

TRANSFORMAÇÕES QUÍMICAS DO (+)-10 β ,14-DIOL-ALLO-AROMADENDRANO, ISOLADO DE *DUGUETIA GLABRIUSCULA* R. E. FRIES (R. E. FRIES) (*ANNONACEAE*) E AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS DE ALGUNS DERIVADOS OBTIDOS

Dênis Pires de Lima*, Adilson Beatriz e Alexandre Ayoroa Ramos

Departamento de Química - CCET - UFMS - Cidade Universitária S/N - CP 649 - 79070-900 - Campo Grande - MS

João Máximo de Siqueira

Laboratório de Farmacognosia - DFB - CCBS - UFMS

Celso Corrêa de Oliveira

Laboratório de Microbiologia - DPA - CCBS - UFMS

Maria Rita Marques

Laboratório de Bioquímica - DMF - CCBS - UFMS

Recebido em 29/10/96; aceito em 17/4/97

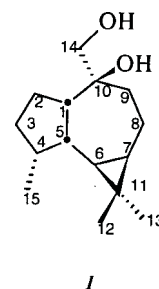
CHEMICAL MODIFICATIONS OF (+)-ALLO-AROMADENDRANE-10 β ,14-DIOL ISOLATED FROM *DUGUETIA GLABRIUSCULA* R. E. FRIES (R. E. FRIES) (*ANNONACEAE*) AND BIOLOGICAL EVALUATION OF SOME OBTAINED DERIVATIVES. The sesquiterpene (+)-*allo*-aromadendrane-10 β ,14-diol **1** was the lead compound to the preparation of several derivatives in order to test their biological activity against *A. salina*, *C. sphaerospermum*, *E. coli* and *S. aureus*. In this way the monoalcohols (+)-viridiflorol **4**, **9** and **11** were synthesized from **1** together with the acetal **6**, the ketal **7**, and the ketone **8**. The oxirane **3** and nitrile **5** were also prepared using as an intermediate the tosylate derivative **2**.

Keywords: *allo*-aromadendrane-10 β ,14-diol; *D. glabriuscula*; biological activity.

INTRODUÇÃO

As substâncias naturais isoladas de diversas espécies de plantas apresentam características peculiares, atraindo o interesse de diversos grupos de pesquisa, seja por suas propriedades farmacológicas ou pelo próprio desafio acadêmico que alguns compostos representam do ponto de vista sintético. A descoberta de novas drogas, principalmente as antitumorais, foi realizada na sua grande maioria a partir de modificações químicas de produtos de origem natural¹. Atualmente, substâncias naturais anti-tumorais são usadas com sucesso clinicamente; como exemplos podemos citar a daunorrubicina e doxorubicina (Adriamycin®), mitomicina C, bleomicina, vincristina e vinblastina, actinomicina D, e muito recentemente, o taxol (Paclitaxel®). Adicionalmente, novos produtos naturais têm servido de substrato para hemi-sínteses de drogas antitumorais poderosas².

Nas últimas décadas, uma classe de substâncias naturais, os sesquiterpenos, tem sido intensamente investigada sobre a ocorrência, isolamento e determinação estrutural¹. Dentre estes compostos está o sesquiterpeno diidroxilado (+)-10 β ,14-diol-*allo*-aromadendrano **1** isolado de *Pulicaria paludosa*³ e *Duguetia glabriuscula*⁴. Esta substância natural é um representante do grupo de sesquiterpenos tricíclicos, com estrutura caracterizada pela presença do anel dimetil ciclopropano fundido ao sistema anelar hidroazuleno⁵. Portanto, uma vez que **1** está presente em abundância em *D. glabriuscula* e esta planta é facilmente coletada em nossa região, partimos para o isolamento de quantidades adequadas do produto natural de forma a submeter o mesmo a uma série de modificações moleculares afim de produzir derivados simples e avaliá-los quanto a suas atividades antimicrobiana e citotóxica.

