



Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Química

**Semissíntese de derivados de moléculas biologicamente ativas obtidas
de plantas e microrganismos da Amazônia**

Rafael Castro Araújo

**MANAUS - AM
Abril - 2016**

Rafael Castro Araújo*

Semissíntese de derivados de moléculas biologicamente ativas obtidas de plantas e microrganismos da Amazônia

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química. Área de atuação: Química Orgânica

Orientador: Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

Coorientador: Dr. Joel Aparecido Passo

* bolsista CNPq

**MANAUS - AM
2016**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A663s Araujo, Rafael Castro
Semissíntese de derivados de moléculas biologicamente ativas
obtidas de plantas e microrganismos da Amazônia / Rafael Castro
Araujo. 2016
91 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Dr. Afonso Duarte Leão de Souza
Coorientador: Dr. Joel Aparecido Passo
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Semissíntese. 2. Policarpol. 3. Bergenina. 4. Ácido Secalônico.
I. Souza, Dr. Afonso Duarte Leão de II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

**“SEMISSÍNTESE DE DERIVADOS DE MOLÉCULAS
BIOLOGICAMENTE ATIVAS OBTIDAS DE PLANTAS E
MICROORGANISMOS DA AMAZÔNIA”**

Rafael Castro de Araújo

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado em 29 de abril de 2016

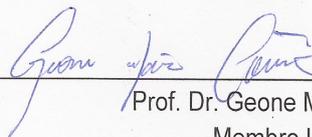
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Belém Pinheiro
Membro UFAM



Prof. Dr. Geone Maia Correa
Membro UFAM/ICET

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 29 de abril de 2016.

*Dedico este trabalho a minha mãe
Maria Verônica e ao meu Pai
Raimundo Nonato, por todo
suporte que me deram ao longo
dos anos para que eu pudesse
chegar até aqui, pois sempre
estiveram comigo não importava
as circunstâncias.*

"O que comprova uma teoria cientificamente é o fato de ela não ser infalível."

Jair Tércio

Agradecimentos

À Deus, a meus guias e protetores da parte astral e espiritual, que sempre estiveram comigo não me deixando seguir por caminhos obscuros.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo financiamento da vinda do professor visitante Dr. Francisco Franco-Montalbán.

À Central Analítica/CAM/UFAM e todos os seus funcionários, onde este trabalho foi realizado.

Ao CBA (Centro de Biotecnologia da Amazônia), pelas análises de RMN.

Aos meus pais, que acreditaram nessa conquista.

À Júlia Figueiredo, minha amiga, confidente e companheira pelo apoio irrestrito na etapa final desse trabalho.

Aos amigos Michel e Vanessa Franco, Odirlei e Tatiane Malaspina, Viviane Nogueira, Bruno Rivera, Edvaldo Melquíades, Aton Gondin e Victor Tagliari, que sempre souberam dá uma palavra de incentivo na hora em que mais precisava.

Ao professor Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, pela orientação, paciência, profissionalismo e formação profissional que me proporcionou

À professora Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza, autora do projeto que financiou esta dissertação, não apenas pela orientação, paciência e

persistência, mas pelo amparo e preocupação materna que sempre ofereceu a todos os seus alunos, muito obrigado.

Ao professor Dr. Francisco Franco-Montalbán, da Universidad de Granada, Espanha, pela orientação, planejamento dos experimentos e paciência .

Ao amigo professor Dr. Héctor Henrique Ferreira Koolen, pela orientação, auxílio, paciência, incentivo e viabilização das análises de RNM, massas, purificação por HPLC realizadas, sem você esse trabalho não estaria como está.

À professora Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro, pelas excelentes conversas e ensinamentos que me proporcionou

À professora Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura pela doação da bergenina para realizar meu trabalho.

Ao amigo Dr. Felipe Moura Araújo da Silva, pelas dúvidas tiradas e doação do Policarpol para a realização do meu trabalho.

Ao Prof. Dr Marco Machado pelas análises de RMN.

Ao Dácio Montenegro do CBA, pelas análise de RMN do Policarpol.

Ao Magno Perêa do INPA, pelas análises de RMN da Bergenina.

Ao colegas de laboratório Richardson Alves e Mayane de Souza, pelo acompanhamento no HPLC.

Aos alunos Larissa e Smith pelo auxílio na reta final no laboratório.

A todos os colegas da Central Analítica, onde esta dissertação, pela companhia e convívio.

Resumo

A região Amazônica é descrita por sua fauna, flora e microbiota, despertando o interesse de pesquisadores para o conhecimento dessa região. Tal interesse são pelas novas descobertas que afirmam a Amazônia como detentora de uma incrível biodiversidade, onde novas moléculas, com potencial para novos fármacos, são reportadas frequentemente. Entre as alternativas para os fármacos existentes no mercado, estão as semissínteses de moléculas orgânicas. Neste trabalho foram realizadas semissínteses a partir do Ácido Secalônico, da isocumarina Bergenina e do triterpeno Policarpol, substâncias bioativas isoladas, previamente, de um microorganismo e plantas da flora amazônica. Através de reações simples de modificação estrutural foram obtidos nove compostos, sendo identificados como: Ácido dibenzilsecalônico, dibenzilbergenina, 15-O-benzoilPolicarpol, 24-epoxi-Policarpol, 3-acetil-Policarpol, 15-acetil-Policarpol, 3,15-diacetil-Policarpol, 2,6,12,15-tetroxo-Policarpol. Adicionalmente foi isolado e caracterizado o intermediário de reação O-acildicicloexilisoureia. Este intermediário e os derivados do Policarpol são inéditos na literatura.

Palavras-chave: Semissíntese, Policarpol, bergenina, ácido Secalônico.

Abstract

The Amazon rainforest has been described by its fauna, flora and microbiota, arousing interest of researchers for this region aggregated knowledge. Such interest is regarding the new findings saying that Amazon has an incredible biodiversity, where new molecules with potential for new drugs are often reported. Among the alternatives to existing drugs in the market is semisynthesis of organic molecules. In this work all semisynthesis were made from secalonic acids, isocoumarin bergenin and triterpene polycarpol. Those bioactive substances were isolated in advance from a microorganism and plants from Amazon. Through simple structural modification reactions, nine compounds were obtained and identified as: dibenzyl secalonic acid, dibenzyl bergenin, 15-O-benzoyl-polycarpol, 24-epoxy-polycarpol, 3-acetyl-polycarpol, 15-acetyl-polycarpol, 3,15-diacetyl-polycarpol, 2,6,12,15-tetroxide-polycarpol. Additionally the reaction intermediate O-acyldicicloexylisoureia has been isolated and characterized. This intermediate and polycarpol derivatives are unprecedented in the literature.

Keywords: Semisynthesis, secalonic acid, bergenin, Polycarpol.

Sumário

Resumo	IX
Abstract.....	X
Sumário	XI
Lista de figuras	XIII
Lista de Tabelas	XVI
1 Revisão Bibliográfica	1
1.1 Biodiversidade amazônica como fonte de moléculas para o estudo de semissíntese.....	1
1.2 Semissíntese.....	3
1.2.1 Definição	3
1.2.2 Semissíntese como estratégia de obtenção de novos compostos biologicamente ativos.	7
1.2.3 Moléculas alvo de estudo de semissíntese.....	11
1.2.3.1 Ácido Secalônico.....	11
1.2.3.2 Bergenina.....	14
1.2.3.3 Policarpol	17
2 Justificativa.....	18
3 Objetivos	19
4 Material e Métodos.....	20
4.1 Reagentes.....	20
4.1.1 Secagem dos solventes.....	20
4.2 Reagentes microbiológicos	21
4.2.1 Preparo dos meios de cultura ISP2	21
4.3 Obtenção dos produtos naturais para as reações de semissíntese	21
4.3.1 Ácido secalônico	21
4.3.2 Bergenina.....	23
4.3.3 Policarpol	24
4.4 Reações de Semissíntese	24
4.4.1 Reação de benzilação do Ácido Secalônico	24
4.4.2 Reação de benzilação da Bergenina	25
4.4.3 Reação de epoxidação com Policarpol.....	26
4.4.4 Reação de acetilação do Policarpol.....	27

4.4.5	Reação do Policarpol com o Ácido Benzoico	28
4.4.6	Reação de oxidação com PCC do Policarpol	28
4.5	Purificação dos produtos obtidos	29
5	Resultados e discussões	30
5.1	Semissíntese.....	30
5.1.1	Reação de benzilação do Ácido Secalônico	30
5.1.2	Reação de benzilação da Bergenina	32
5.1.3	Reação de epoxidação com o Policarpol.....	34
5.1.4	Reação de acetilação do Policarpol.....	39
5.1.5	Reação do Policarpol com o ácido benzoico	52
5.1.5.1	Determinação da estrutura do intermediário de reação.....	57
5.1.6	Reação de oxidação com PCC do Policarpol	65
6	Considerações finais.....	71
	Referências bibliográficas.....	73

Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura da esclerotiorina	2
Figura 2 - Pseurotina A (1) e Fumigaclavina C (2) isolado do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp em <i>Mauruttia flexuosa</i>	3
Figura 3 - Alcaloides: Gandicolina B (1), ergosterol (2), brassicasterol (3), peróxido de ergosterol (4), cerevisterol (5), manitol (6) e (7) 1-O- α -D-glucopyranosídeo isolados de <i>Penicillium</i> sp. retirado das raízes de <i>Mauruttia flexuosa</i>	3
Figura 4 - Semissíntese do paclitaxel.....	4
Figura 5 - Equação proposta por Jason Green para determinar o grau de síntese de uma reação química.	5
Figura 6 - Semissíntese da Carvona e da Bilobanona, tendo como precursor o Limoneno.....	6
Figura 7 - Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos, modificado de (Cechinel-Filho e Yunes, 1988).	8
Figura 8 - Fórmula estrutural geral da Penicilina, onde A é o anel tiazolúrico, B o anel β -lactâmico e R a cadeia lateral.	9
Figura 9 - Reação enzimática da penicilina G catalisada pela enzima penicilina G acilase para a produção de 6-APA, com formação de ácido fenilacético (AFA) como subproduto (Arroyo, 2003).	9
Figura 10 - Fórmulas estruturais das penicilinas: Estrutura básica (centro, R = H) e cadeias laterais substituintes: (a) penicilina G; (b) penicilina V; (c) metecilina; (d) oxacilina, (e) cloxacilina; (f) dicloxacilina, (g) nafcilina; (h) amoxicilina; (i) ampicilina; (j) carbenicilina; (l) indanil-carbenicilina; (m) ticarcilina; (n) mezlocilina; (o) piperacilina (Calixto e Cavalheiro, 2012). ...	11
Figura 11 - Reações envolvidas na biossíntese de xantonas, onde a primeira etapa mostra a formação de xantonas por clivagem oxidativa do anel B de antraquininas, através da ação da deidroxilases, e a segunda mostra a formação do Ácido SecalônicoAA -4,4' por dimerização de xantonas.	12
Figura 12 – Estruturas básicas dos Ergocromos, onde a numeração em A serve de base para as outras estruturas.....	13
Figura 13 - Estrutura básica da Bergenina.....	14
Figura 14 - Reações de produção dos derivados 3a-h de bergenina para avaliação da atividade anglicósídica (Kumar, et al., 2011).	15
Figura 15 - Reações de produção dos derivados I-k de bergenina para avaliação da atividade anglicósídica (Kumar, et al., 2011).	15
Figura 16 - Estrutura do 11-caproato de norbergenina, derivado da bergenina.	16
Figura 17 - Derivado da bergenina, a parte referente ao catecol confere atividades biológicas como a de antioxidante e inibidora de tirosidase.	16
Figura 18 - Estrutura do Policarpol.....	17
Figura 19 - Processo de produção do ácido secalônico.....	23
Figura 20 - Reação de benzilação do ácido secalônico.	25
Figura 21 - Reação de benzilação da bergenina.....	25
Figura 22 - Reação de epoxidação do Policarpol com os produtos planejados.	26
Figura 23 - Reação de acetilação do Policarpol com os produtos planejados..	27
Figura 24 - Reação do Policarpol com o ácido benzóico com os produtos planejados.	28

Figura 25 - Reação do Policarpol com o PCC com os produtos planejados.....	29
Figura 26 - Mecanismo de reação da benzilação do ácido secalônico através da síntese de Williamson e placa de CCD em Hex/AcOEt 5:1 utilizando como revelador UV (280 nm) e vanilina , onde PP (produto de partida) PF (produto final).	30
Figura 27 – Espectro de massas do produto reacional do ácido secalônico com ácido benzoico.....	31
Figura 28 - Reação de benzilação da bergenina através da síntese de Williamson e representação da placa de CCD em Hex/AcOEt 1:5 utilizando como revelador UV (280nm) e vanilina , onde PP (produto de partida) PF (produto final)..	32
Figura 29 - Espetro de massas do produto de benzilação da bergenina.	33
Figura 30 - Estrutura da bergenina benzilada, numerada de acordo com a tabela.....	34
Figura 31 – Mecanismo de epoxidação do Policarpol com m-CPBA em DCM e placa de CCD em Hex/AcOEt 7:2 utilizando como revelador UV (280nm) e vanilina , onde PP (produto de partida) PF (produto final). Em a temos a reação com 24 horas e em b após 48 horas e a adição de mais um equivalente de m-CPBA.	35
Figura 32 - Cromatograma do produto reacional da epoxidação do Policarpol.	36
Figura 33 – Espectro de massas no modo positivo do produto reacional da (epoxidação do Policarpol (amostra RCA27_6) - o pico em m/z 457,3690 corresponde ao produto esperado.	36
Figura 34 - Espectro de RMN 1H da amostra RCA27_6 (superior), em comparação com o espectro de RMN 1H (500 MHz, CDCl ₃) do Policarpol (inferior).	38
Figura 35 - Estrutura do derivado do 24-epóxi-Policarpol.	39
Figura 36 - Mecanismo de reação da acetilação do Policarpol com anidrido acético e piridina e placa de CCD em Hex/AcOEt 7:2 utilizando como revelador UV (280nm) e vanilina , onde PP (produto de partida) PF (produto final).	40
Figura 37 - Cromatograma da mistura reacional após o procedimento da acetilação do Policarpol,.....	41
Figura 38 - Espectro de massas do produto de monoacetilação do Policarpol RCA1_4, onde a massa de 483,3834 corresponde ao produto obtido.	42
Figura 39 - Espectro de massas do produto de biacetilação do Policarpol RCA1_5, onde a massa de 525,3983 corresponde ao produto obtido.	42
Figura 40 - Espectro de RMN 1H do Policarpol biacetilado - amostra RCA1_5 (superior), espectro de RMN 1H Policarpol (inferior) (500MHz, CDCl ₃).	44
Figura 41 – Ampliação do espectro de 1H, onde em na parte superior temos a região dos H olefínicos e os carbinólicos (H-3 e H-15) da amostra RCA1_5 e na parte inferior a mesma região do Policarpol.....	45
Figura 42 - Espectro de 1H, onde na parte superior temos a região dos H carbinólicos (grupo acetilas) e metílicos da amostra RCA1_5 e na parte inferior a mesma região do Policarpol.....	46
Figura 43 - Estrutura do RCA1_5, derivado do Policarpol, 3,15-diacetil-Policarpol.....	47
Figura 44 - Espectro de RMN 1H da amostra RCA1_4 (superior) em comparação com o Policarpol (inferior) (500 MHz, CDCl ₃).	48

Figura 45 - Estrutura do derivado do Policarpol monoacetilado em C-3 - RCA1_4, 3-acetil-Policarpol.	49
Figura 46 - Espectro de RMN 1H da amostra RCA1_3 (superior) em comparação com o espectro do Policarpol (inferior).	50
Figura 47 - Comparação dos espectros de RMN de 1H das amostras RCA1_3 (superior) e RCA1_5 (inferior), da região olefínica.	51
Figura 48 - Estrutura do derivado do Policarpol monoacetilado em C-15 - RCA1_3, 15-acetil-Policarpol.	51
Figura 49 - Esterificação do Policarpol com DCC/DMAP.	53
Figura 50 - Cromatograma do produto benzilação do Policarpol.	54
Figura 51 - Espectro de massas do produto da reação do ácido benzoico com o Policarpol RCA25_9.	54
Figura 52 - Espectro de 1H da amostra RCA25_9 (superior) em comparação com o Policarpol (inferior) (500 MHz, MeOD/CDCl ₃).	55
Figura 53 - Ampliação do espectro de RMN da região olefínica da amostra RCA25_9. O duplo duplete refere-se ao H-15.	56
Figura 54 - Ampliação do espectro de RMN da região aromática da amostra RCA25_9.	56
Figura 55 - Estrutura benzoato de Policarpol.	57
Figura 56 - Produto da reação do ácido benzóico com o DCC formado como intermediário estável no processo de formação do benzoato de Policarpol.	58
Figura 57 - Espectro de 1H da amostra RCA25_5 (500 MHz, MeOD).	59
Figura 58 - Espectro de 13C da amostra RCA25_5 (125,26 MHz, MeOD).	59
Figura 59 - Espectro de 13C DEPT 135 da amostra RCA25_5.	60
Figura 60 - HSQC da região aromática da amostra RCA25_5.	60
Figura 61 - HMBC da região aromática e correlações da amostra RCA25_5.	60
Figura 62 - Espectro de 1H ver-se da região 4,35 – 3,15 ppm da amostra RCA25_5.	61
Figura 63 - HSQC do H-9 (δ 4,27 ppm) da amostra RCA25_5.	61
Figura 64 - HMBC do H-9 (δ 4,27 ppm) da amostra RCA25_5.	62
Figura 65 - HSQC do H-15 (δ 3,19 ppm) da amostra RCA25_5.	62
Figura 66 - HMBC do H-15 (δ 3,19 ppm) da amostra RCA25_5.	62
Figura 67 - Espectro de 1H da região CH ₂ dos ciclohexanos da amostra RCA25_5.	63
Figura 68 - HMBC do H-10eq e H-11eq.	63
Figura 69 - HMBC do Hax-16.	65
Figura 70 - Espectro de massas da amostra RCA17_col.	66
Figura 71 - Espectro de RMN de 1H da amostra RCA17_col (superior) em comparação com o produto de partida Policarpol (inferior) (500 MHz, CDCl ₃).	67
Figura 72 - Estrutura do 2,6,12,15-tetraoxoPolicarpol.	68
Figura 73 - Relação ente o par de elétron não ligante do C-15 com a carga formada em C-7.	68
Figura 74 - Ampliação do espectro de 1H da amostra RCA17_col evidenciando o deslocamento do H-7 e a manutenção dos H-11 e H-24.	69
Figura 75 - Espectro de 1H da amostra RCA17_col dos Heq-2 eHeq-16.	70

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação das penicilinas e suas principais propriedades antimicrobiana (Valdés, <i>et al.</i> , 1998) (Goodman, 2010).....	10
Tabela 2 - Tabela de ^{13}C para comparação entre os dados da literatura.	33
Tabela 3 - Valores de deslocamento químico de ^1H e ^{13}C e correlações observadas.	64

1 **Revisão Bibliográfica**

1.1 *Biodiversidade amazônica como fonte de moléculas para o estudo de semissíntese*

Cada vez mais estudos estão sendo realizados para o conhecimento da biodiversidade brasileira, a maior do mundo. Na Região Amazônica sua fauna e flora e microbiota são cada vez descritas, contribuindo, assim, para o seu conhecimento. Tal interesse em investigar essa região é por conta das novas descobertas que colocam a Amazônia como detentora de uma biodiversidade incrível, onde novas moléculas são reportadas em sistemas biológicos distintos (AMBIENTE).

A biodiversidade amazônica é expressa em todas as formas de vida, destacando-se entre as formas terrestres, as vegetais como as mais estudadas quimicamente. Porém, uma outra fonte de biomoléculas são os microrganismos, um número incalculável de seres distribuídos em todas as partes do globo terrestre e cuja enorme fração amazônica é praticamente inexplorada.

Estudos realizados com fungos endofíticos isolados de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae) que foram testados contra quatro microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Penicillium avellaneum*) apontam a linhagem MgRe2.23B (*Nectria haematocca*) como a mais promissora contra as linhagens patogênicas (Banhos, *et al.*, 2014).

A esclerotiorina (Fig. 1) é uma molécula que já foi isolada da espécie *Penicillium sclerotiorum* encontrada em solo do Amazonas por Celestino (2014). Esta substância possui uma série de atividades biológicas como: inibidora da aldose redutase (Chianda, *et al.*, 2006), antioxidante (Chianda, 2007) citotóxica (câncer de mama e próstata) (Kabbaj, 2015).

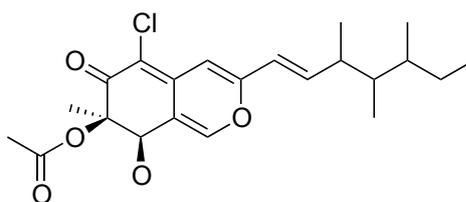


Figura 1 - Estrutura da esclerotiorina

Os alcaloides Pseurotina A (Fig. 2.1) e Fumigaclavina C (Fig. 2.2) foram isolados de um fungo endofítico *Aspergillus* sp. de *Bauhinia guianensis*, uma planta típica da Região Amazônica utilizada na medicina popular contra infecções e doenças renais. Esses alcaloides foram os primeiros a serem descritos como antibacterianos de amplo espectro com boa atividade biológica (Pinheiro, *et al.*, 2013).

O alcaloide glandicolina B (Fig 3.1) e outros seis compostos: Ergosterol (Fig 3.2), Brassicasterol (Fig 3.3), Peróxido de ergosterol (Fig 3.4), Cerevisterol (Fig 3.5), Manitol (Fig 3.6) e 1-O-metil- α -D-glucopyranosídio (Fig 3.7) foram isolados de *Penicillium* sp. das raízes de *Mauritia flexuosa* onde o extrato metanólico apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* e a molécula Glandicolina B mostrou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli* numa concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Koolen, *et al.*, 2012).

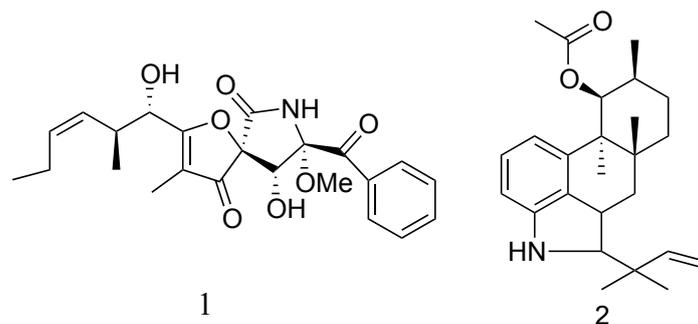


Figura 2 - Pseurotina A (1) e Fumigaclavina C (2) isolado do fungo endofítico *Aspergillus* sp em *Mauruttia flexuosa*.

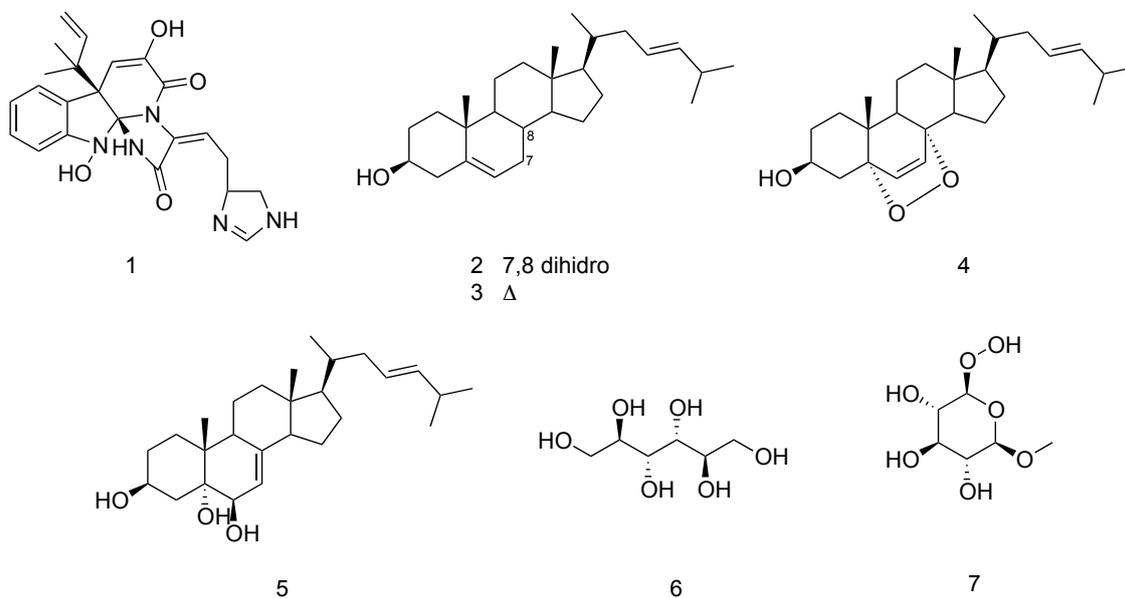


Figura 3 - Alcaloides: Gandicolina B (1), ergosterol (2), brassicasterol (3), peroxido de ergosterol (4), cerevisterol (5), manitol (6) e (7) 1-O-α-D-glucopyranosido isolados de *Penicillium* sp. retirado das raízes de *Mauruttia flexuosa*.

1.2 Semissíntese

1.2.1 Definição

Muito se tem discutido sobre qual a verdadeira definição de semissíntese. Para alguns pesquisadores ocorre semissíntese quando parte de uma molécula é de origem natural e se produz uma outra molécula também produzida pela natureza. Neste caso um valor agregado maior pode decorrer

da baixa produtividade natural, como o exemplo clássico do paclitaxel, o Taxol®, que tem alto valor por conta da sua importância no tratamento de câncer.

O paclitaxel tem fonte natural, mas em pequenas quantidades, sendo necessários cerca de 10.000 quilos de cascas de *Taxus brevifolia* para a extração de 1 quilo da substância, o que ocasiona a morte de inúmeras árvores (Souza, 2004). A alternativa mais viável foi encontrada quando se descobriu nas folhas de *Taxus baccata*, um arbusto da mesma família, o precursor 10-desacetilbacatina-III, que apresenta o esqueleto básico do paclitaxel, o qual pode ser obtido através de transformações pontuais, como a acetilação na posição 10 e a introdução da cadeia lateral no C-13, procedimento conhecido como semissíntese do Taxol® (Potier, 1988; Figura 4).

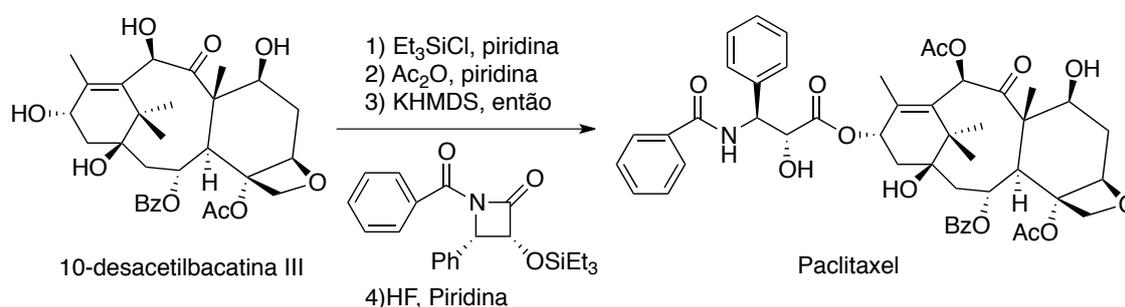


Figura 4 - Semissíntese do paclitaxel.

