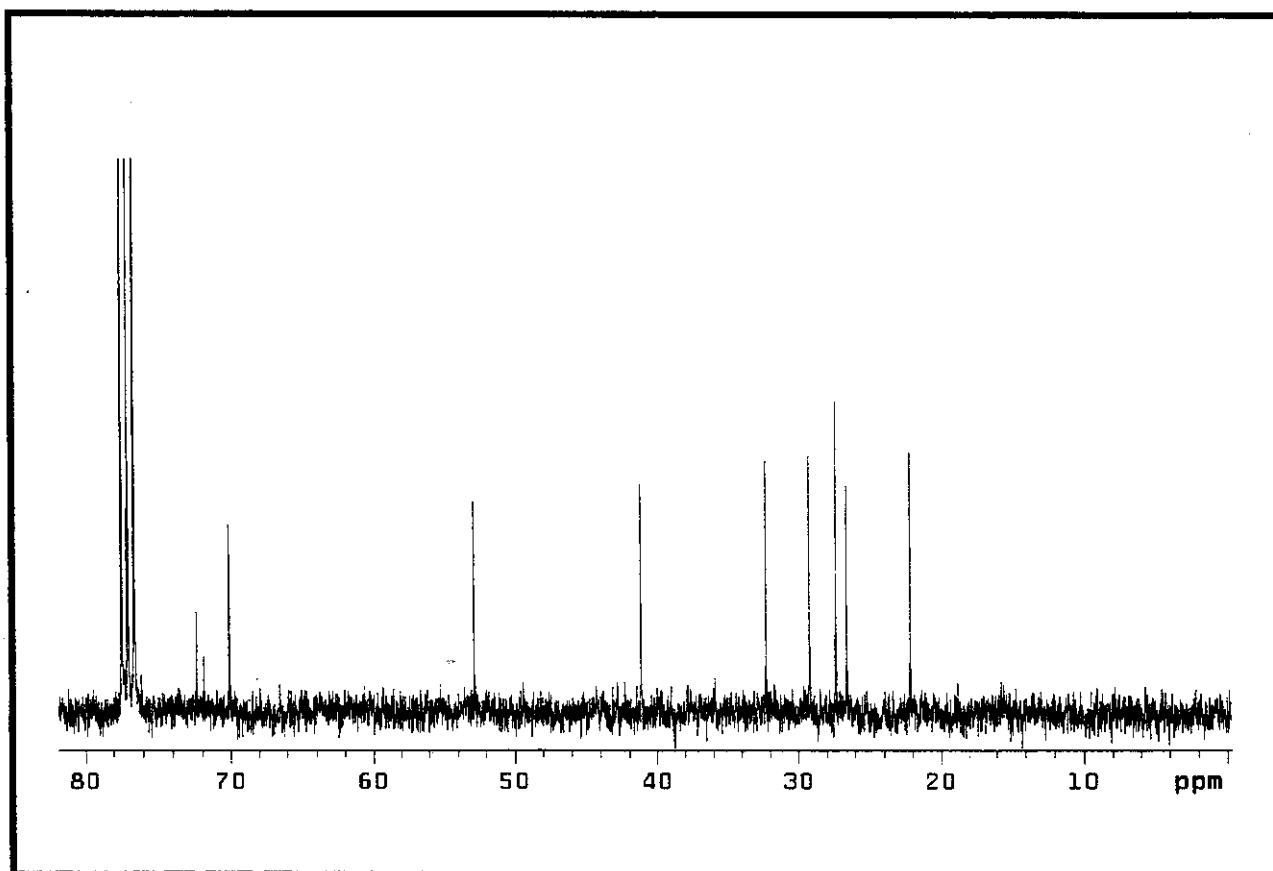


E 79 – Espectro de massas (70 eV) da substância 69b.

Espectros

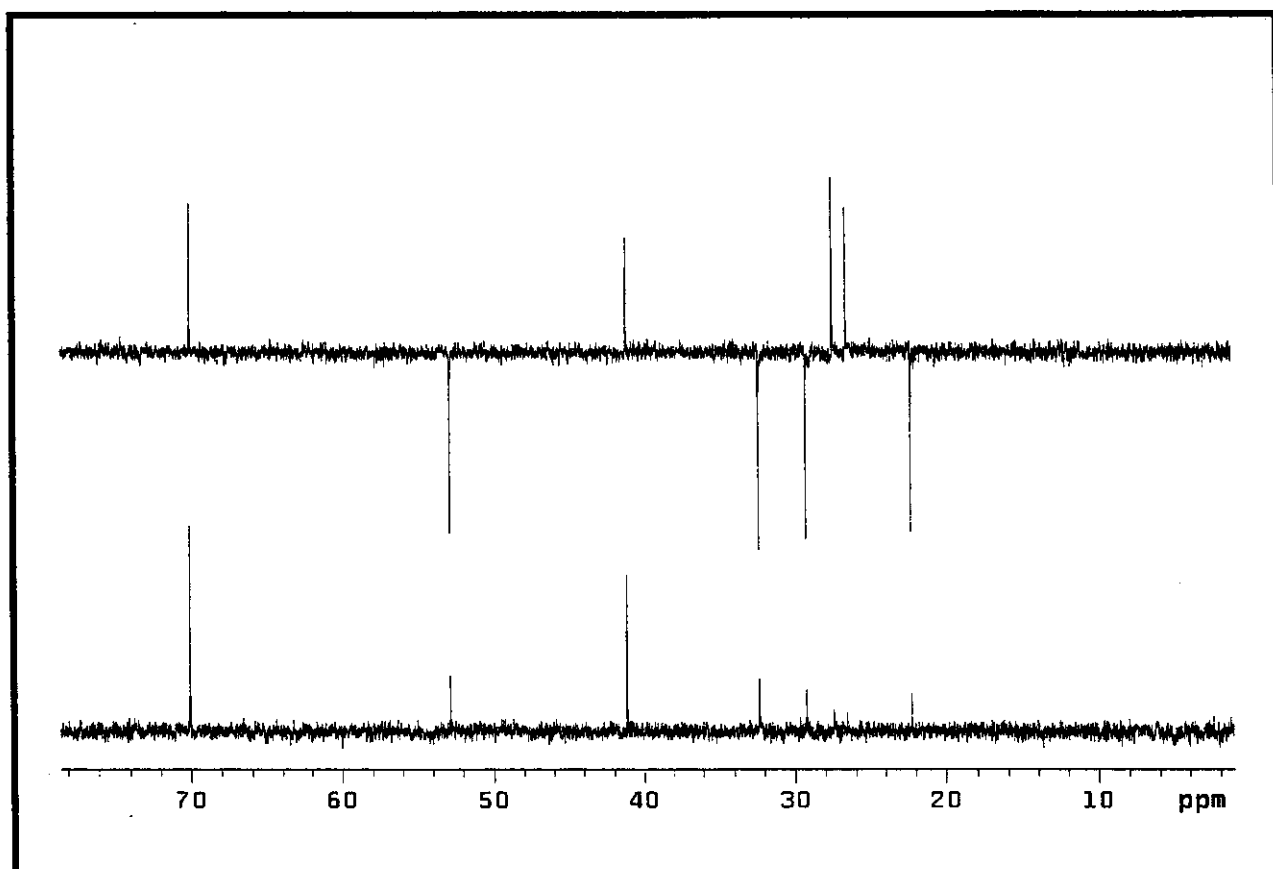


E 80 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 71.

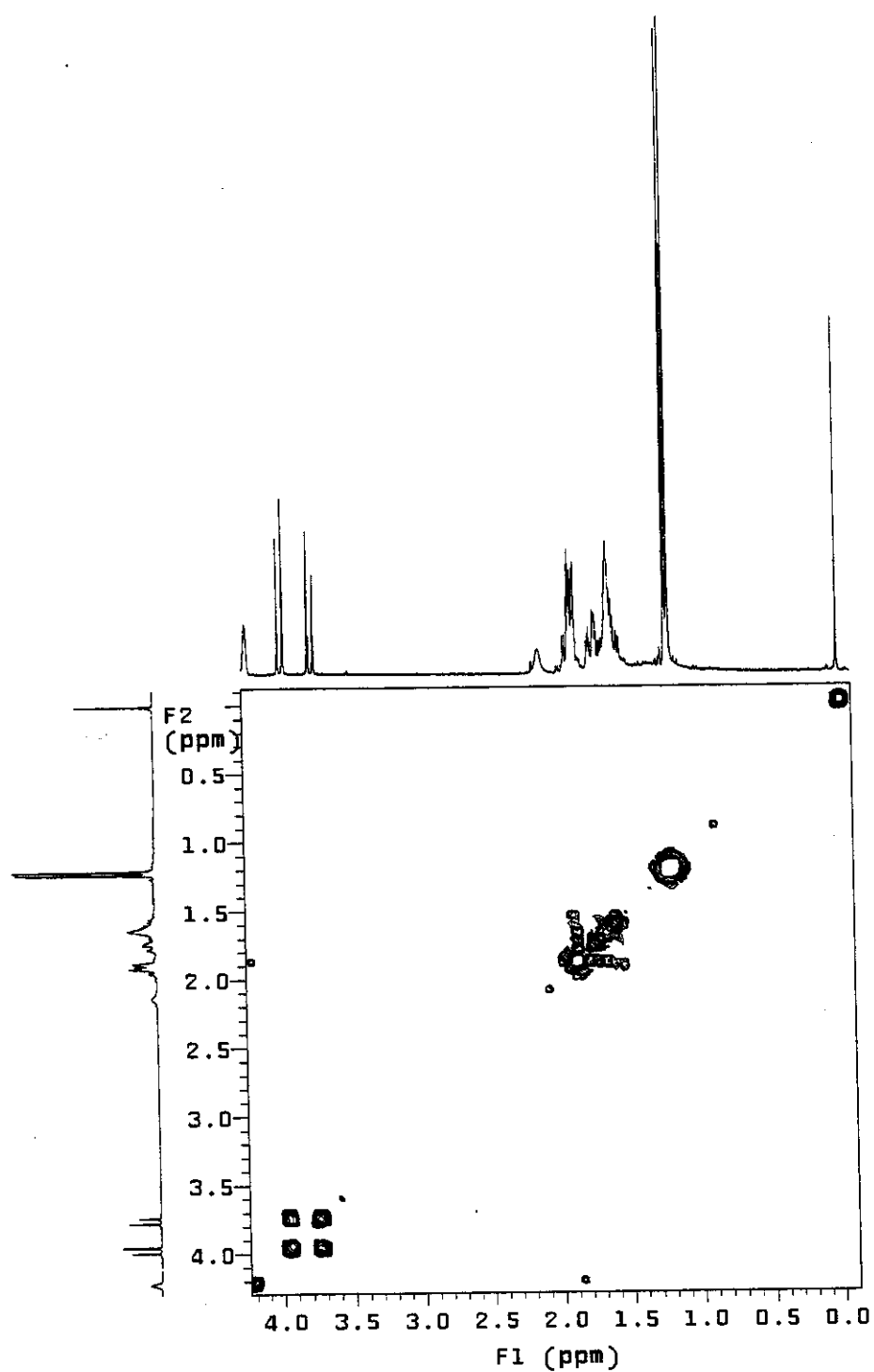


E 81 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, MeOD/TMS) da substância 71.

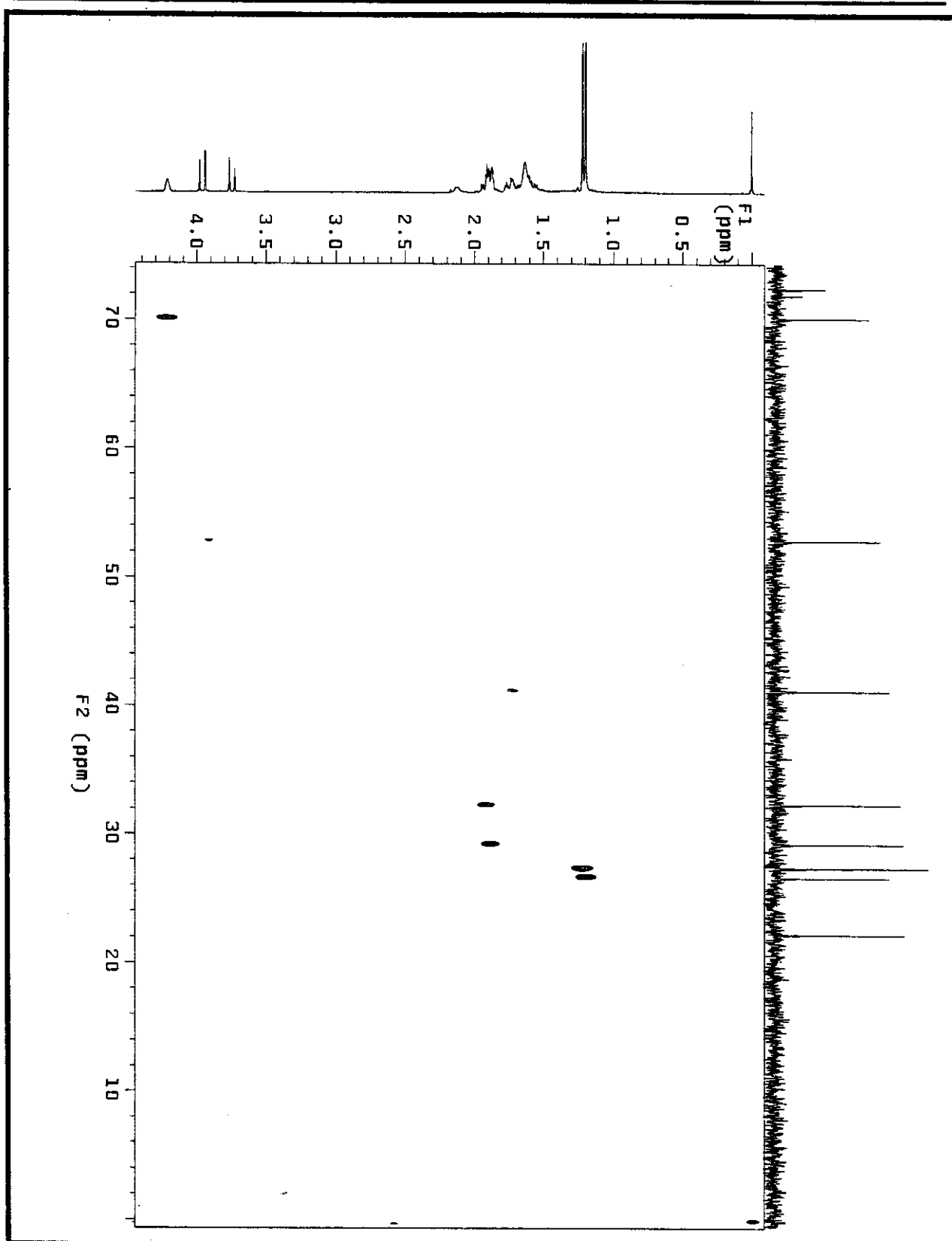
Espectros



E 82 – Espectro DEPT (135° e 90°) da substância 71.

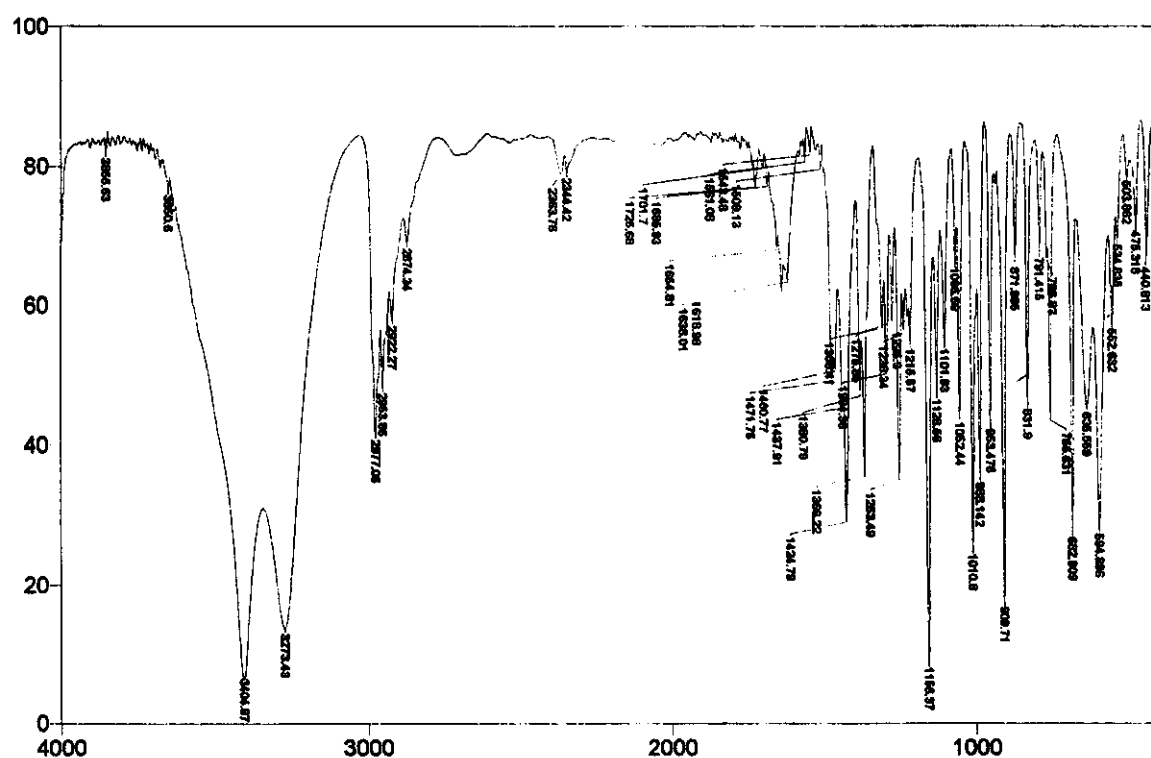


E 83 – Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear (^1H , ^1H – COSY) da substância.

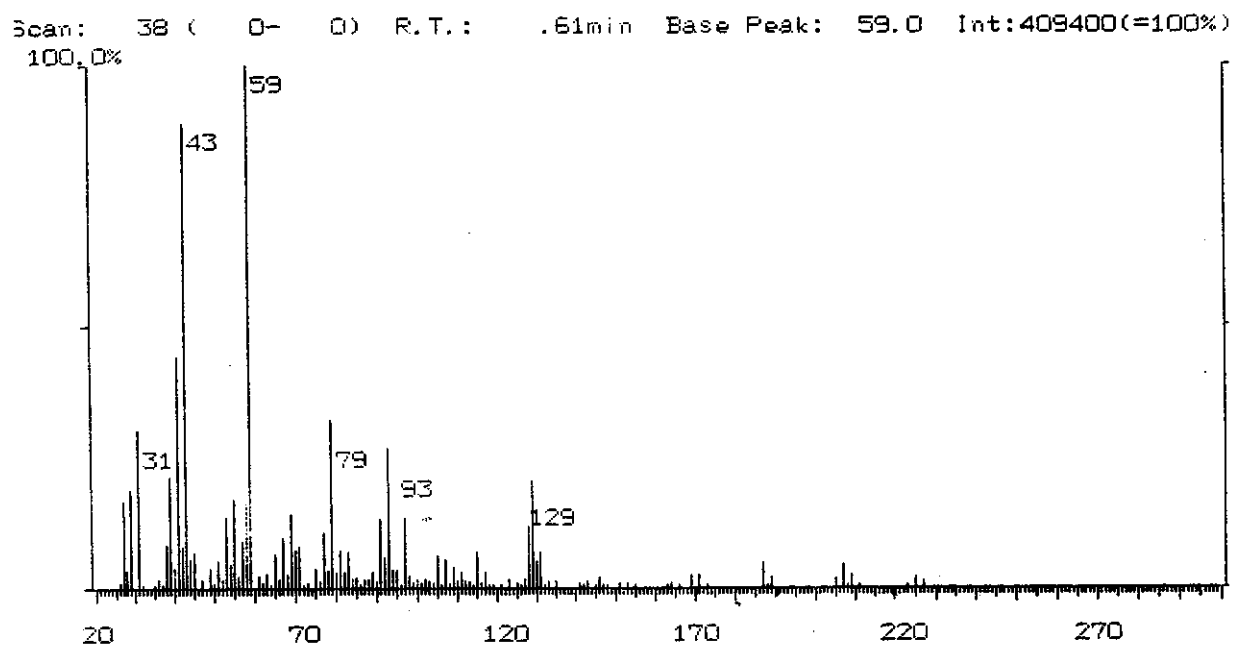


E 84 – Espectro RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR) da substância 71.

Espectros

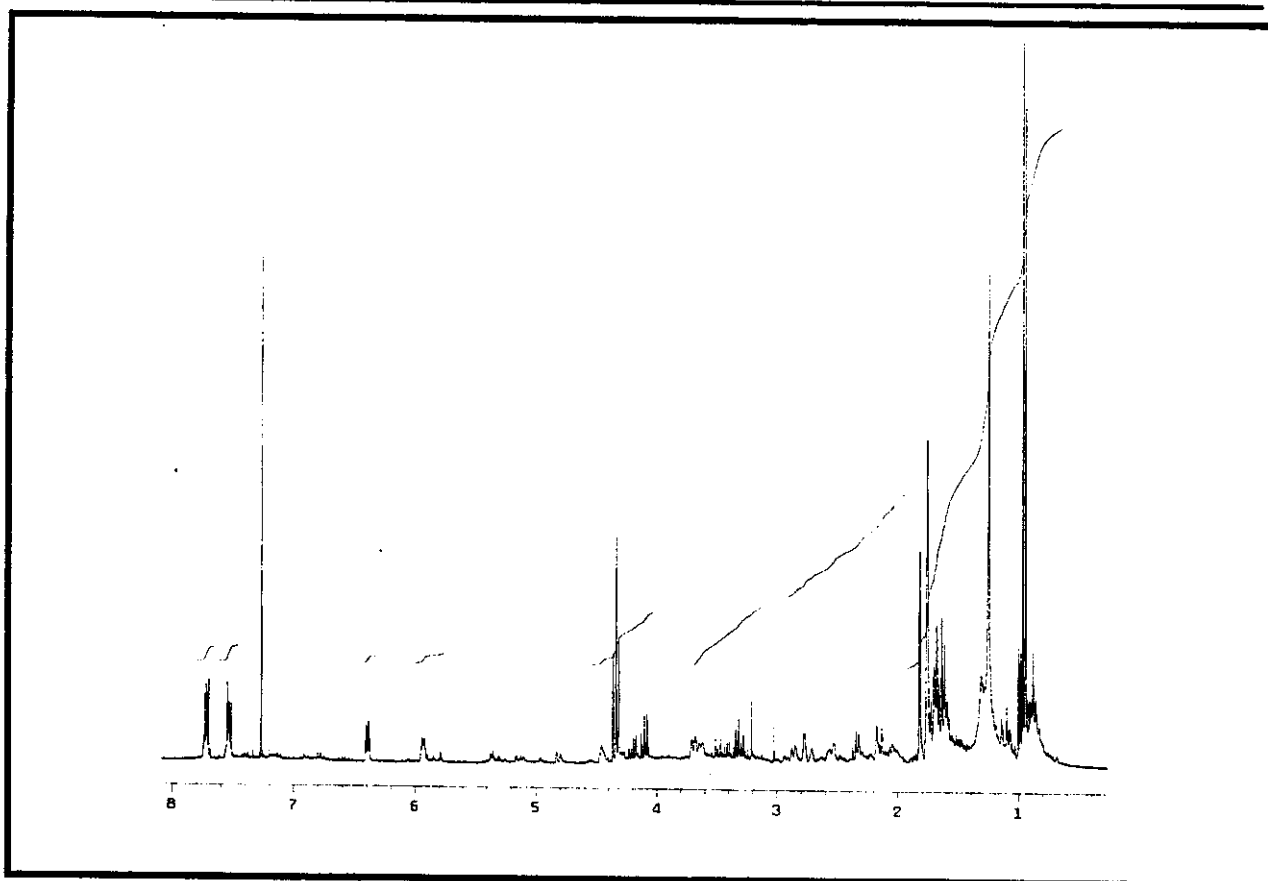


E 85 – Espectro de IV (filme) da substância 71.