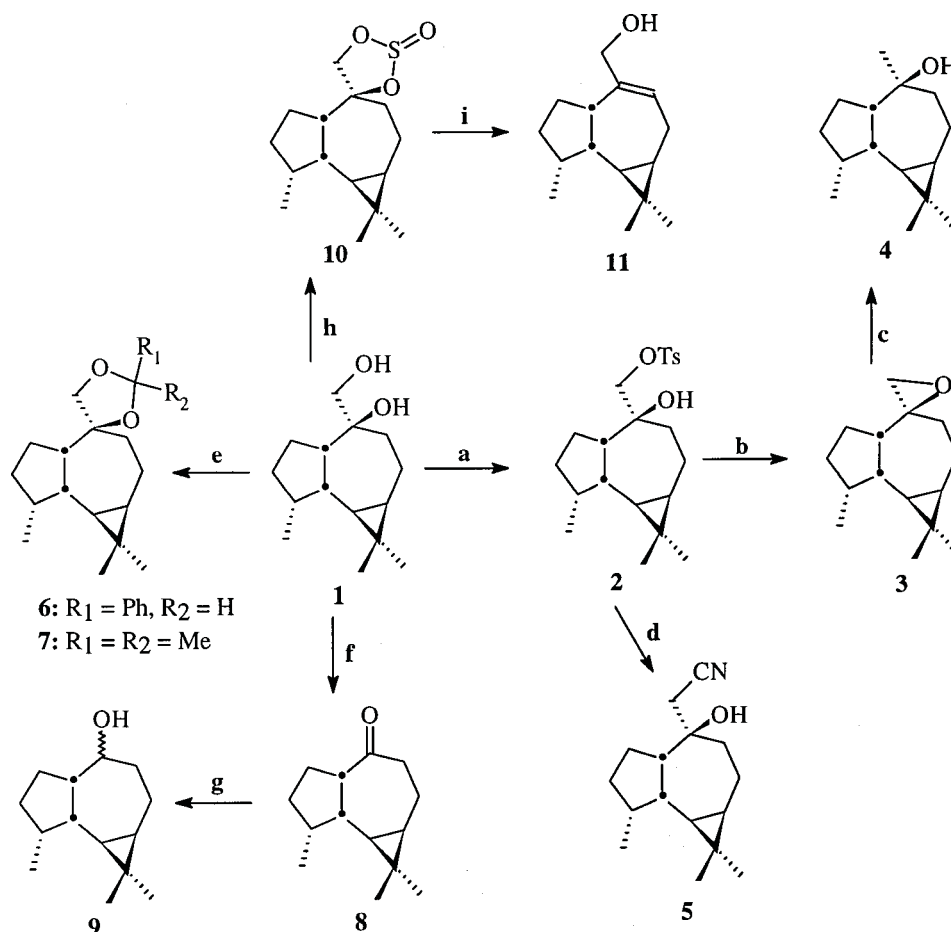


RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando as características estruturais do (+)-10 β ,14-diol-*allo*-aromadendrano **1** - o qual possui um esqueleto carbônico tricíclico, contendo três grupos metílicos, um em C-4 (α) e dois em C-11 (α,β) e duas hidroxilas em C-10 (β) e C-14 - efetuamos a série de transformações moleculares mostradas no esquema 1 direcionadas principalmente ao sítio 1,2-diol da molécula. Iniciamos com a conversão em tosilato da região da molécula contendo o álcool primário (C-14)⁶ com a finalidade de se obter o derivado **3**, a partir da ciclização espontânea⁴ de **2**, numa reação do tipo S_Ni . O derivado **2** foi isolado com bom rendimento (>90%), mas, o produto **3** formado nestas condições, levou a baixo rendimento (<1%). A estratégia para favorecer a S_Ni foi o tratamento de **2** com NaH em éter etílico anidro. Na sequência, **2** foi tratado com KCN em DMF⁷, conduzindo à nitrila correspondente **5**, o derivado **3** recebeu o mesmo tratamento, obtendo-se o mesmo produto, porém com menor rendimento. A substância **3** foi ainda reduzida com LiAlH₄, obtendo-se **4** [(+)-viridiflorol].

Continuando com as modificações estruturais na porção diol do sesquiterpeno natural **1**, de forma a aproveitar essa característica, optou-se pela acetalização e cetalização deste. Para a

e-mail: denis@nin.ufms.br



Esquema 1. (a) TsCl/Py , CHCl_3 , $0^\circ\text{C} \rightarrow$ t.a. 5 h, 90%; (b) NaH , Et_2O , 15 min, 73%; (c) LiAlH_4 , THF , 18 h, 47%; (d) KCN , DMF , 75°C , 15 h, 43%; (e) **6**: benzaldeído/benzeno, TsOH , P.M. 4 Å, 90 min, 52%; **7**: acetona, TsOH , P.M. 4 Å, 30 min, 62%; (f) NaIO_4 , 0°C , 1h, 90%; (g) EtOH , NaBH_4 , 0°C , 30 min, 40%; (h) SOCl_2 , Et_3N , THF , -25°C , 30 min, 70%; (i) $[\text{CH}(\text{COOMe})_2]\text{Na}^+$, HMPA , 100°C , 48 h, 80%.