O pesquisador Jason Green, membro do Laboratório Baran (*The Baran Laboratory*) em um seminário para o grupo de pesquisa explanou sobre o que seria semissíntese. Sua apresentação está disponível no endereço eletrônico http://www.scripps.edu/baran/images/grpmtgpdf/Green_Nov_12.pdf e no blog do laboratório (Green, 2013).

Nesse seminário o autor fala que não há uma terminologia oficial proposta pela IUPAC através do seu compêndio de terminologia química,

(INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2014), e dá exemplos de definições encontradas em dicionários e sítios eletrônicos como o wikipedia.com.

Analisando que não há um sistema métrico adequado para dizer se uma reação seria ou não uma semissíntese o pesquisador propõe uma alternativa, através de uma equação que leva em consideração a massa anexada do produto natural e a complexidade do sistema quiral.

A simples adição destas duas variáveis iria chegar a um determinado fator de naturalidade (N). A variável de massa (M) é constituída por uma percentagem de massa retida do material de partida, que seria o produto natural utilizado, por isso o nome de fator de naturalidade, (m1) em relação à massa do alvo (m2). A variável de complexidade (C) é uma percentagem de estereocentros restante a partir do material de partida (s1) sobre o total de estereocentros no alvo (s2). Depois de multiplicar cada termo por 50 e adicioná-los em conjunto, a escala resultante varia de 0-100, onde uma síntese total sempre daria valor igual a 0. A equação é mostrada na Figura 5.

$$N = M + C = (m1/m2) \times 50 + (s1/s2) \times 50$$

Figura 5 - Equação proposta por Jason Green para determinar o grau de síntese de uma reação química.

Um exemplo que Green cita é o da síntese que vai do Limoneno para Carvona e da Carvona para Bilibanona, conforme mostra a Figura 6.

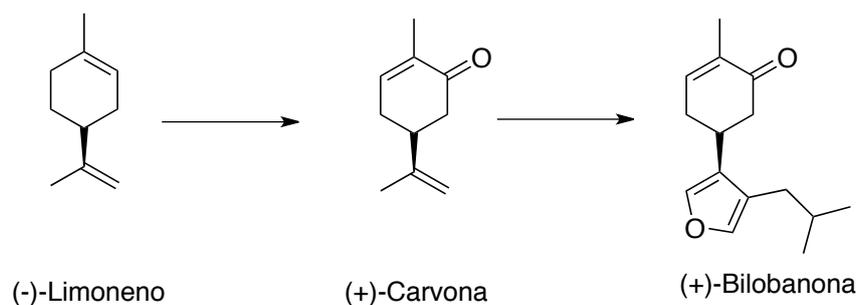


Figura 6 - Semissíntese da Carvona e da Bilobanona, tendo como precursor o Limoneno.

Analisando a reação de formação da Carvona e aplicando na equação temos que a massa do Limoneno (m_1) ($C_{10}H_{16}$) é 136,23 e da Carvona (m_2) ($C_{10}H_{14}O$) é 150,22 e ambos possuem apenas um estereocentro, logo $s_1 = s_2 = 1$, aplicando na equação temos:

$$N = (136,23/150,22) \times 50 + (1/1) \times 50 ;$$

$$N = 45 + 50 ;$$

$$N = 95$$

Utilizando o mesmo raciocínio para a formação da Bilobanona temos a massa do Limoneno $m_1 = 136,23$ e a da Bilobanona ($C_{15}H_{20}O_2$) $m_2 = 232,15$, os estereocentros permanecem inalterados, ou seja, $s_1 = s_2 = 1$. Aplicando na equação temos:

$$N = (136,23/232,15) \times 50 + (1/1) \times 50$$

$$N = 29 + 50$$

$$N = 79$$

Com base nesse exemplos podemos concluir que o fator de naturalidade, ou seja, quanto do produto de partida tem-se no final da reação, para a formação da Carvona é de 95, enquanto que na produção da Bilobanona de 79.

O autor conclui que esse é o primeiro sistema métrico, pois determina o fator de naturalidade da molécula e o termo semissíntese possa ter mais um argumento podendo, então ser adotado mesmo sem uma definição formal.

Outro autor (Souza, 2010) define semissíntese como a síntese realizada em parceria com a natureza, pois uma substância precursora fornecida pela natureza é modificada por sequências reacionais em laboratório até o produto final. Acrescentamos a esta definição que a semissíntese pressupõe o produto como objetivo e apenas neste sentido seria diferente da modificação estrutural, pois nesta a atenção é focada sobretudo na substância de partida, da qual se buscam obter derivados por um ou mais motivos, como por exemplo a busca de um composto com melhor atividade biológica.

Este trabalho foi pensado como abordagem para o aprendizado de técnicas de modificação estrutural, porém na prática, de posse de determinado composto natural, foram planejadas modificações com foco em produtos desejados, portanto seguindo a última definição de semissíntese. Assim adotaremos para esse trabalho os termos modificação estrutural quando nos referirmos ao composto de partida e semissíntese quando nos referirmos ao produto planejado ou obtido. Importante observar que os derivados planejados não são necessariamente produtos naturais, o que não contraria a última definição de semissíntese.

1.2.2 Semissíntese como estratégia de obtenção de novos compostos biologicamente ativos.

A obtenção de substâncias naturais biologicamente ativas é muito complexa e longa, pois geralmente os compostos presentes em menor proporção em plantas são os que apresentam melhores efeitos biológicos.

Nesse sentido, torna-se indispensável a análise de extratos, das frações e substâncias puras em relação a sua concentração permitindo, assim, predizer se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado (Cechinel-Filho e Yunes, 1988).

Na Figura 7 é apresentada uma proposta de obtenção de novas substâncias biologicamente ativas. Devemos observar que a modificação estrutural está presente com o intuito de obter moléculas com atividades biológicas, como ocorre em muitos casos relatados na literatura.

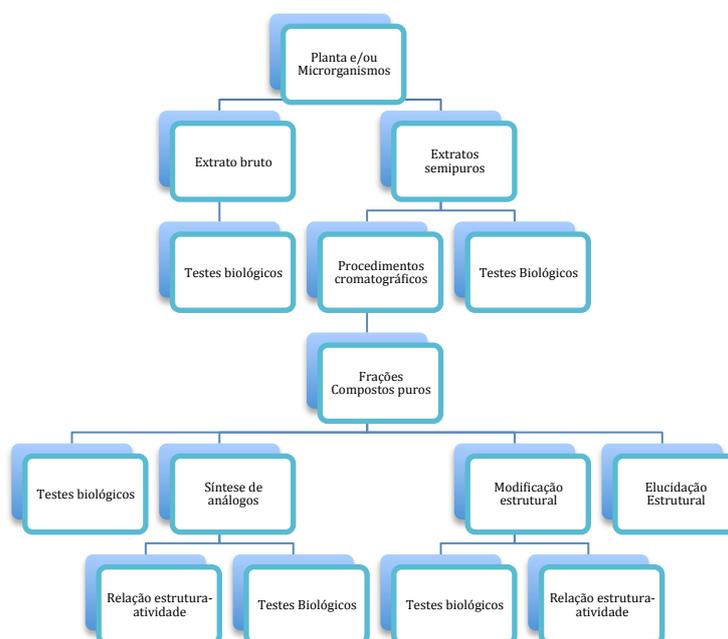


Figura 7 - Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos, modificado de (Cechinel-Filho e Yunes, 1988).

As primeiras modificações realizadas são com relação a natureza da molécula conferindo-lhe características que antes não tinha como lipofilia, rigidez e flexibilidade e/ou alteração dos substituintes (Oliveira, 2008)

Uma das moléculas mais estudadas no quesito estrutura-atividade é a penicilina, que possui em sua estrutura básica três componentes principais sendo um anel de tiazolúrico (A) ligado a um anel β -lactâmico (B), ao qual se

fixa uma cadeia lateral (R). Enzimas como as penicilinases e β -lactamases agem na quebra do anel β -lactâmico inativando o princípio ativo, indicando que tal anel é essencial para a bioatividade da molécula e que qualquer modificação estrutural a ser planejada tem que preservá-lo (Calixto e Cavalheiro, 2012).

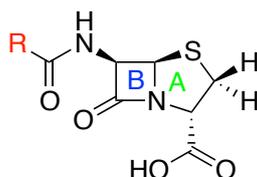


Figura 8 - Fórmula estrutural geral da Penicilina, onde A é o anel tiazolúrico, B o anel β -lactâmico e R a cadeia lateral.

Para a produção dos antibióticos derivados da penicilina obtém-se o núcleo básico β -lactâmico (6-APA) que pode ser produzido por meio da hidrólise enzimática da penicilina G catalisada pela enzima penicilina G acilase (PGA), como mostrado na figura 9 (Arroyo, 2003). É possível então adicionar ao núcleo penicilínico cadeias laterais diferentes das encontradas naturalmente através de reações de semissíntese (Giordano *et al.*, 2006) e produzir penicilinas semissintéticas com grande variedade.

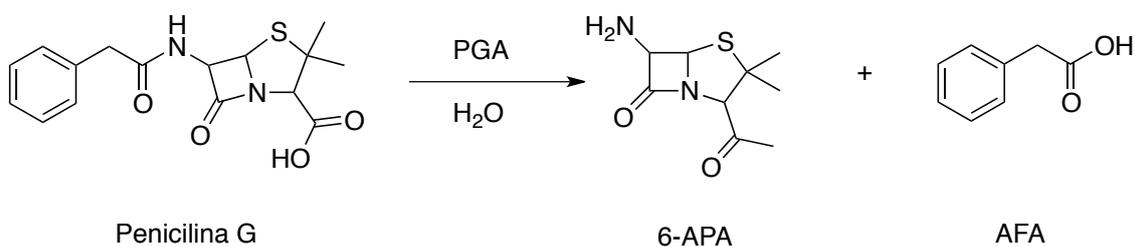


Figura 9 - Reação enzimática da penicilina G catalisada pela enzima penicilina G acilase para a produção de 6-APA, com formação de ácido fenilacético (AFA) como subproduto (Arroyo, 2003).

Dentre as vantagens das penicilinas semissintéticas podem ser citadas: alta eficácia, maior espectro de ação antimicrobiana, maior facilidade de absorção pelo organismo e resistência ao suco gástrico, possibilitando sua

administração oral (Pereira, 2012). Na figura 10 são apresentadas algumas das penicilinas obtidas através de reações de semissíntese na Tabela 1 são descritas as atividades antimicrobianas específicas e estreitamente relacionadas com a cadeia lateral.

Tabela 1 - Classificação das penicilinas e suas principais propriedades antimicrobiana (Valdés, et al., 1998) (Goodman, 2010).

Nome genérico	Principais propriedades
Penicilina G e Penicilina V	Altamente ativos contra cepas sensíveis de cocos Gram-positivos. Não apresentam resistência à penicilinase.
Meticilina, Nafcilina, Oxacilina, Cloxacilina e Dicloxacilina	Atividade antimicrobiana menos potente contra os microrganismos sensíveis à Penicilina G. Apresentam resistência à penicilinase.
Ampicilina e Amoxicilina	Atividade antimicrobiana é ampliada para incluir determinados microrganismos Gram-negativos. Esses fármacos são administrados com um inibidor de betalactamase, tais como clavulanato ou sulbactam, para impedir a hidrólise por betalactamases de amplo espectro. Não apresentam resistência à penicilinase.
Carbencilina, Indanil-carbencilina e Ticarcilina	Atividade antimicrobiana é ampliada para incluir espécies de <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> e <i>Proteus</i> . Esses agentes são inferiores à ampicilina contra cocos Gram-positivos. Não apresentam resistência à penicilinase
Mezlocina, Azlocilina e Piperacilina	Excelente atividade antimicrobiana contra <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella</i> e alguns outros microrganismos Gram-negativos. A piperacilina retém a atividade da ampicilina contra cocos Gram-positivos e contra <i>L. monocytogenes</i> . Não apresentam resistência à penicilinase.

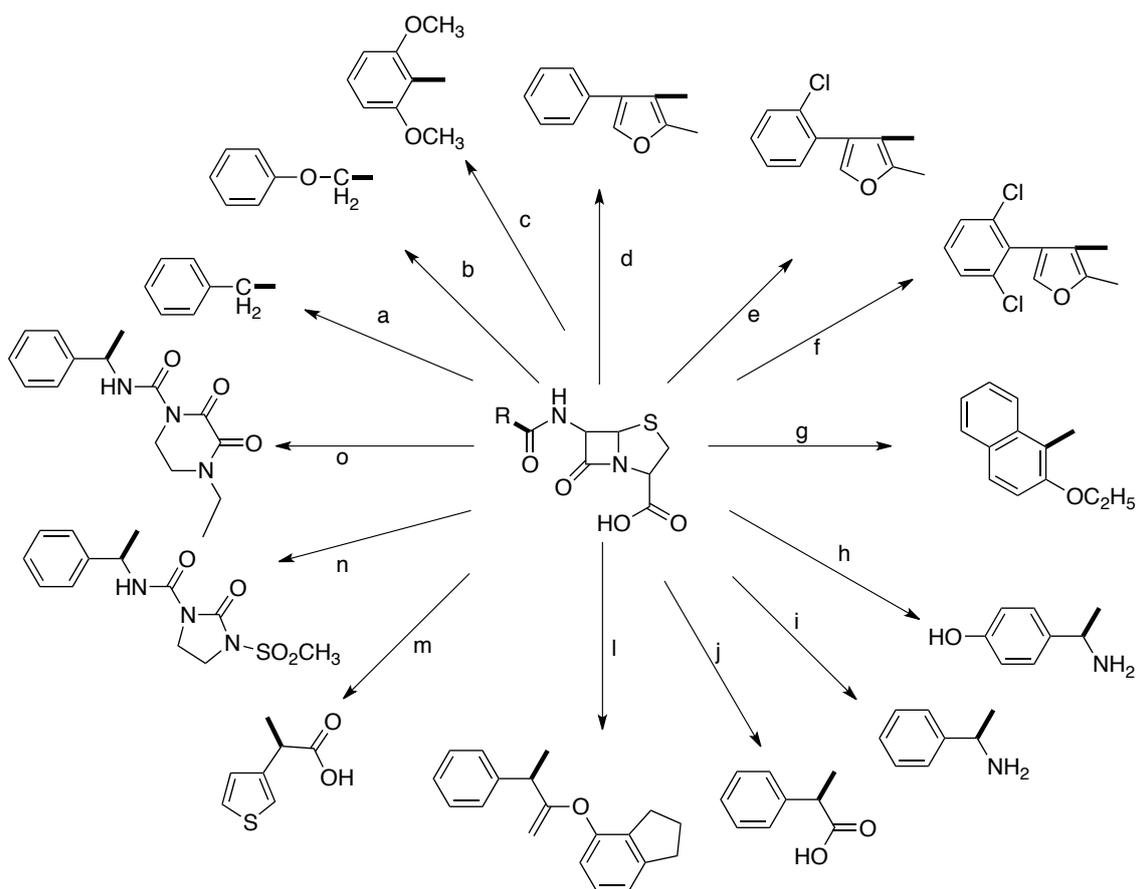


Figura 10 - Fórmulas estruturais das penicilinas: Estrutura básica (centro, R = H) e cadeias laterais substituintes: (a) penicilina G; (b) penicilina V; (c) metecilina; (d) oxacilina, (e) cloxacilina; (f) dicloxacilina, (g) nafcilina; (h) amoxicilina; (i) ampicilina; (j) carbenicilina; (l) indanil-carbenicilina; (m) ticarcilina; (n) mezlocilina; (o) piperacilina (Calixto e Cavalheiro, 2012).

1.2.3 Moléculas alvo de estudo de semissíntese

1.2.3.1 Ácido Secalônico

O Ácido Secalônico é uma série de ergocromos derivados das xantonas, essas, por sua vez, são resultantes das antronas que vem da condensação de 1 mol de Acetil-CoA com 6 mols de Malonil-CoA. As antronas são facilmente oxidadas às antraquinonas que sofrem clivagens oxidativas do anel B e produzem derivados da benzofenona as quais são transformados em xantonas (Honda e Vilegas, 1988). Finalmente, a dimerização de xantonas resulta na formação dos ácidos secalônicos (Figura 12).

Os Ergochromos, são uma série de xantonas que foram descritos pela primeira vez em 1965 e isolado de *Claviceps purpurea*, um fungo fitopatígeno

que causa a doença esporão do centeio (Franl, *et al.*, 1965). Nessa série são encontrados 2 tipos, em que se diferem pela estereoquímica do radical (Figura 12).

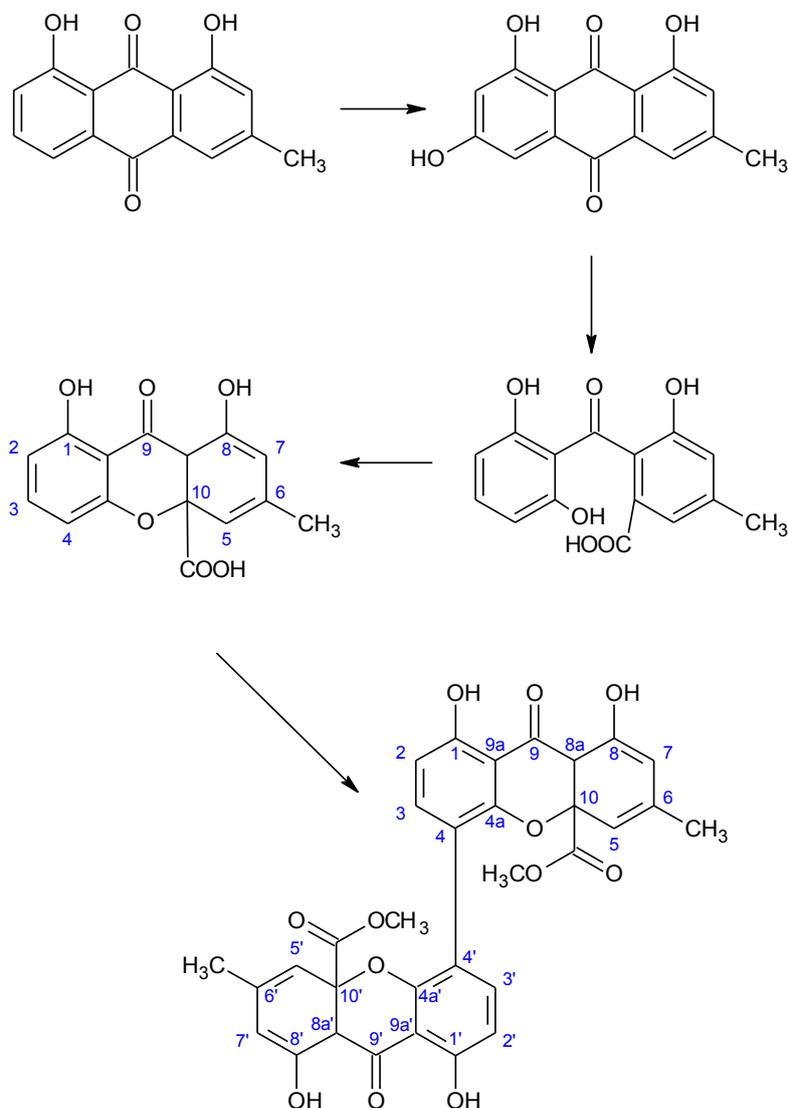


Figura 11 - Reações envolvidas na biossíntese de xantonas, onde a primeira etapa mostra a formação de xantonas por clivagem oxidativa do anel B de antraquininas, através da ação da deidroxilases, e a segunda mostra a formação do Ácido SecalônicoAA -4,4' por dimerização de xantonas.

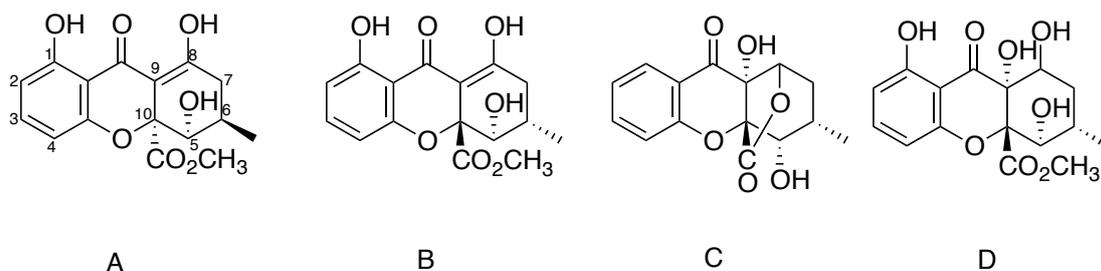


Figura 12 – Estruturas básicas dos Ergocromos, onde a numeração em A serve de base para as outras estruturas.

A dimerização das xantonas da Figura 12 geram uma série de ergocromos. O Ergocromo AA-4,4' é a dimerização do ergocromo A unidos na posição 4, do Ergocromo BB-4,4' pelo ergocromo B também na posição 4 e do Ergocromo CC unidos na posição 2,2'. Essas moléculas são denominadas Ácido Secalônico A, Ácido Secalônico B e Ergoflavina, respectivamente (Frank, *et al.* 1965).

Quando se pesquisa nos bancos de dados tais como CHEMSPIDER (2015) e PUBCHEM (2016) para o termo “*secalonic acid*” aparecem vários resultados, mas a maioria se referindo ao ácido secalônico A como sendo a dimerização do Ergocromo AA-2,2'. Tal confusão de termos faz com que as buscas por referências para o Ácido Secalônico AA-4,4', com relação ao estudos biológicos da molécula, sejam difíceis. Sendo assim não fica claro que os resultados de atividades biológicas descritos sejam de fato da molécula em questão, logo propomos que a melhor maneira de nomear o ácido Secalônico seja sempre referindo-se qual ergocromo se trata e o tipo de dimerização como Ácido Secalônico AA-4,4', pois dessa forma resolve tal confusão.

Contudo, recentemente descobriu-se que os ácidos secalônicos poderiam isomerizar-se quando dissolvido em solventes polares, possivelmente por fatores estéricos. Assim, quando o isômero 4,4' foi dissolvido em diemetsulfóxido (DMSO), observou-se que após 13 h o

equilíbrio termodinâmico foi atingido e com os compostos 2,2', 2,4' e 4,4' na proporção de 3,2:2:1 de (Qin, *et al.*, 2015). Como os ensaios biológicos são via de regra iniciados com a solubilização do ácido secalônico em DMSO, é possível que os resultados citados na literatura sejam da mistura dos três dímeros, sem que seja garantido qual efetivamente é o princípio ativo.

1.2.3.2 *Bergenina*

A bergenina (Figura 13) é uma isocumarina isolada principalmente de cascas e raízes de árvores de diversos gêneros que são utilizadas na medicina popular contra uma série de males, como as plantas do gênero *Bergenia*, que são usadas para combater diarreia, febre, tosse, infecções pulmonares e outras (Nazir, *et al.*, 2007).

Vários estudos foram realizados sobre as propriedades biológicas que indicaram que a bergenina apresenta atividades contra artrite, arritmia (Pu, *et al.*, 2002), antioxidante (Abreu, *et al.*, 2008), antimicrobiana (Silva, *et al.*, 2009) e antiinflamatória (Nunomura, *et al.*, 2009).

A bergenina vem sendo bastante explorada por semissíntese com o objetivo de obter derivados com melhor bioatividade. Kumar, 2011, com o intuito de melhorar o potencial antiglicosídico da bergenina realizou a semissíntese de 11 novos derivados, onde dois apresentaram uma potente atividade biológica.

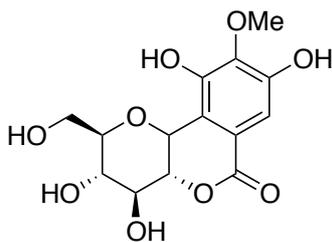


Figura 13 - Estrutura básica da Bergenina

Para a produção de alguns dos derivados realizou-se uma esterificação de Mitsunobu, que consiste em uma reação de conversão de álcoois primários e secundários em ésteres, tioéteres e diversos outros compostos na presença de azocarboxilato de etila (DEAD) e trifetilfosfina (TTP) (Appendino, *et al.*, 2002). Para os outros derivados primeiramente protegeu-se as hidroxilas fenólicas para posteriormente realizar a esterificação e hidrólise (para retirada do grupo protetor) Figura 14 e 15. Os compostos j e k apresentaram uma potente atividade antiglicosídica (Kumar, *et al.*, 2011).

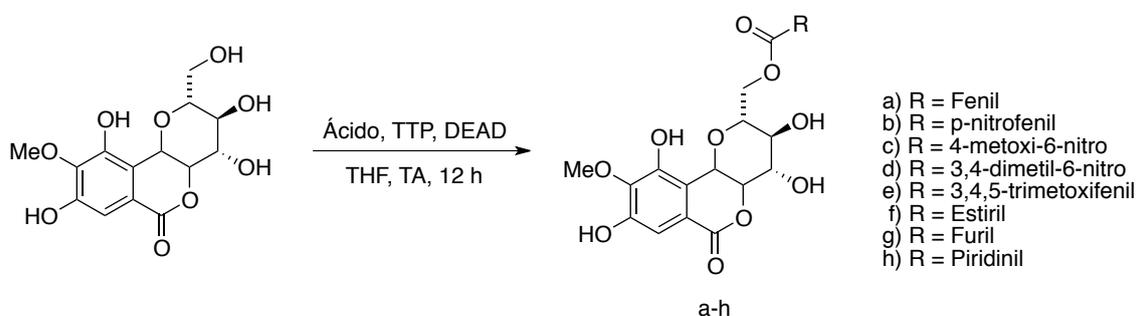


Figura 14 - Reações de produção dos derivados 3a-h de bergenia para avaliação da atividade antiglicosídica (Kumar, *et al.*, 2011).

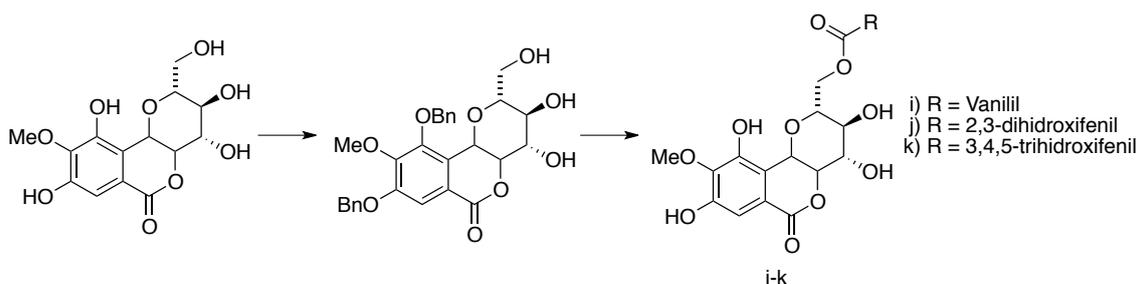


Figura 15 - Reações de produção dos derivados i-k de bergenia para avaliação da atividade antiglicosídica (Kumar, *et al.*, 2011).

A conversão da bergenia em norbergenina, por acilação com anidrido acético e a desproteção do grupo O-metil com BCl_3 seguida de hidrólise com K_2CO_3 , apresentou um bom resultado antioxidante, para averiguar a variação da atividade biológica, acoplou-se na parte glicosídica da molécula cadeias de

ácido graxos de tamanhos variados. Tal estudo demonstrou que a adição de ácidos graxos no C-11 da norbergenina aumentou a atividade antioxidante da molécula. O derivado 11-caproato de norbergenina (Figura 16) apresentou uma atividade antioxidante maior que a da catequina, além da prevenção da morte da cultura de células corticais primárias de ratos (Takahashi, *et al.*, 2003).