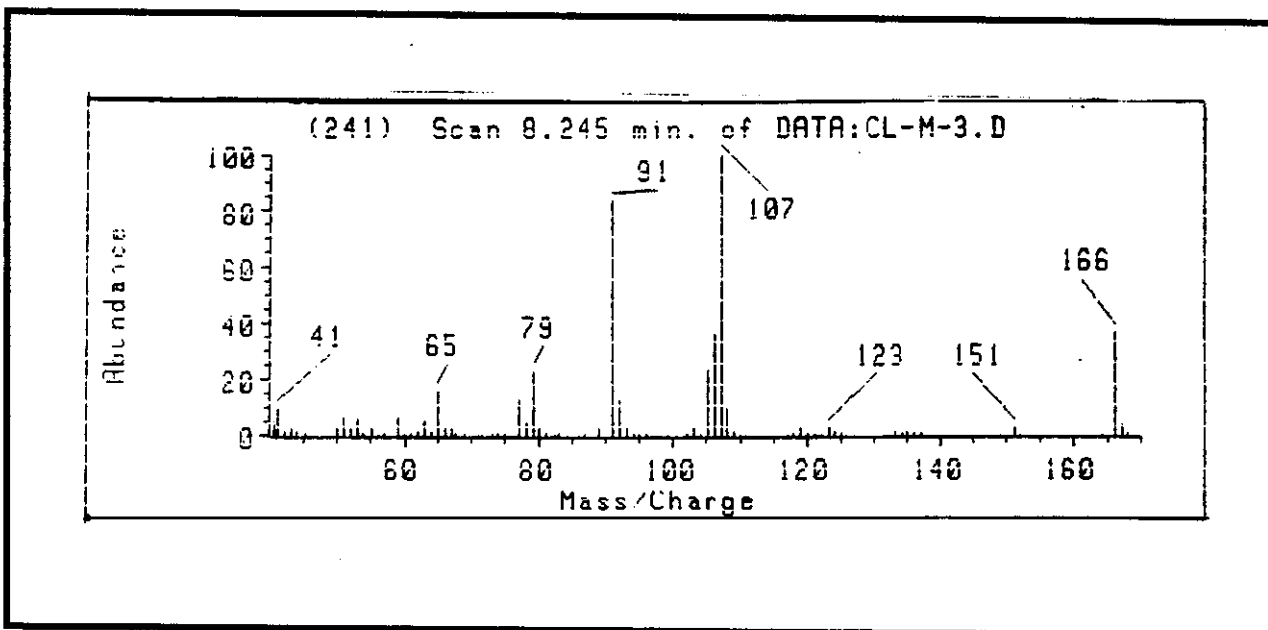


E 86 – Espectro de massas (70 eV) da substância 71.

Espectros

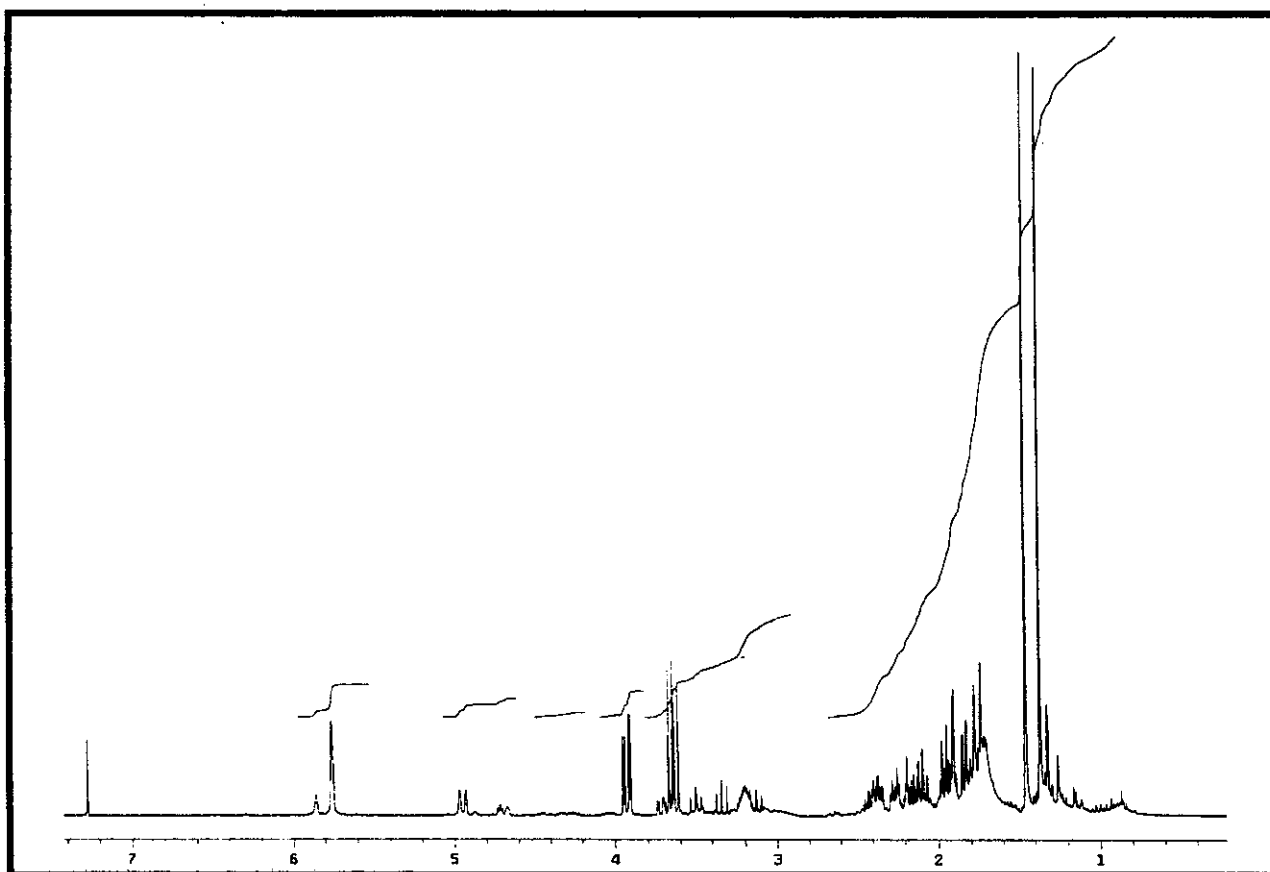


E 87 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da mistura das substâncias 79a/79b.

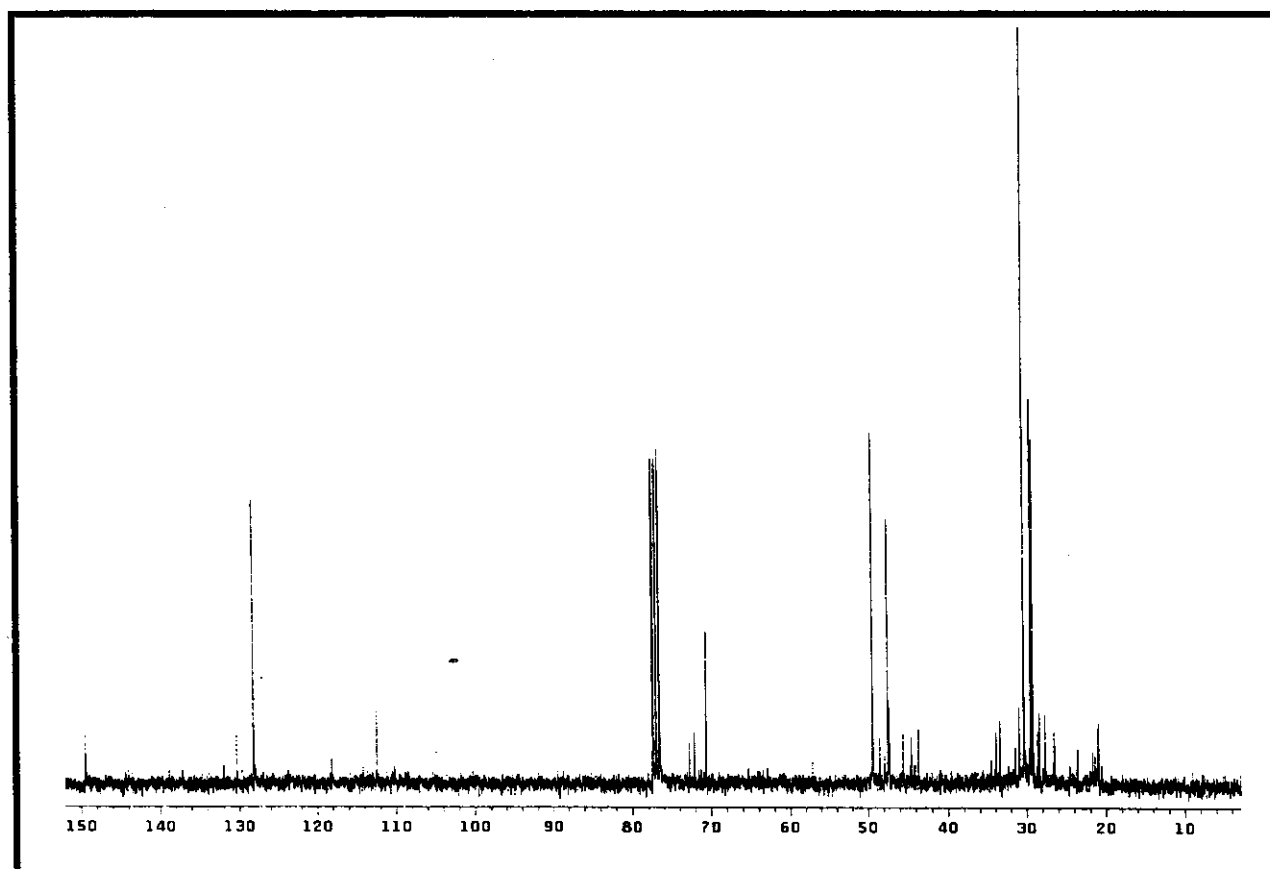


E 88 – Espectro de massas (70 eV) da substância 79a/79b.

Espectros

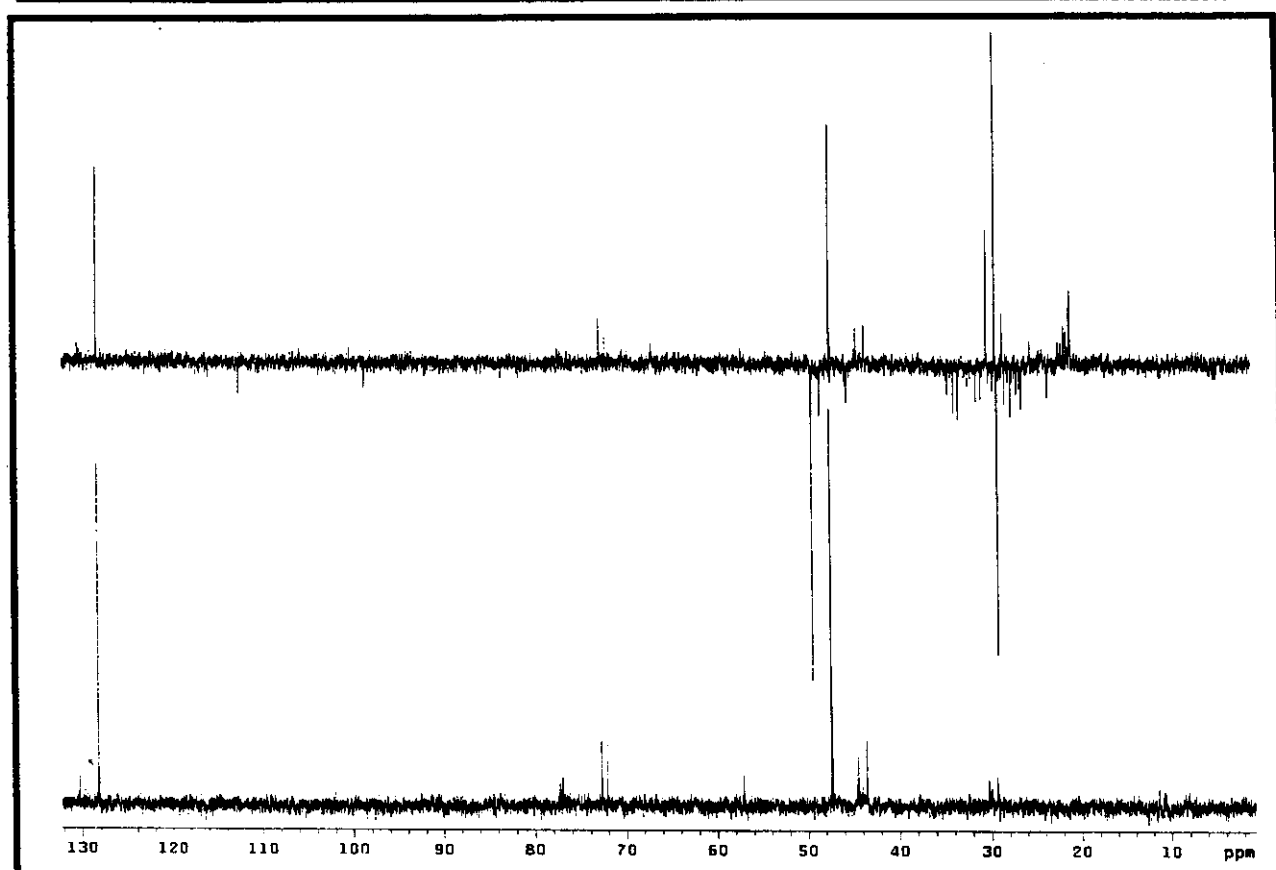


E 89 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 89.

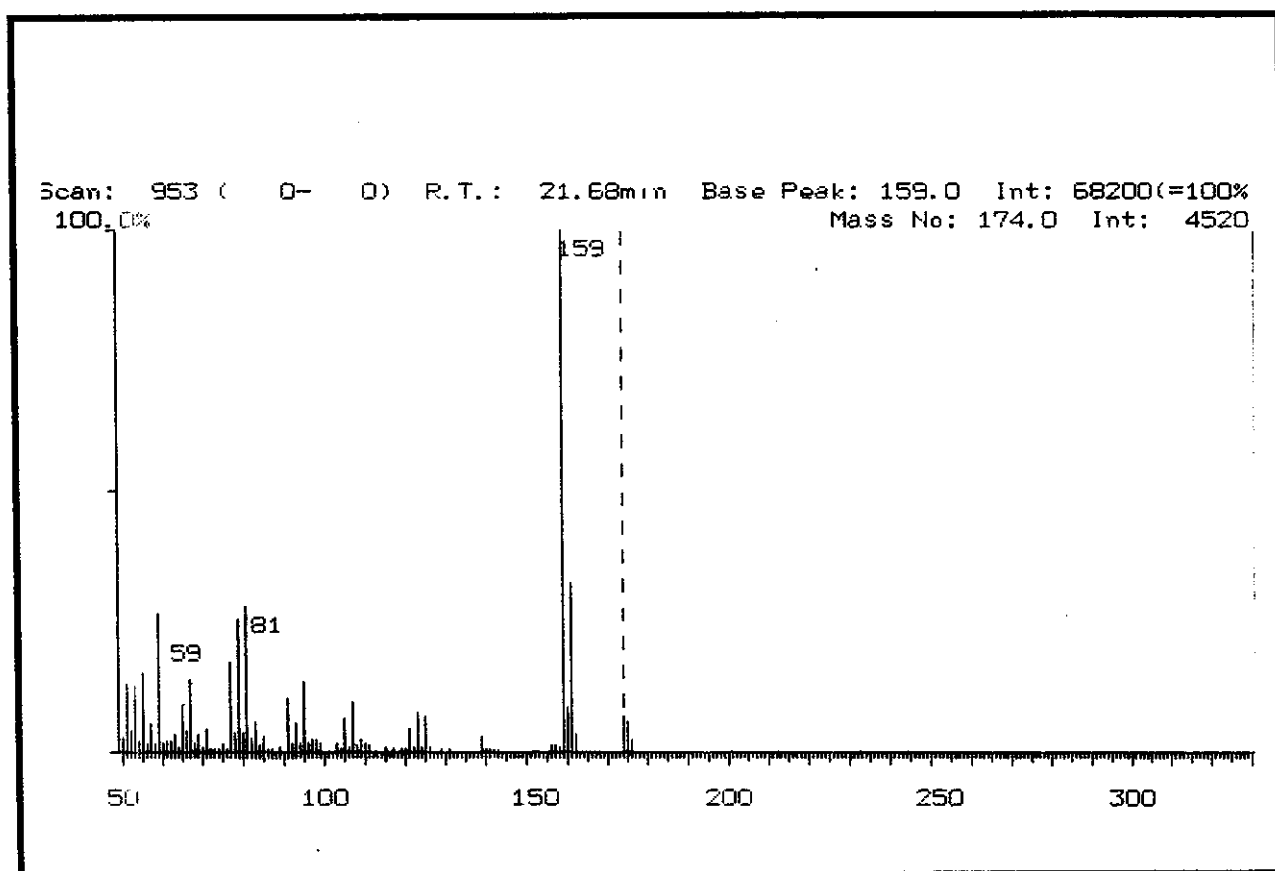


E 90 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 89.

Espectros

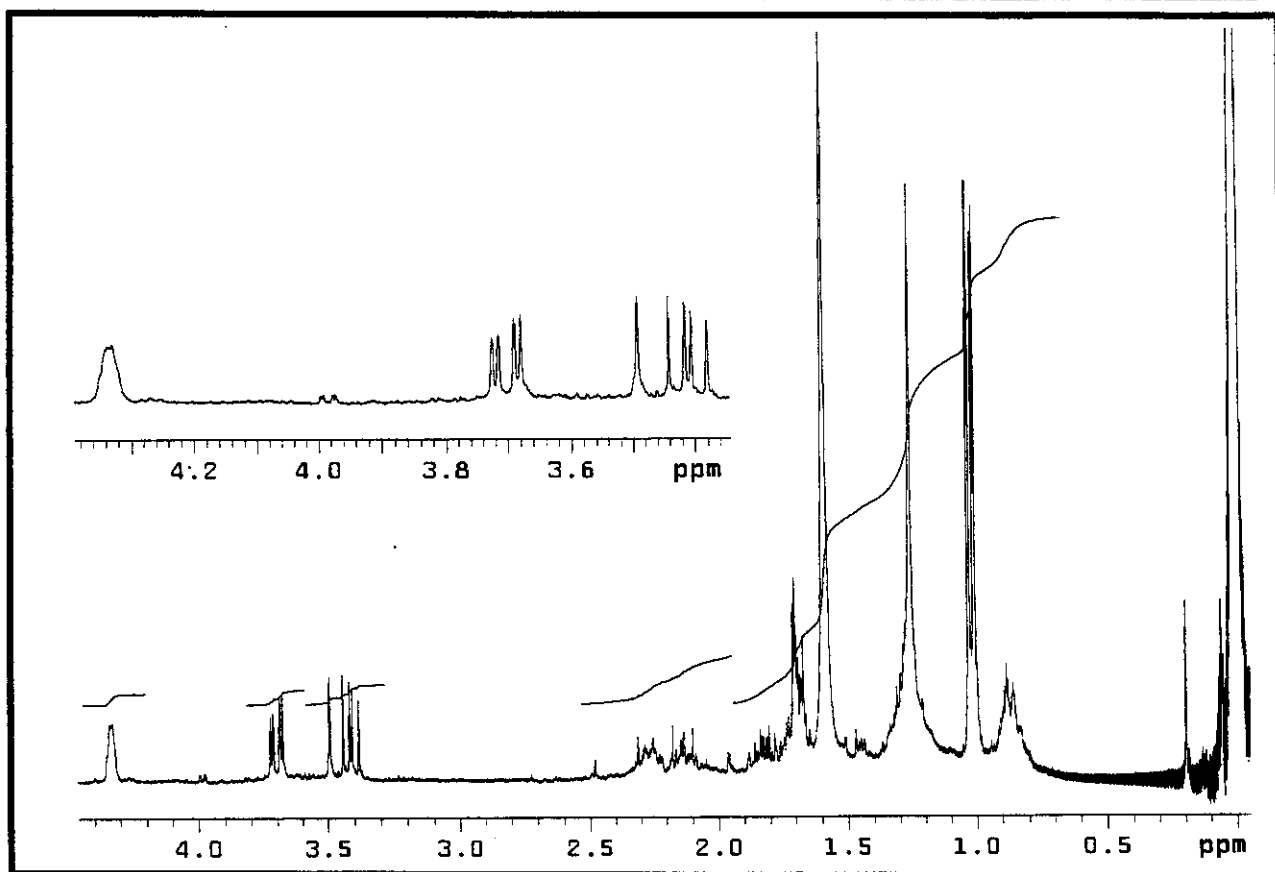


E 91-- Espectro DEPT (135° e 90°) da substância 89.

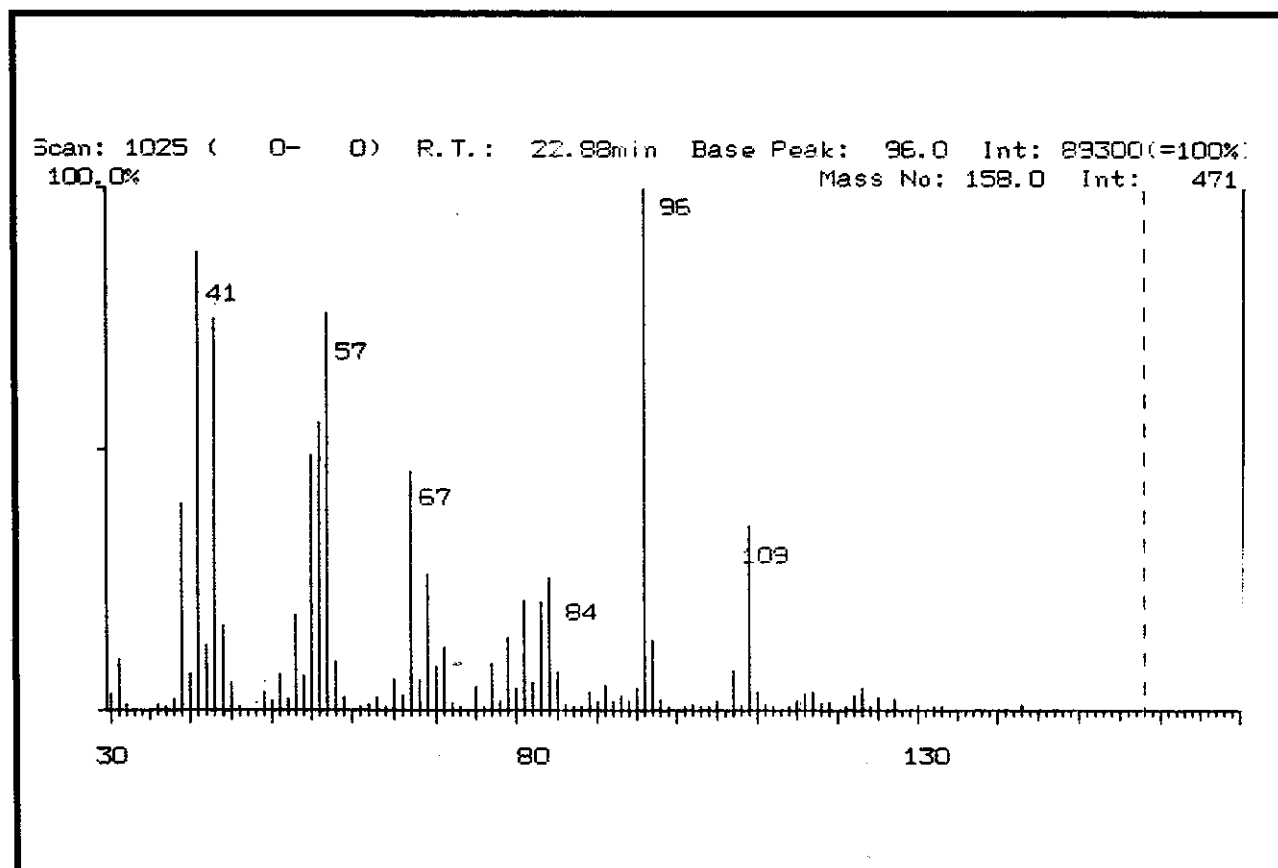


E 92 – Espectro de massas (70 eV) da substância 89.

