



**Síntese, biotransformação e avaliação biológica de
novos heterociclos *cage-like* derivados do
triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona**

Felicia Megumi Ito



Síntese, biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos *cage-like* derivados do triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

Felicia Megumi Ito

Tese apresentada ao Programa *scrito sensu*
Nível de Doutorado Multiinstitucional em
Química UFG-UFMS-UFU- *Química do*
Cerrado e do Pantanal como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Doutor
em Química.

Orientador: Prof. Dr. Adilson Beatriz

**Campo Grande – MS
2012**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL DE DOUTORADO
MULTIINSTITUCIONAL EM QUÍMICA
UFG/UFMS/UFU**

**TERMO DE DEFESA DE TESE
DE
FELÍCIA MEGUMI ITO**

**SÍNTESE, BIOTRANSFORMAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE NOVOS
HETEROCICLOS CAGE-LIKE DERIVADOS DO TRICICLO[6.2.1.0^{2,7}]UNDECA-4,9-
DIEN-3,6-DIONA**

Tese de Doutorado submetida à Comissão Julgadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação – Nível de Doutorado Multiinstitucional em Química – UFG/UFMS/UFU, (Resolução nº 4/2012) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Química – Área de Concentração: Química do Cerrado e do Pantanal.

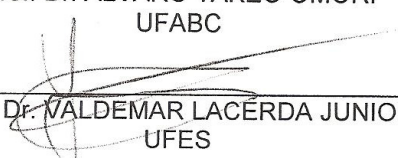
Aprovada Por:



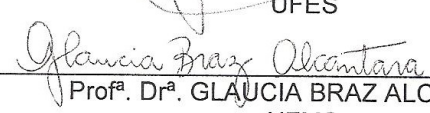
Prof. Dr. ADILSON BEATRIZ
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora
UFMS



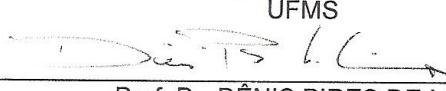
Prof. Dr. ALVARO TAKEO OMORI
UFABC



Prof. Dr. VALDEMAR LACERDA JUNIOR
UFES

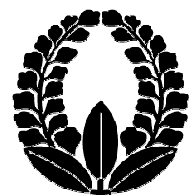


Profª. Drª. GLÁUCIA BRAZ ALCANTARA
UFMS



Prof. Dr. DÊNIS PIRES DE LIMA
UFMS

Campo Grande, 9º de março de 2012



私の成功を心から喜んでくれる人へ

For those who are delighted by my success

Para aqueles que ficam felizes “de verdade” pelas minhas conquistas

manuscrito original do trecho “Ode to Joy” da 9ª sinfonia de Beethoven



*“O you millions, I embrace you. Here’s a joyful kiss for all.”
Beethoven’s 9th Symphony: Ode to Joy*

AGRADECIMENTOS

Uma tese talvez seja um livro que tiveram participações de muitos, seja diretamente ou indiretamente. Gostaria de não esquecer ninguém. Então, para não ser injusta com ninguém, agradeço a todos que passaram em minha vida nesses últimos 4 anos. Com cada um deles aprendi um pouco.

Inicialmente agradeço à minha mãe [Mieko N. Ito] em seus 60 anos de vida por ter mostrado que podemos começar e recomeçar sempre. Ao meu pai [Hitoshi Ito], em me mostrar a ter simplicidade e perseverança. Ao meu irmão Hiro [Marcelino Hirofumi Ito] e Adriana Z. Wilbert Ito em momentos de desespero tive um conforto psicológico como financeiro e Laura Hikari, meu raio de sol, sempre cultivando momentos de alegria.

Ao Prof. Dr. Adilson Beatriz, minha eterna gratidão pela paciência em meus momentos de impaciência, de me instruir “como fazer ciência” e ter aguentado esses anos todos, foram 7 anos talvez. Além de orientador científico em alguns momentos, me aconselhou como um pai e em outros momentos foi como um irmão e amigo. Aos professores do LP-4, Prof. Dênis P. Lima sempre de portas e mente abertas, tive a oportunidade de aprender muito sobre essa arte de fazer ciência e a Profa. Neusa M. M. Somera aprendi o significado da “dignidade sempre!” e “quando crescer quero ser como a senhora, com aquelas aulas super didáticas e bom humor sempre!” que nos dias de hoje está cada vez mais difícil.

Aos professores e pesquisadores do curso de Química e outros cursos da UFMS e outras universidades que tive oportunidade de passar um tempo, citar nomes talvez fosse injusto, pois cada um tiveram contribuições importantíssimas desde um simples gesto, das conversas úteis e inúteis, trocas de ideias em corredores e até aquelas difíceis teorias do orbital molecular, de ressonância magnética nuclear, farmacóforos, ativação das células, reação dos nomes mais variados e entre outros.

Aos integrantes do *cage-like molecules project*: estagiários [Rudley Kamiya], alunos de iniciação científica [Tatiana Matayoshi, Paulo Rogério S. Fernandes, Felipe Garcia, Felipe C. Braga, Camila Ungari], mestrandos [Suély Copini] e alguns já mestres [Msc. Andressa Guedes], minha imensa gratidão por ter compartilhado momentos difíceis, de alegria na obtenção destes compostos, seus resultados e ainda aprendi muito com vocês. Os momentos de passeio e os cafezinhos no laboratório, também foram muito importantes para descontrair um pouco.

Aos professores, técnicos e alunos que colaboraram com a realização dos ensaios biológicos: Profa. Dra. Neli K. Honda (UFMS) e sua equipe (Rodrigo Cesar-IC e Luís Fabrício G. Brandão-Msc) pelos ensaios com a enzima tirosinase, além disso, a Prof.^a Neli esteve sempre de portas abertas para emprestar seu laboratório e sempre que tive dúvidas esteve disposta para ensinar-me e aconselhar em tudo; Profa. Dra. Cláudia Pessoa (UFC) e sua equipe (Msc. Adriana Carvalho, Dra. Letícia Veras Lotufo) pelos ensaios de citotoxicidade; Profa. Dra. Maria Rita Marques pelos ensinamentos e trocas de ideias nos ensaios de biotransformação.

Aos meus amigos doutorandos [Edson A. dos Santos e Ana C. Micheletti], o caminho foi difícil, mas chegamos sãos e salvos. Obrigada pelos momentos de discussão científicas e não científicas, das boas risadas sobre assuntos da vida. Aos amigos da Química (LP-1, LP-2, LP-3, LP-5 e LP-6) e de outros laboratórios (QF, Farmacognosia, DTA), muito obrigada pelos vários momentos, seja de conversas inúteis ou de discussões de teoria, talvez citar nomes ficaria difícil e posso até esquecer alguém, mas em especial ao Migueta [Carlos Henrique Migueta], companheiro de passeio, dos almoços, das discussões de tese, dos momentos de risos e de angústia.

À família LP-4 que não gostaria de esquecer ninguém (Rosângela, Adriano, Rejane, Nathalia, Paulo César, Denilson, Ricardo, Ingridhy, Michel, Gláucia, Daiane, Paola, Carol) que me aguentaram todo esse tempo e um carinho especial ao Alisson Meza, um biólogo, também vizinho de bancada da frente, amante da química e da cultura espanhola e ao Hélio Merá, vizinho de bancada do lado, amante da química e de uma boa música. Ainda um agradecimento à Fernanda Pascoski [aluna de monografia da Faculdade Estácio de Sá em 2010 (obrigada pela amizade também)] e aos ICs júnior [Gabriel e Aline], nesses últimos 1 ano e meio tive que aperfeiçoar a minha paciência oriental e a criatividade de orientadora, mas foi um aprendizado e tanto.

Um agradecimento especial à equipe do laboratório de RMN [Luciana M. Ravaglia, Edilene Delphino Rodrigues, Joaquim Corsino e Prof. Walmir Garcez] e ao técnico Luiz Leonardo S. Viana, pela obtenção dos espectros de ¹³C, experimentos de rotação óptica e no cromatógrafo gasoso; aos secretários Celestino, Maria Otávia, Ademar e as professoras visitantes, Lucinéia, Gláucia (atualmente Prof.^a da UFMS) e Roberta G. Coelho pela amizade, pelas valiosas trocas de ideias e serviços prestados.

Ao professor de música [Thiago L. Quevedo] e aos meus professores de dança [Juliano, Débora, Melissa, Marília, Rômulo, Nayadi] que sem saberem cuidaram de minha saúde mental e física. Sem esquecer também os meus colegas e amigos de música e de dança (em especial aos pares de dança) que nunca me deixaram enlouquecer devido a minha preocupação constante por resultados. Todos foram companheiros sempre!

Aos meus amigos próximos e distantes fisicamente, os novos e velhos [Euzébio G. Barbosa, Cristiane Kawasoko, Nídia Yoshida, Ana Kojima, Diana Oki, Sandra Kawakami, Yara Keber, Sirlene Shiota, Toshio Kawasoko, Gilberto e Leonardo Suzue, Mie Konishi, Luciana Kawakami, Priscila Tiemy, Prof. Jorge Gonda, Lidia Oshiro, Hideo Matsunaga, Yumi Ito (Prima), Erika Nishio, Márcio Palacios e muitos amigos da Casa do Estudante JAMIC] pelo incentivo, pela ajuda, momentos de descontração e perdoe-me pela ausência em momentos importantes.

Aos membros da banca por ter aceitado gentilmente o convite e ter disponibilizado seu precioso tempo para participar de minha banca.

Aos órgãos de fomento FUNDECT, PROPP-UFMS, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e FUNDECT pela bolsa concedida.

Por fim, uma força maior ou energia que esteve sempre guiando em minhas decisões, nem sempre atendendo aos meus pedidos, mas ensinando-me com os desafios colocados em minha vida.

Aos que leram este texto de agradecimento e não encontraram seus nomes, nem nas entrelinhas, talvez fosse por esquecimento mesmo, mas de alguma forma todos colaboraram para minha formação profissional e pessoal. Muito obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURA	i
LISTA DE COMPOSTOS SINTETIZADOS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ESPECTROS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Composto <i>cage-like</i>	1
1.2. A reação de Diels-Alder	6
1.3. Antecedentes da Pesquisa	8
1.4. Citotoxicidade <i>in vitro</i>	9
1.5. Enzima tirosinase	11
1.6. Biotransformação / Biocatálise	13
1.7. <i>Mucor ramosissimus</i>	14
2. OBJETIVOS	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1. Síntese	17
3.2. Biotransformação	27
3.3. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	34
3.4. Ensaio com a enzima tirosinase	35
3.5. Seção de espectros	38
3.5.1. Triciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undeca-2,4,6,9-tetraene-3,6-diol (18)	39
3.5.2. <i>rel</i> -decahidro-2,4-metanoindeno[7,1- <i>bc</i>]furan-5-ol (19)	43
3.5.3. <i>rel</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,12 <i>R</i>)-5-Iodo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}] decan-11-ona (20)	53
3.5.4. <i>rel</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,12 <i>R</i>)-5-Cloro-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}] dodecan-11-ona (21)	63
3.5.5. <i>rel</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,12 <i>R</i>)-5-Hidróxi-7- oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}] dodecan-11-ona (23)	74
3.5.6. Oxima <i>E</i> -24 e/ou <i>Z</i> -24	84
3.5.7. Oxima <i>E</i> -25 e/ou <i>Z</i> -25	88
3.5.8. Oxima <i>E</i> -26 e/ou <i>Z</i> -26	92
3.5.9. Oxima <i>E</i> -27 e/ou <i>Z</i> -27	96
3.5.10. Oxima <i>E</i> -28 e/ou <i>Z</i> -28	100
3.5.11. (5 <i>S</i> ,8 <i>S</i>)-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-metanonaftalene-5,8-diol (30)	104
3.5.12. (+)-(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,11 <i>R</i> ,12 <i>R</i>)-5-Bromo-7-oxatetraciclo [6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ol (31)	108
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
5. PARTE EXPERIMENTAL	120
5.1. Materiais, equipamentos e métodos	120
5.2. Síntese	122
5.2.1. Preparação do triciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undeca-2,4,6,9-tetraene-3,6-diol	122

(18)	
5.2.2. Preparação do <i>rel</i> -decahidro-2,4-metanoindeno[7,1- <i>bc</i>]furan-5-ol (19) a partir do triciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undeca-2,4,6,9-tetraene-3,6-diol (18)	122
5.2.3. Preparação do Preparação do <i>rel</i> -decahidro-2,4-metanoindeno[7,1- <i>bc</i>]furan-5-ol (19) a partir do <i>rel</i> -(8 <i>S</i> ,12 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-7-oxatetraciclo [6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ona (14)	123
5.2.4. <i>rel</i> -(8 <i>S</i> ,12 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ona (14)	124
5.2.5. <i>rel</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,12 <i>R</i>)-5-Iodo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]decan-11-ona (15)	124
5.2.6. <i>rel</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,12 <i>R</i>)-5-Iodo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]decan-11-ona (20)	125
5.2.7. <i>rel</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,12 <i>R</i>)-5-Cloro-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ona (21)	126
5.2.8. <i>rel</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,12 <i>R</i>)-5-Hidróxi-7-oxatetraciclo[6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}] dodecan-11-ona (23)	126
5.2.9. Preparação das oximas	125
5.2.9.1. Oxima <i>E</i> -24 e/ou <i>Z</i> -24	128
5.2.9.2. Oxima <i>E</i> -26 e/ou <i>Z</i> -26	128
5.2.9.3. Oxima <i>E</i> -25 e/ou <i>Z</i> -25	128
5.2.9.4. Oxima <i>E</i> -27 e/ou <i>Z</i> -27	129
5.2.9.5. Oxima <i>E</i> -28 e/ou <i>Z</i> -28	127
5.3. Biotransformação	130
5.3.1. Material Biológico	130
5.3.2. Biotransformação com Células Integrais de Microrganismos	130
5.3.2.1. Ensaio Padrão	130
5.3.2.2. Reação de biotransformação	130
Biotransformação do composto 11	130
Síntese 1: Reação com o produto diastereoisomérico da biotransformação	131
Síntese 2: (-)-(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,11 <i>R</i> ,12 <i>R</i>)-5-Bromo-7-oxatetraciclo [6.4.0.0 ^{2,6} .0 ^{4,12}]dodecan-11-ol	132
Síntese 3: Redução do <i>rel</i> -(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-6-hidroxitriciclo[6.2.1.0 ^{2,7}]undec-9-en-3-ona (29) para (5 <i>S</i> ,8 <i>S</i>)-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-metanonaftalene-5,8-diol (30)	133
Síntese 4: Reação de bromação com o (5 <i>S</i> ,8 <i>S</i>)-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-metanonaftalene-5,8-diol (30)	133
Síntese 5: Oxidação do álcool secundário 31 para obtenção da bromo-cetona (15)	134
Biotransformação do composto 11 para monitoramento diário durante 1 mês para experimento em CG-EM	134
5.4. Ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i>	136
5.4.1 Material biológico	136
5.4.2. Avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i>	
5.5. Ensaios biológicos com a enzima tirosinase	137
5.5.1. Atividade enzimática específica	137
5.5.2. Avaliação enzimática	138

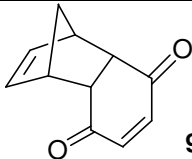
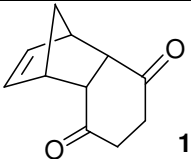
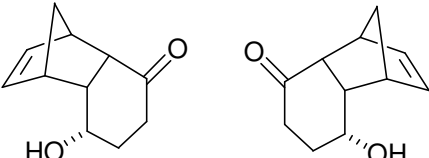
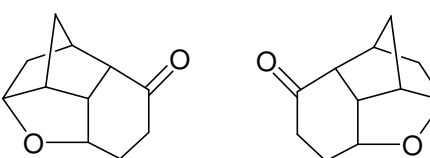
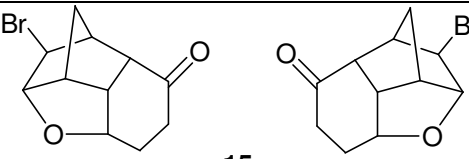
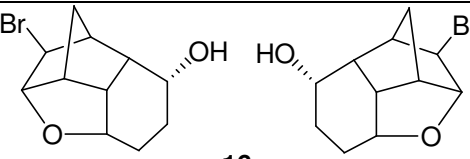
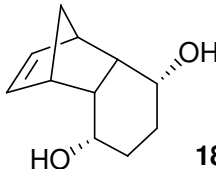
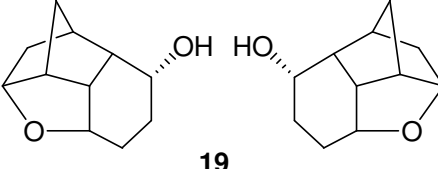
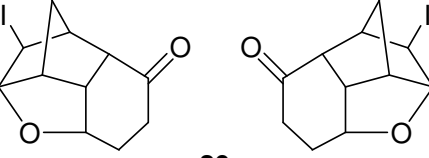
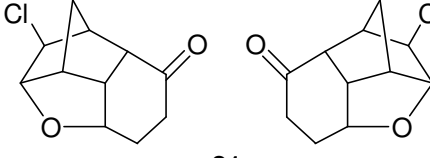
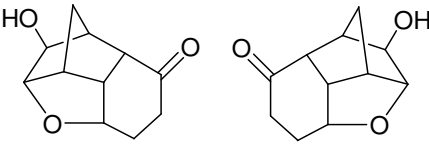
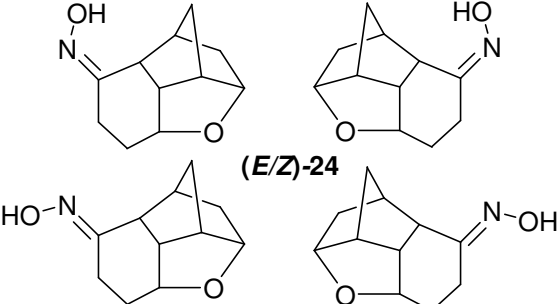
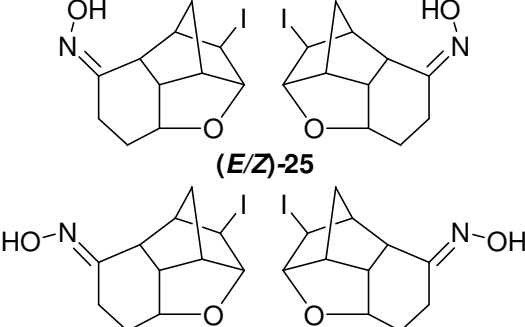
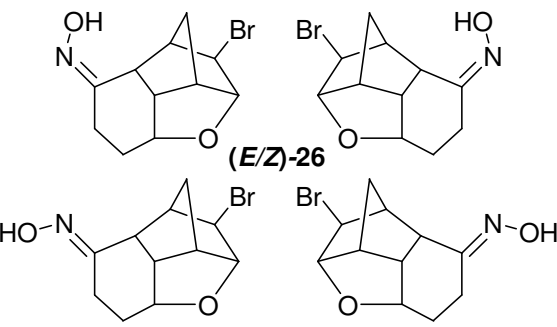
LISTA DE ABREVIATURA

δ	Deslocamento químico
CCD	Cromatografia em camada delgada
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dq</i>	Duplo quarteto
<i>dt</i>	Duplo tripleto
DEPT	“Distortionless enhancement by polarization transfer” ou intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização
DPM	Desvio padrão da média
gCOSY	“Gradiente correlation spectroscopy” ou espectroscopia de correlação com utilização de gradiente de campo pulsado na coordenada z
gHSQC	“Gradiente heteronuclear single-quantum coherence” ou correlação heteronuclear de quantum único com utilização de gradiente de campo pulsado na coordenada z
gHMBC	“Gradiente heteronuclear multiple-bond coherence” ou correlação heteronuclear de ligação múltipla com utilização de gradiente de campo pulsado na coordenada z
gNOESY	“Gradiente nuclear Overhauser effect spectroscopy” ou espectroscopia do efeito nuclear de Overhauser com utilização de gradiente de campo pulsado na coordenada z
HL-60	Linhagem de células leucêmica promielocítica humana
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	multiplete
MDA-MB435	Linhagem de células tumorais de mama humano
MCPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperoxibenzóico
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
NBS	<i>N</i> -bromossuccinimida
NIS	<i>N</i> -iodossuccinimida
NCS	<i>N</i> -clorosuccinimida
PCC	Clorocromato de piridínio
PTSA	Ácido <i>para</i> -toluenossulfônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

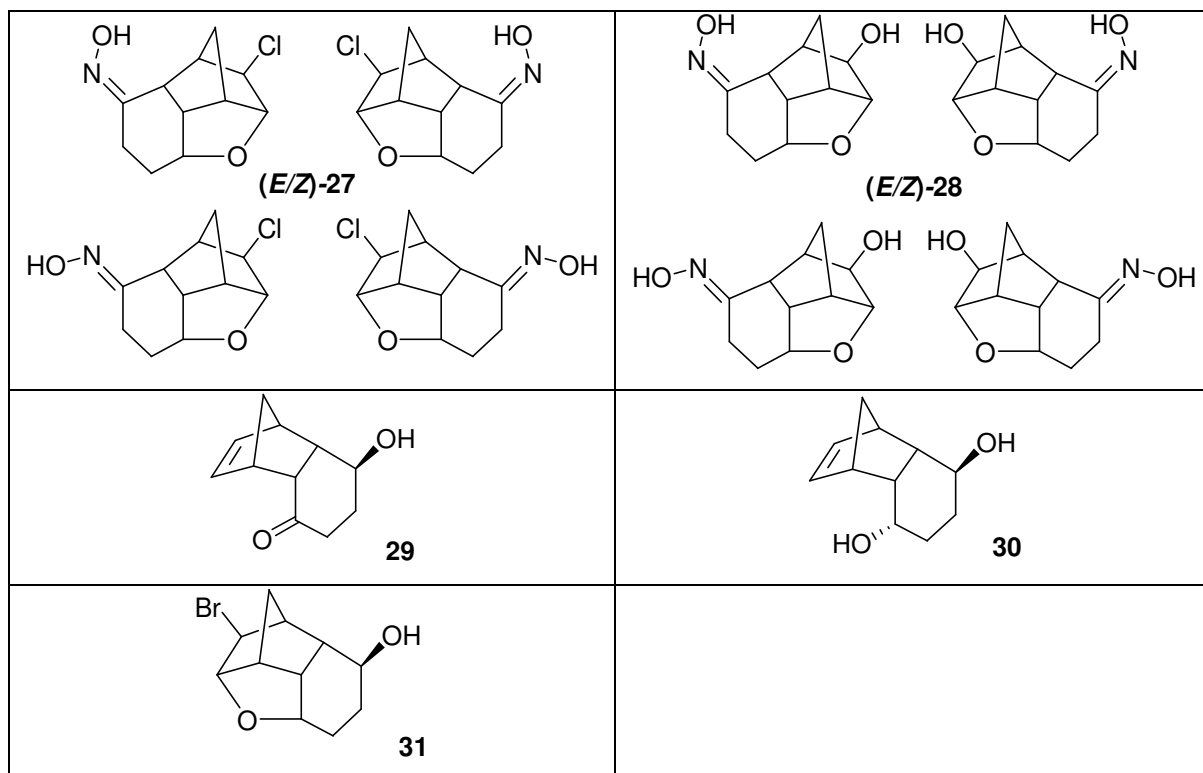
Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do tríciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

SF-295	Linhagem de célula tumoral de sistema nervoso central (glioblastoma)
TMS	Tetrametilsilano

LISTA DE COMPOSTOS SINTETIZADOS

Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterocícos cage-like derivados do triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Exemplos de compostos policíclicos <i>cage-like</i>	1
Figura 2.	Moléculas <i>cage-like</i> bioativas	2
Figura 3.	Similaridade estrutural entre compostos hidrocarbônicos policíclicos engaiolados	3
Figura 4.	Pentacicloundecilaminas bioativas sintetizados pela primeira vez.	3
Figura 5.	<i>s-trans</i> é a conformação preferida, mas a favorável para reação de Diels-Alder é a <i>s-cis</i>	5
Figura 6.	Sobreposição favorável entre dieno e dienófilo.	6
Figura 7.	Estereosseletividade exibida pela reação de Diels-Alder	7
Figura 8.	Interação dos orbitais moleculares na reação de Diels-Alder entre ciclopentadieno e anidrido maléico	8
Figura 9.	Substâncias testadas para atividade citotóxica e inseticida	8
Figura 10.	Cetonas, oximas e tionas estruturalmente relacionadas	9
Figura 11.	Biossíntese da eumelanina e feomelanina a partir da tirosina	12
Figura 12.	Aspecto geral da colônia de <i>Mucor ramosissimus</i> e desenho esquemático de <i>Mucor spp.</i>	15
Figura 13.	Espectros de RMN de ^1H dos compostos 11 e 21 .	20
Figura 14.	Espectro de RMN de ^1H comparando os deslocamentos dos hidrogênios H6, H9, H10 e H11 dos compostos 14 , 15 , 20 , 21 e 23 .	23
Figura 15.	Espectro de RMN de ^{13}C comparando os deslocamento dos Carbonos C6, C9, C10 e C11 dos compostos 14 , 15 , 20 , 21 e 23 .	24
Figura 16.	Deslocamento químico de RMN de ^{13}C de oxima da literatura	26
Figura 17.	Espectro de RMN de ^1H do bromo-álcool racêmico ($\pm$)-(16) com e sem reagente de deslocamento químico quiral	29
Figura 18.	Espectro de RMN de ^1H do bromo-álcool racêmico e do produto da reação a partir biotransformação com reagente de deslocamento químico quiral de európio	31

Figura 19.	Cromatograma do monitoramento diário do ensaio de biotransformação para análise da conversão do ceto-álcool	33
Figura 20.	Acompanhamento por CG da conversão da dicetona 11 para os diastereoisômeros (-)- 12 e (-)- 29 em função do tempo.	34
Figura 21.	Placa de bioautografia do ensaio com a enzima tirosinase	37
Figura 22.	Gráfico gerado para atividade específica da enzima utilizada para a realização dos ensaios	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Transformações químicas do álcool 12 e condições reacionais, a 25 °C	21
Tabela 2.	Comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios H6, H9, H10 e H11 e carbonos C6, C9, C10 e C11 dos derivados policiclos <i>cage-like</i> 14 , 15 , 20 , 21 e 23	22
Tabela 3.	Deslocamento químico dos carbonos dos derivados policiclos das oximas	26
Tabela 4.	Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais	35
Tabela 5.	Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto 18	42
Tabela 6.	Atribuição dos deslocamentos químicos (δ [ppm]) aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C), multiplicidade, constantes de acoplamento $J(^1\text{H}, ^1\text{H})$, $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ do gHMBC e correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do gCOSY do composto 19 em CDCl_3	52
Tabela 7.	Atribuição dos deslocamentos químicos (δ [ppm]) aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C), multiplicidade, constantes de acoplamento $J(^1\text{H}, ^1\text{H})$, $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ do gHMBC e correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do gCOSY e gNOESY do composto 20 em CDCl_3	61
Tabela 8.	Atribuição das bandas de absorção de IV a grupos funcionais do composto 20	62
Tabela 9.	Atribuição dos deslocamentos químicos (δ [ppm]) aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C), multiplicidade, constantes de acoplamento $J(^1\text{H}, ^1\text{H})$, $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ do gHMBC e correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do gCOSY e gNOESY do composto 21	72
Tabela 10.	Atribuição dos deslocamentos químicos (δ [ppm]) aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C), multiplicidade, constantes de acoplamento $J(^1\text{H}, ^1\text{H})$, $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ do gHMBC e correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do gCOSY e gNOESY do composto 23	82
Tabela 11.	Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto 24	87
Tabela 12.	Atribuição dos deslocamentos químicos (δ) aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto 25	91
Tabela 13.	Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (^1H) e	

carbonos (^{13}C) do composto 26	95
Tabela 14. Atribuição das bandas de absorção de IV a grupos funcionais do composto 26 com mistura do isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	95
Tabela 15. Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto 27	99
Tabela 16. Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto 28	103
Tabela 17. Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto 30	107
Tabela 18. Atribuição dos deslocamentos químicos (δ [ppm]) aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C), multiplicidade, constantes de acoplamento $J(^1\text{H}, ^1\text{H})$, $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ do gHMBC e correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do gCOSY e gNOESY do composto 31 em CDCl_3	118

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 18	40
Espectro 2.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 18	41
Espectro 3.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 19	44
Espectro 4.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 19	43
Espectro 5.	Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C diretamente ligados, obtido a partir do experimento gHSQC do composto 19	46
Espectro 6.	Ampliação do mapa de correlação gerado a partir do experimento gHSQC do composto 19	47
Espectro 7.	Mapa de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância, obtido pelo experimento gHMBC do composto 19	48
Espectro 8.	Ampliação do mapa de correlação gerado a partir do experimento de gHMBC do composto 19	49
Espectro 9.	Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H gerado a partir do experimento gCOSY do composto 19	50
Espectro 10.	Ampliação do mapa de correlação do experimento gCOSY do composto 19	51
Espectro 11.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 20	54
Espectro 12.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 20	55
Espectro 13.	Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C diretamente ligados, obtido a partir do experimento gHSQC do composto 20	56
Espectro 14.	Ampliação do mapa de correlações do experimento gHSQC do composto 20	57
Espectro 15.	Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância, obtido pelo experimento gHMBC do composto 20	58
Espectro 16.	Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H , obtido a partir do experimento gCOSY do composto 20	59
Espectro 17.	Mapa de correlação espacial ^1H - ^1H , obtido a partir do experimento gNOESY do composto 20	60

Espectro 18.	Espectro de infravermelho do composto 20	62
Espectro 19.	Espectro de massas do composto 20	62
Espectro 20.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 21	64
Espectro 21.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 21	65
Espectro 22.	Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C diretamente ligados, obtido a partir do experimento gHSQC do composto 21 e ampliação	66
Espectro 23.	Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância, obtido pelo experimento gHMBC do composto 21	67
Espectro 24.	Mapa de correlações homonuclear ^1H - ^1H obtido a partir do experimento gCOSY do composto 21	68
Espectro 25.	Ampliação do mapa de correlações do experimento gCOSY do composto 21	69
Espectro 26.	Mapa de correlações espaciais ^1H - ^1H obtido a partir do experimento gNOESY do composto 21	70
Espectro 27.	Ampliação do mapa de correlações do experimento gNOESY do composto 21	71
Espectro 28.	Espectro de massas do composto 21	73
Espectro 29.	Espectro RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 23	75
Espectro 30.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 23	76
Espectro 31.	Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C diretamente ligados, obtido a partir do experimento gHSQC do composto 23	77
Espectro 32.	Ampliação do mapa de correlações do experimento gHSQC do composto 23	78
Espectro 33.	Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância, obtido pelo experimento gHMBC do composto 23	79
Espectro 34.	Mapa de correlações homonuclear ^1H - ^1H obtido a partir do experimento gCOSY do composto 23	80
Espectro 35.	Mapa de correlações espaciais ^1H - ^1H obtido a partir do experimento gNOESY do composto 23 e ampliação.	81
Espectro 36.	Espectro de massas do composto 23	83

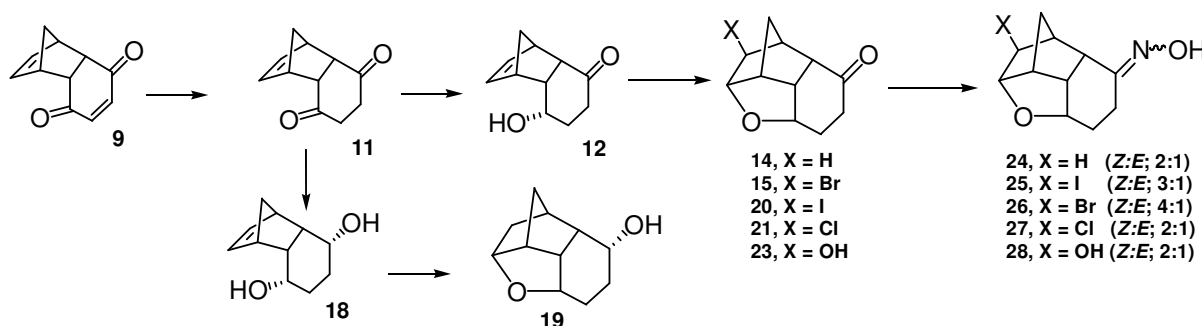
Espectro 37.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 24 com mistura dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	85
Espectro 38.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 24 com mistura dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	86
Espectro 39.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 25 com mistura dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	89
Espectro 40.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 25 com mistura dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	90
Espectro 41.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 26 com mistura dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	93
Espectro 42.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 26 com mistura dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	94
Espectro 43.	Espectro de infravermelho do composto 26 com mistura dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	95
Espectro 44.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 27 com mistura dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	97
Espectro 45.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 27 com mistura dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	98
Espectro 46.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3 > \text{CD}_3\text{OD}_{\text{ligota}}$) do composto 28 com mistura dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	101
Espectro 47.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 28 com mistura dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>	102
Espectro 48.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 30	105
Espectro 49.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 30	106
Espectro 50.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 31	109
Espectro 51.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 31	110
Espectro 52.	Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C diretamente ligados, obtido a partir do experimento gHSQC do composto 31	111
Espectro 53.	Ampliação do mapa de correlações do experimento gHSQC do composto 31	112
Espectro 54.	Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância, obtido	

Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do tríciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

	pelo experimento gHMBC do composto 31	113
Espectro 55.	Ampliação do mapa de correlações do experimento gHMBC do composto 31	114
Espectro 56.	Mapa de correlações homonuclear ^1H - ^1H obtido a partir do experimento gCOSY do composto 31 e ampliação	115
Espectro 57.	Mapa de correlações espaciais ^1H - ^1H obtido a partir do experimento gNOESY do composto 31	116
Espectro 58.	Ampliação mapa de correlações do experimento gNOESY do composto 31	117

RESUMO:

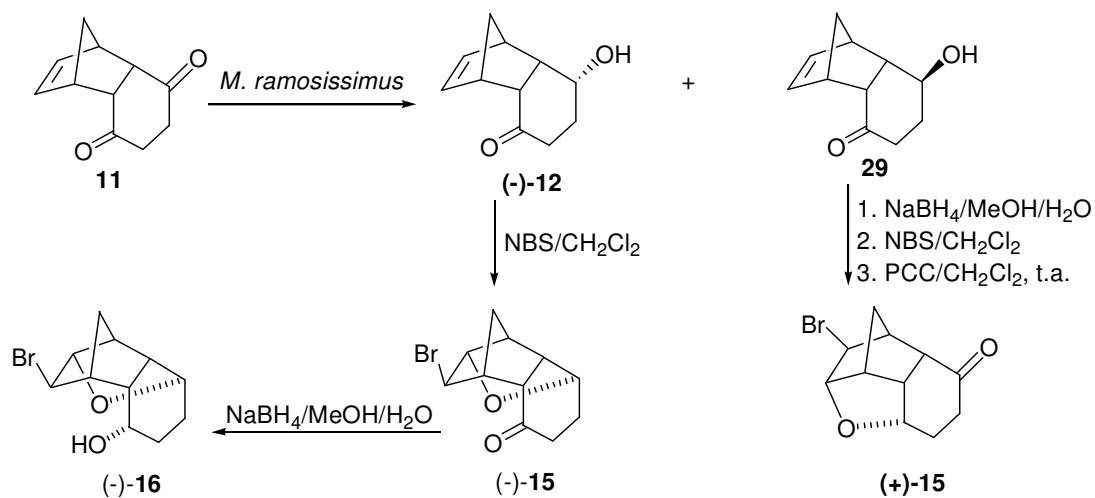
Moléculas possuindo o esqueleto carbônico policíclico rígido tipo gaiola (*cage-like*) têm atraído grande interesse de vários grupos de pesquisas em fármacos e pesticidas. O composto *endo*-tríciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona (**9**) é facilmente preparado a partir da cicloadição de ciclopentadieno com *p*-benzoquinonona. Este composto é amplamente usado em muitas pesquisas acadêmicas, entretanto, há poucos relatos sobre o seu uso na química medicinal. Em trabalho anterior, o composto **12** foi obtido a partir do aduto de Diels-Alder **9**. O bromo-éter **15**, obtido pelo tratamento de **12** com NBS em CH₂Cl₂, apresentou atividades biológicas importantes. Neste trabalho, foram preparados novos heterociclos *cage-like* estruturalmente relacionados com **15**, como os compostos **14**, **20**, **21** e **23** e as oximas **24-28**.



Os compostos **14**, **15**, **20**, **21** e **23-28** foram testados em ensaios de atividades citotóxica e anti-tirosinase. As amostras analisadas frente às linhagens MDA-MB435, SF-295 e HL-60 não indicaram potencialidade citotóxica. Os ensaios de inibição enzimática com a tirosinase mostrou que o composto **23** é dotado de alta atividade inibitória (< 25 µg) e todos os demais compostos apresentaram halos de inibição nas concentrações testadas (600 µg < X < 50 µg).

A enediona **11** foi biotransformada por *Mucor ramosissimus* Samutsevitch obtendo-se o ceto-álcool (-)-**12** (com *ee* > 99,9%) e seu epímero **29**. O excesso enantiomérico da substância (-)-**12** foi determinado indiretamente por espectros de RMN de ¹H do seu derivado (-)-**16** usando-se reagente de deslocamento químico quiral [(+)-Eu(hfc)]₃ e a sua configuração absoluta foi determinada por comparação com dados de seu antípoda (+)-**12**, registrados na literatura. O epímero **29** foi transformado por reações controladas na

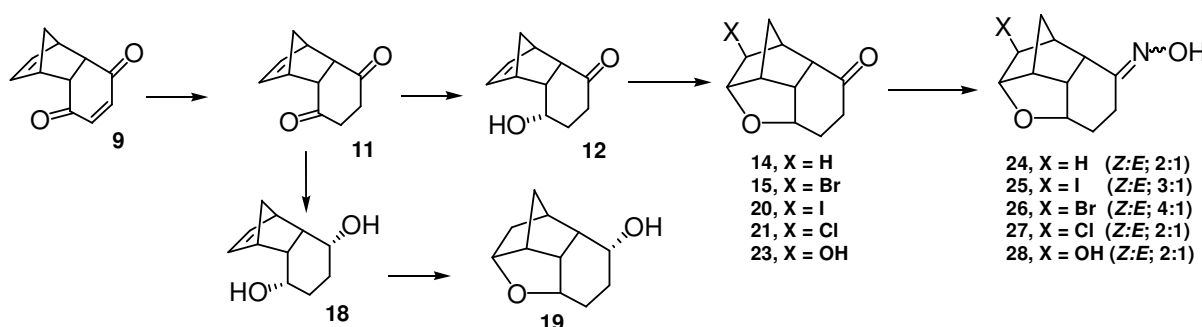
bromo-cetona (+)-**15** e, portanto, sua configuração absoluta determinada por correlação com seu enantiômero de configuração conhecida [(-)-**15**].



Palavras-chave: aduto de Diels-Alder, heterociclos cage-like, atividade anti-tirosinase, biotransformação, configuração absoluta

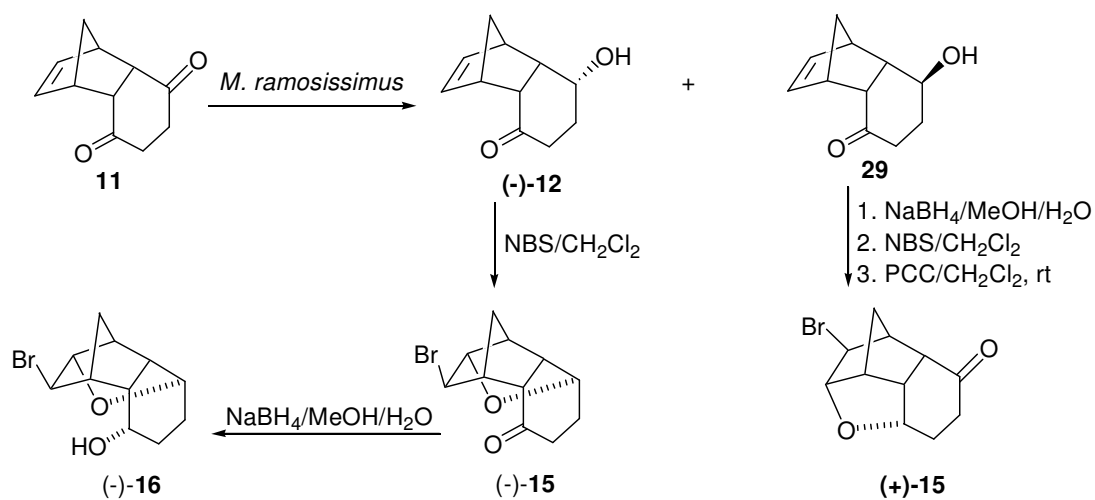
ABSTRACT:

New biological active molecules bearing cage-like structures show a new field of interest to drug and pesticide research. Accordingly, a few years ago we have devised to make use of dienedione **9** as a substrate in the synthesis of compounds with this structural pattern. The compound **9** is easily obtained from the Diels-Alder cycloaddition of cyclopentadiene and *p*-benzoquinone. This compound is extensively used in several academic researches. However, reports about its use in medicinal chemistry are scarce. In a previous work, compound **12** was prepared by NaBH₄ reduction of **11** and the bromine ether **15** was obtained by treatment of **12** with NBS in dichloromethane and, showed important biological activities. The present work reports the synthesis of new heterocyclic compounds structurally related to **15**, such as **14**, **20**, **21**, **23** and **24-28** oximes for cytotoxic and anti-tyrosinase assay.



The tested compounds **14**, **15**, **20**, **21** and **23** and oximes **24-28** did not show important cytotoxic activity against cell lines MDA-MB435, SF-295 e HL-60. All compounds showed inhibition spots in tested concentrations ($600\mu\text{g} < X < 25\mu\text{g}$) in the tyrosinase inhibition assay, specially compound **23** ($< 25\mu\text{g}$).

Enediona **11** was submitted to a biotransformation assay employing the saprobe fungus *Mucor ramosissimus* Samutsevitch. As a results it was formed a mixture of isomers (-)-**12** with *ee.* = 99% and its epimer **29**. Enantiomeric excess was determined through planned and controlled reactions and, NMR spectroscopy experiments employing chiral shift reagent [(+)-Eu(hfc)]₃. Therefore, *M. ramosissimus* is a promising species to perform biotransformation of heterocyclic *cage-like* compounds with high enantioselectivity.



Key words: *Diels-Alder adduct, cage-like heterocycles, anti-tyrosinase activity, biotransformation, absolute configuration*

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Composto *cage-like*

Os compostos *cage-like*, moléculas hidrocarbônicas policíclicas engaioladas, compostos policíclicos do tipo gaiola ou compostos policíclicos rígidos tensionados são os que contêm um ângulo de ligação incomum entre as ligações C-C-C que se encontra significativamente diferente de $109,5^\circ$, isto é, possuem ligações tensionadas entre os carbonos sp^3 , exceto adamantano, entre os apresentados na Figura 1 [MARCHAND, 1989].

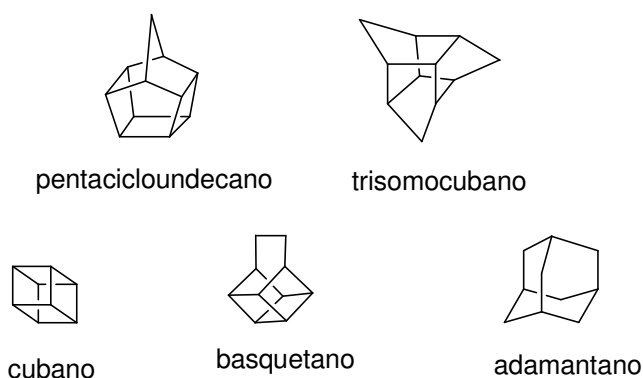


Figura 1. Exemplos de compostos policíclicos *cage-like*.

O interesse das indústrias farmacêuticas e das pesquisas acadêmicas em química medicinal por esses compostos policíclicos vêm desde 1950 com uma publicação sobre suas propriedades farmacológicas e logo em seguida na década de 60, quando foi utilizado no tratamento clínico da influenza a partir da amantadina (**1**) (Figura 2). Embora a amantadina tivesse sido o primeiro medicamento utilizado clinicamente para o tratamento contra o vírus influenza, uma observação clínica ao acaso e bastante positiva de alguns pacientes com a doença de Parkinson, que contraíram o vírus da influenza, foram tratados com a amantadina, tiveram melhora significativa em ambas as sintomatologias. Mais tarde, um derivado da amantadina, a rimantadina (**2**) também mostrou atividade antiviral, e foi relatado melhor que a amantadina com efeitos colaterais reduzidos [VAN der SCHYF & GERDE NHUYS, 2009].

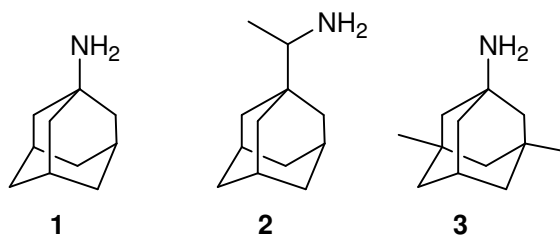


Figura 2: Moléculas *cage-like* bioativas

A memantina (**3**), outro importante composto *cage-like*, foi usado para o tratamento da doença de Alzheimer. Este composto apresentou uma pequena afinidade pelos receptores neuronais NMDA, receptores associados aos canais de cálcio, prevenindo o excessivo influxo de Ca^{2+} nas células neuronais, que este, em excesso pode levar a morte celular e ainda foi clinicamente bem tolerado com poucos efeitos colaterais [PARSONS, 1999].

Numerosos derivados do adamantano têm recebido considerável atenção por apresentarem diversas atividades biológicas, tais como atividade antibacteriana, antineoplásica, anticolinérgica, anti-inflamatória, analgésica, inibidor da HIV-protease e inibidor da enzima dipeptidil peptidase-4. Este último está relacionado para o tratamento do diabetes do tipo 2 [VAN der SCHYF & GELDE NHUYS, 2009].

Os compostos hidrocarbônicos policíclicos engaiolados, também tem sido úteis como protótipos de estudo em química medicinal para desenvolvimento de medicamentos e também para unir partes destas estruturas engaioladas em outros grupos farmacofóricos melhorando as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas [GELDENHUYS *et al.*, 2005].

Considerando a atividade antiviral da amantadina (**1**), mais estudos relacionados com compostos hidrocarbônicos policíclicos engaiolados conduziram para a descoberta de outros compostos com propriedades antivirais. Em um estudo com modelos computacionais, as estruturas da amantadina (**1**) e 8-aminoxapentaciclo[5.4.0.0^{2,6}.0.^{3,10}.0^{5,9}]undecilamina (**4**), foi observada uma similaridade estrutural, como mostrado na Figura 3 [GELDENHUYS *et al.*, 2005].

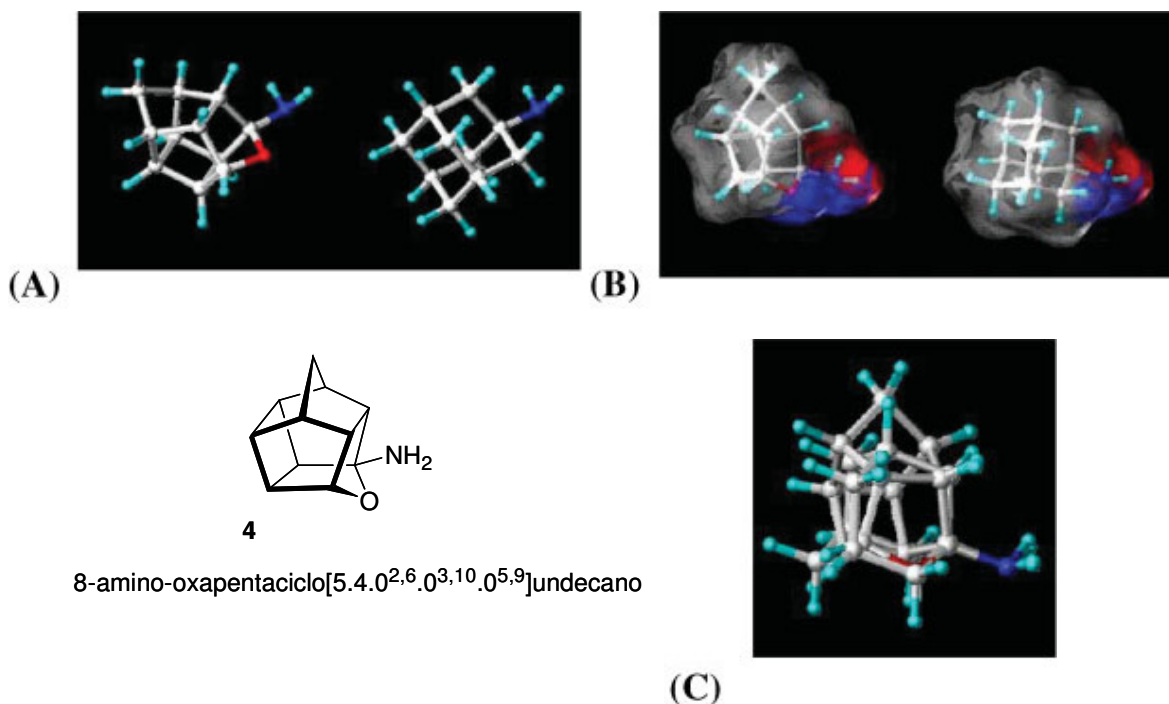


Figura 3. Similaridade estrutural entre compostos hidrocarbônicos policíclicos engaiolados: a) amantadina e 8-amino-oxapentaciclo[5.4.0.^{2,6}.0.^{3,10}.0^{5,9}]undecilamina (4) b) potencial de ligação de hidrogênio (em vermelho e azul) para amantadina de 154,12Å e para 8-amino-oxapentaciclo[5.4.0.^{2,6}.0.^{3,10}.0^{5,9}]undecilamina de 155,81Å. c) sobreposição dos dois compostos mostrando a similaridade estrutural [GELDENHUYS *et al.*, 2005].

As pentacicloundecilaminas (**5** e **6**) foram sintetizadas pela primeira vez em 1970 por Underwood e Ramamoorthy (Figura 4) [UNDERWOOD & RAMAMOORTHY, 1970] mas a atividade biológica foi avaliada após 20 anos por Oliver e seus colaboradores contra Herpes simplex I e II, Influenza A2/Taiwan e Rhinovirus 1A. Estas pentacicloundecilaminas mostraram atividade comparável ao aciclovir e amantadina [OLIVER *et al.*, 1991].

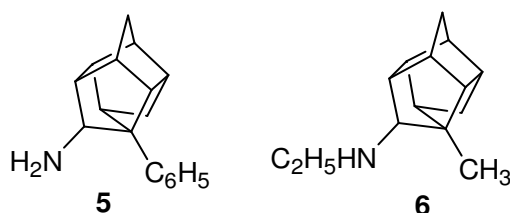
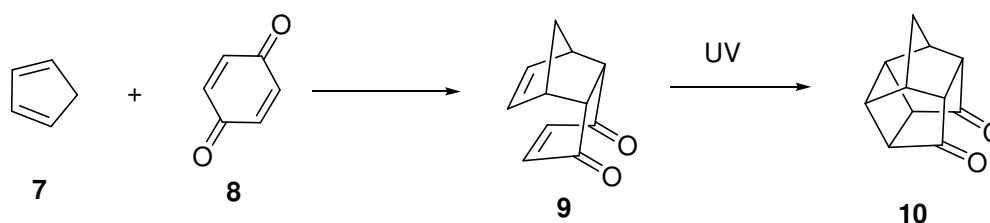


Figura 4: Pentacicloundecilaminas bioativas sintetizados pela primeira vez

As pentacicloundecilaminas são derivados da dicetona de Cookson (**10**) ou pentaciclo[5.4.0.0^{2,6}.0^{3,10}.0^{5,9}]undecano-8,11-diona, chamado de composto do tipo gaiola (*cage-like*) por ter uma semelhança com uma gaiola. Esta dicetona (**10**) é obtida a partir da fotociclização intramolecular [2+2] do aduto de Diels-Alder (**9**) (esquema 1). O aduto de Diels-Alder, nomeado de triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona (**9**) pela regra da IUPAC, é um composto de fácil preparação e até hoje é extensivamente utilizado em diversas pesquisas acadêmicas [GELDENHUYS *et al.*, 2005]. Apesar disso, o seu potencial na área da química medicinal ainda não é bem explorado. Por outro lado, existe um grande interesse no estudo da avaliação biológica destas moléculas policíclicas rígidas devido à sua peculiaridade estrutural. Estes esqueletos moleculares são úteis na interação específica com receptores biológicos e/ou na inibição competitiva ou não-competitiva com espécies químicas menores em seu interior [RANGANATHAN *et al.*, 1999].

Além disso, a incorporação destas estruturas carbogênicas rígidas em compostos biologicamente ativos, geralmente potencializa a sua atividade fisiológica. As estruturas carbônicas policíclicas rígidas aumentam a lipofilicidade por meio das membranas celulares, bem como a sua afinidade pelas regiões lipofílicas nos receptores. Estas estruturas também proporcionam estabilidade metabólica, podendo prolongar o efeito farmacológico o que pode permitir, por exemplo, a redução da dose [BROOKES *et al.*, 1992; GOVENDER *et al.*, 2005].

Esquema 1



1.2. A reação de Diels-Alder

A reação de Diels-Alder, desde a descoberta por Diels e Alder em 1928, é uma das mais versáteis estratégias empregadas na síntese orgânica. Esta reação reúne características de grande valor para a química sintética, como o fato de ser essencialmente

Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

Introdução

estereosseletiva, com isso possibilita reações intermolecular e intra-molecular, na obtenção de compostos de alta complexidade. Outra observação é a economia de átomos, ou seja, durante a reação, independente da natureza da reação, não há perda de átomo ou de grupos funcionais. Nesta reação, duas moléculas insaturadas, um dieno apresentando dois pares de elétrons π (pi) conjugado com dienófilo contribuindo com um par de elétrons π , se combinam para formar um anel de seis membros. O produto também chamado de aduto de Diels-Alder contém duas novas ligações (δ) sigma e uma ligação π . A nova ligação π forma entre as duas ligações duplas do dieno. A reação é facilitada pelo grupo retirador de elétrons (ex.: C=O e C $\equiv$ N) no dienófilo e grupo doador de elétron (ex.: -R e -OR) no dieno. Além disso, o dieno deve ser capaz de realizar a conformação *s-cis* (Figura 5) a fim de ter as ligações duplas necessariamente em *cis* na obtenção do produto cicloexeno [OLIVEIRA, 2006; CLAYDEN, 2001].

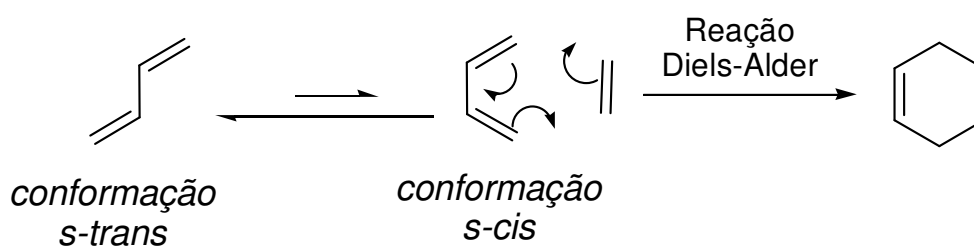


Figura 5: Conformação preferida para reação de Diels-Alder é a *s-cis*.

A reação de Diels-Alder é um cicloadição [4+2], concertada e estereosseletiva. Na reação do anidrido maléico com o ciclopentadieno, por exemplo, o isômero *endo* é formado preferencialmente do que o *exo*. A preferência pela estereoquímica *endo* é observada em muitas reações de Diels-Alder. O fato é que o mais impedido, no caso o produto *endo* é formado principalmente, o que originou um grande questionamento entre os cientistas, até que Woodward, Hoffmann e Fukui usaram a teoria do orbital molecular para explicar que a sobreposição dos orbitais *p* nos substituintes do dienófilo com os orbitais *p* do dieno é favorável, facilitando a ligação entre as duas moléculas. Então, Hoffman e Fukui compartilharam o prêmio Nobel em 1981 pela explanação sobre a teoria do orbital molecular desta e outras reações orgânicas. Na figura 6, podemos notar a sobreposição favorável (combinação entre o lóbulo escuro e claro) do dieno e substituintes no dienófilo na formação do produto *endo* [CLAYDEN, 2001].

Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do tríciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

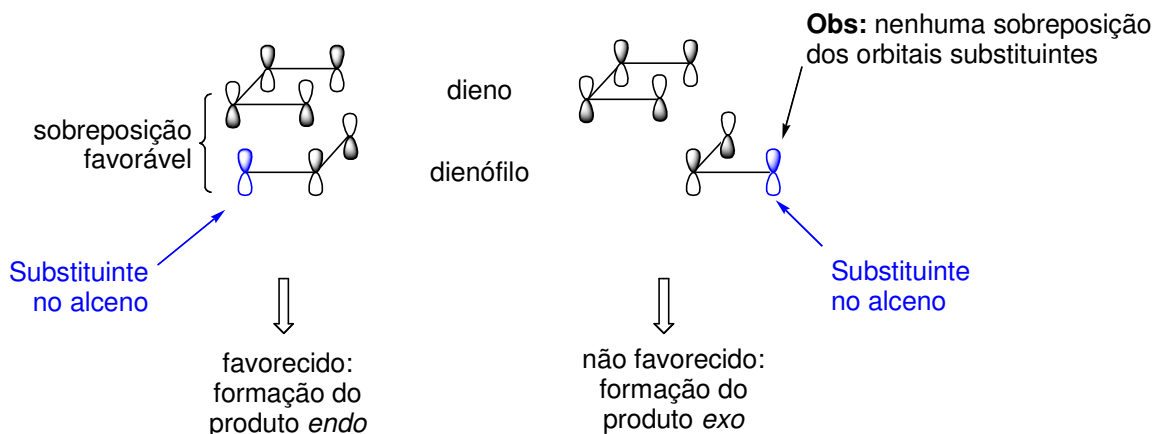


Figura 6: Sobreposição favorável entre dieno e dienófilo

Muitas vezes, ainda que o produto *endo* seja formado inicialmente, o isômero *exo* será isolado da reação de Diels-Alder. Isto ocorre porque o isômero *exo* tem menos compressão estérica que o *endo*, e é mais estável, pois a reação é frequentemente reversível sob a condição de reação. Numa reação reversível, o produto formado reverte para o material de partida e forma novamente o produto muitas vezes antes de ser isolado. O isolamento do produto *exo* é um exemplo de um importante conceito: de controle cinético e termodinâmico da composição dos produtos. O primeiro produto formado é chamado de produto cinético. Se a reação não é reversível sob condições usadas, o produto cinético será isolado. Entretanto, se o primeiro produto formado não é mais estável e a reação é reversível sob as condições usadas, então, o produto mais estável é chamado de produto termodinâmico, que será isolado [SOLOMONS, 2008].

A reação de Diels-Alder também mostra outra estereoespecificidade. Nota-se que o dieno e dienófilo abordam planos paralelos: o dieno sofre uma adição *syn* para o dienófilo. Portanto, os grupos que estão *cis* no dienófilo são também *cis* no produto. Então, a reação do 1,3-butadieno com o ácido maléico (*cis*) obtém somente o *cis*-diácido, enquanto a reação com o ácido fumárico (*trans*) obtém somente o *trans*-diácido (Figura 7) [CLAYDEN, 2001].

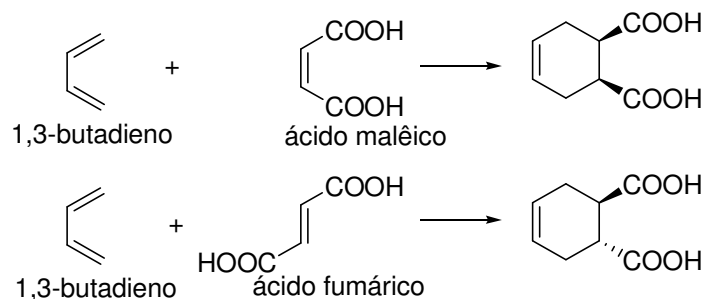


Figura 7: Estereoespecificidade exibida pela reação de Diels-Alder [adaptado de CLAYDEN, 2001].

Quando uma reação de ciclização ocorre, há uma combinação de um orbital cheio e um vazio para formar uma nova ligação. Na cicloadição são formadas duas novas ligações ao mesmo tempo, isto é, num processo reacional são desfeitas três ligações do tipo π e formadas duas ligações do tipo σ e uma nova ligação π . Na Figura 8, pode-se observar que as duas moléculas aproximam uma da outra, e o orbital LUMO do anidrido maleico, o orbital HOMO do ciclopentadieno podem interagir no carbono onde a nova ligação σ será formada. Nesta aproximação é mostrada a sobreposição favorável de uma interação secundária de orbitais entre o LUMO do grupamento carbonila do anidrido maléico e HOMO do ciclopentadieno levando preferencialmente para o estado de transição *endo*. O estado de transição do produto *endo* é de baixa energia, porque a interação dos orbitais é favorável e consequentemente a forma *endo* é o produto majoritário e também cinético na maioria das vezes. A forma *exo* é o produto termodinâmico, pois a interação estérica é menor no aduto *exo* do que no aduto *endo*. Assim, o aduto *exo* é geralmente mais estável, mas não é o produto principal, pois é formado mais lentamente, como já foi descrito anteriormente [CLAYDEN, 2001].

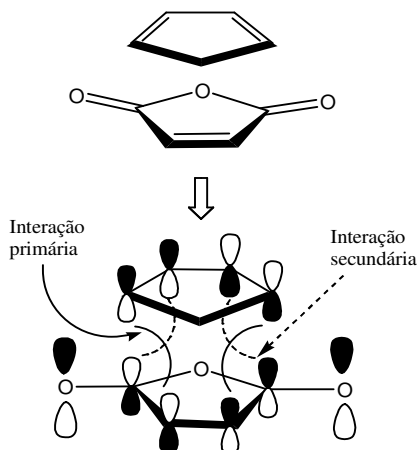


Figura 8: Interação dos orbitais moleculares na reação de Diels-Alder entre ciclopentadieno e anidrido maléico [adaptado de CLAYDEN, 2001].

1.3. Antecedentes da pesquisa

Em trabalhos anteriores, foram preparados alguns compostos do tipo gaiola pelo grupo de pesquisa SINTMOLB (Figura 9), do Departamento de Química da UFMS e avaliados quanto às suas atividades citotóxica, inseticida e fungicida [ITO *et al.*, 2007; ITO, 2007].

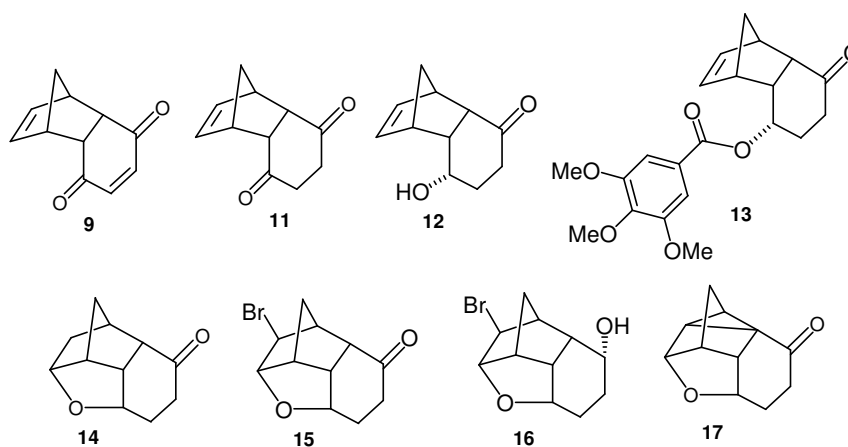


Figura 9: Substâncias testadas para atividade citotóxica e inseticida.

Com essas substâncias foram também realizados testes de atividade inseticida sobre indivíduos adultos não sexados de *Sitophilus zeamais* (gorgulho-do-milho) [ITO, 2007;

SOUZA *et al.*, 2006]. Foram testados os compostos **9**, **11**, **12**, **13**, **15** e **16** e todos causaram mortalidade significativa, sendo estes resultados bastante promissores, estimulando a prosseguirmos com estes estudos. Entre esses compostos, o bromoéter **15** se destacou nesse teste, despertando-nos o interesse em utilizá-los como protótipo em nossos estudos.

Em princípio, inúmeros derivados seriam possíveis de serem preparados, tais como os mostrados na Figura 10.

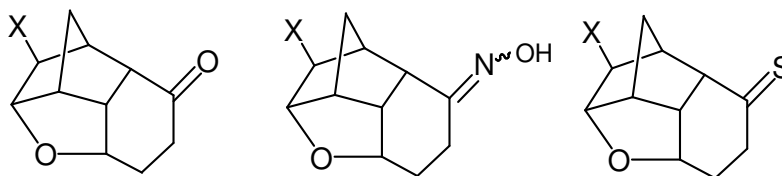


Figura 10: Cetonas, oximas e tionas estruturalmente relacionadas, onde X = H, Br, Cl, I, OH.

As tionas são classes de compostos com reconhecidas atividades biológicas [TADA *et al.*, 1996]. A conversão do grupo oxo (cetona) na função tioxo (tiona) ou oxima leva, em geral, a um aumento na atividade biológica [WAISSER *et al.*, 2000; WAISSER *et al.*, 2001].

Várias oximas, em diversos estudos, têm apresentado atividades farmacológicas importantes, tais como, antitumorais, antibiótica, analgésica, anestésica, antidepressivas anticonvulsivante e antiarrítmico [SOUZA *et al.*, 2006]. Sendo assim, considerando-se o grande potencial terapêutico de oximas, focamos nossos estudos para sintetizar substâncias estruturalmente relacionadas com as apresentadas na Figura 10 (nas formas racêmicas e enantiomericamente puras) e submetê-las a ensaios de atividades biológicas, tais como citotóxica e anti-tirosinase.

1.4. Citotoxicidade *in vitro*

Os testes de citotoxicidade consiste em colocar o material ou a substância a ser testada, tais como composto sintético, natural ou semissintético, direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células e, em tempo apropriado, observando as alterações celulares que este material ocasionou. As alterações celulares podem ser observadas de diferentes modos, como por exemplo, a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares provocadas pela ação de certas substâncias. O parâmetro

Introdução

mais utilizado para avaliar a toxicidade de um material é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais. Quando os materiais testados apresentam-se nocivos às células, estas entram em processo de necrose ocorrendo o rompimento da membrana e consequentemente, liberam o corante. Este processo determina a possibilidade de distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular apresenta ao final do ensaio [CIAPETTI *et al.*, 1996].

O estudo *in vitro* utilizando culturas de células tem se mostrado preferencial devido à homogeneidade das amostras e à facilidade de uma padronização, pois é possível o controle de tais fatores como: pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e de O₂. Porém, algumas desvantagens devem ser consideradas para este método de estudo, entre elas podemos citar a necessidade de se trabalhar em ambiente estéril e asséptico, o que exige certa prática pelo pesquisador, e ainda, o custo de um experimento feito em cultura de célula é muito maior do que o mesmo feito em animais [FRESHNEY, 1990].

O sal de tetrazólio (MTT) pode ser empregado com um método quantitativo colorimétrico para a avaliação da sobrevivência e da proliferação de células. Este método detecta o sinal gerado pela ativação de células vivas cuja avaliação é realizada por um espectrofotômetro, o qual apresenta um alto grau de precisão na leitura de incrementos celulares para o estudo de citotoxicidade. As vantagens do método colorimétrico são: a sua rapidez, precisão além de não ser necessária a utilização de um radioisótopo.

Os testes de culturas celulares podem ser divididos em duas classes: (1) resposta em curto prazo onde inclui alteração na permeabilidade da membrana e alteração de uma via metabólica e (2) sobrevivência em longo prazo que inclui auto-renovação e transformações malignas. Os ensaios em curto prazo medem proporção de células viáveis após serem submetidas a situações traumáticas. A maioria destes testes se baseia no rompimento da integridade da membrana, visualizado pela incorporação de um corante vital ao qual a célula é normalmente impermeável. Já os testes em longo prazo, determina a capacidade metabólica ou proliferativa das células após uma determinada influência tóxica.

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais em laboratório, há uma necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os biomateriais que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente.

Em maio de 1992, a *Food Drug Administration* (FDA) emitiu um memorando onde os protocolos relacionados aos testes de citotoxicidade foram padronizados pela *International Standard Organization* (ISO). Este documento descreve uma série de requisitos que devem ser respeitadas durante a realização dos testes *in vitro* de citotoxicidade de biomateriais para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Após comprovada a sua toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando ensaios necessários em animais de laboratórios.

Segundo as normas ISO 10993-5 existem três categorias de testes: testes por extração, teste de contato direto e teste de contato indireto. Esta escolha vai determinar então, os detalhes dos preparos das amostras. Ao final do tempo de exposição, a avaliação da presença e extensão dos efeitos da citotoxicidade pode ser realizada pelas alterações morfológicas das células, danos celulares, crescimento celular e pelo metabolismo celular. É importante que o pesquisador saiba identificar em qual dos métodos o seu estudos se adapta a fim de que seja possível comparar os resultados com de outros materiais similares e permitir a reprodução laboratorial do estudo.

1.5. Enzima tirosinase

A enzima tirosinase (EC 1.14.18.1) ou polifenoloxidase é uma enzima que em seu núcleo contem átomos de cobre que se ligam a espécies de oxigênio, sendo assim, uma metaloproteína amplamente distribuída na natureza. A melanogênese é o processo de produção de melanina pelos melanócitos, na pele e dentro dos folículos capilares em animais. A tirosinase é a enzima-chave que regula os pontos críticos das reações de biossíntese nos organismos vivos. Esta enzima catalisa a *orto*-hidroxilação da tirosina (monofenóis) para 3,4-dihroxifenilalanina ou *L*-DOPA (*orto*-difenois) e, subsequentemente, oxidação dos difenois (DOPA) a *o*-quinonas (dopaquinonas), instáveis e reativas. Esta *o*-quinonas podem transformar-se em pigmento de melanina através de uma série de reações enzimática e não-enzimática (Figura 11) [KIM & UYAMA, 2005].

Introdução

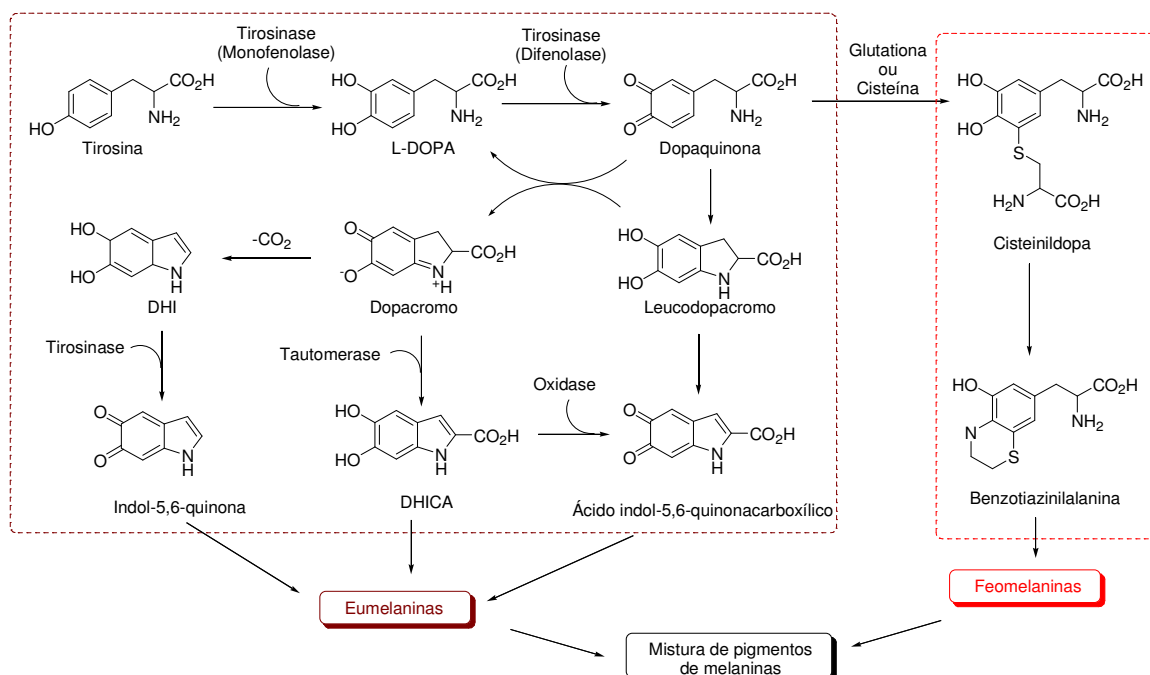


Figura 11: Biossíntese da eumelanina e feomelanina a partir da tirosina. (adaptado de KIM & UYAMA, 2005).

Em animais, a enzima é responsável pela melanização, isto é, coloração atribuída à pele, pêlos, olhos, substância negra cerebral e também distribuídas no corpo de anfíbios e répteis. Ainda é responsável pelo escurecimento indesejado depois de batidas e cortes em frutas e verduras. Em insetos a tirosinase é a enzima chave no processo de muda ou ecdise [WANGTHONG *et al.*, 2007].

Do ponto de vista medicinal, devido ao crescente aumento de incidência de melanoma ou câncer de pele, há uma constante busca da elucidação de processos bioquímicos e de fabricação de compostos para controle da inativação enzimática para esta moléstia e nas indústrias alimentares o foco está sendo em preservação dos produtos de prateleira como frutas, vegetais e bebidas, mas também se pode explorar os inibidores de tirosinase nos interesses agroquímicos como agentes controladores de inseto ou formular meios de inibição ou ativação enzimática para desordem pigmentar em nível de melanócitos [KIM & UYAMA, 2005].

1.6. Biotransformação/Biocatálise

Apesar dos significativos avanços na descoberta de agroquímicos e fármacos potencialmente ativos, ainda persiste um grande número de doenças e prejuízos o qual desafiam os pesquisadores em encontrar compostos ou formulações efetivos para seus tratamentos e prevenção. Um dos grandes desafios para os químicos sintéticos orgânicos e pesquisadores de áreas afins é preparar compostos que além de atuar especificamente contra o agente causador da moléstia ou prejuízos, também não causem efeitos indesejados e que a meia-vida de eliminação seja fácil sem deixar resíduos no organismo ou no meio em que está atuando [OLIVEIRA & MANTOVANI, 2009].

Uma das constatações para obtenção de compostos que atuem especificamente e que não causem efeitos indesejados é o fato do uso do medicamento da talidomida, administrado na forma racêmica, utilizado na década de 60 para amenizar o mal-estar da gestante durante a gravidez, onde um dos enantiômeros causava a má formação do feto [PEREIRA, 1995].

A partir da confirmação de que diferenças estereoisoméricas podem dar origem a diferenças na atividade biológica, o reconhecimento e a possibilidade de desenvolvimento de estereoisômeros isolados passaram a ser uma abordagem de importância para a indústria farmacêutica. Entre as possibilidades industriais ou laboratoriais de produzir moléculas definidas do ponto de vista estereoquímico, ou enantiômeros, podemos incluir: a) separação de misturas racêmicas por cristalização, cromatografia ou resolução cinética; b) utilização de compostos opticamente puros contendo estruturas presentes na natureza, isoladas de fontes naturais ou manufaturadas por processos enzimáticos ou similares; c) utilização de produtos não-naturais, mas elaborados em laboratório, frequentemente disponíveis com alta pureza enantiomérica; d) aplicação de síntese assimétrica, na qual os compostos são transformados, com a ajuda de microrganismos ou catalisadores, para obtenção de moléculas de alta pureza óptica [FERREIRA *et al.*, 1996].

A incorporação da biotransformação em rotas sintéticas usando microrganismos e/ou enzimas isoladas está sendo bastante explorada por indústrias e pela comunidade acadêmica. A primeira consideração para o uso da biotransformação numa rota sintética é o controle régio e estereosseletivo, que podem ser alcançados através de reações

Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do tríciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

catalisadas por enzimas ou microrganismos. A biotransformação é um dos métodos eficazes na produção de compostos opticamente puros e no desenvolvimento de rotas eficientes para compostos alvos. Ainda, a biotransformação proporciona alternativas para metodologia sintética clássica, assim representando uma ferramenta viável para a síntese orgânica [LOUGHLIN, 2000].

Enzimas isoladas e/ou microrganismos têm sido frequentemente utilizados na indústria como catalisadores ou conversão de substâncias racêmicas em produtos enantiomericamente puros. Comparando com enzimas isoladas, culturas de microrganismos podem ser preparadas mais rapidamente e com menor custo. Em particular, os microrganismos têm sido mais comumente utilizados em processos industriais graças à sua diversidade, viabilidade econômica e facilidade de manuseio. Crescentes avanços na área acadêmica têm aumentado as vantagens do uso de microrganismos com catalisadores [ISHIGE *et al.* 2005].

1.7. *Mucor ramosissimus*

Neste trabalho será utilizada uma espécie de fungo, o *Mucor ramosissimus*. O gênero *Mucor* pertence à família Mucoraceae, da ordem dos Mucorales dentro da classe dos Zigomicetos. *Mucor* é um fungo filamentoso encontrado no solo, em plantas e em material vegetal morto. *Mucor ramosissimus* Samutsevitch é uma espécie de fungo sapróbia isolada de folhas de *Rudgea jasminoides* (Rubiaceae) nativa de Mata Atlântica [SIMÕES, 2004].

As colônias desta espécie são de cor bege a acinzentadas e o crescimento é restrito em relação à temperatura, não apresentando desenvolvimento numa temperatura acima de 37°C, mas é de crescimento rápido em meios de cultura em temperatura em torno de 30°C. Os esporangióforos são hialinos e podem ser simples ou ramificados, formando esporângios globulares apicais de cor cinza a negro suportados e elevados por uma columela (Figura 12).

A maioria das espécies de *Mucor* é incapaz de infectar humanos e animais endotérmicos devido à sua incapacidade de se desenvolverem em ambientes com temperaturas acima de 37 °C. Alguns relatos descrevem este fungo como causador de zigomicoses em pacientes imunodeprimidos [ELLIS, 1997]. Esse fungo também possui a capacidade de degradar pesticidas químicos [SZEWCZYK *et al.*, 2003]. A Figura 12

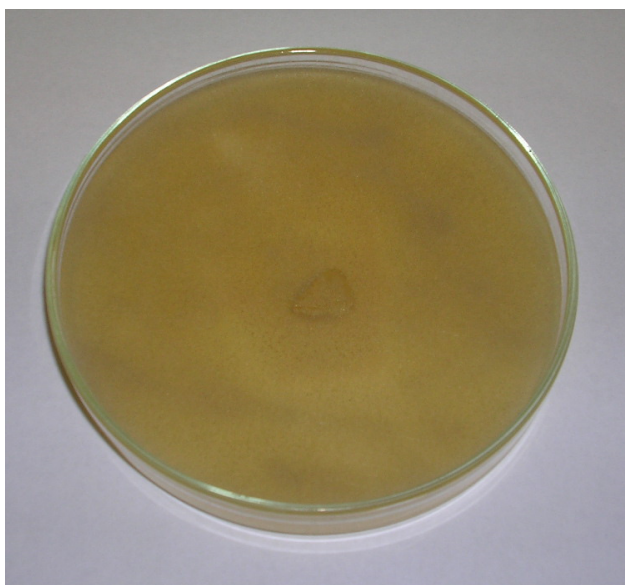
Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do tríciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

Introdução

ilustra um aspecto geral da colônia de *M. ramosissimus* e esquema da estrutura de esporos e esporangióforos de espécies do gênero.

Este fungo foi selecionado por ser componente da microbiota fúngica de ecossistemas brasileiros e por não existir muitos registros na literatura de sua utilização em biotransformação de substâncias orgânicas.

A)



B)

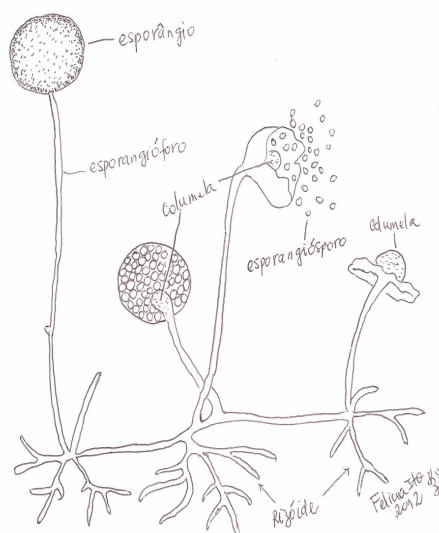


Figura 12: A) aspecto geral da colônia de *Mucor ramosissimus* crescida em Batata-Dextrose-Agar (BDA) com cinco dias de idade em placa de Petri de 10 cm de diâmetro. B) Desenho esquemático de *Mucor spp.*, ilustrando esporangióforos, esporângio multiesporulado (30-300 μm), columela, esporangiósporos (4-8 μm) e rizóide.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Preparar novos heterociclos derivados do aduto de Diels-Alder *endo*-triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona e avaliar suas atividades biológicas frente a células tumorais: HL-60 (leucemia humano), MDA-MB435 (mama humano), SF-295 (glioblastoma humano) e ensaios de inibição da enzima tirosinase.

Realizar os ensaios de biotransformação dos compostos policiclos *cage-like* derivados do aduto de Diels-Alder.

Determinar configurações absolutas e excessos enantioméricos de compostos quirais obtidos por biotransformação estereosseletiva.

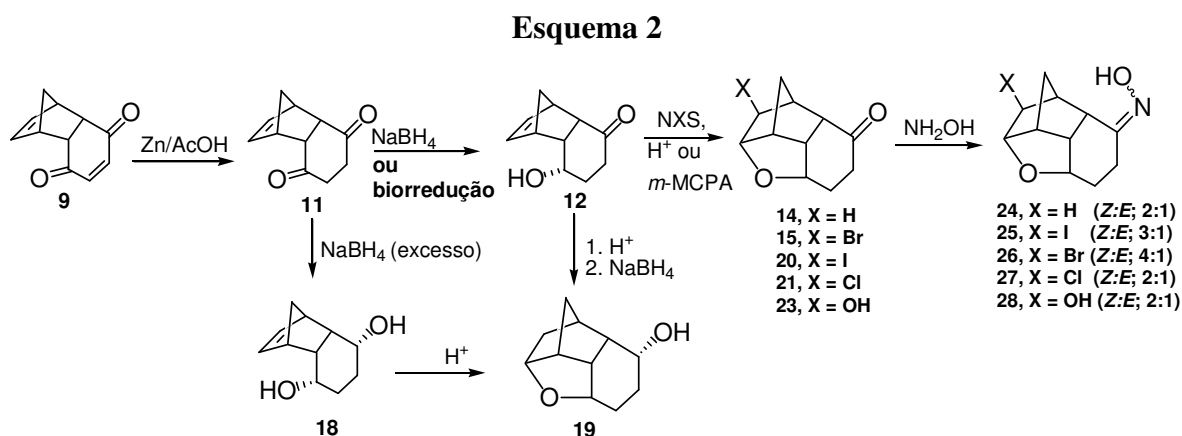
Resultados e discussão

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a leitura, os compostos obtidos na forma de racematos serão representados por apenas um de seus enantiômeros. As substâncias puras ou enriquecidas enantiomericamente, serão apresentadas com a sua configuração absoluta correta, bem como sua rotação óptica (+ ou -).

3.1. Síntese

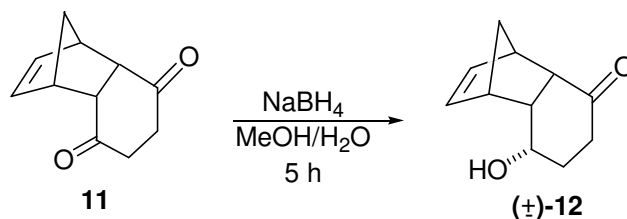
No esquema 2 está representada a sequência de transformações planejadas para a construção das estruturas *cage-like* contendo as funcionalidades desejadas:



Dessa forma, o desenvolvimento da presente tese iniciou-se com o planejamento de sínteses de moléculas *cage-like* contendo o esqueleto carbônico do ceto-éter **14**, baseando-se em experiências prévias [ITO *et al.* 2007]. A seguir, será descrita passo a passo as transformações químicas envolvidas.

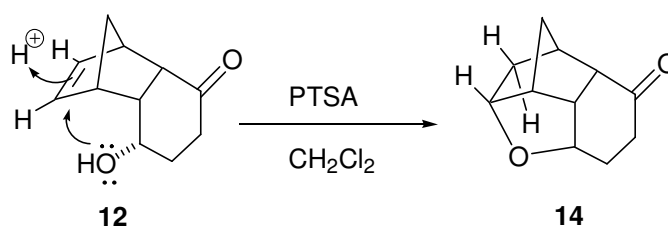
A enediona **11**, obtida por redução quimiosseletiva do aduto de Diels-Alder **9** (ITO *et al.*, 2007), foi submetida à redução de uma das suas carbonilas com NaBH₄, obtendo-se o ceto-álcool **12**, como exibido no Esquema 3:

Esquema 3



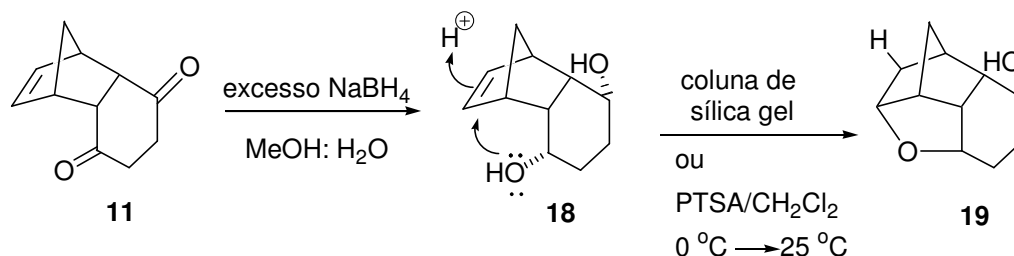
O composto **14**, por sua vez, foi obtido a partir do cetohidróxido **12**, após tratamento com ácido *p*-toluenossulfônico em diclorometano [ITO *et al.*, 2007]. Em meio ácido ocorre ciclização pelo ataque do grupo hidroxila à ligação dupla protonada, formando-se o anel tetra-hidrofurânico altamente substituído e tenso (Esquema 4), o qual teve sua estrutura confirmada com os dados descritos na literatura [CONSTANTINO *et al.* 2001].

Esquema 4



A enediona **11** foi reduzida para o diol **18**, pelo tratamento com NaBH₄ em excesso, obtendo-se um sólido branco (98% de rendimento), após seu “work-up” (Esquema 5). Sua estrutura foi confirmada por dados espectroscópicos de RMN de ¹H (Espectro 1) e de ¹³C.

Esquema 5



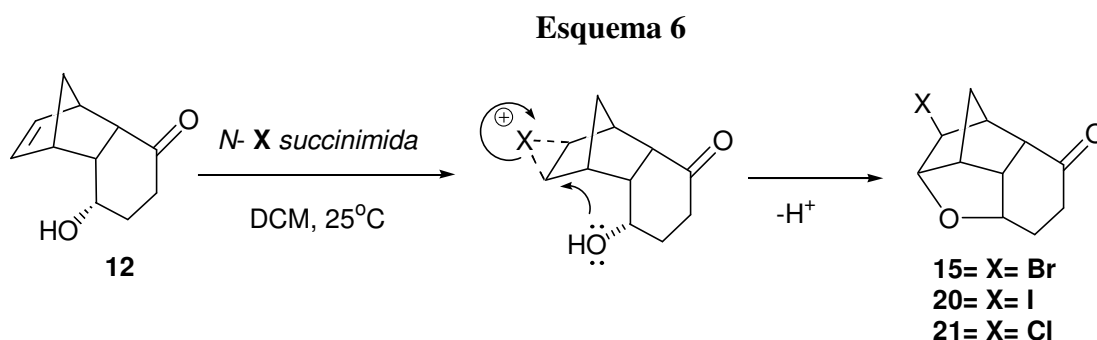
O diol **18** demonstrou ser instável em meio levemente ácido, sofrendo reação de ciclização até mesmo durante sua purificação em coluna cromatográfica de sílica gel,

Resultados e discussão

obtendo-se o éter **19**, confirmado por espectros de RMN de 1D e 2D (Espectros 2 -9; Tabelas 6-8).

O produto **19** foi obtido devido ao meio ácido da sílica, o qual sofreu ciclização pelo ataque do grupo hidroxila à olefina (Esquema 5), como no caso da formação do composto **14**, o que foi comprovado colocando o diol **18** nas mesmas condições para formar **14** (PTSA/CH₂Cl₂), obtendo-se rendimento quantitativo. Dessa forma, até aqui foram sintetizadas com sucesso duas substâncias com estruturas moleculares consideradas *cage-like* (**14** e **19**).

O composto **12** foi usado para dar origem aos compostos halogenados **15**, **20** e **21** (Esquema 6), pelo tratamento do mesmo com com *N*-bromosuccinimida (NBS), *N*-iodosuccinimida (NIS) e *N*-clorosuccinimida (NCS), respectivamente, com rendimentos de 97% para os compostos **15** e **20** e 60% para o composto **21**.



O rendimento baixo para o composto **21**, provavelmente é devido à re-oxidação do álcool **12** para à dicetona **11**, promovida pela *N*-clorosuccinimida, que é também um agente oxidante [CUNHA *et al.*, 2006]. A formação de **11**, nessa reação, foi confirmada por espectro de RMN de ¹H. Quando comparamos os espectros da dicetona **11** pura, da mistura (**11** + **21**) e do composto **21** puro, fica evidente esta transformação (Figura 13).

Resultados e discussão

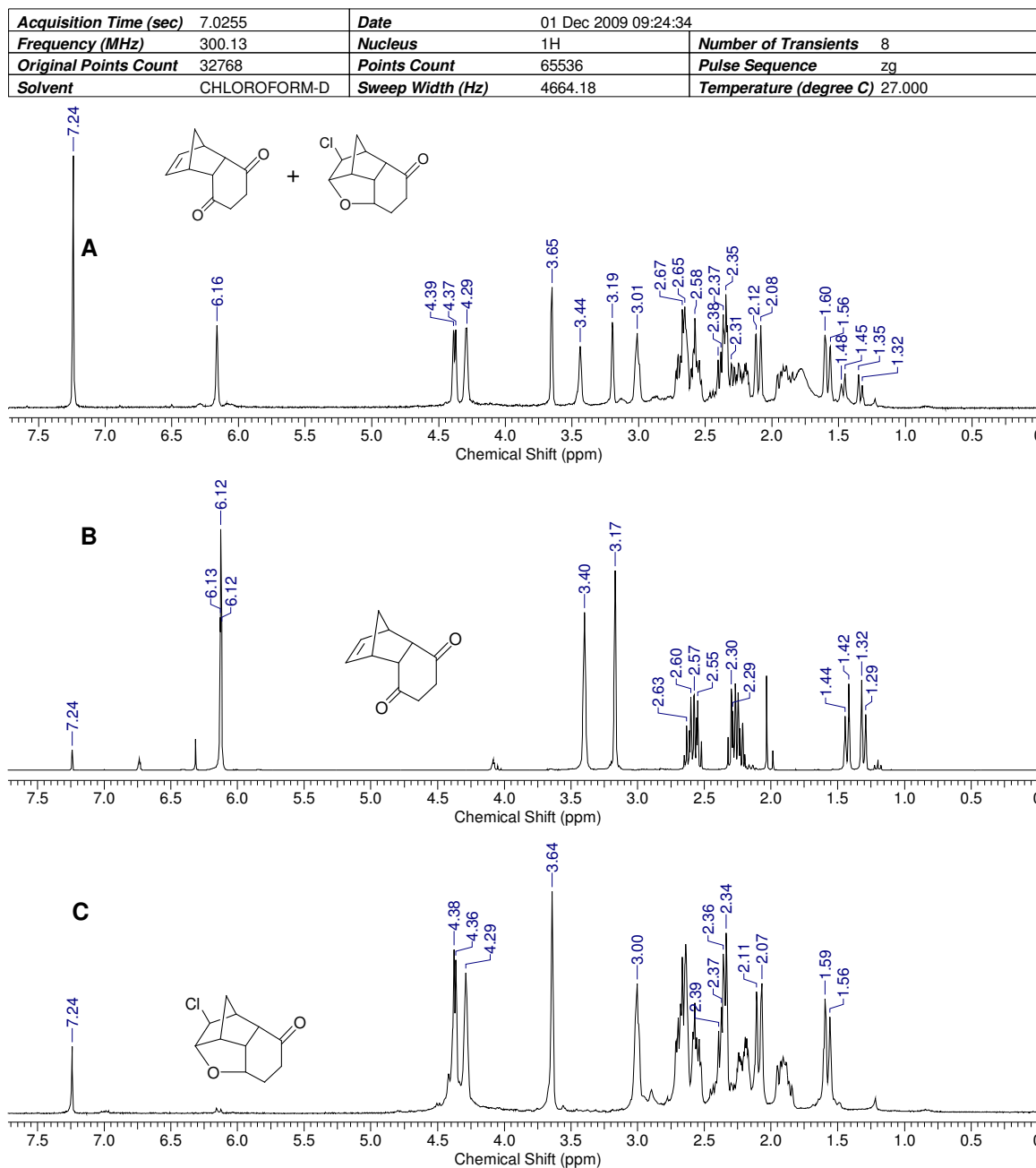
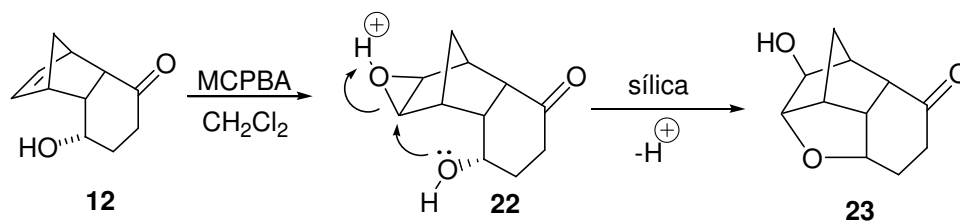


Figura 13: Espectros de RMN de ^1H dos compostos **11** e **21**. A) Mistura de **11** com **21**. B) Composto **11** puro. C) Composto **21** puro.

O ceto-álcool **12** foi ainda submetido ao tratamento com ácido *m*-cloroperoxibenzóico, com intuito de formar o anel oxirano presente em **22**, para posterior abertura intramolecular (Esquema 7). No entanto, além de **22**, o composto **23** desejado foi formado “one-pot”. Durante purificação da mistura formada, o epóxido **22** foi totalmente isomerizado para **23**, de acordo com proposta mecanística, já conhecida, apresentada no Esquema 7.

Esquema 7



A Tabela 1 resume os resultados experimentais obtidos com o uso do ceto-álcool **12** para a preparação das moléculas *cage-like* **14**, **15**, **20**, **21** e **23**.

Tabela 1: Transformações químicas do álcool **12** e condições reacionais, a 25 °C.

Material Partida	Reagente (equivalente)	Produto	Tempo (horas)	Rendimento (%)
 12	PTSA (1,1 eq.)	 14	3	97
	NBS (1,1 eq.)	 15	2,5	98
	NIS (1,1 eq.)	 20	1	97
	NCS (1,1 eq.)	 21	6	60
	1. MCPBA (1,1 eq.) 2. Sílica ou CH_2Cl_2 /PTSA (cat.)	 23	3	97

Comparando os espectros de RMN de ^1H (Figura 14; Tabela 2) dos compostos policiclos *cage-like* **14**, **15**, **20**, **21** e **23**, os sinais dos hidrogênios H10 geminais aos compostos halogenados ou oxigenados não tiveram deslocamentos significativos, com exceção do H10 do composto **14** que está em um ambiente químico diferente dos demais derivados. As diferenças nos deslocamentos dos sinais foram notadas no hidrogênio H9, vicinal ao H10. H9 está protegido, dependendo do heteroátomo ligado em C10 (I, Br, Cl, O).

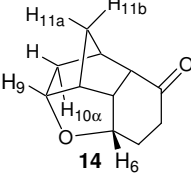
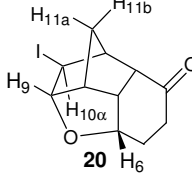
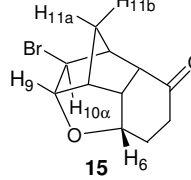
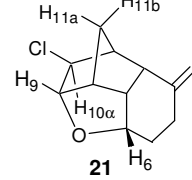
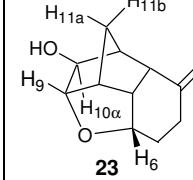
Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do tríciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

Resultados e discussão

O). O deslocamento de H11a também teve influência dos átomos substituintes em C10. Quanto maior o tamanho do heteroátomo ligado em C10, maior é a desproteção de H11a. Este fato, muito provavelmente, é devido a efeito eletrônico retirador de elétrons do átomo substituinte exercidos em H11a, que está muito próximo espacialmente. Pela Tabela 2 é possível comparar esses deslocamentos químicos dos hidrogênios em discussão.

Como esperado, nos espectros de RMN de ^{13}C desses policiclos *cage-like*, podemos observar que C10 desloca-se para região mais desblindada (desprotegidos) de acordo com o aumento de eletronegatividade dos heteroátomos ligados em C10, veja na Figura 15 e Tabela 2.

Tabela 2: Comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios H6, H9, H10 e H11 e carbonos C6, C9, C10 e C11 dos compostos **14**, **15**, **20**, **21** e **23**.

Posição dos H e C										
	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$
6	74,4	4,22	74,8	4,24	75,2	4,28	75,7	4,30	75,7	4,28
9	43,5	4,40	89,5	4,80	88,4	4,59	88,2	4,38	87,3	4,07
10	37,4	α)1,36 β)1,44	32,7	3,77	55,0	3,72	63,9	3,65	77,1	3,56
11a	37,2	1,52	37,1	2,19	34,8	2,17	35,2	2,10	34,9	1,97
11b		1,30		1,75		1,66		1,59		1,46

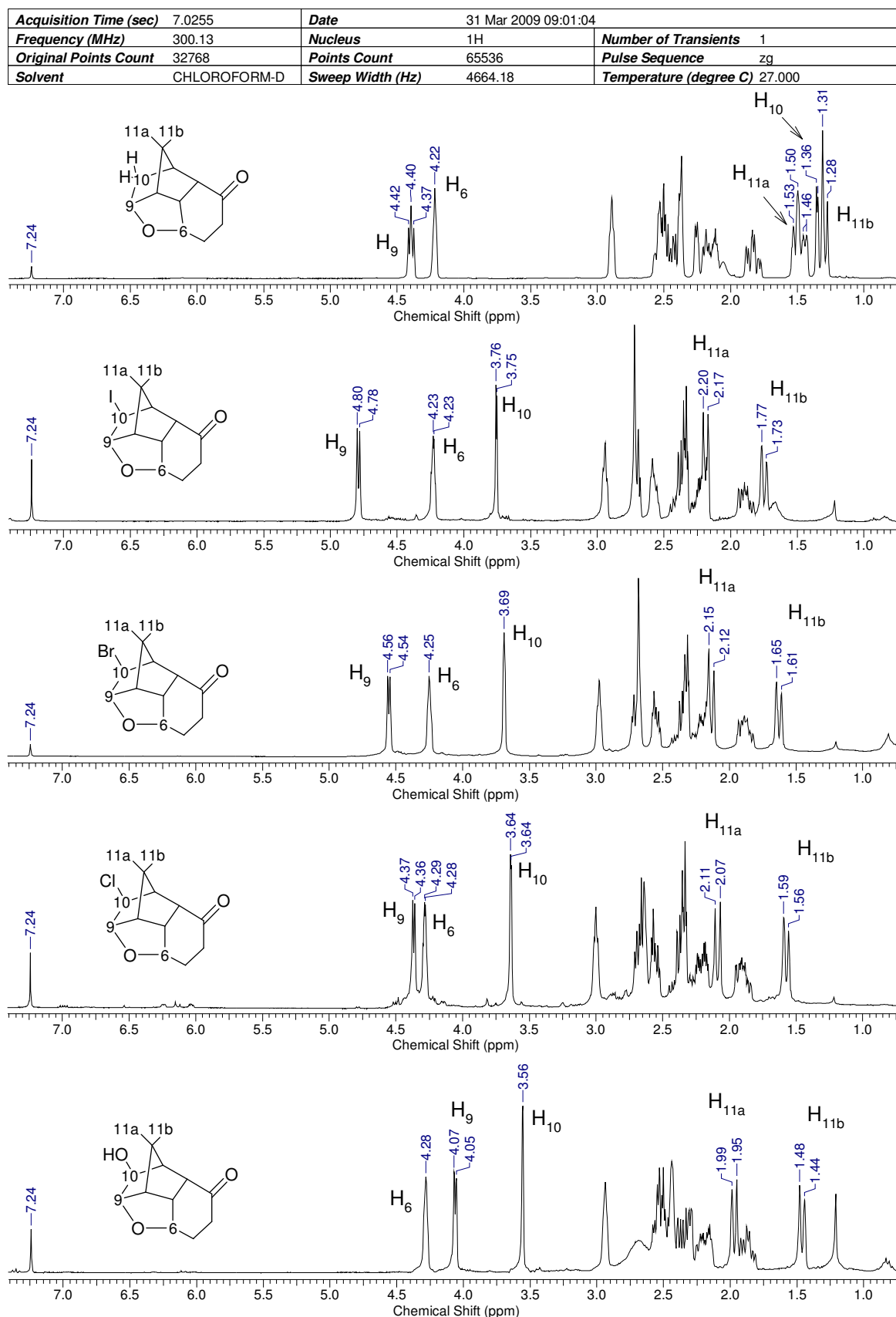


Figura 14: Espectros de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) destacando-se os deslocamentos químicos dos hidrogênios H₆, H₉, H₁₀ e H₁₁ dos compostos **14**, **15**, **20**, **21** e **23**.

Resultados e discussão

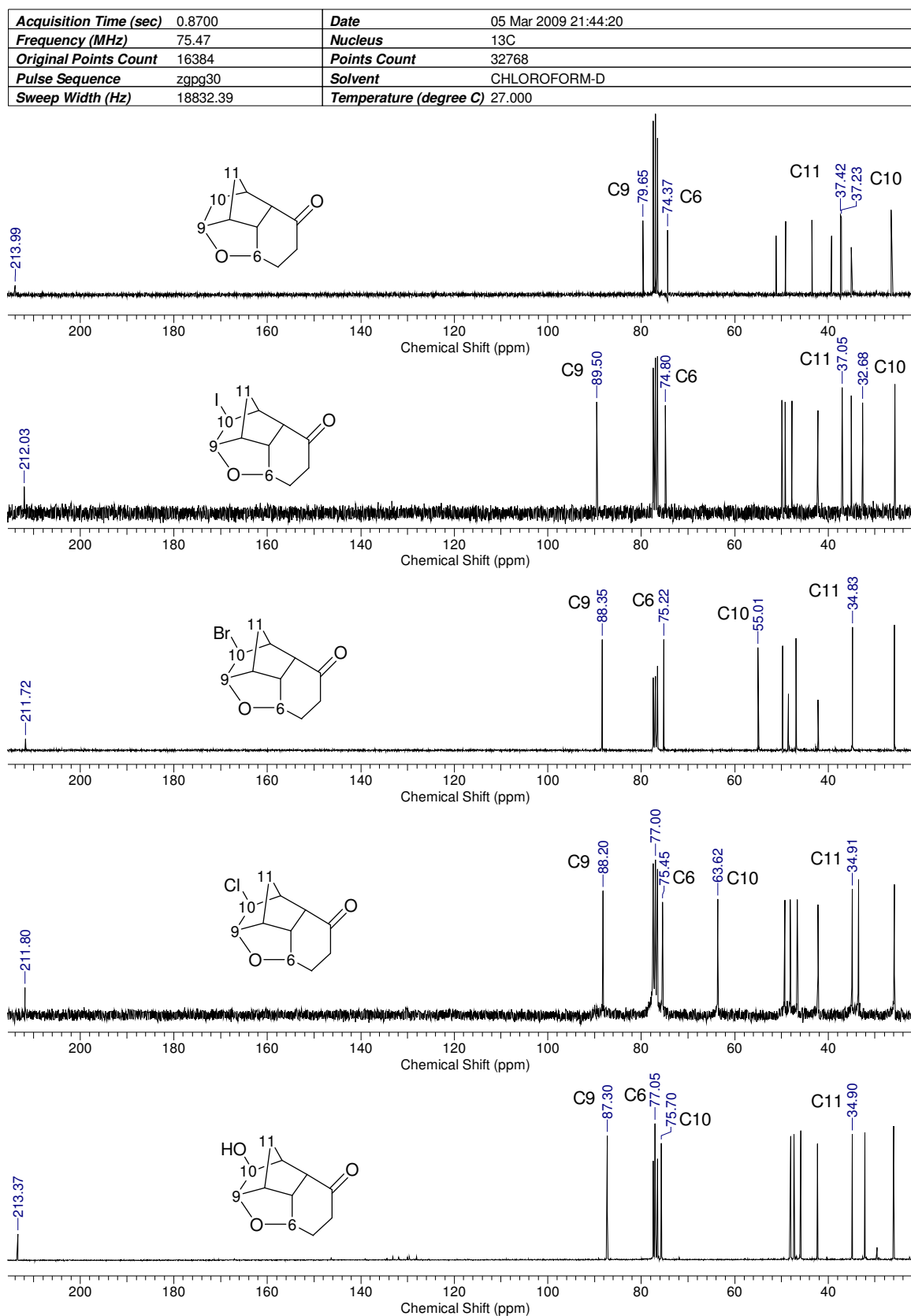
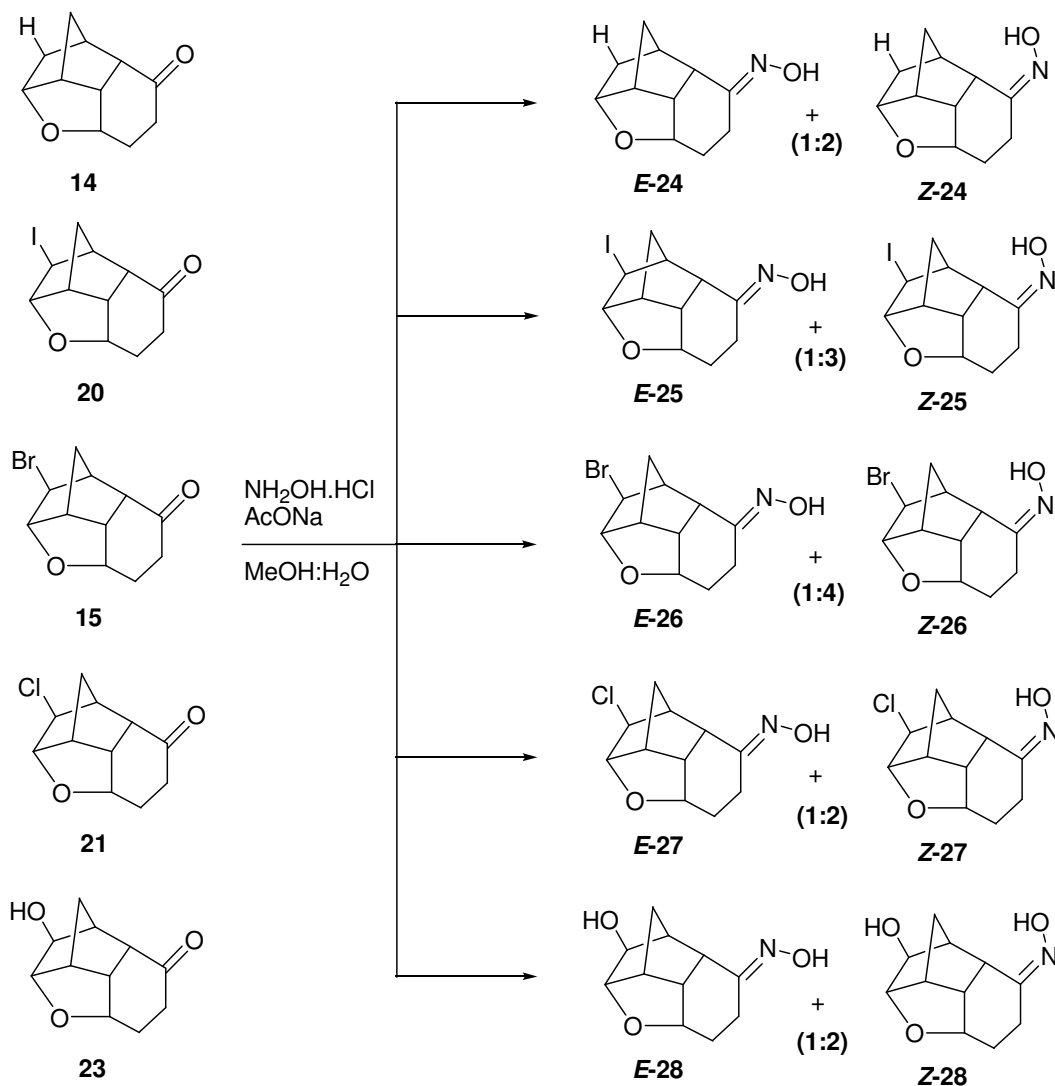


Figura 15: Espectros de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) destacando-se os deslocamentos químicos dos carbonos C6, C9, C10 e C11 dos compostos **14**, **15**, **20**, **21** e **23**.

Resultados e discussão

Dando sequencia às reações de transformações químicas propostas, as oximas **24**, **25**, **26**, **27** e **28** foram preparadas a partir das cetonas **14**, **15**, **20**, **21** e **23**, respectivamente, quando tratadas com cloridrato de hidroxilamina e acetato de sódio. Os rendimentos das oximas foram excelentes (90-97%), com produção de isômeros *E* e *Z*, em proporções diferentes, conforme podemos observar no Esquema 8.

Esquema 8



Através dos espectros de RMN de ^{13}C e comparação com dados da literatura de uma oxima foi possível identificar os isômeros *E* e *Z*. Em geral, os carbonos vicinais ao sistema $\text{C}=\text{N}-\text{OH}$ que estão em *cis* com a hidroxila da oxima encontram-se blindados, enquanto que os carbonos que estão em *trans* são menos protegidos, como podemos observar no exemplo da Figura 16 [SILVERSTEIN, 2002.; BREITMEIER, 2002].

Resultados e discussão

Pela integração relativa dos hidrogênios nos espectros de RMN de ^1H de cada composto, determinamos a proporção dos estereoisômeros E/Z, apresentados na Tabela 3 e Esquema 8.

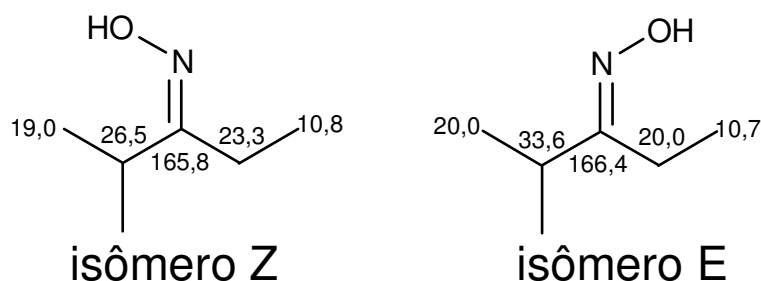


Figura 16: Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C de uma oxima registrada na literatura [BREITMEIER, 2002].

Tabela 3: Deslocamento químico dos carbonos dos derivados policiclos das oximas.

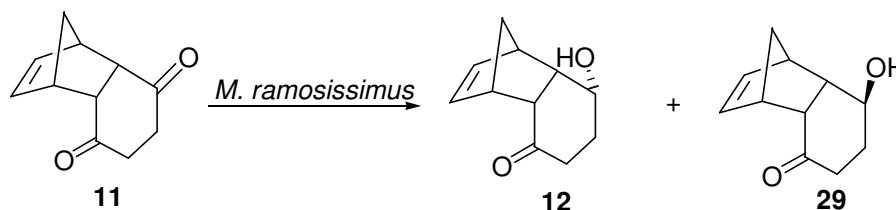
		 isômero Z		 isômero E	
X		C3	C4	C3	C4
H	δ_{C}	160,3	24,2	160,7	17,5
	Proporção*	2		1	
I	δ_{C}	158,5	24,1	159,1	17,6
	Proporção*	3		1	
Br	δ_{C}	158,2	24,1	158,8	17,5
	Proporção*	4		1	
OH	δ_{C}	158,7	23,8	159,3	17,4
	Proporção*	2		1	
Cl	δ_{C}	158,1	23,9	158,7	17,6
	Proporção*	2		1	

*Calculada pela integração relativa dos H nos espectros de RMN.

3.2. Biotransformação

Em trabalho anterior [ITO, 2007], o composto **11** foi submetido à biotransformação com o fungo *M. ramosissimus* e produziu uma mistura dos álcoois **12** e **29** (Esquema 9).

Esquema 9



Os estereoisômeros **12** e **29** não puderam ser separados por cromatografia de coluna do tipo “flash”. No entanto, foi possível identificar os sinais nos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C para cada composto e compará-los com dados publicados na literatura [MARCHAND *et al.*, 1995]. A razão isomérica foi determinada pela integração relativa dos sinais no espectro de RMN de ¹H. A mistura dos álcoois **12** e **29** apresentou atividade óptica ($[\alpha]_D^{20} = -31.04$, c 0.06, MeOH), indicando uma biotransformação enantiosseletiva.

A configuração absoluta do composto **12** (como apresentado nos Esquemas 9 e 10) foi determinada por correlação com resultados apresentados por Marchand e colaboradores (1995). Dessa forma, restavam-nos apenas determinar os excessos enantioméricos (*ee*) de cada álcool e a configuração absoluta do composto **29** (enantiômero em excesso). Com o objetivo de obter, portanto, os *ee*, foi efetuado um estudo, com o racemato de **12**, usando-se cromatografia gasosa em coluna quirai. No entanto, todas as tentativas foram infrutíferas, pois não houve separação dos picos relativos aos enantiômeros do álcool em estudo.

Diante das dificuldades encontradas, resolvemos transformar quimicamente **12** e **29** para obter derivados que pudessem ser analisados por cromatografia em fase quirai e, assim, se determinar indiretamente os excessos enantioméricos de ambos ou de um deles.