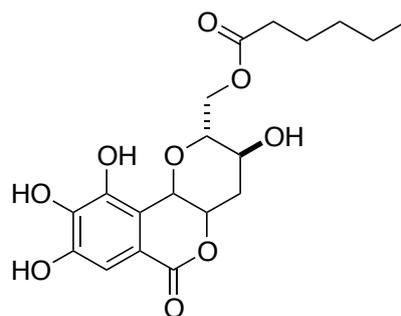


Figura 16 - Estrutura do 11-caproato de norbergenina, derivado da bergenina.

Em estudos visando a substituição do C-11 da bergenina por grupos benzoicos, com o intuito de avaliar o seu potencial biológico antioxidante e atividade inibidora de tirosinase de cogumelos, foi observado que ao inserir o Ácido 3,4-dihidroxibenzóico as duas atividade avaliadas aumentam significativamente, sendo o derivado mais potente que o inibidor padrão de tioridase de arbutina e o ácido kójico (Kashima e Miyazawa, 2012).

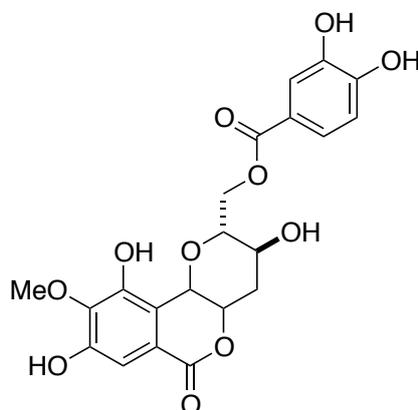


Figura 17 - Derivado da bergenina, a parte referente ao catecol confere atividades biológicas como a de antioxidante e inibidora de tirosidase.

1.2.3.3 Polícarpol

O Polícarpol (Figura 24) é um triterpeno do tipo lanostano isolados de plantas, proposto como marcador quimiotaxinômico para a família *Anonaceae* (Leboef *et al.*, 1982), com várias atividades biológicas descritas, tais como antiplaquetária e antitrombótica (Saadawi *et al.*, 2012), antitripanossoma (Ngantchou *et al.*, 2009) e antimicrobiana (Silva *et al.*, 2015), entre outras.

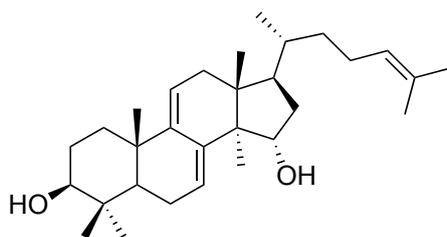


Figura 18 - Estrutura do Polícarpol.

Estudos com a produção de derivados para estudos estrutura-atividade ainda não foram descritos para essa molécula, sendo portanto uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos.

2 *Justificativa*

A Região Amazônica comporta a maior biodiversidade do planeta e os estudos de sua fauna e flora são de suma importância para a caracterização do seu imenso potencial biotecnológico. O fato da biodiversidade ainda ser pouco explorada e ter alto grau de preservação nos dá uma vantagem em relação a outros países por conta da disponibilidade.

Plantas e fungos tem se revelado ao longo da história uma fonte quase inesgotável de moléculas com potencial de aplicação, seja para uso como novos fármacos e/ou como ferramenta da pesquisa básica.

No ínterim dessa procura por novas moléculas biologicamente ativas a formação de mão de obra qualificada constitui uma necessidade para o fortalecimento técnico-científico da região, onde o mercado de trabalho exige cada vez mais profissionais qualificados.

Nesse contexto, trabalhos como o aqui apresentado fortalecem e diversificam as pesquisas no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas (PPGQ/UFAM), pois o uso das técnicas de semissíntese são uma maneira de agregar valor aos produtos naturais obtidos de organismos regionais. Além disso, também aumentam a chance de gerar patentes e novos fármacos.

3 Objetivos

- Objetivos gerais:
 - Realizar reações de semissíntese em moléculas isoladas de plantas e microrganismos da Amazônia.

- Objetivos específicos:
 - Modificar por meio de reações de semissíntese as moléculas desses produtos naturais isoladas de plantas e micro-organismos da Amazônia;
 - Purificar por técnicas de cromatografia e caracterizar por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear os produtos formados;

4 Material e Métodos

4.1 Reagentes

Os reagentes *N,N'*-diciclohexilcarbodimida (DCC), clorocromato de piridina (PCC), *N,N'*-dimetilpiridin-4-amina (DMAP), brometo de benzila (BnBr) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). O sais sulfato de sódio (Na_2SO_4) e cloreto de sódio (NaCl) foram obtidos da Nuclear (Diadema, SP). Os solventes grau ACS anidrido acético (Ac_2O), piridina (Py) e dimetilformamida (DMF) e o ácido clorídrico (HCl) foram obtidos da Dinâmica (Diadema, SP). O reagente ácido benzoico foi obtido da Synth (Diadema, SP). Os solventes grau HPLC acetato de etila (AcOEt), hexano, diclorometano (DCM), *iso*-propanol (*i*-Pr) e metanol (MeOH) foram obtidos da Tedia (Fairfield, Estados Unidos). Todos os solventes utilizados nesta dissertação passaram por secagem utilizando-se peneiras moleculares (6 Å) da Sigma-Aldrich. A água utilizada foi obtida de um purificador Milli-Q da Merck-Millipore (Darmstadt, Alemanha).

4.1.1 Secagem dos solventes

Garrafas de 1 L foram lavadas com água e detergente e posteriormente lavadas com etanol, após a higienização dos recipientes os mesmos foram colocados em uma estufa de secagem a 180 °C por 24 h. Foi posto uma quantidade suficiente para encher um béquer de 500 mL de peneira molecular na estufa, nas mesmas condições que os recipientes.

Depois das garrafas secas e a peneira ativa as garrafas foram preenchidas com 500 mL dos solventes que seriam utilizados nas reações (Metanol, Piridina, DMF, DCM, AcOEt) com muito cuidado, com as garrafas

mornas, adicionando, depois, a peneira (também morna) em quantidade suficiente para cobrir o fundo da garrafa, onde a mesma foi vedada.

4.2 *Reagentes microbiológicos*

Os meios de cultura extrato de malte e extrato de levedura foram obtidos da Biosystems (Barcelona, Espanha). A fonte de carbono amido de milho foi obtida da Yoki (Andirá, PR). Outra fonte de carbono utilizada foi o açúcar dextrose obtido da Synth.

4.2.1 *Preparo dos meios de cultura ISP2*

Todos os componentes: 10 g de amido de milho, 4 g de extrato de levedura, 10 g de extrato de malte, 4 g de dextrose, 15 g de ágar microbiológico e 1 L de água destilada foram misturados em um erlenmeyer de 2 L. O material foi tampado com papel alumínio e autoclavado a 121 °C, a 1 atm em um autoclave da Tecnal (Ourinhos, SP) por 15 minutos para esterilização. Para os meios líquidos utilizou-se o mesmo procedimento, porém sem a adição do ágar microbiológico.

4.3 *Obtenção dos produtos naturais para as reações de semissíntese*

4.3.1 *Ácido secalônico*

O fungo *Talaromyces* sp. (DgCr2.2.1b) previamente isolado da planta hospedeira *Duguetia stelechanta* (Annonaceae) foi reativado em 20 placas de petri contendo meio sólido ISP2 a 28 °C por 8 dias em uma incubadora BOD da Tecnal. Após o crescimento do fungo o conteúdo de cada placa foi dividida em

oito partes e cada fração foi inoculada em um Erlenmeyer de 1L contendo 300 mL de meio de cultura ISP2 isento de agarose e previamente esterilizado. A linhagem fúngica cresceu durante 17 dias a temperatura ambiente (25 °C +/- 1 °C). Para este procedimento foram utilizados 103 Erlenmeyers, 3 apenas com o meio líquido para controle.

Ao final dos 17 dias de incubação o micélio foi separado do meio líquido, triturado e extraído com AcOEt (3 x 750 mL). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida utilizando-se um rotaevaporador, marca Tecnal. Após seco, o extrato (9,6 g) foi submetido a fracionamento em gel de sílica (70-230 mesh) sendo utilizado sequencialmente hexano/ AcOEt (9:1 e 1:1, v:v), AcOEt 100% e MeOH 100% (250 mL para cada eluente). A fração em AcOEt 100% (4,93 g) foi novamente cromatografada em sílica gel (230-400 mesh) utilizando volumes iguais (100 mL) das seguintes combinações de solventes: hexano/AcOEt (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1 v:v), AcOEt 100% e MeOH 100%. Por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) foram comparadas todas as 19 frações obtidas em relação ao padrão de ácido secalônico. As frações 14 a 17 (AcOEt 100%, ~150 mg) apresentaram perfil semelhante ao padrão e foram reunidas e posteriormente caracterizadas.



Figura 19 - Processo de produção do ácido secalônico

4.3.2 *Bergenina*

O derivado glicosídico do ácido trihiroxibenzóico, *Bergenina*, foi cedida pela Profa. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura do Grupo de Prospecção e Aplicação de Micromoléculas Naturais da Amazônia. A obtenção se deu através de 2,9 kg de casca de *Endopleura uchi* (Humiriaceae), que primeiramente foi extraída com hexano, para retirada das moléculas apolares, seguida de uma extração com MeOH. O extrato metanólico, depois de seco, foi particionado com hexano, clorofórmio e AcOEt. Com a fração de AcOEt realizou-se uma coluna isocrática com MeOH em Sephadex LH-20 (Merck). As primeiras frações foram reunidas e submetidas a uma coluna com sílica flash com um gradiente crescente de concentração de AcOEt a MeOH. As frações eluídas com AcOEt/MeOH (9:1 v:v) foram reunidas e recristalizadas em AcOEt, que apresentou um sólido branco que foi identificado como *Bergenina* (37 mg) (Silva, *et al.*, 2009).

4.3.3 Policarpol

O Policarpol utilizado nesse trabalho foi cedido pelo Dr. Felipe Moura Araújo da Silva. A obtenção dessa molécula se deu através do estudos dos constituintes químicos da casca de *Unonopsis guatterioides*. 503,9 g de material pulverizado foram macerados em hexano, com a troca do solvente três vezes a cada três dias. No final do processo, depois de concentrado e seco, obtiveram-se 3,8561 g de extrato. Durante o processo de concentração observou-se a formação de um precipitado que foi purificado através de diversas lavagens com hexano e posteriormente recristalizado em AcOEt obtendo 20,3 mg de Policarpol (Silva, *et al.*, 2012).

4.4 Reações de Semissíntese

4.4.1 Reação de benzilação do Ácido Secalônico

Dissolveu-se 20 mg (0,03134 mmol) de ácido secalônico em 2 mL de DMF anidra, adicionou 9,1 mg de K_2CO_3 (0,0658 mmol, 2,1 eq.) e deixou-se a mistura reagindo por 15 minutos. Após este período foram adicionados 7,8 μ L de Brometo de Benzila (BnBr, 0,0658 mmol, 2,1 eq.).

O tempo total da reação foi de 4h sendo sua evolução acompanhada a cada hora por Cromatografia de Camada Delgada, eluente Hexano/AcOEt 7:2.

Após o término da reação adicionou-se AcOEt ao meio reacional e o mesmo foi levado ao rotaevaporador, com o intuito de retirar o DMF do meio e posteriormente realizou-se uma partição de Acetato de etila/Água 1:1. O produto da fase orgânica foi passado por uma coluna de sílica normal com

Hexano/AcOEt 10:1. A amostra foi caracterizada por métodos espectroscópicos.

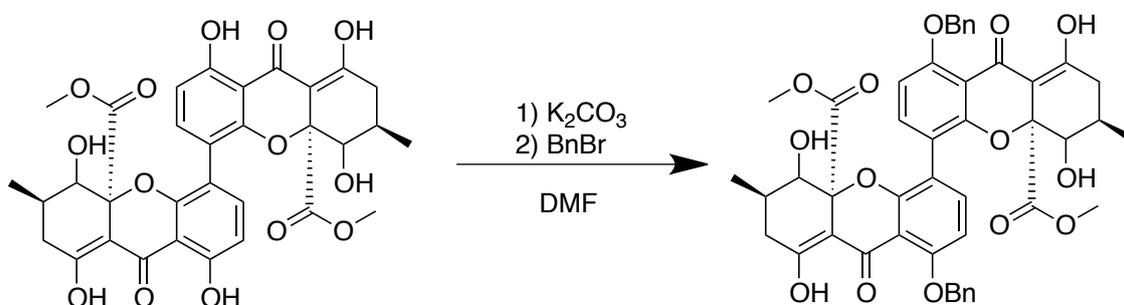


Figura 20 - Reação de benzilação do ácido secalônico.

4.4.2 Reação de benzilação da Bergenina

Solubilizou-se 100 mg (0,304 mmol) de bergenina em 4 mL DMF anidro, adicionou-se 210,6 mg de K_2CO_3 (1,52 mmol, 5 eq.) e deixou sob agitação por 15 minutos, ao término desse tempo inseriu no sistema reacional 181,2 μ L de Brometo de Benzila (1,52 mmol, 5 eq.) e deixou-se a reação sob agitação durante a noite. O acompanhamento da reação foi realizado por Cromatografia de Camada Delgada, eluente Hexano/AcOEt 1:5 (Kumar, *et al.*, 2011).

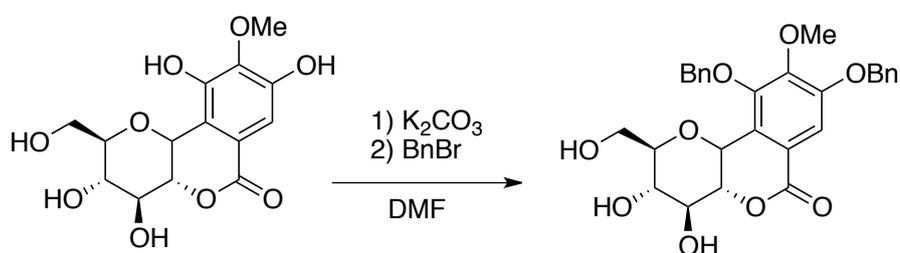


Figura 21 - Reação de benzilação da bergenina.

Após o término a reação foi filtrada e o filtrado foi lavado com AcOEt em excesso e se extraiu com salmoura. A fase aquosa foi extraída com AcOEt e se

juntou com a fase orgânica anterior. O produto foi purificado por cromatografia de coluna utilizando sílica de fase normal, eluente Hex/AcOEt 10:1 e caracterizada por métodos espectroscópicos.

4.4.3 Reação de epoxidação com Policarpol

Dissolveu-se 50 mg de Policarpol (0,113 mmol) em 2 mL de DCM anidro e adicionou-se 30,5 mg de *m*-CPBA (0,136 mmol, 1,2 eq.) e deixou-se sob agitação no escuro em temperatura ambiente por 24 horas. Após o tempo de reação foi realizada uma CCD eluída com Hexano/Acetato de etila 7:2. Adicionou-se mais 1 equivalente de *m*-CPBA e deixou-se sob agitação por mais 24h. Uma nova CCD foi realizada na mesma condição da anterior.

Após o término da reação o meio reacional foi posto em um banho de gelo e a mistura foi extraída com DCM. A fase orgânica foi lavada com $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$, e extraída novamente com DCM que depois foi seca com Na_2SO_4 .

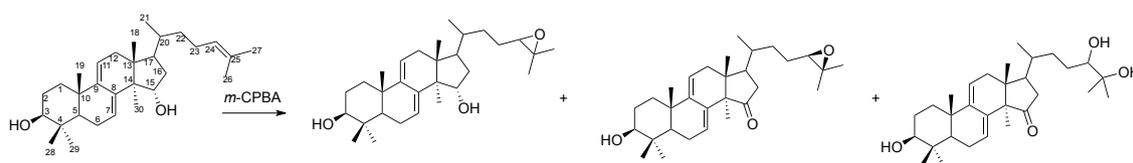


Figura 22 - Reação de epoxidação do Policarpol com os produtos planejados.

A amostra foi codificada como RCA27 e enviada para purificação por HPLC e caracterizada por métodos espectroscópicos.

4.4.4 Reação de acetilação do Policarpol

Dissolveu-se 50 mg de Policarpol (0,113 mmol) em 5 mL de piridina, adicionou-se 128,71 μL de Ac_2O (1,362 mmol, 12 eq.) e a reação foi colocada em refluxo por 24 h.

Após o tempo de reação realizou-se uma CCD, eluída com Hexano/ AcOEt 7:2. Adicionaram-se ao meio reacional 5,36 μL de Ac_2O (5 eq.) e deixou-se a reação por mais 24h. Depois de mais 24h analisou-se o progresso da reação por CCD com as mesmas condições anteriores e adicionou-se mais 2,144 μL de Ac_2O (2 eq.) e deixou-se reagir por mais duas horas, repetindo-se mais uma CCD como as anteriores.

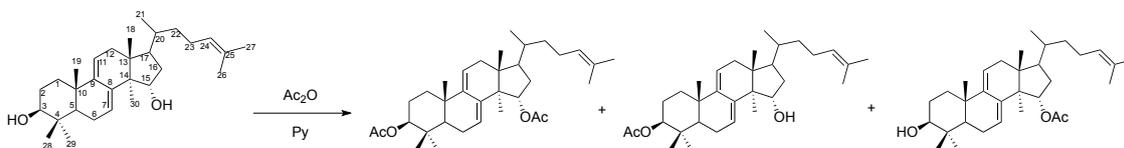


Figura 23 - Reação de acetilação do Policarpol com os produtos planejados.

Após 50 h de tempo reacional esperou-se o sistema esfriar e adicionou-se acetato de etila e levou-se ao rotaevaporador para poder retirar a piridina do meio, esse procedimento foi repetido por 2 vezes, após rotaevaporação, adicionou-se 5mL de HCl 10%, para retirar qualquer traço de piridina ainda existente, e a extração se deu com AcOEt , em seguida a fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 .

Concentrou-se a fase orgânica, identificada sob o código RCA1, a qual foi purificada por cromatografia HPLC e caracterizada por métodos espectroscópicos.

4.4.5 Reação do Policarpol com o Ácido Benzoico

Dissolveu-se 70 mg de Policarpol (0,159 mmol) em 2 mL de DCM e adicionou-se 77,64 mg de ácido benzóico (0,635 mmol, 4 eq.) seguido de 131,16 mg de DCC (0,635 mmol, 4 eq.) e 77,69 mg de DMAP (0,635 mmol, 4 eq.). A reação ficou sob agitação em temperatura ambiente por 48 horas. Após o tempo de reação realizou-se uma CCD eluída com Hexano/Acetato de etila 7:2.

Secou-se o solvente e o sólido foi ressuspensão em AcOEt frio, posteriormente filtrado e em seguida, extraído com HCl 10% e salmoura. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e concentrada em rotaevaporador. O produto da reação foi purificado por cromatografia e caracterizado por métodos espectroscópicos sob o código RCA25

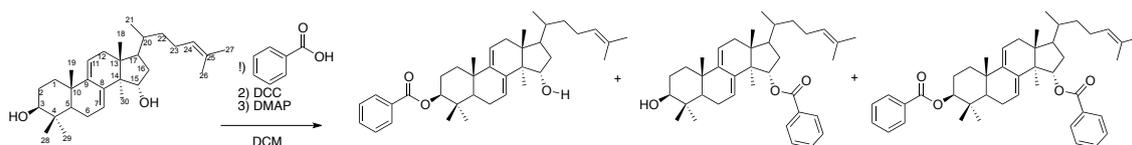


Figura 24 - Reação do Policarpol com o ácido benzóico com os produtos planejados.

4.4.6 Reação de oxidação com PCC do Policarpol

Dissolveu-se 30 mg de Policarpol (0,068 mmol) em 2 mL de DCM anidro e adicionou-se aos poucos 51,00 mg de PCC (0,238 mmol, 3,5 eq.). A reação ficou sob agitação em temperatura ambiente, no escuro, por 2 horas.

Após o tempo de reação realizou-se uma CCD com Hexano/Acetato de etila 7:2. Filtrou-se a reação em sílica utilizando acetato de etila abundante. O produto recuperado foi submetido a uma cromatografia de coluna aberta, utilizando sílica normal, eluente Hexano/Acetato de etila 12:1. A caracterização do produto foi realizada utilizando métodos espectroscópicos. O produto foi codificado como RCA_17_col

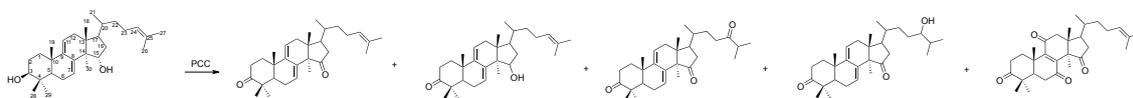


Figura 25 - Reação do Polycarpol com o PCC com os produtos planejados

4.5 Purificação dos produtos obtidos

As purificações dos produtos obtidos por meio de semissíntese foram realizadas por cromatografia líquida no modo preparativo em equipamento Shimadzu (Quioto, Japão), com detector de UV (PDA), bomba LC10AD *gradient pumps*. O método utilizado foi isocrático em MeOH 100% em coluna C18, 5 μ , 250 x 15,00 mm (Phenomenex).

As colunas para cromatografia líquida de baixa pressão utilizadas nesse trabalho foram realizadas em: sílica gel 230-400 mesh (flash), sílica gel 70-230 mesh - Silicycle® e Sephadex LH-20 - Aldrich®.

5 Resultados e discussões

5.1 Semissíntese

5.1.1 Reação de benzilação do Ácido Secalônico

O Ácido Secalônico benzilado foi produzido pela síntese de Alexander William Williamson, uma das melhores formas de se obter éteres. O mecanismo inicia-se na reação do fenol com o carbonato de potássio para formar um fenolato de potássio. Em seguida o íon fenóxido ataca o brometo de benzila, em uma reação de substituição nucleofílica bimolecular, gerando a molécula de interesse e o sal de brometo de potássio (Figura 26; Passo, 2012).

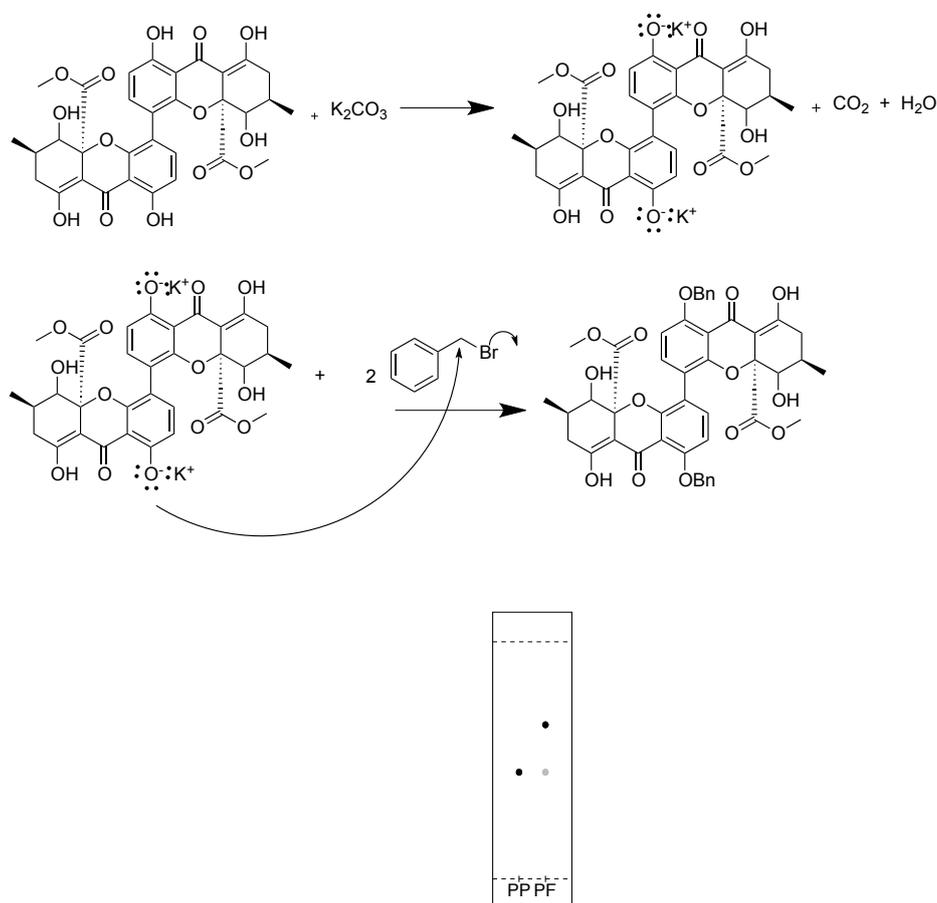


Figura 26 - Mecanismo de reação da benzilação do ácido secalônico através da síntese de Williamson e placa de CCD em Hex/AcOEt 5:1 utilizando como revelador UV (280 nm) e vanilina, onde PP (produto de partida) PF (produto final).

A placa de CCD mostrou a formação de um produto com Rf superior ao do composto de partida, coerente com a expectativa de um ou mais derivado éter, além de resquícios do precursor da reação. Após o tratamento por cromatografia em coluna aberta, a amostra do derivado foi caracterizada como um sólido vermelho-castanho.

O espectro de massas de alta resolução foi realizado e apresentou uma relação de m/z $[M + H] = 819,2621$ Da em resultado experimental enquanto que o seu resultado teórico é $819,2647$ Da apresentando um erro de $0,73$ ppm (Figura 27).

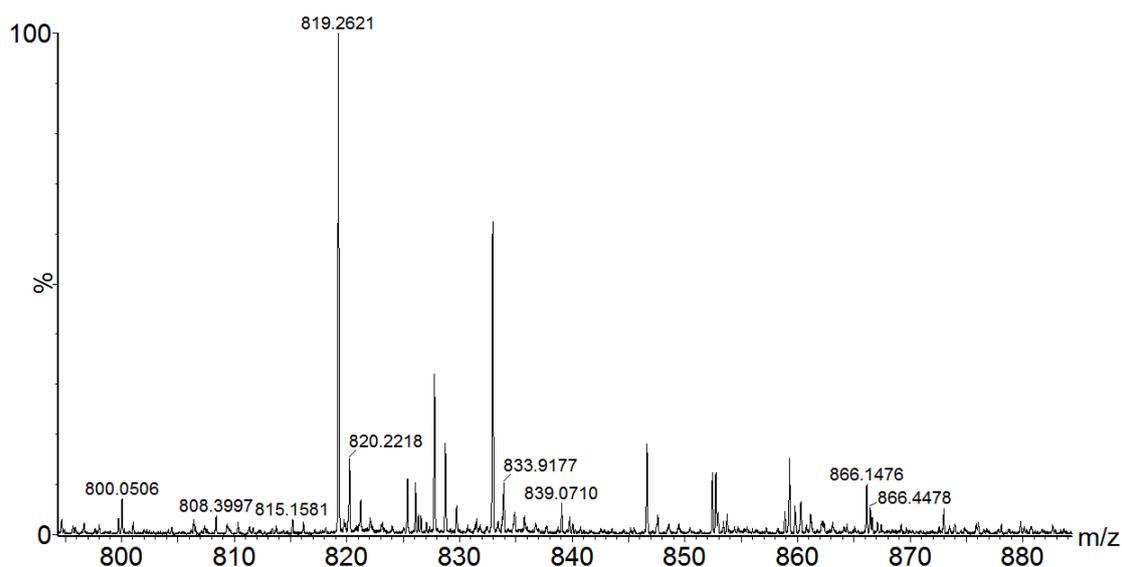


Figura 27 – Espectro de massas do produto reacional do ácido secalônico com ácido benzoico.