Espectros

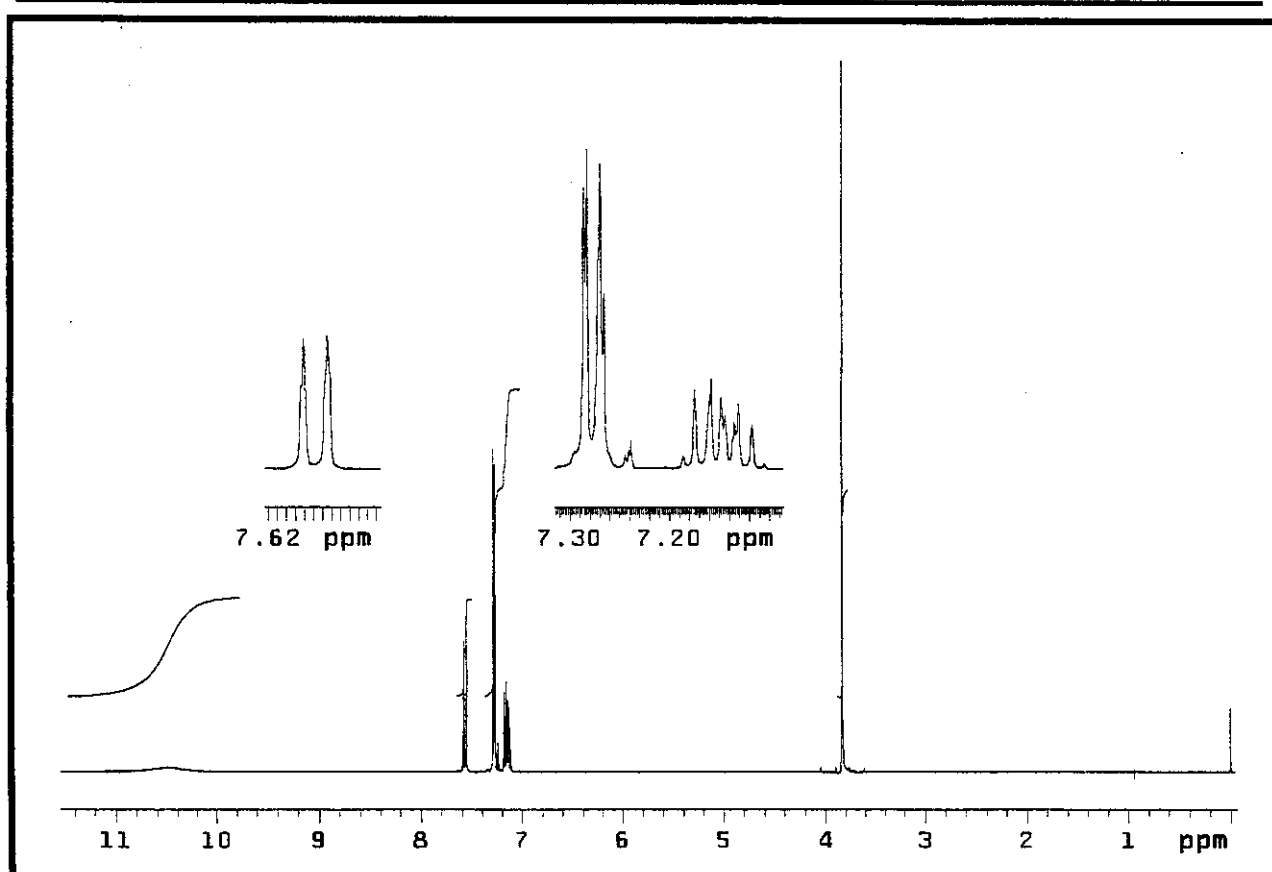


E 93 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 90

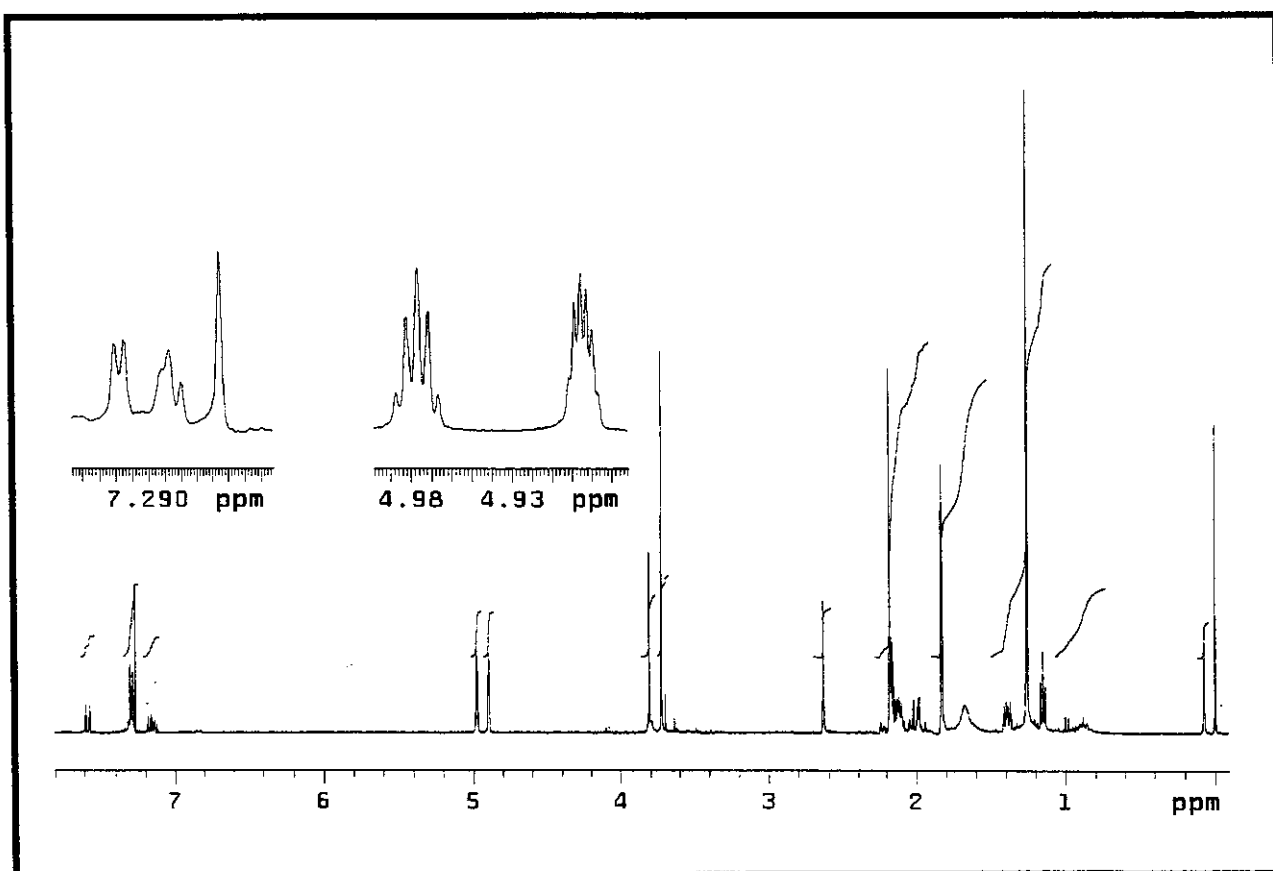


E 94 – Espectro de massas (70 eV) da substância 90.

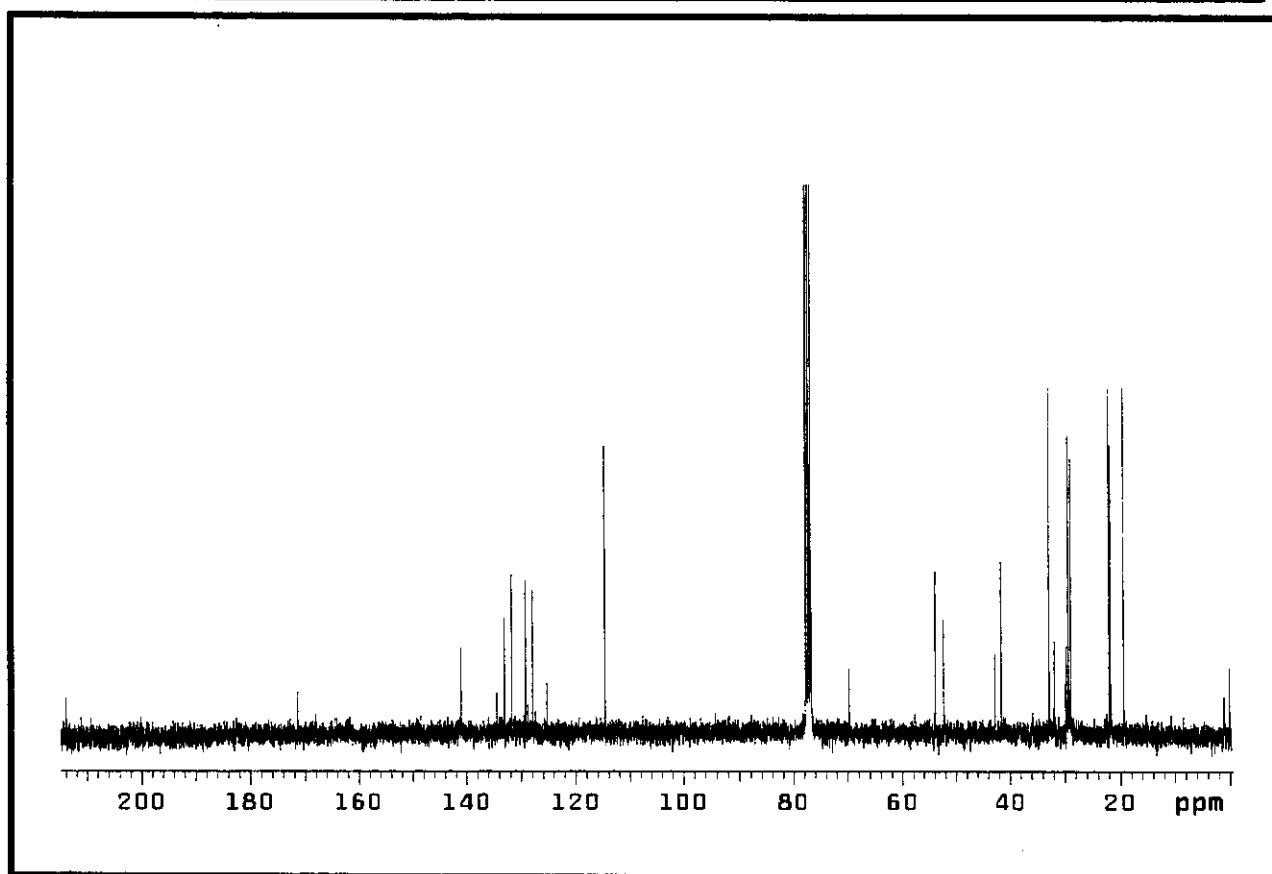
Espectros



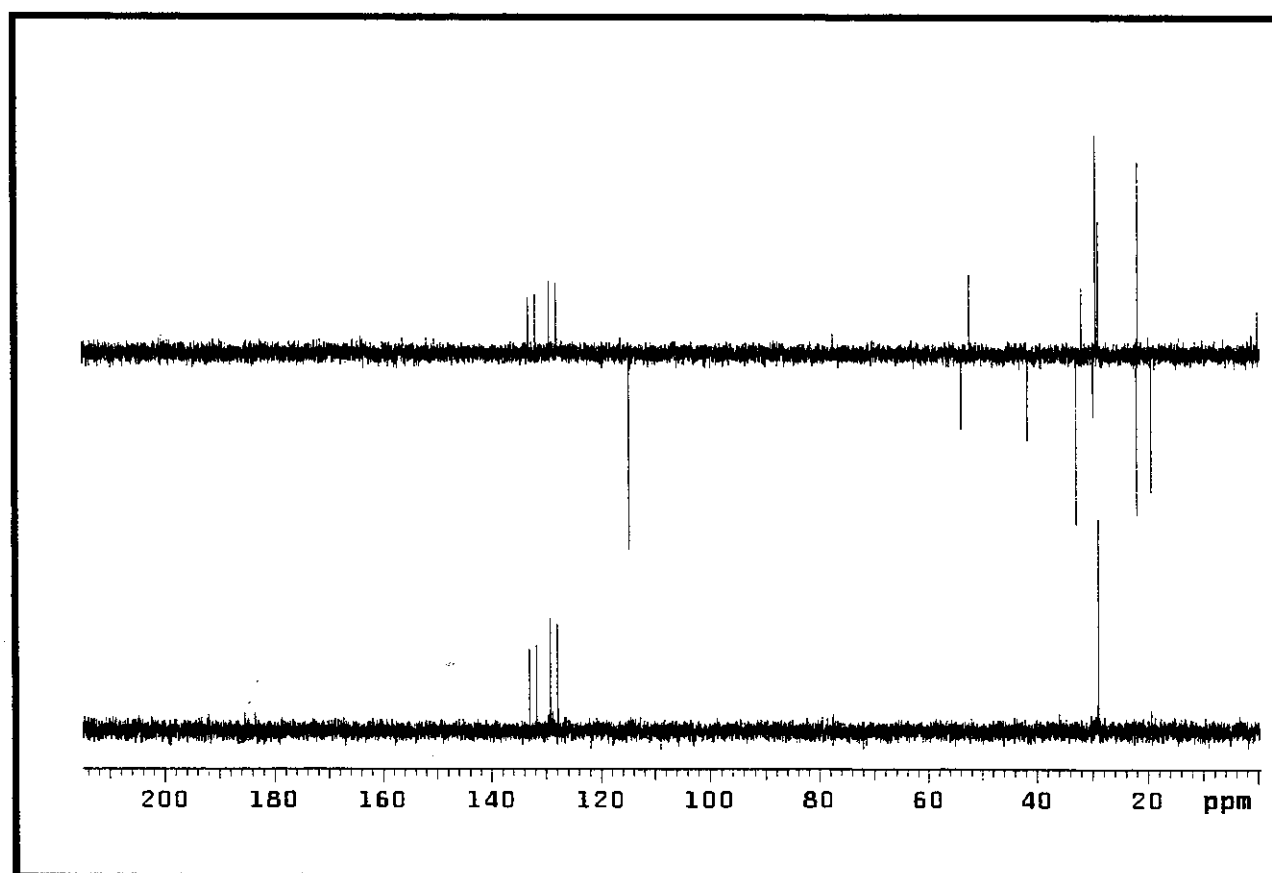
E 95 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 92.



E 96 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da mistura 92/93.

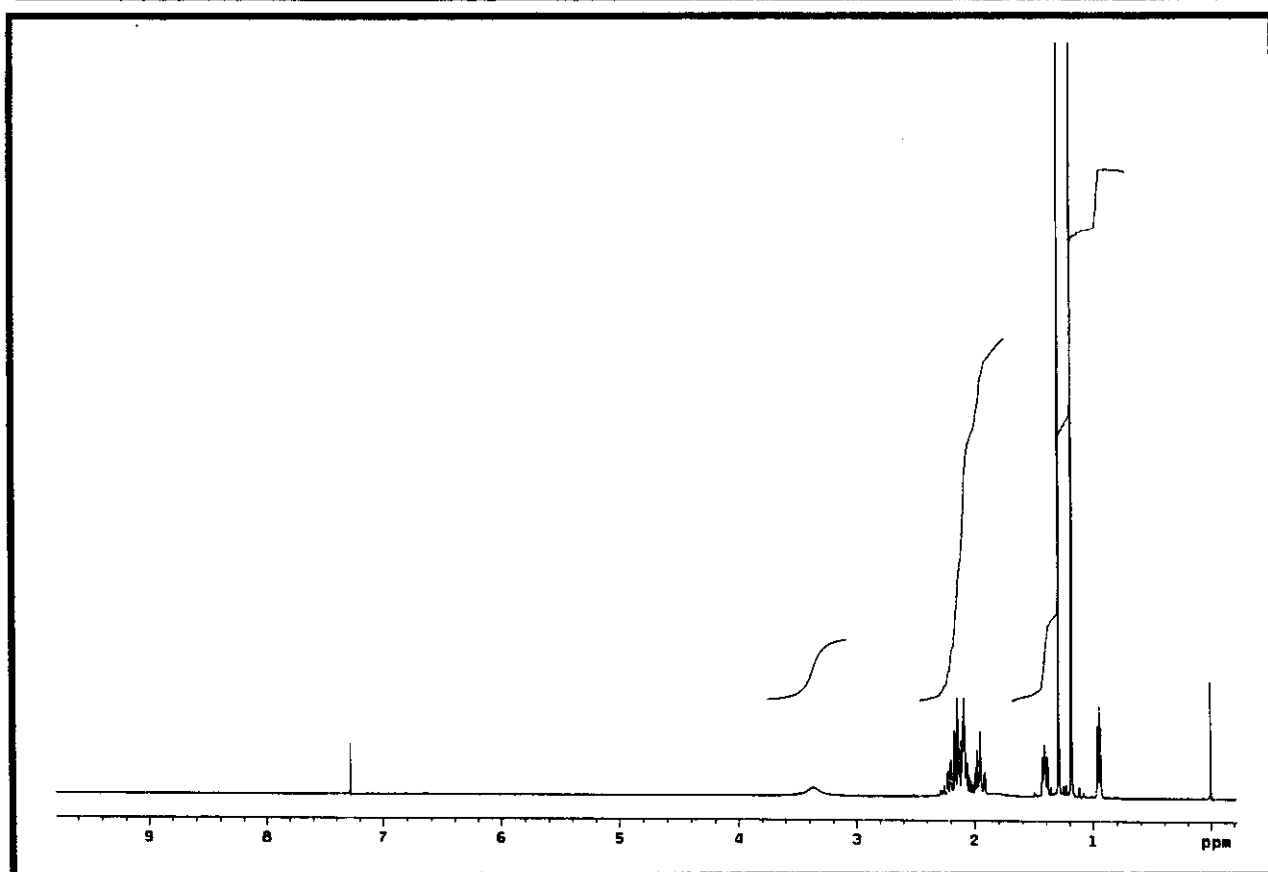


E 97 – Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3/TMS) da mistura 92/93.

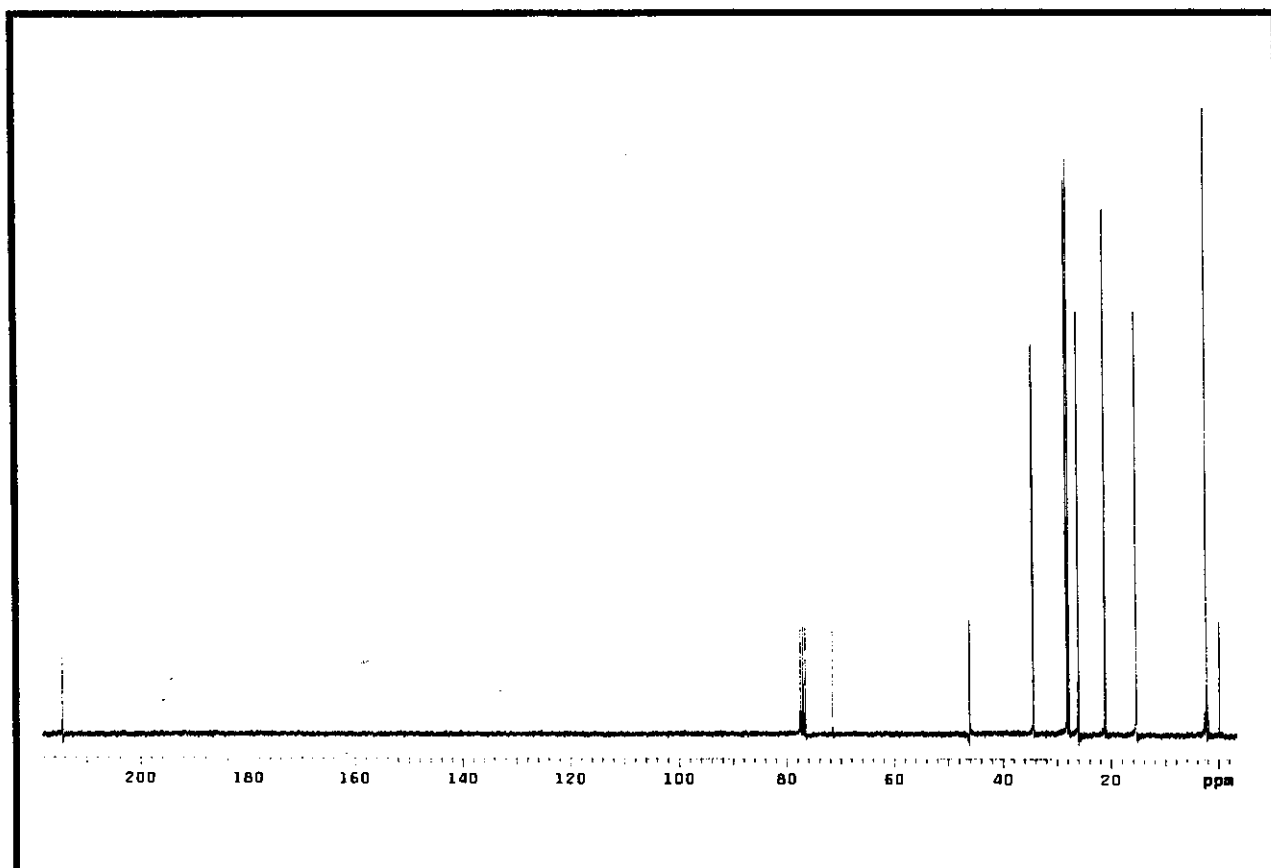


E 98 – Espectro DEPT (135° e 90°) da mistura 92/93.