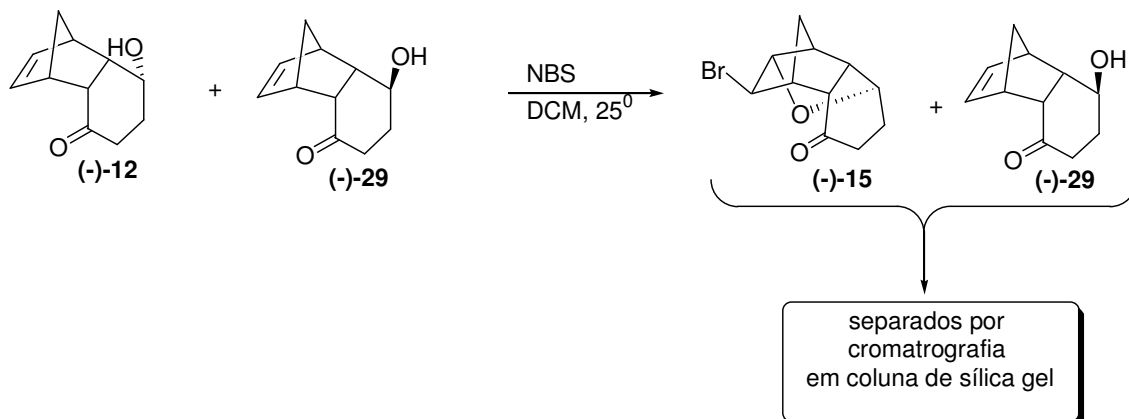
Com isso em mente e aproveitando-se da diferença de reatividade dos dois álcoois epiméricos, devido à stereoquímica do grupo hidroxila em **12** estar na face *alpha* do ciclo e em **29** na face *beta*, transformamos seletivamente o álcool **12** no bromo-éter **15**, usando-se NBS em diclorometano. Os compostos **15** e **29** puderam ser facilmente separados um do outro por cromatografia de coluna de sílica gel e totalmente caracterizados por

Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

Resultados e discussão

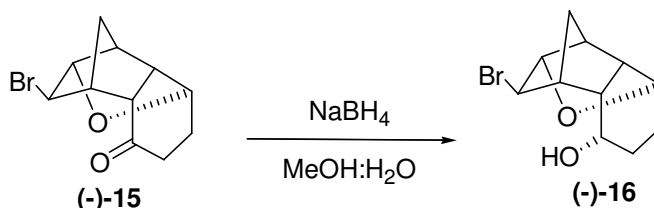
espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C e por comparação com dados da literatura (ITO *et al.* 2007).

Esquema 10



A bromo-cetona **15** (óleo e $[\alpha]_D = -101,7^\circ$) foi reduzida com NaBH_4 obtendo-se o álcool correspondente **16**, um sólido cristalino com rotação específica ($[\alpha]_D$ de $-73,2^\circ$) (Esquema 11).

Esquema 11



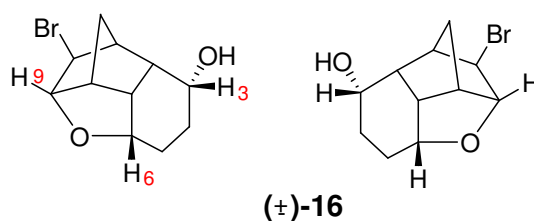
Com as transformações acima, tínhamos em mãos dois derivados de **12** e estes foram analisados, com intuito de obtermos indiretamente o *ee* do composto biotransformado **12**, por cromatografia gasosa de fase quiral. Para nossa surpresa, novamente não foi possível separar os compostos **15** e **16** (racematos), em seus respectivos enantiômeros.

Um método alternativo à cromatografia gasosa em coluna quiral, para determinação de excesso enantiomérico é o uso de RMN de ^1H utilizando-se reagente de deslocamento químico quiral [COSTA & MARTINS, 2006], tal como tris[3-(heptafluoropropilhidroximetileno)-(+)-canforato de Európio] III ou [(+)-Eu(hfc)]₃.

Para o estudo de RMN de hidrogênio com reagente de deslocamento químico quiral, foi escolhido o composto (-)-16. Para comparação, inicialmente foi realizado o experimento de RMN de ^1H com o composto racêmico ($\pm$)-16 com e sem reagente químico

Resultados e discussão

quiral, como mostrado na Figura 17. Para cada 1 mM do composto foi adicionado 0,1 mM do reagente químico quiral [(+)-Eu(hfc)₃].



Acquisition Time (sec)	7.0255	Date	13 Oct 2009 14:58:10		
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4664.18	Temperature (degree C)	27.000

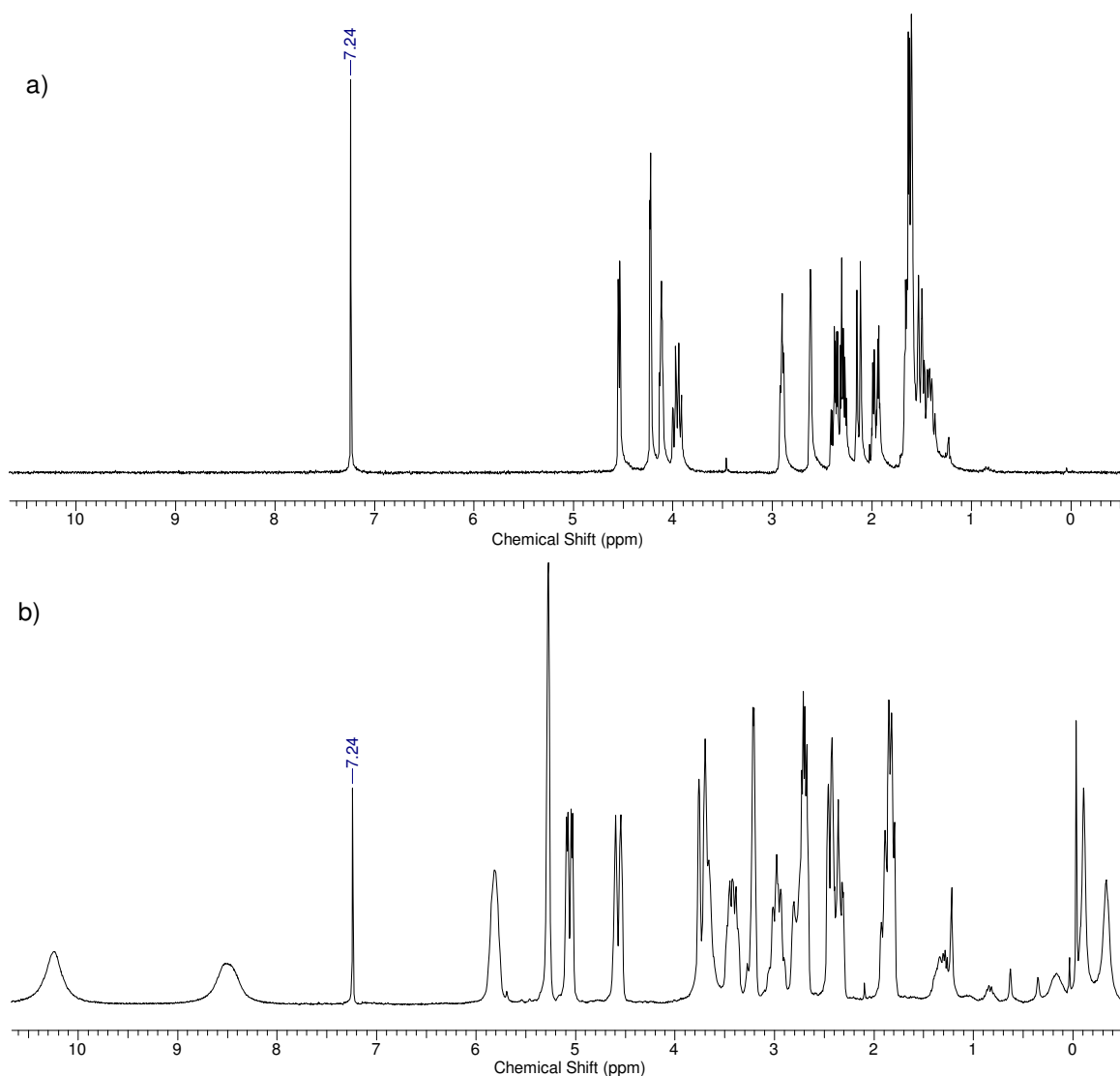


Figura 17: Espectro de RMN de ¹H do bromo álcool racêmico (±)-**16**. a) sem [(+)-Eu(hfc)₃]. b) com adição de [(+)-Eu(hfc)₃].

Resultados e discussão

Como podemos observar nos espectros de RMN de ^1H de ($\pm$)-**16** (Figura 17) com e sem acréscimo de reagente de deslocamento, notamos o desdobramento dos sinais de cada enantiômero presente na amostra, quando é acrescido o reagente [(+)-Eu(hfc)]₃.

Em seguida, foi realizado o experimento de RMN de ^1H com o composto enantiomericamente enriquecido (-)-**16**, derivado do álcool (-)-**12**, nas mesmas condições citadas anteriormente.

Podemos verificar claramente no espectro de RMN de ^1H da mistura racêmica de ($\pm$)-**16** (Figura 18A), que muitos dos sinais estão duplicados. Na região de aproximadamente δ 4,5 e 5,0 ppm, por exemplo, encontramos os sinais duplicados para H9 e H6, respectivamente, enquanto que no espectro do produto (-)-**16** (Figura 18B), observa-se apenas 1 sinal para os respectivos deslocamentos químicos desses mesmos hidrogênios. Desta maneira, com a integração desses sinais, podemos afirmar que o *ee* de (-)-**16** é > 99,9% e, conseqüentemente, o álcool **12** é obtido enantiomericamente puro (*ee* > 99,9%) por biotransformação de **11**.

Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	7.0255	Date	13 Oct 2009 14:58:10
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H
Original Points Count	32768	Points Count	65536
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4664.18
		Number of Transients	8
		Pulse Sequence	zg
		Temperature (degree C)	27.000

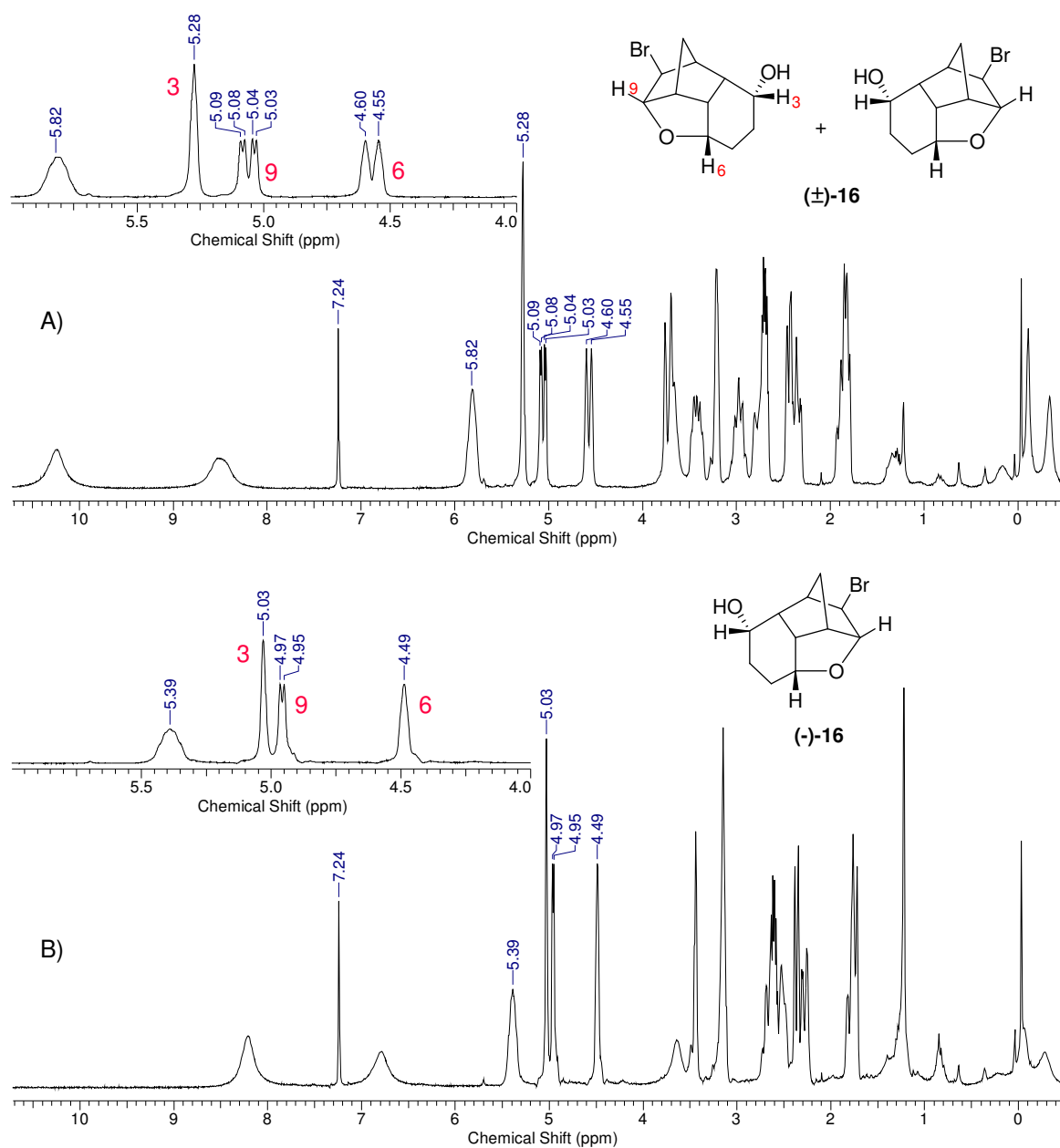
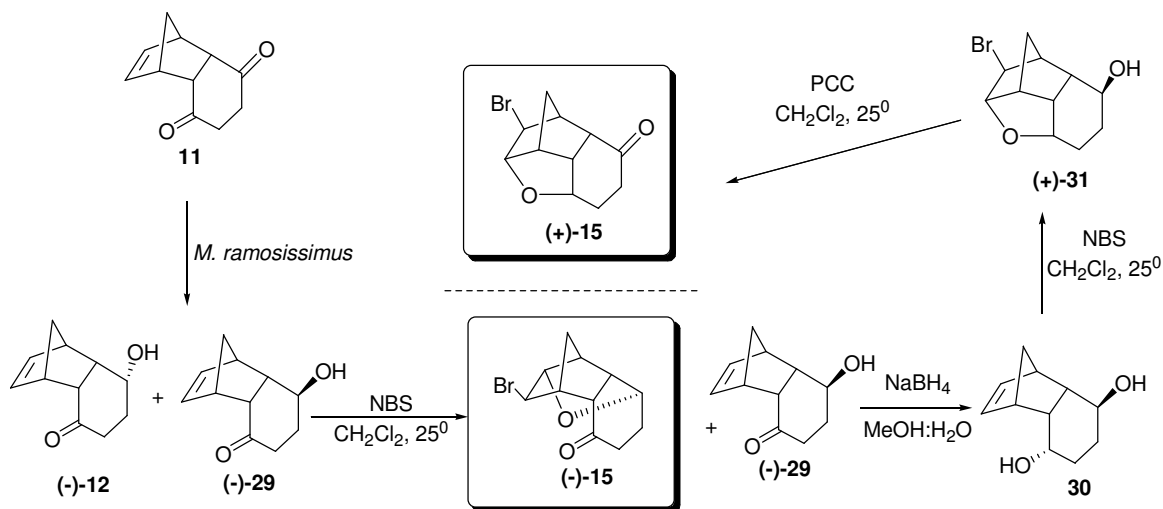


Figura 18: Espectros de RMN de ¹H do composto 30. Em A) bromo-álcool racêmico e em B) bromo-álcool obtido das reações subsequentes a partir dos ensaios de biotransformação.

Resultados e discussão

Para determinar a configuração absoluta do isômero (-)-**29**, decidimos transformá-lo na bromo-cetona **15** (com configuração absoluta já conhecida), através da sequência de reações mostradas no Esquema 12. Assumindo que (-)-**29** possuía a estrutura como desenhada no Esquema 12, ou seja, um epímero de (-)-**12**, o resultado final deveria ser inevitavelmente a bromo-cetona **15** dextrogiro (+). Caso contrário, (-)-**29** teria de ser o outro enantiômero (de configuração contrária).

Esquema 12



A sequência de reações escolhidas, apresentadas no Esquema 12, foi executada. Após purificação das misturas dos produtos diastereoisoméricos **12** e **29** da biotransformação (Esquema 10), foi realizada uma reação de redução do ceto-álcool **29** com NaBH_4 em metanol:água para obtenção do diol **30**. O diol **30** foi identificado por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C (Tabela 17, Espectro 48 e 49).

O diol **30** foi então submetido novamente a reação com NBS em diclorometano, obtendo como produto o bromo-álcool **31**, o qual foi caracterizado por espectroscopia de RMN 1D e 2D (Tabela 18, Espectro 50-58) e teve seu desvio óptico medido como sendo dextrogiro (+).

Em seguida, (+)-**31** foi oxidado com PCC (clorocromato de piridínio) obtendo-se o a bromo-cetona (+)-**15**, como esperado. Desta maneira, determinamos, por correlação, que a configuração absoluta do composto (-)-**29** é aquela como está desenhada no Esquema 12, tendo como nome sistemático da IUPAC [(1*R*,4*S*,4*aR*,8*S*,8*aS*)-8-hidroxi-4,4*a*,6,7,8,8*a*-

Resultados e discussão

hexaidro-1,4-metanonaftalen-5(1*H*)-ona)], um epímero do álcool principal (-)-**12**, obtidos no experimento de biotransformação da dicetona **11**, por *M. ramosissimus*.

Para observar a conversão da dicetona **11** nos diastereoisômeros (-)-**12** e (-)-**29**, foi realizado o ensaio de biotransformação com duração de 30 dias. Diariamente foram retiradas alíquotas de 200 µL para análise qualitativa em cromatógrafo gasoso. A Figura 19 mostra cromatogramas da dicetona **11** pura e da mistura dos álcoois **12** e **29**, bem como da mistura reagente. Ao decorrer dos dias nota-se o consumo do material de partida (dicetona **11**) e a conversão para os diastereoisômeros (-)-**12** e (-)-**29**. Na primeira semana observa-se a biorredução em maior parte para o isômero (-)-**12**. Ao passar dos dias nota-se o aparecimento do outro estereoisômero (-)-**29**. A partir do 15º dia observamos no gráfico da Figura 20, que a concentração dos 3 compostos, na mistura reagente, não tem mudanças significativas. Como sabemos que o fungo *M. ramosissimus* é capaz de re-oxidar o álcool **12** para a dicetona **11** [ITO *et al.*, 2009], podemos especular que a partir do 15º dia a reação de biotransformação atinge o equilíbrio químico e, portanto, nesse ponto o fungo está promovendo concomitantemente reações de biorredução e de bio-oxidação (Esquema 13).

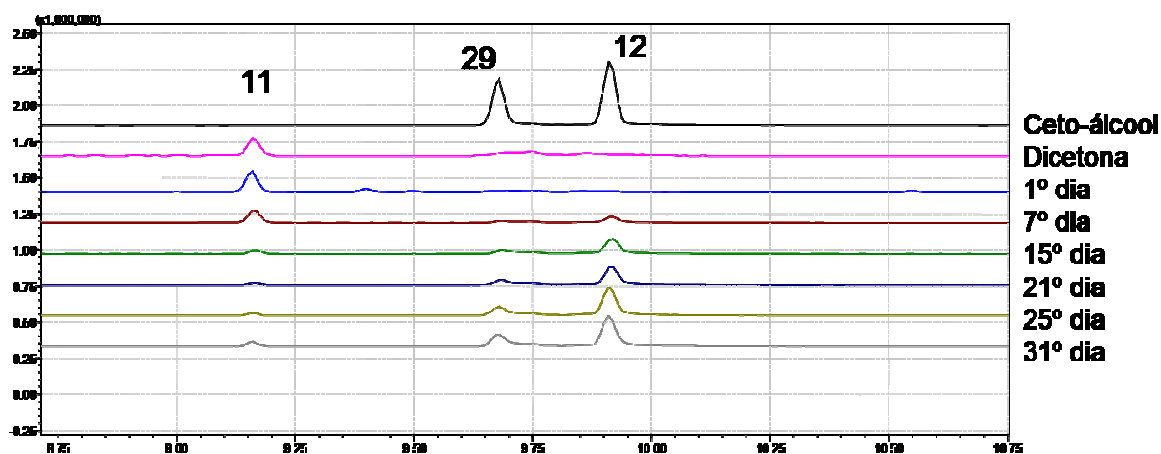


Figura 19: Cromatograma do monitoramento diário do ensaio de biotransformação para análise da conversão do ceto-álcool. Em preto, ceto-álcoois **12** e **29** e em rosa, padrão de dicetona **11**.

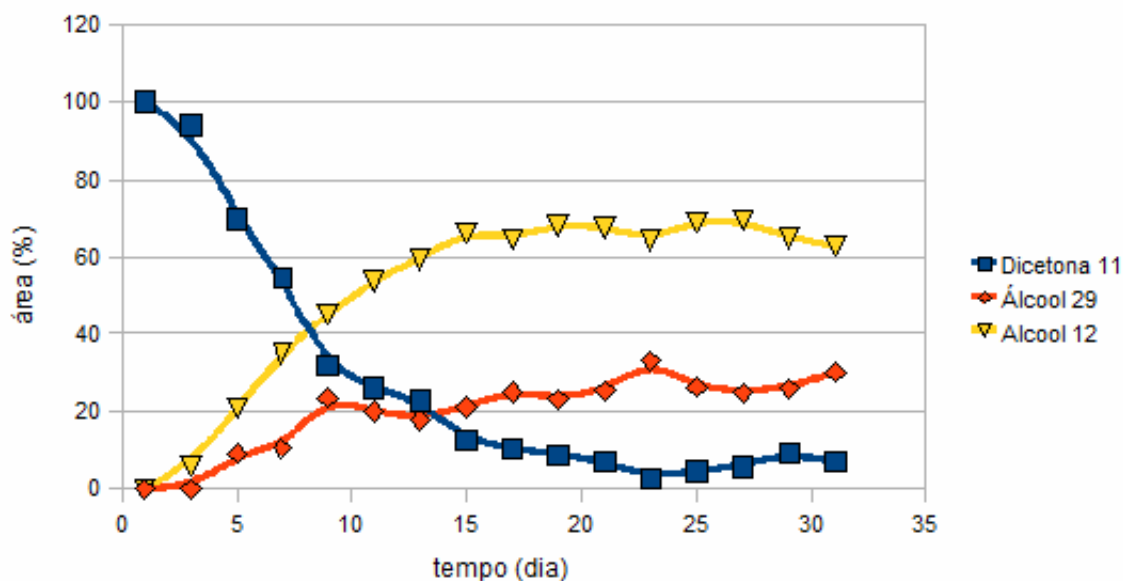
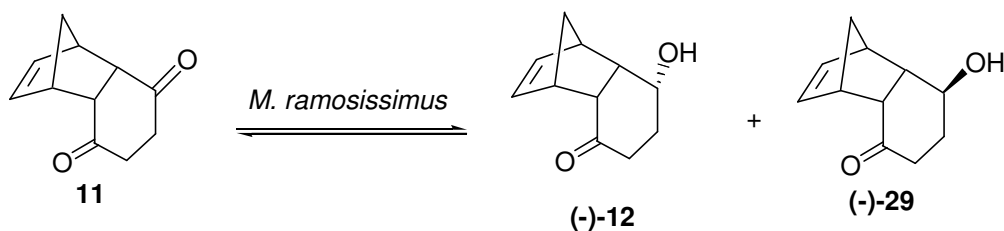


Figura 20: Acompanhamento por CG da conversão da dicetona **11** para os diastereoisômeros (-)-**12** e (-)-**29** em função do tempo. Em azul: dicetona **11**; em amarelo, o álcool **12** e em vermelho, o álcool **29**.

Esquema 13



3.3. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

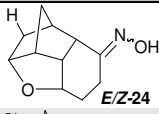
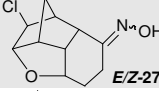
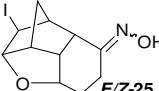
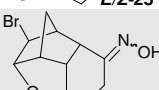
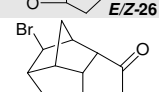
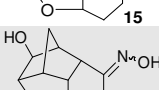
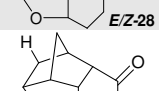
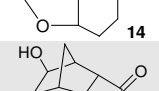
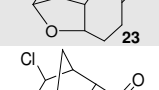
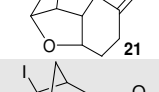
O teste de atividade citotóxica foi efetuado no Laboratório de Oncologia Experimental da Unidade de Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará, supervisionada pela Professora. Dar. Cláudia do Ó Pessoa.

A atividade citotóxica das amostras está apresentada na Tabela 4, com seus respectivos percentuais de inibição. Apenas as substâncias que apresentaram valores de inibição ≥ 90 % em pelo menos duas linhagens tumorais (elevado potencial citotóxico) são escolhidas para avaliações subsequentes. Este valor é considerado como *cut-off* ou parâmetro para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral. Dentre as

Resultados e discussão

amostras estudadas, os valores de inibição variaram de 0,02 % a 37,95%, sendo que nenhuma delas mostrou valores de inibição ≥ 90 %. Desta forma, as amostras testadas não indicaram potencialidade citotóxica frente às linhagens testadas.

Tabela 4: Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais. Valores são médias $\pm$ DPM.

Amostra Nº Identificação	HL-60 IC% (média)	SD	MDA-MB435 IC% (média)	SD	SF-295 IC% (média)	SD
 E/Z-24	0,02%	0,42%	31,71%	6,43%	37,95%	0,24%
 E/Z-27	0,94%	0,76%	27,59%	5,18%	35,39%	7,63%
 E/Z-25	1,67%	0,36%	23,42%	8,18%	11,91%	4,96%
 E/Z-26	3,82%	7,02%	18,37%	2,29%	4,73%	2,05%
 15	6,73%	2,23%	22,59%	3,95%	12,97%	1,57%
 E/Z-28	1,22%	0,08%	31,66%	6,24%	25,65%	4,72%
 14	19,65%	1,81%	33,13%	5,55%	30,83%	4,80%
 23	14,38%	5,46%	34,75%	1,32%	31,00%	0,94%
 21	7,60%	7,24%	27,39%	0,90%	19,09%	0,79%
 20	1,38%	2,45%	30,43%	2,98%	33,39%	1,65%

3.4. Ensaios com a enzima tirosinase

Os experimentos com a enzima tirosinase foram realizados no Laboratório de Pesquisa 2 da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, sob supervisão da Professora Dra. Neli Kika Honda.

Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

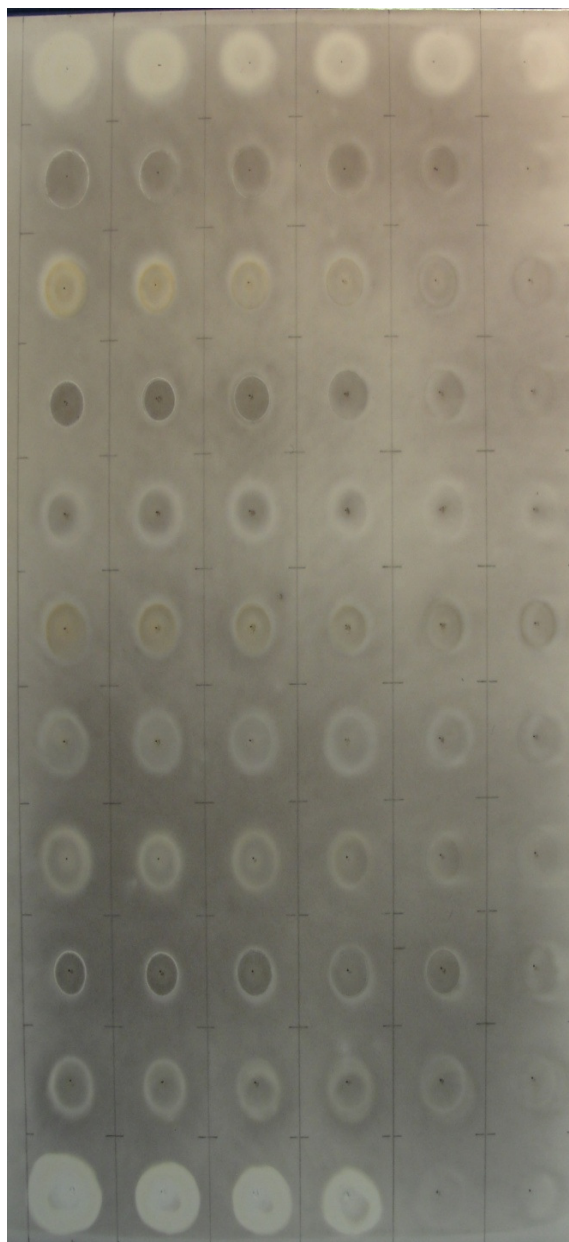
Resultados e discussão

A Figura 21 sumariza os resultados da atividade das substâncias testadas (**14**, **15**, **20**, **21**, **23**, **24**, **25**, **26**, **27** e **28**) sobre a enzima tirosinase. Os ensaios foram realizados pela técnica de bioautografia em cromatofolha de sílica gel e a atividade é indicada pelo aparecimento de manchas claras, nos pontos de aplicação das soluções das substâncias, sobre fundo escuro. O desenvolvimento da cor escura deve-se à formação de dopacromo a partir do substrato *L*-Dopa.

Esta conversão pode ser observada na placa pelo escurecimento das regiões onde a enzima realiza a catálise. No local onde foi aplicada a solução da substância que inibe esta conversão, há um clareamento como mostrado com o ácido ascórbico qual tem com comprovada atividade anti-tirosinase, isto é, inibe a tirosinase por se ligar ao sítio ativo enzimático formando quelato, impedindo tanto a ação mono e como difenolase. Além disso, os compostos com atividade anti-tirosinase comprovada, por exemplo, o ácido kojico, inibe a produção de pigmentos pela redução dos intermediários da biossíntese da melanina. Assim, com o composto **23**, como mostrado na Figura 21, ocorreu o clareamento no local onde foi aplicado, tendo resultado comparável ao ácido ascórbico.

As oximas (**24**, **25**, **26**, **27** e **28**) e os compostos halogenados (**15**, **20** e **21**) apresentaram além de um halo de inibição, um halo de escurecimento interior ao halo de inibição, podendo ser indício de ativação enzimática ou por outros fatores, sendo necessários estudos mais detalhados.

Resultados e discussão



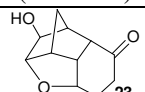
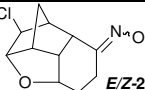
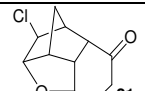
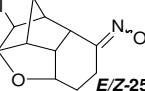
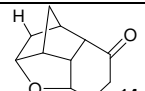
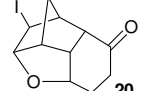
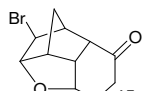
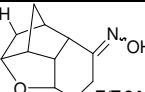
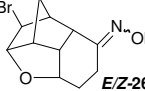
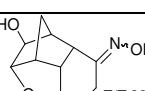
Amostra (racemato)	Quantidade (µg)					
 23	300	200	100	75	50	25
 E/Z-27	300	200	100	75	50	25
 21	600	450	300	200	100	50
 E/Z-25	300	200	100	75	50	25
 14	300	200	100	75	50	25
 20	600	450	300	200	100	50
 15	600	450	300	200	100	50
 E/Z-24	600	450	300	200	100	50
 E/Z-26	600	450	300	200	100	50
 E/Z-28	600	450	300	200	100	50
Ácido ascórbico	100	75	50	25	S ₁	S ₂

Figura 21: Placa de bioautografia do ensaio com a enzima tirosinase. S₁: acetato de etila e S₂: Mistura (1:1 v/v) de acetato de etila e metanol.

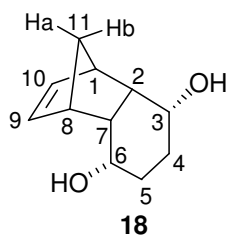
3.5. Seção de espectros

A numeração dos átomos de carbono e hidrogênio dos compostos não segue uma norma oficial, tendo como objetivo apenas facilitar a identificação dos átomos de carbono e hidrogênio dos espectros apresentados.

Devido à proximidade dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C para átomos de carbono numa mesma molécula, usamos simbolicamente asterisco para a incerteza na atribuição do deslocamento químico, ou seja, átomos com o mesmo número de asteriscos podem ter os deslocamentos químicos trocados.

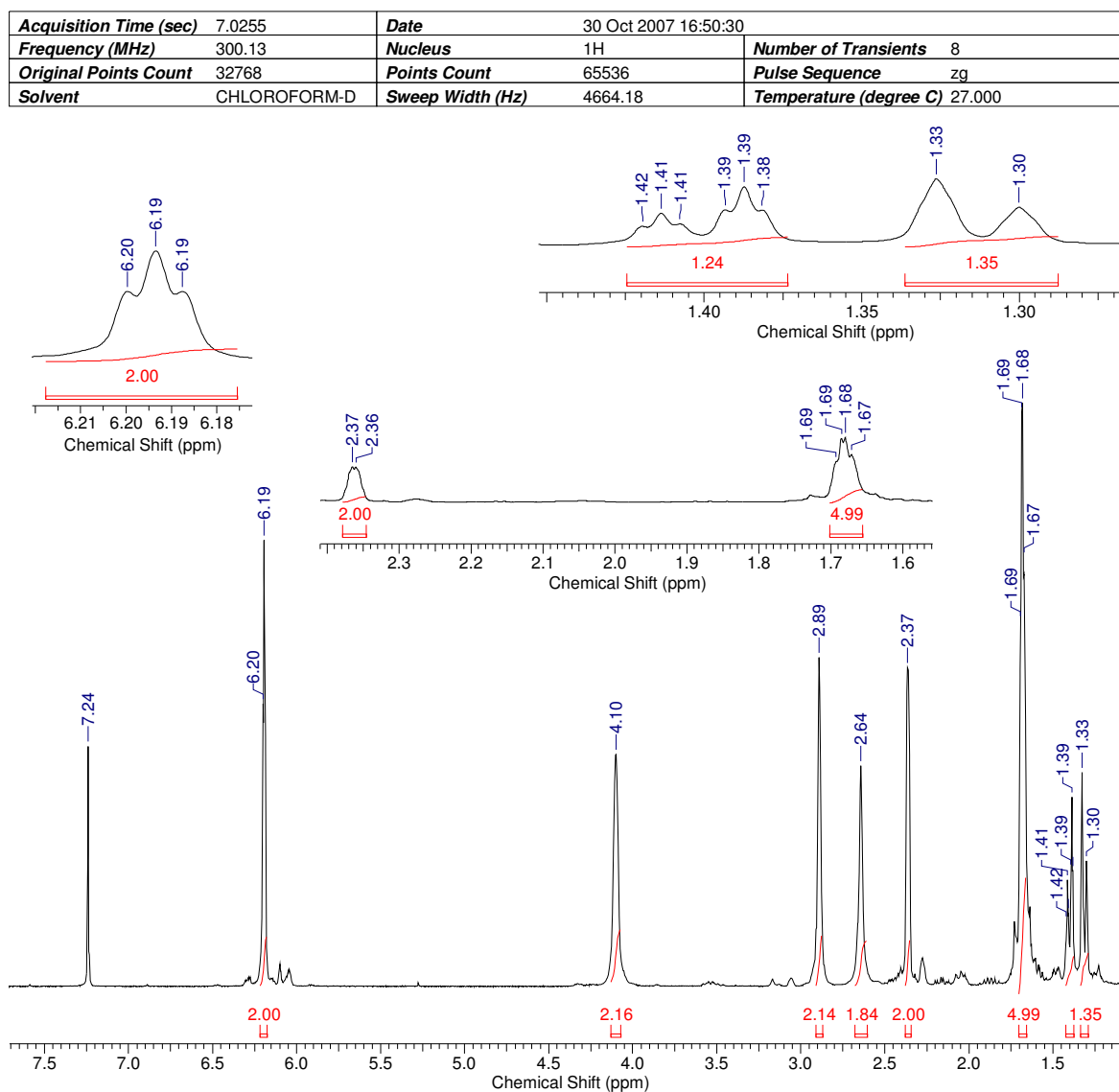
Para a atribuição dos sinais espectrais foram consultados artigos, revisões, tabelas e livros textos [SILVERSTEIN, 2005; BREITMEIER, 2002; PAVIA, 2001].

3.5.1. Triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-2,4,6,9-tetraene-3,6-diol (**18**)



A partir da reação de redução das carbonilas do composto (**11**) com o excesso de NaBH₄, obteve-se um sólido branco. A formação do diol **18** pode ser notada pela presença de plano simetria do composto a partir do simplificação dos sinais apresentados no espectro de RMN de ¹H (Espectro 1). Em δ 6,20 ppm observa-se sinal característico de olefina. O dubleto em δ 1,32 ppm e os duplos tripleto em δ 1,40 referem-se aos hidrogênios (H_{11a} e H_{11b}) da ponte. Os sinais em δ 2,38 ppm e δ 2,90 ppm são da junção entre os anéis (H₂/H₇) e da cabeça de ponte (H₁/H₈), respectivamente. Além disso, podemos observar o aparecimento do sinal característico de hidrogênio carbinólico (H₃/H₆) em δ 4,11 ppm e um singlete largo em δ 2,65 referente aos hidrogênios das hidroxilas.

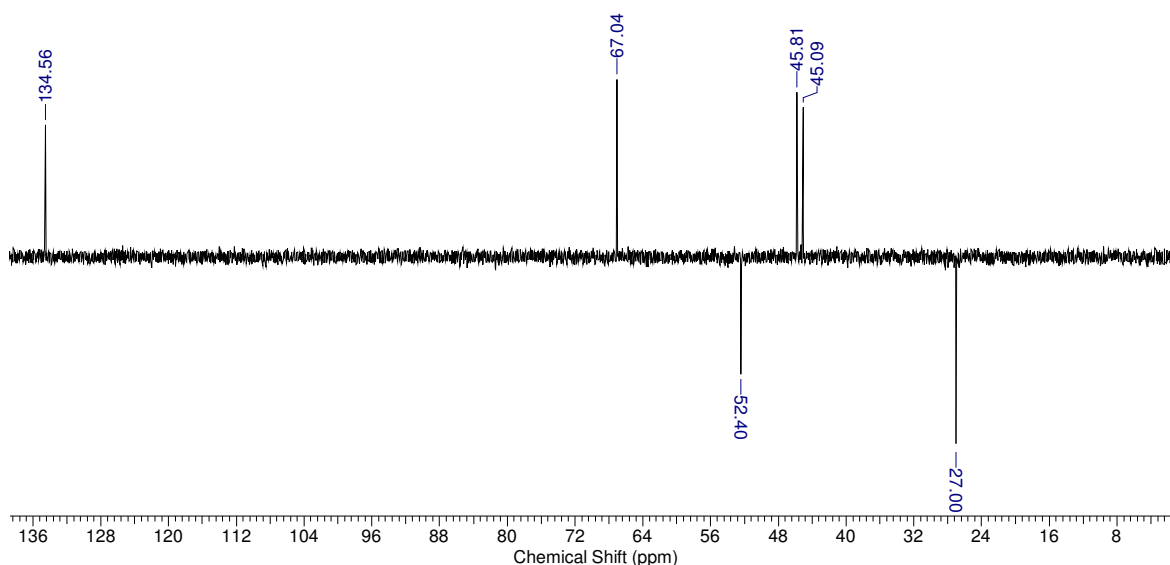
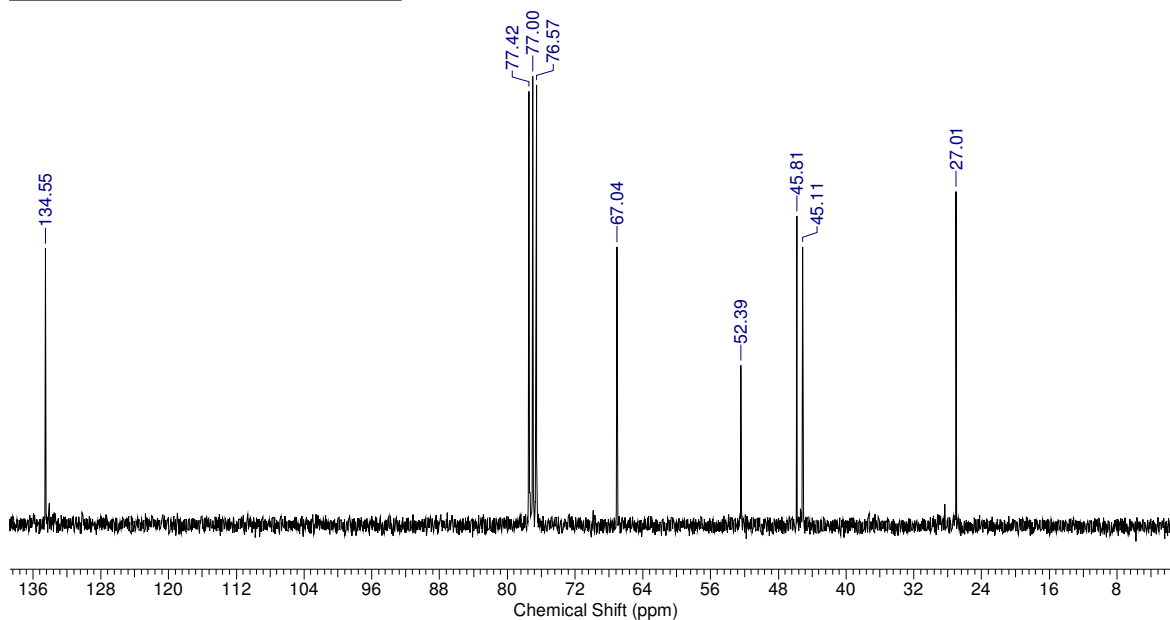
Resultados e discussão



Espectro 1: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **18**.

Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	04 May 2008 08:50:50
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	¹³ C
Number of Transients	1302	Original Points Count	16384
Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
Temperature (degree C)	27.000		

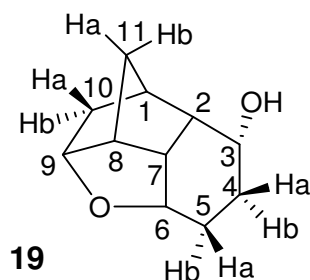


Espectro 2: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **18**. Espectro acima: Totalmente desacoplado. Espectro abaixo: DEPT 135° , $\uparrow$ (CH, CH_3); $\downarrow$ (CH_2).

Resultados e discussão

Tabela 5: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto **18**.

posição	δ (^1H) [<i>multiplicidade, J (Hz), integral relativa</i>]	δ (^{13}C)	DEPT
1/ 8	2,89 (<i>m</i> , 2H)	45,1	CH
2/ 7	2,37 (<i>m</i> , 2H)	45,8	CH
3/ 6	4,10 (<i>m</i> , 2H)	67,0	CH
4/ 5	1,65 – 1,72 (<i>m</i> , 4H)	27,0	CH ₂
9/ 10	6,20 (<i>t</i> , <i>J</i> =2,49, 1,80, 2H)	134,6	CH
11	a) 1,32 (<i>d</i> , <i>J</i> =7,9, 1H)	52,4	CH ₂
	b) 1,40 (<i>dd</i> , <i>J</i> =7,9; 1,7, 1H)		
-OH	2,64 (<i>sl</i> , 2H)	----	----

3.5.2. *rel*-decaidro-2,4-metanoindeno[7,1-*bc*]furan-5-ol (**19**)

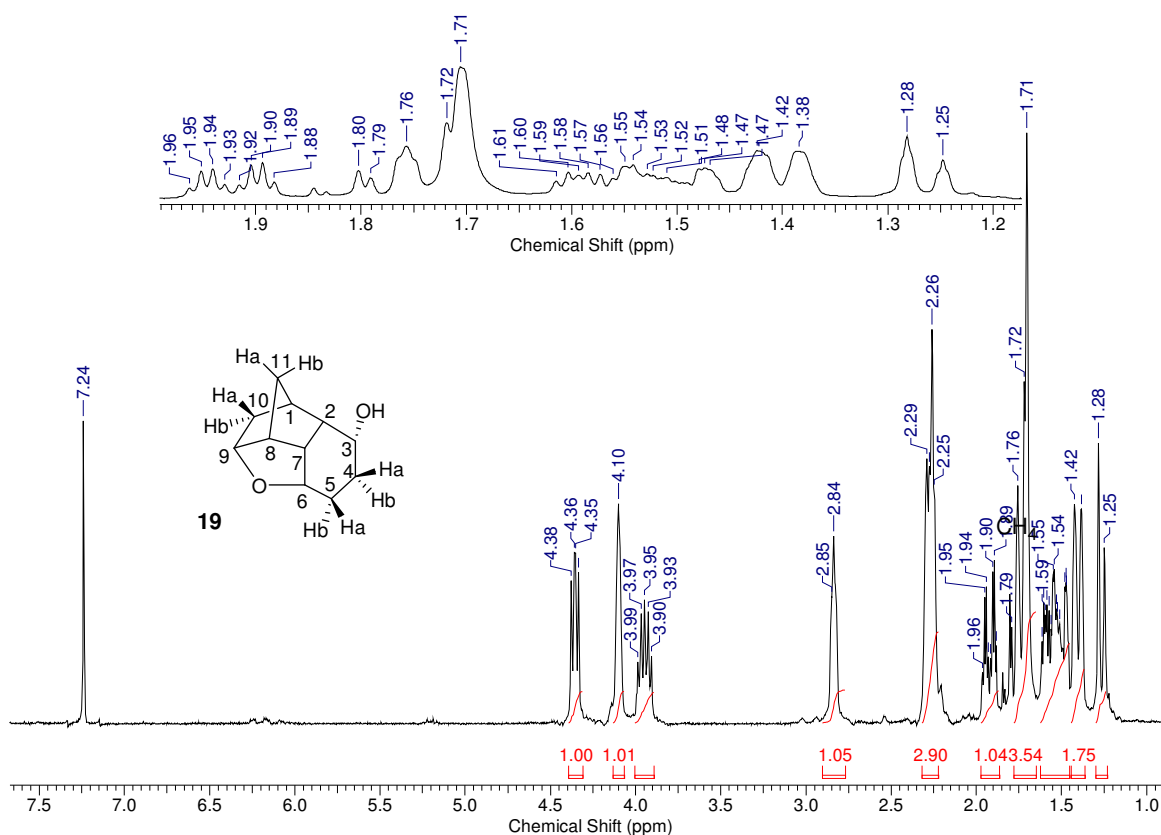
No espectro de RMN de ^1H desse composto, nota-se a presença de 3 sinais na região de δ 3,5-4,5 característicos a sinais de hidrogênios carbinólicos e ausência do sinal de olefina em δ 6,20, presente no material de partida. Em relação ao espectro do diol **18**, este novo composto apresenta desdobramento dos sinais na região de δ 1,0-2,0, relativos aos hidrogênios H4 e H5, uma vez que a molécula tornou-se assimétrica. Os hidrogênios da ponte apresentaram como dubletos ($J = 11,0$ Hz) em δ 1,26 e δ 1,39 ppm atribuídos a H11a e H11b, respectivamente.

A partir do espectro de RMN de ^{13}C , observam-se 11 sinais diferentes conferindo a assimetria do composto. Não foi observado sinal de carbonila e no DEPT 135, observou-se 4 sinais metilênicos e ausência de carbono quaternário.

Com o espectro de gHSQC foi identificado a correlação direta de hidrogênios e carbonos, mas ainda não caracterizando exatamente os C1/H1, C2/H2, C7/H7 que podem estar trocados e entre os C10/H10, C5/H5 e C4/H4. No espectro de gCOSY foi observado correlação entre os H9 com H10a, H8 com H1, H3 com H4 e H2, H6 com H5 e H7 mostrados na tabela 6 e espectros 9 e 10, e ainda acoplamento em W de H10b com H11b e H10a com H2, sendo possível de atribuir os deslocamentos destes sinais que não estavam assinalados de forma exata. No gHMBC foi indicado a correlação 2J e 3J e notou-se correlação a longa distância entre H4b com C1 (Espectro 8) mas de difícil visualização, pois o sinal do H10b sobrepõe com H4b, podendo ser correlação 2J entre H10b com C1.

Resultados e discussão

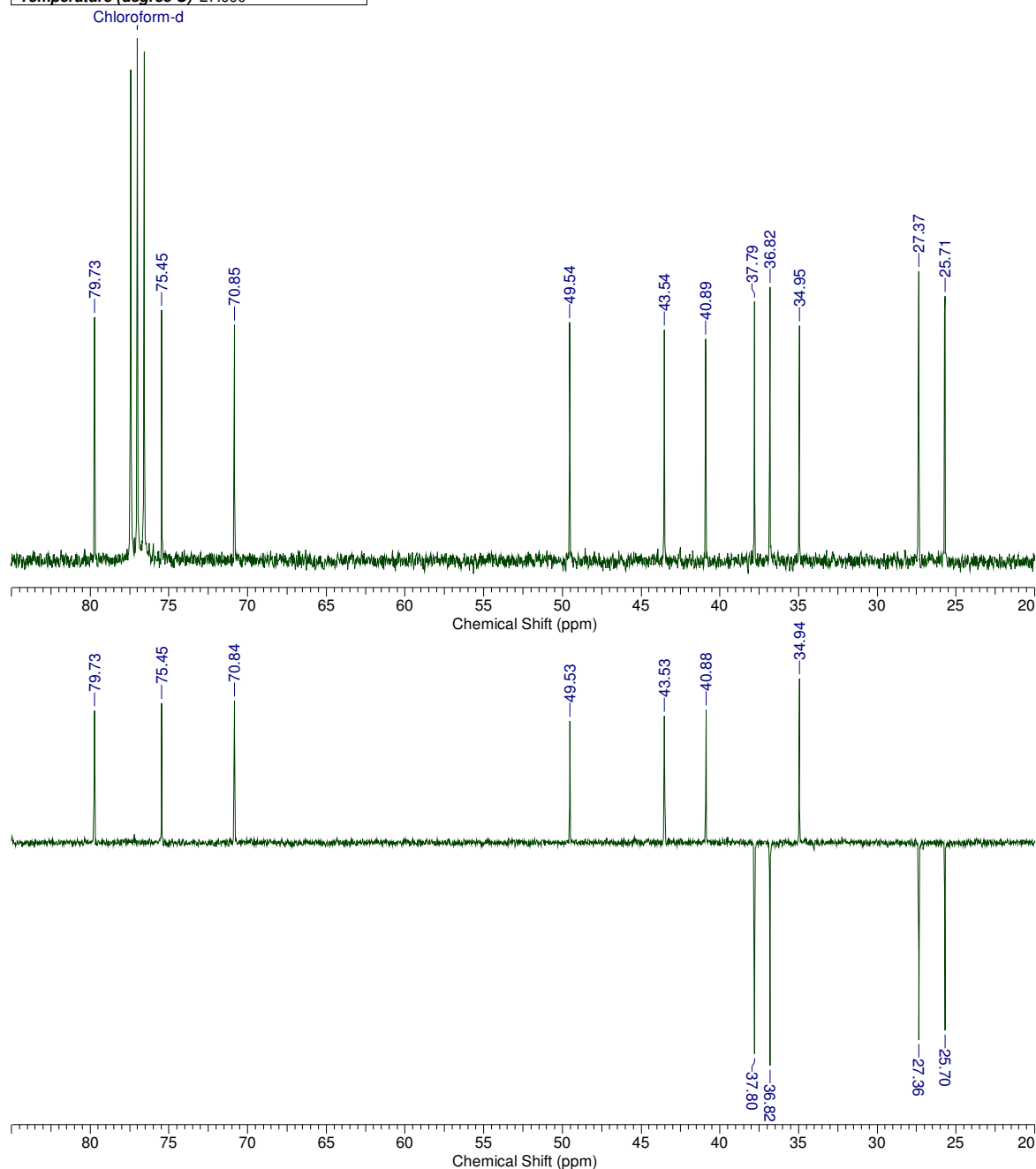
Acquisition Time (sec)	7.0255	Date	20 Nov 2007 11:26:56	300.13
Nucleus	¹ H	Number of Transients	1	Frequency (MHz)
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg	Original Points Count
Sweep Width (Hz)	4664.18	Temperature (degree C)	27.000	Solvent



Espectro 3: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **19**.

Resultados e discussão

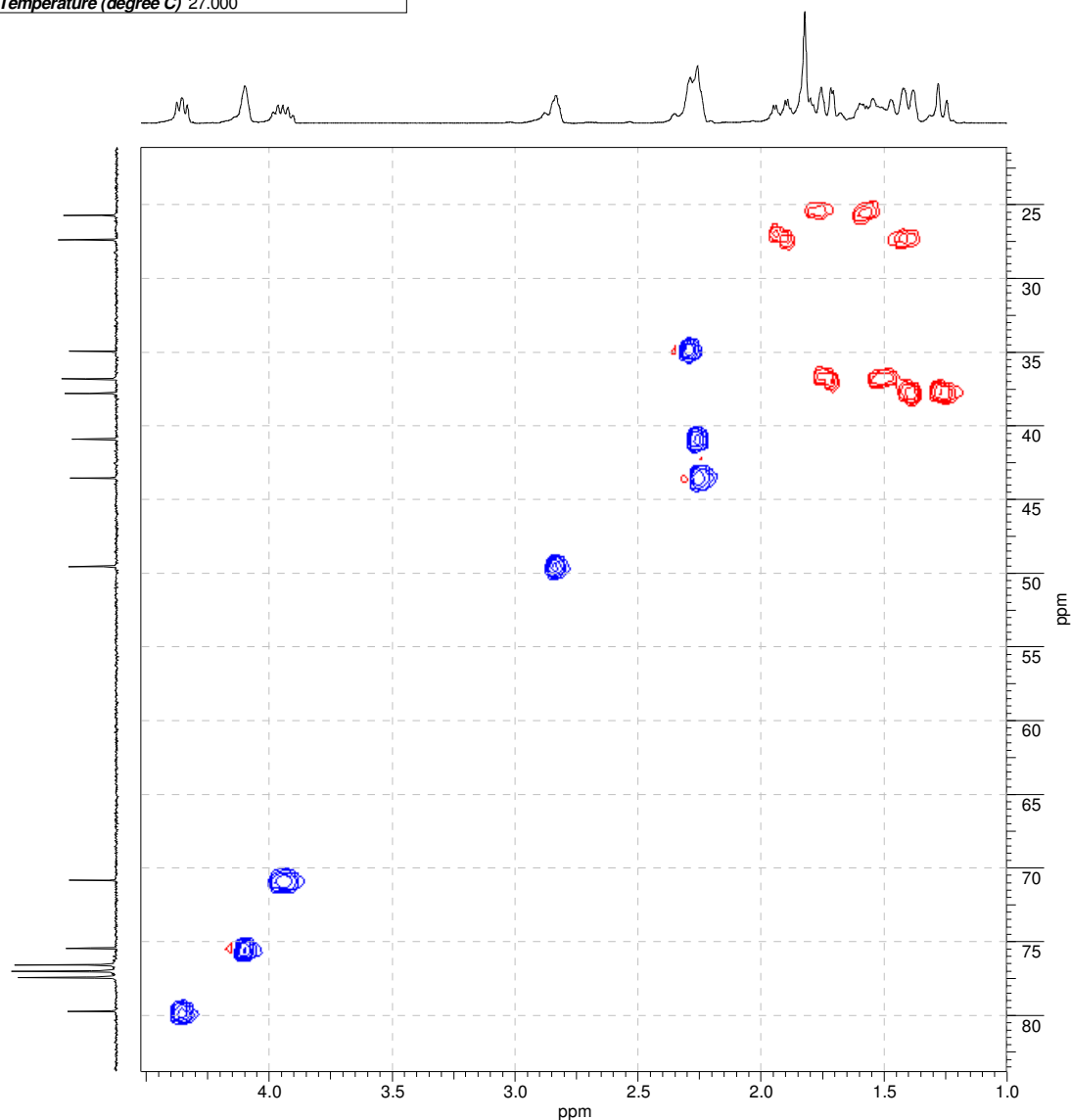
Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	20 Nov 2007 11:29:06
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	^{13}C
Number of Transients	1198	Original Points Count	16384
Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
Temperature (degree C)	27.000		



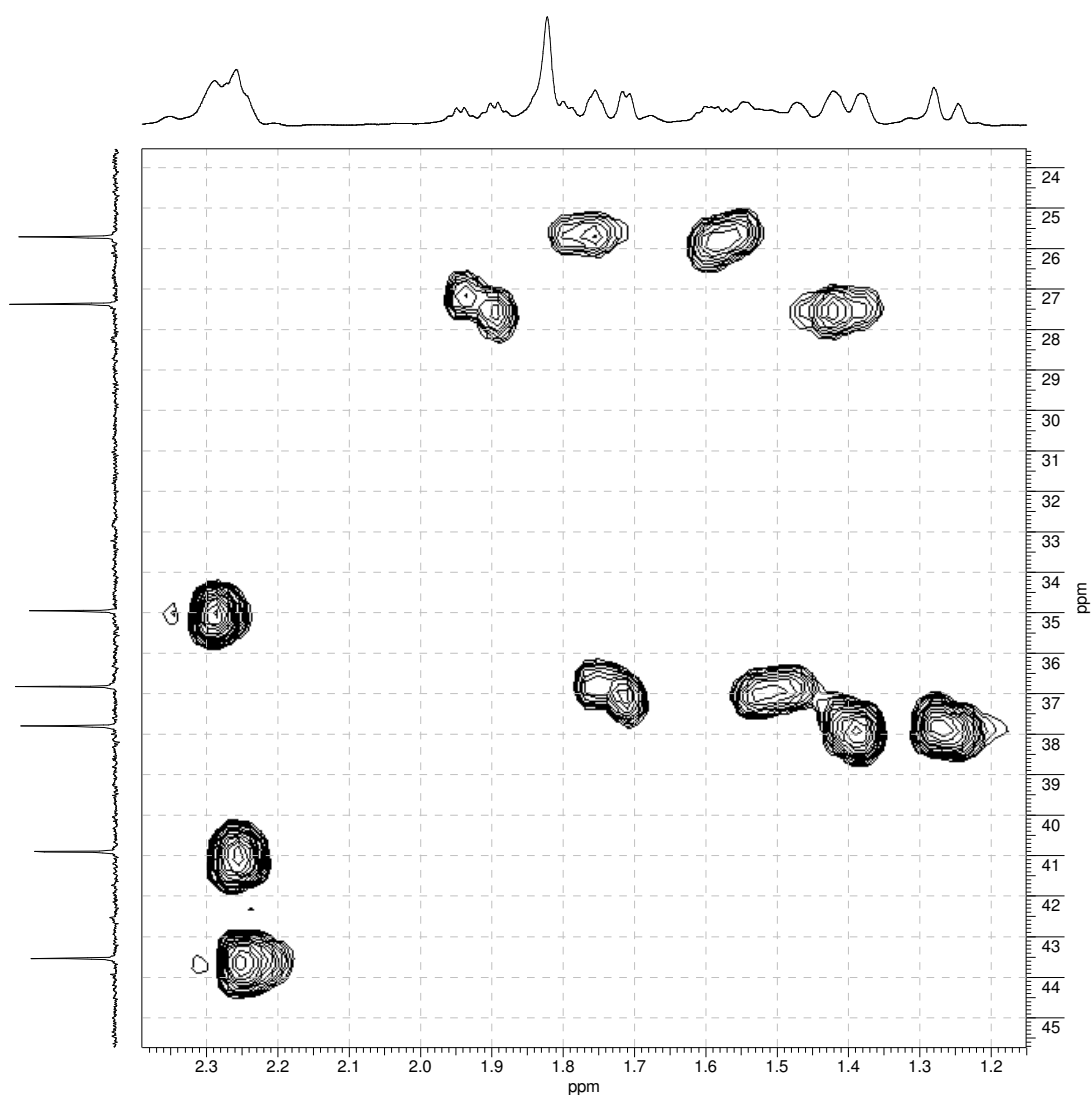
Espectro 4: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **19**. Espectro acima: Totalmente desacoplado. Espectro abaixo: DEPT 135°, $\uparrow$ (CH, CH_3); $\downarrow$ (CH_2).

Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	(0.0544, 0.2195)		
Date	14 Nov 2007 08:22:24		
Frequency (MHz)	(75.47, 300.13)	Nucleus	(¹³ C, ¹ H)
Number of Transients	40	Original Points Count	(1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	hsqcetgpg
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(18832.39, 4664.18)
Temperature (degree C)	27.000		



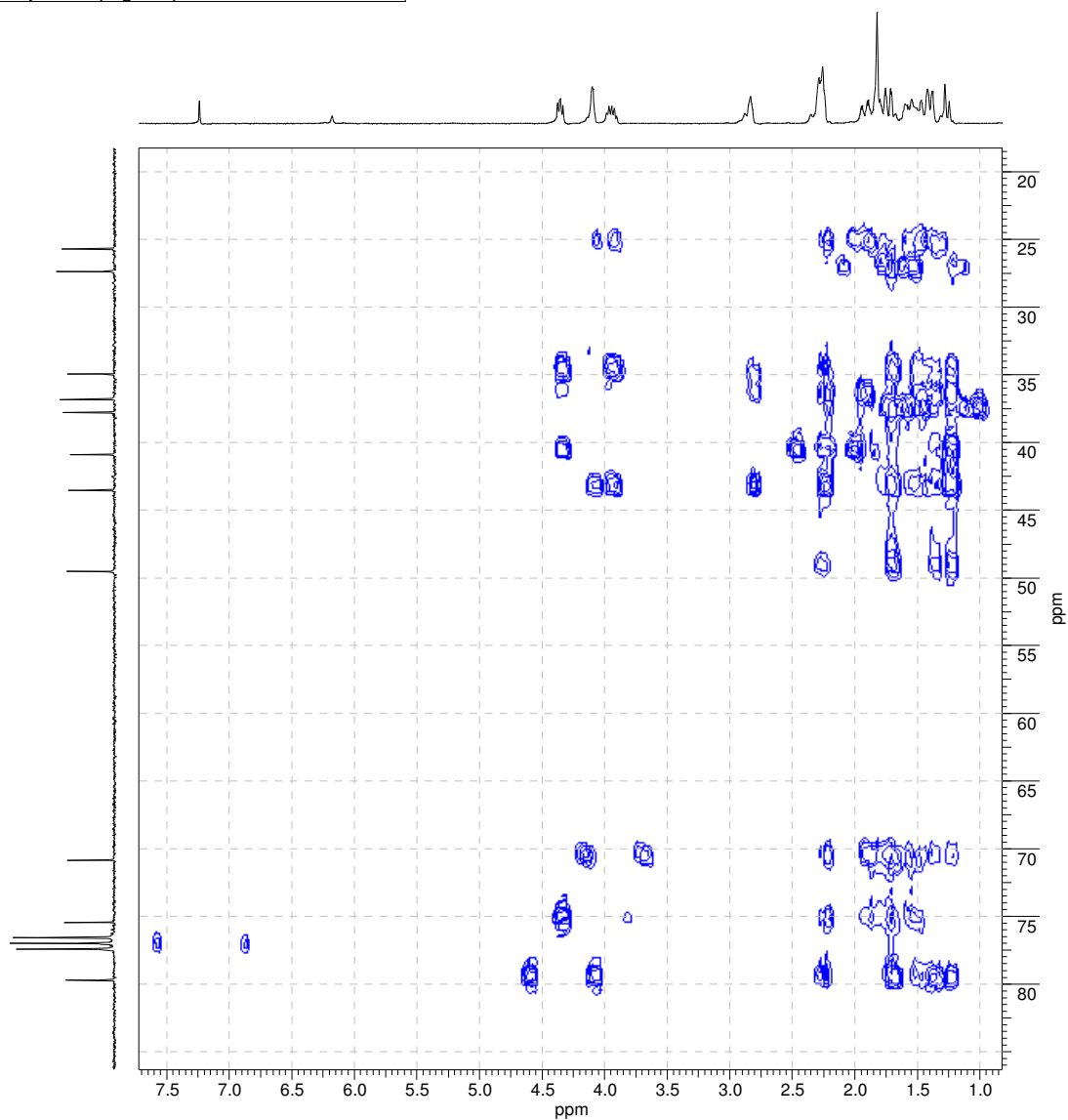
Espectro 5: Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C diretamente ligados, obtido a partir do experimento gHSQC do composto **19**.



Espectro 6: Ampliação do mapa de correlação gerado a partir do experimento gHSQC do composto **19**.

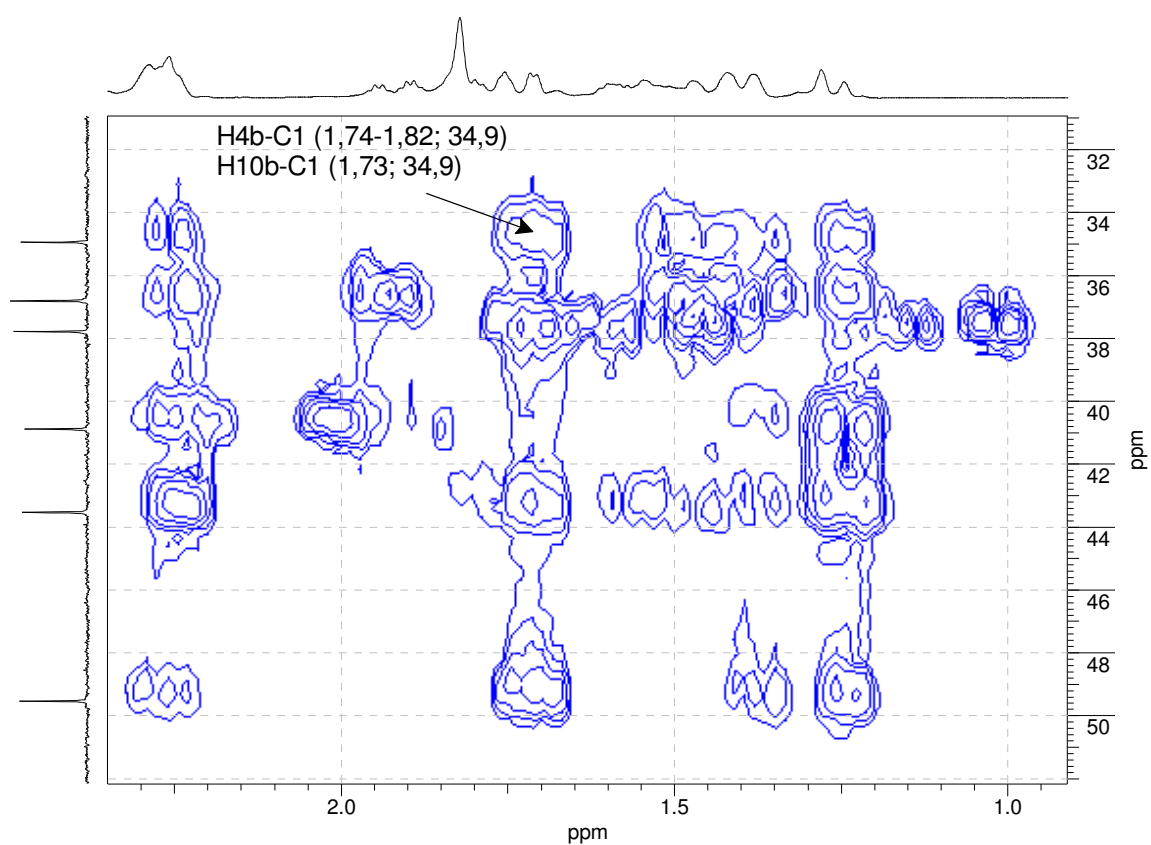
Resultados e discussão

Date	14 Nov 2007 08:22:34	Acquisition Time (sec)	(0.0544, 0.2195)
Frequency (MHz)	(75.47, 300.13)	Nucleus	(¹³ C, ¹ H)
Number of Transients	40	Original Points Count	(1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	hmbcgpndqf
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(18832.39, 4664.18)
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 7: Mapa de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância, obtido pelo experimento gHMBC do composto **19**.

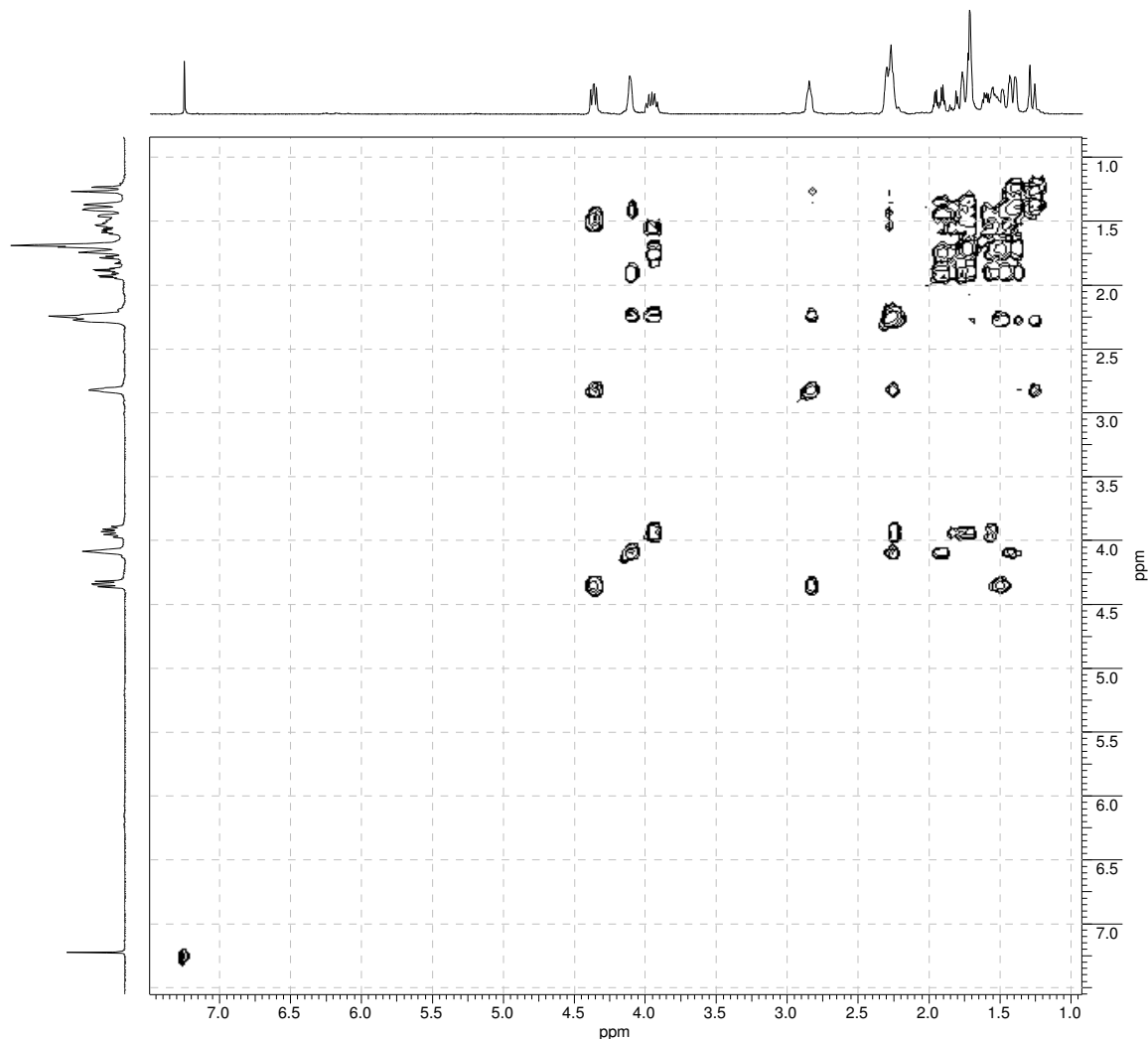
Resultados e discussão



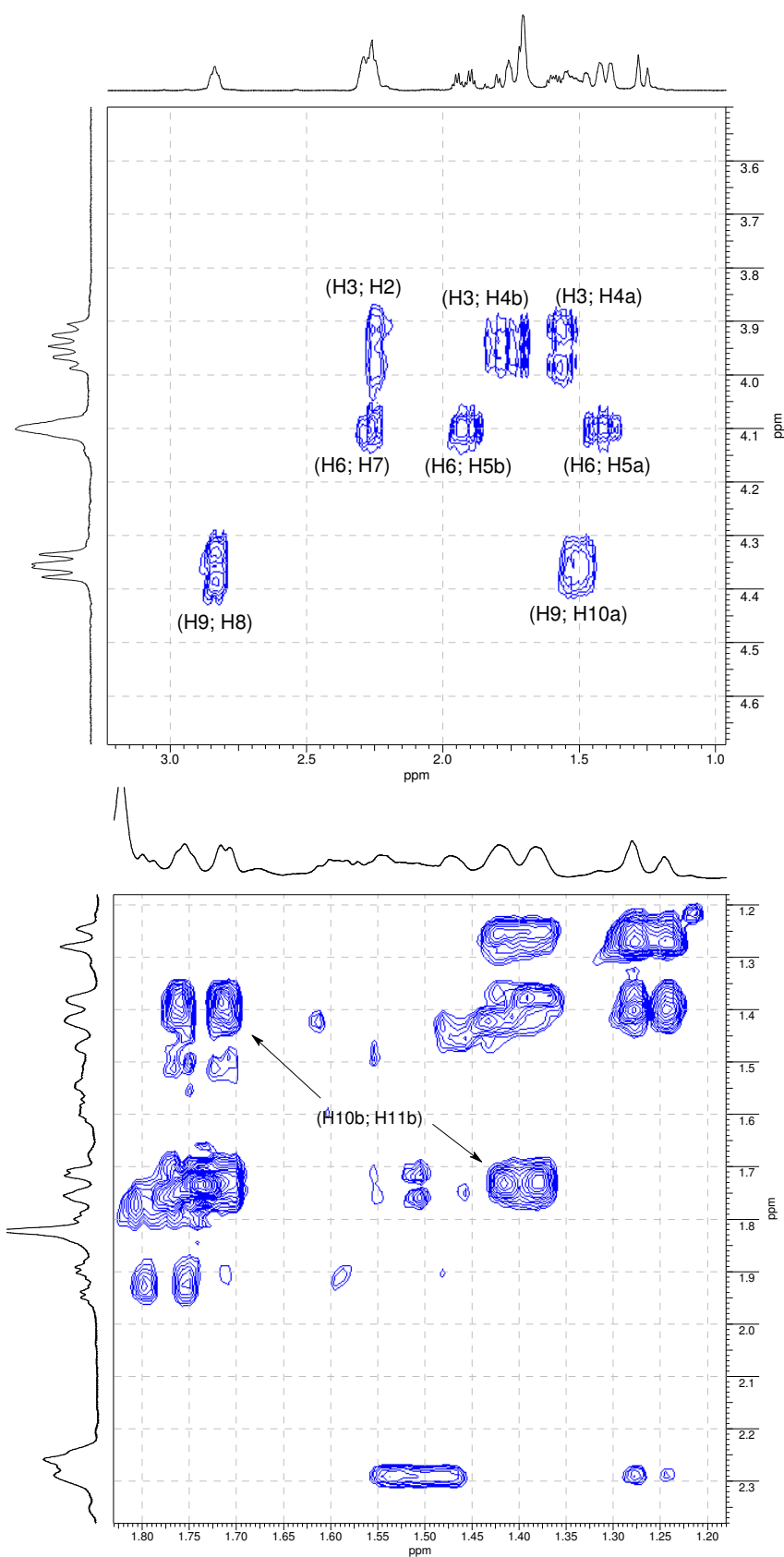
Espectro 8: Ampliação do mapa de correlação gerado a partir do experimento de gHMBC do composto **19**.

Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	(0.4129, 0.4129)	Temperature (degree C)	27.000
Date	14 Nov 2007 07:22:46		
Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)	Nucleus	(1H, 1H)
Number of Transients	40	Original Points Count	(1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	cosygpgqf
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(2480.16, 2480.16)



Espectro 9: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H do experimento gCOSY do composto 19.



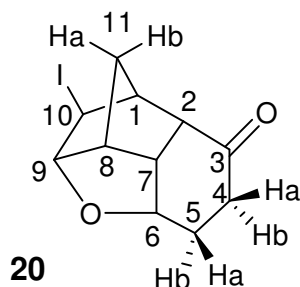
Espectro 10: Ampliação do mapa de correlação do experimento gCOSY do composto **19**.

Resultados e discussão

Tabela 6: Atribuição dos deslocamentos químicos (δ [ppm]) aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C), multiplicidade, constantes de acoplamento $J(^1\text{H}, ^1\text{H})$, $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ do gHMBC e correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do gCOSY do composto **19** em CDCl_3 .

	DEPT	gHSQC		gHMBC		gCOSY		
		$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$ [multiplicidade, J (Hz), integral relativa]	2J	3J	2J	3J	4J
1	CH	34,9	2,20 – 2,35 (<i>m</i> , 1H)	H11a/b/H10a/b	H6		H2/H10	H8
2	CH	43,5	2,17 – 2,30 (<i>m</i> , 1H)	H3/H7	H8/H6/H11a		H1/H7/H3	
3	CH	70,9	3,96 (<i>m</i> , 1H)	H2/H4a/4b	H5a/b		H2/H4a/H4b	
4a	CH ₂	25,7	1,54 – 1,66 (<i>m</i> , 1H)	H5a/H5b	H2	H4b	H3	
4b			1,74 – 1,82 (<i>m</i> , 1H)			H4a	H3	
5a	CH ₂	27,4	1,87 – 1,97 (<i>dq</i> , $J=14,2$; 3,4, 1H)	H4a/b		H5b	H6	
5b			1,38 – 1,45 (<i>m</i> , 1H)			H5a	H6	
6	CH	76,0	4,11 (<i>m</i> , 1H)		H7/H2/ H9		H7/H5a/H5b	
7	CH	40,9	2,20 – 2,35 (<i>m</i> , 1H)		H9/H11a/b		H2/H6/H8	
8	CH	49,5	2,85 (<i>m</i> , 1H)	H7/H11a/b	H2		H7/H9/H11a/b	H1
9	CH	79,7	4,36 (<i>dd</i> , $J=7,7$; 5,3 1H,)	H6/H10	H1/H7/H11a/b		H10a/H10b	
10a	CH ₂	36,8	1,54 (<i>m</i> , 1H)	H9			H9	
10b			1,73 (<i>m</i> , 1H)	H9	H1		H9	H11b
11a	CH ₂	37,8	1,26 (<i>d</i> , $J=11,0$, 1H)				H1/H8	
11b			1,39 (<i>d</i> , $J=11,0$, 1H)	H10a/H11b	H9		H1/H8	H10b

3.5.3. *rel*-(4*S*,5*S*,6*S*,8*S*,1*R*,2*R*,12*R*)-5-Iodo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]decan-11-ona (20)



O espectro de RMN de ^1H desse composto evidencia sua obtenção devido ao desaparecimento do sinal da olefina em δ 6,20, presente no material de partida (composto **12**) e o aparecimento de sinais mais complexos na região de δ 3,5-5,0. Os sinais dos hidrogênios da ponte, H11a e H11b aparecem em δ 2,19 e 1,75, respectivamente (dublete com $J=11,0$ Hz).

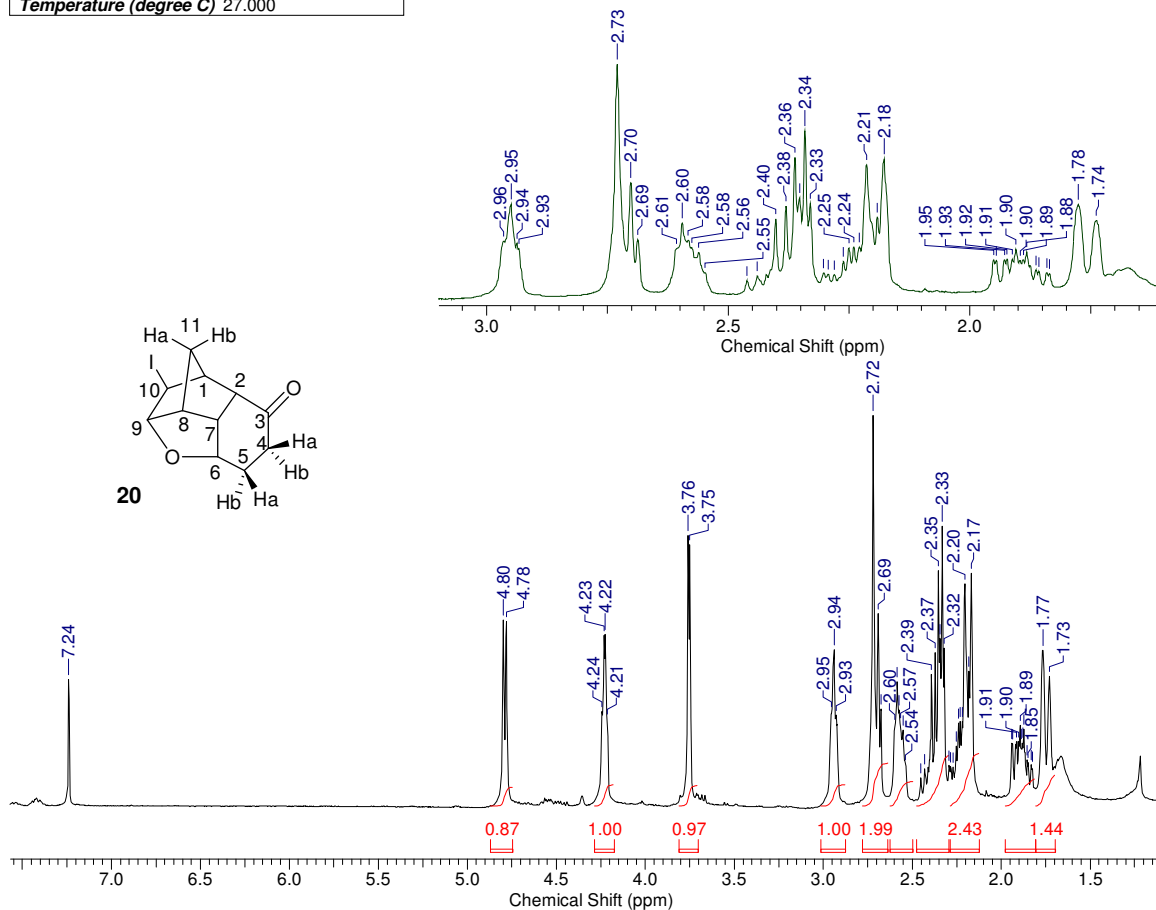
No espectro de RMN de ^{13}C observa-se a presença de sinal em δ 212,0 referente ao carbono da carbonila e mais 10 sinais na região de 20-90 ppm. Pelo DEPT 135, observa-se 3 carbonos metilênicos em δ 25,8 e 35,1 (referentes aos carbonos C4 e C5, respectivamente) e δ 37,1 relativo ao carbono da ponte. Estes sinais e C6, C9 e C10 foram caracterizados inequivocamente pelo experimento de gHSQC. Os demais sinais (C1, C2, C7 e C8) foram identificados e caracterizados por gCOSY a partir das correlações observadas. Ainda pelo gCOSY, observou-se acoplamento em W entre os H10 e H11b. Pelo experimento de gNOESY observou a proximidade do H11b com H7 e do H10 com H4, em vez de H5, assim, determinando conformação mais estável do composto **20**.

No espectro de infravermelho observam-se bandas de absorção de estiramento axial de carbonila em $1693,35\text{ cm}^{-1}$ e de C-H alifático em $2881,39$ e $2950,82\text{ cm}^{-1}$ (Espectro 18 e tabela 8).

O espectro de massas observou-se o pico do íon molecular (M^+) em $m/z = 304$, conferindo a massa molecular de **20**.

Resultados e discussão

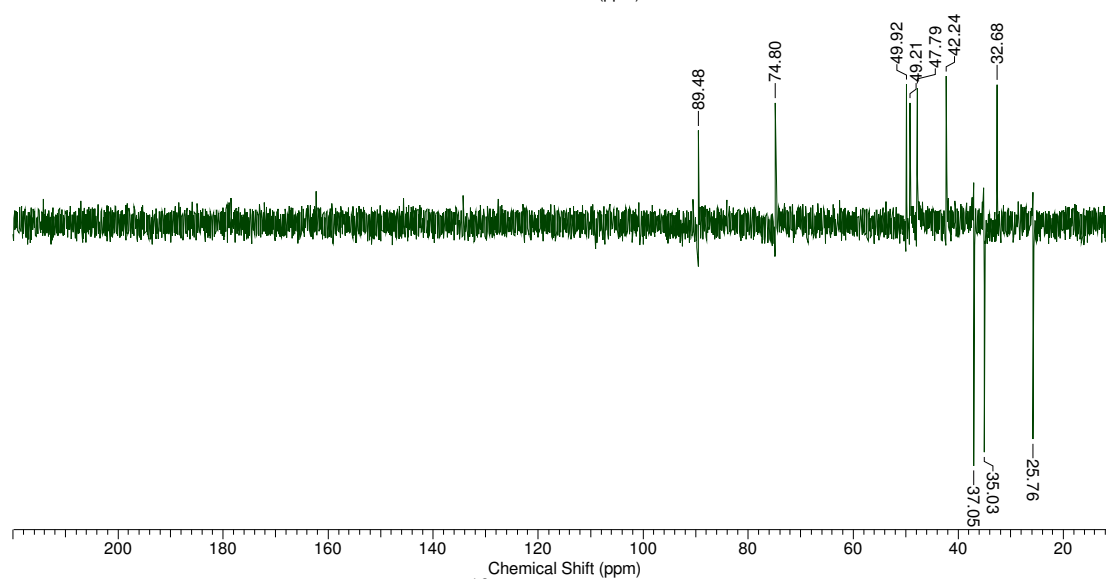
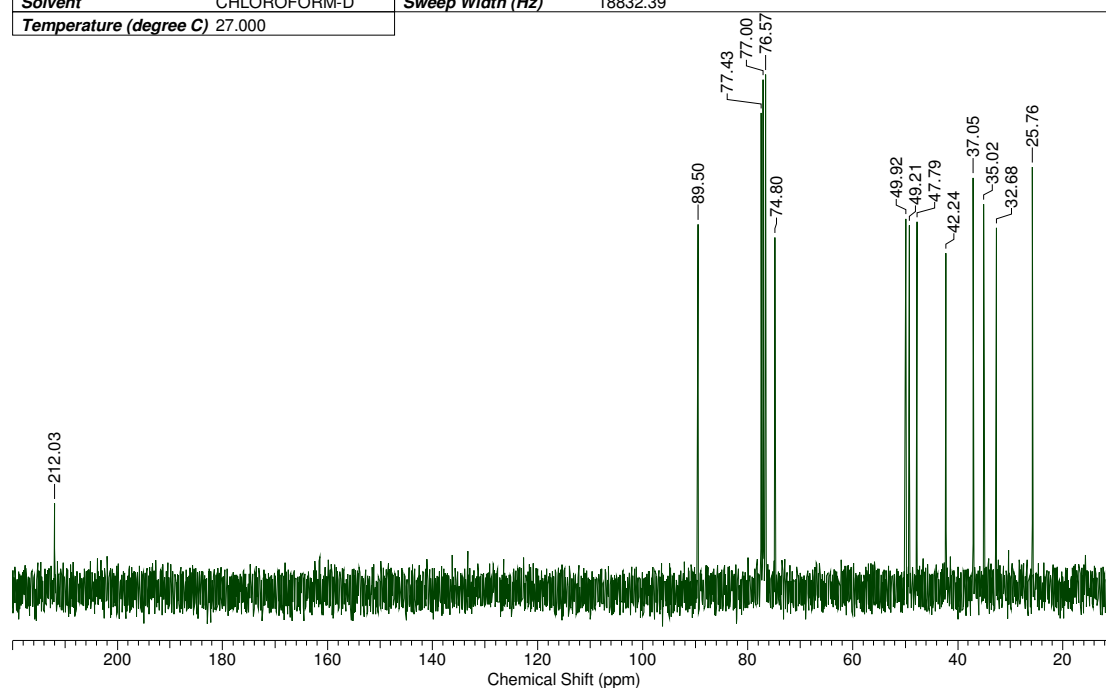
Acquisition Time (sec)	7.0255	Date	03 Jul 2008 14:17:44
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H
Number of Transients	8	Original Points Count	32768
Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4664.18
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 11: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **20**.

Resultados e discussão

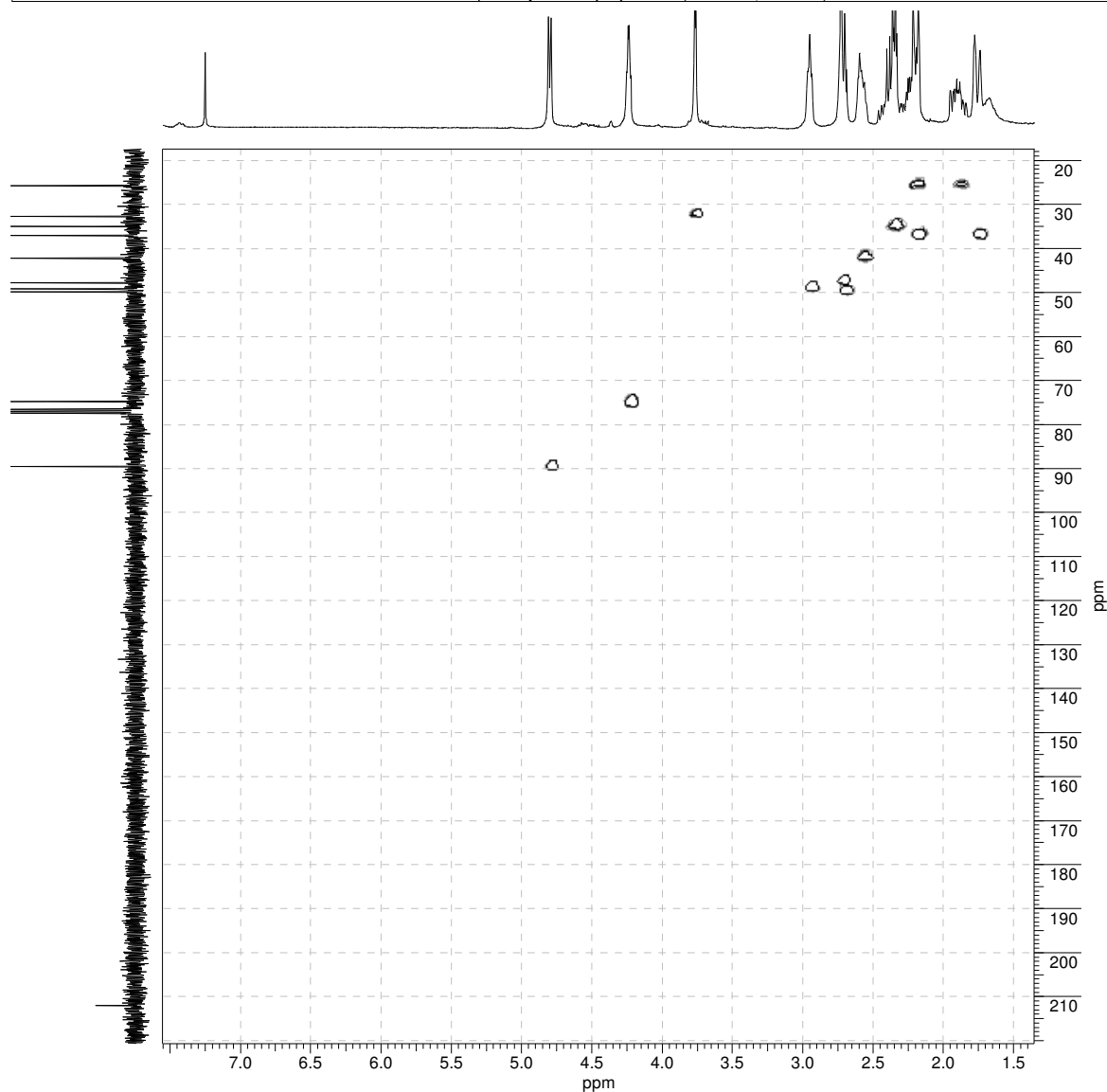
Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	10 Jul 2008 16:03:48
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	^{13}C
Number of Transients	310	Original Points Count	16384
Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 12: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **20**. Espectro acima: Totalmente desacoplado. Espectro abaixo: DEPT 135 $^\circ$, $\uparrow$ (CH, CH_3); $\downarrow$ (CH_2).

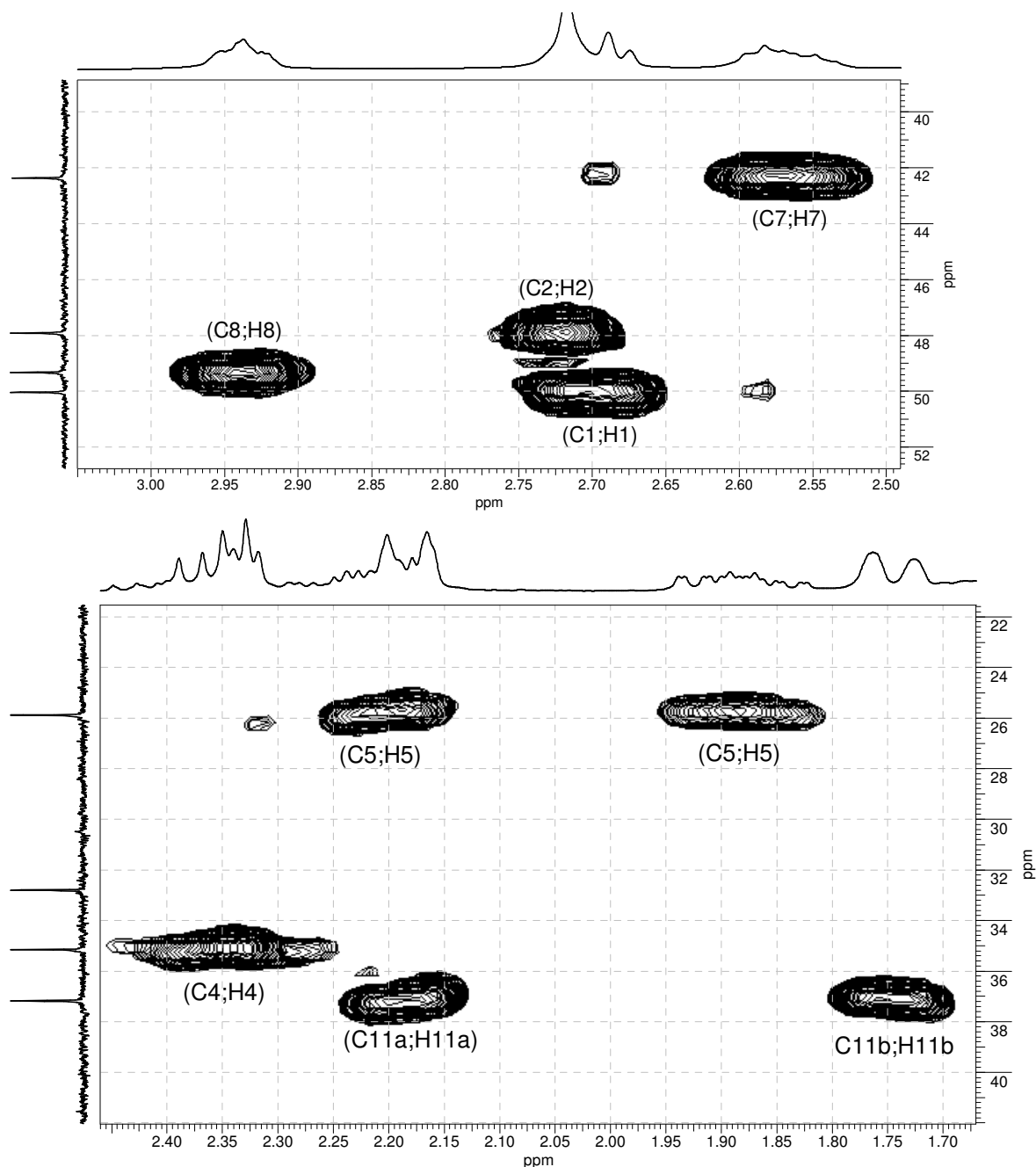
Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	(0.0544, 0.2195)	Temperature (degree C)	27.000
Date	27 Feb 2009 08:04:48	Nucleus	(13C, 1H)
Frequency (MHz)	(75.47, 300.13)	Original Points Count	(1024, 1024)
Number of Transients	40	Pulse Sequence	hsqcetgpg
Points Count	(1024, 1024)	Sweep Width (Hz)	(18832.39, 4664.18)
Solvent	CDCl3		



Espectro 13: Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C diretamente ligados, obtido a partir do experimento gHSQC do composto **20**.

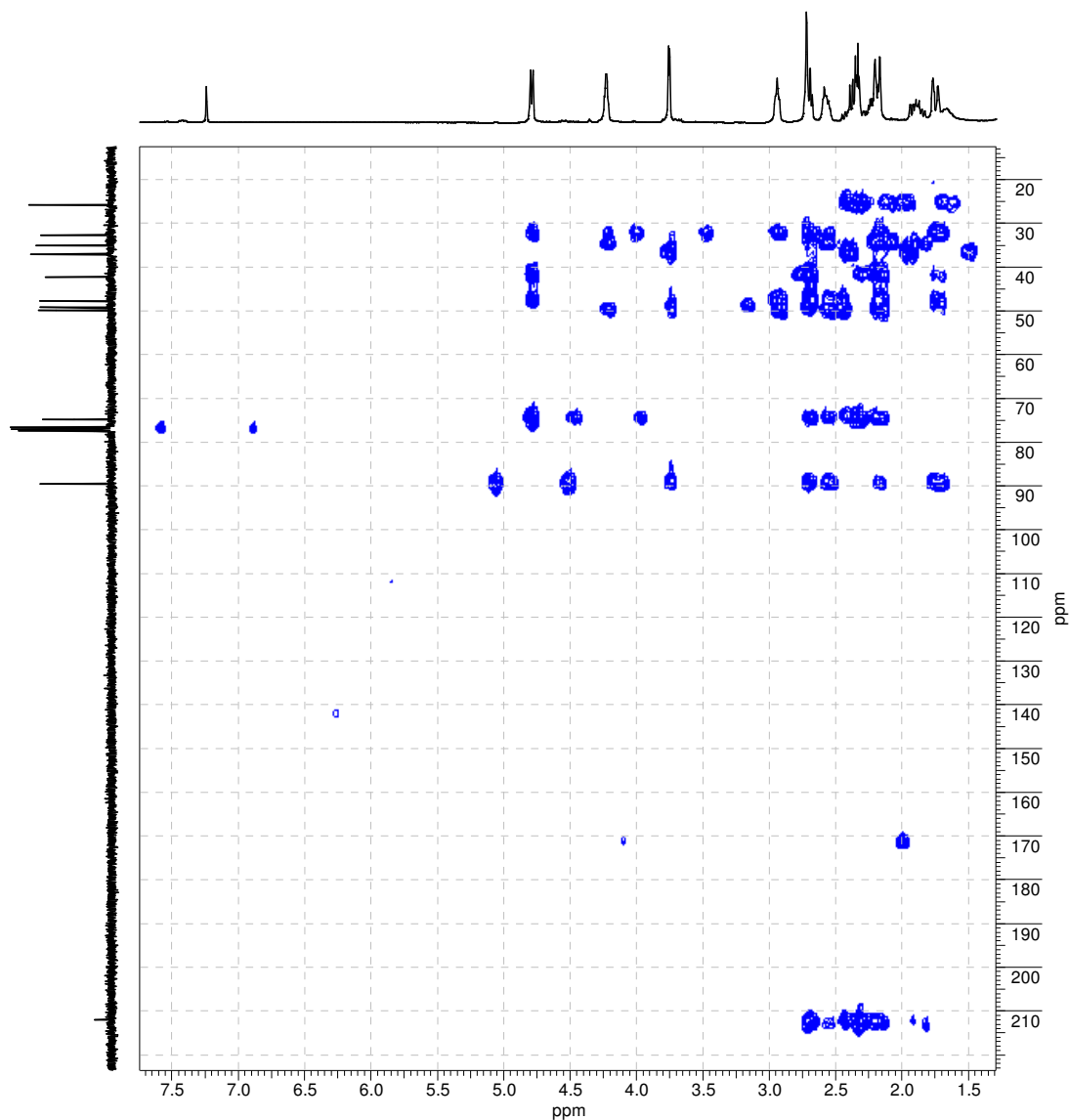
Resultados e discussão



Espectro 14: Ampliação do mapa de correlações do experimento gHSQC do composto 20.

Resultados e discussão

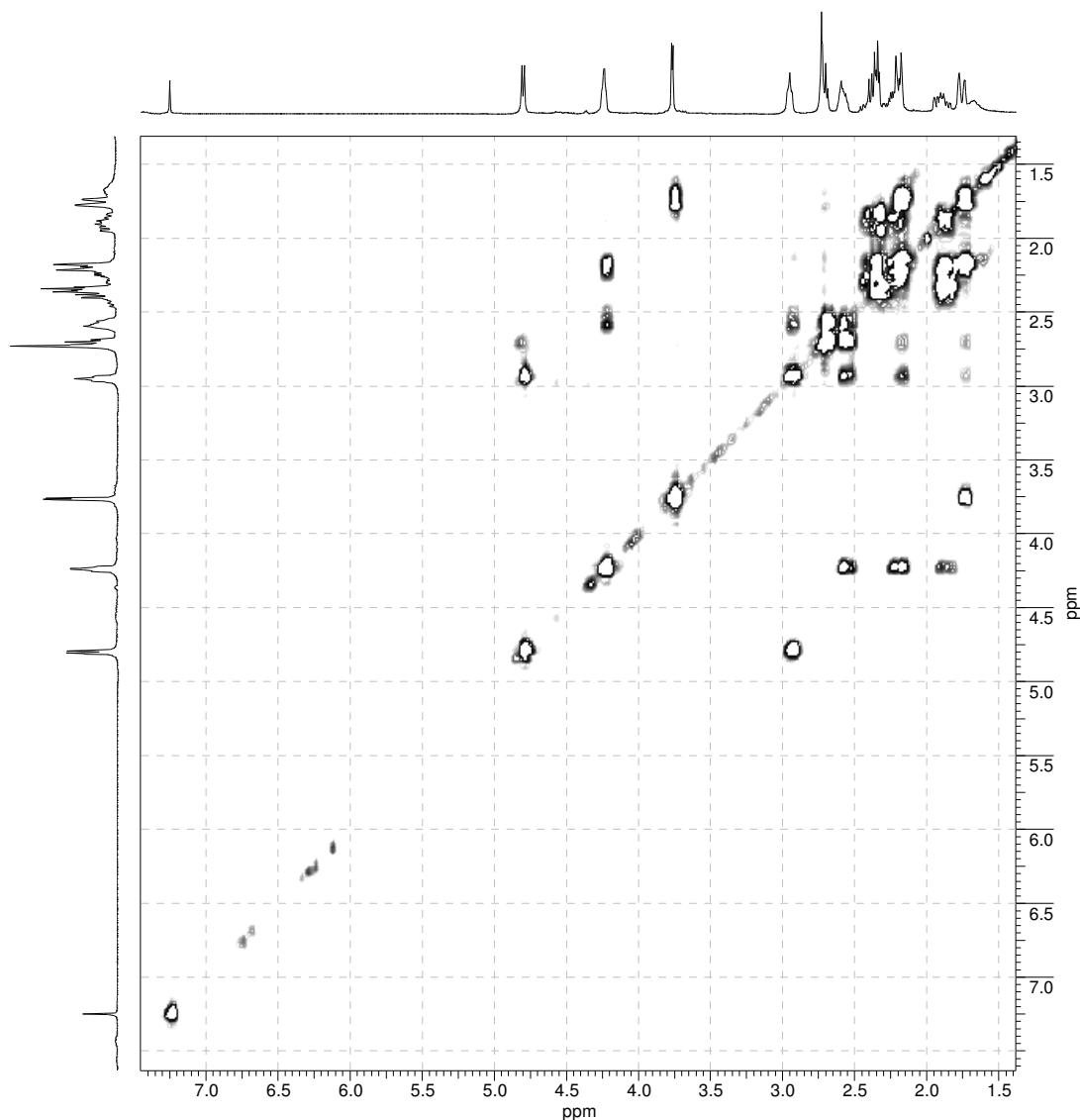
Acquisition Time (sec)	(0.0544, 0.2195)	Temperature (degree C)	27.000
Date	27 Feb 2009 07:22:08	Nucleus	(13C, 1H)
Frequency (MHz)	(75.47, 300.13)	Original Points Count	(1024, 1024)
Number of Transients	64	Pulse Sequence	hmbcgpndgf
Points Count	(1024, 1024)	Sweep Width (Hz)	(18832.39, 4664.18)
Solvent	CDCl ₃		



Espectro 15: Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância, obtido pelo experimento gHMBC do composto **20**.

Resultados e discussão

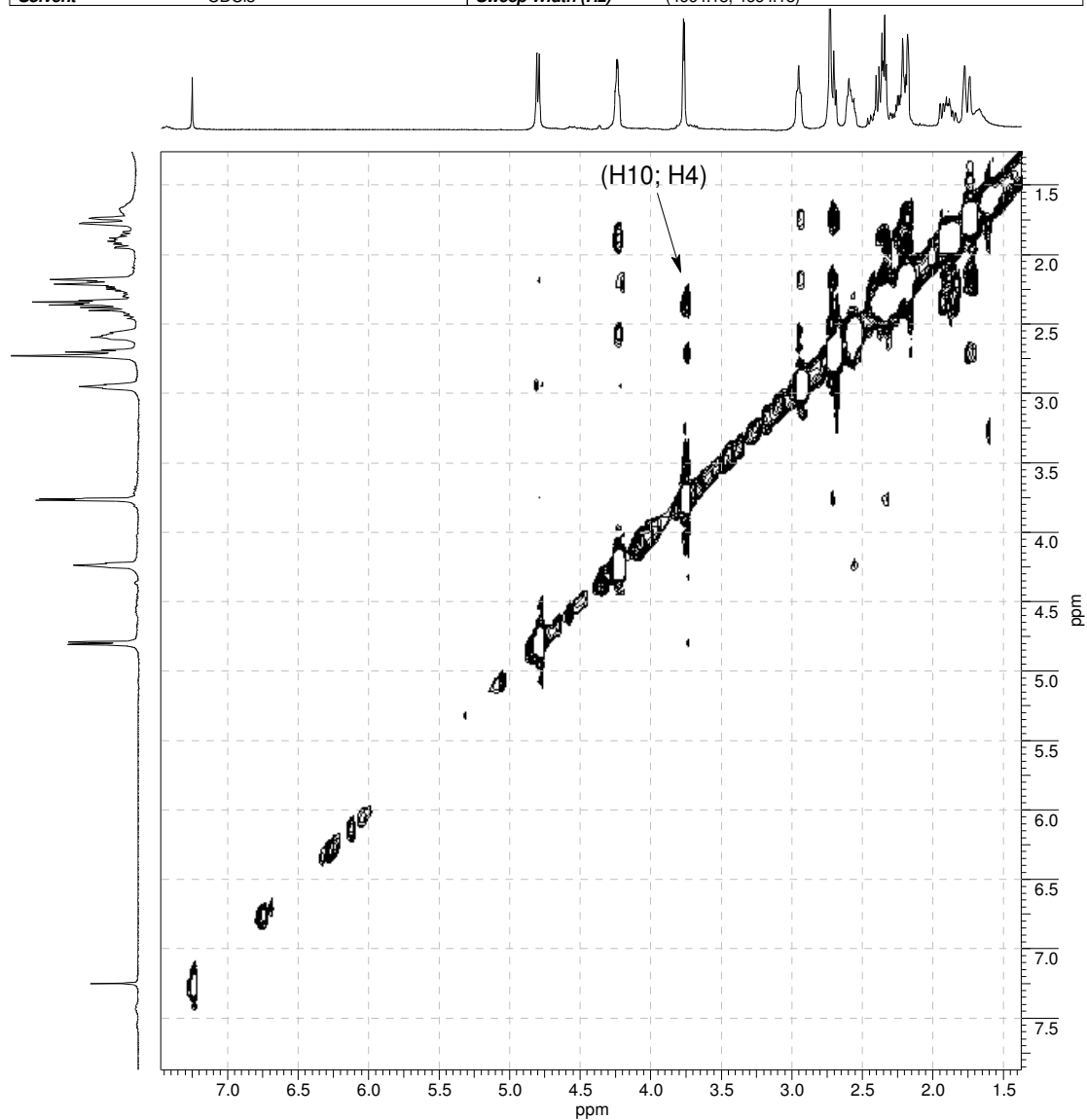
Acquisition Time (sec)	(0.2195, 0.2195)	Temperature (degree C)	27.000
Date	27 Feb 2009 07:22:24	Nucleus	(1H, 1H)
Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)	Original Points Count	(1024, 1024)
Number of Transients	17	Pulse Sequence	cosygpoif
Points Count	(1024, 1024)	Sweep Width (Hz)	(4664.18, 4664.18)
Solvent	CDCl ₃		



Espectro 16: Mapa de correlação homonuclear ^1H - ^1H , obtido a partir do experimento gCOSY do composto **20**.

Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	(0.2195, 0.2195)	Temperature (degree C)	27.000
Date	27 Feb 2009 08:11:56	Nucleus	(1H, 1H)
Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)	Original Points Count	(1024, 1024)
Number of Transients	12	Pulse Sequence	noesygpph
Points Count	(1024, 1024)	Sweep Width (Hz)	(4664.18, 4664.18)
Solvent	CDCl3		



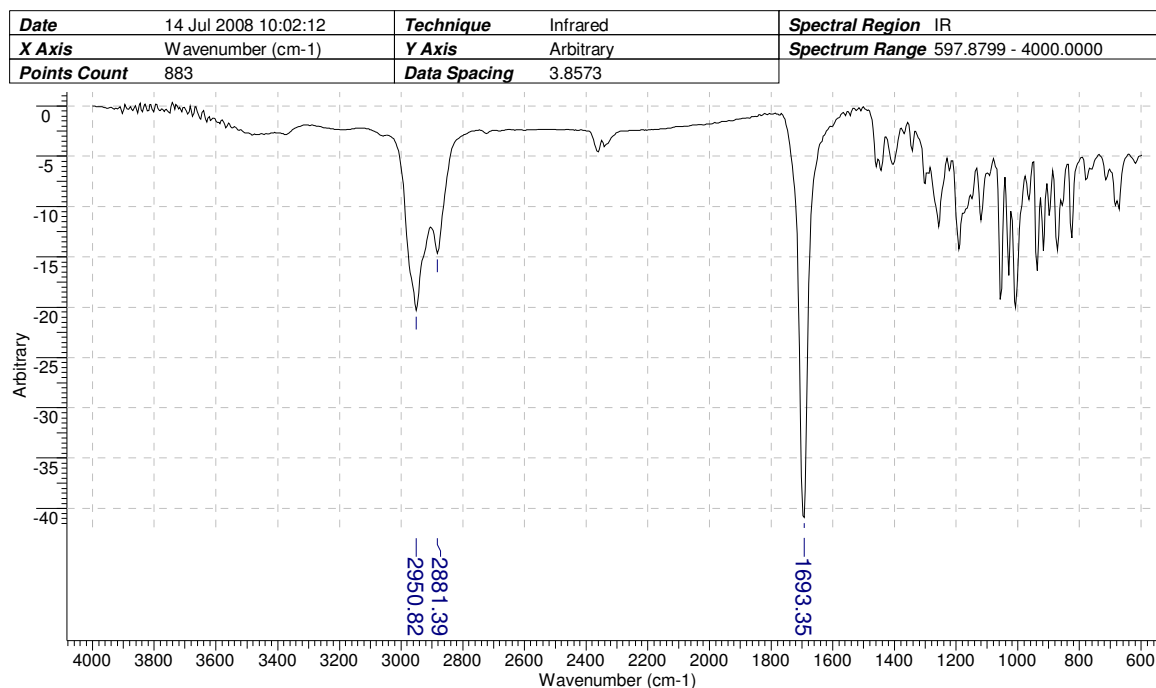
Espectro 17: Mapa de correlação espacial ^1H - ^1H , obtido a partir do experimento gNOESY do composto **20**.

Resultados e discussão

Tabela 7: Atribuição dos deslocamentos químicos (δ [ppm]) aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C), multiplicidade, constantes de acoplamento $J(^1\text{H}, ^1\text{H})$, $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ do gHMBC e correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do gCOSY e gNOESY do composto **20** em CDCl_3 .

	DEPT	gHSQC		gHMBC		gCOSY			gNOESY
		δ (^{13}C)	δ (^1H) [m , J (Hz), integral relativa]	2J	3J	2J	3J	4J	
1	CH	50,3	2,69 – 2,72 (m , 1H)	H11a	H8		H11a/ H11b	H8	H1/ H11a/b
2	CH	48,1	2,69 – 2,72 (m , 1H)	H1	H8		H7		H7
3	C	212,0	-----	H2/H4a/b	H5b				-----
4a	CH ₂	35,1	a) 2,32-2,49 (m , 1H)	H5b	H6	H4b	H5a/b		H5a/b
4b			b) 2,32-2,49 (m , 1H)			H4a	H5a/b		H10/ H5a/b
5a	CH ₂	25,8	a) 1,84 – 1,95 (m , 1H)	H4a/H4b		H5b	H4a/b; H6		H5b/ H4a/b
5b			b) 2,18-2,29			H5a	H4a/b; H6		H5a/ H4a/b
6	CH	74,8	4,24 (m , 1H)	H5a/H5b	H4a/b		H5a/ H5b/ H7		H5a/ H5b/ H7
7	CH	42,5	2,55 – 2,61 (m , 1H)	H2	H1/H9		H2/ H6/ H8		H6/ H8
8	CH	49,5	2,95 (m , 1H)	H7/H11a	H6		H7/ H9/ H11a/b		H1/ H7/ H11a/b
9	CH	89,5	4,80 (d , 5,3 1H,)	H10	H7/H1		H8		H8/ H11a
10	CH	33,0	3,77 (m , 1H)	H9/ H1	H8/H11a/b			H11b	H4b/ H1
11a	CH ₂	37,1	a) 2,19 (d , $J=11,0$, 1H)		H10/		H1/ H8		H1/ H8
11b			b) 1,75 (d , $J=11,0$, 1H)				H1/ H8	H10	H1/ H8

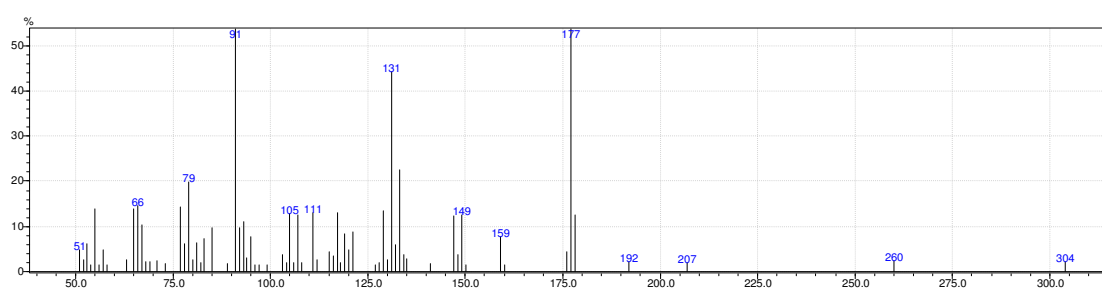
Resultados e discussão



Espectro 18: Espectro de infravermelho do composto **20**.