A reação de Williamson é específica para obtenção de éteres através de hidroxilas fenólicas, portanto afirma-se que a reação ocorreu e os dados do espectro de massas comprova o fato, no entanto como o Ácido Secalônico pode sofrer isomerização somente é possível determinar a estrutura com precisão depois da análise dos dados de RMN.

5.1.2 Reação de benzilação da Bergenina

Para a benzilação da Bergenina foi utilizada a síntese de Williamson, onde primeiro obteve-se a formação do fenolato para depois ocorrer uma reação de substituição. O mecanismo para reação da bergenina segue conforme a Figura 28.

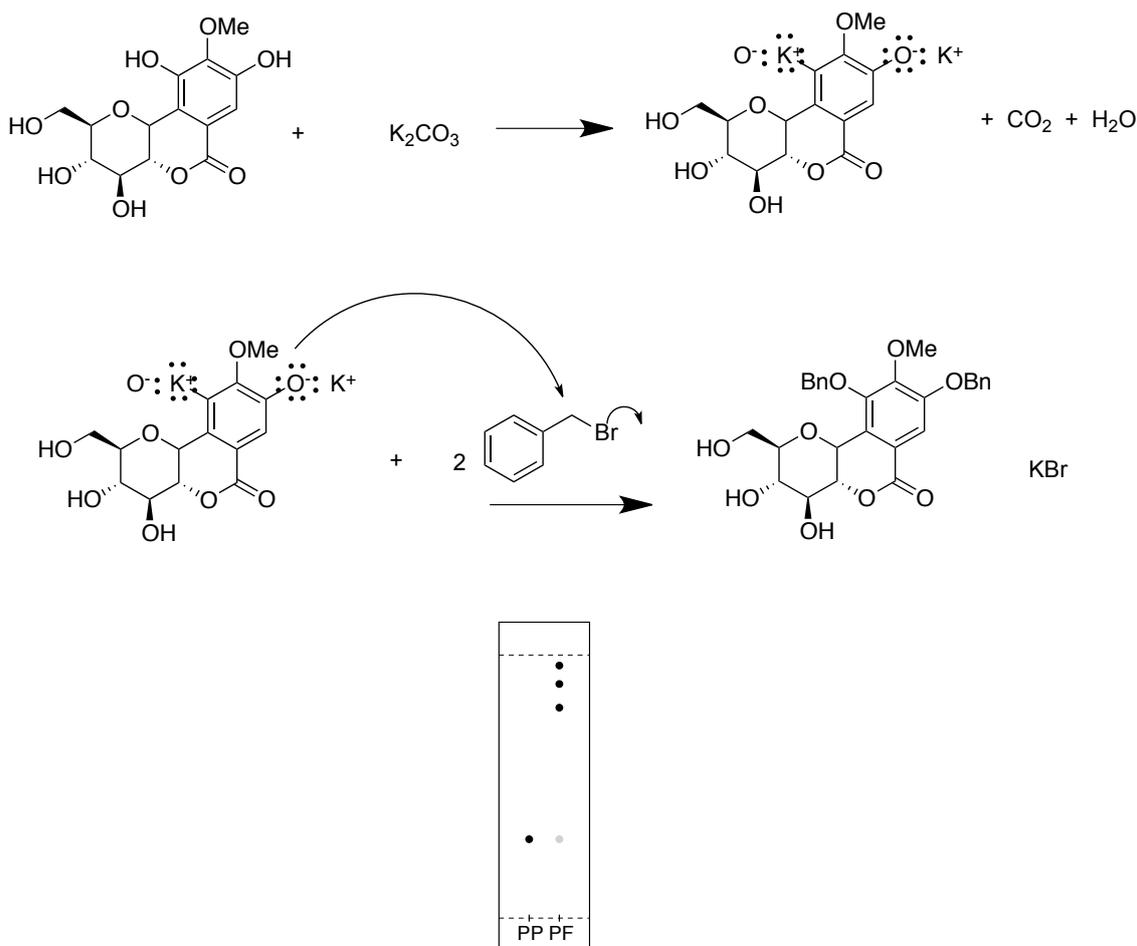


Figura 28 - Reação de benzilação da bergenina através da síntese de Williamson e representação da placa de CCD em Hex/AcOEt 1:5 utilizando como revelador UV (280nm) e vanilina, onde PP (produto de partida) PF (produto final)..

O espectro de massas de alta resolução do produto de reação apresentou um pico em m/z 509,1842 ($[M+H]^+$), correspondente à Bergenina benzilada nas duas hidroxilas e compatível com o valor teórico de 509,1812 Da, apresentando um erro de 5,89 ppm (Figura 29). O espectro de RMN de 1H da amostra não apresentou boa qualidade, porém o espectro de RMN de ^{13}C

apresentou valores de deslocamento químicos compatíveis com os da literatura (Tabela 2).

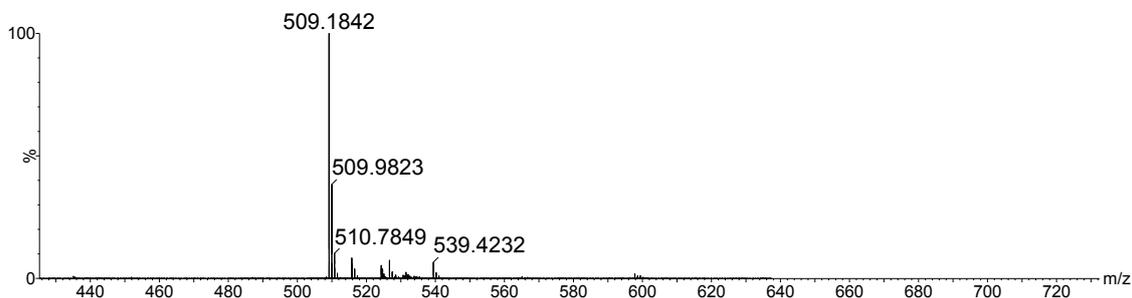


Figura 29 - Espectro de massas do produto de benzilação da bergenina.

Com um rendimento de 44%, inferior ao encontrado na literatura que é de 99% (Liu, *et al.*, 2014), foi portanto obtida a substância desejada, citada como um intermediário para outros derivados da bergenina. Assim, essa reação de benzilação é citada como um artifício para proteger os grupos hidroxilas fenólicos para que outras partes da molécula possam reagir. Posteriormente esses grupos benzilas são retirados fazendo com que a molécula volte a ter as hidroxilas livres através de uma hidrólise simples (Kumar, *et al.*, 2011).

Tabela 2 - Tabela de ^{13}C para comparação entre os dados da literatura.

C	Bergenina ¹	Bergenina Benzilada ²	BerBn
1			
2	168,40	164,22	164,60
3	118,20	120,01	118,70
4	109,90	111,53	111,80
5	151,10	152,17	152,70
6	141,10	148,95	149,10
7	148,20	150,86	149,70
8	118,10	126,70	127,60
9	73,10	75,44	74,30

10			
11	81,90	82,59	80,80
12	70,70	71,15	69,70
13	74,40	72,44	72,00
14	80,20	81,37	80,20
15	58,80	60,86	60,90
16	61,50	61,84	61,00
17	*		
18	*	70,79	69,9
19	*	136,59	135,9
20	*	127,8	127,50
21	*	128,7	128,50
22	*	128,36	128,20
23	*	128,7	128,50
24	*	127,8	127,50
25	*		
26	*	75,73	76,10
27	*	138,54	136,40
28	*	128,18	127,50
29	*	128,7	128,50
30	*	128,36	128,20
31	*	128,7	128,50
32	*	128,18	127,50

1 (Silva, *et al.*, 2009); 2 (Liu, *et al.*, 2014)

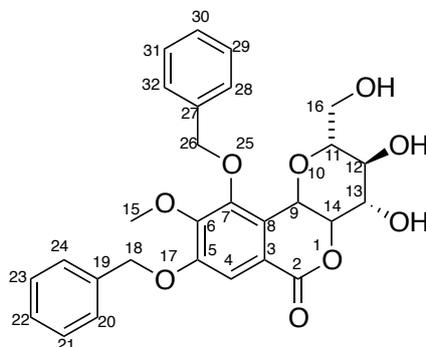


Figura 30 - Estrutura da berberina benzilada, numerada de acordo com a tabela.

5.1.3 Reação de epoxidação com o Policarpol

O Policarpol foi epoxidado através da reação com o perácido *m*-CPBA (Ácido 3-Cloroperbenzóico), em que o mesmo transfere um átomo de oxigênio para o alceno em um mecanismo cíclico de etapa única tendo como resultado

uma adição *sin* do oxigênio ao alceno formando um epóxido e um ácido carbinólico (Figura 31) (Bruice, 2006).

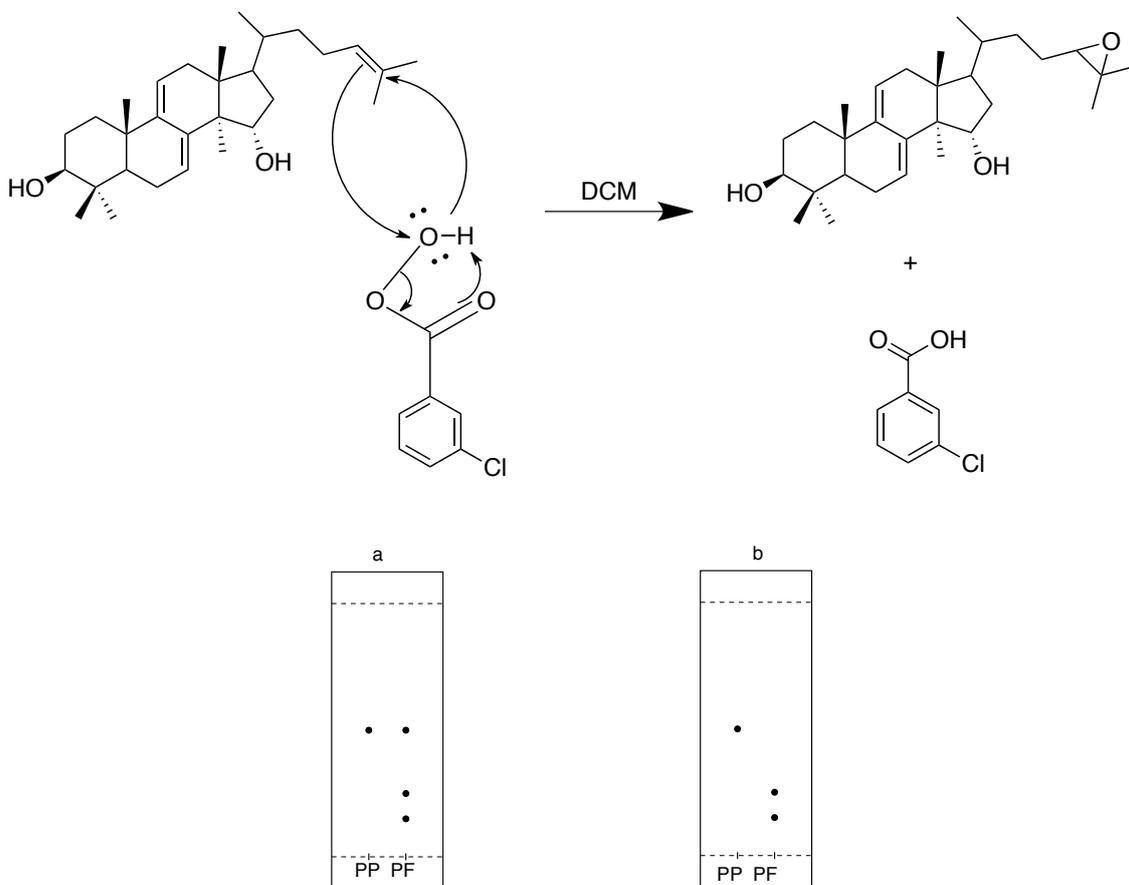


Figura 31 – Mecanismo de epoxidação do Polycarpol com *m*-CPBA em DCM e placa de CCD em Hex/AcOEt 7:2 utilizando como revelador UV (280nm) e vanilina , onde PP (produto de partida) PF (produto final). Em a temos a reação com 24 horas e em b após 48 horas e a adição de mais um equivalente de *m*-CPBA.

Na placa de CCD onde observou-se o aparecimento de duas manchas de *r_f* menor que o produto de partida. A amostra RCA27 apresentou-se como um sólido amorfo incolor. Após a cromatografia (Figura 38) obteve-se sete amostras (RCA27_1 – RCA27_7).

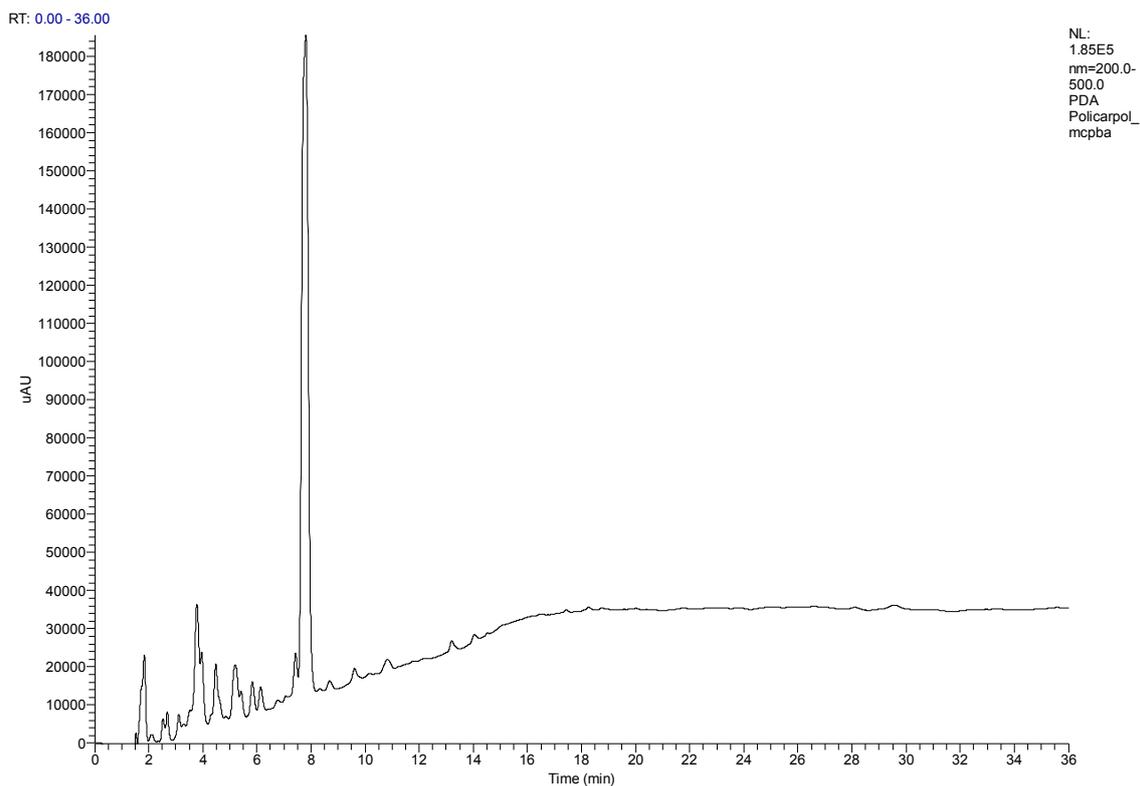


Figura 32 - Cromatograma do produto reacional da epoxidação do Polycarpol.

O espectro de massas de alta resolução da fração RCA27_6(Figura 32) apresentou o pico correspondente a molécula protonada do derivado epoxidado do Polycarpol ($[M + H]^+$) em m/z 457,3690. Comparado ao valor teórico de 457,3682 Da, tem-se um erro de 1,75 ppm (Figura 33).

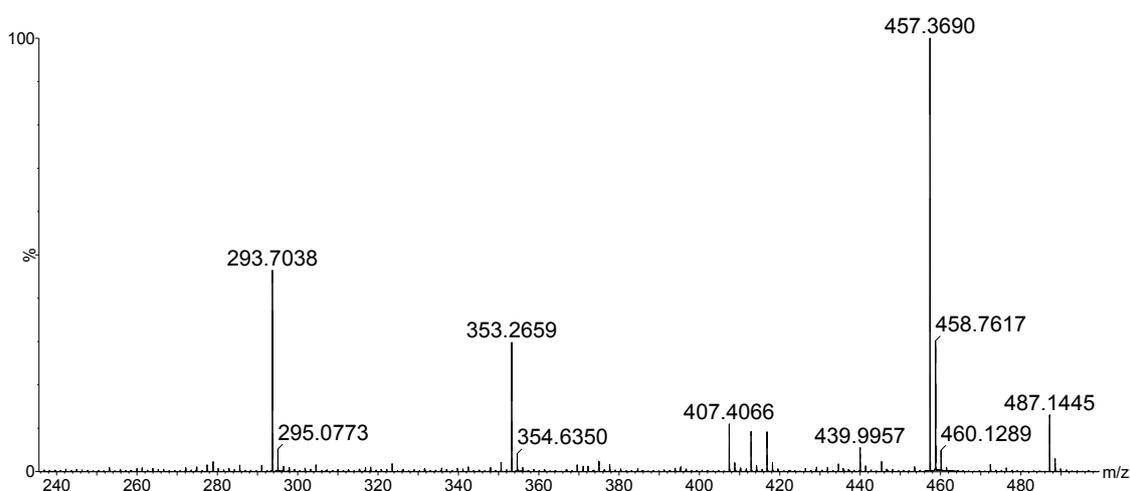


Figura 33 – Espectro de massas no modo positivo do produto reacional da (epoxidação do Polycarpol (amostra RCA27_6) - o pico em m/z 457,3690 corresponde ao produto esperado.

No espectro de RMN ^1H da amostra RCA27_6 (Figura 34) foram focalizados os sinais diferentes em relação ao produto de partida Policarpol (Silva, *et al.*, 2012). O sinal olefínico referente ao H-24 apresentou uma mudança no deslocamento de 5,11 ppm (t) no Policarpol para 2,68 ppm no derivado epoxidado, devido ao efeito de blindagem do H-24 provocado pelo novo grupo funcional. O deslocamento químico típico de epóxido em 2,54 ppm (Silverstein, 2005) é muito próximo ao resultado experimental. Viu-se também uma alteração nos deslocamentos dos H metílicos H-26 e H-27 que também sofreram blindagem. O H-26 variou de 1,63 para 1,26 ppm e o H-27 de 1,71 para 1,31 ppm. Os outros sinais olefínicos, carbinólicos e metílicos não sofreram alterações significativas.

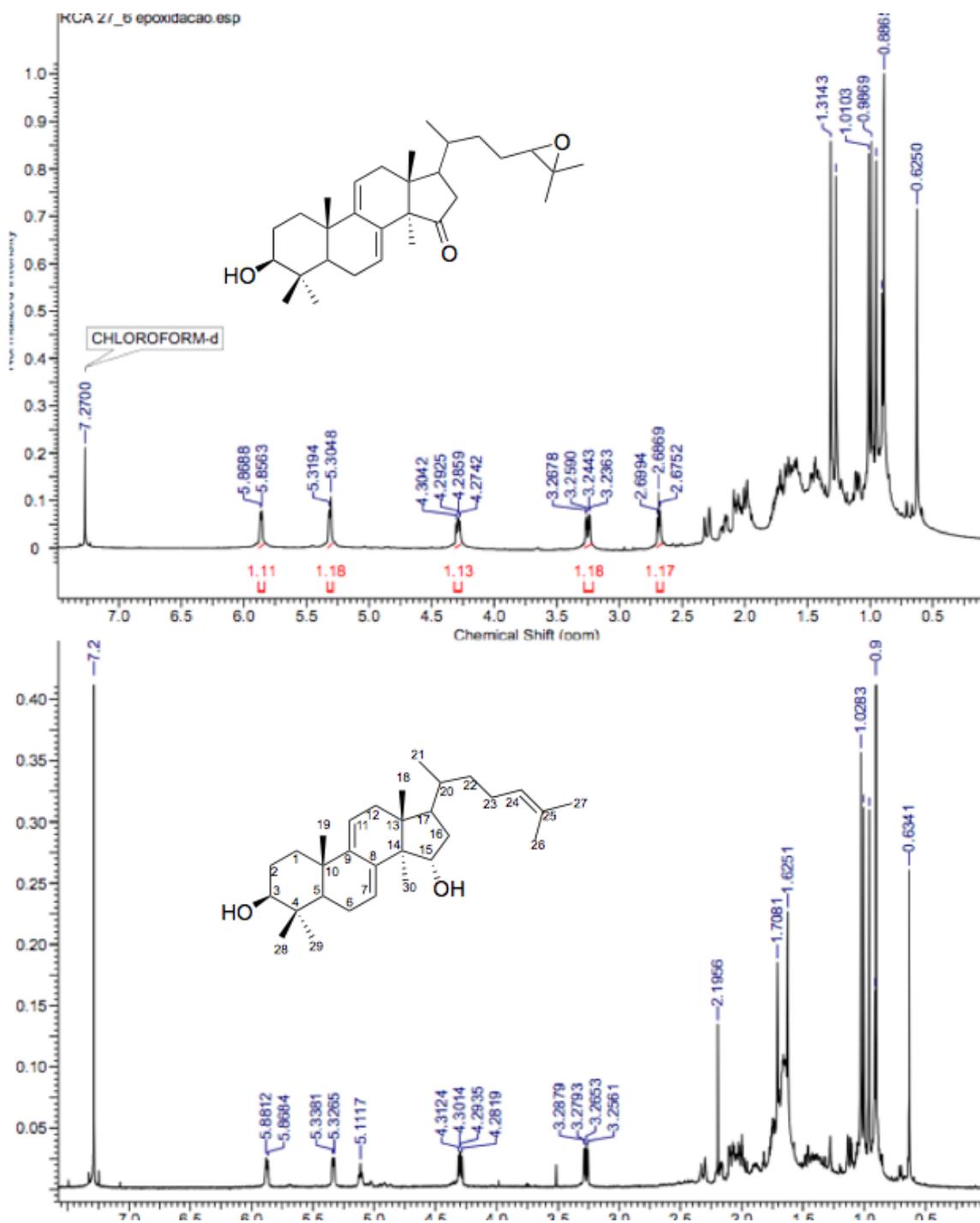


Figura 34 - Espectro de RMN 1H da amostra RCA27_6 (superior), em comparação com o espectro de RMN 1H (500 MHz, CDCl₃) do Polycarpol (inferior).

A modificação pontual na função em C-24/25, evidenciada e comprovada através dos dados espectroscópicos apresentados permite concluir o sucesso da reação de epoxidação executada e a estrutura da amostra RCA27_6 como o 24-epóxi-Polycarpol (Figura 41).

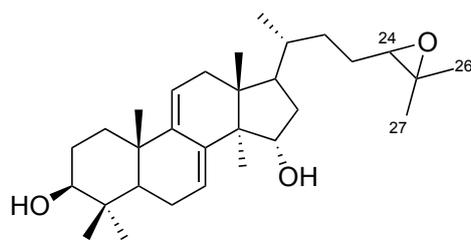


Figura 35 - Estrutura do derivado do 24-epóxi-Policarpol.

Aplicando a proposta de Jason Green para o cálculo do fator de naturalidade na nova molécula obtida temos: Policarpol ($C_{30}H_{48}O_2$, $m = 440,37$, $s = 7$); 24-epóxi-policarpol ($C_{30}H_{48}O_3$, $m = 456,36$, $s = 7$).

$$N = (440,37/456,36) \times 50 + (7/7) \times 50$$

$$N = 48,24 + 50$$

$$N = 98,24$$

O fator de naturalidade para a nova molécula formada é de $N = 98,24$, logo temos 98,24 % do produto natural de partida presente na nova molécula obtida por semissíntese.

5.1.4 Reação de acetilação do Policarpol

O Policarpol foi acetilado através de uma reação clássica de piridina e anidrido acético. Inicialmente ocorre um ataque nucleofílico da piridina ao carbono da carbonila do anidrido acético formando um ânion acetato e um derivado da piridina, que logo em seguida reage com o Policarpol formando o éster e regenerando a piridina.

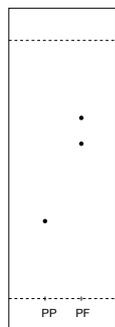
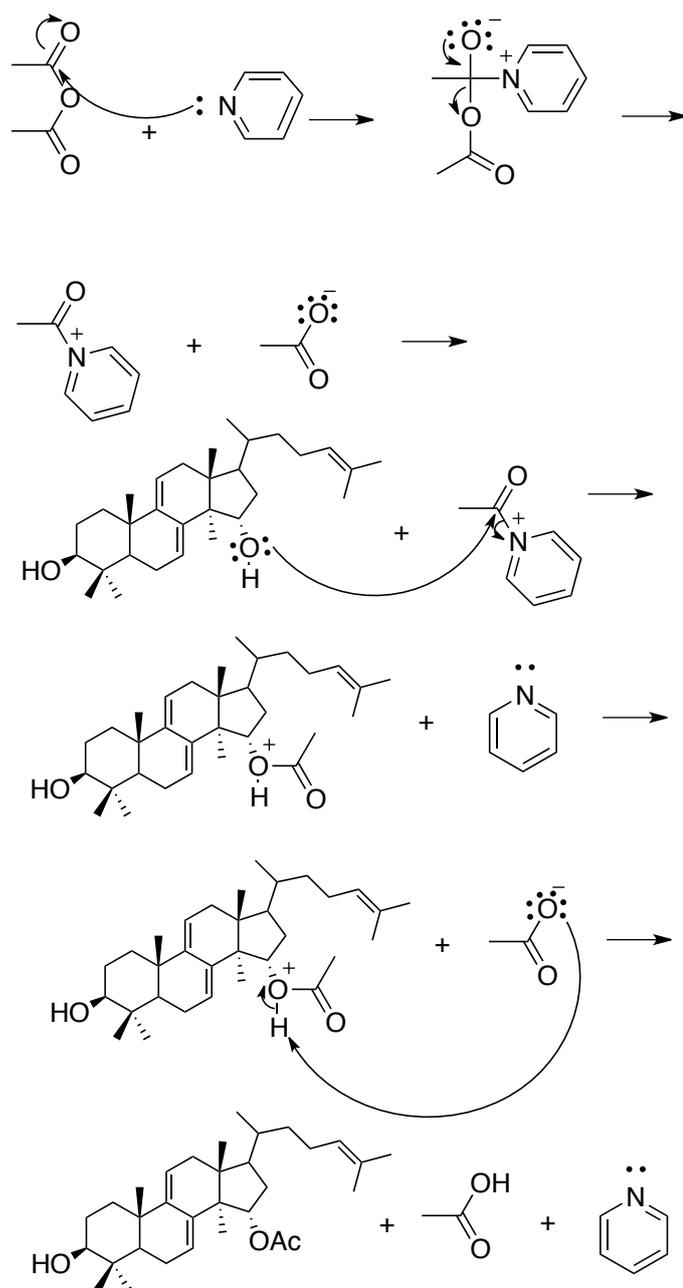


Figura 36 - Mecanismo de reação da acetilação do Polycarpol com anidrido acético e piridina e placa de CCD em Hex/AcOEt 7:2 utilizando como revelador UV (280nm) e vanilina , onde PP (produto de partida) PF (produto final).