Espectros

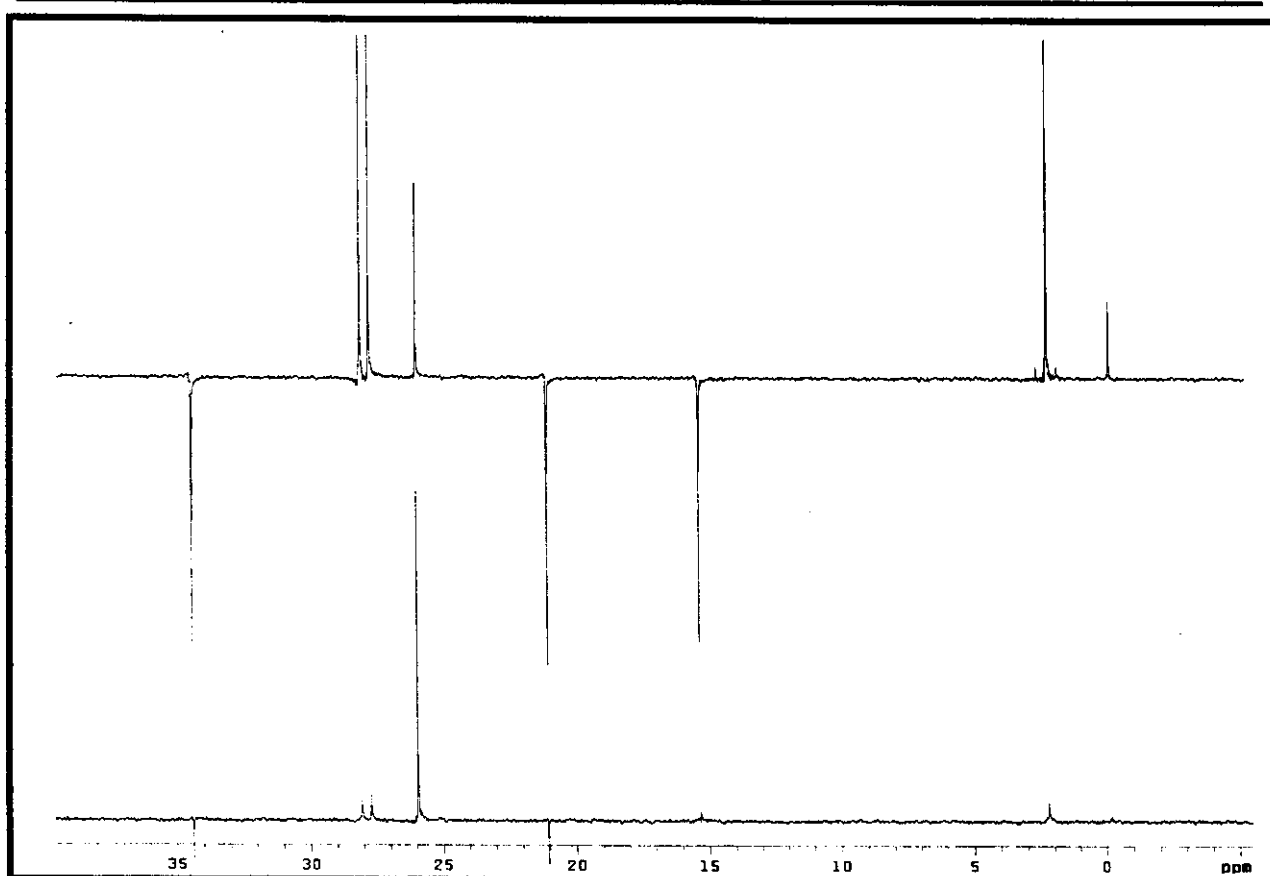


E 99 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 96b.

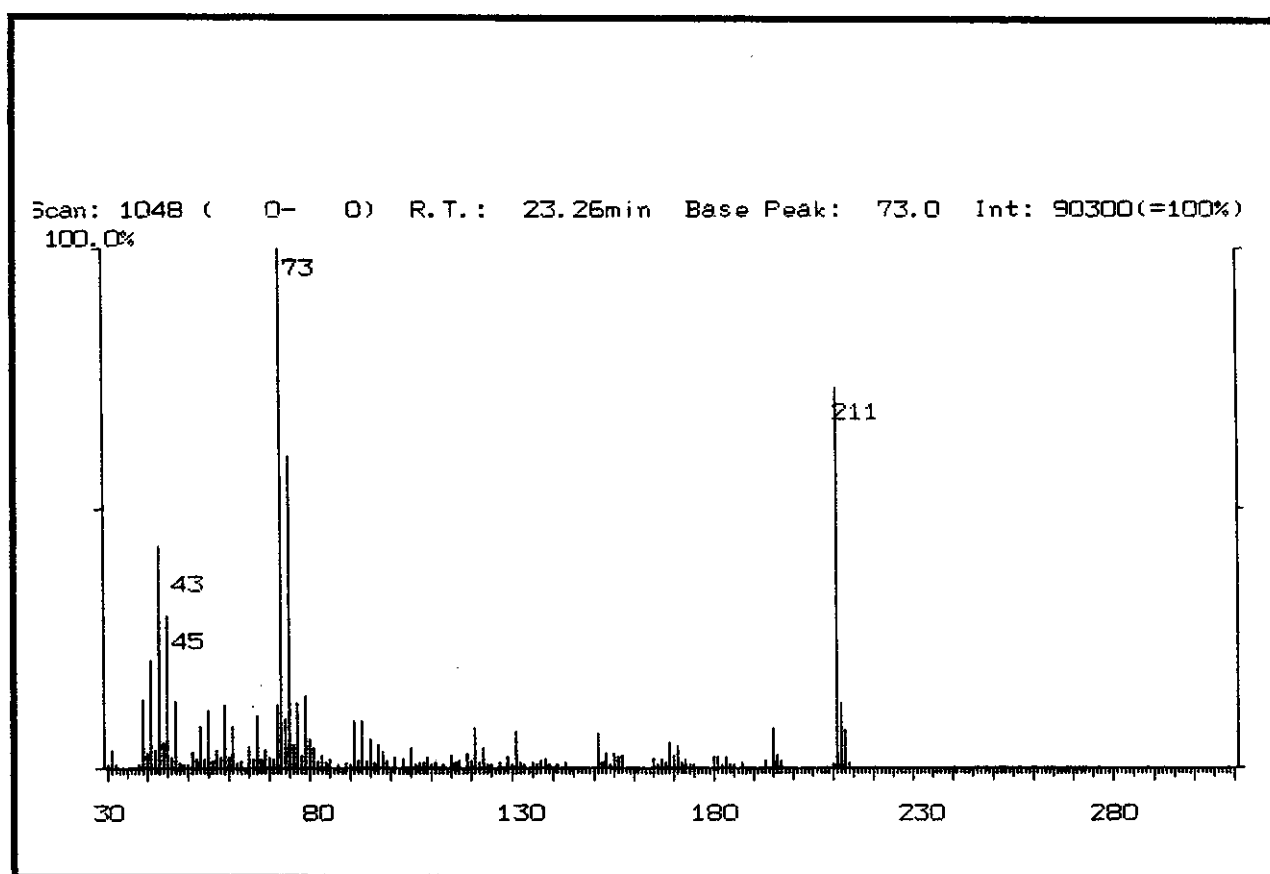


E 100 – Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 96b.

Espectros

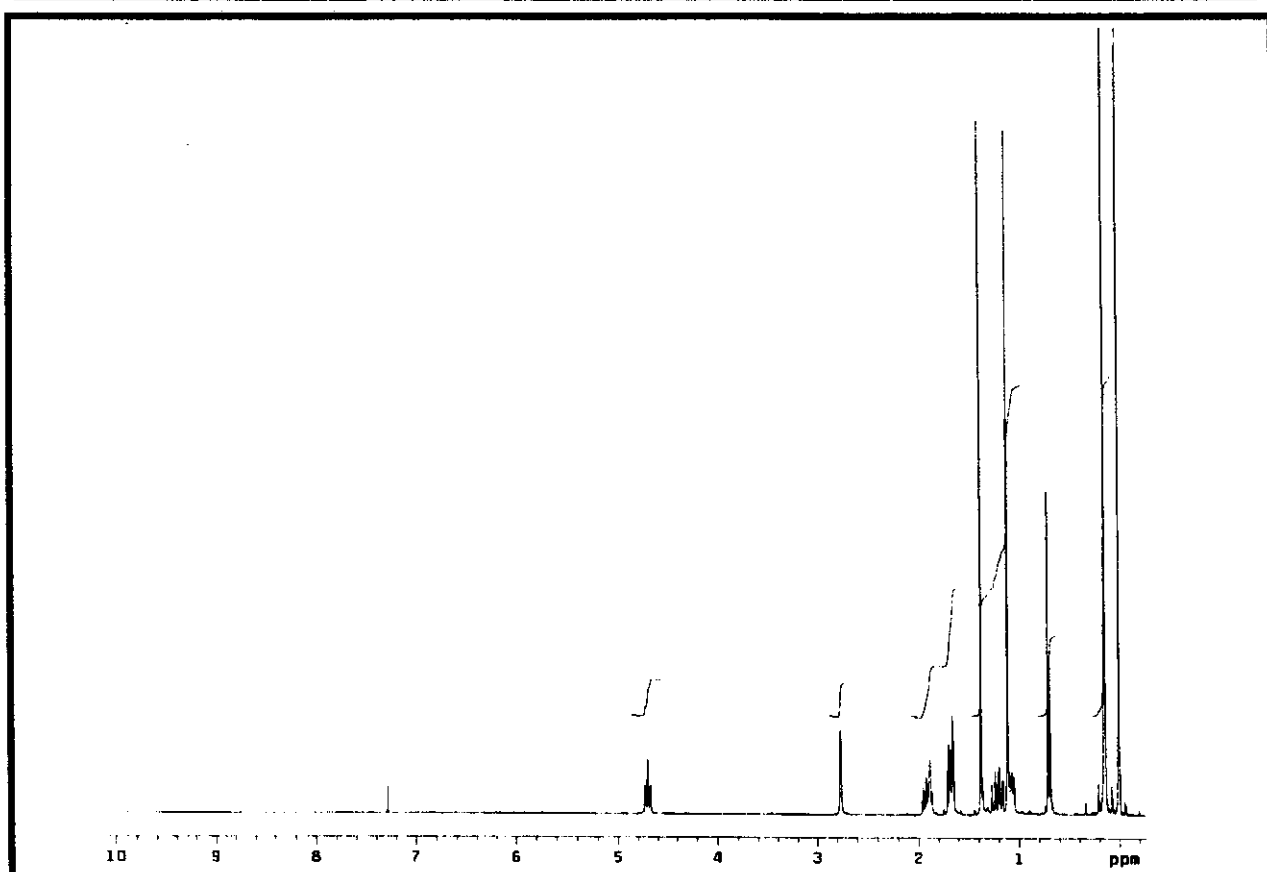


E 101 – Espectro DEPT (135° e 90°) da substância 96b.

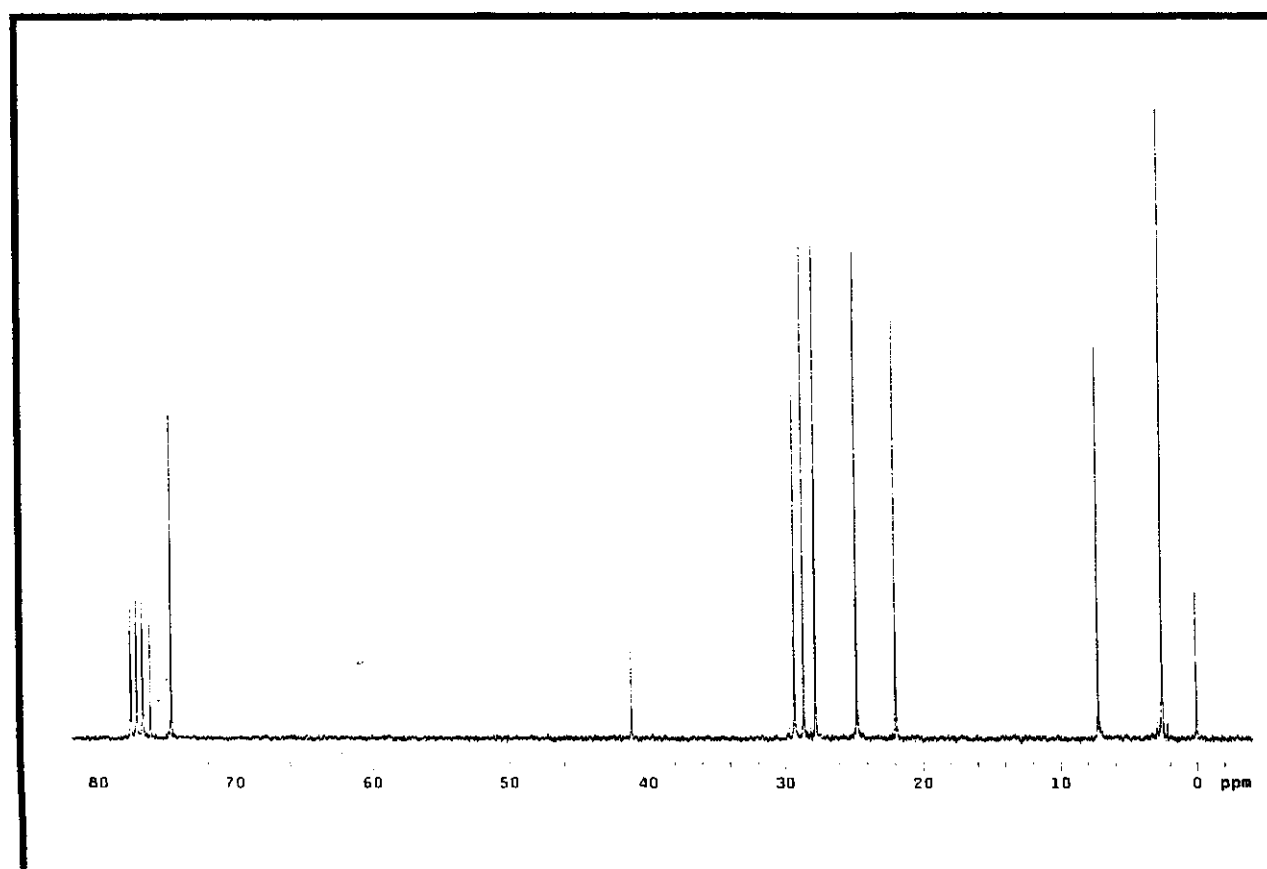


E 102 – Espectro de massas (70 eV) da substância 96b.

Espectros

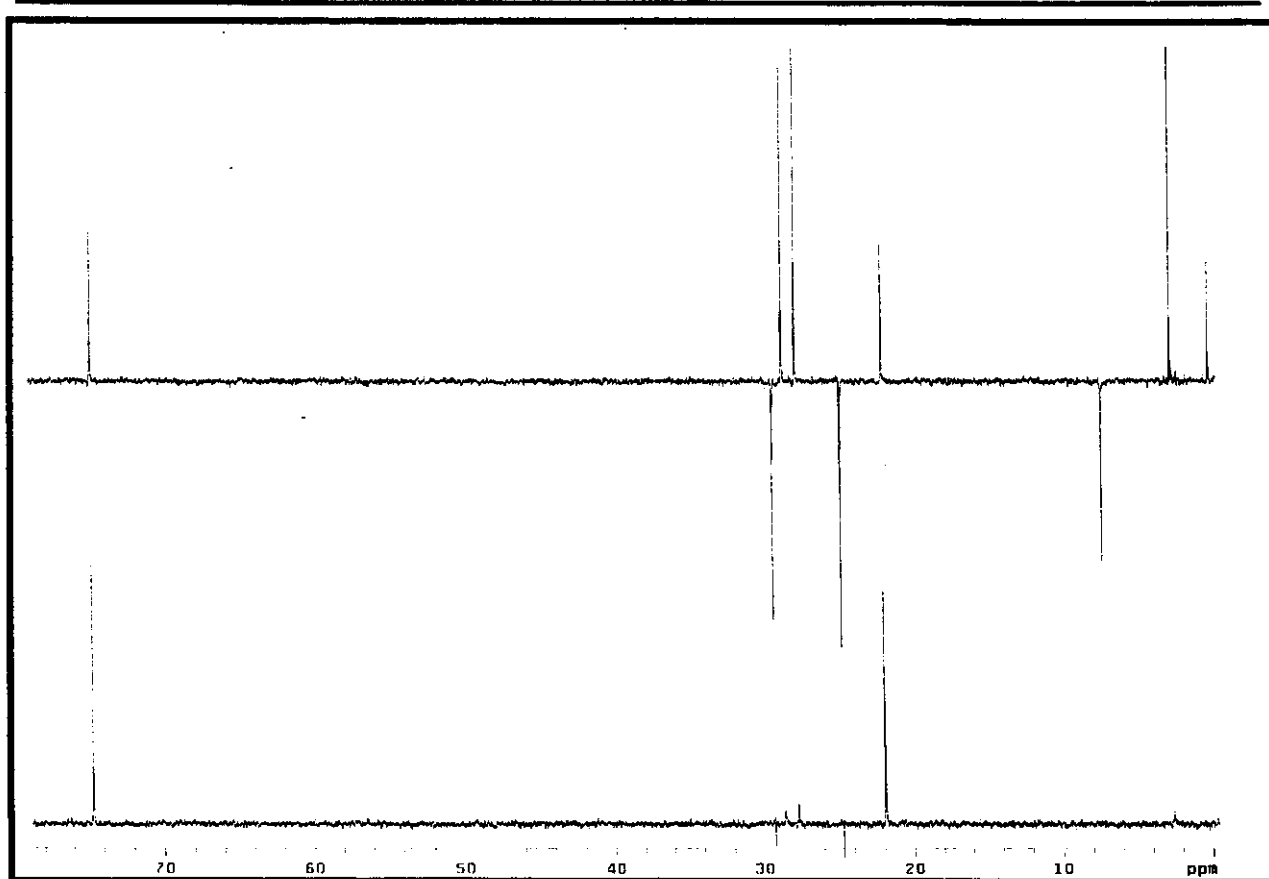


E 103 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 97b.

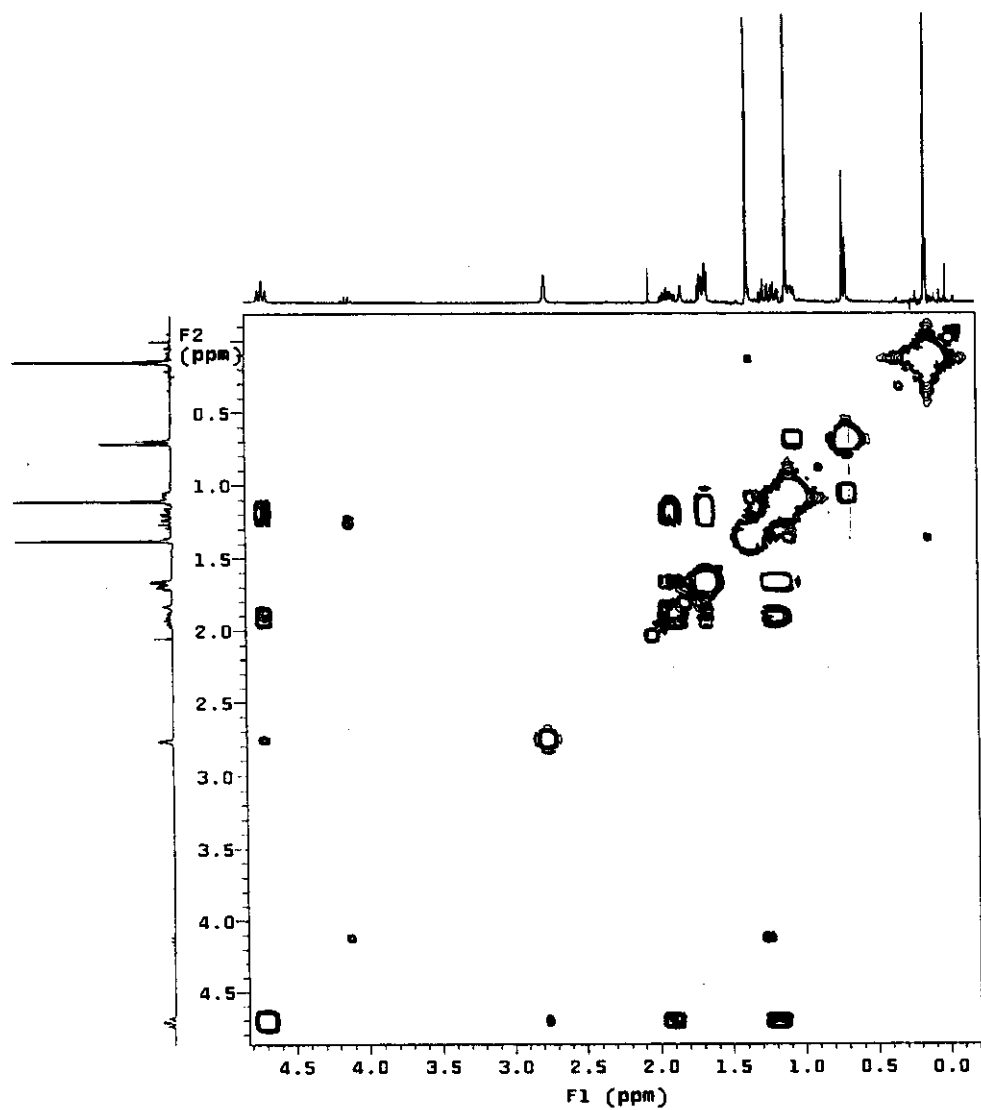


E 104 – Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 97b.