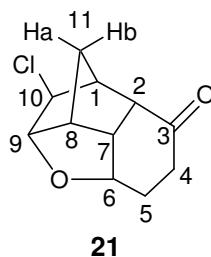
Tabela 8: Atribuição das bandas de absorção de IV a grupos funcionais do composto **20**.

V _{MAX}	Atribuição
2881,39 - 2950,82	Estiramento axial de C-H de alifático
1693,35	Estiramento axial de C=O de cetona



Espectro 19: Espectro de massas do composto **20**.

3.5.4. *rel*-(4*S*,5*S*,6*S*,8*S*,1*R*,2*R*,12*R*)-5-Cloro-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ona (**21**)



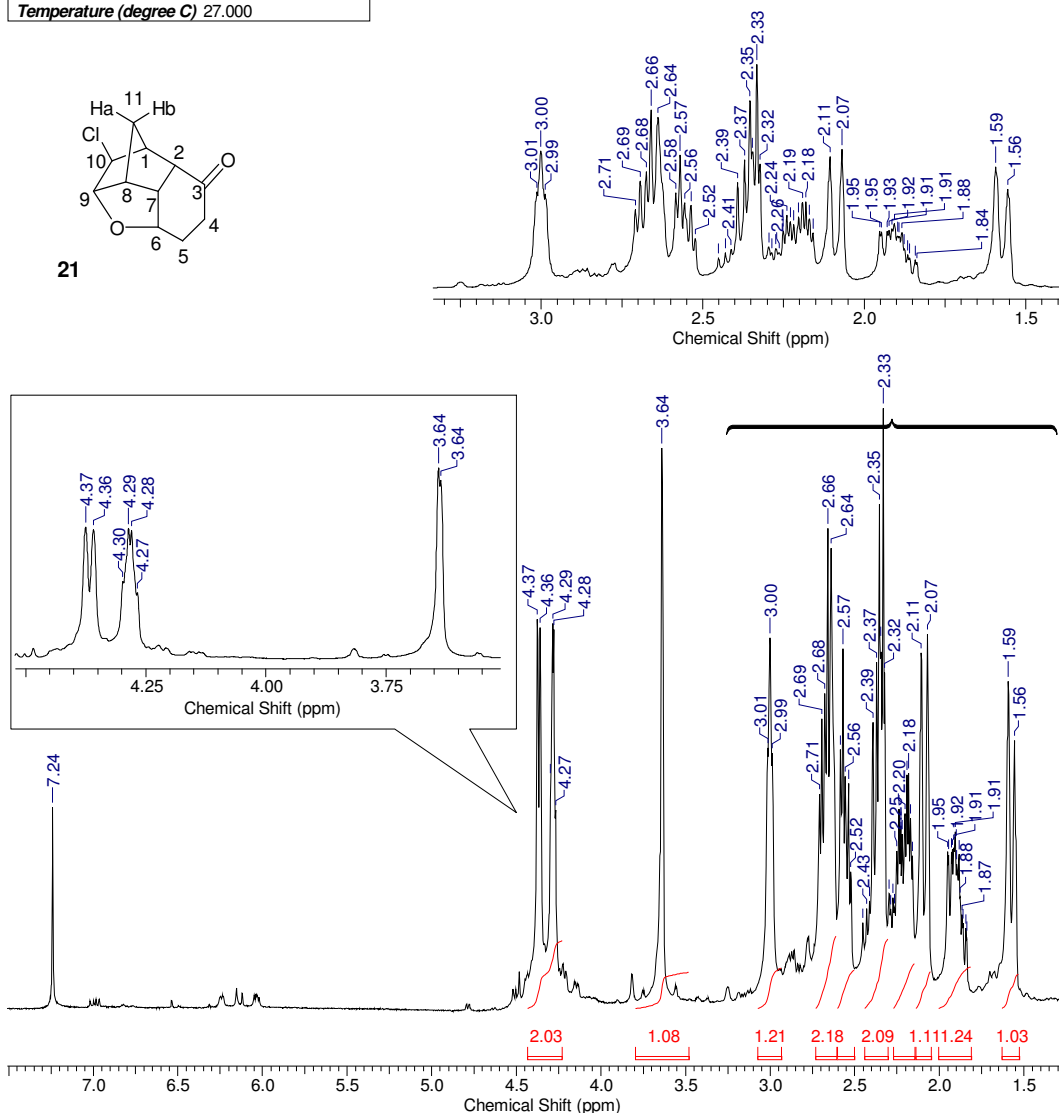
Observando o espectro de RMN de ^1H , nota-se a conversão do material de partida pela ausência dos sinais olefínicos na região de δ 6,0 e presença de sinais entre δ 3,5-4,5 referentes a hidrogênios ligados em átomos mais eletronegativos que o carbono. Os hidrogênios da ponte seguem os mesmos padrões de acoplamento dos anteriores (dublete e $J=11,0$ Hz) e foram localizados em δ 2,10 e 1,59 para H11a e H11b, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C registra sinal em δ 211,8 referente à carbonila de cetona e mais 10 sinais na região de 20-90 ppm. No experimento de DEPT 135, nota-se a presença de 3 sinais metilênicos e ausência do sinal em δ 211,8 determinando a presença de carbono quaternário. Os sinais metilênicos em δ 26,1 e 33,8 referem-se aos C5 e C4 respectivamente e o sinal em δ 35,2 atribui-se ao carbono da ponte.

As correlações dos carbonos ligados diretamente ao hidrogênio foram confirmadas através do espectro gHSQC. O mapa de correlações de gCOSY foi importante para identificar os sinais dos H1, H2, H4, H5, H7 e H8 (Tabela 9). A análise do espectro de RMN gNOESY permitiu-nos especular sobre a conformação mais estável de **21**, pela correlação entre H10 e H4. O espectro de massas confirmou a transformação com o registro do pico do íon molecular (M^+) em $m/z = 212$ do composto **21**.

Resultados e discussão

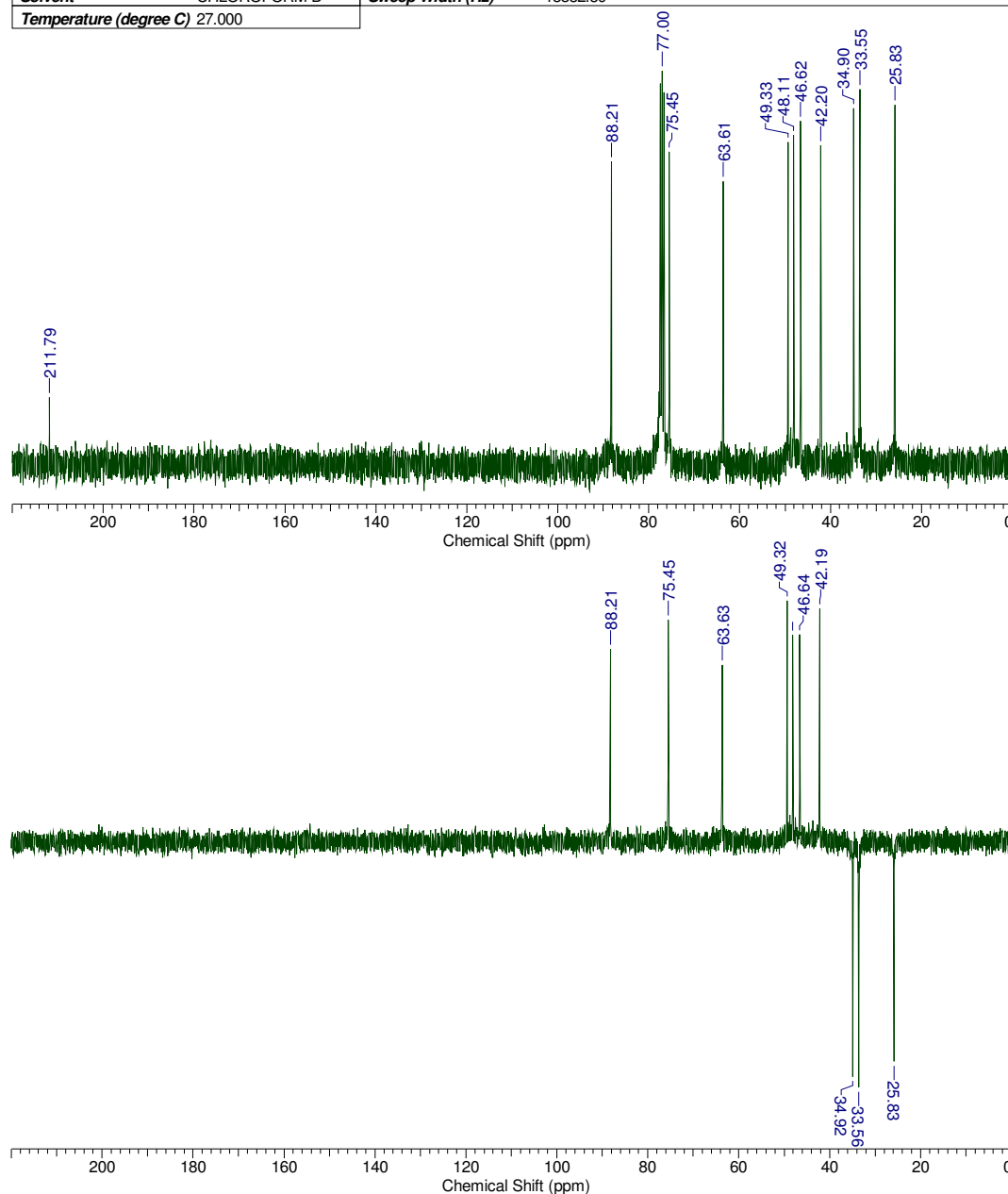
Acquisition Time (sec)	7.0255	Date	10 Feb 2009 07:08:16
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H
Number of Transients	8	Original Points Count	32768
Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4664.18
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 20: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **21**.

Resultados e discussão

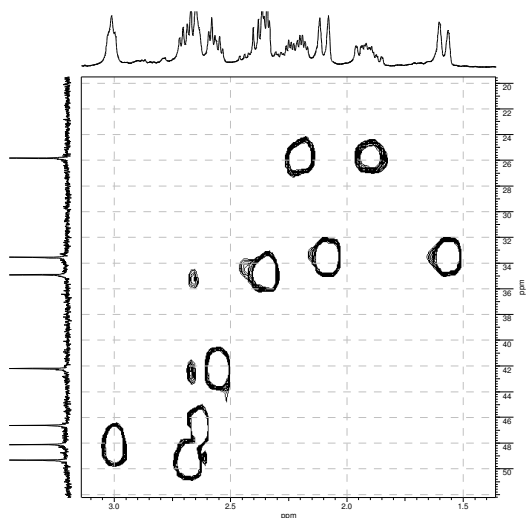
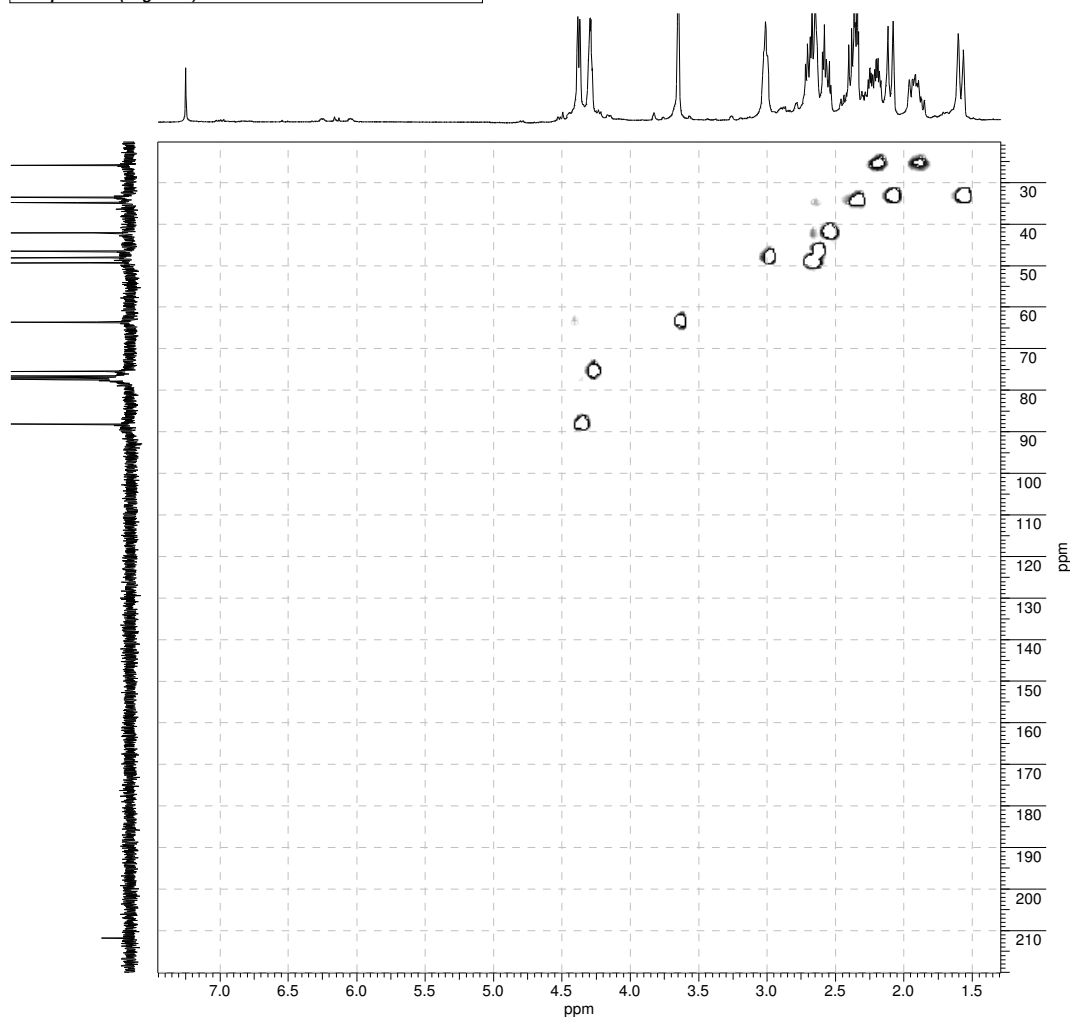
Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	03 Mar 2009 16:49:04
Frequency (MHz)	75.48	Nucleus	¹³ C
Number of Transients	7048	Original Points Count	16384
Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 21: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **21**. Espectro acima: Totalmente desacoplado. Espectro abaixo: DEPT 135 $^\circ$, $\uparrow$ (CH, CH_3); $\downarrow$ (CH_2).

Resultados e discussão

Date	25 Mar 2009 13:25:52	Acquisition Time (sec)	(0.0544, 0.2195)
Frequency (MHz)	(75.47, 300.13)	Nucleus	(¹³ C, ¹ H)
Number of Transients	40	Original Points Count	(1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	hsqcetgpp
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(18832.39, 4664.18)
Temperature (degree C)	27.000		

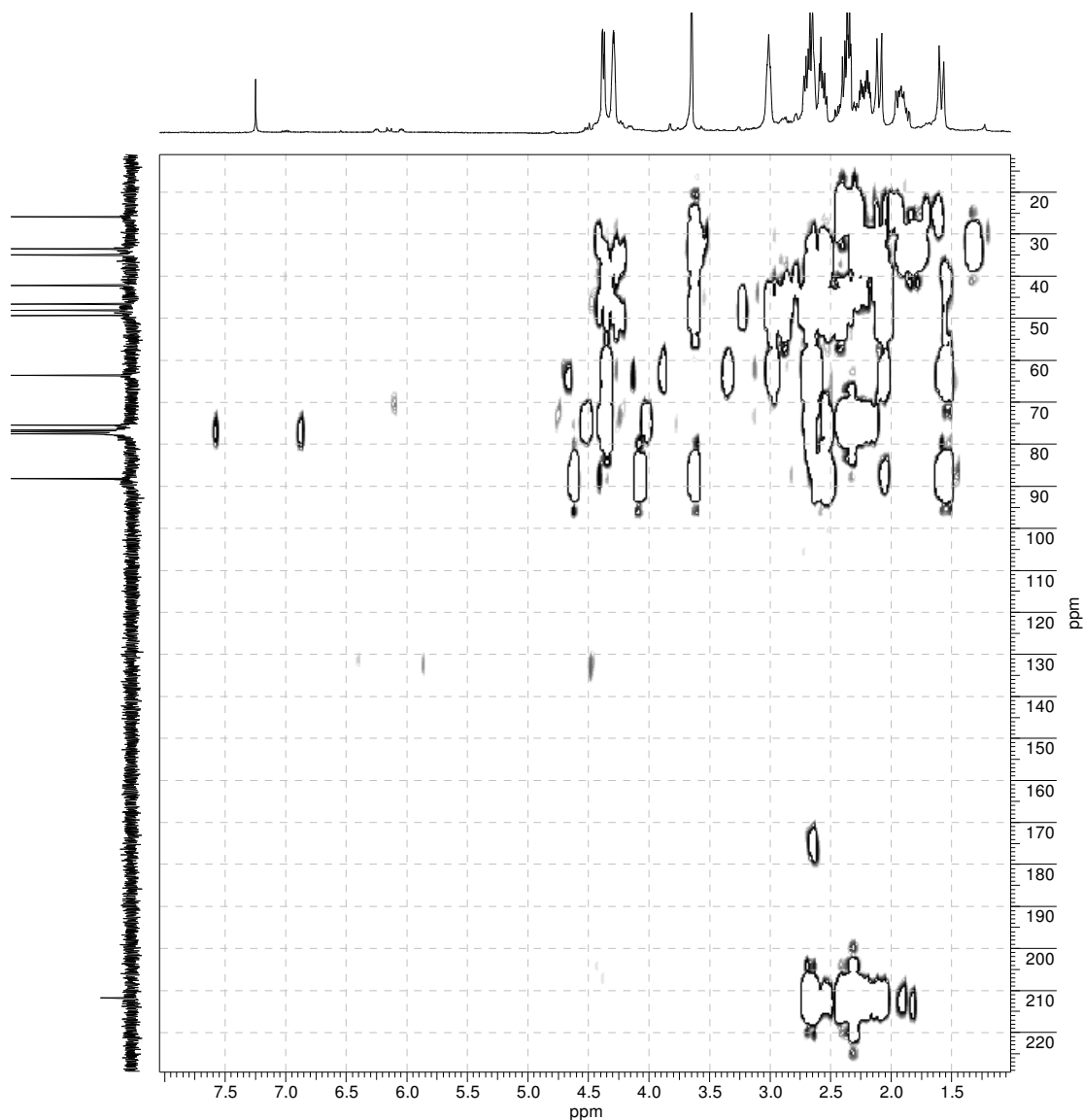


Espectro 22: Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C diretamente ligados, obtido a partir do experimento gHSQC do composto **21** e ampliação.

Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

Resultados e discussão

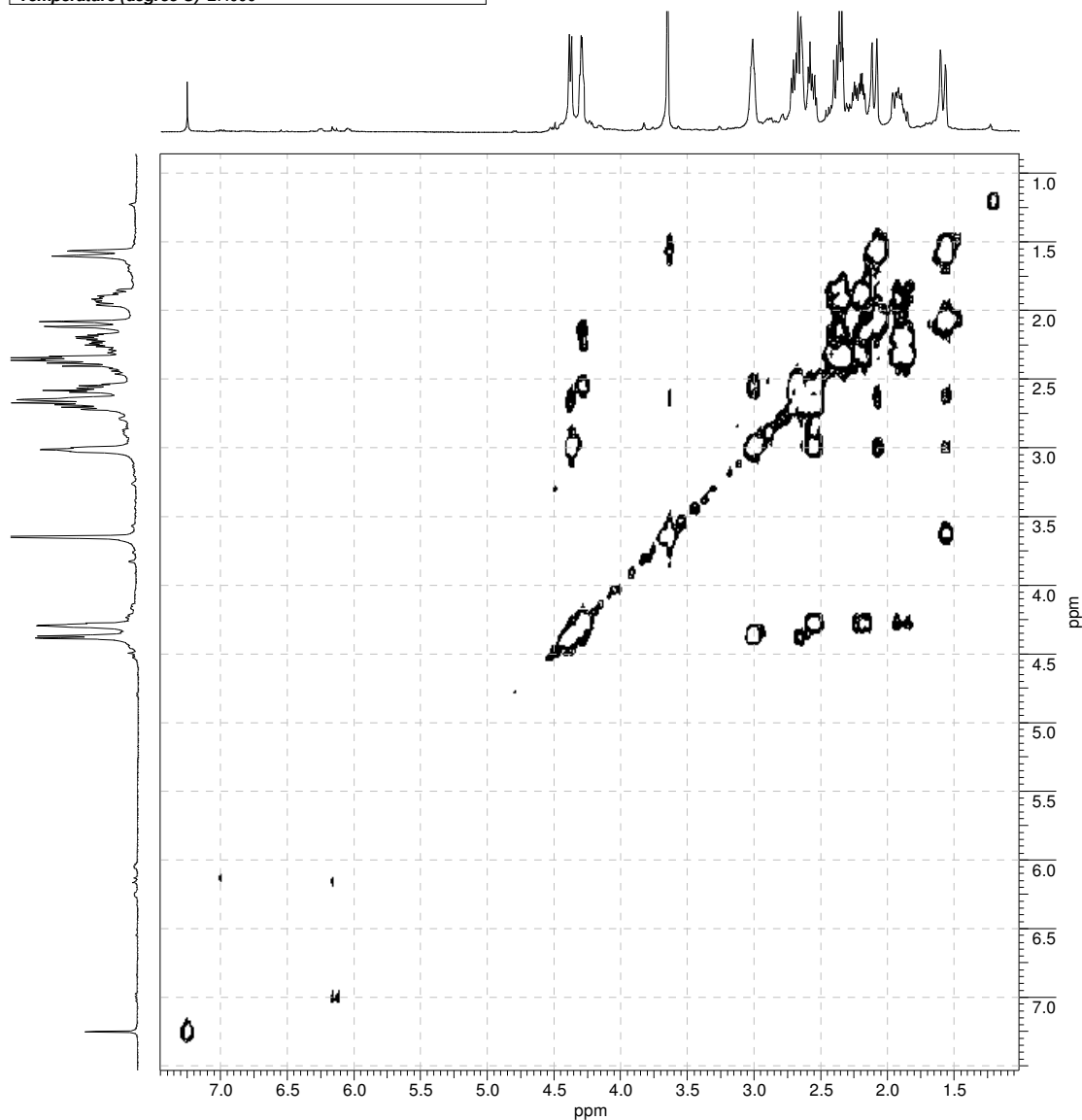
Date	25 Mar 2009 16:50:30	Temperature (degree C)	27.000
Acquisition Time (sec)	(0.0544, 0.2195)	Nucleus	(13C, 1H)
Frequency (MHz)	(75.47, 300.13)	Original Points Count	(1024, 1024)
Number of Transients	200	Pulse Sequence	hmbcgpndqf
Points Count	(1024, 1024)	Sweep Width (Hz)	(18832.39, 4664.18)
Solvent	CDCl ₃		



Espectro 23: Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância, obtido pelo experimento gHMBC do composto **21**.

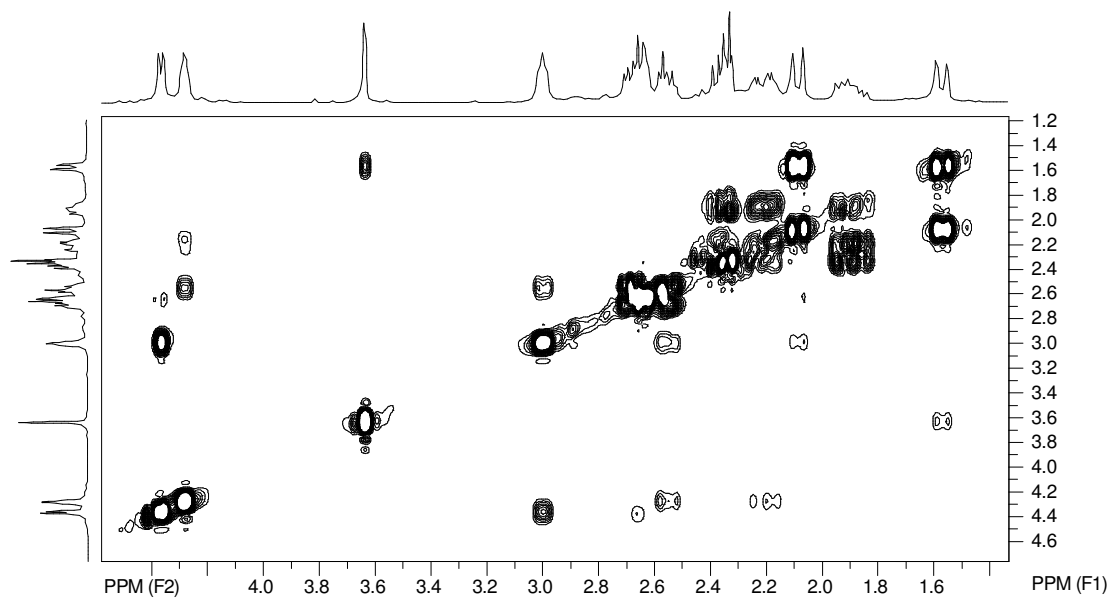
Resultados e discussão

Date	30 Mar 2009 13:45:44	Acquisition Time (sec)	(0.2195, 0.2195)
Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)	Nucleus	(¹ H, ¹ H)
Number of Transients	30	Original Points Count	(1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	cosygpdf
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(4664.18, 4664.18)
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 24: Mapa de correlações homonuclear ^1H - ^1H obtido a partir do experimento gCOSY do composto **21**.

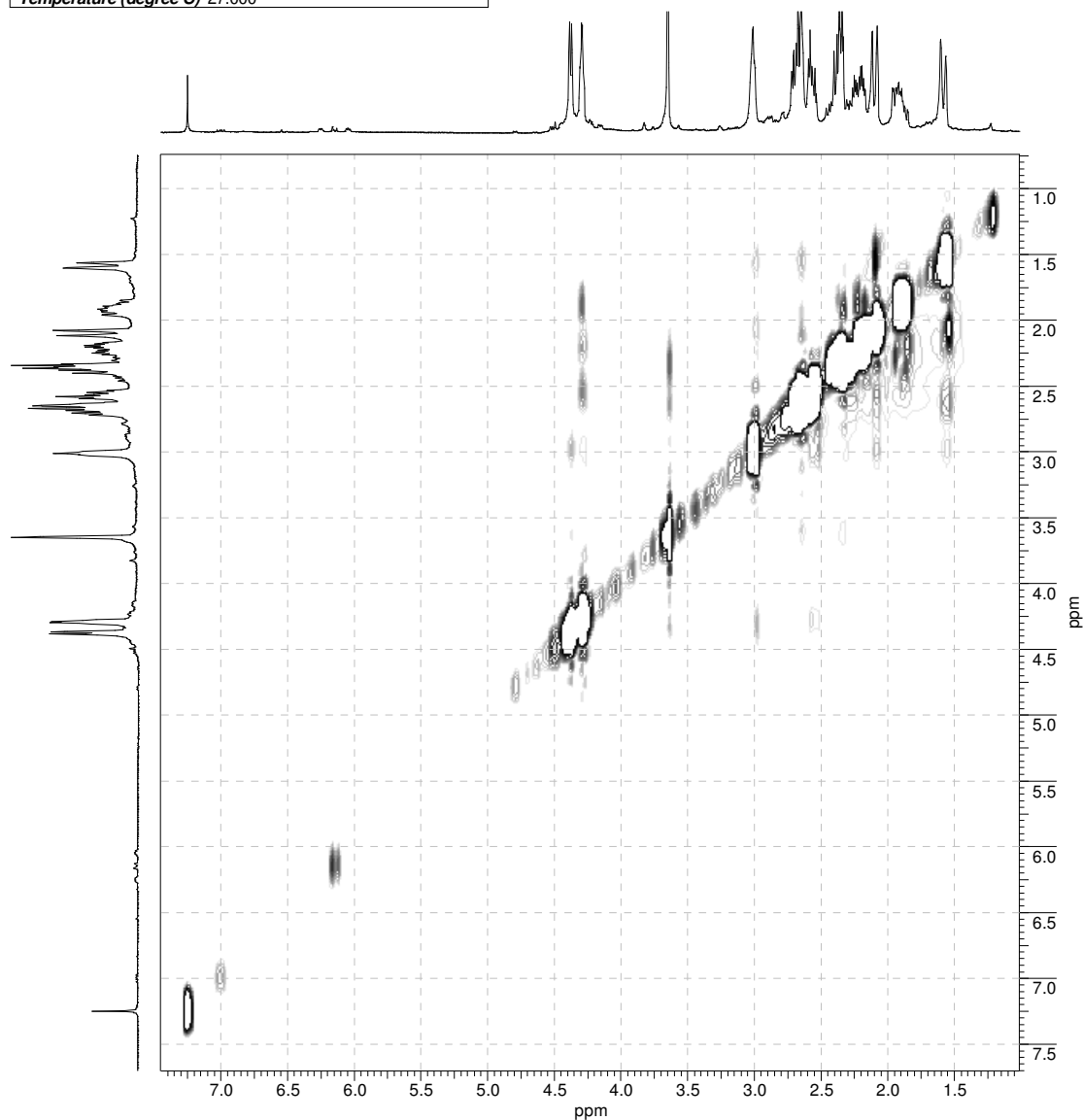
Resultados e discussão



Espectro 25: Ampliação do mapa de correlações do experimento gCOSY do composto **21**.

Resultados e discussão

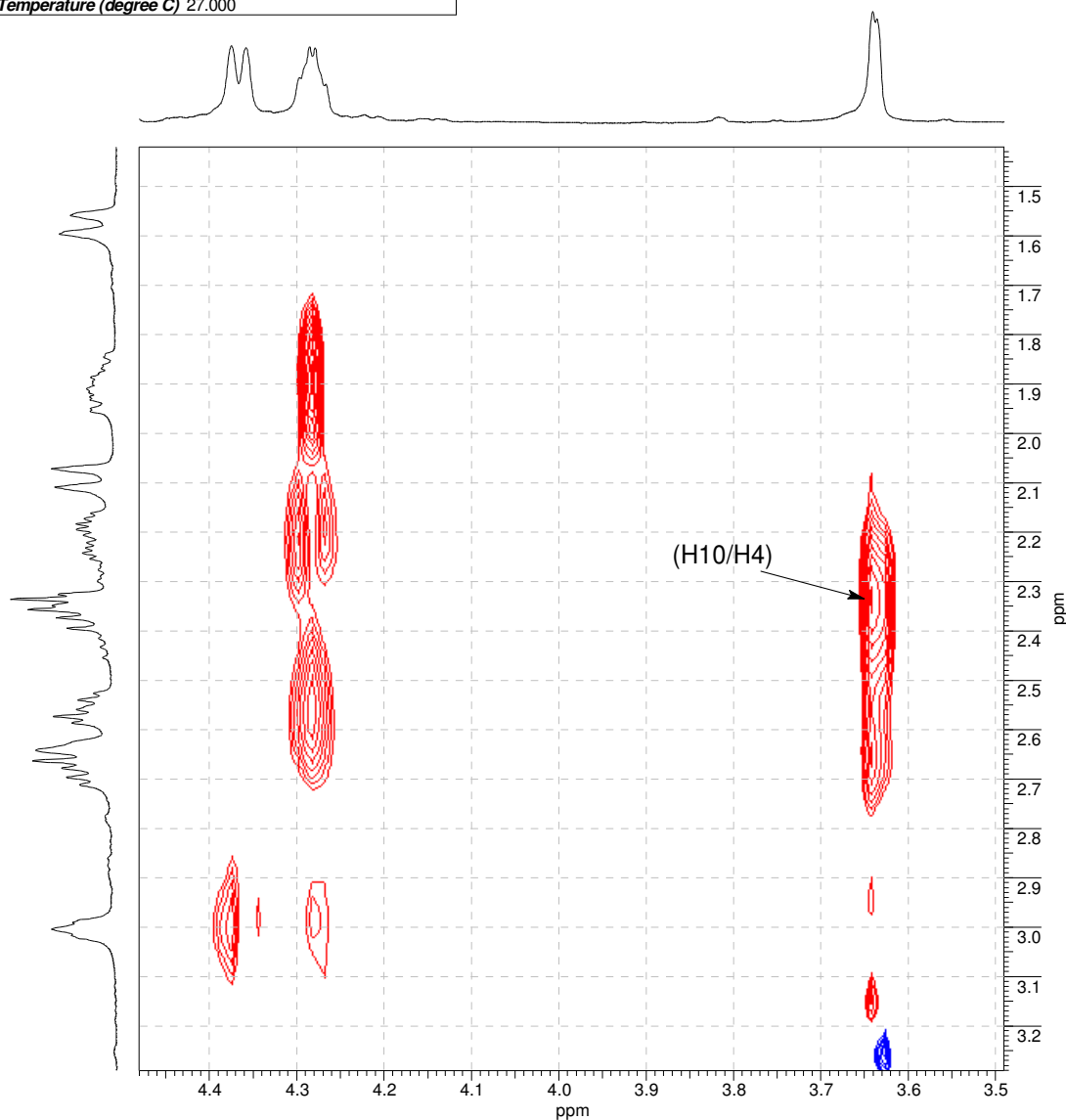
Date	25 Mar 2009 10:51:06	Acquisition Time (sec)	(0.2195, 0.2195)
Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)	Nucleus	(1H, 1H)
Number of Transients	20	Original Points Count	(1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	noesygpph
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(4664.18, 4664.18)
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 26: Mapa de correlações espaciais ^1H - ^1H obtido a partir do experimento gNOESY do composto **21**.

Resultados e discussão

Date	25 Mar 2009 11:51:06	Acquisition Time (sec)	(0.2195, 0.2195)
Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)	Nucleus	(1H, 1H)
Number of Transients	20	Original Points Count	(1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	noesygpph
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(4664.18, 4664.18)
Temperature (degree C)	27.000		



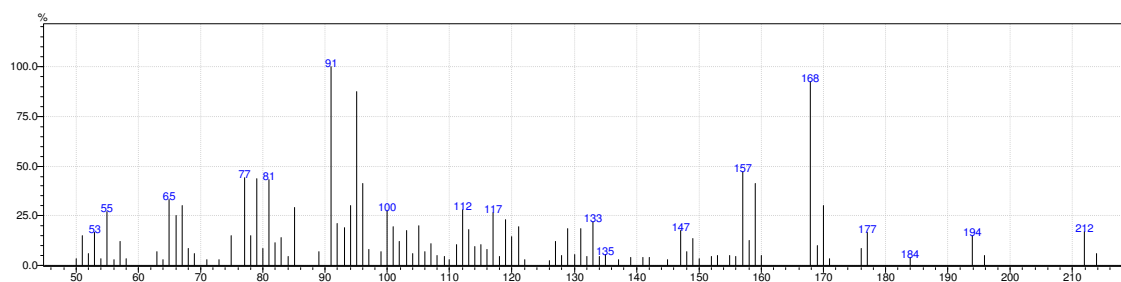
Espectro 27: Ampliação do mapa de correlações do experimento gNOESY do composto 21.

Resultados e discussão

Tabela 9: Atribuição dos deslocamentos químicos (δ [ppm]) aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C), multiplicidade, constantes de acoplamento $J(^1\text{H}, ^1\text{H})$, $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ do gHMBC e correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do gCOSY e gNOESY do composto **21**.

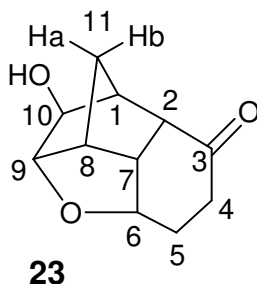
	DEPT	gHSQC		gHMBC		gCOSY			gNOESY
		$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$ [m , J (Hz), integral relativa]	2J	3J	2J	3J	4J	
1	CH	49,6	2,65 – 2,72 (m , 1H)	H10/ H2	H8/ H7			H8	H11a/ H11b
2	CH	42,5	2,65 – 2,30 (m , 1H)		H4a/ H4b		H7		
3	C	211,8	-----	H4a/ H4b/ H2	H5b	-----	-----	----	-----
4a	CH ₂	33,8	a) 2,33-2,40	H5a/ H5b	H2		H5a/ H5b		H5a
4b			b) 2,33-2,40				H5a/ H5b		H5a
5a	CH ₂	26,1	a) 1,85-1,96 (m , 1H)	H4a/ H4b		H5b	H4a/ H4b / H6		H4a/ H4b
5b			b) 2,17-2,26			H5a	H4a/ H4b/ H6		H4a/ H4b
6	CH	75,7	4,30 (m , 1H)	H7/ H5b			H7/ H5a/ H5b		H5a/ H5b/ H7
7	CH	46,9	2,53-2,59 (m , 1H)	H8	H11a/ H11b		H8/ H2		
8	CH	48,4	3,01 (m , 1H)	H7/ H9/ H10			H7		H11a/ H11b
9	CH	88,2	4,38 (d , $J=4,9$, 1H ₂)	H10	H11b/ H7		H8		H8
10	CH ₂	63,9	3,65 (m , 1H)	H11a/ H11b	H8		H11b/ H1		H1/ H4
11a	CH ₂	35,2	a) 2,10 (d , $J=11,0$, 1H)	H10	H7/ H2	H11b	H1/ H8		H8/ H1
11b			b) 1,59 (d , $J=11,0$, 1H)			H11a	H1/ H8		H8/ H1

Resultados e discussão



Espectro 28: Espectro de massas do composto **21**.

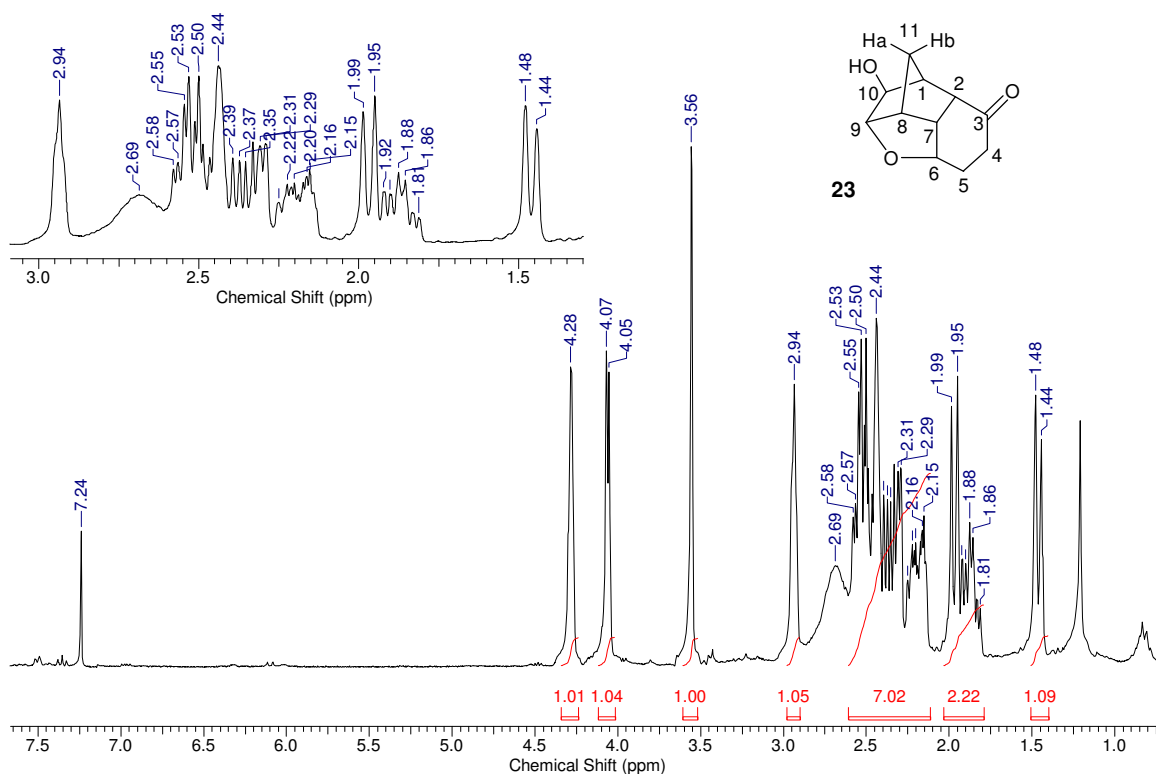
3.5.5. *rel*-(4*S*,5*S*,6*S*,8*S*,1*R*,2*R*,12*R*)-5-Hidróxi-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ona (23)



O espectro de massas confirma a transformação pela observação do pico do íon molecular em $m/z = 194$, como esperado. A identificação deste composto foi baseada na comparação dos espectros do material de partida, bem como nos derivados iodados e clorados já obtidos como mostrado na tabela 16-18 e espectros 28-34. No espectro de RMN de ^1H foi possível de identificar os H8, H8, H9 e H11a e H11b, sendo que H9 aparece mais protegido que nos outros derivados, observando-se seu padrão de acoplamento. O espectro de RMN de ^{13}C mostra onze carbonos, sendo que em δ 213,4 ppm sinal característico do carbono da carbonilica da cetona e no DEPT 135, observou-se três sinais de carbonos metilênicos. O sinal de C10 foi confirmado por experimento de gHSQC observando-se sinal em δ 77,1 ppm, mais desprotegido como se esperava. Ainda, pelo espectro gHSQC foi possível identificar cada hidrogênio correlacionado diretamente ao seu carbono (tabela 17 e espectros 30 e 31). O espectro gCOSY foi importante para conferir a correlação $^1\text{H}/^1\text{H}$ e observação de acoplamento em W dos H10 com H11b (espectro 33). O espectro gNOESY mostrou a proximidade do H10 com H4 (espectro 34).

Resultados e discussão

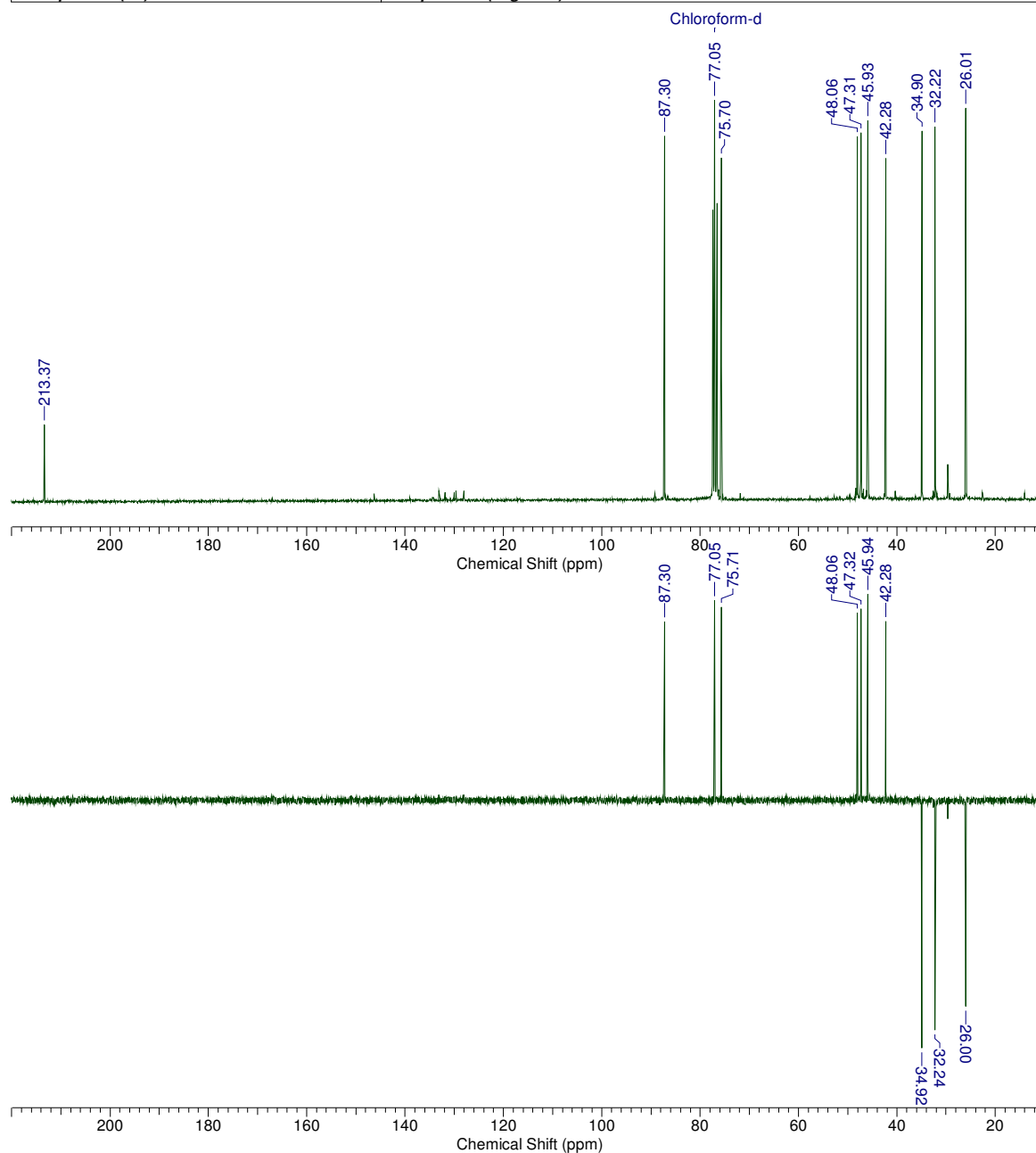
Acquisition Time (sec)	7.0255	Date	13 Feb 2009 08:15:20
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H
Number of Transients	8	Original Points Count	32768
Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4664.18
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 29 de: Espectro RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **23**.

Resultados e discussão

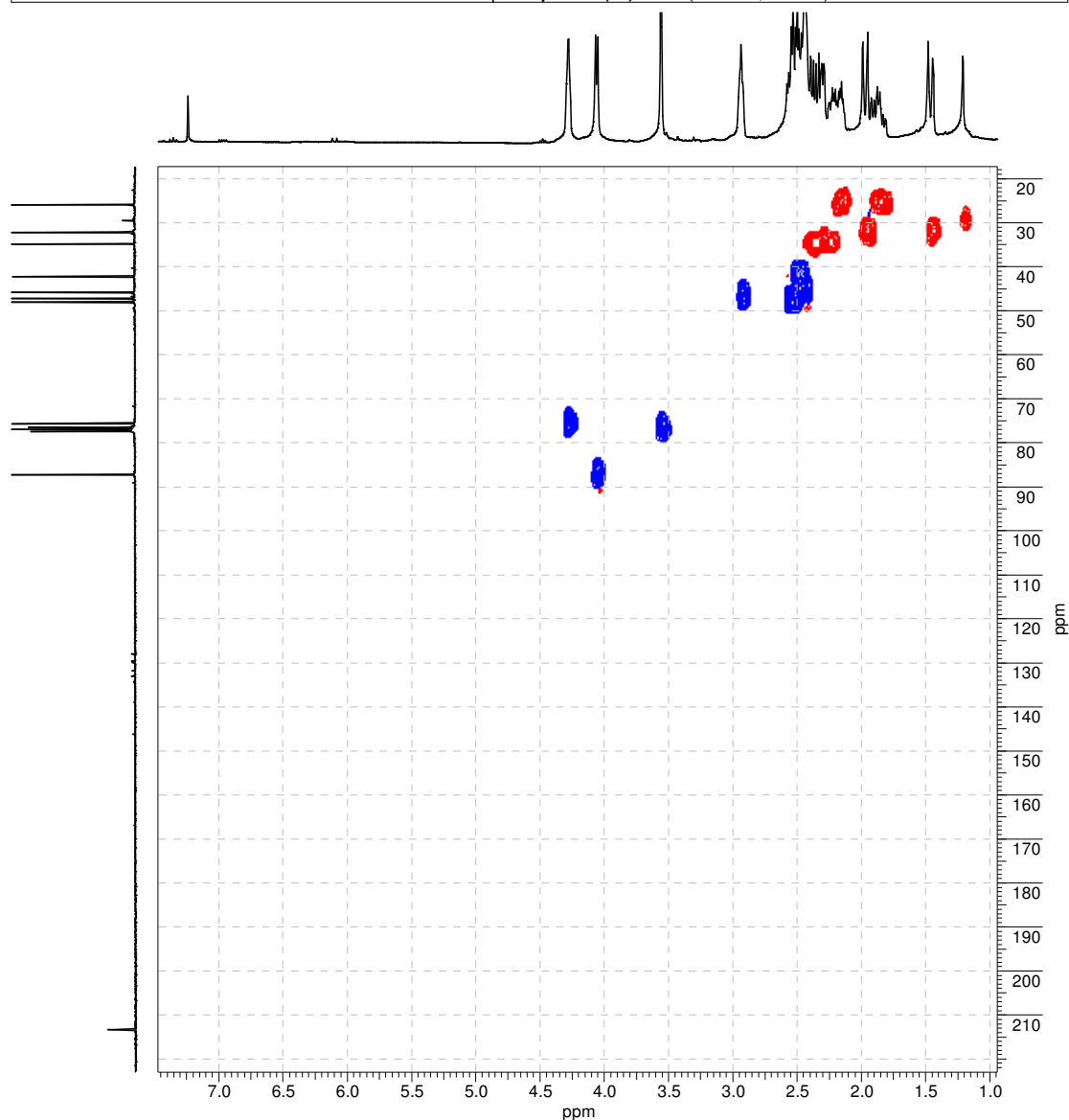
Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	05 Mar 2009 20:44:20
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	¹³ C
Original Points Count	16384	Points Count	32768
Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	CHLOROFORM-D
Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



Espectro 30: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **23**. Espectro acima: Totalmente desacoplado. Espectro abaixo: DEPT 135° , $\uparrow$ (CH , CH_3); $\downarrow$ (CH_2).

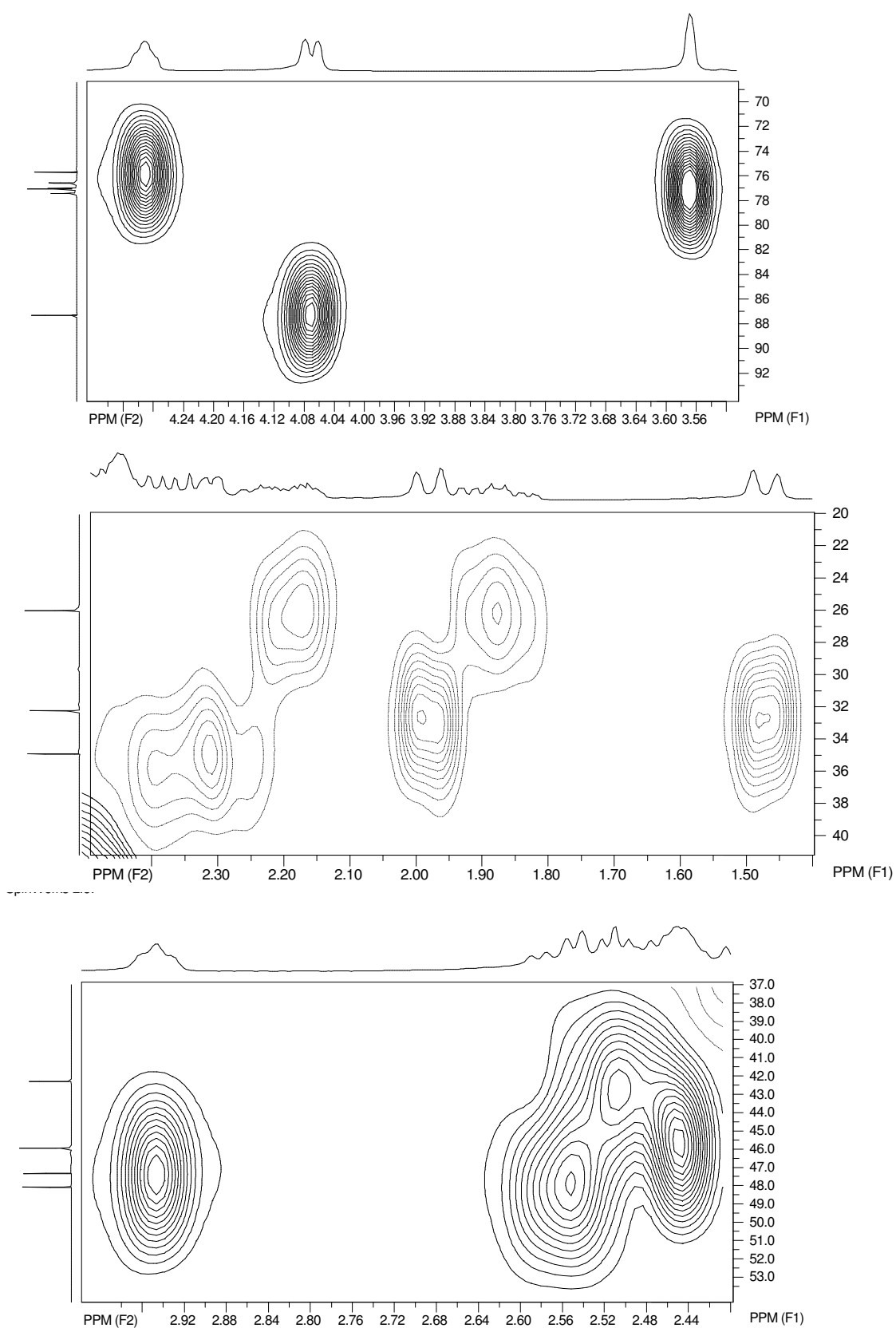
Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	(0.0544, 0.2195)	Temperature (degree C)	27.000
Date	31 Mar 2009 10:08:32	Nucleus	(13C, 1H)
Frequency (MHz)	(75.47, 300.13)	Original Points Count	(1024, 1024)
Number of Transients	40	Pulse Sequence	hsqcetgpg
Points Count	(1024, 1024)	Sweep Width (Hz)	(18832.39, 4664.18)
Solvent	CDCl3		



Espectro 31: Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C diretamente ligados, obtido a partir do experimento gHSQC do composto **23**.

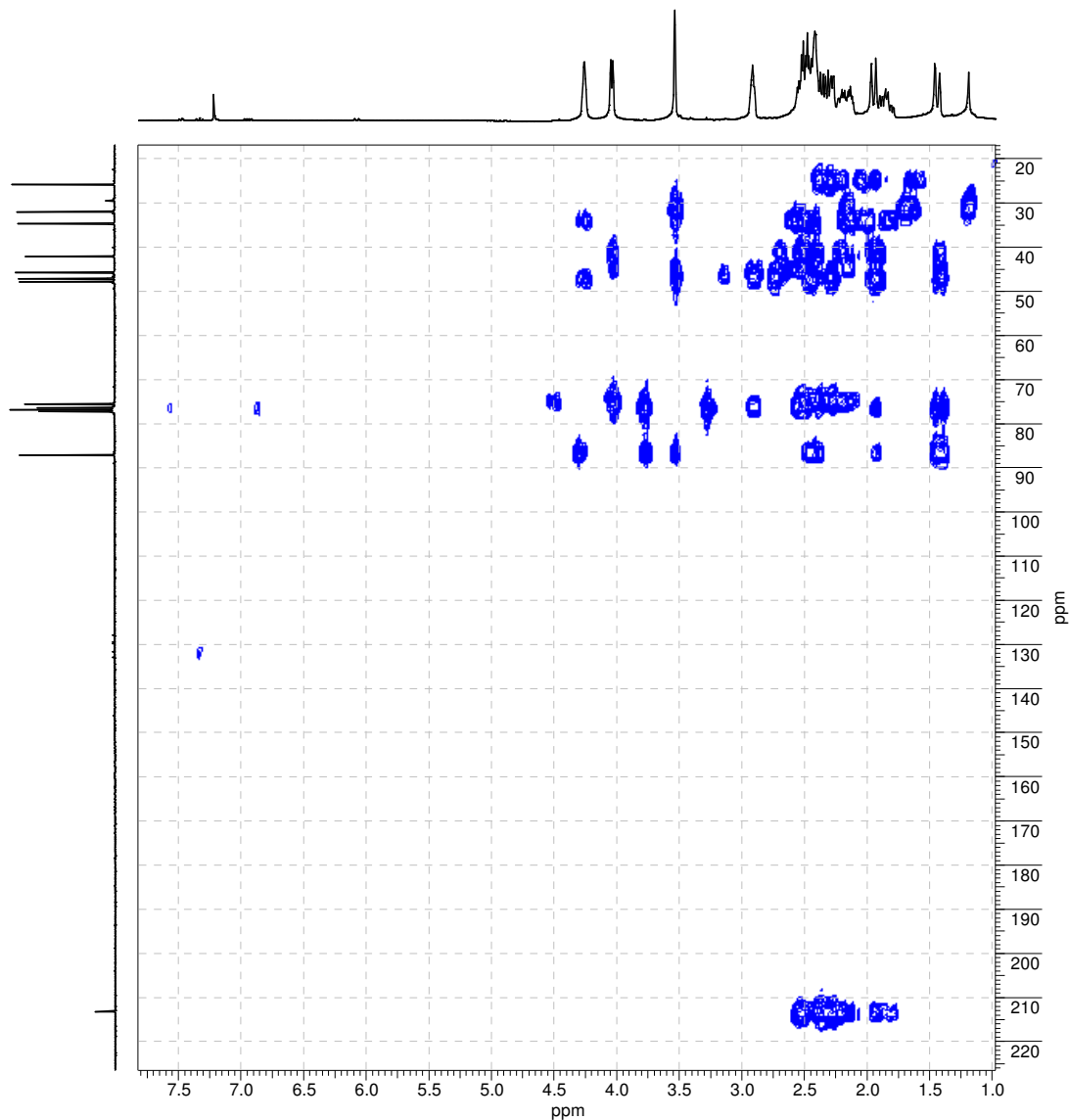
Resultados e discussão



Espectro 32: Ampliação do mapa de correlações do experimento gHSQC do composto **23**.