Conforme foi observado na placa de CCD, a formação de dois pontos com Rf maior que o do produto de partida indicam mais de um produto formado. Além da reação na hidroxila indicada na figura acima, a reação ocorreu na outra hidroxila para algumas moléculas e nas duas hidroxilas para outras, formando no total três produtos.

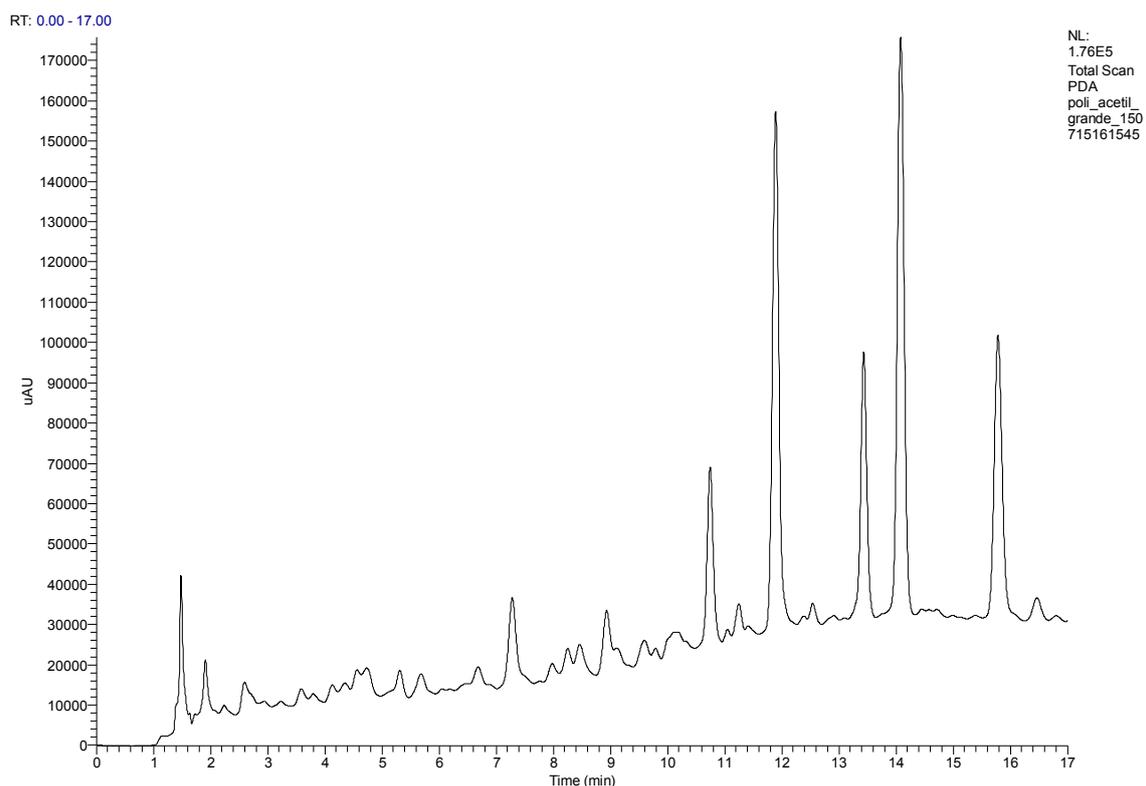


Figura 37 - Cromatograma da mistura reacional após o procedimento de acetilação do Policarpol,

As cinco frações (RCA1_1 – RCA1_5) obtidas por HPLC apresentaram aspecto de sólido amorfo incolor. As frações RCA1_3 e RCA1_4 foram identificados como os prováveis produtos monoacetilados, pois os espectros de massas de alta resolução foram praticamente o mesmo, apresentando pico em m/z 483,3834 ($[M+H]^+$) (Figura 38), compatível com o valor teórico de 483,3830 e apresentando um erro de apenas 0,827 ppm. O provável produto biacetilado (RCA1_5) apresentou espectro de massas com pico em m/z 525,3983,

compatível com o valor teórico de 525,3838 Da e com um erro de 8,56 ppm (Figura 39).

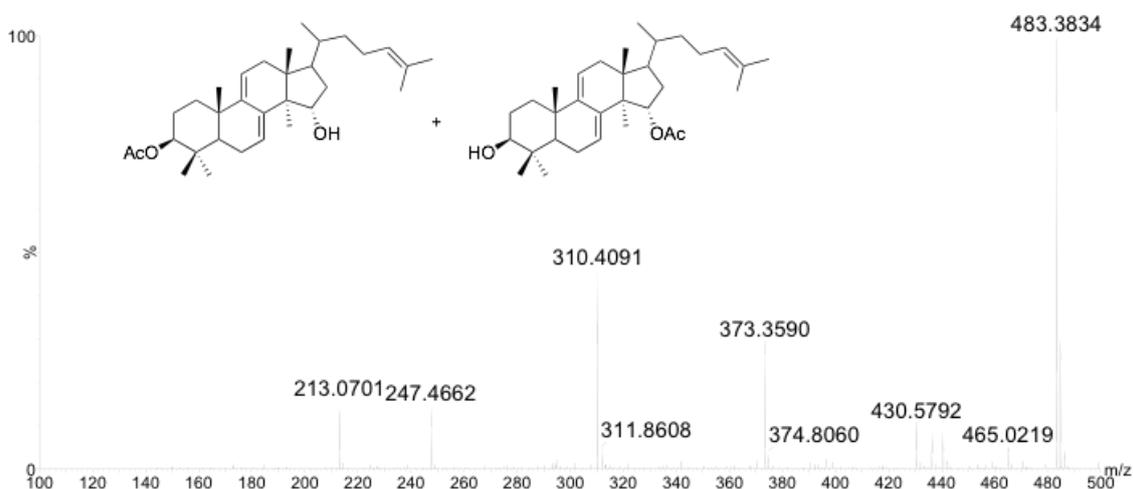


Figura 38 - Espectro de massas do produto de monoacetilação do Polycarpol RCA1_4, onde a massa de 483,3834 corresponde ao produto obtido.

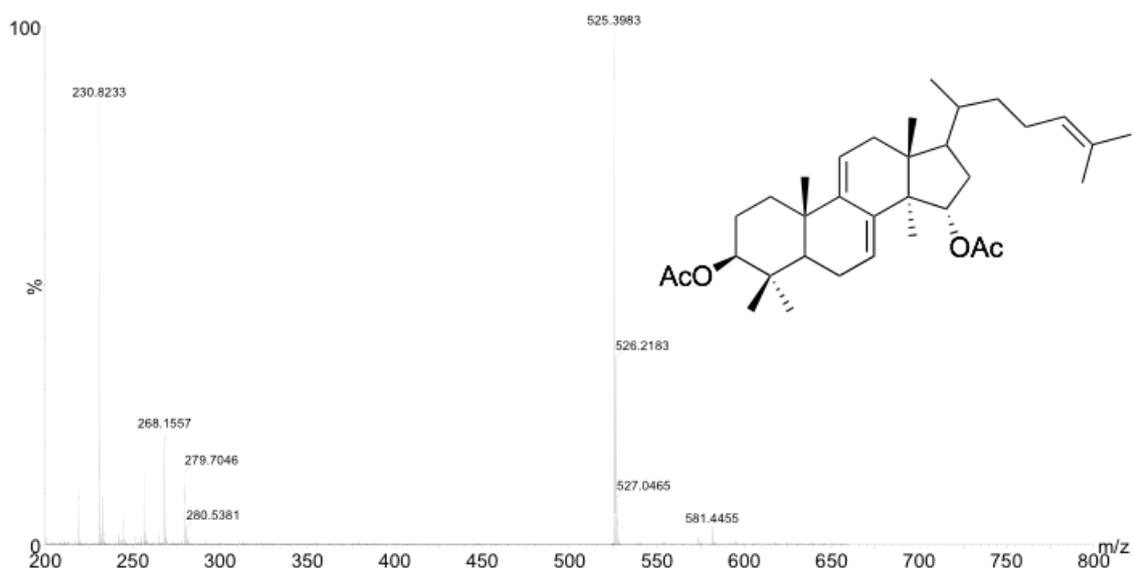


Figura 39 - Espectro de massas do produto de biacetilação do Polycarpol RCA1_5, onde a massa de 525,3983 corresponde ao produto obtido.

O Espectro de RMN de ^1H da amostra RCA1_5 (Figura 40) apresentou sinais diferentes em relação ao Polycarpol nos hidrogênios dos C-3 e C-15, os quais apresentaram o esperado efeito de desblindagem para derivados acetilados de alcoóis. Em comparação com a molécula precursora, Polycarpol, (Silva, *et al.*, 2012) o sinal do H-3 sofreu alteração no produto biacetilado de δ

3,27 (dd, $J_1 = 4,3$ Hz e $J_2 = 11,3$ Hz) para δ 4,52 (dd, $J_1 = 3,4$ Hz e $J_2 = 11,3$) e o H-15, de δ 4,30 (dd, $J_1 = 5,5$ Hz e $J_2 = 9,4$) para δ 5,07 (multiplicidade não detectada pois esse sinal ficou sobreposto com o sinal do H-24; Figura 41).

Os sinais olefínicos dos H-11 (δ 5,33; d) e H-24 (δ 5,08) não sofreram alterações em seus sinais, comparados ao seu precursor. No entanto o H-7 sofreu um efeito de blindagem, causando em seu deslocamento alteração de δ 5,87 (d) para δ 5,49 como consequência da acetilação na posição C-15 (Figura 42).

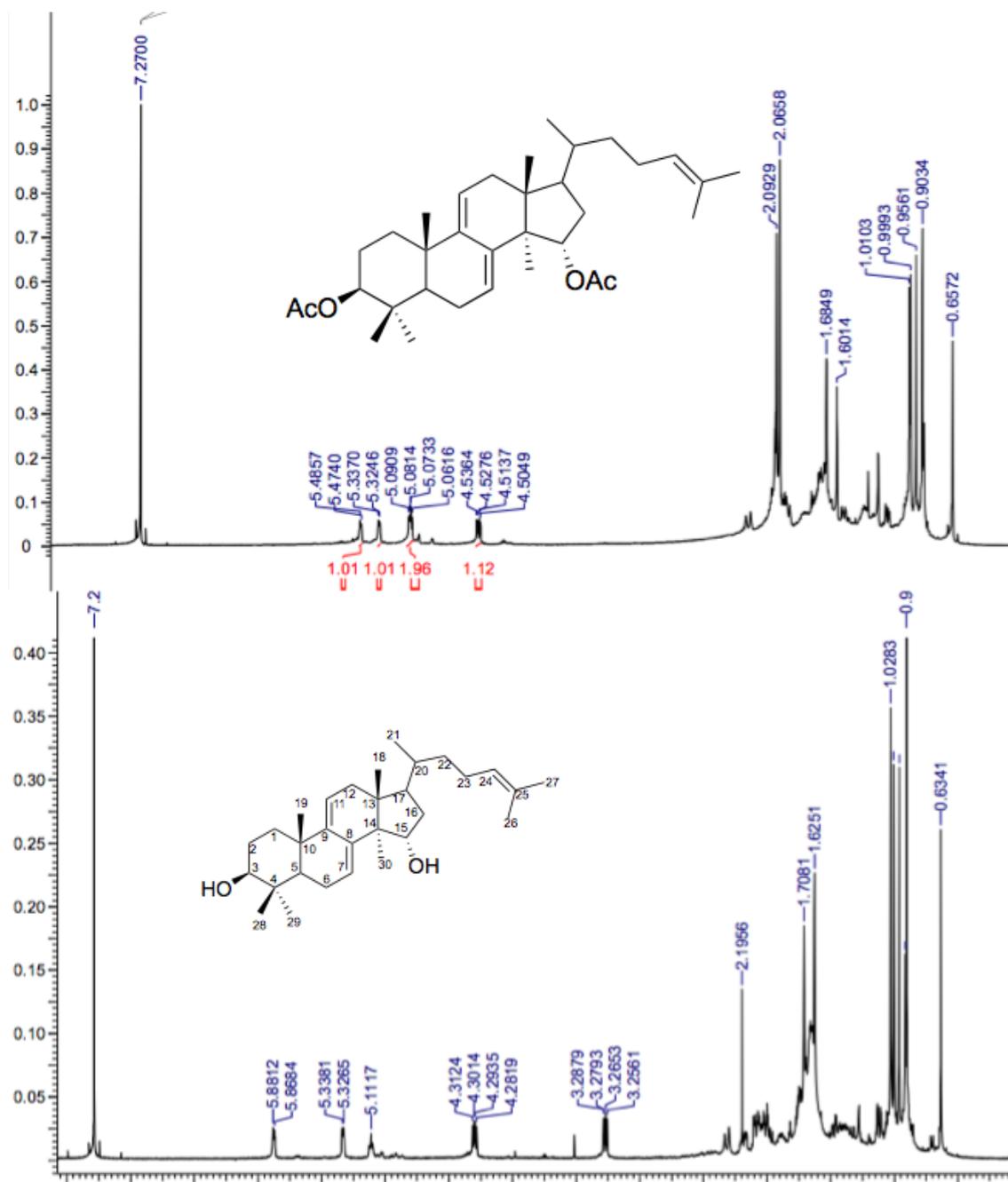


Figura 40 - Espectro de RMN 1H do Policaprol biacetilado - amostra RCA1_5 (superior), espectro de RMN 1H Policaprol (inferior) (500MHz, CDCl₃).

Percebe-se também no espectro de RMN de ¹H os dois sinais das metilas dos grupos acetilas ligados no C-15 e C-3, em δ 2,09 e δ 2,06, respectivamente (Figura 42).

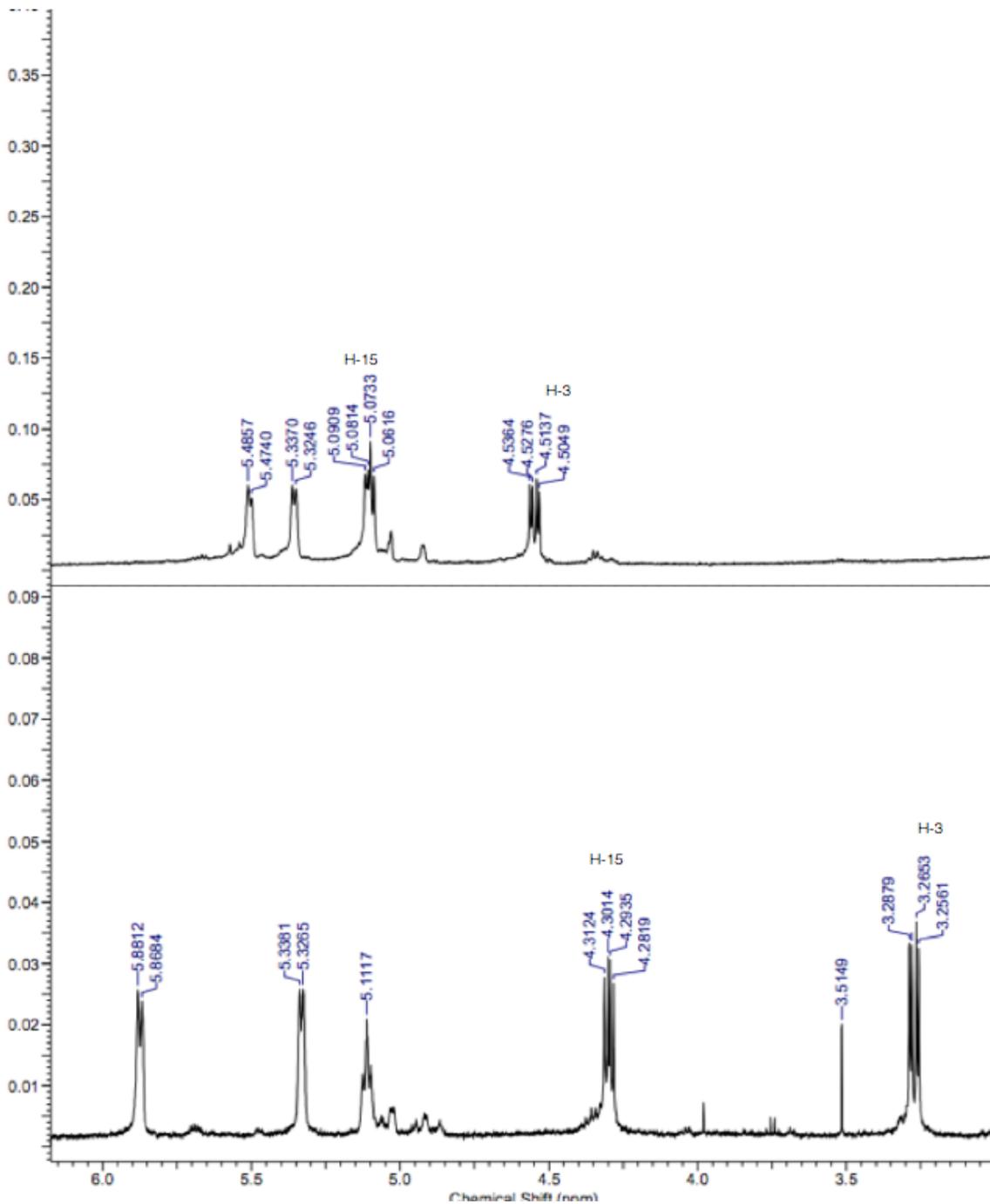


Figura 41 – Ampliação do espectro de ¹H, onde em na parte superior temos a região dos H olefínicos e os carbinólicos (H-3 e H-15) da amostra RCA1_5 e na parte inferior a mesma região do Policarpol.

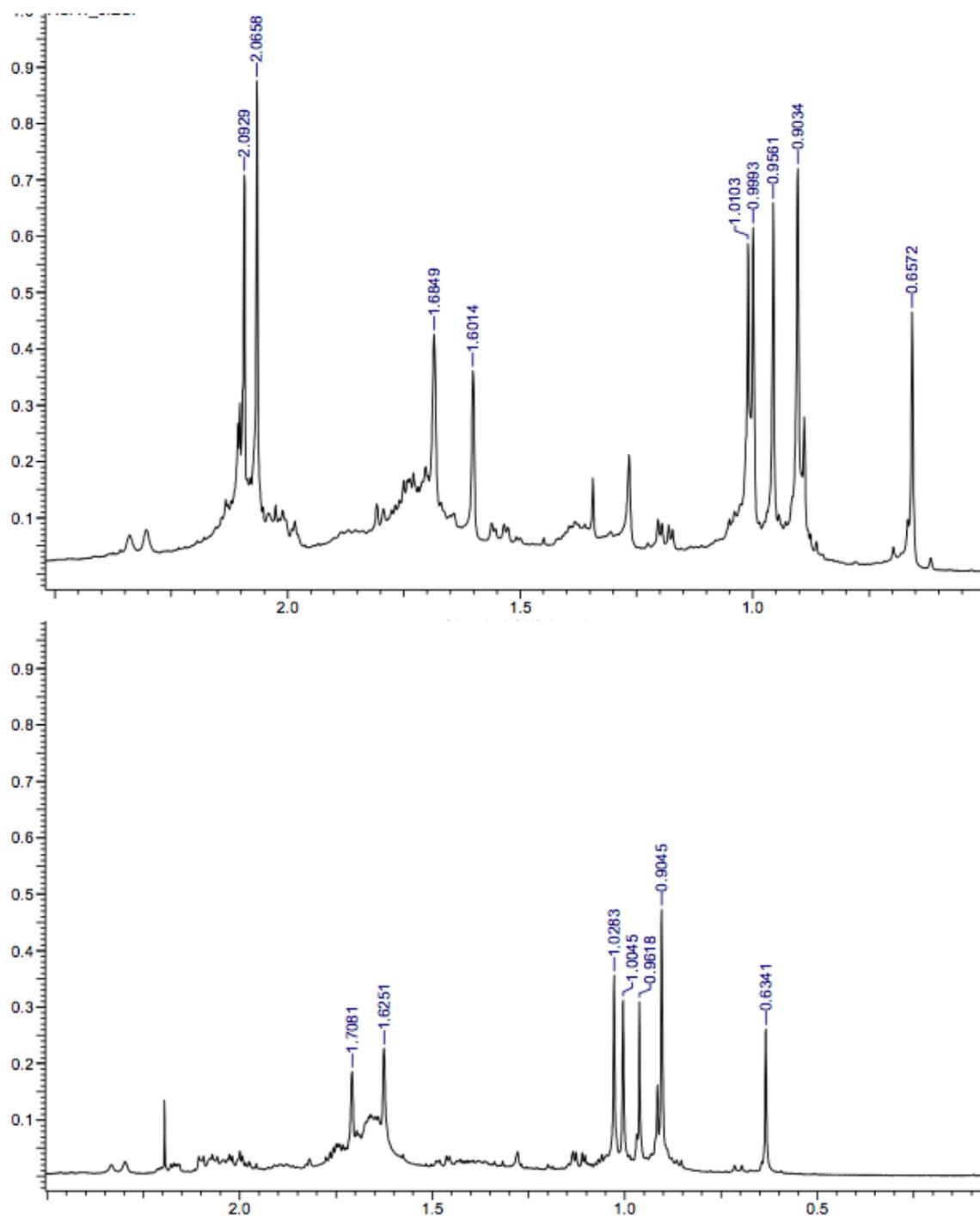


Figura 42 - Espectro de ¹H, onde na parte superior temos a região dos H carbinólicos (grupo acetilas) e metílicos da amostra RCA1_5 e na parte inferior a mesma região do Policaprol.

Os dados de espectro de massas e RMN de ¹H corroboram para a identificação da amostra RCA1_5 com o derivado do Policaprol acetilado nas posições C-3 e C15 (Figura 43)

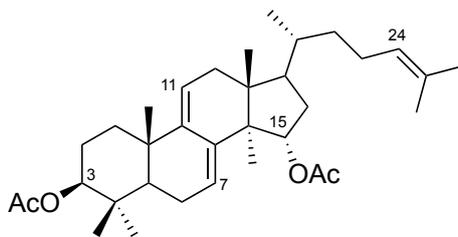


Figura 43 - Estrutura do RCA1_5, derivado do Policarpol, 3,15-diacetil-Policarpol.

Aplicando a proposta de Jason Green para o cálculo do fator de naturalidade na nova molécula obtida temos: Policarpol ($C_{30}H_{48}O_2$, $m = 440,37$, $s = 7$); 3,15-diacetil-policarpol ($C_{34}H_{52}O_4$, $m = 524,39$, $s = 7$).

$$N = (440,37/524,39) \times 50 + (7/7) \times 50$$

$$N = 41,99 + 50$$

$$N = 91,99$$

O fator de naturalidade para a nova molécula formada é de $N = 91,99$, logo temos 91,99 % do produto natural de partida presente na nova molécula obtida por semissíntese.

O espectro de RMN de 1H da amostra RCA1_4 apresentou semelhança com o espectro da amostra RCA1_5 relativa a adição de um grupo acetil no C-3, pois houve a mesma mudança em relação ao Policarpol no deslocamento do H-3, de $\delta 3,27$ para $\delta 4,52$, e o aparecimento de sinal referente a um único grupo metil de acetila, em $\delta 2,06$ (Figura 44). Não foi observada outra mudança no espectro de RMN de 1H dessa amostra.

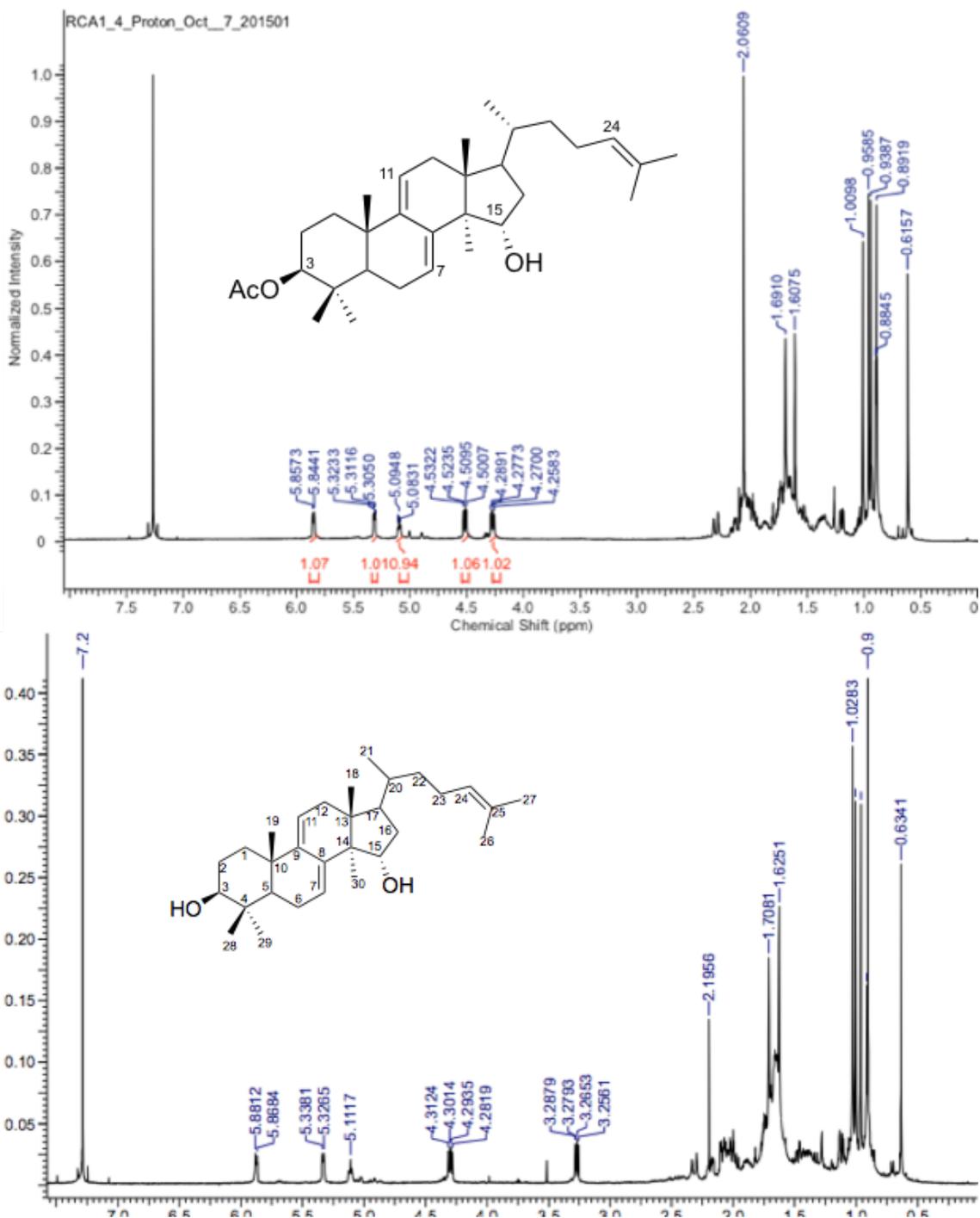


Figura 44 - Espectro de RMN 1H da amostra RCA1_4 (superior) em comparação com o Policarpol (inferior) (500 MHz, CDCl₃).

Os dados comparativos com o produto de partida com os dados da amostra RCA1_5, juntamente com o espectro de massas de RCA1_4 indicam a amostra como o derivado do Policarpol acetilado na posição C-3 (Figura 45).

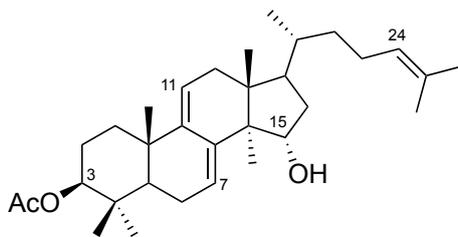


Figura 45 - Estrutura do derivado do Policarpol monoacetilado em C-3 - RCA1_4, 3-acetil-Policarpol.

De modo análogo, o espectro de RMN da amostra RCA1_3 (Figura 46) apresentou semelhanças com a amostra RCA1_5, porém indicando a substituição de um grupo acetila no C-15, pois foi observado a alteração no deslocamento químico referente ao H-15 de δ 4,30 para δ 5,07, sobreposto ao sinal do H-24, e tendo o aparecimento de um único sinal de metila de acetila em δ 2,09. Como no composto biacetilado, o H-7 foi alterado de δ 5,87 (d) para δ 5,49 (d) (Figura 47).

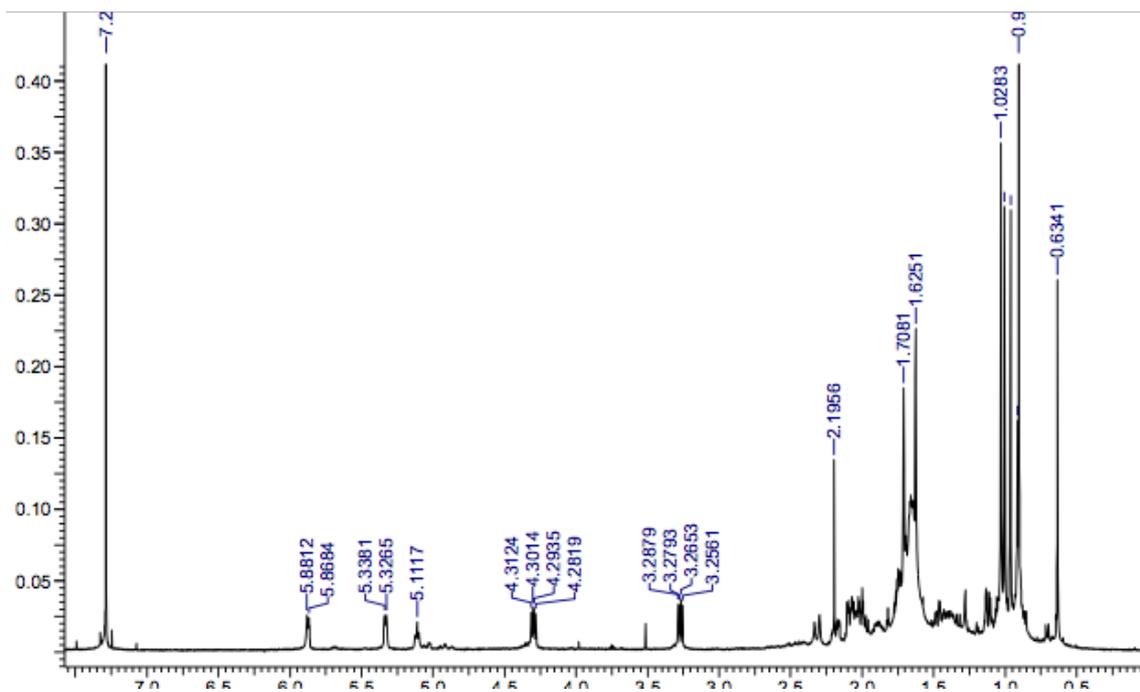
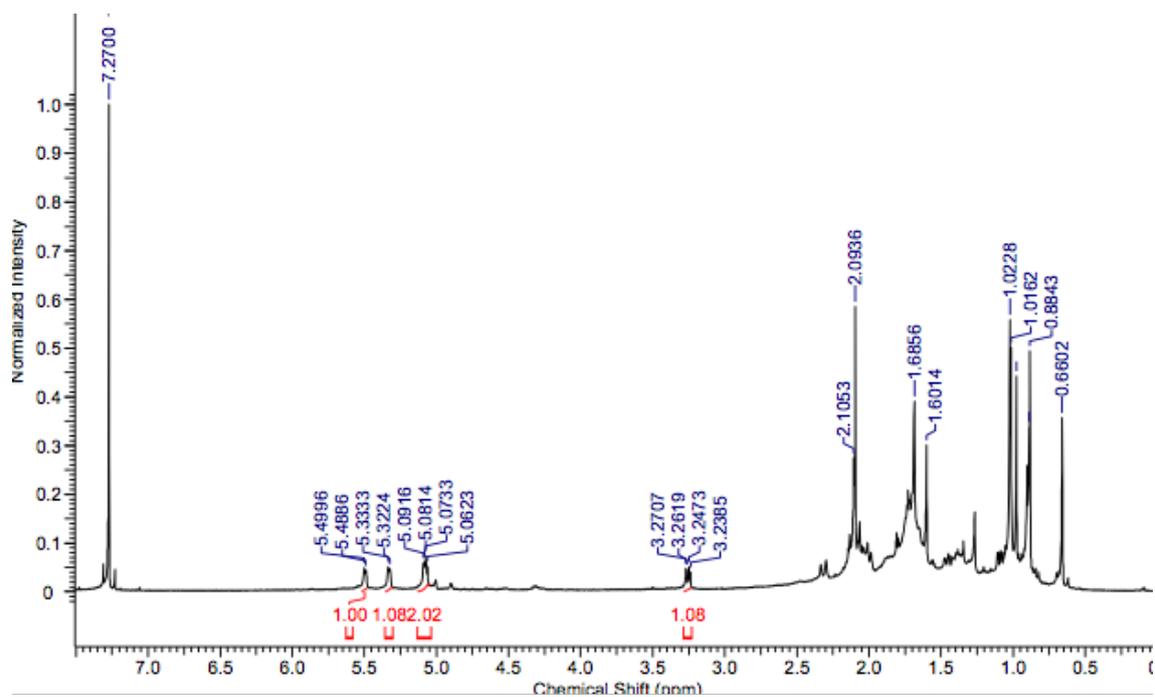


Figura 46 - Espectro de RMN 1H da amostra RCA1_3 (superior) em comparação com o espectro do Policaprol (inferior).

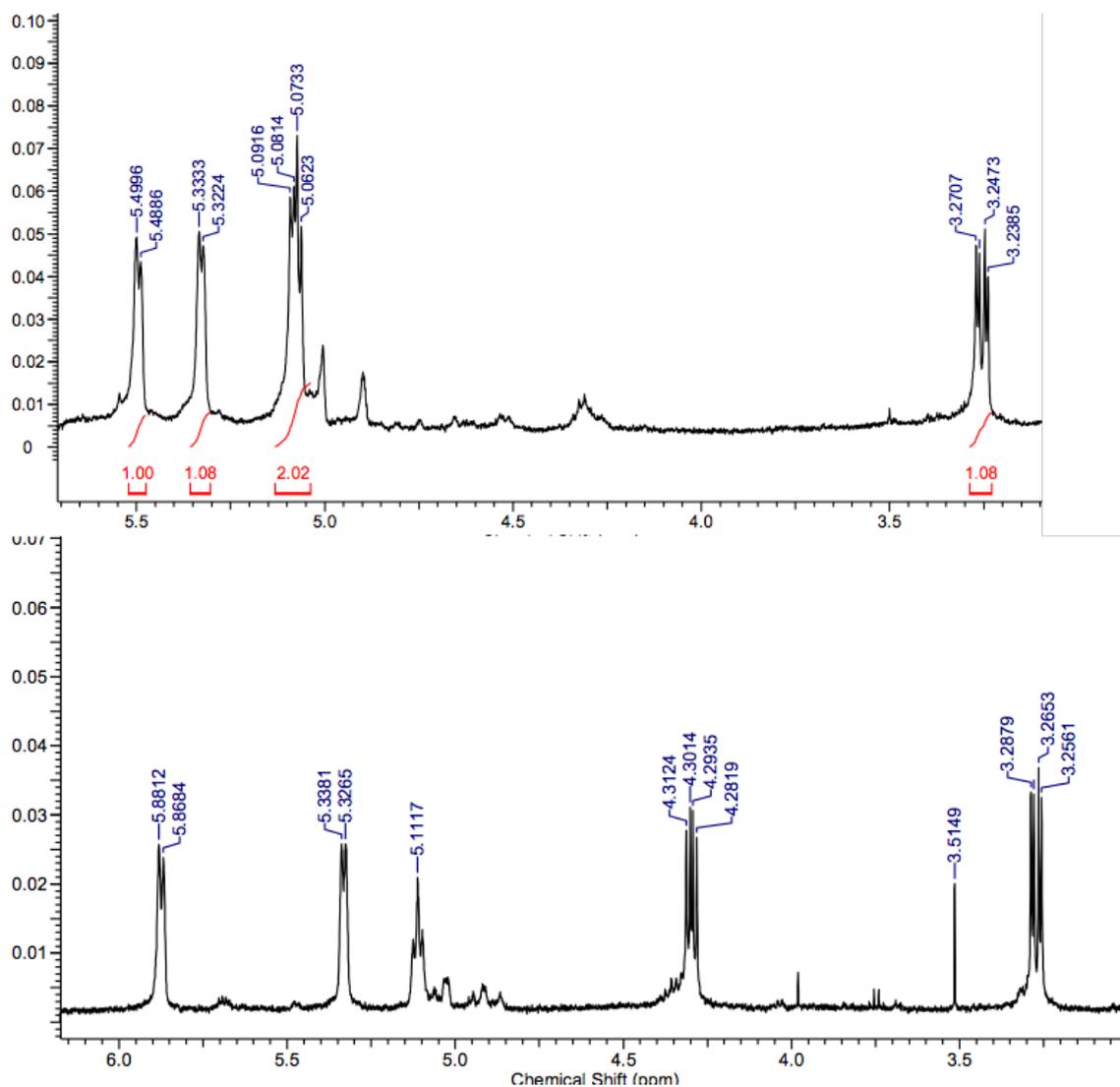


Figura 47 - Comparação dos espectros de RMN de 1H das amostras RCA1_3 (superior) e RCA1_5 (inferior), da região olefínica.

Tendo visto e analisado todas as evidências pode-se dizer que a amostra RCA1_3 trata-se do derivado do Policarpol acetilado no C-15 (Figura 48).

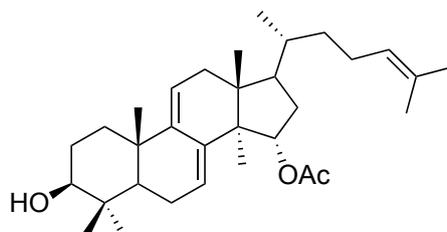


Figura 48 - Estrutura do derivado do Policarpol monoacetilado em C-15 - RCA1_3, 15-acetil-Policarpol.

Aplicando a proposta de Jason Green para o cálculo do fator de naturalidade os isômeros 3-acetil-policarpol e 15-acetil-policarpol temos: Policarpol ($C_{30}H_{48}O_2$, $m = 440,37$, $s = 7$); isômeros ($C_{32}H_{50}O_3$, $m = 456,36$, $s = 7$).

$$N = (440,37/482,36) \times 50 + (7/7) \times 50$$

$$N = 45,64 + 50$$

$$N = 95,64$$

O fator de naturalidade para aos isômeros formados é de $N = 95,64$, logo temos 95,64 % do produto natural de partida presente na nova molécula obtida por semissíntese.

5.1.5 *Reação do Policarpol com o ácido benzoico*

A reação do Policarpol com o ácido benzoico é uma esterificação, em que o DCC é utilizado para a formação do intermediário reativo O-acilisouréia e o DMAP age como catalisador nucleofílico (Passo, 2012). A reação começa pela formação do intermediário, quando o DCC reage com o ácido benzóico e termina pela reação da O-acisouréia formada com o Policarpol (Figura 49).

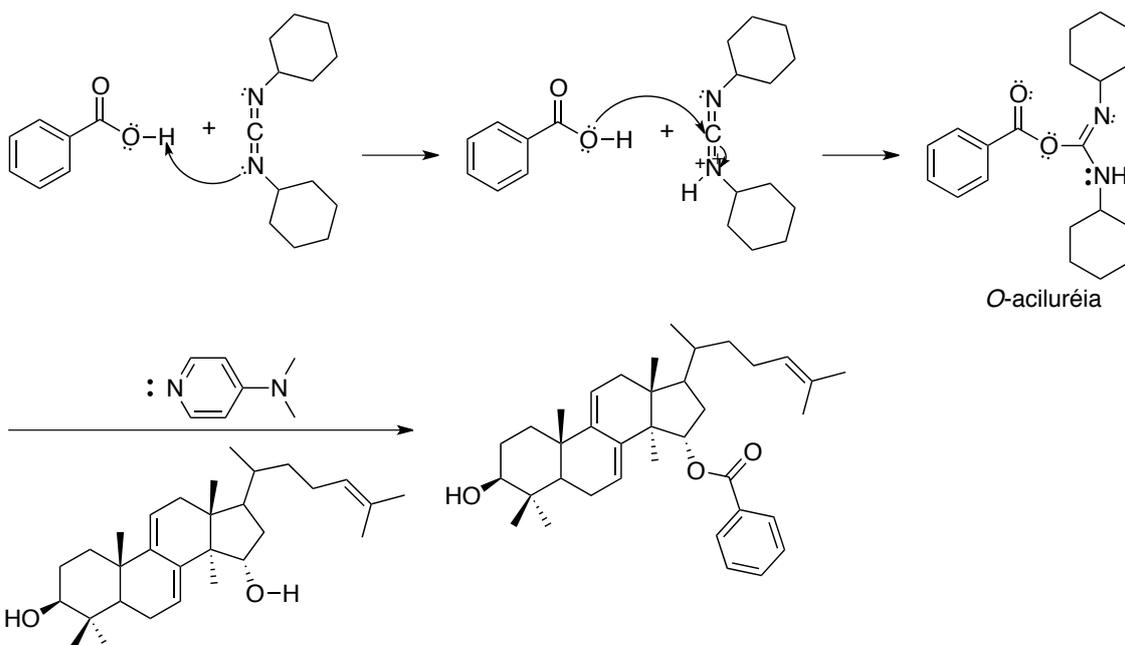


Figura 49 - Esterificação do Policarpol com DCC/DMAP

Após o tempo reacional foi realizada uma CCD onde se observou o aparecimento de três manchas de R_f maior que do produto de partida. O produto da reação apresentou uma característica sólida incolor e gerou dez frações após a purificação (RCA25_1 – RCA25_10). Todas as frações após secas apresentaram-se como um sólido amorfo incolor.

O espectro de massas de alta resolução da fração RCA25_9 foi realizado e apresentou uma relação de m/z ([M+H]⁺) 545,3970, compatível com o valor teórico de 545,3965 Da para derivado monobenzoato do Policarpol, com um erro de 0,917 ppm (Figura 51)

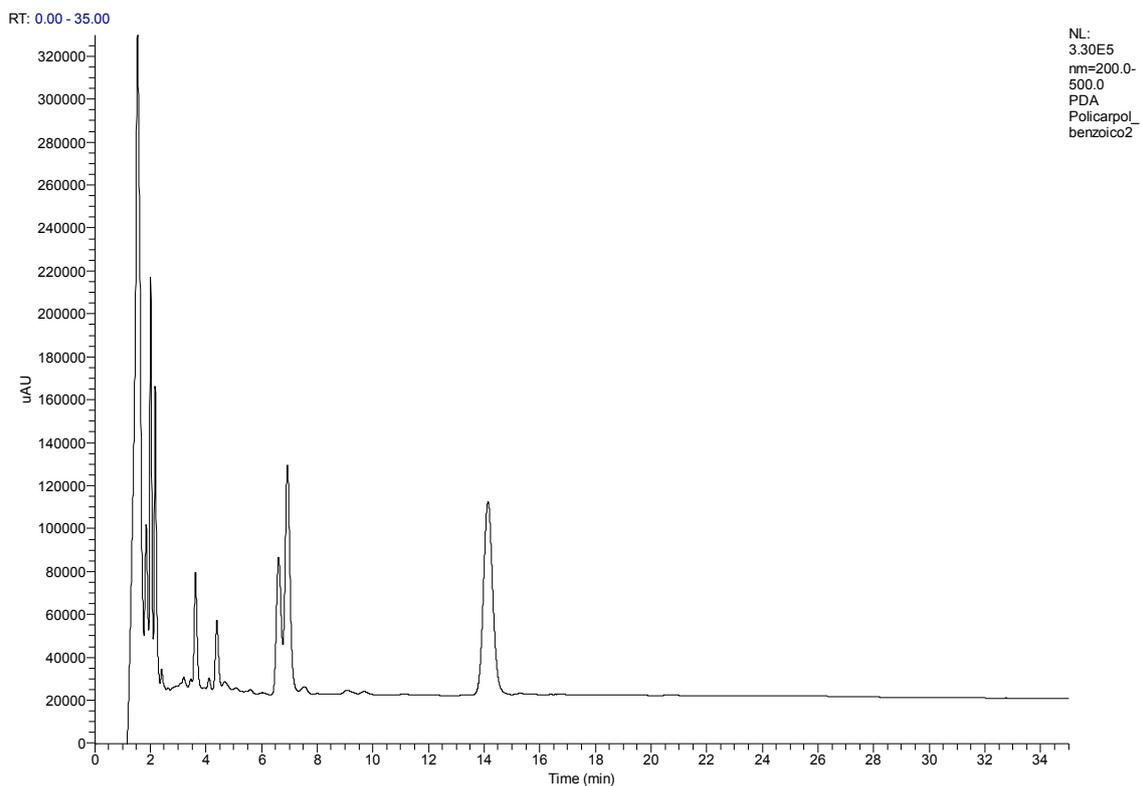


Figura 50 - Cromatograma do produto benzilação do Polycarpol.

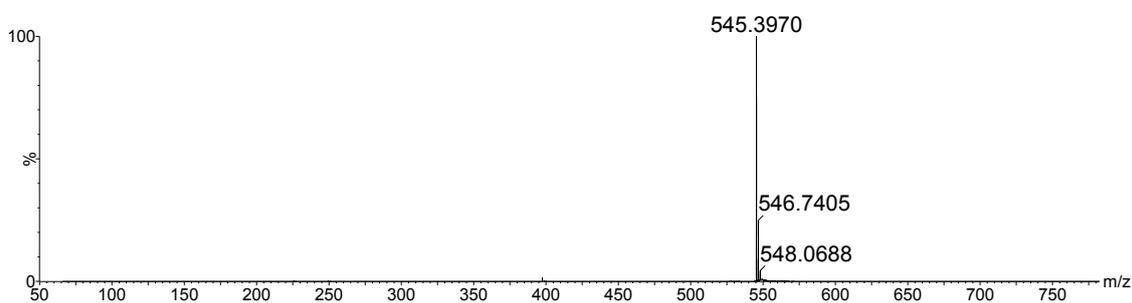


Figura 51 - Espectro de massas do produto da reação do ácido benzoico com o Polycarpol RCA25_9.

O espectro de RMN de ^1H da amostra RCA25_9 (Figura 52) confirmou esse derivado do Polycarpol e permitiu determinar o ponto onde houve a substituição do benzoato, por comparação dos efeitos observados sobre os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênios olefínicos e carbinólicos dos derivados acetilados em relação ao Polycarpol discutidos em 5.1.4.

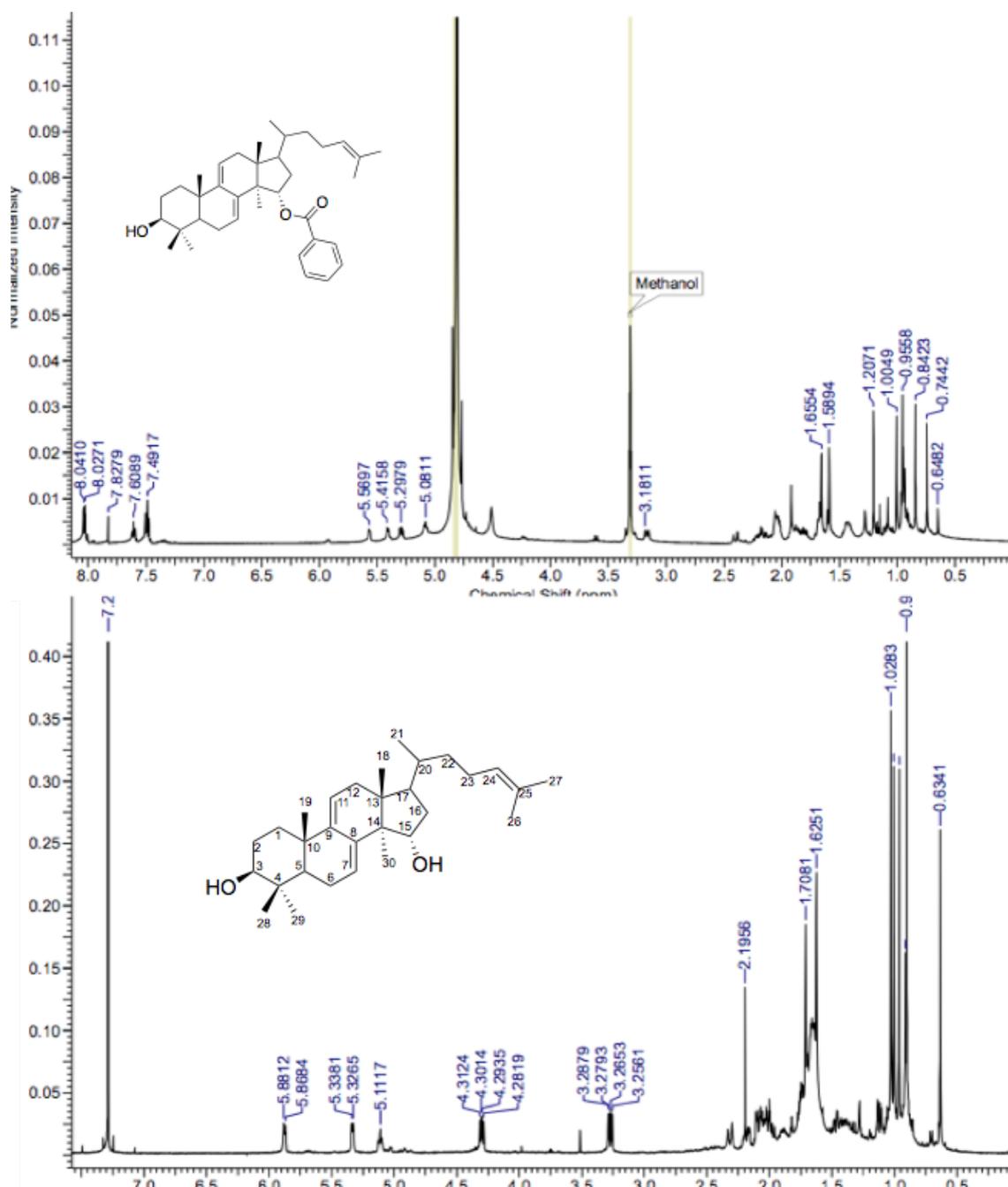


Figura 52 - Espectro de ¹H da amostra RCA25_9 (superior) em comparação com o Policarpol (inferior) (500 MHz, MeOD/CDCl₃).

A indicando a substituição de um grupo benzila no C-15, é observada pelo fato do H-15 ter mudado em relação ao Policarpol de δ 4,30 para δ 5,29, (Figura 54) e tendo o aparecimento de sinais na região de aromáticos (Figura 55).

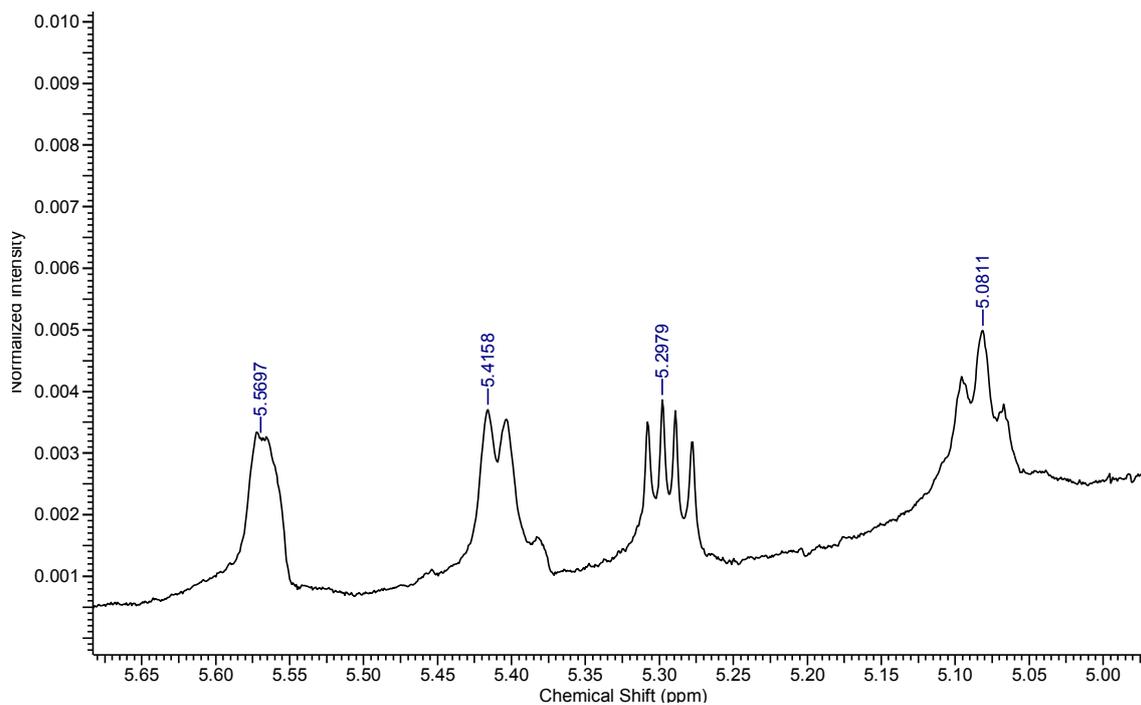


Figura 53 – Ampliação do espectro de RMN da região olefínica da amostra RCA25_9. O duplo duplete refere-se ao H-15.