Espectros

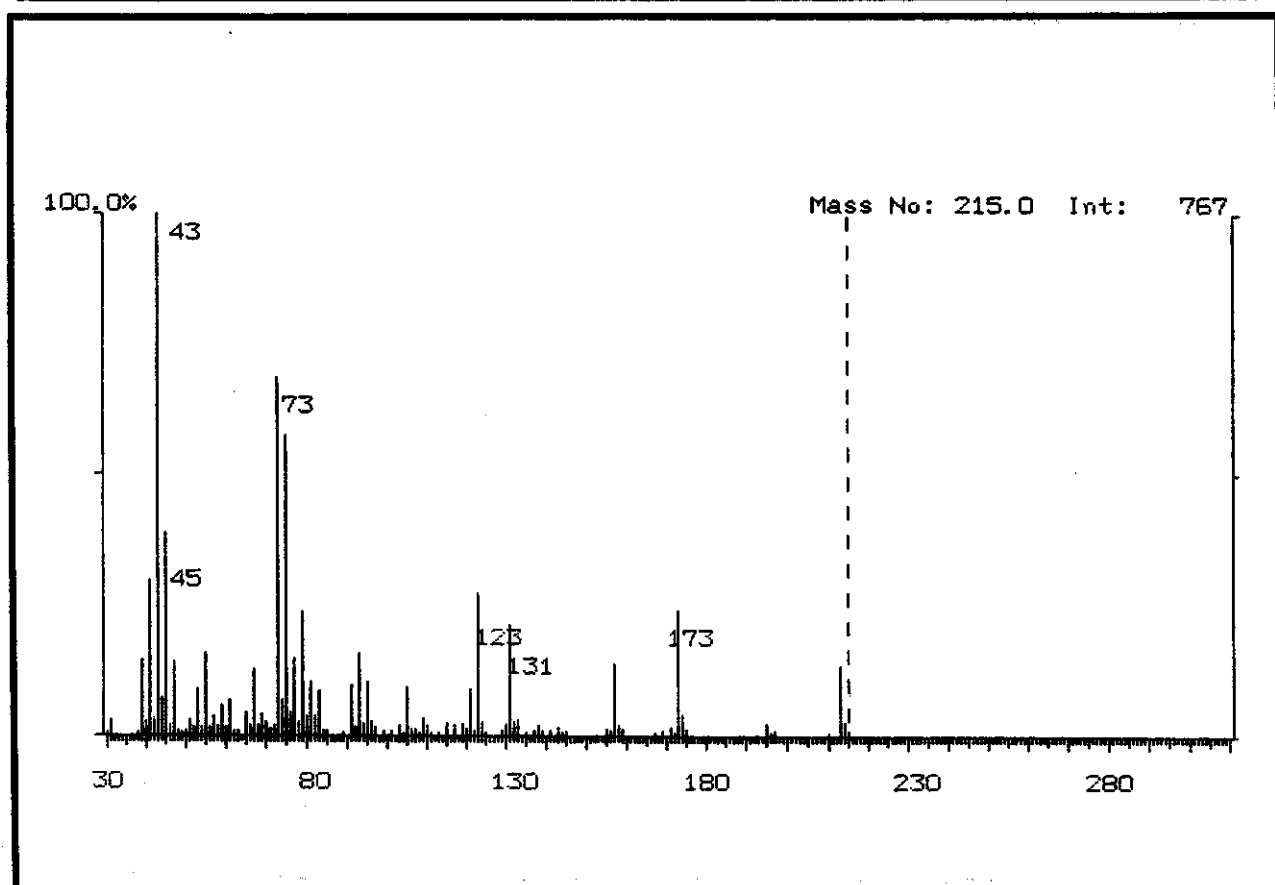


E 105 – Espectro DEPT (135° e 90°) da substância 97b.



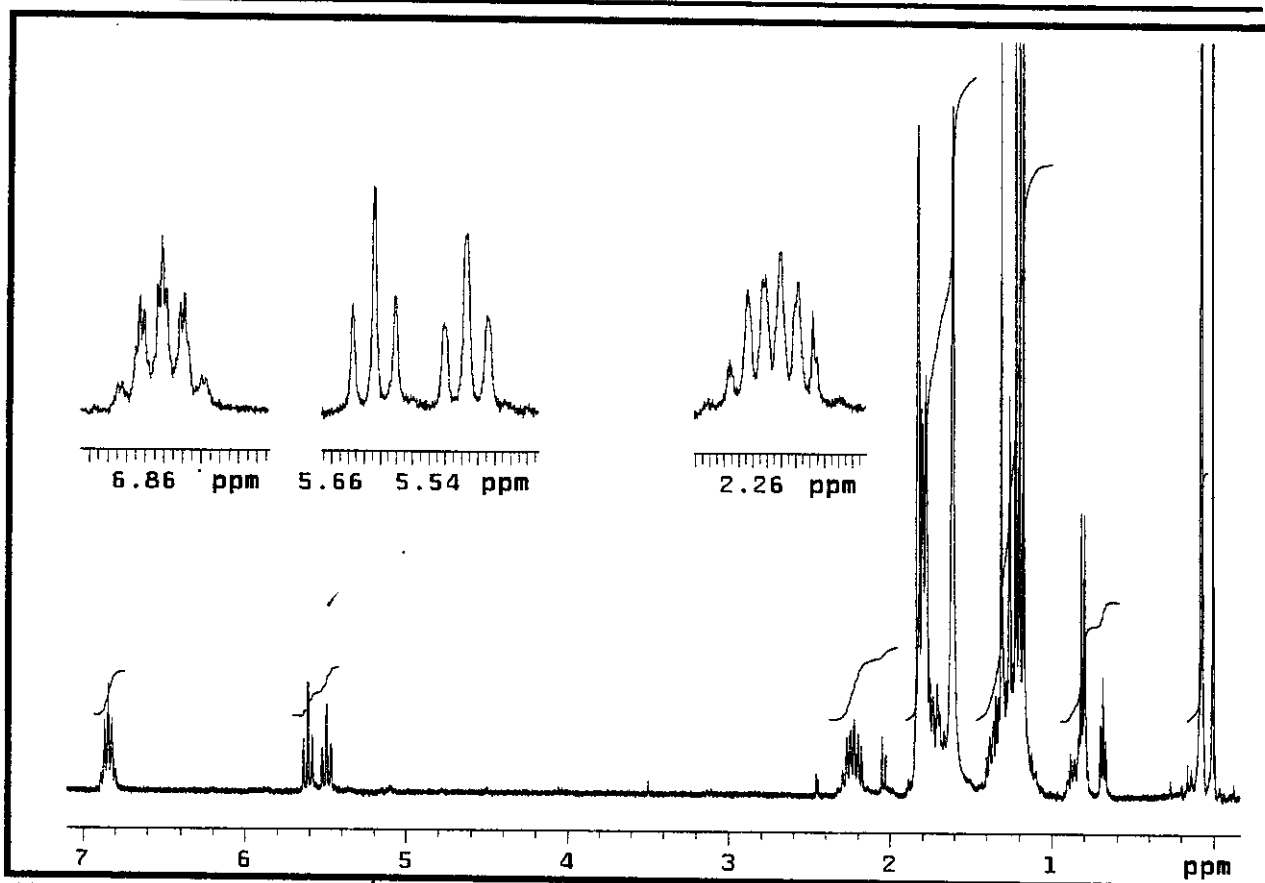
E 106 – Espectro de RMN²D de correlação homonuclear (¹H, ¹H– COSY) da substância 97b.

Espectros

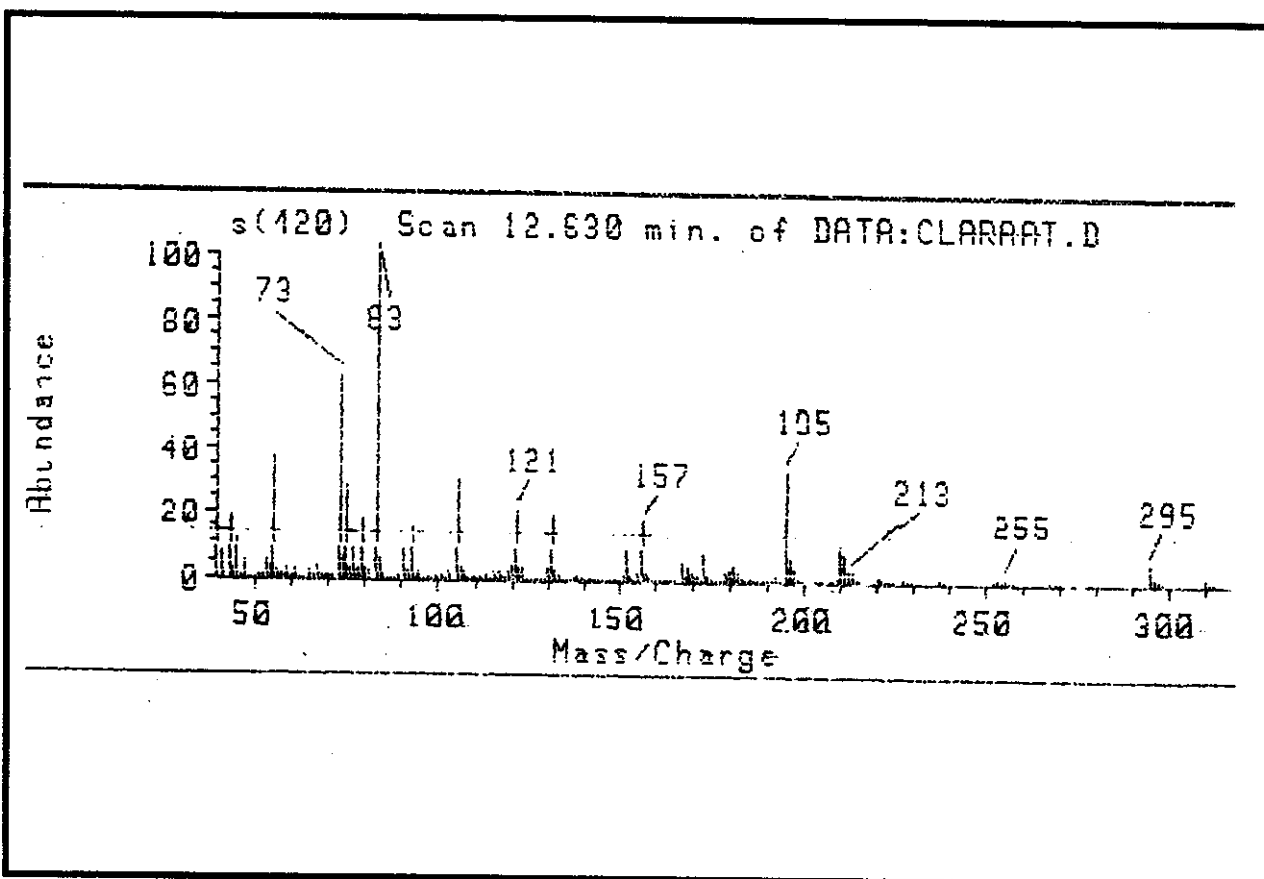


E 107 – Espectro massas (70eV) da substância 97b.

Espectros

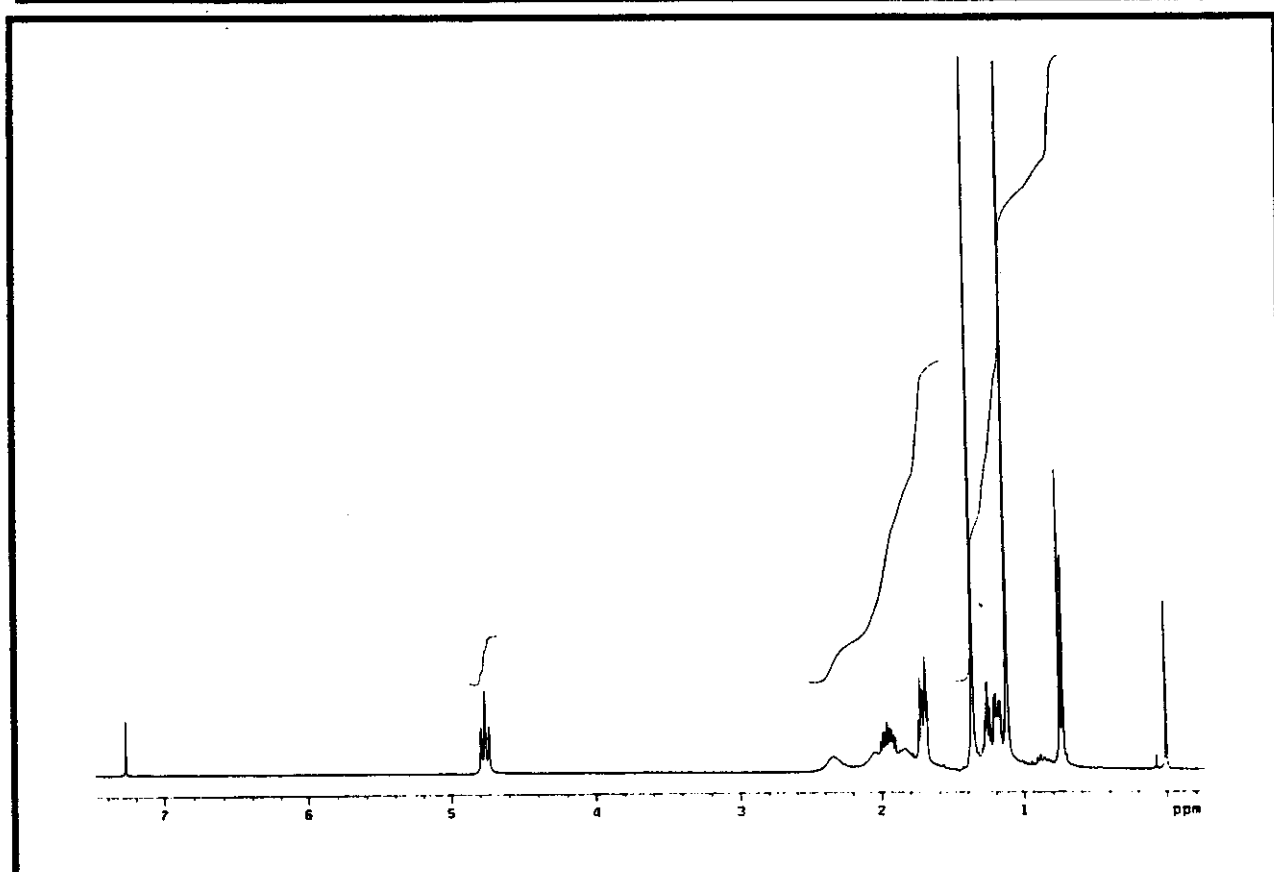


E 108 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 98a.

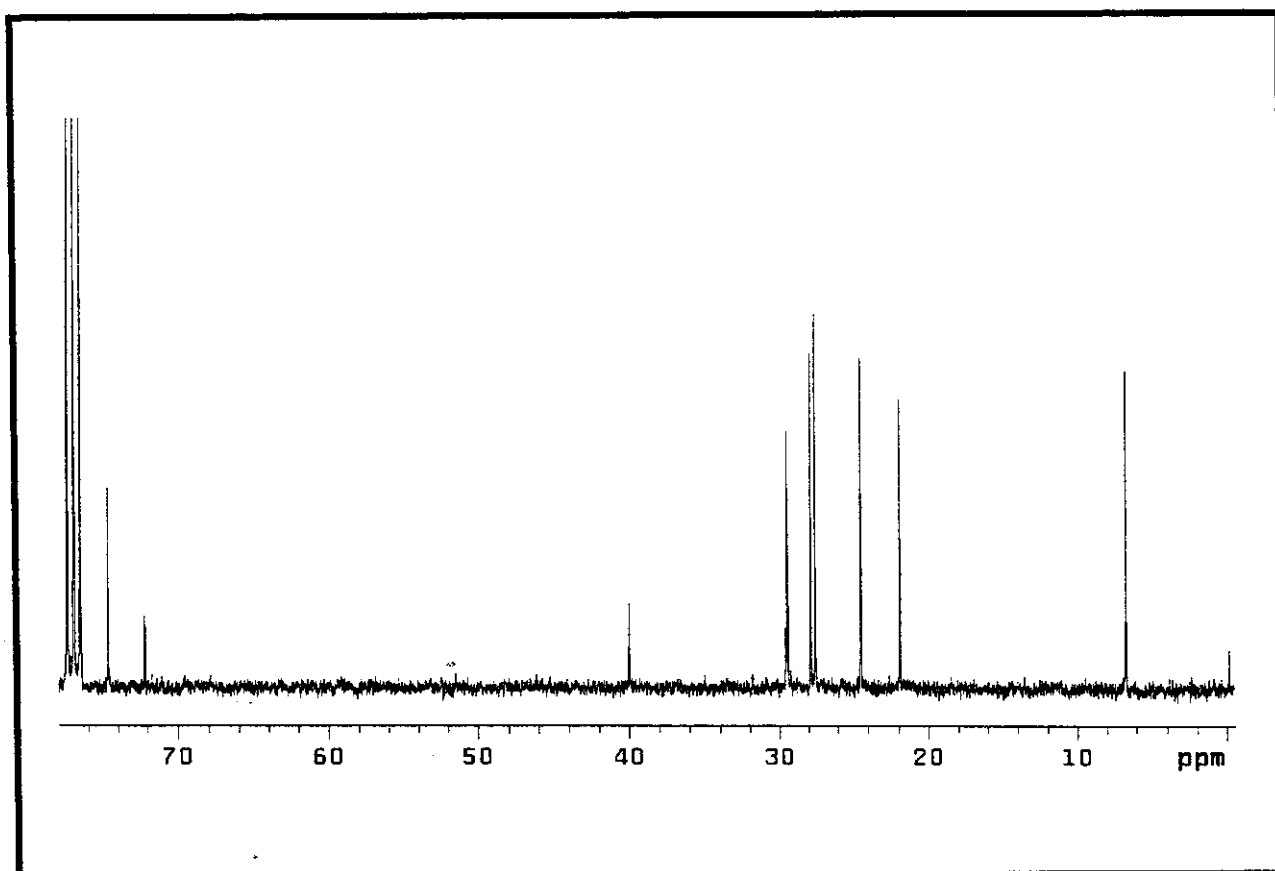


E 109 – Espectro massas (70eV) da substância 98a.

Espectros

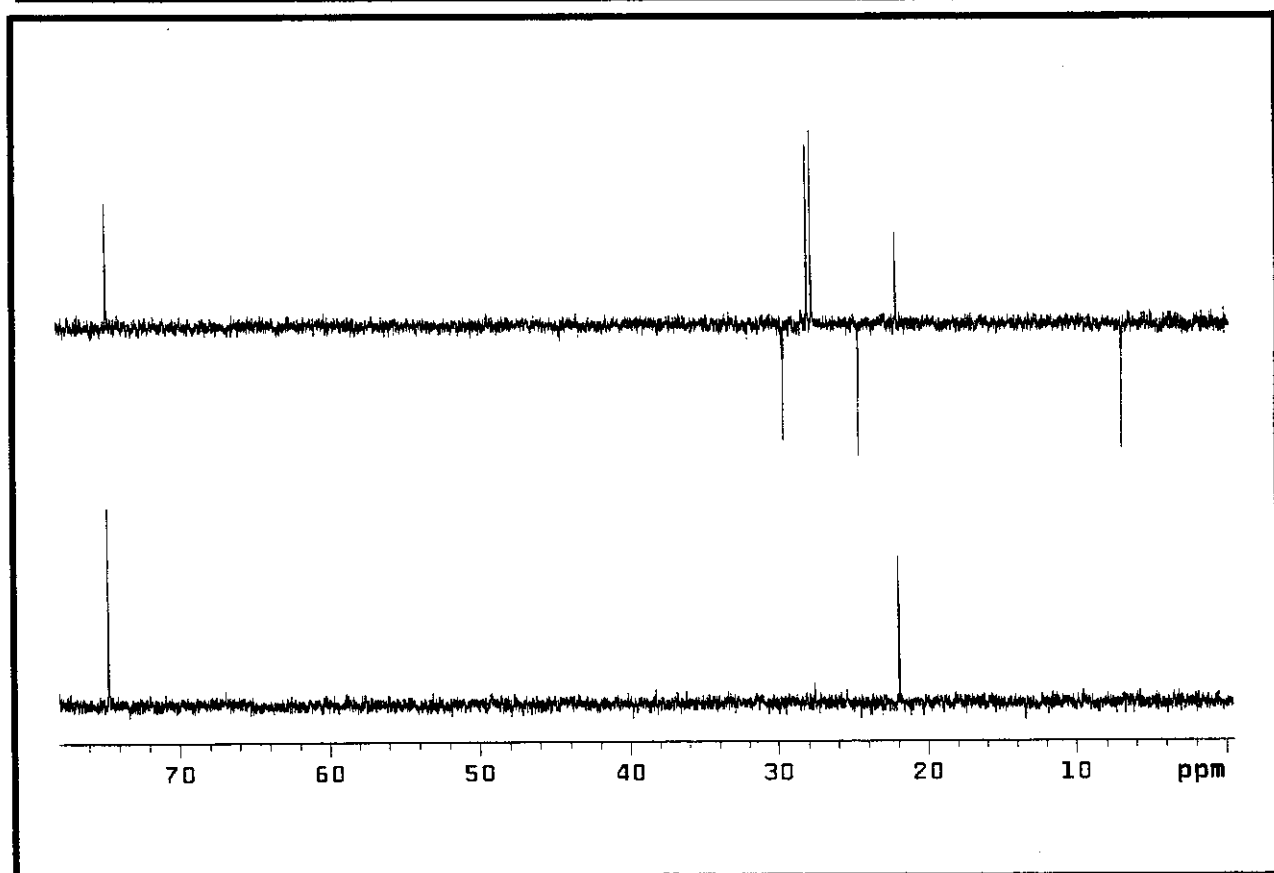


E 110 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 99a.

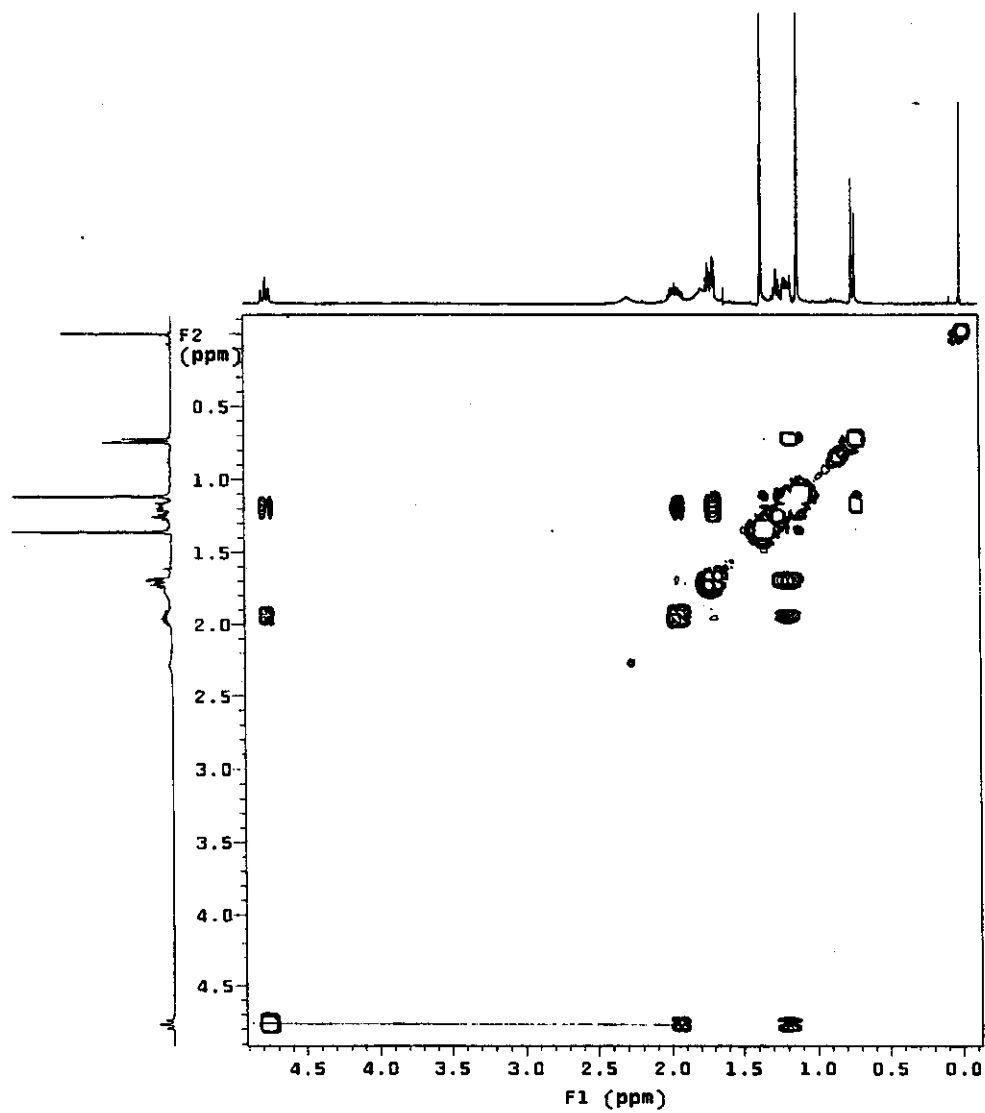


E 111 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 99a.