Resultados e discussão

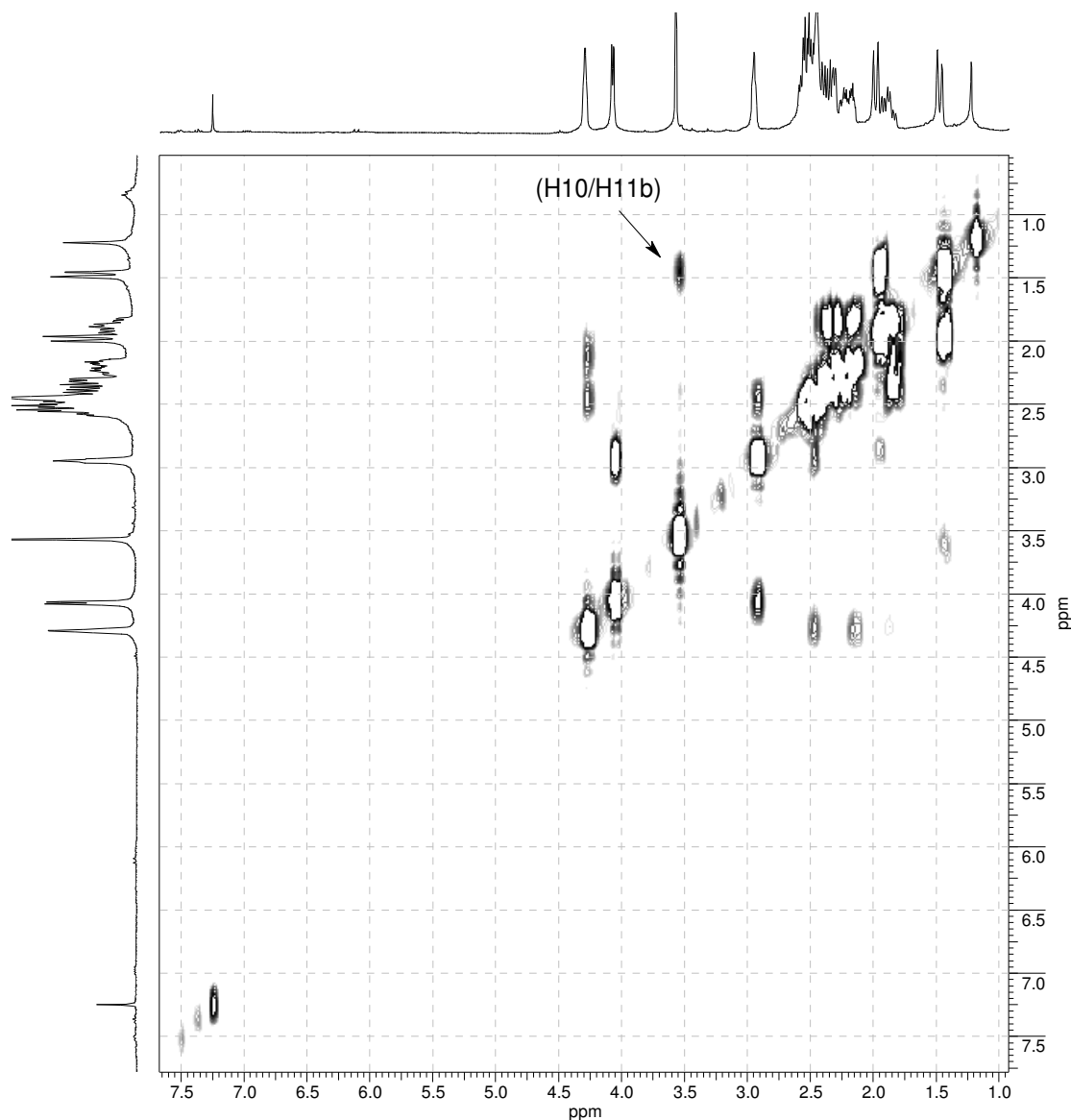
Acquisition Time (sec)	(0.0544, 0.2195)	
Date	31 Mar 2009 13:13:04	Temperature (degree C) 27.000
Frequency (MHz)	(75.47, 300.13)	Nucleus (13C, 1H)
Number of Transients	64	Original Points Count (1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence hmbcgpndgf
Solvent	CDCl3	Sweep Width (Hz) (18832.39, 4664.18)



Espectro 33: Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância, obtido pelo experimento gHMBC do composto **23**.

Resultados e discussão

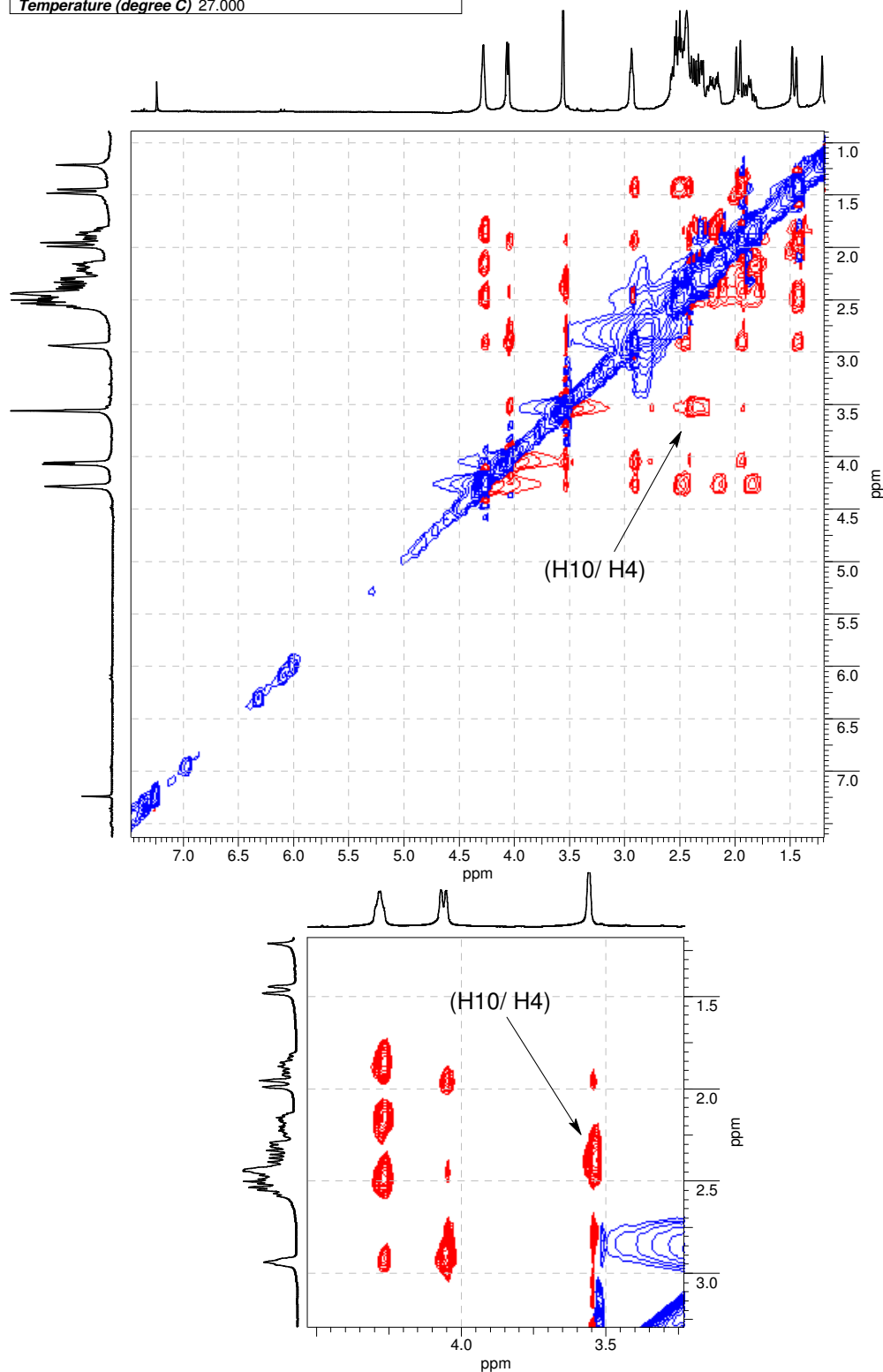
Acquisition Time (sec)	(0.2195, 0.2195)	Temperature (degree C)	27.000
Date	31 Mar 2009 08:37:24	Nucleus	(1H, 1H)
Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)	Original Points Count	(1024, 1024)
Number of Transients	16	Pulse Sequence	cosygpgqf
Points Count	(1024, 1024)	Sweep Width (Hz)	(4664.18, 4664.18)
Solvent	CDCl ₃		



Espectro 34: Mapa de correlações homonuclear ^1H - ^1H obtido a partir do experimento gCOSY do composto **23**.

Resultados e discussão

Date	28 Apr 2009 14:07:02	Acquisition Time (sec)	(0.2195, 0.2195)
Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)	Nucleus	(1H, 1H)
Number of Transients	8	Original Points Count	(1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	noesygpph
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(4664.18, 4664.18)
Temperature (degree C)	27.000		



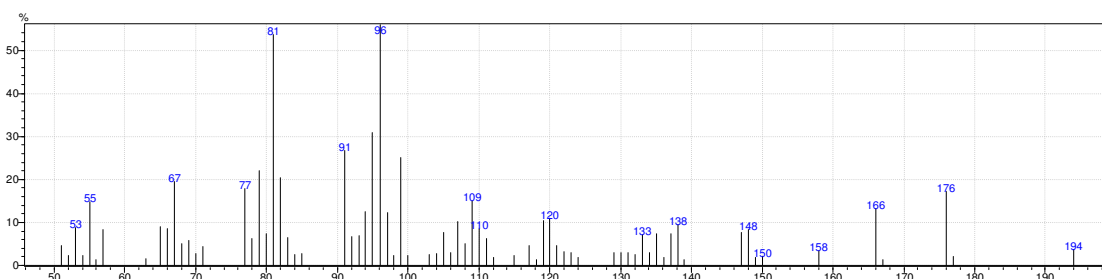
Espectro 35: Mapa de correlação espacial ^1H - ^1H obtido a partir do experimento gNOESY do composto **23** e ampliação.

Resultados e discussão

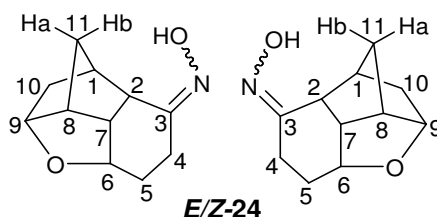
Tabela 10: Atribuição dos deslocamentos químicos (δ [ppm]) aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C), multiplicidade, constantes de acoplamento $J(^1\text{H}, ^1\text{H})$, $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ do gHMBC e correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do gCOSY e gNOESY do composto **23**.

		gHSQC		gHMBC		gCOSY			gNOESY
	DEPT	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$ [<i>m</i> , <i>J</i> (Hz), integral relativa]	2J	3J	2J	3J	4J	
1	CH	48,1	2,43-2,46 (<i>m</i> , 1H)	H11a/ H11b		H11a/ H11b		H8	H11a, H11b
2	CH	42,3	2,49-2,56 (<i>m</i> , 1H)	H7					H7
3	C	213,4	-----	H2/ H4a/ H4b		-----	----	----	-----
4a	CH ₂	32,2	2,29-2,39 (<i>m</i> , 1H)			H5a			H5a, H5b,H10
4b			2,13-2,25 (<i>m</i> , 1H)	H2		H5a			H5a, H5b, H10
5a	CH ₂	26,0	2,13-2,25 (<i>m</i> , 1H)	H4a/H4b			H6		H5b, H6,
5b			1,81-1,92 (<i>m</i> , 1H)				H6		H5a, H6
6	CH	75,7	4,28 (<i>m</i> , 1H)	H4a/H4b		H7, H5a, H5b			H5a, H5b, H7
7	CH	45,9	2,93 (<i>m</i> , 1H)	H9		H6			H6
8	CH	47,3	2,49-2,56 (<i>m</i> , 1H)	H11a/ H11b	H10	H9, H11a, H11b		H1	H7, H9, H11a, H11b
9	CH	87,3	4,07 (<i>d</i> , <i>J</i> =5,0, 1H)	H10	H7/H6	H8			H8, H11a
10	CH	77,1	3,56 (<i>m</i> , 1H)	H11b				H11b	H4a, H4b, H9
11a	CH ₂	34,9	a) 1,97 (<i>d</i> , <i>J</i> =11,0, 1H)	H1, H8		H11b	H1		H1, H11b
11b			b) 1,46 (<i>d</i> , <i>J</i> =11,0, 1H)			H11a	H1, H10		H1, H11a

Resultados e discussão



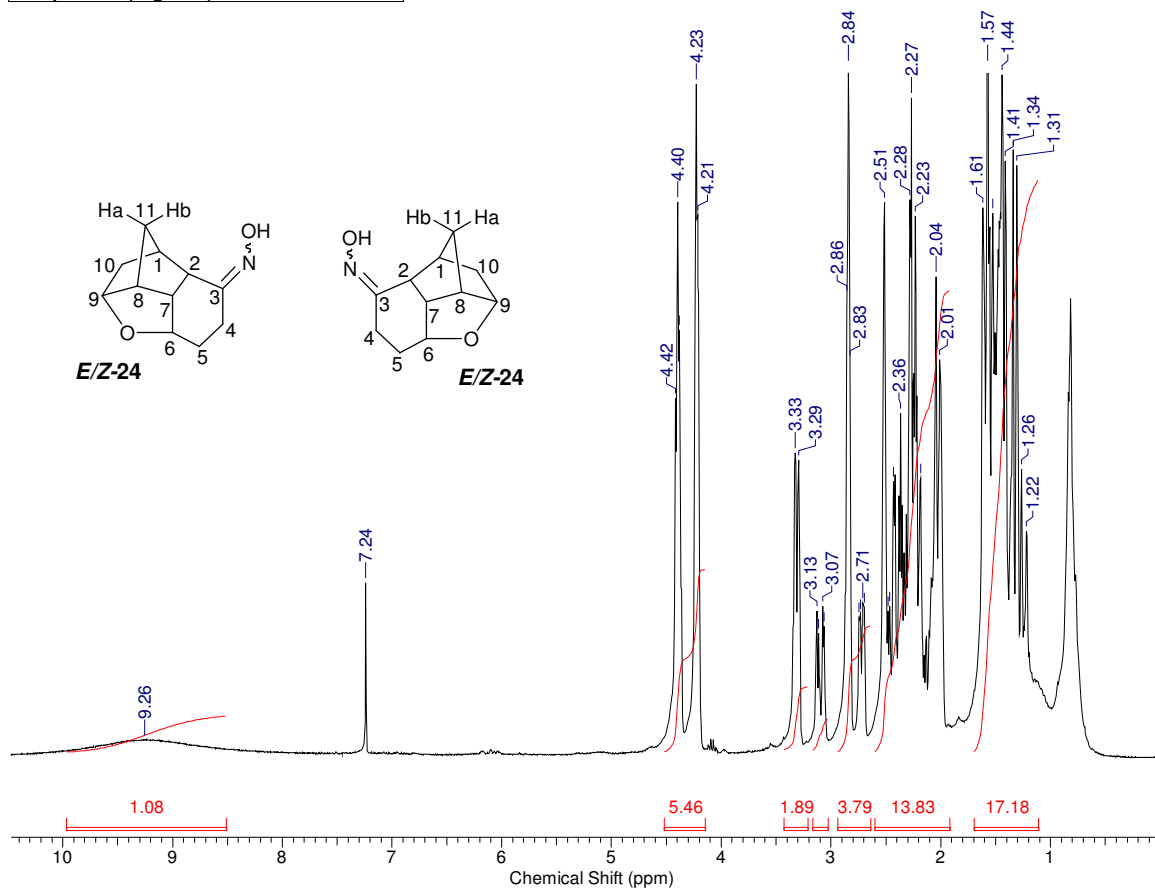
Espectro 36: Espectro de massas do composto **23**.

3.5.6. Oxima *E*-24 e/ou *Z*-24

Nos espectros de RMN (^1H e ^{13}C) desta oxima, nota-se a presença de mistura de isômeros *E* e *Z*, observando-se sinais duplicados em seus espectros. No espectro de RMN de ^1H observam-se sinais em δ 4,41 e 4,24 referentes aos H9 e H6, respectivamente. Ainda nota-se a presença de um singlete largo em δ 8,25 referente ao grupo OH confirmando a transformação do composto **14** para **24**. Os hidrogênios da ponte apresentam-se como dubleto em δ 1,60 (11a) e δ 1,34 (11b) com $J=11,1$ Hz. A transformação deste composto também é verificada no espectro de RMN de ^{13}C com a presença de sinal em δ 160,3 (configuração *Z*) e δ 160,7 (*E*) indicativo de $\text{C}=\text{N}$ de oximas e ausência deste no DEPT 135. No espectro de DEPT, observam-se quatro sinais de CH_2 duplicados referentes a carbonos da ponte C11 (δ 37,5), C4 (δ 24,2), C5 (26,7) e C10 (36,9) do isômero majoritário *Z*. Os sinais majoritários em δ 79,7 e δ 75,5 referem-se aos carbonos H9 e H6, respectivamente e os sinais δ 36,9, δ 40,9, δ 37,2 e δ 48,6 indicam os H1, H2, H7 e H8.

Resultados e discussão

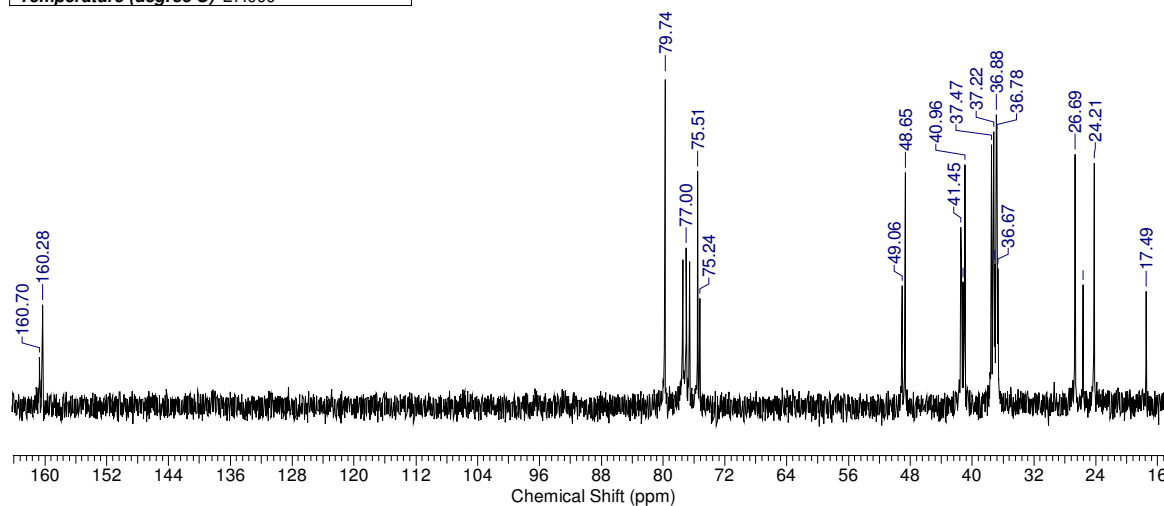
Acquisition Time (sec)	7.0255	Date	13 Apr 2009 10:22:06
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H
Number of Transients	8	Original Points Count	32768
Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4664.18
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 37: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, Cdc13) do composto **24** com mistura dos isômeros *E* e *Z*.

Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	13 Apr 2009 13:37:44
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	¹³ C
Number of Transients	455	Original Points Count	16384
Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
Temperature (degree C)	27.000		



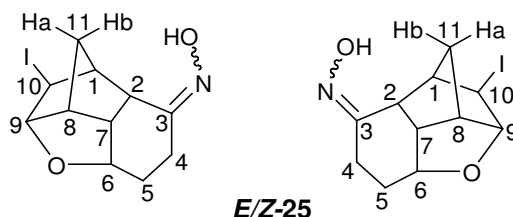
Espectro 38: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **24** com mistura do isômeros *E* e *Z*. Espectro acima: Totalmente desacoplado. Espectro abaixo: DEPT 135⁰, ↑ (CH, CH₃); ↓ (CH₂).

Resultados e discussão

Tabela 11: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto **24**.

posição	[$\delta(^1\text{H})$, multiplicidade (Hz), integral relativa]	$\delta(^{13}\text{C})$		DEPT
		E	Z	
1*	2,28 (m, 1H)	41,4	37,2	CH
2**	3,32 (m, 1H)	41,2	36,9	CH
3	-----	160,7	160,3	C
4***	2,19-2,22 (m, 1H) 2,25-2,27 (m, 1H)	17,5	24,2	CH ₂
5***	1,45-1,57 (m, 1H) 2,02-2,10 (m, 1H)	25,6	26,7	CH ₂
6	4,24 (m, 1H)	75,2	75,5	CH
7**	2,52 (m, 1H)	41,5	40,9	CH
8*	2,90 (m, 1H)	49,1	48,6	CH
9	4,41 (d, J=4,75, 1H)	79,7	79,7	CH
10	a) 1,43 (m, 1H) b) 1,53 (m, 1H)	36,7	36,9	CH ₂
11	a) 1,60 (d, J=11,1, 1H) b) 1,34 (d, J=11,1, 1H)	37,1	37,5	CH ₂
-OH	9,26 (sl, 1H)	-----	-----	-----

*, **, ***podem estar trocados

3.5.7. Oxima *E*-25 e/ou *Z*-25

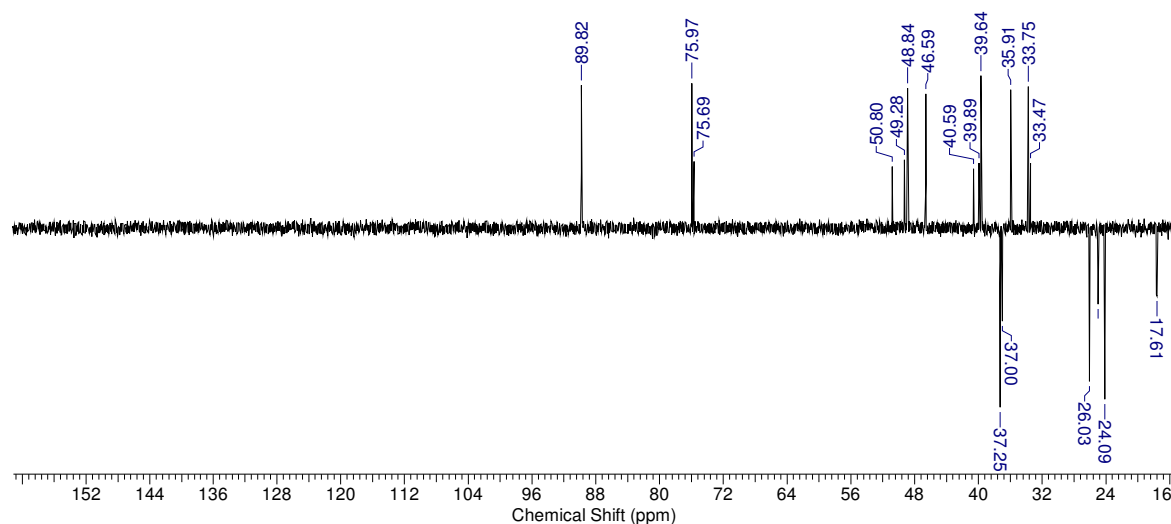
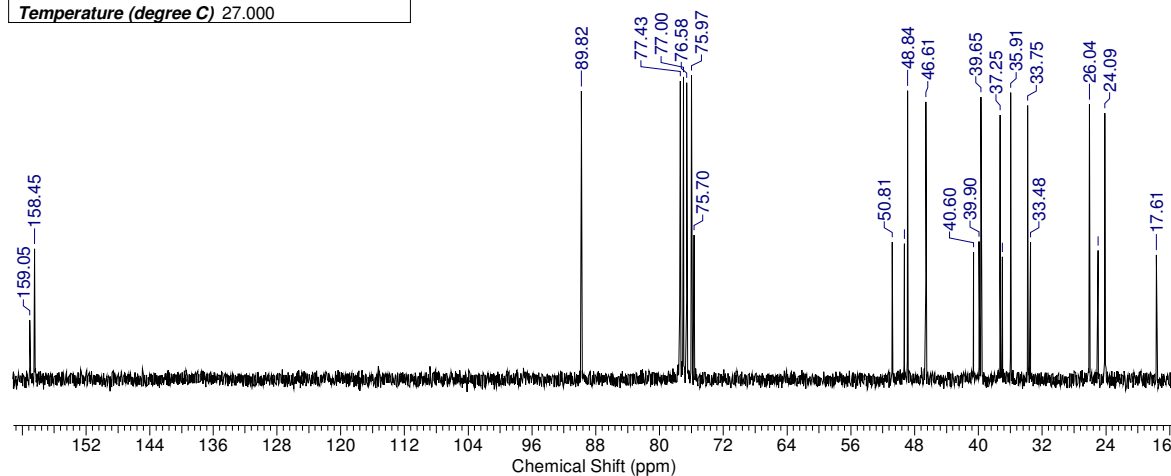
Como no caso anterior, os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C apresentam a mistura de isômeros, devido aos sinais duplicados observados. A transformação do material de partida **20** para o **25** é sugerida pela presença de singlete largo em 9,18 referente a grupo OH no espectro de RMN de ^1H e no espectro de RMN de ^{13}C notamos a presença de sinais em δ 158,5 (*Z*) e 159,1 (*E*) referentes a $\text{C}=\text{N}$ e a sua ausência deste no DEPT 135. Os sinais em δ 4,80, δ 4,22 e δ 3,83 foram atribuídos aos hidrogênios H9, H6 e H10, respectivamente. Os hidrogênios da ponte apresentam-se como dubletos em δ 2,19 e δ 1,83 (com $J=11,0$ Hz). No espectro de DEPT 135, nota-se a presença de três sinais metilênicos referentes a C4 (δ 26,0), C5 (δ 24,1) e C11 (δ 37,2) do isômero majoritário *Z*. Os sinais δ 89,8 e δ 76,0 do majoritário é indicativo de H9 e H6 com proximidade a átomo de oxigênio e os sinais δ 48,8, δ 39,6, δ 35,9 e δ 46,6 são atribuídos aos C1, C2 C7 e C8, respectivamente.

Figure 1 displays two ^1H NMR spectra of compound **E/Z-25**. The top spectrum is recorded in CDCl_3 and shows peaks in the aliphatic region (1.4–2.6 ppm). The bottom spectrum is recorded in $\text{DMSO}-d_6$ and shows peaks across a wider range (1.2–9.2 ppm), including a broad peak at 9.18 ppm. Integration values are provided below the peaks in red. Chemical structures of **E/Z-25** are shown above the spectra, with protons labeled Ha and Hb.

Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	06 Apr 2009 08:32:14
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	¹³ C
Number of Transients	930	Original Points Count	16384
Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
Temperature (degree C)	27.000		



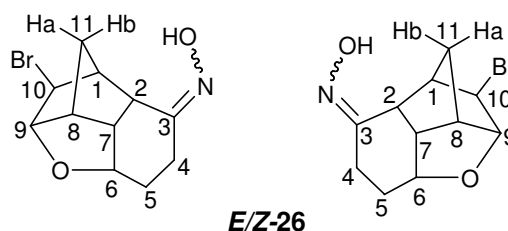
Espectro 40: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **25** com mistura do isômeros *E* e *Z*. Espectro acima: Totalmente desacoplado. Espectro abaixo: DEPT 135°, ↑ (CH, CH₃); ↓ (CH₂).

Resultados e discussão

Tabela 12: Atribuição dos deslocamentos químicos (δ) aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto **25**.

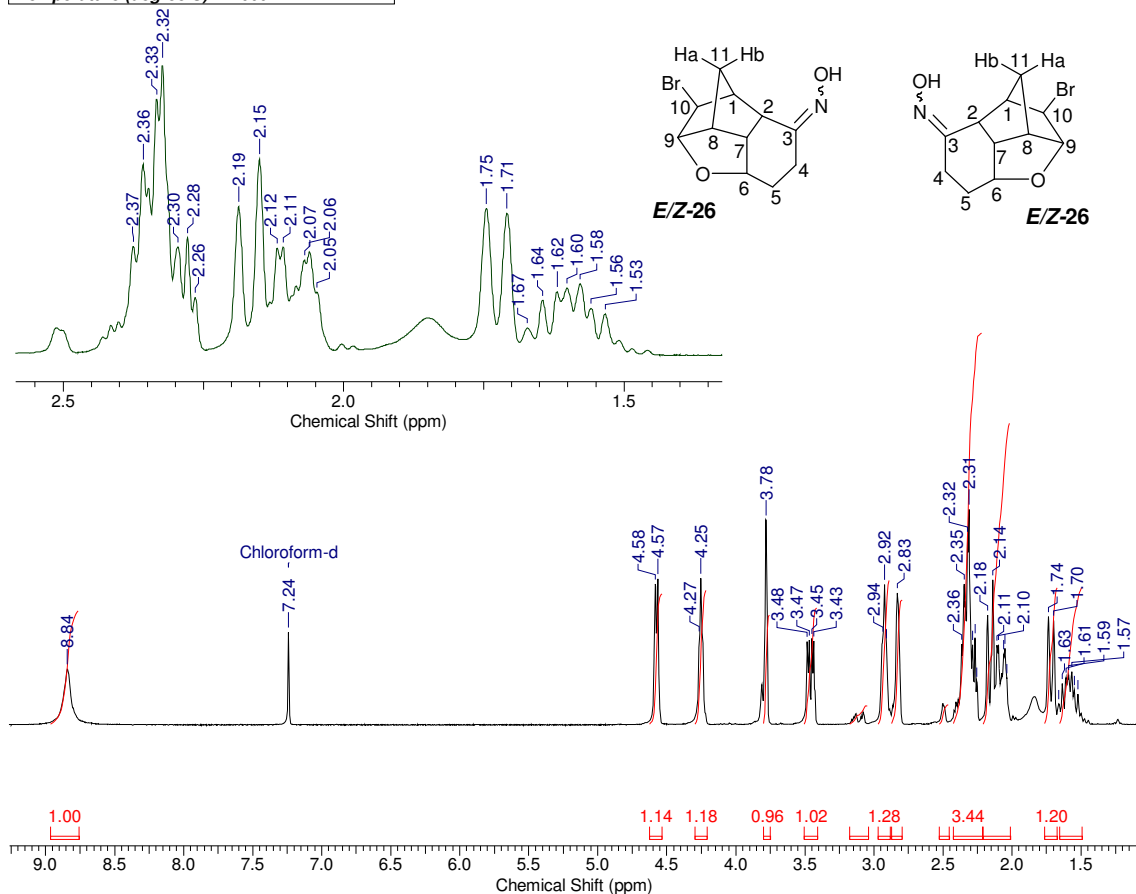
posição	[$\delta(^1\text{H})$, multiplicidade (Hz), integral relativa]	$\delta(^{13}\text{C})$		DEPT
		E	Z	
1*	2,54 (m, 1H)	50,8	48,8	CH
2**	3,44 (m, 1H)	40,6	39,6	CH
3	-----	159,1	158,5	C
4***	a) 2,27 – 2,38 (m, 1H) b) 2,27 – 2,38 (m, 1H)	17,6	24,1	CH ₂
5***	a) 1,46 – 1,64 (m, 1H) b) 2,04 – 2,11 (m, 1H)	25,0	26,0	CH ₂
6	4,22 (m, 1H)	75,7	76,0	CH
7**	2,32 (m, 1H)	39,9	35,9	CH
8*	2,86 (m, 1H)	49,3	46,6	CH
9	4,80 (d, J=4,82, 1H)	89,8	89,8	CH
10	3,83 (d, J=2,37, 1H)	33,8	33,7	CH
11	a) 2,19 (d, J=11,0, 1H) b) 1,83 (d, J=11,0, 1H)	37,0	37,2	CH ₂
-OH	9,18 (sl, 1H)	-----	-----	-----

*, **, ***podem estar trocados

3.5.8. Oxima *E*-26 e/ou *Z*-26

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiu-nos observar que se trata de uma mistura. A transformação do composto **15** para **26** é confirmada pela presença de singlete largo em δ 8,84 no espectro de RMN de ^1H e o sinal em δ 158,2 (*Z*) e δ 158,8 (*E*) referentes a $\text{C}=\text{N}$ no espectro de RMN de ^{13}C . O espectro de infravermelho reforça que houve a transformação observando as bandas de absorção de deformação axial em 3211,2 cm^{-1} indicativo da presença de OH e deformação axial de carbonila em 1635,5-1652,9 cm^{-1} referente a $\text{C}=\text{N}$. Ainda no DEPT 135 observa-se três sinais de carbonos metilênicos C4 (δ 26,4), C5 (δ 24,3) e C11 (35,4) do isômero majoritário *Z* e ausência do sinal em δ 158,2 e δ 158,8 de carbono quaternário. Os carbonos majoritários mais desblindados em δ 88,8, δ 76,3 e δ 55,4 foram atribuídos a C9, C6 e C10, respectivamente e δ 48,4, δ 39,3, δ 35,9 e δ 45,7 foram atribuídos a C1, C2, C7 e C8 do isômero de configuração *Z*.

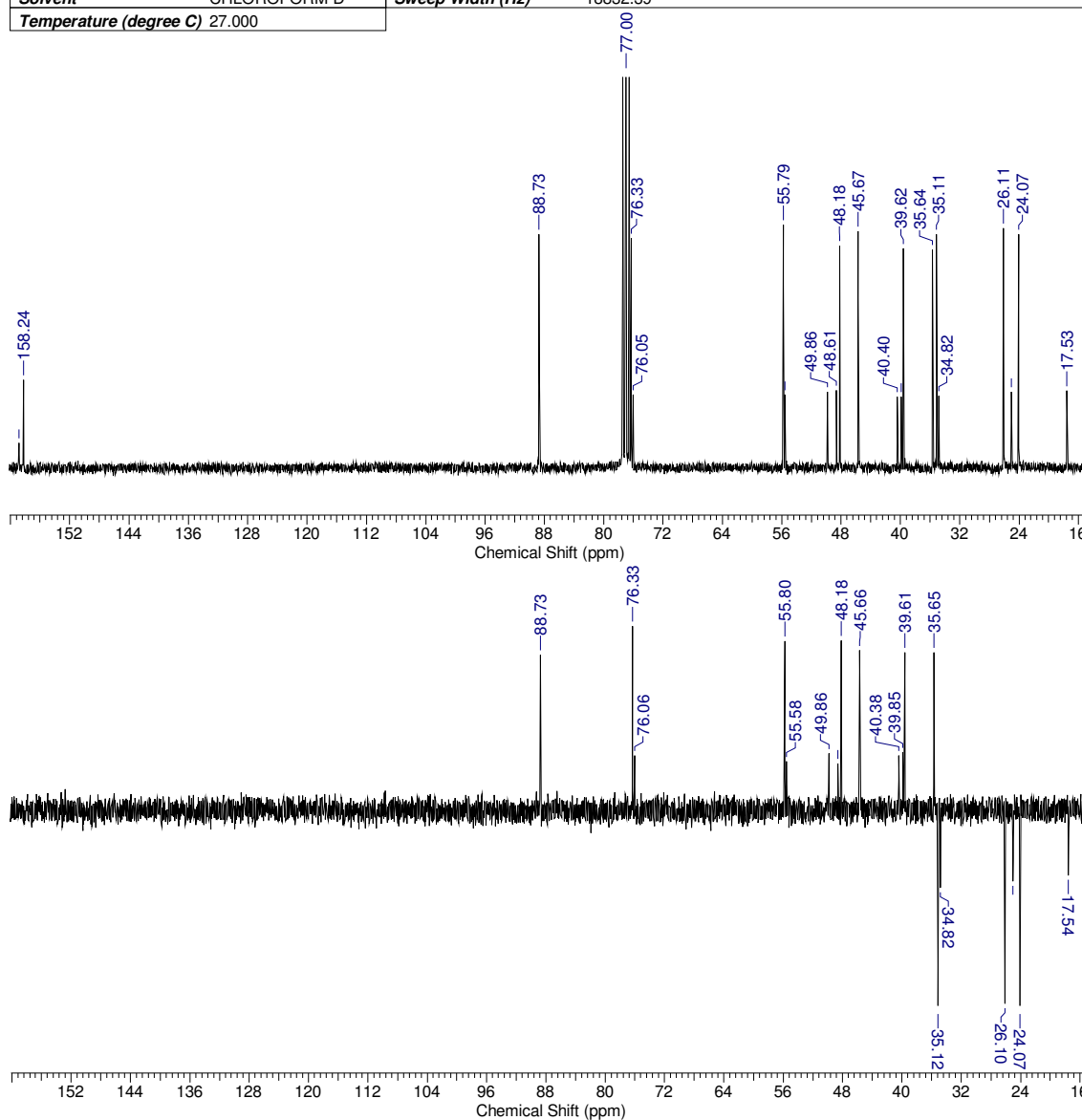
Acquisition Time (sec)	7.0255	Date	18 Mar 2009 08:46:28
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H
Number of Transients	8	Original Points Count	32768
Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4664.18
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 41: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **26** com mistura de isômeros *E* e *Z*.

Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	02 Apr 2009 16:43:28
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	^{13}C
Number of Transients	3870	Original Points Count	16384
Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
Temperature (degree C)	27.000		



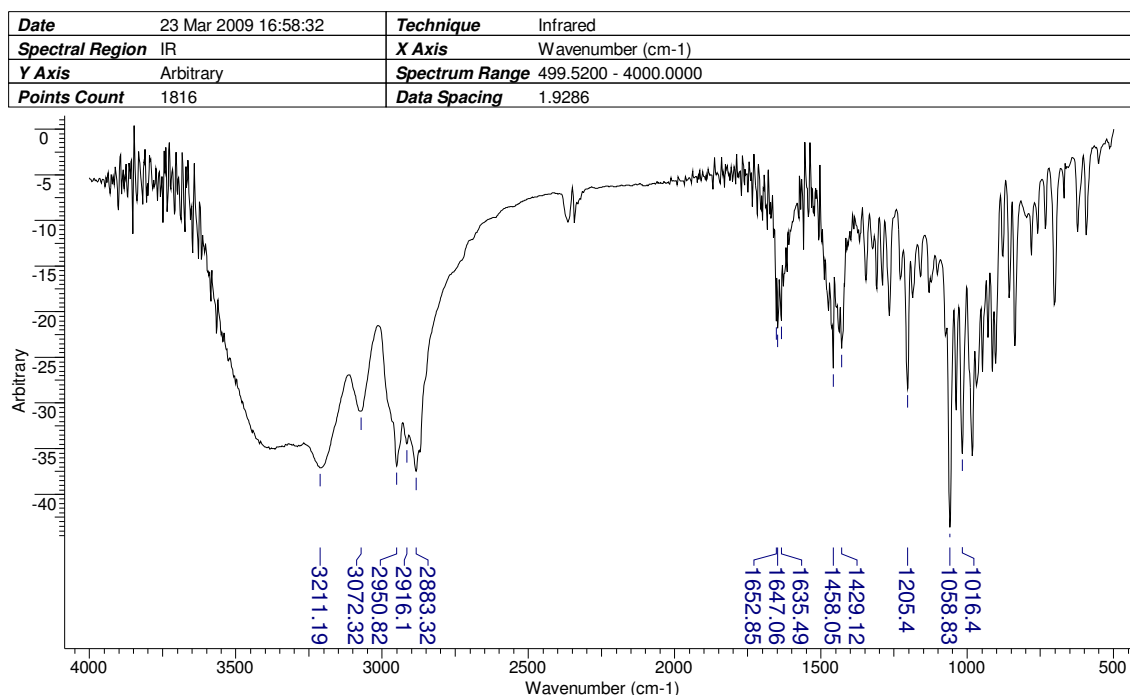
Espectro 42: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **26** com mistura do isômeros *E* e *Z*. Espectro acima: Totalmente desacoplado. Espectro abaixo: DEPT 135° , $\downarrow$ (CH , CH_3); $\uparrow$ (CH_2).

Resultados e discussão

Tabela 13: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto **26**.

posição	$[\delta(^1\text{H}), \text{multiplicidade (Hz), integral relativa}]$	$\delta(^{13}\text{C})$		DEPT
		E	Z	
1*	2,83 (m, 1H)	49,9	48,1	CH
2**	3,46 (m, 1H)	40,4	39,6	CH
3	-----	158,8	158,2	C
4***	a) 2,25 – 2,36 (m, 1H) b) 2,25 – 2,36 (m, 1H)	17,5	24,1	CH ₂
5***	a) 1,52 – 1,66 (m, 1H) b) 2,04 – 2,11 (m, 1H)	25,0	26,1	CH ₂
6	4,25 (m, 1H)	76,1	76,3	CH
7**	2,31 (m, 1H)	39,8	35,7	CH
8*	2,92 (m, 1H)	48,6	45,7	CH
9	4,58 (d, $J=4,77$, 1H)	88,7	88,7	CH
10	3,78 (m, 1H)	55,6	55,8	CH
11	a) 2,16 (d, $J=11,1$, 1H) b) 1,72 (d, $J=11,1$, 1H)	34,8	35,1	CH ₂
-OH	8,84 (sl, 1H)		-----	-----

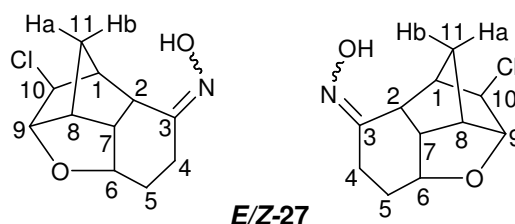
*, **, ***podem estar trocados



Espectro 43: Espectro de infravermelho do composto **26** com mistura dos isômeros *E* e *Z*.

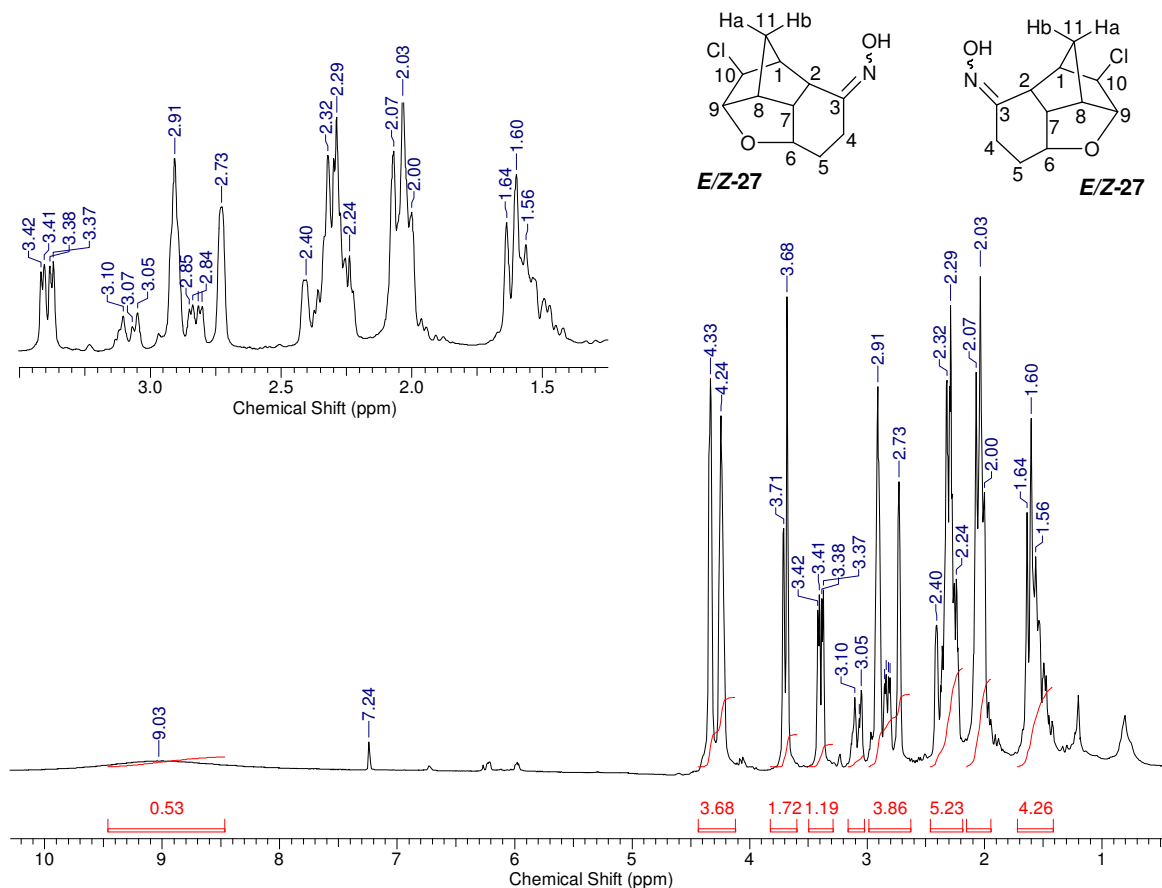
Tabela 14: Atribuição das bandas de absorção de IV a grupos funcionais do composto **26** com mistura dos isômeros *E* e *Z*.

ν_{MAX}	Atribuição
3211,19	Deformação axial de OH
2883,32 – 2950,82	Deformação axial de C-H de alifático
1635,49 – 1652,85	Deformação axial de C=N

3.5.9. Oxima *E*-27 e/ou *Z*-27

O espectro de RMN de ^1H e ^{13}C deste composto chama a atenção devido a presença de sinais duplicados apresentando-se como uma mistura de isômeros *E* e *Z*. A transformação para este composto foi confirmada pela presença de sinal largo de -OH em δ 9,03 no espectro de RMN de ^1H e sinais em δ 158,1 (*Z*) e δ 158,7 (*E*) no espectro de RMN de ^{13}C referente a C=N e ausência deste no DEPT. Pelo DEPT 135 observam-se ainda três sinais de CH_2 referentes a carbonos da ponte (δ 33,8), C4 (δ 26,1) e C5 (δ 23,9) dos sinais do isômero majoritário *Z*. Os C9, C6 e C10 do foram designados como δ 88,6, δ 76,5 e 64,1 por estarem próximos a um átomo eletronegativo e os sinais em δ 47,7, δ 39,6, δ 35,2 e δ 45,3 foram atribuídos como C1, C2, C7 e C8 para o isômero majoritário.

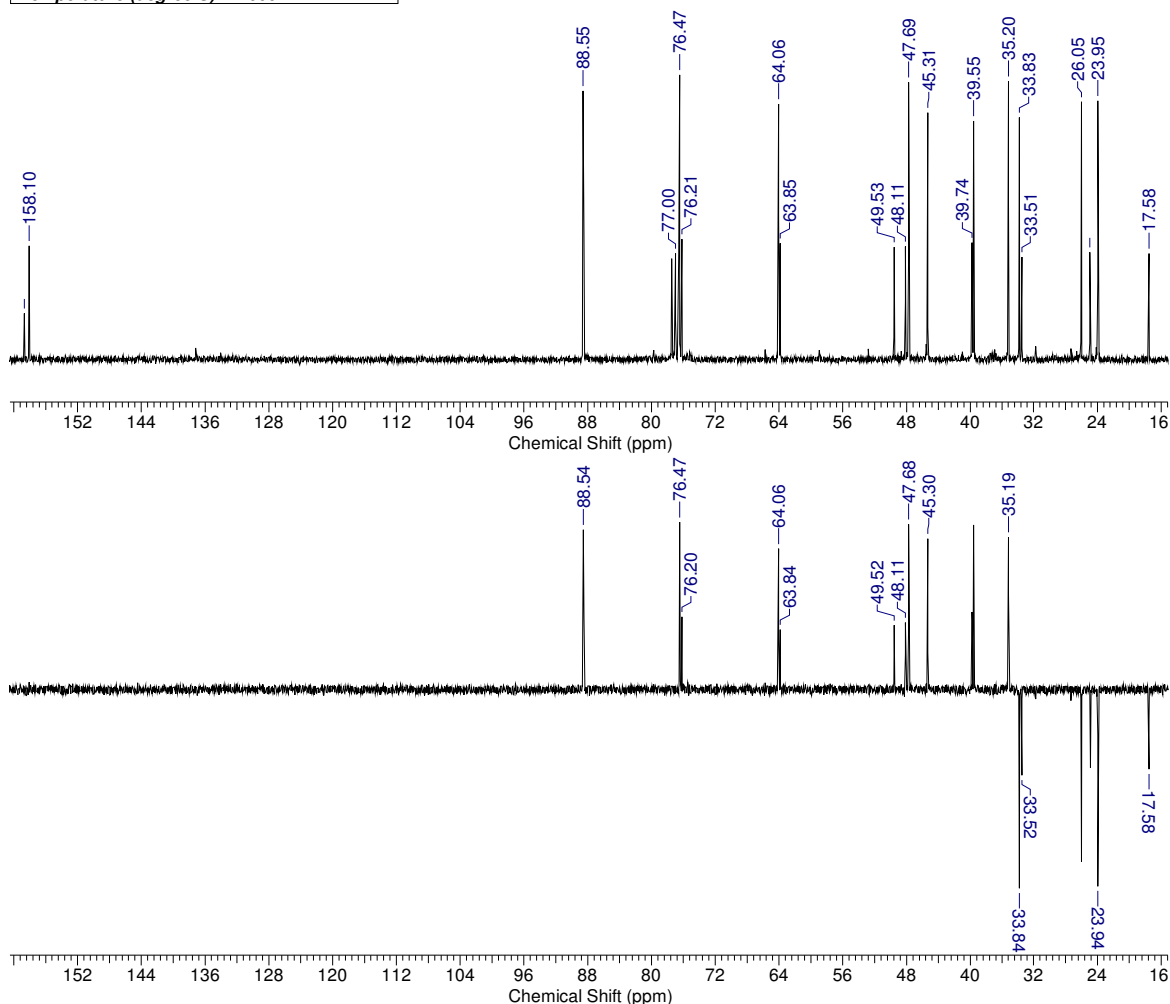
Acquisition Time (sec)	7.0255	Date	13 Apr 2009 10:28:28
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H
Number of Transients	8	Original Points Count	32768
Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4664.18
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 44: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **27** com mistura de isômeros *E* e *Z*.

Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	23 Apr 2009 17:43:34
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	¹³ C
Number of Transients	1030	Original Points Count	16384
Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
Temperature (degree C)	27.000		



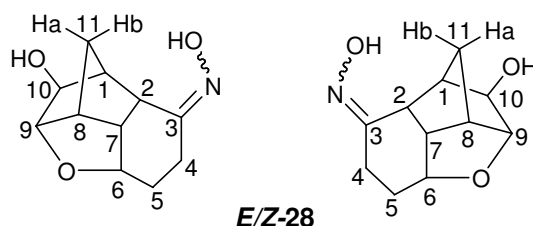
Espectro 45: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **27** com mistura do isômeros *E* e *Z*.

Resultados e discussão

Tabela 15: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto **27**.

posição	$[\delta(^1\text{H}), \text{multiplicidade (Hz), integral relativa}]$	$\delta(^{13}\text{C})$		DEPT
		E	Z	
1 [*]	2,42 (m, 1H)	49,5	47,7	CH
2 ^{**}	3,40 (m, 1H)	39,8	39,6	CH
3	-----	158,7	158,1	C
4 ^{***}	a) 2,24-2,38 (m, 1H) b) 2,24-2,38 (m, 1H)	24,9	26,1	CH ₂
5 ^{***}	a) 1,97-2,05 (m, 1H) b) 1,48-1,57 (m, 1H)	17,6	23,9	CH ₂
6	4,25 (m, 1H)	76,2	76,5	CH
7 ^{**}	2,74 (m, 1H)	39,7	35,2	CH
8 [*]	2,92 (m, 1H)	48,1	45,3	CH
9	4,34 (d, J=4,35, 1H)	88,5	88,6	CH
10	3,69 (m, 1H)	63,9	64,1	CH
11	a) 2,10 (d, J=11,0, 1H) b) 1,59 (d, J=11,0, 1H)	33,5	33,8	CH ₂
-OH	9,03 (sl, 1H)	-----	-----	-----

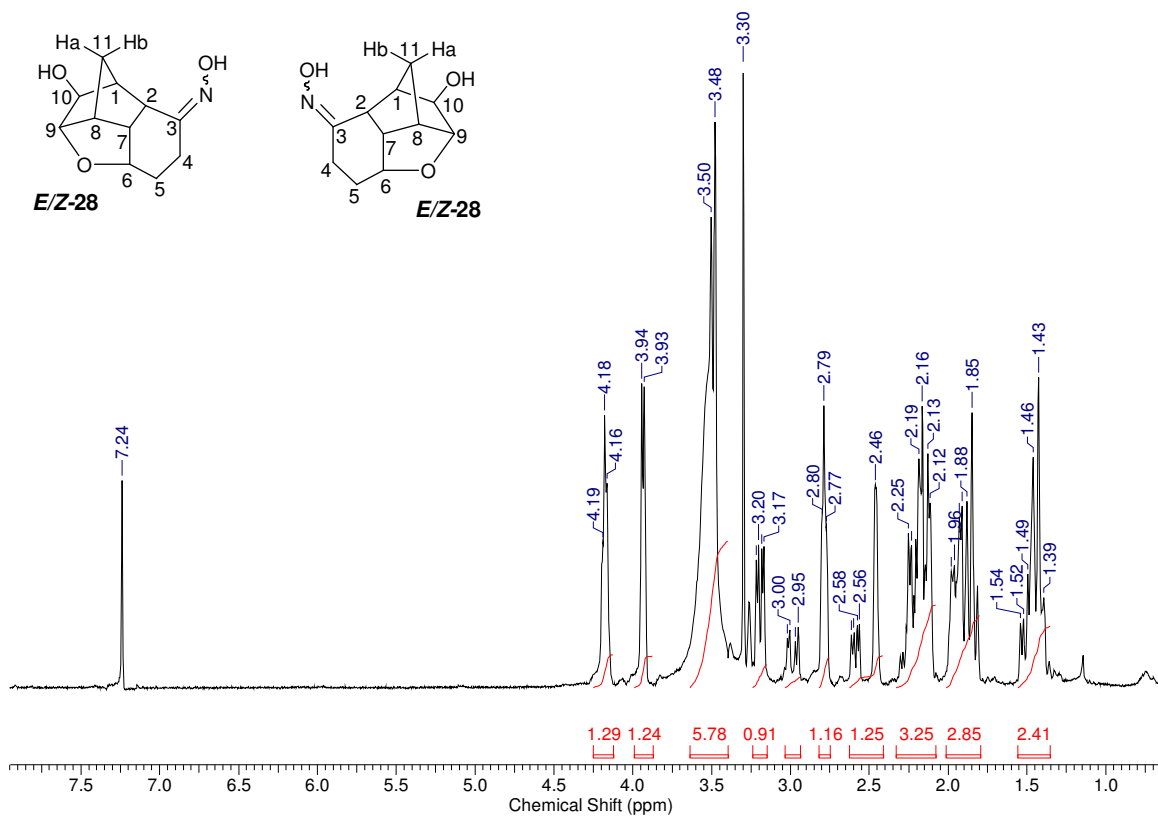
*, **, ***podem estar trocados

3.5.10. Oxima *E*-28 e/ou *Z*-28

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C se apresentam com sinais duplicados tratando-se também de uma mistura de isômeros. A transformação do composto **23** para o composto **28** é conferida com o sinal em δ 2,46 referente ao H1 onde no composto de partida estava sobreposto com outros sinais na região de δ 2,10-2,70 e foi observado o sinal largo de $-\text{OH}$ ligado em C10 em δ 3,50. No espectro de RMN de ^{13}C foi notado os sinais em δ 158,7 (*Z*) e δ 159,3 (*E*) indicativo de $\text{C}=\text{N}$ de oximas e a ausência no DEPT 135. Ainda no DEPT 135 registra sinais de CH_2 do isômero majoritário *Z* em δ 23,9, δ 26,2 e δ 32,4 atribuídos a C4, C5 e carbono da ponte, respectivamente. Os carbonos mais desblindados referem-se a C9 (δ 87,5), C6 (δ 76,4) e C10 (δ 76,7) e os C1, C2, C7 e C8 foram atribuídos como δ 46,8, δ 39,7, δ 33,8 e δ 43,9, respectivamente, para o isômero majoritário de configuração *Z*.