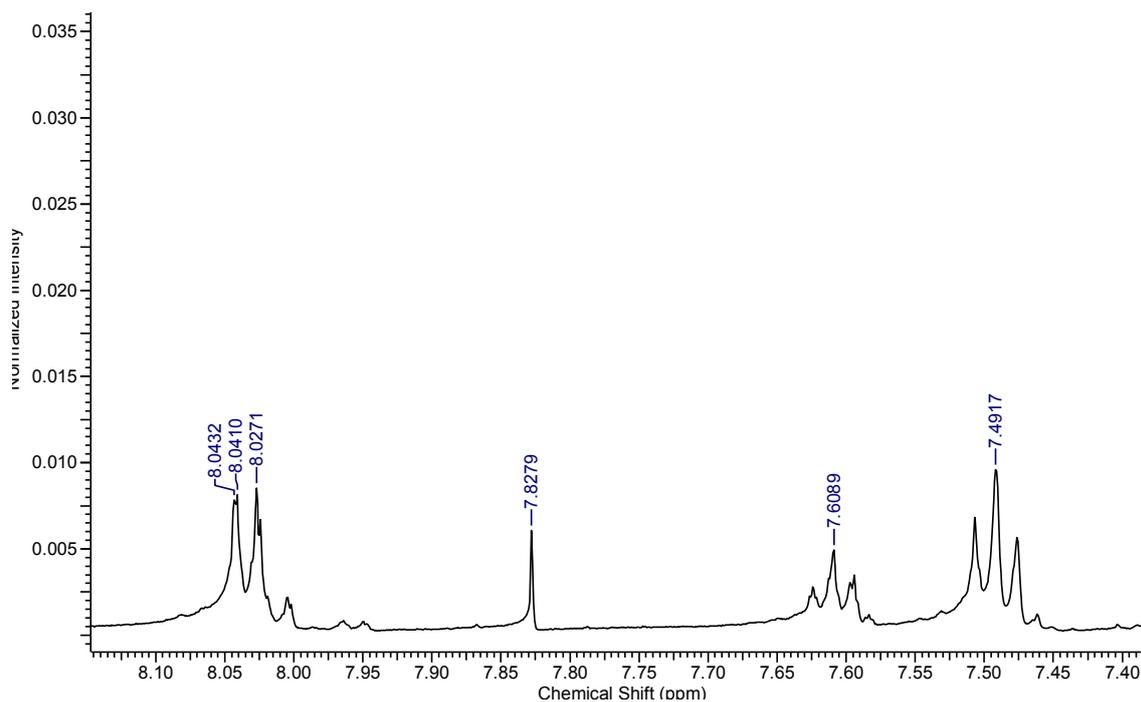


Figura 54 – Ampliação do espectro de RMN da região aromática da amostra RCA25_9

Analisando os dados apresentados pode-se concluir que a amostra RCA25_9 trata-se do derivado do Policarpol benzilado no C-15 (Figura 55).

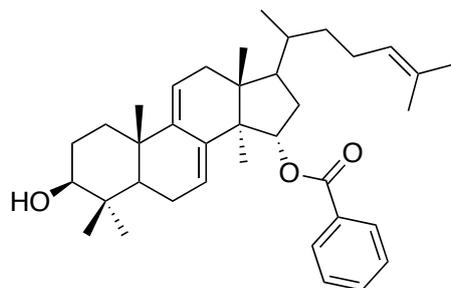


Figura 55 – Estrutura benzoato de Policarpol.

Aplicando a proposta de Jason Green para o cálculo do fator de naturalidade na nova molécula obtida temos: Policarpol ($C_{30}H_{48}O_2$, $m = 440,37$, $s = 7$); benzoato de policarpol ($C_{37}H_{52}O_3$, $m = 544,39$, $s = 7$).

$$N = (440,37/544,39) \times 50 + (7/7) \times 50$$

$$N = 40,55 + 50$$

$$N = 90,55$$

O fator de naturalidade para a nova molécula formada é de $N = 90,55$, logo temos 90,55 % do produto natural de partida presente na nova molécula obtida por semissíntese.

5.1.5.1 Determinação da estrutura do intermediário de reação

A amostra RCA25_5 (Figura 56), foi determinada como um intermediário estável de reação, cuja estrutura foi determinada conforme se discute abaixo. A determinação de sua estrutura é de sua importância para a confirmação do mecanismo de reação que ocorre conforme o proposto.

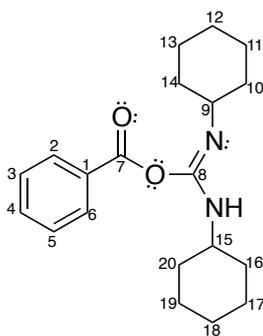


Figura 56 - Produto da reação do ácido benzóico com o DCC formado como intermediário estável no processo de formação do benzoato de Policarpol.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 57) da amostra RCA25_5 apresentou sinais na região de aromáticos em δ 7,54 (H-2 e H-6, m), δ 7,47 (H-4, m) e δ 7,39 (H3 e H-5, m). Pela análise do espectro RMN de ^{13}C (Figura 58) e DEPT 135 (Figura 59) observaram-se os carbonos sp , sp^2 e sp^3 e pelo HSQC foi possível determinar em qual carbono os hidrogênios do anel aromático estão ligados (Figura 60). H-2 e H6 são quimicamente equivalentes entre si e seus átomos de carbonos também apresentam o mesmo deslocamento, assim como H-3 e H5. No HMBC foram observadas as correlações do H-2 com o C-3 (δ 126,6), C-4 (δ 130,3) e C-7 (δ 170,0); do H-4 com o C-5 (δ 126,6) e do H-5 com o C-6 (δ 127,9), C-1 (δ 136,9) e C-7 (δ 170,0) (Figura 61).

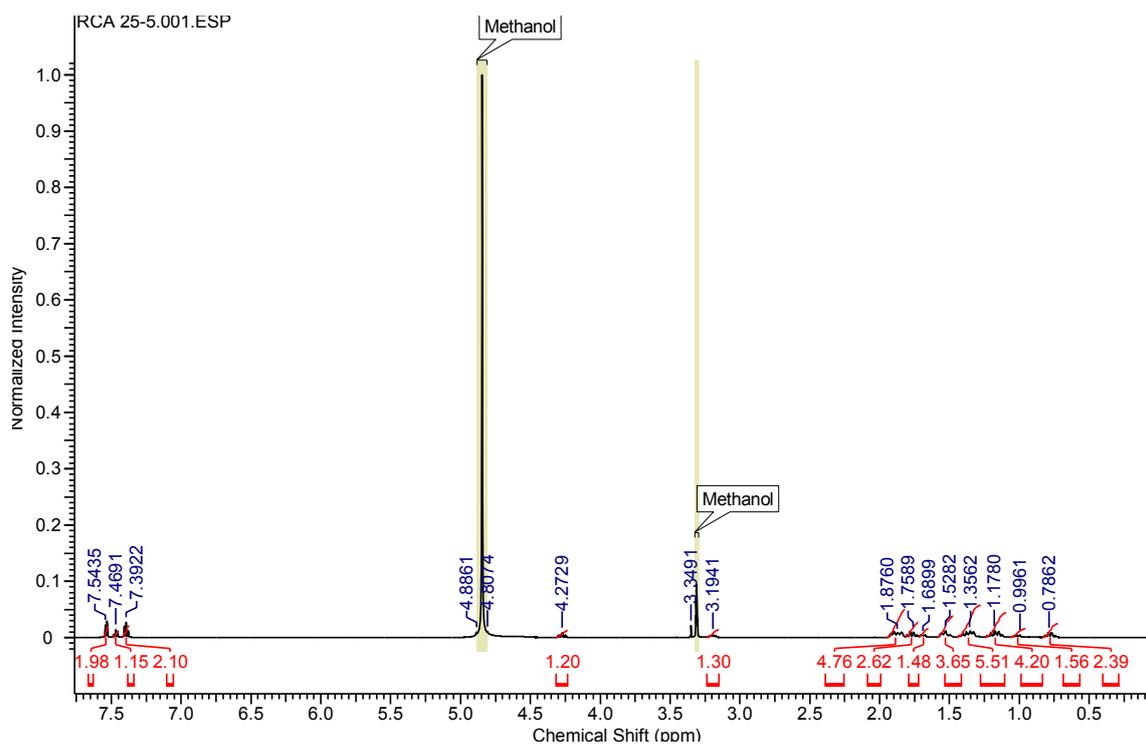


Figura 57 - Espectro de ^1H da amostra RCA25_5 (500 MHz, MeOD).

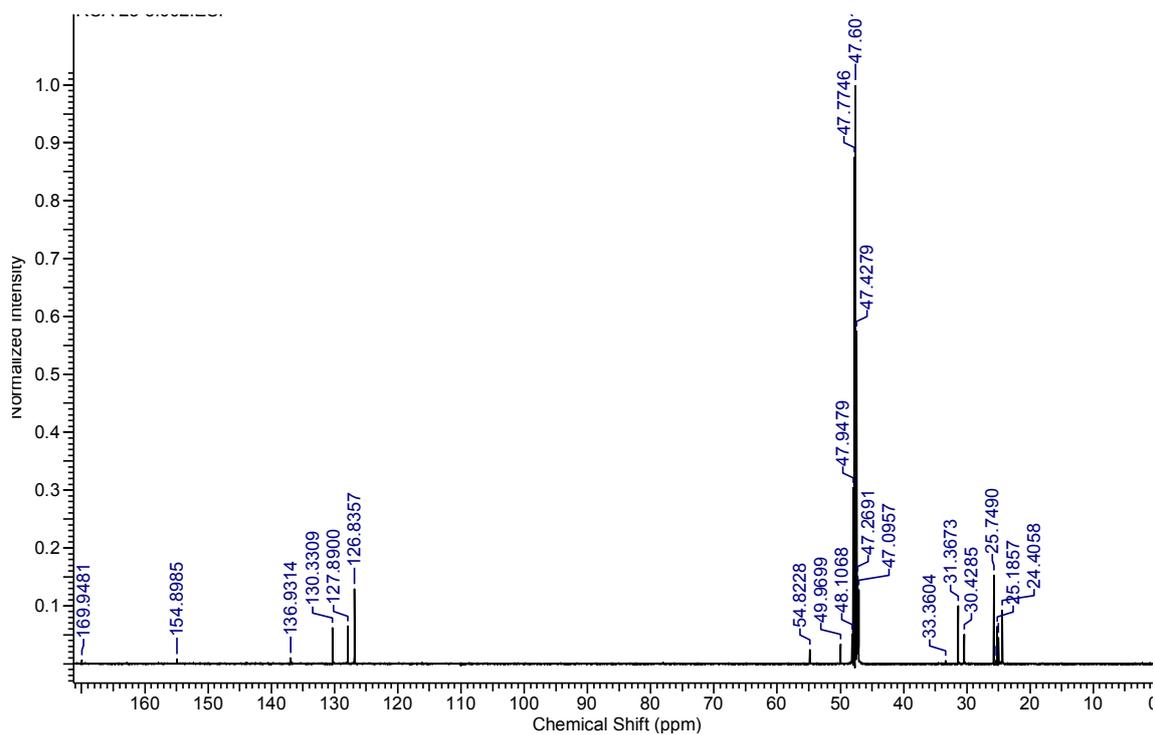


Figura 58 - Espectro de ^{13}C da amostra RCA25_5 (125,26 MHz, MeOD)

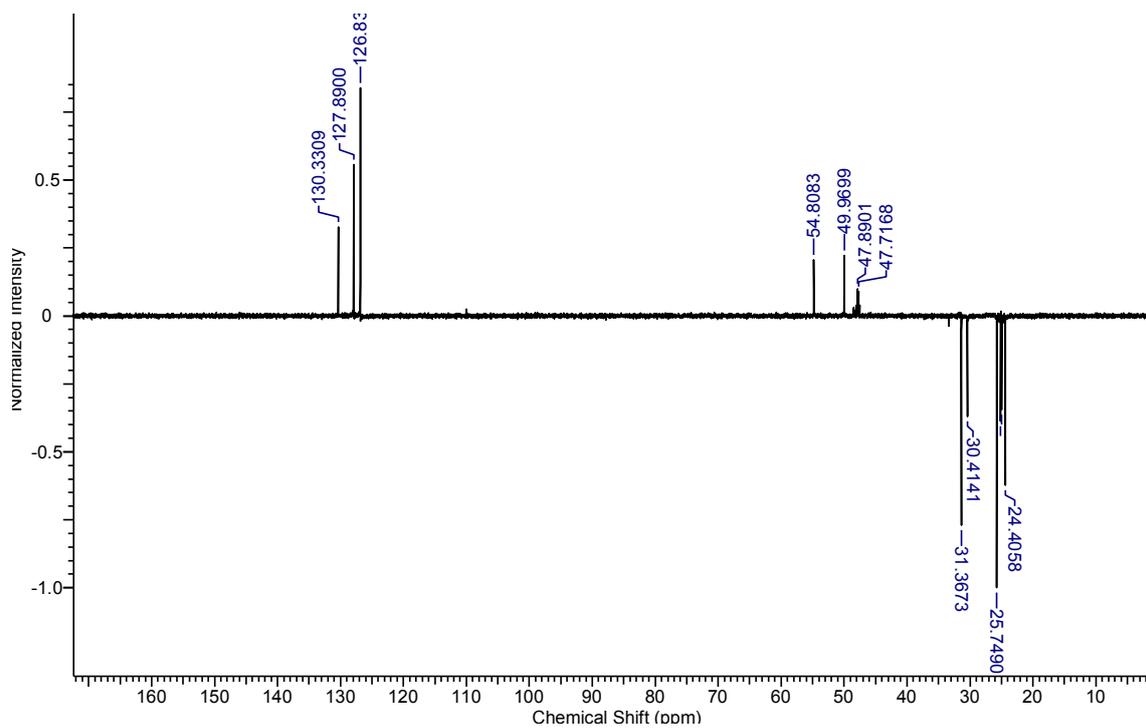


Figura 59 - Espectro de ^{13}C DEPT 135 da amostra RCA25_5.

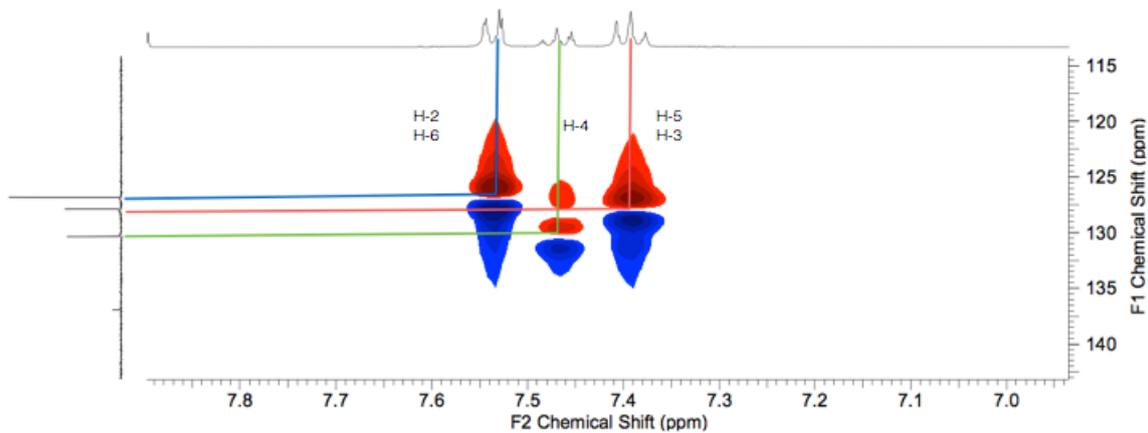


Figura 60 - HSQC da região aromática da amostra RCA25_5.

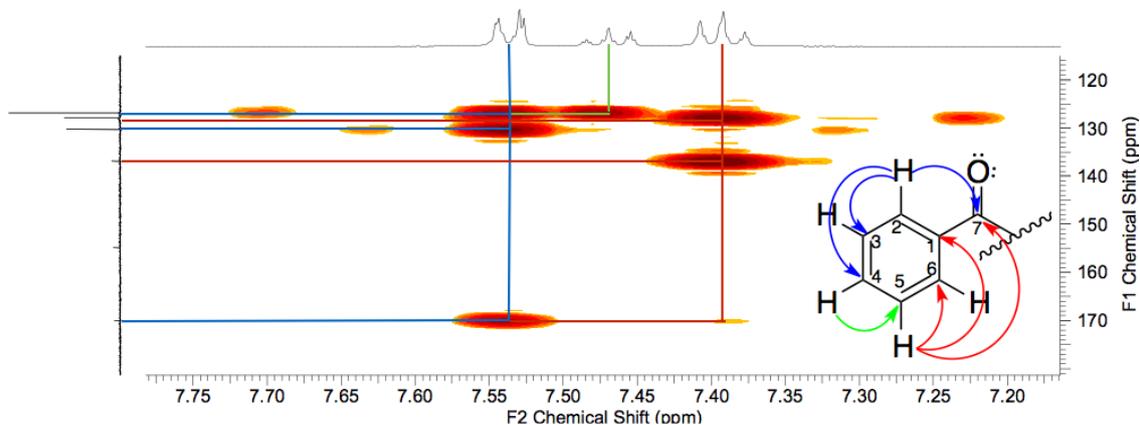


Figura 61 - HMBC da região aromática e correlações da amostra RCA25_5.

Os dois ciclohexanos oriundos da DCC apresentam perfis de deslocamentos distintos, pois estão ligados a nitrogênios quimicamente diferentes, o que reflete principalmente nos deslocamentos de hidrogênios e carbonos ligados diretamente a eles.

No espectro de ^1H vê-se na região em δ 4,35 – 3,15 (Figura 62) os hidrogênios dos carbonos ligados ao nitrogênio. O H-9 (δ 4,27, m), pelo HSQC, tem ligação com o C-9 (δ 54,1) (Figura 63) e no HMBC apresenta correlações com os carbonos C-8 (δ 154,9) e C-10/14 (δ 30,4) (Figura 64).

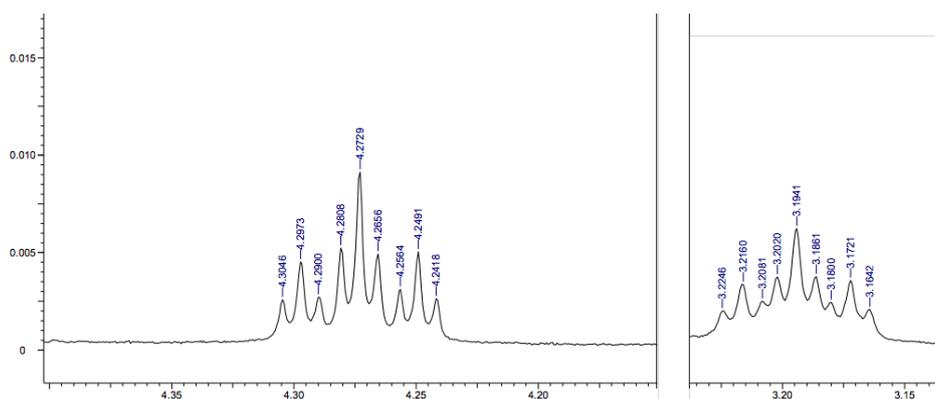


Figura 62 - Espectro de ^1H ver-se da região 4,35 – 3,15 ppm da amostra RCA25_5

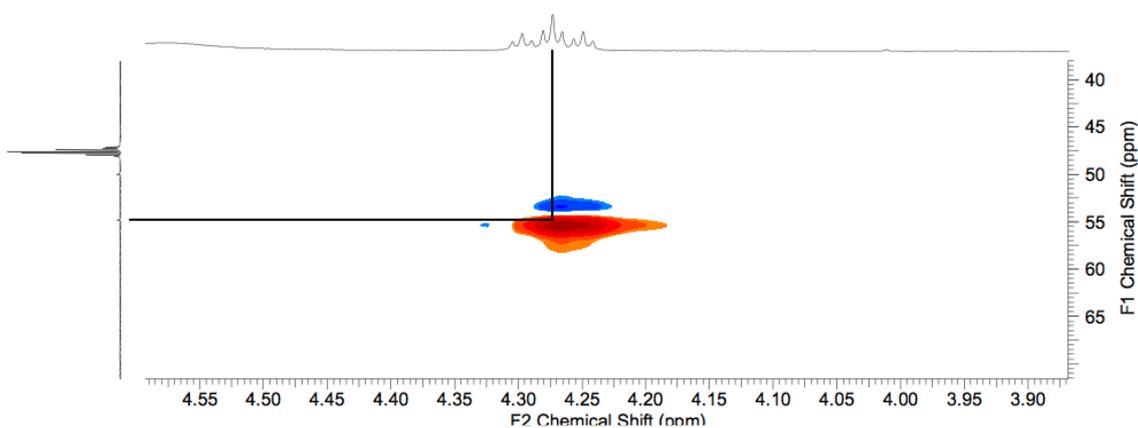


Figura 63 - HSQC do H-9 (δ 4,27 ppm) da amostra RCA25_5.

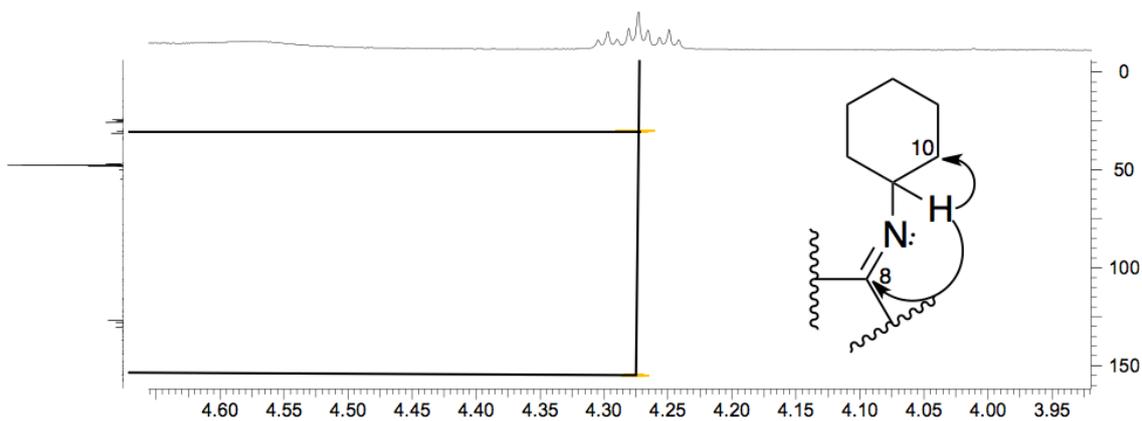


Figura 64 - HMBC do H-9 (δ 4,27 ppm) da amostra RCA25_5.

O H-15 (δ 3,19, m) está ligado com o carbono em δ 49,9 (Figura 65) e apresenta correlação com C-8 (δ 154,9) e C-16/20 (δ 31,4) (Figura 66).

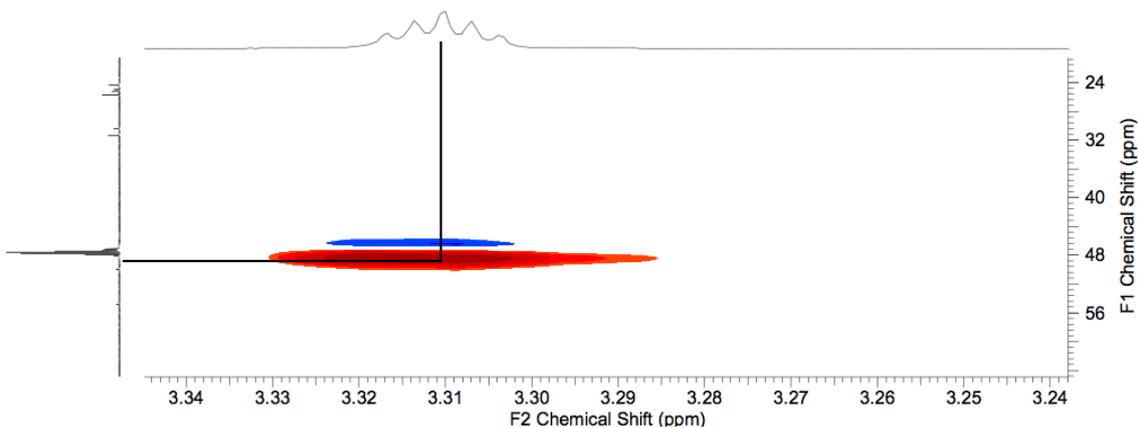


Figura 65 - HSQC do H-15 (δ 3,19 ppm) da amostra RCA25_5.

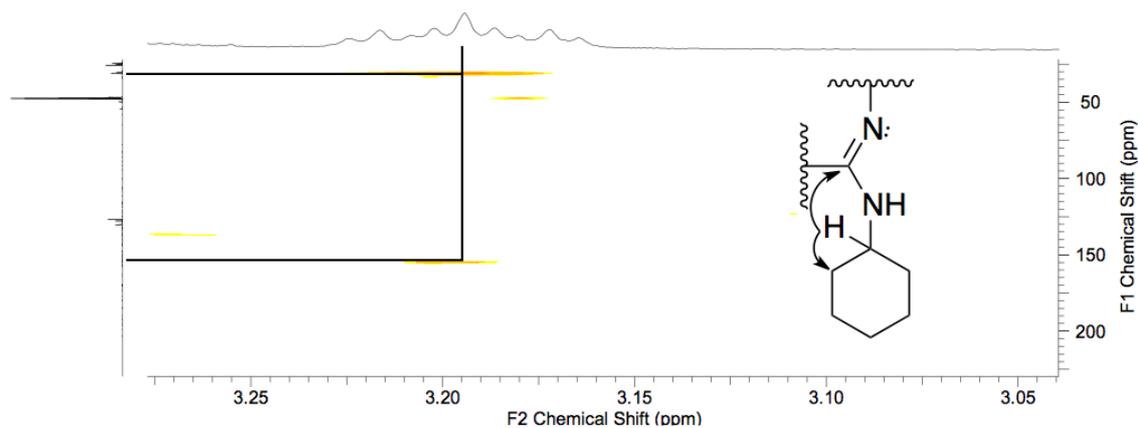


Figura 66 - HMBC do H-15 (δ 3,19 ppm) da amostra RCA25_5.

Na região de maior blindagem encontram-se os hidrogênios dos ciclohexanos axiais e equatoriais (Figura 67), que só foram possíveis de

determinar pela a análise do espectros bidimensional HSQC. No anel superior o H_{eq}-10 (δ 1,92) correlaciona-se com o C-9 (δ 54,8) e com o seu par C-14 (δ 30,4), o H_{eq}-11 (δ 1,88) tem correlação com o C-14 (δ 30,4) e o C-12 (δ 25,2) (Figura 68). Não foi possível ver as correlações do H_{eq}-12 (δ 1,70) no espectro.

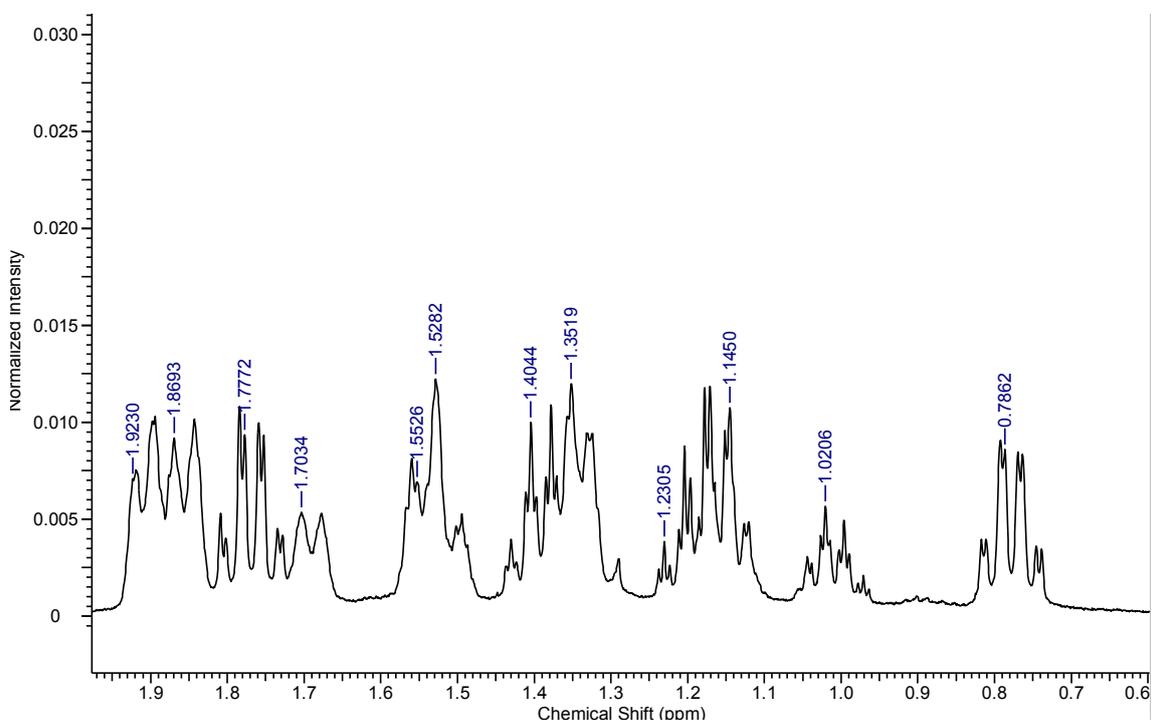


Figura 67 - Espectro de ¹H da região CH₂ dos ciclohexanos da amostra RCA25_5.