formação do acetal benzilidênico **6** e o cetal isopropilidênico **7** foi utilizada técnica usual, via reações com benzaldeído e acetona, respectivamente, catalisadas com o ácido *p*-toluenossulfônico. A síntese de **8** foi via degradação oxidativa do diol por reação com clorocromato de piridínio ou com periodato de sódio e este por sua vez, foi tratado com NaBH_4 , resultando na mistura epimérica **9**, inseparável pelos métodos convencionais de cromatografia instantânea em coluna contendo sílica e em camada delgada preparativa.

O derivado *O*-sulfonila **11** foi formado inesperadamente, quando se tentou a obtenção de uma lactona sesquiterpênica. O derivado instável **10** (obtido por reação de **1** com cloreto de tionila em presença de trietilamina)⁸ foi tratado, a 100°C , com o carbânion do malonato de dimetila, $[\text{CH}(\text{COOMe})_2]\text{Na}^+$ e o monitoramento por cromatografia em camada delgada de sílica (CCDS) mostrou o aparecimento de um produto que foi isolado e identificado como sendo **11**. Tal produto de eliminação pode ter sido formado devido às condições de reação empregadas, como já descrito no caso da pirólise de derivados *O*-sulfonilas quando tratados com azida sódica em altas temperaturas⁸. Apesar da não obtenção da lactona desejada, o produto foi também submetido à avaliações biológicas.

Alguns produtos puros das transformações químicas obtidos em quantidades razoáveis foram testados quanto à toxicidade sobre *Artemia salina* e às atividades antifúngica e antimicrobiana. A toxicidade à *Artemia salina*⁹, foi feita pela determinação da Dose Letal (DL_{50}). A atividade antimicrobiana¹¹ foi avaliada sobre cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, obtidas de pacientes do Hospital Universitário/UFMS

e cepas padrões de *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25903). A atividade antifúngica¹² foi determinada por bioautografia sobre *Cladosporium sphaerospermum*. A tabela 1 resume os resultados, na qual verificamos que os compostos **2**, **5**, **6**, **7** e **8** apresentaram-se bem mais tóxicos para *Artemia salina*, quando comparados com o produto de partida, que é inativo. A toxicidade sobre a *Artemia salina*, por ser um bioensaio de baixo custo, rápido e por não exigir técnicas assépticas tem sido amplamente utilizado nos laboratórios de produtos naturais à procura de compostos bioativos⁹. Diversas substâncias foram testadas em diferentes culturas de células tumorais, comparativamente com o bioensaio acima citado, no qual este último demonstrou ser superior ou de igual exatidão aos resultados de linhas de células humanas de tumor sólido¹⁰. Pode-se obter uma correlação positiva entre os de ensaios, na qual a Dose Eficaz (DE_{50}) da citotoxicidade é da ordem de grandeza de um décimo (1/10) da DL_{50} da toxicidade sobre a *Artemia salina*⁹. Com os nossos resultados, podemos então deduzir que estes compostos podem, possivelmente, também apresentar citotoxicidade de moderada à baixa em testes mais específicos com células tumorais^{9,10,13}. A atividade dos compostos **2-8** sobre *Cladosporium sphaerospermum* foi bastante acentuada. O derivado **8** teve baixa atividade *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25903) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Podemos ainda afirmar que as modificações estruturais no sesquiterpeno natural potencializaram o seu efeito tóxico sobre *A. salina*, porém, a atividade antimicrobiana foi diminuída, o que poderia sugerir a presença de correlação entre estes dois bioensaios, o que até o momento não se

Tabela 1. Toxicidade sobre a *Artemia salina* e atividades antibacteriana e fungitóxica de derivados sesquiterpênicos.

Substância	<i>A. salina</i> DL ₅₀ (ppm)	<i>S. aureus</i> (ATCC25903) halo inibição (mm)	<i>S. aureus</i> padrão halo inibição (mm)	<i>E. coli</i> (ATCC25922) halo inibição (mm)	<i>E. coli</i> padrão halo inibição (mm)	Teste de bioautografia sobre <i>C.</i> <i>sphaerospermum</i> halo inibição (mm)
1	>1000	30	30	>10	>10	+
2	6,1	nt	nt	10	nt	+
3	nt	nt	nt	nt	nt	+
4	nt	nt	nt	nt	nt	+
5	13,6	nt	10	nt	nt	+
6	<50	nt	nt	nt	nt	+
7	10,3	nt	nt	nt	nt	+
8	33,4	10	nt	12	nt	nt
9	nt	nt	nt	nt	nt	nt
11	nt	nt	nt	nt	nt	nt

nt: não testado

+: Presença de zona de inibição

tem confirmado¹⁴. Mas o importante nesta etapa do projeto é que partindo de um produto natural e inativo obtivemos produtos tóxicos ao microcrustáceo.