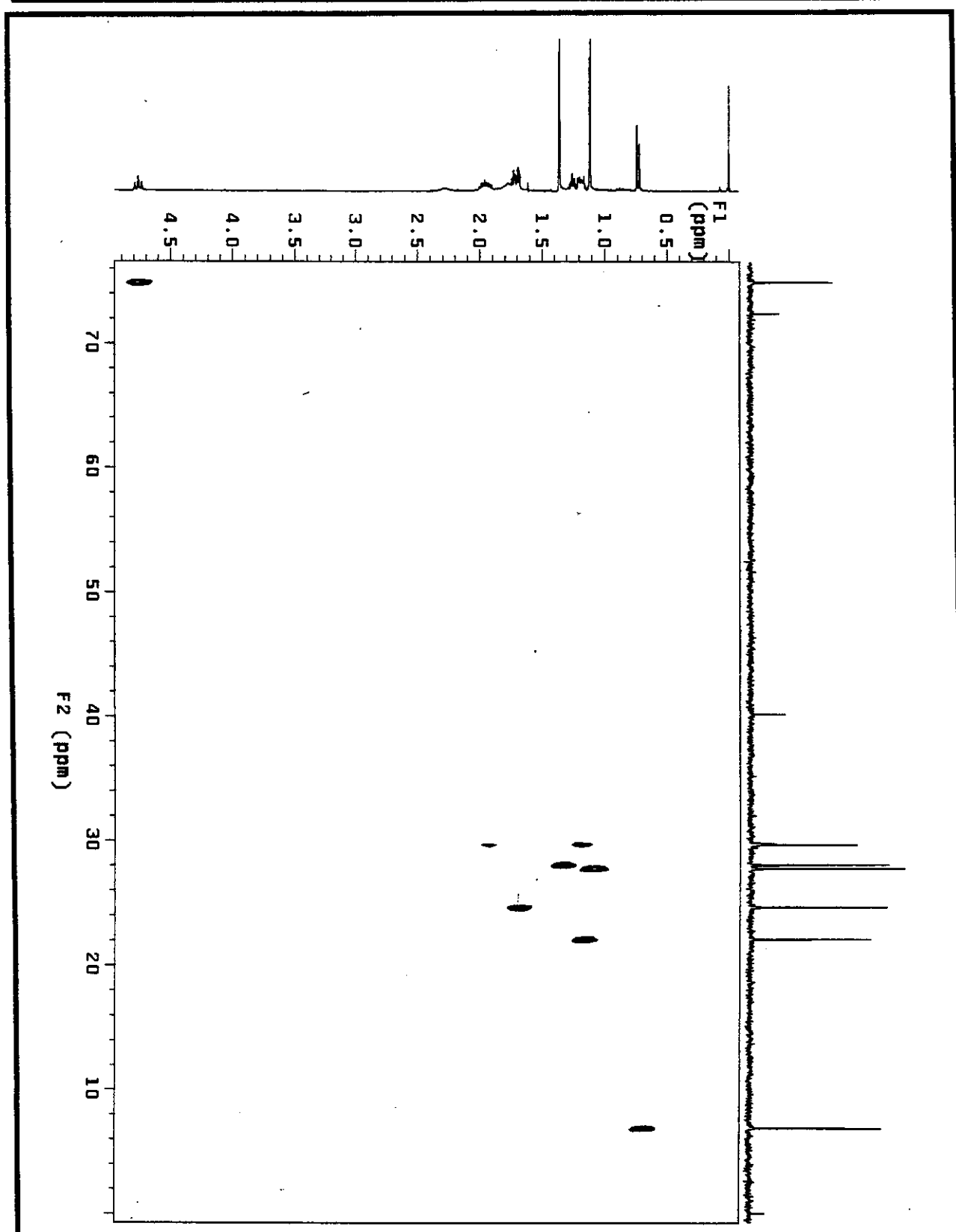
Espectros



E 112 – Espectro DEPT (135° e 90°) da substância 99a.

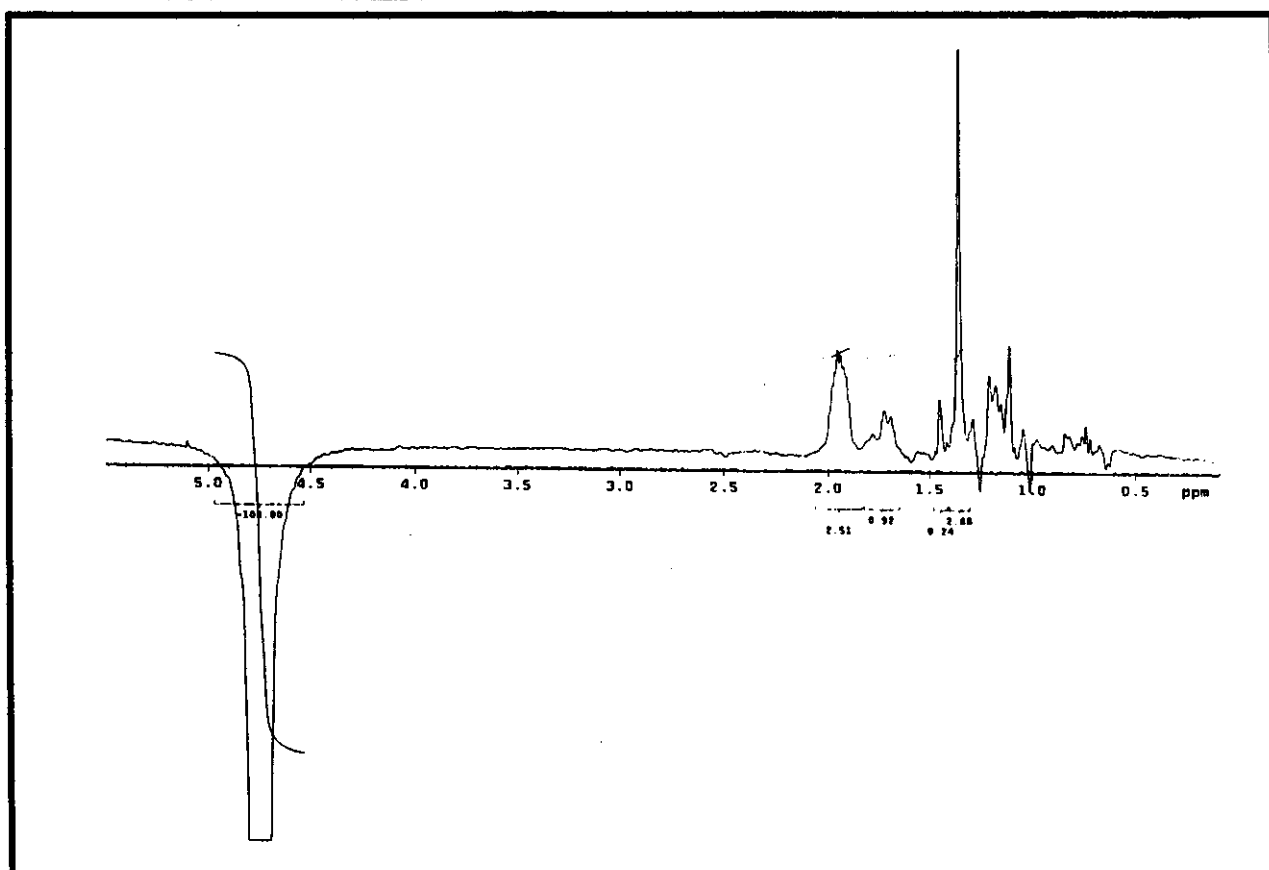


E 113 – Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear (^1H , ^1H – COSY) da substância 99a.

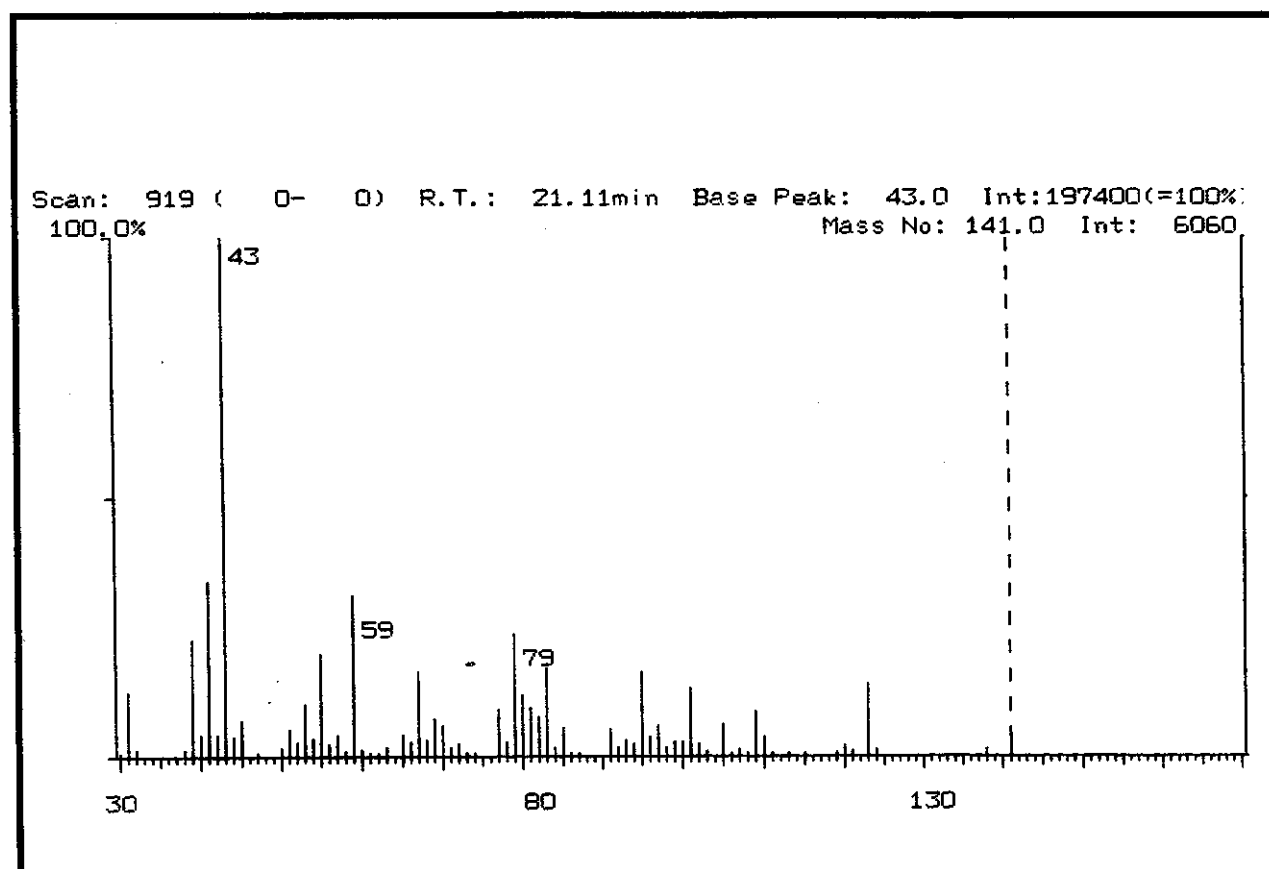


E 114 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR) da substância 99a.

Espectros

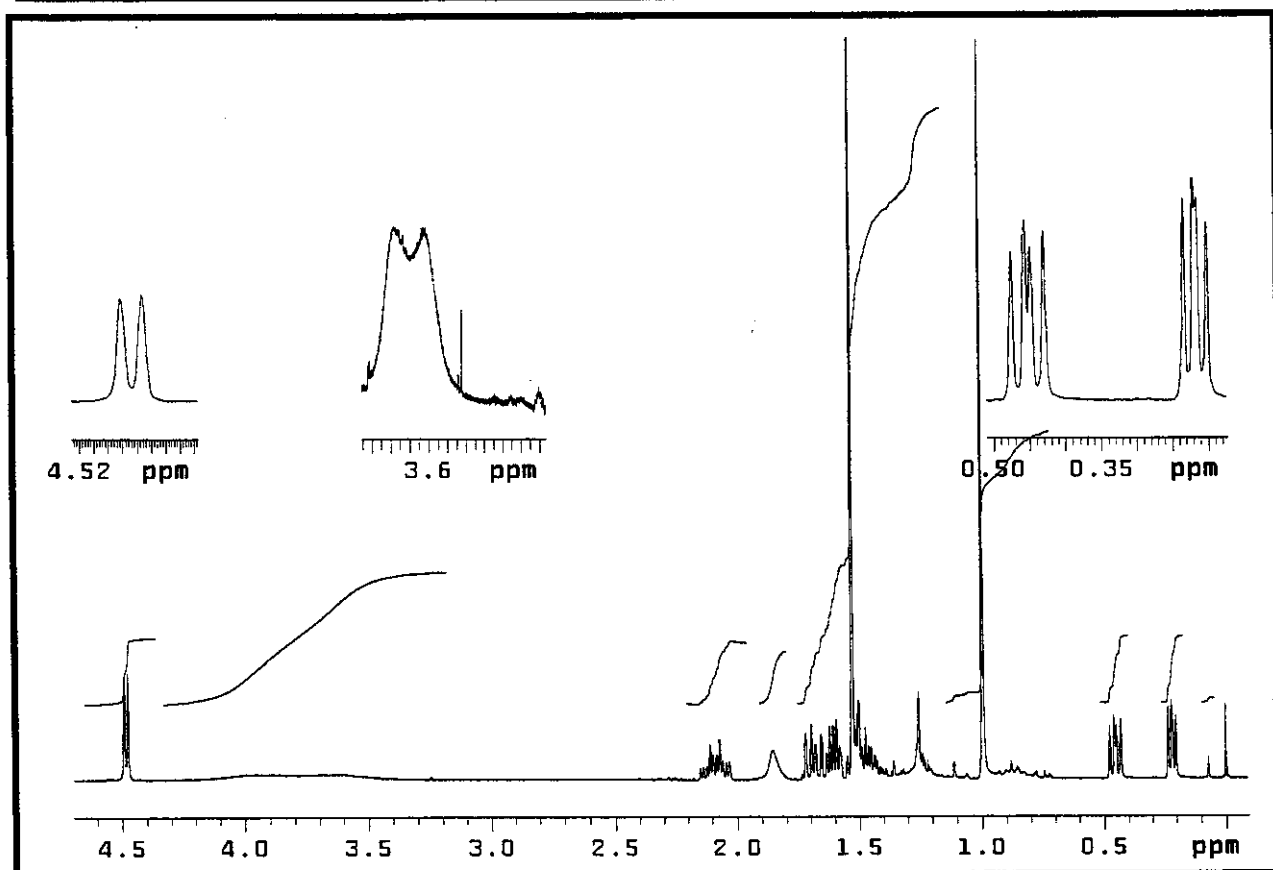


E 115 – Espectro de diferença de NOE do composto 99a.

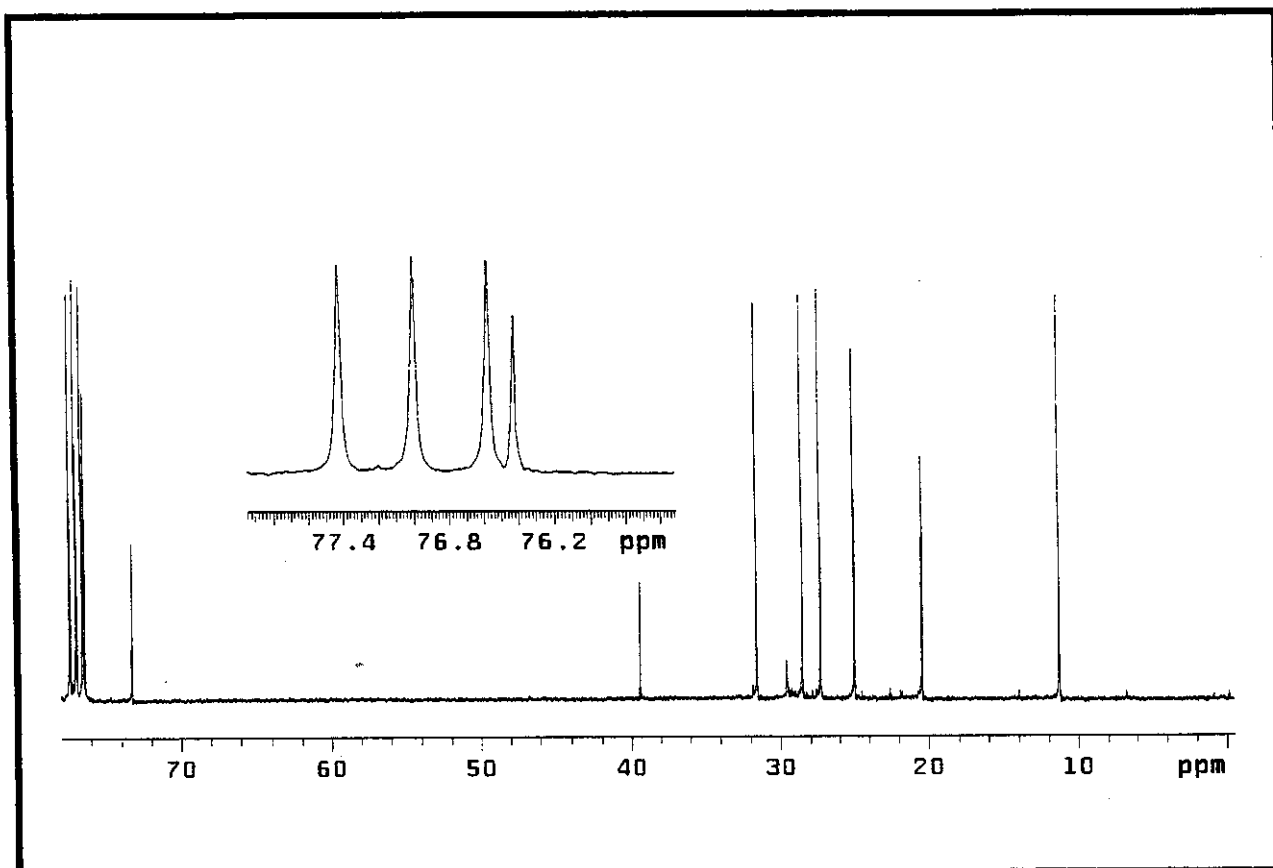


E 116 – Espectro massas (70eV) da substância 99a.

Espectros

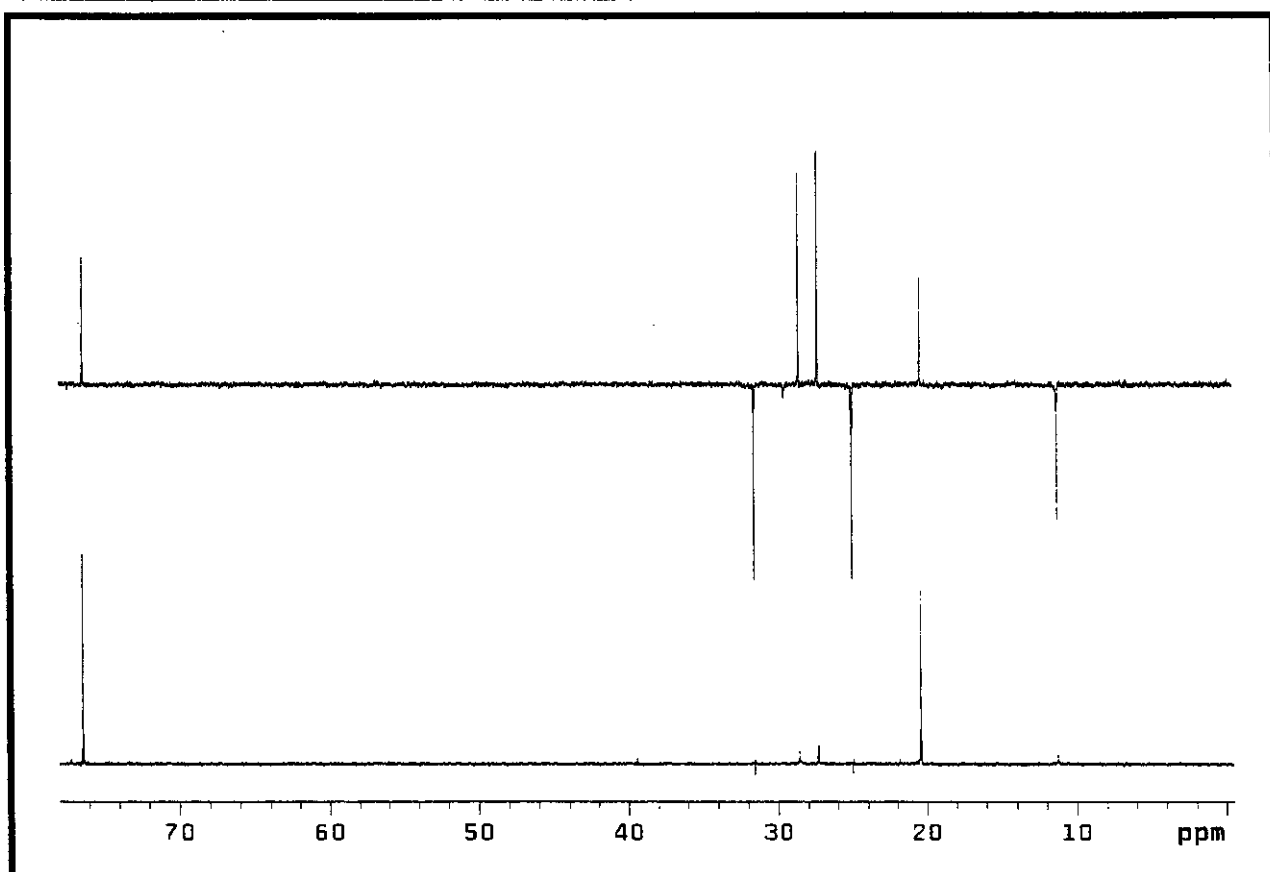


E 117 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância **99b**.