Resultados e discussão

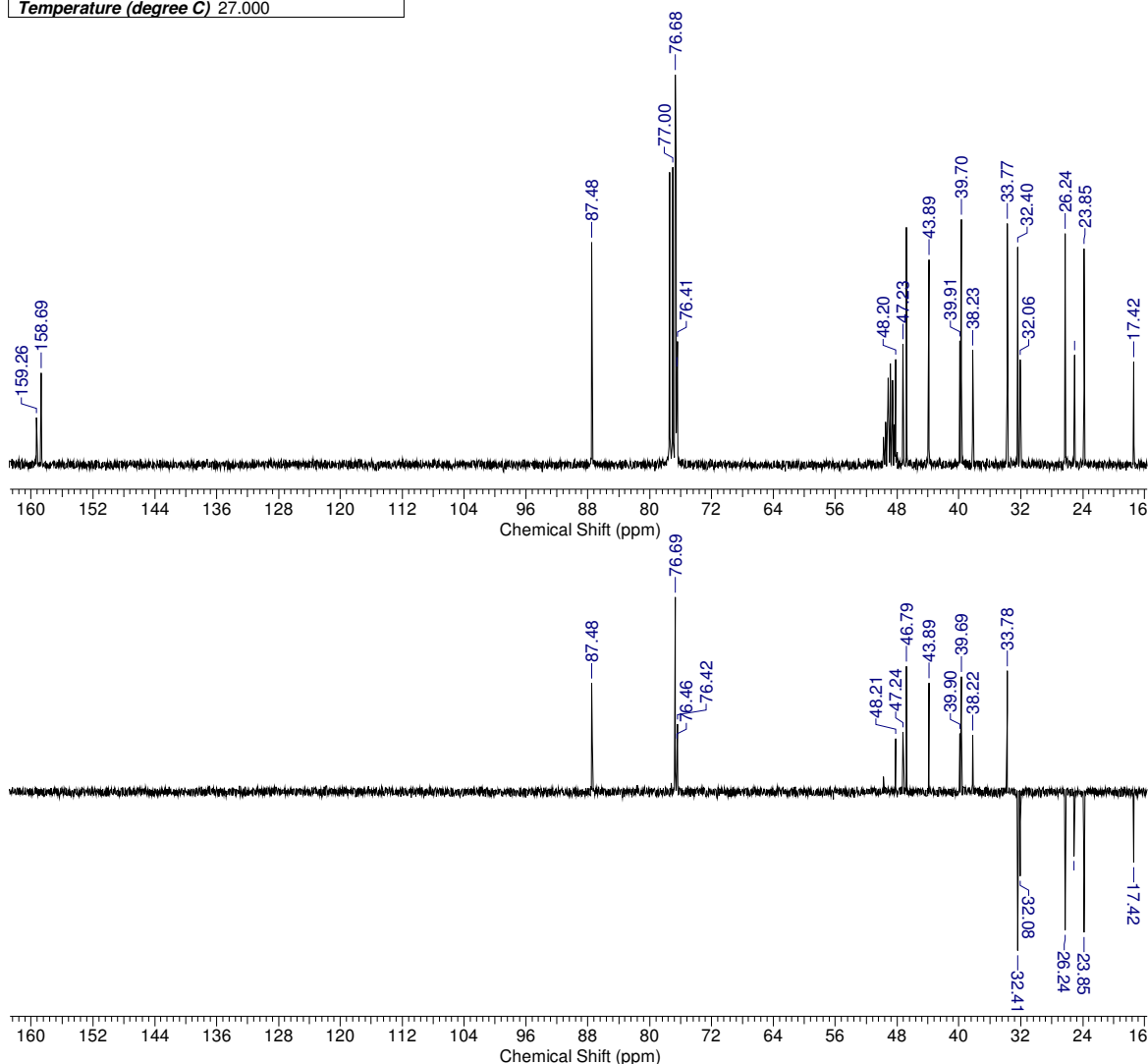
Acquisition Time (sec)	5.4657	Date	14 Apr 2009 10:56:40
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H
Number of Transients	1	Original Points Count	32768
Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5995.20
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 46: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃> CD₃OD_{1gota}) do composto **28** com mistura do isômeros *E* e *Z*.

Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	14 Apr 2009 13:09:00
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	¹³ C
Number of Transients	4662	Original Points Count	16384
Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 47: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **28** com mistura do isômeros *E* e *Z*. Espectro acima: Totalmente desacoplado. Espectro abaixo: DEPT 135°, ↑ (CH, CH₃); ↓ (CH₂).

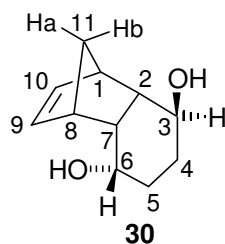
Resultados e discussão

Tabela 16: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto **28**.

posição	$[\delta(^1\text{H}), \text{multiplicidade (Hz), integral relativa}]$	$\delta(^{13}\text{C})$		DEPT
		<i>E</i>	<i>Z</i>	
1 [*]	2,46 (<i>m</i> , 1H)	48,2	46,8 [#]	CH
2 ^{**}	3,20 (<i>m</i> , 1H)	39,9	39,7 [#]	CH
3	-----	159,3	158,7	C
4 ^{***}	2,12-2,25 (<i>m</i> , 1H) 2,12-2,25 (<i>m</i> , 1H)	17,4	23,9	CH ₂
5 ^{***}	2,12-2,25 (<i>m</i> , 1H) 1,88-1,96 (<i>m</i> , 1H)	25,1	26,2	CH ₂
6	3,93 (<i>m</i> , 1H)	76,5	76,4 [*]	CH
7 ^{**}	2,54-2,59 (<i>m</i> , 1H)	38,2	33,8 [#]	CH
8 [*]	2,79 (<i>m</i> , 1H)	47,2	43,9 [#]	CH
9	3,49 (<i>d</i> , <i>J</i> =5,11, 1H)	87,4	87,5	CH
10	4,18 (<i>m</i> , 1H)	76,5	76,7 [*]	CH
11	1,83 (<i>d</i> , <i>J</i> =10,9, 1H) 1,41 (<i>d</i> , <i>J</i> =10,9, 1H)	32,1	32,4	CH ₂
-OH ₁₀	3,50 (<i>sl</i> , 1H)	-----	-----	-----

^{*}, ^{**}, ^{***}podem estar trocados

3.5.11. (5S,8S)-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octaidro-1,4-metanonaftaleno-5,8-diol (30)

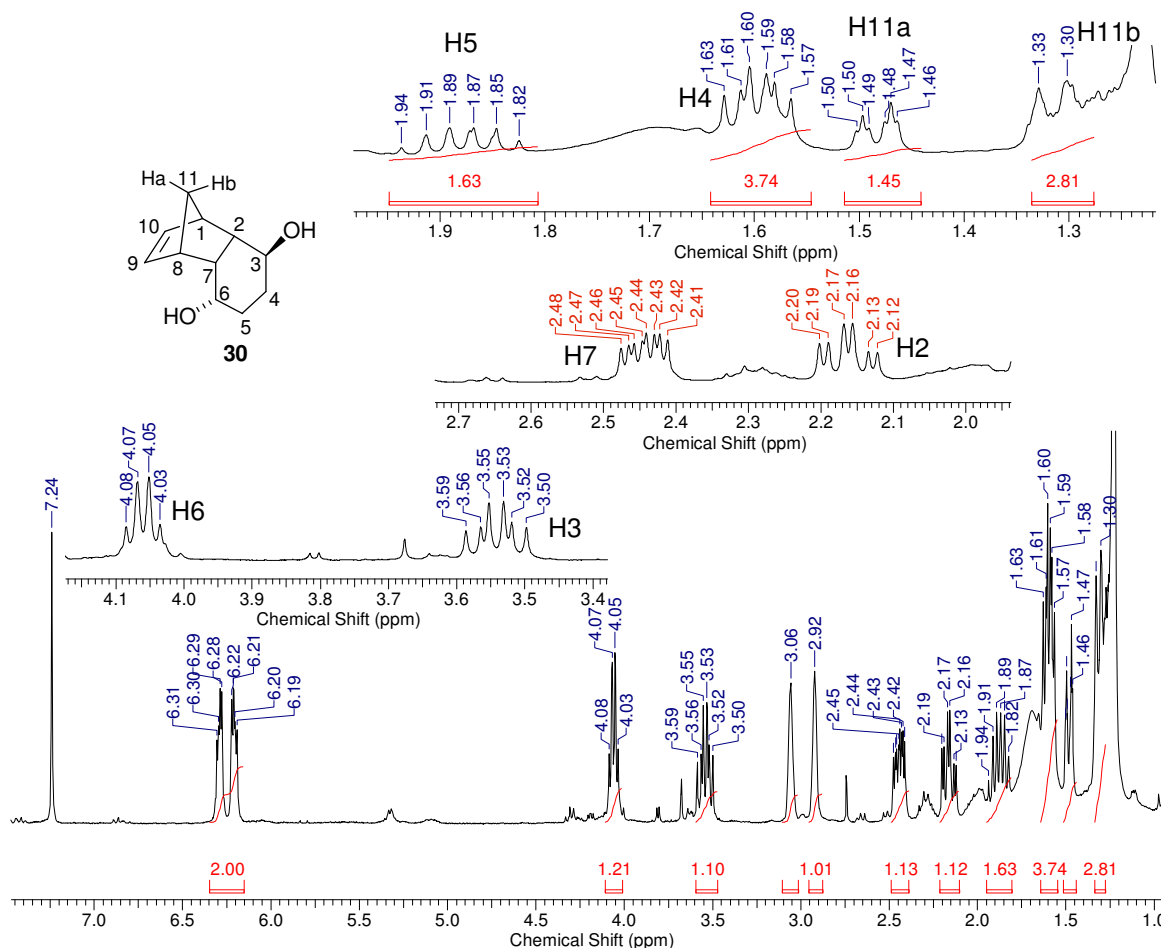


A reação de redução do composto **29** para o diol **30** foi comprovada pelo aparecimento de sinal referente ao hidrogênio carbinólico (H6) em δ 4,07 e sinal em δ 3,54 referente a H3, mais protegido do que o H6, pois o mesmo se encontra em ambiente mais impedido estericamente. Em seguida, pode-se identificar os hidrogênios H2 a partir do hidrogênio carbinólico H3, pelos valores de J observados. O duplo tripleto ($J_2=10,1$ e $6,6$ Hz) observado em δ 3,54 do H3 está acoplado com H2 (δ 2,16, $J = 10,1$). O sinal em δ 2,44 foi atribuído ao H7, δ 1,88 para o H5 e δ 1,60 para o H4. Os hidrogênios da ponte (H11a e H11b), observados como duplo dubletos ($J=11,0$; $1,6$) e dubleto ($J=11,0$) foram atribuídos como δ 1,49 e 1,32, respectivamente. Os hidrogênios cabeças-de-ponte H1 e H8 foram identificados também por comparação com os derivados heterociclos sintetizados anteriormente e seguindo sempre os mesmos padrões de deslocamentos químicos e multiplicidades.

No espectro de RMN de ^{13}C foram observados 11 sinais diferentes, conferindo assimetria do composto. Em δ 135,9 e 136,4 observam-se sinais de carbonos olefínicos, sendo atribuído como C10 e C9, respectivamente. Os sinais em δ 68,7 (C6) e 70,0 (C3) referem-se a carbonos ligados diretamente a um heteroátomo. Pelo DEPT 135, confirma-se a presença de 3 CH_2 : o carbono da ponte em δ 50,9, C4 em δ 29,0 e C5 em δ 29,2. Os sinais em δ 44,7, δ 46,2, δ 48,5 e δ 45,8 foram atribuídos aos carbonos C1, C2, C7 e C8, respectivamente.

Resultados e discussão

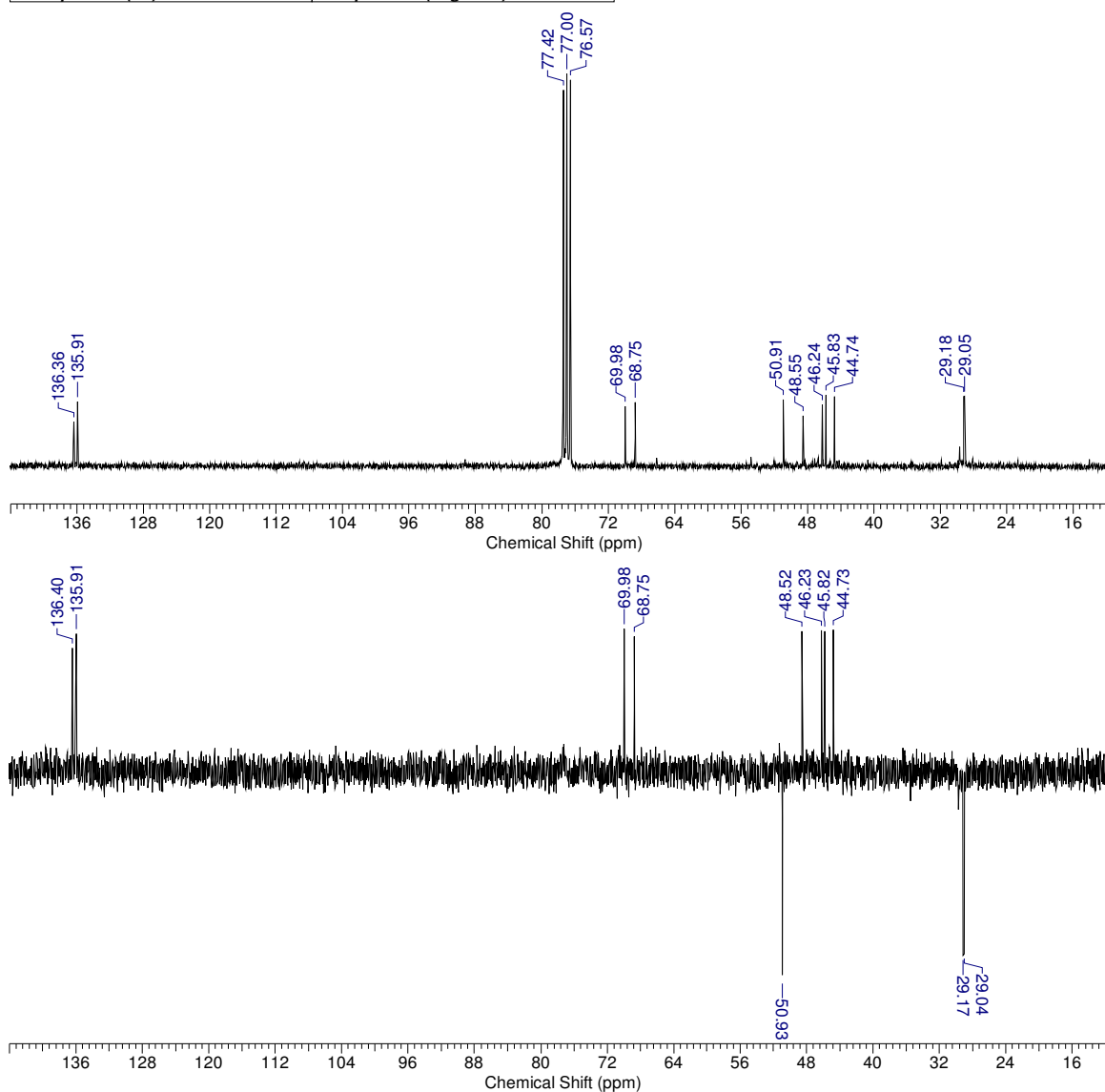
Acquisition Time (sec)	6.8420	Date	01 Feb 2011 07:28:36
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H
Original Points Count	32768	Points Count	65536
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27
		Number of Transients	8
		Pulse Sequence	zg
		Temperature (degree C)	27.000



Espectro 48: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **30**.

Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	25 Aug 2010 14:52:02
File Name	D:\FMITO-72 003001r	Frequency (MHz)	75.47
Nucleus	¹³ C	Number of Transients	10622
Points Count	32768	Original Points Count	16384
Sweep Width (Hz)	18832.39	Pulse Sequence	zgpg30
		Solvent	CHLOROFORM-D
		Temperature (degree C)	27.000



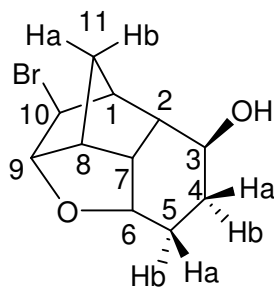
Espectro 49: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **30**. Espectro acima: Totalmente desacoplado. Espectro abaixo: DEPT 135°, ↑ (CH, CH₃); ↓ (CH₂).

Resultados e discussão

Tabela 17: Atribuição dos deslocamentos químicos aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C) do composto **30**.

posição	δ (^1H)	δ (^{13}C)	DEPT
1	2,92 (<i>m</i> , 1H)	44,7	CH
2	2,16 (<i>dt</i> , 1H, $J=11,0$; 10,1)	46,2	CH
3	3,54 (<i>dt</i> , 1H, $J=10,1$; 6,6)	70,0	CH
4	1,60 (<i>m</i> , 2H)	29,0	CH ₂
5	1,88 (<i>m</i> , 2H)	29,2	CH ₂
6	4,07 (<i>m</i> , 1H)	68,7	CH
7	2,44 (<i>m</i> , 1H)	48,5	CH
8	3,06 (<i>m</i> , 1H)	45,8	CH
9	6,21 (<i>dd</i> , $J=5,6$; 3,0)	136,4	CH
10	6,30 (<i>dd</i> , 1H, $J=5,6$; 3,0)	135,9	CH
11	a) 1,49 (<i>dd</i> , $J=11,0$; 1,6, 1H) b) 1,32 (<i>d</i> , $J=11,0$, 1H)	50,9	CH ₂

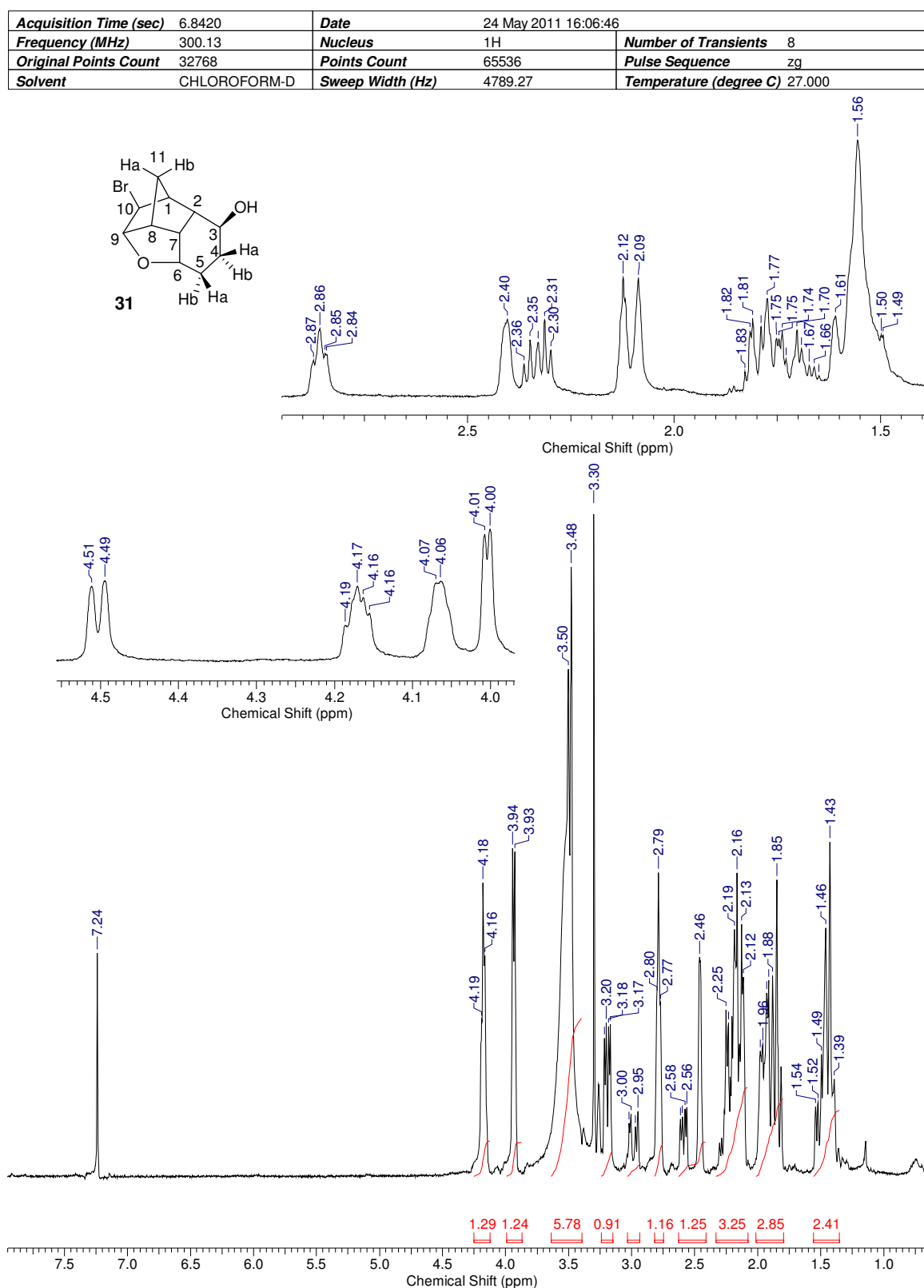
3.5.12 (+)-(4S,5S,6S,8S,1R,2R,11R,12R)-5-Bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ol (31)



31

Pelo espectro de RMN de ^1H , pode-se comprovar a conversão do composto **30** para **31**, principalmente devido à ausência de sinal de olefina em δ 6,21 e δ 6,30 e aparecimento de deslocamentos químicos na região de δ 4,0 a 4,5, referentes a sinais de hidrogênios ligados em átomos mais eletronegativos. Os hidrogênios da ponte foram identificados em δ 1,58 e 2,11, para H11b e H11a, respectivamente, por apresentarem mesmos padrões de acoplamentos, quando comparados aos outros compostos *cage-like*. Os sinais mais complexos nas regiões de δ 2,0-3,0 são provavelmente referentes aos H1 H2, H7 e H8 e de δ 1,5-2,0 para H4 e H5. O espectro de RMN de ^{13}C mostra 11 sinais diferentes, não apresentando mais carbonos olefínicos. O experimento de DEPT 135, apresenta 3 sinais de CH_2 e o deslocamento em δ 35,5 atribui-se ao carbono da ponte e os sinais em δ 26,2 e δ 21,7 referem-se aos C4 e C5, respectivamente. As correlações dos carbonos ligados diretamente aos respectivos hidrogênios foram confirmadas através do experimento de gHSQC (Tabela 27). No espectro gCOSY foi possível caracterizar os H1, H2, H4a, H4b, H7 e H8 e ainda observar os acoplamentos em W entre H10 e H11b. No espectro gNOESY foi observado a proximidade entre o H10 e H4 e entre H10 e H5.

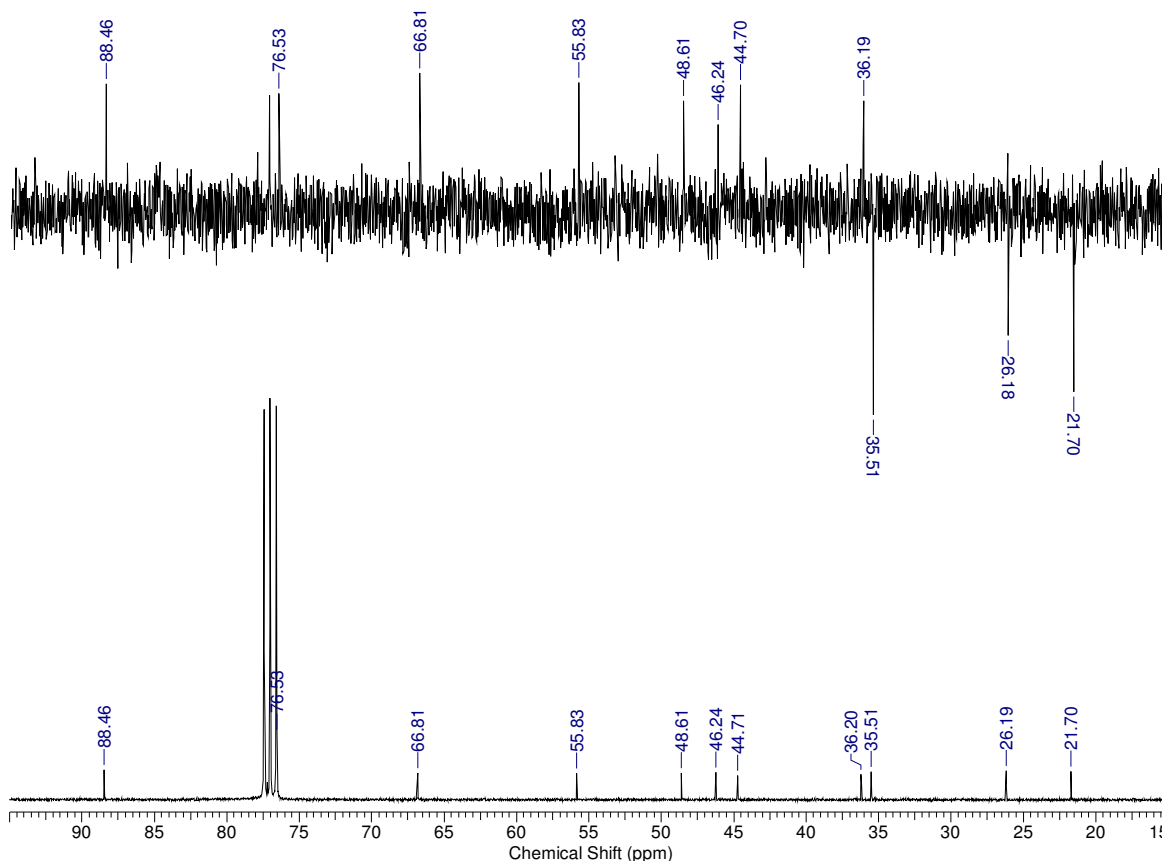
Resultados e discussão



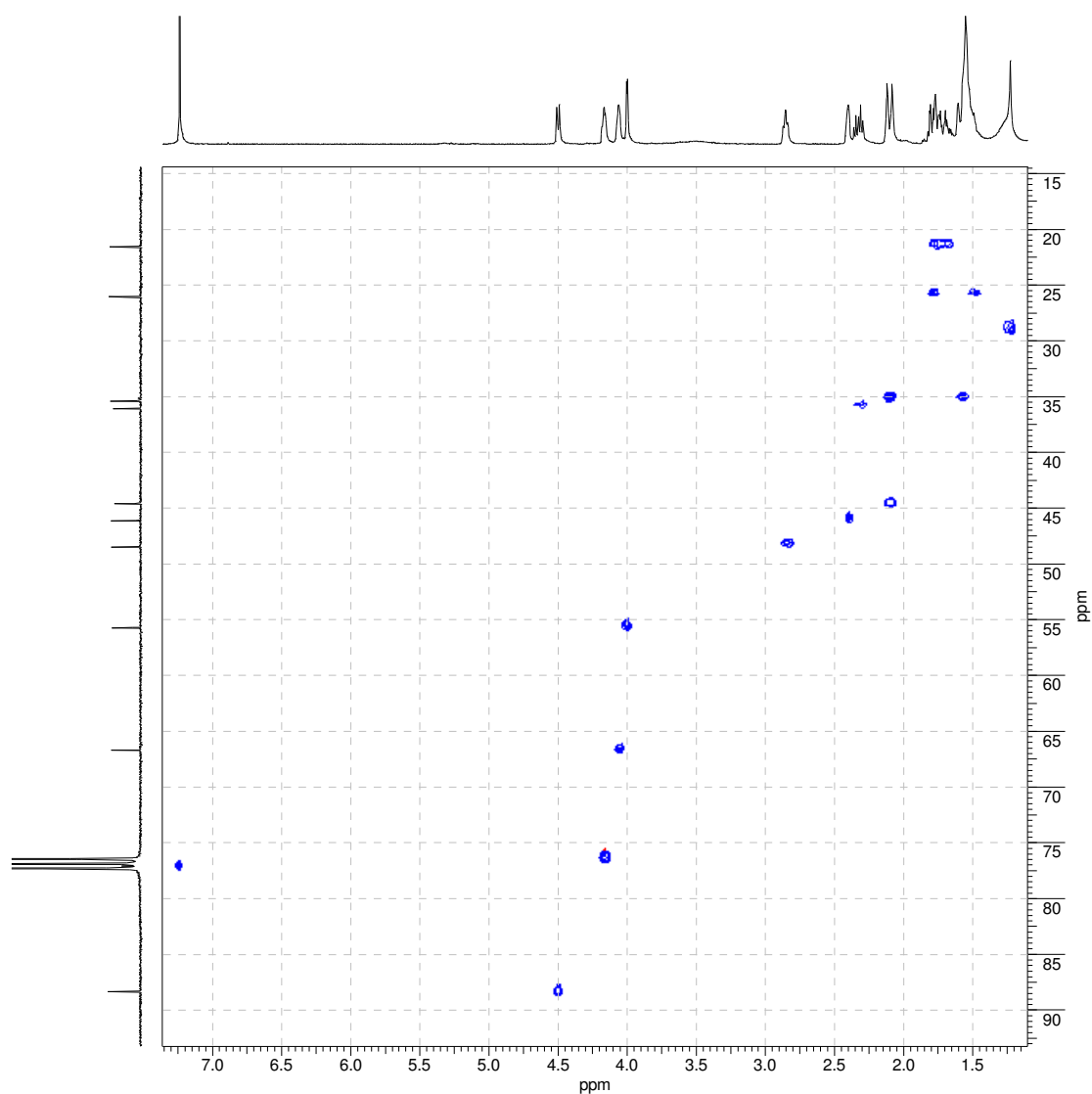
Espectro 50: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **31**.

Resultados e discussão

Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	27 Apr 2011 10:07:14
File Name	C:\Users\MIEKO ITO\Documents\EstruturasRIGIDAScageLike 2007ago-2010ago DOUTORADO\Parte Experimental RelatoriosEspectros\EspectroRMN FID\FMITO-88_003001r		
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	¹³ C
Number of Transients	30090	Original Points Count	16384
Points Count	131072	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
Temperature (degree C)	27.000		

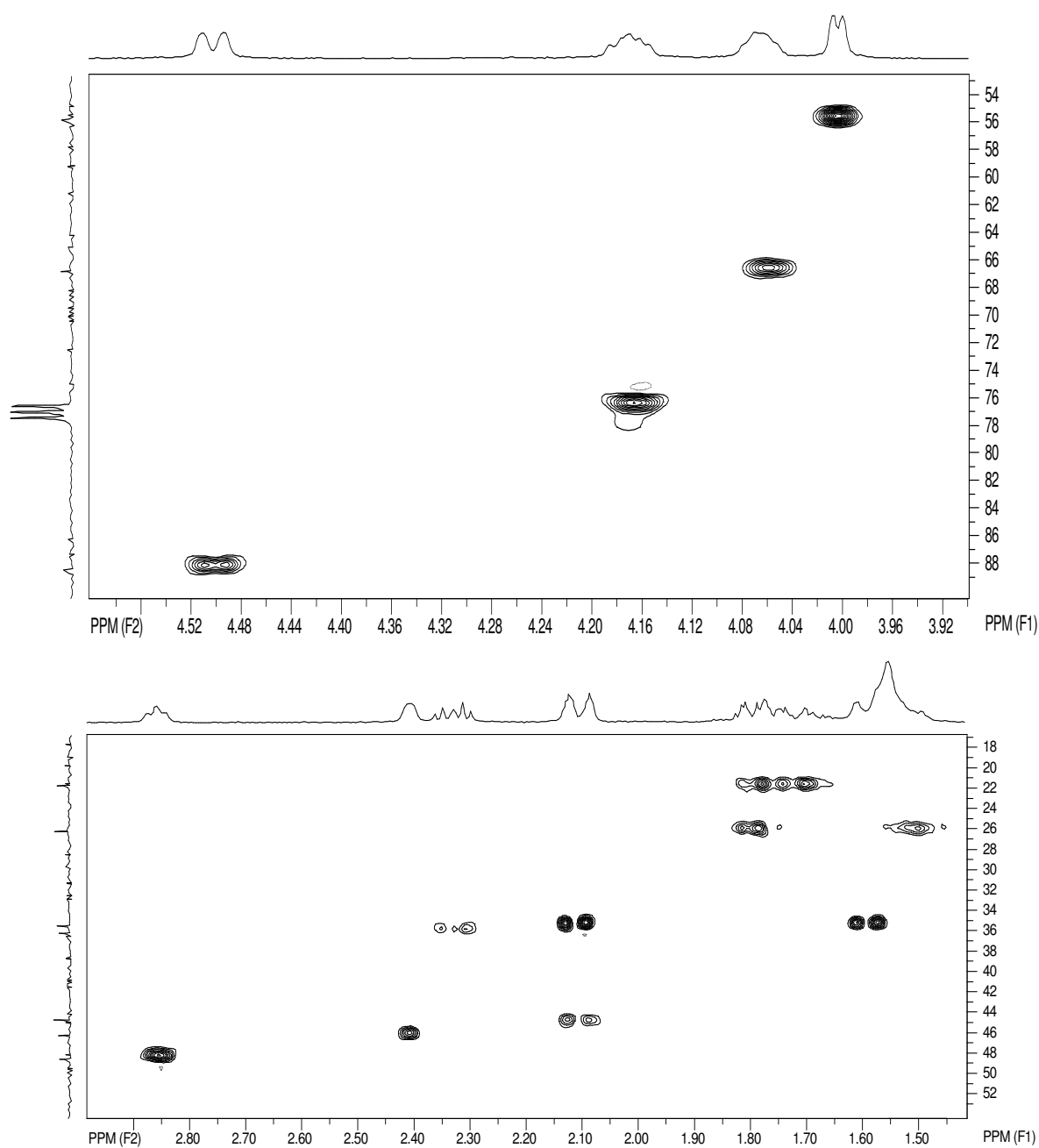


Espectro 51: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **31**. Espectro acima: Totalmente desacoplado. Espectro abaixo: DEPT 135°, $\uparrow$ (CH, CH_3); $\downarrow$ (CH_2).



Espectro 52: Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C diretamente ligados, obtido a partir do experimento gHSQC do composto **31**.

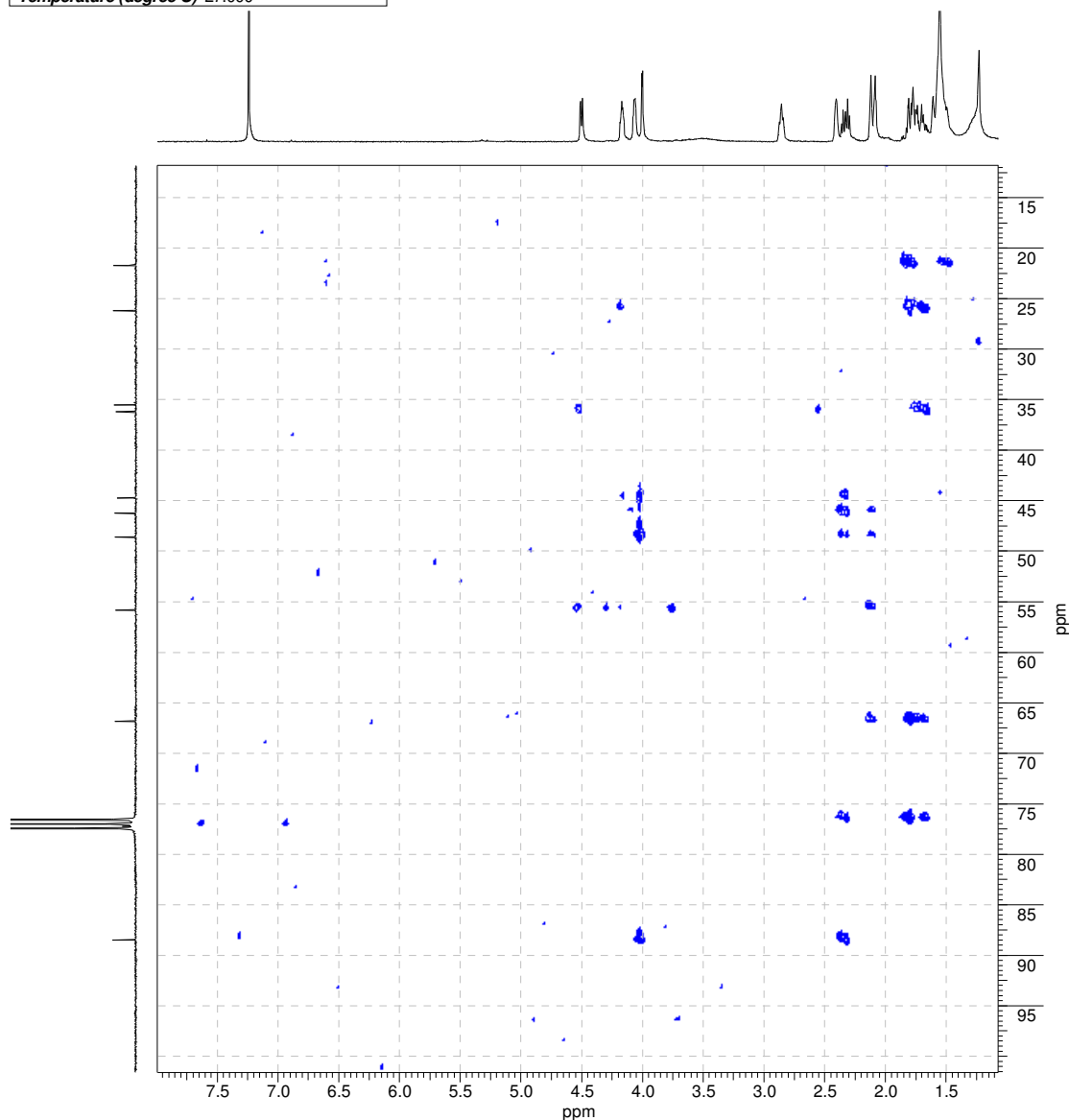
Resultados e discussão



Espectro 53: Ampliação do mapa de correlações do experimento gHSQC do composto **31**.

Resultados e discussão

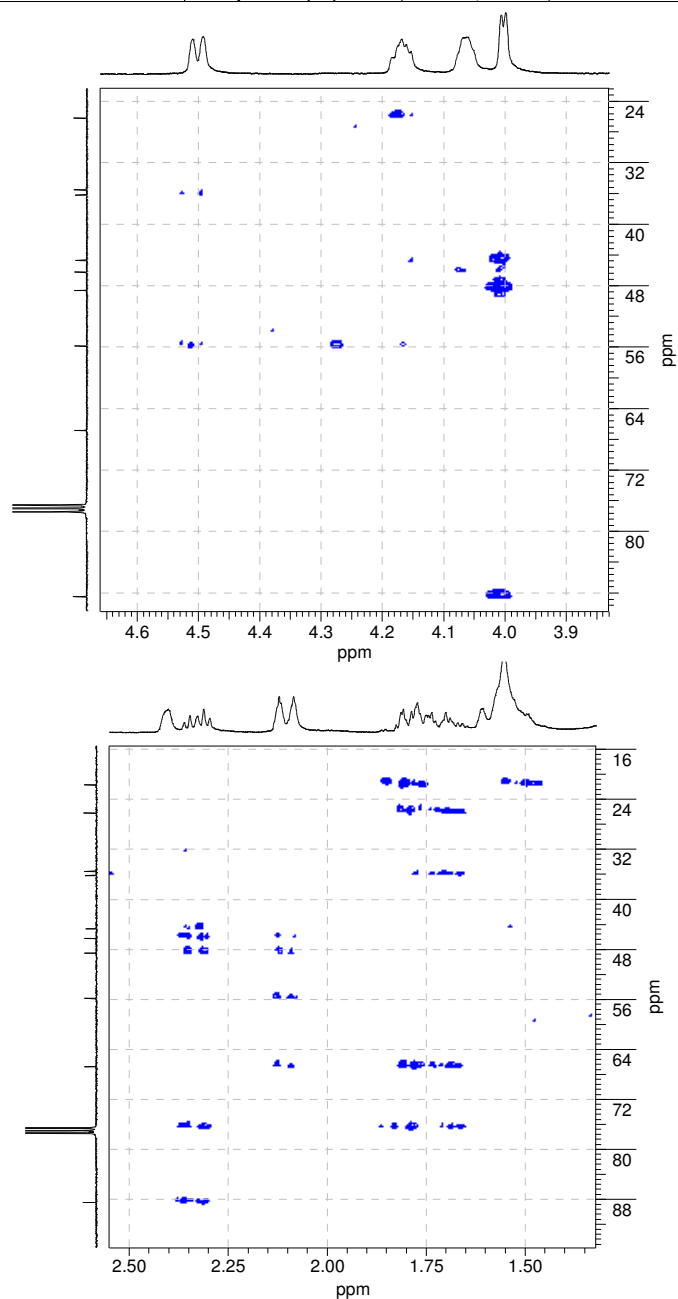
Date	06 Jun 2011 08:40:22	Comment	HMBCGP
Acquisition Time (sec)	(0.0544, 0.4276)	Nucleus	(13C, 1H)
Frequency (MHz)	(75.47, 300.13)	Original Points Count	(1024, 2048)
Number of Transients	32	Pulse Sequence	hmbcgp1pndqf
Points Count	(1024, 2048)	Sweep Width (Hz)	(18832.39, 4789.27)
Solvent	CDCl3		
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 54: Mapa de correlações heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância, obtido pelo experimento gHMBC do composto **31**.

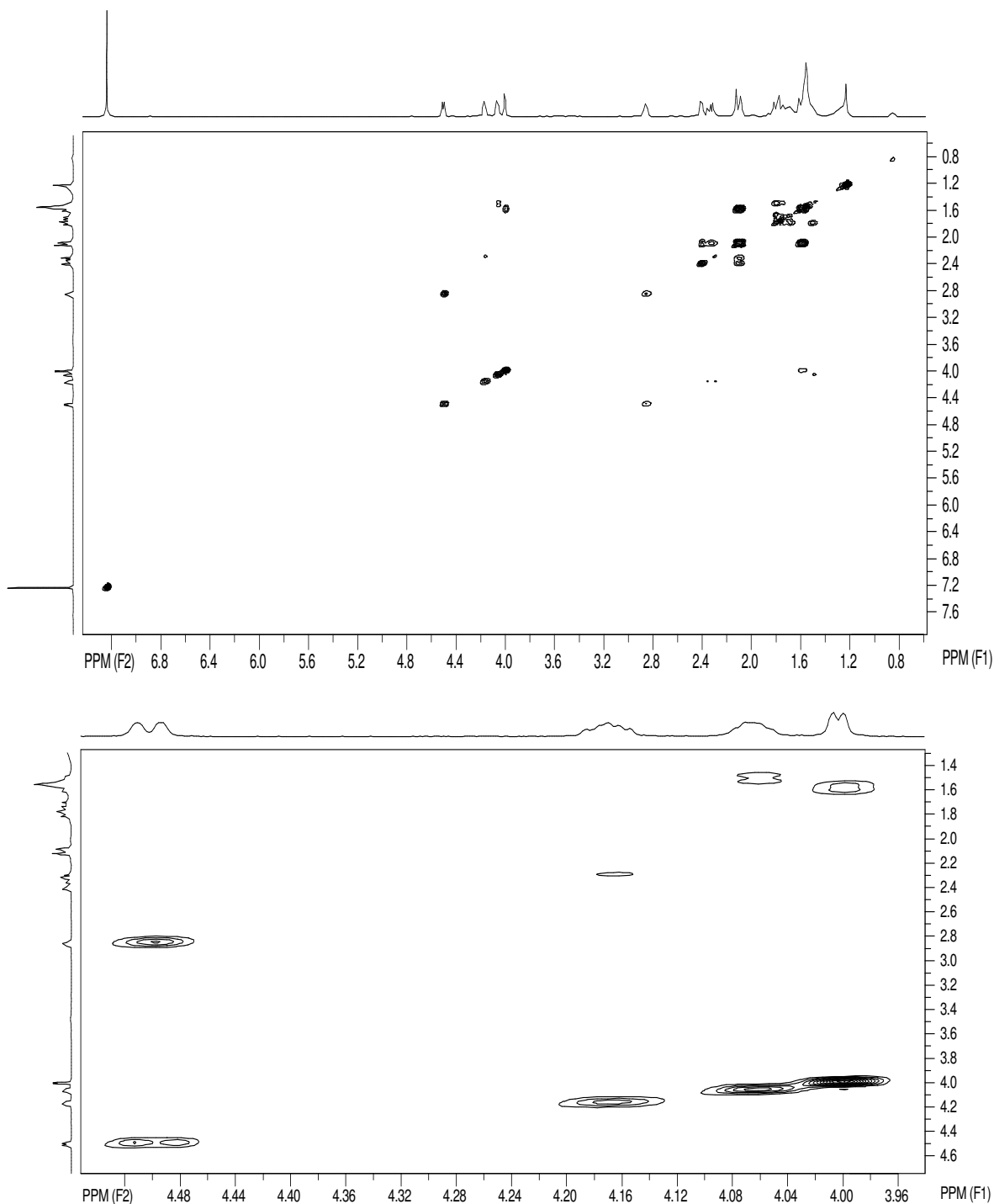
Resultados e discussão

Date	06 Jun 2011 08:40:22	Temperature (degree C)	27.000
Acquisition Time (sec)	(0.0544, 0.4276)	Comment	HMBCGP
Frequency (MHz)	(75.47, 300.13)	Nucleus	(13C, 1H)
Number of Transients	32	Original Points Count	(1024, 2048)
Points Count	(1024, 2048)	Pulse Sequence	hmbcgpplndqf
Solvent	CDCI3	Sweep Width (Hz)	(18832.39, 4789.27)



Espectro 55: Ampliação do mapa de correlações do experimento gHMBC do composto 31.

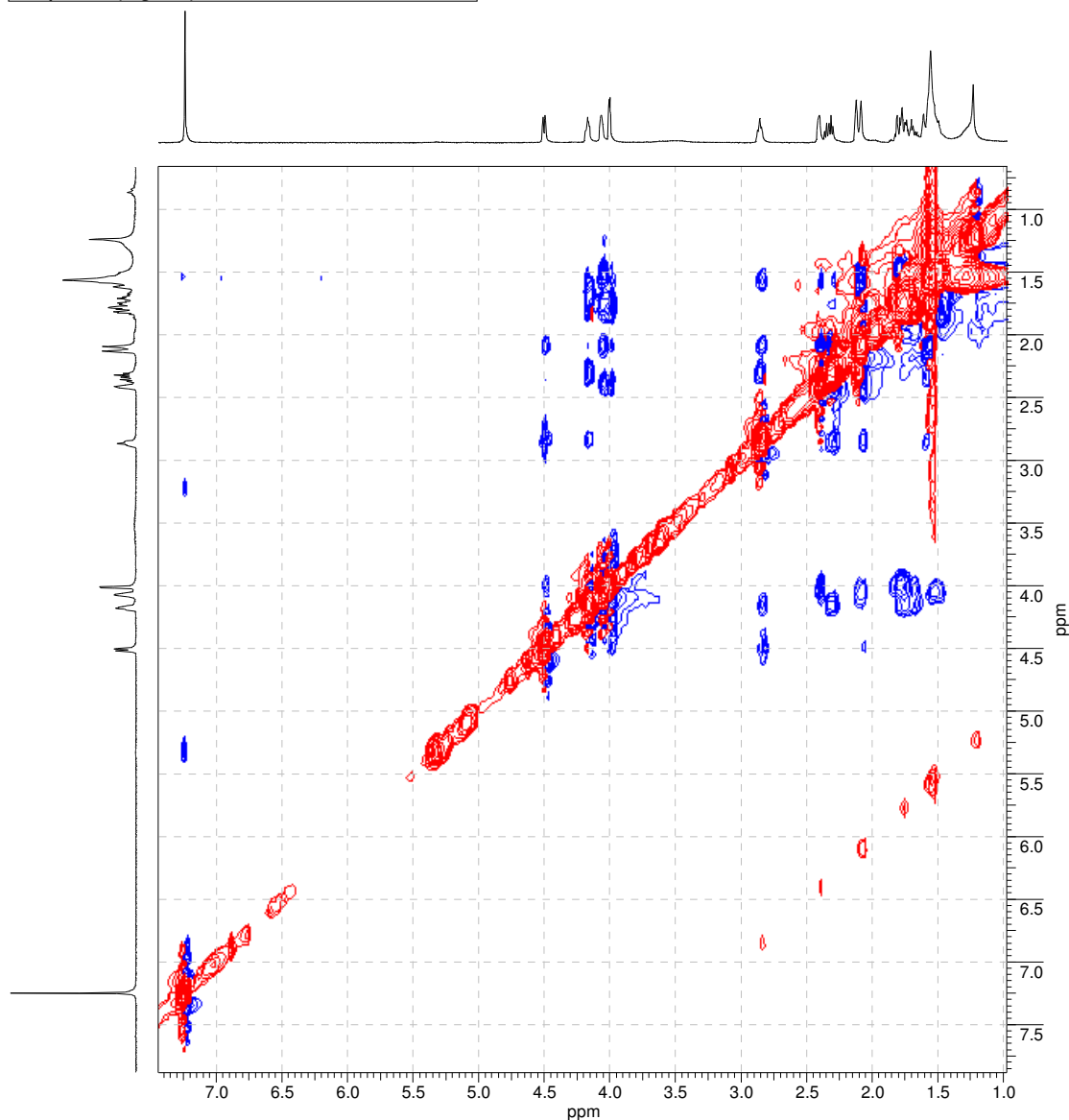
Resultados e discussão



Espectro 56: Mapa de correlações homonuclear ^1H - ^1H obtido a partir do experimento gCOSY do composto **31** e ampliação.

Resultados e discussão

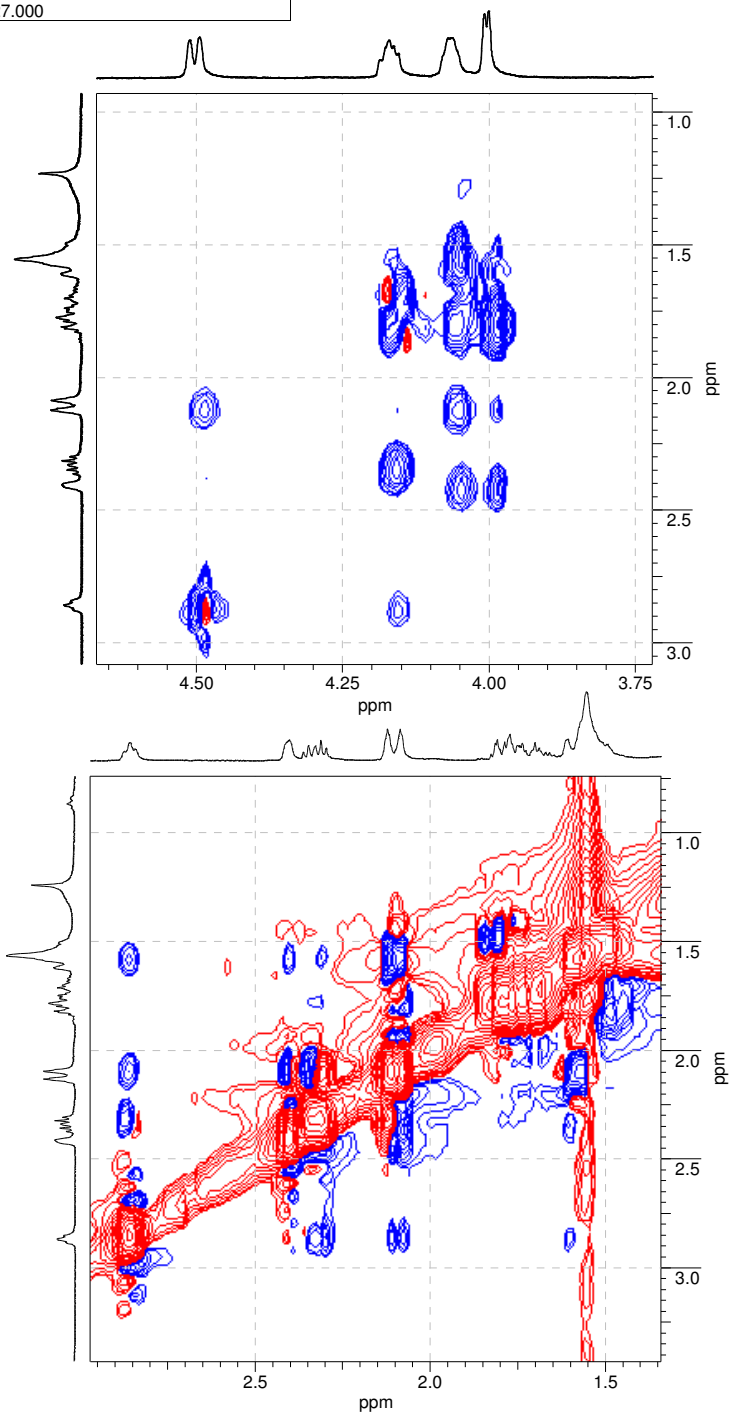
Date	06 Jun 2011 09:11:02	Acquisition Time (sec)	(0.2138, 0.2138)
Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)	Nucleus	(1H, 1H)
Number of Transients	48	Original Points Count	(1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	noesygpph
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(4789.27, 4789.27)
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 57. Mapa de correlações espaciais ^1H - ^1H obtido a partir do experimento gNOESY do composto **31**.

Resultados e discussão

Date	06 Jun 2011 09:11:02	Acquisition Time (sec)	(0.2138, 0.2138)
Frequency (MHz)	(300.13, 300.13)	Nucleus	(1H, 1H)
Number of Transients	48	Original Points Count	(1024, 1024)
Points Count	(1024, 1024)	Pulse Sequence	noesygpph
Solvent	CDCl ₃	Sweep Width (Hz)	(4789.27, 4789.27)
Temperature (degree C)	27.000		



Espectro 58. Ampliação mapa de correlações do experimento gNOESY do composto **31**.

Resultados e discussão

Tabela 18: Atribuição dos deslocamentos químicos (δ [ppm]) aos hidrogênios (^1H) e carbonos (^{13}C), multiplicidade, constantes de acoplamento $J(^1\text{H}, ^1\text{H})$, $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ do gHMBC e correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ do gCOSY e gNOESY do composto **31** em CDCl_3 .

	DEPT	gHSQC		gHMBC		gCOSY			gNOESY
		$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$ [multiplicidade, J (Hz), integral relativa]	2J	3J	2J	3J	4J	
1	CH	34,9	2,24 (<i>m</i> , 1H)		H3, H7		H10, H11a/b		H2, H3
2	CH	43,5	2,11 (<i>m</i> , 1H)	H1, H3			H1/H7		H1, H3, H7
3	CH	70,9	3,07 (<i>m</i> , 1H)	H2, H4a, H4b	H5a/b		H2/H4a/H4b		H4a, H4b
4a	CH ₂	25,7	1,74 – 1,80 (<i>m</i> , 1H)	H5a/H5b	H6	H4b	H3, H5a, H5b		H3, H4b, H5a/b
4b			1,45 (<i>m</i> , 1H)			H4a	H3, H5a, H5b		H3, H4a, H5a/b, H10
5a	CH ₂	27,4	1,70 – 1,81 (<i>m</i> , 1H)	H4a/ H4b		H5b	H4a, H4b, H6		H4a/b, H5b, H6
5b			1,70 – 1,81 (<i>m</i> , 1H)			H5a	H4a, H4b, H6		H4a/b, H5a, H6
6	CH	76,0	4,17 (<i>m</i> , 1H)	H5a, H5b	H4		H7/H5a/H5b		H5a, H5b, H7
7	CH	40,9	2,30-2,36 (<i>m</i> , 1H)	H6	H9, H5a/b		H2/H6/H8		H2, H6
8	CH	49,5	2,86 (<i>m</i> , 1H)	H7			H7/H9/H11a/b		H7, H11a, H11b
9	CH	79,7	4,50 (<i>d</i> , $J=5,19$, 1H)	H10	H7		H10a/H10b		H8, H10, H11a
10	CH	36,8	4,01 (<i>d</i> , $J=2,1$, 1H)	H9, H11a		H9	H1	H11b	H4b
11a	CH ₂	37,8	2,11 (<i>d</i> , $J=11,0$, 1H)	H11b		H11b	H8		H8, H9
11b			1,58 (<i>d</i> , $J=11,0$, 1H)	H11a	H9	H11a	H1/H8	H10	H2, H7, H8

Considerações finais

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram obtidos 12 compostos a partir da reação clássica de Diels-Alder entre ciclopentadieno e benzoquinona, planejada para obtenção de novos compostos heterocíclicos do tipo gaiola potencialmente bioativos. Dos compostos sintetizados, as substâncias **14**, **15**, **20**, **21**, **23-28** foram testadas para atividade citotóxica e ensaio de inibição enzimática sobre a enzima tirosinase.

Os compostos testados sobre as linhagens MDA-MB435, SF-295 e HL-60 não demonstraram potencialidade citotóxica com valores de inibição $\geq 90\%$. A avaliação de atividade anti-tirosinase mostrou que o derivado heterociclo *cage-like* **23** tem alta atividade inibitória ($< 25 \mu\text{g}$) e todos outros compostos testados apresentaram halos de inibição nas concentrações testadas ($600\mu\text{g} < X < 50\mu\text{g}$). As halo-oximas **25**, **26** e **27** apresentaram halos de escurecimento na parte interior dos halos de inibição podendo ser indicativo de ativação enzimática, sendo necessário estudos mais específicos relacionados a esta atividade enzimática.

A enediona **11** foi submetida à biotransformação com fragmentos de meio de cultura com o fungo *M. ramosissimus* e foram obtidos os diastereoisômeros **12** e **29**. Esta mistura de diastereoisômeros foi opticamente ativa. As configurações absolutas dos compostos **12** e **29** foram determinadas, bem como o excesso enantiomérico do álcool majoritário **12** ($e = 99,9\%$).

A partir da dienediona **9**, *endo*-tríciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona, foram obtidos ceto-éteres e oximas *cage-like* de maneira fácil e com excelentes rendimentos.

Parte experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Materiais, equipamentos e métodos

Os solventes utilizados foram da marca Merck, Acros, Vetec, Dinâmica, Simth e tratados conforme descrito na literatura [PERRIN & AMAREGO, 1988].

Para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio – Sílica Gel 60 F₂₅₄ da Merck e Macherey-Nagel.