PARTE EXPERIMENTAL

1) Transformações Químicas

Os pontos de fusão foram determinados no aparelho Uniscience do Brasil - Modelo 498. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C, 300 MHz e 75 MHz, respectivamente, foram registrados no espectrômetro DPX-300 - Bruker. Os deslocamentos químicos estão apresentados em partes por milhão (δ) relativos ao tetrametilsilano (δ = 0,0), o CDCl₃ foi utilizado como solvente e padrão interno. Os espectros de massas foram registradas em espectrômetro CG-EM. Os espectros de IV foram registrados no espectrofotômetro Perkin Elmer modelo 783. Para as cromatografias do tipo instantânea ("flash") foi utilizada sílica gel 60 (230-400 mesh) Aldrich. As substâncias utilizadas (solventes e reagentes) foram adquiridas comercialmente com grau de pureza P.A. O MgSO₄ foi usado para secagem das partições orgânicas e os solventes foram evaporados sob pressão reduzida utilizando-se rota-evaporador. Todas as reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada, técnica ascendente, utilizando-se placa ativada de sílica gel Merk-G com indicador de fluorescência.

10β, 14-Diol-*allo*-aromadendrano, 1. O produto natural foi isolado do extrato hexânico das folhas de *D. glabriuscula*. O extrato foi submetido à partição entre MeOH-H₂O/Hexano. Da fração hidrometanólica obteve-se, por recristalização em acetona:água, um sólido cristalino que após análise espectral, observou-se que os dados eram consistentes com os relatados na literatura^{4,5}.

Tosilato, 2. À uma solução de **1** (0,2 g, 0,84 mmol) em clorofórmio (3,0 mL) e piridina (1,0 mL), sob agitação e à temperatura inicial de 0°C, adicionou-se cloreto de tosila (0,9 g, 4,72 mmol). A mistura foi submetida à agitação por 5 horas. Ao final desse prazo, adicionou-se éter etílico (5,0 mL) ao meio reagente e este foi transferido para um funil de separação contendo éter etílico-água 5:1. A fase orgânica foi então separada, secada com MgSO₄, filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi submetido à cromatografia instantânea ("flash") em coluna de adsorção de sílica, o que forneceu o produto puro **2** (0,3 g, 90,5%), como um sólido branco cristalino: p.f. 96-98°C; IV (acetona) ν_{max} 3360, 2940, 2880, 1460, 1325, 1150, 1090, 1000, 985, 860, 820 cm⁻¹; RMN

¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,12 (dd, J = 10,5, 9,8 Hz 1H), 0,61-0,75 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 1,01 (s, 3H), 1,03 (s, 3H), 1,27-1,85 (m, 12H), 2,45 (s, 3H), 3,70 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 3,80 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,35 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,79 (d, J = 8,0, 2H); EM (CG-EM) m/z (%): 220,25 (4,89), 189,25 (11,03), 177,20 (13,38), 175,20 (3,25), 174,20 (1,98), 173,20 (3,66), 159,20 (32,14), 149,20 (15,59), 135,20 (22,71), 121,15 (26,78), 107,15 (46,57), 95,15 (48,50), 94,15 (30,18), 93,10 (58,62), 82,10 (65,53), 81,10 (82,65), 80,10 (23,49), 79,10 (78,82), 77,05 (52,44), 67,05 (86,00), 64,05 (2,54), 55,05 (100,00).