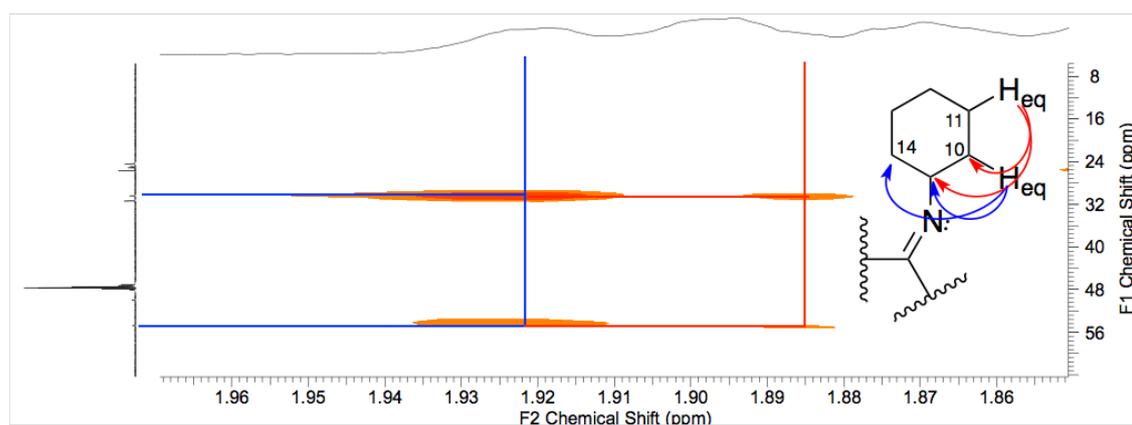


Figura 68 – HMBC do H-10eq e H-11eq.

Para o anel inferior só foi possível ver as correlações do H_{ax}-16/20 (δ 0,78) com o C-15 (δ 49,9), C-15 (δ 31,4) e C-17(δ 24,7) (HMBC; Figura 69).

Fechando os dados desse intermediário, as atribuições dos valores de deslocamentos para os outros hidrogênios foram feitas pelo HSQC (Tabela 3)

Tabela 3 - Valores de deslocamento químico de ^1H e ^{13}C e correlações observadas.

Nº	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	HMBC
1	N.O.	136,9	N.O.
2	7,54,	127,9	126,8; 130,3; 170,0
3	7,39	126,8	127,9; 136,9; 170,0 fr
4	7,47	130,3	126,8
5	7,39	126,8	127,9; 136,9; 170,0 fr
6	7,54,	127,9	126,8; 130,3; 170,0
7	N.O.	170	N.O.
8	N.O.	154,9	N.O.
9	4.27	54,82	154,9; 30,4
10*	1.92	30,4	54,8; 30,4
10**	1,77	30,4	54,8; 30,4; 25,8
11*	1,88	25,8	30,4, 54,8
11**	1.40	25,8	30,4
12*	1.70	25,2	N.O.
12**	1,23	25,2	N.O.
13*	1,88	25,8	30,4, 54,8
13**	1.40	25,8	30,4
14*	1.92	30,4	54,8; 30,4
14**	1,77	30,4	54,8; 30,4; 25,8
15	3.19	49,9	154,9; 31,4
16*	1,35	31,4	N.O.
16**	0.78	31,4	49,9; 31,4; 24,7
17*	1.55	24,7	N.O.
17**	1.14	24,7	N.O.
18*	1,52	25	N.O.
18**	1.02	25	N.O.
19*	1.55	24,7	N.O.
19**	1.14	24,7	N.O.
20*	1,35	31,4	N.O.
20**	0.78	31,4	49,9; 31,4; 24,7

*Hidrogênios Equatoriais

**Hidrogênio Axiais

N.O. – Não observado

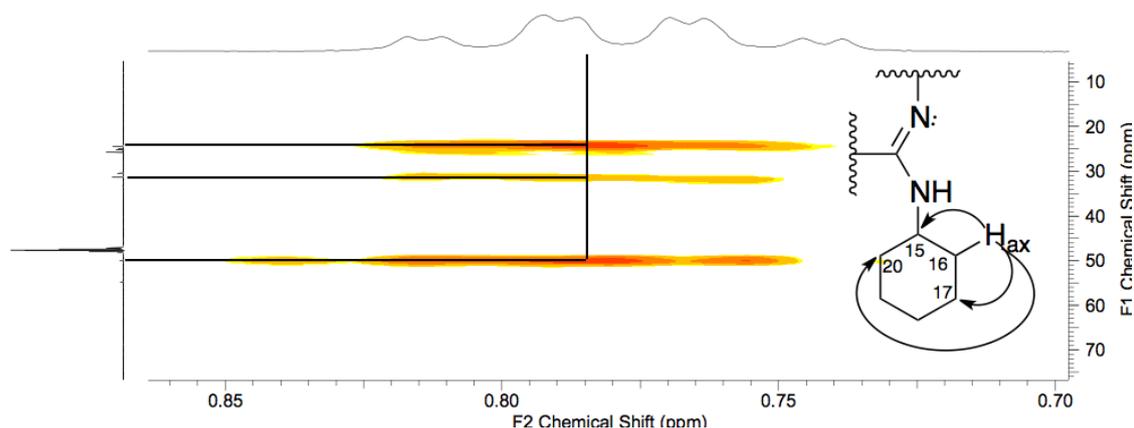


Figura 69 – HMBC do Hax-16.

5.1.6 Reação de oxidação com PCC do Policarpol

O Policarpol foi oxidado com clorocromato de piridínio (PCC) em diclorometano. Essa é uma reação de oxido-redução onde o Cr (VI), um poderoso agente oxidante, reduz a Cr (III) oxidando os substratos orgânicos. É utilizada principalmente para oxidar álcoois primários e secundários a aldeídos e cetonas, respectivamente (Souza, 2010), mas pode também promover outras oxidações.

O produto da oxidação do Policarpol com PCC apresentou-se como um sólido branco e foi identificado como RCA17_col. O espectro de massas de alta resolução apresentou para o íon $[M+H]^+$ uma relação de m/z 465,3000, compatível com o valor teórico de 465,6436 Da de um derivado do Policarpol com dois oxigênios a mais e seis hidrogênios a menos, e apresentando um erro de 0,917 ppm (Figura 70).

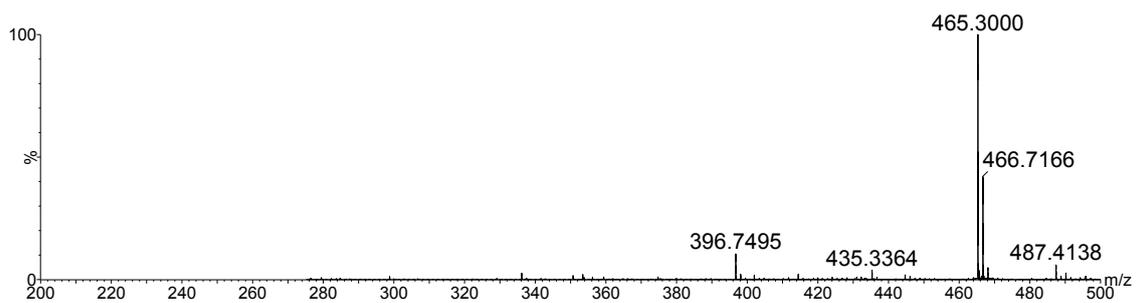


Figura 70 - Espectro de massas da amostra RCA17_col

O espectro de RMN de ^1H da amostra RCA17_col (Figura 71) apresentou deslocamentos químicos diferentes comparados ao produto de partida. A evidência mais nítida da reação de oxidação foi o desaparecimento dos deslocamentos referentes ao H-3 (δ 3,27; dd) e H-15 (δ 4,29, dd).

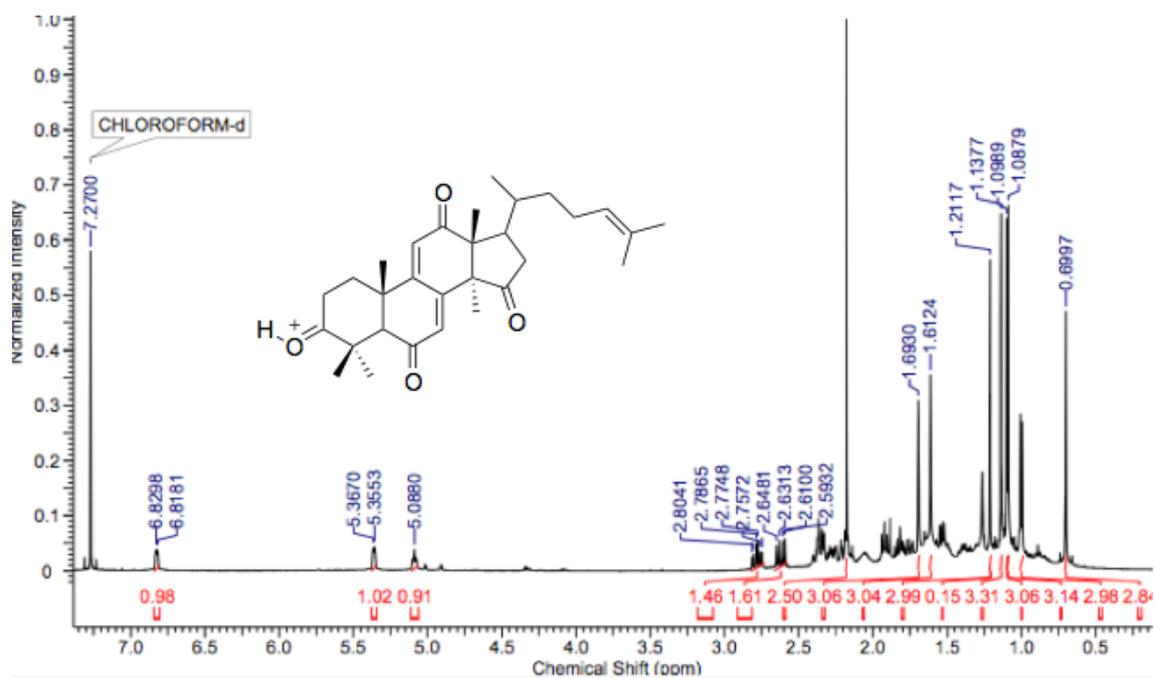


Figura 71 - Espectro de RMN de ^1H da amostra RCA17_col (superior) em comparação com o produto de partida Policaprol (inferior) (500 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN de ^1H também apresentou uma alteração significativa no deslocamento do H-7 que sofreu desblindagem, mudando em relação ao Policarpol de δ 5,87 para δ 6,82, neste derivado. Essa desblindagem é coerente com um derivado em que as duas oxidações extras ocorrem na posição alílica às duplas conjugadas do Policarpol, estrutura compatível com a massa observada no espectro de massas.

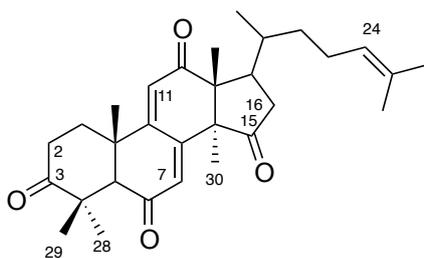


Figura 72 – Estrutura do 2,6,12,15-tetraoxopolicarpol.

O forte efeito sobre o H-7 parece indicar que a conjugação ocorre preferencialmente em direção à carbonila em C-12, o que pode ser justificado pela assistência nucleofílica ao carbono C-7 parcialmente positivo pelos pares de elétrons não ligantes do oxigênio em C-15, estabilizando este sistema de conjugação mais que o sistema em direção à carbonila em C-6 (Figura 73). Isto é reforçado pela falta de mudança significativa no H-11, pois a carga parcial positiva nesta posição seria menos estável que a do H-7 por não contar com semelhante assistência nucleofílica. Como esperado, o H-24 também não sofreu mudança significativa em relação ao Policarpol.

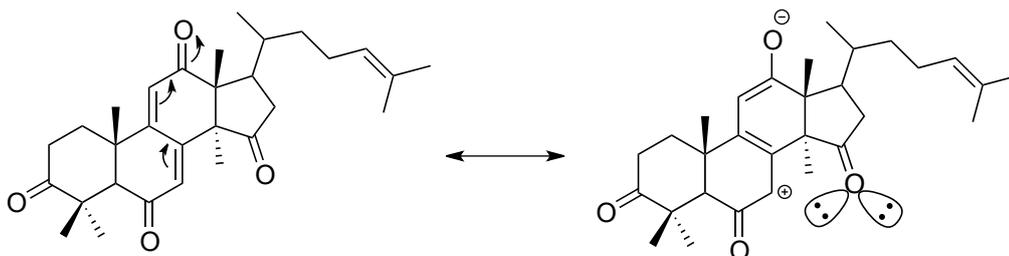


Figura 73 - Relação ente o par de elétron não ligante do C-15 com a carga formada em C-7.

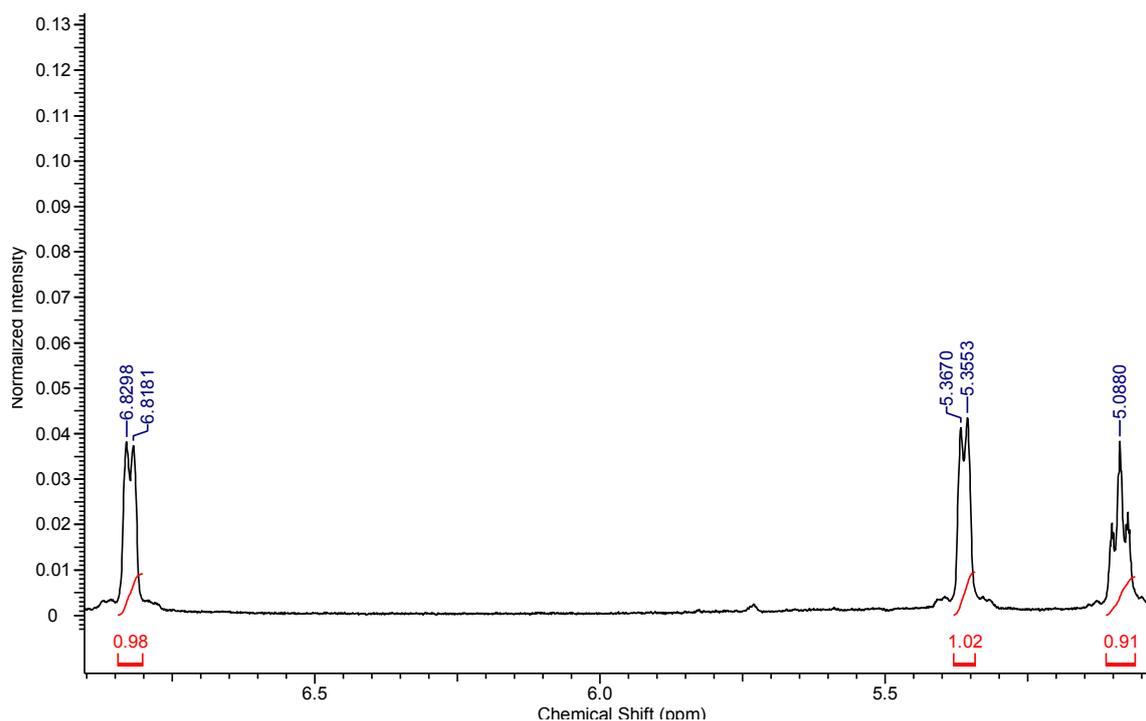


Figura 74 – Ampliação do espectro de ^1H da amostra RCA17_col evidenciando o deslocamento do H-7 e a manutenção dos H-11 e H-24.

Viu-se também dois novos sinais em δ 2,78 e δ 2,62 (Figura 75) que são referentes ao $\text{H}_{\text{eq}}\text{-2}$ e $\text{H}_{\text{eq}}\text{-16}$ respectivamente, vizinhos a centros estereogênicos, cujas respectivas cetonas vizinhas (antes hidroxilas) faz que esses hidrogênios acoplem diferentemente da molécula inicial. Na região metílica percebeu-se mudanças significativas em vários sinais como seria esperado pelos efeitos de desblindagem anisotrópica provocada pela presença de carbonilas vizinhas. H-28 (δ 0,92/1,13 ppm; $\Delta\delta = 0,21$ ppm), H-29 ($\delta = 1,03/1,21$ ppm; $\Delta\delta = 0,18$ ppm) e H-30 ($\delta = 0,96/1,09$ ppm; $\Delta\delta = 0,13$ ppm).

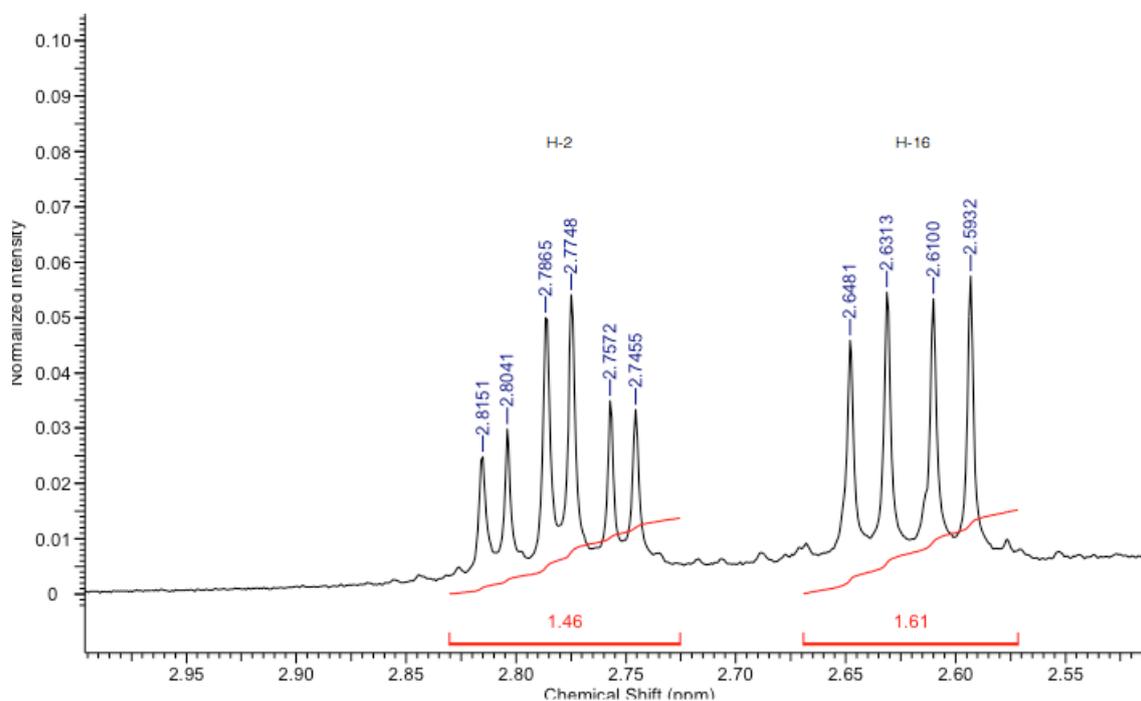


Figura 75 - Espectro de ^1H da amostra RCA17_col dos Heq-2 eHeq-16.

Esses dados de RMN de ^1H e o valor observado no espectro de massas para o íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ são coerentes com a proposta da semissíntese inicial de um dos produtos planejados, permitindo afirmar que a amostra RCA17_col é o derivado do Policarpol tetraoxidado nas posições 2, 6, 12 e 15 (Figura 72).

Aplicando a proposta de Jason Green para o cálculo do fator de naturalidade na nova molécula obtida temos: Policarpol ($\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_4$, $m = 464,29$, $s = 7$); 2,6,12,15-tetraoxo-policarpol ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$, $m = 456,36$, $s = 7$).

$$N = (440,37/464,29) \times 50 + (7/7) \times 50$$

$$N = 47,42 + 50$$

$$N = 97,42$$

O fator de naturalidade para a nova molécula formada é de $N = 97,42$, logo temos 97,42 % do produto natural de partida presente na nova molécula obtida por semissíntese.

6 Considerações finais

A proposta inicial do trabalho foi de realizar a produção e a semissíntese de moléculas isoladas de microrganismos e flora da Amazônia e verificar atividades biológicas dos derivados obtidos.

O ácido secalônico foi obtido do cultivo da linhagem fúngica DgCr2.2.1b e a sua modificação por semissíntese foi realizada com aparente sucesso para a obtenção de um derivado. Novos dados espectroscópicos serão obtidos para que se conclua a determinação da estrutura desse derivado.

Em relação ao Ácido Secalônico deve-se aproveitar o estudo dessa molécula por não haver muitos dados descritos, logo a sua semissíntese pode ser bastante explorada.

A Bergenina, por suas atividades biológicas já descritas, tem muitos derivados relatados na literatura, portanto em futura abordagem sugere-se a combinação da bergenina com outras moléculas que também tenham atividade biológica, para que dentro do organismo elas possam ser separadas e ter um duplo efeito ou um efeito potencializado. Como a bergenina possui atividade antimicrobiana poderia ser feita uma semissíntese para anexar o naproxeno, um anti-inflamatório bastante utilizado na indústria farmacêutica, por exemplo.

O Policarpol é uma das moléculas mais promissoras com a qual trabalhamos, pois não há dados na literatura de obtenção de derivados, logo

todos os derivados produzidos são inéditos e seus estudos devem ser continuados.

Quanto às atividades biológicas dos derivados em comparação aos seus precursores, as quantidades trabalhadas eram pequenas e depois de todo o processo de isolamento e caracterização ficaram menores ainda, na ordem de menos de 1 mg, não suficientes para a realização dos testes.

Esse trabalho em semissíntese é um dos primeiros do Programa de Pós-Graduação em Química da UFAM – PPGQ/UFAM e visa contribuir para enriquecer ainda mais as pesquisas realizadas, ampliando seu leque de opções para o desenvolvimento da química de produtos naturais e para a descoberta de novos compostos bioativos.

Referências bibliográficas

- Abreu, H., *et al.* Organic & Biomolecular Chemistry, 2008: 6, 2713-2718
- Ambiente, Ministério do Meio. Biodiversidade.
<http://www.mma.gov.br/biodiversidade> (acesso em 10 de Março de 2016).
- Appendino, G., *et al.* Organic Letters, 2002: 4, 3839-3841.
- Arroyo, M., *et al.* Applied Microbiology Biotechnology, 2003: 60, 507-514.
- Banhos, E., *et al.* Brazilian Journal of Microbiology, 2014, 45, 153-161.
- Bruice, Paula Yurkanis. Química Orgânica. Tradução: Vários tradutores.
Vol. 1. 2 vols. São Paulo: Perason Prentice Hall, 2006.
- Calixto, C., *et al.* Química Nova na Escola, 2012: 34, 118-123.
- Cechinel-Filho, V., *et al.* Química Nova, 1988: 3, 59-64.
- Celestino, J., *et al.* Process Biochemistry 2014: 49, 569-575.
- Chemspider. Royal Society of Chemistry. 2015.
<http://www.chemspider.com/> (acesso em 19 de Março de 2016).
- Chianda., *et al.* Biotechnology Letters, 2006: 28, 1633–1636.
- Chinanda., *et al.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 2007: 55, 2879-2883.
- Franck., *et al.* Tetrahedron Letters, 1965: 2031-2037.
- Giordano, R., *et al.* Biotechnology Advances, 2006: 27-41.
- GOODMAN, L.S. e GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica.
Rio de Janeiro, RJ: McGraw-Hil, 2010.

Green, Jason. The Baran Laboratory BLOG. 11 de Março de 2013. <http://openflask.blogspot.com.br/2013/03/why-not-semisynthesis.html> (acesso em 11 de Março de 2016).

International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical Terminology: Gold Book. 2.3.3. IUPAC, 2014.

Hassner, *et al.* Tetrahedron Letters 1978: 16, 4475-4478.

Honda, *et al.* QUÍMICA NOVA , 1988: 21, 110-125.

Kumar, T., *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters , 2011: 21, 4928–4931.

Kabbaj, F., *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry 2015: 23, 126-131.

Kashima, Y., *et al.* Archive of Pharmal Research , 2012: 35, 1533-1541 .

Koolen, H., *et al.* Quimica Nova 2012: 35, 771-774.

Leboef, C., *et al.* Phytochemistry, 1982: 21, 2783-2813.

Liu, N., Medicinal Chemistry Research , 2014: 23, 4803-4813.

Nunomura, R., *et al.* Journal of Brazilian Chemical Society, 2009: 20, 1060-1064.

Nazir, *et al.* Journal of Ethnopharmacology, 2007: 112, 401-405.

Ngantchou, I., *et al.* Fitoterpia, 2009: 80, 188-191.

OLIVEIRA, SHEILA RODRIGUES. “Síntese, estudos de relações estrutura-atividade e da atividade antifúngica de novos agentes quimioterápicos para tratamento de doenças infecciosas emergentes.” Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte, Julho de 2008.

Qin, T., Journal of American Chemical Society , 2015: 137, 15225-15233.

Pu, H., *et al.* *Planta Medica*, 2002: 68, 372-374.

Pubchem. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. 2016. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (acesso em 19 de Março de 2016).

Passo, Joel Aparecido. “Síntese e caracterização de novos polímeros líquido- cristalinos de cadeia lateral derivados do heterociclo 2-isoxazolinico 3,5-dissubstituído.” Tese de Doutorado. Porto Alegre, RS, Agosto de 2012.

Pereira, Sandra Cerqueira. “Inovações na síntese enzimática de amoxicilina.” Tese de Doutorado. São Carlos, SP, Abril de 2012.

Pinheiro, E., *et al.* *Natural Product Research* 2013: 27, 1633–1638 .

Potier, P., *et al.* *Journal of American Chemical Society* 1988: 110, 5917-5919 .

Saadawi, S., *et al.* *Molecules* , 2012: 17, 4824-4835 .

Silva, F., *et al.* *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2015: 25, 11-15.

Silva, F., *et al.* *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2012: 4, 522-523.

Silva, S., *et al.* *Acta Amazonica*, 2009: 39, 187-192.

Silverstein. *Spectrometric identification of organic compound*. 7 ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2005.

Souza, Marcus Vinícius Nora. *Estudo da Síntese Orgânica: Baseado em substâncias bioativas*. Campinas, SP: Editora Átomo, 2010.

Souza, M. *Química Nova* , 2004: 27, 308-312 .

Solomons. Química Orgânica. Tradução: Maria Lucia Godinho de Oliveira. Vol. 1. 2 vols. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

Veiga Jr, V., e Pinto, A. Química Nova, 2002: 25, 273-286.

Valdés, D., *et al.* "Penicilinas." ACTA MEDICA, 1998: 28-39.