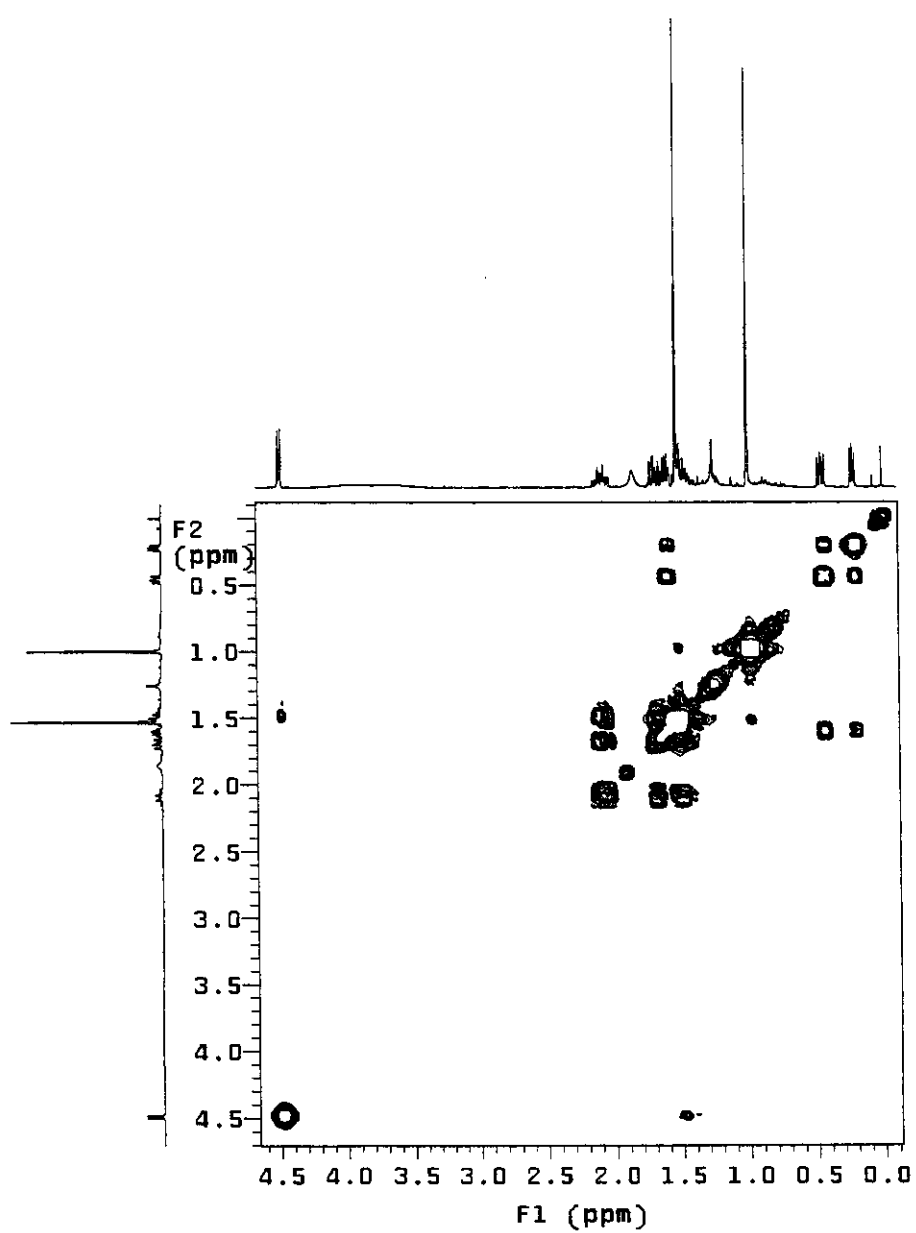


E 118 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) da substância **99b**.

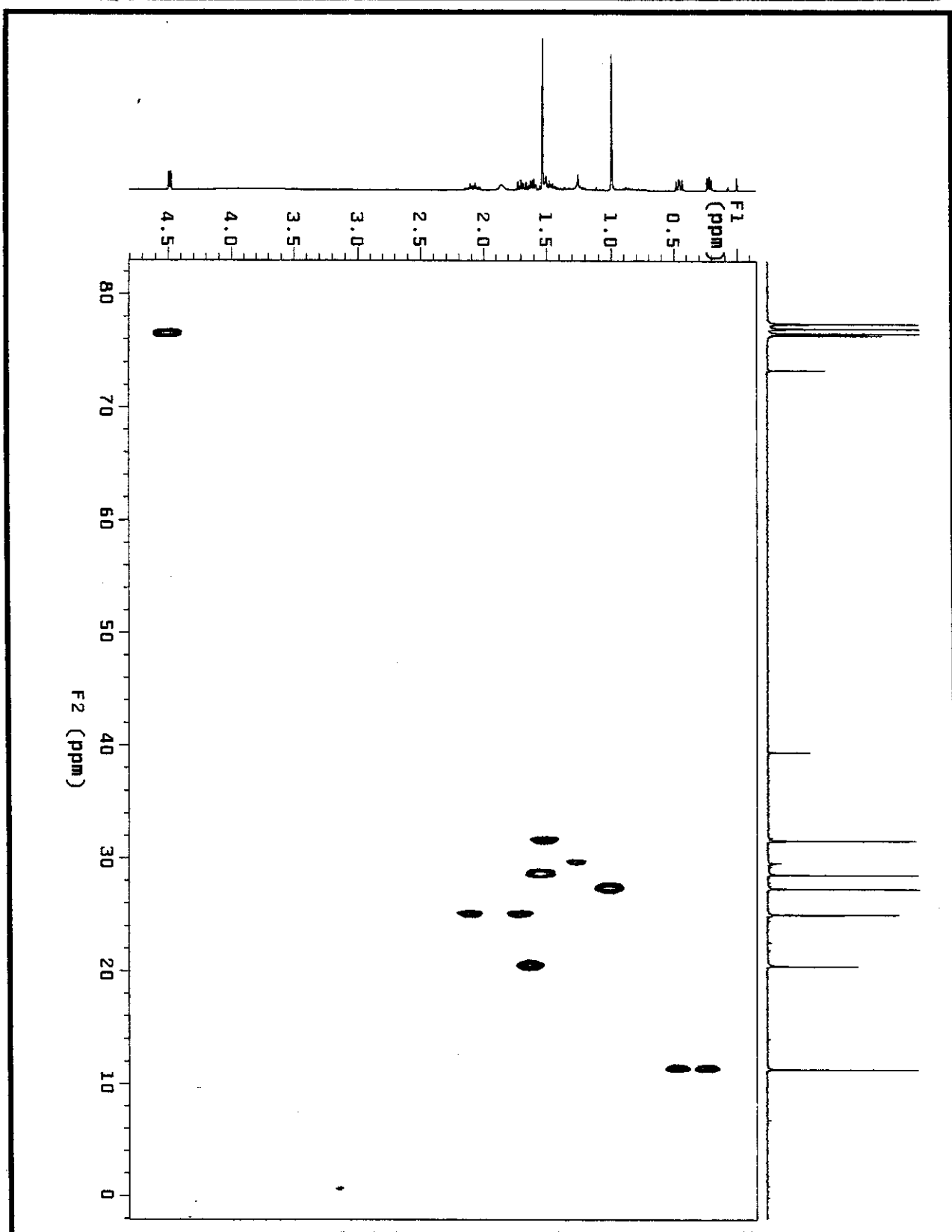
Espectros



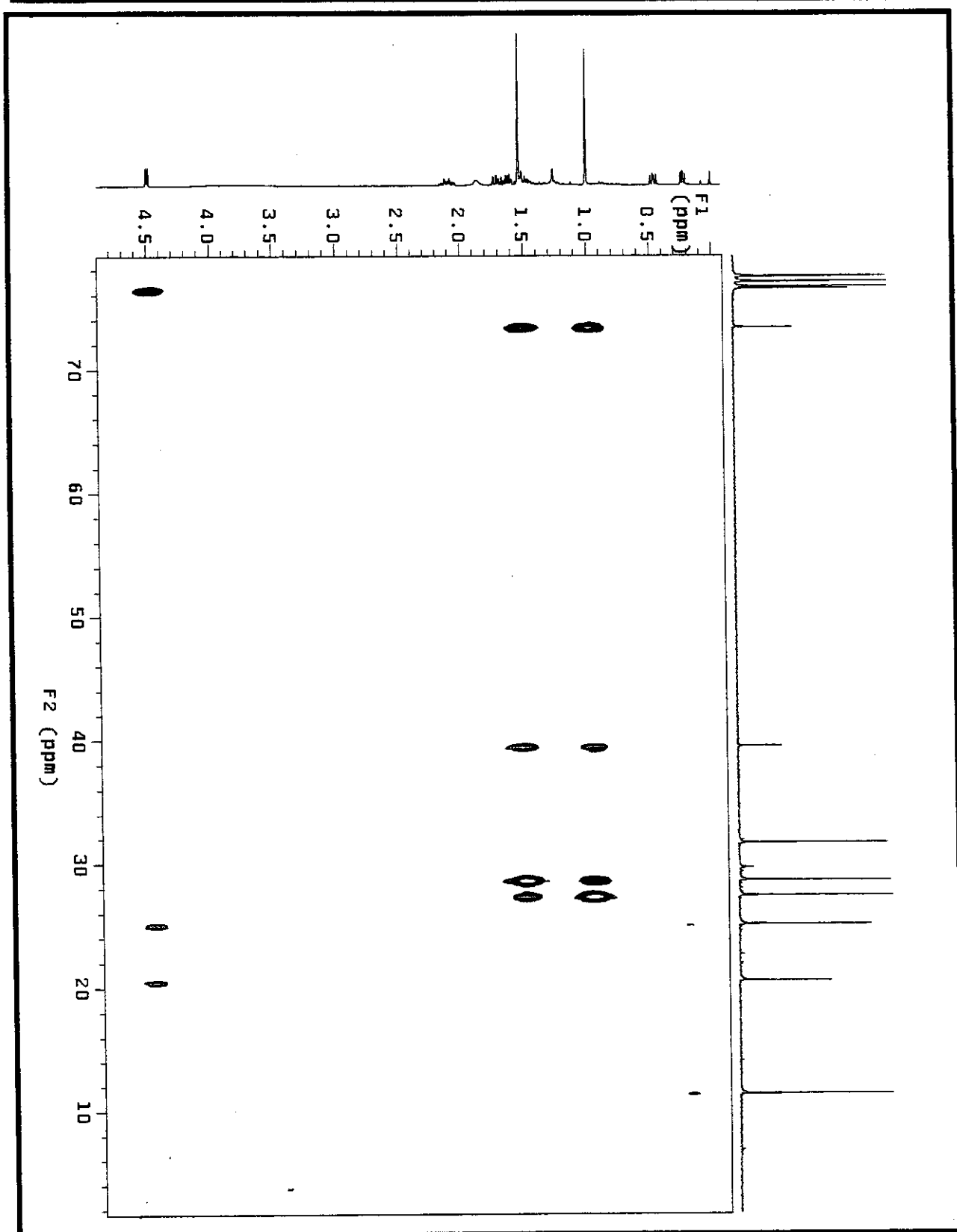
E 119 – Espectro DEPT (135° e 90°) da substância **99b**.



E 120– Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear (^1H , ^1H – COSY da substância 99b.

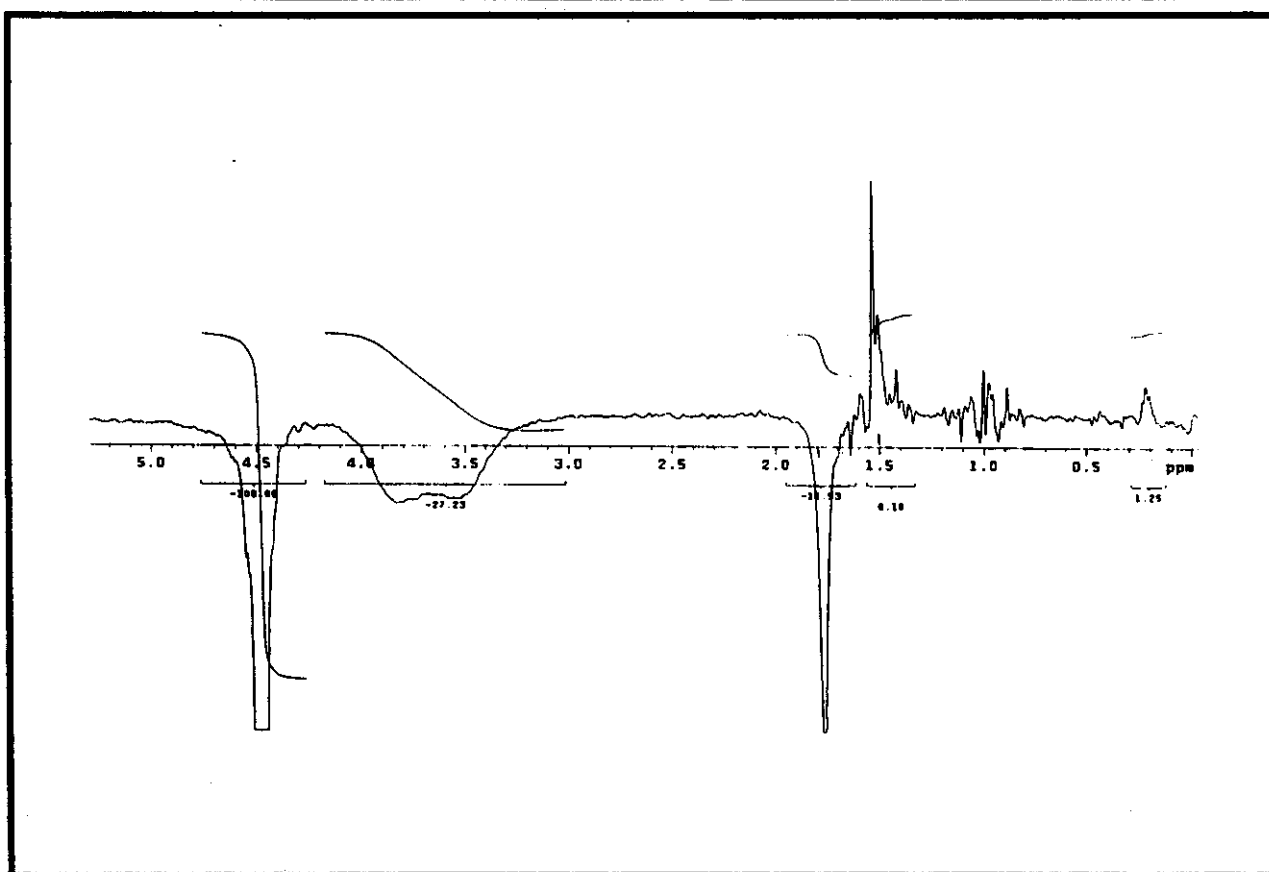


E 121 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR) da substância 99b.

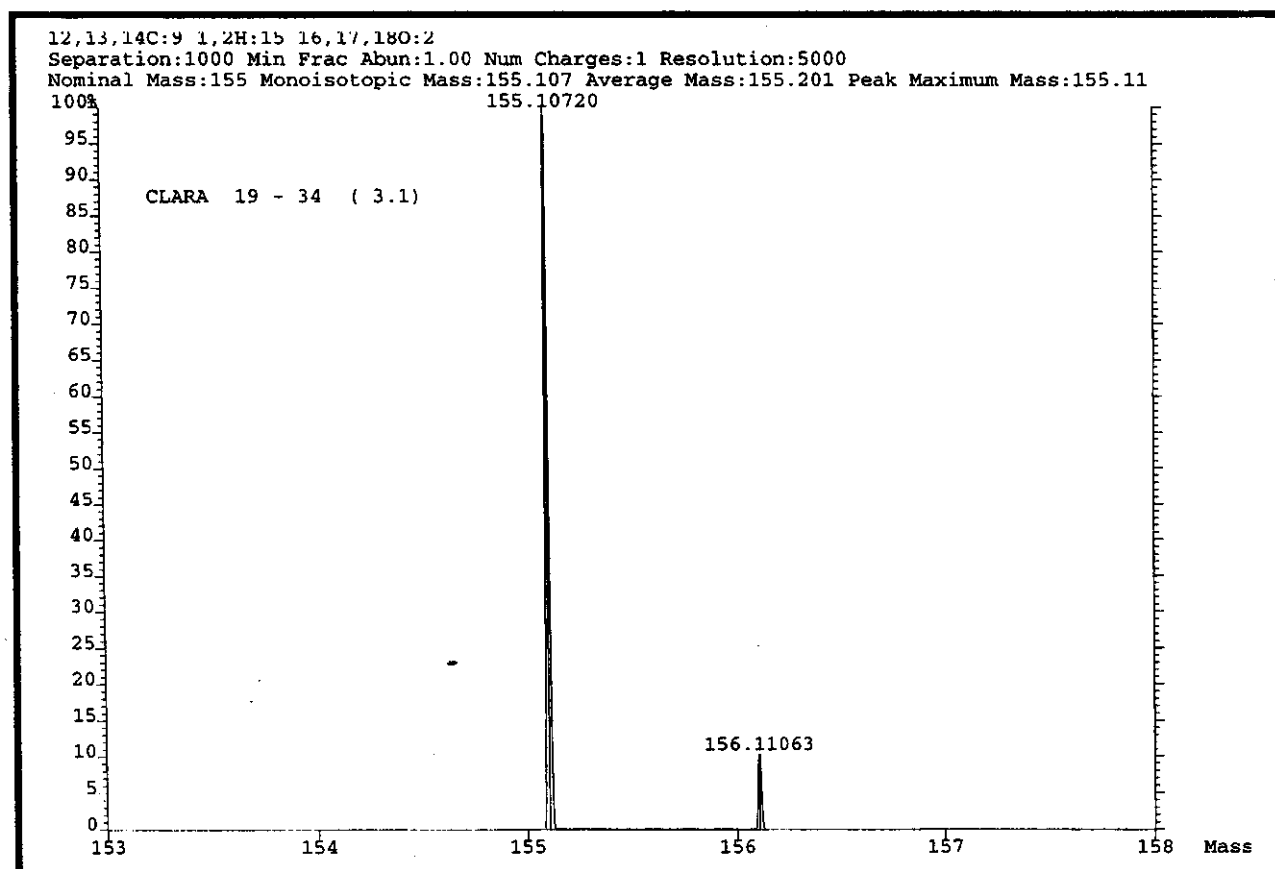


E 122 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR-L.D.) da substância **99b**.

Espectros

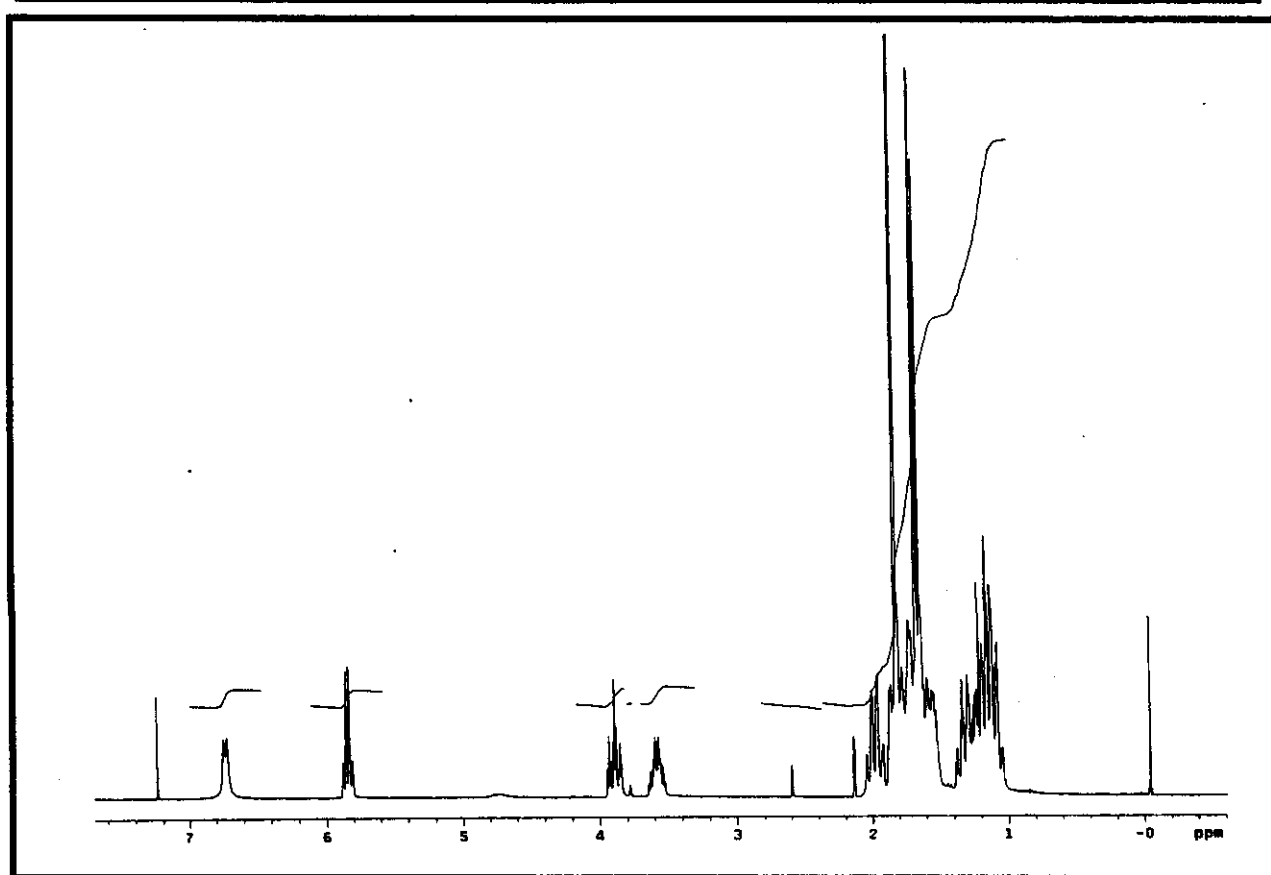


E 123 – Espectro de diferença de NOE da substância 99b.

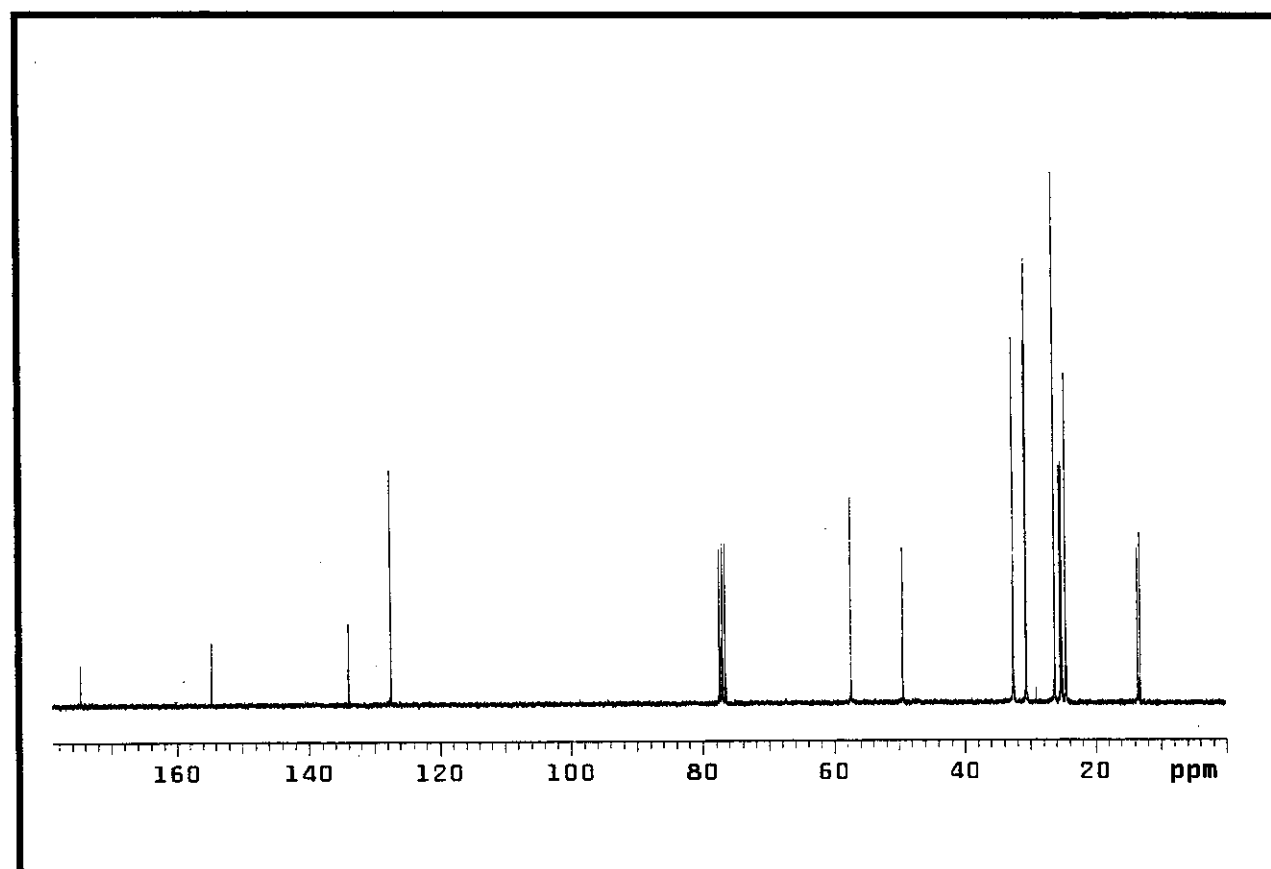


E 124 – Espectro massas (70eV) da substância 99b.

Espectros

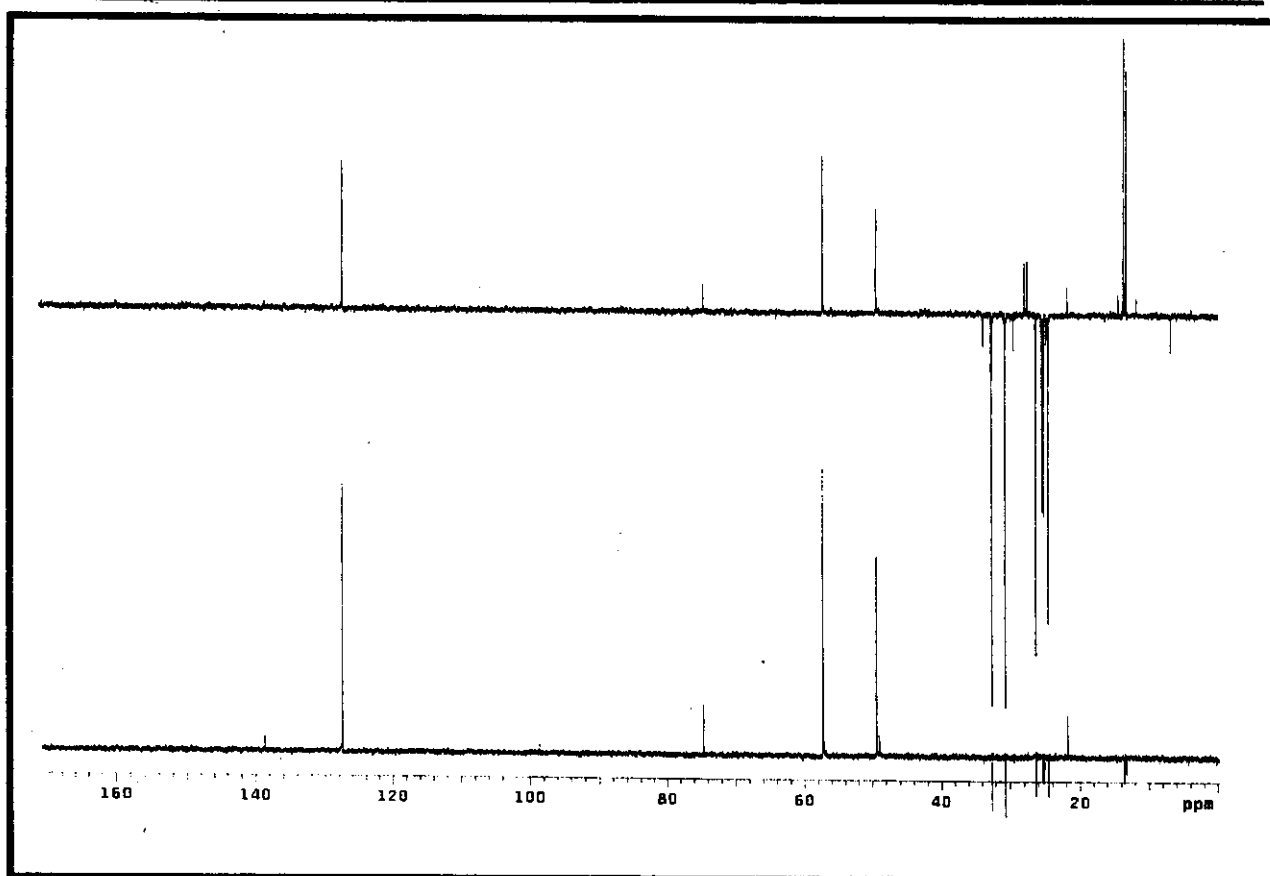


E 125 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 100a.

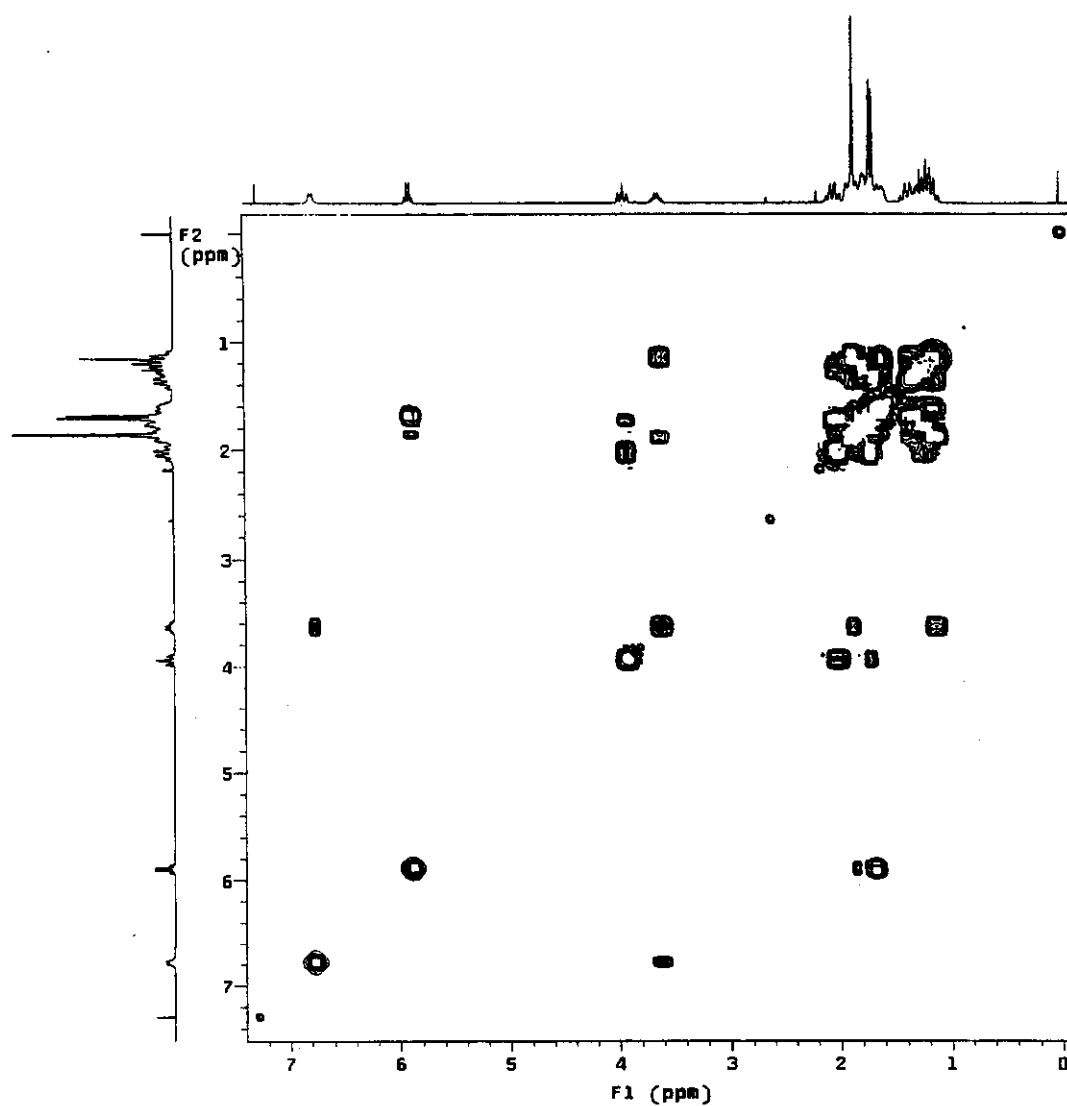


E 126 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 100a.

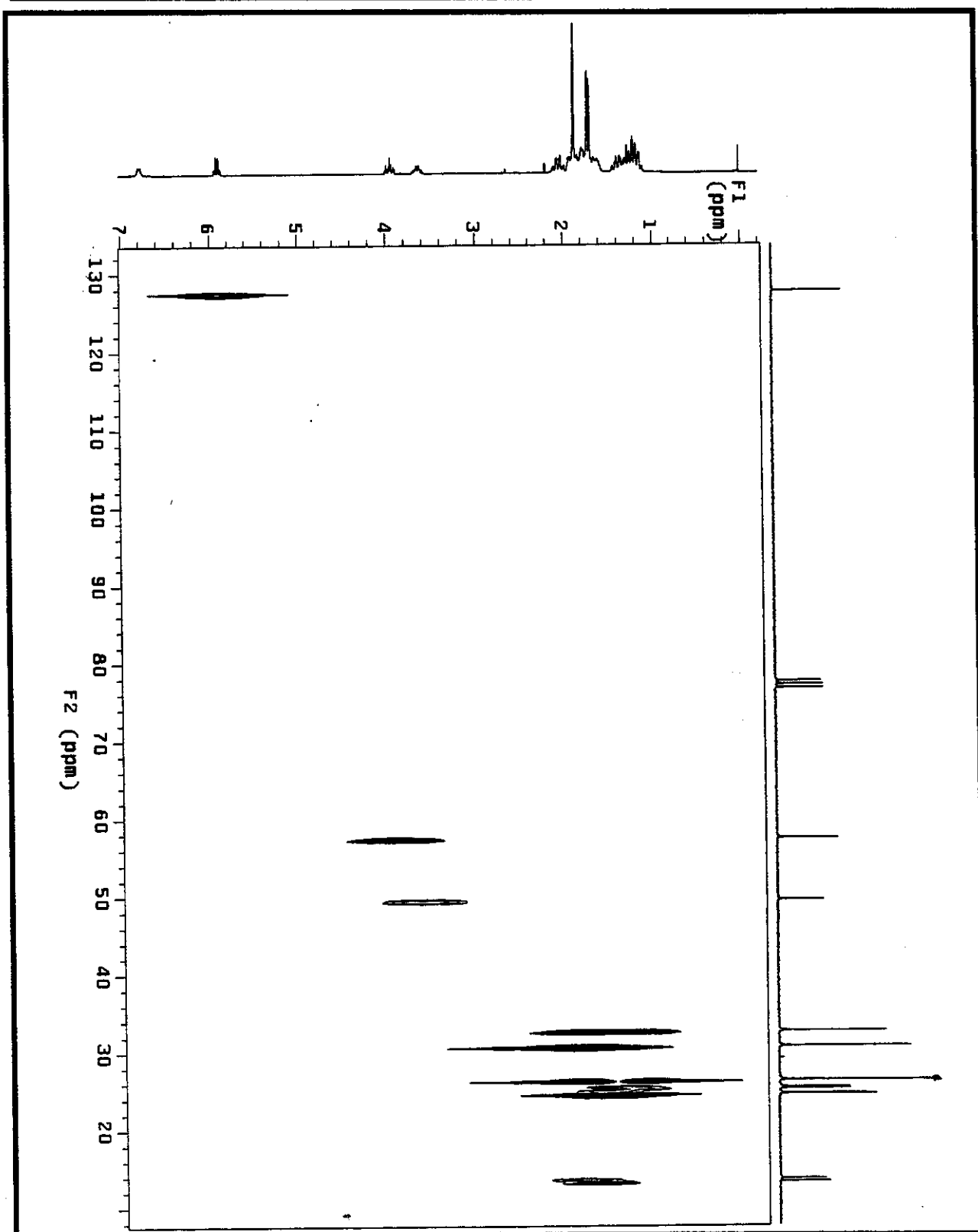
Espectros



E 127 – Espectro DEPT (135° e 90°) da substância 100a.

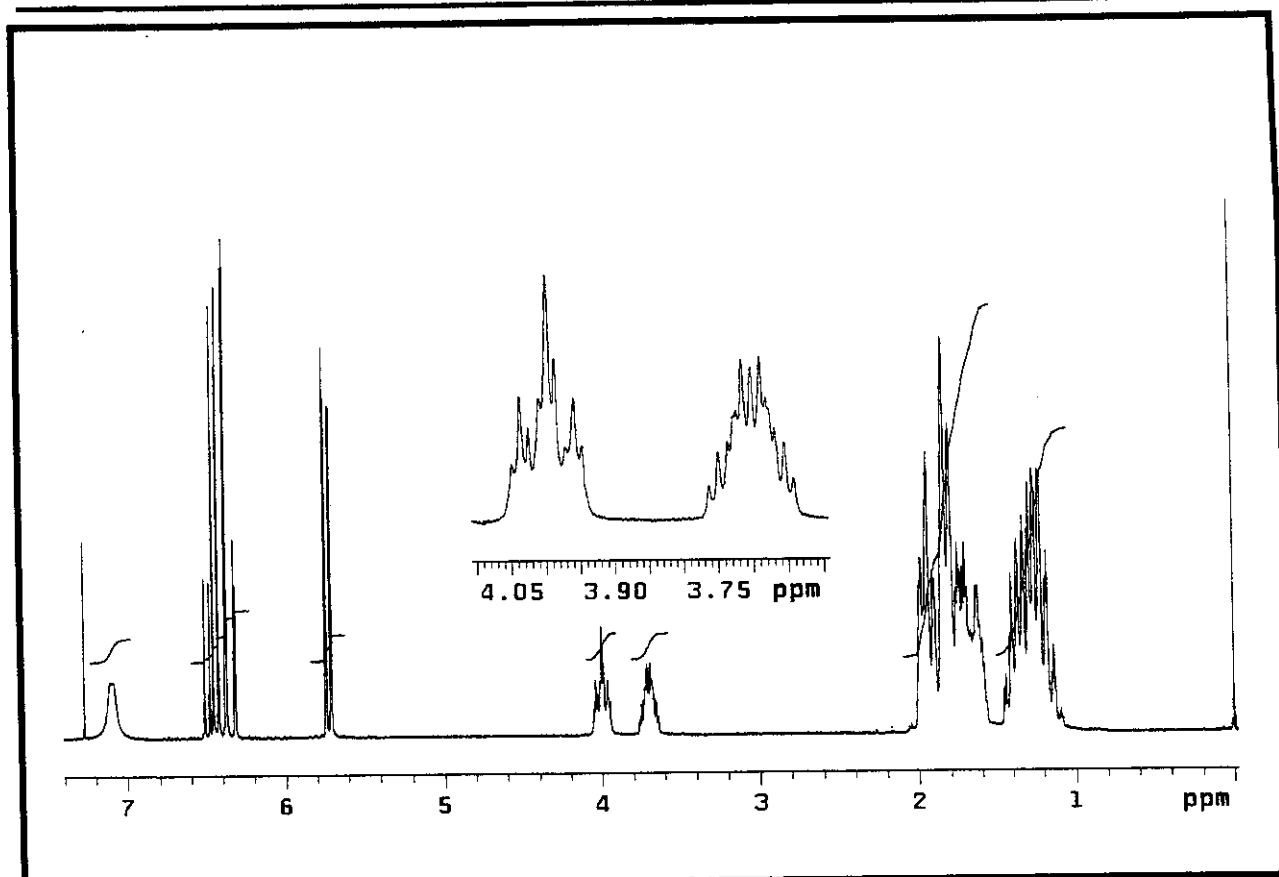


E 128 – Espectro de RMN 2D de correlação homonuclear (^1H , ^1H – COSY) da substância 100a.

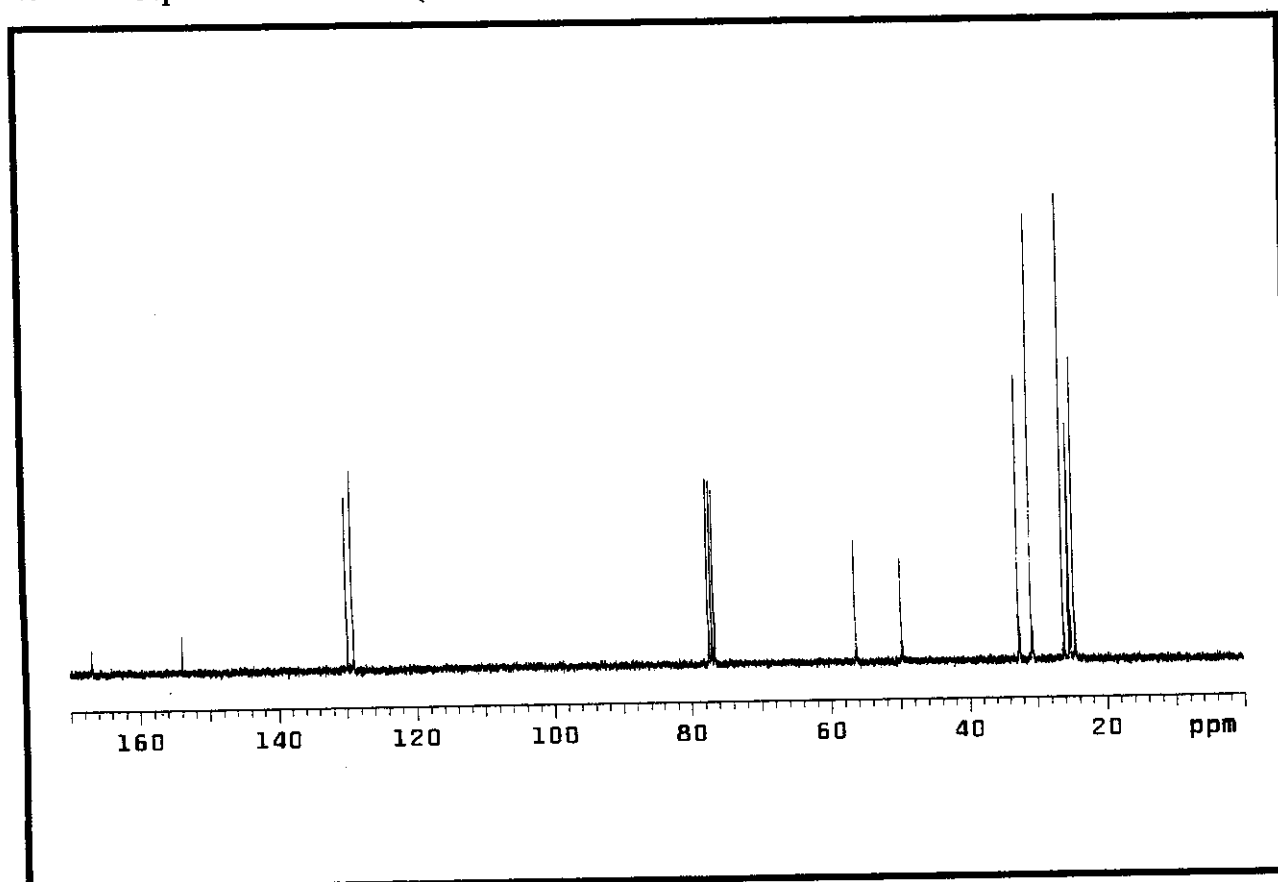


E 129 – Espectro de RMN 2D de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C – HETCOR) da substância 100a.

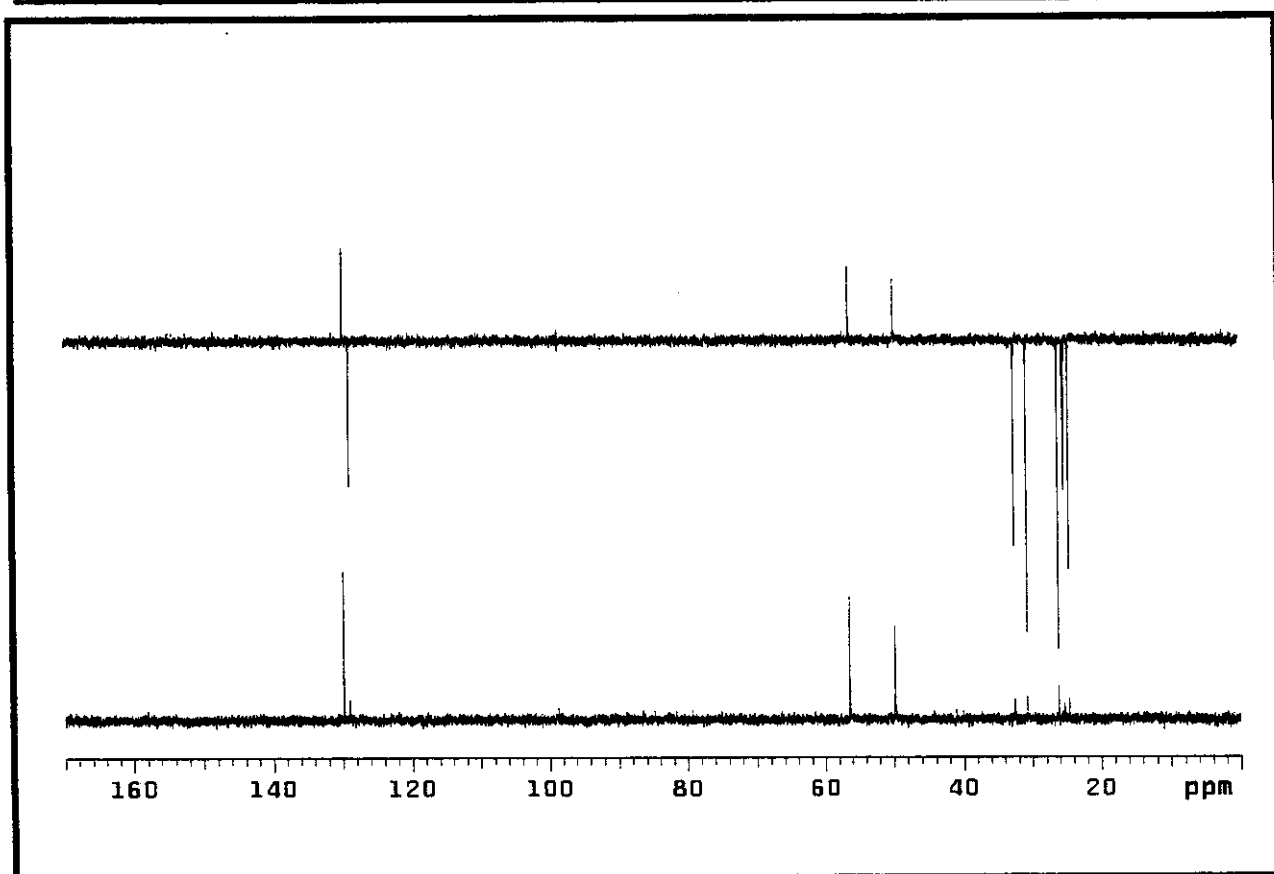
Espectros



E 130 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 100b.



E 131 – Espectro de RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3/TMS) da substância 100b.



E 132 – Espectro DEPT (135° e 90° da substância 100b.