Epóxido, 3. A substância **2** (0,075 g) foi solubilizada em éter etílico seco (10,0 mL) e a esta solução adicionou-se NaH em excesso. A solução reagente foi então submetida a agitação, à temperatura ambiente, por 15 minutos. Ao final desse período, verteu-se a solução em um funil de separação contendo AcOEt (20,0 mL). A camada orgânica foi lavada com água destilada (3 X 15,0 mL), secada com MgSO₄, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O sólido obtido foi submetido a purificação por cromatografia instantânea, fornecendo assim o produto **3** puro (0,030 g, 73,2%), na forma de um óleo transparente: IV ν_{max} 1460, 1360, 1265, 1165, 810 cm⁻¹; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,20 (dd, J = 11,0, 9,6 Hz, 1H), 0,61-0,75 (m, 1H), 0,93 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 1,00 (s, 3H), 1,02 (s, 3H), 1,21-1,48 (m, 2H), 1,49-1,60 (m, 1H), 1,60-1,80 (m, 4 H), 1,81-2,29 (m, 4H), 3,26 (d, J = 10,5, 1H), 3,34 (d, J = 10,5 Hz, 1H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 16,1 (C-15), 16,2 (C-12), 19,00 (C-11), 20,9 (C-8), 24,6 (C-3), 26,2 (C-6), 27,1 (C-7), 29,3 (C-9), 32,1 (C-13), 36,4 (C-2), 39,3 (C-4), 41,2 (C-5), 48,9 (C-10), 54,4 (C-1), 60,0 (C-14); EM (CG-EM) m/z (%): 220,15 (5,27), 202,15 (9,77), 89,15 (13,80), 177,10 (14,06), 159,10 (29,62), 147,10 (28,22), 133,10 (25, 58), 121,05 (28,44), 105,10 (63,33), 91,05 (93,92), 81,10 (85,48), 67,10 (91,25), 55,10 (100, 00).

(+)-Viridiflorol, 4. Adicionou-se LiAlH₄ (0,038g, 1,0 mmol) à uma solução de **3** (0,1g, 0,45 mmol) em tetraidrofurano (30,0 mL) e a mistura reagente foi submetida a agitação por 18 horas. Após esse tempo, a mistura foi diluída com éter etílico (20,0 mL) e cuidadosamente, acrescentou-se solução aquosa saturada de Na₂SO₄. A mistura foi então lavada com água destilada (5 X 15,0 mL) e a fase orgânica foi secada com MgSO₄, filtrada e concentrada à pressão reduzida. Procedeu-se então, afim de se isolar o produto, cromatografia preparativa (AcOEt/Hexano 2:8). O viridiflorol foi dessa forma obtido (0,047 g, 47%), com bom grau de pureza: p.f. 74,5°C, lit. 74°C; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,06-0,116 (m, 1H), 0,55-0,63 (m, 1H), 0,91 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,97 (s, 3H), 1,01 (s, 3H), 1,13

(s, 3H), 1,23-1,95 (m, 12H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 16,1 (C-15), 16,3 (C-12), 18,4 (C-11), 18,8 (C-8), 22,2 (C-7), 25,8 (C-3), 28,5 (C-13), 28,7 (C-6), 29,0 (C-9), 32,1 (C-14), 37,7 (C-2), 38,4 (C-4), 39,7 (C-5), 58,2 (C-1), 74,6 (C-10); EM (CG-EM) m/z (%): 222,18 (2,02), 204,30 (17,27), 189,25 (21,32), 175,20 (6,09), 161,25 (51,66), 147,20 (23,31), 133,15 (17,48), 122,20 (34,16), 109,15 (25,52), 93,10 (42,04), 81,10 (62,52), 69,10 (100,00), 55,10 (87,42).

Nitrila, 5. A substância **2** (0,028 g, 0,07 mmol) foi solubilizada em DMF (10,0 mL) e a esta solução foi adicionado KCN (0,05 g, 0,77 mmol). A mistura reagente foi submetida a agitação, à temperatura de 75°C, durante 15 horas. Após este período, adicionou-se AcOEt (30,0 mL), água destilada (20,0 mL) e solução saturada de NaCl (20,0 mL) ao meio reagente. Após a separação da fase orgânica, esta foi secada com MgSO_4 e após filtração e concentração à pressão reduzida, obteve-se uma mistura de produtos que foi purificada por cromatografia em coluna de adsorção de sílica. Obteve-se assim a o produto puro **5** (0,007g, 43%), como um óleo transparente e de cheiro agradável: IV (CHCl_3) ν_{max} 3400, 3025, 2940, 2725, 2260, 1730, 1460, 1375, 1170, 1000 cm^{-1} ; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 0,09 (dd, J = 11,0, 8,8 Hz, 1H), 0,63-0,64 (m, 1H), 0,93 (d, J = 9,2 Hz, 3H), 0,98 (s, 3H), 1,01 (s, 3H), 1,23-1,98 (m, 12H), 2,38 (d, J = 15,9 Hz, 1H), 2,45 (d, J = 15,9 Hz, 1H); EM (CG-EM) m/z (%): 247,18 (2,87), 229,30 (6,64), 207,30 (6,72), 189,30 (22,80), 173,20 (7,19), 158,20 (5,39), 147,20 (25,74), 133,15 (20,28), 132,15 (8,05), 121,15 (16,75), 107,15 (22,00), 95,15 (37,51), 81,10 (67,69), 69,15 (100,00), 55,05 (98,38).

Acetal benzilidênico, 6. Uma mistura do sesquiterpeno natural, **1** (0,1g, 0,42 mmol), ácido *p*-toluenossulfônico (0,008 g, 0,04 mmol), benzaldeído (5,0 mL) e peneira molecular 4 Å (1,0 g), em benzeno (5,0 mL), foi submetida à agitação por 90 minutos. Ao fim desse período, adicionou-se AcOEt (20,0 mL) e H_2O_2 20% (60,0 mL), solução aquosa de Na_2CO_3 a 10% (20,0 mL, 45°C). A fase orgânica foi então lavada com água (5 X 20,0 mL), secada com MgSO_4 , filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por cromatografia instantânea, levando ao isolamento do acetal puro (0,077 g, 52%) na forma de um sólido branco amorfo: p.f. 135-138°C; IV (CHCl_3) ν_{max} 3100, 3040, 3065, 2945, 2875, 1490, 1460, 1310, 1260, 1220, 1090, 1065, 1025, 975, 890, 810, 750, 690 cm^{-1} ; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 0,10-0,22 (m, 1H), 0,61-0,65 (m, 1H), 0,91 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 0,98 (s, 3H), 1,01 (s, 3H), 1,3-2,1 (m, 11H), 3,83 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 3,90 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 5,85 (s, 1H), 7,2-7,5 (m, 5H).

Acetal Isopropilidênico, 7. Uma mistura da substância **1** (0,1g, 0,42 mmol), peneira molecular 4Å (1,0 g) e ácido *p*-toluenossulfônico em acetona (0,002 M, 20,0 mL), sob agitação constante por 30 minutos e à temperatura ambiente, foi monitorada por CCDS. Quando detectou-se o consumo total do material de partida e a formação do produto, a solução foi filtrada e evaporou-se o solvente parcialmente. A fase orgânica foi então tratada com clorofórmio (10,0 mL) e a fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaHCO_3 (3 X 15,0 mL), secada com MgSO_4 , filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica (Hexano/AcOEt 9:1), fornecendo assim a substância pura **7** (0,073 g, 62,0%), como um sólido cristalino incolor: IV (CHCl_3) ν_{max} 2990, 2960, 2860, 1450, 1370, 1250, 1215, 1150, 1100, 1070, 1050, 970, 900 cm^{-1} ; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 0,51-0,61 (m, 1H), 0,91 (d, J = 6,7 Hz, 3H), 0,97 (s, 3H), 1,00 (s, 3H), 1,25-1,30 (m, 6H), 1,31 (s, 3H), 1,35 (s, 3H), 1,45-2,1 (m, 6H), 3,67 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 3,71 (d, J = 8,3 Hz, 1H); EM (CG-EM) m/z (%) 220, 203, 189, 107, 91, 79, 43 (100,00).

Cetona, 8. Foi adicionado à uma solução de **1** (0,1g, 0,42 mmol) em etanol (20,0 mL), a temperatura de 0°C, uma solução

aquosa de NaIO_4 0,1 M (10,0 mL) e a mistura foi mantida em banho de gelo e sob agitação por 1 hora. O produto formado foi extraído com CH_2Cl_2 e lavado com água (5 X 20,0 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO_4 , filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto foi então submetido à purificação em coluna cromatográfica, fornecendo o produto puro (0,074g, 90,1%) na forma de um sólido branco amorfo. Os dados espectrométricos são consistentes com os relatados na literatura³: p.f. 59-62°C; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 0,36 (dd, J = 11,3, 9,2 Hz, 1H), 0,65 (ddd, J = 11,6, 9,1, 4,8 Hz, 1H), 0,94 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,97 (s, 3H), 1,03 (s, 3H), 1,20-1,40 (m, 1H), 1,51-1,68 (m, 3H), 1,80-1,92 (m, 1H), 1,93-2,10 (m, 1H), 2,30-2,40 (m, 2H), 2,42-2,58 (m, 1H), 2,65 (ddd, J = 14,4, 11,6, 7,1 Hz, 1H), 3,10-3,25 (m, 1H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 15,2 (C-15), 15,4 (C-12), 17,8 (C-11), 18,9 (C-8), 24,3 (C-7), 24,5 (C-3), 25,2 (C-6), 28,2 (C-13), 31,7 (C-9), 38,9 (C-4), 40,3 (C-5), 44,3 (C-2), 55,5 (C-1), 211,9 (C-10); EM (CG-EM) m/z (%): 206, 191, 173, 163, 145, 135, 124, 111, 95, 83, 69 (100,00), 55.

Monoálcool, 9. À uma solução de NaBH_4 (0,189g, 5 mmol) em etanol (10,0 mL), à temperatura de 0°C, foi adicionada uma solução de **8** (0,1g, 0,48 mmol) em etanol (10,0 mL), também à mesma temperatura. A mistura ficou em banho de gelo e sob agitação por 30 minutos. Acrescentou-se então diclorometano (20,0 mL) e lavou-se a mistura com solução saturada de NaCl (3 X 10,0 mL). A fase orgânica foi secada sobre MgSO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi então purificado em coluna cromatográfica (AcOEt/Hexano, 5%). Obteve-se o produto **9** (0,04 g, 40%) na forma de um óleo transparente: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 0,25 (t, J = 10,4 Hz, 1H), 0,56-0,7 (m, 1H), 0,92 (dl, J = 6,3 Hz, 3H), 0,94 (sl, 3H), 1,01 (sl, 3H), 1,23-1,30 (m, 4H), 1,62-21,8 (m, 5H), 1,90-2,20 (m, 1H), 2,30-2,35 (m, 1H), 3,80-3,83 (m, 1H); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 15,0, 15,6, 15,9 (C-15 e C-12), 18,8 (C-11), 20,7 (C-8), 23,3 (C-7), 24,5 (C-3), 26,8 (C-6), 28,7 (C-13), 29,7, 30,5 (C-9), 33,5 (C-2), 38,7 (C-4), 40,1 (C-5), 49,3 (C-1), 73,8, 74,7 (C-10). (Sinais na sua maioria sobrepostos e/ou múltiplos, indicando tratar-se de mistura epimérica).

Derivado Sulfinila, 10. À uma solução de **1** (0,12g, 0,5 mmol) e trietilamina (5,0 mL) em tetraidrofurano anidro (10,0 mL), à temperatura de -25°C, foi adicionado cloreto de tionila recém destilado (2,0 mL, 27 mmol) em tetraidrofurano (5,0 mL), à mesma temperatura. A mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos a -25°C e após evidenciar-se o consumo completo do material de partida (CCDS), adicionou-se AcOEt (50,0 mL), seguido por solução saturada de NaCl (30,0 mL). A fase aquosa foi separada e a fase orgânica foi lavada com solução aquosa de NaCl (4 X 50,0 mL), filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado em coluna cromatográfica (Hexano/AcOEt 4:1), obtendo-se assim a substância **10** (0,1 g, 70%): O produto foi usado, sem posterior purificação para a reação seguinte.

Álcool Alílico, 11. A substância **10** (0,1g, 0,35 mmol) foi então dissolvida em hexametildisfosforamida, HMPA (15,0 mL) (CUIDADO, SOLVENTE TÓXICO!!) e a solução foi aquecida até 100°C por 48 horas, em presença de excesso do carbânio do malonato de metila $[\text{CH}(\text{COOMe})_2]^- \text{Na}^+$ (0,08 g, 0,52 mmol), previamente preparado e isolado. Após este período, adicionou-se ao meio reagente AcOEt (80,0 mL). A fase orgânica foi então lavada com água (3 X 50,0 mL) e solução saturada de NaCl (2 X 20,0 mL), filtrada e secada com MgSO_4 . O solvente foi então removido sob pressão reduzida, fornecendo dessa maneira um resíduo que foi purificado em coluna cromatográfica (AcOEt/Hexano 3:7). Obteve-se inesperadamente com esse tratamento o produto puro **11** (0,062 g, 80%), na forma de óleo amarelo: RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 0,24 (dd, J = 11,9, 8,5 Hz, 1H), 0,91 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 0,99 (s, 3H), 1,03 (s, 3H), 1,22-1,31 (m, 2H), 1,55-2,00 (m, 8H), 1,90-2,20 (m, 4H), 2,62-

2,65 (m, 1H), 3,88 (d, 12,0 Hz, 1H), 3,97 (d, J= 12,0 Hz, 1H), 5,71-5,75 (m, 1H); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 15,8 (C-15), 16,3 (C-12), 18,1 (C-8), 21,8 (C-11), 22,2 (C-3), 28,4 (C-6), 28,6 (C-7), 28,8 (C-13), 29,7 (C-2), 37,8 (C-4), 41,6 (C-5), 47,4 (C-1), 68,3 (C-14), 124,7 (C-9), 142,4 (C-10).

2) Ensaios de Atividade Biológica

O ensaio de atividade sobre *A. salina* foi executado de acordo com a metodologia proposta por McLaughlin⁹. As diluições das amostras e o controle positivo foram feitos pelo método de diluições aritmética¹⁵, diluídas em solução de sal marinho sintético (38,0 g/L, Enterprise, Co.), com 1% de DMSO (v/v). Todas as etapas foram acompanhadas utilizando-se o sulfato de quinidina como controle positivo¹³ e cada avaliação foi repetida pelo menos duas vezes. Utilizou-se o método Probitos de análise para obtenção das DL₅₀ e respectivos intervalos de confiança¹⁶.

A atividade antibacteriana foi realizada utilizando o método de difusão em discos¹¹ contra cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, obtidas de pacientes do Hospital Universitário/UFMS e cepas padrões de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATC 25903). As amostras foram solubilizadas em DMSO e foram aplicadas em discos de papel de filtro (6,0 mm) e incubadas 24 h, a 37°C em placas de petri com meio nutritivo. Avaliou-se então, a atividade, medindo-se o halo de inibição (mm).

A atividade antifúngica foi determinada por bioautografia¹², utilizando como suporte sílica-gel. A suspensão do fungo fitopatogênico, foi borrifada sobre a placa com as amostras e incubada a 37°C. Observou-se o halo de inibição 24 h e 48 h após a aplicação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a PROPP (CPq)/UFMS pelo apoio financeiro e ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) do aluno Alexandre Ayoroa Ramos.

REFERÊNCIAS

1. Pesquero, E. T. C.; Silva, C. F.; Matias, L. G. O.; Cechi, M. A.; Brocksom, U.; Brocksom, T. J.; *Quím. Nova* **1990**, *13*, 327.
2. Casazza, A. M. e Long B. H. In *The Discovery of Natural Products With Therapeutic Potential*; Vincent P. Gullo, Ed.; (Biotechnology series; 26); New Jersey, 1994; p 281.
3. San Feliciano, A.; Medarde, M.; Gordaliza, M.; Del Omo, E.; Del Orral, J. M. M.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2717.
4. De Siqueira, J. M.; Boaventura, M. A. D.; Garcez, F.; Garcez, W.; *Fitoterapia*, no prelo.
5. Gijzen, H. J. M.; Wijnberg, J. B. P. A.; Stork, G. A.; Groot, A.; *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2465.
6. Kabalka, W. G.; Varma, M.; Varma, R. S.; *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2386.
7. Clive, D. L. J.; Keshava Murthy, K. S.; Wee, A. G. H.; Siva Prasad, J.; da Silva, G. V. J.; Majewski, M.; Anderson, P. C.; Evans, C. F.; Haugen, R. D.; Heerze, L. D.; Barrie, J. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3018.
8. Dauban, P.; Chiaroni, A.; Riche, C.; Dodd, R. H.; *J. Org. Chem.* **1996**, *21*, 2488.
9. MacLaughlin, J. L. In *Methods in Plant Biochemistry*; Hostettmann, K., Ed.; Academic Press; London, 1991, Vol. 6, p 1.
10. Anderson, J. E.; Goetz, C. M.; McLughlin, J. L.; Suffness, M.; *Phytochemical Analysis* **1991**, *2*, 107.
11. Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Shenhis, J. C.; Turck, M.; *Amer. J. of Clin. Path.* **1966**, *45*, 493.
12. Saxena, G.; Susan, F.; Towers, G. H. N. e Hancock, R.E.W.; *Phytochemical Analysis* **1995**, *6*, 125.
13. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L.; *Planta Medica* **1982**, *45*, 31.
14. Macrae, W. D.; Hudson, J. B.; Towers, G. H. N.; *Journal of Ethnopharmacology* **1988**, *22*, 143.
15. Cepleanu, F.; Tese de Doutorado, University of Lausanne, Switzerland, 1993.
16. Finney, D. J.; *Probit Analysis*; Cambridge University Press; Cambridge, 1971.