As revelações cromatográficas foram feitas com os reveladores: Vapor de iodo e/ou solução de vanilina/ ácido sulfúrico/ metanol.

Para o fracionamento em coluna foi utilizada, como fase estacionária, sílica gel 60 (230-400 mesh ASTM) da Merck e sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM) da Acros.

Os solventes foram evaporados à pressão reduzida em rotaevaporador Fisaton 802D.

Os espectros de RMN foram realizados no aparelho Bruker Avance DPX-300 sendo empregadas as frequências de 300 MHz para ¹H e de 75 MHz para ¹³C. A referência interna foi ajustada a partir do sinal de TMS e dos sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente (CDCl₃ e CD₃OD)

Os espectros de absorção de infravermelho foram registrados em espectrômetro Bomem-Michelson série MB-100, com transformada de Fourier, em filme de CHCl₃ para líquidos ou em pastilhas de KBr para sólidos.

As rotações ópticas, $[\alpha]_D^{20}$, foram observadas no polarímetro Perkin Elmer, modelo 341.

Cultivo, inoculação e coleta das amostras biotransformadas foram feitas em câmara de fluxo laminar da Labconco, previamente esterilizada com álcool 70% e incidência de luz UV. Para esterilização dos materiais e meios de cultura foi utilizado a autoclave da marca Phoenix modelo AV 50.

As biotransformações foram realizadas em incubadora refrigerada com agitação, marca Marconi, modelo MA 830/A.

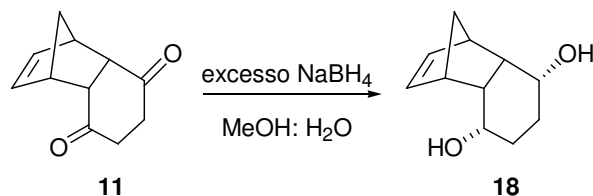
Os produtos diastereoisoméricos da biotransformação a partir da dicetona **11** foram analisados através de um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa Shimadzu (QP2010) e coluna capilar de sílica (30m x 0,25mm x 0,25µm) Rtx®-5MS

Parte experimental

RESTEK. A temperatura de operação da coluna foi programada, com temperatura inicial de 100 °C por 3 min e elevado até 250 °C e mantido a temperatura por 20 min. As temperaturas do injetor, da interface e da fonte de íons foram de 250°C. A velocidade linear do gás de arraste (He) foi mantida constante a 39,0 cm/s.

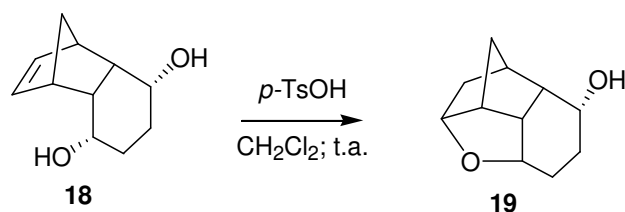
5.2. Síntese

5.2.1. Preparação do triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-2,4,6,9-tetraeno-3,6-diol (**18**)



Procedimento: Uma solução do composto **11** (0,21 g, 1,18 mmol) em 5 mL de metanol: água (5:1) foi resfriada em banho de gelo. Nesta mistura foi adicionado NaBH₄ (0,05 g, 1,3 mmol). Após a adição do agente redutor, foi retirado o banho de gelo e a mistura foi agitada por 2,5 horas. Ácido acético glacial (0,5 mL) foi adicionado, seguido de água gelada (2,5 mL). O produto foi extraído com CH₂Cl₂ (3 X 10 mL). Após a secagem da fase orgânica com MgSO₄ anidro, o solvente foi removido com vácuo. Rendimento: 98 %. Sólido branco à temperatura ambiente. Composto **18**: **RMN-¹H** (300MHz, CDCl₃): δ 1,33 (*d*, 1H, *J*₁ = 7,9 Hz); 1,41 (*d*, 1H, *J*₁ = 7,9 Hz, *J*₂ = *J*₃ = 1,77 Hz); 1,65 – 1,72 (*m*, 4H); 2,38 (*m*, 2H); 2,65 (*sl*, 2H); 2,90 (2H); 4,11 (2H); 6,20 (2H). **RMN-¹³C** (75MHz, CDCl₃): 27,0 (CH₂); 45,1 (CH); 45,8 (CH); 52,4 (CH₂); 67,0 (CH); 134,6 (CH).

5.2.2 Preparação do *rel*-decaidro-2,4-metanoindeno[7,1-*bc*]furan-5-ol (**19**) a partir do triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-2,4,6,9-tetraeno-3,6-diol (**18**)

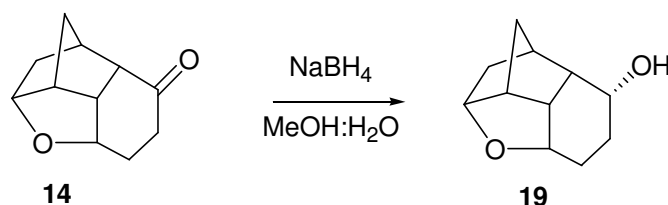


Procedimento: O composto **18** (0,12 mg, 0,67 mmol) foi dissolvido em 4 mL de CH₂Cl₂. Em seguida acrescentou-se ácido *p*-toluenossulfônico (0,15 mg, 0,81 mmol) e a mistura foi agitada por 4 horas em temperatura ambiente. A extração foi feita com acréscimo de 5 mL CH₂Cl₂ e lavada com H₂O destilada (3 X 10 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO₄

Parte experimental

anidro e o solvente removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando-se hexano: acetato de etila (1:1) como eluente. Rendimento: 99%. **RMN-¹H** (300MHz, CDCl₃): δ 2,17 – 2,30 (1H); 1,20 – 2,35 (2H); 1,26 (1H); 1,39 (1H); 1,38 – 1,45 (1H); 1,54 (1H); 1,54 – 1,66 (1H); 1,73 (1H); 1,74 – 1,82 (1H); 1,87 – 1,97 (1H); 2,20 – 2,35 (1H); 3,96 (1H); 4,11 (1H); 4,36 (1H); **RMN-¹³C** (75MHz, CDCl₃): 27,4 (CH₂); 25, 7 (CH₂); 34,9 (CH); 36,8 (CH₂); 37,8 (CH₂); 40,9 (CH); 43,5 (CH); 49,5 (CH); 70,9 (CH); 76,0 (CH); 79,7 (CH).

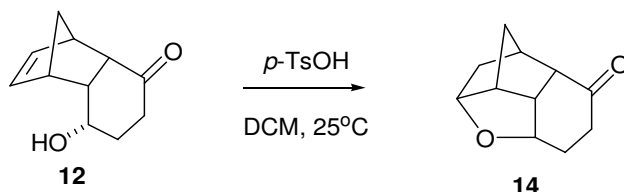
5.2.3 Preparação do *rel*-decaidro-2,4-metanoindeno[7,1-*bc*]furan-5-ol (**19**) a partir do *rel*-(8*S*,12*S*,1*R*,2*R*,4*R*,6*R*)-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ona (**14**)



Procedimento: Uma solução do composto **14** (0,53 g, 0,6 mmol) em MeOH (1,6 mL) foi resfriada em banho de gelo. Em seguida foi adicionado NaBH₄ (0,034 g, 0,89 mmol). Depois de acrescentados os reagentes a solução foi retirada do banho de gelo e agitada por 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com uma gota de ácido acético e adicionado mais 2 mL de CH₂Cl₂ e lavada com H₂O destilada (3 X 2 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro e o solvente removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando-se hexano: acetato de etila (2:1) como eluente. Rendimento: 90%. Sólido branco à temperatura ambiente. **RMN-¹H** (300MHz, CDCl₃): δ 2,17 – 2,30 (1H); 1,20 – 2,35 (2H); 1,26 (1H); 1,39 (1H); 1,38 – 1,45 (1H); 1,54 (1H); 1,54 – 1,66 (1H); 1,73 (1H); 1,74 – 1,82 (1H); 1,87 – 1,97 (1H); 2,20 – 2,35 (1H); 3,96 (1H); 4,11 (1H); 4,36 (1H); **RMN-¹³C** (75MHz, CDCl₃): 27,4 (CH₂); 25, 7 (CH₂); 34,9 (CH); 36,8 (CH₂); 37,8 (CH₂); 40,9 (CH); 43,5 (CH); 49,5 (CH); 70,9 (CH); 76,0 (CH); 79,7 (CH).

Parte experimental

5.2.4 *rel*-(8*S*,12*S*,1*R*,2*R*,4*R*,6*R*)-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ona (14)



Procedimento: O composto **12** (0,12 mg, 0,67 mmol) foi dissolvido em 4 mL de CH₂Cl₂. Em seguida acrescentou-se ácido *p*-toluenossulfônico (0,15 mg, 0,81 mmol) e a mistura foi agitada por 4 horas em temperatura ambiente. A extração foi feita com acréscimo de 5 mL CH₂Cl₂ e lavada com H₂O destilada (3 X 10 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro e o solvente removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando-se hexano: acetato de etila (1:1) como eluente. Rendimento: 97%. **RMN-¹H** (300MHz, CDCl₃): δ 1.30 (d, *J* = 10.3, 1H); 1.36 (d, *J* = 7.4, 1H); 1.44 (dt, *J* = 7.4; 2.7, 1H) 1.52 (d, *J* = 10.3, 1H); 1.83 (dt, *J* = 5.5; 13.8; 14.9 Hz, 1H); 2.10 - 2.21 (m, 1H); 2.23 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H); 2.39 (d, *J* = 5.8, 1H); 2.42 - 2.47 (m, 1H); 2.47 - 2.51 (m, 1H); 2.56 (dd, *J* = 3.6; 10.3, 1H); 2.89 (t, *J* = 4.0; 6.3 Hz, 1H); 4.31 (m, 1H); 4.49 (t, *J* = 6.3; 7.4 Hz, 1H). **RMN-¹³C** (75MHz, CDCl₃): δ 26.5 (CH₂), 35.1 (CH₂), 37.2 (CH₂), 37.4 (CH₂), 39.3 (CH), 43.5 (CH), 49.1 (CH), 51.2 (CH), 74.4 (CH), 79.7 (CH), 214.0 (C=O). Comparados com o descrito na literatura [ITO, 2007].

5.2.5 *rel*-(4*S*,5*S*,6*S*,8*S*,1*R*,2*R*,12*R*)-5-Iodo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]decan-11-ona (15)



Procedimento: O composto **12** (0,9 mg, 5 mmol) foi dissolvido inicialmente em 30 mL de CH₂Cl₂ e em seguida foi adicionado N-bromossuccinimida (NBS) (1,08 g, 6 mmol). A mistura resultante foi agitada por 1 hora em temperatura ambiente. Por CCD observou-se que o material de partida foi consumido, elaborou-se a reação com acréscimo de CH₂Cl₂ e lavagem com H₂O destilada (3 X 20 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro, o solvente foi removido com vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando hexano: acetato de etila (1:1) como eluente. Rendimento 98 %.

Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

Parte experimental

¹H (300MHz, CDCl₃): δ 1,66 (d, J = 11,2, 1H), 1,85 – 1,96 (m, 1H), 2,17 (dd, J = 11,2; 2,2, 1H), 2,18-2,31 (m, 1H), 2,34 – 2,41 (m, 1H), 2,54 – 2,60 (m, 1H), 2,69 – 2,77 (m, 1H), 3,00 (m, 1H), 3,72 (d, J = 2,3, 1H), 4,28 (ddd, J = 1,8; 4,0; 4,2, 1H), 4,59 (d, J = 5,1, 1H). **RMN-¹³C** (75MHz, CDCl₃): δ 25,8 (CH₂), 34,8 (CH₂), 35,0 (CH₂), 42,2 (CH), 46,8 (CH), 48,5 (CH), 49,8 (CH), 55,0 (CH), 75,2 (CH), 88,4 (CH), 211,7 (C). **I.V.** (cm⁻¹): 2982, 2951, 2924, 2883, 1697, 1184. Comparados com o descrito na literatura [ITO, 2007].

5.2.6 *rel*-(4*S*,5*S*,6*S*,8*S*,1*R*,2*R*,12*R*)-5-Iodo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]decan-11-ona
(20)

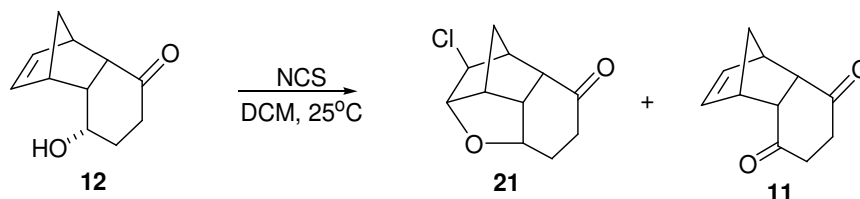


Procedimento: O composto **12** (31,5 mg, 0,18 mmol) foi dissolvido inicialmente em 1,5 mL de CH₂Cl₂ e em seguida foi adicionado N-iodossucinimida (NIS) (47 mg, 0,21 mmol). A mistura resultante foi agitada por 1 hora em temperatura ambiente. Por CCD observou-se que o material de partida foi consumido, elaborando-se a reação com um acréscimo de CH₂Cl₂ e lavagem com H₂O destilada (3 X 5 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro e filtrada e o solvente removido a vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna flash, usando hexano e acetato de etila em gradiente de eluição até a proporção de 1:1 de hexano e acetato. Óleo amarelo à temperatura ambiente. Rendimento: 97%.

RMN-¹H (300MHz, CDCl₃): δ 1,75 (d, J = 11,4, 1H), 1,84 – 1,95 (m, 1H), 2,19 (dd, J = 11,4; 1,5, 1H), 2,18-2,29 (m, 1H), 2,32 – 2,49 (m, 2H), 2,55 – 2,61 (m, 1H), 2,69 – 2,72 (m, 2H), 2,95 (m, 1H), 3,77 (d, J = 3,0, 1H), 4,24 (m, 1H), 4,80 (d, J = 5,1, 1H). **RMN-¹³C** (75MHz, CDCl₃): δ 25,8 (CH₂), 33,0 (CH), 35,1 (CH₂), 37,1 (CH₂), 42,5 (CH), 48,1 (CH), 49,5 (CH), 50,3 (CH), 74,8 (CH), 89,5 (CH), 212,0 (C). **I.V.** (cm⁻¹): 2982, 2951, 2924, 2883, 1697, 1184.

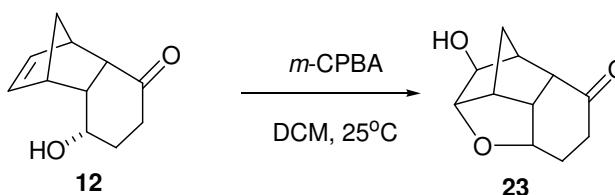
Parte experimental

5.2.7 *rel*-(4*S*,5*S*,6*S*,8*S*,1*R*,2*R*,12*R*)-5-Cloro-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ona (**21**)



Procedimento: O composto **12** (0,18 g, 1,04 mmol) foi dissolvido inicialmente em 1,1 mL de CH₂Cl₂ e em seguida foi adicionado N-clorossuccinimida (NCS) (0,03 g, 1,3 mmol). A mistura resultante foi agitada por 1 hora em temperatura ambiente. Por CCD observou-se que o material de partida foi consumido, elaborando-se a reação com um acréscimo de CH₂Cl₂ e lavagem com H₂O destilada (3 X 10 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro e filtrada e o solvente removido a vácuo. Rendimento: 60 %. Composto **rac-21**: **RMN**-¹H (300MHz, CDCl₃): δ 1,59 (d, 1H); 1,85 – 1,96 (1H); 2,10 (d, 1H); 2,17 – 2,26 (m, 1H); 2,33– 2,40 (m, 2H); 2,52 – 2,59 (1H); (2,65 – 2,72 (m, 2H); 3,01 (1H); 3,65 (1H); 4,30 (1H); 4,38 (1H). **RMN**-¹³C (75MHz, CDCl₃): 25,8 (CH₂); 33,6 (CH₂); 34,9 (CH₂); 42,2 (CH); 46,6 (CH); 48,1 (CH); 49,3 (CH); 63,6 (CH); 75,5 (CH); 88,2 (CH); 211,8 (C). Composto **11**: **RMN**-¹H (300MHz, CDCl₃): (1,32 (d, 1H, J = 8,8 Hz); 1,44 (dt, 1H, J₁ = 8,7 Hz, J₂ = J₃ = 1,9 Hz); 2,27 (m, 2H); 2,59 (m, 2H); 3,18 (s, 2H); 3,40 (m, 2H); 6,12 (t, 2H, J = 1,7 Hz). **RMN**-¹³C (75MHz, CDCl₃): 37,8 (CH₂); 47,3 (CH); 48,6 (CH₂); 51,8 (CH); 136,5 (CH); 209,6 (C=O). Este último descrito na literatura [ITO, 2007].

5.2.8 *rel*-(4*S*,5*S*,6*S*,8*S*,1*R*,2*R*,12*R*)-5-Hidróxi-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ona (**23**)

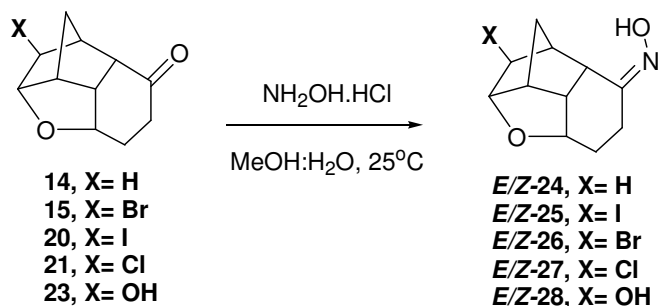


Procedimento: O composto **12** (18,7 mg, 0,11 mmol) foi dissolvido inicialmente em 1,5 mL de CH₂Cl₂ e em seguida foi adicionado ácido *m*-cloroperbenzóico (MCPBA) (17 mg, 0,10 mmol). A mistura resultante foi agitada por 2 horas em temperatura ambiente. Por CCD observou-se que o material de partida foi consumido, elaborando-se a reação com um acréscimo de CH₂Cl₂ e lavagem com H₂O destilada (3 X 5 mL). A fase orgânica foi secada

Parte experimental

com MgSO_4 anidro e filtrada e o solvente removido a vácuo. O resíduo resultante foi colunado através de uma coluna contendo sílica do tipo “flash”, usando-se hexano:acetato 1:1, como eluente. Rendimento: 97%. Óleo amarelo à temperatura ambiente. Rendimento: 97%. **RMN- ^1H** (300MHz, CDCl_3): δ 1,81-1,92 (1H); 1,97 (1H); 1,88-2,20 (1H); 2,17-2,25 (2H); 2,20 (1H); 2,48-2,53 (1H); 2,96-2,98 (2H); 3,07 (1H); 3,61 (1H); 4,32 (1H); 4,09 (1H). **RMN- ^{13}C** (75MHz, CDCl_3): 26,0 (CH_2); 32,2 (CH_2); 34,9 (CH_2); 42,3 (CH); 45,9 (CH); 47,3 (CH); 48,1 (CH); 75,7 (CH); 77,1 (CH); 87,3 (CH); 213,4 (C).

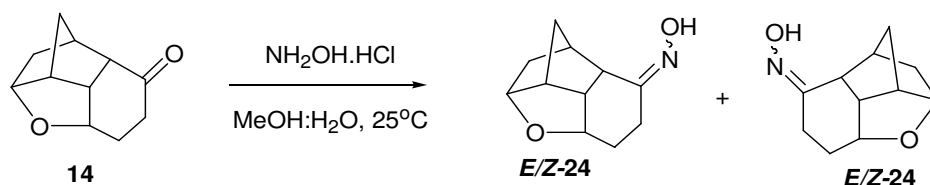
5.2.9 Preparação das oximas



Procedimento Geral: A cetona (0,107 g; 0,3 mmol) foi dissolvida em 3 mL de metanol: água (4:1). Acetato de sódio (0,06 g; 0,7 mmol) e cloridrato de hidroxilamina (0,049 mg; 0,7 mmol) foram adicionados à reação e manteve-se a mistura sob agitação a temperatura ambiente por 1-1,5 hora. Ao final da reação foi adicionada água ao meio e o produto foi extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro e o solvente eliminado em evaporador rotativo. A purificação foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando hexano: acetato de etila (2:1) com exceção para a oxima **28** iniciando numa proporção de (2:1) hexano: acetato de etila e aumentando o gradiente até a proporção de (1: 3) de hexano: acetato de etila.

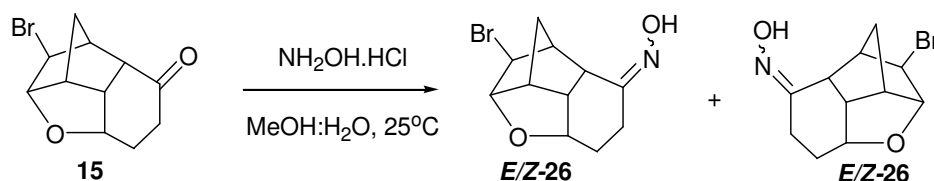
Parte experimental

5.2.9.1 Oxima *E*-24 e/ou *Z*-24



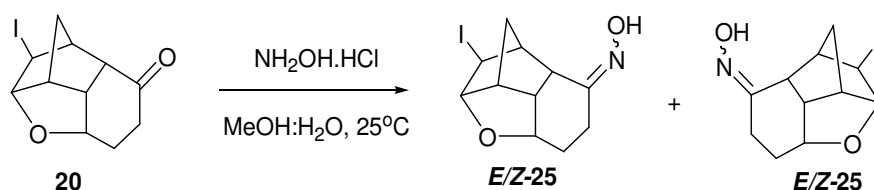
Procedimento: Rendimento: 90 %. **RMN-¹H** (300 MHz; CDCl₃): δ 1,34 (1H); 1,43 (1H); 1,53 (1H); 1,45-1,57 (1H); 1,60 (1H); 2,02-2,10 (1H); 2,19-2,22 (1H); 2,25 – 2,28 (1H); 2,28 (1H); 2,52 (1H); 2,90 (1H); 3,32 (1H); 4,24 (1H); 4,41 (1H); 9,26 (1H). **RMN-¹³C** (75 MHz; CDCl₃): δ 24,2 (CH₂); 26,7 (CH₂); 36,8 (CH₂); 36,9 (CH); 37,2 (CH); 37,5 (CH₂); 40,9 (CH); 48,6 (CH); 75,5 (CH); 79,7 (CH); 160,3 (C).

5.2.9.2. Oxima *E*-26 e/ou *Z*-26



Procedimento: Rendimento: 97 %. **RMN-¹H** (300 MHz; CDCl₃): δ 1,34 (1H); 1,43 (1H); 1,53 (1H); 1,45-1,57 (1H); 1,60 (1H); 2,02-2,10 (1H); 2,19-2,22 (1H); 2,25– 2,27(1H); 2,28 (1H); 2,52 (1H); 2,90 (1H); 3,32 (1H); 4,24 (1H); 4,41 (1H). **RMN-¹³C** (75 MHz; CDCl₃): δ 24,3 (CH₂); 26,4 (CH₂); 35,4 (CH₂); 35,9 (CH); 39,9 (CH); 45,7 (CH); 48,4 (CH); 55,8 (CH); 76,3 (CH); 88,8 (CH) 158,8 (C). **IV** (cm⁻¹): 3211,19; 2883,32 – 2950,82; 1635,49 – 1652,85.

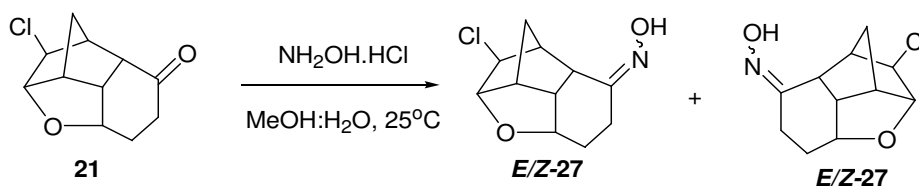
5.2.9.3. Oxima *E*-25 e/ou *Z*-25



Parte experimental

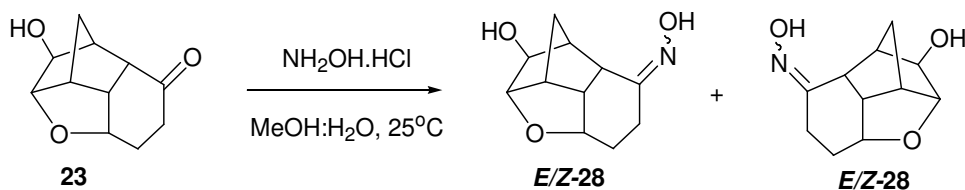
Procedimento: Rendimento: 95 %. **RMN-¹H** (300 MHz; CDCl₃): δ 1,46 – 1,64 (1H); 1,83 (1H); 2,04 – 2,11 (1H); 2,19 (1H); 2,32 (1H); 2,27 – 2,38 (2H); 2,54 (1H); 2,86 (1H); 3,83 (1H); 3,44 (1H); 4,22 (1H); 4,80 (1H); 9,18 (-OH). **RMN-¹³C** (75 MHz; CDCl₃): δ 24,1 (CH₂); 26,0 (CH₂); 33,7 (CH); 35,9 (CH); 37,2 (CH₂); 39,6 (CH); 46,6 (CH); 48,8 (CH); 76,0 (CH); 89,8 (CH); 158,5 (C).

5.2.9.4. Oxima *E*-27 e/ou *Z*-27



Procedimento: Rendimento: 90 %. **RMN-¹H** (300 MHz; CDCl₃): δ 1,48-1,57 (1H); 1,59 (1H); 1,97-2,05 (1H); 2,10 (1H); 2,24-2,38 (2H); 2,42 (1H); 2,74 (1H); 2,92 (1H); 3,40 (1H); 3,69 (1H); 4,25 (1H); 4,34 (1H); 9,03 (OH). **RMN-¹³C** (75 MHz; CDCl₃): 23,9 (CH₂); 26,1 (CH₂); 33,8 (CH₂); 35,2 (CH); 39,6 (CH); 45,3 (CH); 47,7 (CH); 64,1 (CH); 76,5 (CH); 88,6 (CH); 158,1 (C).

5.2.9.5. Oxima *E*-28 e/ou *Z*-28



Procedimento: A purificação foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando hexano: acetato de etila iniciando numa proporção de (2:1) aumentando o gradiente até a proporção de (1: 3) de hexano: acetato de etila. Rendimento: 90 %. **RMN-¹H** (300 MHz; CDCl₃ > CD₃OD _{1 gota}): δ 1,41 (1H); 1,83 (1H); 1,88-1,96 (1H); 2,12-2,25 (3H); 2,46 (1H); 2,54-2,59 (1H); 2,79 (1H); 3,20 (1H); 3,49 (1H); 3,93 (1H); 4,18 (1H). **RMN-¹³C** (75 MHz; CDCl₃ > CD₃OD): δ 23,8 (CH₂); 26,3 (CH₂); 32,4 (CH₂); 33,8 (CH); 39,7 (CH); 43,9 (CH); 46,8 (CH); 76,4 (CH); 76,7 (CH); 87,5 (CH); 158,7 (C).

5.3. Biotransformação

5.3.1. Material Biológico

O fungo sapróbio *Mucor ramosissimus* (*URM 3087) foi fornecido pela Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo. O fungo foi mantido no Anexo de Biotransformação do LP-4 e a manutenção deste microrganismo foi feita por subcultura sucessivas em meio sólido BDA da Merck, em tubos inclinados e placas de Petri.

5.3.2. Biotransformação com Células Integrais de Microrganismos

5.3.2.1. Ensaio Padrão

Preparo do meio de cultura líquido: O fungo *Mucor ramosissimus* foi cultivado em erlenmeyers de 250 mL previamente autoclavados em meio de cultura contendo D-glucose (4,0 g), asparagina (0,2 g), fosfato de potássio monobásico (0,05 g), sulfato de magnésio (0,025 g), tiamina (0,05 g) dissolvidos em 100 mL de água destilada. O pH do meio foi ajustado para 6,0 com uma solução aquosa de NaOH 0,1M [ITO, 2007].

Inoculação do microrganismo ao meio líquido: A inoculação do meio de cultura líquido foi realizada pela retirada de um pequeno fragmento do meio de cultura sólido contendo o fungo com a ajuda de uma alça do tipo agulha em forma de “L”, o qual foi adicionado ao meio de cultura líquido. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e com incidência de luz ultravioleta por 15 minutos.

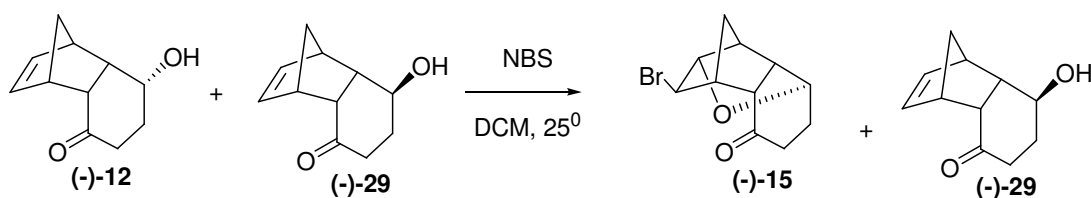
5.3.2.2. Reação de biotransformação

Biotransformação do composto 11: Após a inoculação com *M. ramosissimus*, o meio líquido (150 mL) foi mantido em incubadora a 30°C com agitação a 150 rpm na ausência de luz. Após um período de 48 horas o substrato orgânico **11** (150 mg) foi adicionado e monitorado por 15 dias. Foram utilizados três tipos de controles para as reações: apenas meio de cultura, meio de cultura e substrato, meio de cultura e fungo. O meio foi filtrado

Parte experimental

em celite para retirada dos micélios e os produtos extraídos com acetato de etila (3 X 50 mL), sendo a fase orgânica secada sobre MgSO_4 anidro e concentrado em evaporador rotativo. O resíduo da fase orgânica foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel, usando hexano/ acetato de etila (2:1) como eluente. Foram recuperados 10% de material de partida e 75% da mistura dos álcoois **12** e **29** na proporção de 75:25 (determinada através do espectro de RMN de ^1H). Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da mistura estão de acordo com os reportados na literatura [MARCHAND, 1995]. Os valores da atividade óptica obtidos foram $\alpha_{20}^D = -31,04$, c. 0,057, MeOH.

Síntese 1: Reação com o produto diastereoisomérico da biotransformação



Procedimento: A mistura diastereoisomérica (0,044 g) foi solubilizada em 4 mL de CH_2Cl_2 e em seguida acrescentado NBS (0,04 g; 0,15 mmol). A formação do novo produto, observado por CCD, mais apolar e amarelo e o material de partida ainda presente, mas modificado para preto em vez marrom-amarelada, a mistura reacional foi elaborada com acréscimo de CH_2Cl_2 e H_2O destilada (3 X 10 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO_4 anidro, o solvente foi removido com vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando hexano: acetato de etila (1:1) como eluente.

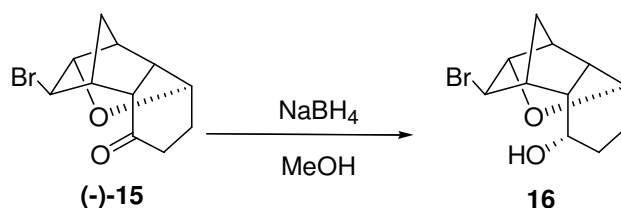
Composto **29**: **RMN- ^1H** (300 MHz; CDCl_3): 1,40 - 1,47 (m, 1H), 1,52 (dd, $J = 11,1$; 1,7 Hz, 1H); 1,61 - 1,68 (m, 2H); 1,97 (ddd, $J = 14,4$; 6,8; 3,4 Hz, 1H); 2,13 (d, $J = 11,1$ Hz, 1H); 2,31 (m, 1H); 2,41 (m, 1H); 2,63 (m, 1H); 2,92 (m, 1H), 4,13 (m, 1H); 4,25 (d, $J = 17,9$; 7,7 Hz, 1H); 4,55 (d, $J = 5,1$ Hz, 1H). **RMN- ^{13}C** (75 MHz; CDCl_3): δ 30,9 (CH_2), 37,2 (CH_2), 44,3 (CH), 45,3 (CH), 48,3 (CH_2), 49,3 (CH), 52,0 (CH), 71,7 (CH), 134,6 (CH), 138,1 (CH), 213,2 (C), comparado com o descrito na literatura [ITO, 2007].

Composto (-)-**15**: **RMN- ^1H** (300MHz, CDCl_3): δ 1,66 (d, $J = 11,2$, 1H), 1,85 - 1,96 (m, 1H), 2,17 (dd, $J = 11,2$; 2,2, 1H), 2,18-2,31 (m, 1H), 2,34 - 2,41 (m, 1H), 2,54 - 2,60 (m, 1H), 2,69 - 2,77 (m, 1H), 3,00 (m, 1H), 3,72 (d, $J = 2,3$, 1H), 4,28 (ddd, $J = 1,8$; 4,0; 4,2,

Parte experimental

1H), 4,59 (d, $J = 5,1$, 1H). **RMN- ^{13}C** (75MHz, CDCl_3): δ 25,8 (CH_2), 34,8 (CH_2), 35,0 (CH_2), 42,2 (CH), 46,8 (CH), 48,5 (CH), 49,8 (CH), 55,0 (CH), 75,2 (CH), 88,4 (CH), 211,7 (C), comparado com o descrito na literatura [ITO, 2007]. $[\alpha]_{\text{D}} = -101,7^\circ$, c. 0,002, CHCl_3

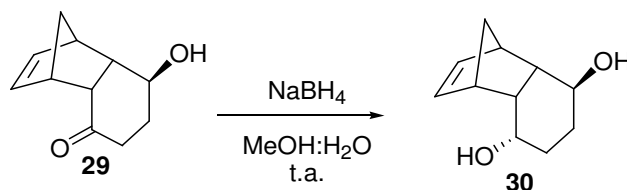
Síntese 2: (-)-(4*S*,5*S*,6*S*,8*S*,1*R*,2*R*,11*R*,12*R*)-5-Bromo-7-oxatetraciclo[6.4.0.0^{2,6}.0^{4,12}]dodecan-11-ol



Procedimento: Uma solução do composto **15** (36,4 mg, 0,15 mmol) em MeOH (0,11 mL) foi resfriada em banho de gelo. Em seguida foi adicionado NaBH_4 (6,4 mg, 0,17 mmol). Após acrescentados os reagentes a solução foi retirada do banho de gelo e agitada por 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 1 gota de ácido acético e adicionado mais 2 mL de CH_2Cl_2 e lavada com H_2O destilada (3 X 2 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO_4 anidro e o solvente removido sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando-se hexano: acetato de etila (2:1) como eluente. Rendimento: 80 %. **RMN- ^1H** (300 MHz; CDCl_3): 1,40 - 1,47 (m, 1H), 1,52 (dd, $J = 11,1$; 1,7 Hz, 1H); 1,61 - 1,68 (m, 2H); 1,97 (ddd, $J = 14,4$; 6,8; 3,4 Hz, 1H); 2,13 (d, $J = 11,1$ Hz, 1H); 2,31 (m, 1H); 2,41 (m, 1H); 2,63 (m, 1H); 2,92 (m, 1H), 4,13 (m, 1H); 4,25 (d, $J = 17,9$; 7,7 Hz, 1H); 4,55 (d, $J = 5,1$ Hz, 1H). **RMN- ^{13}C** (75 MHz; CDCl_3): 26,1 (CH_2); 26,7 (CH_2); 35,4 (CH_2); 39,5 (CH); 42,9 (CH); 44,2 (CH); 49,1 (CH); 56,5 (CH); 69,7 (CH); 76,1 (CH); 88,7 (C-O). Comparados com os valores descritos na literatura [ITO, 2007]. $[\alpha]_{\text{D}}$ de $-73,2^\circ$, c. 0,003, CHCl_3

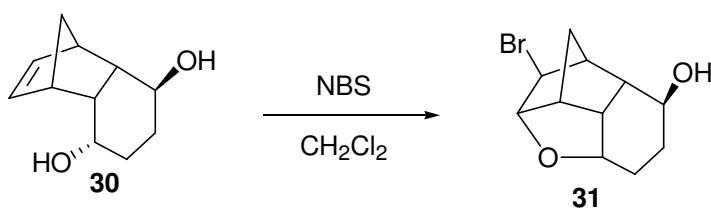
Parte experimental

Síntese 3: Redução do *rel*-(1*S*,2*S*,6*R*,7*R*,8*R*)-6-hidroxitriciclo[6.2.1.0^{2,7}]undec-9-en-3-ona (**29**) para (5*S*,8*S*)-1,4,4*a*,5,6,7,8,8*a*-octaidro-1,4-metanonaftaleno-5,8-diol (**30**)



Procedimento: Uma solução do composto **29** (15 mg, 0,08 mmols) em uma mistura de 0,3 mL de metanol e água (5:1/) foi resfriada a 0° C. A esta mistura fria foi adicionado NaBH₄ (3,1 mg, 0,085 mmol). Após a adição do agente redutor à temperatura ambiente, a mistura reagente foi agitada por 2,5 horas. Ácido acético glacial (0,05 mL) foi adicionado, seguido da adição de água gelada (1 mL). O produto foi extraído com CH₂Cl₂ (3 X 10,0 mL). Após a secagem da fase orgânica com MgSO₄ anidro, o solvente foi removido com vácuo. **RMN-¹H** (300MHz, CDCl₃): δ 1,58 (*d*, *J* = 11,0 Hz, 1H); 1,60 (*m*, 2H); 1,88 (*m*, 2H); 2,11 (*dd*, *J* = 11,0; 1,6 Hz; 1H); 2,16 (*ddd*, *J* = 11,0; 5,5; 4,8 Hz; 1H); 2,44 (*dd*, *J* = 16,5; 5,6 Hz; 1H); 2,92 (*m*, 2H); 3,06 (*m*, 1H); 3,54 (*dd*, *J* = 11,0; 5,5; 4,8 Hz; 1H); 4,07 (*ddd*, *J* = 10,9; 9,9; 6,5 Hz; 1H); 6,16 (*dd*, *J* = 5,6; 3,0 Hz; 1H); 6,30 (*dd*, *J* = 5,6; 3,0 Hz; 1H). **RMN-¹³C** (75 MHz; CDCl₃): 29,0 (CH₂); 29,2 (CH₂); 44,7 (CH); 46,2 (CH); 48,5 (CH); 50,9 (CH); 68,7 (CH); 70,0 (CH); 135,9 (CH); 136,4 (CH).

Síntese 4: Reação de bromação com o (5*S*,8*S*)-1,4,4*a*,5,6,7,8,8*a*-octaidro-1,4-metanonaftaleno-5,8-diol (**30**)

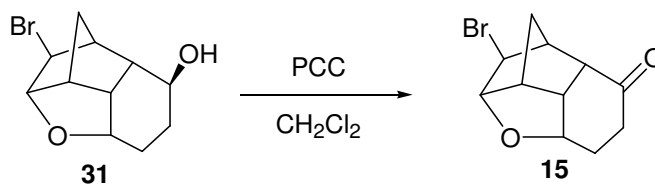


Procedimento: O diol **30** (0,044 g) foi solubilizada em 4 mL de CH₂Cl₂ e em seguida acrescentado NBS (0,04 g; 0,15 mmol). Observando a formação do novo produto, mais apolar e amarelo e a mancha do material de partida estiver preto, foi elaborado a reação com acréscimo de CH₂Cl₂ e lavagem com H₂O destilada (3 X 10 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro, o solvente foi removido com vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando hexano: acetato de etila (1:1) como eluente. **RMN-¹H** (300 MHz; CDCl₃): 1,45 (*m*, 1H), 1,58 (*dd*, *J* = 11,0; 1,6 Hz, 1H); 1,70 -

Parte experimental

1.81 (m, 2H); 1.74 – 1.80 (m, 1H); 2.10 (m, 1H); 2.11 (dd, $J = 11,0$; 1,6 Hz, 1H); 2.30-2.36 (ddd, $J = 10,5$; 5,7; 4,6 Hz, 1H); 2.40 (m, 1H); 2.86 (m, 1H); 3.07 (m, 1H), 4.01 (d, $J = 2,1$, 1H); 4.17 (m, 1H); 4.50 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H). **RMN- ^{13}C** (75 MHz; CDCl_3): 21,7 (CH_2); 26, 2 (CH_2); 35,5 (CH); 36,2 (CH); 44,8 (CH); 46, 3 (CH); 48,6 (CH); 55,8 (CH); 66,8 (CH); 76,5 (CH); 88,5 (CH).

Síntese 5: Oxidação do álcool secundário **31** para obtenção da bromo-cetona **15**



Procedimento: PCC (3,7 mg, 0,017mmol) foi adicionado em uma solução de bromo-álcool **31** (3 mg, 0,011 mmols) em 0,5 mL de CH_2Cl_2 . Após 30 minutos de agitação, foi monitorada por CCD e observando que o material de partida foi totalmente consumida, a mistura foi filtrada e elaborada com 3 porções de água destilada. A fase orgânica foi secada em MgSO_4 anidro e o solvente foi removido. **RMN- ^1H** (300MHz, CDCl_3): δ 1,66 (d, $J = 11,2$, 1H), 1,85 – 1,96 (m, 1H), 2,17 (dd, $J = 11,2$; 2,2, 1H), 2,18-2,31 (m, 1H), 2,34 – 2,41 (m, 1H), 2,54 – 2,60 (m, 1H), 2,69 – 2,77 (m, 1H), 3,00 (m, 1H), 3,72 (d, $J = 2,3$, 1H), 4,28 (ddd, $J = 1,8$; 4,0; 4,2, 1H), 4,59 (d, $J = 5,1$, 1H). **RMN- ^{13}C** (75MHz, CDCl_3): δ 25,8 (CH_2), 34,8 (CH_2), 35,0 (CH_2), 42,2 (CH), 46,8 (CH), 48,5 (CH), 49,8 (CH), 55,0 (CH), 75,2 (CH), 88,4 (CH), 211,7 (C). Comparados com os valores descritos na literatura [ITO, 2007].

Biotransformação do composto **11** para monitoramento diário durante 30 dias para experimento em CG-EM

O procedimento inicial foi idêntico ao descrito para a dicetona **11**. Após inoculação do fungo e do substrato, foi coletado alíquotas de 200 μL num período de 48 horas durante 30 dias. Para micro-extração, foi feito um micro-filtro com celite em uma pipeta Pasteur para retirada de micélios e extraído com acetato de etila e a fase orgânica secada em MgSO_4 e concentrou a fase orgânica. Para retirada do triacilglicerol proveniente do fungo,

Parte experimental

antes do preparo da amostra para cromatografia gasosa, as amostras foram filtradas em cartucho Supelclean LC-18 da supelco em metanol.

5.4 Ensaios de Citotoxicidade *in vitro*

As culturas de células e os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal de Ceará, sob supervisão da Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa

5.4.1. Material biológico

Células: As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (célula de câncer de mama humana), SF-295 (glioblastoma – célula tumoral de SNC humano) e HL-60 (célula leucêmica promielocítica humana), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostras: As 10 amostras sintetizadas (Tabela 4) foram diluídas em DMSO puro estéril. As substâncias foram testadas na concentração única de 5µg/mL.

5.4.2. Avaliação de citotoxicidade *in vitro*

Método: Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano [SKEHAN *et al.*, 1990]. É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação [BERRIDGE *et al.*, 1996].

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e 0,7 x 10⁵ cél/mL para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da

Parte experimental

solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm. Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

5.5. Ensaios biológicos com a enzima tirosinase

Os ensaios com a enzima tirosinase foram realizados no Laboratório de Pesquisa 2 da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, sob supervisão da Prof.^a Dar. Neli Kika Honda.

5.5.1. Atividade enzimática específica

A atividade específica da enzima foi inicialmente calculada a fim de se conhecer a concentração ótima para realização do teste. A avaliação da atividade específica foi realizada em solução. Adicionou-se 1,7 mL de tampão fosfato (1/15M, pH = 6,8), 0,1 mL da solução de enzima tirosinase (75µg/ mL de tampão fosfato) e 0,2 mL de L-Dopa (0,3%, m/v, em água deionizada). O controle foi realizado pela medida da absorbância da solução contendo todos os componentes com exceção da enzima tirosinase. Após a homogeneização das soluções foram realizadas as leituras de absorbância a 475 nm após o primeiro minuto de reação em intervalos de 30 segundos, por dez minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A determinação da quantidade de produto formado, dopacromo, foi calculada do seguinte modo:

$$C = (A / \epsilon \times b) \times 10^6$$

Onde:

C = concentração de dopacromo formado (µM);

A = absorbância a 475 nm;

ε = absortividade molar do dopacromo (3.700 M⁻¹ cm⁻¹) e

b = largura da cubeta (1,0 cm)

Parte experimental

A atividade específica foi realizada como base na oxidação do substrato L-Dopa pela enzima tirosinase formando dopacromo e foi determinada pelo aumento da absorbância a 475 nm. A atividade enzimática foi expressa em μmol (dopacromo)/ μg (enzima tirosinase). Após o cálculo da concentração de dopacromo em cada tempo, foi plotado um gráfico (gerado com o auxílio do programa Origin 6.0., figura 20) de concentração de dopacromo contra o tempo. O coeficiente angular da reta ($B = 18,16$) corresponde à variação da concentração de dopacromo (μM) formado por unidade de tempo (minutos). Portanto a atividade enzimática específica obtida foi de $9,0 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{min. } \mu\text{g}$.

Linear Regression for DATA1_B
 $Y = A + B * X$

Parameter	Value	Error	
A	10,19	1,48	
B	18,16	0,47	
R	SD	N	P
1	1,39	7	>0,0001

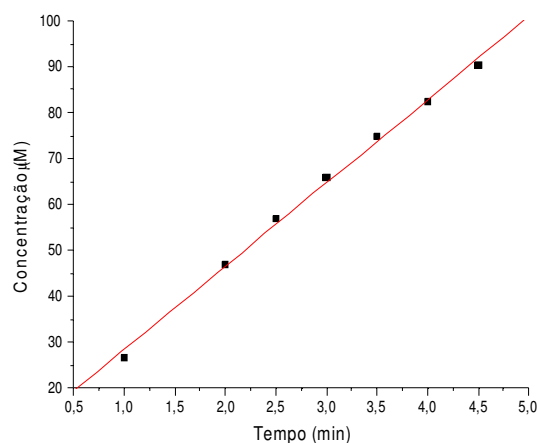


Figura 22: Gráfico gerado para atividade específica da enzima utilizada para a realização dos ensaios.

5.5.2. Avaliação enzimática

A avaliação das substâncias **14**, **15**, **20**, **21**, **23**, **24**, **25**, **26**, **27** e **28** sobre a enzima tirosinase (adquirida da sigma-aldrich) foi realizada pela técnica de bioautografia. As substâncias foram solubilizadas em acetato de etila, exceto a substância **28** foi solubilizada em acetato de etila e metanol (1:1, v/v). Foram realizadas diluições para obter soluções com concentração de 300, 200, 100, 75, 50 e 25 μg por 20 microlitros e a aplicação foi realizada utilizando uma micropipeta automática.

O ensaio da atividade das substâncias foi realizada com a pulverização de solução da enzima tirosinase (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão fosfato 1/15M, pH = 6,8) sobre a placa

Parte experimental

contendo as substâncias aplicadas. Após 5 minutos foi pulverizada a solução de L-Dopa (0,3%, m/v em água deionizada). O resultado foi registrado em intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos por meio de fotografia (até não houver mais alterações na superfície da placa).

Referências

REFERÊNCIAS

- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 4: 14-19, **1996**.
- BREITMAYER, E. **Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical Guide**. 3rd Ed. Germany. John Wiley & Sons, Ltd. **2002**.
- BROOKES, K. B.; HICKMOTT, P. W.; JUTLE, K. K.; SCHREYER, C. A. Introduction of pharmacophoric groups into polycyclic systems. Part 4. aziridine, oxiran and tertiary β -hydroxythylamine derivatives of adamantane. *South African Journal of Chemistry*. vol. 45, p. 8-11, **1992**.
- CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. Application of a combination of neutral red and amid black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials*, v. 17, p. 1259-1264, 1996.
- CLAYDEN, J.; GREEVS, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**. Oxford University Press, p. 912-916. 2001.
- CONSTANTINO, M. G.; BEATRIZ, A.; SILVA, G. V. J. da.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Synthetic studies on the diels-alder adduct from 3,4-dimethoxyfuran and benzoquinone. *Synthetic Communications*, vol. 31, p. 3329-3336, **2001**.
- COSTA, V. E. U.; MARTINS, J. E. D. Using ^1H NMR and Chiral Chemical Shift Reagent to Study Intramolecular Racemization of Pentacyclo Pure Enantiomer by Thermal Dyotropic Reaction. *Annual Magnetic Resonance*. Vol. 5, p. 5-10, **2006**.
- CUNHA, A. C.; PAIXÃO, F. M.; SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, V. F. Cloreto isocianúrico e cloreto cianúrico: aspectos gerais e aplicações em síntese orgânica. *Química Nova*, Vol. 29, p. 520-527, **2006**.
- ELLIS, D. H. Zygomycetes In: **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 9th edition. Edward Arnold London. p. 247-277. **1997**.
- FERREIRA, V. F.; BARREIRO, E. J. L. & COSTA, P. R. R. Substâncias enantiomericamente puras: Motivações acadêmicas e implicações industriais. *Ciência Hoje*. 1996.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 2. ed. Nva York: Wiley-Liss, 1990.
- GELDENHUYS, W. J. ; MALAN, s. F.; BLOOMQUIST, J. R.; MARCHAND, A. P.; VAN DER SCHYF, C. J., Pharmacology and Structure-Activity Relationships of Bioactive Polycyclic Cage Compounds: A Focus on Pentacycloundecane Derivatives. *Medicinal Research Review*. vol. 25, N° 1, 21-48. **2005**.

Síntese, Biotransformação e avaliação biológica de novos heterociclos cage-like derivados do triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona

- GOVENDER, T.; HARIPRAKASHA, H. K.; KRUGER, H.; RAASCH, T. Synthesis of trishomocubane amino acid derivatives. *South African Journal of Chemistry*, vol. 58, p. 37-40, **2005**.
- ITO, F. M.; PETRONI, J. M.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A.; MARQUES, M. R.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L.V. C.; MONTENEGRO, R. C.; MAGALHÃES, H. I.; PESSOA, C. Synthesis and biological Evaluation of rigid polycyclic derivatives of the Diels-Alder adduct tricyclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona. *Molecules*, vol. 12, p. 271-282, **2007**.
- ITO, F. M.; MENA, A. E. M.; MARQUES, M. R.; de Lima, D. L.; Beatriz, A. Biotransformation of a cage-like Diels-Alder Adduct and derivatives by *Mucor ramosissimus* SAMUTSEVITSCH. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 40, p. 563-568, **2009**.
- ITO, F. M. *Síntese, Biotransformação e Avaliação Biológica de Substâncias Policíclicas Cage-Like Derivadas do Aduto de Diels-Alder Triciclo[6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dien-3,6-diona*. **2007**. (dissertação de mestrado, Departamento de Química, UFMS) Versão eletrônica ver: http://www.dqi.ufms.br/~lp4/Dissert_Felicia2007.pdf
- KIM, Y. -J. and UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthesis sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 62, p. 1707-1723, **2005**.
- LOUGHLIN, W. A. Biotransformations in organic chemistry. *Bioresource Technology*, vol. 74, p. 49-62, **2000**.
- MARCHAND, A.P. Synthesis and chemistry of homocubanes, bishomocubanes and trishomocubanes. *Chemical Review*, vol. 89, p. 1011-1033. **1989**.
- MARCHAND, A. P.; XING, D.; WANG, Y.; BOTT, S. G. Improved of racemic and optically active 4-hydroxycyclohex-2-en-1-one. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 6, n° 11, p. 2709-2714, **1995**.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, p. 55-63, **1983**.
- OLIVEIRA, K. T., *Estudos sintéticos e teóricos sobre anulenos e baquenolidas*. **2006**. (tese de doutorado, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP)
- OLIVEIRA, L. G. & MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: Contribuições e perspectivas. *Química nova*, vol. 32, n° 3, 742-756, **2009**.
- OLIVER, D. W.; DEKER, T. G.; SNYCKERS, F. O. Antiviral properties of 4-amino-(D₃)-trishomocubanes. *Arzneimittel-Forschung*, vol. 41, p. 549-552, **1991**.

PARSONS, C. G.; DANYSZ, W.; QUACK, G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist – Review of preclinical data. *Neuropharmacology*, 38, p. 735-767, **1999**.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy – A guide for students of Organic Chemistry**. 3rd ed. Thomson Learning, United States of America. **2001**.

PEREIRA, R. S. Fermento biológico de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) e seu uso em síntese assimétricas. *Química nova*, vol. 18, nº5, p. 452-459. **1995**.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of Laboratory Chemicals**, 3rd Ed., Pergamon Press, Oxford, **1988**.

RANGANATHAN, D.; THOMAS, A.; HARIDAS, V.; KURUR, S.; MADHUSUDANAN, P.; ROY, R.; KUNWAR, A. C.; SARMA, A. V. S.; VAIRAMANI, M. and SARMA, K. D. Design, synthesis and characterization of tyrosinophanes, a novel family of aromatic-bridged tyrosine-based cyclodepsipeptides. *Journal of Organic Chemistry*, vol. 64, p. 3620-3629, **1999**.

SALLES, R. C.; LACERDA JÚNIOR, V. ; BEATRIZ, A.; ITO, F. M.; SANTOS, R. B.; GRECO, S. J.; DE CASTRO, E. V. R.; DE LIMA, D. P.; ¹H and ¹³C NMR spectral data of bioactive cage-like polycyclic compounds. *Magnetic Resonance in Chemistry*, vol. 48, p. 409-415, **2010**.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G. C.; MORRIL; T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5^a ed. Guanabara Koogan. **1994**.

SIMÕES, K., *Caracterização do eliciador do fungo Mucor ramosissimus e estudo da supressão de sua atividade indutora em soja por fragmento de polissacarídeos pécticos*. **2004**. (dissertação de mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP)

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. *Journal Of The National Cancer Institute*, vol. 82, nº13, p. 1107-1112, **1990**.

SOLOMONS, T. W. G. & FRYHLE, C. G. **Organic chemistry**, 9th ed, John Wiley & Sons, Inc, EUA, **2008**.

SOUZA, A.P., ITO, F. M.,_BEATRIZ, A. MARQUES, M.R., LIMA, D.P., PETRONI, J.M., CAPUTO, B.A., CANHETE, G.M. Atividade inseticida de substâncias cage-like derivadas do triciclo [6.2.1.0^{2,7}]undeca-4,9-dieno-3,6-diona. In: XXI Congresso Brasileiro de Entomologia. Resumo. Recife, Agosto, **2006**.

SZEWECZYK, R.; BERNAT, P.; MILCZAREK, K.; DLUGONSKI, J. Application of microscopic fungi isolated from polluted industrial areas for polycyclic aromatic hydrocarbons and pentachlorophenol reduction. *Biodegradation*, vol.14, p. 1-8, **2003**.

TADA, I.; MOTOKI, M.; TAKAHASHI, N.; MIYATA, T.; TAKECHI, T.; UCHIDA, T.; TAKAGI. Synthesis and structure-activity relationships of miticidal 4,5-dihydropyrazole-5-thiones. *Pesticide Science*, vol. 48, p. 165-163, **1996**.

UNDERWOOD, G.R.; RAMAMOORTHY, B. Chemical studies of caged compounds. II the synthesis of pentacyclo[6.3.0^{2,6}.0^{3,10}.0^{5,9}]undecane: trishomocubane. *Tetrahedron Letters*, vol. 11, p. 4125-4127, **1970**.

VAN DER SCHYF, C. J.; GELDERNHUYS, W. Polycyclic Compounds: Ideal Drug Scaffolds for the Design of Multiple Mechanism Drugs? *Neurotherapeutic: The journal of the American society for experimental neurotherapeutics*. vol. 6, p. 175-186, **2009**.

WAISSER, K.; GREGOR, J.; DOSTÁL, H.; KUNEŠ, J.; KUBICOVÁ, L.; KLIMEŠOVÁ, V.; KAUSTOVÁ, J. Influence of the replacement of the oxo function on with the thioxo group on the antimycobacterial activity of 3-aryl-6,8-dichloro-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H) diones and 3-arylquinazoline-2,4(1H,3H)-diones. *II Farmaco*, vol. 56, p. 803-807, **2001**.

WAISSER, K.; GREGOR, J.; KUBICOVÁ, L.; KLIMEŠOVÁ, V.; KUNEŠ, J.; MACHÁEK, M.; KAUSTOVÁ, J. New groups of antimycobacterial agents: 6-chloro-3-phenyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and 6-chloro-3-phenyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 35, p. 733-741, **2000**.

WANGTHONG, S.; TONSIRIPAKDEE, I.; MONHAPHOL, T.; NONTHABENJAWAN, R.; WANICHWECHARUNGRUAND, S. P. Post TLC developing technique for tyrosinase inhibitor detection. *Biomedical chromatography*, vol. 21, p94-100, **2007**.

YOSHIDA, N.; KAMIKUBO, T.; OGASAWARA, K. A concise synthesis of (-)-neplanocin A. *Tetrahedron Letters*, vol. 39, p. 4677-4678, **1998**.

Oração da serenidade

“Conceda-me serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar, coragem para mudar aquelas que posso e sabedoria para reconhecer a diferença entre elas”



ESTE PROJETO DE PESQUISA RECEBEU O APOIO FINANCEIRO DA:



**Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino,
Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul**